

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：豆類澱粉酶抑制劑之研究與應用

學校 / 作者：國立彰化女子高級中學 李亭諄



尋夢

向青草更青處慢溯

我叫李亭諄

因追夢而踏入科學國度

掀開著了迷的故事扉頁
路途上智慧果實讓我驚奇
沿路裡重重困阻讓我堅強
旅程中無私協助讓我感恩
人文與科學交會處
正激發耀眼花火

巨人的肩上

開始慢慢充實能量
感謝一路上相伴的荊棘
使我變得勇敢 不畏挑戰

懷著不減的熱忱 迎向未來
因為 我要

向青草更青處慢溯

築夢

中文摘要

豆類澱粉酶抑制劑具害蟲防治與血糖調節之功效。本研究從台灣五種豆類中進行澱粉酶抑制劑活性初篩，篩選出四季豆對麗蠅的澱粉酶有明顯的抑制效果，粗萃後分離純化出單一蛋白質，經胺基酸定序結果得到兩個多肽片段-VGLDFVLV 與 TETSFNIDG，與已發表文獻比對推測為腰豆澱粉酶抑制劑— α AI-1。經測試發現此抑制劑在 85°C 時仍具備抑制果蠅澱粉酶之活性，為一熱安定性蛋白質，其抑制作用受 pH 值影響很大，在偏酸性環境下的效果最好，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。在調節血糖方面，本研究利用豬胰臟澱粉酶進行抑制活性測試，篩選出四季豆、花豆與黑豆對豬胰臟澱粉酶有明顯的抑制效果，進一步利用 Wistar 品系大鼠，進行豆類澱粉酶抑制劑降血糖功效之活體試驗，將四季豆、花豆和黑豆粗萃經濃縮乾燥後餵食大鼠，發現花豆、黑豆在第一小時具有顯著抑制血糖增加效果；四季豆、黑豆在第三小時血糖回升，花豆仍可維持較低血糖濃度。此初步結果顯示，花豆粗萃物可能具備減緩消化吸收作用，具應用潛能，其確切分子作用機制值得深入探究。

英文摘要

Amylase inhibitors can be applied in pest control and glucose adjustments. The study screens *Phaseolus vulgaris* from five Taiwan's beans that has the most significant inhibition towards *Chrysomia megacephala*. The protein was isolated and sequenced two fragments, -VGLDFVLV and TETSFNIDG, highly homologous to that of α AI-1 from *Phaseolus vulgaris*. The pure protein still inhibits the amylase from *Drosophila melanogaster* at 85°C, suggesting it is thermal-stable. Its activity was specific and was affected by pH, reaching the peak in weak acidic condition. It obviously inhibits amylases from *D. melanogaster*, *Solenopsis invicta*, *Odontotermes formosanus*, *Periplaneta Americana Linnaeus*, and *Alphitobius sp.* In addition, the study points out *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus L.* and *Glycine max*, which have significant inhibition toward pancreatic amylase. The amylase inhibitors' functions of decreasing in blood glucose were detected by animal experiments on Wistar rats. The rats fed with the extracts of *Phaseolus coccineus L.* and *Glycine max* showed the inhibition of glucose increasing at the first hour, while blood glucose concentration after rats fed with *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* increase at the third hour, and blood glucose after rats fed with *Phaseolus coccineus L.* maintains low. Its premier result indicates that the extract from *Phaseolus coccineus L.* might postpones digestion and has potential to be applied. According to these results, amylase inhibitors are worthy to further analysis.

目 錄

壹. 前言	p5-6
貳. 研究目的	p7
參. 材料與方法	p7-11
肆. 研究結果	p12-18
伍. 討論	p19-20
陸. 結論	p20
柒. 參考文獻	p21-22

壹、前言

一、研究動機：

在國二的時候，曾做過有關澱粉酶的實驗，實驗中測試了許多蔬菜、水果內所含的澱粉酶活性，得到不錯的成果。進入高中後，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。尤其是豆類，目前市面上已有從腰豆所萃取出來的“腰豆素”，因為抑制人類澱粉酶的作用很顯著，近年來已被分離純化作為藥用，用以治療糖尿病和減肥【十八】。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。

在 2006 年的全國科展中，曾分析數種豆類種子的萃取液可抑制不同生物的澱粉酶活性，其中，花豆、黑豆、馬鈴薯萃取液抑制豬胰臟澱粉酶的效果最佳；菜豆、四季豆萃取液抑制麗蠅澱粉酶的效果最佳；黑豆、皇帝豆萃取液抑制黃豆澱粉酶的效果最佳；我也針對幾種抑制效果較顯著的萃取液，進行活性測試，其中皇帝豆的澱粉酶抑制劑最耐高溫，100°C 才會失去活性，其次是菜豆、四季豆，在 85°C 時變性，最差的是黑豆。菜豆、四季豆兩者在偏酸性環境中的抑制蒼蠅澱粉酶的效果最佳，而皇帝豆、黑豆則在中性的環境中抑制黃豆澱粉酶之效果最佳。由此可見，不同植物的澱粉酶抑制劑的活性皆會受溫度與 pH 值的影響，其成分應為蛋白質。

