Microgreens als voeding voor astronauten

Invloed van microgravitiet en gammastraling op de nutritionele waarde

Bachelor in de chemie
Afstudeerrichting: Biochemie

Charelle Jansen

Academiejaar 2020-2021
Campus Geel, Kleinhoefstraat 4, BE-2440 Geel

LID VAN ASSOCIATIE KU LEUVEN

THOMAS MORE

VOORWOORD

Dit eindwerk vormt de afsluiter van mijn bacheloropleiding biochemie aan de Thomas More hogeschool in Geel. Ik heb de kans gekregen mijn stage te lopen bij het Belgisch nucleair onderzoekscentrum, SCK CEN. Mijn stage bij de unit biosfeer impact studies was een heel boeiende ervaring waar ik de kans heb gekregen veel bij te leren. Daarom zou ik graag enkele mensen bedanken voor de kansen, hulp en steun die ik tijdens deze maanden gekregen heb.

In de eerste plaats zou ik graag mijn stagebegeleider Dr. Nele Horemans willen bedanken voor al haar hulp, steun en het nalezen en verfijnen van mijn eindwerk. Verder zou ik graag Robin Nauts bedanken voor het beantwoorden van mijn vele vragen, zijn hulp bij de verwerking van de resultaten en de begeleiding in het labo tijdens het uitvoeren van de experimenten.

Vervolgens wil ik graag Kristien Schoone bedanken omdat zij steeds klaar stond voor het beantwoorden van mijn vragen, haar motiverende woorden en feedback op mijn eindwerk. Ik zou ook graag Marc Van Rumst en Kim Vekemans bedanken voor de hulp en steun bij het uitvoeren van experimenten die ik omwille van corona heb uitgevoerd op Thomas More en de afdeling van de onderzoeksgroep KU Leuven.

Graag wil ik nog een speciale dankjewel richten aan mijn dochtertje Lina, die mij heel veel gemist heeft de afgelopen drie jaar, voor haar vele motiverende kusjes, knuffels en liefde. Een dikke merci aan mijn ouders, vrienden en familie voor al hun steun en hulp gedurende mijn hele opleiding. Ten slotte wil ik ook nog Jimmy Matheussen bedanken, die mij niet enkel doorheen deze stage steunde maar gedurende de hele opleiding achter mij stond. Dankjewel voor al de bijlessen, de motivering, de vele babbels en steun.

Charelle Jansen

SAMENVATTING

Astronauten zullen in de toekomst lange termijnvluchten maken zoals de ruimtereis naar Mars. Gedurende deze reizen worden de astronauten blootgesteld aan verminderde zwaartekracht en verhoogde kosmische straling. De gevolgen van deze ruimtecondities op de astronaut zijn onder meer gewichtsverlies door verlies aan botweefsel, hematologische veranderingen, verhoogd risico op nierstenen en problemen met het centrale zenuwstelsel. Hierdoor is onderzoek naar de voeding van astronauten van groot belang om een optimale gezondheid te kunnen garanderen. Doordat het onmogelijk is al het voedsel voor deze lange termijnvluchten te bevoorraden vanuit de aarde worden studies uitgevoerd naar alternatieven waarbij de astronaut zelf aan boord planten kweekt.

Dit onderzoek werd uitgevoerd op het SCK CEN binnen de afdeling biosfeer impact studies. De studie focust zich op een specifiek groeistadium van de plant die microgreens genoemd worden, waarbij het effect van gammastralen en verminderde zwaartekracht op het nutritionele profiel bestudeerd wordt. De plantensoorten die gebruikt werden in dit onderzoek zijn tarwe, radijs en rode kool. De parameters die onderzocht werden zijn de biomassa, eiwitten, antioxidanten, ascorbinezuur, anthocyaninen, mineralen (calcium, magnesium, kalium, natrium, natrium en ijzer) en anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet). Deze parameters werden vergeleken tussen groepen die gekweekt werden onder verschillende condities: een controlegroep, een groep die blootgesteld werd aan gammastralen, een groep die blootgesteld werd aan verminderde zwaartekracht en tenslotte nog een groep die gelijktijdig blootgesteld werd aan beide ruimtecondities.

De biomassa's werden gravimetrisch bepaald en de totale proteïnegehaltes via de Kjeldahl methode. Doormiddel van de FRAP assay werd zowel de totale hydrofiele als lipofiele antioxidatieve capaciteit bepaald. In de bekomen hydrofiele fractie werd ook de anthocyaninen concentratie vastgesteld. Het ascorbaatgehalte werd bepaald via het protocol van Gillespie en Ainsworth (2007). De niveaus van verschillende mineralen werden tenslotte gemeten met behulp van de inductief gekoppelde plasmamassaspectrometer en de anionen via een ionenchromatograaf.

Het onderzoek toonde aan dat er significante verschillen zijn tussen de controleplanten en de planten die blootgesteld werden aan de ruimtecondities. Er is een toename in biomassa en watergehalte en een afname van de proteïnegehaltes. De totale antioxidatieve capaciteit neemt af, voornamelijk door een daling in de hydrofiele antioxidatieve fractie. Deze daling is ook te zien wanneer de concentraties anthocyaninen en ascorbaat, beide behorend tot de hydrofiele antioxidanten, bepaald worden. De lipofiele antioxidatieve fractie daarentegen kent een significante stijging bij bestraalde rode kool en een significante daling bij de tarwe die blootgesteld werd aan microgravitеit. Er zijn enkele significante dalingen te zien bij specifieke anionen waaronder een afname van nitraat bij de bestraalde tarwe en rode kool. Een significante toename van nitriet werd vastgesteld bij de tarwe en radijs die blootgesteld werden aan microgravitеit, alsook bij de radijsplanten die blootgesteld werden aan de gecombineerde conditie. De antioxidant capaciteit en zwavelconcentraties zijn soort specifiek, rode kool heeft de hoogste concentraties en tarwe de laagste.

Er kan besloten worden dat de gunstige nutritionele waarden van microgreens gedeeltelijk verloren gaan wanneer deze gekweekt worden in de ruimte. De blootstelling aan gammastraling en microgravitеit zorgt ervoor dat microgreens een verminderde bijdrage leveren aan de gezonde voeding voor astronaut.

SUMMARY

In the future, astronauts will make long-duration flights such as space trips to Mars. During these journeys, the astronauts will be exposed to microgravity and increased cosmic radiation. The effects of these space conditions on the astronaut include weight loss due to loss of bone tissue, haematological changes, increased risk of kidney stones, and central nervous system problems. Because of this, research on astronaut nutrition is of great importance to ensure optimal health. Because it is impossible to bring all the food needed for these long-term flights from Earth, studies are being conducted into alternatives in which the astronaut themselves grows plants on board.

This research was carried out at SCK CEN within the biosphere impact studies group. The study focuses on a specific growth stage of the plant called microgreens, where the effect of gamma rays and microgravity on the nutritional profile is studied. The plant species used in this study are wheat, radish and red cabbage. The parameters studied were biomass, proteins, antioxidants, ascorbic acid, anthocyanins, minerals (calcium, magnesium, potassium, sodium, sodium and iron) and anions (chloride, phosphate, sulphate, nitrate and nitrite). These parameters were compared between groups grown under different conditions: a control group, a group exposed to gamma rays, a group exposed to microgravity and finally another group simultaneously exposed to both space conditions.

Biomasses were gravimetrically determined and total protein content by the Kjeldahl method. By means of the FRAP assay, both total hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity were determined. The anthocyanin concentration was also determined in the obtained hydrophilic fraction. The ascorbate content was determined via the protocol of Gillespie and Ainsworth (2007). Finally, the levels of various minerals were measured using the inductively coupled plasma mass spectrometer and the anions via an ion chromatograph.

Within this study it is shown that there are significant differences between the control plants and the plants exposed to the space conditions. There is an increase in biomass and water content and a decrease in protein contents. The total antioxidant capacity decreases, mainly due to a decrease in the hydrophilic antioxidant fraction. This decrease can also be seen when determining the concentrations of anthocyanins and ascorbate, both belonging to the hydrophilic antioxidants. In contrast, the lipophilic antioxidant fraction shows a significant increase in irradiated red cabbage and a significant decrease in wheat exposed to microgravity. Some significant decreases were observed for specific anions including a decrease in nitrate in the irradiated wheat and red cabbage. A significant increase in nitrite was observed in the wheat and radish exposed to microgravity as well as in the radish plants exposed to the combined condition. The antioxidant capacity and sulphur concentrations are species specific, red cabbage having the highest concentrations and wheat the lowest.

It can be concluded that the beneficial nutritional values of microgreens are partially lost when grown in space. The exposure to gamma radiation and microgravity causes microgreens to make a reduced contribution to the healthy diet of astronauts.

INHOUDSOPGAVE

VOORWOORD **2**
SAMENVATTING **3**
SUMMARY **4**
INHOUDSOPGAVE **5**
LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN **6**
INLEIDING **7**
1 LITERATUURSTUDIE **8**
1.1 Microgreens **8**
1.2 Nutritionele waarden **9**
1.2.1 Proteïnen 9
1.2.2 Antioxidanten 10
1.2.3 Mineralen 12
1.2.4 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet 13
1.3 Ruimte condities **14**
1.3.1 Micrograviteit 14
1.3.2 Ruimtestraling 15
2 KWEEK, OOGST EN ANALYSEMETHODEN **17**
2.1 Kweek en oogst van microgreen planten **17**
2.2 Analysemethode **19**
2.2.1 Biomassa 20
2.2.2 Eiwitten 20
2.2.3 Antioxidanten 21
2.2.4 Mineralen 24
2.2.5 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet 25
2.2.6 Statistische verwerking 25
3 RESULTATEN **26**
3.1 Biomassa **26**
3.2 Eiwitten **29**
3.3 Antioxidanten **31**
3.4 Mineralen **37**
3.5 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet **39**
4 DISCUSSIE **44**
BESLUIT **47**
LITERATUURLIJST **48**
BIJLAGEN **53**

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

AA = ascorbic acid of ascorbinezuur

ANOVA = variantieanalyse (analysis of variance)

ANS = instituut voor geavanceerde nucleaire systemen

BIS = Biosfeer Impact Studies

CELSS = controlled ecological life support system

DHA = dehydroascorbinezuur

DTT = dithiothreitol

EHS = instituut voor milieu, gezondheid en veiligheid

EMS = elektromagnetische straling

FRAP = ferric reducing antioxidant power

FW = vers gewicht

IC = ionenchromatografie

ICP-MS = inductief gekoppeld plasmamassaspectrometer

ISS = International Space Station

NASA = National Aeronautics and Space Administration

NMS = instituut voor Wetenschappen Nucleair Materiaal

ROS = reactive oxygen species

RPM = random positioning machine

SCK CEN = Studiecentrum voor Kernenergie – Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire

INLEIDING

De mens heeft de behoefte te verkennen. In de middeleeuwen waren dit gevaarlijke reizen op zee op zoek naar nieuw land. De laatste halve eeuw heeft technologie de mens in staat gesteld om de ruimte en planeten rondom de aarde te onderzoeken. De eerste man in de ruimte was Yuri Gagarin. Op 12 april 1961 deed hij een baan om de aarde in de Vostok1. Op 21 juli 1969 zette Neil Armstrong als eerste een voet op de maan. Sinds 1998 zit het Internationale Ruimtestation (ISS, International Space Station) in een baan om de aarde. Het ruimtestation is een onderzoekslaboratorium en wordt sinds 2 november 2000 permanent bewoond. Doorheen de jaren werden ook verschillende satellieten, landers en rovers naar Mars gestuurd om de planeet te onderzoeken. De laatste succesvolle landing op Mars is deze van de rover Perseverance op 18 februari 2021 (*Nature*, 2021). Als de mens echter zelf deze rode planeet wil koloniseren zullen nog verschillende obstakels overwonnen moeten worden. Zo zal de afstand en tijd nodig voor deze missies het niet meer mogelijk maken om bevoorraad te worden vanuit de aarde en dus zullen deze ruimtevluchten afhankelijk worden van zelfvoorzienende systemen.

Een van de uitdagingen voor langeafstandsmissies is dus het voorzien in voedingsbehoeften van de astronauten. Uit voorgaand onderzoek blijkt dat voeding een grote rol speelt bij de psychologische en fysiologische conditie van de bemanning (Kyriacou, De Pascale, Kyratzis & Rouphael, 2017). De focus in dit onderzoek ligt op een voedzaam en vers alternatief dat aan boord gekweekt kan worden, wat naast bijdragen aan de lichamelijke behoefte ook goed zijn voor de psyché doordat de astronaut een deel voeding zelf groeit. Microgreens kunnen deze rol invullen. Microgreens zijn eetbare zaailingen geproduceerd uit de zaden van groenten, kruiden of granen. Doordat ze voedzaam zijn, een intense smaak hebben en knapperig zijn van textuur zijn ze een goede aanvulling op het dieet van de astronaut (Kyriacou et al., 2016). Echter de omgevingscondities in de ruimte zijn niet ideaal voor het kweken van voedsel en bevatten een aantal onbekende factoren die mogelijk de groei en voedingswaarde van de planten beïnvloeden. Zo zullen de planten onder meer blootgesteld worden aan een verhoogde dosis kosmische ioniserende straling en verminderde zwaartekracht. De invloed hiervan op de groei en voedingswaarde van de microgreens moet nog verder onderzocht worden en vormt het onderwerp van deze studie.

SCK CEN (Studiecentrum voor Kernenergie – Centre d'Etude de l'Energie Nucléaire) is het Belgisch nucleair onderzoekscentrum. SCK CEN bevat verschillende instituten namelijk NMS (instituut voor Wetenschappen Nucleair Materiaal), ANS (instituut voor geavanceerde nucleaire systemen) en EHS (instituut voor milieu, gezondheid en veiligheid). Binnen het instituut voor milieu, gezondheid en veiligheid zit de expertisegroep interdisciplinaire biowetenschappen waaronder de unit biosfeer impact studies (BIS) valt. SCK CEN is actief in het ruimteonderzoek. Enerzijds bestuderen zij het recycleren van afvalstromen door middel van bacteriën en planten. Anderzijds bestuderen zij de invloed van straling en microgravitéit op de gezondheid van de mens en op de groei en voedingskwaliteit van planten.

Deze studie wordt uitgevoerd bij de onderzoek unit BIS en bestudeert het effect van microgravitéit en gammastralen op de nutritionele waarde van microgreens. De microgreens die gebruikt worden in dit onderzoek zijn tarwe, radijs en rode kool. Deze worden blootgesteld aan gammastralen en verminderde zwaartekracht en een combinatie van beide condities, er wordt ook telkens een controlegroep geanalyseerd. De parameters die bepaald worden zijn biomassa, eiwitten, antioxidanten, ascorbinezuur, anthocyaninen, mineralen (calcium, magnesium, kalium, natrium, natrium en ijzer) en anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet).

1 LITERATUURSTUDIE

Mars ligt op het dichtste punt ongeveer 55 miljoen kilometer van de aarde en de heenreis duurt ongeveer zeven maanden. Lange afstandsmissies zoals deze maken de bevoorrading van voedsel en water vanuit de aarde, zoals bij het Internationale Space Station, onmogelijk. De groei van planten in de ruimte is een deel van het strategische plan van NASA (National Aeronautics and Space Administration) (*National Aeronautics and Space Administration*, 2021). Tijdens langdurige periode in de ruimte is de onderlinge relatie tussen planten en dieren van groot belang. Planten zetten koolstofdioxide en water om in suikers waarbij zuurstof vrijkomt, ze leveren ook menselijke voedingsstoffen (eiwitten, mineralen en vitaminen). De mens recycleert het plantafval en voorziet de planten van voedingsstoffen. Om deze reden wordt gezocht naar een plant die astronauten zelf kunnen kweken aan boord. Naast een verse en gezonde aanvulling op hun dieet zorgt het kweken van planten voor een goede psychische gezondheid bij de astronauten (Kyriacou et al., 2017).

In de huidige studie wordt onderzoek gedaan op microgreens, dit is een specifiek groeistadium van de plant zoals gedefinieerd in 1.1. Het effect van twee ruimtecondities die mogelijk een negatieve invloed hebben op plantengroei en -ontwikkeling, nl. verminderde zwaartekracht en verhoogde kosmische straling, op de nutritionele waarde van microgreens wordt nagegaan. Alvorens de methoden en resultaten worden toegelicht zal de literatuurstudie een verduidelijking geven over verschillende aspecten binnen dit onderzoek nl. microgreens, de nutritionele waarden en de ruimtecondities.

1.1 Microgreens

Microgreens zijn eetbare zaailingen geproduceerd uit de zaden van groenten, kruiden of granen. De meest commerciële microgreensoort is de *Brassicaceae*-familie zoals broccoli, radijs en kool. Ze worden afhankelijk van de soort geoogst na 7-14 dagen, wanneer de zaadlobben volledig zijn uitgezet en het eerste paar bladeren ontwikkeld zijn. Er is weinig verlies van plantmateriaal doordat het bovengrondse gedeelte van de plant volledig eetbaar is. Microgreens hebben aan populariteit gewonnen door toevoeging aan gerechten en salades om de kleur, smaak of textuur te verbeteren. Ze bevatten bioactieve stoffen die bepaalde functies binnen een organisme verbeteren en het risico op ziekten verminderen. Door het goede voedingsprofiel worden ze beschouwd als 'superfoods' (Treadwell et. Al., 2010). De planten die gebruikt worden in dit onderzoek zijn tarwe (wheat, *Triticum aestivum* L. *cv. Servus*), radijs (red arrow radish, *Raphanus sativus* L.) en rode kool (red cabbage, *Brassica oleracea* L. var *capitate*). De verschillende microgreens worden weergegeven in Figuur 1. De zaadjes van deze planten worden gekweekt op een hennep kweekmat in plaats van aarde. Het voordeel hiervan is dat het compact en proper is en de microgreens na het oogsten niet gewassen moeten worden. De zaadjes worden bevochtigd met een Hoagland oplossing, dit is een specifiek groeimedium met verschillende zouten ontwikkeld zodat het alle macro- en micronutriënten bevat nodig voor de groei van de microgreens. De kweek van de microgreens wordt verder besproken in hoofdstuk 2.

Figuur 1. De verschillende soorten microgreens: (van boven naar onder) rode kool, radijs en tarwe. Copyright: Fotograaf, Jansen, C. (2021)

1.2 Nutritionele waarden

Er zijn verschillende gezondheidsproblemen die verband houden met leven in de ruimte. De gevolgen van lange termijnvluchten zijn onder meer gewichtsverlies door verlies aan botweefsel, hematologische veranderingen, verhoogd risico op nierstenen en problemen met het centrale zenuwstelsel. Het voedsel dat we eten en de voedingsstoffen die ze zouden moeten leveren, zijn de belangrijkste omgevingsfactoren die onze groei, ontwikkeling, functionele vermogens en gezondheid beïnvloeden (Milton, 2003). Hierdoor is onderzoek naar voeding een heel belangrijk aspect binnen de ruimtevaart voor het behoud van een goede gezondheid (Vergari, Tibuzzi & basile, 2010).

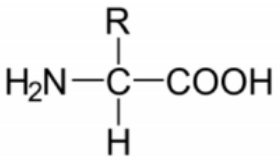
De Amerikaanse bemande ruimtevluchtprogramma's vereisen dat voeding de voedingstoffen bevat die aanpassing aan de extreme omgeving mogelijk maken en ook dienen als tegenmaatregel om de negatieve effecten van de ruimtereizen te verzachten. Daarom is onderzoek nodig voor het vaststellen van het nutritionele profiel van microgreens en het stellen van voedingsnormen en een veilig en smakelijk voedselsysteem (Lane et al., 2013). Recent onderzoek speculeert dat microgreens een goede alternatieve bron van voedingsstoffen zijn en de menselijke gezondheid kunnen bevorderen (Choe, Yu & Wang, 2018).

1.2.1 Proteïnen

Proteïnen – ook eiwitten genoemd – zijn essentiële bouwstenen voor leven, ze komen voor bij zowel planten als dieren. In het menselijke lichaam bevinden ze zich o.a. in spieren, botten, haren, huid en organen waar ze veel belangrijke functies vervullen. Zo is hemoglobine een eiwit dat instaat voor het transport van zuurstof doorheen het lichaam en zijn enzymen complexe eiwitten die instaan voor de vele chemische reacties. In planten hebben proteïnen verschillende functies waaronder enzymatisch, structureel en functioneel (bv fotosynthese). Ze dienen ook als opslag voor de groei en nood aan nutriënten tijdens de ontwikkeling van de zaailingen (Rasheed, Markgren, Hedengvist & Johansson, 2020).

Eiwitten zijn polymeren van aminozuren die verbonden zijn door een α-peptidebinding. Een aminozuur is een organische verbinding die een aminogroep ($-NH_2$), een carboxylgroep (-COOH) en een restgroep (-R) bevat. De zijketen of restgroep is de groep die zorgt voor de unieke eigenschappen van elk aminozuur. De basisstructuur van aminozuren wordt weergegeven in Figuur 2. Er komen honderden verschillende aminozuren voor in de natuur waarvan twintig belangrijk zijn voor de mens, deze zijn de basis voor alle noodzakelijke proteïnen (Watford & Wu, 2018). Deze twintig aminozuren kunnen onderverdeeld worden in drie verschillende groepen: essentiële aminozuren, conditioneel essentiële aminozuren en niet-essentiële aminozuren.

Niet-essentiële aminozuren kunnen in het lichaam aangemaakt worden, er zijn vijf niet-essentiële aminozuren nl. Alanine, Asparagine, Asparaginezuur, Glutaminezuur en Serine. Conditioneel essentiële aminozuren worden onder normale omstandigheden door een gezond lichaam aangemaakt maar worden niet aangemaakt onder bepaalde stress condities zoals hongersnood of een stofwisselingsziekte. Arginine, Cysteïne, Glutamine, Glycine, Proline en Tyrosine zijn de zes conditioneel essentiële aminozuren. De laatste groep zijn de essentiële aminozuren deze kan het lichaam niet zelf aanmaken en zodoende kunnen de aminozuren uit deze groep enkel uit de voeding gehaald worden. De essentiële aminozuren zijn Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Fenylalanine, Threonine, Tryptofaan en Valine (Young & Pellet, 1994).



Figuur 2. De basisstructuur van aminozuren.
Noot: overgenomen van Huygens, A. (2018 Biochemie. [Cursus]. Geel: Thomas More, Life sciences & Chemistry, Bachelor in de chemie.

