

豆科作物發芽過程中澱粉酶活性 變化的研究

高中教師組生物科第一名

台灣省立中興高級中學

作者：洪美貞、林清坤

一、研究動機

種子一旦發芽，將再度重現植物生機，在衆多的影響發芽的因素中，充足的能量和養分供給，為胚之生長發育所不可或缺。種子萌發時，可誘導產生一系列之水解酵素，如澱粉酶（1, 3, 5, 6, 8）、蛋白酶（9）、脂肪酶（7）等，分別將子葉或胚乳中所貯存的養分，分解成胚生長所必需的還原醣、胺基酸、脂肪酸和甘油等。在三種不同類型的豆科種子中，如綠豆（*Phaseolus aureus* L.）富含澱粉⁽²⁾花生（*Arachis hypogaea* L.）種子脂肪含量較多，而黃豆（*Glycine max* (L.) Merrill）則貯有大量的蛋白質，在種子發芽過程中，由上述三類作物種子所產生之澱粉酶量及其活性有何變化，是否與整個發芽過程呈正比關係，乃本實驗研究之動機。於本研究中，我們將以最簡明而有效的方法⁽⁴⁾，來闡述其關係，或可為高中生物教學之參考。

二、材料方法與原理

(一)材料：綠豆、黃豆、花生種子

α -Amylase (Sigma)

 標準澱粉 (Merck)

 檸檬酸溶液 (Shimakyu)

(二)方法與原理：

1 三類作物之發芽率、胚根長度及種仁、種皮每日增重測定。

(1)取綠豆 50 粒，黃豆 25 粒，花生 20 粒，各六盤，以 5%

NaOCl 溶液消毒 10 分鐘，置於培養皿中，加無菌水，放入 30 °C 溫箱。

(2) 定時計算其發芽數，求其發芽平均率，量其胚根長度及其種仁、種皮每日增重量測定。

2. 還原醣與澱粉酶量之標準曲線測定

(1) 取 2.8 克標準澱粉溶在少量水中，加熱溶化，配成 500 ml 之澱粉溶液，加檸檬酸液調 PH 值為 4.5。

(2) 取 0.5 克 α -Amylase，加純水至 1000 ml，即成 500 p.p.m. Amylase 溶液，再由其配成下列濃度— 250 p.p.m.，100 p.p.m.，50 p.p.m.。

(3) 取 45 支試管，分為 5 組（每組 9 支），各加 9 ml 澱粉溶液及 1 ml 不同濃度之 Amylase 溶液，置於 40 °C 水浴中 30 分鐘，以進行酵素水解作用。

(4) 上液各取 5 ml，加入 A 液 10 ml 及純水，配成 30 ml 溶液，加熱沸騰 3 分鐘，冷卻，各加 10 ml B 液、C 液，再以 0.05 N 硫代硫酸鈉溶液滴定，測其還原醣含量（Somogyi 法）。

(5) 以所得還原醣量，繪出各濃度 Amylase 之標準作用曲線。

Somogyi 法 —— 為最常用且準確的還原醣測定法之

一，包含下列各試液。

A 液：① 90 克酒石酸鉀鈉 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)，225 克磷酸鈉 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 溶於約 600 ml 水。

② 30 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶於約 100 ml 水。

③ 3.5 克碘酸鉀 (KIO_3) 溶於少量水。

將上述三種溶液混合後，加水至 1000 ml。

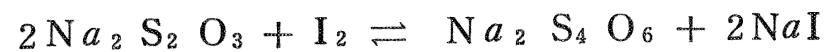
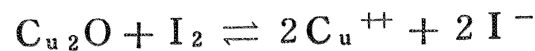
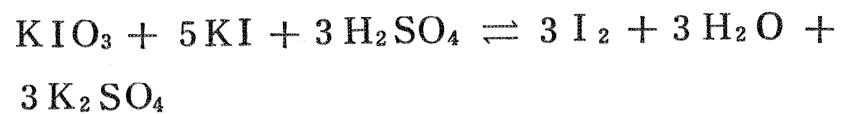
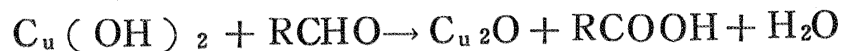
B 液：草酸鉀 ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 90 克，碘化鉀 (KI) 40 克溶於水至 1000 ml。

