

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會
作品說明書

國小組 化學科

第三名

080211

「瓜」熟酵弱 - 木瓜蛋白酵素天然美白牙膏

學校名稱：臺北市私立靜心高級中學(小學部)

作者： 小六 廖卉軒 小六 許智森 小六 陳炯赫 小六 林憶淳	指導老師： 王晶瑩 蔡垂其
---	-----------------------------

關鍵詞：木瓜蛋白酵素、酪蛋白、透析膜

摘 要

研究木瓜樹的木瓜蛋白酶活性及萃取、純化方法製成的自製木瓜蛋白酶牙膏。以氫氧化鈉滴定法測量酵素的活性，本研究發現，木瓜樹未成熟的果實，木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 3.93 (mL)。以純水萃取後再過濾的上清液，經超音波震盪、pH 7 緩衝溶液浸泡、烘箱 50 °C 乾燥，活性是置於室溫 25 °C 的 2.11 倍。以硫酸銨純化，活性為未經純化酵素的 1.63 倍，最後以豬腸膜分離硫酸銨。自製木瓜蛋白酶牙膏，能分解口腔內的蛋白質表膜層，除去最難去色的咖哩粉色素，增加自製木瓜蛋白酶牙膏與咖哩粉唾液混合液間的反應時間為 5 分鐘，以自製木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g 添加市售木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g，潔牙後的色差值 ΔE 1.49 最小，優於市售木瓜蛋白酶牙膏 ΔE 2.05。

壹、前言

一、研究動機

學校的木瓜樹要移除了，我們除了不捨也想要有效的利用資源，我們開始研究這棵木瓜樹可以如何運用，發現木瓜樹的汁液竟然具有潔牙去色的效果，擁有一口潔白的牙齒一直是我們夢寐以求的夢想，於是我們開始從牙膏的成分進行研究，發現市售美白牙膏中以化學藥劑去色的，多半含過氧化物具有刺激性，可能造成琺瑯質損傷、牙齒敏感與脆弱等不適反應。經由文獻搜尋後得知：木瓜樹中含有牙齒潔白的成分是木瓜蛋白酶，於是我們決定研究木瓜蛋白酶，希望可以得到最環保、天然、綠色化學的木瓜蛋白酶天然美白牙膏。

二、研究目的

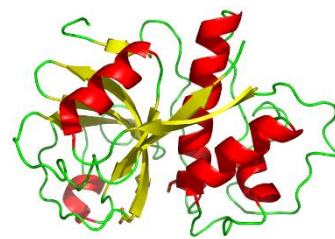
- (一) 探討木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶活性
- (二) 探討木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酶活性
- (三) 探討成熟與未成熟果實的木瓜蛋白酶活性
- (四) 探討不同處理法的木瓜蛋白酶活性
- (五) 探討不同 pH 溶液對木瓜蛋白酶活性的影響
- (六) 探討不同烘乾溫度對木瓜蛋白酶活性的影響
- (七) 探討酵素純化對木瓜蛋白酶活性的影響

(八) 探討如何去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨

(九) 模擬牙齒染色實驗

(十) 研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力

(十一) 研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法



三、文獻回顧

【圖 1】木瓜蛋白酶三維結構

(一) 木瓜蛋白酶

木瓜蛋白酶 (papain) 簡稱木瓜酶、木瓜酵素，又稱嫩精或木瓜粉，為蛋白水解酶，存在於木瓜的莖、葉和果實內。分子量為 23400，由單肽鏈組成，含有 212 個胺基酸殘基，其結構如【圖 1】，是一種在酸性、中性、鹼性環境下均能分解蛋白質的蛋白酶。

(二) 木瓜蛋白酶相關的研究與分析

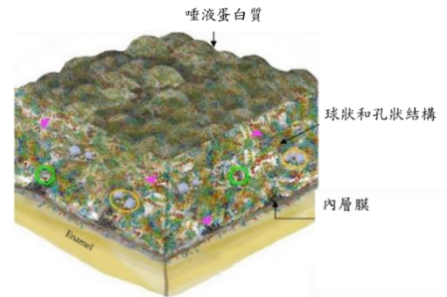
【表 1】木瓜蛋白酶相關的研究

作品類型	題目	研究焦點
中華民國第 53 屆中小學科學展覽會-化學科	酵果十足酵 CC~探討常見水果之維生素 C、澱粉酶、蛋白酶、脂肪酶的含量關係及其活性~	以鹼性硫酸銅溶液滴定鳳梨汁的蛋白酶含量，發現鳳梨汁中含有蛋白酶，蛋白質溶液會被分解掉，滴定後的溶液不會呈現紫色。
中華民國第 59 屆中小學科學展覽會-化學科	「膠」情「非」淺-探討魚鱗膠原蛋白的凝聚及水解分析研究	在魚膠溶液中添加新鮮青木瓜汁，發現因為果汁中的蛋白質分解酶作用而影響魚膠溶液的凝膠現象。經由 TLC 檢測魚膠水解液，發現水解後的魚膠確實會分解成較小的胜肽或胺基酸。
臺北市中等學校學生科學專題研究	木瓜酵素分解蛋白質分析研究	研究天然木瓜酵素做分解蛋白質實驗，用 TLC 分析及 HPLC 證實分解後的物質為胺基酸或是胜肽類。
臺北市中等學校學生科學專題研究	百善「酵」為先-用酵素分解酪蛋白	以光電比色器測量市售酵素及新鮮水果酵素去分解牛奶中酪蛋白後的吸光值。
國立高雄師範大學 教學碩士論文	木瓜乳汁之採集與木瓜酵素活性的研究	主要探討從木瓜株體或青碩果粒中，找出最佳的採乳方法，研究乾燥、儲存及純化的方法，製成高活性的木瓜酵素。
國外期刊	Efficacy of Extrinsic Stain Removal by Novel Dentifrice Containing Papain and Bromelain Extracts	研究評估含有木瓜蛋白酶和鳳梨蛋白酶的市售潔齒劑的去汙效果。

在國內的科學報告中，都證實木瓜蛋白酶是蛋白質的水解酵素，國外文獻已證明可透過水解蛋白質表膜層來去除牙齒上的污漬。所以接下來的實驗，我們試著建立簡易的酵素活性測量方法，並且從木瓜各部位來萃取酵素，找出酵素活性最高的來源及萃取法並混合天然牙膏，研究模擬色素黏附的牙齒表面，並以自製的木瓜蛋白酶牙膏水解唾液膜來檢視潔牙能力。

(三) 牙垢

牙齒表面的蛋白質表膜層由唾液、淚溝液、宿主和細菌細胞的成分構成，如【圖 2】。具有保護功能，但也是細菌積聚的基質，會形成牙菌斑，易吸收色素，會導致牙齒產生污漬。



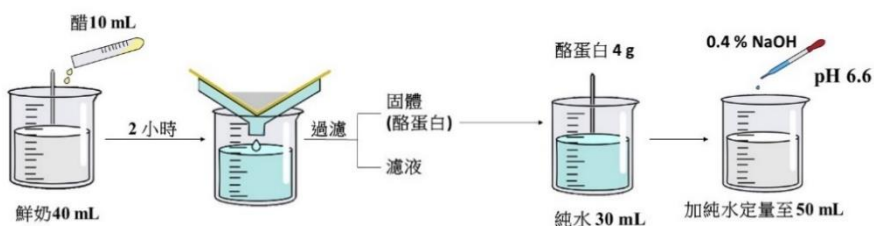
【圖 2】牙齒表面的蛋白質表膜層

貳、研究設備及器材

一、研究設備

(一) 模擬牙齒唾液膜—酪蛋白配製

1. 原理：牙齒唾液膜的蛋白質主要包括內層膜的組氨酸、富酪蛋白、富脯氨酸及外層膜的黏蛋白等，我們想到可以取牛奶中的酪蛋白，內含脯胺酸、酪胺酸、組氨酸，模擬口腔中的蛋白質表膜層。
2. 模擬牙齒唾液膜，示意圖如【圖 3】。



【圖 3】模擬牙齒唾液膜實驗示意圖

3. 0.4% 氫氧化鈉溶液配製：1 g 氫氧化鈉加純水 250 mL。

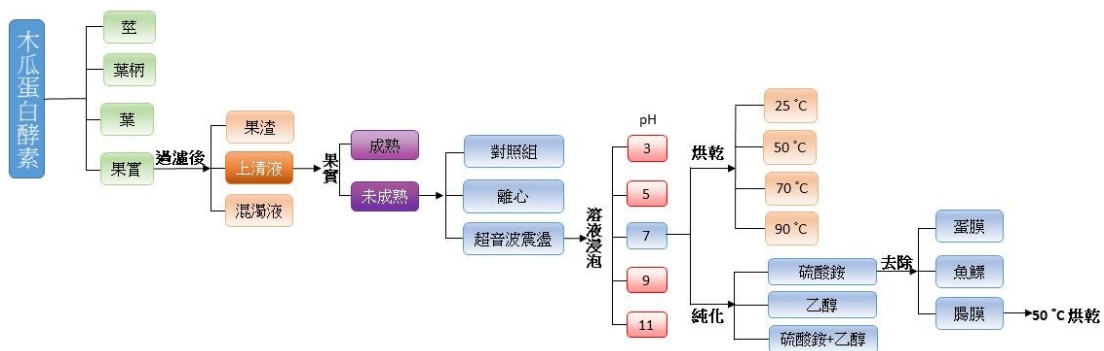


【圖 4】酪蛋白溶液配製流程圖

(二) 木瓜蛋白酶萃取及活性測量

1. 原理：木瓜蛋白酶對蛋白質有極強的水解能力，我們參考「木瓜蛋白酶活性測定方法」，設計在 25 °C 恆溫條件下，以酪蛋白溶液為基質，用氫氧化鈉滴定，測量木瓜蛋白酶水解酪蛋白後的釋出量。我們以滴定法計算溶液中被中和的程度，也就是酪蛋白被水解的程度，氫氧化鈉滴數越多即木瓜蛋白酶的活性越高。
2. 木瓜蛋白酶的萃取步驟

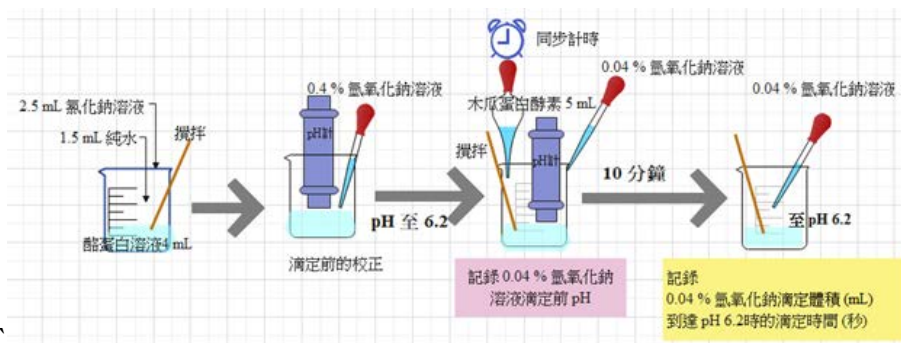
取實驗一~八結果，可得最高活性木瓜蛋白酶的製程，如【圖 5】。



【圖 5】木瓜蛋白酶萃取示意圖

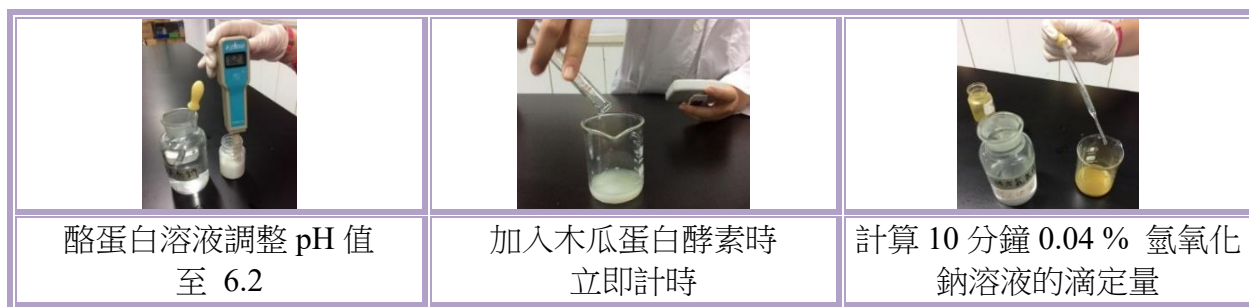
3. 木瓜蛋白酶活性測定方法

以氫氧化鈉滴定法測量，如【圖 6】，計算 10 分鐘內 0.04 % 氫氧化鈉溶液滴定的體積及記錄到達 pH 6.2 時的滴定時間。



【圖 6】木瓜蛋白酶活性測定示意圖

4. 氯化鈉溶液配製：17.5 g 氯化鈉 + 純水 100 mL。
5. 0.04 % 氫氧化鈉溶液配製：0.4 g 氫氧化鈉加純水 1000 mL。
6. 酪蛋白溶液配製：同酪蛋白溶液配製，但改 pH 值至 6.2。



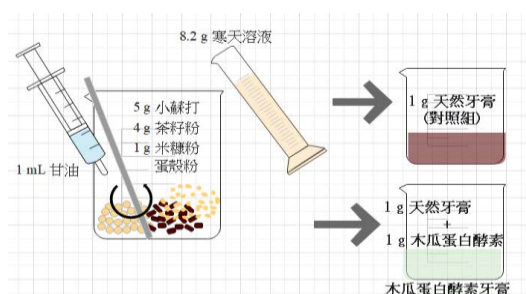
【圖 7】木瓜蛋白酶活性測定過程

(三) 天然牙膏及自製木瓜蛋白酶牙膏配製

1. 原理：我們參考中華民國第 54 屆科展「齒如含貝－以蛋殼等常見材料自製牙膏」，修改且調整他們自製牙膏的材料及劑量，以蛋殼、米糠粉為研磨劑，茶籽粉為界面活性劑，甘油為保濕劑，寒天溶液為膠黏劑，小蘇打粉為研磨抗菌除臭劑，再添加我們純化且經 50 °C 烘乾後的木瓜蛋白酶製成自製木瓜蛋白酶牙膏。

