

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

磁性氧化鐵奈米顆粒固定化纖維水解酵素及纖維水解  
應用研究

Immobilization of cellulase on iron oxide magnetic  
nanoparticles for cellulose hydrolysis

指導老師：黃啟裕 博士

研究生：曾昱智

中華民國 一零二年六月

June 2013

## 中文摘要

本研究是利用共沉澱法(co-precipitation)製備磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並利用溶膠凝膠法(sol-gel)於顆粒表面包覆  $\text{SiO}_2$  保護層以避免核心顆粒被空氣氧化，利用 TEM、SQUID、XRD 來探討附加二氧化矽的磁性奈米顆粒 ( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 的特性。並將真菌 *Trichoderma reesi* 纖維水解酵素(cellulase) 利用碳二亞胺(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride，以下簡稱 EDC)與羥基琥珀亞胺(N-Hydroxysuccinimide，以下簡稱 NHS)以共價鍵結的方式固定於磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面，並探討添加 NHS 對固定化的影響、固定化最佳反應 pH 值、固定化最佳比例及固定化酵素重複利用能力。本研究製備之核心顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒徑為  $9.4 \pm 2.5$  nm；飽和磁化強度為 65.2 emu/g，在包覆  $\text{SiO}_2$  層後顆粒粒徑增加至  $18.8 \pm 3.6$  nm；飽和磁化強度則下降至 20.0 emu/g。核心  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  顆粒及包覆  $\text{SiO}_2$  層之  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  顆粒晶相皆為磁鐵礦相。固定化程序中，添加 NHS 對固定化效果較佳，而最佳酵素固定化 pH 值為 pH 4，酵素、顆粒、NHS、EDC 之最佳比例為 0.36:4:0.75:1(wt/wt)，最佳固定化蛋白質量可達 3.8 mg/g。固定化酵素活性測試方面第一週其酵素活性約 12.32 U/mg，重複利用至第八週酵素活性可維持第一週的 37.63%。從這些結果可以得出結論，藉由 EDC/NHS 以共價鍵結方式將纖維水解酵素固定化於磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面是一種可顯著提高纖維水解酵素重複利用性之新穎方法。

**關鍵字:** 氧化鐵( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )奈米顆粒、酵素固定化、羥基琥珀亞胺、碳二亞胺、纖維水解酵素

# Abstract

In this study magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticle was prepared first by co-precipitation method and a silica shell was then coated on the surface of magnetic nanoparticles ( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) by sol-gel method. Characterization of synthesized  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were analyzed by TEM, SQUID and XRD. Commercial cellulase produced from *Trichoderma reesi* was immobilized onto the  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles by covalent binding via (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethyl carbodiimide hydrochloride, EDC) and (N-Hydroxysuccinimide, NHS). Immobilization of cellulase in the presence or absence of NHS, the optimal pH, optimal ratio for enzyme:particles:EDC:NHS and reusability were investigated. Sizes of the magnetic nanoparticle  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  were  $9.4 \pm 2.5$  nm and  $18.8 \pm 3.6$  nm. Saturation magnetization of the magnetic nanoparticles  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  was 65.2 emu/g and 20.0 emu/g. The core particles  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and silica-coated nanoparticles  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  were all magnetite. The optimal conditions for cellulase immobilization with NHS, optimal ratio for cellulase : particles : NHS : EDC is 0.36:4:0.75:1(*wt/wt*), optimal pH for enzyme immobilization is pH 4, optimal cellulase immobilized amount is 3.8 mg/g. Specific activity of immobilization cellulase was 12.21 U/mg in the first week. The immobilized cellulase maintained 37.6 % activity even after eight weeks of reuse. From these results, it can be concluded that the immobilization of cellulase onto magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticle with covalent binding via EDC/NHS is a novel method to significantly improve the reusability of cellulase.

**Keywords:** iron oxide nanoparticle, enzyme immobilization, EDC, NHS, cellulase

# 目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
表目錄	VIII
圖目錄	IX
第一章 前言	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	2
第二章 文獻回顧	3
2.1 能源現況	3
2.2 再生能源現況	4
2.3 生質能源	6
2.4 木質纖維素及前處理方法	6
2.4.1 機械粉碎法	7
2.4.2 氫纖維爆破(AFEX)	7
2.4.3 蒸氣爆破法 (Stream explosion, STEX)	8
2.4.4 二氧化碳爆破法 (CO <sub>2</sub> Explosion)	8
2.4.5 微波加熱前處理法	8
2.4.6 稀酸前處理	9

2.5 纖維水解酵素	10
2.5.1 內切型纖維酵素 (Endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase)	12
2.5.2 外切型纖維酵素 (Exo- $\beta$ -1,4-D-glucanase)	12
2.5.3 $\beta$ -葡萄糖苷酵素 ( $\beta$ -1,4-D-glucosidase)	12
2.6 磁性奈米材料簡介	13
2.6.1 磁性原理	13
2.6.2 磁性顆粒製備方法	14
2.6.2.1 共沉澱法(Co-precipitation)	15
2.6.2.2 熱解法(Thermal decomposition)	15
2.6.2.3 微乳化法(Microemulsion)	16
2.6.2.4 水熱法(Hydrothermal synthesis)	16
2.6.3 磁性顆粒表面保護層	18
2.6.3.1 包覆界面活性劑於顆粒表面	18
2.6.3.2 包覆界無機矽氧化物於顆粒表面	19
2.6.4 探討材料特性原理	20
2.6.4.1 超導量子干涉儀(SQUID)	20
2.6.4.2 X-ray 繞射光譜儀(XRD)	21
2.6.4.3 傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)	24
2.7 酵素固定化	24

2.7.1 擔體鑿結法(carrier binding)·····	24
2.7.2 交聯法(cross-linking)·····	25
2.7.3 包埋法(entrapping method)·····	25
2.8 磁性顆粒在酵素固定化發展·····	28
第三章 實驗方法與材料·····	32
3.1 實驗藥品·····	32
3.2 實驗設計與流程·····	32
3.3 磁性奈米顆粒之製備·····	34
3.3.1 共沉澱法(co-precipitation method)製備 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ·····	34
3.3.2 溶膠-凝膠法製備 $\text{SiO}_2$ 包覆 $\text{Fe}_3\text{O}_4(\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4)$ ·····	34
3.3.3 磁性奈米顆粒特性分析·····	35
3.4 酵素固定化·····	35
3.4.1 固定化流程·····	35
3.4.2 探討最佳固定化 pH 值·····	36
3.4.3 探討最佳固定化比例·····	36
3.5 酵素活性測試·····	36
3.5.1 商用 <i>Trichoderma reesei</i> 纖維水解酵素活性與特性·····	36
3.5.1.1 最佳反應溫度·····	36
3.5.1.2 最佳反應 pH 值·····	37

3.5.1.3 纖維水解酵素類型	37
3.5.2 固定化酵素活性測試	37
3.5.3 固定化酵素對固體基質之活性測試	37
3.6 分析方法	38
3.6.1 纖維水解酵素活性測定	38
3.6.2 蛋白質濃度測定	38
3.6.3 高效能液相層析儀(HPLC)分析酵素反應產物	39
第四章 結果與討論	40
4.1 磁性奈米顆粒之特性	40
4.1.1 顆粒結構與粒徑分布	40
4.1.2 磁性奈米顆粒之磁性大小	40
4.1.3 X-ray 繞射光譜儀 XRD	43
4.2 商業纖維水解酵素特性	44
4.2.1 最佳反應溫度	45
4.2.2 最佳反應 pH 值	45
4.2.3 利用不同基質測試商業纖維水解酵素的酵素活性	45
4.3 固定化酵素最佳化	47
4.3.1 有無添加 NHS 對酵素活性之影響	47
4.3.2 酵素固定化最佳 pH 值	49

4.3.3 最佳固定比例	49
4.4 固定化酵素特性分析	52
4.4.1 FTIR 分析	52
4.4.2 固定化酵素重複利用能力	54
4.4.3 固定化酵素對固體基質之活性測試	60
4.4.4 固定化酵素反映液相產物分析	60
第五章 結論與建議	64
5.1 結論	64
5.2 建議	65
參考文獻	66
附錄	71
附錄一 還原糖檢量線	71
附錄二 蛋白質檢量線	72
附錄三 葡萄糖檢量線	73
附錄四 纖維二糖檢量線	74

## 表目錄

Table 2-1 Percentage of global total electricity from renewable energy sources	5
Table 2-2 Composition of lignocellulose materials	9
Table 2-3 Comparison of different preparation method of magnetic nanoparticles	17
Table 2-4 Advantages and disadvantages of different enzyme immobilization methods	27
Table 4-1 Comparison of enzyme activity loss during immobilization process in this study and other studies	58
Table 4-2 Comparison of the immobilized enzyme reusability for this study and the other study.	59

## 圖目錄

Fig. 2-1 Schematic diagram of cellulose structure·····	10
Fig 2-2 Schematic diagram of hydrolysis of cellulose fiber by cellulase·····	11
Fig 2-3 Structure of sodium carboxymethyl cellulose·····	12
Fig 2-4 Schematic representation of Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> core particle coated by SiO <sub>2</sub> net layer·····	20
Fig 2-5 Internal structure schematic of superconducting quantum interferometer·····	22
Fig 2-6 Bragg's Law·····	23
Fig 2-7 Types of enzyme immobilization·····	26
Fig 2-8 Immobilization of cellulase by covalent bounding via EDC and NHS·····	31
Fig 3-1 Flowchart of this study.·····	33
Fig 4-1 TEM photomicrograph and size distribution of Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> and SiO <sub>2</sub> /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·····	41
Fig 4-2 Magnetization curves of Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , SiO <sub>2</sub> /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> and enzyme/ SiO <sub>2</sub> /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·····	42
Fig 4-3 XRD curves for Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> JCPDS standard curve, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> and SiO <sub>2</sub> /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·····	43
Fig 4-4 Temperature effect on free <i>Trichoderma</i> cellulase.·····	44

Fig 4-5 Comparison of <i>Trichoderma</i> cellulase activity by different pH's	46
Fig 4-6 Comparison of exoglucanases, endoglucanases and $\beta$ -glucosidases activity by using different substrate	46
Fig 4-7 Enzyme activity of immobilized cellulase via EDC	48
Fig 4-8 Quantity of immobilized enzyme via NHS	48
Fig 4-9 Effect of pH (pH 3~8) on enzyme immobilization	50
Fig 4-10 Comparison of different enzyme : particles ratio for immobilized cellulase amount	50
Fig 4-11 Comparison of different NHS : EDC ratio for immobilized cellulase activity	51
Fig 4-12 FTIR spectrum of cellulase, magnetic nanoparticles and immobilized cellulase	53
Fig 4-13 Activity of free and immobilized cellulase	57
Fig 4-14 Activity loss over 8 weeks of cellulase immobilized on $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanoparticle via NHS	57
Fig 4-15 Comparison of water soluble and non-water soluble substrate (CMC and $\alpha$ -cellulose) for immobilized cellulase activity	61
Fig 4-16 HPLC spectrums of control and immobilized cellulase reaction	62

Fig 4-17 Concentrations of glucose and cellobiose from CMC hydrolysis  
by immobilized *Trichoderma* cellulase.....63

# 第一章 前言

## 1.1 研究動機

隨著全球人口不斷增加以及科技文明持續進步與發展，人類對於能源的需求與日據增。石化燃料是目前最主要的能源之一，例如：石油、煤、天然氣等等。在長期依賴石化燃料的情況下，地球上的石化燃料蘊藏量已出現短缺的問題，且使用石化燃料會產生  $\text{CO}_2$ 、 $\text{SO}_x$ 、 $\text{NO}_x$ 、 $\text{C}_x\text{H}_x$  等全球暖化與空氣污染等環境污染的問題也慢慢獲得各界重視(Cheng and Sun, 2002)。

為解決能源危機的問題，尋找及開發替代能源已是當務之急，譬如：太陽能、風力、地熱、生質能、水利等等。生質能(Bioenergy)是以生物質為原料轉換成可利用的能源，是一種不產生污染物，且對環境相當友善的替代能源。纖維素是陸地上最常見的有機聚合物，普遍存在於植物細胞壁中，台灣每年產生大量富含纖維素之農業廢棄物，多數農業廢棄物都以自家焚化方式處理，不但浪費且產生空氣污染的問題，若將大量纖維素廢棄物轉化成生質能源利用，不但可以增加替代能源的使用，同時也可以減少廢棄物產生的環境汙染問題。

以往在處理含有纖維素之廢棄物的過程中，是直接利用具纖維水解能力之微生物將纖維素水解，並將培養液進行暗發酵產生甲烷或乙醇等生質能源。但微生物在水解纖維素的過程中會消耗部分能量供其代謝或生長，減少暗發酵過程中產生的能源。若直接利用纖維水解酵素進行纖維素水解不但可以減少微生物生長過程中損失的能量，提高生質能源的產量以外；也可增加纖維水解的效率提高纖維廢棄物的經濟價值(Chen *et al.*, 2007)。

雖然直接利用纖維水解酵素來進行纖維素水解反應可以提高效率與減少能量消耗，但水溶性生物酵素可能會因為溫度、pH 值等環境因素改變而

降低或失去活性，且水溶性酵素無法從反應溶液中回收重複利用。若將酵素固定在固體材料上可以提高酵素對於溫度及 pH 等不同環境的穩定性，並且方便於回收再利用以增加酵素的經濟價值(Hong *et al.*, 2008、Sahoo *et al.*, 2011)，在纖維廢棄物暗發酵產生生質能源的領域提供了另一個思維以及突破發展的可能性。

## 1.2 研究目的

本研究自行合成附有二氧化矽層之磁性奈米氧化鐵顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )，並將商業用 *Trichoderma ressi* 纖維水解酵素利用碳二亞胺(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)以及羥基琥珀亞胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)以共價鍵結方式固定於磁性奈米顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )表面。探討最佳固定化方法以及固定化酵素活性、特性及重複利用能力。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 能源現況

長久以來人類的科技文明仰賴著石化燃料的開發與利用，而其價格也深刻的影響各種物資國際市場的情勢。而從石油輸出國組織(Organization of the Petroleum Exporting Countries; OPEC)於1960年初訂定國際原油公認價格為3美元/桶，然而在經過1973年為抵制以色列而實施原油禁運；1978年伊朗發生政變；1998年兩伊發生戰爭造成油價大漲，截至今日以來國際原油價格已經上漲到非常驚人的100美元/桶(OPEC, 2013；何，2012)。

石化燃料為千萬年以前生存於地表的動物、植物死亡後，隨著地殼變動，埋藏於地底深處經高壓、加熱而形成，需要非常長的時間。而人類為了科技的文明與生活便利，快速且過度的開發，使石化燃料日益枯竭，造成不可逆的能源危機。在目前技術與成本限制之下，預估至2010年底世界傳統石油蘊藏量為1.38兆桶，估計可再使用46.2年(BP, 2011)。因此現行石化燃料已無法供給人類生活與科技文明之永續發展。

石化燃料不但在儲存量上發生問題，使用石化燃料所排放的碳氫化合物、硫氧化合物、氮氧化合物皆直接或間接造成空氣污染或轉移至水體及土壤中造成二次污染。而有機物經完全氧化(燃燒)後即形成二氧化碳，大量的二氧化碳排放被認為是現今全球暖化與氣候變遷的主要原因(Joos, 1999)。

因此開發再生能源(Renewable energy)來取代石化燃料或補足石化燃料不足之缺口將是科技文明永續發展一個很重要的課題。國際環境規劃署(United Nations Environment Programme; UNEP)定義再生能源係指能取之不盡的天然資源，使用過程中不會產生污染物。例如太陽能、風能、生質能等。雖然目前再生能源發展技術不夠成熟，暫時無法替代石化燃料，但期望科技不斷進步的同時，再生能源技術也能持續發展進而替代已近枯竭

的石化燃料，使人類科技文明能永續發展。

## 2.2 再生能源發展現況

根據國際能源署(International Energy Agency, IEA)預測資料顯示：全球發電量將由 2005 年的 18.2 兆度增加至 2030 年的 35.38 兆度，年成長率為 2.7%，其中再生能源發電量將由 2005 年的 3.32 兆度(佔總發電量的 18.3%)增加至 2030 年的 7.31 兆度(佔總發電量的 20.7%)，年成長率為 3.2%。由再生能源發電量成長率 3.2% 超過全球總發電量成長率 2.7% 可得知再生能源技術日益成長。其中水力發電在 2005 年時發電量為 2.92 兆度，在 2015 年時可增加至 3.8 兆度，2030 年時可增加至 4.84 兆度，年成率為 2.0%。生質能源發電在 2005 年時發電量為 0.23 兆度，2015 年增加至 0.41 兆度，2030 年時可增加至 0.84 兆度，年成長率為 5.3%。風力發電在 2005 年時發電量為 0.11 兆度，2015 年時成長到 0.55 兆度，2030 年將成長到 1.29 兆度，年成長率為 10.3%。太陽能發電從 2005 年只有 0.003 兆度，2015 年可成長到 0.037 兆度，2030 年則可成長到 0.16 兆度，年成長率達 16.9%。由此可以看出再生能源在全球能源供給量所佔的比例從過去到未來的預測發展趨勢已經有穩定的成長(Table 2-1) (IEA, 2007)。

Table 2-1 Percentage of global total electricity from renewable energy sources.

	2005 年	2015 年	2030 年	2005-2030 年成長率
總發電量	18,197	25,556	35,384	2.7%
非再生能源 (佔總發電量的百分比%)	14,876 (18.7%)	20,664 (80.9%)	28,068 (79.3%)	2.6%
再生能源 (佔總發電量的百分比%)	3,321 (18.3%)	4,892 (19.1%)	7,315 (20.7%)	3.2%
水力 (佔總發電量的百分比%)	2,922 (16.1%)	3,799 (14.9%)	4,842 (13.7%)	2.0%
生質能 (佔總發電量的百分比%)	231 (1.3%)	407 (1.6%)	840 (2.4%)	5.3%
風力 (佔總發電量的百分比%)	111 (0.6%)	549 (2.1%)	1,287 (3.6%)	10.3%
太陽能 (佔總發電量的百分比%)	3 (0.02%)	37 (0.1%)	161 (0.5%)	16.9%

(單位:10 億度)

## 2.3 生質能源

生質能係指以自然界的生物質(biomass)作為燃料或用以提煉燃料。生質能為人類最早使用的能源，燒柴煮飯即為生質能源的利用之一。生質能源的發展依據其原料不同而分成三個世代:第一代生質能源使用玉米、馬鈴薯、小麥等作為原料，第二代生質能源使用稻稈、麥稈等作為原料，第三代生質能源則是大量培養藻類細胞作為原料(UNEP, 2009)。

第一代生質能源為利用玉米、小麥、馬鈴薯等糧食作物為原料生產酒精、生質柴油等，雖然好分解速率快，但因其為人類糧食作物，能源發展與糧食競爭使物價上漲不符合經濟效益。第二代生質能源利用農業廢棄物為原料(如木質纖維素)，雖然技術上較為複雜，且速率較慢，但因其為將廢棄物轉換成能源，不與人類糧食競爭且達環境永續發展之目的，因此第二代生質能源已成為未來生質能源發展的趨勢。

## 2.4 木質纖維素及前處理方法

纖維素是地球上含量最豐富的有機聚合物，是植物細胞壁中主要組成成分。纖維素為葡萄糖分子所組成的多醣體，平均每分子纖維素中約含有10,000分子葡萄糖單體。其中單醣與單醣之間以 $\beta$ -1,4 糖苷鍵結組成長鏈，長鏈之間又以氫鍵連結形成束狀晶體，如 Fig. 2-1 所示。而植物細胞壁中以半纖維素以及木質素包覆在纖維素外，形成木質纖維素(Lignocellulose)之結構(Mathew *et al.*, 2008)。

在第二代生質能源的發展中，木質纖維素必須先經過前處理的步驟使纖維素結晶暴露出來，以利後續處理。木質纖維素前處理步驟包括酸處理、鹼處理、氮氣爆破等(Chen and Zhao, 2013)。經過前處理步驟之後纖維素結晶因其結構依然穩定，須經生物方法(微生物或酵素)催化其水解反應產生單醣，因此在整個以纖維素暗發酵產生能源的過程之中，纖維素水解為其

速率決定步驟。而利用纖維水解酵素催化其水解反應不但效率較微生物處理快，且不產生廢棄物及污染物質，是非常環境友善之技術(Zhang *et al.*, 2011)。

第二代生質能源所利用的纖維物料如稻稈、麥稈、玉米梗、蔗渣、狼尾草及柳枝稷等。其中稻稈的木質纖維部分包含半纖維素20.6%、纖維素24.7%以及木質素7.7%。麥稈包含半纖維素25.8%、纖維素41.2%，以及木質素21.3%。玉米梗包含半纖維素35%、纖維素45%以及木質素15%。蔗渣包含半纖維素26.0%、纖維素52.4%以及木質素12.7%。狼尾草包含半纖維素33.7%、纖維素45.7%及木質素20.6%。柳枝稷包含半纖維素10~40%、纖維素30~50%以及木質素5~20%(Table 2-2)(涂，2010)。上述纖維廢棄物雖然都具有很高的纖維素組成，可利用於生產酒精、氫氣及甲烷等生質能源之原料，但其纖維素外部皆包覆有半纖維素及木質素等微生物較難分解的物質，因此在利用微生物作用分解這些纖維物料之前需要以前處理的步驟將半纖維素與木質素去除(Mosier *et al.*, 2005)。

