

【11】 證書號數：I715282

【45】 公告日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 01 日

【51】 Int. Cl. : C12N11/08 (2020.01) C12N11/10 (2006.01)  
D01D5/00 (2006.01) G01K3/04 (2006.01)  
G01N33/02 (2006.01)

發明

全 11 頁

【54】 名 稱：以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法

【21】 申請案號：108140374 【22】 申請日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 07 日

【72】 發明人：陳輝煌 (TW) CHEN, HUI-HUANG；莊昭容 (TW) JHUANG, JHAO-RONG；  
蔡婷聿 (TW) TSAI, TING-YU；黃鈺凱 (TW) HUANG, YU-KAI；林丞軒 (TW)  
LIN, CHENG-XUAN；許皓昕 (TW) HSU, HAO-HSIN；張育瑄 (TW) CHANG,  
YU-HSUAN【71】 申請人：國立宜蘭大學 NATIONAL ILAN UNIVERSITY  
宜蘭縣宜蘭市神農路一段 1 號

【74】 代理人：陳天賜

【56】 參考文獻：

TW 201226904A

CN 101671665A

US 2018/0142388A1

WO 2017/170781A1

審查人員：許嘉展

## 【57】 申請專利範圍

1. 一種以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，包含：(a)製備電紡液步驟：將一混合聚合物，以水浴加熱並攪拌均勻製得一電紡液；(b)製膜步驟：以電紡技術將該電紡液中的混合聚合物紡絲成為一微奈米纖維薄膜；(c)活化薄膜步驟：將該微奈米纖維薄膜浸泡於一交聯劑溶液中活化，以產生一活化薄膜；(d)固定化酵素步驟：以浸漬、塗抹或噴霧方式固定化酵素於該活化薄膜上，以產生一固定化酵素薄膜；以及(e)製備酵素型時間溫度感應器步驟：將該固定化酵素薄膜與呈色反應基質溶液結合，以製成一酵素型時間溫度感應器。
2. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在該(a)製備電紡液步驟中，該電紡液是經由調整濃度後，並且加熱溶解以去除氣泡，使其成為充分溶解並均勻的該電紡液。
3. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在該(a)製備電紡液步驟中，該混合聚合物係選自由以下組成之群：幾丁聚醣、醋酸、聚乙烯醇及四乙氧基矽烷。
4. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在該(b)製膜步驟中，該電紡液係以電紡設備在電壓 15kV-30kV、針尖與收集板距離在 15cm-20cm、進料速率在 0.3mL/hr-1.0mL/hr 及滾筒轉速在 50rpm-100rpm 的條件下進行靜電紡絲，以將纖維絲堆疊於透明底膜。
5. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在該(c)活化薄膜步驟中，係以 pH 4.5-pH 5.0 緩衝溶液配置該交聯劑溶液，將該微奈米纖維薄膜浸泡於該交聯劑溶液中，靜置 2 小時，再以該緩衝溶液反覆沖洗三次將未鍵結上的該交聯劑溶液去除，接著置於乾燥器皿內抽真空，最後在常溫下乾燥。

(2)

6. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在該(d)固定化酵素步驟中，係取定量酵素吸附於該活化薄膜中，使該活化薄膜吸附有 8 $\mu$ g-80 $\mu$ g 酵素，並且於 25 $^{\circ}$ C 恆溫及恆濕的培養箱中靜置 1 小時。
7. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中在(e)製備酵素型時間溫度感應器步驟中，係以 pH 4.5-pH 5.0 緩衝溶液配製成 5mM-20mM 該呈色反應基質溶液。
8. 如請求項 7 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中該呈色反應基質溶液為 2,2'-聯氮-二(3-乙基-苯並噻唑-6-磺酸)二銨鹽(2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulphonic acid)、丁香醛(Syringaldehyde)、阿魏酸(Ferulic acid)、2,2-二甲氧基丙烷(2,2-dimethoxy-propan)及愈創木酚(guaiacol)具有氧化呈色的化合物。
9. 如請求項 1 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中可添加酵素反應抑制劑，以調整該酵素型時間溫度感應器呈色反應速率及活化能。
10. 如請求項 9 所述之以電紡技術固定化酵素製備時間溫度感應器的製作方法，其中該酵素反應抑制劑為疊氮化鈉、L-半胱胺酸、或抗壞血酸。

