

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松 博士

探討 SBA-15 固定化酵素(HRP)對苯胺聚合之貢獻

The contribution of HRP immobilized in SBA-15 on
the polymerization of aniline



研究生：蔡青旂 撰

中華民國 九十九年一月

中文摘要

本論文以SBA-15固定HRP酵素以催化聚合聚苯胺(PANI)。在研究過程中建立了合成球形SBA-15的條件，並作為HRP酵素固定化的載體。通過控制固定化過程中溶液的pH值，得知在pH 4.0的檸檬酸磷酸鈉緩衝溶液的環境下，除了可以使SBA-15與HRP酵素帶相反電荷而彼此吸引，同時也可確保HRP酵素有較佳的活性與穩定性。固定化後，每毫克SBA-15約負載6.4 μg HRP酵素。BET分析顯示SBA-15(HRP)孔洞體積小於SBA-15的孔洞體積，表明HRP成功地固定於SBA-15的孔洞中。

研究初步顯示 HRP 酵素得參與催化苯胺單體形成自由基及聚合成聚苯胺的過程。而在 SBA-15(HRP)催化聚合聚苯胺時，添加摻雜劑 HCl 與 DBSA 可提升產物 PANI 的導電性。當摻雜劑 HCl 與 DBSA 的濃度分別為 20 mM 以及 3 mM 時，由紫外光可見光光譜儀可以發現，於波長 750 nm 處有較明顯的吸收波峰，其為鹽式中間氧化態聚苯胺的特徵波峰。同時分析結果也表明所得之聚苯胺呈現良好的電化學性質。

關鍵字：聚苯胺(polyaniline)、辣根過氧化酶(Horseradish peroxidase ; HRP)、SBA-15(Santa Barbara Amorphous)、酵素固定化(enzyme immobilization)

Abstract

The study has utilized SBA-15 to immobilize HRP for the enzymatic polymerization of aniline. We have established a condition for the synthesis of spherical SBA-15, which was used as a carrier for HRP immobilization. By controlling the pH of the solution, we found that the sodium phosphate-citrate buffer with pH 4 provided a good environment for immobilization since SBA-15 and HRP had the opposite charges under that condition that might bring about ionic attraction between them. It also ensured the better activity and stability of HRP. By employing the established procedure, about 6.4 μg HRP can be immobilized by per mg of SBA-15. BET analysis has shown that the pore diameter of SBA-15 was reduced by HRP immobilization, indicating the successfulness of HRP immobilization inside the pores of SBA-15.

Preliminary results have indicated that HRP may be important for both the formation of aniline cation and the polymerization of aniline. Meanwhile, the addition of doping agent such as HCl or DBSA during polymerization is able to improve the conductivity of synthesized polyaniline (PANI), whereas the optimum concentrations of HCl and DBSA were 20 mM and 3 mM, respectively. The UV-visible spectrometer exhibited a major peak near the wavelength of 750 nm for PANI after doping, referring to the emeraldine base of polyaniline. Finally, we have demonstrated that the synthesized PANI by the established procedure possessed good electrochemical properties.

Keywords : polyaniline (PANI), Horseradish peroxidase (HRP), SBA-15 (Santa Barbara Amorphous), enzyme immobilization

致謝

目錄

中文摘要	I
ABSTRACT	II
致謝	III
目錄	IV
表目錄	VI
圖目錄	VII
第一章 緒論	1
1.1 辣根過氧化? 酵素(HRP)之簡介	1
1.1.1 HRP 之結構	1
1.1.2 HRP 催化反應機制	4
1.1.3 HRP 的應用	5
1.2 酵素固定化簡介	7
1.3 導電性高分子	9
1.3.1 導電性高分子簡介	9
1.3.2 導電性高分子之導電原理：能帶理論(band theory).....	12
1.4 導電性高分子聚苯胺(POLYANILINE, PANI).....	15
1.4.1 聚苯胺之結構	15
1.4.2 聚苯胺之合成方式	18
1.4.3 聚苯胺之性質分析	20
1.5 中孔洞氧化矽材料	22
1.5.1 中孔洞氧化矽材料之發展與研究	22
1.5.2 非離子型界面活性劑	24
1.5.3 中孔洞氧化矽 SBA-15 之性質與分析	25
1.6 研究動機	27
第二章 實驗設備、分析方法與流程簡介	29
2.1 實驗儀器	29
2.2 實驗藥品	31
2.3 實驗流程	33
第三章 以 SBA-15 為載體之 HRP 固定化製備與分析	34
3.1 實驗目的	34
3.2 實驗方法與程序	35
3.2.1 溶液配製	35
3.2.2 蛋白質定量分析	36
3.2.3 HRP 酵素活性分析	37
3.2.4 SBA-15 之合成	39
3.2.5 HRP 固定於 SBA-15 之製備	39

3.3 實驗結果與討論	41
3.3.1 SBA-15 為載體固定 HRP 酵素探討	41
3.3.1.1 紫外光可見光分光光度計分析	41
3.3.1.2 TEM 與 SEM 分析	45
3.3.1.3 BET 分析	47
3.3.2 HRP 之活性探討	51
3.3.2.1 於 NMP 中 HRP 之活性分析	52
第四章 以 SBA-15 負載 HRP 之苯胺酵素聚合	53
4.1 實驗目的	53
4.2 實驗方法與程序	53
4.2.1 溶液配製	53
4.2.2 以 SBA-15 負載 HRP 之聚苯胺製備	54
4.2.3 CPE 電極製備	54
4.2.4 循環伏安法(Cyclic voltammetry ; CV)	55
4.3 實驗結果與討論	56
4.3.1 以 SBA-15 負載 HRP 之苯胺聚合條件探討	56
4.3.1.1 紫外光可見光分光光度計	56
4.3.1.2 HCl 與 DBSA 摻雜劑之探討	61
4.3.1.3 HRP 催化聚合聚苯胺之探討	69
4.4.2 FTIR 分析	72
4.4.3 SEM 分析	74
4.4.4 BET 分析	78
4.4.5 TGA 分析	82
4.4.6 循環伏安法(CV)分析	86
第五章 結論與建議	88
參考文獻	90
簡歷	93

表目錄

表 1-1 四種酵素固定化方法之比較.....	8
表 1-2 四種聚苯胺型態之紫外光可見光吸收光譜.....	20
表 1-3 聚苯胺之紅外光吸收光譜.....	21
表 1-4 多孔性材料孔洞大小分類.....	22
表 1-5 不同 EO/PO 比值的結構分類.....	24
表 2-1 本研究中所使用的儀器設備一欄表.....	29
表 2-2 本研究使用實驗藥品一欄表.....	31
表 3-1 配製不同 pH 值之檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液所需的體積.....	35
表 3-2 比較兩種檢測方法檢測 HRP 於 SBA-15 中負載量.....	43
表 3-3 SBA-15 酵素固定化前後對孔洞特性的影響.....	48
表 4-1 SBA-15 酵素固定化前後與催化反應 PANI 後對孔洞特性的影響.....	78
表 4-2 氧化電位與電流關係表.....	87

圖目錄

圖 1-1 HRP 的三維結構	3
圖 1-2 HRP 活性中心-heme group 示意圖	3
圖 1-3 HRP 各型態示意圖	5
圖 1-4 常見導電性高分子化學結構式	10
圖 1-5 金屬、半導體、絕緣體與高分子之導電率比較圖	11
圖 1-6 絕緣體、半導體以及金屬之能帶間隙	13
圖 1-7 極子與雙極子之能階圖	14
圖 1-8 聚苯胺不同氧化還原態結構通	15
圖 1-9 聚苯胺的五種氧化還原態	16
圖 1-10 聚苯胺摻雜與去摻雜示意圖	17
圖 1-11 聚苯胺之鹽式中間氧化態示意圖	17
圖 1-12 HRP 催化苯胺形成二聚物之反應機構	19
圖 1-13 擴孔劑與孔徑大小關係圖	26
圖 1-14 擴孔劑與孔洞結構關係圖	26
圖 2-1 實驗架構	33
圖 3-1 SBA-15 表面化學結構	34
圖 3-2 HRP 酵素與 SBA-15 於不同溶液 pH 下帶電性示意圖	41
圖 3-3 ABTS 檢測 HRP 活性分析之濃度檢量曲線圖表	44
圖 3-4 蛋白質定量分析之濃度檢量曲線	44
圖 3-5 SBA-15 表面之 TEM 圖與 SEM 圖(1000 倍)	46
圖 3-6 SBA-15 表面之 SEM 圖(20000 倍)	46
圖 3-7 SBA-15 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖	49
圖 3-8 SBA-15(HRP)之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖	49
圖 3-9 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之氮氣等溫吸/脫附曲線比較圖	50
圖 3-10 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之孔徑分佈比較圖	50
圖 3-11 HRP 於不同 DBSA 濃度下之活性變化圖	51
圖 3-12 HRP 與 SBA-15(HRP)於不同 NMP 濃度下之活性變化圖	52
圖 4-1 電化學分析儀裝置圖	55
圖 4-2 不同苯胺濃度之聚合吸收光譜圖	58
圖 4-3 不同聚合反應時間之吸收光譜圖	59
圖 4-4 不同酵素催化聚合 PANI 條件之吸光譜比較圖	60
圖 4-5 不同 HCl 濃度之聚苯胺吸收光譜圖	62
圖 4-6 不同 HCl 濃度之聚苯胺吸收光譜圖	63
圖 4-7 不同 HCl 濃度之聚苯胺溶液圖	64
圖 4-8 不同 HCl 濃度之聚苯胺溶液圖	64
圖 4-9 不同 DBSA 濃度之聚苯胺吸收光譜圖	66

圖 4-10 不同 DBSA 濃度之聚苯胺溶液圖	67
圖 4-11 反應 24 hr 後加入不同 DBSA 濃度之聚苯胺吸收光譜圖	68
圖 4-12 加熱切斷 HRP 酵素活性催化步驟流程圖	70
圖 4-13 加熱切斷 HRP 酵素活性催化之吸收光譜圖	71
圖 4-14 不同苯胺聚和方式之紅外線光譜.....	73
圖 4-15 酵素聚合聚苯胺之表面 SEM 圖(30000 倍)	75
圖 4-16 不同聚合方式之 SBA-15 表面 SEM 圖.....	76
圖 4-17 分別以 NaOH 與 NMP 清洗後之 SBA-15 表面 SEM 圖.....	77
圖 4-18 SBA-15(HRP)/PANI 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖	79
圖 4-19 SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之氮氣等溫吸/脫附曲線比較圖	80
圖 4-20 SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之孔徑分佈比較圖.....	81
圖 4-21 不同型式聚合聚苯胺之 TGA 圖	84
圖 4-22 不同型式聚合聚苯胺之 TGA 圖	85
圖 4-23 比較碳糊電極感測 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 之 CV 圖	87

第一章 緒論

1.1 辣根過氧化酶(HRP)之簡介

辣根過氧化酶 (Horseradish peroxidase, HRP, EC 1.11.1.1.7)為一中心帶有血紅素蛋白(hemoprotein)的氧化還原酶，其來源為植物辣根(Horseradish)的根部所得，分子量約為 44 KDa，等電點介於 pH 3.0-9.0，並在波長 403 nm 下有特徵吸收波峰(Carlsson et al. 2005; Glazer 1996)。HRP 在生物體的生理代謝過程中，扮演重要的角色，而且價格較便宜以及取得方便且穩定性佳等優點，使得 HRP 成為研究中最常被使用的過氧化酶。

1.1.1 HRP 之結構

HRP 為由 308 個胺基酸所組成的多肽鏈，其三維結構中包含活性中心的血紅素(heme group)以及兩個鈣原子。在多肽鏈上由半胱胺酸所組成的四個雙硫鍵，分別位於 11-91、44-49、97-103、177-209 (Tsaprailis et al. 1998)其結構圖如圖 1-1 所示。Heme group 活性中心含正三價鐵離子，與多肽鏈 His 側鏈上的 N 原子結合，如圖 1-2 所示。結構中兩個鈣離子藉由氫鍵與活性中心結合，根據研究顯示其並不參與酶催化反應，但對於酶結構與活性的穩定有很大的影響(Tsaprailis et al. 1998)。

HRP 的活性點會與部分物質結合，進而影響到酵素的活性，包括有一氧化碳(CO)、氰化物(cyanide)、疊氮化物(azide)、氟化物(fluoride)、甲酸鹽(formate)、醋酸鹽(acetate)等(Carlsson et al. 2005)。HRP 經過冷凍乾燥處理過後，在低溫保存下，其活性可以在數年內不會有明顯的喪失。高濃度的 HRP 溶液於 4 °C 下，其活性亦可維持數個月(Glazer 1996)。

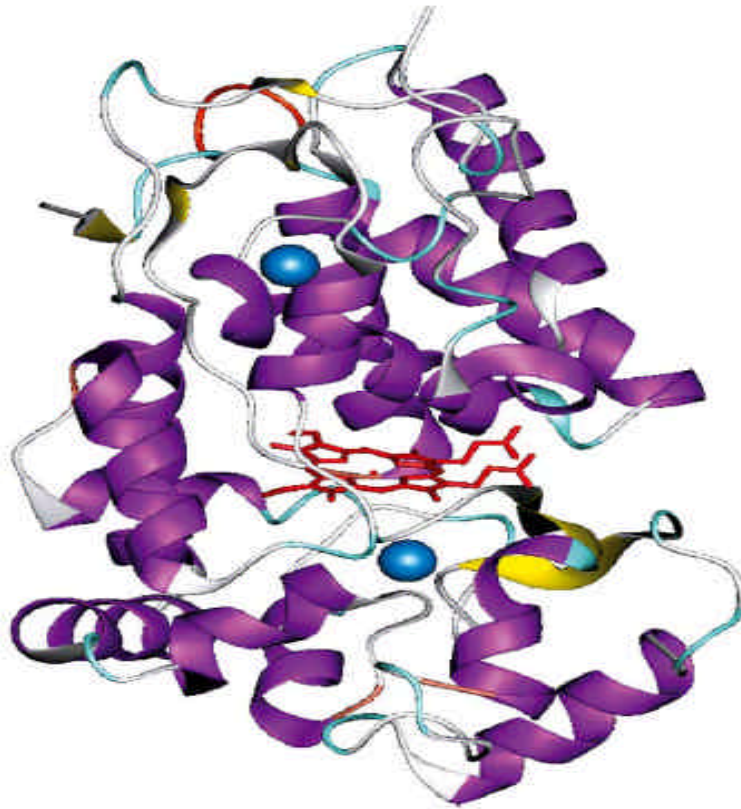


圖 1-1 HRP 的三維結構(Veitch 2004)

(網狀部分為活性中心，球型為鈣離子，螺旋狀為 螺旋，箭頭處為 折疊)

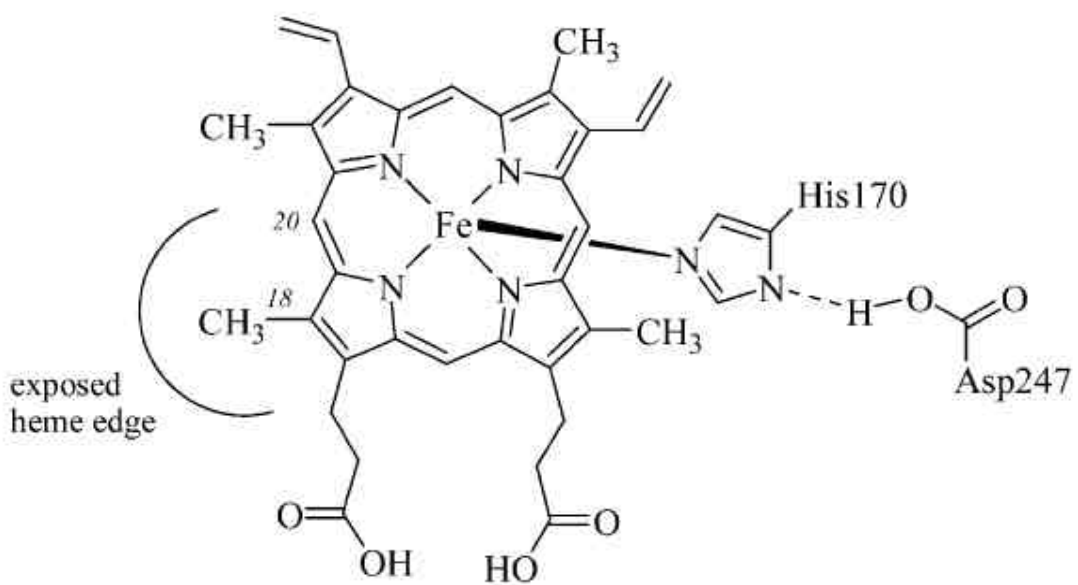
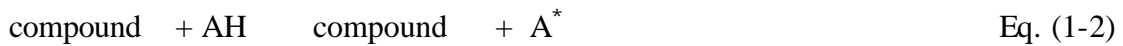


圖 1-2 HRP 活性中心-heme group 示意圖(Veitch 2004)

1.1.2 HRP 催化反應機制

HRP 對於反應受質的差異性不大，在反應中藉由添加過氧化氫以催化進行氧化反應，包括酚類(phenols)、芳香胺類(aromatic)、硫代苯甲醚(thioanisoles)、碘化物(iodide)、NADH、NADPH 等(Lai and Lin 2002)。

HRP 在過氧化氫參與下催化受質的反應機制如下(Everse et al. 1991)：



全反應式為：



其中 compound 與 compound 為 HRP 的中間型態，AH 為被氧化的受質，A* 為帶有自由基的產物。

上述反應中，HRP 首先由其正三價鐵離子活性中心與過氧化氫反應生成中間態 compound，compound 為含氧的具正四價活性中心以及帶一正電荷，此時若有受質(AH)加入，會與 compound 反應脫去氫而成為自由基的產物(A*)，而 compound 則會變成 compound，compound 為一含氧的正四價活性中心，之後 compound 將繼續與受質反應而還原成帶正三價鐵離子活性中心(Yang et al. 1996)。各型態的 HRP 如圖 1-3 所示。HRP 除了可以與過氧化氫反應催化多數受質外，亦可催化過氧化氫分解成水和氧氣，但是此反應速率較慢。

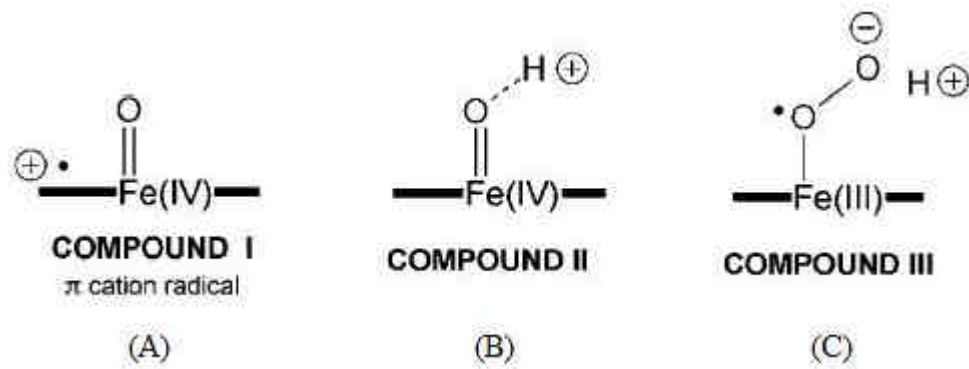


圖 1-3 HRP 各型態示意圖(Carlsson et al. 2005)

(A) 為 compound I 中間態，(B) 為 compound II 中間態，(C) 為 HRP 原型態。

1.1.3 HRP 的應用

HRP 具有催化轉化率高以及熱穩定性好等優點，在各個領域的應用主要有下列幾個方面(Lai and Lin 2002)：

1. 抗體免疫檢測(ELISA)

ELISA 為一種酵素連結免疫吸附分析(Enzyme-linked immunoabsorbent assay)方法。分別將與 HRP 酵素連結的抗原和固定於基材上的抗體作混和，利用抗原與抗體會產生專一性結合之特性，清除未與抗體結合的抗原，接著加入可被 HRP 酵素催化的底物，進行催化反應，並將所得呈色產物定量後，反推出抗原量的多寡(Bhunja et al. 2001)。

2. 生物感測器

電化學生物感測器為將 HRP 酵素固定於載體上，並針對目標物質進行催化反應，其催化氧化還原反應所產生的電流訊號藉由載體傳送，進而被電化學儀器所測得。通常電流訊號會隨著目標物質的濃度增加而逐漸改變。目前 HRP 電化學生物感測器，主要透過電流式(amperometric)或電壓式(pontentiometric)兩種偵測訊號方式。除了應用於感測過氧化氫外，另外在感測葡萄糖(glucose)、乙醇(ethanol)、體外腫瘤檢測(tumour makers in vivo)、一氧化氮(nitric oxide)等物質上，已有相當程度的研究成果(Ryan et al. 2006; Casero et al. 2000)。

3. 高分子合成

HRP 亦可應用於高分子合成方面，主要應用為催化苯胺及酚類聚合反應(Joo et al. 1998)。以合成聚苯胺為例，一般聚合條件需在較苛刻的環境條件下(如低 pH 值下)才能進行聚合反應，而酵素催化聚合反應，其最大優勢為可在溫和條件下進行，且反應速率快、專一性高，產物分子量大，溶解度高且副產物少。

4. 廢水處理

使用 HRP 酵素處理水污染物主要優點有，反應條件溫和、速率快以及經固定化處的酵素可以重複利用，而降低成本，且可適用的污染環境條件範圍較廣(如：pH 值、溫度、污染物濃度)，反應後不會產生有毒產物，造成二次環境污染。HRP 已被證實對於去除廢水中酚類、氯酚類有害物質有極佳的效果。其去除原理為，HRP 在含有過氧化氫的條件下，可使酚類及芳香族胺類氧化成自由

基，進而聚合形成不溶性的高分子，藉由簡單的過濾與離心方法，移除沉澱物，達到去除水中毒物之目的。

1.2 酵素固定化簡介

酵素固定化為在不顯著影響活性的情況下，將酵素固定於不可溶性載體上，其主要優點有：(1)可重複使用酵素以及用於連續製程中，而降低成本；(2)增加酵素活性的穩定性，使其在溫度、酸鹼度等環境下的活性維持，適用區間範圍擴大。常見的固定化方法有下列幾種：

1. 吸附法(adsorption method)

吸附法可藉由生物分子與載體之間的凡得瓦爾力、氫鍵、偶極力以及靜電力等作用力，將生物分子固定在載體上。此種方法的優點是操作方式最為簡單，且對於生物分子結構與活性的影響最小，其缺點為吸附結合力容易受到環境的溫度、pH 值、離子濃度以及酵素的使用次數所影響而逐漸減弱。

2. 包埋法(entrainment method)

包埋法為將生物分子包埋多孔性載體中，常用來的當載體的材料有：明膠(gelatin)、醋酸纖維素(cellulose acetate)、聚乙烯醇(polyvinylalcohol)、Nafion、聚氯乙烯(polyvinylchloride)等高分子膜。此種方法的優點有操作簡單且固定的生物分子不易脫落，其每克載體的包覆能力可固定 1 克以上的生物分子量，其缺點為生物分子的活性可能會被覆蓋而降低其催化能力。

3. 化學鍵結法(chemical conjugation method)

化學鍵結法是藉由添加額外的物質，同時與生物分子結構上的官能基及載體上的官能基產生反應，進而鍵結以達到固定的效果，為被廣泛研究的方法之一。此種方法的優點有鍵結力強且不易脫落，其缺點為鍵結效率差，平均每克的載體約只能固定 0.02 克的酵素，且容易因為改變生物分子的結構而導致失活。

4. 薄膜包覆法(membrane confinement method)

薄膜包覆法為將生物分子包覆在具有半透膜(semipermeable)功能的薄膜之中。此種方法的優點為能使酵素維持較好的活性，而缺點是花費較貴，且反應的底物以及產物必須能夠穿過薄膜這樣才可以得到產物。上述酵素固定化方法之綜合比較如表 1-1 所示。

表 1-1 四種酵素固定化方法之比較

種類	吸附法	包埋法	化學鍵結法	薄膜包覆法
製備流程	簡易	困難	困難	簡易
成本	低	中等	高	高
結合力	不一定	弱	強	強
酵素穩定性 ^a	差	差	佳	佳
酵素殘餘活性	高	低	低	高
應用性	廣	廣	專一性	極廣

^a 酵素穩定性為酵素與載體結合後，是否容易脫落。

1.3 導電性高分子

1.3.1 導電性高分子簡介

大部分的有機高分子為絕緣體(導電度小於 10^{-12} S/cm), 主要原因在於其碳氫化合物所組成的共價單鍵長鏈高分子結構中並沒有可以自由移動的電荷, 因此需經由添加金屬、石墨粉末或纖維等導電性材料, 來提高導電度。然而導電性高分子的主鏈是由共軛的單鍵與雙鍵交替鍵結所組成, 使得 電子沿著分子鏈移動來傳導電流。

關於共軛導電性高分子的發展歷史, 最早在1958年Natta利用Ziegler-Natta為觸媒, 成功將乙炔氣體聚合成聚乙炔(polyacetylene, PA)。1977年, 由Alan Heeger, Alan MacDiarmid、Hideki Shirakawa(2000年諾貝爾化學獎得主)這三位學者於研究中發現, 聚乙炔經由碘和五氟化砷摻雜(doping)後, 有效的提升聚乙炔的導電度(Heeger 2001; Shirakawa et al. 1977), 並得到P型以及是N型半導體, 此後導電性高分子逐漸受到世界各國學術界以及工業界的重視。

目前廣泛被研究的導電性高分子有聚苯胺(polyaniline, PANI)、聚吡咯(polypyrrole, PPy)、聚乙炔(polyacetylene)、聚噻吩(polythiophene, PT)、聚對苯(poly-para-phenylene, PPP)等如圖1-4所示, 均可以經由摻雜來提升其導電度。

