

利用熱力學探討香蕉泥中 過氧化酵素熱變性反應

高中教師組化學科第三名

省立佳多高級農校

作者：林正昌

一、研究動機

本省香蕉常因生產過剩，没人要而亂丟棄，任其腐敗，多麼可惜。目前爲何尚無法拿它來加工，主要原因是香蕉在加工過程中，有嚴重的褐變現象。目前尚找不到有效方法來克服。一般食品在加工前必須先經殺菁（以熱破壞酵素）手續以抑制酵素褐變，香蕉的褐變非常特殊，兼具有酵素性褐變和非酵素性褐變，當以熱來破壞酵素以抑制酵素褐變，若加熱溫度與時間超過，却相反地促進非酵素性褐變，本研究主要探討一種迅速又經濟之方法，能測出殺菁所需之「溫度與時間」之組合，有效地破壞酵素活性，抑制酵素褐變，同時又不會引起非酵素性褐變。

二、研究目的

- (一)探討酵素活性之數學方程式，直接利用數學公式計算完全有效抑制酵素褐變所需「溫度與時間」組合之模式，取代傳統盲目嘗試之方法。
- (二)了解香蕉泥中過氧化酵素變性反應之級數、半衰期、及熱力學常數： k_{eq} ， k ， ΔG^0 ， ΔH^0 ， ΔS^0 等。
- (三)探討香蕉泥中過氧化酵素經加熱破壞後，酵素之再活化性。

三、研究設備器材

- (一)材料：本實驗所用香蕉，品種屬Cavendish品種。
- (二)藥品：檸檬酸——島久藥品株式會社出品。Guaiacol，o-

phenylenediamine , p-cresol , 均採用和光純藥品工業株式會社出品。

(三)儀器：分光光度計以 shimadzu uv-200 。

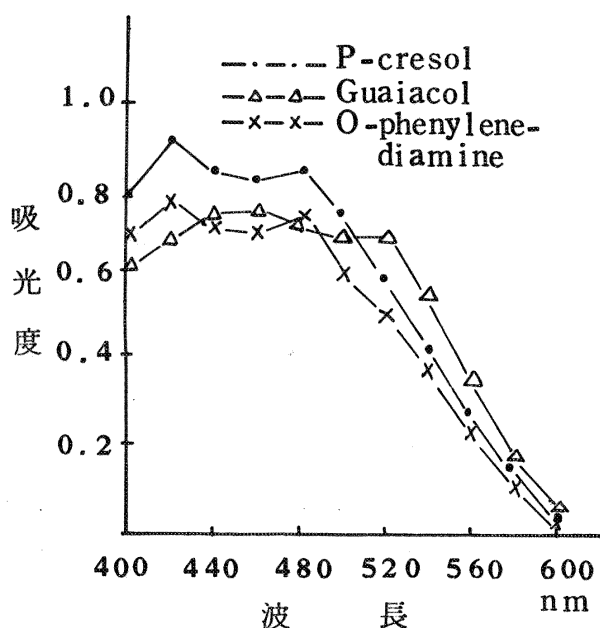
四、研究過程

(一)酵素活性最佳基質及最大吸光度之波長之選擇：

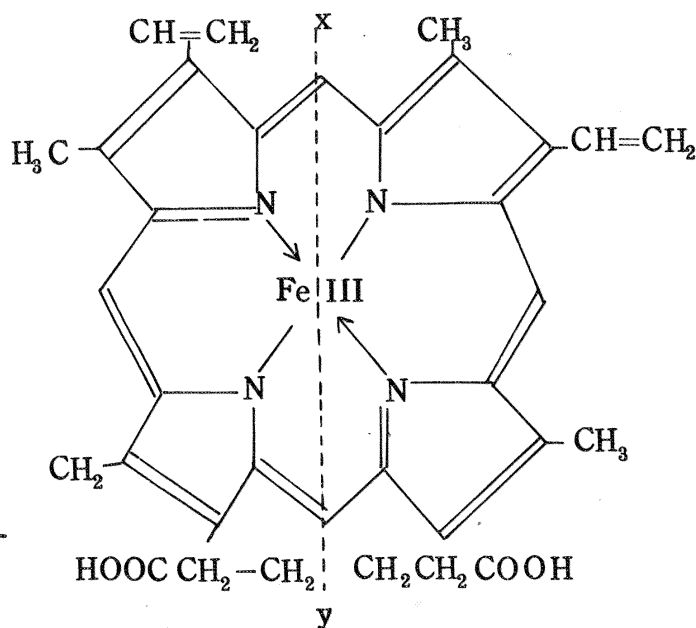
1.方法：自 Guaiacol , O-phenylenediamine , p-cresol 三種基質中選擇對香蕉泥中過氧化酵素感度最高之基質。

