

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作 品 名 稱：澱粉酶抑制劑之研究

得 獎 獎 項：佳作

學校 / 作者：國立彰化女子高級中學
國立彰化女子高級中學

李亭諄
陳毓茹

作者簡介



尋夢

往青草更青處慢溯

我叫李亭諄

因追夢而踏入科學國度
小小的身體 想擁抱全世界

路途上智慧果實讓我驚奇
旅程中無私奉獻讓我感恩
人文與科學交會處
正激發出耀眼花火

站在巨人的肩上
才懂得學習謙卑
感謝一路走來相伴的荊棘
使我變得勇敢 不畏懼挑戰

堅持不減的熱忱 要面對未知的明天

因為 我要
往青草更青處慢溯
築夢

作者簡介



我是陳毓茹，從小對科學充滿著好奇，小時對於各著現象總是感到困惑，無法實際操作，單純只從書面上的文字並無法滿足我的好奇。從自己的手中找出「科學的真理」，因為真相只有一個，而我就是要靠自己的雙手找出真相。這份作品約研究一年多，我從中不僅學習到對科學的應有謹慎態度，對於失敗挫折不會感到畏懼，更培養對科學的熱忱。在這過程中感謝各個教授熱血相助，更感謝蕭碧鳳老師的殷切指導，未來我依然會努力找出科學的真相，揭開其中的真面目。

中文摘要

植物合成澱粉酶抑制劑可以對抗動物的取食，國外實驗證明數種澱粉酶抑制劑對害蟲防治具有顯著效果，其中以腰豆(*Phaseolus vulgaris*)研究最多。我們利用 5% T.C.A.進行粗萃，從台灣常見豆類中篩選出四季豆(與腰豆同種不同品系)與菜豆，對麗蠅的澱粉酶具有明顯的抑制效果，對豬胰臟與黃豆澱粉酶的抑制效果則小或無，此種抑制特異性深具害蟲防治的潛力。經由溫度與 pH 的試驗發現粗萃中的澱粉酶抑制劑成分應為蛋白質。我們以四季豆作為繼續研究的對象，將粗萃進一步純化，經由陰離子交換與膠體過濾層析，分離出單一蛋白質，經蛋白質定序比對確認其可能為國外發表的腰豆澱粉酶抑制劑— α AI-1。經由測試發現此抑制劑在 85°C 時仍能抑制果蠅澱粉酶，為一相當穩定的蛋白質；且抑制劑的作用受 pH 值影響很大，在偏酸性環境下的效果最好，與昆蟲分泌澱粉酶的部位亦為酸性環境有相當密切的關聯；且其抑制作用具特異性，可明顯抑制果蠅、入侵紅火蟻、白蟻、蟑螂及麵包蟲等昆蟲的澱粉酶活性，對人類唾液、豬胰臟、四季豆本身及黃豆澱粉酶的抑制效果很小或無，值得繼續深入研究。

英文摘要

Plant amylase inhibitors can fight against predation from plant-eating animals. It has been reported that several amylase inhibitors have an obvious effect on pest control; among them that from *Phaseolus vulgaris* got the most surveyed. 5% T.C.A was employed to make crude extracts. We have screened the amylase inhibitor activities from crude extract among beans common in Taiwan. The inhibitors from both string beans (the different strain of *Phaseolus vulgaris*) and cowpea notably inhibited the amylases in *Chrysomya megacephala*, but little or no inhibition in porcine pancreas and soy bean. This specific inhibition behavior suggested strong potential in pest control. Its activity can be affected by temperature and pH suggested that amylase inhibitors in crude extracts should be proteins. String beans were chosen to be further purified from the crude extracts. A single protein was isolated after ion exchange and gel filtration chromatography. Through protein sequencing, the partial amino acid sequences were highly homologous to that of α AI-1 from *Phaseolus vulgaris*, indicating it might be α AI-1. The purified protein still can inhibit the amylase from *Drosophila melanogaster* at 85°C, suggesting it is thermal-stable. Its activity was affected by pH and reached the peak in weak acidic environment, which might be related to the fact that amylases are secreted in acidic environment of insect's midgut. It obviously inhibited the amylases from *D. melanogaster*, *Solenopsis invicta*, *Odontotermes formosanus*, *Periplaneta Americana* Linnaeus, and *Alphitobius sp.*, while not to human saliva, porcine pancreas, soy bean and string beans itself. The unique pattern of inhibition activities of the purified amylase inhibitor was worthy of further analysis.

目錄

壹. 研究動機.....	6
貳. 研究目的.....	6
參. 研究方法與過程.....	7
肆. 研究結果.....	10
伍. 討論.....	19
陸. 結論.....	20
柒. 參考文獻.....	21

壹、研究動機

國二的時候，我們就有做過有關於澱粉酶的實驗，我們測試了許多蔬菜、水果內所含的澱粉酶活性，得到不錯的成果。進入高中後，我們本來想針對這個主題進行更深入的研究，偶而從一些文獻中發現許多植物不僅具有澱粉酶，還具有澱粉酶抑制劑，可以抑制澱粉酶的作用。尤其在豆類種子中含量最多，市面上已有從腰豆分離純化出“腰豆素”，用以治療糖尿病和減肥【十四】；除此以外，也有人將之應用於害蟲防治，效果顯著。相關文獻大多是國外所發表，台灣的研究闕如，所以我們想針對台灣一些常見的豆科植物進行篩選，找出具有開發潛力的澱粉酶抑制劑以供研究。

澱粉酶抑制劑可分為非蛋白質類抑制劑和蛋白質類抑制劑，前者是一些小分子有機物，例如 acarbose、isoacarbose、acarviosine-glucose 等；後者包括蛋白質和多肽類抑制劑，可依構造區分為 Legume lectin type、Knottin type、Cereal type、Kunitz type、Thaumatococcus type 以及 γ -Purothionin type，它們主要存在於動物、植物和微生物體內，尤其在植物種子內的含量特別豐富，特別是禾本科和豆科植物的種子內含有多種的澱粉酶抑制劑。在藥用治療糖尿病和減肥方面，非蛋白質類抑制劑較蛋白質類抑制劑優異，且不易被人體澱粉酶所分解，而蛋白質類抑制劑由於具有選擇性與專一性的抑制效果，在害蟲防治方面深具潛力【三、十二】。

目前對害蟲的防治主要依賴化學藥物，但化學殺蟲劑的作用是非專一的，在殺死害蟲的同時，也會毒害有益的昆蟲及害蟲的天敵，引起許多副作用。科學家正積極研發副作用較少且不汙染環境的“生物殺蟲劑”，植物所合成的澱粉酶抑制劑即是其中之一【一、二、四】。豆類種子中以腰豆(*P. vulgaris*)的研究最多，種子中所含的澱粉酶抑制劑至少有兩種，分別稱為 α AI-1、 α AI-2，兩者胺基酸的相似度高達 78%【五】，但對澱粉酶的抑制作用具有特異性。 α AI-1 已知可抑制豬胰臟澱粉酶以及數種豆象(*Callosobruchus chinensis*、*C. Maculatus*、*Bruchus pisorum*)、麵包蟲(*Tenebrio molitor*)、玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera*)以及咖啡果小蠹(*Hypothenemus hampei*)的澱粉酶活性； α AI-2 不會抑制 α AI-1 所抑制的澱粉酶，但會抑制墨西哥豆象(*Zabrotes subfasciatus*)的澱粉酶活性，兩者都曾進行餵食實驗，並被轉殖至豌豆，可使特定的豆象幼蟲或成蟲的腸澱粉酶失去作用，導致蟲體死亡或發育遲緩【六、七、十一、十三】。

植物合成澱粉酶抑制劑的主要原因可能為對抗草食動物的吃食，稱為抗生作用。但“物競天擇，適者生存。”面對植物所合成的澱粉酶抑制劑，昆蟲也有因應之道，許多昆蟲都能合成多種澱粉酶，或能分解澱粉酶抑制劑，所以長期共同演化下，植物必需要對其主要的害蟲具有較好的抑制效果，但對其他種生物的影響則較不能預測，還有待全面性地探討。抑制特異性是澱粉酶抑制劑的重要特質，只能對特定害蟲或生物起作用，可解決化學農藥在減少蟲害的同時所引起的一系列副作用，因而在害蟲防治上的前景看好，未來澱粉酶抑制劑的持續研究或可為農業發展提供另一條嶄新的途徑。