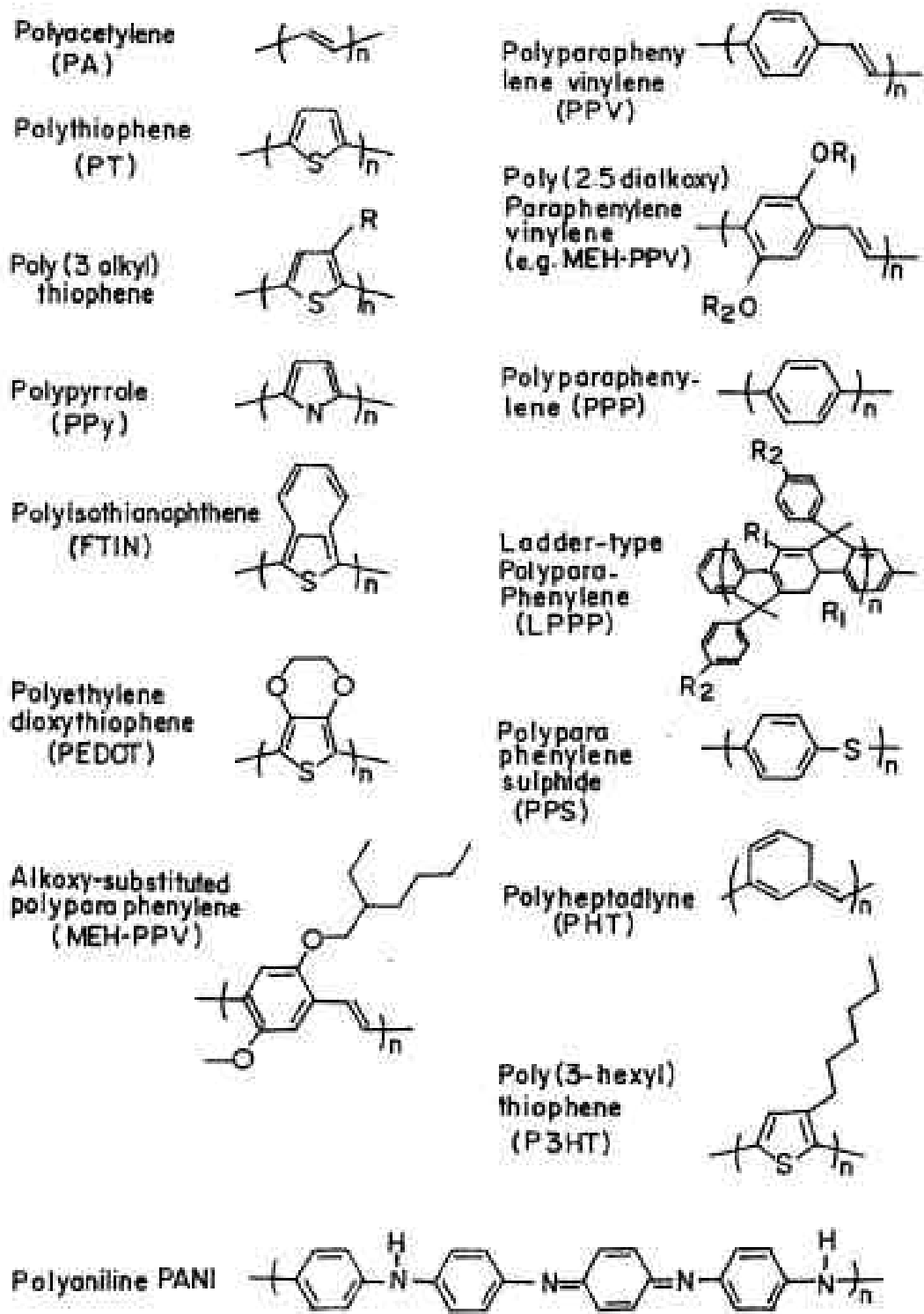


圖 1-4 常見導電性高分子化學結構式(Saxena and Malhotra 2003)

導電性高分子可經由摻雜處理後，將由絕緣體轉變成半導體或者是導體。在未摻雜之前的導電度介於 10^{-12} - 10^{-9} S/cm，摻雜之後的導電度最高可提升為 10^3 S/cm，相差 10^{12} - 10^{15} 倍之多，依照摻雜程度的不同，可分製成半導體以及導體如圖1-5所示。

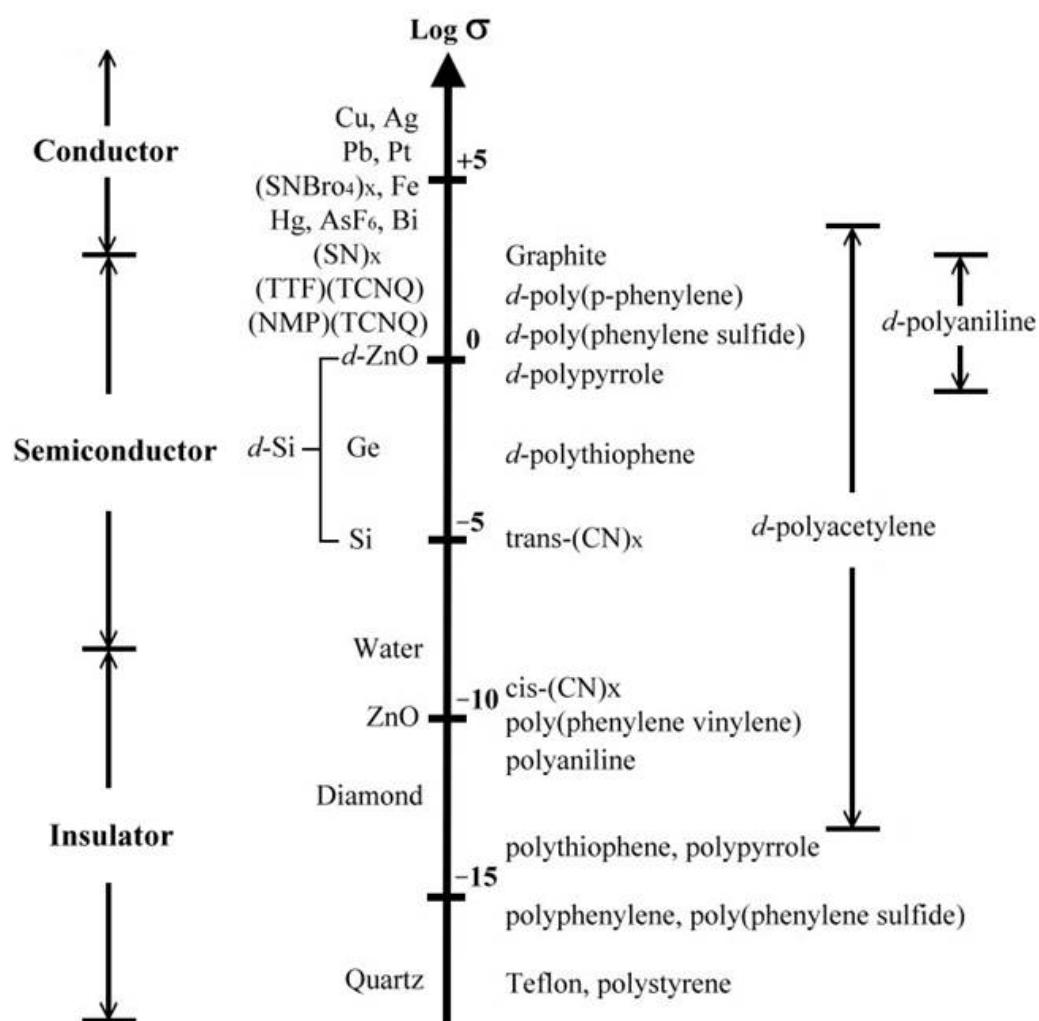


圖 1-5 金屬、半導體、絕緣體與高分子之導電率比較圖

d 表示有添加摻雜物(Cao et al. 1992)

聚苯胺相對於其它導電性高分子而言，它具有下列幾項優點：(1)在空氣中具有良好的穩定性；(2)單體價格低廉，聚合方法簡單；(3)可藉由氧化還原態以及質子酸摻雜來改變導電度。然而獨特的化學和電化學特性，以及在電池、電子元件、記憶體與光學元件等應用，使得聚苯胺成為最被廣泛研究的導電性高分子之一。

1.3.2 導電性高分子之導電原理：能帶理論(band theory)

物質的導電性質取決於其電子結構，一般可以用電子能帶理論(band theory)來解釋(Kanatzidis et al. 1990)。固體狀態時，由每一個原子的原子軌域重疊組成的分子軌域，其能量狀態為類似連續性的能帶(energy band)，能帶中的電子數，以及最高電子所占有之分子軌域(highest occupied molecular orbital；HOMO)和最低無電子軌域(lowest occupied molecular orbital；LOMO)之能帶位置，是依原子軌域包含的電子數與軌域的能量有關。價電子所佔有之能帶稱為價帶(valence band；VB)，在基態時無電子佔有之能帶稱為傳導帶(conduction band；CB)，而價帶之最高電子能量與傳導帶之最低電子能量之間的能量間隔稱為能帶間隙(band gap； E_g)。傳統材料的電子性質由能帶的填充情況而定，當能帶完全被填滿或全空時，無任何電荷傳遞發生。絕緣體的價帶與傳導帶之間的能帶間隙非常大，電子不能在室溫下被激發越過能帶間隙。金屬的能帶間隙為零，因此電子可以自由跳躍到鄰近能階而具有高度導電度。而半導體的能帶間隙介於絕緣體與金

屬之間，電子在室溫下可以從價帶被熱激發到傳導帶，絕緣體、半導體以及金屬的能帶間隙如圖1-6所示。

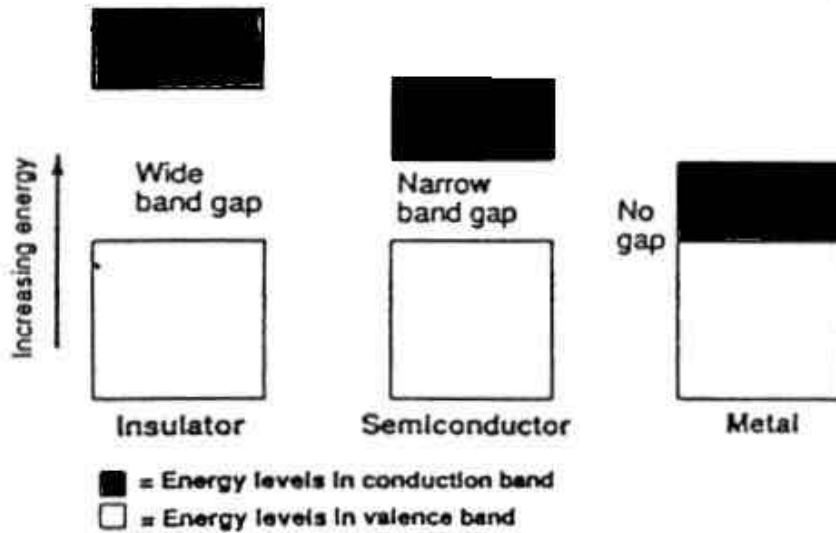


圖 1-6 絕緣體、半導體以及金屬之能帶間隙(Kanatzidis et al. 1990)

一般而言，導電性高分子的導電度約在於半導體與絕緣體之間，經摻雜後，因為電子狀態的改變使得導電度提升到導體與半導體之間。在摻雜中，一個電子的移動，在能帶間隙摻生一個電子-電洞對(electron-hole pair)或自由基陽離子(radical cation)，固態物理學稱之為極子(polaron)，隨著摻雜程度的增加，會有極子轉變成為雙極子(bipolaron)。極子或者雙極子可以在電場作用下，藉由共軛結構而沿著分子鏈移動。在高度摻雜下，更多的雙極子產生與堆疊，產生能帶間隙較窄的雙極子能帶(bipolaron bands)如圖1-7所示。

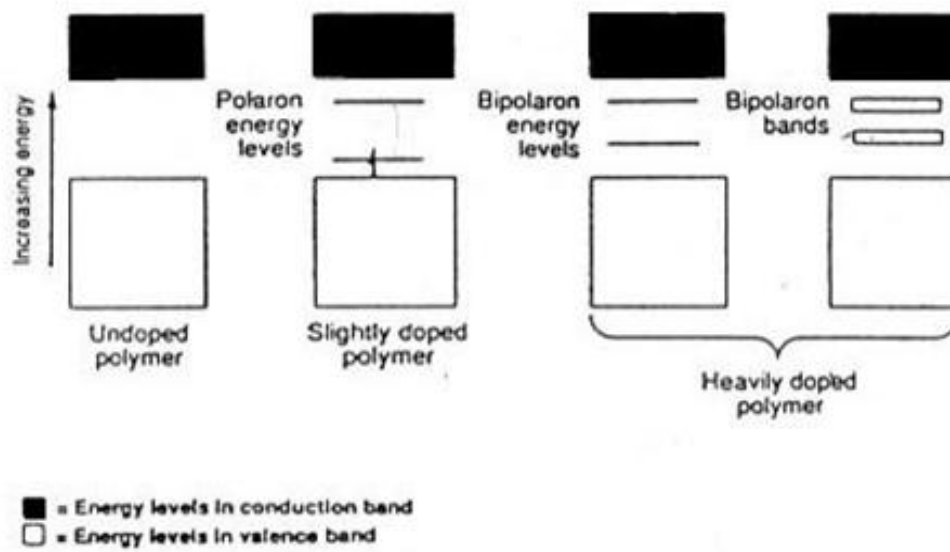


圖 1-7 極子與雙極子之能階圖(Kanatzidis et al. 1990)

1.4 導電性高分子聚苯胺(Polyaniline, PANI)

1.4.1 聚苯胺之結構

聚苯胺為導電性高分子的一種，它的結構分成具氧化態與還原態兩個部分，在依其不同的比例而形成不同的氧化還原態如圖 1-8 所示(Macdiarmid et al. 1989)。主鏈中， $1-y$ 部分為氧化單位(oxidation unit)，包含一個苯環(benzenoid)和一個醌環(quinoid)； y 部分為還原單位(reduction unit)，包含兩個苯環。

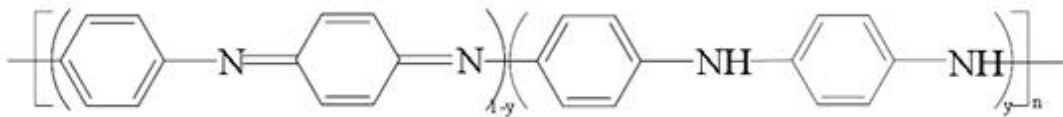


圖 1-8 聚苯胺不同氧化還原態結構通式

當 $y=0$ 、 1 及 0.5 時，聚苯胺的型態分別為 pernigraniline、leucoemeraldiner 及 emeraldine

聚苯胺的結構在未摻雜(undoping)以及摻雜的情況下，會呈現出不同的顏色變化，當完全為還原單位的狀態稱為 Leucoemeraldine，完全還原態，呈現淡黃色；組成 25% 為氧化單位的狀態稱為 Protoemeraldine，顏色為淡藍色，經摻雜後呈現黃綠色；組成 50% 為氧化單位的狀態 Emeraldine，顏色為藍色，經摻雜後顏色呈現深綠色；組成 75% 為氧化單位的狀態 Nigraniline，顏色為深藍色，經摻雜後顏色呈現藍色；組成完全氧化單位的 Pernigraniline，摻雜前後顏色皆呈現紫色，五種不同氧化還原態結構如圖 1-9 所示。

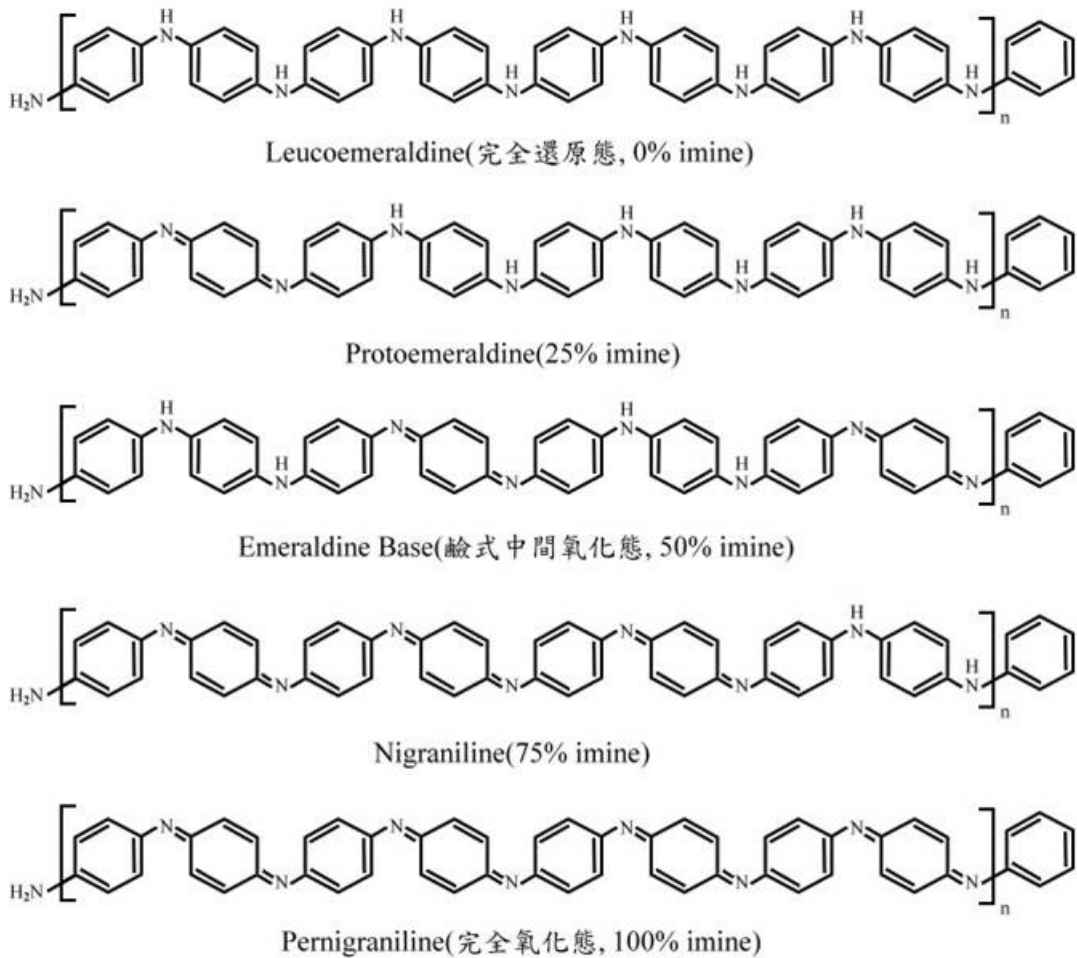


圖 1-9 聚苯胺的五種氧化還原態(Wu and Huang 2002)

聚苯胺可藉由酸和鹼的添加，進行摻雜和去摻雜的可逆反應，來改變其導電性如圖 1-10 所示。鹼式中間氧化態(Emeraldine base, EB)經摻雜之後會變成導電性較高的鹽式中間氧化態(Emeraldine salt, ES)結構如圖 1-11 所示。這五種氧化還原態之中，完全氧化態(Pernigraniline)不具導電性，而深綠色的鹽式中間氧化態(Emeraldine salt, ES)導電性最高。

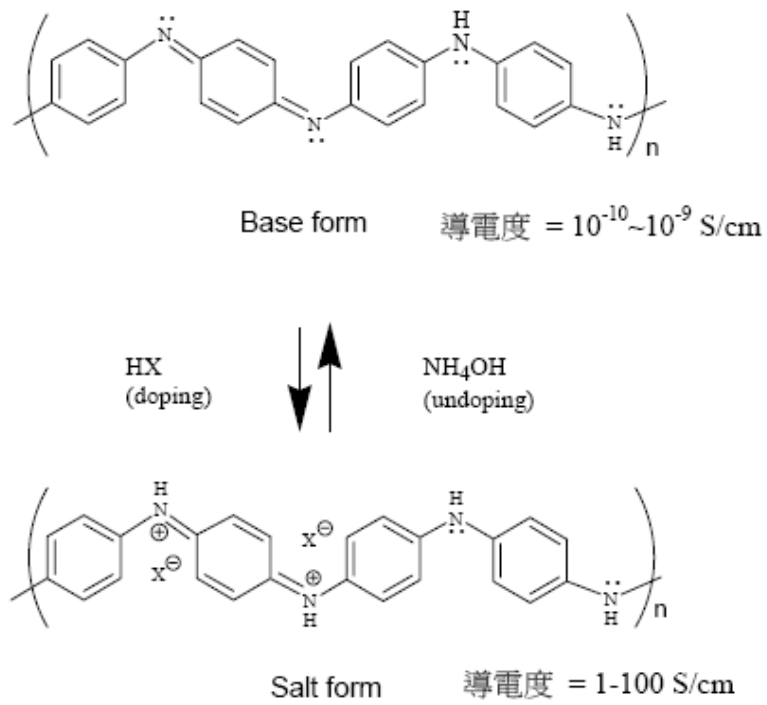


圖 1-10 聚苯胺摻雜與去摻雜示意圖(Zhan and Shu 2003)

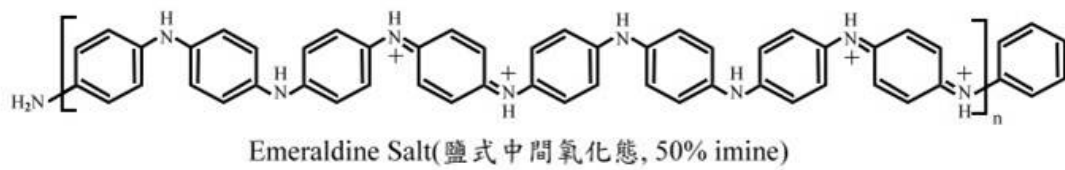


圖 1-11 聚苯胺之鹽式中間氧化態示意圖

1.4.2 聚苯胺之合成方式

聚苯胺的合成方式大致上可以分成三種：化學合成法、電化學合成法以及酵素催化合成法。

1. 化學合成法

化學聚合法為將苯胺單體溶於酸性溶液中，再加入強氧化劑進行氧化聚合反應，一般常見的氧化劑有：過硫酸銨 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、過硫酸鉀 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、過氧化氫 H_2O_2 重鉻酸鉀 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 等。

2. 電化學合成法

電化學合成法為將苯胺單體溶於酸性溶液中，利用陽極氧化的方式在電極上將苯胺單體氧化聚合成聚苯胺。電化學合成法一般可分成定電流法 (Galvanostatic)、定電壓法 (Potentiostatic) 以及循環伏安法 (Cyclic voltammetry, CV)。定電流法聚合聚苯胺的結構型態為顆粒或短纖維狀；定電壓法聚合聚苯胺的結構型態為鬆散粉末狀；循環伏安法聚合聚苯胺的結構為均勻薄膜。

電化學合成法的聚合反應機制，

3. 酵素催化合成法

酵素催化合成法為將苯胺單體溶於適合酵素活性的緩衝溶液之中，再加入氧化劑(如過氧化氫 H_2O_2)和酵素進行催化聚合反應。苯胺單體上的胺根會自由基化，兩個自由基化後的苯胺會互相結合形成二聚物(dimers)，而二聚物會繼續與帶有自由基的胺根結合如圖 1-12 所示，進而形成聚合物。聚合出的導電性高

分子，其主鏈有可能產生彼此交聯或是有支鏈生成的情況產生，而非是單一直鏈的結構，因此聚合物的電化學性質及密度將受到影響。

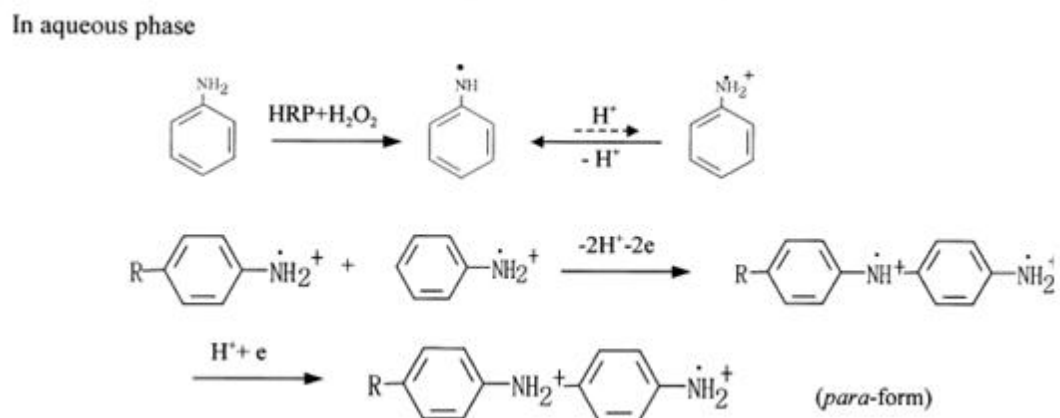


圖 1-12 HRP 催化苯胺形成二聚物之反應機構(Lim and Yoo 2000)

1.4.3 聚苯胺之性質分析

表1-2為四種聚苯胺氧化型態的紫外光可見光吸收光譜，完全還原態聚苯胺在330 nm附近有吸收峰。完全氧化態聚苯胺在330 nm與500 nm附近有吸收峰。鹼式中間氧化態聚苯胺在330 nm與640 nm附近有吸收峰，後者乃是分子鏈上? 環 (quinoid ring) 的激子 (excitation) 吸收所引起，當聚苯胺氧化程度增加時，此吸收峰會出現偏移，往更低的波長靠近，接近完全氧化態的波長。有質子酸摻雜的鹽式中間氧化態聚苯胺在750、420與330 nm附近有吸收峰。此750 nm吸收峰乃是鹼式中間氧化態聚苯胺經過質子摻雜後，聚苯胺主鏈上的電子形成非定域化 (delocalization) 情形，並且使共振現象較佳，以致降低使電子躍遷所需的能量。鹽式中間氧化態聚苯胺額外在420 nm附近有另一個吸收峰，此吸收峰則源自於自由基陽離子，因此可由這些初步判斷聚合而成的物質為何型態。

