

花青苷的研究进展

李兴国, 于泽源

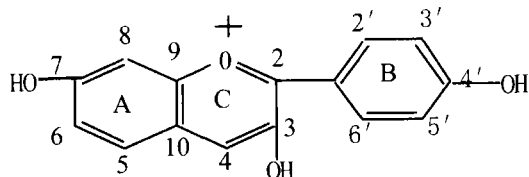
(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要:花青苷是一种重要的植物天然色素, 本文依据有关文献, 简要说明了花青苷的结构、提取鉴定方法以及生物合成途径, 并从生物化学和基因调控的角度重点介绍了 PAL、CHS、DFR 和 UFGT 在花青苷合成中的重要作用, 归纳了其他植物色素、碳水化合物、内源激素以及光照和温度在花青苷合成过程中的调节作用, 同时指出, 关于光敏色素调节酶活性机理以及基因调控花青苷合成模式的研究是揭示花青苷合成机制的关键, 为今后的科研提出了研究重点和方向。

关键词:花青苷; 果实; 着色; 基因; PAL; CHS; DFR; UFGT

中图分类号:Q946.83+6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2003)04-0006-03

花青苷是一种重要的植物天然色素, 在食品加工中具有较广泛的应用前景。现已查明花青苷是由花青素和糖组成的, 花青素易溶于水, 存在于果皮或果肉的细胞液或细胞质中, 而红色苹果果皮中合成的花青苷存在于液泡中。现已查明花青素的基本结构如下:



在花青苷的提取时, 一般采用盐酸乙醇或甲醇的方法, 利用醇类破坏细胞结构及半透膜, 将花青素提取出来, 然后再与盐酸结合为一种较稳定的无糖花青素氯化物。其鉴定方法目前一般用分光光度法或高效液相色谱。目前已鉴定出的花青苷中含量最大的是花青素-3-半乳糖苷, 其次是花青素-3-阿拉伯糖苷和花青素-7-阿拉伯糖苷^[1]。在植物体内花青苷合成主要受到酶活性的调控, 此外也受多种环境因子影响。

1 花青苷的生物合成过程

目前来看对于果实中的花青苷的生物合成途径, 研究较多的树种是苹果。从来源上看花青素的碳原子分别来自苯丙氨酸和乙酸。同位素示踪揭示了这一生化过程。A 环由三分子乙酸转化而来, B 环和 C 环中的 2、3、4 号碳原子来自苯丙氨酸, 首先苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶(PAL)的作用下, 转化为苯丙酮酸, 然后经肉桂酸、香豆酸在液泡膜上与三分子乙酸缩合经一系列步骤形成花青素, 最后花青素与糖形成花青苷贮存在液泡中。

2 花青苷合成过程中的酶调节

关于花青苷合成的酶学研究, 迄今为止, 大多数学者集中于 PAL、CHS、DFR 和 UFGT 的研究。而且取得了比较突出的成就。

2.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)

收稿日期: 2003-03-11

在花青苷的生物合成过程中, PAL 是催化合成反应的第一个酶。长期以来, 一直认为 PAL 是苹果中花青苷合成的关键酶。据周爱琴等^[2]报道, 随果实中花青素含量增加, PAL 活性也增加, 但是二者的关系并非呈简单的正相关关系。这说明有可能存在着更为直接的酶调节着花青苷的合成。Lis-ter 等指出, 只有在果皮变红时 PAL 活性才与花青苷合成紧密相关, 而且 PAL-IS(PAL 抑制物)与花青苷合成之间也没有相关性。据焦培娟等报道, 在乙烯利处理条件下, 山楂果实的 PAL 活性和花色苷积累, 随着乙烯利处理浓度的提高而增加, 但是 PAL 活性高峰出现早于花色苷积累高峰。而且不论是套袋的果实还是成熟的果实, PAL 活性都不是花青苷积累的唯一调控因素。苹果果皮中同时存在多种成分的合成途径, 幼果期花青苷合成与 PAL 活性存在一定相关, 但是 PAL 活性最大的果实膨大期却没有花青苷的积累, 而果实成熟期花青苷开始大量合成, PAL 活性却开始下降。可见花青苷的合成并不随 PAL 活性的变化而变化, 所以从酶学的角度而言, 一定存在更为直接的酶调节着花青苷的合成。

