

293-300 落花生種子萌發時子葉異檸檬酸酵素 (Isocitrate Lyase)之活性變化

摘 要

莊 嘉 坤

在室溫、黑暗下萌發生長的落花生種子，其子葉中所含脂質及碳水化合物之量，一般隨萌發日數增加，在乙醛酸循環 (glyoxylate cycle) 中之關鍵酵素 isocitrate lyase 經測定其活性變化，結果發現乾燥之種子已有 isocitrate lyase 存在，其活性達到 30.4 $\mu\text{nit} / \text{pair-min}$ ，種子萌發後 isocitrate lyase 即隨日數之增加而增加其活性，至第九天達到最高峯，第十一天後又漸漸下降，此與脂質含量隨萌發日數而遞減互相配合，這種現象，說明在落花生種子萌發過程中，確實有乙醛酸循環存在。

一、緒 論

很多植物種子之儲藏器官中，含有大量之脂質，這些脂質提供了種子萌發初期幼苗生長所需的養分及能量的來源。經代謝作用，使這些不溶於水的儲藏脂轉化成溶水性的碳水化合物，在轉換的過程中由 Glyoxysomal enzyme 調節其生長活性。首先脂質經由 β -oxidation pathway 形成 Acetyl CoA，再進入 Citric acid，再經由 glyoxylate cycle 將這些貯藏的脂質轉變成碳水化合物，此為種子萌發時一種很重要的代謝作用。

有關種子發芽過程中，子葉或胚乳裏各種貯藏脂質的分解的過程，已有許多的研究報告 (2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 8 , 10)，其中有一種關鍵酵素 Isocitrate lyase 在種子未經浸水前尚無法加以測定，但種子一旦浸水萌發，該酵素即開始合成，其合成的機制至今仍未被揭曉⁽⁹⁾。本實驗係以含脂質很高的落花生為材料，在黑暗中萌發後，測定其子葉中所含脂質轉變碳水化合物的消長現象及其相關性，並探討 Isocitrate lyase 的活性變化，以瞭解其在種子萌發過程中所負的重要性。

二、實際材料與方法

(一)材料及處理：

取經篩選大小均勻而飽滿的落花生種子用 1.5% 次氯鈉 (Naocl)，消毒 30 分鐘，經自來水沖洗，再用蒸餾水洗淨，繼續浸潤 1 小時後播種於鋪有砂石的塑膠淺盤內置於實

實驗室陰暗處保持黑暗，播種至收穫日分別可供給 1 天，3 天，5 天，7 天，9 天，11 天，13 天的萌發種子。所取之子葉要去種皮及胚軸，本報告中之紀錄皆不包括種皮及胚在內。

(二) 貯藏養分之定量測定：

1. 幼苗採收後，各取 5 對子葉，用水洗淨並以吸水紙吸乾子葉表面，分別稱其鮮重量，再放入 90 °C 的烘箱中，18 小時後，分別取出，並稱其乾重量。

2. 脂質 (Lipid) 之抽取及定量

依照 Wayne M. Becker (10) 之方法，並稍作改良。各取 5 克子葉，置於研鉢中，加入 25ml methanol - chloroform (2 : 1 V / V) 溶液，將之磨碎，然後以 2000xg 離心五分鐘，傾出上層液，沉澱物再加入 2000xg 離心五分鐘，去沉澱物，兩次上層液合併，加入等體積 2 M KCl 溶液，然後充分拌和，小心傾出上層液。保留底層具微黃色的有機物層，倒入乾淨稱過重量之小燒杯中，放入 95° C 烘箱中烘乾，稱重即可獲得脂質含量。

