

Biochemische factoren die een mogelijke rol spelen bij het ontstaan van stootblauw bij aardappel (*Solanum tuberosum* L.)

L.H. Stevens

ab-dlo

Het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO) is onderdeel van de Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij.

Het instituut is opgericht op 1 november 1993 en is ontstaan door de samenvoeging van het Wageningse Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO-DLO) en het in Haren gevestigde Instituut voor Bodemvruchtbaarheid (IB-DLO).

DLO heeft tot taak het genereren van kennis en het ontwikkelen van expertise ten behoeve van de beleidsvoorbereiding en -uitvoering van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, het bevorderen van de primaire landbouw en de agrarische industrie, het inrichten en beheren van het landelijk gebied, en het beschermen van natuur en milieu.

AB-DLO heeft tot taak het verrichten van zowel fundamenteel-strategisch als toepassingsgericht onderzoek en is gepositioneerd tussen het fundamentele basisonderzoek van de universiteiten en het praktijkgerichte onderzoek op proefstations. De verkregen onderzoeksresultaten dragen bij aan de bevordering van:

- de bodemkwaliteit;
- duurzame plantaardige productiesystemen;
- de kwaliteit van landbouwproducten.

Kernexpertises van het AB-DLO zijn: plantenfysiologie, bodembioïogie, bodemchemie en -fysica, nutriëntenbeheer, gewas- en onkruiddecologie, graslandkunde en agrosysteemkunde.

Adres

Vestiging Wageningen:

Postbus 14, 6700 AA Wageningen

tel. 08370-75700

fax 08370-23110

e-mail postkamer@ab.agro.nl

Vestiging Haren:

Postbus 129, 9750 AC Haren

tel. 050-337777

fax 050-337291

e-mail postkamer@ab.agro.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Inleiding	1
2. Mechanisme van stootblauwvorming	3
3. Polyfenol-oxydase (PPO)	5
3.1. Argumenten voor de rol van PPO bij stootblauwvorming	5
3.2. De reacties die gekatalyseerd worden door PPO	5
3.3. Bepalingen van PPO-activiteit in aardappelen	6
3.4. PPO uit <i>Solanum tuberosum</i> L.	7
3.5. Remmers van PPO-activiteit	9
3.6. Activering van latente PPO-activiteit	10
3.7. Localisatie van PPO	10
3.8. Correlatie van PPO-activiteit met stootblauwgevoeligheid	11
4. Potentiële substraten voor stootblauwvorming	13
4.1. Fenolische verbindingen	13
4.2. Localisatie van de fenolische substraten	16
4.3. Correlatie van substraatconcentratie en stootblauwgevoeligheid	16
4.4. Zuurstof	18
5. De chemische structuur van het stootblauwe pigment en van de intermediairen in de blauwsynthese	19
6. Slotsom	21
Literatuur	23
Bijlage 1:Methoden voor de bepaling van de stootblauwgevoeligheid van aardappelen	3 pp.

Samenvatting

Het verschijnsel stootblauw bij de aardappel is een interne verkleuring van het knolweefsel die optreedt na ruwe behandeling tijdens bijvoorbeeld oogst, sortering en transport. Aangenomen wordt dat de hierbij toegediende mechanische impacts leiden tot decompartmentalisatie van de individuele aardappelcellen waardoor het enzym polyphenoloxydase (PPO) in contact komt met fenolische substraten en zuurstof, zodat de vorming van het donkere pigment melanine mogelijk wordt.

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste literatuurgegevens (tot en met oktober 1994) betreffende de (bio)chemische factoren die een rol spelen bij de vorming van stootblauw bij de aardappel (*Solanum tuberosum* L.). Aan de orde komen het enzym PPO, de regulatie van de PPO-activiteit, de potentiële substraten en hun localisatie. Het doel van dit literatuuronderzoek was na te gaan welke kennis hierover nog ontbreekt voor een goed begrip van het mechanisme van stootblauwvorming. Aanbevolen wordt om toekomstig onderzoek te doen naar de karakterisering van het stootblauwe pigment, de identificatie van de substraten, de regulatie van zowel de PPO-activiteit als de beschikbaarheid van vrij tyrosine, en de precieze subcellulaire localisatie van PPO. Voorts wordt het van belang geacht de mogelijke rol van membraan-afbrekende enzymen bij de subcellulaire decompartmentalisatie te onderzoeken.

1. Inleiding

Wanneer aardappelen blootgesteld worden aan een mechanische druk waarbij de schil onbeschadigd blijft (bijvoorbeeld door stoot of val) dan kan er binnen één of enkele dagen in het aardappelweefsel een donkere plek ontstaan. Deze inwendige beschadiging is alleen waarneembaar na verwijdering van de schil of na aansnijden van de knol. De plekken bevinden zich vlak onder de schil, precies daar waar de stoot is aangekomen, en verschillen in vorm en grootte, maar reiken meestal niet verder dan de vaatbundel (Hiller *et al.*, 1985; Burton, 1989; Belknap and Rickey, 1990; Harris, 1991;). De kleur van de plekken varieert (bruin, blauw, paars, grijs, zwart), hetgeen tot uitdrukking komt in de gebruikte benamingen; in het Nederlands wordt gesproken van *stootblauw*, in het Engels heet het *black spot*, *blue spot*, *blue bruise*, *internal gray spot*, *blueing* en *stem-end blackening*, in het Duits *Blaufleckigkeit* en *Schwarzfleckigkeit*, en in het Frans *taches cendrées* (Hiller *et al.*, 1985; Van Loon en Van der Heij, 1989).

De stootblauwgevoeligheid van aardappelen kan sterk uiteenlopen, zowel tussen verschillende rassen, als binnen één ras. Ook tussen knollen afkomstig van dezelfde plant zijn verschillen gevonden (Hiller *et al.*, 1985; De Bruyn, 1929). Binnen de knol blijkt het naveleinde blauwgevoeliger te zijn dan het apicale einde (Oortwijn Botjes en Verhoeven, 1927; de Bruyn, 1929; Mulder, 1949, 1955; Iritani *et al.*, 1973; Mondy en Mueller, 1977; Corsini *et al.*, 1992).

Vanwege de ernst van dit kwaliteitsprobleem is er veel onderzoek verricht naar praktische (teelt-, oogst- en bewaartechnische) maatregelen die het ontstaan van stootblauw kunnen tegengaan. Het is inmiddels overtuigend aangetoond dat de blauwgevoeligheid van aardappelen sterk verminderd kan worden met een ruime kaliumgift. Een ruime bemesting met chloride vermindert de blauwgevoeligheid eveneens. De invloed van stikstofbemesting blijkt daarentegen marginaal te zijn. Voorts is duidelijk dat naarmate de knollen een lagere temperatuur bezitten en ruwer behandeld worden, de kans op blauwvorming toeneemt. Ook het vochtgehalte van de knol speelt een rol, naar men aanneemt doordat het de celturgor en daarmee de knolstevigheid beïnvloedt. Opmerkelijk is de positieve correlatie tussen blauwgevoeligheid en droge-stofgehalte van de knol. Voor een uitgebreide bespreking van teelt- en bewaarfactoren die de blauwgevoeligheid beïnvloeden, wordt verwezen naar de overzichten van Hughes (1974), Hiller *et al.*, (1985), Burton (1989) en Storey en Davies (1991) en de daarin genoemde referenties.

Vooralsnog ontbreekt het inzicht in de wijze waarop de beschreven factoren de blauwgevoeligheid beïnvloeden en is het onduidelijk hoe die factoren met elkaar samenhangen. Perspectief op een definitieve oplossing van het probleem is er nog niet. Het is zelfs niet mogelijk om ruim voor de oogst nauwkeurige voorspellingen te doen over de stootblauwgevoeligheid van de knollen op het moment van de oogst.

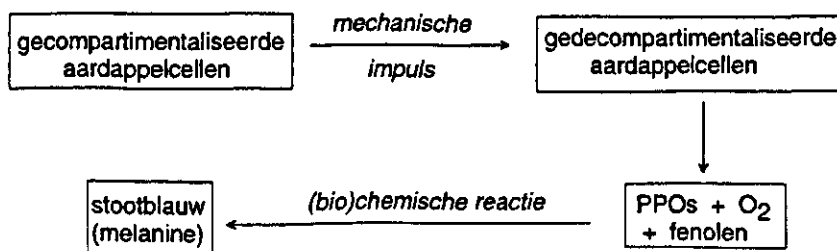
Op het DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheids Onderzoek (AB-DLO) te Wageningen is in het najaar van 1993 een onderzoeksproject gestart met de titel "Onderzoek naar de fysiologische en biochemische regulatie van de vorming van stootblauw bij aardappel". Het doel van dit onderzoeksproject is te komen tot een gedetailleerd inzicht in het mechanisme van stootblauwvorming en vervolgens tot een beter begrip van de manier waarop op diverse factoren de blauwgevoeligheid beïnvloeden. Het is de verwachting dat na het

nauwkeurig in kaart brengen van het proces van blauwvorming, één of meer manipuleerbare factoren aangewezen kunnen worden die bijdragen aan de oplossing van het probleem. Er is besloten om voor de opheldering van het mechanisme van stootblauwvorming allereerst duidelijkheid te verkrijgen over de identiteit en de eigenschappen van het stootblauwe pigment, de substraten en intermediairen, en van de enzymen die bij de pigmentvorming betrokken zijn. Hierbij moet tevens bekeken worden of de activiteit van eventuele endogene remmers een rol spelen bij de blauwgevoeligheid van de knollen. Verder moet onderzocht worden hoe deze variabelen gereguleerd worden, en wat de eventuele relatie is met factoren als kalium- en chloridebemesting, drogestof- en zetmeelgehalte van de knol. Vervolgens komt de vraag aan de orde op welke wijze de (bio)chemische vorming van het pigment als gevolg van de stoot geïnitieerd wordt. Is er sprake van compartimentalisatie? Is er sprake van activering van latente enzym-activiteit? Is er sprake van het aanschakelen van de biosynthese van substraten of enzymen?

Om antwoord te vinden op bovengenoemde vraagstukken, die voornamelijk (bio)chemische aspecten van het stootblauwprobleem betreffen, werd begonnen met een inventarisatie van alle tot op heden (oktober 1994) gepubliceerde relevante gegevens. De resultaten van deze literatuurstudie zijn bijeengebracht in het navolgende overzicht. Als leidraad voor deze studie werd de min of meer algemeen geaccepteerde hypothese van blauwvorming gebruikt, die gepresenteerd is in hoofdstuk 2. De beschikbare gegevens over de diverse onderdelen ervan worden nader besproken in hoofdstuk 3 tot en met 5. Tenslotte wordt in hoofdstuk 6 nagegaan welk aanvullend onderzoek gewenst is om op de gestelde vragen een antwoord te kunnen geven.

2. Mechanisme van stootblauwvorming

De eerste gepubliceerde onderzoeksgegevens over de oorzaken van stootblauwvorming dateren van het begin van deze eeuw. De Bruyn (1929) en Merckenschlager (1929) deden de suggestie dat het enzym "tyrosinase", dat reeds in de vorige eeuw beschreven was, een sleutelrol zou spelen. Dit enzym is in staat om de vorming van donkere pigmenten (aangeduid met de verzamelnaam "melanine") te katalyseren uit het substraat tyrosine. Dat soortgelijke, niet nader geïdentificeerde pigmenten onder invloed van endogeen tyrosinase ook in het perssap van aardappelen gevormd kunnen worden, was reeds in 1919 uitvoerig beschreven (Haehn, 1919). Bovendien begint de vorming van stootblauw in de aardappel met een rose kleur stadium, hetgeen ook het geval is bij melaninevorming uit tyrosine. Experimenten waarbij cellen werden gedood maar waarbij de enzymactiviteit onaangetast bleef (Merckenschlager, 1929; zie ook Mulder, 1949, 1955), alsmede vergelijking van stootblauw met het verschijnsel "zwarte harten" (de Bruyn, 1929) leidden tot de conclusie dat de tyrosinase-reactie pas optreedt na necrose van het aardappelweefsel. Aanvankelijk werd door sommigen (bv. de Bruyn, 1929), verondersteld dat deze necrose plaats vindt door het toevallige samengaan van de mechanische beschadiging met een ziekteverschijnsel (zoals een infectie). Dit idee was echter onhoudbaar omdat de praktijk leerde dat ook bij volledig gezonde knollen de stoot alleen voldoende is om het verschijnsel op te roepen (zie bv. Merckenschlager, 1929; Mulder, 1949; Reeve, 1967). Op grond van deze inzichten werd aangenomen dat de mechanische klap desintegratie van de aardappelcellen tot gevolg heeft waardoor vervolgens het vrijgekomen tyrosinase melanine-vorming katalyseert. Dit model, reeds in de jaren twintig geformuleerd (door bv. Merckenschlager, 1929), is tot op heden algemeen geaccepteerd en, ondanks de forse hoeveelheid onderzoek naar stootblauw, niet wezenlijk veranderd.



Figuur 1 Schematische weergave van het proces van stootblauwvorming

Fig. 1 geeft het veronderstelde proces van stootblauwvorming schematisch weer. Een mechanische impuls heeft tot gevolg dat de interne compartimentalisatie van de aardappelcellen wordt opgeheven, zodat enzym(en) behorend tot de groep van de polyfenoloxydases (PPO's, waaronder "tyrosinase") in contact kan komen met de substraten (moleculair zuurstof en diverse fenolische verbindingen). PPO is daardoor in staat de oxydatie van de fenolische substraten te katalyseren, waarbij reactieve chinonen gevormd worden die vervolgens via een polymerisatiereactie spontaan verder reageren tot donkere pigmenten (melanine).

Dit proces kan onderverdeeld worden in een mechanische en in een (bio)chemische fase. De mechanische fase, waarin de decompartmentalisatie plaats vindt, is per definitie typisch voor stootblauw. Hierbij wordt de stevigheid van weefsel en cellen van belang geacht (Hiller et al., 1985; Burton, 1989; Storey en Davies, 1991).