常見的前處理法有機械粉碎法、氫纖維爆破 (AFEX)、蒸氣爆破法 (STEX)、二氧化碳爆破法、微波加熱前處理法、稀酸前處理等(Mosier *et al.*, 2005)。

#### 2.4.1 機械粉碎法

機械粉碎法即所謂的輾磨法，將木質纖維物料磨成粉末，使其與酵素接觸的面積增加且破壞纖維素的晶體結構進而加速酵素的分解速率，一般材料在經過研磨後尺寸可縮小至0.2~2 mm (millett, 1976)。

#### 2.4.2 氫纖維爆破(AFEX)

將纖維物料置於高溫、高壓的液態氫環境下，經過30分鐘左右處理後，使纖維素結構與晶型形態改變，並利用快速減壓的過程使木質纖維產生爆破。雖然氫纖維爆破法對硬木有較顯著的效果，對於草本植物或農業廢棄

物的處理效果不如其他前處理方法，且在經過氫纖維爆破處理後半纖維素無法完全處理，需另外使用半纖維素酶處理，但其不產生有害物質，較為環境友善(Balan *et al.*, 2009)。

### 2.4.3 蒸氣爆破法 (Stream explosion, STEX)

蒸氣爆破法是將木質纖維物料利用高溫、高壓的水蒸氣處理一段時間後，利用快速減壓的方式使其爆破，因此造成木質素與半纖維素的分子鍵斷裂，也部分破壞纖維素的晶體結構。木質纖維素在經過蒸去爆破後其纖維水解效率可達到90%。影響蒸氣爆破前處理的因素包括蒸氣停留的時間、溫度、木質纖維物料的體積大小與含水量等(Duff and Murray, 1996)。蒸汽爆裂法的優點是耗能低，可批式或連續式操作，主要適合於硬木原料和農作物秸稈，但對軟木的效果較差(Clark and Mackie, 1987)；其缺點是木糖損失多，容易產生對發酵有害的物質。

### 2.4.4 二氧化碳爆破法 (CO<sub>2</sub> Explosion)

二氧化碳爆破法其原理與蒸汽爆破、氫纖維爆破法類似，在纖維素前處理中也是屬於常見的方法。是將原物料暴露於二氧化碳之中，藉由高壓讓纖維素分解。Dale and Moreita在研究中指出在壓力5.6 M Pa、每公斤原料使用4公斤二氧化碳下進行處理，使纖維素在24小時內水解產生75 %的葡萄糖。

### 2.4.5 微波加熱前處理法

微波是高頻率 ( $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^5$  M Hz) 的電磁波。微波加熱是通過微波發生器產生一個高頻振盪的交變外加電場，使置於該電場中的極性分子亦以同樣的頻率作電場極性擺動，通過極化作用把部分電磁能轉化為分子熱運動的動能，而使分子運動加劇，最終使物質溫度升高，達到加熱目的。利用微波處理木質纖維素，可使纖維素分子間的氫鍵

發生變化，破壞纖維素的結構，以促進後續酵素水解反應進行(徐，2009)。

#### 2.4.6 稀酸前處理

稀酸前處理法作用原理為於高溫高壓下添加稀硫酸，利用酸劑釋出的氫離子分解半纖維素與木質素。其操作溫度多介於160~190°C，稀硫酸濃度介於0.5~1.5%。稀酸水解法的適用範圍很廣，於木材、農業廢棄物、草本作物等大多數種類的纖維生質原料均有不錯的效果。此外稀酸水解法於大規模應用上的限制主要包括稀酸腐蝕性、產生發酵抑制物及需要酸鹼中和等問題。

Table 2-2.Composition of lignocellulose materials

Materials	Composition of lignocellulose (%)		
	Lignin	Hemicellulose	Cellulose
Rice straw	7.7	20.6	24.7
Wheat straw	21.3	25.8	41.2
Corn stover	15	35	45
Bagasse	12.7	26.0	52.4
Napier grass	20.6	33.7	45.7
Switch grass	5~20	10~40	30~50

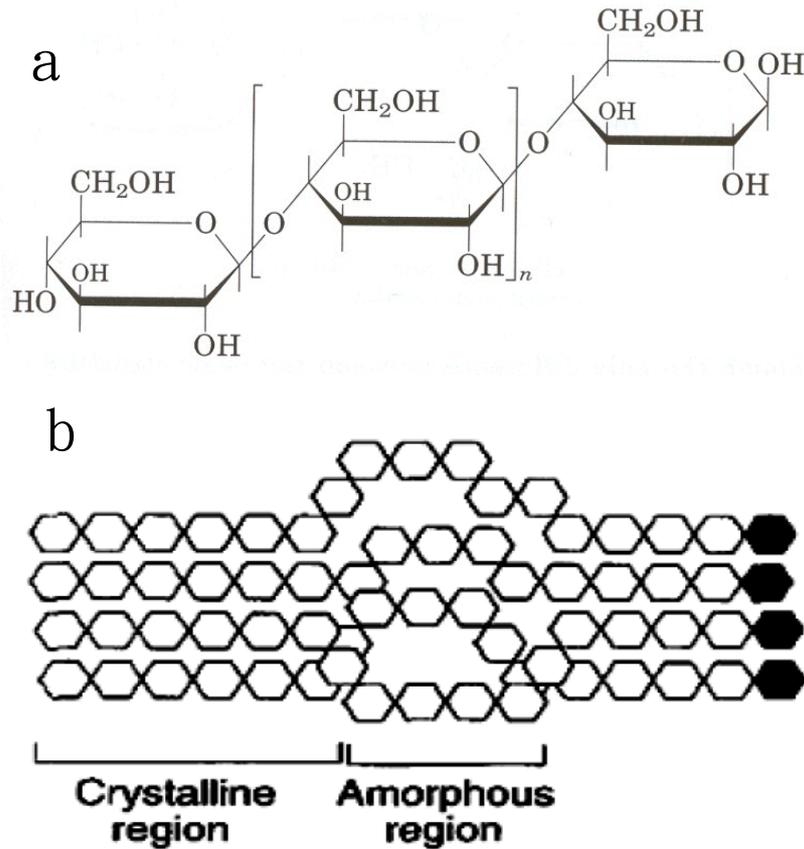


Fig. 2-1 Schematic diagram of cellulose structure. (a)  $\beta$ -1,4 glucosidic linkage of glucose. (b) Crystalline and amorphous region of cellulose fibers.

## 2.5 纖維水解酵素

纖維水解酵素 (cellulase) 為一群共同作用於纖維素，協力將纖維素水解之酵素的總稱，依據其作用位置不同，可分為內切型纖維酵素 (Endoglucanase)、外切型纖維酵素 (Exoglucanase) 以及  $\beta$ -葡萄糖苷酵素 ( $\beta$ -glucosidase)。纖維素水解反應係為以上三種酵素各別作用於纖維素特定區域而協力完成之反應，其示意圖於 Fig. 2-2 所示 (Zhang *et al.*, 2006)。

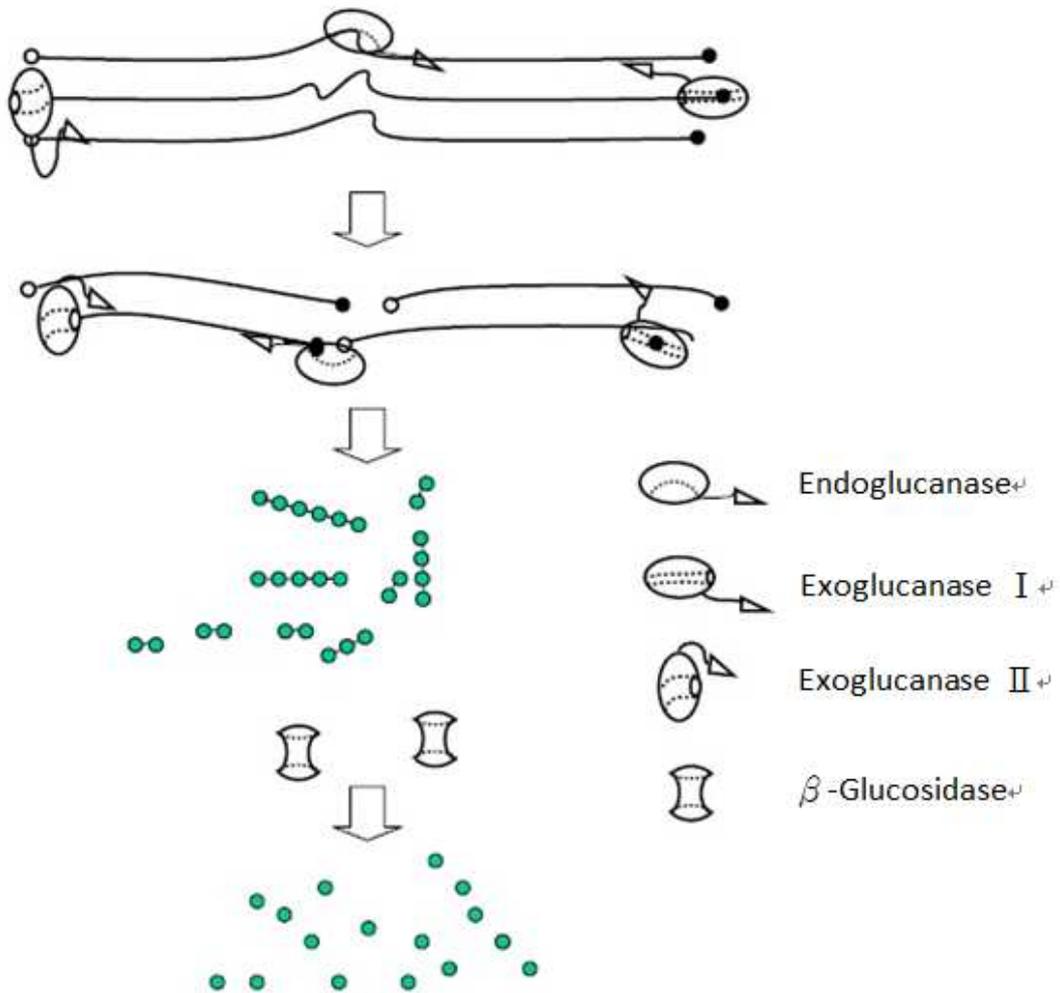


Fig.2-2 Schematic diagram of hydrolysis of cellulose fiber by cellulase. Endoglucanases hydrolyze intermolecular  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds of cellulose chains randomly, exoglucanases cleave cellulose chains at the ends to release soluble cellobiose, and  $\beta$ -glucosidases hydrolyze cellobiose to release glucose. The solid circles represent reducing ends, and the open circles represent non-reducing end.

### 2.5.1 內切型纖維酵素(Endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase)

內切型纖維酵素的作用位置是在纖維素的非尾端，也就是從纖維素長鏈中將 $\beta$ -1,4 糖苷鍵水解進而切斷纖維素長鏈，且只針對非晶型區域有作用。在測定內切型纖維酵素的活性時，可以使用羧甲基纖維素鈉(Sodium carboxymethyl cellulose, CMC)為基質(Zhang *et al.*, 2006)，因為 CMC 其長鏈上的(-OH)被(-OCH<sub>2</sub>COONa)所取代(如 Fig. 2-3 所示)，使纖維素長鏈之間無法結合成晶型結構且可溶於水中(Heinze and Pfeiffer, 1999)。

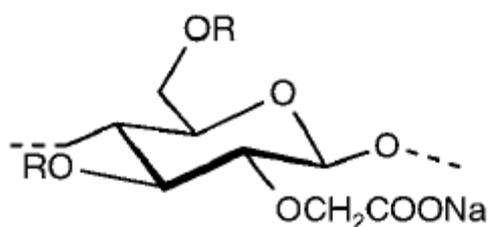


Fig.2-3 Structure of sodium carboxymethyl cellulose. R represent H atom or CH<sub>2</sub>COONa.

### 2.5.2 外切型纖維酵素(Exo- $\beta$ -1,4-D-glucanase)

外切型纖維酵素的作用位置是在結晶型纖維素的尾端，又可分為作用於還原端(cellobiohydrolyase I, CBH I)或是作用於非還原端(cellobiohydrolyase II, CBH II)，以纖維二糖為單位對結晶型纖維素之 $\beta$ -1,4 糖苷鍵進行水解。可使用 Avicel 為基質測定外切型纖維酵素的活性(Zhang *et al.*, 2006)。

### 2.5.3 $\beta$ -葡萄糖苷酵素( $\beta$ -1,4-D-glucosidase)

經過上述兩種酵素反應後產生纖維二糖， $\beta$ -葡萄糖苷酵素則可將纖維二糖水解成兩個葡萄糖單體。在測定 $\beta$ -葡萄糖苷酵素的活性時除可利用纖維二糖為基質以外，還有例如 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside ( $p$ -NPG)

這種類纖維二糖之化合物來測量其活性。

## 2.6 磁性奈米材料

近年來磁性奈米顆粒在生物科技、醫藥、化工等領域逐漸被重視與探討，因其具磁性容易回收、高比表面積增加效率以及顆粒表面易改質以進行不同應用等優點。

### 2.6.1 磁性原理

物質皆由各種原子所組成，而原子又以原子核與電子組成，電子會不斷地繞著原子核之特定軌道旋轉，電子本身也會自旋。而物質之磁性來自於電子繞著原子軌道旋轉所產生的磁矩( $m_0$ )以及電子本身自旋所產生的磁矩( $m_s$ )。不同物質內部的原子包含了不同的磁矩成分及磁矩方向，因此造成了不同的磁性材料；依照材料內部磁矩的排列方式可分為五種不同的磁性材料：鐵磁性(Ferromagnetism)、反鐵磁性(Antiferromagnetism)、順磁性(Paramagnetism)、反磁性(Diamagnetism)、陶鐵磁性(Ferrimagnetism)(滿，2010)。

鐵磁性材料中的每個原子都具有很大的磁矩，因原子間的作用力使在特定區域內(磁區，magnetic domain)其原子間的磁矩整齊的平行排列。因在材料中各個磁區的磁矩方向不一致，其磁矩相互抵消而使材料整體無磁矩呈現。當有外加磁場存在時，大部分的磁矩方向會變得與外加磁場的磁矩方向相同，而當外加磁場離開後，其各磁區的磁矩方向不會回到原本隨意的排列方式，因而在巨觀的結構上殘留磁性，此現象稱為磁滯現象(hysteresis)。

反鐵磁性材料中相鄰近的原子磁矩反方向平行排列，使磁矩互相抵銷而使淨磁矩為零，且當有外加磁場時，反鐵磁性材料只受到稍微影響。通常反鐵磁材料指出現在相當低的溫度當中。

順磁性材料中每個原子皆為一個磁矩，互相獨立無交互作用，其排列

散亂無一定方向，因此在巨觀上順磁性材料無磁性呈現。當有外加磁場出現時，其磁矩方向會變得與外加磁場的磁矩方向相同，因而產生磁性。當外加磁場離開後，所有磁矩又回到原本散亂的方向，因此無磁滯現象產生。

一般顆粒由多個磁區所組成，磁化現象是經由磁壁的移動所形成。當顆粒的直徑小於一臨界直徑( $D_s$ )時，則其不再分磁區，為單一磁區，以  $Fe_3O_4$  為例， $D_s = 40$  nm。鐵磁性材料之磁化是由電子成對的自旋動能所產生，其動能以  $KV$  表示， $V$  為顆粒體積；當顆粒小至動能  $KV$  小於熱能  $KT$  時，則熱能將瓦解這些動能，磁化方向隨機分佈，此臨界粒徑為  $D_p$ 。當無外加磁場情況下磁性材料不再具有磁性，亦不具有磁滯現象，當外加磁場存在時，其磁性又逐漸到達飽和磁化量。此時稱為超順磁材料。以  $Fe_3O_4$  為例， $D_p = 24$  nm。

反磁性材料中相鄰原子間的作用力使原子磁矩反平行排列，其淨磁矩為零，在外界磁場作用下，原子並沒有承受磁力矩，因此其磁場不受外界干擾，材料內磁場就等於外界磁場。

陶鐵磁性物質內部磁矩排列方式與反磁性材料排列相同，皆為反向平行排列，但平行排列的磁矩大小不同，淨磁矩不為零，因此磁化率大於反磁性材料，小於鐵磁性材料，且具有磁滯現象。

## 2.6.2 磁性顆粒製備方法

磁性顆粒在不同的應用上有很多不同的種類，諸如氧化鐵顆粒(例如： $Fe_3O_4$ 、 $\gamma-Fe_2O_3$ )、尖晶石型態的磁鐵礦(例如： $MgFe_2O_4$ 、 $MnFe_2O_4$ 、 $CoFe_2O_4$ )以及合金的型態(例如： $CoPt$ 、 $FePt$  等)。而在製備顆粒的過程中也有各種不同的方法(例如共沉澱法、熱解法、微乳化法以及水熱法)，各種製備方法各有優缺點以及不同的目的(Liu *et al.*, 2007)。

### 2.6.2.1 共沉澱法(Co-precipitation)

共沉澱法是一個簡便且傳統的程序來製備氧化鐵顆粒( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )。以  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  在惰性氣體(如氮氣)中加入鹼性溶液(如氨水或氫氧化鈉)，並加熱升溫進行成核反應。以共沉澱法所製備的磁性顆粒其粒徑大小、形狀及組成取決於  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  的比例、反應 pH 值、反應溫度以及所使用的鹽類種類(例如： $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^{2-}$ )。而顆粒粒徑的大小與分散性控制是共沉澱法成功與否的關鍵。在加入鹼性溶液進行成核反應時溫度必須控制在  $85^\circ\text{C}\sim 90^\circ\text{C}$ ，若反應溫度不夠則顆粒的粒徑大小與分散性將無法準確的控制。以共沉澱法製備的磁鐵礦相奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒徑約為  $2\sim 8\text{ nm}$ 。

磁鐵礦相奈米顆粒(magnetite nanoparticles,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )在一般環境中並不穩定，容易被氧化成赤鐵礦 (maghemite)或溶於酸性溶液中而破壞其結構，除了在顆粒相表面包覆保護層外，可在顆粒被氧化成赤鐵礦相後再加入  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  製成較穩定的 maghemite nanoparticle ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )。

### 2.6.2.2 熱解法(Thermal decomposition)

熱解法是利用金屬有機化合物(metal acetylacetonates,  $[\text{M}(\text{acac})_n]$ ,  $\text{M}=\text{Fe}, \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cr}$ ;  $n=2$  or  $3$ )與高沸點的有機溶劑以及穩定的介面活性劑加熱至高溫( $100^\circ\text{C}\sim 300^\circ\text{C}$ )可形成高品質的半導體金屬晶體，可應用於資料儲存的材料上。而在加熱過程中加入氧化物質例如： $[\text{trimethylamine oxide}, (\text{CH}_3)_3\text{NO}]$ 也可以製作成金屬氧化物之奈米顆粒(例如： $\text{Fe}_3\text{O}_4$  及  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )。奈米顆粒的大小與型態取決於金屬有機化合物、有機溶劑與介面活性劑之間的比例，除此之外反應溫度、反應時間也是控制顆粒大小與型態的另一個關鍵因素。

### 2.6.2.3 微乳化法(Microemulsion)

微乳化法是將兩種穩定且不混溶的液體混合，並加入界面活性劑使其成為微小且分散的微粒(粒徑約 1 nm~50 nm)。在混合的過程中微粒經過碰撞，合併，再分裂的過程中產生固體奈米顆粒沉澱物，並利用離心或過濾收集之。

以  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  奈米顆粒為例，含有  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$  與  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  的水加入界面活性劑(sodium dodecylbenzenesulfonate, NaDBS)，隨後加入大體積的甲苯使兩者混合形成微粒而製造出粒徑約 4 nm~15 nm 的  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  奈米顆粒。 $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  奈米顆粒粒徑大小與型態取決於水與甲苯的體積比。

### 2.6.2.4 水熱法(hydrothermal synthesis)

水熱法是在密封的壓力容器中，以水作為溶劑在高溫、高壓的環境下進行快速的將金屬化合物氧化以製備奈米顆粒。以製作 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 奈米顆粒為例，金屬鐵和空氣中的水氧化反應非常緩慢，但如果在98 MPa、400°C的水熱條件下進行1小時反應則可完全氧化，得到9~12 nm的磁性奈米顆粒 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。而奈米顆粒的粒徑大小與型態則取決於反應溫度與反應時間。

上述四種為較常見的方法來製備各種不同的奈米顆粒，各有不同的優缺點與特性，Table 2-3列出各種方法的特性與反應條件。

Table 2-3 Comparison of different preparation method of magnetic nanoparticles.

