

氨基酸和壳聚糖对烤烟生理特性及香味品质的影响^①

宫长荣¹, 张学伟¹, 景延秋^{1*}, 余金恒², 高远¹

(1 河南农业大学烟草学院, 郑州 450002; 2 百色市烟草公司, 广西百色 533000)

摘要: 本文研究了叶面喷施氨基酸和壳聚糖对烤烟烟叶质体色素含量、酶活性的变异以及对致香物质含量的影响。结果表明: 打顶后氨基酸处理烟叶叶绿素、类胡萝卜素、苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性和脂氧合酶 (LOX) 活性较高, 壳聚糖处理影响不显著; 氨基酸处理的烟叶致香物质均比壳聚糖处理和 CK 高, 尤其是对苯丙氨酸类、美拉德反应产物类影响显著, 增幅分别达到 20.9%、23.1%。壳聚糖对苯丙氨酸类致香物质有较大提高, 增幅为 17.6%。从整体上看, 氨基酸处理调整了发育后期质体色素组分比例和相关酶类的活性, 对烟叶香味品质的影响效果要好于壳聚糖。

关键词: 氨基酸; 烤烟; 香味; 色素; 苯丙氨酸解氨酶; 脂氧合酶

中图分类号: S572

关于植物对氨基酸的吸收和利用已经做了很多研究, 尤其在水稻上研究较多^[1], 在蔬菜、水果上也多有应用研究^[2]。施用氨基酸能促进作物吸收养分, 提高产量和改善品质。壳聚糖是一种生长调节物质, 可调节植物的根、茎、叶和花的生长发育^[3], 在不结球白菜^[4]、小麦^[5]、玉米^[6]等作物上的应用研究表明能促进生长, 增加产量, 改善品质。尹立军^[7]研究发现叶面喷施氨基酸混合物能促进烟株生长, 改善品质; 刘国顺等^[8]研究发现在水培营养液中添加适量氨基酸促进了烟株的生长发育和N代谢; 张燕等^[9]研究了壳聚糖对烟草种子萌发及幼苗生理生化特性的影响。当前在烟草上应用氨基酸、壳聚糖的研究多偏重于产量及抗病性上, 而在影响烟叶香味品质及其相关酶代谢的研究却少见报道。为进一步探讨提高烟叶香味途径及其机理, 本文首次对叶面喷施氨基酸和壳聚糖对烟叶香味物质代谢的影响做了研究, 以期为优质高香气烟叶生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2008 年在河南省许昌市襄城县进行, 供试土壤类型为中壤土, 其理化性质为: pH 7.21, 有机质 17.08 g/kg, 速效 N 86.09 mg/kg, 速效 P 16.25 mg/kg, 速效 K 121.52 mg/kg。供试烟草品种为中烟 100, 试

验地烟苗于 5 月初移栽, 7 月初打顶, 田间管理按照优质烟栽培技术标准执行。

试验设 3 个处理: 处理 1 叶面喷施氨基酸, 处理 2 叶面喷施壳聚糖, 处理 3 叶面喷清水 (CK)。随机区组设计, 3 次重复, 小区面积约 30 m², 行株距为 1.2 m × 0.5 m, 每小区 60 株, 各处理均是在打顶后 0、7、14、21 天开始整株喷施, 每次每株喷施约 200 ml, 整株叶片上下表面露湿为准。每次喷施后 7 天开始取样, 选定 5 棵烟株取中部叶, 切去叶尖和叶基各 1/3 区域, 仅留叶中部剪碎混匀后用于生理指标测定; 成熟后的烟样采用三段式烘烤工艺完成烘烤, 烤后烟样 45 °C 烘干, 磨碎, 过 0.3 mm (孔径) 筛子保存, 用于烤后烟样香味物质的测定。

1.2 测定方法

常规方法测定土壤基本理化性质^[10]; 叶绿素和类胡萝卜素的测定采用分光光度法^[11]; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性采用文献^[12]中的方法测定; 脂氧合酶 (LOX) 活性测定参照 Sekiya 等^[13]的方法测定; 采用气相色谱—质谱 (GC-MS) 法测定烟叶香味成分。采用统计软件 SPSS16.0 进行方差分析, 并按 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 氨基酸和壳聚糖对烤烟生理特性的影响

