

广东主要柑桔果实过氧化物 酶活性及其同工酶谱

林伟振

(园艺系)

提 要

采用蕉柑 (*Citrus reticulata* cv. tankan Hayata) 为材料测定了果皮中过氧化物酶的特性反应, 可溶态和结合态不同状态酶的分配及果实中不同部位酶的分布, 确定果顶的有色皮层为检测柑桔果实过氧化物酶的取样点。比较广东五个主要柑桔品种可溶态过氧化物酶活性的结果表明, 酶活性与果实耐藏性呈负相关。蕉柑原产广东, 是甜橙与柑的自然杂交种。从椪柑、蕉柑和暗柳橙的过氧化物酶同工酶谱初步判断, 三者之间有一定亲缘关系。还着重对广东柑桔果实中过氧化物酶的分布与果汁加工质量的关系进行了讨论。

关键词 柑桔果实; 过氧化物酶; 贮藏寿命; 同工酶; 亲缘关系

过氧化物酶普遍存在于植物体中, 与多种代谢有关。不同发育期的叶片^[1]或不同成熟阶段的果实^{[3][10][5]}, 酶的活性均有明显的差异。过氧化物酶的活性与果实的贮藏寿命有一定关系^{[6][10]}, 也常作为果蔬加工过程的测定指标之一^{[7][8]}, 此外, 其同工酶谱往往也被用作育种时早期鉴定的依据之一。本文拟先了解广东柑桔果实中过氧化物酶的几个基本理化特性, 在此基础上检测该酶在果实各部分组织中的分布情况, 探讨品种间酶活性差异与果实耐藏性的关系, 并通过同工酶谱寻求广东自然杂交种蕉柑的亲缘关系。

材 料 和 方 法

蕉柑 (*Citrus reticulata* cv. tankan Hayata)、年桔 (*Citrus reticulata* cv. tangerina Tan.) 于1982年冬采自杨村柑桔场; 椪柑 (*Citrus reticulata* cv. pooneusis Fort.) 和甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) 同年采自广东省农业科学院果树研究所。贮藏温度为10~15℃。过氧化物酶活性测定参照王秀珍、阎龙飞^[2], Kochbo, J. et al^[9], 稍有改进。取果皮1克(种胚0.5克)加0.2M磷酸缓冲液(pH6)10ml, 于冰浴中匀浆, 置冰箱中冻结过夜, 解冻后离心(4000转/分)20分钟, 取上清液备用, 测定时稀释60倍, 取1ml加反应混合液(0.4%愈创木酚2ml、0.1% H₂O₂ 0.5ml, pH5.5缓冲液2.5ml), 最后体积为6ml, 于35℃保温35分钟, 取出倒入光径1cm的比色杯于波长

1987年7月20日收稿

470nm处读取光密度。以 OD_{470} 读数作为酶的总活性；用Folm法测酶蛋白，以 OD_{470}/mg 蛋白表示酶的比活性。同工酶以同一酶提取液，用聚丙烯酰胺凝胶园盘电泳法，分离胶浓度7.5%，电流每管2mA，电泳缓冲液pH8.9，用醋酸联苯胺法显色。酶谱用绘图记录并照相。

结果分析

(一) 蕉柑果实过氧化物酶的特性反应

1. 温度：过氧化物酶是抗热性强的酶。从图1可以看出，蕉柑外果皮过氧化物酶与底物生成物以40~45℃为最多，而且曲线的陡度较小，可见其对温度的适应范围较宽。

2. pH值：从图2可以看出，蕉柑外果皮过氧化物酶的最适pH值为5.0~5.5。

3. 底物：用1%愈创木酚和0.1% H_2O_2 作底物，测定结果如图3。图3表明，随着底物浓度不断提高，酶的反应生成物均匀地增加，可见酶活性稳定，对底物浓度的适应范围也较宽。

4. 进程曲线：图4是根据以上最适条件测得的酶反应进程曲线。从曲线看出，随着时间增长，酶反应生成物成比例地增多，最高值在40分钟处。

(二) 可溶态与结合态过氧化物酶的分配

过氧化物酶在植物组织中不完全是可溶态的，还有在细胞壁中呈结合态存在的。如表1所示，蕉柑外果皮中可溶态与结合态过氧化物酶几乎各占一半，而且第一次提取的结合态酶量相当于第二、三、四三次的总和，也就是说，可溶态和结合态二者各提取一次，提取率可达到76%。