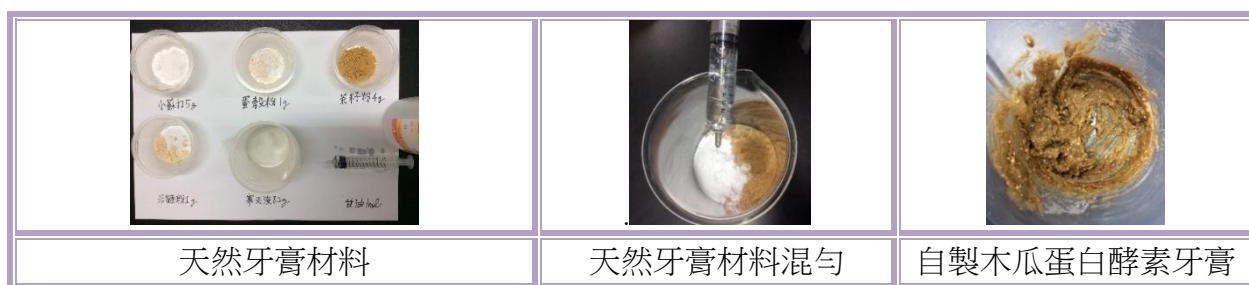
2. 天然牙膏、自製木瓜蛋白酶牙膏配製方法

以實驗一～八結果，將木瓜蛋白酶 1 g 加入 1 g 天然牙膏 (對照組)，製成木瓜蛋白酶牙膏，如【圖 8】。



【圖 8】自製木瓜蛋白酶牙膏示意圖

3. 寒天溶液的配製：12 g 寒天粉 + 90 °C 熱水 400 mL，用旋轉攪拌器攪拌均勻，冷卻時，放入冰箱 24 小時。

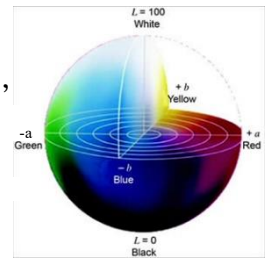


【圖 9】自製木瓜蛋白酶牙膏配製圖

(四) 牙齒色差測量－色差計

1. 原理：牙齒表面的蛋白質表膜層具有吸收色素的特性，我們以酪蛋白溶液模擬牙齒唾液膜，加入易將牙齒染色的色素，混勻後配成色素唾液混合液，塗在牡蠣殼上，牡蠣殼成分主要含有 37.4 % 鈣、鈉、鎂，我們以牡蠣殼模擬牙齒的珐瑯質、象牙質，以色差計測量染色前、潔牙後的 Lab，並計算色差值。

2. 色差計原理：Lab 為給定顏色的點在球面上的三維坐標，如【圖 10】。算 Lab 的距離知道色差值：

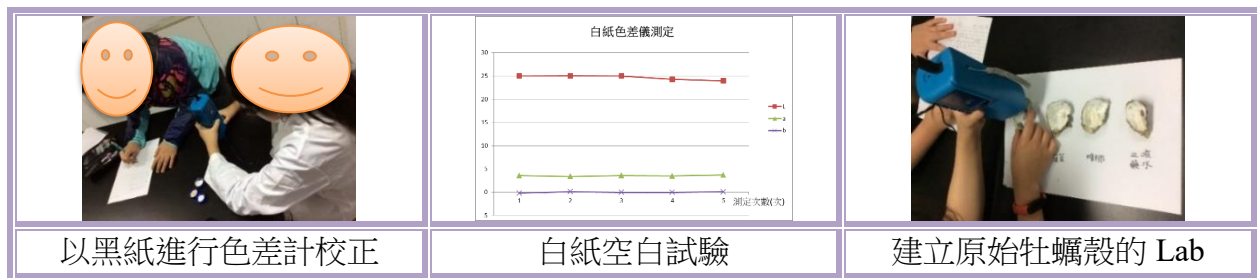


$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

色差值越小代表顏色越接近。

【圖 10】顏色的 Lab 三維座標

3. 色差計的測量：記錄 L、a、b 值。實驗步驟圖解，如【圖 11】。



【圖 11】牙齒色差測量的過程

二、材料及藥品器材







(一) 天然食材或市售材料：木瓜樹 (成熟及未成熟果實、葉、葉柄、莖)、蛋殼粉、茶籽粉、米糠粉、寒天粉、檳榔、菠菜、咖哩粉、咳嗽藥水、雞蛋膜、秋刀魚魚鰓、豬腸膜、牡蠣殼、冰塊、市售木瓜蛋白酶牙膏

(二) 藥品：小蘇打、甘油、乙醇、氫氧化鈉、氯化鈉、硫酸銨、pH 3 醋酸鹽緩衝溶液、pH 5、7、9 磷酸鹽緩衝溶液、pH 11 碳酸鹽緩衝溶液

(三) 器材：燒杯、玻璃滴管、玻璃廣口瓶、離心管、冰箱、漏斗、濾袋、濾網、攪拌棒、研鉢、塑膠樣品罐、塑膠滴管、棉線、鐵棒、支架、超音波電動牙刷、針筒

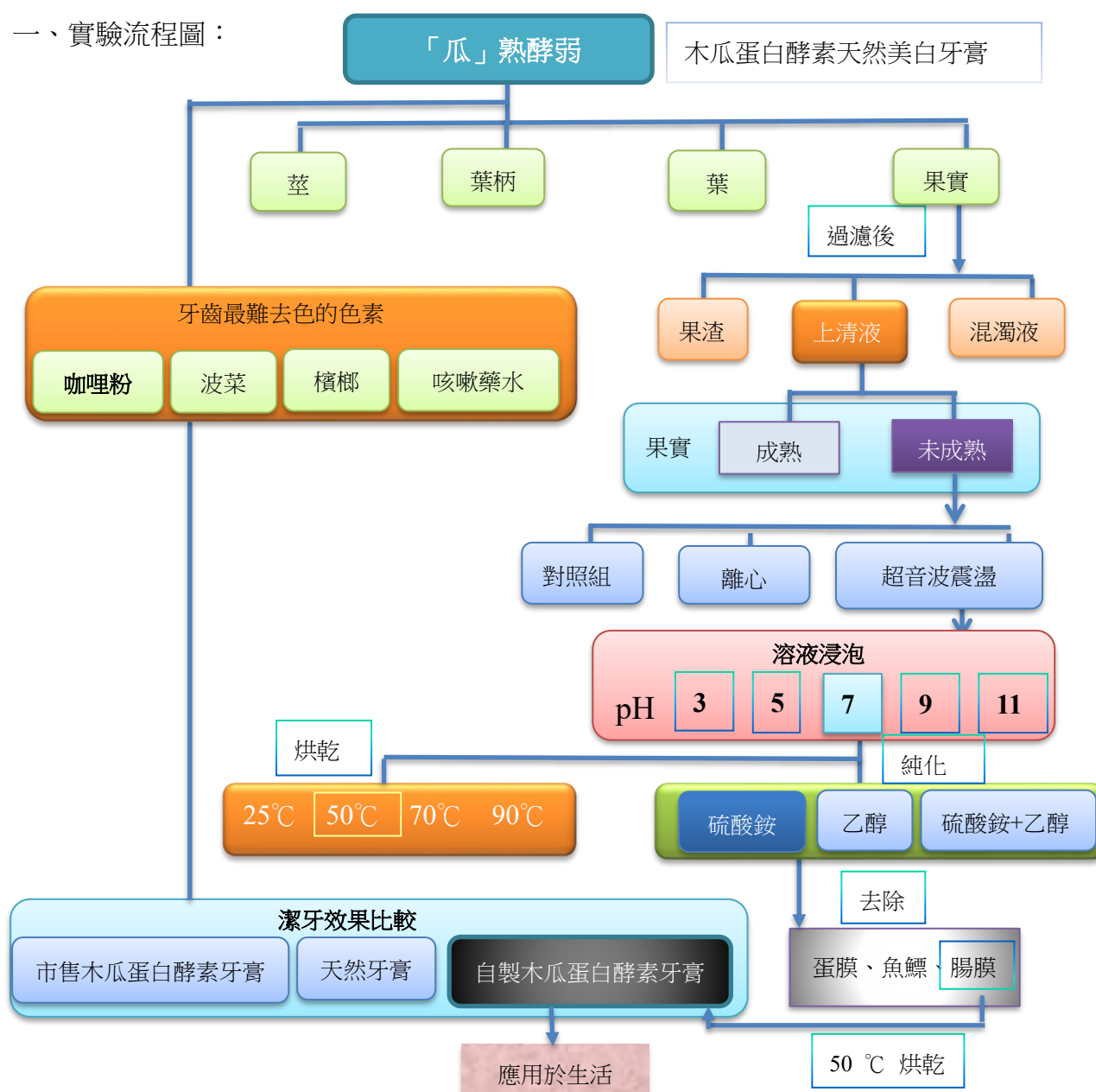
(四) 儀器：烘箱、pH 計、計時器、離心機、果汁機、超音波震盪機、旋轉攪拌器、電子秤

【表 2】本研究使用的器材及材料

木瓜樹 	酵素活性測量器材 	天然牙膏材料 
色素材料 	透析膜材料 	模擬牙齒染色器材 

參、研究過程或方法

一、實驗流程圖：



【圖 12】研究架構

二、實驗一 探討木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶活性

(一) 實驗目的：從資料中得知木瓜果實富含木瓜蛋白酶，我們想知道木瓜其他部位(葉、葉柄、莖)，打碎與純水混合後，木瓜蛋白酶的活性。

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：木瓜樹不同的部位 (果實、葉、葉柄、莖)
2. 控制變因：同一株木瓜樹、(果實、葉、葉柄、莖)重量、純水體積、果汁機打碎時間、室溫、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴滴定量 (1 滴 0.05 mL)

(三) 實驗步驟：

1. 取一株木瓜樹，分別砍下果實、葉、葉柄及莖，如【圖 13】。
2. 秤取 (果實、葉、葉柄、莖)各 100 g，分別加入純水 100 mL，剪成小塊後放入果汁機間歇性打碎，打碎 30 秒後暫停 10 秒，時間為 5 分鐘。
3. 打碎後以濾網及咖啡濾布過濾，漏斗流下的液體即為濾液，放置於陰涼處室溫 25 °C，6 小時濾乾後收集濾液。
4. 分別取濾液 5 mL 進行 pH 值及木瓜蛋白酶活性測量。



【圖 13】比較木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶的活性

三、實驗二 探討木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酶活性

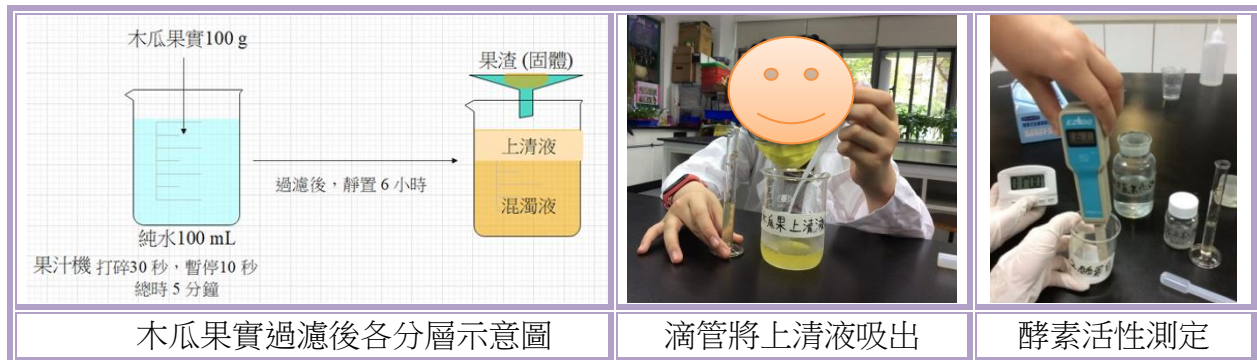
(一) 實驗目的：實驗一得知木瓜果實的木瓜蛋白酶活性最高，我們想知道以純水為溶劑萃取，過濾後產生的分層，哪層的木瓜蛋白酶活性最高？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：木瓜果實過濾後產生的分層 (果渣、上清液、混濁液)
2. 控制變因：室溫、分層體積 5 mL (果渣 5 g)、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴滴定量

(三) 實驗步驟：

1. 同實驗一步驟 2，將木瓜果實打碎後，放置於陰涼處室溫 25 °C 過濾，過濾後靜置 6 小時收集上清液、混濁液。
2. 取濾網上的殘渣即為果渣。
3. 以滴管將上清液移出，剩下有沉澱物的液體為混濁液，分別取 5 mL 進行酵素活性測定，如【圖 14】。



【圖 14】測量木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酵素活性

四、實驗三 探討成熟與未成熟果實的木瓜蛋白酵素活性

(一) 實驗目的：實驗二得知木瓜果實上清液的木瓜蛋白酵素活性最高，那麼成熟的木瓜果實是否會含有較高的木瓜蛋白酵素活性？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：木瓜果實 (成熟、未成熟)
2. 控制變因：同株木瓜樹、果實重量、純水體積、果汁機打碎時間、室溫、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴滴定量

(三) 實驗步驟：

1. 將木瓜果實 (成熟、未成熟)切成小塊後，分別秤取 137 g，再分別加入純水 137 mL，放入果汁機打碎，時間為 5 分鐘。
2. 打碎後過濾，放置於陰涼處室溫 25 °C，6 小時後收集濾液上清液。
3. 分別取 5 mL 濾液上清液進行 pH 值及木瓜蛋白酵素活性測量，如【圖 15】。



【圖 15】測量成熟與未成熟果實的上清液 pH 值

五、實驗四 探討不同處理法的木瓜蛋白酶活性

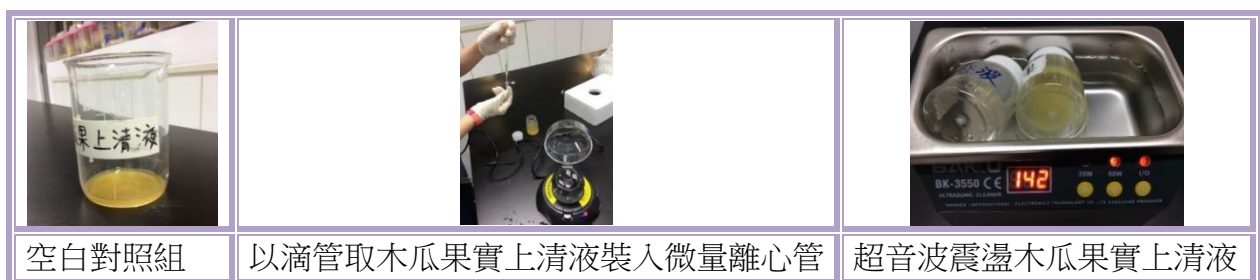
(一) 實驗目的：實驗二得知含有較多的雜質，會影響木瓜蛋白酶的活性，所以我們想知道以不同的處理法對果實上清液進行去除雜質實驗，能否增加果實上清液的木瓜蛋白酶活性？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：不同處理法 (對照組、離心、超音波震盪)
2. 控制變因：經 6 小時沉澱的未成熟木瓜果實上清液體積、離心 (超音波震盪) 時間、室溫、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴定量

