

红阳猕猴桃成熟过程中脂氧合酶基因的表达与香气成分变化关系的研究

张 曾¹, 曾维才², 唐 维¹, 刘永胜¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064;

2. 四川大学轻纺与食品学院, 成都 610065)

摘 要: 研究了红阳猕猴桃在成熟过程中的香气成分变化, 及脂氧合酶基因(Lipoxygenase, LOX, EC1.13.11.12)表达量的差异对香气成分的影响. 通过测定白利糖度(*Brix*)表征红阳猕猴桃在成熟过程中的不同成熟度; 采用顶空-固相微萃取/气相色谱-质谱联用仪对红阳猕猴桃在不同成熟阶段的香气成分进行分析; 利用实时定量PCR技术测定LOX基因家族6个成员(*AcLox1*, *AcLox2*, *AcLox3*, *AcLox4*, *AcLox5*, *AcLox6*)的表达量并初步分析其与红阳猕猴桃香气成分变化之间的关系. 结果表明, 随着成熟度增加, 主要香气成分酯类的含量显著增加, 醇类和醛类成分的含量显著减少; *AcLox1*和*AcLox5*的表达量显著提高, 而*AcLox2*, *AcLox3*, *AcLox4*, *AcLox6*的表达量则呈现下降趋势.

关键词: 猕猴桃香气; 脂氧合酶基因; 顶空-固相微萃取/气相色谱-质谱联用; 实时定量PCR
中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0857-06

The relationship between the expression of lipoxygenase and flavor components at different brix levels of Hongyang kiwifruit

ZHANG Zeng¹, ZENG Wei-Cai², TANG Wei¹, LIU Yong-Sheng¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory for Bio-resource and Eco-environment, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: The changes of flavor components of Hongyang kiwifruit at different *Brix* levels, and the relationship between the expression of Lipoxygenase (LOX, EC1.13.11.12) and flavor changes were investigated. With the measurement of a sugar concentration detector, the samples of Hongyang kiwifruit in different ripening stages were expressed as different *Brix* levels. By using the technique of HS-SPME/GC-MS, the flavor components of Hongyang kiwifruit with different *Brix* values were determined. The results showed that the content of esters was increased whereas the contents of alcohol and aldehyde were decreased, when the *Brix* values of kiwifruit were increased. According to the analysis of Quantitative real-time PCR, the expression level of *AcLox1* and *AcLox5* were increased but *AcLox2*, *AcLox3*, *AcLox4*, *AcLox6* were decreased with the increasing of *Brix* values.

Keywords: flavor components; LOX gene; HS-SPME/GC-MS; Real-time Quantitative PCR

1 引言

红阳猕猴桃(*Actinidia chinensis* cv. Hongyang)是全世界第一个红色果肉的商业化猕猴桃品种,胚囊属于蓇型,果皮为绿褐色,外果肉呈黄绿色,内果肉红色且呈放射性图案,因口感清甜、颜色艳丽而备受消费者喜爱^[1]. 猕猴桃除了具有丰富的营养价值与保健作用,特殊的香气也是消费者青睐的主要原因之一^[2]. 辛广等人采用 GC-MS 从猕猴桃中分离出丁酸乙酯、乙酸乙酯和苯甲酸乙酯^[3]. Wang 等人测定了美味系海沃德和中华系 Hort 16A 两种猕猴桃香气,发现酯类,醛类等主要香气成分均存在明显差异^[4]. Coralia 等人对毛花猕猴桃(*Actinidia eriantha*)香气成分的分析,结果表明,大部分猕猴桃的香气成分常与糖苷络合,如亚麻酸,亚油酸,松柏醇和糠基醇等,这初步解释了猕猴桃香气较清甜的原因^[5].

