

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

030303

芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑對桑蠶生長影響之
研究

學校名稱：嘉義市立大業國民中學

作者： 國二 黃崇漢 國二 陳泓均	指導老師： 范凱雯 張毓敏
---------------------------------	-----------------------------

關鍵詞：芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑、抑制、桑蠶

摘要

芋頭高雄 1 號比起其他品種儲藏時間較久，較不容易被病菌入侵，進一步發現其含有較高含量的半胱胺酸蛋白酶抑制劑，然而此蛋白質能否對昆蟲有抑制的效果，是否能當作生物防治的材料，待進一步研究；我們利用重組蛋白質芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑 (tarocystatin) 以及對照組 BSA 與水塗佈在桑葉上，餵養兩周大的桑蠶持續三周，發現桑蠶的生長情形均受到 tarocystatin 的抑制，並且有較高的死亡率，推論 tarocystatin 可以影響蟲體的消化吸收功能，造成養分吸收減少而死亡。未來可以進一步研究並純化，發展生物防治取代化學農藥使用量。

關鍵詞：芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑、抑制、桑蠶

壹、 研究動機

有天我們吃學校午餐時，同學在午餐桶裡發現一隻菜蟲，我們在想，台灣的氣候溫暖潮溼，適合許多生物生長，其中包含許多危害作物和家禽家畜的病原體和昆蟲，嚴重影響產品的產量和品質，若我們能解決蟲害問題，增加各種農作物的產量，在午餐方面也讓學生吃得安心，所以我們找了相關資訊，發現市面上防止蟲害的方法大多是用農藥對農作物噴灑，達到解決害蟲的效果，然而使用農藥所產生的後遺症影響最廣泛、也最難收拾，尤其農藥殘留的問題，對人類的健康與自然界的生物產生危害，造成生態浩劫，所以我們應用更現代、更環保的方法而不是使用對人體有害的物質來噴灑在我每天吃的糧食上，跟指導老師討論後，希望能找到生物防治的方法，減少施用化學農藥，減輕農業活動對環境所造成的負擔。

貳、 研究目的

- 一、 芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑文獻探討。
- 二、 探討食用含有芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑桑葉後，桑蠶之生長情形。

參、 前言

一、 芋頭的起源和特性

芋又名芋仔或芋頭，為天南星科多年生草本植物，自古即為熱帶地區島嶼居民之主要糧食作物。芋在我國根莖作物中重要性僅次於甘藷之作物，栽培面積約 3000 公頃，年產量維持在 5 萬公噸左右，大多以水田栽培，佔總生產面積 90% 以上，主要生產地為屏東、苗栗、高雄、花蓮、台中。

芋之塊莖含豐富澱粉、礦物質及維生素等，營養價值高，尤其澱粉顆粒小，且易消化吸收，其用途廣泛，可供主、副食、製粉、乾糧 及蔬菜之用。葉柄亦含有多量鈣、磷、鐵、維生素 A、C 及多種胺基酸，可供作蔬菜之用，因應夏季蔬菜短缺之急需。

高雄農改場於民國 78 年檳榔心系統群中選出塊莖大、產量高、耐軟腐病，並且適合水田耕種的優良品種，登記命名為「高雄一號」，推廣栽種。

二、 植物蛋白酶抑制劑介紹

蛋白酶抑制劑普遍存在動物、植物或是微生物體內，依照其專一性抑制的對象可以分成：絲胺酸蛋白酶抑制劑、半胱胺酸蛋白酶抑制劑、天門冬胺酸蛋白酶抑制劑和金屬蛋白酶抑制劑。

植物體的蛋白酶抑制劑存在於繁殖、營養和儲存器官，尤其在種子和塊莖當中，含量佔了該位置所有蛋白質含量的百分之十，而且分子量通常都很小，約為 12 至 16 kDa。目前在單子葉植物和雙子葉植物中，皆成功找到並且分離出蛋白酶抑制劑，目前研究最多的是單子葉植物禾本科的水稻、大麥、玉米和高粱，例如稻米中的胰蛋白酶抑制劑被昆蟲食入後，會抑制其消化道中胰蛋白酶的作用，使蛋白質無法分解，導致昆蟲無法吸收、利用蛋白質的營養成分。雙子葉植物茄科的番茄、馬鈴薯和菸草，豆科的大豆和豌豆。其他的種類桑科、天南星科和番木瓜科也被小規模的研究當中。蛋白酶抑制劑在植物細胞內具有重要的生理功能，包括調節內生性蛋白質分解、調控細胞凋亡和程序性細胞死亡，此外，當植物受傷或是受到昆蟲和病原體襲擊也會誘導蛋白酶抑制劑產生，用來抑制存在於昆蟲的腸道內或是微生物分泌出的蛋白酶，進而影響消化作用，使得昆蟲和微生物無法獲得足量的必需胺基酸，導致生長發育遲緩甚至死亡，所以在植物防禦過程裡，蛋白酶抑制劑能有效的抵抗植食性昆蟲和微生物。

