

澱粉酶的性質及檢驗

澱粉酶是普遍存在於生物體的一種酶(酵素)，主要功用是將大分子的澱粉分解為小分子。在中學教學上常會討論到澱粉酶的性質及測定方法，茲介紹它的一般性質及簡易測定此酶存在的二種定性定量方法。

王月雲 國立臺灣師範大學生物系

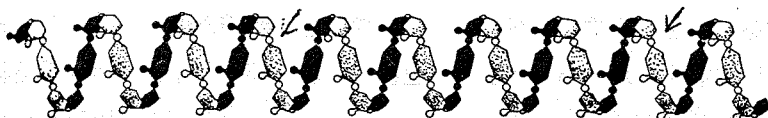
澱粉酶是普遍存在於生物體的一種酶(酵素)，主要功用是將大分子的澱粉分解為小分子。在中學教學上常會討論到澱粉酶的性質及測定方法，茲介紹它的一般性質及簡易測定此酶存在的二種定性定量方法。

澱粉酶(Amylase)，早在1833年，由A. Payern 及 J. Person 所發現，當時在巴黎(Paris)糖廠由麥芽抽出物中找到一種“可再利用因子”(reusable factor)，能將澱粉轉變為糖，稱之為“Diastase”，即今日所稱的澱粉酶。後來也出現於許多動、植物及微生物體中，特別是在高等動物的胰臟中存量最多，在人類、老鼠、天竺鼠等的唾腺內含量也不少。一般在動物組

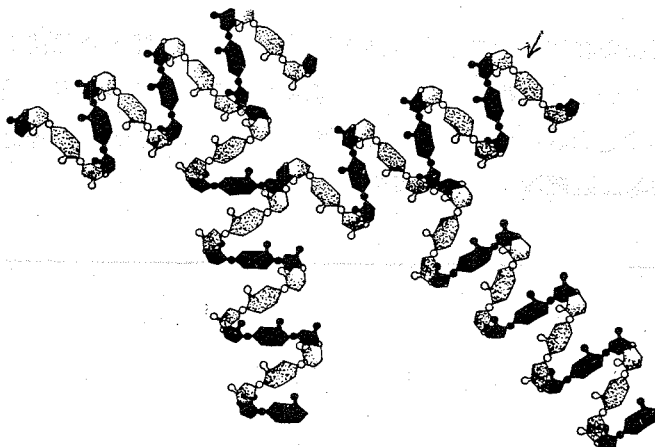
織的分佈主要是在腸胃消化道內，在血清、尿液、肝臟及肌肉含量則較少。

澱粉酶又稱麥芽澱粉酶，有觸化澱粉之水解生成麥芽糖的作用，唯因其作用於受質分子上之部位不同計有三種特別的型式。

A. α -澱粉酶(α -Amylase)：它專作用於澱粉分子之直鏈澱粉(Amylose)及膠澱粉(Amylopectin)的1,4位置的糖苷聯鍵上。兼有內1,4糖苷酶(Endo-1,4 glucosidase)及外1,4糖苷酶(Exo, 1,4-glucosidase)的作用。不過，此酶之切斷澱粉分子鏈鍵的作用方式並不規則。(見圖一、二)。



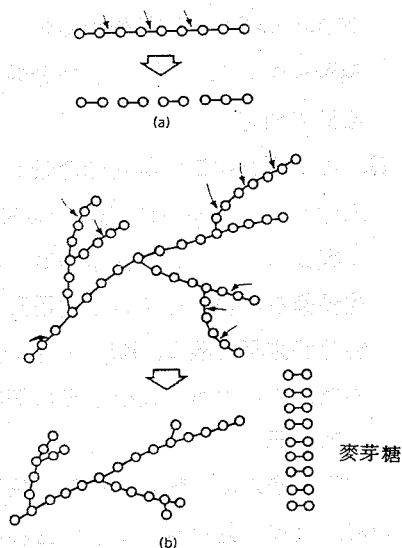
(a)直鏈澱粉分子(Amylose)



(b)膠澱粉(Amylopectin)