有研究表明,猕猴桃的香气在后熟过程中产生,并与脂氧合酶的表达有关^[6]. 脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX, EC1. 13. 11. 12),是一种含非血红素铁的蛋白质,它专一性催化含有顺,顺-1, 4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的加氧反应,催化生成具有共轭双键的脂质氢过氧化物. 在植物体内,亚油酸和亚麻酸是 LOX 的主要底物,它们通过反应生成多种风味化合物^[7]. LOX 催化产物中的己醛和己烯醛是水果产生芳草清香味的主要原因. LOX 基因大多数都是以基因家族的形式存在,如番茄中的 *TomLoxA*、*TomLoxB*、*TomLoxC*、*TomLoxD*、*TomLoxE* 和 *TomLoxF* 基因族^[8]. 根据 LOX 氧化加氧的位置,可将其分为 9-LOXs 和 13-LOXs 两大类,其中 9-LOXs 在 C₉ 上进行加氧反应形成 9-HPOs, 13-LOXs 是在 C₁₃ 上进行加氧反应形成 13-HPOs^[9]. LOX 在果实成熟中通过启动膜脂过氧化,引起细胞膜降解,释放游离脂肪酸,LOX 实现自我活化,对果实软化起作用^[7]. 相关研究还发现,如果上调 *Lox* 基因的表达量,则会加速苹果的成熟过程^[10]. Chen 等人在番茄中克隆出了 *TomloxC* 并证实该基因对脂肪酸类代谢香气成分有重要的调控作用^[8]. 在美味猕猴桃中发现,LoX 基因家族中的 *AdLox1*、*AdLox2*、*AdLox3*、*AdLox4*、*AdLox5* 和 *AdLox6* 等 6 个成员对猕猴桃成熟过程中果实内的酯类和 C₆ 醛类的形成及生成量有显著的影响,对猕猴桃的香气有显著的调控

作用^[11].

本文利用顶空-固相微萃取/气相色谱-质谱联用、实时定量 PCR 等技术对不同成熟度的红阳猕猴桃香气成分进行测定,并分析了果实后熟过程中基因 *Lox* 家族表达水平的变化. 通过对两者之间的变化关系进行初步分析,为猕猴桃品种选育提供理论依据.

2 材料和方法

2.1 材料

红阳猕猴桃,采于双流县永安镇猕猴桃种植基地,采摘时选取大小均匀,无虫害, Brix 大约为 6.5 的果实,置于水果储藏箱中,箱温 18~20℃,相对湿度 80%~85%.

TransStart Green qPCR SuperMix UDG 和 *TransScript II Two-Step RT-PCR SuperMix* 均购买于全式金公司.

DVB/CAR/PDMS(50/30μm)顶空-固相微萃取仪,美国色谱科公司;Trace DSQ II 型气相色谱-质谱联用仪,美国赛默飞公司;CFX Connect 型实时定量 PCR 仪,美国百乐公司;

MQK-90A 型糖度仪,上海米青科公司.

2.2 实验方法

2.2.1 白利糖度(Brix)的测定 将果实去皮,取少量果肉研磨,置于 1.5mL 离心管中,10000 r/min 离心 2min,取上清液于糖度仪中测定. 选取 Brix 值分别为 6.5、10、13 和 16 的果实作为不同成熟阶段的样本^[12].

2.2.2 顶空-固相微萃取方法 选取不同 Brix 值的猕猴桃果实,去皮后将果肉迅速混匀,称取 5g 置于 20mL 的顶空瓶内,密封后在 40℃ 水浴中孵育 10min,迅速将固相微萃取头刺入顶空瓶,在 45℃ 水浴环境下萃取 30min. 萃取完毕后,将萃取头放置于 GC-MS 进样口,在 250℃ 条件下解析 3min,通过 GC-MS 进行香味成分的分析,采用计算机检索、对照标准图谱库(NIST 05)并结合相关参考文献的方式,确定香气中的主要成分,通过归一化积分法计算各个组分的相对含量. GC-MS 的分析条件如下:

色谱柱为 TR-5(30m×0.25mm,0.25μm)弹性石英毛细管柱;载气为 He 气,载气流量 1mL/min;进样口温度为 230℃;无分流进样;升温程序为 50℃→230℃(6℃/min);解析时间为 5min;离

子源为 EI 源;离子源温度 230℃;接口温度 230℃;四级杆质谱温度为 150℃;倍增器电压为 1200eV;电离电压为 70eV;发射电流为 34.6A;扫描范围为 20~500amu.

