

# 明新科技大學 校內專題研究計畫成果報告

## 纖維材料水解反應動力學之研究 Reaction kinetics of cellulosic material hydrolysis

計畫類別：  整合型計畫  個人計畫

計畫編號： MUST-97-化工-06

執行期間： 97 年 1 月 1 日至 97 年 9 月 30 日

計畫主持人： 李靜宜

共同主持人：

計畫參與人員： 劉碩惠、賴君怡、林宛萱、吳博恩、鄭明宏

處理方式：除涉及專利或其他智慧財產權外得立即公開，  
唯必要時本校得展延發表時限。

可立即對外提供參考

(請打√)  一年後可對外提供參考

兩年後可對外提供參考

執行單位：工學院 化工系

中 華 民 國 97 年 10 月 30 日

## 摘要

在全球暖化及石油短缺的雙重衝擊之下，開發潔淨永續的再生資源已成為各國發展的重要課題。可反覆種植取得的纖維材料經水解後可發酵成為酒精，並衍生其他化學品，故纖維材料的利用一直是開發再生資源的重點之一。

以纖維材料為原料的再生資源開發主要關鍵在於降低酵素水解製程的成本，而這可由降低酵素製造成本與減少酵素使用成本兩方面著手。酵素反應動力學的研究有助於了解酵素催化，發揮酵素效能，減少酵素使用成本。

本計劃選用 $\alpha$ -纖維素、濾紙、微晶纖維素 Avicel PH101 與羧甲基纖維素等纖維材料作為原料進行纖維素水解的研究。由纖維素生產酒精須經數個步驟達成：首先纖維素在纖維素酶催化下水解成纖維二糖，纖維二糖再由 $\beta$ -葡萄糖酶分解成葡萄糖，最後為生物將葡萄糖發酵成酒精。纖維素酶的催化能力隨著纖維素的來源與結構不同及纖維二糖的存在而改變。研究分別在纖維二糖的存在與不存在的狀況下進行水解初速率的量測，建立描述纖維二糖抑制作用的動力學模型。利用 Michaelis-Menten 動力學模式模擬纖維素分解與纖維二糖抑制作用，以作為後續研究的參考。

關鍵詞：纖維材料 纖維素酶 纖維二糖 酵素抑制 酵素反應動力學

# Abstract

With the impacts of global warming and crude oil shortage, development of new clean, renewable energy becomes a top priority for many countries. Cellulosic materials are among the candidates of hot renewable resources, because they can be obtained from crops or agro-/industrial wastes and they can be converted to ethanol and ethanol derivatives.

The key issue to make cellulosic ethanol economically feasible is the reduction of enzyme cost in the production of ethanol from cellulosic materials, which can be achieved via the reduction of enzyme manufacturing cost and the minimization of enzyme usage. The understanding of enzyme kinetics could be beneficial in optimizing enzyme capability and consequently minimizing enzyme usage.

In this project, we will focus on the hydrolysis of cellulose-rich materials. The conversion of cellulose to ethanol can be accomplished in steps: cellulose is hydrolyzed to cellobiose by cellulase, followed by the cleavage of cellobiose into glucose under the catalysis of  $\beta$ -glucosidase, and finally the fermentation of glucose by microorganisms to produce ethanol. In the hydrolysis of cellulose, the performance of cellulase could be affected by the structure of cellulose and the existence of cellobiose. Kinetic studies regarding to the hydrolysis of cellulose with and without the presence of cellobiose was performed. These data were used to establish a Michaelis-Menten type of model to describe cellobiose inhibition as a basis for future studies.

Keywords: cellulosic materials, cellulase, cellobiose, enzyme inhibition, enzyme kinetics

# 目 錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
目錄.....	iii
表目錄.....	v
圖目錄.....	vi
第一章 緒論 .....	1
第二章 研究方法 .....	6
2.1 藥品 .....	6
2.1.1 溶液配製.....	6
2.2 儀器設備 .....	7
2.3 實驗步驟.....	7
2.3.1 纖維材料的酵素水解反應.....	7
2.3.2 纖維材料的酵素水解初速率測定.....	8
2.3.3 纖維水解酶活性測定 .....	9
2.3.4 纖維二醣酶活性測定 .....	10
2.3.5 葡萄糖和纖維二醣濃度測定.....	10
2.3.6 纖維材料結晶度測定 .....	11
2.3.7 纖維材料比表面積測定 .....	11
2.4 動力學模型 .....	12
2.4.1 以 Michaelis-Menten 方程式為基礎的纖維素水解動力學.....	12
第三章 結果與討論.....	15
3.1 酵素活性與糖的定量.....	15
3.2 反應初速率 .....	17
3.3 纖維二醣和葡萄糖的抑制作用.....	21

3.4 纖維材料水解的反應時間曲線 .....	22
3.5 纖維材料物性的影響.....	25
第四章 結論.....	27
參考文獻 .....	28

## 表目錄

表2-1	本研究使用的藥品.....	6
表2-2	本研究使用的儀器設備.....	7
表3-1	以纖維素酶水解濾紙的反應初速率.....	17
表3-2	以纖維素酶水解濾紙的動力學參數.....	18
表3-3	以纖維素酶水解Avicel PH101的反應初速率.....	19
表 3-4	以纖維素酶水解 Avicel PH101 的動力學參數.....	20
表3-5	以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應初速率.....	20
表3-6	在纖維二醣存在下以纖維素酶水解濾紙的反應初速率.....	22
表3-7	在葡萄糖存在下以纖維素酶水解濾紙的反應初速率.....	22
表3-8	各種纖維材料的結晶度.....	26
表3-9	各種纖維材料的比表面積.....	26

# 圖目錄

圖 1-1	利用纖維材料生產燃料、化學品和能源流程圖(Jorgensen <i>et al.</i> , 2007)。	3
圖3-1	以高效液相層析儀分析纖維材料水解的典型層析圖譜。	15
圖3-2	利用高效液相層析法定量的(a)葡萄糖與(b)纖維二糖濃度與吸收峰面積檢量線。	16
圖 3-3	以纖維素酶水解濾紙的反應初速率實驗值與以 Michaelis-Menten 動力學模式模擬結果。(◆：葡萄糖，■：纖維二糖，×：濾紙)	18
圖 3-4	以纖維素酶水解濾紙的反應初速率實驗值與以 Michaelis-Menten 動力學模式模擬結果。(◆：葡萄糖，■：纖維二糖，×：Avicel PH101)	20
圖3-5	以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應初速率實驗值。(◆：葡萄糖，■：纖維二糖，×：羧甲基纖維素)	21
圖3-6	以纖維素酶水解濾紙的反應時間曲線。	23
圖3-7	以纖維素酶水解Avicel PH101的反應時間曲線。	23
圖3-9	以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應時間曲線。	24
圖3-9	以纖維素酶水解 $\alpha$ -纖維素的反應時間曲線。	24
圖3-10	各種纖維材料的粉末X光繞射圖。	24

# 第一章 緒論

近年來，在石油蘊藏日漸枯竭，產油地區政治不穩定，以及溫室氣體快速累積引發全球暖化問題等多重衝擊之下，世界各國莫不重新檢驗能源政策，積極開發可能的替代能源。在此時空背景之下，各種再生資源，如風能、太陽能、生質能等，的利用成為各國發展的重點。生質能源是由生物原料取得或轉換而來的能源。由於生質能源作物可以種植而來，且在生長時以陽光為能量所進行的光合作用需消耗二氧化碳，故雖然燃燒時也會產生二氧化碳，其生命週期的淨二氧化碳排放量為零，故可視為可永續取得的潔淨能源。由生質所衍生出來的能源主要有生質氣體、氫能、生質柴油與生質酒精等，其中生質柴油與生質酒精屬於液態生質能源，可以分別添加在現有的柴油及汽油中，直接作為交通工具的燃料，未來若在汽機車船的燃油系統部分修改之後，更可能全面取代現行石化燃料。生質酒精經過化學轉化，更可還原成乙烯或生成其他有機化合物，提供重要化學工業原料，前途未可限量。

生質酒精可利用農產品(如玉米、甘藷)、農業副產品(如糖蜜)、農業廢棄物(如稻稈、玉米稈、甜菜渣)、和工業廢棄物(如紙漿廢液、木屑)作為原料，經處理或轉化後發酵產生。從原料的成分上來看，分成可直接發酵糖(如糖蜜)、澱粉(如玉米、甘藷)與纖維材料(如稻稈、玉米稈、甜菜渣、木屑)三大類。這其中，可直接發酵糖的來源有限；利用澱粉轉化成葡萄糖後發酵產生酒精，雖然技術上已經相當純熟，然而由於許多澱粉作物同時也是人類及牲畜的主要糧食，使用澱粉製造生質酒精會對全球糧食供給造成嚴重的影響。事實上，近幾年利用玉米澱粉製造的生質酒精，雖然能源替代率僅佔全球能源的3%不到，但由玉米缺貨漲價所引發的牛奶、肉品漲價乃至於原物料價格上揚的連鎖反應，已經對人類社會造成相當大的衝擊，因此



以食用澱粉作為生質酒精原料並非長久之計。生產糧食所產生的農業廢棄物相當多，據統計，凡生產稻米一噸，其廢棄物包括稻草、稻殼等約 1.1 噸(曹, 1998)，而造紙、木材工業也產生相當可觀的生質廢棄物。長遠來看，若能使用以農業、工業廢棄物為主的纖維材料作為生產酒精的原料，可兼收廢棄物減量及能源生產之利，而利用纖維材料所生產出來的酒精也被命名為纖維酒精。