圖一 澱粉分子組成·箭頭所指為 α -Amylase 水解位置

B. β -澱粉酶 (β -Amylase) : 此酶作用僅選擇在末端的 1,4 位置的糖苷聯，每次切下二個分子，分解後得出的產物為麥芽糖分子，屬於外 1,4 糖苷酶，其對澱粉分子之鏈鏈切法非常規則，一個挨一個地切；見圖〔二(b)〕。



圖二 (a) α -Amylase 的水解方式
(b) β -Amylase 的水解方式
箭頭所指為其水解位置

C. R 酶 (R-Enzyme), 此酶是對膠澱粉之 1,6 位置之支鏈作水解，整個澱粉分子的 1,6 支鏈也能被分解利用。

在動、植物細胞的 α -Amylase，性質也不同。動物細胞的 α -Amylase 受氯離子 (Cl^-) 激活，其濃度可高至 0.9 % 的氯化鈉的程度。而植物細胞的 α -Amylase 一般是種子浸水後，開始萌芽才產生，並不受氯離子影響；唯有些植物體的 α -Amylase 却需要鈣離子 (Ca^{++}) 參與作用。

單子葉植物的 α -Amylase 的產生已被研究得較為透徹，它合成於糊粉層細胞，其合成受吉貝素 (GA) 的影響；在種子發育過程之珠心 (Kernal) 形成時就有澱粉酶的活動，而種子完全

成熟後，澱粉酶含量遞減。當種子開始萌發澱粉酶含量再度增加。利用細胞化學方法，研究在細胞內澱粉酶分佈，可知單子葉植物細胞其澱粉酶大部份在糊粉層 (Aleuroner layer) 的細胞上，糊粉層是禾本科植物種子周圍的分泌組織，利用特殊染色發現澱粉酶主要是存在糊粉層細胞的周圍且與糊粉粒 (Aleurone grain) 結合在一起。澱粉酶在整株植物的分佈依種類不同而異，大部份都在種子的胚乳上，少部份在莖、根等組織。如玉米種子有百分之八十的澱粉酶集中在胚乳及子葉盤 (Scultellum)，只有百分之二十在根及莖部。

檢驗澱粉酶的方法很多，常有的有下列四種：

- 一、利用酒精使澱粉沉澱，測出殘留澱粉量之多寡以測定澱粉酶活性。但此法不適於檢驗血清或含高蛋白成份的材料；因為酒精會使蛋白質發生變性干擾結果。
- 二、測定溶液中的黏度 (viscosity)；本法利用黏度計測定，唯費時費力，不太實用。
- 三、測定溶液中還原糖的含量，即測量澱粉酶水解後的產物，此法主要是測直鏈澱粉與膠澱粉的比率，可由此推算出澱粉酶的活性。
- 四、測定澱粉與碘液 (Iodine reagent) 呈色的變化值，由於澱粉酶可將澱粉分解為糖，澱粉酶愈多被分解掉的澱粉愈多，殘留的澱粉量愈少，與碘液呈色愈淺。由光電比色計測得之顏色深淺，求出其吸光度變化，依其吸光度變化求其酶含量。

利用第四種方法，簡單介紹二種定性及定量澱粉酶方法。

A. 測定溶液中澱粉酶含量

凡欲研究各類種子浸水時滲出之澱粉酶量，種子浸泡水的時間，種子不同部位的抽取液，以及化學物對種子萌芽時產生澱粉酶含量的影響等

，均可依下列方法施以定量。

(1)作澱粉酶標準曲線之測定：

將澱粉酶以連續稀釋方法配成下列濃度各 5 ml：

20mg/ml, 10mg/ml, 5 mg/ml,
2 mg/ml, 1 mg/ml, 0 mg/ml

(2)取不同濃度的澱粉酶各 0.1 ml，加入 5ml 0.04 % 可溶性澱粉液，置室溫作用 5 分鐘，再加 1 ml 碘液（60克碘化鉀及 0.6 克碘晶體溶於 100 ml 蒸餾水中，使用時再以蒸餾水稀釋 100 倍），呈色 20 秒，立即在光譜計（spectronic 20），以波長 620 nm 測出吸光度並記錄之。此為 O. D. sample。

