

不同发育时期及外源处理后赤霞珠葡萄 脂氧合酶活性及脂肪酸含量变化

鞠延仑¹, 陈 腾¹, 高金珊¹, 房玉林^{1,2*}, 王 凯¹, 张振文^{1,2}

(1 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西杨陵 712100; 2 陕西葡萄栽培工程研究中心, 陕西杨陵 712100)

摘 要:以酿酒葡萄品种赤霞珠为试材,研究了果实发育时期、机械创伤处理与外源茉莉酸甲酯处理对葡萄果皮中脂肪酸组分、含量及 LOX 活性的变化。结果表明:(1)葡萄果皮的 LOX 活性在花后 12 周达到最大值;花后 15 周对果实进行创伤处理,处理 3 h 后 LOX 活性达到最高点;花后 17 周对果实进行 MeJA 处理,处理后 24 h LOX 活性达到最大值。(2)葡萄果皮脂肪酸组分中,饱和脂肪酸以棕榈酸和硬脂酸为主,而不饱和脂肪酸以亚油酸和亚麻酸为主。(3)葡萄果实脂肪酸含量随葡萄发育先增加后下降,花后 15 周创伤处理后的葡萄脂肪酸含量波动较大,花后 17 周茉莉酸甲酯处理后 24 h 葡萄脂肪酸含量显著升高。

关键词:赤霞珠葡萄;脂氧合酶;脂肪酸;茉莉酸甲酯

中图分类号:Q945.6

文献标志码:A

Lipoxygenase Activity and Fatty Acid Content of Cabernet Sauvignon Grape during Berry Development and External Treatment

JU Yanlun¹, CHEN Teng¹, GAO Jinshan¹, FANG Yulin^{1,2*}, WANG Kai¹, ZHANG Zhenwen^{1,2}

(1 College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Grape Cultivation Engineering Research Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this test, the change of fatty acid content and lipoxygenase (LOX) activity of Cabernet Sauvignon peel during berry development, upon treatment with wounding and MeJA were studied. The results showed that: (1) LOX activity increased to the peak at 12 weeks after anthesis. Wounding treatment was carried on berries at 15 weeks after anthesis, and LOX activity increased to the peak at 3 h after wounding. In addition, MeJA treatment was carried on berries at 15 weeks after anthesis, LOX activity increased to the peak at 24 h after MeJA treatment. (2) The major saturated fatty acids were hexadecanoic acid and stearic acid, linoleic acid and linolenic acid were the major unsaturated fatty acids. (3) The content of fatty acid was increased initially and then declined gradually during berry development, and was volatile after wounding treatment which was carried at 15 weeks after anthesis. The content of fatty acid was increased significantly at 24 h after MeJA treatment which was carried at the 17 weeks after anthesis.

Key words: Cabernet sauvignon; lipoxygenase; fatty acid; methyl jasmonate

脂肪酸是形成葡萄香气的主要前体物质。脂氧合酶(LOX)专一催化包括亚油酸、亚麻酸、花生四

收稿日期: 2013-03-18; 修改稿收到日期: 2014-08-31

基金项目: 农业部“948”项目(2014K30902140); 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAD31B07); 国家现代农业产业技术体系(葡萄)专项(nycytx-30-2p-04); 陕西省科技攻关项目(2012K01-25); 西安市科技创新支撑计划(NC10003); 西北农林科技大学科技推广专项

作者简介: 鞠延仑(1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事酿酒葡萄种质资源与品质的研究。E-mail: 1169679203@qq.com

* 通信作者: 房玉林, 博士, 博士生导师, 主要从事葡萄栽培生理与生态学领域的研究与教学工作。E-mail: fangyulin@nwsuaf.edu.cn

烯酸在内的具有顺、顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸及其相应酯的加氧反应,从而生成具有共轭双键的脂氢过氧化物(HPOs)^[1-2],这些脂氢过氧化物可以继续被相关酶类催化产生各具功能的物质。脂氢过氧化物裂解酶(HPL)的产物是挥发性小分子醇、醛、酯类物质^[3-4],与植物香气形成和抗逆性有关^[5-6];丙二烯氧合酶(AOS)和丙二烯氧环化酶(AOC)的产物茉莉酸与植物衰老和抗逆有关^[7]。有研究证明机械损伤可促使茉莉酸积累^[8]。

