

花色苷的酶降解

赵昶灵¹, 李云¹, 陈中坚², 李俊¹, 刘福翠¹

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 文山县苗乡三七实业有限公司, 云南 文山 663000)

摘要:综述了降解花色苷的酶类及其降解机理的研究进展。降解花色苷的酶有花色苷酶、多酚氧化酶、过氧化物酶和果胶酶。花色苷酶和果胶酶均能水解花色苷糖苷键产生花色苷和糖, 花色苷很不稳定, 因此吡喃环极易开环可自发转换成无色衍生物。花色苷不能直接作为 PPO 或 POD 的底物; PPO 和 POD 氧化、降解花色苷须依赖具邻二酚结构的其他酚类的存在, 经连续型的偶联氧化机制实现, PPO 和 POD 分别在氧和 H₂O₂ 存在时将其他酚类氧化为邻位醌类, 邻位醌将花色苷氧化为花色苷邻位醌、自身被还原为酚, 邻位醌与花色苷醌间或花色苷醌相互间发生非酶促自发聚合、形成黑色素。花色苷的体内降解可能是若干种酶的同时催化下完成的, 这为花色苷体内降解机理的研究和人工调控酶活性以稳定或降解花色苷提供参考。

关键词:花色苷; 酶降解; 研究进展

中图分类号: Q946.836

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)06-0576-09

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.016

Enzymatic Degradation of Anthocyanins

ZHAO Chang-ling¹, LI Yun¹, CHEN Zhong-jian², LI Jun¹, LIU Fu-cui¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Miao Xiang Sanqi Industrial Corporation Ltd. of Wenshan County, Wenshan 663000, China)

Abstract: The research advances in the enzymes degrading anthocyanins and their degradation mechanisms were summarized. The enzymes degrading anthocyanins include anthocyanase, polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and pectinases. Anthocyanase and pectinase both hydrolyze the glucosidic bond of anthocyanins to produce anthocyanidins and saccharides, anthocyanidins are highly unstable and spontaneously change into colorless derivatives due to the easy opening of their pyrylium rings. Anthocyanins can not directly act as PPO or POD substrates. The oxidation and degradation of anthocyanins catalyzed by PPO and POD must rely on the presence of other phenolics holding *o*-diphenol structure, and are realized by a coupled oxidation mechanism of consecutive-type. In the presence of O₂ and H₂O₂, respectively, PPO and POD oxidize other phenolics to *o*-quinones which oxidize anthocyanins to anthocyanin *o*-quinones and are reduced back to the native phenolics. Non-enzymatic self-associations happen between the *o*-quinones and the anthocyanin *o*-quinones or among the anthocyanin *o*-quinones, forming melanins. Therefore, the anthocyanins degradation *in vivo* may be realized by the simultaneous catalyzing of several enzymes, which could provide a reference for the exploration of the *in vivo* degradation mechanisms of anthocyanins and the artificial regulations of the enzyme activities to stabilize or degrade the anthocyanins.

Key words: Anthocyanins; Enzymatic degradation; Research advance

花色苷 (Anthocyanins) 是高等植物次生代谢 (Secondary metabolism) 产生的黄酮类 (Flavonoids) 化

合物之一^[1], 赋予植物器官红、紫、蓝等颜色^[2]。花色苷具有抗氧化、抗衰老、抗癌和提高视力等的强

收稿日期: 2011-03-09 接受日期: 2011-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060045)资助

作者简介: 赵昶灵(1969~), 男, 汉族, 四川都江堰市人, 理学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物生理生化和分子生物学的教学与研究, email: zhaophlblossom7@163.com

烈活性^[3]。近年,因花色苷应用潜力巨大、医疗效应卓著和在食品工业中作为人工合成色素的代用品,其稳定性已成研究的焦点^[4]。

花色苷的稳定性差是因为其结构特征和苷元(Aglycone)的高活性。花色苷由苷元[即花色素(Anthocyanidin)]和糖(Saccharide)经 β -糖苷键(Glucosidic bond)形成;花色素是2-苯基苯并吡喃阳离子(2-phenylbenzopyrylium cation)或黄烺盐(Flavylium)的多羟基(Hydroxy)和甲氧基(Methoxyl)衍生物;花色素在自然界中是以糖基化(Glycosylated)的形式存在,即成为苷,大大加强了其在水溶液中的稳定性,但花色苷糖苷键极易被水解^[5],花色素的2-苯基苯并吡喃核因处于缺电子态而高度活跃、易受亲核攻击,故花色苷成品总是快速发生趋于降解的结构变化^[6],其稳定性强烈地受到多种因素影响,如自身结构和浓度;环境pH、温和光;酶、氧和金属离子等^[7]。

花色苷的体外(*in vitro*)、体内(*in vivo*)降解分别受不同因素影响。花色苷的体外降解受理化因子制约^[7-9],而其体内降解迄今了解甚少。植物为了利于生存,在发育或响应环境变化时,花色苷的体内降解被调控^[10]。有研究表明, β -糖苷酶(β -Glucosidase)、多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)等可能负责花色苷的体内降解^[10-11]。

但是,降解花色苷的酶类及其机理至今没有进行系统的总结。本文综述了降解花色苷的酶类及其降解机理的研究进展,以期为花色苷体内降解机理的研究提供参考,也为通过人工调控酶活性而提高花色苷稳定性或促进花色苷降解的研究提供科学依据。

1 降解花色苷的酶类

1.1 花色苷酶

花色苷酶(Anthocyanase),即花色素苷酶,是催化花色苷 β -糖苷键断裂的 β -糖苷酶,也称花色苷 β -糖苷酶(Anthocyanin β -glucosidase)^[12-13];目前,该酶仍无系统命名,对其研究多停留在初步纯化或商用酶制剂水平^[13]。

花色苷酶存在于真菌和高等植物中。真菌,尤其是能感染含花色苷植物组织的病原真菌,含有较高活性的花色苷酶^[13-14],如黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[15]和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)^[16];采后荔