貳、研究目的

- 一、從台灣常見的豆類種子篩選出具有潛力的澱粉酶抑制劑
- 二、分離純化澱粉酶抑制劑
- 三、蛋白質定序比對確認所找到的澱粉酶抑制劑
- 四、澱粉酶抑制劑的抑制活性分析

參、材料與方法

一、器材設備與藥品

1. 生物材料

實驗用種子皆取自台灣彰化縣和美鎮之種子商店

實驗用昆蟲：麵包蟲、熱帶火蟻、入侵紅火蟻、白蟻、果蠅取自彰化師範大學

東方果實蠅取自農委會藥物毒物試驗所

蟑螂取自台中中興大學

2. 器材設備

高速離心機、電子天平、攪拌機、攪拌子、紫外光分光儀(分光光度計)、恆溫槽、恆溫培養箱、研鉢、果菜汁機、蛋白質電泳槽、蠕動幫浦

陰離子樹脂管柱(DEAE column)：20ml DEAE陰離子樹脂，填充至直徑1.6cm長度10cm的管柱

膠體過濾層析管柱(Sephadex G50 column)：200ml Sephadex G50，填充至直徑1.6cm 長度100cm的管柱

3 藥品

(1)澱粉液(0.04%)：0.4g 澱粉加水至 1 升，煮沸 10 分鐘

(2)碘液：12.7g I₂及 0.6g KI 溶於 200ml 水中

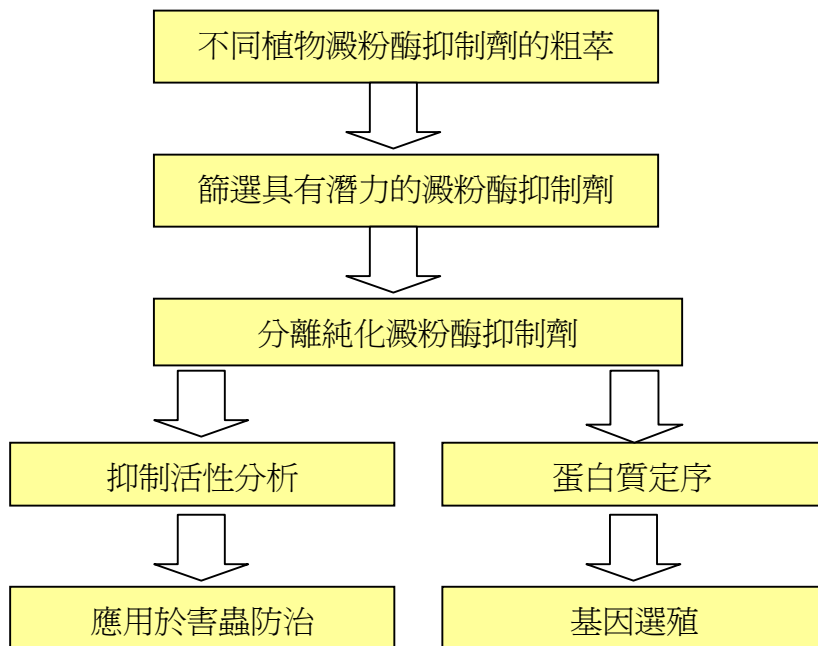
(3)磷酸鹽緩衝溶液(0.02M、pH5.5、6、6.5、6.9、7.5、8)

(4)磷酸鹽緩衝溶液(0.01M、pH8)

(5)硼酸鹽緩衝溶液(pH8、10)

(6)麥克伊文緩衝溶液(pH 4、6)

二、實驗設計與流程：



三、實驗方法

1. 澱粉酶粗萃的製備與反應濃度、反應 pH 值選取

秤取適量的樣本，加入適當體積的磷酸鹽緩衝溶液(0.02M, pH6.9)，置冰上研磨後於 4°C，13500 rpm 離心 10 分鐘，取上清液即為澱粉酶粗萃。

將澱粉酶粗萃依序對半稀釋，取 125 μ l 不同濃度的澱粉酶粗萃加入 125 μ l 磷酸鹽緩衝溶液(0.02M、pH6.9)與 750 μ l 澱粉液於 37°C 反應 30 分鐘後，加入 250 μ l 碘液，於 620nm 測定其吸光值，選取吸光值落於 0.3~1 範圍的澱粉酶粗萃的濃度進行以下的實驗。

取 125 μ l 適當濃度的澱粉酶粗萃加入 125 μ l 磷酸鹽緩衝溶液(0.02M, pH6.9)、分別加入麥克伊文(0.125M、pH 4、6)、硼酸鹽緩衝溶液(0.05M、pH8、10)的 500 μ l 硼酸鹽緩衝液，於 37°C 反應 30 分鐘後，加入 375 μ l 碘液，於 620nm 下測定其吸光值，選取澱粉酶粗萃可以作用的 pH 值範圍。

2. 澱粉酶抑制劑粗萃的製備

取不同植物種類的種子 2g，加入 0.3M NaCl 的磷酸鹽緩衝溶液(0.02M, pH6.9)20ml，置冰上研磨後於 4°C，13500 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。每 10ml 上清液加入 0.5g T.C.A.(三氯乙酸，濃度約為 5%)，使其溶解並緩慢攪拌 1 小時，讓部分蛋白質發生沉澱，以除去植物本身的澱粉酶。上述溶液於 4°C，13500 rpm 再離心 10 分鐘，取出上清液裝入透析袋中，置於 4°C 磷酸鹽緩衝溶液(0.02M, pH6.9)中進行透析，隔夜備用。

3. 四季豆澱粉酶抑制劑的純化

取 50g 四季豆加入 250ml 0.01M HCl，置冰上研磨後於 4°C，6400rpm 離心 15 分鐘，將上清液加入 40~80%硫酸銨進行蛋白質沉澱，離心後將沉澱部分加入 50ml 磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH 8.0)回溶後，裝入透析袋，於 4°C 磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)中進行透析，隔夜備用。每 10ml 透析液加入 0.5g T.C.A.(三氯乙酸，濃度約為 5%)，攪拌離心後取上清液裝入透析袋，置於 4°C 磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)中進行透析，隔夜備用。

先進行陰離子交換，管柱流速固定為 1ml/min 並於室溫進行，先將磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)通入陰離子樹脂管柱，再通入上述透析液(70ml)，收集每管 1ml 流出的溶液，再通入 Wash buffer 60ml，收集每管 4ml 流出的溶液，之後再通入 Elute buffer (0~0.3M NaCl gradient)60ml，收集每管 2ml 流出的溶液。將收集到的溶液每隔三管測試澱粉酶抑制劑的活性，約在收集到的第 43~51 管具有活性。將具有活性的部分混合，再加入 95%硫酸銨進行蛋白質沉澱，離心後將沉澱部分加入 5ml 磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)回溶，再裝入透析袋，於 4°C 磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)中進行透析，隔夜備用。之後進行膠體過濾層析，管柱流速固定為 3ml/min 並於冷房(4°C)中進行，先將磷酸鹽緩衝溶液(0.01M, pH8.0)通入膠體過濾層析管柱，再通入樣本，收集每管 2ml 流出的溶液，每隔三管測試澱粉酶抑制劑的活性，約在收集到的第 39~49 管下具有活性，將有活性的部分混合，即為純化後的澱粉酶抑制劑。取部份進行 spot blot，轉印在 PVDF 膜後送台大生命科學院微生物與生物所進行蛋白質定序，其餘置於-70°C 保存，以備抑制活性分析。

4. 抑制活性分析

(1)於不同 pH 值中進行澱粉酶抑制劑的活性測試

分別置入下列溶液：每管處理皆三重複

溶液	離心管	一	二	三
澱粉酶抑制劑溶液		125 μ l	-	125 μ l
澱粉酶粗萃		125 μ l	125 μ l	-
磷酸鹽緩衝液(0.02M, pH6.9)		-	125 μ l	125 μ l
不同 pH 值的緩衝液		500 μ l	500 μ l	500 μ l

