

花蓮縣第 64 屆國民中小學科學展覽會

作品說明書



科 別：生活與應用科學科二(含生物科技/食品科學)

組 別：國中組

作品名稱：撒「豆」成兵-探討不同豆類抑制澱粉酶吸收效果之比較

關鍵詞：澱粉酶抑制劑、豆類

編 號：

目 錄

- 摘要.....3
- 壹、研究動機.....2
- 貳、研究目的.....3
- 參、研究設備及器材.....4
- 肆、研究過程及方法.....4
- 伍、結果.....7
- 陸、討論.....10
- 柒、結論.....11
- 捌、參考資料及其他.....11

摘要

在我們了解到豆類中有成分可以抑制澱粉酶吸收澱粉後，本次實驗也因此拉開序幕。我們選用市面上較常見的豆類，例如：黃豆、黑豆、綠豆、紅豆、花豆作為實驗器材，將各種豆類研磨並製成萃取液，接著透過控制溫度及 pH 值營造出能將酵素活性最大化的環境，並使用分光光度計檢測吸光值且推測剩餘澱粉量，最後得知各種豆類抑制澱粉酶吸收澱粉之效果後，製成圖表進行比較後，利用變化幅度、標準差及相關係數來解釋各豆類吸光值之圖表。

從實驗結果可知，比較不同豆類萃取液抑制澱粉酶吸收澱粉效果：紅豆>綠豆>花豆>黃豆>黑豆；現今有許多減肥食品、藥物是利用豆類萃取出所需物質，經過分離純化後製成減肥食品和藥物，我們希望能找出對澱粉酶抑制效果最佳的豆類，所以我們從市面上較常見的豆類開始著手進行研究，或許有其他豆類可以更有效的抑制澱粉酶吸收澱粉，因此值得我們做更進一步的探討

壹、研究動機

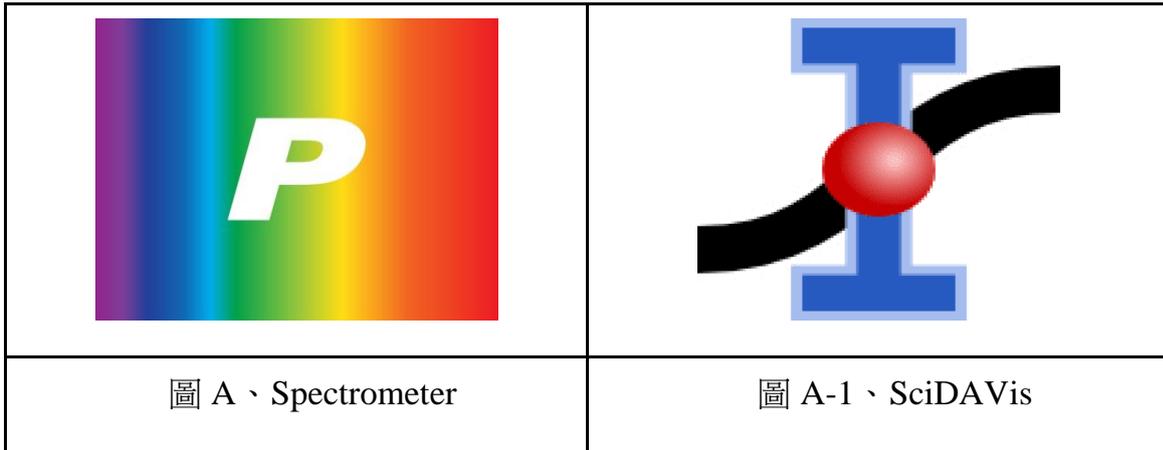
有次在上生物課時，我們進行唾液澱粉酶分解澱粉的實驗，那也是我們第一次了解澱粉酶如何幫助我們吸收澱粉及分解轉變成葡萄糖；不久之後，在進行複習時，我們看到一道關於豆類中具有可以抑制澱粉吸收的成分的問題，引發了我們的好奇心，透過網路搜尋，我們從文獻中發現了許多植物不僅含有澱粉酶，且還具有澱粉酶抑制劑，從而抑制澱粉酶在口腔及小腸中吸收澱粉分解並轉化成葡萄糖的效果，進而減少葡萄糖的吸收及利用。因目前市面上已有從腰豆中萃取出的"腰豆素"，而且因抑制人類澱粉酶吸收澱粉的效果顯著，近幾年已被分離、純化作為藥物用以治療糖尿病及減肥，因此我們想解除腰豆外是否還有其他市面上常見的豆類也可以有效的抑制人類澱粉酶的吸收，因此我們開始了本次實驗。

