

國立臺灣大學工學院化學工程研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis



合成酵素固定或化學酸官能化磁性中孔洞氧化矽奈米
粒子做為可回收式固體催化劑應用於纖維素-葡萄糖-
果糖-5-羥甲基糠醛序列式生質轉換

An Effective Cellulose-to-Glucose-to-Fructose-to-HMF
Sequential Conversion Using Enzyme-Immobilized or
Acid-Functionalized Fe₃O₄-Loaded Mesoporous Silica
Nanoparticles as Recyclable Solid Catalysts

李翊群

Yi-Chun Lee

指導教授：吳嘉文 博士

Advisor: Kevin Chia-Wen Wu, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

合成酵素固定或化學酸官能化磁性中孔洞氧化矽奈米粒子做為可回收式固體催化劑應用於纖維素-葡萄糖-果糖-5-羥甲基糠醛的序列式生質轉換

An Effective
Cellulose-to-Glucose-to-Fructose-to-HMF Sequential
Conversion Using Enzyme-Immobilized or
Acid-Functionalized Fe_3O_4 -Loaded Mesoporous Silica
Nanoparticles as Recyclable Solid Catalysts

本論文係李翊群君 (R00524015) 在國立臺灣大學化學工程學系、所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 102 年 7 月 19 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳嘉文

(簽名)

(指導教授)

山內悠輔

山內悠輔

林裕川

林裕川

林錕松

林錕松

吳紀聖

吳紀聖

盧文章

盧文章

系主任、所長

李翊群

(簽名)

致謝

跟這間實驗室開始的緣分，是在大三的時候，那時候還是懵懵懂懂，不知道自己未來研究的方向，看到了吳嘉文教授的研究領域，有點感興趣，跟老師聊了之後就開啟了我對生質能源轉換的興趣，從那時到現在，經過老師的教導、和學長姊的討論、同屆同學的互相扶持以及學弟妹的幫忙之下，我完成了這本論文，不過我這四年來的收穫絕對不只是這樣而已。首先感謝的當然是我的指導教授——吳嘉文老師，不論是實驗上的討論、實驗技巧的提點、做研究的精神、論文寫作的要領以及口試簡報和口說的指導，老師總是很有耐心地與我對話和教導我；另外也非常感謝老師對我生活上的關懷，之前有想去日本交換學生半年時也非常的細心替我做安排，雖然之後因為有些事沒有去不過很感謝老師有把我的事情放在心上替我安排周全，也非常貼心的關心我們每個人的狀況，用盡所有資源去支持每個學生實驗上的想法或是對於未來的規劃，讓我們可以無憂無慮專心在我們自己的研究上。謝謝能源組我的夥伴——靖天和瑜婷，靖天從我剛進實驗室沒多久就以專題生的身分跟我做實驗，有他幫我一起做實驗還有一起討論如何解決難題，使我的實驗得以順利進行；瑜婷的研究雖然和我大不相同，不過也是接續我的實驗繼續研究下去，和她一起思考難題、一起做材料的研究合成，這些也都大大地幫助了我，也使我的研究可以繼續下去。另外謝謝陪我走過來兩年的夥伴——亞東和士翔，有你們的一起討論和互相扶持，使我順利了完成研究及論文；也謝謝實驗室其他的夥伴——泓原、毓璞、霈恩、瑋玉、有衡、厚升、盈瑩，總是在我遇到困難時可以跟我討論幫助我，並且把實驗室營造地這麼有和諧以及溫馨感，讓我有深深地歸屬感，也讓我有實驗室是個大家庭的感覺，沒有一起吃中飯就是感覺不對，實驗室出遊也讓大家的感情更深，讓實驗室更團結。

最後感謝我的家人，在我最無助的時候給了我避風港，時時給我鼓勵和正面的回饋，謝謝你們陪我一路走到畢業。

李翊群謹致

民國 102 年 7 月

摘要

本研究主要致力於合成有磁性的中孔洞氧化矽奈米粒子(MSN)，利用它來固定兩種酵素(纖維素水解酶、葡萄糖異構酶)做成可方便回收的催化劑，並使用架接法接上磺酸官能基(SO₃H)作為酸性催化劑。此三種催化劑應用於木質纖維素至化學精緻品序列式轉換反應，以達到在水相和兩相(水相和有機相)中纖維素轉換成 5-羥甲基糠醛的目的。

首先，我們合成了鑲嵌入氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子(Fe₃O₄-MSN)固定化兩種酵素，也就是纖維素水解酶和葡萄糖異構酶，由於酵素昂貴，所以我們選擇把它們固定化在基材上就可以利用磁鐵進行回收然後再次使用；此外，我們合成了中孔洞氧化矽奈米粒子(MSN)，由於它表面上有很多的羥基(-OH)，可以利用縮合反應和矽烷類形成化學鍵結使矽烷類被牢牢地固定在基材上，我們選擇的矽烷尾端有硫氫酸根(-SH)，之後藉由氧化作用把官能基氧化成磺酸根(SO₃H)，就會形成酸度很高的固體催化劑，我們利用固態核磁共振儀定性且定量出有多少磺酸根接上去；最後利用三種催化劑來做生質轉換，纖維素寡聚物為起始物，加入已固定在基材上的纖維素水解酶，可以催化纖維素寡聚物水解成葡萄糖；回收酵素調整 pH 值後，再加入固定在基材上葡萄糖異構酶催化葡萄糖異構化成果糖，回收催化劑之後再加入有機溶劑二甲基亞砷(DMSO)使其形成兩相溶液，再加入有修飾磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子，催化果糖脫水成最終產物 5-羥甲基糠醛(HMF)，此步驟為序列式反應。序列式反應的優點是可以藉由最佳化每個小步驟的反應條件，使每個小步驟產物的產率達到最高，而上個步驟的產物是下個步驟的反應物，如此下去可以讓最後的產物產率達到最大，而且藉由分開每個步驟也可以使反應簡單化減少副產物的產生。在三種催化劑的催化下，可從果糖、葡萄糖和纖維素寡聚物的轉化分別得到產率最高的 HMF 產率分別為 81.3%、46.1% 及 45.6%。這是第一次有研究報告利用序列式反應做纖維素的生質轉換。

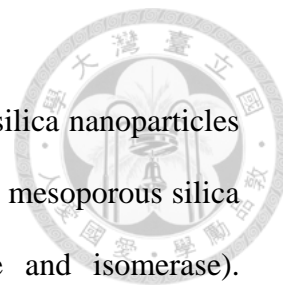
關鍵字:纖維素水解酶、葡萄糖異構酶、氧化鐵、中孔洞氧化矽奈米粒子、5-羥
甲基糠醛、磺酸、二甲基亞碸、序列式反應

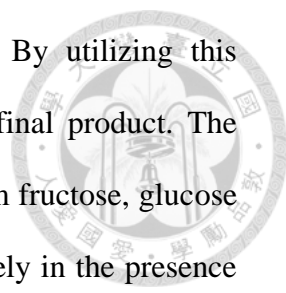


Abstract

This study focuses on the synthesis of magnetic mesoporous silica nanoparticles (MSN). We obtained two recyclable catalysts by utilizing magnetic mesoporous silica nanoparticles to immobilize two types of enzymes (cellulase and isomerase). Furthermore, we functionalized mesoporous silica nanoparticles with sulfonic groups by a grafting method. By utilizing these three kinds of solid recyclable catalysts, we successfully converted cellulose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in a bi-phase system via a sequential reaction.

First, because of the expensive price of enzymes, we tried to immobilize cellulase or isomerase on $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ and recycle these catalysts using magnetic force. Second, we utilized mesoporous silica nanoparticles with many hydroxyl groups to functionalize them with sulfonic groups. We chose silane with thiol functional groups, and after performing a condensation reaction between the materials and silane, we oxidized the thiol groups to sulfonic groups. We could obtain acidic solid catalysts. Then we characterized functionalized the MSN by solid-state NMR to quantify how many sulfonic functional groups had been connected onto the solid materials. Finally, we utilized these three types of recyclable solid catalysts to conduct cellulosic bioconversion. We used pretreated cellulose as the reactant and immobilized cellulase on $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ as the catalyst to hydrolyze cellulose to glucose. Then after recycling the solid catalysts using magnetic force and changing the buffer pH value, we added immobilized isomerase on $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MSN}$ as a catalyst to isomerize glucose to fructose. Finally, after recycling the recycle solid catalysts using magnetic force and adding an organic phase (DMSO), we added functionalized MSN (with sulfonic groups) as a catalyst to dehydrate fructose to HMF. This step-by-step reaction was called a sequential reaction. The advantage of this sequential reaction is that we can optimize the reaction conditions of each step, obtain





high product yields, and lower the production of by-products. By utilizing this sequential reaction, we were able to obtain a high yield of the final product. The HPLC results showed that the highest yield of HMF converted from fructose, glucose and pretreated cellulose were 81.3%, 46.1%, and 45.6%, respectively in the presence of the three solid catalysts. This is the first report on the generation of HMF from fructose, glucose, and pretreated cellulose via a sequential reaction with immobilized enzymes on magnetic mesoporous silica nanoparticles that are grafted with sulfonic groups.

Keywords: cellulase, isomerase, iron oxide, magnetic mesoporous silica nanoparticles, 5-hydroxymethylfurfural, sulfonic groups, DMSO, sequential reaction

目錄



第一章：介紹.....	1
1.1 從地球暖化到生質能源	1
1.2 孔洞奈米材料	6
1.3 生質轉換	8
1.3.1 纖維素的前處理(使用離子液體).....	8
1.3.2 纖維素水解酶水解纖維素機制與應用.....	10
1.3.3 葡萄糖異構酶異構化葡萄糖的機制與應用.....	12
1.3.4 果糖脫水轉化成 5-羥甲基糠醛之機制	15
第二章、文獻回顧.....	18
2.1. 酵素.....	18
2.1.1 中孔洞氧化矽奈米粒子固定酵素.....	18
2.1.2 固定纖維素水解酶.....	19
2.1.3 固定葡萄糖異構酶.....	21
2.1.4 纖維素轉換成果糖.....	23
2.2 纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛	24
第三章：動機.....	26
第四章：實驗.....	29
4.1 材料.....	29
4.1.1 化學藥品.....	29
4.1.2 分析儀器.....	31
4.2 合成固體催化劑	32
4.2.1 合成氧化鐵奈米粒子.....	32
4.2.2 合成含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子.....	32
4.2.3 基材的合成.....	33

4.2.3.1 中孔洞氧化矽奈米粒子之合成.....	33
4.2.3.2 中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化-接上磺酸官能基.....	34
4.2.4 含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化-接上氨基官能基.....	35
4.2.5 含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化-接上羧酸官能基.....	36
4.2.6 酵素的固定化(物理吸附).....	37
4.2.7 酵素的固定化(化學鍵結).....	38
4.3 連續式反應操作	38
4.3.1 纖維素的前處理.....	38
4.3.2 酵素的反應條件最佳化.....	39
4.3.3 纖維素寡聚物至果糖的連續式反應.....	39
4.3.4 纖維素寡聚物至 5-羥甲基糠醛的連續式反應.....	40
4.3.5 材料的回收性及穩定性測試.....	40
4.4 高性能液相層析儀分析(HPLC).....	41
4.4.1 檢量線及滯留時間.....	41
4.4.2 計算.....	42
第五章：結果與討論.....	43
5.1 材料鑑定	43
5.1.1 磁性材料的形貌.....	43
5.1.2. 中孔洞氧化矽奈米粒子之形貌.....	44
5.1.3 孔的特性.....	44
5.1.4 催化劑的鍵結量.....	45
5.2 反應.....	48
5.2.1 酵素的最佳化條件.....	48

5.2.1.1 纖維素水解酶的反應最佳化.....	48
5.2.1.2 葡萄糖異構酶的反應條件最佳化.....	49
5.2.2 酵素吸附量以及反應測試.....	51
5.2.2.1 纖維素水解酶吸附量以及反應測試.....	51
5.2.2.2 葡萄糖異構酶吸附量以及反應測試.....	52
5.2.3 緩衝液的選擇.....	52
5.2.4 利用物理吸附法固定酵素做反應.....	55
5.2.4.1 利用固定在載體的纖維素水解酶做纖維素寡聚物到葡萄糖的反應.....	55
5.2.4.2 利用固定在載體的酵素做葡萄糖到果糖的反應.....	56
5.2.5 利用化學鍵結法固定酵素後做反應.....	57
5.2.6 纖維素寡聚物轉化成果糖的兩步驟反應.....	58
5.2.7 果糖至 5-羥甲基糠醛之轉換.....	59
5.2.8 葡萄糖至 5-羥甲基糠醛的序列式反應.....	65
5.2.9 纖維素寡聚物轉化至 5-羥甲基糠醛之序列式反應.....	66
第六章、結論.....	67
第七章、未來展望.....	68
參考文獻.....	69

圖目錄

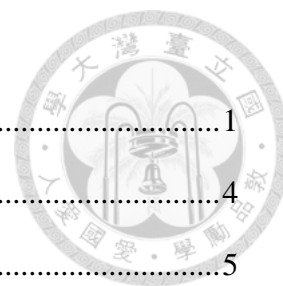


圖 1.1 我國所排放的二氧化碳之來源	1
圖 1.2 木質纖維素的成分以及組成	4
圖 1.3 5-羥甲基糠醛之衍生物	5
圖 1.4 纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛的過程	6
圖 1.5 常見的離子液體	9
圖 1.6 纖維素的結構-結晶區與非結晶區	11
圖 1.7 內切型纖維素水解酶之作用區域	11
圖 1.8 內切型纖維素水解酶與 β -葡萄糖苷酶之作用區域	12
圖 1.9 含有磷酸根的葡萄糖異構酶異構機制	13
圖 1.10 葡萄糖異構酶之催化機制	15
圖 1.11 有質子酸存在下，果糖脫水成 5-羥甲基糠醛的催化反應	16
圖 1.12 在二甲基亞砷中,果糖脫水形成 5-羥甲基糠醛的機制	17
圖 2.1 聚氨脂泡沫塑料聚合機制	24
圖 3.1 實驗動機-利用鑲嵌入氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MSNs)當 基材並修飾不同酵素及官能基後用來做纖維素至 5-羥甲基糠醛的序列式反應	28
圖 3.2 利用磁鐵分離磁性催化劑以及溶液	28
圖 4.1 合成含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之流程圖	33
圖 4.2 合成中孔洞氧化矽奈米粒子	34
圖 4.3 中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾磺酸官能基之流程圖	35
圖 4.4 氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾氮官能基之流程圖	36
圖 4.5 氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾羧酸官能基之流程圖	37
圖 4.6 纖維素前處理流程圖	39
圖 4.7 纖維素寡聚物至果糖的連續式反應流程圖	40

圖 5.1(左)鑲嵌有氧化鐵的中孔徑氧化矽奈米粒子之掃描式電子顯微鏡圖(右)鑲嵌有氧化鐵的中孔徑氧化矽奈米粒子之穿隧式電子顯微鏡圖	43
圖 5.2 中孔洞氧化矽奈米粒子之形貌	44
圖 5.3(a)有磁性的中孔洞氧化矽奈米粒子之氮氣吸脫附曲線 (b)中孔洞氧化矽奈米粒子之氮氣吸脫附曲線	45
圖 5.4(a)中孔洞氧化矽奈米粒子接上磺酸官能基的碳譜分析(b)中孔洞氧化矽奈米粒子的矽譜分析(c)中孔洞氧化矽奈米粒子接上磺酸官能基的碳譜分析	46
圖 5.5 在檸檬酸緩衝液系統下，以 0.015 克的纖維素寡聚物為反應物，做(a)反應溫度的最佳化(b)酵素投入量的最佳化(c)反應時間的最佳化	49
圖 5.6 在磷酸鈉緩衝液系統下，以 0.015 克的葡萄糖為反應物，做(a)反應溫度的最佳化(b)酵素投入量的最佳化(c)反應時間的最佳化(d)反應環境 pH 值的最佳化	51
圖 5.7 利用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的纖維素水解酶(物理吸附)做反應的穩定性以及回收性實驗	56
圖 5.8 利用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的葡萄糖異構酶(物理吸附)做反應的穩定性以及回收性實驗	57
圖 5.9 用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的酵素(化學鍵結)做反應的穩定性以及回收性實驗(藍色部分為纖維素水解酶，紅色部分為葡萄糖異構酶)	58
圖 5.10 纖維素轉化製果糖的兩步驟反應(a)藍色部分-使用含有氧化鐵的無孔洞氧化矽奈米粒子做基材(b) 紅色部分-使用含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子做基材	59
圖 5.11 在不同條件以及不同溶劑下做果糖至 5-羥甲基糠醛之轉換	61
圖 5.12 溫度對於果糖轉至 5-羥甲基糠醛試驗之影響	62

表目錄



表一、IUPAC 分類孔洞材料	7
表二、化學藥品	29
表三、可能出現的化合物之滯留時間	41
表四、轉化率、產率的定義以及計算方法	42
表五、中孔洞氧化矽奈米粒子和接上磺酸根之後的性質	47
表六、自由和固定在載體上的纖維素水解酶比較	52
表七、自由和固定在載體上的葡萄糖異構酶比較	52
表八、不同緩衝液對兩種酵素之影響	54
表九、不同水相有機相體積比對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應之影響	63
表十、有無催化劑對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應之影響	64
表十一、催化劑投入量對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應的影響	64
表十二、葡萄糖轉換至 5-羥甲基糠醛之序列式反應	66
表十三、纖維素寡聚物轉化至 5-羥甲基糠醛的序列式反應	66

第一章：介紹



1.1 從地球暖化到生質能源

自十八世紀工業革命以來，人們學會了怎麼從自然中獲取能源並作為動力的來源。不過到了二十世紀來才發現，使用這些能源——如石油等等，獲取其中能源的同時，也會排放出二氧化碳——也就是人們現在所熟知的溫室氣體。二氧化碳會吸收太陽輻射到地球的紅外光，使地球保持一定溫度。不過因為排放了過多的二氧化碳，會使地球的平均溫度漸漸升高。氣候變化政府間專家委員會(IPCC, 2001)指出，全球平均表面溫度持續升高，氣候變遷跡象日趨顯著，若無法遏止，將嚴重影響人類生存環境。美國太空總署也表示，北極和南極的冰層漸漸變小，消失後海平面上升，地球恐怕面臨大災難。尤其是島嶼型國家的我們，如果海平面上升恐怕會面臨國土被海水淹沒的危險，所以我們應該對於如何減少二氧化碳的排放量有更多的對策才行。

從行政院環境保護署的資料顯示(圖 1.1)，大部分的二氧化碳來源是由於工業所燃燒的石油為主，交通運輸方面，是因為燃燒汽油而產生的二氧化碳。燃燒石油除了會排放對生物體來說不好的物質(一氧化氮等等)之外，也會對地球的環境造成破壞。近年來，由於石油漸漸減少、利用石油所造成的氣候變遷的問題漸漸被世人所重視以及世界對能源的需求越來越大，尋找替代能源是必要的。

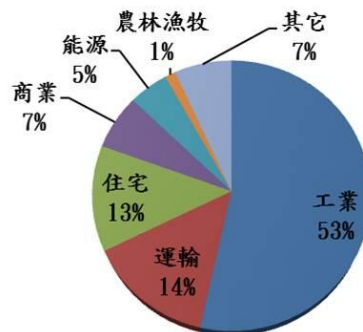
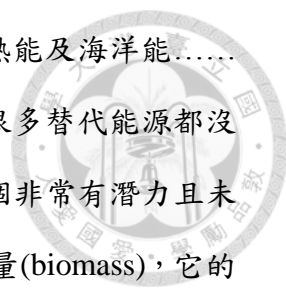


圖 1.1 我國所排放的二氧化碳之來源



替代能源很多，如太陽能、風力能、生質能、水力能、地熱能及海洋能……等等。儘管如此，因為一些自然限制或者是地形風貌所影響，很多替代能源都沒有辦法有效率地發展。替代能源中的其中一種——生質能，是一個非常有潛力且未來是非常有前瞻性的一個替代能源。所謂生質——也就是生物質量(biomass)，它的定義就是來自生命體的生物分子或有機物質，如農林業所產生的木屑、稻桿稻殼、動物屍體、廢水所來的沼氣……等等。簡單地來說，生質能就是藉由燃燒以碳元素為基礎的生質分子後所得到的能源，雖然過程中也會排放二氧化碳，不過這些二氧化碳會經由周期循環再次回到生物體中(藉由植物的光合作用使二氧化碳再被消耗)而產生生質質量，藉由這個消耗與產生的循環，對於二氧化碳的總排放量為零，所以生質能是非常適合發展下去且一個乾淨的能源。

生質能源目前從材料取得來源分類分成第一代、第二代及第三代。第一代生質能源指的就是利用玉米、大豆及甘蔗這些經濟作物來取得能源。由於玉米和甘蔗主要的成分是澱粉，澱粉經過水解後產生葡萄糖後，再經由發酵作用轉化成生質酒精；此外大豆可以取出油脂做成生質燃油。得到的這些生質酒精或生質燃油可以跟目前汽車使用的汽油混和，這樣就可以減少汽油的使用量，此外燃燒汽油產生的空氣汙染氣體(如硫化物)可以減少，燃燒酒精反而更乾淨，讓第一代生質能源在十幾年前開始有了蓬勃的發展。

不過第一代生質能源卻衍生出許多問題。首先，第一代生質能源的來源主要是玉米、大豆及甘蔗，這些東西本身就是人類可以吃的東西；由於世界人口數激增許多，糧食需要量增加，拿這些糧食作物來做成能源使用確實是不太恰當的；此外，根據經濟部能源局報導指出，種植這些作物需很大的耕種面積，巴西已經要砍掉雨林增加耕地面積來種植這些作物，這反而是本末倒置，雨林本身可以使二氧化碳量下降，砍伐掉會使二氧化碳的消耗率下降許多而且還會使生態環境遭到破壞；另外因為要大量種植這些作物，會使用很多的化學肥料，其中化學肥料的成分之一氮會形成一氧化二氮(N_2O)排出，此氣體的全球增溫趨勢(GWP,global

warming potential)為二氧化碳的 296 倍，是非常驚人的；最後一點就是所產出來的生質酒精的能量密度不高(生質酒精:23 (MJ/L), 汽油:35 (MJ/L))。綜合以上這幾點，第一代生質能源並不適合發展，目前取而代之的就是第二代生質能源。

第二代生質能源，使用的原料為廢棄的木材、稻桿稻殼……等等，構成這些東西的主要成分為木質纖維素(lignocellulose)，木質纖維素的成分如圖 1.2 所示¹，木質纖維素主要是由纖維素(cellulose)、半纖維素(hemicellulose)以及木質素(lignin)所組成。纖維素佔木質纖維素的含量約為 40~50%，是木質纖維素中佔大部分的成分，由單體葡萄糖脫水形成 1,4-β 糖苷鍵(1,4-β-glycosidic bond)所聚合而成的聚合物，可以藉由酸催化水解或是酵素分解纖維素來產生葡萄糖。纖維素是一個非常巨大的結構，每一層的葡萄糖脫水聚合成鏈狀聚合物後，層和層之間還會形成氫鍵，使其結構非常穩定且巨大。由於其單體非常單純，常常被拿來做有關生質能源方面研究之起始物。

半纖維素，是由兩種或兩種以上的五碳糖及六碳糖脫水形成的聚合物，單體主要為木糖(xylose)、阿拉伯糖(arabinose)、甘露糖(mannose)以及半乳糖(galactose)等等，脫水形成鏈狀聚合物之後，層跟層之間也會形成氫鍵使半纖維素變成一個巨大的分子，且非常穩定。由於其單體非常複雜，不常被拿來做為生質能的研究。有研究利用半纖維素水解成單體並拿來發酵成生質酒精或是製造糠醛(furfural)^{2,3}。

木質素佔木質纖維素中含量最少，約為 15~25%，是由苯基丙烷的衍生物所聚合而成，這些衍生物主要是酚類，經由分子間互相脫水聚合而成。物性和化性都非常穩定，也很難水解，就算用極端條件(高溫高壓)把它分解完之後也是含有很多種分子，純化很困難，要拿來做生質能相關的研究也是非常稀少⁴。

綜合以上介紹可以知道，如果要拿木質纖維素做生質能源的研究，會先選擇纖維素做起始物，除了它的含量佔大部分之外，主要也是因為它水解後的單體很

單純，就是葡萄糖，不像半纖維素或是木質素水解之後單體非常的複雜，除了反應很難單一化之外，產物也會趨向於複雜。

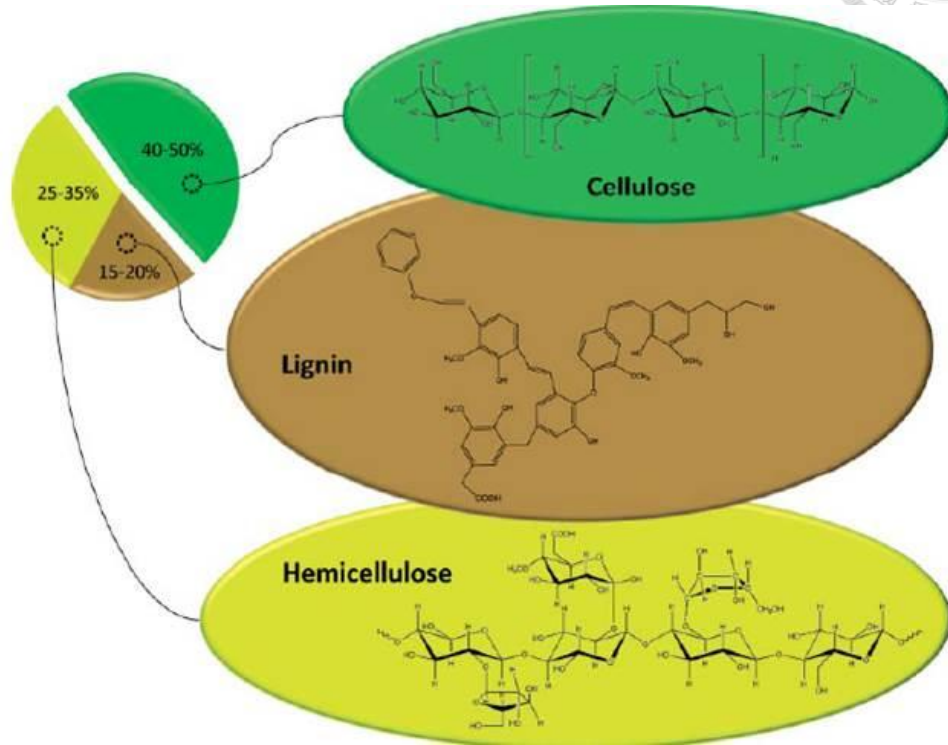


圖 1.2 木質纖維素的成分以及組成

第三代生質能源是利用藻類當作起始物，由於藻類很多油脂，可以利用這些油脂做轉酯化(transesterfication)，形成脂肪酸酯類，也就是生質柴油，目前這項技術很新，還在發展中，且由於各種藻類的來源關係，會造成油脂的含量有很大的差異。

