

莫长明, 王海英, 马小军, 等. 罗汉果甜苷 V 合成生理规律的研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 93-99.

罗汉果甜苷 V 合成生理规律的研究

莫长明^{1,2}, 王海英^{3,4}, 马小军^{1,3}, 唐 其², 万凌云⁵, 翟勇进²

(1 广西大学 农学院, 广西南宁 530004; 2 广西药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023; 3 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193; 4 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193; 5 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041)

摘要:【目的】探讨罗汉果甜苷 V 合成生理规律。【方法】通过不同品种以及遮阴、气调贮藏、低温贮藏比较试验, 分析罗汉果苷类和糖类代谢的关系, 以及光合作用、呼吸作用、温度对它们代谢的影响。【结果和结论】不同品种罗汉果和遮阴果实均在 30 d 时只含罗汉果苷 II E、苷 III, 蔗糖、葡萄糖含量较低, 30 ~ 70 d 时罗汉果苷 II E、苷 III 迅速减少、消失, 蔗糖、葡萄糖含量持续升高, 甜苷 V 出现并急剧积累接近最高含量, 70 ~ 90 d 时仅含甜苷 V, 蔗糖含量继续升高, 葡萄糖含量则明显下降; 但是, 光合速率高的品种果实葡萄糖和甜苷 V 含量也高; 遮阴使叶片光合速率降低, 果实葡萄糖和甜苷 V 含量却均升高; 气调和低温贮藏均促进果实葡萄糖积累, 而抑制甜苷 V 合成。这些结果表明, 罗汉果甜苷 V 由低糖苷与葡萄糖逐渐结合转化而来, 通过调控生育后期叶片光合速率与果实呼吸来增加葡萄糖量不能促进其合成积累, 其合成积累所需葡萄糖量是充足的, 主要限制因子可能是低糖苷量和合成关键酶活性。

关键词: 罗汉果; 甜苷 V; 葡萄糖; 光合速率; 酶活性

中图分类号: S667; Q53

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)01-0093-07

Physiological regularities of *Siraitia grosvenorii* mogroside V biosynthesis

MO Changming^{1,2}, WANG Haiying^{3,4}, MA Xiaojun^{1,3}, TANG Qi², WAN Lingyun⁵, ZHAI Yongjin²

(1 Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2 Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China; 3 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 4 College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 5 Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: 【Objective】To discuss physiological regularities of *Siraitia grosvenorii* mogroside V biosynthesis. 【Method】Comparative experiments of variety, shading, gas storing and low-temperature storing were carried out. Through these experiments, correlations between *Siraitia grosvenorii* mogrosides and saccharides metabolizing in fruits, effects of photosynthesis, respiration and temperature on them were analysed. 【Result and conclusion】In 30 d fruits, mogrosides were mainly mogroside II E and III, sucrose and glucose content were low. During 30 - 70 d, mogroside II E and III content rapidly decreased; sucrose and glucose content increased; mogroside V occurred, and its content sharply rose to near the peak value. During 70 - 90 d, mogroside V was what only detected and found among mogrosides; sucrose content continually increased; glucose content obviously decreased. The higher photosynthetic rates of the variety, the higher its mogroside V and glucose content. In shading conditions, photosynthetic rate of leaves decreased, but mogroside V and glucose content of fruits both climbed up. Both gas storing and low-tem-

收稿日期: 2012-11-29 优先出版时间: 2013-11-07

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1610.012.html>

作者简介: 莫长明(1977—), 男, 副研究员, 硕士, E-mail: mochming@126.com; 通信作者: 马小军(1958—), 男, 研究员, 博士, E-mail: xjma@public.bta.net.cn

基金项目: 国家自然科学基金(81373914); 国家科技支撑计划项目(2011BA101B03); 广西科技攻关项目(桂科攻 11107010-2-11)

perature storing improved glucose accumulation but inhibited mogroside V biosynthesis. These studies suggested that low saccharide group mogrosides gradually combined glucoses into mogroside V. It did not improve mogroside V biosynthesis that leaf photosynthesis and fruit respiration were regulated to increase glucose amount at a late developmental stage. These results showed that low saccharide group mogrosides amount and key enzymatic activities, not the glucose amount, were possibly the main factors of limiting mogroside V biosynthesis.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; mogroside V; glucose; photosynthetic rate; enzymatic activity

