

# Slutrapport för projektet

## *Ljusinducerad glykoalkaloidsyntes i svensk matpotatis - en översiktsstudie för ökad kvalitet. Ref H0942171*

### **Sammanfattning av resultat från projektet**

- Den induktion av totala glykoalkaloider (TGA) som sker i potatisknölar efter en yttre stress (t.ex. skada el. ljus) varierar tydligt med både sort och typ av stress. Detta innebär att en potatissort kan vara känslig för en typ av stress men tolerant mot en annan, medan det omvända kan gälla för en annan sort. Detta tyder på att känsligheten för olika former av stress till viss del regleras av olika genetiska anlag.
- Graden av stresskänslighet varierar tydligt mellan svenska matpotatis-sorter. Studien visar på ett antal sorter (bl.a. Juliette, Marine, King Edward, Eloge, Sava, Early Puritan, Chèrie, Fakse, Ampera) som är särskilt känsliga mot ljusexponering.
- TGA-ökningen i potatisknölar efter en stress sker samtidigt med en ökad kolesterolsyntes och en förändrad sterolsammansättning. I matningsförsök med isotopinmärkta steroler har vi med LC-MS/MS kunnat visa att kolesterol är ett specifikt förstadium till de båda glykoalkaloiderna  $\alpha$ -solanin och  $\alpha$ -chakonin. Hela kolesterolmolekylen, utom två väteatomer, inkorporeras i omvandlingen.
- Inte något av ca. 50 prov tagna från två ljuskänsliga sorter sålda i detaljhandeln under september-december 2011 har haft TGA-halter över den högsta tillåtna på 200 mg/kg friskvikt. För båda sorterna var dock halten något högre för knölar sålda i lösvikt, än i mörka påsar. Sammantaget tyder detta ändå på att den kedja av hantering, förpackning och försäljning av potatis som sker kort efter skörd är adekvat i ett TGA-perspektiv. Emellertid visar samtidigt andra av projektets resultat på att ljuskänsligheten i knölen väsentligt kan öka under lagringsperioden. Det finns därför anledning att i framtiden studera denna aspekt mer ingående.

## **II. Bakgrund**

Glykoalkaloider är giftiga föreningar som förekommer främst inom växtfamiljen potatisväxter, däribland i viktiga grödor som potatis, tomat och äggplanta. De vanligaste glykoalkaloiderna i odlade potatissorter är  $\alpha$ -solanin och  $\alpha$ -chakonin, vilka förekommer i hela växten, men ibland i så höga halter att knölar blir otjänliga eller rentav farliga som föda (Friedman & MacDonald 1997). Milda symptom på glykoalkaloid-förgiftning är diarré, huvudvärk och kräkningar, men även allvarligare eller tom. livshotande symptom kan uppträda. Den totala halten av glykoalkaloider (TGA) påverkas både av genetiska och yttre faktorer; vissa sorter har vanligen låga halter, andra relativt höga eller starkt varierande. För god livsmedelssäkerhet rekommenderar Livsmedelsverket en högsta gräns på 200 mg TGA/kg friskvikt i potatisknölar (SLVFS 1993:36), och analys av TGA-halten ingår i rutinmässig kvalitetsbedömning av olika potatissorter. Normalt innehåller knölar 10-100 mg TGA/kg, men ett överskridande av de högsta tillåtna halterna är inte ovanligt. Potatissorten Magnum Bonum förekommer t.ex.

inte längre i den svenska sortlistan på grund av dess tendens att bilda höga TGA-halter (Hellenäs m.fl. 1995).

Glykoalkaloider bildas på i stort sett okända syntesvägar från steroler, vilka är livsnödvändiga membrankomponenter i djur och växter (Hartmann 1998). Vi har i vår tidigare forskning visat att kolesterol, via reaktioner som ännu ej är klarlagda, är ett troligt förstadium till glykoalkaloider (Bergenstråhle m.fl. 1996). Kolesterol förekommer i de flesta växter i mycket små mängder, vanligen 1-2%, men kan hos just potatisväxter uppgå till hela 20-25 % av den totala sterolhalten. Anledningen till de höga kolesterolhalterna i dessa växter är idag okänd.