Method	Process	Reaction temperature [°C]	Reaction period	Solvent	Surface-capping agents	Shape control	Yield
Co-precipitation	Inert condition	20~90	Minutes	Water	needed, added during or after reaction	not good	high
Thermal decomposition	Inert condition	100~320	Hours ~ days	Organic compound	needed, added during reaction	very good	high
Microemulsion	ambient conditions	20~50	Hours	Organic compound	needed, added during reaction	good	low
Hydrothermal synthesis	high pressure	220	Hours ~ days	Water or ethanol	needed, added during reaction	very good	medium

## 2.6.3 磁性奈米顆粒表面保護層

裸露的金屬(或金屬氧化物)奈米顆粒有很高的化學活性，若直接暴露於空氣中容易被氧化而失去其磁性。且磁性奈米顆粒容易因凡德瓦爾力(Van der Waals force)而聚集在一起，減少其分散性。在顆粒表面包覆上有機(例如:界面活性劑)或無機(例如:無機矽氧化物)的保護層可避免顆粒直接暴露於空氣中使其氧化而失去磁性，且可以增加磁性奈米顆粒於水溶液中的分散性。在核心顆粒外包覆保護層的結構稱為核-殼結構(core-shell structure)，核心的磁性顆粒為核(core)；在顆粒表面包覆的保護層為殼(shell)(Liu *et al.*, 2007)。

### 2.6.3.1 包覆界面活性劑於顆粒表面

界面活性劑為常用於包覆在磁性奈米顆粒的方式，可使顆粒表面帶有電荷，使顆粒形成分散且穩定的膠體(Liu *et al.*, 2007)。一種使用界面活性劑使磁性奈米顆粒保持穩定性及分散性常見的例子為磁流體(ferrofluids)的製備。磁流體是將磁性奈米顆粒完全均勻的懸浮於載流體(有機溶劑或水)中，使載流體呈現超順磁特性(Albrecht *et al.*, 1997)。但因為磁性奈米顆粒容易因凡德瓦爾力造成顆粒聚集在一起，使磁性顆粒與載流體分層，且若暴露於空氣中容易使磁性奈米顆粒氧化而造成磁流體失去磁性。因此在製備磁流體時可在磁性顆粒表面包覆界面活性劑[氫氧化四甲基銨(tetramethylammonium hydroxide, TMAOH)或過氯酸(perchloric acid)]使磁性奈米顆粒形成帶有正電荷的穩定膠體，可避免磁性奈米顆粒聚集，且具有很高的pH穩定性。市售商業化的磁流體在pH小於5或大於8的環境中皆可保持穩定(Liu *et al.*, 2007)。

### 2.6.3.2 包覆無機矽氧化物於顆粒表面

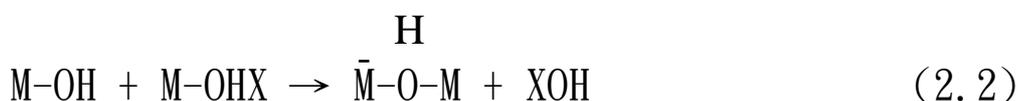
包覆無機矽於顆粒表面除了可以增加顆粒的穩定性外，因顆粒表面的矽酸層具有親水性特性，易於官能基化，因此在固定化領域(如酵素固定化、藥物吸附及螢光染劑吸附等)有很大的發展潛力(Liu *et al.*, 2007)。

溶膠凝膠法(Sol-gel method)是包覆無機矽最常用的方法，以無機聚合反應為基礎，以金屬醇(或金屬烷)氧化物或無機金屬化合物為前驅物，用以醇為溶劑，水為水解劑，來製備無機高分子化合物。在溶液中以中溫(40 °C)，500 rpm持續攪拌之下，前驅物將進行水解(hydrolysis)與聚縮合(polycondensation)反應(式2.1，式2.2)，變成溶膠(sol)，而繼續反應連結在一起，溶膠就在奈米顆粒表面凝固化而成為凝膠(gel)，乾燥與高溫鍛燒(500 °C)後使顆粒表面的凝膠結晶而形成網狀金屬氧化物(蔡，2002)。以本文為例，以共沉澱法製備Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>核心顆粒後，利用四乙氧基矽烷(Tetraethoxysilane, TEOS, C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>)為前驅物進行水解及聚縮合反應在Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>核心顆粒表面包覆網狀二氧化矽層(劉，2009)。其結構如Fig.2-4所示(Du *et al.*, 2006)。

水解反應是把烷氧基(OR)取代成羥基(OH)，誘發縮合反應。式中M為金屬原子，R為烷基。



聚縮合反應是將M-OH或M-OHX彼此聚合在一起進行縮合反應，形成鏈狀或網狀交聯的聚合物。式中X為H或烷基。



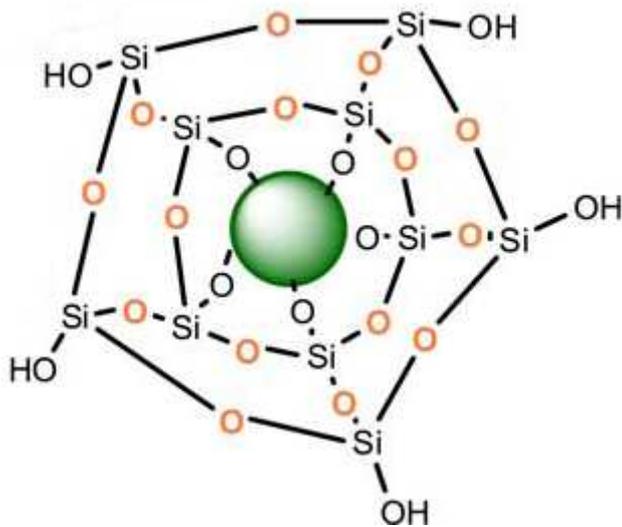


Fig.2-4 Schematic representation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  core particle coated by  $\text{SiO}_2$  net layer.

## 2.6.4 材料特性原理探討

在製備出無機的或有機的材料後，為了瞭解材料的特性(例如:磁性特性、內部晶相結構及表面官能基等)，因此必須利用超導量子干涉儀(Superconducting Quantum Interference Device, SQUID)、X-ray繞射光譜儀(X-ray Diffraction, XRD)及傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)等儀器輔助探討材料的特性。

### 2.6.4.1 超導量子干涉儀(SQUID)

超導量子干涉儀(Superconducting Quantum Interference Device, SQUID)是使超導線圈於超導態時對外在磁場的改變會有相對應的電流變化，此種變化較一般磁性物質都來的靈敏，因此可利用來感測外部磁場的變化。即是利用此種原理所製成的磁量測儀器。其內部設計如Fig. 2-5所示，為將樣品置於超導線圈內，施加一磁場，而後讓樣品往復進出線圈。樣品若對磁場有所感應，則會對週遭的磁場產生影響，而這種影響可由超導線圈的電流變化得知，進而得知樣品的磁性特性(陳，2004)。

根據電磁學原理(式2.3、式2.4及式2.5所示)， $V_{emf}$  是感應電動勢； $\Phi$  是磁通量； $L$ 是電感； $I$ 電流。由超導線圈感應磁場的變化，並以電流 $I$ 表現出來。由所得出的電流 $I$ 換算回磁通量改變而有電動勢 $V_{emf}$ 。所以只要量到感應線圈所產生的電動勢 $V_{emf}$ ，便可求得單位體積磁化量 $M$ ，再將 $M$ 除以外加磁場 $H$ ，便可得到磁化率 $X(X = \frac{M}{H})$ ， $X$ 除以Mole數便為每莫耳的磁化率 $X_m$ ，實驗時可控溫做磁化量( $M$ )對外加磁場( $H$ )的測量；也可在定磁場下做磁化量( $H$ )對溫度( $T$ )的測量。(陳，2004)。

$$V_{emf} = -\frac{d\Phi}{dt} \quad (2.3)$$

$$\Phi_{total} = \Phi_{sample} + LI \quad (2.4)$$

$$\Delta\Phi = -L\Delta I \quad (2.5)$$

#### 2.6.4.2 X-ray繞射光譜儀(XRD)

當帶電粒子在加速或減速的過程中，會釋放出電磁波，而在巨大加速過程中所放出之電磁波具有高能量，當其波長在 $10^{-12} \sim 10^{-8}$  m 則為X光。因此當以經高電壓加速之電子束撞擊陽極標靶，高速電子受到標靶原子的阻擋急劇停止下來，電子在這種非彈性碰撞過程中的能量損失部分轉變成X光子的能量，由於這些碰撞能以許多不同的方式發生，故會形成連續X光帶亦稱為白光(white radiation)光譜。當X射線被晶體內有規則的環境散射時，散射的光線間會產生干涉現象(同時發生建設性干涉以及破壞性干涉)，進而產生繞射。利用布拉格方程式(Bragg's law)，可以計算晶隔之間距離，

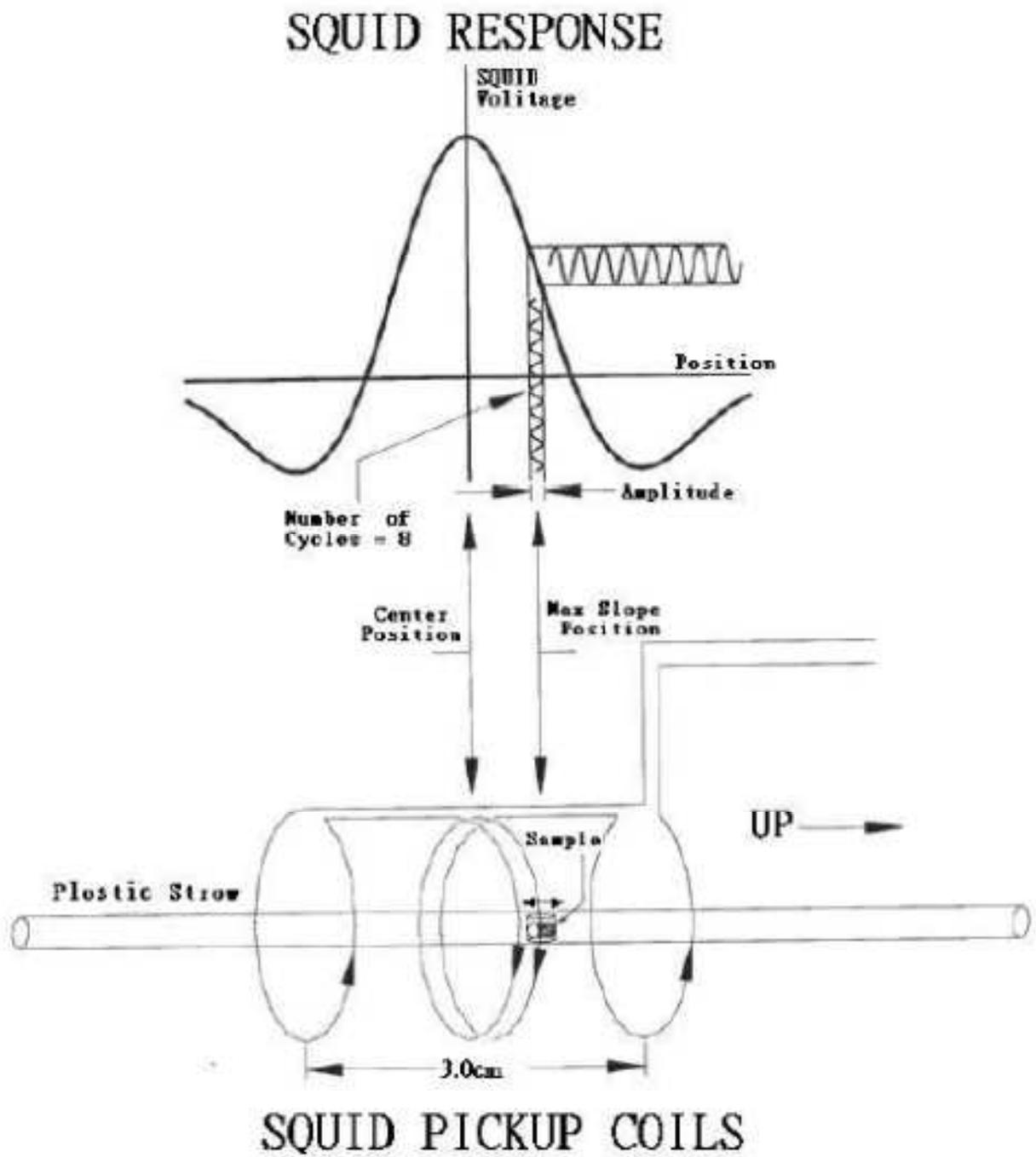


Fig.2-5 Internal structure schematic of superconducting quantum interferometer.

當X光照射晶體時，光束不僅由表面層之原子所反射，而且從相當深的原子層反射，所以建設性干涉僅發生在非常嚴格之條件下，有關這種條件的定律就是布拉格定律 (Bragg's Law) (Kahle *et al.*, 2002)。

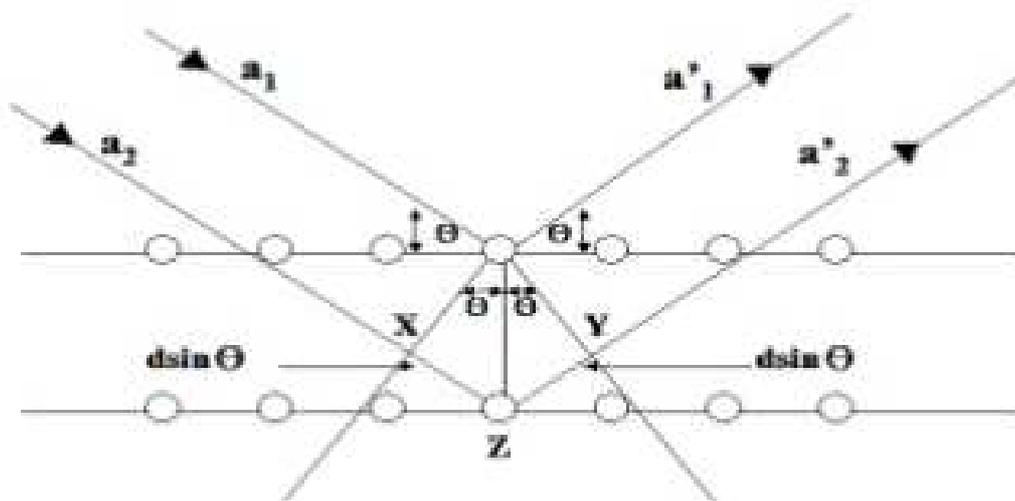


Fig. 2-6. Bragg's Law.

由Fig. 2-6可看出距離xz 及yz 均等於 $d\sin\theta$ ，故距離xz+yz等於 $2d\sin\theta$ ，如果這段路徑差等於波長整數倍 ( $n\lambda$ )，繞射訊號就會有建設干涉。

布拉格定律 (Bragg's Law):

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (2.6)$$

其中d為相鄰兩平面的距離； $\theta$ 為X光束之入射角或反射角； $\lambda$ 為X光波長。當此關係被滿足時，反射線 a'1 及 a'2 為同相，進而產生建設性干涉。當一束細窄之X光照射未變形之晶體時，產生建設性干涉之角度非常明確，這是因為反射係源自於千萬個平行的晶格面，在此種情況下，縱使稍偏離滿足關係式之角度，也會引起反射光的破壞性干涉。因此，離開晶體的反射光束非常細窄，可以在感光片上造成明確的影像(Kahle *et al.*, 2002)。

### 2.6.4.3 傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)

當化合物分子中的原子發生振動或轉動時會吸收特定波長的能量，一般而言分子轉動及振動所吸收的能量範圍在紅外線的範圍，形成IR光譜，由於每一特定的分子振動或轉動時，均會有特定的吸收波長。因此傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)及利用這項原理來觀察分子的基本結構，利用紅外光入射待測樣品，樣品受照射所產生之光電流經過傅立葉轉換之運算而形成樣品之紅外線吸收頻率，因此可藉由連續波長與吸收強度作圖，藉以了解樣品中分子的結構特性。

紅外光主要分為三個範圍： $12800\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 為近紅外光區， $4000\sim 200\text{cm}^{-1}$ 為中紅外光區， $200\sim 10\text{cm}^{-1}$ 為遠紅外光區。其中分子的轉動、振動所吸收的紅外光主要為中紅外光區，因此大多利用中紅外光區的波長範圍來探討物質的結構特性。而分子的振動方式大致可分為拉伸(stretching)和彎曲(bending)兩種，其中拉伸為兩原子沿其軸向作伸縮運動，而彎曲振動則是原子依兩鍵結的夾角做轉動運動(Madejova, 2003)。

## 2.7 酵素固定化

生物酵素在工業上有很多實用用途，例如食品加工、衣服布料製作、生質能源開發等，但因其價格昂貴、水溶性不易回收利用等限制了開發與利用。若將酵素固定於固體載體表面或內部，即可改善或克服上述限制。酵素固定化的方法大致可分為擔體鍵結法、膠聯法以及包埋法三類，如Fig. 2-7所示(陳，2000)。

### 2.7.1 擔體鍵結法(carrier binding)

擔體鍵結法是指藉由顆粒表面與酵素之間相互作用將酵素固定於顆粒

表面，根據不同的鍵結方式又可分為物理吸附法(physical adsorption)、離子鍵結法(ionic binding)以及共價鍵結法(covalent binding)。

物理吸附法主要是利用凡得瓦爾力、親疏水作用、氫鍵以及偶極矩吸引等作用力將酵素吸附於顆粒表面。此方法操作較簡單，且不會造成酵素構型產生變化，但由於酵素與顆粒之間結合力較微弱，酵素易於在操作過程中脫落。

離子鍵結法是藉由酵素與顆粒表面之間相反的電荷所形成的靜電吸引力(electrostatic attraction)，而達到固定化之目的。此方法操作簡單，顆粒與酵素之間的結合力優於物理吸附，但須維持反應溶液中的離子強度、pH值、溫度等條件以避免因環境條件變動使酵素自顆粒上脫落。

共價鍵結法是藉由酵素本身分子上的胺基(amino groups)或羧基(carboxyl groups)與顆粒表面的官能基產生共價鍵結來進行固定化程序，其優點為鍵結力強，酵素不易脫落，但容易造成酵素型態與構造改變造成酵素活性下降。

### 2.7.2 交聯法(cross-linking)

交聯法是透過多官能基的膠聯劑[例如戊二醛(glutaraldehyde)或甲苯二異氰酸酯(toluene diisocyanate)等]利用其雙官能基的特點使酵素分子與分子間結合成非水溶性的聚合物(Fig.2-7 b)。交聯法操作簡單，但膠體聚合形成之孔洞極小，導致質傳阻力增加，使基質無法進入膠體聚合物內部而造成酵素活性無法呈現。因此交聯法應用於酵素固定化上的發展受到限制。

### 2.7.3 包埋法(entrapping method)

包埋法係指將酵素包埋於網狀結構的膠體顆粒或微膠囊內。其膠囊孔

徑大小需適中，可使基質與酵素接觸，但又須防止酵素流失，因此其所使用之基質大小會受到限制。

各種酵素固定化方法皆有其優缺點，如 Table 2-4 所示(陳，2000)。須視酵素與載體之性質選擇適合的方法加以利用。

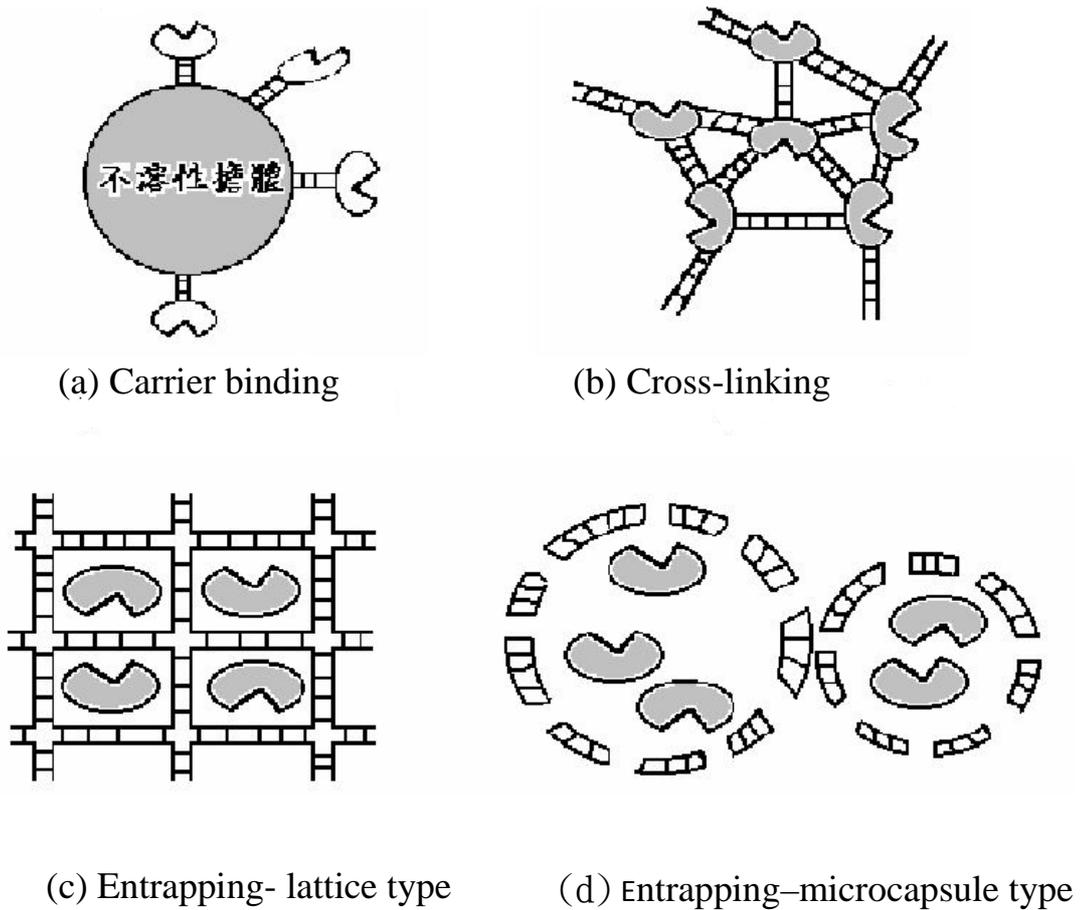


Fig.2-7 Types of enzyme immobilization (a) Carrier binding (b) Cross-linking (c) Entrapping- lattice type (d) Entrapping-microcapsule type.

