

綠豆幼苗中吲哚乙酸氧化酶之研究

國中教師組生物第一名

台北市立南門國民中學

作者：莊小萍

一、摘要：

自綠豆下胚軸萃取的粗酵素液內含有 IAA 氧化酶的活性，IAA 氧化酶的活性因加入輔因子 Mn^{2+} 及 2,4-雙氯酚而大為增進， Mn^{2+} 及 2,4-雙氯酚最適濃度分別為 0.1 mM 及 0.05 mM，PH 值以 5.6 ~ 6.0 為最適宜。

在綠豆發芽期間，下胚軸 IAA 氧化酶的活性每天都在改變，但不與其長度成固定的比例；此時照光植物之酵素活性很低，因為此酵素液內含有大量的天然抑制劑，而黑暗培養之植物酵素的活性很高，內含之天然抑制劑較少，經透析後酵素活性不呈現靜止期。

當反應溶液內含有 0.0006μ mole 核黃素或 0.0001 % 過氧化氫時，對 IAA 氧化酶的活性有增進作用，似乎綠豆之 IAA 氧化酶的作用與過氧化酶有密切的關係。

二、緒言：

吲哚乙酸（簡稱 IAA）是一種植物生長激素，在植物組織中由於 IAA 濃度的變化，可藉以調節植物的生長與分化。植物組織中 IAA 濃度的改變，乃由於植物體內 IAA 的生合成與代謝作用，以及活性（6, 7, 19），因此影響植物組織中 IAA 濃度變化的原因引起廣泛的重視與研究。

IAA 可因代謝分解而失去其生理活性，其主要途徑有二，一：光氧化作用，二：酵素氧化作用。自從 Tang 和 Bonner (17) 由豌豆中分離出氧化 IAA 的酵素以來，IAA 氧化酶不斷

的被發現存在於不同植物組織內，然而由不同植物中所分離出之 IAA 的氧化酶性質常迥異，但是大部份 IAA 氧化酶的作用非常類似過氧化酶的作用（10，17）。

Galston 等（1）與 Siegel 及 Galston（15），報導 IAA 氧化酶可能具有兩個作用部位：(1)過氧化酶的作用部位，需與原血紅素基及黃素結合(2) IAA 氧化酶作用部位，此部位若不與原血紅素及黃素等結合仍有氧化 IAA 的活性，但需有錳離子 (Mn^{2+}) 與有置換基的酚類為輔因子（8）。Hoyle（4）研究 Horseradish (樟木科之一屬) 中分離出之 IAA 氧化酶，也認為此酵素與氧化酶可能為一種酵素分子，具有雙重觸媒作用中心位置的酵素。近年來更由電泳法加上特殊染色法（9）證明過氧化酶的異構酶中，有些異構酶確實具有氧化 IAA 的能力。Sequeira 及 Mineo（14）以煙草根為實驗，發現新鮮的酵素液貯藏幾週以後，IAA 氧化酶的活性就消失了，而過氧化酶的活性仍舊存在，此外二種酵素的溫度失活性點及最適 PH 值均不相同，故認為兩種酵素是分離的分子，但他們並未成功的分離二種酵素。

在植物組織內 IAA 氧化酶的活性常受到植物中天然抑制劑的影響，Franklin 等人（13）發現若使豌豆芽頂照紅光，則會抑制 IAA 氧化酶的活性，此現象因再照近遠紅光而恢復，進一步的研究顯示紅光的抑制性是使頂芽產生大量的可透析性抑制劑，其為 Kaempferol 的衍生物。Morgan 及 Hall（12）報導棉花的葉內也有天然抑制劑，使 IAA 氧化酶反應初期呈現一靜止期，但若加入核黃素，在照光的情況下，可以減少或消除靜止期的拖延，此外，萃取時之酸鹼度也會影響可透析性抑制劑的含量，由此可知光線透過抑制劑的控制以影響 IAA 氧化酶的活性。Jacobsen 及 Caplin（5）發現胡蘿蔔木質部和韌皮部的抑制劑不相同，且在此二部位的分布情形也不相同，較老的韌皮部抑制劑含量較高，在木質部抑制劑的量自根尖向上逐漸減少；由他們的結果顯示植物在不同生長期，不同器官中，IAA 氧化酶及