以纖維素為起始物，經由水解後得到葡萄糖，接著異構化成果糖之後，就可以脫水形成呋喃(furan)衍生物，如 5-羥甲基糠醛(5-hydroxyMethylfurfural, 5-HMF)。5-羥甲基糠醛，是從木質纖維素得到的其中一種衍生物，被美國能源總署(DOE)評為是最有價值的化合物。原因是它是生物質和有潛力的化合物中間的橋樑，只要生成 5-羥甲基糠醛，可以經由很簡單的步驟變成一些非常有經濟

價值的化合物。如圖 1.3 所示⁵，只要經過簡單的氧化步驟就可以生成 2,5-呋喃二甲酸，它常常被用在工業上來做聚酯類的聚合物；經過加氫和氫解作用則可以形成 2,5-二甲基呋喃，它是目前最適合用來做生質燃料的化合物，它是液體、能量密度高達 31.5(MJ/kg)，比生質酒精高出約 40%，約為現在汽油的 80%，基於這些因素，目前有很多研究都在投入如何從木質纖維素量產 2,5-二甲基呋喃⁶；行水合反應的話會產生乙酰丙酸(levulinic acid)，可以做成顯影劑，或是加甲醇之後可以形成酯類做高分子；加氫反應可以得到 2,5-呋喃二甲醇，應用在製造泡棉或是聚脂類。

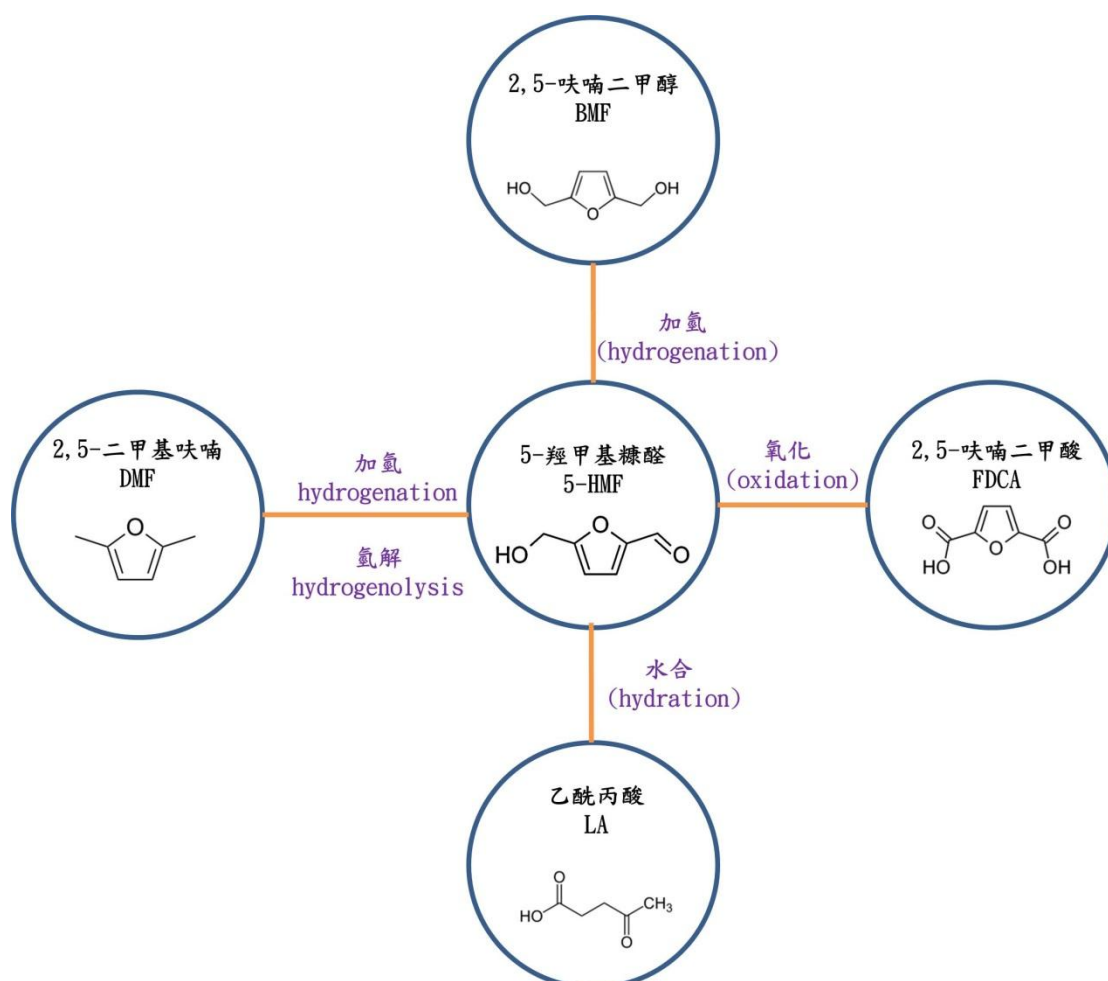


圖 1.3 5-羥甲基糠醛之衍生物

5-羥甲基糠醛是由纖維素水解成葡萄糖，葡萄糖異構化成果糖之後脫水而得，過程中需要很多勻相和非勻相的催化劑⁷⁻¹⁰。過程如圖 1.4 所示，首先，纖維素先藉由離子液體的作用打斷氫鍵，讓層跟層分離，形成鏈狀聚合物¹¹；纖維素寡聚物藉由酸催化或是酵素水解，打斷 1,4-β 糖苷鍵形成葡萄糖^{12,13}；葡萄糖藉由酵素或是鹼催化異構化成果糖^{14,15}；最後藉由果糖脫水成 5-羥甲基糠醛¹⁶。也有研究團隊直接合成多官能基的催化劑使纖維素直接轉換成 5-羥甲基糠醛，這個反應是個多步驟多路徑的催化反應。

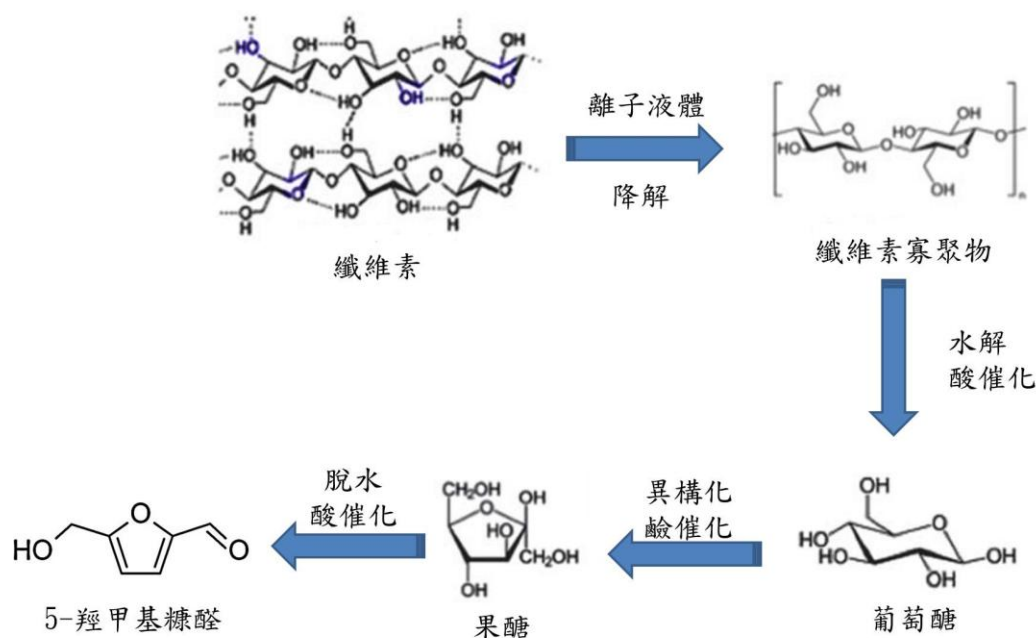


圖 1.4 纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛的過程

1.2 孔洞奈米材料

自從二十世紀中葉開始，以氧化矽為基底的孔洞奈米材料已經被大家熟悉，並大規模的生產及使用。因為它的高比表面積，常常被人們用來做吸附的基材來吸附染料或一些催化劑；而且它有非常穩定的結構，對溫度、水氣還有物理機械力都有一定的耐性；而且它非常容易做表面改質，可以賦予它親水性、疏水性及酸鹼性等等。從國際純粹與應用化學聯合會(IUPAC)的分類來說，我們可以依照

它們的平均孔洞半徑把它們分類為三種不同的範疇，分別是微孔(microporous)、中孔(mesoporous)及大孔(macroporous)。分類的條件以及例子詳見表一



表一、IUPAC 分類孔洞材料

材料種類	孔洞大小(直徑) (nm)	例子
大孔洞	直徑>50	玻璃
中孔洞	2<直徑<50	氣凝膠、M41S
微孔洞	直徑<2	沸石、沸石型活性炭

第一個被發現並廣泛利用的孔洞材料是沸石。沸石在 1756 年首先為瑞典礦冶學家克朗斯提 (B. Cronstedt) 發現，它是一種低密度軟性的礦石，由氧化矽、氧化鋁與鹼在壓力下作用所形成的結晶性矽鋁酸鹽。它是孔洞性材料，孔洞性質是微孔洞結構，因為其比表面積很大的原因，被人們廣泛用在吸附劑、淨水劑。另外沸石是路易士酸，也常常被用來使用在有關酸的催化反應上；目前最新的應用是拿沸石來當分子篩，可以過濾或吸附掉一些不純的物質。

1990 年代，在孔洞材料有一個很重大的突破，就是發現了有規律性的排列以及比較大孔洞的中孔徑氧化矽材料，是由日本早稻田大學的黑田團隊¹⁷所合成出來的材料，受到世界廣大的回響。在這之前，藉由形成介面活性劑的微胞以及利用無機化合物這兩者之間的作用，合成了 M41S 系列的中孔洞氧化矽材料，如有六角形結構的 MCM-41¹⁸、有立方體結構的 MCM-48¹⁹ 等等，之後利用不同的矽來源和不同的介面活性劑所形成的中孔洞氧化矽粒子如雨後春筍般地冒出，研究團隊也會利用這些材料來達到他們的各種目的。

到目前為止，由於它的高比表面積以及很容易修飾的表面和堅固的架構，在催化領域中利用中孔洞氧化矽奈米粒子(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)當作載體或是催化劑已經非常普遍，是一個非常有發展潛力的基材。最近的研究團

隊甚至把氧化矽換掉，換成氧化鈦形成中孔洞氧化鈦奈米粒子(MTNs)拿來做酸的催化反應或者是光觸媒的應用；也有團隊換成碳形成中孔洞碳奈米粒子(MCNs)，由於碳是疏水的，所以此材料可以用來做需要隔離水的反應，種種的發展是具有展望性的。

1.3 生質轉換

1.3.1 纖維素的前處理(使用離子液體)

纖維素，是由葡萄糖分子間經脫水作用形成 1,4-β 糖苷鍵，藉由此鍵結連成鏈狀聚合物，接著再由各個鏈狀聚合物間形成分子間氫鍵，形成一個 3D 的網狀固態結晶結構，性質非常安定²⁰。纖維素可以藉由無機酸幫助水解成單體葡萄糖，不過用無機酸水解的話，葡萄糖很容易再轉化成別的副產物或者是過反應，產生糠醛類的副產物或是腐黑質(humin)；且纖維素為結晶結構也不易溶於水溶液中；另外使用無機酸的話很容易腐蝕容器壁，對於工業化來說是非常不利的；還有廢酸的排放也是一個嚴重問題，綜合以上來說，工業上並不適合利用無機酸水解葡萄糖，會增加非常多的成本。為了解決以上的問題，利用酵素來催化分解是一個非常好的解決辦法。然而卻發現幾個問題²¹，因為纖維素為生物性高分子而且是結晶結構，它很不溶於溶液裡面，所以會大幅度地降低反應速率；另外酵素是需要先吸附在纖維素上面，破壞纖維素的晶體結構，也就是打斷層和層之間的氫鍵，之後才能繼續打斷葡萄糖和葡萄糖之間的 1,4-β 糖苷鍵，這個就是酵素作用的機制，由於纖維素是個緊密的網狀結構以及疏水的特性，要酵素吸附上去已經是難上加難，何況是進入纖維素層和層之間。根據以上這些難題，如果要使用酵素當做催化劑，必須先把纖維素做前處理，先把層和層的氫鍵先打斷，這樣纖維素會比較易溶於水，溶於水後酵素就很容易地擴散到表面進行打斷 1,4-β 糖苷鍵的作用，讓單體葡萄糖釋放出來²¹。

纖維素難溶於水溶液及有機溶液中，能稍溶解的溶液屈指可數，例如；銅銨溶液($\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$)，這個溶液可以使纖維素稍稍膨脹，待膨脹後再加入電解質讓它們解離並滲入層與層之間破壞氫鍵，此過程非常緩慢，這個非常難解的課題到離子液體被發現且被應用在溶解纖維素後才解決。離子液體(ionic liquid)，就是在室溫或是室溫附近呈現液態且由離子所構成的分子。普通的離子化合物因為陰離子和陽離子體積甚差不遠，導致陰陽離子間的庫侖力很大，要在很高溫的溫度才可以迫使離子化合物變成液態(800 度以上)；如圖 1.5 所示(舉出常見的兩個例子)，離子液體因為陽離子大部分為有機之陽離子，結構非常大，然而陰離子大部分是小離子，如氯離子，兩者結合成的離子化合物因體積相差甚遠而導致其庫侖力降低許多，故可以在室溫或是約 100 度附近就可溶解²²。離子液體只要稍微加熱就會解離成離子，由於離子的半徑很小，所以可以穿梭至纖維素層和層之間。以[EMIM]Cl 離子液體為例，在水中會解離成[EMIM]⁺和氯離子，氯離子很小可以穿進纖維素的層與層之間利用靜電吸引力把氫鍵破壞，讓層和層之間的作用力消失，使纖維素變成鏈狀聚合物，也就是纖維素寡聚物，它在水中的溶解度比纖維素還要大，且酵素就可以只做破壞 1,4-β 糖苷鍵這件工作，而釋放出單體葡萄糖出來。

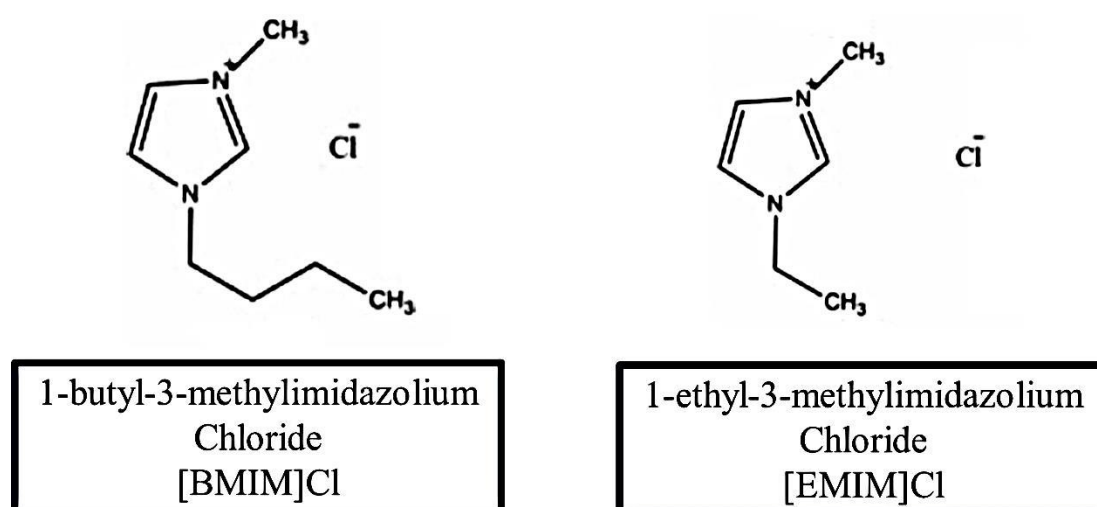


圖 1.5 常見的離子液體

綜合以上說明，我們可以知道，如果要使用酵素來當催化劑的話，纖維素做前處理是必要的，可以節省下非常多的反應時間。雖然離子液體剛被發現時因為稀少而價格很貴，可是現在已經可以由自己合成出離子液體²³或者是已經合成出常溫下就可以解離成離子態的離子液體²⁴，此部分對於要工業化來說是非常有利的，省下不少成本。

1.3.2 纖維素水解酶水解纖維素機制與應用

纖維素水解酶本來是細胞體內的酵素，用來分解纖維素變成單體葡萄糖，在1960年代後被發現可以製作成細胞外酵素後，被視為可以將固體廢棄物轉換成食物來源的重要媒介²⁵。本研究的纖維素水解酶由 *Trichoderma reesei* 這個菌種所產生且提煉出來的。纖維素水解酶它是由三種不同的水解酶群所構成，包含了內切型纖維素水解酶（Endo- β -1,4-gulcanase, E.C. 3.2.1.4.）、外切型纖維素水解酶（Exo- β -1,4-gulcanase, E.C. 3.2.1.91）與 β -葡萄糖苷酶（ β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21）²⁶。內切型纖維素水解酶的作用是切除纖維素內部的非結晶區、隨機切斷1,4- β 糖苷鍵後產生長鏈或短鏈的寡糖²⁷；外切型纖維素水解酶用於分解纖維素的結晶區，可以把纖維素有規律地切成纖維雙糖，此兩種酵素群互相配合把纖維素大分子切成小碎塊^{28,29}； β -葡萄糖苷酶的作用對象是纖維雙糖或是短鏈的寡糖，切斷1,4- β 糖苷鍵後產生單體葡萄糖³⁰。

纖維素水解酶水解纖維素鏈狀聚合物(已前處理過的纖維素)機制如圖1.6~1.8所示²⁶。圖1.6描繪出了纖維素的結晶區和非結晶區，之後如圖1.7所示，首先是內切型纖維素水解酶先將非結晶區打斷成長鏈或短鏈寡糖，接下來到圖1.8，外切型纖維素水解酶進來破壞掉結晶區的纖維素或剛剛已形成的長鏈或短鏈的寡糖切成纖維雙糖，最後再由 β -葡萄糖苷酶把纖維雙糖切成單體葡萄糖。

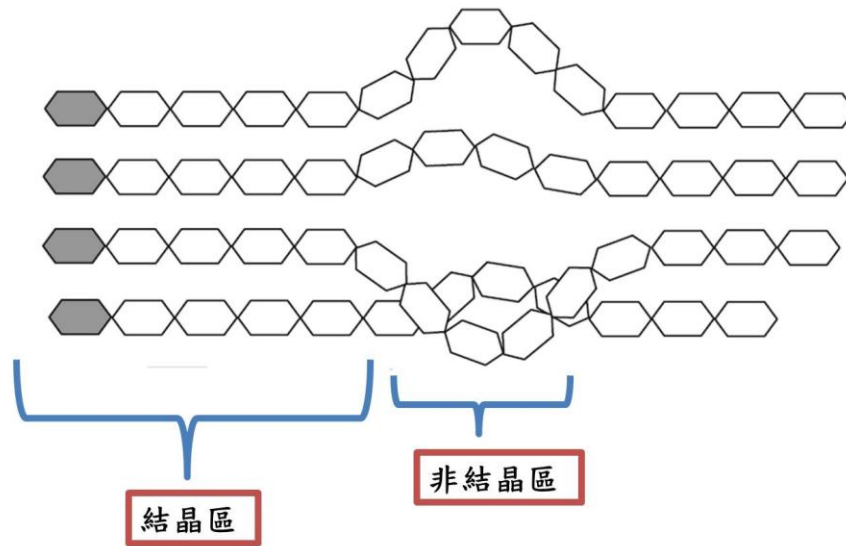


圖 1.6 纖維素的結構-結晶區與非結晶區

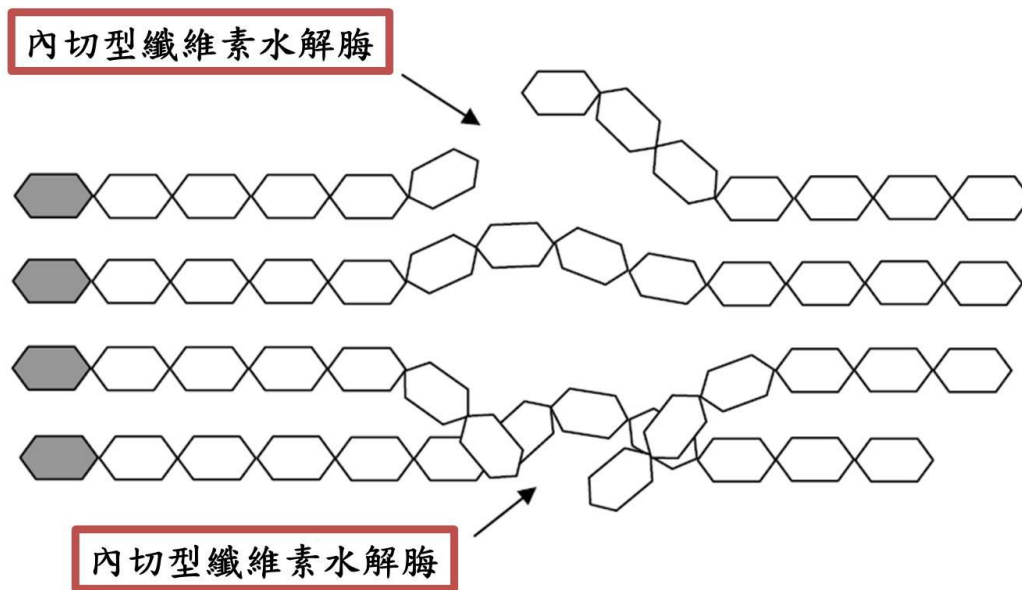


圖 1.7 內切型纖維素水解酶之作用區域

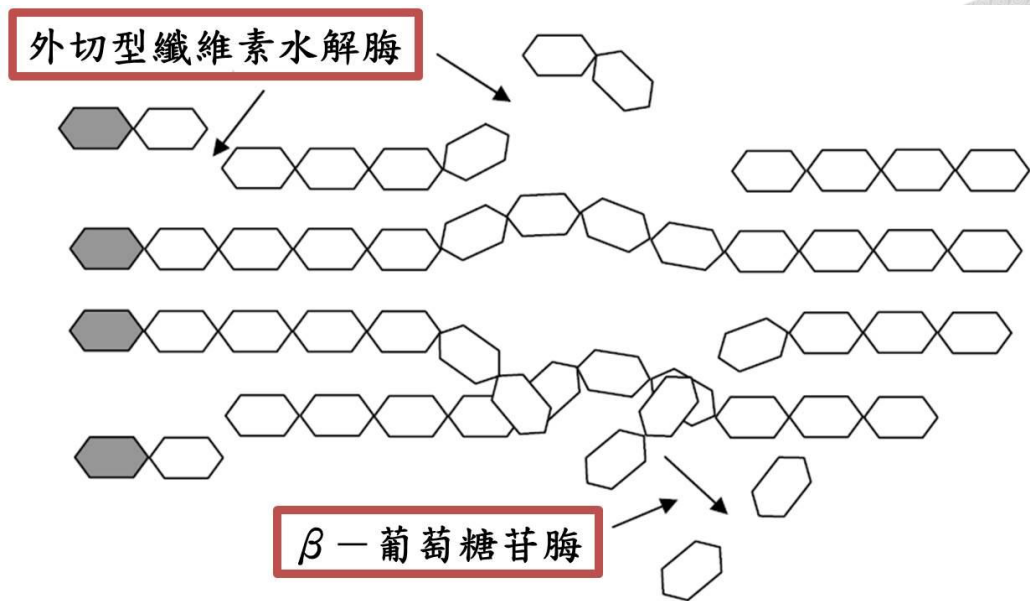


圖 1.8 內切型纖維素水解酶與 β -葡萄糖苷酶之作用區域

目前主要對於纖維素水解酶的研究是關於用很多模型去模擬纖維素水解酶和結晶型纖維素如何作用以用來設計更好的反應條件³¹；如何大量生產纖維素水解酶或是如何用基因改造讓纖維素水解酶的效率更高或是有多重功能性^{32,33}以及使用不同菌種生產纖維素水解酶並互相比較其效率^{34,35}。目前也已有工廠可以生產大量纖維素水解酶，使製造生質能的成本可以降低並使其工業化。

1.3.3 葡萄糖異構酶異構化葡萄糖的機制與應用

異構酶，是一種催化同分異構物互相轉換的酶，有催化消除旋光度的消旋酶、催化順反異構物轉換的順反異構酶、催化分子內氧化還原的氧化還原酶……等等。葡萄糖異構酶(glucose isomerase)，是一種催化葡萄糖異構化成果糖的異構酶，全名叫做 D-木糖-醛糖-酮糖異構酶(D-xylose aldose-ketose-isomerase)，本來此酵素是用來催化木糖(xylose)變成木酮糖(xylulose)，之後發現也可以用來催化葡萄糖(醛糖)異構化成果糖(酮糖)而被人們廣泛的使用。

本研究所使用的葡萄糖異構酶是由 *Streptomyces rubiginosus* 這個菌種提煉出來的，雖然從各菌種提煉出的葡萄糖異構酶主要催化性都差不多，不過所透過的機制卻完全不同，所以導致每種酵素的催化效率也不一樣。

葡萄糖異構酶通常需要的反應條件為中性至微鹼性，且有金屬二價離子的環境會更好，通常需要的是鎂離子、鈷離子或錳離子^{36,37}。這些離子都可以幫助葡萄糖異構酶的維持構型，藉由離子的正電和酵素形成吸引力來穩定酵素的構型以維持酵素的活性，鎂離子還有活化葡萄糖異構酶的功用³⁸；另外，如果溶液裡面含有鈣離子、鋅離子……等等這些，則會降低葡萄糖異構酶的活性，甚至使葡萄糖異構酶失去活性³⁹。

葡萄糖異構酶把葡萄糖異構化成果糖的機制，會因為酶的種類不同而有很大的差異。如其中一種含有磷酸官能基的葡萄糖異構酶，它會催化葡萄糖進行烯二醇(enediol)機制之後轉變成果糖³⁸。如圖 1.9 所示，此種葡萄糖異構酶中的組胺酸(histidine)會參與催化的機制，首先在鹼性的溶液中有氫氧根離子(OH⁻，圖中代號為 B)，會先取走下方氫離子，而鍵結電子會形成孤對電子，會被迫推到中間的碳-碳鍵中形成烯類，上方尾端醛基氧的雙鍵被迫推出去形成氧離子(O⁻)，會把鄰近葡萄糖異構酶中，組胺酸的氫離子取過來形成尾端羥基，這樣就形成中間體，也就是順式的烯二醇類；接著組胺酸會催化把下方羥基的氫離子拿走，孤對電子跑到碳-氧鍵中形成雙鍵，而碳-碳雙鍵的電子就會被擠壓到上方的碳形成孤對電子，此孤對電子會把水中的氫離子搶回來，形成最右邊的酮糖。