#### 圖式簡單說明

圖 1 係本發明實施例利用電紡技術製備固定化酵素薄膜以生產酵素型時間溫度感應器的流程圖。

圖 2 係本發明實施例電紡微奈米纖維薄膜的 SEM 顯微結構圖。

圖 3 係本發明實施例電紡微奈米纖維薄膜固定化酵素後的 SEM 顯微結構圖。

圖 4 係本發明實施例電紡薄膜固定化及未固定之酵素(50 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)於 4 $^{\circ}$ C 儲存 10 天之酵素穩定性的曲線圖。

圖 5 係本發明實施例酵素型時間溫度感應器(電紡薄膜上固定酵素 8—25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)儲存於 4 $^{\circ}$ C 的顏色變化圖。

圖 6 係本發明實施例酵素型時間溫度感應器(電紡薄膜上固定酵素 8—25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)儲存於 15 $^{\circ}$ C 的顏色變化圖。

圖 7 係本發明實施例酵素型時間溫度感應器(電紡薄膜上固定酵素 8—25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)儲存於 25 $^{\circ}$ C 的顏色變化圖。

圖 8 係本發明實施例酵素型時間溫度感應器(電紡薄膜上固定酵素 8—25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)儲存於 37 $^{\circ}$ C 的顏色變化圖。

圖 9 係本發明實施例酵素固定量為 0.021 活性單位的酵素型時間溫度感應器加入濃度 0.01、0.05、0.1 mM 的酵素反應抑制劑，於環境為 pH=4.5 之反應速率常數與 Arrhenius 活化能(Ea)的數據圖。

圖 10 係本發明實施例酵素型時間溫度感應器(固定酵素 8—25  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)儲存於動態溫度(4 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C 各 8 小時，共變動 3 循環)的呈色吸光值變化的曲線圖。

(3)

