

华南热带作物科学研究院科技情报研究所

科技情报研究论丛之三

法国橡胶研究所  
胶乳生理生化研究综述

吴恭恒编译 李良政 毛根海校

一九八三年九月



## 编者的话

法国橡胶研究所在象牙海岸分所从1969年开始直至1981年的十多年时间内，从胶乳的生理生化方面着手，致力于橡胶树的产胶机理、增产途径的研究，取得了可喜的成绩。本文综述了该所的研究成果和具体增产措施。主要内容有：

研究了产生顺式聚异戊二烯的前体——醋酸盐分子的糖代谢，其中包括糖酵解的途径等全部功能。

研究了在一切生化合成中特别是橡胶合成所需的能量中起作用的辅助因子ATP的代谢、烟酰胺核苷酸磷酸盐的代谢、胶乳合成和代谢、包括胶乳的再生、胶乳生产的代谢调节、乳管内蔗糖的供应与产胶的关系以及割胶的影响和季节性变异、黄色体的作用、磷酸烯醇丙酮酸代谢的支路、促成胶乳再生反应的苹果酸酶和蔗糖合成酶等，对产胶机理和增产效应的理论与实践都作了较详细的论证，涉及面广而深，对产胶的生化问题提出了一系列新的见解，并提出了增产的生理学基础和途径。这是橡胶研究所十余年来从事研究橡胶树产胶的生理学获致高产的经验总结，书内附有分析表格50多幅，图解十余张，可供有关橡胶专业的生产、教学和科研人员参考。

本文在编译过程中，曾得到曾友梅、黄丽华、张鹤翥、范思伟、杨少琼等同志帮助，提供了许多宝贵意见，蒙李良政、毛根海同志的精心校对，林永坚同志绘图，特此表示真诚的感谢！

由于编者专业知识有限，难免会有错误和不当之处，希读者批评指教。

编者 一九八三年九月于海南岛

黄屏组 四

# 目 录

## 编者的话

一、胶乳的糖酵解代谢	1
(一) 糖酵解	1
(二) 柠檬酸盐对胶乳糖酵解的作用	1
(三) 各种核苷酸磷酸对胶乳糖酵解功能的比较效应	1
(四) 还原辅酶 I 积累动力学的数学公式研究	2
(五) 还原辅酶 I 的代谢作用	3
(六) 胶乳的糖酵解及其调节	3
(七) 乙烯利对胶乳的糖分解代谢的影响	3
(八) 苹果酸盐和柠檬酸盐在胶乳中的分布 及 C 乳清和 B 乳清中各种酶活性的研究	4
(九) 胶乳中的两种不同的甘油醛-3-磷酸脱氢酶	6
二、胶乳的合成和代谢	9
(一) 胶乳合成的代谢调节	9
(二) 脱羧作用和胶乳 pH 值的调节	11
三、蔗糖合成和乳管内糖的供应	12
(一) 乳管内蔗糖的供应与胶乳的产量	13
(二) 乙烯利对蔗糖含量和渗透压的影响	14
(三) 刺激与蔗糖含量和胶乳性能的关系	16
(四) 胶乳蔗糖含量的季节性变异	17
(五) 刺激割胶频率和割线长短对胶乳蔗糖含量的影响	18
四、胶乳黄色体的研究	21
(一) 黄色体对镁的吸收	21
(二) 离体胶乳中腺苷磷酸分子的平衡	22
(三) 乳清中辅酶 I 磷酸酶	22
(四) 乳清中辅酶 I 磷酸酶的几种特性	23
(五) 胶乳中铜对辅酶 I 磷酸酶的影响	24
(六) 刺激对胶乳铜含量和产量的影响	24
(七) 黄色体膜的透性	25
(八) 刺激对黄色体膜抗性的影响	28
(九) 刺激对 B 乳清和 C 乳清中某些无机元素的影响	28
(十) 黄色体对各种离子的吸收以及刺激对吸收的影响	28

(十一) 刺激对 B 乳清凝固能力的影响·····	30
(十二) 刺激对黄色体稳定性的作用·····	30
(十三) 割胶频率对黄色体稳定性的影响·····	31
(十四) 黄色体膜上的 ATP 酶和酸性磷酸酶·····	31
(十五) 胶乳中磷酸酶的活性·····	32
(十六) 胶乳中酸性磷酸酶活性的抑制·····	33
(十七) 黄色体的酸性磷酸酶·····	33
(十八) 黄色体的对硝苯基磷酸酶·····	34
(十九) 胶乳中磷酸酯酶的活性·····	35
五、胶乳的再生·····	35
(一) 割胶后乳管内含物的再生·····	35
(二) 刺激割胶与乳管内含物的再生·····	36
(三) 胶乳中 2' - 核苷酸酶·····	37
六、胶乳生产的代谢调节·····	42
(一) 胶乳转化酶的研究·····	42
(二) 还原辅酶 I·····	47
七、磷酸烯醇丙酮酸代谢的支路·····	48
(一) 测定的材料和方法·····	48
(二) 试验结果·····	50
(三) 讨论·····	56
八、苹果酸酶和蔗糖合成酶的研究·····	57
(一) 苹果酸酶的研究·····	57
(二) 蔗糖合成酶的研究·····	58
(三) 蔗糖合成酶在生理学上的功能·····	59
(四) 尿苷二磷酸葡萄糖合成的生化途径·····	62