据 Boss 等报道, 在葡萄组织中只有果皮合成花青苷, 但是, PAL 基因在大多数器官中都能表达。这说明, PAL 所催化的反应并不仅为花青苷合成提供前体, 也为其他物质的合成提供前体。因此只有在个别情况下, PAL 才是花青苷合成的关键酶。

2.2 查尔酮合成酶(CHS)

CHS 催化丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酰基和对羟基苯丙烯酰辅酶 A 的一个乙酰基的缩合, 产生柚配基查尔酮。Mizukami-H 等在愈伤组织悬浮培养时发现, 在花青苷积累时, CHS 的作用比 PAL 重要。但是, 在整个果实发育过程中, 不管是否积累花青苷, CHS 总是保持较高的活性^[3]; 而且在同一苹果果皮的红色区域和相邻的非红色区域, 以及红色品种和非红色品种中 CHS 活性都没有差异, 这说明花青苷积累和 CHS 活性之间缺乏相关性^[4]。乙烯利可以促进类黄酮含量的增加, 但是却不能诱导花青苷的积累, 而且没有影响 CHS 的活性^[3]。这表明 CHS 基因似乎总是可以充分表达, 因此不是标兵酶。而且 CHS 基因的表达并不总是与花青苷含量相关, 所以花青苷合成的基因调控位点不是 CHS。Rosati 等^[5]更加明

确指出, CHS 基因的调控不是连翘植物花青苷缺乏的原因, 而是其他基因或因素调控花青苷合成。

2.3 二氢黄酮醇还原酶(DFR)

DFR 是催化槲精苷和花白素之间反应的酶。花白素是花青苷或者前花白素合成的前体。因此 DFR 在花青苷积累和类黄酮合成中具有重要的作用。据 Murray 和 Hackett 报道, 在幼年阶段, 长春藤 DFR 的活性较高, 茎和叶柄中有花青苷的积累; 而在成熟阶段, 虽然植物体内积累了较多的槲精, 但是 DFR 却没有活性, 也没有花青苷的积累, 两位学者从这一角度指出, DFR 活性的缺乏是花青苷积累的限制因素。Ju 等研究指出, 虽然非红色苹果不积累花青苷, 但是 DFR 酶也保持较高的活性, 而且在没有花青苷积累的果实膨大期, 红色品种的 DFR 也有一定活性。果实套袋, 除袋前不仅 DFR 没有活性, 而且果实中也没有类黄酮的合成; 早期除袋, 虽然 DFR 活性也增加, 但却没有花青苷的积累; 稍晚除袋, DFR 活性增强, 花青苷大量合成。这说明, DFR 不是花青苷合成的限速酶。Rosati 等^[5] 也通过 PCR 技术证明, DFR 基因不是花青苷合成的关键调控位点。但是, 在低温下^[6], DFR 基因的表达却是日本欧芹花青苷积累的关键调控步骤。显然 DFR 在不同植物中的表现不同, 其原因何在? 这是植物基因进化的结果, 内部调节机制的作用, 还是环境因素的影响? 需要在以后的研究中进行探讨。

