

隊名：老人小孩隊

指導老師：謝道任

組員：吳芝儒、趙振甫、李唯閣

主題名稱：水果酵素分解蛋白質活性之探討

## 研究動機

有一次媽媽煮晚餐時，看到媽媽把青木瓜和排骨一同丟到湯裡面煮，媽媽說木瓜裡面的酵素可以讓排骨更加軟嫩，我們好奇酵素到底能分解多少蛋白質，在網路上也流行自製水果酵素的作法，效果跟市面上所販售的相比又如何？

## 研究目的

自行製造酵素並比較不同種類酵素的分解能力

- (一)以市售木瓜酵素分解蛋白質
- (二)以生/熟自製木瓜酵素分解蛋白質
- (三)以採集法自製粗木瓜酵素分解蛋白質
- (四)以市售鳳梨酵素分解蛋白質
- (五)以生/熟鳳梨釀造液分解蛋白質

## 研究過程

酵素液的製造及蛋白質檢測品的配製

### (一)生鳳梨皮釀造液

將 1L 的水、100g 細白砂糖、300g 生鳳梨皮放入 1.56L 的玻璃桶。置於陰暗處發酵。接下來每兩天打開攪拌一次，兩個月後以濾紙過濾並放入冰箱保存。

### (二)熟鳳梨皮釀造液

將生鳳梨皮放入沸水中煮三分鐘，即為熟鳳梨皮。將 1L 的水、100g 細白砂糖、300g 熟鳳梨皮放入 1.56L 的玻璃桶。置於陰暗處發酵。接下來每兩天打開攪拌一次，兩個月後以濾紙過濾並放入冰箱保存。

### (三)生青木瓜釀造液

將青木瓜去皮洗乾淨後，切成片狀陰乾。將 700g 生青木瓜以及 700g 的細白糖放入 1.56L 的玻璃桶。接下來每兩天打開攪拌一次，兩個月後以濾紙過濾並放入冰箱保存。

### (四)熟青木瓜釀造液

將青木瓜去皮洗乾淨後，切成片狀並丟入沸水中煮三分鐘，取出後陰乾。將 700g 熟青木瓜以及 700g 的細白砂糖放入 1.56L 的玻璃桶。接下來每兩天打開攪兩個月後以濾紙過濾並放入冰箱保存。

### (五)自製粗木瓜酵素

其採收方法是選擇清澀、堅硬的果實，用刀片縱割數刀以不傷果肉的淺紋為原則，白色乳汁流出用淺盤接收，因新採收的乳汁易膠結，故須速速展開成薄層乾燥，以免損及酵素活性。乾燥後的木瓜乳汁，雖然以冷凍保存能保存其活性，但酵素分子穩定性較差。取用時將 0.45g 的粉末加純水成 100mL 木瓜乳汁粗自製酵素液，再分管以 3500rpm 離心 15 分鐘，並取澄清液使用；尚未用完的酵素液則以冷藏方式保存，變色即不可使用。

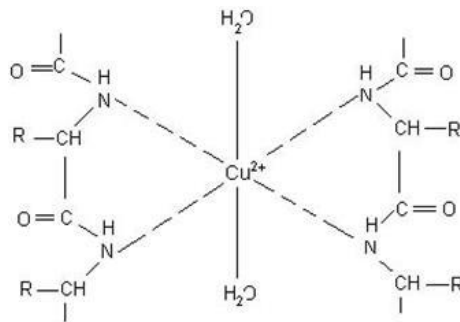
### (六)標準蛋白質溶液：

10mg/mL 的酪蛋白(Caseins)溶於 0.05M 的氫氧化鈉。

#### 雙縮脲法

##### (一)實驗原理

雙縮脲 ( $\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$ ) 是兩個分子脲經  $180^\circ\text{C}$  左右加熱，放出一個分子氨後得到的產物。具有兩個或兩個以上肽鍵的化合物皆有雙縮脲反應。在鹼性溶液中雙縮脲與銅離子結合形成複雜的紫紅色錯合物。而蛋白質及多肽的肽鍵與雙縮尿素的結構類似，也能與  $\text{Cu}^{2+}$  形成紫紅色錯合物。



紫紅色銅雙縮脲複合物分子結構

##### (二)試劑配製：

取 0.175g 的硫酸銅溶於約 15mL 的蒸餾水，加入 100mL 的量瓶中，加入 30mL 的氨水、30mL 的蒸餾水、和 20mL 的飽和氫氧化鈉溶液，室溫放置 70 分鐘後，再加水至 100mL。

為了日後可以比較蛋白質分解量的多寡，我們配製幾種不同濃度的蛋白質溶液，由於蛋白質濃度不同，加入檢驗試劑後的顏色濃度也會不同。配出檢量線後，之後的實驗即可比較蛋白質被分解的量來得知酵素的活性。將各濃度之值做成趨勢線，當數據趨勢線的相關係數高於 0.995，即得出檢量線。