中国特有植物罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 为驰名中外的中药材,果实味甘、性凉,具止咳祛痰、凉血舒胃、润肠通便^[1]、抗氧化^[2]、抗癌^[3]、免疫调节^[4]、降血糖^[5]等功效,是“罗汉果定喘片”、“罗汉果止咳露”、“金嗓子喉宝”等数十种著名中成药与保健品的重要原料.其主要活性成分甜苷V^[6]为低热^[7]、无毒^[8-9]、高甜度^[10]、不引发龋齿^[11]的纯天然甜味剂,可为糖尿病和肥胖病患者食用,开发应用受到广泛关注.但罗汉果果实中的种子太多,甜苷V仅存在于果肉中^[12],因而含量很低,鲜果中甜苷V的质量分数仅为0.3%~0.4%,致使甜苷V生产和使用成本太高,无法与蔗糖等竞争,应用范围受到严重制约.甜苷V提取率已达80.0%~90.0%,因此通过改进提取工艺降低成本的潜力有限,加之罗汉果适宜栽培区域狭窄,不宜连茬,亟待寻找提高罗汉果甜苷V生产效率的新理论、新方法.20世纪80年代,日本学者竹本常松等分离得到罗汉果苷II E、苷III、苷IV和甜苷V^[13].苷II E、苷III、苷IV和甜苷V随着果实发育依次积累出现,甜苷V分子由苷元(罗汉果醇)与5个葡萄糖连接而成,与低糖苷的差异仅在苷元C₃和C₂₄上连接的葡萄糖数目和方式不同,生物合成的唯一糖类底物是光合作用直接产物葡萄糖^[14].果实中的糖主要来自叶片的光合产物^[15].甜苷V是否由低糖苷与葡萄糖结合转化而来?葡萄糖的积累与代谢对甜苷V合成影响如何?增强叶片光合作用是否会增加果实中葡萄糖积累促进甜苷V合成?这些基本问题仍不清楚.针对这些问题,本研究通过不同品种以及遮阴、气调贮藏与低温贮藏比较试验,分析罗汉果甜苷V合成积累与叶片光合、果实糖代谢、果实呼吸等因素的关系,探讨罗汉果甜苷V合成的生理规律,为培育高甜苷V含量新品种以及改进栽培、采收处理技术和提高药材品质提供理论依据和方法.

1 材料与方法

1.1 材料种植

1.1.1 高苷与低苷品种比较试验 以罗汉果甜苷V高含量品种‘农院B6’和低含量品种‘野红1号’
<http://xuebao.scau.edu.cn>

为材料,4月中旬,于广西南宁广西药用植物科研试验基地,按随机区组试验设计,重复3次,每个小区定植10株,田间栽培管理参照杭玲等^[16]方法,8月初的盛花期进行人工授粉挂牌.

1.1.2 遮阴试验 以‘农院B6’品种为材料,设置不遮阴(对照)和遮阴2种处理,定植、田间管理和授粉挂牌同1.1.1.遮阴处理于授粉后30(果实定型)~90 d(果实成熟)进行,在冠层叶片上方1.0 m处,采用黑色遮阳网搭建荫棚,对小区植株进行遮阴,用照度计反复测定控制透光率为70%.

1.1.3 气调和低温贮藏试验 分别以‘农院B6’和‘永青1号’品种为试验材料,每个品种随机种植15株,田间管理和授粉挂牌同1.1.1.

1.2 样品采集制备

1.2.1 高苷与低苷品种比较试验 果实发育到30、50、70和90 d时,于各处理的每一重复小区,分别随机采集二级蔓第3~5节位的果实5个,迅速回到室内取出果肉,混合作为一个样品,液氮速冻后储存于-80℃冰箱,用于测定罗汉果苷和糖含量.

1.2.2 遮阴试验 遮阴试验的样品采集制备方法同1.2.1.

1.2.3 气调贮藏试验 以空气贮藏为对照组,采集‘农院B6’品种40 d果实,放入聚乙烯塑料袋,充入钢瓶盛装的体积分数为15%的CO₂混合气体(其余气体为N₂),密封袋口,于常温下分别贮藏15和45 d,每个处理20个果实.

1.2.4 低温贮藏试验 采集‘永青1号’品种60和70 d果实,分别于5、10和15℃贮藏15 d,每个处理20个果实.

1.3 样品测定方法

1.3.1 光合与温度测定 在果实发育30、50、70和90 d时的上午9:30—11:00,于二级蔓的第4~6片叶间随机选取生长良好的3片叶,采用CI-310便携式光合仪(美国CID公司)测定叶片净光合速率,叶面积6 cm²,LED光源光合有效辐射1 100.00 μmol·m⁻²·s⁻¹.荫棚下温度采用温度计测定.