枝(*Litchi chinensis*)果皮中也有高活性花色苷酶^[17-18]。花色苷酶的最适pH多为3.5,最适温度多为50℃^[18-19]。

最初报道真菌花色苷酶能催化花色苷的降解,后来在高等植物中也有类似报道。1955年,Huang报道黑曲霉粗酶制剂具较高的使花色苷褪色的活性,并据褪色过程有糖释放推测该酶制剂能催化花色苷 β -糖苷键水解^[20];1956年,Huang将其命名为花色苷 β -糖苷酶,简称花色苷酶^[21];此后,在黑曲霉^[15]、灰葡萄孢菌^[16]等真菌和重组酿酒酵母^[19]中也证实了花色苷酶能催化花色苷水解而使其褪色;后来,Zhang等报道荔枝果皮花色苷酶能催化其花色苷 β -糖苷键断裂,这可能与果皮褐变(Browning)有关^[17-18]。

花色苷酶降解花色苷的机理涉及2方面:(1)花色苷酶的底物专一性(Substrate specificity),既体现在对花色苷糖苷键又体现在对花色苷的选择性上。1996年,Wightman等证明花色苷酶的作用是水解花色苷糖苷键^[22];2001年,Kader等证实花色苷酶能打断花色苷糖苷键,导致不稳定苷元的快速降解^[12];现有报道,多数花色苷酶是水解O-糖苷键,部分水解N-糖苷键或S-糖苷键^[23];不同花色苷因不同糖基形成不同糖苷键而对花色苷酶的亲和力不同^[13],但花色苷酶水解不同单、双糖苷键而使花色苷去糖基化的速率无很大差别^[24]。同一花色苷酶对不同花色苷有不同亲和力,如工业用花色苷酶“Pectinol DL”对锦葵色素3-葡萄糖苷(Malvidin 3-glucoside, Mv 3-glc)的亲和力大于对锦葵色素苷(Malvin),即锦葵色素3,5-二葡萄糖苷(Malvidin 3,5-diglucoside)的亲和力^[25]。(2)花色苷酶降解花色苷的化学过程包括“糖苷键断裂”和“花色素裂解”2个阶段。1955年,Huang认为花色苷酶水解花色苷后产生游离糖和花色素,花色素很不稳定,可自发转换成无色衍生物^[20];1994年,Pifaut等报道Malvin在花色苷酶作用下形成的锦葵色素能迅速转变为醇式或假碱式花色素,进而部分开环形成查尔酮(Chalcone),后者再经过碳-碳键断裂开环分解为无色丁香酸(Syringic acid,即4-羟-3,5-二甲氧苯甲酸)和2,4,6-三羟基苯甲醛(2,4,6-trihydroxy-benzaldehyde)^[25]。花色素吡喃烺环(Pyrylium ring)的打开和查尔酮的形成是花色素降解的第一步^[26],而花色素的脱水碱(Anhydrobase)形式对酶的氧化最敏感^[27];2008年,庞学群等也报道荔枝果皮花色苷

酶催化花色苷糖苷键断裂,花色苷再自发裂解成小分子酚类(Phenolics)^[28]。

尽管花色苷酶被证实能降解花色苷,生产中也常用该酶实现葡萄(*Vitis vinifera*)汁、桃(*Prunus persica*)酱等的脱色、以防其褐变^[13],但花色苷酶在花色苷的体内降解中究竟起多大作用仍不清楚,因为不是所有含花色苷的植物都具明显的花色苷酶活性,如苹果(*Malus pumila*)、葡萄和草莓(*Fragaria ananassa*)等果实中几乎检测不到该酶活性,它们贮藏较长时间后仍含高水平的花色苷^[29]。

1.2 多酚氧化酶

多酚氧化酶(PPO)以 Cu^{2+} 为辅基,分布广、专一性低^[30];PPO 有 3 类:(1)单酚单加氧酶(Monophenol monooxygenase, EC 1.14.18.1),也称甲(苯)酚酶(Cresolase)或酪氨酸酶(Tyrosinase),负责将单酚(Monophenols)羟化成邻二酚(*o*-diphenols);(2)对二酚:氧氧化还原酶(*p*-diphenol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2),也称漆酶(Laccases),负责在氧存在时将邻二酚或对二酚(*p*-diphenols)氧化成相应邻位醌(*o*-quinones)或对位醌(*p*-quinones);(3)二酚氧化酶(Diphenol oxidase, EC 1.10.3.1),也称儿茶酚氧化酶(Catechol oxidases)或二酚:氧氧化还原酶(Diphenol: oxygen oxidoreductases),负责先将单酚羟化为邻二酚,再将邻二酚氧化为邻位醌^[30-32],荔枝果皮的 PPO 就属于这一类^[33]。

(1) PPO 降解花色苷的速率决定于花色苷的结构。PPO 降解不同花色苷的速率不同,如高丛蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)的锦葵色素苷比飞燕草色素苷对 PPO 更稳定^[34]。一般来说,PPO 作用于 B 环有邻二酚羟基(*o*-diphenolic hydroxyl)的花色素,如花青素(Cyanidin)、飞燕草色素(Delphinidin)和矮牵牛色素(Petunidin),形成苷时产生的中间产物邻位醌再经氧化,其产生氧化花色苷及降解产物的速率比没有邻二酚羟基结构花色苷的大得多^[35-36]。无邻二酚羟基花色苷对 PPO 不敏感,其降解可能与邻位醌或其降解次级产物形成的共聚物有关^[37-39]。

(2) 花色苷不能直接作为 PPO 的底物。尽管花色苷属多酚类(Polyphenols)化合物,PPO 能使其氧化、褪色,但 PPO 不能直接降解花色苷,如荔枝^[28,40-41]、葡萄^[42]和草莓^[43]等果实的 PPO 均不能直接氧化其花色苷,草莓^[43]、甜樱桃(*Prunus avium*)^[27]等果实的 PPO 却对其花色苷有极高活力,但花青素能直接与 PPO 反应而花葵素(Pelargonidin)

不能^[43]。可见,花色苷的糖组分和糖苷键制约了 PPO 的直接氧化作用,不同花色苷与 PPO 的亲合力不同。在理论上,花色苷的特定糖基及其构建的糖苷键均会成为 PPO 与花色苷结合的立体障碍,使 PPO 不能直接氧化花色苷^[35,40];糖苷键对于花色苷在面临包括 PPO 在内的各因素攻击下的稳定性有普遍意义^[57-9],该键断裂后花色苷因吡喃环极易开环而迅速降解^[35,44]。