混合均勻後，於 37°C 反應 30 分鐘後，各加入 750 μ l 澱粉液(0.04%)，混合均勻後，於 37°C 反應 30 分鐘後，分別加 375 μ l 碘液，混合均勻後，於 620nm 下測定其吸光值。

(2)於不同溫度進行澱粉酶抑制劑的活性測試

將澱粉酶抑制劑溶液分別以 55°C、70°C、85°C 與 100°C 水浴處理 1 小時，之後同上述 1 之活性測試方法，但不加入不同 pH 值的緩衝液。

(3)相對抑制率的計算

相對抑制率的計算公式：

$$\frac{\{ (2.277 - \text{實驗組 O.D.平均值}) - (2.277 - \text{對照組 O.D.平均值}) \}}{\{ 2.277 - \text{對照組 O.D.平均值} \}} \\ = (\text{實驗組 O.D.} - \text{對照組 O.D.平均值}) / \{ 2.277 - \text{對照組 O.D.平均值} \}$$

澱粉酶活性以所分解的澱粉量代表，即未反應前的澱粉液吸光值(2.277)減去反應後的吸光值。實驗組為加入澱粉酶抑制劑的處理，對照組為只有澱粉酶的處理，將實驗組的平均吸光值扣掉對照組的平均吸光值，再除以澱粉液平均吸光值扣掉對照組平均吸光值的差值即為相對抑制率。

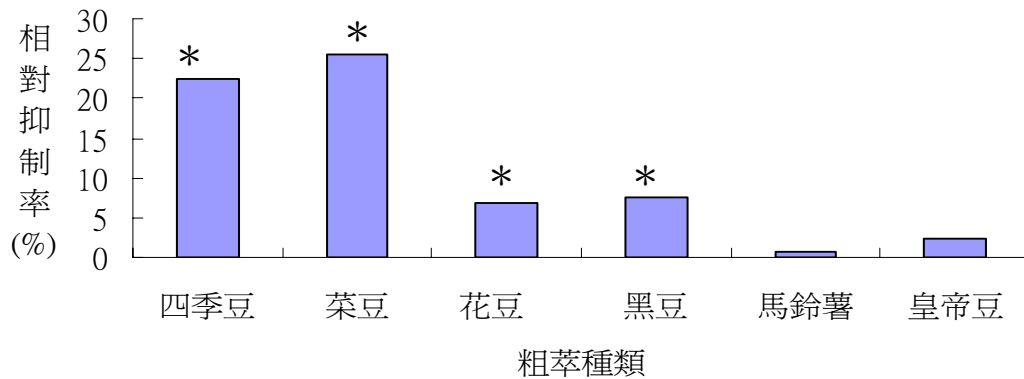
(4)抑制單位的計算

公式： $(\text{實驗組所剩餘的澱粉量平均值} - \text{對照組所剩餘的澱粉量平均值}) / 10 * 8$

1 單位澱粉酶的定義為每三分鐘分解 1mg 澱粉，所以 1 抑制單位的定義為抑制 1 單位澱粉酶的活性，抑制單位意即每毫升純化的抑制劑可抑制多少單位的澱粉酶活性。首先測量吸光值與澱粉量的標準曲線，將實驗組與對照組的吸光值轉換成澱粉量，代表未被分解的澱粉量，兩者平均值的差值除以 10 再乘以 8，即為抑制單位(除以 10 是因為我們反應的時間設為 30 分鐘，乘以 8 是因為抑制劑所加入的量為 125 μ l)。

肆、研究結果

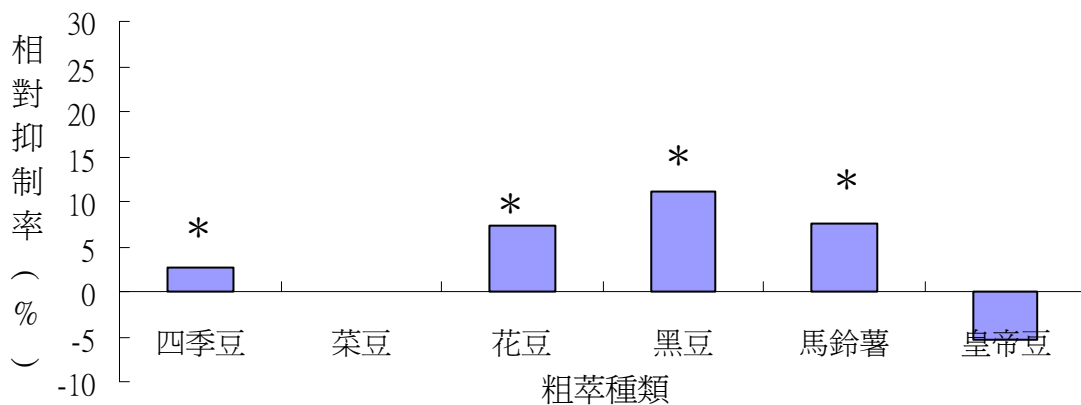
- 一、所有數據皆進行統計分析，具有顯著差異者($P < 0.05$)，於圖表上方標誌” *”。
- 二、不同植物粗萃對不同澱粉酶的抑制效果：
 1. 不同粗萃對麗蠅澱粉酶的抑制效果



圖一、不同粗萃對麗蠅澱粉酶的抑制效果

結果如圖一，除馬鈴薯、皇帝豆澱粉酶抑制劑粗萃外，其餘粗萃皆可抑制麗蠅澱粉酶的活性(t-test, $P < 0.05$)，其中以四季豆與菜豆粗萃對麗蠅澱粉酶的抑制效果最顯著。

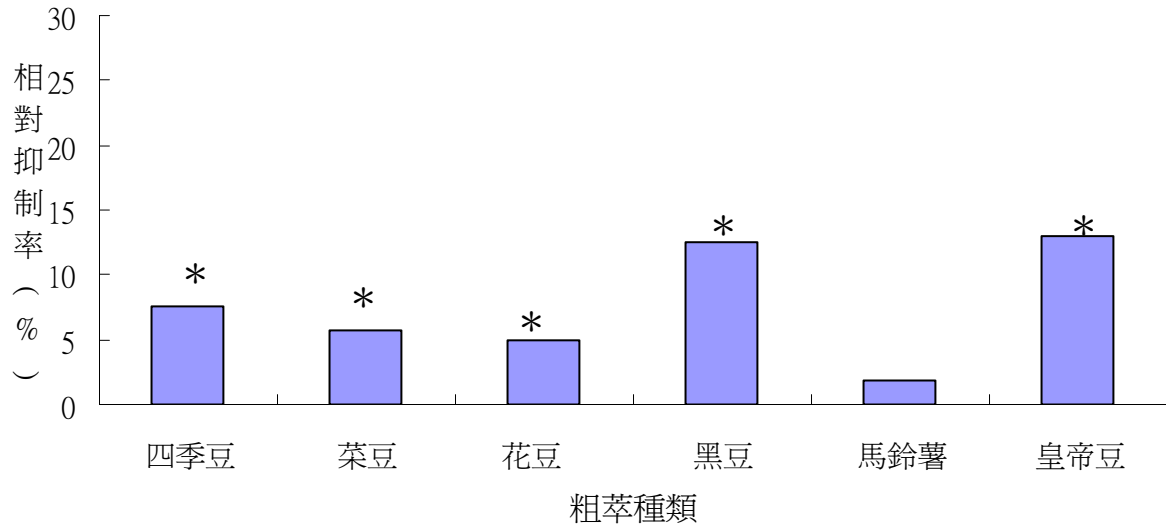
2. 不同粗萃對豬胰臟澱粉酶的抑制效果



圖二、不同粗萃對豬胰臟澱粉酶的抑制效果

結果如圖二，黑豆、花豆、馬鈴薯、四季豆澱粉酶抑制劑粗萃皆可抑制豬胰臟澱粉酶的活性(t-test, $P < 0.05$)，其中以黑豆粗萃的抑制效果最顯著。菜豆粗萃並無顯著的抑制效果(t-test, $P > 0.05$)，而皇帝豆粗萃不僅沒有抑制作用，還能促進豬胰臟澱粉酶的作用(t-test, $P < 0.05$)，值得再進一步探討。

