

## 吉林晒烟多酚类物质及其相关酶活性的变化动态

孟莉<sup>1</sup>, 郭世英<sup>2</sup>, 符云鹏<sup>1\*</sup>, 邱宝平<sup>2</sup>, 刘晓旭<sup>2</sup>, 郭濛濛<sup>1</sup>, 赵晓军<sup>1</sup>, 韩富根<sup>1</sup>

(1.河南农业大学烟草学院, 郑州 450002; 2.红塔辽宁烟草有限责任公司, 沈阳 110000)

**摘要:**选取吉林当地3个主栽晒烟品种研究了不同晒烟品种叶片发育过程中多酚类物质及其相关酶活性的动态变化以及两者之间的关系。结果表明,不同晒烟品种中总酚含量表现为青黄叶>大叶黄>大白花,总酚在整个生育期的含量为0.16%~1.2%。不同晒烟品种中总酚含量随着叶龄的增加而提高,在成熟期稍有降低;青黄叶和大叶黄中绿原酸、芸香苷和茛菪亭在叶片发育过程中整体上表现出上升趋势,而大白花中绿原酸、芸香苷和茛菪亭含量呈单峰曲线。各品种中苯丙氨酸解氨酶活性与绿原酸和芸香苷的变化规律相同,多酚氧化酶活性和过氧化物酶活性呈单峰趋势。在烟叶生长过程中,各晒烟品种中苯丙氨酸解氨酶活性与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚的变化呈正相关,且与绿原酸和芸香苷达到显著水平;多酚氧化酶活性变化与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚的相关性表现为负相关,但未达到显著水平;过氧化物酶活性与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚呈正相关,且与总酚达显著水平。由此可见,苯丙氨酸解氨酶和过氧化物酶与多酚类物质之间有显著的相关性,可以通过调节这两种酶的活性来控制多酚的含量,从而改善烟叶质量。

**关键词:**多酚类物质;苯丙氨酸解氨酶;多酚氧化酶;过氧化物酶

中图分类号:S572.01

文章编号:1007-5119(2014)06-0059-06

DOI:10.13496/j.issn.1007-5119.2014.06.012

## Dynamic Changes of Polyphenol Contents and Enzyme Relating to Polyphenol Synthesis in Sun-cured Tobacco in Jilin

MENG Li<sup>1</sup>, GUO Shiyong<sup>2</sup>, FU Yunpeng<sup>1\*</sup>, QIU Baoping<sup>2</sup>,

LIU Xiaoxu<sup>2</sup>, GUO Mengmeng<sup>1</sup>, ZHAO Xiaojun<sup>1</sup>, HAN Fugen<sup>1</sup>

(1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Hongta Liaoning Tobacco Co., Ltd., Shenyang 110000, China)

**Abstract:** A field experiment was conducted to study the changes of polyphenol contents and enzyme relating to polyphenol synthesis and the relationship between them in three sun-cured tobacco varieties in Jilin. The results showed that the total phenols content Qinghuangye > Dayehuang > Dabaihua in the three sun-cured tobacco varieties in Jilin, with range 0.16% to 1.2% in the whole growth period. The total phenols increased with increasing leaf age, and decreased slight in late mature. Chlorogenic acid, rutin and scopoletin showed an upward trend during leaf development in Qinghuangye and Dayehuang, but they showed a single peak curve in Dabaihua. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity had the same trend with chlorogenic acid and rutin in all varieties. Polyphenol oxidase (PPO) activity and peroxidase (POD) activity showed a single peak trend. With the growth and development of tobacco leaves, phenylalanine ammonia lyase activity with chlorogenic acid, rutin, scopoletin changes and total phenols were positively correlated, and with chlorogenic acid and rutin was significantly correlated. Peroxidase activity with chlorogenic acid, rutin, scopoletin and total phenols were positively correlated, and with total phenol reached significant levels. There was significant correlation between phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol contents. We can regulate the activity of two enzymes to control content of polyphenols, then improving the quality of tobacco finally.

