



國立臺灣大學工學院環境工程學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Environmental Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master's Thesis

利用3D生物列印固定化碳酸酐酶以提升固碳效率

Immobilized Carbonic Anhydrase by 3D Bioprinting for

Enhanced Carbon Fixation Efficiency

萬昌鑫

Chang-Hsin Wan

指導教授：于昌平 教授

Advisor: Professor Chang-Ping Yu

中華民國 114 年 7 月

July, 2025

國立臺灣大學碩(博)士學位論文

口試委員會審定書

**MASTER'S THESIS(DOCTORAL DISSERTATION) ACCEPTANCE
CERTIFICATE**
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

(論文中文題目) 利用 3D 生物列印固定化碳酸酐酶以提升固碳效率

(論文英文題目) Immobilized Carbonic Anhydrase by 3D Bioprinting for Enhanced
Carbon Fixation Efficiency

本論文係 萬昌鑫 (R12541104) 在國立臺灣大學環境
工程學研究所完成之碩士學位論文，於民國 114 年 7 月 28 日承下列考試委員審
查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Graduate Institute of Environmental Engineering
on 28 (July) 2025 have examined a **Master's Thesis** entitled above presented by
Chang-Hsin, Wann (R12541104) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

丁昌平

(指導教授 Advisor)

劉洛德

陳宜龍

系(所、學位學程) 主管 Director:

✓ 陳衍己

謝辭



兩年的碩士時光如白駒過隙，轉眼間已來到求學生涯的最後一哩路。在這段旅程中，我非常慶幸能遇見許多志同道合的好友，與他們一起同甘共苦，讓我在自我懷疑的時刻重新找到屬於自己的自信。感謝自己當初選擇踏入研究所，並順利完成學業；不僅鞏固了專業知識與技術，也豐富了人生歷練，成為一段值得珍藏的寶貴回憶。

由衷感謝我的指導教授于昌平老師，接納了經驗不足的我成為 Yu lab 大家族的一份子，並耐心給予我實驗和學習上的建議。在老師的引領下，實驗室營造出自由開放的氛圍，同時同儕之間互助合作，使我能在極為舒適且富有激勵性的環境中專注於研究工作。感謝口試委員陳宜龍教授與劉啟德教授對我的實驗成果給予肯定與建議，使我在專業的道路上更加精進。感謝吳佩勳博士在儀器上的教學，時刻體醒著我如何以嚴謹且仔細的態度造就不凡。感謝貫中在計畫和實驗上給予大力幫助，和你一起工作總是效率滿滿且歡笑不斷。

感謝 R11 的學長姐智傑、科呈、尚言、晉偉、育綺、凱婷和臻宜，在碩士兩年生涯中給予我在實驗以及課業上的幫助，讓我能快速融入 Yu lab 大家庭。感謝 R12 的昆學長、晉廷兄弟、春雪、輔瑩姊妹、婕涵姐姐，和你們一起做實驗的時光總是有說有笑，讓我在充滿愛的環境度過艱苦的難關。感謝 R13 的學弟妹們愷哥、傑哥、哲哥、李研、怡姿、羽阡，很高興能和你們一起在師生盃揮灑青春，也同樣感謝你們幫助實驗室的大小事，有你們的 Yu lab 特別窩心。感謝 R14 的蓉萱和邦哲，提供各種歡笑，活絡實驗室的氣氛。

最後，特別感謝我的家人們和心喬，總在我最需要的時候，給我滿滿的能量和鼓勵。正是有你們的無限支持，我才能在艱困的生活中保持正向的步調，當一個鋤奸鏟惡的活力俠。

萬昌鑫 謹誌於

2025 年 7 月

中文摘要



碳酸酐酶是一種催化 CO_2 水合反應之含鋅金屬酶，透過兩步驟生化反應進行，包含鋅金屬上氫氧根離子對 CO_2 之親核攻擊，產生碳酸氫根基團，以及水分子對鋅位點之再生。此類型酵素常見於生物體內，能調節酸鹼環境，並具有高轉換效率與 CO_2 專一性，在碳捕捉技術上具開發潛力。然而，游離態酵素容易因環境變化而影響催化活性，導致酵素失活，故需透過固定化程序提高實用性。而使用包埋法進行酵素固定化能有效保持酵素活性且具備良好接枝穩定性，且結合 3D 生物列印技術能進一步打造載體形狀之多樣性，適用於碳捕捉材料之開發。

本研究試著利用 3D 生物列印技術進行酵素固定化，比較不同負載情形下之活性表現，並將載體置於兩種曝氣類型之反應槽內，試著分析氣、液相中無機碳，以及碳酸鈣沉澱量，綜合評估載體固碳效率。實驗結果顯示，酵素分布於載體之交聯結構孔洞中，顯示此類型三維結構能良好的負載酵素並表現活性。低酵素負載時，載體表現出高催化效率，比活性達最高 207.49 WAU/mg CA，在經過 14 天乾式保存後仍保有 71.47% 活性，並在 6 次循環使用後保留 84.98% 酵素活性，展現良好酵素穩定性。另外，酵素負載增加能有效提升熱穩定性，負載最高之 CA-3D-4 (0.171 mg/g) 於 50°C 時表現最佳相對活性。此外，通過比較直接注入式及奈米曝氣式反應槽，可知若引入奈米氣泡能有效增強酵素催化 CO_2 水合反應。藉由碳酸鈣沉澱結果得知進一步驗證低負載酵素之高催化效率，CA-3D-1 (0.028 mg/g) 載體在直接注入式反應槽中表現出 2724.4 mg CaCO_3 /mg CA 之沉澱量，而在奈米氣泡式反應槽中更達到 3016.0 mg CaCO_3 /mg CA 之沉澱量。

關鍵字：碳酸酐酶、3D 生物列印、酵素固定化、奈米氣泡、碳捕捉

Abstract

Carbonic anhydrase is a zinc-containing metalloenzyme that catalyzes the hydration of CO₂ through a two-step biochemical reaction. This process involves a nucleophilic attack of the hydroxide ion coordinated on the zinc metal center, producing bicarbonate ions, followed by the regeneration of the zinc-bound water molecule. This type of enzyme is commonly found in living organisms, where it regulates acid-base balance and exhibits high catalytic efficiency and CO₂ specificity. It also holds great potential for development in carbon capture technologies. However, free enzymes are prone to activity loss due to environmental changes, resulting in enzyme deactivation. Therefore, immobilization techniques are necessary to enhance their practical applicability. Among these, enzyme immobilization by entrapment can effectively maintain enzyme activity and provide good grafting stability. When combined with 3D bioprinting technique, it allows for greater diversity in carrier shapes, making it suitable for the development of CO₂ capture materials.

This study attempts to immobilize the enzyme using 3D bioprinting technique, comparing the activity performance under different enzyme loading. The carriers were placed in two types of reactors, inorganic carbon analysis was conducted in the gas and liquid phase system, combined with calcium carbonate precipitation test to evaluate the carbon fixation efficiency of the carriers. Experimental results show that the enzyme is



distributed within the crosslinked pores of the carrier, indicating that this type of three-dimensional structure can effectively load the enzyme and maintain its activity. At low enzyme loading, the carrier exhibited high catalytic efficiency, with a maximum specific activity of 207.49 WAU/mg CA. After 14 days of dry storage, it retained 71.47% of its activity. In reusability test, after six cycles, it preserved 84.98% of enzyme activity, demonstrating good enzyme stability. Additionally, increasing enzyme loading effectively improved thermal stability, with the highest enzyme loaded CA-3D-4 carrier (0.171 mg/g) showing the best relative activity at 50°C. Furthermore, by comparing direct injection and nano-bubble aeration reactors, it was found that the nano-bubbles can effectively enhance the enzyme-catalyzed CO₂ hydration reaction. The calcium carbonate precipitation results further verified the high catalytic efficiency of the low-loaded enzyme. It shows that the CA-3D-1 carrier (0.028 mg/g) produced 2724.4 mg CaCO₃/mg CA in the direct injection reactor and reached 3016.0 mg CaCO₃/mg CA in the nano-bubble reactor.

Keywords: Carbonic anhydrase, 3D bioprinting, enzyme immobilization, nano bubbles, carbon capture

目次



口試委員會審定書	i
謝辭	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	iv
目次	vi
圖次	ix
表次	xi
第一章 前言	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究動機及目的	2
1.3 研究架構圖	4
第二章 文獻回顧	5
2.1 固碳技術研究	5
2.1.1 CO ₂ 排放趨勢與氣候變遷議題	5
2.1.2 碳捕捉技術現況	6
2.2 碳酸酐酶應用於碳捕捉技術	8
2.2.1 酵素碳捕捉技術	8
2.2.2 碳酸酐酶	9
2.3 酵素固定化方法	11
2.3.1 物理吸附法	11
2.3.2 共價鍵結法	12
2.3.3 交聯型聚合法	14
2.3.4 包埋法	14
2.4 3D 生物列印技術	15



2.4.1 3D 生物列印技術簡介	15
2.4.2 列印技術種類	16
第三章 材料與方法	19
3.1 實驗藥品及設備	19
3.1.1 實驗藥品	19
3.1.2 實驗設備	21
3.2 3D 生物列印	23
3.2.1 3D 生物列印機及列印參數設計	23
3.2.2 生物墨水製備	24
3.2.3 生物列印操作步驟	25
3.3 材料特性分析	28
3.3.1 表面型態分析	28
3.3.2 表面官能基分析	29
3.3.3 酵素活性分析	30
3.3.4 固定化酵素之環境條件最佳化試驗	32
3.3.5 保存性測試	33
3.3.6 重複性測試	34
3.4 固碳實驗	35
3.4.1 直接注入式反應槽	35
3.4.2 微奈米氣泡反應槽	35
3.4.3 氣體分析	36
3.4.4 水中總無機碳分析	37
3.4.5 碳酸鈣沉澱分析	38
第四章 結果與討論	41
4.1 固定化酵素表面分析	41

4.1.1 SEM.....	41
4.1.2 EDS.....	44
4.1.3 FTIR.....	45
4.2 固定化酵素活性測試.....	47
4.3 酵素操作條件最佳化測試結果.....	49
4.3.1 酸鹼度最佳化測試結果.....	49
4.3.2 溫度最佳化測試結果.....	51
4.4 保存性測試結果.....	52
4.5 重複使用性測試結果.....	55
4.6 固碳效果評估.....	57
4.6.1 氣體分析.....	57
4.6.2 水中總無機碳分析.....	59
4.6.3 碳酸鈣沉澱試驗.....	62
第五章 結論與建議.....	67
5.1 結論.....	67
5.2 未來建議.....	69
參考文獻.....	70



圖次

圖 1-1 研究架構圖.....	4
圖 2-1 全球年碳排放量 1900-2024 (IEA, 2025).....	5
圖 2-2 全球平均氣溫上升模擬趨勢 (IPCC, 2018).....	6
圖 2-3 碳捕捉技術介紹(G. Zhang et al., 2024).....	7
圖 2-4 (a) CA 結構 (b)水合反應機制(P. Shao et al., 2024).....	9
圖 2-5 固定化 CA 與游離 CA 活性比較.....	13
圖 2-6 沸石、矽烷化沸石及固定 CA 後之矽烷化沸石之 FTIR 圖譜.....	13
圖 3-1 3D 生物列印機.....	24
圖 3-2 3D 列印材料實體圖 BK-3D(左) CA-3D-4(中) 乾燥後 BK-3D(右).....	27
圖 3-3 掃描式電子顯微鏡.....	28
圖 3-4 ATR-FTIR 機台實體圖.....	29
圖 3-5 直接注入式反應槽.....	35
圖 3-6 奈米氣泡式反應槽.....	36
圖 4-1 載體分子結構示意圖.....	41
圖 4-2 SEM 圖 BK-3D : (a)、(b) CA-3D-1 : (c)、(d) CA-3D-2 : (e)、(f).....	43
CA-3D-3 : (g)、(h) CA-3D-4 : (i)、(j).....	43
圖 4-3 EDS 結果 (a) 3D 列印載體 (b) CA-3D-4.....	45
圖 4-4 FTIR 圖譜 (a)生物墨水材料 (b) CA 及固定化 CA 載體.....	46
圖 4-5 CA 與固定化 CA 相對活性比較圖.....	48
圖 4-6 固定化 CA 之水合酶活性測試結果 (a)活性及酵素負載關係 (b)活性及比 活性關係.....	48
圖 4-7 酸鹼度最佳化測試結果 (a)相對活性與 pH 值變化之關係 (b)脂酶活性與 pH 值變化之關係.....	50

圖 4-8 溫度最佳化測試結果 (a)相對活性與溫度變化之關係 (b)脂酶活性與溫度 變化之關係	52
圖 4-9 保存性測試結果 (a)濕式保存結果 (b)乾式保存結果.....	54
圖 4-10 乾及溼保存 14 天後殘餘活性比較圖.....	54
圖 4-11 固定化 CA 於濕式保存 14 天後之操作狀況	55
圖 4-12 重複使用性測試結果.....	57
圖 4-13 逐時氣體反應量.....	58
圖 4-14 固定化 CA 之氣體反應量	59
圖 4-15 總無機碳分析及 pH 值量測結果 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米氣泡式反 應槽	61
圖 4-16 水中碳酸根系統物質分布 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米曝氣式反應槽.....	62
圖 4-17 TGA 測試結果 (a)碳酸鈣標準品 (b) BK-3D (c) CA-3D-1	64
(d) CA-3D-2 (e) CA-3D-3 (f) CA-3D-4.....	64
圖 4-18 碳酸鈣沉澱試驗結果 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米氣泡反應槽.....	65

表次



表 3-1 實驗藥品清單.....	19
表 3-2 實驗儀器設備清單.....	21
表 3-3 3D 列印機參數.....	23
表 3-4 生物墨水成分.....	25
表 3-5 固定化酵素樣品名稱.....	25
表 3-6 酸鹼溶液配置.....	32
表 3-7 保存性測試條件.....	33
表 3-8 氣相層析條件.....	36
表 3-9 熱重分析操作參數.....	39
表 4-1 載體及固定化酵素 EDS 元素分析結果	44
表 4-2 酵素水合酶活性與比活性表.....	49
表 4-3 酸鹼度最佳化測試結果.....	50
表 4-4 溫度最佳化測試結果.....	51
表 4-5 濕式保存結果.....	53
表 4-6 乾式保存結果.....	53
表 4-7 樣本差異性分析結果.....	55
表 4-8 重複性測試結果.....	56
表 4-9 比固碳量比較表.....	59
表 4-10 直接注入式反應槽之總無機碳分析結果.....	61
表 4-11 奈米曝氣式反應槽之總無機碳分析結果.....	61
表 4-12 碳酸鈣沉澱試驗結果.....	65

第一章 前言



1.1 研究背景

全球氣候變遷問題日益嚴峻，極端氣候所帶來的洪水、颱風、乾旱等，已對人類居住環境帶來毀滅性的影響。根據聯合國政府間氣候變化專門委員會 (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) 所提出之報告，目標在於控制全球升溫 1.5°C 內 (IPCC, 2018)。許多研究顯示，溫室氣體排放的增加與氣候變遷的加劇密切相關，並指出大氣中二氧化碳的累積是其中的關鍵因素。因此，碳捕捉技術在各國被視為重要發展項目投入，在臺灣 2050 淨零轉型關鍵策略中也被納入 12 項關鍵戰略中。現有碳捕捉技術包含：醇胺法、薄膜分離、填充塔吸收以及生物方法等。常見物化方法優勢在於吸收效率高、固碳量大且 CO₂ 選擇性高，但其仍面臨設置成本高昂及操作能耗高等挑戰。因此，在政府推動下，改良或開發新型碳捕捉技術已是刻不容緩。

生物方法是一種利用自然生物代謝反應進行碳捕捉的技術，常見方式包括植物行光合作用、微藻固碳、生物炭技術以及酵素催化等。其中，酵素因其高轉換效率、專一性強及低能耗等優勢，被廣泛認為是具潛力的固碳技術。然而，酵素的催化活性容易受到環境因素影響，如酸鹼度、離子強度及溫度等。為提升酵素的穩定性，尋找並優化合適的固定化方法成為重要的研究方向。



1.2 研究動機及目的

碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)是一種含鋅之金屬酶，具催化 CO_2 水合反應之能力。主要存在於生物體內協助維持酸鹼平衡與促進 CO_2 運輸等工作，其高轉換效率(10^4 - 10^6 1/s)被視為一種重點發展之碳捕捉材料。在碳捕捉應用中，通常先利用 CA 催化二氧化碳的水合反應，將氣相 CO_2 轉化為碳酸型態，隨後再通過鹼性鈣源促進碳酸鈣的沉澱生成，達到固碳的效果。此方法結合酶催化與化學沉澱，提升了 CO_2 捕獲的速率與效率。然而，CA 同樣具有環境穩定性差、高成本等劣勢，限制了酵素之應用環境(Surampalli et al., 2015)。

常見固定化方法包含物理吸附、共價鍵結、包埋法等。物理吸附程序操作簡易，且操作條件溫和，但對酵素結合力弱，酵素容易釋放，進而導致穩定性不佳。共價鍵結儘管具高鍵結強度，其固定程序複雜且接枝時容易影響活性位點，導致酵素活性表現受阻。而包埋法則是將酵素封存於載體結構中，能有效固定酵素的同時，保留酵素原始活性。

3D 生物列印方法是將傳統 3D 列印結合生物相容性材料，其具可塑性高、操作簡易等優勢，因而被應用於仿生組織製造、人工器官、生物檢測器等領域。此外，這類型 3D 建模技術也被廣泛應用於微生物及酵素固定化領域中，試著以包埋形式開發出高穩定性材料以增強環境適性(Shen et al., 2019; Zhao et al., 2023)。因此，本研究試著以低成本 3D 生物列印方式固定化 CA，探討固定化酵素之活性差異與環境穩定性變化，並實際應用於固碳反應槽中。

故本研究所關注之目標為：

1. 比較不同配比之固定化酵素活性，尋找固定形狀下，3D 生物列印載體之最佳化酵素負載量。
2. 藉由材料表面分析，觀察載體 3D 結構之交聯狀態，並以 FTIR 分析材料表面官能基分布情形，了解化學結構組成。

- 
3. 設計兩種不同曝氣條件之反應槽，評估碳酸酐酶催化效率，試著導入奈米曝氣裝置增強酵素固碳能力。
 4. 為了解二氧化碳的轉換，進行系統中二氧化碳之液態及氣態定量與定性分析。
 5. 對碳酸鈣沉澱量進行定性和定量分析，量化固碳效率。
 6. 研究固定化酵素之酸鹼度及溫度最佳化條件。
 7. 評估固定化酵素保存性，探討不同保存條件對其活性之影響。
 8. 評估固定化酵素之重複使用性，研究酵素再利用情形。

1.3 研究架構圖

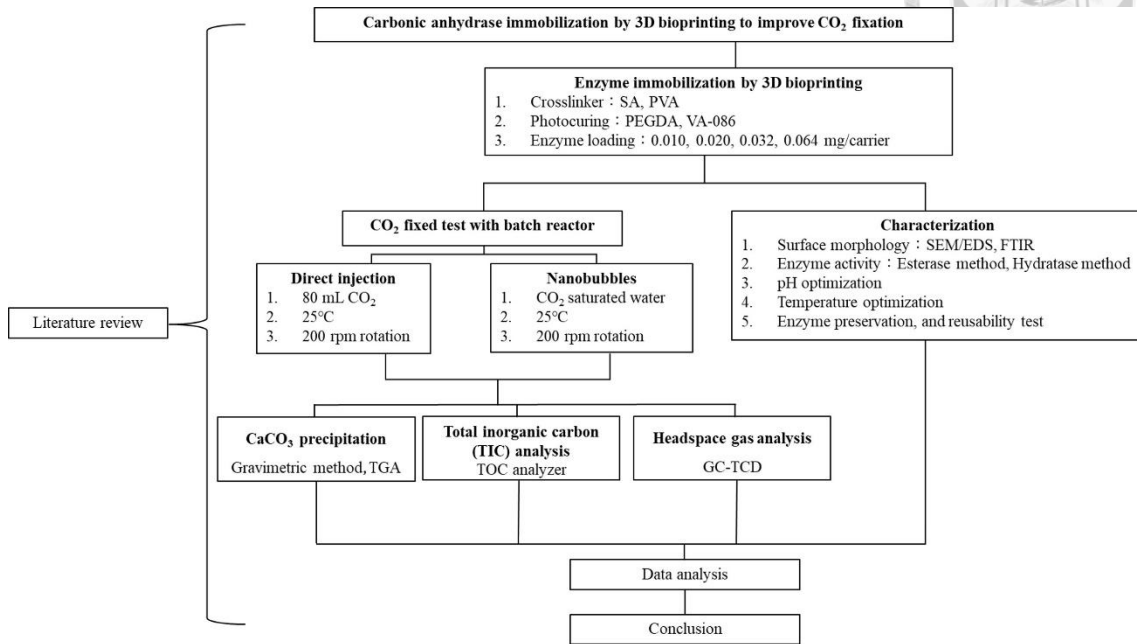


圖 1-1 研究架構圖

第二章 文獻回顧



2.1 固碳技術研究

2.1.1 CO₂ 排放趨勢與氣候變遷議題

極端氣候的頻繁發生正對全球帶來前所未有的破壞與挑戰，包含頻繁的水災及乾旱、糧食短缺和海平面上升等，使得氣候變遷議題受到高度關注(Mezieobi et al., 2025)。多數研究表明全球氣溫上升情形與 CO₂ 排放量增加呈現正相關性，並歸因於人類活動所造成的碳排放。根據國際能源總署(International Energy Agency, IEA)所公布之全球年碳排放量，至 2024 年已達 37.6 Gt CO₂，如下圖 2-1 所示。IPCC 於 2018 年發布之 1.5°C 特別報告中也提到全球氣溫上升 1.5°C 及 2°C 之光景，強調控制平均升溫在 1.5°C 內之重要性，下圖 2-2 為模型預測之全球氣溫上升趨勢圖(IPCC, 2018)。

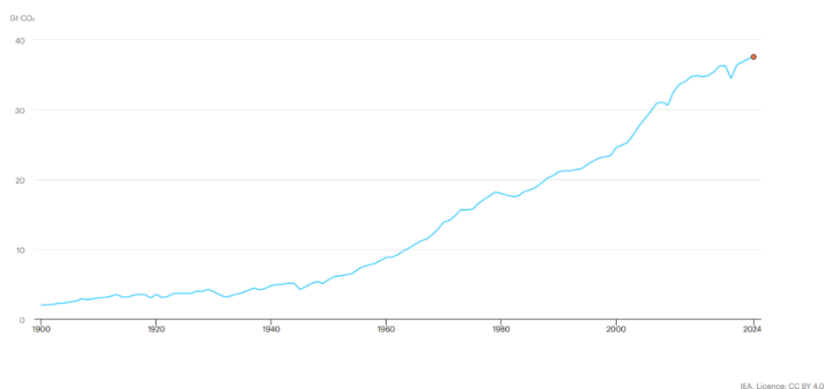


圖 2-1 全球年碳排放量 1900-2024 (IEA, 2025)

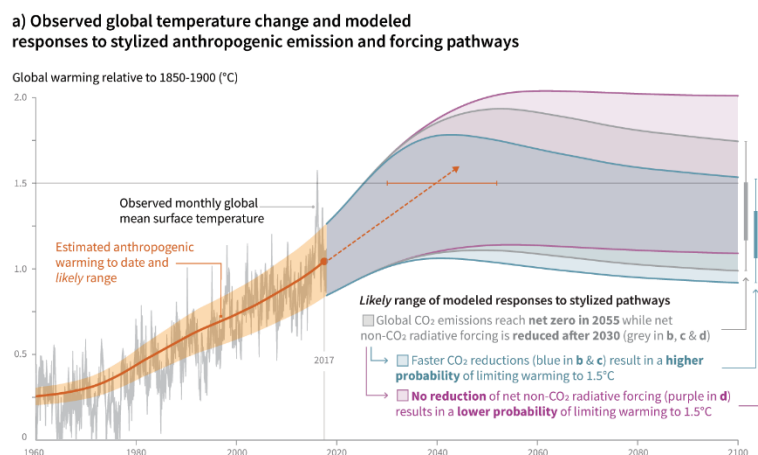


圖 2-2 全球平均氣溫上升模擬趨勢 (IPCC, 2018)

因此，為有效應對氣候變遷的調適與減緩需求，碳捕捉、再利用與封存(Carbon Capture, Utilization and Storage, CCUS)之技術開發刻不容緩。根據政府所頒布之 12 項關鍵戰略中，除資源循環、能源轉型及節能儲能技術研發，CCUS 技術也同樣是重要策略之一(行政院環境保護署, 2023)。由此可見，碳捕捉技術的研發已成為當前熱門且關鍵的研究方向。

2.1.2 碳捕捉技術現況

碳捕捉作為 CCUS 技術中的前端環節，扮演著關鍵的角色，負責從工業排放或燃燒煙氣中有效分離並捕獲二氧化碳，為後續的再利用或封存技術提供基礎碳源(Wei et al., 2020)。常見碳捕捉技術分為四類，分別是：燃燒前捕獲(Pre-combustion)、燃燒後捕獲(Post-combustion)、富氧燃燒(Oxy-combustion)以及直接空氣捕獲(Direct Air Capture, DAC)，如下圖 2-3 所示。燃燒前捕獲涉及燃料氣化重組及水煤氣轉化反應，因其易操作並能有效產氫並提供燃料的優勢，多應用於化工業等(Baskaran et al., 2024)。目前燃燒前捕獲技術仍有設備成本高、混合氣不易純化、吸收溶劑毒性(Ashkanani et al., 2020)等問題，常見應用於混合氣之分離技術，如 Purisol 製程(Zexiong, 2022)及氣體分離薄膜(Scholes et al., 2010)等。燃燒後捕獲應用於煙道尾氣中，使用對 CO₂ 選擇性高之材料且設備改建成本低，對不同產業之適性高(Basile et al., 2011)。常透過多孔材料吸附(Lai et al., 2021)、化學吸收(Du et al., 2024)等技