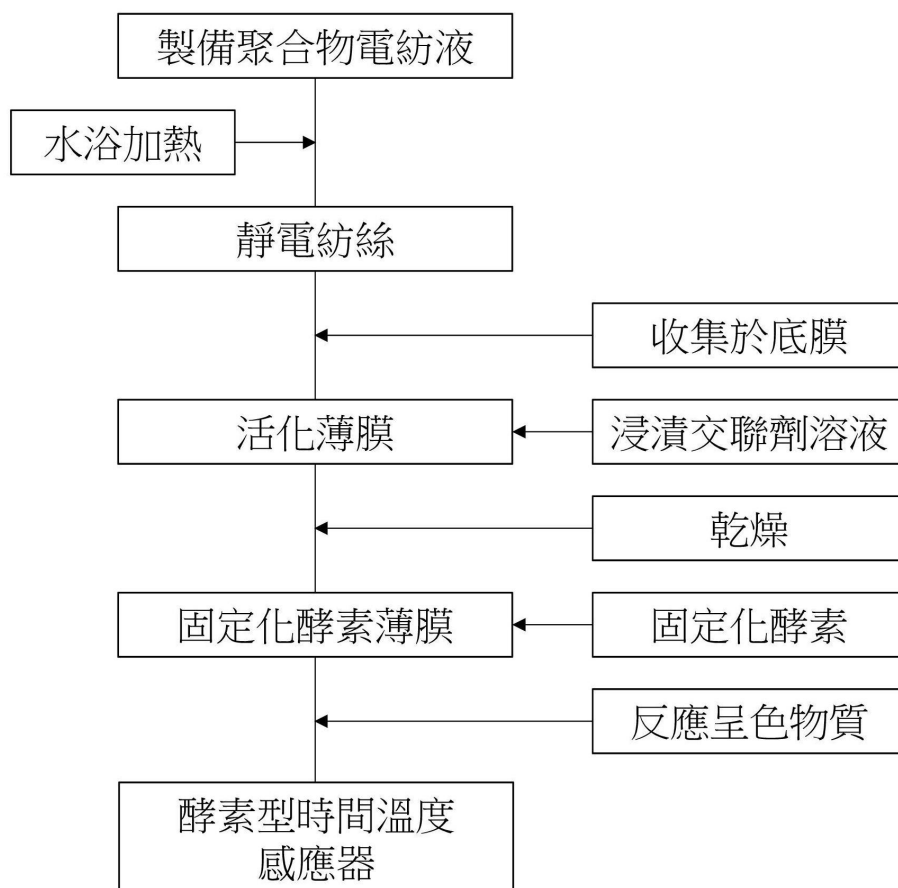


圖1

(4)

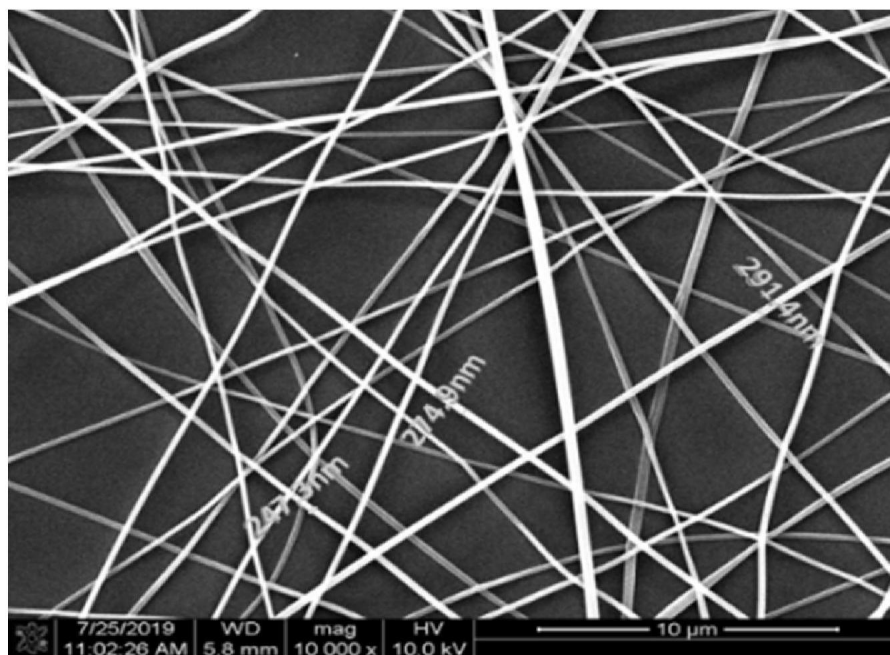


圖2

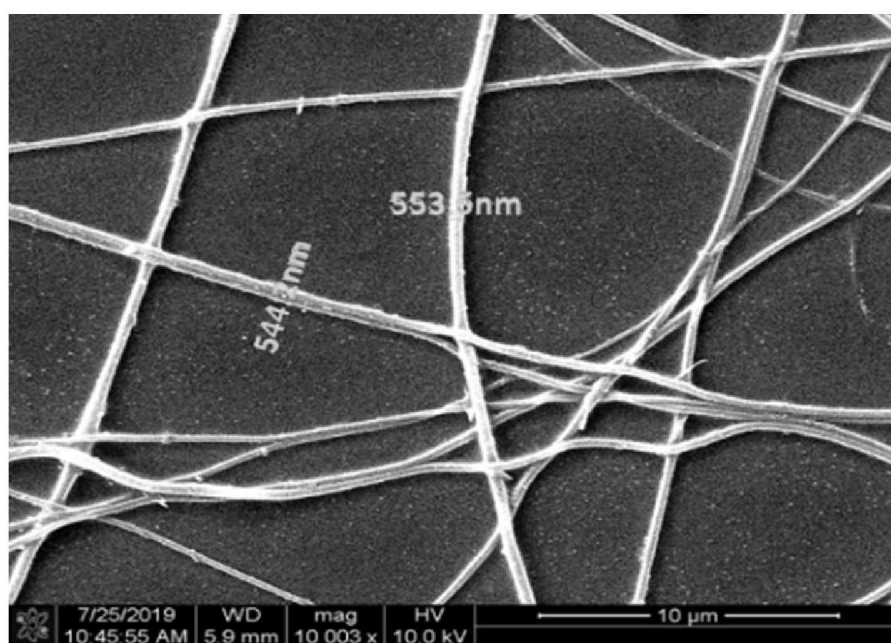


圖3

(5)