Zowel plantaardig voedsel als vlees zijn een goede bron van eiwitten in het dieet van de mens. Voedingsmiddelen die een hoog percentage eiwitten bevatten zijn bijvoorbeeld eieren, vlees, melk, groenten en granen. Een onderzoek rond de eiwit inname bij de mens toont aan dat de bijdrage proteïnen afkomstig van planten wereldwijd hoger is dan deze afkomstig van dieren (Berrazaga, Micard, Gueugneau & Walrand, 2019). Een tekort aan specifieke essentiële en conditioneel essentiële aminozuren en zo ook aan eiwitten kan leiden tot symptomen als vermoeidheid en verlies van spiermassa. Wanneer de mens wordt blootgesteld aan microzwaartekracht vermindert de spiermassa, het volume en de prestaties. (Lane, Bourland, Barett, Heer & Smith, 2013) Hierdoor is het belangrijk dat voldoende eiwitten opgenomen worden via de voeding.

In huidig onderzoek wordt de totale eiwitconcentratie van de diverse onderzochte microgreens, gekweekt in verschillende condities, nagegaan met de Kjeldahl methode. Deze methode wordt besproken in het paragraaf 2.2.2.

1.2.2 Antioxidanten

Antioxidanten zijn stoffen die oxidatie tegengaan. Bij oxidatie ontstaan vrije radicalen; dit zijn zeer kleine, reactieve moleculen die een ongepaard elektron bevatten. Hierdoor gaat het vrije radicaal met omliggende biomoleculen interageren door het wegvangen van elektronen. Dit zorgt ervoor dat eiwitten, vetten en DNA aangetast worden en zodoende belangrijke mechanismen verstoord worden (Lobo, Patil, Phatak & Chandra, 2010). Als het organisme deze vrije radicalen niet voldoende kan verwerken en de verhouding tussen antioxidanten en vrije radicalen uit evenwicht is leidt dit tot oxidatieve stress. Deze schadelijke toestand kan veroorzaakt worden door chronische stress. Bij planten kan deze stress het gevolg zijn van groeicondities die niet optimaal zijn (licht, temperatuur, straling en microgravitei) en dit met verminderde groei en reproductie tot gevolg. Onderzoek toont aan dat de antioxidatieve capaciteit stijgt bij tarweplanten als verdedigingsmechanisme tegen oxidatieve stress (Caverzan, Casassola & Brammer, 2016). Oxidatieve stress bij de mens is één van de belangrijkste oorzaken van veroudering, het veroorzaakt problemen met het zenuwstelsel en hart- en vaatstelsel en kan leiden tot kanker (Pizzino et al., 2017). Oxidatieve stress is voornamelijk afkomstig van overmaat aan productie van reactieve zuurstofcomponenten, afgekort als ROS (reactive oxygen species). De meest voorkomende ROS zijn het superoxide-anion (O_2^-), waterstofperoxide (H_2O_2) en het hydroxylradicaal (OH•).

Reactieve zuurstofcomponenten zijn niet altijd schadelijk, ze dienen ook als cel-signalerende moleculen om biologische en fysiologische processen te reguleren (Schieber & Chandel, 2014). In prokaryoten zijn mechanismen bekend waarbij ROS transcriptiefactoren activeert als aanpassing tegen stress (Kiley & Storz, 2004).

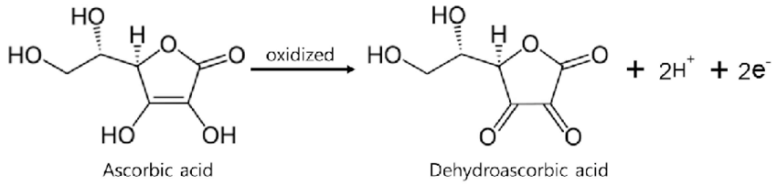
Er bestaan verschillende afweersystemen in cellen die de schadelijke effecten van ROS tegengaan. Een voorbeeld hiervan is de omzetting van superoxide-anionen tot water en zuurstof. Hierbij katalyseert superoxidedismutase de omzetting van twee superoxide-anionen in waterstofperoxide en zuurstof. Het waterstofperoxide wordt omgezet in water en zuurstof door de katalysator katalase (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Antioxidanten kunnen de oxidatieve schade verminderen en worden op basis van hun mechanisme opgesplitst in drie groepen nl. primaire, secundaire en tertiaire antioxidanten.

De primaire antioxidanten werken als de 'vanger' die de ROS rechtstreeks wegvangen, de secundaire antioxidanten werken preventief en de tertiaire antioxidanten herstellen de beschadigde biomoleculen (Daramola & Adegoke, 2011). Ze komen van nature voor in het lichaam maar kunnen ook via de voeding opgenomen worden. Onderzoek toont aan dat microgreens rijk zijn aan antioxidanten (Xiao et al., 2019). Zowel de gereduceerde als de geoxideerde vormen van antioxidanten zoals ascorbinezuur leveren een grote bijdrage voor de menselijke gezondheid (Tsujimura et al., 2008).

Ascorbaat

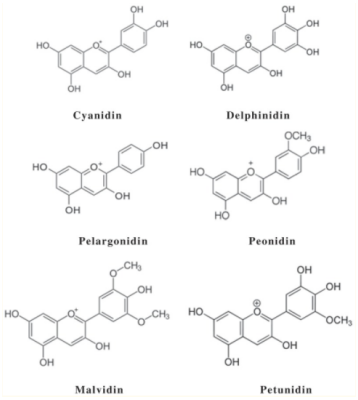
Ascorbinezuur (AA) is het meest voorkomende wateroplosbare antioxidant in planten. Het is een redox buffer, werkt als cofactor voor vele enzymen en als regulator bij de celdeling en groei van planten (Abdullah, Jamil & Attia, 2021). Ascorbinezuur komt voor in gereduceerde en geoxideerde vorm en wordt gemakkelijk omgezet van de ene vorm naar de andere. Hierdoor is het een belangrijk antioxidant om een overproductie van ROS tegen te gaan bij oxidatieve stress. De structuur van de geoxideerde en gereduceerde vorm van AA wordt weergegeven in Figuur 3. Bij fysiologische pH is ascorbinezuur vrijwel geheel geïoniseerd. Ascorbaat is de ontzuurde en gebufferde vorm van AA en vaak gebonden aan calcium of magnesium.

Ascorbinezuur staat bekend als vitamine C en heeft een positief effect op de gezondheid van de mens. Het is noodzakelijk voor normale fysiologische functies, verlaagt het cholesterolgehalte in het bloed en verhoogt de ijzeropname in de darmen. Het beschermt het lichaam tegen schadelijke effecten van vrije radicalen, verontreinigende stoffen en toxinen (Chambial, Dwivedi, Shukla, John & Sharma, 2013).



Figuur 3. De oxidatie van ascorbinezuur tot dehydroascorbinezuur
Noot: overgenomen van Yunjeong, K., & Min-Gul, K. (2016) HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma. Transl Clin Pharmacol.24(1):37-42. Doi:10.12793/tcp.2016.24.1.37

Anthocyaninen
Anthocyaninen zijn wateroplosbare pigmenten (rood-violet) die behoren tot de flavonoïden en bevinden zich in vacuolen bij planten. Ze beschermen de plant tegen UV licht, pathogenen en oxidatieve stress. Ze hebben een positief effect op de gezondheid van de mens door de antioxidatieve en ontstekingsremmende werking. De zes meest voorkomende anthyocyanidines zijn pelargonidine, cyanidine, peonidine, delphinidine, petunidine en malvidine, deze worden weergegeven in Figuur 4. Anthocyaninen zijn de glucosides van anthocyanidines (Vieira, Marinho, Rocha, Barros & Stringheta, 2019).



Figuur 4. De zes meest voorkomende anthocyanidines
Noot: overgenomen van Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., & Lim, S.M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food and Nutrition research 61(1):1361779. Doi:10.1080/16546628.2017.1361779

In deze studie wordt bepaald of microgravitеit en straling een effect hebben op de totale antioxidant capaciteit alsook in de onderverdeling tussen de hydrofiele en hydrofobe antioxidanten. De antioxidanten die in dit onderzoek afzonderlijk bepaald worden zijn AA en anthocyaninen. De antioxidanten worden bepaald via de FRAP assay en een specifieke assay voor ascorbinezuur. De hydrofiele fractie van de FRAP assay wordt gebruikt voor de bepaling van de anthocyaninen. De verschillende methoden worden uitgebreid besproken in paragraaf 2.2.3.

1.2.3 Mineralen

Mineralen kunnen onderverdeeld worden in twee groepen nl. macro-elementen (Ca, Mg, P, K en Na) en micro-elementen (Fe, Zn, Cu en Mn). Zowel de macro- als micro-elementen spelen een belangrijke rol tijdens verschillende biologische processen bij de groei en ontwikkeling van planten (Singh, Sareen, Sengar & Kumar, 2013; Ohkama-Ohtsu & Wasaki, 2010). Doordat planten bijdragen aan de voeding van mens en dier vervullen zij ook hier een belangrijke rol, zo kan een tekort aan calcium leiden tot botverlies met risico op osteoporosis (Waterland et al., 2017). Onderzoek toont aan dat jonge planten zoals microgreens zorgen voor een hogere bijdrage aan essentiële mineralen dan de volgroeide planten (Pinto, Almeida, Aguiar & Ferreira, 2015).

De mineralen die gemeten worden in dit onderzoek zijn Na, Ca, K, Mg en Fe. Calcium speelt een belangrijke rol bij de groei en ontwikkeling van planten, reacties op stimuli en omgevingsstress. Kalium is betrokken bij de fotosynthese en waterhomeostase en natrium kan de rol van kalium vervangen bij sommige metabolische functies. Magnesium wordt geassocieerd met chlorofyl- en eiwitsynthese en speelt een belangrijke rol als cofactor bij enzymen. Ijzer (maar ook Zn, Mn en Cu) zijn belangrijke cofactoren voor antioxidanten (D.E. Kopsell, D.A. Kopsell, Sams & Barickman, 2013; McAinsh & Pittman, 2009; Matés, Péreéz-Gómez & De Castro, 1999).

1.2.4 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet

Stikstof is belangrijk tijdens de groei en ontwikkeling van planten. Een tekort aan stikstof kan leiden tot vergeling en verminderde groei. De plant haalt stikstofgas uit nitraat en nitriet, welke gerelateerd zijn aan de stikstofcyclus binnen het ecosysteem. Nitraat is de voorloper van nitriet en komt van nature veel voor in groen voedsel zoals spinazie, radijs en kool. Doordat planten dienen als voedsel worden zowel nitraat als nitriet opgenomen in het dieet. Hoewel deze afzonderlijk weinig of zelfs niet schadelijk zijn, kunnen nitrosamines gevormd worden die carcinogeen zijn voor mens en dier (Bedale, Sindelar & Milkowski, 2016). Nitrosamines worden gevormd bij de inname van nitriet welke vervolgens reageert met secundaire amines (aminozuren). Een zuur milieu zoals in de maag bevordert de reactie ter vorming van nitrosamines. Nitraat kan echter ook een gunstig effect hebben, het kan gedeeltelijk omgezet worden in stikstofmonoxide dat vasodilatatie – verwijden van de bloedvaten – induceert en zo de bloeddruk verlaagt (Webb et al., 2008; Siervo, Lara, Ogbonmwan & Mathers, 2013).

Fosfor is een essentieel element in nucleïnezuren, fosfolipiden, fosfo-proteïnen en metabolieten (Ajmera, Jamil & Attia, 2019). Het speelt een belangrijke rol in cellulaire processen waaronder het onderhoud van membraanstructuren, de synthese van biomoleculen en de vorming van hoogenergetische molecule. Het helpt bij celdeling, enzymactivering en inactivatie en koolhydraatmetabolisme. Via de bodem wordt fosfor opgenomen en verspreid zich zo naar de wortels en andere delen van de plant (Malhotra, Vandana, Sharma & Panday, 2018). In het westerse dieet wordt fosfor voornamelijk uit dierlijke- en zuivelproducten opgenomen, daarom is dit een aandachtspunt in het veganistische dieet van de astronaut. Een verhoogde opname van fosfor wordt geassocieerd met linkerventrikelhypertrofie, verhoogd risico op fracturen en verhoogde mortaliteit (Moorthi et al., 2014).

Zwavel is net zoals stikstof en fosfor een element dat essentieel is voor de groei en ontwikkeling van planten. Het komt voor in aminozuren en zo ook in eiwitten, als co-factor en in membraanlipiden. Zwavel heeft unieke eigenschappen, het is onmisbaar bij activiteiten van redoxmodulatoren en voor sommige afweerchemicaliën en lokstoffen die een belangrijke rol spelen bij het verminderen van stress. Zwaveltekort beïnvloedt de groei, ontwikkeling, ziekteresistentie en prestatie van planten en heeft een hoge impact op de voedingskwaliteit van gewassen (Kopriva, Malagoli & Takahashi, 2019). Zwavel wordt bij voornamelijk opgenomen via eiwitten, hierdoor is de zwavelopname direct gecorreleerd aan de eiwitopname. Zwavel is gunstig voor dermatologische problemen, wondgenezing en acute blootstelling aan radioactief materiaal. Bijkomende functies van zwavel zijn o.a. metaaltransport, opruiming van vrije radicalen en regulatie van genexpressie (Hewlings & Kalman, 2019).

1.3 Ruimte condities

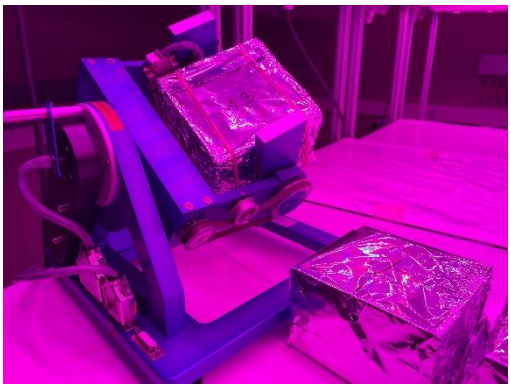
Lange verblijven van de mens in de ruimte maken het noodzakelijk verschillende planten te kunnen kweken en reproduceren. Dit is nodig voor het voedsel en daarmee de energie die de plant levert. Daarnaast maken de planten ook deel uit van een controlled ecological life support system (CELSS). CELSS is een bioregeneratief systeem en zorgt voor het regenereren van levensondersteunende materialen zoals lucht en water (*National Academy of Science*, 1988). Het is belangrijk de effecten van ruimtecondities op de planten te begrijpen omdat astronauten en CELSS afhankelijk zijn van het vermogen om betrouwbaar en efficiënt planten te laten groeien. De microgreens in dit onderzoek zullen blootgesteld worden aan een simulatie van verminderde zwaartekracht en kosmische straling.

1.3.1 Microgravitеit

Zwaartekracht is de kracht die ervoor zorgt dat de maan in een baan om de aarde draait, de aarde rondom de zon en waardoor de zon zijn plaats heeft in het melkwegstelsel. Zwaartekracht werd in de 17de eeuw voor het eerst bestudeerd door Isaac Newton. Newton beschrijft zwaartekracht als de aantrekkingskracht tussen twee willekeurige massa's. De zwaartekracht die aanwezig is op planeten is dus afhankelijk van de grootte van de massa van die planeet. Zo bedraagt de zwaartekracht op aarde 1*g* (9,81m/s^2), deze op de maan 0,16*g* en deze op Mars 0,38*g.* De zwaartekracht op het ISS is nagenoeg gelijk aan deze op aarde nl. 0,99*g* (Barker & Gilroy, 2017).

Microgravitеit is een toestand die ontstaat wanneer voorwerpen in vrije val zijn. Continue vrije val wordt ook bereikt in een ruimteschip, doordat de objecten en het ruimteschip aan dezelfde snelheid bewegen lijken ze bewegingsloos te zijn. Deze objecten zijn gewichtsloos doordat gewicht een uiting is van zwaartekracht. De massa van het object blijft dezelfde. Wanneer astronauten planten kweken aan boord van het ruimteschip zullen ook de planten groeien onder deze verminderde zwaartekracht. Onderzoek naar deze ruimteconditie worden gedaan op het ISS en op aarde (Kiss, Wolverton, Wyatt, Hasenstein & van Loon, 2019). De toegang tot experimenten in de ruimte (ISS) is echter beperkt.

Op aarde zijn simulaties mogelijk om korte termijn effecten na te gaan met valtorens of vliegtuigen die een parabolische vlucht maken. Alsook wordt het lange termijneffect van microgravitеit nagegaan doormiddel van technologieën zoals de clinostaat. Een veelvuldig gebruikte gespecialiseerde tweeassige vorm van de clinostaat is de random positioning machine (RPM) of willekeurig positioneringsmachine. Deze RPM wordt in huidig onderzoek gebruik en weergegeven in Figuur 5. Deze drie dimensionele clinostaat creëert een conditie waarin de gewichtsvector continu veranderd wordt van richting. Doordat de tijdsduur van de oriëntatie kort is en constant veranderd, is de plant niet in staat om te reageren op de zwaartekracht. Het vermindert het effect van zwaartekracht op de plant maar de zwaartekracht op aarde zelf kan niet verminderd worden. De simulatie is niet optimaal maar wel een goed en relatief goedkoop alternatief (Herranz et al., 2013).



Figuur 5. Random positioning machine
Copyright: Fotograaf, Nauts, R. (2021)

Planten op aarde worden constant onderworpen aan de aardse zwaartekracht. Hierdoor heeft zwaartekracht een grote bijdrage in de evolutie van planten. Onderzoek heeft aangetoond dat deze fysische factor een impact heeft op de oriëntatie (gravitropisme) en de ontwikkeling van planten (Wyatt, Rashotte, Shipp, Robertson & Muday, 2002).

1.3.2 Ruimtestraling

Door de zwaartekracht bevindt zich een atmosfeer rond de aarde. Deze dampkring bestaat uit verschillende gassen waaronder stikstof en zuurstof en is enkele tientallen kilometer dik. Deze atmosfeer is essentieel en zorgt dat het leven op aarde beschermd wordt tegen schadelijke straling van kosmische oorsprong. Naast de atmosfeer zorgt ook het aardmagnetische veld ervoor dat schadelijke straling de aarde minder bereikt. In de ruimte is er, buiten het ruimteschip zelf, geen bescherming tegen deze kosmische straling. Om beter te begrijpen wat de invloed van schadelijke kosmische straling is op de groei en ontwikkeling van planten die gekweekt worden in de ruimte, wordt ruimtestraling gesimuleerd in dit onderzoek.

Straling is afkomstig van deeltjes of golven (elektromagnetische straling). Elektromagnetische straling of EMS zijn radiostralen, microgolfstralen, infraroodstralen, zichtbaar licht, ultraviolette straling, röntgenstraling en gammastralen. Deeltjesstraling zijn alfa en bètastraling, neutronen en protonen. Straling wordt onderverdeeld in ioniserende en niet-ioniserende straling. Ioniserende straling heeft voldoende hoge frequentie en energie om atomen te ioniseren door het verwijderen van elektronen (x-stralen, gammastralen, alfastraling en bètastraling). Niet-ioniserende straling hebben een lage energie en frequentie (infraroodstralen, microgolfstralen en zichtbaar licht).

Er zijn verschillende soorten ioniserende straling nl. deeltjes zoals alfa, bèta, neutronen en elektromagnetische golven zoals gammastralen en x-stralen. Ze onderscheiden zich door hun massa, energie en hun interactie met materialen. Alfadeeltjes komen voort uit het verval van grote kernen (bv uranium en thorium) en zijn opgebouwd uit twee protonen en twee neutronen. Ze hebben een klein doordringbaar vermogen. Bètastraling kan onderverdeeld worden in β^--straling en β^+-straling. β^--straling is een elektron en β^+-straling is een positron, ze hebben dezelfde massa maar een tegengestelde lading dan het elektron. Bètastralen zijn kleiner dan alfadeeltjes en hebben hierdoor een groter doordringend vermogen. Neutronen hebben geen lading en komen voor bij kernsplijting of kernfusie.

Elektromagnetische straling zoals gamma en x-stralen bestaan uit golven van fotonen in plaats van deeltjes. Gammastralen zijn hoog energetische fotonen en worden geproduceerd bij kernfusie, kernsplijting of als gevolg van alfa en bètaverval van radionucliden. Ze hebben geen massa of lading en een korte golflengte, waardoor ze zeer doordringbaar zijn. X-stralen zijn gelijkaardig aan gammastralen maar hebben een langere golflengte en daarmee ook een lagere energie als de gammastralen. Kosmische straling is hoog energetische straling die o.a. afkomstig is van de zon en andere kosmische verschijnselen zoals supernova's. Kosmische straling bevat voornamelijk fotonen zoals gammastralen, x-stralen en neutronen (Vanleeuw, 2020). De simulatie van straling in dit onderzoek wordt bekomen door de planten tijdens de kweek bloot te stellen aan gammastralen afkomstig van een cesiumbron (Cs^{137}).

De hoofddoelstelling van deze thesis is nagaan of de onderzochte microgreen soorten (tarwe, radijs en rode kool) die gekweekt worden onder invloed van de verschillende gesimuleerde ruimtecondities een gunstig nutritioneel profiel hebben wat een goede aanvulling zou zijn voor het dieet van de astronaut. Belangrijke parameters hierbij zijn het eiwit- en antioxidantengehalte en het al dan niet voorkomen van potentieel schadelijke nitraten/nitrieten. In dit werk wordt daarnaast voor een selectie anionen en mineralen gekeken of de niveaus veranderen na blootstelling aan de ruimtecondities. De vergelijking wordt gemaakt tussen vier condities nl. de controleplanten blootgesteld aan aardse condities, planten blootgesteld aan gammastralen, planten blootgesteld aan microgravitеit en als laatste planten blootgesteld aan een combinatie van gammastralen en microgravitеit.

2 KWEEK, OOGST EN ANALYSEMETHODEN

2.1 Kweek en oogst van microgreen planten

De zaadjes van de gebruikte microgreens nl. tarwe (*Triticum aestivum* L. *cv. Servus*), radijs (*Raphanus sativus* L.) en rode kool (*Brassica oleracea* L. var *capitate*) worden gekiemd en gekweekt in een groeibox (169 cm^2) met 81 vakjes. De groeibox wordt weergegeven in Figuur 6. De zaaidensiteit wordt per plantensoort weergegeven in Tabel 1.