在 2006 國際科展中，我將四季豆粗萃通過陰離子樹脂管柱、膠體過濾層析，純化出四季豆的澱粉酶抑制劑，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；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，具有防治特定害蟲的潛力。

另外，先前試驗中，花豆、黑豆萃取液在試管內抑制純化豬胰臟澱粉酶的效果顯著，因此本研究進一步利用動物模式進行澱粉酶抑制劑體內試驗，並與國外文獻眾多的四季豆澱粉酶抑制劑比較，以瞭解所篩選豆類在人體預防肥胖及調節血糖等功效之發展潛力。

二、文獻探討

澱粉酶主要功能係將含澱粉的食物(例如米、麵粉、麵包等)分解成葡萄糖，以便人體吸收利用。澱粉酶抑制劑則是抑制澱粉酶的作用，目前研究以 α -澱粉酶抑制劑(Alpha Amylase Inhibitor)的效果最明顯可靠。 α -澱粉酶抑制劑可抑制澱粉酶的作用，使食物中的澱粉不易在口腔、小腸中分解轉變成葡萄糖，進而減少葡萄糖的吸收利用，可應用在改善糖尿病的惡化及減少肥胖的發生。

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。蛋白質類抑制劑由於具有選擇性與專一性的抑制效果，在害蟲防治方面也深具潛力【三、十二】。另外，在藥用治療糖尿病和減肥方面，蛋白質類抑制劑與非蛋白質類抑制劑皆有藥劑的問世，並有些蛋白質類抑制劑是從植

物天然萃取，更被研發為健康食品。澱粉酶抑制劑目前已被發表之用途，大致方向分為以下兩點：

(一)害蟲防治

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，進而造成生態不平衡。科學家正積極研發不汙染環境的“生物殺蟲劑”，植物所合成的澱粉酶抑制劑正是其中之一【一、二、五】。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-2，兩者胺基酸序列的相似度高達 78%【六】，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昆蟲豆象(*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*)體內的澱粉酶活性； α AI-2 雖不能抑制以上所述昆蟲之澱粉酶活性，但卻能抑制墨西哥豆象(*Zabrotes subfasciatus*)的澱粉酶活性。 α AI-1、 α AI-2 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【七、八、十五、十七】。

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，只針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一系列負面影響，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。

(二)調節體重及血糖

1975 年，科學家馬歇爾 (J.J. Marshall) 和勞達 (C.M. Lauda) 從腰豆 (Kidney Bean) 的蛋白質當中，分離出一種物質叫「腰豆素」(Phaseolamin)，並且在實驗中發現，腰豆素可以和人體的澱粉酶 (α -Amylase) 結合，並且抑制它的活性。1980 年代早期，科學家(Bo-Linn 等人)用腰豆粗萃物進行控制肥胖及糖尿病的實驗，但由於抑制劑濃度過低，抑制效果並不顯著【四】。直到 Layer 等人將純化的澱粉酶抑制劑(white bean inhibitor)灌注於人類的十二指腸後，才發現小腸中有 95% 以上的澱粉酶活性被抑制，餐後胰島素的增加速度也明顯的趨緩【十二】。2004 年，西班牙科學家進行動物實驗，將純化後的四季豆抑制劑(α -AI)灌食到小鼠胃中，經 21 天長期的觀察，發現小鼠採食量明顯下降、小腸酵素活性改變及體重減輕的情況，因此推知四季豆抑制劑確會對小鼠的養分吸收產生影響【十三】。

另外，在其他的豆類，以及小麥、黑麥當中，也發現了與腰豆素類似的澱粉酶抑制劑，這些發現激起了許多人對於將澱粉酶抑制劑應用在醫療上的興趣，目前已有相關的臨床實驗結果與一些產品問世。其他豆類如白芸豆(White kidney beans P.E.)萃取物，市面主要將其萃取物應用於治療肥胖【二十】。國外臨床實驗結果也發現小麥萃取物中的 α -澱粉酶抑制劑，可抑制食慾及小腸吸收的作用，並減少體重增加【十】。美國 Pharmachem 實驗室把從四季豆中萃取出來的澱粉酶抑制劑命名為 Phase 2TM Phaseolamin 及 Phaseolamin 2250，並將開發出的成分透過美國各大學的生化研究所進行各項臨床試驗及毒性安全性試驗，證實此成分確可以有效的抑制澱粉轉化為葡萄糖的反應，同時不具毒性【十九】。