TGA-halten i knölar efter skörd är inte konstant, utan kan öka kraftigt vid olika former av stress, som ljusexponering eller mekanisk skada. Eftersom sambandet mellan basal och inducerad TGA-halt är relativt svagt är graden av denna stressrelaterade ökning svår att förutse, och behöver därför bestämmas experimentellt för varje sort. Det är inte undersökt i någon större utsträckning om känslighet mot en viss typ av stress också innebär känslighet mot alla andra, eller om känslighet mot olika former av stress är sinsemellan oberoende egenskaper.

Mål för projektet har därför varit att i olika matpotatissorter kartlägga den glykoalkaloidsyntes som sker som svar på olika stresser, liksom om TGA-halten i butik påverkas av valet av förpackningstyp. Projektet påbörjades i november år 2010. Eftersom beviljade medel var något lägre än de sökta, har den ursprungliga projektplanen i ansökningsen inte genomförts i sin helhet. Tyngdpunkten har lagts på att etablera de centrala delarna.

### ***Delprojekt I. En översikt av basal och ljusinducerad TGA-halt i svenska matpotatissorter***

Projektet inleddes 2010 enligt projektplanen. Detta innebar odling, lagring (5 mån vid +8 C) och därpå följande behandlingar av en första serie om 21 st. svenska matpotatissorter. För att relatera svaret på ljusbehandling (lysrör 110  $\mu\text{E}$  x 8 dagar) till andra former av glykoalkaloid-inducerande behandlingar, användes även skada (snittning x 2 dagar), och värme (34° C x 7 dagar). Under början av 2011 utvecklades och validerades en metod för HPLC-analys av glykoalkaloidhalter med tillsats av en intern standard. Metoden möjliggör korrigering för förluster under provbearbetning, och har använts för att analysera alla prover från försöket.

Resultaten visar att de 21 potatissorterna skiljer sig avsevärt åt avseende glykoalkaloidhalten efter ljus- och skade-behandling; både i den absoluta ökningen och i den relativa effekten av de olika behandlingarna (Tab. 1). Effekten av värme var i stort sett försumbar för alla sorter. Den sortberoende variationen av de olika stressvaren tyder på att respektive stress medieras av olika signalvägar.

Resultaten identifierar ett antal sorter (bl.a. Juliette, Marine, King Edward, Eloge och Sava) med särskilt höga TGA-ökningar efter både skade- resp. ljusbehandling (Tabell I). De sju mest ljuskänsliga sorterna ökade TGA med över 188 mg/kg, och de sju mest skadekänsliga ökade med över 155 mg/kg. Den största ökningen för någon sort och behandling uppmättes för Juliette, som ökade TGA-halten med hela 665 mg/kg efter ljusbehandling. Denna ökning överskrider med stor

marginal den tillåtna halten på 200mg TGA/kg i livsmedel, och halten är sannolikt tillräcklig för att ge allvarliga medicinska symptom om knölna skulle ätas (jfr. Hellenäs 1985). Det finns därför god anledning att minimera ljusexponering av de mest ljuskänliga sorterna i Tab. 1.

**Tabell 1.** Sammanfattning av basalhalt glykoalkaloider och ökningen efter en skade- resp. ljusbehandling. Totala glykoalkaloider (solanin+chakonin) mätt med HPLC, angett i avtagande ordning inom varje klass. Alla sorter är odlade, lagrade och analyserade parallellt, varför ev. skillnader sannolikt har en genetisk bakgrund.