Figuur 6. De groeiboxen met zaadjes van (links naar rechts) radijs, tarwe en rode kool.
Copyright: Fotograaf, Jansen, C. (2021)

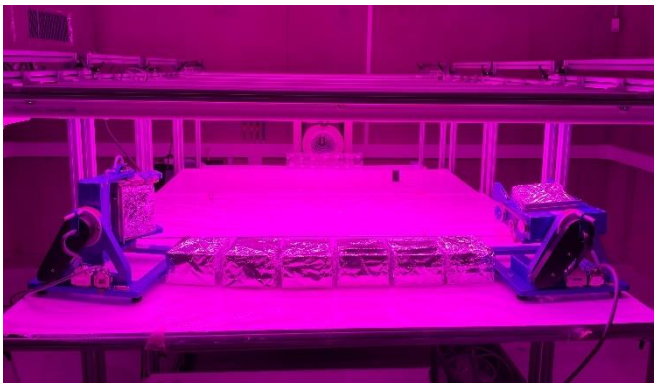
Tabel 1. De zaaidensiteit van tarwe, radijs en rode kool.

microgreen	**zaaidensiteit (zaden/vakje)**	**zaaidensiteit (zaden/100cm²)**
tarwe (*Triticum aestivum* L. *cv. Servus*)	2	96
radijs (*Raphanus sativus* L.)	4	192
rode kool (*Brassica oleracea* L. var *capitate*)	10	480

De zaadjes worden gekweekt op een hennep kweekmat die vooraf 120 minuten op 120°C geautoclaveerd wordt om contaminatie met schimmels te voorkomen. De voedingsoplossing die gebruikt wordt is Hoagland standaard (1/10), hiervan wordt 100mL toegevoegd. De volledige samenstelling van de Hoagland oplossing wordt weergegeven in bijlage 6. Na drie dagen wordt een volume demiwater toegevoegd gelijk aan het startgewicht van de box, dit om uitdroging tegen te gaan.

De kieming vindt plaats in een donker milieu, de eerste twee dagen na het zaaien, door het volledig afdekken van de box met aluminiumfolie. Hierna wordt de aluminiumfolie verwijderd en worden de boxen geplaatst bij een 14/10uur dag/nachtcyclus voor de resterende vijf dagen. Het licht is afkomstig van LED lampen en heeft een intensiteit van 160-180 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (Philips GP LED production2.2 DR/B/FR 150 LB HO). De temperatuur blijft constant op 21°C en de luchtvochtigheid in de boxen bevindt zich tussen >50-65%.

De controle boxen met microgreens worden opgekweekt onder de aardse condities zoals gegeven in de vorige paragraaf. De bestraalde boxen worden ook opgekweekt onder dezelfde condities van licht, temperatuur en luchtvochtigheid maar daarbij worden de microgreens continu blootgesteld aan straling afkomstig van een Cesium-137 bron (662KeV). De boxen worden geplaatst op een afstand van 2,5 meter van de bron waar het dosisdebiet 13,2 mSv/u is, gemeten met een dosimeter. Voor deze meting worden 6 dosimeters geplaatst ter hoogte (voor en achter) van de planten gedurende 60minuten, hiervan wordt het gemiddelde genomen (bijlage 9). De microgreens die gekweekt worden onder het effect van microgravitеit worden opgekweekt door de boxen te plaatsen op de RPM (random positioning machine 1.0, Airbus Defence and Space Netherlands) met instelling 0*g*. In Figuur 7 worden de met aluminiumfolie afgedekte boxen en de RPM weergegeven onder de gebruikte LED lampen weergegeven.



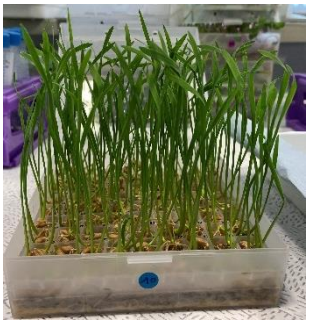
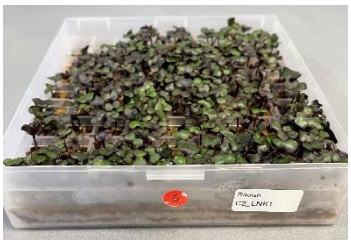
Figuur 7. De boxen afgedekt met aluminiumfolie en de RPM onder de LED lampen.
Copyright: Fotograaf, Nauts, R. (2021)

De oogst van de microgreens vindt plaats op dag zeven na inzet van het experiment. De oogst omvat het knippen van de microgreens met een schaar vlak boven het bodemniveau en het gravimetrisch bepalen van de biomassa's. De stalen worden bewaard op twee verschillende manieren nl. gedroogd of vers ingevroren. De gedroogde stalen worden in de droogstoof op 60°C gedroogd gedurende vier dagen, de verse stalen worden onmiddellijk na het oogsten in vloeibare stikstof gebracht. Hierna worden de verse stalen bewaard in een diepvriezer op -80°C tot aan de analyse. Het snelle invriesproces en de lage bewaartemperatuur moeten ervoor zorgen dat alle enzymen en metabolieten optimaal bewaard blijven. De meeste methodes vereisen verse stalen welke worden verdeeld in 2mL tubes met variërende massa's van ongeveer 100mg FW (vers gewicht). Voordat de analyses starten worden de ingevroren stalen fijngemalen en gehomogeniseerd met behulp van een kogelmolen met 3beats (3min, 30Hz). De Kjeldahl methode (zie paragraaf 2.2.2) voor de bepaling van proteïnen vereist gedroogde stalen van ongeveer 1000mg FW, deze worden in tubes van 10mL bewaard.

2.2 Analysemethode

De analyses worden uitgevoerd op de drie microgreens soorten onder de vier verschillende condities beschreven in Tabel 2. De microgreens worden geanalyseerd voor: biomassa, totaal proteïnen gehalte, antioxidanten, ascorbinezuur, anthocyaninen, mineralen (Ca, Mg, K, Na en Fe) en anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet).

Tabel 2. De verschillende condities en uitgevoerde analyses per plantensoort.

microgreen	**conditie**	**analyse**
tarwe (*Triticum aestivum* L. *cv. Servus)* 	- controle - gammastralen (γ) - microgravitеit (µg) - gammastralen + microgravitеit (γ+µg)	- biomassa - eiwitten - antioxidanten (totale, hydrofiele, hydrofobe, ascorbinezuur, anthocyaninen) - mineralen (Ca, Mg, K, Na en Fe) - anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet)
radijs (*Raphanus sativus* L.) 	- controle - gammastralen (γ) - microgravitеit (µg) - gammastralen + microgravitеit (γ+µg)	- biomassa - eiwitten - antioxidanten (totale, hydrofiele, hydrofobe, ascorbinezuur, anthocyaninen) - mineralen (Ca, Mg, K, Na en Fe) - anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet)
rode kool (*Brassica oleracea* L. var *capitate*) 	- controle - gammastralen (γ)	- biomassa - eiwitten - antioxidanten (totale, hydrofiele, hydrofobe, ascorbinezuur, anthocyaninen) - mineralen (Ca, Mg, K, Na en Fe) - anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet)

Copyright: Fotograaf, Nauts, R. (2021)

2.2.1 Biomassa

De biomassa's van de bovengrondse delen van de microgreens worden bepaald tijdens de oogst door individueel voor elke soort en elke conditie de planten te wegen op een balans tot op 0,001g alvorens ze verder te drogen of in te vriezen. Hierdoor kan een vergelijking gemaakt worden tussen de biomassa's van de vier verschillende condities per soort. De resultaten worden uitgedrukt in mg FW en weergegeven in paragraaf 3.1.

2.2.2 Eiwitten

Het totale proteïnegehalte (eiwit-N) wordt bepaald met de Kjeldahl methode. Deze methode bepaalt het organische stikstof en de stikstof vervat in ammoniak en ammonium. De Kjeldahl methode vereist gedroogde stalen van ±100mg (±1g FW). De methode wordt uitgevoerd op de drie microgreens onder de verschillende condities (Tabel 2), er worden telkens vier biologische herhalingen gedaan. De Kjeldahl methode omvat drie stappen nl. destructie, destillatie en titratie. De destructie gebeurt in warm zwavelzuurmilieu, er wordt 20mL zwavelzuur (95% v/v) toegevoegd. Dit zet het organisch gebonden stikstof om in ammonium.

$N\ (org) \rightarrow NH_4^+$

Vervolgens wordt een spatelpunt kopersulfaat toegevoegd welke werkt als katalysator. Om het kookpunt te verhogen wordt 8g kaliumsulfaat toegevoegd. De destructie wordt uitgevoerd door een geautomatiseerde destructieblok en gaat door op 380°C gedurende 2uur. De geautomatiseerde destructieblok, weergegeven in Figuur 8.

Figuur 8. De geautomatiseerde destructieblok
Copyright: Fotograaf, Jansen, C. (2021)

Hierna wordt het gevormde ammonium verder omgezet naar ammoniak door toevoegen van een overmaat natriumhydroxide. Deze toevoeging gebeurt automatisch bij de geautomatiseerde stoomdestillatie, er wordt 80mL van een natriumhydroxide oplossing (33% m/m) toegevoegd. Hierna wordt het ammoniak gedestilleerd en vervolgens opgevangen in een boorzuuroplossing.

$NH_4^+ + OH^- \rightarrow NH_4OH$

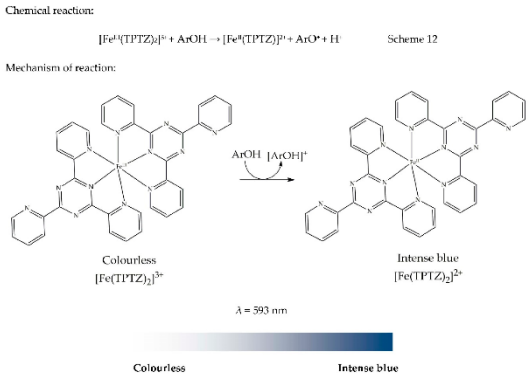
De destillatie is een geautomatiseerde stoomdestillatie, deze wordt weergegeven in Figuur 9.

Figuur 9. De geautomatiseerde stoomdestillatie (Kjeldahl).
Copyright: Fotograaf, Jansen, C. (2021)

Het ammoniak zet het boorzuur om naar een boraat ion, hierna wordt deze getitreerd met een gestandaardiseerd HCl-oplossing (0,100M) voor de bepaling van het eiwitgehalte. Er wordt gecorrigeerd met een blanco en de recovery wordt bepaald doormiddel van een standaard (acetanilide 99+%). De resultaten worden uitgedrukt in eiwit-N (%) en weergegeven in paragraaf 3.2. Het gedetailleerde protocol voor de Kjeldahl methode wordt weergegeven in bijlage 1.

2.2.3 Antioxidanten

<u>totale antioxidant capaciteit</u>
De hydrofiele en lipofiele antioxidant capaciteit wordt bepaald met de FRAP methode (Ferric Reducing Antioxidant Power). De FRAP methode wordt uitgevoerd op ingevroren stalen van ±100mg en dit voor de drie microgreen soorten onder de verschillende condities (Tabel 2). Er worden 4 biologische en 2 technische herhalingen uitgevoerd. De methode is gebaseerd op de reductie van het kleurloze ferric-tripyridyltriazine $[FeIII(TPTZ)]^{3+}$ naar het blauw gekleurde complex $[FeII(TPTZ)]^{2+}$. Deze reductie vindt plaats in een zuur milieu (pH 3.6-4) en de reactie wordt weergegeven in Figuur 10. Het $[FeII(TPTZ)]^{2+}$ complex absorbeert maximaal bij 593 nm.



Figuur 10. De reductie van ferric-tripyridyltriazine $[FeIII(TPTZ)]^{3+}$ naar $[FeII(TPTZ)]^{2+}$.
Noot: overgenomen van Sadeer, N.B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M.F. (2020) The versatility of antioxidant assays in food science and safety – chemistry, applications, strengths and limitations. Antioxidants 9(8):709. Doi:10.3390/antiox9080709

Er wordt onderscheid gemaakt tussen de hydrofiele- en lipofiele fractie om de antioxidant capaciteit te bepalen. De hydrofiele fractie wordt geëxtraheerd uit het staal door toevoegen van 1mL extractiemiddel dat bestaat uit een Na-EDTA oplossing (100mM) en HCl (38% v/v) aangelengd met ultra puur water (pH 1.7). Na centrifugeren (30min, 15000g, 4°C) wordt 750µL van het extract overgebracht in een nieuwe tube van 1,5mL, dit is de hydrofiele fractie. De lipofiele fractie wordt geëxtraheerd uit de resterende pellet. Na toevoegen van 1mL aceton (80% v/v) aan de pellet wordt dit geheel gehomogeniseerd en gedurende één uur geïncubeerd op ijs. Na incubatie wordt nogmaals gecentrifugeerd (15min, 15000g, 4°C) en 750µL extract overgebracht in een nieuwe tube van 1,5mL. De totale antioxidant capaciteit wordt berekend door de som te maken van de hydrofiele en lipofiele fractie.

Er wordt een stockoplossing (100mM) gemaakt van de Trolox standaard. Vanuit deze stockoplossing wordt een standaardreeks gemaakt (1000-15,625µM Trolox), wat resulteert in een concentratie van 50nmol Trolox/well tot 0,78125nmol Trolox/well. Voor de metingen wordt op een 96-well plaat 50µL van de standaarden en de stalen gepipetteerd. De stalen worden verdund met het extractiemiddel, de hydrofiele fractie een 1/10 verhouding en de lipofiele fractie een 1/5 verhouding. Hierna wordt 150µL FRAP reagens toegevoegd, de samenstelling van dit reagens wordt weergegeven in bijlage 2. De plaat wordt gedurende tien minuten geïncubeerd op kamertemperatuur, dit zorgt dat de reactie sneller plaats vindt.

De absorbantie wordt gemeten doormiddel van een spectrofotometer bij 593nm in een 96-well plaat. Er wordt telkens een blancometing uitgevoerd om te corrigeren voor de absorbantie die niet afkomstig is van de te onderzoeken stof. De antioxidant capaciteit wordt berekend doormiddel van de standaardreeks en uitgedrukt in µmol Trolox equivalenten/g FW. De resultaten van de totale, de hydrofiele en de lipofiele antioxidant capaciteit worden weergegeven in paragraaf 0. Het gedetailleerde protocol van de FRAP assay wordt weergegeven in bijlage 2.

<u>Anthocyaninen</u>
Het gehalte anthocyaninen wordt colometrisch bepaald, het meten van de absorbantie is een indirecte manier om de concentratie te bepalen. Omdat anthocyaninen wateroplosbare componenten zijn die zich bij de FRAP assay in de hydrofiele fractie bevinden wordt er geen afzonderlijke extractie gedaan. Het hydrofiele extract van de FRAP assay wordt uitgelezen op 537nm (anthocyaninen), 647nm (chlorofyl a) en 663nm (chlorofyl b). Doordat ook chlorofyl aanwezig is in deze fractie wordt hiervoor gecorrigeerd met onderstaande vergelijking.

$$anthocyaninen = 0.08173\mathrm{A}_{537} - 0.00697\mathrm{A}_{647} - 0.002228\mathrm{A}_{663}$$

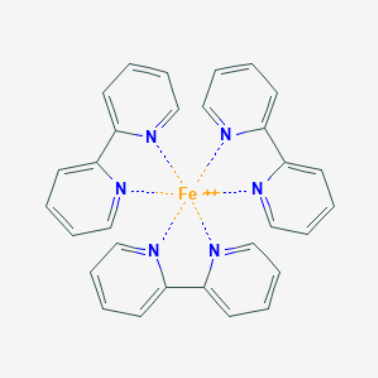
Noot: overgenomen van Sims, A.D., & Gamon, J.A., (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote sensing of environment 81(2-3):337-354. Doi:10.1016.S0034-4257(02)00010-X

Ieder staal word één keer gemeten en gecorrigeerd voor de matrix doormiddel van een blanco. De resultaten worden uitgedrukt in µmol/kg FW en weergegeven in paragraaf 0.

Ascorbinezuur

De totale en gereduceerde concentratie ascorbinezuur wordt bepaald via de methode van Gillespie en Ainsworth (2007). Deze methode wordt uitgevoerd op ingevroren stalen van ±100mg. Ascorbinezuur wordt bepaald op de drie microgreens onder de verschillende condities (Tabel 2), er worden telkens vier biologische herhalingen gedaan. In deze methode wordt Fe^{3+} gereduceerd door AA tot Fe^{2+}. Het gereduceerde ijzer vormt vervolgens een complex met α-α'-bipyridiyl dat een specifieke absorbantie heeft. Het gevormde complex wordt weergegeven in Figuur 11.

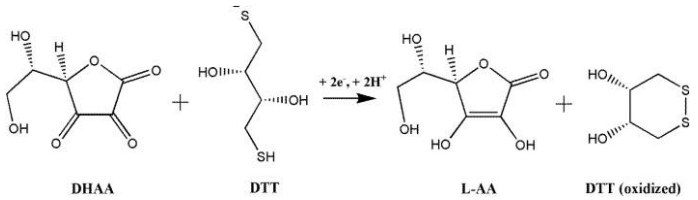
De reductie van ijzer is niet specifiek voor ascorbinezuur, doordat het ascorbinezuur wordt geëxtraheerd in trichloorazijnzuur (TCA) worden potentiële antioxidant eiwitten neergeslagen. Alsook wordt gewerkt in een zuur milieu (pH1-2) door toevoegen van fosforzuur, hierdoor worden andere reducerende metabolieten zoals α-tocoferol en glutathion geremd.



Figuur 11. Het complex van Fe^{2+} en α-α'-bipyridyl.
Noot: overgenomen van Pubchem. 2021. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [website]. Geraadpleegd op 10 april 2021 via https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/FeDipy3_2

Het ascorbinezuur wordt geëxtraheerd door toevoeging van 1mL TCA 6% w/v. Na centrifugeren (15min, 15000g, 4°C) wordt 750µL van het extract overgebracht in een tube van 2mL en op ijs gezet. Er wordt een standaardreeks aangemaakt van natrium-L-ascorbaat met een range van 5 - 0,039 mmol/L. De analyse wordt uitgevoerd op het staal, de standaard en een blanco. Er wordt 100µL van een fosfaatbuffer (75mM) met een pH 7,1 en 200µL van het staal, de standaard of de blanco (TCA 6% w/v) overgebracht in nieuwe tubes van 2mL.

In volgende stap wordt onderscheid gemaakt tussen het totale en gereduceerde ascorbinezuur. Wanneer de bepaling van het gereduceerde AA wordt uitgevoerd wordt 200µL ultrapuur water toegevoegd. Wanneer de bepaling van het totale AA wordt uitgevoerd wordt 100µL dithiothreitol (DTT) toegevoegd welke gedurende 10min geïncubeerd wordt. Na de incubatietijd wordt de overmaat DTT verwijderd door toevoegen van 100µL N-ethylmaleimide (NEM). Dithiothreitol is een sterk reductans en zorgt dat het dehydroascorbaat (DHA) gereduceerd wordt tot AA, waardoor het totale gehalte AA bepaald kan worden. De reactie van DTT met DHA wordt weergegeven in Figuur 12.



Figuur 12. De reactie van DTT en DHA.
Noot: overgenomen van Spinola, V., Mendes, B., Camara, J.S., & Castilho, P.C., (2013) Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. LWT – Food Science and Technology 50(2):731-737. Doi:10.1016/j.lwt.2012.08.020

Hierna worden bij beide bepalingen, voor het totale en gereduceerde AA, volgende reagentia toegevoegd: 500µL TCA (10% w/v), 400µL H_3PO_4 (43% v/v), 400µL α-α'-bipyridiyl (4% w/v) en 200µL $FeCl_3$ (3% w/v). Na toevoegen van de reagentia wordt het geheel gehomogeniseerd en geïncubeerd gedurende 1uur op 37°C. Vervolgens wordt 200µL van elke oplossing op een 96-well plaat gezet en doormiddel van een plate reader wordt de absorbantie van het gevormde complex gemeten op 525nm.

De concentratie AA wordt berekend doormiddel van de standaardreeks en uitgedrukt in µmol/g FW. De resultaten van het totale en gereduceerde ascorbinezuur worden weergegeven in paragraaf 0. Het gedetailleerde protocol voor de bepaling van ascorbinezuur wordt weergegeven in bijlage 3.

2.2.4 Mineralen

De mineralen die bepaald worden zijn Na, Ca, K, Mg en Fe, welke worden bepaald door middel van inductief gekoppeld plasmamassaspectrometer (ICP-MS). De analyse wordt uitgevoerd op de drie microgreens onder de verschillende condities (Tabel 2), er worden telkens drie biologische herhalingen gedaan. Deze techniek zet atomaire elementen doormiddel van een plasmabron om tot ionen die op basis van hun massa gescheiden worden. Het meten van de mineralen werd uitbesteed aan de UHasselt (Prof Dries Vandamme), de staalvoorbereiding wordt uitgevoerd op SCK CEN.

De staalvoorbereiding maakt gebruik van verse stalen van ±1g. De stalen worden in vooraf getarreerde glazen flesjes (20mL) gedroogd in de droogstoof (1week, 60°C) en daarna verast in een moffeloven bij een maximum temperatuur van 550°C gedurende ±23uur. Hierna wordt 1,5mL HCl (37% v/v) toegevoegd en het geheel op een zandbad gezet tot het staal volledig uitgedroogd is. Als er nog zichtbare zwarte vlokken overblijven is niet al het plantmateriaal verast. Daarom wordt er terug 1,5mL HCl (37% v/v) toegevoegd en wordt het staal nogmaals in de moffeloven verast en daarna gedroogd op het zandbad. Als laatste wordt 1mL HCl (1M) toegevoegd en aangelengd tot 10mL met gedemineraliseerd water. De massa van het staal in oplossing wordt opnieuw bepaald om zo het correcte volume te kennen. De stalen worden vervolgens gefilterd met behulp van een spuitfilter (Acrodisc 0,45µm PTFE, AP-4918) en overgebracht in een tube van 10mL. Hierna worden de mineralen bepaald met behulp van de ICP-MS. De resultaten worden uitgedrukt in mg/gFW en weergegeven in paragraaf 0. Het protocol voor de staalvoorbereiding wordt weergegeven in bijlage 4.