(三) 實驗步驟：

1. 同實驗三步驟 1-2，取經 6 小時沉澱的未成熟木瓜果實上清液 10 mL，作為空白對照組。
2. 同步驟 1，以滴管裝入微量離心管，以離心機 3500 rpm 離心 3 分鐘，再以滴管取上清液。
3. 同步驟 1，倒入塑膠樣品罐，以超音波 40 KHz 震盪時間 3 分鐘，再以滴管取上清液，如【圖 16】。
4. 進行 pH 值及木瓜蛋白酶活性測量。



【圖 16】不同處理法 (對照組、離心、超音波震盪)實驗圖

六、實驗五 探討不同 pH 溶液對木瓜蛋白酶活性的影響

(一) 實驗目的：實驗四得知以超音波進行震盪，利用物理性方法能促使細胞壁打破，釋放更多的蛋白質到溶液中。我們又想知道將超音波處理後未成熟木瓜果上清液以不同 pH 溶液浸泡，能否增加木瓜蛋白酶活性？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：不同 pH 緩衝溶液 (pH 3、5、7、9、11)
3. 控制變因：超音波處理後未成熟木瓜果實上清液體積、pH 緩衝溶液體積、浸泡時間、室溫、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴滴定量

(三) 實驗步驟：

1. 取 5 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液 5 份，分別加入 pH 3、5、7、9、11 緩衝溶液 25 mL，攪拌均勻，如【圖 17】。
2. 放置於室溫陰涼處 25 °C，24 小時後分別從不同 pH 緩衝溶液中取 5 mL，進行 pH 值及木瓜蛋白酶活性測量，如【圖 17】。



【圖 17】測量不同 pH 溶液對木瓜蛋白酶活性的影響

七、實驗六 探討不同烘乾溫度對木瓜蛋白酶活性的影響

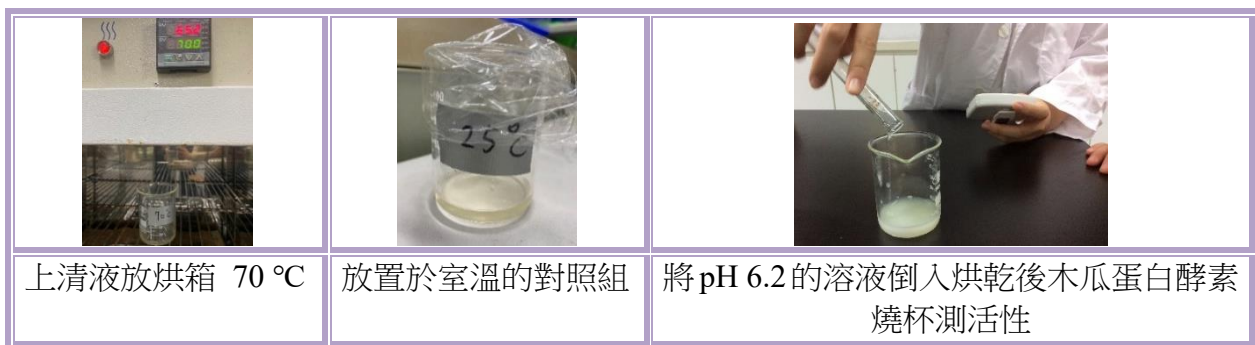
(一) 實驗目的：實驗五得知木瓜蛋白酶在酸性的條件下會不穩定，我們想知道如果以烘箱將木瓜蛋白酶溶液的水分緩和的去除，是否能減少酵素自身水解反應的可能？而增加酵素活性？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：不同溫度烘箱環境 (50 °C、70 °C、90 °C)，室溫 25 °C 對照組
2. 控制變因：超音波處理後未成熟木瓜果實上清液體積、烘箱烘乾時間、氫氧化鈉水溶液濃度、滴管每滴滴定量

(三) 實驗步驟：

1. 取 10 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液 3 份，分別放入烘箱溫度 (50 °C、70 °C、90 °C) 乾燥至無水分殘留。
2. 取超音波處理後未成熟木瓜果實上清液 10 mL，放置於室溫陰涼處 25 °C 作為對照組，靜置 96 小時後，進行木瓜蛋白酶活性測量。
3. 烘乾 96 小時後，以無水氯化亞鈷試紙測試實驗組烘乾後的固體，試紙呈藍色取出，將固體秤重後，進行木瓜蛋白酶活性測量，測量方法同步驟 2，但改將 pH 6.2 的 (酪蛋白溶液、氯化鈉溶液、純水)，倒入裝有烘乾後的木瓜蛋白酶燒杯中，如【圖 18】。



【圖 18】測量不同烘乾溫度對木瓜蛋白酶活性的影響

八、實驗七 探討酵素純化對木瓜蛋白酶活性的影響

(一) 實驗目的：實驗六得知蛋白質需要純化才能延長保存期限。經由酵素化學實驗網站得知鹽析原理，我們決定採取鹽析、沉澱法及鹽析+沉澱法純化木瓜蛋白酶，想知道是否能增加酵素活性？

(二) 實驗變因：

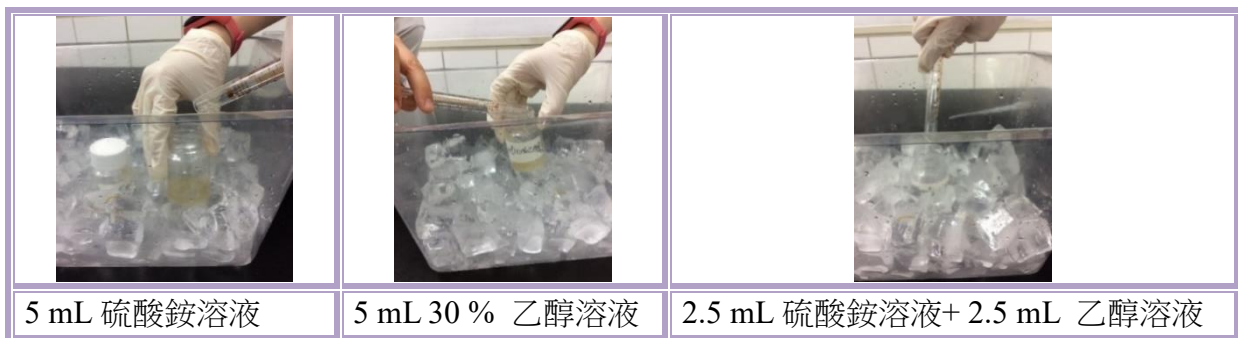
1. 操縱變因：純化法 (硫酸銨、乙醇、硫酸銨+乙醇)
2. 控制變因：超音波處理後未成熟木瓜果實上清液體積、溶劑體積、溫度 0 °C、冰浴攪拌時間 10 分鐘、離心時間、離心速度 3500 rpm。

(三) 實驗步驟：

1. 43.4 % 硫酸銨溶液配製：取 60 °C 烘乾後硫酸銨 76.7 g 加純水 100 mL。
2. 30 % 乙醇溶液配製：取 95 % 乙醇 3.2 mL 加純水 6.8 mL，攪拌均勻後放入

冷凍庫備用。

3. 取 5 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液，在冰浴中緩慢加入 5 mL 硫酸銨溶液，加完後再攪拌 10 分鐘，離心 3 分鐘後取沉澱物。
4. 取 5 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液，在冰浴中緩慢加入 5 mL 30 % 乙醇溶液，其餘同步驟 3。
5. 取 5 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液，在冰浴中加入 2.5 mL 硫酸銨溶液及 2.5 mL 30 % 乙醇溶液，其餘同步驟 3，如【圖 19】。
6. 取 5 mL 超音波處理後未成熟木瓜果實上清液，離心 3 分鐘後取沉澱物，作為對照組，與 3 種純化後酵素進行 pH 值及木瓜蛋白酶活性測量（實驗組活性測量方法同實驗六步驟 3），硫酸銨及硫酸銨 + 乙醇的木瓜蛋白酶活性測量在通風櫃內進行滴定。



【圖 19】加入硫酸銨、乙醇、硫酸銨 + 乙醇於未成熟木瓜果實上清液

九、實驗八 探討如何去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨

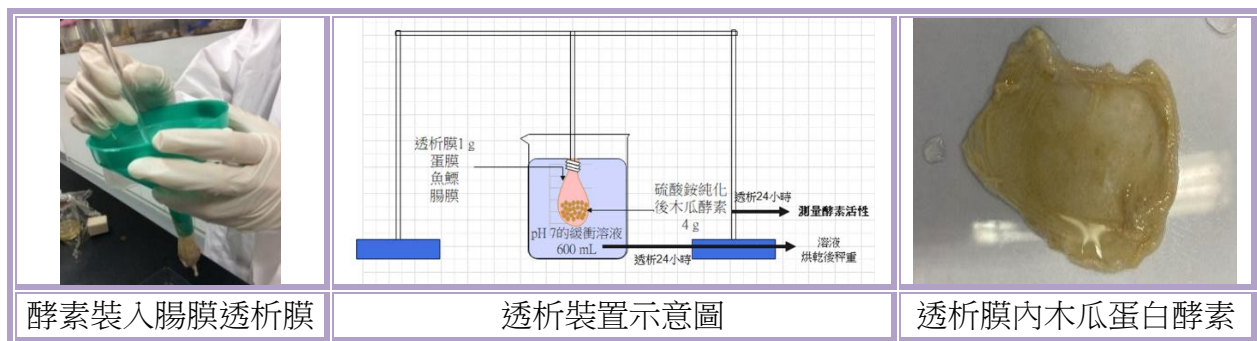
(一) 實驗目的：實驗七發現鹽析法後木瓜蛋白酶的 pH 值降低，我們想知道硫酸銨是否影響木瓜蛋白酶活性測量時的氫氧化鈉滴定量，且硫酸銨具刺激性，於是我們想研究如何以透析的方法去除硫酸銨，找尋天然物中，適合作為透析膜的生物材料，達到分離硫酸銨的目的。

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：不同透析膜 (蛋膜、魚鰾、腸膜)
2. 控制變因：pH 7 緩衝溶液體積、硫酸銨純化後木瓜蛋白酶重量、透析膜重量、透析時間、烘箱溫度、烘箱乾燥時間

(三) 實驗步驟：

1. 以剪刀小心剪裁，並分別秤取透析膜 (蛋膜、魚鰾、腸膜) 1 g。
2. 取 4 g 硫酸銨純化後的木瓜蛋白酶，以鐵絲固定蛋膜開口直接裝入，再以棉線網綁住透析膜袋口。
3. 重複步驟 2，但改為以漏斗裝入魚鰾、腸膜內，如【圖 20】。
4. 分別在燒杯中倒入 pH 7 緩衝溶液 600 mL 3 份，並將鐵棒架在支架上。
5. 將裝有木瓜蛋白酶的透析膜，以棉線固定吊掛在鐵棒上，進行 24 小時的透析。
6. 將透析膜提起，不滴水後取透析膜內木瓜蛋白酶進行酵素活性測量。
7. 燒杯內剩餘溶液放入烘箱以 100 °C 烘乾，24 小時後秤重。



【圖 20】分離硫酸銨的過程

十、實驗九 模擬牙齒染色實驗

(一) 實驗目的：經由資料搜尋後，找出最容易將牙齒染色的四種色素，我們想知道天然牙膏的潔牙效果，以及哪種色素最難去色？

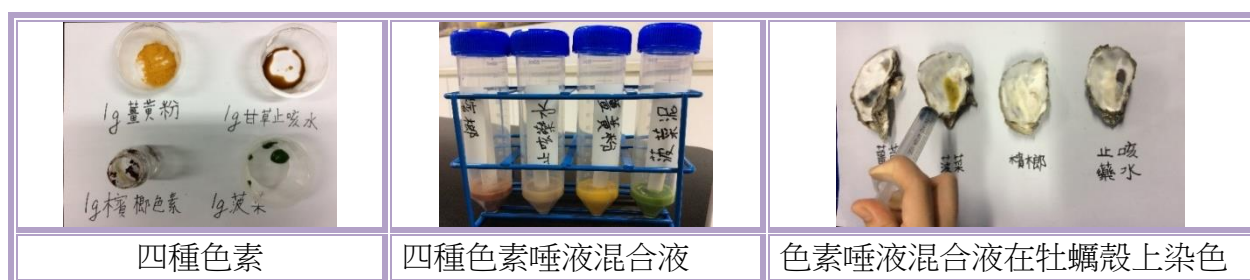
(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：色素 (檳榔、菠菜、咖哩粉、咳嗽藥水)
2. 控制變因：色素重量、色素唾液混合液體積、色素染色時間、天然牙膏重量、電動牙刷潔牙時間、潔牙純水體積

(三) 實驗步驟：

1. 將檳榔及菠菜分別以研鉢研磨。
2. 色素唾液混和液配製：分別秤取色素 (檳榔、菠菜、咖哩粉、咳嗽藥水) 1 g 加入 7 mL 酪蛋白溶液。
3. 四顆牡蠣殼進行染色前 Lab 值測量。

4. 以針筒分別取四種色素唾液混合液 0.2 mL 滴在牡蠣殼上，靜置四小時，如【圖 21】。
5. 取純水 10 mL 沖洗牡蠣殼後以電動牙刷沾取天然牙膏 1 g 後潔牙 15 秒。
6. 再取純水 50 mL 沖洗一次牡蠣殼，放置於室溫乾燥。
7. 測量潔牙後 Lab 值，比較染色前、潔牙後的色差值。



【圖 21】模擬牙齒染色實驗

十一、實驗十 研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力

(一) 實驗目的：實驗九我們發現咖哩粉是最難去色的色素，於是我們以實驗一～八的結果，將木瓜蛋白酶加入天然牙膏，觀察是否能有效潔牙，達到牙齒美白效果。

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：市售木瓜蛋白酶牙膏、天然牙膏 (對照組)、自製木瓜蛋白酶牙膏
2. 控制變因：咖哩粉色素唾液混合液體積、染色時間、牙膏重量、電動牙刷潔牙時間、潔牙純水體積

(三) 實驗步驟：

1. 3 顆牡蠣殼進行染色前 Lab 值測量。
2. 以針筒取咖哩粉色素唾液混合液 0.2 mL 3 份，分別滴在 3 顆牡蠣殼上，靜置四小時。
3. 取純水 10 mL 沖洗牡蠣殼，分別以電動牙刷沾取市售木瓜蛋白酶牙膏、天然牙膏 (對照組)、自製木瓜蛋白酶牙膏 1 g 後潔牙 15 秒。
4. 再取純水 50 mL 沖洗一次牡蠣殼，放置於室溫乾燥，如【圖 22】。
5. 進行色差測量，比較染色前、潔牙後的色差值。