1.3.2 苷含量测定 精确称取1 g果肉冻干粉(过

40目筛),按照刘金磊等^[17]方法进行罗汉果苷II E、苷III、苷IV和苷V含量测定。

1.3.3 糖含量测定 称取0.1g果肉冻干粉,加入1mL体积分数为80%的乙醇,研磨成匀浆,倒入离心管中,再用4mL体积分数为80%的乙醇洗净研钵,倒入离心管中。将匀浆液80℃水浴保温10min,7500 r·min⁻¹离心10min,收集上清液于蒸发皿中。残留物再用5mL体积分数为80%乙醇重复提取2次,然后将装有3次上清混合液的蒸发皿85℃水浴蒸干,再加2mL蒸馏水溶解,经7500 r·min⁻¹离心10min后,上清液经过SEP-C18(Supelclean ENVI C18 SPE)萃取柱和0.22 μm微孔滤膜过滤,滤液用于可溶性糖、蔗糖、葡萄糖测定。用高氯酸法提取淀粉^[18],于提取可溶性糖后的残留物中加5mL体积分数为30%的高氯酸,混匀后,80℃水浴20min(用碘液测试淀粉,待溶液颜色不变蓝说明淀粉分解完全),7500 r·min⁻¹离心10min,取上清液,用于淀粉含量测定。可溶性糖、淀粉含量参照徐迎春等^[18]蒽酮比色法于620nm下测定,根据葡萄糖标准曲线计算出样品的可溶性糖、淀粉含量。蔗糖、葡萄糖含量用高效液相色谱-示差折光检测法测定。液相色谱仪:Waters测定系统;色谱柱:Waters Sugar-Pak-I(6.5mm×300mm);柱温:75℃;示差折光检测器;流动相:脱气后的重蒸水;流速0.5mL/min;进样量:20 μL。

1.3.4 酶活性测定 酶溶液参照Keller等^[19]方法制备,透析后用于α-淀粉酶(AM)、酸性转化酶(AI)、蔗糖磷酸合成酶(SPS)、蔗糖合成酶(SS)活性的测定。淀粉酶活性按照Merlo等^[20]方法测定,酸性转化酶活性参照Moron等^[21]方法测定,蔗糖合成酶(合成方向,SSS)和蔗糖磷酸合成酶活性参照Zhu等^[22]方法测定,蔗糖合成酶(分解方向,SSC)活性参照赵智中等^[23]方法测定,酶活性以单位鲜质量样品单位时间内催化生成产物的量表示。

$$\text{AM、AI 和 SSC 活性} = \frac{(\rho_1/M_1) \times V_1 \times V_2}{m_1 \times V_3 \times t_1},$$

$$\text{SPS 和 SSS 活性} = \frac{(\rho_2/M_2) \times V_1 \times V_2}{m_1 \times V_3 \times t_1},$$

其中, ρ_1 为根据标准曲线计算出的葡萄糖质量浓度(μg/mL); M_1 为葡萄糖的摩尔质量(g/mol); V_1 为反应终体积(mL); V_2 为酶提取液的总体积(mL); m_1 为样品鲜质量(g); V_3 为反应时所加酶液的体积(mL); t_1 为反应时间(h); ρ_2 为根据标准曲线算出的蔗糖质量浓度(μg/mL); M_2 为蔗糖的摩尔质量(g/mol)。

1.3.5 呼吸强度与果实硬度测定 果实硬度采用GY-3硬度计测定:每个处理抽取6个果实,于果实

中部对称测定3处,以探针穿破果皮为标准。呼吸强度采用滴定法测定:吸取0.4mol/L的NaOH溶液10mL于培养皿中,置于呼吸室内的隔板上,装入6个已称质量且气调贮藏15或45d的果实,静置1h后,取出培养皿,将碱液迅速转移入三角瓶中,加5mL饱和BaCl₂,滴加酚酞指示剂(10mg/mL)2滴,用0.1mol/L的草酸溶液进行滴定。以同样方法做空白滴定。呼吸强度以单位质量果实在单位时间内呼吸释放的CO₂的质量表示。

$$\text{呼吸强度} = \frac{[V_4 - V_5] \times c \times M_3}{m_2 \times t_2},$$

其中, V_4 为空白消耗草酸的体积(mL); V_5 为样品消耗草酸的体积(mL); c 为草酸浓度(mol/L); M_3 为CO₂的摩尔质量(g/mol); m_2 为样品鲜质量(kg); t_2 为呼吸测定时间(h)。

1.4 数据统计分析

数据平均值计算采用EXCEL2003软件,差异显著性统计分析采用SPSS 13.0软件。

2 结果与分析

2.1 高、低甜苷品种罗汉果的苷与糖积累动态

由表1可知发育30~90d的高甜苷品种‘农院B6’(苷V质量分数为4.25%)和低甜苷品种‘野红1号’(苷V质量分数为3.40%)罗汉果果实的苷、糖积累变化。30d果实主要含低糖苷苷II E、苷III,随着30~70d果实苷II E、苷III的迅速减少、消失,50~70d果实高糖苷苷IV、苷V开始积累,虽然苷IV很快减少、消失,但苷V迅速积累,且接近最高含量,70~90d果实则只可检测到苷V;淀粉含量急剧下降(降解),可溶性糖含量则急剧上升(积累),其中可溶性糖的主要组分蔗糖含量持续上升,葡萄糖含量则先升后降(70d后出现明显下降)。然而,除淀粉含量外,‘农院B6’与‘野红1号’品种间叶片净光合速率以及果实苷II E、苷III、苷IV、苷V、可溶性糖、蔗糖和葡萄糖含量存在显著差异。尤其,在甜苷V主要积累期(50~90d),‘农院B6’品种叶片净光合速率和果实可溶性糖、蔗糖、葡萄糖含量均显著或极显著高于‘野红1号’。这些显示,不同甜苷含量品种的苷、糖积累动态变化规律一致,光合效率高品种的葡萄糖含量高,甜苷V含量也相应较高。