<b>Basal-halt</b> (före försöket)	<b>Låg</b> 46-86 (mg/kg fv.)	<b>Medium</b> 96-152 (mg/kg fv.)	<b>Hög</b> 154-293 (mg/kg fv.)
	Bintje	Fontane	Sava
	Folva	Eloge	Chèrie
	Superb	Juliette	Marine
	Rocket	Early Puritan	Asterix
	Terra Gold	Amandine	Asperges
	Melody	King Edward	Desirée
	Maris Bard	Maritema	Princess
<b>Ökning efter skada</b> (Snitt +2 dagar)	<b>Låg</b> 59-116 (mg/kg fv.)	<b>Medium</b> 116-149 (mg/kg fv.)	<b>Hög</b> 155-293 (mg/kg fv.)
	Asterix	Maris Bard	Sava
	Amandine	Superb	Eloge
	Desirée	Maritema	Juliette
	Asperges	Princess	King Edward
	Melody	Terra Gold	Fontane
	Early Puritan	Chèrie	Marine
	Folva	Rocket	Bintje
<b>Ökning efter ljusbehandling</b> (Ljus i 8 dagar)	<b>Låg</b> 0-82 (mg/kg fv.)	<b>Medium</b> 95-170 (mg/kg fv.)	<b>Hög</b> 188-665 (mg/kg fv.)
	Amandine	Asperges	Juliette
	Maritema	Asterix	Marine
	Desirée	Maris Bard	King Edward
	Fontane	Princess	Eloge
	Rocket	Superb	Sava
	Melody	Folva	Early Puritan
	Terra Gold	Bintje	Chèrie

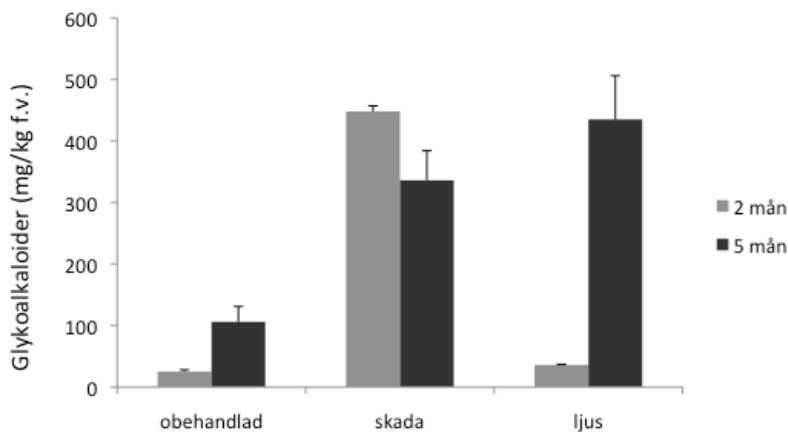
Projektet har under år 2 (2012) fortsatt med nya odlingar och analyser av ytterligare 20 st. sorter. Analyserna av dessa visade i de flesta fall klart höjda halter efter skade-induktion, men inte lika mycket efter ljusbehandling (Tab. 2). En skillnad mot försöken gjorda under år 1 var att lagringsperioden efter skörd av tidsskäl ca 12v kortare i denna serie. Det är möjligt att lagringsperioden därigenom blev för kort för att helt bryta det vilotillstånd knölna befinner sig i efter skörd. Resultaten visar ändå på ytterligare ett antal klart ljuskänsliga sorter; bl.a. Fakse, Ampera, Labella Velox och Ratte. Resultaten ger ännu en indikation på att skade- och ljus-induktion är mekanistiskt skilda processer, och tyder även på att (sort)skillnader i knölvila kan vara en faktor bakom (sort)variationer i stressförsök. För att undersöka knölvilans betydelse

repeterades försöket under år 3 med material som lagrats under olika lång tid efter skörd. Detta indikerar att perioden av en lagring i kylrum (dvs. brytandet av knölvila) påverkar känsligheten för ljusstress, men inte den för skadestress (Fig. 1). Detta tyder på att det kan vara viktigare att förvara knölar mörkt under våren, än under hösten, för att behålla en låg TGA-halt (jfr projekt II nedan). Både liknande resultat (Percival & Dixon, 1994), och motsatta (Haase 2010), har konstaterats i andra studier. Effekten av lagring både på basal-halt och på stressrespons förtjänar därför att studeras mer ingående och i flera potatissorter.

**Tabell 2.** Sammanfattning av basalhalt glykoalkaloider och ökningen av glykoalkaloider efter en skade- resp. ljusbehandling. Totala glykoalkaloider (solanin+chakonin) mätt med HPLC. Alla sorter odlade, lagrade och analyserade parallellt.