天然纖維材料的主要成分包括纖維素、半纖維素與木質素，視物種之不同，這三種成分比例略有不同，以大體而言，纖維素含量約為 40~50%。纖維素與澱粉同為葡萄糖的聚合物，但由於鍵結的方式不同，使這兩種葡萄糖聚合物的結構、物性化性大不相同，水解方式也有極大的差異。纖維素結構單元是纖維二糖(是兩個葡萄糖以 $\beta$ -1,4-糖苷鍵連結而成的分子)，其聚合度的可達 15,000 以上。由於纖維二糖中的兩個葡萄糖分子反向排列結構，使纖維素以直鏈狀存在，長鏈上均勻分布的羥基之間形成的分子間氫鍵使纖維素局部區域出現類似結晶構造，因此，纖維素的水解遠比澱粉的水解困難。半纖維素含量占纖維材料的 30~40%，是以木糖及葡萄糖為主要單體所構成的聚合物，結構較纖維素鬆散，故較纖維素容易水解。木質素則是以含氧代苯丙醇的分子或其衍生物為主要單體所構成的芳香族聚合物，含量約為 10~20%，在纖維材料中扮演粘著劑的角色。

由於纖維材料結構較為堅固，若要分解為單糖，一般需先經過前處理，再利用酵素水解。前處理藉由研磨、粉碎、絞碎等動作使材料顆粒變小，增加表面積，再利用稀硫酸加熱、蒸氣爆裂、氫纖維爆裂或鹼處理初步破壞纖維材料，使其結構變鬆散，表面積增加，方便酵素水解。水解纖維材料的酵素以纖維素酶為主，其他還有木聚糖水解酶、果膠酶等。水解纖維素的酵素統稱為纖維素酶(cellulase)，包含至少三種以上的酵素，各負責催化不同的纖維素水解反應，將纖維素水解成葡萄糖。利用酵母菌或其他微生物將葡萄糖發酵產生的酒精經分離純化之後，可做為燃料或化學原料。有

關利用纖維材料生產燃料、化學品和能源等相關流程可參見圖一。

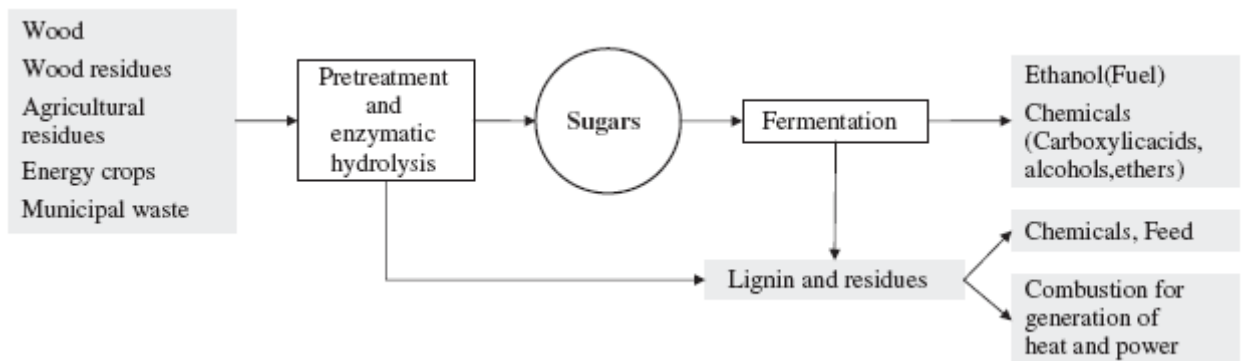


圖 1-1. 利用纖維材料生產燃料、化學品和能源流程圖(Jorgensen *et al.*, 2007)。

數十年來，雖然有關纖維材料利用的學術研究一直持續進行，但是由於經濟方面的考量，一直沒有實際投入生產，其主要原因之一就是因為纖維素酶價格的高居不下。近年來，由於基因改質技術的進步，使纖維素酶的製造成本大幅降低，由 2000 年的 5.40 美元/加侖酒精降低到 2005 年的 0.20 美元/加侖酒精(Moreira, 2005)，再加上原油的價格節節攀升，替代能源的需求甚殷，使利用纖維材料生產酒精的可行性大增。在 2007 年初 BioEthanol Japan 以木屑作為主要的原料，成立了全世界第一個以纖維材料製造生質酒精的工廠，隨後 Celunol 也在美國路易西安那州成立了以甘蔗渣作為原料，規模 1.4 百萬加侖/年的生質酒精工廠，此外加拿大政府也正積極推動生質酒精的量產中(McCoy, 2007)。預期在未來幾年，利用纖維材料生產生質酒精會有更快速的進展。

水解纖維素的酵素統稱為纖維素酶，實際上是一個龐大酵素系統，主要包含三大類，各負責催化不同的纖維素水解反應(Zhang, 2006):內切型葡聚糖水解酶(endoglucanase, 簡稱 EG)負責水解長鏈內部的 $\beta$ -1,4-糖苷鍵，外切型葡聚糖水解酶(exoglucanase 或 cellobiohydrolase, 簡稱 CBH)則自長鏈末端逐次水解出纖維二糖， $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)則進一步將纖維二糖水解成葡萄糖。內切型葡聚糖水解酶將大分子的纖維素切割成若干個較小的聚葡萄糖分

子，其作用主要在降低纖維素的聚合度，所生成的產物多半仍不溶於水。在纖維素酶組成中外切型葡聚糖水解酶占大多數，視其反應部位不同可分成兩大類，一類反應在還原端，切割出仍維持還原糖狀態的水溶性纖維二糖，另一類則自非還原端切割出纖維二糖單元並轉形成為還原糖。由於外切型葡聚糖水解酶的催化部位具有類似一個狹長通道(tunnel-like)的構造，纖維素被水解前分子末端須先進入通道內並吸附在酵素上，反應才能發生。由於纖維素水解時，酵素須先吸附到纖維素表面，再進行催化，故纖維素的物性，包括結構、結晶程度、聚合度、表面積等對酵素的催化活性有相當的影響。

雖然外切型葡聚糖水解酶即有能力將纖維素水解成纖維二糖，但若能先以內切型葡聚糖水解酶進行切割，產生較多低聚合度的纖維素分子，則有助於外切酶催化活性的提升。 $\beta$ -葡萄糖酶將纖維二糖水解成葡萄糖，其反應所需的纖維二糖由外切及內切型葡聚糖水解酶催化的水解反應提供，所以上游的酵素的作用情形與下游酵素的催化能力息息相關。酵素催化纖維素分解成葡萄糖的反應中，有所謂“協同作用(synergistic effect)”，即指酵素個別進行催化時催化能力的總和低於混合酵素的催化能力，其中最明顯的是內切型與外切型葡聚糖水解酶之間和兩種外切型葡聚糖水解酶之間的協同作用(Hoshino, 1997)。造成協同作用的原因目前並不十分清楚，究竟是單純的下游酵素因消耗中間產物造成協同作用，還是酵素之間存在有什麼樣的交互作用，目前並無具體的實驗證明。另一個值得注意的現象是纖維素酶有產物抑制(product inhibition)的現象，即纖維二糖的累積會抑制纖維素酶的催化，葡萄糖的累積會抑制 $\beta$ -葡萄糖酶的作用。有學者報告(Gruno *et al.*, 2004)指出纖維材料的性質會影響到纖維二糖對纖維素酶的抑制作用，這個現象引發了一些思考：對同一種纖維材料來說，纖維二糖對纖維素酶的抑制現象是否是單純的產物抑制？纖維材料特性真的會影響纖維二糖對纖維素酶的抑制作用嗎？

由於酵素成本在纖維酒精的製造上仍占相當大的比例，考慮酵素協同作

用、產物抑制作用的動力學模式有利於找到適當的酵素配方，酵素發揮最大效益。纖維材料特性因來源不同、前處理方式不同而有所差異，如果能將材料特性導入動力學模式中，預測水解不同特性纖維材料的最佳酵素配方，應該可以進一步降低在製造纖維酒精時的酵素成本。由於這是一個龐大的主題，短時間無法完成，現階段本研究將著重在纖維二醣對纖維素酶抑制作用的探討，了解是否可以用簡單的產物抑制模式解釋纖維二醣對纖維素的作用，或者需要一些修正。後續希望可以加入纖維材料特性的考量，探討纖維材料性質如何影響纖維二醣對纖維素酶的抑制作用，未來希望可以找到影響該抑制作用的關鍵材料性質，並將此性質的影響性納入動力學方程式中，並進一步考慮各種纖維素酶之間的協同作用對水解反應的影響程度，使動力學模式更加完善，達到隨纖維材料特性與濃度預測適當水解酵素配方的目的。

## 第二章 研究方法

### 2.1 藥品

表 2-1. 本研究使用的藥品

中文名稱	英文名稱	簡稱/化學式	規格	廠牌
$\alpha$ -纖維素	$\alpha$ -cellulose			Sigma
微晶纖維素	Avicel PH101	Avicel		Fluka
濾紙	filter paper		No.1	Whatman
羧甲基纖維素	carboxymethyl cellulose	CMC		Sigma
纖維素水解酶	cellulose from <i>Trichoderma Reesei</i> ATCC 26921	纖維素酶		Sigma
纖維二醣酶	cellobiase			Sigma
葡萄糖分析試劑	Glucose assay kit			Sigma
氮氣	nitrogen	N <sub>2</sub>		健仁氣體
四環黴素	tetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>		Sigma
亞胺環己酮	cycloheximide	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>		Sigma
檸檬酸鈉	sodium citrate	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>		Merck
鹽酸	Hydrochloric acid	HCl		Merck