## 一、胶乳的糖酵解代谢

糖酵解代谢的研究范围很广，这里首先只研究胶乳的糖酵解、胶乳的蔗糖合成和乳管内糖的供应。

### (一) 糖酵解

对磷酸甘油酸变位酶和烯醇酶所催化的两种反应进行了动力学分析。为了说明各种糖酵解酶特性，测定了磷酸甘油酸变位酶和烯醇酶促底物反应的米氏常数 ( $K_m$ )，结果见表 1。

表 1 胶乳中磷酸甘油酸变位酶促 3-磷酸甘油酸反应和烯醇酶促 2-磷酸甘油酸反应的米氏常数

酶	米氏常数 (毫克分子)
磷酸甘油酸变位酶 (底物: 3-磷酸甘油酸)	$1.2 \pm 0.1$
烯 醇 酶 (底物: 2-磷酸甘油酸)	$0.027 \pm 0.003$

上述两种酶的米氏常数值差异很大，磷酸甘油酸变位酶与其底物的亲和力很小，这是由于试验培养已糖时，乳清中积聚了部份 3-磷酸甘油酸所致。

### (二) 柠檬酸盐对胶乳糖酵解的作用

柠檬酸盐似乎是胶乳糖酵解的强抑制剂，其生理浓度在 10—20 毫克分子之间就有抑制作用。看来，此有机酸的作用首先是对丙酮酸激酶的抑制。之所以发生这种现象，主要是由于与镁离子络合而形成柠檬酸镁之故。此外，即使仅有少量柠檬酸盐，乳酸脱氢酶、烯醇酶和磷酸果糖激酶也是敏感的。实际上，柠檬酸盐在某些条件下，能强烈地抑制这些酶的活性。

柠檬酸盐是胶乳中糖分解代谢的生理效应物 (effecteur physiologique)。然而，在乳清相中柠檬酸盐与镁离子的比值似乎对二磷酸己糖代谢途径的功能起主要作用，比值低时对糖酵解不利，当比值大于 1 时对糖酵解才有利。因此，准确地测定胶乳中镁和柠檬酸盐的确实比值、尽可能研究它们在乳清中的浓度变化和确定这些变化的原因、乃至机理，都是有益的。

### (三) 各种核苷酸磷酸对胶乳糖酵解功能的比较效应

已知，胶乳中除含有 ATP、ADP、AMP 等腺苷磷酸分子外，还含有其他核苷酸磷酸分子。已经找到的有各种尿苷磷酸、肌苷磷酸、胞苷磷酸等。所有这些三磷酸盐形式的辅助因

子部能对糖酵解起作用。

然而，在经交联葡聚糖凝胶G25柱上过滤并补充所有必需元素的乳清进行的一系列试验表明，ATP对二磷酸己糖途径的活性是最有效的辅助因子。如用以ATP进行试验的糖酵解活性作对照（糖酵解活性是以单位时间在司一胶乳中所利用的果糖激克分子表示的），那末，用浓度与ATP相同的肌苷三磷酸、胞苷三磷酸和尿苷三磷酸时所达到的糖酵解活性仅分别为对照的70%、53%和67%。

此外，胞苷三磷酸不利于乳酸盐而有利于苹果酸盐的形成。如果认为促进产生苹果酸盐的二磷酸己糖途径在形成象交联葡聚糖分子的全部机理中都起主要作用，那末这个现象可能是很重要的。这个辅助因子似乎有利于磷酸希醇丙酮酸转化成草酰乙酸盐的β羧化作用，但同样可以设想，胞苷三磷酸的存在不利于丙酮酸激酶促使磷酸希醇丙酮酸转化为丙酮酸盐，从而有利于产生苹果酸盐的羧化作用。

须要指出的，使用尿苷三磷酸时，会积聚相当多的3-磷酸甘油酸，但磷酸化糖则相当少。在这种情况下，丙酮酸激酶的活性对这些现象的发生仍起着重大的作用，而且这种酶能调节糖酵解。

#### （四）还原辅酶 I 积聚动力学的数学公式研究

法国橡胶研究所的研究报告No.64曾指出，在某些试验条件下，利用还原辅酶 I (NADH) 的积聚动力学来研究离体胶乳糖酵解可能是一种好方法。已找出这种积聚动力学的数学公式如下：用dc/dt方程式的积分表示在培养基质中还原型辅酶 I 的积聚动力学，并从积聚公式  $C=f(t)$  得出下列方程式：

$$C = vg \left( \frac{(1 - e^{-kit})}{ki} + \frac{(1 - e^{-kut})}{ku} + \frac{(1 - e^{-(ki+ku)})}{ki+ku} \right)$$

