

烤烟生育期间主要非挥发性有机酸 含量及相关酶活性变化特征

符新妍, 张小全, 杨铁钊*, 李 飞, 李丽华, 王 冬, 薛 刚, 武云杰

(河南农业大学 烟草学院, 郑州 450002)

摘 要:以 12 个烤烟品种为材料, 通过测定烤烟中部叶有机酸总量、苹果酸含量、柠檬酸含量、代谢相关酶活性的动态变化以及烤后烟碱含量和感官质量, 探讨烤烟生长过程中叶片主要非挥发性有机酸含量及代谢相关酶活性变化规律。结果表明: (1) 随着烟株的生长发育, 烤烟中部叶有机酸总量呈先升高后降低趋势, 于叶龄 50~60 d 时达到最高值; 烤烟品种间中部叶有机酸总量在各叶龄时期存在极显著差异, 而在调制前后变化不大。 (2) 苹果酸含量呈“逐渐升高”趋势; 柠檬酸含量呈缓慢“增-减”的趋势; 苹果酸含量与苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性之间极显著负相关; 柠檬酸含量与柠檬酸合成酶(CS)活性之间极显著正相关, 而与异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性相关性不大。 (3) 当有机酸总量大于 32%, 同时烟碱含量介于 1.5%~2.6% 时, “酸碱比”较高的烟叶感官质量较好。研究认为, 烤烟叶片苹果酸和柠檬酸的积累受其代谢相关酶活性变化的调控, “酸碱比”影响烤烟烟气的醇和度, 可通过调控 NAD-MDH 和 CS 活性来调节苹果酸和柠檬酸的含量, 协调“酸碱比”, 提高烟叶质量。

关键词: 烤烟; 非挥发性有机酸; 苹果酸; 柠檬酸; 酸碱比; 感官质量

中图分类号: Q945.6

文献标志码: A

Main Non-volatile Organic Acid Concentrations and the Relative Enzymatic Activity Changes during the Growth Periods of Flue-cured Tobacco

FU Xinyan, ZHANG Xiaoquan, YANG Tiezhao*, LI Fei,

LI Lihua, WANG Dong, XUE Gang, WU Yunjie

(College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In order to clarify the changes of main non-volatile organic acid concentrations and metabolism related enzymatic activities in the process of the growth of flue-cured tobacco leaves, we used 12 flue-cured tobacco varieties to study the dynamic changes of total organic acid content, malic acid content, citric acid content, metabolism related enzymatic activities, the nicotine content and sensory quality of modulated smoke sample. The results showed that: (1) With the growth of tobacco plants, flue-cured tobacco total organic acid content indicated a trend of first increased and then decreased, in the middle of leaf age 50~60 d reached the highest value. The total organic acid content of different flue-cured tobacco variety middle leaves had significant differences in different age periods, while had little changes before and after modulation. (2) Malic acid content had a trend of gradually growth. Citric acid content displayed a slow “increase-decrease” trend. Malic acid content and the NAD-MDH (malic dehydrogenase) activity had a significant negative correlation. Citric acid content and the CS (citrate synthase) activity had a significant positive correlation.

收稿日期: 2013-09-26; 修改稿收到日期: 2013-12-19

基金项目: 中国烟草总公司特色优质烟叶开发重大专项(Ts-01-2011003); 中国烟草总公司科技司重点项目(110201002008)

作者简介: 符新妍(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事烟草遗传育种与品质改良研究。E-mail: fxy1988fxy@163.com

* 通信作者: 杨铁钊, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草遗传育种与品质改良研究。E-mail: yangtiezhao@126.com

tion, while had little correlation with the NAD-IDH(isocitrate dehydrogenase) activity. (3) When the total organic acid content was more than 32%, nicotine content was between 1.5% and 2.6% at the same time, the higher "acid-base ratio", the better sensory quality of flue-cured tobacco. In summary, the accumulation of malic acid and citric acid in flue-cured tobacco leaf were regulated by the changes of its metabolism related enzymatic activities. "Acid-base ratio" influenced the smoke mildness of flue-cured tobacco. Through regulating NAD-MDH and CS activities to adjust the contents of malic acid and citric acid, coordinating "acid-base ratio" and improving the quality of tobacco.

