

光对高等植物乙醇酸氧化酶的诱导

黄卓烈

(农业生物系)

提 要

本文阐述了光对高等植物乙醇酸氧化酶活性的影响,分析了白光、光强度、光质等对酶的诱导作用,讨论了前人解释光的作用机制的几种学说.在此基础上提出了另一个光对乙醇酸氧化酶诱导机理的假说,认为光对该酶的诱导有两方面的作用,一是进行光合作用产生乙醇酸,乙醇酸诱导酶蛋白合成;二是光促进体内FMN的生物合成与还原.所合成的酶蛋白再与FMN结合成全酶而表现出催化活性.

关键词 光; 乙醇酸氧化酶; 乙醇酸; 诱导作用; 黄素单核苷酸

引 言

自从本世纪四十年代在高等植物中发现了乙醇酸氧化酶(E C1.1.3.1)以来,许多人对此酶已进行了大量的研究.现在已经知道,乙醇酸氧化酶是光呼吸过程中的一个非常重要的酶,光合作用所形成的副产物乙醇酸,在乙醇酸氧化酶的作用下,转化为乙醛酸,后者经转氨作用转变为甘氨酸,两分子甘氨酸反应产生丝氨酸,放出 NH_3 和 CO_2 。这就是高等植物光呼吸 CO_2 的主要来源。

光呼吸只有在光下才能进行.光对光的呼吸作用一方面是由于在阳光下,叶绿体利用光能进行光合作用产生乙醇酸,然后进入乙醇酸途径;另一方面,Tolbert等人^[1,7]发现光对乙醇酸氧化酶活性的出现有促进作用.此后,许多人相继研究了光对乙醇酸氧化酶的影响.本文试将这些文献作综合评述。

一、光对乙醇酸氧化酶的诱导作用

许多研究都表明,乙醇酸氧化酶活性的出现与光的作用密切相关.而光对乙醇酸氧化酶活性的影响可归纳为如下五方面。

(一) 白光的作用

早在四十年代,人们就证明,在高等植物的绿色细胞中存在着活泼的能够氧化乙醇酸的酶.此后,Tolbert等人报道,这种酶不存在于白色的根中,在黑暗中发芽和生长的植物,其黄化的叶片中只存在极少量或不存在这种酶.而当将在黑暗中生长了七天的黄

*本文承蒙李明启教授指导和审阅谨此志谢。

1987年11月10日收稿

化大麦幼苗照以450呎烛光的白光时,乙醇酸氧化酶活性迅速出现。在白色的马铃薯块茎中,并不存在乙醇酸氧化酶,而当置之于光下使之变绿时,块茎即产生活泼的乙醇酸氧化酶了^[17]。Toldert及其同事用大麦、小麦、玉米、燕麦和黑麦等植物的黄化幼苗照以100呎烛光白光24小时,经照光的幼苗中乙醇酸氧化酶活性比黄化幼苗大大增加,有的甚至增加十倍之多^[18]。在马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica*)的白色佛焰苞中没有乙醇酸氧化酶活性,而当佛焰苞变绿时,体内便出现了乙醇酸氧化酶活性了。在黄化的豆类叶子变绿96小时内,乙醇酸氧化酶的活性增加约十倍。在黄化的水稻幼苗中不存在乙醇酸氧化酶活性,用白光照射3~5小时后,幼苗便出现活泼的乙醇酸氧化酶。

光呼吸的一个主要特征,就是绿色植物在光下放出 CO_2 。Vil等^[21]用 ^{14}C 标记的乙醇酸-1- ^{14}C 和甘氨酸-1- ^{14}C 掺入到菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的叶子中去,在照光(400—700nm, 30mW·cm⁻²)的条件下,发现由乙醇酸-1- ^{14}C 所产生的 $^{14}\text{CO}_2$ 的数量增加。于是他们认为,在乙醇酸途径中,对光敏感的反应是在乙醇酸形成与甘氨酸形成之间发生。这也进一步证明光对乙醇酸氧化酶具有促进作用。