式中：C = 还原型辅酶 I 的浓度；

vg = 还原型辅酶 I 生成体系的速度；

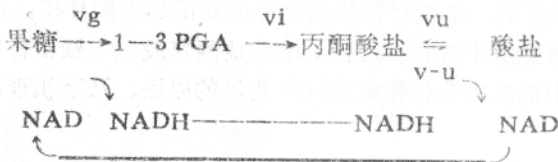
vi = 中间体系速度；

vu = 利用体系速度；

ki = 中间体系速度常数；

ku = 利用体系速度常数。

除其他一切代谢链外，糖酵解在试验条件下单独作用的图式如下：



从试验数据极易分别测得NAD<sup>+</sup>的利用体系活性和生成体系活性两种参数值，这包括了全部糖酵解的参数值。因此，就能确定一些重要因子对胶乳中二磷酸己糖途径功能的影响。同时也证明了过去用其他方法取得的结果。

## （五）还原辅酶 I 的代谢作用

为了获得最适产胶量，必须使胶树的再生能力与栽培和割胶条件保持平衡。为此必须了解乳管的代谢、特别是聚异戊二烯合成的生化过程。

一些离体试验表明，NADH在离体胶乳中的代谢方向取决于氧化型和还原型的NADH的比值，而且这个比值对于异戊二烯的合成确实起着调节的作用。在这种情况下，就联想到黄色体膜上存在着NADH氧化还原酶（E. C. 1. 6. 99. 3）的事实。这种能离体氧化NADH的酶可利用细胞色素C或铁氰化钾作为电子接受体。尚待解决的问题是，它在原位的作用及其生理学的意义。因此，决定研究黄色体膜上存在的可在体内由此氧化还原酶作媒介而氧化NADH的电子接受体。为此采用了各种光谱技术，发现黄色体膜上有两种b型细胞色素，其中有一种为细胞色素b 563，它在体内可被NADH还原。然而，这种现象在生理学上有不可忽视的作用，它应该是可逆的，从而恢复它的电子接受体的原来电势，参与再氧化的机理。为了明确B乳清是否有这种功能，已进行了一些试验，但所得结果还不能作出确实的结论。

## （六）胶乳的糖酵解及其调节

这项研究结果表明，镁的浓度似乎是调节糖酵解的主要因子。这种调节作用是借助于“关键性反应”显示出来的，处于一种主要代谢支路的二磷酸己糖途径在各个调节阶段的相互作用下，可能引起磷酸烯醇丙酮酸的 $\beta$ 羧化作用，从而对顺式聚异戊二烯前体醋酸盐的产生可能起主要的作用（参看Revue Physiologie Végétale, 3, 1970）。

## （七）乙烯利对胶乳的糖分解代谢的影响

### 1、刺激对糖解酶潜在活性的影响

从胶乳糖酵解的全部酶反应来看，只有几种酶在整个调节方面起重要作用。其中有果糖激酶、磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶。此外，已分析出葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及腺苷三磷酸酶的潜在活性。为这两种酶所催化的酶反应，可能会干扰糖酵解的功能。试验结果表明，在观察期内，乙烯利刺激对上述各种酶的潜在活性没有明显的影响。

### 2、刺激对离体胶乳糖酵解功能的影响

胶乳中某些主要成分(如阳离子，各种底物……)的改变会导致糖酵解功能的相应变化。例如，用乙烯利处理过的胶树，其胶乳的镁含量和糖储量都会下降。一系列的试验表明，刺激处理植株所产胶乳的糖酵解强度确实有变化。然而，这些试验结果往往有差异，由于没有做统计研究，还不能作出明确的结论。但可以设想，介质组分的改变，加上某些关键性酶的潜在活性的改变，可能会导致糖酵解功能的改变。从总的结果看，乙烯利刺激对糖分解代谢的影响不大。但须指出，这些分析是在植株刺激后很短的时间内进行的。乙烯利刺激后要经过一段相当长的潜伏期、即到胶树由于刺激加剧胶乳短缺而必须产生生物再平衡时，才能显示出来。这种想法是与胶乳核酸的研究结果相符的，即胶乳核酸浓度要在刺激处理后2—3

周才显出变化。

### (八) 苹果酸盐和柠檬酸盐在胶乳中的分布及C乳清和B乳清中各种酶活性的研究

C乳清和B乳清的成分分析证明,这两种介质差异极大。实际上,由糖酵解作用产生的有机酸如苹果酸盐和柠檬酸盐在胶乳中的分布是不相同的(表2)。B乳清中的柠檬酸盐浓度比C乳清中的高。而B乳清中的苹果酸盐浓度则比C乳清中的略低。这种现象无论是在总的代谢调节方面还是在胶乳稳定性方面都具有极为重要的生理学意义。可以认为,黄色体中的镁浓度是影响这种分布的原因之一。然而,柠檬酸盐在黄色体中积聚的这一事实,却表明B乳清中存在一种能合成柠檬酸的酶系。

表2 胶乳中柠檬酸盐和苹果酸盐的分布

(微克分子/毫升/50毫克冻干物,大约相当于原胶乳中乳清的实际浓度)

不同来源的胶乳	C乳清		B乳清		柠檬酸盐1与 柠檬酸盐2 之比	苹果酸盐1与 苹果酸盐2 之比
	柠檬酸盐1	苹果酸盐1	柠檬酸盐2	苹果酸盐2		
1	4.4	14.8	33.3	6.3	0.13	2.3
2	3.7	16.3	35.9	5.8	0.10	2.8
3	6.0	12.1	23.9	4.3	0.25	2.8
4	4.2	17.9	29.4	6.5	0.14	2.7
5	4.0	15.1	29.8	7.2	0.13	2.1

