

生物科

科別：生物科

組別：高中組

作品名稱：幾丁聚醣膜的生物感測器及電化分析方法之  
探討

關鍵詞：幾丁聚醣、交聯劑、Michaelis-Mentent Equation

編號：040707

學校名稱：

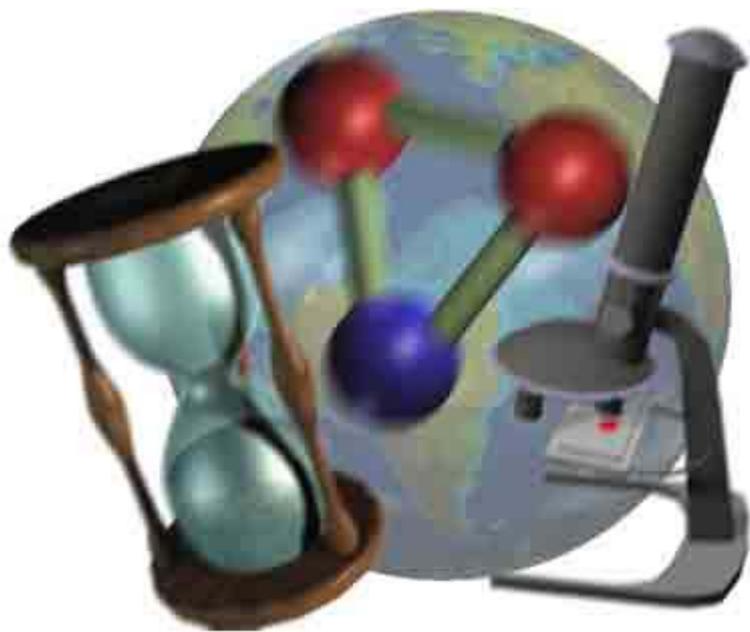
國立台南第一高級中學

作者姓名：

王崇丞、李耕溥、殷士閔、王衍修

指導老師：

鄧明聖



## 摘要

本實驗的目的，就是希望利用幾丁聚醣穩定的性質，把過氧化氫酶用 1,5—戊二醛交聯在幾丁聚醣膜上，將自由基的前身—過氧化物(本實驗使用過氧化氫)在分解過程中造成的電位隨時間的改變速率，以米氏方程式 (Michaelis-Mentent Equation) 求得交聯在幾丁膜上之過氧化氫酶的活性，將可針對各種過氧化物個別濃度作鑑定，以應用於各種較複雜及濃度較低的環境檢測上。而最後得出在沒有除去氧氣的影響下，其偵測的靈敏度可達約 0.000863M/mV(即濃度每改變 0.000863M 可得 1mV 電位差)

### 壹、研究動機

因為見到許多生技公司把人工合成的膜應用在生物檢測上，利用其穩定的性質操作，所以，我想從自然界中取材，希望藉由甲殼類的幾丁質作為自由基感測器的膜。

幾丁質 (chitin) 廣泛地存在於自然界中，例如海洋無脊椎動物、昆蟲外殼以及藻類、真菌和酵母菌等菌體的細胞壁中，其乃是由 N-乙醯基-D-葡萄糖胺 (N-acetyl-D-lucosamine) 單位以  $\beta$ -1,4 鍵結而成的多醣體，而除去部份或全部乙醯基的聚合物則稱為幾丁聚醣 (chitosan) 或甲殼素。

另外，幾丁質是地球上僅次於纖維素含量第二多的多醣類，且為自然界可再生利用之資源。幾丁聚醣因具有生物分解性、無毒性、良好的生物相容性及

價格便宜，而且可從廢棄的蝦蟹殼、葷類中大量取得等優點，所以已經被用於生醫材料方面。目前已知幾丁聚醣為生物性有機物中極為穩定之材質，且已被廣泛的運用在各個科學領域。

而自由基會在人體許多部位及反應中產生，包括神經系統、免疫系統、血液循環系統等等，就連 ATP 在轉換間也會產生此種對人體具攻擊性的物質。目前要測出液體中的自由基較為困難，因此希望將過氧化氫酶(catalase)種在幾丁聚醣膜上並配合設計的檢測電極作為生物感測器，偵測溶液中的過氧化氫以間接計算自由基的含量，可作微量、快速、經濟的分析。

## 貳、研究目的

1. 找出處理蟹殼蟹殼，將其變成溶液的方法。
2. 研究如何做出多孔隙、機械強度佳的幾丁膜。
3. 比較各種製程的利弊。
4. 研究用戊二醛交聯過氧化氫酶和幾丁膜的反應條件。
5. 運用適當的方法計算過氧化氫的濃度。
6. 比較各種計算方式的可行性、靈敏度。

## 參、原理

測過氧化物的濃度

(1)庫倫分析法(Coulometric analysis)

V：電壓

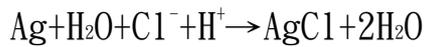
$$V/R=I$$

R：電阻

$$Q=I*T=V/R*T=Q$$

I：電流

## (2) 電位差



(固體不需考慮，而 AgCl 為飽和  $\text{O}_2$  在水中溶解度固定)

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{AgCl}][\text{O}_2]}{[\text{過氧化物濃度}]}$$

$$[\text{AgCl}][\text{O}_2] = k(\text{固定})$$

$$\Delta E = \frac{RT}{nF} \ln [\text{過氧化物濃度}]$$

(Nernst Equation)

P：壓力

V：體積

n：莫耳數

R：氣體常數

## (3) 壓力

$$PV = nRT$$

## (4) 電壓上升斜率

$$1/V_0 = K_m/V_{\max}[S] + 1/V_{\max}$$

$V_0$ ：初始反應速率

$K_m$ ：米氏常數

$V_{\max}$ ：最高反應速率

## 肆、實驗材料

1. 紅蟬殼
2. Toluidine blue
3. Potassium polvriny sulfate
4. 豬肝
5. 醋酸
6. 氫氧化鈉
7. 鹽酸

8. 1,5-戊二醛(glutaraldehyde)

9. 硝酸鎂

10. 三磷酸鈉

11. 硼氫化鈉

12. 硼酸鈉

13. 生理食鹽水

14. 二次純水

## 伍、實驗器材

1. 銀參考電極

2. 恆溫槽

3. pH meter

4. 電導感測器

5. Science workshop 750(Data Studio)

6. 磁攪拌器

7. 電子秤

8. 烘箱

9. 高速離心機

10. 食物調理機

11. 冰箱

## 陸、實驗方法和過程

### 步驟一、蟹殼幾丁聚醣的製備

- 1、取紅蟳殼約 100 個。
- 2、用清水沖洗浸泡，除去表面雜質。
- 3、用稀  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$  煮沸去除蛋白質。
- 4、以  $\text{HCl}$  浸泡以去除  $\text{CaCO}_3$ 。
- 5、用濃  $\text{NaOH}$  浸泡一個月，使幾丁質去乙酰化。

