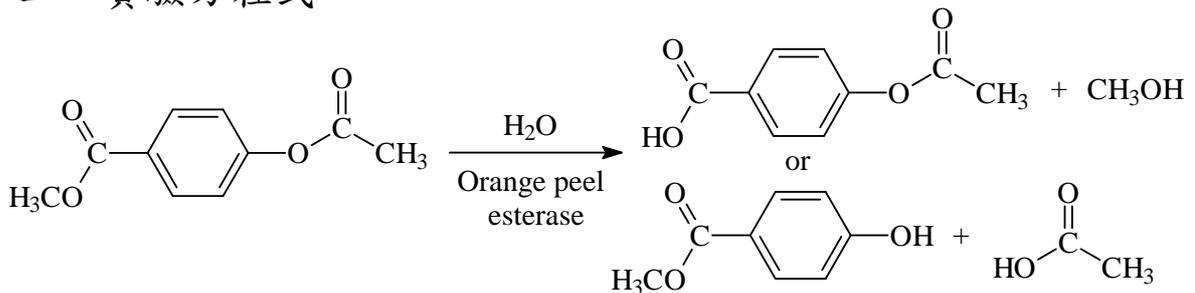


萃取橘子皮的酯化酵素 進行位置專一的酯水解反應

一、實驗目的：

酵素催化在有機合成課程中是很重要的課題，由於酵素催化反應具有高轉換率及高度立體專一的特性，近年來普遍用於不對稱合成，且已獲致相當好的結果，使得仿生合成儼然成為有機合成的一種新潮流。本實驗以橘子皮分離出來的酯化酵素，進行位置專一性的酯水解反應，並觀察其活性，使學生能學習從天然物萃取出出的酵素，進而對酵素催化的原理有一定的認識。

二、實驗方程式：



三、實驗原理：

酵素催化反應依所使用的酵素類型可區分為：

- | | |
|----------------------------|-----------------------|
| 1、氧化還原酵素 (Oxidoreductases) | 2、傳遞酵素 (Transferases) |
| 3、水解酵素 (Hydrolases) | 4、分解酵素 (Lysases) |
| 5、異構酵素 (Isomerases) | 6、結合酵素 (Ligases) |

酵素的活性可藉測量其化學變化而測定之，如連續追蹤反應過程，可發現反應速率很快降低，可能由於受質與生成物的平衡，pH 值改變或生成物對酵素的抑制。

①溫度的影響：

溫度每增 10°C，約可使反應速率增加一倍，但也使酵素因變性而致失去活性，在此情形下，最適溫度決定於反應時間。

②pH 值影響：

酵素的接觸活性在一狹窄的 pH 範圍，大部分酵素的最適 pH 值在 5~7 間，在此 pH 值下呈最穩定狀態，一般以緩衝溶液控制其 pH 值穩定。

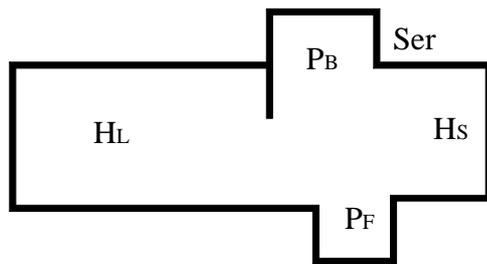
③受質的影響：

在固定條件下，反應速率決定於酵素與受質的濃度，Michaelis & Menten 假定酵素 (E) 與受質 (S) 先形成一複合體 (ES)，然後再轉變成生成物與酵素。



以豬肝酯化酵素 (PLE) 為例，受質先與酵素的活性位置結合形成複合體，再由其上的親核基攻擊完成水解。圖一為豬肝酯化酵素 (PLE) 的 Serine 活性位置，

* PLE (豬肝酯化酵素) 之立體專一性:



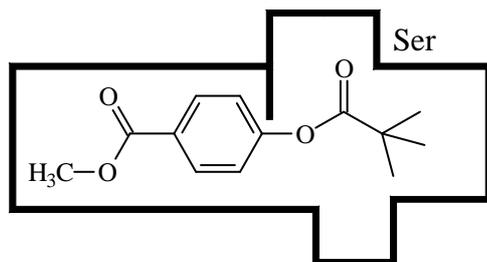
H_L：大的親水性結合點

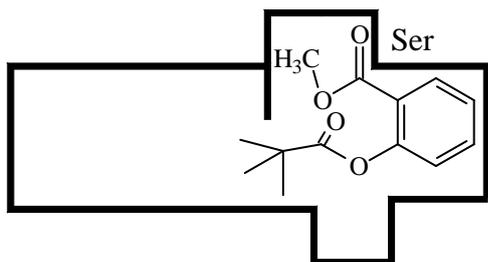
H_S：小的親水性結合點

P_F：前端極性基結合點

P_B：後端極性基結合點

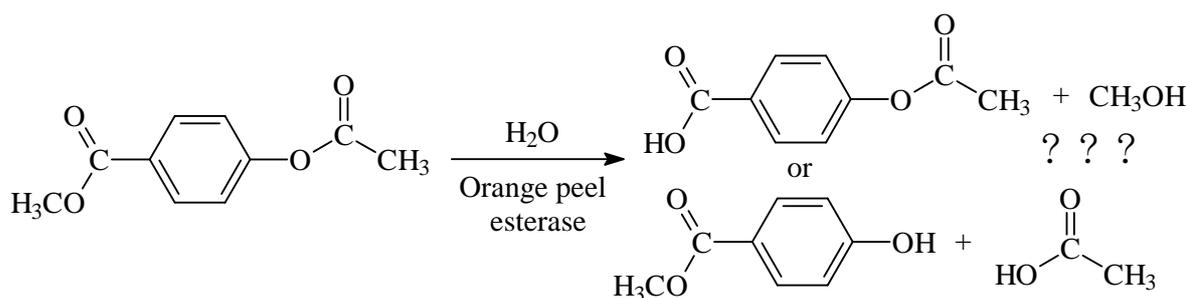
Ser：活性位置





圖一

其中 H_L 為大的親水性結合點， H_S 為小的親水性結合點， P_F 為前端極性基結合點， P_B 為後端極性基結合點。具對位取代受質，芳香環可置於 H_L ， $-OCOR'$ 置於 Serine 活性位置， R' 位於 H_S ，主要產物為 (圖二 2)。而若為鄰位取代受質，則芳香環可置於 H_S ， R' 位於 H_L ， $-COOR$ 置於 Serine 活性位置，主要產物為 (圖二 3)。由於受質不同，酵素催化可選擇水解其中一個酯基，由此證實酵素催化的專一性。一般以 4~6 個學生為一組並用相同的羥基苯甲酸，但每位學生使用不同的試劑，這樣便可合成一系列的雙酯衍生物，接著每一種雙酯以橘子皮酯化酵素(粗萃取物)、買來的豬肝酯化酵素(PLE)以及 Porcine Pancreatic 水解酵素 (PPL) 進行酵素催化水解反應並以薄膜層析法偵測水解產物、測定水解速率，進而比較每種酵素催化的專一性。