(二) 光照强度的影响

光是影响乙醇酸氧化酶的一个主要因子。而该酶活性的高低还与光强度有关。这方面的研究报告并不多。最早报道的是Tolbert及其同事的工作^[18]。他们用黄化的小麦幼苗分别照以0.02~1000呎烛光,结果在低光强范围内,酶活性有随光强增加而升高的趋势,而以15呎烛光所出现的活性为最高。高于15呎烛光其活性又有所下降。用燕麦研究也有相似的结果^[18]。

把白芥(*Sinapis alba*)植于强光(100W·M⁻²)和弱光(3W·M⁻²)下,结果发现,若以鲜重计算,强光下生长的酶活性是弱光下的2倍;而若以叶面积计算,则强光的是弱光的4倍。将水稻黄化幼苗照以不同强度的白光,结果,各处理的幼苗均出现酶活性,但强光处理的酶活性较弱光处理的强^[11]。

这些报道都说明,乙醇酸氧化酶活性高低与光强度有关。在一定范围内,活性随光强增加而增加。但各种植物会有差别。

(三) 光质的影响

在可见光范围内,不同光质对乙醇酸氧化酶的活性有不同的影响。这方面研究较多,但所得结果各异,有些甚至是互相矛盾的。研究得较多的是红光和蓝光,对绿光和远红光也有少量的研究。

将黄色大麦幼苗用白光、红光、蓝光和绿光分别照射6小时,每种处理都能使幼苗体内出现乙醇酸氧化酶活性^[17];用小麦研究也有类似结果,并发现以蓝光及红光的效果较好^[18]。

由此说明,各色光对乙醇酸氧化酶活性的出现都有促进,而较有效的是蓝光和红光。然而,另一些研究却有与此不同的结果。

在烟草中,蓝光严重地抑制乙醇酸氧化酶活性,但红光则没有抑制作用^[16]。将大麦照以30分钟红光,可使体内乙醇酸氧化酶结合到过氧化物酶体的膜上去,而蓝光无此效果。由红光所促进的结合却受到远红光所逆转^[14]。

以上事实说明，红光对诱导或激活乙醇酸氧化酶较有效，蓝光效果较差，甚至起抑制作用。蓝光之所以会抑制乙醇酸氧化酶活性，据说是由于蓝光能使FMN激发，激发态的FMN会钝化酶蛋白，因而抑制了乙醇酸氧化酶活性^{[16][18]}。

与上述结果相反，另一些研究结果则表明，蓝光对乙醇酸氧化酶活性的出现比红光更为有效。

用大麦、豆、玉米和菜豆研究，证明了在蓝光下形成乙醇酸比在红光下多，所形成的乙醇酸能导致乙醇酸氧化酶的合成。Voskresenskaya等报道，植于蓝光下的豆类植株乙醇酸积累的速率较植于红光下者快，同时发现蓝光可刺激黄豆和玉米中乙醇酸氧化酶活性。黄卓烈和李明启用水稻幼苗进行研究，也证明蓝光比红光更有效^[11]。蓝光甚至可使小麦根变绿而出现乙醇酸氧化酶活性^[3]。用离体细胞器研究也有类似的结果。例如，将小麦离体的微体照以不同颜色的光，也发现蓝光对刺激乙醇酸氧化酶更有效。

综上所述，尽管各人的研究结果很不一致，但都说明各种颜色光都有可能诱导乙醇酸氧化酶的活性，而尤以红光和蓝光的作用为主要。其作用光谱可能与光合色素的吸收光谱有关，也即与光合作用有关。Feicrabend等^[4]报道，幼苗照光时，叶绿素形成量的多少与体内乙醇酸氧化酶活性的高低有平行的关系。这就足以说明这一点。