### 步驟二、製備幾丁膜

- 1、將浸泡濃  $\text{NaOH}$  一個月的蟹殼用二次純水洗成中性。
- 2、固定的比例加入醋酸後隔水加熱。
- 3、加熱至約  $80^\circ\text{C}$  全部溶解後熄火。
- 4、將製成的溶液塗抹在玻片上，放入烤箱烘乾，即可得到所需厚度的膜。

### 步驟三、從豬肝中取出過氧化氫酶

- 1、將豬肝放入果汁機中打碎。〔因過氧化氫酶為分泌性的酵素，多散佈在材料中，只要研磨均勻，大多可抽取得到。但在均質前，通常都要把材料先切成碎片（增大表面積），才容易進行抽取〕
- 2、用高速離心機離心後取上清液，再使用紗布過濾。

#### 步驟四、將酵素固定在幾丁聚醣上

- 1、將幾丁膜放入 1% 的戊二醛 1 分鐘。
- 2、放入步驟三的豬肝酵素液使其交聯約 48 小時。
- 3、而後取出放入硼酸鈉 1 小時(洗滌、防腐)。

#### 步驟五、動物膠配置

1. 取 4.0g 澱粉倒入乾淨燒杯中。
2. 加入 100ml 飽和  $\text{KCl}_{(\text{aq})}$  液體。
3. 置於磁攪拌器上攪拌約 15 分鐘後開始加熱。
4. 約加熱 15 分鐘後，加入氯化銀。
5. 繼續加熱攪拌，至沸騰為止，拿出等冷卻後使用。

#### 步驟六、製作電極

1. 根據附錄中〔圖表十五〕的配置情形，利用白金絲製作白金電極，一個是標準電極，另一個與待測液接觸，使兩者間因濃度差產生電位差。
2. 標準電極中以  $\text{KCl}$ 、 $\text{AgCl}$  為電解液，並加有固體，以確保電解質飽和，其下以動物膠防止溶液與外界交換過快，並加上兩層醋酸纖維膜。
3. 將含有酵素的幾丁膜置於檢測電極旁，其催化過氧化氫分解與邊準電極產生的濃度差變化得出反應速率。

步驟七、利用 Science workshop 750 檢測電壓變化

1. 將完成的感測器接到差動放大器中，將放大率調整到 41 倍(可以更高，加大放大率可使感測器的敏感度提升)
2. 再將兩極接到 Science workshop 750 上。
3. 加入已知濃度的雙氧水溶液
4. 觀察電壓改變的斜率，帶入 Michaelis-Mentent 的方程式中求其  $K_m$ 、 $V_{max}$  值，在 Excel 中畫出校正曲線
5. 重複實驗，變更過氧化氫濃度，以及測試過了兩個月後酵素的活性

## 柒、研究結果

### 1 生物感測器之敏感度

因為介面卡偵測的限制，及斜率的改變最小為  $1/100000$ (速率)，根據米氏方程式： $1/V_0 = K_m/V_{max}[S] + 1/V_{max}$ ， $1/V_0$  用  $100000$  代，將以下圖表中求得的公式代入求得  $[S]$ ，得出的即是偵測敏感度。代表的意義是：當濃度每改變某一數值後，電壓產生  $1mV$  的改變。

例如將 (圖表六) 得出的公式： $y = 86.077x + 213.55$

$$R^2 = 0.993$$

$(100000 - 213.55) / 86.077 = 1159.27$  (此值為濃度倒數)

$1 / 1159.27 = 0.000863$  (即濃度每改變  $0.000863M$  可得  $1mV$  電位差)

## 2 找出蟹殼 Chitonsan 溶解之最佳條件

下表為尋找蟹殼 Chitonsan 溶解之最佳條件，分別在改變鎂離子滴數及醋酸數量下所測得的溫度與 pH 值：

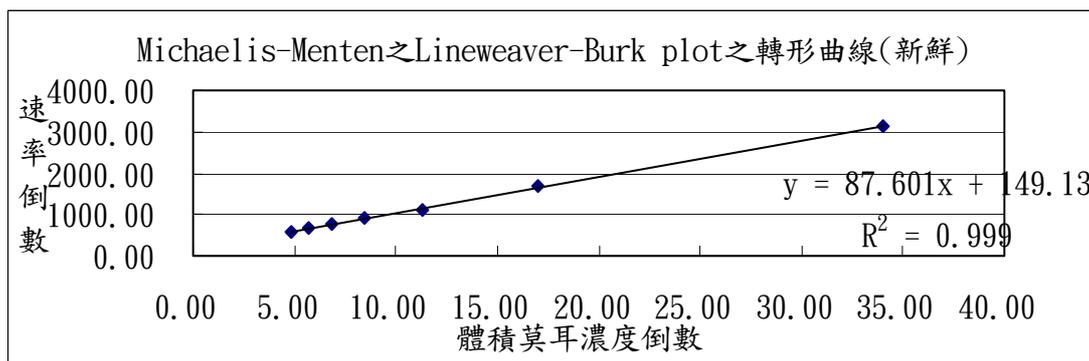
PH 值	醋酸(ml)	Mg <sup>2+</sup> (滴數)	水量(ml)	溫度(結果)
3.35	2	1	48	58°C
3.30	2	3	48	55°C
3.15	2	5	48	46°C
2.90	2	7	48	48°C
2.79	2	9	48	50°C
3.75	1	1	49	88°C
3.14	3	1	47	75°C
	160	15	400	85°C

(圖表一)

<註一>:以上溫度為 Chitonsan 開使溶解的值，全部溶解的溫度大約是在 60°C~62°C 之間。如果 pH 上升或溫度下降，Chitonsan 會再次沉澱。

<註二>:不同種的蟹殼，甚至是不同的部位都有可能造成溶解溫度的不同，因此以上數值只能大概的範圍以作為大量製備的參考。

3 生物感測器在各種濃度之過氧化氫下的校正曲線：



(圖表二)

體積百分率濃度	速率	速率倒數	體積莫耳濃度	體積莫耳濃度倒數
0.1	0.00032	3125.00	0.02941	34.00
0.2	0.00060	1666.67	0.05882	17.00
0.3	0.00092	1086.96	0.08824	11.33
0.4	0.00111	900.90	0.11765	8.50
0.5	0.00130	769.23	0.14706	6.80
0.6	0.00151	662.25	0.17647	5.67
0.7	0.00180	555.56	0.20588	4.86

