

# 草莓果实发育过程中芳香物质含量和醇酰基转移酶活性的变化

隋 静, 姜远茂\*, 彭福田, 国 颖, 刘丙花, 赵凤霞, 王海云

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 以‘丰香’和‘罗莎’两个风味品质差异显著的草莓品种为试材, 采用气谱—质谱联用技术测定果实中芳香物质的成分及相对含量, 同时采用 DTNB 比色法测定果实中醇酰基转移酶活性。结果表明: ‘丰香’成熟果实中的芳香物质以酯类 (32.18%)、醛类 (19.55%) 和酮类 (16.82%) 化合物为主; ‘罗莎’成熟果实中的芳香物质以醛类 (41.51%) 和酯类 (23.25%) 化合物为主。随果实发育, ‘丰香’和‘罗莎’果实中酯类和酮类化合物的相对含量呈上升趋势, 而醇类和醛类化合物则呈下降趋势。‘丰香’果实红熟期酯类化合物的相对含量是粉熟期的 4 倍, 醇类化合物则由粉熟期的 54.35% 降至 5.17%。随着果实发育, ‘丰香’和‘罗莎’中 AAT 酶活性显著升高, ‘丰香’果实各发育期的 AAT 酶活性显著高于‘罗莎’。

**关键词:** 草莓; 果实; 发育阶段; 风味; 芳香物质; 醇酰基转移酶

**中图分类号:** S 668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1411-07

## Development of Aroma Components and Alcohol Acyltransferase Activity in Strawberry Fruit During Ripening

SUI Jing, JIANG Yuan-mao\*, PENG Fu-tian, GUO Ying, LIU Bing-hua, ZHAO Feng-xia, and WANG Hai-yun

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Cropbiology, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** *Fragaria × ananassa* Duch. ‘Toyonoka’ and *Fragaria × ananassa* Duch. ‘Rosa’ were used to study the changes of aroma components and their relative content by using GC-MS, at the same time, alcohol acyltransferase activity was determined with the method of DTNB colorimetry. The majority of aroma components were determined to be esters (32.18%), aldehydes (19.55%) and ketones (16.82%) in ripe ‘Toyonoka’. While the majority of aroma components were determined to be aldehydes (41.51%) and ester (23.25%) in ripe ‘Rosa’ fruit. In the process of strawberry fruit development the relative contents of ketones and esters increased, while the relative content of alcohols and aldehydes decreased. In ‘Toyonoka’ fruit, the relative content of esters was 4 times more at the red ripe stage than those at the pink stage. While the relative content of alcohols decreased from 54.35% at the red ripe stage to 5.17% at the pink stage. The AAT activity increased obviously in ‘Toyonoka’ and ‘Rosa’ in the development of the fruit. In addition, the AAT activity was greater in ‘Toyonoka’ than that in ‘Rosa’ fruit at various development stages.

**Key words:** Strawberry; Fruit; Development stage; Flavour; Aroma component; Alcohol acyltransferase

收稿日期: 2007-07-09; 修回日期: 2007-09-28

基金项目: 农业部‘948’项目 (2003-Z53; 2006-G28)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: ymjiang@sdau.edu.cn)

草莓果实中芳香物质的种类和相对含量是决定其风味品质的重要因素 (McFadden et al., 1965; Latrasse, 1991)。

成熟草莓果实中的芳香物质包括酯、醛、酮、醇、萜、呋喃和硫化物等, 其中酯类化合物、2, 5-二甲基-4-甲氧基-3(2H)-呋喃酮 (DMMF) 和 2, 5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮 (DMHF) 等是其特征芳香成分 (Larsen & Poll, 1992; Shamaila et al., 1992; Perez et al., 1997; Zabetakis & Holden, 1997; Forney et al., 2000)。醇酰基转移酶 (AAT) 是酯类化合物生物合成过程中的关键酶, 催化醇类化合物和酰基辅酶 A 反应生成酯类化合物。有关苹果、甜瓜、香蕉的研究结果表明, AAT 酶活性与果实中酯类化合物的含量呈正相关 (Wyllie & Fellman, 2000; Shalit et al., 2001; Defilippi et al., 2005)。因此, 选择风味品质差异显著的两个草莓品种, 研究其果实发育过程中酯类等芳香物质组成和相对含量的变化以及其与 AAT 酶活性的关系, 对探讨草莓果实酯类化合物的生物合成机理有一定意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及果实发育期的确定