Key words: flue-cured tobacco; non-volatile organic acid; malic acid; citric acid; acid-base ratio; sensory quality

烟草中的有机酸主要是指除了氨基酸以外的有机酸, 含量一般为干物重的 12%~16%, 其中非挥发性有机酸占烟叶重量的 5%~10%^[1]。苹果酸、柠檬酸和草酸是烟草中主要的非挥发性有机酸, 约占烟叶总有机酸含量的 70%~80%^[2]。它们是卷烟加香加料的常用成分, 不仅可与生物碱结合成盐, 调节质子化和游离烟碱比例, 改善抽吸质量, 使吃味醇和, 而且能增加烟气浓度, 间接影响烟草香气^[3-4]。罗琼^[5]和谢焰等^[6]研究认为通过计算烟叶苹果酸、柠檬酸和草酸含量间的比值, 大致可区分卷烟类型并推测其叶组配方。因此, 研究烟叶非挥发性有机酸, 尤其是苹果酸、柠檬酸和草酸具有重要意义。

20 世纪 90 年代以来, 从不同角度对烟草非挥发性有机酸开展了研究, 发现低纬度产区烤烟中的苹果酸、柠檬酸和总有机酸显著低于中纬度产区和高纬度产区^[7]。海拔^[8-9]、气候^[9]、土壤类型^[10]、品种^[9,11]、叶位^[11]以及调制^[12]、陈化^[13]、发酵^[14]处理等均影响着烟叶中非挥发性有机酸的含量。虽然 Davis^[2]和韩锦峰^[15]等对烟草有机酸的生理代谢进行了研究, 但是关于烤烟不同生育期间叶片主要非挥发性有机酸含量及代谢相关酶活性的变化规律却鲜见报道。本文以多个烤烟品种为材料, 研究烤烟生长过程中叶片有机酸总量、苹果酸含量、柠檬酸含量及苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)、柠檬酸合酶(CS)和异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性的动态变化特点, 以期阐明烤烟生长过程中叶片主要非挥发性有机酸含量与代谢相关酶活性的关系, 探讨有机酸总量与烟碱含量的比值(酸碱比)对烟叶质量的影响, 为从代谢水平上调节烤烟主要非挥发性有机酸含量提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以烤烟品种‘CF222’、‘NC89’、‘Y8190’、‘NC71’、‘中烟 101’(ZY101)、‘中烟 203’(ZY203)、

‘8306’、‘8309’、‘豫烟 5 号’(Y5)、‘豫烟 6 号’(Y6)、‘豫烟 10 号’(Y10)、‘豫烟 11 号’(Y11)为试验材料。

1.2 试验设计

2012 年在河南许昌进行大田试验, 每个品种 300 株, 于 5 月 4 日移栽, 采用常规水肥管理。当中部叶(从下往上数第 13 片叶)叶长 1.5 cm 时开始挂牌计算叶龄。分别于叶龄 20、30、40、50、60 和 70 d 时, 挑选 15 株长势均匀整齐的烟株, 每 5 株进行混合取样。一部分用于苹果酸脱氢酶、柠檬酸合酶和异柠檬酸脱氢酶活性的测定。另一部分置于恒温干燥箱中 105 °C 杀青 15 min, 于 60 °C 下烘干, 用粉碎机粉碎, 过孔径为 0.25 mm 筛, 装入自封袋中冷藏, 用于有机酸总量、苹果酸含量和柠檬酸含量的测定。调制后取各品种的 C3F(中桔三)样品, 用于有机酸总量、烟碱含量和感官质量的测定。每项指标重复测定 3 次。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 有机酸总量 采用自动电位滴定法^[16], 利用 PHS-3C 型 pH 计确定滴定终点, 进行自动滴定。

1.3.2 总烟碱含量 采用提取脱色法^[16]测定。

1.3.3 苹果酸和柠檬酸含量 按照“YC/T288-2009 烟草及烟草制品多元酸的气相色谱法”测定, 称取约 1 g 粉碎的烟叶样品(准确至 0.1 mg), 置于 100 mL 平底烧瓶内, 准确加入 40 mL 5% 硫酸-甲醇(体积分数)溶液和 200 μ L 己二酸内标溶液。烧瓶上接冷凝管, 在 60 °C 水浴中回流 2 h, 冷却至室温。取回流液体 10 mL 于 100 mL 分液漏斗中, 加入 20 mL 蒸馏水混匀。每次用 10 mL 二氯甲烷萃取, 萃取 3 次, 合并萃取液, 并加入 3.5 g 无水硫酸钠干燥过夜。

气相色谱质谱联用仪 Trace GC/DSQ ultra 为 Thermo 公司产品, 己二酸、苹果酸、柠檬酸(> 97%)为 Alfa Aesa 公司产品; 色谱柱: DB-5MS(50 m, 0.25 mm, 0.25 μ m), 载气 He(纯度 99.999%),

流速 1 mL · min⁻¹,无分流进样,进样量 1 μL;程序升温条件:70 ℃保持 2 min,4 ℃/min 升至 300 ℃,保持 10 min;质谱扫描范围:33~500。

1.3.4 感官质量评价 由河南中烟技术中心评吸委员会按照“YC/T138-1988·烟草及烟草制品感官评吸方法”对烟样的感官质量进行评价,以 9 分制对各指标进行赋值量化^[17]。每项感官指标评分乘以相应权重系数,再将各感官指标之和乘以 11.11 转换为百分制。计算公式为:

$$T(\text{感官总分}) = (\text{香气质} \times 0.30 + \text{香气量} \times 0.30 + \text{杂气} \times 0.08 + \text{刺激性} \times 0.15 + \text{余味} \times 0.17) \times 11.11$$