De (bio)chemische fase wordt bepaald door de factoren die de PPO-activiteit reguleren en de beschikbaarheid beïnvloeden van verbindingen die deelnemen aan de kleuringsreacties. Veel auteurs gaan er impliciet vanuit dat de (bio)chemische fase identiek is aan het verkleuringsproces dat plaats vindt na vermalen, uitpersen, schillen of doorsnijden van de knollen (*enzymic browning; enzymic (dis)coloration; enzymatische Braunung; enzymatische Verfärbung*). Naar deze "bruiningsreacties", die ook optreden bij vele andere plantaardige producten, is vooral ten behoeve van de levensmiddelen-industrie veel onderzoek verricht (voor reviews, zie: Mathew en Parpia, 1971; Sapers, 1993; Friedman, 1994). Het is echter niet bewezen dat deze (bio)chemische processen ook werkelijk gelijk zijn aan die welke de stootblauwe kleur van aardappelen veroorzaken. Het blijft dan ook moeilijk in te schatten in hoeverre conclusies gebaseerd op experimenten met "blauw" welke niet met stoten is opgewekt, van toepassing zijn op stootblauw. Tot de bepalingsmethoden voor de stootblauwgevoeligheid van aardappelen worden daarom in deze studie uitsluitend die testen gerekend waarbij de knollen onderworpen worden aan een klap of stoot die de schil intact laat. Alle testen waarbij op andere wijze verkleuring van het weefsel wordt opgeroepen (bijvoorbeeld door schillen of malen) worden hier aangemerkt als een test voor de "enzymatische bruining" in bredere zin. Een kort overzicht van bekende methoden waarop stootblauwgevoeligheid van aardappelen bepaald worden, is te vinden in de bijlage.

In theorie zijn bovengenoemde fasen nog te verfijnen. Zo zou men bijvoorbeeld aan membraan-afbrekende enzymen (fosfolipasen, galactolipasen) een rol kunnen toedenken in het proces van decompartmentalisatie. Omdat deze mogelijkheden niet in de literatuur genoemd worden, komen ze ook in dit literatuuroverzicht niet aan de orde.

3. Polyfenol-oxydase (PPO)

3.1. Argumenten voor de rol van PPO bij stootblauwvorming

De vele auteurs die schrijven dat PPO betrokken is bij stootblauwvorming verwijzen nooit naar studies waarin een direct bewijs voor deze stelling geleverd wordt. Soms wordt slechts gerefereerd aan publikaties over tyrosinase en melaninevorming, zoals die van Haehn (1919), Raper (1927), Mason (1948), en Lerner en Fitzpatrick (1950). Kennelijk leidt de aanname dat stootblauwe pigmenten bestaan uit melanine hier automatisch tot de conclusie dat tyrosinase (PPO) een rol speelt.

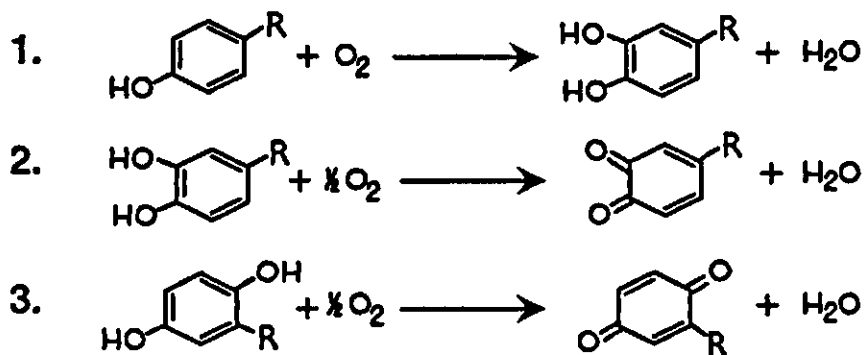
De literatuur biedt wel gegevens die tezamen een aanwijzing vormen dat PPO betrokken is bij stootblauwvorming (zie ook Mulder, 1949, 1955). Zo staat het vast dat de beschikbaarheid van moleculaire zuurstof voor de vorming van stootblauw een absolute vereiste is (Oortwijn Botjes en Verhoeven, 1927; Merckenschlager, 1929; Mulder, 1949, 1955, Dwelle en Stallknecht, 1976), hetgeen aantoont dat het inderdaad om een oxydatie-proces gaat. Kunstmatige opwekking van donkere plekken in aardappelschijfjes door middel van verhitting of toluendamp bleek niet mogelijk na toepassing van temperaturen waarbij enzymen doorgaans denatureren (Mulder, 1949, 1955). Dit duidt erop dat voor het oxydatie-proces werkelijk enzym-activiteit nodig is. Mulder (1949, 1955) liet bovendien zien dat aardappelen met een tekort aan Cu^{2+} significant minder gevoelig zijn voor stootblauwvorming dan aardappelen met voldoende Cu^{2+} . Voor de katalytische activiteit van PPO treedt Cu^{2+} als cofactor op. PPO wordt beschouwd als het enzym dat het meest gevoelig is voor veranderingen van koper-concentraties in de cel (Seliga, 1993). Inderdaad werd voor de knollen lijdend aan kopergebrek een aanzienlijk verminderde tyrosinase-activiteit vastgesteld (Mulder, 1949, 1955).

Hierbij dient opgemerkt te worden dat uit planten nog enkele andere Cu-afhankelijke enzymen bekend zijn die oxydatie-reacties met moleculair zuurstof kunnen katalyseren, zoals ascorbaat-oxydase, quercetin-2,3-dioxygenase, hexose-oxydase, galactose-oxydase, amine-oxydase en *p*-coumarate 3-hydroxylase (zie voor een overzicht: Keevil en Mason, 1978). In theorie kunnen de resultaten van Mulder (1949, 1959) dus ook uitgelegd worden als een aanwijzing voor de betrokkenheid van één of meer van deze enzymen, hoewel ze moeilijk zijn te plaatsen binnen het proces van stootblauwvorming.

3.2. De reacties die gekatalyseerd worden door PPO

Polyfenol-oxydases zijn "*phenol : oxygen oxydo reductases*" en katalyseren dus de oxydatie van fenolische verbindingen waarbij moleculaire zuurstof als waterstof-acceptor optreedt. Men onderscheidt drie typen katalytische activiteit, verdeeld naar de volgende drie groepen oxydatie-reacties (Fig. 2).

1. Hydroxylering van monofenolen tot *o*-difenolen (*monofenol mono-oxygenase* activiteit, ook wel cresolase- of tyrosinase-activiteit genoemd [EC 1.14.18.1])
2. Dehydrogenering van *o*-difenolen tot *o*-chinonen (*o-difenol oxygen oxydoreductase* activiteit, ook wel catecholase-activiteit genoemd [EC 1.10.3.2])
3. Dehydrogenering van *p*-difenolen tot *p*-chinonen (*p-difenol oxygen oxydoreductase* activiteit, ook wel laccase-activiteit genoemd [EC 1.10.3.2]).



Figuur 2 Oxydaties gekatalyseerd door cresolase-activiteit (1), catecholase-activiteit (2) en laccaseactiviteit (3)

Het enzym vertoont voor de hydroxylering van monofenolen een lange inductie-periode ("lagperiode") waarin de reactie uiterst traag verloopt. Deze periode verdwijnt echter al na vorming (of toevoeging) van geringe hoeveelheden produkt (o-dihydroxyfenolen). Ook andere reducerende verbindingen, zoals ascorbinezuur, kunnen de inductie-periode bekorten (Mayer en Harel, 1979, 1991; Mayer, 1987; Matheis, 1987a).

Individuele PPO-enzymen kunnen katalytische activiteit voor een combinatie van bovengenoemde reacties bezitten, hetgeen de nomenclatuur wat complex maakt. Zo worden de enzymen die zowel cresolase- als catecholase-activiteit bezitten ("catechol-oxydases") onderscheiden van de enzymen die daarbij ook nog laccase-activiteit vertonen ("laccases"). Zowel catechol-oxydases als laccases bezitten één of meer koper-atomen die tijdens de reactie een essentiële rol spelen bij de elektronenoverdracht van zuurstof. Verder vertonen beide typen PPO's nauwelijks overeenkomsten. In tegenstelling tot catechol-oxydases, die algemeen voorkomen, worden laccases zelden bij hogere planten aangetroffen en zijn laccases niet in staat de oxidatie van tyrosine te katalyseren (Mayer en Harel, 1991). Voor uitgebreide beschrijvingen van PPO's en speculaties over hun functie in planten wordt hier verwezen naar de overzichtsartikelen van Mayer en Harel (1979, 1991), Vaughn en Duke (1984), Mayer (1987) en Vaughn *et al.* (1988). De overzichten van Matheis (1987a, 1987b) behandelen meer specifiek PPO's en "enzymatic browning" bij aardappelen. Een gedetailleerde discussie over de mechanismen van de PPO-reacties en de rol van koper is te vinden bij Malmström en Rydén (1968).

Omdat in aardappelen geen laccases worden aangetroffen, zijn voor de vorming van stootblauw mogelijk slechts de cresolase-activiteit (hydroxylering van monofenolen, reactie 1) en de catecholase-activiteit (oxidatie van o-difenolen, reactie 2) relevant.

3.3. Bepalingen van PPO-activiteit in aardappelen

Voor de bepaling van cresolase- en catecholase-activiteit zijn diverse methoden bekend. In de wat oudere studies van PPO uit aardappelen werd als maat voor de enzymactiviteit meestal de afname bepaald van moleculaire zuurstof tijdens de incubatie van enzymextract met hetzij monofenolen, hetzij difenolen. Een nadeel hierbij is dat de PPO-activiteit niet te onderscheiden is van eventueel parallel optredende oxidaties. De laatste 20-30 jaar werd PPO-activiteit voornamelijk bepaald door de initiële af- of toename van respectievelijk substraat en produkt spectrofotometrisch te bepalen. Om een voldoende gevoeligheid te verkrijgen werd veelal gewerkt met modelsubstraten die niet in de aardappel voorkomen, zoals *p*-cresol, catechol,

butylcatechol en 4-methylcatechol. In enkele gevallen (Patil en Zucker, 1965; Abakhurma en Woolhouse, 1966; Balasingam en Ferdinand, 1970; Ruis, 1972) werd de PPO-reactie gekoppeld met de oxidatie van ascorbinezuur die dan spectrofotometrisch werd gevolgd.

Voor de spectrofotometrische bepaling van cresolase-activiteit voor het endogene substraat tyrosine is niet eenvoudig omdat zowel tyrosine als het directe produkt dihydroxyfenylalanine geen absorptie-maximum bezitten boven 300 nm. Bovendien blijkt cresolase-activiteit relatief instabiel te zijn (Mayer en Harel, 1991; Matheis en Belitz, 1979a, 1979b) en vormt de hierboven reeds genoemde inductie-periode een complicatie. In de vele tientallen (minstens 70) gepubliceerde studies waarbij op enigerlei wijze activiteitsbepalingen van catechol-oxydases zijn uitgevoerd bij *Solanum tuberosum*, werd dan ook meestal slechts gekeken naar de oxidatie van o-difenolen (catecholase-activiteit).

De nauwkeurigheid vereist dat het enzym tijdens activiteitsbepalingen verzadigd is met substraat. Gezien de relatief geringe oplosbaarheid van de substraten in water en de relatief hoge Km-waarden welke met name voor tyrosine en zuurstof zijn gevonden (zie voor een overzicht Matheis, 1987a) kan dit een probleem vormen.

De betrouwbaarheid van PPO-bepalingen is voorts afhankelijk van eventueel aanwezige verbindingen die het enzym kunnen remmen of die zelf als substraat kunnen optreden. In de meeste studies werd de PPO-activiteit bepaald in een ruw aardappel-extract, waarin potentiële remmers en substraten kunnen voorkomen. In een kleine 30-tal gevallen werd echter een extract gebruikt dat één of meer zuiveringen had ondergaan, zoals aceton-precipitatie, ammoniumsulfaatprecipitatie of size-exclusion chromatografie.

De PPO-reactie genereert reactieve o-chinonen die het enzym tijdens de assay kunnen modificeren en inactiveren. Dit proces kan ook al plaats vinden tijdens de extractie van het enzym. Behalve dat de PPO-bepaling hierdoor wordt beïnvloed, kan het ook leiden tot de kunstmatige vorming van grote aantallen isovormen van PPO (zie hoofdstuk 3.4). Bescherming van PPO tegen de eigen produkten en een goede, partiële voorzuivering van het enzym zijn dus van groot belang. Een vergelijking van enkele voorzuiveringsmethoden is te vinden bij Hsu et al. (1988) en Sánchez-Ferrer et al. (1993c).

Een mogelijke bron van fouten bij de bepaling van PPO-activiteit is de aanwezigheid van peroxidasen. In combinatie met waterstofperoxide zijn peroxidasen in staat substraten van PPO te oxideren. Dit probleem kan voorkomen worden door toevoeging van katalase.

3.4. PPO uit *Solanum tuberosum* L.

Het meeste onderzoek naar PPO uit *S. tuberosum* was gewijd aan PPO uit knollen; slechts enkele studies waren gericht op het enzym uit bladmateriaal (Heinaru et al., 1975; Kowalski et al., 1992; Sánchez-Ferrer et al., 1993).

Op grond van centrifugatie-experimenten neemt men aan dat PPO uit de knol voorkomt als vrij, opgelost enzym, en als deeltjesgebonden enzym (Alberghina, 1964; Craft, 1966; Weaver et al., 1970; Ruis, 1972; Pitt, 1975; Matheis, 1987a). Over de kwantitatieve verhouding tussen deze twee vormen lopen de gegevens sterk uiteen. Weaver et al. (1970) bepaalden het percentage cresolase-activiteit dat precipiteert bij 16,000 g tussen 33 en 51 %; voor de catecholase

activiteit was dit ca. 40 %. Alberghina (1964) vond daarentegen slechts 25 % van de catecholase-activiteit terug in een microsomale (>60, 000 g) fractie. Craft (1966) kon 5 % van zowel cresolase- als catecholase-activiteit bij 12,000 g neerslaan en vervolgens nog eens 5 % bij 90,000 g. Omdat deze laatste fractie eenvoudig in oplossing was te brengen door herhaalde wasstappen concludeerde hij dat dit enzym zwak gebonden zit aan membranen. Ruis (1972) stelde vast dat 57 % van de totale catecholase-activiteit sedimenteert bij 100,000 g. Met behulp van sedimentatie in dichtheidsgradiënten werd zowel door Ruis (1972) als Pitt (1975) een microsomaal deel onderscheiden van een deel dat terecht komt in dezelfde fractie als het enzym katalase, welke in peroxisomen gelocaliseerd is.

