

β -葡萄糖苷酶和醇酰基转移酶对中国水仙花 挥发性成分的影响

彭爱铭¹, 彭镇华^{2*}, 高 健¹

(1.国际竹藤网络中心, 北京 100102; 2.中国林业科学研究院花卉中心, 北京 100091)

摘 要: 采用顶空固相微萃取 (HS-SPME)-气相色谱/质谱 (GC/MS) 联用技术分析了中国水仙花主要挥发性成分芳樟醇、乙酸苯甲酯及乙酸苯乙酯的含量, 并测定了醇酰基转移酶、 β -葡萄糖苷酶的活性。伴随着花的发育, 芳樟醇含量在花蕾期含量最高, 然后逐渐下降; 乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量呈先升高后降低的趋势, 盛花期含量最高; β -葡萄糖苷酶活性在盛花期最高; 醇酰基转移酶活性从花蕾期到盛花期变化不大, 盛花期后明显下降。结果表明乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯的含量与 β -葡萄糖苷酶、醇酰基转移酶有一定的相关性。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 醇酰基转移酶; 中国水仙; 挥发性成分

中图分类号: S682.21

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)01-0101-05

Effects of β -glucosidase and alcohol acyltransferase on volatiles of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

PENG Ai-ming¹, PENG Zhen-hua^{2*}, GAO Jian¹

(1.International Centre for Bamboo & Rattan, Beijing 100102; 2.Flower Center of Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: The volatile components of flower of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*, mainly including linalool, phenylmethyl acetate and phenylethyl acetate were analyzed by the headspace-solid phase micro-extraction coupled to gas chromatography/mass (GC/MS), meanwhile, the activities of β -glucosidase and alcohol acyltransferase were measured. With the development of the flower, the content of linalool decreased gradually, and the maximum concentration was found at the flower bud stage. Phenylmethyl phenylmethyl acetate and phenylethyl acetate increased firstly and decreased in succession, and their concentrations were highest at the full opening stage. The activity of β -glucosidase was the strongest at the full opening stage. The activity of alcohol acyltransferase did not vary, but obviously decreased after the full opening stage. The outcome of the experiment indicated that the concentrations of phenylmethyl acetate and phenylethyl acetate were relative to the activities of β -glucosidase and alcohol acyltransferase.

Key words: β -glucosidase; alcohol acyltransferase; *Narcissus tazetta* var. *chinensis*; volatiles

中国水仙 (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 属石蒜科水仙属, 在我国已有 1 000 年栽培历史, 是中国十大传统名花之一, 主要分布于福建、上海、浙江等地。中国水仙素以花香著称, 不过对其花香的研究并不多。高健利用 GC/MS 分析了用 SDE 蒸馏萃取的中国水仙花的精油成分^[1], 其中含量超过 5% 的有芳樟醇、苯甲醇、吲哚等。黄巧巧利用吸附丝 GC/MS 法分析了水仙鲜花的挥发性成分^[2], 得出成

分中含量最高的是苯甲醛, 其次是芳樟醇、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯等。Song G 等利用固相微萃取 (SPME)GC/MS 法研究了活体水仙的挥发性成分^[3], 主要化合物包括乙酸苯甲酯、*E*-罗勒烯和乙酸苯乙酯等。目前的研究主要是利用不同的方法分析了水仙花的挥发性成分, 而对挥发性物质形成的机理和影响因素基本未涉及。

