Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Instituut voor Agrotechnologisch Onderzoek

Koude verzoeting in aardappelen: relatie met het oogsttijdstip seizoen '95 - '96

Ir. M.P. van Hoof

Vertrouwelijk

ato-dlo



Rapport B263 / april 1997

2223434

Voorwoord

Door ATO-DLO is de laatste jaren veel onderzoek gedaan naar de langdurige bewaring van aardappelen. Dit heeft onder andere geresulteerd in een wiskundig beschrijvend model, dat in staat is het suikerverloop in de knollen in de tijd te beschrijven (FAVIM : Fysiologie Aardappel Verzoeting In Model). Ook is uit onderzoek gebleken dat het afrijpingsstadium van invloed is op het bewaargedrag. Als er een parameter gevonden kan worden, dat het afrijpingsstadium van de aardappelknol kan karakteriseren, dan schept dit mogelijkheden om het FAVIM-model van beschrijvend naar voorspellend te maken. Dit onderzoek is uitgevoerd om deze rijpheids-afhankelijke parameter te vinden.

In dit rapport wordt verslag gedaan van de periode 1-3-'96 tot 1-3-'97 van dit onderzoek, waaraan hebben meegewerkt : Ing PS Hak, Drs MLATM Hertog en Dr J Oosterhaven.

Michiel van Hoof

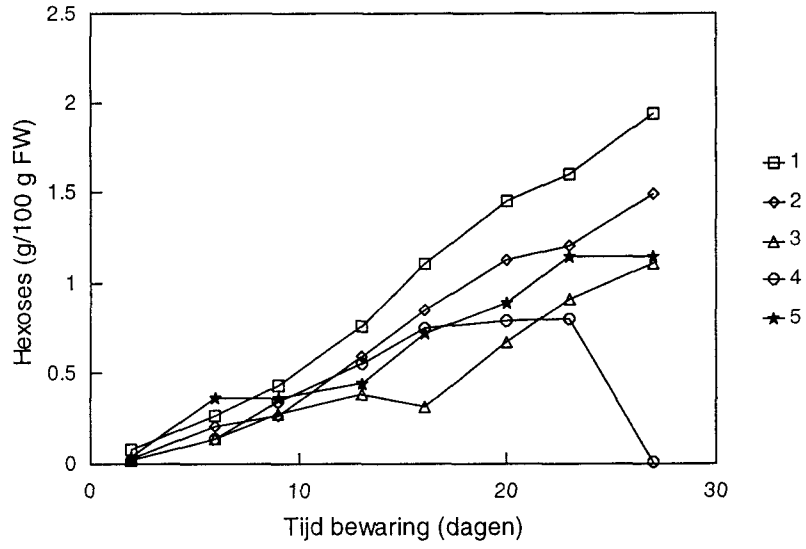
Inhoudsopgave

		pagina
1	Inleiding	1
2	Materiaal en methoden	8
3	Resultaat en discussie	10
4	Conclusies	23
5	Literatuur	26
6	Protocollen	30
7	Bijlagen	44

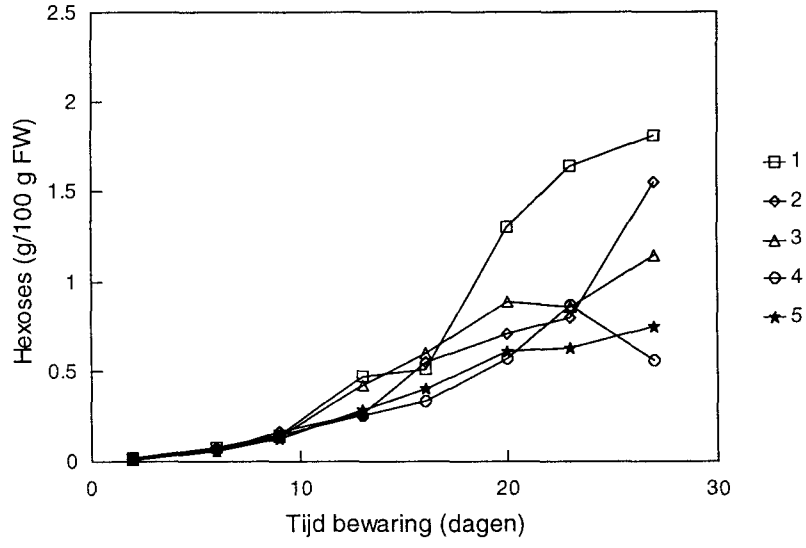
1 Inleiding

Koudeverzoeting

Koudeverzoeting is een verschijnsel dat in verschillende delen van hogere planten kan optreden als gevolg van blootstelling aan lage temperaturen. Ook in aardappelen is het een bekend verschijnsel. Door aardappelen na de oogst te bewaren bij lage temperaturen (lager dan 7°C) ontstaan in de knol, als reaktie op de kou, vrije suikers (figuur 1 en 2). De bron van deze suikers is zetmeel dat wordt afgebroken tot sucrose (58). Sucrose wordt vervolgens gesplitst in glucose en fructose. Deze laatste twee suikers, ook wel hexoses of reducerende suikers genoemd, zijn verantwoordelijk voor de ongewenste bruinverkleuring van de aardappel tijdens het bakken. De



Figuur 1. Accumulatie van hexoses in Bintje na temperatuurstoot van 2°C (zonder wondheelperiode). Verklaring getallen oogstmoment zie tabel 1.

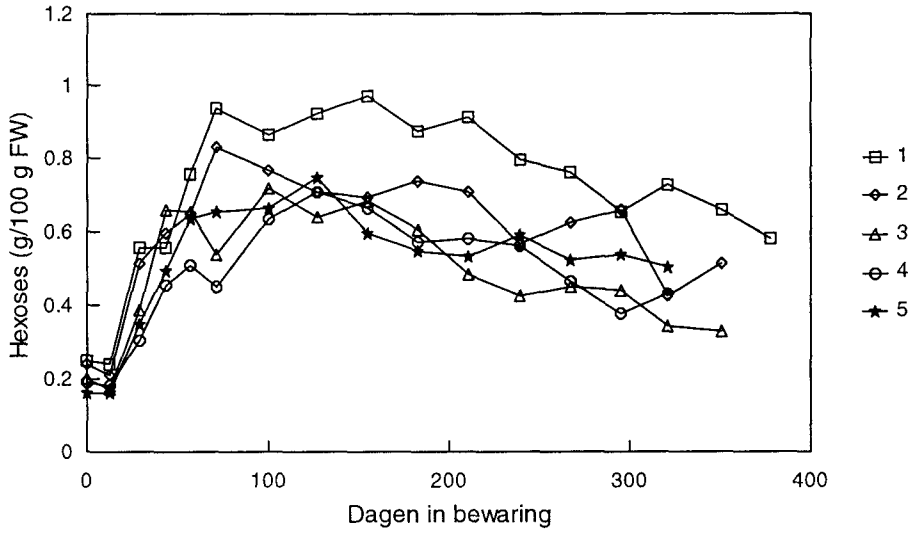


Figuur 2. Accumulatie van hexoses in Agria na temperatuurstoot van 2°C (zonder wondheelperiode). Verklaring getallen oogstmoment zie tabel 1.

ontwikkeling van een bruine kleur tijdens het bakken is het gevolg van reakties tussen vrije aminozuren en reducerende suikers (Maillard-reactie). De mate van bruinkleuring hangt af van de in de aardappel aanwezige hoeveelheid hexoses en niet van de hoeveelheid aminozuren (ATO-onderzoek). De mechanismen verantwoordelijk voor de koudeverzoeting zijn nog niet verklaard op een moleculair niveau. De productie van suikers als gevolg van kou is zeker niet het gevolg van één enkele factor, maar het gevolg van verschillende op elkaar inwerkende metabole gebeurtenissen (47).

Rijpheid

Uit ATO -DLO onderzoek van de afgelopen jaren is naar voren gekomen dat er grote verschillen bestaan in koudeverzoeting tijdens de bewaring tussen de verschillende jaren. Er zijn duidelijk aanwijzingen verkregen dat deze verschillen in suikerophoping tijdens de bewaring bepaald worden door de mate van afrijping van de knollen (19, 21, 22, 23,43). Dit is goed te zien in figuur 3. De gevormde hoeveelheid hexoses tijdens de bewaring bij 4°C is afhankelijk van het oogstmoment. Vroeg geoogst materiaal kan tot twee keer zo veel hexoses bevatten dan latere oogsten bij 4°C bewaring.



Figuur 3: Accumulatie van reducerende suikers bij de bewaring van Bintje bij 4°C tijdens het bewaarseizoen 1995-1996. Verklaring getallen oogstmoment zie Tabel 1.

Er zijn verschillende pogingen gedaan om de rijpheid van een aardappelknol te karakteriseren. Traditioneel wordt er met de duim over de schil gewreven om zo de sterkte van de schil te bepalen. Deze schilsterkte is een maat voor de rijpheid van de knol. Dit is echter geen kwantitatieve methode en bovendien nogal afhankelijk van wie de bepaling uitvoert. Er is wel geprobeerd om deze schilbepaling verder te optimaliseren (20, 29), maar het gaat hier vooral om de schilzetting na een vast oogsttijdstip enkele weken te volgen.

FAVIM-model

Bij ATO-DLO is een mathematisch model ontwikkeld (FAVIM, Fysiologie AardappelVerzoeting In Model) dat in staat is de verzoeting van aardappelen tijdens de bewaring te beschrijven. Dit model kan 95% van het bewaargedrag van aardappelen achteraf verklaren (21, 23). Het model gaat uit van het concept dat de staat van rijpheid op het oogsttijdstip het bewaargedrag van aardappelen bepaald. Deze rijpheid of fysiologische leeftijd van aardappelknollen wordt bepaald

door omgevingsfactoren (zoals weer en bemesting) en het oogstmoment. Er is een rijpheidsfactor gepostuleerd (En_{cold}), die alle factoren betrokken bij de fysiologische rijpheid van de aardappelknol (groeiseizoen, oogstmoment) terugbrengt tot één factor. Deze rijpheidsfactor tijdens het oogstmoment bepaalt het bewaargedrag door de hoeveelheid enzym (of enzymsystemen) dan aanwezig in de knol. Mogelijk is niet één enzym verantwoordelijk voor deze rijpheidsfactor. Het is ook mogelijk dat bijvoorbeeld metabolitenniveaus of een niet-enzymatisch eiwit (inhibitor van enzymaktiviteit) in aardappelknollen een belangrijke rol spelen. Als deze seizoensafhankelijke factor gemeten wordt aan het begin van het bewaarseizoen, dan kan de verzoeting en daarmee de bakkleur van de aardappelen bij iedere temperatuur gedurende het hele bewaarseizoen voorspeld worden (19, 21, 36).

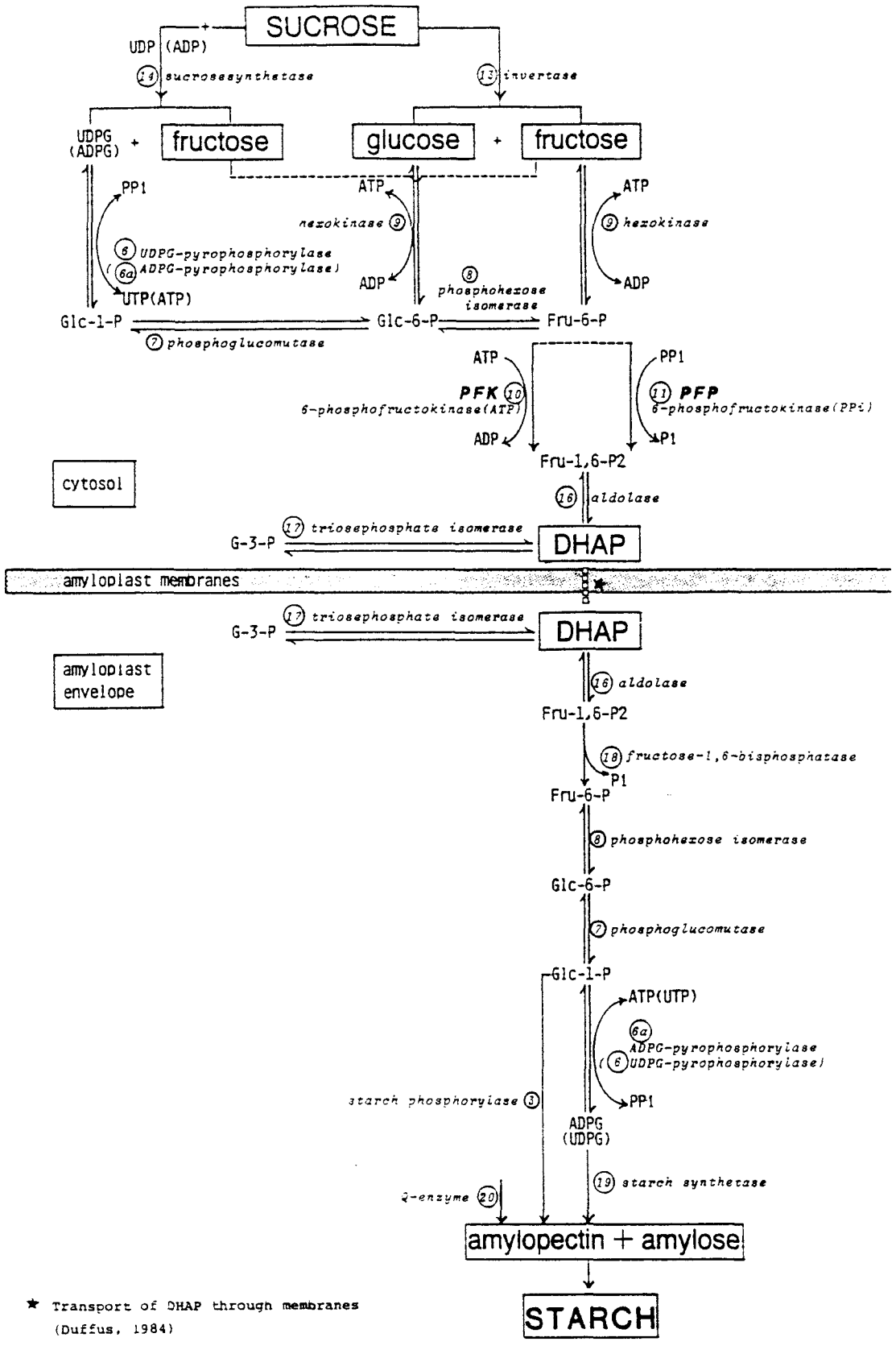
Doelstelling

Het doel van dit onderzoek is het vinden van de rijpheidsafhankelijke parameter zoals gepostuleerd in het FAVIM-model. Dit gebeurt door verschillende enzymen betrokken bij het koolhydraatmetabolisme van de aardappel te meten op 3 momenten (doodspuiten loof, oogst, einde wondheelperiode) en 5 oogsttijdstippen. Er ontstaat zo een beeld van de enzymniveaus in de aardappelknol voordat de bewaring begint. Verschillen in enzymniveaus tussen de verschillende oogsttijdstippen kunnen zo gekoppeld worden aan suikeraccumulatie gedurende de bewaring bij verschillende temperaturen. Ook kan de overgang van de aardappelknol van 'sink' (zetmeelopslag) naar 'source' (zetmeelafbraak) bestudeerd worden op enzymniveau.

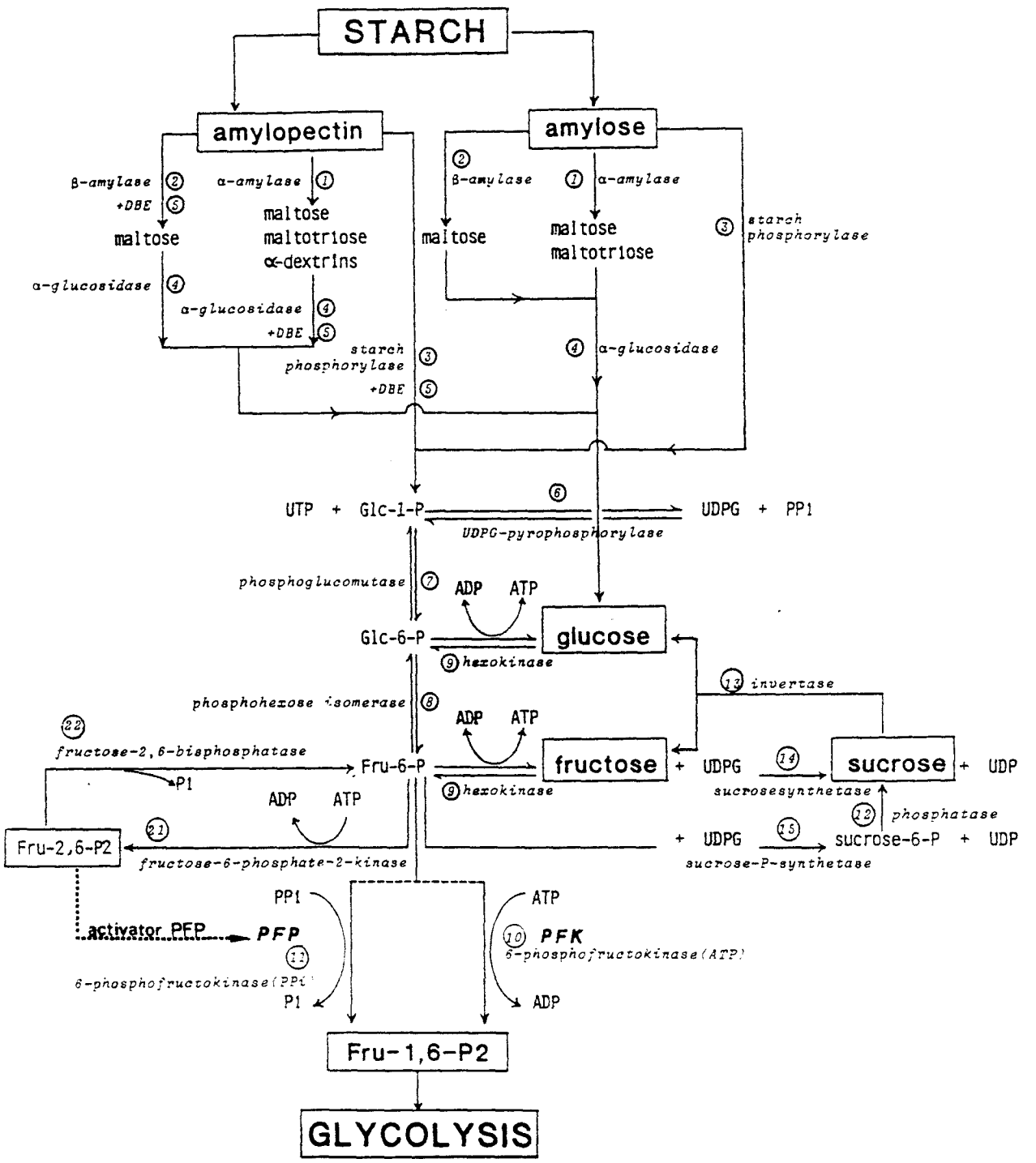
Zetmeel - synthese en afbraak

De rijpheidsafhankelijke parameter is gepostuleerd als een enzym of enzymsysteem in aardappel. Om deze parameter (En_{cold}) te vinden, is het logisch om te kijken naar verschillende enzymen direct betrokken bij de zetmeelsynthese en zetmeelafbraak. Een overgang van zetmeelopslag (sink) naar zetmeelafbraak (source) in de knol zal zich vertalen in verschillende enzymaktiviteiten *in vivo*. Figuur 4 laat schematisch de zetmeelsynthese in een aardappelknol zien, figuur 5 de zetmeelafbraak. Er zijn enkele enzymen uit deze routes gekozen, waarvan verwacht kan worden dat ze een rol spelen bij de koudeverzoeting en vooral bij de overgang van sink naar source. Van deze enzymen zal de aktiviteit op de drie momenten voor vijf verschillende tijdstippen gemeten worden om zo meer inzicht te krijgen in de overgang van sink naar source en de invloed van het oogsttijdstip hierop.

Tijdens de groei van aardappels wordt het door de plant gevormde sucrose naar de knol getransporteerd. In de knol wordt sucrose eerst gesplitst tot monosacchariden en daarna in de amyloplast omgezet tot zetmeel (figuur 4). Voor het koolhydraatmetabolisme van aardappels zijn de enzymen sucrose synthase en invertase belangrijk. Deze twee enzymen zijn verantwoordelijk voor de sucrosesplitsing tot monosacchariden in aardappel. Algemeen wordt aangenomen dat sucrose synthase verantwoordelijk is voor de splitsing van sucrose tijdens de zetmeelsynthese en invertase tijdens de hydrolyse van zetmeel (33, 44).
Een ander belangrijk enzym is UDPG-pyrophosphorylase. Door middel van antisense constructen is de UDPG-pyrophosphorylase aktiviteit in aardappel gereduceerd. Het blijkt dat de hoeveelheid sucrose in de knollen korrelleert met de aktiviteit van UDPG-pyrophosphorylase (2, 51). ADPG-pyrophosphorylase daarentegen blijkt een belangrijke rol te spelen bij de zetmeelvorming in de knol. Antisense uitschakelen van dit enzym levert knollen op die het vermogen tot zetmeelvorming verloren hebben. De suikergehaltes van deze knollen is bij de oogst al extreem hoog (35). ADPG-pyrophosphorylase is wel de snelheidsbepalende stap in de zetmeelsynthese gebleken. Door transformatie van aardappelen met een extra, bacterieel ADPG-PP-gen stijgt de zetmeelproductie van de knollen met gemiddeld 35% (52).



