

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生活與應用科學科

第一名

040808

昆蟲纖維水解酵素生產及其於生質能源應用上的特性

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 馬蓁華 高二 楊喬楓	指導老師： 宋芬菊
-------------------------	--------------

關鍵詞：纖維酵素、結合區位、生質能源

昆蟲纖維水解酵素生產及其於生質能源應用上的特性

摘要

纖維素是最豐富的再生能源之一！如何有效的將多醣組成的纖維素水解成單醣並加以應用是生質能源發展上的一大難題。我們以真菌 *Trichoderma reesei* 纖維水解酵素作為對照組，研究兩種新發現的昆蟲纖維水解酵素 CH1、CH2 與纖維素是否具有結合區位，同時探討結合區位對不同纖維素的影響，並進行水解反應。蛋白質電泳實驗證實 *T. reesei* 纖維水解酵素確實能與纖維素結合。家蠶生產的 CH1、CH2 因體液未純化，改採西方墨點法分析。參酌實際水解的結果得知：具結合區位的 CH1 較無結合區位的 CH2 水解效率高。昆蟲纖維水解酵素(CH1、CH2)較商業用真菌酵素(*T. reesei*)水解效率高。本實驗使用具東方特色的家蠶作為生產 CH1、CH2 的平台，除提高效率外，亦可作為台灣生技發展領先全球的特色。

壹、研究動機

學習基礎化學第四章【能源與生活】時，教材中提及許多生質能源的尖端科技，引發我們探討生質能源的興趣。基礎化學第五章【醣類】、選修化學(下)第八章【天然聚合物】教材中提到纖維素是地球上最豐富的再生能源之一。台灣每年產生許多農業廢棄物如稻桿等，都是廉價的纖維來源。參考化學(下)第六章【反應速率】，提及反應物濃度、酵素等因素會影響反應速率。因此聯想：纖維水解酵素可分解纖維素，形成單醣製造能源，纖維水解酵素能否順利結合纖維素提高水解效率對能源的製程極為重要。因此針對纖維水解酵素的結合區位進行研究，希望能儘速找出提升現有水解酵素使用效率的方法。

貳、研究目的

- 一、藉家蠶生產 CH1、CH2 纖維水解酵素。
- 二、藉 *Trichoderma reesei* 纖維水解酵素作為對照組，找出最佳結合條件。
- 三、探討各種受質與 *T. reesei* 纖維水解酵素結合差異。
- 四、探討各種受質對主要研究目標 CH1、CH2 結合差異。
- 五、探討不同類型纖維水解酵素的加成作用，檢視實際水解成效。
- 六、未來目標：
 - (一)探討 CH1 序列的序進(deletion)，找出結合區位的序列。
 - (二)探討該結合區位是否能作用於其他纖維水解酵素。

參、研究設備及器材

一、設備類		
Novodrop 分光光度計	離心機	vortex
		
水浴機	shaker	Hood
		
SDS、Western 套裝儀器	電極	冰桶
		

二、藥品類		
受質：Avicel、燕麥聚木醣、 樺木聚木醣等	Buffer 原料：sodium acetate、 NaCl、NaHPO ₃ 等	Buffer 原料 2：Tris、Glycine
		
SDS 膠片藥品：Acrylamine、 Temed	毒性物質：甲醇、冰醋酸	實驗後 sample
		

三、耗材類		
電動吸管	微量吸管	tips
		

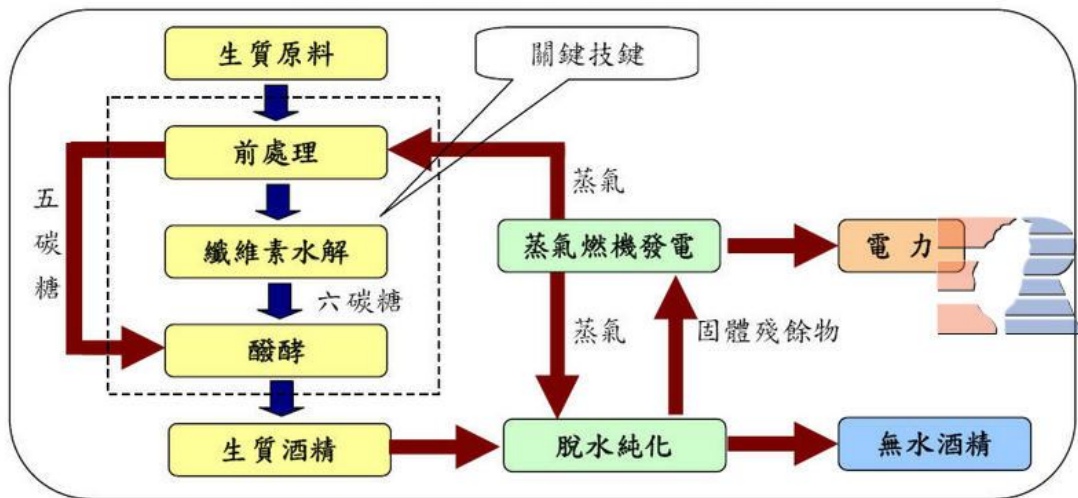
肆、研究過程或方法

一、實驗背景介紹

(一)生質能源

再生能源的研究與發展受到全球關注，其推廣已成為國際能源政策的方向。再生能源相對於石化燃料能源，其能量密度顯著偏低，以目前的科技水準仍無法達到充分經濟效益。以美國及巴西為例，生質燃料的基材主要來自糧食，造成糧價大幅變動。若我國可以發展出使用農業廢棄物生產生質能源的技術，必能取得能源及經濟上極大的優勢。

附圖 纖維素酒精製程示意圖



(資料來源：王惠鈞，“台灣生質酒精研究之現況與展望”，「2007台日科技高峰論壇」，2007年9月13日。)

比較以纖維素生產乙醇的各類製程，不同處在於關鍵技術水解製程，將多醣水解為單醣是生質能源現今發展面臨最大的瓶頸。要提升酵素水解效率，除要用高活性酵素外，加強酵素與纖維素之間的結合，破壞纖維素物質的晶體結構，才能有效分解纖維素及半纖維素分子。

(二)結合區位

結合區位對酵素的功能來說是重要的，它可以離子鍵或凡得瓦力與受體產生緊密結合。文獻中已知具有結合區位的酵素，其結合率和功效都較沒有結合區位的酵素來得高。我們可藉由纖維素與 *T. reesei* 纖維水解酵素的結合，找出結合率最佳之反應條件。利用蛋白質電泳(SDS PAGE)的結果，修正因物理性夾雜受質或因化學性非專一結合而產生的結合率誤差，並且確認其結合成效與酵素特性。(此方法亦可應用於分析未確知功能的纖維酵素。)

(三)昆蟲纖維水解酵素

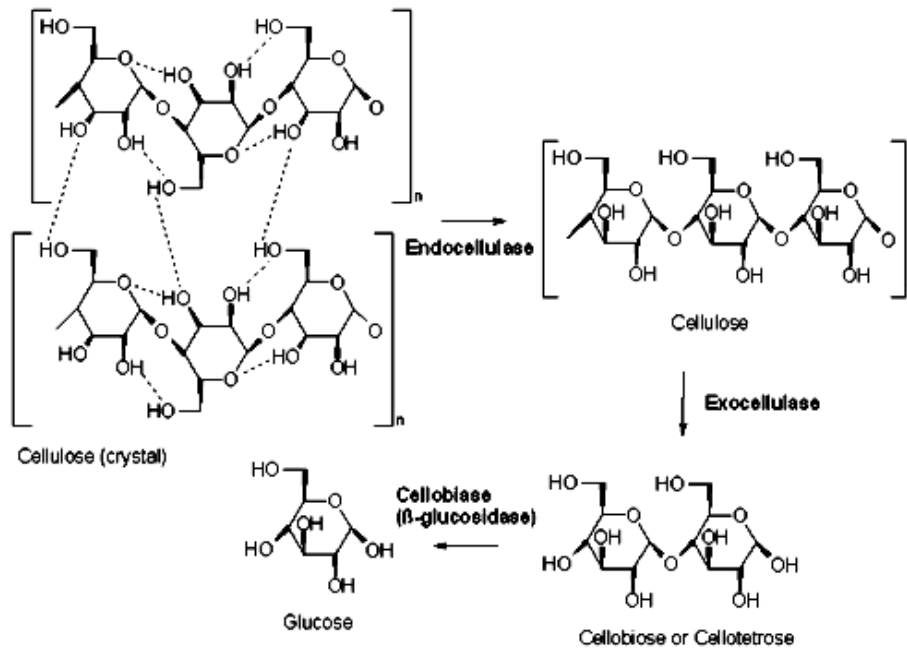
商業用纖維水解酵素多由真菌或細菌提煉出來，高等生物內生纖維水解酵素的發現卻少之又少。目前已有研究從昆蟲體內找出幾種纖維水解酵素，現行蛋白質資料庫中搜尋不到類似的序列，無從推知構型及有無結合區位；找出昆蟲纖維水解酵素的結合區位、序列及分析功能應為科學研究的重要里程碑。

(四)家蠶生產平台

蛋白質的生產傳統上是採細胞培養(大白鼠或大腸桿菌等模式生物)的方法，所有過程都以無菌操作，生產價格高昂。若以桿狀病毒(寄主多為蛾蝶類幼蟲)感染家蠶大量生產基因工程蛋白質，好處有價格低廉、安全、量大等。

(五) *T. reesei* 纖維水解酵素

纖維水解酵素(cellulase)是一種可水解多醣的酵素，大約可分為五類，其中內切型纖維酵素(Endo-cellulase)，可將多條纖維素支鏈切開；外切型纖維酵素(Exo-cellulase)可自末端切下雙醣； β -纖維酵素(β -glucosidase)可將雙醣水解為單醣。除此之外，纖維酵素還可依受質種類分為 Avicelase、xylanase 等。



(資料來源：維基百科 <http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase>)

由 Novozyme 公司出產的 *T. reesei* 纖維水解酵素包含多種纖維酵素，水解效果極強，多用於酒精生質能源。其成分確實比例未知，但所有成份皆具有結合區位 (Binding Domain)。

(六) 酵素的加成作用

家蠶生產平台生產之 CH1、CH2，我們將纖維水解酵素實際應用，研究水解效率與結合率是否正相關，並探討 CH1、CH2 與家蠶生產的 IA、IIA 外切型酵素，藉由是否添加 Novozymes 公司生產的雙醣酵素 NOVO-188，探討酵素是否具加成作用。

二、研究方法

(一) 第一部分：以家蠶生產 CH1、CH2 纖維水解酵素

1. 將天牛基因組中，CH1 及 CH2 的 DNA 片段以生物複製技術(cloning)複製
2. 將該段 DNA 進行聚合酶連鎖反應(PCR)，並轉殖進入質體
3. 與大腸桿菌(*E. coli*)進行共轉染，培養並挑出成功轉染者
4. 以限制酶切下並進行 DNA 電泳確認為目標基因
5. 抽出質體，再次分離目標基因
6. 共轉染進入桿狀病毒載體，感染昆蟲細胞，挑出成功感染者
7. 抽取菌液並注射進入家蠶體內，約 3~5 天即可抽取蠶液使用

(二) 第二部分：測定 *T. reesei* 纖維水解酵素對各受質最佳結合條件

1. 將受質與 *T. reesei* 纖維水解酵素加入醋酸鈉溶劑中
2. 放置不同溫度及反應時間後以 13000rpm 離心兩分鐘，吸取上清液 10ul
3. 加入 10ul 蛋白質染劑 (coomassie blue)，以分光光度計 Novo drop 測定 coomassie blue 於 595nm 的吸光值