虽然对水仙挥发性物质的合成机理的研究非常

收稿日期: 2010-06-29

基金项目: 948 引进国际先进林业科学技术重大项目“花卉良种繁育与精确栽培技术创新”(2006-4-C07)资助。

作者简介: 彭爱铭, 男, 讲师。E-mail: pam198@126.com

* 通讯作者: 彭镇华, 男, 教授。

少,但是对一些花卉和水果中挥发性成分合成机理的研究已有文献报道。Beekwilder 等^[4]验证了草莓和香蕉中醇酰基转移酶的功能性质,醇酰基转移酶可将酰基辅酶 A 中的酰基转移到醇类底物形成酯,认为它是催化酯类合成的最后一步关键酶。Souleyre 等^[5]研究了苹果中的醇酰基转移酶,认为它能催化合成乙酸己酯、乙酸丁酯等酯类化合物。据 Guterman 报道,将来源于玫瑰的醇酰基转移酶基因转入矮牵牛花中,转化植株产生的乙酸苯甲酯和乙酸苯乙酯比未转化植株高 5~10 倍^[6]。 β -葡萄糖苷酶属于水解酶类,它可水解结合于配糖基末端、非还原性的 β -D 糖苷键,同时释放 β -D-葡萄糖和相应的配基^[7]。一些挥发性萜烯醇、酚和其他芳香化合物可能与糖苷键结合,以键合态形式存在^[8],黄新安等报道 β -葡萄糖苷酶能水解茉莉花提取物,使糖苷键断裂,产生苯甲醇、苯乙醇和芳樟醇^[9]。当然,挥发性风味物质的产生机理很复杂,除了跟一些酶和基因有关外,还与品种、环境、底物、营养状况等密切相关。本试验主要测定了中国水仙花不同开放阶段其挥发性成分、含量和 β -葡萄糖苷酶、醇酰基转移酶的活性,并探讨了挥发性成分和两种酶的变化规律,以及它们之间的联系。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料中国水仙商品种球购自福建漳州。培养条件:水培,光培养时 20℃,暗培养时 18℃,湿度 80%,光照 16 h。取花蕾期、初花期(开花第 1 天)、盛花期(开花第 3 天)、萎谢期(开花第 7 天)4 个不同开放阶段的花朵。

1.2 试剂与设备

乙酰辅酶 A(Sigma 公司); DTNB(Solarbio 公司); 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(Sigma 公司)。

50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头(Supelco 公司); 5973-6890N(GC-MS Agilent 公司); 冷冻离心机(Thermo 公司); 紫外分光光度计(PerkinElmer 公司)。

1.3 挥发性物质的测定

分别取 6 朵各个开放期的中国水仙花花朵,室温下置于锥形瓶中,用锡箔纸密封。将萃取头 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 置于气相色谱进样口老化 20 min。将萃取头伸进锥形瓶中,25℃萃取 20 min。然后进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析:吸附完成后将萃取头抽出,插入气相色谱-质谱联用仪,于 220℃解吸 2 min,进行

分析。色谱条件:DB-5 毛细管色谱柱,进样量 0.2 μ L,载气为 He,流量 1.0 mL \cdot min⁻¹,不分流进样。程序升温:起始柱温 60℃保持 2 min,以 5℃ \cdot min⁻¹升温至 150℃,再以 8℃ \cdot min⁻¹升温至 220℃,保留 6 min。

质谱条件:进样口温度 220℃,离子源温度 200℃,电离方式 EI,电子能量 70 eV。

1.4 酶活性测定

1.4.1 醇酰基转移酶 参照 Bruno G D 的方法^[10]。

1.4.2 β -葡萄糖苷酶 参照宋晓青的方法^[11]。

2 结果与分析

2.1 中国水仙花不同开放阶段的挥发性成分

2.1.1 花蕾期挥发性成分 花蕾期共检出 13 种挥发性成分。主要成分是桉树脑、芳樟醇以及乙酸苯乙酯、乙酸苯甲酯等酯类。其中芳樟醇相对含量 4.221%,是 4 个阶段含量最高的;乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量分别为 23.478%、1.62%,均为 4 个阶段最低。

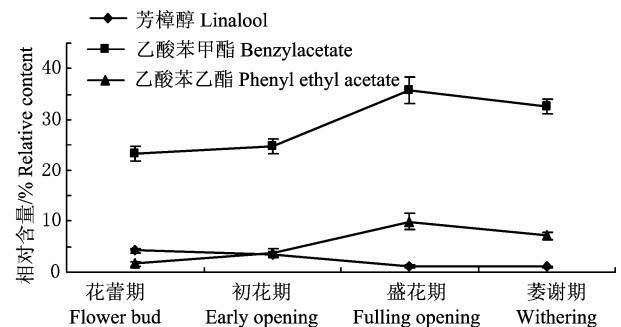


图 1 挥发性成分变化

Figure 5 Variation of volatile components

2.1.2 初花期挥发性成分 初花期共检出 19 种挥发性物质。主要成分是桉树脑、芳樟醇以及乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯等酯类。芳樟醇含量为 3.477%,比花蕾期低;乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量分别为 24.751%、3.842%,高于花蕾期。