Figuur 4. Schematisch overzicht van de zetmeelsynthese in aardappel (13)



Figuur 5. Schematisch overzicht van de zetmeelafbraak in aardappel (13)

Legenda figuur 4 en 5. Namen en afkortingen (13)

Enzymen		
No. In figuur	Naam	EC nummer
1	α-amylase	3.2.1.1
2	β-amylase	3.2.1.2
3	starch phosphorylase	2.4.1.1
4	α-glucosidase	3.2.1.20
5	DBE (debranching enzyme)	3.2.1.10
6	UDPG-pyrophosphorylase	2.7.7.9
6a	ADPG-pyrophosphorylase	2.7.7.27
7	phosphoglucomutase	5.4.2.5
8	phosphohexose isomerase	5.3.1.9
9	hexokinase	2.7.1.1
10	PFK = ATP-PFK 6-phosphofructokinase (ATP)	2.7.1.11
11	PFP = PPi-PFK 6-phosphofructokinase (Ppi) (Pyrophosphate-D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase)	2.7.1.90
12	phosphatase	3.1.3.24
13	invertase	3.2.1.26
14	sucrose synthase	2.4.1.13
15	sucrose-phosphate-synthase	2.4.1.14
16	aldolase	4.1.2.13
17	triosephosphate isomerase	5.3.1.1
18	fructose-1,6-biphosphatase	3.1.3.11
19	starch synthase (UDPG)	2.4.1.11
20	starch synthase (ADPG)	2.4.1.21
21	fructose-6-phosphate 2-kinase	2.7.1.105
22	fructose-2,6-biphosphatase	3.1.3.46
Afkortingen		
ADP	adenosine 5'-difosfaat	
ADPG	adenosine 5'-difosfaat glucose	
ATP	adenosine 5'-difosfaat	
DHAP	dihydroxyaceton fosfaat	
Fru-6-P	fructose 6-fosfaat	
Fru-1,6-P2	fructose 1,6-difosfaat	
Fru-2,6-P2	fructose 2,6-difosfaat	
G-3-P	glyceraldehyde 3-fosfaat	
Glc-1-P	glucose 1-fosfaat	
Glc-6-P	glucose-6-fosfaat	
Pi	orthofosfaat (anorganisch)	
Ppi	pyrofosfaat (anorganisch)	
UDP	uridine 5'-difosfaat	
UDPG	uridine 5'-difosfaat glucose	
UTP	uridine 5'-trifosfaat	

Sucrose fosfaat synthase katalyseert de reaktie van UDP-glucose en fructose-6-fosfaat tot sucrose fosfaat en UDP. Deze reaktie kan een belangrijke rol spelen bij de koudeverzoeting in aardappelen (40). Sowokinos concludeert dat SPS aktiviteit stijgt tijdens bewaring bij lage temperaturen en dat SPS aktiviteit lineair is met de glucose concentratie in de knol voor verschillende cultivars (47).

De belangrijkste enzymen bij de afbraak van zetmeel tot vrije suikers zijn α-amylase, β-amylase, α-glucosidase en starch phosphorylase. De aktiviteit van deze enzymen zal ook worden onderzocht.

Futile cycle

Als er in aardappelknollen netto zetmeelsynthese plaatsvindt, wordt er gelijktijdig een deel van dit zetmeel weer afgebroken. Deze cyclus tussen polymeren en monomeren staat bekend als de 'futile cycle' (15, 58). Deze energetisch ongunstige situatie wordt sterk gereguleerd door metabolieten en allostere effectoren (fosforylatie). Betrokken enzymen bij deze futile cycle zijn onder andere neutrale invertase, sucrose synthase (14) en sucrose-fosfaat synthase (11). Door het bestaan van deze cycle kan de aardappelknol snel reageren op kleine veranderingen van de substraten en producten van deze reakties.

2 Materiaal en methoden

Algemeen

Er zijn twee rassen betrokken bij dit onderzoek, namelijk Agria en Bintje. Beide rassen hebben ook een rol gespeeld bij de ontwikkeling van het beschrijvende model. Van beide rassen zijn op drie momenten monsters genomen; tijdens het doodspuiten van het loof, tijdens de oogst en na de wondheelperiode (curing). Tussen deze momenten zat telkens veertien dagen. Op vijf verschillende tijdstippen, met tussenperioden van veertien dagen, werd materiaal geoogst. In totaal resulteerde dit in 15 monsters per ras (tabel 1). De monsters zijn voorbewerkt, gevriesdroogd en opgeslagen voor verdere analyse.

TABEL 1. Data-overzicht codering en monstername Bintje en Agria

	Bintje				Agria		
	11100	doodspuiten loof	1-8-95		21100	doodspuiten loof	15-8-95
1	11200	oogsttijdstip	15-8-95	1	21200	oogsttijdstip	29-8-95
	11400	einde curing	28 **2**-8-95		21400	einde curing	11-9-95
	12100	doodspuiten loof	15-8-95		22100	doodspuiten loof	29-8-95
2	12200	oogsttijdstip	29-8-95	2	22200	oogsttijdstip	12-9-95
	12400	einde curing	11-9-95		22400	einde curing	25-9-95
	13100	doodspuiten loof	29-8-95		23100	doodspuiten loof	12-9-95
3	13200	oogsttijdstip	12-9-95	3	23200	oogsttijdstip	26-9-95
	13400	einde curing	25-9-95		23400	einde curing	9-10-95
	14100	doodspuiten loof	12-9-95		24100	doodspuiten loof	26-9-95
4	14200	oogsttijdstip	26-9-95	4	24200	oogsttijdstip	10-10-95
	14400	einde curing	9-10-95		24400	einde curing	23-10-95
	15100	doodspuiten loof	26-9-95		25100	doodspuiten loof	10-10-95
5	15200	oogsttijdstip	10-10-95	5	25200	oogsttijdstip	24-10-95
	15400	einde curing	23-10-95		25400	einde curing	6-11-95

Extractie gevriesdroogde aardappelmonsters

De extractie van gevriesdroogde aardappelmonsters is gebaseerd op het voorschrift volgens Claassen *et al* (6). De gebruikte buffer was Tris of Hepes, pH 7,0. Bij extractie voor het zure invertase assay is een citraat-buffer gebruikt met een pH van 4,5. Alle handelingen van de extractie zijn uitgevoerd op ijs of bij 4°C. Het vermengen van het gevriesdroogd poeder met de extractiebuffer is uitgevoerd onder een constante stikstofstroom om bruinverkleuring ten gevolg

van oxidatiereakties te voorkomen.

Eiwitbepalingen

Bepaling van de hoeveelheid eiwit in ruw enzym-extract zijn uitgevoerd volgens het protocol (zie protocollen) en gebaseerd op de handleiding van de fabrikant (Pierce).

Zetmeelafbrekende enzymen

Assays voor α-amylase, β-amylase en α-glucosidase zijn uitgevoerd volgens Cochrane *et al*. (7) gebruik makend van de Ceralpha en Betamyl kits van Megazyme, Australië. Starch phosphorylase aktiviteitsassay is voornamelijk uitgevoerd als beschreven in Steup (53). Belangrijkste verschil met Steup is dat het enzymassay ontkoppeld is. Eerst wordt de enzymreaktie uitgevoerd, daarna volgt een bepaling van de hoeveelheid gevormd product (glucose-1-fosfaat).

Sucrose synthase

Het sucrose synthase assay is uitgevoerd volgens Copeland (9) en aangepast voor microplatereader analyse. De enzymaktiviteit wordt gemeten in de richting van sucroseafbraak en de bepaling van het gevormde UDP-glucose wordt bepaald in een microtiterplaat. Belangrijk is om géén Tris-buffer te gebruiken voor het assay, omdat Tris de aktiviteit van sucrose synthase kan remmen (9). Het assay is uitgevoerd bij 30°C.
De gevonden resultaten voor sucrose synthase zijn door de grote aktiviteitsverschillen van sucrose synthase in de monsters niet altijd linerair met de tijd en de enzymconcentratie. Het assay is verbeterd door kort (tot 30 minuten) het assay in te zetten bij 25°C in plaats van 30°C. De vermelde resultaten , uitgevoerd volgens het protocol (zie protocollen), geven wel een goede indicatie over het verloop van de sucrose synthase aktiviteit in de monsters.

Invertase

Zure invertase wordt, in tegenstelling tot neutrale invertase, in aktiviteit geremd door de in aardappel aanwezige inhibitor. Om deze inhibitor onwerkzaam te maken, moet het enzymextract enkele minuten 'gefoamed' worden. Tris-buffer is een sterke inhibitor van neutrale invertase en moet niet gebruikt worden voor extractie of assay (9). Het assay is gebaseerd op Zrenner *et al.* (59). De producten van de enzymreactie (glucose/fructose) zijn enzymatisch bepaald met gebruik van een microtiterplaatlezer en een Boehringer testkit.

Sucrose fosfaat synthase

Assay is uitgevoerd op basis van Takahata *et al.* (54). De methode is gebaseerd op de kleurreaktie met resorcinol.

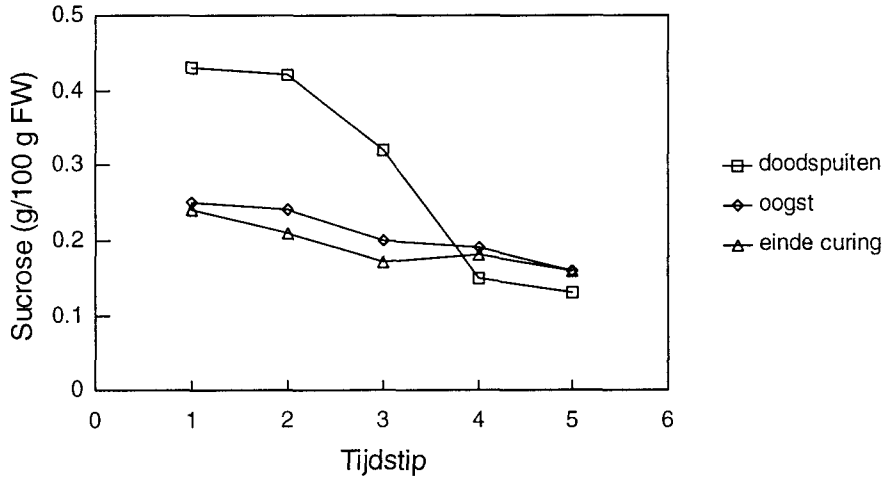
UDP-glucose pyrofosforylase

Het assay (zie protocollen) is afkomstig van Sigma. Het is niet geoptimaliseerd voor de gevriesdroogde aardappelmonsters, maar de eerste pilot-experimenten lieten wel enzymaktiviteit zien. Het nadeel van dit assay is dat er 'on line' gemeten moet worden in een spectrofotometer uitgerust met een thermostaat.

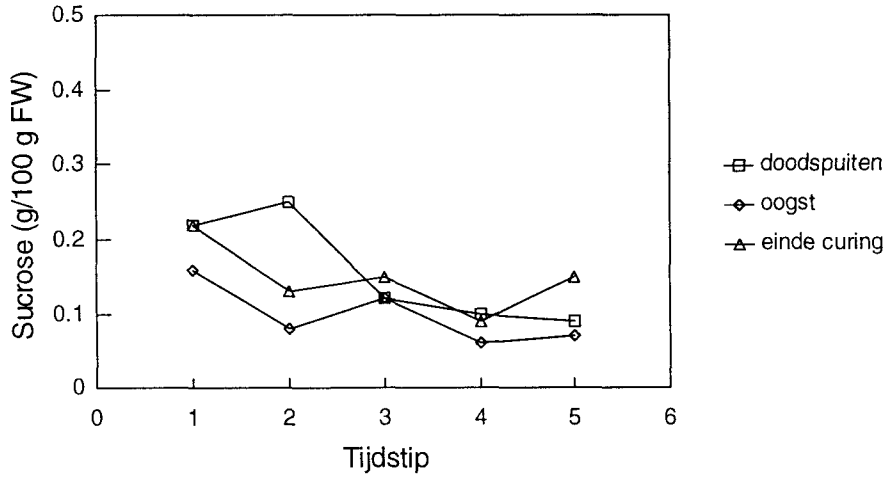
3 Resultaat en discussie

Suikergehalte

Van de gevriesdroogde aardappelmonsters zijn de initïele suikergehaltes bepaald op het moment van doodspuiten, oogst en na de wondheelperiode (figuur 6, 7, 8 en 9). Op het moment van doodspuiten van het gewas kan de knol, zeker bij de vroege tijdstippen, gezien worden als sink. Er zal aktief zetmeelopslag plaatsvinden in de knol. Er is een sucroseflux van de (groene) plant naar de knol. Deze sucroseflux zal afnemen naarmate het gewas langer op het veld staat door natuurlijke afsterving of als het gewas gedood wordt. In een aktieve sink-knol is het hexosegehalte laag (<0,05 g/100g FW) (figuur 8 en 9, moment doodspuiten). Na twee weken, op het moment van oogst, zijn de hexosegehaltes in de knol nog steeds laag.
Het sucrosegehalte op het moment van doodspuiten is het hoogst bij vroege tijdstippen en neemt geleidelijk af (figuur 6 en 7, moment doodspuiten). Dit resultaat komt overeen met een afnemende sucroseflux naar de knol naarmate het gewas langer op het veld staat (natuurlijke afrijping).

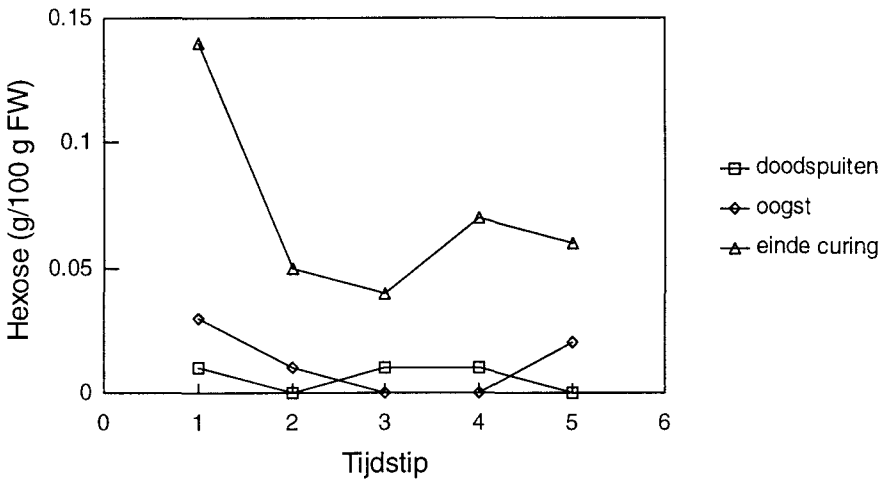


Figuur 6. Initiële sucrosegehalten Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

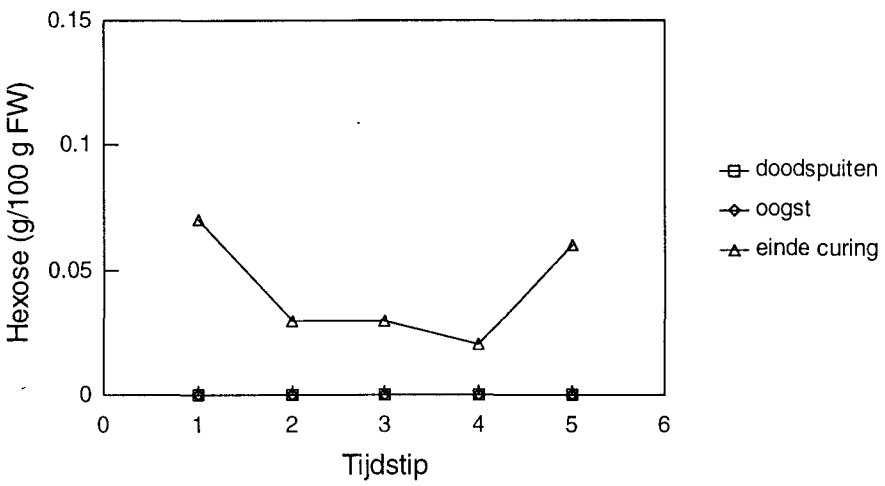


Figuur 7. Initiële sucrosegehalten Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

Op het oogstmoment is het hexosegehalte in de aardappelknol nog steeds laag. Na de wondheelperiode neemt de hexosehoeveelheid in de knol voor alle tijdstippen toe. Dit is een aanwijzing dat de knol tijdens de wondheelperiode hexoses is gaan vormen en van zetmeelopslag is overgegaan naar zetmeelafbraak. De grootste hoeveelheid hexose werd gevonden in vroeg materiaal om vervolgens af te nemen tot een minimum bij tijdstip 3 (Bintje) en 4 (Agria). Daarna is een stijging van het hexosegehalte te zien.
De sucrosegehaltes op het oogstmoment en na de wondheelperiode zijn voor Bintje rond de 0,2 g/100 g FW. Voor Agria liggen deze waarden iets lager.



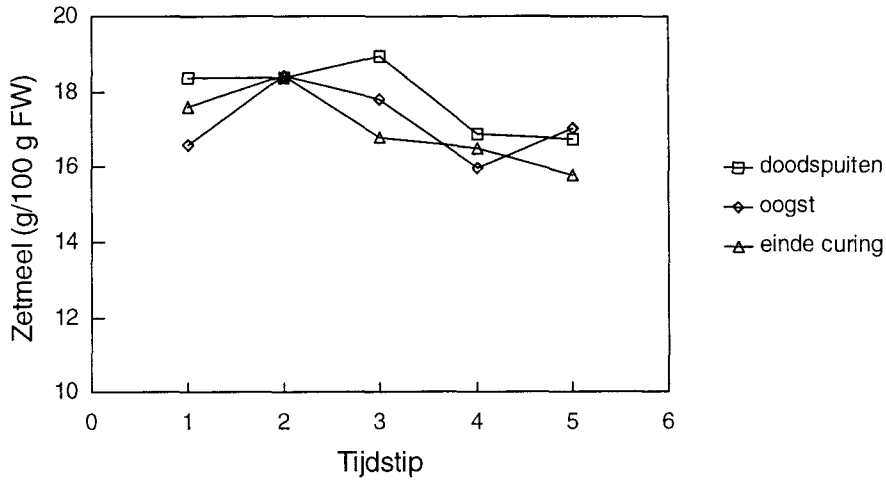
Figuur 8. Initiële hexosegehalten Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



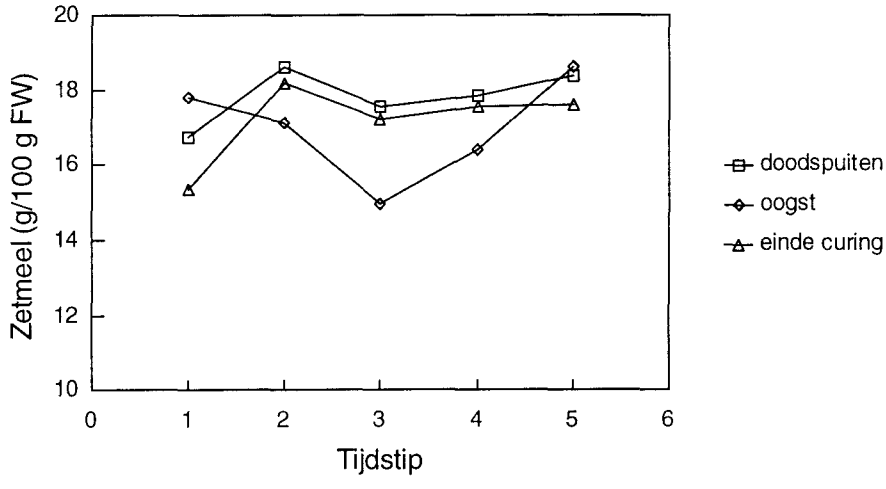
Figuur 9. Initiële hexosegehalten Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

Zetmeelgehalte

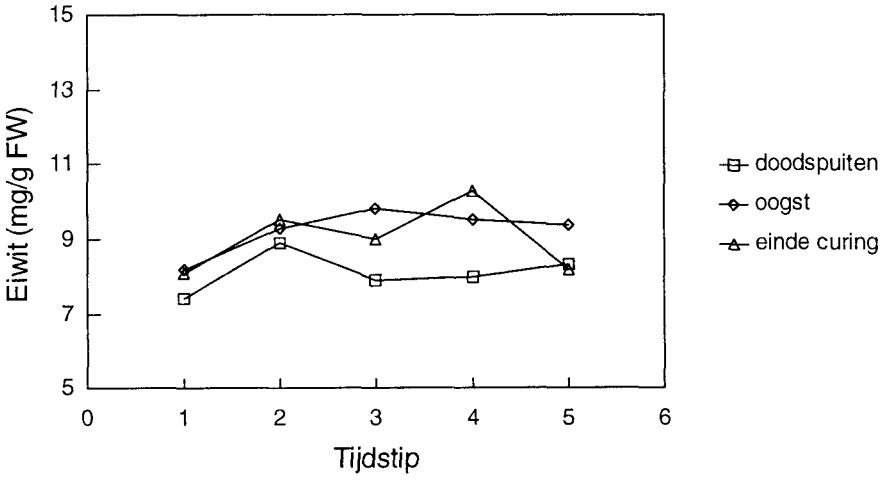
Het zetmeelgehalte van de knollen schommelt tussen de 16% en 19% (figuur 10 en 11). Dit zijn normale waarden voor aardappel. Omdat de hoeveelheid zetmeel zo hoog is, is van de gemeten verschillen eigenlijk niets te zeggen. De hoeveelheid zetmeel die omgezet wordt in suiker is niet nauwkeurig te meten (17% van het versgewicht van aardappel is zetmeel en maar 0.5% oplosbaar suiker).