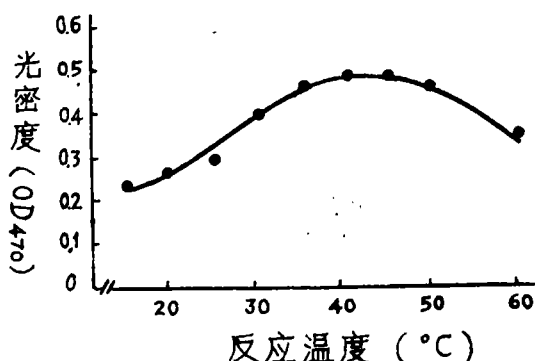


图1 温度对蕉柑果实过氧化物酶活性的影响

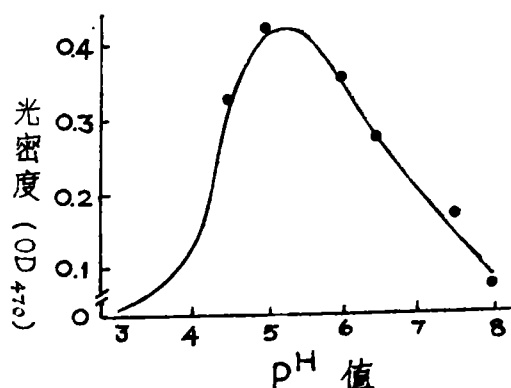


图2 pH值对蕉柑果实过氧化物酶活性的影响

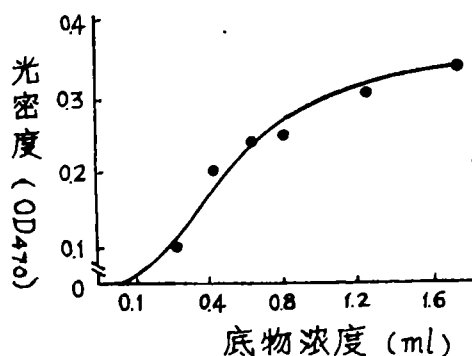


图3 底物浓度对蕉柑果实过氧化物酶活性的影响

(三) 果实不同部位可溶态过氧化物酶的分布

蕉柑果实不同部位可溶态过氧化物酶相对活性测定结果, 以有色皮层为100, 种胚相应为133, 果蒂盘为82、柑络28, 白色皮层8, 而果汁只有0.5, 相当于有色皮层的1/200。单就有色皮层而论, 酶的分布也不均匀, 活性最高是果顶部分(162)而赤道面(100)和蒂缘(109)二个部位十分接近。

(四) 广东主要柑桔品种可溶态过氧化物酶活性比较

以上酶特性反应测定的基础上, 选酶活性较高的果顶有色皮层为取样点, 对广东柑桔(包括椪柑、年桔和蕉柑)与甜橙(包括明柳橙和暗柳橙)进行测定, 结果如表2和表3。

表2和表3的数据说明, 不论是酶的总活性, 或者从果的实某一部位或几个部位测定的平均结果看, 椪柑的酶活性最高, 暗柳橙活性最低, 而蕉柑介于二者之间。虽然五月底测定的结果(表2)椪柑酶的总活性似不如蕉柑高, 但比活性仍然是椪柑最高。

多年来贮藏椪柑、蕉柑和甜橙, 无论大规模或小试验, 都公认暗柳橙最耐藏, 蕉柑之, 椪柑最不耐藏。如果与过氧化物酶活性联系起来, 可看出二者之间呈负相关。这一次点与蒙盛华等对中华猕猴桃的贮藏试验结果是一致的^[6]。

(五) 同工酶酶谱

从图5可以清楚地看到, 椪柑、蕉柑和暗柳橙三者之间同工酶酶谱的主带(1, 2, 3, 4)都相当一致和稳定; 椪柑还有二条附带, 暗柳橙却没有, 而蕉柑有一条附带。从柑桔分类的角度认为“蕉柑(Tankan, 桶柑, 招柑), 广东原产, 系柑与甜橙的自然杂交种。”^[4]图5似乎可以提供一点酶学上的依据。

表1 蕉柑果顶有色皮层可溶态与结合态过氧化物酶的分配*

提取次序	性 质	光密度(OD ₄₇₀)	相对活性
0	可溶态	0.600	100
1	结合态	0.250	42
2	结合态	0.165	27
3	结合态	0.070	12
4	结合态	0.030	5

* 结合态酶用0.2M CaCl₂提取(搅拌5分钟)