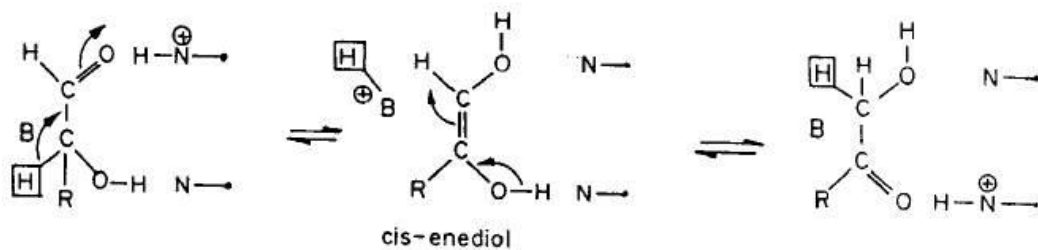


圖 1.9 含有磷酸根的葡萄糖異構酶異構機制

本研究使用的葡萄糖異構酶在催化葡萄糖異構化成果糖時所經過的機制是另外一種，叫做氫陰離子轉移機制(hydride shift mechanism)。根據文獻的研究，結果圖 1.10 所示⁴⁰，可以看到的是，酵素分子中間有二價錳離子(錳離子存在於緩衝液中，鎂離子也有此功用)，和酵素分子內產生吸引力而穩定酵素結構；首先水分子和錳離子、葡萄糖異構酶中含羧酸離子(COO⁻)的部分以及葡萄糖分子產生氫鍵，以固定葡萄糖分子；羧酸離子會搶走水分子的氫離子產生氫氧根離子，接下來氫氧根離子又會把葡萄糖上的羥基之氫離子搶回來形成水分子，葡萄糖分子上就形成氧離子(O⁻)，氧離子的孤對電子不穩定，直接下移形成碳氧雙鍵；而這個碳上就會多一鍵形成五鍵，瞬間氫陰離子就會脫離出去到尾端醛基的碳上，而尾端醛基的雙鍵就會被推出去形成孤對電子在尾端的氧上，此時酮基產生而尾端有氧離子；接下來氧離子就會搶走水的氫離子形成羥基，而水形成氫氧根離子，然後氫氧根離子搶走葡萄糖異構酶上羧酸(COOH)的氫離子形成水分子，羧酸回復成羧酸根離子(COO⁻)。

由此兩種催化機制我們可以看到，如果反應環境下有在鹼性下，也就是溶液中含有氫氧根離子，可以幫助尾端的氫被取走，接著一連串的異構化反應就會發生；另外從第二個機制也可以看到，二價陽離子可以和酵素中的分子有吸引力可以固定酵素構型，同時也可以抓住水分子和葡萄糖分子。

目前葡萄糖異構酶已經被固定在基材上，並大量生產應用到工業上。現在食品工業都用以固定在基材上的葡萄糖異構酶生產高果糖糖漿⁴¹；另外也看到有研究用葡萄糖異構酶來異構化很多不同的醛糖至酮糖的反應並討論其效率⁴²。

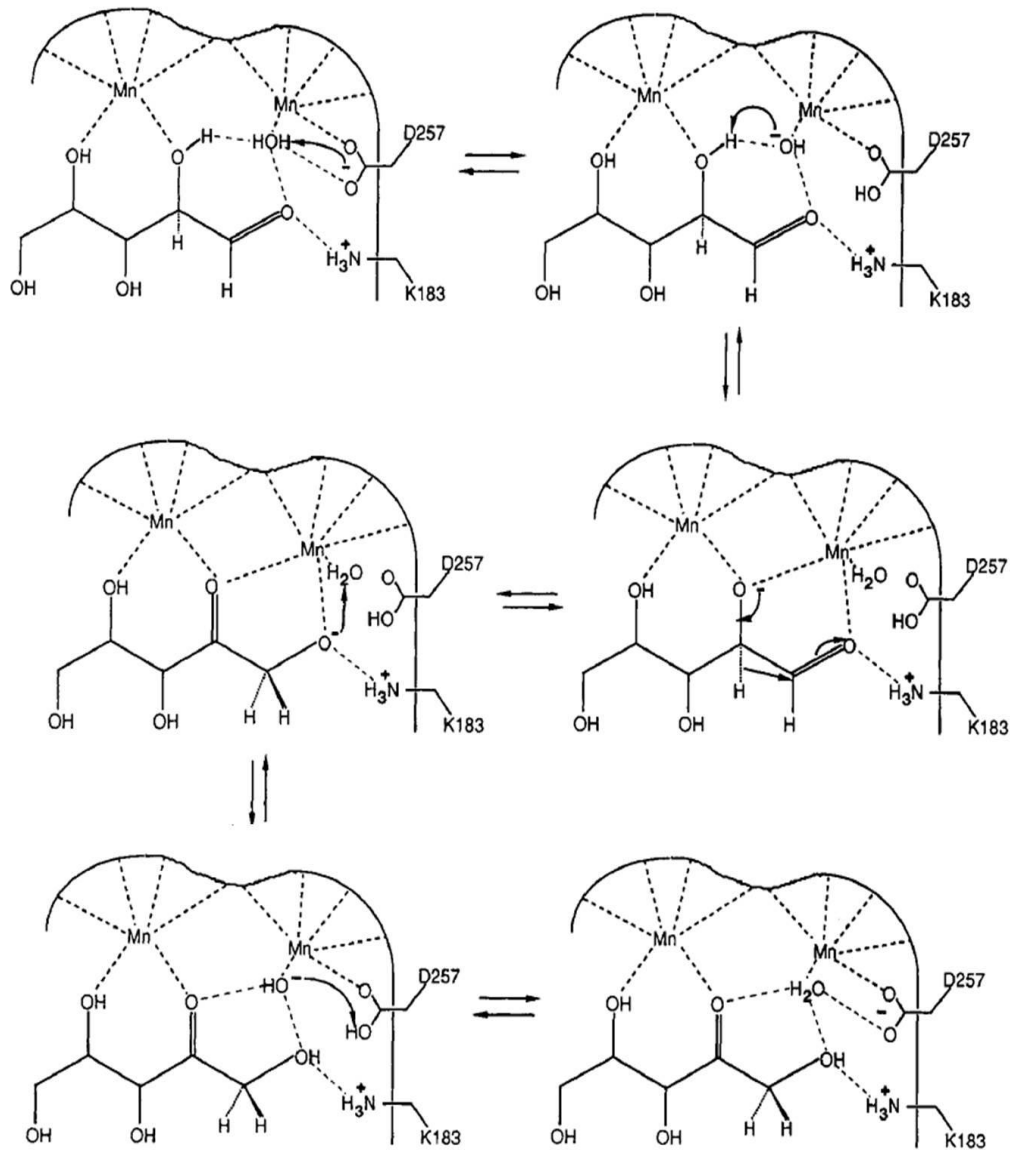


圖 1.10 葡萄糖異構酶之催化機制

1.3.4 果糖脫水轉化成 5-羥甲基糠醛之機制

果糖在酸性環境的催化下會脫水成 5-羥甲基糠醛，其催化機制非常複雜，而且也有另外一些催化劑會走不同的催化路線到最終產物。酸催化的機制如圖 1.11 所示⁴³，果糖分子在水中成五圓環結構，藉由一個質子酸催化，鍵結在一個羥基上，形成 H_2O^+ 這個不穩定結構，會脫去水分子而使正電留在分子內轉移，最後都會跑到羥基上，和氫原子一起轉移到另一個羥基上再次形成 H_2O^+ 的結構，一

樣脫去水，此動作三次之後，到環內形成兩個雙鍵後才會把正電給中和掉並形成穩定結構的5-羥甲基糠醛。

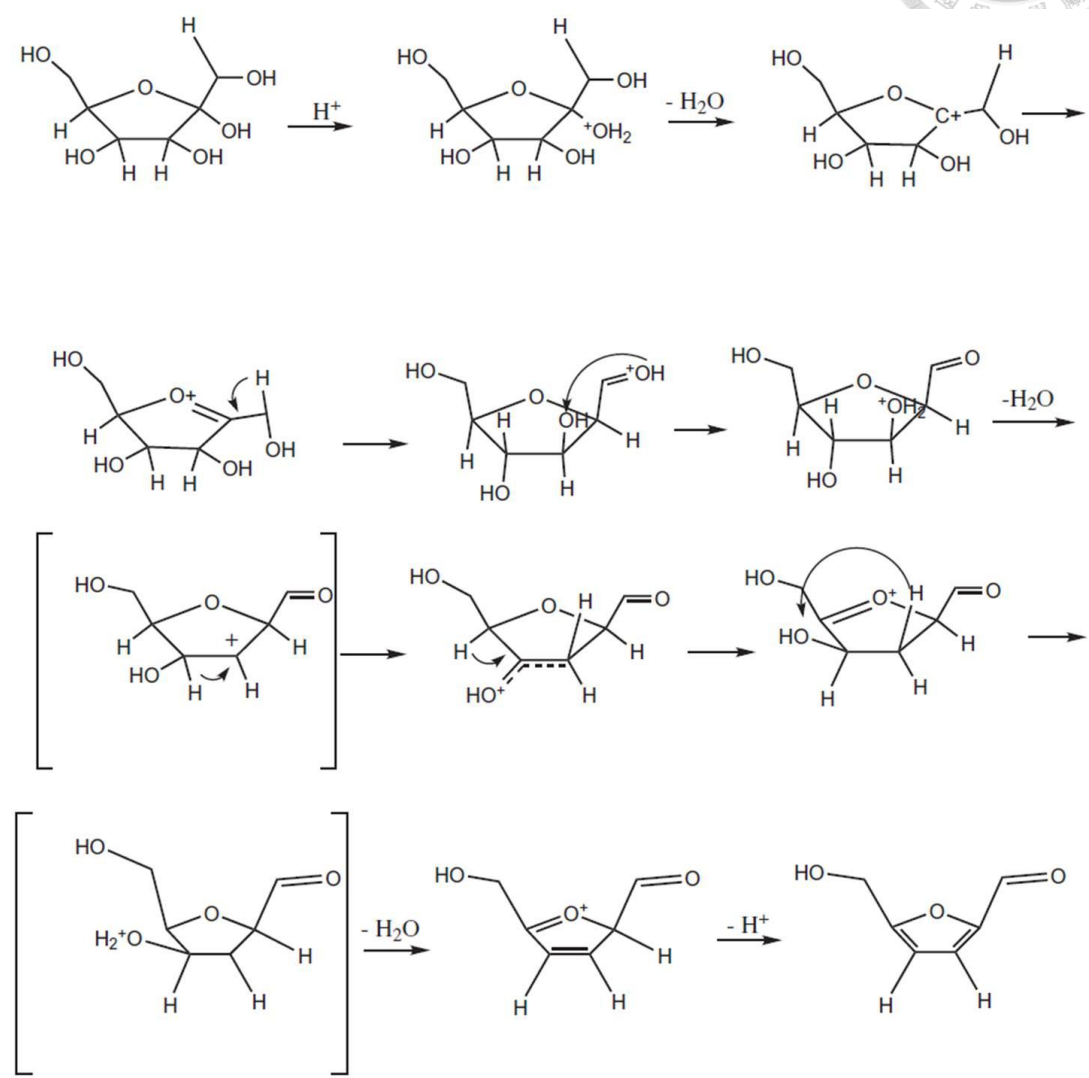


圖 1.11 有質子酸存在下，果糖脫水成5-羥甲基糠醛的催化反應

由以上結論我們可以知道，果糖脫去三個水之後會形成5-羥甲基糠醛，所以我們對於反應系統選擇是非常重要的。既然是脫水反應，所以我們應當選擇有機溶劑作為反應時的溶劑，脫水之後水和有機層會分相，5-羥甲基糠醛會傾向於溶在有機相。另外我們選擇的溶劑可能也有幫助催化此反應的功用，例如選擇二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)當作溶劑，由於此分子有硫的孤對電子對，有

很強吸引力的原子存在，就可以引發電子對的轉移而促進果糖分子脫水產生 5-羥甲基糠醛。二甲基亞砜當作催化劑的機制如圖 1.12 所示⁴⁴，溶劑分子的硫和羥基發生作用產生鍵結，之後脫去氫離子和氫氧根離子(脫去水)，接著利用溶劑分子中的雙鍵氧分子和羥基的氫原子發生作用，電子對的轉移，接著在脫去兩個水也同時形成環狀中的兩雙鍵。

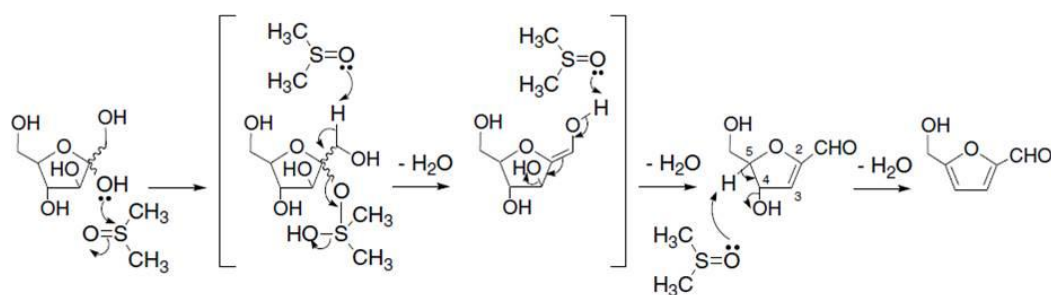


圖 1.12 在二甲基亞砜中,果糖脫水形成 5-羥甲基糠醛的機制

綜合以上論點可以得到結論，如果在二甲基亞砜系統下再加上酸的催化，果糖轉換成 5-羥甲基糠醛的反應將會進行得很順利且很快速；不過在這個系統我們很難得知到底是溶劑的影響還是催化劑的影響；另外常用在此脫水反應的溶劑有四氫呋喃(tetrahydrofuran, THF)、1-丁醇等等這些有機溶劑，使用這些溶劑我們可以知道酸催化劑對此反應的影響及貢獻。

第二章、文獻回顧



2.1. 酵素

2.1.1 中孔徑氧化矽奈米粒子固定酵素

中孔徑氧化矽奈米粒子(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)由於它擁有堅固的結構、高比表面積以及適合的孔洞半徑這些優勢，常常用於負載催化劑⁴⁵、分子篩⁴⁶、藥物釋放^{47,48}、生物醫療⁴⁹以及吸附劑^{50,51}等等。但是最近它多半被用來做酵素的載體⁵²，原因是之前多半是用溶膠類來固定酵素，而它沒有孔洞且會因為加入交聯劑(crosslink agent)而使酵素失去活性；利用中孔徑氧化矽奈米粒子的話則可以讓酵素被吸附在孔洞裏面而保護酵素，而且也可以固定構型不會讓酵素因為外力變形而失去活性，甚至可以使中孔徑氧化矽奈米粒子表面修飾不同的官能基來鍵結不同的酵素上去；綜合以上原因⁵³，中孔徑氧化矽奈米粒子是非常適合來做酵素載體。

有關中孔徑氧化矽奈米粒子用來做酵素固定的文章最早是 2000 年發表在化學材料期刊上⁵⁴，Takahashi 團隊比較三種不同製程所得到的中孔徑氧化矽奈米粒子，並有各種不同的孔洞半徑，用來吸附辣根植物所提煉出來的過氧化酶(horseradish peroxidase)。此種酵素的作用是放大某些目標分子的偵測訊號，就算是很弱的訊號也可以藉由酵素催化後訊號變強以至於偵測得出來，是個非常有用的酵素；得到的結論是大概約五奈米的孔洞大小可以利用物理吸附法固定最多此種酵素(因為太大孔洞會很容易脫附；而太小孔洞則根本固定不上去)；這種酵素在基材裡面一樣可以維持很高的活性及增加了對熱的穩定性。雖然此篇文章的內容沒有討論到多次實驗的回收性或是其他固定方法，不過得知酵素固定在中孔徑氧化矽奈米粒子裡面卻可以維持高活性以及提高耐熱性這兩件事，是非常重要的，也為之後利用此基材固定酵素的研究奠定了重要的里程碑。

之後的研究就在如何固定更多酵素上去、如何讓酵素不脫落以及如何讓酵素在載體上更穩定，漸漸固定不同種酵素上去，研究其特性也變的很多；在文獻中

使用過的酵素例如枯草桿菌蛋白酶⁵⁵(subtilisin, 蛋白質水解酵素)、溶菌酶⁵⁶(lysozyme)、細胞色素 C⁵⁶(cytochrome C)、超氧化物歧化酶⁵⁷(Superoxide Dismutase)、纖維素水解酶^{12,58}(cellulase).....等等；上述方法都是使用物理吸附方法, 也有研究使用表面修飾官能基的中孔洞氧化矽奈米粒子來當基材化學鍵結酵素⁵⁹、利用交聯法(crosslinking)來固定酵素⁶⁰.....等等。最近有關於酵素和中孔徑奈米矽材的主要應用則是在生物感測器上居多^{61,62}。

目前沒有人做過利用中孔洞氧化矽奈米粒子來固定葡萄糖異構酶的實驗, 雖然已經有市售固定在基材上的葡萄糖異構酶, 如果可以比較市售的酵素和我們的固體生物催化劑就是一個非常值得研究的客題。

2.1.2 固定纖維素水解酶

纖維素水解酶是一個廣泛被利用的酵素, 同時它也被視為生質能源實現的重要鑰匙, 因為它可以把龐大的纖維素組織水解成單體葡萄糖, 這個步驟看似簡單卻是最重要的步驟, 纖維素水解酶的重要性可見一般; 不過很明顯的就是, 如果要發展生質能源的話, 必須大量使用纖維素水解酶, 在這個觀念剛開始出現的時候酵素的生產是非常昂貴的, 所以必須要固定酵素在基材上, 盡量讓它可以回收並做有效地利用。

第一個研究纖維素水解酶固定化在基材上的是 Frein 團隊⁶³, 它是利用暗紅色的海藻提煉出來的海藻膠(kappa-carrageenan)當作基材來固定纖維素水解酶, 此研究做了一些基本的測試, 都可以保持酵素的活性可是效率卻不高; 另外 Kashiwagi 團隊研究利用已活化的瓊脂膠(接上 CNBr, cyanogen-bromide activated sepharose), 和纖維素水解酶產生交聯, 並做其活性及回收率的探討⁶⁴, 可以推測到的是, 利用交聯法固定的酵素一定會部分失去活性; Kumakura 團隊⁶⁵直接把生產纖維素水解酶的菌種和聚合物的單體混合在一起並泡在培養液中, 由於這個單體是屬於輻射聚合型, 也就是只要照射一定的強度的輻射, 就會開始產生聚

合物，聚合物就是菌種的固定基材，而菌種只要給一定的養分和環境就會開始產生纖維素水解酶，此方法有個很大的優點，就是產生的纖維素水解酶或許不會因為聚合作用而失去活性而且如果纖維素水解酶脫附的話還可以補充新的，是個不錯的想法，不過缺點是菌種可能因為聚合作用或是輻射照射而死亡，而且由結果可以知道葡萄糖的產率大概只有 20%，雖然結果並沒有很好不過卻是創新的點子。

Takeuchi 團隊⁶⁶利用麩胺酸聚合物(Poly-glutamic Acid)當作基材來固定纖維素水解酶，此基材有一個優勢，就是它是水溶性的，可以在中性或鹼性環境之下溶於水中，此反應就變成勻相反應可以增加催化劑和反應物的碰觸以提高反應效率，反應完如果要回收催化劑則把溶液調整成酸性，此基材就會沉澱出來方便回收，此方法是利用化學鍵結的方法固定酵素，也就是和酵素形成鍵結以確保酵素在基材上，可惜葡萄糖產率還是不夠高而且定酵素的量偏少；Jain 團隊把基材換成尼龍(nylon)，一樣用形成醯胺鍵(peptide bond)的方法來固定酵素並做測試，結果也是差不多⁶⁷；也有團隊利用甲殼素(chitosan)⁶⁸、矽晶圓上⁶⁹等等。

綜合以上幾點，纖維素水解酶被固定在很多種不同的基材上，由於那些都是沒有孔洞的材料，所以物理吸附是不可能的；此外，也都只在基材上表面修飾官能基或是利用交聯法來和酵素形成化學鍵結固定，除了酵素可能會受到化學藥物影響而失去活性之外，也有可能因為固定在基材的表面沒有任何保護而很容易失去活性，所以本研究會使用中孔洞氧化矽奈米粒子做研究就是因為有孔洞的話可以提供酵素一個環境讓它受到保護不至於構型被破壞；而且有孔洞的話大大提高表面積使可以鍵結上去的酵素或是吸附上去的酵素多更多，這些都是孔洞材料比起以前的基材好用的地方。

2.1.3 固定葡萄糖異構酶

自從研究上發現葡萄糖異構酶這個酵素之後，大家就把焦點放在這個酵素的使用上，因為它可以使葡萄糖部分異構化成果糖，但是果糖產率通常只有 50~60%，主要是因為葡萄糖和果糖互為異構物，熱力學上的平衡使它們最多可以有約一半同分異構物存在，就算有酵素的催化頂多也是到 70% 的果糖產率⁷⁰，在工業是則是為了要節省成本，把反應溫度下降，使果糖產率為 50% 即可，而且 50% 產率果糖和 50% 葡萄糖混合物即為高果糖糖漿，甜度夠已經可以作為食品添加劑，所以從很早開始就有研究致力於如何把葡萄糖異構酶固定在基材上以方便做回收再利用。

目前文獻中最早固定化葡萄糖異構酶的研究是 Gerald.W 團隊⁷¹ 在 1971 年所發表的論文中，可以看到他們先最佳化葡萄糖異構酶的反應條件，接著把它固定化在聚丙烯酰胺(Polyacrylamide)這個聚合物膠上，首先他們先把丙烯酰胺單體和交聯劑還有葡萄糖異構酶的單體混和均勻，接著只要照射遠紅外光就可以使單體聚合並同時把酵素固定下來，此方法就是交聯法或是叫共沉澱法，接著還測試了鎂離子和鈷離子對酵素的影響，由圖表可以看出，果糖的產率大概為 54%，不過由內文可以得知，雖然有部分葡萄糖異構酶鍵結上去，不過保留活性的酵素卻只有 30%，表示了雖然接很多酵素上去但是大部分去處於失去活性狀態，果糖產率雖然有維持在一半以上不過這個結果卻不是我們所樂見的；由此可得知此方法並不太適用於固定化酵素。

Yokote 團隊⁷² 則利用酚甲醛樹脂作為基材做葡萄糖異構酶固定化之研究。由於酚甲醛樹脂是個孔洞材料，所以只要利用物理吸附原理就可以吸附葡萄糖異構酶上去，此篇研究有計算出吸附上去量多少、並對此固體催化劑做反應的最佳化條件及離子的影響，探討動力學並計算出動力學的常數，此篇研究已經開始在對孔洞材料固定葡萄糖異構酶這件事有很多的著墨，發現利用物理吸附似乎可以

保持酵素很高的活性，不過此研究並沒有做回收固體催化劑的實驗，雖然不知道其效果如何，不果此篇研究開啟了孔洞材料吸附酵素的領域。

接著有學者就有想法，我們需要的是孔洞材料、並有孔洞可以提供酵素吸附且有堅固的架構，很多學者就想到了利用二氧化矽來做基材^{73,74}，這些研究團隊或者是利用有孔洞的玻璃、或者是無孔洞的氧化矽當作固定酵素之基材，並利用戊二醛這個交聯劑，使材料和酵素產生化學鍵結，之後再做利用；此方法已經改良了很多以前不好的缺點，不過還是有稍嫌不足的地方，例如孔洞材料的選擇，選擇了孔太大的材料，因為孔太大會使酵素很容易的脫附，這樣會使物理吸附酵素無法達到有效的應用；另外還有使用戊二醛這個交聯劑，雖然它可以讓材料表面和酵素之間做鍵結，不過材料表面如果沒有氨基的話是無法跟戊二醛產生鍵結；此外利用戊二醛最大的缺點就是此分子的兩頭都是一樣的醛基都可以和酵素做鍵結，一定會出現戊二醛兩頭都接上葡萄糖異構酶這種分子，難保戊二醛分子都是一頭接基材另一頭接上酵素。此兩個研究都固定葡萄糖異構酶上去，不過葡萄糖異構酶的活性卻只保留一半，這也是說明了戊二醛這個交聯劑的缺陷。

還有一些研究團隊是想做出連續反應的固體生物催化劑，就拿氧化鋁的孔洞管柱吸附酵素⁷⁵；另外還有利用二乙氨基乙基纖維素(DEAE-cellulose)這個基材⁷⁶，因為此基材表面有氨基會帶正電，利用靜電吸引力可以吸引葡萄糖異構酶中帶負電的結構，使其固定化，此方法的回收次數可以達到3~4次，而且如果酵素脫附的話還可以再利用新的一批自由酵素做靜電吸引力的吸附，所以可以達到再生催化劑的效果；也有利用幾丁質(chitin)做基材，並加入戊二醛當作交聯劑固定葡萄糖異構酶⁷⁷。

現在工業上用的固定化葡萄糖異構酶是叫做 Sweetzyme IT，最近目前的研究就是集中於利用現有的市售酵素來研究它的動力學性質⁷⁸、如何利用改變外在條件來使葡萄糖異構酶達到更高的效率⁷⁹、如何找到一個基材是可以減少固定酵素

上去之後失去活性的數量¹⁴以及用數值模擬方法來達到最高葡萄糖異構酶的效率⁸⁰。

綜合以上文獻內容，可以得知葡萄糖異構酶雖然可以被固定化，不過因為可能利用物理吸附可能很快會脫附、利用靜電吸引力力量會不足、利用戊二醛法固定會使酵素失去活性以及利用共沉澱法會使酵素失去活性的這些缺點，本研究選擇利用中孔洞氧化矽奈米粒子來作為基材，它具有適當的孔洞半徑，可以讓物理吸附上去的酵素好好地留在孔洞中；加入氧化鐵則可以改良一些回收的缺失。