C 液：2N—硫酸溶液 (56.1 ml 濃硫酸加水至 1000

ml)。

D液：0.05 N — 硫代硫酸鈉溶液（取 $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12.4 克加水至 1000 ml ）。

原理 A： Cu^{++} 在鹼性溶液中，被醣類還原時，變為 Cu^+ ，此氧化亞銅（ Cu^+ ）為碘酸鉀和碘化鉀在酸性溶液中游離的碘所氧化，殘存的碘用硫代硫酸鈉標準溶液滴定，求被氧化亞銅所氧化的碘量，算出醣量。其反應式如下：



3. 發芽過程中還原醣與 Amylase 量變化測定

- (1) 稱 2 克重之三種作物種子各 36 盤，以 5% NaOCl 溶液消毒 10 分鐘，置於 30 °C 溫箱，使其發芽。
- (2) 每日各取六盤發芽種子，加水 400 ml，以果汁機打碎，靜置 1 小時，取上液 5 ml，各 8 次，用 Somogyi 法，測其還原醣每日變化量。
- (3) 再取上液 1 ml 各加 9 ml 澱粉液（各 8 次），置於 40 °C 水浴中 30 分鐘，依 Somogyi 法測其還原醣量，以該量換算出 Amylase 的酵素活性（ Enzyme activity ）。

⊗ 酵素活性的定義：

原理 B： 酵素活性 = $0.1 \times$ 由澱粉酶作用所產生的葡萄糖量 (mg) \times 溶液稀釋倍數（每克澱粉每小時之葡萄糖變化量 (mg)）

由方法(二)3 — 4 中求得的還原醣量，並就其稀釋倍數，依上列公式即可求得澱粉酶的酵素活性。

澱粉酶量的測定：利用所求得還原醣與澱粉酶量的標準曲線關係圖，再依各發芽時期測得的還原醣

量由標準曲線圖換算求得。

4. 澱粉含量測定：

- (1) 將種子研碎，取 1 克，加水 100 ml，靜置 1 小時後，取出 5 ml，用 Somogyi 法測其還原醣含量，此為初還原醣量。
- (2) 上之餘液加 10 ml 25% 鹽酸後，於沸騰水溶液中迴流 3 小時，冷卻後用 NaOH 溶液中和至微酸，加水稀釋至 250 ml，用濾紙過濾之。
- (3) 取濾液 5 ml，用 Somogyi 法測定還原醣量，經減去其初還原醣量後，依公式換算，得其澱粉含量。

原理 C：澱粉加酸加熱，會水解變成還原醣，再以 Somogyi 法定量還原醣，其定量值依下列公式計算，即得澱粉量。

$$\text{澱粉}(\%) = \frac{\text{還原醣量}(\text{mg}) \times 0.9 \times \frac{250}{5} \times \frac{100}{\text{樣品重}(\text{g})} \times \frac{1}{1000}}$$

三、結果與討論

比較這些主要成分各異的豆科作物種子在 30℃ 下之發芽率，由表一可知：

- (一) 綠豆——發芽速率最快，在 24 小時內已達 80%，41 小時內全都萌芽完畢。
- (二) 黃豆——發芽率略低於綠豆，在 24 小時內約達 60% 左右，在 41 小時內全部種子也都萌芽了。
- (三) 花生——發芽率為三者中最低的，在 24 小時內只達 20% 左右，在 41 小時尚有 7.5% 的種子尚未萌芽。

表一：三類豆科作物種子發芽率比較

發芽時間 (小時)	發 芽 率 (%)		
	綠 豆	黃 豆	花 生
0	0	0	0
16	43.3	24.0	5.0
21	76.3	48.7	10.0
25	91.0	60.7	21.7
38	99.0	96.0	79.2
41	100.0	100.0	92.5