De staalvoorbereiding voor de mineraalbepaling vereist het drogen van de microgreens, vanuit deze gegevens kunnen de watergehaltes bepaald worden. De resultaten van de watergehalten worden weergegeven in 3.4.

2.2.5 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet

De verschillende anionen nl. chloride, nitraat, nitriet, sulfaat en fosfaat worden bepaald via ionenchromatografie (IC). Deze scheidingstechniek is gebaseerd op de wisselwerking tussen de mobiele en stationaire fase en de affiniteit van het analyt met deze twee fasen. Doordat de verschillende ionen verschillende eigenschappen hebben en zodoende op andere tijdstippen voorbij de detector komen kunnen de ionen geïdentificeerd worden. De eigenschappen die hierbij een grote invloed hebben zijn de grootte en de lading van het te bepalen ion.

De mobiele fase is NaOH (30mM) en de analytische kolom die gebruikt wordt is een IonPac AS11-HC. Het staal wordt geïnjecteerd, mengt zich met de mobiele fase en gaat vervolgens door de stationaire fase in de kolom. Voordat de oplossing door de detector gaat, stroomt het langs een suppressor. De suppressor zorgt voor een grotere gevoeligheid omdat deze de storende ionen zal vervangen door minder storende waterstofionen. De gebruikte detector is een ED50 elektrochemische detector. De methode wordt uitgevoerd op de drie microgreen soorten onder de verschillende condities (Tabel 2), er worden telkens vier biologische herhalingen gedaan.

De staalvoorbereiding maakt gebruik van ingevroren stalen van ±100mg. Er wordt 10mL warm water aan de stalen toegevoegd waarna deze gedurende 2uur in een verwarmd ultrasoonbad (80°C) geëxtraheerd worden. Vervolgens worden de stalen gecentrifugeerd (15min, 15000g) en het extract gepipetteerd in een nieuwe tube van 10mL met behulp van een spuitfilter (Acrodisc 0,45µm PTFE, AP-4918). Hierna worden de stalen overgebracht in flesjes van 1,5mL en in de autosampler geplaatst. De autosampler injecteert 25µL staal, welke vervolgens wordt gescheiden en geanalyseerd door de ionenchromatograaf. De concentraties chloride, nitraat, nitriet, sulfaat en fosfaat worden bepaald doormiddel van een standaardreeks. De standaarden worden per element aangekocht (Sigma-Aldrich) en aangemaakt in gedemineraliseerd water (1000mg/L). Vanuit deze oplossingen wordt een gecombineerde standaard gemaakt en verder verdund.

Het protocol van de staalvoorbereiding wordt weergegeven in bijlage 5. De resultaten worden uitgedrukt in mg/g FW en weergegeven in paragraaf 3.5.

2.2.6 Statistische verwerking

De statistische verwerking van de resultaten wordt uitgevoerd met R statistics versie i386 2.15.2. De uitgevoerde testen zijn o.a. Shapiro, Bartlett, ANOVA, Tukey en eventueel de Kruskal-conover-test. De Shapiro-test gaat na of de data normaal verdeeld is. Als er geen normaalverdeling is wordt de dataset getransformeerd in log(x), √(x), 1/x en exp(x). Vervolgens wordt er een Bartlett-test gedaan welke nagaat of de varianties in de data gelijk zijn. Wanneer beide testen goede resultaten opleveren wordt een ANOVA-test gedaan om te bepalen of er significante verschillen zijn tussen de data. Vervolgens wordt de Tukey-test gedaan die nagaat tussen welke groepen de significante verschillen aanwezig zijn.

Indien de resultaten van de Shapiro- en Bartlett-test uitwijzen dat de data niet normaal verdeeld zijn, wordt gebruik gemaakt van een niet-parametrische test nl. Kruskal-conover-test. Deze test toont significante verschillen aan tussen groepen die niet normaal verdeeld zijn door deze te rangschikken. Deze test werd uitgevoerd met R statistics versie i386 4.1.0 omdat deze test niet compatibel is met de versie eerder vernoemde versie.

De resultaten worden grafisch weergegeven. Op de grafieken worden de standaardfouten aangeduid en krijgen groepen met significante verschillen ($p<0,05$), een verschillende letter.

3 RESULTATEN

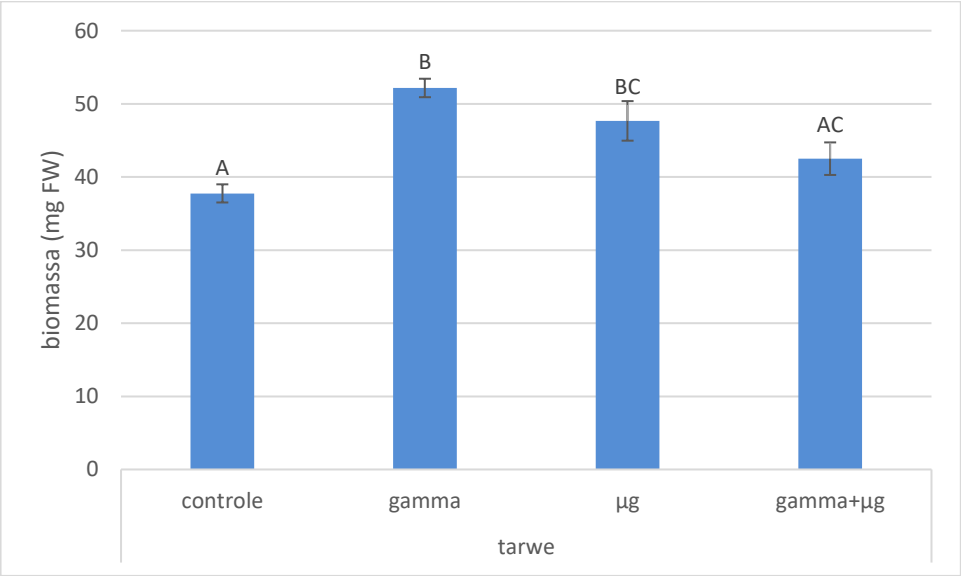
In de volgende paragrafen worden de resultaten weergegeven van de uitgevoerde analyses. De analyses omvatten de bepaling van biomassa, totaal proteïnen gehalte, antioxidanten, ascorbinezuur, anthocyaninen, mineralen (Ca, Mg, K, Na en Fe) en anionen (chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet). Voor alle gemeten parameters werd een vergelijking gemaakt tussen de controlegroep, de bestraalde planten (gamma), de planten die gekweekt werden onder microgravitеit (µg) en een combinatie van beide ruimtecondities (gamma+µg).

Omdat voor de testen onder microgravitеit slechts twee RPMs beschikbaar waren, werden deze experimenten binnen het tijdsbestek van deze thesis enkel uitgevoerd op de snelst groeiende planten (zie paragraaf 3.1). Bij gevolg werd voor rode kool voor alle hier geteste parameters enkel de vergelijking gemaakt tussen de controle groep en de groep die bestraald werd tijdens de kweek.

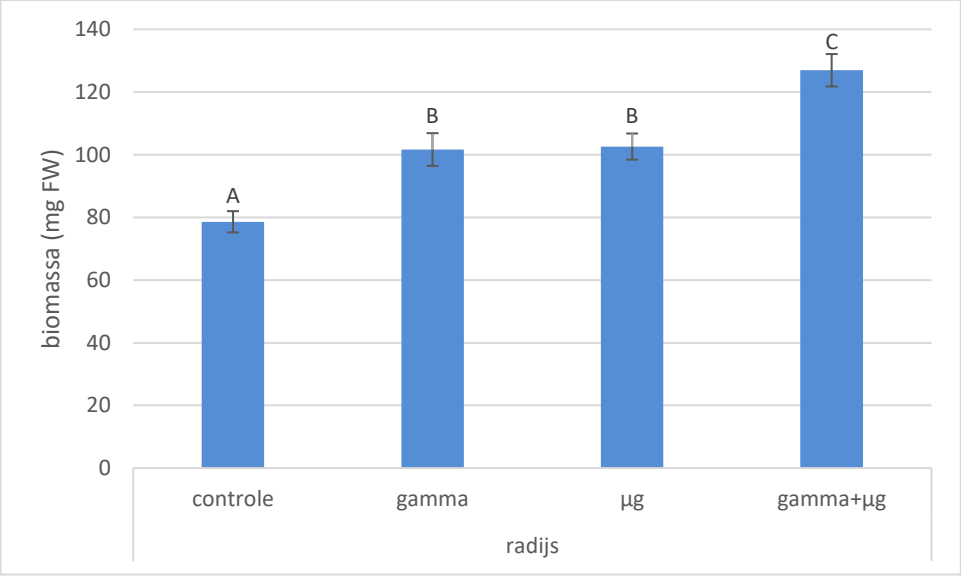
3.1 Biomassa

De vergelijking in de bekomen biomassa na één week tussen de verschillende condities bij tarwe, radijs en rode kool worden weergegeven in Figuur 13, Figuur 14 en Figuur 15. Onder controle condities wegen de tarwe, radijs en rode kool planten na één week gemiddeld 38±1,24 mg, 79±3,4 mg en 23±0,6 mg. De rode kool planten vertonen dus de laagste toename in biomassa.

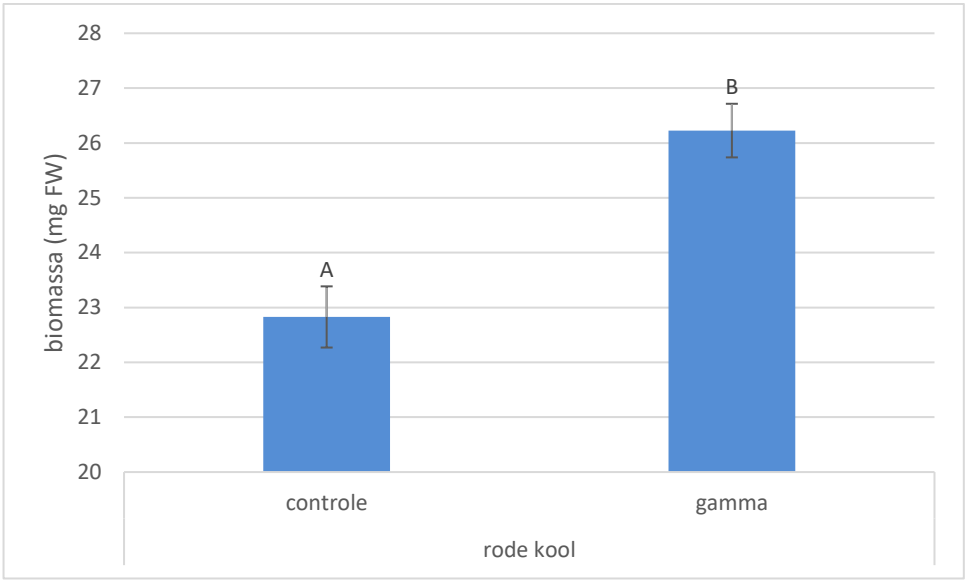
Globaal gezien is de biomassa bij alle hier geteste planten blootgesteld aan de ruimtecondities, hoger ten opzichte van deze onder controlecondities. De tarwe die bestraald werd en de tarwe die gekweekt werd onder verminderde zwaartekracht hebben een significant hogere biomassa dan de tarwe uit de controlegroep. De tarwe die gekweekt werd onder de gecombineerde ruimtecondities heeft gemiddeld wel een hogere biomassa dan de controlegroep maar deze zijn niet significant verschillend. De radijsplanten die gekweekt werden onder de ruimtecondities, zowel afzonderlijk als gecombineerd, hebben een significant hogere biomassa dan de controlegroep. De radijs die gekweekt werd onder de gecombineerde condities nl. bestraling en verminderde zwaartekracht ondergaat de grootste stijging in biomassa. De rode kool die bestraald werd heeft een significant hogere biomassa dan de controlegroep.



Figuur 13. Vergelijking van de toename in biomassa bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=96, n(gamma)=154, n(µg)=36 en n(gamma+µg)=46).



Figuur 14. Vergelijking van de toename in biomassa bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=62, n(gamma)=73, n(µg)=62 en n(gamma+µg)=49).

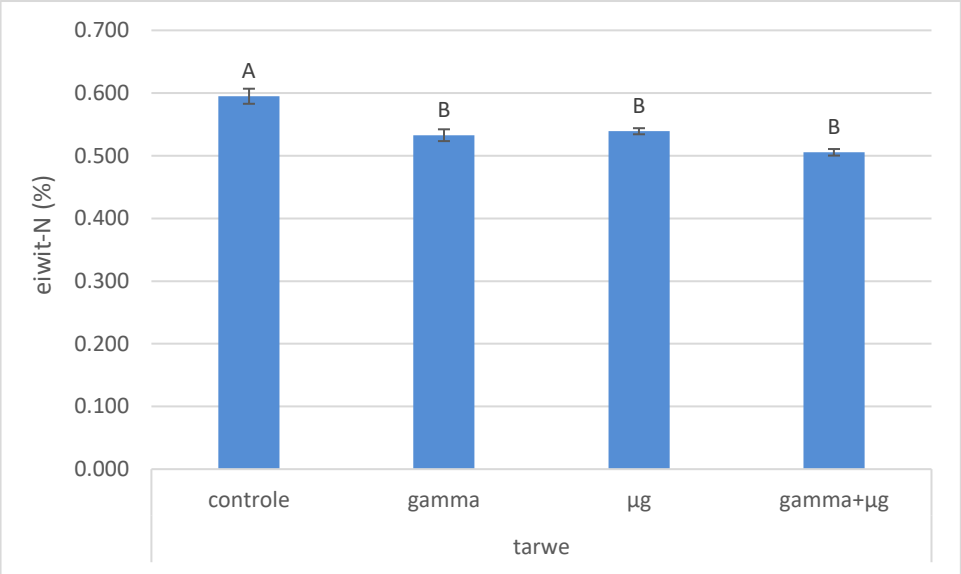


Figuur 15. Vergelijking van de toename in biomassa bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=186, n(gamma)=301).

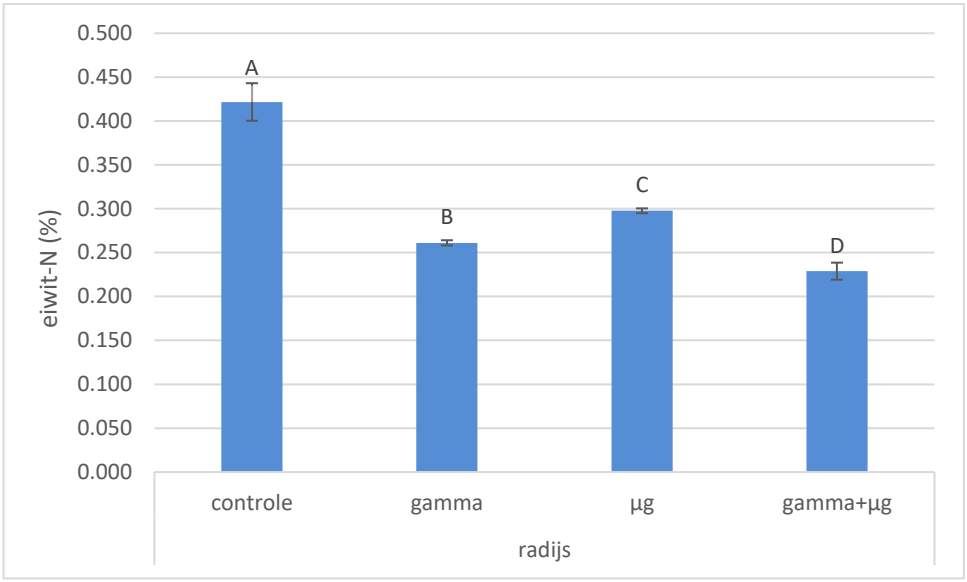
3.2 Eiwitten

De vergelijking in proteïnegehalte tussen de verschillende condities bij de microgreens wordt weergegeven in Figuur 16, Figuur 17 en Figuur 18. De microgreens die onder de ruimtecondities gekweekt werden hebben algemeen een lager proteïnegehalte dan de controleplanten.

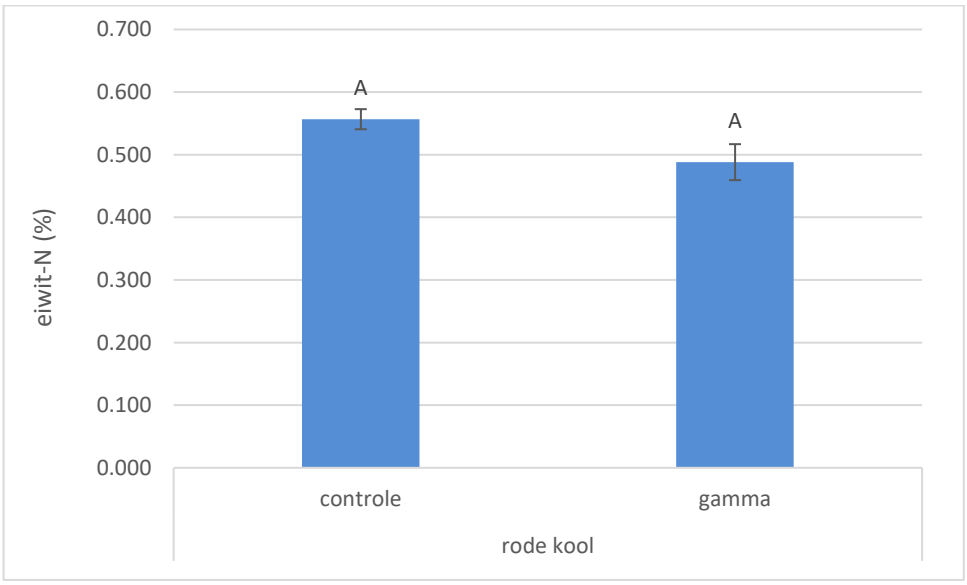
Bij de tarweplanten bevatten de aan straling en/of microgravitеit blootgestelde planten een significant lager proteïnegehalte dan de controlegroep. Bij de radijsplanten is het proteïnegehalte van elke conditie significant verschillend. Het proteïnegehalte van de bestraalde rode kool is niet significant lager dan de controlegroep. De afname van het gehalte aan proteïnen is bij radijs het hoogste.



Figuur 16. Vergelijking van de afname van het totale proteïnegehalte bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



Figuur 17. Vergelijking van de afname van het totale proteïnegehalte bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

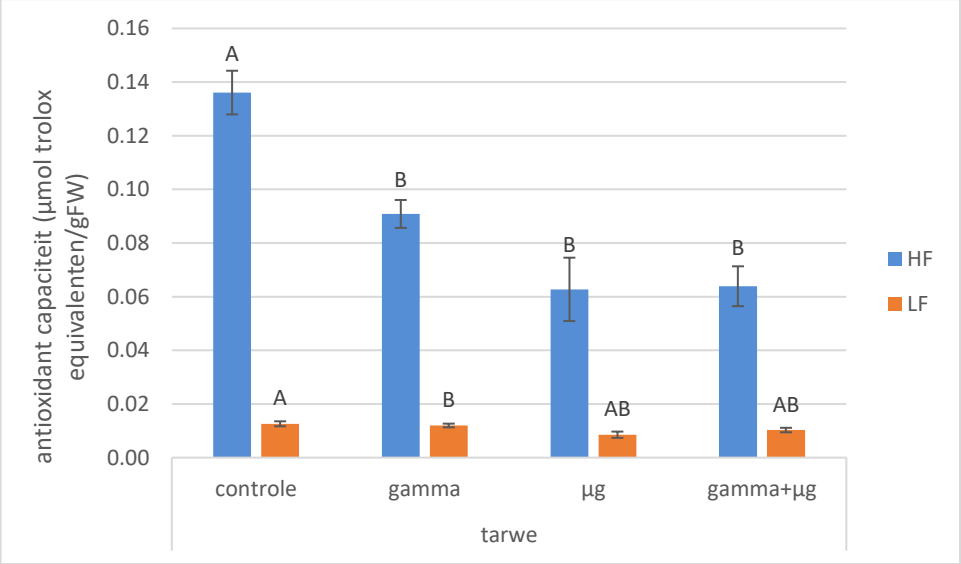


Figuur 18. Vergelijking van de afname van het totale proteïnegehalte bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

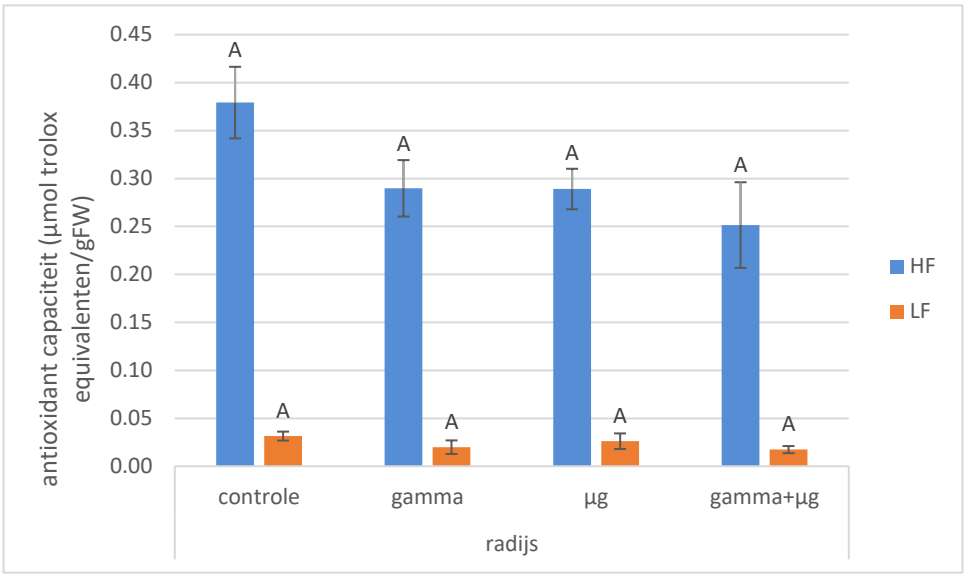
3.3 Antioxidanten

De totale antioxidatieve capaciteit (TAC) werd opgesplitst in hydrofiele- en lipofiele antioxidatieve capaciteit. De vergelijking tussen de verschillende condities bij de microgreens wordt weergegeven in Figuur 19, Figuur 20 en Figuur 21. De grafische weergave van de TAC wordt weergegeven in bijlage 7, en toont aan dat deze bij de blootgestelde microgreens lager ligt dan bij de controles. Bij de tarwe en rode kool is dit een significante afname.