(3) PPO 降解花色苷须依赖与 PPO 和花色苷共存的其他酚类。PPO 能导致花色苷氧化而不能直接降解花色苷的事实使人类探索 PPO 降解花色苷的机理经历了漫长的过程。一方面,部分学者将花色苷酶与 PPO 混淆,如甜樱桃褐变曾被归因于一种“花色苷酶”(其实为 PPO)的作用,该酶只有在氧存在时才发挥功能,其功能被儿茶酚,即邻苯二酚(Catechol)强化;“花色苷酶”还被认为是“负责花色苷氧化降解的酶”,既包括糖苷酶又包括 PPO,前者使花色苷糖苷键断裂,而后者的活性依赖儿茶酚^[45]。另一方面,大量学者报道 PPO 降解花色苷离不开与花色苷共存的、具邻二酚结构的其他酚类化合物(图 1),并由此探究 PPO 降解花色苷的机理。1963 年, Peng 等报道 PPO 降解花色苷的速率随儿茶酚浓度的增加而增加,提出儿茶酚在氧和 PPO 作用下被氧化成苯醌(Benzoquinone),苯醌将花色苷氧化为无色产物,无色产物经非酶促反应形成羟醌(Hydroxyl quinone),羟醌随聚合度增大而由红变褐产生黑色素(Melanins)^[37]。1966 年, Sakamura 等报道醌类(Quinines)在茄子(*Solanum melongena*)花色苷被 PPO 降解中起重要作用^[46]。1974 年, Pifféri 等认为,在甜樱桃果浆中,PPO 氧化绿原酸(Chlorogenic acid)、儿茶酚等产生的醌氧化花色苷,花色苷脱水碱似乎是最易被氧化的结构形式^[27]。1986 年, Williams 等观察到 PPO 引起花色苷封闭溶液产生褐变反应^[47]。1989 年, Raynal 等报道花色苷经“偶联氧化(Coupled oxidation)”机制被转化,该机制涉及绿原酸经 PPO 形成的醌^[45]。1990 年, Wesche-Ebeling 等证明 PPO 通过“共聚(Copolymerization)”使花色苷褪红,花色苷因儿茶酚的加入被 PPO 迅速降解^[48]。1994 年, Cheyner 等证实在 PPO 降解花色苷时,咖啡酸(Caffeic acid)的氧化产物咖啡酸邻位醌(Caffeic acid *o*-quinone)有重要作用^[48]。1995 年, Sami 等证实儿茶酚能促进“PPO-葡萄糖基花色苷”系统中花色苷的降解,花青素 3-葡萄糖苷(Cyanindin

3-glucoside, Cy 3-glc)和 Mv 3-glc 的降解产物都含咖啡酰酒石酸(Caffeoyl tartaric acid 或 Caftaric acid)和花色苷的某些部分,这些产物逐渐被进一步氧化产生的无色产物取代,不同花色苷在相同“PPO-酚反应系统”中的降解速率不一样, Cy 3-glc 的比 Mv 3-glc 大得多,前者对醌类更敏感,更易被氧化^[42]。1997年, Kader 等证实高丛蓝莓果皮褐变中, PPO 氧化绿原酸成醌,醌再氧化花色苷^[49]; Sarni-Manchado 等指出只有在咖啡酰酒石酸存在时 Mv 3-glc 才被 PPO 降解,因咖啡酰酒石酸被 PPO 氧化成的咖啡酰酒石酸醌(Caftaric acid *o*-quinone)和 Mv 3-glc 反应导致加合物(Adducts)形成^[50]; Yokotsuka 等证实 PPO 底物(儿茶酚和咖啡酰酒石酸)的存在促进葡萄花色苷被 PPO 降解^[51]。1998年, Kader 等报道 Cy 3-glc 不能被高丛蓝莓 PPO 氧化而可被绿原酸诱导降解,绿原酸经 PPO 氧化成的醌经“偶联氧化”和“绿原酸的部分再生”参与 Cy 3-glc 降解,这意味着部分绿原酸被结合到 Cy 3-glc 降解产物中,被降解 Cy 3-glc 的量和被氧化绿原酸的量之比等于 2^[36]。1999年, Jiang 等报道 4-甲基儿茶酚(4-methylcatechol)能促进荔枝 PPO 对花色苷的降

解^[52]; Kader 等证实 Cy 3-glc 通过“偶联氧化”被降解,有氧时,咖啡酸被 PPO 氧化为咖啡酸邻位醌,后者结合进微橙色的降解产物中,被降解 Cy 3-glc 量和被结合进缩合产物的咖啡酸邻位醌量之比约为 2, PPO 的添加导致形成于 Cy 3-glc 和咖啡酸邻位醌偶联氧化反应的咖啡酸的消失和褐色聚合物的形成,而聚合物由咖啡酸和 Cy 3-glc 缩合而成^[39]; Kader 等又证实绿原酸的存在促进了高丛蓝莓 PPO 降解花葵素 3-葡萄糖苷(Pelargonidin 3-glucoside, Pg 3-glc)^[38]。2000年, Jiang 证实儿茶酚可促进“PPO-花色苷系统”中花色苷的降解^[40]; Skrede 等报道,在高丛蓝莓果汁加工中,花色苷被氧化、含量下降与多酚类物质含量的减少相关^[34]。2001年, Kader 等将咖啡酸邻位醌与 Pg 3-glc 反应,结果产物中有咖啡酸和残存的 Pg 3-glc,推断咖啡酸由咖啡酸醌再生^[12]。2007年, Fang 等证实没食子酸,即 3,4,5-三羟基苯甲酸(Gallic acid)能促进杨梅(*Myrica rubra*)的 PPO 对 Cy 3-glc 的降解^[53]; Liu 等提出荔枝果皮 PPO 能氧化(-)表儿茶精[(-)epicatechin]产生(-)表儿茶精邻位醌[(-)epicatechin *o*-quinone],该醌与花青素 3-芦丁糖苷(Cyanindin 3-rutinoside,

