

壹、緒論

最近幾年來，天然藥用植物的開發與利用正日受重視，一般民眾對於養生保健食品的接受度及喜愛度也逐漸增高。山藥組成中大部分為澱粉和蛋白質，利用澱粉分解酵素處理澱粉，可以產生許多澱粉衍生物，包括糖漿、甜料、葡萄糖、麥芽糖、食品纖維等。澱粉對加工質地的影響在陳（1987）等人研究中指出，不同品種甘薯之粉質及泥質質地於蒸煮過程中受澱粉水解酵素影響極大，且澱粉對質地之影響來得高。原因是在於澱粉活性較高者於蒸煮過程中易將細胞內之澱粉水解產生麥芽糖溶於胞外，使水溶性固形物含量增加，造成許多細胞內並未充滿糊化的澱粉，使細胞易變形及收縮而成軟質，入口後因水溶性固形物較多而形成泥質質地。

山藥極適合在本省栽培，一年產量可高達 40 噸/公頃左右（劉等人, 1995）。台灣中部所種植的山藥品系是紅肉山藥中的紫田薯品系，同時也是全國的主要紫田薯品系的生產地，塊莖富含多種人體的必需胺基酸、蛋白質及澱粉等物質。近年來本研究室積極從事生產植物天然色素之研究，選取含有較安定紅色素，如紅莧菜 (*Amaranthus tricolor*) (張, 1983 ; 溫, 1992 ; 溫等, 1993)、紅鳳菜 (*Gynura bicolor*) (蔡與陳, 1992 ; 溫等, 1993)、甘薯 (*Ipomoea batatas*) (溫, 1992 ; 溫與屈, 1993 ; 屈, 1994 ; 屈等, 1994 ; 溫等, 1994 ; 葉與蔡, 1994 ; 呂, 1995 ; 呂等, 1995)、紫田薯 (*Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch) (溫, 1992 ; 范與溫, 1993 ; 范, 1994 ; 范等, 1994 ; 溫, 1994 ; 葉與蔡, 1994 ; 徐, 1995 ; 徐與溫, 1995 ; 徐等, 1995 ; 曾,

2000) 紅心菜菔 (*Raphanus sativus* L.) (金, 1996; 金與溫, 1996) 與紫蘇 (*Perilla frutescens* Brit.) (金, 1996; 金與溫, 1996), 初步結果顯示, 此六種植物皆可產生紅色或紫紅色癒合組織; 而又以紫田薯和甘薯可得較多量之紫紅色癒合組織, 但在紫田薯癒合組織建立繼代培養, 使其大量生產紫紅色素之階段, 卻無法順利進行。此外, 在 Nielsen and Sitt (1997) 的研究中發現, 利用溫度儲藏馬鈴薯塊莖可調節其 α -澱粉 活性之表現。因此, 若能瞭解山藥塊莖內主要的澱粉分解酵素的生化特性, 必能有效的解決實驗或加工上所產生的問題。

本實驗的目的在進行紫田薯塊莖中 α -澱粉 之分離純化並進一步瞭解其生化特性, 可對日後生產及加工山藥製品過程有所助益, 以創造紅山藥的新商機。

貳、文獻整理

一、山藥的簡介

山藥為薯蕷科(*Dioscoreaceae*)薯蕷屬(*Dioscorea*)之蔓性植物，其塊莖為可食用的一種蔬菜，提供了大量的碳水化合物(Waite, 1963)，在我國之栽培與利用歷史極早，如本草衍義、山海經、圖經本草、新修本草、本草綱目及齊民要術等本草古籍均有記載，我國最早之本草藥典神農本草經且列山藥為上品藥材。山藥利用部位為塊莖(擔根體)，有滋養強壯及止瀉功效，為常用與保健植物。全球山藥之年產量在 1991 年約為 24×10^6 噸，為熱帶地區生產量僅次於樹薯及甘薯，而營養價值則有過之的最重要根莖作物，亦為國際性重要糧食作物之一(劉等人, 1995)。

山藥之塊莖自古以來即供藥用，神農本草經列其為上品，其性平、涼潤味甘而無毒，能健胃、補肺腎，主治泄瀉久痢、消渴、虛勞、咳嗽、遺精及小便頻密等，民間用為滋養強壯藥，另具祛痰功效，傳統名方如六味丸、八味丸、參苓白朮散，以及坊間之四神湯中即有山藥。山藥除了具備上述功效外，因山藥生性強健，無嚴重病蟲害，亦是一種嗜口性絕佳之健康蔬菜(黃和范, 1995)。在食品加工上可用來進行機能性食品之試製和外銷，在塊莖粉末、塊莖切角、罐裝食品、八寶粥及火鍋料等方面都具有開發價值(江和鄭, 1999)。

(一) 山藥的品種

山藥原產於我國、日本及熱帶地區，主要產區多分佈在熱帶，其中以中南美洲為最多，次為亞熱帶地區及非洲。薯蕷屬植物在全

世界超過 600 種，主要的食用種則有 50 餘種，台灣有 14 種 5 變種，如大薯(*D. alata* L.)、紫田薯(*D. alata* L. *Var purpurea*(Roxb.) M. Pouch.)、基隆山藥 (*D. japonica* Thunb. *Var pseudojaponica* (Hay.)Yamamoto) 以及恆春山藥(*D. doryophora* Hance)等種類在各地區已有零星的栽培 (徐和黃, 1997)。最近幾年經台灣省農業試驗所初步調查，估計全省栽種面積約有二百公頃，栽種品種以大薯、紫田薯、山藥薯、黃藥子、巴西山藥、千里達山藥、恆春薯蕷及基隆山藥為主，其中主要產地為南投縣名間鄉、竹山鎮、嘉義縣、嘉義市、台北縣瑞芳地區、花蓮縣以及阿里山等 (江和鄭, 1999)。山藥依照薯塊的形狀分成下面兩類：

1.塊狀山藥

D. alata、*D. alata var.purpurea*、*D. esculenta*、*D. bulbifera*、*D. rotundata*、*D. cayenensis* 等六種，分佈於熱帶及亞熱帶，其地下塊莖成圓形、紡錘狀、掌狀及罐狀等。通常此類山藥薯形大、葉片大形、產量高、生育快速，如紫田薯、千里達山藥、巴西山藥等。

2.長形山藥

D. pseudojaponica、*D. batatas*、*D. doryophora*、*D. japonica* 等四種，原分佈於中國大陸及日本等溫帶地區，莖蔓較為纖細圓形，葉較狹長，塊莖形如長棍棒為其特點，品質極為優異，產量較塊狀山藥低，在中藥方中常被當做補品，售價很高，如基隆山藥、懷山藥、恆春山藥等 (黃和范, 1995)。

根據劉等人 (2000) 整理出台灣較常見之山藥品種如下：

(1)大薯又稱為田薯(*D. alata*)，大薯原為所有山藥中分佈最廣者，

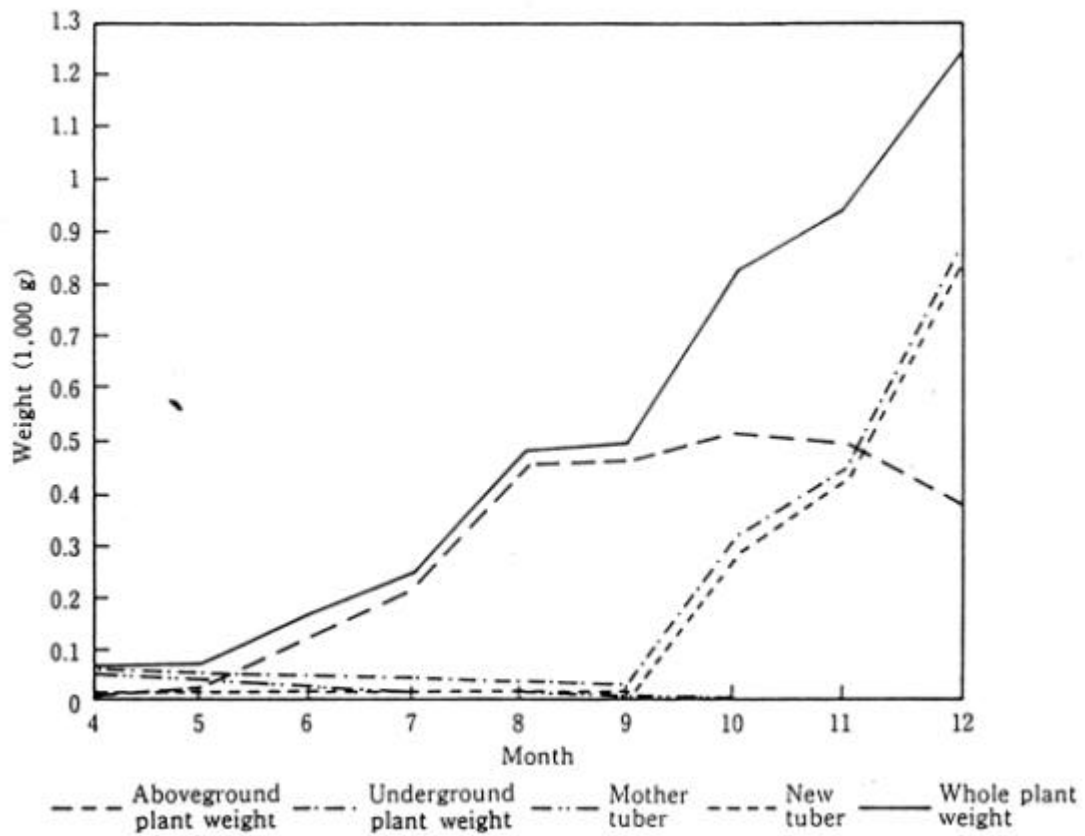
廣泛栽培於非洲、東南亞、中南美洲及部分歐洲。

- (2) 長薯又稱家山藥 (*D. batatas*), 原產大陸, 較耐寒, 可供藥用。
- (3) 山薯又稱日本山藥 (*D. japonica*), 原產日本, 現在栽培於大陸、日本及東南亞一帶。
- (4) 條薯又稱紫田薯 (*D. alata* L.var. *purpurea*), 現在栽培於台灣中部。
- (5) 恆春山藥又稱戟葉田薯 (*D. doryophora*), 原產於台灣恆春半島一帶。

(二) 山藥的生長及儲藏特性

山藥要求溫暖氣候, 耐寒力較弱。其薯塊於溫度降至 12 以下時, 將因寒害而腐爛 (劉等人, 1995)。一般山藥的種植時期為每年 4 月, 歷經 8 個月生長時期後, 當莖葉等地上部位因秋冬來臨溫度下降而枯黃凋萎時, 即為其採收時期。整個生長時期可區分為三個階段 (如圖一): 4 5 兩個月為生根及萌芽長葉時期, 6 8 三個月為莖葉快速生長時期, 9 12 四個月為新塊莖之形成、整形、肥大及充實時期 (劉等人, 1990)。就山藥整個生長期而言, 溫度太高或乾旱太久, 將不利其發育成長。就雨量而言, 600 mm 至 3000 mm 降雨量之地區均可種植山藥, 雨量多少與全株莖葉有正比關係, 與塊莖產量亦成正比。就日長而言, 山藥對日長之感應類似馬鈴薯, 日長超過 12 小時將有利於莖蔓及葉之生長, 短日照環境 (12 小時以下) 則對塊莖之形成與生長較為有利 (劉等人, 1995)。

採收後的塊莖具有休眠性, 於室溫下可儲藏 2 3 個月才開始發芽。在朱研究中 (1998) 發現基隆山藥塊莖採收後在室溫儲藏



圖一、山藥植株部位之生長曲線 (劉等人, 1990)

Fig 1. Changes of fresh weight in the different plant parts of yam during growth period at Taichung in 1988. (Liu *et al*, 1990)

8 週，在儲藏期間，山藥塊莖濕重、水分含量及澱粉含量會下降，這些結果顯示山藥塊莖在儲藏過程中會因呼吸作用及蒸散作用使其濕重、水分和澱粉含量下降，而造成品質降低。因此，基本上若能延長山藥塊莖的休眠期則可延長儲藏的時間。降低儲藏的溫度可有效的延長山藥塊莖之休眠。以溫帶及熱帶品種而言，產於溫帶的品種在 10℃ 下儲存 164 天仍可保持良好的外觀及質地；而產於熱帶的品種因在 10℃ 會造成嚴重寒害，因此以 15℃ 為儲藏適溫（黃，1992）。而不同的儲藏容器也會影響山藥的儲藏壽命，在 17℃ 下利用紙箱和網袋儲存山藥，結果發現利用網袋可顯著延後山藥塊莖之開始萌芽期及全部萌芽期，又可抑制萌芽數目及芽的繼續生長（王和劉，1992）。

（三）山藥的一般營養成分

山藥營養成份甚為豐富，塊莖富含多種人體的必需胺基酸、蛋白質及澱粉，另具粘液質、尿囊素、膽鹼、纖維素、維生素 A、B₁、B₂、C、及鈣、磷、鐵、碘等礦物質（Abe, 1973；Coursey, 1967；Wanasundera and Ravindran, 1994），特殊山藥品種如 *D. colettii* 尚含有 diosgenin 及類似類固醇皂元結構，為合成重要醫療用類固醇

（Medicinal steroids）的原料（江和鄭，1999）。山藥塊莖一般成分隨品種不同及種植地區不同而有所差異（Pall and Chen, 1988），在劉等人（1994）實驗中發現，70R01 具有較山藥台農一號及 70W04 為高之蛋白質、脂肪、粗纖維及灰份成分，其磷、鎂、鐵及鈣之含量較高。一般而言水份含量在 65—73%，澱粉約佔乾重 75—83%，粗蛋白在 6—8% 之間，粗纖維在 1.2—1.8%，粗灰份在 2.8—3.8% 間

(表一)。不同品種其品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化能力也有所差異(劉等人, 1999)。例如：大葉壽豐品系、二刺品系及中國長品系等之塊莖產量表現為最優異，且二刺品系還具有很高的過氧化酵素活性。

除此之外，山藥塊莖由於具備高營養、低熱量及多重保健功能，在經由不同溫度做加工處理時，其化學組成也不會有明顯改變(Omonigo and Ikenebomeh, 2000)。由國內外臨床實驗證實，山藥確有增進食慾、改善人體消化功能及增強體質等功能，且尚有下列功能性：

- 1.山藥具有降血糖作用，可供輕、中型糖尿病患者使用及消渴症。
- 2.山藥可強化免疫系統。
- 3.山藥對消化系統影響很大。
- 4.山藥具有抗老化、抗衰老作用(劉等人, 2000)。

二、植物細胞內澱粉之代謝途徑

植物生長過程中醣類的儲存及運轉之整體系統，是由光合作用下同化的二氧化碳先合成為不溶性澱粉暫存在葉綠體中，再被轉變為蔗糖作為植物內醣的主要運轉形式(Beck and Ziegler, 1989)。在儲存組織中，則可將運轉進來的蔗糖轉變為不溶性澱粉而大量儲存。植物的主要能量儲藏形態為澱粉而能量轉運形態則為蔗糖，兩者之間互相轉變提供植物生長所需能源。

澱粉是由直鏈澱粉與支鏈澱粉所組成的，兩者皆是以 α -1,4 鍵將葡萄糖分子連接起來的聚合物。是以葡萄糖為單位利用 α -1,4 葡

表一、不同品種山藥之營養組成 (Wanasundera and Ravindran, 1994)

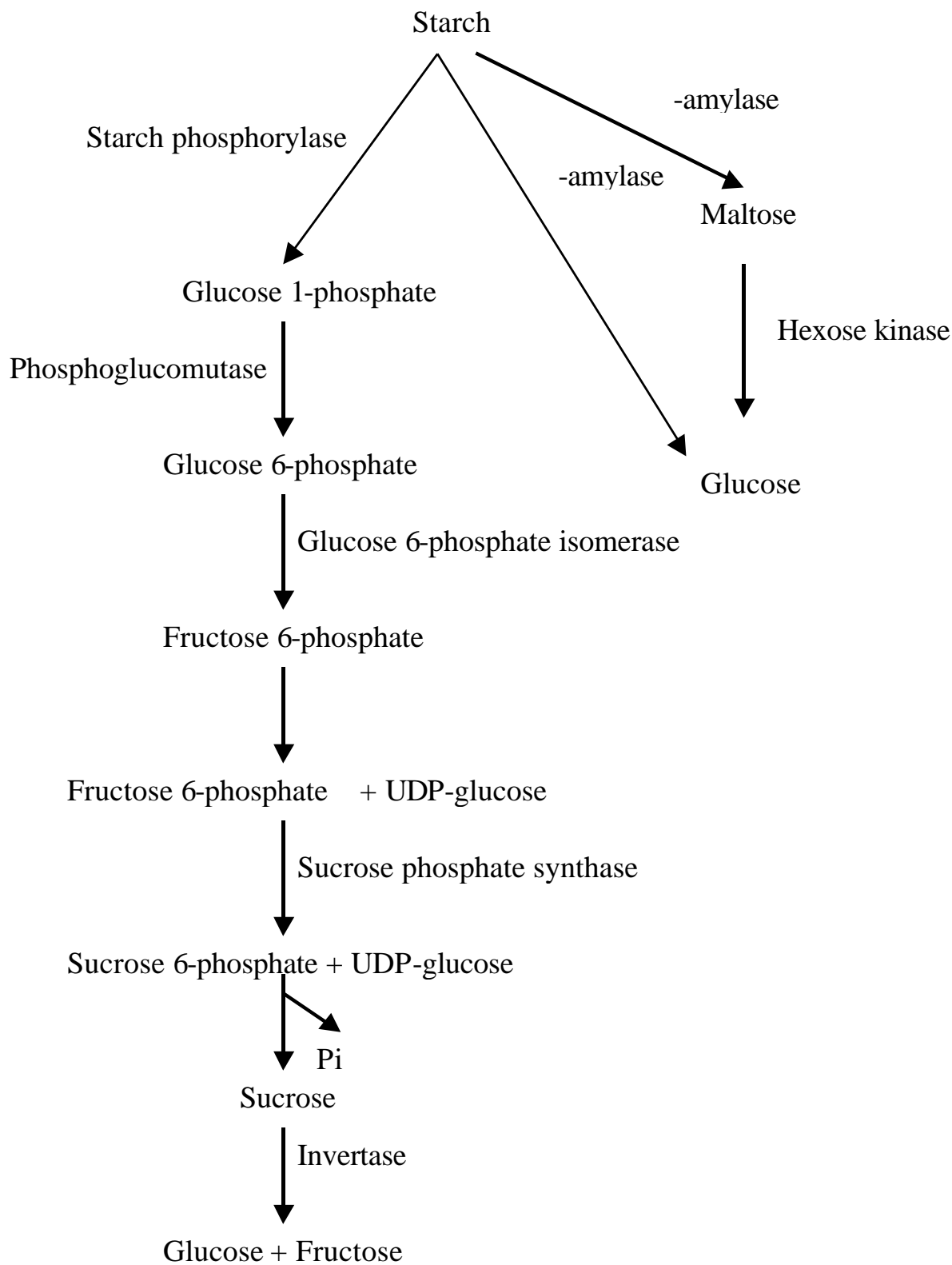
Table 1. Nutrition composition of tubers of different cultivars of *D. alata*. (Wanasundera and Ravindran, 1994)

Cultivar	Moisture (%)	% Dry weight basis					Soluble sugar	Total energy (kcal / 100 g)	Vitamin C (mg / 100 g)
		Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Ash	Starch			
<i>Ini ala</i>	73.1	7.9	1.1	1.5	3.0	75.6	1.1	353	15.8
<i>Kahata ala</i>	71.0	7.0	1.2	1.2	3.7	77.1	1.1	369	19.9
<i>Kombuwalli</i>	74.8	6.7	1.0	1.8	3.8	82.8	1.2	380	13.0
<i>Raja ala</i>	69.9	7.4	1.0	1.4	2.8	83.3	1.3	383	ND
<i>Rta ala</i>	77.1	7.9	1.0	1.6	3.6	76.5	1.2	355	18.5
<i>Thumbata</i>	77.5	7.5	1.0	1.6	3.6	77.1	0.9	357	24.7
<i>Hingurala</i>	65.5	7.3	1.0	1.6	3.0	84.3	1.5	357	15.8
Mean ± SD	72.7 ± 4.0	7.4 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.2	3.4 ± 0.4	79.5 ± 3.4	1.2 ± 0.1	365 ± 11.6	18.0 ± 3.7

葡萄糖 鍵為鍵結，其分子量較小，約由數百個至數千個葡萄糖分子所組成。而支鏈澱粉還具有支鏈，在每 20 30 個葡萄糖會有一個 -1,6 鍵結作為分支，其分子量較大，約由 2,000 至 500,000 個葡萄糖分子所組成。支鏈澱粉和直鏈澱粉在植物澱粉中所佔的比例大致是 70 80 % 及 20 30 % (Preiss, 1990 ; 江,1998)。

高等植物體中與澱粉代謝有關的酵素可分為兩類 (Steup *et al.*, 1983 ; Beck and Ziegler, 1989) : 第一類澱粉生合成相關酵素，一般蔗糖轉變成為澱粉的生合成前體反應與其他多醣的生合成作用一樣，是經由酵素催化的糖 基轉移反應，主要包括腺核 二酸葡萄糖焦磷解 (ADP-glu-cosepyrophosphorylase)、澱粉合成 (soluble and granule-bound starch synthase)、澱粉分支 (branching enzyme) 及澱粉磷解 (starch phosphorylase)，其中腺核 二酸葡萄糖焦磷解與澱粉磷解 是高等植物體內澱粉生合成兩個可能路徑中的關鍵酵素。另一類為澱粉分解相關酵素，澱粉的分解方式一般可分為磷解作用 (phosphorolysis) 及醣解作用 (amylolysis) (Nielsen and Sitt, 1997)，由已知的酵素可推測其可能的合理生化反應途徑如圖二 (黃和劉, 1998)。前者主要分解酵素為澱粉磷解 (starch phosphorylase) ; 後者主要包括 α -澱粉 (α -amylase)、 β -澱粉 (β -amylase) 及 γ -葡萄糖 等，其中又以 α -澱粉 與 β -澱粉 較為重要 (黃和劉, 1998 ; Paulo *et al.*, 1997)。