術，從組成複雜的尾氣中分離 CO_2 ，但仍面臨高能耗、維護成本高及捕捉效率有限等劣勢(Nema et al., 2025)。富氧燃燒技術指使用較高純度氧氣進行燃燒，具有可產生相對高濃度 CO_2 及較低 NO_x 生成之優勢(Koohestanian & Shahraki, 2021)，有效提升能源效率，然而製氧成本高、氧氣純化能耗大等劣勢尚待克服(Wu et al., 2018)。直接空氣捕獲是透過物理化學方法，直接自大氣中移除二氧化碳，常見技術包含固體吸附、液體吸收及微藻碳捕捉(Paul et al., 2021)等。此技術不具地域性、技術結合適性高、 CO_2 選擇性高及固碳效率快等優勢(Sodiq et al., 2023)，使其具備發展潛力且能有效幫助產業達成去碳目標。與其他技術相比，DAC 發展較不純熟且尚具備成本高、規模小、環境風險等劣勢需要突破(Sanz-Pérez et al., 2016)。

本研究著手研發一種新型的直接捕獲技術，將一種具有 CO_2 水合轉換的酵素，經過固定化程序後，導入富 CO_2 的氣體環境下進行碳捕捉程序，並同時利用微米起泡的方式製作富 CO_2 的溶液，以探討固碳效率的變化。為此，本研究設計了兩種不同曝氣方式的動態反應槽，其一為直接注入式，其二為奈米氣泡式，進而比較並評估兩種不同系統之碳捕捉效果。

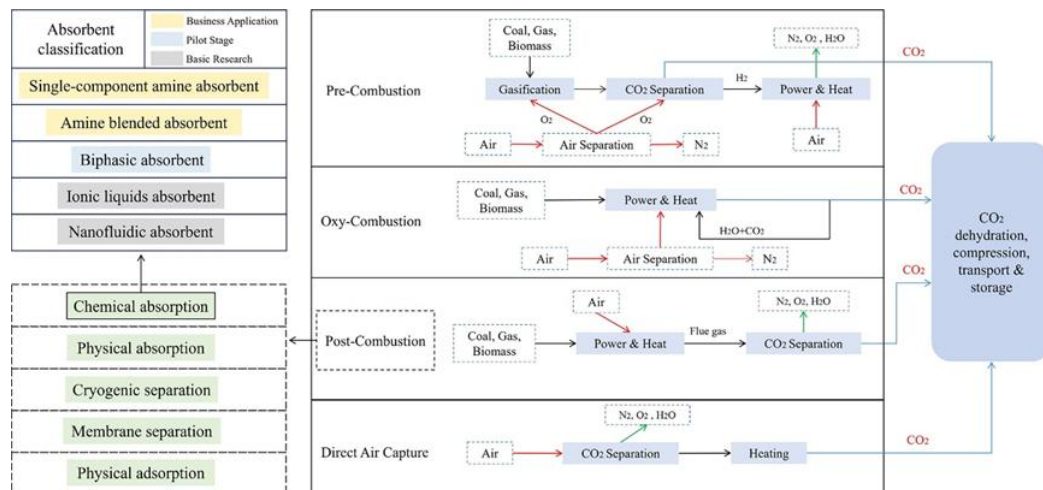


圖 2-3 碳捕捉技術介紹(G. Zhang et al., 2024)



2.2 碳酸酐酶應用於碳捕捉技術

2.2.1 酵素碳捕捉技術

基於碳捕捉技術目前仍面臨能耗高、成本昂貴及固碳效率有限等挑戰，除了持續進行技術改良外，結合生物方法亦展現出良好的發展潛力(Chen et al., 2024)。在這些生物技術之中，酵素所具備之專一性(Mukherjee et al., 2025)、產物多元性(Chen et al., 2023)、高效率(P. Shao et al., 2024)等優勢，讓其在固碳及碳捕捉領域上倍受關注。酵素的導入可有效催化多種與 CO_2 有關之反應，多數文獻也證實了利用酵素將 CO_2 轉換為有價物質之可行性，如 Maureira 等人將甲酸去氫酶共價固定於碳氈上，在 CO_2 加壓溶解下反應，達到每小時 0.56 mol/L 之甲酸鹽累積生產率(Maureira et al., 2025)；Song 等人將 β -環糊精結合鹵化鉀，在無溶劑的情形下進行 CO_2 與不同種類環氧物質反應之催化，反應在 4-12 小時內完成並具備 90% 以上產率(Song et al., 2008)；Malankowska 等人將碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)共價固定於聚砜膜(Polysulfone, PSF)上，開發了一種生物催化活性為 $744 \mu\text{U}/\text{cm}^2$ 之膜反應器，表明碳酸酐酶具有固碳潛力(Malankowska et al., 2024)。

其中，碳酸酐酶較廣泛存在於自然界中，如動物紅血球中負責調節血液中 CO_2 濃度及酸鹼度環境(Sharma et al., 2020)、催化藻類利用環境中 CO_2 以增加光合作用效率(Mukherjee et al., 2025)、固碳微生物之代謝反應(Yuan & Qian, 2025)等。此外，CA 對 CO_2 水合轉換具有專一性、反應速率快且環境適應力強，適合在中性條件(pH 7)下進行催化(de Oliveira Maciel et al., 2022)。這些優勢使得 CA 在碳捕捉領域上受到更多的關注，相關研究團隊也積極探索 CA 與其他碳捕捉技術的結合應用，如 Mourad 等人將碳酸酐酶結合 Solvay 製程，當導入 50 mg/L 之 CA 至反應中，可有效增加整體反應速率 38.2% 並提高約 2 倍之 CO_2 吸收量(Mourad et al., 2024)。



2.2.2 碳酸酐酶

CA 是一種金屬酶，結構包含鋅中心、三個組氨酸基團以及一個水分子配位(P. Shao et al., 2024)。隨著科學家深入研究，發現 CA 依其來源具有不同的結構樣式，如 α -CA 來自於脊椎動物、植物等，中心金屬為鋅(Alterio et al., 2018)； γ -CA 來自於真菌、古細菌等，中心金屬為鋅、鈷、鐵等元素(Supuran, 2018)； ζ -CA 則是來自某些海洋矽藻，中心金屬為鎘或鋅(Supuran & Capasso, 2017)。然而，CA 多數來源於常溫環境中生存的物種，因此其酶活性通常適用於常溫條件，這限制了其在工業碳捕捉過程中於高溫環境的應用。為提高 CA 的熱穩定性，Kumari 等人試著將嗜熱細菌上的熱穩定性基因(*Persephonella marina* EX-H1)與碳酸酐酶的生產基因同時轉殖到大腸桿菌上，製備出具熱穩定性之 CA (Kumari et al., 2024)。此研究大幅增強了 CA 在高溫環境下碳捕捉應用的可行性與潛力。

CA 所催化之 CO_2 水合反應牽涉到配位基團上之電子轉移，如下圖。首先，鋅位點上的水分子配位基團去質子化，產生羥基基團(OH)。接著， CO_2 分子與羥基基團結合，並受到來自羥基基團之親核攻擊，在鋅中心上形成碳酸氫根基團。由於水分子與鋅之配位能力高於碳酸氫根，水分子將會置換酶上之碳酸氫根，使其轉移至溶劑中(Surampalli et al., 2015)。因此，透過 CA 與 CO_2 分子間之交互作用，得以實現以綠色方法固碳之目標。

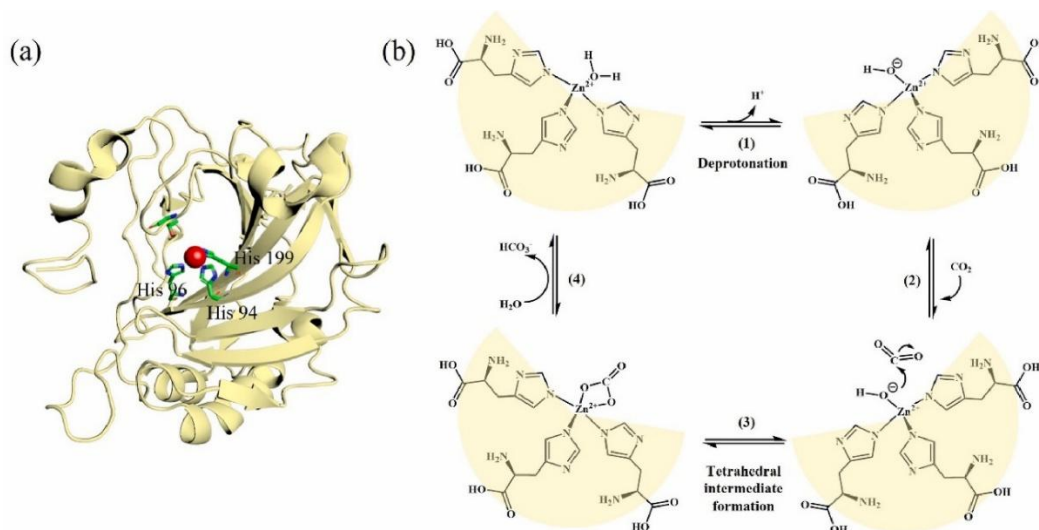
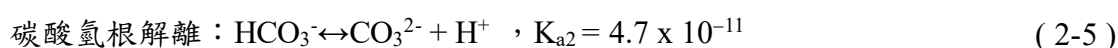
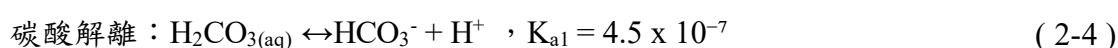
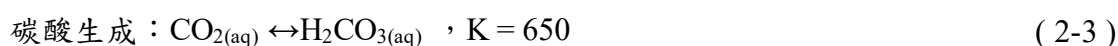
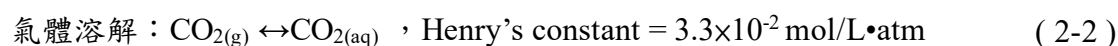
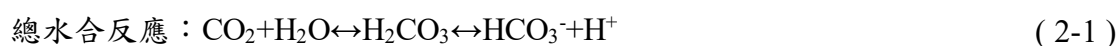


圖 2-4 (a) CA 結構 (b)水合反應機制(P. Shao et al., 2024)

CO₂ 水合反應涉及氣體溶解及碳酸的解離過程，研究顯示，CO₂ 轉換為碳酸的反應速度相當緩慢(張名惠，謝佩珊，黃國璋，廖啟雯, 2016)，而碳酸鈣的沉澱則依賴水中碳酸根的含量以及溶液酸鹼性(Azdarpour et al., 2015)。由此可見，這一緩慢的轉換過程不利於固碳反應的快速進行。以下為 CO₂ 溶解總反應：



CA 作為一種高效的二氧化碳水合酶，具有良好的 CO₂ 轉換效率，最大催化速率可達約 10⁴-10⁶ 1/s (Molina-Fernández et al., 2021)。為了進一步提升酵素的固碳效果，除了優化酵素的水合轉換速率外，強化氣液間質傳之反應槽設計亦成為研究重點，促使 CA 碳捕捉技術逐步邁向規模化應用。Michaud 等人開發出一種具彈性的泡棉填充床反應槽，將 CA 包埋於泡棉表面，並操作在 50 mL/min 的氣體與液體流量下。相對於固定式泡棉反應槽，質傳系數增加約 5 倍(Michaud et al., 2023)。

然而，酵素反應容易受到環境因子影響，包含：環境酸鹼度、溫度以及離子強度(Zhang et al., 2015)。根據 Gladis 等人之研究成果，在一種氣-液反應槽中探討不同 CO₂ 吸收劑濃度及操作溫度對 CO₂ 轉換速率之影響，結果表明在氨基甲基丙醇(2-amino-2-methyl-1-propanol, AMP)及碳酸鉀溶液中，溫度升高及溶劑濃度增加皆有助於 CO₂ 水合轉換效率；而對 N-甲基二乙醇胺(N-methyl-diethanolamine, MDEA)來說，溫度升高導致酵素轉換效率降低，溶劑濃度則顯著影響(Gladis et al., 2017)。除此之外，當開發 CA 碳捕捉複合材料時，也可能因酵素表面改質、固定化等功能化程序，而使酵素增加環境適應性(Effendi & Ng, 2019)。因此，如何最佳化酵素之反應條件是十分重要的課題，如 Shamna 等人將 CA 接枝在一種矽鋁複合材料上，

根據活性測試結果顯示，固定化後的酵素具有更高的鹼性環境與低溫適性(Shamna et al., 2021)。

儘管 CA 在碳捕捉領域具有可發展性，但目前仍面臨多項技術瓶頸，如材料成本高、重複使用性不佳、容易因環境條件失活等(Bai et al., 2025)。因此，為提升酵素的實用性，增強其穩定性成為關鍵且極需解決的課題。

2.3 酵素固定化方法

固定化技術是一種將酵素、微生物等對環境變動較敏感之物質，透過物理化學方法固定於載體上，以提升其環境穩定性及重複使用性，並試著延長活性存留時間(Prabhakar et al., 2025)。為了讓碳酸酐酶能在不同環境條件下參與固碳反應，研究者們嘗試了多種固定化方法，常見包括：物理吸附法、共價鍵結法、化學交聯及酵素包埋法等四種方式。

2.3.1 物理吸附法

物理吸附是透過酵素與載體之分子間凡得瓦力、氫鍵等作用力進行，其優勢在於操作簡易、反應條件溫和、操作成本低(Ishak et al., 2025)。常見於酵素於多孔吸附材料上之固定化，如 Ren 等人將 CA 固定於一種 ZIF-8 奈米粒子上，有效增加了酵素熱穩定性，在 60°C 下仍保有 40% 活性，且經過 9 個循環後仍保有 80% 以上活性(Ren et al., 2018)；Zhang 等人透過將脂酶固定於中孔矽材料上，在 30 天後，活性仍保有 55.7%，且經過 10 個循環後保有 63% 相對活性(Zhang et al., 2025)；Kumari 等人將 CA 固定在微晶纖維素球上。結果顯示，固定化後的 CA 能適應更高溫及鹼性環境。除此之外，在室溫下保存 28 天仍能保有 70% 活性，並在 10 個循環後保持 90% 原始活性(Kumari et al., 2020)。

即使物理吸附法對酵素活性及化學結構影響較小、反應易操作且快速，但此類型分子間作用力易受動態反應環境影響而斷鍵，可能導致材料上酵素洩漏釋出。因此，在酵素之長期穩定性或重複使用性表現上，尚有不足之處。



2.3.2 共價鍵結法

共價鍵結法是透過酵素與載體表面官能基之間相互作用形成，常使用胺基、羥基、羧基或環氧基等官能基團對載體表面進行改質(Wu et al., 2020)，以便和酵素結構連結。如 Yang 等人先進行 PAN 奈米纖維羥基化，而後以 EDC/NHS 耦合結合殼聚糖交聯，成功使 CA 鍵結於薄膜表面(Yang et al., 2025)；Rasouli 等人在拉西環表面以特定比例之聚多巴胺(Polydopamine, PDA)與聚乙烯亞胺(Polyethyleneimine, PEI)共沉積，使得基材表面帶有胺官能基，接著引入戊二醛作為交聯劑，連接 CA 與載體表面胺基(Rasouli et al., 2022)。

此法最大的優勢在於接枝穩定度高，可有效增加酵素之環境穩定性並減少其洩漏情形，且對動態反應槽的適性高(Smith et al., 2020)。因此，多數研究者嘗試以共價鍵結方式固定化 CA，如 Lv 等人將 CA 接枝於預先羧基官能化的磁性氧化鐵上，在材料穩定性上表現出更高的酸鹼適性及更大範圍的溫度適性，經過 10 個循環的使用後仍保持 58.5%酵素活性，顯示良好的重複使用性(Lv et al., 2015)；Vinoba 等人使用預先矽烷化的 SBA-15 型中孔二氧化矽(Santa Barbara Amorphous Mesoporous Silica, SBA)作為載體，利用表面胺基以及戊二醛交聯劑接枝 CA。結果顯示，使用 SBA 參與固定化程序，增加了 CA 的高溫適性。經過 10 次循環後仍保持 97%之酵素活性，且經過 30 天常溫保存後依舊保留了 95%原始活性，顯示良好的重複性及保存性(Vinoba et al., 2012)。

儘管共價鍵固定法能顯著提升酵素的穩定性及其對環境的耐受性，但該方法仍存在固定過程繁瑣、耗時且成本較高的問題，且在接枝過程中可能阻擋酵素的活性位點，導致活性降低(H. Rasouli et al., 2022)。在本研究的預實驗中，我們參考 Lim 等人的研究，使用矽烷化氧化鋁基材接枝 CA (Lim et al., 2019)，並嘗試使用矽烷化沸石對 CA 進行共價鍵結，FTIR 結果如下圖 2-6。在這項實驗中，預先使用一種胺基矽烷對沸石表面進行改性，再將 CA 與表面胺基鍵結，並測量酵素接枝量及固定化酵素活性。結果顯示，即便接枝率達 59.2%，固定化後的 CA 僅剩 5%原始活性，

如下圖 2-5。比對 Fei 等人的研究，同樣使用胺基矽烷改性之矽材對 CA 進行固定，接枝率達 30%-37%，但自反應常數及碳酸鈣生成量降低等，此外，接枝後比表面積及材料孔徑減小，可能影響 CO₂ 材料孔隙內外質傳，進而影響酵素活性表現(Fei et al., 2016)。由此可知，此法雖具備高穩定性，但對 CA 活性表現可能帶來抑制作用。

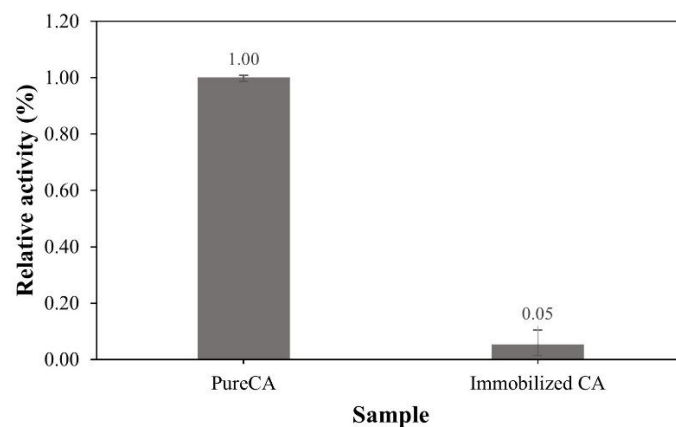


圖 2-5 固定化 CA 與游離 CA 活性比較

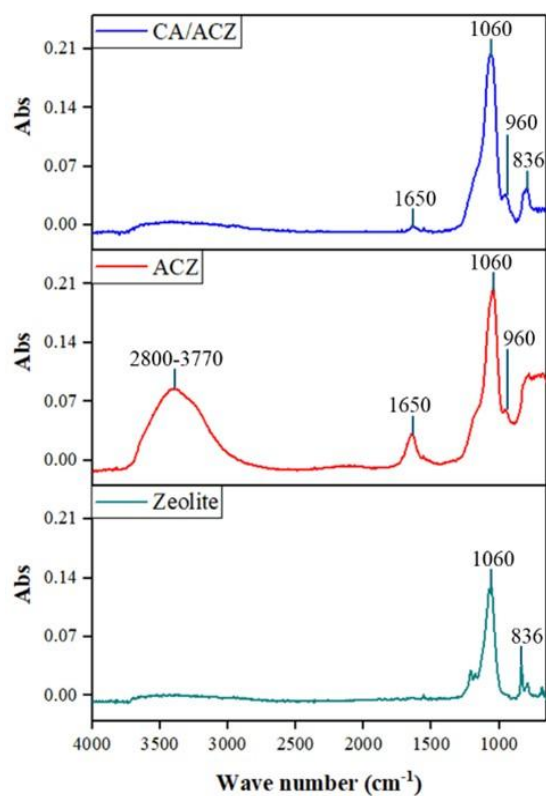


圖 2-6 沸石、矽烷化沸石及固定 CA 後之矽烷化沸石之 FTIR 圖譜



2.3.3 交聯型聚合法

交聯型聚合法(Cross-linked enzyme aggregates, CLEA)是一種無載體參與的固定化方法，類似於生物膜形成原理，利用特殊聚合物與酶之間建立交聯橋樑，形成酵素自支撐三維網絡(Molina-Fernández et al., 2021)。使用此法進行固定時，有效減少了載體所造成之質傳屏障，製程簡易且低成本，並能達成多種酶同時固定之效果。Jun 等人比較了在 CA 上使用 CLEA 法與 CLEA 法結合電紡纖維(Electrospun polymer nanofibers, EPC)之差異。雖然在 CLEA 相較 CLEA-EPC 表現更高催化活性，並較無質傳限制，但在 CLEA-EPC 樣品中展現極高的酵素穩定性，經過 868 天後仍保有 65.3%活性(Jun et al., 2020)。而 Peirce 等人在 CA 固定化程序中，將 CLEA 技術結合磁性奈米粒子，並比較不同交聯劑濃度下之酵素活性表現。當引入高濃度交聯劑時，提高交聯穩定性的同時，酵素活性呈現下降趨勢(Peirce et al., 2017)。因此，當交聯程度大時，反而影響整體結構之質傳。

由此可見，儘管 CLEA 法對酵素結構影響較小且操作簡便，但在提升酵素穩定性方面仍存在一定限制，且可能對質傳效應產生輕微影響。此外，CLEA 法仰賴酵素與聚合物間之交聯聚集，其分子間作用力較弱，容易受到攪拌或其他動態擾動的影響，因此較適合應用於靜態反應槽中。

2.3.4 包埋法

包埋法則是將酵素封裝於材料中，再透過調節內孔徑大小或增加填充物，將物質限制在包埋結構中以達成酵素固定化(Hu et al., 2025)。包埋法的優勢在於固定過程對酵素活性影響小、隔絕環境影響提高穩定性、材料多樣性高、操作簡易等。Oh 等人將甘油去氫酶(Glycerol Dehydrogenase, GDH)固定於一種基於聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)的光固化凝膠結構內，並使用戊二醛交聯，在酵素及矽烷化奈米材料之間架橋。有效提高了 GDH 的高溫及鹼度適性，並在 7 個循環後仍保有 91%原始活性(Oh et al., 2025)。另外，在 Cao 等人的研究中，透過聚甲基丙烯酸甲酯及聚乙烯亞胺交聯而成之磁性奈米材料，將脂酶包埋在聚合物籠狀結構中。

有效增加了脂酶的環境穩定性，同時也提高了重複使用性，經過 7 次循環後仍保有 70.2% 酵素活性表現(Cao et al., 2021)。

此外，文獻常使用海藻酸鹽、聚乙二醇、聚乙醇醇、殼聚糖等之聚合物進行酵素或微生物包埋(Liu et al., 2025)，因具生物相容性而被廣泛使用，如 Wang 等人研發了一種 CA 的創新包埋方法，利用氧化竹纖維與 CA 結構上的胺基反應，將 CA 包裹於纖維內部，並應用於增強微藻碳捕捉。在酵素穩定性上，提高了 CA 的高溫及鹼性適性，並成功促進微藻生長及葉綠素生成(Wang et al., 2024)。此外，Yadav 等人將 CA 均勻分布在海藻酸鈉(Sodium alginate, SA)溶液中，再逐滴加入氯化鈣溶液形成一種凝膠型態的交聯網絡。實驗結果顯示，在常溫下保存 18 天後，活性總損失 34.5%，且經過 6 次循環後仍保有 67% 原始活性。不僅提高了 pH 及溫度適性，在保存性及重複使用性上皆表現良好(Yadav et al., 2012)。

整體而言，包埋法的固定化強度介於交聯聚合與共價鍵結之間，且對酵素結構與活性的影響較小。雖然交聯結構可能對前驅物及產物的質傳產生輕微影響，但能有效提升酵素的保存性與重複使用性。因此，本研究採用包埋法對 CA 進行固定化，期望在提升酵素穩定性的同時，兼顧其重複使用性與保存性能。

2.4 3D 生物列印技術

2.4.1 3D 生物列印技術簡介

傳統 3D 列印是根據電腦輔助設計之三維模型，將特定材料逐層堆疊形成一功能元件，或針對特殊形狀或功能進行客製化，可有效增加設計自由度及減少製程中材料浪費(Mukherjee, 2021)。近年來，各界不斷提倡綠色製程或綠色化學方法，在 3D 列印領域中也試著引入可生物降解或環境友善之材料，如：聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)(Vidakis et al., 2024)、殼聚糖(Rodrigues et al., 2012)、纖維素(Jiang et al., 2021)等。此外，科學家們也試著在污染物處理上結合 3D 列印方法，如廢水處理薄膜(Akowanou et al., 2019)、空氣品質監測器(Salamone et al., 2015)等。

