

烤烟存储期间烟叶酶活性变化的初步研究

王川¹, 刘紫薇², 朱启法¹, 张丽娜³, 马称心¹, 张朝⁴, 高琴¹, 陈学平^{2*}

(1. 安徽皖南烟叶有限责任公司, 安徽宣城 242000; 2. 中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 安徽合肥 230051; 3. 安徽省烟草公司, 安徽合肥 230071; 4. 安徽中烟工业有限责任公司, 安徽合肥 230088)

摘要 [目的]探究初烤烟存储过程中烟叶相关酶活性变化。[方法]以烤烟品种 NC89 为材料, 研究皖南地区烟叶存储过程中多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、脂氧合酶(LOX)、苯丙氨酸裂解酶(PAL)活性随存储时间延长的变化趋势。[结果]随着存储时间变长, 几种酶活性均呈现先上升后下降的趋势。其中多酚氧化酶、脂氧合酶和苯丙氨酸裂解酶活性在存储 180 d 时分别达到最大值[50.50 U/g, 34.20, 0.54 Δ OD/(g·min)], 而过氧化物酶活性则在存储 270 d 时达到最大值(118.90 U/g)。[结论]该研究为进一步丰富烟叶陈化理论, 探究烤烟存储质量提升形成机理提供了参考。

关键词 烤烟; 存储; 酶活性

中图分类号 TS41⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0001-02

Preliminary Study on the Changes of Enzyme Activity in Flue-cured Tobacco Leaves during Storage

WANG Chuan¹, LIU Zi-wei², ZHU Qi-fa¹ et al (1. South Anhui Tobacco Co., Ltd., Xuancheng, Anhui 242000; 2. Tobacco and Health Research Center, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230051)

Abstract [Objective] To explore the activity changes of related enzymes in flue-cured tobacco leaves during storage. [Method] We studied the activity change trends of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD), lipoxygenase (LOX) and phenylalanine lyase (PAL) in tobacco leaves with the extension of storage time based on NC89 flue-cured tobacco as experimental material in south Anhui. [Result] As the storage time increased, the activity of four enzymes showed a tendency of increasing first and then decreasing. The maximum activity of polyphenol oxidase, lipoxygenase and phenylalanine were reached when the tobacco were stored 180 days. The maximum were 50.50 U/g, 34.20, 0.54 Δ OD/(g·min), respectively, while the peroxidase activity reached the maximum (118.90 U/g) when the tobacco were stored 270 days. [Conclusion] The study provides a reference for further enriching the theory of tobacco leaf aging and exploring the mechanism of improving the quality of flue-cured tobacco during storage.

Key words Flue-cured tobacco; Storage; Enzyme activity

烟叶陈化能够改善烟叶的香味品质, 是提高烟叶可用性的重要环节^[1]。在烟叶存储期间, 烟叶内各种化学变化借助自然气候的变化加速进行, 从而改善烟叶品质和理化性状, 这一过程被称为自然陈化。酶类是陈化过程中提高烟叶发酵质量的动力, 是烟叶陈化的主要机理之一^[2]。烤烟存储过程中, 在酶类的作用下烤烟烟叶中的多种物质氧化分解形成重要的香气成分, 多酚氧化酶、过氧化物酶、脂氧合酶和苯丙氨酸裂解酶则是其中主要的酶类, 对促进烟叶陈化发酵、提高烟叶品质具有积极作用。前人^[3-6]对初烤烟存储期间相关酶的活性变化进行了大量的研究。为了进一步丰富烟叶陈化理论、探究烤烟存储质量提升形成机理, 笔者以皖南地区存储烤烟为材料, 研究了烤烟在陈化过程中多酚氧化酶、过氧化物酶、脂氧合酶、苯丙氨酸裂解酶活性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料 以烤烟品种 NC89 初烤烟为材料, 烘烤后于自然条件下储存。每隔 45 d 取 1 次样, 烟叶去主脉, 干燥、粉碎后备用。

1.2 方法

1.2.1 多酚氧化酶活性测定。参照朱广廉等^[7]的方法: 取 1 g 样品, 加入预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8) 1 mL, 研磨, 再加 1 mL 缓冲液, 倾入 5 mL 离心管, 于 4 ℃、