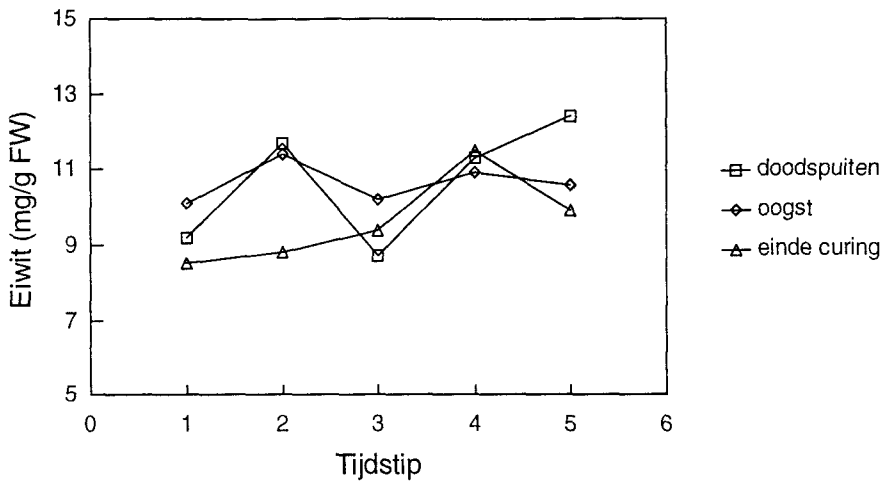
Figuur 10. Zetmeelgehalte Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



Figuur 11. Zetmeelgehalte Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



Figuur 12. Eiwitgehalte gevriesdroogde monsters Bintje na neutrale extractie. Verklaring tijdstippen: Tabel 1.



Figuur 13. Eiwitgehalte gevriesdroogde monsters Agria na neutrale extractie. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

Eiwitgehalte

Het gehalte extraheerbaar eiwit met de gebruikte methode en een neutrale extractiebuffer (zie protocollen) is voor Bintje tussen de 7,5 en 10,5 mg/g FW en voor Agria tussen de 8,5 en 12,5 mg/g FW (Figuur 12 en 13).

Zetmeelafbrekende enzymen

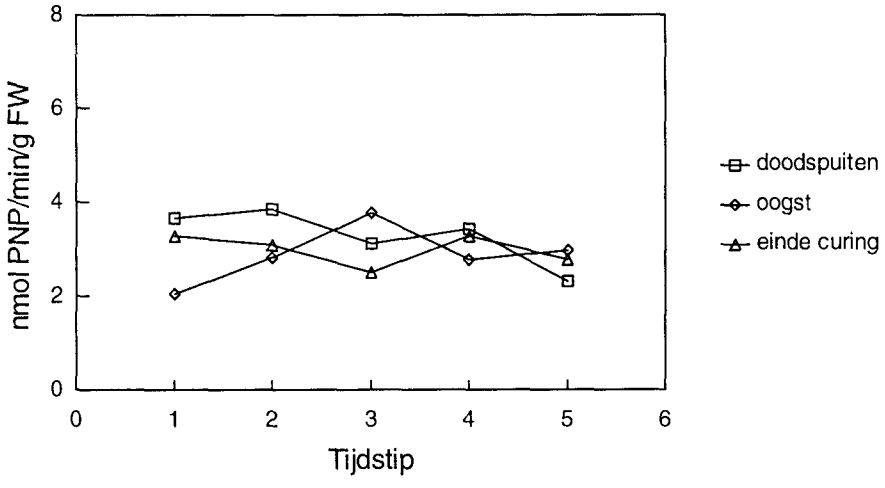
De bron van de suikers die ontstaan als reaktie op lage temperaturen, is zetmeel. Zetmeel kan worden afgebroken door verschillende enzymen (zie fig 5). De belangrijkste enzymen voor de mobilisatie van zetmeel zijn:

- α-amylase (endoamylase) : hydrolyse van α-1,4-verbonden oligo- of polyglucanen. Amylose afbraak levert maltose, glucose en oligoglucanen op. Afbraak van amylopectine levert dezelfde producten op plus vertakte oligosacchariden.
- β-amylase (exoamylase) : Hydrolyse van α-1,4-verbindingen van amylose en amylopectine. Met amylopectine stopt de hydrolyse bij α-1,6 verbindingen. Producten zijn maltose en vertakte oligosacchariden.
- α-glucosidase : splitst maltose en andere oligosacchariden tot glucose
- α-1,4- glucan phosphorylase (starch phosphorylase) : Vorming van glucose-1-fosfaat van amylose en orthofosfaat.

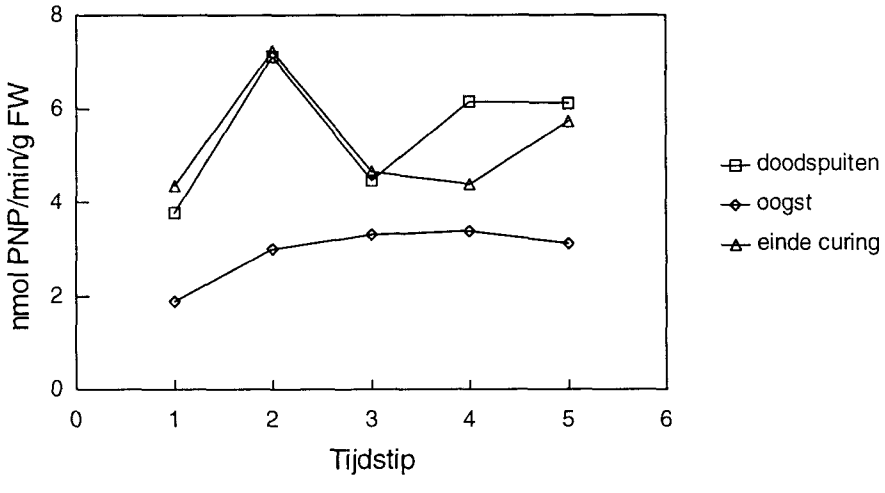
Er zijn veel tegenstrijdige berichten over de rol van amylases en phosphorylases bij de zetmeelafbraak in aardappelen (8, 10, 46). Davies (12) concludeert hieruit dat dit deels te wijten is aan de verschillende manieren van extracties en aktiviteitsmetingen van amylases. Verder meldt Davies dat er weinig overtuigend bewijs is dat zetmeelafbraak in aardappelknollen gepaart gaat met aanzienlijke verhogingen van amylase of phosphorylase aktiviteiten (12, 58). Dit impliceeert een andere vorm van regulering van de zetmeelafbraak dan door alleen de enzymniveaus. Een mogelijkheid voor deze regulering is bijvoorbeeld compartimentalisatie van een enzym of substraat. Dit is gevonden voor starch phosphorylase (4). Een andere

mogelijkheid is dat de enzymaktiviteit gecontroleerd wordt door een specifieke inhibitor, zoals dit beschreven is voor invertase. In bataat (sweet potato) is bekend dat β-amylase kan optreden als inhibitor van starch phosphorylase (38). Of dit ook in aardappel speelt is onbekend.
Er zijn in de literatuur wel meldingen van verhoogde amylaseaktiviteiten in aardappel tijdens de bewaring (8, 10). Ook zijn deze amylaseaktiviteiten hoger naarmate de aardappels bij lagere temperaturen bewaard worden. Een dergelijk effect is ook beschreven voor α-glucosidase (8, 34).

De enzymaktiviteiten van α-amylase liggen voor cv. Bintje tussen 2 en 4 en voor cv. Agria tussen 2 en 7 nmol PNP gevormd per gram versgewicht per minuut (figuur 14 en 15). Dit komt overeen met eerder gevonden waarden voor α-amylase-aktiviteit in aardappel rond het

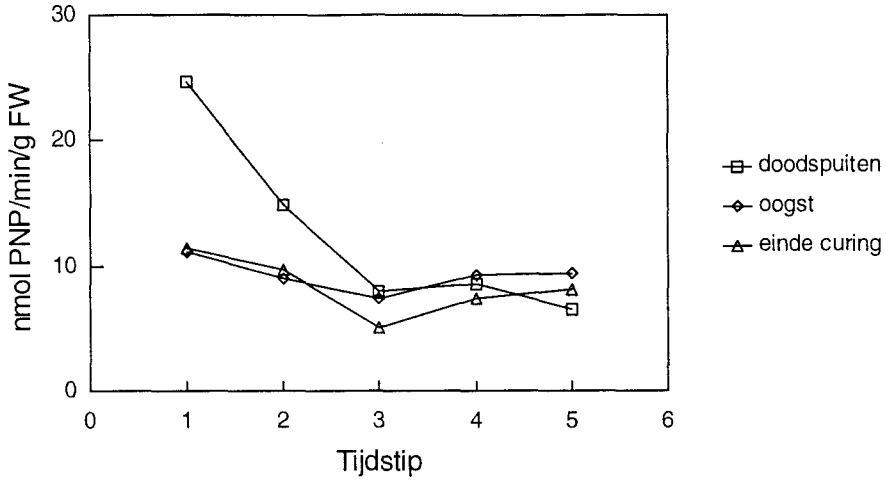


Figuur 14. Alfa-amylase aktiviteit in Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

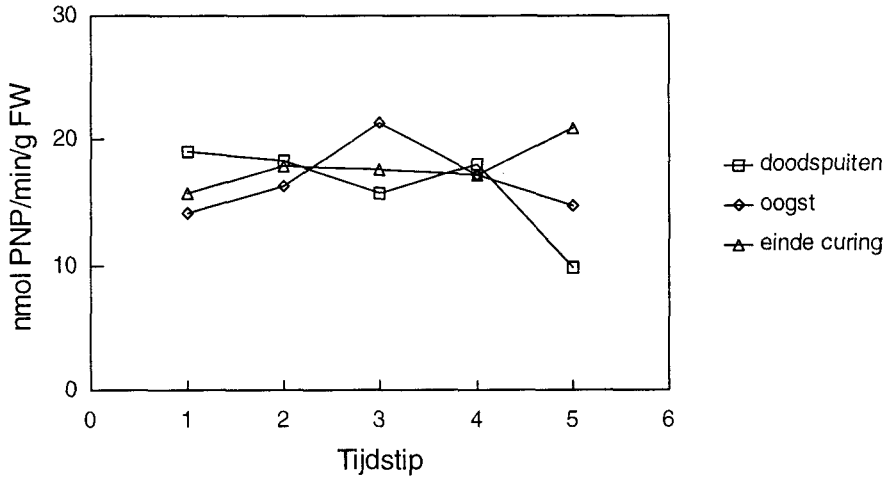


Figuur 15. Alfa-amylase aktiviteit in Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

oogsttijdstip (8, 10). Opvallend bij de resultaten van α-amylase is dat voor cv. Agria de aktiviteiten bij oogst lager liggen dan die bij doodspuiten en na de wondheling, terwijl die laatste twee momenten erg veel overeenkomst vertonen. Er is geen duidelijk verband te leggen tussen de gemeten hoeveelheid α-amylase aktiviteit en de overgang van de aardappelknol van sink naar source. Ook een relatie tussen oogstmoment en aktiviteit is niet direct zichtbaar.



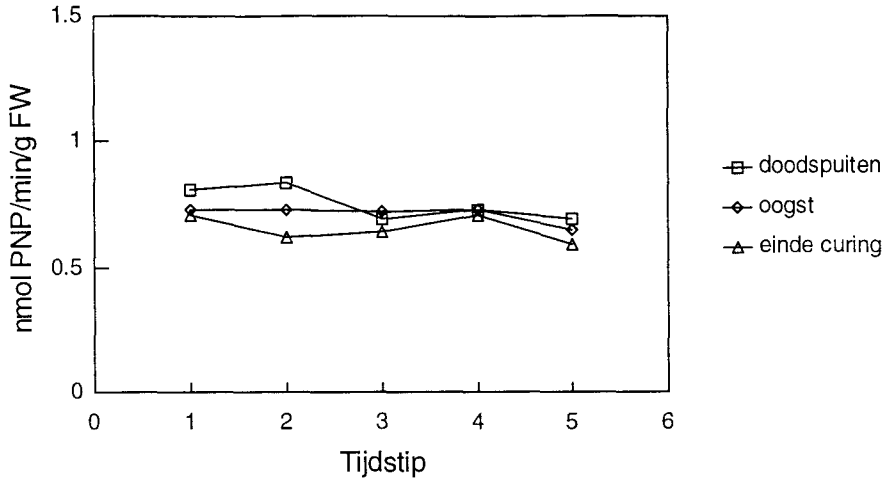
Figuur 16. Beta-amylase aktiviteit in Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



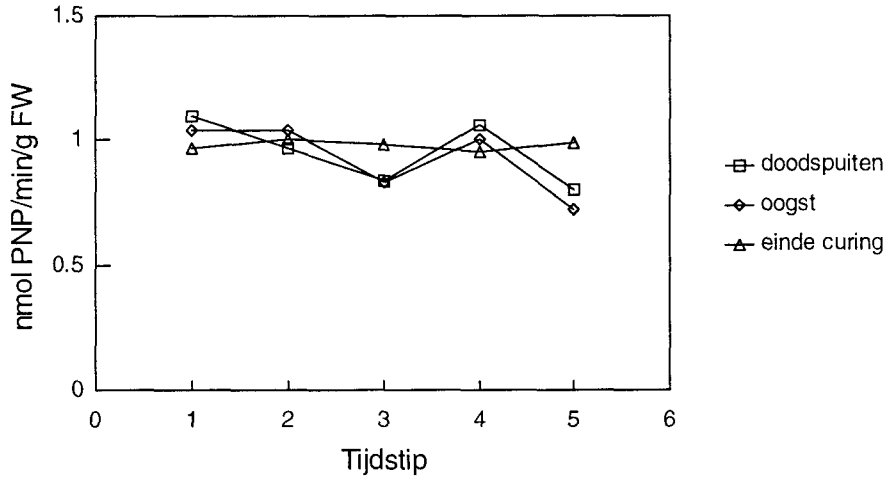
Figuur 17. Beta-amylase aktiviteit in Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

β-amylase. De aktiviteit van β-amylase ligt tussen 5 en 25 nmol PNP/g FW.min en is daarmee aanzienlijk hoger dan die van α-amylase (figuur 16 en 17). De gevonden waarden komen overeen met literatuurwaarden van β-amylase aktiviteit in aardappel rond het moment van oogst (8, 10). Tijdens de bewaring van aardappels bij lage temperaturen kan de aktiviteit van β-amylase echter oplopen tot 100 nmol PNP/g FW.min (10).
De β-amylase aktiviteit in Bintje op het moment van doodspuiten is in vroeg materiaal hoog en loopt terug naarmate de knollen later worden doodgespoten. Dit effect is niet duidelijk te zien bij Agria, hoewel hier het laatste tijdstip een daling van de aktiviteit laat zien. Op de momenten van oogst en na de wondheelperiode zijn de aktiviteiten van β-amylase vergelijkbaar en zijn er geen verschillen tussen vroeg en laat materiaal.

α-glucosidase. De aktiviteiten van α-glucosidase blijven vrijwel constant voor de drie momenten en de 5 tijdstippen, waarbij de aktiviteit in Agria iets hoger ligt dan die in Bintje (figuur 18 en 19). De gevonden aktiviteiten liggen lager (0,75 tot 1 nmol PNP/g FW.min) dan eerder gevonden aktiviteiten (2 tot 3 nmol PNP/g FW.min) (8).



Figuur 18. Alfa-glucosidase aktiviteit in Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

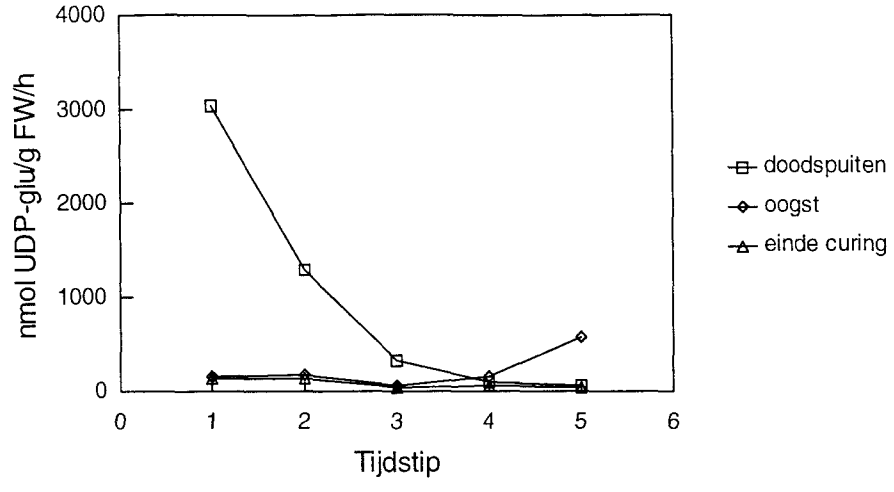


Figuur 19. Alfa-glucosidase aktiviteit in Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

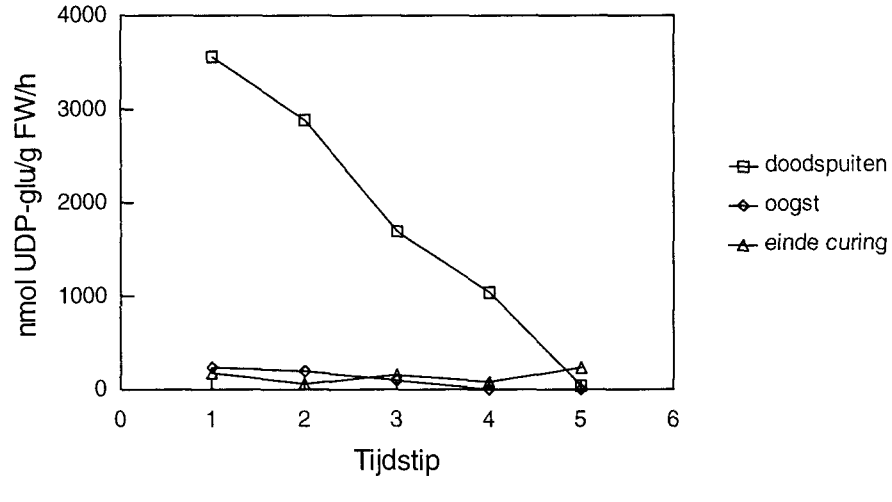
Sucrose synthase

In aardappel neemt de sucrose synthase (susy) aktiviteit toe vanaf het moment van knolinitiatie tot een maximum bij de maximale groei en zetmeelformatie (45, 48, 50). Hierna neemt de susy aktiviteit weer geleidelijk af. Transgene aardappelen met een antisense susy construct kenmerken zich door verminderde knolgrootte, verminderde zetmeelgehaltes, verhoogde suikergehaltes en verhoogde invertase aktiviteit (22).
Regulering van het enzym susy gebeurt hoofdzakelijk door het aantal aanwezige enzymmoleculen (coarse control) en niet door effectors (fine control) (48, 50). Dit gegeven en het feit dat de susy aktiviteit in een aardappelknol een reflectie is van de knolgroei en zetmeelsynthese maken susy aktiviteit een belangrijke indicator voor de 'sink strength' van de aardappelknol (50, 60).

Sowokinos (50) heeft geprobeerd rijpheid van een knol te koppelen aan de in de knol aanwezige hoeveelheid susy. Als de susy aktiviteit lager dan 2000 Units per knol is, dan heeft de gemiddelde knol 97% van zijn uiteindelijke grootte en zetmeelgehalte bereikt.