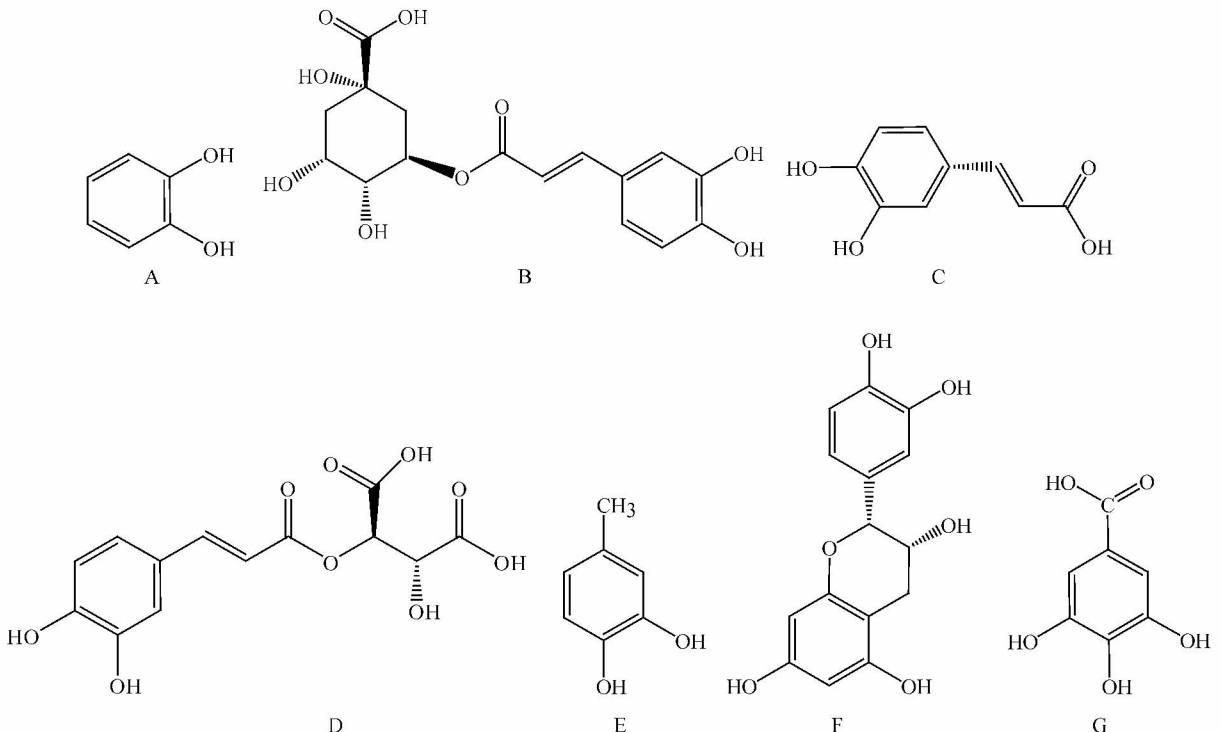


图1 具邻二酚结构、实现多酚氧化酶降解花色苷的其他酚类。A. 儿茶酚; B. 绿原酸; C. 咖啡酸; D. 咖啡酰酒石酸; E. 4-甲基儿茶酚; F. (-)表儿茶精; G. 没食子酸。

Fig. 1 Other phenolics holding *o*-diphenol structure and realizing anthocyanin degradation catalyzed by polyphenol oxidases. A. Catechol; B. Chlorogenic acid; C. Caffeic acid; D. Caftaric acid; E. 4-methylcatechol; F. (-)epicatechin; G. Gallic acid.

Cy 3-rut)和(-)-表儿茶精竞争,导致 Cy 3-rut 降解和(-)-表儿茶精再生,竞争过程受(-)-表儿茶精和 Cy 3-rut 浓度的影响^[54]。2008 年,庞学群等认为在儿茶酚存在下,荔枝果皮花色苷被 PPO 迅速降解形成褐色产物,花色苷的降解不依赖于 PPO 而仅依赖于 PPO 催化形成的醌^[28]。2009 年,Ruenroengklin 等报道,在荔枝果皮花色苷被 PPO 降解中,儿茶酚最有效,其次是(-)-表儿茶精和没食子酸,但儿茶酚和(-)-表儿茶精间无显著差异,他们认为荔枝 PPO 氧化表儿茶精的产物催化了花色苷降解导致褐变^[41]。2010 年,Jaiswal 等证实儿茶酚在 PPO 降解石榴(*Punica granatum*)干假种皮花色苷中有重要作用^[55];Liu 等报道了(-)-表儿茶精被荔枝果皮 PPO 氧化,产生的邻位醌氧化花色苷,导致荔枝果皮褐变^[56]。

可见,PPO 降解花色苷须依赖具邻二酚结构的其他酚类(图 1),降解为连续型的偶联氧化机制^[27]: (1) PPO 在氧存在时将其他酚类氧化为浅黄色、活跃的邻位醌类^[57]; (2) 邻位醌将花色苷,尤其是邻二酚花色苷(*o*-diphenolic anthocyanins),氧化为“花色苷(邻位醌”、自身被还原为酚^[42]; (3) 邻位醌与花色苷醌间或花色苷醌相互间发生非酶促自发聚合(Nonenzymatic self-association)、形成黑色素(图 2)^[36,49]。

大量体外研究表明,PPO 降解花色苷必须基于“花色苷-PPO-其他酚类”三元系统的存在;自然条件下,“其他酚类”可能以 2 种方式满足,一是细胞合成;二是花色苷裂解形成,不稳定的花色苷经吡喃环打开即形成小分子酚类^[44],如花青素形成酚类的结构与儿茶酚的很相似,可作 PPO 的合适底物^[25]。此外,醌类氧化花色苷后自身被还原为酚类,可维持“三元系统”中酚类含量的相对稳定,实现 PPO 对花色苷的持续降解^[42]。因此,PPO 在花色苷的体内降解中可能发挥着重要作用。

1.3 过氧化物酶

过氧化物酶(POD; EC 1.11.1.7)由微生物或高等植物产生,在过氧化氢(H_2O_2)存在时能氧化多种酚类成褐色产物^[58]。但 POD 与不同酚类的亲和力差异较大^[59],并且可作为 POD 底物的酚类种类远比 PPO 的多^[58]。POD 以铁卟啉(iron porphyrin)为辅基;不同来源 POD 的最适 pH 和最适温度不同,但均较接近,如以愈创木酚(Guaiacol)为底物时,草莓^[60]、葡萄^[61]和荔枝^[59]果实 POD 的最适 pH 和最适温度分别为 6.0、5.5、

6.5 和 30℃、40℃、35℃。POD 在 pH 3.0 以下完全失活,因低 pH 使 POD 失去构成其结构及活性中心所必需的血红素(Heme)^[62-63]。