试验于 2005 年 10 月~2006 年 5 月在山东农业大学玻璃温室内进行。试材为‘丰香’ (*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Toyonoka’) 和‘罗莎’ (*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Rosa’) 草莓品种。选三叶一心健壮植株定植于 30 cm × 30 cm 塑料花盆中。盆中土壤有机质含量 1.10%、碱解氮 53.9 mg · kg<sup>-1</sup>、速效磷 24.68 mg · kg<sup>-1</sup>、速效钾 211.68 mg · kg<sup>-1</sup>。

草莓果实分为绿熟期 (果实全绿, 没有着色)、白熟期 (果实向光面 1/4 转红)、粉熟期 (果实一半以上转红) 和红熟期 (果实全红) (郭英燕 等, 2003)。果实按不同发育期采收后, 立即送到实验室作进一步分期挑选, 去除破损和病害果, 水洗风干, 待测。

### 1.2 芳香物质测定方法

SPME 取样: 选取成熟一致的草莓鲜果实 50 g, 用刀片切碎果肉混合, 取少量样品迅速装入 15 mL 样品瓶内, 上部留有约 2 cm 左右的空间, 加盖封口。将老化好的萃取头插入样品瓶顶空部分, 在磁力搅拌器上萃取 40 min, 萃取温度为 40℃, 然后将萃取头抽出插入气质联用仪, 于 250℃ 解吸 2.5 min, 进行 GC-MS 检测分析。

GC-MS 分析: 色谱条件为 DB-5 毛细管色谱柱, 长 50 m, 内径 0.32 mm, 液膜厚 1.0 μm, 载气 He, 不分流, 恒流 1 mL · min<sup>-1</sup>, 进样口温度 250℃, 柱温起始温度 40℃ 保持 1 min, 以 5℃ · min<sup>-1</sup> 升温至 120℃, 再以 8℃ · min<sup>-1</sup> 升温至 200℃, 最后以 12℃ · min<sup>-1</sup> 升温至 250℃ 保持 7 min。质谱条件为离子源温度 200℃, 电离方式 EI, 电子能量 70 eV。

### 1.3 醇酰基转移酶活性测定

酶粗提液的制备: 取 3 g 鲜果样品液氮研磨, 每 g 样品加入 0.75 mL 蛋白提取液 (0.5 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0; 0.1% Triton X-100; 0.3 mg PVPP), 冰浴提取 20 min, 12 000 × g 离心 20 min, 上清液即为酶粗提液。

酶活性检测: 反应液组成为: 2.5 mL 5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 溶液 (0.5 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, 其中含 5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>)、150 μL acetyl-CoA 溶液 (0.5 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, 其中含 5 mmol · L<sup>-1</sup> acetyl-CoA)、50 μL 丁醇溶液 (0.5 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0, 其中含 200 mmol · L<sup>-1</sup> 丁醇) 和 150 μL 酶提取液。将以上组分混合后放置于 35℃ 水浴 15 min, 然后添加 100 μL 10 mmol · L<sup>-1</sup> DTNB, 在室温下放置 10 min, 412 nm 比色, 用不含酶提取液的反应液为空白, 每样品重复 3 次。以 1 min 内吸光度升高的数值为一个酶活单位 (U), 结果以比活性 (U · g<sup>-1</sup>) 表示。

