

真菌花色素苷酶研究进展*

张昭其¹ 庞学群²

(华南农业大学园艺系¹ 华南农业大学生物技术学院² 广州 510642)

摘要:花色素苷酶是一类能催化花色素苷水解、褪色的糖苷酶,目前仅发现真菌有该酶的存在。本文综述了真菌花色素苷酶在食品工业上的应用,花色素苷酶的来源、种类、催化花色素苷降解的模式,花色素苷酶活力测定方法、分离纯化方法及酶学性质。

关键词:花色素苷酶,真菌,综述

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0086-04

花色素苷 (Anthocyanin) 是一类水溶性黄酮类植物色素,它存在于植物的液泡,赋予水果、蔬菜、花卉红色、粉红、蓝色、紫色等五彩缤纷的颜色,也为现代食品工业提供了诱人的天然食用色素。花色素苷是一种糖苷,其非糖部分称为花色素 (Anthocyanidin)。花色素苷 β -糖苷键的水解产物为游离的花色素和糖,花色素不稳定,进而转化为无色化合物而导致花色素苷褪色,浓度较高的酸或碱在加热条件下可催化花色素苷 β -糖苷键的水解^[1]。花色素苷 β -糖苷键的酶促水解在 50 年代已有报道, Huang^[2] 从曲霉提取得到的粗酶制剂具有较高的使花色素苷褪色的活性,并且还发现有糖的释放,说明这些粗酶制剂能催化花色素苷 β -糖苷键的水解。后来人们将这些具有较高水解花色素苷 β -糖苷键活性的酶称为花色素苷- β -糖苷酶 (Anthocyanin- β -Glycosidase), 简称花色素苷酶 (Anthocyanase)^[3]。

1 花色素苷酶在食品工业上的应用

在许多食品加工业中,人们希望能保持加工品中诱人的天然色素-花色素苷的稳定性,然而在某些含花色素苷果品的加工中,却要考虑如何去除或部分去除过多的色素。例如,在一些白葡萄品种难以种植的地区,用红葡萄代替白葡萄以生产白葡萄酒,就要考虑去除果酒中的花色素苷,既要消除果酒颜色,又要保持红葡萄酒的风味^[2,4];果酱和果冻往往是浓缩产品,由于过高的花色素苷含量常导致颜色过深和失去原先诱人的色泽,也有必要去除部分花色素苷^[5];某些果汁或果酒由于花色素苷含量过高而导致在贮藏过程中出现沉淀^[2,5];有时过多的花色素苷沉积在酒瓶的内壁会引起消费者的疑虑而降低其价格等等^[5]。在这类问题中,都涉及到去除花色素苷的问题。过去,通常是通过加热沉淀的方法去除过多的花色素苷,即将果汁或果酒加热到 100℃,使花色素苷沉淀。但加热容易破坏果汁、果酒的品质和风味,受到很大限制,而使用花色素苷酶则可在温和、可控的条件下去除过多的花色素苷,受到人们的欢迎^[8]。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39900102)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund. (No. 39900102)

广东省自然科学基金资助项目 (No. 980165)

收稿日期: 2000-03-07, 修回日期: 2001-01-30

2 花色素苷酶的种类与来源

从目前报道的文献来看,花色素苷酶仅存在于真菌中,特别是一些病原真菌中。一些能感染植物组织的病原真菌存在花色素苷酶^[8],如曲霉属(*Aspergillus niger*)就含有极高的使花色素苷褪色的酶活性^[9];能感染含花色素苷果实的病原真菌也发现具有较高的花色素苷酶活性,如草莓灰霉病的病原菌(*Botrytis cinerea*)含较高的花色素苷酶活性^[10]。Sanchez-Torres 等^[4]发现从念珠菌属的 *Candida molischiana* 菌株提纯的 β -葡萄糖苷酶具有很高的使红葡萄酒褪色的活性,将编码该 β -葡萄糖苷酶(BGLN)的 *bglN* 基因转移到酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中,利用重组的酵母能酿制出色度很低的葡萄酒。酿酒酵母的具有降解花色素苷活性的 β -葡萄糖苷酶大部分定位于细胞壁,只有小部分存在于胞外和胞内。