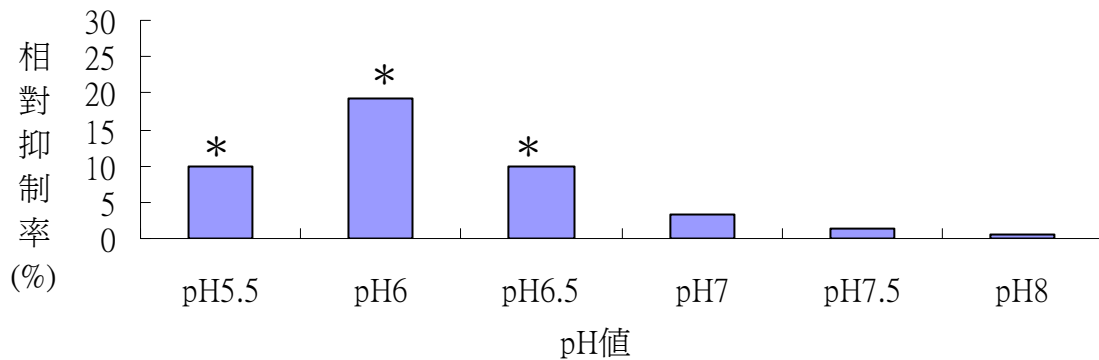
3.不同粗萃對黃豆澱粉酶的抑制效果



圖三、不同粗萃對黃豆澱粉酶的抑制效果

結果如圖三，除馬鈴薯澱粉酶抑制劑粗萃外，其餘粗萃皆可抑制黃豆澱粉酶的活性 (t-test, $P < 0.05$)，其中以黑豆與皇帝豆粗萃的抑制效果最顯著。

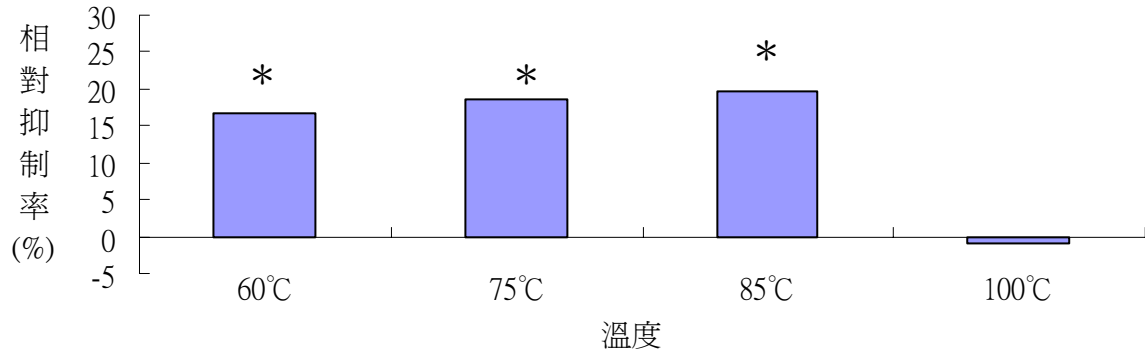
三、四季豆粗萃在不同 pH 值下對麗蠅澱粉酶的抑制效果



圖四、四季豆粗萃在不同pH值下對麗蠅澱粉酶抑制效果

結果如圖四，在弱酸性環境下皆可抑制麗蠅澱粉酶的活性 (t-test, $P < 0.05$)，其中以 pH6 時的抑制效果最顯著。

四、四季豆粗萃在不同溫度下對麗蠅澱粉酶的抑制效果

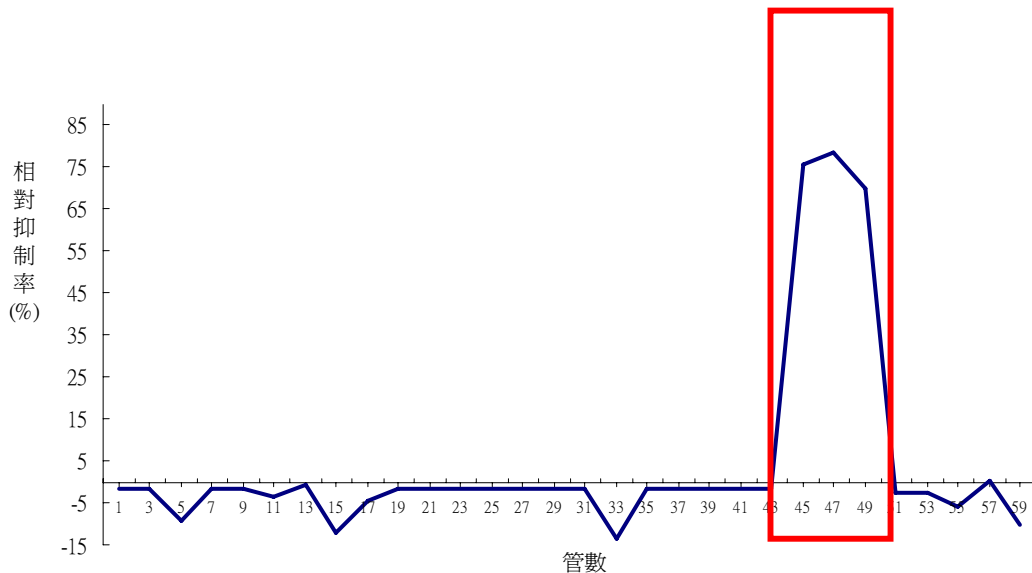


圖五、四季豆粗萃在不同溫度處理後對麗蠅澱粉酶的抑制效果

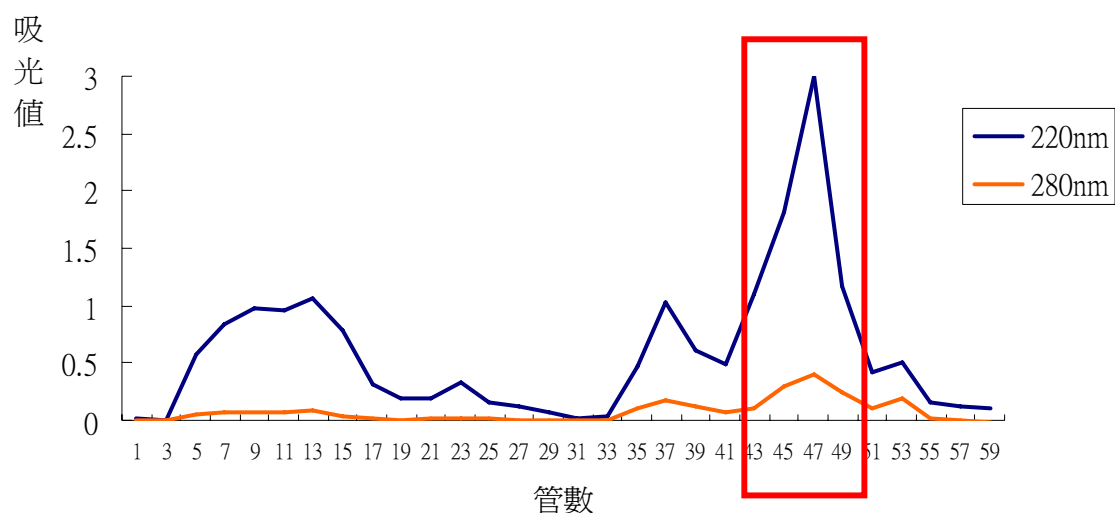
結果如圖五，在 85°C 的高溫處理後依然可抑制麗蠅澱粉酶活性 (t-test, $P < 0.05$)，但經 100°C 處理後即失去抑制效果。