用 DPS 进行数据分析。



续表 1

化合物 Compound	香气成分 Aroma	罗莎 Rosa				丰香 Toyonka			
		绿熟 Green	白熟 White	粉熟 Pink	红熟 Red	绿熟 Green	白熟 White	粉熟 Pink	红熟 Red
醇类 Alcohols	2,4-己二烯-1-醇 2,4-hexadien-1-ol	20.82	33.74						
	2-环丙烯-1-醇 2-cyclohexen-1-ol	30.18	31.95						
	2-亚甲基-环五醇 2-methylene-cyclopentanol					26.56			
	2-环己烯-1-醇 2-cyclohexen-1-ol						38.21	47.23	
	四氢-2H-吡喃-2-甲醇 2h-pyran-2-methanol, tetrahydro-		2.09			1.96			
	反-5-乙烯基四氢- $\alpha,\alpha,5$ -三甲基-2-咪喃甲醇 2-furanmethanol, 5-ethenyltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimethyl-, trans-		0.21	1.60	0.45		1.91	0.90	
	(R)- $\alpha$ -甲基苯甲醇 Benzenemethanol, $\alpha$ -methyl-, (R)-		0.21	0.96	0.41				
	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	0.28		1.49	1.41		3.81	4.97	4.26
	$\alpha,\alpha,4$ -三甲基-3-环己烯-1-甲醇 3-cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-						0.43	1.25	0.91
	醛类 Aldehydes	(E)-2-戊烯醛 2-pentenal, (E)-	1.27	0.88	0.28		0.97	0.55	0.30
2-甲基-4-戊烯醛 4-pentenal, 2-methyl-		8.39		6.13	4.24			4.91	
(Z)-3-己烯醛 3-hexenal, (Z)-								6.41	
2-己烯醛 2-hexenal		9.53	10.34	54.77	32.36	32.14	25.57	3.38	0.51
3-甲基戊醛 Pentanal, 3-methyl-									1.53
(E)-2-己烯醛 2-hexenal, (E)-									17.04
(E,E)-2,4-己二烯醛 2,4-hexadienal, (E,E)-		8.87	6.26	2.95	2.04	8.60	5.14	0.32	0.47
庚醛 Heptanal						0.53			
苯甲醛 Benzaldehyde									1.06
5-(羟甲基)-2-咪喃甲醛 2-furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-					2.87				
其它 Others		乙腈, 氰化甲烷 Acetonitrile					0.72	0.50	0.21
	二氯甲烷 Methylene chloride	0.86							
	丁烷 Butane			1.10					
	二硫化碳 Carbon disulfide	4.14	1.86			3.35			
	乙醚 Ethyl ether						7.08		
	甲乙醚 Ethene, ethyloxy-		0.66	2.93					
	氯乙烷 Methylene chloride					0.97			
	硫脲 Thiourea						1.76		
	乙酸 Acetic acid			0.80	0.80				
	2-氯-2-硝基丙烷 Propane, 2-chloro-2-nitro-	0.26	0.81	1.69					
	2-乙基咪喃 Furan, 2-ethyl-	2.31	1.66	0.54	0.50	2.43	1.19	0.78	
	2-甲基丁酸 Butanoic acid, 2-methyl-				2.54				2.81
	甲氧基苯基肟 Oxime-, methoxy-phenyl-		0.26	0.50					
	己酸 Hexanoic acid			2.83	7.98				14.18
	顺-1,2-二氢儿茶酚 cis-1,2-dihydrocatechol					0.76	0.27	0.50	
	$\alpha$ -香叶烯 $\alpha$ -myrcene						0.42		
	柠檬油精 Limonene							0.38	0.31
	蔗糖 Sucrose				0.64				
	(E)-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二三烯 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-								1.72
	占总峰面积的百分数 Percent of the total peak area(%)		91.81	96.08	95.13	92.15	83.17	93.98	90.17

## 2.2 不同发育期果实芳香物质相对含量的变化

### 2.2.1 酯类化合物

酯类化合物是草莓果实中最重要的一类芳香物质。‘丰香’和‘罗莎’两个品种在绿熟期均未检测到酯类化合物,从白熟期开始随果实成熟,酯类化合物相对含量显著增加,白熟期、粉熟期和红熟期‘丰香’果实酯类化合物含量分别为4.9%、8.86%和32.18%,‘罗莎’分别为0.23%、14.65%和23.25% (图1,图2)。“丰香”果实红熟期酯类化合物的相对含量是“罗莎”的1.4倍,以乙酸甲酯、乙酸乙酯、丁酸甲酯、丁酸乙酯和己酸甲酯为主,“罗莎”以乙酸甲酯和丁酸甲酯为主。