表 1-2 四種聚苯胺型態之紫外光可見光吸收光譜

名稱	吸收波長(nm)
Leucoemeraldine	330
Emeraldine base	330、 600
Pernigraniline	330、 500
Emeraldine salt	330、 420、 750

表 1-3 為醞式中間氧化態之紅外光吸收光譜，鹽式中間氧化態得聚苯胺，其 N = Q = N 及 N-B-N 吸收波比起醞式中間氧化態的聚苯胺要向低波數偏宜，吸收強度大之相同。同時，N = Q = N 的吸收峰自 1140 cm⁻¹ 附近移至 1120 cm⁻¹ 附近。

表 1-3 聚苯胺之紅外光吸收光譜(Arnao et al. 1996)

吸收波長 (cm ⁻¹)	振動模式
3376	NH str.
3310	H-bonded NH str.
1589	str. of N=Q=N
1496	str. of N-B-N
1378	C-N str. in QB _t Q
1306	C-N str. in QB _c Q, QBB, BBQ
1238	C-N str. in BBB
1165	a mode of N=Q=N
(1131)	a mode of Q=NH ⁺ -B or B-NH ⁺ -B
830	C-H op on 1, 4-ring

Assignment : sym. = symmetric, str. = stretching, op. = out-of-plane bending,
 Q = quinoid unit, B = benzoid unit, B_t = *trans*-benzoid unit, B_c = *cis*-benzoid unit

1.5 中孔洞氧化矽材料

1.5.1 中孔洞氧化矽材料之發展與研究

多孔性材料(porous material)具有選擇性吸附、高表面積、具離子交換能力以及化學性質與物理性質的高穩定性等優點。分子篩(molecular)這個名詞最早是由 McBain 在 1932 年所提出，他發現一種名為 chabazite 的天然礦物對於直徑小於 0.5 nm 的分子具有選擇性吸附，因此提出分子篩必須能夠藉由分子的大小與形狀的不同來分離混合物。早期的分子篩大都屬於微孔洞型，如沸石(Zeolite)，應用於石油的裂解、小分子催化、脫氫與異構化等方面，但因為孔徑太小，使得應用受到限制。為了增加分子篩的應用性以及大分子的催化，微孔洞分子材料進入到中孔洞分子材料甚至是巨孔洞分子材料的研究，成為近年來重要的目標。

根據國際純粹應用化學聯合會(IUPAC)的分類，多孔材料可依其孔徑的大小分成三類：(1)孔洞直徑小於 2 nm 為微孔洞(microporous)；(2)孔洞直徑介於 2 nm 50 nm 為中孔洞(mesoporous)；(3)孔洞直徑大於 50 nm 為巨孔洞(macroporous)，其分類如表 1-4 所示。

表 1-4 多孔性材料孔洞大小分類

材料種類	孔洞直徑範圍(nm)	實例
微孔洞材料	$d < 2$	ZSM-5、沸石、活性炭
中孔洞材料	$2 < d < 50$	MCM-41、SBA-15
巨孔洞材料	$d > 50$	離子交換樹脂

1992 年 Mobil oil 公司於 Nature 雜誌上發表，利用帶正電的四級銨鹽界面活性劑作為模板，與帶負電的矽酸鹽作結合，合成出新型的中孔洞二氧化矽(SiO_2) 分子篩 MCM-41(Mobile Composite of Matter 41)(Kresge et al. 1992; Beck et al. 1992)，比起傳統的分篩，其具有高表面積($1000 \text{ m}^2/\text{g}$)、高穩定性以及孔洞規則排列且孔徑可微調 (1.5 nm - 10 nm)等優點，可應用於大分子的催化、奈米導線製作之模板與光電材料等方面。在製備 MCM-41 的過程中加入少量的金屬，可提升其催化能力且不會影響孔道的結構。1998 年 Stucky 在 Science 雜誌上發表(Zhao et al. 1998)，利用三區塊共聚合物(triblock copolymer)的非離子型界面活性劑作為模板，合成出以二氧化矽為骨架的中孔洞分子篩 SBA-15(Santa Barbara Amorphous)，其不論孔徑大小(4.6 nm - 30 nm)、孔壁厚度(3.1 nm - 6.4 nm)以及空洞體積($> 0.85 \text{ cm}^3/\text{g}$)皆優於 1992 年 Mobil oil 公司的 M41S，從此開啟研究中孔洞材料的新領域。由於中孔洞材料具有良好的化學穩定性、機械強度以及高表面積等優點，廣泛被使用於酵素固定化的載體，以增進其催化能力與穩定性 (Aburto et al. 2005; Bai et al. 2007; Vamvakaki and Chaniotakis 2007)。

1.5.2 非離子型界面活性劑

界面活性劑為一種兩性分子，大致上可分成親水性與疏水性兩部分。親水性基團通常為極性或離子的原子團；疏水性基團則為一條或是數條的碳氫長鏈。依其結構上的不同可分為下列 4 種：(1)陽離子型界面活性劑；(2)陰離子型界面活性劑；(3)兩性離子型界面活性劑；(4)非離子型界面活性劑。本研究中所合成的 SBA-15 為非離子型界面活性劑。

合成 SBA-15 的界面活性劑，為一種三區塊共聚合物 $(\text{PEO})_n-(\text{PPO})_m-(\text{PEO})_n$ [(poly(ethylene oxide)_n- poly(propylene oxide)_m- poly(ethylene oxide)_n]，其中 EO 區塊為親水性高分子，PO 區塊為疏水性高分子。當界面活性劑於水溶液中的濃度超過臨界微胞濃度時，親水端向外與水分子接觸並將疏水端包圍，由於本身沒有靜電力的作用，所以彼此間的堆積很緊密。可以藉由調整 n/m 的比值來改變晶型，如 $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ 合成出六角排列(hexagonal)的 SBA-15。藉由 EO/PO 的比值來推測所合成出中孔洞材料的結構，其大致趨勢如表 1-5 所示(Zhao et al. 1998)。

表 1-5 不同 EO/PO 比值的結構分類

EO/PO < 0.07	低濃度時(0.5 ~ 1 wt%)，較傾向形成六角排列(hexagonal)的結構；高濃度時(2 ~ 5 wt%)，則較傾向形成層狀(lamellar)排列的結構，如 $\text{EO}_5\text{PO}_{70}\text{EO}_5$ 。
EO/PO = 0.07 ~ 1.5	傾向形成六角排列(hexagonal)的結構，如 $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ 。
EO/PO > 1.5	傾向形成立方排列(cubic) 的結構，如 $\text{EO}_{100}\text{PO}_{39}\text{EO}_{100}$ 、 $\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$ 。

1.5.3 中孔洞氧化矽 SBA-15 之性質與分析

SBA-15於1992年由Stucky所發表，其使用非離子型界面活性劑為模板，利用此共聚合物中的親水端及疏水端的特性，在酸性($\text{pH} < 1$)的環境下以自身堆聚的方式，形成六角柱狀的堆疊($p6mm$)，再與無機矽化物(ex: TEOS)結合而形成有機-無機中孔洞結構的物質，接著經過鍛燒或是始使用有機溶液的方式將有機模板去除，即可得到六角柱型的中孔洞材料SBA-15。

SBA-15的孔徑大小與結構型態，可以在合成過程中藉由添加的擴孔劑 (swelling agent)來調整，根據文獻Lettow等人研究指出(Lettow et al. 2000)，以三甲基苯為擴孔劑，其孔徑大小與三甲基苯濃度成正比關係。如圖1-13所示，在相同界面活性劑濃度下，孔徑大小與擴孔劑的添加量呈現兩段線性正比關係，當擴孔劑的添加量介於0 ~ 0.2 wt%之間，孔徑大小介於6 ~ 12 nm，孔洞結構為直孔洞型態；當擴孔劑的添加量介於0.3 ~ 0.6 wt%之間，孔徑大小介於22 ~ 42 nm，孔洞結構為球型型態；當擴孔劑的添加量介於0.3 ~ 0.6 wt%之間，孔徑大小介於22 ~ 42 nm，孔洞結構介於質孔洞與球型之間，不同擴孔劑比例下的孔洞結構如圖1-14所示。

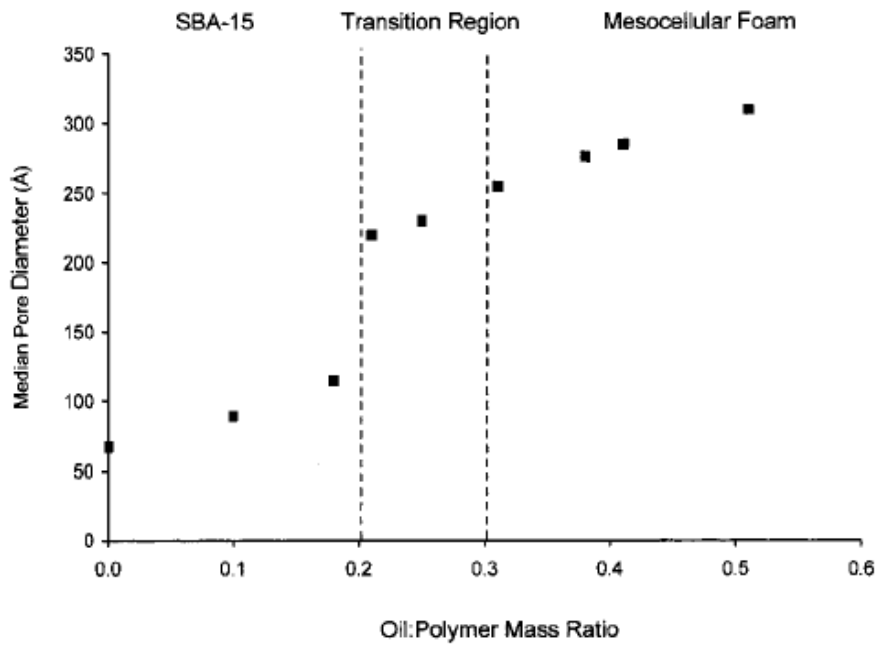


圖 1-13 擴孔劑與孔徑大小關係圖(Lettow et al. 2000)

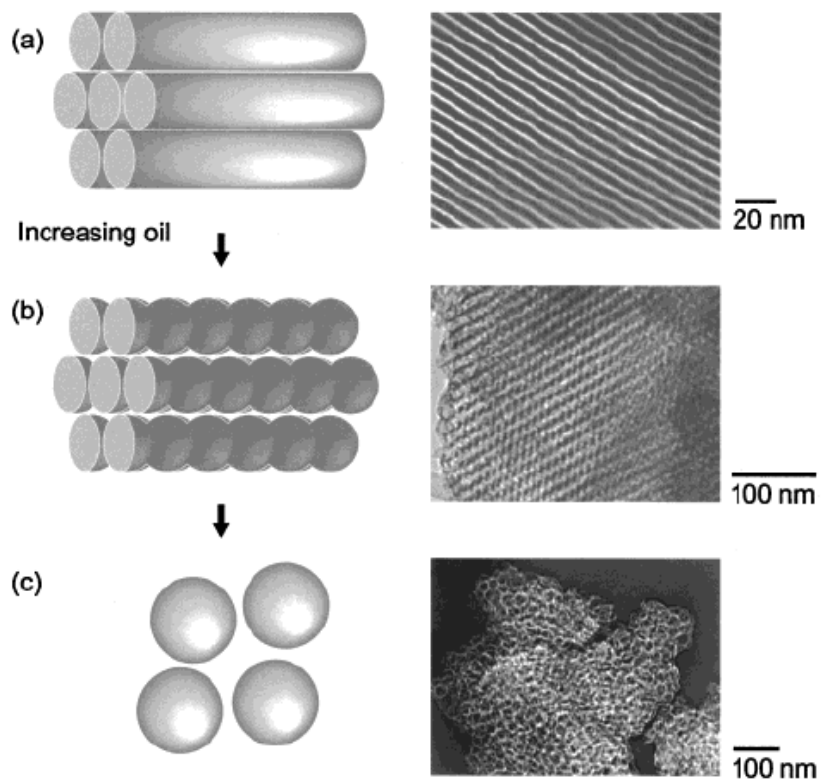


圖 1-14 擴孔劑與孔洞結構關係圖(Lettow et al. 2000)

1.6 研究動機

聚苯胺為價格低廉且物理性質與化學性質的穩定性佳的導電性高分子，其研究與應用相當廣泛，如電池、電變色原件、抗靜電材料與金屬防腐等。常用於聚合聚苯胺的方式有：(1)化學法(2)電化學法(3)酵素法，然而在化學法與電化學法的聚合過程中，所使用的氧化劑與強酸容易對環境造成污染且回收不易。

隨著環保意識的抬頭，研究人員轉而尋找對環境傷害較小的製程，其中生物催化劑的使用，除了可以增加反應速率且具有專一性外，生物材料容易分解，因此對環境傷害最小。本研究所使用的是酵素法聚合聚苯胺，因為酵素催化能夠加快聚合反應速率，而且不需要在極端的pH環境中反應，所使用的氧化劑 H_2O_2 容易分解，對環境危害較輕。

另外，為了增加酵素的使用性以及增加酵素聚合出聚苯胺的分子量，研究中使用中孔洞材料SBA-15當作固定酵素HRP的載體以及苯胺聚合時的模板，在適當pH值的緩衝溶液中，以過氧化氫為氧化劑。然而一般酵素催化聚合之聚苯胺，其導電性不佳，因此在聚合過程中，添加摻雜劑(如HC與DBSA)，進行摻雜以增加導電性。將聚合出的聚苯胺，使用紫外光可見光譜儀(UV-vis spectro.)、霍式轉換紅外線光譜儀(FT-IR)、熱重分析儀(TGA)、四點探針、電子顯微鏡(SEM)與循環伏安法等，分析其結構與性質，以及未來的應用方向。

本論文的内容分述如下：

第一章 緒論

第二章 實驗設備、分析方法與流程簡介

第三章 以SBA-15為載體之HRP固定化製備與分析

第四章 以SBA-15負載HRP之聚苯胺酵素聚合

第五章 結論與建議

第二章 實驗設備、分析方法與流程簡介

2.1 實驗儀器

本研究中所使用的儀器設備簡介如下表 2-1 所示：

表 2-1 本研究中所使用的儀器設備一欄表

儀器名稱	製造商名稱	型號
Electrochemical Analyzer (電化學分析儀)	CH Instruments (Austin, U.S.A)	CHI621B
FESEM (場發式掃描電子顯微鏡)	JEOL (Tokyo, Japan)	JSM-7000F
Thermogravimetric Analyer (TGA) 熱中分析儀	(Delaware, U.S.A)	Q50
Fourier-Transform Infrared Spectrometer (FTIR) (霍氏轉換紅外光譜儀)	Bomem (Canada)	DA8.3
Hotplate Stirrer (磁石攪拌加熱器)	LabTECH (Beijing, China)	LMS-1003
Micro-Electronic Balance (微量電子天秤)	OHAUS (New Jersey, U.S.A)	AR1530
Micro-Pipette (微量移液吸取器)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/100/20/2.5
Oven (烘箱)	DENG YNG (Taipei, Taiwan)	DOV30

pH meter (酸鹼度計)	Suntex (Taipei, Taiwan)	SP-701
refrigerator(4°C & -20) (一般冰箱)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222
TEM (穿透式電子顯微鏡)	JEOL (Tokyo, Japan)	JEM-2010
Ultrapure Water system (超純水機)	Barnstead (Dubuque,Iowa, U.S.A)	NANO pure Dlamond™
UV/visible Spectrophotometer (紫外線及可見光光譜儀)	Spectronic instruments (New York, U.S.A)	Genesys2
Vortex-Mixer (試管震盪器)	Scientific Industries (New York, U.S.A)	VORTEX-2 GENIE
Thermostat Bath (恆溫水浴槽)	FIRSTEK (Taipei, Taiwan)	B206

2.2 實驗藥品

本研究中所使用的實驗藥品相關資訊如下表 2-2：

表 2-2 本研究使用實驗藥品一欄表

藥品名稱	廠商	產品編號	藥品等級
ABTS Kit	PIERCE	37615	
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad		
Paraffin oil	Fluka	76235	
Ammonia solution	SHOWA	0128-3150	28% ~ 30%
Aniline	MERCK	1.01261	99.5%
Citric acid	SIGMA	C0759	Reagent Grade
Dipotassium hydrogen phosphate	SHOWA	1645-8150	99.0%
Disodium hydrogen phosphate	KANTO	37243-00	99.0%
Horseradishperoxidase (HRP)	SIGMA	P8250	181 units/mg
Hydrogen chloride	MERCK	1.00317	30% ~ 37%
Hydrogen peroxide	MERCK	1.08600	35% ~ 36.5%
N-methyl pyrrolidinone (NMP)	SIGMA	M6762	
Potassium dihydrogen phosphate	KANTO	32379-00	99.0%
Tetraethoxysilicate	Aldrich	S46886-158	98.0%

(TEOS)

1,3,5-Trimethylbenzene

Aldrich

S29028

98.0%

(TMB)

poly(ethylene oxide)-block

poly(propylene

Aldrich

435465-250

oxide)-block-

poly(ethylene oxide)

2.3 實驗流程

將所製備的 SBA-15 進行酵素固定化，並分析在 SBA-15 上的酵素量，以及在不同 NMP 濃度下，酵素的活性變化(第三章)。接著將所製好的 SBA-15(HRP) 進行催化聚合聚苯胺反應，於聚合反應中藉由摻雜劑的添加以提升聚苯胺的導電性(第四章)。整體實驗架構如圖 2-1 所示

本研究中將利用紫外光可見光光譜儀觀察 HRP 酵素的活性與蛋白質定量以及聚苯胺特徵波峰；利用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察所製備的 SBA-15/PANI 外觀型態；利用穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察 SBA-15 的孔洞結構；利用熱重量分析儀(TGA)與傅立葉紅外線光譜(FTIR)分析 SBA-15 與 SBA-15/PANI 高分子組成；利用氮氣等溫吸/脫附儀(BET)分析 SBA-15 的孔洞結構。

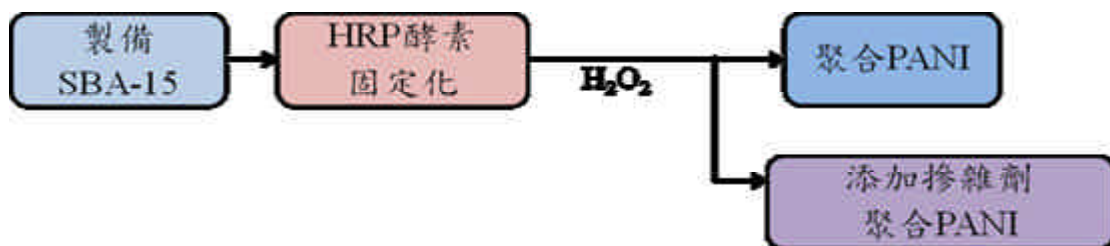


圖 2-1 實驗架構

第三章 以 SBA-15 為載體之 HRP 固定化製備與分析

3.1 實驗目的

中孔洞材料具有高表面積與孔體積等優點，根據許多研究結果顯示，將酵素固定在中孔洞材料中有助於酵素活性的穩定。SBA-15 的等電點(pI)為 4.0(Essa et al. 2007)，HRP 的等電點為 7.2(Yang and Mu 1997)，當兩者置於 pH4.0 - 7.2 之間的緩衝溶液中，會因為本身的帶電性相異而產生吸引力，使得 HRP 吸附在在 SBA-15 上，SBA-15 的表面化學結構具有 OH 基如圖 3-1 所示。因此本章節使用中孔洞材料 SBA-15 作為固定酵素 HRP 的載體，藉由酵素活性測定與蛋白質定量分析，分析固定在 SBA-15 上 HRP 的負載量，再以 BET 及紫外光可見光分光光度計分析 HRP 的吸附情況與在 NMP 中 HRP 活性的穩定性。SBA-15 的來源取自於實驗室學長郭華良自製，因此本章節不討論 SBA-15 的製備條件。

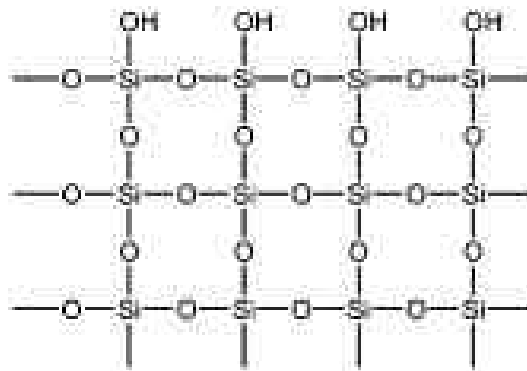


圖 3-1 SBA-15 表面化學結構(Hudson et al. 2005)

3.2 實驗方法與程序

3.2.1 溶液配製

實驗中所有溶液皆使用去離子水配置，經純化後電阻係數為 18.0 MΩ·cm。

A. 檸檬酸磷酸鹽緩衝溶液

1. 取 19.212 g 檸檬酸($C_6H_8O_7$)溶於 1 L 去離子水中，取 28.392 g 磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)溶於，配成 0.1 M 的檸檬酸與 0.5 M 的磷酸氫二鈉之標準儲備溶液。
2. 分別取不同體積之檸檬酸與磷酸氫二鈉標準液配製成所需之不同 pH 值檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液，如表 3-1 所示。

表 3-1 配製不同 pH 值之檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液所需的體積

pH	Volume of 0.1 M $C_6H_8O_7$	Volume of 0.5 M Na_2HPO_4
3.0	79.45	20.55
4.0	61.45	38.55
4.3	59.16	40.84
5.0	48.50	51.50
6.0	36.85	63.15
7.0	17.65	82.35
8.0	2.75	97.25

B. HRP 酵素溶液

1. 取 22 ul 分裝保存之 HRP 酵素溶液(111.6 mg/ml)，HRP 粉末溶於的 pH6.0 的磷酸緩衝溶液中)於冰浴中解凍。

- 待退冰後取 20 ul HRP 酵素原溶液加入與先配置好 980 ul 的 0.1 M pH 4.0 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液中，配成 2.232 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的酵素溶液。

3.2.2 蛋白質定量分析

A. 分析原理

本論文使用 Bio-Rad Protein Assay 試劑，進行蛋白質定量分析。其原理為試劑中的 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑在溶液中呈現紅棕色，與測定樣品中的蛋白質結合後則會變成藍色，藉由紫外光可見光分光光度計量測 595 nm 下之吸光值，可將蛋白質濃度與吸光值之關係作線性標準曲線圖，進行蛋白質定量分析。

B. 實驗步驟

- 取 22 ul 分裝保存之 HRP 酵素原溶液於冰浴中解凍，加入磷酸鹽緩衝溶液中分別配置 390.6、334.8、279.0、223.2、167.4、111.6、55.8 與 22.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等八種不同濃度之酵素溶液。
- 分別取 100 ul 的上述溶液與 700 ul 的磷酸鹽緩衝溶液於 1.5 ml 的 microtubes 中。
- 於每個 microtubes 中加入 200 ul 的 Bio-Rad Protein Assay，使其混合均勻並在 25 °C 下靜置 5 分鐘。
- 將上述溶液放入比色槽(cuvette)中，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長

595 nm 下之吸光值。

5. 將不同酵素濃度下所測得的吸光值對酵素濃度作圖，建立蛋白質濃度與吸光值線性關係曲線。

C. 分析步驟

1. 取適量的蛋白質溶液，使用磷酸鹽緩衝溶液稀釋到 800 ul，加入 microtubes 中。
2. 於 microtubes 中加入 200 ul 的 Bio-Rad Protein Assay，使其混合均勻並在 25 下靜置 5 分鐘。
3. 將上述溶液放入比色槽中，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 595 nm 下之吸光值。

3.2.3 HRP 酵素活性分析

A. 分析原理

於過氧化氫環境中，HRP 與 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)進行反應，將 ABTS 催化成自由基陽離子型態($ABTS^+$)，溶液也由暗紅色轉變為藍綠色，於 410 nm 與 750 nm 波長下有吸收波峰出現。實驗中，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 410 nm 之吸光值(Kadnikova and Kostic 2002)。

B. 實驗步驟

1. 取 22 ul 分裝保存之 HRP 酵素原溶液於冰浴中解凍，加入磷酸鹽緩衝溶液中

分別配置 1.116、0.893、0.67、0.446 與 0.223 $\mu\text{g/ml}$ 等五種不同濃度之酵素溶液。

2. 分別取 100 μl 的上述溶液與 825 μl 的磷酸鹽緩衝溶液於 1.5 ml 的 microtubes 中。
3. 於每個 microtubes 中加入 75 μl 的 ABTS，使其混合均勻並在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 5 分鐘。
4. 將上述溶液放入比色槽(cuvette)中，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 410 nm 下之吸光值。
5. 將不同酵素濃度下所測得的吸光值對酵素濃度作圖，建立酵素活性與吸光值線性關係曲線。

C. 分析步驟

1. 取適量的酵素溶液，使用磷酸鹽緩衝溶液稀釋到 925 μl ，加入 microtubes 中。
2. 於 microtubes 中加入 75 μl 的 Bio-Rad Protein Assay，使其混合均勻並在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 5 分鐘。
3. 將上述溶液放入比色槽中，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 410 nm 下之吸光值。

3.2.4 SBA-15 之合成

1. 取 2 g P123 與 1.49 g KCl 加入 60 ml 的 2 M HCl, 在 35 °C 下攪拌至完全溶解
2. 將上述溶液加入 1.5 g (1.77 ml) TMB, 在 35 °C 下攪拌 2 hr。
3. 將上述溶液緩慢滴入 4.25 g (4.65 ml) TEOS, 在 35 °C 下磁石劇烈攪拌 10 min 後, 移至 35 °C 恆溫水槽, 靜置 24 hr。
4. 將上述溶液移至 100 °C 烘箱, 進行水熱反應 24 hr。
5. 待水熱反應結束, 取出溶液於室溫下冷卻, 再以抽氣過濾方式, 使用大量去離子水清洗, 收集濾餅在 60 °C 下進行冷凍乾燥。
6. 將乾燥的濾餅, 在 500 °C 下進行鍛燒。鍛燒升溫速率為 1 °C/min, 升至 500 °C 後, 持溫 6 hr, 降溫速率為 2 °C/min。
7. 鍛燒完的粉末即為球型 SBA-15, 以瑪瑙硯研磨後收集作為實驗中的藥品。