2.2.3 LOX 基因家族序列查找 利用张波等人在美味猕猴桃中发现的 LOX 基因家族序列^[13],在 NCBI 中查询得到相应的 CDS 序列,将目标序列放入红阳猕猴桃转基因数据库中进行比对^[14],选取相似度最高的序列作为红阳猕猴桃 LOX 基因家族序列.

2.2.4 RNA 提取及 RT-PCR 条件 使用 TRIzol 试剂提取不同 Brix 时期的果实总 RNA,提取方法参照 Invitrogen 的试剂说明书进行. RT-PCR 反应体系为 20μL,第一步含有 11μL 水,0.5μL 的 Oligdt,0.5μL 的 DNTP(10mM),1μL 的 Inhibitor,2μL 的 RNA. 运行程序为:65℃,5min. 第二步加入 4μL 经 5x buffer,1μL 的 ACE 反转录酶. 运行程序为:42℃,40min;95℃,5min.

2.2.5 qPCR 方法 qPCR 反应体系为 20.0 μL,含有 10.0μL 的 2×SYBR Green PCR Master Mix (UDG)(Bio-Rad, 美国),2.0μL 稀释的 cDNA,引物浓度为 250.0μmol/L. 使用实时定量 PCR 仪器开展 qPCR 检测,运行程序为:50℃,2min;94℃,10min;40 个循环的 94℃,5s 和 60℃,30s. 以猕猴

桃 Actin 作为内参,上游引物 5'-TGCAGATCT-TCGTGAAAACC-3',下游引物 5'-CCACCACG-GAGA CGGAGCAC-3'.

2.2.6 数据统计与分析 每组试验重复操作 3 次,结果以“平均值±标准差”的形式表示,试验结果用 SPSS12.0 进行统计分析,显著性差异 $P < 0.05$

3 结果与分析

3.1 香气成分种类与相对含量的分析

通过 HS-SPME/GC-MS 的联用分析,从不同 Brix 值(6.5、10、13 和 16)的红阳猕猴桃样品中检出 8 种共有香气成分,分别为己醛、(E)-2-己烯醛、丁酸甲酯、丁酸乙酯、己醇、2,2,6,6-四甲基-4-乙烷基庚烷,(Z)-3-己烯醇和壬酸. 含量结果如表 1 所示.

对比红阳猕猴桃与 Hort 16A 和海沃德的香气成分^[4],海沃德(绿心)有 48 种,Hort 16A 有 56 种,均少于红阳猕猴桃的 75 种;但三种猕猴桃主要的香气成分是一致的,说明猕猴桃品种间香气成分的差异可能是由香气成分不同的比例形成. 此外,在 Hort 16A 和海沃德中均发现了甲酸乙酯和乙酸乙酯,而红阳中未发现,说明一两种含量极少的成分的差异也是造成猕猴桃品种间香味差异的可能原因.

表 1 不同成熟度红阳猕猴桃共有香气成分变化表

Tab. 1 Relative contents of common aroma components in kiwifruits during different storage stages

序号	香气成分	相对含量(%)			
		Brix=6.5	Brix=10	Brix=13	Brix=16
1	(Z)-3-己烯醇	17.37	17.76	9.702	3.96
2	正己醛	13.785	10.47	7.434	2.233
3	(E)-2-己烯醛	12.505	9.915	5.768	4.235
4	己醇	6.195	7.815	6.356	3.432
5	丁酸乙酯	5.16	6.315	23.842	32.527
6	丁酸甲酯	3.345	4.68	19.362	30.921
7	壬酸	0.285	0.12	0.028	0.033
8	2,2,6,6-四甲基-4-乙烷基庚烷	1.26	1.245	0.714	0.616

3.2 不同 Brix 条件下猕猴桃果实香气成分种类变化的分析

经检测,红阳猕猴桃的香气成分种类主要有醛类、酯类,醇类和烃类,且在不同 Brix 值样品中的含量差别较大,结果如图 1 所示.

由图可知,醇类的相对含量随 Brix 的增加先

略微上升,随后出现下降趋势(图 1A);醛类的相对含量在成熟过程中一直呈现下降趋势(图 1B);酯类的相对含量则呈现先下降再上升的趋势(图 1C);烃类的相对含量表现为先迅速增加再迅速降低的趋势(图 1D).