2.1.3 盛花期挥发性成分 盛花期共检出 32 种挥发性成分。主要成分是芳樟醇、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯。芳樟醇含量为 1.252%,低于初花期;乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量分别为 35.856%、9.874%,是 4 个开放阶段中最高的。

2.1.4 萎谢期挥发性成分 萎谢期共检出 21 种挥发性化合物。主要成分是芳樟醇、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯。芳樟醇含量为 1.034%,是 4 个阶段最低的;乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量分别为 32.633%、

7.084%,与盛花期相比,其含量均呈下降趋势,但高于花蕾期和初花期。

表 1 中国水仙花不同开放阶段其挥发性成分及相对含量

Table 1 Volatile compounds and their relative contents in the flower of *Narcissus tazetta* var. *Chinensis* during different developmental stages

化合物名称 Compounds	相对含量/% Relative content			
	花蕾期 Flower bud	初花期 Early opening	盛花期 Fulling opening	萎谢期 Withering
乙酸-3-甲基-2-丁烯酯 Acetic acid (-)-3-2-dinitramine ester	0.629	1.434	0.610	1.349
β -蒎烯 Beta pinene	1.076	0.999		
β -月桂烯 Beta laurel ene			0.439	0.345
1, 2-二甲基-1, 5-环辛二烯 1-2 methyl 1, 5-loops Michael essien-two ene	3.338	2.021	1.252	1.994
桉树脑 Cineole	11.857	8.080		
(E)-罗勒烯 (E)-basil ene				4.911
(Z)-罗勒烯 (Z)-basil ene	45.037	45.291	36.984	38.404
1-甲基-4 (1-甲基乙烯)-环己烯 1 (-)-4(1-methyl vinyl)-ring has ene		0.698	0.540	0.583
芳樟醇 linalool	4.221	3.477	1.252	1.034
(E, E)-2, 6-二甲基-1, 3, 5, 7-辛四烯 (E, E)-utilization 1,3,5,7-two methyl - Michael essien arachidonic		0.141	0.160	
1, 3, 5, 5-四甲基-1, 3-环己二烯 1,3,5,5-four methyl arene ring adipic ene	3.566	3.352	2.601	4.609
(E, Z)-2, 6-二甲基-2, 4, 6-辛三烯 (E, Z)-utilization 2,4,6-Michael essien two methyl - three ene	3.641	3.510	2.848	3.001
乙酸苯甲酯 Benzyl acetate	23.478	24.751	35.856	32.633
(Z)-丁酸-3-己烯酯 (Z)-butyrate-3-has ene ester		0.099	0.099	0.104
$\alpha, \alpha, 4$ -三甲基-3-环己烯甲酯 Alpha, alpha, 4-3-3 - ring methyl has ene methanol	0.342	0.271	0.148	0.111
苯丙醇 Phenylpropanol			0.211	0.159
乙酸苯乙酯 Phenylethyl acetate	1.620	3.842	9.874	7.084
异氰基甲苯 Different cyano toluene			0.088	
吡啶 Benzazole		0.503	0.857	0.739
2-苯丙烯醇 2-benzene propylene alcohol				0.063
2, 2-二甲基丙酸苯乙酯 Active-2 methyl ethyl benzene propionic acid			0.113	
肉桂醇 Cinnamyl alcohol			0.145	
乙酸苯丙酯 Phenylpropyl acetate	1.015	1.219	2.75	2.089
肉桂酸乙酯 Ethyl cinanmate ethyl cinnamate			0.174	
正十四烷 Tetradecane n-Tetradecane			0.040	
*				0.060
乙酸-2-苯丙烯酯 Acetic-2-benzene propylene ester		0.092	0.551	0.209
2-甲基苯乙酮 2-methyl acetophenone	0.181	0.171	0.619	0.462
正十五烷 Pentadecane			0.033	
2, 6-二叔丁基-4-异丁基苯酚 Lysine-2 uncle butyl-4-isobutyl phenol			0.136	
癸酸癸酯 Decanoate fd			0.133	
*			0.111	
2, 6, 10-三甲基十四烷 2,6,10-three methyl fourteen silane			0.095	
苯甲酸苯甲酯 Benzyl Benzoate		0.050	0.035	0.056
*			0.035	
4-十八烷基吗啉 4-18 alkyl benzopyrazine			0.172	
酞酸二丁酯 dibutyl phthalate dibutylphthalate			0.051	

* 表示未知化合物。* Means unknown compounds.