3D 生物列印(3D Bioprinting)技術是一種利用細胞、生物材料等所製成之生物墨水(Bioink)，逐層堆疊出仿真 3D 生物組織，目前多應用在藥物開發或再生醫學等領域(Raees et al., 2023)。其優勢在於能夠模擬複雜組織結構、降低人工組織製造成本並能配合不同 Bioink 及列印方式，客製化生物性材料產製(Züger et al., 2023)。因此，科學家們正針對不同領域，研究最佳化生物列印法，並試著找出最適 Bioink 比例以及列印技術種類(Ginestra et al., 2020)。

此外，3D 生物列印技術也被應用於酵素固定化領域中，如 Liu 等人將漆氧化酶加入含有海藻酸鈉與丙烯醯胺之生物墨水中，並利用擠出型 3D 生物列印達成酵素固定化。結果表明固定化酵素提高了整體環境適性，並在 72 小時保存後，保留了約 80%活性，相較於游離型酵素提升了 4 倍(Liu et al., 2020)；Y. Shao 等人將 β -半乳糖苷酶放入含有 PLA、PEI 及 EDC/NHS 交聯之生物墨水中進行 3D 生物列印，在 6 次循環後仍保有 90.5%活性，表現良好固定化穩定性(Y. Shao et al., 2024)。由此可見，3D 生物列印技術對生物材料具有相容性外，在固定化上也能有效提高酵素性能，包埋型的固定方式也能減少對酵素結構的破壞，適合應用於酵素固定化領域中(Remonatto et al., 2023)。

2.4.2 列印技術種類

原料的多樣性與列印技術的相互搭配造就了 3D 生物列印的客製化優勢。在學術研究上，除生物墨水的最適配比研究外，科學家們也專注於列印技術與生物材料之適性研究。常見生物列印技術包含光固化技術(Stereolithography, SLA)、雷射輔助列印(Laser-Assisted Bioprinting, LAB)、噴墨型生物列印(Inkjet-based bioprinting, IBB)、擠出型生物列印(Extrusion-based Bioprinting, EBB)(Qureshi et al., 2025)。

(1) 光固化技術

SLA 是利用特定波長之紫外光或可見光，使光敏感性之材料結構間形成鍵結，達到材料固化效果並逐層堆疊成 3D 結構。此法具有列印結構強度高、列印時無剪切壓力且固化速度高等優勢，常用於高精度微組織之結構製造(Bagheri & Jin, 2019)。

文獻中，如同 Xu 等人使用聚乙二醇二丙烯酸酯(Poly (ethylene glycol) diacrylate, PEGDA)及 PVA 所組成之光敏性生物墨水固定化漆酶，達到平均 1.8 分鐘/個固定化酵素的生產率，固定化效率達到 75%以上且在 18 次循環使用後仍保持 83.0%酵素活性(Xu et al., 2022)。SLA 技術對生物性材料具備良好的列印適性，能精準成形細緻結構。然而，光固化反應所需的光敏劑具有一定的生物毒性，且紫外光照射可能對活細胞或微生物產生活性抑制作用。因此，在進行活體細胞或微生物固定時，必須謹慎選擇光固化的環境條件與試劑配方，以避免光固化過程對生物活性造成不良影響。

(2) 噴墨型生物列印

IBB 是透過熱氣泡生成或是壓電材料震動產生動力，推動生物墨水自噴頭射出，滴至目標接收板上形成特定結構。其優勢在於列印速度快、設備成本低且列印解析度高(Ozbolat & Yu, 2013)。D. Zhang 等人將一種丙酮酸氧化酶結合奈米碳管及多種交聯劑，試著保有電化學性能的同時增加結構穩定性(D. Zhang et al., 2024)。由於使用 IBB 需要確保生物墨水流動性，所適用材料黏度範圍小，且可能導致產品結構穩定性不佳。此外，生物材料可能因噴頭溫度過高或噴射至接收板所產生之衝擊而導致結構損壞(Sun et al., 2020)，IBB 較不適用於高環境敏感性之列印原料。

(3) 雷射輔助列印

LAB 分為吸收層及接收層，吸收層上置有生物墨水，當吸收了高能脈衝雷射後，產生墨水微滴噴射至特定接收板上，似噴墨型生物列印技術。LAB 所產生之微滴最小可達皮米等級，列印解析度高且適用於高黏度之生物墨水，同時解決傳統噴墨型之噴頭堵塞問題。Xiong 等人嘗試以 LAB 進行細胞列印，保存了約 77.1%活性(Xiong et al., 2017)。然而，透過 Xiong 等人的研究，可以看出生物墨水對雷射能量的吸收、噴墨速度以及撞擊接收板的緩衝性等因素，皆可能影響列印效果。此外，儘管 LAB 是一種高解析度的列印技術，金屬吸收層之毒性殘留(Zhigarkov et al., 2021)以及設備成本過高仍是一大困境。

(4) 擠出型生物列印

EBB 是利用氣動、活塞擠壓等方式，將材料自噴頭擠出成形。因形狀可控性佳、成本低、操作簡易且適合高黏度墨水等優勢，使得 EBB 技術成為目前生醫領域最常見的製造技術。EBB 技術具備高度的材料適用性，能與多種不同材質的墨水相容使用，從而實現產品的多樣化與功能拓展。Khaled 等人利用 EBB 結合纖維素材料，打造一種緩釋藥物之 3D 結構。透過對釋放動力學之研究，此種結構展現出兩種不同釋放機制並同時對 3 種不同藥物達到緩釋效果(Khaled et al., 2015)。另外，在 Schmieg 等人的研究中，他們試著以 EBB 方式結合材料光固化開發一種適用於多種酵素的固定化方式，展現 EBB 應用於酵素固定化之可行性(Schmieg et al., 2019)。作為一種依靠機械應力的生物列印技術，EBB 噴頭擠壓可能對墨水帶來強剪切力，使得材料失活，且因列印解析度較低。

儘管 EBB 並不能表現高列印解析度，其仍然展現良好列印速度、低設備成本及結構可控性。此外，由於 EBB 適用高黏度墨水，使得產品機械强度高，能良好打造多孔材料，減少包埋所造成之質傳屏障。本研究採用結合 EBB 與光固化技術的 3D 生物列印方法，嘗試將 CA 固定於生物墨水所構築的交聯結構中，以提升酵素的重複使用性與保存穩定性。

第三章 材料與方法



3.1 實驗藥品及設備

3.1.1 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品清單

藥品中文名稱	化學式	廠牌
碳酸酐酶	$\text{ZnOH}(\text{His})_3 (\geq 95\%, \geq 3500 \text{ W-A unit})$	Sigma Aldrich
三羥甲基氨基甲烷	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	Sigma Aldrich
三羥甲基氨基甲烷	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2 \cdot \text{HCl}$ ($\geq 99.5\%$)	Amresco
硝基苯基乙酸脂	$\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	Thermo Fisher Scientific Chemicals
對-硝基苯酚	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$	Thermo Fisher Scientific Chemicals
乙腈	CH_3CN	Merck
聚乙二醇二丙烯酸酯	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	Double Bond Chemical Industries
聚乙烯醇	$\{-\text{CH}_2\text{CHOH}-\}_n$ (86-89%)	帝一化工
海藻酸鈉	$\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_4\text{COONa}$	Sigma Aldrich
偶氮光敏劑	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$	Fujifilm
奈米二氧化矽	$\text{SiO}_2 (\geq 99.8\%)$	UniRegion Bio-Tech
氯化鈣二水合物	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (>99\%)$	Thermo Fisher Scientific Chemicals



酒精	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (95%)	景明化工
碳酸鈣	CaCO_3 (>98%)	Nacalai Tesque
氫氧化鈉	NaOH (100%)	Honeywell FLUKA
磷酸緩衝液	PBS (10X)	UniRegion Bio-Tech
硫酸	H_2SO_4 (95-97%)	Sigma Aldrich
鹽酸	HCl (35-37%)	Honeywell FLUKA
磷酸	H_3PO_4 ($\geq 85.0\%$)	Avantor
過氧焦硫酸鈉	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($\geq 99\%$)	Honeywell FLUKA
無水碳酸鈉	Na_2CO_3 (>99.8%)	日本試藥
碳酸氫鈉	NaHCO_3 (>99.6%)	日本試藥
二氧化碳	CO_2 (>97%)	清豐行
氮氣	N_2 (99%, 99.9995%)	瓏碳前氣體

3.1.2 實驗設備

表 3-2 實驗儀器設備清單

設備名稱	型號	廠牌
電子天秤	ATX224	SHIMADZU
抽氣櫃	訂製品	章嘉
純水機	Milli-pore	Milli-Q
超音波振盪器	5800	BRANSON
製冰機	FM-120K	HOSHIZAKI
3D 列印機	Crealty Ender-5	創想三維
冷藏櫃	NR-B486GV	Panasonic
低溫冷凍櫃	LSC-20	FRIGIDAIRE
冷凍乾燥機	COLE-PARMER	LABCONCO
多點式電磁攪拌器	MIX 15 eco	2mag
無油式真空泵	Rocker 300	RONE
質量流量控制器讀出電源	PC-540	PROTEC
氣體質量流量控制器	5850E	BROOKS INSTRUMENT
手提式 pH 計	HQ2200	HACH
分光光度計	DR 3900	HACH
試管振盪器	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
烘箱	DO-45	DENG YNG
高溫爐	JH-4	章嘉
場發射掃描式電子顯微鏡	JSM-7600F	JEOL
傅立葉轉換紅外線光譜儀	Frontier FT-IR Spectrometer	PerkinElmer



氣相層析儀	GC1000TCD	中國層析科技
離心機	UNIVERSAL 320	Hettich
熱重分析儀	TGA-51	SHIMADZU
奈米氣泡產生裝置	GB1610	廣鴻精密科技
總有機碳分析儀	Aurora 1030D	Xylem



3.2 3D 生物列印

3.2.1 3D 生物列印機及列印參數設計

本實驗使用改機後之 Creality Ender-5 列印機進行酵素固定化，如下圖 3-1 所示。硬體設備調整如下，包含：(1)為同時擠出生物墨水及固化材料，設計同軸針頭以取代原有加熱噴頭；(2)同軸內外管線分別連接針管，以負載不同材料；(3)在同軸針頭上加裝藍光 LED 燈（波長：388 nm），以達到材料光固化效果；(4)自列印程式碼中刪除噴頭之加熱程序。列印前，先以 Solidworks 軟體繪製目標 3D 模型，接著將檔案導入 Ultimaker Cura 軟體中進行切片及列印參數調整。3D 生物列印之參數詳列於下表 3-3。

表 3-3 3D 列印機參數

列印參數	數值
內外針擠出速率(內針：外針)	0.8：0.2
列印速度(mm/s)	6-8
擠出流速(%)	75
填充率(%)	40
層高(mm)	0.12
列印樣式	直線(90 度垂直)

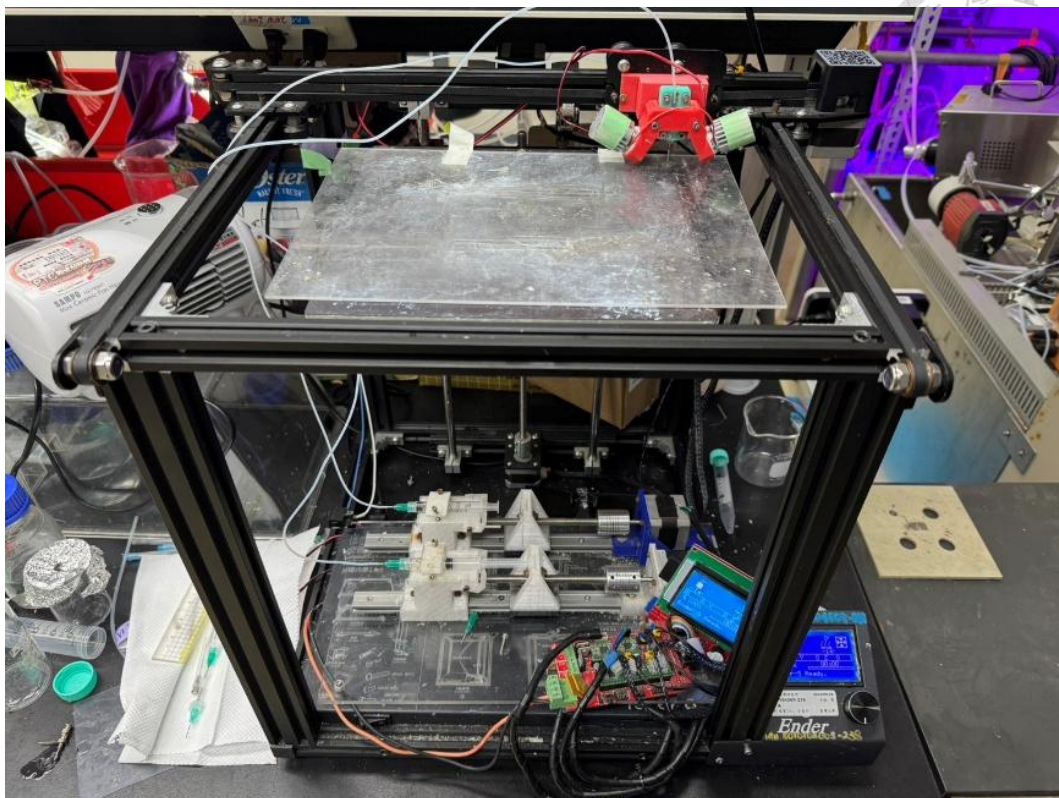


圖 3-1 3D 生物列印機

3.2.2 生物墨水製備

同軸內針裝有生物墨水，是由交聯分子、光引發劑、光固化骨架及碳酸酐酶所組成之高分子溶液，並於當次列印前才配置所需生物墨水，以避免材料變質或酵素失活。生物墨水含有聚乙醇醇(PVA)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、偶氮二甲基 N-2-羥丁基酰胺(VA-086)、海藻酸鈉(SA)、碳酸酐酶(CA)及 40 nm 奈米二氧化矽 (SiO₂ Nanoparticles, Si-NPs)，材料的詳細配比如表 3-4 所示。本研究依據酵素負載量的不同，對樣品進行命名，相關名稱整理於表 3-5 中。同軸外針填充有 2%氯化鈣溶液，並預先以 0.22 μm 針筒過濾器過濾，用於高分子骨架交聯。以下為生物墨水配置步驟：

1. 以清水洗淨容器及攪拌棒，接著使用 75%酒精擦拭器材表面
2. 依照下表材料排列，依序加入燒杯中，同時使用攪拌棒慢速混勻材料
3. 使用超音波震盪機對生物墨水進行除氣
4. 加入 40 nm 二氧化矽後進行混勻

5. 使用保鮮膜蓋住燒杯口以避免材料變質

表 3-4 生物墨水成分

	藥品	添加量	最終濃度
1	PEGDA	4 mL	20%
2	PVA (16.66 wt%)	9 mL	7.5%
3	VA-086	0.04 g	0.2%
4	SA	0.8 g	4%
5	CA solution	7 mL	0.0065%-0.04%
6	SiO ₂ (40 nm)	3 g	12%
	總量	20 mL	-
外針	CaCl ₂ solution	-	2%

表 3-5 固定化酵素樣品名稱

樣品名稱	BK-3D	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
酵素負載量 (mg/carrier)	0	0.010	0.020	0.032	0.064
酵素負載量 (mg/g carrier)	0	0.028	0.053	0.086	0.171

3.2.3 生物列印操作步驟

本研究使用擠出型 3D 列印機，並於室溫下(25°C)進行列印操作，載體實體圖如下圖 3-2 所示。此外，列印平台上方無遮罩，屬於開放式的列印環境。為防止列印中途污染，列印前使用 75%酒精清潔管線、同軸針頭及列印平台，並於列印操作時以酒精消毒後之鋁箔覆蓋於平台上方。列印後，將管線及同軸針頭浸入 75%酒



精內，並以超聲波震盪清洗，避免生物墨水殘留於管線內部。以下為生物列印操作流程：

1. 列印前清洗

- (1) 開機：開啟電源後，使用面板上旋鈕操作選單，依 prepare>move axis>move Z>move 10mm 順序操作，使平台下降約 190 mm (250 mL 燒杯高度)。將一燒杯置於擠出頭下方。
- (2) 洗針：使用 3 mL 針筒吸取 DI 水並導入管線內，擠壓迫使針筒內 DI 水排空，並重複動作 3-4 次直至管線內無酒精殘留。接著以針筒吸取空氣，反覆多次直到管線內水分排空。
- (3) 填料：使用清洗完成後之針筒吸取生物墨水(外針筒吸取 2% 氯化鈣溶液)後，固定於針筒架上，並以手動方式緩慢朝管線內擠入材料至滿管。填料時，需排空管線內氣泡，避免影響列印品質。

2. 生物列印

- (1) 針頭復位：將燒杯取下，並使用面板旋鈕依 prepare>auto home 操作，使針頭回到儀器所設定之原點。
- (2) 列印：使用面板旋鈕，選擇 print from SD，並選取模型檔案，即開始生物列印程序。列印時，開啟藍光 LED 燈，並將鋁箔紙覆蓋於列印平台上方，防止落塵。
- (3) 樣品取件：自樣品上方滴加數滴氯化鈣溶液，使其進一步固化。接著將樣品鏟起，放置於塑膠培養皿內保存。

3. 列印後清潔

- (1) 排空填料：將針筒排空並填入 DI 水，朝向管線內擠入使得管線內剩餘墨水完全排出，並使用 DI 水及 75% 酒精分別潤洗 3-4 次。
- (2) 管線拆卸：將同軸針頭、管線及針筒拆下，泡入 75% 酒精內以超聲波震盪清洗 30 分鐘，浸泡至下次使用。

(3) 關機：使用面板旋鈕依 prepare>auto home 操作，將針頭復位後關閉電源。

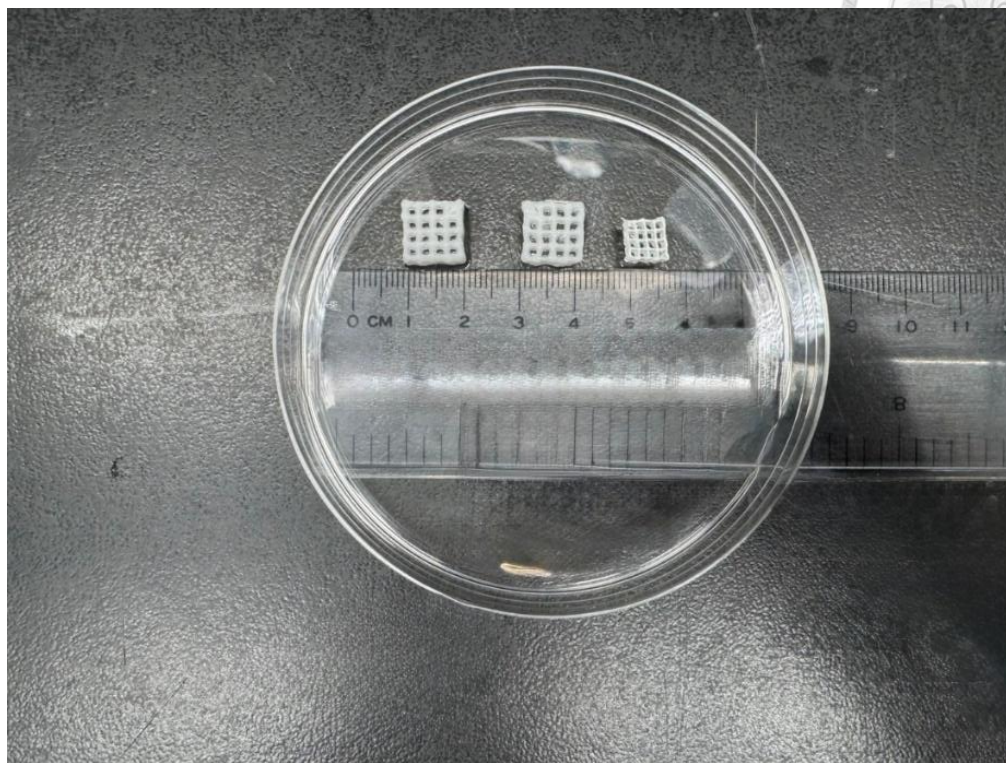
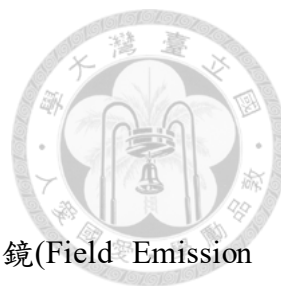


圖 3-2 3D 列印材料實體圖 BK-3D(左) CA-3D-4(中) 乾燥後 BK-3D(右)



3.3 材料特性分析

3.3.1 表面型態分析

本研究使用臺大貴重儀器中心之場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)進行樣品表面分析，如下圖 3-3 所示，並配合能量散射光譜儀(Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS)分析樣品表面元素分布。利用 SEM 觀察固定化酵素之表面，可用於推估生物墨水所構築之 3D 列印骨架交聯及酵素接枝情形。透過 EDS 分析碳、氮、氧、鋅等元素，比較 3D 列印骨架與固定化酵素樣品之組成，初步估計酵素固定情形。測試前，以冷凍乾燥方式進行樣品預處理，並於表面濺鍍鉑金。測試時，以 1000 及 5000 倍放大倍率觀察樣品表面型態。



圖 3-3 掃描式電子顯微鏡

(圖片來源：國立台灣大學貴重儀器中心)

<https://www.hic.ch.ntu.edu.tw/EM%E5%8C%96/em1.html>)

3.3.2 表面官能基分析

本研究使用衰減式全反射傅立葉轉換紅外光譜儀(Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR-FTIR)進行樣品表面官能基之定性分析，如下圖 3-4 所示。紅外光在晶體上的反射情形，會隨著樣品上之官能基分布而有所差異，並反映於圖譜中，使得不同波數下有相對應之官能基。透過 FTIR 分析，可以清楚辨識酵素固定化前後樣品的結構差異，藉此確認酵素的負載情形及固定化效果。FTIR 能透過檢測樣品中官能基的變化，揭示酵素與載體間的鍵結形成與化學交互作用，進而驗證酵素是否成功固定於載體表面以下為測試步驟：

1. 載體與固定化酵素樣品預先以冷凍乾燥方式去除水分，並保存於防潮箱內。
2. 測試前，將載體以剪刀切成塊狀形式。
3. 生物墨水材料多以粉末形式測量，唯 PEGDA 為濃稠膠體，預先結合 VA-086 在 388 nm 藍光下進行光固化，待其固化成塊後自然風乾過夜。
4. 測試時，將樣品鋪滿 ATR 組件上之紅外光視窗，並將上方壓力臂下壓固定樣品。
5. 每次分析皆設定 16 次掃描，波數範圍設定為 650 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} 。



圖 3-4 ATR-FTIR 機台實體圖



3.3.3 酵素活性分析

本研究使用兩種常用於檢測 CA 酵素活性之方式，分別是脂酶法(Esterase method)及水合酶法(Hydratase method)。脂酶法是利用 CA 促進對硝基苯酚乙酸酯(*p*-Nitrophenyl acetate, *p*-NPA)水解之原理，並使用比色法量測水解產物。水合酶法是一種直接量測 CA 催化活性之方式，透過 CA 對水中溶解性 CO₂ (CO_{2(aq)})之轉換，量測水中酸鹼值對時間關係以代表酶活性(Wilbur & Anderson, 1948)。此兩種方式皆能達到檢測 CA 活性之效果，然而，有文獻顯示脂酶法較易受環境因子影響，相對適合檢測酵素本身性質對酶活性之影響，如酸鹼度、中心離子種類、酵素結構等。另外，以電化學方式檢測之水合活性較精準反映酵素催化活性，因其檢測方式是直接對酵素催化機制進行量測(Effendi & Ng, 2019)。

(1) 酯酶法(Fei et al., 2015)

1. 預先配置 0.05 M TRIS 緩衝液，並調整 pH 值至 8，作為酵素反應之基質溶液。
2. 另置備 1mM 硝基苯酚酯(*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)，以乙腈作為溶劑，作為呈色劑使用。
3. 量測游離態酵素時，將酵素溶液調整至 0.1 mg/mL。
4. 以移液器將 0.3 mL 游離態酵素溶液加入至 2.4 mL TRIS 緩衝液中，最後加入 0.3 mL *p*-NPA 溶液，使反應體積控制為 3mL。
5. 對於固定化酵素，則將一片固定化酵素樣品加入 2.7 mL TRIS 緩衝液中，接著以移液器加入 0.3 mL *p*-NPA 溶液反應。
6. 以分光光度計測量上述溶液在 400 nm 波長下的吸光值，並分別在 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 分鐘下進行紀錄，作為後續酵素活性計算使用。
7. 酵素活性使用以下公式進行量化及相對活性計算：

$$\text{脂酶活性(U/mg CA)} = \frac{\Delta C \times V}{\Delta t \times W} \quad (3-1)$$



ΔC ：反應生成之 p-NP 濃度差(μM)

V ：反應總體積(3 mL)

Δt ：反應時間差

W ：反應酵素總量(mg)

$$\text{相對活性 (\%)} = \frac{A_{e, \text{ experimental}}}{A_{e, \text{ estimated}}} \quad (3-2)$$

$A_{e, \text{ experimental}}$ ：固定化酵素實際活性(U/mg CA)

$A_{e, \text{ estimated}}$ ：純酵素實際活性(U/mg CA)

(2) 水合酶法(Yang et al., 2025)