澱粉完全分解需要許多酵素參與，首先先大略介紹磷解作用。澱粉磷解 與水解酵素不同的是在於其反應不需要水的參與，但需要有磷酸根 (Pi) 的協助，此酵素是由非還原端分解澱粉，產物為



圖二、植物細胞中澱粉分解之可能途徑 (黃和劉, 1998)

Fig 2. Possible pathways of starch catabolism . (Huang and Liu, 1998)

葡萄糖-1-磷酸。而水解作用中， α -澱粉 是一種內切酵素可隨意地將直鏈澱粉與支鏈澱粉中的 α -1,4 鍵結打斷，產生長的葡萄糖鏈，之後再繼續作用形成約 10 個葡萄糖鍵結的較短糖鏈。最後被 β -澱粉 分解成麥芽糖，而麥芽糖再被麥芽糖分解酵素分解成葡萄糖。同樣地， β -澱粉 也可以打斷澱粉中的 α -1,4 鍵結，但其跟 α -澱粉 不同的是它是一種外切酵素，只能作用在澱粉分子的非還原端，並直接將澱粉水解成麥芽糖（朱, 1998）。

三、 α -澱粉 的生化特性

（一） α -澱粉 的發現及調控

1. α -澱粉 的發現

α -澱粉 最早由 Kuhu 於 1924 年由大麥芽中分離出來，以後陸續由穀類種子，如大麥、小麥、燕麥以及大豆種子、甘薯塊根等發現亦有其存在，是屬於外切酵素。其水解澱粉之方式是由非還原端以麥芽糖為單位水解直至分支點附近為止，因此對直鏈澱粉可水解為 α -麥芽糖，支鏈澱粉則水解為 α -麥芽糖及限制糊精（limiting dextrin）（Beatriz *et al.*, 1996）其普遍存在於高等植物特別是在發育中的種子或發芽的塊莖中表現（Boyce and Volenec, 1992），但也有存在於細菌，如：*Bacillus megterium*、*B. circulans*、*B. polymixa*、*Pseudomonas sp.*和 *Streptomyces sp.*（表二）。

2. 影響 α -澱粉 活性之因子

雖然 α -澱粉 和 β -澱粉 一樣具分解澱粉能力，但其調控卻和 β -澱粉 完全不同（Yamaguchi *et al.*, 1999）。在發芽的玉米種子內即包括四種不同形式的 α -澱粉 和一種 β -澱粉，在研究過程中

表二、 α -澱粉 的基本性質(Beatriz *et al.*, 1996)

Table 2. Properties of α -amylases (Beatriz *et al.*, 1996)

Source	MW (kDa)	Optimal pH	Optimal temperature()	Stable pH range	pI
Sweet potato	197	4.5~5.0	60	5.0~8.0	4.77
Soybean	61.7	6.0	45	5.0~10.0	5.0~5.9
Wheat	64.2	5.2		4.5~9.2	6.0
Malt		5.2		4.5~8.0	6.0
Mustard	58	5.8~6.2		3.0~8.0	4.6~4.8
Pea	56	6.0			4.35
Barley	56	5.2	>50	4.5~8.0	6.0
Ichoimo	60	6.0	55	4.3~8.5	5.0~5.2
Sorghum	20	5.0~5.5	30~40	4.3~8.5	
Taro tuber ^a	66 and 67	5.0	60		
Maize	65				4.40
Kiwi		6.0	35		
<i>Bacillus megaterium</i> NO. 32	67	6.5		5.0~7.5	9.1
<i>Bacillus polymxa</i> NCIB 8158	67	6.8	37	6.4~7.2	
<i>Bacillus polymixa</i> N ^o 72	44	7.0~8.0	45	4.0~9.0	8.35
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	35	7.0	50	5.0~10.0	
<i>Pseudomonas sp</i> BQ06	37	6.5~7.4	45~55	6.5~8.0	

發現在其種子發育時， α -澱粉 不但會在植物體內合成且會分泌至糊粉層（aleurone layer）和子葉（scutellum）內；但 β -澱粉 則只會合成並不會分泌至糊粉層中（Subbarao *et al.*, 1998），不同植物則有所不同。

（1）糖類

甘藷塊根中 α -澱粉 表現會受到糖類的促進；以阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）為材料也發現代謝性糖類（葡萄糖、蔗糖）可誘導 α -澱粉 表現，且其表現與澱粉含量成正比（黃和劉, 1998），而在阿拉伯芥的研究也發現， α -澱粉 在光照下糖類更可促進其活性（Satoru *et al.*, 1995）。在 Jiahua（1999）所做的實驗中則發現，要增加麥芽糖之產量是必須要增加直鏈鍵結之受質濃度而不是增加 α -澱粉 之濃度。

（2）植物生長調節劑

除此之外，離層酸（abscisic acid）或逆境相關化合物（如 ploygalacturonic acid 及 chitosan）也會誘導甘藷塊根中 α -澱粉 的表現（黃和劉, 1998），但 乙酸（indole-3-acetic acid）則會影響 α -澱粉 進而使植物中澱粉代謝遲緩（Purgatto *et al.*, 2001）。

（3）金屬離子

金屬離子存在的與否會影響到 α -澱粉 之活性高低，有些金屬離子對 α -澱粉 而言是促進作用，而有些則為抑制。例如以細菌的 α -澱粉 為例，其最適溫度為 75℃，但如果鈣離子存在可達到 80℃、2 小時內皆有很高的酵素活性（Wang, 1992）。在其他純化 α -澱粉 的實驗中也可以得到類似結果，如：玉米的 α -澱粉 會受到

汞離子、銅離子和鐵離子的抑制 (Wang, 1992)。另外，在洪等人 (1991) 的實驗也發現含有 α -澱粉 和 isoamylase 的雙酵素液中會受到金屬離子 (如：鈣離子、鐵離子和銅離子等) 的抑制。而普魯南糖 (pullulanase) 則會受鈉離子和鉀離子促進、但汞離子、鉛離子和鐵離子等抑制 (Ara *et al.*, 1995)。

另外儲藏環境溫度也是調控因子之一，像是馬鈴薯塊莖經過低溫處理後， α -澱粉 活性也會增高 (Nielsen and Sitt, 1997)。

(二) 山藥塊莖之 α -澱粉 研究

山藥塊莖在儲存過程中澱粉會進行一連串的代謝作用 (Kouassi *et al.*, 1990)，其中最主要的作用酵素為澱粉分解酵素。一般而言，

α -澱粉 的存在是以植物中的種子器官為主，但在根莖類植物中則是以 α -澱粉 為主要型態 (Ugochukwu *et al.*, 1977)。有關山藥塊莖

α -澱粉 的研究文獻不多，最早是 Takahashi 等人於 1966 年由日本種之山藥品種 Nagaimo 純化 α -澱粉，但未探討其特性 (朱, 1998)。直至 1991 年 Arai 等人由日本種之山藥品種 Ichoimo 純化 α -澱粉，並探討其特性，結果發現此種山藥品種其純化後回收率為 3.4%，比活性為 161 U/mg，最適 pH 為 6.0，pH 穩定性則在 4.3

8.5 之間，最適反應溫度為 60，分子量為 60 kDa，才開始對山藥中的 α -澱粉 有進一步的瞭解。此外，朱 (1998) 利用國內特用品種基隆山藥所純化出的 α -澱粉 做性質測定，結果和 Arai 等人所做的結果相似，其最適 pH 為 6.0，pH 穩定性則在 6.0 8.0 之間。

最適反應溫度為 55，分子量為 267.6 kDa，次單元分子量為 35.5 kDa。

參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 材料

以購自彰化花壇之紫田薯 (*Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch) 薯塊 (圖三), 是屬於塊狀山藥中的紅山藥品系之一; 尚有由行政院農業試驗所劉新裕博士所提供白山藥品系: 中國長形品系 (*D. alata* L.) 二刺品系 (*D. alata* L.)。

(二) 試藥

本研究所使用之化學藥品, 其來源如下:

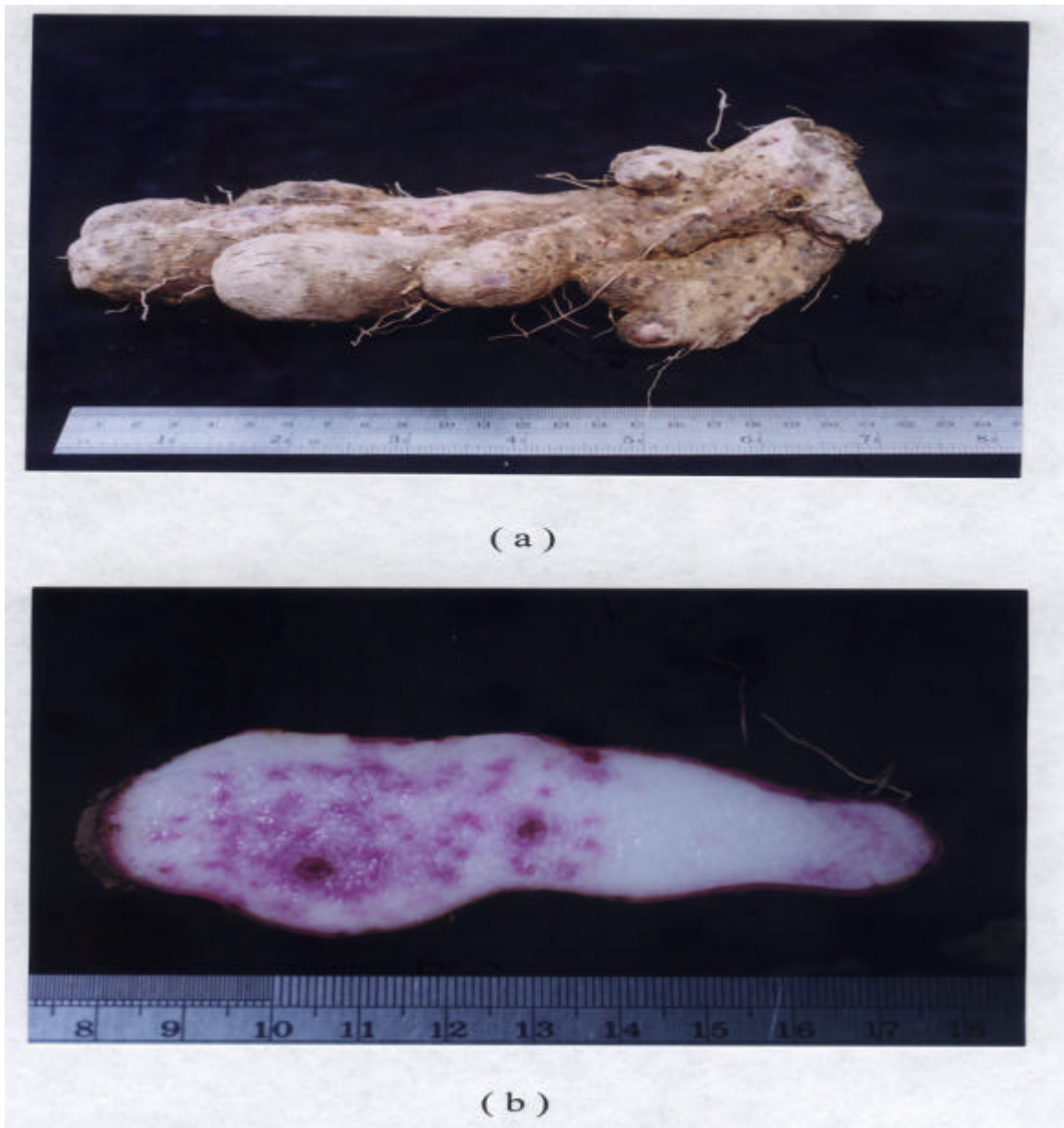
1. 日本和光株式會社: soluble starch, potassium sodium tartate
2. 美國 Sigma 公司: Bromphenol blue, Coomassie brilliant blue R-250, glycine, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), maltose, 2-mercaptoethanol, maize starch, potato starch, N,N,N',N' -tetra-methyl-ethlenediamine, rice starch
3. 美國 Bio-rad 公司: 40 % acrylamide / Bis solution, ammonium persulfate, Coomassie brilliant blue R-250, protein assay reagent
4. 美國 Alorich 公司: 5,5' -Dithiobis(2-nitrobenoic acid)(DTNB)

二、試驗方法

(一) 粗酵素液之萃取

將紫田薯薯塊以 Tris 緩衝溶液 (10 mM, Tris-HCl, pH7.0, 10 mM -mercapethanol, 4 mM EDTA) 進行粗酵素液之抽取。

取薯塊整塊加入等體積之 Tris 緩衝溶液, 均質 10 mins 後, 在 24000 × g、4 離心 15 mins, 取其上層液以玻璃棉過濾即為粗酵素液。



圖三、花壇紫田薯薯塊 (a) 及薯塊之橫切面 (b)

Fig 3. The tuber (a) and the cross-section of tuber (b) of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch

(二) 紫田薯 -澱粉 比活性測定

1. 粗酵素液中 -澱粉 活性測定

以可溶性澱粉 (soluble starch) 為受質，加入粗酵素液，經反應後，釋放之還原糖以 2-硝基水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 呈色定量之，計算酵素活性。

取 1.5 mL 1.5% 溶於 5 mM 醋酸-醋酸鈉緩衝溶液之可溶性澱粉於 37 預熱 5 mins。加入 0.5 mL 粗酵素液，混和後於 37 分別反應 0 和 1 小時 (0 時間的為本實驗之對照組)。反應後取 0.5 mL 之反應液加等體積之 DNS 試劑，在 100 水浴加熱 5 mins，冷水浴冷卻加入 4 mL 水，測定 590 nm 吸光值。另取 0.5 mL 濃度在 0-10 mg/ml 之麥芽糖溶液，以 DNS 呈色法製作麥芽糖校正曲線，由校正曲線換算產生之麥芽糖量並計算酵素活性 (1 酵素單位活性係指在每 1 min 測定條件下每 1 μ l 之酵素液產生 1 μ mole 之麥芽糖)

DNS 呈色劑之配法：甲液為 5 g 3,5-二硝基水楊酸溶於 100 mL 2N NaOH 溶液中。乙液為 150 g 酒石酸鉀鈉溶於 250 mL 水。

甲乙兩液加熱混和，並定量至 500 mL。

2. 粗酵素液中蛋白質濃度測定

將 Bio-Rad 的蛋白質分析反應劑 (protein assay reagent) 稀釋 5 倍後，取 1 mL 的試劑與 5 μ l 待測之蛋白質樣品混和均勻。靜置 5 分鐘，測其 595 nm 波長之吸光值。

另取不同濃度之 BSA (0、4、8、16、32 μ g/ml)，經上述反應後測其 595 nm 波長之吸光值，製作標準曲線並由曲線換算樣品之蛋白質濃度。將由 -澱粉 中所測得之酵素單位除以蛋白質濃度即

為 -澱粉 之比活性。

(三) 山藥塊莖活性測試

1.不同品種山藥其 -澱粉 活性之比較

取中國長形品系、二刺品系（由行政院農業試驗所劉新裕博士所提供）及紫田薯等 3 種不同品種之山藥，將其利用 Tris 緩衝溶液萃取成粗酵素液，測定其酵素活性和蛋白質濃度，並換算成比活性，最後比較是否有差異性。

2.塊莖溫度儲藏試驗

在 25 及 16 兩種不同溫度下，每個溫度下各取 4 重複，每隔 5 天測定其酵素活性和蛋白質含量，所獲得之比活性利用 SAS 套裝軟體進行統計分析各因子間之顯著性，並利用 Duncan 比較各處理間之差異性。

(四) 粗酵素液中黏性去除之方法

在做紫田薯 -澱粉 純化時，發現酵素液中黏性物質會影響到實驗操作。因此，利用下列方法將黏度去除，並做比較。

1.添加陽離子介面活性劑

將利用 Tris 緩衝溶液所萃取得到之粗酵素液加入 2 % cetylpyridinium (cpc) 陽離子介面活性劑，在 4 下均勻攪拌 2 小時。並在 24000 × g、4 離心 20 分鐘，取上層液。

2.粗酵素液之透析

將利用陽離子介面活性劑處理過之酵素液，分為兩組，一組放在透析膜(Wako, Dialysis membrane, size27)中,4 下透析過夜；一組則不做透析。

3. 添加甲醇

將上述兩組酵素液添加甲醇，體積比為 20：1，混和均勻後， $24000 \times g$ 、4 離心 15 分鐘，取上層液。

4. 黏度測試

將經過不同處理之粗酵素液利用 Brookfield viscometer (1 號探針) 測黏度。首先將儀器轉速調至 60 rpm，將酵素液倒在試管中使液面高度跟探針上的刻度對齊，待其指針轉到穩定後即可測定樣品黏度。所讀出的值帶入下列公式中，即可得到樣品之黏度。

公式：

$$\text{Dial reading} \times \text{Factor} = \text{Viscosity in centipoises}$$

Factor : 5 (依照轉速查表的的數值)

5. 澱粉活性染色

分別製 2 片膠體 (附表一)，其中一片含有 1.5 % 之可溶性澱粉，利用迷你電泳系統 (Bio-rad , Versatile mini-protein 3 electrophoresis cell)，以 pH 8.3 的 Tris-glycine 之電泳緩衝溶液，固定電壓 140 伏特進行電泳約 1 小時。電泳完畢後，其中一片未含 1.5 % 可溶性澱粉之膠體，利用 Coomassie brilliant blue R-250 染色 1 小時後，再脫色 2 ~ 3 小時。另一片含有 1.5 % 可溶性澱粉之膠體，在取出膠片後，置於 0.05 M 之醋酸緩衝溶液 (pH = 5.4) 於 37 °C 下振盪反應一小時，倒出緩衝溶液後加入碘液，緩緩搖動，則呈現出褐色背景，而有澱粉活性之部分出現透明帶，再將兩片膠做比對 (標準品 A 如附表二(a))。

(五) 紫田薯中 -澱粉 粗酵素液一般性質之測定

1. 溫度對紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之影響

取酵素液 0.5 mL, 以 1.5% 澱粉溶液 1.5 mL 為基質, 於 30~80 不同溫度下測定 -澱粉 活性, 並由溫度和酵素活性做圖。

2. 溫度穩定性

將所測定出最適溫度之結果作為溫度穩定性的溫度, 將粗酵素液放置在最適溫度中, 每隔 10 分鐘測定一次酵素活性, 所得之結果再利用酵素之比活性和時間來做圖。

3. pH 對紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之影響

配製 0.2 M 磷酸氫二鈉溶液和 0.1 M 檸檬酸溶液調成 pH 為 4 至 8 之緩衝溶液。在 4 8 不同 pH 值之磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液下, 測定 -澱粉 活性, 以 pH 對 -澱粉 活性做圖。

4. pH 穩定性

取適量酵素液存放在最適 pH 值的磷酸氫二鈉-檸檬酸緩衝溶液, 於室溫靜置, 每隔 1 天再取出定量酵素液加入可溶性澱粉基質, 測定 -澱粉 殘留活性, 並以 pH 對酵素之比活性做圖。

5. 澱粉受質對紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之影響

取不同之受質 (Wako : 可溶性澱粉、馬鈴薯澱粉、玉米澱粉及水稻澱粉) 各 1.5 mL (濃度皆為 1.5 %), 在 37 預熱 5 mins , 加入 0.5 mL 粗酵素液於 37 反應 1 小時, 測酵素活性, 以受質種類和酵素活性做圖。

6. 紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之 K_m 值

取 0.2~1.5% 不同濃度之可溶性澱粉 1.5 mL 為受質, 與酵素液 0.5 mL 於 37 水浴下反應 1 小時, 測定麥芽糖生成速率, 以澱粉

濃度對麥芽糖生成速率作基質飽和曲線圖，並以雙倒數作圖，求 K_m 值。

7. 紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之活化能

取酵素液 0.5 mL，以 1.5%澱粉溶液 1.5 mL 為受質，於不同溫度 (30~80) 下測定 -澱粉 活性，並用絕對溫度之倒數和 $\log K$ 做圖。

酵素催化反應之進行，可使活化能降低加速反應之進行，反應之速率常數、活化能及溫度之間關係可以 Arrhenius 方程式表示：

$$\log k = \log A - E_a (1 / T) / 2.3R$$

速率常數與 V_m 成正比，於不同溫度下測定酵素反應之 V_m ，以 $\log V_m$ 對絕對溫度倒數作圖，為一直線關係，由直線斜率即可求得活化能。

8. 金屬離子對紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之影響

在粗酵素液中分別添加 1 mM 及 5 mM 兩組，其中各加入 NaCl、CuSO₄ · 5H₂O、CaCl₂ · 2H₂O、FeSO₄ · 7H₂O、HgCl₂、KCl、ZnCl₂ 和 MgSO₄ 溶於醋酸-醋酸鈉緩衝溶液中 (0.05 M, pH 5.5)，做酵素活性測定。

9. 化學修試劑對紫田薯粗酵素液中 -澱粉 之影響

在粗酵素液中分別添加 1 mM 及 5 mM 兩組，其中各加入 EDTA、含 CaCl₂ 之 EDTA、PMSF 和尿素溶於醋酸-醋酸鈉緩衝溶液中 (0.05 M, pH 5.5)，做酵素活性測定。

