

马铃薯贮藏块茎低温糖化研究进展 ——()生理生化机理

成善汉¹, 谢从华², 吴艳阁¹

(1.海南大学生命科学与农学院, 海口 570228; 2.华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘 要: 马铃薯低温贮藏造成还原糖积累是影响块茎加工品质最重要的因素, 有关低温糖化机理一直是马铃薯品质改良研究的热点。本文总结了马铃薯基因型、环境因子、ABA 和生物膜组成变化对还原糖积累的影响, 重点从生理生化水平上探讨了块茎碳水化合物代谢路径变化与还原糖积累的关系, 为抑制还原糖含量改良块茎品质打下了理论基础。

关键词: 马铃薯; 低温糖化; 生理生化机理

马铃薯是世界第四大作物, 其块茎的贮藏受温度、湿度和通风条件等环境因素的影响。为了有效抑制块茎的萌芽, 减少贮藏期间病害的发生, 人们通常将块茎贮藏在低温条件下, 但低温贮藏使块茎中还原糖含量迅速上升, 高温加工时, 还原糖与块茎中游离氨基酸发生 Maillard 反应, 严重影响块茎炸条和炸片色泽。目前关于块茎低温糖化的生理生化机理已经做了比较全面的研究, 也得到了一些关键调控结论。

1 基因型和环境因子对贮藏块茎还原糖积累的影响

Claassen 等^[1]将不同品种的马铃薯分别贮藏于 2, 4, 8 条件下, 尽管品种间耐“低温糖化”能力有一定差异, 但还原糖含量都出现了一定程度增加, 并且蔗糖含量亦有不同程度的升高。Ewing 等^[2]将块茎贮藏于 1, 5, 10, 15 条件下, 发现 10 还原糖水平稍有上升, 而蔗糖含量基本不变; 5 条件下不仅还原糖含量显著升高, 而且蔗糖含量亦有很明显上升。至于低温下贮藏多少时间后才会有糖化现象发生, 目前说法不一。Ewing 等对块茎在炸片前

进行低温 1) 贮藏处理, 分别经 1-24 h、48 h、2、4 d 低温处理后, 发现这些处理对炸片颜色均不产生影响, 但贮藏时间超过 7 d 后, 炸片颜色显著加深。由于薯片中还原糖含量与炸片颜色呈显著负相关^[3], 可见低温下贮藏一个星期左右即能引起糖化现象的发生。

块茎中还原糖含量还与马铃薯生长环境、收获期和块茎的成熟度相关。Morrell 和 ap Rees^[4]发现, 不同品种间、相同品种不同生长环境下、相同品种相同生长环境下不同块茎间均存在着相当大的还原糖含量差异。Blenkinsop 等^[5]比较生长于不同年份块茎中的糖含量发现, 块茎生长早期水分胁迫造成收获期的糖分积累。

2 马铃薯块茎“低温糖化”的渗透膜理论

植物体是一个开放的体系, 生存于自然环境, 受环境因素的影响。冷胁迫条件下, 贮藏马铃薯块茎体内发生一系列生理生化变化而导致还原糖的积累, 尽管对还原糖积累的机理有很多阐述^[6-9], 但对于“低温糖化”的起始原因一直存在争议。

多年来冷胁迫机理的研究主要集中在生物膜的结构方面, 生物膜通透性(permeability)变化是冷胁迫生理障碍的理论已为人们广泛接受。马铃薯“低温糖化”过程中涉及的淀粉体膜和液泡膜都是生物膜, 因此许多“低温糖化”机理的研究主要集中在在

收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(30270842/C02020505)资助。

作者简介: 成善汉(1975-), 男, 海南大学生命科学与农学院副教授, 从事蔬菜抗逆分子生物学研究。

粉体膜和液泡膜的变化, 包括膜脂组成和膜蛋白功能上。目前的研究表明, 在低温糖化过程中淀粉体膜基本保持完整, 而在衰老甜化过程中, 淀粉体膜发生渗漏^[10-11]。但一些研究也认为, 冷胁迫下淀粉体膜的分子组成和组织结构也有一定的变化, 如膜脂流动性的降低, 也可能造成膜通透性发生改变^[12]。