3.2.5 HRP 固定於 SBA-15 之製備

1. 取 0.15 g SBA-15 粉末加入 5 ml 的 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液, 超音波震盪 1 hr。
2. 待震盪完, 放入旋轉离心机離心(5432.1 G; 5 min; 27 °C)。
3. 待離心完, 抽取掉 2 ml 上清液, 維持粉末與溶液比 0.05 g SBA-15; 1 ml 的 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液。

4. 將上述溶液加入 600 μl 的 2.232 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HRP，混合均勻。
5. 以旋轉離心機離心(5432.1 G；1 min；27 $^{\circ}\text{C}$)後，再使其混合均勻。
6. 重複十次步驟 5。以離心分散的方式，加快 SBA-15 內外 HRP 濃度平衡。
7. 待離心分散完，以旋轉離心機離心(5432.1 G；15 min；27 $^{\circ}\text{C}$)，抽取掉上清液後，加入 0.1 M 檸檬酸 Buffer 直到體積為 3 ml。
8. 重複五次步驟 7，將收集的上清液進行蛋白量分析與活性分析。
9. 待清洗完，加入 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液，使總體積為 3ml。
10. 此即為包覆 HRP 的球型 SBA-15。0.05 g/ml SBA-15(446.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HRP)。單位重量的 SBA-15 對於 HRP 的負載量為 8.928 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

3.3 實驗結果與討論

3.3.1 SBA-15 為載體固定 HRP 酵素探討

3.3.1.1 紫外光可見光分光光度計分析

藉由酵素活性與蛋白質定量兩種分析方式，了解酵素固定於 SBA-15 上的負載量，本實驗所使用的固定化方式為含浸法(Impregnation method)，步驟如 3.2.5 小節所示。吸附溶液的 pH 值在選擇上必須同時考慮到 HRP 酵素的活性與其淨電荷的分布狀況，SBA-15 上官能基團的 pI 值為 4.0，而 HRP 的 pI 值為 7.2，當兩者置於 pH 4.0 ~ 7.2 之間的緩衝溶液中，會因為本身的帶電性相異而產生吸引力，如圖 3-2 所示。然而在比較酸的環境(pH = 5.6)下 HRP 的吸附有較高的負載量(Chen et al. 2009)，而在 pH 4.0 的檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液下 HRP 酵素有較佳的催化能力(Chou and Gu 2008)。因此，在緩衝溶液 pH 值的挑選上，已接近 4.0 為主。

	pH 4.0		pH 7.2
SBA-15 的電性 (pK = 7.2)	+	+	-
HRP 酵素的電性 (pK = 4.0)	+	-	-

圖 3-2 HRP 酵素與 SBA-15 於不同溶液 pH 下帶電性示意圖

在 HRP 固定化的過程中，首先秤取 0.05 g 的 SBA-15 與 0.8 ml 的檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)混合均勻後，置入超音波震盪機震盪 1 hr，去除孔洞中的氣泡。使得 HRP 更容易進入到 SBA-15 的孔洞中。接著將分裝保存的 4 μ l 酵素原溶液(111.6 μ g/ μ l)取出退冰，以 0.1 M 的檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)稀釋 50 倍，配成 2.232 μ g/ μ l 的 HRP。取 200 μ l 的 HRP 稀釋液(共 446.4 μ g)加入 SBA-15 溶液中，使用 Voltex 輕微震盪混合均勻，隨後以旋轉離心機離心(5432.1 G; 1 min; 4 $^{\circ}$)，重複此震盪混合、離心步驟 10 次，以促使 HRP 在 SBA-15 離心沉降的過程中，進入 SBA-15 的孔洞中。最後以旋轉離心機離心(5432.1 G; 5 min; 4 $^{\circ}$)，並收集上層酵素溶液，取適量與 ABTS 和 Bio-Rad Protein Assay 試劑混合 5 分鐘後，使用紫外光可見光分光光度計分別量測波長 410 nm 與 595 nm 下之吸光值。

配合圖 3-3 酵素活性分析與圖 3-4 蛋白質定量分析之吸光值與濃度關係曲線，可以得知在固定化前 HRP 的濃度為 446.4 μ g/ml，固定化後經五次清洗離心後的上層酵素溶液。酵素活性分析得知，清洗後的上清液，酵素總和為 119.06 μ g，故吸附在 0.05 g SBA-15 上的酵素為 327.34 μ g，百分比為 73.33%，單位重量的 SBA-15 對於 HRP 酵素的負載量為 6.49 μ g/mg。而利用蛋白質定量分析得知，清洗後的上清液，酵素總和為 114.3 μ g，吸附在 0.05 g SBA-15 上的酵素為 332.1 μ g，百分比為 74.39%，單位重量的 SBA-15 對於酵素的負載量 6.46 μ g/mg，如表 3-2 所示。兩者相較，所測得上清液中 HRP 酵素量約有 1% 的誤差，

判斷可能為清洗的上清液中仍有些許的 SBA-15 殘留。在蛋白質定量時，SBA-15 會吸附溶液中的 Bio-Rad Protein Assay 試劑，可能導致所測得 HRP 酵素量略小於酵素活性分析所測得知酵素量。

表 3-2 比較兩種檢測方法檢測 HRP 於 SBA-15 中負載量

樣品	ABTS	Bio-Rad
SBA-15 含量 (g)	0.05	0.05
加入的酵素總量 (μg)	446.4	446.4
第一次清洗液(μg)	38.89	40.99
第二次清洗液(μg)	29.94	21.08
第三次清洗液(μg)	23.12	21.06
第四次清洗液(μg)	16.67	17.60
第五次清洗液(μg)	10.44	13.57
清洗後所殘存的酵素量(μg)	327.4	332.1
清洗後所殘存的酵素量(%) \pm %	73.33	74.40
單位重量 SBA-15 對於酵素的負載量($\mu\text{g}/\text{mg}$)	6.49	6.46

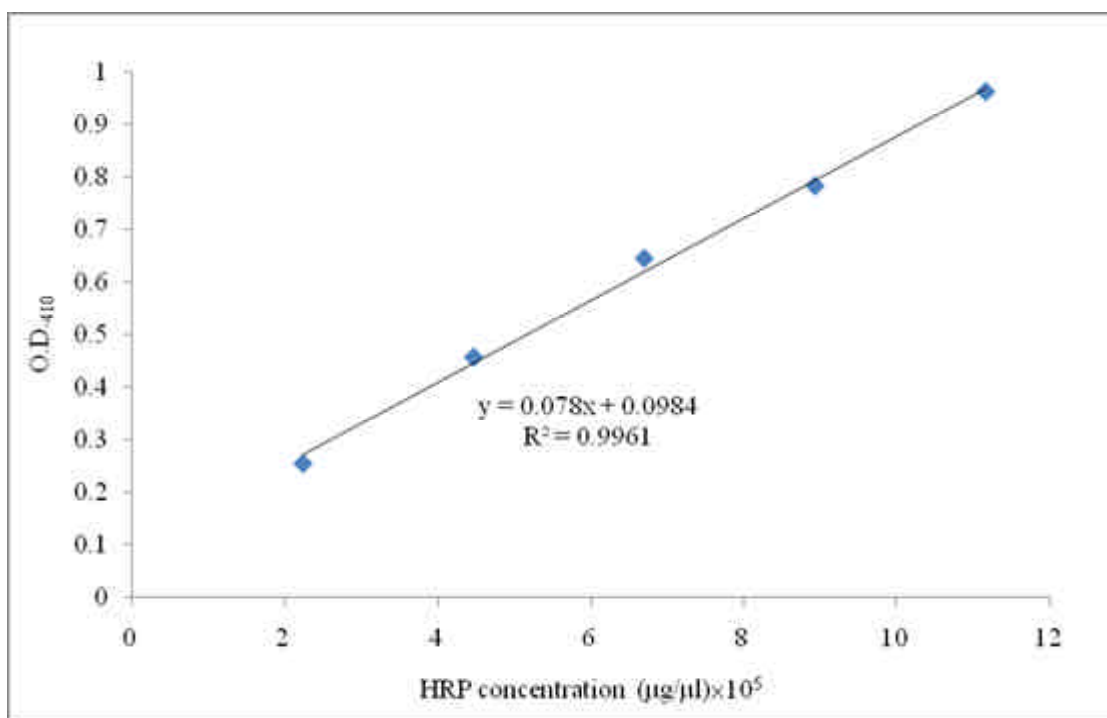


圖 3-3 ABTS 檢測 HRP 活性分析之濃度檢量曲線圖表

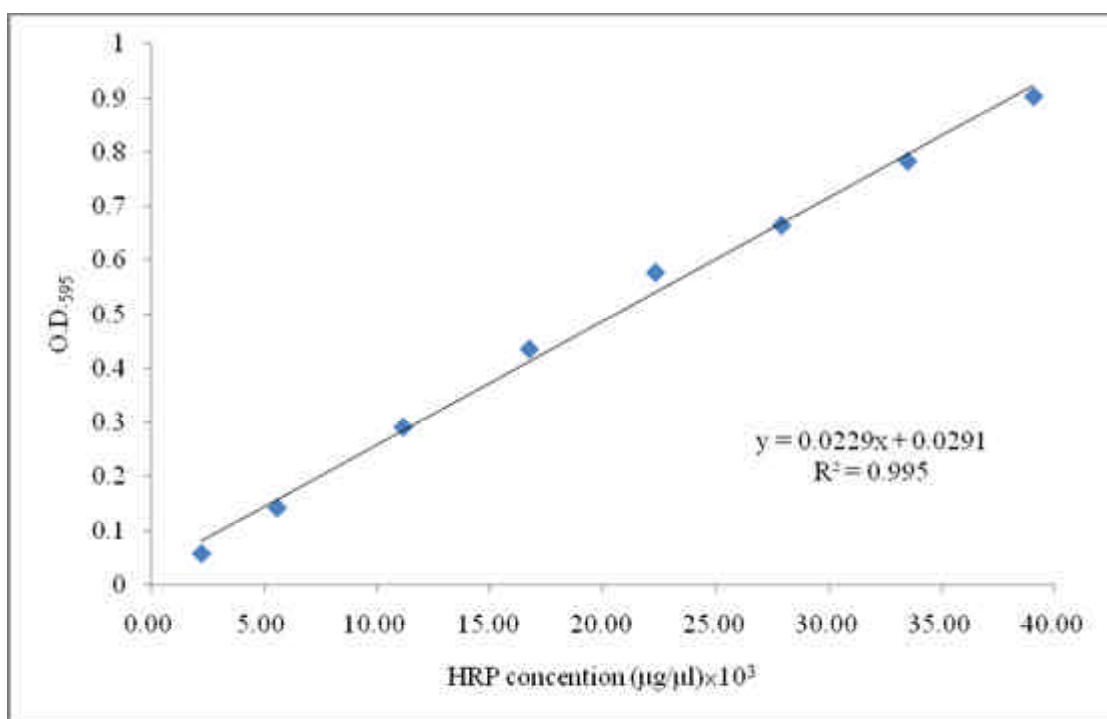


圖 3-4 蛋白質定量分析之濃度檢量曲線

3.3.1.2 TEM 與 SEM 分析

將 HRP 固定化前後的 SBA-15 樣品分別使用 TEM 及 SEM 觀察孔徑變化與表面型態。圖 3-5 的 A 與 B，分別為 SBA-15 之 TEM 圖與 SEM 圖。由 A 觀察到，孔洞結構呈現圓孔洞狀，孔道為不規則狀，孔洞大小約為 18 nm。由 B 可以觀察到，外觀呈現球體型態，球體大小約 4 μm 。

圖 3-6 的 A 與 B，分別為 SBA-15 與 SBA-15(HRP)放大的 SEM 圖，由表面觀察比較得知，負載 HRP 的 SBA-15 表面較為粗糙。

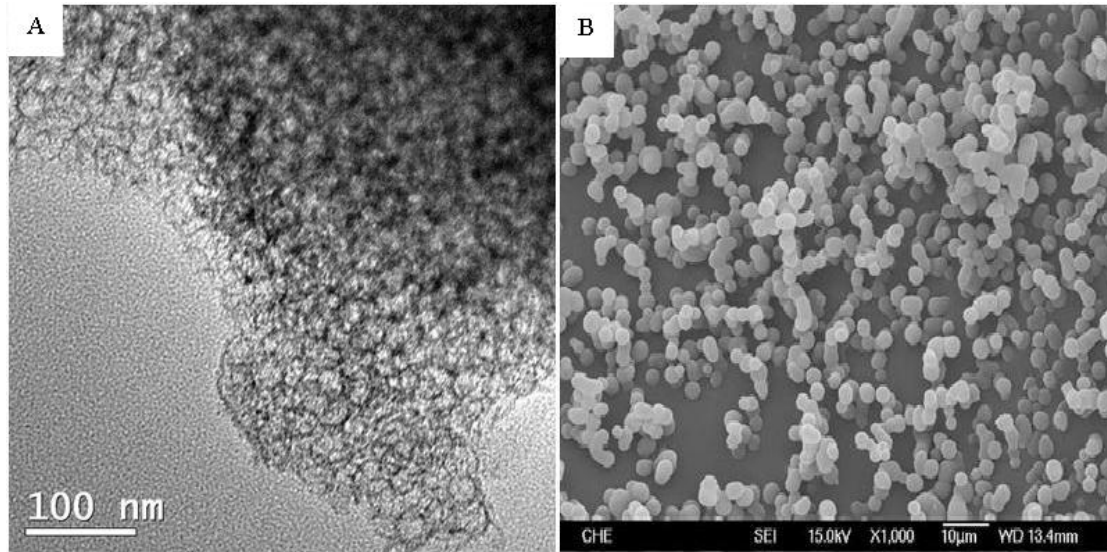


圖 3-5 SBA-15 表面之 TEM 圖與 SEM 圖(1000 倍)

圖中 A 為 TEM 圖，B 為 SEM 圖。[P123] = 5.75 mM，[KCl] = 0.333 M，
[HCl] = 2 M，[TMB] = 0.2 M，[TEOS] = 0.31 M。

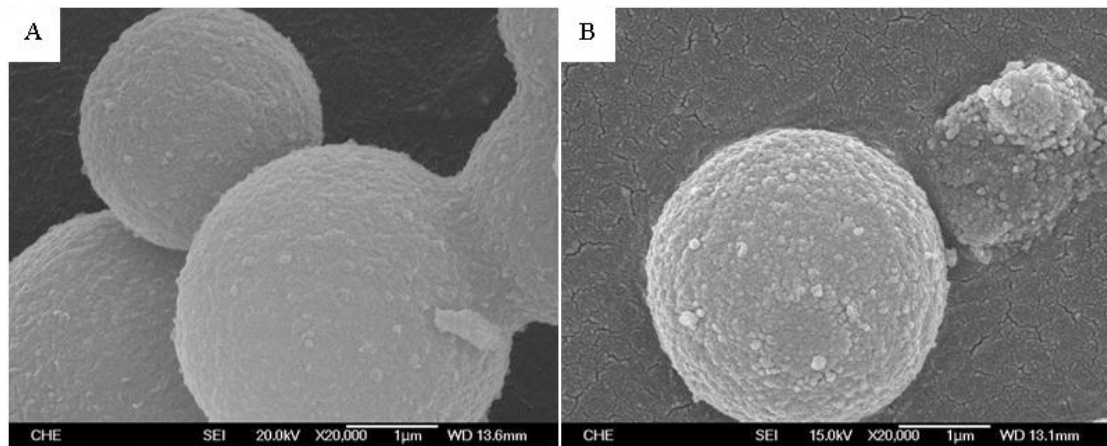


圖 3-6 SBA-15 表面之 SEM 圖(20000 倍)

圖中 A 為未固定 HRP 酵素之 SBA-15，B 為固定 HRP 酵素之 SBA-15
[P123] = 5.75 mM，[KCl] = 0.333 M，[HCl] = 2 M，[TMB] = 0.2 M，[TEOS] = 0.31
M，6.595 μ g HRP/mg SBA-15。

3.3.1.3 BET 分析

使用型號為 Micromeritics ASAP2020 之氮氣等溫吸/脫附儀，分析 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之孔洞性質。圖 3-7 與圖 3-8 分別為 SBA-15 與 SBA-15(HRP)的氮氣等溫吸/脫附曲線(下方曲線為吸附曲線；上方曲線為脫附曲線)與孔徑分佈圖，分別將這兩種樣品的氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈整理於圖 3-7 與圖 3-8，將 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之孔洞性質分析結果整理在表 3-3。

對於中孔洞材料而言，氮氣的吸附隨著壓力的增大，孔道表面吸附的氮氣分子層會漸漸增加，直到某一壓力時開始有毛細冷凝現象，因此孔體積會被液態氮填滿，而我們則可從此數據獲得孔體積大小。由圖 3-9 中可以觀察到 SBA-15(HRP)的氮氣吸附量比 SBA-15 的氮氣吸附量小，表明 SBA-15(HRP)的孔洞上吸附 HRP，因此孔道體積與比表面積變小。由圖 3-10 的孔徑分佈圖發現，HRP 酵素固定化後，SBA-15(HRP)於孔洞大小為 15~18 nm 的孔洞體積較為減少，主要是因為 SBA-15(HRP)上負載 HRP，吸附在表面與孔道中，使單位重量下的孔洞體積減少，也因此使 SBA-15(HRP)的氮氣吸附量比 SBA-15 少。SBA-15 與 SBA-15(HRP)主要孔徑皆為 22 nm，但是在該孔徑的孔洞體積 SBA-15(HRP)卻略小於 SBA-15，推測此為部分 HRP 酵素聚集在 SBA-15 孔洞洞口所致。BET 分析中，SBA-15 的孔徑大小為 22 nm，與 SEM 觀察所得知孔徑大小 18 nm 相近。

表 3-3 SBA-15 酵素固定化前後對孔洞特性的影響

樣品	$A_{\text{BET}}(\text{m}^2/\text{g})$	$V_{\text{total}}(\text{cm}^3/\text{g})$	D(nm)
SBA-15	538.0	1.20	22.3
SBA-15(HRP)	350.5	0.96	22.2

A_{BET} : BET specific specific ; V_{total} : total pore volume ; D : pore diameter

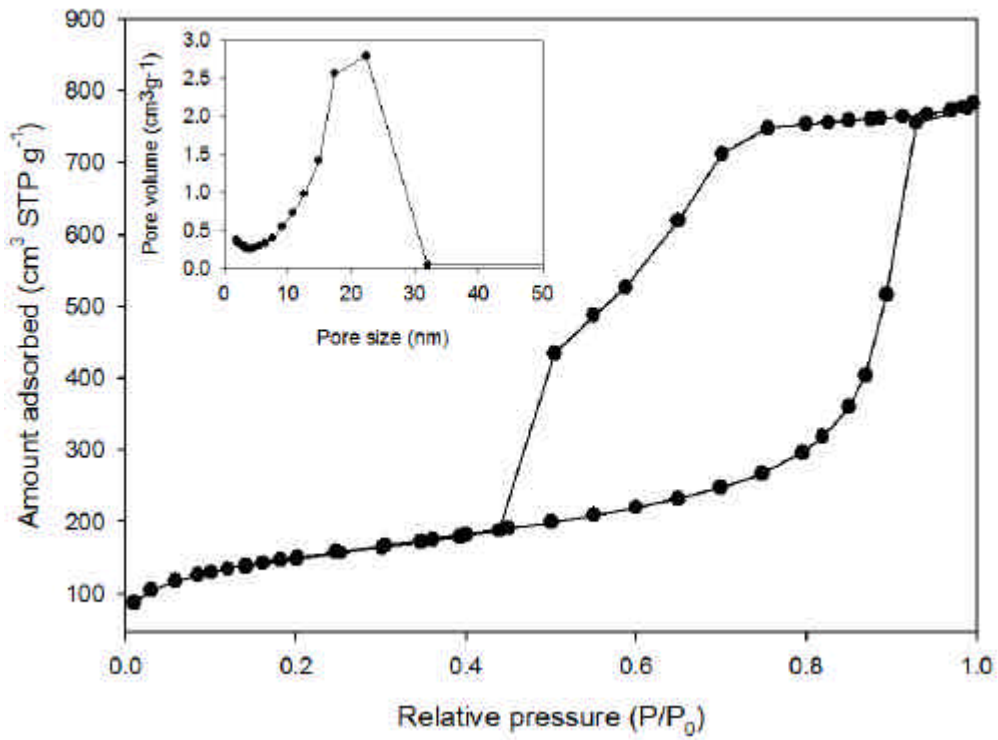


圖 3-7 SBA-15 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

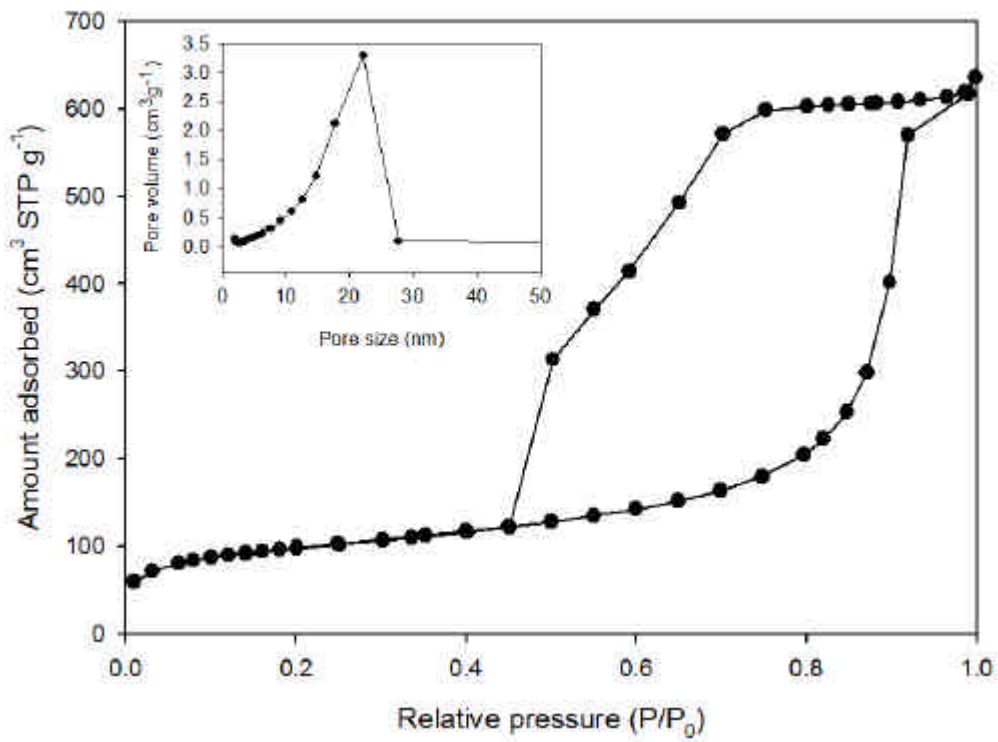


圖 3-8 SBA-15(HRP)之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

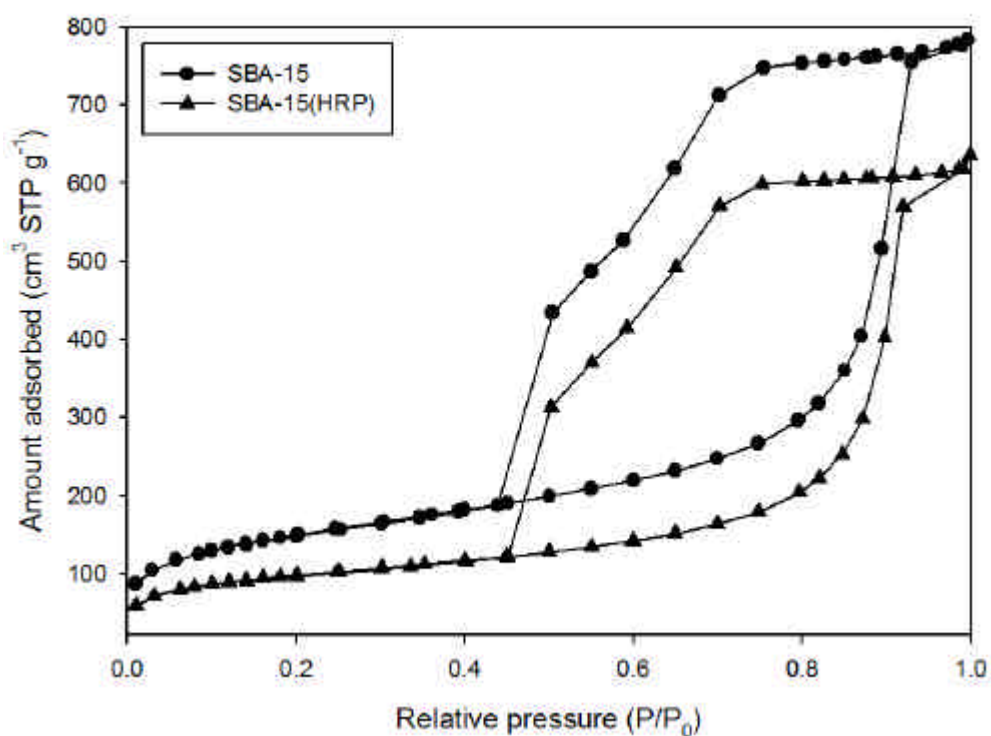


圖 3-9 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之氮氣等溫吸/脫附曲線比較圖

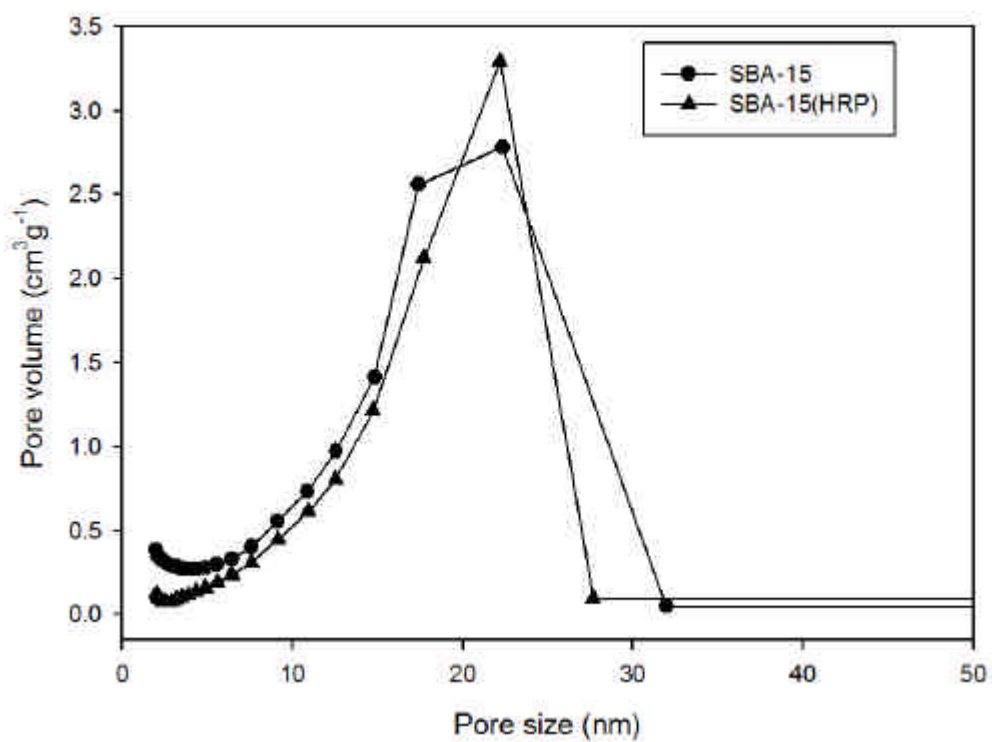


圖 3-10 SBA-15 與 SBA-15(HRP)之孔徑分佈比較圖

3.3.2 HRP 之活性探討

取 4 μl 的 111.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HRP 原溶液以檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液稀釋 10^5 倍，配成 1.116 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 的 HRP 稀釋液。取 100 μl HRP 稀釋液分別加入不同濃度的 DBSA 溶液中，混合均勻 30 s 後加入 75 μl ABTS 反應 5 min，接著使用紫外光可見光分光光度計分析波長 410 nm 的波值。圖 3-11 為 HRP 於不同 DBSA 濃度下的活性變化，一開始隨著 DBSA 濃度的增加，HRP 酵素的活性會隨之持續下降。尤其當 DBSA 的濃度由 0~0.3 mM 時，HRP 的活性下降了 86%。雖然 DBSA 的摻雜對於 PANI 導電性有提升的作用，但是過高的 DBSA 濃度卻會導致 HRP 活性下降。因此，DBSA 使用的最佳濃度必須經過測試而獲得。

