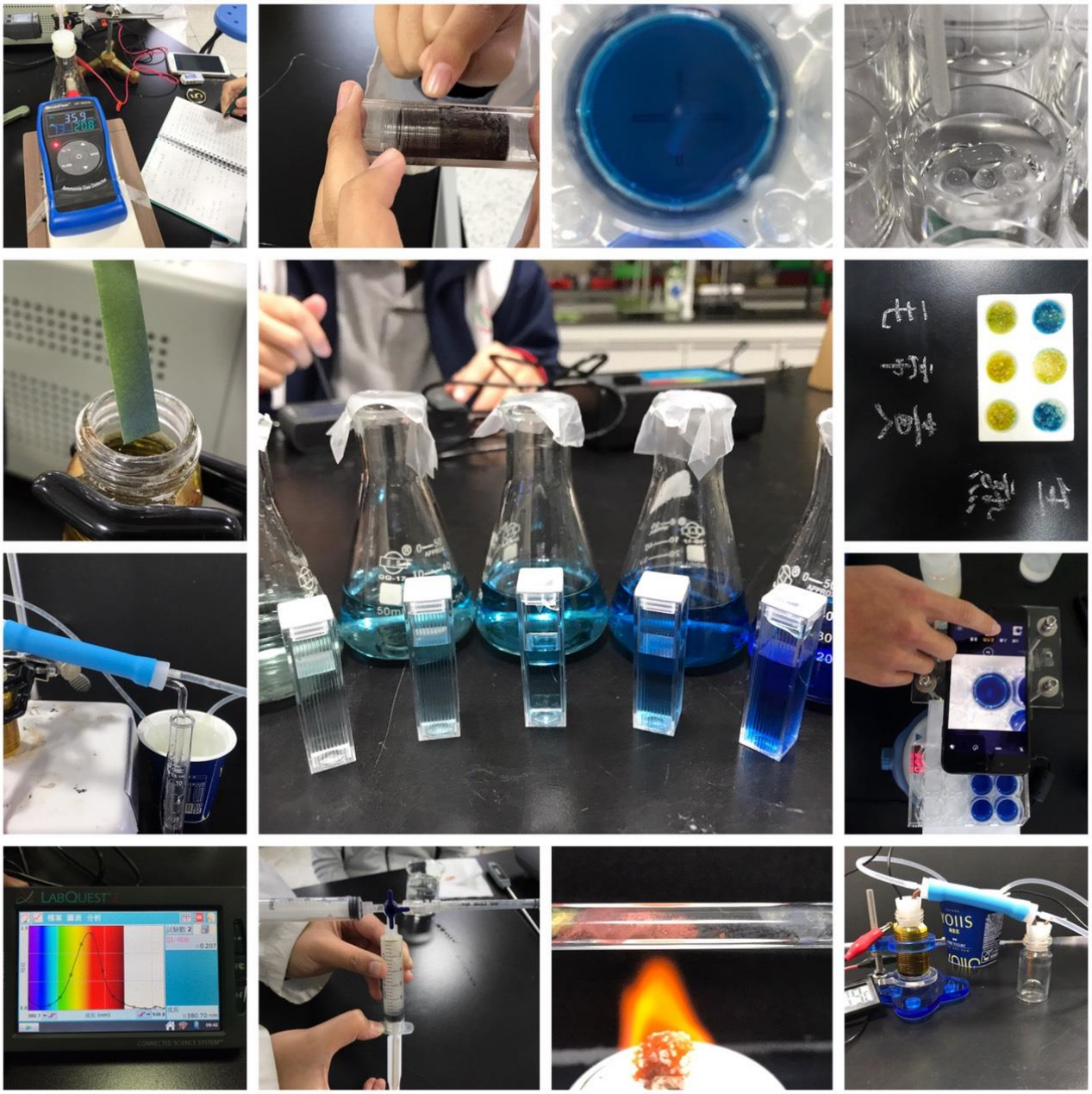
作品名稱：微「酵」行動



成果報告書

作品名稱：微「酵」行動

摘要

因應綠色化學減毒、減廢的精神，響應環保及落實永續發展，以加油站常出現「加尿素」的好奇心為起點，探討黃豆的酵素-尿酶對基質尿素的催化分解探究。本實驗設計聚焦在化學動力學的探究，減少有毒化學品的使用為優先考量；使用便宜又方便的黃豆、麵包酵母、與低毒性的尿素作為反應藥品；利用多孔盤作為反應容器減少藥品使用量；結合環保吸管與細銅管，發展蒸餾使用的冷凝管，改良蒸餾裝置；利用電熱帶製作電熱瓶，減少本生燈等明火的使用，提高實驗的安全性；透過手機鏡頭結合色彩分析 App，有效地紀錄反應過程中 BTB 指示劑因產物 NH_3 增加，所帶來的顏色變化，進而紀錄反應速率。使用隨手可得的手機 APP 色彩分析工具，設定 BTB 指示劑的 RGB 色碼值中 G/B 比值 0.3 為反應終點（與最低值 0.25 相去不遠），進行尿素分解動力學的探討，所得的趨勢與結果，跟直接利用靛酚比色法來偵測產物的存在，相去不遠。

尿素的分解速率受到很多因素的左右，當基質尿素、脲酶酵素的濃度越高時，分解反應速率越快，某個濃度範圍內，高度正相關，相關係數達 0.997 以上，可視為濃度的一級反應；不過酵素活性應該有限制，超過某一個濃度，分解速率就會減慢。至於溫度約在 40℃時，活性最高，溫度超過 80℃，酵素蛋白質恐會發生變性，分解速率因而急速減慢，酵素活性明顯降低。酸性的環境也不利尿素的分解，活性明顯被壓抑。重金屬抑制劑的存在可有效壓制尿素的分解，其中銅離子的抑制效果高於亞鐵離子；實驗發現有趣的現象就是基質的濃度越高，固定少量的銅離子存在下，反應速率竟然不變，推測銅離子應該是屬於非競爭型的抑制作用，抑制劑直接與酵素特異位置作用，不跟基質競爭活性位置。海藻酸鈉晶球的包埋，能有效降低尿素的分解速率，最高達 99.42 %，此項研究適合近一步發展包埋技術，在農牧業上可能有發展潛力。

利用靛酚法檢測水中的氨濃度，是相當精準的檢測，從分解百分率來看，最低濃度時為 62.4 %，高濃度時降至 7.5%，基質濃度升高，某一個時間點，酵素分解百分率急速下降，證實酵素活性有其極限。從溫度來看，都是 40 ℃左右反應速率最快，產率也最高。

麵包酵母催化雙氧水的分解，利用常見的壓力感測器，取代氧氣偵測器，可即時連續偵測氧氣增加所帶來氣壓的變化，作為反應速率，精準記錄各種變因下氣壓的變化。基質的濃度、酵母的添加量越高，反應速率越快；酵母在 60℃時活性最高，高於 80℃反應速率大幅度降低；

酸鹼環境中，pH=10，分解速率最快，pH=1 時分解速率最慢，兩者速率約 3.1 倍，代表酵母在強酸的環境中活性會被抑制。

壹、研究動機

進入交流道下的加油站加油時，站內常見到寫著『加尿素』三個大字的看板，起初不甚明白，為什麼汽機車要添加肥料。後來在基礎化學上到在空汙議題時，老師提及了柴油車引擎與一般的汽機車的噴射引擎不同，廢氣排放中氮氧化物 NO_x 的占比較高，加上氮氧化物為空汙主要元兇，因此目前歐洲五期環保多以選擇性催化還原法(SCR, Selective Catalytic Reduction)來減少貨卡柴油車氮氧化物的排放。然而選擇性催化還原法與一般汽機車所使用的三元觸媒轉化器不同，它需要在排氣管中段進入處還原性觸媒轉化器前噴入尿素水溶液，尿素在高溫時會分解出 NH_3，NH_3 與廢氣中的 NO_x 反應生成無害的氮氣與水[1]。聽了老師的解說後，觸媒的催化作用與尿素的神奇的反應，深深吸引了我們的好奇注意。

尿素除了在高溫下經觸媒作用分解外，常溫下可行嗎？經文獻[2]探討發現土壤中有一種酵素-脲酶，可以分解肥料尿素，產生高溶解度的氨，以做為植物合成蛋白質的氮源，尤其是豆科植物體內即含有脲酶。

因此瞭解本實驗計畫聚焦在尿素的催化與分解，首先探討尿素在不同熱環境下的熱分解，接著進入正題探究豆科植物體內所含的酵素-脲酶，在不同尿素濃度、溫度等環境下分解速率、分解百分比的差異等酵素活性分析與調查，並嘗試開發脲酶催化作用的抑制方法，不同面相來探究脲酶酵素動力學。

催化反應是中學化學實驗手冊中的常客，像老師常示範的大象牙膏，透過碘化鉀或二氧化錳作為催化劑，催化雙氧水的分解，快速產生氧氣，湧出大量的泡泡，很受我們學生青睞；植物內含有形形色色的酵素，像國中的生物實驗做過，馬鈴薯亦可快速催化雙氧水；唾液中的澱粉酶可以分解麵包中的澱粉，木瓜中的蛋白酶可以分解蛋白質，幫助消化；甚至連常見的麵包酵母除了可以促進糖發酵成酒精外，促成釀酒工業的發展，也可催化雙氧水分解的功能。

本計畫以尿素的分解為出發，擴及豆科植物中分解尿素的活性分析，探究酵素催化動力學；開發各種微型實驗設計，進行微量鑑定，並量測反應速率大小；以價格實惠麵包酵母作為催化劑，取代原來實驗室的製備方法。期盼透過本計畫的努力，優化實驗內容，印證酵素反應動力學外，更能有效降低有毒藥品的使用，達到綠色化學目標。

貳、研究目的

一、 調查自製式電熱瓶在不同電壓下，溫度變化與時間的關係，並評估取代本生燈或酒精燈，應用於尿素的熱分解的熱源供應上。

二、 調查尿素熱分解的氨產物的存在，並探討溫度的差異對分解反應速率的影響。

三、 調查生、熟皇帝豆，毛豆，黃豆等豆科植物與尿素反應，並比較產物的異同。

四、 發展尿素催化分解速率產物 NH_3 的偵測與分析方法，如 BTB 變色、RGB 色彩分析、壓力偵測、分光比色法等，比較不同尿素濃度、溫度等條件下，黃豆萃取液催化反應速率與產率的差異。

五、 探究海藻酸鈉-氯化鈣包埋法[3]，以及過渡金屬離子，如 Fe^{2+}、Cu^{2+}的存在對脲酶催化反應作用的影響。

六、 探究各種變因如溫度、濃度等條件的不同，對酵母催化反應的影響，如雙氧水的分解、葡萄糖的發酵。

七、 自製微型加熱瓶取代加熱板與本生燈，探究溫度對尿素熱分解的影響；利用自製的微型蒸餾器分離發酵後的產物；利用色彩分析 App 分析顏色組成，推估尿素分解的反應速率。