2.1.4 纖維素轉換成果糖

有關於纖維素一步驟轉換成果糖的文獻非常的少，其中大部分是利用化學方法把纖維素水解之後再利用鹼催化把葡萄糖異構化成果糖(序列式反應)⁸¹。有關於利用酵素把纖維轉化成果糖的文章目前只有在 1990 年 Kenneth B. 團隊的研究⁸²，此研究固定纖維素水解酶、纖維雙糖水解酶以及葡萄糖異構酶三種酵素再聚合物的基材上，基材是利用二異氰酸酯(methylene diphenyl diisocyanate)的異氰基(isocyanate group, N=C=O)和乙二醇的醇基脫水形成氨脂鍵後形成的聚氨酯泡沫塑料(polyurethane foam)，此聚合物的聚合機制以及化學式如圖 2.1 所示。接著二異氰酸酯也可以和酵素中的氨基形成醯胺鍵，接著另一頭再和另一個單體聚合，藉由這些聚合反應，我們可以得到含有三種酵素的聚氨酯泡沫塗料，藉由化學鍵結可以確定酵素不容易脫落。此方法固定了三種酵素在基材上並利用此固體生物催化劑做纖維素到果糖的轉換。結果如論文所示，首先可以得知酵素利用此化學方法固定在上面可以維持一半的活性，也就是說有 50% 的酵素在固定化過程中失去活性；另外如果只固定葡萄糖異構酶的話，葡萄糖轉換至果糖的產率約有 53%，隨著溫度提高可以達到 65%，之後由於摻入另外兩種酵素，溫度降低至 50°C 反應，利用此複合酵素固體催化劑做纖維素至果糖的產率最好達到 25%，雖然最後果糖產率不高，卻利用一步驟反應使纖維素轉換至果糖，是個跨時代的里程碑。

本研究從此篇文章中得到一些啟示，首先由於聚合物不是一種比表面積很大的基材，所以固定上去的酵素有限，加上此研究又固定三種酵素上去，每種酵素固定上去的量一定不多；另外，纖維素水解酶和葡萄糖異構酶的反應條件相差太多，前者需要酸性環境和較低溫(50°C)，後者卻需要鹼性環境、較高溫(70°C)以及二價離子的存在，條件相差太多；最後想要一步驟地把纖維素轉換至果糖，其中酵素量不足以致於果糖的產率並不高。綜合以上幾點，本研究利用同一種基材固定兩種不同的酵素，再利用回收的手法做序列式兩步驟反應，也就是利用纖維素水解酶先把纖維素水解成葡萄糖，回收酵素之後再加入葡萄糖異構酶使葡萄糖異構化成果糖，此方法雖是兩步驟，不過可以讓每個酵素在最適當的環境下反應，使每個步驟的產物達到最高，促使最終產物果糖的產率達到最高。

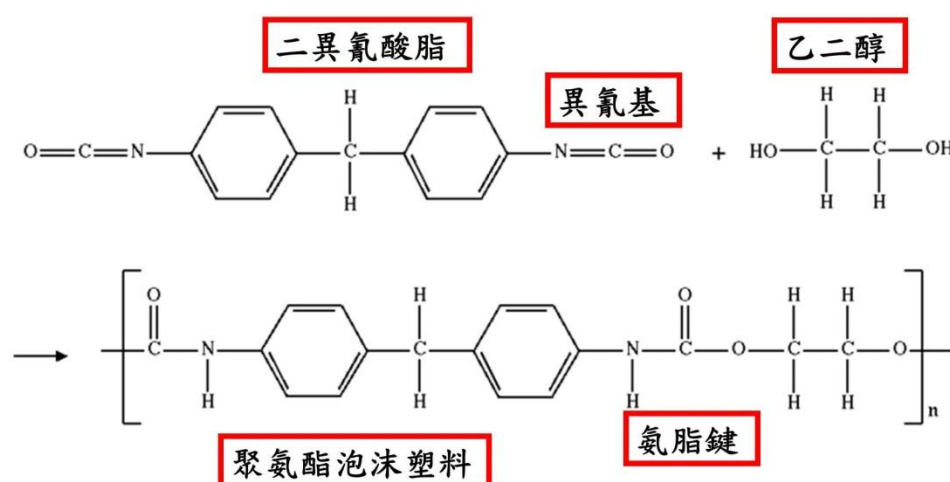


圖 2.1 聚氨基酯泡沫塑料聚合機制


2.2 纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛

有關於此方面的研究非常晚才起步，主要是因為前面都先研究出纖維素到 5-羥甲基糠醛中經過的各種中間物以及機制，才有辦法統合出一步驟轉換的模式。Yu 團隊⁸利用離子液體([EMIM]Cl)當作溶劑溶解起始物纖維素之後，並加入氯化銅或氯化鉻當做催化劑，並在 80~120 度的反應溫度之下做實驗，得到最高的

5-羥甲基糠醛的最高產率為 54%，且溶劑和催化劑還可以再利用；或是利用幾乎相同的反應條件，只在反應條件下加入微波輻射，可以使 5-羥甲基糠醛的產率達到 60%⁸³；Daorattanachai 團隊⁸⁴ 利用磷酸鈣和磷酸鋁當做催化劑，做纖維素至 5-羥甲基糠醛在水溶液的轉換，此研究有個很重大的突破就是在水相中做這個生質轉換，我們都知道果糖要脫三個水才能形成 5-羥甲基糠醛，所以在有機相中反應會比較好，不過此研究做了最大的突破就是水相做反應，雖然最後 5-羥甲基糠醛的最高產率為 12%，不過卻讓在水中作生質反應有了重大的突破；目前最新的研究⁵⁰ 是利用另一種離子液體當溶劑和氯化鈿做催化劑，得到了最高產率為 84%。

從文獻中可以得知，做纖維素至 5-羥甲基糠醛的反應都是需要昂貴的離子液體以及重金屬或稀土金屬氯化物當做催化劑，這些東西除了貴以外重點就是會傷害自然環境；另外這些反應牽涉到很多複雜的機制，所以副產物產生很多；溶劑、催化劑和 5-羥甲基糠醛要透過很多分離程序才能各自分離出來。現在的研究致力於如何在水相及溫和的反應條件下且副產物產生最少的情形下做出 5-羥甲基糠醛，本研究使用酵素的話，專一性高且副產物很少，反應條件也很溫和，最後在水相轉換成果糖之後只要添加一個有機相溶液和酸性催化劑就可以在雙相溶液系統中得到 5-羥甲基糠醛，而且本研究之催化劑是具有磁性的，所以只要簡單外加磁場就可以分離催化劑和產物。

第三章：動機



很多團隊都是利用化學方法將纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛，如利用強酸迫使纖維素降解成單體葡萄糖，再經由一些催化劑(如:氯化鉻)把葡萄糖轉化成 5-羥甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural,5-HMF)。使用上述方法有一些缺點，例如強酸(硫酸)雖是一個非常適合用來降解纖維素的東西，不過它容易腐蝕器壁，而且還會有廢酸排放問題所以在工業上也很難實行；在葡萄糖轉化成 5-羥甲基糠醛的催化反應中，大部分也使用重金屬催化劑，除了價格昂貴外排放也是一個大問題；最後這些反應的條件都非常地極端(例如；高溫高壓)；由於果糖在溶液中會形成五圓環的結構，此結構和 5-羥甲基糠醛的結構比較類似，所以通常用果糖來轉換成 5-羥甲基糠醛產率會比較高而且比較沒有一些副反應，用葡萄糖直接轉換成 5-羥甲基糠醛的反應，除了反應不專一和產率較低之外，也需要比較嚴苛的反應條件來執行；綜合以上幾點，這些方法雖然是非常好的但是都卻很難應用在實際的工業上。

本研究所利用的是酵素系統，利用酵素可以有效地把纖維素降解成單體葡萄糖；再經另一酵素異構化成果糖之後行脫水反應轉化成 5-羥甲基糠醛。酵素有專一性、反應條件溫和、少副產物.....等等非常好的特性，而且不會有廢棄物排放的問題。酵素的唯一缺點就是價格昂貴，所以本實驗把它固定在基材上讓它非常有效率地使用。為了達成這個目的，選擇含有磁性粒子的中孔洞氧化矽奈米材料(mesoporous silica nanoparticles,MSNs)來做酵素的載體。中孔徑氧化矽奈米材料的優點主要是高比表面積、合適的孔徑大小、堅定的架構以及容易接上官能基的特性，所以我選擇它來做我的載體。它雖然可以直接利用物理吸附或化學鍵結的方法固定酵素，做多次的回收利用，可是有一個缺點就是回收率的問題。一般都是利用過濾或離心的方式分離固體，不過會殘留在離心管管壁或是濾紙上，無法百分之百地回收。所以在載體裡再鑲嵌入氧化鐵磁性粒子，使材料變得有磁性，最後只要利用磁鐵就可以輕易地分離固體催化劑和液體的產物，不會使固體催化

劑有減少，達到最有效率地利用。

通常做生質能源的研究，都會傾向一步驟反應，例如做出一個催化劑可以直接把纖維素轉換成 5-羥甲基糠醛，它的優點就是很方便，不過缺點就是反應太複雜、可能產生很多個副產物、最終產物產率太低……等等；我選擇的方法是多個步驟的序列式反應，也就是先研究出纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛的反應中需要經過哪些步驟轉換，把這些步驟一個個的切開，讓每個步驟的產物產率達到最高，上個步驟的產物就是下個反應的反應物；藉由序列式反應我們可以最佳化每個步驟的實驗條件以及產率，最後得到最好的最終產物產率。

綜合以上的描述，本研究是把纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛的反應；本研究的優點是，利用的是酵素系統，它在反應條件相對溫和的情況下，還可以發揮酵素的專一性讓產物達到最大的產率，酵素作用是在水相，所以可以減少很多昂貴的有機溶劑使用；有磁性的基材可以更方便做序列式反應，只要使用磁鐵回收催化劑就可以進入下一步驟反應；序列式反應的優點就是可以把每個反應的小步驟都分開做且使每個步驟的產物達到最高，最後藉著串連這些小步驟來讓最終產物的產率達到最大，讓每個步驟簡單化，而不像一步驟反應，雖然很簡單可是裡面牽扯到的副產物、機制太多，間接導致最終產物的產率不會太高，而且純化最終產物出來也需要經過很多繁瑣的步驟(因為很多副產物)。

本研究如圖 3.1，先利用固定在基材上的纖維素水解酶(cellulase)把纖維素降解成單體葡萄糖；再利用固定在基材上的葡萄糖異構酶(glucose isomerase)把葡萄糖異構化成果糖；最後再藉由修飾上磺酸官能基的基材為催化劑，做果糖到 5-羥甲基糠醛的反應。所有的固體催化劑皆可回收(如圖 3.2 所示)，並最佳化各個反應步驟的最佳反應條件使各步驟的產物產量達到最大，以求最終產物產量的最大；並討論所有催化劑的回收再使用次數以及相關的產物產量變化，而得知所有催化劑的最大可使用次數已及耐性和穩定性。

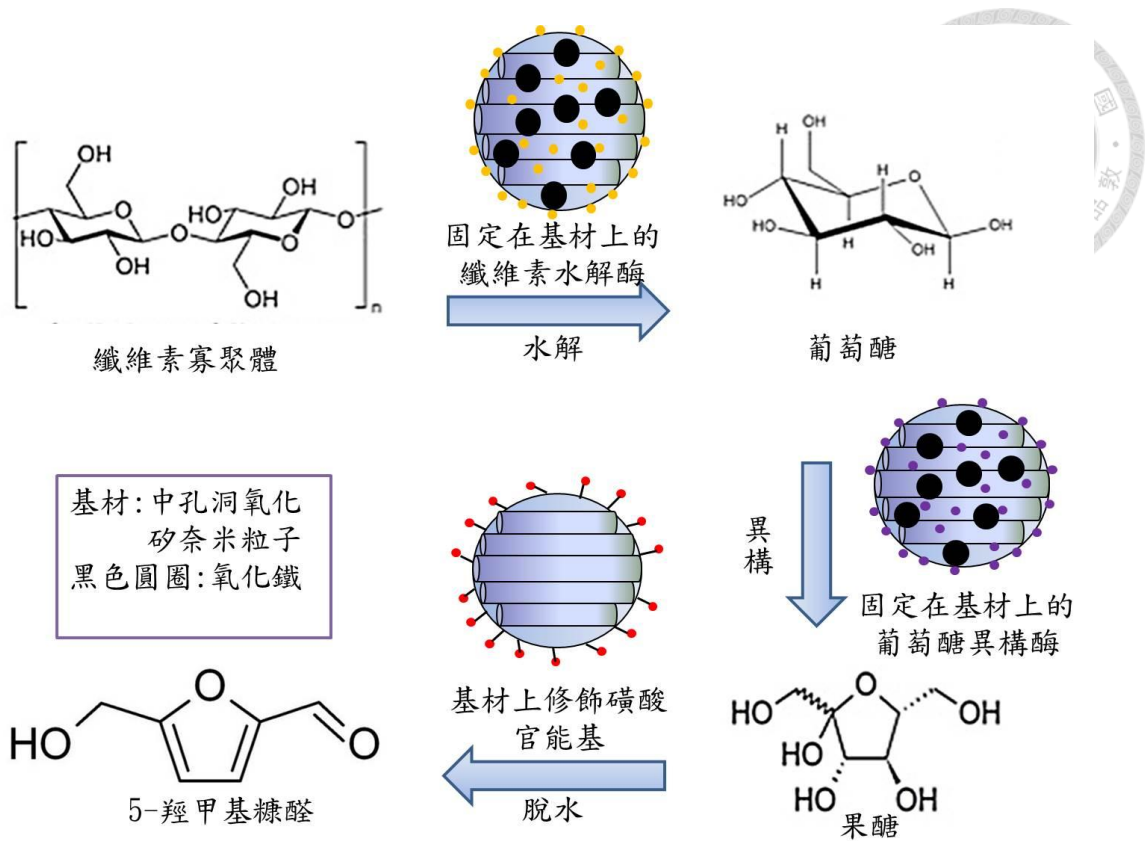


圖 3.1 實驗動機-利用鑲嵌入氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MSNs}$)當基材並修飾不同酵素及官能基後用來做纖維素至 5-羥甲基糠醛的序列式反應



圖 3.2 利用磁鐵分離磁性催化劑以及溶液

第四章：實驗



4.1 材料

4.1.1 化學藥品

在所有實驗中我們用的化學藥品如下表二所示

表二、化學藥品

化學藥品名稱	化學式	廠商
<i>Brij® O10</i>	$C_{36}H_{76}O_{11}$	Aldrich
<i>3-Aminopropyltrimethoxysilane, 97%, APTMS</i>	$H_2N(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$	Aidrich
<i>Dimethyl phthalate, 99+%, DOP</i>	$C_{10}H_{10}O_4$	Aldrich
<i>Tetraethyl orthosilicate (TEOS), reagent grade, 98%</i>	$Si(OC_2H_5)_4$	Aidrich
<i>Methyl alcohol, anhydrous</i>	CH_3OH	Mallinckrodt Chemicals
<i>Toluene, 99.8%, extra dry, over molecular sieves, AcroSeal®</i>	$C_6H_5CH_3$	Acros
<i>5-Hydroxymethyl-2furaldehyde, 98+%, 5-Hydroxymethylfurfural</i>	$C_6H_6O_3$	Alfa Aesar
<i>3-Mercaptopropyltrimethoxysilane, 95%, MP</i>	$HS(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$	Alfa Aesar
<i>Hydrogen peroxide solution, 30%</i>	H_2O_2	Sigma-Aldrich
<i>Sulfuric acid</i>	H_2SO_4	Shimakyu's

		pure chemicals
<i>Ammomia hydroxide, ACS reagent, 28-30%</i>	NH ₄ OH	Sigma-Aldrich
<i>Hydrochloric acid, ACS reagent, 37%</i>	HCl	Sigma-Aldrich
<i>Iron(II) chloride tetrahydrate ReagentPlus® , 98%</i>	FeCl ₂ · 4H ₂ O	Alfa Aesar
<i>Cellulase Trichoderma reesei ATCC 26921</i>		Sigma
<i>1-Butyl-3-methyl-imidazolium chloride [BMIM]Cl</i>	C ₈ H ₁₅ ClN ₂	Aldrich
<i>Cellulose microcrystalline, powder, 20µm</i>	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Aldrich
<i>D-(+)-Glucose, minimum 99.5%</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma
<i>D-(-)-Fructose, minimum 99%</i>	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma
<i>Sodium phosphate tribasic, anhydrous, ≥94%</i>	Na ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich
<i>Magnesium sulfate heptahydrate, ACS reagent, ≥98%</i>	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-Aldrich
<i>Sodium chloride, BioXtra, ≥99.5%</i>	NaCl	Sigma-Aldrich
<i>Citric acid, anhydrous</i>	C ₆ H ₈ O ₇	Sigma
<i>Sodium hydroxide reagent grade, ≥98%, anhydrous</i>	NaOH	Sigma-Aldrich
<i>Iron(III) chloride hexahydrate, ACS reagent, 97%</i>	FeCl ₃ · 6H ₂ O	Alfa Aesar
<i>Glucose isomerase</i>		Hampton

		research
<i>N</i>-(3-dimethylaminopropyl)-<i>N</i>'-ethylcarbodiimide hydrochloride ≥99.0% <i>EDC</i>	$C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$	Sigma
<i>N</i>-hydroxysuccinimide, 98% <i>NHS</i>	$C_4H_5NO_3$	Aldrich
3-(triethoxysilyl)propylsuccinic anhydride, 95% <i>TESPSA</i>	$C_{13}H_{24}O_6Si$	gelest
<i>Ethanol, absolute, ≥99.8%</i>	C_2H_5OH	Sigma-Aldrich
<i>Pluronic® P 104</i>		BASF
<i>Dimethyl sulfoxide, 99.7%, pure</i> <i>DMSO</i>	C_2H_6OS	Aldrich

4.1.2 分析儀器

固體催化劑的孔洞特性，是藉由 Micromeritics ASAP2010 這台儀器，得到氮氣吸脫附曲線而得知；而比表面積和孔洞大小分別是用 BET 和 BJH 法計算得知。固體催化劑的形貌則藉由掃描式電子顯微鏡可以看到 (JEOL JSM-5310 SEM)。固體催化劑接上多少官能基是利用固態核磁共振儀來測定，得到的 ^{13}C -譜和 ^{29}Si -譜可以計算出接上多少的官能基。固體催化劑接上多少酵素是利用紫外光-可見光光譜儀來測定 (Jasco V-670)。纖維素到 5-羥甲基糠醛的連續式反應下所有的產物都是由高性能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC ASI500 System) 配上 HPX-87H 的管柱並在衝提液是 0.005(M) 硫酸、流速為 0.6(mL/min) 的條件下分析 (管柱溫度為 45°C)。



4.2 合成固體催化劑

4.2.1 合成氧化鐵奈米粒子

首先，1.349(g)的氯化鐵(III)和 0.781(g)的氯化鐵(II)放入 600 毫升的去離子水中，攪拌至溶解。溶解後，慢慢滴入氨水(滴入的速度是 30mL/hr)至整杯溶液的 pH 值為 9，杯底放置在磁鐵上面，靜置一段時間後，會看到氧化鐵都被磁鐵吸至杯底，上面是澄清的水溶液，把水溶液倒掉後再加入去離子水，靜置後又倒掉，重複這些動作五次後，再加入 600 毫升的去離子水等待下一步驟的使用。

4.2.2 合成含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子

如圖 4.1 所示，首先，從 4.2.1 的氧化鐵溶液中取出其中的 180 毫升，利用超音波震盪器振十分鐘讓氧化鐵粒子分散更好。接著放入界面活性劑 brij-O10 6.92 毫升，經過 1~2 小時攪拌均勻之後，再放入 APTMS 0.3 毫升及 DOP 0.08 毫升做為孔的擴張劑，可以讓形成的孔徑稍微變大。半小時後，再加入 TEOS 6.7 毫升後，攪拌 24 小時，此時溶液的顏色為咖啡色。接下來所得溶液在 100°C 的油浴下迴流一天就可以得到藉由共沉澱法得到的含氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子這個基材。最後用甲醇藉由抽氣過濾洗滌材料(使用甲醇量為一公升)，收進減壓真空乾燥即可使用。另外，氧化鐵無孔氧化矽奈米粒子的做法幾乎都一樣，只是沒有加入介面活性劑 brij O10。

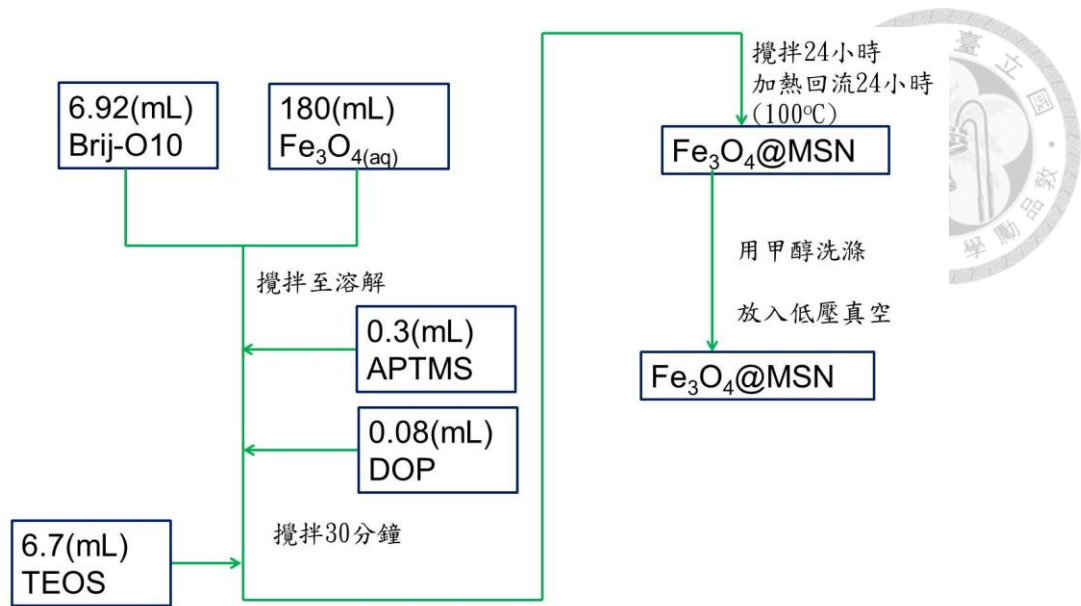


圖 4.1 合成含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之流程圖

4.2.3 基材的合成

4.2.3.1 中孔洞氧化矽奈米粒子之合成

由於含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子是使用共沉澱法合成，氧化鐵會在中孔洞氧化矽奈米粒子裡面或者是覆蓋在表面，如果覆蓋在表面的話會使表面的羥基官能基減少許多，導致以後利用接枝法(grafting method)在材料表面上修飾上的官能基會非常少，為了解決這個問題，選擇了不修飾氧化鐵的 MSN。

我們選擇合成具有高表面積的中孔洞氧化矽奈米粒子來做另外一種基材。合成方法如圖 4.2 所示。在 500 毫升的圓底瓶中放入 164 克的去離子水和 109 克濃度為 4M 的鹽酸，並加入 7 克的 P104 作為介面活性劑，並在室溫下攪拌一天，之後放入 55°C 的油浴中，並且使用針筒幫浦(syringe pump)來定速，以每小時三十毫升的速度加入 TEOS 11.4 毫升，並攪拌一天；之後放入高壓釜中並在 150°C 下水熱一天，拿出來用甲醇和水清洗，原因是要洗掉多餘的介面活性劑；最後為了讓介面活性劑清除得更乾淨，放入 550°C 的氮氣環境下高溫燒結 6 小時，即完成中孔洞氧化矽奈米粒子合成之步驟。

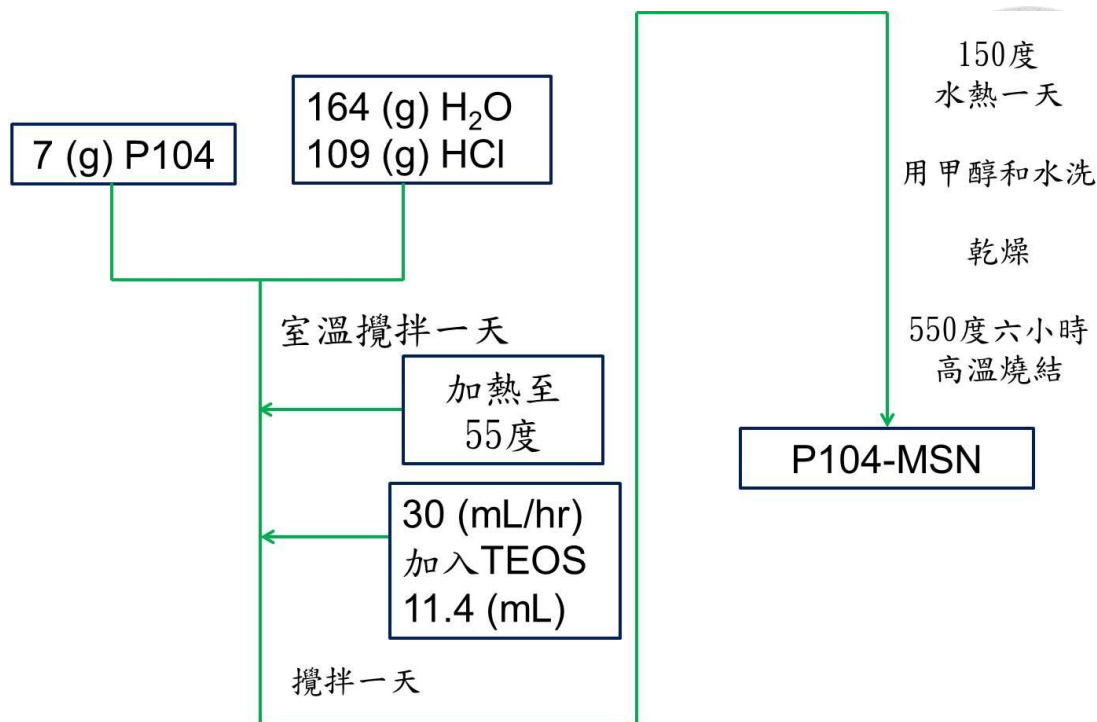


圖 4.2 合成中孔洞氧化矽奈米粒子

4.2.3.2 中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化—接上磺酸官能基

我們利用接枝法(grafting method)使基材表面修飾上官能基以便實驗之用。如圖 4.3 所示，首先取出 1(g)的中孔洞氧化矽奈米粒子當作基材並放入雙頸瓶中，其中一個頸用血清塞塞住防止漏氣。放入磁石後，另一個頸接上冷凝管並放入 110°C 的油浴中並固定。接著開始抽真空半小時，之後再灌入氮氣，重複這個動作三次之後，已經去除反應容器內大部分的水氣(因為矽烷類很容易水解所以要去除水氣)。接著打入 40 毫升的無水甲苯進去，再加入磺酸矽烷-MP(3-Mercaptopropyltrimethoxysilane) 2.23 毫升，在 110°C 油浴下迴流攪拌 24 小時。一天之後，以甲苯當洗滌液(一公升)，用抽氣過濾的方式清洗材料，最後放入低壓真空裡面乾燥即可得到基材表面上修飾硫氫根(-SH)的固體催化劑。接下來拿出乾燥後的基材表面上修飾硫氫根(-SH)的催化劑，以 1 克的基材配上 20 毫升的雙氧水、20 毫升的甲醇以及 20 毫升的去離子水為比例，做官能基氧化的動作。在室溫下攪拌一天後，以去離子水當洗滌液(一公升)，用抽氣過濾的方式