去離子水(>18M $\Omega$ /cm)則是利用 Barnstead Nanopure 去離子水製造機製造。

#### 2.1.1 溶液配製

1. 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液：取 12.9g 檸檬酸鈉加去離子水至 1000 mL，再用鹽酸將 pH 值調到 4.8，存放於 4°C 冰箱備用。

2. 四環黴素溶液：在 5 mL 70%乙醇水溶液中加入 0.05 g 四環黴素，渦流振盪至完全溶解，再分裝成每小瓶 0.5 mL，存放於-70°C 冰箱。
3. 亞胺環己酮溶液：在 5ml 去離子水中加入 0.05g 的亞胺環己酮，渦流振盪至完全溶解，再分裝成每小瓶 0.5 mL，存放於-70°C 冰箱。
4. 0.008 N 硫酸水溶液：取 0.224 mL 98%硫酸，緩慢加到 1000 mL 去離子水中，再以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾，可在室溫下存放約 1 週。

## 2.2 儀器設備

表 2-2. 本研究使用的儀器設備

名稱	廠牌	型號
恆溫振盪箱	FIRSTEK	S300R
乾浴機	FIRSTEK	DB200-1-110
分光光譜儀	JASCO	V-530
掃描式電子顯微鏡	JEOL	JSM-6700F
氮氣吸脫附儀	QUANTACHROME	NOVA 4200e
離心機	HETTICH	MICRO22R
高效液相層析儀	WATERS	600E pump + 2410 RI detector
X 光繞射儀	SHIMADZU	XRD-6000

## 2.3 實驗步驟

### 2.3.1 纖維材料的酵素水解反應

纖維材料的水解反應主要採用 *Trichoderma reesei* 生產的纖維素酶(如 Novozyme 的 Celluclast 1.5L)來作為催化劑。纖維材料的懸浮液與酵素混合，

在恆溫震盪若干時間後，測量纖維二醣及葡萄糖濃度作成反應物與生成物濃度隨反應時間變化曲線。其詳細步驟如下：

1. 在 250 mL 錐形瓶中先加入 50 mL, 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液, 1.00 g 纖維材料( $\alpha$ -纖維素、微晶纖維素 Avicel PH101、濾紙或羧甲基纖維素), 並加入 0.4 mL 四環黴素溶液和 0.6mL 亞胺環己酮溶液, 混合均勻後再加入檸檬酸鈉緩衝溶液, 使總體積達到 100 mL。基質空白樣品不加酵素, 酵素空白樣品則不加纖維材料。
2. 將混合液放在 50 °C, 150 rpm 恆溫振盪箱加熱 1 小時。
3. 在混合液中加入 60 FPU 纖維素酶, 並開始計時。
4. 每隔一段時間(0、0.25、0.50、0.75、1、2、3、4、5、6、12、24、36、48、72、96 小時)各取 1mL 樣品, 以 85 °C 乾浴加熱 5 分鐘使酵素失去活性後離心取上層液進行糖濃度的分析或暫存-70 °C 冰箱。

### 2.3.2 纖維材料的酵素水解初速率測定

纖維材料的水解初速率採用 *Trichoderma reesei* 生產的纖維素酶(如 Novozyme 的 Celluclast 1.5L)來作為催化劑。纖維材料的懸浮液與酵素混合, 在恆溫震盪若干時間後, 測量纖維二醣及葡萄糖濃度以計算反應速率。其詳細實驗步驟如下：

1. 在 250 mL 錐形瓶中先加入 30 mL, 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液, 0.5 g 纖維材料( $\alpha$ -纖維素、微晶纖維素、濾紙或羧甲基纖維素), 並加入 0.2 mL 四環黴素溶液和 0.3mL 亞胺環己酮溶液, 混合均勻後再加入檸檬酸鈉緩衝溶液, 使總體積達到 50mL。
2. 將混合液放在 50 °C, 150 rpm 恆溫振盪箱加熱 1 小時。
3. 在混合液中加入 30 FPU 纖維素酶後, 即刻取各取 1mL 反應時間等於 0 的樣品, 並開始計時。樣品以 85 °C 乾浴加熱 5 分鐘使酵素失去活性後離心取上層液進行糖濃度的分析或暫存-70 °C 冰箱。

4. 反應時間經過 1 小時之後再取 1mL 樣品，以 85 °C 乾浴加熱 5 分鐘使酵素失去活性後離心取上層液進行糖濃度的分析或暫存-70 °C 冰箱。  
當進行有抑制劑存在情況下的反應出速率測定時，實驗步驟與上述類似，但於反應系中多添加定量纖維二醣或葡萄糖作為抑制劑，再進行測定。

### 2.3.3 纖維水解酶活性測定

纖維水解酶活性是根據 Ghose(1987)的濾紙分析法(filter paper assay, FPA)測定的，其操作步驟如下：

1. 準備至少兩種比例的待測酵素稀釋液。
2. 在試管中加入 1 mL 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液, 0.5 mL 酵素稀釋液及 50 mg Whatman No.1 濾紙。
3. 另準備一支試管加入 1.5 mL 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液和 50 mg Whatman No.1 濾紙作為酵素空白試驗。
4. 再準備一支試管，加入 1 mL 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液和 0.5 mL 酵素稀釋液，作為光學空白試驗。
5. 將各試管放在 50°C 水浴中加熱反應 1 小時。
6. 將各試管移至沸水中加熱 5 分鐘，使酵素失去活性。
7. 將反應液離心後取上清液 1 mL，以 DNS 法測定還原糖濃度。
8. 利用使反應釋出還原糖量最接近 2 mg，且 1 個大於，另 1 個小於 2 mg 的兩種酵素稀釋液倍率內插換算出使反應剛好釋出 2 mg 還原糖的酵素稀釋倍率，再根據下列公式換算原酵素液以濾紙單位(filter paper unit, FPU) 表示的纖維水解酶活性。



$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{enzyme concentration to release 2.0 mg glucose}} \text{ units/mL}$$

$$\text{concentration} = \frac{1}{\text{dilution}} = \frac{\text{volume of enzyme in dilution}}{\text{total volume in dilution}}$$

#### 2.3.4 纖維二醣酶活性測定

纖維二醣酶活性是根據 Ghose(1987)的纖維二醣酶分析法(cellobiase assay)測定的，其操作步驟如下：

1. 利用纖維二醣和 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液配製 15 mM 纖維二醣溶液。
2. 準備至少兩種比例的待測酵素稀釋液。
3. 在試管中加入 0.5 mL 的酵素稀釋液和 0.5 mL 的 15 mM 纖維二醣溶液。
4. 另準備一支試管加入 0.5 mL 的 0.05 M, pH 4.8 檸檬酸鈉緩衝溶液和 0.5 mL 的 15 mM 纖維二醣溶液作為酵素空白試驗。
5. 將各試管放在 50°C 水浴中加熱反應 30 分鐘。
6. 將各試管移至沸水中加熱 5 分鐘，使酵素失去活性。
7. 利用葡萄糖分析試劑分析葡萄糖濃度。
8. 利用使反應釋出葡萄糖量最接近 1 mg，且 1 個大於，另 1 個小於 1 mg 的兩種酵素稀釋液倍率內插換算出使反應剛好釋出 1 mg 葡萄糖的酵素稀釋倍率，再根據下列公式換算原酵素液以纖維二醣單位(cellobiose unit, CBU) 表示的纖維二醣酶活性。

$$\text{CBU} = \frac{0.0926}{\text{enzyme concentration to release 1.0 mg glucose}} \text{ units/mL}$$

$$\text{concentration} = \frac{1}{\text{dilution}} = \frac{\text{volume of enzyme in dilution}}{\text{total volume in dilution}}$$

#### 2.3.5 葡萄糖和纖維二醣濃度測定

水解反應產物纖維二醣及葡萄糖濃度是利用高效液相層析儀(HPLC)分析，並用已知濃度的纖維二醣及葡萄糖標準品製作檢量線(calibration curve)，換算濃

度。 高效液相層析分析條件如下：

1. 分析管柱： BioRad Aminex 87H column, 9  $\mu\text{m}$ , 300\*7.8 mm，管柱溫度維持在 65°C。
2. 移動相： 0.008 N 硫酸水溶液，流速 0.6 mL/min。
3. 檢測器：示差折光偵測器(refractive index detector, RI)，檢測器溫度設定為 35°C。
4. 樣品：將新鮮或解凍後渦流振盪樣品以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後使用。把葡萄糖、纖維二糖標準品作檢量線，作為測量葡萄糖及纖維二糖的濃度。

### 2.3.6 纖維材料結晶度測定

結晶程度：纖維材料的結晶程度將利用 Segal *et al.* (1959)所定義的結晶指標 (crystal index, CrI %)表示：

$$\text{CrI \%} = (I_{\text{cr}} - I_{\text{am}}) / I_{\text{cr}} \%$$

其中  $I_{\text{cr}}$  表纖維素 200 晶面( $2\theta = 22.5^\circ$  附近)的 X 光繞射峰強度， $I_{\text{am}}$  表示 X 光繞射儀在非結晶區( $2\theta = 18.7^\circ$  附近)測得的繞射峰強度。