2.2 遮阴对罗汉果苷与糖积累的影响

表2显示,遮阴处理50d时叶片净光合速率与对照无显著差异,但70~90d时则显著或极显著低于对照。遮阴处理与对照30~90d果实苷、糖积累动态变化规律一致,同高、低苷品种的积累动态变化规律。除淀粉含量外,遮阴处理各苷含量和可溶性糖、

蔗糖、葡萄糖含量与对照均存在明显差异,其中50 d 果实苜ⅡE、苜Ⅲ含量分别极显著和显著高于对照,苜Ⅳ、苜Ⅴ含量则均极显著低于对照,但70~90 d 果实苜Ⅴ含量均极显著高于对照,且增幅也大大高于对照;70~90 d 果实可溶性糖、蔗糖含量显著或极显

著低于对照,50~90 d 果实葡萄糖含量显著高于对照.这些说明,遮阴显著降低了罗汉果叶片净光合速率,延缓了果实苜ⅡE、苜Ⅲ消耗和苜Ⅳ、苜Ⅴ合成积累,降低了果实可溶性糖、蔗糖含量,但显著提高了果实葡萄糖含量和苜Ⅴ含量.

表1 不同品种罗汉果苜和糖含量变化¹⁾

Tab.1 Mogroside and saccharide content changes in different *Siraitia grosvenorii* varieties

| 果期/d | 品种 | 净光合速率/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) | w/% | | | |
|------|------|---|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | | | 苜ⅡE | 苜Ⅲ | 苜Ⅳ | 苜Ⅴ |
| 30 | 野红1号 | 3.18 ± 0.09 | 0.57 ± 0.08 | 3.49 ± 0.28 | — | — |
| | 农院B6 | 8.08 ± 0.16** | 0.52 ± 0.06 | 6.58 ± 0.09** | — | — |
| 50 | 野红1号 | 4.90 ± 0.51 | 0.29 ± 0.03 | 2.58 ± 0.10 | 0.36 ± 0.03 | 0.12 ± 0.06 |
| | 农院B6 | 9.61 ± 0.31** | 0.69 ± 0.13* | 3.25 ± 0.13* | 0.50 ± 0.04* | 0.24 ± 0.06 |
| 70 | 野红1号 | 4.65 ± 0.15 | — | — | — | 3.15 ± 0.14 |
| | 农院B6 | 7.57 ± 0.43** | — | — | — | 4.00 ± 0.17* |
| 90 | 野红1号 | 3.78 ± 0.14 | — | — | — | 3.40 ± 0.27 |
| | 农院B6 | 4.77 ± 0.15** | — | — | — | 4.25 ± 0.09* |

| 果期/d | 品种 | w/% | | | |
|------|------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | | 淀粉 | 可溶性糖 | 蔗糖 | 葡萄糖 |
| 30 | 野红1号 | 38.36 ± 5.01 | 12.19 ± 0.30 | 0.10 ± 0.01 | 10.22 ± 0.36 |
| | 农院B6 | 34.05 ± 3.07 | 11.91 ± 1.33 | 0.22 ± 0.06 | 9.98 ± 0.71 |
| 50 | 野红1号 | 10.30 ± 0.49 | 17.36 ± 0.78 | 1.33 ± 0.06 | 12.15 ± 0.40 |
| | 农院B6 | 9.57 ± 0.68 | 21.35 ± 1.13* | 2.28 ± 0.21* | 13.98 ± 0.31* |
| 70 | 野红1号 | 9.18 ± 0.70 | 44.82 ± 2.55 | 18.26 ± 0.64 | 14.37 ± 0.82 |
| | 农院B6 | 10.01 ± 0.89 | 54.70 ± 2.00* | 22.35 ± 1.20* | 16.94 ± 0.58* |
| 90 | 野红1号 | 3.92 ± 0.29 | 55.61 ± 1.68 | 29.80 ± 1.71 | 9.61 ± 1.71 |
| | 农院B6 | 3.87 ± 0.26 | 67.51 ± 1.63** | 36.70 ± 1.69* | 13.11 ± 1.69** |

1) “*”和“**”分别表示相同果期品种间差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)(独立样本 t 检验).