清洗材料，最後放入低壓真空裡面乾燥即可得到基材表面上修飾磺酸根(-HSO₃)的固體催化劑。

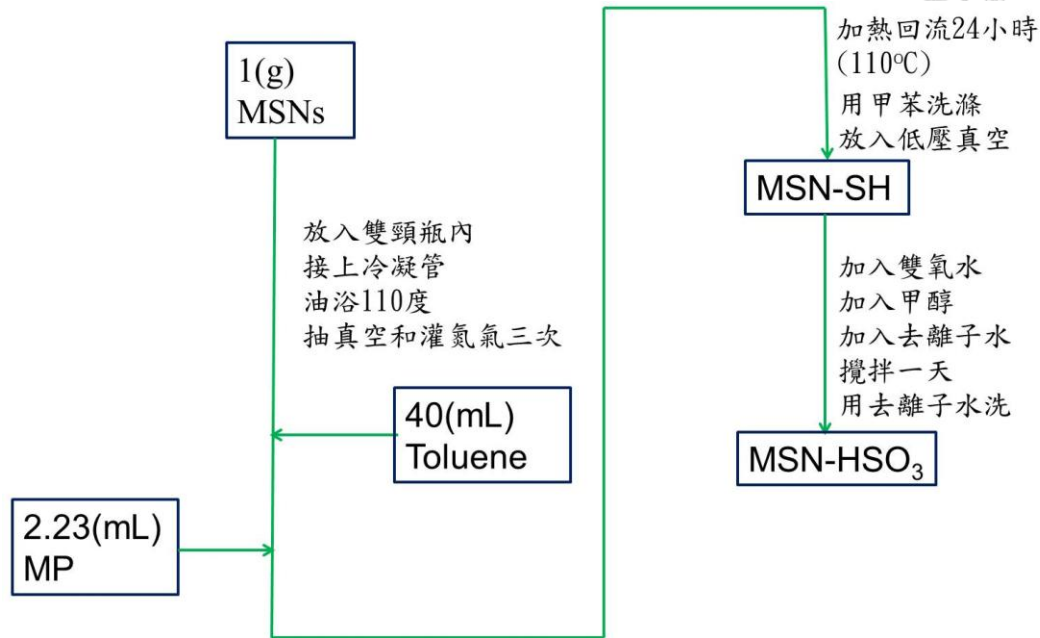


圖 4.3 中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾磺酸官能基之流程圖

4.2.4 含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化—接上氮官能基

如圖 4.4 所示，首先取出 1(g)含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子當作基材並放入雙頸瓶中，其中一個頸用血清塞塞住防止漏氣。放入磁石後，另一個頸接上冷凝管並放入 110°C 的油浴中並固定。接著開始抽真空半小時，之後再灌入氮氣，重複這個動作三次之後，已經去除反應容器內大部分的水氣(因為矽烷類很容易水解所以要去除水氣)。接著打入 40 毫升的無水甲苯進去，再加入氨基矽烷 -APTMS(3-Aminopropyltrimethoxysilane)5 毫升，在 110°C 油浴下迴流攪拌 24 小時。一天之後，以甲苯當洗滌液(一公升)，用抽氣過濾的方式清洗材料，最後放入低壓真空裡面乾燥即可得到基材表面上修飾氮根(-NH₂)的固體催化劑。

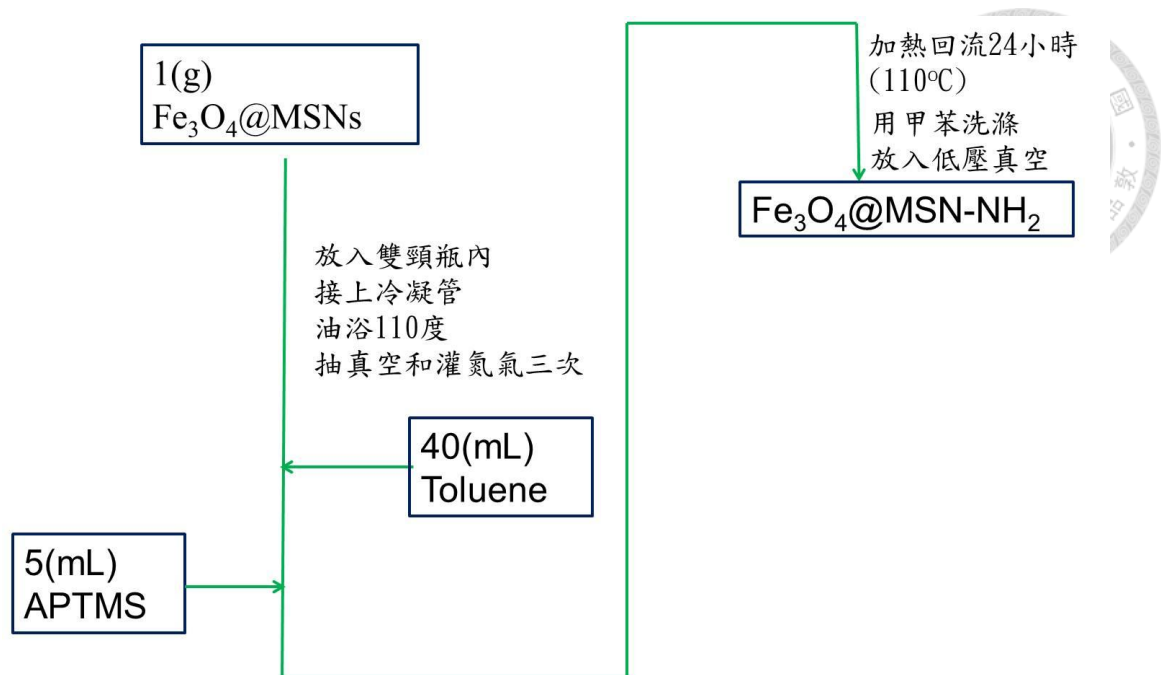


圖 4.4 氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾氨基官能基之流程圖

4.2.5 含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之表面官能化—接上羧酸官能基

如圖 4.5 所示，首先取出 1(g)的含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子當作基材並放入雙頸瓶中，其中一個頸用血清塞塞住防止漏氣。放入磁石後，另一個頸接上冷凝管並放入 110°C 的油浴中並固定。接著開始抽真空半小時，之後再灌入氮氣，重複這個動作三次之後，已經去除反應容器內大部分的水氣(因為矽烷類很容易水解所以要去除水氣)。接著打入 40 毫升的無水甲苯進去，再加入酸酐矽烷-TEPSA(3-(triethoxysilyl)propylsuccinic anhydride)0.37 毫升，在 110°C 油浴下迴流攪拌 24 小時。一天之後，以甲苯當洗滌液(一公升)，用抽氣過濾的方式清洗材料，最後放入低壓真空裡面乾燥即可得到基材表面上修飾酸酐官能基的固體催化劑。

接下來拿出乾燥後有接上酸酐官能基的基材，以 1 克的基材配上 30 毫升的 99% 酒精為比例，加熱到 90°C，一小時後，再加入去離子水(比例為 1 克的基材配上 2 毫升的去離子水)，在 90°C 油浴下再反應一小時，做酸酐開環變成兩個羧酸基的反應。最後以去離子水(一公升)當作洗滌液，用抽氣過濾的方式清洗材料，

放入低壓真空裡面乾燥即可得到基材表面上修飾羧酸官能基的固體催化劑。

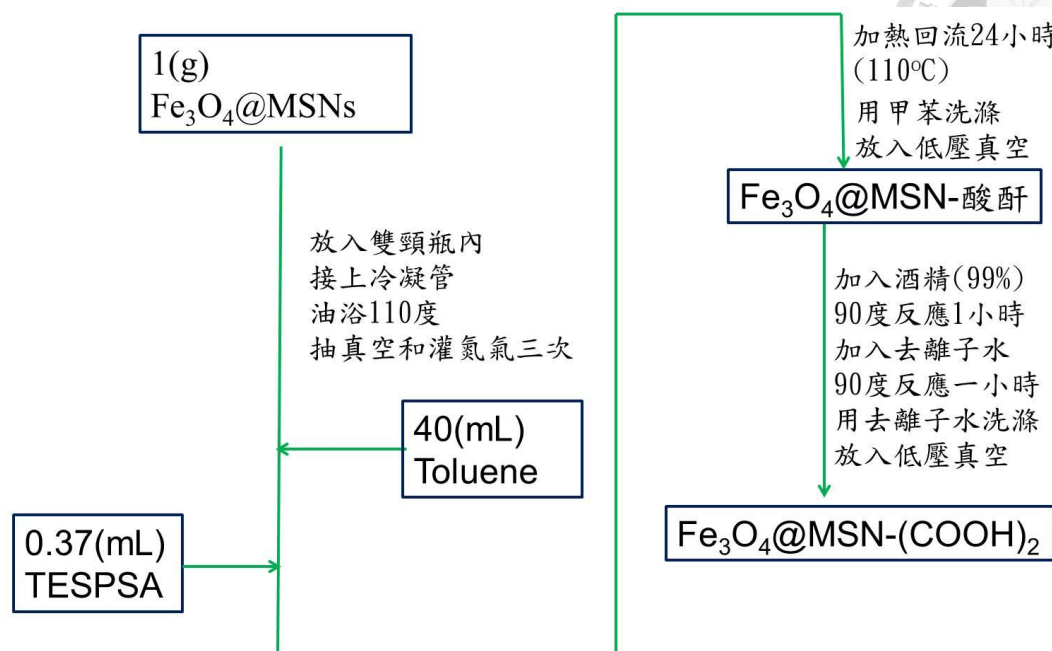


圖 4.5 氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾羧酸官能基之流程圖

4.2.6 酵素的固定化(物理吸附)

要固定纖維素水解酶的話，首先，取含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子 50 毫克當作固定酵素的基材，接著加入 2 毫升的檸檬酸緩衝液(10mM, pH=4.8)。粒子攪拌均勻分布在緩衝液之後，再加入纖維素水解酶 1 毫升進去，並在 4°C 的環境下攪拌一天。一天之後，取出並利用磁鐵分離固體催化劑和液體，重複三次之後並保留上清液待測試。另外一方面，要固定葡萄糖異構酶的話，一樣取含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子 50 毫克當作固定酵素的基材，接著加入 2.5 毫升的磷酸鈉緩衝液(磷酸鈉 20mM/氯化鈉 0.15 M/硫酸鎂 5mM, pH=7.5)。粒子攪拌均勻分布在緩衝液之後，再加入葡萄糖異構酶 0.5 毫升進去，並在 4°C 的環境下攪拌一天。一天之後，取出並利用磁鐵分離固體催化劑和液體，重複三次之後並保留上清液待測試。上清液經過紫外光-可見光光譜儀測定(280nm)之後，藉由檢量線並經過計算之後，可以得知上清液中酵素有多少，加入的酵素量為已知，只要兩個相減之後並可以知道固定上基材的酵素有多少。

4.2.7 酵素的固定化(化學鍵結)

利用化學鍵結把酵素固定在基材上的原理是利用材料上面修飾上的氨基(或羧酸基)和酵素分子內的羧酸基(或氨基)形成穩定的醯胺鍵(peptide bond)後，酵素和基材形成鍵結而不容易脫落。要利用化學鍵結固定纖維素水解酶的話，首先先取鑲嵌入氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾羧酸官能基($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MSNs}-(\text{COOH})_2$)0.05 克，加入 2 毫升的檸檬酸緩衝液中，再加入 EDC 12.4 毫克和 NHS 7.5 毫克，這兩種化學藥品的作用是幫助醯胺鍵能夠更快的形成。接下來加入 1 毫升的纖維素水解酶，在 4°C 的條件下反應一天。一天之後，取出並利用磁鐵分離固體催化劑和液體，重複五次之後並保留上清液待測試。要利用化學鍵結固定葡萄糖異構酶的話，首先先取鑲嵌入氧化的中孔洞氧化矽奈米粒子表面修飾氨基官能基($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MSNs}-\text{NH}_2$)0.05 克，加入 2.5 毫升的磷酸鈉緩衝液中，再加入 EDC 12.4 毫克和 NHS 7.5 毫克，接下來加入 0.5 毫升的葡萄糖異構酶，在 4°C 的條件下反應一天。一天之後，取出並利用磁鐵分離固體催化劑和液體，重複五次之後並保留上清液待測試。利用上清液測紫外光-可見光光譜儀再經過計算後可以知道鍵結多少酵素上去。

4.3 連續式反應操作

4.3.1 纖維素的前處理

買來的纖維素都是有結晶的結構，而且都是交聯在一起的纖維素，如果直接讓纖維素水解酶去反應的話，時間要拉的很長而且需要很多酵素量，所以我們選擇用前處理過的纖維素來做反應。前處理的步驟如圖 4.6 所示，取 0.05 克的纖維素加入 0.95 毫升的離子液體([BMIM]Cl)。接著在 120°C 的油浴裡反應一小時，一小時後加入甲醇使反應中止並使前處理過的纖維素(纖維素寡聚物)沉澱出來，同時利用離心的方法收集膠狀的纖維素寡聚物並且用甲醇還有去離子水洗五次，最後放入低壓真空乾燥即可得到前處理過的纖維素。

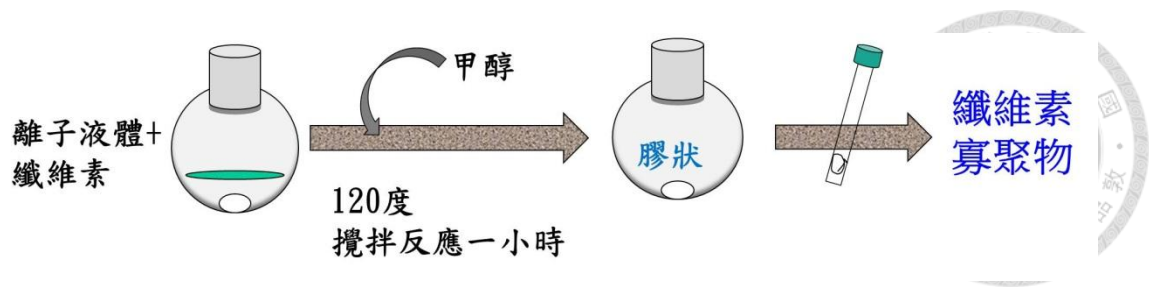


圖 4.6 纖維素前處理流程圖

4.3.2 酵素的反應條件最佳化

取前處理過的纖維素 0.015 克，接著放入檸檬酸緩衝液和纖維素水解酶。首先我們先最佳化反應的溫度，先固定放入緩衝液以及酵素的比列，調整不同的溫度，並固定一個反應的時間，可以得到在某個溫度下(T_{max})有最高葡萄糖的產率。接下來固定溫度(T_{max})，改變緩衝液和酵素的比列，到達某一個比列也會達到最高產率，這個比列就是放入酵素和緩衝液的最佳比列(R_{max})。最後一部分在最適當的反應溫度及比列下(T_{max} 、 R_{max})，調整反應時間，也會得到最高的葡萄糖產率，所以得到最佳的反應時間(t_{max})。另一方面如果要最佳化葡萄糖異構酶的話，反應物改成葡萄糖 0.015 克，把緩衝液改成磷酸鈉緩衝液，並重複上述步驟即可得知葡萄糖異構酶的反應最佳條件。

4.3.3 纖維素寡聚物至果糖的連續式反應

如圖 4.7 所示，取 0.015 克的纖維素寡聚物，放入 1 毫升的磷酸鈉緩衝液 (pH=4.8)(會在結果部分說明)，接著加入 0.05 克的含氧化鐵中空洞氧化矽奈米粒子並有固定纖維素水解酶的固體催化劑，在最佳化的反應條件下反應，接下來使用磁鐵把催化劑吸到瓶壁，就可以分離出固體催化劑和澄清液，澄清液包含未反應完的反應物、產物，接下來再加入緩衝液清洗固體催化劑，使卡在孔洞中的反應物及產物都洗出來，重複五次之後就可以洗乾淨，固體催化劑就可以再次使用。接著澄清液收集起來，並加入含氧化鐵中空洞氧化矽奈米粒子並有固定葡萄糖異

構酶的固體催化劑 0.05 克，以及調整反應環境至 pH 值為 7.5 之後(用氫氧化鈉調整)，在最佳的反應條件下反應，利用磁鐵分離液體和固體催化劑，固體催化劑可以再做下一次使用而澄清液收集起來，用高效能液相層析儀分析產物並計算產率。回收過的固體催化劑則可以再繼續下一次的反應。

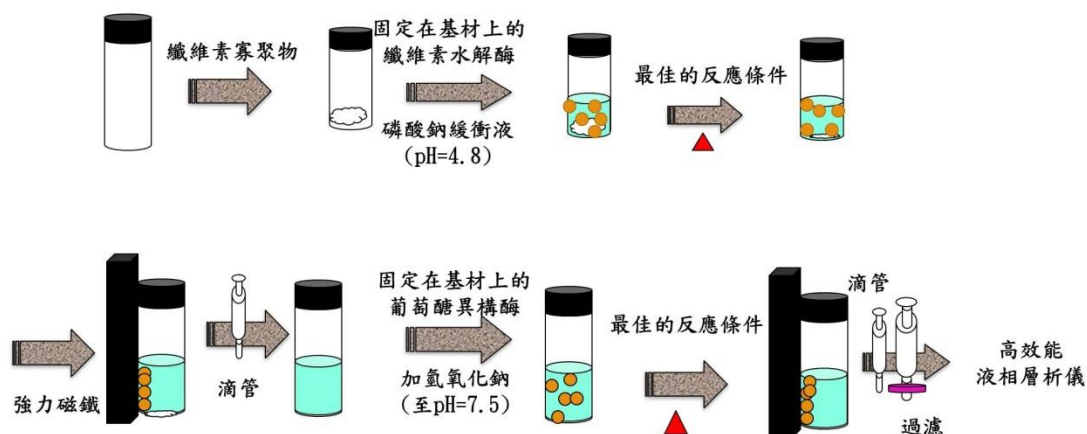


圖 4.7 纖維素寡聚物至果糖的連續式反應流程圖

4.3.4 纖維素寡聚物至 5-羥甲基糠醛的連續式反應

由 4.3.3 最後取出來的澄清液，接下來濃縮反應體積，並加入 DMSO(dimethyl sulfoxide)，使反應成為兩相的系統(有機相和水相都存在)，並加入 0.15 克的中孔洞氧化矽奈米粒子並有磺酸官能基的固體催化劑，在適當的反應時間和反應溫度下反應完後，如果要回收催化劑則用離心回收，如果沒有要回收催化劑則過過濾膜把固體催化劑濾掉。最後用高性能液相層析儀分析產物，並計算產率。

4.3.5 材料的回收性及穩定性測試

我們取反應物和固定在基材上的酵素或是修飾上官能基的基材做催化劑，在最佳反應條件反應完時，用磁鐵把固體催化劑和溶液分開，就可以把液體取出，剩下固體催化劑的部分。因為我們的基材是孔洞材料，有可能反應物或產物會殘

留在固體催化劑內沒有被分離出來，所以我們會繼續加入反應時的溶劑做清洗的動作，把上清液取出用高性能液相層析儀分析，直到沒有產物或反應物就代表催化劑恢復到它原本的狀態。經過實驗得知清洗五次即可。



4.4 高性能液相層析儀分析(HPLC)

4.4.1 檢量線及滯留時間

利用每個反應物和產物在 HPLC 管柱內的滯留時間不同(每個產物和反應物和管柱內的填充材料作用力不同，造成滯留時間的差異)，可以藉此分離產物進而得到它們的量。先準備有可能出現的產物，取 0.005(M)的硫酸來配成不同五個不同的濃度(0.02~0.00125M)，打入 HPLC，可以知道這個物質現在圖譜的哪個時間，並且得到波峰的積分面積，因為積分面積和濃度成正比，所以可以利用這個關係得到每個產物的檢量線，利用此檢量線計算出每次下反應澄清液中有反應物和產物量有多少。我預估的反應物和產物的滯留時間如表三所示。

表三、可能出現的化合物之滯留時間

化合物	滯留時間(分鐘) (在 HPX-87H 的管柱 衝提液是 0.005M 的硫酸溶液 流速為 0.6mL/min，溫度為 45 度)
纖維雙糖 (兩葡萄糖脫水聚合物)	7.425
葡萄糖	8.968
果糖	9.672
5-羥甲基糠醛	30.584

4.4.2 計算

為了使我的研究更有系統，必須算出每個反應的反應物轉化率、產物的產率。
計算的方法如下表四所示



表四、轉化率、產率的定義以及計算方法

轉化率(X)：有多少莫耳比率的反應物反應掉
$X(\%) = \frac{n_{i,rec} - n_{f,rec}}{n_{i,rec}} \times 100$
$n_{i,rec}$ ：投入反應的反應物之莫耳數
$n_{f,rec}$ ：由 HPLC 分析後所得到積分面積並經過檢量線計算得到的反應物莫耳數
產率(Y)：有多少莫耳比率的反應物轉化成想要的產物
$Y(\%) = \frac{n_{f,pro}}{n_{i,rec}} \times 100$
$n_{f,pro}$ ：由 HPLC 分析後所得到積分面積並經過檢量線計算得到的產物莫耳數

第五章：結果與討論



5.1 材料鑑定

5.1.1 磁性材料的形貌

本研究合成出來的基材-鑲嵌有氧化鐵的中孔徑氧化矽奈米粒子，為了得到材料的表面形貌以及氧化鐵的分布，本研究做了顯微鏡的測試，此材料的形貌特性如圖 5.1 所示。圖 5.1 左邊為此材料的掃描式電子顯微鏡(SEM)圖，我們可以看到此材料的形狀為類圓形，粒子約為 150~200 nm，由於氧化鐵有磁性的關係，粒子和粒子間會因為磁性作用而吸附在一起而有聚集的現象；另外圖 5.1 右邊為此材料的穿隧式電子顯微鏡(TEM)圖，我們可以看到此材料的內層結構，首先可以看到顏色較暗的部分而且一顆顆的散佈，那就是氧化鐵的粒子；白色的部分即為中孔洞氧化矽奈米粒子，可以看到氧化鐵不只分布在中孔洞氧化矽奈米粒子的內部，有些也分布在外部，會使中孔徑氧化矽奈米粒子因磁性作用產生聚集的現象。

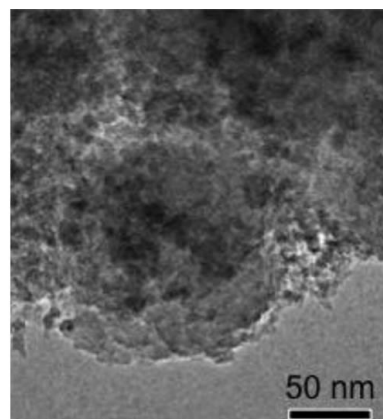
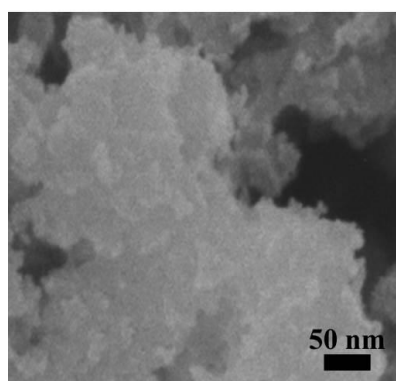


圖 5.1(左)鑲嵌有氧化鐵的中孔徑氧化矽奈米粒子之掃描式電子顯微鏡圖(右)鑲嵌有氧化鐵的中孔徑氧化矽奈米粒子之穿隧式電子顯微鏡圖

5.1.2. 中孔洞氧化矽奈米粒子之形貌

本研究另外使用的無磁性材料，也就是中孔洞氧化矽奈米粒子，為了得到它表面的形貌，我們使用了掃描式電子顯微鏡來得到此資訊，結果如圖 5.2 所示，中孔洞氧化矽奈米粒子的粒子大小約為 500 nm，而且每一顆粒子的大小都差不多，另外可以得知它為短棒狀結構。

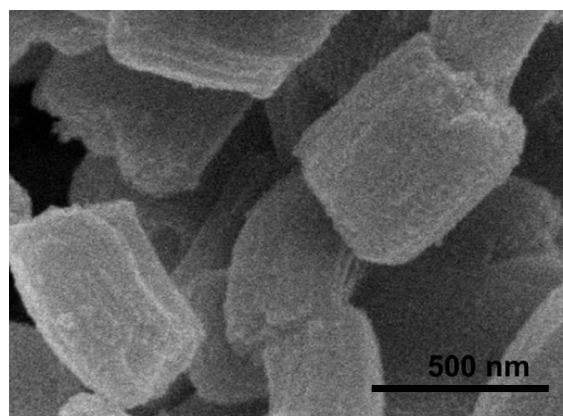


圖 5.2 中孔洞氧化矽奈米粒子之形貌

5.1.3 孔的特性

為了瞭解鑲嵌有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子之孔道的特性，本研究做了氮氣吸脫附實驗並藉由 BET 或 BJH 方法計算孔洞直徑。氮氣吸脫附曲線如圖 5.3(a)所示，首先由吸脫附曲線的六種型態可以看出來，本研究的材料為中孔洞的吸脫附曲線，就可以證明我們的材料為中孔洞；另外由附圖的孔洞分布可以看到，此材料孔洞的直徑約為 3.7 nm，屬於中孔徑的範圍，且比表面積為 100.9 m²/g；另外也把中孔洞氧化矽奈米粒子做氮氣吸脫附實驗，結果如圖 5.3(b)所示，由吸脫附曲線可以確定本材料為中孔洞，另外由附圖孔的分布可以得知孔的平均直徑為 5.5 nm，比表面積為 302.9 m²/g，比起有磁性的中孔洞氧化矽奈米粒子多了三倍的比表面積，有多三倍的表面積就代表此材料上的羥基更多，所以本研究選擇此材料用接枝法修飾上磺酸官能基來做果糖轉換成 5-羥甲基糠醛的酸性催化劑。