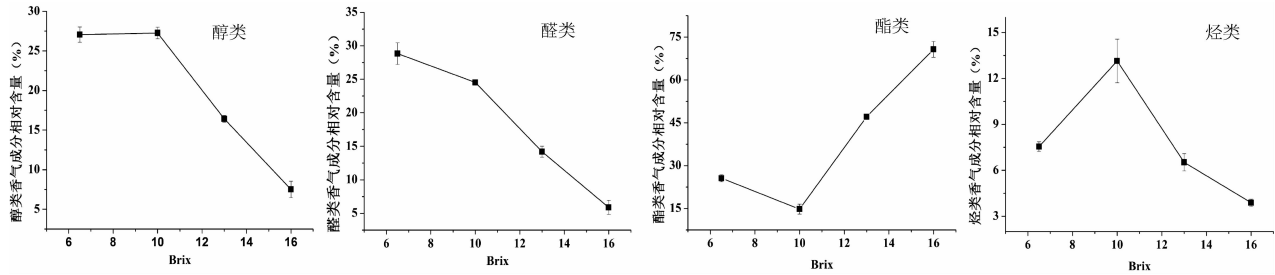


图 1 不同白利糖度下猕猴桃各类香气成分含量。

Fig. 1 Relative contents of aroma components in kiwifruits during different storage stages

果实的芳香是由大量挥发性有机化合物组成的特殊气味,它有助于果实种类的鉴别及其感官品质的分析,构成果实香气的物质主要有酯类、醛类、醇类、酮类和萜烯类等.目前对于猕猴桃香气成分的研究大部分是集中于海沃德(绿心)这种最主要的商业品种,近年来,针对于已商业化的红心和黄心猕猴桃及未商业化的毛花猕猴桃香气的研究开始增多^[15],研究表明猕猴桃的香气成分多数是以糖苷络合物的形式存在,从而导致其香气稀少.在植物组织中,以络合形式存在的香气成分通常远多于以自由挥发形式存在的香气成分,两者的比例最高可达 10 : 1. 研究指出,以络合形式存在的香气成分在果实成熟,贮藏或者加工过程可能会发生一系列的生化反应,从而使其脱离糖苷基,被完全释

放出来^[5].所以,植物果实在成熟过程中其风味会因香气成分的变化而出现明显的改变.因此,研究不同成熟度猕猴桃香气成分的变化对进一步了解并提高其感官品质具有重要的意义.

2.3 不同 Brix 条件下猕猴桃果实主要香气成分的含量变化分析

经过对总离子图检测分析,C₆ 醛中的己醛和(E)-2-己烯醛在刚采摘下来,Brix 为 6.5 时含量最高,并且随着果实的成熟而逐渐降低(图 2A).而 C₆ 醇类中主要成分己醇和(Z)-3-己烯醇含量则先略微上升并随着果实成熟而下降(图 2B).酯类中主要成分丁酸甲酯和丁酸乙酯含量则是先略微上升,随后出现大幅度提高的现象(图 2C).