Table.2-4 Advantages and disadvantages of different enzyme immobilization methods.

性質	固定化方法				
	physical adsorption)	covalent binding)	ionic binding)	cross-linking)	entrapment)
製備難度	易	難	易	難	易
生物觸媒失活機率	小	大	小	大	小
結合強度	弱	強	弱	強	強
再生可能性	可	不可	可	不可	不可
固定化對象之範圍	中	小~中	中	中	大
固定化成本	低	高	低	低	中

## 2.8 磁性顆粒在酵素固定化發展

利用磁性奈米顆粒進行酵素固定化近年來逐漸受到重視，許多研究者投入期望酵素固定化可提高酵素的活性及其可重複利用性。

Koneracka *et al.* 製備磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並利用 EDC 以共價鍵結固定化牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、溶栓酶(streptokinase)及中性蛋白酶(dispace)於  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  顆粒表面，探討固定化程序最佳化(包括顆粒、EDC 與酵素的比列及固定化最佳 pH 值)。其結果顯示在固定化 BSA 時最佳顆粒、BSA 與 EDC 的比列為 3:1:1，固定化程序在 pH 5.5 時最佳，可固定 70 % BSA；在固定化 GOD 時最佳顆粒、GOD 與 EDC 的比列為 6:1:2，固定化程序在 pH 4.5 時最佳，可固定 76 % 的 GOD；而在固定化 dispace、chymotrypsin 與 streptokinase 最佳顆粒、酵素與 EDC 的比列皆為 2:1:2，且最佳固定化 pH 皆為 pH 6.3，其固定化效率為 41 %、28 %及 26 % (Koneracka *et al.*, 2002)。

Chen and Liao 製備磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並利用 EDC 以共價鍵結固定化酵母酒精脫氫酶(yeast alcohol dehydrogenase, YADH)，其磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  之粒徑大小為 10.6 nm，飽和磁化強度為 63.3 emu/g，在固定化程序方面，最佳 YADH 與顆粒的比列為 1:8，每 g 的顆粒約可固定 6 mg 的 YADH，在 4°C 和 25°C 中保存 500 小時後其活性可維持原本的 60%和 30%，而經過固定化的 YADH 在 65°C 中活性可維持 90%，未經固定化的 YADH 在 55°C 中就完全失去活性(Chen and Liao, 2002)。

Jordan *et al.* 製備  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並利用 EDC 以共價鍵結固定化纖維水解酵素(cellulase)，其顆粒粒徑為  $13.31 \pm 3.2$  nm，最佳纖維水解酵素與顆粒的比列為 1:50，未經固定化的纖維水解酵素最佳反應 pH 為 pH 4，經過固定化的纖維水解酵素最佳反應 pH 值為 pH 5，固定化與未固定化的纖維水解酵

素最佳反應溫度都是 50 °C，固定化的纖維水解酵素的初始活性為未固定化的纖維水解酵素的 30.2%，在重複利用第六次後其酵素活性可保留初始的約 10% (Jordan *et al.*, 2011)。

Kuo *et al.* 製備 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性奈米顆粒，並在顆粒上凝聚甲殼素(chitosan) 形成 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan 的顆粒，並以 EDC 和 NHS 來以共價鍵結固定化脂肪酶(lipase)。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan 的顆粒粒徑大小約 30 nm，飽和磁化強度為 60 emu/g。固定化程序中最佳 lipase 與 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan 顆粒的比例為 1:1.37，最佳固定化 pH 值為 pH 6.37。經固定化後之 lipase 在 pH 3 及 pH 11 皆可保持約 80%的活性，未經固定化的 lipase 在 pH 11 的環境下酵素活性則只能保持 10%；熱穩定性方面固定化的 lipase 在 60 °C 的環境下可維持 76%的活性，而未經固定化的 lipase 在 60 °C 的環境下只剩 21%的酵素活性；固定化的 lipase 在重複利用 20 次後其活性還可以維持原本的 83%，而將固定化的 lipase 保存在室溫(25 °C)之下 13 天後，其活性可維持將近原本的 100% (Kuo *et al.*, 2012)。

Liao *et al.* 利用微乳化法製備包覆 PVA(polyvinyl alcohol)磁性奈米顆粒 PVA/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>，並加入纖維水解酵素於此微乳化系統中使纖維水解酵素固定於 PVA/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 上並形成直徑約 0.5 μm 的微球體，比較纖維水解酵素固定化於微球體中與直接固定化於顆粒表面之酵素固定化量與酵素活性的差異。直接將酵素固定化於 PVA/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 顆粒表面其最佳酵素固定化量為 4.31 ± 0.13 mg/g，最佳酵素比活性為 5.63 ± 1.26 U/mg，酵素活性降至未固定化纖維水解酵素的 63%。將纖維水解酵素固定化於 PVA/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的微球體中其最佳酵素固定化量為 3.58 ± 0.23 mg/g，最佳酵素比活性為 8.13 ± 1.72 U/mg，酵素活性降至未固定化纖維水解酵素的 91%。由此可知固定於微球體中的酵素雖然量比較少，但是其酵素比活性較高，其原因是因為在微乳化系統中微球體可均勻的分散於反應中，使纖維水解酵素可充分且均勻的與反應

基質接觸。在重複利用性方面固定微球體內的纖維水解酵素在重複利用第四次後其酵素活性可維持原本的 40% (Liao *et al.*, 2010)。

Šulek *et al.* 以包覆網狀二氧化矽的磁性奈米顆粒  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ( $\text{SiO}_2/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) 利用戊二醛(glutaraldehyde)以共價鍵結法固定化膽固醇氧化酶(cholesterol oxidase)，並探討有無添加戊二醛對固定化酵素的量與酵素活性的影響。 $\text{SiO}_2/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  顆粒之粒徑大小為 26 nm； $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$  奈米顆粒之飽和磁化強度為 60 emu/g，在包覆網狀二氧化矽層後其飽和磁化強度降至 20 emu/g。在固定化過程中有添加戊二醛其最佳酵素固定化百分比可達 90%，最佳酵素活性為 0.016 U/mg；而在固定化過程中未添加戊二醛其酵素固定化百分比為 33%，酵素活性為 0.0029 U/mg。此結果顯示在固定化過程中添加戊二醛可增加固定化效率與固定化酵素活性(Šulek *et al.*, 2010)。

本研究之固定化程序為利用碳二亞胺 (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC) 活化磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面羥基(-OH)，再與纖維水解酵素的胺基(-NH<sub>2</sub>) 反應，進而將酵素共價鍵結在顆粒表面。但 EDC 在活化顆粒表面羥基(-OH) 的過程中會產生中間產物氧乙醯化異尿素(O-acylisourea)，此種中間產物在水溶液中並不穩定，可能會水解成原本的 EDC 進而影響固定化的效率與酵素活性。Sehgal *et al.* 於研究中指出在 EDC 活化過程中添加羥基琥珀亞胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS) 可以將氧乙醯化異尿素(O-acylisourea) 轉化成 NHS-activated hydroxylic acid group (Fig. 2-8)，此化合物在水溶液中較穩定，因此可增加固定化效率(Sehgal *et al.*, 1994)、(周子原，2010)。

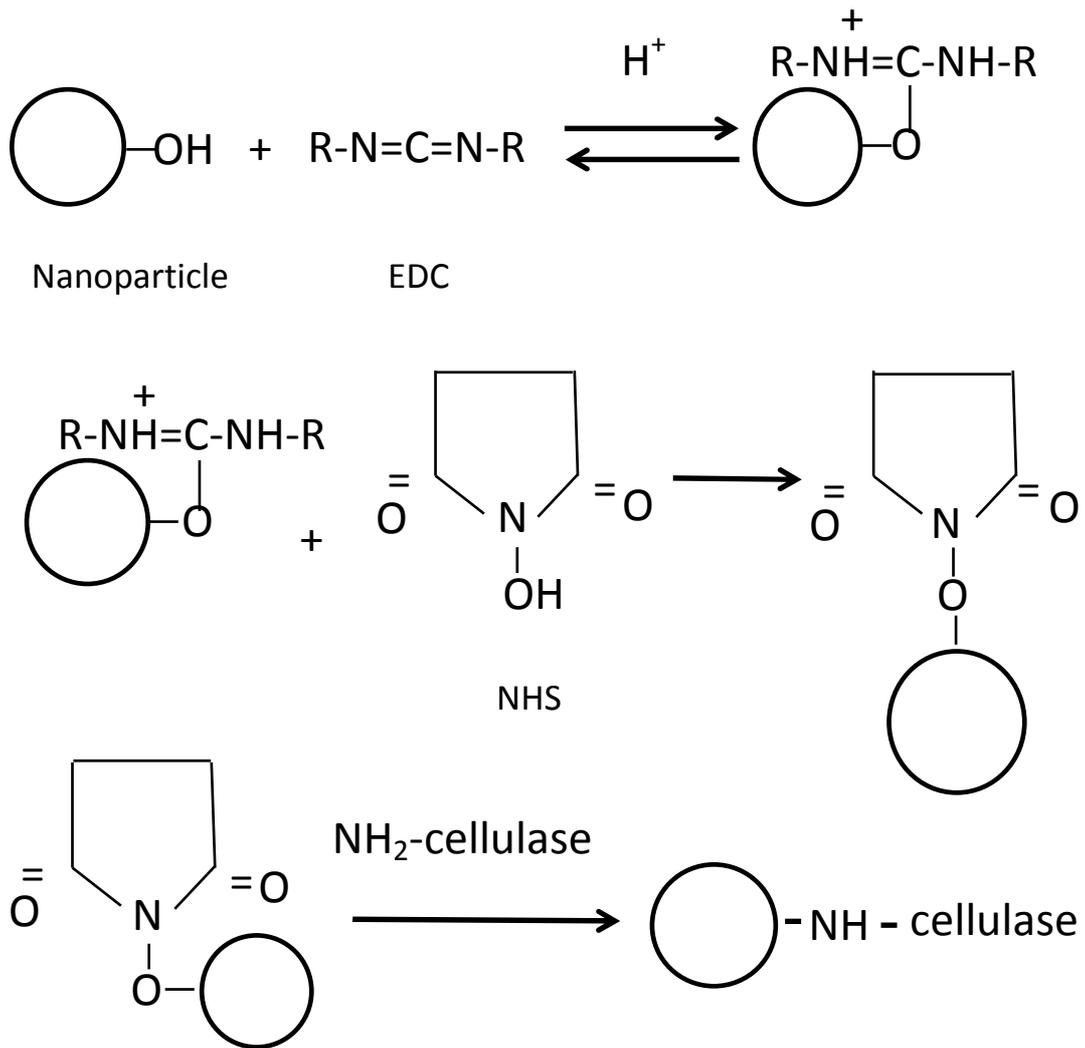


Fig. 2-8 Immobilization of cellulase by covalent bounding via EDC and NHS.

## 第三章 實驗方法與材料

### 3.1 實驗藥品

本研究實驗中使用的藥品有：纖維水解酵素(*cellulase from Trichoderma reesei* ATCC 26921)、縮甲基纖維素鈉(CMC, carboxymethylcellulose sodium salt)、檸檬酸鈉(sodium citrate tribasic dihydrate)、碳二亞胺(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC,  $C_8H_{17} \cdot HCl$ )為美國 Sigma 公司產品；檸檬酸(citric acid,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )、氯化鐵(chloride-6-hydrate,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ )為德國 Merck 公司產品；四乙氧基矽烷(Tetraethoxysilane, TEOS,  $C_8H_{20}O_4Si$ )為瑞士 Fluka 公司產品；羥基琥珀亞胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS,  $C_4H_5NO_3$ )為美國 Alfa Aesar 公司產品。本研究所使用的藥品皆為分析級試藥。

### 3.2 實驗設計與流程

本研究首先利用共沉澱法製備磁性奈米顆粒  $Fe_3O_4$ ，並利用溶膠凝膠法在  $Fe_3O_4$  顆粒表面包覆二氧化矽保護層並以穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy, TEM)、超導量子干涉儀(Superconducting QUantum Interference Device, SQUID)及 X-光繞射儀(X-ray Diffractometer, XRD)等儀器來探討磁性奈米顆粒的型態與粒徑大小、磁性大小及晶相結構等特性並利用磁性奈米顆粒固定化纖維水解酵素，並探討其最佳固定化方法與固定化酵素重複利用之特性。實驗設計流程如 Fig.3-1 所示。

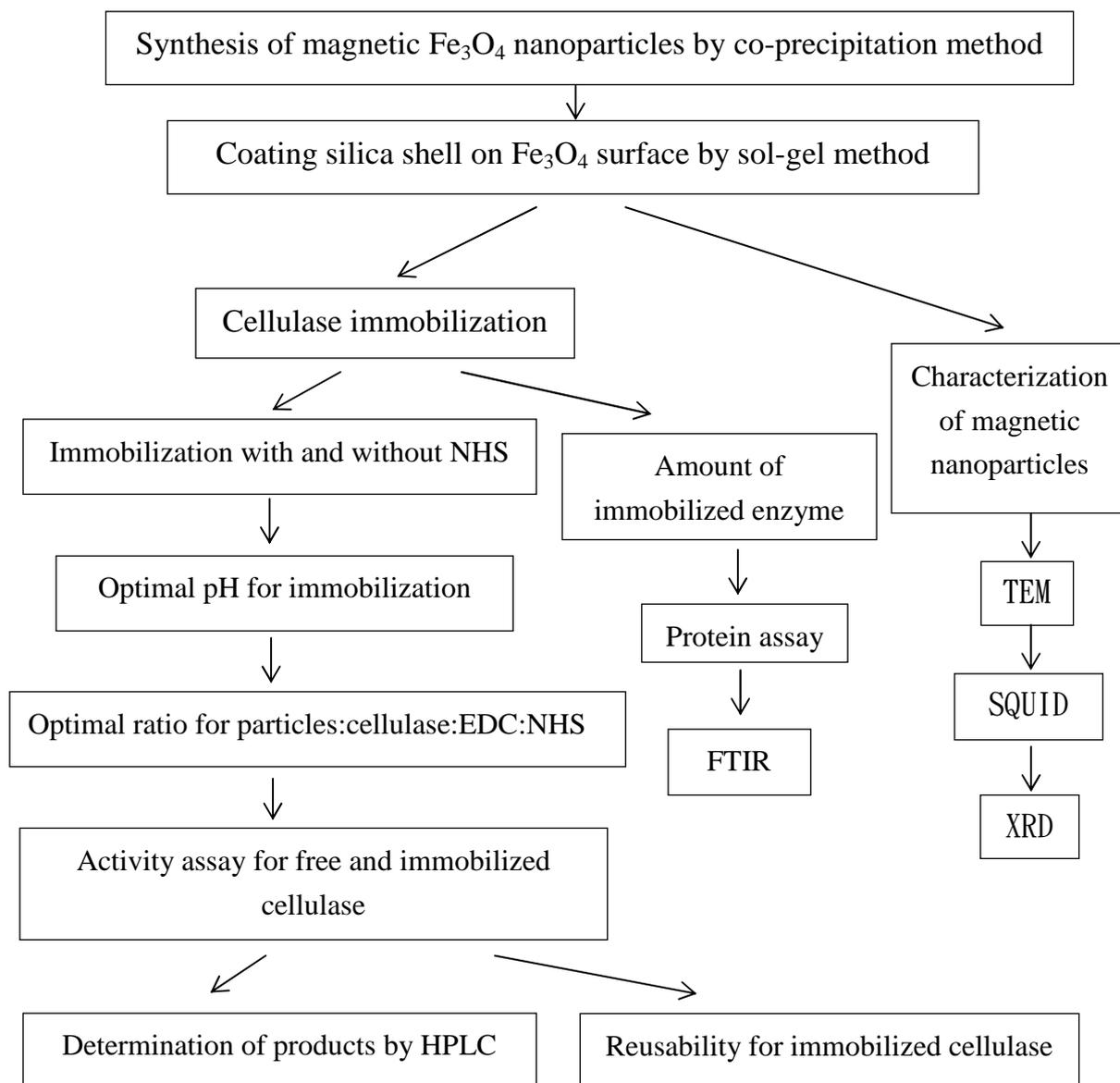


Fig. 3-1 Flowchart of this study.

### 3.3 磁性奈米顆粒之製備

#### 3.3.1 共沉澱法(co-precipitation method)製備 $\text{Fe}_3\text{O}_4$

核心奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  以共沉澱法製備，以 1 公升三角錐形瓶裝 500 mL 去離子水持續通入氮氣，以溫度控制加熱面板加熱至  $70^\circ\text{C}$  後加入氯化亞鐵 ( $\text{FeCl}_2$ ) 8.6 g 及氯化鐵 ( $\text{FeCl}_3$ ) 23.5 g (莫爾數比約為 1:2)，以直流攪拌器控制在 300~400 rpm 之轉速攪拌均勻後持續升溫至  $85^\circ\text{C}$ ，此時加入 25% 氨水 28 mL，以 500 rpm 攪拌 3 分鐘即完成核心奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。以上所有過程皆在通入氮氣得情況中進行。利用強力磁鐵分離製備完成之核心顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並以通入過氮氣之去離子水清洗核心顆粒以去除多餘之氨水 (Du *et al.*, 2006)。

#### 3.3.2 溶膠-凝膠法製備 $\text{SiO}_2$ 包覆 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  核心顆粒於 3 公升反應槽加入 25% 氨水 392 mL、去離子水 116 mL 以及異丙醇 1492 mL，利用封口膜密封後以超音波震盪 30 分鐘。將反應溫度加熱至  $40^\circ\text{C}$ ，持續以 500 rpm 攪拌之下慢慢滴入 60 mL Tetraethoxysilane (TEOS，速率為 2 mL/min)，之後持續攪拌 5 小時。利用強力磁鐵固液分離，去除上清液後之顆粒以紅外線燈罩進行隔夜乾燥。之後將乾燥完成後之顆粒置於高溫爐中，於充滿氮氣的條件下依下述升溫程式進行鍛燒：  
 $100^\circ\text{C}$ ，功率 50 W，0.3 hour； $100^\circ\text{C}$ ，功率 100 W，0.3 hour； $400^\circ\text{C}$ ，功率 50 W，8.0 hour。待鍛燒完畢待溫度降至室溫後即完成磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。利用 TEM、SQUID 及 XRD 來探討顆粒 ( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 的特性。

### 3.3.3 磁性奈米顆粒特性分析

本研究利用穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscopy, TEM)、超導量子干涉磁量儀(Superconducting Quantum Interference Device, SQUID)、X光繞射分析儀(X-ray Diffraction, XRD)進行磁性奈米顆粒特性分析；TEM 為委託中興大學貴儀中心操作、SQUID 為委託交通大學電物系貴儀中心操作、XRD 委託東海大學化材系貴儀中心操作。

## 3.4 酵素固定化

### 3.4.1 固定化流程

精秤 0.02 g 磁性奈米顆粒加入 5 mL, pH 4 之去離子水中，並加入 5 mg EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride;  $C_8H_{17} \cdot HCl$ )和 3.75 mg NHS (N-Hydroxysuccinimide;  $C_4H_5NO_3$ )，利用平台式搖擺機(Firstek, RS-101)於 4°C 之下以 55 rpm 均勻搖晃 30 分鐘使 EDC 活化顆粒表面的羥基(hydroxyl groups)與 NHS 的取代反應。反應完成後利用去離子水清洗顆粒以去除未反應的 EDC 和 NHS。加入 5 mL citric buffer(0.05 M, pH=5)和 1.8 mg 纖維水解酵素，並在 4°C 冰箱中利用上述震盪反應器以 55 rpm 混合 24 小時進行酵素固定化，之後利用去離子水清洗顆粒三次去除未固定上的酵素。利用 Bio-red 蛋白質套件(Protein Assay, Bio-Rad, American)測定反應前與反應後水溶液中蛋白質減少的量來代表固定上的酵素量。