10 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。反应体系为 3 mL 0.2 mol/L 邻苯二酚(用 pH 7.8 磷酸缓冲液配制), 1 mL 酶液, 以灭活酶液作为空白对照, 于 30 ℃ 下水浴 10 min, 立即用 20% 三氯乙酸中止反应。5 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液于 495 nm 处测定其吸光值。

1.2.2 过氧化物酶活性测定。参照李玲等^[8]的方法: 取 1 g 样品, 加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0), 在冰浴中研磨, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。4.7 mL 反应液包括 2.7 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 5.5), 1.0 mL 2% 的 H₂O₂, 1.0 mL 0.05 mmol/L 愈创木酚。向反应液中加入 0.3 mL 酶液(空白管为 0.3 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液)混匀后, 水浴 37 ℃ 反应 15 min, 冷却后测定其在 470 nm 处的吸光值。

1.2.3 脂氧合酶活性测定。参照官长荣等^[9]的方法: 取 0.5 g 样品, 加入 0.10 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0) 在冰浴中研磨, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。取 0.3 mL 酶液于试管中, 加入 2 mL 底物乳液(2.24 mmol/L 亚油酸分散于含 0.5 μ L/mL 吐温-20 的 0.1 mol/L、pH 9.0 的硼酸缓冲液中), 混匀后放入 30 ℃ 水浴中并开始计时, 反应 3 min 后加入 5 mL 无水乙醇终止反应, 然后加入 5 mL 蒸馏水混匀并测定其在 234 nm 处的吸光值。

1.2.4 苯丙氨酸裂解酶测定。参考张志良等^[10]的方法: 取 1 g 样品, 加入 0.10 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0) 在冰浴中研磨, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。1 mL 酶液中加 1 mL 0.02 mol/L 苯丙氨酸, 2 mL 蒸馏水, 总体积为 4 mL。空白管不加底物, 多加 1 mL 蒸馏水。反应液于 30 ℃ 水浴中反

基金项目 安徽省烟草公司项目(20160551011)。

作者简介 王川(1989—), 男, 河南周口人, 助理农艺师, 从事烟草学研究。*通讯作者, 教授, 博士, 从事植物生物技术及遗传改良研究。

收稿日期 2018-02-07; **修回日期** 2018-03-05

应 30 min,反应结束后于 290 nm 处测定吸光值。

2 结果与分析

2.1 存储期间多酚氧化酶和过氧化物酶活性分析 由图 1 可知,存储初期多酚氧化酶活性呈现逐渐升高的趋势,存储 0~90 d 时上升较缓,90~180 d 过程中酶活性迅速升高,在 180 d 时酶活性达到最大值(50.50 U/g),此时是存储初期多酚氧化酶活性的 5.55 倍;之后随存储时间延长酶活性迅速降低,至 270 d 时趋于平稳;存储 360 d 时,烟叶中多酚氧化酶活性降低到 5.48 U/g。

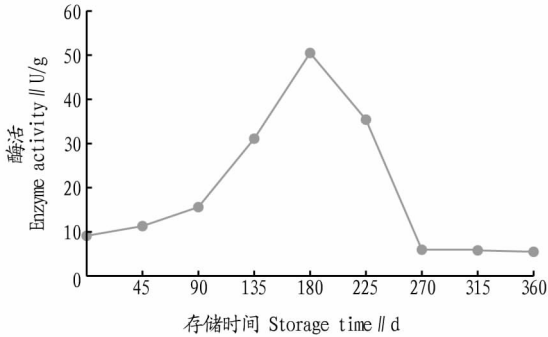


图 1 存储期间多酚氧化酶的活性变化

Fig. 1 Change of PPO activity during the storage

由图 2 可知,烤烟烟叶过氧化物酶活性在存储初期迅速上升,至 180 d 后上升趋势变缓,存储 270 d 时过氧化物酶活性达到最大值(118.90 U/g),此时是存储初期酶活性的 17.49 倍;之后随存储时间延长酶活性迅速下降,至存储 360 d 时酶活性降低到 34.50 U/g,此时过氧化物酶活性仍显著高于存储初期,是存储初期过氧化物酶活性的 5.07 倍。