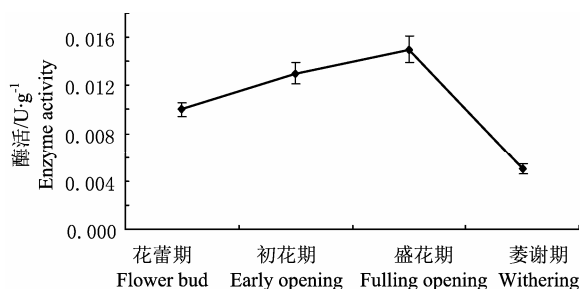


图2 β -葡萄糖苷酶活性
Figure 2 Activity of β -glucosidase

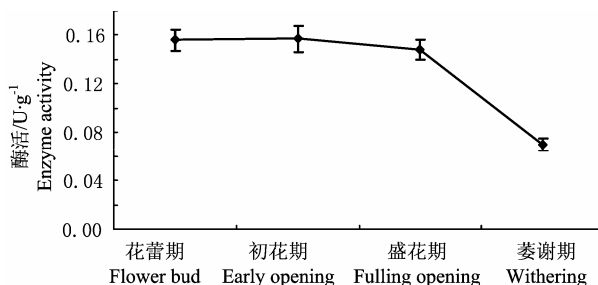


图3 醇酰基转移酶活性
Figure 3 Activity of alcohol acyltransferase

中国水仙花不同开放阶段芳樟醇、乙酸苯乙酯、乙酸苯甲酯等挥发性成分变化见图1。

由表1可知,在4个阶段均存在且含量较多的主要挥发性成分包括1,2-二甲基-1,5-环辛二烯、(Z)-罗勒烯、芳樟醇、1,3,5,5-四甲基-1,3-环己二烯、(E,Z)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯、乙酸苯丙酯。

2.2 酶的活性

2.2.1 β -葡萄糖苷酶活性 中国水仙花不同开放阶段的 β -葡萄糖苷酶活性见图2。从图2可看出, β -葡萄糖苷酶活性从花蕾期、初花期、盛花期逐步上升,盛花期达到最高,然后下降,萎谢期最低。

2.2.2 醇酰基转移酶活性 中国水仙花不同开放阶段的醇酰基转移酶活性见图3。从图3可看出,醇酰基转移酶活性在花蕾期、初花期、盛花期相差不大,基本保持平稳的状态,盛花期到萎谢期酶活性急剧下降。

3 小结与讨论

采用固相微萃取结合GC/MS分析了中国水仙花在不同开放阶段的挥发性成分。花蕾期的挥发性成分最少,盛花期最多。与Song G的分析类似,中国水仙挥发性成分中罗勒烯、桉树脑、芳樟醇、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量较多,对中国水仙花香气的贡献相对也大一些。

本文重点分析了中国水仙中特征性的挥发性成分芳樟醇、乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯的含量变化,以及酯类变化与相关酶活性的关系。

虽然 β -葡萄糖苷酶可水解芳樟醇衍生物糖苷类前体而生成芳樟醇,且 β -葡萄糖苷酶活性在花蕾期、初花期、盛花期逐渐升高,但芳樟醇在花蕾期、初花期、盛花期、萎谢期相对含量逐渐降低,表明芳樟醇在中国水仙中可能属于头香物质,大量的芳樟醇在水仙生长前期就已经开始合成,且内源 β -葡萄糖苷酶的活性低,决定芳樟醇含量的可能还是

芳樟醇合成酶^[12-14],故芳樟醇前期含量高,后期含量低。

乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量随花开放阶段而变化,从花蕾经初花到盛花逐渐升高,而此三阶段醇酰基转移酶变化不大,表明底物是逐渐增加的,而 β -葡萄糖苷酶活性在这3个阶段逐步升高, β -葡萄糖苷酶可水解水仙中的香味前体物质产生苯甲醇、苯乙醇等物质,而这2种物质也许是合成乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯的底物^[15]。萎谢期的醇酰基转移酶、 β -葡萄糖苷酶活性比盛花期低,故乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量低。而萎谢期的醇酰基转移酶活性虽然低于花蕾期、初花期,乙酸苯甲酯、乙酸苯乙酯含量却比花蕾期、初花期高,可能跟酯类的散发机制有关,也许经过盛花期,酯类物质已大量合成,但并未全部散发出来,而是贮存在花器官中,在一定条件下缓慢释放出来。