1.3.5 相关酶活性 柠檬酸合成酶活性测定参照 Hirai^[18]和罗安才^[19]等的方法,略有改动。酶促反应体系为 3 mL,含 20 × 40 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 9.0)、20 × 40 μmol · L⁻¹ DTNB、20 × 4 μmol · L⁻¹ 乙酰辅酶 A、20 × 4 mmol · L⁻¹ 草酰乙酸,于 25 ℃下测定 412 nm 处吸光值。以 5 s 为单位读数,共测 3 min,记录吸光度(OD)变化,重复 3 次。以单位质量的样品单位时间内 OD 值变化 0.01 为 1 个活力单位 U,以 U · g⁻¹ · min⁻¹ 表示酶活性,酶活单位表示下同。

异柠檬酸脱氢酶活性测定用 Srene^[20]和罗安才等^[19]的方法,略有改动。反应体系为 3 mL,含 20 × 40 mmol · L⁻¹ Hepes (pH 8.2)、20 × 800 μmol · L⁻¹ NAD⁺、20 × 200 μmol · L⁻¹ MnSO₄、20 × 2 mmol · L⁻¹ 异柠檬酸钠,于 25 ℃下测定 340 nm 处

吸光值。以 5 s 为单位读数,共测 3 min,记录吸光度变化,重复 3 次。

苹果酸脱氢酶酶活测定采用朱广廉^[21]的方法,略有改动。反应体系为 3 mL,含 5 mmol · L⁻¹ NADH 溶液、0.1 mol · L⁻¹ (pH 7.5)磷酸缓冲液、10 mmol · L⁻¹ 草酰乙酸溶液,于 25 ℃下测定 340 nm 处吸光值。每隔 30 s 测定 1 次吸光度,共测 3 min,记录吸光度变化,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 烤烟生育期叶片非挥发性有机酸含量的变化特征

烤烟大田生长过程中中部叶有机酸总量整体上呈增-减-增-减的变化趋势(表 1),不同品种有机酸总量达到最大值的时期不同,但是集中在叶龄 50~60 d;不同叶龄时期烤烟品种间中部叶有机酸总量差异极显著;对调制前和调制后有机酸总量平均值进行相关分析,发现各烤烟品种中部叶有机酸总量在调制前后变化不大,且两者呈极显著正相关关系(0.902**)。前人研究表明随着烟株和叶片的生长,叶片中有机酸的积累量是不断变化着的,打顶以后,各种营养物质均无需向顶部输送,相应地有机酸含量随之增加,而且随着烟叶成熟度的增加,大分子营养物质会部分分解和转化,有利于有机酸的积累,达到工艺成熟调制后,总的酸浓度变化则很小^[2,16]。本研究结论与此基本一致。

本试验中有机酸总量较高的烤烟品种有‘8306’、

表 1 烤烟生育期中部叶有机酸总量变化
Table 1 The total organic acid contents in middle leaves during the growth period of flue-cured tobacco

品种 Variety	不同叶龄时期有机酸总量 Total organic acid content at different leaf ages/%					
	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d	70 d
CF222	22.47±1.86BC	29.72±1.07BCDE	25.55±1.13F	30.58±1.43CD	34.39±1.93CD	32.74±1.16DE
NC89	25.36±2.4AB	44.58±1.58A	38.66±1.12AB	41.78±1.76A	42.86±2.19A	41.42±0.70BC
Y8190	24.80±2.00AB	26.02±0.87E	29.24±1.44DEF	32.46±1.93BCD	35.13±2.20CD	37.20±1.31AB
8306	23.06±1.12ABC	31.14±2.25BCD	35.84±0.94BC	43.60±1.14A	40.87±0.89AB	42.78±0.90A
NC71	23.78±0.94ABC	33.49±1.51B	27.33±1.98EF	33.69±1.71BCD	34.10±2.04CD	38.85±0.77DE
8309	23.54±0.59ABC	27.93±1.79CDE	38.73±1.09AB	31.33±1.77CD	37.54±2.21BC	34.17±2.17DE
Y11	21.71±0.89BC	32.27±2.26BC	41.91±2.59A	37.08±1.66B	42.93±1.77A	33.90±0.64DE
Y10	25.10±1.37AB	28.03±1.59CDE	33.18±1.44CD	29.42±1.58D	37.64±2.34BC	36.51±0.76CD
Y6	24.57±0.66AB	31.93±2.33BC	32.37±0.66BC	33.11±1.96BCD	36.06±1.74D	33.02±0.39DE
Y5	20.83±1.59C	30.09±2.42BCDE	30.28±2.37DE	31.97±2.68CD	36.61±2.60BCD	31.06±1.89E
ZY203	23.34±0.56ABC	27.15±1.20DE	28.73±1.87EF	35.26±2.71BC	36.64±1.03BCD	34.26±1.53DE
ZY101	26.25±1.43A	32.49±0.91B	28.08±2.40EF	32.25±2.10BCD	38.27±2.06ABC	35.32±1.14BCD

注:表中数据为均值±标准差;同列不同字母表示 0.01 水平差异显著。
Note: Data are shown as means±SD of three replicates; The different capital letters mean significant at 0.01 level.