注:冻干物,即真空干燥的冰冻乳清。

表3表明,乙烯利刺激后,B乳清中苹果酸盐和C乳清中柠檬酸盐均有所增加,其余变化不大。

表3 乙烯利刺激对B乳清和C乳清中的柠檬酸盐和苹果酸盐的影响

16次测定的平均结果(毫克分子)

	柠檬酸盐				苹果酸盐			
	B乳清		C乳清		B乳清		C乳清	
	刺激	对照	刺激	对照	刺激	对照	刺激	对照
处理前	53.5	47.4	2.4	6.2	14.2	13.4	13.2	13.9
处理后	64.2	49.2	7.5	7.6	25.2	14.4	15.0	17.3

用 $1-C^{14}$ 标记的丙酮酸盐在同一胶乳的C乳清和B乳清中作比较培养,结果表明:在这两种生物培养基中都发生酮酸的脱羧作用。实际上,在B乳清中的这种反应虽然不大活跃,但在



处理植物材料时，B乳清如被C乳清污染，这种反应就会非常显著。

表4 用 $1-C^{14}$ 丙酮酸盐在C乳清和B乳清中的脱羧作用

培 养 时 间	培养释出的 $C^{14}O_2$ (以外加的 $1-C^{14}$ 丙酮酸盐的放射性百分率表示)	
	30分钟	60分钟
50毫克冻干C乳清	26.3	46.7
50毫克冻干B乳清	7.8	15.4

在培养基加0.15克分子pH值6.5的硝酸钾缓冲液，10毫克分子氯化镁，5毫克分子谷胱甘肽，0.1毫克分子TPP。

丙酮酸盐在黄色体乳清中能被分解代谢，这就需要了解在这种培养基中是否存在着一种能促进柠檬酸盐合成的酶系。为此，用均一标记的 $C^{14}$ 乙醛和加入辅酶A、草酰乙酸和烟酰胺核苷酸等进行了培养。这样，实际上限制了这些主要因子的不稳定性。表5清楚地表明，如果C乳清能使草酰乙酸代谢，显然就能产生醋酸盐，B乳清则没有任何类似的现象。

表5 在同一胶乳的C乳清和B乳清中用均一标记的 $C^{14}$ 乙醛培养时的合成放射性物质

合成放射性物质	每 分 钟 闪 烁 次 数		
	C 乳 清	C乳清(煮沸)	B 乳 清
柠 檬 酸 盐	224,661	—	—
丙 二 酸 盐	77,997	—	—
谷 氨 酸 盐	51,480	—	—

培养基：0.2克分子pH值6.5的四乙基铵缓冲液；每毫升培养物含50毫克C乳清冻干物或B乳清冻干物；3毫克分子（即2.5微居里）均一标记的 $C^{14}$ 乙醛；5毫克分子草酰乙酸；0.5毫克分子辅酶I；0.5毫克分子辅酶II；0.5毫克分子ATP；1毫克分子辅酶A；5毫克分子谷胱甘肽；5毫克分子氯化镁；0.2毫克分子钼酸铵；在30℃保温2小时。

总的结果都支持胶乳C乳清中可合成柠檬酸和由黄色体聚集这种三羧酸的假设。一般说来，这种现象与植物细胞的液泡性质有关，液泡能积聚有机酸，特别是柠檬酸。此外须指出的是，已证明植物细胞液泡和黄色体还有其他类似之处，如都具有积聚 $Mg^{++}$ 、 $Ca^{++}$ 、 $Cu^{++}$ 等阳离子的性能，它们的膜都对渗透敏感等。

这些事实表明，乳管内黄色体，不论是在代谢方面，还是在生理学方面都起着特别重要的作用。因此，必须深入地了解细胞器的结构，但也要了解影响其性能（如在原位的稳定性及其膜壁的选择透性等）的条件和因子。

## (九) 胶乳中的两种不同的甘油醛-3-磷酸脱氢酶

### 1、使用辅酶 I 和辅酶 II 两种辅助因子时, 显示出甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的催化反应功能

到目前为止, 一般认为胶乳中的橡胶合成必需有还原辅酶 II 的再生。它的再生主要是由戊糖途径最初生成的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的作用所致。但须注意, 在糖酵解链上, 由于甘油醛-3-磷酸脱氢酶能利用辅酶 I 和辅酶 II, 因此, 它是这种还原型辅酶再生的一个因子。这种现象很重要, 因此可以认为糖酵解不但是产生顺式聚异戊二烯前体醋酸盐和产生 ATP 型能量的起因, 也是胶乳中橡胶合成所必需的专一性还原能再生的起因。

### 2、证明乳清中存在两种甘油醛-3-磷酸脱氢酶的分离试验

需要了解的问题是, 在有辅酶 I 或辅酶 II 的情况下观察到的甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性, 是分别利用每种辅助因子的两种专性酶, 还是能同时利用两种辅助因子的一种专性酶。用经葡聚糖凝胶 G25 柱过滤的 C 乳清进行动力学分析, 当分别地先后加入辅酶 I 或辅酶 II 于辅酶 I 时, 在辅助因子浓度与速度关系的曲线上出现两个饱和和高峰, 这表明确实存在着两种不同的甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