八、 發展尿素分解的綠色化學動力學的實驗教材，取代課本中探討反應速率的相關實驗，如秒錶實驗、碘化鉀催化雙氧水分解實驗、二氧化錳催化氯酸鉀分解等。

參、研究設備及器材

一、器材：

自製微型加熱瓶(1mm 寬的電熱線，14.6 Ω/m，耐熱膠帶)、智慧型手機（安裝 Color Picker APP）、微型蒸餾器（電熱式加熱瓶、環保吸管冷凝銅管、USB 沉水小馬達、24V 變壓器、#2、#5 矽膠塞等）、電源供應器等、威尼爾氣壓數位感測器、HoldPeak HP-5800G 氨氣感測器、威尼爾數位紅外線溫度感測器、USB 分光光度計 1 台、酒精曲折計（0~80 % v/v）、12 孔多孔盤、攪拌磁石、塑膠滴管數支等。

二、藥品：

尿素、1M 雙氧水、0.01M 氫氧化鈉、0.1%溴瑞香草酚藍(Bromothymol Blue，以下簡稱 BTB)、0.1 %酚紅、0.002 M 硫酸亞鐵、0.002 M 硫酸銅、氧化銅粉末、葡萄糖、麵包酵母、黃豆、毛豆、皇帝豆、氯化銨標準液、氨/氮呈色試劑[4]（A：苯酚酒精溶液、B：亞硝醯鐵氰化鈉溶液、C： 5%的次氯酸鈉加檸檬酸三鈉）等。

肆、研究過程與方法

一、微型實驗器具的製作與實驗方法

1. 自製微型加熱瓶：以鎳鉻電熱線加熱方式，利用電熱線圈數和改變電壓來控制溫度。在樣本瓶上貼兩段雙面膠後開始用電熱線在外纏繞，再用耐熱膠帶固定電熱線，防止電熱線在加熱過程中碰在一起造成短路。並在電熱線兩端接上環形端子方便於夾

上鱷魚夾接上變壓器，上方的矽膠塞上可鑽 1~2 個洞裝上溫度計或氣體感測器。完成後的電熱瓶，接上直流電源供應器，改變電壓 3V~21V 下，調查升溫趨勢此加熱瓶可應用於尿素熱分解等反應上。

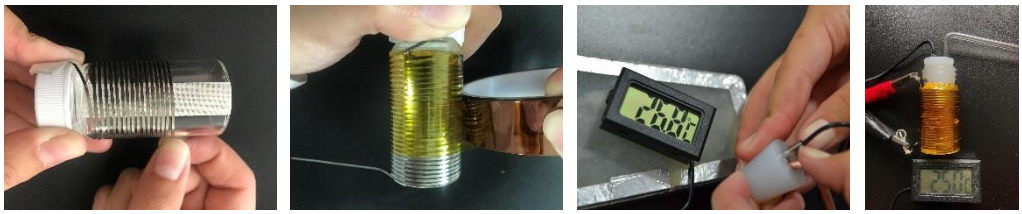


圖 1：微型加熱器的製作過程

2. 微型蒸餾器[5]：從微型加熱器出發改良，以銅管（或玻璃管）、珍珠奶茶用的矽膠環保吸管製作冷凝管為最重要的核心。其製作重要程序如下：矽膠塞鑽孔，2 孔孔徑各約 3mm➔以彎管器彎折 4mm 銅管，製作熱蒸氣通道➔銅管穿越環保吸管，並貫穿矽膠塞的孔洞，製作冷凝管，做為冷卻水通道。下圖為矽膠冷凝管的製作過程。

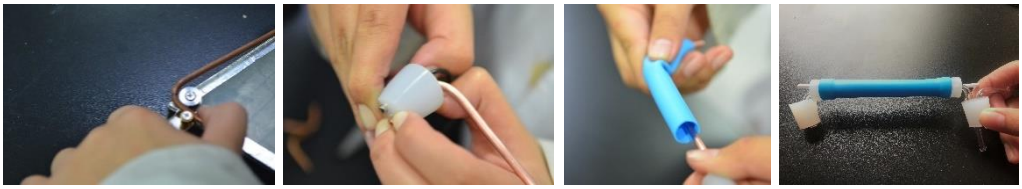


圖 2：環保吸管式冷凝管製作

在 USB 沉水馬達的進、出水口接上內徑約為 3mm，長約 40 cm 的兩條矽膠管後，並與已完成矽膠冷凝管上的兩個矽膠塞孔洞相連接，置入預先盛水八分滿的燒杯中，組裝而成循環式的冷卻裝置；電熱式蒸餾瓶、蒸餾液收集瓶塞上矽膠塞，蒸餾瓶上的矽膠塞上插入數位溫度感測器；電熱蒸餾瓶上的卡扣接好電源正、負極後完成微型蒸餾器的組裝。此裝置可用於葡萄糖發酵產物的分離與尿素分解產物氨的收集。若銅管改為玻璃管則需要利用本生燈加熱來彎管，稍微麻煩，而且容易折斷。

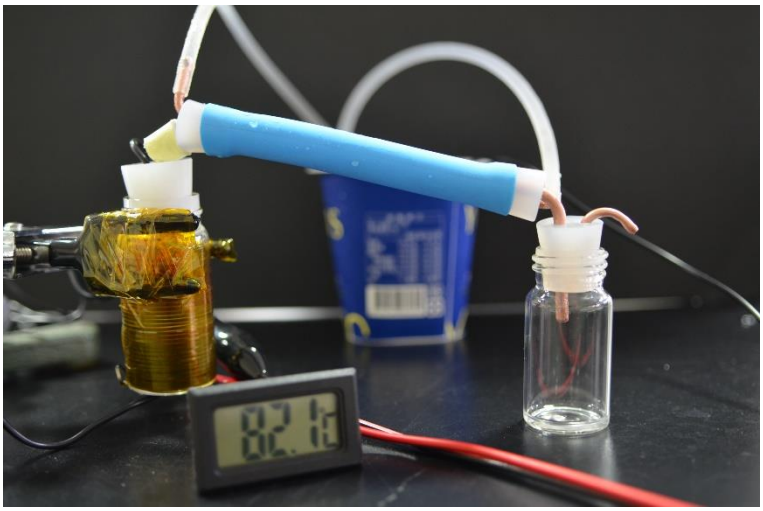


圖 3：微型蒸餾器示意圖

3. 色彩分析 APP：此次使用的 ColorPicker，在安卓系統與蘋果系統的 app store 中都可以下載。使用上相當簡便；之前也有研究做過[6]，使用時，只要以手機的鏡頭對準拍攝物，即可在照片上方出現 R:　G:　B:　的數值。實驗中也可直接按下拍攝鍵，事後再來解讀、統計 RGB 值。不過色碼值會因為拍攝物的距離、位置、甚至手持相機的穩定度而不同，因此必須將手機架設穩固，並在同一位置拍攝、觀察，下圖為 ColorPicker 的簡介畫面。

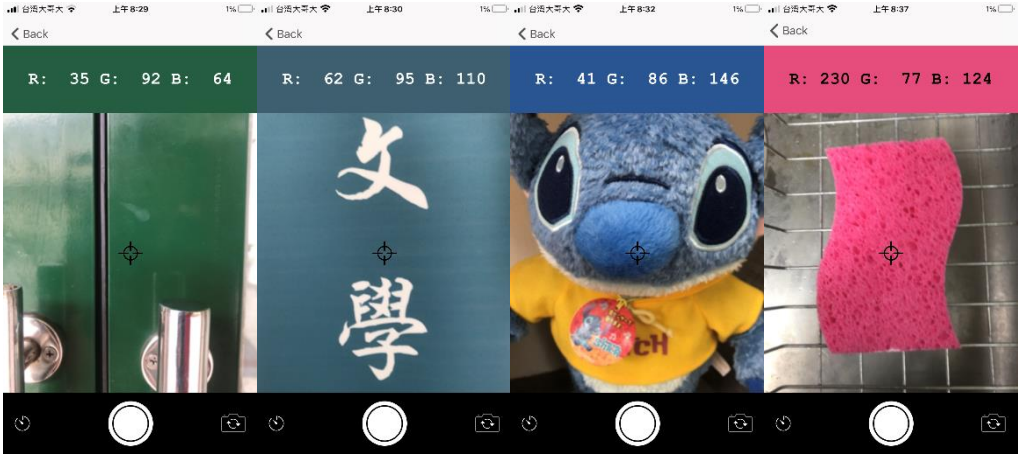


圖 4：APP 拍攝畫面，已拍攝的照片，亦可匯入 APP 中，並移動至選定的區域

尿素分解會產生氨氣，氨極易溶解在水中，水溶液會呈鹼性，並使指示劑溴瑞香草酚藍（簡稱 BTB）由綠色(G)變為藍色(B)。本次實驗即利用色彩分析 APP 觀測實驗過程中 G/B 值的變化，G/B 值越低，代表溶液越藍，鹼性越高，產物氨的濃度越高。我們可以因此判斷反應完成的程度，亦可固定某一個 G/B 值，比如 G/B = 0.3，以此為變色基準點，藉此判斷各種不同條件下，分解反應所需的時間，時間的倒數大小即可代表速率的快慢，減少人為觀測的判斷的誤差。下圖為實驗過程及 G/B 值變化。

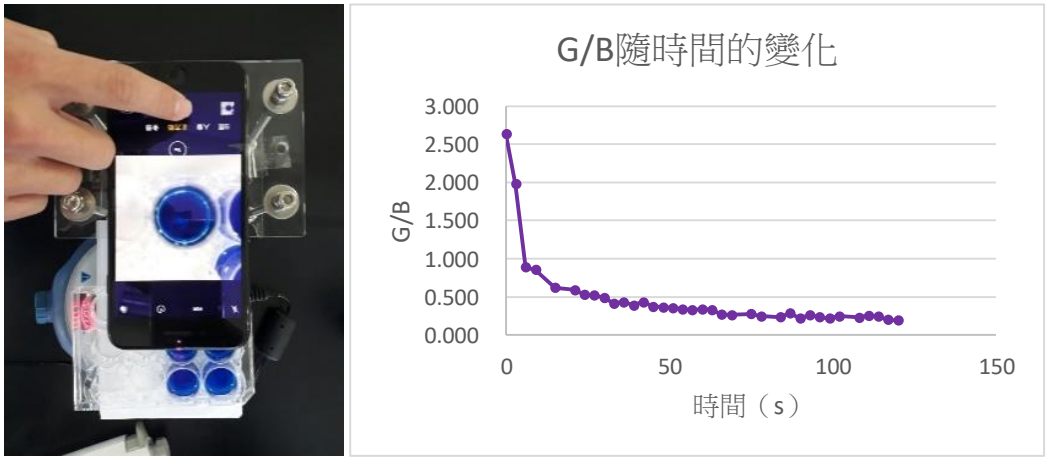
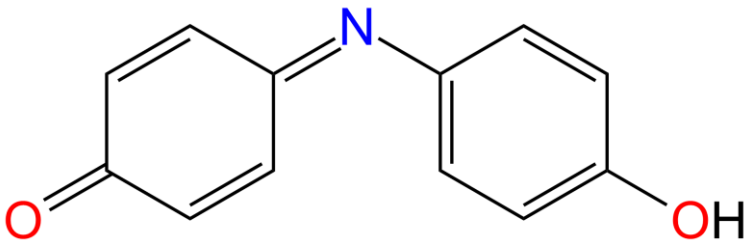