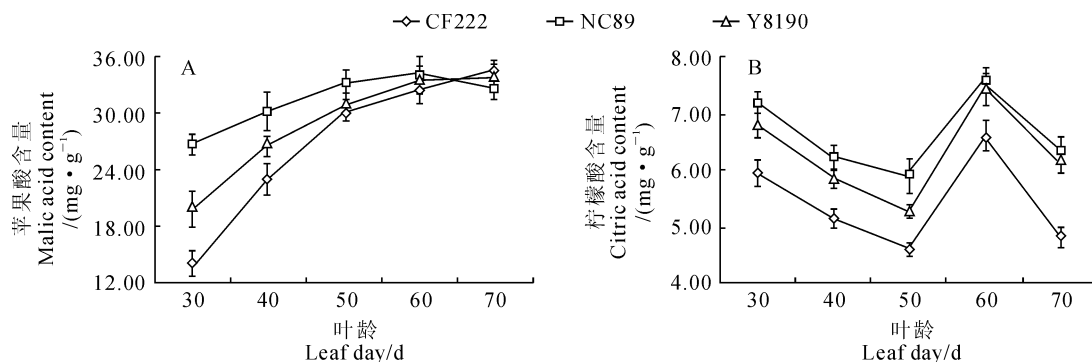


图1 烤烟品种‘CF222’、‘NC89’和‘Y8190’中部叶的苹果酸(A)和柠檬酸(B)含量动态变化

Fig. 1 The dynamic changes of middle leaves malic acid (A) and citric acid (B) content of flue-cured tobacco varieties ‘CF222’, ‘NC89’ and ‘Y8190’

‘NC89’和‘NC71’,有机酸总量较低的烤烟品种有‘豫烟5号’和‘CF222’。试验选择1个高有机酸含量的烤烟品种‘NC89’,1个低有机酸含量的烤烟品种‘CF222’和1个有机酸含量中等的烤烟品种‘Y8190’,作为进一步研究烤烟叶片主要非挥发性有机酸代谢特征的材料。其中,3个烤烟品种中部叶苹果酸含量在生长过程中大体呈现逐步增加的趋势(图1,A),品种‘NC89’和‘Y8190’苹果酸的积累量在叶龄60 d之前一直高于‘CF222’,之后含量缓慢变化并于叶龄70 d时略低于‘CF222’。同时,3个烤烟品种中部叶柠檬酸含量呈降-升-降的趋势(图1,B),且柠檬酸积累量均在叶龄50 d时达到最低,而在叶龄60 d时均达到最高,之后均又出现下降趋势。整个生长过程中,中部叶柠檬酸积累量始终为‘NC89’>‘Y8190’>‘CF222’。以上结果说明,苹果酸和柠檬酸作为三羧酸循环的中间产物,参与到烟株体内的新陈代谢,其合成和分解与呼吸作用密切相关。随着烟株生育期的推进,呼吸作用变化呈单峰曲线。呼吸速率苗期最低,旺长期最高,成熟期下降^[15]。在中部叶叶龄50~60 d,烟株处于旺长期,叶片苹果酸和柠檬酸的积累量较大,随后积累量则逐步下降。

2.2 烤烟生育期有机酸代谢相关酶活性的变化特征

2.2.1 苹果酸脱氢酶活性

苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)分布于细胞质、线粒体、过氧化物酶体、乙醛酸循环体中,线粒体MDH在三羧酸循环中催化草酰乙酸与苹果酸之间的可逆反应^[22]。3个烤烟品种中部叶NAD-MDH活性随生育期大体呈降-升-降的趋势(图2,A)。其中,在叶龄60 d之前,品种‘CF222’中部叶NAD-MDH的活性一直高于‘NC89’和‘Y8190’,之后则迅速下降并低于‘NC89’和‘Y8190’。