POD 对花色苷的降解机理包括以下 2 方面。(1) 花色苷不能直接作为 POD 的底物。与 PPO 一样,POD 也不能直接氧化降解花色苷,如葡萄^[64]和荔枝^[65]果实 POD 均不能直接氧化其花色苷,但花色苷却能作为 POD 的底物^[64-65]。(2) POD 降解花色苷须依赖 H_2O_2 的存在。1964 年,Grommeck 等报道了花青素 3-龙胆二糖苷(Cyanidin 3-gentiobioside, Cy 3-gen),花青素 3-鼠李葡萄糖苷(Cyanidin 3-rhamnoglucoside, Cy 3-rhagl)和 Pg 3-glc 都能被辣根(*Armoracia rusticana*)POD 氧化而脱色,反应要求的 H_2O_2 浓度为 $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ ^[66]。2001 年,Kader 等报道 POD 能将介质中的酚氧化为醌,醌与花色苷反应产生褐色缩合物^[12]。2002 年,Kader 等证实,在高丛蓝莓汁中,不管绿原酸是否存在,如果 H_2O_2 不存在就不会产生蓝莓花色苷降解产物,这意味着蓝莓 POD 参与了其花色苷降解^[67]。2005 年,Zhang 等报道荔枝果实贮藏期间,POD 活性与花色苷含量呈负相关,POD 在体外 H_2O_2 存在时不能直接氧化花色苷,添加愈创木酚后花色苷含量才快速下降^[65]。可见,与 PPO 类似,POD 降解花色苷也须依赖 H_2O_2 和其他酚类的存在,经“偶联氧化”实现^[17]。POD 在 H_2O_2 存在时首先将其他酚类氧化为邻位醌^[57],邻位醌将花色苷氧化为“花色苷(邻位醌”、自身被还原为酚^[42],最后聚合形成黑色素(图 2)。

作为植物酶促抗氧化防御系统的关键组分之一,POD 在植物响应胁迫时出现在活细胞的各部位、广泛参与多种功能^[68],而花色苷是植物响应紫外线(Ultraviolet, UV)、低温等胁迫的一种重要产物^[69-70]。因此,POD 在花色苷的体内降解中可能也发挥着重要作用,Vaknin 等证实 POD 在鸳鸯茉莉(*Brunfelsia calycina*)花花色苷的体内降解中起重要作用^[71]。

1.4 果胶酶

果胶酶(Pectinases)是指降解果胶质(Pectic substance)的一组酶,广泛分布于高等植物和微生物中,在某些原生动物和昆虫中也存在^[72-73]。果胶酶分为 4 大类:(1) 原果胶酶(Protopectinases),A 型作用于原果胶内部即多聚半乳糖醛酸(Polygalacturonic acid)区域,B 型作用于原果胶外部即连接聚半乳糖醛酸链和细胞壁组分的多糖链(Polysaccharide chain);

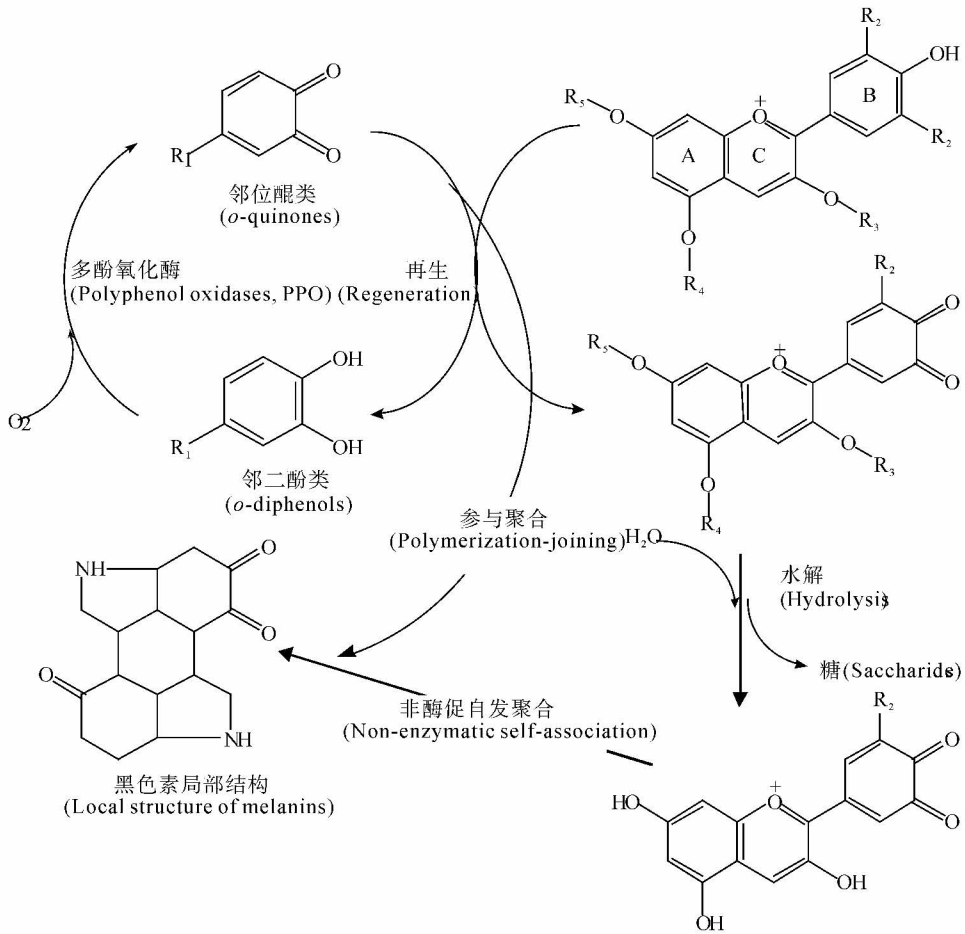


图 2 多酚氧化酶催化花色苷降解的可能机制。R₁: 酚类侧链取代基; R₂: H, OH 或 OCH₃; R₃: 糖基; R₄ 和 R₅: 糖基或质子。

Fig. 2 Proposed mechanism of the anthocyanin degradation catalyzed by polyphenol oxidases. R₁: Substituent group of the side chain of the phenolics; R₂: H, OH or OCH₃; R₃: Glycosyl group; R₄ and R₅: Glycosyl group or proton.