三、 芋頭蛋白酶抑制劑 (Tarocystatin)

Tarocystatin 屬於半胱胺酸蛋白酶抑制劑中的一員，由 CeCPI 基因大量表現且儲藏於芋頭 (*Colocasia esculenta*) 塊莖中。CeCPI 基因只表現在成熟球莖，包括整個球莖內外部份均存在，具有組織專一性。經過一段時間貯藏，tarocystatin 蛋白質會隨貯藏時間的增長，含量越來越少。

不同抗病能力之芋頭品種，赤芽芋、高雄 1 號、檳榔心及狗蹄芋中含有半胱胺酸蛋白酶抑制劑之差異，這些品種之粗抽總蛋白質對木瓜酶活性之抑制效果，高雄 1 號對木瓜酶活性表現之抑制力最高；其次赤芽芋；而檳榔心及狗蹄芋則完全不具有抑制木瓜酶活性之能力，顯示品種間有顯著差異。前人研究顯示芋頭高雄 1 號具有耐軟腐病及對病蟲害之抗性相較其

他品種強。一般而言，植物體中蛋白酶抑制劑為其對外來病原之重要防禦機制，高雄 1 號可能因為含較高之蛋白酶抑制劑因而使其對病原之抗性較強的原因。

研究顯示芋頭高雄 1 號田間生育過程中主要特性為耐軟腐病，且其對病蟲害之抗性，均較對照品種檳榔心芋強，產量也高，耐濕性強，適合水田栽培。由於蛋白質酶抑制劑在植物防禦機制中扮演者重要角色，而芋頭抗病性較強之品種—高雄 1 號球莖中存在的特定之蛋白質酶抑制劑 **tarocystatin**，其對木瓜酶活性具明顯抑制效果，對真菌性或細菌性病害的抗性能力之研究顯示，**tarocystatin** 針對真菌性病原菌白絹菌能夠抑制其菌絲之生長。

肆、 研究材料

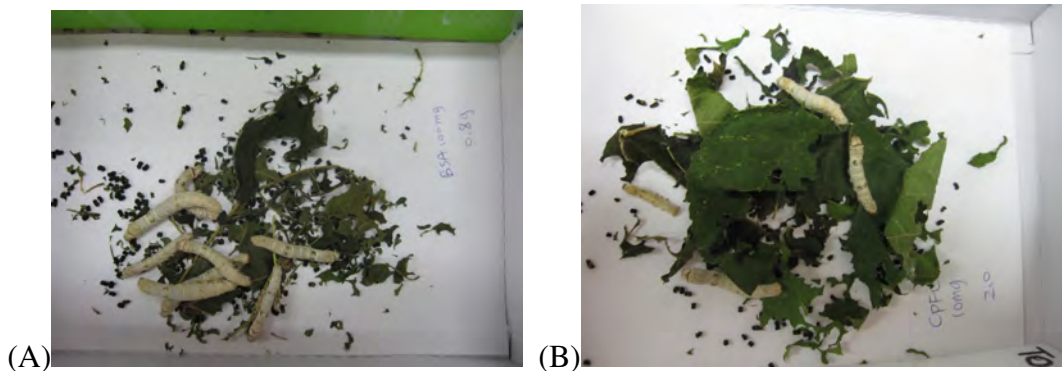
- 一、 桑蠶 *Bombyx mori* L. (苗栗農改場)
- 二、 桑葉 *Morus alba* L.
- 三、 蛋白質
 1. 純度 95% 以上的芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑(*Colocasia esculenta* cystatin protease inhibitor, CeCPI)：來自於國立台灣大學植物科學所鄭貽生老師實驗室。
 2. 小牛血清蛋白(Albumin from bovine serum, BSA)：購於 sigma-aldrich
- 四、 含蓋紙盒數個
- 五、 電子天秤
- 六、 剪刀
- 七、 鑷子
- 八、 玻璃棒