（四）不同照光时间的影响

乙醇酸氧化酶活性的出现与光照时间有一定的关系。Tolbert等^[17]用黄化大麦幼苗照光时，在起初6个小时内酶活性随时间增加而迅速升高，超过6小时，上升速度减缓。Kuczmak等^[8]把FMN掺入黄化小麦幼苗后再照光，发现酶活性也随照光开始而逐渐升高。这些报道都表明，一开始照光，酶活性就随之出现或增加。

但另有一些与此不同的研究结果。Kolesnikov等曾报道，在小麦和大麦中，10~25分钟的短时间照光不能诱导出乙醇酸氧化酶活性，而要经3小时的连续照光才有酶活性出现。Van Poucke等^[10]将播种36小时后对白芥照以远红光，需经过至少12小时的滞后期，其体内乙醇酸氧化酶活性才比在连续黑暗中生长的对照处理有明显的差异。用黄化水稻幼苗照光，也需3~5小时的滞后期才出现乙醇酸氧化酶的活性^[11]。

可见，乙醇酸氧化酶活性的出现与照光时间有关。一些实验结果是酶活性随照光开始而立即出现活性，而另一些结果则认为需一定长度的照光时间才出现活性。从机理说，这两种结果似乎是有矛盾的。

二、关于光的作用机理的几种学说

从上面的叙述可知，乙醇酸氧化酶活性的出现与光的作用密切相关。但光是通过何种方式来影响乙醇酸氧化酶活性的，人们根据各自的研究结果提出了不同的假说。

（一）关于底物激活作用

“底物激活”的假说是由Kuczmak等^[8]提出来的。他们认为，在黄化的植物中有乙醇酸氧化酶的酶原存在。给植物照光时，叶子进行光合作用产生乙醇酸，乙醇酸便将早已存在的酶原激活成为有活性的乙醇酸氧化酶^[8]。但是用乙醇酸渗入到黄化的水稻

幼苗中后,立即测定,未测到酶活性;用放线菌酮处理黄化幼苗后照光,幼苗体内也不出现酶活性;经黑暗处理酶活性已消失但尚能进行光合作用的水稻绿色幼苗,用放线菌酮处理后照光,也不出现乙醇酸氧化酶活性^[1]。这说明黄化幼苗体内不可能存在酶原,所以似乎是不存在底物激活作用的。

(二) 关于底物保护作用

Kuczmak等^[8]在提取酶液时,把乙醇酸加进黄化幼苗叶片中一起研磨,提取得的组织液有乙醇酸氧化酶活性;而如果提取时不加入乙醇酸,而在提取后20~40分钟才加入并立即测定,未测到活性,他们认为可能是在黄化幼苗中已存在大量的有活性的酶,在提取时失去了活性。如果提取时加入乙醇酸,则可保护酶不受钝化。这称为底物保护作用(substrate protection)^[8]。这种假说与光活化是矛盾的。在水稻幼苗试验中,将底物乙醇酸或乙醇酸加上FMN渗入黄化幼苗中立即测定,测不到乙醇酸氧化酶活性^[1]。这就未能证实底物保护作用。

(三) 关于FMN活性

Kuczmak等^[8]在正常绿色叶子和黄色幼苗叶子的提取液中加入FMN (flavin mononucleotide, 黄素单核苷酸),乙醇酸氧化酶活性增强;但用根的提取液加进FMN,却无乙醇酸氧化酶活性出现。因此认为黄化幼苗体内已有大量的脱辅基酶蛋白,外源加进FMN,使之结合成全酶便表现出活性来。但是,将FMN在黑暗中渗入到黄化水稻幼苗中时,却测不到乙醇酸氧化酶活性^[1]。这就不能证明黄化幼苗体内已有该酶的脱辅基酶蛋白,即是说,照光后酶活性出现不是FMN激活的结果。