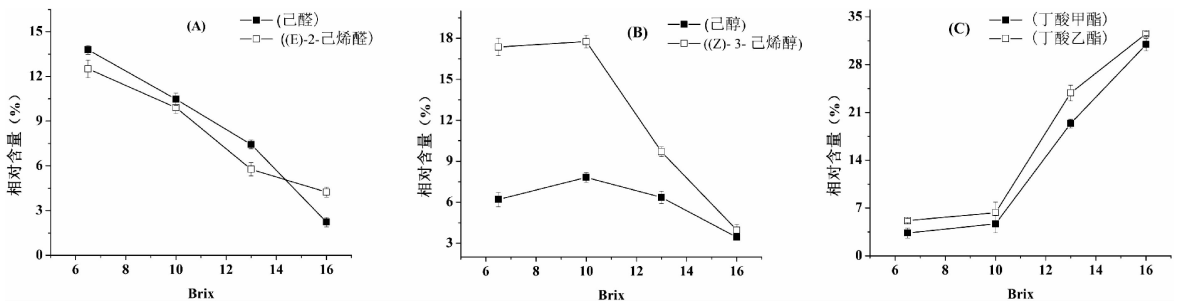


图 2 不同白利糖度下猕猴桃中己醛、(E)-2-己烯醛、己醇、(Z)-3-己烯醇、丁酸甲酯和丁酸乙酯相对含量变化。

A: 己醛、(E)-2-己烯醛; B: 己醇、(Z)-3-己烯醇; C: 丁酸甲酯和丁酸乙酯

Fig. 2 Relative content of *n*-hexanal, (*E*)-2-hexenal, *n*-hexanol, (*Z*)-3-hexenol, methyl butanoate, and ethyl butanoate in different Brix from kiwifruit

A: *n*-hexanal, (*E*)-2-hexenal; B: *n*-hexanol, (*Z*)-3-hexenol; C: methyl butanoate, and ethyl butanoate

目前已从桃果实中分离鉴定出了 100 多种香气成分,但是在这些香气成分中,只有少数的特征性香气成分对于果实的香气性状起到了决定性作用,被称之为“特征效应化合物”.在猕猴桃中,C₆ 醛和醇属于“青香型”香气物质,其中己醛和 2-己烯醛对于青草芳香具有非常重要的作用;而甲基磺酰类和酯类属于“果香型”香气物质,比如丁酸乙酯对于甜蜜香气起到一定的作用^[9].在桃果实中,还

普遍存在内酯,是对桃果实香味影响最大的特征香气物质,被称为“桃味”化合物,具有果香和甜香味,主要以 C₆~C₁₂ 偶数碳原子的 γ 和 δ 内酯的形式存在^[18].

研究发现,LOX 会催化亚油酸和亚麻酸反应生成氢过氧化脂肪酸,再被再由氢过氧化物裂解酶(HPL)裂解为 C₆、C₉ 醛,醛类物质继而在乙醇脱氢酶(ADH)催化下氧化为相应的醇类^[19].在

本研究中,随着红阳猕猴桃 Brix 值的提升,果实在逐渐成熟,香气成分中 C₆ 醛类的含量在逐步下降,C6 醇类先上升而后下降,酯类在后期大幅度提升,这可能就是因为醛类物质被 ADH 催化生成了相应的醇类,同时在后期醇类和醛类受到代谢控制,转化为了酯类,这与其它猕猴桃品种在成熟过程中香气成分的变化也是一致的^[6,7,19].本实验中,红阳猕猴桃刚采摘时散发出青草芳香,到 Brix=16 时则散发出浓郁的甜香,这与醛类减少,酯类含量上升的结果相符.

3.4 不同 Brix 条件下红阳猕猴桃果实中 LOX 基因表达量的变化

经过 Realtime-PCR 检测,*AcLox1*(Achn198621)和 *AcLox5*(Achn220011)的表达随果实成熟度的增加呈现出上升趋势,特别是 Brix 值由 13 增加至 16

的过程中,出现了大幅度的增加(图 3A 和图 3E).而 *AcLox2* (Achn022081)、*AcLox3* (Achn098971)、*AcLox4*(Achn123601)和 *AcLox6*(Achn123621)则随着果实成熟的增加而出现下降的趋势(图 3B,图 3C,图 3D 和图 3F).

对比图 2 和图 3 可见,两种 C₆ 醛类的香气成分随着果实成熟度的增加而下降,与 *AcLox2*、*AcLox3*、*AcLox4* 和 *AcLox6* 的基因实时表达量呈现正相关性,可以推测 *AcLox2*、*AcLox3*、*AcLox4* 和 *AcLox6* 在红阳猕猴桃成熟过程中对其香气成分中醛类合成有一定的调控效应.而 *AcLox1* 和 *AcLox5* 基因的表达水平与酯类含量的变化趋势一致,表明其在红阳猕猴桃酯类香气成分合成的过程中可能会起主要作用.