肆、結果與討論

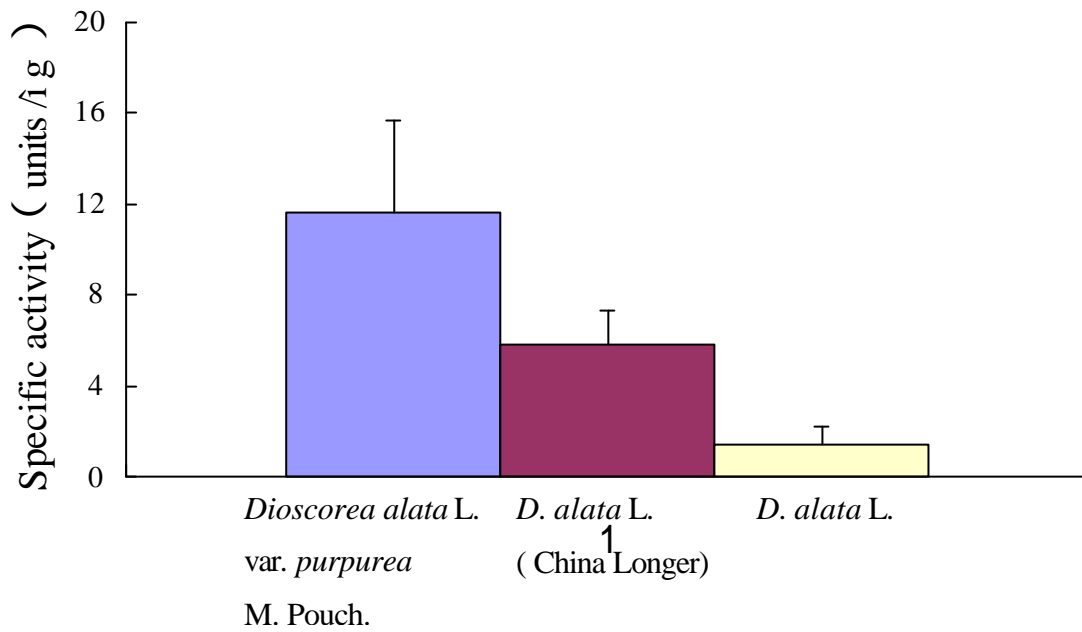
一、不同品種山藥其 -澱粉 活性之比較

山藥為農業試驗所發展之重點特用作物，多年以來，即不斷進行山藥種原之引進、繁殖、評估與篩選工作，同時進行篩選品系之觀察、比較、特性調查、區域試驗、品質分析、病虫害防治、栽培技術提升與多元化產品之開發等研究。因此，本次實驗選擇了 2 種新開發之品系：中國長品系（塊莖長柱形，紅皮白肉，具頗高的生產能力，產量可達 30-40 噸/公頃）及二刺品系（塊莖長柱形，褐皮白肉，具頗高的生產能力，產量可達 20-40 噸/公頃）和中部盛產的紫田薯做比較。結果發現，白山藥品系（中國長形品系、二刺品系）的 -澱粉 的活性比紅山藥（紫田薯）的活性低（圖四）。所以，後續實驗皆以紫田薯作為試驗材料。

二、紫田薯塊莖溫度儲藏之研究

1.塊莖差異性研究

由表三得到不同薯塊間是具有差異性，且薯塊大小也會影響這種差異，而表四是測單一塊莖中不同部位酵素活性，結果發現塊莖的發芽的芽點、塊莖中段及尾段不同部位也會有差異性。在芽點的位置測不到 -澱粉 的活性，而在中段部分其活性為最高，因此，為了使個體間和個體內的差異性降低，後續實驗皆採取整塊塊莖加入 Tris 緩衝溶液萃取粗酵素液以及選取相同形狀、大小塊莖並做多重覆試驗以降低實驗誤差。



圖四、不同品系之山藥其 α -澱粉 活性之比較

Fig 4. Comparison of α -amylase specific activity of different yams.

表三、不同紫田薯塊莖 -澱粉 活性之差異

Table 3. Comparison of α -amylase specific activity in *Dioscorea alata*

L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

Tuber	Amylase unit (μ mole / min)	Protein concentration (μ g / μ l)	Specific activity (unit / μ g)
1	77.68	5.38	14.44
2	71.85	5.65	12.72
3	104.70	5.98	17.51
4	81.92	5.73	14.30
5	55.95	6.67	8.39
6	97.28	6.39	15.22
Average	81.56	5.95	13.76
S.D.	17.59	0.50	3.06

表四、單一紫田薯塊莖不同部位 α -澱粉 之活性

Table 4. Comparison of α -amylase specific activity in a *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tuber.

	Amylase unit (μ mole / min)	Protein concentration (μ g / μ l)	Specific activity (unit / μ g)
Bud	-	1.108	-
Middle segment	6.67	11.377	0.586
Tail segment	4	15.415	0.259

2.溫度儲藏實驗

由表五結果顯示，在儲藏期間 16 和 25 並無顯著差異，而單以同一溫度下來探討儲藏期間塊莖的差異時，25 在儲藏 20 天期間塊莖有顯著差異，16 則無差異，但數據中顯示第 10 和 15 天時其平均值誤差過大，以第 10 天所得之原始數據中，4 個薯塊比活性分別為：20.95、51.39、15.35 和 9.85 (unit/ μg)，薯塊之間誤差過大，第 15 天的結果也為塊莖間所產生之誤差。

三、紫田薯塊莖中黏性物質去除之研究

在純化紫田薯粗酵素液時發現粗酵素液中的黏性物質會干擾酵素活性的測定。一般薯蕷科塊莖中含有澱粉質，卻由於其黏性物質之存在而使其澱粉之分離操作受到阻礙 (蔡和戴, 1984)，關於薯塊中的黏性物質經多位研究者研究，一般認為可能是一種同時具有碳水化合物及蛋白質之性質而類似醣蛋白 (Glycoprotein) 之物質。而在蔡和戴 (1984) 的研究結果得到田薯中的黏物質是含有碳水化合物 31.8 %、蛋白質 43.1 % 及灰份 8.3 %。

因此，利用添加 cpc、透析和加入甲醇來去除粗酵素液中的黏性物質。由表六結果顯示，在處理 A 的過程中發現經過 2% cpc 處理後黏度會下降、比活性會增高，但再經過透析後其黏度又再升高，即使利用甲醇處理黏度也不會有大幅度的下降。而處理 B 中發現經 2% cpc 處理後直接再用甲醇處理，得到黏度會隨著處理步驟一直降

表五、紫田薯塊莖在室溫和 16 儲藏期間其 -澱粉 活性之變化

Table 5. Changes of α -amylase specific activity in *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tubers during the course of storage.

Specific activity (unit / μ g)		
Days	16	25
0	13.34 \pm 3.780 ^{a x*}	11.29 \pm 5.630 ^{a x}
5	28.09 \pm 3.310 ^{a x}	25.63 \pm 6.340 ^{a x}
10	24.39 \pm 18.56 ^{a x}	10.70 \pm 3.030 ^{b x}
15	17.25 \pm 10.21 ^{a x}	19.38 \pm 3.970 ^{b x}
20	26.17 \pm 6.360 ^{a x}	20.94 \pm 2.340 ^{a x}

*Means \pm S.D. : means in the same column (a ~ d) and same row(w ~ z) followed by different letters are significantly different (p < 0.05)

表六、利用不同處理程序去除紫田薯塊莖中黏性物質

Table 6. Different procedures to remove sticky materials in *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

	Procedure A				Procedure B		
	Crude extract	→ 2 % cpc	→Dialysis	→Methanol	Crude extract	→ 2 % cpc	→Methanol
Amylase unit (μ mole / min)	86.37	66.58	64.07	62.9	63.47	64.50	69.93
Protein concentration (μ g / μ l)	5.200	3.560	2.910	2.520	5.140	3.490	2.250
Specific activity (unit / μ g)	16.61	18.70	22.02	24.96	12.35	18.48	31.08
Viscosity (centipoises)	138.0	78.00	139.5	117.3	139.5	92.25	80.25

低，酵素比活性增高。因此，後續實驗中之粗酵素液皆經由處理 B 的方式去除黏性物質以增加酵素之比活性，作為簡單之純化處理。

四、活性染色

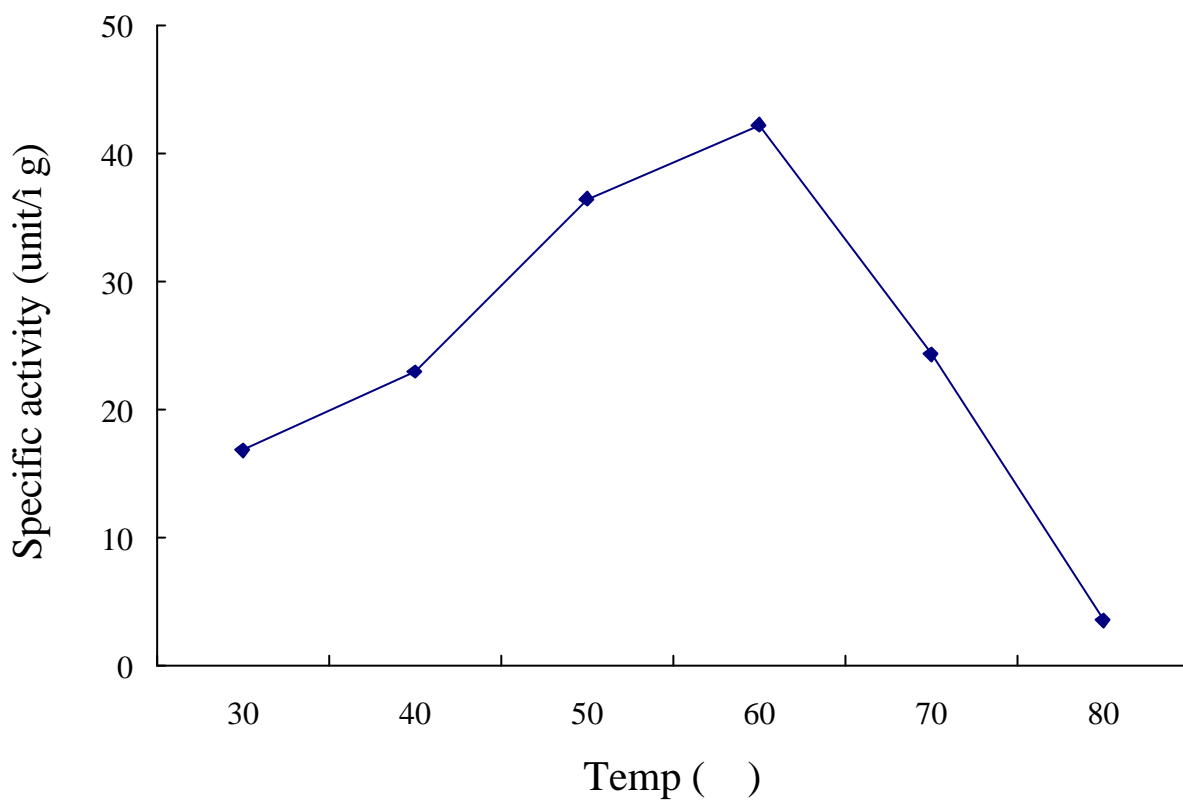
由結果顯示，在活性染色的膠片中（圖五），在第三和七的位置為未經任何處理之粗酵素液，有 2 個不同分子量之酵素可分解可溶性澱粉（其中一個約在 207 KD，而另一個約在 52.5 KD 的位置），但經過 2 % cpc 處理過後，分子量較小的 band 會消失，可推測經過簡單 cpc 處理即可把另一個可分解澱粉的酵素去除，只保留 α -澱粉 在酵素液中。在經過透析和甲醇的處理後，酵素活性依然存在且位置都相同。

另外，經過 Coomassie Brilliant Blue R-250 染色的膠片（圖六），因為本身紫田薯粗酵素液亦含有黏性，因此跑電泳時會產生有拖曳的現象，但由活性染色和此膠片對照的結果，可推測紫田薯中的 α -澱粉 其分子量會在接近 200 KD 的位置，但由於未做進一步的純化，此為估算位置。

五、紫田薯之 α -澱粉 性質測定

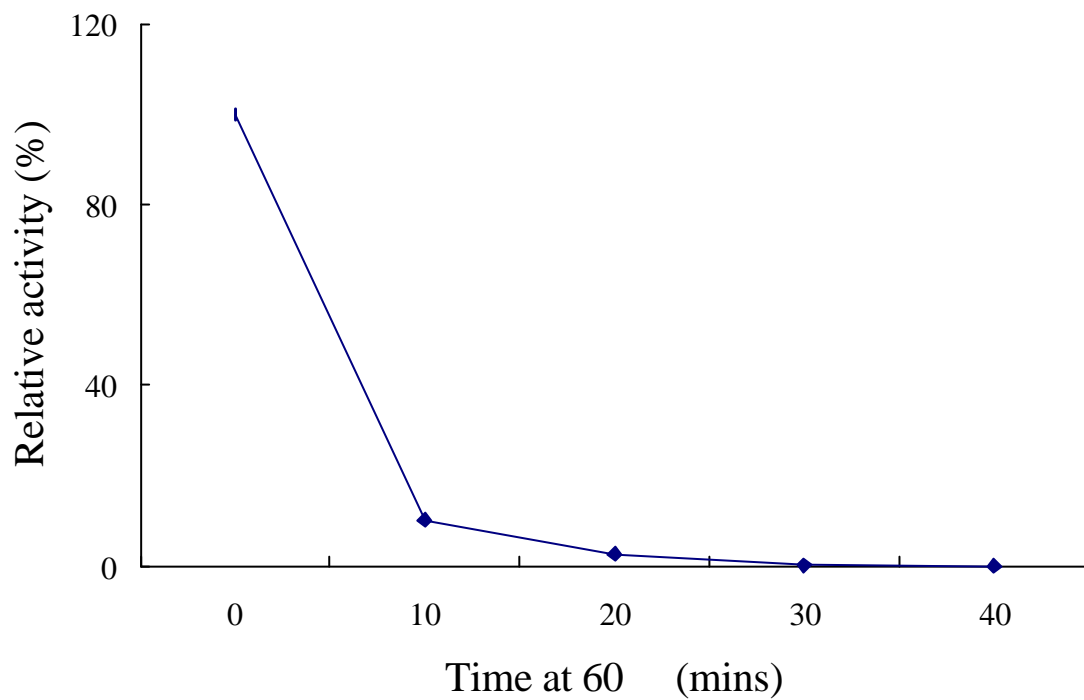
（一）最適溫度

紫田薯的最適反應溫度為 60（圖七）。朱（1998）的研究中其基隆山藥的最適溫度則在 55，在 Dicko 等人（1999）純化石蒜科(*Curculigo pilosa*)的 α -澱粉 其最適溫度同樣也在 55，甘薯和大豆而言，其 α -澱粉 的最適溫度在 50。因此，由結果中發現紫田薯的 α -澱粉 最適溫度高於其他塊莖、塊根等。



圖七、溫度對紫田薯粗酵素液中 α -澱粉 之影響

Fig 7. Effect of temperature on the activity of α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.



圖八、紫田薯塊莖 α -澱粉 在 60 °C 之熱穩定性

Fig 8. Thermostability of α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea*

M. Pouch tubers at 60 °C.

(二) 酵素液之溫度穩定性

如圖八，當紫田薯粗酵素液單獨存在於 60 加熱時，酵素之溫度穩定性不佳。由圖中可得到，只需加熱 10 分鐘其相對比活性即開始急速下降，加熱超過 30 分鐘便失去活性。

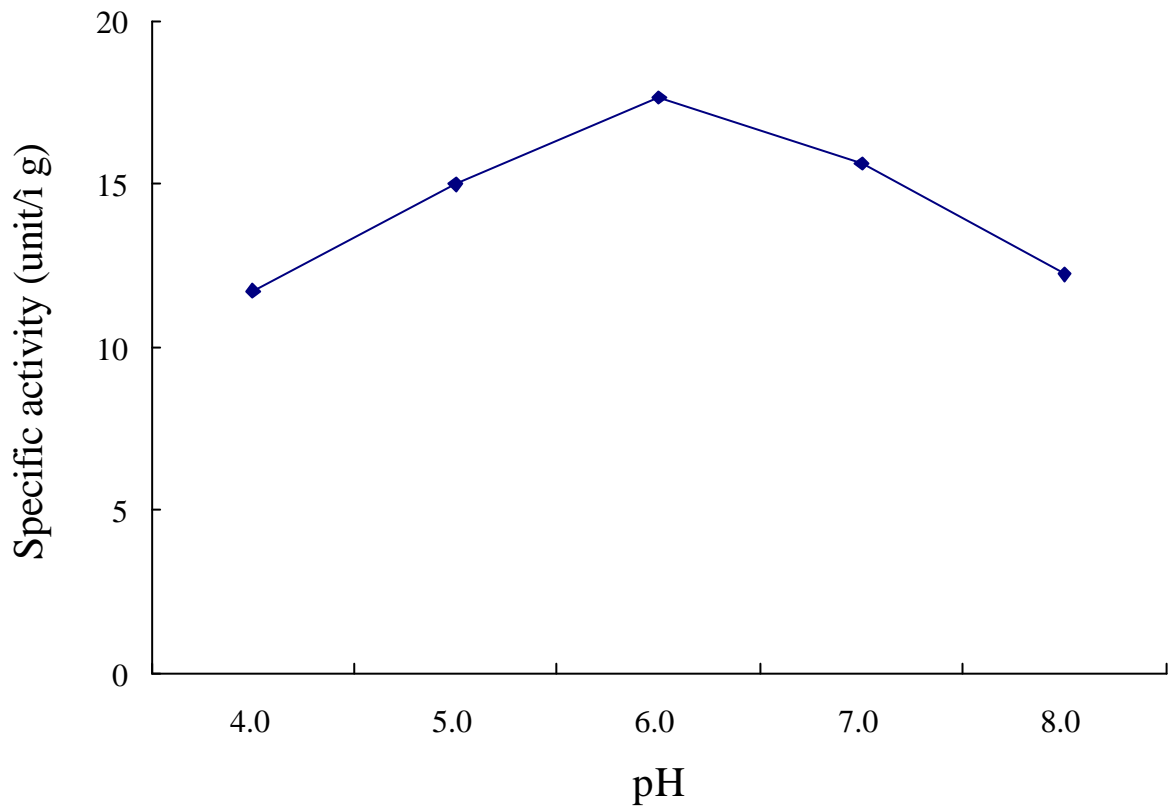
(三) 最適 pH 及 pH 穩定性

在本次實驗結果顯示，紫田薯塊莖中 -澱粉 最適 pH 值為 6.0 (如圖九)。若將粗酵素液 pH 值固定為 6，測其在室溫 25 和 4 之穩定性，結果發現粗酵素液在低溫下活性較穩定 (圖十)。

一般而言，-澱粉 的最適 pH 值呈微弱酸性，約在 4.5 6.2 之間 (Doehlert et al.,1982; Lizotte et al., 1990)。朱 (1998) 則發現基隆山藥 -澱粉 的最適 pH 值 6.0，而 pH 穩定性在 6 8 之間，跟本次實驗結果作比較，發現山藥 -澱粉 其最適 pH 值類似。其他植物結果如下：在 Wang (1992) 的實驗發現玉米 -澱粉 的最適 pH 值是一個範圍，為 pH 5 8 之間。另外，大豆中 -澱粉 pH 穩定性則是相當廣在 3 12 之間均有活性存在，是目前範圍最廣的 -澱粉。Dicko(1999) 等人在 *Curculigo pilosa* 所純化出的 -澱粉 測其最適 pH 值同樣也為 5.0。

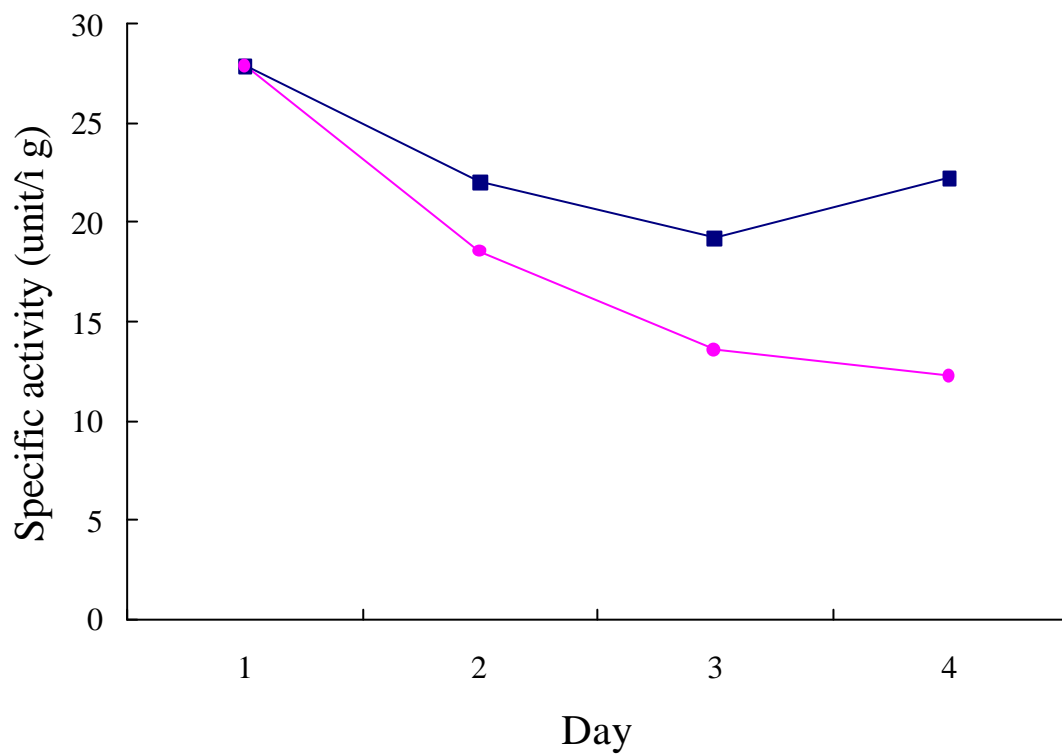
(四) 澱粉受質對紫田薯 -澱粉 之影響

澱粉是由直鏈和支鏈澱粉所組成，兩者之構造均會顯著影響澱粉之理化性質、成糊與回凝。在本次實驗中利用四種不同種類之澱粉受質，探討紫田薯中 -澱粉 對受質結構的相對關係。結果顯示(圖十一)，以 Wako 的可溶性澱粉為受質測得紫田薯中 -澱粉 的活性最高，其次為水稻米粒澱粉、馬鈴薯澱粉，而玉米澱粉是完全測不到活性存在。



圖九、pH 對紫田薯粗酵素液中 α -澱粉 之影響

Fig 9. Effect of pH on the activity of α -amylase of *Dioscorea alata* L.
var. *purpurea* M. Pouch tubers.