圖 5：圖左拍攝照片記錄 R、G、B 值，圖右為 G/B 比值隨時間的變化

4. 水中氨氮檢測-靛酚比色法：產物中阿摩尼亞極易溶解在水中，因此參考環保署水中氨氮檢測法[4]。含有氨氮及銨離子之水樣於加入 C 溶液-次氯酸鹽 (Hypochlorite) 及 A 溶液-酚

溶液反應，生成深藍色之靛酚 (Indophenol)，而 B 溶液-亞硝醯鐵氰化鈉溶液在反應中作為偶合劑，它的存在可以催化反應進行，使靛酚的濃度提升，顏色更加強烈[7]。使用分光光度計於波長 640 nm 左右處進行比色分析，即可求得水樣中氨氮之濃度。下圖為反應產物靛酚的結構式：



Indophenol, $C_{12}H_9NO_2$

圖 6：靛酚的 2D 結構式

靛酚比色法，必須先配置氯化銨標準液，取 3.819g 的氯化銨加蒸餾水配至 1000 mL 為 1000ppm 氯化銨；1000 ppm 氯化銨溶液取 10 mL 加入蒸餾水稀釋至 1000 mL 為 10 ppm 氯化銨；10 ppm 氯化銨取 10 mL 加入蒸餾水稀釋至 100 mL，為 1.0 ppm 氯化銨標準液。呈色劑 A 溶液配製，取 11.1mL 液態酚加酒精製 100mL。B 溶液配製，取 5 g 酚與 25 mg 亞硝醯鐵氰化鈉溶於 500 mL 蒸餾水中。C 溶液配製，5%次氯酸鈉 25mL 加 100mL 鹼性檸檬酸鹽。從標準液分別稀釋至 0.04 / 0.12 / 0.2 / 0.4 / 1.0ppm 總體積 25mL，各濃度中各加入 1mL A 溶液、1mL B 溶液、2.5mL C 溶液，用蠟模封口放入暗室靜置一小時進行呈色。隨後取出裝入比色管，取空白比色管校正儀器。由濃度最高的溶液打出全吸收光譜，再從光譜圖中找出吸收峰最高點的波長，陸續測出其他濃度的吸收度，以製作檢量線。下圖為全光譜掃描圖。

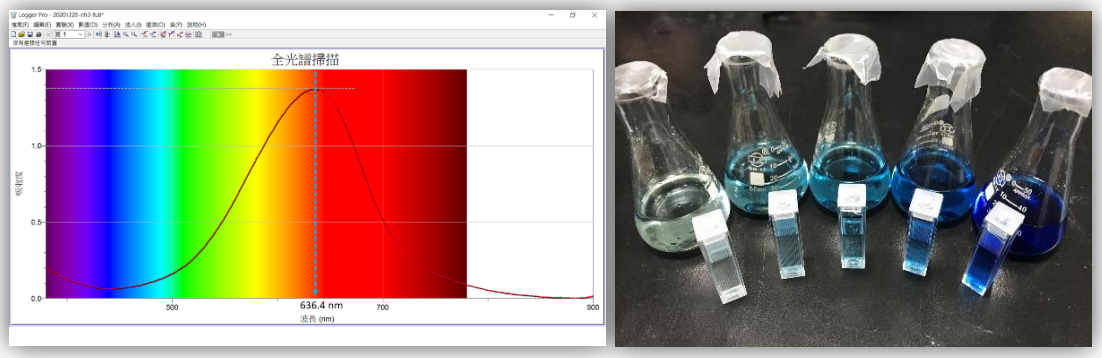


圖 7：全光譜掃描圖

二、尿素熱分解的產物是甚麼？溫度對尿素的熱分解會造成影響嗎？

1. 自製熱源固態酒精凍：取一個小果醬罐，體積約 30 毫升，首先加入 4 毫升的飽和醋酸鈣溶液，再置入一根棉製燭芯，隨後倒入 20 毫升 95 %的藥用酒精，靜置 1 分鐘後，將事先鑽好孔的瓶蓋旋緊，備用。

2. 準備兩個 30 毫升的樣本瓶 A、B，一個固定架，及兩個事先開好兩孔的矽膠塞，以矽膠塞塞住瓶口，其中一孔穿入數位溫度計的金屬探針，另一孔為氣體導孔。相關裝置固定好後，樣本瓶 A 內加入 0.5g 的尿素，塞好矽膠塞，接好氣體玻璃導管，導管內中間置入事先強火氧化變黑的細銅線圈。導管的另一端連接的樣本瓶 B，倒入 10 毫升的澄清石灰水。

3. 點燃酒精燈開始加熱使用〈為方便控溫，亦可使用電熱瓶加熱〉，關注溫度計的讀數，1 分鐘後觀察黑色氧化銅粉顏色的變化，此時 B 瓶中是否有氣泡產生，仔細觀察澄清石灰水是否變混濁？10 分鐘後，停止加熱，冷卻後打開瓶塞，以潮濕廣用試紙靠近瓶口，試紙顏色有何變化？以手在瓶口揮動，是否有特殊氣味？將下圖為產物檢測模組、黑色氧化銅粉的變色，以及試紙的檢測。

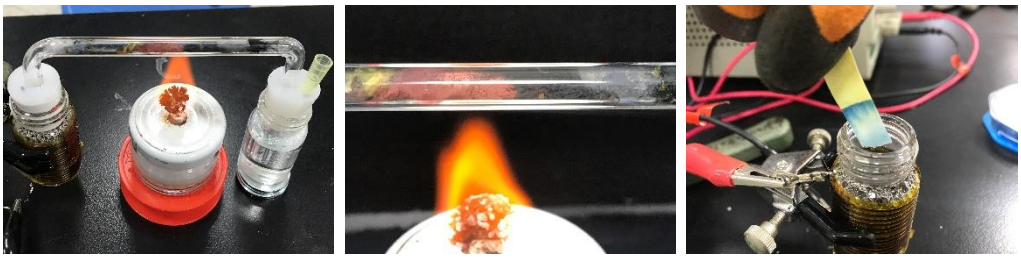


圖 8：尿素熱分解產物檢測示意圖

4. 不同溫度下，尿素熱分解速率的測量：分為氣壓感測法與電化學氨氣感測法。

(1) 氣壓感測法:換一根乾淨的玻璃導管，並將樣本瓶 B 內的石灰水換成檸檬酸，以吸收分解產物 NH_3；將矽膠塞上的另一導管連接器氣壓計，測量另一分解產物 CO_2 的分壓。下圖為裝置圖。

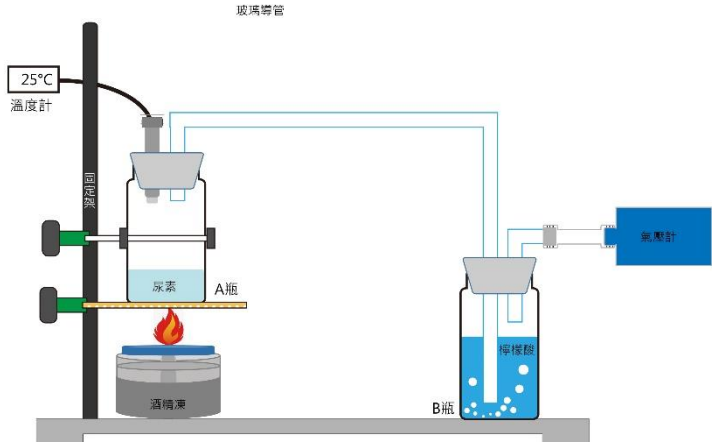


圖 9：尿素分解產物 CO_2 分壓的偵測圖

(2) 氨氣感測法：將尿素置於電熱瓶內，以矽膠塞塞住，另一根玻璃管連接一個抽濾型的錐型瓶做為緩衝瓶，並將抽濾瓶的抽器孔以透明塑膠管連接氨氣感測器。下圖為測量裝置。

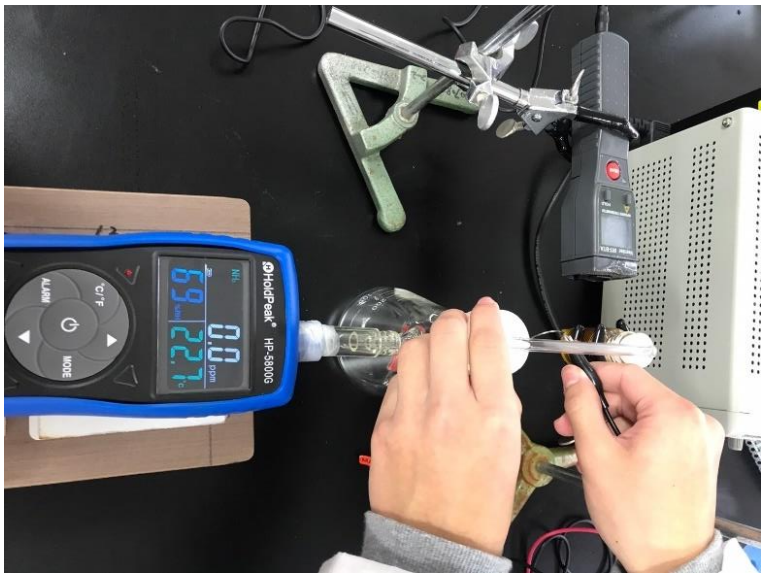


圖 10：電化學氨氣感測法裝置圖

三、尿素可以在室溫下被酵素分解嗎？分解的產物是甚麼？那些因素會影響酵素－脲酶的催化尿素分解速率？

經文獻探討發現尿素分解的產物是氨氣與二氧化碳，按常理推測，氨氣易溶於水，呈弱鹼性，適合的酸鹼指示劑如酚紅、溴瑞香草酚藍皆可選擇；那二氧化碳微溶於水，可以測量氣壓的變化。實驗設計如下：