(圖表三)

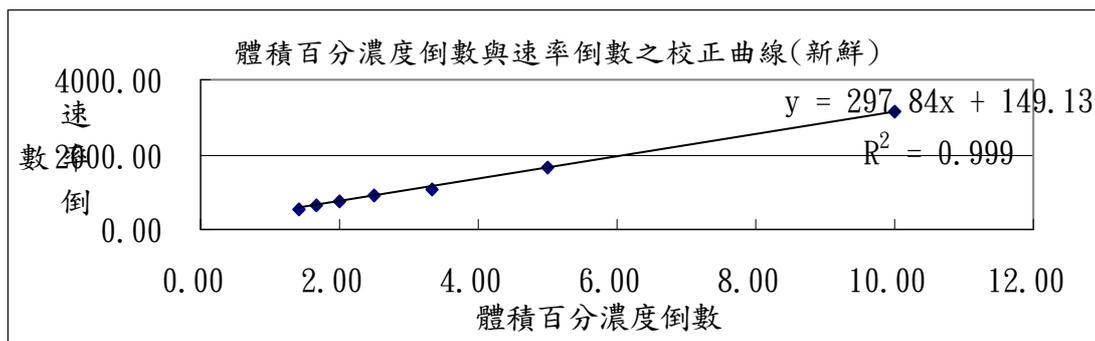
$$y = 87.601x + 149.13$$

$$R^2 = 0.999$$

$V_{max}=0.006706$

$K_m=0.587414$

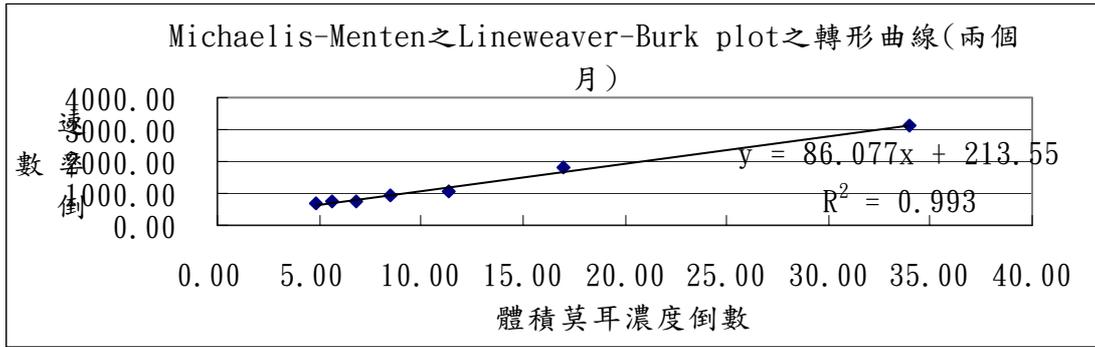
$V_{max}/K_m$ (酵素活性) : 0.011414



(圖表四)

體積百分率濃度	體積百分率濃度倒數	速率	速率倒數
0.1	10.00	0.00032	3125.00
0.2	5.00	0.00060	1666.67
0.3	3.33	0.00092	1086.96
0.4	2.50	0.00111	900.90
0.5	2.00	0.00130	769.23
0.6	1.67	0.00151	662.25
0.7	1.43	0.00180	555.56

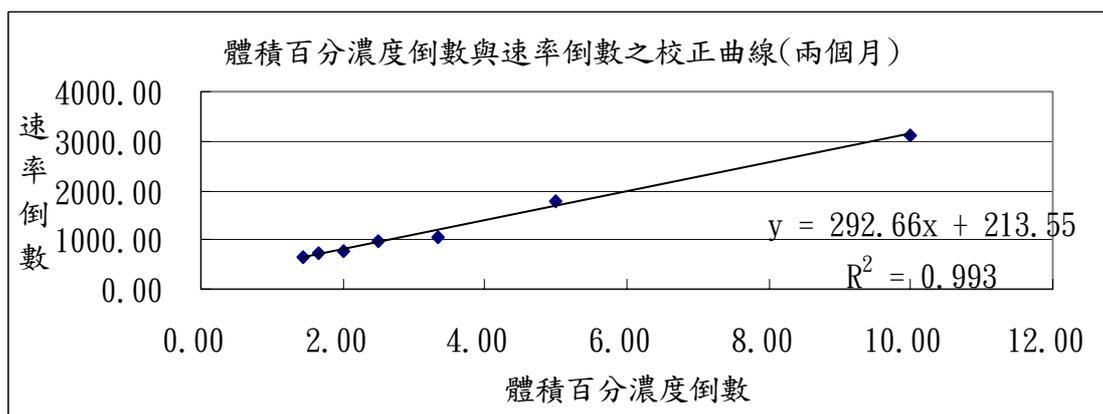
(圖表五)



(圖表六)

體積百分率濃度	體積百分率濃度倒數	速率	速率倒數
0.1	10.00	0.00032	3125.00
0.2	5.00	0.00056	1785.71
0.3	3.33	0.00095	1052.63
0.4	2.50	0.00105	952.38
0.5	2.00	0.00129	775.19
0.6	1.67	0.00137	729.93
0.7	1.43	0.00151	662.25

(圖表七)



(圖表八)

體積百分率濃度	速率	速率倒數	體積莫耳濃度	體積莫耳濃度倒數
0.1	0.00032	3125.00	0.02941	34.00
0.2	0.00056	1785.71	0.05882	17.00
0.3	0.00095	1052.63	0.08824	11.33
0.4	0.00105	952.38	0.11765	8.50
0.5	0.00129	775.19	0.14706	6.80
0.6	0.00137	729.93	0.17647	5.67
0.7	0.00151	662.25	0.20588	4.86