用硫酸铵分级沉淀可以把这两种酶分离。从表 6 可知, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶与辅酶 II 主要是在第二个级份起作用。但不能认为, 在加辅酶 I 的情况下, 某种酶活性是由于这种酶利用了辅酶 I, 或记录的活性是由于利用辅酶 I 的一小部分酶过早沉淀所致。

甘油醛脱氢酶与辅酶 I 主要是在第 4 级份起作用。加辅酶 II 并未显出活性, 说明这种酶与辅酶 II 在这个级份中毫不起作用, 同时甘油醛-3-磷酸脱氢酶对于辅酶 I 具有绝对的专一性。

表 6 硫酸铵分级沉淀分离甘油醛-3-磷酸脱氢酶

硫酸铵 饱和百分率	蛋白氮 (毫克/毫升)	辅 酶 I		辅 酶 II	
		总 活 性 (微克分子/分钟)	比 活 性 (国际单位)	总 活 性 (微克分子/分钟)	比 活 性 (国际单位)
I					
0—45%	16.4	0.91	0.05	2.06	0.12
II					
45—65%	15	1.71	0.11	27.00	1.35
III					
65—75%	3.2	6.80	1.68	1.58	0.05
IV					
75—100%	2.8	23.20	8.40	0	0

此外, 研究甘油醛-3-磷酸脱氢酶的初步结果表明, 没有磷酸盐或无机磷的情况下,

利用辅酶 I 的甘油醛-3-磷酸脱氢酶也能起作用, 这个特性非常重要。

关于甘油醛-3-磷酸脱氢酶可使甘油醛-3-磷酸直接转化为3-磷酸甘油酸的研究, 过去作得很少。因此, 与底物有关的磷酸化作用曾被忽视。磷酸化作用可产生1,3-磷酸甘油酸, 再通过3-磷酸甘油酸激酶可使二磷酸腺苷(ADP)生成三磷酸腺苷(ATP)。

因此, 由于甘油醛-3-磷酸脱氢酶(利用辅酶 I 的)在糖酵解链上代替标准的甘油醛脱氢酶, 糖酵解就不再有肯定的能量平衡。相反, 糖分解代谢能再生成某些合成反应、特别是聚异戊二烯合成反应所必需的还原辅酶 I。

胶乳中两种甘油醛-3-磷酸脱氢酶之间可能有竞争作用, 这是非常重要的问题。为了弄清这个问题, 必须详细研究这些酶的动力学特性, 尤其是与辅酶 I 的作用。为此, 必须获得很纯的酶蛋白。

现在已弄清楚, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶是能使辅酶 I 还原为还原型辅酶 I (NADPH)。此种甘油醛-3-磷酸脱氢酶已被国际生物化学联合委员会命名为 EC 1.2.1.9 酶。胶乳中还有另一种同样以甘油醛-3-磷酸为底物但专利用辅酶 I 的甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 已命名为 EC 1.2.1.12 酶。它们的潜在活性相似, 同时存在于 C 乳清中。为了进一步了解这些酶在胶乳生理学方面所起的主要作用, 必须对它们进行分离, 并研究它们的特性。

### 3、利用辅酶 I 的专性酶—甘油醛—3—磷酸脱氢酶 (EC 1.2.1.12)

(1) 提纯: 分离出的 EC 1.2.1.12 未沾染丝毫的同系物 EC 1.2.1.9。用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果只出现一条相当于酶活性区的蛋白质带, 这表明分离物很纯净。但须指出, 酶分子的电泳迁移率是很小的。

#### (2) 几种特性

a、热稳定性 EC 1.2.1.12 这种甘油醛-3-磷酸脱氢酶相当稳定, 在 60°C 培养 6 分钟后, 仅损失活性约 38%。

b、分子量 用十二烷基硫酸盐 (dodécylsulfate) 处理蛋白质后, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳测得其分子量的大小与其同系物 EC 1.2.1.9 的相同, 但其生物学来源不同。分子量约为 38,000, 相当于此酶的一个亚单位的分子量, 此酶一般有 4 个分子量完全相同的亚单位。

c、pH 值 最适 pH 值为 8.0。

d、亲和力 此酶在其所催化的反应中, 对各组分都有亲和力, 其米氏常数见表 7。

表 7 EC 1.2.1.12 酶在其所催化的反应中, 对各反应组分的米氏常数

反 应 组 分	米氏常数 (克分子浓度)
甘油醛-3-磷酸	$1 \times 10^{-4}$
无机磷酸盐	$2.6 \times 10^{-3}$
辅 酶 I	$1.2 \times 10^{-4}$
辅 酶 II	EC 1.2.1.12 酶与辅酶 II 毫无作用。