1. 尿素分解產物二氧化碳的檢測：取 A、B 兩個 10 毫升的針筒，一個 1 毫升的 C 針筒，及一個醫用注射三通閥，預備連接三個針筒。先利用 A 針筒吸取 2M 的尿素 5 毫升，B 針筒吸取 10%的黃豆萃取液 5 毫升，隨後利用三通閥連接 A、B 兩個針筒（成垂直狀），第三個閥門連接另一個 1 毫升的 C 針筒，轉動閥門 A-B 通，將 A 針筒的溶液吸至 B 針筒，後旋轉閥門 B-C 通，關閉 A 閥門後靜置。觀察 1 毫升的 C 針筒體積刻度是否有變化？

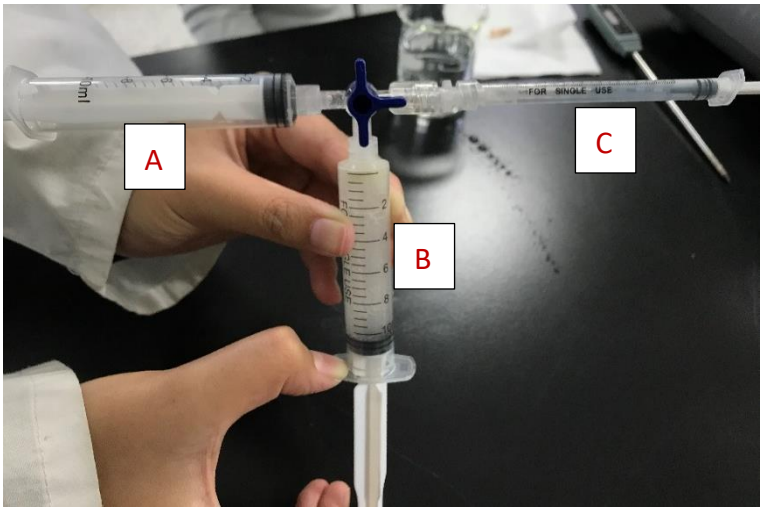


圖 11 ：產物 CO_2 體積的測量示意圖

2. 尿素的酵素分解產物氨的檢測：以 BTB（變色範圍：黃 6.0~7.6 藍）及酚紅（變色範圍：黃 6.4~8.2 紅）作為氨的檢測指示劑，目測當 BTB 的顏色由綠色轉變為藍色時，或酚紅由黃色轉為紅色時，代表氨的出現，讓水溶液變鹼性，判為反應終點。取一枚皇帝豆莢，撥開豆莢取出豆仁，並剝開外皮，分開成兩瓣，隨後於兩瓣豆仁上，各滴入一滴酚紅指示劑，觀察指示劑顏色；分別於左、右兩瓣的豆仁分別滴入 1 滴蒸餾水與 5%的尿素溶液，觀察顏色的變化。下圖為皇帝豆仁的顏色。

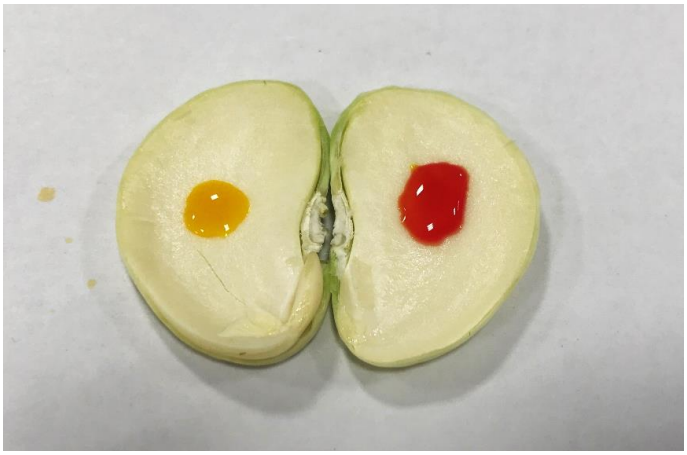


圖 12：左瓣保持原色，右瓣轉為紅色，呈鹼性，研判有 NH_3 的生成

3. 大豆脲酶的提取：秤取 10g 的乾黃豆粉，加入 90 毫升的蒸餾水稀釋，攪拌一小時，並在離心機 4000 轉下，離心 10 分鐘。吸取上層溶液，分成兩等分，備用。生毛豆、皇帝豆不用浸泡過夜，剝除豆莢，取出豆仁烘乾後秤重。待磨碎後加入等比例的蒸餾水稀釋，攪拌、離心後備用。

4. 豆子煮熟後可以催化尿素分解嗎？比較生、熟皇帝豆、毛豆、黃豆的萃取液比較是否都可以催化尿素分解嗎？下圖為各種生、熟豆類滴加數滴尿素及指示劑後的顏變化。

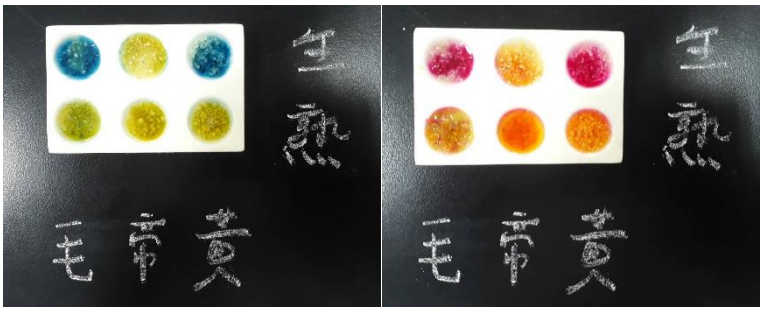
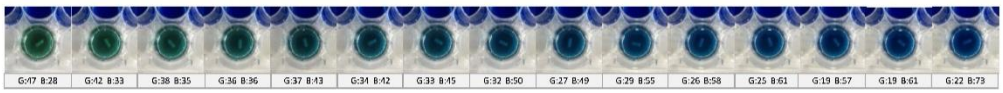


圖 13：圖左添加的 BTB 指示劑，圖右為添加酚紅指示劑

5. 改變基質 S 的濃度，催化分解的反應速率 R 會受影響嗎？

取一個 12 孔多孔盤，分別加入不同濃度的尿素 2 毫升、溴瑞香草酚藍 5 滴、黃豆萃

取液 5 滴，分別以目視法與 APP 色彩分析法比較微孔盤內各種溶液顏色由黃變藍所



需的時間。下圖為 APP 色彩分析法，紀錄各個時段的 GB 值。

圖 14：APP 色彩分析法，紀錄各個時段的 G、B 值。

6. 改變酵素 E 的濃度，酵素催化分解速率 R 一樣嗎？

   取一個 12 孔多孔盤，分別加入同濃度的尿素 2 毫升、溴瑞香草酚藍 5 滴、及不等量的黃豆萃取液，分別以目視法輔以 APP 色彩分析法，比較微孔盤內各種溶液顏色由黃變藍所需的時間。

7. 改變溫度 T 的高低，催化分解的反應速率 R 會不同嗎？

   利用水浴控制溫度，分別於 25、40、60、70、80℃不同溫度下，取一個 12 孔多孔盤，分別加入同濃度的尿素 2 毫升、溴瑞香草酚藍 5 滴、黃豆萃取液 5 滴，分別以目視法與 APP 色彩分析法比較微孔內各種溶液顏色由黃變藍所需的時間。

8. 酵素的催化水解反應速率 R 可以被抑制或減速嗎？

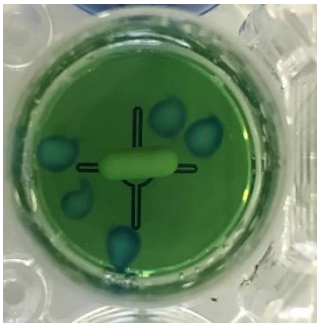
   (1) 添加不同濃度的重金屬離子如 Cu^{2+}、Fe^{2+}，調查催化反應速率的差異。取一個 12 孔多孔盤，分別加入同濃度的尿素 2 毫升、溴瑞香草酚藍 5 滴、黃豆萃取液 5 滴，以 APP 色彩分析法比較微孔內各種溶液顏色由黃變藍所需的時間。

   (2) 在催化反應中，基質與抑制劑的角色是競爭對手嗎？當固定抑制劑的濃度，改變尿素基質的濃度，速率如何變化？尿素濃度由 0.1mM~8.0M、取體積 2 毫升，0.25mL 的 BTB，0.25mL 的黃豆萃取液，0.01M 硫酸銅、0.05 毫升。

9. 利用海藻酸鈉晶球法將酵素 E 包埋，反應速率會改變？

   取 10 %大豆萃取液與 2%海藻酸鈉溶液不同體積混合，製備 0.5%~5%不同濃度的萃取液，隨後逐滴進入 2 %的 $CaCl_2$(aq)中，形成海藻酸鈣包覆層[3]。選取 5 顆大豆的萃取溶液所形成得酵素晶球，加入 12 孔多孔盤，分別加入 0.1M 的尿素 2 毫升、溴瑞香草酚藍 5 滴，以 APP 色彩分析法觀察比較微孔盤內各種溶液顏色由黃變藍所需的





時間。下圖為晶球製備與反應過程。

圖 15：圖左為酵素晶球的製備，圖右為添加 BTB 指示劑的尿素催化分解反應

四、如何精準量測尿素的分解所產生的氨，並計算分解產率？

1. 以靛酚比色法測量分解產物氨氣的濃度

本次反應的產品中有黃豆萃取物，溶液成白色混濁狀，會對比色造成很大的誤差，因此需要經過蒸餾的過程，去除干擾。本實驗將反應溶液放在電熱式蒸餾瓶中，收集溶液則使用 10 毫升量筒，筒內添加 0.02%醋酸酸性溶液以吸收鹼性的氨。溶液靜置反應十分鐘後，再加入 100 μ ml 0.01M NaOH 調整溶液酸鹼值後（ pH=10 左右），開始蒸餾 20 分鐘，將蒸餾液收集在量筒中，下圖為蒸餾收集產物氨的實驗配置圖。



圖 16：以電熱式蒸餾瓶分離產物氨的裝置圖

隨後將溶液稀釋至 25mL，備用。測量時分別加入 A 溶液 1mL，B 溶液 1mL，C 溶液 2.5mL，用蠟模封口，放置暗處等待呈色一小時。先以標準試樣在波長 640 nm 左右製作檢量線，再將樣品裝入比色管，讀出吸收度，將吸收度帶入檢量線，即可換算成濃度，並可推算分解產率。已完成氨氮檢量線如下：