(3)將欲測溶液（含澱粉酶）取 0.1 ml，加入 5 ml 0.04 % 可溶性澱粉液作用 5 分鐘，加 1 ml 碘液，同上法測出吸光度並記錄之。此為 OD unknown。

(4)取 0.1 ml 蒸餾水，加入 0.04 % 可溶性澱粉液，再加 1 ml 碘液，測出吸光度，記為 OD starch。

(5)計算 $\Delta OD = OD \text{ starch} - OD \text{ sample}$;

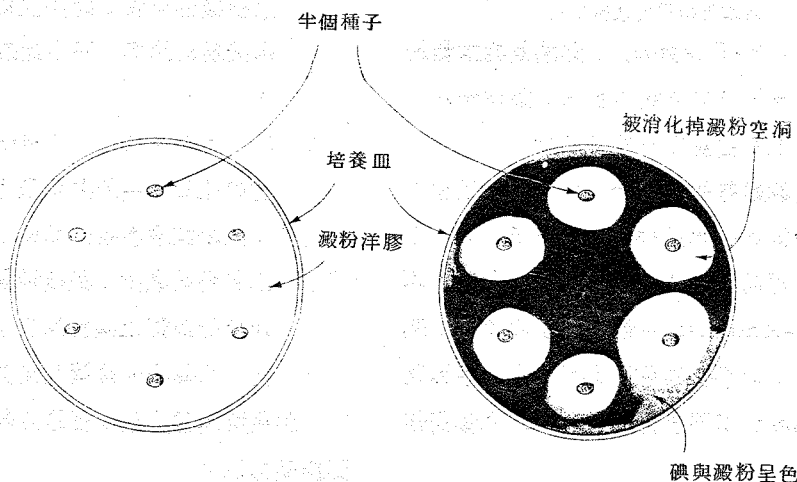
以 $\Delta O.D$ 為縱座標，澱粉酶濃度為橫座標，繪在方格紙上即為標準曲線，再於標準曲線內，將 OD unknown 值所得的 $\Delta O.D$ 內插於曲線內，求其酶含量。

(6)若欲測種子抽取液，其抽取溶液最好是用 0.05 M 醋酸鹽緩衝液 pH = 5.0，內含 20 μ M $CaCl_2$ ，則其作用更理想。抽取液若混濁則須以 500 $\times$ g 離心 10 分鐘後，取上層澄清液測定。

B. 測量活體組織中澱粉酶含量：

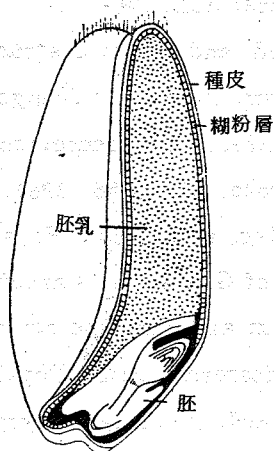
本法利用簡單的呈色反應（ I_2 -KI-starch），觀察澱粉酶存在及含量多寡，在培養皿內先預備有澱粉—洋菜膠，利用澱粉酶能將澱粉分解則不再跟 I_2 -KI 呈色，觀察培養皿內空白洞口直徑的大小，可瞭解澱粉酶含量，如圖三。