### (3) 几种效应物对EC1.2.1.12酶功能的影响

a、EC1.2.1.12酶对还原辅酶I的抑制常数( $K_i$ )为 $1.3 \times 10^{-5}$ 克分子浓度。因此,还原辅酶I是一种竞争性强的抑制剂。

b、还原辅酶II绝对不受EC1.2.1.12酶的影响。

c、在含有氢硫基的化合物时EC1.2.1.12酶才起作用。半胱氨酸在胶乳中能起作用,它激活EC1.2.1.12酶而引起建立“假”米氏常数( $K_m$ ), $K_m$ 值为 $1.6 \times 10^{-4}$ 克分子浓度。这个数值表明半胱氨酸在这种场合的功是相当的。

d、乙二胺四乙酸(EDTA)对EC1.2.1.12酶的活性有强烈的抑制作用。

### 4、利用辅酶II的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(EC1.2.1.9)

(1) 提纯 EC1.2.1.9酶的纯化要经过一系列的复杂过程。电泳的结果证实这种纯化的酶除酶分子外没有发现任何其他蛋白质(非洲橡胶研究所研究报告№67)。

#### (2) 几种特性

a、热稳定性 EC1.2.1.9酶相当不耐热,在60°C的水浴中,4分钟就丧失活性约76%;

b、分子量 有两种测定方法:一是预先用十二烷基硫酸盐处理蛋白质,然后用电泳法测得出分子量为50,000,相当于此酶的一个亚单位的分子量。一是用葡聚糖凝胶G200过滤法测得此酶的全分子量为200,000。因此,此酶可能是由分子量同为50,000的4个亚单位组成;

c、催化反应 这种酶的催化反应显然是不可逆的,只有氧化反应能使甘油醛-3-磷酸变成3-磷酸甘油酸;

d、pH值 最适pH值为8.5—8.6;

e、亲和力 此酶对反应组分有亲和力;

表8列出各反应组分的米氏常数。

表8 胶乳中EC1.2.1.9酶在不同组分催化反应中的米氏常数

反 应 组 分	米氏常数(克分子浓度)
甘油醛-3-磷酸	$1.2 \times 10^{-3}$
辅 酶 II	$1 \times 10^{-6}$
辅 酶 I	$1.2 \times 10^{-2}$

### (3) 几种效应物对EC1.2.1.9酶功能的影响

a、与EC1.2.1.12酶相反,EC1.2.1.9酶起作用无须有氢硫基化合物。但半胱氨酸是防止此酶随时间推移而钝化的一个有力因子;

b、还原辅酶I(NADH)或还原辅酶II(NADPH)对此酶的活性毫无影响;

c、腺苷磷酸有轻微的激活作用,但要起到这种生理学的作用,其浓度要很高;

d、表9表明与试的其他效应物、特别是对许多脱氢酶和EC1.2.1.12酶有抑制作用的

3-磷酸甘油酸(3-PGA)和碘乙酰胺,没有一种对EC1.2.1.9酶功能有强烈的影响;  
e、高浓度的硼,如硼酸盐-二甲胂酸盐-醋酸盐缓冲液中含硼量高达100毫克分子时,对EC1.2.1.9酶功能就有抑制作用。

表9 几种效应物对胶乳中利用辅酶I的EC1.2.1.9酶活性的影响

效应物(毫克分子)	酶活性的反应(占对照的%)
$Cu^{++}$ 0.4	极 微
$Mg^{++}$ 20	-14.7
$Mg^{++}$ 40	-35.2
$Ca^{++}$ 2	-17
$PO_4$ 35	-29.3
$PO_4...$ 70	-35.2
3PGA 2	-18
柠檬酸盐 20	-20
甘油醛 4	-25
碘乙酰胺 30	-14.5

f、胶乳中的两种截然不同的甘油醛-3-磷酸脱氢酶对异戊二烯的代谢和调节都起着重要的作用(这在非洲橡胶研究所研究No=67报告中已有详细报道)。

但须指出,利用辅酶I的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(EC1.2.1.9),过去很少研究,它在酶学领域内还是一个新的课题。

## 二、胶乳的合成和代谢

非洲橡胶研究所生理组的研究工作是根据以下的设想进行的,即胶乳的生产主要是内在和外因子对胶乳代谢活性和植株生产有机物的能力所起作用的结果。这种设想是根据以前柬埔寨橡胶研究所的研究提出来的。该所的研究表明,胶乳的代谢和形成,其最初基质是蔗糖,这种基质的储备和利用很可能是对长期产胶能力起决定性作用。

此外,黄色体粒子在割胶生理学和异戊二烯本身的代谢方面都起主要作用。为了深入了解这些粒子的性能,对黄色体也进行了研究。

### (一) 胶乳合成的代谢调节

#### 1、胶乳转化酶活性的调节

过去已证实,蔗糖的利用和胶乳全部代谢活性都受转化酶活性的限制。这个发现引起对转化酶进行更详细的研究。

## 2、转化酶与镁的关系

(1) 镁在胶乳中的定域 曾研究14个胶乳样品,以确定镁在乳白和乳黄内的分布情况。同时,测定黄色体破裂指数。用外推法确定黄色体在破裂指数等于零时的镁含量。根据14个胶乳样品的平均结果,大部份的镁都集中在黄色体(在乳黄内有镁133毫克分子,而在乳白内只有14毫克分子)。

(2) 镁的扩散 黄色体内的镁由于黄色体破裂而扩散到乳白部分。用低渗溶液进行的试验表明,黄色体破裂后,释出的镁几乎是与破裂指数成正比。因此,当确知破裂指数时,就可测出镁的扩散量。但这种扩散还不是普遍的现象,在25个样品中,只有8个出现这种情况。