使用 Shimadzu XRD-6000 X-光粉末繞射儀(Cu/K $\alpha$   $\alpha$ 射源，波長=1.5418Å)測樣品在  $2\theta = 10\sim 45^\circ$  範圍的繞射強度，再依結晶指標定義計算。

### 2.3.7 纖維材料比表面積測定

使用 Quantachrome NOVA 4200e 等溫吸/脫附儀進行氮氣等溫吸附，再依據(BET)模型樣品的比表面積估計。

其操作步驟如下：

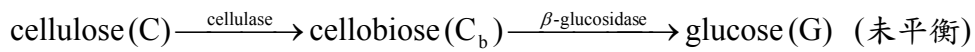
1. 樣品前處理：將樣品靜置在 105°C 的真空烘箱中 24 小時，去除吸附水分。
2. 將樣品移至乾燥皿中靜置冷卻。

3. 以樣品管精確秤取約 0.1 g 樣品(記錄至 0.1 mg)，移至氮氣吸/脫附儀，以 200°C 除氣 6 小時，去除吸附氣體(空氣)和水蒸氣等。
4. 將樣品管浸泡在液態氮瓶中維持 77K 恆溫，於相對壓力(P/P<sub>0</sub>) = 0.05~0.30 範圍中取 6 點進行氮氣等溫吸附。
5. 根據 BET 吸附模型計算樣品比表面積。

## 2.4 動力學模型

### 2.4.1 以 Michaelis-Menten 方程式為基礎的纖維素水解動力學

本研究探討纖維素酶水解纖維材料的反應動力學，了解是否可以用簡單的產物抑制模式解釋纖維二糖對纖維素的作用，或者需要一些修正。在此，我們以 Michaelis-Menten 動力學模式為起點考慮纖維材料的水解反應。若簡化纖維素的水解反應為



則纖維材料消耗速率、纖維二糖生成速率與葡萄糖的生成速率分別為：

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max,c} C}{K_{m,c} + C} = r_c \quad (2.1)$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{V_{\max,c} C}{K_{m,c} + C} - \frac{0.5 V_{\max,g} C_b}{K_{m,g} + C_b} = r_b \quad (2.2)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{V_{\max,g} C_b}{K_{m,g} + C_b} = r_g \quad (2.3)$$

其中  $C$  = 基質纖維材料濃度

$C_b$  = 纖維二糖濃度

$G$  = 葡萄糖濃度

$K_m$  = Michaelis-Menten 常數

$V_{\max}$  = 最大反應速率

許多研究發現纖維素酶水解纖維材料的反應中有產物抑制的現象，即指產物隨著產物生成與累積濃度增加導致纖維素酶的催化速率減少的現象。考慮產物與酵素在活化位(active site)生成，可能因解離(或脫附)速率較慢而造成抑制作用，故將它視為競爭型抑制劑是合理的作法。在纖維素酶水解纖維材料的反應動力學中加入產物抑制現象的考量，則纖維材料消耗速率、纖維二醣生成速率與葡萄糖的生成速率分別為：

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max,c} C}{K_{m,c} \left(1 + \frac{C_b}{K_{i,b}}\right) + C} = r_c \quad (2.4)$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{V_{\max,c} C}{K_{m,c} \left(1 + \frac{C_b}{K_{i,b}}\right) + C} - \frac{0.5 V_{\max,g} C_b}{K_{m,g} \left(1 + \frac{G}{K_{i,g}}\right) + C_b} = r_b \quad (2.5)$$

$$\frac{dG}{dt} = \frac{V_{\max,g} C_b}{K_{m,g} \left(1 + \frac{G}{K_{i,g}}\right) + C_b} = r_g \quad (2.6)$$

其中  $C, C_b, G, K_m$  及  $V_{\max}$  的定義與前式相同

$K_{i,b}$  = 纖維二醣抑制常數

$K_{i,g}$  = 葡萄糖抑制常數

在反應初始期，纖維二醣與葡萄糖濃度較低，故其對纖維素酶抑制作用可以忽略不計。利用 Hanes-Woolf plot 方法，式(2.1)和式(2.3)分別整理成

$$\frac{C}{r_c} = \frac{K_{m,c}}{V_{\max,c}} + \frac{C}{V_{\max,c}} \quad (2.7)$$

$$\frac{G}{r_g} = \frac{K_{m,g}}{V_{\max,g}} + \frac{G}{V_{\max,g}} \quad (2.8)$$

測量基質纖維材料在不同基質濃度條件下測量纖維素酶水解纖維材料的反應初速率，並計算  $C/r_c$  和  $G/r_g$  數值，將  $C/r_c$  和  $C, G/r_g$  和  $G$  以最小方差逼近法

進行線性迴歸計算，再利用式(2.7)和式(2.8)估計無抑制劑(纖維二醣)條件下的纖維素水解動力學參數  $K_{m,c}$  和  $V_{max,c}$  及  $K_{m,g}$  和  $V_{max,g}$ 。

其次，再在不同的纖維二醣濃度下測纖維素酶催化纖維材料水解反應的初速率。將初速率、濃度、 $K_{m,c}$  和  $V_{max,c}$  等數值代入式(2.4)估計纖維二醣抑制常數  $K_{i,b}$ 。同理，於不同的葡萄糖濃度下測反應初速率以估計葡萄糖抑制常數  $K_{i,g}$ 。

## 第三章 結果與討論

### 3.1 酵素活性與糖的定量

在進行酵素反應之前須先測量酵素活性，以作為量取酵素的依據。本研究中所使用的纖維素水解酶(cellulose)為市售之 celluclast 1.5L 酵素，由 *Trichoderma Reesei* ATCC 26921 所生產，並經初步純化而成的液態酵素，此酵素由濾紙分析法實驗測得的酵素活性為 84 FPU/mL，其值符合廠商分析報告中所標示數值，後續實驗即以此數值作為量取纖維素酶的依據。研究中所使用的纖維二醣酶 (cellobiase，也稱為  $\beta$ -glucosidase) 為市售之 Novozyme188 酵素，是由 *Aspergillus niger* 所生產的酵素，利用纖維二醣作為基質進行分析測試所測得酵素活性為 244 CBU/mL，與廠商出廠分析報告所報導的 268 CBU/mL 相符，所以後續實驗均以 244 CBU/mL 作為量取纖維二醣酶的依據。

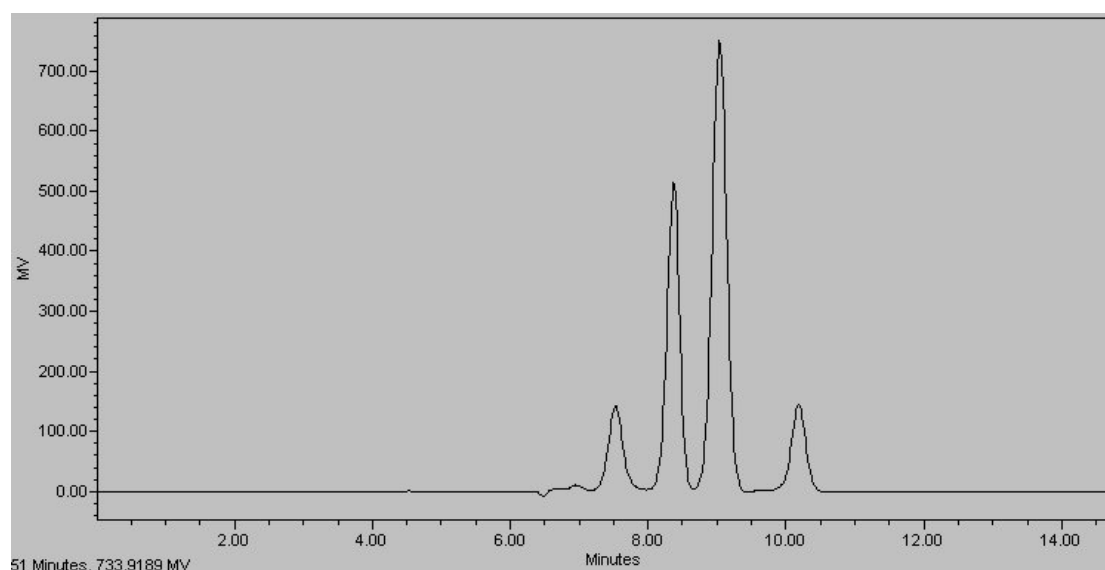
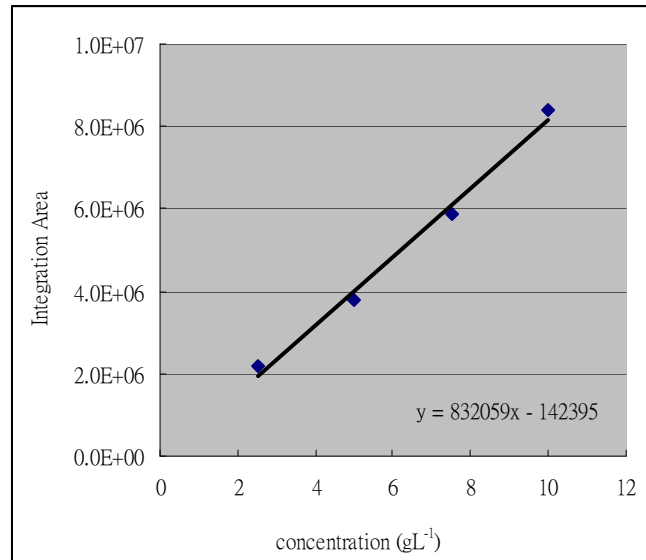