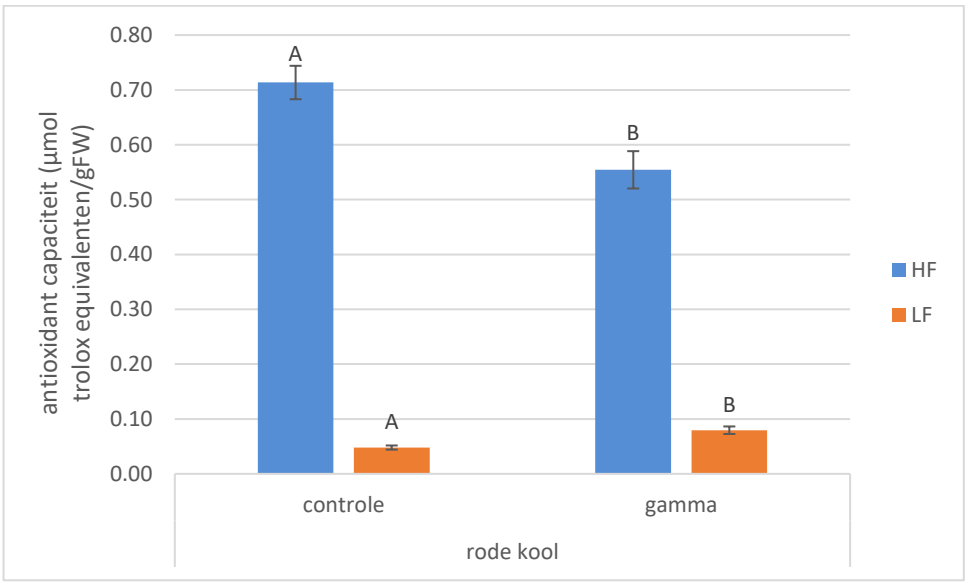
De hydrofiele fractie toont een daling na blootstelling aan ruimtecondities bij de drie soorten microgreens. De capaciteitsafname van de hydrofiele fractie is significant bij tarwe en rode kool. De lipofiele fractie volgt deze dalende trend niet. Bij de lipofiele fractie van rode kool, Figuur 21, is een significante capaciteitstoename zichtbaar. Bij radijs is geen trend zichtbaar in de lipofiele fractie (Figuur 20), er zijn geen significante verschillen. De tarweplanten die bestraald werden zijn significant toegenomen in lipofiele antioxidant capaciteit. De tarwe volgt geen duidelijke trend zoals weergegeven in Figuur 19.



Figuur 19. Vergelijking van de antioxidant capaciteit van de hydrofiele (HF) en lipofiele fractie (LF) bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



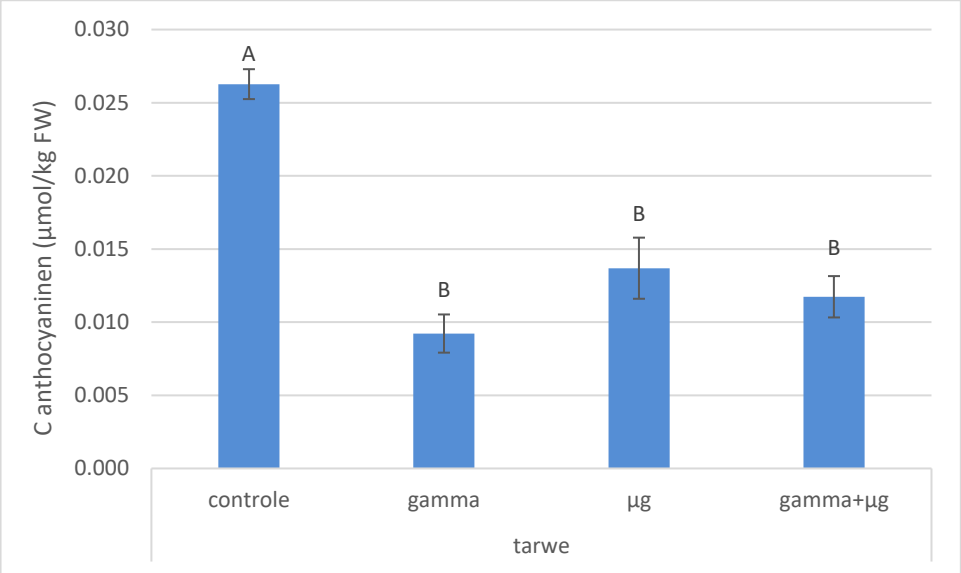
Figuur 20. Vergelijking van de antioxidant capaciteit van de hydrofiele (HF) en lipofiele fractie (LF) bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan micrograviteit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



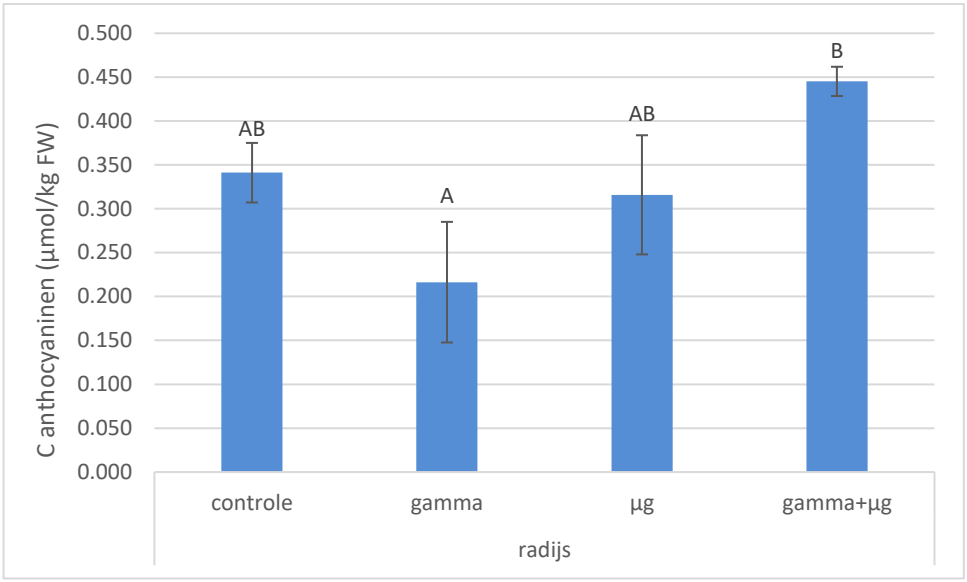
Figuur 21. Vergelijking van de antioxidant capaciteit van de hydrofiele (HF) en lipofiele fractie (LF) bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

Anthocyaninen en ascorbaat bevinden zich in de hydrofiele fractie van de totale antioxidanten. De vergelijking van de concentratie anthocyaninen tussen de verschillende condities bij de microgreens wordt weergegeven in Figuur 22, Figuur 23 en Figuur 24. Dezelfde vergelijking wordt gemaakt voor de concentratie ascorbaat, deze wordt weergegeven in Figuur 25, Figuur 26 en Figuur 27.

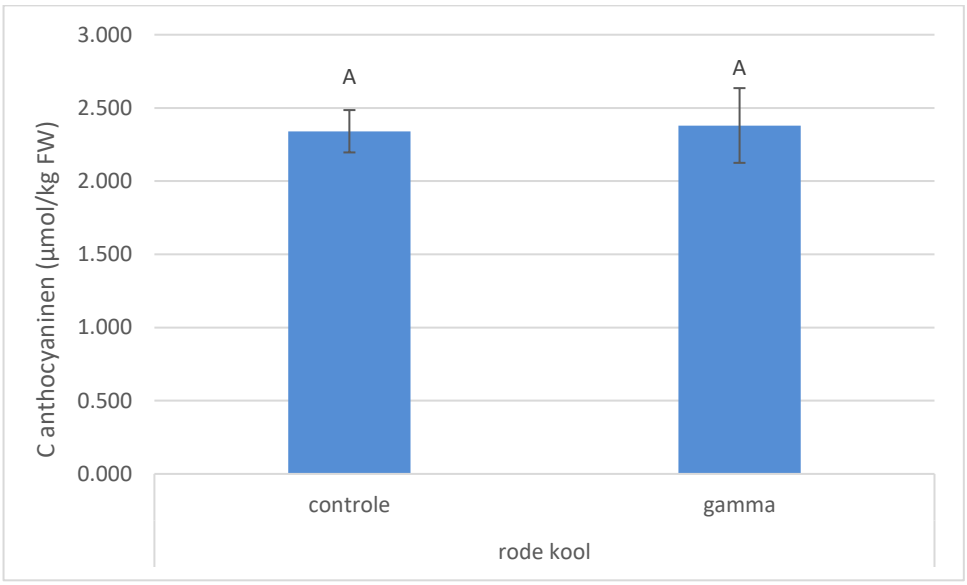
De concentraties anthocyaninen bij rode kool liggen een factor 100 hoger dan deze van tarwe, de concentraties bij radijs liggen tussen deze van rode kool en tarwe. De tarweplanten tonen een significante afname in anthocyaninen concentraties wanneer deze blootgesteld worden aan gammastralen en/of microgravitеit. De rode kool- en radijsplanten volgen deze trend niet. De rode kool vertoont geen significante verschillen in concentratie anthocyaninen wanneer deze bestraald wordt. Bij radijs is een afname in anthocyaninen bij de planten die afzonderlijk blootgesteld werden aan gammastralen en microgravitеit. Echter de radijsplanten die blootgesteld werden aan de gemengde condities hadden een toename in concentratie anthocyaninen.



Figuur 22. Vergelijking van de afname van de concentratie anthocyaninen bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



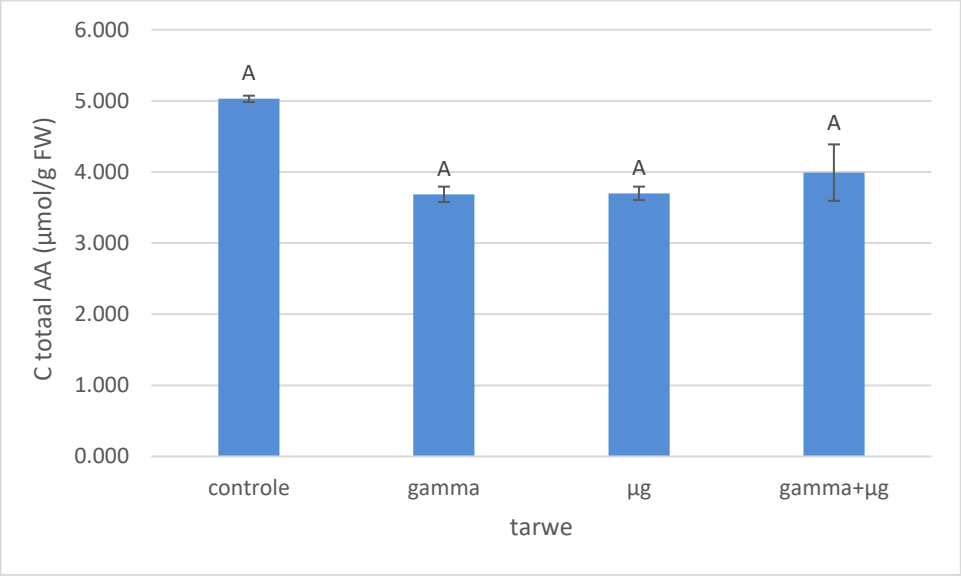
Figuur 23. Vergelijking van de concentratie anthocyaninen bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



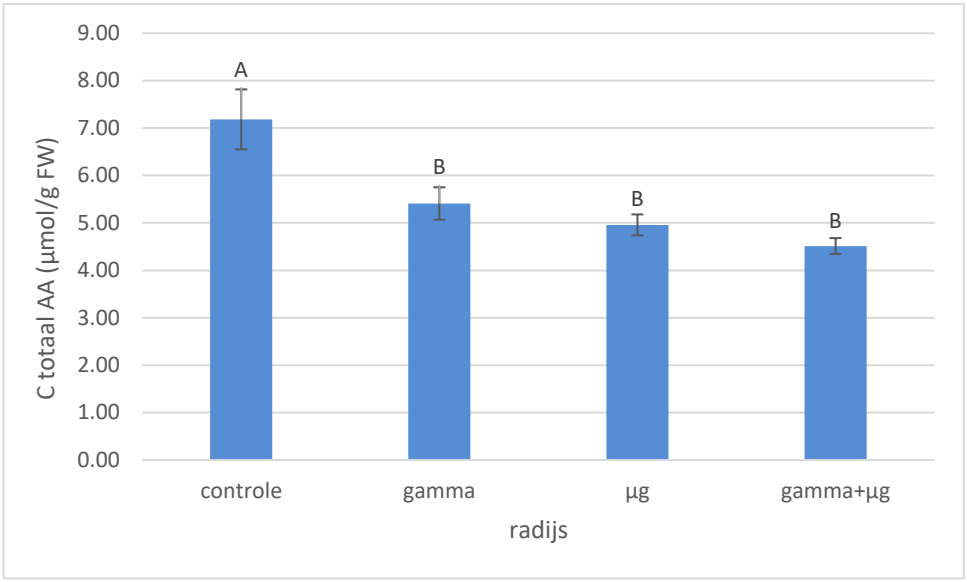
Figuur 24. Vergelijking van de concentratie anthocyaninen bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

De concentraties ascorbaat liggen bij de rode kool het hoogst, daarna radijs en dan tarwe. Bij de drie microgreens is de trend van de concentratie AA dalend. In de tarweplanten lijkt er een afname in de concentratie AA voor alle behandelingen tegenover de controle maar deze is binnen onze metingen niet significant. Bij de radijs en de rode kool zijn de concentraties ascorbaat bij de condities gammastralen en/of verminderde zwaartekracht significant gedaald ten opzichte van de controleplanten.

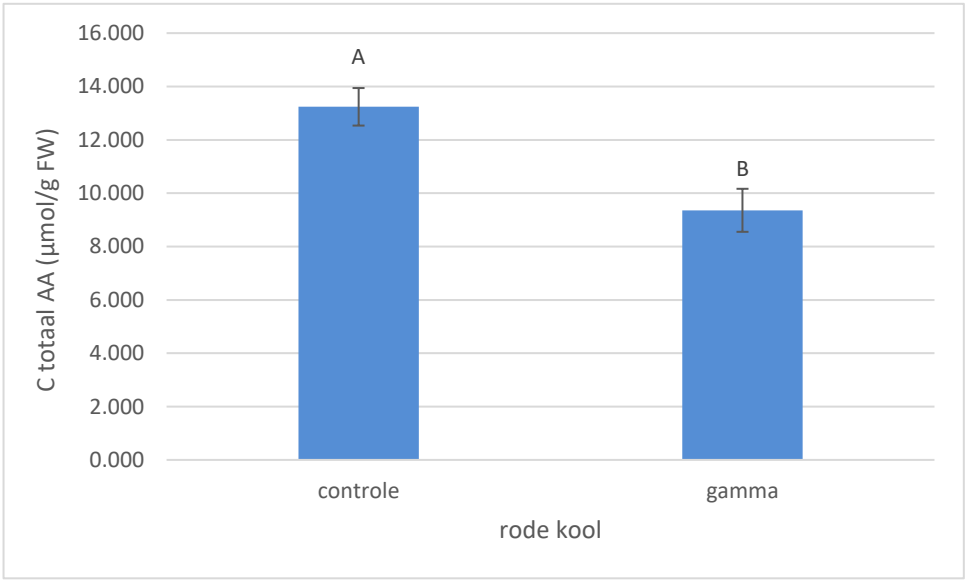
Naast de totale concentratie ascorbaat werd ook het gereduceerde ascorbaat bepaald. De grafische weergave van het gereduceerde gehalte ascorbaat tussen de verschillende condities bij de microgreens worden weergegeven in bijlage 8. Hieruit blijkt dat het grootste deel van de ascorbaat gereduceerd is met als gevolg dat er nagenoeg geen geoxideerde ascorbaat aanwezig is.



Figuur 25. Vergelijking van de afname van de concentratie totaal ascorbinezuur bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



Figuur 26. Vergelijking van de afname van de concentratie totaal ascorbinezuur bij 1-week oude radijs tussen de verschillende conditi
es: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

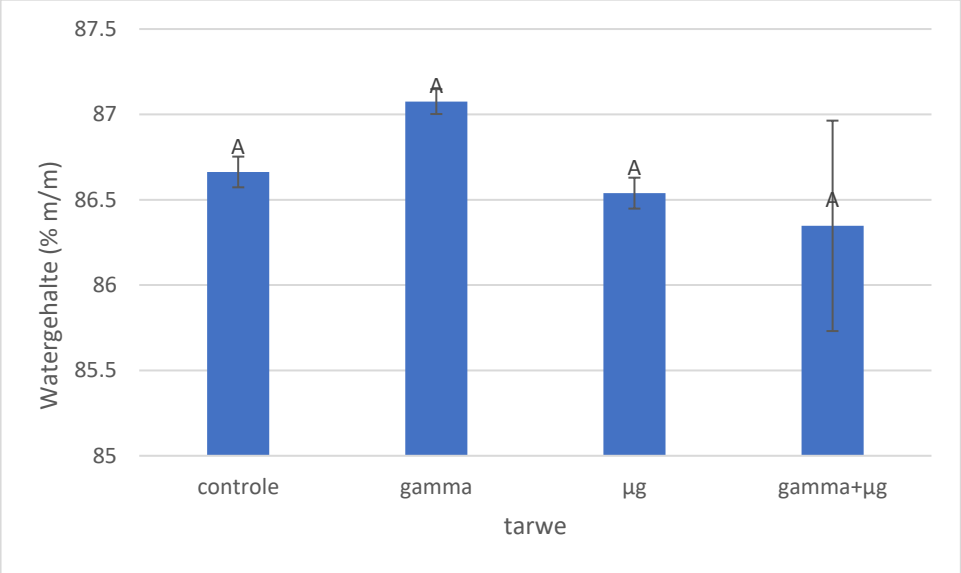


Figuur 27. Vergelijking van de afname van de concentratie totaal ascorbinezuur bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

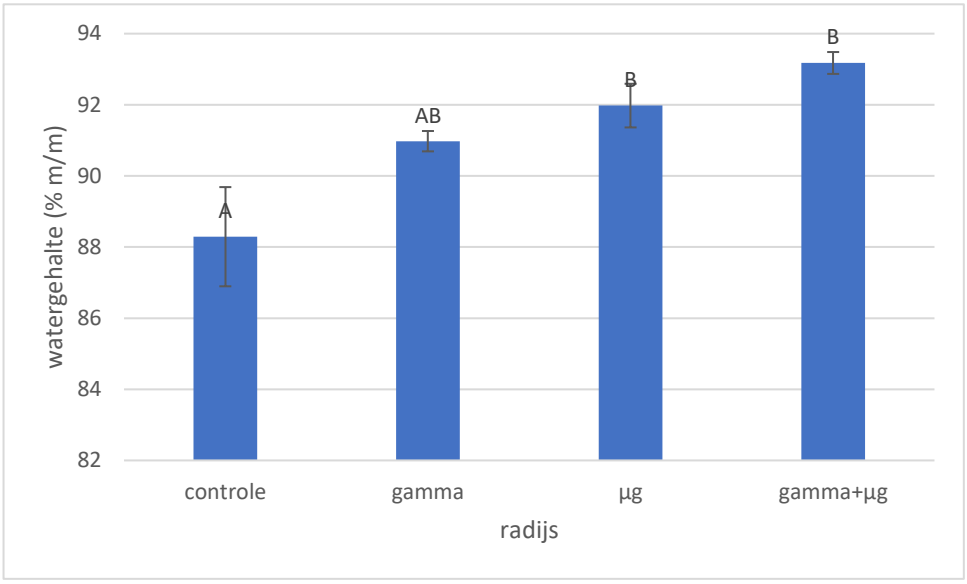
3.4 Mineralen

De stalen zijn binnen het tijdsbestek van deze thesis niet geanalyseerd geraakt in UHasselt waardoor deze niet verder besproken worden.

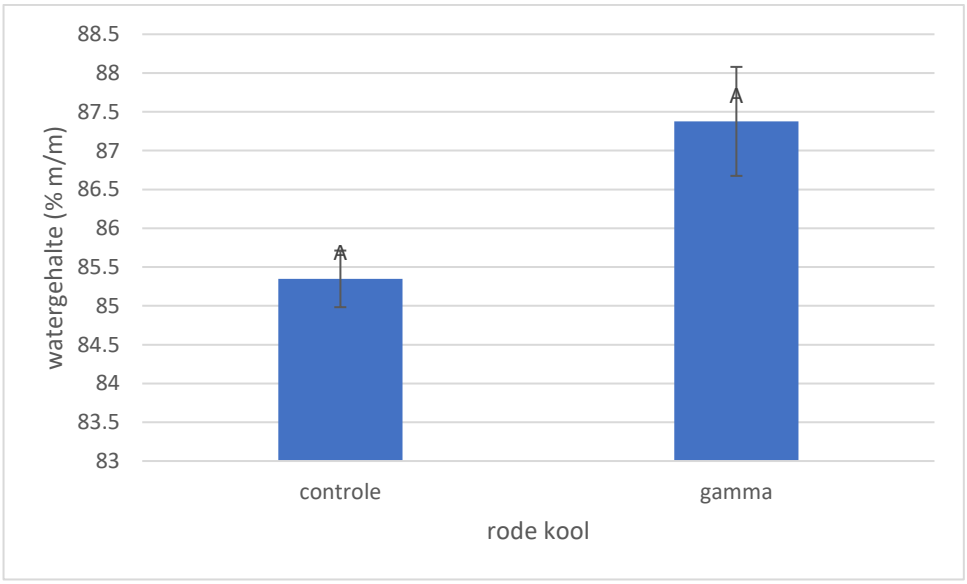
De watergehaltes werden bepaald uit de resultaten van de staalvoorbereiding van de ICP-MS. De vergelijking in watergehalte tussen de verschillende condities bij de microgreens wordt weergegeven in Figuur 28, Figuur 29 en Figuur 30. Algemeen is het watergehalte bij alle planten blootgesteld aan de ruimtecondities, hoger ten opzichte van deze onder controlecondities. Bij de tarweplanten zijn geen significante verschillen waarneembaar. Het watergehalte bij de bestraalde tarweplanten ligt hoger dan bij de controleplanten, de planten die blootgesteld werden aan microgravitеit en de gecombineerde ruimtecondities zijn afgenomen. De radijsplanten die blootgesteld werden aan de ruimtecondities zijn toegenomen. De radijs die blootgesteld werd aan microgravitеit en deze die blootgesteld werden aan de gecombineerde ruimtecondities kennen een significante toename t.o.v. de controleplanten. Het watergehalte neemt toe bij de rode kool die bestraald werd, dit verschil is niet significant.