(圖表九)

$$y = 86.077x + 213.55$$

$$R^2 = 0.993$$

$$V_{max}=0.004683$$

$$K_m=0.403077$$

$$V_{max}/K_m(\text{酵素活性}) : 0.011618$$

## 捌、根據研究所得的討論及應用

### (一)、幾丁溶液的製備

要製作幾丁膜有兩種方式，一種是直接利用蟹殼的基本架構去乙酰化後製得，另一種是將其溶解後再製作成膜。我們選擇後者的方法是因為其他三個 partner 的實驗所必須，而另外則是為了將來的擴展，我們還可將幾丁溶液加入飽和之 sodium-tripoly-phosphate 中使其硬化成球珠，將可增加有效反應面積以增加反應速度，而本實驗的重點印證提出檢測自由基方法的可行性，因此雖然有嘗試此法成功，且應用於另一實驗——幾丁質包埋酵母菌處理廢水上，但沒有在本實驗中作成數據。而參考文獻中製膜的方法可發現需要飽和 NaOH 在超過攝氏一百度才能溶解，因此我們嘗試尋找別的方法，結果發現使用 0.33M 的醋酸及少量的鎂離子即可在約 85°C 溶成液態，且後來又發現只要依照配方放置在常溫下半天的時間，即可變成液態。其中若只有加入醋酸而沒有加入鎂離子，溶解就會較為困難，而鎂離子加的量又有極限，若超過一定限度則溶解溫度也不會再降了。推測可能原因是鎂離子占去了先前鈣離子在幾丁質的空洞，因鎂離子和醋酸的介入，使得原本存在分子鏈間的氫鍵被與鎂或醋酸的共價鍵取代，導致熔點下降。但以上都是純粹猜測，若有更精密的儀器即可得出真正的反應機構，了解其中的奧秘。(註：因為加入鎂離子後的熔點有極值，而非一直下降，因此推測反應中幾丁質的鏈長沒有變短，所以可能和 Fenton Reagent 的反應無關)

### (二)、幾丁膜的製備

依據文獻上的方法是將浸泡濃 NaOH 一個月後的蟹殼放入特殊耐熱容器加熱至攝氏一百多度後可將其溶解，然後再靜置等幾丁溶液冷卻、乾燥成膜。不過此方法的缺點在於這種膜不能在酸性的環境下操作，因為其去乙醯化程度太高，導致碰到酸時分子鏈間之氫鍵被破壞，熔點下降。而在實驗中我們發現，若在本實驗配方下配製的幾丁溶液，因為沒有在強鹼中加熱的過程，因此去乙醯化的程度不高，所以可以在酸性的環境下操作。另外，實驗中發現，若在溶液上噴灑濃 NaOH，將會出現一層白色的膜凝固出來，而這些白色的物質即是幾丁聚醣膜，但因為我們希望幾丁膜能重複使用，所以需要機械強度高的膜，然而用此方法做出的膜缺乏韌性，因此不採用。

在幾丁溶液冷卻成膜的過程中，我們分三個方向考慮，其一是利用真空冷凍乾燥器製作而成，但因缺乏設備所以作罷，而且此方法製得的機械強度也不高；另外則是放在室溫下靜置，待其冷卻而得，此方法是無意間在殘留幾丁溶液的燒杯中發現的，而且做出的幾丁膜韌性很強，是效果最好的方法，但因為不能控制膜的厚度、均勻度及孔隙大小，因此最後採用將幾丁溶液滴在大片的玻片上，將玻片一面用馬達等速旋轉，使溶液均勻，一面放在烘箱中，控制溫度、溶液稀釋的比例，使其蒸發速度一致，以增加孔隙大小的一致性。

### (三)、生物感測器的敏銳度

目前製成的感測電極之敏感度為  $0.000863\text{M}/\text{mV}$  (即濃度每改變  $0.000863\text{M}$  電位差  $1\text{mV}$ )，此數值之所以不夠理想是因為本實驗的目的在於證

明利用 Michaelis-Mentent 的方法可以做出對未知溶液的檢測，因此實驗是在開放式的環境下操作，並沒有隔絕空氣中氧的作用，導致在放大 41 倍後會因為外界氧氣的干擾使得電位下降的曲線有上下波動的現象，若希望提高此感測器的靈敏度及實用價值，可將感測器置於封閉的錐形瓶內，將氮氣通入其中，因氮氣比氧氣重且穩定，所以能夠排除干擾的因素，而後即能將感測器的放大倍率調高，即可獲得更高的敏銳度。另外，本實驗使用的生物來源是市場中取得的豬乾萃取液，因為豬肝中的酵素種類複雜，相對而言所含過氧化氫酶的純度很低，但是微量的酵素仍然使我們的實驗得到印證，相信如果能夠使用純化過的過氧化氫酶，一定能夠提高反應的速度及減少因時間產生的誤差。

#### (四)、經實驗後比較各種測定方法的可行性

##### (1)庫倫分析法(Coulometric analysis)：

原本的想法是，用庫倫分析法中電流對時間作圖的方式，描繪出電流的下降曲線。因為必須等到〔時間〕趨近於零才能得到較準確的值，將會導致反應的時間過長，使感應器檢測的時間無法在短時間內完成。後來想到利用加入酵素的方式，使過氧化氫自身氧化還原加速，藉由比較與原本曲線的差異，求得該溶液的濃度。但實驗結果發現，因銀電極在製作時為了檢測的穩定性及靈敏度，將內電阻做得很大之故，本實驗產生的電流極小，難以觀察。

##### (2)電位差：

影響電位的因素包括溶液中各種物質的濃度，以此方法測得的將是混合各種影響濃度的因素所得出的結果，但我們只純粹要測過氧化氫的濃度，因此若溶液中的背景不單純，內含的物質複雜，將影響輸出的電位差，導致檢測不準確。

(3)雙氧水分解生成氧氣的氣體壓力：

當壓力改變 133mm-Hg，則輸出 1V，敏感度為  $V$ ：體積(L)  
(0.133/760)\*V/0.0821/298=n  $n$ ：莫耳數 (mol)

這個方法存在以下缺點：

1. 雙氧水即使被催化也無法完全生成氧，且生成的氧氣有一部分也會溶解在溶液當中，其溶解的量隨溶液的性質而異。
2. 反應慢，要收集所有反應的氣體需要長時間。而且酶類反應求活性時需要反應初期始時的最大速率，若反應時間過長，則無法求取最正確的酶類活性。
3. 若要測反應氣體壓力的改變的速率則類似 Michaelis-Menten 的方法，但受限於壓力感測器的響應時間太長而無法測氣壓改變速率。
4. 因為使用注射針筒的體積刻度時，針筒前端與塑膠管相連處的體積因重疊而造成誤差，因此要增大注射針筒的總體積才能降低誤差的比例，故無法使微量氣體墨爾數改變，形成大的氣壓改變。