【圖 22】研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力

十二、實驗十一 研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法

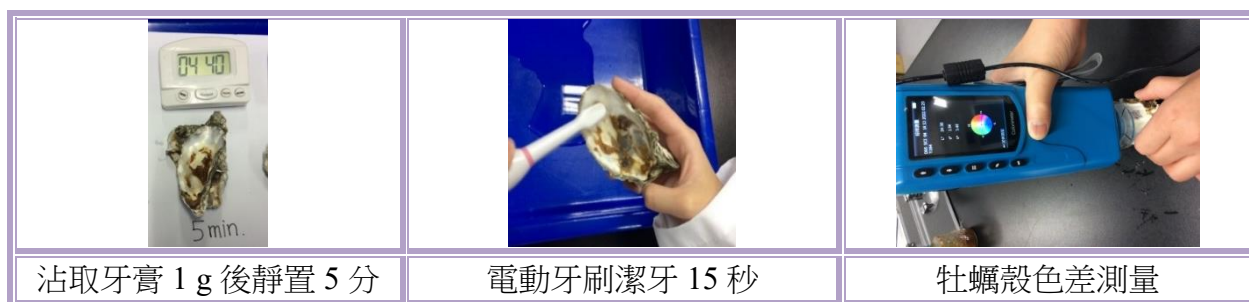
(一) 實驗目的：實驗十我們發現自製木瓜蛋白酶牙膏潔牙後還是有一些色素殘留，我們試著增加自製木瓜蛋白酶牙膏與咖哩粉唾液混合液間的反應時間為 5 分鐘，觀察是否增加潔牙去色的效果？

(二) 實驗變因：

1. 操縱變因：自製木瓜蛋白酶牙膏、市售木瓜蛋白酶牙膏、自製+市售木瓜蛋白酶牙膏 (0.5 g + 0.5 g)
2. 控制變因：咖哩粉色素唾液混合液體積、染色時間、牙膏重量、電動牙刷潔牙時間、潔牙純水體積

(四) 實驗步驟：

1. 3 顆牡蠣殼進行染色前 Lab 值測量。
2. 以針筒取咖哩粉色素唾液混合液 0.2 mL 3 份，分別滴在 3 顆牡蠣殼上，靜置四小時。
3. 取純水 10 mL 沖洗牡蠣殼，分別以電動牙刷沾取三種牙膏 1 g 塗於牡蠣殼上，靜置 5 分鐘後，再潔牙 15 秒。
4. 同實驗十步驟 4-5，如【圖 23】。



【圖 23】研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法

肆、研究結果

一、實驗一 探討木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶活性

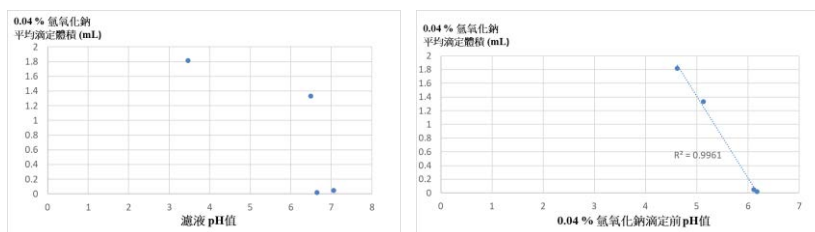
(一) 實驗結果：

【表 3】木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶活性

種類	果實	葉	葉柄	莖
濾液 pH 值	3.46	6.49	7.06	6.65
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值				
	4.62	5.13	6.11	6.18
一	1.85	1.20	0.00	0.05
二	1.70	1.50	0.05	0.00
三	1.90	1.30	0.10	0.00
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	1.82	1.33	0.05	0.02
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	82.67	49.33	4.33	2.67

(二) 結果分析：

1. 從氫氧化鈉平均滴定體積顯示，木瓜蛋白酶活性：果實 > 葉 > 葉柄 > 莖。
2. 將【表 3】木瓜樹不同部位 (果實、葉、葉柄、莖) 及 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積作圖，以 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積為縱坐標，以濾液 pH 值、0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值為橫坐標，得【圖 24】(1)(2)



【圖 24】(1)(2)木瓜樹的不同部位 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積與濾液 pH 值、0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值之關係

3. 由【圖 24】(1)與(2)比較，我們發現 0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值與氫氧化鈉平均滴定體積有負相關的關係，也就是當木瓜蛋白酶加入酪蛋白溶液時




的 pH 值越低，氫氧化鈉的滴定體積就會越多。

- 我們發現果實及葉的木瓜蛋白酶在滴定過程中，pH 值有時會下降，推測因分解酪蛋白中的胺基酸，使硫游離出來越多，因此到達滴定終點所需的時間越久，氫氧化鈉平均滴定體積也越多，就代表活性越大。
- 實驗中我們發現靜置 6 小時後收集到的濾液會分層，我們進行後續實驗。

二、實驗二 探討木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酶活性

(一) 實驗結果：

【表 4】木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酶活性

種類	果渣	上清液	混濁液
各分層圖片			
定量	98 g	51 mL	40 mL
濾液 pH 值	—	3.46	3.68
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	5.38	4.48	4.70
一	0.15	4.05	2.25
二	0.15	3.95	2.00
三	0.15	3.80	2.60
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	0.15	3.93	2.28
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	10.45	133.33	78.33

(二) 結果分析：

- 從氫氧化鈉平均滴定體積顯示，木瓜蛋白酶活性：上清液 > 混濁液 > 果渣。
- 由實驗結果得知上清液中含有較多木瓜蛋白酶，推測因木瓜蛋白酶較易溶於水中，而混濁液中存在許多細小固體懸浮混濁物，所以後續實驗取果實上清液進行實驗。

三、實驗三 探討成熟與未成熟果實的木瓜蛋白酶活性

(一) 實驗結果：

【表 5】成熟與未成熟果實的木瓜蛋白酶活性比較

種類	成熟果實	未成熟果實
上清液		
濾液 pH 值	5.20	3.46
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	5.16	4.48
一	1.15	4.05
二	1.40	3.95
三	1.20	3.80
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	1.25	3.93
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	50.11	133.33


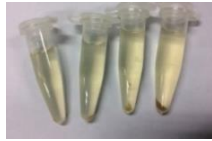

(二) 結果分析：

1. 從氫氧化鈉平均滴定體積顯示，未成熟果實的木瓜蛋白酶活性較高。
2. 在實驗中我們也發現，只以果皮顏色變黃判別木瓜成熟，不夠準確，從成熟果實的氫氧化鈉平均滴定體積推測，此株木瓜樹的成熟果實尚未完全成熟。

四、實驗四 探討不同處理法的木瓜蛋白酶活性

(一) 實驗結果：

【表 6】不同處理法的木瓜蛋白酶活性比較

種類	對照組	離心	超音波震盪
不同處理法後木瓜蛋白酶			
上清液定量	10 mL	8.7 mL	8.5 mL
濾液 pH 值	3.46	3.50	3.27
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	4.48	4.69	4.01
一	4.05	4.15	6
二	3.95	4.20	6.75
三	3.80	3.70	7.2
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	3.93	4.02	6.65
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	133	138.20	188

(二) 結果分析：

1. 從氫氧化鈉平均滴定體積顯示，木瓜蛋白酶活性：超音波震盪 > 離心 ≡ 對照組，經超音波震盪後確實能增加木瓜蛋白酶活性。
2. 由實驗結果得知，超音波震盪後的木瓜蛋白酶活性最高，推測因在超音波高頻振動下能打破細胞壁，導致更多的蛋白質釋放到溶液中。

五、實驗五 探討不同 pH 溶液浸泡對木瓜蛋白酶活性的影響

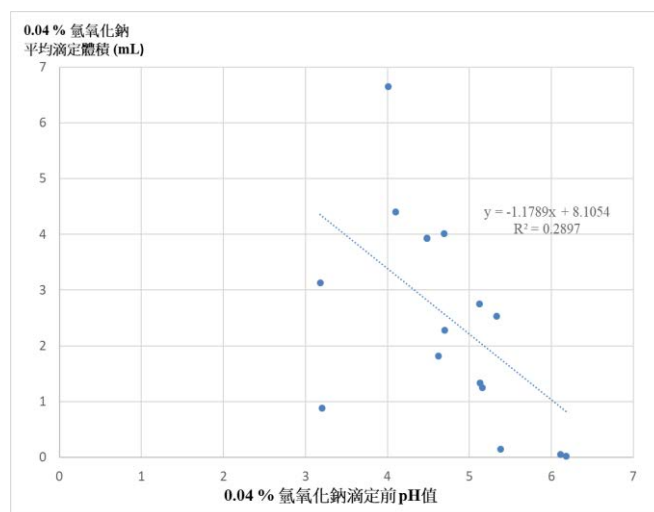
(一) 實驗結果：

【表 7】經不同 pH 緩衝溶液浸泡後對木瓜蛋白酶活性的影響

種類	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11												
浸泡 24 小時後木瓜蛋白酶溶液 pH	3.38	4.49	5.80	7.66	8.39												
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH	3.20	3.18	4.10	5.12	5.33												
一	0.65	3.15	4.15	3.05	2.2												
二	0.95	2.95	4.45	2.75	2.85												
三	1.05	3.3	4.6	2.45	2.55												
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體 (mL)	0.88	3.13	4.40	2.75	2.53												
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	41	104	141	65	45												
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積比較圖	<p>0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL) 不同 pH 溶液浸泡後木瓜蛋白酶活性比較圖</p> <table border="1"> <caption>Figure 25: Average titration volume of 0.04% NaOH after 24h soaking at different pH values.</caption> <thead> <tr> <th>緩衝溶液 (pH 值)</th> <th>0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>0.88</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3.13</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>4.40</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>2.75</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>2.53</td> </tr> </tbody> </table>					緩衝溶液 (pH 值)	0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)	3	0.88	5	3.13	7	4.40	9	2.75	11	2.53
緩衝溶液 (pH 值)	0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)																
3	0.88																
5	3.13																
7	4.40																
9	2.75																
11	2.53																

(二) 結果分析：

1. 從實驗數據可以知道，將木瓜蛋白酶溶液浸泡在 pH 7 緩衝溶液下，木瓜蛋白酶活性最高，在 pH 3 的緩衝溶液下，木瓜蛋白酶活性急速下降。
2. 將實驗一至五結果整理作圖，以 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積為縱坐標，0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值為橫坐標，得【圖 25】。






【圖 25】不同條件下 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積與 0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值之關係

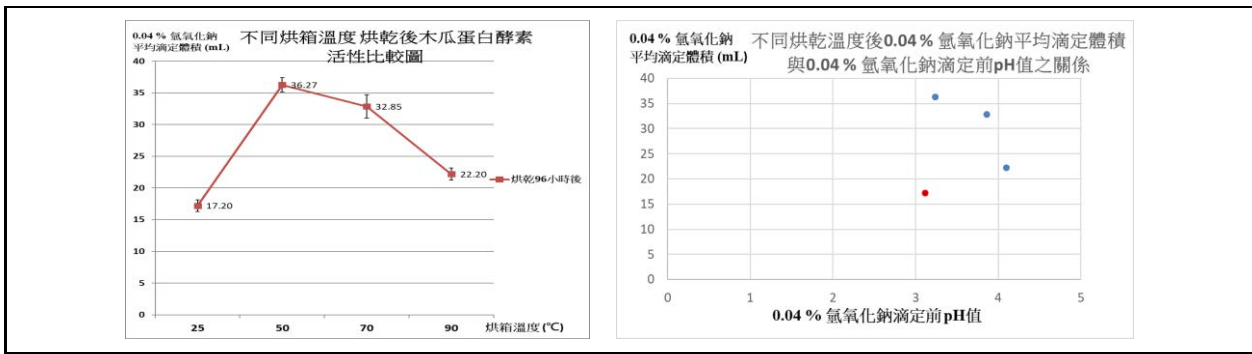
- 由【圖 25】我們發現在不同條件下，0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值與氫氧化鈉平均滴定體積有負相關的關係，但在 pH 值 4 以下時無相關性，推測木瓜蛋白酶溶液在酸性的條件下會不穩定，會導致酵素結構破壞。
- 我們也發現浸泡在 pH 3 的緩衝溶液下，木瓜蛋白酶產生顆粒狀沉澱。

六、實驗六 探討不同烘乾溫度對木瓜蛋白酶活性的影響

(一) 實驗結果：

【表 8】經不同烘乾溫度後的木瓜蛋白酶活性

種類	25 °C	50 °C	70 °C	90 °C
烘乾 96 小時後重量 (g)	9.8 mL	2.3	2.3	2.4
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH				
	3.12	3.24	3.86	4.10
一	18.25	36.00	34.95	23.30
二	16.85	37.50	32.10	21.80
三	16.50	35.30	31.50	21.50
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	17.20	36.27	32.85	22.20
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	375	593	548.33	420



(二) 結果分析：

1. 我們發現將木瓜蛋白酶溶液以 50 °C 低溫乾燥，木瓜蛋白酶活性最高，高溫乾燥會降低木瓜蛋白酶活性。
2. 從 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積與 0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值之關係圖中，我們也發現液態的木瓜蛋白酶 (25 °C)，產生其他具酸性的物質。

七、實驗七 探討酵素純化對木瓜蛋白酶活性的影響

(一) 實驗結果：

【表 9】經不同純化法後的木瓜蛋白酶活性

種類	空白對照組	硫酸銨	乙醇	硫酸銨+乙醇										
純化後木瓜蛋白酶圖片														
0.04 % 氫氧化鈉 滴定前 pH	4.42	3.72	3.8	3.79										
一	12.50	20.00	11.65	2.65										
二	12.20	21.75	13.40	1.10										
三	13.65	21.00	11.00	1.85										
0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)	12.78	20.92	12.02	1.87										
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	268.33	415	250	65										
0.04 % 氫氧化鈉 平均滴定體積比較圖	<p>酵素純化法對木瓜蛋白酶活性影響</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>純化方法</th> <th>0.04% 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>空白對照組</td> <td>12.78</td> </tr> <tr> <td>硫酸銨</td> <td>20.92</td> </tr> <tr> <td>乙醇</td> <td>12.02</td> </tr> <tr> <td>硫酸銨+乙醇</td> <td>1.87</td> </tr> </tbody> </table>				純化方法	0.04% 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)	空白對照組	12.78	硫酸銨	20.92	乙醇	12.02	硫酸銨+乙醇	1.87
純化方法	0.04% 氫氧化鈉 平均滴定體積 (mL)													
空白對照組	12.78													
硫酸銨	20.92													
乙醇	12.02													
硫酸銨+乙醇	1.87													

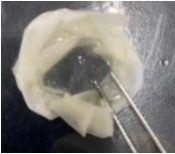
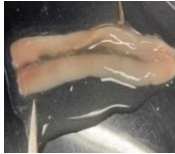
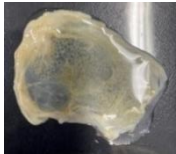
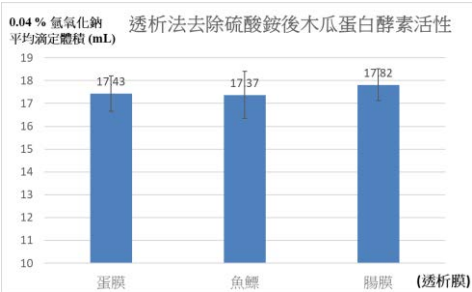
(二) 結果分析：