①基金项目: 河南省烟草专卖局项目 (HYKJ200701) 资助。

* 通讯作者 (jingyanqiu72t@yahoo.com.cn)

作者简介: 宫长荣 (1948—), 男, 河南濮阳人, 教授, 主要从事烟草研究。E-mail: gongchr009@126.com

2.1.1 氨基酸和壳聚糖对烤烟叶片叶绿素和类胡萝卜素的影响 色素是影响烟叶品质和可用性的主要因素之一,它不仅决定了调制后烟叶的外观质量,而且其降解产物是烟叶重要的致香物质。由图 1 和图 2 可以看出,各处理烟叶的叶绿素与类胡萝卜素含量均随着打顶后时间的推移呈现下降的趋势,叶绿素含量在打顶后下降速度较快,7 天后下降速度有所减缓,而类胡萝卜素含量下降幅度不大,下降趋势与叶绿素类似,与 CK 相比,处理 1 和处理 2 均增强了烟叶叶绿素和类胡萝卜素的合成,叶绿素与类胡萝卜素含量

都有所增加,喷施后 28 天时叶绿素含量比 CK 分别增加了 26%和 4.2%,平均增加了 27%和 6.6%,类胡萝卜素含量分别增加了 40.7%和 11.9%,平均增加了 24.2%和 3.5%。方差分析(表 1)表明,不同处理间叶绿素含量达到了极显著水平,类胡萝卜素含量差异显著,打顶后时期色素含量差异极显著。从多重比较结果(表 2)来看,处理 1 的叶绿素、类胡萝卜素含量均显著高于处理 2 和 CK,处理 2 与 CK 差异不显著。说明氨基酸处理对烟叶叶绿素、类胡萝卜素含量的影响显著。

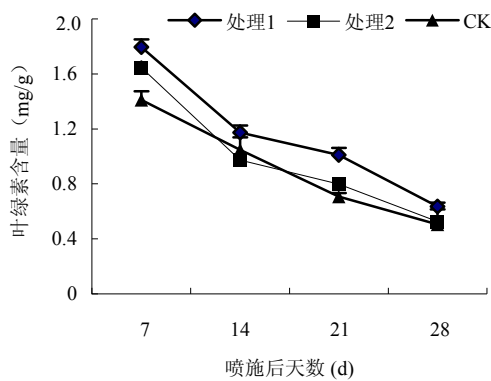


图 1 不同处理烤烟叶绿素含量变化

Fig. 1 Changes of Chlorophyll content in flue-cured tobacco

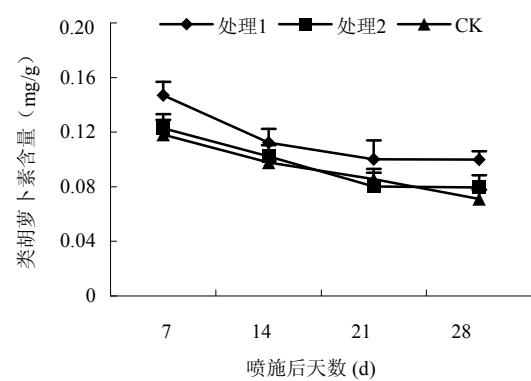


图 2 不同处理烤烟类胡萝卜素含量变化

Fig. 2 Changes of carotenoid in flue-cured tobacco

表 1 烤烟生理特性的方差分析

Table 1 ANOVA of physiological characteristics of flue-cured tobacco

变异来源	df	叶绿素含量		类胡萝卜素含量		苯丙氨酸解氨酶活性 PAL		脂氧合酶活性 LOX	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
处理间	2	0.131	13.510**	0.002	7.335 *	4.305	37.695**	4.257	34.089**
时期间	3	1.802	185.795**	0.004	16.906**	12.965	113.519**	46.980	376.242**
误差	24	0.01		0.001		0.114		0.125	