伍、 研究過程及方法

- 一、 使用兩周大的桑蠶當實驗品，挑選體型、重量相當之桑蠶，置入有蓋、透光紙盒中，每盒 10 隻，共七盒。
- 二、 每日秤取七片一公克的桑葉，分別塗上 CeCPI 100 μg 、CeCPI 10 μg 、CeCPI 1 μg 和 BSA 100 μg 、BSA 10 μg 、BSA 1 μg ，以及 H₂O，以玻璃棒均勻塗抹於桑葉表面，等待風乾後餵食，持續三周；CeCPI 為實驗組，H₂O 和 BSA 為控制組。
- 三、 並於每日早上 8 點、中午 12 點 30 分及下午 5 點觀察量測蟲體生長情形。
- 四、 三周後，測量蟲體長度、重量並拍照紀錄，以及計算存活率。

陸、 研究結果

芋頭高雄一號含有較高含量的芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑 (CeCPI)，而較能夠對抗真菌感染，而增加儲藏的時間。CeCPI 也許對昆蟲有生理上的影響，我們利用大腸桿菌所表現的重組蛋白 CeCPI 塗佈在桑葉表面，每一公克的桑葉分別塗上 100, 10, 1 μg ，風乾後餵食桑蠶，此外我們以水和相同濃度的 BSA 處理桑葉當作控制組。桑蠶則是每 10 隻分裝一盒(圖一)，每天塗佈不同濃度的蛋白質於葉片上，風乾後餵食桑蠶，連續三周。



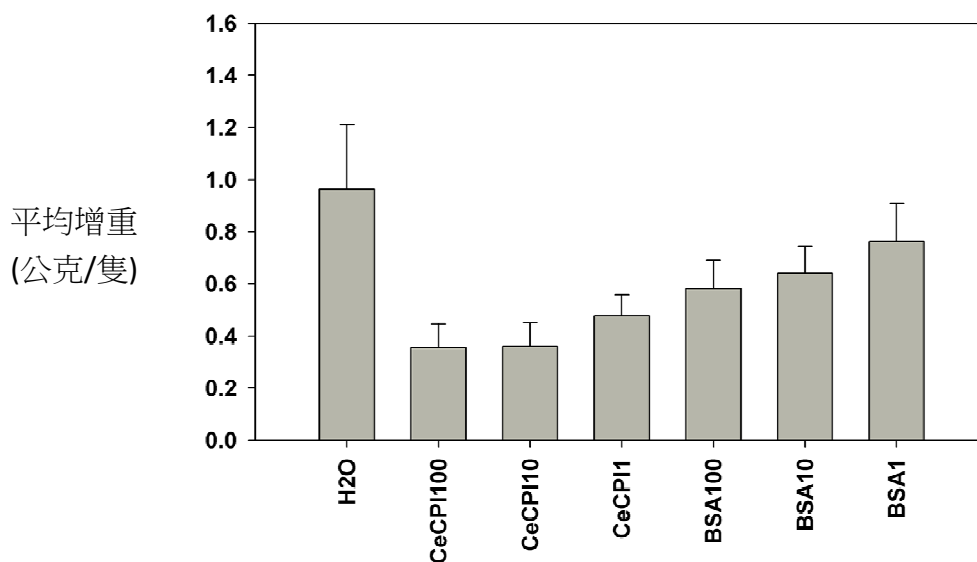
圖一：飼養情形，每 10 隻桑蠶分裝一盒。(A)為 BSA 組 (B)為 CeCPI 組。

餵食三周之後，各組桑蠶重量以表一表示。以水處理的控制組，桑蠶體重平均增加 0.96 g，然而 BSA 處理的控制組，桑蠶體重平均增加 0.58~0.76 g (表二；圖二)。

表一：實驗三周後各組存活之各隻桑蠶重量 (g)									
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
H ₂ O	1.22	0.9	1.24	0.8	0.69	1.36	0.87	0.89	0.69
CeCPI100	0.41	0.28	-	-	-	-	-	-	-
CeCPI10	0.36	0.27	0.45	-	-	-	-	-	-
CeCPI1	0.45	0.52	0.56	0.38	-	-	-	-	-
BSA100	0.74	0.53	0.46	0.47	0.54	0.63	0.7	-	-
BSA10	0.78	0.72	0.57	0.66	0.48	0.57	0.7	-	-
BSA1	0.88	0.62	0.78	0.63	0.76	0.84	0.73	1.04	0.59