(3) 镁的抑制作用 已证明,C乳清中的镁含量约为5—20毫克分子。在这个范围内的镁就能显著地抑制转化酶,而抑制的程度主要取决于镁的浓度。这表明镁为什么能对排胶和产胶起负作用。

(4) 底物浓度 饱和转化酶所需的底物浓度随pH值朝最适pH值方向的增加而显著提高。这意味着pH值越高,蔗糖含量的变异对转化酶功能的影响就越大。当转化酶活性因缺糖而大大地受到限制时,施用刺激剂也不能增产。一般说,当每毫升乳清中的蔗糖含量少于1毫克时,刺激就不起作用了。这是胶乳转化酶活性对产量起决定作用的主要证据之一。

## 3、pH值的重要性

胶乳的pH值介于6.3至7.2之间,而转化酶活性的最适pH范围较窄,介于7.2至7.5之间。事实证明,对开割树进行的一切刺激增产处理都能提高胶乳的pH值,从而增强转化酶活性。同时也证明,在胶乳pH值与转化酶活性之间,以及转化酶活性与胶乳产量之间都有高度显著的相关。

从逻辑上可以设想,转化酶活性和胶乳产量都受到刺激剂的影响,而且植株的胶乳pH越呈酸性(即低于最适pH值),其所受的影响越显著。例如,无性系BD5和PR107的胶乳pH值显然比GT1和PB86的低,因而它们对刺激处理的反应较敏感。另一方面,如果胶乳的pH值偏低,则蔗糖的利用率也较低。因此,胶乳的蔗糖含量较高的植株,更适于进行刺激处理,从而获得高产。

## 4、pH值和转化酶活性在排胶过程中的演变

排胶时,胶乳的pH值和转化酶活性都下降。当这种活性下降到很低时,排胶即停止。刺激不但能增强处理部位转化酶活性,还可以扩大刺激树皮内的排胶面积。这种作用在刺激后割第一刀时就显示出来;显然,刺激后转化酶活性的增强是排胶增多的原因之一。根据这些观察结果可以认为,转化酶活性是胶乳全部代谢活动的限制因子。在调节排胶和胶乳产量方面起到极为重要的作用。

## 5、乙烯利刺激能加强转化酶活性

转化酶能将蔗糖降解为葡萄糖和果糖,从而提供了橡胶合成的原料。这种酶无疑是糖酵解的重要限制因子。涂乙烯利后第2次割胶时,转化酶活性显著增加。很可能由此导致分解

代谢机理的活化，从而为橡胶合成提供了原料、能量和还原能力。

## 6、胶乳中的酚类化合物

排胶停止的一个主要原因是割线上的胶乳凝固。胶线变黑则是由于接触空气氧化所致。乳管内的胶乳是永不凝固的，只是由于与氧气接触后才导致割口的胶乳凝固。由此想到一种能导致酚类产物起絮凝作用的机理，可能是在黄色体破裂后在有基质和催化剂的情况下，通过酶的氧化作用而发生的。

首先，对胶乳各组分中的狭义性酚类化合物进行了系统的研究，所得结果表明，在所有分析样品中都没有鞣酸、儿茶酸和类黄酮等化合物。然后在植株材料内寻找以糖苷配基形式存在的酚类化合物。在C乳清和B乳清中发现有莨菪亭、香豆素、原香豆酸等来自肉桂酸的产物。此外，在B乳清抽提物中还发现有另一种尚不能确定的物质。

用Folin-Ciocalteu定量法可以测定水解酚类物的酚当量含量（见表10）。

表10 Folin—Ciocalteu定量法测定酸解后的酚类化合物

		莨菪亭或酚 (微克当量/毫升 C乳清或B乳清)	占总乳清 或B乳清 的%	占乳清 的%	胶乳中的 莨菪亭或酚 (微克当量/毫升胶乳)	占总乳清或 B乳清的%
乳清水 解产物	醚相	45	65		17	
	异戊基相	24	35		9	
	总乳清	69	100	42	26	71
B乳清 水解 产物	醚相	30	32		3.3	
	异戊基相	65	68		7.2	
	总B乳清	95	100	58	10.5	29
橡胶水解 产物	醚相	极微	—	—	—	
酸解后的乳清 和B乳清总量		164		100	36.5	100

在C乳清和B乳清中测得的平均酪氨酸浓度分别为18微克/毫升和43微克/毫升。

总的说来，这些数值是相当小的。B乳清变黑的原因尚未弄清，可能是由于酚类物质氧化为带色醌类所致。

## （二）脱羧作用和胶乳pH值的调节

由于pH值对转化酶活性有重要作用，就必须研究对胶乳pH起调节作用的生化机理。决定胶乳细胞质pH值的一种体系可能与CO<sub>2</sub>的代谢、特别是与脱羧作用的活力有关。研究结果表明，在乳清介质中，铜离子在生理浓度下能抑制丙酮酸的脱羧，但对转化酶并无负效应。由此

可知，在铜的影响下，从蔗糖生成的CO<sub>2</sub>大为减少（见表11）。在树干内注射硫酸铜后虽然会提高蔗糖的利用率和激活转化酶的pH值，但同样能抑制丙酮酸脱羧酶和由蔗糖生成二氧化碳。