果實泥用離心機，1,300rpm離心10min，取上層澄清液1ml，加1%檸檬酸緩衝液(pH5 4ml和0.3% H_2O_2 1ml)置於試管內，充分混合。整支試管浸於30°C恒溫。槽內30min，然後分別加入0.2M基質溶液0.5ml充分混合，再置於30°C恒溫水槽內，正確反應5min後取出，迅速以冰水冷却，加3% $NaHSO_3$ 1ml中止反應，分別以分光光度計(Spectrophotometer, Shimadzu UV-200)波長400~600nm間，測其吸收光譜，求最大吸光度之基質及最大吸光度之波長。

2.結果：如圖二



圖二 香蕉泥中過氧化酵素與 P-cresol, Guaiacol, O-phenylenediamine 溶液在可視光區之吸收光譜。



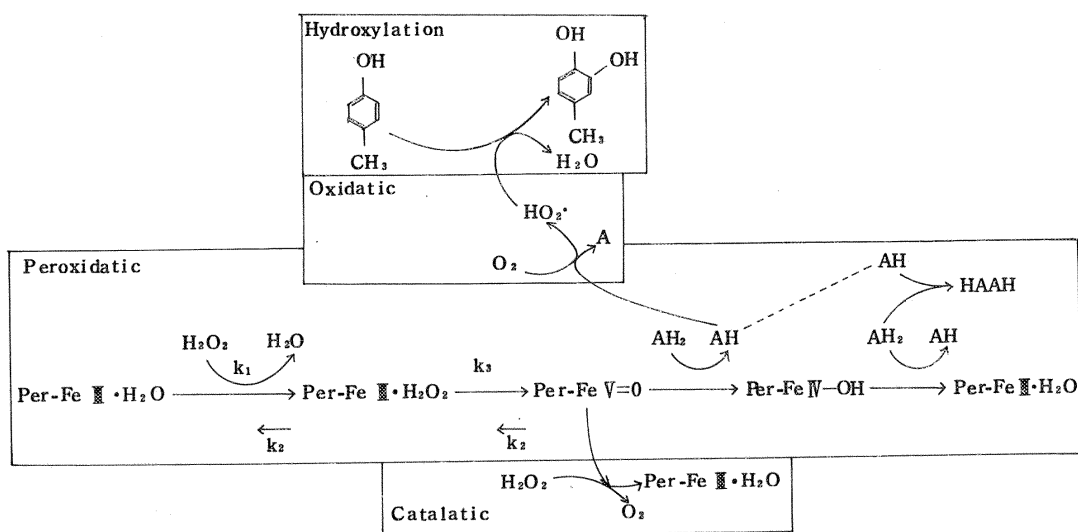
圖三 過氧化酵素結構

3. 結論：

(1)香蕉泥中過氧化酵素性以對 p-cresol 活性感度最高，吸光度 0.92。

(2)由資料（註 2）過氧化酵素是一種含鐵的 porphyrin，結構如圖三。

4.由資料（註 3）以 p-cresol 為例，過氧化酵素反應機構如下：



(二)破壞香蕉泥中過氧化酵素最有利 pH 值之選擇：

1. 方法：

(1)不同 PH 值，加熱 75°C ，20 sec，香蕉泥中過氧化酵素相對活性測定：

香蕉泥先調整不同 PH 值，裝滿於試管內，塞好橡皮塞，置於 75°C 恒溫水槽內，當試管中心溫度達 75°C 時開始計時 20 sec，每一種 PH 值取 3 支，分別以離心機 300rpm，離心 10 min，取上層澄清液 1 ml，置於試管內加 0.3% H_2O_2 1 ml，充分混合，試管浸於恒溫槽內保持 30°C ，30min，再加 1% P-cresol 0.5ml，正確反應 5 min 迅速取出加 30% NaHSO_3 1ml 中止反應，以分光光度計，波長 420 nm 測其吸光度，香蕉泥中過氧化酵素相對活性單位以每 ml 酵素反應 5 min 增加 0.1 吸光度作為 1 個相對活

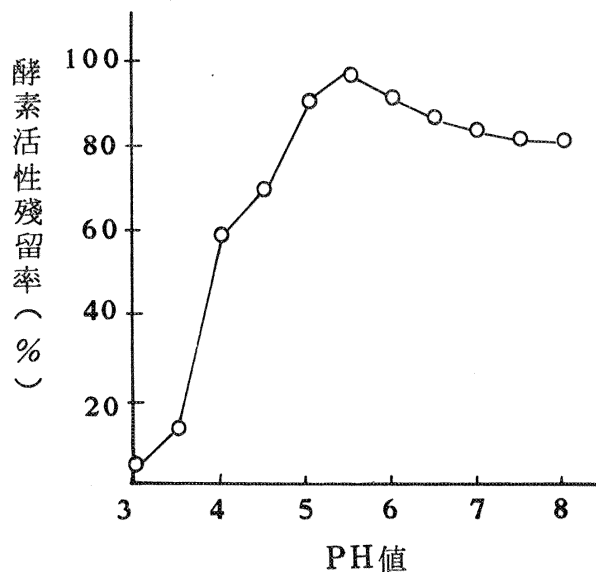
性單位。此所得相對活性爲 (E)。