表2 不同品种柑桔果顶有色皮层可溶态过氧化物酶活性比较*

品 种	总 活 性 (OD ₄₇₀)	比 活 物 (OD ₄₇₀ /mg 蛋白)
椪 柑	0.540	6.353
蕉 柑	0.770	5.310
暗柳橙	0.265	1.963

* 1983年5月下旬测定

表3 不同品种柑桔可溶态过氧化物酶活性比较

品 种	果顶有色皮层*		果实6个部位 平均**
	总活性 (OD ₄₇₀)	相对活性	相对活性
椪 柑	0.410	139	167
年 桔	0.390	132	153
蕉 柑	0.295	100	100
明柳橙	0.260	86	58
暗柳橙	0.130	44	43

* 1983年4月中旬测定 ** 1983年2月中旬测定

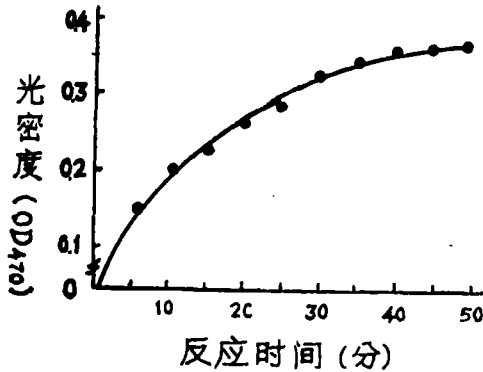


图4 蕉柑果实过氧化物酶进程曲线

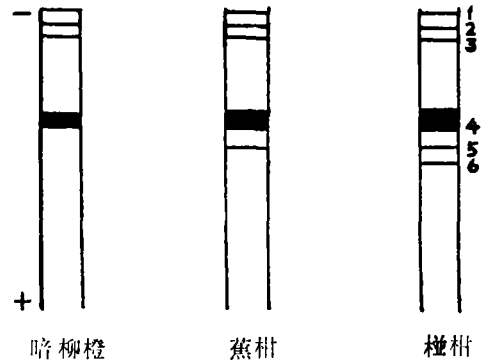


图5 不同品种柑橙果顶有色皮层过氧化物同工酶谱

讨 论

(一) 取样点的确定及酶提取液的冻结处理问题

因为过氧化物酶普遍存在于植物各组织中,人们可根据实际情况或特殊要求进行取样。分类、育种或生理工作者一般用叶片、茎尖、花药、子叶、种子或愈伤组织^[9],而果品采后生理或果品加工工作者多用果肉提取酶液^{[6][10]}。柑桔类果实结构比较复杂,各部分酶活性也明显不同。本试验把果顶的有色皮层作为取样点,不但考虑到酶反应的敏感度,也顾及柑桔类品种繁多,有的果实极少种子或者是焦核的如脐橙和蕉柑,而温州密柑甚至完全无核,因而认为,这一取样点既有代表性,也切合实际,操作简便,效果满意。

酶液制备,常用的方法是把样品进行冰浴匀浆,有条件的可以低温离心,或者进一步经过透析或柱层析。本试验受阎龙飞等的启发^[2],根据过氧化物酶在冻结情况下活性稳定甚至可被激活的特点^{[8][11]},采取冰浴中匀浆结合冰箱冻结处理,解冻后立即离心,所得上清液清沏透明,效果良好。也曾用此法处理国光苹果果顶,获得的同工酶酶谱同样十分清晰。

(二) 过氧化物酶在柑桔果实中的分布与果汁加工问题

Morita(1977)曾指出,辣根的过氧化物酶活性稳定,在100℃下13分钟仍保持50%活力^[11],Burnette(1977)也提到过氧化物酶在121℃6分钟才被钝化^[7]。可见,植物过氧化物酶的热钝化抗性十分强。在果汁中如有部分残留,将引起产品风味变劣。Bruemmer等(1976)研究过氧化物酶反应与橙汁质量之间的关系的结果,认为出汁率与橙汁风味成负相关。重榨法比轻榨法,虽然出汁率多5~10%,可是由于挤压力的影响,不但果肉中部分酶随果肉小颗粒转入果汁中,而且有可能使果皮和种子中的酶也渗入到果汁中去。如果酶热钝化处理不彻底,那么,即使在冻藏过程中,酶也可能从微小的肉质颗粒中释放出来,进而引致橙汁风味变劣。