其抑制劑相互協調以達成生理上的調節功能。

三、實驗材料與方法：

(一)綠豆幼苗之培養：

綠豆之下胚軸（俗稱綠豆芽）為研究之酵素來源，實驗用之綠豆芽除部份由市場購買外，大部份為暗室中培養。培養時可用盒底有孔的紅磚花盆為容器，內墊乾淨的布，將已浸水半天的綠豆均勻的舖在布上，以舖滿一層為限，否則發芽後太擁擠，生長情形不佳；花盆底置一托盤以保留水分，但水面不可超過綠豆層，否則通風不良，易腐爛。將以上裝置放在暗室中，室溫在 25°C 左右，每天換水二次；換水時，先倒掉托盤內之積水，再將托盤放回花盆下，將適量之自來水灑在綠豆芽上面，水自盆底的孔流入托盤內，因為毛細現象，可以保持發芽中的潤濕，如此培養之綠豆芽可以得到大量活性甚高的酵素。做不同生長期綠豆芽長度的研究時，以潮濕的蛭石來種植綠豆，綠豆再經浸水半天，但播種時必須更疏鬆、均勻，才不會相互擠壓，才能自然的生長，每天澆水一次，於每天固定時間收穫一次，洗淨、稱重並測量下胚軸之長度後立即貯藏於冰箱冷凍庫中，待收集完畢後一起萃取酵素。

(二)酵素的萃取：

將在花盆內培養5~6天，長度約6~10公分的綠豆芽取出，去除子葉部份，先用自來水沖洗，再用蒸餾水洗幾次，用紗布拭乾水份。稱重後，每100克綠豆芽加冷卻蒸餾水30ml，倒入預先冷卻的果汁機內攪碎，時間約為30秒，用三層紗布過濾以除去渣質，再以Hitachi 18-PR3冷凍離心機 $15,000\text{rpm}$, 0°C 冷凍離心20分鐘，取上層液在冰箱中透析，所用的蒸餾水約為酵素液的15倍，時間為18~24小時，如此所得之酵素萃取液立即用以做實驗或貯存於冰箱冷凍庫中備用。

(三)IAA氧化酶活性之測定：

本研究第一部份的主題是酵素的性質，第二部份是研究光

線對綠豆芽及幼苗生長過程中 IAA 氧化酶活性的影響。分成照光及黑暗兩組，天然抑制劑部份是以照光組的綠豆幼苗之酵素萃取液經煮沸、去除蛋白質後的澄清液為之。除非特別說明，IAA 氧化酶測定之反應溶液包含 1.0ml , 200 μ g / ml IAA ; 0.1ml , 2.5 mM 2,4 - 雙氯酚 (2,4 - dichlorophenol , DC P) ; 0.1ml , 5.0 mM MnCl₂ ; 1.0ml 酵素萃取液； 2.8 ml , 0.05 M 磷酸緩衝溶液 (PH = 6.0) ，反應時每管最後總體積為 5ml ，在 30° C 水浴 (water bath) 中放置一小時後，測 IAA 殘留的量。用 Salkowski 呈色法 (2) 每 2 ml 溶液加 8ml Salkowski 試劑 (300ml 濃硫酸加入 500 ml 蒸餾水，加 15ml 0.5M FeCl₃) ，猛烈搖盪後靜置 30 分鐘，用 Bausch 及 Lomb spectronic 20 colorimeter 波長 525 nm 測吸光度，各組實驗都以煮沸的酵素液加入相同的反應溶液中以為對照。酵素的活性以「破壞的 IAA 量 μ g / mg 蛋白質・分」為單位。

(四) 酵素蛋白質之測定：

將酵素萃取液適當稀釋後，採用 Waddell 法 (18) ，以 Shimadzu spectrophotometer QV - 50 測其在 215 nm 及 225 nm 波長之吸光度 (O , D) ，由吸光度換算成蛋白質的含量，依照下列公式：蛋白質含量 (μ g / ml) = (O.D_{215 nm} - O.D_{225 nm}) × 144 × 稀釋倍數

四、實驗結果：

(一) IAA 氧化酶的活性與反應時間之關係：

由暗室培養的綠豆芽下胚軸中萃取的 IAA 氧化酶，經透析後，立即用以做酵素測定實驗，反應開始時無靜止期，在 30 分鐘內酵素活性與反應時間成直線關係，60 分鐘後酵素反應速度逐漸降低。