注: **表示差异达 $p < 0.01$ 显著水平。

表 2 烤烟生理特性的多重比较

Table 2 Multiple comparison for physiological characteristics of flue-cured tobacco

处理	叶绿素含量 (mg/g)	类胡萝卜素含量 (mg/g)	苯丙氨酸解氨酶活性(PAL) (OD290/(g·min))	脂氧合酶活性(LOX) (OD234/(g·min))
处理1	1.13a	0.11a	3.57a	6.00a
处理2	0.98b	0.96b	2.59b	5.06b
CK	0.92b	0.93b	2.49b	4.89b

注: 不同小写字母表示处理间差异达 $p < 0.05$ 显著水平。

2.1.2 氨基酸和壳聚糖对烤烟叶片相关酶活性的影响 苯丙氨酸解氨酶(PAL)为多种酚类形成提供

前体,是苯丙烷类代谢反应的关键酶和限速酶^[14]。图 3 显示打顶后 PAL 活性呈快速上升趋势,到生育后

期有所下降, 处理1的PAL活性在各个时期均高于其他处理, 方差分析结果(表1)也显示处理间PAL活性差异极显著, 处理1的PAL活性显著高于其他处理, 多重比较结果(表2)显示处理1显著高于其他处理, 比处理2和CK分别高出37.8%和43.4%; 而处理2也高于CK, 高出4%, 但没有达到显著水平。说明氨基酸处理更有利于合成绿原酸、芸香苷等酚类物质。

脂氧合酶(LOX)是一种含非血红素铁的加双氧酶, 它专一催化含有顺, 顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸加氧反应, 生成具有共扼双键的过氧化氢物^[15], 因而LOX是酶促膜脂过氧化作用的关键酶之一,

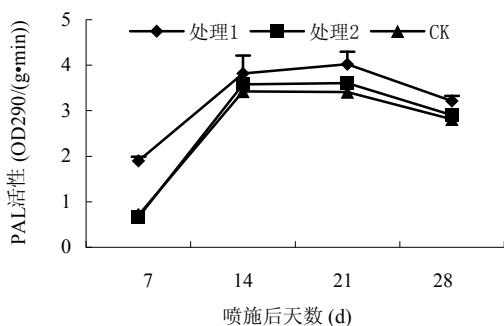


图3 不同处理对烤烟PAL活性变化的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on activity of PAL in flue-cured tobacco

也是类胡萝卜素降解的关键酶, 其活性强弱直接影响膜脂过氧化作用及类胡萝卜素的降解水平。图4可以看出LOX活性在喷施后两周达顶峰, 然后随叶片衰老而下降, 处理1的LOX活性在各个时期均高于处理2和CK, 喷施后28天分别高出17.4%和53.3%, 平均高出18.3%和30.2%。处理2的LOX活性在喷施后14天低于CK, 低11.9%。最终的LOX活性显示比CK略高, LOX活性的方差分析(表1)表明处理间差异极显著, 表2多重比较也表明相同的结果, 且处理1显著高于其他处理。处理2与CK间差异不显著。LOX活性越高越有利于类胡萝卜素的降解, 乃至香味物质的形成, 故以处理1表现最佳。

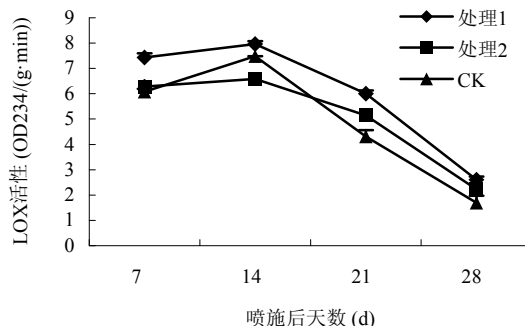


图4 不同处理对烤烟LOX活性变化的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on activity of LOX in flue-cured tobacco