	Kontroll (mg TGA/kg f.v.)	Skada (mg TGA/kg f.v.)	Ljusexponering (mg TGA/kg f.v.)
Fakse	165	665	562
Ampera	104	932	288
Asterix	98	329	188
Labella	56	556	174
Velox	59	906	165
Ratte	70	182	161
Ditta	79	96	160
Solist	50	1473	95
Franceline	78	84	74
Perlo	72	734	72
Toluca	55	513	66
Arrow	22	735	50
Satina	27	934	46
Inova	50	508	44
Princess	32	435	40
Bionica	50	747	39
King Edward	22	438	38
Balmoral	42	596	36
Ballerina	51	737	34
Ukama	37	741	34
Maribell	36	718	23
Jutlandia	43	354	22
Gala	19	474	17

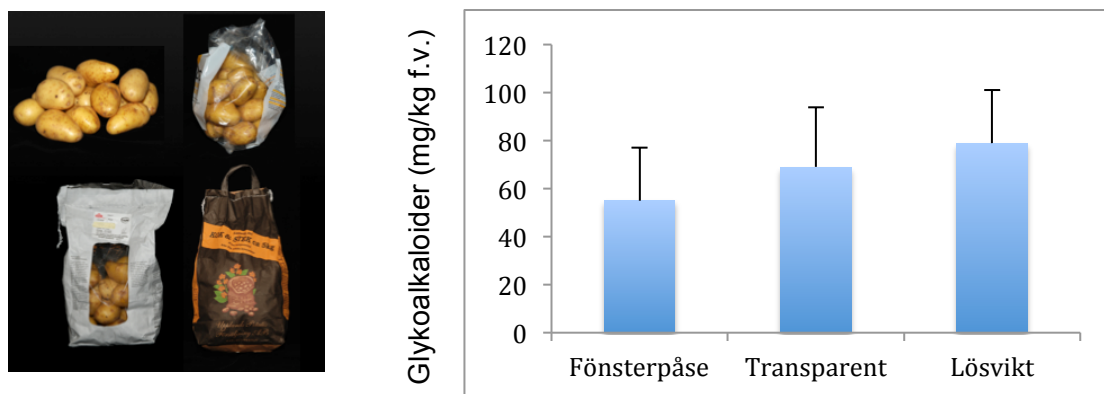
Ett samarbete inleddes under år 2 med Christer Andersson (Livsmedelsverket) och Prof. Jana Hajslova (Tekniska Universitetet i Prag) rörande analyser av *calysteginer*; en annan typ av potentiellt ohälsosamma eller giftiga alkaloider i potatis. Jämförelsen av glykoalkaloider med *calysteginer* är värdefull eftersom man idag inte vet hur *calysteginer* och glykoalkaloider bildas i förhållande till varandra, eller i vilken utsträckning *calystegin*-syntesen är stressreglerad. Halten *calysteginer* finns heller inte beskriven i svenska potatissorter. Genom samarbetet har 13 av potatis-proverna i Tab. 1 analyserats parallellt för *calysteginer*. Resultaten visar tydligt att glykoalkaloider och *calysteginer* bildas oberoende av varandra, och att syntesen av *calysteginer* inte är stressreglerad. De resultat som sammantagna erhållits rörande glykoalkaloider och *calysteginer* har nyligen publicerats i en vetenskaplig tidskrift (Petersson m.fl. 2013).



**Figur 1.** Knölens ljusrespons påverkas av lagringsperiodens längd. Glykoalkaloidhalt i 'King Edward' lagrad mörkt i kylrum under 2 resp. 5 månader efter skörd, och sedan stressad med skada genom snittning (2 d) eller ljusbehandling (8 d).

### **Delprojekt II. Analys av förpackningens inverkan på TGA-halten**

För att studera om typen av förpackning inverkar på TGA-halten i en ljuskänslig sort, har två potatissorter (King Edward och Solist) med något olika ljuskänslighet valts ut och analyserats under hösten 2011 genom stickprov i detaljhandeln. Resultaten visar att TGA-halten i alla prover låg klart under gränsen på 200mg/kg, oberoende av potatissort och förpackningstyp. För båda sorterna var dock medelhalten högst i lösvikt och lägst i mörka påsar, även om skillnaderna statistiskt sett inte var signifikanta (Fig. 2). Mot bakgrund av den variation vi observerat i materialet, bedömer vi att det dubbla antalet prover (ca 15 st.) för varje typ av förpackning skulle behövas för att med 95% sannolikhet detektera ev. skillnader mellan förpackningar på ett statistiskt säkerställt sätt.