五、四季豆澱粉酶抑制劑的純化結果

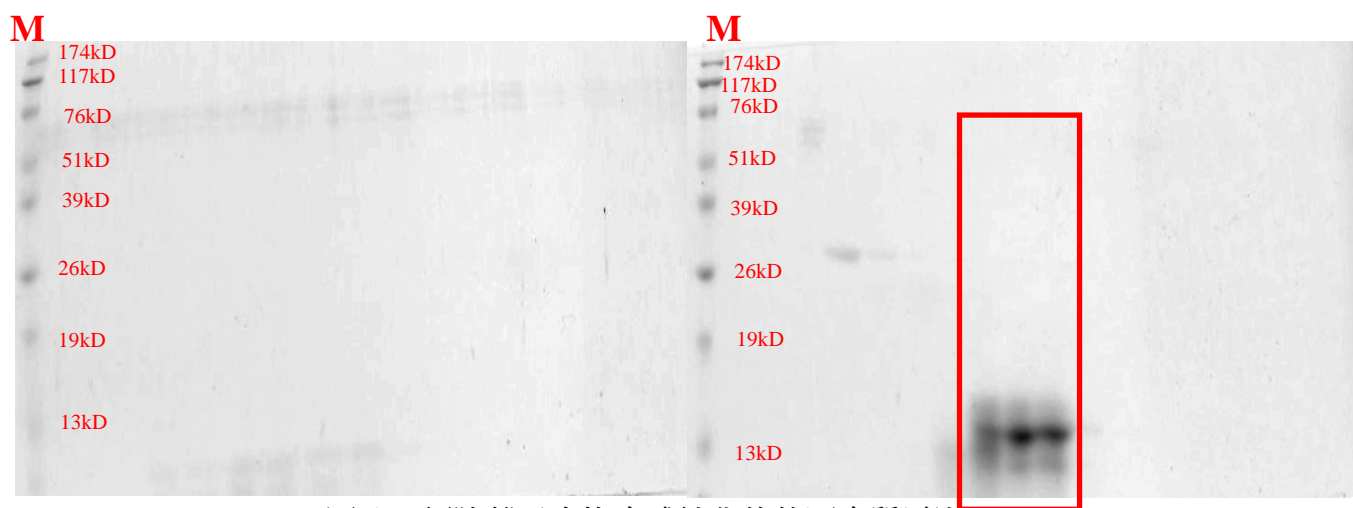
1. 由二的結果，四季豆與菜豆的澱粉酶抑制劑粗萃對麗蠅澱粉酶的抑制效果最顯著，兩者可能具有防治害蟲的潛力，由於文獻中以腰豆的研究最多，而四季豆與腰豆為同種不同品系的作物，故先以四季豆為研究對象。
2. 四季豆澱粉酶抑制劑粗萃經陰離子樹脂管柱進行純化，收集不同管溶液進行相對蛋白質含量及抑制活性的測試，將有抑制活性的部份進行蛋白質電泳(SDS-PAGE)：



圖六、經陰離子樹脂方式純化後每管的抑制活性



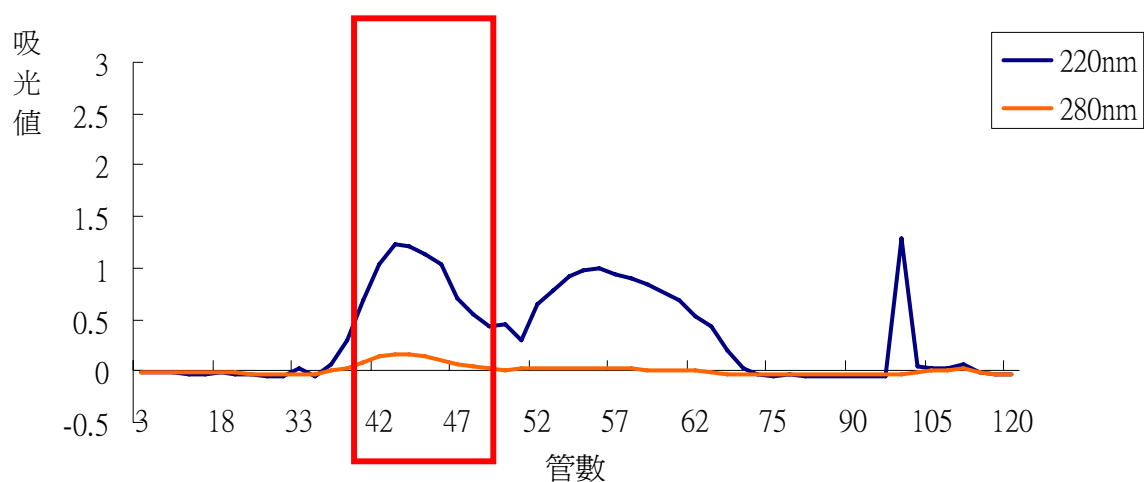
圖七、經陰離子樹脂方式純化後每管的相對蛋白量



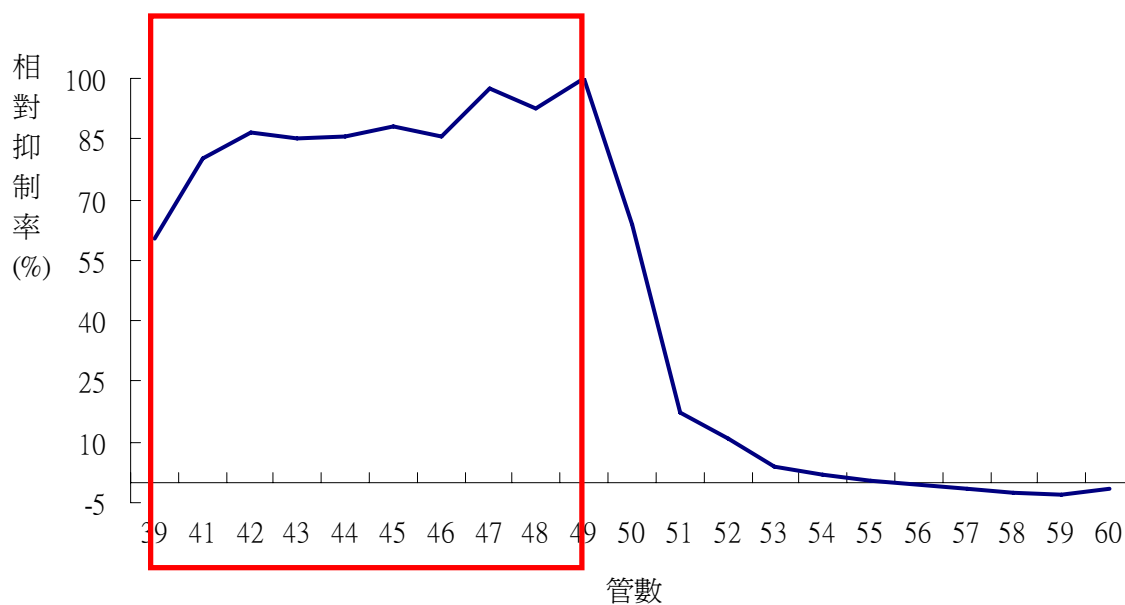
圖八、經陰離子交換方式純化後的蛋白質電泳圖

陰離子樹脂管柱分離純化後的各管澱粉酶抑制劑的抑制活性如圖六，蛋白質相對含量如圖七，具有抑制活性的部份約出現在第 43~51 管，其蛋白質相對含量也出現高峰。每三管取一管進行蛋白質電泳的結果如圖八，顯示經陰離子樹脂管柱分離純化結果仍有多種蛋白質存在。