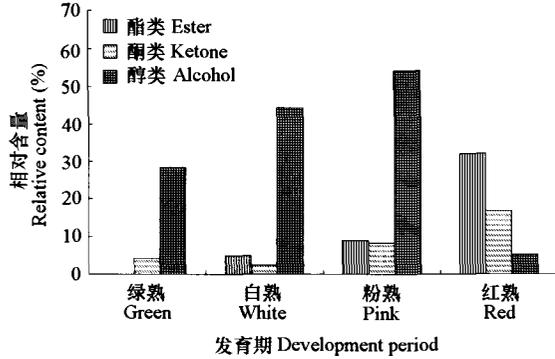


图1 ‘丰香’草莓不同发育期芳香物质含量的变化

Fig. 1 The contents of aroma components in different development periods of Toyonoka

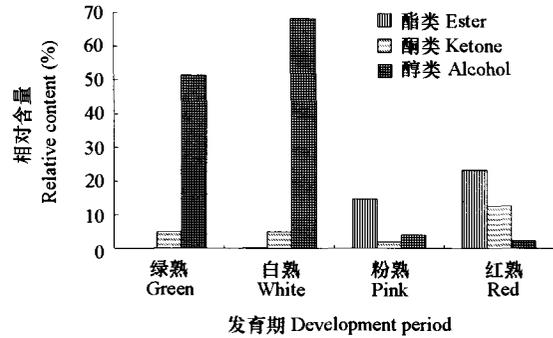


图2 ‘罗莎’草莓不同发育期芳香物质含量的变化

Fig. 2 The contents of aroma components in different development periods of Rosa

### 2.2.2 酮类化合物

在果实发育过程中,‘丰香’和‘罗莎’酮类化合物的变化动态均表现为前期(绿熟、白熟和粉熟期)较低(1.91%~8.71%),红熟期显著增加(‘丰香’16.82%,‘罗莎’12.66%)的趋势(图1,图2)。

由表1可知,DMMF在两品种粉熟期之前均未检测出,在粉熟期相对含量较低,‘丰香’和‘罗莎’分别为0.60%和0.77%,到红熟期迅速上升,分别为9.56%和3.38%。在‘丰香’和‘罗莎’果实红熟期才检测到DMHF,其相对含量分别为1.62%和0.31%。‘丰香’和‘罗莎’果实中DMMF和DMHF之和分别占红熟期酮类化合物的66.5%和29.3%,表明DMMF和DMHF是红熟期草莓果实中主要的酮类化合物。

### 2.2.3 醇类化合物

‘丰香’和‘罗莎’果实中醇类化合物的相对含量在发育过程中均表现为先高后低的趋势(图1,图2)。“丰香”果实发育过程中绿熟、白熟、粉熟、红熟期醇类化合物的相对含量分别为28.52%、44.36%、54.35%和5.17%,‘罗莎’分别为51.28%、68.2%、4.05%和2.27%。

## 2.3 草莓果实不同发育期醇酰基转移酶活性的变化

由图3可以看出,绿熟期‘丰香’和‘罗莎’均未检测到醇酰基转移酶(AAT)的活性,其他各发育期‘丰香’的AAT酶活性显著高于‘罗莎’。

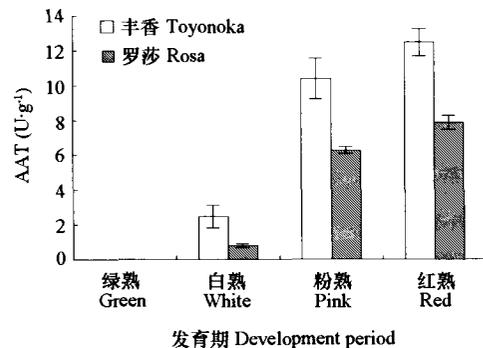


图3 草莓果实不同发育期 AAT 活性的变化

Fig. 3 The activity of AAT in different development periods of strawberry fruit

两个品种的 AAT 活性均随着果实的成熟而逐渐升高,在白熟期、粉熟期和红熟期,‘丰香’果实 AAT 酶活性分别为 2.5、10.4 和 12.5  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ,‘罗莎’果实 AAT 酶活性分别为 0.8、6.3 和 7.9  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 不同草莓品种成熟果实中的芳香物质