De niet-gebonden, vrij oplosbare PPO-activiteit kan in meerdere fracties gescheiden worden met behulp van size-exclusion chromatografie (Balasingam en Ferdinand, 1970; Matheis en Belitz, 1975, 1977a, 1979a, 1979b; Anisimov *et al.*, 1978), polyacrylamide-gel-electroforese (Nye *et al.*, 1968; Cheung en Henderson, 1972; Pendharkar en Nair, 1974; Matheis en Belitz, 1975, 1977a; Watson en Flurkey, 1986), isoelectric focusing (Matheis en Belitz, 1975; Thomas *et al.*, 1978; Thomas en Delincée, 1981), en anionwisselings-chromatografie (Alberghina, 1964; Patil en Zucker, 1965; Abukharma en Woolhouse, 1966). Met polyacrylamide-gel-electroforese en isoelectric focusing werden een groot aantal banden (tot 18 stuks) gevonden die alle catecholase-activiteit vertoonden. Slechts enkele ervan vertoonden ook cresolase-activiteit (Nye *et al.*, 1968; Pendharkar en Nair, 1974; Matheis en Belitz, 1975, 1977a; Thomas *et al.*, 1978). Voor het isoëlectrisch punt van de isovormen werden waarden gevonden die lagen tussen pH 4.4 en 5.8 (Matheis en Belitz, 1975; Thomas *et al.*, 1978; Thomas en Delincée, 1981).

Matheis en Belitz (1979a, 1979b) vonden met size-exclusion chromatografie isovormen met molecuulgewichten van 36 tot 800 kDa die zowel cresolase- als catecholase-activiteit vertoonden. Het vóórkomen van de diverse isovormen was afhankelijk van de pH van het extract. Bij pH 4.5 kwamen vooral laag-moleculaire vormen voor (< 150,000 kDa), bij pH 7.8 vooral hoog-moleculaire vormen (> 150,000 kDa). De cresolase-activiteit bleek bij pH 7.8 zeer instabiel te zijn. De auteurs concludeerden dat er minstens twee isovormen zijn van 36 en 55 kDa die onder invloed van pH en eiwitconcentratie aggregaten kunnen vormen.

In zes publikaties wordt de isolatie van PPO uit knolmateriaal beschreven waarbij homogeen zuiver enzym werd verkregen (Patil en Zucker, 1965; Abakharma en Woolhouse, 1966; Balasingam en Ferdinand, 1970; Batistuti en Lourenco, 1985; Chen *et al.*, 1992; Pathak en Ghole, 1994). Balasingam en Ferdinand (1970) isoleerden één isovorm die uiteen kon vallen in twee kleinere met een molecuulgewicht van ten minste 36 kDa. Chen *et al.* (1992) vonden vier isovormen die samengesteld waren uit één monomeer van 148 kDa. Door middel van bio-affiniteitschromatografie met *p*-aminofenyl azijnzuur als ligand verkregen Pathak en Ghole (1994) uit een ruw knolextract in één isolatiestap homogeen zuiver PPO. Het gezuiverde preparaat bestond uit één eiwit met een molecuulgewicht van 60 kDa.

Boniwell en Butt (1986) beschrijven een wat moeilijk te classificeren enzym uit aardappelknollen dat hydroxylase-activiteit vertoont voor 4-hydroxyfenylpropaan carboxylzuren, waaronder tyrosine en coumaarzuur. Het enzym was afhankelijk van de elektrondonors NADH, NADPH, FAD of FMN, en vertoonde in het geheel geen difenoloxydase-activiteit voor dihydroxyfenylalanine en chlorogeenzuur. De auteurs veronderstelden dat het hier om PPO-activiteit ging. De resultaten van de bepaling van het pH-optimum van PPO lopen uiteen. In de meeste studies werd een optimum gevonden dat overeenkomt met de fysiologische pH van de aardappel (pH 5.6-6.4, Matheis, 1987b).

Recentelijk is cDNA coderend voor PPO uit bladmateriaal van *S. tuberosum* gecloneerd en gekarakteriseerd (Hunt *et al.*, 1993). Hiervoor werd cDNA uit tomaat gebruikt dat geïsoleerd was met behulp van polyclonaal antilichaam opgewekt tegen PPO uit de klierharen van bladeren van de wilde aardappelsoort *Solanum berthaultii*. Deze klierharen vormen een geschikte isolatiebron omdat 70 % van het aanwezige eiwit bestaat uit PPO. Het enzym werd geïsoleerd als monomeer (molecuulgewicht 59 kDa; isoelektrisch punt pH 5,5). Opmerkelijk is dat het enzym slechts catecholase-activiteit bezat (voor o.a. chlorogeenzuur en koffiezuur, nauwelijks voor dihydroxyfenylalanine) en in het geheel geen cresolase-activiteit vertoonde (Kowalski *et al.*, 1992).

3.5. Remmers van PPO-activiteit

De verbindingen die PPO-activiteit remmen kunnen onderverdeeld worden in een groep die interactie aangaat met Cu^{2+} , een groep die affiniteit vertoont voor de bindingsplaats van de fenolische substraten, en een groep die elders op het eiwit bindt. Mayer en Harel (1979) geven van deze remmers een ruime opsomming. Een aantal remmers zijn ook werkzaam gebleken bij PPO uit aardappelknollen (zie bv.: Abukharma en Woolhouse, 1966; Alberghina, 1964; Balasingam en Ferdinand, 1970; Anisimov *et al.*, 1978; Chen *et al.*, 1991a, 1991b; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b). Slechts in enkele gevallen gaat het om verbindingen die van nature in de aardappel voorkomen en dus relevant kunnen zijn voor het proces van stootblauwvorming.

Zo is voor kaneelzuur en voor de kaneelzuurderivaten ferulinezuur en *p*-coumaarzuur aangetoond dat ze PPO-activiteit uit aardappelen remmen, waarbij de inhibitieconstanten van deze verbindingen afhankelijk bleken te zijn van zowel pH als substraat (Macrae en Duggleby, 1968; Batistuti en Lourenco, 1985; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b). Ook benzoëzuur, in uiterst lage concentratie in de aardappel aangetroffen (Malmberg en Theander, 1984), bezit een remmende werking op PPO-activiteit (Balasingam en Ferdinand, 1970; Anisimov *et al.*, 1978).

Ascorbinezuur, dat in aardappelen in relatief grote hoeveelheden voorkomt (zie bv.: Mondy en Leja, 1986; Mondy *et al.*, 1987; Munshi en Mondy, 1989; Mondy en Munshi, 1993a, 1993b), wordt algemeen beschouwd als belangrijkste endogene remmer van de enzymatische bruiningsreactie. Strikt genomen kan deze verbinding echter geen PPO-remmer genoemd worden, omdat het slechts de gevormde *o*-chinonen tot difenolen reduceert (Mayer en Harel, 1979; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b); de verkleuring wordt hiermee slechts uitgesteld totdat alle ascorbinezuur geoxideerd is. Ascorbinezuur kan bovendien de inductie-periode van de cresolase-activiteit verkorten, hetgeen als activering van PPO kan worden beschouwd.

Binnen de knol bevat de cortex minder ascorbinezuur dan de kern, waarbij het relatief blauwgevoelige naveleinde hogere concentraties bevat dan het apicale einde (Munshi en Mondy, 1989). Het gehalte neemt af naarmate de bewaartijd langer is (Plaza *et al.*, 1985; Mondy *et al.*, 1987; Mondy en Munshi, 1993b). Kneuzing van de knollen heeft binnen een dag een grote daling van het ascorbinezuurgehalte tot gevolg (Mondy en Leja, 1986), waarbij de bewaar-temperatuur geen rol speelt (Mondy *et al.*, 1987). Mondy en Munshi (1993b) konden geen correlatie waarnemen tussen ascorbinezuurgehalte en stootblauwgevoeligheid.

Ook het aminozuur L-cysteïne kan de enzymatische verkleuring van aardappel materiaal remmen zonder invloed op PPO zelf uit te oefenen. Men neemt aan dat hierbij de SH-groep van

cysteïne reageert met de gevormde o-chinonen waarbij kleurloze verbindingen ontstaan (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b; Friedman, 1994).

Nilova *et al.* (1973) isoleerden uit aardappelen een "apo-enzym van tyrosinase", dat bestaat uit PPO-eiwit zonder Cu^{2+} . Dit eiwit vertoonde een remmende werking op cresolase-activiteit.

3.6. Activering van latente PPO-activiteit

Een veelvuldig beschreven fenomeen van PPO's uit bovengrondse delen van de plant is dat het enzym in ruwe of gedeeltelijk gezuiverde extracten geactiveerd kan worden door uiteenlopende behandelingen of toevoegingen. Voorbeelden hiervan zijn de activering van PPO in chloroplasten door middel van licht (spinazie-chloroplasten, Tolbert, 1973), activering van PPO door middel van het verwijderen van laag-moleculaire verbindingen (spinazieloof, Sato, 1976), met detergentia (tuinbonen, Robinson en Dry, 1992; spinazie, Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989a; druiven, Sánchez-Ferrer *et al.* 1989b; aardappelloof, Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993a), d.m.v. proteolyse (suikerbietenloof, Mayer, 1966; spinazieblad, Sato 1976; tuinbonenblad, King en Flurkey, 1987; spinazie, Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989a; druiven, Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989b), met gedenatureerd trypsine (spinazie, Tolbert, 1973) en met linoleenzuur (spinazie thylakoiden, Golbeck en Cammarata, 1981). Söderhall *et al.* (1985) isoleerden "profenoloxydase" uit celcultures van *Daucus carota* L.. Dit proenzym kon specifiek geactiveerd worden met Ca^{2+} en Mn^{2+} in concentraties boven 1 mM. Bij toevoeging van trypsine volstonden lagere concentraties. De inactieve vorm was volledig oplosbaar in water, terwijl het actieve enzym overging in aggregaten.

Dit fenomeen zou verklaard kunnen worden met de veronderstelling dat PPO in thylakoïd-membranen verankerd is en daarbij in een inactieve vorm verkeert. Activering zou dan plaats kunnen vinden door verwijdering van het "anker" o.i.v. proteases, of door desintegratie van het membraan dat het PPO omgeeft, o.i.v. detergenswerking van bv. linoleenzuur. De mogelijkheid van een latente, inactieve vorm van PPO's die bij desintegratie van de membranen geactiveerd wordt, zou uiteraard van groot belang kunnen zijn bij het ontstaan van stootblauw. Magere pogingen om dit fenomeen ook aan te tonen in ondergrondse delen van spinazie (Sato, 1982) en van aardappelen (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b) leverden niets op. Dat de latente PPO-activiteit in deze gevallen reeds volledig geactiveerd was als gevolg van de extractie kan niet uitgesloten worden.

3.7. Localisatie van PPO

PPO is niet homogeen over de knol verdeeld. Mulder (1949) stelde vast dat de kern aanzienlijk minder PPO-activiteit bevat dan de cortex. Reeve *et al.* (1969) vonden in de relatief blauw-gevoelige cortex van het navelende bijna twee maal zoveel PPO-activiteit als in de cortex van het apicale einde, terwijl de kern van de knol de minste PPO-activiteit vertoonde. In een vervolgstudie (Weaver *et al.*, 1970) werd bevestigd dat het navelende significant meer PPO-activiteit vertoonde voor de substraten *p*-cresol, tyrosine en catechol dan het apicale einde. Opmerkelijk is dat tussen beide knol-einden geen verschil in PPO-activiteit waargenomen werd voor het substaat chlorogeenzuur.

Samen met de in hoofdstuk 3.4 genoemde centrifugatie-experimenten van Ruis (1972) en Pitt (1975) vormt de studie van Czaninski en Catesson (1974) het enige gepubliceerde onderzoek

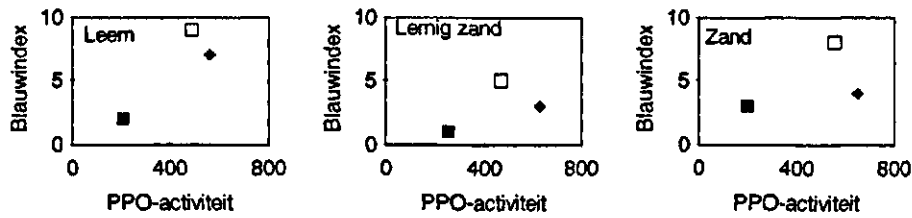
dat uitgevoerd is naar de subcellulaire localisatie van PPO in aardappelknollen. In deze laatstgenoemde studie werden aardappelcoupes geïncubeerd met L-dihydroxyfenylalanine (L-DOPA) waarna met behulp van elektronenmicroscopie de positie van het gevormde melanine werd bepaald binnen de afzonderlijke celorganellen. Buiten de amyloplasten werd geen PPO-activiteit waargenomen. Net als alle andere plastiden zijn amyloplasten omgeven door twee membranen. De nauwe ruimte tussen deze membranen wordt de plastide-enveloppe genoemd. Dit complete systeem van dubbelmembranen omsluit het stroma, waarin zetmeel aanwezig is (omgeven door een enkele membraan) en een lammellair membraan systeem, dat in het geval van chloroplasten met de term thylakoïden wordt aangeduid. De ruimte binnen dit lamellair membraansysteem is het zogenoemde lumen. Czaninski en Catesson (1974) stelden vast dat binnen de amyloplasten reactie-product van L-DOPA werd gevormd in de ruimten die door hen met de termen "*thylakoïds*" en "*vesicles*" werden aangeduid.

De resultaten van Czaninski en Catesson (1974) komen overeen met het grote aantal waarnemingen bij tal van plantesoorten dat PPO exclusief voorkomt in plastiden van uiteenlopend type, zoals leucoplasten, chromoplasten, etioplasten, chloroplasten en amyloplasten. Voor overzichten van deze subcellulaire localisatie-studies wordt verwezen naar Vaughn en Duke (1984), Mayer (1987) en Sherman *et al.* (1991).