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、測試篩選出的澱粉酶抑制劑。
- 三、純化後四季豆澱粉酶抑制劑對不同昆蟲澱粉酶的抑制活性分析。
- 四、以花豆、黑豆及四季豆粗萃進行大鼠灌食實驗，篩選出抑制澱粉酶活性最佳的種類。

參、材料與方法

一、器材設備與藥品

(一)生物材料

- 1.實驗用種子皆取自台灣彰化縣和美鎮之種子商店
- 2.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
- 3.實驗用大鼠：由中興大學自勒斯科生物科技股份有限公司購得

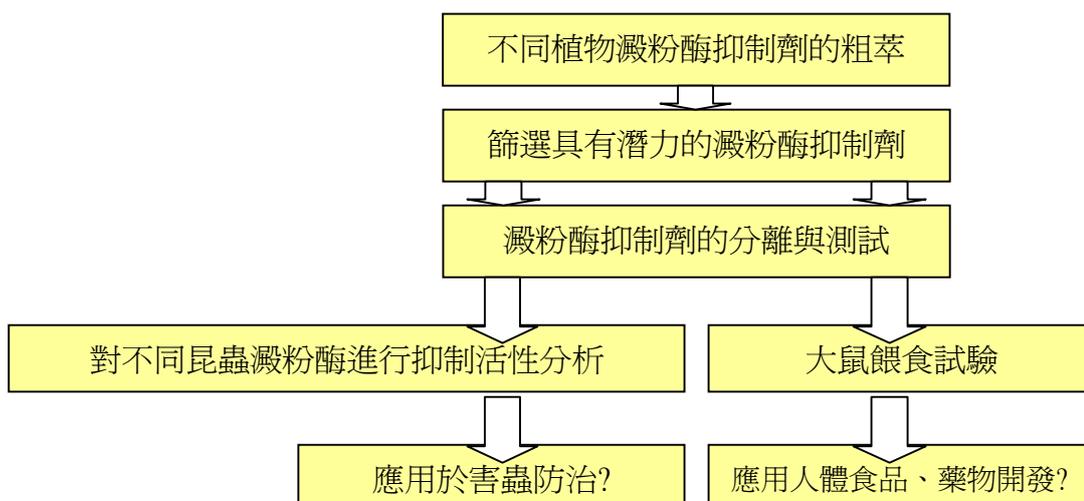
(二)器材設備

電子天平、粉碎機、加熱攪拌器、高速離心機、超濃縮蛋白過濾系統、抽血裝備、分光光度計、恆溫箱

(三)藥品

- 1.澱粉液(0.04%)：0.4g 澱粉加水至 1 升，煮沸 1 分鐘
- 2.豬胰臟澱粉酶(Sigma,USA)
- 3.碘液：1.27g I₂及 0.6g KI 溶於 200ml 水中
- 4.磷酸鹽緩衝溶液(20mM、pH 值分別為 5.5、6、6.5、6.9、7.5、8)
- 6.硼酸鹽緩衝溶液(50mM、pH 值分別為 8、10)
- 7.麥克伊文緩衝溶液(125mM、pH 值分別為 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(20mM, 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(20mM、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(20mM, pH6.9)、分別加入 麥克伊文(125mM、pH 4、6)、硼酸鹽緩衝溶液(50mM、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. 不同植物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(20mM, 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(20mM, pH6.9)中進行透析，隔夜備用。

3. 花豆、黑豆及四季豆澱粉酶抑制劑的濃縮乾燥

分別取 1kg 花豆、黑豆及四季豆的種子，置入粉碎機磨碎後，加入 0.3M NaCl 的磷酸鹽緩衝溶液(20mM, pH6.9)10 公升，後於 4°C，3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。每 100ml 上清液加入 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，3000 rpm 再離心 10 分鐘，取出上清液後，以超濃縮蛋白過濾系統進行蛋白濃縮及酸置換，最後將蛋白質冷凍乾燥後備用。

4. 抑制活性分析

(1) 不同植物粗萃對不同澱粉酶的活性測試

分別置入下列溶液：每管處理皆三重複

溶液 \ 離心管	一	二	三
不同澱粉酶抑制劑粗萃	125 μ l	-	125 μ l
澱粉酶溶液	125 μ l	125 μ l	-
磷酸鹽緩衝液(0.02M, pH6.9)	-	125 μ l	125 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) 計算方式

a. 相對抑制率的計算公式：

相對抑制率=

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

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。

b. 抑制單位的計算公式：

抑制單位=

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

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 125ul)。

c. 血糖相對變化率的計算公式：

血糖變化量=

$$\text{各時間點的血糖濃度} - \text{第 0 小時的血糖濃度}$$

5.大鼠灌食試驗

(1)實驗動物：使用 20 週齡的 Wistar 公鼠，自由取食固定食物(61.41%(w/w)碳水化合物(100%澱粉),3.96%纖維,15.06%蛋白質和 2.66%脂肪)和飲水，飼養於 24°C 恆溫的環境，早上 8 點至晚上 8 點給予光照。

