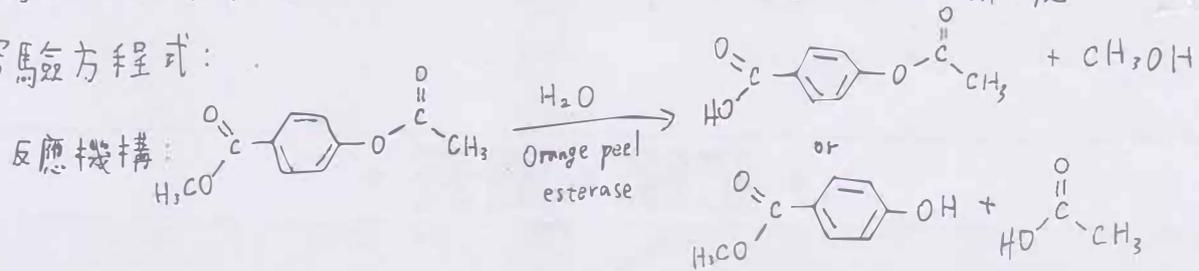


一. 實驗名稱: 萃取橘子皮的酯化西毒素——進行位置專一的酯水解反應

二. 實驗方程式:



三. 實驗原理:

西毒素催化反應依所使用的西毒素類型可分為:

1. 氧化還原西毒素 (Oxidoreductases)
2. 傳遞西毒素 (Transferases)
3. 水解西毒素 (Hydrolases)
4. 分解西毒素 (Lyases)
5. 異構西毒素 (Isomerases)
6. 結合西毒素 (Ligases)

而西毒素活性可藉由測量其化學變化而測定, 一般來說反應速率會在反應的過程中很快的降低, 可能是因受變質與生成物的平衡、pH值改變或生成物對西毒素的抑制所致。此外影響西毒素活性的因素有:

1. 溫度: 每增 $10^{\circ}C$ 約可使反應速率增加一倍, 但過高的溫度會使西毒素因熱變性失活。
2. pH值: 大多數西毒素最適pH值在 $4-7$ 之間, 一般會以緩衝溶液使pH值穩定。
3. 受質的影響: 在固定條件下反應速率決定於西毒素與受質的濃度。

四. 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大於 $0.1g$ 。
  - (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) 沖提液面不可超過起點線。
  - (3) 沖提時人不可離開, 一到終止線, 立即取出。
  - (4) 毛細管要平整。
  - (5) 點壞的TLC片可用甲醇當沖提液洗。
  - (6) 每次使用, 沖提液要重配, 因為乙醚易揮發。

# 五. 實驗步驟 & 實驗觀察

## 1. 標準片製作 (Standard TLC)

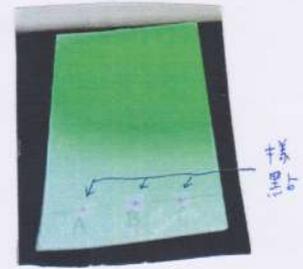
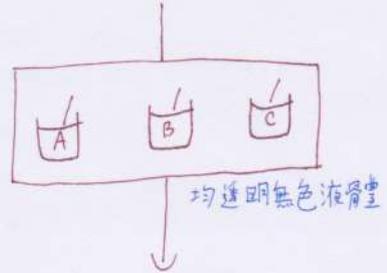
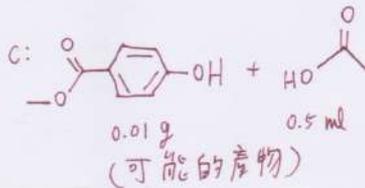
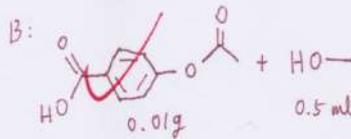
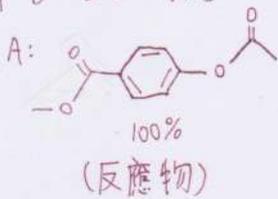
1-1 取用一張 3 cm X 5 cm 的 TLC 片，並在頭尾各 0.5 cm 處標上起點和終點線，並標上 A、B、C 三點。