(2) PH 5.5，加熱前原來香蕉泥中過氧化酵素相對活性測定：

此所得相對活性爲 (E₀)，定 (E₀) 爲 100，計算不同 PH 下，香蕉泥經加熱 75°C 20 sec 後，過氧化酵素活性

$$\text{殘留率} : \frac{(E)}{(E_0)} \times 100 \%。$$

2. 結果：(如圖四)。



圖四 PH 值對香蕉泥中過氧化酵素之熱安定性之影響

3. 討論：

(1) 溫度爲何選擇 75°C？由資料 (註 4) 溫度不同，對酵素活性最有之 PH 值會不一樣。由實驗知道在 75°C 時香蕉泥中過氧化酵素已開始被破壞，故本實驗以 75°C 20 sec，其主要目的是要選擇破壞香蕉泥中過氧化酵素活性最有利之 PH 值，藉 PH 值來增強破壞效果。

(2) 由圖四，香蕉泥中過氧化酵素在 PH 5.5 時最耐熱，尤其在 PH 4.5 以下時，酵素活性驟然下降。

(3) PH 值越低對香蕉泥中過氧化酵素之熱破壞越有促進效果。本實驗採取 PH 4.2，因兼顧到將來實際應用在香蕉加工時適宜人類食用之酸度。

(4) 本實驗在作酵素活性最佳，基質選擇時，採取 PH 5.5，因

PH5.5 時對酵素活性較有利。

(二)溫度對香蕉泥中過氧化酵素活性之反應：

1. 方法：

(1) PH4.2 加熱後，香蕉泥中過氧化酵素相對活性 (E) 之測定：

香蕉泥以 1 % 檸檬酸調整 PH4.2 裝滿於試管內，橡皮塞塞好，浸於恒溫水槽，溫度分別控制 40°C, 50°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 90°C，試管中心溫度到達預定溫度後開始計時，分別為 20sec，每種溫度取 3 支，立即以冰水冷卻，離心 300rpm, 10 min，取上層澄清液 1 ml，置於試管內，加 0.3 % H₂O₂ 1 ml，充分混合，試管浸於恒溫水槽內，保持 30°C, 30 min，再加 1 % P-cresol 0.5 ml，正確反應 5 min，迅速取出加 30 % NaHSO₃ 1 ml 中止反應，以分光光度計波長 420nm，測其吸光度，過氧化酵素相對活性單位以每 ml 酵素反應 5 min，增加 0.1 吸光度作為 1 個相對活性單位。