Lax *et al.* (1984) concludeerden dat het DNA coderend voor PPO in *Nicotiana*-soorten zich in de celkern en niet in de plastiden bevindt. Uit de moleculair-biologische studies van Hunt *et al.* (1993) bleek dat processing plaats vindt van precursor-PPO, waarbij een keten van ca. 8 kDa wordt afgesplitst. De auteurs vermoedden dat deze korte eiwitketen fungeert als *transit*-peptide bij het transport van PPO naar de plastide. Deze hypothese werd recentelijk ondersteund door het werk van Sommer *et al.* (1994), die opname en transport van [³⁵S]methionine-gelabeld precursor-PPO (verkregen door *in vitro*-transcriptie en -translatie van een gen uit tomaat) in geïsoleerde chloroplasten (van erwten, tomaat en mais) bestudeerden. PPO bleek in twee stappen naar het thylakoïdlumen getransporteerd te worden. Het 67 kDa precursor-PPO werd eerst naar het stroma overgebracht via een ATP-afhankelijke stap, waarbij het eiwit met behulp van een peptidase verkleind werd tot 62 kDa. Vervolgens kon dit PPO-intermediair via een lichtafhankelijke stap naar de binnenzijde van de thylakoïden getransporteerd worden waarbij via processing van de 62 kDa-keten het uiteindelijke PPO van 59 kDa ontstond. Dit eindproduct was niet gebonden aan de thylakoïden maar volledig opgelost in het lumen. De verhouding die aanwezig is in de plant tussen de intermediaire vorm en de uiteindelijke vorm van PPO bleek afhankelijk van plantesoort, bladleeftijd, groeiomstandigheden en lichtregime.

3.8. Correlatie van PPO-activiteit met stootblauwgevoeligheid

De resultaten van de schaarse studies naar een mogelijke correlatie tussen PPO-activiteit en stootblauwgevoeligheid zijn niet eenduidig. Vertregt (1968) vond geen samenhang tussen mate van blauwgevoeligheid en PPO-activiteit. Weaver *et al.* (1970) namen een positieve correlatie waar tussen blauwgevoeligheid en PPO-activiteit voor catechol. Wanneer *p*-cresol, tyrosine of chlorogeenzuur als substraat werd gebruikt, kon echter geen correlatie worden vastgesteld. Kennelijk was de substraatspecificiteit van het door hen bepaalde enzym niet constant. Zij geven hiervoor geen verklaring. Clark *et al.* (1957) vergeleken twee rassen en concludeerden dat het blauwgevoelige ras meer PPO-activiteit vertoonde. De resultaten van



Figuur 3 Blauwgevoeligheid uitgezet tegen relatieve PPO-activiteit in de knol van verschillende aardappelrassen geteeld op drie grondsoorten. Voor de blauwindex geldt: 1 = zeer geringe blauwgevoeligheid; 9 = zeer ernstige blauwgevoeligheid. ■ = Bintje; □ = Irmgard; ◆ = Maritta (Amberger en Schaller, 1975).

Amberger en Schaller (1975) laten echter zien dat rassen met relatief geringe PPO-activiteit blauwgevoeliger kunnen zijn dan rassen die een ruime PPO-activiteit bezitten (Fig. 3), en dat de PPO-activiteit in hoge mate afhankelijk is van het ras. De stootblauwgevoeligheid neemt toe naarmate aardappelen langer bewaard worden, terwijl volgens Cheung en Henderson (1972) de PPO-activiteit afneemt gedurende de bewaring. Ook dit suggereert dat de PPO-activiteit niet bepalend is voor de mate van blauwgevoeligheid.

Meer publikaties zijn verschenen over een mogelijke correlatie tussen PPO-activiteit en de neiging tot "bruinverkleuring" in ruimere zin (bijvoorbeeld in aardappelpulp, op snijvlakken van aardappelen of na schillen). Ook hier zijn de conclusies niet eensluidend (zie voor een overzicht Matheis, 1977b).

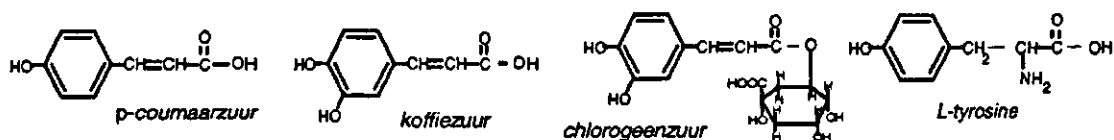
Dat er geen duidelijke correlatie tussen blauwgevoeligheid en PPO-activiteit gevonden is, kan uitgelegd worden als een aanwijzing dat PPO geen limiterende factor is voor blauwvorming.

Het is bekend dat stress, zoals een virus-infectie en bestraling, invloed kan hebben op de PPO-activiteit (Ogawa en Uritani, 1970; Cheung en Henderson, 1972; Pendharkar en Nair, 1974; McLaughlin, 1983). Onduidelijk is of dit ook voor een mechanische impact geldt. De resultaten van Belknap *et al.* (1990) wijzen erop dat kneuzing van het weefsel zoals dit bij stootblauwvorming plaats vindt geen effect heeft op de PPO-activiteit in de knol. Cheung en Henderson (1972) namen bij gekneusde knollen daarentegen wel een significante verhoging van de PPO-activiteit waar.

4. Potentiële substraten voor stootblauwvorming

4.1. Fenolische verbindingen

De substraatspecificiteit van PPO uit aardappelknollen is uitvoerig bestudeerd door Baruah en Swain (1959), die 40 potentiële substraten testten, waaronder flavonoiden en coumarines. De verhouding tussen specifieke PPO-activiteiten voor een kleiner aantal substraten is bekeken door Alberghina (1964), Abukharma en Woolhouse (1966), Patil en Zucker (1965), Pendharkar en Nair (1974), en Matheis en Belitz (1975, 1977b). Een overzicht van K_m -waarden bepaald voor chlorogeenzuur, L-dihydroxyfenylalanine en L-tyrosine wordt gegeven door Matheis (1987a). Uit deze studies blijkt dat PPO uit aardappelknollen in staat is een groot aantal monofenolen en *o*-dihydroxyfenolen te oxideren, waartoe behalve fenylpropanen ook flavonoïd-aglyconen en coumarines behoren. Ortho-gesubstitueerde monofenolen (ferulinezuur; vanillinezuur; *o*-cresol; guaiacol) en *m*-dihydroxyfenolen (1,3-dihydroxybenzeen; 1,3,5-trihydroxybenzeen) worden daarentegen niet geaccepteerd door het enzym (Baruah en Swain, 1959; Macrae en Duggleby, 1968).



Figuur 4 Mogelijke substraten voor stootblauwvorming

Wanneer uit het grote aantal PPO-substraten uitsluitend die verbindingen worden geselecteerd waarvan de aanwezigheid in de aardappelknol is aangetoond, blijft slechts een kleine groep over die relevant is voor stootblauwvorming. Deze groep bestaat uit het aminozuur tyrosine en de fenylpropan-verbindingen *p*-coumaarzuur, koffiezuur en chlorogeenzuur¹ (Fig. 4). Hierbij dient opgemerkt te worden dat de beschikbare gegevens over *p*-coumaarzuur tegenstrijdig zijn; alleen Patil en Zucker (1965) vonden (geringe) katalytische activiteit van PPO voor *p*-coumaarzuur, terwijl Baruah en Swain (1959) in het geheel geen activiteit voor dit substraat waarnamen. Bovendien is *p*-coumaarzuur door anderen als remmer van PPO aangemerkt (zie hoofdstuk 3.5). De in aardappelen aangetroffen coumarines (scopoline, scopoletine, aesculine; Harborne, 1960a, 1960b, 1962; Baruah en Swain, 1959; Matheis en Belitz, 1977b) zijn niet relevant omdat ze door PPO niet als substraat geaccepteerd worden (Baruah en Swain, 1959; Matheis en Belitz, 1977b). In de knollen zijn geen significante hoeveelheden flavonoiden gedetecteerd, op enkele anthocyanen na; ook deze kunnen hier buiten beschouwing gelaten worden, omdat ze uitsluitend in de schil voorkomen (Harborne, 1960a, 1960b, 1962). Tabel 1 geeft een overzicht van tyrosine-, *p*-coumaarzuur-, koffiezuur- en chlorogeenzuur-

¹ Naast chlorogeenzuur (3-caffeoylquinic acid) zijn in de aardappel ook nog geringe hoeveelheden van de chlorogeenzuur-isomeren 4-caffeoylquinic acid (crypto-chlorogeenzuur) en 5-caffeoylquinic acid (neo-chlorogeenzuur), en verwaarloosbare hoeveelheden "isochlorogeenzuren" (3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid) aangetroffen (Brandl en Herrmann, 1984). Het is niet bekend of deze verbindingen door PPO als substraat geaccepteerd worden. Desondanks worden ze hier toch als PPO-substraat beschouwd en zonder onderscheid onder de noemer "chlorogeenzuur" besproken.

gehalten in aardappelknollen zoals vermeld in de literatuur. Uitgaande van deze gegevens kan berekend worden dat de gehalten *p*-coumaarzuur en koffiezuur in de orde liggen van ca. 5-90 μmol per kg versgewicht. Dat is verwaarloosbaar ten opzichte van de in tabel 1 vermelde hoeveelheden tyrosine en chlorogeenzuur, die beide liggen in de orde van ca. 100-1200 μmol per kg versgewicht (met uitschieters tot ca. 5000 μmol per kg versgewicht; Malmberg en Theander, 1984; Mulder, 1949; Vertregt, 1968).

Het is mogelijk dat de stootbeschadiging de biosynthese van bovengenoemde verbindingen activeert zodat de concentraties drastisch gewijzigd worden. Figuur 5 geeft de biosynthese van de relevante verbindingen schematisch weer. Zoals in de meeste planten wordt de aanmaak van fenylpropaanverbindingen in *Solanum tuberosum* gestimuleerd door weefselverwonding en aanval van pathogenen (Hahlbrock en Scheel, 1989). Over eventuele activering van deze route in het specifieke geval van stoten is niet veel bekend. Reeve (1967) vond met zijn histologische studies aanwijzingen dat chlorogeenzuur accumuleerde op de plekken waar stootblauwvorming was waar te nemen.

Tabel 1 Gepubliceerde gehalten van tyrosine, *p*-coumaarzuur, koffiezuur en chlorogeenzuur in de aardappelknol. DW: drooggewicht; FW: vers gewicht.

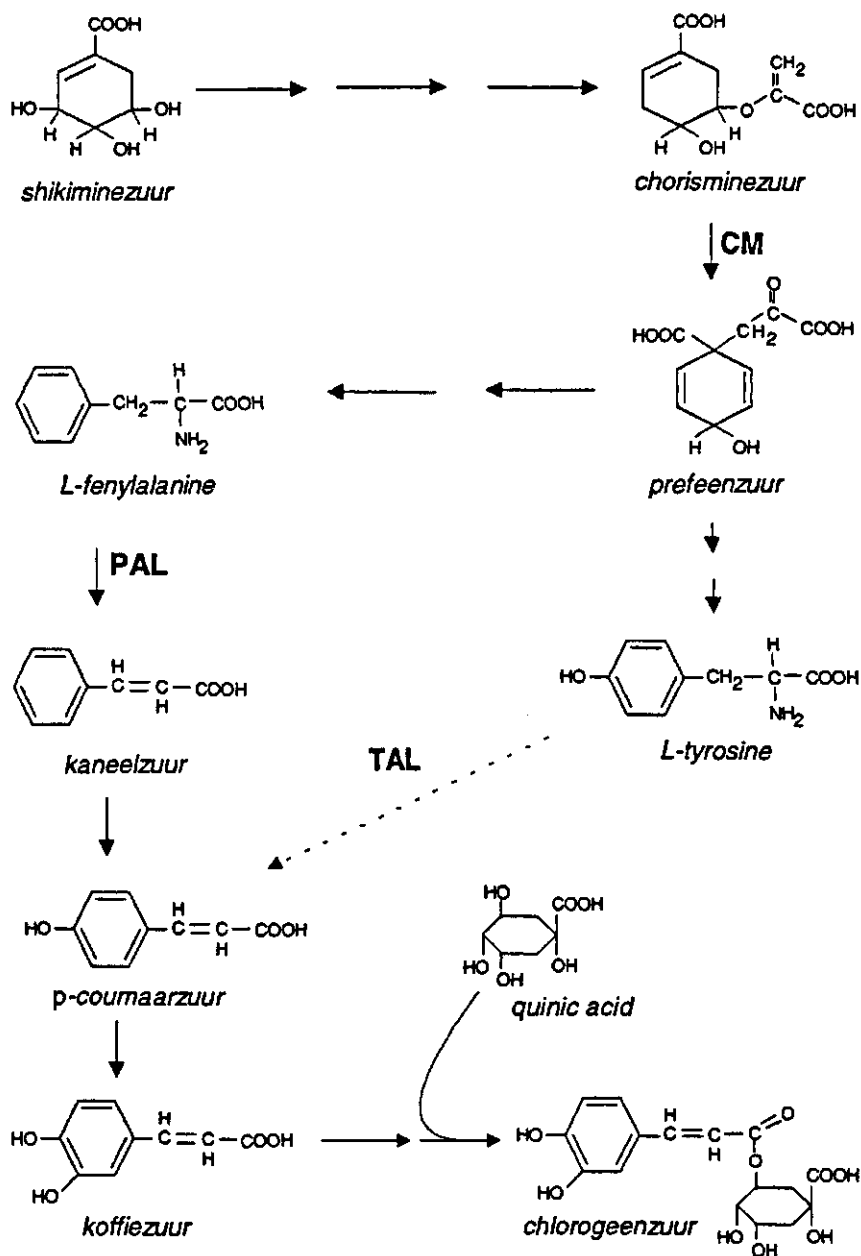
Verbinding	Gehalte in de knol	Referentie
L-Tyrosine	1083 - 2431 μmol per l sap	Matheis en Belitz, 1977b
	500 - 3600 μg per g DW	Mulder, 1949
	152 - 303 μg per g DW	Dean <i>et al.</i> , 1992
	79 - 750 μg per g DW	Dean <i>et al.</i> , 1993
	61 - 374 μg per g DW	Dean <i>et al.</i> , 1994
	848 μg per g DW	Baumgartner <i>et al.</i> , 1983
	0,2 - 1,8 mmol per l sap	Vertregt, 1968
	10 - 180 μg per g FW	Mapson <i>et al.</i> , 1963
	0,8 - 4,4 μmol per g DW ^{a)}	Corsini <i>et al.</i> , 1993
30 - 260 μg per g FW	Mondy en Munshi, 1993b	
92 - 168 μg per g FW	Sweeney, 1969	
<i>p</i> -Coumaarzuur	"traces" ^{b)}	Sosulski <i>et al.</i> , 1982
	0,05-0,43 μmol per g DW ^{c)}	Malmberg en Theander, 1984
Koffiezuur	"traces" ^{d)}	Sosulski <i>et al.</i> , 1982
	29-93 μmol per l sap	Matheis en Belitz, 1977b
	1-3 ppm	Brandl en Herrmann, 1984
	12-82 μg per g DW	Dean <i>et al.</i> , 1993
Chlorogeenzuur	246 - 602 μmol per l sap	Matheis en Belitz, 1977b
	90 - 190 μg per g FW	Dao en Friedman, 1992
	490 - 1690 μg per g DW	Wynne Griffiths <i>et al.</i> , 1992
	30 - 100 ppm	Brandl en Herrmann, 1984
	80 - 180 μg per g FW	Mapson <i>et al.</i> , 1963
	60 μg per g FW	Baumgartner, 1983
	4,7 - 20 μmol per g DW	Malmberg en Theander, 1984
	312 - 1036 μg per g DW	Dean <i>et al.</i> , 1993
0,14 - 1,32 μmol per g FW	Amberger en Schaller, 1975	

a) bepaald in het knolweefsel van schil tot 10 mm diepte

b) alleen in veresterde vorm aanwezig, bepaald in gehydrolyseerd extract van geschilde aardappel

c) alleen in veresterde vorm aanwezig, bepaald in gehydrolyseerd extract

d) bepaald in geschilde aardappel



Figuur 5 Schematische weergave van de biosynthese van fenylpropanen.
 CM = chorismaatmutase (EC 5.4.99.5);
 PAL = L-fenylalanine ammonialyase (EC 4.3.1.5);
 TAL = L-tyrosine ammonialyase.