目前,对苹果、猕猴桃、番茄、黄花梨等呼吸跃变型果实的研究中发现,LOX活性随果实的成熟迅速增加^[9-12],但对于非呼吸跃变型果实中LOX的变化机制及其对果实品质影响的研究则较少。虽然机械损伤及外源茉莉酸甲酯诱导在脂氧合酶途径的作用已经证实,但是否对葡萄脂肪酸含量及脂氧合酶活性产生影响尚不清楚。为此,本研究以酿酒葡萄赤霞珠(*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon)为试材,研究了葡萄果实的发育时期、机械损伤及外源茉莉酸甲酯处理对脂氧合酶及脂肪酸组分及含量的影响,为进一步研究脂氧合酶对葡萄香气合成的影响提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料来源于陕西杨陵曹辛庄葡萄园2008年扦插定植的赤霞珠[Cabernet sauvignon,欧亚种(*V. vinifera* L.)酿酒葡萄品种]。2012年5~8月在坐果期、果实生长期、果实成熟期进行取样。取样时,采用随机取样的方式:按照五点法,除去外周2行,每个取样区相对固定30株生长相对中庸一致的葡萄植株。葡萄果实自坐果后开始取样,共取样8次,分别为开花后5~17周;开花后15周在葡萄树上对浆果进行创伤处理,使用6×6颗大头针创伤板对整穗葡萄进行创伤处理,平均每粒葡萄刺入1~2次,在引入创伤后0、0.5、1、3、6、12和24 h分别采集样品;开花后17周在葡萄树上对浆果进行茉莉酸甲酯(浓度约822.4 μmol/L)喷施处理,在喷施后0、0.5、1、3、6、12和24 h分别采集样品。样品采下后立即用锡箔纸包好投入液氮速冻,并及时带回实验室,果实在氮气环境下解冻,将果实果皮剥下放入离心管中液氮速冻后与其他样品一起放入-80℃冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 葡萄果脂氧合酶活性测定 参照《果蔬采

后生理生化实验指导》等^[13-14]的方法。试剂添加量略加改进。

(1)底物制备 取50 μL亚油酸加入到1 mL蒸馏水中,再加入25 μL Tween-20,摇匀后逐滴加入1 mol/L NaOH,摇动至溶液变得澄清,再用蒸馏水稀释至10 mL,即为0.5%(V/V)亚油酸钠溶液,分装并保存于-20℃冰箱中。

(2)粗酶液提取 取适量葡萄皮,液氮下研磨,称取2 g于离心管中,加入4 mL提取缓冲液(pH 6.8),4℃,12 000 r/min离心30 min,收集上清液用于脂氧合酶活性测定。

(3)活性测定 取900 μL 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.8),加入33 μL底物,在30℃保温10 min,再加入67 μL粗酶液后立即计时,于234 nm处记录30、45、60、75、90、105、120、135、150 s的吸光度变化。酶活性以 $\Delta OD_{234} \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 表示,重复3次。测定前先用蒸馏水调零。

1.2.2 葡萄果脂脂肪酸含量的测定 (1)脂肪酸的提取 参照张晓萌^[15]的方法,取果皮5 g在液氮下充分研磨,加入10 mL石油醚和乙醚(4/3,V/V)的混合液0~4℃下浸提24 h;然后加入10 mL 0.4 mol/L的氢氧化钾-甲醇溶液,室温下甲酯化2 h,后室温下4 000 r/min离心10 min,取上层有机相保存于10 mL蒸馏烧瓶中,减压蒸馏,最终定容至5 mL。取1 mL样品于进样瓶中,并加入1 μL 100 mg/mL的十七烷酸甲酯作为内标,待用。

(2)脂肪酸的测定 分析仪器为热电TRACE DSQ气相色谱-质谱联用仪。

色谱条件:DB5MS石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)。具体仪器条件:进样1 μL,分流进样(分流比30:1),进样口温度240℃,检测器温度250℃,炉温程序升温,100℃保持1 min,以8℃/min的速率升至205℃,保留0.1 min,再以3℃/min的速率升至240℃,保留10 min。载气压力(N₂)0.60 kg/cm²,燃气压力(H₂)0.65 kg/cm²,助燃气压力(空气)0.50 kg/cm²。

质谱条件:电子轰击(EI)离子源;电子能量70 eV;传输线温度275℃;离子源温度250℃;激活电压1.5 V;质量扫描范围m/z 40~500。

2 结果与分析

2.1 不同发育时期以及不同处理下果实脂氧合酶活性变化

由图1,A可知,发育过程中的葡萄LOX活性

呈现出先上升后下降的变化趋势,其中在花后 12 周达到最大值,在花后 14、15 周,LOX 活性又恢复到早期水平。而在花后 15 周对果实进行创伤处理后的 LOX 活性也有所变化(图 1,B),在引入创伤处理 3 h 内 LOX 活性不断增强且升至最高水平,此后的 24 h 内略有下降,但仍高于本底水平。如图 1,B 所示,在花后 17 周对葡萄进行茉莉酸甲酯处理,LOX 活性也有所变化,在处理后的 1 h 内变化极微,此后便不断上升,在处理后的 24 h 达到最大。