(三)第三部分：進行 SDS-PAGE，可看出各受質對 *T. reesei* 纖維水解酵素之結合表現

- 1.將受質與 *T. reesei* 纖維水解酵素加入醋酸鈉溶劑中。
- 2.於 4°C 靜置反應 24hr
- 3.以醋酸鈉 沖洗結合物
- 4.以 0.5M NaCl 醋酸鈉 沖洗結合物
- 5.將結合前 *T. reesei* 纖維水解酵素、未與受質結合之 *T. reesei* 纖維水解酵素(上清液)、以醋酸鈉沖提物、0.5M NaCl 醋酸鈉沖提物、與受質結合之 *T. reesei* 纖維水解酵素，取出進行 SDS-PAGE。
- 6.以 coomassie blue 進行染色及退染。
- 7.比較電泳結果。

(四)第四部分：進行 CH1、CH2 纖維水解酵素的西方墨點法

1. 將受質與 CH1、CH2 纖維水解酵素加入醋酸鈉溶劑中。
- 2.於 4°C 靜置反應 24hr
- 3.以醋酸鈉 沖洗結合物
- 4.以 0.5M NaCl 醋酸鈉 沖洗結合物
- 5.將結合前 CH1、CH2、未與受質結合之 CH1、CH2 (上清液)、以醋酸鈉沖提物、0.5M NaCl 醋酸鈉沖提物、與受質結合之 CH1、CH2、無 CH1、CH2 之對照組(mock)，取出進行 SDS-PAGE。
- 6.將 SDS-PAGE 繼續進行 western。
- 7.比較 western 結果。

註：由於 CH1、CH2 之生產平台為家蠶，故實驗所用之酵素混有家蠶體液，若僅以 SDS-PAGE 分析恐效果不彰；且該 CH1、CH2 具有事先插入其序列的抗原，故改採西方墨點法。

(五)第五部分：進行不同類型纖維水解酵素的加成作用，檢視實際水解效果

- 1.將受質與 CH1、CH2 加入醋酸鈉溶劑中。
- 2.分別加入外切型酵素(IA、IIA)以及雙醣酵素(Novo 188)
- 3.於 4°C 靜置反應 24hr
- 4.離心處理後，取 100uL 上清液
- 5.加入等體積(100uL)的 3,5-二硝基水楊酸(DNS)100uL，於 95°C 煮 10 分鐘
- 6.使用酵素免疫分析儀(Dunateck UK7000)測於波長 540nm 時的吸光值
- 7.利用吸光值換算為水解率

(六)第六部分：進行 CH1 序列的序進

- 1.根據 CH1 序列設計引子(primer)、加上抗原
- 2.進行聚合酶連鎖反應(PCR)
- 3.將該 DNA 片段以大腸桿菌質體為載體，在大腸桿菌內進行表現。
- 4.打破大腸桿菌，得到含有 CH1 的菌液。
- 5.同(三)1~6 步驟。
- 6.比較結果，鎖定一區域為結合區位。

(七)第七部份：確定該結合區位是否能作用於其他纖維水解酵素上

- 1.根據該結合區位設計引子(primer)、加上抗原，製作：
 - (1) CH1 接上一個結合區位(共二個)
 - (2)無結合區位 CH2 接上一個結合區位

- (3)取 *T. reesei* 纖維水解酵素中屬於外切型纖維酵素的 IA、IIA 接上該結合區位。
- 2.進行聚合酶連鎖反應(PCR)
- 3.將該 DNA 片段以大腸桿菌質體為載體，在大腸桿菌內進行表現。
- 4.打破大腸桿菌，得到含有纖維水解酵素的菌液。
- 5.同(三)1~6 步驟。受質使用水溶性的 DNS 及 CMC。
- 6.比較結果，分析是否接上結合使其結合能力增加。

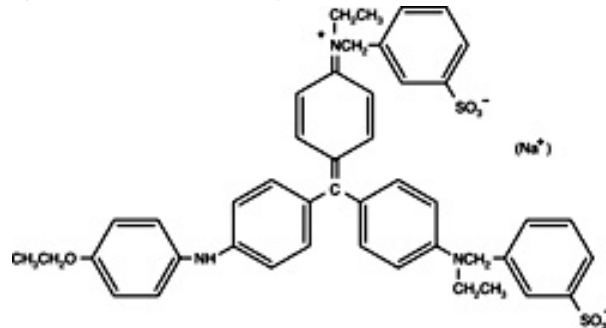
三、研究方法原理

(一)離心

以 13000rpm 離心兩分鐘使受質及與之結合的酵素分離至下層，未結合之酵素留於上清液中。

(二)以 coomassie blue 測定蛋白質濃度

coomassie blue 在酸性條件下呈茶色，中性條件下呈藍色。coomassie blue 可和蛋白質中的精胺酸、色胺酸、酪胺酸、組胺酸和苯丙胺酸結合。蛋白質會提供 coomassie blue 較為中性的環境，故當 coomassie blue 吸附至胺基酸上，會呈現藍色。所以藍色的呈色強度與樣本中的蛋白質質量成正比。



(三)SDS-PAGE

以電場作為蛋白質移動的動力，將蛋白質在 SDS-PAGE 下進行分離。比照標準品蛋白質於膠體上之移動距離作成標準曲線，計算蛋白質的分子量，利用前人研究資料判讀分離出的酵素成份。利用 SDS 使蛋白質帶有均勻負電，在 5%的集膠(pH 6.5)中聚集濃縮後，在 5%~8%的酸-鹼界面層中會產生聚焦現象(stackings)，並在 8%的 SDS-PAGE 膠體(pH 8)中依分子量大小進行分離。

(四)西方墨點法(Western)

Western 採用聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)。經過 PAGE 分離的蛋白質樣品，轉移到固相載體（硝酸纖維素薄膜）上，固相載體以非共價鍵形式吸附蛋白質，保持電泳分離的多肽類型及生物活性不變。以固相載體上的多肽作為抗原，與對應的抗體起免疫反應，再與同位素標記的第二抗體起反應，經過放射自顯影顯像可檢測目的基因表達的蛋白成分。

(五)DNS 還原糖測定

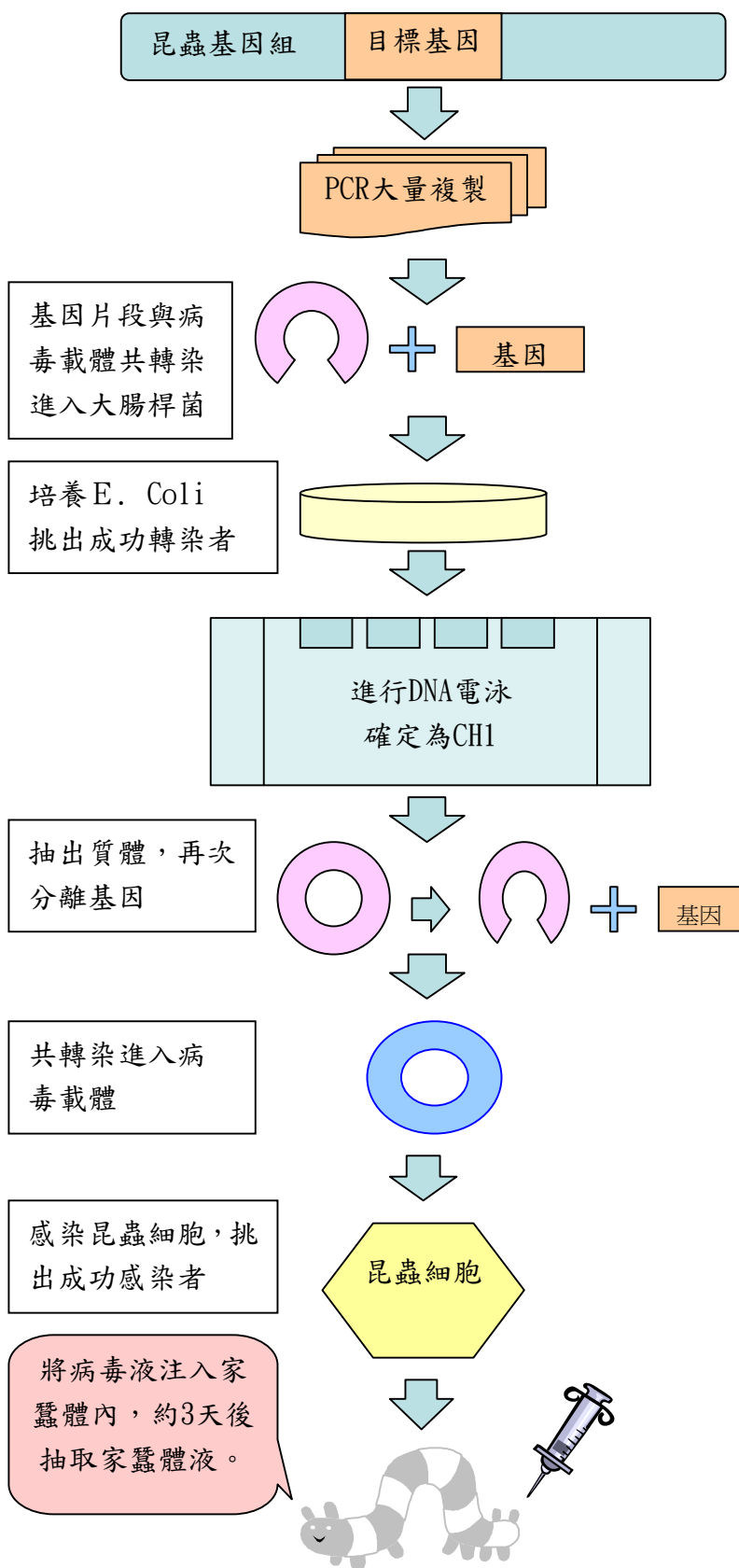
樣品中的還原糖，也就是水解過後的醣類，和 DNS 試劑在鹼性(氫氧化鈉)、高溫(95°C)的環境反應會吸收 590nm 的光。一定範圍內，吸收強度和還原糖的濃度成比例，可用吸光值繪製檢量線來定量試樣中還原糖的含量。

(六)聚合酶連鎖反應(PCR)

PCR 用於擴增一小段已知的 DNA 片斷，可能是單個基因，或是某基因的一部分。PCR 反應由 20 到 35 個循環組成，每個循環包括以下 3 個步驟：利用高溫(93-98°C)使雙鏈 DNA 分離。高溫將連接兩條 DNA 鏈的氫鍵打斷。DNA 雙鏈分離後，降低溫度使引子結合於單鏈 DNA 上。最後，DNA 聚合酶由降溫時結合上的引子開始沿著 DNA 合成互補鏈。反應時間決定於聚合酶及需要合成的 DNA 片斷長度。

伍、研究結果

一、第一部分：以家蠶生產 CH1、CH2 纖維水解酵素



二、第二部分：以 *T. reesei* 纖維水解酵素作為對照組，找出最佳結合條件

實驗(一)：以小牛血清蛋白(BSA)確認蛋白質濃度，藉由蛋白質染劑 coomassie blue 的吸光值測定出。

實驗(二)：使用 BSA 與受質 Avicel 反應，反應前後濃度差距在機器的誤差值之內，可作為結合率相關實驗的負控制組。

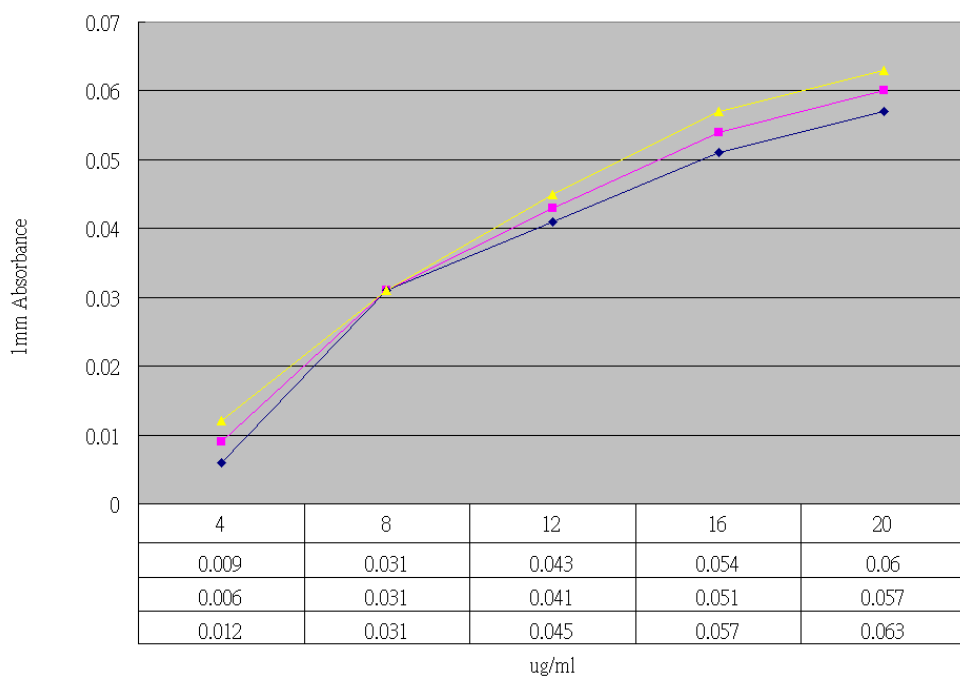
實驗(三)：使用 *T. reesei* 纖維水解酵素與各受質在不同條件下反應，測定結合率。