对液泡膜的变化, Sowokinos^[13]提出的“液泡膜渗透模型”对块茎的“低温糖化”给予了很好的解释。该模型认为, 冷胁迫导致细胞生物膜选择通透性功能遭到破坏, 主要是液泡膜发生渗漏, 使得基质内的一些离子特别是无机磷(Pi)从液泡渗透到细胞质, 最后运输到淀粉体内, 促进淀粉磷酸化酶对淀粉的降解活性并抑制AGPase介导的淀粉再合成作用, 造成还原糖的积累。对膜的冷害破坏, 很多试验对其机理进行了解释。首先是膜的电导率发生改变, 陈芳等^[14]研究表明, 冷胁迫下马铃薯块茎细胞电导率与糖浓度增加平行变化, 由于细胞电导率是表示液泡膜渗漏程度的良好指标, 这说明“低温糖化”过程中液泡膜发生渗漏。第二是膜脂组成和膜流动性发生变化, 一般认为不饱和脂肪酸含量随着温度的降低而增多, 抗冷品种膜脂的不饱和脂肪酸不只在含量上比不抗冷品种的多, 而且在不饱和程度方面(双键数目)也比不抗冷品种高, 植物就是通过调节膜脂不饱和度来维持膜的流动性, 以适应低温条件。Wisner等^[15]通过比较抗冷品种ND860-2和对冷敏感品种Norchip在4与12℃贮藏温度下膜脂中总脂肪酸含量、自由脂肪酸(FFA)含量、不饱和脂肪酸双键数目(DBI)、半乳糖脂(galactolipid, 包括MGDG、DGDG、OGL)、磷脂(phospholipids, 包括PC、PE、PA、PI和PG)和自由固醇的含量, 发现Norchip在4℃贮藏过程中脂肪酸含量变化很大且具周期

性, 特别是软脂酸、硬脂酸和油酸在贮藏34d出现大幅度的增加, 而同期亚油酸和亚麻酸含量下降, 整个贮藏期中DBI值显著低于同样贮藏条件下ND860-2 DBI值; 整个贮藏期间MGDG没有太大变化, 但是低温处理品种DGDG值增大, 利于维护膜的流动性和通透能力; 而尽管磷脂含量处理间没有差异, 但总磷脂含量在4℃贮藏的Norchip中逐步增加, 自由脂肪酸含量也大于其他处理。第三是组成膜脂类物质的过氧化反应破坏膜的结构, Kumar和Knowles^[16]的研究表明, Russet Burbank块茎中还原糖的积累与脂肪酸的过氧化程度呈正相关。第四是膜结合蛋白活性发生变化影响膜的通透性, 研究表明, 低温贮藏条件下, 脂酰水解酶活性增高是防止膜过氧化破坏的第二防卫系统, 可以降低自由基链的增殖, 使得裂解过氧化形成的脂肪酸被谷胱甘肽解毒系统消除。此外, 低温贮藏下SOD、CAT活性和维生素E含量也增加。

3 贮藏块茎碳水化合物代谢途径与“低温糖化”

马铃薯块茎碳水化合物代谢是个复杂的代谢作用网络(图1), 块茎糖化不仅涉及到块茎发育期间蔗糖合成、运输以及向淀粉的转化, 而且与块茎贮藏期间淀粉的降解和再合成、蔗糖的裂解和合成、块茎的休眠和发芽、块茎的呼吸代谢等密切相关, 因而这种复杂的代谢作用网络已经成为当前块茎品质改良研究的一个重要领域^[8-9, 17-19]。作为采后生物学的热点, 贮藏块茎淀粉—糖转化的机理的阐述以及调节淀粉向糖转化的调节因子的研究, 是利用分子生物学手段产生具有抗“低温糖化”遗传背景马铃薯栽培品种(系)的前提。