Figuur 28. Vergelijking van de watergehaltes bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=3, n(gamma)=3, n(µg)=3 en n(gamma+µg)=3).



Figuur 29. Vergelijking van de watergehalten bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=3, n(gamma)=3, n(µg)=3 en n(gamma+µg)=3).

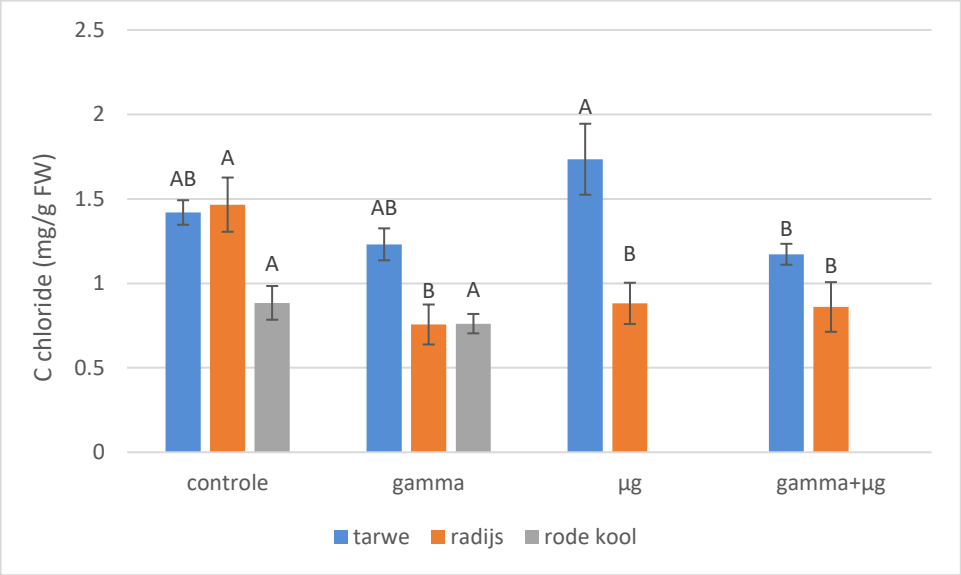


Figuur 30. Vergelijking van de watergehalten bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=3, n(gamma)=3).

3.5 Chloride, fosfaat, sulfaat, nitraat en nitriet

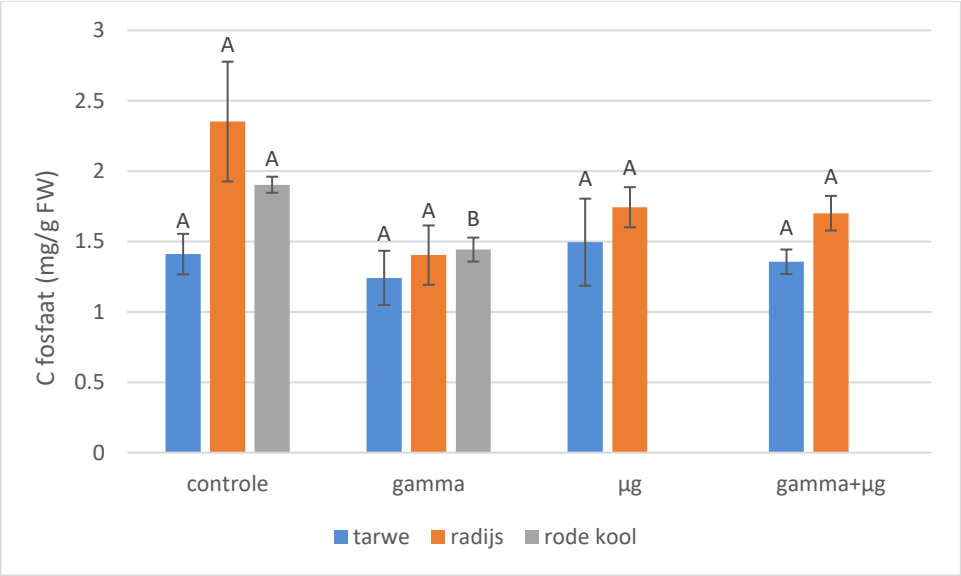
De vergelijking van de anionenconcentraties tussen de verschillende condities bij de microgreen soorten worden weergegeven in volgende figuren: Figuur 31 (chloride), Figuur 32 (fosfaat), Figuur 33 (sulfaat), Figuur 34 (nitraat), en Figuur 35 (nitriet).

De chlorideconcentraties zijn algemeen lager na blootstelling aan gammastralen, microgravitéit of een combinatie van beide dan de controlegroep. De tarwe die blootgesteld werd aan microgravitéit is de enige conditie met een toename. Enkel bij de radijs vertonen de ruimtecondities een significante daling ten opzichte van de controle.



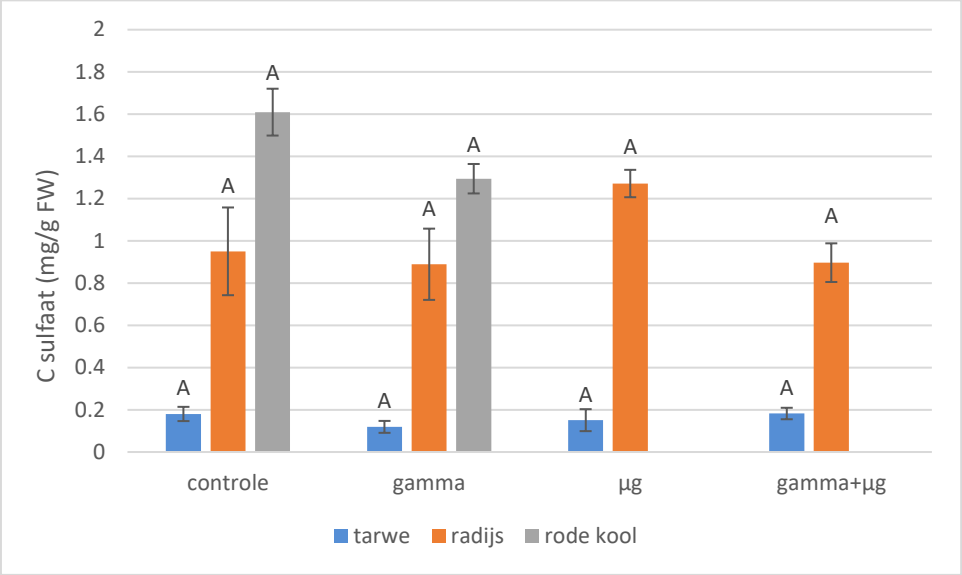
Figuur 31. Vergelijking de massaconcentratie chloride bij 1-week oude tarwe, radijs en rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitéit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

Er is een algemene afname in fosfaatconcentraties na blootstelling aan gammastralen, microgravitеit en de combinatie van beide. De afname van fosfaat bij de bestraalde rode kool ten opzichte van de controle is significant. De tarwe die blootgesteld werd aan de verminderde zwaartekracht is toegenomen ten opzichte van de controletarwe.



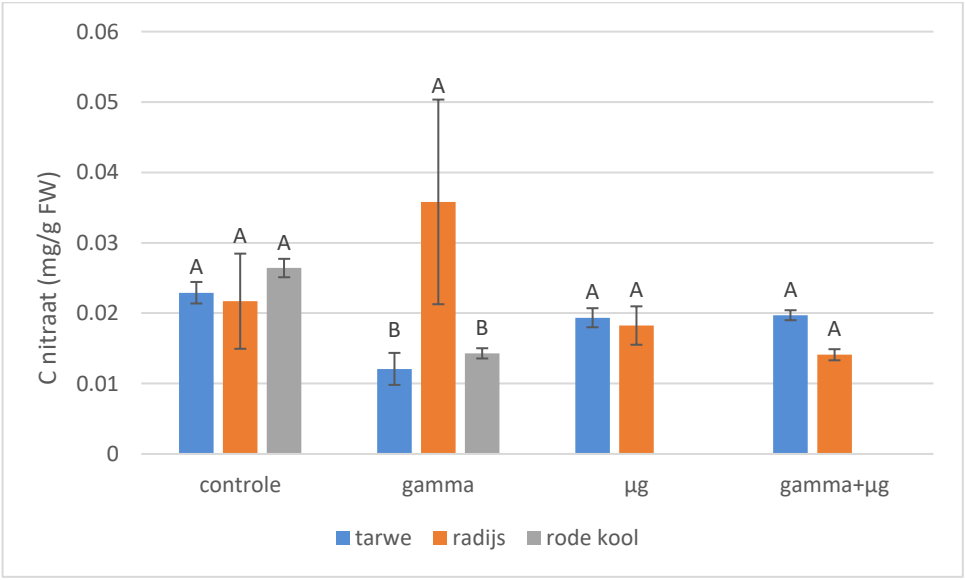
Figuur 32. Vergelijking de massaconcentratie fosfaat bij 1-week oude tarwe, radijs en rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

De concentraties sulfaat volgen geen algemene trend noch zijn hier significante verschillen tussen de controleplanten en de planten die blootgesteld werden aan de ruimtecondities. De concentraties aan sulfaat liggen het hoogste bij de rode kool. Deze van radijs liggen lager maar dicht tegen deze van de rode kool aan. De sulfaatconcentraties liggen het laagste bij de tarweplanten, deze zijn een factor 10 lager dan deze van de rode kool.



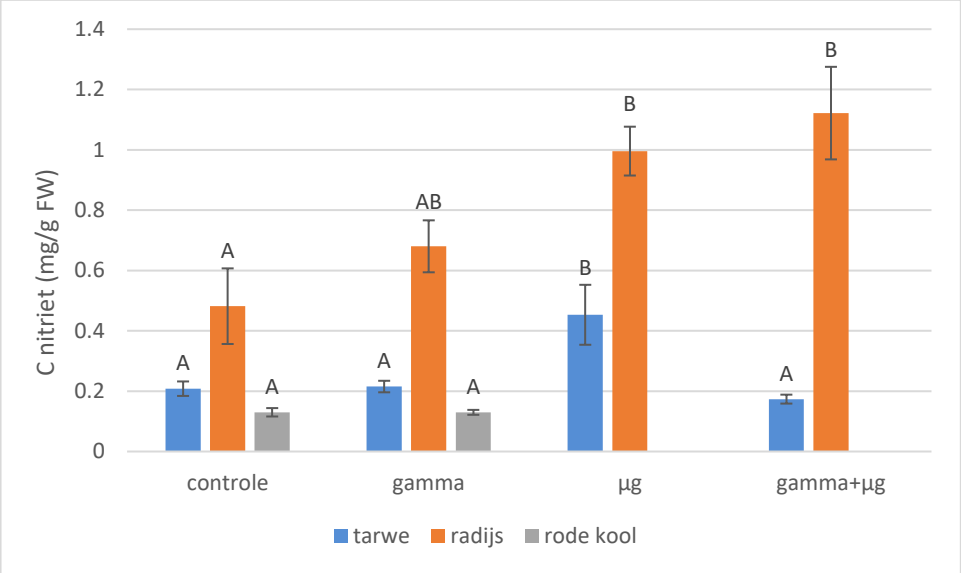
Figuur 33. Vergelijking de massaconcentratie sulfaat bij 1-week oude tarwe, radijs en rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

Bij de drie microgreen soorten zijn de concentraties nitraat algemeen afgenomen na blootstelling aan gammastralen en/of microgravitеit. Een significante daling is te zien bij tarwe en rode kool na bestraling. De bestraalde radijsplant volgt deze trend niet, deze is toegenomen. De nitraatgehaltes van de drie soorten microgreen zijn laag en gelijkaardig aan elkaar.



Figuur 34. Vergelijking de massaconcentratie nitraat bij 1-week oude tarwe, radijs en rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

De concentraties nitriet bij de radijsplanten nemen toe na blootstelling aan de ruimtecondities, de toename is significant wanneer blootgesteld aan microgravitеit. Bij de tarweplanten is deze trend ook waarneembaar, een significante toename van de aan microgravitеit blootgestelde planten ten opzichte van de controles. De bestraalde tarweplanten zijn weinig verschillend, dit is gelijkaardig bij de rode kool. De nitrietgehaltes zijn het hoogst bij de radijs.



Figuur 35. Vergelijking de massaconcentratie nitriet bij 1-week oude tarwe, radijs en rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).

Een samenvatting van alle significante verschillen ten opzichte van de controleplanten wordt weergegeven in Tabel 3. Deze dient als basis voor de discussie van dit eindwerk.

Tabel 3. Een overzicht van de verschillen in parameters in verschillende microgreen soorten (tarwe, radijs en rode kool) blootgesteld aan gammastraling, microgravitеit of beide ten opzichte van de controle planten. Een pijl naar boven (↑) of onder (↓) staat respectievelijk voor een significante stijging of daling ten opzichte van de controleplanten. Voor detail van de analyses en de gebruikte statistische analyses zie Figuur 13 tot 32.

					Antioxidanten				**Anionen**				
Conditie	**Plantsoort**	**Biomassa**	**Watergehalte**	**Eiwitten**	**Hydrofiel**	**Lipofiel**	**Anthocyaninen**	**Ascorbaat**	**Chloride**	**Fosfaat**	**Sulfaat**	**Nitraat**	**Nitriet**
Gammastralen	tarwe	↑	≈	↓	↓	≈	↓	≈	≈	≈	≈	↓	≈
	radijs	↑	≈	↓	≈	≈	≈	↓	↓	≈	≈	≈	≈
	rode kool	↑	≈	≈	↓	↑	≈	↓	≈	↓	≈	↓	≈
Microgravitеit	tarwe	↑	≈	↓	↓	↓	↓	≈	≈	≈	≈	≈	↑
	radijs	↑	↑	↓	≈	≈	≈	↓	↓	≈	≈	≈	↑
Microgravitеit en gammastralen	tarwe	≈	≈	↓	↓	≈	↓	≈	↓	≈	≈	≈	≈
	radijs	↑	↑	↓	≈	≈	≈	↓	↓	≈	≈	≈	↑

4 DISCUSSIE

In onderstaande discussie worden de resultaten uit hoofdstuk 3 besproken. Eerst wordt gekeken of de planten stress ondervinden ten gevolge van de verschillende ruimtecondities. Daarna volgt een vergelijking tussen de gebruikte plantensoorten, waarbij gekeken wordt naar de soort-specifieke resultaten. Tenslotte wordt een vergelijking gemaakt van de nutritionele waarde van de planten bij blootstelling aan ruimtecondities ten opzichte van de controleplanten.

Microgreens ondervinden stress bij blootstelling aan microgravitеit en verhoogde gammastralen

De drie soorten microgreens vertoonden een significante toename in biomassa na blootstelling aan de ruimtecondities, met uitzondering van de tarweplanten die blootgesteld werden aan een combinatie van gammastralen en microgravitеit. De watergehaltes vertoonden dezelfde trend als de toenemende biomassa's, dit wijst op een verband tussen beide. Het verband suggereert dat de plant meer water opneemt bij blootstelling aan de stressfactoren in de ruimte met als gevolg de toenemende biomassa's. Deze toename gaat gepaard met een significante afname bij de drie verschillende condities in proteïnegehalte, uitgezonderd van de bestraalde rode kool. De microgreens lijken dus schijnbaar beter te groeien maar de toegenomen biomassa is waarschijnlijk het gevolg van extra wateropname in de blootgestelde planten. Een toegenomen biomassa aan vers materiaal werd al eerder beschreven voor Arabidopsis en rijstplanten blootgesteld aan gammastraling maar nog niet voor deze microgreens soorten blootgesteld voor slechts één week (Biermans, et al., 2015; Kariuki, et al., 2019). Het wordt beschouwd als een typische stress respons. In de literatuur is echter nog niet eerder zo duidelijk aangetoond dat deze toename voornamelijk te wijten is aan een verhoogde wateropname door de planten en gepaard gaat met een relatieve verlaging in eiwitgehalte.

Gammastralen zorgen voor een daling van de hydrofiele antioxidant fractie, welke significant is bij tarwe en rode kool. Verwacht werd dat de antioxidatieve capaciteit zou stijgen in de planten blootgesteld aan gammastralen of microgravitеit omdat de antioxidanten als belangrijke functie hebben om de planten te beschermen tegen oxidatieve stress (Caverzan et al., 2016). De daling die hier zichtbaar is zou gedeeltelijk het gevolg kunnen zijn van de verhoogde watergehaltes waardoor de antioxidanten minder geconcentreerd aanwezig zijn. Eenzelfde significante afname was meetbaar in de concentraties anthocyaninen (tarwe) en ascorbaat (radijs en rode kool), welke belangrijke antioxidanten zijn aanwezig in de hydrofiele fractie. Deze vaststelling bevestigt daarmee de waargenomen trend in de totale niveaus. Echter daarnaast hebben gammastralen een significant stijgend effect op de lipofiele antioxidant fractie bij rode kool, dit effect wordt bij geen enkele andere conditie waargenomen. Bij de anionen toont chloride een significante daling en zorgen de gammastralen voor een significante daling van nitraat bij tarwe en rode kool.

Microgravitеit veroorzaakt een significante afname van zowel de hydrofiele- als lipofiele antioxidant fractie bij de tarweplanten. De dalende anthocyaninen van tarwe en de dalende ascorbaatconcentatie van radijs volgen dezelfde significante daling als de hydrofiele fractie, dit is zoals verwacht doordat deze twee antioxidanten hydrofiel zijn en dus aanwezig zijn in de hydrofiele fractie. Microgravitеit zorgt voor een significante dalende chlorideconcentratie bij radijs. Ten slotte induceert microgravitеit een significante toename in nitrietconcentratie bij de twee blootgestelde plantsoorten: tarwe en radijs.

Bij de blootstelling aan een combinatie van gammastralen en microgravitéit wordt dezelfde trend waargenomen in de hydrofiele antioxidant fractie van beide condities afzonderlijk. De hydrofiele fractie daalt significant bij tarwe, deze significante daling is ook zichtbaar in de anthocyaninen concentratie van tarwe en de concentratie ascorbaat bij radijs. De lipofiele antioxidant fractie kent geen significante verschillen bij de gecombineerde blootstelling. Chloride kent ook hier een significante afname bij zowel tarwe als radijs en de nitrietconcentratie van radijs neemt opnieuw significant toe.

De toename van biomassa onder de vorm van verhoogde wateropname en afname van eiwitten doet vermoeden dat de plant een soort stress ondervindt, alsook de minimale verhoging van lipofiele antioxidant fractie. Echter er wordt verwacht dat de antioxidant capaciteit door deze stress stijgt maar het tegengestelde wordt waargenomen. De dalende antioxidant capaciteit toont aan dat de plant niet zwaar onder stress staat, dit wordt bevestigd doordat ascorbaat voor het grootste deel aanwezig is in gereduceerde vorm. Bij stressreacties wordt het gereduceerde ascorbaat normaal geoxideerd (Noctor & Foyer, 1998).

Blootstelling aan gammastraling en microgravitéit induceert soortspecifieke veranderingen in verschillende microgreens soorten

In deze studie werd gewerkt met drie microgreensoorten: tarwe, radijs en rode kool. De vergelijking tussen de plantensoorten toont aan dat de totale antioxidatieve capaciteit het hoogst ligt bij rode kool, daarna volgt radijs en als laatste tarwe. De concentratie anthocyaninen bij rode kool ligt een factor 100 hoger dan deze van tarwe en deze van radijs ligt een factor 10 hoger dan deze van tarwe. Dit is zoals verwacht omdat deze variëteit van tarwe geen anthocyaninen aanmaakt terwijl radijs en rode kool rode plantensoorten zijn. De rode kleur is te wijten aan de rood-violette pigmenten welke anthocyaninen zijn. De verschillen in antioxidatieve capaciteit en dan voornamelijk de anthocyaninen zijn daardoor zeker te linken aan de gebruikte microgreens soorten.

Een verdere vergelijking van de gemeten parameters in de hier gebruikte plantensoorten laat een duidelijk verschil merken in de sulfaatgehaltes. De concentraties sulfaat zijn het laagste bij tarwe, daarna volgt radijs en de hoogste concentraties zijn aanwezig bij de rode kool. De rode kool en radijs zijn beide planten van de familie van de *Brassicaceae* of koolachtigen. Deze plantenfamilie bevat van nature een hoog zwavelgehalte, voornamelijk onder de vorm van glucosinolaten en hun afgeleide thiocyanaten, die de koolsoorten ook hun typische geur en smaak geven (Vig, Rampal, Thind & Arora, 2009). Voor de plant spelen ze een rol in het aantrekken van bestuivers enerzijds en het verweer tegen vraat door allerlei insecten anderzijds (Jahangir, Abdel-Farid, Kim, Choi & Verpoorte, 2009; Lucas-Barbosa, van Loon & Dicke, 2011).

De nutritionele waarde van microgreens vermindert door blootstelling aan gammastraling en microgravitéit

Een belangrijk doel binnen dit werk was om het effect van de blootstelling aan straling of microgravitéit te bekijken op het nutritioneel profiel van de geteste microgreens om hun potentiële kweek in de ruimte te testen. Algemeen zijn geen gunstige effecten waargenomen op de componenten die een nutritioneel voordeel zouden geven wanneer de planten worden blootgesteld aan de verschillende condities nl. gammastralen en microgravitéit. Zoals in de literatuur reeds vermeld, werd is de opname van eiwitten essentieel voor de gezondheid van de mens (Lane et al., 2013).

Astronauten worden zelf ook blootgesteld aan microgravitеit en ondervinden hierdoor ook verlies aan spiermassa. Deze afname in eiwitgehaltes bij de microgreens onder de ongunstige ruimtecondities maakt dat deze een minder goede eiwitbron zouden zijn voor de astronaut dan oorspronkelijk gehoopt (Wojdylo, Nowicka, Tkacz & Turkiewicz, 2020; Paradiso et al., 2018).