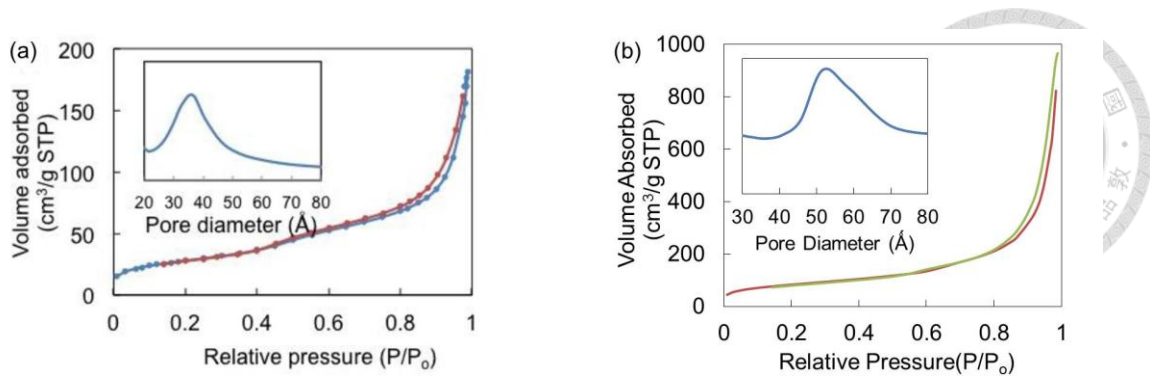


圖 5.3(a)有磁性的中孔洞氧化矽奈米粒子之氮氣吸脫附曲線 (b)中孔洞氧化矽奈米粒子之氮氣吸脫附曲線

5.1.4 催化劑的鍵結量

為了定性且定量鍵結在中孔洞氧化矽奈米粒子上的磺酸官能基，就把此催化劑拿去做了固態核磁共振儀的測試。結果如圖 5.4(a)所示，是拿材料拿去做碳譜分析，因為我們的基材為氧化矽，所以可以知道我們材料並沒有碳原子的存在，所以做碳譜分析所得到的碳訊號為已接上去的官能基分子內的碳原子，而圖中的 C₁、C₂ 及 C₃ 依序可以對到官能基上面的三個碳原子，所以由固態核磁共振的碳譜分析可以得知確實磺酸根有接上去中孔徑氧化矽奈米粒子上。

上述的分析為定性分析，接下來由核磁共振的矽譜分析可以做定量分析，也就是可以計算出官能基的量。分析中孔洞氧化矽奈米粒子的結果如圖 5.4(b)所示，圖上的 Q⁴ 為矽原子的四個鍵結都跟氧原子結合，然後氧再接矽原子，即 Si(OSi)₄，所以這個訊號表示此矽原子並沒有接上任何官能基；Q³ 為矽原子的三個鍵結都跟氧原子結合然後再跟矽原子接上，而另一個鍵結上羥基，即 Si(OSi)₃(OH)，表示此矽原子接了一個羥基；Q² 為矽原子的兩個鍵結都跟氧原子結合然後再跟矽原子接上，而另兩個鍵結上羥基，即 Si(OSi)₂(OH)₂，表示此矽原子接了兩個羥基，所以可以利用分峰軟體先把訊號分開，之後可以計算出中孔洞氧化矽奈米粒子上有多少的羥基，因為接枝法是利用化學官能基和材料表面上的羥基發生化學反應而接上去，所以羥基的多寡決定了接上去官能基的多寡；計算結果如表五整理所

示，在 1 g 的基材中，有 6.04 mmol 的羥基；圖 5.4(c)為中孔洞氧化矽奈米粒子接上磺酸跟之後的矽譜分析，一樣計算 Q 的訊號之後可以算出羥基量，由表五得知 1 g 的材料上只剩 2.69 mmol 的羥基，羥基量有下降表示跟磺酸官能基作用，但並不是所有的羥基都有反應。

如圖 5.4(c)所示，除了 Q 用來計算羥基的量之外，T 則是用來計算接上多少官能基上去的訊號， T^3 為矽原子的三個鍵結都接上氧再接矽，另一個鍵結接上磺酸根，即 $Si(OSi)_3(SO_3H)$ ， T^2 為矽原子的兩個鍵結都接上氧再接矽，另一個鍵結接上磺酸根而另一鍵結接上羥基，即 $Si(OSi)_2(OH)(SO_3H)$ ，所以可以根據兩個訊號值經由計算後得到官能基量。如表五所示，有接上磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子接上去磺酸根的量為每公克含 1.06 mmol。

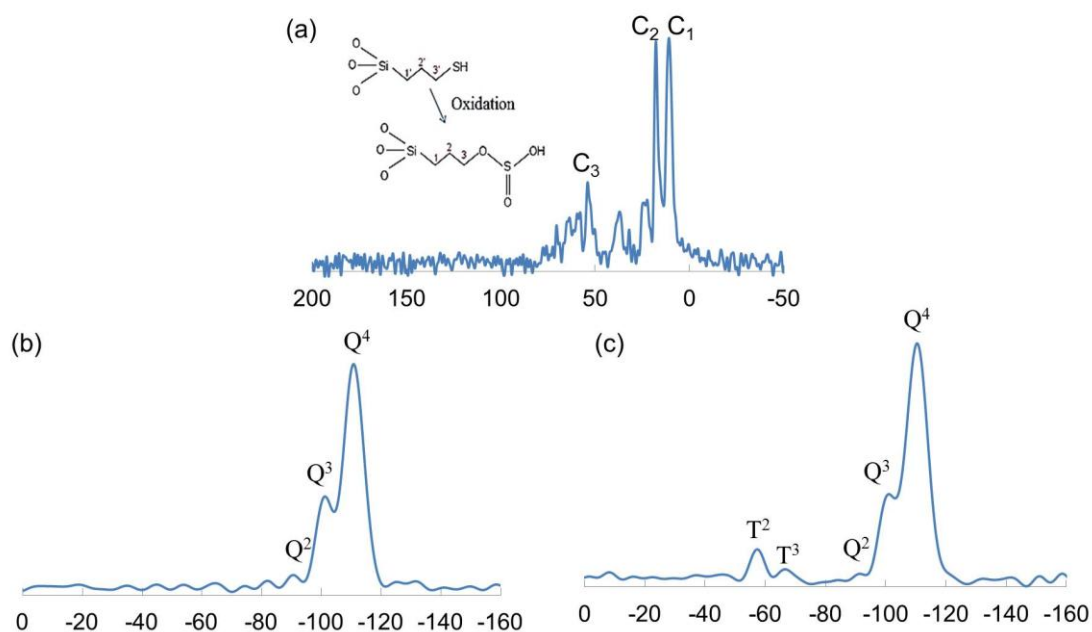


圖 5.4(a)中孔洞氧化矽奈米粒子接上磺酸官能基的碳譜分析(b)中孔洞氧化矽奈米粒子的矽譜分析(c)中孔洞氧化矽奈米粒子接上磺酸官能基的碳譜分析

表五、中孔洞氧化矽奈米粒子和接上磺酸根之後的性質

催化劑	粒徑 (nm)	表面積 (m ² /g)	孔徑 (nm)	羥基量 (mmol/g)	磺酸根量 (mmol/g)	酸強度 (pKa)	酸量 (mmol H ⁺ /g)
MSN	510.5	302.9	5.3	6.04	N.D.	2-4.8	0.253
HSO ₃ -MSN	520.3	285.8	4.7	2.69	1.06	0.8-2	1.290

接下來為了測定酸的強度，我們利用各種指示劑來推算出材料的酸度範圍，由表五我們可以知道 MSN 的酸度介在 2~4.8 之間，屬於弱酸；另外有接上磺酸根的話，酸度增強，pKa 介在 0.8~2 之間，屬於中弱酸。最後為了得知酸量有多少，我們利用氫氧化鈉來做標準品，滴定兩個材料，結果如表五所示，1 g 的中孔洞氧化矽奈米粒子有 0.253 mmol 的氫離子，而接上磺酸根酸量大約增加六倍，一克含有 1.290 mmol 的氫離子。



5.2 反應

5.2.1 酵素的最佳化條件

5.2.1.1 纖維素水解酶的反應最佳化

我們想要知道纖維素水解酶在什麼環境下可以達到最高的效率，我們用反應溫度、酵素投入量以及反應時間當作變因。首先取 0.015 克的纖維素寡聚物當反應物，加入 50 單位(units, 1 毫克的纖維素水解酶有 5 單位)的纖維素水解酶，反應時間 24 小時，改變反應溫度。結果如 5.5(a)所示，我們取 20~70°C 之間的五個溫度做反應，結果發現從 20 度溫度慢慢上升，葡萄糖的產率也跟著上升，到了 50 度之後達到最高產率 85.1%，繼續上升溫度，到 60 度葡萄糖產率下降一點點(83.2%)，加熱到 70 度後產率掉到約 26%。由此實驗我們可以推測纖維素水解酶的最佳反應溫度在 50~60 度之間，溫度太高會使酵素失去活性。由於溫度越低越節省成本，所以我們選擇 50 度當成最佳化的反應溫度。

接下來固定反應溫為 50 度、反應時間為 24 小時，由於酵素昂貴，量使用的越少越好，所以必須知道投入酵素的量在最小的情況下卻能達到最大產率的值。我們改變投入纖維素水解酶的量，從 1~23 毫克(5 單位~115 單位)。所得到的結果如圖 5.5(b)所示，投入量從 1~5 毫克時，葡萄糖產率漸漸上升，到達 5 毫克(25 單位)達到最大，為 83.2%，接下來繼續加入纖維素水解酶，葡萄糖產率幾乎維持固定，所以已經達到最大值。由此實驗所知，分解 0.015 克的纖維素寡聚物，只需要 5 毫克(25 單位)的纖維素水解酶就足夠，添加過量只是浪費酵素並無益處。

已經知道最適合纖維素水解酶的反應溫度還有投入量之後，最後我們做反應時間變化對葡萄糖產率的影響。由圖 5.5(c)所示，時間從 0~24 小時漸增，葡萄糖產率也是漸增，在 24 小時達到葡萄糖最大產率 84%，時間繼續拉長葡萄糖的產率大約維持相同。所以我們取最佳反應時間為 24 小時。

綜合以上三個實驗得知，纖維素水解酶的最佳反應溫度為 50 度、最佳投入

量為 5 毫克而最佳反應時間為 24 小時。另外選擇的緩衝液條件是酵素使用說明書上的建議，我們選擇檸檬酸緩衝液，pH 值為 4.8。

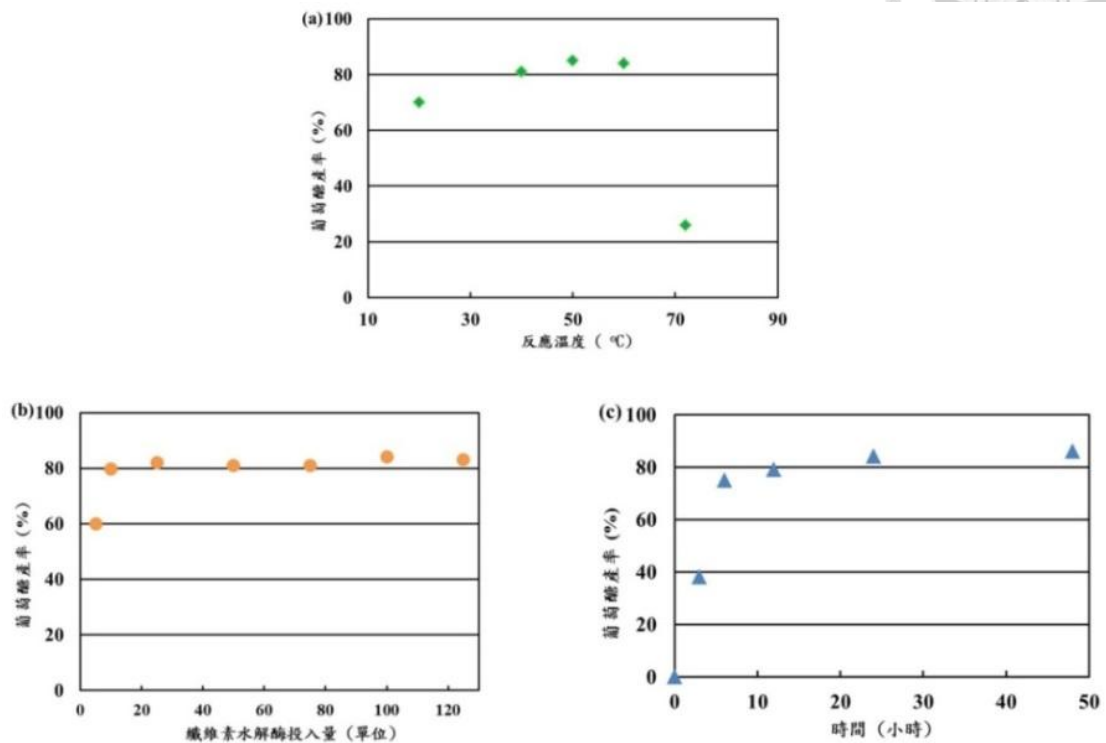


圖 5.5 在檸檬酸緩衝液系統下，以 0.015 克的纖維素寡聚物為反應物，做(a)反應溫度的最佳化(b)酵素投入量的最佳化(c)反應時間的最佳化

5.2.1.2 葡萄糖異構酶的反應條件最佳化

對於葡萄糖異構酶也要最佳化反應溫度、投入量和反應時間。首先，在磷酸鈉緩衝液(pH=7.5)0.95 毫升下，加入 0.015 克的葡萄糖以及 0.05 毫升的葡萄糖異構酶(含 1.65 毫克的葡萄糖異構酶，共 47.85 單位)，反應時間為 24 小時下，並在 25~80 度之間取五個點做反應。結果如圖 5.6(a)所示，從 25~60 度之間，果糖的產率大約都是 40%之間，溫度升到 70 度時，果糖產率達到最高 60.4%，溫度繼續升高到 80 度時，果糖產率掉回 50%，表示如果超過 70 度酵素會因為溫度太高而部分失去活性，所以我們挑 70 度為葡萄糖異構酶的最佳反應溫度，由這個實驗我們也可以知道葡萄糖異構酶比纖維素水解酶還要耐高溫，屬於高溫型的酵

素。

接下來要最佳化投入酵素的量，投入了 0.033~9.9 毫克的酵素(0.957~287.1 單位)，而得到最小的酵素投入量有最佳的果糖產率。由圖 5.6(b)所示，隨著酵素的投入量漸漸變多，果糖產率也慢慢變高，到達果糖產率最高的時候(69.5%)葡萄糖異構酶的投入量為 3.3 毫克(95.7 單位)，之後投入量越多，果糖的產率約為定值，所以我們取投入量 3.3 毫克為最佳的葡萄糖異構酶的投入量。

最後最佳化反應時間，結果如 5.6(c)所示。在 0~24 小時之間，隨著時間漸增果糖的產率也會漸漸上升，並在反應時間 24 小時的時候達到最大值。時間拉長到 48 小時的時候，果糖產率驟降到約 45%。葡萄糖和果糖本身就是同分異構物，所以果糖產率不可能到很高，時間漸漸拉長，葡萄糖和果糖的量也會漸漸趨近於平衡，所以果糖產率會下降到約 50%。

磷酸鈉緩衝液的建議 pH 值為 7.5，不過為了讓酵素在最好的環境下發揮作用，我們試著調整緩衝液 pH 值做測試，結果如圖 5.6(d)所示，我們把磷酸鈉緩衝液用氫氧化鈉和鹽酸調整 pH 值至 0~12 這個範圍內，pH 值從 0 到 7.5 之間，果糖產率漸增，到 7.5 達到最高，之後繼續上升 pH 值，發現果糖產率下降，顯示不太適合。所以我們選擇 pH 為 7.5 為最佳反應酸鹼度。

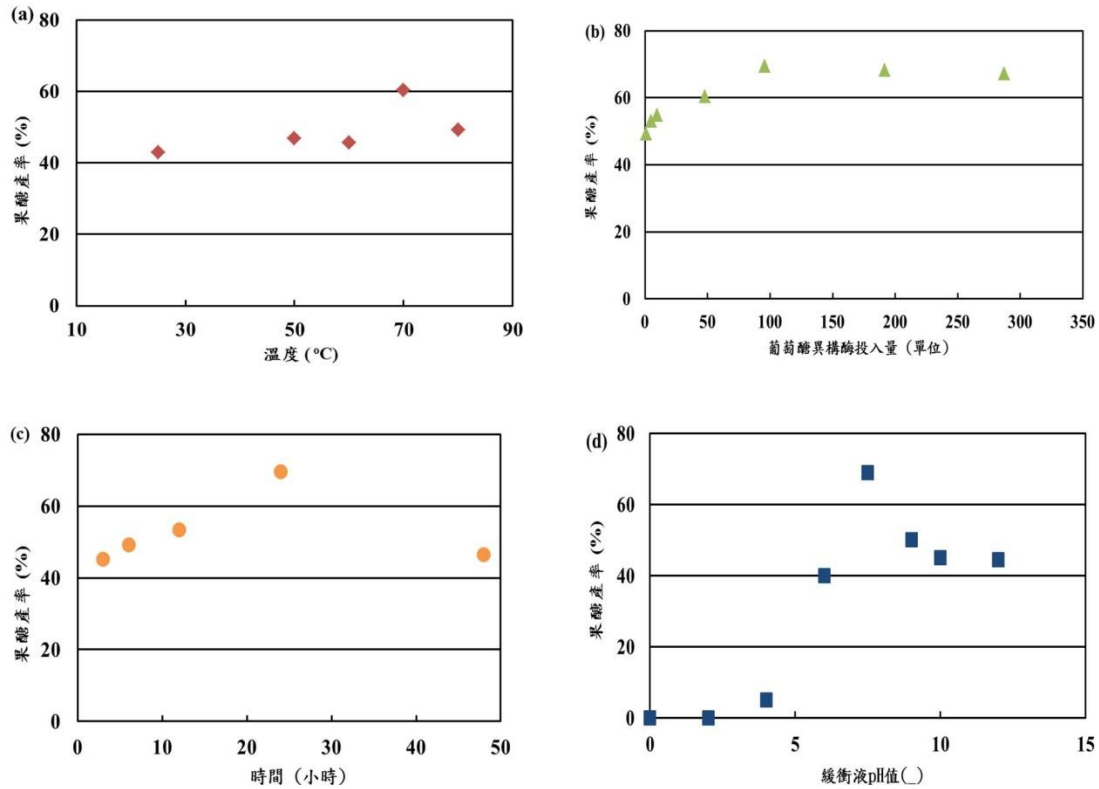


圖 5.6 在磷酸鈉緩衝液系統下，以 0.015 克的葡萄糖為反應物，做(a)反應溫度的最佳化(b)酵素投入量的最佳化(c)反應時間的最佳化(d)反應環境 pH 值的最佳化

5.2.2 酵素吸附量以及反應測試

5.2.2.1 纖維素水解酶吸附量以及反應測試

我們利用含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子做固定纖維素水解酶的載體。結果如下表六所示。利用紫外光-可見光光譜儀來測試吸附完後上清液有多少殘留酵素，再用投入量扣除即可知道固定上基材的纖維素水解酶有多少，經由計算後得知固定上載體的纖維素水解酶為 7.3 毫克。接著拿自由的纖維素水解酶的最佳投入量五毫克和固定在基材上的纖維素水解酶做相同的反應(分解 0.015 克的纖維素寡聚物，反應溫度為 50 度，反應時間為 24 小時)，由表六可知，自由的纖維素水解酶作用後葡萄糖的產率為 85.1%，接著拿固定在基材上的纖維素水解酶做測試，葡萄糖的產率為 78.6%。由這些實驗我們可以知道，固定在基材上的纖維素水解酶雖然比起自由的纖維素水解酶量還多，不過葡萄糖產率卻低了一點

點。由此可知固定在基材上的纖維素水解酶失去了一點點活性，所以沒有像自由酵素一樣發揮它最大的效能，但卻保留了絕大部分的活性，代表我們的基材是適合做為纖維素水解酶的載體。



表六、自由和固定在載體上的纖維素水解酶比較

催化劑	投入量 (mg)	葡萄糖產率 (%)
自由的纖維素水解酶	5	85.1
固定在基材上的纖維素水解酶	7.3/0.05g 載體	78.6

5.2.2.2 葡萄糖異構酶吸附量以及反應測試

我們一樣利用含氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子當作載體做葡萄糖異構酶的物理吸附。結果如表七所示，我們用最佳酵素的投入量做比較(溫度 70 度，反應時間 24 小時)，也就是投入 3.3 毫克的葡萄糖異構酶，來讓 0.015 克的葡萄糖異構化成果糖，果糖產率為 69.5%。固定在基材上的葡萄糖異構酶經過紫外光-可見光光譜儀的測定再計算後得知固定上基材的葡萄糖異構酶為 5.03 毫克，做一樣的實驗測試果糖產率為 51%。由此實驗可知，葡萄糖異構酶固定在載體上後一樣會部分失去活性，不過還是有維持大部分的活性。

表七、自由和固定在載體上的葡萄糖異構酶比較

催化劑	投入量 (mg)	葡萄糖產率 (%)
自由的葡萄糖水解酶	3.3	69.5
固定在基材上的葡萄糖水解酶	5.03/0.05g 載體	51

5.2.3 緩衝液的選擇

由實驗所知，纖維素水解酶所適合的環境是 pH 值為 4.8 的檸檬酸緩衝液；

而葡萄糖異構酶所適合的環境是 pH 值為 7.5 的磷酸鈉緩衝液，兩個酵素所適合的緩衝液種類不同之外所適合的 pH 值也有很大的差異，如果想一步驟把纖維素寡聚物轉化成果糖的話，是不太可能的事，就算可以的話果糖的產率也會很低。我們想要藉由兩步驟反應(纖維素寡聚物先水解成葡萄糖，葡萄糖再異構化成果糖)來達成，不過也有一個小問題就是再換催化劑的時候緩衝液如何轉變。

為了解決這個問題，我們先配出四種不同條件的緩衝液，分別是 pH 值為 4.8 的檸檬酸緩衝液、pH 值為 7.5 的檸檬酸緩衝液、pH 值為 4.8 的磷酸鈉緩衝液跟 pH 值為 7.5 的磷酸鈉緩衝液分別去對纖維素水解酶和葡萄糖異構酶做反應測試。結果如表八所示，首先取自由的纖維素水解酶來做反應，反應都在最佳的條件下進行(反應溫度為 50 度、反應時間為 24 小時、酵素投入量為 5 毫克、纖維素寡聚物為 0.015 克)，纖維素水解酶在 pH 值為 4.8 的檸檬酸緩衝液中反應，葡萄糖產率有 84%；在 pH 值為 7.5 的檸檬酸緩衝液中反應時，葡萄糖的產率卻驟降至 2%，由此兩實驗可知，纖維素水解酶對 pH 值是非常敏感的；接下來在 pH 值為 4.8 的磷酸鈉緩衝液中反應，葡萄糖產率為 80.5%，由此實驗可知，雖然更換緩衝液的種類使葡萄糖產率降低一點點，不過基本上來說還是可以接受此緩衝液；最後在 pH 值為 7.5 的磷酸鈉緩衝液中反應，葡萄糖產率降為 1.5%，因為改變了緩衝液的種類及 pH 值，所以葡萄糖產率四個測試中最低的。由此四個實驗我們可知，對於纖維素水解酶而言，pH 值為最重要的因素，而緩衝液的種類對它沒有什麼影響。

接下來也讓葡萄糖異構酶在最佳化的條件下(反應溫度 70 度、反應時間 24 小時、酵素投入量為 3.3 毫克、葡萄糖投入 0.015 克)配合這四種不同的緩衝液結果如表八所示。葡萄糖異構酶在 pH 值為 7.5 的磷酸鈉緩衝液中反應自然是最好的，果糖產率達到 65%；接著讓葡萄糖異構酶在 pH 值為 7.5 的檸檬酸緩衝液下反應，果糖產率卻降到 39.8%，由這兩個實驗我們可以知道，緩衝液的種類對葡萄糖異構酶是重要的；另外在 pH 值為 4.8 的磷酸鈉緩衝液中作用，果糖的產率

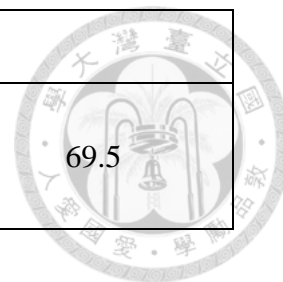
驟降為為 5%，所以我們也知道 pH 值對葡萄糖異構酶也是非常重要的；最後放在 pH 值為 4.8 的檸檬酸緩衝液中作用，果糖產率降到不到 1%，葡萄糖異構酶幾乎完全失去活性。由此四個實驗我們可以知道，對於葡萄糖異構酶而言，緩衝液的種類以及 pH 值都是非常重要的。

總結這八個實驗(表八)，我們可以知道，如果要做兩步驟從纖維素寡聚物轉化成果糖的實驗，首先我們可以讓纖維素水解酶在 pH 值為 4.8 的磷酸鈉緩衝液中進行反應(纖維素水解酶只對 pH 值很敏感)，之後經由氫氧化鈉調整 pH 值至 7.5 後，再放入葡萄糖異構酶使葡萄糖異構畫成果糖。這樣一來每個步驟的產物產率都可以盡可能達到最大值，以求最終產物的產率達到最高。

表八、不同緩衝液對兩種酵素之影響

酵素	緩衝液	反應	產物產率(%)
纖維素水解酶	pH=4.8 檸檬酸緩衝液	纖維素寡聚物 →葡萄糖	85.1
纖維素水解酶	pH=7.5 檸檬酸緩衝液	纖維素寡聚物 →葡萄糖	2
纖維素水解酶	pH=4.8 磷酸鈉緩衝液	纖維素寡聚物 →葡萄糖	80.5
纖維素水解酶	pH=7.5 磷酸鈉緩衝液	纖維素寡聚物 →葡萄糖	1.5
葡萄糖異構酶	pH=4.8 檸檬酸緩衝液	葡萄糖→果糖	0.9
葡萄糖異構酶	pH=7.5 檸檬酸緩衝液	葡萄糖→果糖	39.8
葡萄糖異構酶	pH=4.8	葡萄糖→果糖	5

	磷酸鈉緩衝液		
葡萄糖異構酶	pH=7.5 磷酸鈉緩衝液	葡萄糖→果糖	69.5



5.2.4 利用物理吸附法固定酵素做反應

5.2.4.1 利用固定在載體的纖維素水解酶做纖維素寡聚物到葡萄糖的反應

我們利用固定在含有氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子上的纖維素水解酶做催化劑(物理吸附)，來做纖維素寡聚物水解成葡萄糖的反應，測試其反應性及回收性。結果如圖 5.7 所示，取 0.015 克的纖維素寡聚物做反應物，可以看到第一次反應後，葡萄糖的產率約 80%(藍色)，跟之前的實驗結果差不多，雖然比使用自由的纖維素水解酶做催化劑的葡萄糖產率還要低一點，不過仍然是不錯的產率。接下來回收固體催化劑繼續做相同的實驗，可以看到回收固體催化劑至第八次時，葡萄糖產率幾乎都是維持在 74% 以上，代表活性可以保持；另外用 UV 測得每一次反應後材料上面的酵素量，如圖 5.7 紅色部分所示，纖維素水解酶雖然有脫落，可是卻沒有掉很多，第十二次的酵素量大概為第一次的 80%，可是葡萄糖產率卻掉下來很多，可以推知酵素沒有掉下來可是卻慢慢失去活性。一般而言，用物理吸附法固定酵素之後，酵素很容易脫附，進而使產物產率隨著每一次回收的次數而下降，通常都是要利用很複雜的膠聯法或是和酵素形成化學鍵結才可以使酵素固定的很好，達到回收率十次以上。本實驗讓人值得注意的是，我們的固體催化劑只用物理吸附就可以固定纖維素水解酶非常好，回收率可以達八次左右。