**Keywords:** polyphenol contents; phenylalanine ammonia lyase; polyphenol oxidase; peroxidase

酚类物质是植物次生代谢-苯丙烷类代谢途径的主要产物,在烟草中发现的酚类物质包括单宁类(绿原酸的异构体、咖啡酸和奎尼酸)、香豆素类

(茛菪亭和茛菪亭的糖苷衍生物)、黄酮类(芸香苷、黄酮、鼠李糖、黄酮醇)、花色素类(花色素-3-芸香糖苷、花葵素-3-芸香苷、槲非醇)、简单酚衍

基金项目:中国烟草实业发展中心资助项目(zysy-2010-03);红塔辽宁烟草有限责任公司资助项目(20130401)

作者简介:孟莉,女,在读硕士,主要从事烟草栽培生理生化研究。E-mail:mengli61400@163.com。\*通信作者,E-mail:ypfu01@163.com

收稿日期:2014-07-12

修回日期:2014-09-23

生物等<sup>[1]</sup>,其中绿原酸、芸香苷和茛菪亭是烟草中最主要的多酚类物质。多酚类物质对烟草的生长发育、调制特性和调制后烟叶色泽、商品等级以及烟香气味、生理强度等具有重要影响,是衡量烟叶品质的重要指标之一<sup>[2-3]</sup>,有人提出以酚类化合物含量与蛋白质氮含量的比值作为判断烟草芳香吃味的依据<sup>[4]</sup>,另外酚类代谢在植物的生态适应性方面具有重要的意义<sup>[5]</sup>。国内外学者就基因型、生态因素、调制过程对烤烟多酚类物质的影响进行了大量研究<sup>[6-8]</sup>,关于多酚类物质与烤烟质量的关系也有不少报道<sup>[9-11]</sup>,然而对于晒烟这一特色类型多酚类物质的相关研究缺乏报道。本文研究了不同晒烟品种多酚类物质在生长过程中的积累动态及其相关酶的活性变化,旨在探讨晒烟生长过程中多酚类物质的积累机理,为调控烟草中多酚类物质、进一步改善烟叶品质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验地点设在吉林省长春市农安县朝阳沟村,供试晒烟品种为青黄叶、大叶黄和大白花,采用随机区组设计,小区面积 0.02 hm<sup>2</sup>,重复 3 次。试验地土壤为油砂土,pH 5.7,有机质 15.98 g/kg,碱解氮 140.00 mg/kg,速效磷 17.58 mg/kg,速效钾 148.83 mg/kg,田间栽培管理措施按照优质晒烟生产技术规范进行。

### 1.2 取样方法

选取各品种具有代表性烟株的上二棚叶(自下而上第 13、14 位叶),自叶龄 10 d 开始取样,每隔 10 d 取样 1 次,直至叶片成熟采收,每次各处理取 10 片鲜烟叶,3 片经液氮速冻后放入 -70 ℃ 的超低温冰箱中保存用于多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶和过氧化物酶活性的测定,余下的烟叶在 105 ℃ 下杀青 15 min,之后于 60 ℃ 下烘干至恒重保存用于多酚类物质的测定。

### 1.3 测定指标与方法

#### 1.3.1 多酚类化合物的测定 多酚类化合物绿原

酸、芸香苷和茛菪亭含量按照 YC/T202—2006 烟草及烟草制品多酚类化合物绿原酸、茛菪亭和芸香苷的方法测定<sup>[12]</sup>。总酚含量采用福林试剂法测定<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.2 酶活性的测定 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性按照文献<sup>[13]</sup>方法测定,多酚氧化酶(PPO)活性采用邻苯二酚氧化法测定<sup>[14]</sup>,过氧化物酶活性(POD)采用愈创木酚氧化法测定<sup>[15]</sup>。