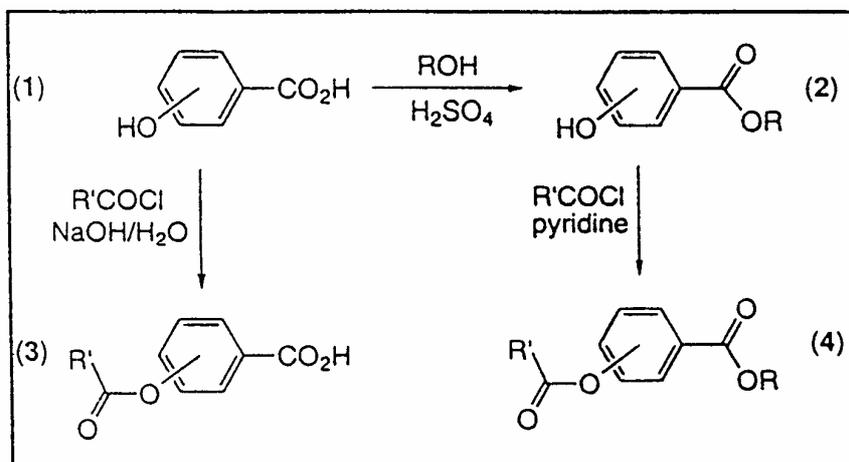


四、實驗步驟：

1、雙酯的合成：

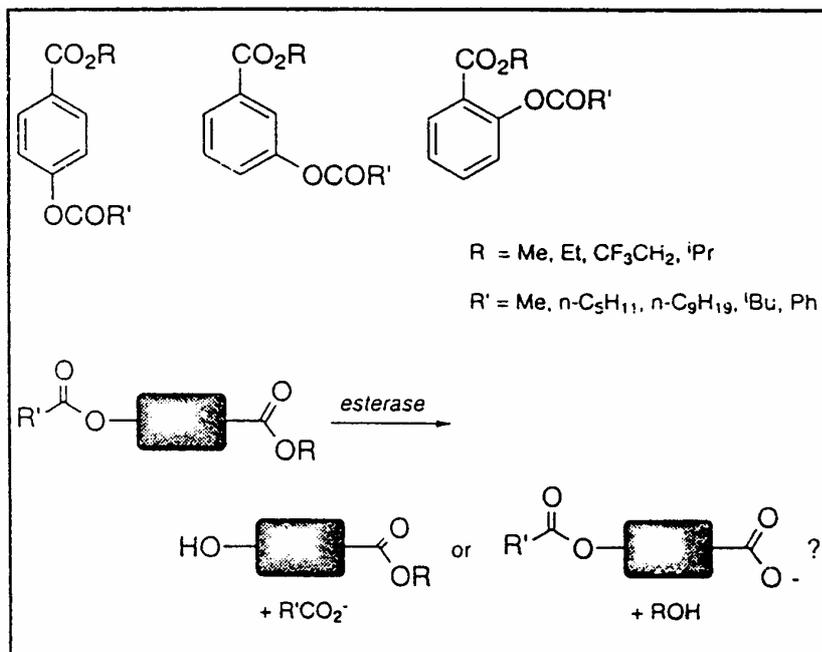
羥基苯甲酸在酸催化下與不同的醇反應便可合成單酯，其中對位及間位產物為固體可以再結晶純化之，鄰位產物為液體以減壓蒸餾純

化，羥基苯甲酸之醯化反應可於氫氧化鈉水溶液中，0°C下快速加入合適的醯氯化合物製得，所有產物均為固體以再結晶純化，產率一般為20~50%，如圖二所示。



圖二

雙酯的合成可利用單酯在吡啶中，加入合適的醯氯化合物迴流 1 小時，以水終止反應，主要產物為液體，產率一般為 60~90%，如圖三所示。純度可以氫核磁共振光譜 ($^1\text{H-NMR}$) 檢定之。



圖三

2、橘子皮萃取物的製備：

每位同學用刀子刮下一顆橘子皮，合起來的橘子皮加到 50~60 毫升的 50mM 內含 2.3% 氯化鈉的檸檬酸鈉緩衝溶液 (pH=5.5)，在混均器中 2 分鐘直到為勻相，將此混合物放在 12,000 轉速的離心機內離心 10 分鐘，橘色的上層澄清液倒入燒杯中，將此萃取液放在冰浴儲存，可保存至少 24 小時。

3、酵素催化水解反應的分析：

同學們先準備合適的薄膜層析沖提系統，用以分開雙酯 (4)、單酯 (2) 及醃化後的酸 (3)，一般以乙酸乙酯/石油醚，二氯甲烷或二氯甲烷/10% 甲醇當成沖提液，接著將 0.1 克的雙酯溶於 5 毫升丙酮配製下列各組：

A：0.1 毫升的雙酯 (4) + 0.9 毫升 50mM 檸檬酸鈉緩衝溶液 (pH=5.5)

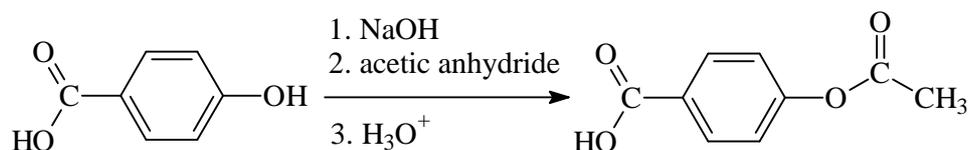
B：0.1 毫升的雙酯 (4) + 0.9 毫升橘子皮萃取物

C：0.1 毫升的雙酯 (4) + 0.9 毫升豬肝酯化酵素儲存液 (1.0 單位/毫升於 50mM 磷酸鉀溶液，pH=7.0)

D：0.1 毫升的雙酯 (4) + 0.9 毫升 Porcine Pancreatic 水解酵素儲存液 (1.0 單位/毫升於 50mM 磷酸鉀溶液，pH=7.0)

這四組各依時間 30 分鐘、1 小時、2 小時、24 小時，以薄膜層析分析並觀察其酵素水解的過程。若 30 分鐘後便完成水解則用 10 倍或 100 倍稀釋酵素，以便能估算水解速率。利用橘子皮萃取物之蛋白質濃度，已知的 PLE 及 PPL stork 溶液的濃度，每一種酵素的水解速率便可計算得，而整組的結果可用以評估改變取代基對酵素專一性的影響。