(二) PH 值對 IAA 氧化酶活性的影響：

IAA 氧化酶的活性偏向於酸性 PH 值方面，其最適 PH 值範圍介於 PH 5.6 ~ 6.0 ，超過 6.2 則酵素活性速度減低

(三) Mn^{2+} 濃度對 IAA 氧化酶的影響：

Mn^{2+} 對 IAA 氧化酶活性的影響非常靈敏，反應溶液中加入很低濃度的 Mn^{2+} 就能迅速促進酵素的活性，最適 Mn^{2+} 濃度範圍為 $0.05 \sim 0.2\text{mM}$ ， Mn^{2+} 之濃度超過此範圍，則酵素活性逐漸降低。

(四) 2,4-雙氯酚對 IAA 氧化酶活性的影響：

由圖四顯示 2,4-雙氯酚 (D C P) 對 IAA 氧化酶有促進作用，D C P 濃度在 $0.05 \sim 0.1\text{nM}$ 之間對酵素的影響差異並不大。

(五) 過氧化氫對 IAA 氧化酶活性的影響：

H_2O_2 對 IAA 與 Salkowski 之呈色有「退色」的干擾作用，因為以煮沸的酵素液加上 H_2O_2 後，隨著 H_2O_2 濃度的上升而吸光度減小，實驗的結果 H_2O_2 濃度高於 0.003% 時，呈色二天後會完全退色，低於 0.0003% 的濃度對呈色干擾很小，可以忽略，實驗結果顯示當溶液中含有 0.0001% 的 H_2O_2 時，酵素的活性成直線式的上升，當 H_2O_2 濃度超過 0.0001% 時，對酵素活性的促進作用影響不大。

(六) 溫度對 IAA 氧化酶活性的影響：

以煮沸的酵素液加 IAA 做為各溫度反應時的對照組，結果發現溫度對呈色並無干擾。IAA 氧化酶對溫度相當穩定。 50°C 為溫度的巔峯點，溫度再升高到 60°C 、 70°C 酵素活性逐漸降低。

(七) 金屬離子對 IAA 氧化酶活性的影響：

亞硫酸鈉和一些二價離子如 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等對酵素有輕微的促進作用，而 Co^{2+} 及 Cu^{2+} 則有強烈的抑制作用， Hg^{2+} 及 Zn^{2+} 有輕微的抑制作用。 Hg^{2+} 的濃度由 0.1mM 增至 0.2mM 時，對酵素之抑制力即很明顯； Mn^{2+} 為各金屬離子中對 IAA 氧化酶活性的促進為最強。

(八) 酚類化合物及其它環狀化合物對 IAA 氧化酶的影響：

α -茶酚及維生素丙對 IAA 氧化酶有百分之百的抑制性。

8-羥基醌及茶兒酚之抑制力亦在 50% 以上；核黃素對此酵素有很強的促進效果，此外，其它化合物如 2,4-雙氯酚，2,4-雙氮酚、香豆素、咖啡鹼、二苯胺、二甲基樹脂酚、焦性沒食子酚、間苯二酚或多或少皆有促進作用，但以 2,4-雙氯酚（D C P）為酚類中最佳的促進劑。

(九)光線對綠豆發芽及生長過程中之 IAA 氧化酶活性的影響：

綠豆發芽後四天內，照光組與黑暗組之下胚軸生長情形，差異不大，第四天以後黑暗組之下胚軸繼續延長，而照光組之下胚軸停止延長，開始伸長上胚軸部份並展開初生葉，照光組在各生長過程中，IAA 氧化酶活性皆很低，而黑暗組之 IAA 氧化酶活性除了第四天中午稍微下降外，大致是隨著生長日數而升高，由二組酵素之活性曲線可知綠豆幼苗在不同生長期中，IAA 氧化酶的量是變動性的。

(十)內在天然抑制劑對 IAA 氧化酶的影響：

由圖七顯示 IAA 氧化酶活性以黑暗組為高，照光組酵素活性甚低，若在反應液中加入煮沸之照光組綠豆幼苗萃取液，則減低 IAA 氧化酶之活性，其抑制性與加入煮沸酵素萃取液之量成正比，當加入 0.3ml 之煮沸酵素萃取液時，IAA 氧化酶之活性則完全被抑制。