### 1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 进行数据处理和统计分析。

## 2 结果

### 2.1 各品种叶片发育过程中多酚类物质含量变化

#### 2.1.1 绿原酸和芸香苷

由图 1、2 可知,不同晒烟品种叶片发育过程中绿原酸和芸香苷含量呈现出相同的变化规律,在叶龄 10~30 d 呈增加趋势,之后大白花品种开始减少,而大叶黄和青黄叶品种则继续增加。3 个品种以大白花烟叶中绿原酸和芸香苷的含量要远远小于青黄叶和大叶黄,大叶黄品种绿原酸和芸香苷的含量在叶龄 10~30 d 高于青黄叶,在叶龄 30~50 d 时低于青黄叶。

#### 2.1.2 茛菪亭

由图 3 可知,不同晒烟品种叶片发育过程中茛菪亭含量整体上呈增加趋势,且青黄叶 > 大叶黄 > 大白花,其中青黄叶和大叶黄在叶龄 50 d 时茛菪亭含量达最大值,分别为 0.12 和 0.10 mg/g;大白花在 40 d 时达到最高值为 0.05 mg/g,之后出现缓慢下降的趋势。

#### 2.1.3 总酚

由图 4 可知,各品种晒烟中总酚在烟叶生长过程中变化规律相同,随着叶龄的增加而增加,大叶黄和青黄叶品种在叶龄 40 d 之后、大白花品种在叶龄 30 d 之后略有下降;总酚含量表现为青黄叶 > 大叶黄 > 大白花,品种间差异显著,特别是大白花品种多酚含量要远远小于青黄叶和大叶黄,成熟期大白花品种总酚含量稳定在 5.0 mg/g 左右,大叶黄和青黄叶稳定在 10~12 mg/g,遗传因素差异可能是造成不同品种晒烟多酚类物质含量差异的主要原因。

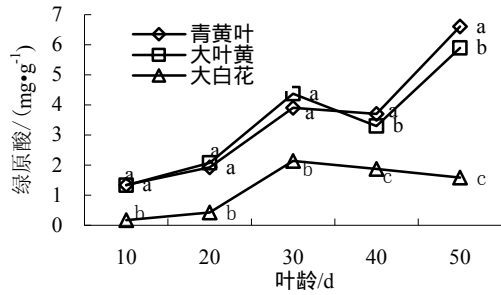


图 1 不同晒烟品种叶片发育过程中绿原酸含量的变化  
Fig. 1 Dynamic changes of chlorogenic acid during leaf developing of the three varieties

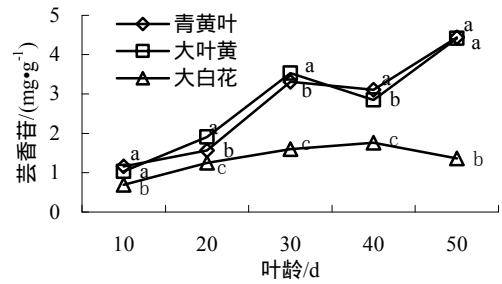


图 2 不同晒烟品种叶片发育过程中芸香苷含量的变化  
Fig. 2 Dynamic changes of rutin content during leaf developing of the three varieties

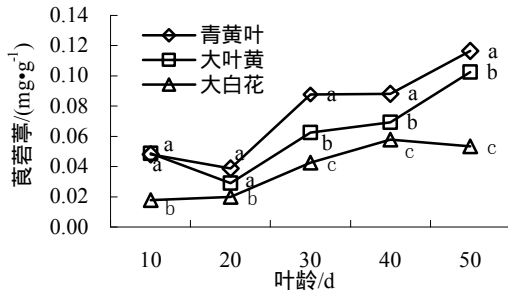


图 3 不同晒烟品种叶片发育过程中茛菪亭含量的变化  
Fig. 3 Dynamic changes of scopoletin during leaf developing of the three varieties