Belknap et al. (1990), Belknap en Rickey (1990), en Rickey en Belknap (1991) bestudeerden de relatie tussen blauwvorming en activiteit van enzymen in de biosynthese van fenylpropanen. Zij volgden tijdens de ontwikkeling van stootblauw de activiteiten van chorismaat mutase (CM, Figuur 5), tyrosine ammonium-lyase (TAL, Fig. 5) en 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (enzym in de biosynthese-route van shikimaat). Deze bleken nagenoeg constant te blijven. Wel werd na stoten een verhoogde gen-expressie van fenylalanine ammonia lyase (PAL, Figuur 5) waargenomen en reacties die algemeen zijn bij stress, zoals een toename van ubiquitine en HSP70, en een afname van het transcriptie-niveau voor patatine. In een recente karakteriseringsstudie van genotypen met uiteenlopende blauwgevoeligheid werd geconcludeerd dat chorismaatmutase-activiteit (CM, Figuur 5) niet gecorreleerd is met

blauwgevoeligheid (Sabba en Dean, 1994). Dit sluit echter niet uit dat blauwgevoeligheid samenhangt met een verhoogde biosynthese van fenylpropanverbindingen; de in de knol aanwezige hoeveelheden CM, TAL en 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate-synthase zijn hiervoor immers niet noodzakelijk limiterend.

Tenslotte moet hier nog de theoretische mogelijkheid genoemd worden dat de stootbeschadiging de biosynthese initiëert van verbindingen die in onbeschadigde knollen niet voorkomen en die ook als substraat kunnen dienen voor stootblauwvorming. De literatuurgegevens bieden hiervoor echter geen enkele aanwijzing.

4.2 Localisatie van de fenolische substraten

In tegenstelling tot tyrosine, dat meer gelijkmatig over de knol verdeeld is, vertoont chlorogeenzuur een negatieve concentratiegradiënt vanaf de schil naar de kern (Reeve *et al.*, 1969; Brandl en Herrmann, 1984; Jonasson en Olsson, 1994); de schil bevat zelfs 50 % van het totaal van koffiezuurverbindingen (chlorogeenzuur + koffiezuur; Brandl en Herrmann, 1984). De tyrosine- en chlorogeenzuurgehaltes van het naveleinde zijn hoger dan die van het apicale einde (Mulder, 1949; Reeve *et al.*, 1969; Sweeney, 1969; Corsini *et al.*, 1992).

Over de subcellulaire compartimentalisatie van de fenolische PPO-substraten bestaat geen duidelijkheid. Wel is aangetoond dat tenminste een deel van de biosynthese van deze verbindingen plaats vindt in plastiden (Jensen, 1986; zie voor een overzicht van de shikimaat-route: Bently, 1990). Algemeen wordt verondersteld dat de meeste fenolische verbindingen opgeslagen worden in de vacuole (Vaughn en Duke, 1984), maar of dat voor aardappelen ook het geval is, is niet bekend.

Het aminozuur tyrosine is een bouwsteen voor eiwit, hetgeen betekent dat tyrosine in alle compartimenten voorkomt waar eiwitsynthese plaatsvindt. Dit zijn niet alleen het cytosol en de mitochondriale matrix, maar ook het stroma binnen plastiden.

4.3. Correlatie van substraatconcentratie en stootblauwgevoeligheid

De in hoofdstuk 4.1 besproken gegevens duiden erop dat chlorogeenzuur en tyrosine de belangrijkste fenolische substraten zijn voor blauwvorming. Er zijn dan ook verscheidene studies uitgevoerd waarin getracht werd een correlatie vast te stellen tussen de gehalten van tyrosine en chlorogeenzuur enerzijds en de stootblauwgevoeligheid van de knol anderzijds. Tabel 2 geeft hiervan een overzicht. Over het algemeen wijzen de resultaten erop dat het chlorogeenzuurgehalte geen invloed heeft op de blauwgevoeligheid van de knol. Voor het tyrosinegehalte werd daarentegen in de meeste gevallen wel een positieve correlatie met de blauwgevoeligheid vastgesteld. Figuur 6 toont het verband tussen blauwindex en tyrosinegehalte welke door Corsini *et al.* (1992) werd bepaald. Uit enkele van de in tabel 2 genoemde studies (Dean *et al.*, 1993; Corsini *et al.*, 1992; Mondy en Munshi, 1993b) en uit andere studies is gebleken dat een verhoogd tyrosinegehalte tevens samenvalt met een verhoogde gevoeligheid voor de zogenoemde enzymatische bruining (Mapson *et al.*, 1963; Sweeney, 1969; Umaerus en Olssen, 1974; Stark *et al.*, 1985; Sabba en Dean, 1994). Alleen Matheis en Belitz (1977c) vonden geen correlatie tussen tyrosinegehalte en enzymatische bruining.

Tabel 2 Correlatie tussen chlorogeenzuurgehalte en stootblauwgevoeligheid, en tyrosinegehalte en stootblauwgevoeligheid, zoals vermeld in aangegeven literatuur. In alle gevallen werd de blauwgevoeligheid bepaald door beoordeling van blauwkleuring van knollen die gekneusd waren met een mechanische klap, toegebracht met een vallend gewicht ([1], [2], [3], [5]), in een schudtrommel ([6]), door 5 minuten schudden in een glazen fles ([4]), of op niet nader aangeduide wijze ([7]). Positieve correlatie is aangegeven met +, negatieve correlatie met -, en geen correlatie met O.

Fenolische verbinding	Correlatie	Referenties
Chlorogeenzuur	+	[1]
	o	[2], [3]
	-	-
Tyrosine	+	[4], [6], [5], [6]
	o	[1], [4], [7]
	-	-

[1] Baumgartner *et al.*, 1983;

[2] Dean *et al.*, 1993;

[3] Amberger en Schaller, 1975;

[4] Mulder, 1949;

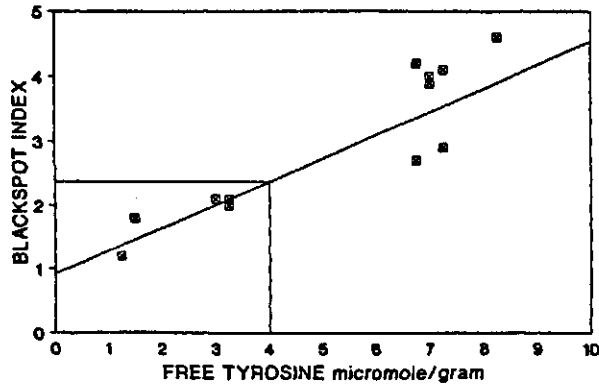
[5] Corsini *et al.*, 1992;

[6] Mondy en Munshi, 1993b;

[7] Vertregt, N., 1968.

Het tyrosinegehalte in de knol vertoont een sterke toename tijdens de groei en neemt licht toe gedurende de bewaring (Corsini *et al.*, 1992; Mondy en Munshi, 1993b). Mapson *et al.* (1963) concludeerden dat vooral genetische en klimatologische factoren het tyrosinegehalte bepalen.

Hierboven is steeds gesproken over tyrosine als zogenaemd "vrij" molecuul, terwijl het tyrosine dat in eiwit is ingebouwd buiten beschouwing werd gelaten. Er lijkt echter ook een relatie te bestaan tussen blauwgevoeligheid en het gehalte eiwitgebonden tyrosine. Mulder (1949) deed de waarneming dat het gehalte "vrij" tyrosine significant afnam bij een verhoogde kaliumgift, maar dat desondanks het gehalte eiwitgebonden N niet afnam. Stark *et al.* (1985) en Corsinini *et al.* (1992) vergeleken klonen met uiteenlopende blauwgevoeligheid en vonden dat de klonen met geringe blauwgevoeligheid een relatief hoog eiwitgehalte en relatief laag "vrij" tyrosinegehalte vertoonden. Deze resultaten suggereren dat een verhoogde eiwitsynthese een afname van de hoeveelheid "vrij" tyrosine tot gevolg heeft, en dat alleen "vrij" tyrosine deelneemt aan de vorming van stootblauw, zodat een voldoende verhoging van de eiwitsynthese per saldo tot een vermindering van de blauwgevoeligheid leidt. Het werk van Dean *et al.* (1992) lijkt deze hypothese ten dele te ondersteunen. Zij stelden vast dat een blauwgevoelige variëteit slechts 10 % van het totaal gesynthetiseerde tyrosine in eiwit had ingebouwd, terwijl dit voor een resistente variëteit 30 % was; tevens bleek echter de biosynthese van tyrosine bij de blauwgevoelige variëteit 55 % hoger te zijn. Overigens is aangetoond dat PPO uit champignons wel in staat is de oxidatie van tyrosine in eiwit te katalyseren (Yasunobu *et al.*, 1959; Ito *et al.*, 1984).



Figuur 6 Relatie tussen blauwindex van 12 aardappelklonen en gehalte 'vrij' tyrosine in de knollen. Voor de blauwindex geldt: 0 = zeer geringe blauwgevoeligheid, 5 = zeer ernstige blauwgevoeligheid; blauwindex = $0,85 + 0,41 (\mu\text{mol/g tyrosine})$; $r = 0,90$, $p = 0,001$.
Uit: Corsini *et al.*, 1992.

Sabba en Dean (1994) bepaalden met synthetische substraten protease-activiteit in diverse genotypen en vonden een positieve correlatie tussen blauwgevoeligheid en protease-activiteit. Omdat daarbij geen correlatie tussen blauwgevoeligheid en chorismaatmutase-activiteit (zie hoofdstuk 4.1, Fig. 5) werd waargenomen, suggereren de auteurs dat het gehalte vrij tyrosine niet zozeer door de tyrosine-biosynthese wordt gereguleerd, als wel door de activiteit van proteases.

4.4. Zuurstof

Bij de door PPO gekatalyseerde oxidatie van het fenolisch substraat treedt moleculaire zuurstof (O_2) op als waterstof-acceptor. Zonder O_2 kan de reactie niet verlopen en ontwikkelt zich geen stootblauw, zoals veelvuldig is aangetoond is (zie o.a. Mulder, 1955; Dwelle en Stallknecht, 1976). PPO vertoont een relatief lage affiniteit voor O_2 (Maier en Harel, 1979; Matheis, 1987a), zodat voor een maximale reactie-snelheid relatief hoge O_2 -concentraties nodig zijn.

Mulder (1955) concludeerde dat de hoeveelheid O_2 in de knol beperkend is voor de snelheid waarmee de blauwe plekken zich ontwikkelen. Deze conclusie werd ondersteund door de bevindingen van Duncan (1973); de tijd benodigd voor maximale blauwkleuring was 2 uur met 100 % O_2 onder een druk van $1,4 \text{ kg/cm}^2$, 8-12 uur met lucht onder dezelfde druk, en 3 dagen met lucht onder een druk van 1 atmosfeer. Dwelle en Stallknecht (1976) vonden dat de incubatie-temperatuur van de knollen na stoten eveneens een grote invloed heeft op de snelheid van blauwvorming; bij 40°C ontwikkelden de knollen maximale blauwkleuring binnen 6 uur. Zij stelden echter tevens vast dat bij deze incubatie-temperatuur de toepassing van lucht of O_2 onder druk geen significant effect meer heeft op de verkleuringssnelheid.

Deze gegevens wijzen erop dat de beschikbaarheid van zuurstof slechts bepalend is voor de snelheid van blauwverkleuring en geen invloed heeft op de mate van blauw worden.

Moleculair zuurstof is een klein en relatief apolair molecuul dat daarom gemakkelijk membranen kan passeren. Binnen de aardappel en binnen de individuele cellen van de aardappel zijn geen anaërobe ruimtes bekend. Het is daarom te betwijfelen of O_2 strikt gecompartmentaliseerd is.

5. De chemische structuur van het stootblauwe pigment en van de intermediären in de blauwsynthese

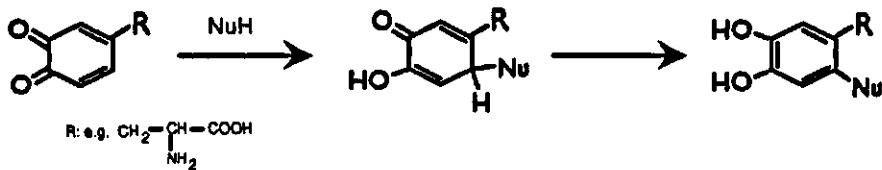
De chemische structuur van het donkere pigment dat uiteindelijk bij stootblauw ontstaat, is nooit opgehelderd. Algemeen wordt aangenomen dat het "blauw" melanine is. Alleen Van Middlem et al. (1953) geven voor deze aanname enige experimentele onderbouwing; zij namen absorptiespectra op van stootblauwe pigmenten in natronloog en vonden dat die overeenkwamen met de spectra van melanine dat kunstmatig bereid was uit aardappelsap en tyrosine.