3 花色素苷酶引起花色素苷褪色的模式

花色素苷酶催化花色素苷 β -糖苷键水解生成花色素和糖,花色素进而自发地转变为无色的衍生物,这是 50 年代 Huang^[2]提出的花色素苷酶引起花色素苷褪色的模式。1994 年 Piffaut 等^[11]深入研究了花色素酶催化锦葵素-3, 5-二葡萄糖苷降解产物的吸收光谱,发现锦葵素苷在花色素苷酶的作用下形成的锦葵素迅速转变为醇式或假碱式(Carbinol or pseudobase)花色素,进而部分开环形成查尔酮(Chalcone),查尔酮进一步开环分解为无色的丁香酸(Syringic acid)和 2, 4, 6-三羟基苯甲醛(2, 4, 6-Trihydroxy-benzaldehyde),进一步解释了花色素苷在花色素苷酶作用下褪色模式。

4 花色素苷酶的活性测定

根据花色素苷酶使花色素苷褪色,引起对 510nm 吸收的下降来测定。具体方法如下:参照 Martino 等^[12]的方法,测定活性的反应系统中包含 1mL pH3.5 0.1mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液、2mL 酶液和 1mL 0.15% (w/v) 不含多酚类物质的溶于 0.001mol/L HCl 花色素苷的溶液,对照以沸水浴 10min 变性的酶液代替酶液,将反应体系在 25℃ 下放置 30min,样品与对照都加入 2mL 0.1mol/L 的 HCl 终止反应,然后测定 510nm 的光吸收。

根据花色素苷酶是 β -糖苷酶,以对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPC)为底物,以每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯为 1 个活力单位,对硝基苯的释放可通过测定 400nm 吸收的增加来确定^[13]。

5 花色素苷酶的分离与纯化

参照冈田茂孝等^[14]和 Sanchez-Torres 等^[4]的方法,具体如下:

菌体培养液的制备:将曲霉属菌株(*Aspergillus niger*)接种到基本培养基中,于 30℃ 振荡培养 5d,离心(4000r/min 5min)除去菌体,于上清培养液中加入 10mg/L 的活性炭脱色,过滤。

硫酸铵分部与 Rivanol 沉淀经 30% ~ 70% 饱和硫酸铵溶液分部,沉淀溶于蒸馏水中,并在蒸馏水中透析,透析后用 10% (体积比)乙酸将 pH 调至 4.0,加入 1/5 体积 4% 的 Rivanol (乳酸-6, 9, -二氨基-7-乙氧基吡啶),静置片刻,离心除去沉淀。上清液通过再生好的 ICR-50 阳离子树脂交换柱以除去残留的利凡诺,收集流出液。

DEAE-Sephadex 柱层析:流出液上 DEAE-Sephadex 柱(1cm × 20cm, 已用 pH5.0 的 0.005mol/L 乙酸缓冲液平衡)。以 NaCl 溶液浓度梯度洗脱(0-0.5mol/L NaCl 溶于 0.05mol/L 乙酸缓冲液中)收集活性部分。

热处理与 Sephadex G-100 凝胶过滤:将上述收集液对 pH7.0 的 0.01mol/L 磷酸缓冲

液透析,然后于90℃下保温10min,于30℃保温16h,离心(10,000r/min,10min)除去沉淀。上清液经真空浓缩后,上预先用0.01mol/L、pH7.0的磷酸缓冲液平衡好的SephadexG-100柱(1.5cm×24cm)。收集活性部分,浓缩备用。

6 花色素苷酶的专一性

1995年Huang^[2]发现从黑曲霉(*A. niger*)的一菌株提取得到的花色素苷酶对黑莓果汁的褪色比草莓、葡萄果汁的快得多,认为这是由于不同水果果汁中含有的花色素的苷种类不同的缘故。Wrolstad等^[6]也发现不同酶制剂对不同花色素苷的活力相差很远。Wightman^[15]等认为,Boysenberry因含40%的矢车菊素-3-槐糖苷、35%矢车菊素-3-葡萄糖苷和20%矢车菊素-3-葡萄糖芸香二糖苷,其果汁是一种较好的用于鉴别花色素苷酶对不同花色素苷专一性的底物。借助高效液相色谱,他发现,一种酶制剂对果汁中矢车菊素-3-槐糖苷有较强的水解作用,而对矢车菊素-3-葡萄糖苷几乎无活力,另一种酶制剂对矢车菊素-3-葡萄糖苷有较强的活力,而对其它花色素几乎无活力。可见,不同花色素苷中因糖基的不同而形成不同的糖苷键,从而对花色素苷酶表现不同的亲和力。目前的研究还发现,花色素苷酶不仅对糖苷键糖基一端有专一性,花色素一端也有一定的专一性, Sanchez-Torres等^[4]比较了从重组酿酒酵母中提纯的花色素苷酶对不同葡萄糖苷底物的活性,结果发现该酶对水杨醇 β -(1,4)-葡萄糖(水杨苷)、对苯二酚 β -(1,4)-葡萄糖苷(杨梅苷)的活性远比对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)和葡萄果汁(主要色素为锦葵素-3-葡萄糖苷)的活性低。花色素苷酶的底物专一性,特别是对不同种类的花色素苷的花色素的专一性还有待进一步研究。