(2)立即效應測試：經 18 小時禁食至早上 10 點時測量大鼠血糖和胰島素含量，不需麻醉，使用胃插管灌食澱粉(100mg/kg BW)或有添加豆類粗萃(200mg/kg BW)，分別於灌食後一小時、兩小時、三小時，以乙醚麻醉大鼠並抽取 1ml 老鼠尾部的血液，血液於 2000rpm、離心十分鐘，取出血清並測量大鼠的血糖含量變化。

(3)血糖濃度測定：葡萄糖氧化酵素法(glucoseoxidase assay)-取 10 λ 血清，加入 1ml 呈色液，經 37°C、10min 反應後在 450nm 波長下測定數值，並換算成血糖濃度(mM)。

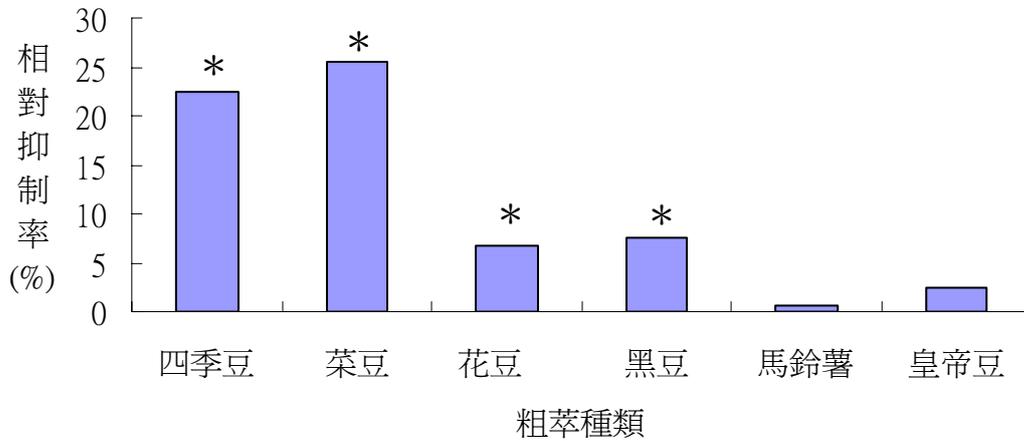
6.統計分析

所有數據皆以 t-test 進行統計分析，具有顯著差異者(P<0.05)，於圖表上方標誌” *”。

肆、研究結果

一、不同植物粗萃對不同澱粉酶粗萃的抑制活性：

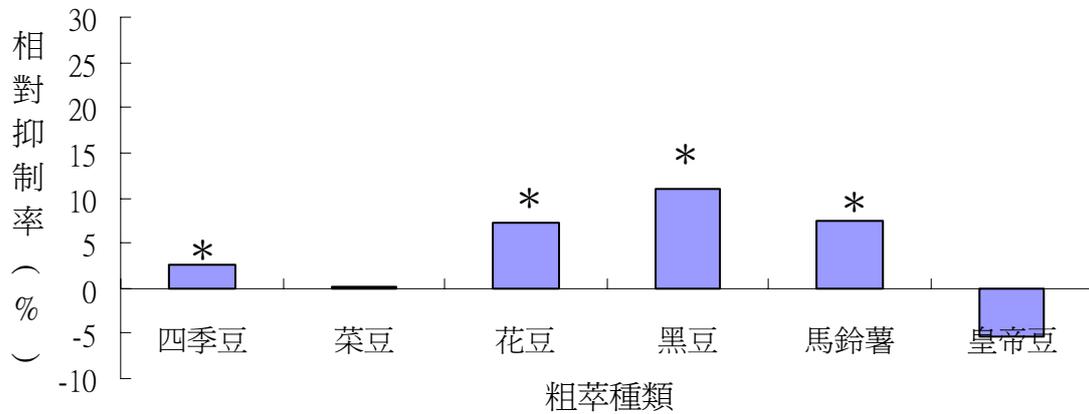
1. 不同植物粗萃對粗麗蠅澱粉酶的抑制活性



圖一、不同植物粗萃對粗麗蠅澱粉的抑制活性

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粗萃的活性(t-test, $P < 0.05$)，其中以四季豆與菜豆粗萃對麗蠅澱粉酶粗萃的抑制活性最高。