表2 遮阴下的罗汉果苜和糖含量变化¹⁾

Tab.2 Mogroside and saccharide content changes in shading

| 果期/d | 处理 | 净光合速率/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) | w/% | | | |
|------|----|---|---------------|--------------|---------------|---------------|
| | | | 苜ⅡE | 苜Ⅲ | 苜Ⅳ | 苜Ⅴ |
| 30 | 对照 | — | 0.71 ± 0.17 | 6.30 ± 0.93 | — | — |
| | 遮阴 | — | 0.66 ± 0.06 | 6.50 ± 0.22 | — | — |
| 50 | 对照 | 6.93 ± 0.87 | 0.14 ± 0.05 | 1.05 ± 0.25 | 1.11 ± 0.34 | 2.77 ± 0.34 |
| | 遮阴 | 7.33 ± 1.30 | 2.07 ± 0.20** | 2.38 ± 0.18* | 0.21 ± 0.06** | 0.15 ± 0.05** |
| 70 | 对照 | 5.64 ± 0.26 | — | — | — | 4.34 ± 0.12 |
| | 遮阴 | 4.32 ± 0.17* | — | — | — | 4.74 ± 0.11* |
| 90 | 对照 | 4.21 ± 0.22 | — | — | — | 4.83 ± 0.10 |
| | 遮阴 | 1.30 ± 0.10** | — | — | — | 5.79 ± 0.16** |

| 果期/d | 处理 | w/% | | | |
|------|----|--------------|---------------|----------------|---------------|
| | | 淀粉 | 可溶性糖 | 蔗糖 | 葡萄糖 |
| 30 | 对照 | 38.92 ± 0.32 | 17.26 ± 0.33 | 0.29 ± 0.08 | 12.51 ± 0.35 |
| | 遮阴 | 37.78 ± 3.13 | 15.11 ± 1.96 | 0.14 ± 0.01 | 13.23 ± 0.05 |
| 50 | 对照 | 13.89 ± 1.24 | 25.54 ± 1.68 | 1.66 ± 0.13 | 17.79 ± 0.18 |
| | 遮阴 | 11.66 ± 0.80 | 24.63 ± 0.78 | 1.26 ± 0.23 | 19.64 ± 0.53* |
| 70 | 对照 | 4.15 ± 0.35 | 52.52 ± 1.11 | 19.75 ± 1.28 | 19.15 ± 0.37 |
| | 遮阴 | 3.81 ± 0.38 | 42.99 ± 1.42* | 13.65 ± 0.71* | 22.54 ± 0.55* |
| 90 | 对照 | 3.10 ± 0.66 | 65.46 ± 5.42 | 31.06 ± 0.57 | 11.77 ± 0.46 |
| | 遮阴 | 3.52 ± 0.05 | 46.10 ± 3.78* | 19.44 ± 0.46** | 14.71 ± 0.42* |

1) “*”和“**”分别表示相同果期遮阴与对照间差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)(独立样本 t 检验).

表 3 显示,与对照相比,遮阴未改变果实发育 30~90 d 糖代谢酶活性动态变化规律,即 α -淀粉酶活性呈上升趋势,与蔗糖合成相关的酶蔗糖磷酸合成酶和蔗糖合成酶(合成方向)活性也均呈上升趋势,与蔗糖分解相关的酶酸性转化酶和蔗糖合成酶(分解方向)活性则呈下降趋势.但除 α -淀粉酶和蔗糖合成酶(合成方向)活性外,遮阴处理的蔗糖磷酸合成酶、酸性转化酶和蔗糖合成酶(分解方向)活性则均与对照存在显著差异,其中 70~90 d 果实

的蔗糖磷酸合成酶活性显著低于对照,50~90 d 果实的酸性转化酶和蔗糖合成酶(分解方向)活性显著或极显著高于对照.这些说明,30~90 d 时,罗汉果将增强 α -淀粉酶活性使淀粉分解消耗,增强蔗糖磷酸合成酶和蔗糖合成酶(合成方向)活性,降低酸性转化酶和蔗糖合成酶(分解方向)活性,促进蔗糖合成积累,遮阴则会阻碍蔗糖磷酸合成酶活性增强和酸性转化酶、蔗糖合成酶(分解方向)活性降低,从而减少蔗糖合成积累.