Figuur 20. Sucrose synthase aktiviteit in Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

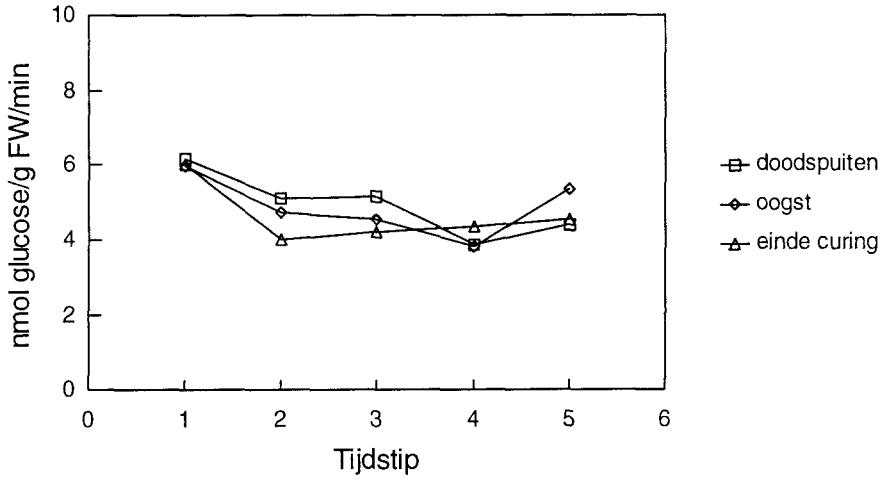


Figuur 21. Sucrose synthase aktiviteit in Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

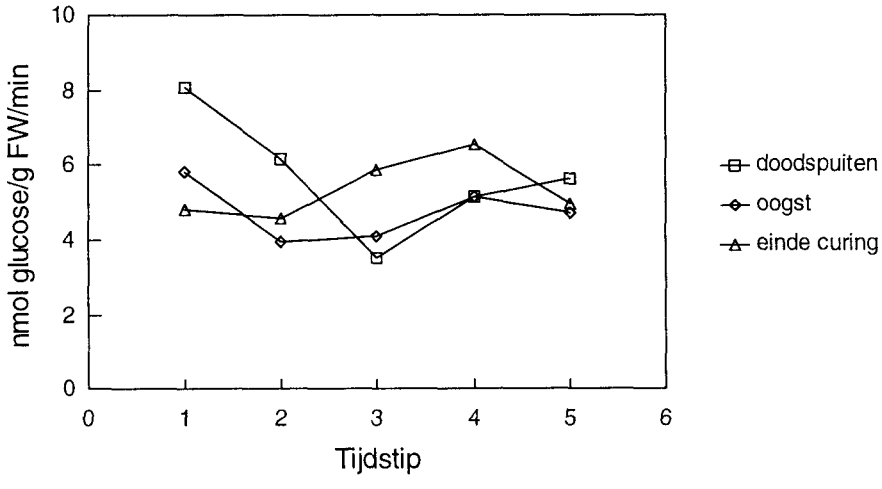
De gemeten susy aktiviteiten in Bintje en Agria (figuur 20 en 21) zijn door de grote verschillen in aktiviteit tussen de verschillende monsters niet geheel geoptimaliseerd naar tijd en enzymconcentratie, maar globaal geven de gevonden resultaten wel een afspiegeling van de aktiviteiten in de verschillende monsters.
De susy aktiviteit op het moment van doodspuiten van het gewas is in vroeg materiaal hoog en neemt af naarmate de knollen langer op het veld staan en verder natuurlijk afrijpen. Dit resultaat komt overeen met eerdere onderzoeken (44, 50). Op moment van oogst en na de wondheelperiode is een drastische daling te zien van de susy aktiviteiten ten opzichte van de hoge susy aktiviteiten tijdens het doodspuiten. Susy aktiviteit wordt sterk gereguleerd door de hoeveelheid sucrose aanwezig in de knol (44). Door het doodspuiten van de knol (of het scheiden van knol en plant) stopt de sucroseflux naar de knol en neemt de susy aktiviteit af. Dit verklaart de lage susy aktiviteiten op het oogstmoment en na de wondheelperiode.

Invertase

Er zijn in aardappel twee invertases beschreven. Neutrale invertase is een cytosolisch enzym werkend bij neutrale pH. Zure invertase is een enzym dat in de vacuole voorkomt en een pH optimum heeft bij 4,5. De neutrale invertase heeft aktiviteiten die over het algemeen veel lager liggen dan die van de zure invertase. Er is zelfs enige controversie over het bestaan van een neutrale invertase (12). Richardson *et al.* (42) en Ross *et al.* (44) konden alleen invertase-aktiviteit aantonen bij lage pH-waarden en concludeerden dat in aardappelknollen geen specifieke neutrale invertase aanwezig was. Andere publicaties melden wel een neutrale invertase in aardappelknollen (31, 34, 59). Figuur 22 en 23 laten de gevonden waarden voor neutrale invertase zien. Deze waarden zijn veel lager dan die voor zure invertase (figuur 24 en 25 en figuur 26 en 27). Er zijn geen grote verschillen tussen aktiviteiten van neutrale invertase op verschillende momenten of op verschillende tijdstippen.

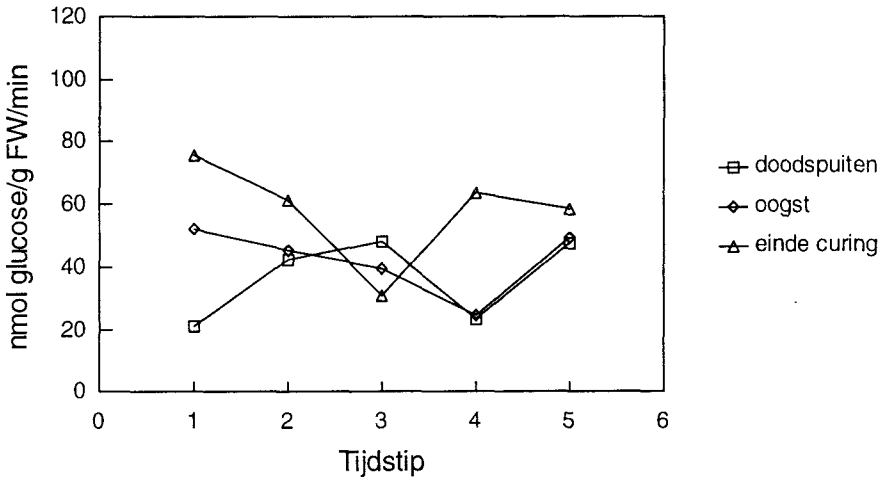


Figuur 22. Neutrale invertase aktiviteit Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

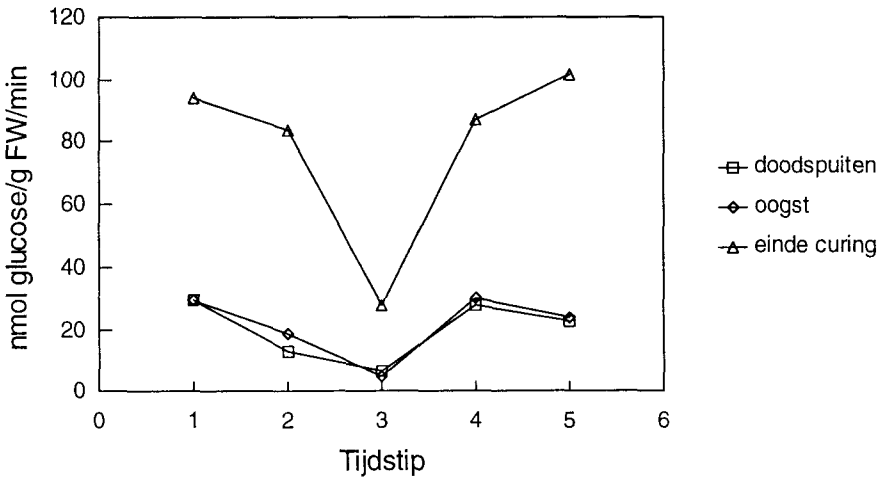


Figuur 23. Neutrale invertase aktiviteit Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

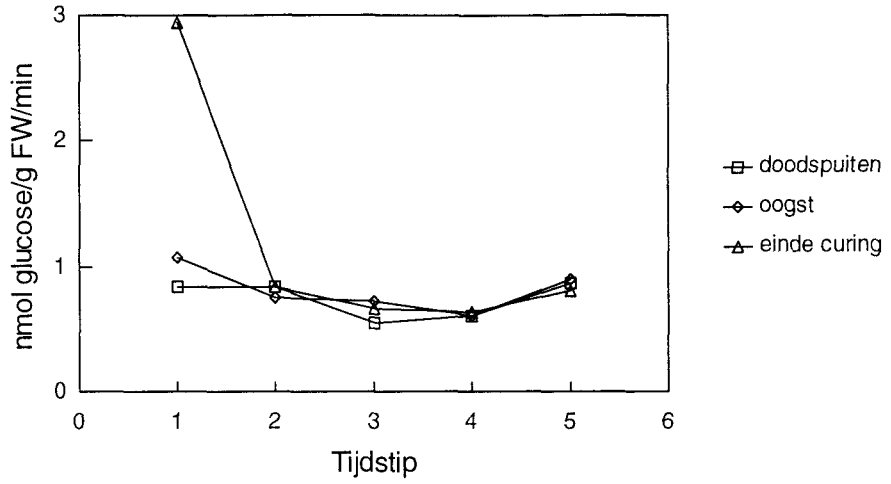
Er bestaat in aardappel een eiwit, dat aan zure invertase kan binden en zo *in vitro* de aktiviteit kan remmen. Deze eiwit-inhibitor is gezuiverd en gekarakteriseerd (37). Ook in andere planten is deze inhibitor van zure invertase aangetroffen, bijvoorbeeld in tomaat (39). Over de rol van deze eiwit-inhibitor bestaat enige discussie. Isla *et al.* rept over een regulerende rol van de inhibitor (26), waar anderen *in vivo* geen rol voor de inhibitor toebedelen. Doordat de eiwit-inhibitor in een ander compartiment zit dan zure invertase speelt de inhibitor *in vivo* geen rol in de regulering van invertaseaktiviteit (25, 42). Figuur 24, 25, 26 en 27 laten de zure invertase aktiviteit met en zonder inhibitor zien. De eiwit-inhibitor reduceert de zure invertase aktiviteit tot bijna niets.
Zure invertase aktiviteit kan *in vitro* bijna geheel teniet worden gedaan door de eiwit-inhibitor (figuur 24, 25, 26 en 27). De aktiviteit van zure invertase zonder inhibitor neemt toe na de wondheelperiode. Tijdens het doodspuiten van het loof en de oogst zijn de aktiviteiten van zure invertase lager. Dit onderstreept het idee dat de hoeveelheid zure invertase snel toeneemt als de knol wordt losgemaakt van de plant (44).



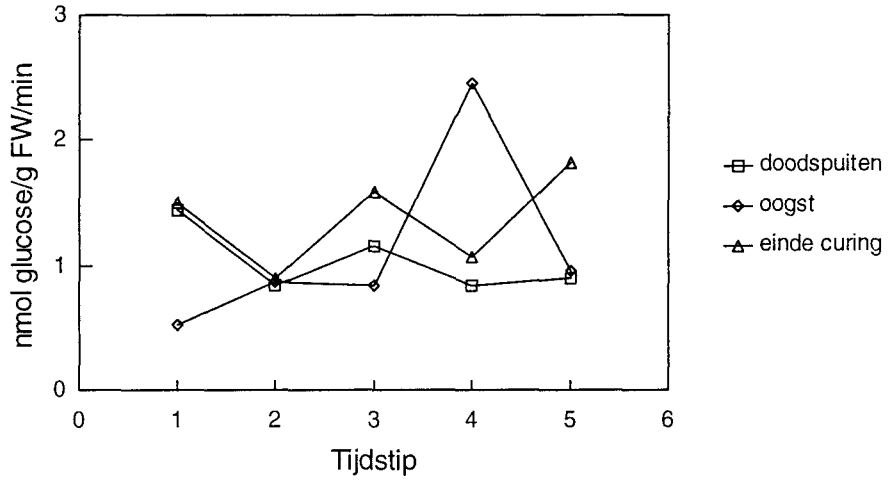
Figuur 24. Zure invertase aktiviteit Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



Figuur 25. Zure invertase aktiviteit Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.



Figuur 26. Zure invertase aktiviteit met inhibitor Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

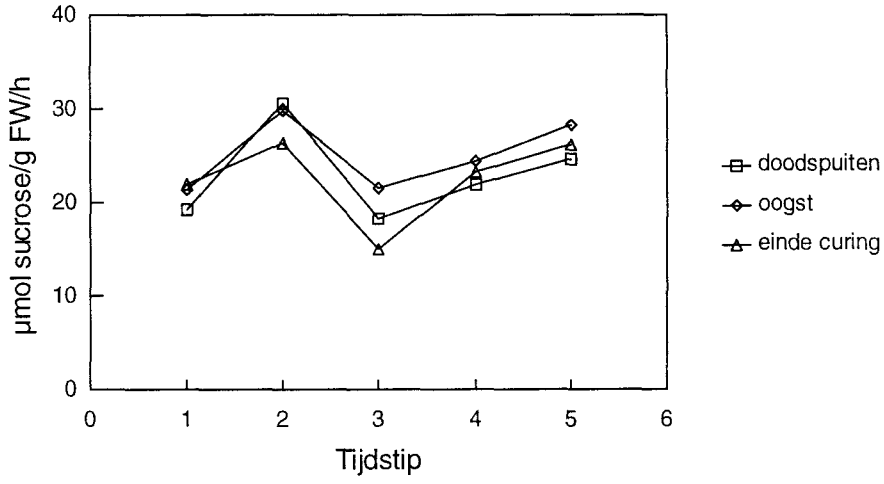


Figuur 27. Zure invertase aktiviteit met inhibitor Agria. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

Invertase wordt geremd in aktiviteit door zijn producten (glucose en fructose) (24, 25). Deze regulering kan een belangrijke rol spelen bij de invertase aktiviteit *in vivo*. Zrenner *et al.* vindt een correllatie tussen de hexose/sucrose ratio en de zure invertase aktiviteit (59). Antisense inhibitie van zure invertase aktiviteit leverde een vermindering op van de hoeveelheid hexoses, maar een stijging van het sucrosegehalte in de knol. De totale hoeveelheid suikers in de knol veranderde niet. De conclusie luidt dat zure invertase de ratio hexose/sucrose, maar niet de totale hoeveelheid suikers (59).

Sucrose fosfaat synthase

Sucrose fosfaat synthase (SPS) katalyseert de reaktie van fructose-6-fosfaat en UDP-glucose naar sucrose-6-fosfaat en UDP. SPS kan hiermee, naast susy, hexoses omzetten in sucrose. Sucrose maakt een aanzienlijk deel uit van de vrije suikers die ontstaan in aardappels als gevolg van lage temperaturen (figuur 1, 2 en 3). De susy aktiviteit in aardappels gescheiden van de plant is zeer laag (figuur 20 en 21), waarmee een rol van susy in de koudeverzoeting onwaarschijnlijk wordt. Er lijkt een belangrijke rol te zijn van SPS in de vorming van sucrose uit zetmeel (via hexoses) (12, 56). De vorming van de reducerende suikers gebeurt vanuit het gevormde sucrose. SPS wordt gereguleed door glucose-6-fosfaat (aktivator) en anorganisch fosfaat (inhibitor). Ook is er regulatie van het enzym door fosforylatie van het eiwit (41).



Figuur 28. Sucrose-fosfaat synthase aktiviteit Bintje. Verklaring tijdstippen: zie Tabel 1.

De gevonden aktiviteiten van SPS liggen allen tussen 15 en 30 µmol per uur per gram FW (figuur 28). Er zijn geen grote verschillen tussen de drie verschillende momenten of de vijf tijdstippen. Vanuit dit resultaat zijn geen conclusies te trekken. Het is mogelijk dat de SPS aktiviteit gaat stijgen samen met een toename van sucrose. Dit zal dan gebeuren als de aardappels koud worden bewaard. Gezien de regulatie van het enzym is dit effect mogelijk niet *in vitro* terug te vinden.

UDP-glucose pyrophosphorylase

Een belangrijk enzym in het koolhydraatmetabolisme is UDP-glucose pyrofosforylase (UDPG-PP). De hoogste aktiviteit van UDPG-PP in aardappelknollen wordt gemeten in groeiende 'sink' knollen. Tijdens de bewaring van aardappelknollen bij kamertemperatuur is de UDPG-PP aktiviteit nihil, maar bij bewaring bij lage temperaturen (4°C) stijgt de aktiviteit (61). De hoevelheid UDPG-PP korreleert met de hoeveelheid gevormde sucrose in een koud bewaarde knol (2, 51). Dit enzym is, op enkele pilot-experimenten na, nog niet gemeten.
Analyse van transgene aardappelen met antisense UDPG-PP constructen laten een reductie ten opzichte van wild type zien van de hoeveelheid UDPG-PP aktiviteit en een reductie van de hoeveelheid sucrose na bewaring bij lage temperaturen (2,51). Verminderen van de UDPG-PP aktiviteit is echter geen afdoende oplossing van het koudeverzoetings-probleem, maar UDPG-PP speelt waarschijnlijk wel een belangrijke rol (2, 49, 51, 61).

Er wordt momenteel gewerkt aan transgene aardappelen met antisense constructen voor UDPG-PP en zure invertase met verschillende promotors (constitutief, knolinduceerbaar en koudespecifiek). Het idee hierachter is dat UDPG-PP verantwoordelijk is voor de hoeveelheid sucrose in de knol en zure invertase de sucrose-splitsende capaciteit levert (3).

4 Conclusies

Enzymen

Bij de overgang van sink naar source blijkt op de onderzochte momenten (doodspuiten, oogst en na wondheelperiode) dat er een overgang is in sucrosesplitsende enzymaktiviteit. Als de knol nog aan de plant zit is susy het belangrijkste sucrosesplitsende enzym (moment doodspuiten loof, vroege tijdstippen). Na het doden of afsterven van de plant of scheiden van plant en knol neemt de susy aktiviteit drastisch af. Na de wondheelperiode is er een stijging te zien van de zure invertase aktiviteit. Deze resultaten bevestigen dat susy vooral aktief is in sink knollen en invertase de sucrosesplitsing bewerkstelligt in source knollen.

De amylolytische enzymen laten geen duidelijke veranderingen zien in aktiviteit, die duiden op een rol bij de overgang van sink naar source bij de gemeten momenten. Deze enzymen zijn daarom waarschijnlijk ongeschikt om te dienen als rijpheidsindicator van de knollen.

Hoewel de rol van sucrose-fosfaat synthase in aardappelknollen een belangrijke is bieden de *in vitro* gemeten enzymaktiviteiten van SPS geen aanknopingspunten voor een indicator van rijpheid.

De susy aktiviteit in een aardappelknol is een belangrijke parameter voor de 'sink strength' van de knol en daardoor een potentiële kandidaat voor een rijpheidsafhankelijke parameter. Om dit te valideren moeten de monsters van Bintje en Agria van seizoen 95/96 opnieuw gemeten worden met de nadruk op lineairiteit van het assay in tijd en enzymconcentratie.

In het algemeen zijn de enzymen betrokken bij de zetmeel suiker overgang in aardappel complex gereguleerd. Invertase susy en SPS zijn betrokken bij de futile cycle en worden gereguleerd door substraten en producten van de reakties die zij katalyseren. Daarnaast is er ook enzymaktiviteitsregulatie door fosforylering van ezymen. De zetmeelafbrekende enzymen laten geen grote verschillen zien in de gemeten aktiviteiten tijdens de overgang van sink naar source. Uit de literatuur is bekend dat tijdens de bewaring van aardappelen bij lage temperaturen deze enzymen wel iets in aktiviteit stijgen. Het is maar de vraag of deze enzymen rechtstreeks betrokken zijn bij de regulering van de omzetting van zetmeel in vrije suikers. Ook compartimentalisatie van enzymen of substraten kan een belangrijke rol spelen *in vivo*. Het is maar de vraag of met metingen *in vitro* een goed beeld gevormd kan worden van de daadwerkelijke aktiviteiten *in vivo*.

De rijpheidsafhankelijke parameter En_{cold} is gepostuleerd als aktiviteit van een enzym of enzymsysteem. Dit is een aanname en het staat niet vast dat andere factoren een rol spelen in de parameter. Duidelijk is dat de onderzochte enzymen veelal gereguleerd worden door metabolietenniveaus (substraat, product) of door andere enzymen (fosforylatie) of eiwitten (specifieke inhibitors). Een mogelijkheid om meer inzicht te krijgen in deze regulaties en de aktiviteiten van de enzymen *in vivo* is om de metabolietenniveaus in de aardappelknol te meten (HPLC).

Ook compartimentalisatie van enzymen of metabolieten in de aardappelcellen kan een verkeerd beeld geven. Om dit te onderzoeken moeten de enzymen of metabolieten gelokaliseerd worden in de aardappelknolcellen.