- 起點線和終點線之間大約隔 4 cm 左右，略為誤差不會影響 R<sub>f</sub> 值，不要太近使結果難以辨識即可。
- 起點線和邊緣的距離要特別注意，避免後續跑片時樣點被浸到展開液中



1-2 以 UV light 照射確認乾淨無污染，之後取 A、B、C 三項溶液，以毛細管輕輕點樣 2~3 次在 TLC 片之 A、B、C 三點上，之後等待乾燥。

A、B、C 分別為：



已事先備好

## 2. 實驗組製作: (本次不做對照組)

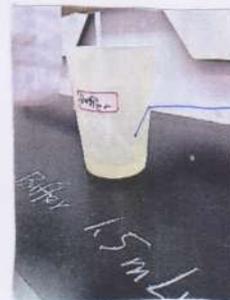
2-1 將橘子皮打成泥，之後使用離心機使之沉澱，取上層澄清液 0.5 ml。

- 已事先完成。
- 因為老師取澄清液時並非用滴管吸取，而是用倒的，因此我們使用的橘皮萃取液含有一些殘渣，呈現黃色。(不過這並不會干擾結果)



2-2 配製 buffer for pH 5.5, 使用檸檬酸鈉 14.7g、氯化鈉 23g、蒸餾水 962 ml。

- 已事先完成。
- 緩衝溶液通常含有一種以上弱酸/鹼及其共軛鹼/酸。它們可以在酸性環境中擔任鹼的角色吸收 H<sup>+</sup>，而在鹼性環境中可作為酸，提供 H<sup>+</sup>。(每種 Buffer 維持的 pH 值都有不同)
- 緩衝溶液在微生物培養中也尤為重要，因為微生物就和酵素一樣容易受到 pH 值的影響。我們會在培養基中加入 buffer，避免微生物因代謝產物改變周邊 pH 值之後將自己殺死，所幸做為氮源的胺基酸本身就具有 Buffer 的功能。
- 不過 buffer 在超過一定的乘載上限後就不再能穩定住 pH 值，而且此時 pH 值也會快速上升/下降接近於沒有 buffer 時的數值。



透明無色，檸檬酸鈉為主要有效成分。

2-3 取一乾淨的燒杯，裝入 0.5 ml 橘子皮萃取液、1.5 ml buffer 和 0.3 ml A 溶液，隨後不斷搖晃使其充分反應，並計時。

此時 O=C(O)c1ccc(OC(=O)C)cc1 正在被分解。  
(A)

2-4 取一張 3 cm x 5 cm 的 TLC 片，同樣和標準片一樣劃記並照射 UV light 確認，不過改標記 10、20、30 三點。將燒杯中溶液每 10、20、30 min 用乾淨的毛細管採取並點樣（請參考第 1-1、1-2 步驟）