表 3 遮阴下的罗汉果糖代谢酶活性变化¹⁾

Tab. 3 The changes of saccharide metabolizing enzymatic activities in shading

| 果期/d | 处理 | 酶活性/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ | | | | |
|------|----|--|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | α -淀粉酶 | 蔗糖磷酸合成酶 | 蔗糖合成酶 (合成方向) | 酸性转化酶 | 蔗糖合成酶 (分解方向) |
| 30 | 对照 | 11.13 ± 0.48 | 0.38 ± 0.03 | 0.97 ± 0.16 | 53.22 ± 1.67 | 44.98 ± 1.22 |
| | 遮阴 | 11.24 ± 0.62 | 0.06 ± 0.01 | 0.48 ± 0.19 | 59.00 ± 2.06 | 47.93 ± 2.53 |
| 50 | 对照 | 24.75 ± 1.74 | 2.29 ± 0.51 | 2.81 ± 0.07 | 32.16 ± 3.23 | 39.37 ± 2.36 |
| | 遮阴 | 23.98 ± 2.27 | 1.10 ± 0.41 | 1.84 ± 0.48 | 45.27 ± 2.72** | 46.62 ± 2.43** |
| 70 | 对照 | 29.67 ± 1.96 | 7.13 ± 0.12 | 9.71 ± 0.73 | 30.91 ± 1.82 | 32.99 ± 2.73 |
| | 遮阴 | 25.74 ± 0.31 | 6.21 ± 0.61* | 7.77 ± 0.14 | 35.26 ± 1.12* | 39.48 ± 1.87* |
| 90 | 对照 | 27.94 ± 2.55 | 6.44 ± 0.25 | 10.84 ± 0.62 | 26.77 ± 1.08 | 30.02 ± 1.77 |
| | 遮阴 | 23.06 ± 2.10 | 5.68 ± 0.73* | 7.52 ± 0.81 | 34.06 ± 2.21* | 37.56 ± 2.00* |

1) “*”和“**”分别表示相同果期遮阴与对照间差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)(独立样本 t 检验).

2.3 呼吸对罗汉果苷与糖积累的影响

表 4 显示,CO₂ 贮藏 15 d 果实在空气中呼吸强度与对照相近,CO₂ 贮藏 45 d 果实在空气中呼吸强度则明显高于对照,在贮藏 15~45 d 期间,对照果实呼吸强度大幅降低,CO₂ 贮藏果实则大幅升高;CO₂ 贮藏 15 d 果实的苷 II、苷 III、苷 IV 含量均高于对照,45 d 时 CO₂ 贮藏与对照果实的苷 II、苷 III 和苷 IV 含量均减少、消失;CO₂ 贮藏果实的苷 V 和可溶性糖、蔗糖、葡萄糖含量均低于同期的对照,在贮藏 15~45

d 期间,CO₂ 贮藏与对照果实的苷 V、蔗糖含量均升高,可溶性糖、葡萄糖含量均降低,且对照果实苷 V 含量增幅大,葡萄糖含量降幅也大,CO₂ 贮藏果实苷 V 含量增幅小,葡萄糖含量降幅也小.这些表明,减少果实呼吸会促进葡萄糖积累,抑制苷 V 合成积累,但未改变各处理果实随苷 II、苷 III 迅速减少、消失和苷 V 急剧合成积累而葡萄糖含量明显下降的变化规律,葡萄糖含量减少幅度随苷 V 含量升高幅度增大而增大,其减少非呼吸消耗所致.

表 4 气调贮藏下的罗汉果苷和糖含量变化

Tab. 4 Mogroside and saccharide content changes in gas storing conditions

| $t_{\text{贮藏}}/d$ | 处理 | 呼吸强度/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) | $w/\%$ | | | | | | |
|-------------------|--------------------|---|--------|-------|------|------|-------|------|------|
| | | | 苷 II E | 苷 III | 苷 IV | 苷 V | 可溶性糖 | 蔗糖 | 葡萄糖 |
| 15 | 对照 | 21.08 | 0.20 | 0.82 | 0.90 | 4.15 | 10.36 | 0.66 | 3.28 |
| | CO ₂ 贮藏 | 20.29 | 1.16 | 1.15 | 1.32 | 3.59 | 7.66 | 0.26 | 2.53 |
| 45 | 对照 | 8.50 | — | — | — | 7.14 | 10.10 | 0.90 | 1.84 |
| | CO ₂ 贮藏 | 32.55 | — | — | — | 3.66 | 7.00 | 0.59 | 1.96 |

2.4 温度对罗汉果苷与糖积累的影响

表 5 显示,随着贮藏温度升高,60 和 70 d 离体果实硬度和葡萄糖含量均降低,苷 V 和蔗糖、可溶性

糖含量均升高,且 70 d 果实苷 V 含量增加幅度大于 60 d 果实,葡萄糖含量降低幅度也大于 60 d 果实;所有处理苷 II E、苷 III、苷 IV 都未检出.这些表明,低温

贮藏下,升高温度明显促进果实后熟和甜苷 V 合成积累,使葡萄糖因消耗而减少且加剧,葡萄糖减少幅度随苷 V 含量升高幅度增大而增大.相反,随着贮藏

温度降低,则将延缓果实后熟和抑制甜苷 V 合成积累,促使葡萄糖积累增加.