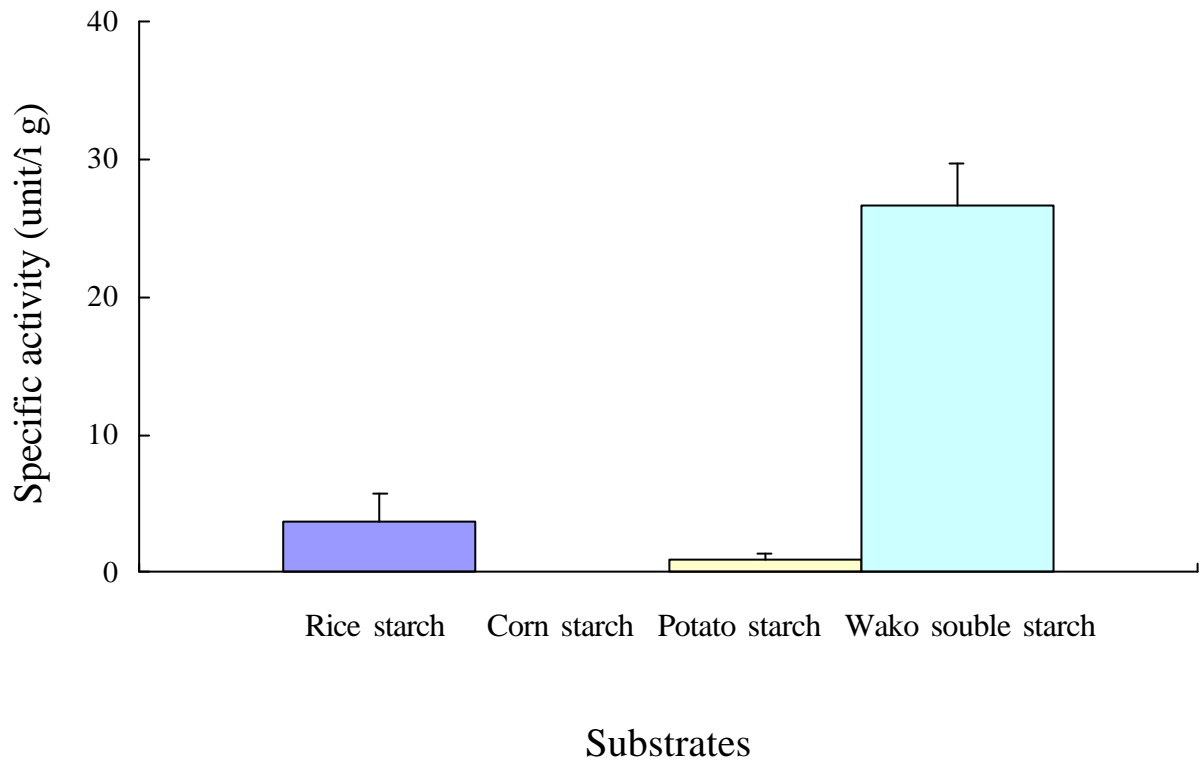


() 4 , () 25

圖十、在 pH 6.0 下紫田薯塊莖 α -澱粉 之穩定性

Fig 10. Stability of α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M.

Pouch tubers at pH 6.0.



圖十一、受質種類對紫田薯中 α -澱粉 之影響

Fig 11. Effects of various substrates on the α -amylase activities of

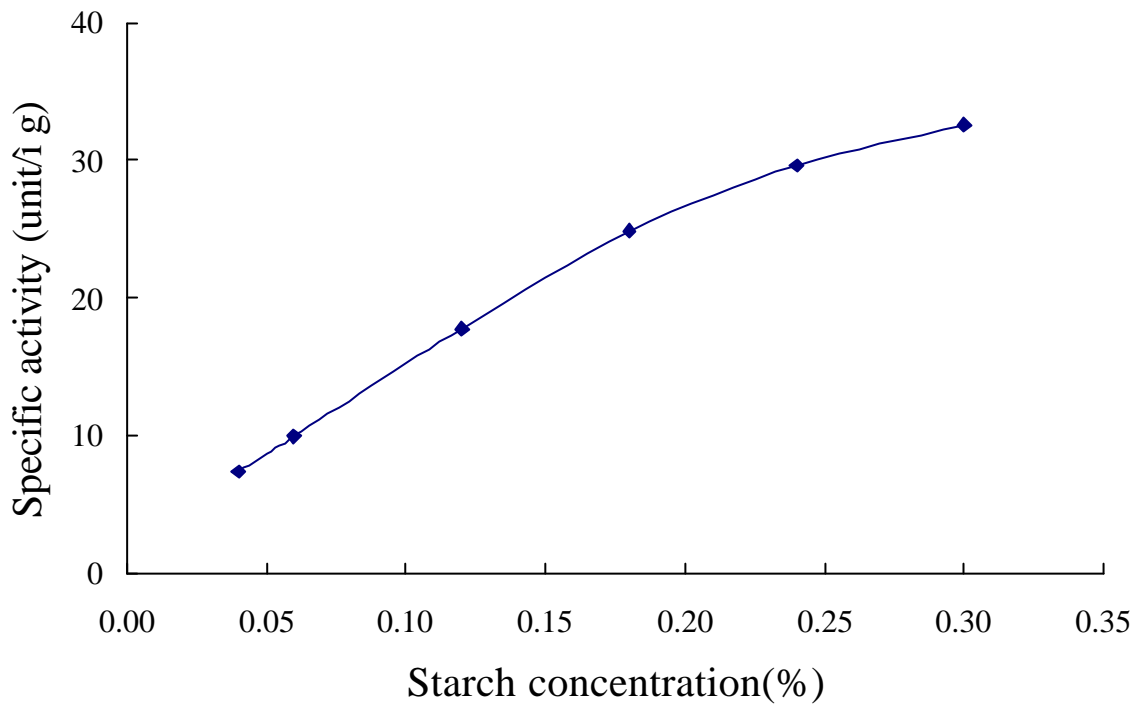
Dioscorea alata L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

這可能是因為澱粉結構所導致之結果，天然澱粉顆粒為一種半結晶體構造，主要分成結晶區和不定型區。結晶區是指支鏈澱粉的分支鏈間或直鏈澱粉間，形成有秩序排列的區域，而不定型區則是支鏈澱粉的 α -1,6 鍵結集中處，成混亂分佈。澱粉結晶型態與支鏈澱粉之鏈長密切相關，因支鏈澱粉其外鏈是形成雙股螺旋之主要區域，若外鏈較長將有助於結晶形成並增加穩定性，大致分為：平均鏈長較短的稻米和小麥等穀類澱粉、平均鏈長較長的馬鈴薯及山藥等澱粉和介於兩者之間的蓮藕澱粉（黃和曾，1997）。

而本次實驗所得之結果推測 Wako 的可溶性澱粉其結構較鬆散，易被酵素結合，而米澱粉較馬鈴薯澱粉效果好可能是因其鏈長較短的因素。在 Dicko (1999) 的研究中得到 *C. pilosa* 的 α -澱粉 之活性則在不同受質而有不同，在可溶性澱粉為 1.5 mg/mL、馬鈴薯澱粉為 1.8 mg/mL、直鏈澱粉為 1.7 mg/mL 及支鏈澱粉為 2.3 mg/mL，同樣也是可溶性澱粉的效果最佳。

(五) 基質飽和曲線及 K_m 值

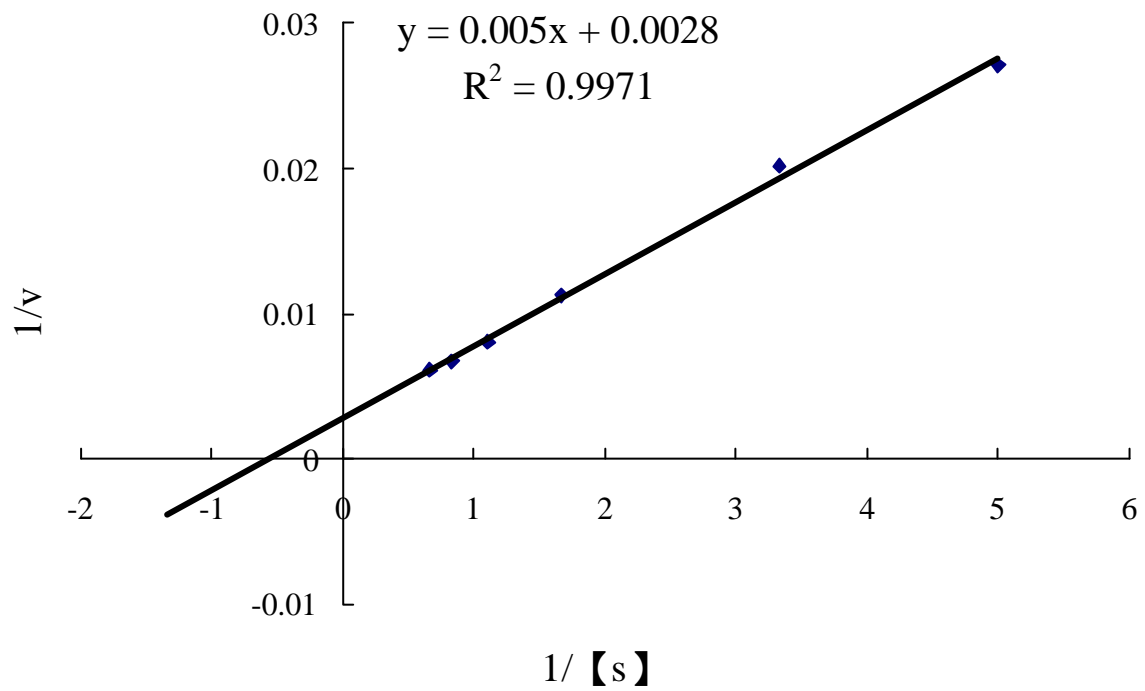
由圖十二所顯示，在受質濃度 0.2 % - 1.5 % 下所測得的酵素活性是呈現一上升曲線，在 1.5 % 時酵素活性達到最高。再將圖十二的結果取雙倒數得到的結果如圖十三，由回歸曲線中可得到 $y=0.005x + 0.0028$ 的直線方程式，因此可知紫田薯中 α -澱粉 的最大反應速率為 357.1 $\mu\text{mole} / \mu\text{L min}$ ， K_m 值為 1.786 %。而基隆山藥的 K_m 值為 0.18 %（朱，1998），另外 *C. pilosa* (Dicko *et al.*, 1999) 的 α -澱粉 K_m 值則因不同受質而有不同，可溶性澱粉為 15 mg/mL、馬鈴薯澱粉為 1.8 mg/mL、直鏈澱粉為 1.7 mg/mL 及支鏈澱粉為 2.3 mg/mL。



圖十二、澱粉濃度對紫田薯 α -澱粉 催化水解澱粉速率之影響

Fig 12. Effect of starch concentration on the reaction rate catalyzed by

α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tubers .



圖十三、紫田薯 -澱粉 之 K_m

Fig 13. The K_m of α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M.

Pouch tubers.

(六) 活化能

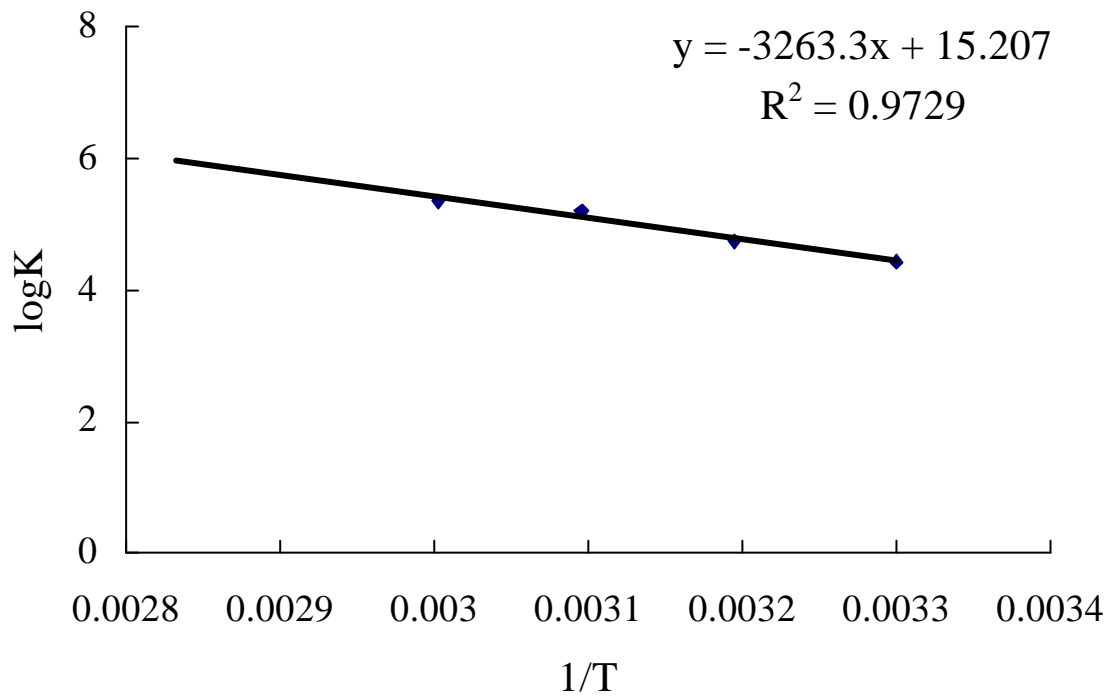
由圖十四所得到的曲線，取後四點做回歸，得到方程式為： $y = -3263.3x + 15.207$ ，因此紫田薯之 α -澱粉 其活化能為 717.954 cal / mole，而在朱(1998)的實驗中測得基隆山藥 α -澱粉 的活化能為 5066.0 cal / mole，造成結果有如此大的差異可能是因為本實驗之酵素液未經純化，因此有其他干擾因子影響反應。

(七) 金屬離子對紫田薯 α -澱粉 之影響

本次實驗結果顯示(表七)，只有鋅離子會促進 α -澱粉 之活性，其他如鈉離子、鉀離子、鈣離子、銅離子、汞離子和鐵離子皆會使紫田薯中 α -澱粉 活性降低，但並不顯著。而汞離子其在 5mM 濃度下會完全使酵素活性喪失。而不同濃度下抑制和促進的程度也會有所不同，如鈣離子、銅離子和鐵離子在高濃度時抑制作用會更明顯。這些結果可能是因為酵素的活性中心有時以金屬離子為中心主角，此時若在酵素反應液中加入金屬離子，使其成為錯合物，失去機能，結果導致阻害反應(船津, 1977)。

(八) 化學修飾劑對紫田薯 α -澱粉 之影響

在本次實驗中選用尿素、PMSF、EDTA 和 EDTA (含有 1 mM CaCl_2) 作為化學修飾劑。結果顯示(表八)，尿素對 α -澱粉 則會明顯抑制，這可能是因為尿素會破壞酵素，使酵素鍵結或結構產生改變。而 PMSF 和 EDTA 對酵素則為促進的作用，EDTA 為金屬螯合劑，酵素可能會受到微量重金屬離子之阻害(通常實驗中所添加的蒸餾水、緩衝液等，會含有極微量的重金屬)，因此添加 EDTA 可和金屬離子結合，保護酵素(船津, 1977)。但 EDTA 中含有鈣離子的緩衝溶液對 α -澱粉 則會抑制，這可能是因為鈣離子對酵素所造成的影響。而 PMSF 為蛋白 抑制劑，主要是抑



圖十四、紫田薯 α -澱粉 之活化能

Fig 14. The Energy activity of α -amylase of *Dioscorea alata* L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

表七、金屬離子對紫田薯中 α -澱粉 活性之影響

Table 7. Effects of various metal ions on the α -amylase activities of

Dioscorea alata L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

Metal ions	Residual activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100.0
NaCl	93.79	91.72
KCl	99.60	98.77
CaCl ₂	92.56	87.59
CuSO ₄	94.63	63.38
MgSO ₄	98.77	103.7
ZnCl ₂	103.32	107.9
HgCl ₂	23.43	0
FeSO ₄	93.39	85.73

表八、化學修飾劑對紫田薯中 α -澱粉 活性之影響

Table 8. Effects of various inhibitors on the α -amylase activities of

Dioscorea alata L. var. *purpurea* M. Pouch tubers.

Inhibitor	Residual activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100.0
Urea	92.97	90.08
PMSF	115.72	116.1
EDTA	101.66	107.5
EDTA plus CaCl_2	91.31	92.14

制 serine proteases，因本次實驗所用為 α -澱粉 為粗酵素液，因此 PMSF 可抑制蛋白質，保護酵素不被蛋白質 分解。

在化學修飾劑對酵素影響這方面有許多研究，在 Ara 等人 (1995) 的研究中發現，以多種不同修飾劑 (如：monoiodoacetate、DTNB、Sodium fluoride 和 urea 等) 對普南糖支鏈澱粉 和 α -澱粉 皆有抑制的效果，但會因酵素類型的不同其抑制程度會有差異。而在 Wang (1992) 只利用不同濃度之 PCMB 測其對玉米中 α -澱粉 之影響，結果也發現有明顯的抑制作用。另外以山藥中 α -澱粉 而言，在朱 (1998) 的研究中發現 0.1 mM 的 PCMB 即會很明顯的抑制酵素活性。

伍、結論

- 一、在預備實驗中發現紫田薯塊莖內的 α -澱粉 活性比其他兩種山藥品系高，且發現薯塊間和不同部位之薯塊會有差異性。
- 二、溫度儲藏時發現，紫田薯在儲藏期間其 α -澱粉 會呈現波動的情形，這是因為在儲藏期間塊莖內會有呼吸作用和代謝作用同時進行，塊莖間的差異會影響到實驗結果，且 16 和 25 並無顯著差異。
- 三、經由陽離子介面活性劑和甲醇處理後的粗酵素液，可成功的降低其黏性並且提高比活性。再透過活性染色的方法，大約可預測紫田薯 α -澱粉 的分子量約為 207 KD。
- 四、紫田薯 α -澱粉 的基本性質如下：
 - 1.最適溫度：60 ，但其在 60 時穩定性不佳。
 - 2.最適 pH 值為 6.0，而 pH 值在 6.0 時穩定性很高。
 - 3.Km 值為 1.786 %，最大反應速率為 357.1 μ mole / mL / min。
 - 4.活化能為 718.0 cal / mole。
 - 5.在金屬離子方面只有鋅離子會促進 α -澱粉 之活性，其他離子（鈉離子、鉀離子、鈣離子、銅離子、汞離子和鐵離子）皆會使紫田薯中 α -澱粉 活性降低，尤其是汞離子，其在 5 mM 濃度下會完全使酵素活性喪失。
 - 6.在化學修飾劑方面 Urea 對 α -澱粉 則會明顯抑制，而 PMSF 和 EDTA 對酵素則為促進的作用，但 EDTA 中含有鈣離子的緩衝溶液對 α -澱粉 則會抑制。
 - 7.不同的受質種類對紫田薯中 α -澱粉 活性影響很大，結果發現紫田薯中 α -澱粉 對分解直鏈澱粉的能力較高。

陸、參考文獻

- 王昭月、劉新裕：不同山藥(*Dioscorea alata* L.)品系塊莖之儲藏研究。中華農業研究，41 (2)：159-168 (1992).
- 朱汎琪：基隆山藥塊莖採收後之生物化學研究。私立靜宜大學食品營養研究所碩士論文 (1998).
- 江伯源、鄭惟仁：捍衛健康的新興戰士——山藥。農業世界雜誌，196：86-89 (1999).
- 江志明：利用水稻種子生產耐高溫的基因工程澱粉普魯男糖——以改進麥芽糖即高蛋白食品的製造。國立海洋大學水產生物技術研究所碩士論文(1998).
- 呂淑芳、屈靈慧、曾慶元、蔡正宗、溫銘：甘藷植物體及癒合組織花青素萃取物安定性之探討。中華民國食品科學技術年會第二十五屆會員大會。中華民國84年11月30日。中興大學 (1995).
- 呂淑芳、金立德、溫銘：環境因子對甘藷細胞及組織培養生產花青素之影響。中華民國食品科學技術年會第二十五屆會員大會。中華民國84年11月30日。中興大學 (1995).
- 屈靈慧：以甘藷組織培養生產花青素之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文 (1994).
- 屈靈慧、溫銘：培養基成分對甘藷組織培養生產花青素之影響。中國園藝，40 (2):126-141 (1994).
- 金立德：以紅心菜菔及紫蘇組織培養生產花青素之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文 (1996).