五、討論：

高等植物中 IAA 氧化酶的反應為一種氧化、還原作用，需要金屬離子做為輔因子，在各種金屬離子中以 Mn^{2+} 的作用最好，在各種酚類中以 2,4-雙氯酚（D C P）最佳（8），關於這些輔因子的反應機制，目前尚未十分瞭解，Yamazaki 報導單酚類的游離基是單電子的強氧化劑，能氧化還原態的物質，如 IAA 等。2,4-雙氯酚可以取代 IAA 氧化酶的天然輔因子地位。Stutz (16) 報導 Mn^{2+} 為 IAA 氧化酶的輔因子，酵素對 Mn^{2+} 及 2,4-雙氯酚的依賴程度隨植物種類而異，從綠豆下胚軸萃取之 IAA 氧化酶需要 Mn^{2+} 與 2,4-雙氯酚做為輔因子。 Mn^{2+} 的濃度最適範圍在 0.05 ~ 0.2 mM，2,4-雙氯酚的最適

濃度爲 0.05 mM，此結果符合其它學者研究豌豆、胡蘿蔔、煙草之 IAA 氧化酶之報導（5, 13, 14）。Margan 及 Hall (12) 報導棉花之 IAA 氧化酶若不加 Mn^{2+} 或 2,4-雙氯酚，則沒有明顯的活性。但他們用丙酮部份純化酵素，可能在此過程中將天然輔因子去除了。本研究所用的未純化酵素中，可能有天然輔因子存在，故未加 Mn^{2+} 及 2,4-雙氯酚時仍有微量的活性，而加入 Mn^{2+} 及 2,4-雙氯酚可以大量促進酵素活性。緩衝液大多選用正磷酸緩衝液，Stutz (16) 認爲檸檬酸緩衝液會與 Mn^{2+} 起相互作用，其它有機酸緩衝液如琥珀酸、蘋果酸對 IAA 氧化酶都有不同的抑制性，綠豆 IAA 氧化酶的適宜 PH 值都在 5.6 ~ 6.0 之間，重覆多次實驗的結果所得最適 PH 值都在 PH 5.0 ~ 6.0 之間，若能進一步純化酵素，或許可以在 PH 5 和 6 之間找出一尖銳巔峯點。Morgan 及 Hall (12) 報導因抑制劑之存在，所以反應初期有一段靜止期，當 PH 值越低，則靜止期越短。故推論酸化可使抑制劑不活躍，但酸性雖使靜止期縮短，然而整個反應期間的活性並不高；相反地，萃取酵素時，若 PH 值越低則抑制劑量越高，但經過透析後，PH 值越低者之靜止期越短，表示此抑制劑在酸性液中易從結合的蛋白質之間分離出來，他們的實驗表示 PH 值透過對抑制劑的控制而影響酵素的活性；從綠豆下胚軸萃取之 IAA 氧化酶，反應初期並沒有靜止期（圖一），可能因爲綠豆幼苗是在暗室中培養，天然抑制劑量甚微，經過透析後天然抑制劑之量已不足以影響 IAA 氧化酶之活性。以往關於 IAA 氧化酶之抑制劑方面的研究 (11)，一般多認爲單酚類促進酵素活性，而鄰位雙酚類與多酚類抑制酵素之活性，但本研究之結果顯示以上的看法並非絕對的，因爲間苯二酚、焦性沒食子酚、二甲基樹脂酚皆爲雙酚、多酚類，但對酵素有促進作用，而 α -苯酚爲雙環單酚類，却有百分之百的抑制性。現已知很多植物體內都有 IAA 氧化酶的天然抑制劑，如胡蘿蔔的根 (5)，扁豆的葉內 (15) 所含的天然抑制劑，棉花內的棉花醇 (12) 及豌豆 Kaempferol 衍生物（多酚類化合物）。

物）。本研究發現在黑暗中培養的綠豆幼苗並不明顯的存在天然抑制劑（圖七），而照光生長的綠豆幼苗酵素活性極低，探究其原因是因為照光植物產生了強烈的抑制劑，當加入0.3ml此抑制劑時就完全抑制了酵素的活性，這點與其他學者的報導相符合（3, 13）他們發現收穫前照紅光（640nm）會使植物產生抑制劑，但近遠紅光（730nm）對它有逆效果，本研究自開始就分成二組，一組完全照光，一組完全黑暗，究竟是日光中的何種波長光線對植物有影響，有待進一步的探討，此外，綠豆天然抑制劑的分離及分子結構式的確定也是有趣而值得研究的部份。