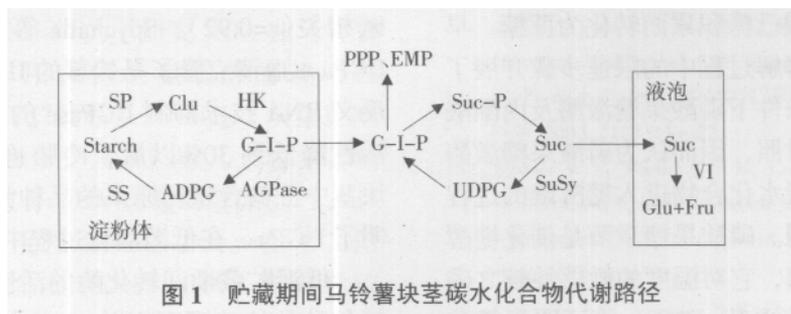


图1 贮藏期间马铃薯块茎碳水化合物代谢途径

SP: 淀粉磷酸化酶; AGPase: 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; SS: 淀粉合成酶; HK: 己糖激酶; UGPase: 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; SuSy: 蔗糖合成酶; VI: 液泡转化酶; PPP: 磷酸戊糖途径; EMP: 糖酵解

3.1 低温贮藏条件下, 块茎淀粉合成关键酶活性下降, 淀粉分解酶活性上升

马铃薯贮藏块茎糖分来源于淀粉^[20], 淀粉的降解和再合成直接决定着块茎糖的含量, 从而决定着块茎的加工品质。参与淀粉合成和降解的酶类很多, Sowkinos等^[13]在研究AGPase动力学特征时发现, 块茎在低温贮藏条件下, AGPase活性持续降低, 温度越低活性越低。Stark等^[21]在马铃薯中异源表达大肠杆菌glgC16基因, 发现块茎淀粉含量上升35%, 贮藏期间还原糖含量降低。此外, Cheng等^[22]分析了AGPase活性和还原糖关系, 表明AGPase活性与还原糖积累呈负相关关系, 通过增加AGPase活性可以抑制还原糖的形成。而关于淀粉降解存在两种类型的酶作用假说, 一种观点认为贮藏块茎的淀粉降解主要通过淀粉酶的水解作用, 持这种观点的人研究发现块茎在低温贮藏条件下, 在贮藏的前几个星期淀粉酶(α和β淀粉酶)、淀粉脱分支酶活性急剧上升, 同时还原糖含量也大幅度上升^[23]。另一种观点认为, 淀粉降解主要是淀粉磷酸化酶(SP)起作用, 持这种观点的人通过测定不同温度下SP相对活性、比较呼吸和糖分积累速率以及淀粉糖转化路径的能量来源, 发现块茎在低温贮藏中SP活性是上升的, 然后还原糖含量、转化酶活性也增大, 因而他们认为淀粉的降解主要是通过磷酸降解路线, SP活性升高是块茎“低温糖化”的初始信号^[4]。产生上述两种不同观点的原因很可能是, 一则低温贮藏淀粉降解酶种类多样, 其中很多酶活性都发生变化, 没有充分考虑不同淀粉降解酶或它们同工酶的相对作用, 二则品种之间存在差异。

3.2 低温贮藏条件下, 块茎糖酵解代谢相关酶活性下降

Dixon等^[24]采用同位素标记法研究认为低温抑制了糖酵解, 导致磷酸己糖积累而转化为蔗糖。早在此前, 他们就对糖酵解过程中的限速步骤开展了研究, 发现低温贮藏条件下磷酸果糖激酶及丙酮酸激酶的活性远远低于对照, 因而认为磷酸果糖激酶及丙酮酸激酶在调控碳水化合物进入糖酵解的过程中起到了关键性的作用。磷酸果糖激酶是催化糖酵解过程中的关键调控酶, 它对温度的敏感性较之磷酸己糖代谢中的其他酶更甚。Dixon等证明了磷酸果糖激酶在低温下是不稳定的, 低温降低了该酶的