7 花色素苷酶的酶学性质

花色素- β -糖苷酶是一类能水解花色素苷 β -糖苷键,能使花色素苷褪色的糖苷酶,暂称为“花色素苷酶”,从目前报道的文献来看,国际生化协会酶命名委员会仍未对其进行系统命名,对花色素苷酶酶学性质的研究,多数停留在初步纯化的酶或商业用的酶制剂水平上,因此,不同研究者所得的动力学参数有一定的差异,例如, Piffaut等^[11]以锦葵素-3,5-二葡萄糖苷为底物,在pH3和25℃下测定酶制 Pectinol DL的 K_m 值为0.72mmol/L; Blom等^[8]分别以矢车菊素-3-葡萄糖苷和天竺葵素-3-葡萄糖苷为底物,在pH4、30℃条件下测定从同一菌属中提取的花色素苷酶的 K_m 值分别为0.12mmol/L和0.2mmol/L。 Sanchez-Torres等^[4]对重组酿酒酵母的花色素苷酶进行纯化和动力学研究,发现在SDS-PAGE上只显示一条带,分子量为94KD(与从其它酶菌提取的 β -葡萄糖苷酶分子量相近^[13]),其最适pH为4.5,最适温度为60℃,以对硝基苯基- β -吡喃葡萄糖苷(pNPG)为底物, K_m 值为0.25mmol/L, V_m 值为25.89nkat/mg,20%的乙醇可作为激活剂,葡萄糖是竞争性抑制剂,其 K_i 值为0.63mmol/L,EDTA、 Hg^{2+} 对酶活力也有较大的抑制作用,0.5mol/L的果糖和 150×10^{-6} 的 SO_2 对其活性无显著影响。

8 结束语

由于花色素苷酶在食品加工业中的特殊作用,对于真菌花色素苷酶的研究越来越受到人们的重视。人们正在研究通过转基因技术生产高纯度商品花色素苷酶产品,但是否存在特异的或专一性较高的花色素苷酶,还是花色素苷酶就是各种基团专一的 β -糖苷酶的总称,尚未能确定。目前对花色素苷酶的研究主要集中真菌和食品工业上,对植物组织中是否存在花色素苷酶及其在植物花色素苷降解和褪色中的作用,以及由此引起的植物组织褐变,目前研究甚少。

参考文献

- [1] Harborne J B. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall Press, 1984, 61 ~ 69.
- [2] Huang H T. J. Agr. food chem. 1995, 3 (2): 141 ~ 146.
- [3] Huang H T. J Am Chem Soc. 1956, 78: 2390 ~ 2393.
- [4] Sanchez-Torres P, Gonzalez-Candelas L, Ramon D. J Agric Food chem. 1998, 46: 354 ~ 360.
- [5] Yang H Y, Steel W F. Food Tech. 1958, 10: 517 ~ 519.
- [6] Wrolstad R E, Wightman J D, Durst R W. Food Tech. 1994, 11: 90 ~ 98.
- [7] Huang H T. Nature, 1956, 177: 39.
- [8.] Blom H. Food Chem, 1983, 12: 197 ~ 204.
- [9] Unno T, Ide K, Yazaki T, et al.. Biosci. Biotech. Biochem. 1993, 57 (12): 2172 ~ 2173
- [10] Rwabahizi S. Wrolstad R E. J Food Sci. 1988, 53: 857 ~ 861, 872.
- [11] Piffaut B, Kader F, Girardin M, et al. Food Chem. 1994, 50: 115 ~ 120.
- [12] Martino A, Pefferi P G, Spagna G. Chem Tech Biotchnol. 1994, 61: 255 ~ 260.
- [13] Freer S N. Arch Biochem Biophys. 1985, 243 (2): 12: 512 ~ 522.
- [14] 冈田茂孝. 化学の工業. 1968, 42: 303 ~ 308.
- [15] Wightman J D, Wrolstad R E. J Food Sci. 1996, 61 (3): 544 ~ 547, 552.