(2) PH5.5 未加熱前原來香蕉泥中過氧化酵素相對活性 (E₀) 之測定：

香蕉泥先調整 PH5.5，以離心機離心 300 rpm, 10 min，取上層澄清液 1 ml，置於試管內，加 0.3 % H₂O₂ 1 ml，充分混合，試管浸於恒溫水槽內，保持 30°C, 30 min，再加 1 % P-cresol 0.5 ml，充分混合，正確反應 5 min，迅速取出，加 30 % NaHSO₃ 1 ml 中止反應，以分光光度計，波長 420 nm 測其吸光度，並以每 ml 酵素反應 5 min，增加 0.1 吸光度作為 1 個酵素相對活性單位，以此所測得為未加熱前原來香蕉泥中過氧化酵素相對活性 (E₀)，定 (E₀) 為 100，計算不同溫度下酵素活性增加或

$$\text{殘留率} : \frac{(E)}{(E_0)} \times 100 \%。$$

2. 結果：如表一。

表一 不同溫度加熱 20 sec 後過氧化酵素之活性

溫度 (°C)	加熱 20 sec 酵素活性 增加率或殘留率 (%)
40	166
50	172
60	176
65	178
70	77
75	65
80	41
90	7

3. 討論：

(1) 利用化學動力論，由資料（註 5）一般酵素變性之反應屬於一級反應，故本實驗假設：“香蕉泥中過氧化酵素熱變性是一級反應”。 $A \xrightarrow{k} P$ 一級反應，必須要滿足： $kt = 2.3$

$\log \frac{(A_0)}{(A)}$ ① (A_0) ：是反應前反應物濃度。 (A) ：反

應 t 時後，反應物剩下濃度。

本實驗探討酵素熱變性反應，故 (A_0) = 未加熱前原來酵素濃度。 (A) = 經 $T^\circ C$ ， t 時後酵素剩下濃度。

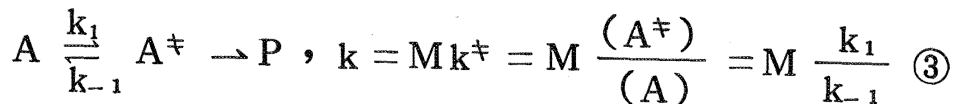
$\frac{(A_0)}{(A)}$ 之比值，濃度單位相互抵消，故凡是和酵素濃度相對變化關係之變數（parameter），皆可用來代替 $\frac{(A_0)}{(A)}$ ，

酵素濃度比 = 酵素相對活性比。酵素相對活性由酵素和基質反應之吸光度測出。

$$\frac{(A_0)}{(A)} = \frac{(E_0)}{(E)} = \frac{1}{\text{酵素活性殘留率}}$$

$$\textcircled{1} \text{式變成 } kt = 2.3 \log \frac{1}{\text{酵素活性殘留率}} \quad \textcircled{2}$$