2.2 不同发育时期以及不同处理下果实脂肪酸含量的变化

花后 15 周葡萄皮脂肪酸甲酯离子流如图 2 所示,各峰对应的质谱图以质谱数据库(NIST08. L)进行谱图解析,最终确认葡萄皮提取油中各脂肪酸的组成(表 1)。离子流图中保留时间为 17.02 min 的峰为内标物十七烷酸甲酯。

按面积归一化法计算各峰面积的相对百分含量,并根据内标法计算主要脂肪酸的含量(图 3)。由图 3 知,葡萄皮油脂中饱和脂肪酸以棕榈酸和硬脂酸为主,而不饱和脂肪酸以亚油酸和亚麻酸为主。由图 3,A 可知,葡萄皮脂肪酸随着葡萄的成熟含量增加,到花后第 15 周达到最大值,而花后第 17 周有所下降,但仍高于果实成熟初期。由图 3,B 可知,对葡萄引入创伤处理后 0.5 h,棕榈酸含量增加,1 h 后下降,并保持该水平至 6 h;创伤处理后 12 h 又上升至较高水平,24 h 又降至本底水平。亚油酸和亚麻酸在创伤处理后 1 h 含量升高,之后到 6 h 下降

至最低点,12 h 后又升至较高水平。由图 3,C 可知,棕榈酸、亚油酸、亚麻酸及硬脂酸都在茉莉酸甲酯处理后 3 h 及 24 h 达到较高水平,且高于本底水平。说明葡萄在不同发育时期、创伤处理及茉莉酸甲酯处理都会影响脂肪酸的含量。

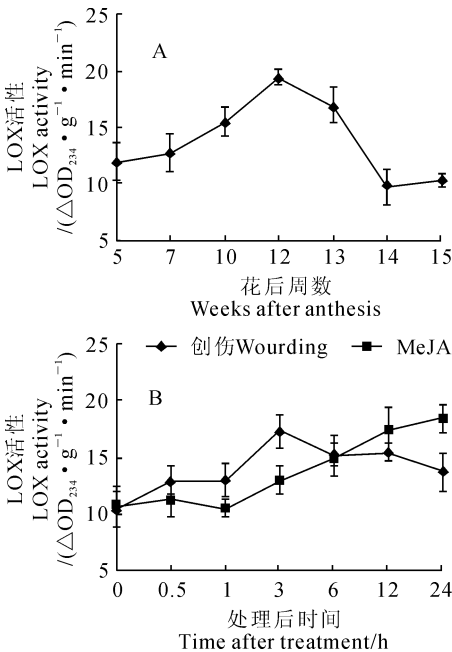


图 1 葡萄果实不同发育时期(A)及花后 15 周创伤处理、花后 17 周 MeJA 处理(B)后 LOX 活性的变化
Fig. 1 Changes in LOX activities during berry development(A), upon treatment with wounding carried at 15 weeks and MeJA carried at 17 weeks after anthesis (B)