在發芽過程中，黃豆的胚根生長長度呈逐漸凌駕綠豆胚根的趨勢，到第6天時，黃豆胚根即超過綠豆胚根 2.1 cm，雖然在第4天時，尚差綠豆胚根 1.54 cm。花生胚根之生長勢呈緩慢增加現象，在6天的發芽過程中，其每天胚根的生長長度平均約 0.9 cm，不若綠豆的 1.9 cm 及黃豆的 2.2 cm。（表二）

表二：三類豆科作物種子萌發後胚根長度之比較

發 芽 日 數	胚 根 長 度 (cm)		
	綠 豆	黃 豆	花 生
1	0.83	0.59	0.53
2	2.30	3.50	1.33
3	4.61	5.86	3.35
4	9.25	7.71	4.63
6	11.21	13.32	5.38

在 6 天的發芽過程中，種仁增重現象相當明顯，其中尤以綠豆種仁之增重趨勢最大，由未發芽時的 2 克重，到第 6 天的 7.7 克，每天約增重 0.95 克，遠大於黃豆的 0.56 克及花生的 0.46 克。在種皮方面，其增重的趨勢不明顯，由第 1 天到第 6 天，綠豆種皮只增重 0.14 克，黃豆只 0.02 克，花生只 0.07 克。（表三）

表三：三類豆科作物種子萌發後種仁及種皮每日重量變化（克）比較

發 芽 日 數	綠 豆		黃 豆		花 生	
	種 仁	種 皮	種 仁	種 皮	種 仁	種 皮
1	3.02	0.31	3.69	0.26	3.06	0.07
2	5.38	0.32	4.68	0.27	3.41	0.07
3	6.04	0.38	4.89	0.26	3.95	0.08
4	7.33	0.39	5.17	0.26	4.27	0.11
6	7.68	0.45	5.33	0.28	4.77	0.14

由上述的發芽現象，可知三類豆科作物種子的發芽速率，以綠豆最快。在種仁的增重方面，也以綠豆的增加最大。在胚根生長長度方面，綠豆則緊跟在黃豆之後，綠豆發芽勢的強勁，應與其內含物質有關。由表四可知，綠豆澱粉平均含量高達 50.68%，此量高出黃豆 4.2 倍，高出花生達 7.5 倍左右。綠豆種子內豐富的澱粉含量是其發芽期間充足的養分及能量供給來源所在。花生種子的發芽勢較弱，胚根生長長度較小，其種仁每日增重較弱，也應與其低澱粉含量（6.8%）有關。

表四：三類豆科作物種子未發芽前之澱粉含量測定

澱粉量 (%)	綠豆	黃豆	花生
平均值	50.68	12.05	6.77
最高值	62.48	13.54	7.45
最低值	43.24	8.69	5.36

綠豆及花生種子在發芽前測不出其澱粉酶的存在，而黃豆種子則否。

黃豆種子於發芽前即有甚高的澱粉酶活性測定量，酶為一種蛋白質，黃豆種子之蛋白質含量為三者之最，或可作為黃豆種子在發芽前期即有澱粉酶之因。

由這些酵素活性的直接調查資料可知：

- (一) 黃豆——發芽時，其種子內澱粉酶之酵素活性偏高，於第4天達最高峯（79.2）之後即逐漸下降。
- (二) 綠豆——種子發芽時，其澱粉酶酵素活性於第3天達最高峯（16.5），其活性只達當時黃豆活性之 $\frac{1}{3}$ 量，之後亦呈緩慢下降趨勢。
- (三) 花生——種子於發芽時，其澱粉酶酵素活性於第2天達最高峯（11.3），但其值只為綠豆最高峯值的68%，為黃豆最高峯值的5%。花生種子在第3天時，澱粉酶酵素活性即急遽下降，只為第2天時的55%左右。（表五）