表5 不同低温贮藏下的罗汉果苷和糖含量变化

Tab.5 Mogroside and saccharide content changes in different low temperature storing conditions

| 果期/d | $\theta_{\text{贮藏}}/^\circ\text{C}$ | 果硬度/ ($\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$) | w/% | | | | | | |
|------|-------------------------------------|--|--------|-------|------|------|-------|-------|------|
| | | | 苷 II E | 苷 III | 苷 IV | 苷 V | 可溶性糖 | 蔗糖 | 葡萄糖 |
| 60 | 5 | 3.47 | — | — | — | 2.85 | 17.11 | 9.00 | 2.63 |
| | 10 | 2.41 | — | — | — | 3.39 | 22.55 | 14.11 | 2.61 |
| | 15 | 2.04 | — | — | — | 3.41 | 23.59 | 14.27 | 2.48 |
| 70 | 5 | 1.91 | — | — | — | 4.55 | 17.28 | 9.15 | 2.45 |
| | 10 | 1.44 | — | — | — | 5.71 | 17.97 | 10.03 | 1.83 |
| | 15 | 1.10 | — | — | — | 6.37 | 25.87 | 16.03 | 1.38 |

3 讨论

李典鹏等^[14] TLC 检测 5~85 d 罗汉果果实发现,苷 II E、苷 III、苷 IV 和苷 V 随着果实发育依次出现.刘金磊等^[17] HPLC 法进一步研究表明,5 d 果实即可检测到苷 II E、苷 III,50 d 前果实仅检测到苷 II E、苷 III,60 d 后果实则仅检测到苷 V,苷 II E、苷 III、苷 V 依次主要存在于 5~30、30~50、60~85 d 果实.本研究中不同品种和不同遮阴条件下,果实中罗汉果苷、糖积累规律一致,即 30 d 果实主要含低糖苷 II E、苷 III,随着 30 d~70 d 果实苷 II E、苷 III 的迅速减少、消失,50~70 d 果实高糖苷 IV、苷 V 开始积累出现,虽然苷 IV 很快减少、消失,但苷 V 迅速积累接近最高含量,70~90 d 果实则只可检测到苷 V,与二者研究结果类似;30~90 d 果实的淀粉逐渐分解,转化为葡萄糖、蔗糖等可溶性糖,葡萄糖含量先升后降(70 d 后含量出现明显下降),气调和低温贮藏试验进一步表明葡萄糖含量下降不是呼吸消耗所致,且其下降幅度随苷 V 合成积累量增加幅度增大而增大.糖类可作为重要信号调节次生代谢产物的生成^[24].因此,罗汉果甜苷 V 生物合成与低糖苷、葡萄糖代谢密切相关,其可能是在葡萄糖积累信号诱导下,以苦味低糖苷 II E 为前体物,依次与葡萄糖结合,经由苷 III、苷 IV 等转化而成.

光合作用的直接产物是葡萄糖.本研究中高光合效率品种‘农院 B6’果实的葡萄糖含量高,甜苷 V 含量也高,但是遮阴条件降低了叶片净光合速率,果实葡萄糖、甜苷 V 含量却升高.气调贮藏减少果实呼吸促进葡萄糖积累,却抑制苷 V 合成积累.这与增强叶片光合效率和减少果实呼吸,将增加果实葡萄糖含量,从而提高甜苷 V 含量的预期结果相反,说明

调控生育后期叶片光合速率和果实呼吸增加葡萄糖量不能促进其合成积累.虽然遮阴果实甜苷 V 含量升高,葡萄糖含量也升高,但随着果实发育,不同品种和遮阴果实,蔗糖含量均持续急剧上升,且成熟时(90 d)葡萄糖含量仍达 10% 左右,减少、消失的是苷 II E、苷 III 等低糖苷,故认为葡萄糖量对甜苷 V 合成需求是充足的,无需过度消耗储存的蔗糖来加以补充,供应不足的可能是低糖苷.遮阴使甜苷 V 含量增加的原因可能是罗汉果喜阴凉环境,露天栽培气温太热,遮阴降低了生境温度,植株处于最佳生长温度 24~26 $^\circ\text{C}$,增强了甜苷 V 合成关键酶活性所致.果实低温贮藏降低酶活性,甜苷 V 合成则明显受到抑制.再有,Tang 等^[25]报道,50~70 d 甜苷 V 急剧积累期,果实中调控罗汉果苷元前体合成的鲨烯环氧酶(SQE)、葫芦二烯醇合酶(CS)和苷元糖基化的葡萄糖基转移酶(UDPG)基因表达水平大幅上调或下调.因此,甜苷 V 生物合成可能主要受到低糖苷量不足和限速酶活性影响.高光合效率品种果实甜苷 V 含量高,可能是其低糖苷合成和相关葡萄糖基转移酶活性也较高所致.