2.2 氨基酸和壳聚糖对烤烟中性致香物质的影响。

2.2.1 烟叶致香物质含量

经气相色谱-质谱(GC-MS)对烤后烟叶样品进行定性定量分析, 共检出22种对烟叶致香成分有较大影响的化合物(表3)。其中酮类10种, 醛类4种, 醇类3种, 酯类1种杂环类3种, 烃类1种。含量较高的致香物质主要有新植二烯、茄酮、 β -大马酮、法尼基丙酮、巨豆三烯酮II、巨豆三烯酮IV、糠醛、苯乙醛、芳樟醇。不同处理比较, 在测定的22种香气成分中, 氨基酸处理烟叶致香物质中的糠醛、5-甲基-糠醛、苯甲醛、苯乙醛、芳樟醇、香叶基丙酮、茄酮、吡嗪、新植二烯等9种成分含量较高, 壳聚糖处理烟叶中苯甲醇、巨豆三烯酮I、巨豆三烯酮II、巨豆三烯酮III、巨豆三烯酮IV等5种物质含量较高, 清水(CK)处理烟叶中除了3-羟基- β -二氢大马酮外, 各种物质致香物质含量都较低。从致香物质总量看, 氨基酸和壳聚糖处理都高于CK, 分别高于CK 25.2%和9.5%。氨基酸处理烟叶致香物质总量较高, 壳聚糖处理次之, CK处理较低。

2.2.2 不同种类致香物质含量

烟叶中致香物质种类繁多, 具有不同的化学结构和性质, 对烟叶的香气、香气量、香型有不同的贡献。为了便于分析, 把致香物质按烟叶香气前体物进行分类, 可分为苯丙氨酸类、棕色化产物类、类西柏烷类、类胡萝卜素类4类^[16]。

苯丙氨酸类致香物质包括苯甲醇、苯乙醇、苯甲醛、苯乙醛等成分, 对烤烟的香气具有良好的影响, 尤其对烤烟的果香、清香贡献较大^[16]。处理1和处理2烟叶中苯丙氨酸类致香物质含量均高于CK(表3), 分别高出50.7%和28.2%。表明喷施壳聚糖可以提高烟叶苯丙氨酸类致香物质含量, 而喷施氨基酸效果更明显。

棕色化产物类致香物质包括糠醛、5-甲基糠醛、3,4-二甲基-2,5-咪喃二酮、2-乙酰基吡咯等成分, 其中多种物质具有特殊的香味^[16]。由表3看出, 不同处理烟叶中棕色化产物类致香物质含量以处理1含量较高, 比处理2和CK分别高出34.3%和41.2%, 表明

表 3 不同处理对烤烟不同种类致香物质含量的影响

Table 3 Effects of different treatments on contents of different kinds of aroma constituents in flue-cured tobacco leaves

香味成分	处理 1 ($\mu\text{g/g}$)	处理 2 ($\mu\text{g/g}$)	CK ($\mu\text{g/g}$)
糠醛	19.85	14.70	13.64
5-甲基-糠醛	2.83	2.21	2.30
3,4-二甲基-2,5-呋喃二酮	0.97	0.68	0.75
2-乙酰基吡咯	0.43	0.34	0.37
美拉德反应产物总量	24.08	17.93	17.05
苯甲醇	5.12	5.21	3.94
苯甲醛	3.05	2.15	1.97
苯乙醛	11.73	9.39	7.00
苯乙醇	2.01	1.89	1.63
苯丙氨酸类香气物质总量	21.91	18.64	14.54
6-甲基-5-庚烯-2-酮	1.09	0.59	0.73
芳樟醇	9.04	6.15	7.27
β -大马酮	26.61	26.49	24.78
香叶基丙酮	2.74	2.22	2.29
二氢猕猴桃内酯	2.71	2.65	2.40
巨豆三烯酮 I	1.53	1.77	1.33
巨豆三烯酮 II	8.27	9.15	6.66
巨豆三烯酮 III	1.09	1.31	1.09
巨豆三烯酮 IV	7.56	8.49	6.97
3-羟基- β -二氢大马酮		0.81	1.02
类胡萝卜素降解产物总量	60.65	59.63	54.53
茄酮	16.44	8.77	9.66
类西柏烷类降解产物	16.44	8.77	9.66
吲哚	0.95	0.77	0.62
法尼基丙酮	10.22	8.80	9.94
新植二烯	887.03	884.19	835.93
总计 (不含新植二烯)	240.88	210.73	192.47