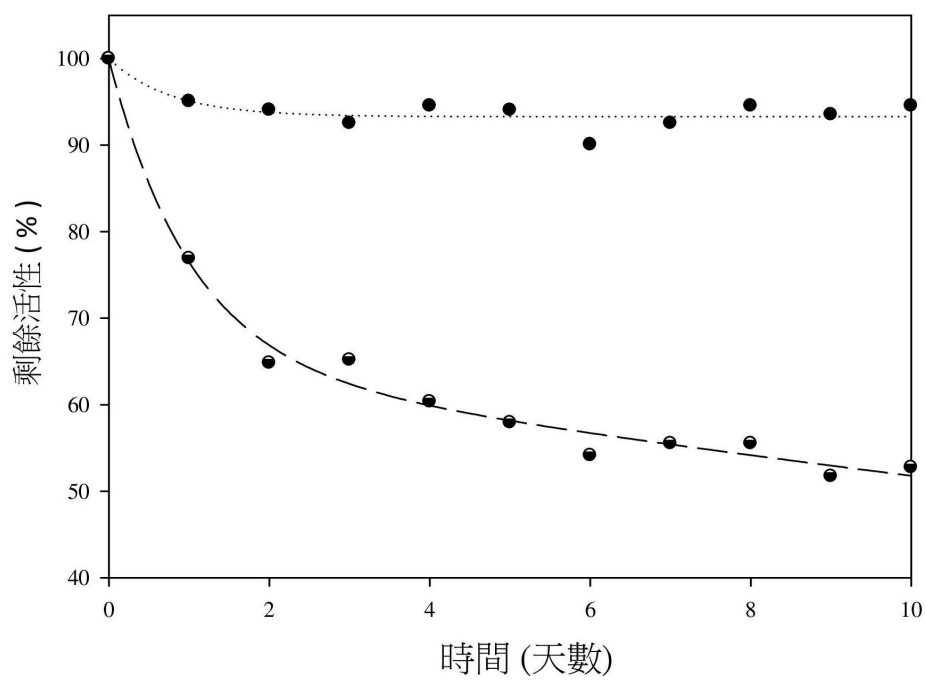


圖4

(6)

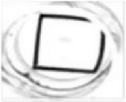
| 固定化酵素 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 天數                                  | 8                                                                                   | 10                                                                                  | 15                                                                                 | 20                                                                                 | 25                                                                                  |
| 0                                   |    |    |   |  |  |
| 0.5                                 |    |    |   |  |  |
| 1                                   |    |    |   |  |  |
| 3                                   |    |    |   |  |  |
| 5                                   |    |    |   |  |                                                                                     |
| 7                                   |   |   |  |                                                                                    |                                                                                     |
| 9                                   |  |  |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |
| 11                                  |  |  |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |
| 14                                  |  |                                                                                     |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |

圖5

(7)

| 固定化酵素 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                                                                     |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 天數                                  | 8                                                                                   | 10                                                                                 | 15                                                                                 | 20                                                                                 | 25                                                                                  |
| 0                                   |    |   |   |  |  |
| 0.5                                 |    |   |   |  |  |
| 1                                   |    |   |   |  |  |
| 1.5                                 |    |   |   |  |  |
| 2                                   |   |  |  |                                                                                    |                                                                                     |
| 3                                   |  |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |

圖6

(8)

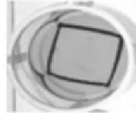
| 固定化酵素 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                                                                     |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 天數                                  | 8                                                                                   | 10                                                                                 | 15                                                                                 | 20                                                                                 | 25                                                                                  |
| 0                                   |    |   |   |  |  |
| 0.1                                 |    |   |   |  |  |
| 0.5                                 |    |   |   |  |  |
| 1                                   |    |   |   |  |  |
| 1.5                                 |   |  |  |                                                                                    |                                                                                     |
| 2                                   |  |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                    |                                                                                     |