- 金立德、孫友強、曾慶元、溫銘：紫蘇組織培養生產花青素之研究。中華民國食品科學技術年會第二十六屆會員大會。中華民國 85 年 12 月 5 日。嘉義農專 (1996).
- 洪哲穎、邱俊彥、陳國誠、許文輝：利用 α -amylase 與 Isoamylase 進行電冷水解反應之特性。中國農業化學會誌，29(1):54~60 (1991).
- 范鸞婉、沈啟明、溫銘：紅薯組織培養中花青素產生之誘導。植物組織及細胞培養研討會 p.67。台灣省農業試驗所。台中 (1993a).
- 范鸞婉、金立德、陳志平、溫銘：紫田薯組織培養中花青素產生之誘導。中華民國食品科學技術會第二十三屆會員大會。基隆 (1993b).
- 范鸞婉、溫銘：培養條件於紫田薯組織培養生產花青素之影響。中國園藝，40:192-211 (1994).
- 徐添根：環境條件對紫田薯組織培養生產花青素之研究。東海大學食品科學研究所碩士論文 (1995).
- 徐添根、呂淑芳、金立德、溫銘：高壓對甘藷及紫田薯組織及細胞培養生產紫紅色癒合組織之影響。中華民國食品科學技術年會第二十五屆會員大會。中華民國食品科學 84 年 11 月 30 日。中興大學 (1995).
- 徐添根、范鸞婉、邱銘凰、溫銘：環境條件對於紫田薯組織生產花青素之影響。中華民國食品科學技術年會第二十五屆會員大會。中華民國 84 年 11 月 30 日。中興大學 (1995).
- 徐輝妃、黃鵬：山藥的營養保健價值與食用法介紹。農業世界，161：63 65 (1997).
- 張基煌：莧菜紅色素之純化與穩定試驗。國立台灣大學食品科技研究所碩

- 士論文 (1983).
- 船津勝：酵素，復漢出版社，台南市，pp.62~63 (1977).
- 陳克廉：甘薯加工特性與質地特性之研究。國立台灣大學食品科技研究所
博士論文 (1987).
- 范鸞婉：以植物組織培養法生產紫田薯花青素之研究。東海大學食品科學
研究所碩士論文 (1994).
- 曾慶元：不同品系紫田薯組織培養生產花青素之研究。東海大學食品科學
研究所碩士論文 (2000).
- 黃文理、劉麗飛：植物細胞培養過程中碳水化合物之代謝。科學農業，46
(7,8): 227 235 (1998).
- 黃瑞美、曾仁佑：澱粉之理化性質與微粒結構。輔仁民生學誌，3(1):
115 130 (1997).
- 黃鵬：不同儲藏溫度對山藥鮮重及品質之影響。花蓮區農業改良場研究彙
報，8: 73 80 (1992).
- 黃鵬、范美玲：長形山藥塊莖保鮮技術。花蓮區農業專訊，14:12 14(1995).
- 溫銘：植物細胞培養生產紅色素之探討。中華民國食品科學技術學會第
二十二屆會員大會。屏東 (1992).
- 溫銘：Formation of anthocyanins in cell culture of *Gunura bicolor*。植物組
織及細胞培養研討會。台中 (1993).
- 溫銘、屈靈慧：植物生長調節劑對甘藷組織培養生產花青素之影響。中
國園藝，39(2):81-89 (1993).
- 溫銘、屈靈慧：植物生長調節劑對甘藷組織培養生產花青素之影響。中

- 國園藝 , 39 (3):1-9 (1993b).
- 溫銘、林博得、范鸞婉：以紅莧菜組織培養生產紅色素之探討。東海學報 , 34:1103-1114 (1993).
- 溫銘、范鸞婉、沈啟明：植物生長調節劑對於紫田薯組織培養生產花青素之影響。中國園藝 , 39 (2):90-98 (1993).
- 葉碧櫻、蔡正宗：白皮甘藷 (*Ipomoea batatas*) 所含的四種主要醃化花色素。食品科學 , 21 (5):356-368 (1994).
- 劉新裕、王昭月、徐原田、宋麗梅：重要藥用植物山藥之生產與品質研究。J Chin Med , 5 (3) : 167 183 (1994).
- 劉新裕、王昭月、徐原田、宋麗梅：本省山藥之研究。中醫藥雜誌 , 6(2) : 111 126 (1995).
- 劉新裕、呂秀英、王昭月、賴永昌：環境因子對山藥生長與產量之影響。中華農業研究 , 39 (4) : 287 296 (1990).
- 劉新裕、張同吳、林義恭、王昭月：優良保健植物 山藥。農業世界雜誌 , 197 : 41 45 (2000).
- 劉新裕、張同吳、林義恭、陳淑芬：山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究。中華農業研究 , 48(4) : 1 22 (1999).
- 蔡正宗、陳中文：紅鳳菜花青素安定性之探討。食品科學 , 19:310 (1992).
- 蔡錫舜、戴芬芝：台灣產田薯 (*Dioscorea alata* Linn.) 所含黏質物之分離及理化性質之研究 , 第一報：黏物質之分離與精製。中國化學會誌 , 22 : 88 94 (1984).
- M. O. Abe: Adaptability of potato drying to yam processing. J. Milk and Food Technol., 36: 456~460 (1973).

- K. Ara, K. Saeki, K. Igarashi, M. Takaiwa, T. Uemura, H. Hagihara, S. Kawai and S. Ito: Purification and characterization of an alkaline amylo-pullulanase with both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 1243 : 315~324 (1995).
- T. Arai, A. Kawabata and H. Taniguchi: Purification and some properties of *Ichuimo* α -amylase. *Agric. Biol. Chem.*, 55 : 399~405 (1991).
- M. B. Beatriz, P. Claudia, F. F. Laura and B. V. Francisco: Chromatographic methods for amylases. *J. Chromato. B.*, 684 : 217~237 (1996).
- E. Beck and P. Ziegler: Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.*, 40 : 95~117 (1989).
- P. J. Boyce and J. J. Volenec: Taproot carbohydrate concentration and stress tolerance of contrasting alfalfa genotypes. *Crop Sci.*, 32 (3) : 757-761 (1992).
- D. G. Coursey: Yam storage. 1: a review of yam storage practices and information on storage losses. *J. Stored Pro. Res.*, 2 : 229~244 (1967).
- M. H. Dicko, M. J. F. Searle-van Leewen, G. Beldman, O. G. Ouderaogo, R. Hillhorst and A. S. Traore: Purification and characterization of α -amylase from *Curculigo pilosa*. *Appl. Micro. Biotech.*, 52 : 802~805 (1999).
- D. C. Doehlert, S. H. Duke and J. Anderson: Beta-amylase from alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots. *Plant Physiol.*, 69:1096~1102 (1982).
- Z. Jiahua,: Kinetic model for the co-action of beta-amylase and debranching

- enzymes in the production of maltose. *Biotechnol Bioeng.* 62(5) : 618~622 (1999).
- B. Kouassi, J. Diopoh and B. Fournet: Souble sugars from yam and changes during tuber storage. *Phytochemistry.*, 29 : 1069~1072 (1990).
- P. A. Lizotte, C. A. Henson and S. H. Duke: Purification, and Characterization of pea epicotyl α -amylase. *Plant Physiol.*, 92: 615~621 (1990).
- H.T. Nielsen, U. Deiting and M. Stitt: α -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant physiol.*, 113 : 503~510 (1997).
- S. E. Omonigo and M. J. Ikenebomeh: Effect of temperature tratment on the chemical composition of pounded white yam during storage. *Food Chem.*, 71 : 215~220 (2000).
- R. E. Pall and N. J. Chen: Compositional chang in yam bean during storage. *Host. Since.*, 23 : 194~196 (1988).
- M. F. R. da Silva. Paulo, J. E. Peter, M. H. Lionel, M. S. Alison and R. Stephen: Starch metabolism in developing embryos of oilseed rape. *Planta.*, 203 : 480~487 (1997).
- J. Preiss: Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surv. Plant. Mol. Cell. Biol.*, 7 : 59~100 (1990).
- E. Purgatto, F. M. Lajolo, J. R. Nascimento and B. R. Cordenunsi: Inhibition of beta-amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta.*, 212(5~6) : 823~828 (2001).

- M.Satoru, S. F. Kanako and N. Kenzo: Sugar-inducible expression of a gene for α -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiol.*, 107 : 895~904 (1995).
- M. Steup, H. Robenek and M. Melkonian: In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta.*, 158:428~ 436 (1983).
- K. V. Subbarao, R. Datta and R. Sharma: Amylases synthesis in scutellum and aleurone layer of maize seeds. *Phytochemistry.*, 49(3): 657~666 (1998).
- E. N. Ugochukwu, E. O. Anosike and I. O. Samuel: Changes in enzyme activity of white yam tubers after prolonged storage. *Phytochemistry.*, 16 : 1159~1162 (1977).
- A. W. Waitt: Yam:*Dioscorea* species. *Field Crop Abstract.*, 16(3) : 155~160 (1963).
- J. P. D. Wanasundera and G. Ravindran: Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods for Hum. Nut.*, 46 : 33~39 (1994).
- S. M. Wang, S. Y. Wu and J. Chen: Purification and characterization of beta-amylase in maize kernel. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 33 : 359~367 (1992).
- J. Yamaguchi, S. Itoh, T. Saitoh, A. Ikeda, T. Tashiro and T. Nagato: Characterization of α -amylase and its deficiency in various rice cultivars. *Theo. Appl. Genet.*, 98 : 32~38 (1999).

壹、緒論

近年來，分子農作（Molecular farming）在先進國家已有極快速發展，成為一項重大商機的關鍵技術，尤其是利用植物做為生物反應器來生產低成本卻具有高價值的藥品、酵素、疫苗及其他生物分子等（Fischer and Emans, 2000）。農作物的儲藏器官，如種子、塊根、塊莖等，含有豐富的澱粉及蛋白質及其他養分，是植物繁殖後代提供養分的主要來源。在食品及製酒業上，這些器官內所含的澱粉及蛋白質，也往往是重要的加工原料。在傳統食品業上，澱粉轉化成各種甜味料，例如麥芽糖、葡萄糖、果糖及其他多糖類。各種糖漿中以麥芽糖漿最受歡迎，因其具有甜味溫和、低吸濕性、低黏度、可降低食品褐變及熱穩定性等良好加工機能特性，因此，常被應用於食品加工上當做溫度調節劑、結晶抑制劑、穩定劑和膨脹劑等（洪等人, 1991）。

尤其隨著醫藥的發達，生理學家們發現蔗糖會提高蛀牙的發生，攝取過量會引起糖尿病、肥胖及動脈硬化等疾病（蘇, 1991），使得澱粉甜味料在食品加工上的角色日益重要。而傳統的方法製備高麥芽糖漿步驟繁瑣且費時，並有成本較高及化學殘留或污染等問題（江, 1998）。1994年中央研究院植物所蕭介夫教授首創使用微生物來源的酵素來轉換澱粉成為麥芽糖及高蛋白食品（中華民國專利 TW 197472 與美國專利 US 5,312,739），由於使用材料為自然界生物來源物質，因此對維護消費者的健康有正面影響。但是，微生物來源的酵素提高加工成本，而且也有微生物毒素污染的顧慮。因此，如果能利用基因工程技術，使植物本身的儲藏器官來製造耐高溫澱粉分解酵素，使食品加工過程產生對人體健康有害物質的顧慮消除，並進一步簡化及經濟化工業製造澱粉衍生物的程序。

目前已有成功利用水稻種子生產耐熱普魯南糖 之研究 (江, 1998), 且水稻、馬鈴薯的基因轉殖技術已在中研院植物所余淑美及符宏勇博士的研究室中已建立, 擁有在水稻種子、馬鈴薯塊莖及甘薯塊根中能高度表現的啟動子, 其中 α -澱粉 及蔗糖合成酵素基因之啟動子已分別在研院植物所余淑美及符宏勇博士的研究室研究多年 (Fu *et al.*, 1995)。本部分論文目的在探討是否能利用馬鈴薯塊莖表達與生產具有經濟效益耐熱性 α -澱粉 , 進以發展利用耐熱 α -澱粉 來生產高麥芽糖漿和高蛋白食品的方法。

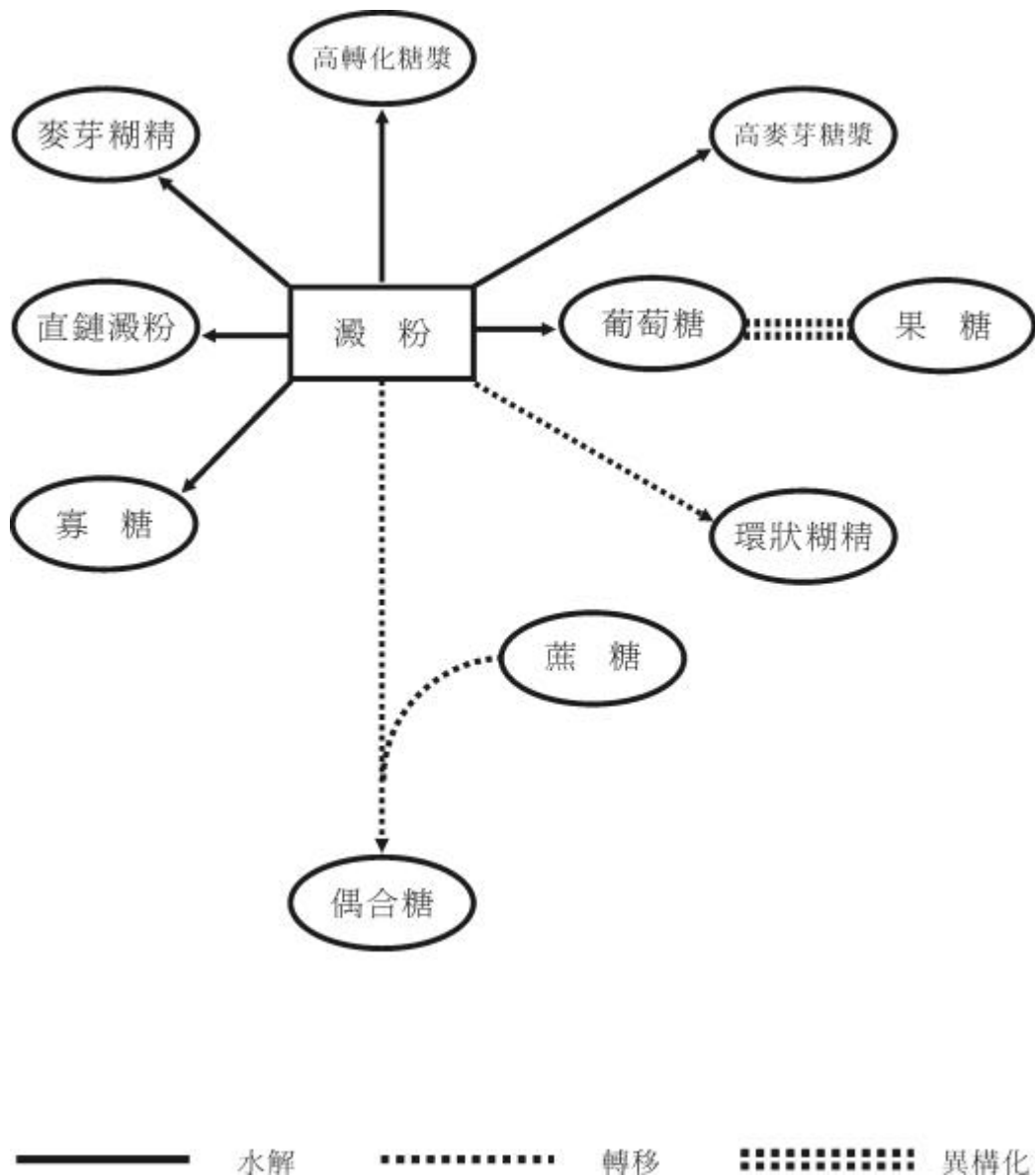
貳、文獻整理

一、澱粉

澱粉可說是世界上來源最豐富，價格最低廉，用途最廣的食品原料。澱粉是植物體儲存之主要碳水化合物，目前加工大部分來自玉米、小麥、稻米、馬鈴薯、樹薯是作為原料，以取代傳統上所使用薯及其他穀類、塊根作物等。雖然它的來源不同，然而水解所得的產物在化學或物理性質上卻沒什麼差別。澱粉是由葡萄糖所聚合而成的大分子化合物，因此具有加熱凝化增稠的特性，但是卻不溶於水，因此限制了澱粉的應用範圍（陳，1998）。

澱粉水解產物於食品工業之應用，主要是作為甜味劑，以取代傳統上所使用的砂糖。目前主要是以生產 DE42 的傳統麥芽糖漿為主，其主要成分中，除了約 35% - 45% 之麥芽雙糖外，尚有 20% - 25% 三醣（maltotriose），其餘則仍為高分子糊精。所以黏度極高，吸濕性也強（James, 1995）。澱粉水解的方法可使用酸水解及酵素水解兩種，酸水解由於在酸鹼度低、溫度較高的條件下隨意作用，因此在一定轉化條件下，很難控制水解糖之大小分佈。酵素作用擁有很高的特異性及選擇性，可減少不必要的副產物生成，且其反應溫和，可減輕對產品的破壞。以澱粉為原料，利用酵素水解所得之產品如圖十五所表示（賴和劉，1996）。

澱粉水解分為兩個步驟，即液化作用（Liquefaction）及糖化作用（Saccharification），前者為高溫下於 80 - 105 左右加入 α -澱粉使澱粉分解成糊精，後者則是將液化所得之糊精在 40 - 60 加入 β -澱粉及去支鏈酵素作用最後形成麥芽糖。



圖十五、澱粉以酵素作用可得之產物 (黃和曾, 1997)

Fig 15. Products of starch by enzyme reaction(Huang and Tseng, 1997)

(一) α -澱粉

在一般工業化生產所操作澱粉含量約在 30-40%，黏度相當高，造成操作上困難，因此必須予以液化來降低黏度。一般用於澱粉液化的酵素為 α -澱粉，為一種內切酵素 (endo-amylase) (Dettori-Campus *et al.*, 1992; Nigam and Singh, 1995)。 α -澱粉除了可以降低黏度外，亦會讓澱粉產生部分水解，以避免澱粉液冷卻後有沈澱生成。通常在液化程序裡會加入鈣離子，以增強 α -澱粉的活性。 α -澱粉可由 *Bacillus licheniformis*、*B. amylolofaciens*、*B. stearothermophilus*、*Aspergillus niger*、*A. oryzae* 及 *Rhizopus oryzae* 等微生物發酵產生 (Beatriz *et al.*, 1996)。

(二) β -澱粉

生產麥芽糖漿時，需加入 β -澱粉於液化過的澱粉液中，以產生麥芽糖。 β -澱粉為外切酵素 (exo-amylase) 會自澱粉分子之非還原端由外而內漸序催化分解 (Sopanen and Lauriere, 1989)。其普遍存在於高等植物特別是在發育中的種子或發芽的塊莖中表現 (Boyce and Volenec, 1992)，但也有存在於細菌，如：*Bacillus megterium*、*B. circulans*、*B. polymixa*、*Pseudomonas sp.*和 *Streptomyces sp.*。其主要商業化來源是大麥、黃豆或小麥，而反應通常需要有鈣離子及游離硫氫基存在才會有催化活性。

在生產麥芽糖漿時，液化需要在約 100°C 下進行而糖化約在 60°C，但一般工業上用於液化和糖化的澱粉分解酵素不耐高溫 (Gashaw and Amare, 1999)。因此酵素若能耐高溫必可經濟化工業製造澱粉衍生物的程序，近幾年來許多耐高溫的澱粉分解酵素及其基因 (包括普魯南糖 α -澱粉等) 已由各種耐高溫的細菌分離出 (Dong *et al.*, 1997a,b)，例如：

從 thermophilic *Bacillus* sp. 中分離純化出的 α -澱粉 可耐 75-80℃，且在 80℃ 下作用 4 小時仍具有 50% 以上之活性 (Gashaw and Amare, 1999)。且中研院蕭介夫博士已成功將耐熱普魯南糖 α -澱粉 轉殖至水稻種子中表現 (江, 1998)。同時，若糖化酵素也為耐高溫更可增加在加工處理時之效率，目前已成功分離純化的 α -澱粉 有 *Thermoactinomyces* sp. V4。其最適溫度為 70℃ (Zhou and Zheng, 1991)。Clostridium thermosulphurogenes 純化 α -澱粉 最適溫度為 75℃ (Shen et al., 1988)。

二、植物基因轉殖

植物基因工程 (plant genetic engineering) 屬植物生物技術的範疇，其以植物細胞為對象，借外源基因 (foreign gene) 的轉殖 (transformation)、整合 (integration)、表現 (expression)，對目標細胞的遺傳物質進行修飾及改造，進而達到改良植物的遺傳性狀或獲得有用的基因產品。植物基因轉殖技術 (gene transfer) 是指將外來基因 DNA 轉殖到植物細胞內，藉此來研究基因的功能及其調控機制，其中最普遍的是利用農桿菌 (*Agrobacterium*) 媒介之基因轉殖、原生質體直接導入之基因轉殖、基因槍或粒子槍直接導入的轉殖、電壓穿孔導入法 (electroporation) 和基因對胚珠或生殖細胞之直接注射轉殖等。但由於原生質體分離過程繁瑣且再生不易，因此目前使用較多的為農桿菌法和基因槍或粒子槍轉殖法。

(一) 農桿菌轉殖系統

在進行基因轉殖時，常需要一種媒介，將一物種內的優良基因轉移到另一物種的基因組中。有一種常被利用做為媒介的，就是農桿腫瘤菌，或稱為農瘤桿菌 (李和劉, 1994)。農桿菌屬 (*Agrobacterium*) 為革蘭氏陰性 (gram-negative) 桿菌，屬於 Rhizobiaceae 科，是土壤中常見的病原菌。