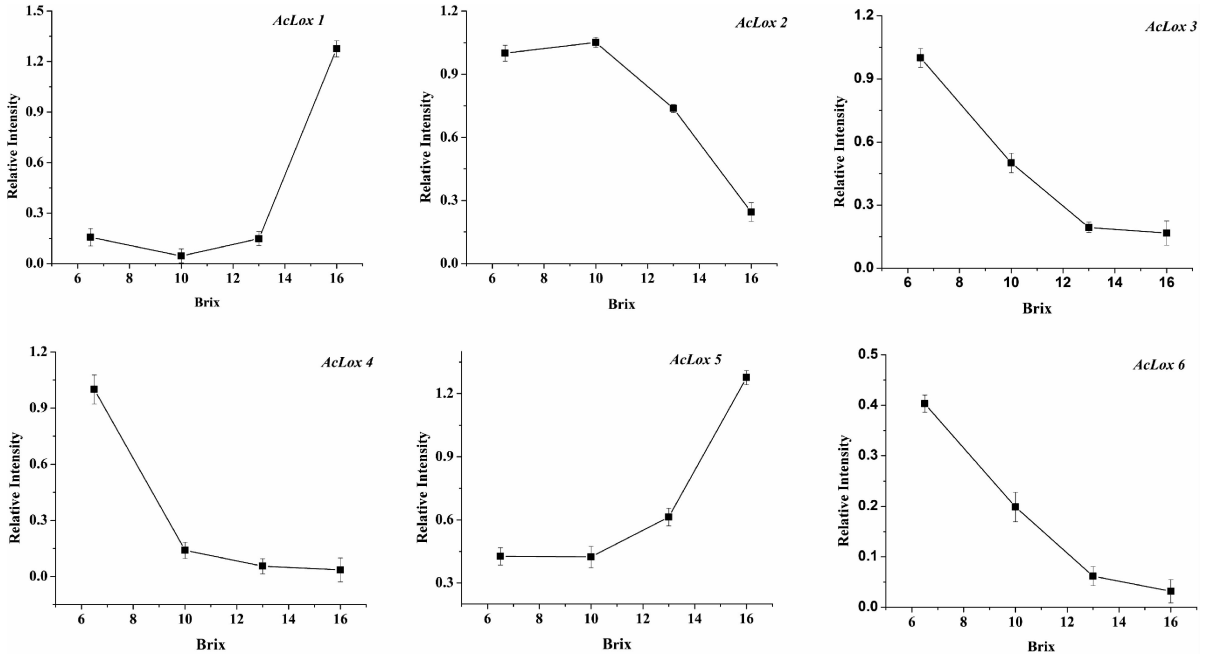


图 3 不同白利糖度下 *AcLox* 基因家族实时表达量变化

Fig. 3 Relative intension of *AcLox1*、*AcLox2*、*AcLox3*、*AcLox4*、*AcLox5*、*AcLox6* in different Brix from kiwifruit .

Zhang Bo 等人通过对不同植物中的 LOX 基因进行系统进化树构建,得出 LOX 基因进化树有三个分支,LOX1、LOX2 和 LOX3,在美味猕猴桃中,*AdLox2* 和 *AcLox5* 属于 LOX1,*AdLox4* 和 *AdLox6* 属于 LOX2,*AdLox1* 和 *AdLox3* 属于 LOX3,LOX1 具有 9-LOX 活性,LOX2 和 LOX3 具有 13-LOX 活性^[19].Feussner 等人研究发现 13-LOX 会在 C6 醇类和醛类的合成中起作用,而 9-LOX 在果实成熟过程有促进作用,但是有很多功能尚待研究^[21].在本研究中,*AcLox2*、*AcLox3*、

AcLox4 和 *AcLox6* 对醛类合成可能会有一定的调控效应,那属于 LOX1 的 *AcLox2* 对于醛类合成起到的调控作用,可能是因为在促进果实成熟过程,对醛类起到了一定作用,可待接下来进一步研究.