(四) 关于光敏色素调控

光敏色素是广泛存在于高等植物中的一种色素,有 P_r 和 P_{fr} 两种形式。一些研究表明,光敏色素参与调控乙醇酸氧化酶的活性。将黄化菜豆照以10分钟红光,乙醇酸氧化酶活性升高,24小时后再照7分钟远红光,酶活性下降^[7]。Van Poucke等认为,乙醇酸氧化酶是由光敏色素诱导出现的^{[10][20]}。

Roth-Bejerano等^[14]提出,过氧化物酶体内的乙醇酸氧化酶可能是一个外周酶(Peripheral enzyme),而外周酶一般是靠非专一的静电键、阳离子桥或靠一种特殊蛋白质与膜相结合的。乙醇酸氧化酶可能靠静电键结合在过氧化物酶体膜上,其结合较疏松,等电点为 $7.1 \sim 7.2$ ^[14]。

红光可以使 P_r 结合到膜上去^[13]。结合到膜上去的 P_{fr} 作为一个内源的、形成通道的准离子载体改变膜电位而影响离子转移^[14]。改变膜电位后导致带电的乙醇酸氧化酶与膜结合,从而表现出催化活性^[13]。而远红光则可能使 P_{fr} 转变为 P_r 从膜上脱落,从而导致酶失活。

但这不能圆满地解释黄化幼苗照光后酶活性出现的机理。因为,如果光敏色素诱导酶形成或促进酶与膜结合而表现出活性,应是红光和远红光才起调节作用,而上述许多报道都证明蓝光对酶活性的表现比红光更有效。这似乎说明光对乙醇酸氧化酶的调节与光敏色素的作用无关。

三、光作用本质的探讨

(一) 乙醇酸氧化酶活性的出现可能与光合作用有关：在未变绿的黄化叶子中，没有乙醇酸氧化酶^[1]，而当将之照光使之变绿时，组织内便逐渐出现乙醇酸氧化酶，绿色增加，酶活性也上升^{[1][8][17]}。没有酶活性的白色马铃薯块茎^[17]和马蹄莲的白色佛焰苞经照光变绿以后，也产生了活泼的乙醇酸氧化酶活性。甚至将白色的小麦根照光变绿，也会形成大量的乙醇酸氧化酶^[3]。这充分说明，乙醇酸氧化酶活性的出现与叶绿素的存在有关。而叶绿素是重要的光合作用色素，因此，乙醇酸氧化酶活性的出现可能与光合作用有关。

(二) 乙醇酸氧化酶活性出现与底物乙醇酸的关系：将外源乙醇酸引进黄化幼苗中，即使不给予照光、幼苗体内也会出现乙醇酸氧化酶活性^{[1][18]}。用乙醇酸钠或乙醇酸钾对叶子喷雾或作培养基质，也可导致体内出现乙醇酸氧化酶活性，这些事实证明乙醇酸氧化酶活性的出现与底物乙醇酸有关。光合作用对乙醇酸氧化酶的影响可能是通过乙醇酸起作用的。

(三) 照光后乙醇酸氧化酶活性的出现是新合成酶蛋白的结果：黄化幼苗照光后，乙醇酸氧化酶活性的出现有一个数小时到十多个小时的滞后期^{[1][18]}；绿色幼苗经黑暗处理活性消失后，再照光，酶活性的出现也需8~10小时的滞后期^[1]。将黄化幼苗用蛋白质合成抑制剂放线菌酮处理后，即使再给予长时间照光，也没有乙醇酸氧化酶活性出现^{[1][4]}。经暗处理后的绿色幼苗用放线菌酮处理再照光，也不出现酶活性^[1]。这些事实充分说明，黄化幼苗照光后乙醇酸氧化酶的出现是新合成乙醇酸氧化酶酶蛋白的结果。