### 3.4.2 探討最佳固定化 pH 值

EDC 在酸性情況下(pH=4~5)活化羥基的效果較好(Sehgal *et al.*, 1994)，因此本研究在固定化過程中利用 0.1 M HCl 和 0.1 M NaOH 調整反應 pH 值(pH 3~pH 8)，並比較不同 pH 值對固定化酵素量的影響。

### 3.4.3 探討最佳固定化比例

顆粒、酵素、EDC 與 NHS 的比例會影響固定化的效果，若加入過量的酵素、EDC 與 NHS，會產生彼此競爭的現象反而影響到固定化的酵素量(Chen *et al.*, 2002)。因此本研究分別探討顆粒與酵素，EDC 與 NHS 之最佳反應比例。酵素固定化過程中固定顆粒添加量(20 mg)，分別加入 0.05 mg、0.4 mg、0.8 mg、1.2 mg、1.8 mg、2.2 mg、2.6 mg、3.0 mg 酵素以探討最佳顆粒與酵素的比率。以及固定酵素添加量(1.8 mg)與 EDC 添加量(5 mg)分別加入 2.5 mg、3.0 mg、3.75 mg、5.0 mg、7.5 mg、15 mg NHS 以探討最佳 EDC 與 NHS 的比率。

## 3.5 酵素活性測試

### 3.5.1 商用 *Trichoderma reesei* 纖維水解酵素活性與特性

#### 3.5.1.1 酵素最佳反應溫度

為了解商業纖維水解酵素之最佳反應溫度，本實驗利用 CMC(carboxyl methyl cellulose)為酵素反應基質，分別在中溫(35°C)與高溫(50°C)條件下反應兩小時，並於反應前及反應後分別測定其還原醣濃度以計算酵素活性。

### 3.5.1.2 酵素最佳反應 pH 值

為了解商業纖維水解酵素之最佳反應 pH 值，本實驗利用 CMC 為酵素反應基質，利用 0.05 M 之鈉-檸檬酸緩衝溶液(Sodium citrate buffer)調整 pH 值，分別在 pH 4、pH 4.5、pH 5、pH 5.5、pH 6 條件下反應兩小時，並於反應前以及反應後分別測定其還原糖濃度以計算酵素活性。

### 3.5.1.3 纖維水解酵素類型

本實驗為了解 *Trichoderma reesei* 商業纖維水解酵素當中外切型、內切型纖維水解酵素以及  $\beta$ -葡萄糖苷酵素各別之活性。分別利用 1 g/L 之 Avicel、CMC、cellulose 為反應基質進行酵素反應，並分別計算 *Trichoderma reesei* 商業纖維水解酵素於上述基質中酵素活性。

### 3.5.2 固定化酵素活性測試

利用磁性奈米顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )固定 *Trichoderma reesei* 之商業纖維水解酵素後，為了解其酵素活性及重複使用之能力，利用 1 g/L CMC、pH 5 之條件下對固定化之酵素進行酵素反應。反應結束後利用 0.05 M，pH 5 之檸檬酸鈉緩衝溶液(Sodium citrate buffer)清洗顆粒，並保存於 4 °C 冰箱中。每星期測試其活性一次，測試固定化酵素重複利用之活性與次數。

### 3.5.3 固定化酵素對固體基質之活性測試

為了解固定化之纖維水解酵素對於分解固體饋料之活性，利用 1 g/L  $\alpha$ -cellulose 以及 1 g/L CMC 於 pH5 之條件下進行酵素反應，並比較固定化之纖維水解酵素對  $\alpha$ -cellulose 以及對 CMC 之反應比活性以了解其對於分

解固體饋料之活性。

## 3.6 分析方法

### 3.6.1 纖維水解酵素活性測定

纖維素被水解後產物為葡萄糖，葡萄糖等單糖之半縮醛具有還原能力，稱為還原端，此類單糖又被稱為還原糖。在測定纖維水解酵素之活性時，可依反應前後還原糖的改變量來計算成葡萄糖當量，以計算纖維水解酵素的活性。酵素活性(U)定義為每小時能產生多少  $\mu\text{mole}$  的葡萄糖當量，酵素比活性(U/mg)定義為每毫克酵素能產生多少 U 之酵素活性。

還原糖濃度測定之方法參考 DNS 法(Miller, 1959)。DNS 試劑(Dinitrosalicylic acid reagent)在液體中被還原糖還原而成紅棕色並以分光光度計定量之。DNS 試劑之配置如下:以少量去離子水先溶解 1.6 g NaOH，加入 30 g 酒石酸鉀鈉( $\text{K-Na-tartarate-}4\text{H}_2\text{O}$ )，再加入 1 g 3,5-二硝基水楊酸(3,5-Dinitrosalicylic acid)並定量至 100 ml，保存於  $4^\circ\text{C}$  不照光處。檢量線以葡萄糖為標準品配置(附錄一)。

測定還原糖樣品時，取適量還原糖樣品並做適當稀釋，加入等體積 DNS 試劑混和均勻，以含橡膠墊片之螺旋蓋封於玻璃管中，置於沸水域加熱 10 分鐘，拿出試管以冷水快速冷卻至室溫後，以分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu)在 512 nm 可見光下測其吸光度。

### 3.6.2 蛋白質濃度測定

利用市售蛋白質套件(Bio-Rad Protein Assay)進行分析，此套件試劑中包含 Coomassie Brilliant blue G-250，與蛋白質結合時由紅棕色轉為藍色，以分光光度計測量其吸光值，以牛血清蛋白(Bovine serum albumin)作為標

準品配置檢量線(附錄二)。

測定蛋白質濃度時先採取至少 0.2 mL 樣品，經適當稀釋後將分析試劑與樣品以 1:4(v/v)比例均勻混和，靜置 5 分鐘待呈色完全，以分光光度計在 595 nm 下測其吸光度。

### 3.6.3 高效能液相層析儀(HPLC)分析酵素反應產物

為了解固定化之纖維水解酵素之酵素型態，利用高效能液相層析儀 (Shimadzu, LC 10-AD)對酵素反應進行液相產物分析，並比較固定化纖維水解酵素於酵素反應後產生之單醣(葡萄糖)與雙醣(纖維二糖)之比例。HPLC 分析條件如下:樣品以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，注射量為 20  $\mu\text{L}$ ；移動相為 0.008 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液(流速為 0.6 mL/min)，分析管柱為 *Transgenomic* COREGEL 87H3 (300 mm\*7.8 mm)；偵測器為 RI-detector (Shimadzu, RID-10A)。根據酵素反應之產物，標準品選用葡萄糖以及纖維二糖，分別配置檢量線(附錄三)。

## 第四章 結果與討論

### 4.1 磁性奈米顆粒之特性

#### 4.1.1 顆粒結構與粒徑分布

磁性奈米顆粒( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )與( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )之 TEM 照片與其粒徑分布如 Fig. 4-1 所示；磁性奈米顆粒( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )粒徑大小約為  $9.4 \pm 2.5$  nm，而經包覆  $\text{SiO}_2$  層後之顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )粒徑大小約為  $18.8 \pm 3.6$  nm。由此顯示包覆  $\text{SiO}_2$  層後顆粒大小比原本大了約 9.4 nm 左右。此結果與文獻中相同材料比較，Peng *et al.* 研究中製備的磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒徑大小為 10 nm (Peng *et al.*, 2004)；Lien and Wu 研究中製備的磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  其顆粒核心  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  大小為 6 nm，而在包覆二氧化矽後顆粒粒徑增加至 20 nm (Lien and Wu, 2008)。顯示本研究所製備的磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  顆粒核心與包覆二氧化矽後之粒徑皆與文獻中的粒徑大小相差不多。

#### 4.1.2 磁性奈米顆粒之磁性大小

磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  以及固定酵素後之顆粒 enzyme/ $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  的磁滯曲線圖如 Fig. 4-2 所示。三者皆無磁滯現象，顯示本研究所製備之磁性奈米顆粒為超順磁之特性。這是因顆粒粒徑非常小，且磁區為單磁區所造成。未包覆上  $\text{SiO}_2$  之磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  之飽和磁化強度為 65.2 emu/g，而包覆上  $\text{SiO}_2$  之磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  之飽和磁化強度則下降至 20.0 emu/g，飽和磁化強度下降的原因是因為  $\text{SiO}_2$  包覆住  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的同時也增加了顆粒的厚度，當顆粒厚度增加時，相對的也是顆粒核心之中心與顆粒之表面距離增加，因此造成其飽和磁化強度下降。而經酵素固定化後之顆粒 enzyme/ $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  之飽和磁化強度為 18.7 emu/g，略小於  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  之飽和磁化強度，其原因與上述相同，顆粒表面固定上酵素

使顆粒中心與表面之距離增加，因此造成其飽和磁化強度有些微下降。  
 Sulek *et al.* 研究中製備的磁性奈米顆粒的飽和磁化強度為 60 emu/g，當其  
 包覆上 SiO<sub>2</sub> 後的飽和磁化強度減少至 21 emu/g (Sulek *et al.*, 2010)。由此  
 得知包覆上 SiO<sub>2</sub> 後顆粒的飽和磁化強度腳少大約 40 emu/g，其結果與本研  
 究相符。

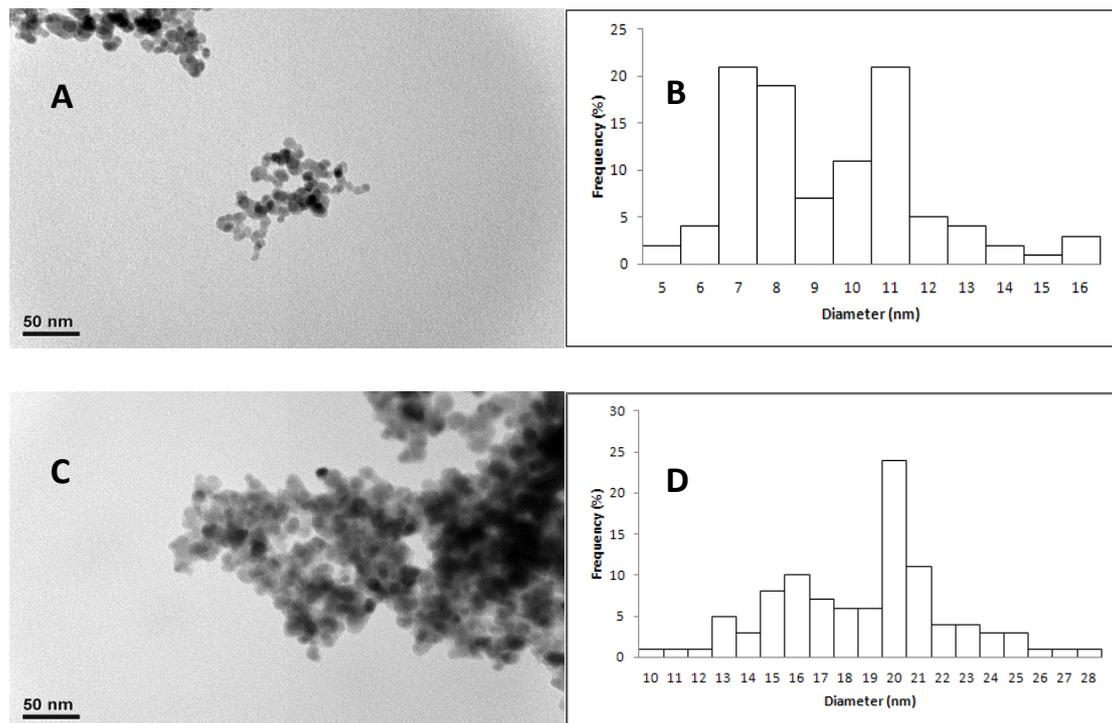


Fig.4-1 TEM photomicrograph and size distribution of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (A) and (B), SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (C) and (D). The average particle size of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and SiO<sub>2</sub>/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> is 9.4 ± 2.5 nm and 18.8 ± 3.6 nm.

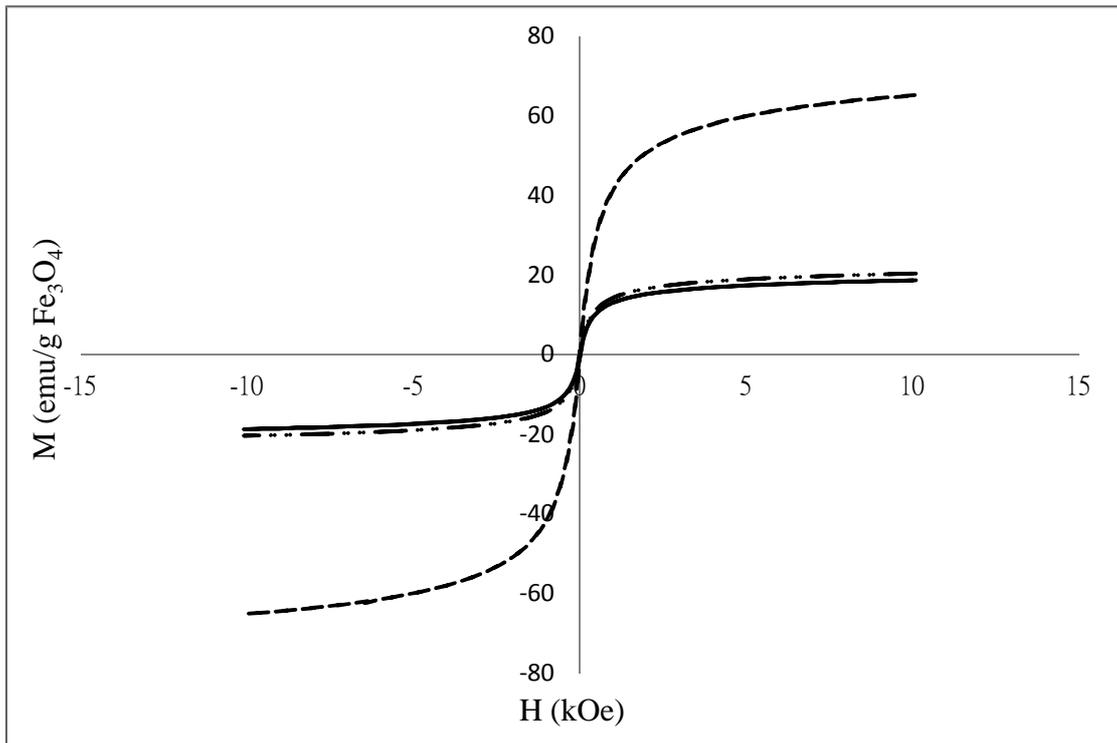


Fig.4-2 Magnetization curves of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(---), SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(- • -) and enzyme/SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(-). Saturated magnetization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and enzyme/SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> is 65.2 emu/g, 20.0 emu/g and 18.7 emu/g.

### 4.1.3 X-ray 繞射光譜儀(XRD)

磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  與  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  之 XRD 圖譜如 Fig.4-3 所示。根據 Joint Committee on Powder Diffraction Standard (JCPDS) 當中  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (JCPDS:03-0356) 之磁鐵礦相 (Magnetite) 之標準 XRD 圖譜在  $2\theta$  角分別為 30.16、32.05、35.45、43.25、53.54、56.78、62.72 及 73.99 有波峰產生(如圖 4-3 a 所示)。本研究所製備的磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  與  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  (如圖 4-3 b 與 c 所示) 所呈現的特徵波峰與 JCPDS  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  之標準圖譜相符，因此可證明本研究所製備的磁性奈米顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  之晶相為磁鐵礦相，且在包覆上  $\text{SiO}_2$  後之磁性奈米顆粒  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  的 XRD 圖譜與核心顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的圖譜無明顯變化，因此可證明在核心顆粒表面包覆  $\text{SiO}_2$  後其晶相仍為磁鐵礦相，此結果與前人文獻結果相比，劉等人將  $\text{SiO}_2$  包覆於  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面，包覆  $\text{SiO}_2$  之顆粒與未包覆  $\text{SiO}_2$  的顆粒之 XRD 晶相結構無變化，皆為磁鐵礦晶相，其結果與本文相符(劉，2009)。

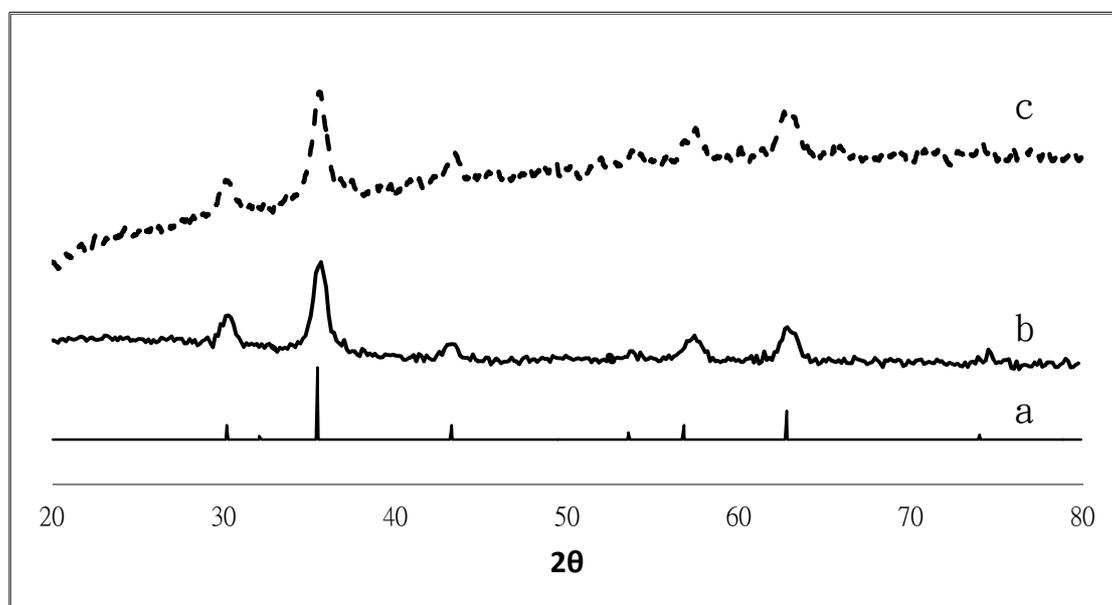


Fig.4-3 XRD curves for (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$  JCPDS standard curve; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and (c) $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

## 4.2 商業纖維水解酵素特性

本研究利用 *Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素進行固定化研究，為了解其最佳酵素反應條件，分別測試最佳反應溫度、pH 值以及不同基質之酵素活性。

### 4.2.1 酵素最佳反應溫度

利用 1 g/L CMC 4 ml 加入 1 ml 酵素溶液分別在中溫(35°C)以及高溫(50°C)下反應 2 小時。比較 *Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素於中溫及高溫下之反應活性。結果如 Fig.4-4 所示，*Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素最佳反應溫度為 35°C，在此溫度下其酵素比活性為 29.6 U/mg。

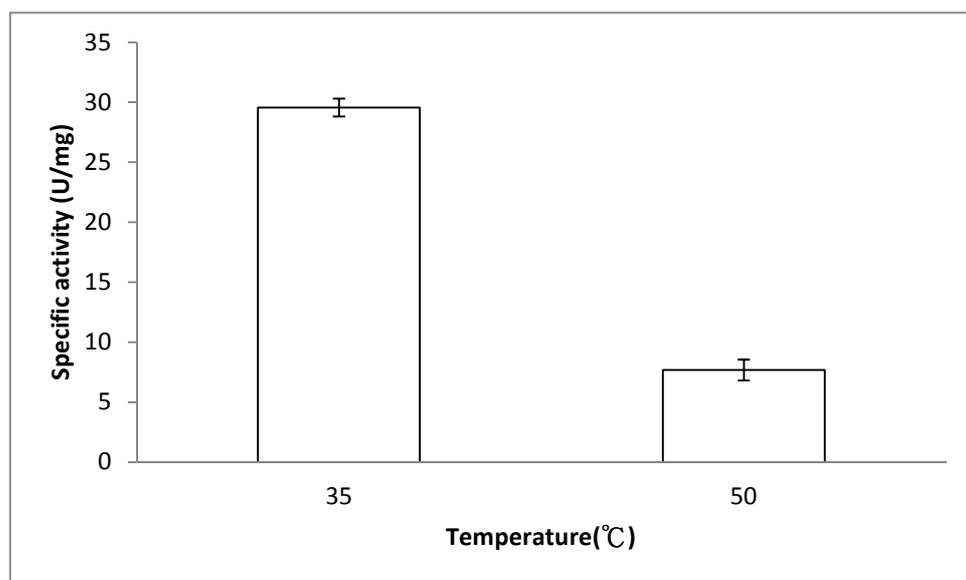


Fig.4-4 Temperature effect on free *Trichoderma* cellulase. Enzyme activity assay was performed in 35°C and 50°C.