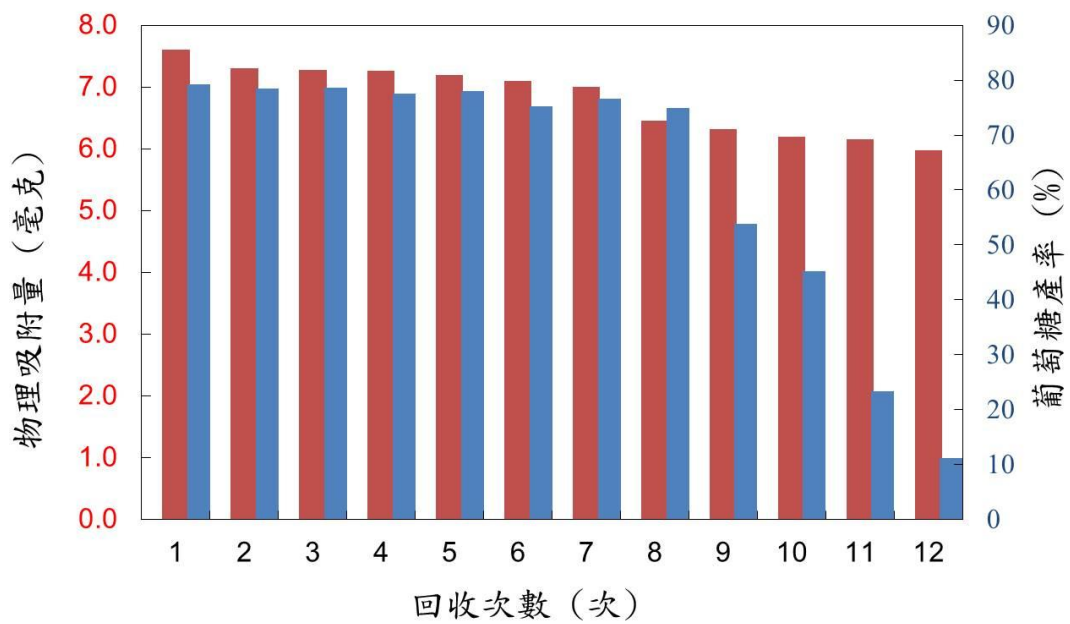


圖 5.7 利用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的纖維素水解酶(物理吸附)做反應的穩定性以及回收性實驗

5.2.4.2 利用固定在載體的酵素做葡萄糖到果糖的反應

利用固定在含有氧化鐵中孔洞氧化矽奈米粒子上的葡萄糖異構酶(物理吸附)做反應的催化劑，取葡萄糖做反應物轉化成果糖的實驗。實驗結果如圖 5.8 所示，在最佳化的條件反應完第一次後，果糖產率約為 50%，表示固定在基材上的葡萄糖異構酶可能有部分失去活性(使用自由的葡萄糖異構酶果糖產量最高為 69%)，不過還是有維持大部分的活性。回收固體催化劑後繼續下反應，可以發現一樣可以回收到第八次，果糖產率一樣大概都維持 50% 上下，代表活性可以維持；另外用 UV 測得每一次反應後材料上面的酵素量，如圖 5.8 紅色部分所示，葡萄糖異構酶雖然有脫落，可是卻沒有掉很多，第十二次的酵素量大概為第一次的 80%，可是果糖產率卻掉下來很多，可以推知酵素沒有掉下來可是卻慢慢失去活性。我們一樣只用物理吸附就可以讓葡萄糖異構酶固定的不錯，這也代表我們的基材非常適合用來固定酵素。

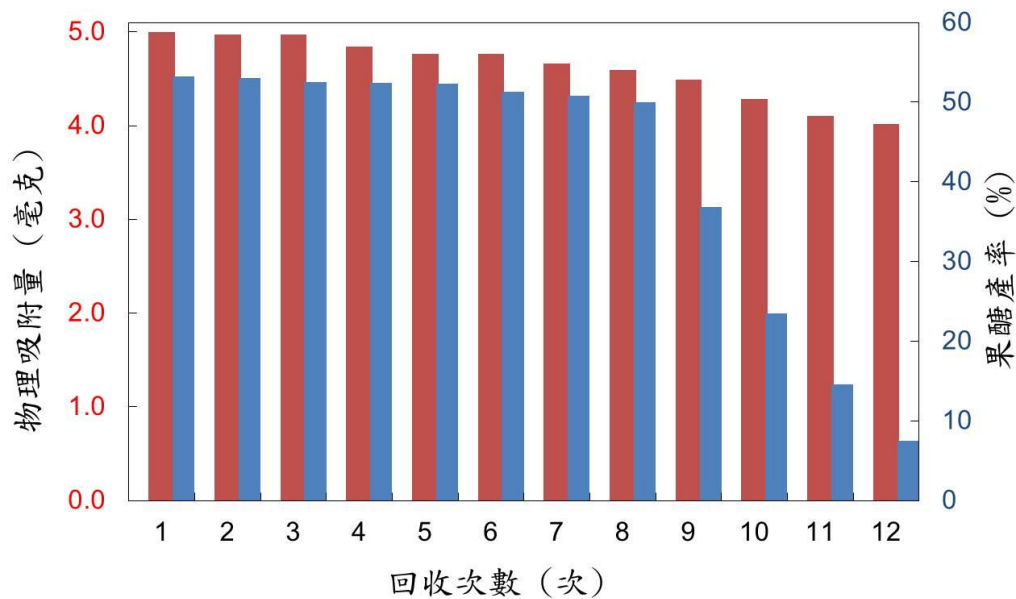
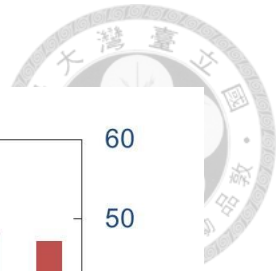


圖 5.8 利用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的葡萄糖異構酶(物理吸附)做反應的穩定性以及回收性實驗

5.2.5 利用化學鍵結法固定酵素後做反應

我們一樣取含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子當作基材，作為纖維素水解酶以及葡萄糖異構酶的載體，並利用基材表面上的官能基和酵素做化學鍵結來固定酵素。結果如圖 5.9 所示，藍色的部分固定纖維素水解酶做纖維素寡聚物水解成葡萄糖的實驗，我們可以看到回收至第十次，葡萄糖產率都維持在 71% 以上，到了第十一次後葡萄糖產率急速下降；另一方面紅色的部分是固定葡萄糖異構酶做葡萄糖異構化成果糖的實驗，一樣可以從圖得知道第十次以前，果糖的產率依舊維持在 45% 以上，到了第十次後急遽下降，產物產率急遽下降的原因是因為酵素反應太久之後漸漸失去活性的緣故。我們可以從物理吸附和化學鍵結這兩個固定方法得知，就我們的基材來說，雖然物理吸附感覺不牢固(比其化學鍵結)，不過因為做化學鍵結法時需要加入一些催化劑，或者是因為在材料表面修飾官能基時加入很多不同的化學藥品沒有清洗乾淨，會使酵素失去活性，所以回收次數才會跟使用物理吸附法的催化劑差不多。物理吸附法比化學鍵結法簡單許多，而且

又可以達到跟化學鍵結法差不多的回收次數，因此之後的實驗我會選擇使用物理吸附法固定酵素的催化劑。

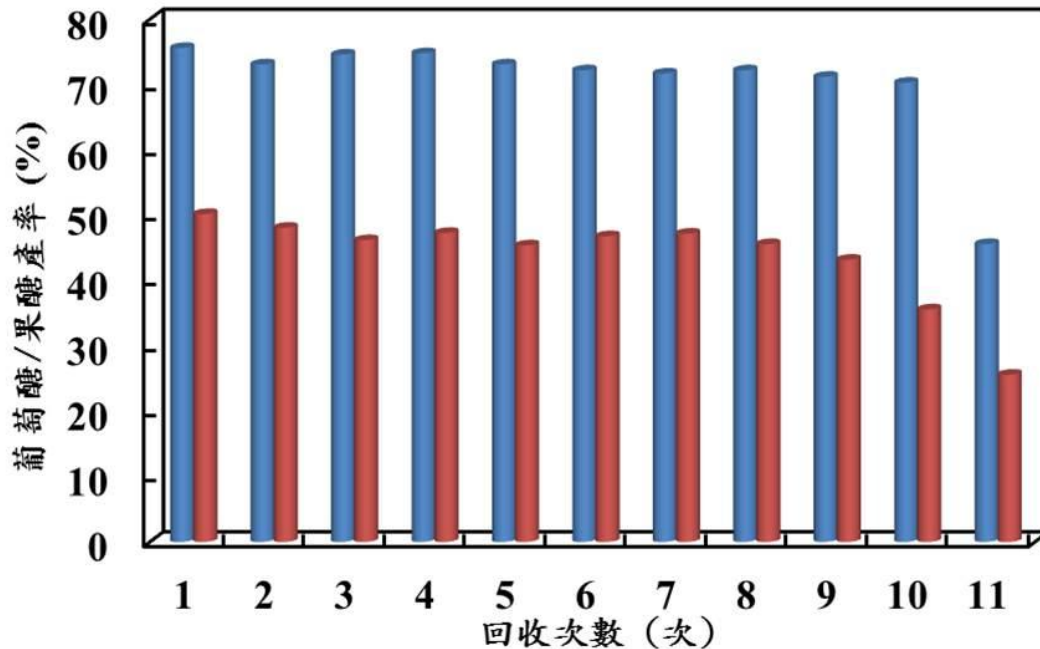


圖 5.9 用固定在含有氧化鐵中孔徑氧化矽奈米粒子的酵素(化學鍵結)做反應的穩定性以及回收性實驗(藍色部分為纖維素水解酶，紅色部分為葡萄糖異構酶)

5.2.6 纖維素寡聚物轉化成果糖的兩步驟反應

取纖維素寡聚物，利用固定在含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子的纖維素水解酶，在最佳反應條件反應後，利用磁鐵分離催化劑和澄清液，接下來收集澄清液後調整 pH 值到 7.5 之後，放入固定在含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子的葡萄糖異構酶做反應，一樣在最佳化的條件反應後分離催化劑及澄清液後，澄清液利用高性能液相層析儀做產物分析。結果如圖 5.10 所示，首先先看到紅色部分，我們可以看到由纖維素寡聚物轉化成果糖，果糖產率約在 45% 上下，接著回收催化劑再重新下反應，也可以得到差不多的產率，直到回收第七次。到第七次之後，果糖產率下降到 25% 左右，顯示酵素到第八次反應時已經慢慢的失去活

性了。接著我們取含有氧化鐵的無孔洞氧化矽奈米粒子做基材，一樣固定兩種酵素做相同的實驗，結果如圖 5.10 的藍色部分所示，發現第一次下反應果糖產率是有維持在 45%，接下來經由回收次數的增多時，每增加回收數一次果糖產率就下降，到了第五次時果糖產率變得不到 10%。所以我們由此兩個實驗可以得知，材料上有沒有孔洞對固定酵素來說是非常重要的，孔洞可以增加比表面積所以可以讓酵素的吸附量變大，同時也可以提供酵素一個空間可以穩定，如果沒有孔洞的話會使酵素容易脫附而讓反應性越來越差。

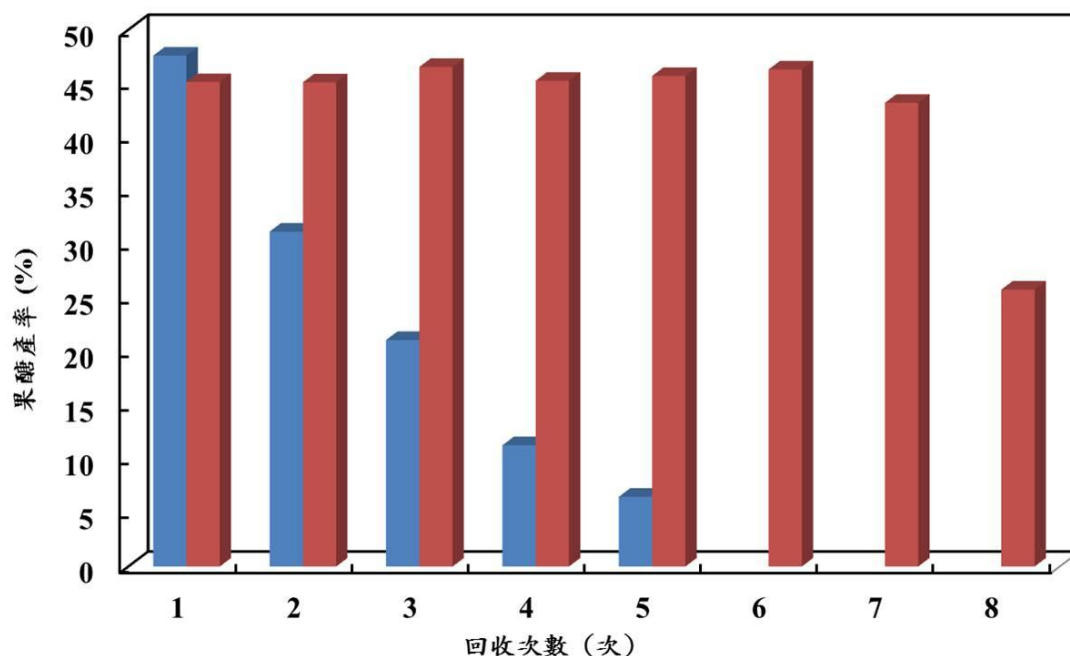


圖 5.10 纖維素轉化製果糖的兩步驟反應(a)藍色部分-使用含有氧化鐵的無孔洞氧化矽奈米粒子做基材(b) 紅色部分-使用含有氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子做基材

5.2.7 果糖至 5-羥甲基糠醛之轉換

為了使纖維素轉換至 5-羥甲基糠醛的步驟順利進行，先研究了果糖到 5-羥甲基糠醛的轉換之反應條件及結果。首先從文獻得知，此轉換機制有兩個很重要

的關鍵-溫度及反應溶劑；溫度越高可以使果糖更容易脫水成 5-羥甲基糠醛；另外由於脫水反應，如果在水相反應必定困難，所以一定要有有機相溶劑的存在。

本研究先對溶劑做挑選，由文獻可得知，最常用在轉換至 5-羥甲基糠醛反應的溶劑為四氫呋喃(tetrahydrofuran, THF)或二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)，所以我們就利用這兩種溶劑來做研究。結果如圖 5.11 所示，首先為空白實驗，取 0.1 克的果糖在 5 毫升的 THF 溶劑下做反應(反應時間為 15 小時,反應溫度為 75 度)，結果 5-羥甲基糠醛的產率為 0.5%；另外也是取 0.1 克的果糖在 5 毫升的 DMSO 溶劑下做反應(反應時間為 5 小時,反應溫度為 90 度)，可以得到 55% 的 5-羥甲基糠醛的產率，此結果說明了 DMSO 溶劑也有催化果糖轉 5-羥甲基糠醛的能力；另外加入修飾磺酸官能基的中孔洞氧化矽奈米粒子 0.1 克為催化劑，在 THF 以及 DMSO 兩種溶劑下反應，5-羥甲基糠醛的產率分別為 60.7% 和 77.3%，這個實驗和空白實驗比較，可以確定催化劑可以有效地催化此反應；另外如果是葡萄糖或是纖維素寡聚物作為起始物的話，會先用酵素處理過才做此反應，反應的條件都是在緩衝液(水相)中，所以在此先做一個模擬實驗，也就是加入 0.5 毫升的緩衝液(水相:有機相體積=1:10)，結果發現 5-羥甲基糠醛的產率在 THF 溶劑下反應為 0% 而在 DMSO 下也降至 10.3%，由於果糖轉換成 5-羥甲基糠醛的反應為脫水反應，如果有水存在的話確實會使轉換效率下降許多；最後在 THF 以及 DMSO 系統下加入緩衝液(水相)之後再加入修飾磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子為催化劑，在各自的反應條件下，分別可以得到 5-羥甲基糠醛的產率為 0% 及 76.2%，這個實驗說明了兩件事，其中之一為比起 THF，DMSO 更適合作為果糖轉換至 5-羥甲基糠醛的反應，另外，使用含有磺酸官能基的中孔洞氧化矽奈米粒子當催化劑並在 DMSO 的溶劑下，就算有少量水相的液體存在，此催化劑也可以有效地催化果糖轉換至 5-羥甲基糠醛的反應。

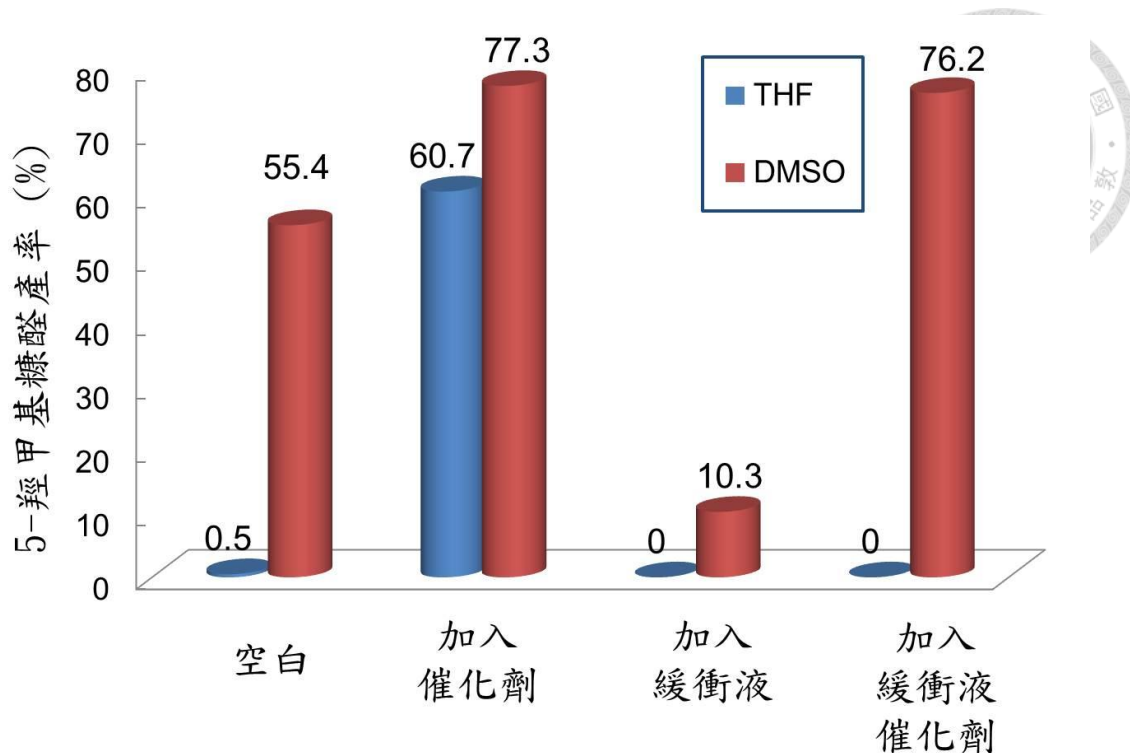


圖 5.11 在不同條件以及不同溶劑下做果糖至 5-羥甲基糠醛之轉換

由上述的實驗可以知道，果糖轉換至 5-羥甲基糠醛的反應在 DMSO 為溶劑、且利用修飾磺酸官能基的中孔洞氧化矽奈米粒子為催化劑就算系統中有水相，也就是系統是雙相系統(同時存在水相和有機相)也可以有效率地產生 5-羥甲基糠醛，接著利用這些已知條件來使此反應達到轉換率最佳化。

首先，我們固定已知條件，也就是 0.1 克的果糖為起始物、5 毫升的 DMSO 為溶劑並沒有加入水相，討論溫度對此反應的影響，根據經驗，要到 5-羥甲基糠醛的產率很高時，溶液顏色會變很深的棕色，我們選擇的四個溫度為 120 度、90 度、60 度及 27 度(室溫)，根據實驗觀察，120 度反應時間為兩小時、90 度反應時間為 5 小時、60 度為 15 小時而 27 度延長至 24 小時。結果如圖 5.12 所示，溫度在 120 度的時候，有加催化劑和沒加催化劑 5-羥甲基糠醛的產率是差不多的，這表示溫度高的時候是溫度主導此轉換反應，有無催化劑並無直接關係；為了凸顯催化劑的效果，漸漸將溫度降低，降到 90 度時，沒有加入催化劑的產率降為

55.4%而加入催化劑的卻上升至 77.3%，由此兩個反應可以看出一些小結論，其中可以看出溫度降低，催化劑的效果也就凸顯出來，而且催化劑會更準確地把果糖轉換至 5-羥甲基糠醛；另外如果溫度太高的話很容易過反應，也就是 5-羥甲基糠醛再進一步轉換成別的副產物，這就是為什麼降低溫度加催化劑可以讓產率變高的原因。一般轉換至 5-羥甲基糠醛都需要很高的溫度(90 度以上)，為了要強調我們催化劑的優點，我們再把溫度往下調降至 60 度，沒有放催化劑和有放催化劑的差別漸漸出來，有放催化劑的還是維持一樣的產率沒放催化劑的卻掉了下來；最後調降至 27 度，沒有放催化劑的試驗沒有產率有放催化劑的試驗卻有產率將近 40%，由此多組實驗可以得知修飾磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子在果糖轉換至 5-羥甲基糠醛的試驗中是一個很好的催化劑。我選擇 60 度為最佳反應溫度，除了 60 度比一般文獻的反應低之外，5-羥甲基糠醛也維持在不錯的產率。

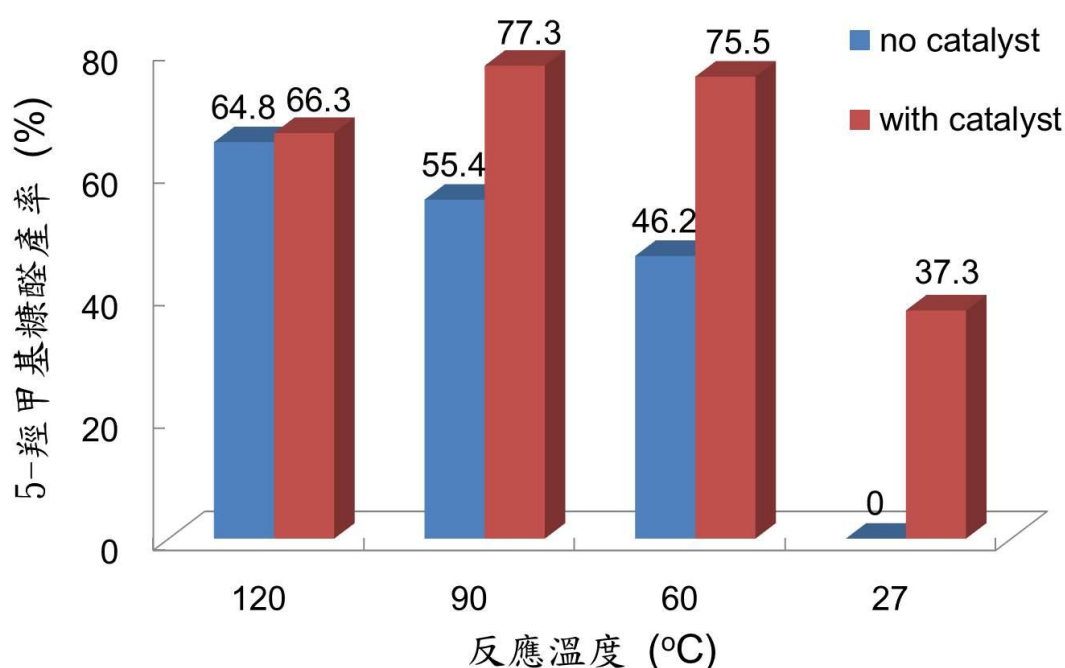


圖 5.12 溫度對於果糖轉至 5-羥甲基糠醛試驗之影響

最後決定水相和有機相的體積比，可以知道的是，如果水相越多，則反應越難進行(因為是脫水反應)，如果有機相過多，則會浪費溶劑(DMSO 比起水相還要貴)，所以我們必須最佳化水相和有機相的體積比。0.1 克果糖和 0.1 克催化劑在不同比例的溶劑下進行反應，溫度為 60 度及反應時間為 15 小時，結果如表九所示，分別做了五組實驗，當水相和有機相的體積比為 1:1 的時候，果糖的轉化率只有 42% 而 5-羥甲基糠醛的產率 16.2%，表示水相過多此反應很難進行；接著漸漸提高有機相比例，也就是水相和有機相體積比為 1:3、1:5 及 1:10 的時候，5-羥甲基糠醛的產率也漸漸上升，最後體積比上升到 1:20 的試驗產率也差不多，所有由此五組試驗可以得知最佳水相和有機相的體積比為 1:10。

表九、不同水相有機相體積比對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應之影響

水相:有機相體積比 (緩衝液:DMSO)	果糖轉化率 (%)	5-羥甲基糠醛產率 (%)
1:1	41.7	16.2
1:3	88.9	58.9
1:5	98.2	68.4
1:10	98.7	74.5
1:20	98.5	72.4

0.1 克的果糖在水相及有機相體積比為 1:10 的溶劑下，反應溫度為 60 度及反應時間為 15 小時，測試有無催化劑存在對於果糖轉換至 5-羥甲基糠醛之轉換影響。結果如表十所示，沒有催化劑存在的話，由於溫度低又有水相存在，所以果糖轉化率和 5-羥甲基糠醛的產率都很低，分別為 4.1% 和 1.3%；如果加入催化劑，則果糖轉化率和 5-羥甲基糠醛的產率驟升為 89.1% 和 74.4%，又再次證明了修飾磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子為非常好的催化劑。

表十、有無催化劑對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應之影響

	果糖轉化率 (%)	5-羥甲基糠醛產率 (%)
無催化劑	4.1	1.3
有催化劑	89.1	74.4

最後最佳化催化劑的量，從 0.002 克依序取了六種不同量的催化劑，在最佳化的條件之下(反應時間:15 小時、反應溫度:60 度、水相和有機相體積比為 1:10)做果糖轉成 5-羥甲基糠醛的反應，結果如表十一所示，由於裡面有水相存在的關係，催化劑太少的話很難進行脫水反應，所以加入了 0.002 克的催化劑只有 5.6% 的 5-羥甲基糠醛的產率；隨著加入的催化劑越多，5-羥甲基糠醛的產率也越來越高；催化劑加入到 0.15 克時 5-羥甲基糠醛的產率達到最高，為 81.3%，再加更多催化劑進去產率維持差不多，代表已經呈現飽和狀態，所以最佳化加入催化劑的量為 0.15 克。