(三) Isocitrate lyase 之萃取及其活性之測定：

依照 C. Schnarrenberger (4) 及 R. William (9) 所述方法，並稍作改良。取新鮮子葉五克，加入三倍冰冷之 PH7.5 0.2M Tris-HCl， 1×10^{-3} M EDTA， 1×10^{-3} M Mg， 1×10^{-2} M KCl， 1×10^{-4} M Mercaptoethanol，0.1 % BSA，在研鉢中磨碎，再以 12,000 xg 冷凍離心十分鐘，上層澄清液即酵素。另取 3ml 混合液 (Assay mixture) 中含 PH6.85，200 μ moles Potassium Phosphate，15 μ moles MgCl₂，10 μ moles Phenylhydrazine-HCl，6 μ moles Cysteine - HCl，置於試管中，加入 0.1 ml 5 μ moles Potassium L-isocitrate，再加入 0.1ml 酵素，立刻用 Gilford 柱膠掃描儀，在波長 324 nm 下測定，記錄其每 1 分鐘之吸光度 (O.D) 變化。Isocitrate lyase 活性單位以 1 molar Extinction Coe = 1.67×10^4 cm⁻¹ mole⁻¹ 表示。

三、結 果：

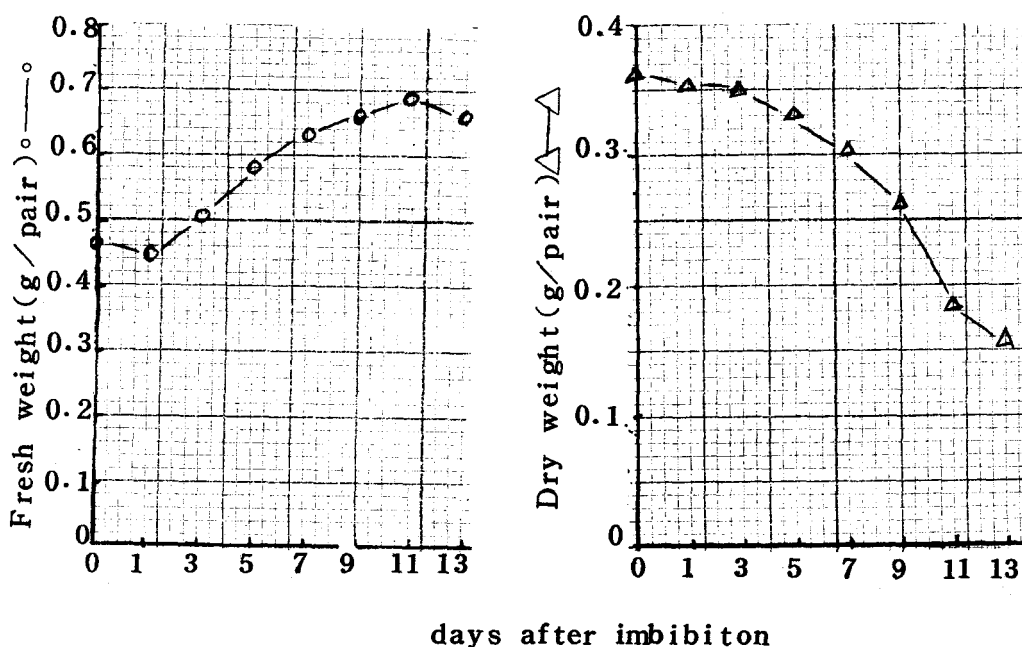
1. 子葉鮮重乾重的變化：

在黑暗下生長之落花生幼苗子葉經鮮重，乾重測定後，鮮重在第3天後開始隨萌發日數而遞增，乾重則隨萌發日數而遞減，測定之數據如表一。

表一 落花生子葉的鮮重量及乾重量

Catyledon olds	Coty. Pairs No.	Fresh weight g/pair	Dry weight g/pair
0	5	0.466	0.364
1	5	0.450	0.358
3	5	0.504	0.354
5	5	0.586	0.336
7	5	0.636	0.304
9	5	0.674	0.262
11	5	0.688	0.186
12	5	0.662	0.164