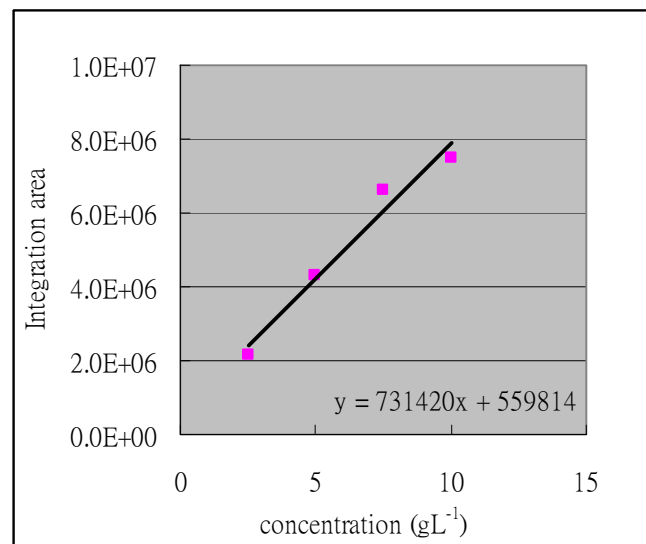
圖 3-1 以高效液相層析儀分析纖維材料水解的典型層析圖譜。

利用高效液相層析法分析纖維材料水解的典型層析圖如圖 3-1。主要的層析峰包括可溶性寡糖、檸檬酸、纖維二醣、葡萄糖與抗生素等，其滯留時間分別為 6.5~7.0、7.5、8.3、9.0、10.1 分鐘。其中可溶性寡糖、纖維二醣與葡萄糖為纖

維材料水解產物，檸檬酸與抗生素則是緩衝溶液中的成分。水解物中的木糖生成量較低，這應該是因為研究中所選取的材料半纖維素含量較低與纖維素酶特异性雙重因素的關係。圖 3.2 是利用高效液相層析法進行纖維二醣與葡萄糖定量的醣濃度與吸收峰面積檢量線，可溶性寡醣則未特別加以定量。



(a)



(b)

圖 3-2 利用高效液相層析法定量的(a)葡萄糖與(b)纖維二醣濃度與吸收峰面積檢量線。

### 3.2 反應初速率

本研究所使用的 Whatman11 號濾紙是由棉花纖維精製而成，其 $\alpha$ -纖維素含量高達 98%以上，聚合度  $DP_N$  約為 750 (Zhang and Lynd, 2006)。以纖維素酶水解濾紙的反應初速率數據見於表 3-1，反應所使用的酵素量為 60 FPU/g 基質。其中葡萄糖生成速率與纖維二糖生成速率分別由單位時間內葡萄糖與纖維二糖濃度變化計算而得，纖維材料的消耗速率則是由葡萄糖與纖維二糖的生成速率計算得到。隨著反應系統中濾紙的添加量增加，葡萄糖與纖維二糖的生成速率與濾紙的消耗速率也有增加的趨勢，但增加率則隨濾紙的添加量增加而漸漸趨緩。表 3-1 的數據顯示纖維二糖的生成速率高於葡萄糖生成速率，由此可見 celluclast 1.5L 這個酵素的纖維素水解能力 (cellulose activity) 高於纖維二糖水解能力 ( $\beta$ -glucosidase activity)。這一點與學者報告之 *T. reesei* 纖維素酶組成以外切酶為主 (CHB1 占  $60\pm 5\%$ ，CHB2 占  $20\pm 6\%$ )，內切酶次之 ( $12\pm 3\%$ ) 的現象相吻合 (Zhang et al., 2004)。由於反應初速率隨濾紙添加量變化的趨勢與 Michaelis-Menten 動力學模式所描述的情形類似，因此，儘管 Michaelis-Menten 動力學模式原本是根據均相酵素反應系統推導而來，此處還是利用它來模擬濾紙的水解。

表 3-1 以纖維素酶水解濾紙的反應初速率

濾紙用量 ( $gL^{-1}$ )	葡萄糖生成速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )	纖維二糖生成速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )	濾紙消耗速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )
1	0.16	0	0.16
5	0.50	0.50	1.00
10	1.01	1.58	2.60
30	1.44	3.32	4.76
50	1.66	4.36	6.02

表 3-2 是根據 Michaelis-Menten 動力學模式，根據酵素水解反應初速率數



據，以 Hanes-Woolf plot 方法(Shular and Kargi, 2002) 線性迴歸所得的動力學參數。根據這些動力學參數所模擬出來的反應速率-基質(反應物)濃度關係圖與數據點的比較可見於圖 3-3。由圖中所見發現這個簡單的動力學模式已經可以大致上描述出反應初速率與基質濃度的關係，這是因為在初速率反應條件下，產物濃度不高，產物抑制的現象尚不顯著的關係。

表 3-2 以纖維素酶水解濾紙的動力學參數

$K_{m,c}$	$39.4 \text{ gL}^{-1}$
$K_{m,g}$	$13.0 \text{ gL}^{-1}$
$V_{\max,c}$	$7.76 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$
$V_{\max,g}$	$2.09 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$

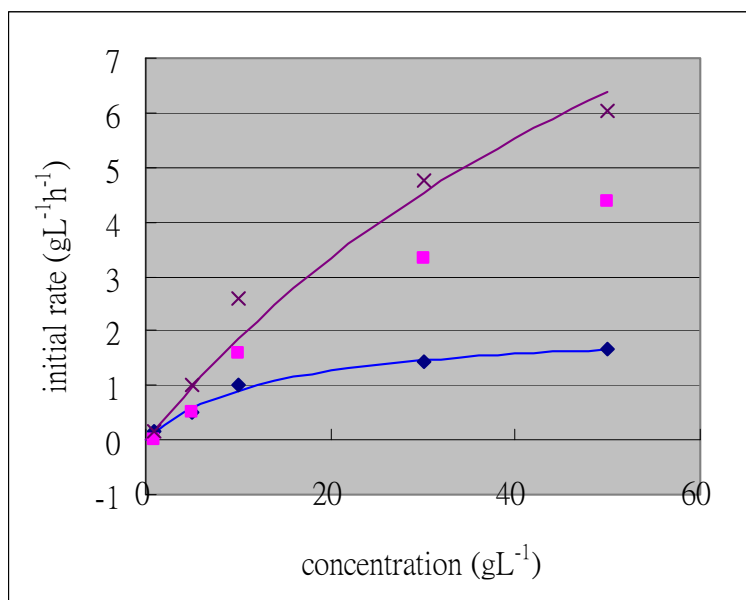


圖 3-3 以纖維素酶水解濾紙的反應初速率實驗值與以 Michaelis-Menten 動力學模式模擬結果。(◆：葡萄糖，■：纖維二糖，×：濾紙)

除了使用濾紙當作水解基質之外，我們也嘗試以纖維素酶催化微晶纖維素

Avicel PH101 和可溶性的羧甲基纖維素的水解。微晶纖維素 Avicel PH101 是由植物所取得的 $\alpha$ -纖維素去除非晶型纖維素後所得到的高度結晶纖維素，其成分有 97% 以上是纖維素(Yang *et al.*, 2006)，聚合度  $DP_N$  約為 300 (Zhang and Lynd, 2006)。Avicel PH101 水解的反應初速率數據見於表 3-3；根據 Michaelis-Menten 動力學模式與酵素水解反應初速率數據，以 Hanes-Woolf plot 方法線性迴歸所得的動力學參數見於表 3-4。根據這些動力學參數所模擬出來的反應速率-基質(反應物)濃度關係圖與數據點的比較可見於圖 3-4。羧甲基纖維素水解的反應初速率數據見於表 3-5，其反應速率-基質(反應物)濃度關係圖則見於圖 3-5。與濾紙的水解初速率比較發現微晶纖維素 Avicel PH101 的葡萄糖生成速率及纖維二糖生成速率均較高，顯示 Avicel PH101 比較容易被酵素水解，而羧甲基纖維素水解初速率則比前二者低許多。羧甲基纖維素是由數個單糖所構成的可溶性纖維素，其組成單體有部分-OH 基(主要為 2 號碳和 6 號碳上的-OH 基)被羧甲基所取代。由於聚合度較低，內切型纖維素酶可反應位置則相對較少，加上羧甲基取代造成羧甲基纖維素並非纖維素酶的天然反應物，這些都可能影響酵素作用，因此 celluclast 1.5L 酵素對羧甲基纖維素表現出較低的水解活性。

表 3-3 以纖維素酶水解 Avicel PH101 的反應初速率

反應物濃度 ( $gL^{-1}$ )	葡萄糖生成速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )	纖維二糖生成速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )	Avicel PH101 消耗速率 ( $gL^{-1}hr^{-1}$ )
1	0.18	0.045	0.22
5	0.62	0.70	1.312
10	1.21	1.95	3.16
30	1.75	4.49	6.24
50	1.78	5.06	6.84