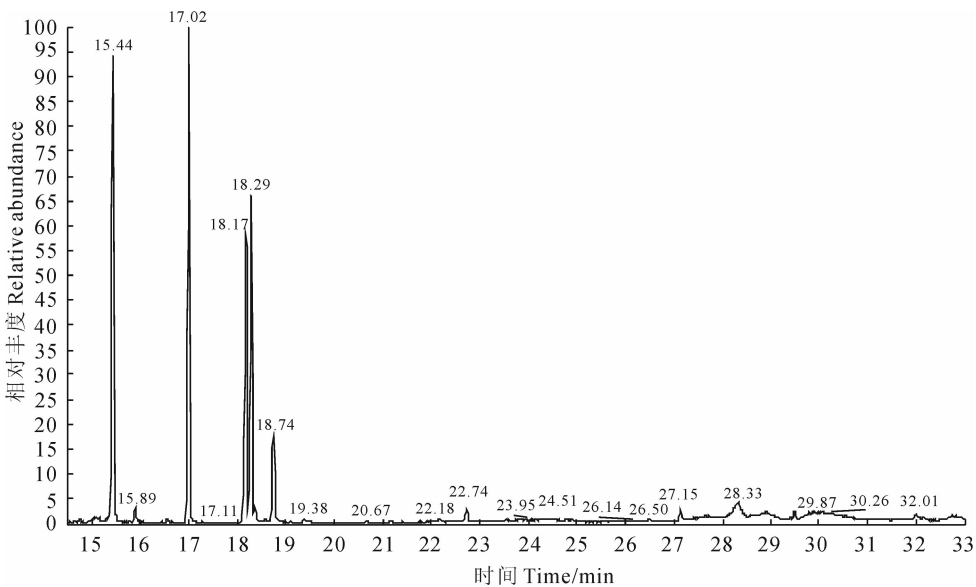


图 2 葡萄皮油中脂肪酸(甲酯)的总离子流色谱图
Fig. 2 The total ion chromatogram of grape skin oil fatty acids (methyl ester)

表 1 葡萄皮中脂肪酸(甲酯)的组成及保留时间

Table 1 Composition and retention time of grape skin oil fatty acids (methyl ester)

脂肪酸名称 The name of fatty acid	分子式 Molecular formula	保留时间 Retention time/min
棕榈油酸 9-hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	15.08
棕榈酸 Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	15.44
亚油酸 9,12-octadecadienoic acid (Linoleic acid)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	18.17
亚麻酸 9,12,15-octadecatrienoic acid (Linolenic acid)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	18.29
油酸 9-octadecenoic acid (Elaidic acid)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	18.37
硬脂酸 Octadecanoic acid (Stearic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	18.74
二十烷-10,13-二烯酸 10,13-eicosadienoic acid	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	22.05
二十烷-11-烯酸 11-eicosenoic acid	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	22.18
花生酸 Eicosanoic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	22.74
二十一烷酸 Heneicosanoic acid	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	24.91
山嵛酸 Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	27.15
二十四烷酸 Tetracosanoic acid	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	32.01

3 讨 论

LOX 被认为是与果实成熟相关的重要酶,其活性反映了果实的成熟状况和膜脂的降解。Riley 等^[16]对番茄的研究中,发现 LOX 随果实发育成熟活性逐渐增加;张晓萌^[15]对桃的研究表明,LOX 活性在果实达到成熟时明显升高。汪开拓等^[17]对采后葡萄的研究表明 10 μmol/L MeJA 处理显著抑制了亚油酸、亚麻酸含量的降低,同时延缓了硬脂酸和棕榈酸含量的上升。有研究已经证明,机械性创伤会使葡萄 LOX 迅速累积,并导致茉莉酸类物质和绿叶挥发性物质(GLVs)的增加^[2,18]。

本实验结果表明,在葡萄果实发育成熟过程中,部分香气成分的前体物质脂肪酸的含量发生变化。果皮中不饱和脂肪酸含量最多的亚油酸和亚麻酸随果实成熟进程呈明显上升趋势,并在花后 15 周达到最大值,此时 LOX 活性也降至最低点;引入创伤处理 3 h 后,LOX 活性达到最高点,此时的脂肪酸含量也在最低水平;茉莉酸甲酯处理后,葡萄 LOX 活性在处理 1 h 活性最低,而此后的脂肪酸含量则较高。这说明葡萄 LOX 活性的降低导致了游离脂