Schilbepalingen

De schilzetting is, zeker in de praktijk, een parameter om de rijpheid van de aardappel te bepalen. Om de mate van schilsterkte of schilzetting te bepalen is een apparaat ontwikkeld, de Halderson schilsterktemeter (20). Met dit apparaat kunnen, in het veld, geno- en feno-typische verschillen in schilsterkte bepaald worden (20, 30). Resultaten met deze meter laten zien dat de schilsterkte na de oogst toeneemt in de tijd gedurende ongeveer een maand (30). Er is daarbij steeds uitgegaan van één oogsttijdstip.
Naast schilsterktemetingen is ook gekeken naar de mate van verdamping door de schil, waarbij onrijpe knollen meer water door de schil verdampen dan rijp materiaal (29). De verdamping door de schil kan gemeten worden met een porometer.

2-D electroforese / differential display

Verschillen in de aanwezigheid van eiwitten op verschillende momenten of onder verschillende omstandigheden kunnen zichtbaar gemaakt worden door middel van 2-D electroforese. Deze techniek is gebruikt om de verschillen in aardappelknollen te onderzoeken bij verschillende bewaartemperaturen (16, 17, 18). Ook verschillen in genexpressie, na *in vitro* translatie van uit aardappel geïsoleerd mRNA, kunnen zo onderzocht worden (1). Met 2-D electroforese zijn verschillende eiwitten en bijbehorende genen geïsoleerd, die koude-induceerbaar zijn. Deze eiwitten zijn aanwezig in de knol bij lage temperatuur-bewaring en afwezig bij bewaring bij kamertemperatuur.
Deze techniek is ook toepasbaar om verschillen te vinden in gen-expressie tussen de verschillende momenten (doodspuiten, oogst, na wondheelperiode) en tijdstippen. De gevonden verschillen in expressieniveau van bijvoorbeeld sucrose synthase op de verschillende momenten en tijdstippen moet theoretisch terug te vinden zijn op 2-D electroforese gels. Ook kunnen andere eiwitten die verschillen vertonen in expressieniveau aan het licht komen.

Om genen te isoleren met een verschillend expressieniveau onder verschillende condities (bijvoorbeeld oogstmoment), is differential display een gebruikte techniek (27, 28). Deze techniek is bijvoorbeeld toegepast om genen te isoleren betrokken bij de ontwikkeling van de vrucht van tomaat (55) en de rijping van aardbeien (57). De differential display techniek is gevoeliger dan 2-D electroforese. Een ander voordeel is dat genen, die differentieel tot expressie komen, meteen geïsoleerd kunnen worden.

Mogelijk zijn er niet-enzymatische eiwitten (membraaneiwitten, receptors) goede parameters voor de rijpheid van een aardappelknol. Met 2-D electroforese of differential display kunnen deze eiwitten, als ze een rol spelen, gevonden worden.

Glucosemetingen

Mogelijk kan in de toekomst een bloed glucose teststrip gebruikt worden om de glucosegehalten in ruwe aardappelextracten te meten. Hiermee kan meteen in een ruw aardappelextract op eenvoudige wijze het glucosegehalte bepaald worden. Dit systeem (ExacTech blood glucose monitoring system) is op het ATO-DLO aanwezig en geschikt gebleken voor deze toepassing (32).

Voortzetting onderzoek

- Meten van de enzymen susy en UDPG-PP van de monsters van '95-'96 en '96-'97. Eventueel uitbereiden van enzymaktiviteitsmetingen van de gevriesdroogde monsters met andere enzymen.

- Zoeken naar nieuwe potentiële rijpheidsafhankelijke parameters met 2-D electroforese / differential display technieken.

- Schilbepalingen met de Halderson-meter bij de oogst '97

- HPLC analyses metabolietenniveaus (eventueel microsampling om metabolieten te lokaliseren)

- In situ enzym assays / in situ hybridisatie voor het lokaliseren van enzymen of mRNA's

- Glucosemetingen met een bloedglucosemeter

5 Literatuur

1 Berkel J van, Salamini F, Gebhardt C (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. Plant Physiol **104**: 445-452

2 Borovkov AY, McClean PE, Sowokinos JR, Ruud SH, Secor GA (1996) Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. J Plant Physiol **147**: 644-652

3 Borovkov AY (1997) The sweet home of cold potatoes. http://biospud.cws.ndsu.nodak.edu

4 Brisson N, Giroux H, Zollinger M, Camirand A, Simard C (1989) Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. Plant Cell **1**: 559-566

5 Claassen PAM, Budde MAW, Calker MH van (1993) Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. Potato Res **36**: 205-217

6 Claassen PAM, Budde MAW, Ruyter HJ de, Calker MH van, Es A van (1991) Potential role of pyrophosphate:fructose 6-phosphate phosphotransferase in carbohydrate metabolism of cold stored tubers of *Solanum tuberosum* cv bintje. Plant Physiol **95**: 1243-1249

7 Cochrane MP, Duffus CM, Allison MJ, Mackay GR (1991) Amylolytic activity in stored potato tubers. 1. Estimation using *p*-nitrophenyloligosaccharides. Potato Res **34**: 325-332

8 Cochrane MP, Duffus CM, Allison MJ, Mackay GR (1991) Amylolytic activity in stored potato tubers. 2. The effect of low-temperature storage on the activities of α- and β-amylase and α-glucosidase in potato tubers. Potato Res **34**: 333-341

9 Copeland L (1990) Enzymes of sucrose metabolism. *In* PJ Lea ed, Methods in Plant Biochemistry **3**: 73-85. PM Dey, JB Harborne, series eds. Academic Press, New York

10 Cottrell JE, Duffus CM, Paterson L, Mackay GR, Allison MJ, Bain H (1993) The effect of storage temperature on reducing sugar concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. Potato Res **36**: 107-117

11 Dancer J, Hatzfeld W-D, Stitt M (1990) Cytosolic cycles regulate the turnover of sucrose in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. Planta **182**: 223-231

12 Davies HV (1990) Carbohydrate metabolism during sprouting. Am Potato J **67**: 815-827

13 Es A van, Hartmans KJ (1981) Starch and sugars during tuberization, storage and sprouting. *In* A Rastovski, A van Es, et al. eds, Storage of potatoes. p 82-98. Pudoc, Wageningen

14 Geigenberger P, Stitt M (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. Planta **189**: 329-339

15 Geigenberger P, Stitt M (1991) A "futile" cycle of sucrose synthesis and degradation is involved in regulating partitioning between sucrose, starch and respiration in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings when phloem transport is inhibited. Planta **185**: 81-90

16 Gounaris Y, Sowokinos JR (1992) Two-dimensional analysis of mitochondrial proteins from potato cultivars resistant and sensitive to cold-induced sweetening. J Plant Physiol **140**: 611-616

17 Gounaris Y (1993) Comparison of restriction patterns of mitochondrial DNA from low and high sugar accumulating cultivars/selections. J Plant Physiol **141**: 423-427

18 Gounaris Y (1996) Localization of the gene coding for a 26-kDa mitochondrial protein detected in low temperature-stored potato tubers. J Plant Physiol **147**: 755-758

19 Hak PS, Doorn AA van, Kleef W van, Oosterhaven J (1996) De suikerhuishouding in aardappelen tijdens de bewaring (Voorlopig verslag over de periode 1-8-'95 tot 1-3-'96). ATO-DLO rapport

20 Halderson JL, Henning RC (1993) Measurement for determining potato tuber maturity. Am Potato J **70**: 131-141

21 Hertog MLATM, Tijskens LMM, Hak PS () On the effects of temperature and senescence on the accumulation of reducing sugars during storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers

22 Hertog MLATM (1994) Aardappelbewaring door de jaren heen. Aardappelwereld **48**(11): 34-35

23 Hertog MLATM (1995) Fysiologie aardappelverzoeting in model (FAVIM) beschrijft mate van afrijping en bewaargedrag. Aardappelwereld **49**(6): 32-34

24 Isla MI, Vattuone MA, Sampietro AR (1991) Modulation of potato invertase activity by fructose. Phytochemistry **30**: 423-426

25 Isla MI, Leal DP, Vattuone MA, Sampietro AR (1992) Cellular localization of the invertase, proteinaceous inhibitor and lectin from potato tubers. Phytochemistry **31**: 1115-1118

26 Isla MI, Vattuone MA, Sampietro AR (1991) Proteinaceous inhibitor from *Solanum tuberosum* invertase. Phytochemistry **30**: 739-743

27 Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science **257**: 967-971

28 Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. Nucleic Acids Res **21**: 3269-3275

29 Lulai EC, Orr PH (1994) Techniques for detecting and measuring developmental and maturational changes in tuber native periderm. Am Potato J **71**: 489-505

30 Lulai EC, Orr PH (1993) Determining the feasability of measuring genotypic differences in skin-set. Am Potato J **70**: 599-609

31 Merlo L, Geigenberger P, Hajirezaei M, Stitt M (1993) Changes of carbohydrates, metabolites and enzyme activities in potato tubers during development, and within a single tuber along a stolon-apex gradient. J Plant Physiol **142**: 392-402

32 Misener GC, Gerber WA, Tai GCC, Embleton EJ (1996) Measurement of glucose concentrations of potato extract using a blood glucose test strip. Canadian Agricultural Engineering **38**: 59-62

33 Morrell S, Rees T ap (1986) Sugar metabolism in developing tubers of *Solanum tuberosum.* Phytochemistry **25**: 1579-1585

34 Morrell S, Rees T ap (1986) Control of the hexose content of potato tubers. Phytochemistry **25**: 1073-1076

35 Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. EMBO J **11**: 1229-1238

36 Oosterhaven K, Hak PS, Hertog MLATM (1996) Aardappelbewaring in 2000: perfecte bewaking bakkleur komt stapje dichterbij. Boerderij/Akkerbouw **81**(15): 14-15

37 Ovalle R, Keyes AC, Ewing EE, Quimby FW (1995) Purification and characterization of the acid-stable proteinaceous inhibitor of potato tuber invertase by nonideal size exclusion chromatography. J Plant Physiol **147**: 334-340

38 Pan SM, Chang TC, Juang RH, Su JC (1988) Starch phosphorylase inhibitor is β-amylase. Plant Physiol **88**: 1154-1156

39 Pressey R (1994) Invertase inhibitor in tomato fruit. Phytochemistry **36**: 543-546

40 Rees T ap, Dixon WL, Pollock CJ, Franks F (1981) Low temperature sweetening of higher plants. *In* J Friends, MJC Rhodes eds, Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. 41-61. Academic Press, New York

41 Reimholz R, Geigenberger P, Stitt M (1994) Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. Planta **192**: 480-488

42 Richardson DL, Davies HV, Ross HA, Mackay GR (1990) Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. J Exp Bot **41**: 95-99

43 Richardson DL, Davies HV, Ross HA (1990) Potato tuber sugar content during development and storage (10°C): possible predictors of storage potential and the role of sucrose in storage hexose accumulation. Potato Res **33**: 241-245

44 Ross HA, Davies HV (1992) Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Physiol **98**: 287-293

45 Ross HA, Davies HV, Burch LR, Viola R, McRae D (1994) Developmental changes in carbohydrate content and sucrose degrading enzymes in tuberising stolons of potato (*Solanum tuberosum*). Physiol Plant **90**: 748-756

46 Sowokinos J (1990) Effect of stress and senescence on carbon partitioning in stored potatoes. Am Potato J **67**: 849-857

47 Sowokinos J (1990) Stress-induced alterations in carbohydrate metabolism. *In* ME Vayda, WD Park Eds, The Molecular and Cellular Biology of the Potato. 137-158. CAB International, Wallingford, Berkshire, England

48 Sowokinos JR, Varns JL (1992) Induction of sucrose synthase in potato tissue culture: effect of carbon source and metabolic regulators on sink strength. J Plant Physiol **139**: 672-679

49 Sowokinos JR, Spychalla JP, Desborough SL (1993) Pyrophosphorylase in *Solanum tuberosum*. IV. Purification, tissue localization, and physicochemical proporties of UDP-glucose pyrophosphorylase. Plant Physiol **101**: 1073-1080

50 Sowokinos JR (1973) Maturation of *Solanum tuberosum*. 1. Comparative sucrose and sucrose synthetase levels between several good and poor processing varieties. Am Potato J **50**: 234-247

51 Spychalla JP, Scheffler BE, Sowokinos JR, Bevan MW (1994) Cloning, antisense RNA inhibition, and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato tubers. J Plant Physiol **144**: 444-453

52 Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. Science **258**: 287-292

53 Steup M (1990) Starch degrading enzymes. *In* PJ Lea ed, Methods of Plant Biochemistry **3** :103-128. PM Dey, JB Harborne series eds, Enzymes of primary metabolism. Academic Press, New York

54 Takahata Y, Noda T, Sato T (1995) Changes in carbohydrates and enzyme activities of sweetpotato lines during storage. J Agric Food Chem **43**: 1923-1928

55 Tieman DM, Handa AK (1996) Molecular cloning and characterization of genes expressed during early tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development by mRNA differential display. J Amer Soc Hort Sci **121**: 52-56

56 Viola R, Davies HV, Chudeck AR (1991) Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). Planta **183**: 202-208

57 Wilkinson JQ, Lanahan MB, Conner TW, Klee HJ (1995) Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. Plant Mol Biol **27**: 1097-1108

58 Wismer WV, Marangoni AG, Yada RY (1995) Low-temperature sweetening in roots and tubers. Hort Rev **17**: 203-231

59 Zrenner R, Schüler K, Sonnewald U (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. Planta **198**: 246-252

60 Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). Plant J **7**: 97-107

61 Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U (1993) Analysis of the expression of potato uridine-diphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. Planta **190**: 247-252

6 Protocollen

1 Extractie van gevriesdroogde aardappelmonsters

2 Sucrose-synthase assay (afbraak) in aardappel

3 Starch phosphorylase assay

4 Waterige extractie van verse aardappelen

5 Zetmeelbepaling in aardappel

6 α-amylase assay

7 β-amylase assay

8 α-glucosidase assay

9 Invertase neutraal

10 Invertase zuur (met en zonder inhibitor)

11 Sucrose fosfaat synthase assay

12 UDP-glucose pyrofosforylase assay

13 Eiwitbepaling

1 Extractie van gevriesdroogde aardappelmonsters

Extractiebuffer

	100 ml	200 ml	Eindconcentraties
demi	76 ml	146 ml	
Hepes 500 mM, pH 7.0	20 ml	40 ml	100 mM
$MgCl_2$ 100 mM	4 ml	8 ml	4 mM
EDTA 100 mM	1 ml	2 ml	1 mM
EGTA 100 mM	1 ml	2 ml	1 mM
PMSF 100 mM	1 ml	2 ml	1 mM
DTT	75 mg	150 mg	5 mM

pH stellen op 7.0

Extractie

- Weeg 1.25 gram gevriesdroogd aardappelmonster af in een monsterpotje.
- Voeg 5 ml koude extractiebuffer toe en roer 15 minuten op ijs onder constante stroom N_2.
- Centrifugeer 15 minuten in koude kamer, maximaal RPM.
- 2.5 ml van supernatant op een voorbehandeld PD-10 kolommetje brengen.
- Elueer kolommetje met 3.5 ml extractiebuffer.

2 Sucrose synthase assay in aardappel

Sucrose synthase reactie

- Voeg 25 µl extract en 100 µl extractiebuffer bij elkaar en laat dit op temperatuur komen in een waterbad bij 30°C
- Voeg 125 µl substraat (0.2 M sucrose met 10 mM UDP) toe en incubeer bij 30°C
- Beëindig de reaktie na 30 minuten door de epjes 2 minuten in kokend water te houden. Neem ook een t=0 monster
- Bewaar het epje bij -20°C

UDP-glucose bepaling

- Maak een ijklijn van 0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 en 50 nmol UDP-glucose
- Verdun monsters indien nodig
- Maak oplossing van UDP-glu-DH door een hoeveelheid te centrifugeren en het pellet te resuspenderen in een 5x zo groot volume glycinebuffer (pH 8.7)
- Pipetteer in microtiterplaat 50 µl monster
- Voeg hieraan 125 µl substraat toe
- Meet de absorptie bij 340 nm en sla de gemeten waarden op
- Voeg per well 10 µl UDP-Glu-DH toe en meng 10 seconden. Zet de plaat bij kamertemperatuur gedurende ongeveer een half uur
- Meet opnieuw de absorptie bij 340 nm; herhaal dit na 5 minuten om te controleren of de absorptie nog verder toeneemt. Sla de gemeten waarden op
- Voer de gegevens in LOTUS in en bereken de aktiviteit

Glycinebuffer

- 7.51 g glycine in 180 ml water oplossen
- 7.2 ml KOH (1 M) toevoegen
- pH stellen op 8.7 bij 25 °C
- aanvullen tot 200 ml
- is ongeveer een maand stabiel bij 4 °C

Substraat

- Los op in 10 ml glycinebuffer (verwarmen)
- 30 mg EDTA
- 23 mg Na_2CO_3
- Na afkoelen 20 mg β-NAD oplossen
- Enkele dagen stabiel bij 4 °C

3 Starch phosphorylase assay

Starch phosphorylase reaktie

- In epje pipetteren :
  - 720 µl H_2O
  - 5 µl 100 mM Na_2MoO_4
  - 20 tot 200 µl extract
  - (200 - hoeveelheid extract) µl extractiebuffer
  - 25 µl 1 M Na-fosfaatbuffer pH 7.3
- Laat op temperatuur komen in een waterbad van 30 °C
- Voeg 50 µl substraat toe (2% (w/w) zetmeel) en schud
- Incubeer bij 30 °C
- Beëindig de reaktie door de epjes 90 seconden in kokend water te houden
- Bewaar monsters bij -20 °C

Glucose-6-fosfaat bepaling

- Maak een standaardreeks van glucose-6-fosfaat van 0 tot 2 mM
- Centrifugeer de monsters die uit -20 °C komen (2 minuten max RPM)
- Pipetteer in microtiterplaat :
  - 100 µl G-6-P (standaard) of monster
  - 30 µl NAD (stock 6 mM)
  - 20 µl Tris-buffer (500 mM, pH 7,0)
  - 15 µl Phosphoglucomutase (PGM, Boehringer, 10 keer verdunnen)
  - 20 µl H_2O
- Meng 10 seconden en meet de absorptie bij 340 nm
- Voeg toe 15 µl G6PDH (Boehringer, 10 keer verdunnen)
- Meng 10 seconden en meet de absorptie bij 340 nm na 15 tot 20 minuten
- Meet opnieuw absorptie na enkele minuten om te controleren of deze nog verder toeneemt
- Bereken de aktiviteit

4 Waterige extractie van verse aardappelen[1]

Methode

- Twintig aardappelen
- Aardappelen wassen
- Aardappelen snijden. Per aardappel wordt één stuk uit de lengte gebruikt. Deze stukken in kleinere stukken snijden en bij elkaar doen.
- Malen in de Magimix
- Flesje met antifoam op weegschaal op "0.00" zetten
- Weeg ± 50 gram van het monster af. **Schrijf monstercode en afgewogen gewicht op!**
- Voeg 50 ml water toe
- Mix met de UltraTurrax 90 seconden stand 8.
- Spoel UltraTurrax af en giet flesje over in maatcilinder (250 ml). Spoel flesje uit.
- Carrez 1 toevoegen (5 ml) - 3 x zwenken
- Carrez 2 toevoegen (5 ml) - 3 x zwenken
- NaOH toevoegen (2 ml)
- Aanvullen tot 250 ml met demiwater - 3 x zwenken
- Uitgieten in trechter met filter (S&S 597½) en filtraat opvangen in erlenmeyer
- Plastic monsterflesje vullen en bewaren in vriezer (-20°C). **Noteer nummer monsterflesje bij de juiste monstercode en het gewicht!**

Carrez 1 : 72 g/l $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$

Carrez 2 : 144 g/l $ZnSO_4$

NaOH : 40 g/l

[1] Zie ook handleiding Boehringer Test Combination Sucrose/Glucose/Fructose

5 Zetmeelbepaling in aardappel[1]

Monstervoorbereiding met DMSO

- In 100 ml erlenmeyer precies 0.200 gram gevriesdroogd aardappelpoeder afwegen
- 20 ml DMSO (dimethylsulfoxide) toevoegen (in zuurkast) en goed schudden
- 5 ml HCl (8 M) toevoegen en weer schudden
- Erlenmeyers afdekken met aluminiumfolie en gedurende 60 min incuberen bij 60°C in een schudwaterbad
- Daarna 5 ml NaOH (8 M) toevoegen
- Overbrengen inmaatkolf van 100 ml en aanvullen met 0.112 M citraatbuffer pH 4
- Filtreren over vouwfilter (S&S 595½) en voor het bepalen van het zetmeelgehalte het heldere filtraat 1:10 verdunnen

Zetmeelbepaling

- In kuvet pipetteren : 100 µl oplossing 1 + 50 µl monster/standaard
- 15 min incuberen bij 55-60°C
- 500 µl oplossing 2 en 500 µl demiwater toevoegen
- Na ± 3 min meten (A1)
- 10 µl oplossing 3 toevoegen
- Na 10-15 min meten (A2)
- Bereken zetmeelgehalte volgens protocol testkit

[1] Met Boehringer testkit Starch (Cat. No. 207748)

6 α-amylase assay[1]

Oplossingen

- Substraat: geblokkeerd *p*-nitrofenyl maltoheptaoside (BPNPG7), glucoamylase en α-glucosidase. Prepareren en bewaren volgens instructies in Ceralpha kit[2].
- Stop reagens: 1% (w/v) Trizma base oplossing.