(1) 製備對苯甲酸乙醃酯



取一個 50 毫升 三角錐瓶加入 0.138 克 4-氫氧基苯甲酸

再加入 0.8 毫升 10% 氫氧化鈉

↓ 攪拌兩分鐘

加入 0.104 毫升 (~2d) 乙酸酐

↓ 攪拌十分鐘

加入 2 毫升乙醚萃取

↓

加入 4 毫升水幫助分層

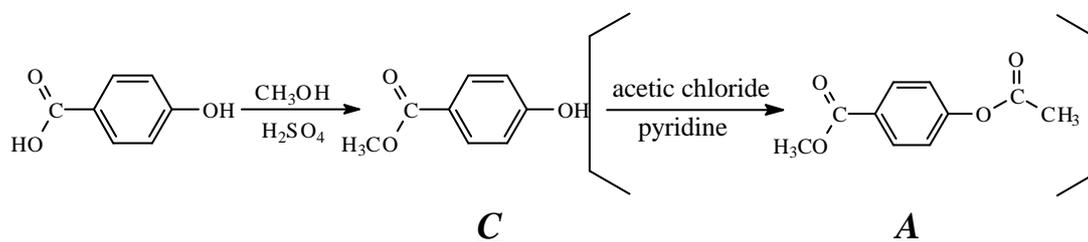
↓

收集有機層 (貼上標示 **B**)

↓

TLC 片上點上標準點(**B** point)

(2) 製備 4-氫氧基苯甲酸甲酯



取一個 50 毫升三角錐瓶 + 0.138 克 4-氫氧基苯甲酸 + 3 毫升甲醇

↓ (預先進行冰浴)

慢慢滴入 5 滴濃硫酸

↓

水浴下迴流 30 分鐘

↓

加入 5 毫升水

↓

以 5 毫升乙醚進行萃取

↓

加入 6 毫升 10%碳酸鈉水溶液

↓

收集有機層(貼上標示 C)

↓

TLC 片上點上標準點(C point)

(3) 作一張標準的 TLC 片：(展開液使用乙醚：正己烷=1：1)

A 0.01 克雙酯溶在 0.5 毫升的丙酮：

B 0.01 克對苯甲酸乙醯酯溶在 0.5 毫升的丙酮

C 0.01 克 4-氫氧基苯甲酸甲酯溶在 0.5 毫升的丙酮

(4) 橘子皮的萃取液：

2 顆橘子皮加上 200 毫升緩衝溶液 (50mM 檸檬酸鈉含 2.3% 氯化鈉→
pH=5.5)

[配製緩衝溶液：14.7 克檸檬酸鈉+ 23 克氯化鈉+ 962 毫升蒸餾水]

↓

放入果汁機中攪打 3 分鐘

↓

將橘子皮漿液置入離心管中進行離心(注意：離心管對稱重量不得相差
0.1 克以上)

↓

將離心液置於冰箱冷藏

(5) 酵素水解反應：

準備兩個 50 毫升的三角錐瓶並分別標上記號甲、乙

↓

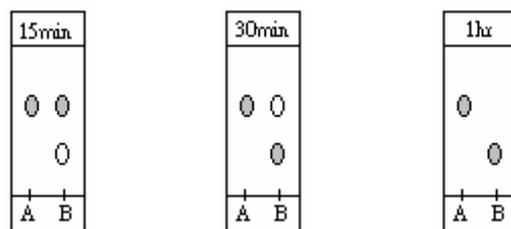
甲瓶中置入 0.3 毫升雙酯溶液(A)及 2.7 毫升緩衝溶液

↓

乙瓶中除了置入 0.3 毫升雙酯溶液(A)及 2.0 毫升緩衝溶液外再額外加入 **0.7 毫升橘子皮的萃取液**

↓

甲、乙兩瓶持續搖晃並分別於 15 分、30 分及一小時以 TLC 來檢測反應變化情形



五、儀器裝置：

高速離心機、果汁機、TLC 片、跑片槽、紫外光燈、三角錐形瓶及毛细管等

六、藥品性質：

Sodium Citrate 檸檬酸鈉 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	白色有鹽味的粉末，溶於水，微溶於乙醇， $150^{\circ}C$ 時失水。遇熱時分解，在醫學上用作阻凝劑，亦可用於飲料、乳酪製作和電鍍。
Acetone 丙酮 CH_3COCH_3	無色微香液體。易著火，密度 0.778，沸點 $56.5^{\circ}C$ 。與水、乙醇、乙醚、氯仿、油類互溶。化學性質活潑，能發生鹵化、加成、縮合等反應。廣泛用於油脂、樹脂、化學纖維等溶劑。為合成藥物、樹脂及合成橡膠等的重要原料。