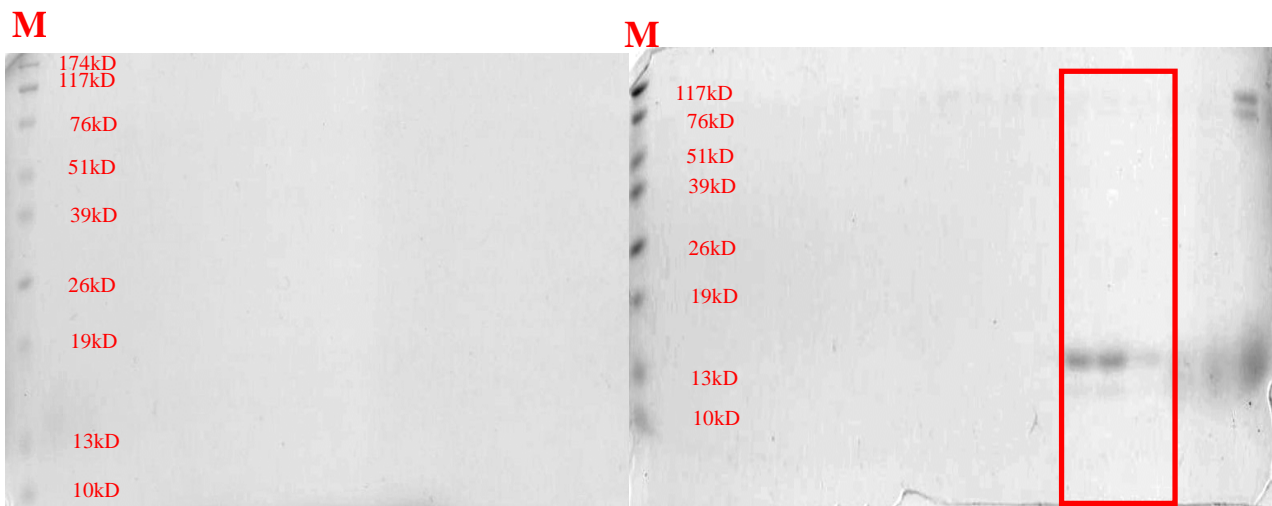
3.再經膠體過濾層析管柱進行純化，收集不同管溶液，並進行蛋白質含量及抑制活性的測試，每三管取一管進行蛋白質電泳(SDS-PAGE)



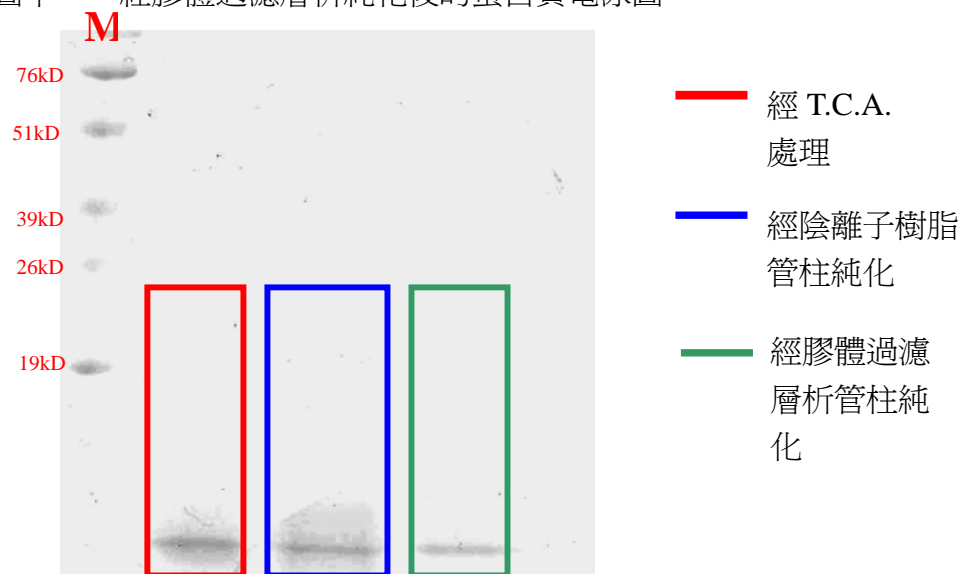
圖九、經膠體過濾層析方式純化後每管的相對蛋白量



圖十、經膠體過濾層析純化後每管的抑制活性



圖十一、經膠體過濾層析純化後的蛋白質電泳圖



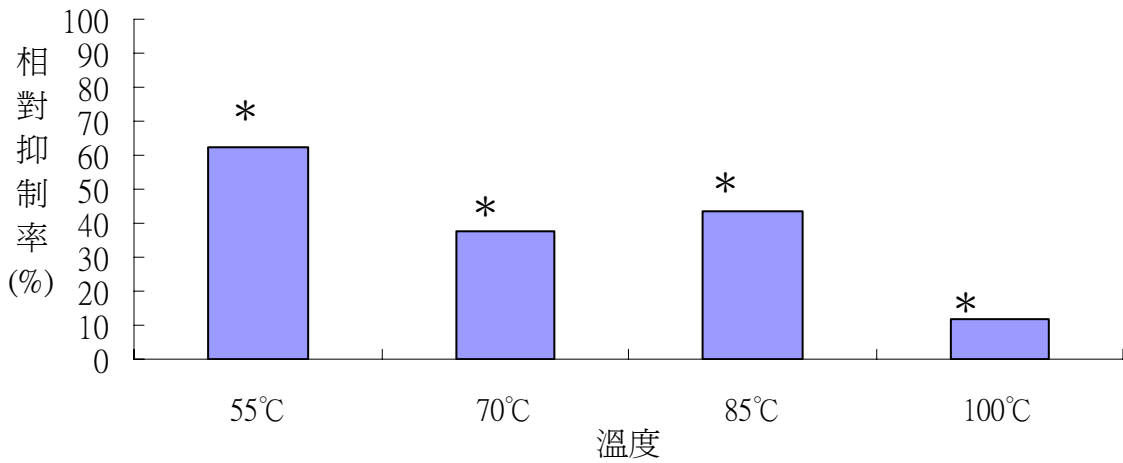
圖十二、澱粉酶抑制劑純化過程蛋白質電泳圖

經膠體過濾層析管柱分離純化後的各管澱粉酶抑制劑的蛋白質相對含量如圖九，抑制活性如圖十，具有抑制活性的部份約出現在第 43~51 管，其蛋白質相對含量也出現高峰。有抑制的部份，每三管取一管進行蛋白質電泳的結果如圖十一，顯示經膠體過濾層析管柱分離純化結果僅具單一蛋白質。各步驟純化過程的蛋白質電泳圖如圖十二，純化過程中，雜蛋白逐漸減少，最後僅剩單一蛋白質，分子量大小約 20kD，濃度為 0.9 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$ 。

- 上述純化後的蛋白質送至台大定序的結果得到兩個多肽片段，N 端的第一個胺基酸不明確，其後分別為 VGLDFVLV 與 TETSFNIDG，經 NCBI 資料庫比對，VGLDFVLV 與 PHA-I beta subunit (Phaseolus vulgaris=kidney beans, Peptide, 137 aa, accessions AAB50854) 的第 3~10 胺基酸皆相符；TETSFNIDG 與 PHA-I alpha subunit (Phaseolus vulgaris=kidney beans, Peptide, 76 aa, accessions AAB50853) 的第 2~10 個胺基酸皆相符，分子量也差不多，此兩段序列亦與多條 α AI-1 前驅物的序列相符，推測此蛋白質可能即為腰豆的 α AI-1 蛋白質水解修飾後的產物，具有兩個次單元。

四、純化後的澱粉酶抑制劑的抑制活性分析

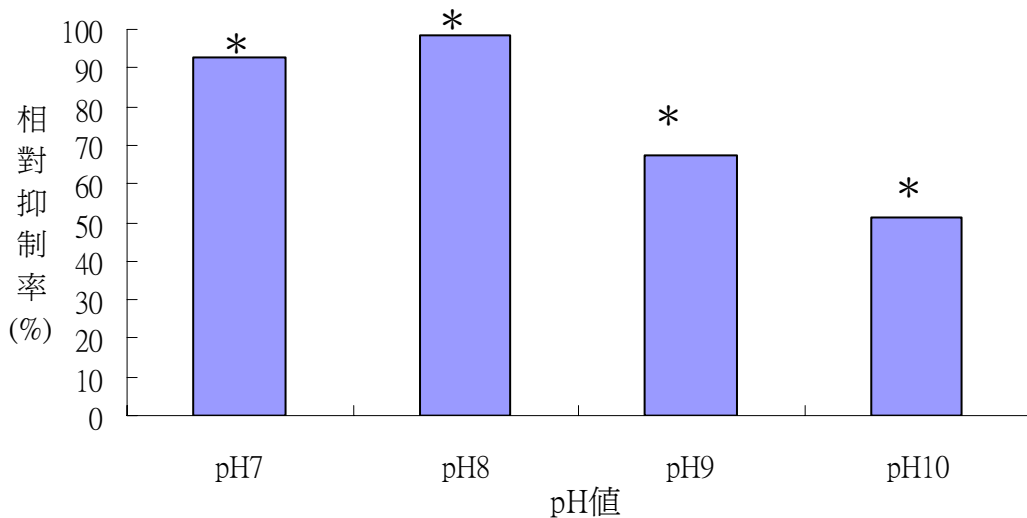
1. 純化後的抑制劑經不同溫度處理後對果蠅澱粉酶的抑制活性



圖十三、純化後的抑制劑經不同溫度處理後對果蠅澱粉酶度下的抑制活性

結果如圖十三，純化後的抑制劑經 85°C 處理後對果蠅澱粉酶仍有顯著的抑制效果 (t-test, $P < 0.05$)，經 100°C 的高溫處理後，抑制效果就大幅降低。由此可知此抑制劑具有相當好的耐熱性，與之前對麗蠅澱粉酶的測試一致。