番茄中的 *TomLoxA* 和 *TomLoxB* 具有 9-LOX 活性,*TomLoxC* 基因具有 13-LOX 活性.Chen 等人通过抑制番茄中的 *TomLoxC* 基因,将番茄果实中的己烯醛和己烯醇降低为正常情况下的 1.5%.但是抑制 *TomLoxA* 和 *TomLoxB*,果实的挥发性成分并未有显著改变^[8].这进一步证实了

具有 13-LOX 活性的基因在调控果实醛类和醇类的合成中起到重要作用。

4 结 论

红阳猕猴桃在成熟过程中, C₆ 醛类成分的含量大幅度减少, 丁酸甲酯和丁酸乙酯含量大幅度上升. 推测 *AcLox3*、*AcLox4* 和 *AcLox6* 在红阳猕猴桃成熟过程中是调控醛类合成表达的相关基因. *AcLox2* 是否有直接调控作用还有待进一步研究. 而 *AcLox1* 和 *AcLox5* 是调控酯类香气成分合成的相关基因. LOX 基因家族不同成员的表达水平对猕猴桃果实的香气成分起关键作用, 调控红阳猕猴桃成熟过程中香气成分从青草芳香转变为甜蜜果香.

参考文献:

- [1] 杜燕姬, 唐维, 张景荣, 等. 中华猕猴桃“红阳”花药和胚囊发育研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53: 677.
- [2] Marsh K B, Ellen N, Anne G, *et al.* Perception of flavor in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars[J]. *Food Qual Preference*, 2006, 17: 376.
- [3] 辛广, 张博, 冯帆, 等. 软枣猕猴桃果实香气成分分析[J]. *食品科学*, 2009, 30: 159.
- [4] Wang M Y, Elspeth M, Mark W. Changes in volatile production and sensory quality of kiwifruit during fruit maturation in *Actinidia deliciosa* ‘Hayward’ and *A. chinensis* ‘Hort16A’[J]. *Postharvest Biol Technol*, 2011, 59: 20.
- [5] Garcia C V, Coralia V G, Siew Y Q, *et al.* Characterisation of bound volatile compounds of a low flavour kiwifruit species: *Actinidia eriantha* [J]. *Food Chem*, 2012, 134: 661.
- [6] 吴敏, 陈昆松, 张上隆. 桃果实采后成熟过程中脂氧合酶活性变化[J]. *园艺学报*, 1999, 04: 19.
- [7] 孙炎峰, 吕东, 王丽, 等. 13-脂氧合酶在拟南芥叶片衰老中的作用分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2013, 50: 1391.
- [8] Chen G P, Hackett R, Walker D, *et al.* Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds[J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2641.
- [9] Liavonchanka A, Feussner N. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis[J]. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 348.
- [10] Schaffer R J, Friel E N, Souleyre E J, *et al.* A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway[J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1899.
- [11] Zhang B, Yin S X, Shen J Y, *et al.* Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 2875.
- [12] 陈宝妹, 潘林娜, 陈长忠, 等. 猕猴桃果实成熟度及其营养成份的变化[J]. *福建果树*, 1994, 12: 12.
- [13] 张波, 李鲜, 陈昆松, 基于 EST 库的猕猴桃脂氧合酶基因家族成员的克隆[J]. *园艺学报*, 2008, 03: 337.
- [14] Huang S X, Ding J, Deng D J, *et al.* Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis* [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 4.
- [15] Garcia C V, Quek S Y, Ralph J S, *et al.* Kiwifruit flavour: a review[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2012, 24: 82.
- [16] Reineccius G. Flavor chemistry and technology [M]. (2nd ed.), Boca Raton: Taylor and Francis, 2006: 50.
- [17] 郑孝华, 翁雪香, 邓春晖. 中华猕猴桃果实香气成分的气相色谱/质谱分析[J]. *分析化学*, 2004, 32: 83.
- [18] 席万鹏, 郁松林, 周志钦. 桃果实香气物质生物合成研究进展[J]. *园艺学报*, 2013, 40: 1679.
- [19] Zhang B, Shen J Y, Wei W W, *et al.* Expression of genes associated with aroma formation derived from the fatty acid pathway during peach fruit ripening[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 6157.
- [20] 张波, 李鲜, 陈昆松. 脂氧合酶基因家族成员与果实成熟衰老研究进展[J]. *园艺学报*, 2007, 34: 245.
- [21] Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 275.