貳、研究目的

- 一、了解澱粉酶及酵素的相關知識和設計實驗、實驗操作方式
- 二、探討不同豆類對澱粉酶抑制效果

參、研究設備與器材

- 一、實驗器材：試管、研鉢、離心機、離心管、恆溫儀器、微量吸管、分光光度計、黃豆、黑豆、紅豆、綠豆、花豆
- 二、實驗藥品：碘液(I3K)、澱粉、唾液、氯化鈉(NaCl)、氫氧化鈉(NaOH)、磷酸氫二鈉(Na2HPO4)、磷酸二氫鈉(NaH2PO4)
- 三、程式：Spectrometer、SciDAVis



肆、研究過程與方法

- 一、根據研究目的，我們制定了以下實驗流程：

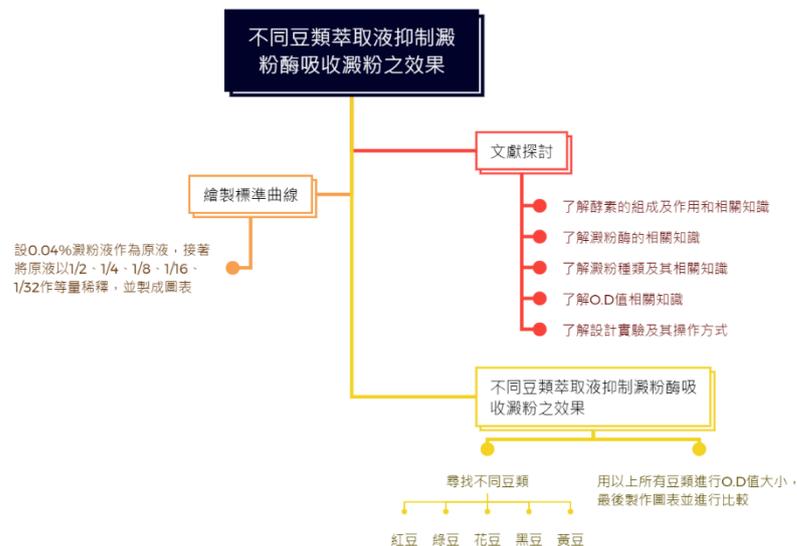
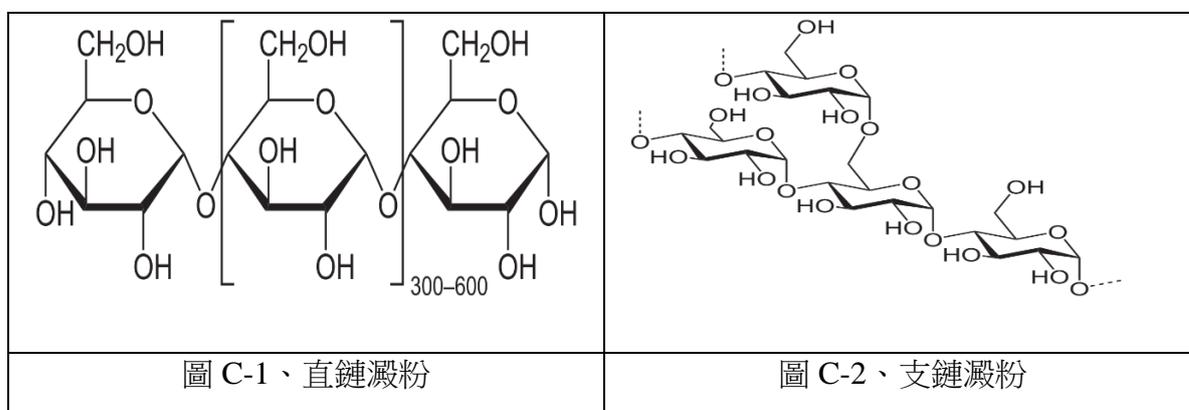