疏水作用, 改变了酶的构型, 导致酶活性的丧失。此后, Hammond等^[25]发现马铃薯块茎中有4种形式的磷酸果糖激酶, 其中一些对低温敏感, 在低温下活性下降, 使磷酸己糖由呼吸作用进入蔗糖的合成途径。此外, 对低温敏感的磷酸甘油醛脱氢酶也因阻塞糖酵解路径而使块茎内蔗糖和还原糖的含量上升。糖酵解限制推测为磷酸己糖含量上升, 从而刺激蔗糖合成^[6], 然而研究发现磷酸己糖并不是糖分积累的中间激发子, 糖酵解受抑制并不是糖分积累的主要原因, 因为低温条件下磷酸己糖积累在6~10h发生, 而糖分积累在几天后直至磷酸己糖积累下降后才发生^[20]; 冷敏感和耐冷品种间呼吸率没有多大差异, 而且NADH和NADPH浓度也没有明显不同^[5]; 反义抑制PFK转基因块茎系中, 尽管磷酸己糖含量比野生型高, 但没有刺激糖分的积累^[26]; 异源表达大肠杆菌焦磷酸酯酶, 降低了贮藏块茎胞质中PPi含量, 尽管磷酸己糖含量降低, 而糖积累却增加^[27]; 代谢控制分析(Metabolic control analysis, MCA)显示PFK对糖酵解流向几乎没有影响^[28]。

3.3 低温贮藏条件下, 块茎糖异生作用相关酶活性上升

糖异生过程中的几个关键酶, 尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase), 6-磷酸蔗糖合成酶(Sucrose 6-phosphate synthase, S-6-PS)和转化酶影响“低温糖化”的马铃薯块茎中还原糖的水平。

UGPase催化块茎低温甜化过程的第一步, 形成UDPG, 而UDPG是淀粉、蔗糖和其它结构多糖直接的或间接的前体物质, 因而该酶被认为是高等植物糖异生过程中的关键酶之一。Sowkinos等^[10,29]研究发现, 在3℃贮藏条件下, 不耐低温贮藏的马铃薯品种中的UGPase活性比耐“低温糖化”的马铃薯品系高10倍, 而且UGPase活性与己糖积累紧密相关($r=0.92$)。Spsychalla等^[30]通过多克隆抗体UGPase血清克隆了马铃薯的UGPase基因, 并通过反义RNA技术抑制UGPase的活性, 当UGPase酶活性降低到30%以后, 冷胁迫后的转基因马铃薯块茎中蔗糖含量比原来的品种大幅度下降, 从而证明了UGPase在低温甜化过程中的重要作用。

低温贮藏期间转化酶的活性也是升高的, 但增幅与品种的基因型有关。Cheng等^[22]和Uppal等^[31]发现, 低温贮藏期间液泡转化酶活性变化很大, 还

原糖含量与转化酶活性呈极显著相关 ($r=0.821$), 因而认为该酶在“低温糖化”过程中起到了很重要的作用。低温贮藏初期由于存在大量转化酶的抑制剂, 因而酶的活性较低。随着贮藏期的延长, 在 0~30 d 之内, 观察到转化酶活性的显著升高, 可能是由于抑制剂分解的缘故。目前已经在烟草内克隆到了该抑制剂同系物的基因 Nt-VIF, 并转化马铃薯, 成功抑制了块茎的低温糖化^[32]。

3.4 块茎贮藏期间, 无氧呼吸代谢加强

Blenkinsop 等^[5]研究发现, 耐冷品种块茎的贮藏低温下时, 乳酸和乙醇的含量显著性高于冷敏感品种, 而还原糖含量则相对较低, 因而第一个提出块茎的无氧呼吸代谢维持了贮藏块茎较低还原糖含量的理论。此理论基于下列事实: 用 CIPC 处理两个加工品种 Snowden 和 Monona 发现, 块茎呼吸速率和鲜重损失减少, 块茎糖酵解关键酶、戊糖磷酸途径关键酶、蛋白质含量、干物重和炸片色泽均没有显著改变, 无氧呼吸增强^[33]; 冷敏感与耐冷品种的 NADH 和 NADPH 浓度没有显著差异, 表明三羧酸循环和氧化磷酸戊糖途径不是造成糖分积累的主要原因, 低温下线粒体的氧化磷酸化功能出现衰退, 因而为了补偿线粒体功能, 呼吸活性从有氧向无氧转移; Dolferus 等^[34]研究发现, Adh1 (乙醇脱氢酶 1) mRNA 表达水平和 ADH1 蛋白质活性在冷敏感条件下增加, 而耐冷植株 Adh1 基因受低温胁迫诱导, 很可能向无氧途径转移是耐冷和冷敏感植物适应低温的一种现象; 马铃薯块茎中 ADH 可能是帮助维持低温贮藏块茎呼吸代谢和能量平衡的一个重要的酶, 低温贮藏虽然限制了线粒体氧化磷酸化, 但促进了 ADH 特异性同工酶 (PDC 和 LDH) 的表达, 以满足细胞能量要求和维持细胞的能量平衡^[5]。