1. 預先準備二氧化碳飽和水，準備 200 mL 去離子水，在 0-4 °C 下，使用固定流量下之二氧化碳氣體，預曝氣約 30 分鐘。
2. 另配置 0.02 M TRIS 緩衝液，在 4°C 下，以 2N 硫酸調整 pH 值至 8.3。
3. 整體實驗操作於 0-4 °C 之冰浴中。
4. 測定純酵素時，在 9 mL TRIS 緩衝液中加入 0.1 mL 酵素溶液(2 mg/mL)，而測定固定化 CA 時，則是加入一片固定化酵素。另外，控制組則是加入 0.15 mL DI 水。
5. 加入 6 mL 之二氧化碳飽和水至上述溶液中。
6. 反應時，測量混合液從 pH 8.3 下降至 pH 6.3 所需時間並記錄之。
7. 以此法所得之活性可使用以下公式量化：

$$\text{水合酶活性(WAU/mg CA)} = \frac{(T_b - T)}{T} \times \frac{DF}{V} \quad (\text{游離態 CA}) \quad (3-3)$$

$$\text{水合酶活性(WAU/g)} = \frac{(T_b - T)}{T} \times \frac{1}{M} \quad (\text{固定化 CA}) \quad (3-4)$$

$$\text{比活性(WAU/mg CA)} = A_w, i \times EL \quad (3-5)$$

T_b ：控制組實驗，自 pH 8.3 下降至 6.3 所需時間(second)

T ：酵素參與後，自 pH 8.3 下降至 6.3 所需時間(second)

DF ：反應總體積/酵素液體積(mL/mL)



V：酵素液體積(mL)

M：載體重量(經抽樣 3 次平均後得 0.374 g)

EL：酵素負載量 = 酵素量/載體重(mg CA/g carrier)

3.3.4 固定化酵素之環境條件最佳化試驗

酵素活性與環境酸鹼值與酵素存活溫度息息相關，已經證實不同種類酵素或是使用不同固定化方式之酵素，在特定 pH 值或溫度環境下才能表現出最佳活性。本研究參考 Fei 等人之檢測方法(Fei et al., 2015)，酸鹼度試驗整體實驗操作於室溫 25°C 下，將純酵素以及固定化酵素完全浸泡至特定 pH 值之溶液中，再利用酯酶法對不同 pH 環境下的酵素樣品進行活性測定。以下為酸鹼值最佳化試驗流程：

1. 配置不同 pH 值溶液，以模擬不同酸鹼值環境，如下表 3-6 所示。

表 3-6 酸鹼溶液配置

pH 值	配置溶液
3	0.01M HCl
5	0.1M TRIS-HCl
7	0.1M PBS buffer
9	0.05M TRIS buffer
11	0.01M NaOH

2. 將 CA 置於上述溶液中溶解，使其成為游離態，濃度保持為 0.1 mg/mL，並浸泡 4 小時以模擬酸鹼環境。
3. 取一片固定化酵素放入 10 mL 上述不同 pH 值之溶液中浸泡 4 小時。
4. 以酯酶法測試固定化酵素活性並記錄之。下式為相對活性計算式：

$$\text{相對活性(\%)} = \frac{A_{\text{pH}}}{A_{\text{pH, max}}} \quad (3-6)$$

A_{pH} ：每個樣品在設定的 pH 範圍中，所表現的脂酶活性(U/mg CA)

$A_{\text{pH, max}}$ ：每個樣品在設定的 pH 範圍中，最大的脂酶活性(U/mg CA)



溫度最佳化測試則操作在 PBS (pH=7) 溶液中，以下為實驗步驟：

1. 將 PBS 溶液預先放置於 25°C、35°C、50°C、70°C 環境中調適溫度，模擬常溫、中溫、高溫等情形。
2. 將 CA 置於上述溶液中溶解，使其成為游離態，濃度保持為 0.1 mg/mL，並浸泡 4 小時以模擬不同溫度環境。
3. 取一片固定化酵素放入 10 mL 上述不同溫度之 PBS 溶液中浸泡 4 小時。
4. 以酯酶法測試固定化酵素活性並記錄之，以下式計算相對活性。

$$\text{相對活性 (\%)} = \frac{A_{eTemp}}{A_{eTemp, max}} \quad (3-7)$$

A_{eTemp} ：每個樣品在設定的溫度範圍中，所表現的脂酶活性(U/mg CA)

$A_{eTemp, max}$ ：每個樣品在設定的溫度範圍中，最大的脂酶活性(U/mg CA)

3.3.5 保存性測試

本研究使用濕式(Fei et al., 2015)及乾式兩種保存條件對固定化酵素進行試驗，旨在研究不同保存條件下，固定化 CA 是否能適應環境並長期保持活性。下表 3-7 說明了本研究所採用的兩種保存方式及其設計條件。。在乾式及濕式保存下實驗期程中，第 0、4、7、14 天分別取樣並以水合酶法測試活性，以下為保存性測試之操作條件及相對活性計算公式：

$$\text{相對活性 (\%)} = \frac{A_{wDays}}{A_{w, 0}} \quad (3-8)$$

$A_{w, 0}$ ：固定化樣品原始活性(WAU/g)

A_{wDays} ：固定化樣品於第 0、4、7、14 天之活性(WAU/g)

表 3-7 保存性測試條件

保存方式	濕式保存	乾式保存
保存基質	0.05M TRIS 緩衝液 (pH=8.5)	置於乾燥箱內
保存溫度	25°C	



另外，本研究使用 Real Statistics 增益集中之獨立樣本 T 檢定(Independent samples T-Test)，試著探討 14 天後乾式及濕式保存結果兩個獨立群組中的平均數差異。在 T-Test 分析中，以 p 值(p-value)來判斷觀察到的數據結果在虛無假設成立的前提下的出現機率。當 T-Test 中 p-value 越小(<0.05)，代表觀察到的結果有較大機率不是隨機事件，因此提供了拒絕虛無假設的較強證據。此二組數據需同時具備常態分佈、變異數齊一性及獨立事件三項標準，以下為分析步驟：

1. 使用 Shapiro-Wilk Test 分析兩筆數據是否具備常態分布，當 p-value>0.05 則表示具備常態分布特性。
2. 使用 Levene's Test 測試兩筆數據之變異數是否具備齊一性，當 p-value>0.05 則表示具備變異數齊一性。
3. 使用 T-Test 對兩筆數據進行差異性分析，並選擇 Two independent samples，假設兩筆數據間為獨立事件，當 p-value<0.05 則表示此二筆數據具有顯著差異性。

3.3.6 重複性測試

在固定化酵素的應用上，常測試材料之重複使用性，以表示材料耐用性。本研究參考 Wang 等人之研究(Wang et al., 2024)，以水合酶法測試酵素活性，並將測試活性後的固定化 CA 浸入 PBS 溶液(pH=7)中，經過 10 分鐘後再次取出測試酵素活性，共進行 6 次活性測試循環。以下為相對活性計算公式：

$$\text{相對活性 (\%)} = \frac{A_{w, \text{reuse}}}{A_{w, 0}} \quad (3-9)$$

$A_{w, 0}$ ：固定化樣品原始活性(WAU/g)

$A_{w, \text{reuse}}$ ：固定化樣品於 0-6 次循環後之活性(WAU/g)



3.4 固碳實驗

3.4.1 直接注入式反應槽

以 114 mL 厭氧血清瓶作為反應容器，將生物列印出的酵素載體置入含有 30 mL DI 水的厭氧瓶中，並操作在 200 rpm 動態環境中增加固碳效率。為使容器內充滿 CO_2 並維持反應於 1 大氣壓下進行。先使用抽氣泵將瓶內氣體將空氣抽出，透過質量流量控制器調節氣體流量，導入定量 CO_2 氣體。反應完成後將液體取出保存，以利後續分析水中無機碳及碳酸鈣沉澱測試，氣體部分則以 1 mL 氣針抽出，使用 GC-TCD 進行氣體分析。反應流程如下圖 3-5 所示：

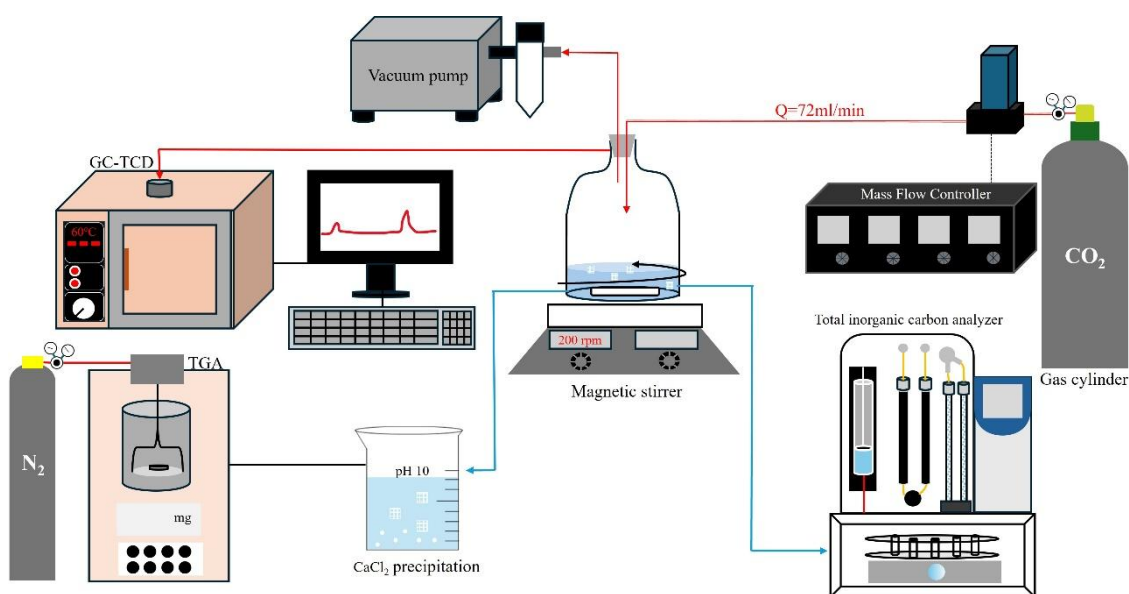


圖 3-5 直接注入式反應槽

在此類型反應槽中，設置了抽氣系統，預先將瓶內氣體抽空後，再將 CO_2 氣體灌入達成置換效果。實驗所使用之真空泵最大真空度為 99 mbar， CO_2 氣體純度約為 97%，經計算後，瓶內初始 CO_2 濃度為 87.3% (v/v)。

3.4.2 微奈米氣泡反應槽

將定壓(20 psi) CO_2 輸入微奈米陶瓷模組中，總曝氣時間為 1 小時，溶液體積約為 20 L，預先製備出 CO_2 奈米氣泡溶液。設置 114 mL 厭氧血清瓶作為反應容器，將生物列印出的酵素載體置入含有 CO_2 氣泡水的厭氧瓶中，並操作在 200 rpm

動態環境中增加固碳效率。反應後保存水樣，以利後續水中無機碳及碳酸鈣沉澱測試進行。反應流程如下圖 3-6 所示：

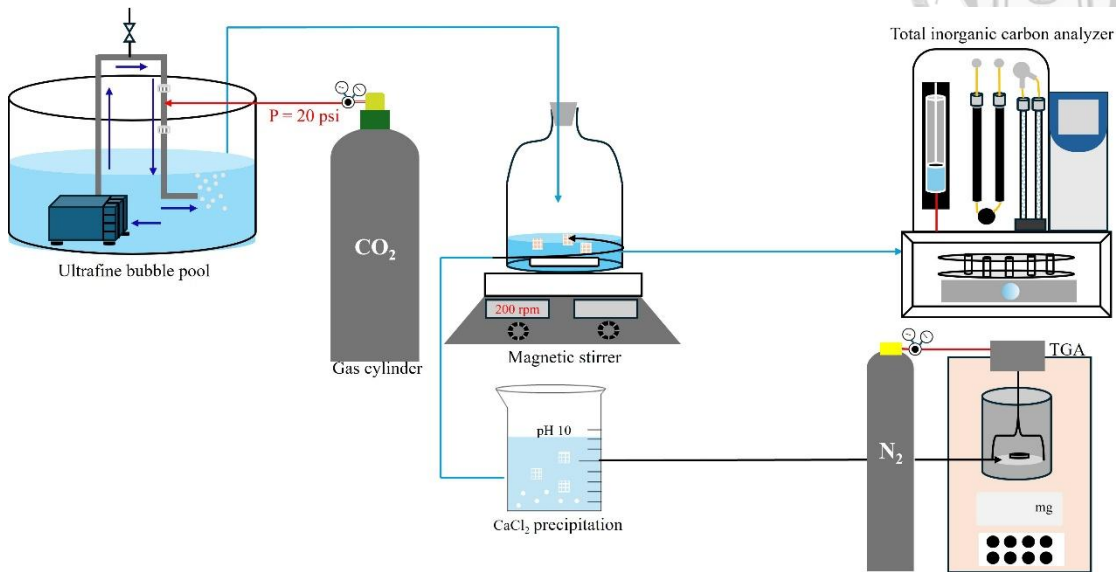


圖 3-6 奈米氣泡式反應槽

3.4.3 氣體分析

為確認固定化酵素之固碳效率，本研究使用氣相層析儀(Gas Chromatography-Thermal Conductivity Detector, GC-TCD)分析反應槽頂空 CO₂ 剩餘量，試著推估溶解於水中的 CO₂ 量。進樣時以 1 mL 氣針操作，每次進樣 0.2 mL 氣體樣品，並利用峰面積及進樣體積估算氣體濃度。下表 3-8 為本研究所使用之氣相層析條件：

表 3-8 氣相層析條件

目標氣體	CO ₂
停留時間	5.5 min
偵測器	Thermal Conductivity Detector
管柱	材料 Stainless steel
	型態 Packed column
	填充物 60/80 Carboxen-1000 support
	長×外徑×內徑 4 ft × 1/8 in × 2.1 mm



載流氣體	He	
溫度條件	Injector	60°C
	Detector	60°C
	Oven	50°C

為精確計算氣體反應量，以理想氣體方程式為基礎進行計算，下式 3-10 至 3-13 為氣體反應量計算公式：

$$V_{\text{total, react}} = \frac{(0.2 - V_{\text{rest}})}{0.2} \times V_{\text{total}} \quad (3-10)$$

$$\rho = \frac{P_{\text{rest}} \times 44 \text{ g/mol}}{0.082 \times 298.15} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \quad (3-11)$$

$$\text{比固碳量 (mg CO}_2\text{/mg CA)} = \frac{V_{\text{total, react}} \times \rho}{W_{\text{CA}}} \quad (3-12)$$

$$\text{固碳量 (mg CO}_2\text{/g carrier)} = \frac{V_{\text{total, react}} \times \rho}{M} \quad (3-13)$$

$V_{\text{total, react}}$ ：氣體反應總量(mL)

V_{rest} ：槽內剩餘氣體量(mL)

V_{total} ：槽內氣體總量(mL)

ρ ：氣體質量指數(mg/mL)

P_{rest} ：槽內剩餘氣壓(atm)

W_{CA} ：酵素重量(mg)

3.4.4 水中總無機碳分析

為定量分析固定化酵素固碳反應後水樣中的碳酸根及碳酸氫根含量，本研究參考環境部公告之水中總有機碳檢測方法—過氧焦硫酸鹽加熱氧化／紅外線測定法(環境部, 2024)進行檢測。檢測過程中，進樣體積設定為 20 mL，氧化劑採用 10% 過氧焦硫酸鈉溶液，酸化劑使用 95% 濃磷酸，載流氣體則為高純度氮氣。以下為總無機碳分析(Total Inorganic Carbon, TIC)詳細操作步驟：



1. 預先配製氧化劑、酸化劑及無機碳標準液(0.5-10 ppm)，並使用 0.45 μm 過濾所
有待測樣品。
2. 以超純水清洗進樣針筒及加熱風扇管線 3 次。
3. 以酸化劑及氧化劑潤洗管線 3 次。
4. 設定進樣序列，並依照進樣盤順序放置樣品。
5. 開始進樣，待其分析程序結束後，再以 DI 水進行管線清洗。

本研究使用碳酸根系統中之平衡常數進行粗略估計，計算水中碳酸、碳酸氫根、碳酸根之分布情形，以下為估算公式：

$$[\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3]=\alpha_0\times\text{C}_{\text{TIC}} \quad (3-13)$$

$$[\text{HCO}_3^-]=\alpha_1\times\text{C}_{\text{TIC}} \quad (3-14)$$

$$[\text{CO}_3^{2-}]=\alpha_2\times\text{C}_{\text{TIC}} \quad (3-15)$$

$$\alpha_0=\frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^2+K_{a1}[\text{H}^+]+K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha_1=\frac{K_{a1}[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2+K_{a1}[\text{H}^+]+K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha_2=\frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}^+]^2+K_{a1}[\text{H}^+]+K_{a1}K_{a2}}$$

C_{TIC} ：總無機碳濃度(mg C/L)

$$K_{a1}=4.5\times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

$$K_{a2}=4.7\times 10^{-11} \text{ mol/L}$$

3.4.5 碳酸鈣沉澱分析

碳酸鈣沉澱法常被用來評估碳捕捉效率。此方法透過向碳酸溶液中通入氯化鈣，並調控溶液的 pH 值以促進鹼性沉澱反應，進而生成碳酸鈣沉澱物。對於沉澱產物的分析，定性部分通常採用熱重分析儀進行，藉由熱重曲線的變化推估產物組成。操作前，為確保去除產物中雜質，預先使用離心機進行產物和溶劑相分離以 6000 rpm 離心 3 分鐘，倒出上清液，再使用超純水重新懸浮，重複上述步驟清洗

三次。參數設定上，以 10 °C/min 的升溫速率，自 50 °C 升溫至 900 °C。下表 3-9 為詳細操作參數：

表 3-9 熱重分析操作參數

目標物質	CaCO ₃
秤盤	Platinum
樣品量	10-20 mg
載流氣體	N ₂
溫度區間	50-900 °C
升溫條件	10 °C/min

而定量上使用重量分析，參考 Shamna 等人之研究(Shamna et al., 2021)，以 0.22 μm 濾紙對鹼性沉澱後之反應槽溶液進行抽濾，並於抽濾前後量取濾紙重量差，用以表示碳酸鈣產生量。以下為操作流程：

1. 自兩種反應系統中取 10 mL 之溶液。
2. 加入 10 mL 之 4% 氯化鈣溶液(0.5M TRIS 緩衝液(pH=10))至曝氣後之溶液中，以產生碳酸鈣沉澱。
3. 架設抽濾設備，並裝載 0.22 μm 玻璃纖維濾紙。
4. 預先以 DI 水潤洗濾紙 3 次，並放入 105 °C 烘箱內乾燥至恆重。
5. 取 15 mL 液體樣品倒入抽濾容器中，待濾紙下方出口不再流出濾液後，再以 DI 水沖洗固體樣品表面多次，以確保沒有氯離子殘留。關閉抽氣泵並收集濾紙。
6. 將抽濾後的濾紙放入 60 °C 烘箱內乾燥過夜，紀錄重量並計算碳酸鈣產生量。
7. 碳酸鈣產出量公式：

$$Y = M_{f, \text{ after }} - M_{f, \text{ before }} \quad (3-16)$$

$$Mc = \frac{Y}{M} \quad (3-17)$$



$$M_{\text{react}} = \frac{Y}{W_{\text{CA}}} \quad (3-18)$$

Y：碳酸鈣產生量(mg)

$M_{f, \text{ after}}$ ：濾紙抽濾後重量(mg)

$M_{f, \text{ before}}$ ：濾紙抽濾前重量(mg)

M_c ：每單位固定化 CA 所產生之碳酸鈣沉澱量(mg $\text{CaCO}_3/\text{g carrier}$)

M_{react} ：比沉澱量，每單位 CA 所產生之碳酸鈣沉澱量(mg $\text{CaCO}_3/\text{mg CA}$)

8. 理論沉澱量計算

以常溫下 CO_2 的亨利定律常數進行換算，在直接注入式反應槽中， CO_2 分壓約為 0.873 atm；而在奈米曝氣式系統中， CO_2 曝氣分壓則提升至約 0.97 atm。操作過程中，取用 10 mL 反應槽內液體進行沉澱分析。計算過程如下式 3-19 及 3-20 所示。

(1) 直接注入式

$$3.3 \times 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{L} \times \text{atm}} \times 44000 \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \times \frac{100}{44} \times 0.873 \text{ atm} \times 0.01 = 28.8 \text{ mg} \quad (3-19)$$

(2) 奈米曝氣式

$$3.3 \times 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{L} \times \text{atm}} \times 44000 \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \times \frac{100}{44} \times 0.97 \text{ atm} \times 0.01 = 32 \text{ mg} \quad (3-20)$$



第四章 結果與討論

4.1 固定化酵素表面分析

4.1.1 SEM

在材料表面分析上，使用 1000 及 5000 倍放大倍率對載體進行觀察。BK-3D 表面在 1000 倍放大下，可以看出由 3D 生物列印所構築之層狀結構。而在 5000 倍放大下可以看出明顯的顆粒結構堆疊，這是由於材料中 Si-NPs 與 PVA、SA 等交聯劑膠結團聚而成。由此可推測本研究所使用之載體結構是利用 SA 及鈣離子之間以及 PVA 分子交聯，交聯孔隙由 Si-NPs 填注，並結合 PEGDA 光固化形成之三維結構，下圖 4-1 為載體結構示意圖。

在 SEM 影像觀察中，如下圖 4-2，載體與固定化 CA 的結構並無明顯差異。從微觀結構來看，可見顆粒狀區域，推測這些顆粒是由 PEGDA 大分子鏈與 Si-NPs 共同構築並支撐的。此外，部分樣品表面可觀察到膜狀結構，這主要歸因於樣品經凍乾處理後，隨著水分蒸發導致體積縮小，但交聯網絡並未因凍乾而流失，因此在載體表面殘留形成一層穩定的交聯膜。

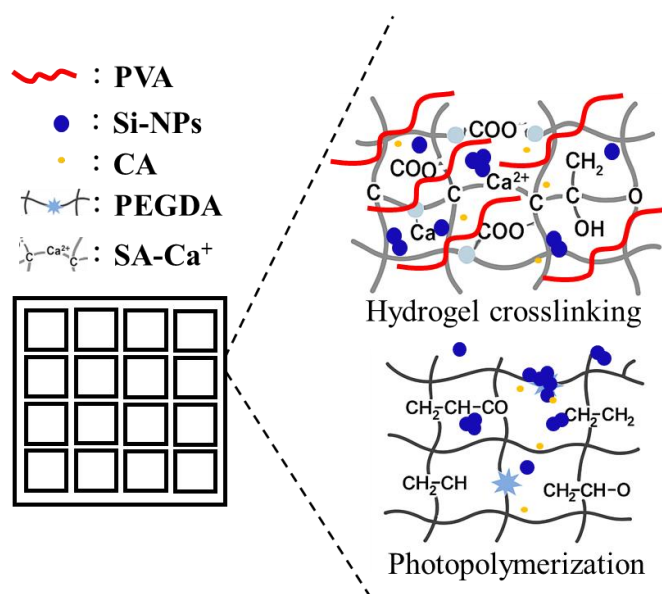
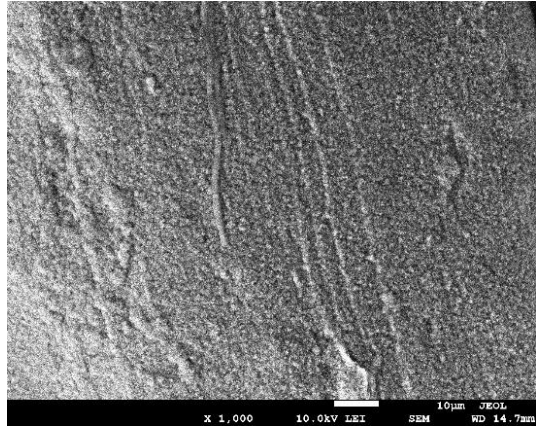
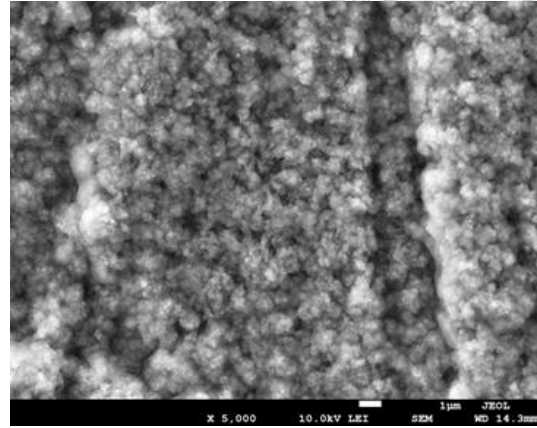