(2) 依照反應過度狀態理論 (註 6)，A 必須吸收足夠活化能 (E_a)，才能變成活化複體 A^\ddagger ，然後轉變成生成物 P，



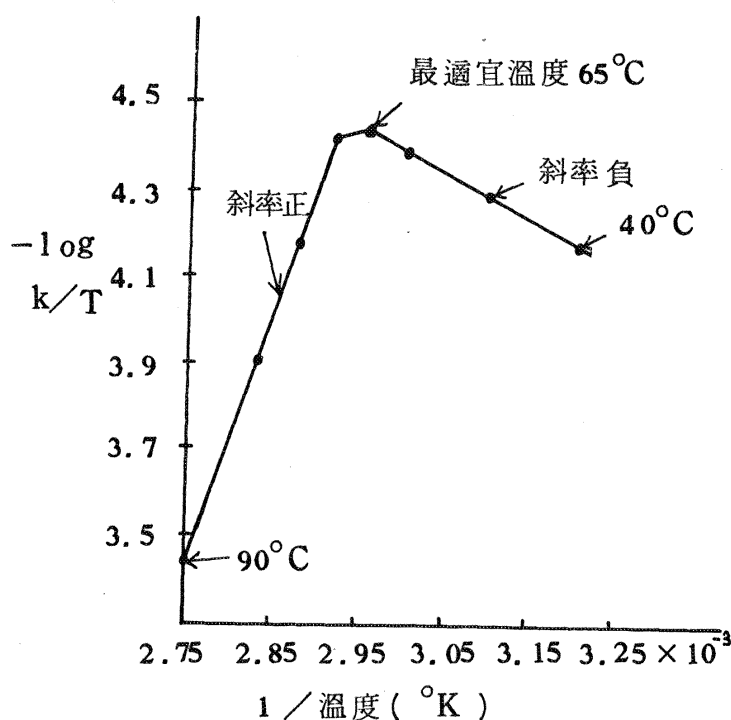
$$k^\ddagger = \frac{(A^\ddagger)}{(A)} = \frac{k_1}{k_{-1}} = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger_0}{RT}} \quad \textcircled{4} \quad M = \frac{RT}{Nh} =$$

$$\frac{k_B T}{h} \quad \textcircled{5}, \text{ 把 } \textcircled{4}、\textcircled{5} \text{ 代入 } \textcircled{3} \text{ 中, } k = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger_0}{RT}} \quad \textcircled{6}$$

$$\Delta G^\ddagger_0 = \Delta H^\ddagger_0 - T \Delta S^\ddagger_0 \quad \textcircled{7} \quad \text{把 } \textcircled{7} \text{ 代入 } \textcircled{6} \text{ 中, } k = \frac{k_B T}{h} \cdot$$

$$e^{-\frac{(T \Delta S^\ddagger_0 - \Delta H^\ddagger_0)}{RT}} \quad \textcircled{8} \quad 2.3 \log \frac{k}{T} = 2.3 \log \frac{k_B}{h} +$$

$$\frac{\Delta S^\ddagger_0}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger_0}{RT} \quad \textcircled{9}。$$



圖六 溫度與香蕉泥中過氧化酵素活性關係

將表一之結果，利用②式和⑨式，以 $-\log \frac{k}{T}$ 對 $\frac{1}{T}$ 作圖，結果如圖六，可看出溫度對香蕉泥中過氧化酵素活性之影響。圖中分兩段直線，一段斜率為正，另一段斜率為負，在兩條直線相交點，即 $\frac{dy}{dx} = 0$ 處，是為酵素作用最適當

之溫度。香蕉泥中過氧化酵素作用最適當之溫度為 65°C 。

(3)在 $40 \sim 65^{\circ}\text{C}$ ，斜率為負，表示在此段溫度範圍內，溫度升高，香蕉泥中過氧化酵素活性增加，速率加快，一直到 65°C 止。

(4)在 $65 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 斜率為正，表示在此段溫度範圍內，溫度升高香蕉泥中過氧化酵素活性減低，速率減慢，也即表示香蕉泥中過氧化酵素在 $65 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 範圍內變性。故本實驗採取 $65 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 作熱力動力學研究。