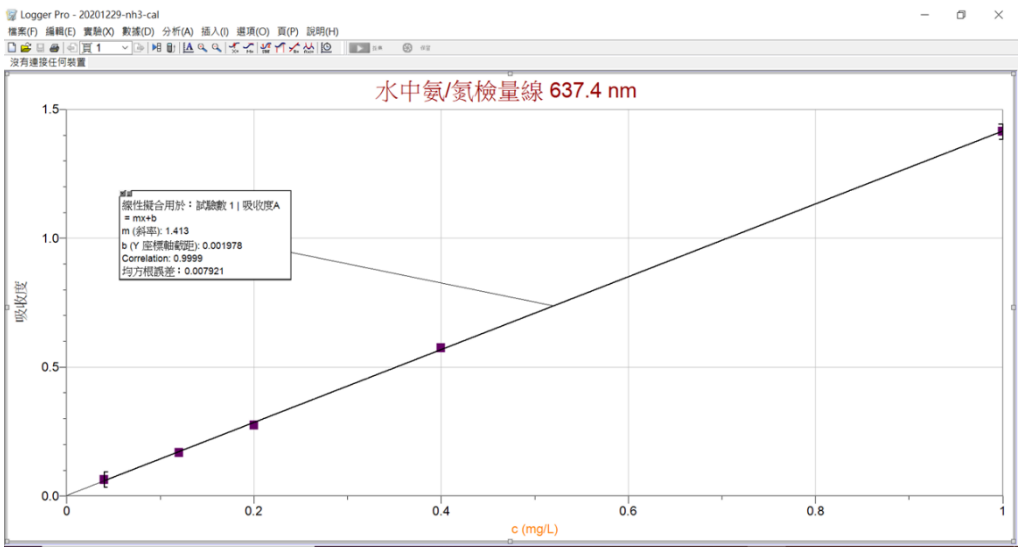


圖 17：靛酚比色法的檢量線

2. 常溫下固定酵素濃度，調查不同尿素濃度下產物氨的量，及分解百分率。

   反應條件：拿 10 毫升量筒取 0.02%醋酸 1mL，3 mL 水。蒸餾瓶個別取不同尿素濃度 0.05 / 0.1 / 0.2 / 0.5 / 1.0 / 2.0 / 4.0 mM 總體積 10 毫升。加入 0.25 mL 黃豆萃取液反應 10 分鐘後加鹼調整 pH 值後蒸餾 20 分鐘，收集蒸餾液，以待呈色、檢測。

3. 不同溫度下分解百分率的調查

   反應條件：收集瓶取 0.02%醋酸 1 mL，3 mL 水。蒸餾瓶取 0.001 M、2 mL 尿素和 8mL 蒸餾水，控制在 15 / 40 / 60 / 80 ℃時，加入 0.25 mL，10%黃豆萃取液，反應 10 分鐘，再加入 100 μ ml 0.01M 氫氧化鈉調整 pH 值後，收集蒸餾液，以待呈色、檢測。

4. 不同 pH 值下分解百分率的調查

   反應條件：拿 10 毫升量筒取 0.02%醋酸 1mL、蒸餾水 3mL，作為收取蒸餾液的容器。固定加入 0.001M 的尿素 1 毫升和 9 毫升的緩衝液，分別是 pH=1、4、10、13，並取 0.25 毫升的 10%黃豆萃取液，加入至電熱瓶中靜置反應 10 分鐘，之後加入 0.01M 的氫氧化鈉 0.1 毫升來中和瓶內酸鹼值，接著裝上自製微型蒸餾器蒸餾 20 分鐘，蒸餾結束後，收集蒸餾液，以待呈色、檢測。

5. 重金屬銅離子、亞鐵離子抑制劑的存在下，尿素分解百分率的調查

   反應條件：拿 10 毫升量筒取 0.02%醋酸 1mL，蒸餾水 3mL。蒸餾瓶取 0.001M、2mL 尿素和 8mL 蒸餾水，分別加入 2.0 / 1.0 / 0.4 / 0.2 / 0.1mM 硫酸銅（總體積 1mL），加入 0.25mL10%黃豆萃取液，反應 10 分鐘，再加入 100 μ ml 0.01M 氫氧化鈉，蒸餾 20 分鐘，將蒸餾溶液稀釋至 25mL，收集蒸餾液，以待呈色、檢測。

五、其他的酵素催化反應：酵母菌如何催化雙氧水與葡萄糖的分解？

1. 使用酵母做為過氧化氫酶的來源，催化定量的雙氧水分解，分解後溶液變酸嗎？以數位壓力感測器檢測產物氧氣氣壓的改變，與 pH meter 酸鹼值的變化。

   反應條件： 於 50 毫升的錐形瓶中加入 1M 的雙氧水 12 毫升、蒸餾水 12 毫升、1%的酵母液 1 毫升，檢測雙氧水分解過程中氣壓與 pH 的變化。

2. 偵測氧氣氣壓的變化改變，調查不同受質濃度、溫度等下，反應速率的快慢與酵素活性分析。

   (1)**不同基質濃度下，催化分解的反應速率會受影響嗎？** 固定取 1%的酵母液 1 毫升，改變雙氧水濃度，分別取 0.16、0.32、0.48、0.64、0.8、0.96M 的雙氧水濃度 24 毫升，加入至 50 毫升的錐形瓶內進行攪拌，以壓力感測器檢測氣壓的變化。

(2)**不同酵素濃度下，酵素催化分解速率一樣嗎？** 固定取 1M 的雙氧水 6 毫升，改變酵母濃度，分別取 0.04、0.08、0.12、0.16、0.32%的酵母濃度 19 毫升，加入至 50 毫升的錐形瓶內進行攪拌，以壓力感測器檢測氣壓的變化。

(3)**酸鹼值不同的環境，催化分解的反應速率會不同嗎？** 固定取 1%的酵母液 2 毫升、1M 雙氧水 8 毫升，改變酸鹼環境，分別取 pH = 1、4、7、10、13 的緩衝液 15 毫升，加入至 50 毫升的錐形瓶內進行攪拌，以壓力感測器檢測氣壓的變化。

(4)**溫度不同時，催化分解的反應速率會不同嗎？** 固定取 1%的酵母液 2 毫升、1M 雙氧水 8 毫升，改變溫度，使用加熱板將溫度控制在 25、40、50、60、70、80℃，加入至 50 毫升的錐形瓶內進行攪拌，以壓力感測器檢測氣壓的變化。

3. 使用酵母菌，催化葡萄分解，並利用自製的微型蒸餾器，分離發酵反應後的產物，並檢測蒸餾前後酒精濃度的改變。

反應條件：準備紅葡萄約 100 克，洗淨陰乾後，以果汁機打成葡萄汁裝入一個 250 毫升的血清瓶中，加入約 0.1 克的酵母後旋緊，瓶身包覆鋁箔，於陰涼處發酵 50 天。50 天後小心打開瓶身，細聞是否有酒味？以紗布過濾果渣後，將溶液倒入 30 毫升的電熱式蒸餾瓶中，裝置安裝完成後開始蒸餾 30 分鐘。觀察第一滴餾液溜出的溫度與顏色；時間結束後，收集瓶內酒精濃度是否與發酵的葡萄酒有何不同？下圖為活動過程。

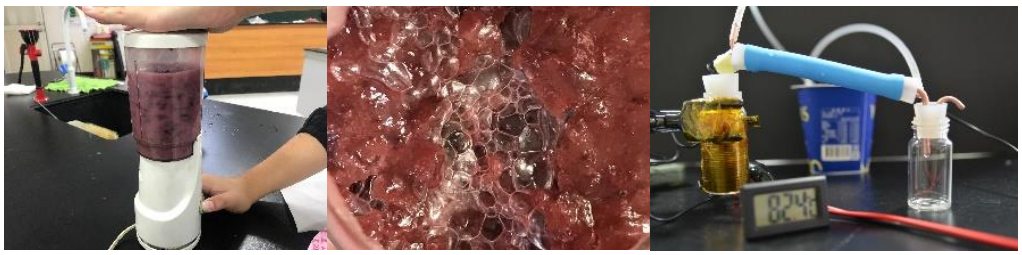


圖 18：葡萄糖發酵及蒸餾過程

4. 藉由透過偵測二氧化碳氣壓的變化，調查不同葡萄糖濃度、溫度等條件下，反應速率的快慢差異。

(1) **基質越濃，酵母分解葡萄糖的反應速率會有所不同嗎？**調配 25%葡萄糖溶液，加以稀釋至 0.1%、0.2%、0.5%，1%、5%、10%、15%、20%、25%等濃度，總體積為 25 毫升。加入 0.5 克酵母粉錐形瓶，並且放入磁石用 320 轉反應 20 分鐘，讓酵母粉甦醒。塞入矽膠塞，緩慢將魯爾接頭轉入氣壓感測器，並開始測量壓力變化。

(2) **添加越多酵素，酵母分解葡萄糖的反應速率會加快嗎？**各組分別加入 25%葡萄糖溶液 15 毫升與 10 毫升的蒸餾水。加入不等酵母粉重量 0.1g、0.3g、0.5g、0.7g、0.9g、1.1g、1.5g。放入磁石以 320 轉攪拌 20 分鐘，讓酵母甦醒。塞入矽膠塞，將

另一端的魯爾接頭慢慢旋入氣壓感測器上，並開始檢測壓力變化。

伍、研究結果與討論

一、以電源供應器 3V~21V 定電壓下，進行電熱式加熱瓶的升溫測試：發現電壓越高，加熱越快，溫度越高。其中 18V~21V 定電壓的加熱溫度均超過 100℃度，可應用在多數的高中的加熱實驗，如蒸餾。下圖為加熱曲線與時間的關係。