實驗(四)：用受質濃度當做操縱變因，測定 *T. reesei* 纖維水解酵素與受質結合率。

結論：4°C、反應 24hr 為最佳結合條件。

(一)以小牛血清蛋白(BSA)測定濃度與吸光值

以BSA測定蛋白質濃度

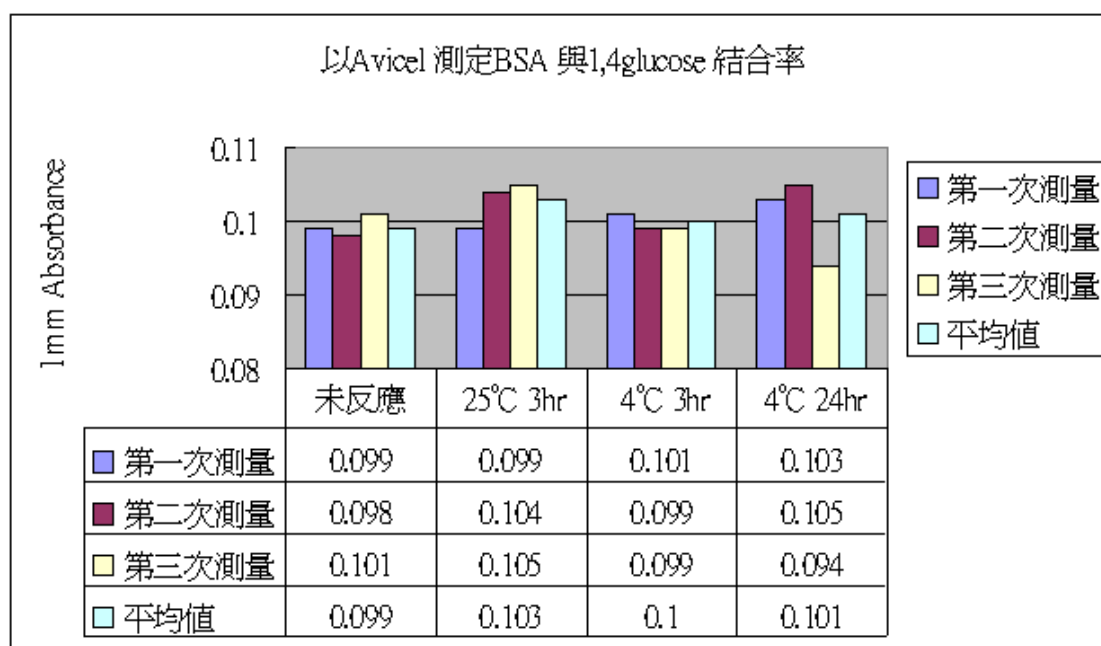


—■—	以BSA測定蛋白質濃度(平均吸光值)
—◆—	第一次測量
—▲—	第二次測量

說明：由圖可知蛋白質濃度和吸光值成正比，可藉此推算未知濃度蛋白之濃度。

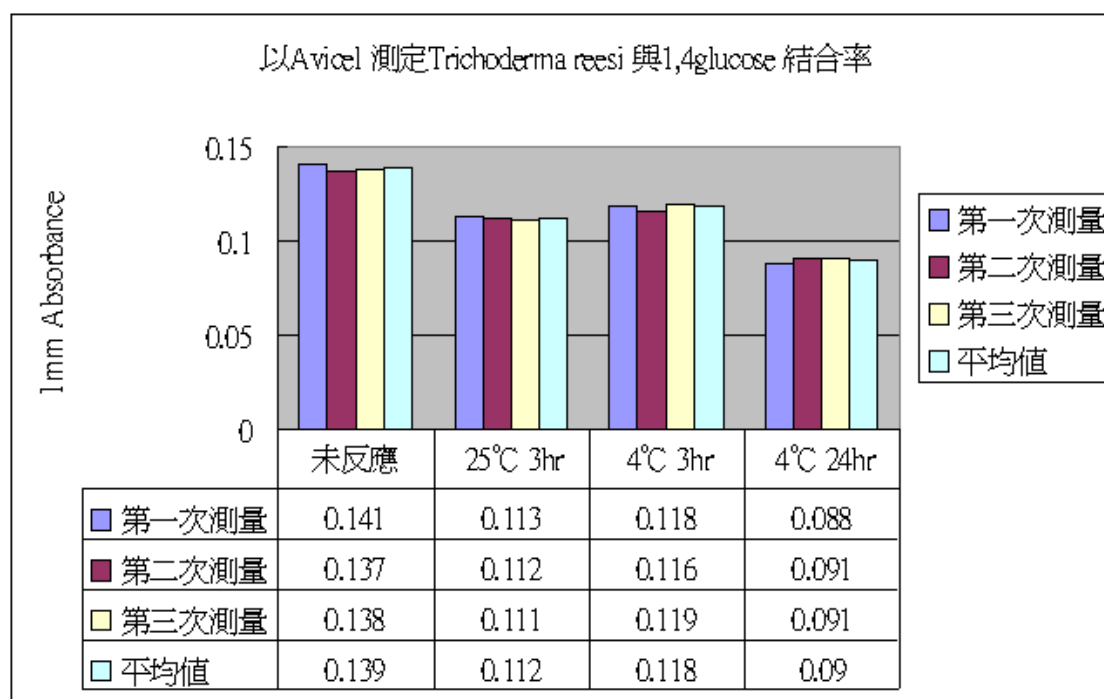
(二) 以 Avicel 測定 BSA 與 1,4glucan 結合率

- 1.將 0.15mg/mL BSA (溶劑：醋酸鈉 ,pH=4)加入 50mg Avicel
- 2.於 25°C 反應 3hr、4°C 反應 3hr、4°C 反應 24hr
- 3.結果：



(三)以不同受質(50mg/mL)測定 *T. reesei* 纖維水解酵素與其之結合率

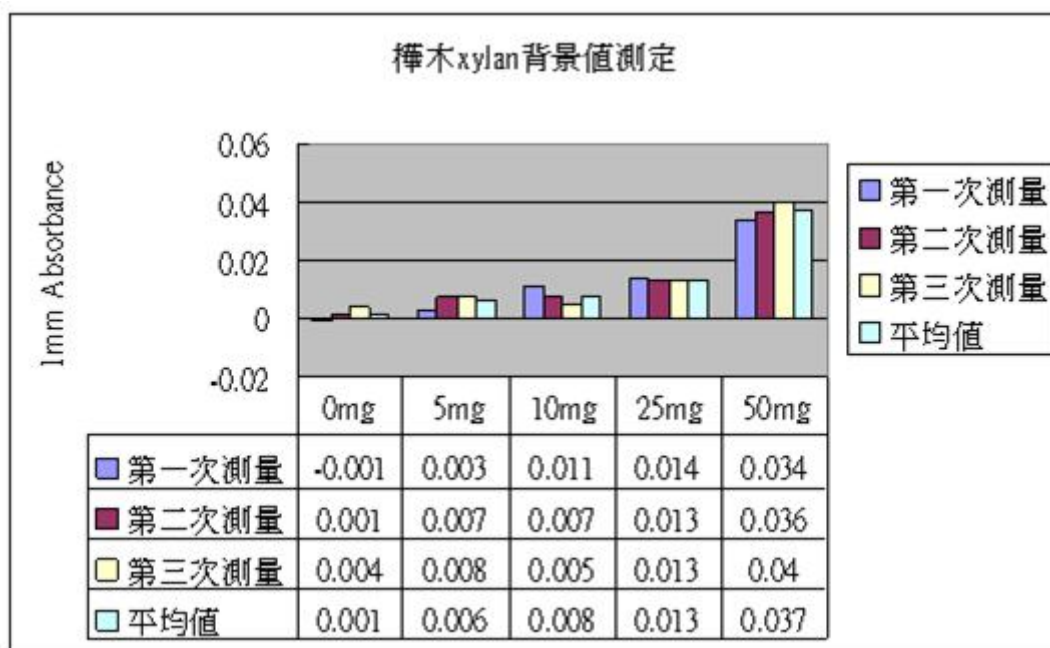
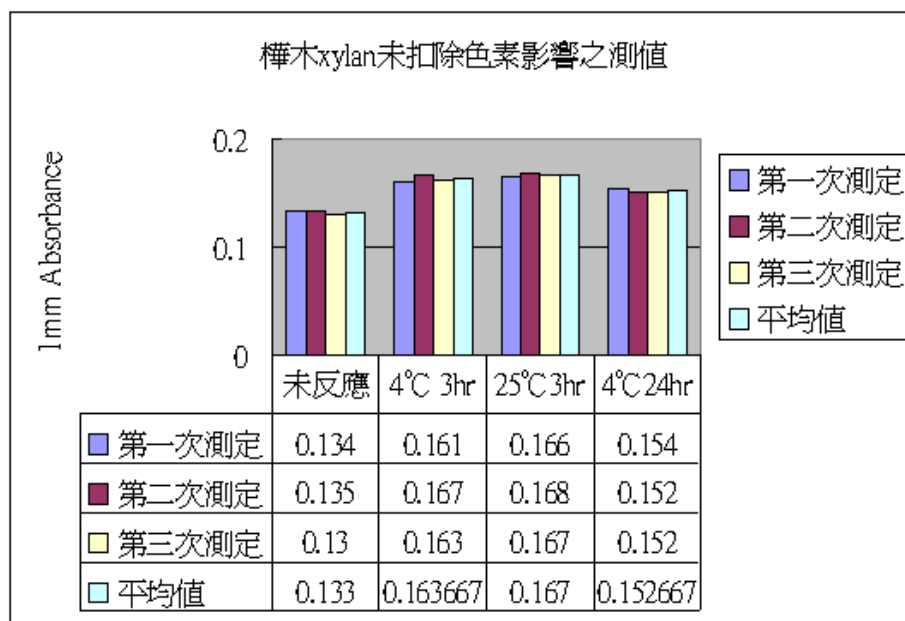
1. Avicel