1. 不同純化方法得到的木瓜蛋白酶，其活性：鹽析法 > 沉澱法 > 鹽析 + 沉澱法。
2. 我們也發現硫酸銨及硫酸銨 + 乙醇滴定前 pH 小於乙醇及對照組，經查詢資料，硫酸銨水溶液為酸性，為了了解添加硫酸銨是否會影響木瓜蛋白酶活性測量時的氫氧化鈉滴定體積，我們決定後續實驗進行硫酸銨與木瓜蛋白酶的分離。

八、實驗八 探討如何去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨

(一) 實驗結果：

【表 10】以不同生物膜去除木瓜蛋白酶中的硫酸銨後之活性

種類	蛋膜	魚鰾	腸膜
透析後圖片			
溶液烘乾後重 (g)	0.5	2.89	3.55
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH	3.53	3.46	3.78
一	16.70	18.15	18.4
二	18.25	16.20	18.00
三	17.35	17.75	17.05
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體 (mL)	17.43	17.37	17.82
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (秒)	332	330	345
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積比較圖			

(二) 結果分析：

1. 從溶液烘乾後數據顯示，蛋膜析出的硫酸銨量最少，氫氧化鈉滴定前 pH 值比魚鰾大，所以我們推論添加硫酸銨降低滴定前的 pH 值，對木瓜蛋白酶

活性影響不大。

2. 不同透析膜除去硝酸銨，得到的木瓜蛋白酶，其活性：腸膜 > 蛋膜 > 魚鰾。
3. 我們發現以腸膜為透析膜，析出的硫酸銨最多且木瓜蛋白酶活性最大。

九、實驗九 模擬牙齒染色實驗

(一) 實驗結果：

【表 11】以不同色素唾液混合液染色後，比較染色前 Lab、潔牙後 Lab 的色差值

種類	咖哩粉			菠菜			檳榔			咳嗽藥水												
染色前																						
	L	A	B	L	A	B	L	A	B	L	A	B										
一	34.89	-0.39	0.72	19.22	3.7	1.89	21.25	0.89	2.45	22.33	1.00	2.16										
二	31.88	-0.33	0.83	17.35	4.19	1.79	23.56	1.19	2.49	22.11	0.86	2.12										
三	30.03	-0.6	0.6	19.1	3.54	1.74	23.14	1.15	2.71	23.16	1.85	2.4										
平均	32.27	-0.44	0.72	18.56	3.81	1.84	22.65	1.08	2.55	22.53	1.24	2.23										
潔牙前後																						
	L	A	B	L	A	B	L	A	B	L	A	B										
一	35.7	-0.81	6.46	20.84	2.14	2.26	25.36	2.72	3.21	23.84	2.28	3.01										
二	38.93	2.06	3.05	21.82	2.02	2.19	26.14	1.74	3.22	24.09	3.07	3.51										
三	33.62	0.48	5.42	22.92	1.98	2.22	25.22	1.73	3.89	22.62	2.98	3.43										
平均	36.08	0.58	4.98	21.33	2.08	2.22	25.57	2.06	3.44	23.52	2.78	3.32										
色差值比較圖	 <p>色差值 (ΔE) 比較圖</p> <p>四種色素染色前、潔牙後的色差值比較</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>色素</th> <th>色差值 (ΔE)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>咖哩粉</td> <td>5.81</td> </tr> <tr> <td>菠菜</td> <td>3.29</td> </tr> <tr> <td>檳榔</td> <td>3.04</td> </tr> <tr> <td>咳嗽藥水 (色素)</td> <td>2.14</td> </tr> </tbody> </table>												色素	色差值 (ΔE)	咖哩粉	5.81	菠菜	3.29	檳榔	3.04	咳嗽藥水 (色素)	2.14
色素	色差值 (ΔE)																					
咖哩粉	5.81																					
菠菜	3.29																					
檳榔	3.04																					
咳嗽藥水 (色素)	2.14																					



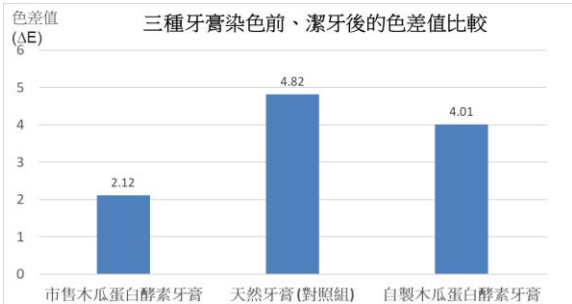
(二) 結果分析：

1. 以天然牙膏潔牙後，牡蠣殼染色前、潔牙後的色差值小，顯示確實能去色。
2. 從色差比較圖中得知，咖哩粉色差值最大，是最難去色的色素。

十、實驗十 研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力

(一) 實驗結果：

【表 12】以咖哩粉唾液混合液染色後，比較不同牙膏的染色前 Lab、潔牙後 Lab 的色差值

種類	市售木瓜蛋白酶牙膏			天然牙膏 (對照組)			自製木瓜蛋白酶牙膏														
染色前																					
	L	A	B	L	A	B	L	A	B												
一	18.04	4.32	2.52	35.18	-0.67	0.37	22.77	1.15	2.02												
二	17.85	3.37	2.00	31.54	-0.68	1.56	21.14	2.49	1.79												
三	18.28	3.27	2.23	29.89	-0.51	1.58	22.32	1.47	1.81												
平均	18.06	3.65	2.25	32.21	-0.62	1.17	22.08	1.70	1.87												
潔牙前後																					
潔牙後	L	A	B	L	A	B	L	A	B												
一	19.01	5.54	2.46	35.94	-0.39	1.87	26.9	1.54	4.57												
二	19.66	4.66	2.11	38.27	-0.20	1.96	23.20	2.16	3.56												
三	20.18	5.05	2.40	36.65	-0.29	1.92	25.98	1.65	4.40												
平均	19.62	5.08	2.32	36.95	-0.29	1.92	25.36	1.78	4.18												
色差值比較圖	 <p>三種牙膏染色前、潔牙後的色差值比較</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>牙膏種類</th> <th>染色前 ΔE</th> <th>潔牙後 ΔE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>市售木瓜蛋白酶牙膏</td> <td>2.12</td> <td>4.18</td> </tr> <tr> <td>天然牙膏(對照組)</td> <td>1.17</td> <td>1.92</td> </tr> <tr> <td>自製木瓜蛋白酶牙膏</td> <td>1.70</td> <td>1.78</td> </tr> </tbody> </table>									牙膏種類	染色前 ΔE	潔牙後 ΔE	市售木瓜蛋白酶牙膏	2.12	4.18	天然牙膏(對照組)	1.17	1.92	自製木瓜蛋白酶牙膏	1.70	1.78
牙膏種類	染色前 ΔE	潔牙後 ΔE																			
市售木瓜蛋白酶牙膏	2.12	4.18																			
天然牙膏(對照組)	1.17	1.92																			
自製木瓜蛋白酶牙膏	1.70	1.78																			



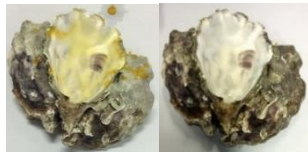
(二) 結果分析：

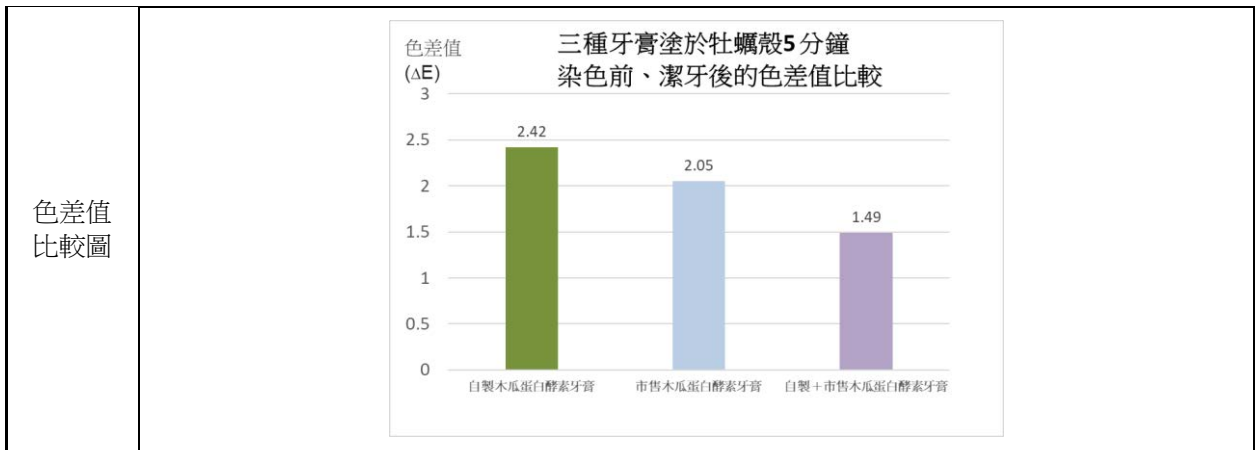
1. 自製木瓜蛋白酶牙膏染色前、潔牙後的色差值小於天然牙膏（對照組），顯示有潔牙去色效果。
2. 色差值比較圖中得知，市售木瓜蛋白酶牙膏色差值最小，從牙膏成分得知，內含有二氧化鈦，具有增白的效果，但是會對人體產生不利影響。

十一、 實驗十一 研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法

(一) 實驗結果：

【表 13】以咖哩粉唾液混合液染色後，將三種牙膏塗於牡蠣殼 5 分鐘後，比較染色前 Lab、潔牙後 Lab 的色差值

種類	自製木瓜蛋白酶牙膏			市售木瓜蛋白酶牙膏			自製+市售木瓜蛋白酶牙膏		
染色前									
	L	A	B	L	A	B	L	A	B
一	23.59	1.08	1.79	26.85	-0.10	1.15	23.45	1.52	1.05
二	26.28	-0.43	1.83	26.96	-0.12	1.3	24.03	1.34	1.44
三	25.97	0.33	1.19	27.62	-0.12	1.22	22.36	1.42	1.37
平均	25.28	0.33	1.60	27.14	-0.11	1.22	23.28	1.43	1.29
潔牙前後									
	L	A	B	L	A	B	L	A	B
一	27.55	1.52	1.28	27.74	1.01	2.98	24.33	1.85	1.00
二	27.09	2.11	1.88	27.78	1.55	2.74	25.08	1.51	1.51
三	26.83	1.92	1.81	27.82	0.97	2.33	24.83	1.68	1.53
平均	27.16	1.85	1.66	27.78	1.18	2.68	24.75	1.68	1.35



(二) 結果分析：

1. 從色差值比較圖中得知，色差值：自製+市售 < 市售 < 自製木瓜蛋白酶牙膏，顯示將自製木瓜蛋白酶牙膏添加於市售木瓜蛋白酶牙膏中，確實具有潔牙去色的功能，且效果優於市售木瓜蛋白酶牙膏。
2. 從【表 13】得知，自製木瓜蛋白酶牙膏與市售木瓜蛋白酶牙膏比較，色差值只多 0.37，但本研究的木瓜蛋白酶牙膏純天然且對人體無害。
3. 塗於牡蠣殼時間增加為 5 分鐘，自製木瓜蛋白酶牙膏染色前、潔牙後的色差值與【表 12】的自製木瓜蛋白酶牙膏相比較，色差值小了 1.59，顯示增加自製木瓜蛋白酶牙膏與咖哩粉唾液混合液間的反應時間可以減少色差值。

伍、討 論

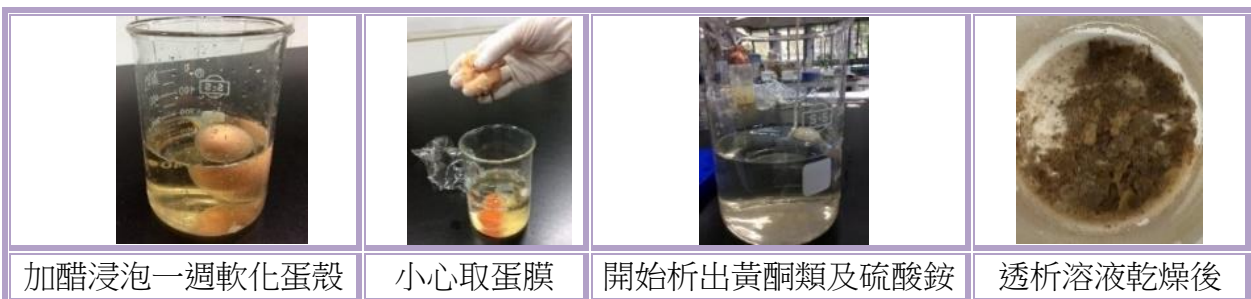
- 一、酵素活性常用的表示法：在固定條件下，每分鐘內能催化分解受質 1 μ mol 的酵素量。
在實驗一我們以滴定法去測量木瓜蛋白酶的活性，發現活性越高的部位，除了氫氧化鈉的滴定體積越多，反應速度也會越快，胺基酸中的硫會游離出來越多，而拉長到達滴定終點的時間，在實驗六 50 °C 烘乾後的木瓜蛋白酶，到達 pH 6.2 時的平均滴定時間最久 593 秒，因此本研究中，採取計算 10 分鐘內 0.04 % 氫氧化鈉溶液的滴定體積，以比較不同條件下，木瓜蛋白酶分解酪蛋白溶液的活性。
- 二、我們以滴定法測量木瓜蛋白酶分解酪蛋白溶液的活性，發現在 pH 4 以下時，0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值與氫氧化鈉平均滴定體積無相關性【圖 25】，從文獻得知木瓜蛋白酶在 pH 小於 3 或大於 11 時安定性都很差，本研究發現木瓜蛋白酶在 pH 4

以下時，分解酪蛋白溶液的活性就變差，浸泡在 pH 3 的緩衝溶液下時，木瓜蛋白酶就開始產生顆粒狀沉澱。

三、在實驗六，以 50 °C 烘乾後的木瓜蛋白酶活性為放置於室溫 25 °C 對照組的 2.11 倍【表 8】，文獻中得知酵素在液態的時間長，易發生自身水解的反應，本研究中以 50 °C 烘乾後的木瓜蛋白酶製成的自製木瓜蛋白酶牙膏，與其他相關研究用液態木瓜蛋白酶進行實驗，更可維持酵素的活性。

四、實驗七中，經硫酸銨純化後的木瓜蛋白酶活性為對照組的 1.63 倍，採取硫酸銨 + 乙醇處理後的木瓜蛋白酶活性只有對照組的 0.15 倍【表 9】，經由文獻搜尋後，得知採乙醇沉澱法時若溶液中有高濃度鹽類，則會影響酵素的沉澱，在實驗七時我們發現：硫酸銨 + 乙醇法離心後的沉澱物少於乙醇法的沉澱物。