表 3-4 以纖維素酶水解 Avicel PH101 的動力學參數

$K_{m,c}$	$70.7 \text{ gL}^{-1}$
$K_{m,g}$	$13.1 \text{ gL}^{-1}$
$V_{max,c}$	$7.76 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$
$V_{max,g}$	$2.22 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$

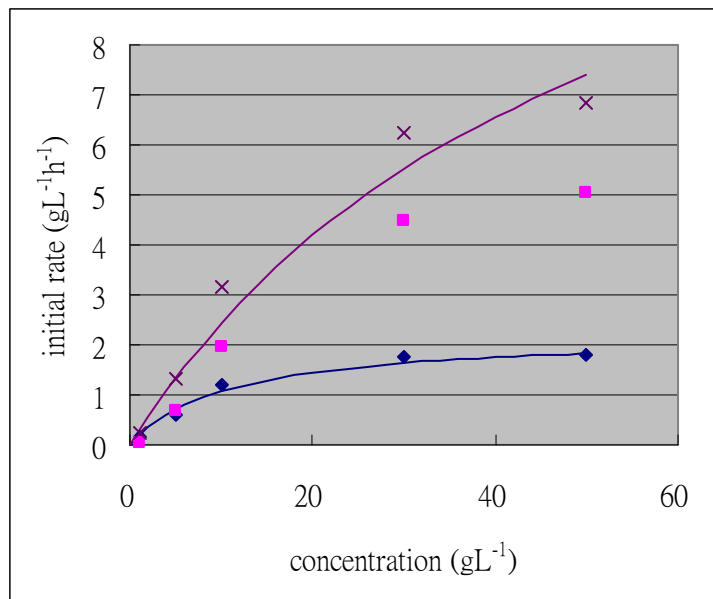


圖 3-4 以纖維素酶水解濾紙的反應初速率實驗值與以 Michaelis-Menten 動力學模式模擬結果。(◆：葡萄糖，■：纖維二糖，×：Avicel PH101)

表 3-5 以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應初速率

反應物濃度 ( $\text{gL}^{-1}$ )	葡萄糖生成速率 ( $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )	纖維二糖生成速率 ( $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )	羧甲基纖維素消耗速率 ( $\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ )
1	0.12	0.054	0.17
5	0.13	-0.08	0.047
10	0.34	0.040	0.38
30	0.89	0.15	1.05
50	1.32	0.51	1.83

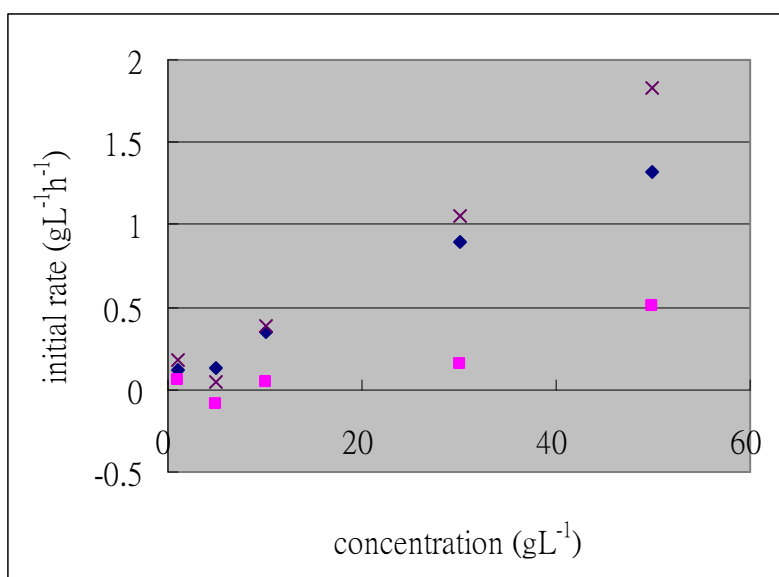


圖 3-5 以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應初速率實驗值。(◆：葡萄糖，■：纖維二醣，×：羧甲基纖維素)

### 3.3 纖維二醣和葡萄糖的抑制作用

為探討纖維二醣和葡萄糖對纖維素分解酶的抑制作用，我們在反應系統中加入纖維二醣和葡萄糖，測量生成物生成速率和反應基質消耗速率。在以  $10\text{g L}^{-1}$  濾紙為基質，酵素量為  $60\text{ FPU/g}$  基質的反應系中，添加  $10\text{g L}^{-1}$  纖維二醣，測得反應初速率如表 3-6。因為纖維二醣同時是纖維素分解的產物與葡萄糖生成的反應物，因此其生成速率隨這兩種反應的消長而有所變化。由實驗數據顯示濾紙的消耗速率隨著纖維二醣的增加而減少，顯示纖維二醣對濾紙纖維素的水解有抑制作用。利用表 3-6 的濾紙消耗速率、式(2.4)與表 3-2 的動力學參數可以估計出纖維二醣對纖維素分解酶的抑制常數為  $29.83\text{ g L}^{-1}$ 。表 3-7 為在葡萄糖存在下以纖維素酶水解濾紙的反應初速率，與未添加葡萄糖的情況比較，反應初速率均有減少的情形，然而或許因生成之纖維二醣與葡萄糖較微量，疑似有定量不準的問題，因此這些數字有待進一步確認。

表 3-6 在纖維二醣存在下以纖維素酶水解濾紙的反應初速率

纖維二醣濃度 (g L <sup>-1</sup> )	葡萄糖生成速率(gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	纖維二醣生成速率(gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	濾紙消耗速率 (gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )
5	2.94	-0.62	2.32
10	1.01	0.92	1.93
15	1.96	-0.29	1.67

表 3-7 在葡萄糖存在下以纖維素酶水解濾紙的反應初速率

纖維二醣濃度 (g L <sup>-1</sup> )	葡萄糖生成速率(gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	纖維二醣生成速率(gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )	濾紙消耗速率 (gL <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> )
5	-0.053	1.37	1.32
10	0.53	1.53	2.06
15	0.22	1.70	1.92

### 3.4 纖維材料水解的反應時間曲線

圖 3-6~圖 3-9 分別為以纖維素酶水解濾紙、微晶纖維素 Avicel PH101、羧甲基纖維素以及 $\alpha$ -纖維素的反應時間曲線。在這四種纖維材料的反應時間曲線中，纖維材料的濃度持續下降，而纖維二醣濃度隨著反應時間進行，先是快速增加，在約 6 小時之後達最高值，之後漸漸降低，葡萄糖濃度則是持續增加。由圖中可見在 96 小時的反應時間內濾紙與微晶纖維素 Avicel PH101 的水解程度達 90%以上， $\alpha$ -纖維素接近 80%，而羧甲基纖維素的水解程度最低，僅達 20%左右。這些結果顯示材料的特性對纖維素酶的催化活性有顯著的影響。研究人員針對一些纖維材料的物性，如結晶度、比表面積、酵素可及比表面積、聚合度、木質素含量、乙醯基含量等對水解反應速率與水解程度的影響(Wang *et al.*, 2006, Al-Zuhair, 2007, Zhu *et al.*, 2008)。Zhu *et al.*指出對相同材料而言，結晶度的減少有助於增加水解初速率，而木質素的去除則有助於提高材料水解程度，Wang *et al.*則指出材料溶脹及水解造成的表面腐蝕對水解速率有重要的影響。為了解纖維材