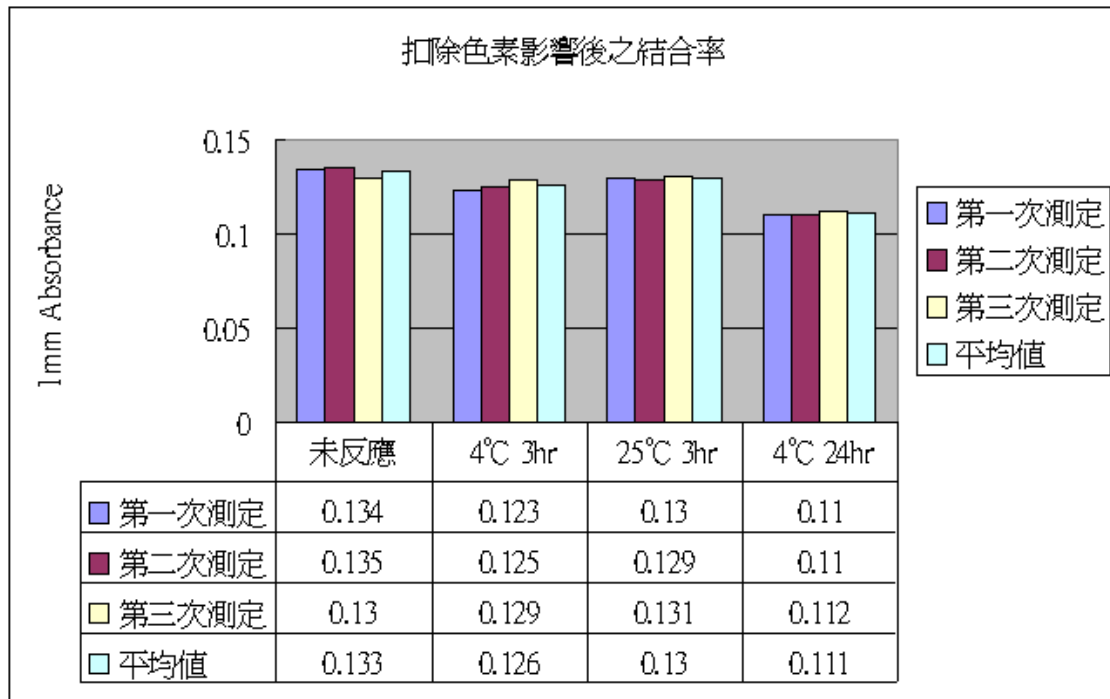


反應條件	4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	15%	43%	20%

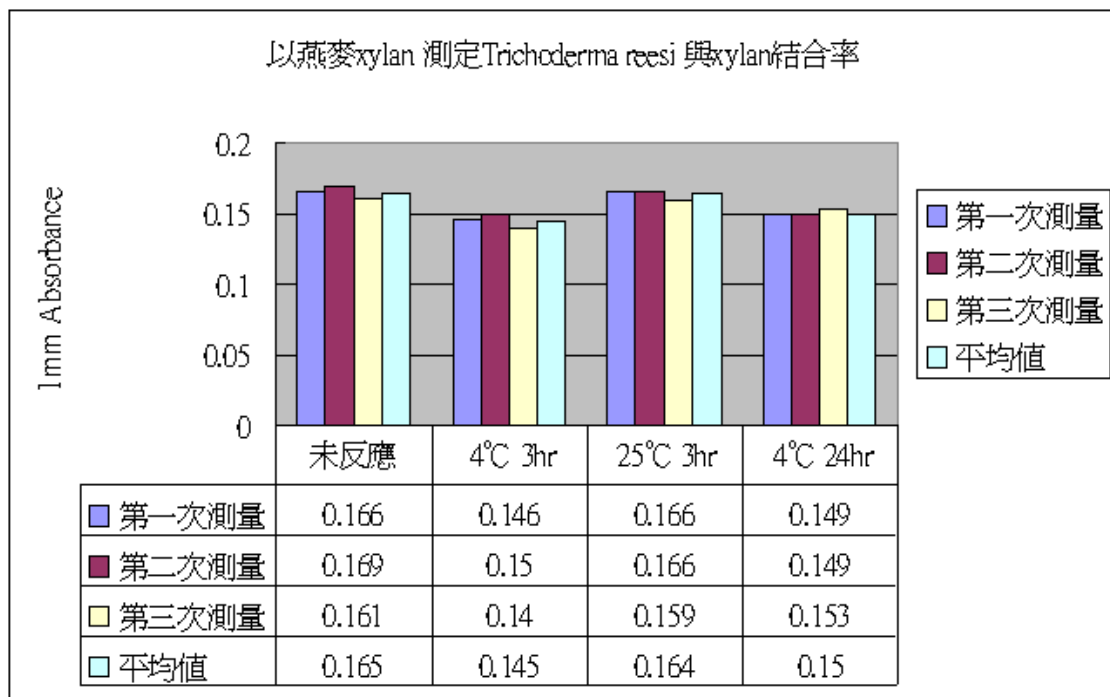
2. 樺木聚木醣(xylan)

註：樺木聚木醣在溶劑中會釋出色素，我們另外做背景值的討論並探討受質濃度是否影響反應結果。



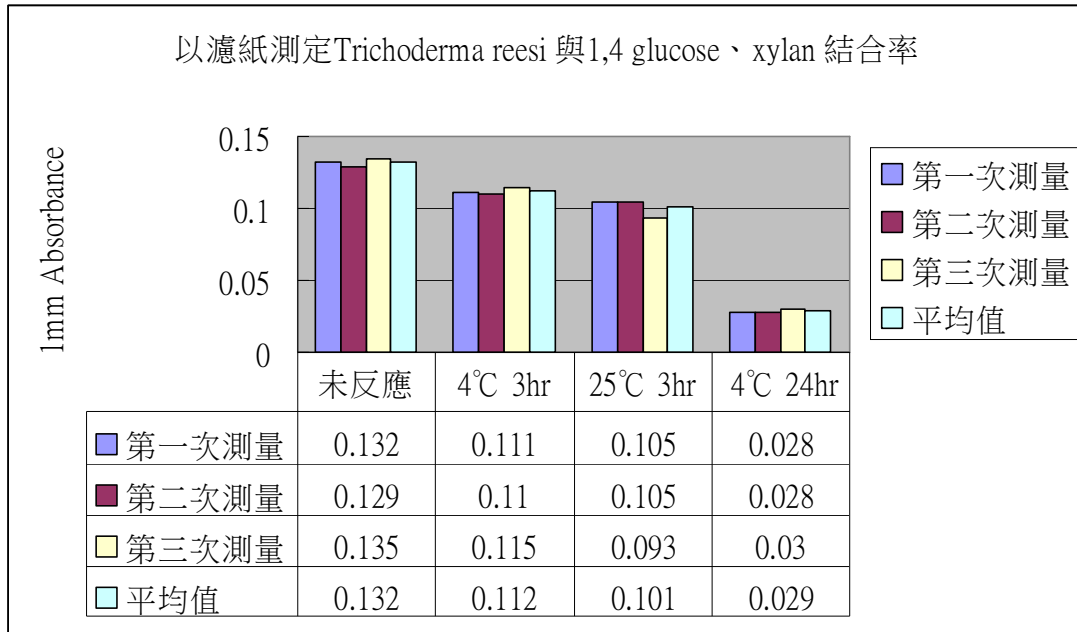


反應條件	4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	5%	17%	2%



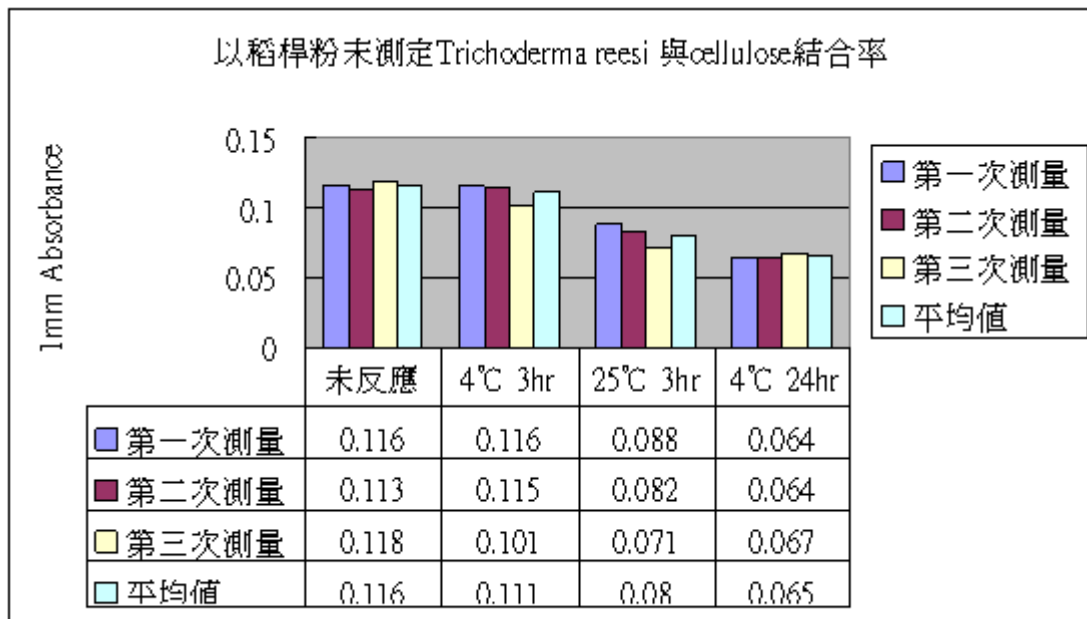
反應條件	4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	12%	9%	0%