五、歷屆科展作品中有不少選擇蛋膜作為透析膜，我們實際試驗後發現，蛋膜製造費時，且容易產生棉線封口處滲漏或破裂的問題，腸膜與魚鰾具有韌性，較容易將木瓜蛋白酶灌入且不易滲漏，將裝有木瓜蛋白酶的透析膜放入緩衝溶液 1 分鐘後，觀察到有黃色液體開始析出，經由文獻搜尋得知，是黃酮類的化合物。



【圖 26】以生物膜作為透析膜，實驗觀察記錄圖

六、由實驗五結果發現，木瓜蛋白酶最佳酸鹼值是在中性的緩衝溶液中，可推論人體刷牙時，因為唾液 pH 值 6.6 - 7.1，可帶動木瓜蛋白酶在口腔中有較好的分解效益。經純化且乾燥後的木瓜蛋白酶，由實驗十一結果證明：將自製木瓜蛋白酶牙膏添加於市售木瓜蛋白酶牙膏中，與酪蛋白溶液反應 5 分鐘後，能分解蛋白質，確實具有潔牙去色的功能，且效果優於市售木瓜蛋白酶牙膏。

陸、結 論

- 一、探討木瓜樹的不同部位，包括：果實、葉、葉柄及莖，發現木瓜果實的木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 1.82 (mL)，以滴定法測量木瓜蛋白酶活性時，發現木瓜蛋白酶加入酪蛋白溶液時的起始 pH 值與氫氧化鈉滴定體積有負相關的關係。
- 二、探討木瓜果實過濾後的各分層 (上清液、混濁液、果渣)，發現上清液的木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 3.93 (mL)。
- 三、比較成熟與未成熟的果實，發現未成熟果實的木瓜蛋白酶活性較高。
- 四、探討不同的處理法 (對照組、離心、超音波震盪)，發現超音波震盪後的木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 6.65 (mL)。
- 五、探討不同的 pH 溶液 (pH 3、5、7、9、11)，發現將木瓜蛋白酶浸泡在 pH 7 的緩衝溶液下，木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 4.40 (mL)，也發現木瓜蛋白酶在 pH 4 以下時，分解酪蛋白溶液的活性就變差。
- 六、探討不同的烘乾溫度 (50 °C、70 °C、90 °C)，發現 50 °C 低溫乾燥，木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 36.27 (mL)，是放置於室溫 25 °C 對照組的 2.11 倍。
- 七、探討酵素的純化法，發現經硫酸銨純化後的木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 20.92 (mL)，是未經純化對照組的 1.63 倍。
- 八、探討如何去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨，發現腸膜可以析出的硫酸銨最多且木瓜蛋白酶活性最高：氫氧化鈉平均滴定體積 17.82 (mL)。
- 九、模擬牙齒染色實驗，發現以天然牙膏潔牙後，牡蠣殼染色前潔牙後的色差值變小。咖哩粉色差值 ΔE 5.81 最大最難去色。
- 十、研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力，發現自製木瓜蛋白酶牙膏染色前潔牙後色差值 ΔE 4.01 小於天然牙膏 (對照組) ΔE 4.82，顯示有潔牙去色的效果。
- 十一、研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法：增加自製木瓜蛋白酶牙膏與咖哩粉唾液混合液間的反應時間為 5 分鐘，將自製木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g 添加於市售木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g 中，色差值 ΔE 1.49，確實具有潔牙去色的功能，且效果優於市售木

瓜蛋白酶牙膏的色差值 ΔE 2.05。

柒、參考文獻資料

1. 木瓜蛋白酶 (2021 年 9 月 5 日)。維基百科。取自 <https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E6%9C%A8%E7%93%9C%E8%9B%8B%E7%99%BD%E9%85%B6>
2. 曲柏勳、郭瑜安、李竝均、黃偉特、黃敬昊、楊永濬 (2013)。酵果十足酵 CC~探討常見水果之維生素 C、澱粉酶、蛋白酶、脂肪酶的含量關係及其活性~。中華民國第 53 屆中小學科學展覽會。台灣國立科學教育館。
3. 張少懷、吳昱瑤、林睦潔、聶瑋君 (2019)。「膠」情「非」淺-探討魚鱗膠原蛋白的凝聚及水解分析研究。中華民國第 59 屆中小學科學展覽會。台灣國立科學教育館。
4. 張智硯 (2005)。木瓜酵素分解蛋白質分析研究。臺北市中等學校學生科學專題研究-化學科。取自 <https://www.shs.edu.tw/works/essay/2013/11/2013110814275507.pdf>
5. 徐少崗、黃應淪、江宏宇、林智凱 (2009)。百善「酵」為先—用酵素分解酪蛋白。臺北市中等學校學生科學專題研究-化學科。取自 https://www.mingdao.edu.tw/mdhsp/biology/pdf/b_p9606.pdf
6. 王福泉 (2002)。木瓜乳汁之採集與木瓜酵素活性的研究。國立高雄師範大學教學碩士論文，高雄市。
7. 木瓜蛋白酶活性測定方法 (2021 年 9 月 10 日)。北京市：北京索萊寶科技有限公司。取自 <https://www.solarbio.com/article-350.html>
8. 陳品延、廖中豪、鄭亦軒 (2014)。齒如含貝—以蛋殼等常見材料自製牙膏。中華民國第 54 屆中小學科學展覽會。台灣國立科學教育館。
9. 莊榮輝 (2001)。酵素化學實驗。取自 <http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/Purification/P1.htm>
10. Chakravarthy, P. K. (2012). Efficacy of Extrinsic Stain Removal by Novel Dentifrice Containing Papain and Bromelain Extracts. *Journal of Young Pharmacists*, 4(4), 245-249.
11. Chawhuaveang, D. D. *et al.* (2021). Acquired salivary pellicle and oral diseases: a literature review. *J. Dent. Sci.* 16, 523- 529. Retrieved January 20, 2022, from <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.10.007>
12. Huijuan, Liu, Menghui Hu, Qi Wang, Lin Cheng & Zaibao Zhang (2018). Role of papain-like cysteine proteases in plant development. *Front. Plant Sci.*, December 4, 2018, from <https://doi.org/10.3389/fpls..01717>

【評語】 080211

研究木瓜酵素，實驗將木瓜蛋白酶活性做詳細的討論，報告內容扎實，主題有趣，用自己萃取的木瓜酵素製作跟市售一樣的木瓜酵素牙膏算是相當不一樣的應用。木瓜酵素活性測定方法應說明清楚。對果實上清液進行去除雜質，採用離心和超音波振盪等方法需多解釋。木瓜蛋白酶有美白的效果，但是必須使用的量要多，要考慮成分問題，很多蛋白質相關實驗的實驗條件與步驟並不直觀，也沒有說明為何要如此進行。

作品簡報

「瓜」熟酵弱—木瓜蛋白酶天然美白牙膏

組別：國小組

科別：化學科

前言

研究目的

研究木瓜樹的木瓜蛋白酶活性及萃取、純化方法製成的自製木瓜蛋白酶牙膏



探討木瓜蛋白酶的活性

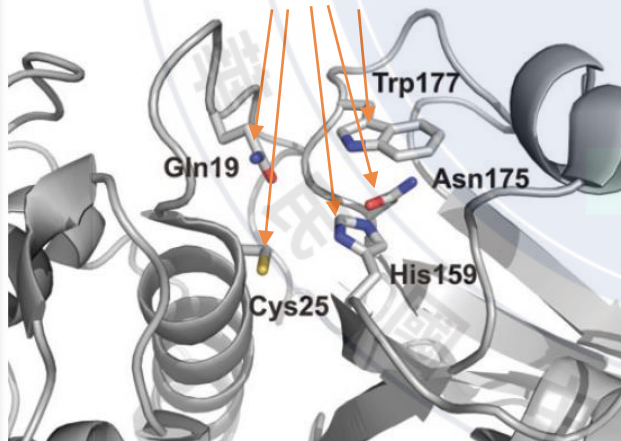
木瓜樹不同部位、各分層、成熟與未成熟果實、不同處理法、pH 溶液、烘乾溫度、酵素純化、去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨

自製木瓜蛋白酶牙膏

模擬牙齒染色
自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力
自製木瓜蛋白酶牙膏應用

文獻探討

活性部位



木瓜蛋白酶結構

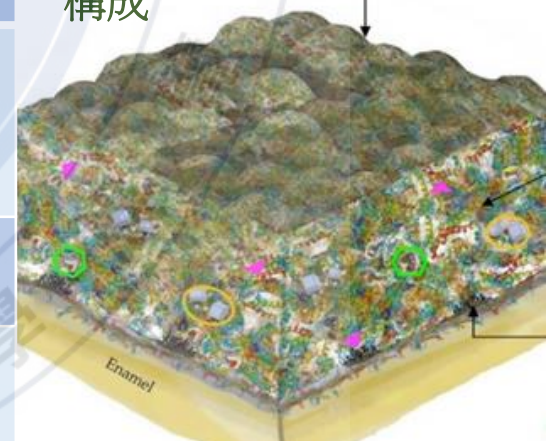
木瓜蛋白酶相關研究

證實會將蛋白質分解為氨基酸或是胜肽類物質

木瓜蛋白酶牙膏研究

木瓜和鳳梨蛋白酶潔齒劑具去汙效果

表層由密集聚集的蛋白質構成

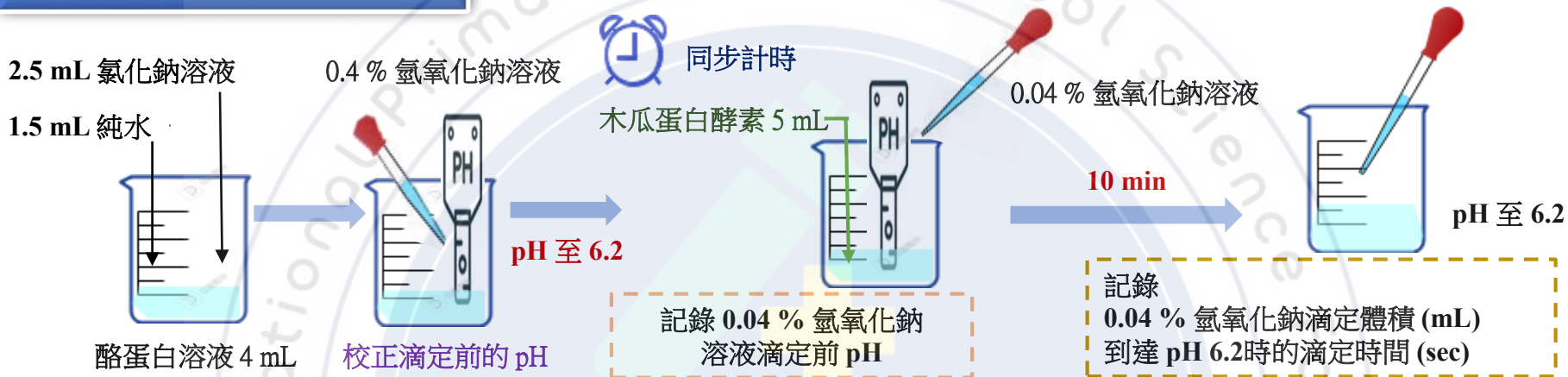


牙齒表面蛋白質表膜層

研究方法

木瓜蛋白酶活性測定方法

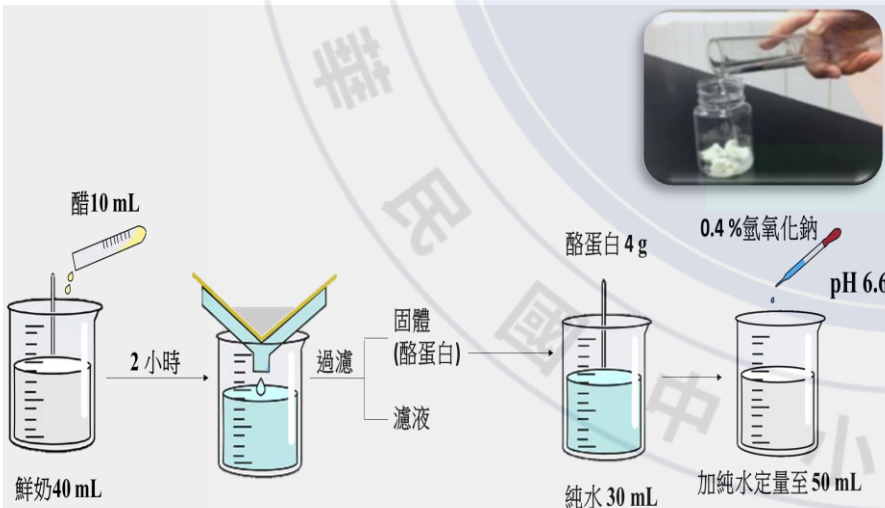
得最高活性木瓜蛋白酶製程



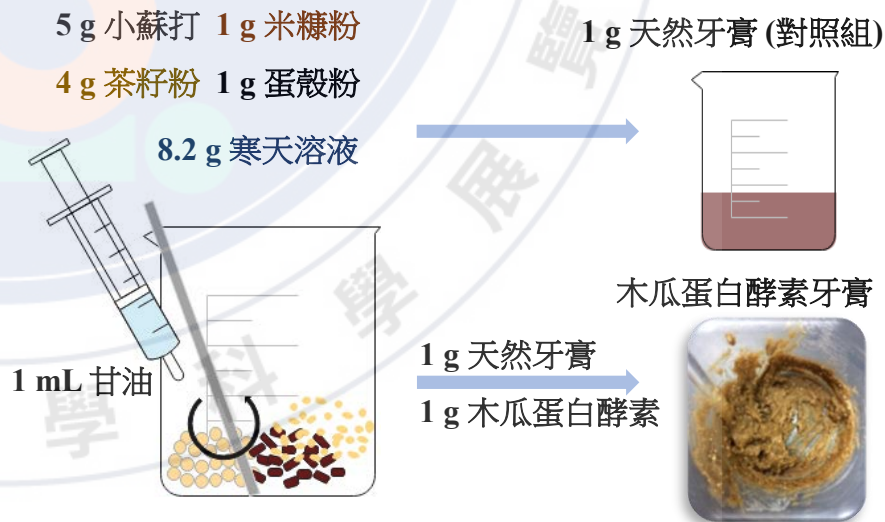
自製木瓜蛋白酶牙膏

應用實驗結果製造成品且用於生活中

模擬牙齒唾液膜—配製酪蛋白



配製自製木瓜蛋白酶牙膏



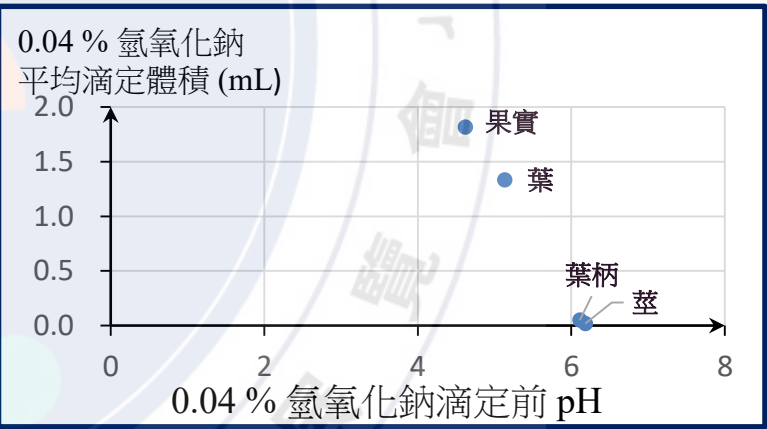
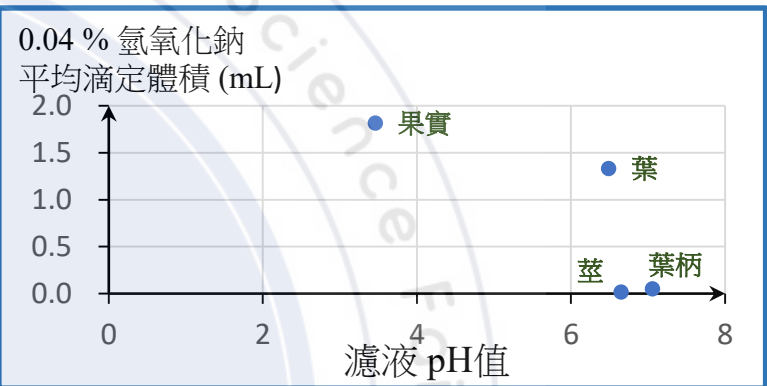
研究結果 (一) 探討木瓜蛋白酶活性－木瓜樹不同部位