## 4.2.2 酵素最佳反應 pH 值

利用 1 g/l CMC 4 ml 加入 1 ml 酵素溶液分別在 pH4、pH4.5、pH5、pH5.5、pH6 條件下酵素反應 2 小時。比較 *Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素最佳反應 pH 值。結果如 Fig. 4-5 所示，*Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素之最佳反應 pH 值為 pH 5，此時最高酵素比活性為 22.4 U/mg。

## 4.2.3 利用不同基質測試商業纖維水解酵素的酵素活性

為了解 *Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素中外切型酵素、內切型酵素以及  $\beta$ -葡萄糖苷酵素各別之活性，分別利用 Avicel、CMC、cellobiose 以及  $\alpha$ -cellulose 為酵素反應基質進行酵素反應 2 小時。比較各別酵素活性。結果如 Fig. 4-6 所示，利用 Avicel 為基質時酵素活性為 50.6 U/mg，利用 CMC 為基質時酵素活性為 33.7 U/mg，利用 cellobiose 為基質時酵素活性為 30.4 U/mg，利用  $\alpha$ -cellulose 為基質時酵素活性為 98.5 U/mg。據此結果推斷 *Trichoderma reesei* 商業用纖維水解酵素中外切型纖維酵素所佔比例比內切型纖維酵素與  $\beta$ -葡萄糖苷酵素多。此結果與文獻記載相符 (Vinzant *et al.*, 2001)。但因固定化酵素於分解固體基質時酵素與固體基質無法完全接觸使酵素反應不完全的問題尚待突破，因此本研究中固定化酵素之活性測定基質還是選用 CMC。

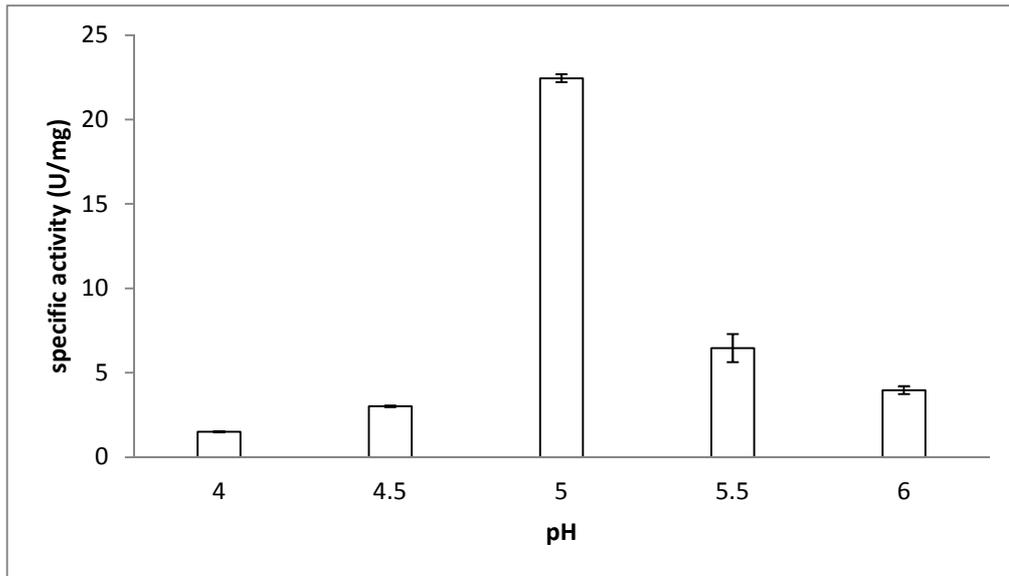


Fig.4-5 Specific activities of *Trichoderma* cellulase different pH's (pH 4 ~ pH 6). Concentration of *Trichoderma* cellulase is 1 mg/L, substrate is 1 g/L CMC.

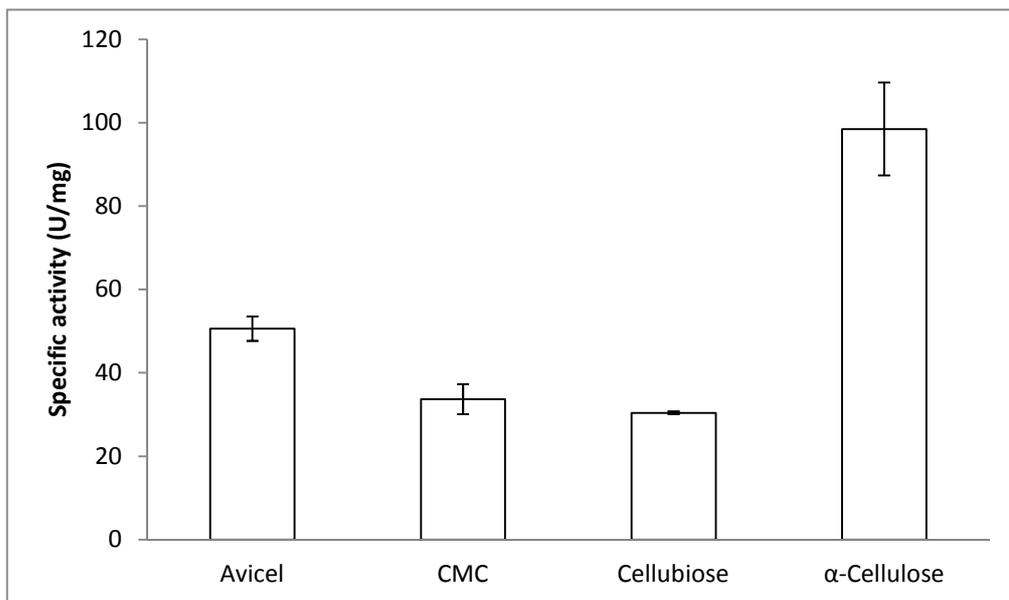


Fig.4-6 Comparison of exoglucanases, endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases activity by using different substrate (Avicel, CMC Avicel and cellobiose). Specific activities of exoglucanase, endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase are 50.6 U/mg, 33.7 U/mg and 30.4 U/mg. Specific activity of commercial *Trichoderma* cellulase by using  $\alpha$ -cellulose as substrate is 98.5 U/mg.

### 4.3 固定化酵素最佳化

本研究初期利用 EDC 為膠聯劑活化磁性奈米顆粒表面 hydroxyl group(-OH)再與酵素的 amino group(-NH<sub>2</sub>)以共價鍵形式鍵結，並對固定化酵素進行酵素活性與重複利用能力之活性分析。結果如 Fig. 4-7 所示，第一天酵素活性為 6.14 U/mg，每兩天測其酵素活性一次，重複利用四次至第七天其酵素活性降至 0.75 U/mg，約為第一天的 12.21%。

#### 4.3.1 有無添加 NHS 對酵素活性之影響

利用 EDC 為膠聯劑進行酵素固定化之測試結果顯示，其重複利用能力不佳。而根據前人文獻記載(Sehgal *et al.*, 1994、周子原, 2010)，EDC 在活化顆粒表面羥基(-OH)的過程中會產生中間產物氧乙醯化異尿素 (*O*-acylisourea)，此種中間產物在水溶液中並不穩定進而影響固定化的效率。在 EDC 活化過程中添加 NHS 可以將氧乙醯化異尿素 (*O*-acylisourea) 轉化成 NHS-activated carboxylic acid group，其在水溶液中較穩定並可增加固定化效率。

因此本實驗在固定化過程中比較有無添加 NHS 對酵素固定化量的影響。結果如 Fig. 4-8 所示，於固定化過程中未添加 NHS 時酵素固定化量為 1.09 mg/g，而有添加 NHS 時酵素固定化量為 1.68 mg/g，在固定化過程中添加 NHS 可增加約 0.59 mg/g 的酵素固定量。

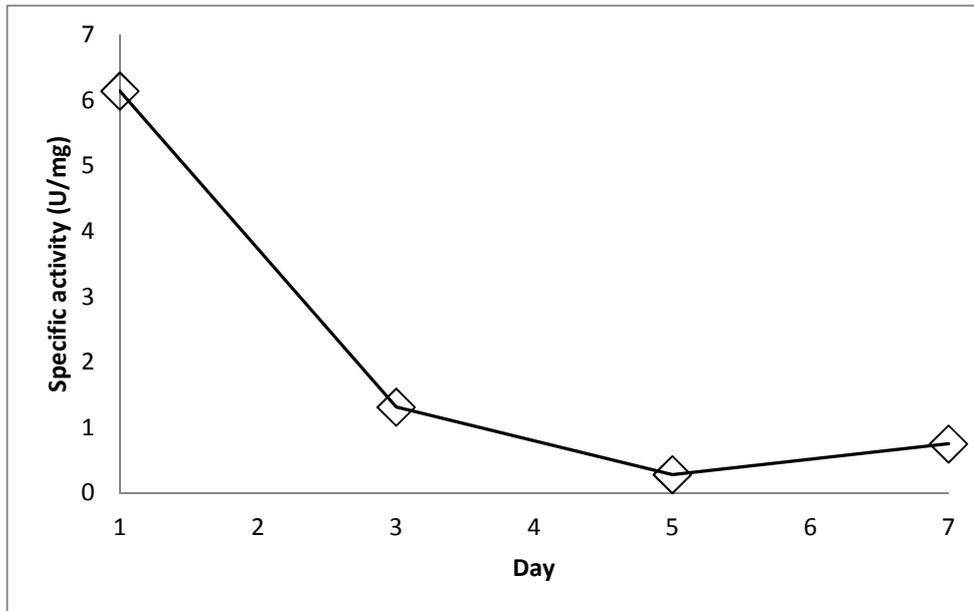


Fig.4-7 Enzyme activity of immobilized cellulase via EDC. Activity of immobilized cellulase is 6.14 U/mg on first day, 0.75 U/mg on seventh day. Remained cellulase activity is 12.21%.

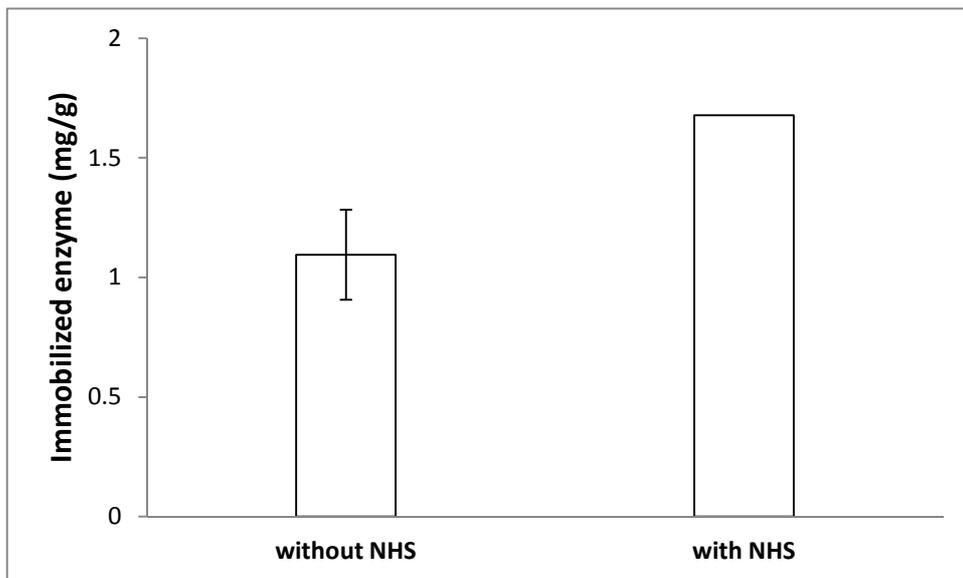


Fig.4-8 Quantity of immobilized enzyme via NHS. Amount of immobilized cellulase for immobilization process with and without NHS is 1.68 mg/g and 1.09 mg/g.

### 4.3.2 酵素固定化最佳 pH 值

Sehgal *et al.* 研究顯示 EDC 在微酸性條件(pH 4~pH 5)之下活化羥基的效果最好，因為 EDC 在對羥基進行親核攻擊時，需要氫離子(H<sup>+</sup>)參與(見 Fig. 2-5)(Sehgal *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 2008)。因此本研究在固定化過程中利用 0.1 M HCl 和 0.1 N NaOH 調整固定化反應 pH 值(pH 3、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8)，並比較不同 pH 值之酵素固定量。結果如 Fig. 4-9 所示，酵素固定化之最佳 pH 值為 pH4 其酵素固定量為 2.5 mg/g。

### 4.3.3 最佳固定化比例

顆粒、酵素、EDC 與 NHS 的比例會影響固定化的效果，若加入過量的酵素或膠聯劑，會產生彼此競爭的現象反而影響到固定化的酵素量，當顆粒、酵素、EDC 與 NHS 之添加量為最佳比例時固定化酵素量或活性可達到最好(Chen *et al.*, 2002)。因此本研究分別改變酵素與顆粒的比例(0.0025:1、0.02:1、0.04:1、0.06:1、0.09:1、0.11:1、0.13:1、0.15:1(wt/wt))以及改變 NHS 與 EDC 的比例(0.5:1、0.6:1、0.75:1、1:1、1.5:1、3:1(wt/wt))來尋找出最佳固定化比例。結果如 Fig.4-10 及 Fig.4-11 所示，顆粒與酵素最佳比例為 0.09:1(wt/wt)；而 NHS 與 EDC 之最佳比例為 0.75:1(wt/wt)。因此在固定化過程中酵素、顆粒、NHS、EDC 之最佳比例為 0.36:4:0.75:1(wt/wt)。

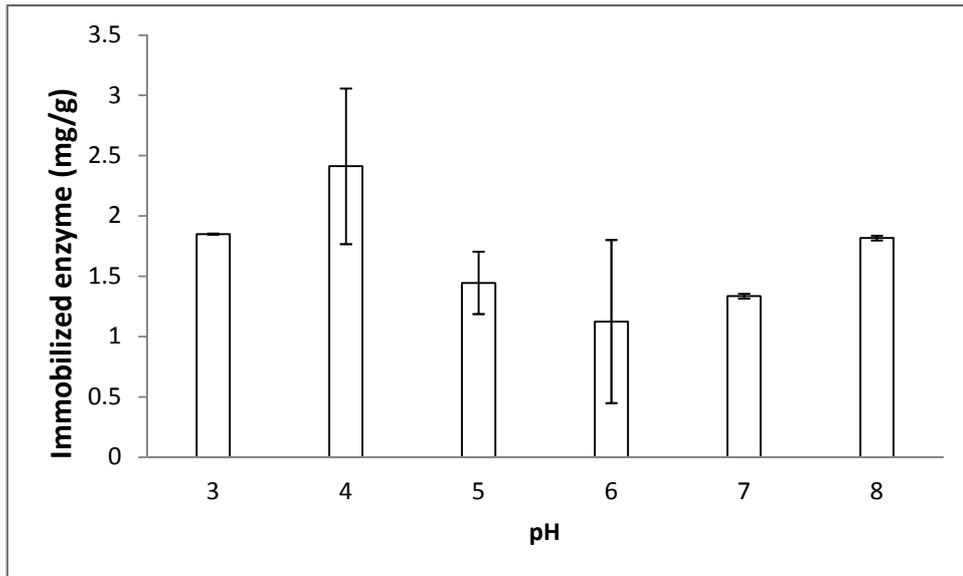


Fig.4-9 Effect of pH (pH 3~8) on enzyme immobilization. Optimal pH is pH 4, the immobilized cellulase amount is 2.5 mg/g.

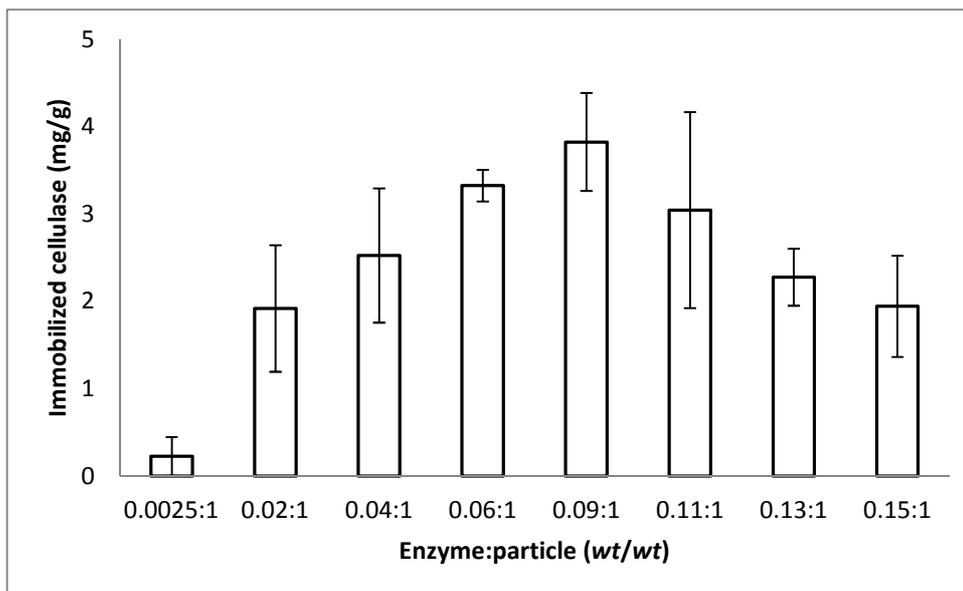


Fig.4-10 Comparison of different enzyme : particles ratio for immobilized cellulase amount. Optimal ratio for enzyme : particle is 0.09:1(wt/wt), which immobilized cellulase is 3.8 mg/g.

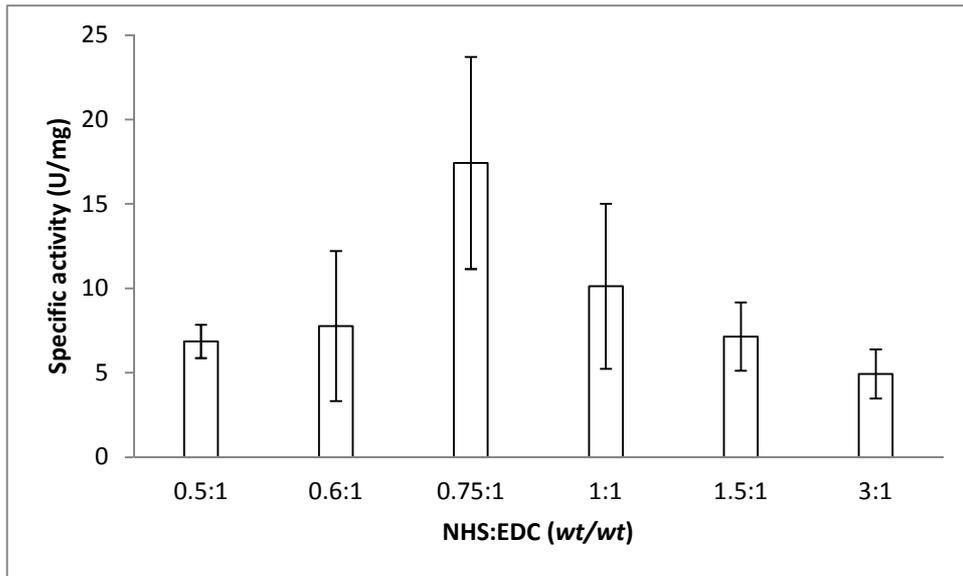


Fig.4-11 Comparison of different NHS : EDC ratio for immobilized cellulase activity. Optimal ratio for NHS : EDC is 0.75:1 (*wt/wt*), which enzyme activity is 17.4 U/mg.