De term "melanine" bezit geen chemische betekenis, maar is slechts de verzamelnaam voor zwarte pigmenten van biologische oorsprong ($\mu\epsilon\lambda\alpha\varsigma$ = zwart), hoewel sommige melanines bruin zijn, of geel. Veelal worden melanines omschreven als pigmenten met een hoog moleculgewicht die ontstaan door enzymatische oxidatie van fenolen. Een welomschreven, algemeen gehanteerde definitie bestaat echter niet. Voor gedetailleerde overzichten gewijd aan melanines wordt hier verwezen naar Nicolaus (1968) en Swan (1974).

Melanines worden doorgaans onderverdeeld in drie groepen. De *eumelanines* bevatten stikstof en worden gevormd uit tyrosine en daaraan nauw verwante verbindingen als dihydroxy-fenylalanine, tyramine en dopamine. Ze zijn meestal zwart. De *feomelanines* zijn daarentegen roodbruin en bevatten stikstof en zwavel; ze worden gevormd uit een combinatie van tyrosine en cysteïne. Eumelanines en feomelanines komen vooral voor in dierlijke organismen als pigmenten in bijvoorbeeld haar, veren, sproeten, en melanoma. Als derde groep worden de *allomelanines* onderscheiden, die meestal zwart zijn en voornamelijk in het plantenrijk worden aangetroffen. Ze bevatten geen stikstof en worden gevormd uit de oxidatie van difenolen zoals catechol. Tyrosine is dus geen bouwsteen voor allomelanines.

Het meeste onderzoek dat tot op heden uitgevoerd is naar melanine heeft betrekking op eumelanine uit dierlijk weefsel. Swan (1974) beschrijft deze groep als polymeren van onregelmatige structuur die vaak geconjugeerd zijn met een eiwitmolecuul. Ze zijn onoplosbaar in nagenoeg alle oplosmiddelen; sommige eumelanines lossen alleen op in loog. Ze bezitten geen duidelijk omschreven fysische karakteristieken en zijn zeer moeilijk te zuiveren. De grote, complexe verbindingen zijn niet onder milde chemische condities in kleinere eenheden af te breken, hetgeen de structuuropheldering extra bemoeilijkt. In het melanine-onderzoek is het lonender gebleken te zoeken naar de identiteit van de substraten en intermediären van de biosynthese, dan naar de chemische structuur van het melanine zelf.

Zoals in hoofdstuk 2 is aangegeven, leidt de eerste stap van de stootblauw(bio)synthese (gekatalyseerd door PPO) tot de vorming van *o*-chinonen. Hoewel de daarop volgende reacties in het proces van blauwworming niet opgehelderd zijn, bestaat er wel een ruime kennis over de reacties die deze *o*-chinonen kunnen aangaan (een uitgebreide bespreking van de chemie van *o*-chinonen in biologische systemen is te vinden in het overzichtsartikel van Peter, 1989; zie ook: Matheis en Whitaker, 1984).



Figuur 7 Conjugatie van een nucleofiel (Nu) met een o-chinon, via nucleofiele additie

o-Chinonen kunnen gemakkelijk een nucleofiele additie ondergaan zoals aangegeven in figuur 7. Hierbij ontstaat dan het gesubstitueerde difenol dat bij aanwezigheid van voldoende hoeveelheden oxidator (bijvoorbeeld de door PPO gevormde o-chinonen zelf) opnieuw geoxideerd kan worden tot het gesubstitueerde o-chinon. Deze kan dan een tweede nucleofiele additie ondergaan. Op deze wijze kunnen grote netwerken gevormd worden. In biologische systemen verlopen deze reacties vaak spontaan, zonder tussenkomst van enige enzymactiviteit. Theoretisch kunnen een groot aantal functionele groepen als nucleofiel optreden, zoals thiolen, thioethers, primaire en secundaire amines, en hydroxylgroepen. Deze groepen zijn vooral aanwezig op aminozuren en eiwitten; nucleïne-zuren bevatten aromatische amines, terwijl (poly)sachariden slechts hydroxylgroepen in kunnen brengen.

In de praktijk blijkt dat in het waterige milieu van de cel de SH-groepen van cysteïne vaak de meest reactieve nucleofielen zijn. Ook de amino-groepen van lysine en histidine worden soms aangemerkt als belangrijke nucleofielen. Nucleofiele additie van de hydroxylgroep van serine, hydroxyproline en threonine op chinonen zijn niet bekend (Peter, 1989). De reacties van de o-chinonen van koffiezuur en chlorogeenzuur met aminozuren en eiwitten zijn uitgebreid bestudeerd door Pierpoint (1965, 1966, 1969a, 1969b). Aangetoond is dat bij de bruinverkleuring van tabak chlorogeenzuur gekoppeld wordt met eiwit; hierbij werd geconcludeerd dat binding plaats vindt op lysine-eenheden binnen het eiwit (Anderson *et al.*, 1970; Laird *et al.*, 1979; Eagles *et al.*, 1980). Hetzelfde is waargenomen in zaden van zonnebloemen (Davies *et al.*, 1978). Pierpoint *et al.* (1977) incubeerden *potato virus X* met chlorogeenzuur en PPO uit tabak, waarbij het virus-eiwit gemodificeerd werd door conjugatie met chlorogeenzuur, vermoedelijk via lysine-eenheden. Davies en Laird (1976) vonden dat de fractie "chemisch vrij" lysine afneemt tijdens de bruinverkleuring van fijn gemalen aardappelen. Wel namen ze een significante afname van tyrosine, chlorogeenzuur en een afname van cysteïne waar in hydrolysaat van het aanwezige eiwit.

De bovengenoemde gegevens wijzen op de mogelijkheid dat stootblauw ontstaat via covalente binding van peptides en enkele aminozuren met de o-chinonen van fenolen als tyrosine, koffiezuur en chlorogeenzuur. Het produkt is dan een heterogene groep van complexe polymeerverbindingen.

6. Slotsom

De vele publikaties die zijn verschenen over stootblauw bij aardappelen tonen het bestaan van een redelijk algemeen aanvaarde hypothese over de wijze waarop stootblauw tot stand komt. Uit het hierboven gegeven literatuuroverzicht blijkt dat over afzonderlijke (bio)chemische elementen uit dit model, zoals bijvoorbeeld PPO, de biosynthese van de vermoedelijke substraten en reacties van chinonen in biologische systemen, een ruime hoeveelheid informatie bestaat. In het navolgende zal worden nagegaan in hoeverre de literatuurgegevens antwoord geven op de in de inleiding aan de orde gestelde vragen, zodat de balans opgemaakt kan worden over nog uit te voeren onderzoek.

Er zijn geen studies bekend naar identiteit en chemische structuur van het stootblauwe pigment. Men neemt aan dat het om melanine gaat. De eerste stap in de vorming van melanine wordt gekatalyseerd door het enzym polyfenoloxydase (PPO). Afgezien van zuurstof zijn de belangrijkste in de aardappelknol aanwezige substraten voor PPO tyrosine, chlorogeenzuur en koffiezuur (hoofdstuk 4.1). De in hoofdstuk 5 gepresenteerde gegevens maken duidelijk dat in geval van oxidatie van de endogene PPO-substraten het stootblauwe melanine zeer wel een mengsel kan zijn van polymeerverbindingen, opgebouwd uit peptideketens, enkele aminozuren en fenolische verbindingen. Om hierover uitsluitel te verkrijgen is het van belang het blauw te isoleren en te karakteriseren; dit immers kan leiden tot zowel identificatie van de substraten als tot een beter inzicht in het uiteindelijke verloop van het chemische proces van blauwvorming.

Het staat vast dat de vorming van stootblauw via één of meer oxidatie-reacties verloopt met moleculaire zuurstof als essentieel substraat. Zoals aangegeven in hoofdstuk 3.1 is het enzym dat hierbij optreedt waarschijnlijk PPO, welke in ruime mate in aardappelen voorkomt. In theorie zijn voor de vorming van melanine geen andere enzymen dan PPO nodig, omdat de produkten van de door PPO gekatalyseerde reactie spontaan verder kunnen reageren tot donkere verbindingen (hoofdstuk 5). De literatuur noemt dan ook PPO als enige enzym dat direct betrokken is bij de vorming van de blauwe pigmenten.

De PPO-activiteit kan gereguleerd worden door endogene remmers als kaneelzuur en kaneelzuurderivaten. Het is onduidelijk welke rol deze remmers feitelijk spelen bij stootblauw. Dit geldt ook voor ascorbinezuur. Enerzijds wordt de lag-fase van de cresolase-activiteit van PPO door ascorbinezuur bekort, anderzijds is ascorbinezuur reductor voor de gevormde chinonen, waardoor ascorbinezuur het verkleuringsproces kan vertragen. PPO kan in bovengrondse plantedelen vóórkomen in een latente vorm die op uiteenlopende wijze, zoals door proteases, geactiveerd kan worden (hoofdstuk 3.5). Het is niet goed onderzocht of een dergelijke regulatie van PPO-activiteit in het proces van stootblauwvorming een rol speelt. Hiervoor is meer kennis over PPO uit de aardappelknol nodig.

Het voor blauwvorming benodigde enzym (PPO) en de vermoedelijke substraten zijn aanwezig in zowel gestoten als ongestoten weefsel. Cruciaal is de vraag op welke wijze het (bio)chemisch proces van blauwsynthese gestart wordt, of anders gesteld: wat weerhoudt een ongestoten knol ervan om stootblauw te vormen? Algemeen gaat men er van uit dat substraat en enzym subcellulair gecompartmentaliseerd zijn en dat de stoot tot decompartmentalisatie leidt. Vele studies wijzen erop dat PPO gelocaliseerd is in het lumen van plastiden. Voor

chloroplasten is aangetoond dat precursor PPO naar het lumen van plastiden wordt overgebracht en tijdens het transport over de membranen omgezet wordt tot actief, rijp PPO (hoofdstuk 3.6). Omdat potentieel substraat voor PPO waarschijnlijk in het stroma voorkomt, vormt in ongestoten knollen vermoedelijk de lammellaire membraan binnen de plastiden de fysieke barrière voor blauwvorming. De studies naar localisatie en transport van PPO hebben voornamelijk betrekking op chloroplasten. De gegevens over de subcellulaire localisatie van PPO in aardappelknollen zijn echter schaars en niet eensluidend (hoofdstuk 3.6). Het is dan ook van belang hier nader naar te kijken.

De literatuur biedt geen informatie over de relatie tussen blauwgevoeligheid van knollen en de activiteit van enzymen die de afbraak van membranen versnellen. Omdat het proces van compartimentalisatie in belangrijke mate van deze enzymen afhankelijk kan zijn, verdient het aanbeveling hier onderzoek naar te verrichten.

Als reactie op de mechanische impact zouden de concentraties van de potentiële stootblauwsubstraten een belangrijke verandering kunnen ondergaan. De expressie van enzymen uit de biosynthese van fenylpropanverbindingen lijkt echter niet verhoogd te worden (zie hoofdstuk 4.1), hetgeen suggereert dat voor de synthese van stootblauw geput wordt uit de substraatpool die reeds voor de stoot aanwezig was. Omdat het niet zeker is of de onderzochte enzymen limiterend zijn voor de substraatbiosynthese is het zinvol om het verloop te onderzoeken van de substraatconcentraties zelf, na stoten en bij afwezigheid van zuurstof. Hetzelfde zou gedaan moeten worden voor de activiteit van PPO, zodat duidelijkheid verkregen wordt over activering of eventuele *de novo* synthese van dit enzym na toedienen van de stoot.

Zoals in hoofdstuk 4.3 is aangegeven, bestaan er belangrijke aanwijzingen dat de beschikbaarheid van het aminozuur tyrosine in vrije, ongebonden vorm een limiterende factor kan zijn voor de vorming van stootblauw. De regulatie van de verhouding eiwitgebonden tyrosine en vrij tyrosine zou daarom van belang kunnen zijn voor de blauwgevoeligheid van aardappelen. Omdat dit wellicht een direct aanknopingspunt kan bieden voor een oplossing van het stootblauwprobleem is het gewenst ook hier verder onderzoek naar te doen.

Veelal wordt verondersteld dat kalium- en drogestofgehalte van de knol van belang zijn voor de mechanische verwerking van de stoot. Het is echter niet uitgesloten dat beide factoren indirect via het celmetabolisme de beschikbaarheid van de bij stootblauw betrokken enzymen en substraten beïnvloeden. Voor een beter inzicht in de rol van kalium- en drogestofgehalte is een nauwkeuriger beschrijving van het mechanisme van stootblauwvorming nodig. Opheldering van de hier besproken onduidelijkheden over de (bio)chemische factoren die bij stootblauw een rol spelen, is hiervoor een eerste vereiste.