料物性與水解情形的關聯，故本研究也進行一些性質分析。

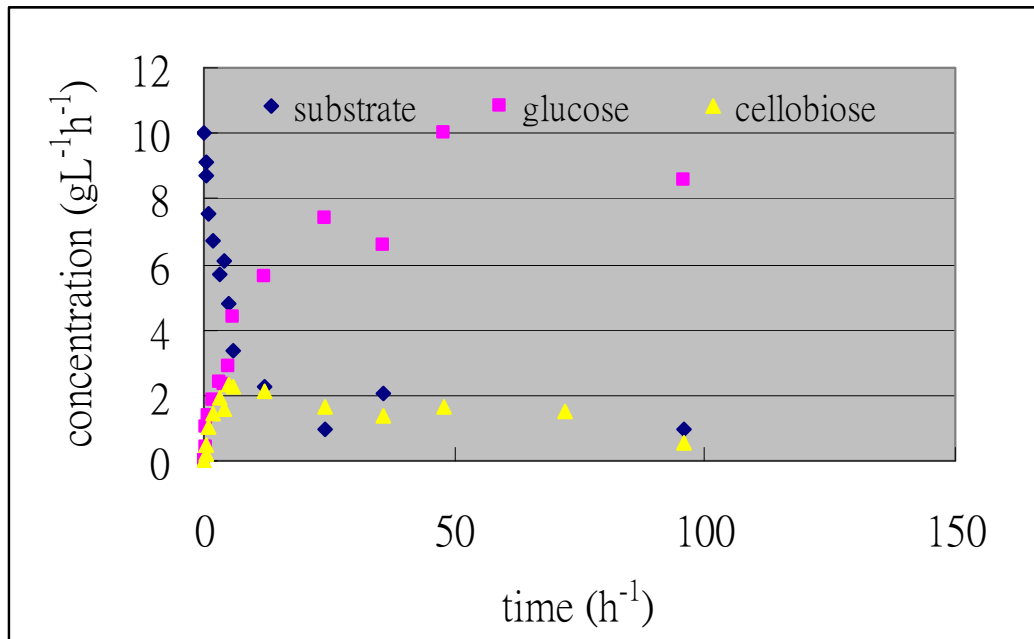


圖 3-6 以纖維素酶水解濾紙的反應時間曲線。

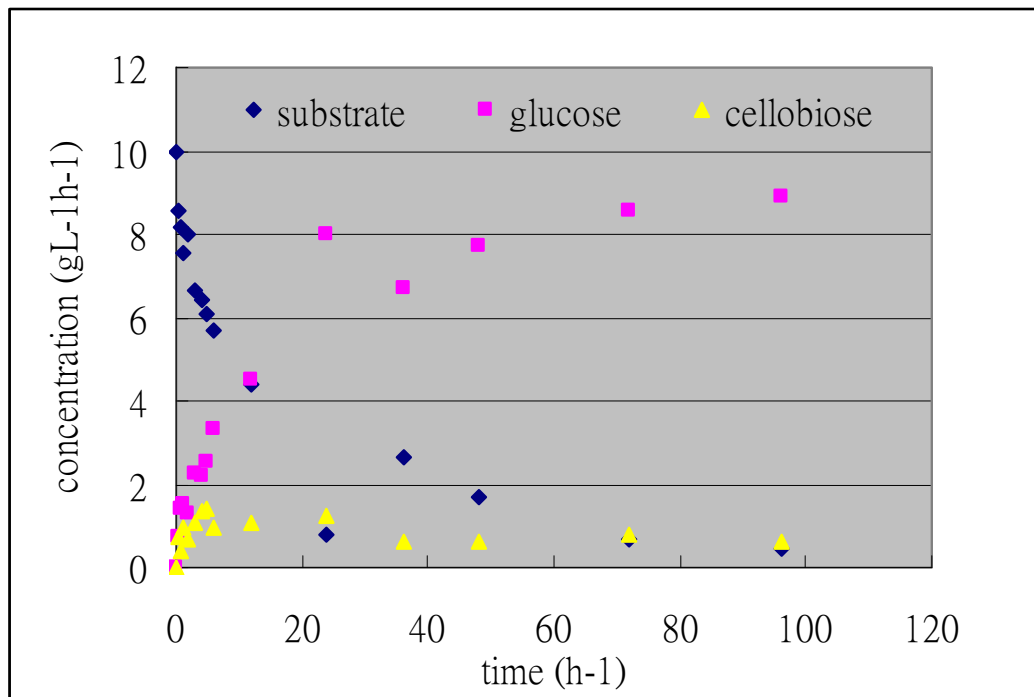


圖 3-7 以纖維素酶水解 Avicel PH101 的反應時間曲線。

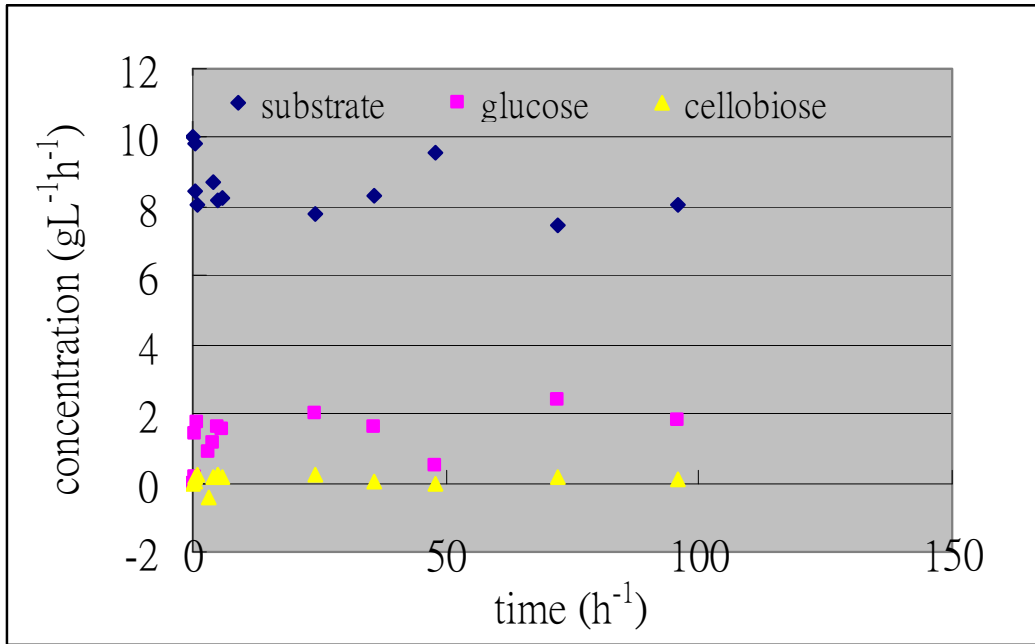


圖 3-8 以纖維素酶水解羧甲基纖維素的反應時間曲線。

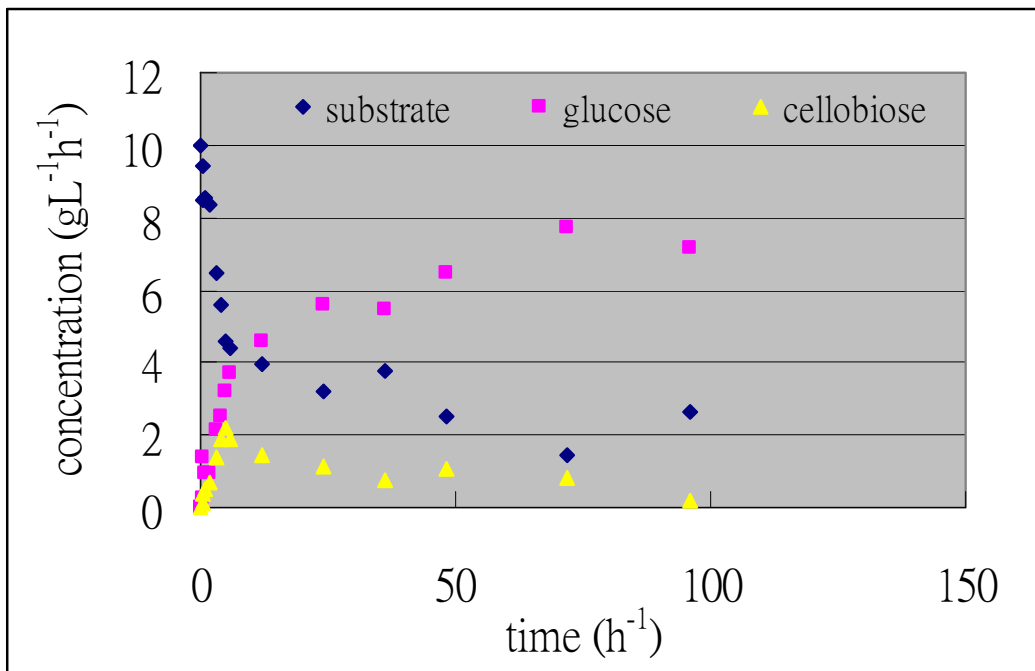


圖 3-9 以纖維素酶水解 $\alpha$ -纖維素的反應時間曲線。

### 3.5 纖維材料物性的影響

圖 3-10 是各種纖維材料的粉末 X 光繞射圖。α-纖維素、Avicel PH101 和濾紙在  $2\theta = 22.5^\circ$  附近都有明顯的繞射峰，這個繞射峰是對應於纖維素的 200 晶面，顯示這些纖維材料有較高的結晶程度，而  $2\theta = 18.7^\circ$  附近的繞射訊號則對應於纖維素的非晶形區域(Wang *et al.*, 2006)。由這兩個角度的訊號強度所計算出來的結晶指數 CrI % (表 3-8) 顯示這些纖維材料的結晶度依序為濾紙 > Avicel PH101 > α-纖維素 > 羧甲基纖維素。纖維素本身為直線形的聚合物，因為聚合單體是由兩個葡萄糖反向結合而成的纖維二糖。這些纖維二糖單體上的-OH 基之間可形成氫鍵，聚合單體因氫鍵存在而整齊排列使得纖維素分子的部分區域形成類似結晶的結構。外切型(CBH)與內切型(EG)的纖維素酶對結晶區的水解均有作用，而非結晶區則僅由內切酶 (EG) 催化其水解。(黃, 2007) 這個情形或可解釋濾紙與微晶纖維素 Avicel PH101 的水解初速率接近，而非晶形的羧甲基纖維素水解初速率較低。