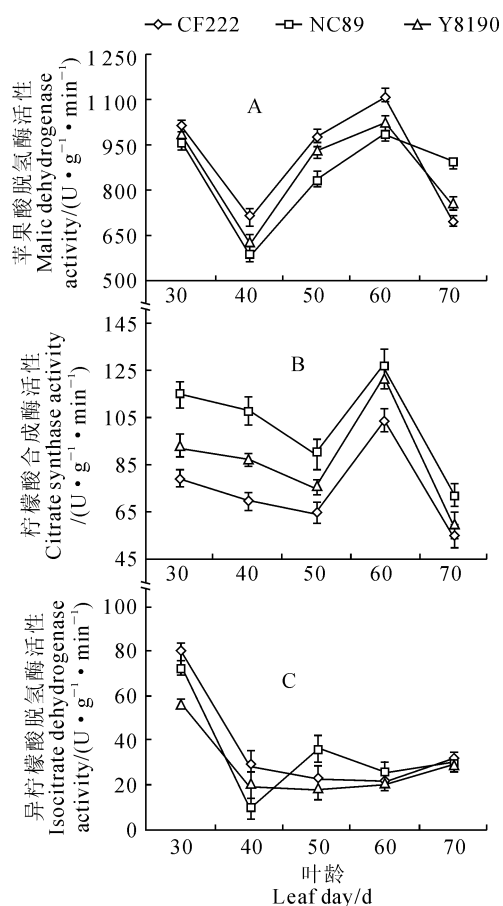


图2 烤烟品种‘CF222’、‘NC89’和‘Y8190’中部叶的NAD-MDH(A)、CS(B)和NAD-IDH(C)活性动态变化

Fig. 2 The dynamic changes NAD-MDH(A), CS(B) and NAD-IDH(C) activities in middle leaves of flue-cured tobacco varieties ‘CF222’, ‘NC89’ and ‘Y8190’

2.2.2 柠檬酸合成酶活性

柠檬酸合成酶(CS)催化草酰乙酸与乙酰辅酶A缩合为柠檬酸,并生成辅酶A^[22]。3个烤烟品种中部叶CS活性随生育期大体呈降-升-降的趋势(图2,B),且5个叶龄时期中部叶CS活性均为‘NC89’>‘Y8190’>‘CF222’。

其中,在叶龄 50 d 之前,中部叶 CS 活性均呈逐渐降低趋势;而后迅速升高,并在叶龄 60 d 时均达到最大值;之后,3 个品种的 CS 活性再次大幅度下降达到最低值。

2.2.3 异柠檬酸脱氢酶(NAD-IDH)活性 异柠檬酸脱氢酶(IDH)存在 NAD-IDH 和 NADP-IDH 两种形式,前者只存在于细胞线粒体参与三羧酸循环,后者在胞质、叶绿体、过氧化物酶体和线粒体中均存在^[22]。3 个烤烟品种中部叶 NAD-IDH 活性在叶龄 40 d 时均大幅度下降,之后则呈缓慢上升的趋势(图 2,C)。与品种‘Y8190’和‘CF222’不同,品种‘NC89’的 NAD-IDH 活性在叶龄 50 d 时大幅上升,叶龄 60 d 时又下降。

以上结果说明,中部叶 NAD-MDH、CS 和 NAD-IDH 活性随生育期推进呈现规律性变化,且品种间存在较大差异。推测,品种间 NAD-MDH、CS 和 NAD-IDH 活性的差异是导致品种间有机酸含量差异的主要原因。

2.3 烤烟品种中部叶苹果酸、柠檬酸含量与代谢相关酶活性的关系

在中部叶叶龄 50 d 和 60 d 时,各烤烟品种间有机酸总量差异均达到极显著水平,且品种间差异在叶龄 50 d 时大于叶龄 60 d。因此,试验选择在中部叶叶龄 50 d 时用多个烤烟品种来定量研究中部叶苹果酸含量和柠檬酸含量与代谢相关酶活性之间的关系(表 2)。结果表明,各烤烟品种中部叶苹果酸含量与 NAD-MDH 活性呈极显著负相关;中部叶柠檬酸含量与 CS 活性呈极显著正相关,而与 NAD-IDH 活性相关性不显著。可见,烤烟生育期中部叶苹果酸和柠檬酸的积累显著受到代谢相关酶活性的影响,NAD-MDH 和 CS 分别是调控烤烟中部叶苹果酸和柠檬酸含量的关键酶。

表 2 12 个烤烟品种中部叶叶龄 50 d 酸含量与酶活性的相关系数

Table 2 The correlation coefficients between acid content and enzyme activity of middle leaves among 12 flue-cured tobacco varieties at the leaf age of 50 days			
相关系数 Correlation coefficient	苹果酸脱氢酶活 NAD-MDH enzyme activity	柠檬酸合成酶活性 CS enzyme activity	异柠檬酸脱氢酶活性 NAD-IDH enzyme activity
苹果酸含量 Malic acid content	-0.801**	—	—
柠檬酸含量 Citric acid content	—	0.887**	-0.165

注: ** 表示在 0.01 水平上显著相关。
Note: ** indicate significance at 0.01 levels.