Literatuur

- Abukharma, D.A. en Woolhouse, H.W., 1966 - The preparation and properties of o-diphenol:oxygen oxydoreductase from potato tubers. *New. Phytol.*, **65**, 477-487.
- Alberghina, F.A.M., 1964 - Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices: partial purification and properties. *Phytochemistry*, **3**, 65-72.
- Amberger, A. en Schaller, K., 1975 - Der einfluss von Sorte und Standort auf die an der enzymatischen Verfärbung beteiligten Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Potato Res.*, **18**, 161-173.
- Anderson, R.A., Vaughn, T.H. en Lowe, R.H., 1970 - Brown pigment in tobacco leaf during air curing. *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 940-942.
- Anisimov, V.D., Kastal'eva, T.B. en Loginova, L.N., 1978 - Isolation and certain properties of potato o-diphenol oxidase. *Biokhimiya*, **43**, 1616-1619.
- Balasingam, K. en Ferdinand, W., 1970 - the purification and properties of a ribonucleo-enzyme, o-diphenol oxidase, from potatoes. *Biochem. J.*, **118**, 15-23.
- Batistuti, J.P. en Lourenco, E.J., 1985 - Isolation and purification of polyphenol oxidase from a new variety of potato. *Food Chem.*, **18**, 251-263.
- Baruah, P. en Swain, T., 1959 - The action of potato phenolase on flavonoid compounds. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 125-129.
- Baumgartner, M., Keller, E.R. en Schwendimann, F., 1983 - Versuch einer characterisierung von Blaustabilität un Blaulabilität bei der Kartoffel durch Knolleneigenschaften. *Potato Res.*, **26**, 17-30.
- Belknap, W. and Rickey, T., 1990 - Physiological and stress-induced changes in potato tuber gene expression. In: *The molecular and cellular biology of the potato*, Vayda, M.E. en Park, W.D. (eds.), C.A.B. International.
- Belknap, W.R., Rickey, T.M. en Rockhold D.R., 1990 - Blackspot bruise dependent changes in enzyme activity and gene expression in Lemhi Russet potato. *Amer. Potato J.*, **67**, 253-265.
- Bently, R., 1990 - The shikimate pathway - A metabolic tree with many branches. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 25, pp.307-384. Fasman, G.D. (ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Boniwell, J.M. en Butt, V.S., 1986 - Flavin nucleotide-dependent 3-hydroxylation of 4-hydroxyphenylpropanoid carboxylic acids by particulate preparations from potato tubers. *Z. Naturforsch. C*, **41**, 56-60.
- Brandl, W. en Herrmann, K., 1984 - Ueber das Vorkommen der Chlorogensäure in der Kartoffel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **178**, 192-194.
- de Bruyn, H.L.G., 1929 - Het blauw worden van aardappelen. *Tijdschr. Plantenzieken*, **35**, 185-222.
- Burton, W.G., 1989 - *The potato* (3e ed.), Longman, New York.
- Chen, J.S., Preston, J.F., Wei, C., Hooshar, P., Gleeson, R.A. en Marshall, M.R., 1992 - Structural comparison of crustacean, potato, and mushroom polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1326-1330.
- Chen, J.S., Wei, C. en Marshall, M.R., 1991 - Inhibitory effect of kojic acid on some plant and Crustacean polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1396-1401.
- Chen, J.S., Wei, C. en Marshall, M.R., 1991 - Inhibition-mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1897-1901.
- Cheung, K.W.-K. en Henderson, H.M., 1972 - Effect of physiological stress on potato polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **11**, 1255-1260.

- Clark, W. L., Mondy, N., Bedrosian, K., Ferrari, R.A. en Michon, C.A., 1957 - Polyphenolic content and enzymatic activity of two varieties of potatoes. I. Preliminary report. *Food Technol.*, **11**, 297-301.
- Corsini, D.L., Pavek, J.J. en Dean, B., 1992 - Differences in free and protein-bound tyrosine among potato genotypes and relationship to internal blackspot resistance. *Amer. Potato J.*, **69**, 423-435.
- Craft, C.C., 1966 - Localization and activity of phenolase in the potato tuber. *Amer. Potato J.*, **43**, 112-121.
- Czaninski, Y. en Catesson, A.-M., 1974 - Polyphenoloxidases (plants). In: *Electron microscopy of enzymes*, vol.2 (Hayat, M.A. ed.), pp. 66-89. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Dao, L. en Friedman, M., 1992 - Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2152-2156.
- Davies, A.M.C. en Laird, W.M., 1976 - Changes in some nitrogenous constituents of potato tubers during aerobic autolysis. *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 377-382.
- Davies, A.M.C., Newby, V.K. en Synge, R.L.M., 1978 - Bound quininc acid as a measure of coupling of leaf and sunflower-seed proteins with chlorogenic acid congeners: loss of availability of lysine. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 33-41.
- Dean, B.B., Jackowiack, N. en Munck, S., 1992 - Tyrosine synthesis in potato tuber tissue from blackspot-susceptible and resistant genotypes. *Potato Res.*, **35**, 49-53.
- Dean, B.B., Jackowiak, N., Nagle, M., Pavek, J. en Corsini, D., 1993 - Blackspot pigment development of resistant and susceptible *Solanum tuberosum* L. genotypes at harvest and during storage measured by three methods of evaluation. *Amer. Potato J.*, **70**, 201-217.
- Dwelle, R.B. en Stallknecht, G.F., 1979 - Rates of internal blackspot bruise development in potato tubers under conditions of elevated temperatures and gas pressures. *Amer. Pot. J.*, **53**, 235-245.
- Eagles, J., March, J.F. en Synge, L.M., 1980 - Mass-spectrometric evidence for quinonoid-lysine coupling products in cigar protein. *Phytochemistry*, **19**, 1771-1775.
- Golbeck, J.H. en Cammarata, K.V., 1981 - Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.*, **67**, 977-984.
- Haehn, H., 1919 - Die Melaninbildung im autolysierenden Kartoffelpresssaft. *Biochem. Zeitschr.*, **100**, 114-129.
- Hahlbrock, K. en Scheel, D., 1989 - Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 347-369.
- Harborne, J.B., 1960a - Plant polyphenols. 1. Anthocyanin production in the cultivated potato. *Biochem J.* **74**, 262-269.
- Harborne, J.B., 1960b - Plant polyphenols. 2. The coumarins of *Solanum pinnatisectum*. *Biochem J.* **74**, 270-2273.
- Harborne, J.B., 1962 - Plant polyphenols. 6. The flavonol glycosides of wild and cultivated potatoes. *Biochem. J.*, **84**, 100-106.
- Heinaru et al., 1975 - *Chemical Abstracts* **84**:132635e en **84**:132636f.
- Hiller, L.K., Koller, D.C. en Thornton, R.E., 1985 - Physiological disorders of potato tubers. In: *Potato physiology*, Li, P.H. (ed.), Academic Press.
- Hsu, A.F., Thomas, C.E. en Brauer, D., 1988 - Evaluation of several methods for estimation of total activity of potato polyphenol oxidase. *J. Food Sci.*, **53**, 1743-1745.
- Hughes, J.C., 1974 - Factors influencing the qualities of ware potatoes. 2. Environmental factors. *Potato Res.*, **17**, 512-547.
- Hunt, M.D., Eanetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M. en Steffens, J.C., 1993 - cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 59-68.
- Iritani, W.M. en Weller, L., 1974 - Dry matter content of apical and basal portions of Russet Burbank potatoes. *Amer. Potato J.*, **50**, 389-397.

- Ito, S., Kato, T., Shinpo, K. en Fujita, K., 1984 - Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase. Formation of protein-bonded 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochem J.*, **222**, 407-411.
- Jonasson, T. en Olsson, K., 1994 - The influence of glycoalkaloids, chlorogenic acid and sugars on the susceptibility of potato tubers to wireworm. *Potato Res.*, **37**, 205-216.
- Keevil, T. en Mason, H.S., 1978 - Molecular oxygen in biological oxidations - an overview. In: Fleischer, S. en Packer, L. (eds.), *Methods in enzymology*, vol. LII, pp.3-42. Academic Press, New York.
- King, R.S. en Flurkey, W.H., 1987 - Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 231-240.
- Kowalski, S.P., Eanetta, N.T., Hirzel, A.T. en Steffens, J.C., 1992 - Purification and characterization of polyphenol oxidase from glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol.*, **100**, 677-684.
- Laird, W.M., March, J.F., Newby, V.K. en Synge, R.L.M., 1979 - Changes in bulk protein of tobacco leaves on aerobic autolysis: hydrogenation studies and identification of bound quininc acid. *Phytochemistry*, **18**, 1501-1503.
- Lerner, A.B. en Fitzpatrick, Th.B., 1950 - Biochemistry of melanin formation. *Physiol.Rev.*, **30**, 91-125.
- van Loon, C.D. en van der Heij, D. G., 1989 - *Potato terms*, p. 13, Pudoc Wageningen.
- Macrae, A.R. en Duggleby, R.G., 1968 - Substrates and inhibitors of potato tuber phenolase. *Phytochemistry*, **7**, 855-861.
- Mapson, L.W., Swain, T., en Tomalin, A.W., 1963 - Influence of variety, cultural conditions and temperature of storage on enzymic browning of potato tubers. *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 673-684.
- Mason, H.S., 1948 - The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **172**, 83-99.
- Matheis, G., 1987a - Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of potato polyphenol oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **11**, 5-12.
- Matheis, G., 1987b - Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic browning and potato constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **11**, 33-41.
- Matheis, G. en Belitz, H.-D., 1975 - Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen-oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **157**, 221-227.
- Matheis, G. en Belitz, H.-D., 1977a - Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen-oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **163**, 279-282.
- Matheis, G. en Belitz, H.-D., 1977b - Untersuchungen zur enzymatischen Bräunung bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum*). I. Phenoloxidasen und phenolische Inhaltsstoffe verschiedener Sorten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **163**, 92-95.
- Matheis, G. en Belitz, H.-D., 1977c - Untersuchungen zur enzymatischen Bräunung bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum*). II. Quantitative Beziehung zwischen Bräunung und Inhaltstoffen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **163**, 186-190.
- Matheis, G. en Belitz, H.-D., 1979a - Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). III. Influence of pH on the molecular weight distribution of enzyme activity in potato juice. *Z. lebensm. Unters. Forsch.*, **169**, 165-169.

- Matheis, G en Belitz, H.-D., 1979b - Multiple forms of soluble monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tuber (*Solanum monophenol*, dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase (EC 1.14.18.1) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). IV. Association and dissociation phenomena. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **169**, 271-275.
- Matheis, G. en Whitaker, J.R., 1984 - Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J. Food Biochem.*, **8**, 137-162.
- Mathew, A.G. en Parpia, H.A.B., 1971 - Food browning as a polyphenol reaction. In: *Advances in food research*, volume 19, pp. 75-145, Chichester, C.O., Mrak, E.M. en Stewart, G.F. (eds.), Academic Press, New York.
- Mayer, A.M., 1966 - Catechol oxidase: enzymic liberation from sugar beet chloroplasts. *Phytochemistry*, **5**, 1297-1301.
- Mayer, A.M., 1987 - Polyphenol oxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry*, **26**, 11-20.
- Mayer, A.M. en Harel, E., 1979 - Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, **18**, 193-215.
- Mayer, A.M. en Harel, E., 1991 - Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. In: *Food enzymology*, pp.373-398, P.F.Fox (ed.), Elsevier Applied Science, London.
- Merkenschlager, F., 1929 - Ueber das Schwarzwerden der Kartoffelknollen. *Nachr. Bl. Deut. Pflanzenschutzdienst*, **9**, 20-21.
- Mondy, N.I., Bond Gedde-Dahl, S. en Owens Mobley, E., 1966 - Effect of storage temperature on the cytochrome oxidase activities and phenolic content of potatoes. *J. Food Sci.*, **31**, 32-37.
- Mondy, N.I. and Mueller, T.O., 1977 - Potato discoloration in relation to anatomy and lipid composition. *J. Food Sci.*, **42**, 14-18.
- Mondy, N.I. en Leja, M., 1986 - Effect of mechanical injury on the ascorbic acid content of potatoes. *J. Food Sci.*, **51**, 355-357.
- Mondy, N.I., Leja, M. en Gosselin, B., 1987 - Changes in total phenolic, total glycoalkaloid, and ascorbic acid content of potatoes as a result of bruising. *J. Food Sci.*, **52**, 631-633.
- Mondy, N.I. en Munshi, C.B., 1993a - Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid contents of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 554-556.
- Mondy, N.I. en Munshi, C.B., 1993b - Effect of maturity and storage on ascorbic acid and tyrosine concentration and enzymatic discoloration of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1868-1871.
- Mulder, E.G., 1949 - Mineral nutrition in relation to the biochemistry and physiology of potatoes. I. Effect of nitrogen, phosphate, potassium, magnesium and copper nutrition on the tyrosine content and tyrosinase activity with particular reference to blackening of the tubers. *Plant Soil*, **2**, 59-121.
- Mulder, E.G., 1955 - Effect of the mineral nutrition of potato plants on the biochemistry and physiology of the tubers. *Neth. J. Agric. Sci.*, 333-356.
- Munshi, C.B. en Mondy, N.I., 1989 - Ascorbic acid and protein content of potatoes in relation to tuber anatomy. *J. Food Sci.*, **54**, 220-221.
- Nicolaus, R.A., 1968 - *Melanins*. Hermann, Paris.
- Nilova, V.P., Zarubina, M.A., Guseva, T.A., Naumov, G.P., Chernikov, S.L. en Kuznetsova, S.V., 1973 - A protein inhibitor of tyrosinase (o-diphenol oxidase) from potato tuber. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **210**, 270-273.
- Nye, T.G., Kern, C.H. en Aldrich, R.F., 1968 - Polyacrylamide gel electrophoresis of *Solanum tuberosum* L. - I. Total soluble protein and polyphenol oxidase activity. *Phytochemistry*, **7**, 741-743.
- Ogawa, M. en Uritani, U., 1970 - Tissue browning of potato tubers induced by gamma irradiation. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 870-877.