雙縮脲檢量線的繪製(酪蛋白溶液)：

實驗步驟：

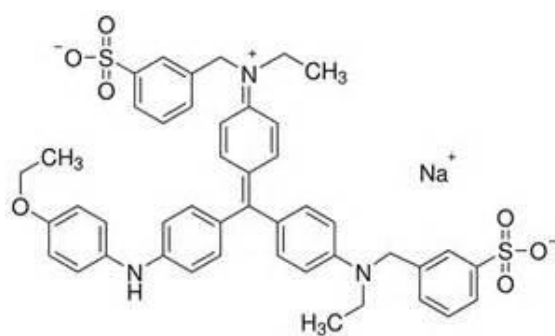
1. 在五個試管之中，分別加入總體積為 1.5ml，濃度分別為 20%、40%、60%、80%、100%的酪蛋白溶液。

2. 每管間間隔兩分鐘，加入 6ml 的雙縮脲試劑，並搖勻靜置。
3. 裝入 scale 中，以 1.5ml 的水加 6ml 的雙縮脲試劑作為背景值，放入光譜儀中檢測。

#### 五、考馬斯亮藍法(Bradford 法)：

##### (一)實驗原理

考馬斯亮藍在一定檢測範圍內與蛋白質濃度成正比，因此可用於蛋白質的定量測定，由於其可以測得微克級蛋白質含量變化，所以此方法相較靈敏精確。而考馬斯亮藍分為 R-250 與 G-250 兩種檢測法，其中考馬斯亮藍 G-250 由於與蛋白質的結合反應十分迅速，常用來作為蛋白質含量的測定。考馬斯亮藍 R-250 與蛋白質反應雖然比較緩慢，但是可以經洗脫後，取得聚丙烯胺凝膠电泳後蛋白質條帶的染色，雖然 R-250 較 G-250 繁瑣複雜，但也因其檢測方法相較準確，所以我們便決定採用 R-250 檢測法，



考馬思亮藍 R-250 化學結構

##### (二)試劑調配

###### 1.考馬斯亮藍 R-250：

取0.25g 的考馬斯亮藍 R-250，再將其溶於 45.5ml 甲醇與 10ml 冰醋酸中，待溶解後，加水至 100ml。

2.固定液：取 20g 三氯醋酸並加水至 100ml。

3.脫色液：取 95%乙醇 135ml 與冰醋酸 15ml、蒸餾水 150ml，並將其互相混合。

4.洗脫液：取 0.12M NaOH，再加入 80%的甲醇混合。

##### (三)考馬斯亮藍 R-250 檢測蛋白質之檢量線配製：

與上述雙縮脲的實驗目的相同，為了利用分光光譜儀檢測蛋白質在溶液中的量，我們必須配製檢量線。我們依照上述操作方法進行不同蛋白質溶液的量與考馬斯亮藍反應，得出不同的試液在波長 590nm 下的吸收值，將其值做成趨勢線，當數據趨勢線的相關係數高於 0.995，即得出檢量線。

##### (四)實驗操作步驟

考馬斯亮藍 R-250 試劑檢測酵素方式

- 1.配製待測試劑(蛋白質+酵素)。

- 2.準備 1.6Cm\*2Cm 的濾紙數張，使用微量滴管取出試劑，以每次 5 $\mu$ l 的量數，滴至固定位置，並分別進行 5 次(共 25 $\mu$ l)滴量。
- 3.將滴量好的濾紙浸在固定液中 10 分鐘，時時輕輕攪動。
- 4.將泡好的濾紙進入染色液(考馬斯亮藍)中，維持 30 $^{\circ}$ C 恆溫一小時。
- 5.為了除去未與蛋白質結合的染料部分，需要充分的脫色反應。故將已染色的濾紙浸在脫色液中，10 分鐘或更長時間，時時搖動。如此反覆數次，至濾紙基本呈現為無色。