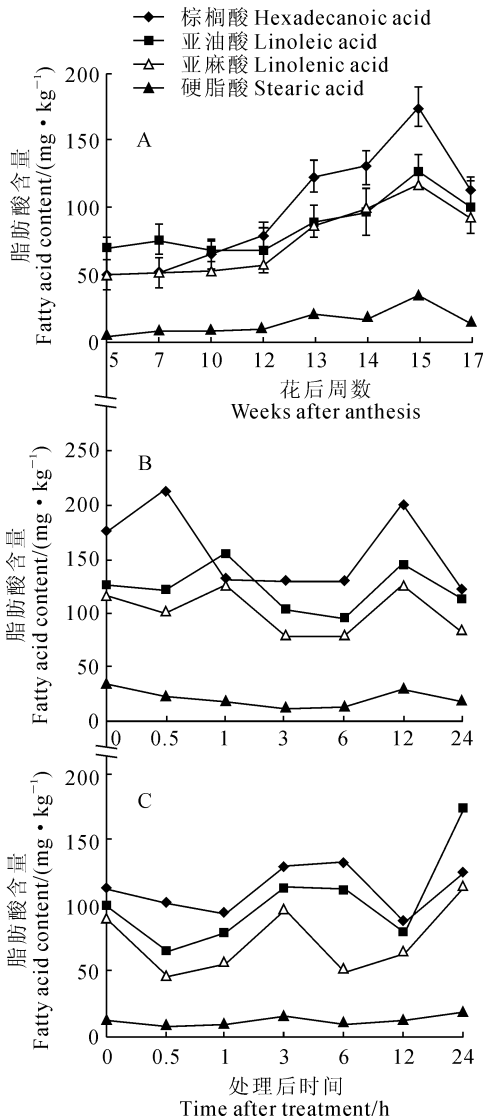


图 3 葡萄果实不同发育时期(A)及花后 15 周创伤处理(B)、花后 17 周 MeJA 处理(C)后脂肪酸的变化
Fig. 3 Changes in fatty acid during berry development(A), upon treatment with wounding carried at 15 weeks (B) and MeJA carried at 17 weeks after anthesis (C)

肪酸含量的增加,而 LOX 活性的升高也导致了脂肪酸含量的降低,与 LOX 催化脂肪酸的作用原理相一致。综上所述,机械损伤及外源茉莉酸甲酯诱导对葡萄脂氧合酶及相关脂肪酸产生了影响,推测其对果实香气成分的形成有重要调节作用。相关问题有待今后进一步研究。

参考文献:

[1] CHEN X F(陈发兴),ZHENG SH Q(郑少泉),JIANG J M(蒋际谋). Progress in study of fruit aromatic and biosynthetic metabolism[J]. Fujian Fruits(福建果树),2010,11(2):26-30(in Chinese).

- [2] FEUSSNER I, WASTERNAK C. The lipoxygenase pathway[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, **53**(12): 275–297.
- [3] LAURENT G D, DAVID R Q, ALAIN D, *et al.* Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay[J]. *BMC Genomics*, 2009, **40**(10): 212–244.
- [4] OLIAS J M, PEREZ A G, RIOS J J. Aroma components and free aroma acids in strawberry variety Chandler during ripening[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1992, **40**(17): 2 232–2 235.
- [5] BALDWIN E A. Fruit volatile metabolism and consumer perceptions[J]. *Fruit Quality and Its Biological Basis*, 2002, **12**(2): 89–106.
- [6] HATANAKA A. The bio generation of odour by green leaves[J]. *Phytochemistry*, 1993, **34**(8): 1 201–1 218.
- [7] CHEHAB E W, PEREA J V, GOPALAN B, *et al.* Oxylin pathway in rice and *Arabidopsis*[J]. *Plant Biol.*, 2007, **49**(1): 43–51.
- [8] BELL E, CREELMAN R A, MULLET J E. A chloroplastli lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**(16): 8 675–8 679.
- [9] WEI J M(魏建梅), LIU CH J(刘长江), ZHU X Q(朱向秋), *et al.* Changes of lipoxygenase activity of apple at softening stage and ethylene regulation after harvest[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*(河北农业科学), 2008, **12**(7): 27–30(in Chinese).
- [10] CHEN K S(陈昆松), XU CH J(徐昌杰). Effects of lipoxygenase on the postharvest physiology of kiwifruit[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学报), 1999, **25**(2): 138–144(in Chinese).
- [11] LUO Y B(罗云波). Effects of Lipoxygenase on the postharvest physiology of tomato fruit[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 1994, **21**(4): 357–360(in Chinese).
- [12] LI ZH Q(李志强), WANG L J(汪良驹), WANG ZH H(王中华). Effect of 1-MCP on postharvest physiology of Huanghua pear(*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruits[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2007, **27**(11): 2 334–2 338(in Chinese).
- [13] 曹建康, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 150–107.
- [14] CHEN K S(陈昆松), XU CH J(徐昌杰), XU W P(许文平), *et al.* Improved method for detecting lipoxygenase activity from kiwifruit and peach fruit[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2003, **20**(6): 436–438(in Chinese).
- [15] 张晓萌. 桃果实成熟进程中香气成分形成及其生理机制研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2005.
- [16] RILEY J C M, WILLEMOT C, THOMPSON J E. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activity in ripening tomato fruit[J]. *Postharvest Bio. Technol.*, 1996, **10**(7): 97–107.
- [17] WANG K T(汪开拓), ZHENG Y H(郑永华). Effects of methyl jasmonate treatment on membrane-lipid peroxidation in bunch abscission zone and fruit abscission in postharvest grape berries[J]. *Food Science and Technology*(食品科技), 2012, **37**(8): 42–51(in Chinese).
- [18] MATSUI K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylin metabolism[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, **9**(3): 274–280.