另一方面，以重組蛋白 CeCPI 餵食桑蠶的實驗組，桑蠶體重增加較為緩慢，每一公克桑葉塗佈 CeCPI 100, 10, 1 μg ，桑蠶體重分別平均增加 0.35, 0.36, 0.48 g (表二；圖二)。並且隨著餵食 CeCPI 蛋白質濃度增加，桑蠶的體重增加速度明顯下降。

	初重平均(g/隻)	後重平均(g/隻)	平均增重(g/隻)
H ₂ O	0.21	1.17	0.96
CeCPI100	0.15	0.50	0.35
CeCPI10	0.2	0.56	0.36
CeCPI1	0.11	0.59	0.48
BSA100	0.1	0.68	0.58
BSA10	0.08	0.72	0.64
BSA1	0.08	0.84	0.76



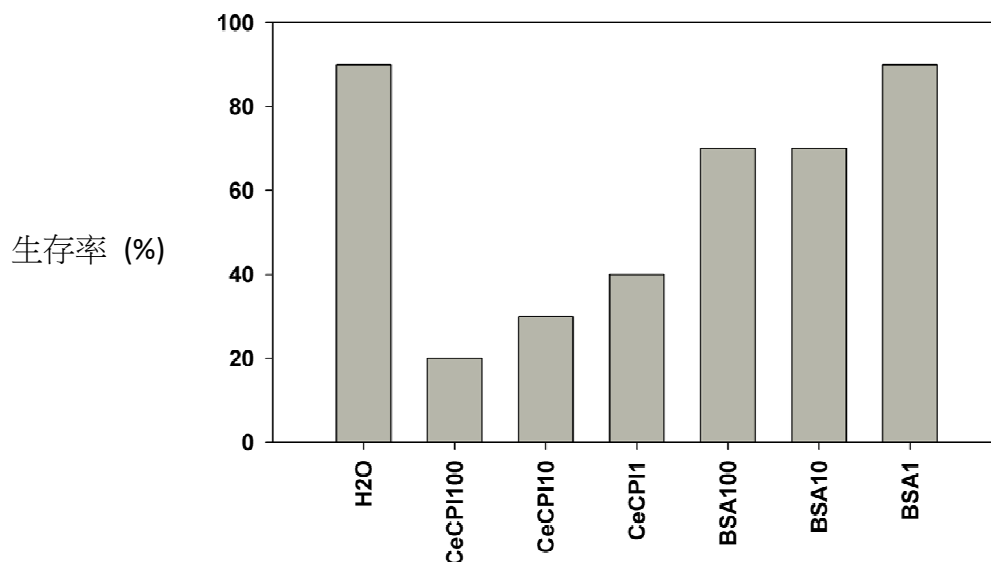
圖二：食用塗佈重組蛋白 CeCPI 桑葉後之桑蠶重量變化。餵養兩周大之桑蠶食用塗有不同濃度蛋白質處理的桑葉，重組蛋白 CeCPI 100 μg (CeCPI100)、10 μg (CeCPI10)以及 1 μg (CeCPI1)；控制組 BSA 100 μg (BSA100)、10 μg (BSA 10)、1 μg (BSA 1)，以及水 (H₂O)。

實驗處理三周後的桑蠶身體長度，食用葉片塗佈 H₂O 及 BSA 的桑蠶體長明顯比餵食 CeCPI 的桑蠶來得長，由結果可以知道芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑會抑制蟲體生長(圖三)。

CeCPI100		CeCPI10		CeCPI1	
體長	2.6 cm	體長	3 cm	體長	3.5 cm
					
BSA100		BSA10		BSA1	
體長	3.5 cm	體長	3.8 cm	體長	4.5 cm
					
H₂O					
體長	5.1 cm				
					

圖三：食用塗佈重組蛋白 CeCPI 桑葉後之桑蠶體長變化。

由實驗結果可知 CeCPI 重組蛋白可以延遲桑蠶的生長速度。此外；實驗經過三周後，食用葉片塗佈 H₂O 及 BSA 的桑蠶存活率大於 70%，然而食用每一公克的桑葉分別塗上 CeCPI 重組蛋白 100, 10, 1 μg 之桑蠶，存活率分別是 20%，30%和 40% (圖四)。實驗結果說明以塗佈 CeCPI 重組蛋白之葉片進行餵食，對桑蠶有毒害(圖五)。