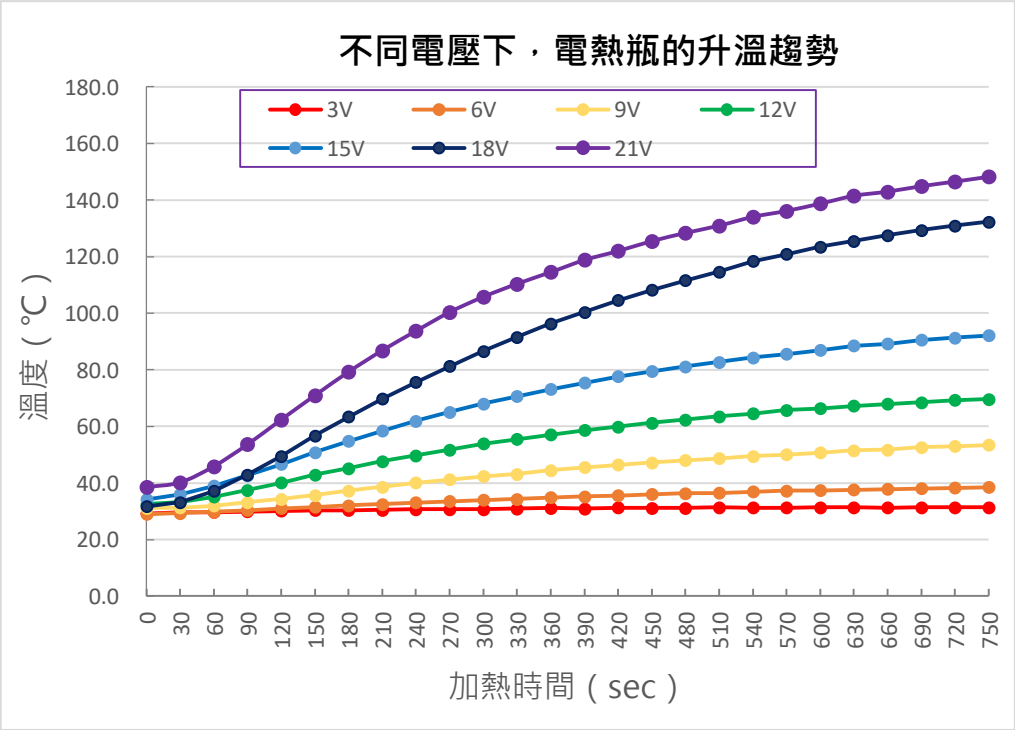


圖 19：不同電壓下，微型加熱瓶的升溫曲線圖

二、尿素熱分解的產物是甚麼？溫度對尿素的熱分解會造成影響嗎？

1. 產物是氨氣嗎？

實驗發現：尿素分解的產物使黑色氧化銅粉末還原成紅棕色的銅，表示此氣體具有還原性；以廣用試紙檢測變藍色，證實氣體產物為鹼性；以手在瓶口揮動，聞到特殊的臭味。綜合以上。

【推測】：尿素熱分解的產物中含有 $NH_3(g)$。

2. 產物是二氧化碳嗎？

實驗發現：盛裝澄清石灰水的 B 瓶，以 24V 加熱 10 分鐘的過程中，並無明顯的氣泡，數位氣壓感測器，即時連續的偵測中，壓力由 101.2KPa~102.3KPa，氣壓並無明顯的變化。澄清石灰水亦無混濁，無法證實熱分解產物中有二氧化碳的存在。

【推測】：尿素熱分解的含碳氧產物，可能溶於水會快速與部分的 $NH_3(g)$作用。不易

被觀察。

3. 將不同溫度下，尿素熱分解速率的測量：將 5 克尿素倒入電熱瓶，通入 18V、21V、24V、27V 不同電壓，室內溫度 25 度，使用電化學氨氣感測器量測氨氣濃度，量測範圍 0~100 ppm（超過亦可測量，會發出高音量的警告聲響）。

   實驗發現：通入電壓越高，溫度越高；實驗結束前，18V 最高溫度約 158℃，21V 最高約 185℃，24V 最高約 210℃，27V 最高約 230℃。氨氣觀測達 100 ppm 所需時間如下圖所示：

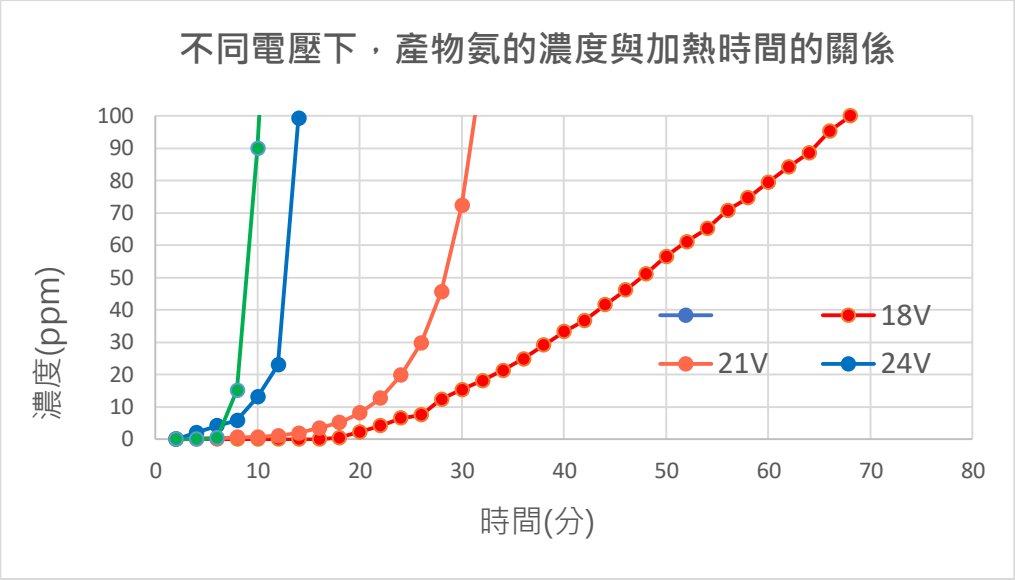


圖 20：不同定電壓下，加熱時間與產物濃度的關係

【推測】：溫度越高，尿素熱分解百分率越高。27V 的平均分解速率最快，約 9.0ppm/分，18V 的平均分解速率最慢，約為 1.5 ppm/分

三、尿素可以在室溫下被酵素分解嗎？分解的產物是甚麼？那些因素會影響酵素－脲酶的催化尿素分解速率？

1. 尿素分解的產物－二氧化碳可以被偵測嗎？

   實驗發現：1 毫升的 C 針筒的按柄放置 24 小時後，並無移動，體積刻度不變。

   【推測 1】：氨氣是易溶於水，呈鹼性，在密閉的空間內，會中和吸收微溶水呈弱酸的二氧化碳，造成體積刻度不變。

   【推測 2】：若想觀測尿素酵素分解的動力學，偵測產物應該以氨為對象較合適。

2. 豆科植物中有脲酶酵素的存在嗎？尿素的酵素分解產物氨的檢測中，當 BTB 的顏色由綠色轉變為藍色時，或酚紅由黃色轉為紅色時，代表氨的出現，或脲酶酵素的存在。

實驗發現：生皇帝豆加了尿素的後，可使酚紅由黃變紅，皇帝豆中有脲酶酵素的存在而加了蒸餾水的對照組保持黃色不變色。

3. 煮熟後的豆類，酵素活性會不會改變？

實驗發現：煮熟後的豆類，不管毛豆、皇帝豆或黃豆指示劑皆不會變色。而生皇帝豆變色速率較生毛豆和生黃豆慢。相關 BTB 變色實驗三種生豆速率比較如下圖：

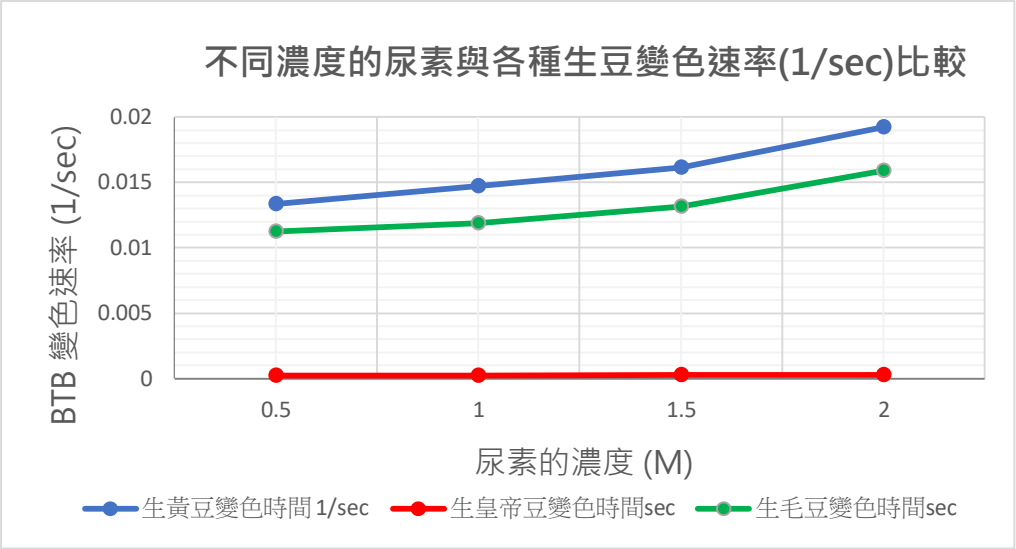


圖 21：各種生豆變色速率與基質濃度的關係

【推測】：皇帝豆的脲酶活性較低，鑒於價格因素，以下實驗僅採用生黃豆即可。

4. 改變基質 S 的濃度，催化分解的反應速率 R 會受影響嗎？

實驗發現：在 2mL 的尿素，濃度分別為 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 M，加入 10%的黃豆萃取液 0.25 毫升的條件下，以變色時間 T 的倒數 1/T，代表反應速率 R，基質的濃度越高，則變色時間越短。相關數據作圖如下：

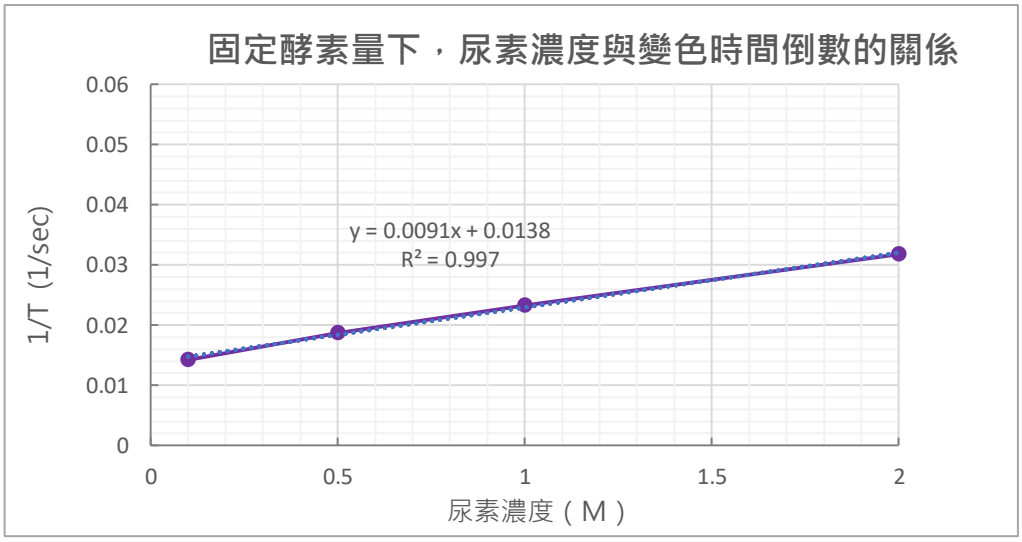


圖 22：固定酵素量下，尿素濃度與變色時間倒數的關係

【推測】：基質 S 的濃度越高，反應速率 R 越大，兩者呈高度正相關，相關係數高達 0.997，推測在此濃度條件下催化速率與基質濃度呈正比。

5. 改變酵素 E 的濃度，基質 S 的濃度不變，催化分解的反應速率 R 會受影響嗎？

實驗發現：固定尿素濃度，改變黃豆萃取液添加量、5 滴 BTB 的條件下，以變色時間 T 的倒數 1/T，代表反應速率 R，當黃豆酵素濃度在 0.1 %以內時，濃度越高，變色時間越短；當濃度高於 0.1 %~5 %時，變色時間相近。相關結果如下圖所示：