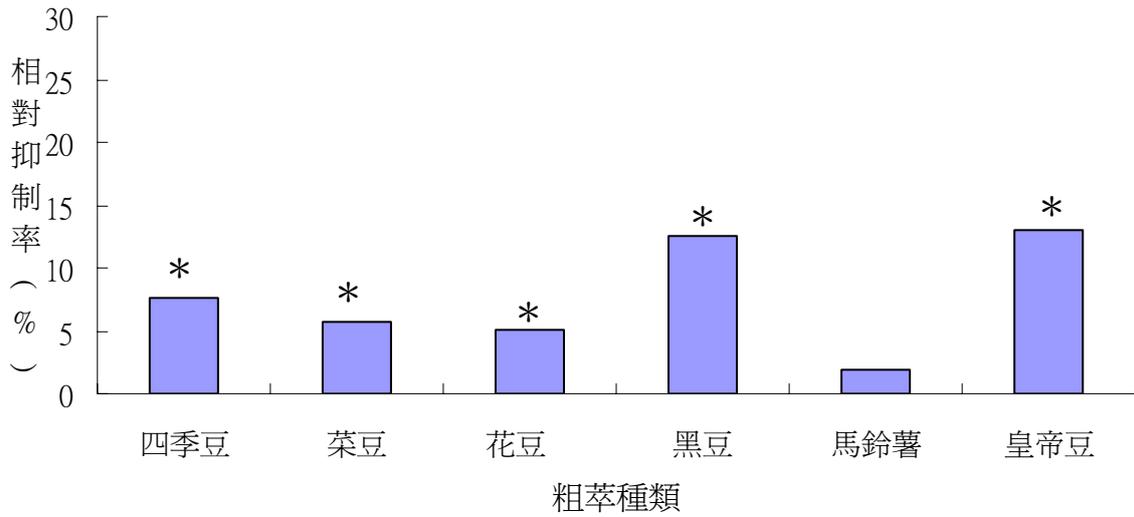
2. 不同植物粗萃對粗豬胰臟澱粉酶的抑制活性



圖二、不同粗萃對粗豬胰臟澱粉酶的抑制活性

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粗豬胰臟澱粉酶的活性(t-test, $P < 0.05$)，其中以黑豆粗萃的抑制活性最高。菜豆粗萃並無顯著的抑制活性(t-test, $P > 0.05$)，而皇帝豆粗萃不僅沒有抑制作用，還能促進澱粉酶的作用(t-test, $P < 0.05$)，值得再進一步探討。

3.不同植物粗萃對粗黃豆澱粉酶的抑制效果



圖三、不同粗萃對粗黃豆澱粉酶的抑制活性

結果如圖三，除馬鈴薯粗萃外，其餘粗萃皆可抑制黃豆澱粉酶粗萃的活性(t-test， $P < 0.05$)，其中以黑豆與皇帝豆粗萃的抑制活性最高。

二、純化四季豆澱粉酶抑制劑對不同害蟲澱粉酶的抑制活性：

結果如表 1，純化後四季豆抑制劑對不同害蟲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、東方果實蠅抑制活性較差。

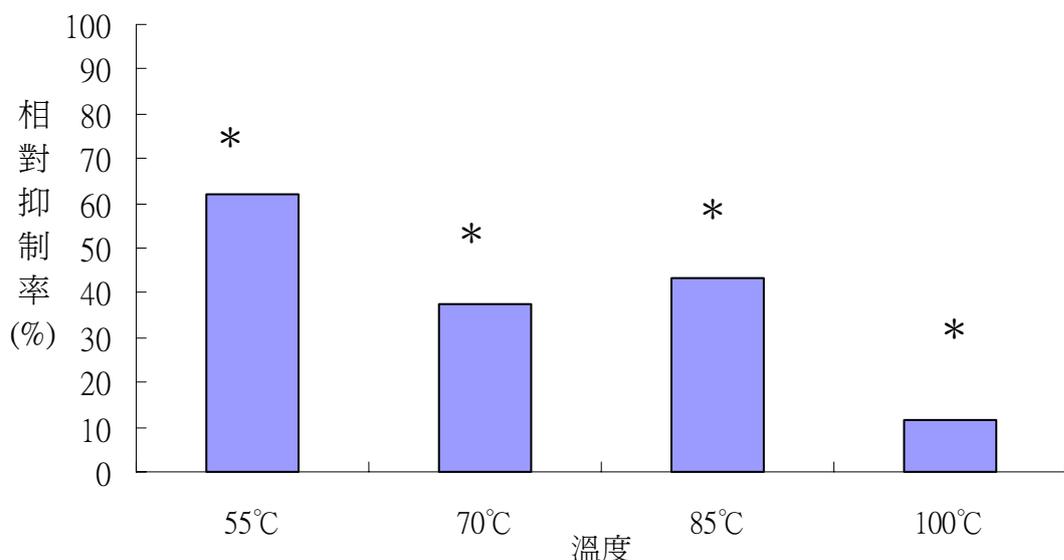
表 1、純化四季豆澱粉酶抑制劑對不同害蟲澱粉酶的抑制活性

pH		4		6		8		10	
抑制種類	抑制活性/比率	抑制活性 (unit*10 ⁻² /ml)	相對抑制 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	-	-