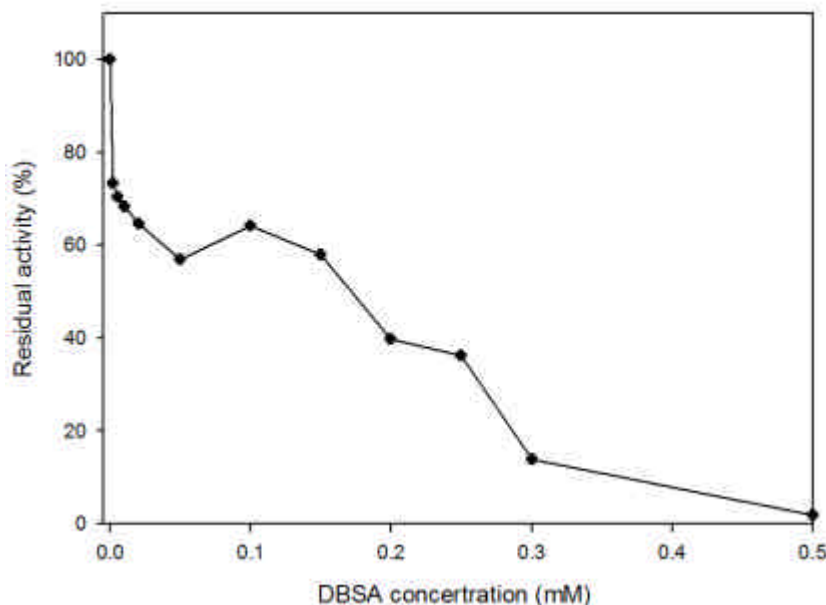


圖 3-11 HRP 於不同 DBSA 濃度下之活性變化圖

[DBSA] = 0, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 與 0.5 mM ,
[HRP] = 1.116×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{ml}$

3.3.2.1 於 NMP 中 HRP 之活性分析

取 4 μl 的 111.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HRP 原溶液與 1 ml 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP/ml), 分別以檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液稀釋 10^5 倍與 400 倍, 配成 1.116×10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 HRP 與 1.24×10^{-4} g/ml SBA-15(.824 μg HRP/ml) 稀釋液。分別取 100 μl HRP 稀釋液及 200 的 SBA-15(HRP)稀釋液, 分別加入不同濃度的 NMP, 混合均勻 30 s 後加入 75 μl ABTS 反應 5 min, 接著使用紫外光可見光分光光度計分析波長 410 nm 的波值。

NMP 能將聚合後 SBA-15 上面的 PANI 溶解, 使得 SBA-15(HRP)有潛在回收的可能, 重新作為苯胺聚合催化劑可能。觀察 HRP 與 SBA-15(HRP)於不同 NMP 濃度下的酵素活性變化, 由圖 3-12 得知, SBA-15(HRP)相對於 HRP, 活性的衰退有較為減緩的趨勢。所以 SBA-15(HRP)可以穩定 HRP 酵素的活性。

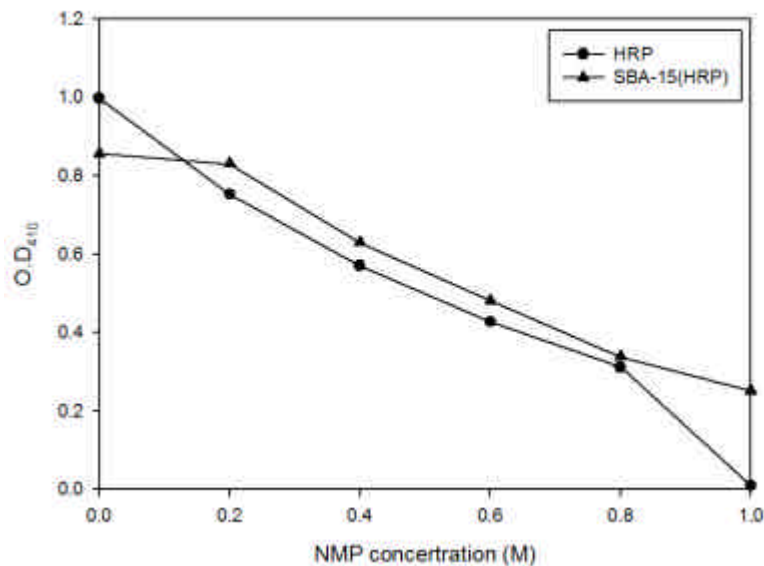


圖 3-12 HRP 與 SBA-15(HRP)於不同 NMP 濃度下之活性變化圖

[NMP] = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 與 1 M, [HRP] = 1.116×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 與 2.5×10^{-5} g/ml SBA-15(1.649×10^{-1} μg HRP/ml)

第四章 以 SBA-15 負載 HRP 之苯胺酵素聚合

4.1 實驗目的

將第三章所製備的 SBA-15(HRP)作為苯胺聚合反應的催化劑。一般利用未固定化的 HRP 酵素催化聚合出的聚苯胺，在熱穩定性與導電性的表現尚有待改善。而藉由 SBA-15(HRP)與過氧化氫催化後，帶有自由基的苯胺單體從孔洞內部開始產生，沿著孔道延伸到外部形成較常直鏈型態的聚苯胺。若再使用 DBSA 或 HCl 為摻雜劑，則可以得到穩定性與導電性均有改善的聚苯胺。另一方面本研究將探討聚合反應後的 SBA-15(HRP)能否重複使用的可行性，以減少 HRP 在 PANI 聚合時的消耗。

4.2 實驗方法與程序

4.2.1 溶液配製

實驗中所有溶液皆使用去離子水配置，經純化後電阻係數為 $18.0 \text{ M} \cdot \text{cm}$ 。

C. 苯胺單體溶液(0.1 M aniline)

1. 於 50 ml 的燒杯中加入 15 ml 去離水中並置於電子天平上，加入 11 M 的苯胺單體 1.2 g。
2. 將上述溶液加入檸檬酸溶液與去離子水使總體積為 40 ml，配成 0.32 M 的 pH4.3 苯胺單體溶液。

3. 將上述溶液倒入體積瓶中並用鋁箔紙包裹，並於磁石攪拌器上攪拌 20 分鐘。

4.2.2 以 SBA-15 負載 HRP 之聚苯胺製備

1. 取 13.5 ml 的 0.32M Aniline 與 30 ml 的 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝液(pH 4.0) 液加入 93.75 ml 去離子水，在 4 °C 下持續攪拌。
2. 將上述溶液加入 12 ml 的 0.05 g/ml SBA-15(446.4 μg HRP)，在 4 °C 下持續攪拌。
3. 將上述溶液緩慢加入 0.75 ml 的 1 M H₂O₂，在 4 °C 下持續攪拌，反應 24 hr。
4. 待反應完，以抽氣過濾方式，使用 50 %丙酮水溶液(去離子水：丙酮 = 1：1) 清洗，收集濾餅進行冷凍乾燥。
5. 待乾燥完，所得粉末即為摻合 SBA-15 的 PANI 粉末。

4.2.3 CPE 電極製備

1. 將直徑 0.3 cm 之聚乙烯(PE)管切成 1.0 cm 的長度。
2. 截取適當的長度之導線，剝去前端 0.5 cm 絕緣套並放入切好的 PE 管中，使用熱融膠接著並封住放入端，此即為碳糊電極容器，帶熱融膠冷卻後秤取碳糊電極容器重量。
3. 秤取 0.2 g 碳粉與 0.0656 g 石蠟油以 3：1 (w/w)的比例混合，並在瑪瑙砵上混合均勻後填入步驟 2 製成之碳糊電極容器內，待填至電極容器內部緊時後將電極表面磨至光滑，此即為 CPE 電極。

4. 秤取 CPE 電極重量求得容器內碳糊總重，並放入 4 冰箱中保存使用。

4.2.4 循環伏安法(Cyclic voltammetry ; CV)

本研究中使用碳糊電極來進行此方法，預備碳糊工作電極是將 0.16 g 石墨碳粉(graphite powder)和 0.04 g 聚合物粉末混合，用瑪瑙研鉢研磨混合均勻後，再加入石蠟油(paraffin oil)使之充分混合，再將粉末填充入事先製作好的 CPE 電極中，壓實後完成，再配合白金絲輔助電極與 Ag/AgCl 3 M NaCl 參考電極，設定好電位範圍進行掃描，掃描速率 20 V/s，裝置如圖 4-1 所示。藉由氧化還原峰的變化分析聚合物之導電性。

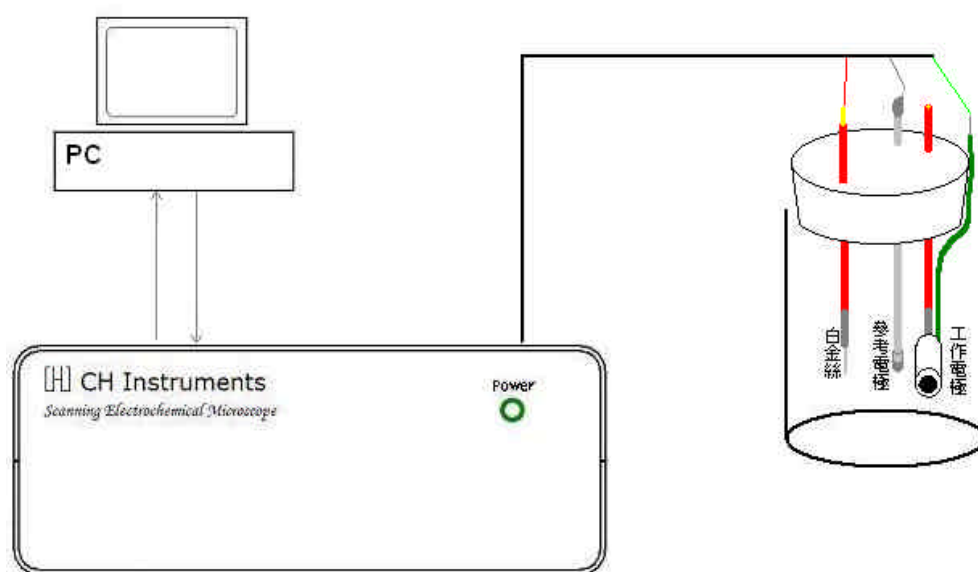


圖 4-1 電化學分析儀裝置圖(Tsun and Gu 2008)

4.3 實驗結果與討論

4.3.1 以 SBA-15 負載 HRP 之苯胺聚合條件探討

4.3.1.1 紫外光可見光分光光度計

酵素的多？結構會因為參與氧化反應而有所改變，因而其活性會有下降的趨勢。在 PANI 催化聚合中，過高的過氧化氫濃度對於 HRP 活性有明顯的影響，研究表明為了維持 HRP 的酵素活性，過氧化氫濃度的合適使用濃度範圍為 10 mM (Ruan and Gu 2009)。此小節將固定 SBA-15 與過氧化氫的濃度，分別設為 0.05 g/ml 與 5 mM，探討在不同的苯胺濃度與聚合反應時間下，藉由紫外光分光光度計觀察，聚苯胺位於 330 nm、420 nm 與 750 nm 的特徵波長變化。

具體的實驗步驟如下，取 0.25 g SBA-15 加入 4 ml 的 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)中，使用超音波震盪後，加入 1 ml 的 2.232 μ g/ml HRP 進行酵素固定化步驟，根據第三章的酵素活性與蛋白質定量分析，固定在 SBA-15 的 HRP 為 17 unit 佔總量的 70%。於反應瓶中加入 0.8 ml SBA-15(HRP)與不同的苯胺濃度，使得苯胺最終濃度分別為 0.005 M、0.001 M、0.03 M、0.05 M 與 0.1 M，緩慢滴入 5 μ l 的 1M 過氧化氫進行聚合反應，待反應結束取 200 μ l 樣品與 2.8 ml 去離子水混合均勻，放入比色槽中，使用紫外光可見光分光光度計觀察聚苯胺的特徵波峰。由圖 4-2 可得知，隨著苯胺濃度的增加吸收光譜的波值也增加，當苯胺濃度為 0.03 M 時，在波長 750 nm 有較高的吸收值出現。此為導電性聚苯

胺的特徵波峰，在之後的研究，苯胺的濃度將控制為 3 mM。

將 0.03 M AN 與 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)放入反應瓶中，接著加入 SBA-15(HRP)與 5 mM 過氧化氫在 4 ℃ 下攪拌進行聚合反應，分別在開始反應後 30 min、1 hr、4 hr、7 hr 與 24 hr 五個不同時間點，取 200 μ l 樣品與 2.8 ml 去離子水混合均勻，放入比色槽中，使用紫外光可見光分光光度計觀察聚苯胺的特徵波峰。由圖 4-3 可得知，隨著反應時間的增長，吸光譜的波形與波值並無明顯的變化，但在溶液外觀的顏色變化，隨著反應時間的增長，溶液顏色由紫色慢慢變成藍色接著再變褐棕色，直到接近反應時間 4 hr，溶液顏色將不再變化。因此在之後的研究，反應時間將控制為 4 hr。

為了了解酵素固定化的必要性，分開探討(a) 沒有添加 SBA-15；(b)添加負載酵素的 SBA-15(HRP)；(c) 未負載酵素的 SBA-15，三種不同條件酵素催化聚合聚苯胺。使用紫外光吸收光譜儀分析吸收波的波形變化。由圖 4-4 得知，條件(a)和(c)所得之 PANI，波長集中在 300~400 nm 之間。條件(b)所得之 PANI 於波長 750 nm 有較明顯的波峰形成。使用 SBA-15(HRP)催化聚合聚苯胺，希望苯胺可以由 SBA-15 孔道內部，經催化後由內往外聚合，形成較長鏈之聚苯胺。藉由吸收光譜的比較，SBA-15(HRP)催化所得之聚苯胺，有明顯的導電性聚苯胺的特徵波長峰值。

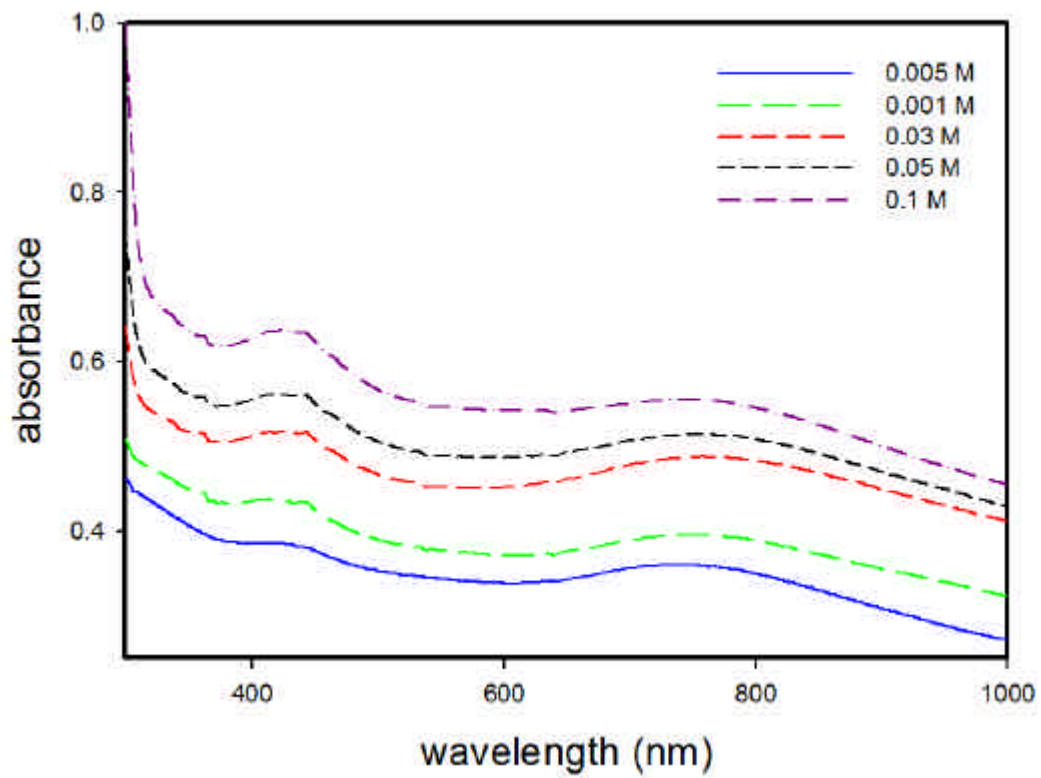


圖 4-2 不同苯胺濃度之聚合吸收光譜圖

[AN] = 0.005、0.001、0.03、0.05 與 0.1 M。總體積 1 ml, $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$,
80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15 (329.75 μg HRP /ml), 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶
液 (pH 4.0)。

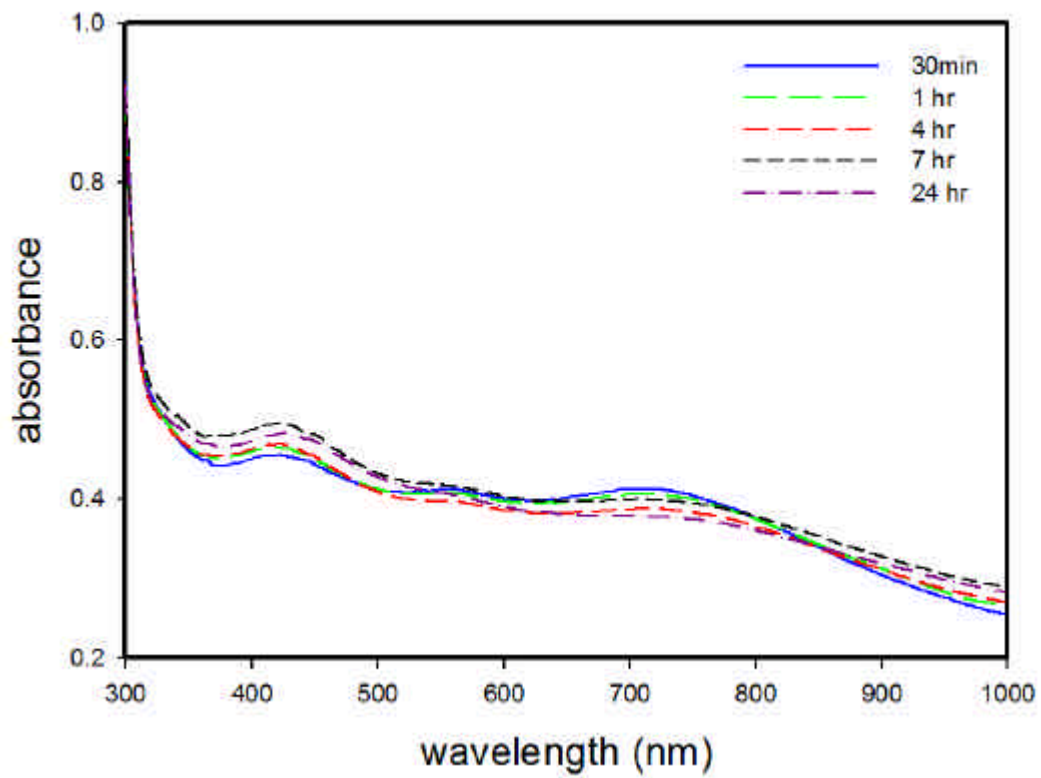


圖 4-3 不同聚合反應時間之吸收光譜圖

總體積 1 ml , [AN] = 0.03 M , [H₂O₂] = 5 mM , 80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP/ml) , 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

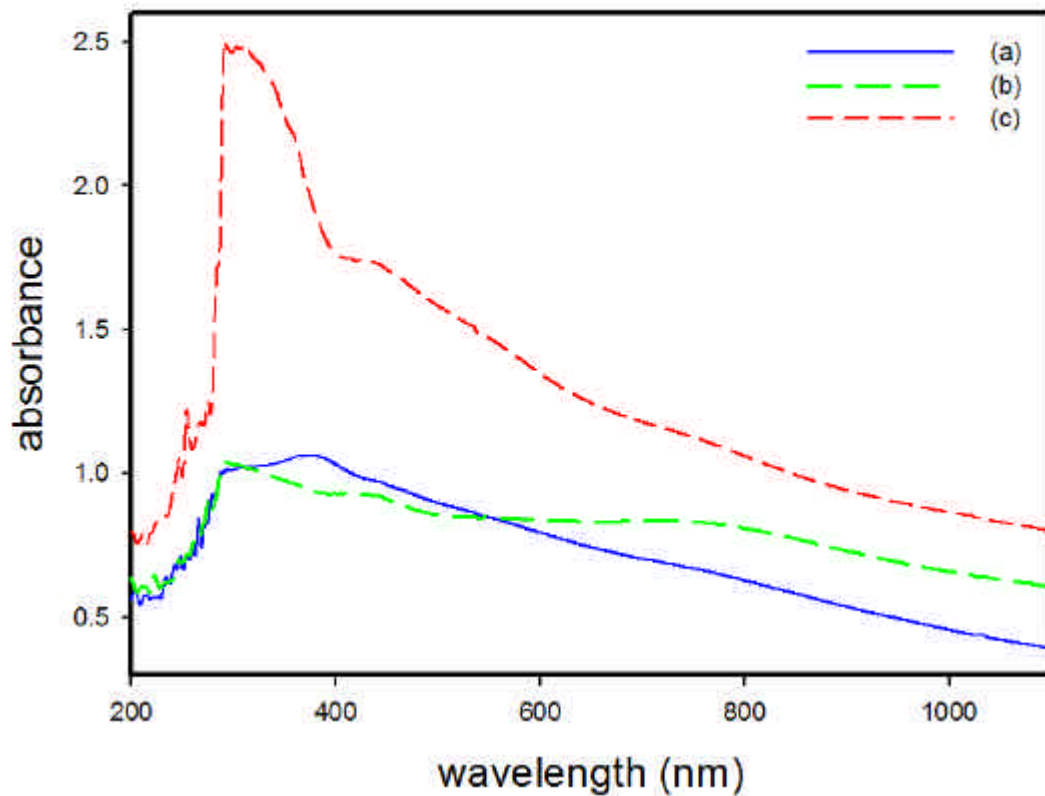


圖 4-4 不同酵素催化聚合 PANI 條件之吸光譜比較圖

圖中分別為：(a) 沒有 SBA-15；(b) 固定化酵素的 SBA-15(HRP)；(c) 未固定酵素的 SBA-15 之三種不同酵素。263.8 μ g HRP；0.04 g SBA-15(263.8 μ g HRP)；0.04 g SBA-15+263.8 μ g HRP。總體積 10 ml，[AN] = 0.03 M，[H₂O₂] = 5 mM，0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

4.3.2 HCl 與 DBSA 摻雜劑之探討

聚苯胺藉由摻雜的處理，能夠提升其導電性，本小節將藉由摻雜劑 HCl 與 DBSA 的添加，探討在不同的摻雜劑濃度與摻雜時間下，藉由紫外光分光光度計觀察，聚苯胺特徵波長的變化。