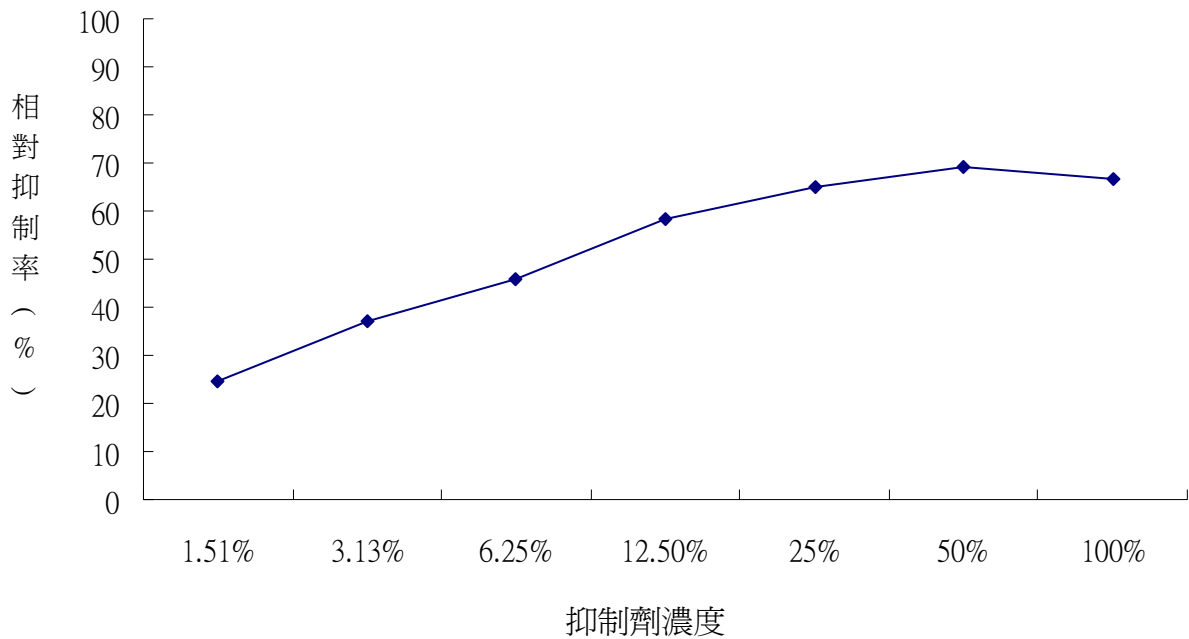
2. 純化後的抑制劑在不同 pH 值下對果蠅澱粉酶的抑制效果



圖十四、純化後的抑制劑在不同pH值下對果蠅澱粉酶的抑制效果

結果如圖十四，純化後的抑制劑在 pH7~10 的環境下皆有顯著的抑制效果 (t-test, $P < 0.05$)，但在不同 pH 環境下的抑制效果不同。

3. 不同濃度的純化抑制劑對果蠅澱粉酶的抑制效果



圖十五、不同濃度的純化抑制劑對果蠅澱粉酶的抑制效果

結果如圖十五，純化抑制劑於濃度低時，濃度與抑制效果成正比；抑制劑濃度太高，抑制效果不再增加，呈現飽和。

4. 純化的抑制劑對不同種生物澱粉酶的效果

結果如表 1，純化的抑制劑對不同生物澱粉酶的抑制具有特異性，且不同 pH 值下的抑制效果也不同，對麵包蟲成蟲、幼蟲、入侵紅火蟻、白蟻、果蠅以及蟑螂的澱粉酶都具有明顯的抑制效果，對人類唾液、豬胰臟、熱帶紅火蟻、東方果實蠅以及四季豆、黃豆澱粉酶的抑制效果較差。

表 1、純化的抑制劑對不同種生物澱粉酶的效果

pH		4		6		8		10	
抑制種類	抑制單位/率	抑制單位 (unit*10 ⁻² /ml)	抑制率 (%)	抑制單位 (unit*10 ⁻² /ml)	抑制率 (%)	抑制單位 (unit*10 ⁻² /ml)	抑制率 (%)	抑制單位 (unit*10 ⁻² /ml)	抑制率 (%)
唾液		-	-	-	-	None	None	-	-
豬胰臟		-	-	8.8	10.4	None	None	None	None
麵包蟲成蟲(<i>Alphitopius sp.</i>)		67.6	57.6	67.6	61.8	23.7	23.1	-	-
麵包蟲幼蟲(<i>Alphitopius sp.</i>)		66.8	61.0	69.5	62.9	None	None	-	-
熱帶火蟻(<i>S.geminata</i>)		-	-	11.3	13.8	None	None	None	None
入侵紅火蟻(<i>Solenopsis invicta</i>)		51.2	58.2	11.5	12.1	None	None	None	None
白蟻(<i>Odontotermes formosanus</i>)		-	-	52.2	53.6	49.5	50.9	5.5	6.0
東方果實蠅(<i>Bactrocera dorsalis Handel</i>)		None	None	17.6	18.4	None	None	-	-
果蠅(<i>Drosophila melanogaster</i>)		-	-	-	-	89.6	95.3	42.4	51.3
蟑螂(<i>Periplaneta Americana Linnaeus</i>)		64.6	55.8	None	None	None	None	-	-
四季豆(<i>Phaseolus vulgaris</i>)		-	-	10.0	10.7	7.5	10.3	None	None
黃豆(<i>Glycine max Merrill</i>)		-	-	None	None	None	None	None	None

“-”表沒測，在此 pH 環境下的澱粉酶活性差；“none”表示抑制劑對此澱粉酶在統計上沒有抑制效果，1 單位澱粉酶的定義為每三分鐘分解 1mg 澱粉，所以 1 抑制單位的定義為抑制 1 單位澱粉酶的活性，抑制單位意即每毫升純化的抑制劑可抑制多少單位的澱粉酶活性。