4 ABA 参与马铃薯贮藏块茎的“低温糖化”

Doucette 和 Pritchard^[35]为了研究 ABA 在马铃薯“低温糖化”中的作用, 将低温敏感的栽培种 Norchip 和抗“低温糖化”的品系 ND860-2 块茎贮藏于 4、10 两种条件下, 发现贮藏几天后糖含量快速增加的同时伴随有 ABA 含量的急剧上升, 且在 Norchip 中上升幅度较 ND860-2 大。在 4 时, 若在马铃薯愈伤中加入 10 mM ABA, 结果导致 ND860-2 产生更高的果糖和葡萄糖含量, 而对两个马铃薯品种呼吸速率的影响相同。

[参 考 文 献]

- [1] Classen P A M, Budde M A W, van Calker M H. Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers [J]. *Potato Research*, 1993, 36: 205-217.
- [2] Ewing E E, Senesac A H, Siczka J B. Effects of short periods of chilling and warming on potato sugar content and chipping quality [J]. *Am Potato J*, 1981, 58: 663-647.
- [3] Maag W, Reust W. Storage and reconditioning of crisp potatoes [J]. *Kartoffelbau*, 1992, 43: 443-448.
- [4] Morell S, Ap Rees T. Control of the hexose content of potato tubers [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25: 1073-1076.
- [5] Blenkinsop R W, Copp L J, Yada R Y, et al. A proposed role for the anaerobic pathway during low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum* [J]. *Physiol Plant*, 2003, 118: 206-212.
- [6] Ap Rees T, Dixon W L, Pollock C J, et al. Low temperature sweetening of higher plants [M]//Friend J, Rhodes M J C. Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. New York: Academic Press, 1981: 41-61.
- [7] Sowokinos J. Effect of stress and senescence on carbon partitioning in stored potatoes [J]. *Am Potato J*, 1990, 67: 849-857.
- [8] Sowokinos J R. Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes [J]. *Am J Potato Res*, 2001, 78: 221-236.
- [9] Wismer W V, Marangoni A G, Yada R Y. Low temperature sweetening in roots and tubers [J]. *Hort Rev*, 1995, 27: 203-231.
- [10] Sowokinos J R, Orr P H, Knoper J A, et al. Influence of potato storage and handling stress on sugars, chip quality and integrity of the starch (amyloplast) member [J]. *Am Potato J*, 1987, 64: 213-216.
- [11] Yada R Y, Coffin R H, Baker K W, et al. An electron microscopic examination of the amyloplast membranes from potato cultivar susceptible to low temperature sweetening [J]. *Can Inst Food Sci Technol J*, 1990, 23: 145-148.
- [12] Shekhar V V, Iritani W M. Starch to sugar interconversion in *Solanum tuberosum* L.: Influence of membrane permeability and fluidity [J]. *Am Potato J*, 1979, 56: 225-234.
- [13] Sowokinos J. Stress-induced alteration in carbohydrate metabolism [M]//Yayda M E, Park W D. Molecular and cellular biology of the potato. Wallingford: CAB International, 1990: 137-158.
- [14] 陈芳, 胡小松. 加工用马铃薯“低温糖化”机制的研究 [J]. *食品科学*, 2000, 21(3): 19-22.
- [15] Wismer W V, Worthing W M, Yada R Y, et al. Membrane lipid dynamics and lipid peroxidation in the early stages of low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum* [J]. *Physiol Plant*, 1998, 102: 396-410.
- [16] Kumar G N M, Knowles N R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato seed-tubers [J]. *Plant Physiol*, 1993,