於反應瓶中加入不同濃度的 HCl 進行苯胺聚合反應。由圖 4-5 與圖 4-6 可得知，在圖 4-5 中當 HCl 濃度由 0 mM 增加到 20 mM，於波長 750 nm 的波值有增加的趨勢，並在濃度 20 mM 有最高的波值。在圖 4-6 中持續增加 HCl 的濃度到 0.2 M，吸光譜的波值有明顯下降的趨勢，判斷是於反應中摻雜的 HCl 濃度過高，導致大部分的 HRP 在催化聚合聚苯胺時有失活。由圖 4-7 與圖 4-8 可以觀察出添加不同 HCl 濃度的聚苯胺溶液顏色變化，當 HCl 濃度為 0.1 M 與 0.2 M 時，反應產物經離心後，觀察其沉澱物，發現相較於其他 HCl 濃度，其沉澱收集的聚苯胺量明顯較少。雖然過高的 HCl 濃度會導致酵素失活，也使聚苯胺的產量減少，然而選擇 HCl 濃度為 20 mM 時，吸光譜於波長 750 nm 有較大的波值。因此 HCl 摻雜劑的濃度將控制為 20 mM。

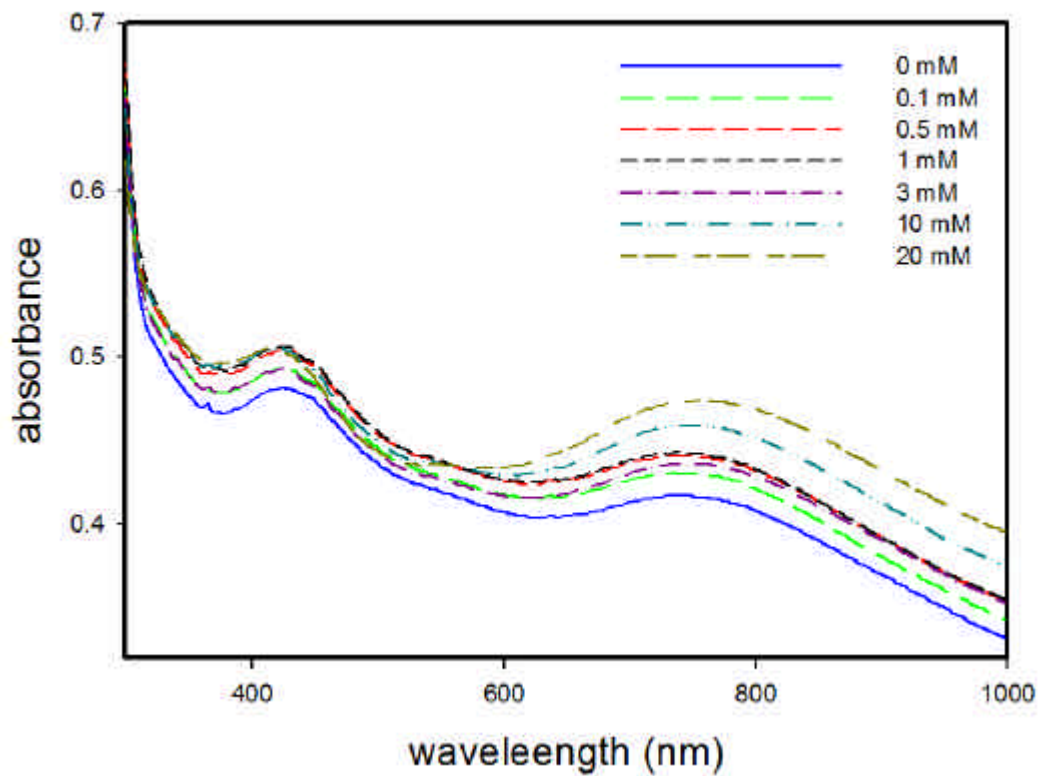


圖 4-5 不同 HCl 濃度之聚苯胺吸收光譜圖

[HCl] = 0、0.1、0.5、1、3、10 與 20 mM。總體積 1 ml，[AN] = 0.03 M，[H₂O₂] = 5 mM，80 μ l 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μ g HRP/ml)，0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

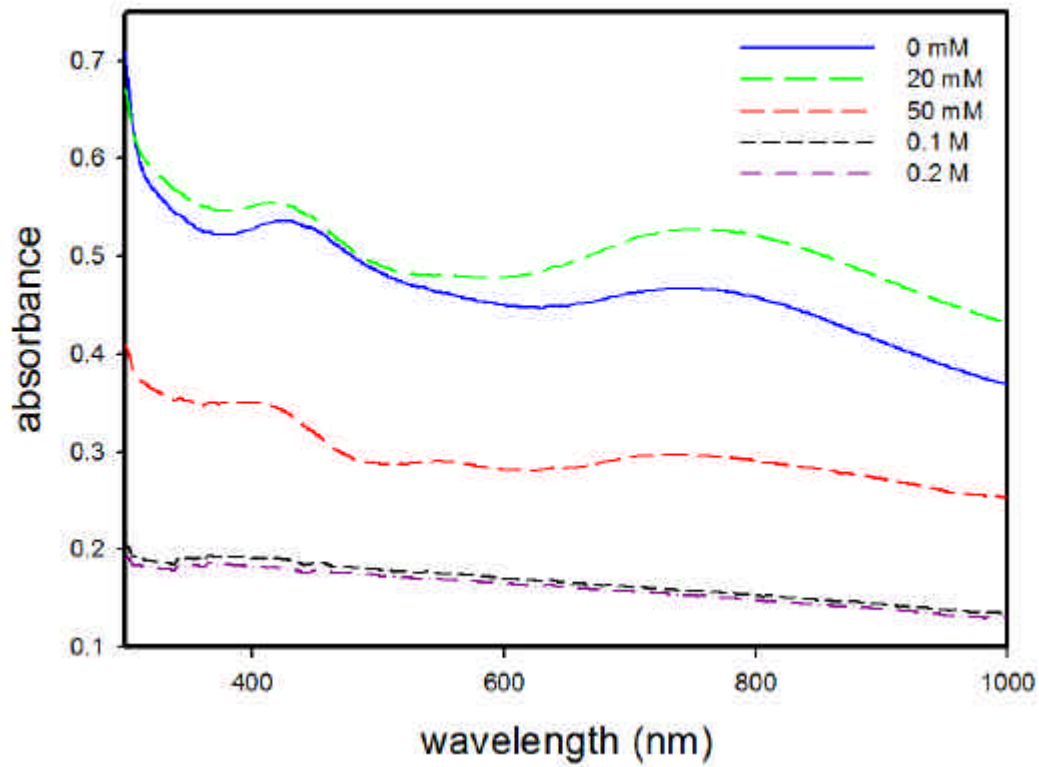


圖 4-6 不同 HCl 濃度之聚苯胺吸收光譜圖

[HCl] = 0 mM、20 mM、50 mM、0.1 M 與 0.2 M。總體積 10 ml, [AN] = 0.03 M, [H₂O₂] = 5 mM, 80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP/ml), 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

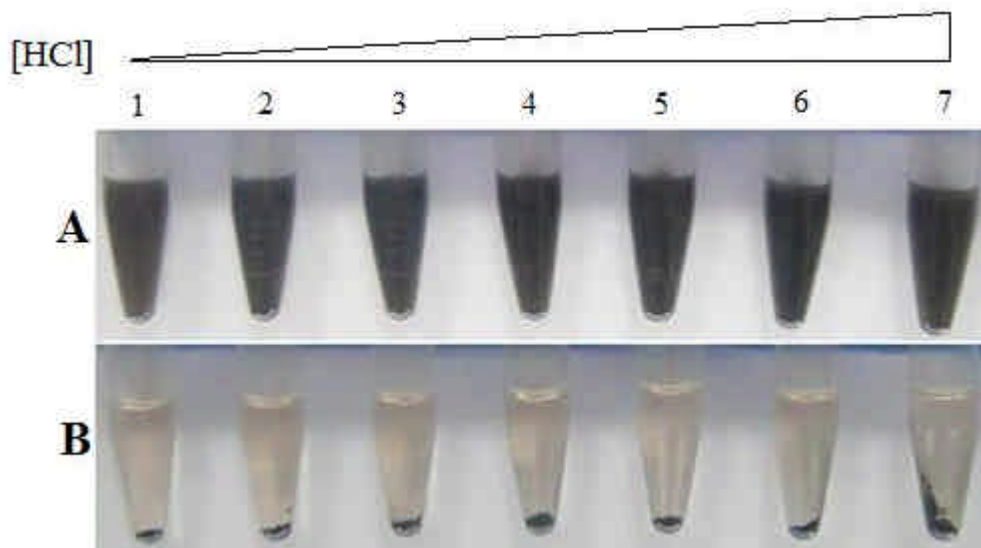


圖 4-7 不同 HCl 濃度之聚苯胺溶液圖

B 為 A 離心後的圖，由 1 到 7 分別為 0、0.1、0.5、1、3、10 與 20 mM 的 HCl。

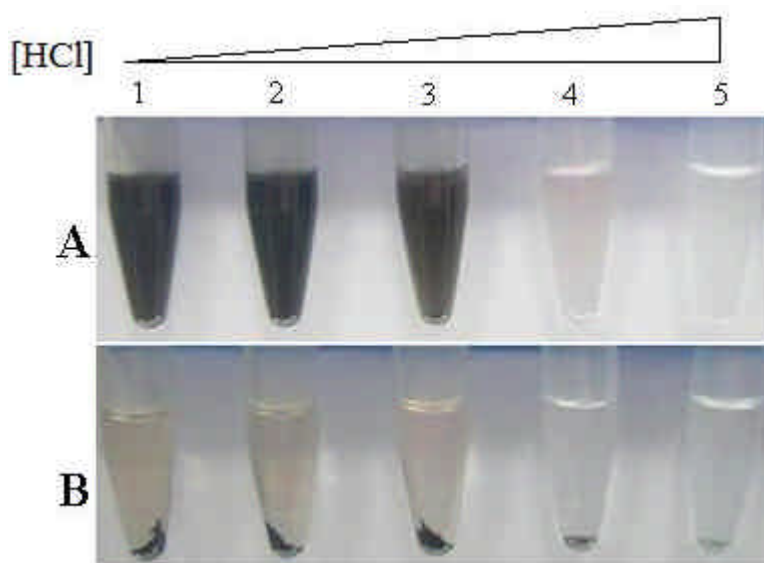


圖 4-8 不同 HCl 濃度之聚苯胺溶液圖

A 為 B 離心後的圖，由 1 到 5 分別為 20 mM、50 mM、0.1 M 與 0.2 M 的 HCl。

於反應瓶中加入不同濃度的 DBSA 進行苯胺聚合反應。由圖 4-9 可得知，當 DBSA 濃度由 0 mM 增加到 0.05 mM，在波長 750 nm 的波值有增加的趨勢。當 DBSA 濃度為 0.5 mM 時，吸光譜的波形產生變化，於波長 420 nm 的波值增加，這是由於自由基陽離子所造成，此外於波長 600 nm 之後的波形持續上升，並在濃度 3 mM 有最高值。而持續增加 DBSA 的濃度到 10 mM 時，吸光譜的波值明顯下降，判斷是 DBSA 濃度過高，導致大部分的 HRP 在催化聚合聚苯胺時而有失活。由圖 4-10 可以觀察出添加不同 DBSA 濃度的聚苯胺溶液顏色變化，濃度 0~0.05 mM 的溶液呈現紅棕色，離心後，上清液為透明無色，此為未摻雜或是摻雜效果很低之聚苯胺溶液。而濃度為 0.5~3 mM 時，溶液轉變為綠色，離心後，濃度 0.5 mM 的上清液為透明無色，濃度 1 mM 與 3 mM 的上清液呈現綠色。沉澱的產物為綠色應該是 DBSA 摻雜所造成，此外也增加聚苯胺的可溶性。濃度 10 mM 的溶液呈現淡綠色，且聚合的產物很少。由吸光譜與溶液顏色外觀判斷，DBSA 濃度為 3 mM 有較好的摻雜效果。

改變 DBSA 的添加時機，將酵素催化聚苯胺的溶液反應 24 hr 後，再添加不同濃度的 DBSA，混合均勻於 4 下持續攪拌反應 24 hr。由圖 4-11 可得知，隨著 DBSA 濃度增加，於波長 750 nm 的波值並沒有產生變化。於酵素催化聚苯胺反應 24 hr 後，再添加 DBSA 的摻雜效果並不顯著。

當 DBSA 摻雜的濃度為 3 mM，以及添加於催化聚合反應的同時，其摻雜效果似乎較佳。

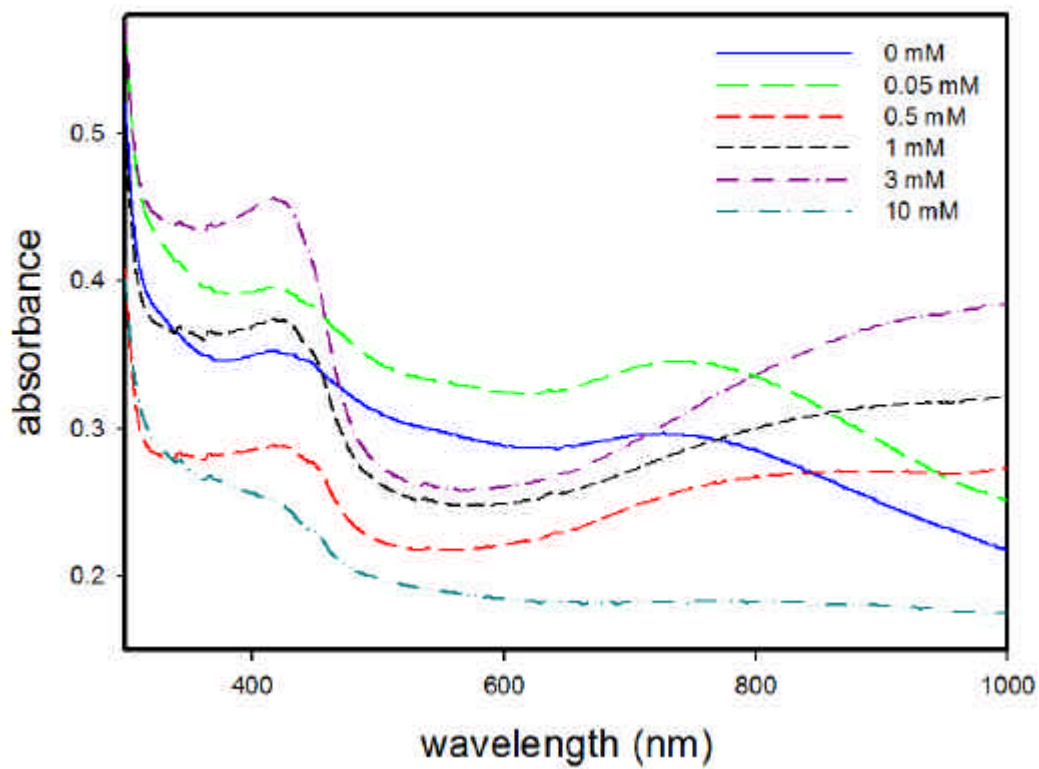


圖 4-9 不同 DBSA 濃度之聚苯胺吸收光譜圖

[DBSA] = 0、0.05、0.5、1、3 與 10 mM。總體積 1 ml，[AN] = 0.03 M，[H₂O₂] = 5 mM，80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP/ml)，0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

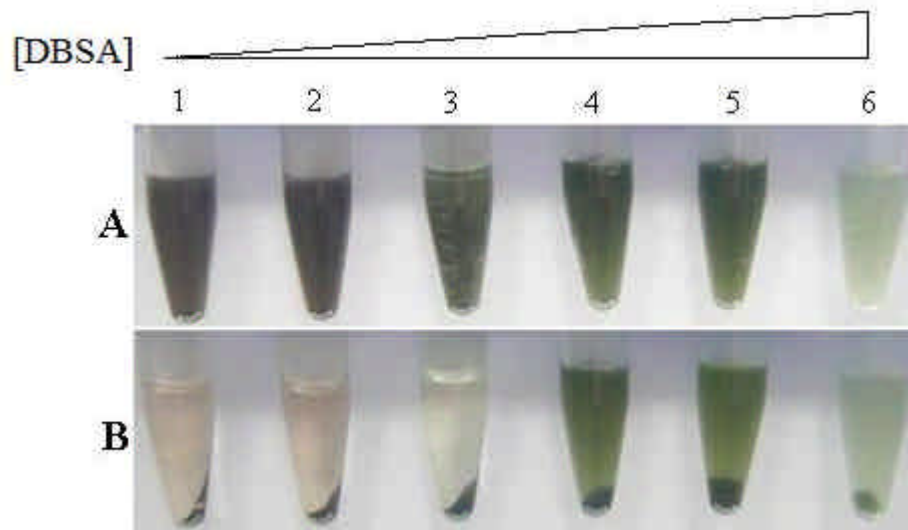


圖 4-10 不同 DBSA 濃度之聚苯胺溶液圖

B 為 A 離心後的圖，由 1 到 6 分別為 0、0.05、0.5、1、3 與 10 mM 的 DBSA。

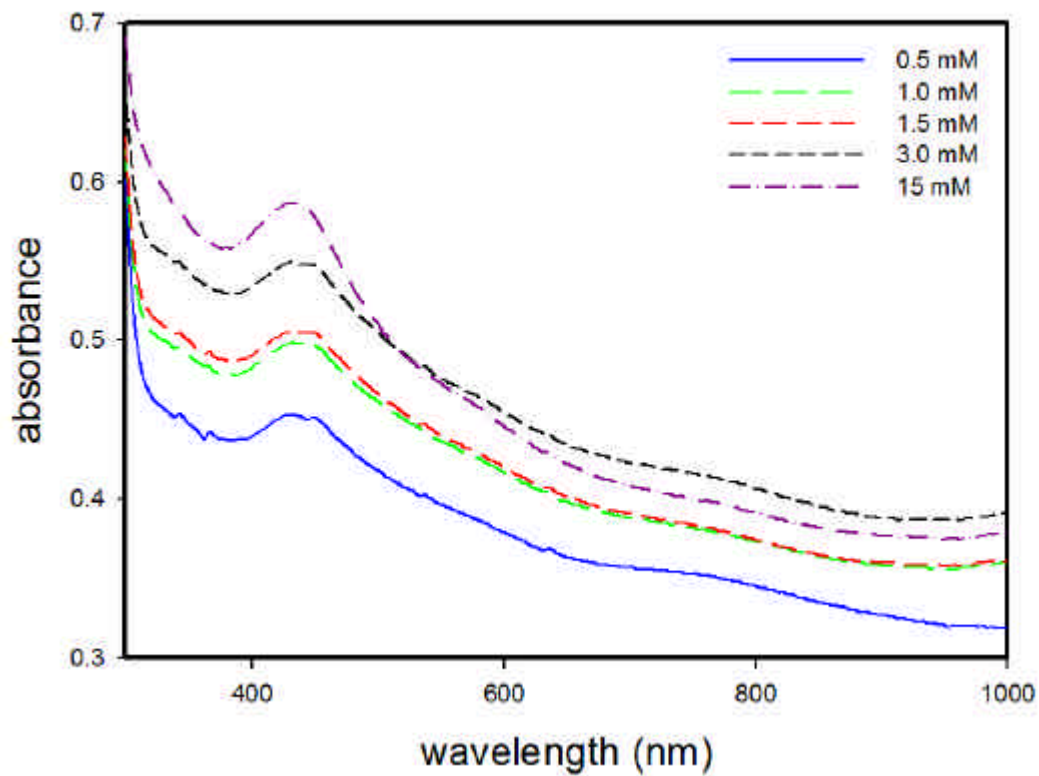


圖 4-11 反應 24 hr 後加入不同 DBSA 濃度之聚苯胺吸收光譜圖

[DBSA] = 0.5, 1.0, 1.5, 3 與 15 mM, 總體積 1 ml, [AN] = 0.03 M, [H₂O₂] = 5 mM, 80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15 (329.75 μg HRP / ml), 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液 (pH 4.0)。

4.3.3 HRP 催化聚合聚苯胺之探討

在聚合聚苯胺的反應中，HRP 酵素與過氧化氫反應變成 compound 的結構，而苯胺單體經 compound 的催化而帶有自由基，多個帶有自由基的苯胺聚合而成聚苯胺。本小節將探討於聚合反應過程中，HRP 的酵素催化是否需要全程參與。計時開始反應 15 min 的溶液標號為樣品 0，取 200 μl 樣品 1 與 2.8 ml 去離子水混合均勻，使用紫外光可見光光譜儀分析波值並標號 T_0 ，接著樣品 0 分裝成等量兩管，取其中一管放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 水中煮沸 10 min，加入 30 μl 的 0.32 M Aniline 與 5 μl 的 1 M H_2O_2 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下持續攪拌反應 3 hr 並標號樣品 2，接著取 200 μl 樣品 2 與 2.8 ml 去離子水混合均勻使用紫外光可見光光譜儀分析並標號 T_{2_heat} ；取分裝的另一管加入 30 μl 的 0.32 M Aniline 與 5 μl 的 1 M H_2O_2 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下持續攪拌反應 3 hr 並標號樣品 1，接著取 200 μl 樣品 1 與 2.8 ml 去離子水混合均勻使用紫外光可見光光譜儀分析並標號 T_1 ，之後將樣品 1 放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 水中煮沸 10 min，取 200 μl 樣品 1 與 2.8 ml 去離子水混合均勻使用紫外光可見光光譜儀分析並標號 T_{1_heat} ，實驗流程如圖 4-12 所示。

由圖 4-13 的 T_0 與 T_1 得知，於分裝之後 HRP 酵素還繼續催化聚合聚苯胺；由 T_1 與 T_{1_heat} 得知，聚苯胺經煮沸後結構與波型會產生改變；由 T_{1_heat} 與 T_{2_heat} 得知， T_{1_heat} 的吸光譜波值較 T_{2_heat} 的吸光譜波值高，因為 T_{2_heat} 煮沸加熱導致 HRP 失去活性而無法繼續催化聚合聚苯胺。因此，在酵素催化聚合聚苯胺的過程裡，需要酵素的全程參與。

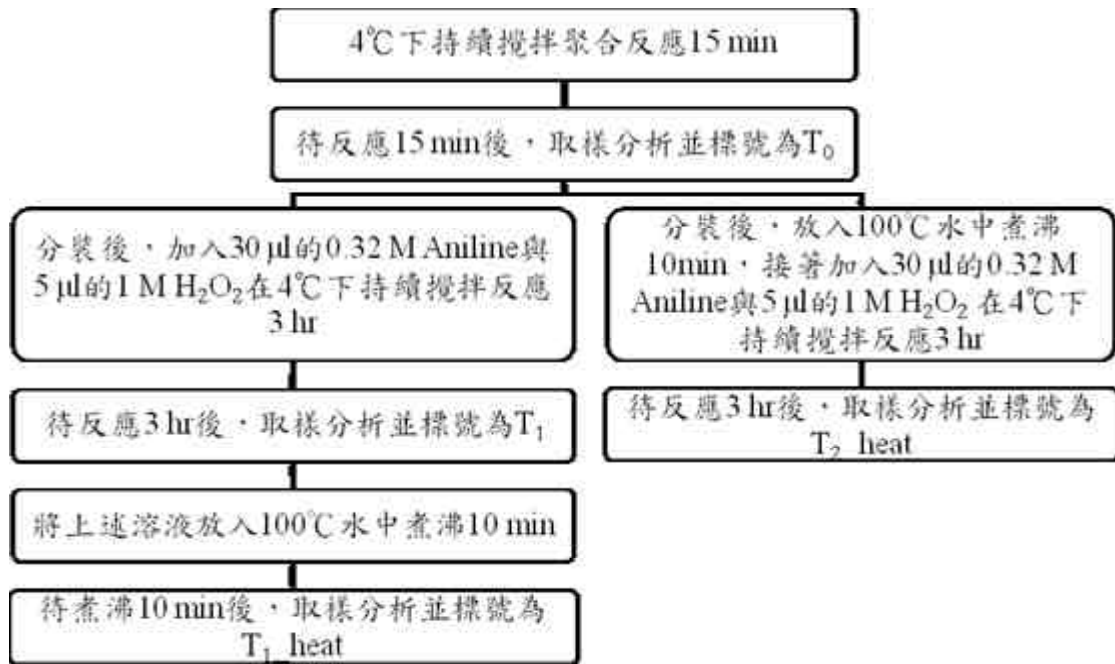


圖 4-12 加熱切斷 HRP 酵素活性催化步驟流程圖

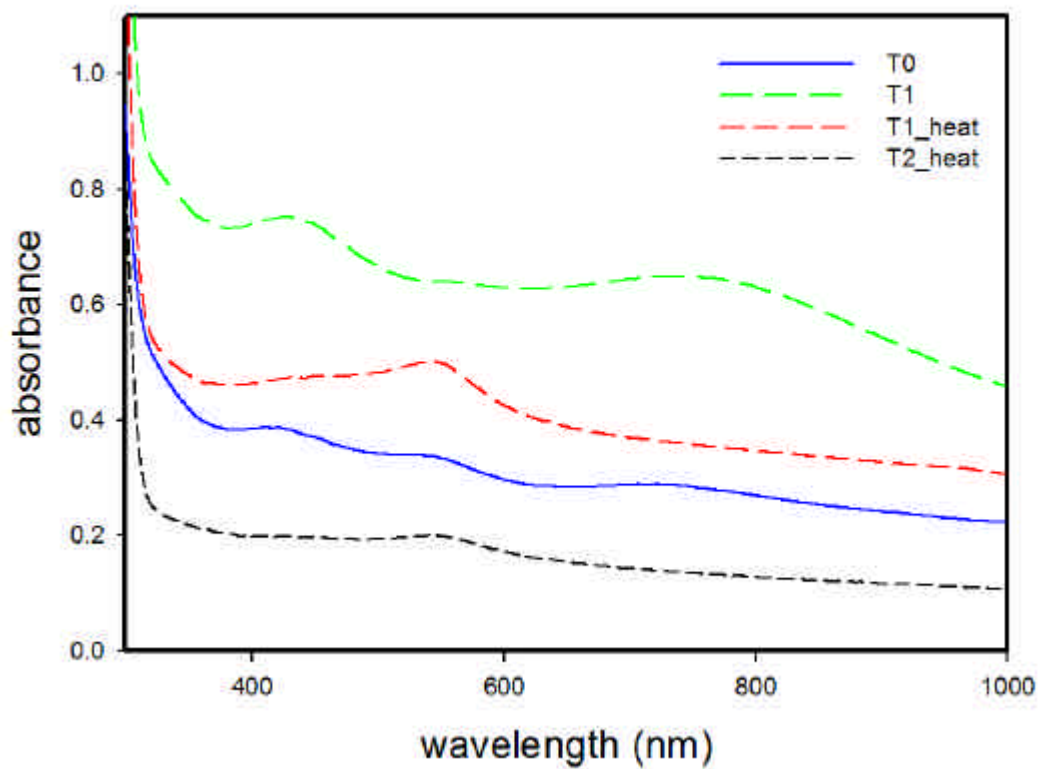


圖 4-13 加熱切斷 HRP 酵素活性催化之吸收光譜圖

總體積 1 ml , [AN] = 0.03 M , [H₂O₂] = 5 mM , 80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP /ml) , 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