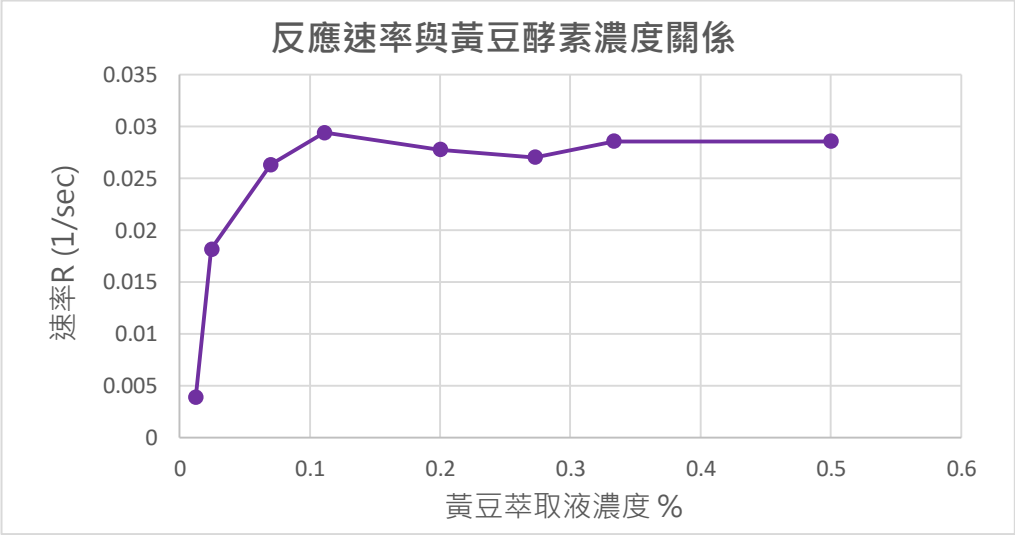


圖 23：酵素濃度與反應速率的關係

【推測】：酵素在低濃度時，濃度越高，反應速率 R 越大；當酵素濃度大於 0.1%時，催化速率不再改變。

6. 改變溫度 T 的高低，催化分解的反應速率 R 會不同嗎？

實驗發現：固定相關條件，分別於室溫(19.0)、40、60、80℃不同溫度下進行實驗發現，反應速率大小依序為 $R_{40}>R_{60}>R_{19}>R_{80}$，相關結果如下圖所示：

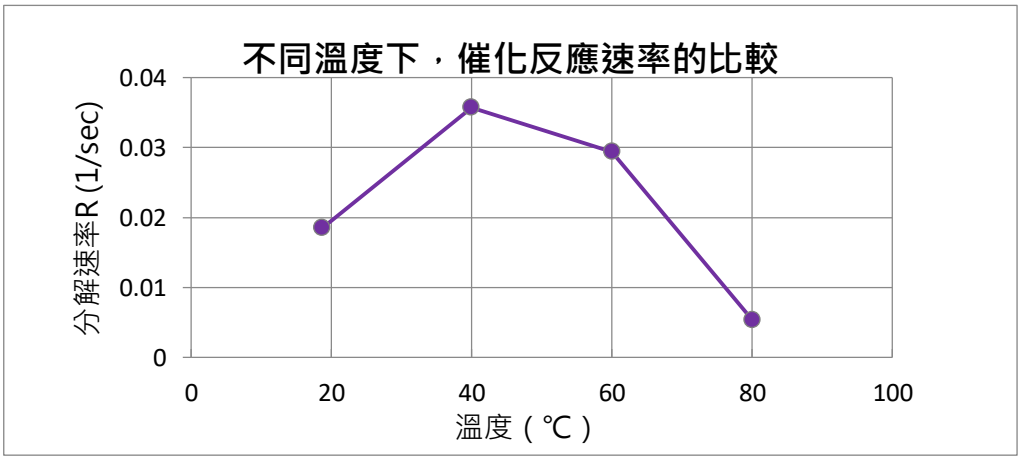


圖 24：反應速率與溫度的關係

【推測】：酵素活性在 40 ℃最高，80℃最低。酵素在高溫時可能失去活性。

7. 酵素的催化水解反應速率 R 可以被抑制或減速嗎？

實驗發現：固定基質 S 尿素濃度為 2M，固定黃豆萃取液濃度 10%，分別添加 0, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM,1.0 mM, 2.0 mM 不同濃度的硫酸亞鐵，與硫酸銅，結果發現，亞鐵離子、銅離子都能使催化反應變色時間拉長。銅離子延遲反應的時間比亞鐵離子長。下圖為兩種離子抑制反應的比較圖。

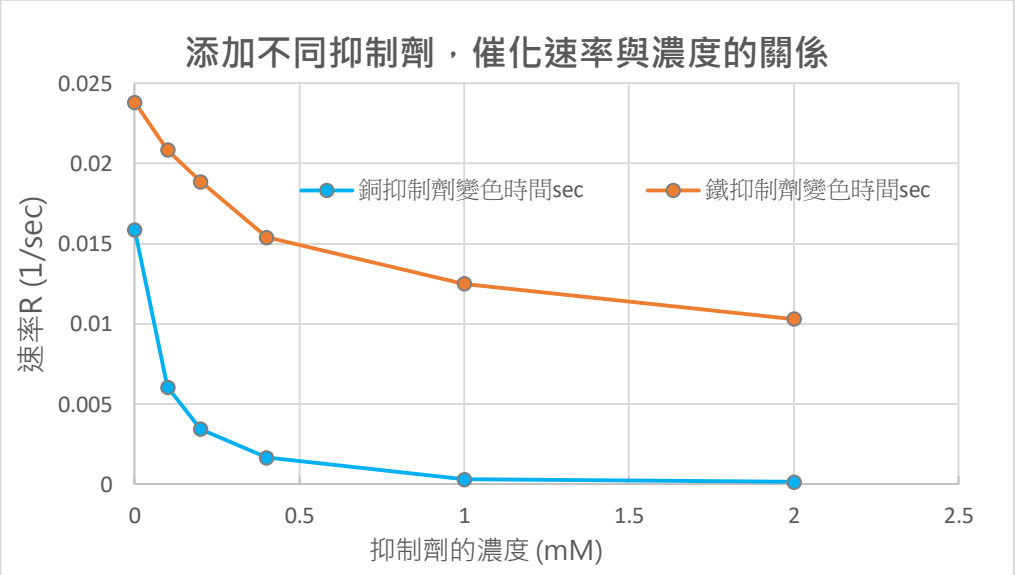


圖 25：催化反應速率與兩種抑制劑濃度的比較圖

【推測】：抑制劑濃度越高，反應速率越慢，抑制效果越好；銅離子的抑制速率百分比高於亞鐵離子。下圖為抑制速率百分率與抑制劑濃度的關係圖。

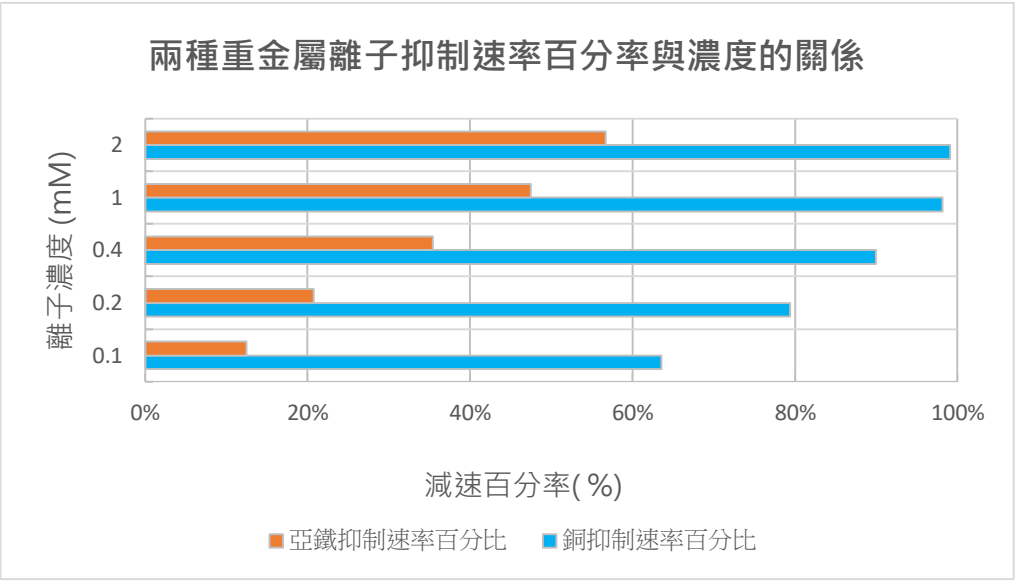
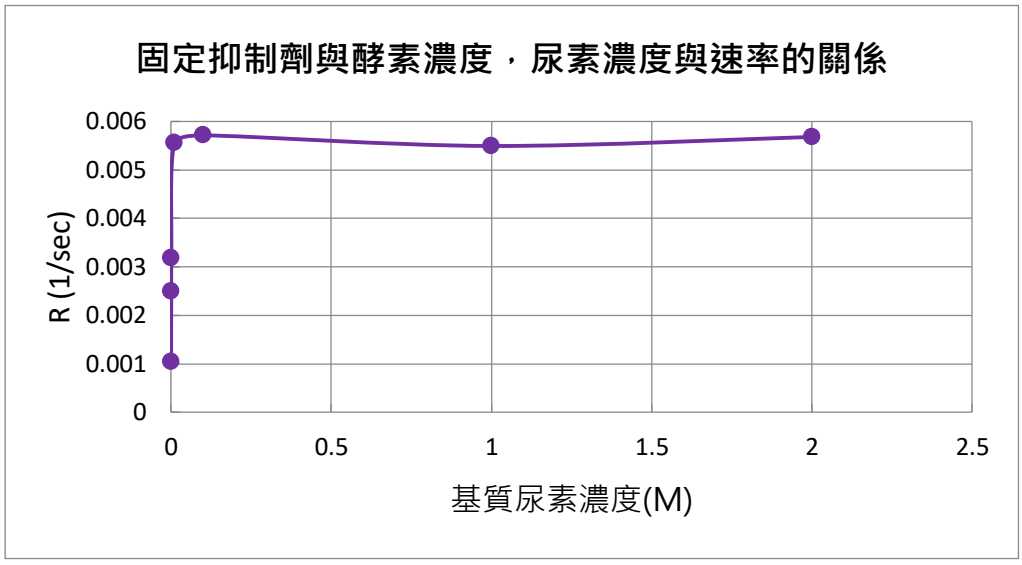