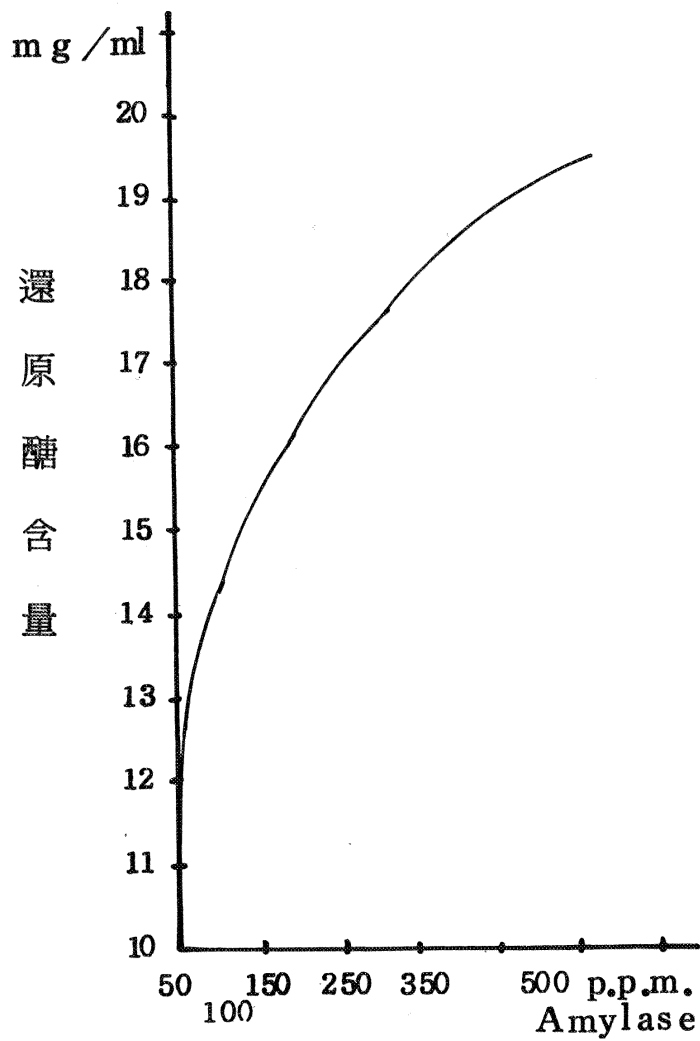
表五：三類豆科作物種子發芽時澱粉酶酵素活性調查

發 芽 日 數	澱 粉 酶 酵 素 活 性		
	綠 豆	黃 豆	花 生
0	0	23	0
1	4.2	40.5	6.1
2	5.7	62.5	11.3
3	16.5	71.6	6.2
4	14.9	79.2	5.7
6	13.8	71.0	3.7

藉測定發芽種子之每日還原醣量，並依據還原醣與澱粉酶標準曲線關係（圖一），可得三類豆科作物種子發芽時澱粉酶量之間接測定值。

- (一)花生種子——發芽時，頭兩天的澱粉酶量呈甚高趨勢（ >500 p.p.m.），第3天後則急遽下降，此與表五之澱粉酶酵素活性變化符合。
 - (二)黃豆種子——澱粉酶量於發芽第2天達最高峯（ >500 p.p.m.），之後呈緩慢下降現象。
 - (三)綠豆種子——於發芽時呈逐漸上升趨勢，於第3天達最高峯（ >500 p.p.m.），於第4天亦呈下降現象。
- （表六）

圖一：還原醣與澱粉酶標準曲線關係圖



表六：三類豆科作物種子萌發時之澱粉酶量調查（由還原醣與澱粉酶標準曲線所求得）。

發 芽 日 數	澱粉酶量 (p.p.m.)		
	綠 豆	黃 豆	花 生
1	< 50	155	> 500
2	90	> 500	> 500
3	> 500	436	184
4	251	411	149