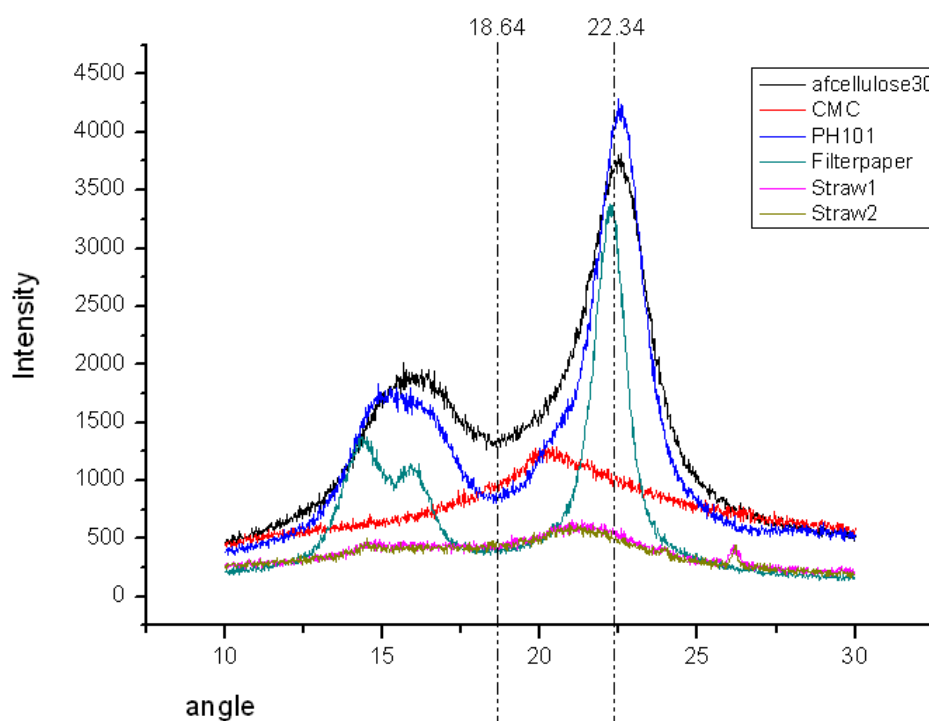


圖 3-10 各種纖維材料的粉末 X 光繞射圖。



表 3-8 各種纖維材料的結晶度

	濾紙	Avicel PH101	羧甲基纖維素	$\alpha$ -纖維素
2 $\theta$ =18.7°訊號強度	436	788	956	1350
2 $\theta$ =22.5°訊號強度	3356	4094	962	3666
結晶指數 CrI %	87.0	80.6	0.62	63.2

表 3-9 列出各種纖維材料的比表面積，比表面積大小依序為濾紙 > Avicel PH101 >  $\alpha$ -纖維素。羧甲基纖維素為可溶性纖維素，因此此處測得之比表面積為其固態粉末比表面積，故僅供參考。當酵素催化纖維材料的水解時，酵素必須先找到正確的水解位置並吸附到材料的表面上，因此理論上酵素可及的比表面積愈大，愈有利於水解反應的進行。由數據來看，濾紙與 Avicel PH101 的比表面積雖然有些差距，但不能完全解釋它們在水解速率上的差異。由於酵素分子大小約數十 Å，無法接觸到某些較小孔隙，因此可能需要更進一步去探討酵素可及比表面積，並同時考慮其他物性因素才能較準確地與水解速率關聯。

表 3-9 各種纖維材料的比表面積

	$\alpha$ -纖維素	羧甲基纖維素	Avicel PH101	濾紙
比表面積 ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )	14.8	31.5	19.5	35.0

## 第四章 結論

本研究分別在纖維二醣的存在與不存在的狀況下進行水解初速率的量測，建立描述纖維二醣抑制作用的動力學模型。利用 Michaelis-Menten 動力學模式模擬纖維素分解與纖維二醣抑制作用，求出以纖維素酶水解濾紙的動力學參數  $K_{m,c}$ 、 $K_{m,g}$ 、 $V_{max,c}$ 、 $V_{max,g}$  和  $K_{i,b}$  分別為  $39.4 \text{ gL}^{-1}$ 、 $13.0 \text{ gL}^{-1}$ 、 $7.76 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ 、 $2.09 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  和  $29.83 \text{ gL}^{-1}$ 。在濾紙、微晶纖維素 Avicel PH101、羧甲基纖維素以及 $\alpha$ -纖維素四種纖維材料的反應時間曲線中，纖維材料的濃度持續下降，纖維二醣濃度隨著反應時間進行，先是快速增加，在約 6 小時之後達最高值，之後漸漸降低，而葡萄糖濃度則是持續增加。基質消耗速率依序為微晶纖維素 Avicel PH101 最高，濾紙次之， $\alpha$ -纖維素第三，羧甲基纖維素最小。羧甲基纖維素的水解速率最小可能是因為羧甲基纖維素並非纖維素酶的天然基質，並且僅內切型纖維素酶對非晶形羧甲基纖維素有水解作用的緣故。纖維材料的結晶度與酵素可及比表面積會影響纖維素酶催化纖維材料的水解，但其影響性需更進一步評估。

## 參考文獻

- S. Al-Zuhair, "The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis", *Biores. Technol.*, 99(10), 4078, 2007.
- T. K. Ghose, "Measurement of cellulose activities", *Pure App. Chem.*, 59, 257-268, 1987.
- M. Gruno, P. Väijämäe, G. Pettersson, G. Johansson, "Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate", *Biotechnol. Bioeng.*, 86(5), 503, 2004.
- Q. Gan, S.J. Allen, G. Taylor, "Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling", *Process Biochem.*, 38, 1003, 2003.
- E. Hoshino, M. Shiroishi, Y. Amano, M. Nomura, "Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities", *J. Ferment. Bioeng.*, 84(4), 300, 1997.
- A. A.Huang, "Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system", *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1421, 1975.
- H. Jorgensen, J. B. Kristensen, and C. Felby, "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities", *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, in press, published on line 27 Jun, 2007.
- M. McCoy, "Biofuels Merger", *C&EN*, 85(8), 11, 2007.
- N. Moreira , "Growing expectations: new technology could turn fuel into a bumper crop", *Sci. News*, 168(14), 218, 2005.
- S. Peri, S. Karra, Y. Y. Lee, M. N. Karim, "Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis", *Biotechnol. Prog.*, 23, 626, 2007.
- L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin Jr., C. M. Conrad, "An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer", *Text. Res. J.*, 29, 786, 1959.

- M. L. Shuler, F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2<sup>nd</sup> ed., Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, 2002.
- B. Yang, D. M. Willies, C. E. Wyman, “Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion”, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(6), 1122, 2006.
- L. Wang, Y. Zhang, P. Gao, D. Shi., H. Liu., H. Gao, “Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis”, *Biotechnol. Bioeng.*, 93(3), 443, 2006.
- Y.-H. P. Zhang, L. R. Lynd, “Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems”, *Biotechnol. Bioeng.*, 88(7), 797, 2004.
- Y.-H. P. Zhang, L. R. Lynd, “A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose”, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(5), 888, 2006.
- Y.-H. P. Zhang, M. E. Himmel, J. R. Mielenz, “Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies”, *Biotechnol. Adv.*, 24, 452, 2006
- L. Zhu, J. P. O’Dwyer, V. S., Chang, C. B. Granda, M. T. Holtzapple, “Structural features affecting biomass enzymatic digestibility”, *Biores. Technol.*, 99, 3817, 2008.
- 曹祖寧, “再生資源的利用及生物工程”, *化工技術*, 6(11), 122, 1998.
- 黃翊, “纖維素酶水解機理及影響因素”, *山東化工*, 36(5), 29, 2007.

明新科技大學 97 年度 研究計畫執行成果自評表

計畫類別： <input type="checkbox"/> 任務導向計畫 <input type="checkbox"/> 整合型計畫 <input checked="" type="checkbox"/> 個人計畫 所屬院(部)： <input checked="" type="checkbox"/> 工學院 <input type="checkbox"/> 管理學院 <input type="checkbox"/> 服務學院 <input type="checkbox"/> 通識教育部 執行系別：化工系(中心) 計畫主持人：李靜宜 職稱：助理教授 計畫名稱：纖維材料水解反應動力學之研究 計畫編號：MUST-97-化工-06 計畫執行時間：97年1月1日至97年9月30日	
計畫執行成效	教學方面 1. 對於改進教學成果方面之具體成效： <u>研究內容豐富了任教科目應用微生物學及酵素技術的教學內容</u> 2. 對於提昇學生論文/專題研究能力之具體成效： <u>研究生劉碩惠與專題生賴君怡、林宛萱、吳博恩、鄭明宏等無論在專業思考, 文獻蒐集分析, 實驗設計與實驗執行觀察等均有長足進步</u> 3. 其他方面之具體成效： <u>參與本計畫的學生在以英文寫成的專業論文的閱讀與分析、簡報製作以及口語表達方面均大有進步</u>
	學術研究方面 1. 該計畫是否有衍生出其他計畫案 <input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否 計畫名稱： <u>非糧料源酸解法前處理技術評估研究</u> 2. 該計畫是否有產生論文並發表 <input type="checkbox"/> 已發表 <input checked="" type="checkbox"/> 預定投稿/審查中 <input type="checkbox"/> 否 發表期刊(研討會)名稱：_____ 發表期刊(研討會)日期：____年____月____日 3. 該計畫是否有衍生產學合作案、專利、技術移轉等，請說明： <u>產學合作案：非糧料源酸解法前處理技術評估研究 (工研院, 97/10~98/3)</u>
成果自評	計畫預期目標：完成利用纖維素酶水解纖維材料的初速率實驗。建立纖維二醣對纖維素酶抑制作用的動力學模型。確認材料物性對水解速率的影響性。 計畫執行結果：完成在有/無纖維二醣存在條件下的利用纖維素酶水解纖維材料的初速率實驗。建立纖維二醣對纖維素酶抑制作用的動力學模型。 <p style="text-align: right;">預期目標達成率：90%</p>
	其它具體成效： 1. 完成有/無纖維二醣存在條件下利用纖維素酶水解纖維材料的初速率實驗。 2. 建立纖維二醣對纖維素酶抑制作用的動力學模型。 3. 材料物性的量測。 4. 參與研究計畫學生的專業知識、專業論文閱讀能力、實作技巧、思考與表達能力均明顯成長。