(4)電壓上升斜率：

Michaelis—Menten 的方程式  $V_0 = V_{max}[S]/(K_m + [S])$

此方程式適用於反應初期的狀態，所以利用在過氧化氫還原成氧氣時電位下降的速率，推之溶液的體積莫耳濃度，而實驗證明可行。

#### (五)、影響檢測的因素探討及解決改良方法

經實驗後發現，幾丁膜浸泡戊二醛時會有硬化的現象，因此若泡太久會變成碎片，嘗試過後認為在 1% 戊二醛下浸泡依分鐘較文獻上在 0.025% 下浸泡 30 分鐘的效果好，因此採用此配方。而以戊二醛交聯酵素時其交聯量的多寡又常會與反應溫度、反應時間、孔隙、幾丁膜上幾丁聚糖含量比例等有關，因此在實驗中我們設計了數個實驗組，分別改變其中的操縱變因以比較出最適合的反應條件。(註：因幾丁聚糖含量的比例隨著去乙酰化程度不同而有差異，單考量到製成膜的耐酸度，所以保持原來方法；而將幾丁溶液製成膜時採用定溫烘乾的方式，因此此兩項不列入操縱變因)

編號 變因	A	B	C	D	E	F
交聯時間	1 天	1 天	2 天	2 天	3 天	3 天
反應溫度	室溫	4°C	室溫	4°C	室溫	4°C

(圖表十)

註：最後裝入電極觀察反應時的斜率，結果發現 F 的效果最好。

#### 1. 氧氣的產生及測量

本實驗是利用過酵素分解過氧化氫成為氧氣，但如果反應速度(即電壓上升斜率)慢，則會被過氧化氫的自然分解率所影響，因此計算時要將背景值除去，

原本使用兩個對稱的電極經由差動放大器扣除，但因為無法做出完全對稱的兩個電極，因此只好針對單一的電極作校正曲線後再行扣除。另外實驗中發現，原本使用的塑膠管壁的介面性質也會影響過氧化氫的分解速率，我們將玻璃管和塑膠管同時插入雙氧水中，靜置一小時後比較，塑膠管壁上明顯佈滿了許多氣泡，所以後來改採玻璃管。在偵測時我們還發現下降的斜線中有些許波動的情況，經實驗後證實此為空氣中氧的影響，因此時放大器之放大倍率為 41 倍，故波動的情形也會造成一定的誤差。若要改善這種情形，只須灌入氮氣以隔絕氧氣操作即可。以上的問題若在超微量的分析上都會造成一定的誤差，因此必須進一步排除。

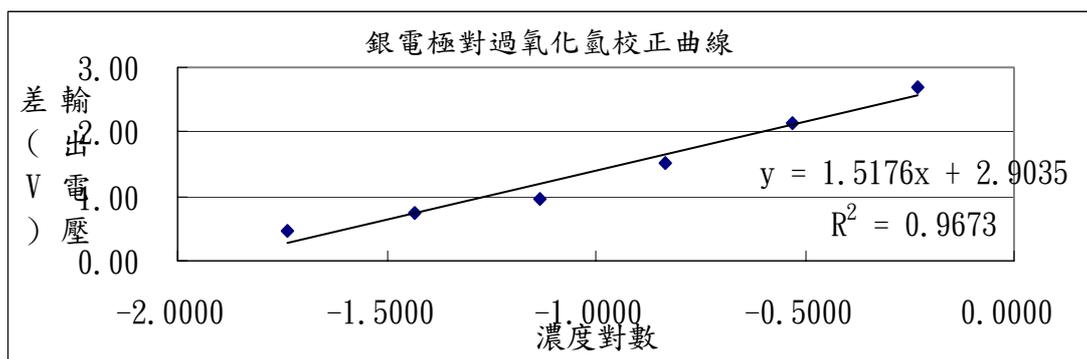
#### (六)、計算產生自由基的數目

將偵測得出的過氧化物的體積莫耳濃度，乘上溶液的體積得到過氧化物的莫耳數，因為每個過氧化物可產生兩個自由基，所以可以間接計算出自由基的數目。這種方法算得的是溶液中將會產生的自由基數目，因為生化系統中自由基存在的時間很短，而代謝不正常的過氧化物又將會產生自由基補充，所以生化系統中某一時刻的過氧化物濃度正意味著下一時刻將會產生的自由基數目。利用本實驗方法可針對過氧化物中的過氧化氫所產生的自由基作偵測，若生化系統中有過量的過氧化氫，即可針對會產生過氧化氫的部位作範圍更小的檢測。相同的，本實驗也可換上不同的過氧化物酵素，針對各種單獨的過氧化物產生的自由基做追蹤，即可擴大本實驗的實用範圍。

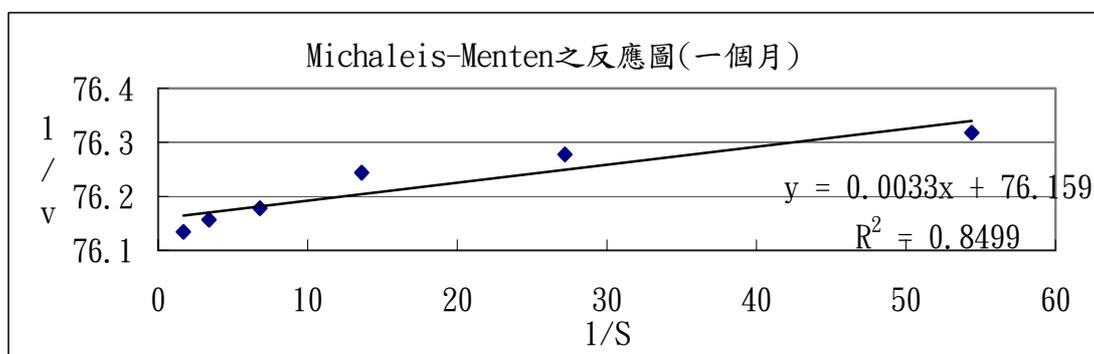
## 玖、參考資料

1. 陳國誠，生物固定化技術與產業應用，一版一印，台灣，茂昌圖書有限公司，167、285 頁，2000 年 11 月.
2. 謝魁鵬、魏耀輝，最新生物化學實驗，一版，台灣，藝軒圖書出版社，143 頁，1994 年九月.
3. 黃郁文、黃芊豪、楊順、吳政勳，科學作品彙編，一版，台灣，國立台南第一高級中學，21 頁，1999 年 8 月.
4. 陳信成，科學作品彙編，一版，台灣，國立台南第一高級中學，2000 年 8 月.
5. 邱念華、熊楚強、王月，電化學，一版，台灣，文京圖書有限公司，101 頁，1996 年 7 月