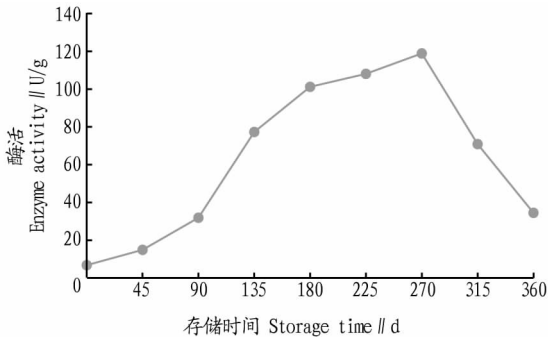


图 2 存储期间过氧化物酶的活性变化

Fig. 2 Change of POD activity during the storage

2.2 存储期间脂氧合酶和苯丙氨酸裂解酶活性分析 由图 3 可知,在烤烟存储过程中,随着时间的延长,烤烟烟叶中脂氧合酶活性变化与多酚氧化酶呈现的先升高后降低的变化趋势基本一致。存储初期脂氧合酶活性不断升高,到 180 d 时达最高值[34.20 $\Delta OD/(g \cdot min)$],较存储初期脂氧合酶活性增加了 72.55%。而后脂氧合酶活性逐渐下降,存储 180~225 d 酶活性下降较快,之后下降变缓;存储 360 d 时脂氧合酶活性为 24.10 $\Delta OD/(g \cdot min)$ 。

由图 4 可知,存储初期苯丙氨酸裂解酶活性为 0.31 $\Delta OD/(g \cdot min)$,之后随存储时间延长酶活性持续升高,至存储 180 d 时达最大值[0.54 $\Delta OD/(g \cdot min)$],酶活性

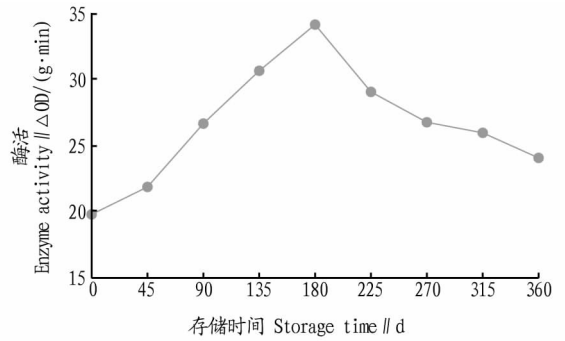


图 3 存储期间脂氧合酶的活性变化

Fig. 3 Change of LOX activity during the storage

较存储初期增加了 74.19%。之后随时间延长酶活性缓慢下降,至存储 315 d 后趋于平稳。存储 360 d 时,苯丙氨酸裂解酶达 0.44 $\Delta OD/(g \cdot min)$,仍显著高于存储初期。

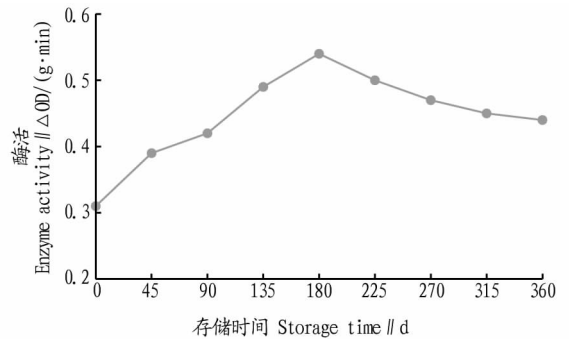


图 4 存储期间苯丙氨酸裂解酶的活性变化

Fig. 4 Change of PAL activity during the storage

3 结论与讨论

对皖南地区烤烟烟叶中酶活性的测定结果表明,在存储期间,烟叶中的多酚氧化酶、过氧化物酶、脂氧合酶及苯丙氨酸裂解酶一直具有一定活性,并且具有相似的变化规律:存储初期,4 种酶活性均随时间延长而逐渐上升,至存储 180 d 或 270 d 后达到最大值,随后酶活性逐渐下降。这与赵铭钦等^[11-12]、韩锦峰等^[13]的研究结果一致。

在多酚氧化酶和过氧化物酶的共同作用下,烤烟烟叶中的多酚类物质可被氧化成为醌类物质,醌类物质又与氨基酸、蛋白质及其他化合物缩合成大分子物质,形成香气物质的前体物,并赋予烟草制品优雅的香气、改善余味、增加香气量,对提高烤烟烟叶的品质具有良好作用^[14-15]。脂氧合酶是脂类物质氧化降解代谢过程中的重要酶。类胡萝卜素在脂氧合酶的作用下可以氧化分解成中间产物香叶醇、紫罗兰酮、紫黄质、黄质醛等,是烤烟烟叶中的重要致香物质^[16]。苯丙氨酸裂解酶主要参与烟叶中苯丙氨酸的代谢,烤烟烟叶中许多重要挥发性香气成分如苯甲醇、苯乙醇等的形成均与其代谢密切相关^[17]。烤烟烟叶中多酚氧化酶、过氧化物酶、脂氧合酶和苯丙氨酸裂解酶的酶活性在存储期间的动态变化很可能与烟叶表面微生物的活性变化有关。烟叶陈化过程是一个经过烘烤之后不存在生命活性的干物体自然发酵过程。烟叶自身存在的酶在初烤阶段几乎全部高温钝化失