依據他們的致病特性，可將其分類為：農桿腫瘤菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)，能誘發植物產生冠狀腫瘤；農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)，致使植物產生毛狀根群 (徐和黃, 1995)。而農桿腫瘤菌為一種能寄生在植物組織上的微生物，此細菌可將自己細胞內 DNA 一小段，轉移到植物的細胞中。藉此，可先將一組基因誘導至此細菌細胞的一片 DNA 片段上。此片段可稱為 T-DNA (即 transfer DNA)。當此細菌感染植物時，這些 DNA 片段就可接在被感染植物細胞的染色體上。因而導致細胞產生高量的植物荷爾蒙。這種荷爾蒙可導致植物形成一些特異的組織，諸如腫瘤或豐厚的根組織。這些組織均能提供農桿腫瘤菌一個優良的生長環境和豐富營養 (李和劉, 1994)。

而農桿菌轉殖系統乃是利用 *Agrobacterium* 菌體內 Ti 質體上的 T-DNA 會插入植物染色體內的原理達到基因轉殖的目的 (Chilton *et al.*, 1977)。其嵌入植物染色體組中約為以下步驟：1. 農桿菌染色體上的 *chvA* 及 *chvB* 基因表現，使農桿菌可附著植物傷口細胞之細胞壁上結合位置 (Douglas *et al.*, 1985; Matthyse, 1983; Matthyse, 1987; Thomashow *et al.*, 1980) 2. 受傷的植物細胞釋放出酚類物質 acetosyringone (AS) (Hooykaas and Beijersbergen, 1994) 3. AS 與農桿菌細胞膜上的 VirA 蛋白結合促成 VirG 蛋白被磷酸化而成有活性的 VirG 蛋白 (Jin *et al.*, 1990a) 4. 有活性的 VirG 蛋白是個轉錄促進子，能結合到其他 *vir* 基因啟動子上，促使其他 Vir 蛋白的表現。5. VirE2 蛋白與 T-strand 形成穩定 T-complex (Christie *et al.*, 1988) 6. VirD2 蛋白可辨認 T-DNA 的兩端，並予以切割 (Rossi *et al.*, 1993) 7. T-complex 進入植物細胞，並嵌入染色體組中。8. T-DNA 中 *onc* 基因表現，致使植物體內賀爾蒙不平衡而產生腫瘤 (Koncz *et al.*, 1989)。

(二) 農桿菌轉殖效率之影響因素

有許多因素會影響到轉殖效率，目前大致分為三大因素，包括農桿菌因素、植物因素和環境因素，現在分述如下：

1. 農桿菌因素

農桿菌的因素除了 *vir* 基因的活化外，感染時之菌數也是其中一項影響因素。Grimsley 等人 (1986) 在作玉米 agroinfection 時，發現每微升中若有一百萬個細菌，則轉殖效率可達到 82 %。在轉殖實驗中，以抗生素除去農桿菌之前，植物組織與農桿菌共同培養的時期大都是二至三天。雖然延長共同培養的時間可能提高轉殖效率，但過度生長之農桿菌卻會成為另一影響因素。因為從農桿菌依附在植物細胞上，*vir* 基因的活化及 T-DNA 的轉移是需要一段時間，而促使此階段之最短時間即成為一項限制因素。

農桿菌的寄主範圍則是決定於菌系原本 Ti 質體的類別(Thomashow *et al.*, 1980)，其相關的主要基因是位於 T-DNA 上而不是 *vir* 基因區域中 (Hoekema *et al.*, 1984)，McCormick 等人 (1986) 證實蕃茄之轉殖效率會因農桿菌內所帶之 Ti 質體類別而有所影響。在油菜轉殖中，菌系也會影響轉殖效率(Holbrook and Miki, 1985)，試驗結果顯示油菜對於 nopaline 菌系之農桿菌有反應，而 octopine 系則無反應，原因是 nopaline 菌系含有 *tzs* 基因，在菌體內會合成 *trans-zeatin* 而增進轉殖植物的再生效率。

2. 植物因素

近幾年來研究指出，*vir* 基因的活化實是此轉殖系統的關鍵之一，其中促使 *vir* 基因活化的植物因素即為酚類化合物代謝。單子葉植物於感染期間，其傷口處並不會生成訊息物質（如菸草的植物訊息物質 AS）或僅

生成微量之酚類訊息物質或有抑制 *vir* 基因活化的物質產生 (Sahi *et al.*, 1990)。因此可利用保育培養 (nurse culture) 提升轉殖效率，以菸草為保育培養之中間感染源即是成功的例子，這種方法應用之原因乃是因菸草會釋出高量的酚類訊息物質，促使 *vir* 基因活化，所以增進了 T-DNA 的轉移。而以先經馬鈴薯塊莖共同培養後之農桿菌感染單子葉薯芋，亦可成功使之形成腫瘤 (Schafer *et al.*, 1987)。

除了上述之因素外，植物基因型、接種部位及株齡也會影響轉殖效率。例如幼嫩組織對於農桿菌的反應較成熟組織來的敏感 (Charest *et al.*, 1989)，而容易再生的組織也是優良的接種材料，如馬鈴薯以塊莖、大豆、蕃茄以子葉、油菜以下胚軸中間部位最好。馬鈴薯之塊莖可由轉殖處直接再生成植株，而不必經過癒合組織之階段，更縮短了轉殖時間。

3.環境因素

環境因素對於整個系統之影響，嚴格地說應是菌體或植物或兩者對環境因素所產生之生理反應。而 AS 存在狀態下，不同菌系對於 pH 值的感受性也不同，而且在不同植物物種的情形下，並沒有一定的準則 (Godwin *et al.*, 1991)。幾種影響轉殖效率的因素，包括光照、更換培養基的頻率等。在油菜轉殖中，接種後之組織在光照下，其直接長成植株的效果比黑暗中好。不過一般轉殖癒合組織的生成在弱光下效果較好。經常更換接種過之組織至新的篩選培養基中，對於轉殖組織的增生及再生有所助益。將存活之組織移出，常可確保這些組織快速生長分化。可能的原因是被篩選物(如 kanamycin) 殺死組織，會釋出了一些有毒物質影響組織的存活。另外生體外培養材料，其瓶內聚集的乙烯也可能影響轉殖癒合組織的再生。

(三) 組織培養再生系統建立

組織培養 (tissue culture) 即是生物技術一環，主要是利用植物各部位之器官、組織及細胞當培養材料，稱為培植體 (explant)，在無菌的環境下，提供無機鹽類、碳源、有機成分及生長調節物質等，並控制溫度及光線等環境因子，促使培植體大量增生、分化及再生成小植株 (plantet)。經轉殖之受體在組織培養中，一方面恢復其生長優勢，並配合具可篩選的標誌基因，即可在培養過程中提供先期篩選，除此之外還扮演著轉殖前植物受體的提供及轉殖後細胞的維持及再生植株的培育 (蘇, 1999)。

三、高麥芽糖漿之特性

以傳統的方法製備麥芽糖糖漿繁瑣且費時，但現在由於酵素技術的突破，且因應現代化食品加工之特殊要求，可將傳統麥芽糖糖漿中的雙糖含量提高至 70 % 以上稱之為高麥芽糖糖漿。因為麥芽雙糖是可結晶糖，但甜度稍低為蔗糖得三分之一左右外，其餘物理性質均類似蔗糖，這種高麥芽糖糖漿中因已去除大部分的高分子糊精，所以黏度不高，也較不吸濕，而且尚有許多蔗糖所沒有的特殊加工特性 (陳, 1996)。

麥芽雙糖在食品加工上具有以下之特性：麥芽雙糖的結晶相當穩定，在廣泛的相對濕度下，可吸水達 10% 12 % 左右便呈平衡狀態而不再吸濕，因此所製出的糖果不會黏包裝紙，保存期限可延長 2 3 倍、麥芽雙糖的乳化效果佳，可吸收自身重量 30% 50 % 之油脂，乳化及保香能力較糊精強、在酸性下十分安定，即使在 pH = 3, 120 °C 下加熱 90 分鐘亦不被水解，因此可使糖果在高溫下加工、麥芽糖為製造麥芽糖醇 (Maltitol) 之前驅物，麥芽糖醇具有非發酵性、低熱量、不具還原基、保濕性好、耐熱性及耐酸性高，因此可防止蛀牙、防發胖、不會進行梅納反應、不結晶、

可作為安定劑等優點，可使食品品質良好，而適用於食品工業上（陳, 1996；張, 1975；邱, 1977）。

參、材料與方法

一、試驗材料

(一) 材料

1. 轉殖之目標基因

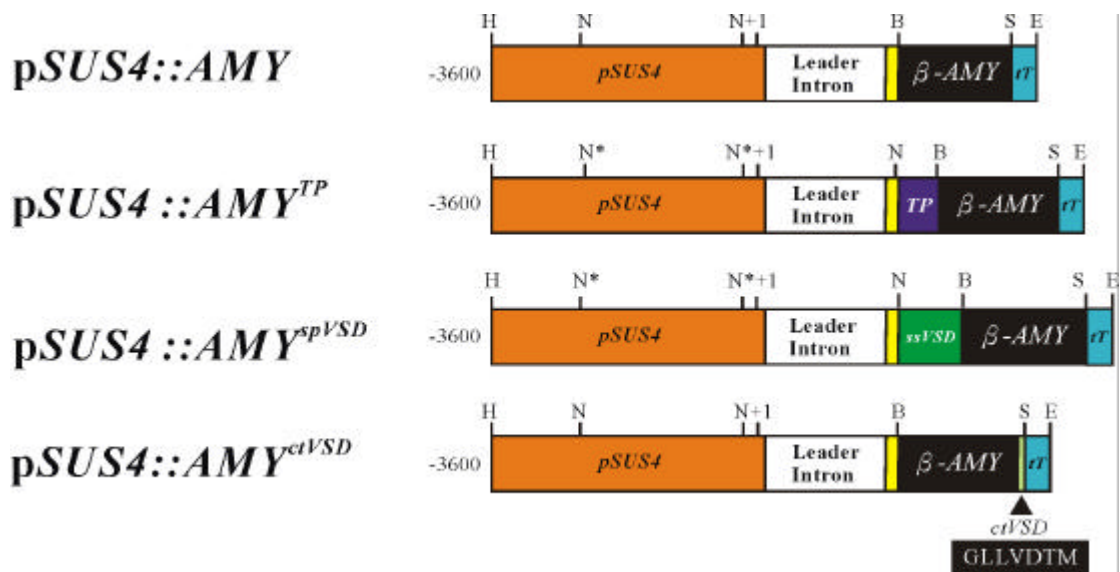
本實驗利用由蕭介夫博士提供來自 *Thermoanaerobacter thermo-sulfurigenes* 的 -澱粉，再由符宏勇博士建立利用各式 SUS4 基因之啟動子構築四種耐熱澱粉分解基因之轉殖建構(ptAmy, ptAmy-sp, ptAmy-ct 及 ptAmy-tp)，預定分別定位表達於細胞質、造粉體/amyloplast 及液泡等不同之胞器內(如圖十六)。

2. 轉殖所用之培植體

選自以組織培養之馬鈴薯克尼伯植株，作為本次轉殖材料。以單葉莖節利用 CM 培養基做繼代培養，待其生長約為 1 個月，取其葉片作為轉殖所需之材料(圖十七)。

(二) 試藥

1. Bio-rad 公司：40 % acrylamide / Bis solution , protein assay
2. Duchef 公司：Ticarcillin / clavulanic acid (Timentin)
3. GibcoBRL 公司：alpha-Naphthaleneacetic acid , Murashige & Skoog Salt mixture .
4. MDBio 公司：kanamycin , Streptomycin
5. Sigma 公司：acetosyringone , Dimethyl sulfoxide (DMSO)
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), maltose,2-mercaptoethanol,
myo-inositol , nicotinic acid , thiamine HCl , trans-Zeatin riboside , Tris



圖十六、各式 澱粉 基因之轉殖建構

Fig 16. Constructs of amylose gene.



圖十七、未經轉殖之馬鈴薯幼苗

Fig 17. Non-transformed potato seedling.

(hydroxymethyl) aminomethane, potassium sodium tartate , pyridoxin
HCl .

6. 日本和光株式會社 : soluble starch

二、試驗方法

(一) 農桿菌轉殖馬鈴薯之方法

1. 農桿菌轉殖

在第一天時把質體 DNA (ptAmy、ptAmy-sp、ptAmy-ct 及 ptAmy-tp) 利用電激穿孔法轉殖入農桿菌內。將構築好的質體 DNA 濃度約為 200 ng / 2 μ l 加入已分裝好 100 μ l 勝任細胞中，以微量吸管吸入菌液至半量塑膠比色管 (cuvette) 中。利用 Bio-Rad Gene Pulser (R450) 以電激穿孔法 (2.5 kV , 25 μ Fd , 200 ohms) 方式將質體 DNA 送入農桿菌勝任細胞中。加入 0.8 ml LB 液態培養基，於震盪培養 1~2 小時後，在含有 250 mg / ml 鏈黴素及 100 μ g / ml 卡那黴素 (kanamycin) 的 M9 培養基 (附表三) 上塗 50 μ l 之菌液，於 28 $^{\circ}$ C 培養 4 天。

第 4 天在 M9 培養基上挑選單一菌落培養在含有 250 μ g / ml 鏈黴素及 100 μ g / ml 卡那黴素的 M9 液態培養基中於 28 $^{\circ}$ C 震盪培養 2 天。在農桿菌轉殖的第五天，準備轉殖所需之培植體。將馬鈴薯植株的葉片切下，切成約 0.1 cm 寬的大小，培養在 H.H. 培養基 (high hormone medium) 上，備用。第六天，將 M9 液態培養基中的菌液取 100 μ l 至 5 ml LB 液態培養基中 (250 μ g / ml 鏈黴素 , 100 μ g / ml 卡那黴素及 20 μ M Acetosyringone) 於 28 $^{\circ}$ C 震盪培養 18 小時。第七天做 cocultivation，將培養好的菌液用含有 20 μ M Acetosyringone 的 MS30 液態培養基稀釋至 OD₆₀₀ = 0.01，再將 H.H 培養基上的葉片與稀釋好的菌液均勻混和 10 分鐘，把

葉片利用滅菌過的衛生紙巾吸乾菌液，將葉片背面朝上培養於 LSR1 培養基上。

2.馬鈴薯再生系統建立

第 9 天，將 LSR1 上的葉片轉移至 LSR1 / KT 的培養基上，之後每兩個星期換一次培養基，依次為 LSR2、LSR3、LSR4（成分列於附表四）。等到 LSR4 中的癒傷組織有莖或葉形成時，將整個癒傷組織培養在 LSR4 / KT 的生長盒內，使莖充分生長，待植株發育良好時，將癒傷組織上所長出的植株分出並命名，培養在 CM / KT 的培養基中。最後在由 CM / KT 所生長完全之植株以一片葉子為一節，切出後培養在 MT / KT 的培養基上，約 3 星期後即會有馬鈴薯微塊莖形成，此微塊莖為分析酵素活性用。

另外，將未進行轉殖的馬鈴薯植株，同樣的以一片葉子為一節，切出後培養在 MT 的培養基中，約 3 星期便會產生微塊莖，此未轉殖的對照組。

（二）粗酵素液之萃取

1. 馬鈴薯微塊莖中 -澱粉 的抽取

將我們所誘導出的馬鈴薯微塊莖（ potato microtuber ）以醋酸-醋酸鈉緩衝溶液（ 0.1 M ,NaOAc , pH 4.8, 10 mM CaCl₂ , 1mM DTT ,1mM PMSF ）進行粗酵素液之抽取。

將微塊莖由植株上取下並秤重，利用液態氮將其磨成粉末，加入醋酸-醋酸鈉緩衝溶液（依照微塊莖之重量：緩衝溶液 = 1 : 2 ），在室溫下混和均勻攪拌 1 小時，在 21000 ×、g 4 離心 5 分鐘，取其上層液即為粗酵素液。

2.蛋白質濃度測定

將 Bio-ray 的蛋白質分析反應劑 (protein assay reagent) 稀釋 5 倍後 , 取 1 ml 的試劑與 5 μ l 待測之蛋白質樣品混和均勻。靜置 5 分鐘 , 測其 595 nm 波長之吸光值。

另取不同濃度之 BSA (0、4、8、16、32 μ g / ml) , 經上述反應後測其 595 nm 波長之吸光值 , 製作標準曲線並由曲線換算樣品之蛋白質濃度。

(三) 分析轉殖株中 α -澱粉 活性方法之建立

1. 重組蛋白質的抽取 (Jankenecht *et al.*, 1991 ; Hoffmann *et al.*, 1991)

將由蕭介夫博士實驗室所構築可在細菌表現的 α -澱粉 表現載體轉形到細菌宿主 BL21 後 , 接種至 LB / CARB agar plate 上 , 37 $^{\circ}$ C 培養 18 小時後 , 用無菌牙籤挑一個單一菌落到 5 ml LB / CARB , 置於 37 $^{\circ}$ C 培養 16 小時 , 取 1 ml 的菌液 , 接種至新的 50 ml LB / CARB 約 3-4 小時後 , 當 OD₆₀₀ 達 0.6-0.8 時 , 加 200 μ l 0.1M IPTG , 25 $^{\circ}$ C 培養 7 小時後 , 以 7000 \times g 離心 15 分鐘 , 將菌液沈澱下來 , 加入 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.0, 含有 2 mM EDTA) , 再加入 50 μ l lysozyme 使其最終濃度為 100 μ g / ml 和 0.5 ml 1% Triton X-100 , 在 30 $^{\circ}$ C 振盪均勻 15 分鐘 , 於冰上進行超音波破碎菌體細胞 (XL-2020 SONICATOR-output level 4) , 程式設定 : on 10 seconds , off 10 seconds 進行 30 秒。收集破碎菌體 , 於 4 $^{\circ}$ C 18000 \times g 離心 15 分鐘 , 收集上清液 , 此即為 *E. coli* BL21 α -澱粉 的粗酵素液。

2. SDS-PAGE 電泳

配製 7.5% 之分離膠和 4 % 之聚集膠 (附表一) , 利用迷你電泳系統 (Bio-rad , Versatile mini-protein 3 electrophoresis cell) , 以 pH8.3 的 Tris-glycine 之電泳緩衝溶液 , 固定電壓 100 伏特進行電泳約 1 小時。電泳完畢後 , 利用 Coomassie brilliant blue R-250 染色 1 小時後 , 再脫色 2-3

小時，標準品 B 如附表二(b)。

3.最適反應溫度之測定

E. coli(對照組)和 *E. coli* 之粗酵素液各取 50 μ l 再加入澱粉受質 150 μ l 放在 30、37、50、60、70、80 加熱 1 小時，加入 DNS 試劑測定酵素活性。利用溫度和酵素活性做圖，找出此重組蛋白之最適溫度。

4.溫度穩定性測定

將 *E. coli* 之粗酵素液、未含重組蛋白之 *E. coli* 之粗酵素液和未經轉殖植株之粗酵素液，在 60 下，分別加熱 10、20、30、40、50、60、90 和 120 分鐘後，再加入 150 μ l 受質在 60 反應 1 小時，加入 DNS 試劑測定酵素活性。利用時間和酵素活性做圖。

5. Km 值

利用 0.3 1.5 % 不同受質濃度和酵素反應，以受質濃度之倒數和酵素比活性之倒數做圖，求 Km 值。

6.活化能

取酵素液 50 μ L，以 1.0% 澱粉溶液 1.0 μ L 為基質，於 30~80 不同溫度下測定 -澱粉 活性，並用絕對溫度之倒數和 logK 做圖。酵素催化反應之進行，可使活化能下低加速反應之進行，反應之速率常數、活化能及溫度之間關係可以 Arrhenius 方程式表示：

$$\log k = \log A - E_a (1 / T) / 2.3R$$

速率常數與 V_m 成正比，於不同溫度下測定酵素反應之 V_m ，以 $\log V_m$ 對絕對溫度倒數作圖。

(四) 轉殖植株 -澱粉 活性之測定

1.還原糖之去除

將粗酵素液放在透析膜 (Spectra / Por ® molecular porous membrane tubing, MWCO : 12~14,000) 中做透析，去除掉原本酵素液中之還原糖。取粗酵素液放在透析膜中，每隔一小時測定一次粗酵素中還原糖之含量，並以時間對還原糖含量做圖。

2.轉殖株中耐熱 -澱粉 活性測定

以可溶性澱粉 (soluble starch) 為基質，加入粗酵素液，經澱粉水解後，釋放之還原糖量以 2-硝基水楊酸 (DNS) 呈色定量之，計算酵素活性，1 單位酵素活性 (unit) 係指在測定條件下每分鐘產生相當 1 μ mole 麥芽糖之酵素量。

取 150 μ l 1.0% 可溶性澱粉 (溶於水) 於 60 預熱 5 分鐘。加入 50 μ l 的酵素液 (先在 60 加熱 20 分鐘)，混和後於 60 分別反應 0 和 1 小時。反應後加 100 μ l DNS 試劑，在 100 水浴加熱 5 分鐘，冷水浴冷卻加入 1 ml 水，測定 540 nm 吸光值。

另取 200 μ l 濃度在 0 5 μ mole / ml 之麥芽糖溶液，以 DNS 呈色法製作麥芽糖校正曲線，由校正曲線換算產生之麥芽糖量並計算酵素活性。

3.轉殖株溫度穩定性測定

將所篩選出之轉殖株和未經轉殖植株之粗酵素液，在 60 下，加熱 10、20、30、40、50、60、90 和 120 分鐘後，再加入 150 μ l 受質在 60 反應 1 小時，加入 DNS 試劑測定酵素活性。利用時間和酵素活性做圖。