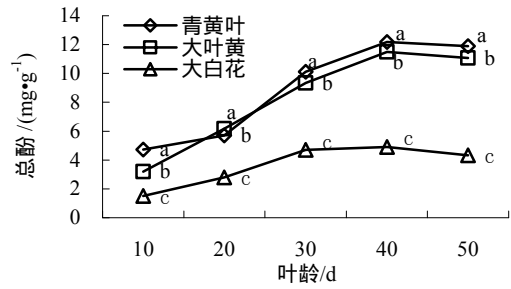


图 4 不同晒烟品种叶片发育过程中总酚含量的变化  
Fig. 4 Dynamic changes of total phenols during leaf developing of the three varieties

2.2 各品种叶片发育过程中与多酚类物质相关的主要酶活性的变化

2.2.1 苯丙氨酸解氨酶活性的变化 由图 5 可知，叶片发育过程中 PAL 活性的变化与绿原酸和芸香苷的变化一致。不同品种中苯丙氨酸解氨酶的活性差异显著，青黄叶和大叶黄的 PAL 活性显著高于大白花。PAL 可以作为植物抗逆境能力的一个生理指标，而大白花在发育过程中赤星病、蛙眼病、野火

病较为严重，可能与其叶片 PAL 活性低、烟株的抗病性能差有关。

2.2.2 多酚氧化酶活性的变化 由图 6 可知，随着叶龄的增加 PPO 活性先上升后下降，在叶龄 30 d (打顶后 10 d) PPO 活性最高；不同品种中 PPO 活性以大白花最高，青黄叶次之，大叶黄最低。

2.2.3 过氧化物酶活性的变化 由图 7 可知，不同品种晒烟 POD 活性的变化规律一致，即在叶片发育中 POD 活性逐渐提高，叶龄 40 d 时达到最高值，之后随着烟叶的衰老成熟稍有下降。不同品种 POD 活性表现为：大叶黄 > 青黄叶 > 大白花，各品种之间的差异在不同时期表现不一致。

2.3 各品种 3 种多酚类物质占总酚的比例

由表 1 可以看出，在烟叶发育过程中 3 种酚类物质占总酚比例的变化没有明显的规律性。不同品种叶片发育过程中茛菪亭占总酚的比例最小仅为 0.47% ~ 1.71%；绿原酸和芸香苷占总酚的比例较大，但品种间差异明显，大叶黄和青黄叶品种绿原

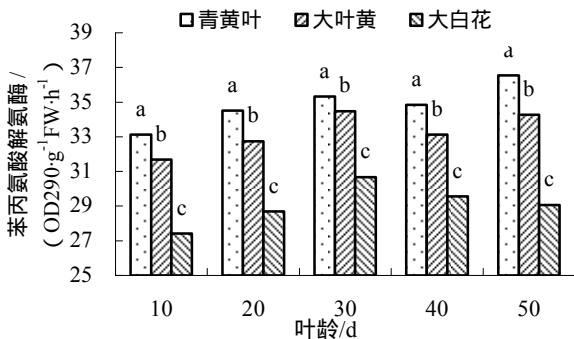


图 5 苯丙氨酸解氨酶活性的动态变化  
Fig. 5 Dynamic changes of phenylalanine ammonia lyase in three varieties of sun-cured tobacco

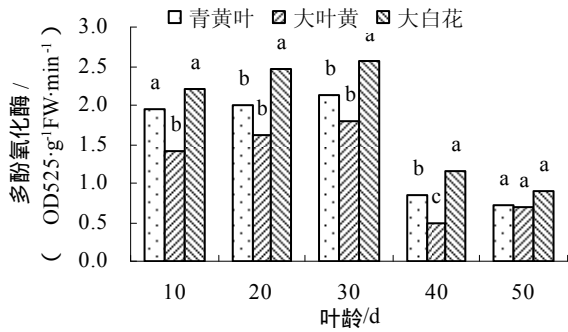


图6 不同晒烟品种中多酚氧化酶活性的动态变化  
Fig. 6 Dynamic changes of Polyphenol oxidase in different varieties of sun-cured tobacco