圖 4-1 載體分子結構示意圖

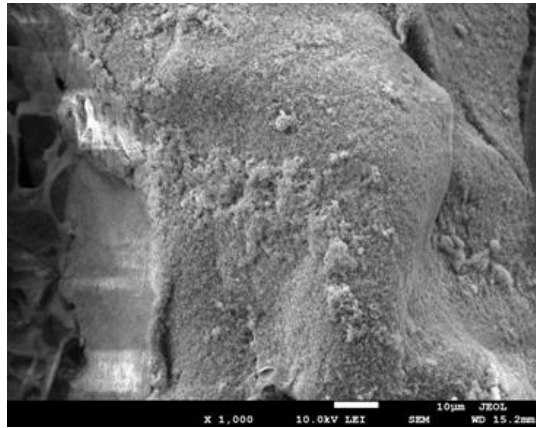
(a) 1000X



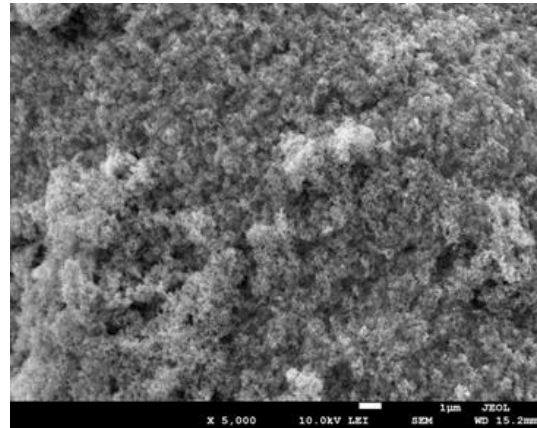
(b) 5000X



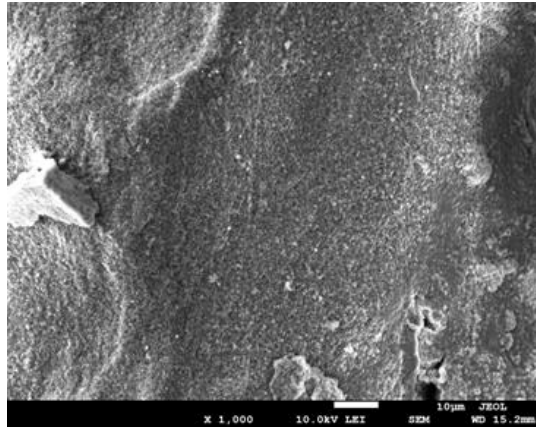
(c)



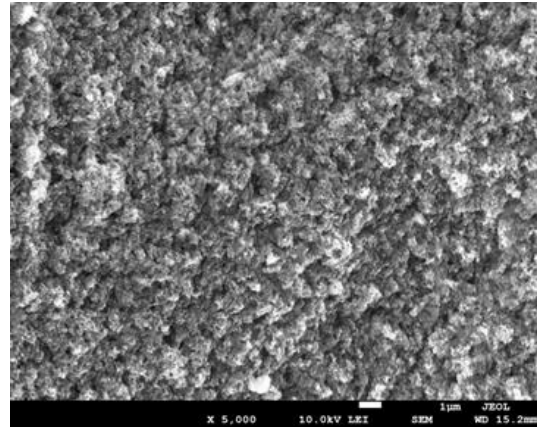
(d)



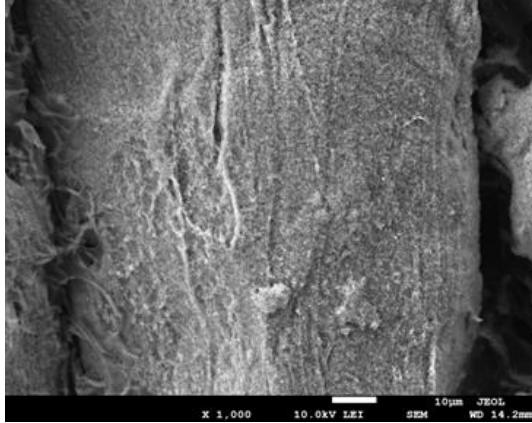
(e)



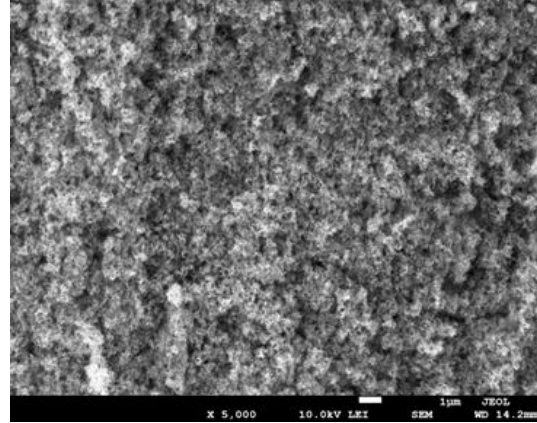
(f)



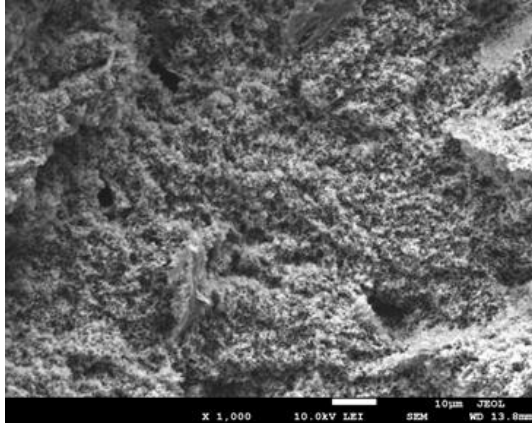
(g)



(h)



(i)



(j)

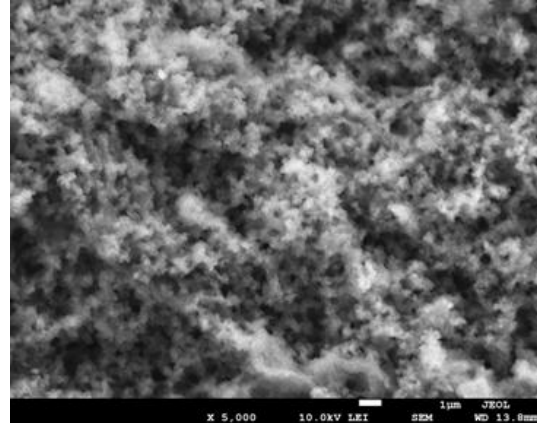


圖 4-2 SEM 圖 BK-3D : (a)、(b) CA-3D-1 : (c)、(d) CA-3D-2 : (e)、(f)
CA-3D-3 : (g)、(h) CA-3D-4 : (i)、(j)



4.1.2 EDS

本研究透過 EDS 進行元素表面分析，試著比較酵素負載量最高的 CA-3D-4 (0.171 mg/g)與 BK-3D 之間差異性，元素的質量比例詳見表 4-1，圖 4-3 為本研究所取得的 EDS 能譜圖。結果顯示，負載酵素的 CA-3D-4 被發現有更多的 C、N、O 原子存在，這主要來自酵素本身的組成結構。然而，結構中矽與鈣的重量比略低於 BK-3D，這可能是因為酵素接枝佔據了部分交聯孔隙，導致 Si-NPs 的填充量減少。另一方面，根據鋅元素分析結果顯示，其含量增加約 0.01%。鋅元素在 CA 單體中約占總重量的 0.22%，而 CA 在 CA-3D-4 樣品中的含量約為 0.017%。綜合以上數據，可推測 CA 在載體中的分布可能存在不均勻現象，導致實際檢測到的濃度與理論計算值之間出現差異。

表 4-1 載體及固定化酵素 EDS 元素分析結果

Element	BK-3D	CA-3D-4
	Mass (%)	Mass (%)
Carbon	33.57	35.24
Nitrogen	5.72	5.75
Oxygen	40.68	43.80
Silicon	15.64	12.78
Chloride	2.79	1.36
Calcium	1.51	0.95
Zinc	0.10	0.11

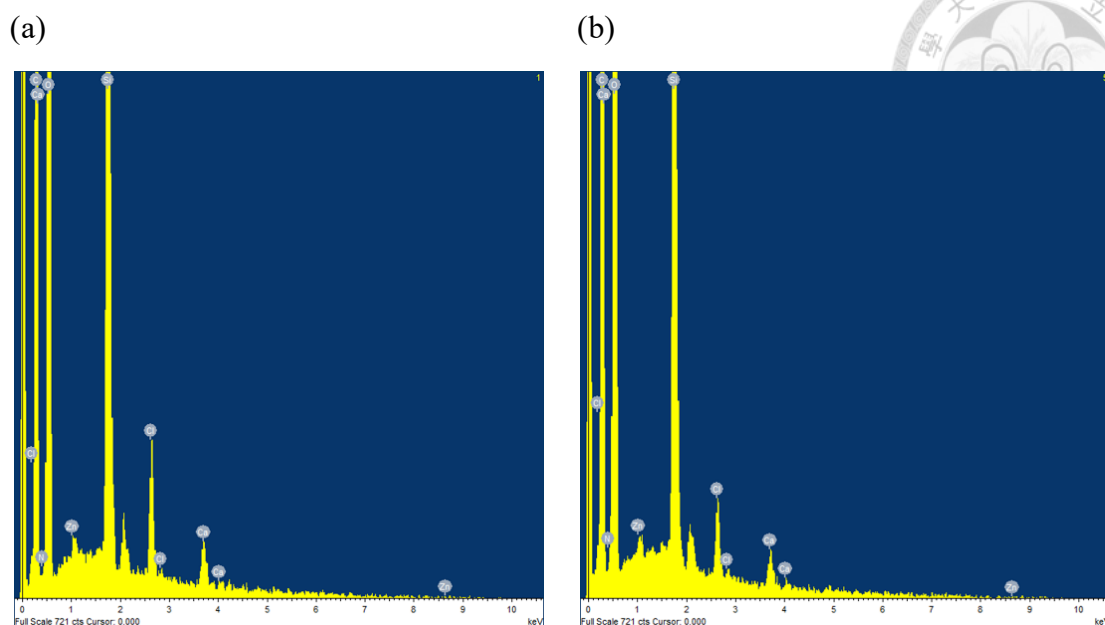


圖 4-3 EDS 結果 (a) 3D 列印載體 (b) CA-3D-4

4.1.3 FTIR

為了解載體表面結構，使用 FTIR 分析結構上官能基分布，並試著將載體與生物墨水材料之 FTIR 圖譜比較，如下圖 4-4(a)。從 BK-3D 的圖譜中可以觀察到 3000-3700 cm^{-1} 波段是屬於-OH 拉伸振動，是屬於 SA 及 PVA 結構中羥基(Chen et al., 2021)。另外，圖譜中能觀察到-CH₂ 伸縮振動(2870 cm^{-1})、C=O 拉伸振動(1728 cm^{-1})、C-O-C 醚鍵拉伸振動(1093 cm^{-1})以及 C=C 拉伸振動(810 cm^{-1})，根據文獻顯示，能證實 PEGDA 的分子聚合情形(Li et al., 2022; Myat et al., 2022; Zhou et al., 2019)。於 1048 cm^{-1} 是 Si-O-Si 結構之拉伸振動，而 820 cm^{-1} 則是 Si-O 彎曲振動，是由生物墨水中之 Si-NPs 所提供(Herth et al., 2016)。另外，C=O 拉伸振動(1644 cm^{-1})與-NH 彎曲振動(1450 cm^{-1})是由於 VA-086 結構中之醯胺(Ji et al., 2020)。綜合各材料的結構特徵峰，並與 BK-3D 載體的 FTIR 譜圖進行比較，如下圖 4-4 (b)，結果顯示生物墨水中的五種複合材料共同構築了本研究所使用的載體結構。

從 CA 的圖譜中可以發現 C-OH 拉伸振動(1020 cm^{-1})、-NH₂ (1584 cm^{-1})、C-H 彎曲振動(1432 cm^{-1})、C=O 拉伸振動(1632 cm^{-1})以及-OH 和-NH₂ 伸縮振動(3352 cm^{-1})。(Hazarika et al., 2023)然而，CA 結構中之官能基與生物墨水材料中結構官能基

多有重複，如 VA-086 具有醃胺、SA 及 PVA 具有羥基、PEGDA 具 C=O 鍵等。因此，在圖譜上試著以疊合方式判斷接枝情形。

由於不同官能基可能於相似波數範圍顯示波峰，如 Si-O-Si (1048 cm^{-1})、C-O-C 醚鍵(1093 cm^{-1})及 C-OH 拉伸振動(1020 cm^{-1})。根據文獻，波峰疊合可能導致峰寬增加(Bernardo J. G. de Aragão, 2008)。從載體及固定化 CA 的樣品中可以觀察到，由於 1048 cm^{-1} - 1093 cm^{-1} 之波峰涵蓋上述三種結構，與 CA、Si-NPs 及 PEGDA 等單一材料之圖譜相比，峰寬增加。此結果亦與 EDS 分析中載體中碳、氧及矽元素占比位居前三的觀察相呼應。

透過上述材料特徵峰比對，證實載體結構是由生物墨水成分交聯而成，且從 $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ 左右之峰寬增加，能觀察到 CA 負載之現象。因此，透過表面官能基分析，得以從分子結構的角度探討載體的三維交聯結構以及證明 CA 的負載情形。

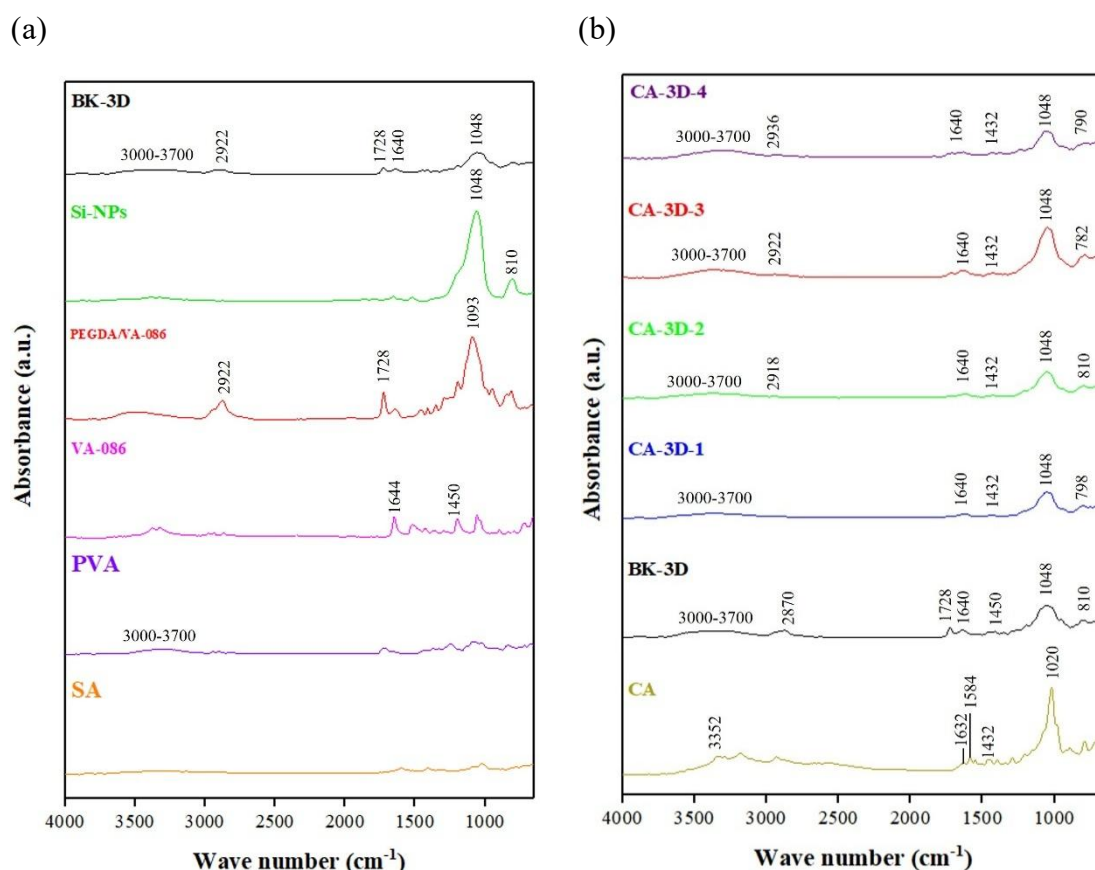


圖 4-4 FTIR 圖譜 (a)生物墨水材料 (b) CA 及固定化 CA 載體



4.2 固定化酵素活性測試

本研究分別使用脂酶法以及水合酶法，對 CA 與固定化 CA 進行酵素活性分析，探討 CA 使用包埋法固定化後，酵素活性之差異。其中，脂酶法檢測易受酵素质質影響，因此，以固定化 CA 與純酵素之相對活性顯示結果。而水合酶法較能表現出 CA 催化活性，以絕對活性方式表示，並試著以比活性方式比較不同酵素負載下之活性表現(Effendi & Ng, 2019)。

首先，在酵素脂酶活性分析結果中，如下圖 4-5 所示，純 CA 之比活性達到約 1.05 U/mg，固定化 CA 部分則是隨著負載量升高，表現逐漸下降趨勢，自 0.028 mg/g 酵素負載下之 0.52 U/mg，至 0.171 mg/g 酵素負載下之 0.07 U/mg。據相對比活性計算結果，以純酵素視為 100%比活性表現，隨著酵素負載增加，相對活性也從 49.32%下降至 6.49%。

在水合酶活性分析中，結果如圖 4-6 所示，可以觀察出固定化 CA 之單位活性隨著酵素負載增加，活性從 5.77 WAU/g 上升至 12.18 WAU/g。此結果可與 FTIR 圖譜中，CA 特徵峰高增加相呼應。然而，在比活性結果中，固定化 CA 之比活性因酵素負載量增加而有下降趨勢，自 207.49 WAU/mg 下降至 71.18 WAU/mg，與脂酶活性檢測結果相符。

自上述結果中可以得知，酵素負載量增加與酵素催化活性呈現正相關性。這顯示出在較高酵素負載量下，增加了固定化 CA 上之活性位點，可能促進 CO₂ 水合反應，加速碳捕捉效率。然而，自此兩種方法之比活性計算結果，可以發現到比活性隨著酵素負載上升而有下降趨勢。這是由於酵素負載量增加，導致載體內部結構擁擠，產生結構空間阻礙，進而影響酵素效率表現(Yang et al., 2025)。此外，結構中交聯或 Si-NPs 填充孔徑也可能使得內部質傳受影響，進而使固定化 CA 之活性效率不佳(Miao et al., 2022)。

下表 4-2 彙整了脂酶與水合酶的活性測試結果。結果顯示，CA 的包埋有效賦予載體碳捕捉功能，且隨負載量增加，絕對活性呈現提升趨勢，最高達 12.18 WAU/g。

惟當 CA 負載過高時，可能引發催化反應受阻，導致酵素效率下降。整體而言，低負載之固定化 CA 具高效率低效能，較適合應用於廢氣預處理、連續式反應槽等大規模粗分離。反之，高負載之固定化 CA 則具有高效能低效率特性，較適合應用於批次式反應槽等長時間操作之氣體分離。

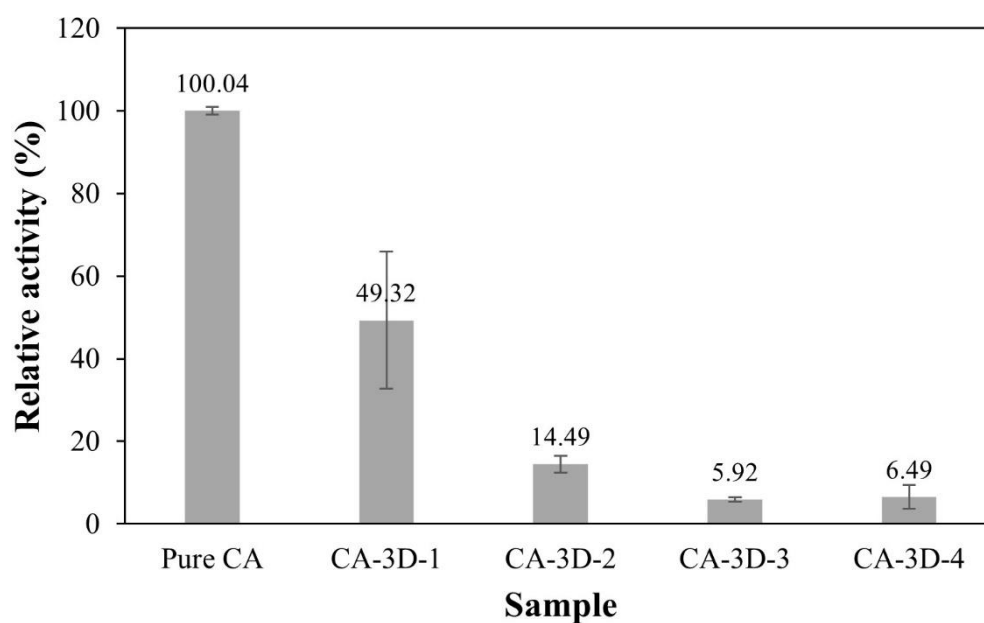


圖 4-5 CA 與固定化 CA 相對活性比較圖

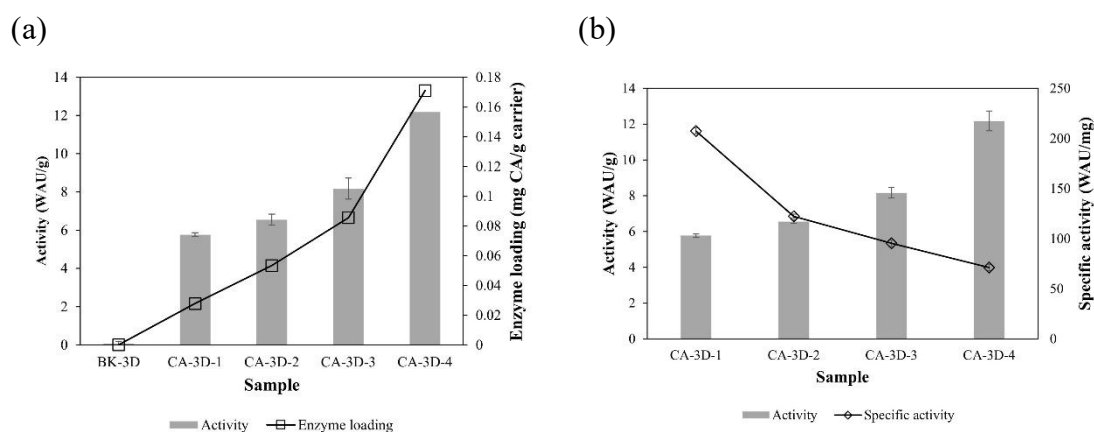


圖 4-6 固定化 CA 之水合酶活性測試結果 (a)活性及酵素負載關係 (b)活性及比活性關係

表 4-2 酵素水合酶活性與比活性表

樣品	酵素負載 (mg/g)	脂酶活性 (U/mg CA)	水合酶活性 (WAU/g)	比活性 (WAU/mg CA)
Pure CA	-	1.05±0.009	-	2366.32±133.33
BK-3D	0	-	0.08±0.01	-
CA-3D-1	0.028	0.52±0.17	5.77±0.02	207.49±0.09
CA-3D-2	0.053	0.15±0.02	6.55±0.05	122.41±0.11
CA-3D-3	0.086	0.06±0.01	8.17±0.08	95.44±0.29
CA-3D-4	0.171	0.07±0.03	12.18±0.17	71.18±0.55

4.3 酵素操作條件最佳化測試結果

4.3.1 酸鹼度最佳化測試結果

本研究使用脂酶法檢測不同酸鹼度環境下，CA 與固定化 CA 之活性差異，試著找出固定化 CA 之最適酸鹼值操作條件，並以各樣品在不同 pH 環境下最佳的活性表現作為相對活性計算依據。下表 4-3 列出了載體在不同酸鹼度條件下的脂酶活性測試結果，圖 4-7 (a)與(b)則分別呈現相對活性及脂酶活性的變化趨勢，此處的相對活性係以各載體在設定 pH 範圍內所達到的最高活性作為基準進行比較。

結果顯示，CA 在 pH 7 之中性環境下有最佳活性表現，而固定化 CA 同樣皆於 pH 7 之中性環境下有最佳活性表現，顯示包埋法能良好的保持酵素本身性質，並未對其結構產生顯著影響。

另外，在 CA 檢測結果中可以觀察到，相對中性環境之測試結果，鹼性環境下 CA 表現 90%以上相對活性，而在酸性環境中，則下降約 12-22%相對活性，顯示出 CA 較不適用於酸性環境下操作。

然而，在固定化 CA 的測試結果中，酸或鹼性環境皆對酵素活性產生抑制，並造成約 25-53%相對活性下降。其中，負載最高的 CA-3D-4 樣品中達到平均 48.79% 相對活性下降。

由上述結果可以觀察出，本研究所使用之 CA 與固定化 CA 皆適合操作於中性環境下。此外，在不同酸鹼環境的結果分析中，可知此類型固定化方式能夠為 CA 帶來更優越的酸鹼值專一性。

表 4-3 酸鹼度最佳化測試結果

	Pure CA	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)
pH 3	0.85±0.05	0.50±0.04	0.18±0.02	0.10±0.00	0.07±0.01
pH 5	0.76±0.04	0.44±0.01	0.16±0.00	0.14±0.00	0.07±0.00
pH 7	0.97±0.05	0.66±0.03	0.36±0.00	0.21±0.01	0.15±0.00
pH 9	0.90±0.01	0.45±0.03	0.22±0.01	0.13±0.01	0.09±0.02
pH 11	0.91±0.05	0.50±0.04	0.22±0.06	0.12±0.02	0.07±0.01