圖四：食用塗佈重組蛋白 CeCPI 桑葉三周後之桑蠶生存率。餵養兩周大之桑蠶食用塗有不同濃度蛋白質處理的桑葉，重組蛋白 CeCPI 100 μg (CeCPI100)、10 μg (CeCPI10)以及 1 μg (CeCPI1)；控制組 BSA 100 μg (BSA100)、10 μg (BSA 10)、1 μg (BSA 1)，以及水 (H₂O)。



圖五：實驗期間桑蠶死亡情況。

柒、 討論

- 一、 本實驗利用小牛血清蛋白質當作控制組，是由於 BSA 經過蟲體消化道後會被分解消化，並不會與消化酵素結合影響消化作用。
- 二、 CeCPI 重組蛋白明顯可以延遲桑蠶的生長狀況，並且與餵食的 CeCPI 蛋白質劑量呈負相關性，隨著蛋白質濃度提高，桑蠶的生長越不良好。
- 三、 桑蠶的存活率也受餵食的 CeCPI 蛋白質劑量影響，濃度越高越容易致死。
- 四、 因此 CeCPI 蛋白質之所以能夠提升芋頭儲藏時間不易腐壞，推測原因可能是昆蟲食用之後，CeCPI 抑制了昆蟲腸道中半胱胺酸酶的分解作用，進而影響昆蟲的營養吸收及生長。
- 五、 實驗雖然無法立即殺死昆蟲，但由於啃食植物葉子的害蟲大部分都是昆蟲的幼蟲，沒有遠距離移動的能力，因此很容易餓死或長不大，而發育不良昆蟲的繁殖力會降低，族群數量也會因此減少。
- 六、 目前全世界主要以蘇力菌才開發各種不同的抗蟲基因，而芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑來自於芋頭，所以人類吃下去後，進到消化器官胃部時，於酸性環境被胃蛋白酶分解，與昆蟲鹼性的消化道性質不同，因此不用擔心產生不良影響。

捌、 結論

在我們實驗中，以水(H₂O)、小牛血清蛋白(BSA)為控制組，濃度 95%的重組蛋白芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑為實驗組。經過三周實驗和餵養，發現食用芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑之桑蠶的生長及發育都受到抑制，並且有較高的死亡率，由此可知芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑明顯對桑蠶有害，並且隨著濃度提高，影響更嚴重。

芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑之所以對桑蠶有害，推測應該是芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑抑制桑蠶消化道中的半胱胺酸蛋白酶，使蟲體養分不易分解和吸收，導致桑蠶營養不良而死亡。由於大部分食用農作物的都是幼蟲，沒有太大的移動能力，若是以芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑於田間噴灑，期能抑制害蟲的生長發育。芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑是從芋頭塊莖表層提煉出來，又人體的消化道胃部為強酸性，對人體應無害，未來若其能代替化學農藥，減低對人體的傷害，必能造福人類。

玖、 未來展望

芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑表現於芋頭球莖皮層當中，能夠抑制木瓜酶，並且參與植物防禦對抗植物病原性真菌和細菌，本研究結果發現其可以抑制桑蠶的生長，未來可以進一步研究並純化，用以發展生物防治取代化學農藥使用量。

生物醫學相關研究也指出半胱胺酸蛋白酶抑制劑可以調控蛋白酶防止蛋白質被不當的水解而造成疾病，譬如癌症、真菌性或是寄生性的疾病等，芋頭半胱胺酸抑制劑是否可以廣效抑制各種類之半胱胺酸酶，是否具有潛力可以開發成為治療疾病之藥物，是未來值得研究的方向。

壹拾、 參考資料

國中自然課本第二冊。

葉開溫(2012)。抗蟲作物與害蟲性管理有效解決蟲害問題。科學人，125，50-53。

楊藹華(2005)。芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑(Tarocystatin)之基因選殖、表現特性及對微生物抗性的分子機制研究。國立台灣大學植物科學所博士論文，未出版，台北市。

【評語】 030303

本作品針對芋頭半胱胺酸蛋白酶抑制劑進行對桑蠶生長影響之探討。由於現有的基改抗蟲作物中確有使用蛋白酶抑制劑的案例，故本作品的內容具實用價值。然而本研究使用的蛋白酶抑制劑屬重組蛋白，在塗葉餵食之前應先有生化實驗的驗證活性較宜；此外，重組蛋白溶於何種緩衝溶液中也應先明瞭，才能有效配製 BSA 及對照組的材料。