芳香物质对果实香气的贡献是依据其香气值(相对含量/香气阈值)(Larsen & Poll, 1992)来划分的。

成熟草莓果实中具有较高香气值的成分为其特征芳香物质,主要包括酯类、2,5-二甲基-4-甲氧基-3(2H)-咪喃酮和 2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-咪喃酮等。

本试验检测到‘丰香’和‘罗莎’品种成熟果实芳香物质均为 24 种。‘丰香’中占主导地位的是乙酸甲酯、乙酸乙酯和丁酸甲酯,总相对含量为 22.1%。‘罗莎’中占主导地位的是乙酸甲酯和丁酸甲酯,总相对含量为 17.74%。其他研究表明,‘宝交早生’、‘肯特’和‘阿纳波利司’草莓果实香气成分以甲基酯类为主,‘康菲哥拉’和‘常得乐’以乙基酯类为主(Dirinek et al., 1981; Miszczak et al., 1995; Forney et al., 2000)。

2,5-二甲基-4-甲氧基-3(2H)-咪喃酮和 2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-咪喃酮在‘丰香’中的相对含量为 11.18%,明显高于‘罗莎’中的 3.69%。另外,‘罗莎’草莓成熟果实芳香物质中醛类化合物的相对含量达到了 41.51%,但 2-己烯醛作为非特征芳香物质(刘松忠等, 2004)相对含量高达 32.36%。‘丰香’和‘罗莎’成熟果实中特征芳香物质的类型和相对含量存在明显差异。酯类化合物等特征芳香物质的类型和含量在不同品种间的差异是其风味品质各异的原因。

#### 3.2 草莓果实不同发育期酯类化合物和醇类化合物相对含量的变化

酯类化合物生物合成的前体为脂肪酸和氨基酸。脂肪酸通过  $\beta$ -氧化过程产生乙酸、丁酸和己酸,然后还原为相应的醇类化合物(Paillard, 1990),而这些醇类化合物在酰基 CoA 存在的条件下,通过醇酰基转移酶(AAT)酯化为酯类化合物(Paillard et al., 1979; Knee & Hatfield, 1981)。氨基酸经过转氨基作用形成酮酸,一条途径是在脱羧酶作用下生成醛,然后在醇脱氢酶作用下生成醇;另一条途径是与 CoAs 生成酰基 CoAs(Wyllie et al., 1996),然后在 AAT 酶作用下生成酯。上述两种途径中酯类化合物生物合成的底物都是醇类化合物。

本试验中,‘丰香’果实酯类化合物的相对含量由粉熟期的 8.86% 急剧上升到红熟期的 32.18%,与之对应醇类化合物由粉熟期的 54.35% 急剧降到红熟期的 5.17%;‘罗莎’果实酯类化合物的相对含量由白熟期的 0.23% 急剧上升到粉熟期的 14.65%,其醇类化合物则由白熟期的 68.2% 急剧降到粉熟期的 4.05%。两个品种除酯类化合物相对含量急剧变化的果实发育期存在差异外,其酯类化合物相对含量的急剧增加均与醇类化合物相对含量的急剧下降同步,验证了醇类化合物是草莓酯类化合物合成的底物。

#### 3.3 草莓果实不同发育期酯类化合物相对含量与醇酰基转移酶活性的关系

醇酰基转移酶(AAT)是催化酯类化合物生物合成的关键酶之一。本试验两个品种草莓果实从白熟期到红熟期过程中,AAT 酶活性均呈逐渐增加的趋势,与之相对应酯类化合物的相对含量也逐渐增高,这与 Shalit 等(2001)在甜瓜中的研究结果一致。