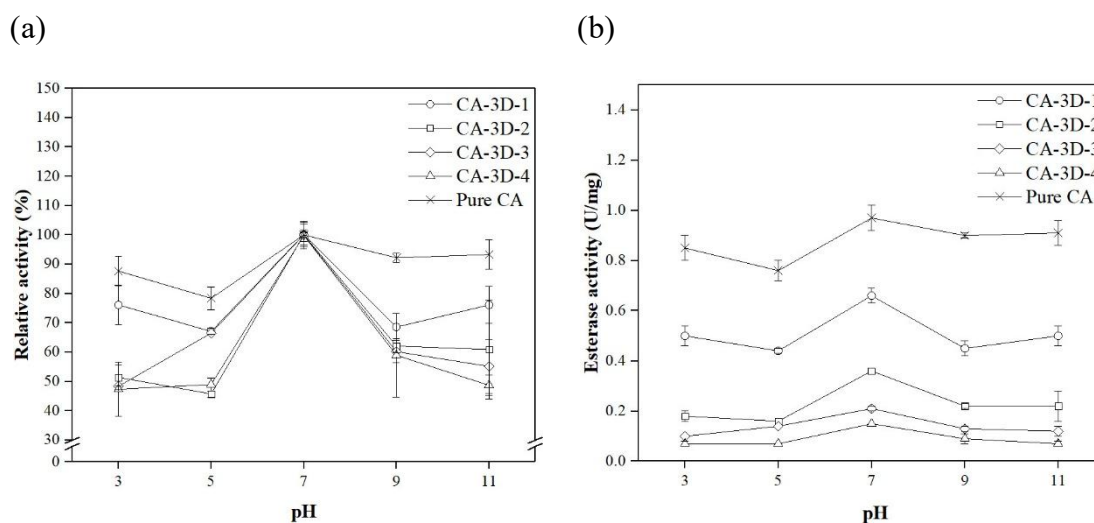


圖 4-7 酸鹼度最佳化測試結果 (a)相對活性與 pH 值變化之關係 (b)脂酶活性與 pH 值變化之關係



4.3.2 溫度最佳化測試結果

除了酸鹼度測試外，本研究進一步對 CA 及固定化 CA 進行溫度最佳化實驗，選用 4 個溫度分別代表常溫、中溫、高溫等環境條件，以便觀察酵素在不同溫度下之脂酶活性表現。本研究以各樣品在設定溫度範圍中所表現出的最高活性作為相對活性的計算依據，並將相對活性及脂酶活性隨溫度變化的趨勢繪製於圖 4-8 (a) 與(b)中。

在游離態 CA 的溫度測試結果中，如下表 4-4 所示，可觀察到酵素活性隨溫度從常溫升高至中溫情形時呈現緩慢下降的趨勢，且在 70°C時活性急劇下降，降至最低 0.70 U/mg，較 25°C時的最高活性減少約 51.5%。此現象與文獻報告一致，顯示 CA 在 60°C以上的環境中活性迅速降低，甚至可能失活，主要原因在於高溫導致蛋白質結構變性，進而影響酵素功能(Surampalli et al., 2015)。

在固定化 CA 中，較低負載的 CA-3D-1 (0.028 mg/g)和 CA-3D-2 (0.053 mg/g)樣品同樣表現出溫度與相對活性之負相關性。有趣的是，當酵素負載量上升時，可以觀察出固定化 CA 更能適應中溫環境，展現較高熱穩定性。這可能是由於較高負載下所造成之空間阻絕，使得固定化 CA 內部保留較完整酵素活性，展現較佳熱穩定性(Chang et al., 2021)。

表 4-4 溫度最佳化測試結果

Temperature (°C)	Pure CA (U/mg)	CA-3D-1 (U/mg)	CA-3D-2 (U/mg)	CA-3D-3 (U/mg)	CA-3D-4 (U/mg)
25	1.45±0.02	1.26±0.10	0.64±0.10	0.36±0.00	0.10±0.01
35	1.35±0.04	0.81±0.02	0.54±0.01	0.24±0.00	0.18±0.00
50	1.33±0.05	0.66±0.01	0.46±0.00	0.27±0.08	0.23±0.02
70	0.70±0.03	0.47±0.01	0.31±0.01	0.26±0.00	0.15±0.01

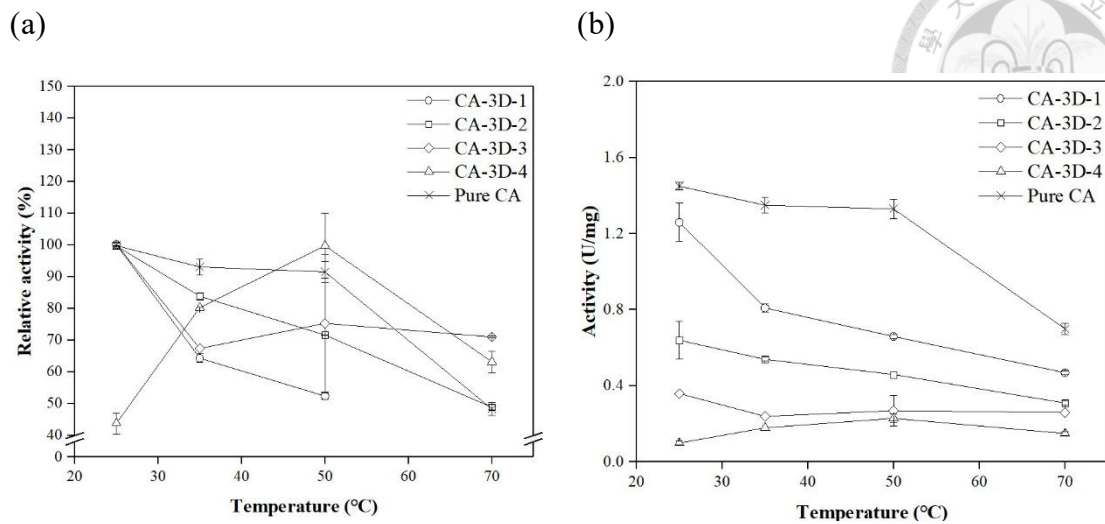


圖 4-8 溫度最佳化測試結果 (a)相對活性與溫度變化之關係 (b)脂酶活性與溫度變化之關係

4.4 保存性測試結果

本研究使用濕式及乾式保存兩種方式，對固定化 CA 的保存性進行實驗，試著找出最適保存方案。所有樣品均在常溫(約 25°C)下靜置保存 14 天。濕式保存條件是將固定化 CA 浸泡於 TRIS 緩衝液中，而乾式保存則將樣品置於玻璃乾燥箱內。保存結束後，透過水合酶法測定各樣品的催化活性，並以固定化 CA 在保存第 0 天的活性作為相對活性比較的基準，以評估其保存穩定性。

下表 4-5 及圖 4-9 (a)呈現了濕式保存的結果。可見固定化 CA 經過 14 天保存後，活性殘留率介於 36.61%至 67.36%之間。此現象主要歸因於水凝膠結構長期浸泡後產生的溶脹行為，以及親水性材料的部分崩解，如下圖 4-11 所示，導致微量 CA 從結構中釋放(Weng et al., 2023)。如 Moriyama 及 Yoshimoto 在研究中使用海藻酸鈣交聯網絡對 CA 進行包埋，在游離型 CA 包埋實驗中，過夜浸泡保存導致活性大量流失(Moriyama & Yoshimoto, 2021)。

下表 4-6 及圖 4-9 (b)所示的乾式保存結果顯示，固定化 CA 仍保有約 41.99%至 71.47%的酵素活性，顯示乾式保存具有較佳的長期穩定性(Shen et al., 2022)。另外，對較低的酵素負載樣品來說，活性降低之幅度較高負載緩慢，反之，較高酵素

負載的 CA-3D-3 (0.086 mg/g)、CA-3D-4 (0.171 mg/g) 樣品在第 4 天後顯示出較大幅的活性降低。此結果顯示，在保存過程中，高酵素負載的樣品活性較易流失，這主要是因為水分流失同時，結構中部分 CA 微量釋放所致。

根據圖 4-10 所示，14 天後的保存結果比較如下，對於本研究所使用的固定化 CA，乾式保存在數據上表現出較大酵素活性保留，且對低負載樣品更為適合。此外，由於載體結構中含有親水性材料如 PVA 及 SA，推測在濕式保存過程中可能發生結構崩解，導致酵素流失及活性降低的現象。這與固定化酶在保存穩定性上的差異相呼應，顯示乾式保存有助於維持載體的完整性及酵素活性。然而，乾式及濕式差異性分析如下表 4-7，透過 T-Test 計算，p-value 為 0.44，表明在統計上可能不具備顯著差異性。

表 4-5 濕式保存結果

樣品	Day 0 (WAU/g)	Day 4 (WAU/g)	Day 7 (WAU/g)	Day 14 (WAU/g)
CA-3D-1	3.18±0.21	2.78±1.20	1.62±0.07	1.16±0.02
CA-3D-2	4.30±0.18	4.42±0.19	3.90±0.22	2.90±0.15
CA-3D-3	8.62±0.16	6.88±0.00	6.76±0.11	4.55±0.07
CA-3D-4	10.26±0.42	8.95±0.51	7.88±0.56	5.51±0.17

表 4-6 乾式保存結果

樣品	Day 0 (WAU/g)	Day 4 (WAU/g)	Day 7 (WAU/g)	Day 14 (WAU/g)
CA-3D-1	5.77±0.09	4.97±0.07	4.89±0.14	4.12±0.35
CA-3D-2	6.55±0.11	5.95±0.28	5.04±0.30	4.62±0.00
CA-3D-3	8.17±0.29	9.12±0.35	7.88±0.28	4.69±0.20
CA-3D-4	12.18±0.55	12.46±0.29	10.48±0.22	5.11±0.23

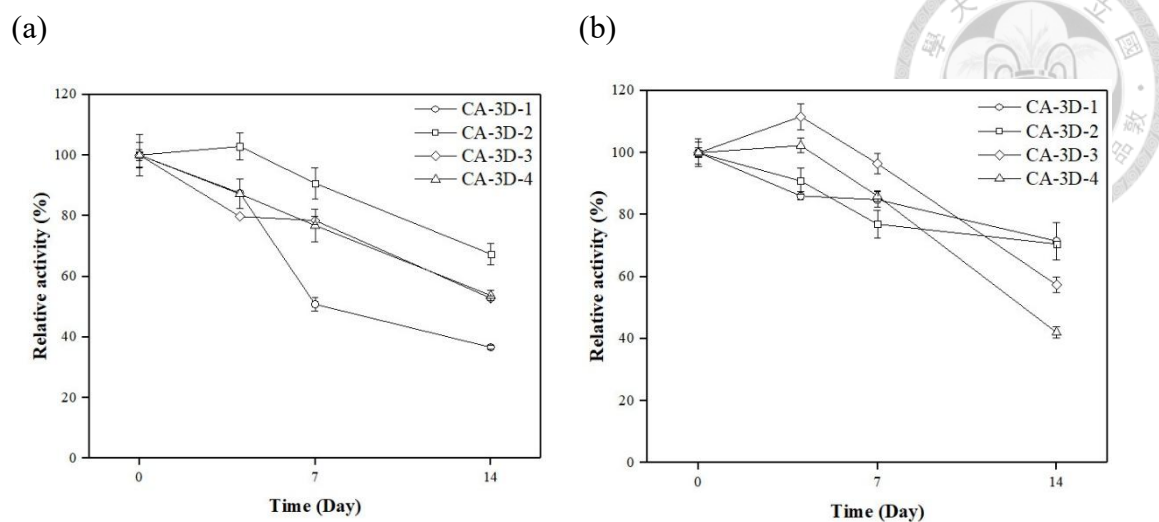


圖 4-9 保存性測試結果 (a)濕式保存結果 (b)乾式保存結果

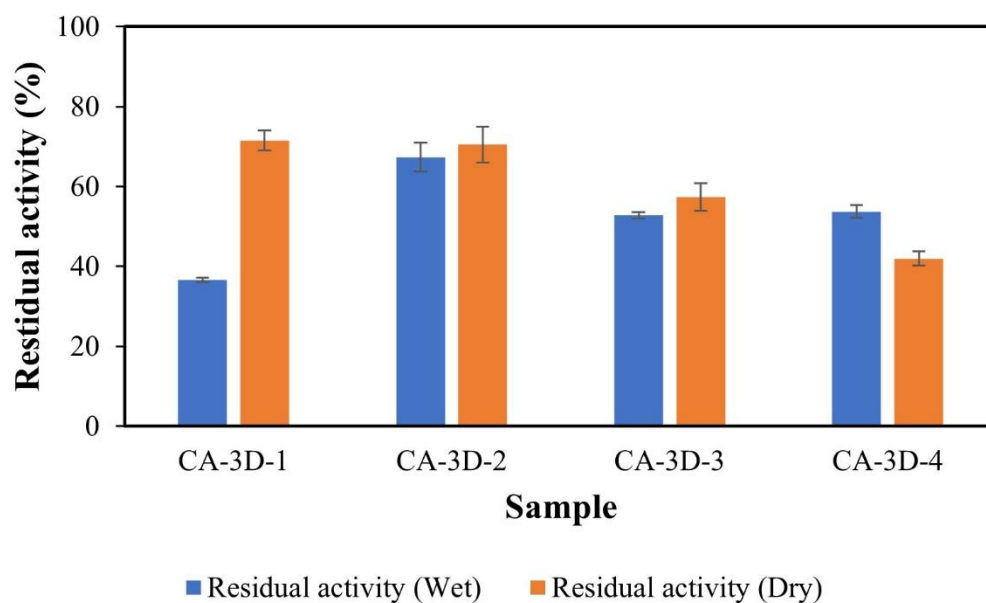


圖 4-10 乾及溼保存 14 天後殘餘活性比較圖

表 4-7 樣本差異性分析結果

Shapiro-Wilk test		Levene's test	T-Test
(p-value>0.05)		(p-value >0.05)	(p-value <0.05)
Dry	Wey	0.63	0.44
0.34	0.74		

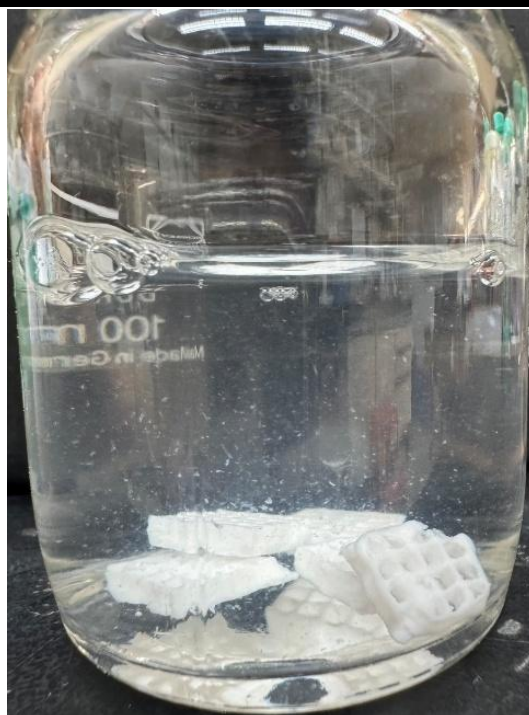


圖 4-11 固定化 CA 於濕式保存 14 天後之操作狀況

4.5 重複使用性測試結果

為探討固定化 CA 之重複使用性，本研究操作 6 次活性實驗循環，並於每次活性檢測後將固定化 CA 浸入 PBS 緩衝液(pH=7)中進行沖洗，試著觀察催化反應後，酵素活性變化。

從下圖 4-12 及表 4-7 的結果可見，固定化 CA 經過 6 次重複使用後，仍保留約 30.55%至 84.98%的酵素活性，顯示其具備良好的重複使用穩定性。低酵素負載之 CA-3D-1 (0.028 mg/g)及 CA-3D-2 (0.053 mg/g)表現出較佳重複使用性，其中，CA-3D-1 經過 6 次循環使用後仍保有 84.98%活性，提高了 CA 耐用性。然而，在

CA-3D-3 (0.086 mg/g)及 CA-3D-4 (0.171 mg/g)測試結果中可以發現，經過第 2-3 次循環使用後，活性大致殘餘 30%-40%，顯示過高的酵素負載可能影響固定化 CA 之穩定性。這可能是由於檢測過程中，固定化 CA 結構中水溶性物質溶出，導致酵素洩漏或影響內部結構質傳，使得活性表現逐漸下降(Liu et al., 2024)。

表 4-8 重複性測試結果

Cycles	CA-3D-1 (WAU/g)	CA-3D-2 (WAU/g)	CA-3D-3 (WAU/g)	CA-3D-4 (WAU/g)
0	3.19±0.21	4.31±0.18	8.63±0.16	10.28±0.42
1	3.09±0.04	3.26±0.44	5.45±0.41	5.43±0.08
2	2.29±0.25	2.64±0.04	4.19±0.29	3.81±0.31
3	2.20±0.27	2.58±0.24	3.59±0.10	3.18±0.13
4	2.57±0.03	3.37±0.32	2.60±0.07	3.47±0.33
5	2.61±0.14	2.56±0.34	2.92±0.39	3.47±0.33
6	2.71±0.04	2.64±0.04	2.65±0.25	3.14±0.08

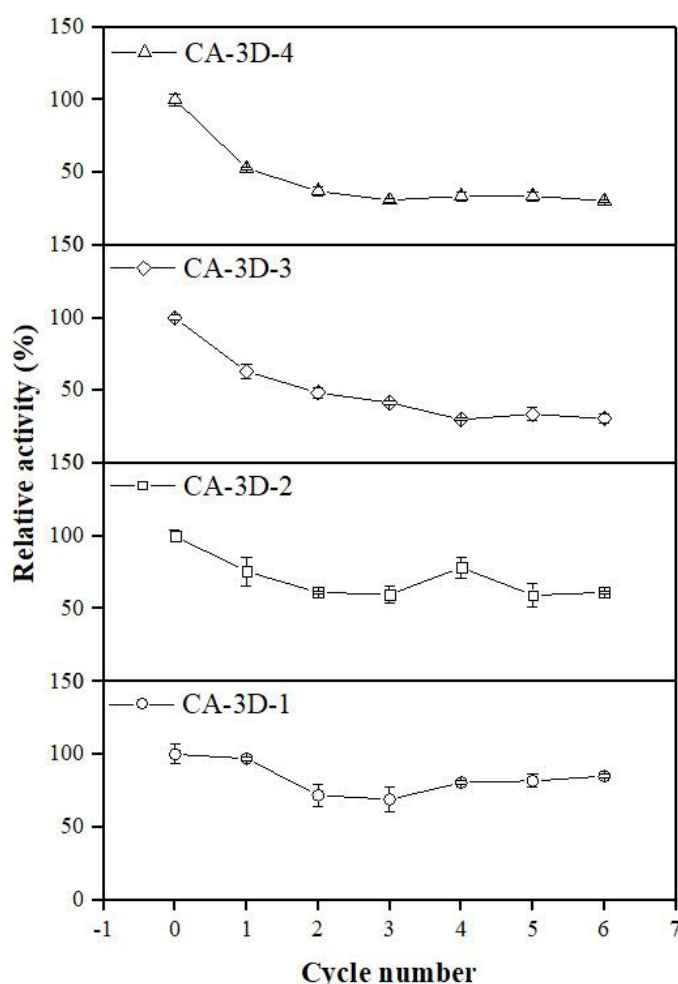


圖 4-12 重複使用性測試結果

4.6 固碳效果評估

本研究試著使用批次式反應概念，設計出兩種動態反應槽。透過氣體組成、水中無機碳、碳酸鈣沉澱分析，檢驗反應槽固碳效率，並討論固定化 CA 對批次式反應槽之適用性。此外，設計加入 CO_2 奈米曝氣裝置，探討奈米氣泡是否進一步增強 CA 固碳效率。

4.6.1 氣體分析

在氣體分析中，使用 GC-TCD 對反應槽頂空區域氣體進行檢測，藉由檢測固碳反應後之 CO_2 剩餘量，推估固碳效率。預先以純 CA (0.087 mg/reactor) 進行固碳實驗，探討 CA 在批次式反應槽內之最佳反應時間。根據下圖結果所示，槽內 CO_2 反應量逐時上升，飽和反應量約為 61.13 mg。此外，根據氣體分析結果，採用每單

位酵素固碳量作為 CA 反應效率的指標，發現其於第 60 分鐘達到飽和狀態，效率為 99.68 mg CO₂/mg CA，詳見圖 4-13。

下圖 4-14 為固定化 CA 於反應槽中之固碳量，取第 60 分鐘之氣體數據，分別計算每單位固定化 CA 之固碳量以及比固碳量。結果顯示，具最高負載之 CA-3D-4 (0.171 mg/g) 樣品表現出最高固碳量，達到 4.5 mg/g。然而，透過比固碳量數據得知，如下表 4-8 所示，負載最少酵素之 CA-3D-1 (0.028 mg/g) 樣品表現最佳，具最高固碳效率，這也與前述章節中比活性結果相符。由此可知，高酵素負載可增加系統固碳量，而低酵素負載則有較高固碳效率。

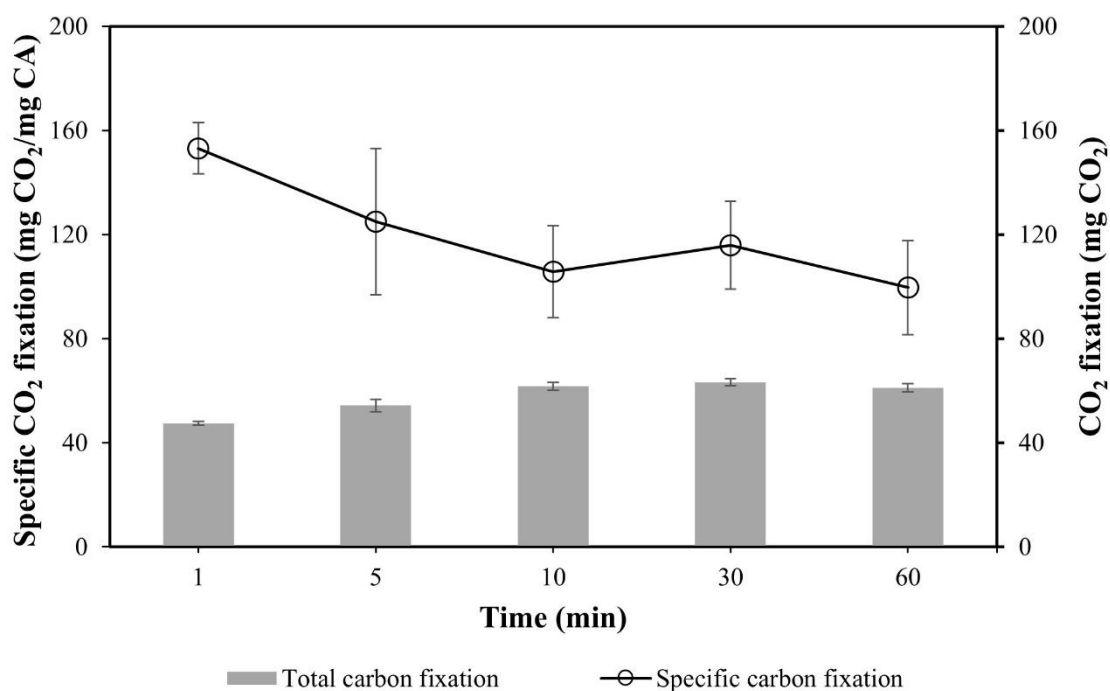


圖 4-13 逐時氣體反應量

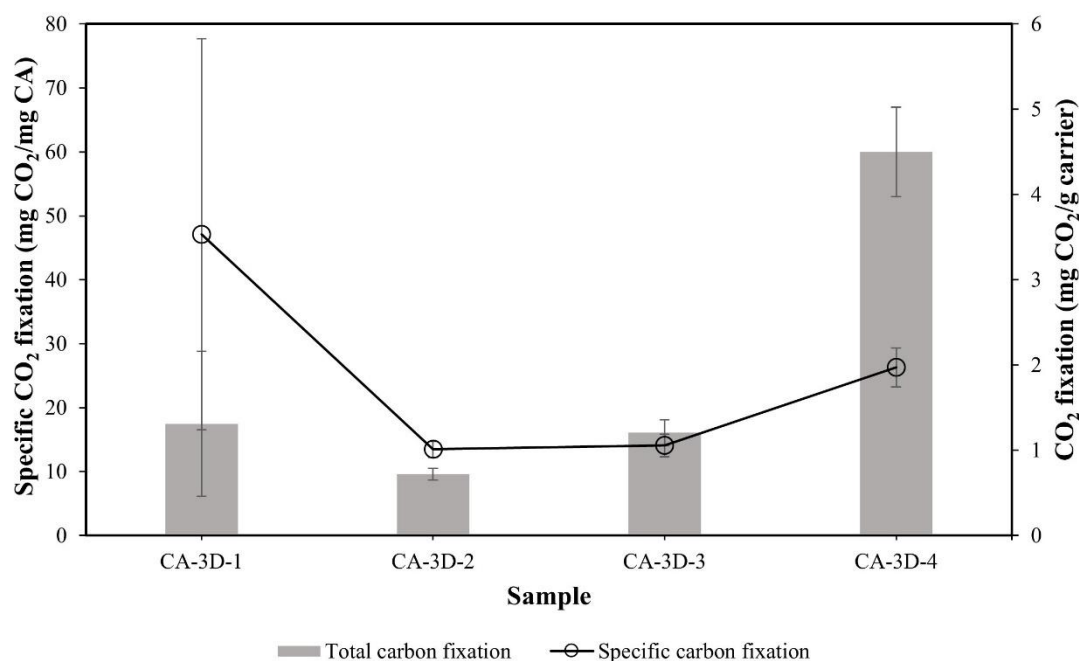


圖 4-14 固定化 CA 之氣體反應量

表 4-9 比固碳量比較表

	Pure CA	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
比固碳量	99.68	47.10	13.47	14.08	26.30
(mg CO ₂ /mg CA)	±18.05	±30.59	±1.24	±1.79	±3.07