(四) FMN形成与光照的关系：FMN是乙醇酸氧化酶的辅基，因而体内FMN的含量水平势必影响乙醇酸氧化酶的活性。据研究，植物体内黄素的含量水平及其转变与光的作用有密切的关系。在照光条件下，白羽扇豆幼苗的核黄素合成速率增加^[6]。

研究还指出，细胞合成的黄素和黄素蛋白可由光的作用使之活化或还原^[6]。在照光条件下，叶绿体可以将体内的黄素还原^[11]，在光下体内的氨基酸也可使黄素还原^[12]，甚至黄素本身也可充当催化剂催化黄素蛋白的光还原作用^[6]。

Asomaning及其同事发现照光后，燕麦和大麦胚芽鞘内的FMN含量比黄化的升高近一倍^[2]。Kuczmak等人^[8]测定了黄化和绿色小麦幼苗中的黄素总量及FAD/FMN的比例变化，发现两种幼苗的黄素总量不相上下，但在黄化幼苗中，FAD的含量约为FMN的两倍；相反，在照光后变绿的幼苗中，FMN的量是FAD的两倍。这可能是在照光叶子变绿期间，核苷酸焦磷酸化酶将FAD分解为FMN所致。

可见，黄素的合成和体内FMN的含量水平都与光的作用有关。光既可促使原有黄素的还原和转化，又可以促进黄素的生物合成。

(五) 光在乙醇酸氧化酶诱导形成中的作用本质：综上所述，我们认为，在乙醇酸氧化酶的诱导形成中，光所起的作用有两方面：一是引起组织变绿从而进行光合作用，

产生乙醇酸, 然后由乙醇酸作为诱导物, 诱导乙醇酸氧化酶蛋白的形成; 二是促进辅基FMN的生物合成与还原, 从而提高体内FMN的含量水平。诱导形成的酶蛋白与FMN结合成为全酶, 从而表现催化活性。这可能就是光影响乙醇酸氧化酶活性的作用本质。据此, 光的作用可用图1作总结。图1中, 黄素的合成和转变在细胞质中进行^[10], 其几个过程由光所促进。叶绿体在光下发育完全后, 可进行光合作用, 在光合作用中产生的乙醇酸诱导基因表达在细胞质中合成乙醇酸氧化酶蛋白, 后者与FMN结合成全酶, 然后在过氧化物酶体内执行催化功能。

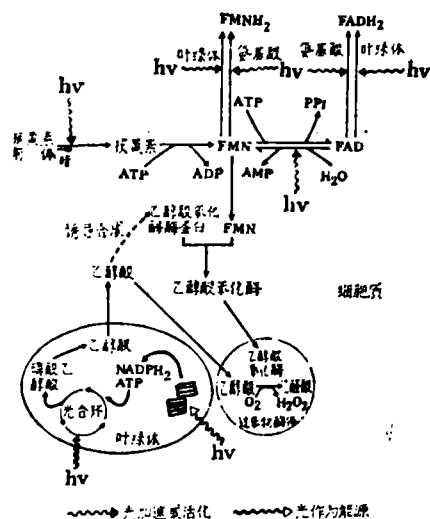


图1 光在乙醇酸氧化酶诱导形成中的作用假说

引用文献

- [1] 黄卓烈, 李明启. 植物生理学报, 1985; 11 (1), 25—32
- [2] Asomaning, E. J. A., Galston, A. W. 1961, Comparative study of phototropic responses and pigment content in oat and barley coleoptiles. *Plant Physiol.* 36: 453-464
- [3] Björn, L. O. 1967, Some effects of light on excised wheat roots with special reference to peroxide metabolism. *Physiol. Plant.* 20 (1); 149-170
- [4] Feierabend, J., Beever, Harry 1972, Developmental studies on microbodies in wheat leaves. I. Conditions influencing enzyme development. *Plant Physiol.* 49: 28-32
- [5] Galston, Arthur W. 1950, Riboflavin, light and growth of plants. *Sci.* 111: 619-624
- [6] Gustafson, Felix G. 1954, Synthesis of B vitamins by excised parts of white lupine seedlings grown in sterile culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 52: 190-196
- [7] Klein, Attila O. 1969, Persistent photoreversibility of leaf development. *Plant Physiol.* 44 (6): 897-902
- [8] Kuczmak, M., Tolbert, N. E. 1962, Glycolic acid oxidase formation in greening leaves. *Plant Physiol.* 37: 729-734
- [9] Massey, Vincent, Stankovich, Marian, Hemmerich, Peter 1978, Light-mediated reduction of flavoproteins With flavins as catalysts. *Biochemistry* 17 (1): 1-8