伍、討論

- 一、從台灣常見的豆類種子篩選出四季豆與菜豆，兩者的粗萃對麗蠅澱粉酶皆有很高的抑制效果，對豬胰臟澱粉酶以及黃豆澱粉酶的抑制效果很低或無，所以很適合用於害蟲防治，僅抑制昆蟲澱粉酶，而不抑制哺乳類或植物本身的澱粉酶。後來我們選擇先以四季豆作為研究對象，乃因四季豆與腰豆為同種(*Phaseolus vulgaris*)不同品系的作物，文獻中對腰豆的研究最多，且四季豆對果蠅澱粉酶亦有很高的抑制效果，果蠅較麗蠅容易取得，且澱粉酶的活性也較穩定，對於後續的抑制劑純化工作較容易。
- 二、四季豆與菜豆粗萃中的澱粉酶抑制劑活性皆會受到溫度與 pH 的影響，推測粗萃中所含的澱粉酶抑制劑應為蛋白質。故之後以蛋白質純化的方法進行澱粉酶抑制劑的純化。先以 5%T.C.A.(三氯乙酸)除去植物所含澱粉酶及其他雜蛋白，再通入陰離子樹脂管柱與膠體層析管柱，分離出單一蛋白質，經蛋白質定序比對後確認可能為腰豆的 α AI-1，詳細序列有待進一步證實，可能不同品系的序列會有所差異。
- 三、純化後的四季豆澱粉酶抑制劑與粗萃相同可耐熱至 85°C 仍有抑制活性，可見此抑制劑為一相當耐高溫且穩定的蛋白質。在不同 pH 環境下對不同種類生物澱粉酶的抑制效果也不盡相同，在偏酸性環境下的抑制效果最好，可能和昆蟲腸道的 pH 值變化有關。昆蟲腸道的 pH 值呈現梯度變化，由酸至鹼，前段中腸部位為酸性環境，澱粉酶即由此處分泌，具有生理學上的重要意義。
- 四、純化抑制劑於濃度低時，濃度與抑制效果成正比；抑制劑濃度太高時，抑制效果不再增加，呈現飽和。與酵素濃度固定時，反應速率與受質濃度變化曲線圖類似，因為腰豆 α AI-1 為澱粉酶的競爭性抑制物，會和澱粉共同競爭澱粉酶的活化位，因而抑制了澱粉酶的活性。
- 五、由於澱粉酶抑制劑的作用具有特異性，且會受到 pH 值很大的影響，所以在不同生物種類澱粉酶的活性測試上，我們選取適當的濃度，在選取可作用的 pH 範圍進行抑制劑的實驗。我們所選取的物種與前人所研究的大多不同，前人偏重在大多取食豆類種子的昆蟲，我們則測試了許多雜食性昆蟲，例如火蟻、白蟻、蟑螂等。實驗結果顯示四季豆純化的抑制劑可明顯抑制包括果蠅、入侵紅火蟻、白蟻、蟑螂及麵包蟲等昆蟲，但對人類唾液、豬胰臟、四季豆本身及黃豆澱粉酶的抑制效果很小或無，在害蟲防治上深具潛力。尤其在入侵紅火蟻與蟑螂的防治上，投以天然萃取或基因工程合成的澱粉酶抑制劑可能也有防治的效果，雖然可能不若對植食性害蟲(其消化液以澱粉酶為主)有效，但能減少其醣類與能量的攝取，影響生長與生殖，詳細影響還有待進一步活體實驗的証實。
- 六、植物所合成的抗蟲物質可分為兩大類，蛋白酶抑制劑與外源凝集素，其中外源凝集素又可分為幾丁質家族及 PHA 家族，PHA 家族的蛋白質之間的相似度達六成，包括 PHA-E、PHA-L、arcelin 以及澱粉酶抑制劑，前三者可與昆蟲腸道上皮細胞結合，後者則可與澱粉酶結合而抑制澱粉酶的活性【四】，其中腰豆的 α AI-1 與 AI-2，兩者胺基酸的相似度高達 78%，但對澱粉酶的抑制作用具有特異性【五】。由此可見 PHA 家族蛋白質之間的些微差異，即可造成截然不同的作用。
- 七、*Phaseolus vulgaris* 在世界各地均可栽種，雖為同種但品系紛雜。同種不同品系所產生的 α AI-1 的胺基酸序列相似性很高，作用頗類似。例如國外腰豆的 Magna 品系的 C 端較 Tebo 品系少 6 個胺基酸，其間 130 個胺基酸僅有 9 個胺基酸不同，相似度達七成；且 α AI-1

的前驅蛋白質必須經水解修飾後形成 α 、 β 次單元，形成二聚物後，才能具有活性。同種不同品系間的轉譯後修飾可能略有差異，在 Magna 品系 β 次單元的 C 端分別比 Tebo 以及 Greensleeves 品系短少 6 個與 8 個胺基酸【八】，這些差異的部分與抑制活性的關係仍有待進一步證實。

- 八、經由 X 光繞射比對 α AI-1 與豬胰臟澱粉酶以及黃粉蟲澱粉酶所形成的複合物結構，找到澱粉酶上大約由 50 個胺基酸與 α AI-1 所形成的接觸區域，包含催化澱粉分解的活性部分【十】。不同生物的澱粉酶在接觸區域的胺基酸序列比較，活性部位的胺基酸序列具有保守性，其他接觸的胺基酸部份，能被抑制者和不被抑制者之間具有明顯的分隔，顯現這個部位與澱粉酶抑制劑的抑制效果有顯著相關【八】。
- 九、持續對澱粉酶抑制劑進行研究，初期的工作為篩選有效的澱粉酶抑制劑、了解不同蛋白質之間的交互作用與差異，後期的工作為利用蛋白質體學的發展，針對某一昆蟲澱粉酶量身訂做一種澱粉酶抑制劑，真正做到專一性的防治。

陸、結論

- 一、植物合成之澱粉酶抑制劑的作用具有特異性，利用植物粗萃先篩選出有效的抑制劑，再進一步分離純化與測試，可快速篩選研究標的。
- 二、我們所純化的四季豆抑制劑經蛋白質定序後比對可能為腰豆的 α AI-1，兩者的胺基酸序列可能有些微不同，影響抑制活性。
- 三、純化的四季豆抑制劑可耐熱至 85°C 仍有抑制活性，為一相當穩定的蛋白質。
- 四、澱粉酶抑制劑的抑制作用受 pH 值影響很大，純化的四季豆抑制劑在偏酸性環境下的效果最好，而昆蟲分泌澱粉酶的部位亦為酸性環境，具重要意義。
- 五、純化的四季豆抑制劑可明顯抑制果蠅、入侵紅火蟻、白蟻、蟑螂及麵包蟲等昆蟲的澱粉酶活性，對人類唾液、豬胰臟、四季豆本身及黃豆澱粉酶的抑制效果很小或無，具有發展潛力。
- 六、澱粉酶抑制劑的持續研究有助於了解更多抑制劑與酶之間的交互作用，未來可應用於特定害蟲的防治。

柒、參考文獻

- 一、王清玲、林鳳琪、林俊義(民 93)。抗蟲基因轉殖植物之類別與其對環境中昆蟲類之影響。植物保護學會學刊，46：181-209。
- 二、王琳(民 95)。昆蟲澱粉酶抑制劑的研究發展。中國農學通報，22(8)：397-400。
- 三、Birte Svensson, etc. (2004) Proteinaceous α - amylase inhibitors. Biochimica et Biophysica Acta 1696: 145 - 156.
- 四、Carlini, C. R., and M. F. Grossi-de-Sá. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40: 1515-1539.
- 五、Grossi de Sá MF, etc. (1997) Molecular characterization of a bean alpha-amylase inhibitor that inhibits the alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. Planta 203(3): 295-303.
- 六、Hartmut E . Schoroeder, etc. (1995) Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the Pea Weevil in Transgenic Peas. Plant physiol. 107: 1233-1239.
- 七、Ishimoto, M., and K. Kitamura. (1989) Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Appl. Entomol. Zool. 24: 281-286.
- 八、Ivan Klueh, etc. (2005) Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α - amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry 66: 31-39.
- 九、K. Sasikiran, etc. (2002) Proteinase and alpha-amylase inhibitor of sweet potato: Changes during growth phase, sprouting, and wound alterations. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 291-298.
- 十、M. C. M. Da Silva, etc. (2000) Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between α - amylase and their inhibitors. Protein Engineering 13(3): 167-177.
- 十一、Masao Ishimoto, etc. (1999) Insecticidal activity of an α - amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. Biochimica et Biophysica Acta 1432: 104-112.
- 十二、Octavio. etc. (2002) Plant α - amylase inhibitors and their interaction with α - amylase. Structure, function and potential for crop protection. Eur. J. Biochem. 269: 397-412.
- 十三、Roger L. Morton, etc. (2000) Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas provides complete protection from pea weevil under field conditions. PNAS 97(8): 3820 - 3825.
- 十四、美食主義者的窈窕新寵-腰豆與黃豆萃取精華。Smile 夢想天堂。民九十年二月二十日，取自：<http://home.kimo.com.tw/ccmw.tw/h005.html>

評語

這個澱粉酶抑制蛋白的純化，具生物製劑的應用之價值，然此研究內容應

改進：

- 一、 蛋白純化之 SDS-PAGE pattern 應顯示不同步驟的純化效益。
- 二、 蛋白純化 Fold，應清楚標示數據。
- 三、 應有蛋白序列之數據。