(四)加熱對香蕉泥中過氧化酵素變性反應之熱力動力學之探討：

1. 方法：

(1) PH4.2 不同加熱條件下，香蕉泥中過氧化酵素相對活性(E)之測定：

香蕉泥先調整 PH4.2，裝滿於試管內，以橡皮塞塞好，浸於恒溫水槽內，溫度分別控制 75°C ， 80°C ， 90°C ，每種溫度加熱之時間分別為 20 sec，40 sec，60 sec，80 sec，每種溫度和時間組合分別取 3 支，立即以冰水冷卻，離心 300 rpm，10 min，取澄清液 1 ml，置於試管內，加 0.3% H_2O_2 1 ml，充分混合，試管浸於恒溫水槽內，保持 30°C ，30 min，再加 1% p-cresol 0.5 ml，正確反應 5 min，迅速取出加 30% NaHSO_3 1 ml，中止反應，以分光光度計，波長 420 nm，測其吸光度，並以每 ml 酵素反應 5 min 增加 0.1 吸光度作為 1 個酵素相對活性單位。

(2) PH5.5，未經加熱前原來香蕉泥中過氧化酵素相對活性

(E_0) 之測定：

如同(三) 1.(2)，並計算不同加熱條件下香蕉泥中過氧化酵素

$$\text{素活性殘留率} = \frac{(E)}{(E_0)} \times 100\%$$

2. 結果：如表二。

表二 加熱對香蕉泥中過氧化酵素活性殘留

溫度 (°C)	香蕉泥中心溫度達預定溫度後加熱時間 (sec)			
	20	40	60	80
	酵素活性殘留率 (%)			
75	65	42	22	18
80	41	17	8	3
90	7	< 0.2	< 0.1	< 0.1

3. 討論：

(1) 香蕉泥中過氧化酵素熱變性反應之反應級數和反應速率常數，在(三) 3.(1)討論中假設“香蕉泥中過氧化酵素熱變性反應是一級反應”。

由公式② $kt = 2.3 \log \frac{(E_0)}{(E)}$ ，以 $2.3 \log \frac{(E_0)}{(E)}$

對 t 作圖，必須是一條直線斜率為 k ，單位是 sec^{-1} 。由表

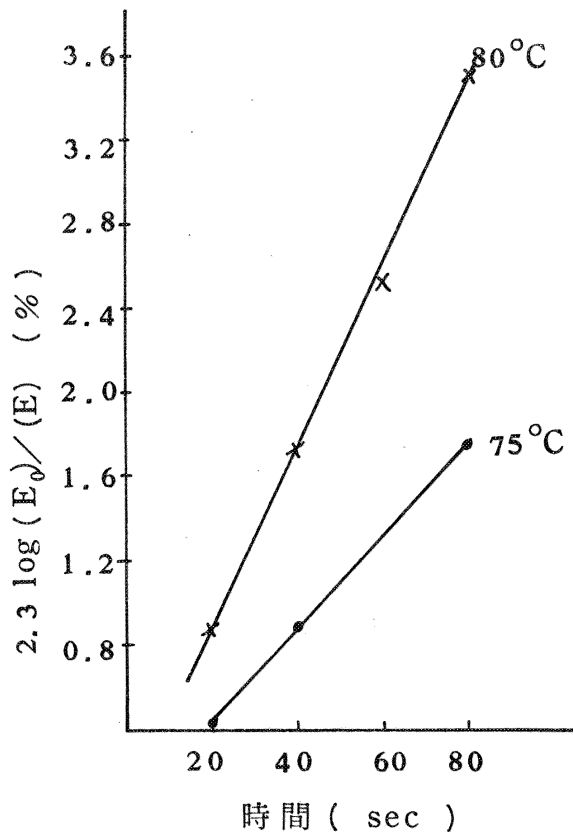
二結果代入公式②中，可得結果如表三，以 $2.3 \log \frac{(E_0)}{(E)}$ 對