“-”表在此 pH 環境下的澱粉酶無活性；“None”表示無抑制效果，lunit 的定義為每 3 分鐘分解 1mg 澱粉，所以 1 抑制單位的定義為抑制 1unit 的活性。

三、純化四季豆澱粉酶抑制劑的抑制活性分析

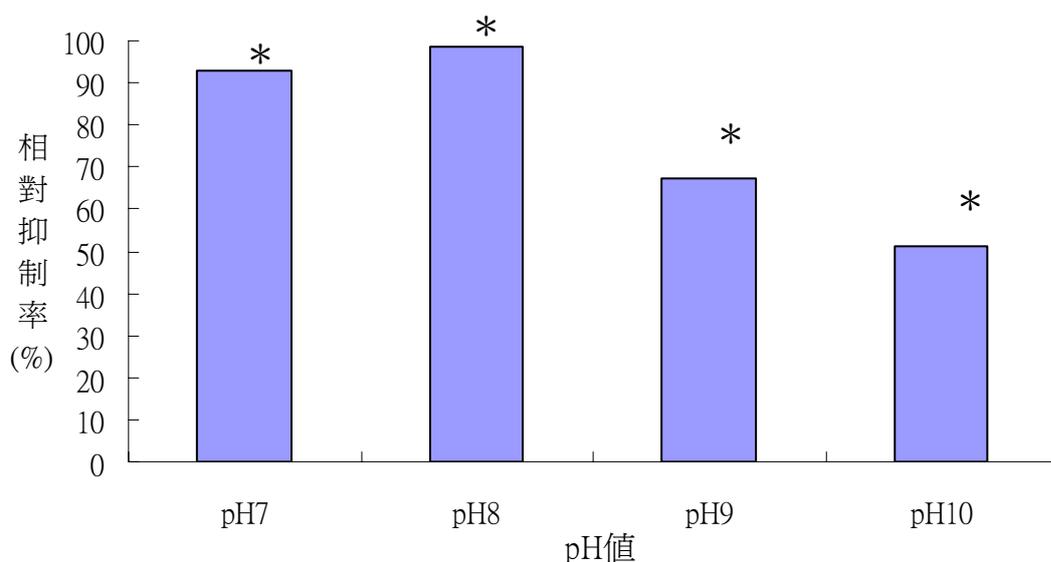
1. 純化四季豆澱粉酶抑制劑經不同溫度處理後對果蠅澱粉酶的抑制活性



圖四、純化四季豆澱粉酶抑制劑經不同溫度處理後對果蠅澱粉酶下的抑制活性

結果如圖四，純化四季豆抑制劑經 85°C 處理後對果蠅澱粉酶仍有顯著的抑制活性 (t-test, $P < 0.05$)，經 100°C 的高溫處理後，抑制活性就大幅降低。由此可知此抑制劑具有相當好的耐熱性。