木瓜樹不同部位的木瓜蛋白酶活性

種類	果實	葉	葉柄	莖
濾液 pH 值	3.46	6.49	7.06	6.65
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	4.62	5.13	6.11	6.18
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	1.82	1.33	0.05	0.02
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (sec)	82.67	49.33	4.33	2.67

木瓜樹不同部位氫氧化鈉平均滴定體積與濾液 pH 值、氫氧化鈉滴定前 pH 值之關係



- 木瓜蛋白酶活性：果實 > 葉 > 葉柄 > 莖。
- 0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值與氫氧化鈉平均滴定體積有負相關的關係。
- 酵素活性較大的果實及葉，滴定過程中 pH 會下降，推測胺基酸的硫化物游離出來越多，氫氧化鈉滴定體積就越多，到達滴定終點時間也越久。

研究結果 (二) 探討木瓜蛋白酵素活性—過濾後各分層、成熟與未成熟果



成熟與未成熟果實的木瓜蛋白酵素活性比較

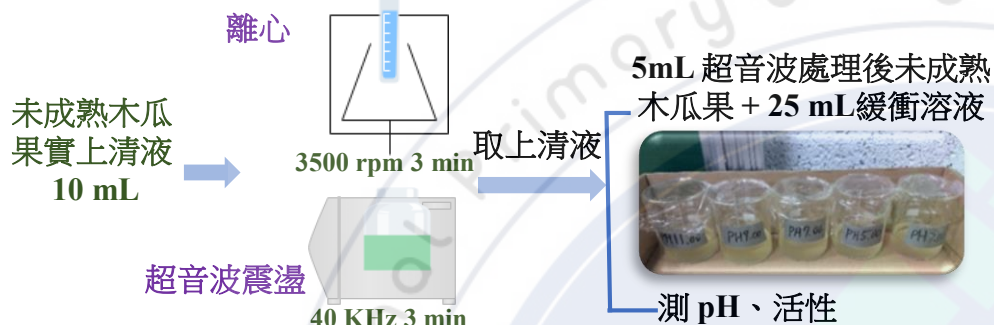
木瓜果實過濾後各分層的木瓜蛋白酵素活性

種類	果渣	上清液	混濁液
各分層圖片			
定量	98 g	51 mL	40 mL
濾液 pH 值	—	3.46	3.68
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	5.38	4.48	4.70
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	0.15	3.93	2.28
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (sec)	10.45	133.33	78.33

種類	成熟果實	未成熟果實
上清液		
濾液 pH 值	5.20	3.46
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	5.16	4.48
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	1.25	3.93
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (sec)	50.11	133.33

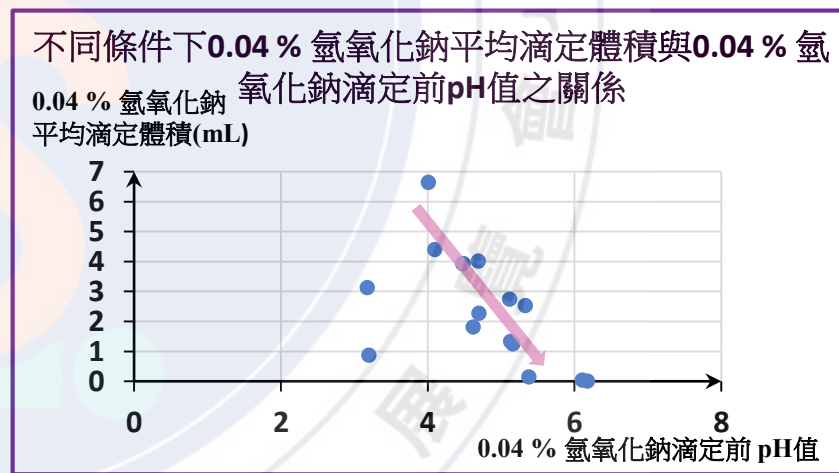
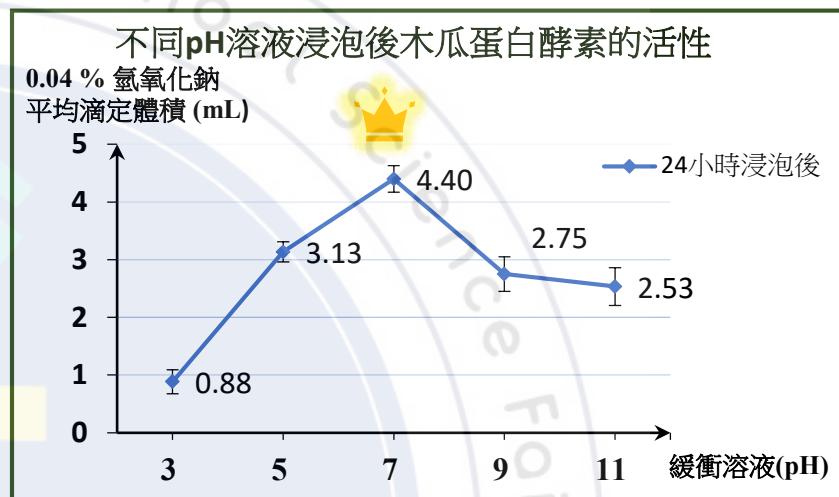
1. 木瓜蛋白酵素活性：上清液 > 混濁液 > 果渣。
2. 上清液中含有較多木瓜蛋白酵素，推測因木瓜蛋白酵素較易溶於水中。
3. 未成熟果實的木瓜蛋白酵素活性高於成熟果實。

研究結果 (三) 探討木瓜蛋白酵素活性 – 不同處理法、不同 pH 溶液浸泡



不同處理法的木瓜蛋白酵素活性比較

種類	對照組	離心	超音波震盪
不同處理法後木瓜蛋白酵素			
上清液定量	10 mL	8.7 mL	8.5 mL
濾液 pH 值	3.46	3.50	3.27
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值	4.48	4.69	4.01
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	3.93	4.02	6.65
到達 pH 6.2 時的平均滴定時間 (sec)	133	138.20	188



1. 將木瓜蛋白酵素溶液浸泡在 pH 7 緩衝溶液下，活性最高。
2. 在 pH 4 以上，0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值與氫氧化鈉平均滴定體積成負相關，推測木瓜蛋白酵素溶液在酸性的條件下會不穩定，會導致酵素結構破壞。

研究結果 (四) 探討木瓜蛋白酶活性—不同烘乾溫度

10 mL 超音波處理後
未成熟木瓜果實上清液

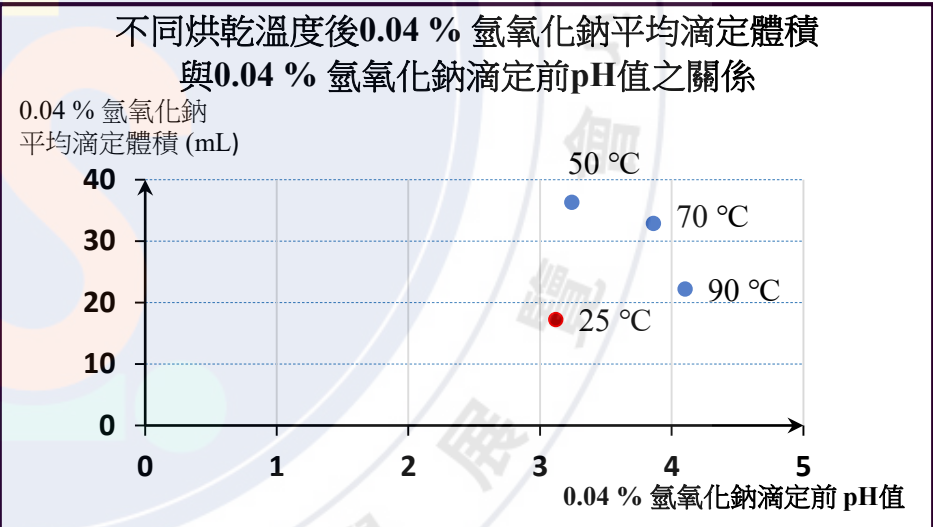
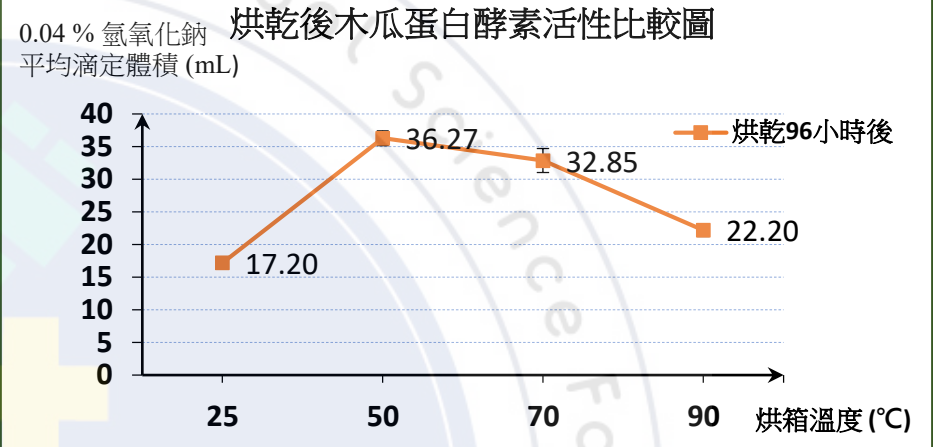
無水氯化亞鈷
試紙測試



烘乾 96 小時
(50°C、70°C、90°C)

經不同烘乾溫度後的木瓜蛋白酶活性

種類	25 °C	50 °C	70 °C	90 °C
烘乾96小時後重量 (g)	9.8 mL	2.3	2.3	2.4
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH	3.12	3.24	3.86	4.10
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	17.20	36.27	32.85	22.20
到達pH 6.2時的平均滴定時間 (sec)	375	593	548.33	420



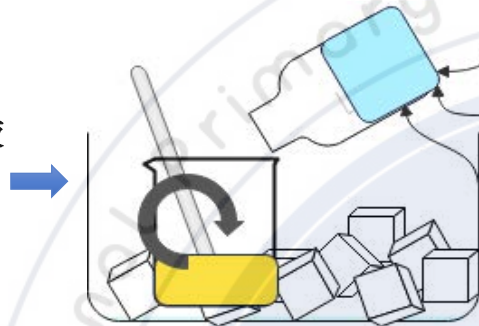
- 木瓜蛋白酶溶液以 50 °C 乾燥，保留木瓜蛋白酶活性最高，高溫乾燥會降低酵素活性。
- 從 0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積與 0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH 值之關係圖中，氫氧化鈉平均滴定體積：50 °C > 25 °C 對照組 → 木瓜蛋白酶溶液以液態保存 96 小時後，活性較差。