四、結論

(一)三類豆科作物種子：

1. 發芽速率——綠豆最快（24小時即達80%），緊跟著的是黃豆，花生種子之發芽率較為緩慢。
2. 胚根生長長度——種子萌發後，胚根生長長度方面以黃豆最長，其次為綠豆，花生亦較為緩慢。
3. 種仁之每日增重量——以綠豆最大，其次為黃豆，再次為花生。

就整個發芽過程觀之，綠豆種子的發芽勢最為強勁，黃豆次之，花生則較為低弱。

(二)綠豆種子中含甚高的澱粉量（50.68%），藉澱粉酶的作用，澱粉可以被分解成小分子的還原醣，所以在還原醣充分供應方面，綠豆種子優異於黃豆及花生種子，雖然綠豆種子在發芽後才合成其澱粉酶，且其量於發芽初期亦不高於黃豆及花生種子，但藉其作用即能提供源源不斷之胚生長發育所直接必需的還原醣，此或可解釋其發芽勢甚為強勁之因。

(三)黃豆種子於發芽前，其澱粉酶即有相當活性存在，於發芽後澱粉酶之酵素活性更凌駕其他二者之上，藉如此高的酵素活性，將能充分利用其所含之澱粉資源（12.1%）。而其發芽勢所以較綠豆低弱之因，可能由於其澱粉含量只為綠豆之24%之故了。

(四)花生種子於發芽前，無澱粉酶存在，但在發芽初期即有甚高的澱粉酶量（ > 500 p.p.m.）產生，此或許由於其種子甚大，於發芽時所誘導產生之澱粉水解酵素比種子較小的黃豆及綠豆為多，只是因為其澱粉來源有限（6.8%），於短時期內即被利用完畢，所以其澱粉酶量由於作用基質逐漸短缺，而呈急遽下降趨勢。

(五)三類豆科作物種子於發芽時之澱粉酶量對整個發芽現象的關係，必須依其種子內含澱粉量而定。若種子內含豐富澱粉資源，

如綠豆，則雖然澱粉酶量及其酵素活性於初期較低，也有最高的發芽速率。反之，發芽初期時，澱粉酶量及其酵素活性不低的作物，如花生者，因其甚低的澱粉含量，卻有不高的發芽勢。

五、參考文獻

- (一)王月雲 1983 花生種子澱粉酶之研究 生物科學第 21 期 P.9 ~ 27。
- (二)陳昭義 1978 濕法分離各種原料澱粉的粉絲品質及其理化性質之研究 台大農化研究所碩士論文 P. 26。
- (三)Chrispeels, M.J. and J.E. Varner. 1967 Gibberellic acid—Enhanced Synthesis and Release of α -Amylase and Ribonuclease by Isolated Barley Aleurone Layers. Plant physiol. 42. P. 398 — 406 .
- (四)Clum, H.H. 1967. Formation of amylase in disks of Bean Hypocotyl. Plant physiol. 42. P. 568 — 572 .
- (五)Koshiha, T. and T. Miramikawa. 1981. Purification by Affinity Chromatography of α -Amylase — A Main Amylase in Cotyledons of Germinating Vigna Mungo Seeds. Plant & cell physiol. 22 (6): P. 979. — 987 .
- (六)Moll, B.A. and R.L. Jones, 1982. α -amylase secretion by Single. barley aleurone layers. Plant physiol 70 P. 1149 — 1155 .
- (七)Oo, K. C. and P.K. Stumpf, 1983. Some enzymic activities in the germinating oil Palm (*Elaeis guineensis*) seedling, Plant physiol. 73. P. 1028 — 1032 .
- (八)Varner J.E. and R.M. Mense 1972 Characteristics of the Process of enzyme release from Secretor,

- plant cells. Plant physiol. 49. P. 187 — 189 .
- (九) Yomo, H. and J.E. Varner. 1973. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. Plant physiol. Vol. 51. P. 708 — 713 .

評語：研究三種植物種子發芽與澱粉酶之活性比較，實驗設計周詳、試驗過程及使用方法很得體。結果討論有創作性。文獻引用方式一致，是篇寓喻嚴謹的作品。