關於IAA氧化酶的作用機制有幾種說法，Galston（1）研究豌豆的IAA氧化酶，因加入H₂O₂而顯著的提高酵素活性，其中核黃素扮演了重要的角色，故認為過氧化酶及黃素蛋白質（flavoprotein）乃是IAA氧化酶系統內的一部份；Yamazaki（20）最近提出一套假設以解釋Horseradish過氧化酶的作用機制；到底IAA氧化酶與過氧化酶的關係如何？從許多人的研究看來，二者之關係可能因植物種類而異，例如Morgan及Hall（12）研究棉花內之IAA氧化酶發現H₂O₂對它並沒有明顯的促進，而Galston（1）的研究顯示豌豆的IAA氧化酶因H₂O₂的加入而大為促進，本研究之結果也顯示H₂O₂與核黃素對IAA氧化酶活性有促進效果。若能在酵素的分離技術上有所改進，且對各科植物做廣泛的調查，則不難瞭解IAA氧化酶的作用機制。

六、參考文獻：

- 1 Galston, A.W., J. Bonner, and R. S. Baker, 1953. Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleactic acid oxidase from peas. *Arch Biochem. Biophys.* 42: 456-470.
- 2 Gordon, S.A., and R. Weber. 1951. Colorimetric estimation of IAA. *Plant physiol.* 26: 192-195.
- 3 Hillman, W.S., and A.W. Galston. 1957 Inductive control

- of indoleacetic acid oxidase activity by red and near infrared light. *Plant Physiol.* 32: 129-135.
4. Hoyle, M.C., 1972 Indoleacetic acid oxidase "A dual catalytic enzyme" *Plant Physiol.* 50: 15-18.
 5. Jacobson, B.S., and S. M. Caplin 1967 Distribution of an indoleacetic acid-oxidase-inhibitor in the storage root of *Doccus carota*. *Plant Physiol.* 42: 578-584.
 6. Lang, A. 1967 Plant growth regulation. *Science* 157: 589-592.
 7. Leopold, A.C., 1964 *Plant Growth and Development*. Mc Graw-Hill Book Company New York. p.89-91.
 8. Lockhart, J.A., 1955. The role of 2,4-dichlorophenol in the determination of IAA by peroxidase. *Plant Physiol.* 30: 86-89.
 9. Macnicol, P.K., 1966 Peroxidase of the Alaska pea 87 : 19-30.
 10. Meudt, W. J., 1967 Studies on the oxidation of IAA by peroxidase enzymes. *Ann, N.Y. Acad-Sci*, 144: 118-128.
 11. Morgan, P. 1967 Meetings. Plant growth regulation. *Science* 157: 589.
 12. Morgan, P.W., and W.C. Hall. 1963. Indoleacetic acid oxidizing enzyme and inhibitor from light-grown cotton. *Plant Physiol.* 38:365-370.
 13. Mumford, F.S., D.H. Smith., and J.E. Castle 1961. An inhibitor of Indoleacetic acid oxidase from pea tips- *Plant Physiol.* 36: 752-756.
 14. Sequeira, L., and L. Mineo, 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots, *Plant Physiol.* 41: 1200-1208
 15. Siegel, B. E., and A. W. Galston. 1967. Indoleacetic

- acid oxidase activity of apoperoxidase Science 157:1557
-1559.
16. Stutz, R.E. 1957. The indole-3-acetic acid oxidase of Lupinus albus. L. Plant Physiol. 32 : 31-39
 17. Tang, Y.W., and J. Bonner. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. Arch Biochem Biophys 13 : 11.
 18. Waddell, W. J., and C. Hill. 1956. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. J. Lab. Chin. Med. 48 : 311-314.
 19. Wareing, P.F., and I.D.J. Phillips. 1971. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon, Press. New York P.69-70.
 20. Yamazaki, I. 1957. The oxidoreductive feature of intermediates formed in the reaction of peroxidase. Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem. Tokyo Kyoto. P. 224-229.
 21. Yamazaki, H., Yamazaki, I., 1973. The reaction between Indole-3-acetic acid and Horse radish peroxidase. Arch. Biochem Biophys. 154 : 147-159.