De literatuur toont aan dat microgreens een hogere concentratie antioxidanten bevatten dan de volgroeide planten, dit zou gunstig zijn om de stressreacties van de astronaut tegen te gaan (Xiao, et al., 2019). Uit huidig onderzoek blijkt dat deze antioxidatieve capaciteit significant afneemt wanneer de planten gekweekt worden in ongunstige ruimtecondities, wat wederom het gunstig effect van de planten op de gezondheid van de astronaut gedeeltelijk vermindert. Nitraat heeft een gunstig effect op de bloeddruk doordat het vasodilatatie induceert (Webb et al., 2008; Siervo et al., 2013). De daling van de concentraties nitraat in microgreens na blootstelling aan ruimtecondities zorgt dat ook hier geen voordeel uit kan gehaald worden. Nitraat is de voorloper van nitriet, welke schadelijk is voor de mens doordat deze met aminozuren samen carcinogene nitrosamines vormen (Bedale et al., 2016). De toename van de concentraties nitriet zijn als gevolg behoorlijk ongunstig voor de gezondheid van de astronaut.

Er kan gesteld worden dat de gunstige voedingswaarden van microgreens verminderen na blootstelling aan de verhoogde gammastraling en microgravitеit. Dit in combinatie met het verhoogde watergehalte zorgen ervoor dat de astronaut in de ruimte meer microgreens moet eten om dezelfde nutriënten op te nemen. Het gevolg hiervan is dat er meer energie nodig is om dezelfde nutriënten te verwerken dan wanneer de microgreens onder aardse condities gekweekt zouden zijn. Bijkomend zorgen de grotere porties ook weer voor een toename in de potentieel schadelijke nitrosaminen.

BESLUIT

Microgreens als potentiële voeding voor astronauten: de literatuur speculeert dat microgreens een goede alternatieve bron zijn van voedingstoffen en de gezondheid bevorderen. Op het SCK CEN worden de effecten van micrograviteit en gammastraling op het nutritionele profiel van deze planten onderzocht. De planten die gedurende dit onderzoek bestudeerd werden zijn tarwe, radijs en rode kool. Een vergelijking werd gemaakt tussen de controleplanten en de planten die blootgesteld werden aan gammastralen en/of micrograviteit.

Beide geteste ruimtecondities, gammastralen en micrograviteit, zorgen afzonderlijk en in combinatie voor significante toenames in biomassa en dit bij de drie onderzochte planten. Er zijn aan de andere kant significante afnames in proteïnegehaltes vastgesteld bij tarwe en radijs. De hydrofiele antioxidant fractie neemt significant af bij tarwe onder de drie onderzochte condities, alsook bij de bestraalde rode kool. Dit dalende effect is ook duidelijk zichtbaar bij de twee afzonderlijk bepaalde hydrofiele antioxidanten: anthocyaninen en ascorbaat. De lipofiele fractie kent echter wel een stijging bij rode kool die blootgesteld werd aan gammastralen en een daling bij de aan micrograviteit blootgestelde tarwe. De lipofiele fractie kent geen significante verschillen wanneer de planten blootgesteld worden aan de combinatie van de condities. Tenslotte daalt het chloridegehalte van radijs bij elke conditie en bij tarwe na blootstelling aan de gecombineerde condities. De gammastralen induceren een significante afname van de concentraties nitraat bij de tarwe en rode kool. Blootstelling aan micrograviteit zorgt bij tarwe en radijs voor een significante stijging van de nitrietconcentraties, alsook bij de radijsplanten die blootgesteld werden aan de combinatie van gammastraling en verminderde zwaartekracht.

De antioxidant capaciteit is soort-specifiek, rode kool bevat de hoogste concentraties anthocyaninen. De anthocyaninen zijn kleurpigmenten die de rode kleur van rode kool en radijs vormen, tarwe bevat minimale hoeveelheden anthocyaninen. Ook de zwavelconcentraties zijn soort-specifiek, de rode kool en de radijs behoren tot de plantensoort *Brassicaceae*, welke hoge concentraties thiocyanaten bevatten. In vervolgonderzoek zouden nog andere potentieel interessante planten getest kunnen worden.

Uit dit onderzoek kan geconcludeerd worden dat de microgreens die op aarde een gezonde aanvulling zijn op het dieet, de gunstige nutritionele waarden en bijhorende positieve gezondheidseffecten gedeeltelijk verliezen wanneer deze gekweekt worden in de ongunstige ruimtecondities getest in deze studie (blootgesteld aan gammastralen en micrograviteit). De ruimtecondities verhogen bovendien ook de nitrietconcentraties wat potentieel schadelijk kan zijn. Er kan gesteld worden dat microgreens die gekweekt worden in de ruimte een mindere bijdrage leveren aan de gezonde voeding voor astronauten.

Een volgend verkennend onderzoek kan uitgevoerd worden naar de effecten van micrograviteit en gammastraling op de concentraties mineralen in microgreens. Alsook zou toekomstig onderzoek kunnen dienen voor het verder ontleden van de meest voorkomende lipofiele antioxidant (tocoferol of vitamine E). Het vezelgehalte en de samenstelling van vetten werden in huidig onderzoek niet bepaald, ook deze analyses kunnen het nutritioneel profiel van de microgreens na blootstelling aan de ruimtecondities verder verduidelijken.

LITERATUURLIJST

Abdullah, M., Jamil, R.T., & Attia F.N. (2021) Vitamin C (Ascorbic Acid). Statpearls Publishing. Geraadpleegd op 20 mei 2021 via https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499877/

Ajmera, I., Hodgman, T.C., & Lu C., (2019) An integrative systems perspective on plant phosphate research. Genes 10(2):139. Doi:10.3390/genes10020139

Bedale, W., Sindelar, J.J., & Milkowski, A.L. (2016) Dietary nitrate and nitrite: benefits, risks and evolving perceptions. Meat science 120:85-92. Doi:10.1016/j.meatsci.2016.03.009

Bergouignan, A., Stein, P.T., Habold, C., Coxam, V., O'Gorman, D., & Blanc, S. (2016) Towards human exploration of space: the theseus review series on nutrition and metabolism research priorities. NPJ Microgravity 2 doi:10.1038/npjmgrav.2016.29

Berrazaga, I., Micard, V., Gueugneau, M., & Walrand, S. (2019) The role of the anabolic properties of plant- versus animal-based protein sources in supporting muscle mass maintenance: a critical review. Nutrients. 11(8),1825. doi: 10.3390/nu11081825

Biermans, G., Horemans, N., Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Saenen, E., & Van Hees, M., et al. (2015) Arabidopsis thaliana seedlings show an age-dependent response on growth and DNA repair after exposure to chronic γ-radiation. Environ Exp Bot 109 (0):122-130. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.001

Braeken, E. (2019). Analytische Chemie: Klassieke Analytische Methoden. [Cursus]. Geel: Thomas More, Life sciences & Chemistry, Bachelor in de chemie.

Caverzan, A., Casassola, A., & Brammer, S.P. (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. Genetics and molecular biology 39(1):1-6. Doi:10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109

Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K.K., John, P.J., & Sharma, P. (2013) Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. Indian J Clin Biochem 28(4):314-328. doi:10.1007/s12291-013-0375-3

Choe, U., Yu, L.L., & Wang, T.Y. (2018) The science behind microgreens as an exciting new food for the 21st century. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(44):11519-11530. Doi:10.1021/acs.jafc.8b03096

Daramola, B., & Adegoke, G.O. (2011) Bitter Kola (Garcinia kola) seeds and health management potential. Nuts and seeds in health and disease prevention (25):213-220. Doi:10.1016/B978-0-12-375688-6.10025-8

Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid redox signal. 15(6),1583-1606. doi: 10.1089/ars.2011.39997

Gillespie, M.K., & Ainsworth, A.E. (2007) Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. Nature protocols 2(4)871-874. Doi:10.1038/nprot.2007.101

Herranz, R., Anken, R., Boonstra, J., Braun, M., Christianen, P.C.M., de Geest, M., et al. (2013) Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use and recommended terminology. Astrobiology 13(1):1-17. Doi:10.1089/ast.2012.0876

Hewlings, S., & Kalman, D. (2019) Sulfur and human health. EC Nutrition 14(9):785-791. Geraadpleegd op 21 mei 2021 via https://www.ecronicon.com/ecnu/pdf/ECNU-14-00660.pdf

Huygens, A. (2018) Biochemie. [Cursus]. Geel: Thomas More, Life sciences & Chemistry, Bachelor in de chemie.

Jahangir, M., Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2009) Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. Environ Exp Bot 67 (1):23-33. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.06.007

Kariuki, J., Horemans, N., Saenen, E., Van Hees, M., Verhoeven, M., Nauts, R., et al. (2019) The responses and recovery after gamma irradiation are highly dependent on leaf age at the time of exposure in rice (Oryza sativa L.). Environ Exp Bot 162:157-167. doi:10.1016/j.envexpbot.2019.02.020

Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., & Lim, S.M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food and Nutrition research 61(1):1361779. Doi:10.1080/16546628.2017.1361779

Kiley, J.P., Storz, G., (2004) Exploiting thiol modifications. PLoS Biol. 2(11),e400. doi: 10.1371/journal.pbio.002040

Kiss, J.Z., Wolverton, C., Wyatt, S.E., Hasenstein, K.H., & van Loon, J. (2019) Comparison of microgravity analogs to spaceflight in studies of plant growth and development. Front. Plant Sci. 10:1577. doi: 10.3389/fpls.2019.01577

Kopriva, S., Malagoli, M., & Takahashi, H. (2019) Sulfur nutrition: impacts on plant development, metabolism and stress responses. Journal of experimental botany 70(16):4069-4073. Doi:10.1093/jxb/erz319

Kopsell, D.E., Kopsell, D.A., Sams, C.E., & Barickman, C. (2013) Ratio of calcium to magnesium influences biomass, elemental accumulations and pigment concentrations in kale. Journal of plant nutrition 36(14):2154-2165. Doi:10.1080/01904167.2013.789108

Kyriacou, M.C., De Pascale, S., Kyratzis, A., & Rouphael, Y. (2017) Microgreens as a component of space life support systems: A Cornucopia of functional food. Front Plant Sci 8 (1587). doi:10.3389/fpls.2017.01587

Kyriacou, M.C., Rouphael, Y., Di Gioia, F., Kyratzis, A., Serio, F., Renna, M., et al. (2016) Micro-scale vegetable production and the rise of microgreens. Trends Food Sci Technol 57:103-115. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.005

Lane, W.H., Bourland, C., Barett, A., Heer, M., & Smith, M.S. (2013) The role of nutritional research in the success of human space flight. Adv. Nutr. 4,521-523 (2013) doi: 10.3945/an113004101

Lenzi, A., Orlandini, A., Bulgari, R., Ferrante, A., & Bruschi, P. (2019) Antioxidant and mineral composition of three wild leafy species: a comparison between microgreens and baby greens. Foods 8(10):487. Doi:10.3390/foods8100487

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 4(8),118-126. doi: 10.4103/0973-7847.70902

Lucas-Barbosa, D., van Loon, J.J.A & Dicke, M. (2011) The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. Phytochemistry 72(13): 1647-1654. Doi:10.1016/j.phytochem.2011.03.013

Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., & Panday, R. (2018) Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. Plant nutrients and abiotic stress tolerance 171-190. Doi:10.1007/978-981-10-9044-8_7

Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., & Núnez De Castro, I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical biochemistry 32(8):595-603. Doi:10.1016/S0009-9120(99)00075-2

McAinsh, M.R., & Pittman, J.K. (2008) Shaping the calcium signature. New phytologist 181(2):275-294. Doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02682.x

Milton, K. (2003) The critical role played by animal source foods in human (homo) evolution. The Journal of Nutrition. 133(11): 3886S-3892S. Doi:10.1093/jn/133.11.3886S

Moorthi, R.N., Armstrong, C.L.H., Janda, K., Ponsler-Sipes, K., Asplin, J.R., & Moe, S.M. (2014) the effect of a diet containing 70% protein from plants on mineral metabolism and musculoskeletal health in chronic kidney diseases. American journal of nephrology 40:582-591. Doi:10.1159/000371498

National Aeronautics and Space Administration (2021). Growing plants in space. Geraadpleegd via https://www.nasa.gov/content/growing-plants-in-space

Noctor, G., & Foye,r C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49:249-279. Doi:10.1146/annurev.arplant.46.1.249

Ohkama-Ohtsu, N., & Wasaki, J. (2010) Recent progress in plant nutrition research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. Plant and cell physiology 51(8):1255-1264. doi:10.1093/pcp/pcq095

Oluwafemi, F.A., De La Torre, A., Afolayan, E.M., Olalekan-Ajayi, B.M., Dhital, B., More-Almanza, J.G., et al. (2018) Space food and nutrition in a long term manned mission. Advances in Astronautic Science and Technology 1:1-21. Doi:10.1007/s42423-018-0016-2

Paradiso, V.M., Castellino, M., Renna, M., Gattullo, C.E., Calasso, M., Terzano, R., et al. (2018) Nutritional characterization and shelf-life of packaged microgreens. Food Funct 9 (11):5629-5640. doi:10.1039/c8fo01182f

Pinto, E., Almeida, A.A., Aguiar, A.A., & Ferreira, I. (2015) Comparison between the mineral profile and nitrate content of microgreens and mature lettuces. Journal of food composition and analysis 37:38-43. Doi: 10.1016/j.jfca.2014.06.018

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., et al. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxid Med Cell Longev.. 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763

Pubchem. 2021. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov [website]. Geraadpleegd op 10 april 2021 via https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/FeDipy3_2

Rasheed, F., Markgren, J., Hedengvist, M., & Johansson, E. (2020) Modeling to understand plant protein structure-function relationships – implications for seed storage proteins. Molecules. 25(4),873. doi: 10.3390/molecules25040873

Richard, B., & Gilroy, S. (2017) Life in space isn't easy, even if you are green. The biochemist 39(6)10-13. Doi:10.1042/BIO03906010

Sadeer, N.B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020) The versatility of antioxidant assays in food science and safety – chemistry, applications, strengths and limitations. Antioxidants 9(8):709. Doi:10.3390/antiox9080709

Schieber, M., & Chandel, S.N. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 24(10),R453-R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034

Siervo, M., Lara, J., Ogbonmwan, I., & Mathers, J.C. (2013) Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. The journal of nitrition 143(6):818-826. Doi:10.3945/jn.112.170233

Sims, A.D., & Gamon, J.A. (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote sensing of environment 81(2-3):337-354. Doi:10.1016.S0034-4257(02)00010-X

Singh, U.M., Sareen, P., Sengar, R.S., & Kumar, A. (2013) Plant ionomics: a newer approach to study mineral transport and its regulation. Physiol plant 35: 2641-2653. Doi:10.1007/s11738-013-1316-8

Spinola, V., Mendes, B., Camara, J.S., & Castilho, P.C. (2013) Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. LWT – Food Science and Technology 50(2):731-737. Doi:10.1016/j.lwt.2012.08.020

Treadwell, D., Hochmuth, R., Landrum, L., & Laughlin W. (2010) Microgreens: A new specialty crop. EDIS 2010(3). Geraadpleegd via https://journals.flvc.org/edis/article/view/118552/116475

Tsujimura, M., Higasa, S., Nakayama, K., Yanagisawa, Y., Iwamoto, S., & Kagawa, Y. (2008) Vitamin C activity of dehydroascorbic acid in humans – association between changes in the blood vitamin C concentration or urinary excretion after oral loading. 45(4),315-320. doi: 10.3177/jnsv.54.315

Vanleeuw, E. (2020). Radiochemie: deel 1. [Cursus]. Geel: Thomas More, Life sciences & Chemistry, Bachelor in de chemie.

Vergari, F., Tibuzzi, A., & Basile, G. (2010) An Overview of the Functional Food Market: From Marketing Issues and Commercial Players to Future Demand from Life in Space. Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 698 (p308-321) doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_23

Vercampt, H. (2014). Total antioxidative capacity according to the FRAP assay for plant material [onuitgegeven intern document]. Universiteit Hasselt: Centrum voor milieukunde.

Vieira, L. M., Marinho, L.M.G., Rocha, J.C.G., Barros, F.A.R., & Stringheta P.C. (2019) Chromatic analysis for predicting anthocyanin content in fruits and vegetables. Food Science Technol 39(02). doi:10.1590/fst.32517

Vig, A.P., Rampal, G., Thind, T.S., & Arora, S. (2009) Bio-protective effects of glucosinolates - A review. LWT-Food Sci Technol 42 (10):1561-1572. doi:10.1016/j.lwt.2009.05.023

Wannijn, J. (2021). Standard laboratory protocol: Mineralization of plant material [onuitgegeven intern document]. SCK CEN.

Waterland, N.L., Moon, Y., Tou, J.C., Kim, M.J., Pena-Yewtukhiw, E.M., & Park, S. (2017) Mineral content differs among microgreen, baby leaf, and adult stages in three cultivars of kale. Hortscience 52(4):566-571. Doi:10.21273/HORSCI11499-16

Watford, M., & Wu, G. (2018) Protein. Adv. Nutr. 9,651-653. doi: 10.1093/advances/nmy027

Webb, A.J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S. et al. (2008) Acute blood pressure lowering, vasoprotective and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertension 51:784-790. Doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523

Wojdylo, A., Nowicka, P., Tkacz, K., & Turkiewicz, I.P. (2020) Sprouts vs. Microgreens as Novel Functional Foods: Variation of Nutritional and Phytochemical Profiles and Their In vitro Bioactive Properties. Molecules 25 (20):19. doi:10.3390/molecules25204648

Wyatt, S.E., Rashotte, A. M., Shipp, M.J., Robertson, D., & Muday, G.K. (2002) Mutations in the gravity persistence signal loci in Arabidopsis disrupt the perception and/or signal transduction of gravitropic stimuli. Plant Physiol 130(3):1426-1435. Doi:10.1104/pp.102.010579

Xiao, Z., Rausch, S.R., Luo, Y., Sun, J., Yu, L., Wang, Q. et al. (2019) Microgreens of Brassicaceae: genetic diversity of phytochemical concentrations and antioxidant capacity. LWT – Food Science and Technology 101:731-737. Doi: 10.1016/j.lwt.2018.10.076

Xiao, Z., Lester, E. G., Luo, Y., & Wang, Q. (2012) Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: edible microgreens. J. Agric. Food Chem. 60(31),7644-7651. Doi.org/10.1021-jf300459b

Young, V.R., & Pellet, P.L. (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. The American Journal of Clinical Nutrition 59(5) 1203S-1212S doi:10.1093/ajcn/59.5.1203S

Yunjeong, K., & Min-Gul, K. (2016) HPLC-UV method for the simultaneous determinations of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in human plasma. Transl Clin Pharmacol.24(1):37-42. Doi:10.12793/tcp.2016.24.1.37

BIJLAGEN

BIJLAGE 1

Protocol Kjeldahl
Protocol voor de bepaling van het massapercentage organisch gebonden stikstof (%N).

- Er worden vier biologische herhaling gedaan van elk staal.

- Bij de oogst worden verse stalen van +-1g afgewogen waarna deze gedroogd worden in de droogstoof (60°C, 4dagen). De gedroogde stalen hebben massa's van +-100mg.

- De stalen worden overgebracht in de destructiebuizen, de massa wordt hierbij bepaald doormiddel van verschilweging.

- Bij elke meting wordt een blanco en een controlestandaard mee gemeten. Er wordt 0,2g van de acetanilidestandaard op 0,0001g nauwkeurig afgewogen en de blanco destructiebuis bevat geen staal noch standaard.

- Vervolgens wordt in elke destructiebuis 8,0g kaliumsulfaat (K_2SO_4) en een spatelpunt kopersulfaat ($CuSO_4.5H_2O$) toegevoegd.

- Wanneer de automatische destructieblok een temperatuur van 380°C bereikt, wordt 20mL zwavelzuur (95%) toegevoegd aan elke destructiebuis met behulp van een dispenser. De destructie vindt nu plaats gedurende 2uur. In het geval van lege plaatsen worden deze opgevuld met lege destructiebuizen.

- Wanneer de destructie afgerond is worden de buizen afgekoeld tot kamertemperatuur.

- Vooraf de stoomdestillaties wordt een cleaning-cyclus uitgevoerd op het destillatietoestel (Gerhardt). De buizen worden één na één bevestigd in het toestel en er wordt automatisch 80mL van een NaOH-oplossing (33%m/m) toegevoegd. De destillatietijd van het toestel bedraagt 9minuten, de watertoevoer wordt volledig open gezet en er dient gecontroleerd te worden dat het demiwaterreservoir nog voldoende demiwater bevat en dat het reservoir van NaOH gevuld is.

- Het destillaat wordt opgevangen in een erlenmeyer van 600mL waarin 100mL boorzuuroplossing (4%) zit.

- De laatste stap is de titratie met dosimat buret en een potentiometrische opvolging doormiddel van een pH-elektrode. Er wordt getitreerd met een HCl-oplossing (0,100M). Aan de hand van de toegevoegde volume HCl-standaardoplossing op het equivalentiepunt, kan het massapercentage Kjeldahl-stikstof bepaald worden uitgedrukt in %N (FW). De volumes worden gecorrigeerd met de blancometingen en de recovery van de acetanilidestandaard wordt bepaald.

Noot: bewerking van Braeken, E. (2019). Analytische Chemie: Klassieke Analytische Methoden. [Cursus]. Geel: Thomas More, Life sciences & Chemistry, Bachelor in de chemie.

BIJLAGE 2

Protocol FRAP
Protocol voor de bepaling van de totale antioxidatieve capaciteit (µmol Trolox equivalenten/g FW).

- Er worden 4 biologische en 2 technische herhalingen uitgevoerd per staal.

Aanmaak extractiemiddel en reagentia:

Extractiemedium (0,01N NaOH-oplossing met 1mM Na-EDTA)

- Stockoplossing (100x) 100mM Na-EDTA:
  Los 39,9971mg NaOH op in ultrapuur water en leng aan tot 10mL met NaOH (1M).
  Breng 2mL van deze oplossing in een beker van 50mL.
  Voeg 1,861g Na-EDTA toe en leng aan tot 50mL.

- Neem een erlenmeyer van 500mL en breng hierin een kleine hoeveelheid ultrapuur water.
- Voeg hieraan toe: 813µL HCl (38%) en 5mL van de stockoplossing (pH +-1.7).

Trolox standaard oplossing (100mM) – dagelijks vers aanmaken

- Weeg +-10mg trolox af in een tube van 1,5mL.
- Deel deze afgewogen massa door 25,029: dit is de hoeveelheid ethanol (mL) die toegevoegd moet worden.
- Verdun de trolox standaard oplossing 100x (1mM).
- Maak volgende standaardreeks aan zoals weergegeven in Tabel 4 (1/1): leng telkens aan met extractiebuffer (tussendoor goed homogeniseren)

Tabel 4. De aanmaak van de standaardreeks Trolox.