子葉鮮重乾重的相對關係的變化情形由圖一表示。



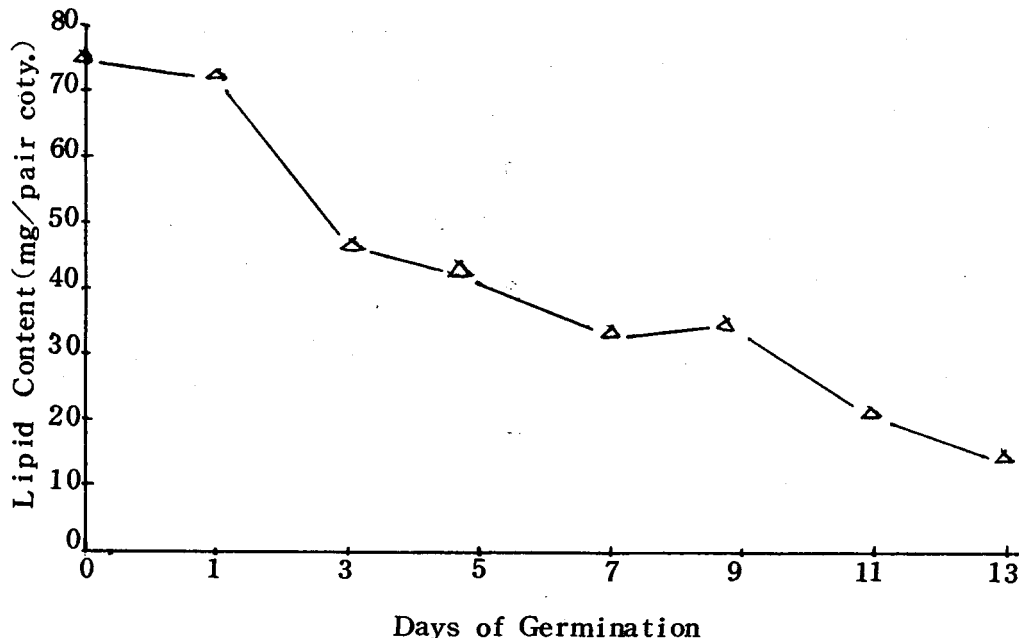
圖一 落花生萌芽期間黑暗下子葉鮮乾之變化情形

2. 脂質(Lipid)含量的變化：

在黑暗下生長的落花生幼苗，其五克子葉內所含脂質的重量，隨萌發日數之增加而遞減，並求出每一對子葉內所含脂質重量如表二。

表二 黑暗下落花生萌發期子葉中脂質含量

Cotyledon olds	Lipid Content of 5g Coty. (g)	Cotyledon pair No.	Lipid Content(mg) of per pair Coty.
0	0.443	6	74
1	0.431	6	72
3	0.312	7	45
5	0.283	7	41
7	0.253	8	32
9	0.263	8	33
11	0.182	9	20
13	0.149	9	16