表11 铜离子对蔗糖利用和脱羧作用的影响

硫酸铜	每升乳清中被利用的蔗糖 (毫克分子)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (毫微居里)	利用每毫克分子蔗糖 释出的 <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (毫微居里)
0	4.8	12.6	2.6
16	5.2	11.7	2.25
40	5.2	10.7	2.0
80	4.9	9.6	1.95
400	4.8	4.2	0.87

培养条件：0.8毫升PR107的乳清，0.1毫升硫酸铜，0.1毫升C<sup>14</sup>标记的蔗糖(0.25微居里)，在30℃培养90分钟。

在树皮上涂施植物生长素或乙烯利，可获得与用铜处理的相似效应，即抑制了脱羧作用和促进了葡萄糖的分解代谢。此外，刺激处理后，丙酮酸脱羧酶的潜在活性没有减弱。

胶乳丙酮酸脱羧酶活性的最适pH值为6.4，并随pH值的提高而迅速下降。当pH值为7.2时，它的活性就消失了。因此，它是对胶乳pH值的变化反应十分敏感的一种酶，但与转化酶对pH值变化的反应相反。实际上，可以认为，在胶乳pH值变化的范围内，当pH值最适于脱羧酶活性时，转化酶的活性就非常弱；反之，当转化酶pH处于最适(7.2—7.5)状态时，脱羧酶就丧失活性。这两种酶对pH值的不同反应也是由于刺激后pH值增加而使转化酶活性增强，而丙酮酸脱羧酶活性则下降，因此，刺激也是主要原因。此外，可以设想，生成的CO<sub>2</sub>少，有利于胶乳的pH值朝碱性方向变化。

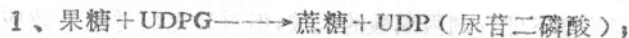
由于铜对丙酮酸脱羧酶的活性有直接影响，这种抑制脱羧酶的作用可能就是铜影响pH值的首要机理，从而影响转化酶活性和胶乳产量。

### 三、蔗糖合成和乳管内糖的供应

现已证明，在体外胶乳中，由果糖合成蔗糖可以抵消糖分解代谢中的糖酵解作用。

当培养全乳清时，用<sup>14</sup>C均一标记的果糖可以获得蔗糖。反之，用葡聚糖凝胶G25过滤的乳清培养则不能合成蔗糖。之所以如此，很可能是由于把主要的辅助因子滤去了。被滤去的是UDPG（尿苷二磷酸葡萄糖）。

已知至少有三种能合成蔗糖的反应：





2、6-磷酸果糖+UDPG $\longrightarrow$ 6-磷酸蔗糖+UDP;

3、单磷酸葡萄糖+果糖 $\longrightarrow$ 蔗糖+正磷酸盐。

一系列试验都证明，在体外乳清中唯一起催化作用的酶是葡基果糖转移酶。看来，这种酶的活性是不可忽视的，但这还有待确定，同时，UDPG的再生问题也待解决。

### (一) 乳管内蔗糖的供应与胶乳的产量

乳管内的蔗糖含量能影响胶乳的产量，它是催化异戊二烯代谢初级阶段的转化酶的底物。过去的研究已表明，在现行的割胶条件下，胶乳内蔗糖的储备是胶树保持长期产胶最重要的因子。在象牙海岸的条件下，已充分证明了这个假设。此外，又证实割胶与刺激都能引起蔗糖的亏缺而不利于植株生长，并且可能是造成乳管衰退和树皮干涸的原因。

#### 1、割胶对蔗糖含量的影响

割胶导致胶乳蔗糖含量急剧下降并不断地促进胶乳的代谢，从而增加了蔗糖向割口区的转移率。在定期割胶的植株，可以发现在割胶期中排胶面的蔗糖含量明显下降。下降的原因是蔗糖被利用以生成胶乳，而且割胶强度越大，蔗糖含量下降得越多。

另一方面，割胶时，大部分韧皮组织被割去，造成蔗糖的输送更加困难。因此，乳管的蔗糖供应量随割面上的树皮消耗的增加而减少，亦即随割线长度和剖面宽度而变化(见表12)。

表12 随割线上的剖面宽度不同而变化的胶乳蔗糖含量

定植年度	剖面宽度(厘米)	乳清的蔗糖含量		
		毫克/毫升	系统误差	%
1966	8	5.1	0.42	100
1965	22	3.1	0.51	61
1964	33	2.1	0.25	41
1963	56	1.1	0.29	22
1962	70	0.8	0.08	16
1960*	7	3.7	0.38	73

\*1972年换高割面。GT1, S.d/3, d/4割制, 1972年9月, 15株的平均数。

因而，在同一剖面上连续割胶数年后，植株的产胶能力就下降。但转换剖面后，乳管蔗糖供应和产胶能力又会得到改善。同时，不同的无性系对割胶有不同的反应。至今观察到的一些无性系对割去韧皮部最敏感的为PR107，其次为PB86、GT1和PB5/51。

#### 2、割线位置与蔗糖含量和胶乳性能的关系

无性系GT1的胶乳性能严重地受到割线位置的影响。同一批15龄的GT1在不同位置的割线割胶时有不同的反应，3种位置不同，有3种结果。三种位置是：