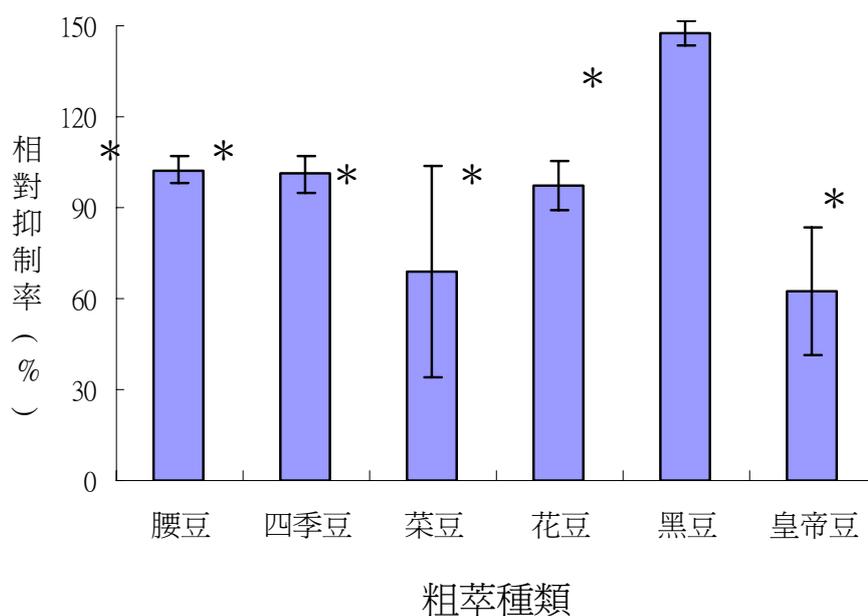
2. 純化四季豆澱粉酶抑制劑在不同 pH 值下對果蠅澱粉酶的抑制活性



圖五、純化四季豆抑制劑在不同pH值下對果蠅澱粉酶的抑制活性

結果如圖五，純化四季豆澱粉酶抑制劑在 pH7~10 的環境下皆有顯著的抑制活性 (t-test, $P < 0.05$)，但在不同 pH 環境下的抑制活性不同。

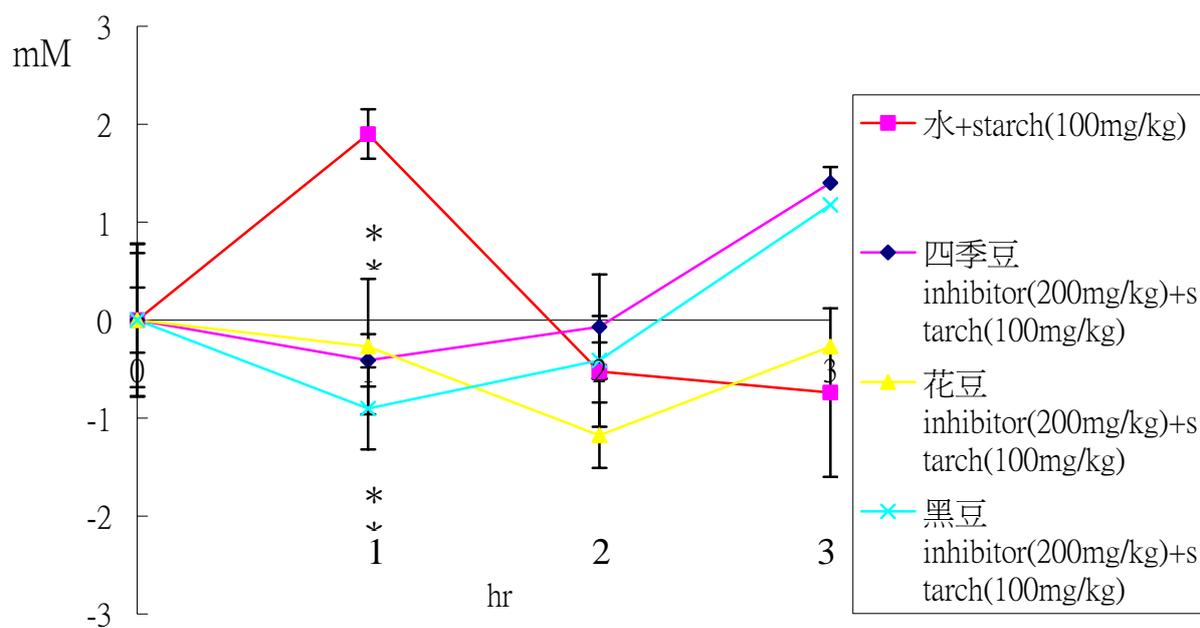
四、不同植物粗萃對豬胰臟澱粉酶的抑制活性



圖六、不同粗萃對豬胰臟澱粉酶的抑制活性

結果如圖六，黑豆粗萃抑制豬胰臟澱粉酶的活性最高，腰豆、四季豆和花豆其次，仍有接近 100%的抑制率，菜豆、皇帝豆其次，馬鈴薯粗萃的抑制效果最低。

五、三种植物粗萃灌食大鼠血糖變化量



圖七、三种植物粗萃餵食大鼠血糖變化量

結果如圖七，在未加入豆類澱粉酶抑制劑之控制組，大鼠血糖在餵飼澱粉後第一小時即上升 1.900 mmole/l，然四季豆、花豆、黑豆在第一小時均有顯著的抑制血糖增加的效果，其血糖相較於第 0 小時分別為-0.412mmole/l、-0.270mmole/l、-0.902mmole/l。四季豆與黑豆處理組，大鼠血糖於餵飼後第三小時即回升；然而，花豆處理組，在三小時的測定期間，血糖濃度變化不大，顯示其抑制效果和持續性佳，應是未來值得進行分子作用機制研究之良好標的。

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。後來選擇先以四季豆作為害蟲防治的標的，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、四季豆的澱粉酶抑制劑純化先以 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。
- 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、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，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。此實驗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。
- 五、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(chitin)家族及 PHA(phytohemagglutinin)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【五】，其中腰豆的 α AI-1 與 α 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【六】。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。若能針對某一昆蟲澱粉酶量身訂做一種澱粉酶抑制劑，便可達到專一性的防治。