**Figur 2.** Inverkan av förpackningstyp (lösvikt, transparent påse, fönsterpåse, mörk påse) på glykoalkaloidhalten i potatissorten King Edward. Prover tagna i detaljhandeln i Uppsala-området under sept.-dec 2011 och analyserade med HPLC. Data från mörk påse var i stort sett identiskt med det från fönsterpåse. Medelvärde  $\pm$  SD av 6 oberoende prover per förpackning. Resultat från sorten Solist var liknande.

Det är ändå värt att notera att inget prov av de totalt ca. 50 st. som analyserats har överskridit 150 mg/kg, vilket tyder på att kombinationen av potatissortens ljuskänslighet och den ev. ljusexponering som sker under transport/i butik i ett kvalitetsperspektiv inte är något problem för färskpotatis. Det är möjligt att den

variation av ljuskänslighet under året vi visat (Fig. 1) skulle kunna leda till högre halter senare på säsongen, framför allt i lösviktspotatis, men denna aspekt har inte kunnat studeras inom ramen för projektet. Vi hoppas därför att i framtiden kunna repetera analysen med material taget även under senvinter/vår för att se om årstidsvariation i ljuskänslighet påverkar TGA-halten i knölar sålda i olika förpackningstyper. För de ljuskänsliga sorter som identifierats i projektet, vore det också intressant att i en utökad studie studera TGA-halter i ett provmaterial från ett geografiskt sett större område.

### **Delprojekt III. TGA-fördelning i knölen efter ljusstress - utvecklande av ny analysmetodik**

En LC-MS/MS metod för känslig och specifik TGA-analys har etablerats i samarbete med bl.a. forskare vid Inst. för Kemi, SLU, och Livsmedelsverket. Metoden bygger på en initial separation av kemiska substanser med vätskekromatografi, och en därpå följande fragmentering av molekyler och detektion av deras massa. Molekylernas sönderfall blir mycket specifik för molekylen i fråga, exempelvis har  $\alpha$ -chakonin en moderjon med masstalet 852 och en dotterjon på 398. Transitionen 852 till 398 blir således mycket specifik för just  $\alpha$ -chakonin.

För att förstå hur glykoalkaloider bildas i växten har metoden använts för att studera hur olika steroler inmärkt med en tung isotop av väte omsätts till glykoalkaloider, som vid en ev. omsättning får ett högre masstal. Resultaten visar att sterolen kolesterol är ett metaboliskt förstadium till både  $\alpha$ -chakonin och  $\alpha$ -solanin, men att sterolen sitosterol inte är det. Studien visar också att sättet man löser upp kolesterol inverkar på graden av omvandling i växten. Genom att utnyttja kolesterol inmärkt i olika positioner har vi visat att hela kolesterolmolekylen övergår till glykoalkaloider, men att två väteatomer i sidokedjan förloras. Liknande resultat har helt nyligen visats av också av andra (Ohyama m. fl. 2013). Vår studie är den första som otvetydigt visar att kolesterol är ett specifikt förstadium till glykoalkaloider, och ett manus har nyligen insänts till en vetenskaplig tidskrift för bedömning (2013).

Liknande metodik för en samtidig glykoalkaloid- och kolesterol-kvantifiering med internstandarder har också tagits fram. Den radiella TGA-fördelningen i knölen har studerats med denna teknik i relation till kolesterol- och sterol-halter (Tab. 3). Resultaten visar att både glykoalkaloider och kolesterol finns på samma ställen i knölen. Vi avser att i kommande försök undersöka även ljusbehandlat material. Resultaten väntas kunna visa var glykoalkaloider syntetiseras i knölen.

<b>Tabell II. Halter av TGA och kolesterol i snitt av potatisknölar (King Edward)</b>		
Avstånd från ytan (mm)	TGA (mg/kg)	Kolesterol (mg/kg)
0-2 (skal)	158	1,4
2-4	13	3,4
4-6	4	0
6-14	0	0

## Resultatförmedling

Resultat från projektet har förmedlats skriftligt och muntligt i olika sammanhang.