- Oortwijn Botjes, J. en Verhoeven, W.B.L., 1927 - Het blauw worden van aardappelen. *Tijdschr. Plantenziekten*, **33**, 57-96.
- Pathak, S.U. en Ghole, V.S., 1994 - Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, **36**, 1165-1167.
- Patil, S.S. en Zucker, M., 1965 - Potato phenolases. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3938-3943.
- Pendharkar, M.B. en Nair, P.M., 1974 - Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation. *Phytochemistry*, **13**, 1373-1377.
- Pierpoint, W.S., 1965 - Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 134-146.
- Pierpoint, W.S., 1966 - The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, **98**, 567-580.
- Pierpoint, W.S., 1969a - o-Quinones in plant extracts. Their reactions with amino acids and peptides. *Biochem. J.*, **112**, 609-616.
- Pierpoint, W.S., 1969b - o-Quinones in plant extracts. Their reactions with bovine serum albumine. *Biochem. J.*, **112**, 619-629.
- Pierpoint, W.S., Ireland, R.J. en Carpenter, J.M., 1977 - Modification of protein during the oxidation of leaf phenols: reaction of potato virus X with chlorogenoquinone. *Phytochemistry*, **16**, 29-34.
- Pitt, D., 1975 - Changes in the subcellular location of katalase and o-diphenol oxidase during infection of potato tubers by *Phytophthora erythroseptica*. *Trans Br. Mycol. Soc.*, **65**, 91-100.
- Plaza, S.G., Sueldo, R.J., Crupkin, M. en Barassi, C.A., 1985 - Changes in composition of potatoes *Solanum tuberosum* cv. Huinkul, stored in clamps. *J. Food Sci.*, **50**, 1254-1255.
- Raper, H.S., 1927 - The tyrosinase-tyrosine reaction. Production from tyrosine of 5:6-dihydroxyindole and 5:6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid - the precursors of melanin. *Biochem. J.*, **21**, 89-96.
- Reeve, R.M., Hautala, E. en Weaver, M.L., 1969 - Anatomy and compositional variations within potatoes. 3. Phenolics, enzymes and other minor components. *Amer. Potato J.*, **46**, 274-386.
- Reeve, R.M., 1967 - Preliminary histological observation on internal blackspot in potatoes. *Amer. Potato J.*, **45**, 157-167.
- Rickey, T.M. en Belknap, W.R., 1991 - Comparison of the expression of several stress-responsive genes in potato tubers. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 1009-1018.
- Robinson, S.P. en Dry, I.B., 1992 - broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.*, **99**, 317-323.
- Ruis, H., 1972 - Particulate and soluble forms of o-diphenol oxidase from potato tubers. *Phytochemistry*, **11**, 53-58.
- Sabba, R.P. en Dean, B.B., 1994 - Sources of tyrosine in genotypes of *Solanum tuberosum* L. differing in capacity to produce melanin pigments. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **119**, 770-774.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. en Carcía-Carmona, F., 1989a - Novel procedure for extraction of latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.*, **91**, 1481-1487.
- Sánchez-Ferrer, A., Villalba, J. en Carcía-Carmona, F., 1989b - Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **28**, 1321-1325.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. en Carcía-Carmona, F., 1993a - Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1583-1586.
- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. en Carcía-Carmona, F., 1993b - Cresolase activity of potato tuber partially purified in a two-phase partition system. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1225-1228.

- Sánchez-Ferrer, A., Laveda, F. en Carcía-Carmona, F., 1993c - Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1219-1224.
- Sapers, G.M., Douglas, F.W., Bilyk, A., Hsu, A.-F., Dower, H.W., Garzella, L. en Kozempel, M., 1989 - Enzymatic browning in Atlantic potatoes and related cultivars. *J. Food Sci.*, **54**, 362-365.
- Sapers, G.M., 1993 - Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Techn.*, **47**, 75-84.
- Sato, M. en Hasegawa, M., 1976 - The latency of spinach chloroplast phenolase. *Phytochemistry*, **15**, 61-65.
- Sato, M., 1982 - Multiplicity of spinach root phenolase and its monophenolase activity. *Phytochemistry*, **21**, 1229-1231.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C. en Duke, S.O., 1991 - A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, **30**, 2449-2506.
- Skrobacki, A., Halderson, J.L., Pavek, J.J. en Corsini, D.L., 1989 - Determining potato resistance to impact damage. *Amer. Potato J.*, **66**, 401-415.
- Söderhall, K., Carlberg, I. en Eriksson, T., 1985 - Isolation and partial purification of prophenoloxidase from *Daucus carota* L. Cell Cultures. *Plant Physiol.*, **78**, 730-733.
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M. en Harel, E., 1994 - Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, **105**, 1301-1311.
- Stark, J.C., Corsini, D.L., Hurley, P.J. en Dwelle, R.B., 1985 - Biochemical characteristics of potato clones differing in blackspot susceptibility. *Amer. Potato J.*, **62**, 657-666.
- Storey, R.M.J. and Davies, H.V., 1991 - Tuber quality. In: *The potato crop*. Harris, P. (ed.), Chapman & Hall, London.
- Swan, G.A., 1974 - Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins. In: *Progress in the chemistry of organic natural products*, vol. 31, pp. 521-582. Springer Verlag, Wien.
- Sweeney, J.P., 1969 - Enzymic browning and free tyrosine in potatoes affected by level of treatment with pentachloronitrobenzene. *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1412-1413.
- Thomas, P., Delincée, H. en Diehl, J.F., 1978 - Thin-layer electric focusing of polyphenol oxidase on Sephadex and its detection by the print technique. *Anal. Biochem.*, **88**, 138-148.
- Thomas, P. en Delincée, H., 1981 - Isoelectric patterns of polyphenol oxidase during suberization of wounded potato tubers. *Potato Res.*, **24**, 177-182.
- Tolbert, N.E., 1973 - Activation of polyphenol oxidases of chloroplasts. *Plant Physiol.*, **51**, 234-244.
- Umaerus, M. en Olssen, K., 1974 - Varietal differences in tyrosine and chlorogenic acid in relation to enzymic discoloration of potato tubers. *Potato Res.*, **17**, 157-158.
- VanMiddeltem, C.H., Jacob, W.C. en Thompson, H.C., 1953 - Spectrophotometric comparison of internal blackspot and melanin. *Amer. Potato J.*, **30**, 85-88.
- Vaughn, K.C. and Duke, S.O., 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.*, **60**, 106-112.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. and Duke, S.O., 1988 - Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.*, **72**, 659-665.
- Vertregt, N., 1968 - Relation between black spot and composition of the potato tuber. *Eur. Potato J.*, **11**, 34-44.
- Watson, R.A. en Flurkey, W.H., 1986 - Use of contact prints for recording polyphenol oxidase isoenzymes separated by electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 791-796.
- Weaver, M.L., Hautula, E. en Reeve, R.M., 1970 - Distribution of oxidase enzymes in potato tubers relative to blackspot susceptibility. I. Phenolases. *Amer. Potato J.*, **47**, 479-488.

- Wynne Griffiths, D., Bain, H. en Dale, M.F.B., 1992 - Development of rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers., *J. Sci. Food Agric.*, **58**, 41-48.
- Yasunobu, K.T., Peterson, E.W. en Mason, H.S., 1959 - The oxidation of tyrosine-containing peptides by tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, **234**, 3291-3295.

Bijlage 1:

Methoden voor de bepaling van de stootblauwgevoeligheid van aardappelen

De methoden voor de bepaling van stootblauwgevoeligheid van aardappelen bestaan uit een procedure voor het toedienen van de beschadiging van de knollen en een procedure voor de beoordeling van de ontstane blauwverkleuring. In de literatuur worden voor beide onderdelen van de blauwgevoelighedsbepaling uiteenlopende methoden met vaak daartoe speciaal ontwikkelde apparatuur genoemd.

Voor het toebrengen van de mechanische impact kunnen de knollen op een min of meer gestandaardiseerde wijze geschud worden. Oortwijn Botjes en Verhoeven (1927) gebruikten een methode waarbij de knollen vanuit een poterbak werden opgegooid en opgevangen. Mulder (1949) schudde knollen 5 minuten in een glazen fles. Ophuis *et al.* (1958) leidden de knollen door een valkoker. Anderen gebruikten roterende trommels (Aeppli *et al.*, 1981; Mondy en Munshi, 1993b). Op het IBVL te Wageningen (Meijers en Kleijburg, 1973) is een schudapparaat ontwikkeld waarbij het verblijf van de knollen op een sorteermachine wordt nagebootst, en waarin grotere aantallen (30-60 stuks) tegelijk behandeld kunnen worden. Belangrijke nadelen van deze schudmethoden zijn dat de grootte van de toegediende impuls afhankelijk is van de massa van de knol en dat de stoten op willekeurige plaatsen van de knol aankomen. Voor een betrouwbare bepaling moeten dan ook relatief grote aantallen knollen gebruikt worden (zie de evaluatie van Meijers en Kleijburg, 1973). De methoden waarbij de stoot wordt toegebracht aan een stil liggende knol bezitten deze nadelen niet. De Bruyn (1929) en Maas (1964) ontwierpen simpele instrumentjes waarmee een gewichtje in een valbuis op de knol losgelaten kan worden. Met de zogenaamde pendules, waarbij een hamertje van een instelbare hoogte wordt losgelaten en tegen een gefixeerde knol slingert, kan aan de hand van de terugslag van het hamertje de toegediende energie nauwkeurig worden vastgesteld (Gall *et al.*, 1967; Hughes *et al.*, 1975; Skrobacki *et al.*, 1989; Gall en Zachow, 1992). Ook is er apparatuur ontwikkeld waarmee individuele knollen gecontroleerd aangeslagen kunnen worden met een hamerkop dat door een motor wordt aangedreven (Skrobacki *et al.*, 1989; Love *et al.*, 1994).

De toegepaste tijdsperiode tussen het toedienen van de beschadiging en het moment waarop de ontstane verkleuring beoordeeld wordt, varieert van een etmaal tot ongeveer een week. De incubatietemperatuur gedurende deze periode ligt meestal tussen 12 en 20 °C.

De mate van blauwverkleuring wordt visueel beoordeeld na schillen van de knollen, hetzij door te kijken naar het percentage van het oppervlak van de geschilde knol dat verkleurd is (zie bijvoorbeeld Meijers en Kleijburg, 1973), hetzij door te kijken naar de oppervlakte-grootte en kleur-intensiteit van de blauwe plekken (zie bijvoorbeeld Baumgartner *et al.*, 1983). De individuele knollen kunnen op deze wijze in klassen ingedeeld worden, aan de hand waarvan middels een arbitrair gedefinieerde rekenformule voor de totale partij een zogenaamde blauw-index berekend kan worden (zie voor voorbeelden: Meijers en Kleijburg, 1973; Aeppli *et al.*, 1981; Baumgartner *et al.*, 1983). Wanneer de beschadiging nauwkeurig is toegediend op een vastgelegde positie van het knol-oppervlak, wordt als maat voor de blauwgevoeligheid ook wel de diepte van de verkleuring genomen (zie bijvoorbeeld Gall en Zachow, 1992). In Nederland wordt bij de kwaliteitsbeoordeling van consumptie-aardappelen ten behoeve van de handel voor de vaststelling van de stootblauwgevoeligheid een uniforme test gehan-

teerd die gebaseerd is op de schudmethode die ontwikkeld is op het IBVL (beschreven door Meijers en Kleijburg, 1973). Met deze test wordt de blauwgevoeligheid uitgedrukt in een blauwindex die als volgt wordt bepaald. Per maximaal 50 ton aardappelen wordt in tweevoud een monster van 50 knollen (maat 50/60 mm) onder standaardcondities geschud in een schudapparaat. Na een bewaarperiode van minimaal 48 uur bij ten minste 12 °C wordt één van de twee monsters geschud, visueel beoordeeld op blauw en onderverdeeld in 4 klassen: klasse Geen blauw (0 % verkleurd oppervlak), klasse Licht blauw (L; 0-2 % verkleurd oppervlak), klasse Matig blauw (M; 2-10 % verkleurd oppervlak) en klasse Zwaar blauw (Z; >10 % verkleurd oppervlak). Vervolgens wordt het aantal knollen behorende tot L, M en Z berekend als percentage van het totale monster (%L, %M en %Z respectievelijk). De blauwindex volgt dan uit de formule: blauwindex = (%L + 2x %M + 3x %Z)/6. Het tweede monster wordt uitsluitend beoordeeld in geval van onenigheid over de kwaliteitsindeling (van Loon et al., 1993; Meijers en Kleijburg, 1973).

Literatuur

- Aeppli, A., Keller, E.R. en Schwendimann, F., 1981 - Influence of harvest time on blackspot susceptibility of potato tubers. *J. Agron. Crop Sci.*, 150, 372-381.
- Baumgartner, M., Keller, E.R. en Schwendimann, F., 1983 - Versuch einer charakterisierung von Blaustabilität un Blaulabilität bei der Kartoffel durch Knolleneigenschaften. *Potato Res.*, 26, 17-30.
- de Bruyn, H.L.G., 1929 - Het blauw worden van aardappelen. *Tijdschr. Plantenzieken*, 35, 185-222.
- Gall, H., Lamprecht, P. en Fechter, E., 1967 - first results with the rebound pendulum in assessing the susceptibility of potato tubers to damage. *Potato Res.*, 10, 272-285.
- Gall, H. en Zachow, B., 1992 - Pendelschlagwerk-MIDAS P88. Bewertung des Beschädigungsverhaltens von Kartoffelknollen. *Kartoffelbau*, 43, 242-244.
- Hughes, J.C., Grant, A. en Faulks, R.M., 1975 - Susceptibility of tubers to internal damage (Blackspot). *Potato Res.*, 18, 338-339.
- van Loon, C.D., Veerman, A. en Bus, C.B., 1993 - Teelt van consumptieaardappelen, teelthandleiding nr. 57, Proefstation voor de Akkerbouw en de Groenteteelt in de Vollegrond, Lelystad.
- Love, S.L., Thompson-Johns, A., Werner, B.K. en Baker, T.P., 1994 - RBM134: a mutant of Russet Burbank susceptible to blackspot bruise. *Amer. Potato J.*, 71, 411-416.
- Maas, E.F., 1966 - A simple method for bruising of potato tubers. *Amer. Potato J.*, 43, 424-426
- Meijers, C.P. en Kleijburg, P., 1973 - Het bepalen van de blauwgevoeligheid van aardappelen, de nauwkeurigheid van de methode en de invloed van de knoltemperatuur. *Bedrijfsontwikkeling*, 4, 579-584.
- Mondy, N.I. en Munshi, C.B., 1993b - Effect of maturity and storage on ascorbic acid and tyrosine concentration and enzymatic discoloration of potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1868-1871.
- Mulder, E.G., 1949 - Mineral nutrition in relation to the biochemistry and physiology of potatoes. I. Effect of nitrogen, phosphate, potassium, magnesium and copper nutrition on the tyrosine content and tyrosinase activity with particular reference to blackening of the tubers. *Plant Soil*, 2, 59-121.
- Oortwijn Botjes, J. en Verhoeven, W.B.L., 1927 - Het blauw worden van aardappelen. *Tijdschr. Plantenziekten*, 33, 57-96.
- Ophuis, B.G., Heslen, J.C. en Kroesbergen, 1958 - The influence of temperature during handling on the occurrence of blue discolorations inside potato tubers. *Eur. Potato J.*, 1, 48-66.