µM Trolox	nmol Trolox/well
1000	50
500	25
250	12,5
125	6,25
62,5	3,125
32,25	1,5625
15,625	0,78125
0	0

FRAP reagens:

A. 1mL TPTZ oplossing (100mM) – bewaren op -80°C
- Weeg +-31mg TPTZ af in een tube van 1,5mL.
- Deel deze afgewogen massa door 31,234: dit is de hoeveelheid HCl (40%) (mL) die toegevoegd moet worden.

B. 1mL $FeCl_3$ oplossing (200mM) – bewaren op -80°C
- Weeg +-32mg $FeCl_3$ af in een tube van 1,5mL
- Deel deze afgewogen massa door 32,442: dit is de hoeveelheid ultrapuur water (mL) die toegevoegd moet worden.

C. Na-azijnzuur buffer (100mL) – bewaren op 4°C
- Voeg 329µL azijnzuur (CH_3COOH) en 820mg Na-azijnzuur samen, breng pH tussen 3.6-4.
- Leng aan tot 100mL.

Protocol:
1. Extractie stalen:

- De ingevroren stalen (+-100mg) worden met een kogelmolen fijngemaakt door toevoegen van drie beats (3min, 30Hz).
- Voeg 1mL extractiemedium toe aan de stalen, homogeniseer en laat de stalen ontdooien op kamertemperatuur (+-20min). Zet de stalen hierna op ijs.
- Centrifugeer de stalen (30min,15000g,4°C)
- Breng 750µL over in een nieuwe tube 1,5mL: dit is de hydrofiele fractie.
- De overgebleven pellet ondergaat een wasstap door toevoegen van 1mL extractiemedium. Dit geheel wordt gehomogeniseerd, gecentrifugeerd (10min, 15000g, 4°C) en vervolgens wordt het supernatans verwijderd.
- De pellet wordt vervolgens gesuspendeerd in 1mL aceton (80%v/v).
- Dit wordt gedurende 1uur geïncubeerd en vervolgens gecentrifugeerd (15min,15000g,4°C).
- Breng 750µL over in een nieuwe tube 1,5mL: dit is de lipofiele fractie.

2. Aanbrengen op de 96-well plaat:

- Zet de 96-well plaat op ijs met een laagje aluminiumfolie tussen, dit houdt de denaturatie en verdamping tegen.
- Pipetteer de stalen en standaarden op de plaat:
  standaarden: 50µL
  hydrofiele stalen: 5µL staal + 45µL extractiemedium (1/10 verdunnig)
  lipofiele stalen: 10µL staal + 40µL extractiemedium (1/5 verdunning)
- Haal de 96-well plaat nu van het ijs, de reacties gaan sneller door op kamertemperatuur.
- Maak het FRAP reagens: Breng in een tray (voor multichannel) 150µL TPTZ-oplossing (100mM), 150µL $FeCl_3$-oplossing (200mM) en 17,6mL Na-azijnzuur buffer.
- Voeg 150µL FRAP reagens toe aan elke well met een multipipet.
- Een blauwe kleuromslag zou moeten plaatsvinden.

3. Incuberen: Incubeer gedurende 10 minuten op kamertemperatuur.

4. Meting: Meet de absorbantie bij een golflengte van 593nm.

Noot: bewerking van Vercampt, H. (2014). Total antioxidative capacity according to the FRAP assay for plant material [onuitgegeven intern document]. Universiteit Hasselt: Centrum voor milieukunde.

BIJLAGE 3

Protocol ascorbinezuur
Protocol voor de bepaling van het totale en gereduceerde AA (µmol/g FW).

- Er worden 4 biologische uitgevoerd per staal.

Reagentia:

- TCA (6%w/v) – bewaren op kamertemperatuur
- TCA (10%w/v) – bewaren op kamertemperatuur
- DTT (10mM) – bewaren op ijs
- NEM (0,5%w/v) – bewaren op ijs
- H_3PO_4 (43%v/v) – bewaren op kamertemperatuur
- $FeCl_3$ (3%w/v) in TCA (10% w/v) – bewaren op kamertemperatuur
- α-α'-bipyridiyl (4%w/v) in ethanhol (70%v/v) – bewaren op ijs
- fosfaatbuffer 75mM, pH7.0 (K_2HPO_4/KH_2PO_4) – bewaren op kamertemperatuur
- natrium-L-ascorbaat standaard: 0.15-10mM in TCA (6% w/v)- bewaren op ijs

Protocol:

1. Extractie stalen:

- De ingevroren stalen (+-100mg) worden met een kogelmolen fijngemaakt door toevoegen van drie beats (3min,30Hz).
- Voeg 1mL TCA (6%w/v) toe aan de stalen, homogeniseer.
- Centrifugeer de stalen (30min,15000g,4°C)
- Breng minstens 400µL extract over in een nieuwe tube van 1,5mL – op ijs bewaren.
  (200µL nodig per assay: 100µL voor het totale AA en 100µL voor het gereduceerd AA)

2. Assay:

totaal AA	gereduceerd AA
100µL fosfaatbuffer (75mM) 200µL standaard, staal of blanco (TCA 6%w/v)	100µL fosfaatbuffer (75mM) 200µL standaard, staal of blanco (TCA 6%w/v)
100µL DTT (10mM) incuberen gedurende 10minuten 100µL NEM (0,5% w/v) minstens 30 seconden incuberen	200µL demiwater
500µL TCA (10%w/v) 400µL H_3PO_4 400µL α-α'-bipyridiyl (4%w/v) 200 µL $FeCl_3$ (3%w/v)	500µL TCA (10%w/v) 400µL H_3PO_4 400µL α-α'-bipyridiyl (4%w/v) 200 µL $FeCl_3$ (3%w/v)

3. Incuberen:

- Homogeniseren en incuberen gedurende 1uur op 37°C.

4. Aanbrengen op de 96-well plaat:

- Breng van elke standaard, staal en blanco 200µL aan op een 96-well plaat.

5. Meting:

- Meet de absorbantie bij een golflengte van 525nm.

Noot: bewerking van Gillespie, M.K., & Ainsworth, A.E. (2007) Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. Nature protocols 2(4)871-874. Doi:10.1038/nprot.2007.101

BIJLAGE 4

Protocol mineralen
Protocol staalvoorbereiding voor de bepaling van mineralen via ICP-MS.

- Er worden 3 biologische uitgevoerd per staal.

Protocol:

- Bij de oogst worden verse stalen van +-1g afgewogen in vooraf getarreerde vials.

- De stalen worden gedroogd in de droogstoof op 60°C, gedurende één week.

- Hierna worden de stalen verast in de moffeloven. Vervolgens wordt 1,5mL HCl (37%v/v) toegevoegd en op een zandbad geplaatst tot het staal volledig droog is.

- Het staal wordt vervolgens nogmaals in de moffeloven verbrand omdat niet al het plantmateriaal verast is omwille van de grote hoeveelheden.

- Hierna wordt 1mL HCl (1M) toegevoegd en aangelengd tot 10mL met gedemineraliseerd water. De massa's van de stalen in oplossing worden opnieuw bepaald om zo het correcte volume te kennen.

- Vervolgens worden de stalen met behulp van een spuitfilter in een tube van 10mL gebracht.

- De mineralen kunnen bepaald worden met behulp van de ICP-MS.

Noot: bewerking van Wannijn, J. (2021). Standard laboratory protocol: Mineralization of plant material [onuitgegeven intern document]. SCK CEN.

BIJLAGE 5

Protocol anionen
Protocol staalvoorbereiding voor de bepaling van de verschillende anionen via IC.

- Er worden 4 biologische uitgevoerd per staal.

Protocol:

- De ingevroren stalen (+-100mg) worden met een kogelmolen fijngemaakt door toevoegen van drie beats (3min, 30Hz).

- Er wordt 10mL warm water toegevoegd aan de stalen.

- Daarna worden de stalen 2uur op een verwarmd ultrasoonbad (80°C) geëxtraheerd.

- Vervolgens worden de stalen gecentrifugeerd (15min, 15000g) en het extract gepipetteerd in een nieuwe tube van 10mL met behulp van een spuitfilter.

- De anionen worden bepaald met behulp van de ionenchromatograaf.

BIJLAGE 6

De volledige samenstelling van de Hoagland oplossing wordt weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5. De aanmaak van de Hoagland oplossing.

Macro elementen	**g/2L**
KNO3	20,4
Ca(NO3)2.4H2O	14,16
MgSO4.7H2O	9,8
Fosfaatoplossing	
NH4H2PO4	4,6
Ijzeroplossing	
FeSO4.7H2O	1,9
Na2-EDTA.2H2O	1,25
Micro elementen	
H3BO3	2,86
MnCl2.4H2O	1,81
CuSO4.5H2O	0,08
H2MoO4	0,09
ZnSO4.7H2O	0,22

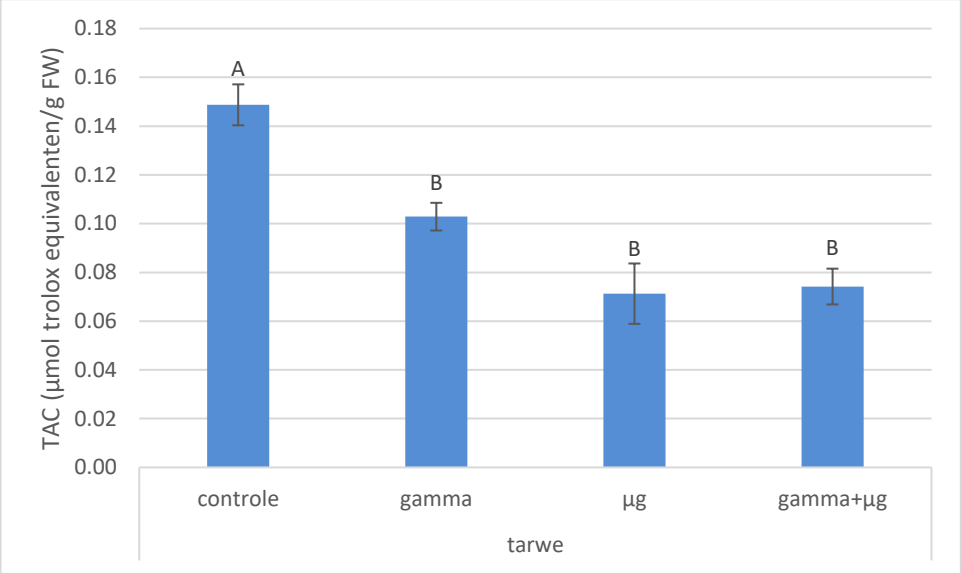
De aanmaak van 10L Hoagland oplossing (1/10) wordt weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6. De aanmaak van de Hoagland (1/10) oplossing.

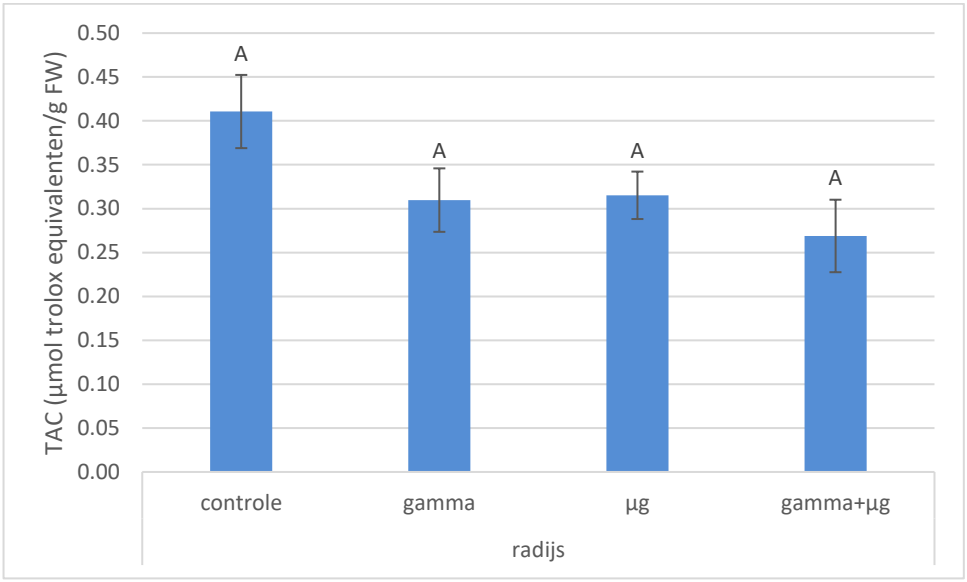
Macro elementen	100 mL
fosfaat-oplossing	50 mL
ijzer-oplossing	0,6 mL
micro elementen	1 mL

BIJLAGE 7

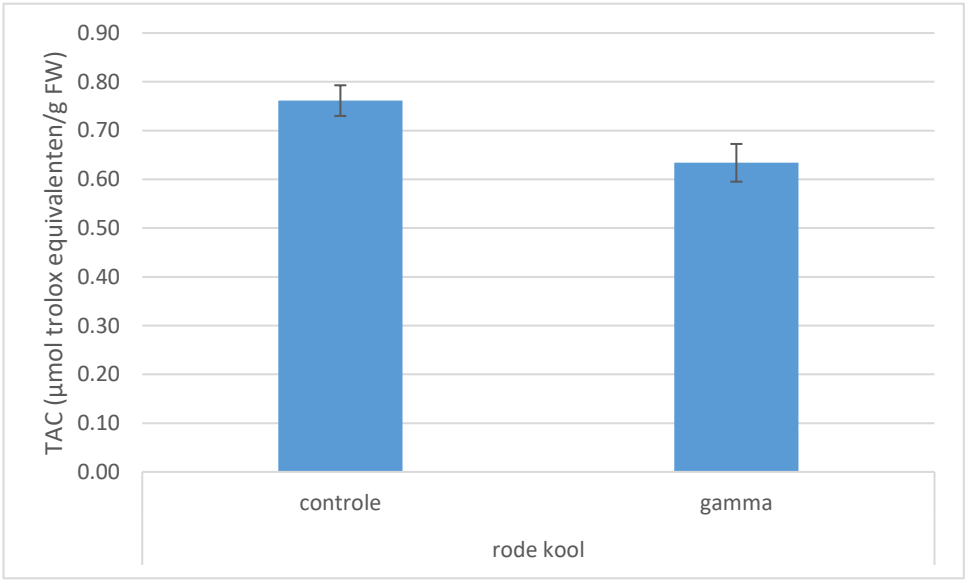
De vergelijking van de totale antioxidant capaciteit tussen de verschillende condities bij de drie microgreen soorten wordt weergegeven in Figuur 36, Figuur 37 en Figuur 38.



Figuur 36. Vergelijking van de afname van de totale antioxidant capaciteit bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



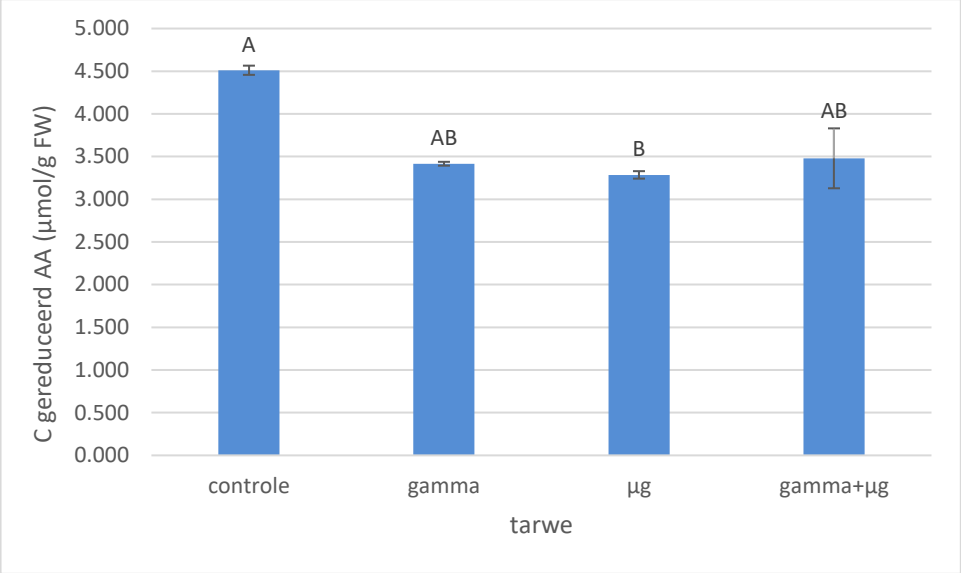
Figuur 37. Vergelijking van de afname van de totale antioxidant capaciteit bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan microgravitеit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen ee significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



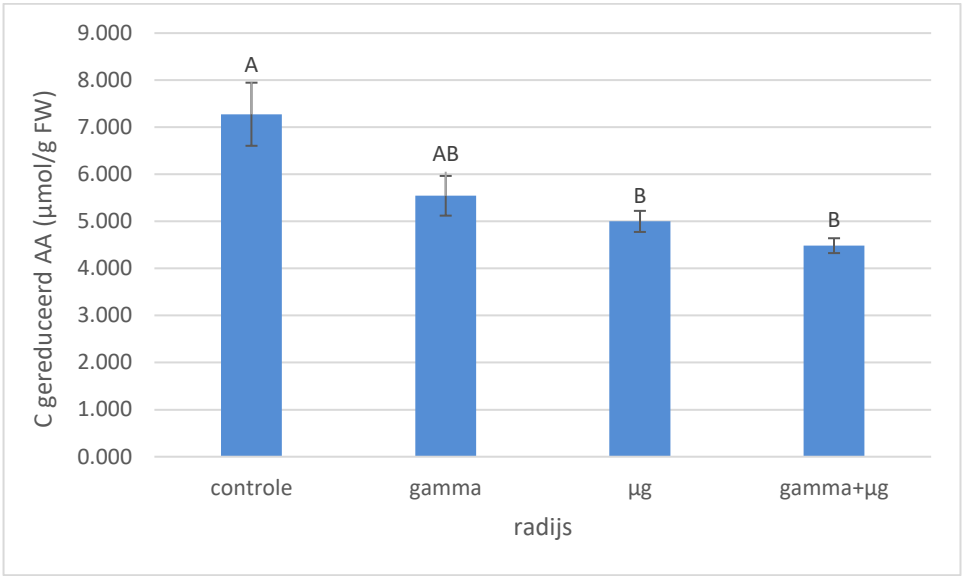
Figuur 38. Vergelijking van de afname van de totale antioxidant capaciteit bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle en blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

BIJLAGE 8

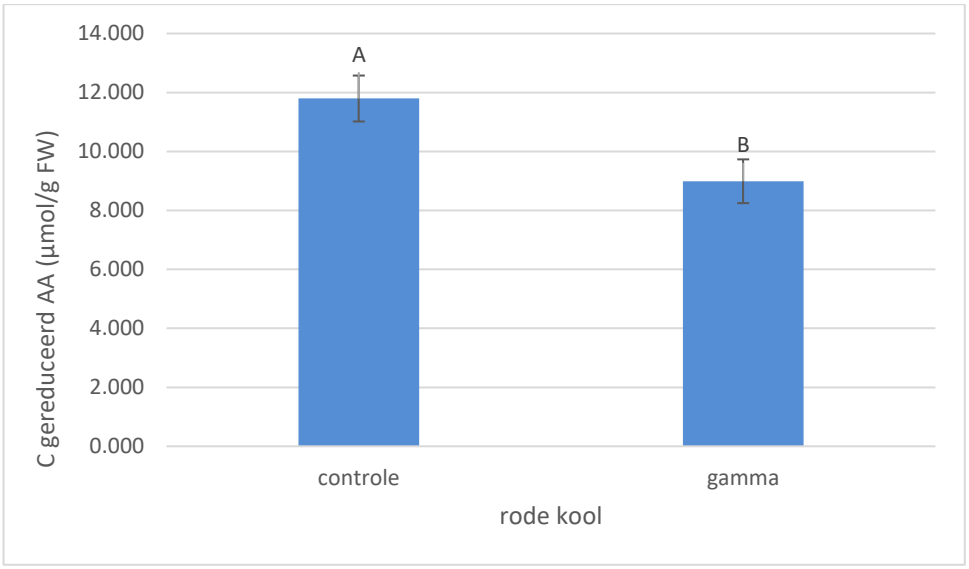
De vergelijking van het gereduceerde ascorbaat tussen de verschillende condities bij de drie microgreen soorten wordt weergegeven in Figuur 39, Figuur 40 en Figuur 41.



Figuur 39. Vergelijking van de afname van de concentratie gereduceerd ascorbinezuur bij 1-week oude tarwe tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan micrograviteit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Kruskal-conover-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



Figuur 40. Vergelijking van de afname van de concentratie gereduceerd ascorbinezuur bij 1-week oude radijs tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen, blootstelling aan micrograviteit en blootstelling aan een combinatie van beide (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4, n(µg)=4 en n(gamma+µg)=4).



Figuur 41. Vergelijking van de afname van de concentratie gereduceerd ascorbinezuur bij 1-week oude rode kool tussen de verschillende condities: controle, blootstelling aan gammastralen (±SE). De verschillende letters tonen een significant verschil aan tussen de condities (Tukey-test, p<0,05, n(control)=4, n(gamma)=4).

BIJLAGE 9

Het dosisdebiet wordt gemeten met dosimeters op een afstand van 2,5meter van de bron. Er worden zes metingen uitgevoerd ter hoogte van de planten, voor- en achteraan de box, gedurende 60minuten. Het gemiddelde wordt genomen omdat er een verschil zit tussen het gemeten dosisdebiet voor- en achter aan de boxen. Doordat de RPM roteert zit er weinig verschil tussen de metingen op deze boxen. Het gemiddelde dosisdebiet bedraagt 13,2 mSv/u. Deze meetresultaten worden weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7. De meetresultaten van de dosimeters, voor- en achteraan de bestraalde boxen.

Dosimeter	**Positie**	**H*(10) (mSv)**	**Meetonzekerheid (mSv)**
21	RPM 13 (voor)	13,3	1,9
22	RPM 13 (achter)	13	1,9
23	box (voor)	14,7	1,9
24	box (achter)	12,3	2,3
25	RPM 19 (voor)	13,5	1,9
26	RPM 19 (achter)	12,6	1,9