2.4 调制后烤烟中部叶有机酸总量、烟碱含量及其感官质量

烟叶的化学成分是烟叶质量形成的物质基础,而烟叶的感官质量又是烟叶质量的最终判定^[23-24]。表 3 和表 4 显示,调制后烤烟叶片有机酸总量小于 32% 的烤烟品种有‘CF222’和‘豫烟 5 号’,而烟碱含量大于 2.6% 的烤烟品种有‘NC89’,有机酸总量与烟碱含量的比值(酸碱比)大于 20 的烤烟品种有‘Y8190’和‘中烟 101’。其中,‘Y8190’和‘中烟 101’的酸碱比最高,表现为香气质较好、香气量较足、浓度较足、余味较舒适、燃烧性强、劲头较大,综合感官质量较好;‘NC89’烟碱含量在 12 个烤烟品种中最高(3.01%),酸碱比为 11.15,表现为香气质中等、香气量较足、浓度较足、余味尚适、燃烧性强、劲头一般,综合感官质量中等偏上;‘NC71’有机酸总量在 12 个烤烟品种中最高(36.09%),酸碱比为 14.26,表现为香气质中等、香气量中等、浓度中等、余味尚适、燃烧性差、劲头中等,综合感官质量一般。

可见,并不是单一的有机酸总量或烟碱含量越高烟叶的感官质量就越好,烟叶感官质量的高低取决于两者的协调程度^[25-27]。酸碱比值较高的烤烟品种香气质、柔细度和余味得分较高,燃烧性和灰色的得分则因烤烟品种的不同而有差异。在有机酸总量大于 32%,同时烟碱含量介于 1.5%~2.6% 时,酸碱比值大于 20 的烤烟感官质量最佳,介于 15 和 20 之间感官质量中等,小于 15 感官质量较差。这与杜咏梅等^[25]研究结果基本一致,即随烤烟质量档次的

表 3 调制后 12 个烤烟品种中部叶有机酸总量和烟碱含量
Table 3 The total organic acid content and nicotine content in middle leaves among 12 flue-cured tobacco varieties after modulation

品种 Varieties	有机酸总量 Total organic acid	烟碱 Nicotine	酸碱比 Acid-base ratio
Y8190	34.94±0.93	1.51±0.22	23.14
ZY101	32.97±0.25	1.58±0.15	20.87
CF222	30.18±1.17	1.65±0.13	18.29
Y11	32.22±0.12	1.94±0.23	17.12
8306	35.01±0.12	2.12±0.14	16.51
Y10	34.15±0.13	2.09±0.19	16.34
Y5	30.36±0.87	1.86±0.21	16.32
Y6	32.47±0.11	2.25±0.24	14.43
NC71	36.09±0.14	2.53±0.17	14.26
ZY203	33.93±0.24	2.42±0.11	14.02
8309	32.86±0.58	2.38±0.13	13.81
NC89	33.55±1.16	3.01±0.12	11.15

表 4 12 个烤烟品种中部叶的感官质量评价

Table 4 The sensory quality evaluation of middle leaves among 12 flue-cured tobacco varieties

品种 Variety	香气质 Aroma quality	香气量 Aroma quantity	杂气 Miscellaneous gas	刺激性 Irritating	余味 Aftertaste	浓度 Concentration	柔细度 Flexible fineness	燃烧性 Combustibility	灰色 Pessimistic	总分 Aggregate score	排序 Sort
Y8190	6.5	6.0	6.0	6.5	6.0	6.0	6.5	7.00	7.0	69.16	1
ZY101	6.5	6.0	6.0	6.5	6.0	6.5	6.0	7.0	7.0	69.16	1
Y11	6.5	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	68.33	2
NC89	6.5	6.5	6.0	5.5	5.5	7.0	6.0	7.0	5.0	68.22	3
CF222	6.0	6.0	6.0	6.0	6.5	6.0	6.5	5.0	5.0	67.60	4
8306	6.5	6.0	5.5	5.5	6.0	6.0	6.5	5.0	5.0	67.05	5
Y10	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.5	6.0	7.0	5.0	66.66	6
Y6	6.0	6.5	6.0	5.5	5.5	7.0	5.5	7.0	5.0	66.55	7
NC71	6.0	6.0	5.5	6.0	6.0	6.0	6.5	5.0	5.0	66.22	8
Y5	6.0	6.0	6.0	5.5	6.0	6.0	6.0	6.0	5.0	65.83	9
ZY203	6.0	6.0	5.5	5.5	6.0	6.0	5.5	6.0	5.0	65.38	10
8309	6.0	6.0	5.5	5.0	6.0	6.0	6.0	5.0	5.0	64.55	11