喷施氨基酸对提高烟叶棕色化产物类致香物质的贡献较大,壳聚糖对提高棕色化产物类致香物质含量影响不大。

类西柏烷类致香物质是烟草中重要的萜烯类化合物,主要成分为茄酮,是烟叶中重要的致香前体物,通过一定的降解途径可形成多种醛、酮等致香成分^[16],其总量虽然仅占香气物质的很小一部分,但对烤烟的香气质量却有较大影响。与CK相比,处理1能提高烟叶中类西柏烷类致香物质含量(表3),提高了70.2%;而处理2则降低该类致香物质的含量,降低了9.2%,表明氨基酸处理可以使烟叶中类西柏烷类致香物质含量保持较高水平。

类胡萝卜素类致香物质包括6-甲基-5-庚烯-2-酮、芳樟醇、 β -大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯、3-羟基- β -二氢大马酮、巨豆三烯酮的4种同分

异构体等,烟草中许多重要的香味成分都是类胡萝卜素的降解产物^[16],类胡萝卜素类香味物质分子量较小,分子极性较大,阈值较低,挥发性较强,是影响烟叶香气质和香气量的重要组分。由表3可知,处理1、处理2可不同程度地提高烟叶中类胡萝卜素类致香物质的含量,分别提高了11.2%和9.4%,但未达到显著水平。

3 讨论

通过对不同处理下烟叶质体色素(叶绿素、类胡萝卜素)含量、有关酶活性及最终的香气物质含量的比较分析,处理1在大田期间的质体色素含量及影响香气前体物质降解的相关酶活性较高,说明氨基酸处理的烟叶更具有形成优质烟叶的潜能和基础。处理2能够提高烟叶生理生化活性,对烟叶质量产生一定影

响,但与CK相比没有明显优势。香气物质检测结果也表明,处理1对四大类香气物质含量有不同程度的促进作用,尤其对苯丙氨酸类、美拉德反应致香物质提升作用明显,增幅分别为20.9%、23.1%。而处理2除了对苯丙氨酸类致香物质有17.6%的增幅外,对其他致香物质含量影响不显著。我们认为可能有两个原因:①喷施氨基酸可被烟草直接吸收利用,作为美拉德反应中的一个反应底物,促进了美拉德反应的进行,从而生成多种对烟叶香气有重要贡献的化合物;②吸收的某些氨基酸(苯丙氨酸)自身可直接分解为香味化合物(如苯甲醇、苯乙醇等)。壳聚糖对抑菌效果的研究较多^[17],有研究表明壳聚糖作为激发子可启动植物的防御系统,能诱导植物产生一系列防卫反应,表现在能激活植物细胞,提高机体免疫能力,提高抗病性^[18]。由此可以推论,壳聚糖在烟叶上应用的效果可能是通过增加作物的免疫力从而达到增产的目的。但是本研究表明壳聚糖在提高烟叶香味物质效果上影响有限。

香气是评价烟叶内在质量的核心内容和重要指标之一。烟叶致香成分众多,含量极微,而且各种致香成分间相互作用,所以烟叶香气质量是由多种香气成分的组成、含量、比例及相互作用所决定的。影响烤烟香味品质的因素很多,但对于同一烤烟品种而言,选择适当的措施来提高烟叶的香气含量,将是烟叶生产中的重要技术。国内外学者在烤烟香气物质的研究中多偏重于香气物质本身及香气物质与环境因子的关系,且多为表观上的描述,有关烟叶香味物质的代谢与其代谢的关键酶以及通过调控相关酶活性来提高烟叶香味品质乃至其影响机理尚缺乏深入研究。

本试验中,通过研究打顶后喷施氨基酸和壳聚糖对质体色素含量及其代谢关键酶活性,以及最终的香气成分的比较分析可知,在打顶后喷施多元氨基酸能够使质体色素含量显著增加,影响致香物质代谢的相关酶活性,对提高烟叶香味品质有更积极的作用。

参考文献:

- [1] 刘强,彭建伟,荣湘民,谢桂先,朱红梅. 同浓度羧甲基壳聚糖对水稻氮代谢影响研究. 植物营养与肥科学报, 2007, 13(4): 597-601
- [2] 穆军,呼世斌,王永科. 猪蹄甲制备氨基酸螯合微肥及其对小白菜生长的影响. 农业工程学报, 2008, 24(4): 185-187
- [3] 刘桂智,朱英波,杜金有,巩振辉. 壳聚糖在农业上的应用研究进展. 中国农学通报, 2007, 23(8): 377-381
- [4] 欧阳寿强,徐朗莱. 壳聚糖对不结球白菜营养品质和某些农艺性状的影响. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 21-24
- [5] 李庆春,翁长仁,曹广才,吴东兵,何福相,刘吉柱,张丽娟. 壳多糖溶液浸种对冬小麦籽粒产量和品质的影响. 环境科学学报, 1991, 11(2): 248-252
- [6] 荣湘民,谢桂先,刘强,彭建伟,朱红梅. 生长调节剂对玉米氮代谢的影响. 植物营养与肥科学报, 2005, 11(5): 634-640
- [7] 尹立军. 氨基酸混合物对烤烟产质影响的研究初报. 中国烟草科学, 1999 (4): 34-36
- [8] 刘国顺,朱凯,武雪萍,郭桥燕,彭飒. 施用有机酸和氨基酸对烤烟生长及氮素吸收的影响. 华北农学报, 2004, 19(4): 51-54
- [9] 张燕,方力,王宝. 壳聚糖对烟草种子萌发及幼苗生理生化特性的影响. 吉林农业大学学报, 1998, 20(3): 28-30
- [10] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [11] 赵世杰,刘华山,董新纯. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [12] 张志良. 植物生物化学技术与方法. 北京: 农业出版社, 1986
- [13] Sekiya JH, Kamiuchi, Hatannaka A. Lipoxygenase, hydroperoxide lyase and volatile C6-aldehyde formation from C18-fatty acids during development of phaseolus vulgaris L. Plant cell physiol., 1982, 23(4): 631-638
- [14] 贺立红,张进标,宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展. 食品科学, 2006, (30): 31-34
- [15] Annerose Koekritz, Tankred Schewe, Hieke B, Hassw. The effects of soybean lipoxygenase-1 on chloroplasts from wheat. Phytochemistry, 1985, 24(3): 381-384
- [16] 史宏志,刘国顺. 烟草香味学. 北京: 中国农业出版, 1998
- [17] 梁蕊,柳明珠. 保墒缓释肥料研究现状与进展. 土壤, 2008, 40(2): 159-166
- [18] 陆建农. 壳聚糖在农业上应用的研究进展. 中国植保导刊, 2008(2): 16-17

[1] 刘强,彭建伟,荣湘民,谢桂先,朱红梅. 同浓度羧甲基壳聚

Effects of Amino Acids and Chitosan on Physiological Characteristics and Aroma Quality of Flue-cured Tobacco

GONG Chang-rong¹, ZHANG Xue-wei¹, JING Yan-qiu¹, YU Jin-heng², GAO Yuan¹

(1 *College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*; 2 *Baise Tobacco Company, Baise, Guangxi 533000, China*)

Abstract: This paper studied the effects of foliar spraying of amino acids and chitosan on plastid pigment, enzymatic activity and aroma constituents of flue-cured tobacco leaves after topping. Results showed that: the contents of Chlorophyll and carotenoid, the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) were higher than other treatments, chitosan treatment had no significant influence; the contents of aroma constituents of amino acids treatment were higher than those of chitosan treatment and CK, particularly there was a significant effect on phenylalanine and Maillard reaction product, increased by 20.9% and 23.1% respectively. The content of phenylalanine increased by 17.6% compared with CK. The proportion of the plastid pigment and relating enzyme changed under amino acids treatment, which were better than chitosan's influence on aroma quality of flue-cured tobacco.

Key words: Amino acids, Flue-cured tobacco, Aroma, Pigment, PAL, LOX