4.6.2 水中總無機碳分析

為了評估 CA 的固碳效率，本研究除了進行氣體成分分析外，亦針對水中無機碳進行定量分析。透過比較水中 HCO_3^- 與 CO_3^{2-} 之濃度變化與氣體反應量，並結合水中酸鹼度數據，進一步探討反應過程中的碳平衡與轉化機制。

如下表 4-9 及圖 4-15(a)所示，在直接注入式反應槽中，隨著酵素負載量增加，TIC 含量僅呈現小幅度下降，維持在 2.78 至 4.85 mg C/L 之間。此有限的變動幅度可能歸因於攪拌環境下載體結構的崩解(Bhujbal et al., 2014)，進而影響固定化 CA 的活性。此現象亦與前述重複性實驗結果相符，負載較高的 CA-3D-3 (0.086 mg/g) 及 CA-3D-4 (0.171 mg/g) 樣品較容易在短時間內出現活性流失的情況。

相較之下，奈米曝氣式反應槽中的 TIC 變化較為顯著，如下表 4-10 及圖 4-15 (b)所示。據文獻顯示，由於 CO_2 奈米氣泡表面容易帶有負電荷，使得氣泡間不易聚合，增加氣泡穩定性。然而，若溶液中具備成核物質，如：陽離子等，則容易破壞氣泡間平衡，以致氣泡破裂(Jiang et al., 2024)。在保存性測試中可見，固定化 CA 若浸泡於溶液中，可能因親水性物質溶解而造成結構崩解。因此，推測在奈米氣泡系統中，TIC 之所以具有較大幅度變動可以歸因於固定化 CA 結構中崩解之 Ca^{2+} 。而無酵素負載的 BK-3D 樣品顯示出最高的 TIC 濃度，這可能是由於結構強度較高，以致水凝膠結構崩解程度小，從前述 4.1.2 EDS 結果中可見鈣與矽占比較高可推論。此外，奈米粒子的釋出也可能使水中氣泡穩定性增加(Cai et al., 2024)，從後續的 TGA 分析中可見，BK-3D 更有機會有從結構中釋出 Si-NPs 而導致沉澱物熱穩定性增加，

TIC 可根據水體的酸鹼度，利用碳酸根系統的平衡常數進行換算，從而簡易評估 TIC 中三種主要無機碳物種的組成比例，分別為 CO_2 ($\text{CO}_{2(g)}$)、 $\text{CO}_{2(aq)}$ 及 H_2CO_3)、 HCO_3^- 及 CO_3^{2-} ，計算結果如下圖 4-16 (a)與(b)所示。在直接注入式反應槽中可以發現，TIC 組成以 CO_2 居多，達到約 90-97%分布， HCO_3^- 部分約為 3-10%，而 CO_3^{2-} 濃度過低而忽略不計。而在奈米曝氣式反應槽中可以發現，TIC 組成具顯著變動， CO_2 約為 16-99%， HCO_3^- 部分增加至 0.4-84%，而 CO_3^{2-} 同樣因濃度過低而忽略不計。

由上述結果可見，在直接注入式反應槽中，由於載體存在於水相中，與頂空區域之 CO_2 接觸較少，且 CO_2 水合反應尚須克服氣-液間質傳以及液-載體間質傳，導致 TIC 結果顯示出 HCO_3^- 分布量較低之情形。反觀奈米曝氣式反應槽，基質溶液預先曝氣，使得液相中初始狀態下即存在大量 CO_2 ，增加液-載體間接觸機會，同時減少氣-液間溶解時間，有效提升水中 HCO_3^- 量。

此外，在直接注入式反應槽中，水中 HCO_3^- 含量隨酵素負載量增加呈現下降趨勢，從 9.9%降至 4.1%。此現象與活性檢測結果相呼應，低負載樣品展現較高的 CO_2

轉換效率，而高負載樣品則因內部質量傳遞阻礙，抑制了水合反應的進行。在奈米曝氣式反應槽中，負載最高的 CA-3D-4 (0.171 mg/g)樣品則展現出最佳的催化性能，然而奈米氣泡系統因動態攪拌導致的除氣效應仍需進一步優化。

表 4-10 直接注入式反應槽之總無機碳分析結果

	BK-3D	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
C_{TIC} (mg C/L)	4.03±0.01	4.85±0.58	4.50±0.14	3.64±0.45	2.78±0.67
pH	4.89±0.07	5.39±0.01	5.34±0.02	5.28±0.13	4.98±0.11

表 4-11 奈米曝氣式反應槽之總無機碳分析結果

	BK-3D	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
C_{TIC} (mg C/L)	13.89±5.82	4.99±2.12	2.80±0.47	5.17±0.72	1.31±0.16
pH	4.00±0.00	6.63±0.04	6.58±0.005	6.39±0.02	7.06±0.01

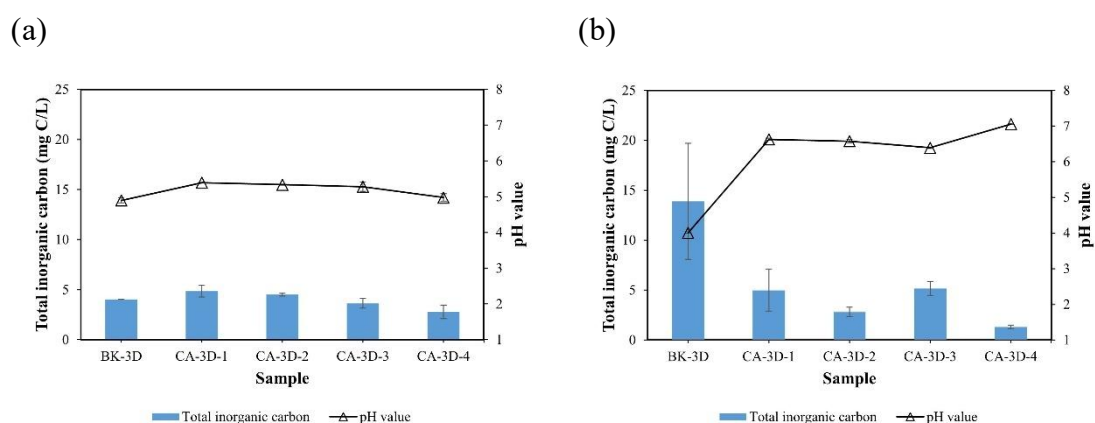


圖 4-15 總無機碳分析及 pH 值量測結果 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米氣泡式反應槽

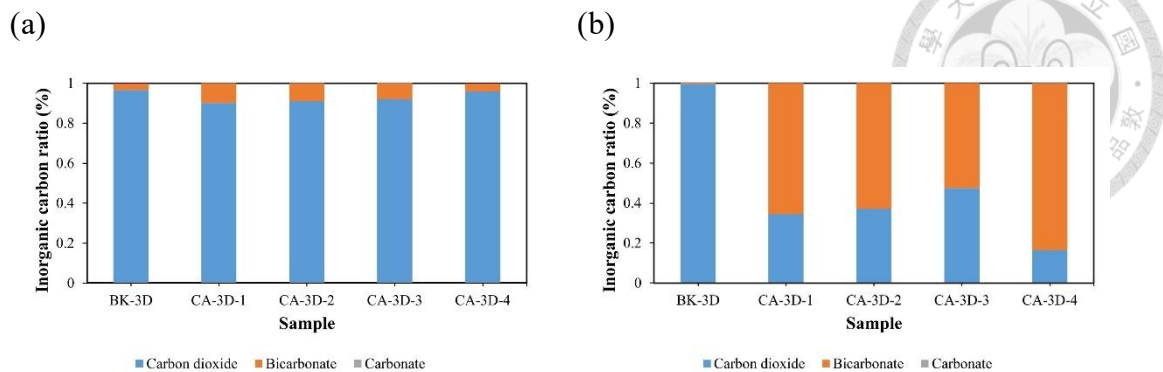


圖 4-16 水中碳酸根系統物質分布 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米曝氣式反應槽

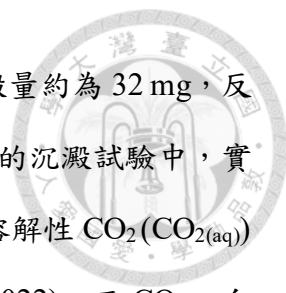
4.6.3 碳酸鈣沉澱試驗

本研究亦針對水中碳酸鈣沉澱進行定性和定量分析，並試著與氣體、水中無機碳數據進行比對，以量化固碳能力。定性分析利用熱重損失進行檢測，比較不同固定化 CA 所催化產製之沉澱物，是否在熱重曲線上有所差異。

結果如圖 4-17 所示，碳酸鈣標準品的熱重曲線在 700 至 800°C 範圍內出現明顯的重量損失，主要原因為碳酸鈣的熱解反應。此現象與文獻中報導的碳酸鈣熱解特性相符(Amal Mohammed et al., 2025)。此外，標準品之總熱重損失量約為 81%，而由 BK-3D 所參與生成之沉澱物之熱重損失量約為 94%。推測沉澱物中可能含有因載體結構崩解而釋放的 Si-NPs，進而提升了沉澱物的熱穩定性(Xie et al., 2025)。

而由固定化 CA 所參與之沉澱反應，可以觀察到熱重曲線中起始分解溫度約為 750-800°C，並造成約 17-20%重量損失，這與標準品之重量損失量相差甚微，可推測產物皆為碳酸鈣。然而，對於碳酸鈣中不同的熱解起始溫度，有文獻指出可能是由於碳酸鈣中不同結晶型態或是顆粒分布所造成(Lee et al., 2016)。另外，在曲線左端並無明顯熱重損失曲線變化，這證實了沉澱物經清洗後，並無雜質殘留。

重量分析同樣在碳酸鈣沉澱分析上扮演重要角色，取 10 mL 系統溶液與氯化鈣進行鹼性沉澱，並使用 $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ 對沉澱量進行理論試算(張名惠，謝佩珊，黃國璋，廖啟雯, 2016)，沉澱結果如下圖 4-18 及表 4-11 所示。在直接注入式反應槽中，常溫常壓下所計算之理論沉澱量約為 28.8 mg，固定化 CA 大約產生 28.3-35.6 mg 碳



酸鈣；而在奈米氣泡式反應槽中，常溫常壓下所計算之理論沉澱量約為 32 mg，反應槽中催化產生 30.7-31.8 mg 碳酸鈣。然而，在 BK-3D 所進行的沉澱試驗中，實際沉澱量約為 0.27 mg，與理論計算值存在顯著差異。這說明當溶解性 CO_2 ($\text{CO}_{2(\text{aq})}$) 參與 CaCO_3 沉澱反應時，必須先轉化為碳酸形式(Alarifi et al., 2022)，而 $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ 向碳酸的轉換反應較為緩慢，導致 BK-3D 系統中的沉澱量遠低於酵素催化下的沉澱試驗結果。相較於 BK-3D 在兩種反應槽中之沉澱量，固定化 CA 所參與之沉澱產量皆有顯著增加，表明經酵素催化後，能藉由生化反應增加 CO_2 之沉澱性，證實此類型固定化 CA 具有催化 CO_2 水合之效。此外，透過比沉澱量計算可得知固定化 CA 之固碳效率。隨著酵素負載上升，比沉澱量具下降趨勢，這也與前述氣體分析數據與比活性分析結果相符，證實在 CA 之負載過高下，容易導致固碳反應之效率表現受影響。

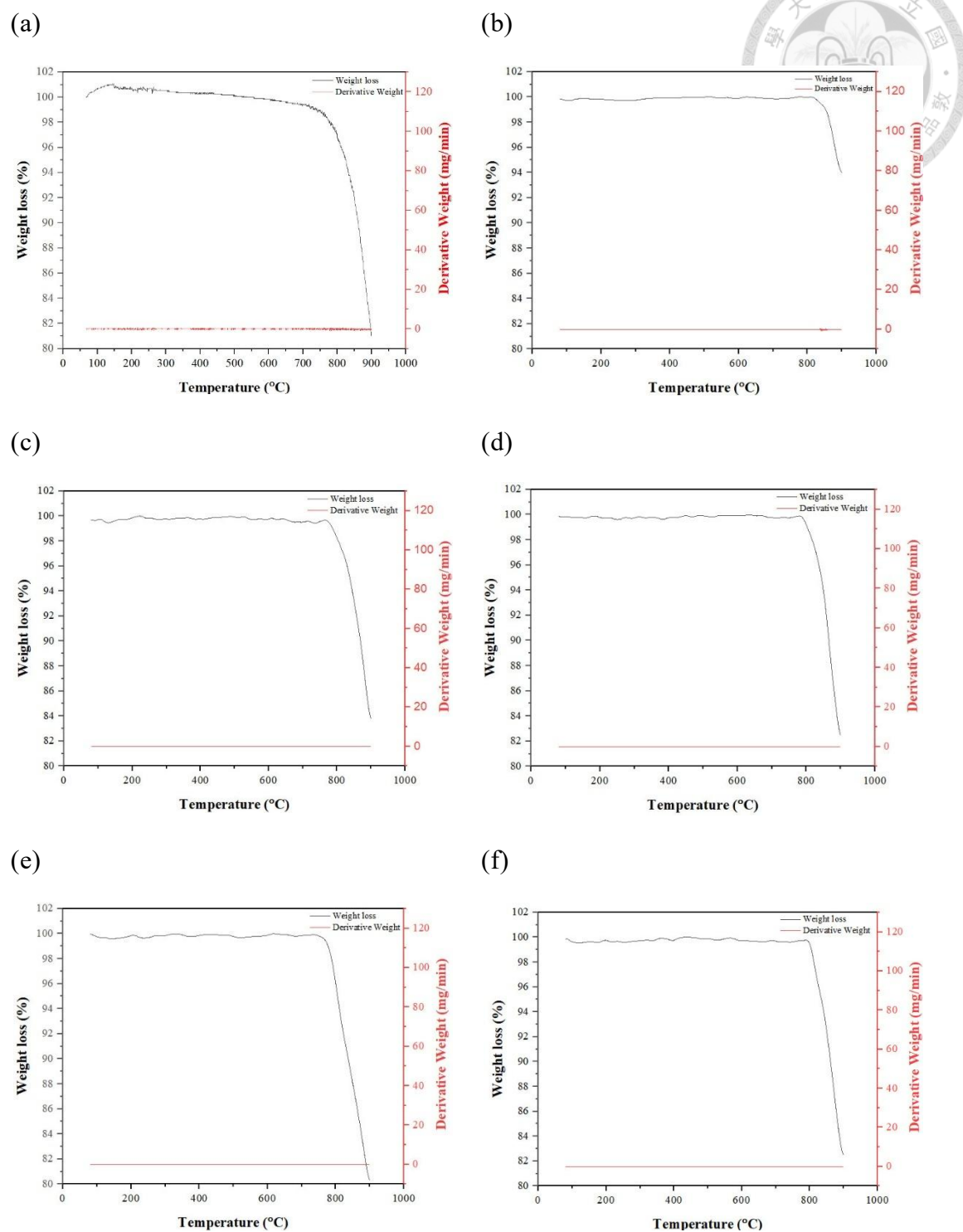
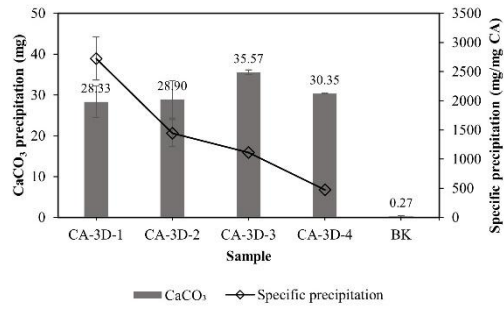


圖 4-17 TGA 測試結果 (a)碳酸鈣標準品 (b) BK-3D (c) CA-3D-1
(d) CA-3D-2 (e) CA-3D-3 (f) CA-3D-4

(a)



(b)

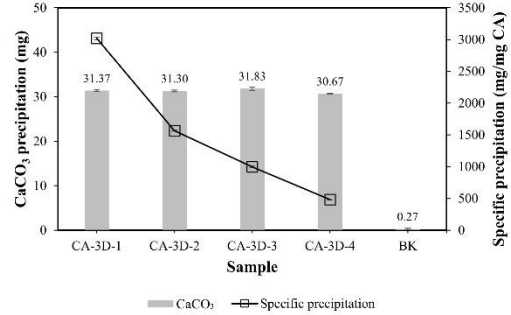


圖 4-18 碳酸鈣沉澱試驗結果 (a)直接注入式反應槽 (b)奈米氣泡反應槽

表 4-12 碳酸鈣沉澱試驗結果

	CA-3D-1	CA-3D-2	CA-3D-3	CA-3D-4
直接注入 (mg/mg CA)	2724.4±369.6	1445.0±230.0	1111.5±17.0	474.2±0.8
奈米氣泡 (mg/mg CA)	3016.0±18.1	1565.0±10.8	994.8±12.6	478.9±2.3



第五章 結論與建議



5.1 結論

本研究試著以 3D 生物列印方式，結合高分子交聯與光固化反應，開發出一種新型包埋方式，並利用於碳酸酐酶固定化上。在實驗設計上，設定 4 種酵素負載量，並從固定化活性、穩定性、保存性、重複使用性、固碳效率等方面，探討出最適負載量方案。反應槽設計上，以兩種曝氣方式比較固碳效率差異，並試著探討反應槽內 CO_2 水合轉換效率，尋找固定化 CA 催化之最適環境。

首先，在固定化 CA 之結構分析上，透過 EDS 元素分析以及 FTIR 圖譜結果證實 CA 包埋於載體結構中，並藉由 SEM 觀察載體微觀結構，以證實結構交聯及 Si-NPs 對結構固化之貢獻。

對固定化 CA 之活性分析上，利用兩種活性檢測方式進行。負載最高之 CA-3D-4 (0.171 mg/g) 達到 12.18 WAU/g 活性，而比活性部分則是由負載最低之 CA-3D-1 表現出 49.32% 相對活性。由此可知，高負載具備高絕對活性，而低負載則具高催化校率。

於固定化 CA 之穩定性分析上，固定化 CA 皆在中性環境中表現最佳活性，而在溫度最佳化上，最高酵素負載的 CA-3D-4 於 50°C 環境下表現出最佳活性，提升熱穩定性。

在保存性測試中，使用兩種保存方式對固定化 CA 活性變化進行探討。結果顯示，濕式保存下之酵素活性殘餘為 36.61%-67.36%，而乾式保存下則為 41.99%-71.47%。整體而言，由於固定化 CA 中含有親水性物質，容易造成崩解情形。因此，乾式保存在數據上顯示更佳保存適性，而在統計上則表明乾式及濕式保存方法對固定化 CA 都展現同樣保存性質。

另外，在重複使用性測試上，CA-3D-1 (0.028 mg/g)經過 6 次循環使用後仍保留 84.98%活性，表現出最佳重複使用性。然而，高酵素負載之樣品可能因使用過程中結構崩解而造成載體不利於重複使用。

在直接注入式反應槽中可以發現到，CA-3D-1 表現出最高 CA 效率，自氣體換算之比固碳量達 47.10 mg CO₂/mg CA，水中 HCO₃⁻比值也達最高之 0.099，且具最大沉澱量 2724.4 mg CaCO₃/mg CA。儘管負載最高之 CA-3D-4 表現出最高固碳量，在 HCO₃⁻轉換比率以及碳酸鈣沉澱量上較差，顯示較低效率。更進一步討論奈米氣泡式反應槽時，可以發現 HCO₃⁻轉換比率皆高於直接注入式，碳酸鈣沉澱量也上升至最大 3016.0 mg CaCO₃/mg CA。

整體而言，本研究開發出一種新型之碳酸酐酶固定化載體，在低酵素負載量下可以表現高效率，而高負載量則能有效提高酵素熱穩定性。透過比較兩種不同設計之反應槽可以發現，預先將 CO₂ 曝氣至基質中能有效減少質傳屏障，並加強系統整體固碳效果。



5.2 未來建議

1. 本研究所使用之生物墨水含有親水性物質，操作在動態環境下容易崩解，未來可嘗試以填充反應槽方式進行固碳。
2. 碳酸酐酶所催化之 CO_2 水合反應並不侷限於水中溶解性 CO_2 ($\text{CO}_{2(\text{aq})}$)，若設計載體密度與基質大略相同，或許能促進氣態 CO_2 質傳效應並增強固碳效率。
3. 可嘗試調整生物墨水配比或配方以增加酸鹼度環境穩定性，並加入具熱穩定性分子以提高酵素載體在鍋爐尾氣的應用性。
4. 本研究僅進行兩種常溫保存性試驗，未來可加入不同保存條件，如： 4°C 、濕度控制等。
5. 本研究針對反應槽系統中氣相及液相之 CO_2 進行檢測，建議可以多加入其他檢測方式，以確保 CO_2 固碳計算準確性，如氣壓計、離子層析儀等。
6. 本研究使用氯化鈣鹼性沉澱來評估固碳效率，但因固定化 CA 結構易崩解，在碳酸鈣定量上可能有檢測誤差，建議以其他方式進行檢測，如沉澱物元素分析等。

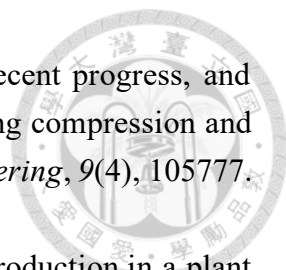
參考文獻

- Akowanou, A. V. O., Deguenon, H. E. J., Groendijk, L., Aina, M. P., Yao, B. K., & Drogui, P. (2019). 3D-printed clay-based ceramic water filters for point-of-use water treatment applications. *Progress in Additive Manufacturing*, 4(3), 315-321. <https://doi.org/10.1007/s40964-019-00091-9>
- Alarifi, S. A., Mustafa, A., Omarov, K., Baig, A. R., Tariq, Z., & Mahmoud, M. (2022). A Review of Enzyme-Induced Calcium Carbonate Precipitation Applicability in the Oil and Gas Industry. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 900881. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.900881>
- Alterio, V., Esposito, D., Monti, S. M., Supuran, C. T., & De Simone, G. (2018). Crystal structure of the human carbonic anhydrase II adduct with 1-(4-sulfamoylphenyl-ethyl)-2,4,6-triphenylpyridinium perchlorate, a membrane-impermeant, isoform selective inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 151-157. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1405263>
- Amal Mohammed, A.-M., Al Saadi, H. K. H., Marwa Fahad, A.-R., Noof Ali, A.-N., Noof Salim, A.-W., Nasra Said, A.-M., Seku, K., & Bellum, R. R. (2025). Influence of nano CaCO_3 on pore structure and compressive strength in concrete bricks. *Journal of Building Engineering*, 105, 112520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jobee.2025.112520>
- Ashkanani, H. E., Wang, R., Shi, W., Siefert, N. S., Thompson, R. L., Smith, K., Steckel, J. A., Gamwo, I. K., Hopkinson, D., Resnik, K., & Morsi, B. I. (2020). Levelized Cost of CO_2 Captured Using Five Physical Solvents in Pre-combustion Applications. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 101, 103135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2020.103135>
- Azdarpour, A., Asadullah, M., Mohammadian, E., Hamidi, H., Junin, R., & Karai, M. A. (2015). A review on carbon dioxide mineral carbonation through pH-swing process. *Chemical Engineering Journal*, 279, 615-630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.064>
- Bagheri, A., & Jin, J. (2019). Photopolymerization in 3D Printing. *ACS Applied Polymer Materials*, 1(4), 593-611. <https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00165>
- Bai, H., Yu, D., & Du, X. (2025). Review of porous microspheres for enzyme immobilization: Strategies, applications, and prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 295, 139627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139627>
- Basile, A., Gugliuzza, A., Iulianelli, A., & Morrone, P. (2011). 5 - Membrane technology for carbon dioxide (CO_2) capture in power plants. In A. Basile & S. P. Nunes

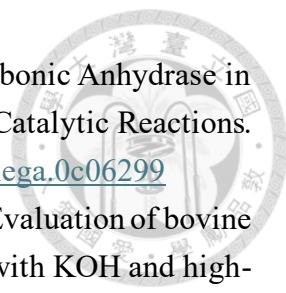
- (Eds.), *Advanced Membrane Science and Technology for Sustainable Energy and Environmental Applications* (pp. 113-159). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9780857093790.2.113>
- Baskaran, D., Saravanan, P., Nagarajan, L., & Byun, H.-S. (2024). An overview of technologies for capturing, storing, and utilizing carbon dioxide: Technology readiness, large-scale demonstration, and cost. *Chemical Engineering Journal*, 491, 151998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.151998>
- Bernardo J. G. de Aragão, Y. M. (2008). Peak separation by derivative spectroscopy applied to ftir analysis of hydrolized silica. *Journal of Brazilian Chemical Society*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000800019>
- Bhujbal, S. V., Paredes-Juarez, G. A., Niclou, S. P., & de Vos, P. (2014). Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37, 196-208.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.05.020>
- Cai, L., Wu, J., Zhang, M., Wang, K., Li, B., Yu, X., Hou, Y., & Zhao, Y. (2024). Investigating the Potential of CO₂ Nanobubble Systems for Enhanced Oil Recovery in Extra-Low-Permeability Reservoirs. *Nanomaterials (Basel)*, 14(15).
<https://doi.org/10.3390/nano14151280>
- Cao, Y.-P., Zhi, G.-Y., Han, L., Chen, Q., & Zhang, D.-H. (2021). Biosynthesis of benzyl cinnamate using an efficient immobilized lipase entrapped in nano-molecular cages. *Food Chemistry*, 364, 130428.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130428>
- Chang, S., He, Y., Li, Y., & Cui, X. (2021). Study on the immobilization of carbonic anhydrases on geopolymer microspheres for CO₂ capture. *Journal of Cleaner Production*, 316, 128163.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128163>
- Chen, Pei-Ru Xia, & Peng-Fei. (2024). Carbon recycling with synthetic CO₂ fixation pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 85, 103023.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.103023>
- Chen, H., Huang, Y., Sha, C., Moradian, J. M., Yong, Y.-C., & Fang, Z. (2023). Enzymatic carbon dioxide to formate: Mechanisms, challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 178, 113271.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113271>
- Chen, J., Wu, A., Yang, M., Ge, Y., Pristijono, P., Li, J., Xu, B., & Mi, H. (2021). Characterization of sodium alginate-based films incorporated with thymol for