(2) 聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonases, PG), 其催化聚半乳糖醛酸链的水解, 多数最适温度为 30℃ ~ 50℃, 最适 pH 值为 3.5 ~ 5.5; (3) 果胶裂解酶(Pectin lyases, PL), 通过反式消去裂解果胶, 在 C₄ 位断开糖苷键, 同时从 C₅ 处消去一个 H 原子而产生不饱和产物, 多数最适温度为 40℃ ~ 50℃, 最适 pH 为 7.5 ~ 10.0; (4) 果胶酯酶(Pectinesterase, PE), 催化从果胶半乳糖醛酸聚糖主链脱去甲基, 释放酸性果胶和甲醇, 多数最适温度为 40℃ ~ 50℃, 最适 pH 值为 4.0 ~ 8.0^[72-74]。

果胶酶能降解花色苷主要是因为原果胶酶、PG 和 PL 能水解糖苷键, 故它们能将花色苷水解为花色苷和糖, 花色苷再自发转换成无色物质^[20]。如 Huang 报道在 pH 3.0 ~ 4.5, 含果胶酶的天然真菌酶制剂可催化植物浆果显著漂白, 这是因果胶酶可将浆果花色苷水解^[20]。Jiang 等报道商用果胶酶制剂 Pectinex 能分别将花青素 3-槐糖苷 (Cyanidin 3-

sophoroside, Cy 3-sop)和花青素 3-葡萄糖基芦丁糖苷(Cyanidin 3-glucosylrutinoside, Cy 3-glc rut)转化为 Cy 3-glc 和 Cy 3-rut, 可能是因为它能水解 β-1,2 糖苷键^[75]。Versari 等报道果胶酶制剂 Pectinex[®] BE 3-L 等能导致木莓(*Rubus idaeus*)汁花色苷减少, 这是因为其具有 β-糖苷酶活性^[76]。

果胶质主要定位于高等植物的中层和初生细胞壁中, 以保持植物组织的完整和粘合^[77]。果胶酶的活动贯穿于细胞生长、果实成熟和衰老的全过程^[78], 尤其在果实成熟过程中参与组织的软化^[77]。对于果色由花色苷决定的果实, 其果实生长、成熟的过程正是花色苷积累的过程^[2], 因此, 果胶酶也可能参与花色苷的体内降解。

2 花色苷体内降解的多种酶参与性

植物细胞中花色苷酶、PPO、POD 和果胶酶总是若干种共存的, 花色苷的体内降解应是在多种酶催

化下完成的。如 Francis^[78] 和 Piffaut 等^[25] 均认为花色苷的降解与花色苷酶、PPO 和 POD 有关。张昭其等报道,在荔枝褐变中,花色苷酶活性一直较高并逐渐上升,POD 的也逐渐升高,而 PPO 的则下降,不易褐变的‘桂味’、‘兰竹’的花色苷酶和 PPO 活性较低,易褐变的‘糯米糍’的则活性较高,暗示荔枝褐变敏感性与其花色苷酶和 PPO 活性有关,此外,荔枝各品种都含高活性的 POD,故荔枝褐变与 PPO、POD 和花色苷酶均有关^[29]。Zhang 等^[17]、Jiang 等^[79]、Liu 等^[54] 和庞学群等^[28] 均认为荔枝果皮花色苷在花色苷酶和 PPO 的共同催化下降解而导致褐变,可能的机制是:(1) 花色苷酶将花色苷裂解为花色素和糖;(2) 花色素自发开环、裂解产生与儿茶酚结构相似的产物;(3) 该产物被 PPO 氧化为邻位醌;(4) 邻位醌氧化、降解花色苷;(5) 花色素的裂解产物同时自发转变为黑色素。2009 年, Oren-Shamir 认为 POD 和花色苷酶参与了鸳鸯茉莉花色苷的降解^[10]。可见,不同植物中协同参与花色苷体内降解的酶的种类和活性比例均不同。

3 结语

花色苷作为植物发育期间响应环境变化的次生产物之一^[10],其生物合成和体内降解机理的完整阐释对于揭示花色苷的生理生态功能有重要意义。尽管花色苷的体内降解已被初步判定为不是一般衰老过程的组成部分,而是一个特征性、专一性的途径^[72],但其机制迄今仍不清楚^[10]。研究表明,能降解花色苷的酶主要有花色苷酶、PPO、POD 和果胶酶,这在理论上有利于对花色苷体内降解机理的解析,在实践上则提供了从控制酶活角度来稳定花色苷或促进花色苷降解的依据。在含花色苷产品的加工、储藏中,一方面,可使用酶促进花色苷降解^[47],另一方面,通过设法抑制酶活以提高花色苷的稳定性,如蒸气漂白可抑制花色苷酶活性;SO₂ 等可抑制 PPO 活性;抗坏血酸(Ascorbic acid)能完全抑制荔枝果皮 POD 活性;Fe²⁺ 和 Mn²⁺ 等可抑制黑曲霉果胶酶活性^[59,80-81]。

参考文献

[1] Mann J. Secondary Metabolism [M]. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1987: 275-285.
 [2] Mazza G, Miniati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains [M]. London: CRC Press, 1993: 210-211.
 [3] Xu Y J(徐渊金), Du Q Z(杜琪珍). Review on anthocyanins bioactivities [J]. Food Mach(食品与机械), 2006, 22(6): 154-157,

174.(in Chinese)