究中的一次探索性研究^[24]。有研究表明,人为干扰对鳞河地区森林群落谱系结构产生了显著影响,但是海拔的不同、物种的不同以及群落结构的不同所造成的影响也不同^[18]。同时不同的尺度研究会对该地区的谱系结构得出不同的结论。在对研究所在地区谱系的研究方法和手段上,今后需要引入其他方式方法,寻找合适的基因信息来构建系统树,与生态特征相结合来加以校正,可以更加精准地找出物种之间的亲缘远近^[25-26]。此外,获得谱系树后,还可以再利用更为合理的统计模型和指数,增加统计分析和解决问题的能力^[13]。

参考文献

- [1] 牛红玉,王峰峰,练璐瑜,等.群落构建研究的新进展:进化和生态相结合的群落谱系结构研究[J].生物多样性,2011,19(3):275-283.
- [2] PRINZING A, REIFFERS R, BRAAKHEKKE W G, et al. Less lineages-more trait variation:Phylogenetically clustered plant communities are functionally more diverse[J]. Ecology letters,2008,11(8):809-819.
- [3] 周道玮.植物功能生态学研究进展[J].生态学报,2009,29(10):5644-5655.
- [4] WEBB C O, ACKERLY D D, MCPECK M A, et al. Phylogenies and community ecology[J]. Annual review of ecology and systematics,2002,33:475-505.
- [5] PAUSAS J G, VERDÚ M. The jungle of methods for evaluating phenotypic and phylogenetic structure of communities[J]. BioScience,2010,60(8):614-625.
- [6] 刘巍,曹伟.长白山植物群落谱系结构及环境因子对其的影响[J].干旱区资源与环境,2013,27(5):63-68.
- [7] LIU J L, QIAN H, JIN Y, et al. Disentangling the drivers of taxonomic and phylogenetic beta diversities in disturbed and undisturbed subtropical forests[J]. Scientific reports,2016,6:1-11.
- [8] 宋凯,米湘成,贾琪,等.不同程度人为干扰对古田山森林群落谱系结构的影响[J].生物多样性,2011,19(2):190-196.
- [9] 卜文圣,许涵,臧润国,等.不同采伐干扰方式对热带山地雨林谱系结构的影响[J].林业科学,2014,50(4):15-21.
- [10] 柴永福,岳明.植物群落构建机制研究进展[J].生态学报,2016,36(15):4557-4572.