本研究对蕉柑果实过氧化物酶分布的测定结果看到,其相对活性有色皮层为100,种

胚为133, 柑络为28, 柑汁只有0.5, 即其他部分酶活性为果汁的50~260倍。这与 Davis对脐橙、葡萄柚、柠檬和红桔分析的结果基本一致^[12], 都很好地说明重棒与轻棒对果汁质量的关系。另外, 还可以从表3中果实6个部位酶活性平均值看出广东柑和桔的过氧化物酶活性比甜橙大2~3倍。对此, 为了获得高产优质的果汁, 在柑桔澄清果汁加工工艺流程中, 压榨和过滤两个环节必须适当掌握; 对混浊果汁的热处理必须予以足够的注意。如果利用柑橙配制混合果汁的话, 也不能忽视柑的过氧化物酶活性比甜橙高这一事实。

(三) 同工酶酶谱问题

近十年来, 国内外一些果树工作者把过氧化物酶同工酶谱型用于植物遗传、分类上, 做为基因表达方面的摸索, 研究得较多的有苹果、其次有葡萄、香蕉、桃等, 但柑桔方面研究似乎不多, 对南方柑桔尚未见报道。本研究提供的同工酶酶谱可以看出广东原产的蕉柑这一自然杂交种同柑桔和暗柳橙有亲缘关系。这一初步结果, 可以作为遗传育种工作者进一步探讨的线索。

引用文献

- (1) 丁宝莲等: 烟草叶肉细胞壁过氧化物酶同工酶的研究, 《植物生理学报》8(2)1982: 127—133
- (2) 王秀珍、阎龙飞等: 苹果矮化砧与乔化砧过氧化物酶同工酶的比较研究, 《植物学报》23(1)1981: 82—84
- (3) 刘存德等: 番茄成熟时乙烯的产生, 过氧化物酶活性及其同工酶的变化, 《植物学报》21(2)1979: 163—169
- (4) 华南农学院主编: 《果树栽培学各论》(南方本, 上册)第25页, 农业出版社, 1985年
- (5) 吴少伯等: 6-苄氨基嘌呤和脱落酸对离体叶片过氧化物酶同工酶的影响, 《植物生理学报》(6)1985: 21—24
- (6) 蒙盛华等: 中华猕猴桃在气调贮藏中过氧化物酶活性和蛋白的变化及乙烯与呼吸的关系, 《园艺学报》9(1)1982: 27—30
- (7) Florences, burnette, 1977, Peroxidase and its relationship to food flavor and quality, A review J. Food sci., 42: 1—6
- (8) Joseph H. Bruemmer et al, 1976, Peroxidase reactions and orange juice quality J. Food sci., 41, 186—189
- (9) Kochba, J., et al, 1977, Differences in Peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'shamouti' orange ovular callus lines Plant and cell physiol. 18, 463—467
- (10) Natalio gorin and Frouwke T. Heidema, 1976 Peroxidase activity in Golden Delicious apples as a possible parameter of ripening and senescence J. Agri. and Food Chemistry 24(1): 200—202
- (11) Norman F. Haard, 1977, Physiological roles of Peroxidase in postharvest fruits and vegetables, in "Enzymes in Food and beverage processing" p.145
- (12) W. B. Davis, 1942, The distribution and preparation of citrus peroxidase Amer. J. Botany 29: 252—254

AN EXPERIMENT ON THE PEROXIDASE ACTIVITY AND ISOENZYME PATHERNS OF MAJOR CITRUS FRUITS GROWING IN GUANGDONG

Lin Weizhen

(Department of Horticulture)

ABSTRACT

This experiment was to assay the proper reaction of citrus peroxidase in the exocarp of Tankan mandarin (*Citrus reticulata* cv. tankan Hayata), the proportion of the bound enzyme to the soluble enzyme as well as the distribution of citrus peroxidase in the fruit were also investigated. Samples for this experiment were taken from the flavedo (the colored portion of the exocarp) to test the peroxidase of citrus fruits. A comparisom was made to determine the soluble peroxidase activity among five varieties of citrus fruits growing in Guangdong. The results showed that the correlation between peroxidase activity and storage life of fruits was negative. Tankan mandarin was known as an endemic variety growing in Swatow, Guangdong, because it was a natural hybrid between tangerine and Sweet orange. As shown by the isoenzyme patterns, Tankan, Ponkan and Anliu Sweet Orange, all these three varieties were considered to have cartain filial affinity. Also the relationship between the distribhutiong of peroxidase in the citrus fruits and the fruit juise quality during processing was discussed particularly.

Key words: citrus fruits, peroxidase, storage life, isoenzyme, filial affinity