· 一組有兩人，可以一人負責搖燒杯，另一人處理 TLC 片和後續的步驟。  
· 每次取樣必須使新的毛細管避免交叉污染。

2-5 完成後等待乾燥，並與標準片一同準備進行跑片。  
· 也可以先將標準片先拿去跑，節省時間。詳細會在後面介紹。



### 3. TLC 分析：

3-1 在抽氣櫃中準備乙酉迷和正己烷，各取 0.75 ml，以 1:1 的比例加入至跑片槽。

· 每次跑片都需要重新調配，因乙酉迷極易揮發，會使比例跑掉，讓展開液的極性改變，影響結果。

3-2 將其中一片 TLC 片放入跑片槽並上蓋防止展開液揮發，當展開液因毛細作用上升接觸終點線時立即取出，放於一旁等待乾燥。

· 如果有更大的 TLC 片和跑片槽其實可以同時分析更多的樣品，不過分批進行或同時進行並不會影響結果。

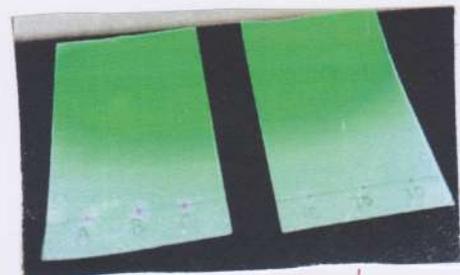
· 分批的好處在於當我們正在等待 2-3 步中的酶反應時可以同步進行標準片的分析。

3-3 重覆 3-1 ~ 3-2 步驟完成另一片 TLC 片。

· 為了避免誤差，我們兩次都是立即配好馬上跑片的。

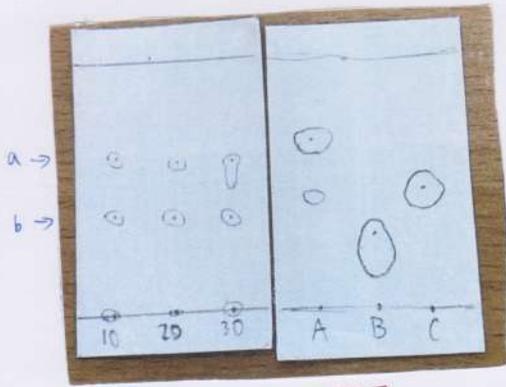
3-4 以 UV light 照射顯色，並做上記號，測量、計算，並比較結果，說明化合物 A 在受酵素催化水解後發生了什麼。

· 在結果中只發現 A 和 C 化合物 (RF 值接近) 的存在，然而其 RF 值都略小



(已調整相對比度)  
因列印而不清楚

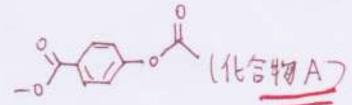
## 六. 結果:



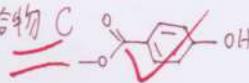
極性較小 極性較大  
 設寬馬組遠近終點線者為 a, 另一點為 b。

R<sub>f</sub> 值: A: 0.66 B: 0.26 C: 0.45  
 a<sub>10</sub>: 0.62 b<sub>10</sub>: 0.39  
 a<sub>20</sub>: 0.58 b<sub>20</sub>: 0.38  
 a<sub>30</sub>: 0.58 b<sub>30</sub>: 0.37

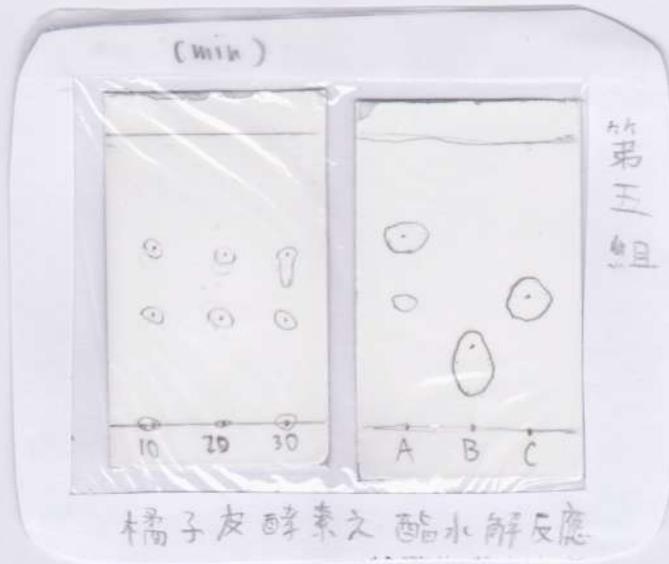
點 a 明顯為非反應的反應物



點 b 比較接近化合物 C



- a<sub>30</sub> 發生細長狀脫尾
- B 發生因濃度過高的脫尾現象
- A 發生分離, 代表不純, 較小的點很淺, 並接近於 C



## 七. 討論:

1. 關於標準組中 A 化合物發生組成成分分離的成因:

本次實驗中的 A 化合物 (雙酯類) 由於存放過久, 因而發生自然水解, 產生了微量的其它物質 (很可能是化合物 C), 不過這幾乎不會干擾實驗的結果, 因為同一種化合物在同樣的條件下, 無論是不是被參雜在混合物中 (除非它們之間具有較高的作用力, 會互相拉扯, 或是濃度太高會相互碰撞) 其 R<sub>f</sub> 值的差異不大。

2. 在樣本中 a 和 b 的 R<sub>f</sub> 值均低於預期 (標準組) 的可能原因:

我們在實驗中使用的展開液混合了兩種溶劑, 它們的蒸散速率並不相同, 假如在調配之後放置過久會因此出現比例上的錯誤, 這可能導致展開液的極性下降 (尤其乙醚和正己烷中, 乙醚極性較高, 但更易揮發), 造成展開液的吸附能力下降。

然而我們在每次進行跑片之前, 都是在放入 TLC 片的前幾秒才將展開液配好, 就是為了避免這種失誤。(除非吸取液體時發生了操作上的失誤)

所以說，假如不是因為上述的原因，那麼還有一些可能的因素，例如參入了雜質。

一般而言，TLC片上的樣本假如是混合物，那麼該樣本將會跑出複數個點，正如同我們的樣本分離出了 a、b 兩點，樣點 A 也分離出了淺淺的一點（從前面的推測中猜想其為因自然水解產生的化合物 C），它們都是明確分離的圓點，這也是 TLC 能用來分析混合物中的物質數量和種類的原因。

但是有時候分子間會具有吸引力而互相拉扯，使較快的組成成分變慢、較慢的組成成分變快。而當這件事情發生時也能觀察到脫尾的現象（正如 30 分鐘樣本中能看到，a<sub>0</sub> 有細長的脫尾，和標準組中樣本 B 因濃度太高導致的寬、大、濃的脫尾不同）。

驗證此猜想的方法可能可以嘗試重新點樣，但點的量（濃度）更淺一些，應該能看出一些差異（如分離或得到較接近標準組的 R<sub>f</sub> 值）。

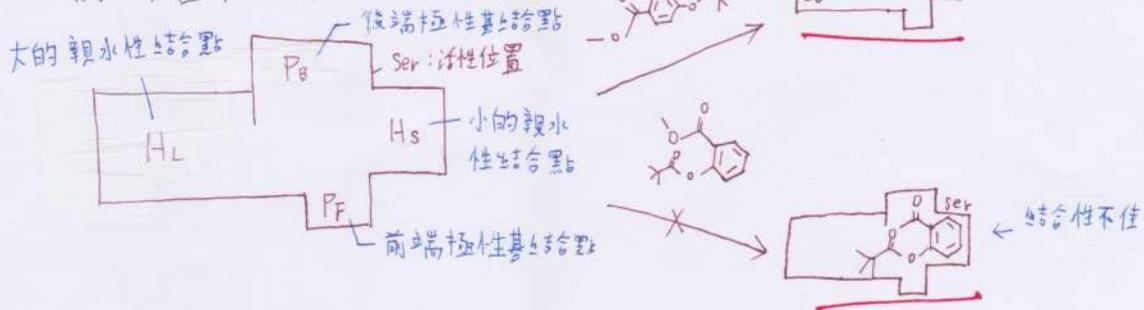
除此之外，TLC 片的品質不一致，如矽膠的厚度、受潮程度等都有可能造成這樣的結果。

### 3. 酵素專一性的原理：

一般來說，酵素與受質的結合都具有很強大的專一性，一個酵素只會對一種特定的物質，或是具有特定結構的部位進行結合（binding）並催化。

基本上除了少數酵素的主成分為 RNA 之外，其餘多數酵素皆由蛋白質組成，主成分為胺基酸，而其帶有的基團有各種各樣（例如極性、非極性），使得酵素得以在不同的部位上能夠吸引不同的基團，再加上酵素本身的形狀，使之能夠有選擇性的與不同的受質結合。