以濾紙測定Trichoderma reesi 與1,4 glucose、xylan 結合率



反應條件	4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	15%	*13%	23%

以稻桿粉末測定Trichoderma reesi 與cellulose結合率

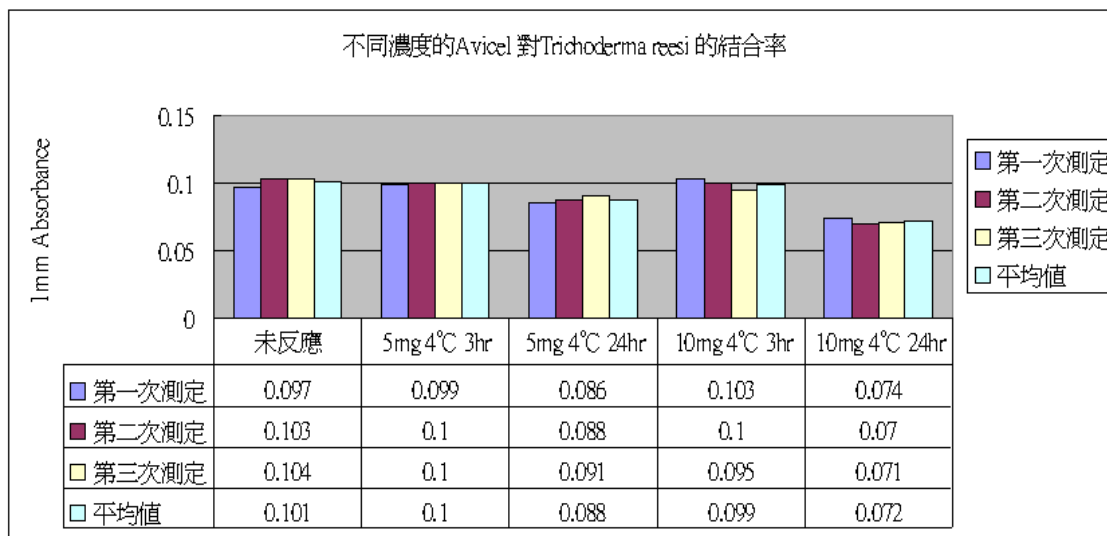


反應條件	4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	4%	44%	22%

(四)、以不同受質濃度(5mg/mL、10mg/mL)測定 *T. reesei* 纖維水解酵素與受質之結合率。

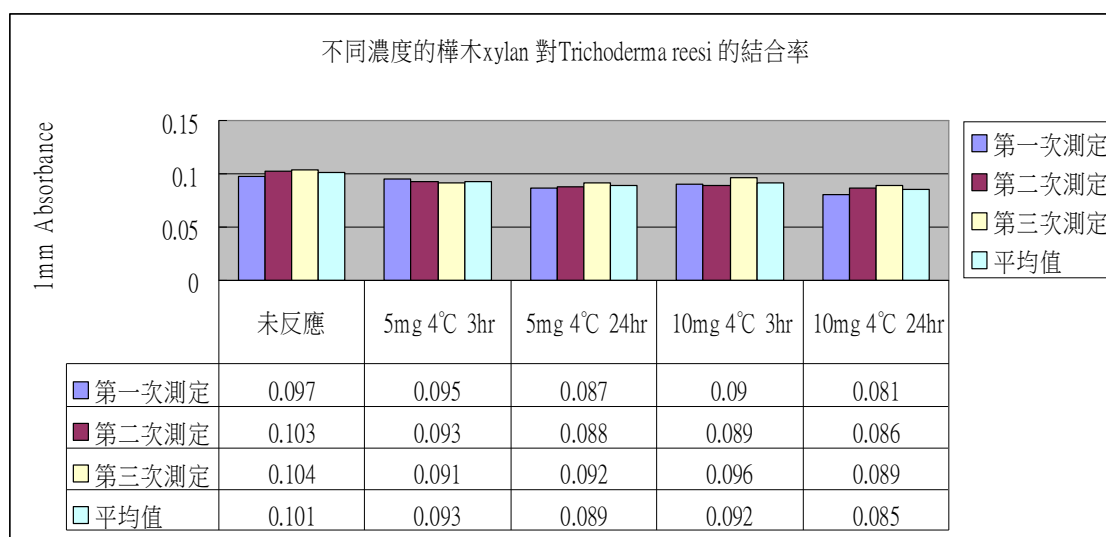
註：由於 25°C 的溫度對於低濃度受質反應會過快，故不使用此條件。

1. Avicel



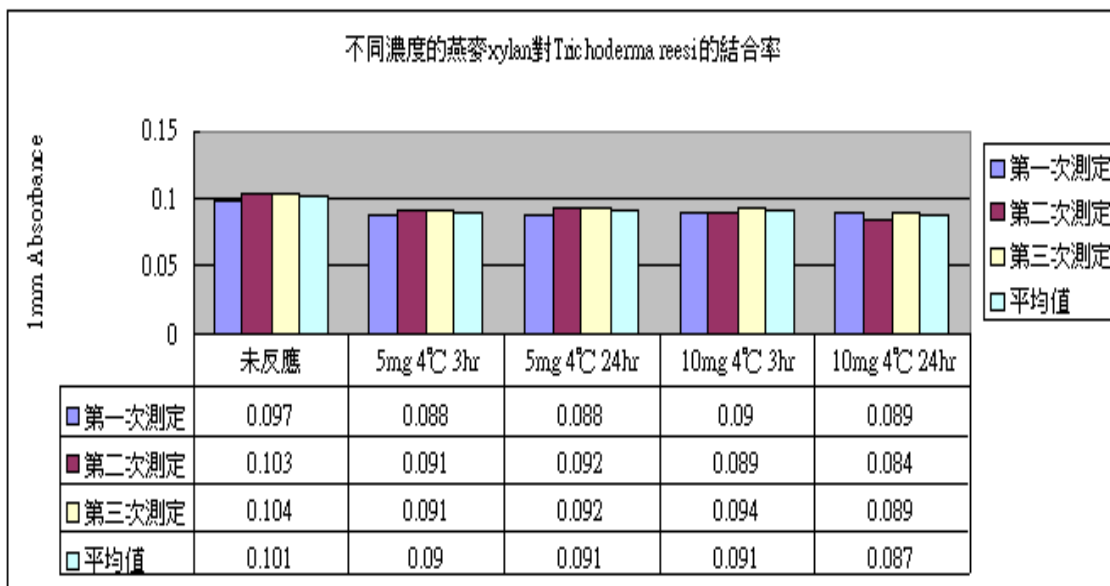
反應條件		4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	5mg/mL	2%	27%	
	10mg/mL	1%	12%	

2. 樺木聚木醣



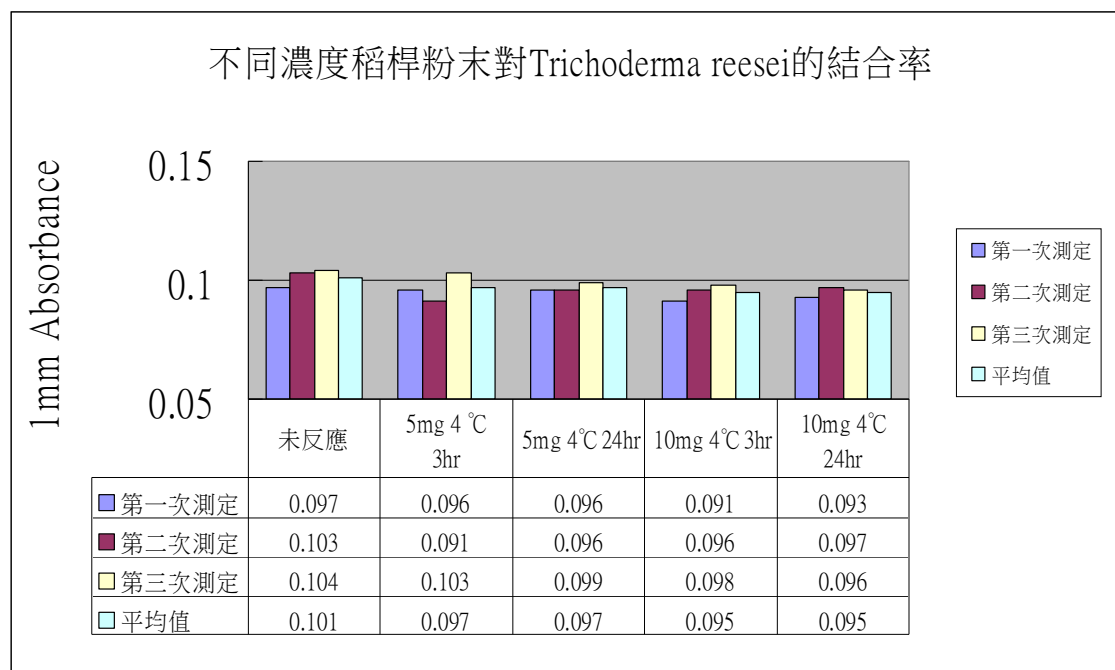
反應條件		4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	5mg/mL	5%	5%	
	10mg/mL	7%	11%	

3. 燕麥聚木醣

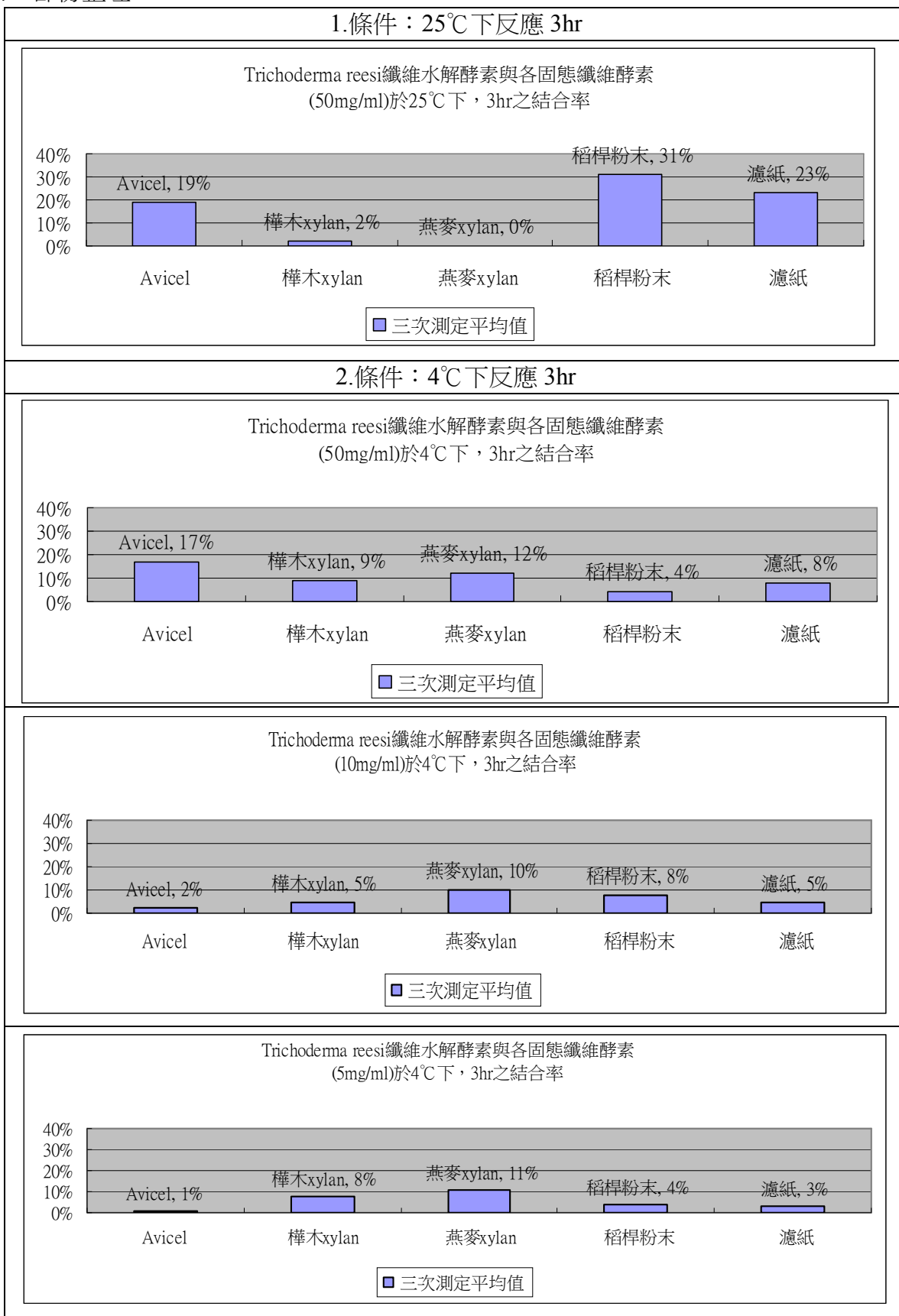


反應條件		4°C 3hr	4°C 24hr	25°C 3hr
結合率	5mg/mL	10%	11%	
	10mg/mL	11%	13%	

4. 稻桿粉末

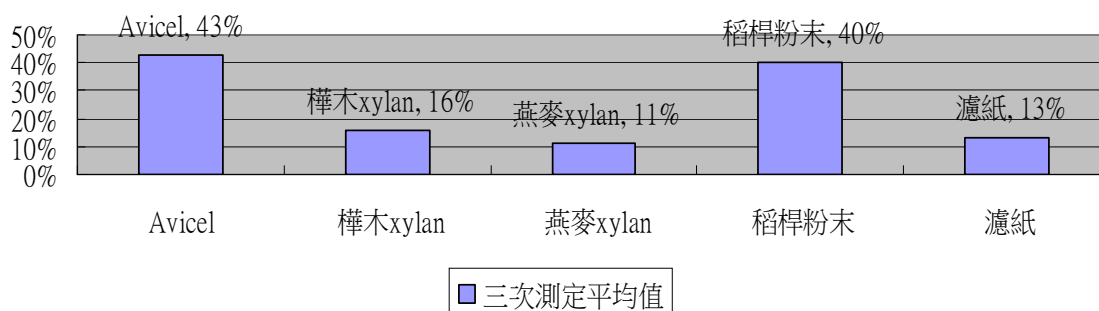


第二部份整理

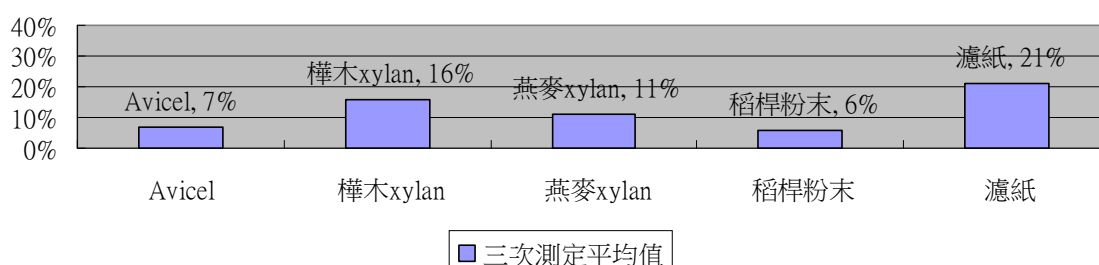


3. 條件：4°C下反應 24hr

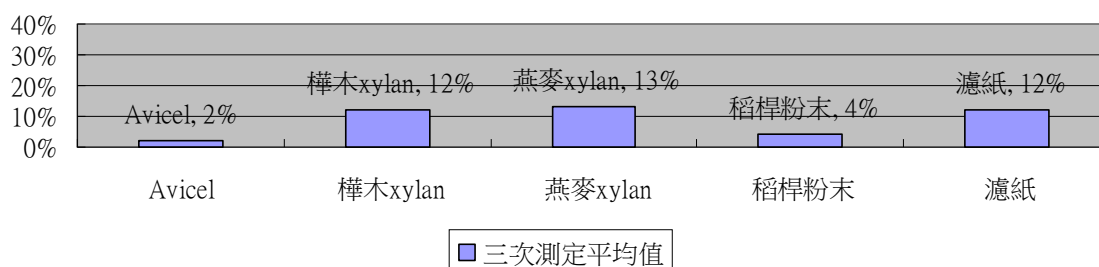
Trichoderma reesi纖維水解酵素與各固態纖維酵素
(50mg/ml)於4°C下，24hr之結合率