圖二 黑暗下落花生萌發期間子葉內脂質含量的變化

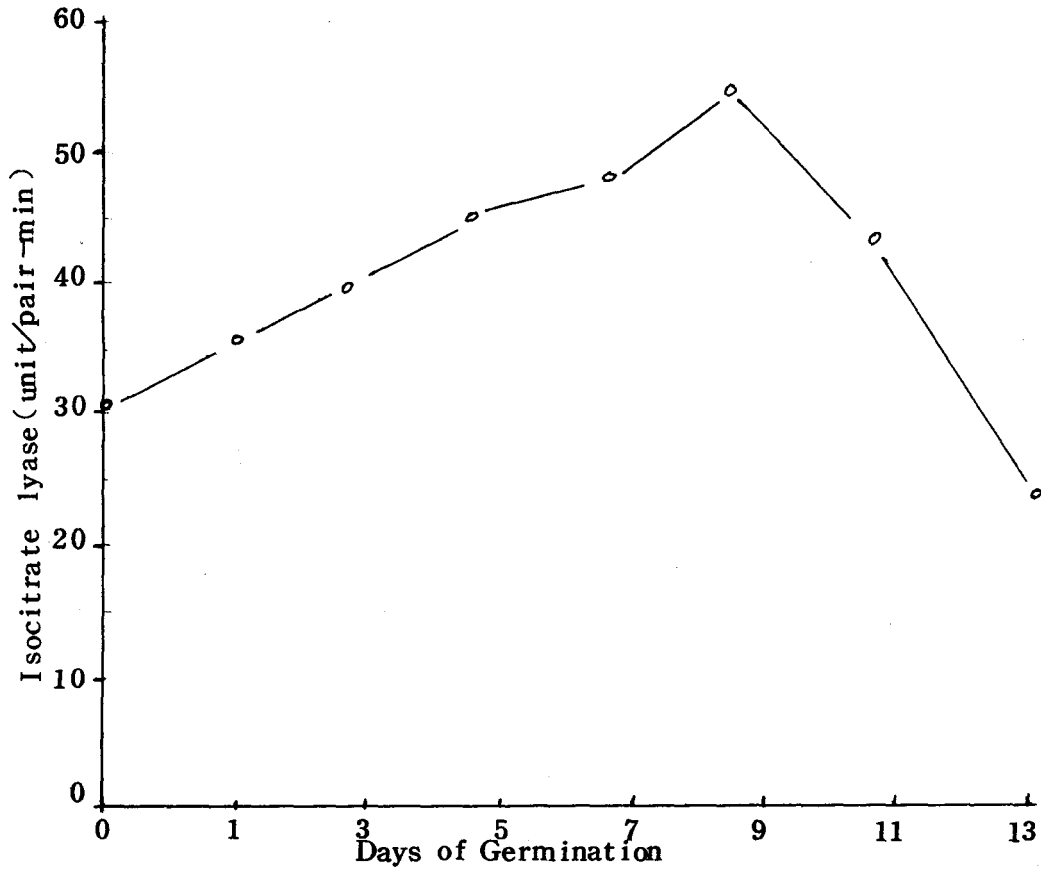
3. Isocitrate lyase 的活性消長情形：

落花生種子在黑暗下生長，然後將不同日數幼苗子葉取下，萃取 Isocitrate lyase，分別以 Gilford 柱膠掃描儀來測定其吸光度 (O.D)，然後再換算出不同日數每對子葉中 Isocitrate lyase 的活性單位 (表三)，由此數據中可知，落花生子葉中所含 Isocitrate lyase 隨萌發日數的增加而逐日上升，到第九天達到最高峯，第十一天以後又逐漸下降，由此推知子葉中脂質之分解作用與 Isocitrate lyase 之活性變化有

極密切的關係。

表三 落花生子葉中 Isocitrate lyase 的各種單位數據

Cotyledon olds	I ΔOD	II ΔOD	III ΔOD	M ΔOD	Coty. pairs(3g)	unit /pair-min	SD(α)
0	0.018	0.023	0.011	0.017	5	30.4	± 0.004
1	0.022	0.023	0.027	0.024	6	35.8	± 0.002
3	0.021	0.031	0.032	0.028	6	41.8	± 0.004
5	0.035	0.043	0.036	0.038	7	48.7	± 0.003
7	0.043	0.036	0.038	0.039	7	50.0	± 0.003
9	0.038	0.052	0.045	0.045	8	55.0	± 0.004
11	0.036	0.034	0.047	0.039	8	43.7	± 0.006
13	0.018	0.020	0.024	0.021	9	20.0	± 0.002



圖三 黑暗下落花生幼苗萌發期間子葉中 Isocitrate lyase 之活性消長變化情形

四、討 論

子葉內所貯藏之養分，乃是種子萌發期間供給胚生長發育所需養分的主要來源。落花生種子在經浸水後，由於酵素之活性逐漸旺盛，子葉內部的貯藏養分亦逐漸被分解利用，提高了溶質的濃度，因而降低了細胞的水勢，使胚根吸進的水分很容易輸送到子葉部份，所以子葉的鮮重量在萌芽生長的初期會很快地上升，但是在整個萌芽生長期間，子葉不斷的供給胚生長所需的養分，其乾重量逐日減低，因此生長初期子葉鮮重量的增加，祇不過是含水量的增加而已。