#### 雙縮脲法實驗步驟：

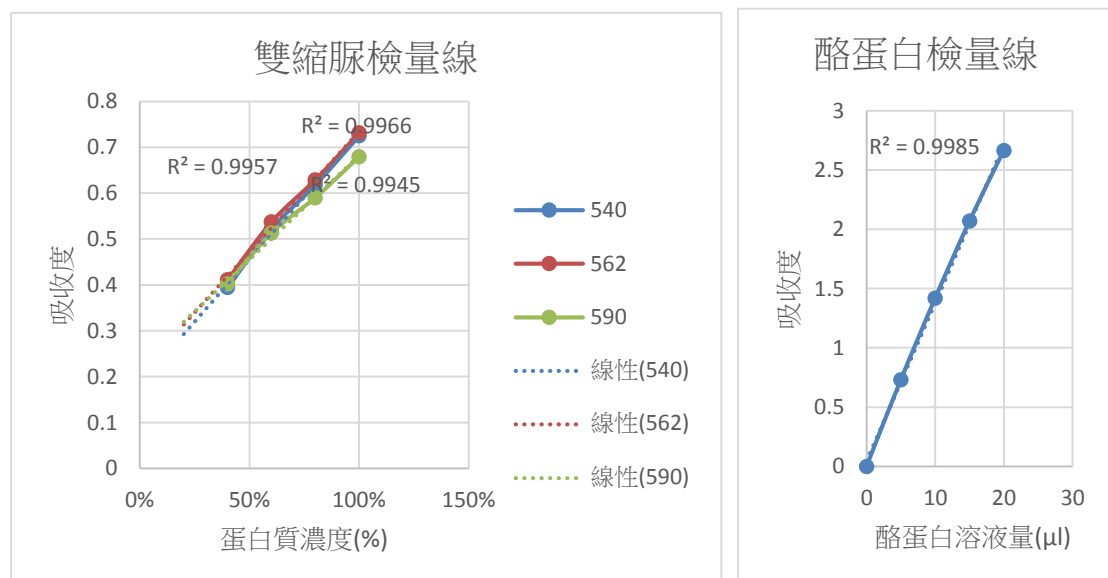
- 1.取 1mL 各種酵素加 pH=7.0 的緩衝溶液至 30mL，為酵素溶液
- 2.取 1mL 的酵素溶液，加入至 3mL 的酪蛋白溶液
- 3.搖勻後於室溫靜置 30 分鐘，加入至 16mL 的雙縮脲試劑中
- 4.與雙縮脲試劑反應 30 分鐘後，放入光譜儀中測數據
- 5.取不同種類酵素重複步驟 1~4

#### 考馬斯亮藍法：

##### 步驟一之不同酵素下待測試劑配製：

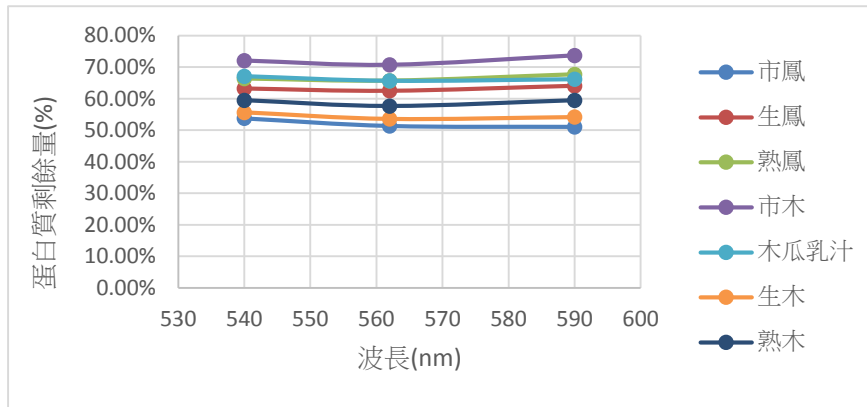
- 1.取 1mL 不同酵素加 pH=7.0 的磷酸鹽緩衝溶液至 30mL
- 2.將各個配好之待測試劑放置固定溫度下(隔水加熱 30 $^{\circ}$ C)
- 3.待酵素溶液達至溫度後，取出 1mL 加入 4mL 的酪蛋白溶液中，並將混和溶液置於固定的溫度環境下 30 分鐘
- 4.將實驗試管置入離心機以 3500rpm 為轉速離心 15 分鐘，即可進入下一階段步驟

## 研究結果

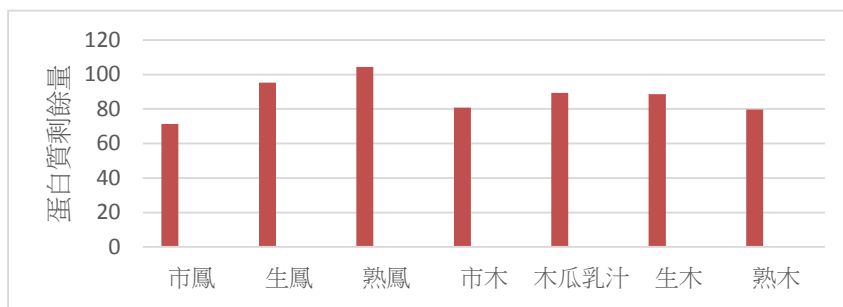


雙縮脲檢量線的繪製(酪蛋白溶液)

(酪蛋白檢量線的繪製)



(不同種類酵素的分解效果(雙縮脲法))



(不同種類酵素的分解效果(考馬斯亮藍法))

### 參考資料

- 一、李建武、蕭能賡、余瑞元、陳麗蓉、陳雅蕙、陳來同、袁明秀(民 88)。生物化學實驗原理與方法 藝軒圖書出版社。
- 二、王福泉(民 91)。碩士論文 木瓜乳汁之採集與木瓜酵素活性的研究。指導教授 鄭寶樹
- 三、紀志穎(民 88)。碩士論文 木瓜酵素之固定化與其性質之研究。指導教授 鄭寶樹
- 四、高雄市中小學科展。張天一、李奕廣(民 102)。萬用的鳳梨鳳梨皮釀造液功能之探討
- 五、高中基礎化學(二) 有機化學