Assay

- Pipetteer 50 µl substraat met 50 µl extract (1:2 verdund, 1 deel extract op 1 deel extractiebuffer) in een reactievaatje
- Incubeer gedurende 30 en 60 minuten bij 30 °C
- Stop de reactie door 800 µl 1% (w/v) Trizma toe te voegen
- Meet de absorptie bij 410 nm tegen 1% Trizma
- Neem twee blancos mee; één met 50 µl extract en 50 µl water en één met 50 µl substraat en 50 µl water
- Bereken de enzymaktiviteit in nmol PNP gevormd per minuut per gram versgewicht bij 30 °C

Standaardreeks PNP

- Gebruik voor een standaardreeks een stockoplossing paranitrofenol (PNP) van 1 µmol/ml
- Pipetteer in cuvetten 100, 50, 30, 20, 10, 5 en 0 µl stockoplossing en vul aan tot 100 µl
- Voeg 800 µl Trizma toe en meet extinctie bij 410 nm

[1] volgens Cochrane et al, Potato Research 34:325-332 (1991)
[2] Ceralpha:α-amylase assay kit, Megazyme (k-cera)

7 β-amylase assay[1]

Oplossingen

- Substraat: *p*-nitrofenyl maltopentaoside (PNPG5) en α-glucosidase. Prepareren en bewaren volgens instructies in Betamyl kit[2].
- Stop reagens: 1% (w/v) Trizma base oplossing.

Assay

- Pipetteer 50 µl substraat met 50 µl extract (1:5 verdund, 1 deel extract op 4 delen extractiebuffer) in een reactievaatje
- Incubeer gedurende 30 en 60 minuten bij 30 °C
- Stop de reactie door 800 µl 1% (w/v) Trizma toe te voegen
- Meet de absorptie bij 410 nm tegen 1% Trizma
- Neem twee blancos mee; één met 50 µl extract en 50 µl water en één met 50 µl substraat en 50 µl water
- Bereken de enzymaktiviteit in nmol PNP gevormd per minuut per gram versgewicht bij 30 °C

Standaardreeks PNP

- Gebruik voor een standaardreeks een stockoplossing paranitrofenol (PNP) van 1 µmol/ml
- Pipetteer in cuvetten 100, 50, 30, 20, 10, 5 en 0 µl stockoplossing en vul aan tot 100 µl
- Voeg 800 µl Trizma toe en meet extinctie bij 410 nm

[1] volgens Cochrane et al, Potato Research 34:325-332 (1991)
[2] Betamyl β-amylase assay kit, Megazyme (k-beta)

8 α-glucosidase assay[1]

Oplossingen

- Substraat: los 30 mg p-nitrofenyl α-D-glucopyranoside (PNPG) op in 5 ml buffer (extractiebuffer uit de Ceralpha kit : 50 mM natriummalaat, 50 mM natriumchloride, 2 mM calciumchloride, 3 mM natriumazide, pH 5,2)
- Stop reagens: 1% (w/v) Trizma base oplossing.

Assay

- Pipetteer 50 µl substraat met 50 µl extract in een reactievaatje
- Incubeer gedurende 30 en 60 minuten bij 30 °C
- Stop de reactie door 800 µl 1% (w/v) Trizma toe te voegen
- Meet de absorptie bij 410 nm tegen 1% Trizma
- Neem twee blancos mee; één met 50 µl extract en 50 µl water en één met 50 µl substraat en 50 µl water
- Bereken de enzymaktiviteit in nmol PNP gevormd per minuut per gram versgewicht bij 30 °C

Standaardreeks PNP

- Gebruik voor een standaardreeks een stockoplossing paranitrofenol (PNP) van 1 µmol/ml
- Pipetteer in cuvetten 100, 50, 30, 20, 10, 5 en 0 µl stockoplossing en vul aan tot 100 µl
- Voeg 800 µl Trizma toe en meet extinctie bij 410 nm

[1] volgens Cochrane et al Potato Research 34:325-332 (1991)

9 Invertase neutraal

Invertase reaktie

- Pipetteer bij elkaar :
  150 µl H_2O
  250 µl monster
  100 µl sucrose (500 mM)
- Incubeer bij 30 °C gedurende 30 en 60 minuten
- Beëindig de reaktie door de epjes gedurende 2 minuten in kokend water te houden. Neem ook een t=0 monster
- Bewaar de monsters bij -20 °C

Glucose/fructose bepaling[1]

- Laat de monsters ontdooien
- Centrifugeer de monsters 2 min bij max toerental
- Pipetteer in een microtiterplaat per well:
  50 µl monster
  83.5 µl H_2O
  66.5 µl NADP/ATP buffer uit kit
- Meet absorptie bij 340 nm (A1)
- Voeg toe per well 1 µl HK/G6PDH uit kit en wacht 15 tot 20 min
- Meet absorptie bij 340 nm (A2)
- Voeg toe per well 1 µl PGI uit kit en wacht 15 tot 20 min
- Meet absorptie bij 340 nm (A3)
- Bereken hoeveelheid gevormd fructose/glucose volgens protocol testkit en aan de hand daarvan de enzymaktiviteit

[1] Met Boehringer Test Combination Sucrose/Glucose/Fructose

10 Invertase zuur (met en zonder inhibitor)

Extractie en foamen

- Gebruik voor de extractie van gevriesdroogd materiaal citraat pH 4,5 als buffer
- Weeg 2,5 gram gevriesdroogd aardappelmonster af in een monsterpotje
- Voeg 10 ml koude extractiebuffer toe en roer 15 minuten op ijs onder constante stikstofstroom
- Breng over in epjes en centrifugeer 15 minuten in koude kamer , maximaal RPM
- 5 ml ontzouten over voorbehandelde PD-10 kolommetje (twee kolommen nodig)
- Resultaat: 7 ml ontzout extract. Hiervan 5 ml foamen en 2 ml gebruiken voor invertaseassay met inhibitor
- 5 ml ontzout extract met 5 ml extractiebuffer in speciale rondbodemkolf overbrengen en gedurende 5 minuten maximaal RPM (35.000) foamen (Edmund Bühler HO 4). Koelen met ijswater.

Invertase reaktie

- Pipetteer bij elkaar :
  150 µl H_2O
  250 µl monster
  100 µl sucrose (500 mM)
- Incubeer bij 30 °C gedurende 30 en 60 minuten
- Beëindig de reaktie door de epjes gedurende 2 minuten in kokend water te houden. Neem ook een t=0 monster
- Bewaar de monsters bij -20 °C

Glucose/fructose bepaling[1]

- Laat de monsters ontdooien
- Centrifugeer de monsters 2 min bij max toerental
- Pipetteer in een microtiterplaat per well:
  50 µl monster
  83.5 µl H_2O
  66.5 µl NADP/ATP buffer uit kit
- Meet absorptie bij 340 nm (A1)
- Voeg toe per well 1 µl HK/G6PDH uit kit en wacht 15 tot 20 min
- Meet absorptie bij 340 nm (A2)
- Voeg toe per well 1 µl PGI uit kit en wacht 15 tot 20 min
- Meet absorptie bij 340 nm (A3)
- Bereken hoeveelheid gevormd fructose/glucose volgens protocol testkit en aan de hand daarvan de enzymaktiviteit

[1] Met Boehringer Test Combination Sucrose/Glucose/Fructose

11 Sucrose fosfaat synthase assay

Extractie

- Extractiebuffer pH 7,5

Assay

- Pipetteer in epje :
  - -15 µl extractiebuffer pH 7,5
  - 10 µl $MgCl_2$ (100 mM)
  - 4 µl Glucose-6-fosfaat (400 mM)
  - 7 µl UDP-glucose (100 mM)
  - 4 µl Fructose-6-fosfaat (200 mM)
  - 25 µl *extract (of verdund extract)*
  - 10 µl H_2O
- Incubeer 0, 10, 20, 30 en 40 minuten bij 30°C in schudwaterbad
- Stop reaktie door toevoegen van 75 µl 1 M NaOH en kook dit 10 minuten
- Voeg na afkoelen 250 µl 0,1% resorcinol-oplossing en 750 µl 30% HCl toe
- Verwarm dit 8 minuten bij 80°C
- Breng over in cuvet en lees absorptie bij 520 nm
- Maak ook een ijklijn van 0 tot 5 mM sucrose
- Bereken de aktiviteit in µmol sucrose per uur per gram versgewicht

12 UDP-glucose pyrofosforylase assay[1]

Reagentia

- A. 100 mM Tris HCl pH 7,6
  B. 4 mM UDP-glucose oplossing
  C. 300 mM $MgCl_2$
  D. 250 mM L-Cysteine
  E. 20 mM β-NAD
  F. 0,6 mM Glucose 1,6-difosfaat (G1,6P)
  G. Phosphoglucomutase enzymoplossing (Boehringer) (PGM)
  H. Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (Boehringer) (G6PDH)
  I. Extractiebuffer
  J. Enzymextract
  K. 50 mM Natriumpyrofosfaat pH 7,6 (PP_i)

Assay

- Pipetteer in cuvet :
  - 90 µl H_2O
  - 500 µl reagent A (buffer)
  - 167 µl reagent B (UDPG)
  - 53 µl reagent C ($MgCl_2$)
  - 40 µl reagent D (Cys)
  - 33 µl reagent E (β-NAD)
  - 17 µl reagent F (G 1,6-P)
  - 17 µl reagent G (PGM)
  - 17 µl reagent H (G6PDH)
  - 33 µl reagent J (of reagent I voor blanco)
- Equilibreer bij 25°C in spectrofotometer met thermostaat. Meet bij 340 nm tot constante absorptie
- Voeg toe - 33 µl reagent K (PP_i)
- Mix en volg reactie gedurende 5 minuten. Gebruik de maximale A_{340}/minuut
- Bereken enzymaktiviteit met volgende formule:

$$\text{Units/ml enzym} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min test} - \Delta A_{340}/\text{min blanco})(\text{verdunningsfactor})}{(6{,}22)(0{,}033)}$$

6,22 = molaire extinctiecoefficient van β-NAD
0,033 = volume (in ml) enzymextract

[1] volgens Sigma Quality Control Test Procedure (http://www.sigma.sial.com/sigma/enzymes/udpgpp.htm)

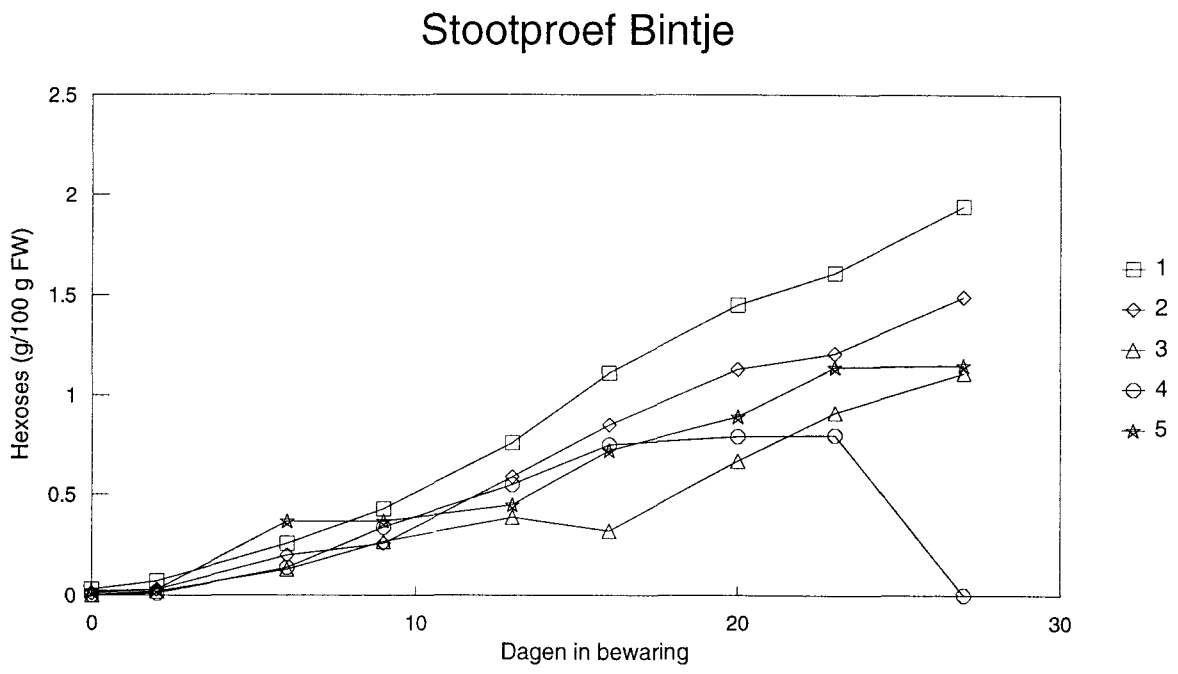
13 Eiwitbepaling[1]

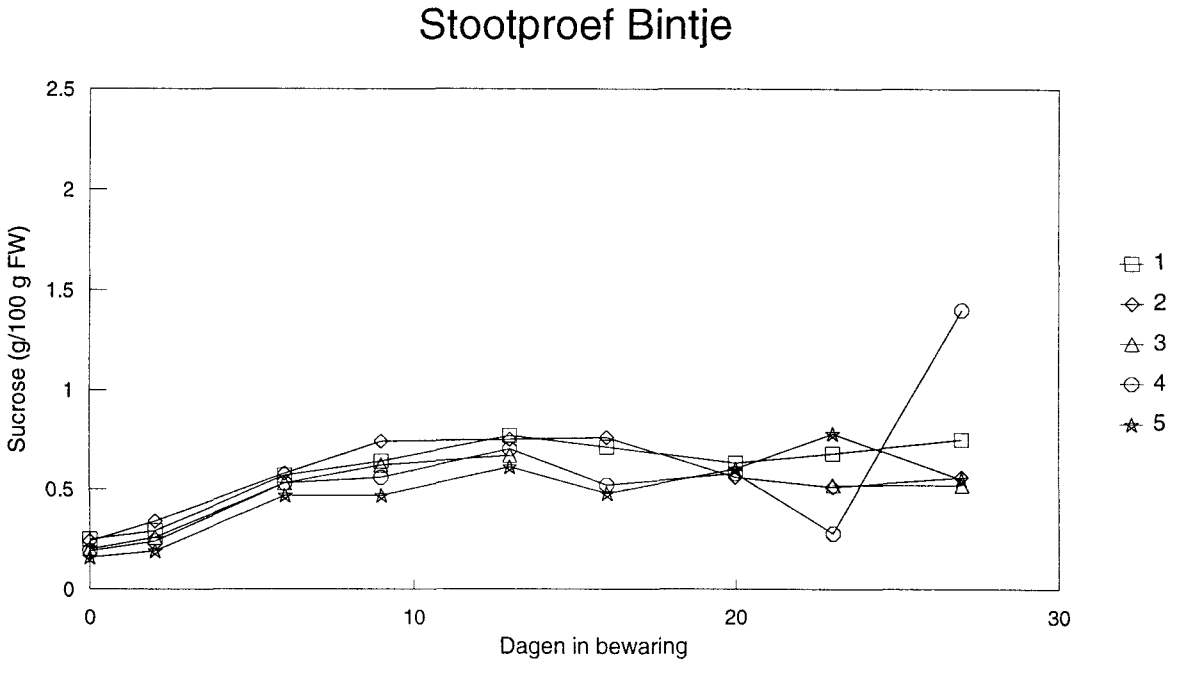
- Maak een standaardreeks BSA oplossingen van 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 en 0.75 mg/ml eiwit (verdunnen vanuit 2 mg/ml BSA)
- Verdun de monster 25 keer
- Pipetteer in kuvet 10 µl standaard of monster
- Voeg toe : 490 µl demi en 500 µl Coomassie
- Goed mengen en meet absorptie na 5 minuten bij 595 nm

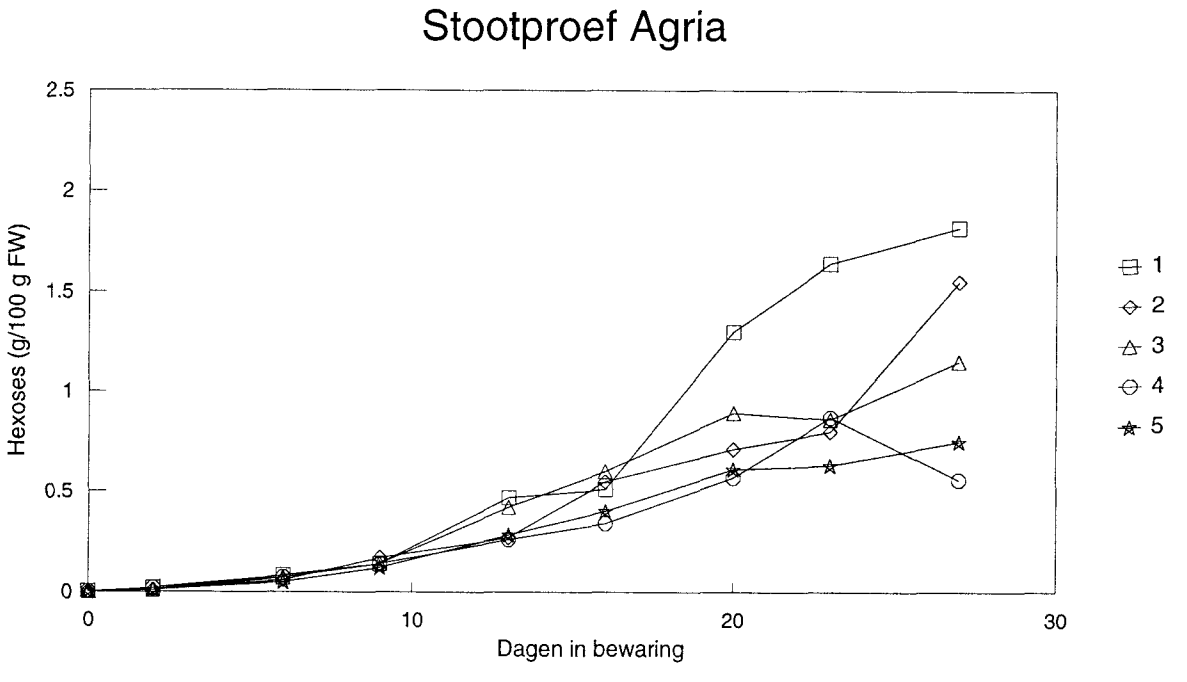
[1] Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce No 23200)