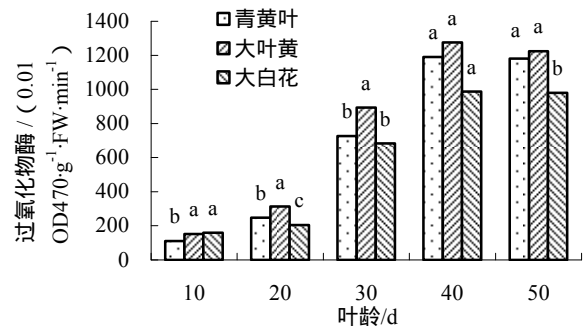


图7 不同晒烟品种中过氧化物酶活性的动态变化  
Fig. 7 Dynamic changes of peroxidase in different varieties of sun-cured tobacco

酸占总酚比例相对较高，而大白花品种芸香苷占比例最高。

2.4 各品种多酚类物质与其相关酶的相关性

由表2知，不同晒烟品种叶片发育过程中PAL活性与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚含量呈正相关，且与绿原酸和芸香苷相关性均达显著水平；PPO活性与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚的含量均为负相关，但没达到显著水平；POD活性与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚含量呈正相关，且与总酚的相关性达到显著水平。

3 讨论

在烟草中发现的酚类及其衍生物种类繁多，因烟草类型和品种的不同，酚类物质含量的变化范围在0.4%~6%，研究表明，烤烟3.58%~4.25%，晾烟0.029%~0.52%，白肋烟1.13%~1.75%<sup>[6]</sup>。酚类物质及其衍生物不仅是次生代谢产物，而且有些成分积极参与烟草植株的代谢活动并有着重要的生理

意义<sup>[16]</sup>。多酚类化合物对烟草品质最直观的影响是烟叶的颜色，烟叶调制过程中，多酚类物质容易发生酶促棕色化反应形成颜色各异的复合色素，对烟叶颜色造成重要影响。另外，多酚类物质的降解物能增加烟草的香气量，对改善烟草制品的品质有着重要的作用。已有研究表明，多酚与香气特征指标的典型相关系数达到显著水平，与烟气特性和口感特性指标的典型相关系数均达到极显著水平<sup>[17]</sup>。一般认为多酚类物质的含量与烟叶等级是相一致的，高等级烟叶多酚含量高，等级较好的烟叶中绿原酸和芸香苷的含量也较高，低等级烟叶多酚含量低<sup>[6]</sup>。本试验3个品种中总酚含量表现为青黄叶>大叶黄>大白花，大叶黄和青黄叶烟叶中绿原酸含量最高，而大白花烟叶中芸香苷含量最高，这可能是其在香型风格上相互区别的重要内在物质基础，这与宗浩等<sup>[18]</sup>研究的结果相似，但二者是否存在关联仍需进一步验证。

表1 不同晒烟品种3种酚类占总酚的比例 %

Table 1 Chlorogenic acid, rutin and scopoletin in the proportion of total phenols in three varieties of sun-cured tobacco

多酚类物质	品种	叶龄/d				
		10	20	30	40	50
绿原酸	青黄叶	28.23b	33.69a	38.58b	30.45b	55.57a
	大叶黄	41.53a	33.69a	46.73a	28.69b	53.29b
	大白花	11.21c	15.36b	45.37a	38.13a	36.71c
芸香苷	青黄叶	24.62b	27.47c	32.71b	25.54b	37.37b
	大叶黄	32.26b	30.93b	37.80a	24.81b	39.88a
	大白花	45.59a	44.82a	33.94b	35.85a	31.45c
茛菪亭	青黄叶	1.01c	0.68a	0.87a	0.72b	0.98b
	大叶黄	1.53a	0.47b	0.67b	0.60c	0.93b
	大白花	1.17b	0.71a	0.91a	1.18a	1.23a