圖 B、研究流程圖

- 二、<文獻探討>了解澱粉酶及酵素的相關知識和設計實驗、實驗操作方式

(一)我們收集的文獻中，我們整理出之前的實驗方式及所需背景知識：

1. 酵素又稱「酶」，是由蛋白質所構成的生物催化劑，並將養分從大分子變成小分子，主要能夠幫助人體分解食物、維持身體機能、修復組織；酵素可分成 3 大類，包含消化酵素、代謝酵素及食物酵素。
2. 澱粉酶是一種水解酶，一般可作用於可溶性澱粉、直鏈澱粉澱粉(C₆H₁₀O₅)可以分成直鏈澱粉(糖澱粉)(圖 C-1)、支鏈澱粉(膠澱粉)(圖 C-2)
3. O.D 是 optical density(光密度)的簡稱，其定義表示為被檢測物所吸收的光密度，光通過被檢測物前後的能量差異即是被檢測物吸收的能量；在特定波長下，同種被檢測物的濃度與被吸收能量成定量關係，其數學表示式為 $O.D = \log(1/trans)$ ，其中 trans 為檢測物的透光率、吸光值用 A 表示，A 是 absorbance，是指光線透過溶液或某一物質前的人射光強度與該光線透過溶液或物質後的透射光強度比值的 log 值
4. 催化劑的定義為只能透過提供另一活化能較低的反應途徑而加快反應速率，而本身的質量、組成和化學性質在參與化學反應前後均保持不變的物質
5. 分光光度計原理是利用物質選擇不同波長的光吸收特性而建立的，通常會使用稜鏡或光柵來獲得單色光以用來穿過連續單色溶液，測量溶液對每個波長的吸收度，從而得到吸收光譜曲線



三、設計實驗及實驗方法

我們從文獻中發現是在試管中放入定量澱粉液、唾液及豆類萃取液，在反應一定時間後，在試管中添加碘液、氫氧化鈉(終止反應劑)，利用澱粉遇碘液會變色的特性以此推測是管中的澱粉量，由此可知豆類萃取液對於澱粉酶的抑制效果，因此我們利用找到的資料進行修改，設計以下實驗方法：

(一)製備實驗所需溶液：

(二)磷酸鹽緩衝液 0.02M(pH6.9)

1. 將磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)與磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)分別取 5.68g、4.8g 並溶於 1L 的水中，依據磷酸緩衝液比例對照表(表 A)混合 A 液與 B 液，即可獲得固定 pH 值之溶液

表 A、磷酸緩衝液比例對照表

pH	1M Na_2HPO_4 体积(mL)	1M NaH_2PO_4 体积(mL)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

2. 包含 0.3M NaCl 的磷酸鹽緩衝液(0.02M、Ph6.9)：取以配好的磷酸緩衝液 1L 並加入 17.5g 的 NaCl
3. 碘液：取 12.7 克的 I_2 及 0.6 克的 KI 並溶於 200ml 的水中
4. 澱粉液(0.04%)：取 0.04 克澱粉加入 1L 的水中並煮至完全透明
5. 2M 氫氧化鈉

(三) 製備豆類萃取液

1. 秤取豆子 4 克，並加入包含 0.3M NaCl 的磷酸鹽緩衝液 20ml，並放置冰上研磨(如圖 D-1)
2. 將研磨液吸至離心管，以離心機 13500rpm 離心 10 分鐘，最後取出上清液 10ml(如圖 D-2)



圖 E-1、將豆類放置冰上研磨



圖 E-2、取上清液 10ml

(四) 實驗步驟：

1. 在試管中加入 3ml 的 0.04% 澱粉液，再加入 0.5ml 的唾液及 0.5ml 的豆類萃取液，並放置於 37°C 的恆溫儀器中反應 15 分鐘
2. 添加 0.5ml 的碘液及 0.5ml 的氫氧化鈉(終止反應劑)於試管中，稍微搖晃試管使碘液混和均勻
3. 以分光光度計測量其 O.D 值(O.D₆₂₀)，並記錄
4. 與對照組進行比較(僅有澱粉液與唾液)的 O.D₆₂₀ 值，並求 $\Delta O.D_{620}$ ($\Delta O.D_{620} =$ 實驗組 O.D₆₂₀ 值-對照組 O.D₆₂₀ 值)
5. 判定澱粉酶抑制效果原則：若 $\Delta O.D_{620}$ 越大代表該豆類抑制澱粉酶吸收澱粉效果越好，若 $\Delta O.D_{620}$ 越小表示其抑制澱粉酶吸收澱粉效果越差
6. 我們將以上步驟定為標準流程，並在往後實驗以改變實驗變因進行後續實驗