综上所述,罗汉果甜苷 V 由低糖苷与葡萄糖逐渐结合转化而成,调控生育后期叶片光合和果实呼吸增加葡萄糖量不能促进其合成积累,其合成积累主要限制因子可能是低糖苷量和合成关键酶活性.选择高光合效率品种,于凉爽生态区进行栽培或利用基因工程技术调控 SQE、CS、UDPG 等关键酶基因过表达,促进低糖苷合成及其与葡萄糖结合,将有利于改善罗汉果甜苷品质.

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第 1 部[M].

- 北京:中国医药科技出版社,2010:197.
- [2] 戚向阳,陈维军,张俐勤,等.罗汉果皂甙清除自由基及抗脂质过氧化作用的研究[J].中国农业科学,2006,39(2):382-388.
- [3] TAKASAKI M, KONOSHIMA T, MURATA Y, et al. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners cucurbitane glycosides from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(1): 37-42.
- [4] 陈维军,宋方方,刘烈刚,等.罗汉果皂甙提取物对1型糖尿病小鼠细胞免疫功能的影响[J].营养学报,2006,28(3):221-225.
- [5] 戚向阳,陈维军,宋云飞,等.罗汉果对糖尿病小鼠的降血糖作用[J].食品科学,2003,24(12):124-127.
- [6] 刘婷,王旭华,李春,等.罗汉果皂苷V的镇咳、祛痰及解痉挛作用研究[J].中国药学杂志,2007,42(20):1534-1536.
- [7] SUZUKI Y A, MURATA Y, INUI H, et al. Triterpene glycosides of *Siraitia grosvenori* inhibit rat intestinal maltase and suppress the rise in blood glucose level after a single oral administration of maltose in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(8), 2941-2946.
- [8] JIN Meilan, MUGURUMA M, MOTO M, et al. Thirteen-week repeated dose toxicity of *Siraitia grosvenori* extract in Wistar Hannover (GALAS) rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(7):1231-1237.
- [9] XU Qing, SU Xiaojian, LIANG Ronggan, et al. Sub-chronic 90-day oral (gavage) toxicity study of a Luo Han Guo mogroside extract in dogs [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12): 2106-2109.
- [10] RYOJI K, NIE R L, KENJI N, et al. Sweet cucurbitane-glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-ziluo-hanguo): A Chinese folk medicine [J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(12): 3347.
- [11] KINGHORN A D, KANEDA N, BAEK N I, et al. Non-cariogenic intense natural sweeteners [J]. *Med Res Rev*, 1998, 18(5): 347-360.
- [12] 苏小建,刘国雄,聂晓,等.罗汉果甜甙V在各部位的含量分布[J].食品科技,2007(5):76-78.
- [13] 李峰,李典鹏,蒋水元,等.罗汉果栽培与开发利用[M].北京:中国林业出版社,2003:113.
- [14] 李典鹏,陈月圆,潘争红,等.不同生长日龄罗汉果甙类成分变化研究[J].广西植物,2004,24(6):546-549.
- [15] 赵智中.柑橘果实糖积累的生理基础研究[D].杭州:浙江大学,2001.
- [16] 杭玲,苏国秀,夏阳升,等.罗汉果组培苗栽培技术[J].广西农业科学,2003(6):70-72.
- [17] 刘金磊,李典鹏,黄永林,等.HPLC法测定不同生长期罗汉果甙ⅡE、Ⅲ、Ⅴ的含量[J].广西植物,2007,27(4):665-668.
- [18] 徐迎春,李绍华,柴成林,等.水分胁迫期间及胁迫解除后苹果树源叶碳同化物代谢规律的研究[J].果树学报,2001,18(1):1-6.
- [19] KELLER F, LUDLOW M M. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) [J]. *J Exp Bot*, 1993, 44(8):1351-1359.
- [20] MERLO L, PASSER C. Changes in carbohydrate and enzyme levels during development of leaves of *Prunus persica*, a sorbitol synthesizing species [J]. *Plant Physiol*, 1991, 83(4): 621-626.
- [21] MORON D, SCHAFF A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and acid invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(2): 623-627.
- [22] ZHU Y J, EWALD K, PAUL H M. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 609-616.
- [23] 赵智中,张上隆,徐昌杰,等.蔗糖代谢相关酶在温州蜜柑果实糖积累中的作用[J].园艺学报,2001,28(2):112-118.
- [24] HUMME M, RAHMANI F, SMEEKENS S, et al. Sucrose-mediated translational control [J]. *Ann Bot*, 2009, 104(1): 1-7.
- [25] TANG Qi, MA Xiaojun, MO Changming, et al. An efficient approach to finding *Siraitia grosvenorii* triterpene biosynthetic genes by RNA-seq and digital gene expression analysis [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 343.

【责任编辑 李晓卉】