- 六、一方面，從台灣常見的豆類種子篩選出花豆與黑豆，兩者的粗萃在試管內對豬胰臟澱粉酶皆有很高的抑制效果，與四季豆(與國外廣被研究的腰豆同種不同品系)進一步進行大鼠餵食測試。豆子磨碎後先以 5%T.C.A.(三氯乙酸)除去植物所含澱粉酶及其他雜蛋白，再以超濃縮蛋白過濾系統進行蛋白濃縮及酸置換，凍乾備用以餵食大鼠。
- 七、四季豆、花豆和黑豆粗萃在第一小時均有抑制大鼠血糖上升的效果，其中花豆和黑豆有顯著的抑制效果；餵食四季豆、黑豆的大鼠血糖在第三小時開始上升，推測可能與其在胃酸失去活性或開始被腸道消化有關，而黑豆的抑制效果又比四季豆顯著；餵食花豆粗萃的大鼠，血糖變化的起伏較為平穩且持久，其可能在動物體內比其他種類較不易失去抑制活性，詳細的影響仍待進一步的活性分析及測試。
- 八、抑制劑能使澱粉無法變成葡萄糖，因而減緩血糖上升的速度；大量未被分解的碳水化合物累積在腸道時，會延緩胃部的排空，增加飽足感，因而在長期餵食澱粉酶抑制劑的觀察中，發現餵食澱粉酶抑制劑的大鼠，有消化不良、食慾不振、體重減輕的現象【十三】。
- 九、比較國外普遍被研究的四季豆澱粉酶抑制劑，尚未受到重視的黑豆、花豆具有相當大的開發潛力：黑豆的抑制效果較四季豆佳，持續時間亦較四季豆長；而花豆的抑制效果顯著且保持穩定。雖然於體外測試活性不如預期，但三種豆類未來均值得進一步研究、活性分析，以明白其在動物體內的抑制情形。

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、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，其可耐熱至 85°C 仍有抑制活性，為一相當穩定的蛋白質。純化四季豆抑制劑的抑制作用受 pH 值影響很大，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。
- 三、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，對豬胰臟、四季豆本身及黃豆澱粉酶粗萃的抑制效果很小或無，具有發展潛力。
- 四、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。
- 五、四季豆、花豆和黑豆的澱粉酶抑制劑均可延緩血糖上升，其中四季豆、黑豆分別在第三、四小時失去抑制活性，花豆的抑制活性穩定且持續性佳，仍值得進一步分析與研究。
- 六、尚未受到重視的花豆、黑豆的澱粉酶抑制劑具有開發及應用的潛力，但仍需進行持續的研究與探討，以明白其在人體作用機制。

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, *et al.* (2004) Proteinaceous α - amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696: 145 - 156.
- 四、Bo-Linn GW. *et al.* (1982) Starch blockers--their effect on calorie absorption from a high-starch meal. *N Engl J Med* 307, 1413-1416.....
- 五、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.
- 六、Grossi de Sá MF, *et al.* (1997) Molecular characterization of a bean alpha-amylase inhibitor that inhibits the alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta* 203. 295-303.
- 七、Hartmut E . Schoroeder, *et al.* (1995) Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the Pea Weevil in Transgenic Peas. *Plant physiol.* 107: 1233-1239.
- 八、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.
- 九、Ivan Kluh , *et al.* (2005) Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α - amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 66: 31-39.
- 十、Kataoka K, Dimagno EP. (1999) Effect of prolonged intraluminal alpha-amylase inhibition on eating, weight, and the small intestine of rats. (2)123-9
- 十一、K. Sasikiran, *et al.* (2002) Proteinase and alpha-amylase inhibitor of sweet potato: Changes during growth phase, sprouting, and wound alterations. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 291-298.
- 十二、Layer P. *et al.* (1986) Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. *Gastroenterology* 91, 41-48.
- 十三、M. A. Tormo. *et al.* (2004) Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British Journal of Nutrition* (2004), 92, 785-790.
- 十四、M. C. M. Da Silva, *et al.* (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.
- 十五、Masao Ishimoto, *et al.* (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.
- 十六、Octavio. *et al.* (2002) Plant α - amylase inhibitors and their interaction with α - amylase. Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269: 397-412.
- 十七、Roger L. Morton, *et al.* (2000) Bean α -amylase inhibitor 1 in transgenic peas provides complete protection from pea weevil under field conditions. *P.N.A.S.* 97: 3820 - 3825.

- 十八、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/cccmw.tw/h005.html>
- 十九、不必改變飲食運動習慣也能瘦得安全的減肥成分-Phase 2TM澱粉酵素阻斷劑...有科學證據的臨床效果。維特益健康網。民九十二年七月十三日，取自：<http://hugoboss.myweb.hinet.net/Phase2.html>
- 二十、白芸豆提取物。西安中鑫生物科技有限公司。民九十四年二月十七日。取自：<http://www.zxsw.com/cpview.asp?id=11>

評語

- 1) 能設計實驗流程針對特定科學問題探索。
- 2) 澱粉酶抑制劑為一種蛋白質，應展示並說明該蛋白質的明確純化及鑑定流程。
- 3) 建議集中對選定的標的蛋白質進行深入的分析，以探討詳盡的反應機制。