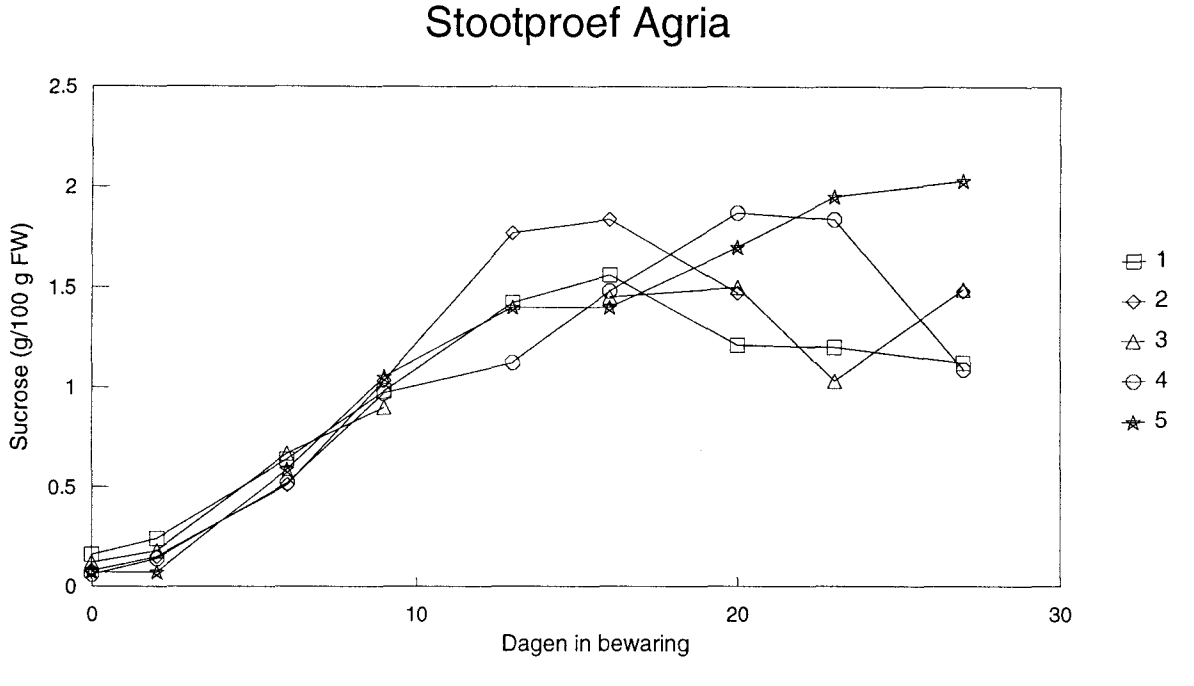
7 Bijlagen

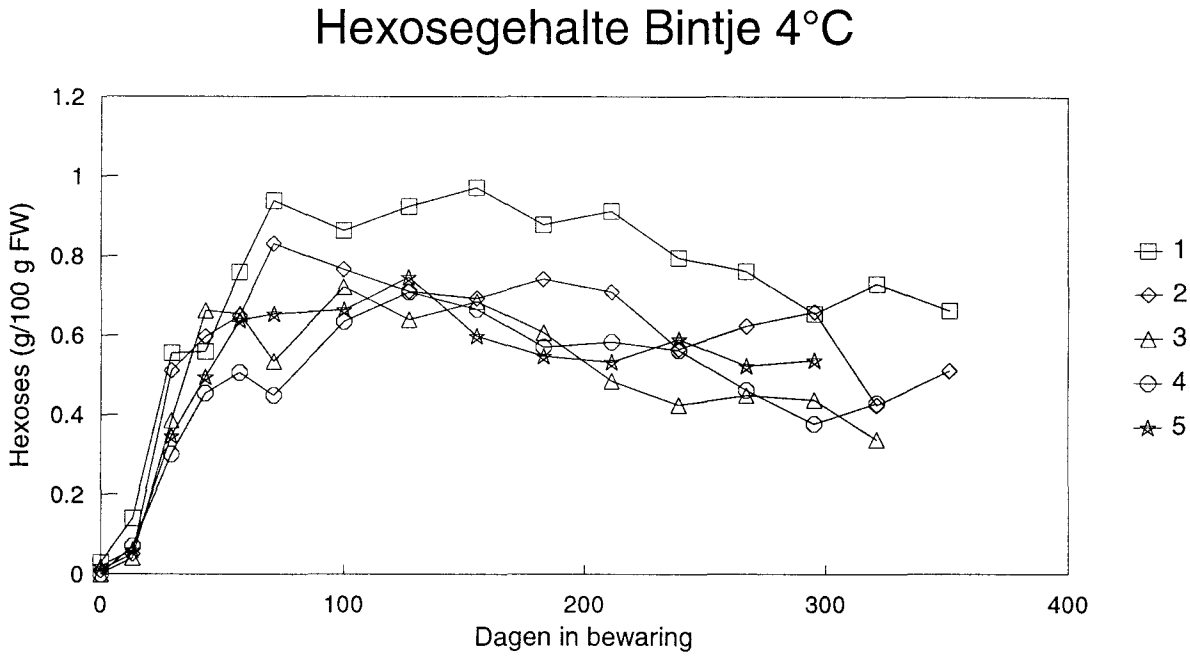
	pagina
Stootproef Bintje (na oogst direct in bewaring bij 2°C)	45
Stootproef Agria (na oogst direct in bewaring bij 2°C)	46
Koudeverzoeting Bintje bij 4°C	47
Koudeverzoeting Bintje bij 6°C	48
Koudeverzoeting Agria bij 4°C	49
Koudeverzoeting Agria bij 6°C	50
Verzoeting Bintje (hexoses) na 43, 100 en 211 bewaardagen bij verschillende temperaturen	51
Verzoeting Bintje (sucrose) na 43, 100 en 211 bewaardagen bij verschillende temperaturen	52
Verzoeting Agria (hexoses) na 43, 100 en 211 bewaardagen bij verschillende temperaturen	51
Verzoeting Agria (sucrose) na 43, 100 en 211 bewaardagen bij verschillende temperaturen	52

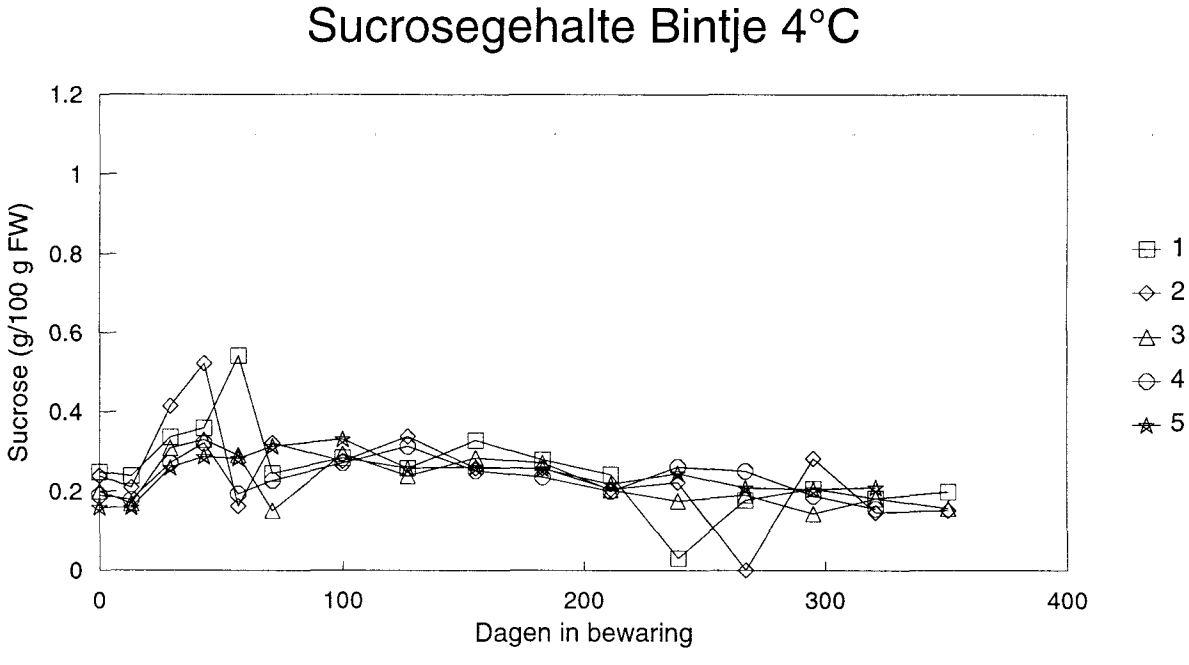

Stootproef Bintje
Hexoses (g/100 g FW)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5


Stootproef Bintje
Sucrose (g/100 g FW)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5

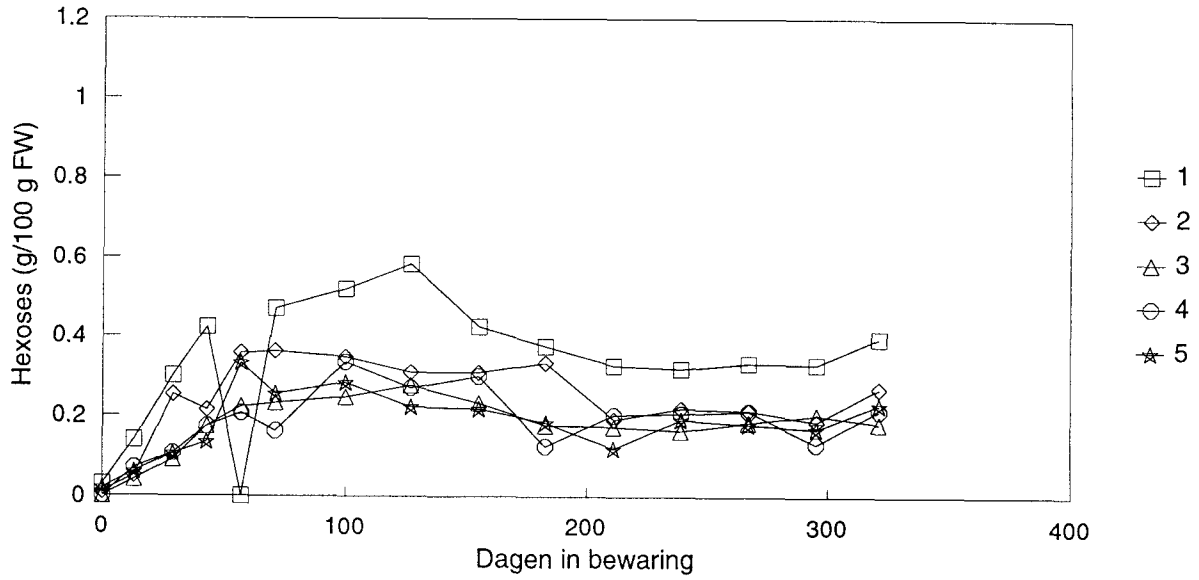

Stootproef Agria
Hexoses (g/100 g FW)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5


Stootproef Agria
Sucrose (g/100 g FW)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5

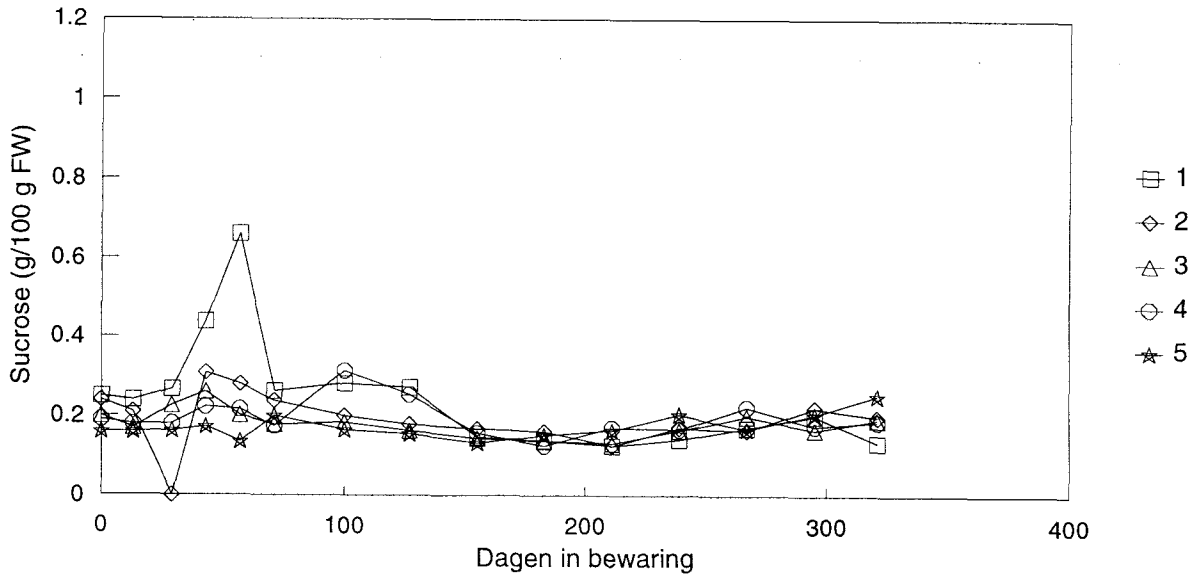

Hexosegehalte Bintje 4°C
Hexoses (g/100 g FW)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5


Sucrosegehalte Bintje 4°C
Sucrose (g/100 g FW)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
Dagen in bewaring
1
2
3
4
5