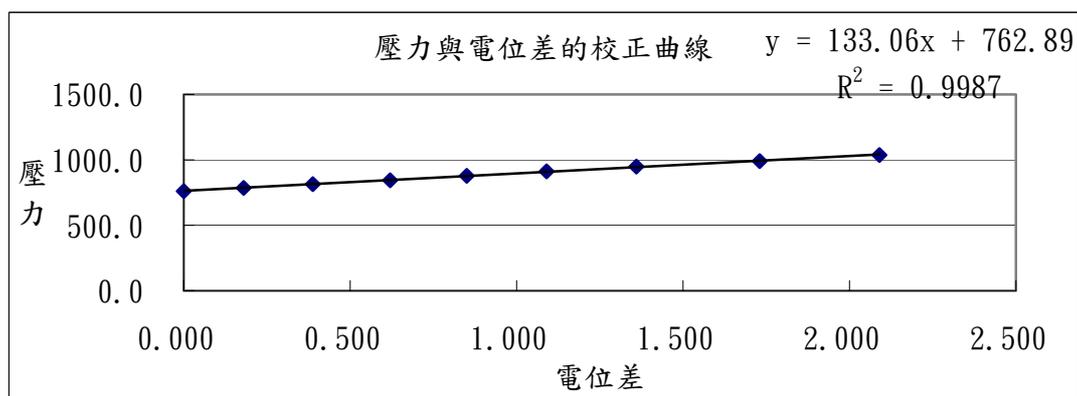
拾、附錄



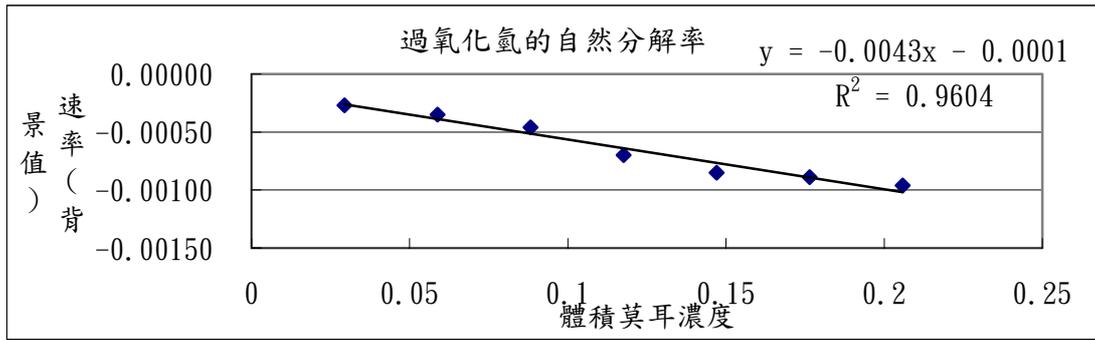
(圖表十一)



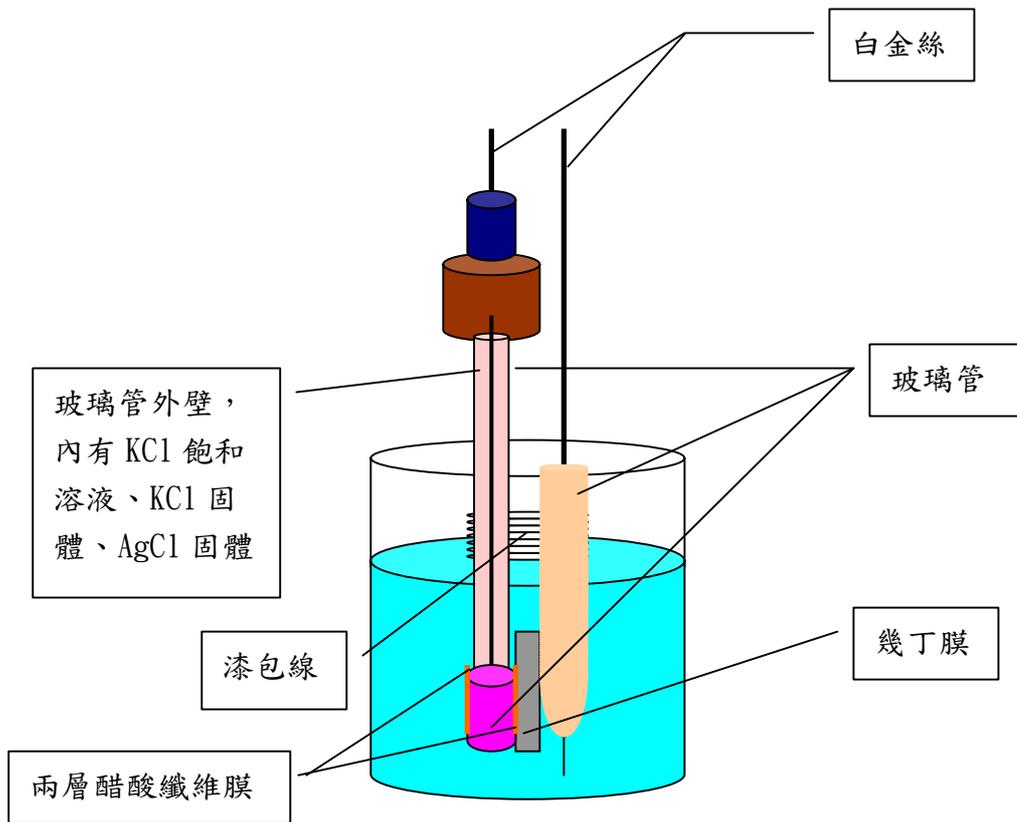
(圖表十二)



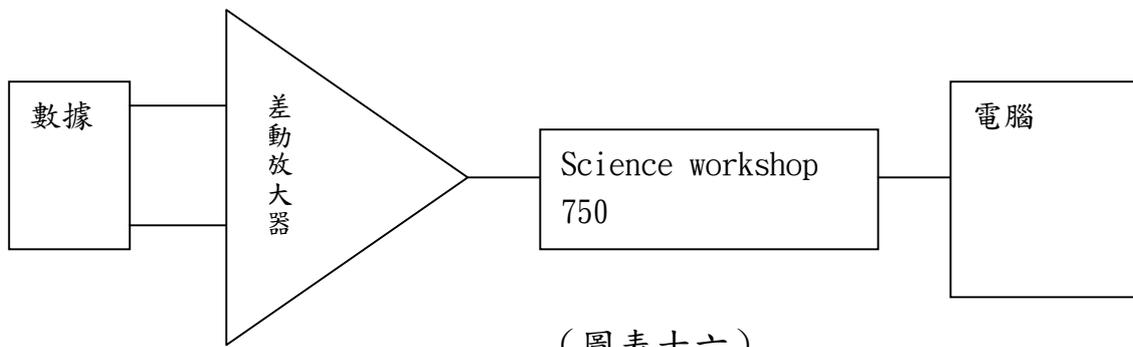
(圖表十三)