肆、結果與討論

一、農桿菌轉殖之結果

在轉殖過程中，在培養基中添加抗生素（kanamycin）來篩選經轉殖的培植體（ptAmy、ptAmy-sp、ptAmy-ct 及 ptAmy-tp）是否有成功的轉殖，成功轉殖的癒傷組織會呈現綠色（圖十八），未轉型成功的癒傷組織則會呈現淡黃色，若持續繼代培養至新培養基上時，未經轉殖成功的植株會呈現白化的現象，這是因為為轉殖成功之植株不具有抗抗生素之能力，所以無法生長良好。因此，在組織培養的階段，可利用培養基來初步篩選癒傷組織，如此可避免日後大量分析再生植株是否為轉殖植株的困擾。

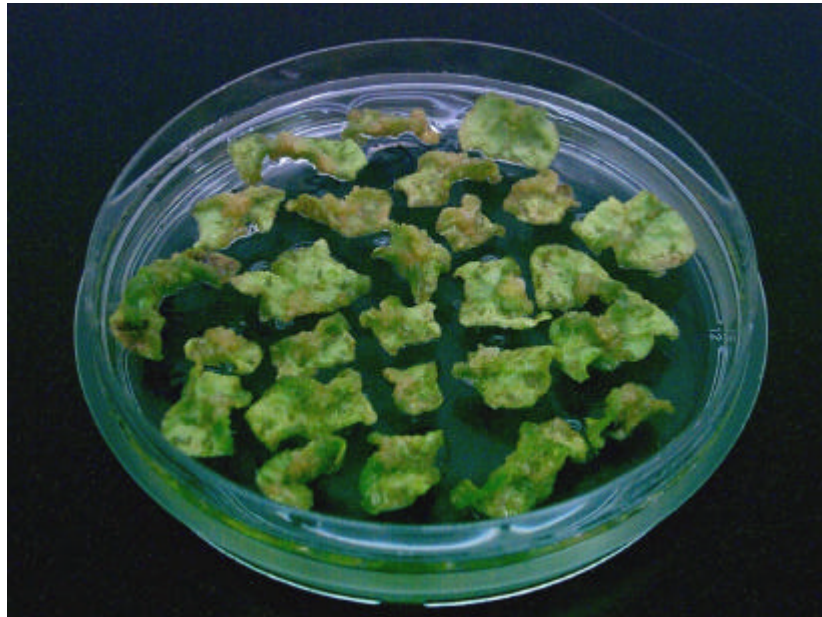
在不同時期於培養基內所添加的不同濃度的植物生長調節劑來誘發癒傷組織形成不同組織，LSR1 到 LSR3 之階段，培養基中添加 NAA 可加速細胞的分裂，葉片上只形成癒傷組織，至 LSR4 的階段時，生長良好的癒傷組織會開始有莖和葉分化的情形，最後在用高濃度的碳源誘導植株形成微塊莖（圖十九、二十），完成再生植株系統之建立。

表九為目前所培養各種植株的階段，在 ptAmy 和 ptAmy-sp 已有完整的系統，因此，可繼代培養維持植株數目及微塊莖的生長。而在 ptAmy-ct 和 ptAmy-tp 兩种植株則還在生長的階段，待其植株生長良好後，再分株至 CM / KT 新培養基上。

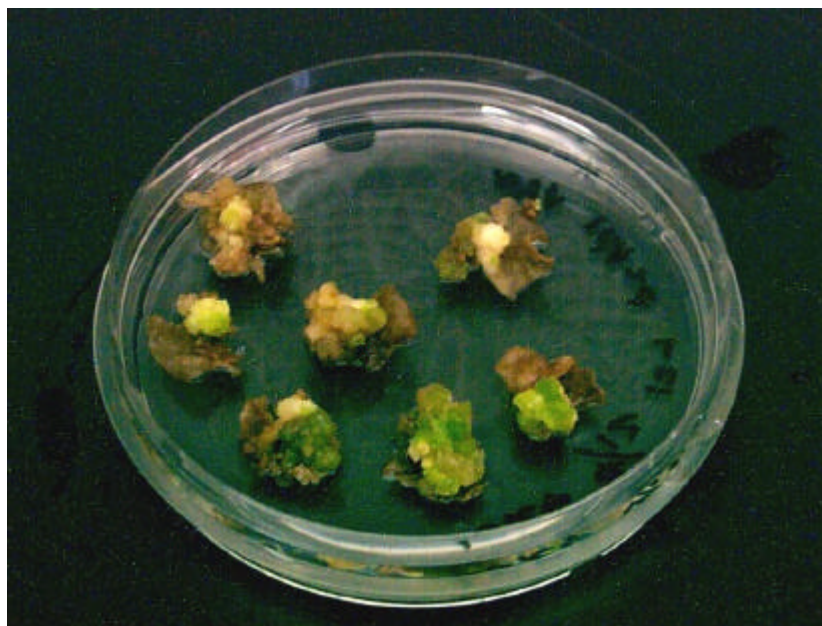
二、耐熱澱粉 植株之表現

（一）*E. coli* BL21 耐熱澱粉 之表現

原始耐熱 -澱粉 是存在於 *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*，其最適催化溫度為 75 80 。一個 1.5 kb 大小的 *T.*



(a)



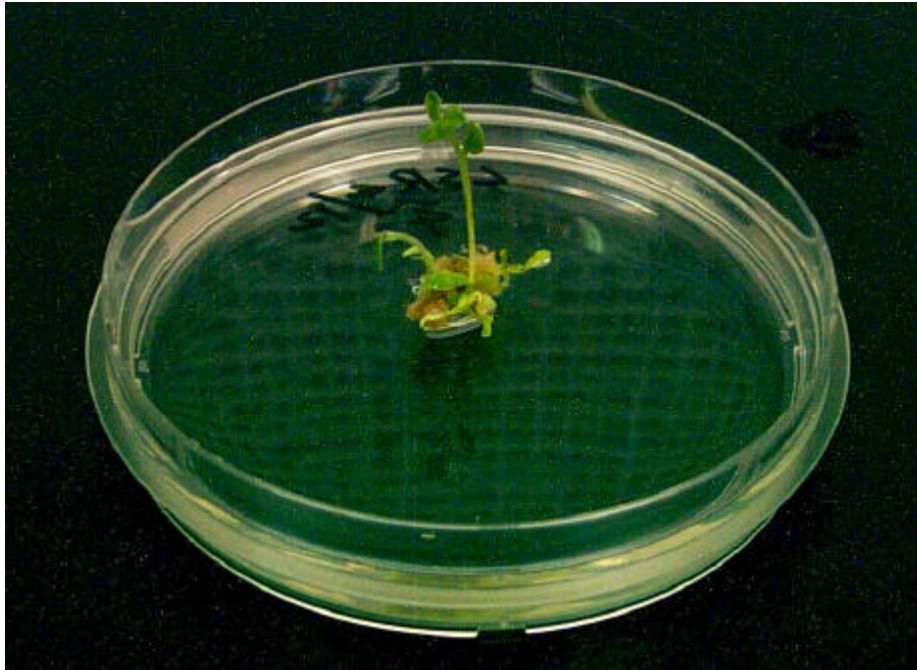
(b)

圖十八、轉殖過程中癒傷組織之篩選

馬鈴薯葉片在 LSR 2 培養基(a)馬鈴薯葉片在 LSR 4 培養基(b)

Fig 18. Screening of calli on medium in transfection.

Potato leaves in LSR2 medium(a), Potato leaves in LSR4 medium(b).



圖十九、在 LSR4 培養基上癒傷組織形成植株

Fig 19. Plantlet regeneraton form callus in the LSR4 medium.



(a)



(b)

圖二十、轉殖株 (a) 其及微塊莖 (b)

Fig 20. Transgenic plants (a) and microtubers (b).

表九、符宏勇教授實驗室現有轉殖株

Table 9. Summary of current transgenic potato lines in Prof. Fu's laboratory.

Construct	Growth		LSR4 box (shooting/callus)
	Strong	Weak	
ptAMY	-	-	3 / 7
ptAMY-2(4)	7	4	-
ptAMY-3(2)	5	2	-
ptAMY-4(3)	14	0	-
ptAMY-5(2)	7	2	-
ptAMY-6(1)	1	1	-
ptAMY-7(3)	13	0	-
ptAMY-sp	-	-	2 / 3
ptAMY-sp-1(4)	10	5	-
ptAMY-ct	-	-	12 / 26
ptAMY-ct-1(1)	1	0	-
ptAMY-ct-2(1)	1	1	-
ptAMY-tp	-	-	4 / 6

thermosulfurigenes -澱粉 cDNA 已藉 PCR 方法分離,將其表現在 *E. coli* BL21 (蕭介夫博士提供)。因此可先藉由萃取 *E. coli* BL21 之粗酵素液來瞭解耐熱 -澱粉 基因的表現情況。

分別利用不具有重組基因之 *E. coli* BL21 和不添加 IPTG 誘導之 *E. coli* BL21 兩組作為對照組。培養菌液並利用 Tris 緩衝溶液萃取出其粗酵素液,將蛋白質定量後 (20 mg / 12 μ l), 經電泳得到結果如圖二十一。結果中可明顯看出具有完整啟動子的 *E. coli* BL21 經由 IPTG 誘導後,可表現出重組蛋白,其分子量約為 81 KD 左右。因此,確定 *E. coli* BL21 可表現重組基因,以此菌體所萃取出之粗酵素液當作篩選植株酵素活性時的正對照組。

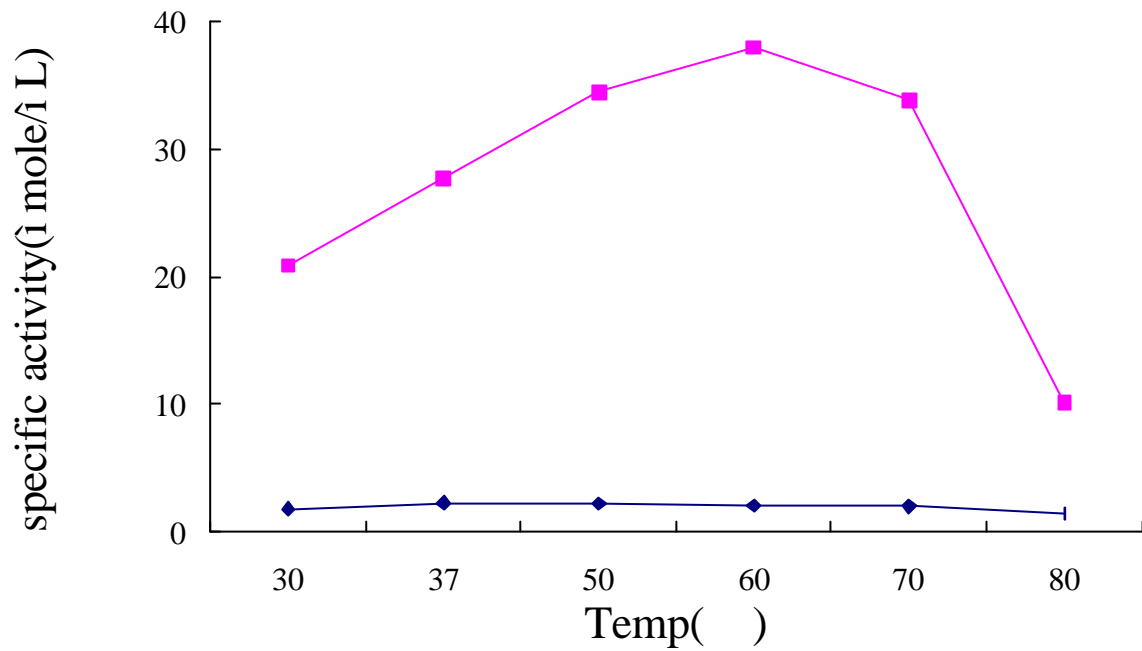
1. 最適反應溫度及粗酵素液之溫度穩定性

由圖二十二可得到, *E. coli* BL21 的 -澱粉 最適反應溫度為 60 。經由溫度穩定性的測試,發現其可在 60 維持約 1 個半小時的活性 (圖二十三)。在其他耐熱菌中,例如 *Aspergillus niger* 所分離出 -澱粉 的最適溫度為 70 、thermophilic *Bacillus* 中的 -澱粉 的最適溫則在 75 - 80 (Gashaw and Amare, 1999)。

2. Km 值與活化能

經迴歸後可得到方程式： $y = 0.0236x + 0.0073$ (圖二十四)。因此, *E. coli* BL21 中的 -澱粉 的最大反應速率為 137.0 μ mole / mL / min , 而 Km 值為 3.2%。

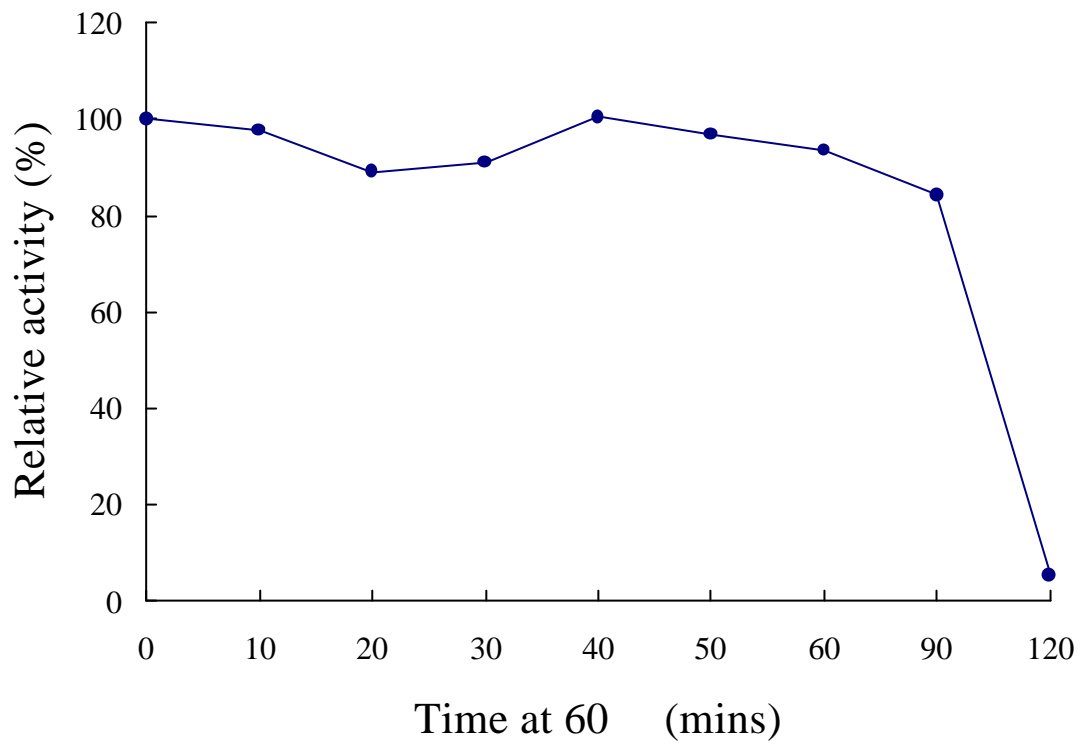
活化能由實驗結果可求得直線方程式： $y = -312.67x + 1.712$ (圖二十五), 由方程式可得活化能為 66.29 cal / mole。



() *E. coli* BL21 without recombinant protein, () *E. coli* BL21

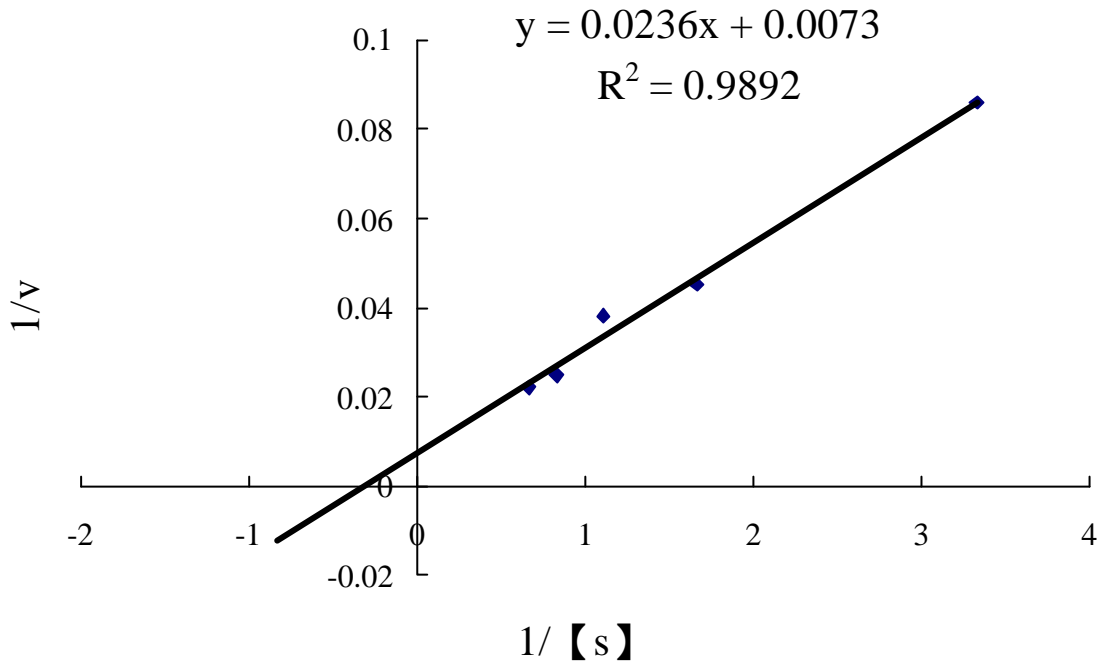
圖二十二、溫度對 *E. coli* BL21 中 α -澱粉 之影響

Fig 22. Effect of temperature on the activity of α -amylase from *E. coli* BL21.



圖二十三、*E. coli* BL21 α -澱粉 在 60 °C 之熱穩定性

Fig 23. Thermostability of α -amylase from *E. coli* BL21 in 60 °C .



圖二十四、*E. coli* BL21 之 α -澱粉 之 K_m

Fig 24. The K_m of α -amylase from *E. coli* BL21.

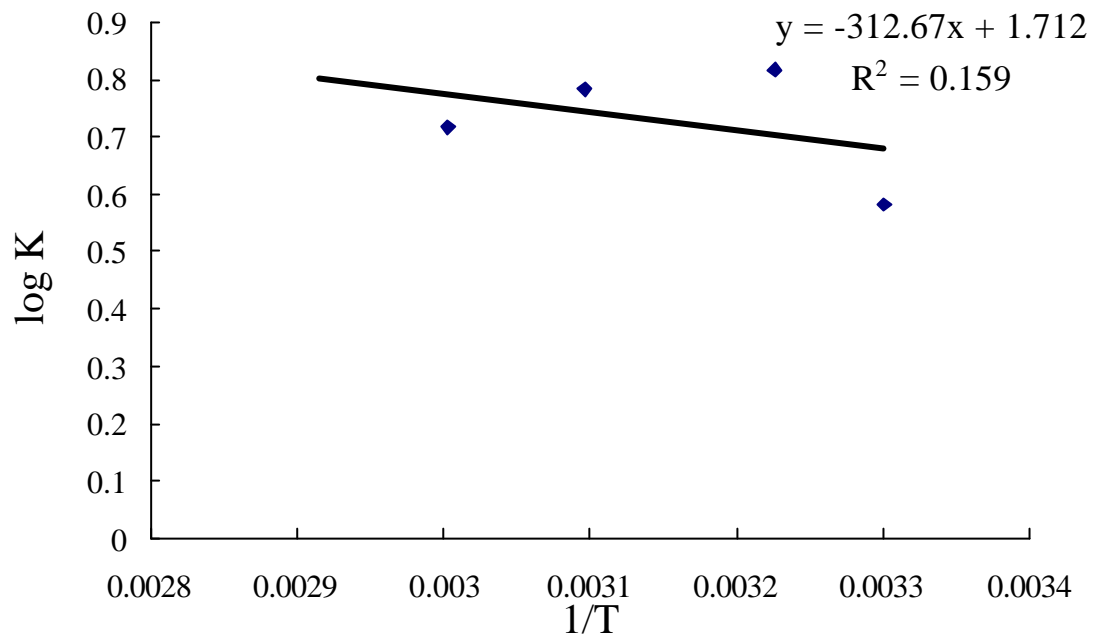
(二) 耐熱 α -澱粉 轉殖植株篩選

1. 干擾因子去除

在萃取馬鈴薯塊莖酵素液時發現塊莖中會含有還原糖，因此影響到測酵素活性時的準確性。利用透析的方式先去除塊莖中還原糖的含量，使轉殖株和未轉殖株的粗酵素液中的還原糖降到最低再測其酵素活性。結果中發現（圖二十六），轉殖株和未轉殖株的還原糖的量約在第 4 小時達到最低，在第 5 個小時則接近零。且由轉殖株和未轉殖株兩者還原糖的下降速率不同，可能是本身還原糖的組成有些許差異所導致，但此需要更進一步的實驗做確認。