含脂質成份極高的落花生種子，在萌芽期間胚乳中的脂質可轉換為碳水化合物（2, 5, 6）以供胚生長利用，而此脂質分解轉換成碳水化合物的作用與乙醛酸循環（Glyoxylate cycle）有極密切的關係（3, 6, 7）。本實驗測得乾燥的落花生種子中含有約 17% 的脂質，並在萌發後不同日數的幼苗中，分別萃取脂質，加以乾燥處理，發現自落花生種子浸潤萌芽，脂質含量即逐日減低，其曲線變化呈斜坡直下，在第七天後脂質含量已減至原來之一半，而至第九天後脂質似有微增的趨勢，此結果與黃等（1）的報告中大豆在第八天脂肪上升的情況相吻合。此可能因落花生在黑暗下生長情況不佳，消耗能量減少，子葉中由脂質轉變而來的碳水化合物一時無法全部有效地被利用，以致造成累積的現象，此現象實值得注意。

本實驗在測定乙醛酸循環關鍵酵素 Isocitrate lyase 之活性變化時，發現在黑暗下落花生種子在萌芽生長的第九天達到最高峯，此正顯示子葉中脂質轉變為碳水化合物的作用在此期間達到最大，第十一天以後曲線即呈下坡，此可能因第七天後脂質的消耗緩慢，為了提早將前述所造成累積脂質轉變為碳水化合物有關。

至今已有很多研究報告指出 Isocitrate lyase 在未經浸潤種子中無法測出其活性（4, 8, 9），但種子一經浸潤萌發後，即誘導 Isocitrate lyase 的活性逐日增加，直到脂質含量減少後，其活性才降低下來，但本實驗發現，落花生種子未經浸潤，亦有 Isocitrate lyase 發生，經測其活性變化，達到 30.4 unit / pair-min，其真正原因尚待進一步的研究，推測可能在乾燥的花生種子中，仍有少量脂質進行轉化成碳水化合物，以行呼吸作用，產生能量，以維持種子的代謝。此實值得研究。

附 註：

EDTA : Ethylenediamine Tetraacetate Disodium Salt.

BSA : Bovine Serum Albumin.

Tris : Tris-(hydroxy methyl)-amino methane.

致 謝

本文承師大生物研究所所長楊冠政博士及師大生物研究所鄭湧涇講師的指導並提供許多寶貴的意見，特此致謝。

參 考 文 獻

1. 黃定鼎、黃啓穎 . 1979 , 大豆種子萌發生長期間貯藏養分的消長及 Isocitrate Lyase , Malate Synthetase 活性的研究。科學發展 . 7(8).830-842.
2. Beevers , H . 1961 . Metabolic Production of Sucrose from fat , Nature , 191 : 433-436.
3. Cooper , T . G . and H . Beevers . 1969 . β -oxidation in glyoxysomes from Castor bean endosperm . J . Biol . chem . , 244 : 3514-3520.
4. C . Schnardenberger , A . Oeser and N . E . Tolber T . 1971 . Development of Microbodies in Sunflower Cotyledon . Plant Physiol . 48 : 566-574.
5. Canvin , D . T and H . Beevers . 1961 , Sucrose Synthesis from acetate in the germinating Castor bean : Kinetics and Pathway . J . Biol . chem . . 236 : 988-995.
6. Huang , A . H . C and H . Beevers . 1974 . Developmental Changes in endosperm of germinating Castor bean independent of embryonic axis . Plant Physiol . . 54 : 277-279.
7. Hutton . H and P . K . Stumpf . 1969 . Fat metabolism higher Plants xxxvII . Characterization of the β -oxidation system from maturing and germinating Castor bean seeds . plant physiol . , 44 : 508-516.

- 8 Longo, C. P. 1968. Evidence for de novo Synthesis of Isocitratase and malate Sythetase in germinating Peanut Cotyledons. *Plant Physiol.*, 43: 660-664.
- 9 R. Willian Bredenbach 1969. Developmental Patterns of gluconeogenic enzymes in fatty seed storage tissues. *Experimental Plant Physiol.* 43: 105-108.
- 10 Wayne M. Becker, Christopher J. Leaver, Elizabeth M. Weir, and Howard Riezman. 1978. Regulation of Glyoxysomal Enzymes during germination of Cucumber. *Plant Physiol.*, 62: 542-549.