(圖表十四)



(圖表十五)



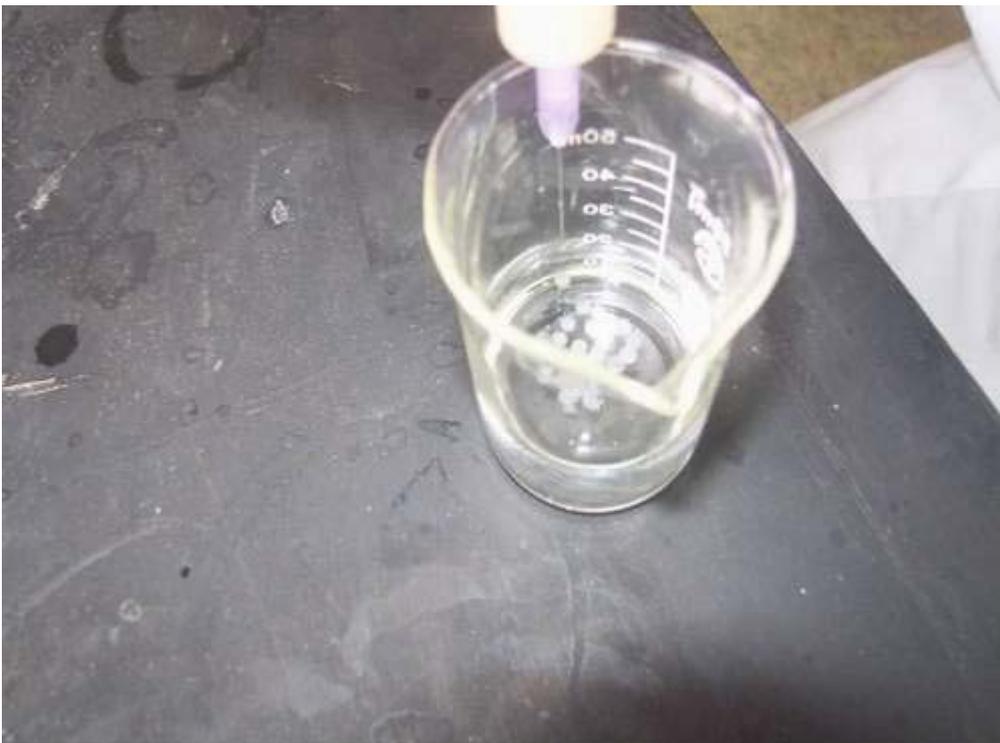
(圖表十六)



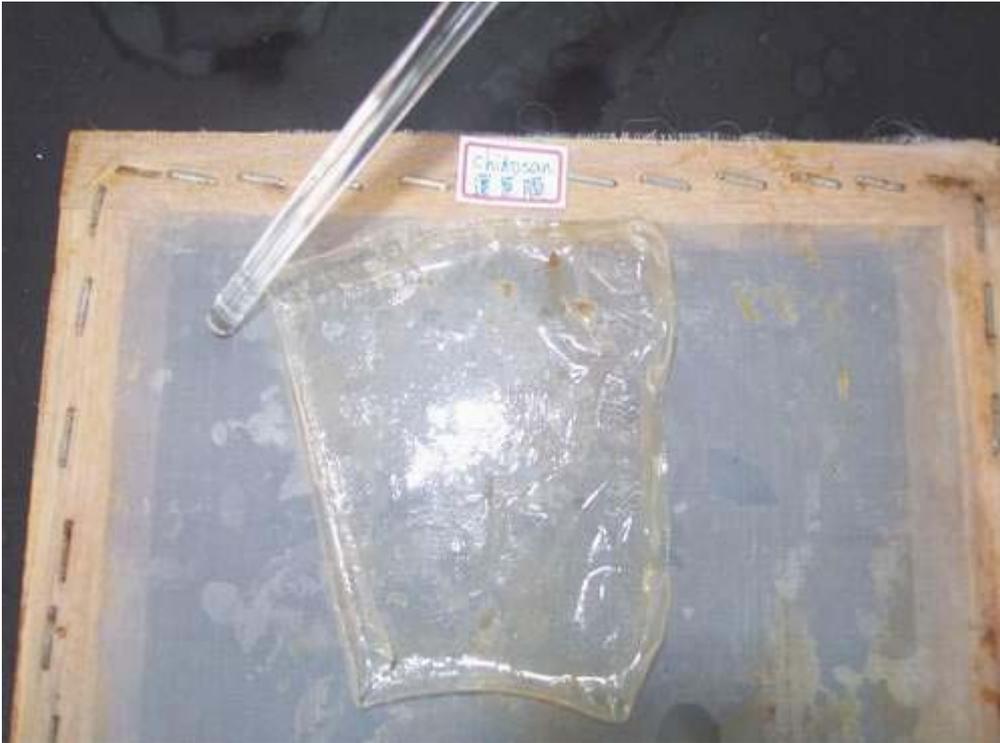
(圖片一)幾丁聚醣環溶液(右)與球珠(左)