4.4.2 FTIR 分析

使用 FTIR 分析 PANI、SBA-15、SBA-15(HRP)/PANI、SBA-15(HRP)/PANI/HCl、SBA-15(HRP)/PANI/DBSA (0.05 mM) 與 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA (3 mM) 之化學鍵與成分。分析結果如圖 4-14 所示，由圖中發現 SBA-15 於 1077 cm^{-1} 處，為 Si-O-Si 鍵之特徵波峰。酵素催化聚合之 PANI，分別於 1506 cm^{-1} 與 1597 cm^{-1} 處，有 C=C 與 C=N 雙峰之特性波峰，於 830 cm^{-1} 處，為 PANI 結構鏈上之 C-H 鍵結。SBA-15(HRP) 催化聚合之 PANI，分別於 1077 cm^{-1} 與 1506 cm^{-1} 處，有 SBA-15 之 Si-O-Si 鍵結與 C=C 之特徵峰。以摻雜劑 HCl 與 DBSA 摻雜後，於 $3000\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 處，有 N-H 鍵結所產生之波峰出現，且於 1597 cm^{-1} 處，C=N 特性波峰，相對 SBA-15(HRP)/PANI 有較高的峰值。由此分析結果發現，由於 SBA-15 的影響，導致部分 PANI 之特徵峰不明顯，但是 HCl 與 DBSA 的摻雜，使得 PANI 之 N-H 鍵與 C=N 鍵顯示出現。

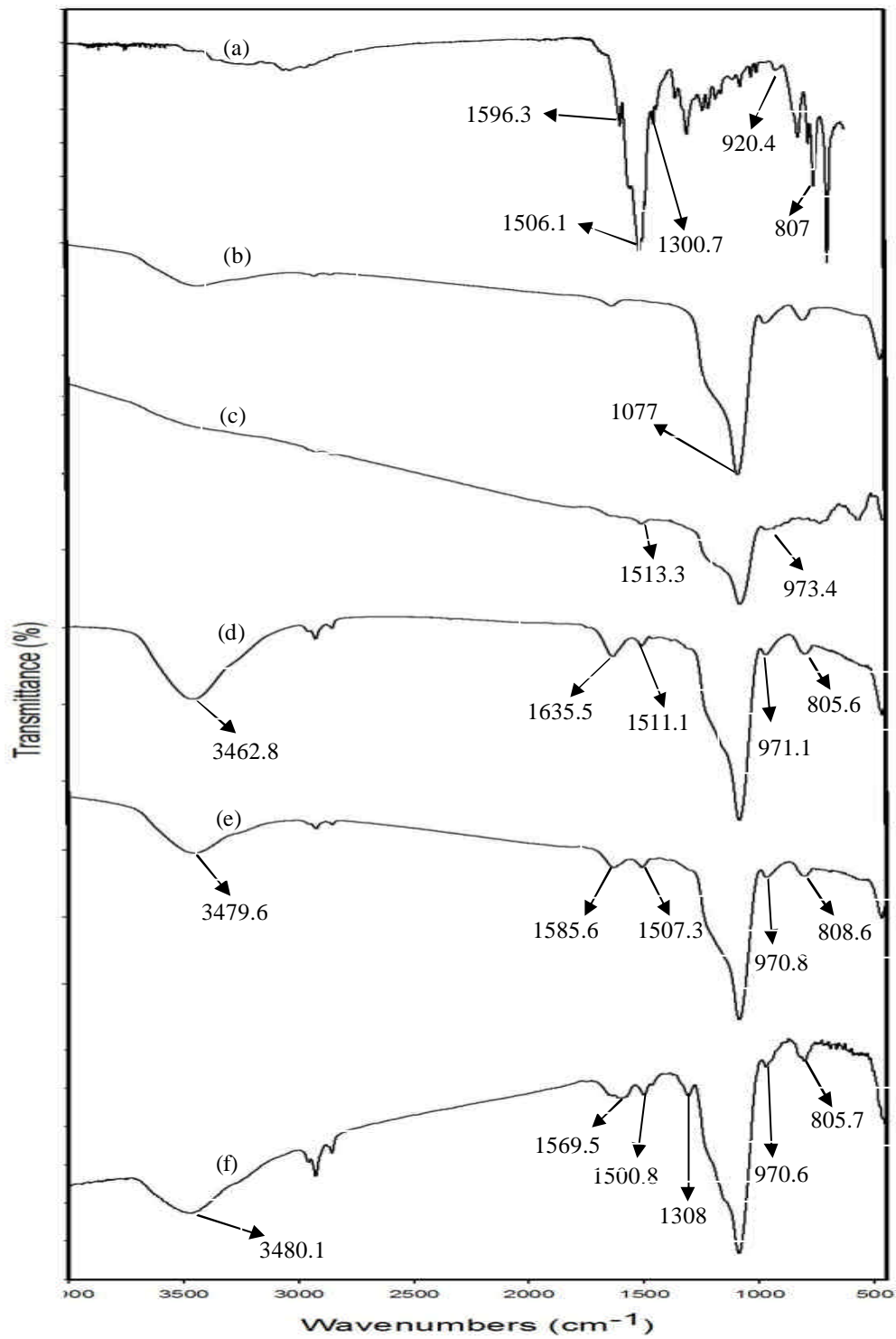


圖 4- 14 不同苯胺聚和方式之紅外線光譜

圖中分別為：(a)PANI；(b)SBA-15；(c)SBA-15(HRP)/PANI；

(b)SBA-15(HRP)/PANI/HCl；(e)SBA-15(HRP)/PANI/DBSA (0.05 mM)；

(f)SBA-15(HRP)/PANI/DBSA (3 mM)之紅外線光譜

4.4.3 SEM 分析

以 SEM 觀察 PANI、SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之表面結構。由圖 4-15 可以看到經由未固定化 HRP 酵素催化聚苯胺為大小約為 200 nm 的顆粒。圖 4-16 中(A)、(B)、(C)與(D)分別為 SBA-15、SBA-15(HRP)/PANI、SBA-15(HRP)/PANI 與 SBA-15/PANI 之表面 SEM 放大圖。比較圖(A)，由(B)可以發現在 SBA-15(HRP)上，表面聚有許多較小不規則顆狀，推測此為聚苯胺產物，且將 SBA-15(HRP)包圍住。由(C)與(D)比較可以觀察到，在 SBA-15(HRP)表面之聚苯胺，除了呈現不規則狀顆粒堆積外，PANI 以層狀包圍著 SBA-15(HRP)。但是無法判斷出 SBA-15(HRP)之聚苯胺，在 SBA-15(HRP)的孔洞內部是否有堆積。

圖 4-17 中的(A)、(B)、(C)與(D)，分別為 SBA-15、以 NaOH 清洗 SBA-15(HRP)/PANI 24 hr、以 NaOH 清洗 SBA-15(HRP)/PANI 4 hr 與以 NMP 溶解 SBA-15(HRP)/PANI 後之表面 SEM 放大圖。因為強鹼可以水解二氧化矽，所以藉由 NaOH 將 SBA-15(HRP)/PANI 中 SBA-15 去除，以探討 PANI 的特性。加入 3 M NaOH 於乾燥後的 SBA-15/PANI 中，持續攪拌 24 hr 後，以去離子水清洗 NaOH，經冷凍乾燥後以 SEM 觀察表面結構。由(A)可以發現，利用 SBA-15(HRP)催化聚合 PANI，除了在 SBA-15(HRP)表面有 PANI 顆粒堆積，還有球型 SBA-15 結構出現。而 NaOH 清洗 24 hr 後如(B)所示，呈現大部分為不規則塊狀的結構，此可能為聚苯胺，球型 SBA-15 的結構已經消失。由(C)可以觀察到，經 NaOH

清洗 4 hr 後，未完全溶解的 SBA-15(HRP)，表面呈現侵蝕狀。由(D)可以觀察到，將聚合於 SBA-15(HRP)之聚苯胺以 NMP(100 %)溶解後，取走大部分的 PANI 使得 SBA-15(HRP)可以再次使用。

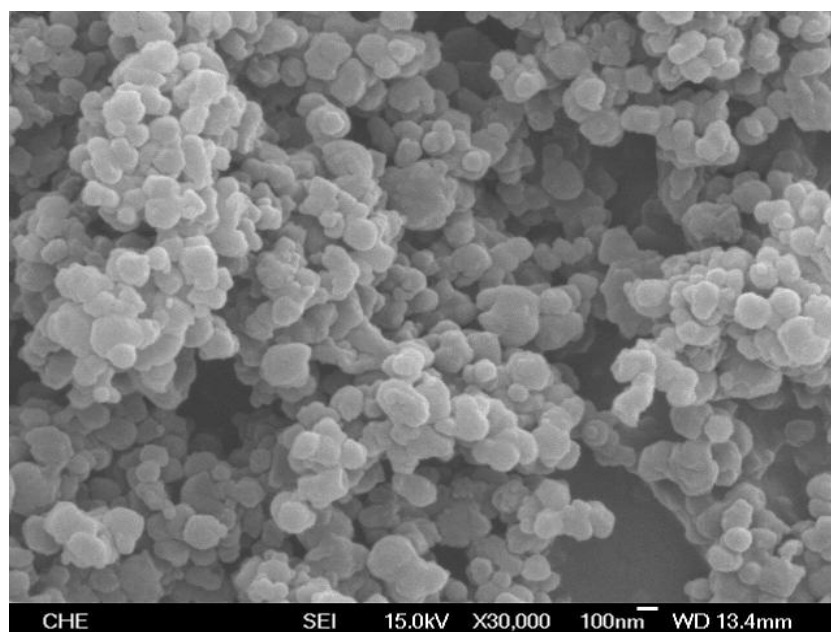


圖 4-15 酵素聚合聚苯胺之表面 SEM 圖(30000 倍)

總體積 1 ml , [AN] = 0.03 M , [H₂O₂] = 5 mM , 44.64 μg/ml , 0.1 M 檸檬酸磷酸
鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

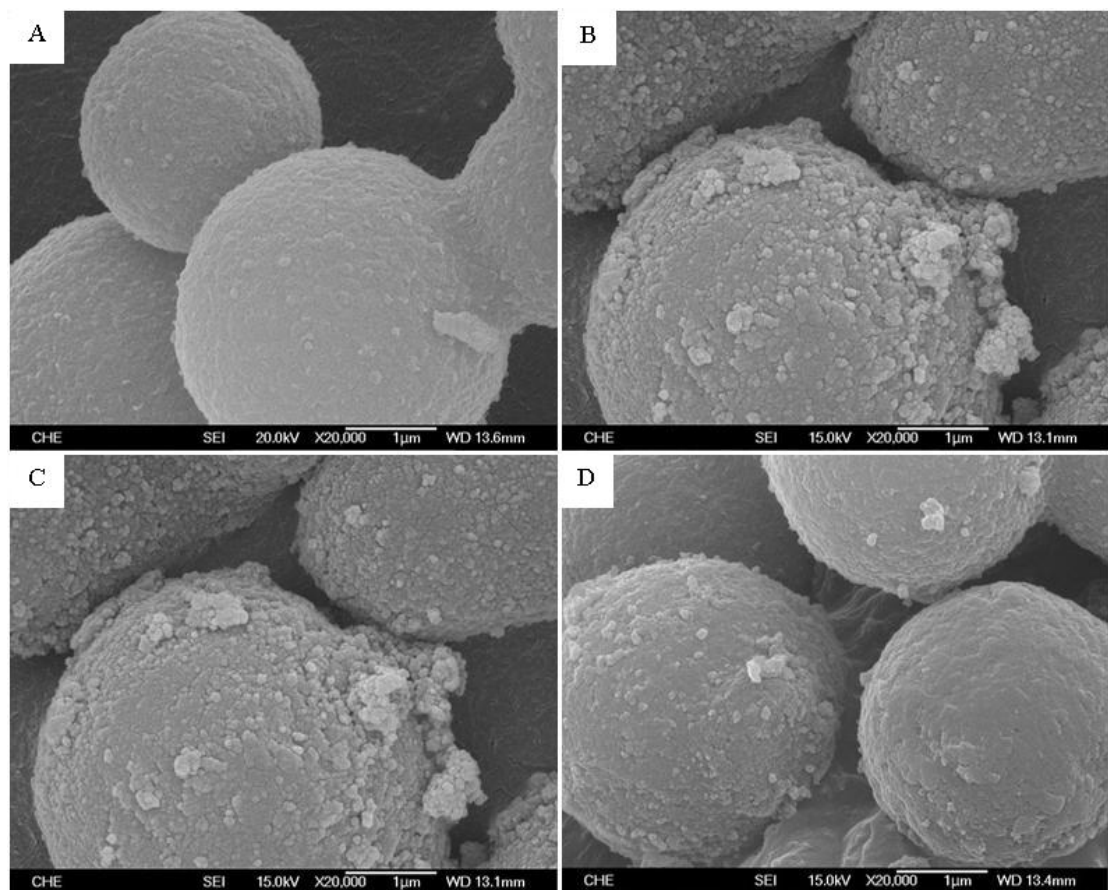


圖 4-16 不同聚合方式之 SBA-15 表面 SEM 圖

圖中分別為：(A)SBA-15 之表面 SEM 圖(20000 倍)；

(B)SBA-15(HRP)/PANI 之表面 SEM 圖(20000 倍)；

(C)SBA-15(HRP)/PANI 之表面 SEM 圖(20000 倍)；

(D)SBA-15/PANI 之表面 SEM 圖(20000 倍)。

(B)與(C)：總體積 1 ml， $[AN] = 0.03 \text{ M}$ ， $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ，80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 $\mu\text{g HRP / ml}$)，pH 4.0 的 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液。

(D)：總體積 1 ml， $[AN] = 0.03 \text{ M}$ ， $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ，0.04 g SBA-15，263.8 $\mu\text{g HRP}$ ，0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

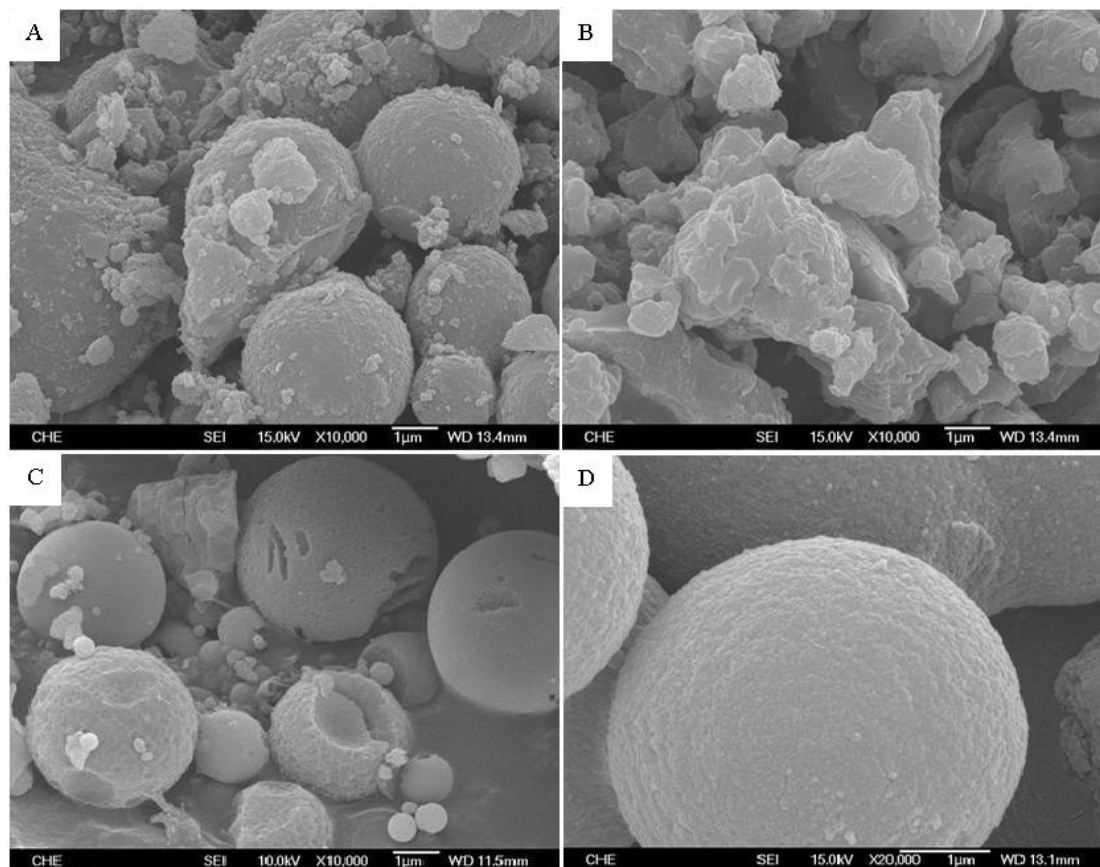


圖 4-17 分別以 NaOH 與 NMP 清洗後之 SBA-15 表面 SEM 圖

圖中分別為：(A)SBA-15(HRP)/PANI 之 SEM 圖(10000 倍)；

(B)以 NaOH 清洗 SBA-15(HRP)/PANI 24 hr 後之 SEM 圖(10000 倍)；

(C)以 NaOH 清洗 SBA-15(HRP)/PANI 4 hr 後之 SEM 圖(10000 倍)；

(D)以 NMP 清洗 SBA-15(HRP)/PANI 後之表面 SEM 圖(20000 倍)。

[NaOH] = 3 mM , [NMP] = 3 mM , 總體積 1 ml , [AN] = 0.03 M , [H₂O₂] = 5 mM ,

80 μl 的 0.05 g/ml SBA-15(329.75 μg HRP /ml) , 0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶

液(pH 4.0)。

4.4.4 BET 分析

使用氮氣等溫吸/脫附儀，分析 SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之孔洞性質。圖 4-18 SBA-15(HRP)/PANI 的氮氣等溫吸/脫附曲線(下方曲線為吸附曲線；上方曲線為脫附曲線)與孔徑分佈圖，分別將這三種樣品的氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈整理於圖 4-19 與圖 4-20，將孔洞性質分析結果整理在表 4-1。

由圖 4-19 中可以觀察到 SBA-15(HRP)/PANI 的氮氣吸附量比 SBA-15 與 SBA-15(HRP)的氮氣吸附量小很多，聚苯胺多層結構堆積在 SBA-15(HRP)/PANI 的表面以及孔道內部，所以 SBA-15(HRP)/PANI 的孔道體積幾乎被堆積，而氮氣吸附量大為減少。再與圖 4-20 的孔徑分佈圖比較，可以看出 SBA-15(HRP)/PANI 的主要孔徑為 2.0 nm，而 SBA-15 與 SBA-15(HRP)可測得孔徑皆為 22 nm。SBA-15(HRP)/PANI 於 3~32 nm 孔徑的孔體積大為減少，也是導致表面積下降的原因。

表 4-1 SBA-15 酵素固定化前後與催化反應 PANI 後對孔洞特性的影響

Sample	$A_{\text{BET}}(\text{m}^2/\text{g})$	$V_{\text{total}}(\text{cm}^3/\text{g})$	D(nm)
SBA-15	538.0	1.20	22.3
SBA-15(HRP)	350.5	0.96	22.2
SBA-15(HRP)/PANI	328.8	0.19	2.0

A_{BET} : BET specific surface ; V_{total} : total pore volume ; D : pore diameter