- [4] Patras A, Brunton N P, O'Donnell C, et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: Mechanisms and kinetics of degradation [J]. Trends Food Sci Techn, 2010, 21 (1): 3-11.
 [5] Harborne J. Plant polyphenols: XI. Structure of acylated anthocyanins [J]. Phytochemistry, 1964, 3(2): 151-160.
 [6] Jurd L. Some advances in the chemistry of anthocyanin type plant pigments [C]// Chichester C O. Advances in Food Research: Supplement 3. The Chemistry of Plant Pigments. New York: Academic Press, 1972: 123-142.
 [7] Rodriguez-Saona L, Guisti M, Wrolstad R. Color and pigment stability of red radish and red fleshed potato anthocyanins in juice model systems [J]. J Food Sci, 1999, 64(3): 451-456.
 [8] Ye X L(叶小利), Li X G(李学刚), Li K P(李坤陪). Study on influence of Ph values on the stability of anthocyanin in purple-sweet potato [J]. Sci Techn Food Ind(食品工业科技), 2002, 23 (11): 38-39.(in Chinese)
 [9] Yao H W(姚伙旺), Zeng Q P(曾秋平), Lao Y M(劳永民), et al. Effects of food additives on the stability of Lüchi anthocyanin [J]. Food Sci(食品科学), 2006, 27(5): 152-156.(in Chinese)
 [10] Oren-Shamir M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? [J] Plant Sci, 2009, 177(4): 310-316.
 [11] Sun J X(孙建霞), Zhang Y(张燕), Hu X S(胡小松), et al. Structural stability and degradation mechanisms of anthocyanins [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2009, 42(3): 996-1008. (in Chinese)
 [12] Kader F, Imouli M, Nicolas J, et al. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid *o*-quinone [J]. Food Chem, 2001, 75(2): 139-144.
 [13] Zhang Z Q(张昭其), Pang X Q(庞学群). Current trends: Anthocyanase of fungi [J]. Bull Microbiol(微生物通报), 2001, 28(6): 86-89.(in Chinese)
 [14] Blom H. Partial characterization of a thermostable anthocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger* [J]. Food Chem, 1983, 12(3): 197-204.
 [15] Unno T, Ide K, Yazaki T, et al. High recovery purification and some properties of β -glucosidase from *Aspergillus niger* [J]. Biosci Biotechn Biochem, 1993, 57(12): 2172-2173.
 [16] Rwabahizi S, Wrolstad R E. Effects of mold contamination and ultrafiltration on the color stability of strawberry juice and concentrate [J]. J Food Sci, 1988, 53(3): 857-861, 872.
 [17] Zhang Z Q, Pang X Q, Ji Z L, et al. Role of anthocyanin degradation in Lüchi pericarp browning [J]. Food Chem, 2001, 75 (2): 217-221.
 [18] Zhang Z Q, Pang X Q, Yang C, et al. Purification and structural analysis of anthocyanins from Lüchi pericarp [J]. Food Chem, 2004, 84(4): 601-604.
 [19] Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase

- in a wine yeast strain [J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46(1): 354-360.
- [20] Huang H T. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes [J]. *J Agri Food Chem*, 1955, 3(2): 141-146.
- [21] Huang H T. The kinetics of decolorization of anthocyanins by fungal "anthocyanase" [J]. *J Amer Chem Soc*, 1956, 78(11): 2390-2393.
- [22] Wightman J D, Wrolstad R E. β -glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis [J]. *J Food Sci*, 1996, 61(3): 544-548.
- [23] Feng F Q(冯凤琴), Ye L Y(叶立扬). *Food Chemistry* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 119-119.(in Chinese)
- [24] Wightman J D, Wrolstad R E. Anthocyanin analysis as a measure of glycosidase activity in enzymes for juice processing [J]. *J Food Sci*, 1995, 60(4): 862-867.
- [25] Piffaut B, Kader F, Girardin M, et al. Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatment [J]. *Food Chem*, 1994, 50(2): 115-120.
- [26] Markakis P, Livingstone G E, Fillers G R. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation [J]. *Food Res*, 1957, 22(2): 117-130.
- [27] Pifferi P G, Cultrera R. Enzymic degradation of anthocyanins: Role of sweet cherry polyphenol oxidase [J]. *J Food Sci*, 1974, 39(4): 786-791.
- [28] Pang XQ(庞学群), Huang X M(黄雪梅), Yang X T(杨晓棠), et al. Role of polyphenol oxidase in anthocyanin degradation of lychee pericarp [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2008, 41(2): 540-545.(in Chinese)
- [29] Zhang Z Q(张昭其), Pang X Q(庞学群), Duan X W(段学武), et al. The anthocyanin degradation and anthocyanase activity during the pericarp browning of lychee fruit [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2003, 36(8): 945-949.(in Chinese)
- [30] Kan J Q(阚健全). *Food Chemistry* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 254-254.(in Chinese)
- [31] Nagai T, Suzuki N. Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage *Brassica rapa* L. [J]. *J Agri Food Chem*, 2001, 49(8): 3922-3926.
- [32] Jang J, Song K B. Purification of polyphenoloxidase from the purple-fleshed potato (*Solanum tuberosum* Jasim) and its secondary structure [J]. *J Food Sci*, 2004, 69(8): C648-C651.
- [33] Jiang Y M, Fu J R, Zauberman G, et al. Purification of polyphenol oxidase and the browning control of *Litchi* fruit by glutathione and citric acid [J]. *J Sci Food Agri*, 1999, 79(7): 950-954.
- [34] Skrede G, Wrolstad R E, Durst R W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. *J Food Sci*, 2000, 65(2): 357-364.
- [35] Markakis P. Stability of anthocyanins in foods [C]// Markakis P. Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, 1982: 163-180.
- [36] Kader F, Haluk J P, Nicolas J P, et al. Degradation of cyanidin-3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase: Kinetics study and mechanisms [J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46(8): 3060-3065.
- [37] Peng C Y, Markakis P. Effect of phenolase on anthocyanins [J]. *Nature*, 1963, 199(4893): 597-598.
- [38] Kader F, Nicolas J P, Metche M. Degradation of pelargonidin 3-glucoside in the presence of chlorogenic acid and blueberry polyphenol oxidase [J]. *J Sci Food Agri*, 1999, 79(4): 517-522.
- [39] Kader F, Imouli M, Zitouni N, et al. Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid *o*-quinone: Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products [J]. *J Sci Food Agri*, 1999, 47(11): 4625-4630.
- [40] Jiang Y M. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning [J]. *J Sci Food Agri*, 2000, 80(3): 305-310.
- [41] Ruenroengklin N, Sun J, Shi J, et al. Role of endogenous and exogenous phenolics in *Litchi* anthocyanin degradation caused by polyphenol oxidase [J]. *Food Chem*, 2009, 115(4): 1253-1256.
- [42] Sami P, Fulcrand H, Souillon V, et al. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solution [J]. *J Sci Food Agri*, 1995, 69(3): 385-391.
- [43] Wesche-Ebeling P, Montgomery M W. Strawberry polyphenol-oxidase: Its role in anthocyanin degradation [J]. *J Food Sci*, 1990, 55(3): 731-734, 745.
- [44] Richardson T, Finley J W. Chemical changes in natural food pigments [C]// Richardson T, Finley J W. Chemical Changes in Food during Processing. Westport, Conn.: AVI Publishing Company, INC, 1985: 425-433.
- [45] Raynal J, Moutounet M. Intervention of phenolic compounds in plum technology: 2. Mechanisms of anthocyanin degradation [J]. *J Agri Food Chem*, 1989, 37(4): 1051-1053.
- [46] Sakamura S, Shibusa S, Obata Y. Separation of a polyphenol-oxidase for anthocyanin degradation in eggplant [J]. *J Food Sci*, 1966, 31(3): 317-319.
- [47] Williams D C, Lim M H, Chen A O, et al. Blanching of vegetables for freezing which indicator enzyme to choose [J]. *Food Techn*, 1986, 40(6): 130-140.
- [48] Cheynier V, Souquet J M, Kontek A, et al. Anthocyanin degradation in oxidising grape musts [J]. *J Sci Food Agri*, 1994, 66(3): 283-288.
- [49] Kader F, Rovel B, Girardin M, et al. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.): Role of blueberry polyphenol oxidase, chlorogenic acid and anthocyanins [J]. *J Sci Food Agri*, 1997, 74(1): 31-34
- [50] Sami-Manchado P, Cheynier V, Moutounet M. Reactions of polyphenoloxidase generated caffeic acid *o*-quinone with malvidin 3-O-glucoside [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(7): 1365-1369.
- [51] Yokotsuka K, Singleton V L. Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates [J]. *Amer J Enol Vitic*, 1997, 48(1): 13-25.
- [52] Jiang Y M, Fu J R. Postharvest browning of *Litchi* fruit by water