Trichoderma reesi纖維水解酵素與各固態纖維酵素
(10mg/ml)於4°C下，24hr之結合率



Trichoderma reesi纖維水解酵素與各固態纖維酵素
(5mg/ml)於4°C下，24hr之結合率



二、第三部分：進行 SDS-PAGE 分析

實驗(一)：*T. reesei* 纖維水解酵素進行進行 SDS-PAGE 分析後的圖像，左鏈為標準品 (marker)，顯示出蛋白質大小(單位：KD)，其七種內容物依大小區分開。

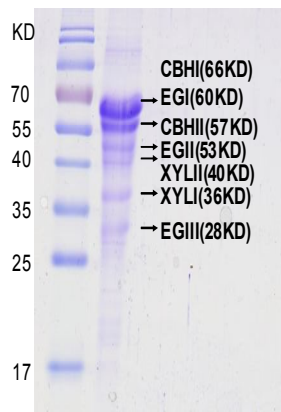
實驗(二)至(五)：*T. reesei* 纖維水解酵素與不同受質進行 SDS-PAGE 之分析。直行由左而右分別為：標準品(marker)、結合前 *T. reesei* 纖維水解酵素、未與受質結合之 *T. reesei* 纖維水解酵素(上清液)、醋酸鈉沖提物、0.5M NaCl 醋酸鈉沖提物、使用結合區位與受質專一性結合之 *T. reesei* 纖維水解酵素。

說明：①以醋酸鈉沖提主要目的是沖洗出因物理性夾雜而被離心至下層的 *T. reesei* 纖維水解酵素。以 0.5M NaCl 醋酸鈉沖提則可去除因離子鍵與受質產生非專一性結合的 *T. reesei* 纖維水解酵素。

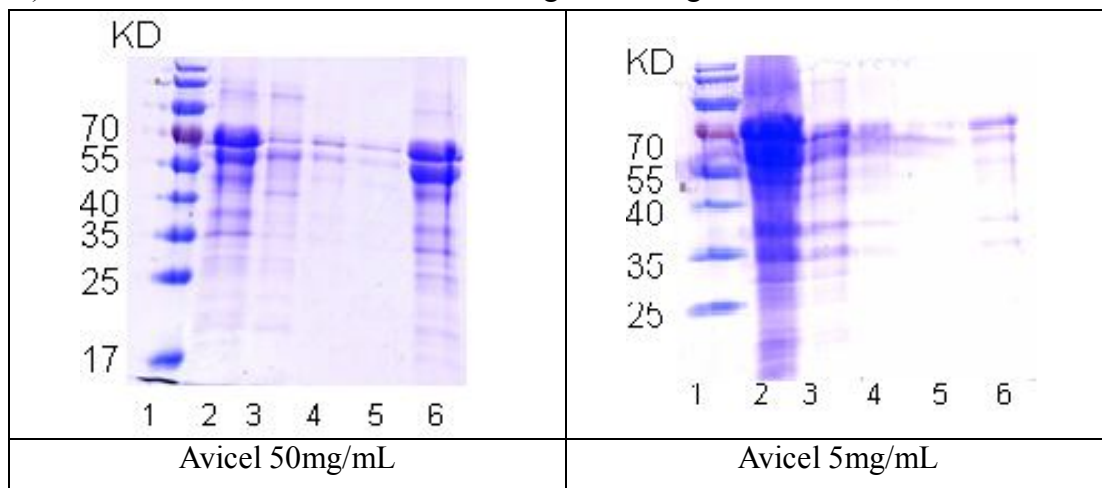
②實驗(二)可判讀出 *T. reesei* 纖維水解酵素與 Avicel 的主要結合是位於 70kb 附近的 EGI、CBHII。可與第一部分的結合率互相印證。

③濃度 50mg/mL 結合效果大於濃度 5mg/mL。其餘資料可類推出大略結合率與結合酵素。

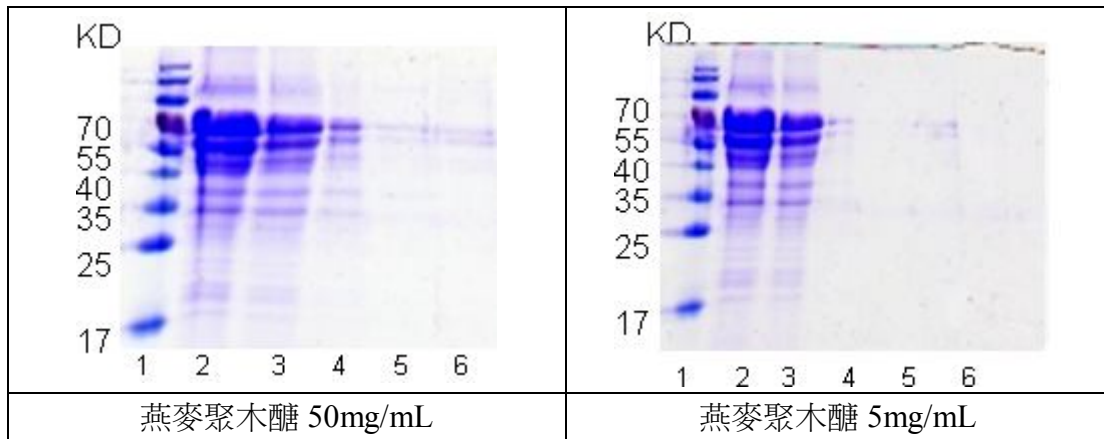
(一) *T. reesei* 纖維水解酵素各成份名稱及大小



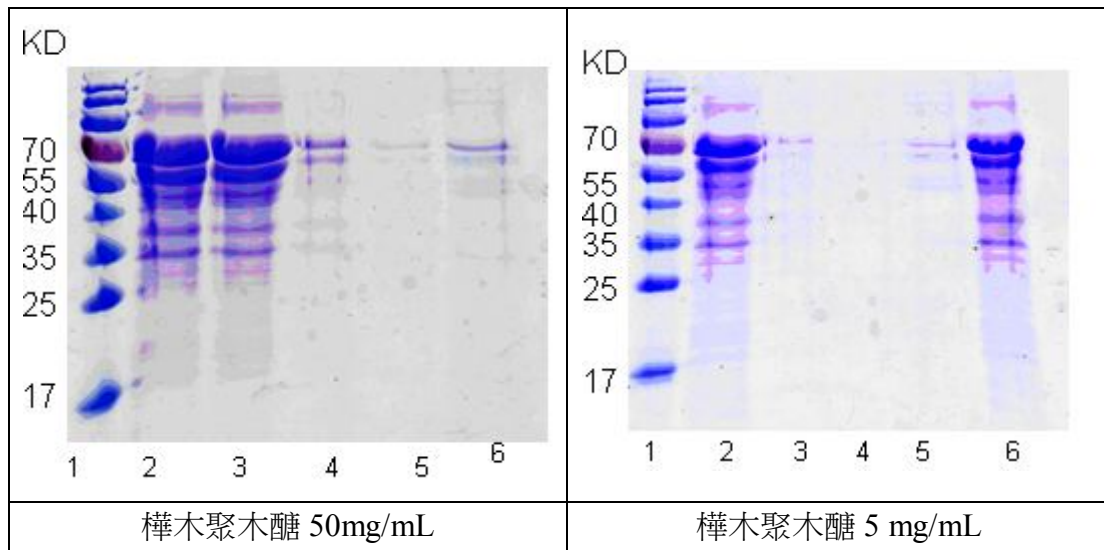
(二) *T. reesei* 纖維水解酵素與 Avicel 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行 SDS-PAGE



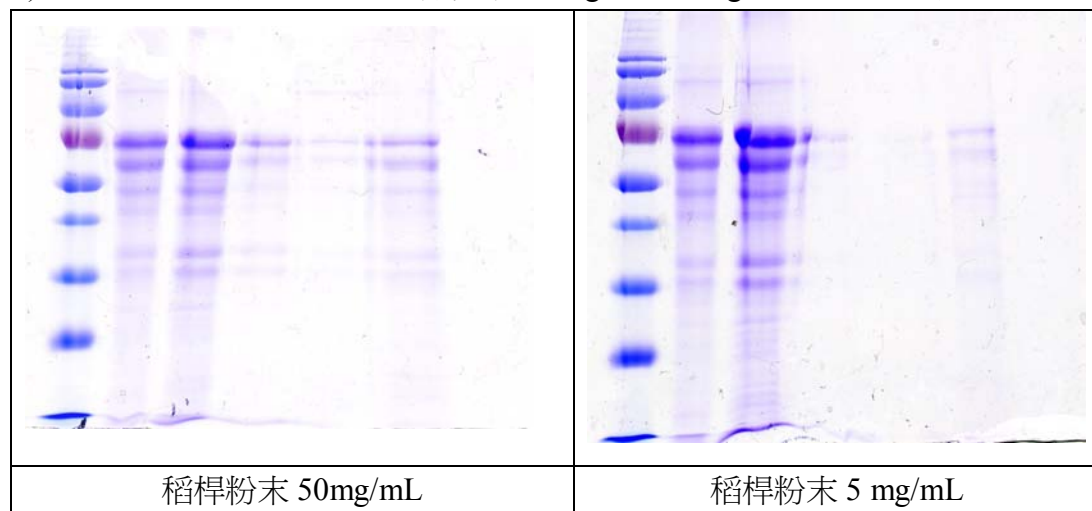
(三) *T. reesei* 纖維水解酵素與燕麥聚木醣 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行 SDS-PAGE



(四) *T. reesei* 纖維水解酵素與樺木聚木醣 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行 SDS-PAGE



(五) *T. reesei* 纖維水解酵素與稻桿粉末 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行 SDS-PAGE