### ***Vetenskapliga publikationer i refereegranskade tidskrifter***

Petersson, E.V., Arif, U., Schulzova, V., Krtkova, V., Hajslova, J., Meijer, J., Andersson, H.C., Jonsson, L., Sitbon, F. 2013. Glycoalkaloid and calystegine levels in table potato cultivars subjected to wounding, light, and heat treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5893-5902

### ***Insänt för publicering***

Petersson, E.V., Nahar, N., Dahlin, P., Dutta, P.C., Broberg, A., Åslund-Tröger, R., Jonsson, L., Sitbon, F. Conversion of exogenous cholesterol into glycoalkaloids in potato shoots, using two methods for sterol solubilisation.

Nahar, N., Petersson, E.V., Arif, U., Beste, L., Dalman, K., Dutta, P., Jonsson, L., Sitbon, F. Transcript profiling of two potato cultivars during wounding or light exposure of tubers reveals key genes in sterol and glycoalkaloid biosynthesis.

### ***Doktorsavhandlingar innehållande resultat från projektet***

Nurun Nahar (2011) Regulation of sterol and glycoalkaloid biosynthesis in potato (*Solanum tuberosum* L.) – Identification of key genes and enzymatic steps. ISBN 978-91-576-7550-7

Usman Arif (2013) Effect of wounding and light exposure on sterol, glycoalkaloid and calystegine levels in potato plants (*Solanum tuberosum* group Tuberosum). ISBN 978-91-576-7828-7

### ***Externa kontakter/aktiviteter***

Artiklar om delar av projektet inom ramen för Nurun Nahars doktorsavhandling och disputation 18 mars 2011. Artiklar i dagspress (Lantbrukets affärstidning, Tema Lantbruk, Uppsala Nya Tidning) och på SLU:s hemsida (<http://www.slu.se/sv/om-slu/fristaende-sidor/aktuellt/alla-nyheter/2011/3/nyfunna-gener-styr-potatisknolars-gifthalt>).

Kontakt har tagits med en populärvetenskaplig tidskrift beträffande möjligheten att skriva en artikel om glykoalkaloider och andra naturliga toxiner i livsmedel. Kontakten kommer att återupptas under år 2014 när alla resultat från projektet har publicerats vetenskapligt.

Deltagande i vetenskapliga konferenser med poster-presentation (Pittcon Conference, Orlando, USA 12-16 mars 2011; Terpnet 10<sup>th</sup> Int. Meeting, Kalmar 22-26 maj 2011; Terpnet 11<sup>th</sup> Int. Meeting, Kolymvari, Grekland 1-5 juni 2013), och som inbjuden talare (2<sup>nd</sup> ENOR symposium, Dijon 20-21 sep 2012).

En resa till Tekniska Högskolan i Prag genomfördes 24-27 september 2012 med doc. Christer Andersson (Livsmedelsverket). Presentation av projektet "Glycoalkaloid and calystegine levels in table potato cultivars" på Institute of Chemical Technology, Food Chemistry and Analysis. Diskussion med forskare på institutet (prof. Jana Hajslova, Vera Schulzova), av gemensamma data inför publicering. Planering av framtida samarbeten.

Muntlig populärvetenskaplig presentation (30 min) av projektet för allmänheten vid "Fascinerande växters dag", Botaniska trädgården i Uppsala 18 maj 2013.

## **Litteratur**

- Bergenstråhle A, Borgå P & Jonsson L (1996) *Phytochemistry* 41:155-161
- Friedman M & McDonald GM (1997) *Crit Revs. Plant Sci.* 16:55-132
- Haase, N U (2010) *Potato Research* 53:297-307
- Hartmann M-A (1998) *Trends Plant Sci* 3:170-175
- Hellenäs K-E, Branzell C, Johnsson H & Slanina P (1995) *J Sci Food Agric* 68:249-255
- Ohyama K, Okawa A, Moriuchi Y & Fujimoto Y (2013) *Phytochemistry* 89: 26-31
- Percival G & Dixon G (1994) *J Sci Food Agric* 66: 139-144