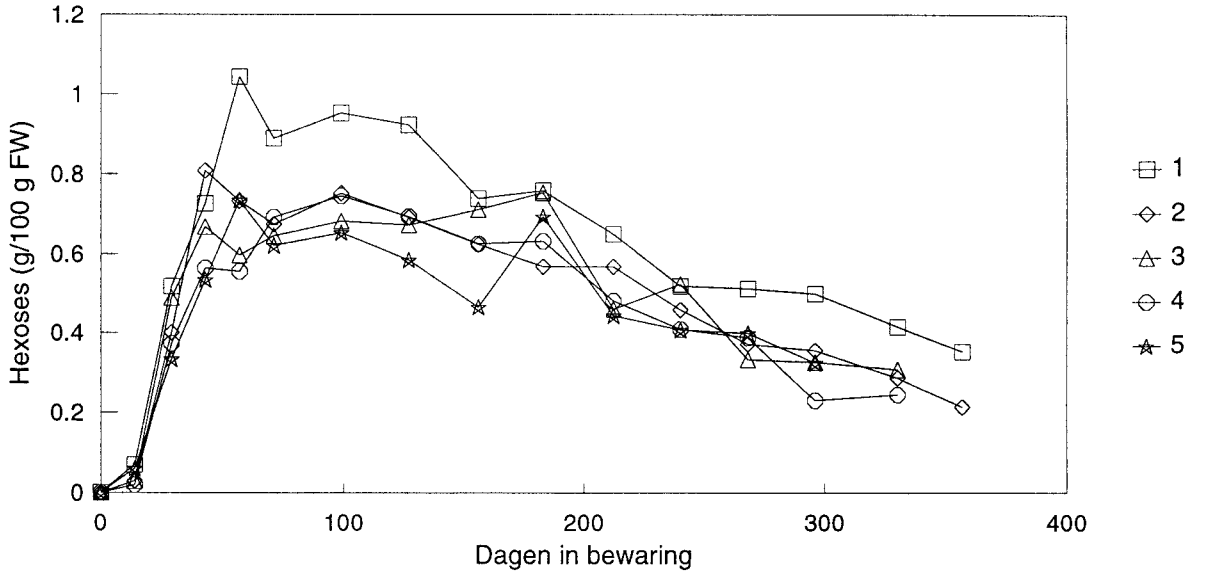
Hexosegehalte Bintje 6°C



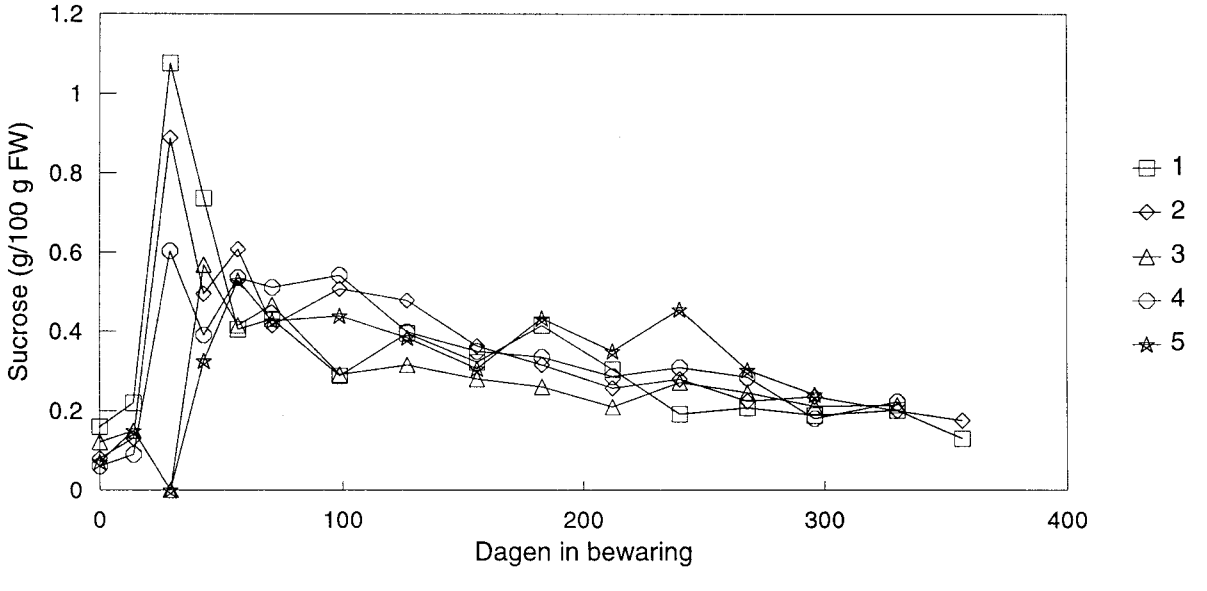
Sucrosegehalte Bintje 6°C



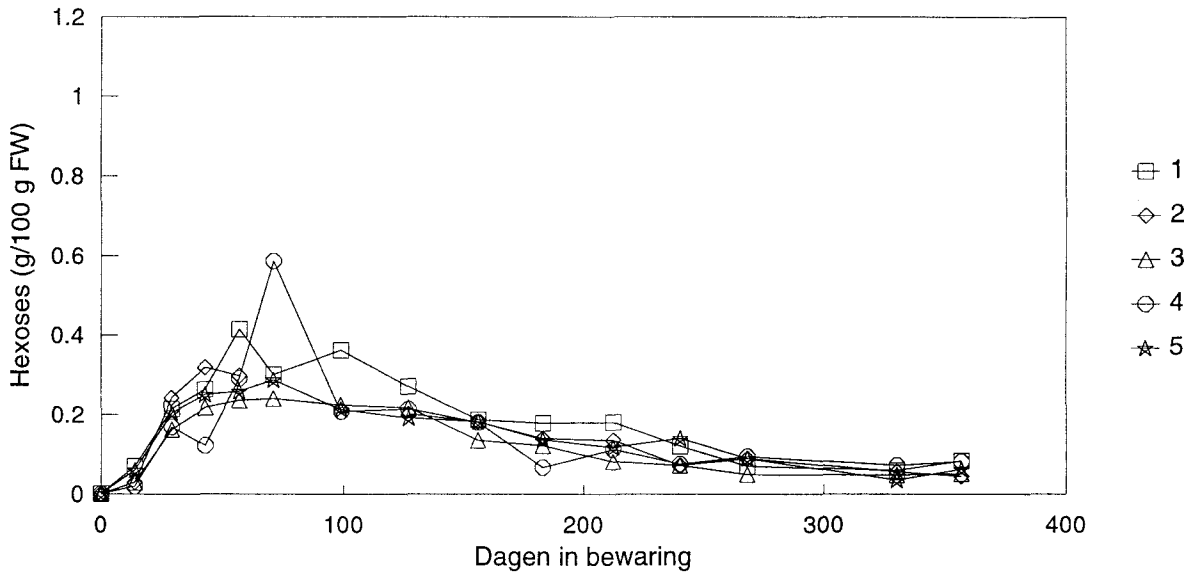
Hexosegehalte Agria 4°C



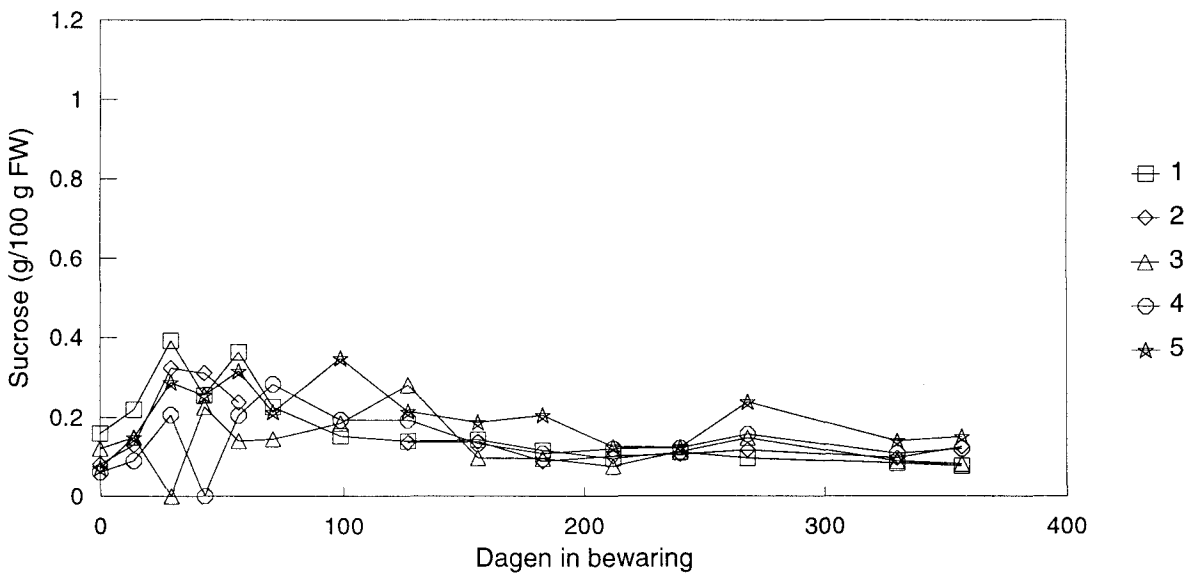
Sucrosegehalte Agria 4°C



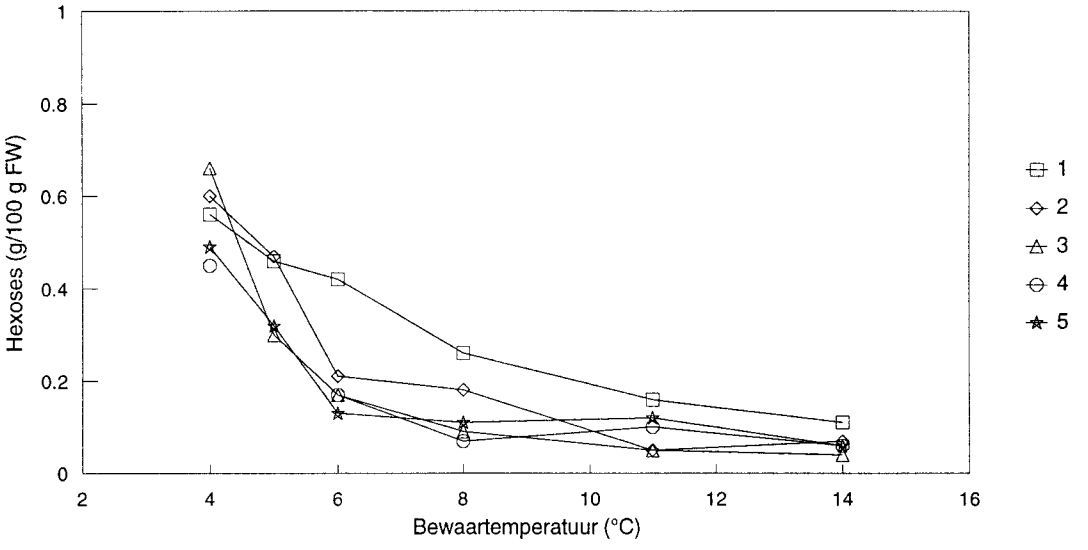
Hexosegehalte Agria 6°C



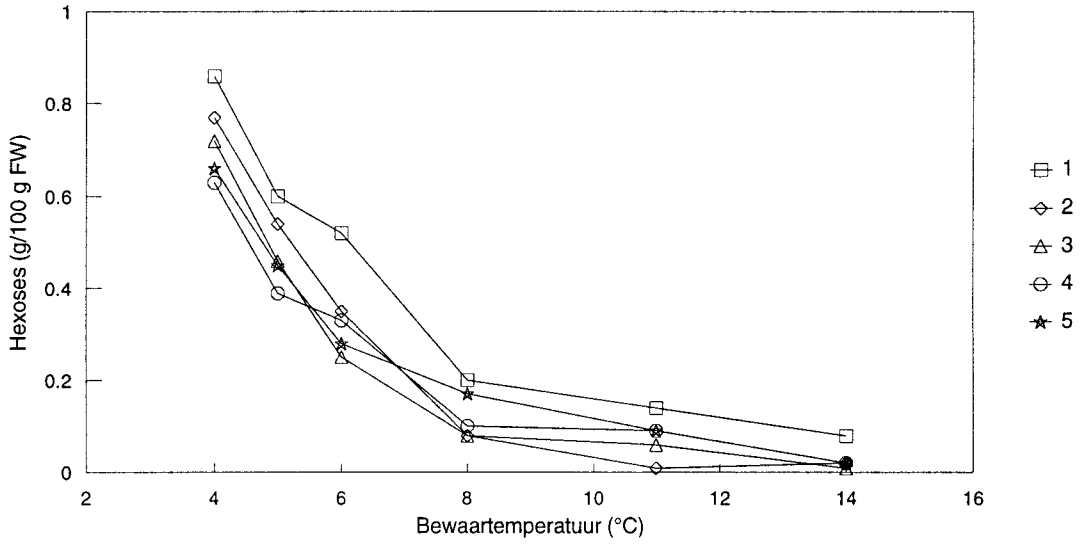
Sucrosegehalte Agria 6°C



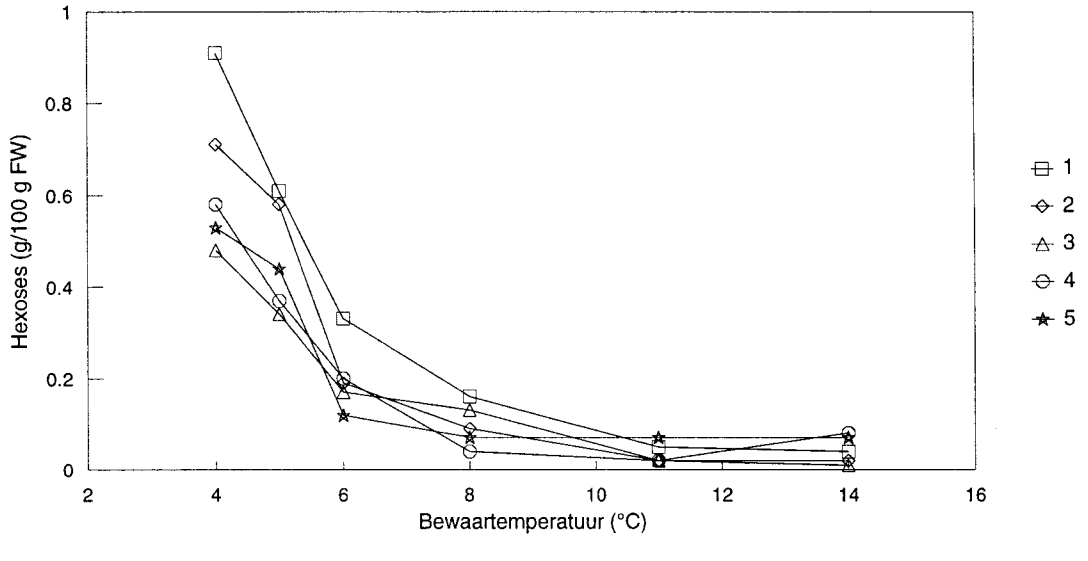
Hexoses Bintje na 43 dagen



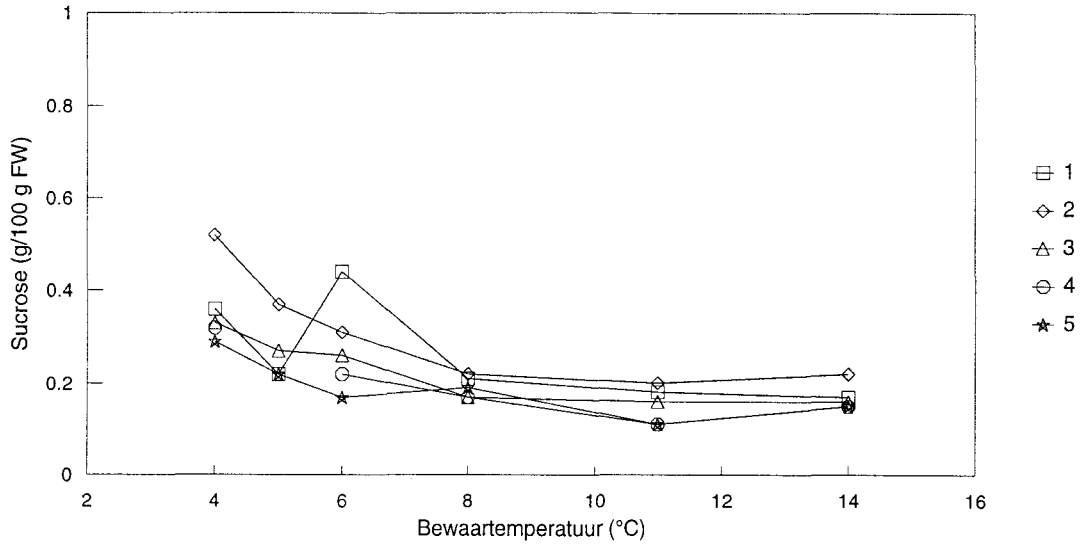
Hexoses Bintje na 100 dagen



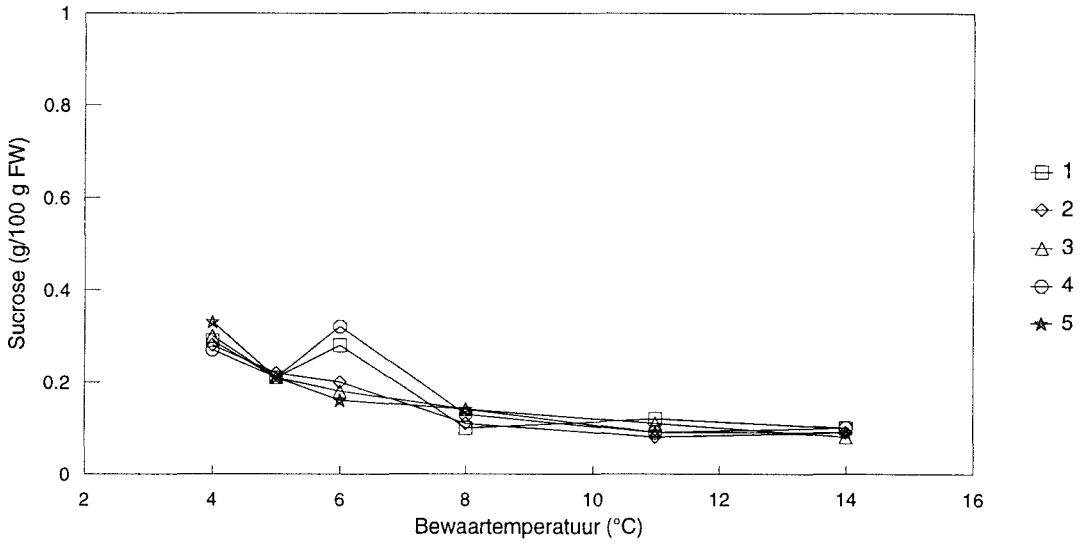
Hexoses Bintje na 211 dagen



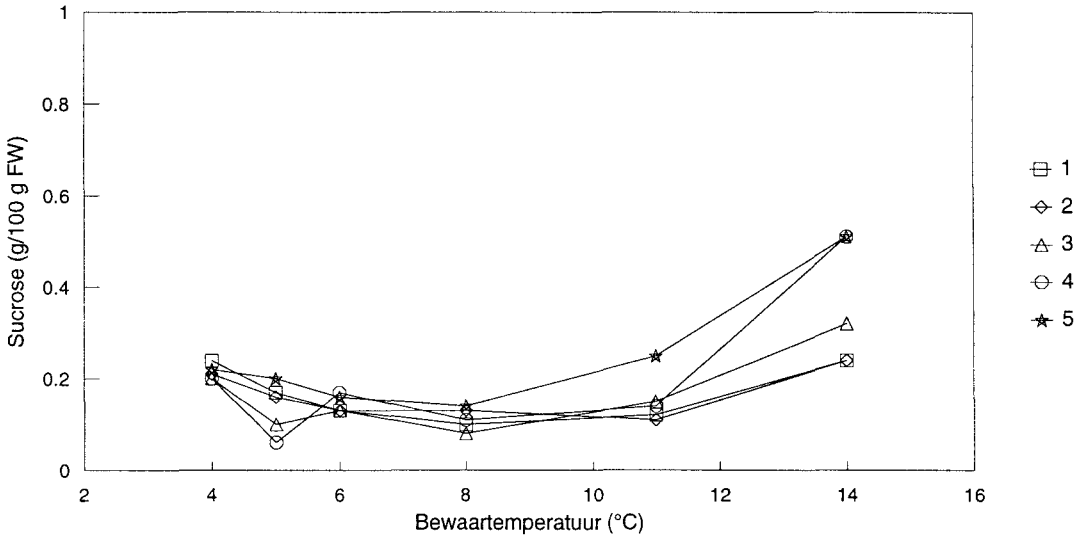
Sucrose Bintje na 43 dagen



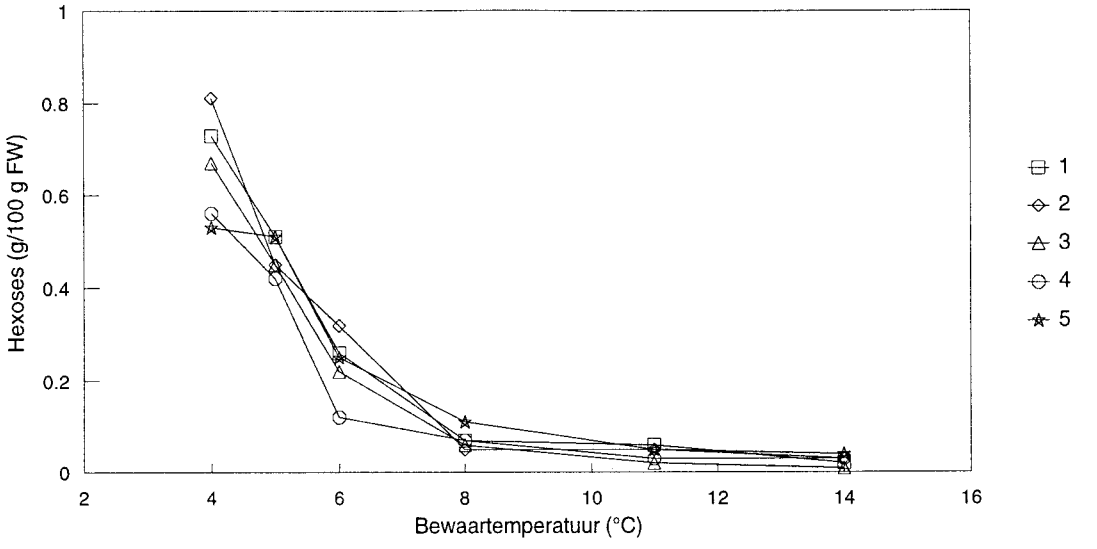
Sucrose Bintje na 100 dagen



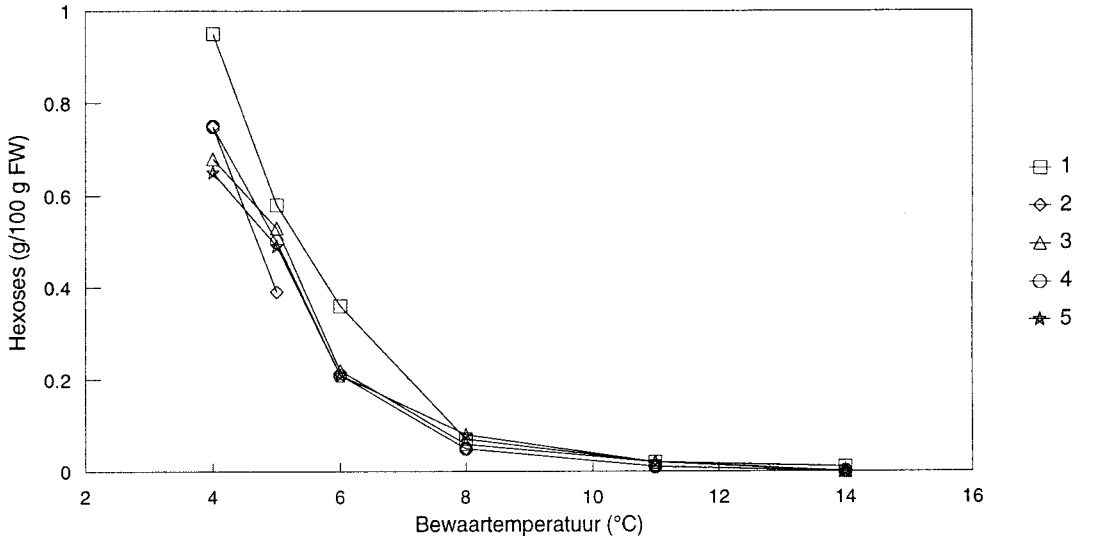
Sucrose Bintje na 211 dagen



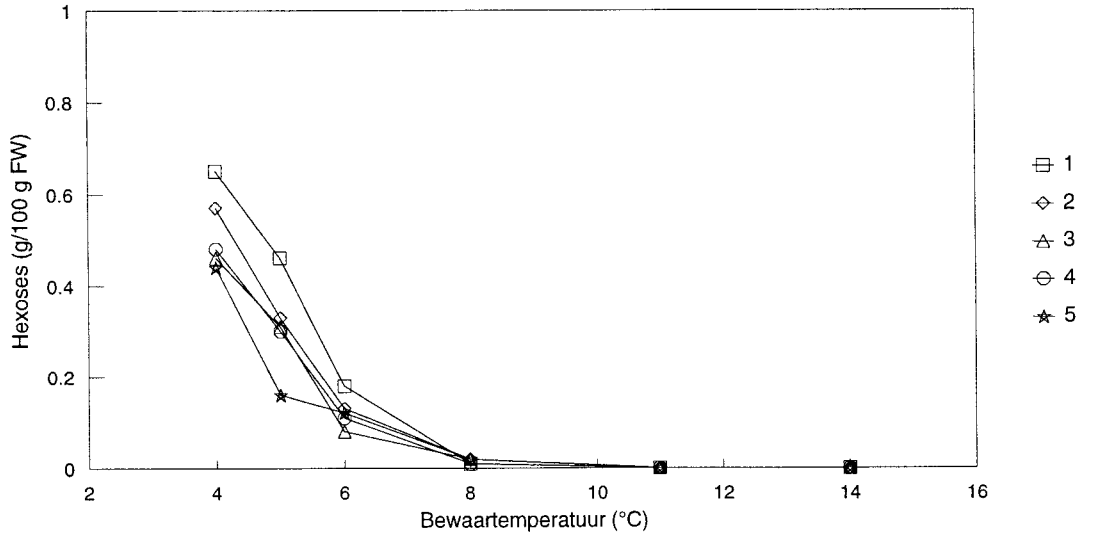
Hexoses Agria na 43 dagen



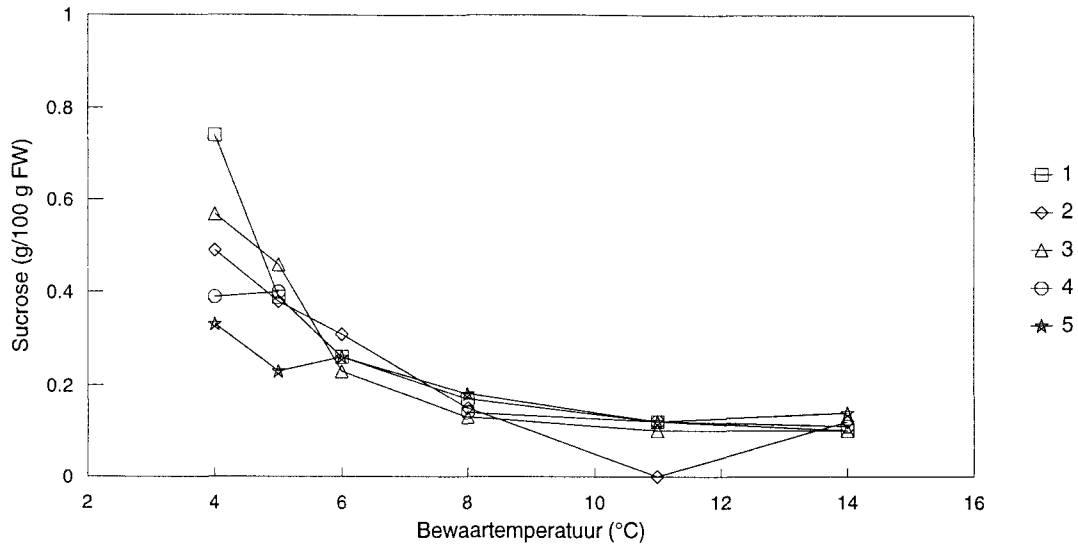
Hexoses Agria na 100 dagen



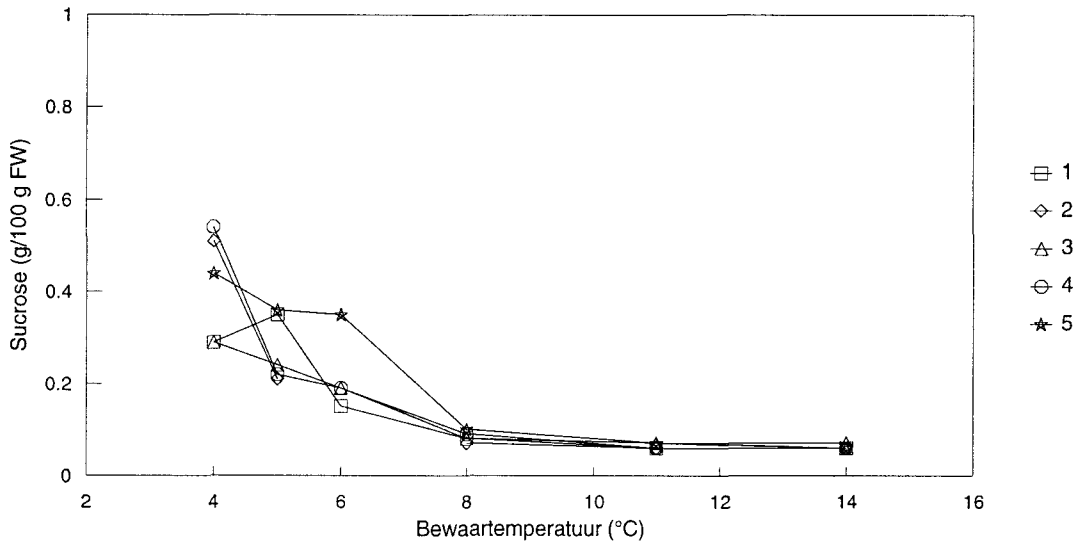
Hexoses Agria na 211 dagen



Sucrose Agria na 43 dagen



Sucrose Agria na 100 dagen



Sucrose Agria na 211 dagen