2.4 UFGT

UFGT 是花青苷合成过程中的最后一个酶, 它使不稳定的花青素转变为稳定的花青苷。Ju 等^[3] 报道, UFGT 活性和花青苷积累之间呈明显的正相关, 乙烯处理和套袋都可提高 UFGT 活性, 促进花青苷的合成。但是, 在果实膨大期没有花青苷积累时, UFGT 活性仍然较高, 而且此时施用乙烯利也可以提高 UFGT 活性, 但是却没有花青苷的积累。这说明 UFGT 不是花青苷合成的关键酶。其他试验结果表明^[4], 延迟收获, 黄色和绿色苹果也能合成花青苷, 同时 UFGT 活性较高, 而且红色品种的绿色果皮也含有较高活性的 UFGT 酶, 这些现象表明, 任何苹果都有花青苷合成的结构基因, 但是调节基因的表现却存在差异。因此, UFGT 是调控花青苷合成的关键酶之一。Kobayashi 等报道, 在红色葡萄中可以很明显看到 UFGT 基因的表达, 并且通过基因序列分析指出, 表现型由白色向红色的转变, 是控制 UFGT 基因表达的调节基因作用的结果, 所以 UFGT 基因的表达在葡萄花青苷合成中具有决定性的作用。不能否认, UFGT 所催化的反应很重要, 但是, 如果 UFGT 是花青苷合成的关键酶, 却无法解释 Ju 等的实验结果^[3]。唯一的解释是 UFGT 酶的底物除花青素外还存在其他物质, 但是, 尚无定论。

需要指出的是 PAL、CHS、DFR 和 UFGT 都是光调节酶^[3], 都以光敏色素为光受体, 但是这种色素尚未分离出来, 调控模式还不清楚, 所以对于光敏色素的研究极为重要。

3 花青苷合成与其他色素的关系

果实的色泽是各种色素在果实中的含量与分布的结果。随着果实的成熟, 果实中的各种色素呈现出不同的消长变化。Saure 指出, 只有在叶绿素开始降解或完成时, 花青素形成才有可能。胡桂兵等^[7] 发现, 在荔枝果实成熟时, 叶绿素、类胡萝卜素都随着花青苷的大量合成而降解。其原因是叶绿素可

以吸收大量的红光, 降低光敏色素的调控效率, 从而影响花青苷的合成。但是潘增光等在新红星苹果的研究中发现, 在果皮深红色期, 叶绿素及类胡萝卜素含量也出现了增加的趋势, 而且这种现象在果皮伤害试验中也可见到。高飞飞等在着色差的妃子笑荔枝中也发现了这种现象, 他们认为高含量的叶绿素影响了果实的色泽。这也可能是潘增光等研究的新红星苹果叶绿素含量上升的原因。但是却无法解释果皮伤害试验中的现象。

4 花青苷的合成与碳水化合物关系

花青苷由花色素和糖组成的。花青素是在糖代谢的基础上由苯丙酮酸和乙酸缩合而成的。因此, 花青苷的合成必须以足够的糖含量为条件, 凡能导致细胞中糖分积累的因素都在不同程度上促进花青苷的合成。据成钰厚等报道, 富士未套袋苹果的果实花青苷含量与可溶性固形物含量不存在相关关系, 但是在一定范围内可溶性固形物含量增加, 花青苷含量也随之增加。这说明糖分只在一定范围内限制着色, 其含量超过一定阈值后则不会成为限制因素。据 Ju 等^[4] 报道, 特异性的糖可能是花青苷合成过程中某些酶活性的诱导因子。然而花青苷的合成机制是极其复杂的, 含糖量对它的影响还要受到其他各种因素的制约。

5 花青苷合成与内源激素的关系

内源激素是植物体内含量极微, 但生理活性极高, 对植物的生长、开花、结实有明显作用的生理活性物质。李秀菊等^[8] 报道, 种子 ABA、乙烯是色素形成的关键诱因, GA 或 CTK (或“GA 和 CTK”) 可能共同参加了这一复杂的生理过程。Saure 指出, 激素对花色苷形成的内在抑制作用可能由 GA 活性与乙烯和/或 ABA 活性之间的平衡调控。激素对花青苷积累的调节, 也可能是通过提高花青苷合成途径中的酶活性, 进而促进基因的表达来实现的。