## 4.4 固定化酵素特性分析

### 4.4.1 FTIR 分析

利用傅立葉紅外線光譜儀(FTIR)對磁性奈米顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、纖維水解酵素、固定化纖維水解酵素之各別官能基進行分析以了解酵素是否已固定於顆粒表面。由 Fig. 4-12 所示，磁性奈米顆粒( $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ )在  $461\text{ cm}^{-1}$ 、 $802\text{ cm}^{-1}$ ，以及  $945\text{ cm}^{-1}$  處有出現 O-Si-O、Si-O-Si 以及 Si-OH 之特徵波峰存在，此為包覆於顆粒表面網狀結構之  $\text{SiO}_2$  所造成的特徵波峰(Tie *et al.*,2007；Bruce and Sen,2005；Lien *et al.*,2008；Du *et al.*,2006)。本研究使用兩種廠牌的纖維水解酵素(嘉年生化，台灣；Sigma，美國)，Sigma 的纖維水解酵素在  $1396\text{ cm}^{-1}$  以及  $1420\text{ cm}^{-1}$  處有出現 C-O 以及 C=O 之特徵波峰存在，此為酵素的羧基(-COOH)的特徵波峰；在  $2922\text{ cm}^{-1}$  以及  $2943\text{ cm}^{-1}$  處有出現 C-H 以及 C-H<sub>2</sub> 之特徵波峰，此為酵素之蛋白質所呈現的波峰；在  $1522\text{ cm}^{-1}$  處出現 N-H 之波峰為酵素的醯胺鍵(amide bound)所造成(Jordan *et al.*,2010；Lien *et al.*,2008；Zhang *et al.*,2013；Ju *et al.*,2012；Ghaffar and Hashem,2010)。而嘉年生化的纖維水解酵素在  $1396\text{ cm}^{-1}$ 、 $1420\text{ cm}^{-1}$  以及  $1522\text{ cm}^{-1}$  處也具有 C-O、C=O 以及 N-H 特徵波峰存在，在  $2922\text{ cm}^{-1}$  處有 C-H 的波峰存在。固定化酵素之顆粒方面，固定嘉年生化酵素的顆粒在  $1396\text{ cm}^{-1}$  以及  $2922\text{ cm}^{-1}$  處有 C-O 以及 C-H 之波峰，但在  $1420\text{ cm}^{-1}$  以及  $1522\text{ cm}^{-1}$  處的 C=O 以及 N-H 之波峰較不明顯，研判可能是因為固定化程序未最佳化造成。而固定 Sigma 酵素的顆粒在  $1396\text{ cm}^{-1}$ 、 $1420\text{ cm}^{-1}$ 、 $1522\text{ cm}^{-1}$ 、 $2922\text{ cm}^{-1}$  以及  $2943\text{ cm}^{-1}$  處皆有 C-O、C=O、N-H、C-H 以及 C-H<sub>2</sub> 之特徵波峰，與未固定化之 free cellulase 有相同之特徵波峰，證明酵素確實有固定於顆粒表面。

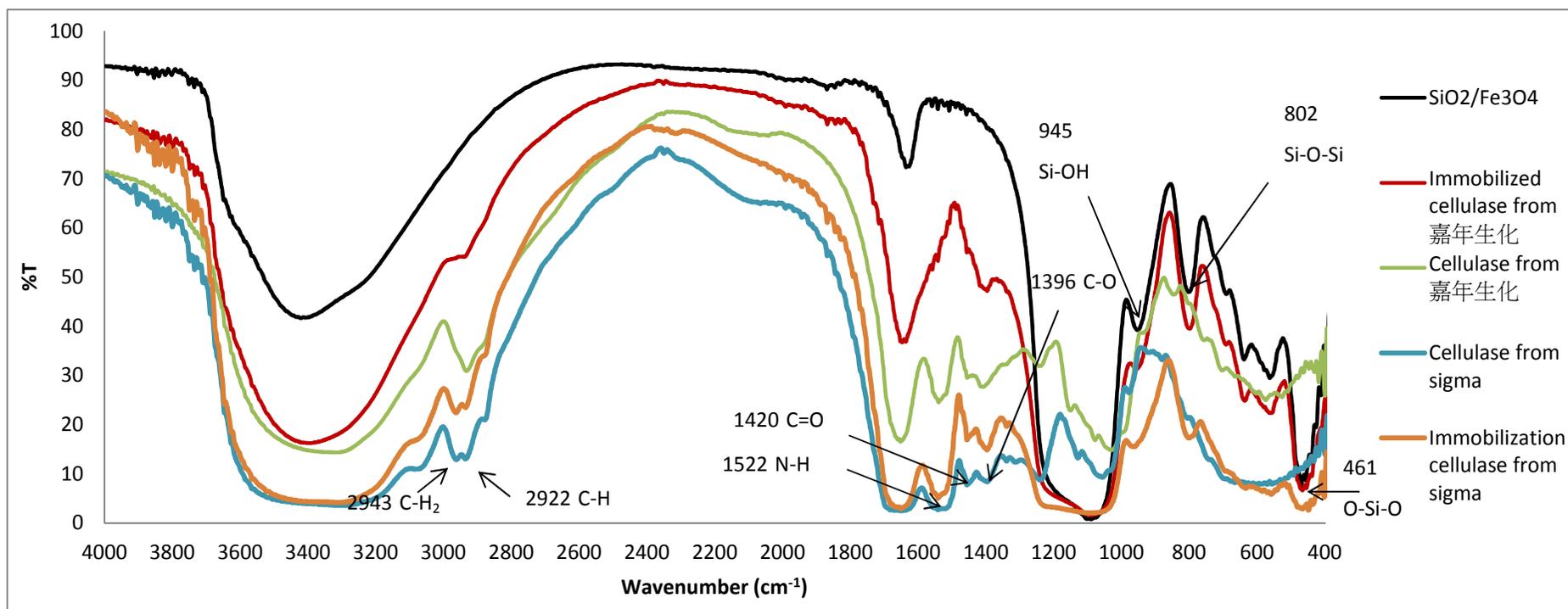


Fig.4-12 FTIR spectrum of cellulase, magnetic nanoparticles and immobilized cellulase.

#### 4.4.2 固定化酵素重複利用能力

為了解本研究之固定化纖維水解酵素之重複利用能力與穩定性，於每星期利用 1 g/L CMC 測定固定化纖維水解酵素活性一次，持續兩個月。並與文獻比較其活性與重複利用能力。結果如 Fig.4-13、Fig.4-14 所示。當 Sigma 纖維水解酵素未經固定化處理時，活性為 23.23 U/mg，而相同酵素經固定化後第一次活性測試活性為 12.32 U/mg，經過酵素固定化程序後酵素活性為原本的 53.03%。以共價鍵結方式固定酵素雖然鍵結力較強酵素較不易脫落，但可能造成酵素構型改變以及使酵素與基質的親和力降低等缺點，因此酵素固定化後其活性也降低了(Jordan *et al.*, 2010)。

此結果與文獻結果比較(Table 4-1所示)，Liao *et al.* 以 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 利用聚烯醇 (polyvinyl alcohol) 固定化纖維水解酵素，未經固定化的纖維水解酵素活性為 8.87 U/mg，在經過固定化後其酵素活性降至 5.63 U/mg，酵素活性為原本的 63.47% (Liao *et al.*, 2010)。Khoshnevisan *et al.* 以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 利用離子鍵結方式固定化纖維水解酵素，未經固定化的纖維水解酵素活性為 27.0 U/mg，在經過固定化後期活性降至 21.6 U/mg，酵素活性為原本的 80.0% (Khoshnevisan *et al.*, 2011)。Chen and Liao 以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 利用EDC固定化酒精脫氫酶(yeast alcohol dehydrogenase, YADH)，未經固定化的YADH活性為 3.19 U/mg，在經過固定化後YADH活性降至 1.97 U/mg，降至原本的 61.76% (Chen and Liao, 2002)。Chiou and Wu以甲殼素(chitosan)利用EDC和NHS固定化脂肪酶(lipase)，未經固定化的lipase活性為 3.75 U/mg，在經過固定化後lipase的活性降至 1.58 U/mg，其酵素活性降至原本的 42.13% (Chiou and Wu, 2004)。Hartono *et al.* 利用有機矽烷化合物；例如 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS), vinyltrimethoxysilane (VTMS), and phenyltrimethoxysilane (PTMS)製備官能基化的中孔矽材(Functionalized Mesoporous Silica)，並進

行纖維水解酵素固定化，其未經固定化的纖維水解酵素活性為14.0 U/mg，在經過固定化程序後其酵素活性降到9.86 U/mg，降為原本的70.43% (Hartono *et al.*, 2010)。Hung *et al.* 利用經醋酸改質，表面具有梭基的聚丙烯腈奈米纖維膜polyacryl nitrile (PAN) nanofibrous membranes固定化纖維水解酵素，未經固定化的纖維水解酵素的活性為3.71 U/mg，而經過酵素固定化後其活性降至3.19 U/mg，為原本的85.98% (Hung *et al.*, 2011)。

固定化酵素活性穩定性測試方面，固定化酵素在第一週活性為12.32 U/mg，第二週活性為12.13 U/mg，第三週活性為11.62 U/mg，第四週活性為10.67 U/mg，第五週活性為7.81 U/mg，第六週活性為5.08 U/mg，第七週活性為4.89 U/mg，第八週活性為4.64 U/mg。此結果顯示固定化酵素的活性在重複利用至第八週後其活性可維持原本的37.63%。Table. 4-2將與本研究相似的固定化酵素研究與其酵素活性、重複利用能力列出，並與本研究比較，由Table 4-2可看出本研究酵素活性可維持八週，酵素可重複利用與保存很長的時間。

由本研究結果推測經過固定化的酵素之活性會隨著重複利用的次數增加而減少，但未經固定化的酵素穩定性方面本研究沒有對未經固定化的酵素進行重複利用，因此利用文獻佐證經固定化及未經固定化的酵素重複利用能力及穩定性。

Khoshnevisan *et al.* 以 $Fe_3O_4$ 利用聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)固定化纖維水解酵素，在經過5個小時重複利用後固定化纖維水解酵素活性為原始的22%，酵素活性損失了78%；而未經過固定化的纖維水解酵素活性為原始的20%，經過重複利用損失了80%的酵素活性(Khoshnevisan *et al.*, 2011)。Liao *et al.* 利用 $Fe_3O_4$ 經由物理吸附的方式固定化纖維水解酵素，在經過4次重複利用後固定化的纖維水解酵素活性剩下第一次的40%，酵素活性損失了60%；而未經過固定化的纖維水解酵素活性剩下第一次的10%，酵素活

性損失的 90% (Liao *et al.*, 2010)。Dincer and Telefoncu 以甲殼素顆粒利用聚乙醇醇(polyvinyl alcohol)固定化纖維水解酵素，在重複利用 11 天後固定化的纖維水解酵素活性可維持第一天的 100%，但未經固定化的纖維水解酵素活性則剩下第一天的 28%，損失了 72%的酵素活性(Dincer and Telefoncu, 2007)。Kuo *et al* 以  $Fe_3O_4$  利用 EDC 和 NHS 固定化 lipase，在重複利用 10 次後固定化的 lipase 活性可維持原始的 85%，損失了 15%的酵素活性；而未經固定化的 lipase 在重複利用至的 5 次後其酵素活性就只剩下原始的 20%，損失了 80%的酵素活性(Kuo *et al.*, 2012)。Chiou and Wu 以甲殼素(chitosan)利用 EDC 固定化脂肪分解酵素(lipase)，在重複利用 30 天後固定化的 lipase 活性可維持原始的 50%，損失了 50%的酵素活性；而未經固定化的 lipase 酵素活性約剩下 5%，損失了約 95%的酵素活性(Chiou and Wu, 2004)。Chen and Liao 以  $Fe_3O_4$  利用 EDC 固定化酒精脫氫酶(yast alcohol dehydrogenase, YADH)，固定化的酒精脫氫酶再重複利用 500 小時後其酵素活性可維持原始的 60%，損失了 40%的酵素活性；而未經過固定化的酒精脫氫酶在重複利用至第 100 小時其活性約剩下原始的 20%，損失了約 80%的酵素活性(Chen and Liao, 2002)。

經過多篇文獻探討證明未經固定化的酵素在重複利用後大部分的酵素都會損失大量活性，如 Table 4-2 所示。經過固定化程序後，固定化酵素雖然在重複利用後還是會損失部分酵素活性，但損失的活性比未固定化的酵素少，且可重複利用的次數也比較多，達到延長酵素使用的目的。

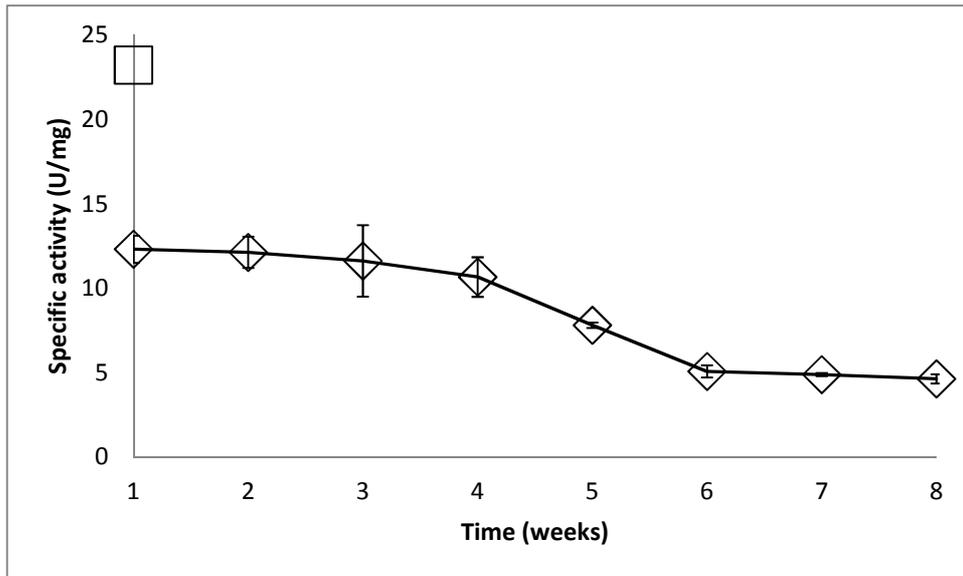


Fig.4-13 Activity of free ( $\square$ ) and immobilized cellulase ( $\diamond$ ) is 23.23 U/mg and 12.32 U/mg. the activity of immobilized cellulase for eighth day reused is remained 4.64 U/mg.

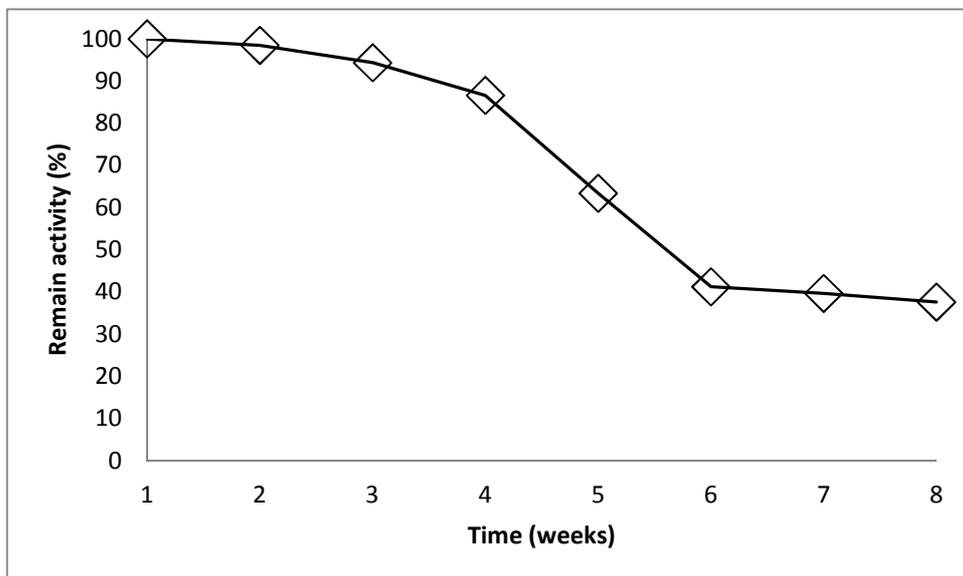


Fig.4-14 Activity loss over 8 weeks of cellulase immobilized on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticle via NHS. Immobilized enzyme activity remained 37.6% after 8 weeks.

Table 4-1. Comparison of enzyme activity loss during immobilization process in this study and other studies.

Materials	Immobilized enzyme	Activity of free enzyme (U/mg)	Activity of immobilized enzyme (U/mg)	Loss enzyme activity for immobilization (%)	reference
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cellulase	8.87	5.63	63.47%	Liao <i>et al.</i> , 2010
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Cellulase	27.0	21.6	80.0%	Khoshnevisan <i>et al.</i> , 2011
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	YADH <sup>a</sup>	3.19	1.97	61.76%	Chen and Liao, 2002
Chitosan	Lipase	3.75	1.58	42.13%	Chiou and Wu, 2004
FMS <sup>b</sup>	Cellulase	14.0	9.86	70.43%	Hartono <i>et al.</i> , 2010
PANNM <sup>c</sup>	Cellulase	3.71	3.19	85.98%	Hung <i>et al.</i> , 2011
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Cellulase	23.23	12.32	53.03%	This study

<sup>a</sup>YADH = yeast alcohol dehydrogenase

<sup>b</sup>FMS = functionalized mesoporous silica

<sup>c</sup>PANNM = polyacryl nitrile nanofibrous membranes

Table 4-2 Comparison of the immobilized enzyme reusability for this study and the other study.

Enzyme	Immobilization carrier	Enzyme activity (U/mg)	Reusability /remained activity(%)	Remained activity of free cellulase (%)	Reference
cellulase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	62.7	6 times /10%	ND <sup>c</sup>	Jordan <i>et al.</i> , 2011
cellulase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	21.6	5 hours /22%	20%	Khoshnevisan <i>et al.</i> , 2011
cellulase	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	487.8	4 times /40%	10%	Liao <i>et al.</i> , 2010
cellulase	PVA membranes <sup>a</sup>	0.33	6 times /35%	ND <sup>c</sup>	Wu <i>et al.</i> , 2005
cellulase	PVA/ chitosan beads	104.4	11 days /100%	28%	Dincer and Telefoncu, 2007
lipase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13.39	10 times /85%	20% (5 times)	Kuo <i>et al.</i> , 2012
lipase	Chitosan	94.8	30 days /50%	5%	Chiou and Wu, 2004
YADH <sup>b</sup>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.9	500 hours /60%	20% (100 hours)	Chen and Liao, 2002
cellulase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	12.32	8 weeks /37%	ND <sup>c</sup>	This study

<sup>a</sup> PVA membranes = polyvinyl acetate membranes

<sup>b</sup> YADH = yeast alcohol dehydrogenase

<sup>c</sup>ND=non detector

#### 4.4.3 固定化酵素對固體基質之活性測試

傳統利用生物酵素於固體物質之分解通常為水溶性酵素，因水溶性酵素可充分且均勻的與固體物質接觸進而將其分解。固定化酵素雖然有可回收重複利用、可維持較長久的活性等優點，但因酵素固定在固體材料上而非溶於液體中，其無法像水溶性酵素一樣與固體物質充分均勻接觸(Liu *et al.*, 2007)。

本研究針對固定化纖維水解酵素對固體基質反應活性進行測試，並與水溶性基質之酵素反應活性進行比較。利用 1 g/L  $\alpha$ -cellulose 與 1 g/L CMC 於 35°C、pH5 之下進行酵素反應兩小時，並比較兩種基質各別之酵素活性。結果如 Fig.4-15 所示，當以水溶性基質 CMC 對固定化酵素進行酵素反應時，酵素活性為 13.3 U/mg，而以固態基質  $\alpha$ -cellulose 對固定化酵素進行酵素反應時，酵素活性為 0.6 U/mg。由此可知固定化之酵素無法有效的與固態基質反應。

#### 4.4.4 固定化酵素反應液相產物分析

先前提到纖維水解酵素是三種個別酵素的統稱，為了解本研究固定化纖維水解酵素的過程中，被固定之酵素型態以及固定化酵素於酵素反應中纖維水解的產物成分，因此以 1 g/L CMC、pH 5、35 °C 之下進行酵素反應，並利用高效能液相層析儀(HPLC)對酵素反應後之反應液進行液相產物分析。結果如 Fig.4-16 及 Fig.4-17 所示，固定化之纖維酵素於酵素反應之產物中主要以葡萄糖為主，產生葡萄糖約為 104.5 mg/L，產生纖維二糖約為 3.1 mg/L (Fig.4-17)。由此結果顯示固定化酵素於酵素反應中將大部分的纖維素水解成葡萄糖，只有少部分的纖維二糖未被完全水解成單糖。因此可推測內切型纖維酵素與  $\beta$ -葡萄糖苷酵素都有被成功固定於顆粒上，但因酵素反應是利用 CMC 為基質，因此無法推測外切型纖維酵素有無成功固定於顆粒表面。

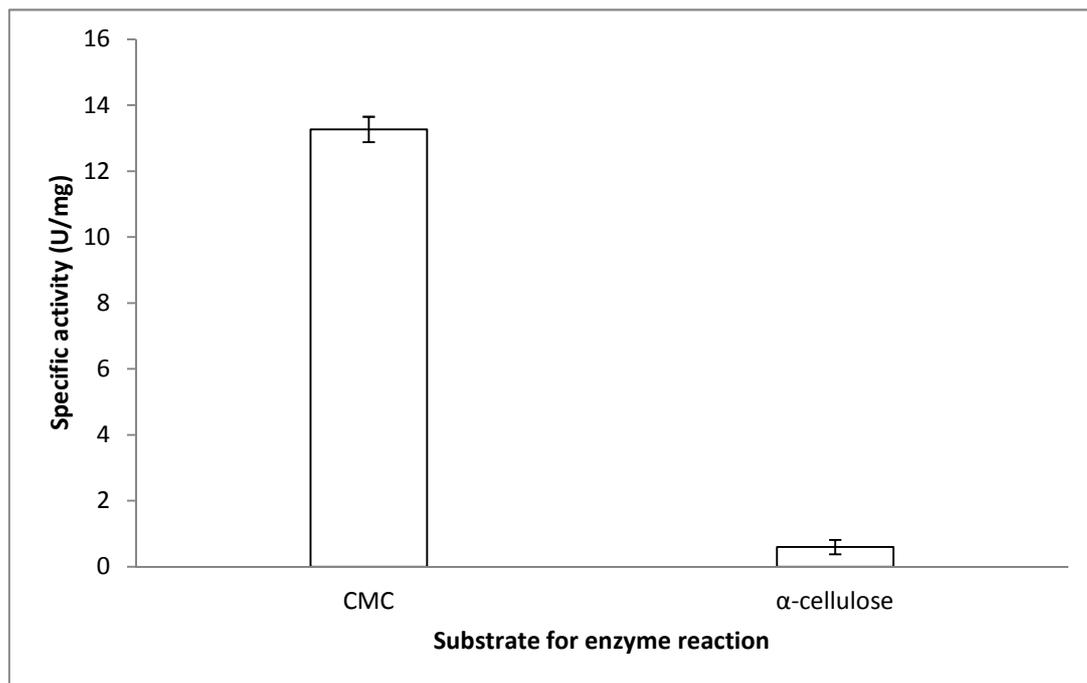


Fig.4-15 Comparison of water soluble and non-water soluble substrates (CMC and  $\alpha$ -cellulose) for immobilized cellulase activity. The specific activity of cellulase with water soluble substrate (CMC) was 13.3 U/mg and specific activity with non-water soluble substrate ( $\alpha$ -cellulose) was 0.6 U/mg.