<p>Ethyl Acetate 乙酸乙酯 CH₃COOC₂H₅</p>	<p>由乙酸與乙醇在酸性條件下行酯化反應而得。沸點 77.15°C，比重 0.90。易與乙醇、醚等有機溶劑混合。具有水果香味的無色、中性液體。易燃。可作為人工果實香精。</p>
<p>Dichloromethane 二氯甲烷 CH₂Cl₂</p>	<p>無色透明易揮發液體，有刺激性芳香氣味，有毒，對肝與神經系統有一定毒性，高濃度時，對人有麻醉作用，蒸氣不燃燒，與空氣的混合物無爆炸性，比重 1.33，沸點 39.75°C，略溶於水，與乙醇、乙醚、苯、油類等。主要用於代替易燃易爆的石油醚與乙醚，可作為脂肪和油的萃取劑，醋酸纖維塗料，有機合成反應溶劑，密閉儲存。</p>
<p>Ethyl Ether 乙醚 C₂H₅OC₂H₅</p>	<p>一般比較穩定，不與水、氧化劑、還原劑、鹼或烯酸起反應，但濃而熱的強酸會導致醚鍵的斷裂。具有迷昏、麻醉的效果。</p>
<p>Methyl-4-acetoxybenzoate 4-乙醯氧基苯甲酸甲酯 CH₃COC₆H₄CO₂CH₃</p>	<p>無色有異臭味液體，具毒性，易由皮膚接觸吸收。</p>

七、注意事項：

1、使用離心機與果汁機攪拌時注意安全。

①裝入溶液後之離心管的重量相差不得大於 0.1 克。

②將離心管置入離心機需對稱放入。

③待離心機旋轉自動停止後方可掀蓋。

2、點 TLC：

①點完先照 UV 燈，以確定濃度不會太稀。

②沖堤液面不可超過起點線。

- ③沖堤過程中，人不可離開，一到達終止線，要馬上取出。
- ④毛細管要平整。
- ⑤點壞的 TLC 片可用甲醇當沖堤液洗。
- ⑥每次使用，沖堤液接要重配，因為乙醚易揮發。

八、實驗問題：

- 1、試說明酵素水解的優、缺點？
- 2、用橘皮酵素水解 methyl 4-acetoxybenzoate (diester) 會得到何種產物？
- 3、追蹤反應中，15min、30min 和 1hr 的 TLC 片有何不同？此變化代表何種意義？

萃取橘子皮的酯化酵素 進行位置專一的酯水解反應 實驗報告

學系： 姓名： 學號： 組別： 日期：

數據及結果：

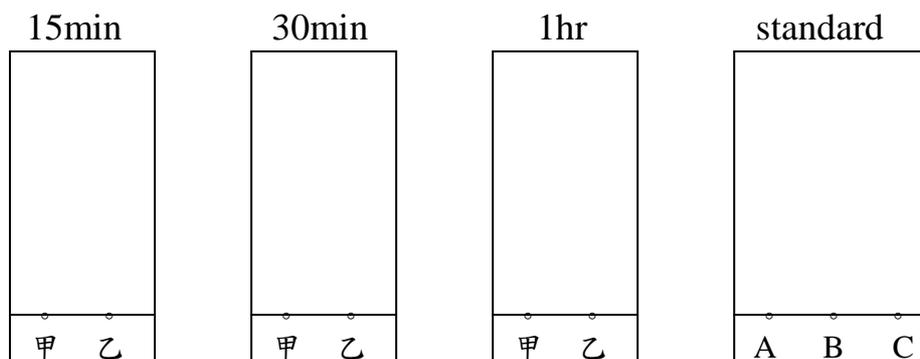
1、配製緩衝溶液： pH=_____

藥品名稱	結構式	分子量	用量	莫耳數
檸檬酸鈉				
氯化鈉				
蒸餾水				

2、15min、30min 和 1hr 的 TLC 片與標準品比較：

①沖提液為：_____

②自行畫出沖提液前端



③

	R _f 甲	R _f 乙 ₁	R _f 乙 ₂	R _f 乙 ₃
15min				
30min				
1hr				

甲瓶溶液為		乙瓶溶液為	
化合物 A 結構式	化合物 B 結構式	化合物 C 結構式	
$R_f A =$	$R_f B =$	$R_f C =$	
橘皮酵素水解雙酯會得到何種產物，B 或 C? _____			