- [11] KRAFT N J B, CORNWELL W K, WEBB C O, et al. Trait evolution, community assembly, and the phylogenetic structure of ecological communities[J]. American naturalist,2007,170(2):271-283.
- [12] BURNS J H, STRAUSS S Y. More closely related species are more ecologically similar in an experimental test[J]. PNAS,2011,108(13):5302-5307.
- [13] 姜晓燕,梁山峰,毕润成,等.山西霍山植物群落谱系结构的格局[J].西北植物学报,2016,36(12):2505-2512.
- [14] 黄建雄,郑凤英,米湘成.不同尺度上环境因子对常绿阔叶林群落的谱系结构的影响[J].植物生态学报,2010,34(3):309-315.
- [15] KEMBEL S W, HUBBELL S P. The phylogenetic structure of a neotropical forest tree community[J]. Ecology,2006,87:86-99.
- [16] SILVA I A, BATALHA M A. Phylogenetic overdispersion of plant species in southern Brazilian savannas[J]. Brazilian journal of biology,2009,69(3):843-849.
- [17] LETCHER S G. Phylogenetic structure of angiosperm communities during tropical forest succession[J]. Proceedings biological sciences,2010,277(1678):97-104.
- [18] 黄建雄,叶万辉,练璐瑜,等.谱系结构、环境因子及空间因子对群落动态变化的影响[J].科学通报,2014,59(35):3471-3478.
- [19] 何艳华,闫明,张钦弟,等.五鹿山国家级自然保护区物种多样性海拔格局[J].生态学报,2013,33(8):2452-2462.
- [20] WOESE C R, FOX G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,1977,74(11):5088-5090.
- [21] SWENSON N G, ENQUIST B J, THOMPSON J, et al. The influence of spatial and size scale on phylogenetic relatedness in tropical forest communities[J]. Ecology,2007,88(7):1770-1780.
- [22] 陈子英,谢长富,毛俊杰.冰河子遗的夏绿林:台湾水青冈[M].台北:行政院农业委员会林务局,2011:1-26.
- [23] CAVENDER-BARES J, KEEN A, MILES B. Phylogenetic structure of Floridian plant communities depends on taxonomic and spatial scale[J]. Ecology,2006,87:109-122.
- [24] 许格希,史作民,唐敬超,等.物种多度和径级尺度对于评价群落系统发育结构的影响:以尖峰岭热带山地雨林为例[J].生物多样性,2016,25(6):617-628.
- [25] 房帅,原作强,蒲菲,等.长白山阔叶红松林木本植物系统发育与功能性状结构[J].科学通报,2014,59(24):2342-2348.
- [26] 任思远,王婷,祝燕,等.暖温带-北亚热带过渡带落叶阔叶林群落不同径级系统发育结构的变化[J].生物多样性,2014,22(5):574-582.

(上接第2页)

活,烟叶自身的细胞结构也遭到破坏。而随着存储时间的延长,酶活性逐渐增加则可能与烤烟烟叶表面的微生物活动有关。烤烟烟叶表面微生物分泌酶从而导致烤烟烟叶的酶活性发生变化,因此烟叶表面的微生物分泌物可能加速烤烟陈化,促进陈化的进行从而改善烤烟烟叶的内在质量。利用微生物进行烤烟的人工陈化可以提高陈化效率,对存储期间烤烟品质的改善具有积极作用,并有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 于建军.卷烟工艺学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 官长荣,刘霞,郭瑞,等.淀粉代谢及影响烤烟淀粉含量的因素[J].云南农业大学学报,2006,21(6):745-748.
- [3] 张西仲,徐晓燕,韩忠明,等.烤烟片烟陈化过程中化学成分及相关酶活性的分析[J].贵州农业科学,2008,36(6):24-26.
- [4] 钱卫,田敏,李丽莉,等.烤烟叶面微生物5种水解酶的产生、温度稳定性及其在烟叶人工陈化中的应用[J].山东大学学报(理学版),2006,41(5):155-160.
- [5] 赵铭钦,王豹祥,邱立友,等.不同陈化时期的烟叶酶活性变化及其同工酶谱分析[J].烟草科技,2006(3):52-54.

- [6] RUAN A D, MIN H. Studies on microbiological degradation of tobacco tar[J]. Journal of environmental science and health,2005,40(11):2073-2083.
- [7] 朱广廉,张爱琴.植物生理学实验[M].北京:北京大学出版社,1990.
- [8] 李玲.植物生理学模块实验指导[M].北京:科学出版社,2009.
- [9] 官长荣,李艳梅,杨立均.水分胁迫下离体烟叶中脂氧合酶活性、水杨酸与茉莉酸积累的关系[J].中国农业科学,2003,36(3):269-272.
- [10] 张志良,吴光耀.植物生物化学技术和方法[M].北京:农业出版社,1986.
- [11] 赵铭钦,邱立友,张维群,等.陈化期间烤烟叶片中生物活性变化的研究[J].华中农业大学学报,2000,19(6):537-542.
- [12] 赵铭钦,王豹祥,邱立友,等.不同陈化时期烤烟叶片中酶活性及其相关化学成分分析[J].中国农业大学学报,2006,11(4):7-10.
- [13] 韩锦峰,朱大恒,杨素勤,等.不同陈化时期烤烟几种酶活性及其相关化学成分的分析[J].中国烟草科学,1999(1):1-2.
- [14] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [15] 李丛民.植物多酚对烟草制品品质的影响[J].烟草科技,2000(1):27-28.
- [16] 张荣平.脂氧合酶在植物体内的生理功能[J].莱阳农学院学报,1993,10(1):47-51.
- [17] 朱大恒,陈锐,陈再根,等.烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J].中国烟草学报,2001,7(2):26-30.