6 影响花青苷合成的环境因子

6.1 光照

在所有影响花青苷合成的外部因子中, 光是最重要的。Katz 等^[9] 利用牵牛花进行试验发现, 花青苷合成的活动光谱包括大部分可见光, 但是不包括 UV 辐射。而且果实采收后利用白色荧光灯照射, 花青素形成量最多。Dong 等^[10] 发现, 在黑暗下苹果开白花, 及时恢复光照, 这些白花也不能合成花青苷, 与此同时他检验了与花青苷合成有关的基因的表达, 得出基因表达受到光照控制的结论。Mori 等利用草莓细胞悬浮培养进行试验发现, PAL 和 CHS 的活性随光强的变化而变化。究其原因, 光照可以激活光敏色素, 促进酶的合成或活化, 提高碳水化合物的含量。PAL、CHS、DFR 和 UFGT 都是光调节酶, 光可以诱导这些酶的活性提高, 促进花青苷积累和果实着色。

6.2 温度

花青苷合成是一系列酶促反应, 温度过高, 酶钝化, 不利于生化反应的进行。昼夜温差大, 利于碳水化合物的积累, 使果实中糖分含量升高, 进而促进花青苷合成。Shvarts 等报道, 适当低温不仅有利于提高花青苷合成基因的发育调节, 而且是花青苷积累的一种特殊信号。最近的研究表明^[6], 在欧芹植物中, 低温有利于 DFR 基因的表达。

7 总结与展望

对果实着色生理生化方面的研究,现在国内外已经取得了长足的进步,但是,调控花青苷合成的标兵酶,还没有一致的结论。此外,调控酶活性的光敏色素尚未分离出来,其调控机理还不清楚。目前人类已经开始利用基因工程的方法调控花青苷的合成,关于花青苷合成基因调节的研究是学术界的热门课题,通过基因调节方面的研究来揭示花青苷合成的关键调控部位是研究中的重点,而且这方面广大学者已经进行了大量的研究工作^[4,5,6,10],但是迄今为止,却仍然没有一致的结论。花青苷合成的基因在其他植物上的利用也具有广泛的前景,但是在我国仅有邵利等利用 CHS 基因改变了矮牵牛花的颜色和育性,在果树上还没有这方面的研究。

参考文献:

- [1] 薛志德,张广军,刘增文等.苹果果实着色研究动态[J].西北林学院学报,1995,10(增):180~185.
- [2] 周爱琴,祝军,生吉萍等.苹果花青素形成与 PAL 活性及蛋白质含量的关系[J].中国农业大学学报,1997,2(3):97~99.
- [3] Ju zhiguo, Liu chenglian, Yuan yongbing. Activity of chalcone synthase and UDPGal: flavonoid-3-O-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple[J]. Scientia horticulturae, 1995, 63: 175~185.

- [4] Ju zhiguo, Liu chenglian, Yuan yongbing, et al. Collocation potential, anthocyanin accumulation, and enzyme activity in fruit of commercial apple cultivars and their F1 progeny[J]. Scientia Horticulturae, 1999, 79: 39~50.
- [5] Rosati C, Cadic A, Duron M, et al. Molecular cloning and analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of Forsythia X intermedia[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(3): 303~311.
- [6] Hasegawa H, Fukasawa A, Akada T, Okuno T, et al. Anthocyanin accumulation and related gene expression in Japanese Parsley (Oenanthe stolonifera, DC.) induced by low temperature[J]. Journal of plant Physiology, 2001, 158(1): 71~78.
- [7] 胡桂兵,陈大成.荔枝果皮色素·酚类物质与酶活性的动态变化[J].果树科学,2000,17(1):35~40.
- [8] 李秀菊,刘用生,束怀瑞.红富士苹果套袋果实色泽与激素含量的变化[J].园艺学报,1998,25(3):209~213.
- [9] Katz A, Weiss D. Light regulation of anthocyanin accumulation and chalcone synthase gene expression in petunia flowers[J]. Israel Journal of Plant Sciences, 1999, 47(4): 225~229.
- [10] Dong YH, Davies K, Mitra D, et al. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1998, 25(2): 245~252.