- loss and its prevention by controlled atmosphere storage at high relative humidity [J]. *Lebensm-Wiss Techn*, 1999, 32(5): 278-283.
- [53] Fang Z X, Zhang M, Sun Y F, et al. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation [J]. *Food Chem*, 2007, 103(2): 268-273.
- [54] Liu L, Cao S, Xie B, et al. Degradation of cyanidin 3-rutinoside in the presence of (-)-epicatechin and *Litchi* pericarp polyphenol oxidase [J]. *J Agri Food Chem*, 2007, 55(22): 9074-9078
- [55] Jaiswal V, DerMarderosian A, Porter J R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. *Food Chem*, 2010, 118(1): 11-16.
- [56] Liu L, Cao S Q, Xu Y J, et al. Oxidation of (-)-epicatechin is a precursor of *Litchi* pericarp enzymatic browning [J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 508-511.
- [57] Vámos-Vigyázó L. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables: A review of principles and practice [C]// Lee C Y, Whitaker J R. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, ACS Symposium Series 600. Washington, DC: American Chemical Society, 1995: 49-62.
- [58] Nicolas J J, Richard-Forget F, Goupy P, et al. Enzymatic browning reactions in apple and apple products [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1994, 34(2): 109-157.
- [59] Pang X Q(庞学群), Duan X W(段学武), Zhang Z Q(张昭其), et al. Purification and some properties of peroxidase from pericarp of *Litchi* (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2004, 12(5): 449-454.(in Chinese)
- [60] Civello P M, Martinez G A, Chaves A, et al. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties [J]. *J Agri Food Chem*, 1995, 43(10): 2596-2601.
- [61] Sciancalepore V, Longone V, Alviti F S. Partial purification and some properties of peroxidase from Malvasia grapes [J]. *Amer J Enol Vitic*, 1985, 36(2): 105-110.
- [62] Bumette F. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: A review [J]. *J Food Sci*, 1977, 42(1): 1-6.
- [63] Farrell R L, Murtagh K E, Tien M, et al. Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Enzyme Microb Techn*, 1989, 11(6): 322-328.
- [64] Zapata J M, Calderon A A, Ros Barcelo A. Actual browning and peroxidase level are not correlated in red and white berries from grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars [J]. *Fruit Variet J*, 1995, 49(2): 82-84.
- [65] Zhang Z Q, Pang X Q, Duan X W, et al. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in *Litchi* fruit pericarp [J]. *Food Chem*, 2005, 90(1/2): 47-52.
- [66] Gromneck R, Markakis P. The effect of peroxidase on anthocyanin pigments [J]. *J Food Sci*, 1964, 29(1): 53-57.
- [67] Kader F, Imouli M, Nicolas P, et al. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice [J]. *J Food Sci*, 2002, 67(3): 910-915.
- [68] Li H S(李合生). *Modern Plant Physiology* [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2006: 324-336.
- [69] Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses [J]. *Photochem Photobiol*, 1999, 70(1): 1-9.
- [70] Hasegawa H, Fukasawa-Akada T, Okuno T, et al. Anthocyanin accumulation and related gene expression in Japanese parsley (*Oenanthe stolonifera*) induced by low temperature [J]. *J Plant Physiol*, 2001, 158(1): 71-78.
- [71] Vaknin H, Bar-Akiva A, Ovadia R, et al. Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday-today-tomorrow) flowers [J]. *Planta*, 2005, 222(1): 19-26.
- [72] Zhang H X(张红霞), Jiang X L(江晓路), Mou H J(牟海津), et al. Research progress in the pectinase of microorganisms [J]. *Biotechnology(生物技术)*, 2005, 15(5): 92-95.(in Chinese)
- [73] Zhang H Y(张海燕), Wu T X(吴天祥). Research progress in pectinase [J]. *Liquor-mak Sci Techn(酿酒科技)*, 2006(9): 82-85. (in Chinese)
- [74] Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review [J]. *Proc Biochem*, 2005, 40(9): 2931-2944.
- [75] Jiang J, Paterson A, Piggott J R. Effects of pectolytic enzyme treatments on anthocyanins in raspberry juice [J]. *Int J Food Sci Techn*, 1990, 25(5): 596-600.
- [76] Versari A, Biesenbruch S, Barbanti D, et al. Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices [J]. *Food Res Int*, 1997, 30(10): 811-817.
- [77] Wang J Y(王镜岩), Zhu S G(朱圣庚), Xu C F(徐长法). *Biochemistry Upper Volume* [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 47-48.(in Chinese)
- [78] Francis F J. Food colorants: Anthocyanins [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1989, 28(4): 273-314.
- [79] Jiang Y M, Duan X W, Joyce D, et al. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested *Litchi* fruit [J]. *Food Chem*, 2004, 88(3): 443-446.
- [80] Lu Y(卢钰), Dong X Y(董现义), Du J P(杜景平), et al. Research progress on anthocyanins [J]. *J Shandong Agri Univ (Nat Sci)(山东农业大学学报: 自然科学版)*, 2004, 35(2): 315-320.(in Chinese)
- [81] Yang X(杨茜), Zhang Z H(张朝晖), Shan N(单宁). Study on characterization and application in fabric pretreatment of alkaline pectinase [J]. *Zhejiang Chem Ind(浙江化工)*, 2009, 40(4): 16-20. (in Chinese)