注：小写字母不同表示差异达0.05显著水平。

表 2 晒烟生长过程中酚类物质与其相关酶的相关分析

Table 2 Correlation coefficient between polyphenol contents and enzyme activity

物质种类	PAL			PPO			POD		
	青黄叶	大叶黄	大白花	青黄叶	大叶黄	大白花	青黄叶	大叶黄	大白花
绿原酸	0.921*	0.917*	0.906*	-0.718	-0.387	-0.373	0.861	0.821	0.871
芸香苷	0.939*	0.945*	0.883*	-0.676	-0.384	-0.326	0.910*	0.856	0.775
茛菪亭	0.85	0.627	0.644	-0.719	-0.672	-0.755	0.912*	0.807	0.997**
总酚	0.801	0.789	0.888*	-0.742	-0.62	-0.458	0.890*	0.980**	0.900*

注：表中\*\*表示  $p < 0.01$ ；\*表示  $p < 0.05$ 。

在酚类物质代谢过程中，需要很多酶的催化，每个酶都有其不同的作用，这些酶及其同工酶的协同作用，才使得酚类物质的代谢活动顺利进行。苯丙氨酸解氨酶（PAL）、多酚氧化酶（PPO）、过氧化物酶（POD）是研究较多的与多酚类物质代谢密切相关的酶。苯丙氨酸解氨酶是一个可用于酚类合成的限速酶，主要催化由苯丙氨酸到各种酚类的第一步反应，为多种酚类及类黄酮提供前提物质<sup>[19]</sup>。多酚氧化酶是一类广泛存在于植物体内的含铜金属酶类，是呼吸链末端氧化酶之一，在氧的存在下，儿茶酚、花色素、绿原酸等单酚和多酚，均能被其催化而氧化<sup>[20]</sup>，且在调制过程中由于多酚氧化酶的催化会使烟叶发生棕色化反应。过氧化物酶是以过氧化氢为电子受体催化底物氧化的酶类，主要存在于细胞的过氧化物酶体中，可以催化酚类物质的氧化<sup>[21]</sup>。王爱华等<sup>[22]</sup>研究表明，增加施氮量会使 PPO 活性降低、PAL 活性增强，而且施氮量高的处理其总酚、绿原酸、类黄酮含量较高。马俊峰<sup>[23]</sup>研究了硫酸铜对烟叶生长过程中多酚调控效应及影响，结果表明喷施硫酸铜增强 PAL、PPO、和 POD 活性，且酚类物质显著提高。总之，合理的农业栽培措施可提高烟草中多酚类化合物的含量；而在适宜的调制、陈化条件下，适当促控多酚的棕色化反应，烟叶可达到理想的色泽。

## 4 结 论

不同晒烟品种 PAL 活性和 POD 活性在叶片发育过程中的动态变化与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚呈正相关且基本上达到显著性水平，而 PPO 活性变化与绿原酸、芸香苷、茛菪亭和总酚的相关性表现为负相关，但未达到显著。对于上述酶的动力学特性，我们可以优化这些酶的可调控因素，充分

利用其在晒烟多酚类物质合成中的作用，进而改善烟叶质量。

## 参考文献

- [1] Sook M E. 凝胶色谱应用于卷烟烟气酚类物质的特性鉴定[J]. 烟草科技, 1983 (1): 58-59.
- [2] 朱小茜, 徐晓燕, 黄义德, 等. 多酚类物质对烟草品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(8): 1910-1911.
- [3] 朱大恒. 烤烟发酵过程中品质及香吃味的形成[J]. 河南农业科学, 1997 (3): 5-7.
- [4] 钟庆辉. 烟草芳香吃味化学指标的探索[J]. 烟草科技, 1981 (4): 21-23.
- [5] 武维华. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [6] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [7] Penn P T, Stephens R L, Weybrew J A. Some factors affecting the content of principal polyphenols in tobacco leaves [J]. Tab. Sci., 1958(2): 68-72 . .
- [8] 宫长荣, 王爱华, 王松峰. 烟叶烘烤过程中多酚类物质的变化及与化学成分的相关分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38 (11): 2316-2320..
- [9] 过伟民, 张骏, 刘阳, 等. 烤烟质体色素及多酚与外观质量关系研究[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(2): 33-40.
- [10] 席元肖, 宋纪真, 杨军, 等. 不同烤烟品种的类胡萝卜素、多酚含量及感官品质的比较[J]. 烟草科技, 2011 (2): 70-74.
- [11] 过伟民, 蔡宪杰, 魏春阳, 等. 豫中浓香型烤烟感官质量与部分质量指标的关系[J]. 烟草科技, 2010 (6): 22-27.
- [12] 国家烟草专卖局. YC/T202—2006 烟草及烟草制品多酚类化合物绿原酸、茛菪亭和芸香苷的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [13] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [14] 白宝璋. 植物生理学测试技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 98-106.
- [15] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 1993: 136-142 .