研究結果 (五) 探討酵素純化對木瓜蛋白酶活性的影響

冷凍庫

43.4 % 硫酸銨溶液

30 % 乙醇溶液



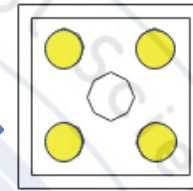
攪拌 10 min

實驗組 (1) 5 mL 硫酸銨溶液

實驗組 (2) 5 mL 乙醇溶液

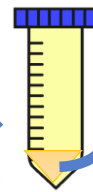
實驗組 (3) 2.5 mL 硫酸銨溶液
2.5 mL 乙醇溶液

離心



3500 rpm 3 min

取沉澱物

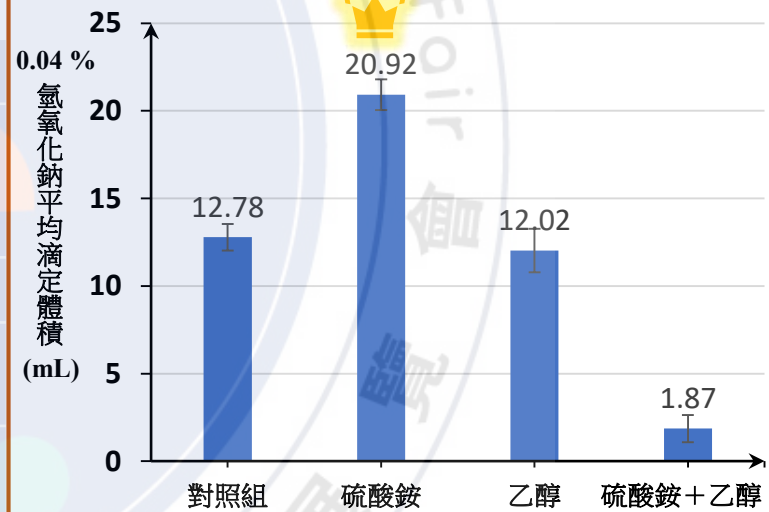


測量木瓜蛋白酶活性

經不同純化法後的木瓜蛋白酶活性

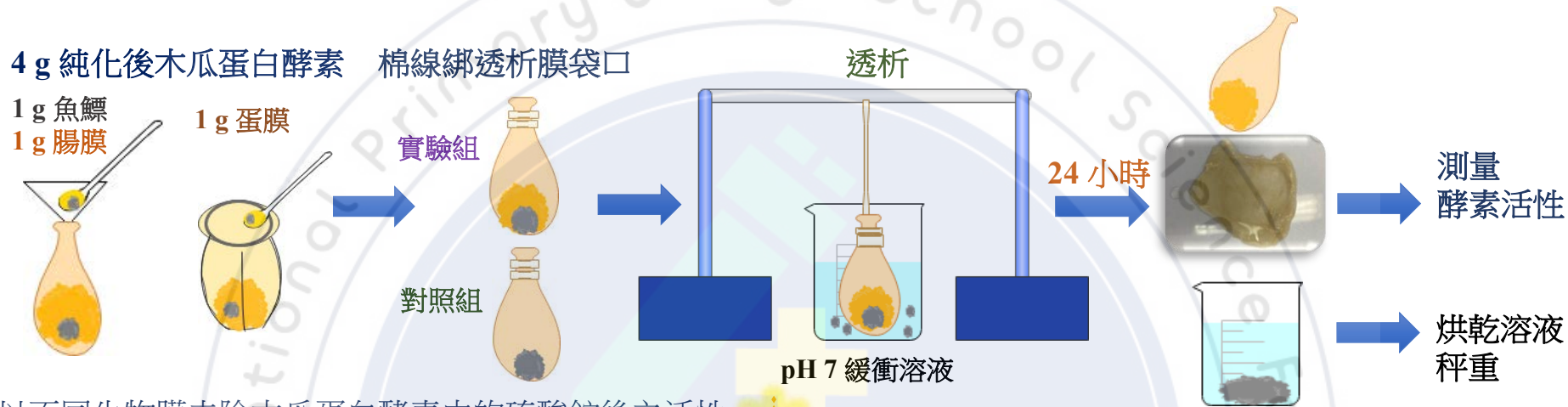
種類	對照組	硫酸銨	乙醇	硫酸銨+乙醇
純化後木瓜蛋白酶圖片				
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH	4.42	3.72	3.8	3.79
0.04 % 氫氧化鈉平均滴定體積 (mL)	12.78	20.92	12.02	1.87
到達 pH 6.2時的平均滴定時間 (sec)	268.33	415	250	65

酵素純化法對木瓜蛋白酶活性影響



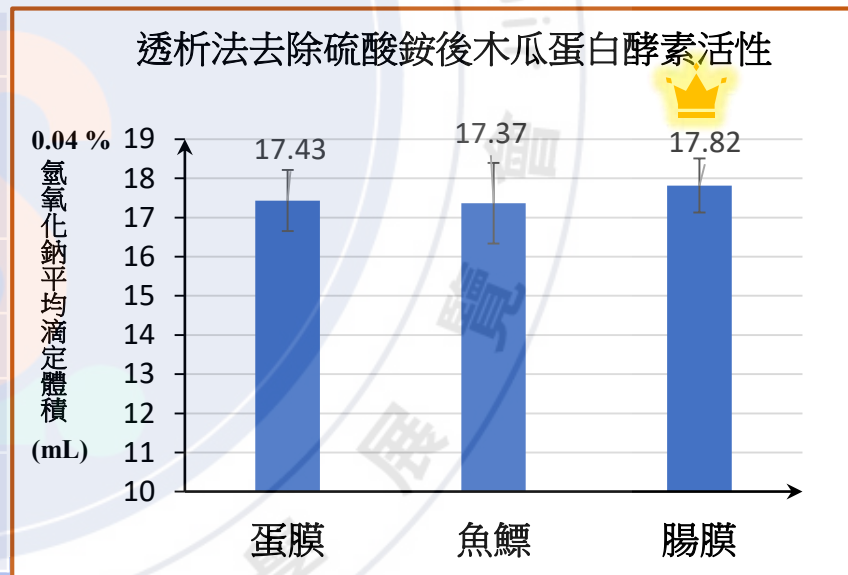
- 木瓜蛋白酶活性：鹽析法 > 沉澱法 > 鹽析+沉澱法
- 硫酸銨及硫酸銨+乙醇滴定前 pH 小於乙醇及對照組，經查詢資料，硫酸銨水溶液為酸性，為了解添加硫酸銨是否會影響木瓜蛋白酶活性測量時的氫氧化鈉滴定體積，我們後續進行硫酸銨與木瓜蛋白酶的分離。

研究結果 (六) 探討如何去除純化後木瓜蛋白酶中的硫酸銨



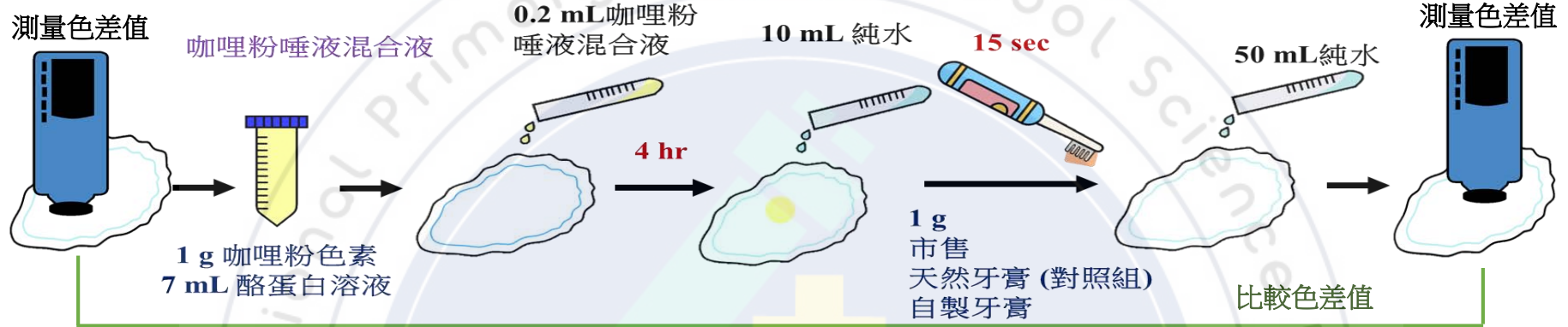
以不同生物膜去除木瓜蛋白酶中的硫酸銨後之活性

種類	蛋膜		魚鰾		腸膜	
透析後圖片						
溶液烘乾後重 (g)	實驗	對照	實驗	對照	實驗	對照
	0.75	0.50	2.14	2.89	3.19	3.55
0.04 % 氫氧化鈉滴定前 pH	3.53		3.46		3.78	
到達pH 6.2時的平均滴定時間 (sec)	332		330		345	

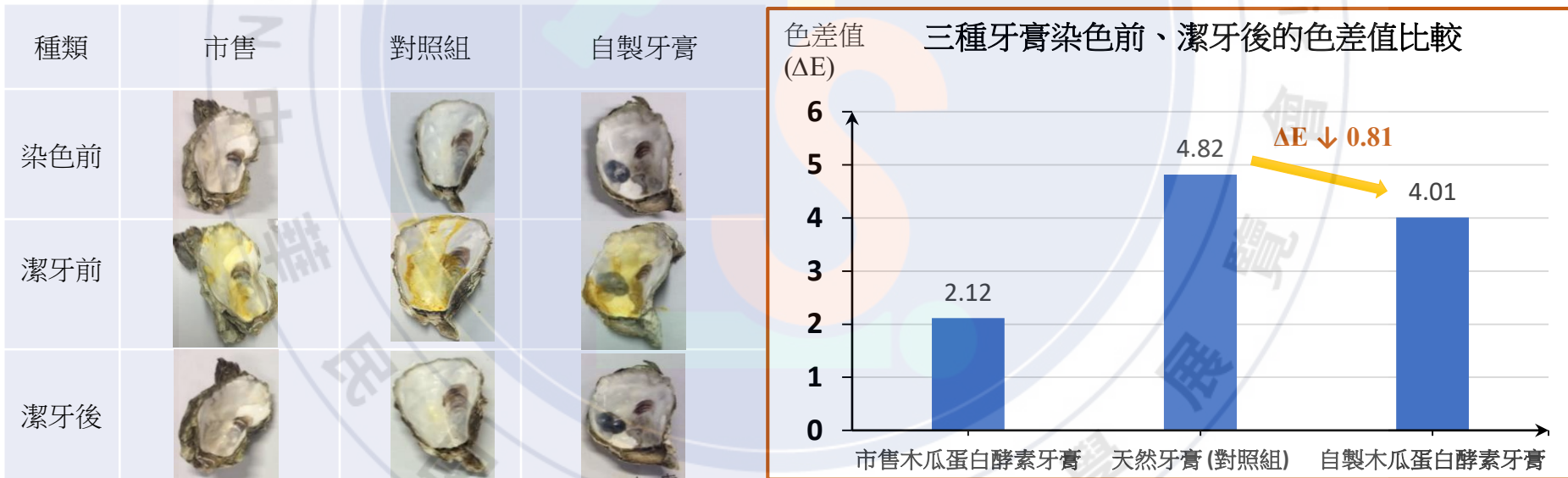


1. 蛋膜析出的硫酸銨量最少，氫氧化鈉滴定前 pH 值比魚鰾大，推論添加硫酸銨降低滴定前的 pH 值，對木瓜蛋白酶活性影響不大。
2. 三種透析膜透析後，木瓜蛋白酶活性差異不大，腸膜析出的硫酸銨最多。

研究結果 (七) 研究自製木瓜蛋白酶牙膏的潔牙能力

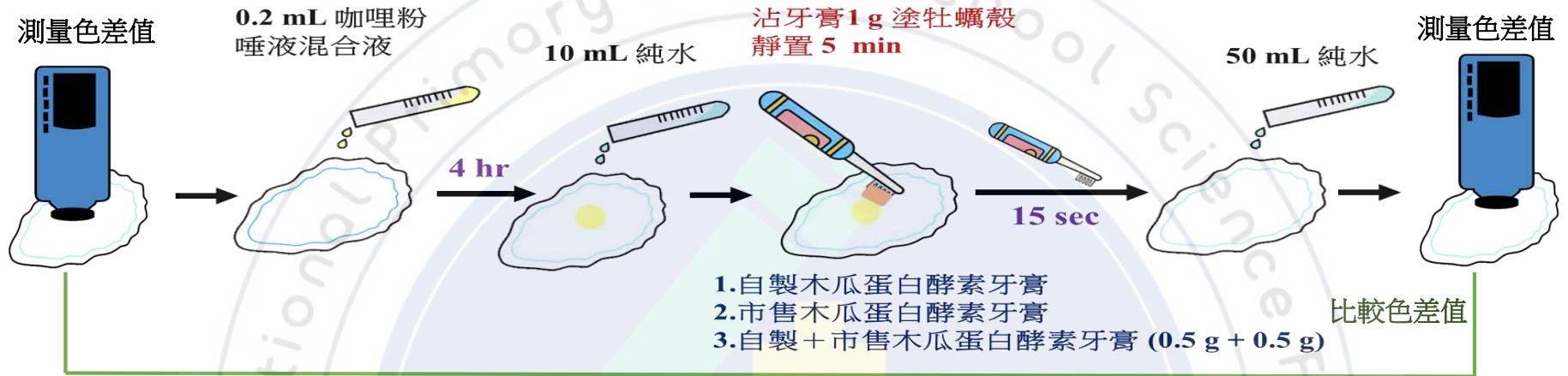


以咖哩粉唾液混合液染色後，比較不同牙膏的染色前Lab、潔牙後Lab的色差值



1. 自製木瓜蛋白酶牙膏染色前、潔牙後的色差值 ΔE 只有 4.01 \Rightarrow 能除去最難去色的咖哩粉色素。
2. 添加自製木瓜蛋白酶於天然牙膏，能使染色前、潔牙後的色差值 ΔE 下降 0.81 \Rightarrow 自製木瓜蛋白酶確實能潔牙去色。

研究結果 (八) 研究自製木瓜蛋白酶牙膏應用的方法



以咖哩粉唾液混合液染色後，比較不同牙膏的染色前Lab、潔牙後Lab的色差值



1. 將自製木瓜蛋白酶牙膏添加於市售木瓜蛋白酶牙膏中，效果優於市售木瓜蛋白酶牙膏。
2. 增加自製木瓜蛋白酶牙膏與咖哩粉唾液混合液間的反應時間 5 min，色差值 ΔE 下降 1.59。
3. 自製木瓜蛋白酶牙膏與市售比較，色差值 ΔE 只差 0.37，純天然且對人體無害。

結論

萃取高木瓜蛋白酶活性的最佳化條件

木瓜樹不同部位：未成熟果實 > 葉 > 葉柄 > 莖

果實過濾後各分層：上清液 > 混濁液 > 果渣

不同的處理法：超音波震盪 > 離心 > 對照組

不同 pH 溶液浸泡：pH 7 > pH 5 > pH 9 > pH 11 > pH 3

不同的烘乾溫度：50 °C > 70 °C > 90 °C > 25 °C

酵素的純化法：鹽析法 > 沉澱法 > 鹽析 + 沉澱法

透析膜去除硫酸銨：腸膜 > 蛋膜 > 魚鰾

自製木瓜蛋白酶牙膏

咖哩粉 色差值 ΔE 5.81 最大、最難去色

自製木瓜蛋白酶牙膏染色前潔牙後色差值 ΔE 4.01

自製木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g 加市售木瓜蛋白酶牙膏 0.5 g 色差值 ΔE 1.49 最小

木瓜蛋白酶加入酪蛋白溶液時的起始 pH 值與氫氧化鈉滴定體積有負相關的關係。

木瓜蛋白酶在 pH 4 以下，分解酪蛋白溶液的活性變差

50 °C 烘乾效果為對照組的 2.11 倍

鹽析法效果為對照組的 1.63 倍

腸膜析出的硫酸銨最多

自製木瓜蛋白酶牙膏潔牙，能除去最難去色的咖哩粉色素，且提升市售木瓜蛋白酶牙膏潔牙去色力。

本研究中以 50 °C 烘乾後的木瓜蛋白酶製成的自製木瓜蛋白酶牙膏，可維持酵素的活性，與酪蛋白溶液反應 5 分鐘後，能分解蛋白質，確實具有潔牙去色的功能，純天然且對人體無害。

參考資料

1. 木瓜蛋白酶活性測定方法 (2021 年 9 月 10 日)。
2. 齒如含貝－以蛋殼等常見材料自製牙膏。中華民國第54屆中小學科學展覽會。
3. 莊榮輝 (2001)。酵素化學實驗。
4. Efficacy of Extrinsic Stain Removal by Novel Dentifrice Containing Papain and Bromelain Extracts. *Journal of Young Pharmacists*, 4(4), 245-249.
5. Acquired salivary pellicle and oral diseases: a literature review. *J. Dent. Sci.* 16, 523- 529. Retrieved January 20, 2022.