提高,非挥发有机酸总量与烟碱含量的比值(酸碱比)显著升高,且质量档次较高的烤烟酸碱比极显著高于质量较差的烤烟。

3 讨论

烟草在生长发育过程中,有机酸的积累是一个动态变化过程。柠檬酸、苹果酸和草酸等非挥发性有机酸的生物合成和降解反应主要发生在三羧酸循环(TCAC)中^[28-29],在植物线粒体中 NAD-MDH 催化苹果酸氧化脱氢生成草酰乙酸,在 CS 的催化下,与乙酰辅酶 A 结合生成柠檬酸^[22]。本研究发现烟叶中的苹果酸含量和 NAD-MDH 活性之间呈极显著负相关关系(-0.801^{**})。在中部叶叶龄 40 d 时,‘NC89’和‘CF222’中部叶 NAD-MDH 活性均下降,而苹果酸的积累量仍在增加。可能是因为在叶龄 40 d 之前,烟株碳氮代谢旺盛,光合产物大量积累,呼吸作用合成了较多的苹果酸,在一定程度上反馈抑制了 NAD-MDH 的活性。随着叶龄增加,苹果酸的积累量逐步减小,这种底物反馈抑制效应又会逐渐消弱。本研究与李雪梅等^[30]在砂梨中的研究结论存在差异,其原因可能是植物叶片与果实在有机酸代谢上不同所致。叶片中有机酸既是异化作用的产物,同时又可作为碳源供植物生长所需,因此代谢过程较为复杂。果实是营养储藏器官,有机酸作为主要的贮藏物质其来源有 2 种途径:一是从根

和叶中合成后输入到果实贮藏;二是由果实本身合成或转化而来,即在果实组织中合成^[31]。

Haffaker^[32]等提出果实中柠檬酸的合成途径是:在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)催化下,固定 CO₂ 形成草酰乙酸,草酰乙酸在 CS 催化下,与乙酰辅酶 A 结合生成柠檬盐。本研究表明柠檬酸含量与 CS 活性之间存在极显著正相关(0.887^{**}),而与 NAD-IDH 活性的相关性不显著(-0.165)。这说明烤烟中部叶柠檬酸的合成受 CS 活性的调控,推测在烤烟叶片中也存在固定 CO₂ 合成柠檬酸的途径。柠檬酸的分解虽然一定程度上与 NAD-IDH 活性有关,但本研究分析结果表明其关系不显著,可能还受到其他因素的影响。如当柠檬酸在叶片内积累到一定水平时,柠檬酸被移到细胞质,胞质乌头酸酶(Cyt-Aco)将柠檬酸异构为异柠檬酸,在 NADP-IDH 的催化下,转换为 α -酮戊二酸,可再次进入 TCAC 或用于氨基酸的合成^[33]。

烟草有机酸代谢是一个极为复杂的生理过程,有机酸含量的高低是内在的遗传特性、环境因子和栽培措施等共同作用的结果。本研究明确了烟叶苹果酸和柠檬酸的代谢关键酶是苹果酸脱氢酶和柠檬酸合成酶,如果在大田生长过程中,通过调控代谢关键酶的活性来促进或抑制有机酸的合成积累,协调烤烟叶片的酸碱比,就可以提高烟叶质量。但有关代谢相关酶活性调控、基因表达等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周冀衡,朱晓平,王彦亭.烟草生理与生物化学[M].合肥:中国科学技术大学出版社,1996:127-132.
- [2] LAYTEN D D, MARK T N.烟草—生产、化学和技术[M].国家烟草专卖局科技教育司,中国烟草科技信息中心,译.北京:化学工业出

版社,2003:251—269.