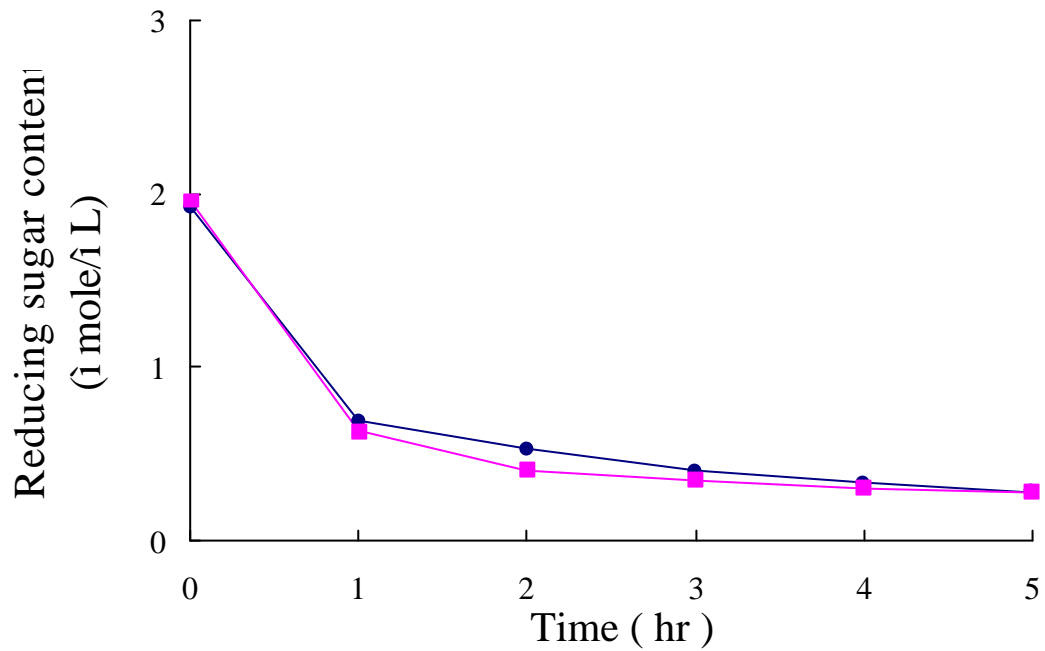
由於未經轉殖的植株內只含有內生性 α -澱粉 的酵素活性，而經由轉殖的植株中會同時具有內生性 α -澱粉 和耐熱的 α -澱粉 存在於植物體內，若要測轉殖株中的耐熱 α -澱粉，則必須先去除內生性 α -澱粉。因此，利用由 *E. coli* BL21 中所測定出的最適溫度來找出時間對酵素活性的關係。在圖二十七中可得到，未轉殖株中的酵素在經過 20 分鐘的加熱後，其酵素活性會趨近零，在 30 分鐘後則會完全測不到酵素活性；而 *E. coli* BL21 則在 60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 20 分鐘還是具有相當高的酵素活性。所以，可利用 60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 20 分鐘作為去除內生性 α -澱粉 的條件。

經由上述實驗可確定測定轉殖株中耐熱 α -澱粉 之方法，先將所萃取的粗酵素液做透析處理，將原本存在於塊莖中的還原糖去除，之後，將粗酵素液於 60 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 20 分鐘，再加入以預熱好之受質反應 1 小時。如此，可初步分辨轉殖株和未轉殖株之間酵素活性之差別。



圖二十五、*E. coli* BL21 之 α -澱粉 之活化能

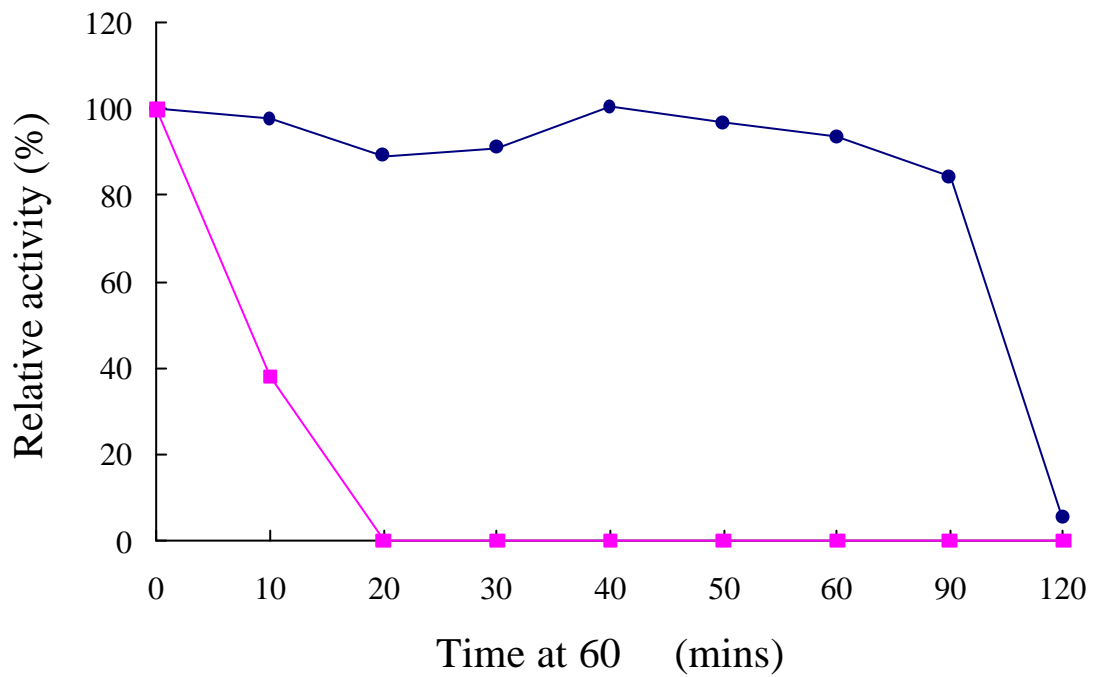
Fig 25. The activation energy of α -amylase from *E. coli* BL21.



(●) non-transgenic plant, (■) transgenic plant

圖二十六、馬鈴薯植株微塊莖 α-澱粉 粗酵素液中還原糖之去除

Fig 26. Removal of reducing sugar in crude α-amylase extract from potato microtubers.



(●) *E. coli* BL21, (■) non-transgenic plant

圖二十七、馬鈴薯微塊莖中內生性 α -澱粉 失活

Fig 27. Inactivation of endogenous α -amylase in potato microtubers.

2.耐熱 -澱粉 轉殖植株篩選之結果

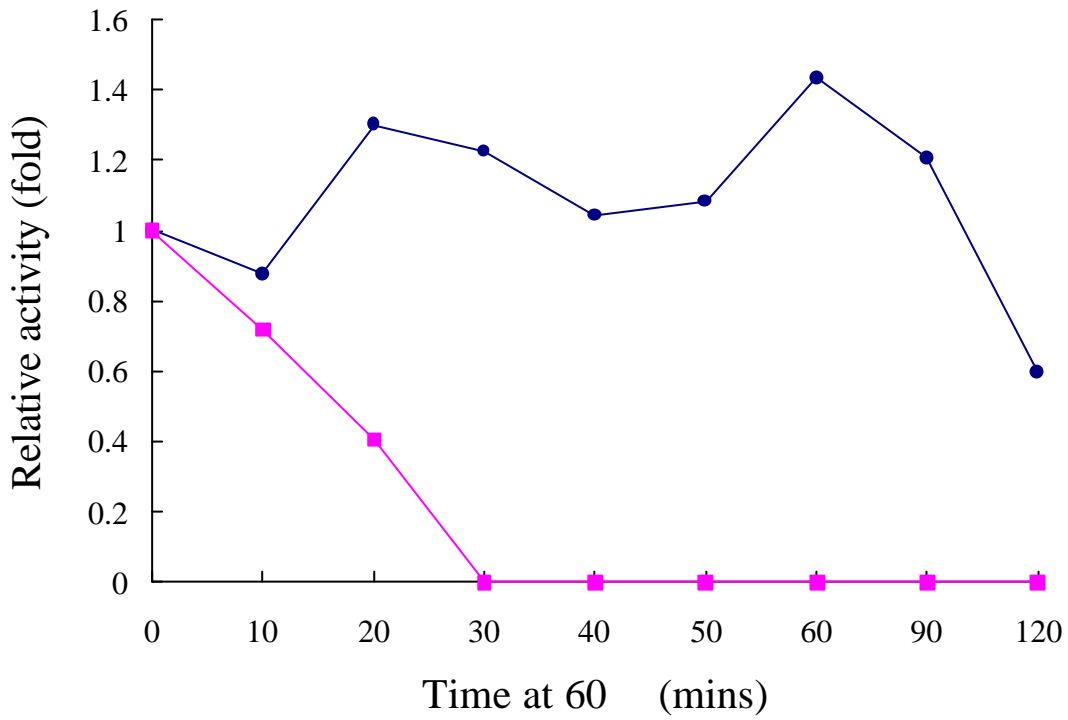
用上述所建立之分析方法篩選植株是否有轉殖成功。由結果顯示(表十), 在 ptAmy-sp 的植株中, ptAmy-sp 1E 有較高的酵素活性(比未轉殖株高 5 倍); 而在 ptAmy 的植株中, ptAmy 2A、ptAmy 5B 及 ptAmy 7F 有較高的活性。另外, ptAmy-sp 1K 和 ptAmy 2K 活性則不會很明顯。

再進一步分析 ptAmy-sp 1E 之溫度穩定性, 結果發現(圖二十八)其耐熱性和 *E. coli* BL 21 相似(如圖二十三), 皆可在 60 維持 1 個半小時以上之活性, 可確定植株轉殖成功。

表十、符宏勇教授實驗室現有轉殖植株 -澱粉 之測定

Table 10. Assay α -amylase in current of transgenic constructs in Prof. Fu's laboratory.

Construct	Amylase unit (μ mole / min)	Protein concentration (μ g / μ l)	Specific activity (μ mole / μ g)	Relative activity (fold)
No transformation	7.15	2.29	3.12	1.00
<i>E. coil</i> BL21	129.3	3.38	38.3	12.3
ptAmy-sp 1A	5.68	2.24	2.53	0.81
ptAmy-sp 1E	28.9	1.69	17.1	5.48
ptAmy-sp 1F	-	1.54	-	-
ptAmy-sp 1K	5.87	1.97	2.98	0.96
ptAmy 2A	7.77	1.15	6.75	2.17
ptAmy 2C	4.72	2.05	2.30	0.74
ptAmy 2H	6.73	1.90	3.53	1.13
ptAmy 2K	6.37	1.89	3.37	1.08
ptAmy 3A	-	1.85	-	-
ptAmy 4C	7.08	3.24	2.18	0.70
ptAmy 4E	-	2.64	-	-
ptAmy 5A	-	2.34	-	-
ptAmy 5B	9.40	1.34	7.02	2.25
ptAmy 6A	-	2.14	-	-
ptAmy 7A	-	1.22	-	-
ptAmy 7D	-	2.12	-	-
ptAmy 7F	8.00	1.57	5.10	1.64
PtAmy-ct 2	-	1.65	-	-



(●) ptAmy-sp 1E, (■) non-transgenic plant

圖二十八、ptAmy-sp 1E 轉殖株中耐熱 α -澱粉 在 60°C 之熱穩定性

Fig 28. Thermostability of α -amylase from ptAmy-sp 1E at 60°C.

五、結論

- 一、成功轉殖之癒傷組織呈現綠色，且經培養後可形成植株和微塊莖。
- 二、由 *E. coli* BL21 中所萃取之粗酵素液當作正對照組得到以下結果：利用 IPTG 的確可以誘導 *E. coli* BL21 中重組性蛋白的表現；且最適溫度為 60℃，粗酵素液可在 60℃ 維持一個半小時之活性，Km 值為 3.2%、最大反應速率為 137.0 $\mu\text{mole} / \mu\text{L} / \text{min}$ ，活化能為 66.29 cal / mole。
- 三、轉殖植株 -澱粉 的篩選條件為：先透析 4 小時，再將粗酵素液在 60℃ 加熱 20 分鐘後做酵素反應。
- 四、分析轉殖植株 -澱粉 活性時發現，只有 ptAmy-sp 1E、ptAmy 2A、ptAmy 5B 及 ptAmy 7F 有活性之表現，這可能是因為基因在植物體表達能力不高。
- 五、ptAmy-sp 1E 其耐熱性和 *E. coli* BL 21 相似，皆可在 60℃ 維持 1 個半小時以上之活性，可確定植株轉殖成功。

陸、參考文獻

- 江志明：利用水稻種子生產耐高溫的基因工程澱粉普魯男糖 以改進麥芽糖即高蛋白食品的製造。國立海洋大學水產生物技術研究所碩士論文 (1998)。
- 李文權、劉英杰：基因轉殖與作物育種。科學農業，42(11,12)：355~360 (1994)。
- 邱見人：由澱粉製造麥芽糖之技術及其應用。食品科學文摘，5：47~51 (1977)。
- 洪哲穎、邱俊彥、陳國誠、許文輝：利用 α -amylase 與 Isoamylase 進行澱粉水解反應之特性。中國農業化學會誌，29(1):54~60 (1991)。
- 徐善德、黃鵬林：農桿菌媒介轉殖法。中國園藝，41(4)：237~250 (1995)。
- 張銀泉：麥芽糖之製造及其在食品上之利用。食品科學文摘，3：29~36 (1975)。
- 陳俊成：澱粉水解產物之特性及應用。食品資訊，153：48~52 (1998)。
- 陳貞斐：高麥芽糖漿在食品加工中的應用。食品資訊，122：32~35 (1996)。
- 黃瑞美、曾仁佑：澱粉之理化性質與微粒結構。輔仁民生學誌，3(1)：115~130 (1997)。
- 賴進此、劉懷勝：澱粉酵素水解糖在食品工業之應用。食品工業月刊，5:8~22 (1996)。
- 蘇宗振：植物基因轉殖之研究。科學農業，47(3~4)：112~119 (1999)。

- 蘇遠志:機能性糖質甜味料的研究發展 生物產業, 2(2,3):135~152 (1991).
- M. B. Beatriz, P. Claudia, F. F. Laura and B. V. Francisco: Chromatographic methods for amylases. J. of Chroma. B., 684 : 217~237 (1996).
- P. J. Boyce and J. J. Volenec: Taproot carbohydrate concentration and stress tolerance of contrasting alfalfa genotypes. Crop Sci., 32 (3) : 757-761 (1992).
- P. J. Charest, V. N. Iyer and B. L. Miki: Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains with Brassica napus and Brassica juncea. Plant Cell Rep., 8 (5): 303~306 (1989).
- M. D. Chilton, M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Godon and E. W. Nester: Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cell: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell., 11:263~271 (1977).
- P. J. Christie, J. E. Ward, S. C. Winans and E. W. Nester : The *Agrobacterium tumefaciens virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associate with T-DNA. J. Bacteriol., 170 : 2659~2667(1988).
- B. G. Dettori-Campus, F. G. Priest and J. R. Stark: Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. Pro. Biochem., 27:17~21 (1992).
- G. Dong, C. Vieille and J.G. Zeikus: Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and

- biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Micro.*, 63 (9):3577~3584 (1997).
- G. Dong, C. Vieille and J.G. Zeikus: Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Micro.*, 63 (9): 3569~3576 (1997).
- C. J. Douglas, R. J. Staneloni, R. A. Rubin and E. W. Nester: Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J. Bacteriol.*, 161 : 850~860 (1985).
- R. Fischer and N. Emans: Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.*, 9(4~5):279~299 (2000).
- H. Fu and W. D. Park: Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell.*, 7 (9) : 1369~1385 (1995).
- H. Fu, S. Y. Kim and W.D. Park: High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell.*, 7 (9) : 1387~1394 (1995).
- M. Gashaw and G. Amare: Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable -amylases from a thermophilic *Bacillus*. *En. and Micro. Technol.*, 25: 433~438(1999).
- I. Godwin, G. Todd, B. Ford-Lloyd and H. J. Newbury: The effects of

- acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep.*, 9 (12) : 671~675(1991).
- N. Grimsley, B. Hohn, T. Hohn and R. Walden: "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA.*, 83 (10): 3282~3286 (1986).
- A. Hoekema, B. S. Pater, A. J. Fellingner, P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperoort: The limited host range of an *Agrobacterium tumefaciens* strain extended by a cytokinin gene from a wide host range T-region. *The EMBO J. European Mol. Bio. Organ.*, 3 (13) : 3043~3047 (1984).
- A. Hoffmann and R. G. Roeder: Purification of His-tagged protein in nondenaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Res.*, 19:6337~6338 (1991).
- L. A. Holbrook and B. L. Miki: Brassica crown gall tumourigenesis and in vitro of transformed tissue. *Plant Cell Rep.*, 4 (6) : 329~332 (1985).
- P. J. J. Hooykaas and A. G. M. Beijersbergen: The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 32 : 157~179 (1994).
- P. James, K. Kevin, D. B. Micheal and L. T. Jerry: Highly fermentable, high maltose, non-crystallizing starch conversion syrup. *Biotechnol. Adv.*, 13(2):310~311 (1995).
- R. Janknecht, G. D. Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Nordheim and H. G. Stunnenberg: Rapid and efficient purification of native histidine-tagged

- protein expressed by recombinant vaccine virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:8972~8976 (1991).
- S. Jin, R. K. Prusti, T. Rotisch, R. G. Ankenbauer and E. W. Nester: Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: Essential role in biological activity of VirG. J. Bacteriol., 172 : 4945~4950(1990a).
- C. Koncz, N. Martini, R. Mayerhofer, R. M. Kalman, H. Korber, G. P. Redei and J. Schell: High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86 : 8467~8471 (1989).
- A. G. Matthyse: Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. J. Bacteriol., 154 : 906~915(1983).
- A. G. Matthyse: Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 169 : 313~323 (1987).
- S. McCormick, J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, and R. Fraley: Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep., 5 (2) : 81~84 (1986).
- P. Nigam and D. Singh: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. En. and Micro. Technol., 17: 770~778(1995).

- L. Rossi, B. Hohn and B. Tinland: The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants. *Mol. Gen. Genet.*, 239 : 345~353 (1993).
- S. V. Sahi, M. D. Chilton and W. S. Chilton: Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87 (10) : 3879~3883 (1990).
- W. Schafer, A. Gorz and G. Kahl: T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature.*, 327 (6122) : 529~532 (1987).
- G. J. Shen, B. C. Saha, Y. E. Lee, L. Bhatnagar and J. G. Zeikus: Purification and characterization of a novel thermostable beta-amylase from *Clostridium thermosulphurogenes*. *J. Biochem.*, 254(3):835~840 (1988).
- T. Sopanen and C. Laurière: Release and activity of bound beta-amylase in a germinating barley grain. *Plant Physiol.*, 89:244~249 (1989).
- M. F. Thomashow, C. G. Panagopoulos, M. P. Gordon and E.W. Nester: Host range of *agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti plasmid. *Nature.*, 283 (5749) : 794~796 (1980).
- B. Y. Zhou and Y. X. Zheng: Studies on properties of thermostable beta-amylase from *Thermoactinomyces* sp. V4. *Chin J. Biotechnol.*, 7(2):145~152 (1991).

附表一、分離膠體和堆集膠體之組成

Appendix Table 1. The composition of separating and stacking gel.

Separating gel (7.5 %)	
Deionized water	4.45 ml
40 % acrylamide / bis	2.50 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.50 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

Stacking gel (4%)	
Deionized water	3.05 ml
40 % acrylamide / bis	0.67 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

附表二(A)、Bio-rad 標準品 A

Appendix Table 2 (A). Standard A from Bio-rad.

Protein	MW
Myosin	207000
-galactosidase	118000
Bovine serum albumin	81000
Ovalbumin	52500
Carbonic anhydrase	36200
Soybean trypsin inhibitor	29900
Lysozyme	20700
Aprotinin	7100

附表二(B)、 Bio-rad 標準品 B

Appendix Table 2 (B). Standard B from Bio-rad.

Protein	MW
Myosin	207000
-galactosidase	118000
Bovine serum albumin	81000
Ovalbumin	52500
Carbonic anhydrase	36200
Soybean trypsin inhibitor	29900
Lysozyme	20700
Aprotinin	7100

附表三、農桿菌轉型所需培養基之成分

Appendix Table 3. The composition of *Agrobacterium tumefaciens* transformation medium.

M9 plate (250 ml)	
composition	
H ₂ O	222.5 ml
Agar	5 g
10x M9 salt	25 ml
1 M MgSO ₄	0.5 ml
20% sucrose	2.5 ml
B1 (1mg / ml)	250 μl
1 M CaCl ₂	25 μl
Streptomycin (250 mg / ml)	250 μl
Kanamycin (100 mg / ml)	250 μl

M9 liquid (250 ml)	
composition	
H ₂ O	222.5 ml
Agar	5 g
10x M9 salt	25 ml
1 M MgSO ₄	0.5 ml
20% sucrose	2.5 ml
B1 (1mg / ml)	250 μl
1 M CaCl ₂	25 μl
Streptomycin (250 mg / ml)	250 μl
Kanamycin (100 mg / ml)	250 μl

附表四、植株再生使用之培养基成分

Appendix Table 4. The composition of medium used for plant regeneration.

Composition	Plant tissue culture medium (1 L)									
	H.H	LSR 1	LSR 1/KT	LSR 2	LSR 3	LSR 4	CM	CM/KT	MT	MT/KT
MS salt	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g	4.3 g
MS vitamins	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Surcose	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	80 g	80 g
Gelrite	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
NAA (1 mg/ml)	5 ml	100 μ l	100 μ l	20 μ l	-	-	-	-	-	-
ZR (1 mg/ml)	5 ml	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml	2 ml	-	-	-	-
GA ₃ (1 mg/ml)	-	10 μ l	10 μ l	20 μ l	20 μ l	10 ml	-	-	-	-
Timentin (300mg / ml)	-	-	0.5 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-	1 ml	-	1 ml
Kanamycin (100 mg / ml)	-	-	0.25 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	-	0.5 ml	-	0.5 ml
STS	-	-	-	-	-	667 μ l	-	-	-	-
6BA	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ml	10 ml