圖7



(9)

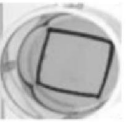
| 固定化酵素 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |                                                                                    |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 天數                                  | 8                                                                                  | 10                                                                                | 15                                                                                | 20                                                                                 | 25                                                                                  |
| 0                                   |   |  |  |  |  |
| 0.05                                |   |  |  |  |  |
| 0.5                                 |   |  |  |  |  |
| 1                                   |   |  |  |                                                                                    |                                                                                     |
| 1.5                                 |  |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |

圖8

(10)

| NaN <sub>3</sub> 濃度 | T (K)  | k ( $\Delta$ Abs/hr) | E <sub>a</sub><br>(kJ/mol) | R <sup>2</sup> |
|---------------------|--------|----------------------|----------------------------|----------------|
| 0mM                 | 308.15 | 0.1804               | 42.6                       | 0.985          |
|                     | 298.15 | 0.0920               |                            |                |
|                     | 188.15 | 0.0630               |                            |                |
|                     | 278.15 | 0.0279               |                            |                |
| 0.01mM              | 308.15 | 0.1444               | 51.2                       | 0.965          |
|                     | 298.15 | 0.1200               |                            |                |
|                     | 188.15 | 0.0807               |                            |                |
|                     | 278.15 | 0.0153               |                            |                |
| 0.05mM              | 308.15 | 0.2038               | 57.3                       | 0.868          |
|                     | 298.15 | 0.0438               |                            |                |
|                     | 188.15 | 0.0486               |                            |                |
|                     | 278.15 | 0.0134               |                            |                |
| 0.1mM               | 308.15 | 0.153                | 62.2                       | 0.920          |
|                     | 298.15 | 0.0451               |                            |                |
|                     | 188.15 | 0.0404               |                            |                |
|                     | 278.15 | 0.0084               |                            |                |

圖9

(11)

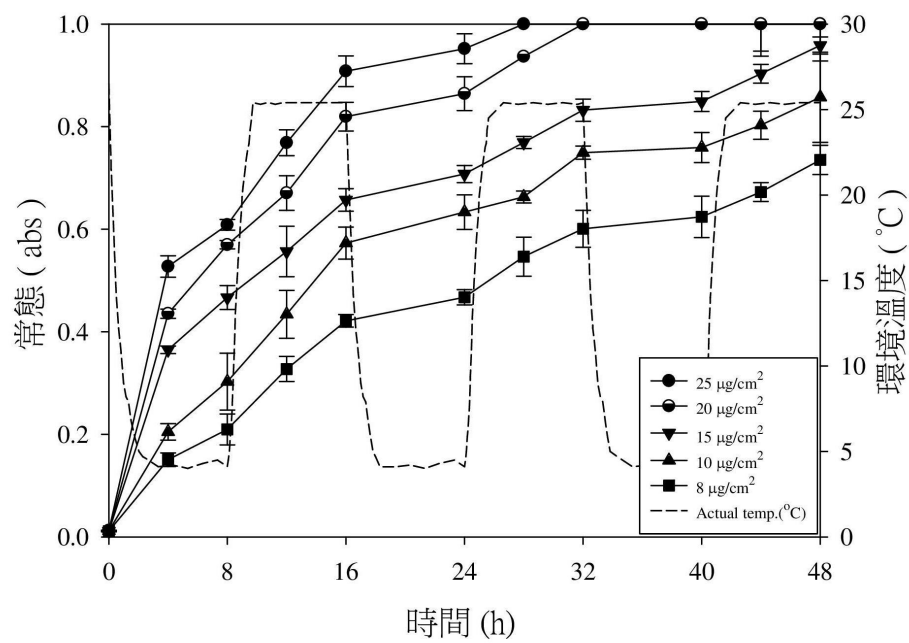


圖10