例如下圖中豬肝酯化酵素的例子：



對於酵素專一性最早的解釋是 1890 年 Emil Fisher 提出的鎖鑰假說（Lock and Key），認為酵素就像是一個鎖一樣，其活性部位只有一個只能容許特定物質/結構進入的凹槽，使得酵素只能與特定的受質結合，例如上面對於豬肝酯化酵素的說明一樣，酵素前後是不會改變的。

不過此外還有另一種模型對於過程發生的細節進行了說明。就像是許多蛋白質一樣，酵素也被認為是靈活多變的，它們會在與受質結合的過程中漸漸的與受質契合（一開始並不吻合），然後發生反應，這也就是 Daniel Koshland 在 1958 年提出的誘導契合模型（Induced-Fit Model）。



# 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：食科2B 姓名：董子澤 學號：S10620236 組別：第五組 日期：2022/10/19

### 數據及結果：

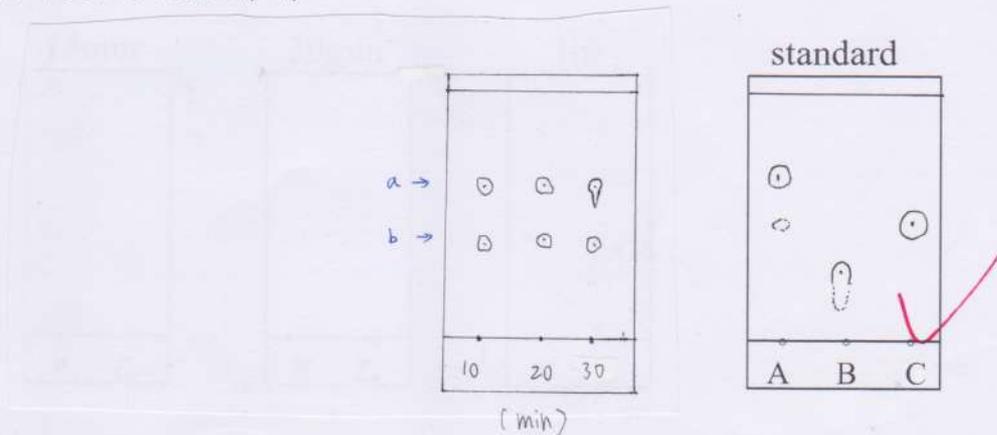
1、配製緩衝溶液：pH = 5.5

藥品名稱	結構式	分子量	用量	莫耳數
檸檬酸鈉	<chem>C6H5Na3O7.2H2O</chem>	258(+36) <small>當小</small>	14.7 g	0.05
氯化鈉	<chem>NaCl</chem>	58	23 g	0.397
蒸餾水	<chem>H2O</chem>	18	962 ml	53.4

2、15min、30min 和 1hr 的 TLC 片與標準品比較：

① 沖提液為：ether + hexane (1:1) 0.75 ml ether + 0.75 ml hexane

② 自行畫出沖提液前端



③

	$R_f$ a	$R_f$ b	$R_f$ (standard)
15min	0.62	0.39	A: 0.66
30min	0.58	0.38	B: 0.26
1hr	0.58	0.37	C: 0.45

$R_f$ : a 接近於 A  
b 接近於 C, 但略小

甲瓶溶液為		乙瓶溶液為	
		0.3 ml diester solution + 1.5 ml buffer + 0.5 ml orange peel extract	
化合物 A 結構式	化合物 B 結構式	化合物 C 結構式	
$R_f A = 0.66$	$R_f B = 0.26$	$R_f C = 0.45$	
橘皮酵素水解雙酯會得到何種產物，B 或 C? <u>C</u>			