t 作圖，結果如圖七。

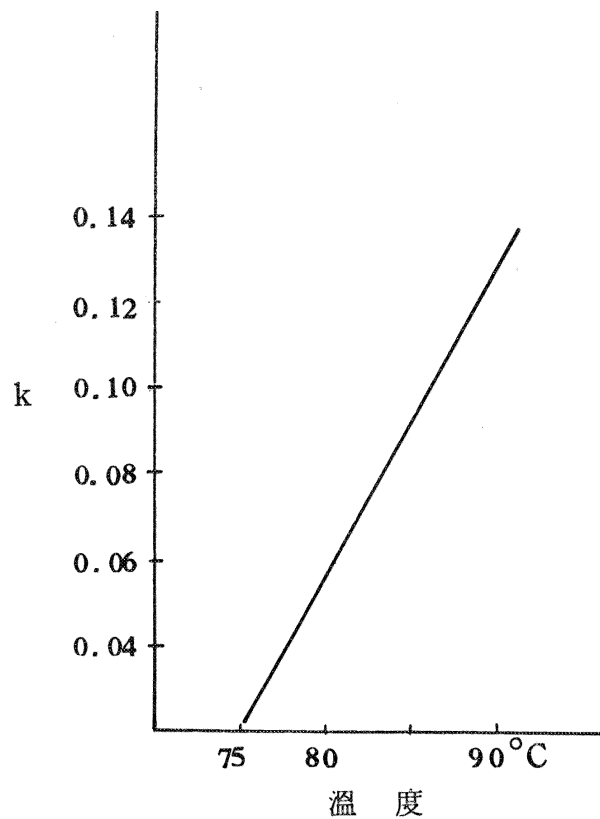
由圖七關係，在 75°C ， 80°C 時均呈一直線，證明假設“香蕉泥中過氧化酵素熱變性反應是一級反應”。成立。

由表三溫度一定時香蕉泥中過氧化酵素加熱變性反應速

率一定和加熱時間長短無關。在 80°C 時 $k = 0.044$ ，在 90°C 時 $k = 0.133$ ，在 75°C 時 $k = 0.023$ 。以 k 對 t 作圖，結果如圖八。香蕉泥中過氧化酵素熱變性速率和溫度成正比。



圖七 香蕉泥中過氧化酵素加熱活性殘留率 and 溫度、時間關係。



圖八 香蕉泥中過氧化酵素熱變性速率和溫度關係

表三 香蕉泥中過氧化酵素熱變性速率常數

時間(sec)	75°C 時之 k	80°C 時之 k	90°C 時之 k
20	0.022	0.045	0.133
40	0.022	0.044	—
60	0.025	0.042	—
80	0.021	0.044	—
平均	0.023	0.044	0.133

(2)香蕉泥中過氧化酵素熱變性反應之熱力動力常數 (thermodynamic parameter) : k_{eq} , ΔG^0 , ΔH^0 , ΔS^0 。

依照 Van't Hoff relationship : $\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{\Delta H^0}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 \cdot T_1} \right)$

$$\textcircled{10} \quad \ln k = - \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \text{reactant} \quad \frac{k_1}{k_{-1}} \quad \text{product} ,$$

k_1 : $T_1^\circ\text{C}$ 時之平衡常數。

k_2 : $T_2^\circ\text{C}$ 時之平衡常數。

$$k_{eq} = \frac{(\text{product})_{eq}}{(\text{reactant})_{eq}} = \frac{(E_0) - (E)_{eq}}{(E)_{eq}} = \frac{(E_0)}{(E)_{eq}} - 1 \textcircled{11}$$

$$75^\circ\text{C} , 20 \text{ sec} , k_{75} = 0.54$$

$$80^\circ\text{C} , 20 \text{ sec} , k_{80} = 1.44$$

$$90^\circ\text{C} , 20 \text{ sec} , k_{90} = 13.29$$

評語：爲了抑制香蕉在加工過程中之褐變，研究過氧化酵素之熱變性，尋求最佳殺菁之溫度 - 時間條件。以動力學方法探討，求得熱力學各項參數以及有效抑制酵素之條件，研究過程適當，數值處理尚合理。結果對農產加工有參考價值，亦可作爲高農食品化學實驗之補充教材。本文缺少文獻探討，撰寫方式有待改進。