- [10] Mitsuda, Hisateru., Tomozawa, Yasuko., Tsuboi, Toshimichi., Kawai, Fumio 1965, Level of enzymes of biosynthesis and degradation of flavines in spinach. *J. Vitaminol.* (Kyoto) 11 (1) : 20-29
- [11] Penzer, G. R., Radda, G. K. 1968, The reduction of flavines by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.* 108 (1) : 6
- [12] Penzer, G. R., Radda, G. K. 1968, Chemistry of flavines and flavoproteins. Photoreduction of flavines by amino acids. *Biochem. J.* 109 (2) : 259-268
- [13] Roth-Bejerano, N. 1980, Nature of the phytochrome effect on the binding of glycolate oxidase to peroxisomes in vitro. *Planta* 149 (8) : 252-256
- [14] Roth-Bejerano, N., Lip, S. H. 1978, Binding of glycolate oxidase to peroxisomal membrane as affected by light. *Photochem. Photobiol.* 27 (2) : 171-175
- [15] Schmid, Georgy H. 1969, Effect of blue light on glycolate oxidase of tobacco Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 350; 1035-1046
- [16] Schmid, Georgy H., Schwarze, Paul 1969, Blue light enhanced respiration in a colorless *Chlorella* mutant. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 350; 1513-1520
- [17] Tolbert, N. E., Burris, R. H. 1950, Light activation of the plant enzyme which oxidizes glycolic acid. *J. Biol. Chem.* 186; 791-804
- [18] Tolbert, N. E., Cohan, Marjorie S. 1953, Activation of glycolic acid oxidase in plants. *J. Biol. Chem.* 204; 639-648
- [19] Van Poucke, M., Barthe, F. 1970, Induction of glycolate oxidase activity in mustard seedlings under the influence of continuous irradiation with red and far-red light. *Planta* 94 (3) : 308-318
- [20] Van Poucke, M., Cerff, R., Barthe, F., Mohr, Hans 1970, Simultaneous induction of glycolate oxidase and glyoxylate reductase in white mustard seedlings by phytochrome. *Naturwissenschaften* 57 (3) : 132-133
- [21] Viil, J., Parnik, T. 1978, On the control of the glycolate pathway by light and oxygen. *Z. Pflanzenphysiol.* 88 (3) : 219-226

INDUCTION OF GLYCOLATE OXIDASE IN HIGHER PLANTS BY LIGHT

Huang Zhuolie

(Department of Agricultural Biology)

ABSTRACT

This paper gives a review about the effects of light on the activities of glycolate oxidase in higher plants. It analyses the induction of glycolate oxidase by white light, light intensities, light qualities, etc., and discusses several hypotheses with which the former workers explained the action mechanism of light on this enzyme. On this basis, a new hypothesis is proposed, suggesting that the effect of light has two aspects. One of these is to make glycolic acid by setting photosynthetic process in motion. Then, being an effector, glycolic acid induces the biosynthesis of apoenzyme of glycolate oxidase. The other aspect of light effect is to accelerate the biosynthesis and changes of flavines and to raise the level of FMN in tissues. Then, FMN enters into combination with apoenzyme to make the holoenzyme of glycolate oxidase.

Key words, light, glycolate oxidase, glycolic acid, induction, flavin mononucleotide