- [3] ZHOU J H(周冀衡), YANG H Q(杨虹琦), YANG SH Y(杨述元), *et al.* Studies on the main volatile aroma components in tobacco from different flue-cured tobacco production regions[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2004, **30**(1): 20—23 (in Chinese).
- [4] LI F L(李方楼), LU X M(鲁喜梅), *et al.* Analysis on changes of key non-volatile organic acids in tobacco leaves during its growth by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.* (安徽农业科学), 2011, **39**(29): 17 860—17 861, 17 903 (in Chinese).
- [5] LUO Q(罗琼), XUE D(薛冬), YANG J(杨俊), *et al.* Difference of main non-volatile organic acid contents among different flue-cured tobacco leaves and cigarettes[J]. *Tobacco Science & Technology* (烟草科技), 2009, **269**(12): 33—37 (in Chinese).
- [6] XIE Y(谢焰), WU D(吴达), JIN Y M(金永明), *et al.* Comparison of chemical characteristics of several domestic and imported cigarette brands[J]. *Tobacco Science & Technology* (烟草科技), 2008, **251**(6): 33—37 (in Chinese).
- [7] YANG H Q(杨虹琦), ZHOU J H(周冀衡), *et al.* Study on chiefly non-volatile organic acid of flue-cured tobacco in the different latitude producing area[J]. *Journal of Hunan Agricultural* (Nat. Sci. Edi.) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2005, **31**(3): 281—284 (in Chinese).
- [8] WANG SH H(王树会), LI T F(李天福), *et al.* Organic acid contents in different flue-cured tobacco cultivars crown at different altitudes[J]. *Journal of Southwest Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.) (西南农业大学学报·自然科学版), 2006, **28**(1): 128—130 (in Chinese).
- [9] ZHANG J T(张锦韬), DENG X H(邓小华), ZHOU J H(周冀衡), *et al.* Content change of main non-volatile organic acids contents of Hongda variety and their influence to smoking quality[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* (核农学报), 2012, **26**(5): 815—820 (in Chinese).
- [10] YIN G T(尹光庭), ZHOU J H(周冀衡), KUANG Y(匡勇), *et al.* Difference of non-volatile organic acids content among tobaccos planted in different types of soil[J]. *Hunan Agricultural Sciences* (湖南农业科学), 2011, (1): 62—65 (in Chinese).
- [11] LI W(李卫), XIAO S(肖遂), ZHOU J H(周冀衡), *et al.* Non-volatile organic acid contents in flue-cured tobacco leaves at different stalk positions during maturing[J]. *Chinese Tobacco Science* (中国烟草科学), 2010, **31**(4): 44—47 (in Chinese).
- [12] DAI L(代丽), HUANG Y CH(黄永成), *et al.* Effects of different temperature and humidity yellowing conditions on aroma constituents of tobacco leaves during bulk curing[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2008, **23**(6): 148—152 (in Chinese).
- [13] ZOU Y(邹悦), YANG SH H(杨式华), XIONG W(熊文), *et al.* Variation on the content of organic acids of tobacco in dali during aging process[J]. *Yunnan Chemical Technology* (云南化工), 2007, **34**(5): 41—45 (in Chinese).
- [14] QUAN L(全琳), TAN F L(谭方利), GONG CH R(宫长荣), *et al.* Research progress in organic acids in tobacco[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi* (江西农业学报), 2010, **22**(11): 68—72 (in Chinese).
- [15] 韩锦峰. 烟草栽培生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 58—74.
- [16] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 100—279.
- [17] 王彦亭. 中国烟草种植区划[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 37—38.
- [18] HIRAI M, UENO I. Development of citrus fruits; Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1977, **18**: 791—799.
- [19] LUO A C(罗安才), YANG X H(杨晓红), DENG Y Y(邓英毅), *et al.* Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of citrus fruits[J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2003, **36**(8): 941—944 (in Chinese).
- [20] SRERE P A, SENKIN J. Citrate condensing enzyme in citrus fruit[J]. *Nature*, 1966, **212**: 506—507.
- [21] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 32—34.
- [22] 郭嵩光, 王宪泽. 基础生物化学[M]. 北京: 高等教育出版, 2001: 151—159.
- [23] WU Y J(武云杰), ZHANG X Q(张小全), DUAN W J(段旺军), *et al.* Ammonia volatilization characteristics and its physiological regulation in flue-cured tobacco leaves during senescence[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(10): 2 082—2 088 (in Chinese).
- [24] LIU G SH(刘国顺), QIAO X R(乔新荣), WANG F(王芳), *et al.* Effects of light intensity on photosynthetic capabilities, growth and quality of flue-cured tobacco[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(9): 1 833—1 837 (in Chinese).
- [25] DU Y M(杜咏梅), ZHANG H B(张怀宝), *et al.* Relationships of non-volatile organic acids and higher fatty acids in flue-cured tobacco with its other chemical components and smoking quality[J]. *Tobacco Science & Technology* (烟草科技), 2011, **287**(6): 29—34 (in Chinese).
- [26] DU Y M(杜咏梅), ZHANG J P(张建平), WANG SH SH(王树声), *et al.* Major chemical indices leading the difference among different flavor types and sensory quality grades of flue-cured tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science* (中国烟草科学), 2010, **31**(5): 7—12 (in Chinese).
- [27] 耿永勤, 胡守毅, 蒋次青, 等. 几种不同类型烟叶非挥发性有机酸的比较分析[C]//云南省烟草学会 2006 年学术年会论文集, 2006.
- [28] WANG P F(王鹏飞), CAO Q(曹琴), *et al.* Composition and dynamic changes of sugars and acids in Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis* Bunge) during fruit development[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(7): 1 411—1 416 (in Chinese).
- [29] YOU J F(尤江峰), YANG ZH M(杨振明), *et al.* Secretion of organic acids in plant roots under aluminum stress and detoxification mechanism[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* (植物生理与分子生物学报), 2005, **31**(2): 111—118 (in Chinese).
- [30] 李雪梅. 砂梨果实有机酸含量及代谢相关酶活性动态变化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [31] 曾骧. 果树生理学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 37—40.
- [32] HAFFAKER R C, WALLACE A. Dark fixation of CO₂ in homogenates from citrus leaves, fruits, and roots[J]. *Pro. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1959, **74**: 348—357.
- [33] CHEN F X(陈发兴), LIU X H(刘星辉), CHEN L S(陈立松), *et al.* Advances in research on organic acid metabolism in fruits[J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2005, **22**(5): 526—531 (in Chinese).