- 102: 115- 124.
- [17] Fernie A R, Willmitzer L, Trethewey R N. Sucrose to starch: A transition in molecular plant physiology [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 35- 41.
- [18] Finlay M, Dale B, Bradshaw J E. Progress in improving processing attributes in potato [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8: 310- 312.
- [19] Menendez C M, Ritter E, Schafer-Pregl R, et al. Cold sweetening in diploid potato: mapping quantitative trait loci and candidate genes [J]. Genetics, 2002, 162: 1423- 1434.
- [20] Isherwood F A. Starch - sugar interconversion in *Solanum tuberosum* [J]. Phytochemistry, 1973, 12: 2579- 2591.
- [21] Stark D M, Timmermann K P, Barry G F, et al. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase [J]. Science, 1992, 258, 287- 292.
- [22] Cheng S, Su Z, Liu J, et al. Effects of variation in activities of starch- sugar metabolic enzymes on reducing sugar accumulation and processing quality of potato tubers [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(7): 519- 526.
- [23] Cottrell J E, Duffus C M, Paterson L, et al. The effect of storage temperature on reducing sugar concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L [J]. Potato Research, 1993, 36: 107- 117.
- [24] Dixon W L, Franks F, Ree T A. Cold-lability of phosphofructokinase from potato tubers [J]. Phytochemistry, 1981, 20: 969- 972.
- [25] Hammond J B W, Burrell M M, Kruger N J. Effects of low temperature on the activity of phosphofructokinase from potato tubers [J]. Planta, 1990, 180: 613- 616.
- [26] Hajirezaei M R, Sonnewald U, Viola R, et al. Transgenic potato plants with strongly decreases expression of pyrophosphate: fructose- 6- phosphate phosphotransferase show no visible phenotype and only minor changes in metabolic fluxes in their tubers [J]. Planta, 1994, 192: 16- 30.
- [27] Jelitto T, Sonnewald U, Willmitzer L, et al. Inorganic pyrophosphate content and metabolites in leaves and tubers of potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol: biochemical evidence that sucrose metabolism has been manipulated [J]. Planta, 1992, 188: 238- 244.
- [28] Thomas S, Fell D A. Design of metabolic control for large flux changes [J]. J Theor Biol, 1996, 182: 285- 298.
- [29] Sowokinos J R, Vigdorovich V, Abrahamson M. Molecular cloning and sequence variation of UDP- glucose pyrophosphorylase cDNAs from potatoes sensitive and resistant to cold sweetening [J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 947- 955.
- [30] Spychalla J P, Scheffler B E, Sowokinos J R, et al. Cloning, anti-sense RNA inhibition and the coordinated expression of UDP- Glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato tubers [J]. J Plant Physiol, 1994, 144: 444- 453.
- [31] Uppal D S, Verma S C. Changes of reducing sugar and invertase activity in cold- stored potato tubers [J]. Potato Research, 1990, 33: 119- 12.
- [32] Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, et al. Inhibition of a starch-granule- bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening [J]. Nature Biotech, 1998, 16: 473- 477.
- [33] Blenkinsop R W, Copp L J, Yada R Y, et al. Effect of chlorpropham (CIPC) on carbohydrate metabolism of potato tubers during storage [J]. Food Research International, 2002, 35: 651- 655.
- [34] Dolferus R, Jacobs M, Peacock W J, et al. Differential interactions of promoters elements in stress responses of the *Arabidopsis* Adh gene [J]. Plant Physiol, 1994, 105: 1075- 1087.
- [35] Doucette M S, Pritchard M K. ABA involvement in low temperature sweetening of potatoes [J]. Acta Horticulturae, 2000, 343: 165- 197.

欢迎订阅《中国马铃薯》杂志

《中国马铃薯》杂志是由中国作物学会马铃薯专业委员会和东北农业大学主办的国内唯一马铃薯专业科技期刊。它以繁荣我国马铃薯事业为办刊宗旨, 报道我国有关马铃薯的学术研究、科研成果, 介绍本专业的实用技术及最新进展。该刊设有学术园地、研究简报、经验交流、综述、薯类加工、病害防治、知识介绍、新品种介绍等栏目。

本刊国内外公开发行人, 双月刊, 大 16 开本, 彩色封面, 每期定价 6.00 元, 全年 36.00 元, 哈尔滨市邮局发行, 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 14- 167。为了减少中间环节, 请读者直接汇款至编辑部。本刊承揽广告业务, 欢迎各界广为利用。

通讯地址: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部

邮 编: 150030 电 话: 0451- 55190003 55190739