新型野生蔬菜——叶底珠

马玉心

叶底珠(*Securinega suffruticosa* Pall.) 属大戟科(Euphorbiaceae), 叶底珠属(*Securinege*), 别名: 一叶荻、狗杏条、懒汉菜, 是一种生于山坡、灌丛及林间溪边的小灌木, 它是一种绿化荒山的好树种。近几年它的食用价值倍受人们重视, 由于口感好, 有一种清香气息, 营养价值又非常高, 是一种值得推广的野生蔬菜。

1 植物体形态

叶底珠, 灌木, 高 1 m~2 m(米), 丛生细枝, 树形扩展, 小枝黄绿色具棱, 老枝灰褐色。叶互生, 叶柄短, 长 3 cm~6 cm(厘米), 叶片椭圆形, 先端比较尖, 有波状齿。花小单性, 雌雄异株, 淡黄色, 雄花数朵簇生于叶腋, 有短梗。雌花单生或 2~3 朵簇生, 花梗较长, 达 1 cm(厘米)。蒴果, 三棱形、扁球形, 径 3 mm~4 mm(毫米), 红褐色无毛, 3 浅裂, 内含 6 种子。种子半圆形, 褐色具三棱。花期 6~7 月, 果期 7~9 月。

2 食用方法

叶底珠食用部分为其较嫩的茎叶, 营养价值非常高, 口感好, 具有清香气息, 食用时, 摘取 20 cm~30 cm(厘米)长的枝条, 先用开水焯一下, 可以直接进行凉拌食用, 也可以作成炒菜食用, 还可以进行深加工, 腌成酱菜投放市场。由于叶底珠适应能力较强, 资源丰富, 全国大部分地区都可以栽培, 是一种极具开发潜力的野生蔬菜。

3 栽培方法

叶底珠常用种子繁殖, 也可以用分株方法进行繁殖。用种子繁殖, 第 1 年育苗, 第 2 年才能收获。3 年之后产量超过 5000 kg(公斤)/667 m²(平方米)。播种前要施足底肥, 可用过磷酸钙 1% 或腐熟人粪尿。每 667 m²(平方米)用种子 2 kg(公斤)左右, 播种方式为大垄播种, 播种方法有两种, 一种是株距 2 cm~4 cm(厘米), 后期生长不开时开始间苗移栽。另一种为按 20 cm(厘米)株距播种以后不用间苗进行移栽。分株法一般在秋季落叶后、早春萌动前进行, 把整株挖起, 用利刀把分蘖枝条带根从母株上分离, 一个母株不宜分离太多, 一般以三株为宜, 分别把子株进行移栽, 这种方法成活率很高。冬季要割去老茬, 施足底肥, 到了第 3 年还要进行移栽定植, 因为蟠根可以造成营养吸收不良, 影响产量。

4 采收方法

当苗长到 20 cm~30 cm(厘米)时就可以采收了, 要采较嫩的部分, 值得注意的是采收时必须保证在母株上留下 2~3 片叶子, 以保证其继续萌发侧枝, 采收后要浇足水, 施一次肥。每一次采收后不久即可发出新枝条, 当到 20 cm~30 cm(厘米)时又可以采收了, 一般可以连续的采收, 而且越采越旺, 每年可采收十几茬。要想使叶底珠发芽快产量高, 关键是别缺水。

5 药用价值

叶底珠除了食用外还可以药用, 其茎叶能祛风活血, 补肾强筋, 而且能治神经衰弱等症。

总之, 叶底珠是一种极具开发潜力的野生蔬菜, 它集药用与食用于一身, 是一种无污染的纯绿色食品。

(黑龙江省牡丹江师范学院生物系, 157012)