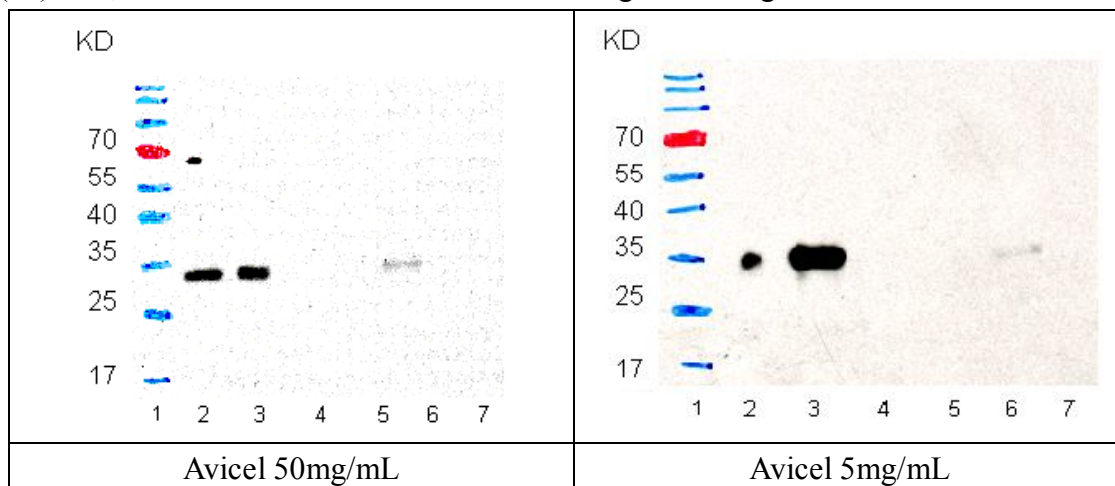
四、第四部分：進行昆蟲纖維水解酵素的西方墨點法(western blot)

說明：樣品處理法同第三部份 SDS-PAGE 分析，直行由左至右為：結合昆蟲纖維水解酵素、標準品(marker)、未與受質結合之昆蟲纖維水解酵素 (上清液)、以醋酸鈉沖提物、0.5M NaCl 醋酸鈉沖提物、與受質結合之昆蟲纖維水解酵素、普通家蠶體液(mock)。

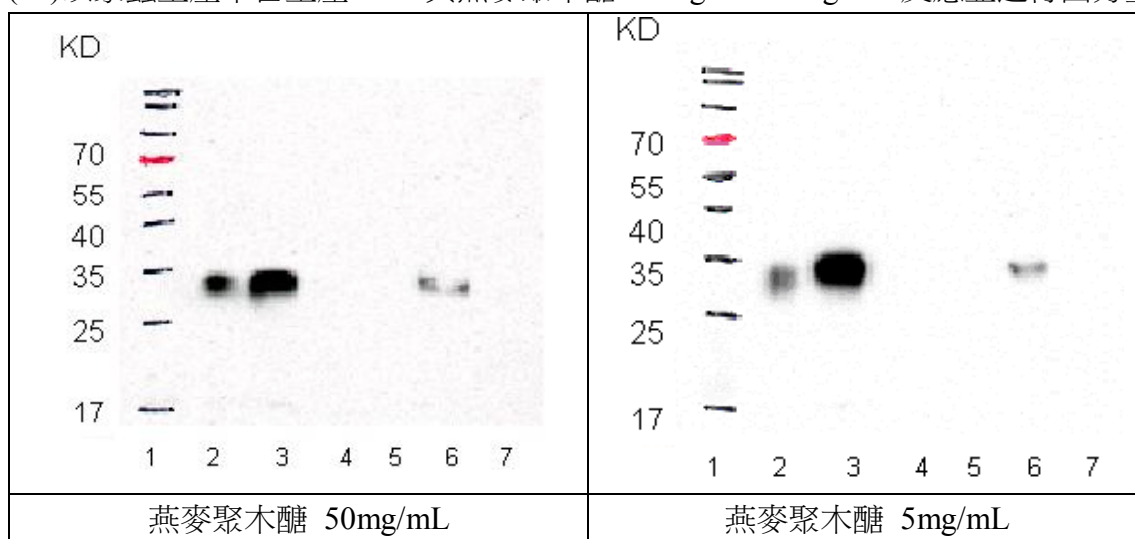
實驗(一)至(三)：CH1 與不同受質結合後進行西方墨點法分析的結果，可以看出 CH1 對樺木聚木醣的結合效果較好。

實驗(四)：CH2 與 Avicel 進行西方墨點法分析結果，可推論 CH2 與受質結合率不高。

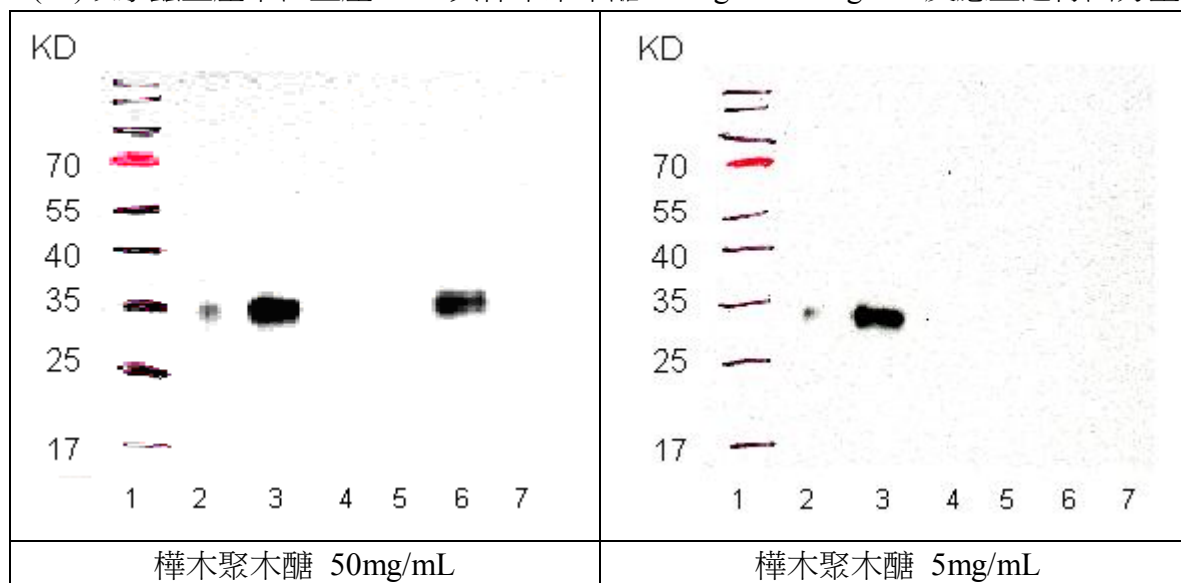
(一) 以家蠶生產平台生產 CH1 與 Avicel 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行西方墨點法



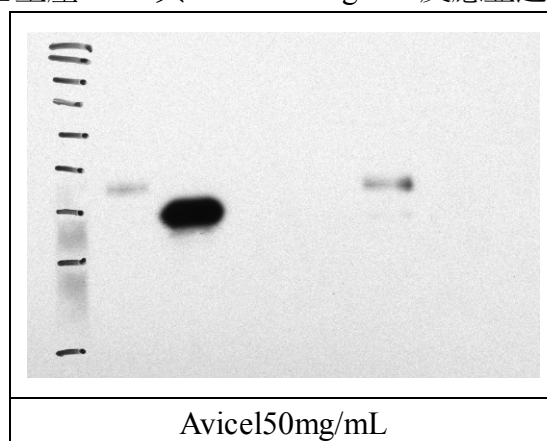
(二) 以家蠶生產平台生產 CH1 與燕麥聚木醣 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行西方墨點法



(三)以家蠶生產平台生產 CH1 與樺木聚木糖 50mg/mL、5mg/mL 反應並進行西方墨點法



(四) 以家蠶生產平台生產 CH2 與 Avicel 50mg/mL 反應並進行西方墨點法



五、第五部分：進行不同類型纖維水解酵素的加成作用，檢視實際水解效果

實驗(一)：使用 Avicel 為受質，加入 CH1、CH2 與外切型酵素 IA、IIA，討論雙醣酵素 Novo188 添加與否對反應的影響。加入雙醣酵素者，效果比未加入者佳。

說明：與 *T.reesei* 比較發現同體積酵素 *T.reesei* 的效果約為 CH1、CH2 的十倍，但 CH1、CH2 未經純化，濃度約 0.7mg/L、0.5mg/L，與濃度 60mg/L 的 *T.reesei* 須再經濃度換算，換算結果如實驗(二)。

(一)取 CH1、CH2 20uL 與 Avicel 10mg/mL，各別加入 IA、IIA 並加入 Novo188 比較之

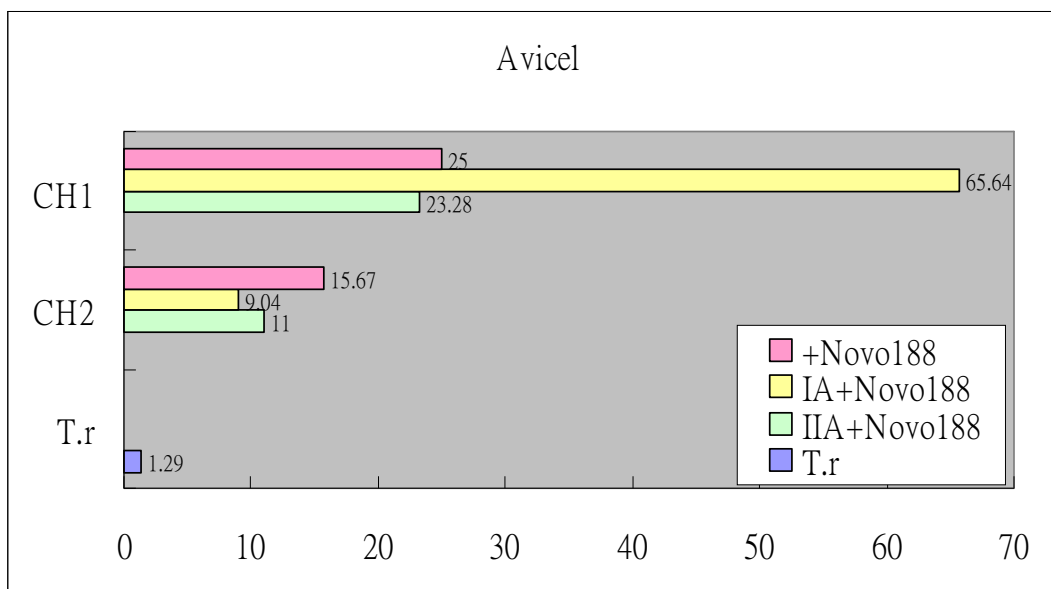
1.不加入 Novo188

Endo \ Exo	無	IA	IIA
CH1	1.32%	0.73%	0.75%
CH2	1.19%	0.7%	0.63%
<i>T.reesei</i>	10.86%		

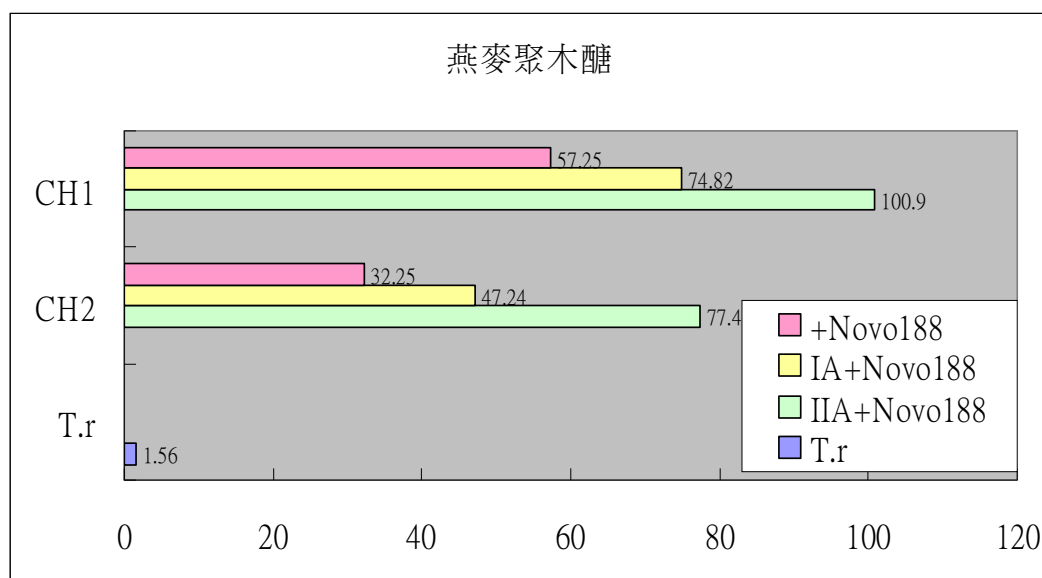
2.加入 Novo188

Endo \ Exo+ β	Novo188	IA+Novo188	IIA+Novo188
CH1	2%	5.58%	1.28%
CH2	1.88%	0.95%	0.83%