四、實驗一：製作澱粉濃度-吸光值之標準曲線：

- (一) 為了能直接以 O.D₆₂₀ 值求出澱粉的變化量，因此假設 0.04% 的澱粉液為原液 (100%)，將其作系列稀釋成原液的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32
- (二) 將不同濃度的澱粉液各取 3ml，分別加入 0.5ml 的碘液
- (三) 混合均勻後，測量 O.D₆₂₀ 值
- (四) 以 0.04% 的澱粉液視為相對濃度 100%，並繪出標準曲線

五、實驗二：探討不同豆類對澱粉酶抑制效果

- (一) 我們希望能從此實驗得知市面上常見的豆類所製成的萃取液能有效抑制澱粉酶吸收澱粉，所以我們利用黃豆、綠豆、紅豆、花豆、黑豆(去皮，原因註記於討論一)希望找出合適的豆類
- (二) 各種豆類萃取液的製備及澱粉酶活性抑制實驗過程參照<文獻探討>三、設計實驗及實驗方法的第 2、3 項
- (三) 每種豆類做 10 次，求 O.D₆₂₀ 平均值及 $\Delta O.D_{620}$ ，最後進行比較

伍、研究結果

一、實驗一：製作澱粉濃度-吸光值之標準曲線

(一)由表一可知將澱粉作系列稀釋後，測得 O.D₆₂₀ 值隨著濃度越低，數值也逐次遞

減：100%(0.969)>50%(0.561)>25%(0.32)>12.5%(0.188)>6.25%(0.133)>3.125%(0.084)

(二)利用 0.04%澱粉液視為 100%原液，並繪出濃度-吸光值的標準曲線(圖 1-1)及迴歸直線(圖 1-2)

表一、0.04%澱粉液作系列稀釋後加碘液測量 O.D₆₂₀ 值

稀釋倍數	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
濃度(%)	3.125	6.25	12.5	25	50	100
O.D ₆₂₀ 值	0.084	0.133	0.188	0.32	0.561	0.969