(圖片二)磷酸鈉溶液



(圖片三)幾丁球珠硬化過程



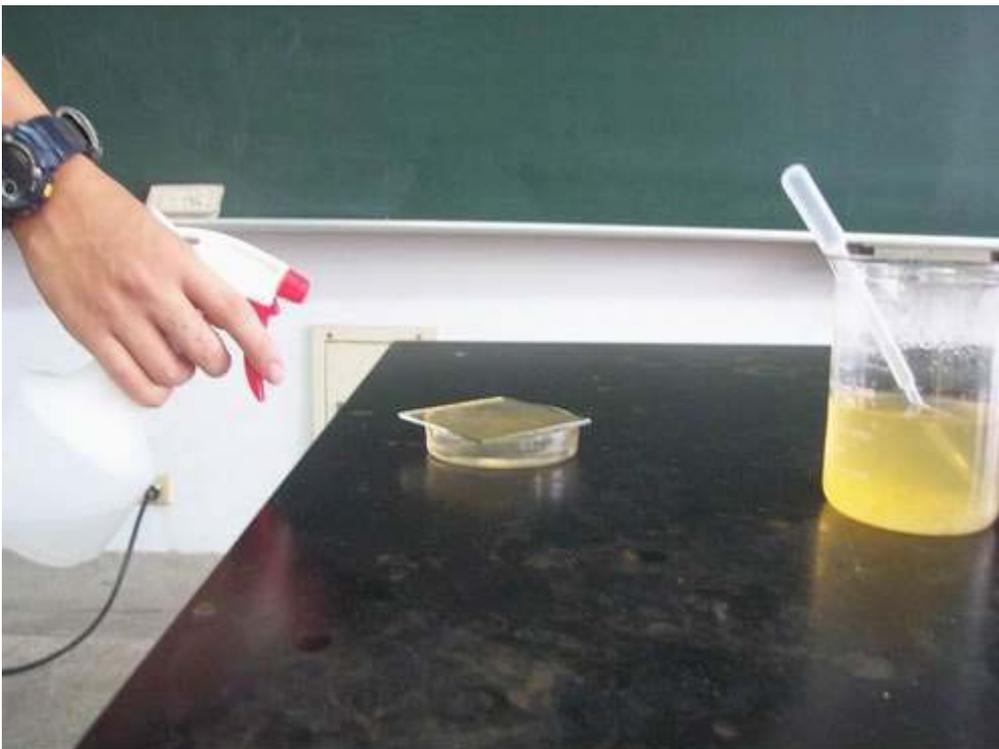
(圖片四)從烘箱中拿出的幾丁膜



(圖片五)在不同濃度的戊二醛中交聯的結果



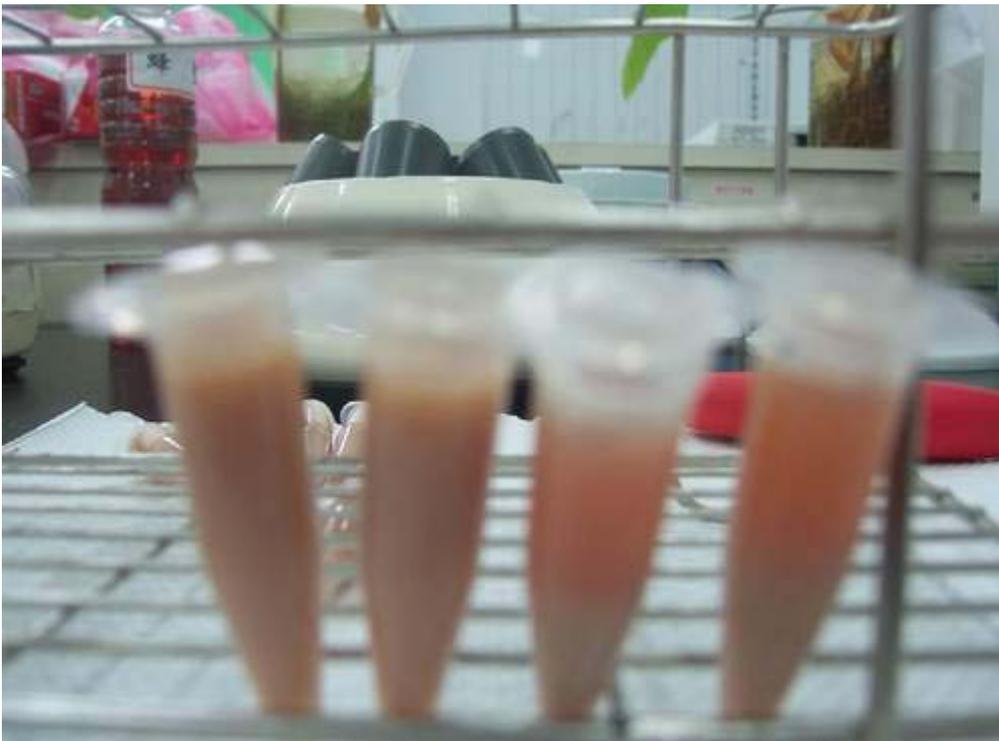
(圖片六)pH meter



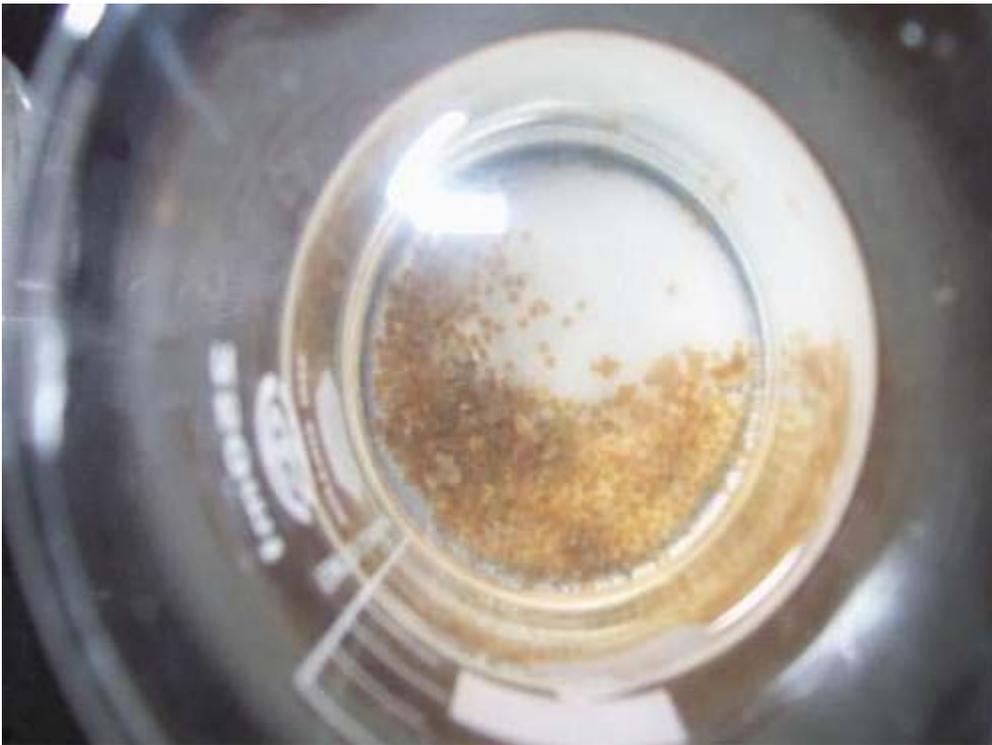
(圖片七)幾丁膜噴戊二醛



(圖片八)豬肝萃取液



(圖片九)離心後的豬肝萃取液



(圖片十)球珠包覆豬肝萃取液



(圖片十一)幾丁球珠



(圖片十二)將豬肝酵素液離心



(圖片十三)幾丁球珠(左)與偵測電極(右)

## 評語

本研究題材甚佳，有應用性，理論基礎亦佳。