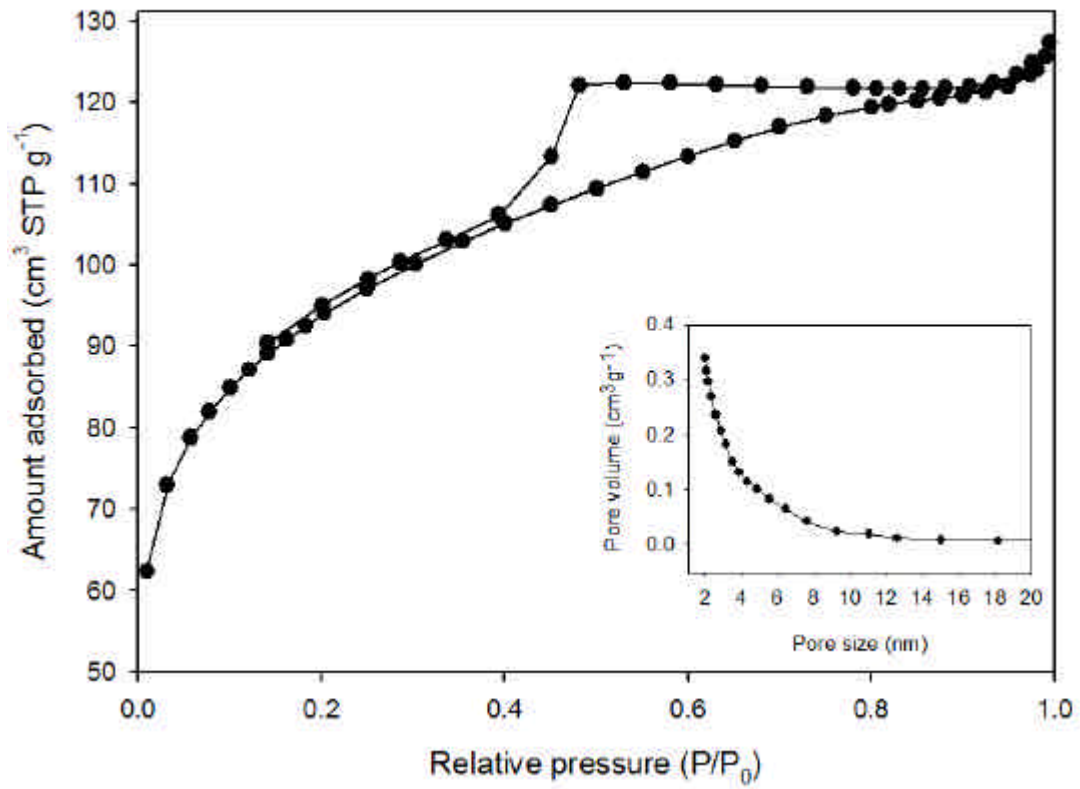


圖 4-18 SBA-15(HRP)/PANI 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

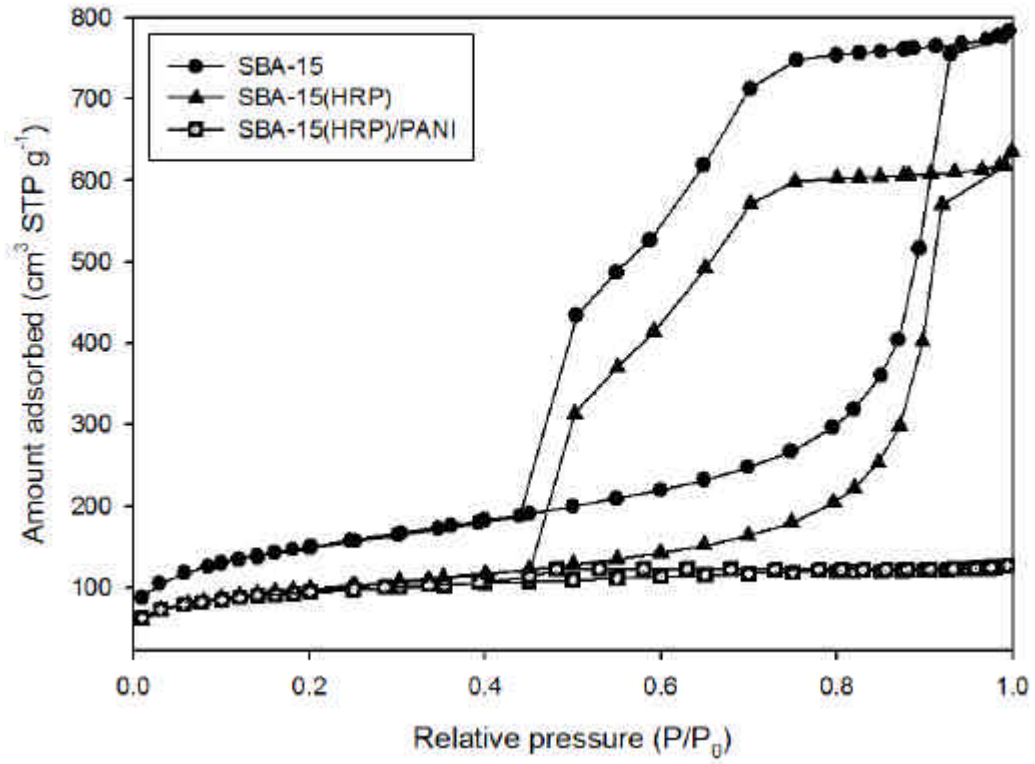


圖 4-19 SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之氮氣等溫吸/脫附曲線比

較圖

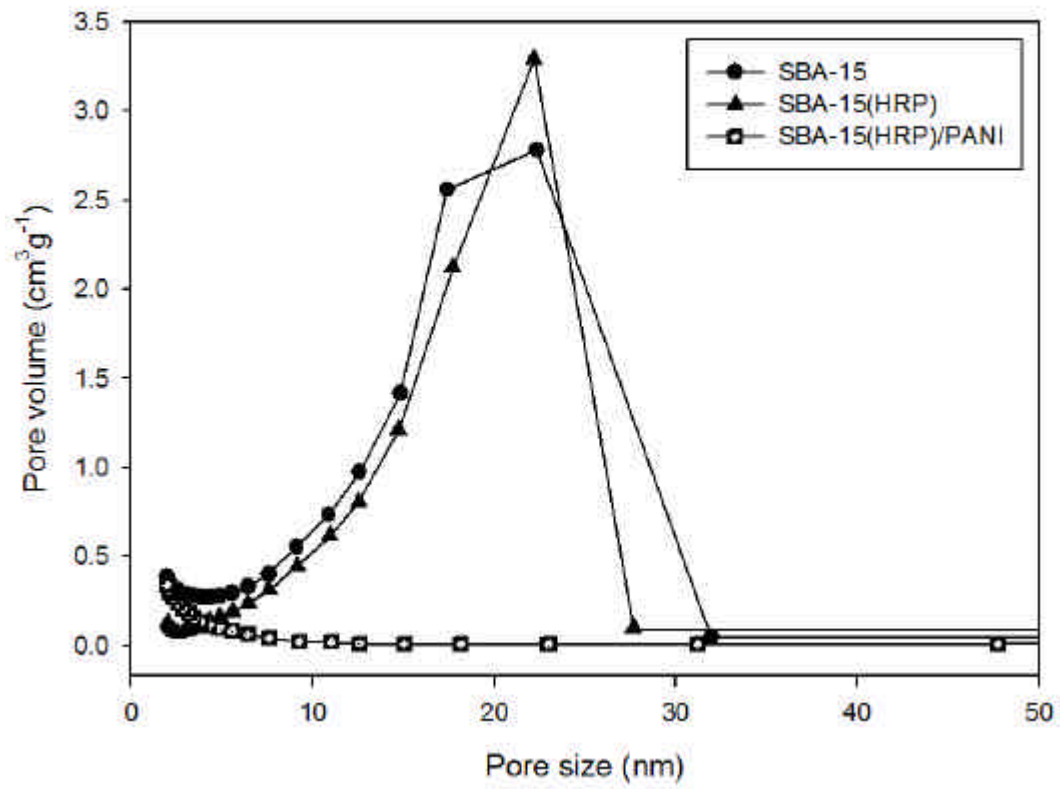


圖 4-20 SBA-15、SBA-15(HRP)與 SBA-15(HRP)/PANI 之孔徑分佈比較圖

4.4.5 TGA 分析

使用 TGA 分析 PANI SBA-15 SBA-15(HRP)/PANI SBA-15(HRP)/PANI/HCl 與 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA 之熱裂解溫度。圖 4-21 為 TGA 分析結果，圖中曲線(a)可發現 PANI 在 100 前的熱重損失為 4%，此部分為水分的損失，溫度在 110 到 230 的熱重損失為 7%，此部分主要為苯胺單體、寡聚物與聚合過程中包覆住的 HRP 進行熱裂解重量損失，溫度在 450 到 500 的熱重損失為 16%，此部分為 PANI 分子進行熱裂解重量損失。由曲線(b)可發現，SBA-15 主要熱重損失在 100 前，此部分是水分的損失，在溫度 100 之後幾乎沒有熱重損失。由曲線(c)可發現 SBA-15(HRP)/PANI 在 100 前的熱重損失為 7%，此部分為水分的損失，溫度在 120 到 230 的熱重損失為 1%，此部分主要為苯胺單體、寡聚物與 HRP 進行熱裂解重量損失，在溫度 520 到 600 的熱重損失為 2%，此部分為 PANI 進行熱裂解重量損失。由曲線(d)可發現 SBA-15(HRP)/PANI/HCl 在溫度 100 前的熱重損失為 10%，此部分為水分的損失，溫度在 130 到 250 的熱重損失為 1%，此部分主要為苯胺單體、寡聚物與 HRP 進行熱裂解重量損失，在溫度 550 到 650 的熱重損失為 2%，此部分為主要為 PANI 進行熱裂解重量損失。由曲線(e)可發現 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA 在溫度 100 前的熱重損失為 10%，在溫度 380 到 590 的熱重損失為 12%，此部分為主要的熱裂解重量損失。由此可見，以 HCl 與 DBSA 摻雜後之 PANI 熱裂解溫度，分別於溫度 550~650 與 380~590 之間，摻雜 HCl 的熱裂解溫度有些許的提升，但是摻雜

DBSA 的熱裂解溫度卻有降低的趨勢。由於無法確定 SBA-15 上 PANI 含量，因此無法從熱重損失中，比較上述條件中之 PANI 含量。

探討負載酵素的 SBA-15(HRP)與單存添加 SBA-15 兩種不同型式，所聚合聚苯胺熱穩定比較。圖 4-22 為 SBA-15(HRP)之聚苯胺與 SBA-15 混 HRP 之聚苯胺 TGA 分析圖，由曲線(b)可發現，SBA-15(HRP)/PANI 在 100 前的熱重損失為 7%，此部分為水分的損失，在溫度 520 到 600 的熱重損失為 2%，此部分為主要 PANI 熱裂解重量損失；由曲線(c)可發現，SBA-15/PANI 在 100 前的熱重損失為 6%，此部分為水分的損失，在溫度 550 到 620 的熱重損失為 2%，此部分為 PANI 進行熱裂解重量損失，發現兩種不同聚合方式在熱穩定的表現上並沒有太大的差異。

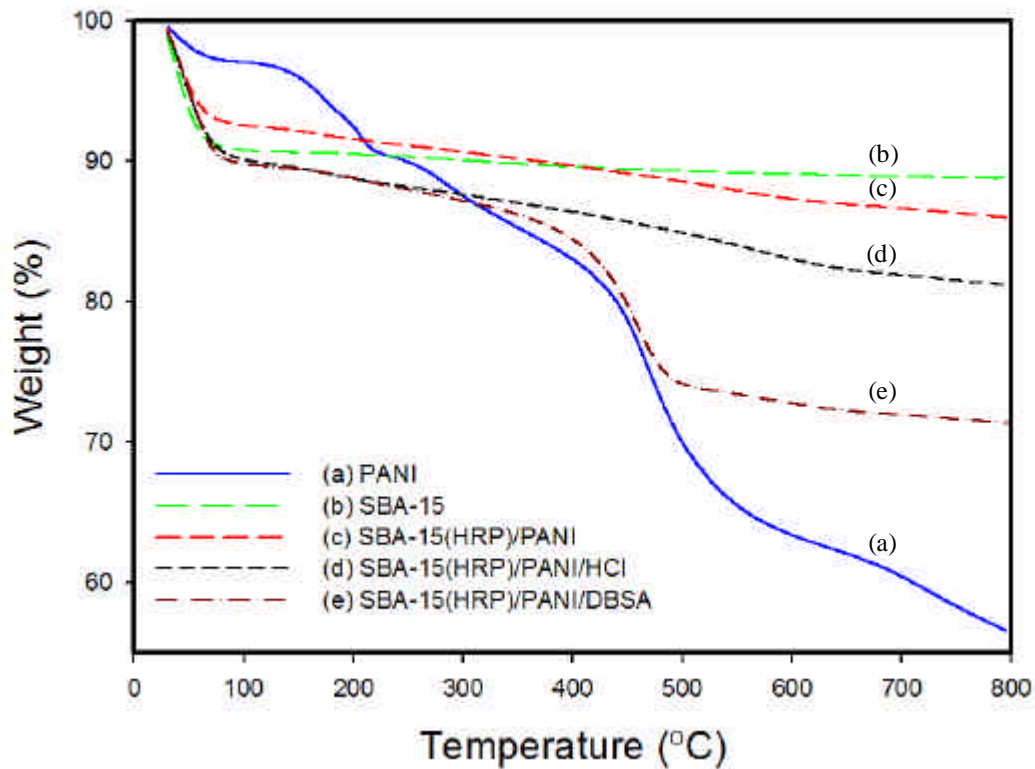


圖 4-21 不同型式聚合聚苯胺之 TGA 圖

圖中分別為：(a)酵素催化聚合聚苯胺；(b)SBA-15；(c)SBA-15(HRP)聚合聚苯胺；
 (d)添加 20 mM HCl 之 SBA-15(HRP)聚合聚苯胺；(e)添加 3 mM DBSA 之
 SBA-15(HRP)聚合聚苯胺。總體積 1 ml、 $[AN] = 0.03 \text{ M}$ ， $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ，0.04 g
 SBA-15(263.8 μg HRP)，0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

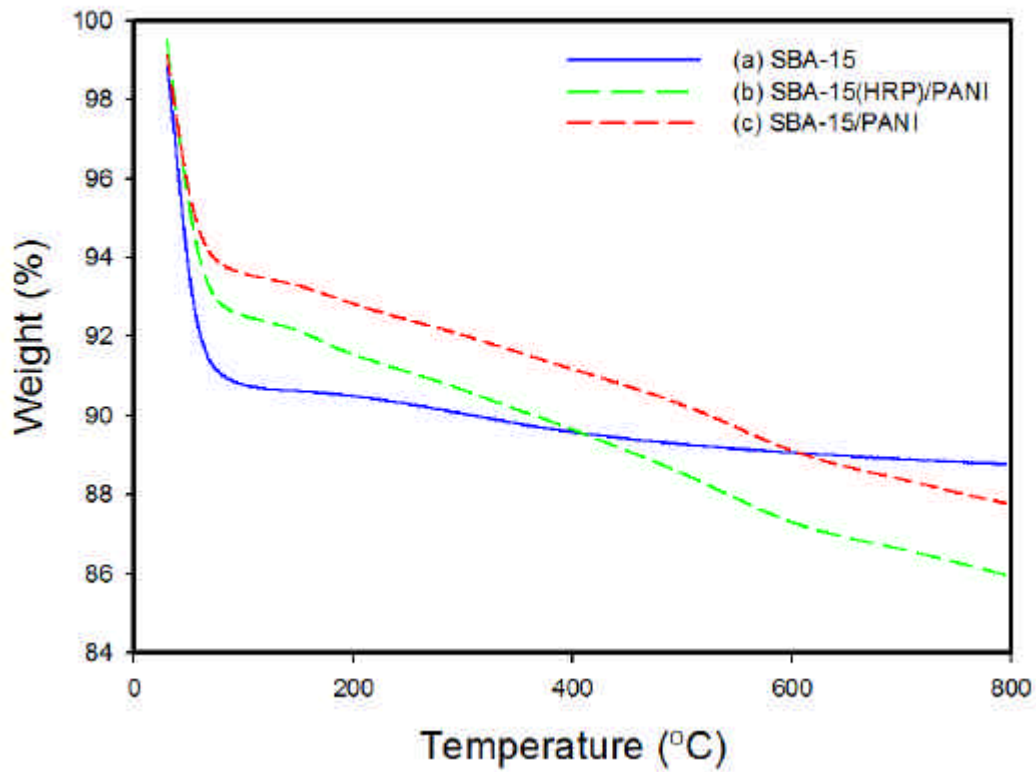


圖 4-22 不同型式聚合聚苯胺之 TGA 圖

圖中分別為：(a)SBA-15；(b) SBA-15(HRP)聚合聚苯胺；(c) SBA-15 聚合聚苯胺。

總體積 1 ml， $[AN] = 0.03 \text{ M}$ ， $[H_2O_2] = 5 \text{ mM}$ ，0.04 g SBA-15(263.8 μg HRP)，

0.1 M 檸檬酸磷酸鈉鹽緩衝溶液(pH 4.0)。

4.4.6 循環伏安法(CV)分析

使用填充式 CPE 電極在 0.1 mM 赤血鹽溶液中，以掃描速率為 20 mV，使用循環伏安法感測 PANI、SBA-15(HRP)/PANI、SBA-15(HRP)/PANI/HCl 與 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA，分析其電極導電度的變化。圖 4-23 為不同碳糊電極所感測出來的結果，分別各個氧化波峰之電流與電位整理在表 4-2。使用循環伏安法分析發現，經摻雜劑添加所聚合之聚苯胺 SBA-15(HRP)/PANI/HCl 與 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA，氧化波峰的電流較未摻雜的 SBA-15/PANI 低。可能是因為 HCl 與 DBSA 影響 HRP 的酵素活性，導致聚苯胺的產量減少，

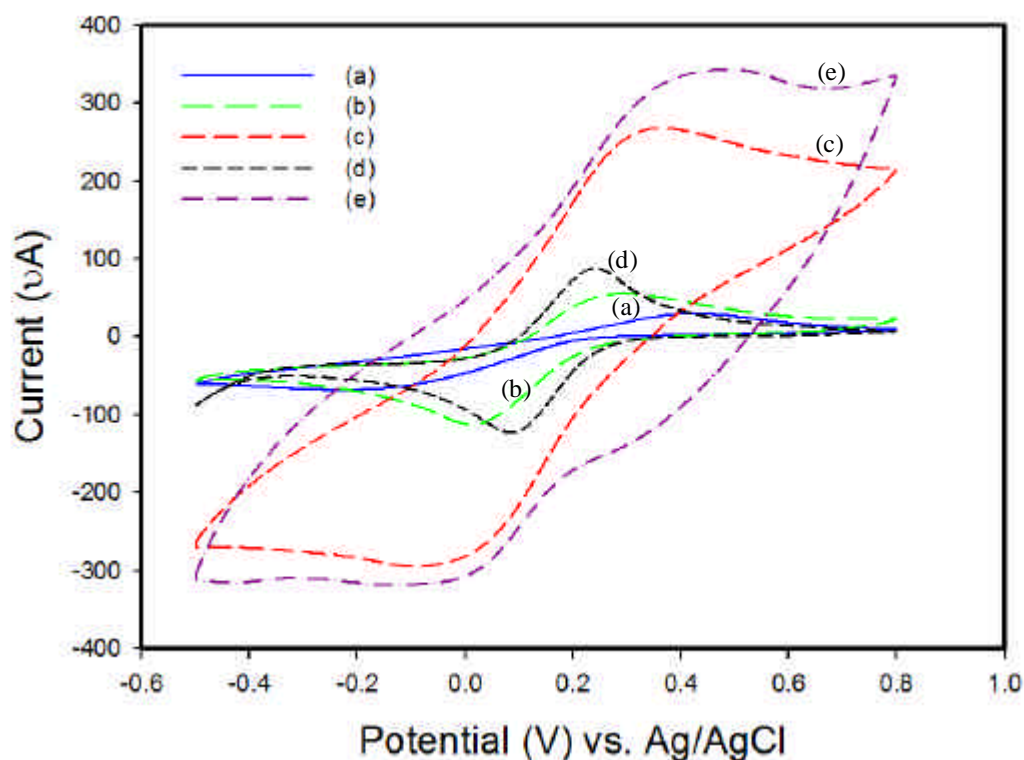


圖 4-23 比較碳糊電極感測 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 之 CV 圖

(a)純碳糊電極；(b)石墨粉：PANI=4：1；(c)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI=4：1；
 (d)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI/HCl=4：1；(e)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI/DBSA
 =4：1。

表 4-2 氧化電位與電流關係表

Sample	電位(V)	電流(μA)
(a)純碳糊電極	0.462	19.37
(b)石墨粉：PANI=4：1	0.280	79.32
(c)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI=4：1	0.309	170.9
(d)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI/HCl=4：1	0.241	118.2
(e)石墨粉：SBA-15(HRP)/PANI/DBSA=4：1	0.305	117.4

第五章 結論與建議

本研究所製備的中孔洞材料 SBA-15, 孔道大小為 18 nm, 球體大小為 4 μm , 為了固定 HRP, 而調整溶液的 pH, 使 SBA-15 與 HRP 帶異性電而得以互相吸附, 固定在 SBA-15 上的 HRP 量約總酵素量的 73%。以 SEM 觀察, SBA-15(HRP)較 SBA-15 的表面來的粗糙, 於不同 NMP 濃度中的酵素活性測試, 固定化後的酵素在活性衰退表現上, 其趨勢較為減緩。所製備的 SBA-15 由 TEM 與 SEM 下觀察, 外觀為球狀內部為圓型不規則孔道, 以氮氣吸脫附分析, SBA-15(HRP)孔道大小與 SBA-15 相似, 但是 SBA-15 的氮氣吸附量卻大於 SBA-15(HRP)。

酵素固定後, 進行苯胺聚合反應, 苯胺濃度在 3 mM, 過氧化氫濃度在 5 mM 時, 所聚合之聚苯胺溶液以紫外光可見光光譜儀分析, 於波長 750 nm 有較高的波值。酵素為催化苯胺單體帶有自由基而進行聚合反應, 經探討發現催化反應必須是持續性進行的。藉由摻雜劑 HCl 與 DBSA 的添加, 以提升原本的導電度。以紫外光可見光光譜儀分析, 摻雜劑的添加, 必須伴隨在苯胺聚合反應的進行, 於苯胺聚合反應結束後添加的摻雜效果並不佳。經摻雜劑摻雜後, 波長 750 nm 的波峰皆比 SBA-15(HRP)/PANI 來的高。但是使用循環伏安法分析發現, 使用 SBA-15(HRP)所催化之 PANI, 其電化學活性較高。但是, 經摻雜劑添加所聚合之聚苯胺, 導電性反而相對來的低, 主原因可能是 HCl 與 DBSA 皆會影響 HRP 的酵素活性, 所以聚合出的 SBA-15(HRP)/PANI 中聚苯胺的含量相對較少, 因此建議將 SBA-15 去除, 所得之聚苯胺再進行分析。以 TGA 分析可得知,

SBA-15/PANI 與 SBA-15(HRP)/PANI/HCl 的熱裂解溫度相近，而 SBA-15(HRP)/PANI/DBSA 的熱裂解溫度卻相對比較低，推測是因為其界面活性劑的結構，摻雜的過程中導致所聚合之聚苯胺熱穩定性較差。在 BET 分析中，SBA-15(HRP)/PANI 的孔洞體積比 SBA-15 與 SBA-15(HRP)少。主要是因為 SBA-15(HRP)/PANI 上包覆著聚苯胺，吸附在表面與孔道中，使單位重量下的孔洞體積減少，因此 SBA-15(HRP)/PANI 的氮氣吸附量比 SBA-15 與 SBA-15(HRP)少。在探討酵素固定化的必要性中，SBA-15(HRP)/PANI 與 SBA-15/PANI 作比較，兩者的熱裂解溫度相似，由 SEM 觀察外觀並無太大差異，但是紫外光可見光光譜儀分析，SBA-15(HRP)/PANI 在波長 750 nm 有較大的波峰。

於 SBA-15 上固定不同濃度之 HRP 酵素，探討催化聚合 PANI 的最小酵素量。並探討 SBA-15 含量與苯胺濃度的關係。將所製備之 SBA-15(HRP)/PANI，藉由 NMP 溶解 PANI 後再收集，或是使用 NaOH 溶解 SBA-15 收集溶液中的 PANI，將所收集的 PANI，探討其他加工與分析的可行性。

參考文獻

- Aburto, J., M. Ayala, I. Bustos-Jaimes, C. Montiel, E. Terres, J. M. Dominguez, and E. Torres. 2005. Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials* 83 (1-3):193-200.
- Arnao, M. B., A. Cano, J. HernandezRuiz, F. GarciaCanovas, and M. Acosta. 1996. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry* 236 (2):255-261.
- Bai, Y., H. Yang, W. W. Yang, Y. C. Li, and C. Q. Sun. 2007. Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction. *Sensors and Actuators B-Chemical* 124 (1):179-186.
- Beck, J. S., J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. Mccullen, J. B. Higgins, and J. L. Schlenker. 1992. A New Family of Mesoporous Molecular-Sieves Prepared with Liquid-Crystal Templates. *Journal of the American Chemical Society* 114 (27):10834-10843.
- Bhunia, A., S. Durani, and P. P. Wangikar. 2001. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering* 72 (5):562-567.
- Cao, Y., P. Smith, and A. J. Heeger. 1992. Counterion Induced Processibility of Conducting Polyaniline and of Conducting Polyblends of Polyaniline in Bulk Polymers. *Synthetic Metals* 48 (1):91-97.
- Carlsson, G. H., P. Nicholls, D. Svistunenko, G. I. Berglund, and J. Hajdu. 2005. Complexes of horseradish peroxidase with formate, acetate, and carbon monoxide. *Biochemistry* 44 (2):635-642.
- Casero, E., M. Darder, F. Pariente, and E. Lorenzo. 2000. Peroxidase enzyme electrodes as nitric oxide biosensors. *Analytica Chimica Acta* 403 (1-2):1-9.
- Chen, Chien-Chung, Ye-song Gu, and Jing-Shan Do. 2009. The techniques and characterizations for constructing hydrogen peroxide biosensors by conductive polyaniline. *Tunghai University, Department of Chemical and Materials Engineering, doctoral dissertation*.
- Chou, Hsiao-duen, and Ye-song Gu. 2008. Investigating the effectors on the HRP immobilization towards the Polyaniline modified electrode. *Tunghai University, Department of Chemical and Materials Engineering, Master's*

thesis.

- Essa, H., E. Magner, J. Cooney, and B. K. Hodnett. 2007. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 49 (1-4):61-68.
- Everse, J., K.E. Everse, and M.B. Grisham. 1991. Peroxidase in Chemistry and Biology Volume . *CRC Press*.
- Glazer, A. N. 1996. Bioconjugate techniques - Hermanson,GT. *Nature* 381 (6580):290-290.
- Heeger, A. J. 2001. Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials. *Journal of Physical Chemistry B* 105 (36):8475-8491.
- Hudson, S., E. Magner, J. Cooney, and B. K. Hodnett. 2005. Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. *Journal of Physical Chemistry B* 109 (41):19496-19506.
- Joo, H., Y. J. Yoo, and J. S. Dordick. 1998. Polymers from biocatalysts. *Korean Journal of Chemical Engineering* 15 (4):362-374.
- Kadnikova, E. N., and N. M. Kostic. 2002. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 18 (1-3):39-48.
- Kanatzidis, M. G., C. G. Wu, H. O. Marcy, D. C. Degroot, and C. R. Kannewurf. 1990. Conductive Polymer - Oxide Bronze Nanocomposites - Intercalated Polythiophene in V₂O₅ Xerogels. *Chemistry of Materials* 2 (3):222-224.
- Kresge, C. T., M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, and J. S. Beck. 1992. Ordered Mesoporous Molecular-Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism. *Nature* 359 (6397):710-712.
- Lai, Yi-Cheng, and Sung-Chyr Lin. 2002. Application of Immobilized HRP in Industrial Wastewater Treatment. *National Chung Hsing University, Department of Chemical Engineering, Master's Thesis*.
- Lettow, J. S., Y. J. Han, P. Schmidt-Winkel, P. D. Yang, D. Y. Zhao, G. D. Stucky, and J. Y. Ying. 2000. Hexagonal to mesocellular foam phase transition in polymer-templated mesoporous silicas. *Langmuir* 16 (22):8291-8295.
- Lim, C. H., and Y. J. Yoo. 2000. Synthesis of ortho-directed polyaniline using horseradish peroxidase. *Process Biochemistry* 36 (3):233-241.
- Macdiarmid, A. G., G. E. Asturias, D. L. Kershner, S. K. Manohar, A. Ray, E. M. Scherr, Y. Sun, X. Tang, and A. J. Epstein. 1989. The Polyanilines - Processing, Molecular-Weight, Oxidation-State and Derivatives. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 197:20-Poly.

- Ruan, Jih-Wei, and Ye-song Gu. 2009. Optimizing the enzymatic polymerization of aniline. *Tunghai University, Department of Chemical and Materials Engineering, Master's thesis.*
- Ryan, B. J., N. Carolan, and C. O'Fagain. 2006. Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends in Biotechnology* 24 (8):355-363.
- Saxena, V., and B. D. Malhotra. 2003. Prospects of conducting polymers in molecular electronics. *Current Applied Physics* 3 (2-3):293-305.
- Shirakawa, H., E. J. Louis, A. G. Macdiarmid, C. K. Chiang, and A. J. Heeger. 1977. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers - Halogen Derivatives of Polyacetylene, (Ch)X. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (16):578-580.
- Tsaprailis, G., D. W. S. Chan, and A. M. English. 1998. Conformational states in denaturants of cytochrome c and horseradish peroxidases examined by fluorescence and circular dichroism. *Biochemistry* 37 (7):2004-2016.
- Tsun, Lai-Meng, and Ye-song Gu. 2008. Preparation of DNA biosensor and its application for DNA analysis. *Tunghai University, Department of Chemical and Materials Engineering, Master's thesis.*
- Vamvakaki, V., and N. A. Chaniotakis. 2007. Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosensors & Bioelectronics* 22 (11):2650-2655.
- Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65 (3):249-259.
- Wu, Chun-Yu, and Shu-Chuan Huang. 2002. Oxidation and molecular weight for polyaniline and its derivatives. *National Dong Hwa University, Department of Chemistry, Master's Thesis.*
- Yang, B. Y., J. S. S. Gray, and R. Montgomery. 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Research* 287 (2):203-212.
- Yang, Y. F., and S. L. Mu. 1997. Bioelectrochemical responses of the polyaniline horseradish peroxidase electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 432 (1-2):71-78.
- Zhan, Wei-Cheng, and Hun-Chi Shu. 2003. Analysis of L-Glutamate and L-Asparagine using polyaniline enzymatically modified carbon paste electrodes. *National Dong Hwa University, Department of Chemistry, Master's Thesis.*
- Zhao, D. Y., J. L. Feng, Q. S. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, and G. D. Stucky. 1998. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 279 (5350):548-552.

簡歷

姓 名：蔡青旂

籍 貫：台灣省高雄市

出生年月日：民國七十三年四月十四日

學 歷：私立東海大學化學工程學系
私立東海大學化學工程與材料工程研究所

經 歷：私立東海大學化學工程與材料工程助教