- [16] 徐晓燕,孙五三,王能如. 烟草多酚类化合物的合成与烟叶品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2003, 24(1): 3-5.
- [17] 俞京,章平泉,龚珍林,等. 烤烟主要多酚与其感官质量的典型相关性[J]. 烟草科技, 2010(1): 38-43.
- [18] 宗浩,扬程,陈刚,等. 不同烤烟品种香型风格与多酚类物质含量差异分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(30): 241-245.
- [19] Amrita Kumar, Brian E Ellis. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution [J]. Plant Physiology, 2001, 127(1): 230-239.
- [20] 戴亚,施春华. 烟草多酚氧化酶的分离提纯及性质研究[J]. 重庆烟草, 2002(2): 29-32.
- [21] 郭红莲,程根武,陈捷,等. 玉米灰斑病抗性反应中酚类物质代谢作用的研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 342-346.
- [22] 王爱华,王松峰,官长荣. 氮素用量对烤烟上部叶片多酚类物质动态的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(3): 57-60.
- [23] 马俊峰. 硫酸铜对烟叶生长过程中多酚和色素的调控效应及影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

## 《烟草科技》2014年第12期目次

### 烟草工艺

- 05 区域环境对烤烟烟叶香韵的影响..... 乔学义,马宇平,王兵,等
- 09 几种再造烟叶物理指标和纤维质量的对比..... 李友明,刘晓雯,许俊鑫,等

### 设备与仪器

- 15 接烟轮凸轮摆杆机构间隙对烟支交接性能的影响研究..... 周长江,孙银方,欧育健,等
- 19 烟草柜式喂料机出柜自动调速系统的设计..... 张梓泳
- 23 YB618 型硬条及条外透明纸包装机第二推进器的改进设计..... 吴建军,施忠兵,陈祁华

### 烟草化学

- 27 造纸法再造烟叶废水的臭氧氧化法预处理..... 陈赛艳,李友明,雷利荣
- 32 高效液相色谱-荧光检测法同时测定香精香料中4种禁限用添加剂..... 李韵,汪宏毅,廖晓玲,等
- 36 基于广义可加模型的烤烟常规化学成分与感官评价指标非线性关系解析..... 胡建军,李广才,李耀光,等
- 43 烟用三乙酸甘油酯含量测定标准方法的改进..... 边照阳,刘珊珊,范子彦,等
- 47 冷阱捕集-GC/MS法测定卷烟主流烟气中的氯乙烯..... 范忠,陈志燕,蔡君兰,等
- 52 利用美拉德反应降低再造烟叶中的还原糖..... 高徐梅,李新生,严新龙,等
- 57 湘西州烤烟烟碱含量的区域特征及其与烟叶评吸质量的关系..... 张黎明,张明发,田峰,等

### 烟草农学

- 62 不同镉积累基因型烟草根系镉整合能力差异及相关基因分析..... 商慧文,陈江华,郭园园,等
- 67 烤烟对Se( )的吸收动力学特征分析..... 黎妍妍,李锡宏,韩丹,等
- 71 生防菌剂ZY-9-13用量对烟草黑胫病发生的影响..... 薛超群,奚家勤,胡利伟,等
- 74 下部烟叶机械采收的最佳施力方式试验..... 张秀丽,李建华,周雪花,等