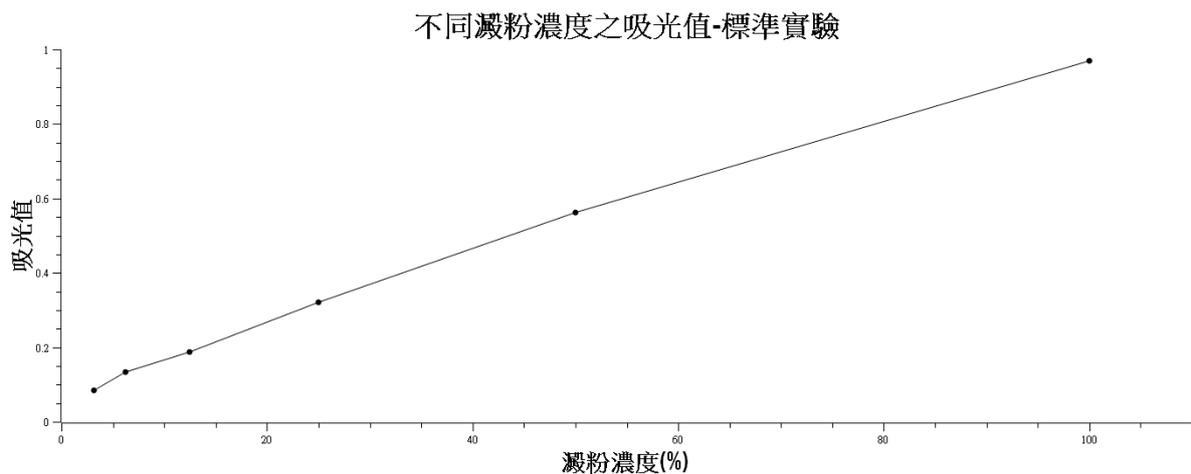


圖 1-1、不同澱粉濃度之吸光值-標準曲線

二、實驗二：探討不同豆類對澱粉酶抑制效果

(一)由表二可知，5種豆類經實驗後計算出 $\Delta O.D_{620}$ 大小依序是：紅豆>綠豆>花豆>黃豆>黑豆

表二、不同豆類抑制澱粉酶抑制效果之 $O.D_{620}$ 值及 $\Delta O.D_{620}$

	黃豆	黑豆	綠豆	紅豆	花豆
1	0.077	0.092	0.248	0.328	0.49
2	0.111	0.101	0.282	0.374	0.26
3	0.072	0.134	0.28	0.315	0.204
4	0.118	0.149	0.322	0.375	0.356
5	0.091	0.118	0.244	0.357	0.226
6	0.08	0.162	0.28	0.388	0.263
7	0.093	0.096	0.26	0.347	0.271
8	0.096	0.2	0.318	0.358	0.212
9	0.099	0.083	0.303	0.351	0.201
10	0.184	0.107	0.267	0.32	0.203
O.D 平均值	0.1021	0.1242	0.2804	0.3513	0.2686
$\Delta O.D$ 值	-0.0429	-0.1068	0.0494	0.063	-0.0164
抑制效果排名	4	5	2	1	3

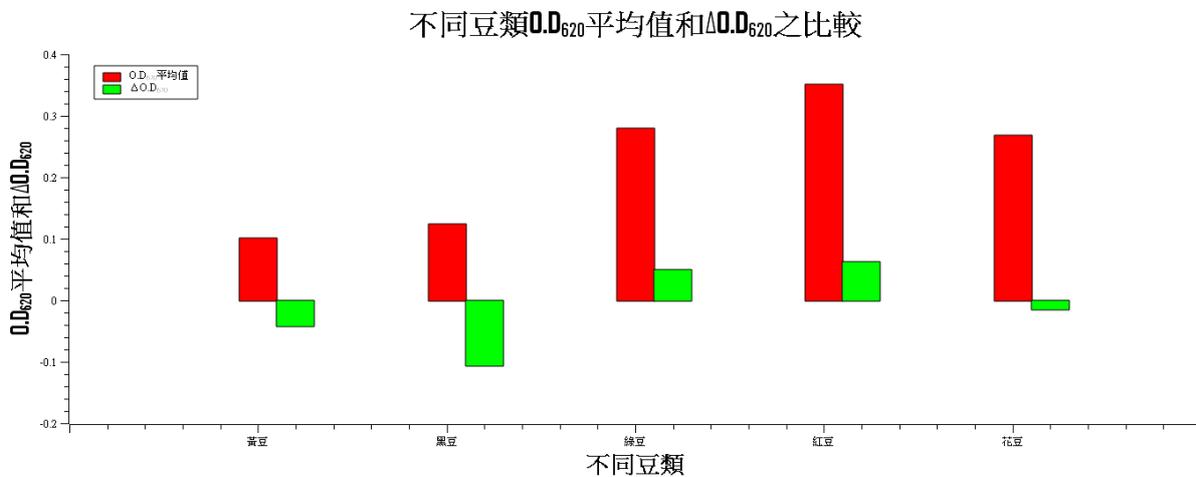


圖 2-8、不同豆類 $O.D_{620}$ 平均值和 $\Delta O.D_{620}$ 之比較

陸、討論

一、進行實驗時會添加終止反應劑停止酵素反應，避免因酵素持續反應而影響測量 O.D₆₂₀ 值的結果，但發現終止反應劑和豆類萃取液皆是鹼性，會導致黑豆萃取液變色，我們從文獻中看到可以嘗試添加酸性溶液，不過酸鹼中和會有放熱反應，因此會增加溫度這個變因，後來發現我們實驗用的黑豆是綠仁黑豆，綠仁黑豆的種皮上含有花青素，會使黑豆萃取液變色所以我們將黑豆去皮再加以研磨以便解決變色的問題，不過希望以後能解決花青素變色的問題，從而了解種皮的影響