参考文献:

- [1] 高健. 钴-60Gamma射线辐照中国水仙的诱变效应和机理研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2000.
- [2] 黄巧巧, 冯建跃. 水仙花开放期间香气组分变化的研究[J]. 分析测试学报, 2004, 23(5): 110-113.
- [3] Song G. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique for the characterization of volatile compounds emitted from Chinese daffodil flowers[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2007, 62(7): 674-679.
- [4] Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, et al. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana[J]. Plant Physiology, 2004, 135: 1865-1878.
- [5] Souleyre E J F, Greenwood D R, Friel E N, et al. An alcohol acyl transferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavor[J]. FEBS J, 2005, 272: 3132-3144.
- [6] Guterman I. Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60: 555-563.

- [7] 李远华, 江昌俊, 余有本. 茶树 β -葡萄糖苷酶基因 mRNA 的表达[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 103-106.
- [8] 姚卫蓉, 陈军杰, 钱和. 玫瑰花中键合态和游离态组分的分析[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 487-492.
- [9] 黄新安, 宛晓春, 夏涛, 等. 茉莉花酶促释香研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(2): 144-145.
- [10] Bruno G D. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene[J]. Plant Science, 2005, 168: 1199-1210.
- [11] 宋晓青. 蜡梅花 β -葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [12] van Schie C C N, Haring M A. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid[J]. Plant Mol Biol, 2007, 64: 251-263.
- [13] Herná'ndez I, Molenaar D, Beekwilder J. Expression of plant flavor genes in *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1544-1552.
- [14] Nagegowda D A, Gutensohn M, Wilkerson C G. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers[J]. Plant Journal, 2008, 55(5): 224-239.
- [15] Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant derived flavor compounds[J]. Plant Journal, 2008, 54(2): 712-732.

本刊外聘编委 朱军教授

朱军, 男, 汉族, 江苏宿迁人, 1949年5月生, 1969年1月参加工作, 1986年5月加入中国共产党。美国北卡罗来纳州立大学统计系和遗传系毕业, 研究生学历, 统计学和遗传学博士, 教授。

1969年1月至1973年9月在安徽省蒙城县插队。1973年9月至1976年9月在安徽农学院农学系农学专业学习。1976年9月至1979年9月任安徽省蒙城县楚村区农技站技术员。1979年9月至1982年9月在浙江农业大学农学系农学专业学习, 获硕士学位。1982年9月至1998年9月在浙江农业大学任教, 其中1986年6月至1989年6月在美国密西西比州立大学农学系、美国北卡罗来纳州立大学统计系和遗传系学习, 获统计学和遗传学专业博士, 1989年6月至1990年7月在美国北卡罗来纳州立大学统计系做博士后研究。1991年7月晋升教授, 1993年12月任博士生导师。1994年9月至1998年9月任浙江农业大学副校长。1999年7月任浙江大学农业与生物技术学院院长。2005年2月任浙江大学党委常委、副校长。

中国数学学会生物数学学会副理事长, 中国农学会农业应用数学分学会理事长, 浙江省遗传学会副理事长, 国家自然科学基金委员会生命科学部遗传学评审组成员, 农业部教学指导委员作物学科组成员。《生物数学学报》编委, 《中国棉花学报》编委。先后主持了3项国家自然科学基金项目、1项国家教委跨世纪优秀人才专项基金项目、1项国家自然科学基金重大项目子课题、2项浙江省自然科学基金和1项棉花育种国家攻关项目。至今已在国外发表论文37篇(其中SCI检索的25篇), 国内核心刊物发表论文50余篇(其中国家学会一级刊物28篇)。有4篇论文获浙江省自然科学优秀论文一等奖。主持的《作物数量性状遗传分析新方法的研究》获1994年国家教委科技进步二等奖。