- fresh-cut apple packaging. *Food Control*, 126, 108063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108063>
- de Oliveira Maciel, A., Christakopoulos, P., Rova, U., & Antonopoulou, I. (2022). Carbonic anhydrase to boost CO₂ sequestration: Improving carbon capture utilization and storage (CCUS). *Chemosphere*, 299, 134419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134419>
- Du, J., Yang, W., Xu, L., Bei, L., Lei, S., Li, W., Liu, H., Wang, B., & Sun, L. (2024). Review on post-combustion CO₂ capture by amine blended solvents and aqueous ammonia. *Chemical Engineering Journal*, 488, 150954. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.150954>
- Effendi, S. S. W., & Ng, I. S. (2019). The prospective and potential of carbonic anhydrase for carbon dioxide sequestration: A critical review. *Process Biochemistry*, 87, 55-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.018>
- Fei, X., Chen, S., Huang, C., Liu, D., & Zhang, Y. (2015). Immobilization of bovine carbonic anhydrase on glycidoxypopyl-functionalized nanostructured mesoporous silicas for carbonation reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, 134-139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.03.016>
- Fei, X., Chen, S., Liu, D., Huang, C., & Zhang, Y. (2016). Comparison of amino and epoxy functionalized SBA-15 used for carbonic anhydrase immobilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(3), 314-321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.02.004>
- Ginestra, P. S., Rovetta, R., Fiorentino, A., & Ceretti, E. (2020). Bioprinting process optimization: evaluation of parameters influence on the extrusion of inorganic polymers. *Procedia CIRP*, 89, 104-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procir.2020.05.125>
- Gladis, A., Gundersen, M. T., Fosbøl, P. L., Woodley, J. M., & von Solms, N. (2017). Influence of temperature and solvent concentration on the kinetics of the enzyme carbonic anhydrase in carbon capture technology. *Chemical Engineering Journal*, 309, 772-786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.056>
- Hazarika, A., Bhuyan, C., & Yadav, M. (2023). Isolation, purification, and characterization of carbonic anhydrase from *Azadirachta indica* (neem) leaves and its CO₂ sequestration efficiency. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 53, 102855. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102855>
- Herth, E., Zeggari, R., Rauch, J.-Y., Remy-Martin, F., & Boireau, W. (2016). Investigation of amorphous SiO_x layer on gold surface for Surface Plasmon Resonance

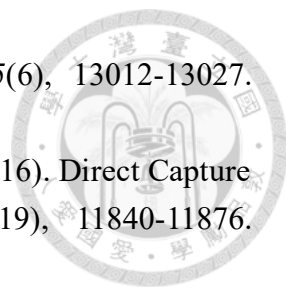
- measurements. *Microelectronic Engineering*, 163, 43-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mee.2016.04.014>
- Hu, H., Lu, W., Li, S., Zhou, X., Zhu, C., Wang, X., Dai, H., & Geng, H. (2025). Hydrogel-based materials for microbial/enzyme immobilization: Advanced applications in wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 511, 161878. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.161878>
- IEA. (2025). Global CO₂ emissions from energy combustion and industrial processes and their annual change, 1900-2023, IEA, Paris. In.
- IPCC. (2018). *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*
- Ishak, S. N. H., Saad, A. H. M., Latip, W., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Kamarudin, N. H. A., Leow, A. T. C., & Ali, M. S. M. (2025). Enhancing industrial biocatalyst performance and cost-efficiency through adsorption-based enzyme immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 316, 144278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144278>
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega*, 5(15), 8572-8578. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04421>
- Jiang, J., Oguzlu, H., & Jiang, F. (2021). 3D printing of lightweight, super-strong yet flexible all-cellulose structure. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126668. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126668>
- Jiang, Y., Ma, Z., Gu, Z., Liu, F., Shen, P., & Poon, C. S. (2024). A novel approach for improving aqueous carbonation kinetics with CO₂ micro- and nano-bubbles. *Chemical Engineering Journal*, 500, 157363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.157363>
- Jun, S.-H., Yang, J., Jeon, H., Kim, H. S., Pack, S. P., Jin, E., & Kim, J. (2020). Stabilized and Immobilized Carbonic Anhydrase on Electrospun Nanofibers for Enzymatic CO₂ Conversion and Utilization in Expedited Microalgal Growth. *Environmental Science & Technology*, 54(2), 1223-1231. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05284>
- Khaled, S. A., Burley, J. C., Alexander, M. R., Yang, J., & Roberts, C. J. (2015). 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(2), 643-650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.067>

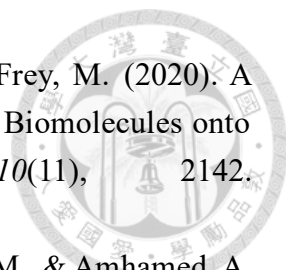
- 
- Koohestanian, E., & Shahraki, F. (2021). Review on principles, recent progress, and future challenges for oxy-fuel combustion CO₂ capture using compression and purification unit. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105777>
- Kumari, M., Lee, J., Lee, D. W., & Hwang, I. (2020). High-level production in a plant system of a thermostable carbonic anhydrase and its immobilization on microcrystalline cellulose beads for CO₂ capture. *Plant Cell Reports*, 39(10), 1317-1329. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02566-4>
- Kumari, M., Soni, A. P., Ryu, B., Chun, I., Lee, J., Kim, M.-S., & Hwang, I. (2024). Developing a hybrid carbonic anhydrase with exceptional high temperature and alkaline environments resistance for efficient CO₂ capture from air. *Journal of CO₂ Utilization*, 86, 102912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2024.102912>
- Lai, J. Y., Ngu, L. H., & Hashim, S. S. (2021). A review of CO₂ adsorbents performance for different carbon capture technology processes conditions. *Greenhouse Gases: Science and Technology*, 11(5), 1076-1117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ghg.2112>
- Lee, S.-W., Kim, Y.-J., Lee, Y.-H., Guim, H., & Han, S. M. (2016). Behavior and characteristics of amorphous calcium carbonate and calcite using CaCO₃ film synthesis. *Materials & Design*, 112, 367-373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.09.099>
- Li, Y., Peng, S., Li, K., Qin, D., Weng, Z., Li, J., Zheng, L., Wu, L., & Yu, C.-P. (2022). Material extrusion-based 3D printing for the fabrication of bacteria into functional biomaterials: The case study of ammonia removal application. *Additive Manufacturing*, 60, 103268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addma.2022.103268>
- Lim, H. K., Kim, D. R., & Hwang, I. T. (2019). Sequestration of CO₂ into CaCO₃ using Carbonic Anhydrase Immobilization on Functionalized Aluminum Oxide. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(4), 375-379. <https://doi.org/10.1134/S0003683819040112>
- Liu, G., Li, K., Yuan, H., Zhou, R., Mao, L., Zhang, R., & Zhang, G. (2024). An antifouling epoxy coated metal surface containing silica-immobilized carbonic anhydrase supraparticles for CO₂ capture through microalgae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 132075. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132075>
- Liu, J., Shen, X., Zheng, Z., Li, M., Zhu, X., Cao, H., & Cui, C. (2020). Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic

- compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 518-525.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.144>
- Liu, W., Hou, L., Huang, F., Pan, Z., Li, J., Tang, P., Zhu, Y., Li, D., & Yao, X. (2025). Advancements in entrapment immobilization technology for enhancing Anammox process: Material effects, preparation strategy and application. *Bioresource Technology*, 433, 132741.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132741>
- Lv, B., Yang, Z., Pan, F., Zhou, Z., & Jing, G. (2015). Immobilization of carbonic anhydrase on carboxyl-functionalized ferroferric oxide for CO₂ capture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 719-725.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.051>
- Malankowska, M., Popkov, A., DeMartini, M., Jørgensen, G., Su, Z., & Pinelo, M. (2024). Integrating metal organic frameworks (MOFs) and polyelectrolytes (PEs) in membrane reactors for boosting the activity of immobilized carbonic anhydrase. *Chemical Engineering Journal*, 498, 155563.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.155563>
- Maureira, D., Rodriguez, S. R., Romero, O., Guillén, M., Álvaro, G., Wilson, L., & Ottone, C. (2025). Immobilization of FDH on carbon felt by affinity binding strategy for CO₂ conversion. *Results in Engineering*, 25, 104442.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rineng.2025.104442>
- Mezieobi, K. C., Alum, E. U., Egwu, C. K., Uti, D. E., Alum, B. N., Ainebyoona, C., & Omuna, D. (2025). Strategies for resilience: Mitigating the effects of climate change on hunger and mental health. *Journal of Agriculture and Food Research*, 22, 102023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.102023>
- Miao, H., Li, M., Sun, X., Xia, J., Li, Y., Li, J., Wang, F., & Xu, J. (2022). Effects of Pore Size and Crosslinking Methods on the Immobilization of Myoglobin in SBA-15 [Original Research]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 9 - 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.827552>
- Michaud, M., Bornette, F., Rautu, E., More, S. H., Leonardo Martinez Mendez, M., Jierry, L., & Edouard, D. (2023). Unprecedented continuous elastic foam-bed reactor for CO₂ capture. *Chemical Engineering Journal*, 452, 138604.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138604>
- Molina-Fernández, Cristhian Luis, & Patricia. (2021). Immobilization of carbonic anhydrase for CO₂ capture and its industrial implementation: A review. *Journal of CO₂ Utilization*, 47, 101475.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2021.101475>

- 
- Moriyama, J., & Yoshimoto, M. (2021). Efficient Entrapment of Carbonic Anhydrase in Alginate Hydrogels Using Liposomes for Continuous-Flow Catalytic Reactions. *ACS Omega*, 6(9), 6368-6378. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06299>
- Mourad, A. A. H., Mohammad, A. F., & Al-Marzouqi, A. H. (2024). Evaluation of bovine carbonic anhydrase for promoting CO₂ capture via reaction with KOH and high-salinity reject brine. *Journal of CO₂ Utilization*, 81, 102714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcou.2024.102714>
- Mukherjee, S., Sen, R., Ralph, P. J., & Poddar, N. (2025). The catalytic role of carbonic anhydrase in optimizing carbon fixation in microalgal cultures. *Journal of Cleaner Production*, 505, 145461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.145461>
- Mukherjee, T. (2021). Special Issue: The Science and Technology of 3D Printing. *Materials*, 14(21), 6261. <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/21/6261>
- Myat, Y. Y., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Opanasopit, P., Bradley, M., Patrojanasophon, P., & Pornpitchanarong, C. (2022). Synthesis of Polyethylene Glycol Diacrylate/Acrylic Acid Nanoparticles as Nanocarriers for the Controlled Delivery of Doxorubicin to Colorectal Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 14(3), 479. <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/3/479>
- Nema, A., Kumar, A., & Warudkar, V. (2025). An in-depth critical review of different carbon capture techniques: Assessing their effectiveness and role in reducing climate change emissions. *Energy Conversion and Management*, 323, 119244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.119244>
- Oh, W. T., Ham, J., Kim, S., & Koh, W.-G. (2025). Enzymatic conversion of glycerol to dihydroxyacetone using a hydrogel bioreactor entrapping glycerol dehydrogenase immobilized on silica nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 505, 159250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.159250>
- Ozbolat, I. T., & Yu, Y. (2013). Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 60(3), 691-699. <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2243912>
- Paul, S., Bera, S., Dasgupta, R., Mondal, S., & Roy, S. (2021). Review on the recent structural advances in open and closed systems for carbon capture through algae. *Energy Nexus*, 4, 100032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100032>
- Peirce, S., Russo, M. E., Istatico, R., Lafuente, R. F., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2017). Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO₂ capture. *Biochemical*

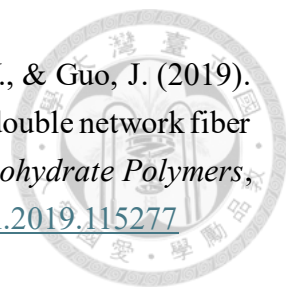
- Engineering Journal*, 127, 188-195.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.014>
- Prabhakar, T., Giaretta, J., Zulli, R., Rath, R. J., Farajikhah, S., Talebian, S., & Dehghani, F. (2025). Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. *Chemical Engineering Journal*, 503, 158054.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158054>
- Qureshi, M. A., Basree, Aziz, R., Azim, Y., & Ahmad, M. (2025). Polymeric hydrogels for bioprinting: A comprehensive review. *Annals of 3D Printed Medicine*, 18, 100198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stlm.2025.100198>
- Raees, S., Ullah, F., Javed, F., Akil, H. M., Jadoon Khan, M., Safdar, M., Din, I. U., Alotaibi, M. A., Alharthi, A. I., Bakht, M. A., Ahmad, A., & Nassar, A. A. (2023). Classification, processing, and applications of bioink and 3D bioprinting: A detailed review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 123476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123476>
- Rasouli, Hannaneh Iliuta, Ion Bougie, Francis Garnier, Alain Iliuta, & C., M. (2022). Enhanced CO₂ capture in packed-bed column bioreactors with immobilized carbonic anhydrase. *Chemical Engineering Journal*, 432, 134029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.134029>
- Rasouli, H., Nguyen, K., & Iliuta, M. C. (2022). Recent advancements in carbonic anhydrase immobilization and its implementation in CO₂ capture technologies: A review. *Separation and Purification Technology*, 296, 121299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121299>
- Remonato, D., Izidoro, B. F., Mazziero, V. T., Catarino, B. P., do Nascimento, J. F. C., Cerri, M. O., Andrade, G. S. S., & Paula, A. V. d. (2023). 3D printing and enzyme immobilization: An overview of current trends. *Bioprinting*, 33, e00289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00289>
- Ren, S., Feng, Y., Wen, H., Li, C., Sun, B., Cui, J., & Jia, S. (2018). Immobilized carbonic anhydrase on mesoporous cruciate flower-like metal organic framework for promoting CO₂ sequestration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 189-198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.173>
- Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C. R., & Grenha, A. (2012). Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(3), 615-641. <https://www.mdpi.com/2079-4983/3/3/615>
- Salamone, F., Belussi, L., Danza, L., Ghellere, M., & Meroni, I. (2015). Design and Development of nEMoS, an All-in-One, Low-Cost, Web-Connected and 3D-

- 
- Printed Device for Environmental Analysis. *Sensors*, 15(6), 13012-13027.
<https://www.mdpi.com/1424-8220/15/6/13012>
- Sanz-Pérez, E. S., Murdock, C. R., Didas, S. A., & Jones, C. W. (2016). Direct Capture of CO₂ from Ambient Air. *Chemical Reviews*, 116(19), 11840-11876.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00173>
- Schmiege, B., Döbber, J., Kirschhöfer, F., Pohl, M., & Franzreb, M. (2019). Advantages of Hydrogel-Based 3D-Printed Enzyme Reactors and Their Limitations for Biocatalysis [Original Research]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 6 - 2018. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00211>
- Scholes, C. A., Smith, K. H., Kentish, S. E., & Stevens, G. W. (2010). CO₂ capture from pre-combustion processes—Strategies for membrane gas separation. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 4(5), 739-755.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2010.04.001>
- Shamna, I., Kwan Jeong, S., & Margandan, B. (2021). Covalent immobilization of carbonic anhydrase on amine functionalized alumino-Siloxane aerogel beads for biomimetic sequestration of CO₂. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 288-295.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.010>
- Shao, P., Ye, J., Shen, Y., Zhang, S., & Zhao, J. (2024). Recent advancements in carbonic anhydrase for CO₂ capture: A mini review. *Gas Science and Engineering*, 123, 205237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgsce.2024.205237>
- Shao, Y., Gan, N., Gao, B., & He, B. (2024). Sustainable 3D-printed β -galactosidase immobilization coupled with continuous-flow reactor for efficient lactose-free milk production. *Chemical Engineering Journal*, 481, 148557.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.148557>
- Sharma, T., Sharma, S., Kamyab, H., & Kumar, A. (2020). Energizing the CO₂ utilization by chemo-enzymatic approaches and potentiality of carbonic anhydrases: A review. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119138.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119138>
- Shen, J., Yuan, Y., & Salmon, S. (2022). Durable and Versatile Immobilized Carbonic Anhydrase on Textile Structured Packing for CO₂ Capture. *Catalysts*, 12(10), 1108. <https://www.mdpi.com/2073-4344/12/10/1108>
- Shen, X., Yang, M., Cui, C., & Cao, H. (2019). In situ immobilization of glucose oxidase and catalase in a hybrid interpenetrating polymer network by 3D bioprinting and its application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 568, 411-418.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.02.021>

- 
- Smith, S., Goodge, K., Delaney, M., Struzyk, A., Tansey, N., & Frey, M. (2020). A Comprehensive Review of the Covalent Immobilization of Biomolecules onto Electrospun Nanofibers. *Nanomaterials*, 10(11), 2142. <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/11/2142>
- Sodiq, A., Abdullatif, Y., Aissa, B., Ostovar, A., Nassar, N., El-Naas, M., & Amhamed, A. (2023). A review on progress made in direct air capture of CO₂. *Environmental Technology & Innovation*, 29, 102991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102991>
- Song, J., Zhang, Z., Han, B., Hu, S., Li, W., & Xie, Y. (2008). Synthesis of cyclic carbonates from epoxides and CO₂ catalyzed by potassium halide in the presence of β -cyclodextrin [10.1039/B815105A]. *Green Chemistry*, 10(12), 1337-1341. <https://doi.org/10.1039/B815105A>
- Sun, H., Jia, Y., Dong, H., Dong, D., & Zheng, J. (2020). Combining additive manufacturing with microfluidics: an emerging method for developing novel organs-on-chips. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 28, 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.10.006>
- Supuran, C. T. (2018). Applications of carbonic anhydrases inhibitors in renal and central nervous system diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(10), 713-721. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1519023>
- Supuran, C. T., & Capasso, C. (2017). An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases. *Metabolites*, 7(4), 56. <https://www.mdpi.com/2218-1989/7/4/56>
- Surampalli, R. Y., Zhang, T. C., Tyagi, R. D., Naidu, R., Gurjar, B. R., Ojha, C. S. P., Yan, S., Brar, S. K., Ramakrishnan, A., & Kao, C. M. (2015). Enzymatic Sequestration of Carbon Dioxide. In *Carbon Capture and Storage* (pp. 401-419). <https://doi.org/doi:10.1061/9780784413678.ch14>
- Vidakis, N., Kalderis, D., Michailidis, N., Papadakis, V., Mountakis, N., Argyros, A., Spiridaki, M., Moutspoulou, A., & Petousis, M. (2024). Environmentally friendly polylactic acid/ferronickel slag composite filaments for material extrusion 3D printing: A comprehensive optimization of the filler content. *Materials Today Sustainability*, 27, 100881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2024.100881>
- Vinoba, M., Bhagiyalakshmi, M., Jeong, S. K., Yoon, Y., II, & Nam, S. C. (2012). Immobilization of carbonic anhydrase on spherical SBA-15 for hydration and sequestration of CO₂. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 91-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.001>
- Wang, X., Li, M., Liu, Z., Shi, Z., Yu, D., Ge, B., & Huang, F. (2024). Carbonic anhydrase encapsulation using bamboo cellulose scaffolds for efficient CO₂ capture and

- conversion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134410>
- Wei, X., Manovic, V., & Hanak, D. P. (2020). Techno-economic assessment of coal- or biomass-fired oxy-combustion power plants with supercritical carbon dioxide cycle. *Energy Conversion and Management*, 221, 113143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113143>
- Weng, Y., Yang, G., Li, Y., Xu, L., Chen, X., Song, H., & Zhao, C.-X. (2023). Alginate-based materials for enzyme encapsulation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 318, 102957. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102957>
- Wilbur, K. M., & Anderson, N. G. (1948). Electrometric and Colormetric Determination of Carbonic Anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176(1), 147-154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51011-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51011-5)
- Wu, F., Argyle, M. D., Dellenback, P. A., & Fan, M. (2018). Progress in O₂ separation for oxy-fuel combustion—A promising way for cost-effective CO₂ capture: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 67, 188-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pecs.2018.01.004>
- Wu, Z., Nan, Y., Zhao, Y., Wang, X., Huang, S., & Shi, J. (2020). Immobilization of carbonic anhydrase for facilitated CO₂ capture and separation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(11), 2817-2831. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.06.002>
- Xie, Y., Zhou, H., Wang, J., Meng, H., Wei, S., Sun, J., & Hu, Y. (2025). Enhancing autoclaved aerated concrete performance via replacement of fly ash with granite stone powder and steel slag: Critical role of Ca/Si ratio. *Construction and Building Materials*, 477, 141360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2025.141360>
- Xiong, R., Zhang, Z., Chai, W., Chrisey, D. B., & Huang, Y. (2017). Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting. *Biofabrication*, 9(2), 024103. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa74f2>
- Xu, X., Pose-Boirazian, T., Eibes, G., McCoubrey, L. E., Martínez-Costas, J., Gaisford, S., Goyanes, A., & Basit, A. W. (2022). A customizable 3D printed device for enzymatic removal of drugs in water. *Water Research*, 208, 117861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117861>
- Yadav, R. R., Mudliar, S. N., Shekh, A. Y., Fulke, A. B., Devi, S. S., Krishnamurthi, K., Juwarkar, A., & Chakrabarti, T. (2012). Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO₂ to calcite. *Process Biochemistry*, 47(4), 585-590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.017>

- Yang, S.-Y., Lin, J.-Y., Li, P.-R., Hanh, N. T. D., Srinophakun, P., Liu, B.-L., Chiu, C.-Y., Ng, I. S., Chen, K.-H., & Chang, Y.-K. (2025). Functionalized polyacrylonitrile nanofiber membranes with carbonic anhydrase for enhanced carbon dioxide capture and conversion: A performance study. *Biochemical Engineering Journal*, 213, 109570. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109570>
- Yuan, Y., & Qian, C. (2025). Comparison and mechanism of CO₂ sequestration by different carbonic anhydrase producing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 222, 109812. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2025.109812>
- Züger, F., Berner, N., & Gullo, M. R. (2023). Towards a Novel Cost-Effective and Versatile Bioink for 3D-Bioprinting in Tissue Engineering. *Biomimetics (Basel)*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biomimetics8010027>
- Zexiong, C. (2022, 2022/04/29). A Review of Pre-combustion Carbon Capture Technology. Proceedings of the 2022 7th International Conference on Social Sciences and Economic Development (ICSSSED 2022),
- Zhang, D., Bai, Y., Niu, H., Chen, L., Xiao, J., Guo, Q., & Jia, P. (2024). Enzyme Immobilization by Inkjet Printing on Reagentless Biosensors for Electrochemical Phosphate Detection. *Biosensors (Basel)*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/bios14040168>
- Zhang, G., Liu, J., Qian, J., Zhang, X., & Liu, Z. (2024). Review of research progress and stability studies of amine-based biphasic absorbents for CO₂ capture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 134, 28-50. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2024.01.013>
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli Rao, Y., & Zhang Tian, C. (2015). Enzymatic Sequestration of Carbon Dioxide. *Carbon Capture and Storage*, 401-419. <https://doi.org/10.1016/9780784413678.ch14>
- Zhang, Y., Gu, J., Fu, Y., Shi, W., Wang, X., Su, Y., Wang, X., & Wang, X. (2025). Immobilization of lipase on mesoporous silica nanocarriers for efficient preparation of phytosterol esters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 286, 138310. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138310>
- Zhao, T., Liu, Y., Wu, Y., Zhao, M., & Zhao, Y. (2023). Controllable and biocompatible 3D bioprinting technology for microorganisms: Fundamental, environmental applications and challenges. *Biotechnology Advances*, 69, 108243. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108243>
- Zhigarkov, V., Volchkov, I., Yusupov, V., & Chichkov, B. (2021). Metal Nanoparticles in Laser Bioprinting. *Nanomaterials (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/nano1102584>

- 
- Zhou, W., Zhang, H., Liu, Y., Zou, X., Shi, J., Zhao, Y., Ye, Y., Yu, Y., & Guo, J. (2019). Preparation of calcium alginate/polyethylene glycol acrylate double network fiber with excellent properties by dynamic molding method. *Carbohydrate Polymers*, 226, 115277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115277>
- 行政院環境保護署. (2023). 淨零排放路徑 112-115 綱要計畫.
- 張名惠，謝佩珊，黃國璋，廖啟雯. (2016). 二氧化碳溶解封存技術發展. 工業污染防治.
- 環境部. (2024). 水中總有機碳檢測方法—過氧焦硫酸鹽加熱氧化/紅外線測定法.