二、豆類介紹

(一)黃豆：大豆（學名：*Glycine max*，英語：soybean），是豆科大豆屬植物，其種子含有豐富的蛋白質

(二)黑豆：屬於豆科，蝶形花亞科，大豆屬，是眾多大豆品種中的一種，種皮由深色花青素形成，又稱為烏豆，豆粒所含蛋白質、氨基酸、脂肪，碳水化合物、維生素、微量元素等成分

(三)綠豆：（學名：*Vigna radiata*），是一種豆科、蝶形花亞科、豇豆屬植物。別名「青小豆」、「植豆」、「交豆」、「文豆」、「八重生」、「菘豆」

(四)紅豆：（學名：*Vigna angularis*）亦稱荅、小豆、赤豆，是豆科蝶形花亞科、豇豆屬植物，為常見的食材之一，紅豆屬高蛋白質、低脂肪的高營養穀類食品，而且含有蛋白質、醣類、脂肪、膳食纖維、維生素 B 群、維生素 E、鉀、鈣、鐵、磷、鋅等營養素。

(五)花豆：其種子形如動物的腎臟，顏色為白色與褐紅色相間，為豆科菜豆屬

（*Phaseolus*）中的一種一年生草本植物，（*Phaseolus coccineus* var. *albonanus*，

Bailey.），別名赤花蔓豆、紅花豆、花仔豆、花柳豆、紅花菜豆、赤花菜豆、虎豆

三、因為本次實驗主要想探討市面上較為常見的豆類進行實驗，因此推測其他未進行實驗的豆類能更有效抑制澱粉酶吸收澱粉

四、我們在實驗中，只以豆類+萃取液再研磨的方式萃取，但在我們參考的文獻中，大多數的團隊在研磨後 0.5g 5% T.C.A.(三氯乙酸)使蛋白質沉澱並利用半透膜更進一步提高純度，我們受限於設備及時間因素只能以相對簡單的方式萃取，希望能有機會探討如何以低成本、簡單、快速的方式製作萃取液

五、我們比較萃取液抑制澱粉酶是和對照組(僅有澱粉+澱粉酶)比較，原本我們希望以澱粉液 加碘液的標準曲線比較，但我們發現有時會有不小誤差，我們認為是因為直鏈澱粉

加碘液會變藍色而支鏈澱粉與碘液會變紫色到紫紅色(多數澱粉都是混合)，加上分光光度儀是測量透光度，所以檢體顏色會有極大的影響，因此出現了誤差，所以我們改採使用同批澱粉溶液添加澱粉酶作為對照組的方式進行比較

六、我們為了瞭解澱粉的濃度，使用分光光度儀測定目標溶液的吸光率(O.D)，我們試過以幾種不同波長的光源進行測定，但發現可能是因為溶液顏色的關係測定結果常出現嚴重的問題(例如澱粉液濃度逐步稀釋並測量數據沒有呈線性函數)，在經過資料收集後，我們發現大多數實驗團隊都是以測量 O.D₆₂₀的方式了解澱粉濃度(測量目標溶液對於波長為 620nm 的光吸收率為何)，經過數次測試後，我們以 O.D₆₂₀測得的數值比較澱粉濃度。實驗中因為需增加其他溶液，單純以 O.D₆₂₀ 值比較會有誤差，因此我們改以反應前後的 Δ O.D₆₂₀ 進行比較

柒、結論

一、比較各種豆類萃取液抑制澱粉酶吸收澱粉效果：紅豆>綠豆>花豆>黃豆>黑豆

捌、參考資料

一、<https://hocom.tw/h/DataDetail?key=5751677005&cont=334440> (濃度與 O.D 值的關係)

二、<https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-1/48/technical/091101.pdf> (直鏈澱粉定量方法之改良)

三、<https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-1/58/pdf/NPHSF2018-030322.pdf> (碘光火石-豆漿內澱粉含量的探討)

四、<https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2008/pdf/080001.pdf> (豆類澱粉酶抑制劑之研究與應用)

五、<http://www.plant-physiology.com/upload/file/20130613171842883.pdf> (澱粉酶活性測定方法的改進)