表十一、催化劑投入量對果糖轉換至 5-羥甲基糠醛反應的影響

催化劑投入量	果糖轉化率 (%)	5-羥甲基糠醛產率 (%)
0.002	31.8	5.6
0.01	79.9	46.5
0.05	87.2	53
0.1	97.5	75.6
0.15	98.5	81.3
0.2	98.7	80.5

5.2.8 葡萄糖至 5-羥甲基糠醛的序列式反應

把序列式反應往前推一個步驟，也就是利用鑲嵌氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子做物理吸附固定化葡萄糖異構酶，在最佳的條件下(溫度:70 度，反應時間:24 小時)使葡萄糖異構化成果糖，接著利用磁鐵分離催化劑和溶液，固體催化劑可以接著加入葡萄糖和磷酸緩衝液做下一輪的反應，分離出的溶液則加入 DMSO(水相:有機相=1:10)，放入 0.15 克的修飾磺酸根的中孔洞氧化矽奈米粒子作為催化劑，在適當的條件下(溫度:60 度，反應時間:15 小時)把果糖轉化成 5-羥甲基糠醛。

結果如表十二所示，放入 0.1 克的葡萄糖為起始物，經由兩步驟的序列式反應後轉化成 5-羥甲基糠醛，經由計算可以知道葡萄糖的轉化率為 63.8%，由於是經由葡萄糖異構酶的作用，所以轉化率大概就是 55~60%，會高於 60% 的原因是因為葡萄糖在 DMSO 中也會轉化成別的副產物；果糖也還有殘留，並沒有全部轉化成 5-羥甲基糠醛，最後 5-羥甲基糠醛的產率為 46.1%。經由此實驗，可以知道序列式反應是有作用的，可以順利的葡萄糖轉化至 5-羥甲基糠醛，而且本研究在溫和的條件下並使用酵素和含有磺酸根官能基的催化劑，是非常環保的，並不會像文獻中指出的需要用高溫(120 度以上)以及重金屬(含有鉻)才能使葡萄糖轉成 5-羥甲基糠醛，而且酵素可以回收再利用(可達九次)。

由於最後反應完溶液中還有未反應的果糖，所以本研究試著提高溫度讓果糖完全反應成 5-羥甲基糠醛。結果如表十一所示，在果糖轉換至 5-羥甲基糠醛的試驗中把溫度調升至 90 度，反應時間維持 15 小時，可以看到葡萄糖轉化率又變高至 70.8%，表示溫度提高會讓葡萄糖更多轉變成副產物；另外溶液沒有偵測到果糖，而 5-羥甲基糠醛的產率也提升至 49.7%，表示果糖已經完全轉換成 5-羥甲基糠醛。

表十二、葡萄糖轉換至 5-羥甲基糠醛之序列式反應

	葡萄糖轉化率 (%)	果糖殘餘量 (克)	5-羥甲基糠醛產率 (%)
60 (度) 15 (小時)	63.8	0.009	46.1
90 (度) 15 (小時)	70.5	0	49.7

5.2.9 纖維素寡聚物轉化至 5-羥甲基糠醛之序列式反應

把反應物在往前推進，也就是利用纖維素寡聚物作為起始物(0.05 克)，利用鑲嵌氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子物理吸附纖維素水解酶，並在適當的反應條件下(反應溫度:50 度，反應時間:24 小時)把纖維素寡聚物水解成葡萄糖，利用磁鐵分離催化劑和溶液，催化劑可以做下一次反應而溶液(含有纖維素寡聚物和葡萄糖)加入鑲嵌氧化鐵的中孔洞氧化矽奈米粒子物理吸附葡萄糖異構酶當作催化劑，並在適當的反應條件下(反應溫度:70 度，反應時間:24 小時)把葡萄糖異構化成果糖，一樣可以利用磁鐵分離催化劑和溶液，催化劑可用來做下次反應而溶液(含纖維素寡聚物、葡萄糖、果糖)加入修飾磺酸官能基的中孔洞氧化矽奈米粒子當做催化劑，在適當的條件下(反應溫度:60 度，、反應時間:15 小時、水相和有機相體積比為 1:10)做果糖至 5-羥甲基糠醛的實驗，經過這個三步驟的序列式反應，目的是為了讓 5-羥甲基糠醛的產率達到最高。結果如表十三，最後一步驟轉換至 5-羥甲基糠醛的反應未完全；另外 5-羥甲基糠醛的產率有 45.6%，並沒有因為往前推一個反應物產率就下降許多，代表序列式反應和所使用的催化劑是可以有效率地把纖維素寡聚物轉換至 5-羥甲基糠醛。

表十三、纖維素寡聚物轉化至 5-羥甲基糠醛的序列式反應

	葡萄糖殘留量 (克)	果糖殘留量 (克)	5-羥甲基糠醛產率 (%)
60 (度) 15 (小時)	0.012	0.01	45.6

第六章、結論

本研究成功合成了有磁性的中孔洞氧化矽奈米粒子，並用來固定化酵素(纖維素水解酶、葡萄糖異構酶)做生質轉換；且因氧化鐵的加入會使孔洞阻塞或是表面的羥基會被覆蓋，並合成出高比面積的中孔洞氧化矽奈米粒子並在其表面利用架接法接上磺酸官能基。利用掃描式電子顯微鏡可以看出來材料形貌為類圓形且因磁性而聚集在一起；利用氮氣吸脫附可以得知皆為中孔洞材料；利用固態核磁共振儀可以定性且定量的知道中孔洞氧化矽奈米粒子上架接多少的磺酸根(1.06 mmol/g Fe₃O₄@MSN)，由實驗數據可以知道架接法比起共沉澱法使官能基更加牢固。

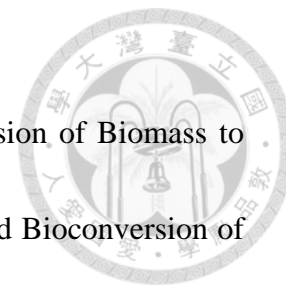
在纖維素寡聚物降解成葡萄糖的反應中，反應溫度為 50 度、反應時間為 24 小時且環境 pH 值為 4.8 為最好，葡萄糖產率可以達到 80%；在葡萄糖異構化成果糖的反應中，反應溫度為 70 度、反應時間為 24 小時且環境 pH 值為 7.5 為最好，果糖產率可以達到 65%；接著解決了如何從纖維素寡聚物經由兩步驟轉換成果糖的問題，可以回收酵素在調整環境 pH 值，最後再加入另一酵素，這樣兩種酵素都可以在各自的最佳環境下反應，果糖產率可以達到約 50%；在果糖脫水轉化成 5-羥甲基糠醛的實驗中，反應溫度為 60 度，水相和有機相體積比為 1:10，含有磺酸根的催化劑投入量為 0.15 克時可以得到最佳產率為 81.3%；往上一個反應物，也就是利用葡萄糖經由兩步驟轉換成 5-羥甲基糠醛，在各個反應為最佳化條件下，可以得到 5-羥甲基糠醛的產率為 46%；最後用纖維素寡聚物為起始物經過三步驟的反應，並在各自的最佳化條件下反應可以得到 5-羥甲基糠醛的產率為 45%。我們利用序列式反應，讓每個小步驟的產物產率達到最大，而使最後產物(5-羥甲基糠醛)的產率達到最大，而且每個步驟中的催化劑都可以回收之後再利用到下一個反應(回收再利用可以達到 8 次以上)，每個反應的條件也都是在溫和的環境下且並沒有使用強酸鹼和金屬離子，對環境是非常友善的；本研究完成了有效率地把纖維素經過序列式反應轉換成 5-羥甲基糠醛。

第七章、未來展望

材料部分由前面文章知道由於 MSN 比起有磁性 MSN 的羥基還要多，所以我們利用 MSN 當作基材來修飾磺酸做為酸性催化劑，雖然它是固體材料可以回收，不過無法達到完全回收；可以試著把氧化鐵的粒徑變小，使他可以包覆在 MSN 裡面而不是分布在表面或是裡面，這樣的話可以讓被覆蓋住的羥基顯露出來，使更多的磺酸根可以接上去，所有的催化劑都可以利用磁力回收。

纖維素轉換的部分，可以使 HMF 繼續轉換成 DMF，DMF 就是真正的生質燃油可以直接和汽油混合使用，要先找出此步驟所需要的催化劑以及所適合的反應系統，根據初步的實驗我們得知轉化 HMF 至 DMF 的催化劑需要羧酸根來催化，所以可以找一個有羧酸根的矽烷類並用架接法接上磁性的 MSN；另外根據文獻記載此反應所用的溶劑為 THF(tetrahydrofuran)並不是 DMSO，所以必須要克服不同溶劑的問題，關於此問題的初步解決方法有數種，其一就是嘗試在 DMSO 下可否利用催化劑使 HMF 轉化成 DMF，另外則是嘗試在 THF 為溶劑下可否在水的存在下使果糖轉換成 HMF，則 HMF 轉換成 DMF 就可以直接加入催化劑做轉換；最後則可以利用萃取的方法將 HMF 從 DMSO 萃取至 THF，再加入有羧酸根磁性 MSN 做催化劑轉換成 DMF；如此就可以使序列式反應達到最終目標，也就是纖維素經過四步驟的序列反應轉換成 DMF，並且四種催化劑都可以很簡易的利用磁力進行回收並做回收次數的測試。

參考文獻



1. Alonso, D. M.; Bond, J. Q.; Dumesic, J. A.: Catalytic Conversion of Biomass to Biofuels. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1493-1513.
2. Peng, F.; Peng, P.; Xu, F.; Sun, R. C.: Fractional Purification and Bioconversion of Hemicelluloses. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 879-903.
3. Riansa-ngawong, W.; Prasertsan, P.: Optimization of Furfural Production from Hemicellulose Extracted from Delignified Palm Pressed Fiber Using A Two-Stage Process. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 103-110.
4. Kosa, M.; Ragauskas, A. J.: Bioconversion of Lignin Model Compounds with Oleaginous Rhodococci. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 891-900.
5. Dutta, S.; De, S.; Saha, B.: A Brief Summary of the Synthesis of Polyester Building-Block Chemicals and Biofuels from 5-Hydroxymethylfurfural. *ChemPlusChem* **2012**, *77*, 259-272.
6. Chidambaram, M.; Bell, A. T.: A Two-Step Approach for the Catalytic Conversion of Glucose to 2,5-Dimethylfuran In Ionic Liquids. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1253-1262.
7. Murphy, M.: Early Success in HMF to Cellulose Process. *Chem. Ind.* **2007**, 10-10.
8. Yu, S.; Brown, H. M.; Huang, X. W.; Zhou, X. D.; Amonette, J. E.; Zhang, Z. C.: Single-Step Conversion of Cellulose to 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), A Versatile Platform Chemical. *Appl. Catal. A-Gen.* **2009**, *361*, 117-122.
9. Centi, G.; Perathoner, S.; Lanzafame, P.; Temi, M.; Macario, A.; Giordano, G.: Second Generation Biodiesel: from Cellulose to 5-HMF Derivates. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2010**, 240.
10. Peng, W. H.; Lee, Y. Y.; Wu, C. N.; Wu, K. C. W.: Acid-base Bi-functionalized, Large-pored Mesoporous Silica Nanoparticles for Cooperative Catalysis of One-pot Cellulose-to-HMF Conversion. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 23181-23185.
11. Liu, L. Y.; Chen, H. Z.: Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Materials Treated with Ionic Liquid BMIM Cl. *Chin. Sci. Bull.* **2006**, *51*, 2432-2436.
12. Chang, R. H. Y.; Jang, J.; Wu, K. C. W.: Cellulase Immobilized Mesoporous Silica Nanocatalysts for Efficient Cellulose-to-glucose Conversion. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2844-2850.
13. Zhang, B.; Wang, L. J.; Shahbazi, A.; Diallo, O.; Whitmore, A.: Dilute-Sulfuric Acid Pretreatment of Cattails for Cellulose Conversion. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 9308-9312.
14. Yu, H. T.; Guo, Y. L.; Wu, D. L.; Zhan, W. C.; Lu, G. Z.: Immobilization of Glucose Isomerase onto GAMM Support for Isomerization of Glucose to Fructose. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2011**, *72*, 73-76.
15. Lima, S.; Dias, A. S.; Lin, Z.; Brandao, P.; Ferreira, P.; Pillinger, M.; Rocha, J.;

- Calvino-Casilda, V.; Valente, A. A.: Isomerization of D-Glucose to D-Fructose over Metallosilicate Solid Bases. *Appl. Catal. A-Gen.* **2008**, *339*, 21-27.
16. Carniti, P.; Gervasini, A.; Marzo, M.: Absence of Expected Side-Reactions in the Dehydration Reaction of Fructose to HMF in Water over Niobic Acid Catalyst. *Catal. Commun.* **2011**, *12*, 1122-1126.
17. Tsuneo Yanagisawa, T. S., Kazuyuki Kuroda, Chuzo Kato: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1990**, 988-992.
18. Trewyn, B. G. S., I. I.; Giri, S.; Chen, H.-T.; Lin, V. S. Y.: *Acc. Chem. Res.* **2007**, 846-853.
19. Boote, B. S., H.; Ranjit, K. T.: *chem. Comm.* **2007**, 4543-4545.
20. Kim, S. J.; Dwiatmoko, A. A.; Choi, J. W.; Suh, Y. W.; Suh, D. J.; Oh, M.: Cellulose Pretreatment with 1-n-butyl-3-methylimidazolium Chloride for solid Acid-catalyzed hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8273-8279.
21. Dadi, A. P.; Varanasi, S.; Schall, C. A.: Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using An Ionic Liquid Pretreatment Step. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 904-910.
22. Sathitsuksanoh, N.; George, A.; Zhang, Y. H. P.: New Lignocellulose Pretreatments Using Cellulose Solvents: A Review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88*, 169-180.
23. Himmler, S.; Konig, A.; Wasserscheid, P.: Synthesis of EMIM OH via Bipolar Membrane Electrodialysis - Precursor Production for the Combinatorial Synthesis of EMIM -Based Ionic Liquids. *Green Chem.* **2007**, *9*, 935-942.
24. Akerstedt, J.; Gorlov, M.; Kloo, L.: Room-Temperature Synthesis of the Bi-5 GaCl₄ (3) Salt from Three Different Classes of Ionic Liquids. *J. Clust. Sci.* **2013**, *24*, 157-164.
25. Alfani, F.; Gallifuoco, A.; Saporosi, A.; Spera, A.; Cantarella, M.: Comparison of SHF and SSF Processes for the Bioconversion of Steam-exploded Wheat Straw. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *25*, 184-192.
26. Beguin, P.; Gilkes, N. R.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C.; Oneill, G. P.; Warren, R. A. J.: Cloning of Cellulase Genes. *Crc Critical Reviews in Biotechnology* **1987**, *6*, 129-162.
27. Ghose, T. K.: Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosic Substances. *Advances in biochemical engineering* **1976**, *6*, 39-74.
28. Bisaria, V. S.; Mishra, S.: Regulatory Aspects of Cellulase Biosynthesis and Secretion. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1989**, *9*, 61-103.
29. Bhat, M. K.; Bhat, S.: Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications. *Biotechnol. Adv.* **1997**, *15*, 583-620.
30. Bisaria, V. S.; Ghose, T. K.: Biodegradation of Cellulosic Materials - Substrates,

- Microorganisms, Enzymes And Products. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, 3, 90-104.
31. Maurer, S. A.; Brady, N. W.; Fajardo, N. P.; Radke, C. J.: Surface Kinetics for Cooperative Fungal Cellulase Digestion of Cellulose from Quartz Crystal Microgravimetry. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 394, 498-508.
32. Matano, Y.; Hasunuma, T.; Kondo, A.: Simultaneous Improvement of Saccharification and Ethanol Production from Crystalline Cellulose by Alleviation of Irreversible Adsorption of Cellulase with A Cell Surface-Engineered Yeast Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 2231-2237.
33. Jagtar, S.: Production Of Carboxymethyl Cellulase by Bacillus Sphaericus JS1 Strain in Low Cost Agriculture Waste Medium. *Res. J. Biotechnol.* **2013**, 8, 11-20.
34. Maeda, R. N.; Barcelos, C. A.; Anna, L.; Pereira, N.: Cellulase Production by Penicillium Funiculosum and Its Application in the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse for Second Generation Ethanol Production by Fed Batch Operation. *J. Biotechnol.* **2013**, 163, 38-44.
35. Ding, Z. Y.; Cao, X. J.: Affinity Precipitation of Cellulase Using Ph-Response Polymer with Cibacron Blue F3GA. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, 102, 136-141.
36. Gaikwad, S. M.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V.: D-glucose Xylose Isomerase from Streptomyces - Differential Roles of Magnesium and Cobalt Ions. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 317-320.
37. Tashpulatova, B. A.; Davranov, K. A.: Effect of Metal Ions on the Activity and Stability of Glucose Isomerase from Streptomyces Atratus. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **1991**, 838-842.
38. Bhosale, S. H.; Rao, M. B.; Deshpande, V. V.: Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 280.
39. Smith, C. A.; Rangarajan, M.; Hartley, B. S.: D-xylose (D-glucose) Isomerase from Arthrobacter Strain NRRL B3728 - Purification and Properties. *Biochem. J.* **1991**, 277, 255-261.
40. Whitlow, M.; Howard, A. J.; Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Winborne, E.; Gilliland, G. L.: A Metal-mediated Hydride Shift Mechanism for Xylose Isoemrase Based on the 1.6 A Streptomyces-rubiginosus Structures with Xylitol and D-Xylose. *Proteins* **1991**, 9, 153-173.
41. Zittan, L.; Poulsen, P. B.; Hemmingsen, S. H.: Sweetzyme-new Immobilized Glucose Isomerase. *Starke* **1975**, 27, 236-241.
42. Pastinen, O.; Visuri, K.; Schoemaker, H. E.; Leisola, M.: Novel Reactions of Xylose Isomerase from Streptomyces Rubiginosus. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, 25, 695-700.
43. Caratzoulas, S.; Vlachos, D. G.: Converting Fructose to 5-Hydroxymethylfurfural: A Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Study of the Mechanism and Energetics.

Carbohydr. Res. **2011**, *346*, 664-672.

44. Amarasekara, A. S.; Williams, L. D.; Ebede, C. C.: Mechanism of the Dehydration of D-fructose to 5-Hydroxymethylfurfural in Dimethyl Sulfoxide at 150 Degrees : An NMR Study. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 3021-3024.

45. Clark, J. H.; Macquarrie, D. J.; Tavener, S. J.: The Application of Modified Mesoporous Silicas in Liquid Phase Catalysis. *Dalton Trans.* **2006**, 4297-4309.

46. Zhai, S.; Wei, L.; Yang, D.; Wu, D.; Sun, Y.: Preparation and Applications of Silica/Aluminum-Based Micro/Mesoporous Composite Molecular Sieves. *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 1330-1337.

47. Trewyn, B. G.; Slowing, II; Giri, S.; Chen, H. T.; Lin, V. S. Y.: Synthesis and Functionalization of A Mesoporous Silica Nanoparticle Based on the Sol-gel Process and Applications in Controlled Release. *Accounts Chem. Res.* **2007**, *40*, 846-853.

48. Pang, J.; Luan, Y.; Yang, X.; Jiang, Y.; Zhao, L.; Zong, Y.; Li, Z.: Functionalized Mesoporous Silica Particles for Application in Drug Delivery System. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 775-788.

49. Li, Z. X.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.: Mesoporous Silica Nanoparticles in Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2590-2605.

50. Li, H.; Zhang, Q. Y.; Liu, X. F.; Chang, F.; Hu, D. Y.; Zhang, Y. P.; Xue, W.; Yang, S.: InCl₃-ionic Liquid Catalytic System for Efficient and Selective Conversion of Cellulose into 5-Hydroxymethylfurfural. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 3648-3654.

51. Zukal, A.; Pastva, J.; Cejka, J.: MgO-modified Mesoporous Silicas Impregnated by Potassium Carbonate for Carbon Dioxide Adsorption. *Microporous Mesoporous Mat.* **2013**, *167*, 44-50.

52. Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S.: Enzyme-functionalized Mesoporous Silica for Bioanalytical Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 543-554.

53. Popat, A.; Hartono, S. B.; Stahr, F.; Liu, J.; Qiao, S. Z.; Lu, G. Q.: Mesoporous Silica Nanoparticles for Bioadsorption, Enzyme Immobilisation, and Delivery Carriers. *Nanoscale* **2011**, *3*, 2801-2818.

54. Takahashi, H.; Li, B.; Sasaki, T.; Miyazaki, C.; Kajino, T.; Inagaki, S.: Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica. *Chem. Mat.* **2000**, *12*, 3301-3305.

55. Takahashi, H.; Li, B.; Sasaki, T.; Miyazaki, C.; Kajino, T.; Inagaki, S.: Immobilized Enzymes in Ordered Mesoporous Silica Materials and Improvement of Their Stability and Catalytic Activity in An Organic Solvent. *Microporous Mesoporous Mat.* **2001**, *44*, 755-762.

56. Wang, Y. J.; Caruso, F.: Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation. *Chem. Mat.* **2005**, *17*, 953-961.

57. Chen, Y. P.; Chen, C. T.; Hung, Y.; Chou, C. M.; Liu, T. P.; Liang, M. R.; Chen, C. T.; Mou, C. Y.: A New Strategy for Intracellular Delivery of Enzyme Using Mesoporous Silica Nanoparticles: Superoxide Dismutase. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1516-1523.
58. Hartono, S. B.; Qiao, S. Z.; Liu, J.; Jack, K.; Ladewig, B. P.; Hao, Z. P.; Lu, G. Q. M.: Functionalized Mesoporous Silica with Very Large Pores for Cellulase Immobilization. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 8353-8362.
59. Functionalized Mesoporous Silica Boosts Enzyme Activity. *Chem. Eng. News* **2002**, *80*, 35-35.
60. Kim, M. I.; Kim, J.; Lee, J.; Jia, H.; Bin Na, H.; Youn, J. K.; Kwak, J. H.; Dohnalkova, A.; Grate, J. W.; Wang, P.; Hyeon, T.; Park, H. G.; Chang, H. N.: Crosslinked Enzyme Aggregates in Hierarchically-Ordered Mesoporous Silica: A Simple and Effective Method for Enzyme Stabilization. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 210-218.
61. Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; Eskandani, M.; de la Guardia, M.: Mesoporous Silica-Based Materials for Use in Electrochemical Enzyme Nanobiosensors. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2012**, *40*, 106-118.
62. Murai, K.; Kato, K.: Development of Cholesterol Biosensor with High Sensitivity Using Dual-Enzyme Immobilization into the Mesoporous Silica Materials. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *258*, 1725-1732.
63. Frein, E. M.; Montenecourt, B. S.; Eveleigh, D. E.: Cellulase Production by *Trichoderma-Reesei* Immobilized on Kappa-carrageenan. *Biotechnol. Lett.* **1982**, *4*, 287-292.
64. Kashiwagi, Y.; Magae, Y.; Sasaki, T.: Preparation And Some Properties of Immobilized Cellulase on Cyanogen-Bromide Activated Sepharose. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **1984**, *31*, 86-91.
65. Kumakura, M.; Kaetsu, I.; Nisizawa, K.: Cellulase Production from Immobilized Growing Cell Composites Prepared by Radiation Polymerization. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 17-21.
66. Takeuchi, T.; Makino, K.: Cellulase Immobilized on Poly-L-Glutamic Acid. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 160-164.
67. Jain, P.; Wilkins, E. S.: Cellulase Immobilized on Modified Nylon for Saccharification of Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 1057-1062.
68. Sheng, C.; Zhiyue, H.; Yanru, L.: Study on Chitosan-Immobilized Cellulase. *Prog. Biochem. Biophys.* **1996**, *23*, 250-254.
69. Tebeka, I. R. M.; Petri, D. F. S.: CELL 255-Hydrolytic Activity of Immobilized Cellulase onto Silicon Wafers. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2008**, 235.
70. Kelly, F. H. C.: Phase Equilibria in Sugar Solutions .4. Ternary System of

- Water-glucose-fructose. *Journal of Applied Chemistry* **1954**, *4*, 409-411.
71. Strandbe.Gw; Smiley, K. L.: Free and Immobilized Glucose Isomerase from *Streptomyces-phaeochromogenes*. *Applied Microbiology* **1971**, *21*, 588-&.
72. Yokote, Y.; Kimura, K.; Samejima, H.: Production of High Fructose Syrup by Glucose Isomerase Immobilized on Phenol-Formaldehyde Resin. *Starke* **1975**, *27*, 302-306.
73. Weidenbach, G.; Bonse, D.; Richter, G.: Glucose-isomerase Immobilized on SiO₂-carrier with High Productivity. *Starke* **1984**, *36*, 412-416.
74. Lee, Y. Y.; Fratzke, A. R.; Wun, K.; Tsao, G. T.: Glucose Isomerase Immobilized on Porous-Glass. *Biotechnol. Bioeng.* **1976**, *18*, 389-413.
75. Messing, R. A.; Filbert, A. M.: Immobilized Glucose Isomerase for Continuous Conversion of Glucose to Fructose. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 920-923.
76. Antrim, R. L.; Auterinen, A. L.: A New Regenerable Immobilized Glucose-isomerase. *Starch-Starke* **1986**, *38*, 132-137.
77. Chen, F. S.; Weng, H. S.; Lai, C. L.: The Performance of Immobilized Glucose-isomerase Supported by Shrimp Chitin in Various Types of Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, *25*, 725-733.
78. Dehkordi, A. M.; Tehrany, M. S.; Safari, I.: Kinetics of Glucose Isomerization to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase (Sweetzyme IT). *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 3271-3278.
79. Yu, D. H.; Wu, H.; Zhang, A. J.; Tian, L.; Liu, L. D.; Wang, C. M.; Fang, X. X.: Microwave Irradiation-assisted Isomerization of Glucose to Fructose by Immobilized Glucose Isomerase. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 599-603.
80. PonRani, V. M.; Rajendran, L.: Mathematical Modelling of Steady-State Concentration in Immobilized Glucose Isomerase of Packed-Bed Reactors. *J. Math. Chem.* **2012**, *50*, 1333-1346.
81. Martinez, L.: Fibrous Cellulose Support Containing Adhered Yeast for Converting Sucrose to Glucose And Fructose. 2000.
82. Storey, K. B.; Chakrabarti, A. C.: One-Step Conversion of Cellulose to Fructose Using Coimmobilized Cellulase, Beta-Glucosidase, and Glucose-Isomerase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *23*, 139-154.
83. Li, C. Z.; Zhang, Z. H.; Zhao, Z. B. K.: Direct Conversion of Glucose and Cellulose to 5-Hydroxymethylfurfural in Ionic Liquid under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5403-5405.
84. Daorattanachai, P.; Khemthong, P.; Viriya-empikul, N.; Laosiripojana, N.; Faungnawakij, K.: Conversion of Fructose, Glucose, and Cellulose to 5-Hydroxymethylfurfural by Alkaline Earth Phosphate Catalysts in Hot Compressed Water. *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 58-61.