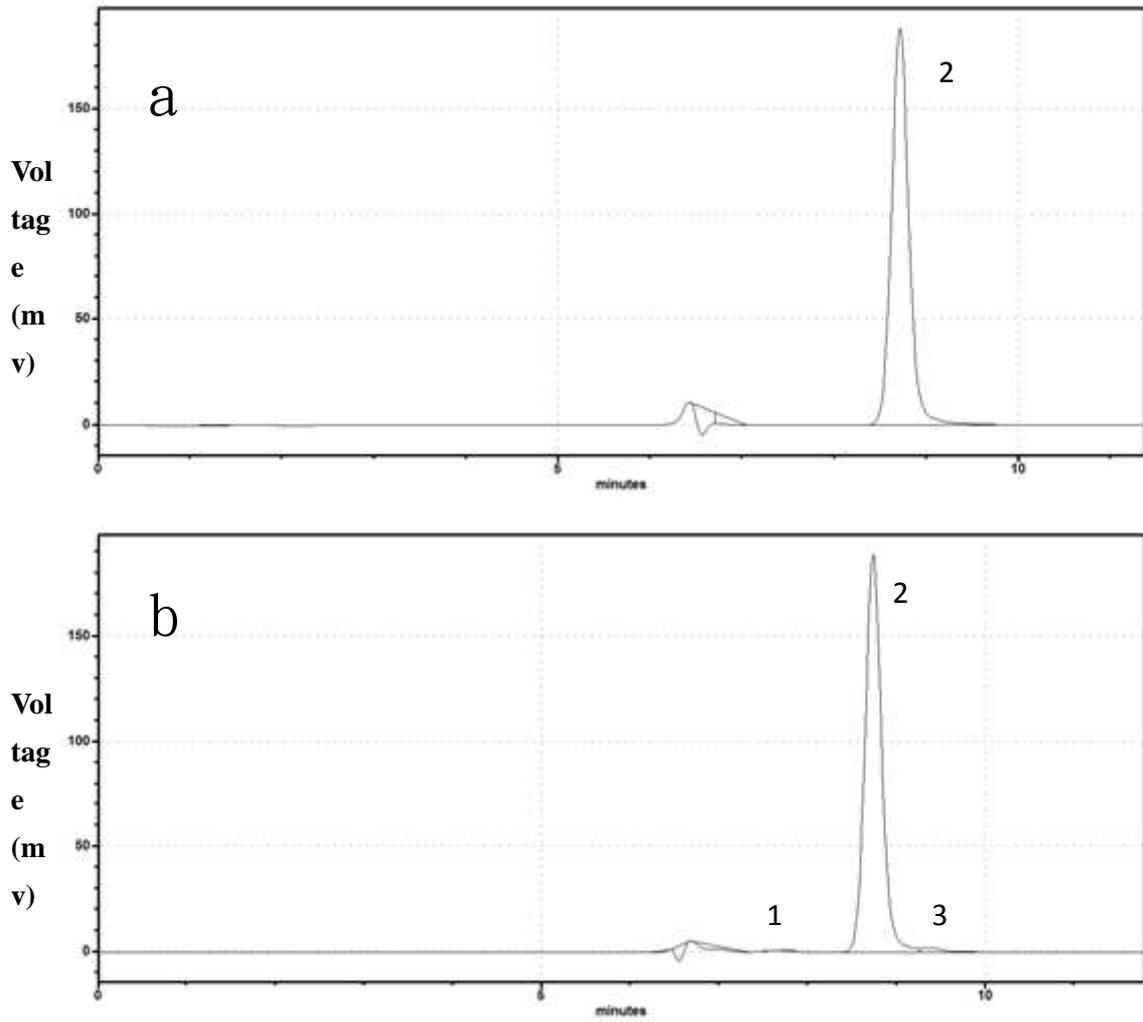


Fig.4-16 HPLC spectrums of cellulose hydrolytic products with immobilized cellulose. Panel (a), reaction control without enzyme; panel (b), reaction with immobilized cellulose; numbers indicated: 1, cellobiose ; 2, CMC and oligosaccharides ; 3, glucose.



Fig.4-17 Concentrations of glucose and cellobiose from CMC hydrolysis by immobilized *Trichoderma* cellulase. Concentration of glucose was 104.5 mg/L, cellobiose was 3.1 mg/L.

## 第五章 結論與建議

### 5.1 結論

本研究成功自行合成磁性奈米氧化鐵顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，並在顆粒表面附加網狀二氧化矽保護層製成  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  奈米顆粒。以此磁性奈米顆粒以共價鍵結的方式固定纖維水解酵素，並針對磁性奈米顆粒的特性(例如:粒徑大小、磁性大小、晶相結構等)、固定化程序最佳化及固定化酵素重複利用能力進行探討。

磁性奈米顆粒核心部分  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粒徑大小為  $9.4 \pm 2.5 \text{ nm}$ ；飽和磁化強度為  $65.2 \text{ emu/g}$ 。而在顆粒表面附加  $\text{SiO}_2$  保護層後顆粒粒徑增加至  $18.8 \pm 3.6 \text{ nm}$ ；飽和磁化強度則減少至  $20.0 \text{ emu/g}$ 。核心顆粒  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  晶相為磁鐵礦相，在包覆  $\text{SiO}_2$  保護層後顆粒的晶相不會改變。

在固定化酵素方面本研究成功利用 EDC 和 NHS 將 *Trichoderma ressi* 纖維水解酵素於  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面。在固定化程序中有添加 NHS 可增加固定化酵素的量；最佳固定化 pH 值為 pH 4；酵素、顆粒、NHS、EDC 之最佳比例為 0.36:4:0.75:1(wt/wt)，最佳固定化量可達  $3.8 \text{ mg/g}$ 。固定化酵素以  $1 \text{ g/L CMC}$  為基質測定酵素活性，其酵素活性約為  $12.32 \text{ U/mg}$ ，而在重複利用方面每星期重複測定其活性一次，至第八週酵素活性可維持 37.63%。

## 5.2 建議

本研究製備磁性奈米顆粒及增加顆粒保護層，並探討固定纖維水解酶的最佳化過程。在成功固定上纖維水解酶後對纖維水解酶的活性穩定性進行探討，而在成功進行固定化後可針對固定化酶在極端環境(例如 pH、溫度等)中的酶活性穩定性進行探討以了解固定化酶的特性。

酶在經固定化程序之後可不斷重複利用，但在經過重複利用後其活性會逐次下降，但其活性下降原因是否為固定化程序所造成，或是因為酶本身經重複利用後活性就會下降，此部分可將未經固定化的酶與固定化酶重複利用測試進行平行活性測定，比較兩者酶活性的變化。

纖維水解反應為利用纖維素進行暗發酵反應的速率決定步驟，且若利用微生物進行纖維水解會因微生物生長而降低產能。在成功固定化纖維水解酶後可將其與發酵微生物混和培養，利用固定化纖維水解酶可重複利用的特點，增加暗發酵產氫、乙醇及甲烷等生質能源的經濟效益。

## 參考文獻

- Albrecht, T., Bühner, C., Fähnle, M., Maier, K., Platzek, D. and Reske, J. (1997). First observation of ferromagnetism and ferromagnetic domains in a liquid metal. *Applied Physics A*, Vol. 65:215-220.
- Balan, V., Costa Sousa, L., Chundawat, S.. (2009) Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*). *Biotechnology Progress*, Vol. 25: 333–339.
- Bruce, I. J. and Sen, T. (2005). Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir*, Vol. 21: 7029-7035.
- Clark, T.A., Mackie, K.L. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *Journal of Wood Chemistry Technology*, Vol.7: 373–403.
- Chen, D. H. and Liao, M. H. (2002). Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 16: 283–291.
- Chen, H. and Zhao, J. (2013). Stalk inhomogeneity and steam explosion integrated fractional refining technology system. *Green Energy and Technology*, Ch4:77-92.
- Cheng, J. and Sun, Y. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, Vol. 83:1-11.
- Chen, Y., Stipanovic, A. J., Winter, W. T., Wilson, D. B., and Kim, Y. J. (2007). Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. *Cellulose*, Vol. 14: 283-293
- Chiou, S., Wu, W. T. (2004) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, Vol. 25:197–204.
- Dale, B.E., Moreira, M.J. (1982). A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioenergy Symposium*, Vol.12:31–43.

- Du, C.h., Liu, Z.L., Xia, X., Chu, Q., Zhang, S.M. (2006). Characterization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanocomposites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Vol. 39: 285-291.
- Dincer, A. and Telefoncu, A. (2007) Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 45:10–14.
- Duff, S.J.B., Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, Vol.55:1–33.
- Ghaffar, M. A. A. E. and Hashem, M.S. (2010). Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 81:507–516.
- Hartono, S.B., Qiao, S.Z., Liu, J., Jack, K., Ladewig, B.P., Hao, Z., Lu, G.Q.M. (2010) Functionalized mesoporous silica with very large pores for cellulase immobilization. *Journal of Physical and Chemistry C*, Vol. 114: 8353–8362.
- Heinze, T., Pfeiffer, K. (1999). Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose. *Applied Macromolecular Chemistry and Physics*, Vol. 266:37–45.
- Hong, J., Xu, D., Gong, P., Yu, J., Ma, H., and Yao, S. (2008). Covalent-bonded immobilization of enzyme on hydrophilic polymer covering magnetic nanogels. *Microporous and Mesoporous Materials*, Vol. 109 : 470-477.
- Hung, T.C., Fu, C.C., Su, C.H., Chen, J.Y., Wu, W.T., Lin, Y.S. (2011) Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 49:30–37.
- Joos, F., Plattner, G., Stoker, T.F., Marchal, O., and Schmittner, (1999). A. Global warming and marine carbon cycle feedbacks on future atmospheric CO<sub>2</sub>. *Science*, Vol. 284, 464.
- Jordan, J., Kumar, C. S. S. R. and Theegala, C. (2011). Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *Journal of Molecular*

*Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 68 : 139–146.

Ju, H. Y., Kuo, C. H., Too, J. R., Huang, H. Y., Twu, Y. K., Chang, C. M. J., Liu., Y. C. and Shieh, C. J. (2012). Optimal covalent immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 78: 9–15.

Kahle M., Kleber M., Jahn R. (2002). Review of XRD-based quantitative analyses of clay minerals in soils: the suitability of mineral intensity factors. *Geoderma*, Vol. 109: 191-205

Khoshnevisan, K., Bordbar, A.K., Zare, D., Davoodi, D., Noruzi, M. Barkhi, M. Tabatabaei, M. (2011) Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 171:669–673.

Koneracka, M., Kopcansky, P., Timko, M., Ramchand, C.N., Sequeira, A., Trevan, M. (2002). Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol.18:13-18.

Kuo, C., Liu, Y.C., Chang, C.M., Chen, J.H., Chang, C. (2012). Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, Vol.87:2538-2545.

Liao, H., Chen, D., Yuan, L., Zheng, M., Zhu, Y., Liu, X. (2010). Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. *Carbohydrate Polymers*, Vol.82: 600–604.

Lien, Y. H. and Wu, T. M. (2008). Preparation and characterization of thermosensitive polymers grafted onto silica-coated iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 326: 517–521.

Liu, A. H., Salabas, E.L., Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol.46: 1222 – 1244.

Madejova, J. (2003). FTIR techniques in clay mineral studies. *Vibrational Spectroscopy*, Vol.31: 1-10.

- Mathew, M. G., Sukumaran, K. R., Singhanian, R. R. and Pandey, A.(2008).Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol.67:898-907.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Vol. 31:426-428.
- Millett M. A., Effland M. J., Caulfield D. P. (1976) Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials-acid versus enzymatic. *Advances in Chemistry Series*, Vol.181:71-89.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol. 96: 673–686.
- Peng, Z.G., Hidajat, K., Uddin, M.S. (2004) Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 271:277–283
- Sahoo, B., Sahu, S. K., and Pramanik, P. (2011). A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *Journal of Molecular catalysis B:Enzymatic*, Vol. 69 : 95-102.
- Sehgal, D. and Vijay, I.K. (1994). A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Journal of Analytical Biochemistry*, Vol. 218: 87-91.
- Sulek, F., Drofenik, M., Habulin, M., Knez, Z., (2010). Surface functionalization of silicacoated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Vol.322:179–185.
- Tie, S. L., Lee, H. C., Bae, Y. S. Kim, M. B., Lee, K., Lee, C. H. (2007). Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Fe@SiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles with enhanced property. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 293: 278-285.
- Vinzant, T. B., Adney, W. S., Decker, S. R., Baker, J. O., Kinter, M. T., Sherman, N. E., Fox, J. W., Himmel, M. E. (2001). Fingerprinting *Trichoderma reesei* Hydrolases in

a Commercial Cellulase Preparation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.2: 99-107.

Zhang, M., Su, R. Li, Q., Qi, W. and He, Z. (2011). Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. *BioEnergy Research*, Vol.4:134-140.

Zhai, R., Zhang, B. Wan, Y., Li, C., Wang, J. and Liu, J. (2013). Chitosan–halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 214:304–309.

Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances, Vibrational Spectroscopy* Vol: 24: 452–481.

何志鴻。(2012)。綠鬚蜥腸道菌叢中一株嗜熱性厭氧產氫菌 *Clostridium* sp. GI512 之分離與特性研究，東海大學環境科學與工程研究所。

滿政顛。(2010)。有機無機可見光奈米磁性光觸媒材料之製備與應用，東海大學環境科學與工程系碩士論文。

劉盈孜。(2009)。製備具氨基之雌性吸附劑及其對銅離子吸附之研究，東海大學環境科學與工程系碩士論文

蔡裕榮。(2002)。以溶膠凝膠法製備透明導電氧化物薄膜的探討，中正大學化學研究所碩士論文。

陳伯仲。(2004)。二鈷化鈾奈米微粒之超導、比熱及磁性研究，輔仁大學物理系碩士論文。

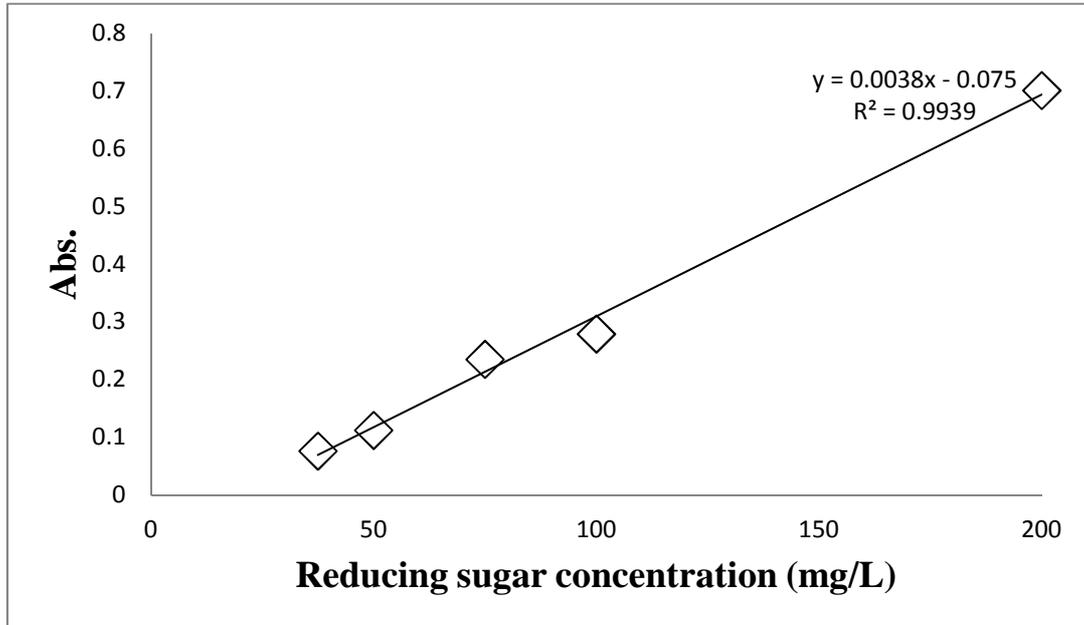
涂伊建。(2010)。生質酒精生產中稀硫酸前處理對蔗渣結構之影響，台南大學綠色能源科技學系碩士論文。

陳國誠。(2000)。生物固定化技術與產業應用。茂昌圖書，台北，48-49。

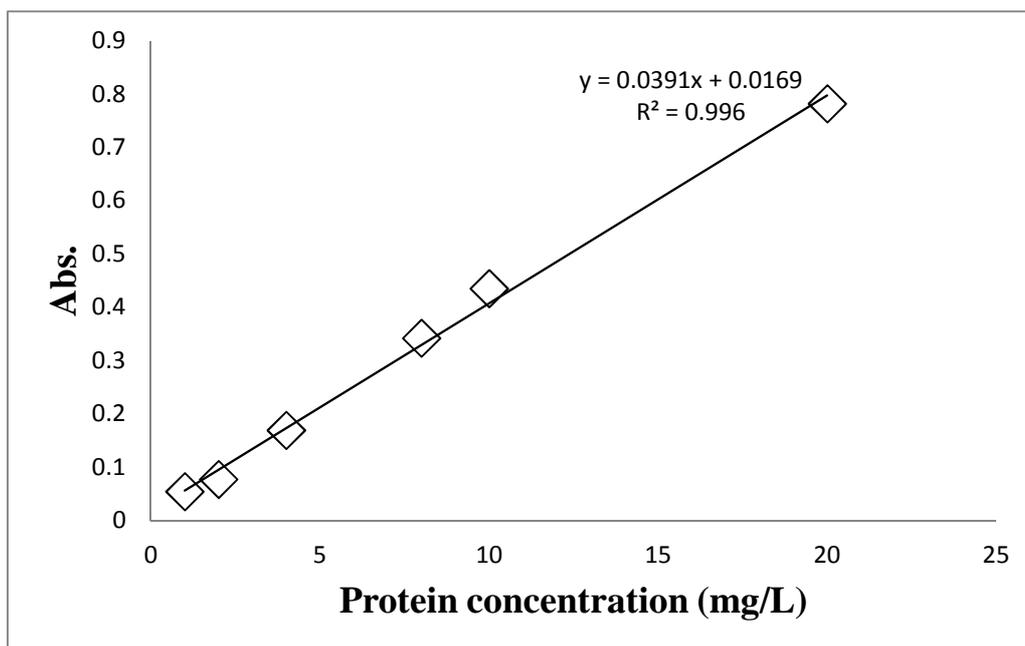
周子原。(2010)。磁載體固定化聚木醣酶之特性研究及其應用。雲林科技大學化學工程與材料科學系碩士論文。

# 附錄

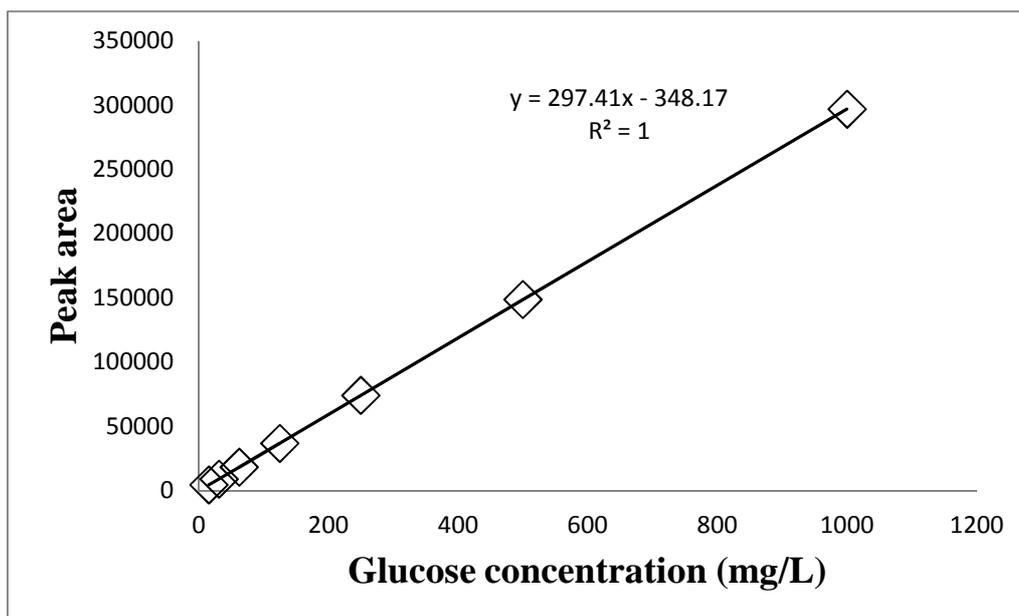
## 附錄一 還原糖檢量線



## 附錄二 蛋白質檢量線



### 附錄三 葡萄糖檢量線



附錄四 纖維二醣檢量線