當種子浸水後，胚即活化產生 GA，GA 刺激糊粉層的細胞（見圖四(a)），分泌許多水解酵素。這些水解酵素將貯存在胚乳中的大分子如澱粉

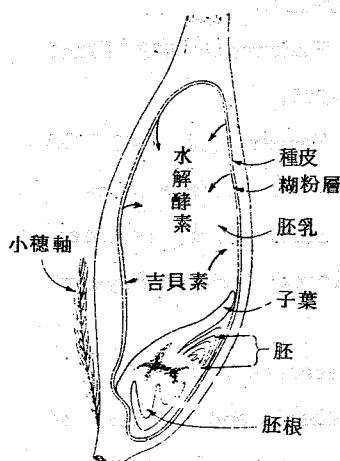


圖三 (a)培養前，切半的種子置
于澱粉—洋菜膠培養基

(b)培養後，加入碘液的呈色結果，
空白處為澱粉被消化掉之情形。



圖四 (a)小麥種子的縱切面，說明胚、胚乳及糊粉層的相關位置。



圖四 (b)大麥種子切面圖，說明種子萌芽時吉貝素作用。

、蛋白質、脂質、核酸等分解利用供應胚生長發育所需的能量及原料（見圖四(b)）。這些水解酵素含有澱粉酶（Amylase），可分解澱粉為麥芽糖；有脂質酶（Lipase），將脂質分解為小分子脂酸及甘油；磷酸水解酶（Phosphorylase），還有蛋白酶（Protease）、核糖核酸酶（Ribonuclease）等。通常這些酵素在大部份成熟的種子皆被發現，有少部份的酵素如大麥種子的 α -澱粉酶是在種子萌芽時才重新合成，其合成約需8~10小時；至於雙子葉植物的澱粉酶的性質，尚有待進一步研究。

檢驗活體組織的方法如下：

1. 將培養皿（直徑為9 cm），以肥皂水泡後刷洗，自來水沖幾次，用蒸餾水沖洗1~2次，置於烘箱內，以160°C烘乾二小時，以達完全滅菌。
2. 準備洋菜-澱粉培養基：稱取2克澱粉、1克洋菜，加水100 ml，煮沸後，置高壓滅菌箱（121°C 15 磅/平方英吋）十五分鐘，於無菌箱內將培養基倒於培養皿內，每皿倒約10~15 ml，待涼即可使用。

3. 將欲測定的材料：如大麥種子、花生種子等先以5%的次氯酸鈉（Sodium Hypochloride）消毒10~15分鐘，倒去消毒液，並用無菌水沖洗3次，使用刀片（先用70%酒精消毒過）將種子切成二半，如圖三(a)方法擺置，放於培養箱30°C內培養三天。
4. 三天後，打開皿蓋，分別加入5 ml 碘液（未稀釋的碘液）混合均勻，倒去多餘碘液，用蒸餾水沖洗一次，觀察在種子周圍透明空白洞口直徑大小，其洞口直徑大者表含澱粉酶愈高，二者呈正相關。
5. 學校若沒有高壓滅菌箱，可以高壓鍋或電鍋代替，唯殺菌時間尚須延長為30分鐘以上。
6. 利用此法即可判斷活體組織中那一種種子含有較高的澱粉酶，並可知道種子的那一部位含有較高的酵素。 □

參考資料

1. Bergneyer, H. U. 1963 "Methods of Enzymatic Analysis" 850-860.

- 2 Ross, 1979 " Plant physiology Laboratory manual " 129-137.
- 3 Salisburg & Ross Wadsworth 1978 "Plant Physiolog" P280-295.
- 4 Chrispeels, M.J. Varner, J.E. 1967 " GA enhanced synthesis and release of α -Amylase and Ribonuclease by isolated barley aleurone layers " Plant Physiol 42:398-406.
- 5 Dashek, W.V. Chrispeels M. J. 1977. " GA Induced synthesis and release of cell wall degrading exooxylanase by isolated aleurone layers of barley " Planta 134:251-256.
- 6 Mcneil, M. Albarsheim, P., Taiz, L. 1975 " The structure of Plant cell walls VII. Barley aleurone layers " Plant Physiol 55:64-68.
- 7 Jones; R.L. 1969 " GA and the fine structure of barley aleurone cell II: Changes during the synthesis and secretion of α -Amylase" Planta. 88:73-86. 1969.
- 8 Paleg, L.G. 1960 " Physiological effects of G.A I : on Carbohydrate Metabolism and Amylase activity of barley endosperm " Plant Physiol 35:293-299.
- 9 Russel, Jones 1972 " Fraction of the enzymes of the barley aleurone layer : Evidence for a soluble Mode of Enzyme release " Planta (Berl) 103 : 95-109.
- 10 Varner J.E 1964 " GA Controlled synthesis of α -Amylase in barley endosperm " Plant Physiol 39:413-415.