在红熟期‘丰香’果实 AAT 酶活性高于‘罗莎’,其酯类化合物相对含量也高于‘罗莎’,而粉熟期 AAT 酶活性高于‘罗莎’,但酯类化合物相对含量却低于‘罗莎’,这可能与两个品种酯类化合物生物合成过程中 SAAT(Jules et al., 2004)基因的表达条件存在差异有关,需要进一步进行酯类化合物生物合成分子机理研究。

## References

- Defilippi B G, Kader A A, Dandekar A M. 2005. Apple aroma; alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*, 168: 1199 – 1210.
- Dirinck P J, de Pooter H L, Willaert G A, Schamp N M. 1981. Flavor quality of cultivated strawberries: The role of sulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 316 – 321.
- Forney C F, Kalt W, Jordan M A. 2000. The composition of strawberry aroma is influenced by cultivar, maturity and storage. *HortScience*, 3 (6): 1022 – 1026.
- Guo Ying-yan, Jiang Yuan-mao, Peng Fu-tian. 2003. Influence of different level of nitrogen on amino and protein in strawberry. *Journal of Fruit Science*, 20 (6): 475 – 478. (in Chinese)
- 郭英燕, 姜远茂, 彭福田. 2003. 不同氮素水平对草莓氨基酸和蛋白质的影响. *果树学报*, 20 (6): 475 – 478.
- Jules Beekwilder, Mayte Alvarez-Huerta, Evert Neef, Francel W A, Verstappen, Harro J Bouwmeester, Asaph Aharoni. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135: 1865 – 1878.
- Knee M, Hatfield S G S. 1981. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *J. Sci. Food Agric.*, 32: 593 – 600.
- Larsen M, Poll L. 1992. Odour thresholds of some important compounds in strawberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 195 (2): 120 – 123.
- Latrasse A. 1991. Volatile compounds in foods and beverages. New York: Marcel-Dekker: 329 – 387.
- Liu Song-zhong, Jiang Yuan-mao, Peng Fu-tian. 2004. The effects of various nitrogen levels on strawberry fruit aroma components in plastic shed. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 10 (6): 638 – 641. (in Chinese)
- 刘松忠, 姜远茂, 彭福田. 2004. 不同氮素水平对棚栽草莓果实芳香成分的影响. *植物营养与肥料学报*, 10 (6): 638 – 641.
- McFadden W H, Teranishi R, Corse J, Black D R, Mon T R. 1965. Volatile from strawberries II. Combined mass pectrometry and gas chromatography on complex mixtures. *Journal of Chromatography*, 18: 10 – 19.
- Miszczak A, Forney C F, Prange R K. 1995. Development of aroma volatiles and color during postharvest ripening of 'Kent' strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120: 650 – 655.
- Paillard N M M. 1979. Biosynthese des produits volatils de la pomme; Formation des alcohols et des ester a partir des acides gras. *Phytochemistry*, 18: 1165 – 1171.
- Paillard N M M. 1990. The flavour of apples, pears and quinces. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Perez A G, Sanz C, Olias R. 1997. Aroma quality evaluation of strawberry cultivars in southern Spain. *Acta Horticulture*, 439 (1): 337 – 340.
- Shalit M, Katzir N, Tadmor Y. 2001. Acetyl-CoA; alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melou fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 49 (2): 794 – 799.
- Shamaila M, Baumann T E, Eaton G W, Powrie W D, Skura B J. 1992. Quality attributes of strawberry cultivars grown in British Columbia. *J. of Food Sci.*, 57 (3): 696 – 699.
- Wyllie S G, Leach D N, Wang Y. 1996. Development of flavor attributes in the fruit of *C. melo* during ripening and storage. In: Takeoka G R, Teranishi R, Williams P J, Kobayashi A eds. *Biotechnology for improved foods and flavors*. Amer. Chem. Soc.: 228 – 239.
- Wyllie S G, Fellman J K. 2000. Formation of volatile branched chain esters in bananas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8): 3493 – 3496.
- Zabetakis I, Holden M A. 1997. Strawberry flavour; analysis and biosynthesis. *J. Sci. of Food and Agric.*, 74: 421 – 434.