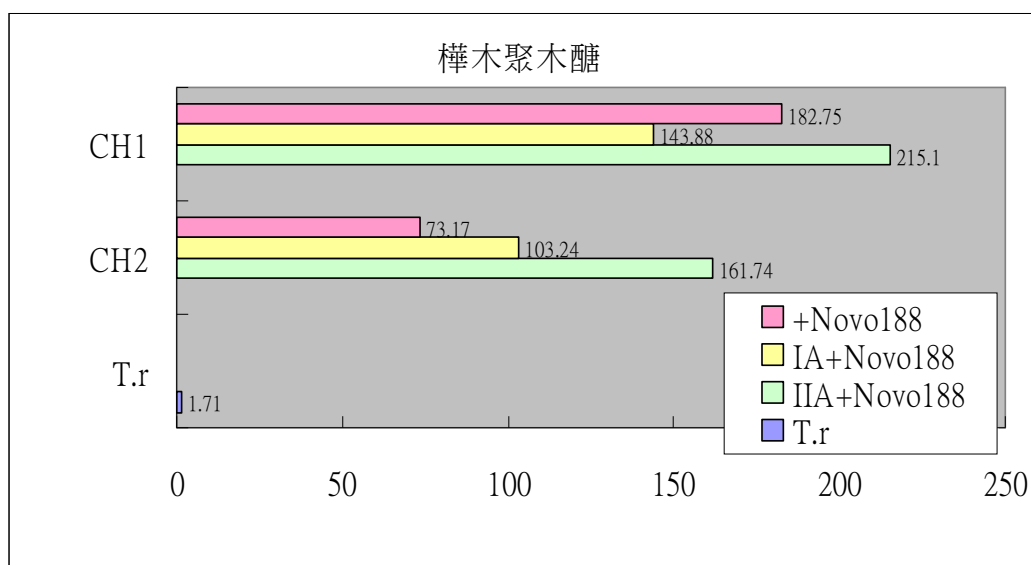
(二) CH1、CH2 與 Novo188 各 20uL 與 Avicel 10mg/mL，各別加入 IA、IIA，並依纖維水解酵素濃度換算，每 1mg 纖維水解酵素水解後還原糖之含量



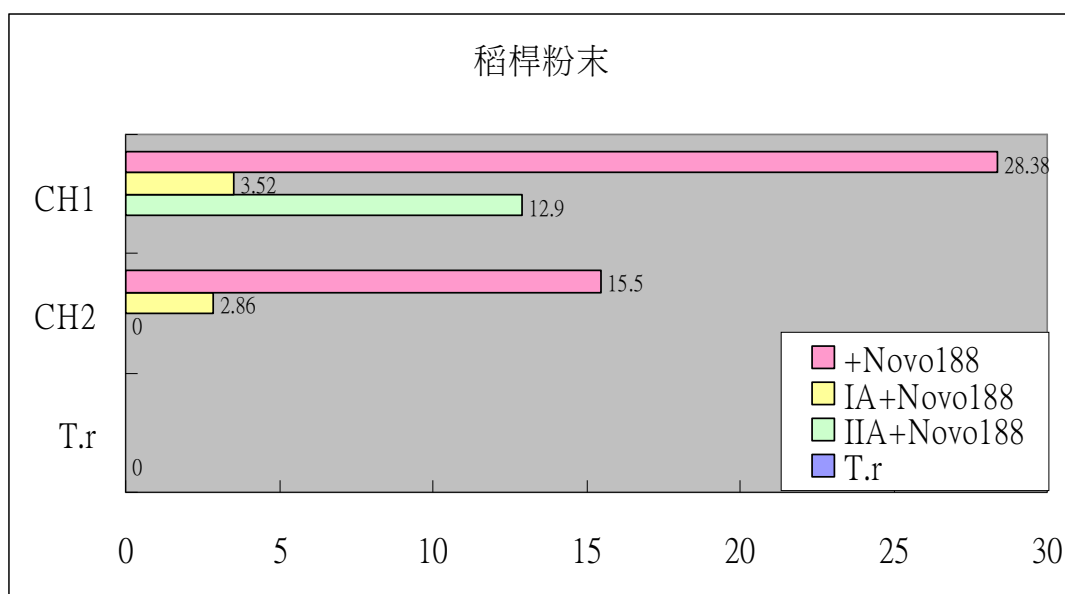
(三) CH1、CH2 與 Novo188 各 20uL 與燕麥聚木糖 10mg/mL，各別加入 IA、IIA，並依纖維水解酵素濃度換算，每 1mg 纖維水解酵素水解後還原糖之含量



(四) CH1、CH2 與 Novo188 各 20uL 與樺木聚木醣 10mg/mL，各別加入 IA、IIA，並依纖維水解酵素濃度換算後，每 1mg 纖維水解酵素水解後還原醣之含量



(五) CH1、CH2 與 Novo188 各 20uL 與稻桿粉末 10mg/mL，各別加入 IA、IIA，並依纖維水解酵素濃度換算後，每 1mg 纖維水解酵素水解後還原醣之含量



陸、討論

一、第二部分：尋找最佳反應條件

1. 實驗(一)：蛋白質濃度和吸光值成正比，可推算未知濃度蛋白之濃度。BSA 不會與 Avicel 產生結合，可作為負控制組。
2. 樺木 xylan 50mg 溶於溶液中會產生色素染色，影響機器判讀蛋白濃度，推測可能為受質濃度太高所致。製作飽和曲線，發現 10mg 以下色素不影響判讀，故改採 5mg、10mg 重新試驗。
3. 實驗(三)：*T. reesei* 纖維水解酵素對不同受質的結合率不同。4°C 和 25°C 對反應結果影響不大，但時間較長者結合率較高。推測可能是溫度高活性大，但是水解同時進行，故結合率偏低；低溫時活性小但水解不易進行，結合率較高。
4. 實驗(四)：濃度越高，結合率亦會提高，但不成比例。隨固態纖維素種類不同，濃度影響亦不同。
5. 進行濾紙 50mg/mL 實驗時，發現濾紙易重疊，造成受質表面積不同，反應結果差異大，因此不進行濾紙相關反應。
6. 實驗(四)：固態纖維素與 *T. reesei* 纖維水解酵素結合率最高為在 4°C，反應 24 小時。
7. *T. reesei* 纖維水解酵素為混合酵素，利用此條件下纖維酵素對固態纖維素的結合差異，藉以分離出適合各受質的理想酵素，進行純化、濃縮以提高水解效率。

二、第三部分：蛋白質電泳分析

1. 蛋白質電泳實驗可推知 *T. reesei* 纖維水解酵素中何種成分與受質結合。
2. 10mg/mL 與 5mg/mL 差異性不大，故 SDS-PAGE 優先進行 5mg/mL 的實驗。
3. 蛋白質電泳分析與第二部份數據結果一致。
4. Avicel 對 *T. reesei* 纖維水解酵素的結合最佳，燕麥聚木醣次之，樺木聚木醣最差。推測與支鏈多寡、結構強弱有關，未來將尋找相關資料並設計實驗驗證。

三、第四部分：西方墨點法

1. 家蠶生產平台生產的 CH1，因為在家蠶體液中尚未純化，故電泳分析效果不彰；且 CH1 含有事先插入的抗原，可進行西方墨點法。
2. 由西方墨點法推知各受質與 CH1 確有結合，並可約略推知結合比率。
3. 樺木聚木醣對 CH1 的結合最佳，Avicel、燕麥聚木醣次之。
4. CH1 與 *T. reesei* 纖維水解酵素最佳結合率相近，推論 CH1 具有結合區位。未來發展或可二者互相補強，大量生產並商業化。

四、第五部分：酵素的加成作用

1. 實驗(一)得知 Novo188 與 CH1、CH2 有明顯的加成作用，但 IA、IIA 則沒有。
2. 由於 *T. reesei* 纖維水解酵素經商業化濃縮，濃度較高(60mg/L)，家蠶生產的 CH1、CH2 於低濃度(0.3~0.7ug/mL)即可有效水解纖維素。兩者經濃度換算後，CH1 最高水解效率約 130 倍於 *T. reesei* 纖維水解酵素，CH2 也有約 95 倍(樺木聚木醣)。

柒、結論

- 一、家蠶生產平台確實可生產出昆蟲纖維水解酵素。
- 二、固態纖維素與 *T. reesei* 纖維水解酵素結合率最高為在 4°C，反應 24 小時。
- 三、*T. reesei* 纖維水解酵素為混合酵素，利用此條件下纖維酵素對固態纖維素的結合差異，藉以分離出適合各受質的理想酵素，進行純化、濃縮以提高水解效率。
- 四、蛋白質電泳實驗可推知 *T. reesei* 纖維水解酵素中何種成分與受質結合。
- 五、Avicel 對 *T. reesei* 纖維水解酵素的結合最佳，燕麥聚木糖次之，樺木聚木糖最差。
- 六、樺木聚木糖對 CH1 的結合最佳，Avicel、燕麥聚木糖次之。
- 七、CH1 與 *T. reesei* 纖維水解酵素最佳結合率相近，推定 CH1 具有結合區位。
- 八、具結合區位的 CH1 較無結合區位的 CH2 水解能力佳。
- 九、昆蟲內生纖維水解酵素(CH1、CH2)較真菌萃取酵素(*T.reesei*)水解效果佳。
- 十、有加入 Novo188 較未加入水解效果佳，可見雙糖酵素與昆蟲內生纖維水解酵素共同反應時有加成作用；但在外切型酵素上(IA、IIA)卻沒有明顯的加成作用。
- 十一、未來目標：
 - 1.進行 CH1 序列的序進(deletion)，找出結合區位的序列。
 - 2.確定該結合區位是否能作用於其他纖維水解酵素上。

捌、參考資料及其他

1. Steven S. Zumdahl(2005). *CHEMICAL PRINCIPLES*. In U.S.A. by Houghton Mifflin Company
2. 黃裕彬等(譯)(2006) *Lehninger生物化學原理* 台北市：合記出版社。(David L.Nelson, Michael M. Cox原著)
3. 謝志誠(2009)。關於生質能源。線上檢索日期：2009年3月10日。網址：<http://tw.myblog.yahoo.com/twbiomass/>
4. 劉怡汝、黃純芳、吳亞謙、陳思婷等(2007)。發現新黑金-台灣農業廢棄物再生。線上檢索日期：2009年3月10日。網址：<http://www.tsint.edu.tw/academics/fuelcell/PDF/15.pdf>
5. 蔡碩文(2007)。生物化學實習－葡萄糖之定量。線上檢索日期：2009年3月10日。網址：<http://web.nchu.edu.tw/~tsai-sw/bioexp06.pdf>
6. 陳建孝。財團法人生物技術開發中心(2008)。纖維酒精製程簡介。線上檢索日期：2009年3月10日。網址：<http://www.ema.org.tw/monthlymgz/pdf/35/6-15.pdf>
7. 趙裕展。中研院院士網站(2009)。蛋白基因工程以及分子模擬病毒之研究與應用。線上檢索日期：2008年10月29日。網址：http://www.imb.sinica.edu.tw/~mbycchao/index_c.html

【評語】 040808

本研究運用家蠶為生產平台，高效生產具強力水解效力之昆蟲纖維水解酵素，在研究過程確實應用科技知識，完成系列實驗結果；該纖維水解酵素等並具發展成產品、運用在生質能源產業的潛力。