圖 26：兩種重金屬離子抑制速率百分率與濃度的關係

8. 在催化反應中，基質與抑制劑的角色是競爭對手嗎？當固定抑制劑的濃度，改變基質的濃度，速率如何變化？

實驗發現：當基質尿素濃度位於 0.1~1.0 mM 時，基質濃度越高反應速率越快；當濃



度高於 0.1mM 以上，0.1mM~8.0M 時，反應速率並無明顯變化。

圖 27：固定抑制劑與酵素濃度，反應速率與基質濃度的關係

【推測】：當基質濃度>0.1mM 時，基質濃度的增加 8000 倍至 8M 時，速率幾乎無明顯增加，顯示抑制劑與基質屬於非競爭關係[8](non-competitive inhibitors)

9. 利用海藻酸鈉晶球法將酵素 E 包埋，反應速率會改變？

實驗發現： 0.5%~5%不同濃度的萃取液製作的海藻酸鈣包覆層，結果發現包埋晶球的酵素，反應速率變慢，僅為未晶球包埋的速率 0.58%~10.12 %。

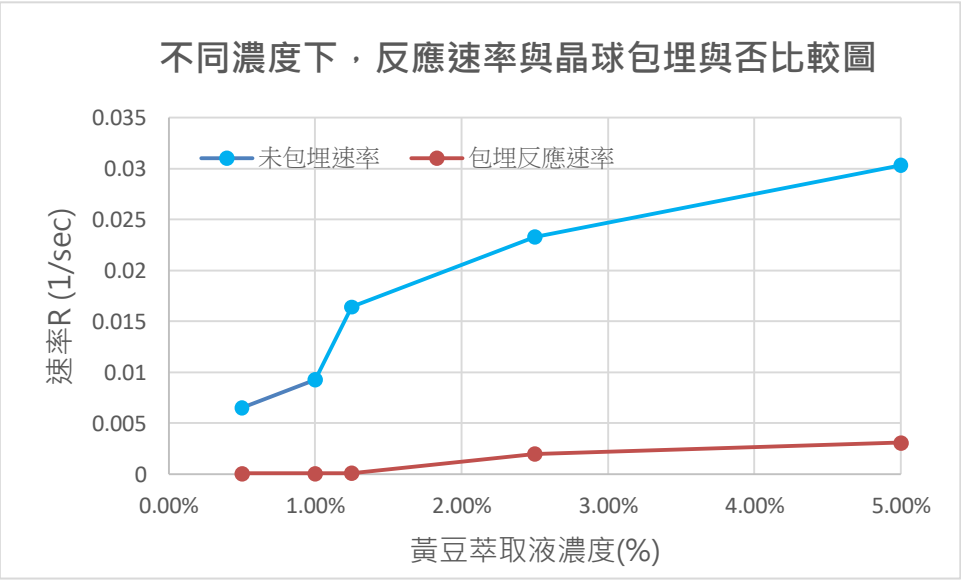


圖 28：酵素包埋對反應速率的影響

【推測】：晶球包埋法，海藻酸鈣的包覆層能減少酵素與基質的接觸，控制酵素的釋

出，大幅減緩尿素的分解。

四、尿素的分解會受到基質濃度、酵素濃度、溫度等條件的影響，以靛酚比色法測量分解產物氨氣的濃度。

1. 常溫下固定酵素濃度，調查不同尿素濃度下產物氨的量，及分解百分率。

實驗發現：固定酵素的濃度，在低濃度時，基質的濃度越高，產物氨的濃度亦越高。當基質濃度高於 1mM 後，產物的量走平。相關數據如下圖所示：

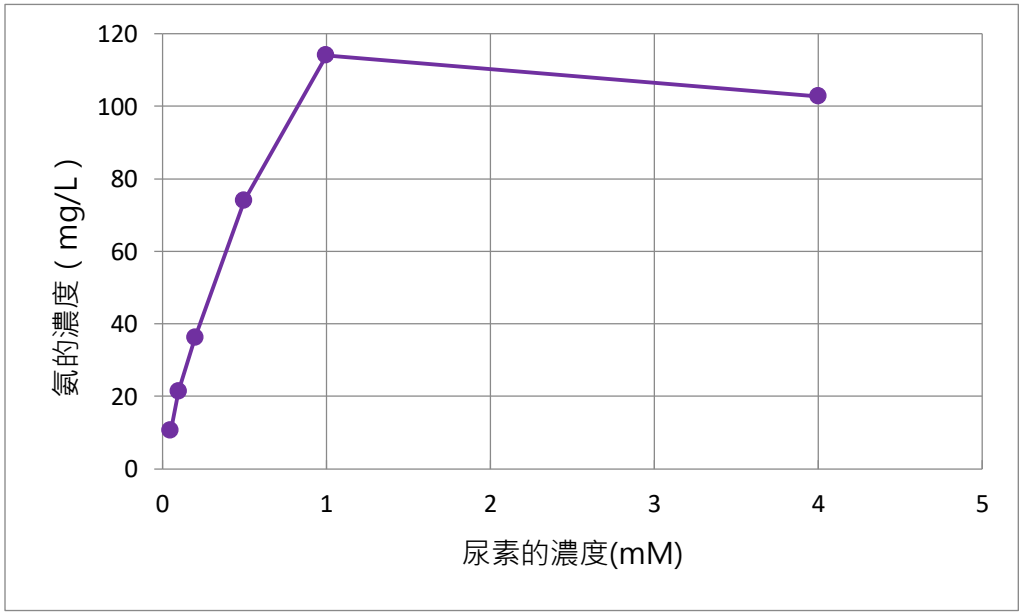


圖 29：尿素濃度與產物氨的濃度關係圖。

【推測】：從分解百分率來看，最低濃度時為 62.4 %，高濃度時降至 7.5%，基質濃度升高，某一個時間點，酵素分解百分率急速下降，酵素活性有極限。下圖為基質濃度與分解百分率的關係：

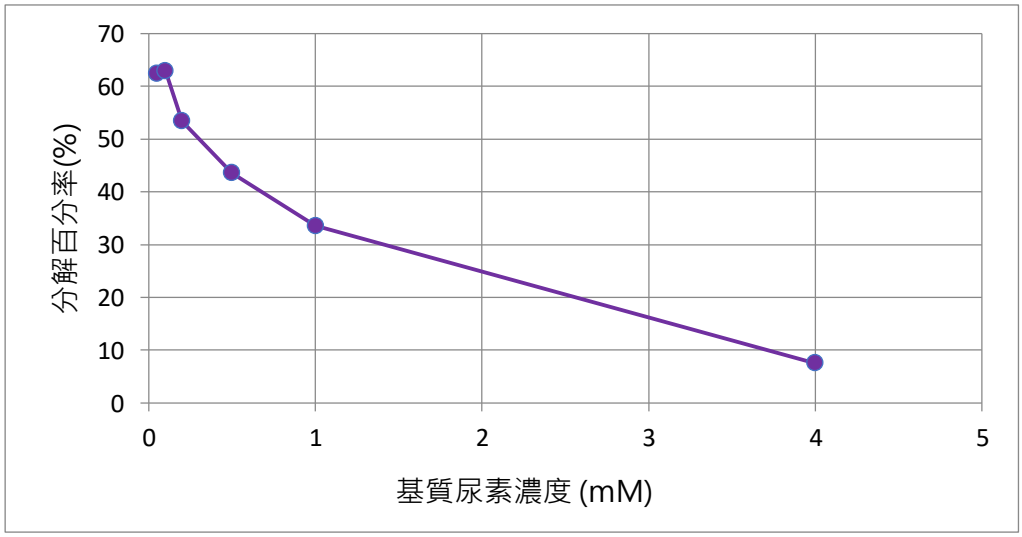


圖 30：尿素基質濃度與分解百分率的關係

2. 不同溫度下分解百分率的調查

實驗發現：固定相關條件，分別於室溫(19.0)、40、60、80℃不同溫度下進行實驗發現，反應速率大小依序為 $R_{40}>R_{60}>R_{19}>R_{80}$，相關結果如下圖所示：

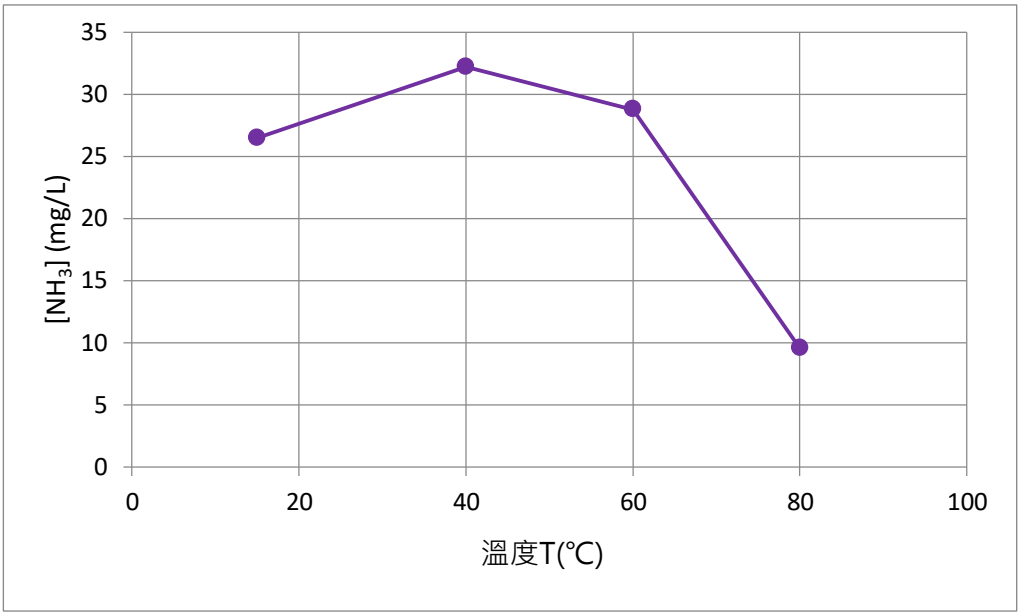


圖 31：溫度對酵素分解反應的影響

【推測】：酵素活性在 40 ℃最高，80℃最低。酵素在高溫時可能失去活性。相關產率亦有相同趨勢。

3. 不同 pH 值下，反應分解百分率調查

實驗發現：在酸中，產物氨的濃度較低，中性或鹼性的環境，產量較高，相關結果如下圖所示：

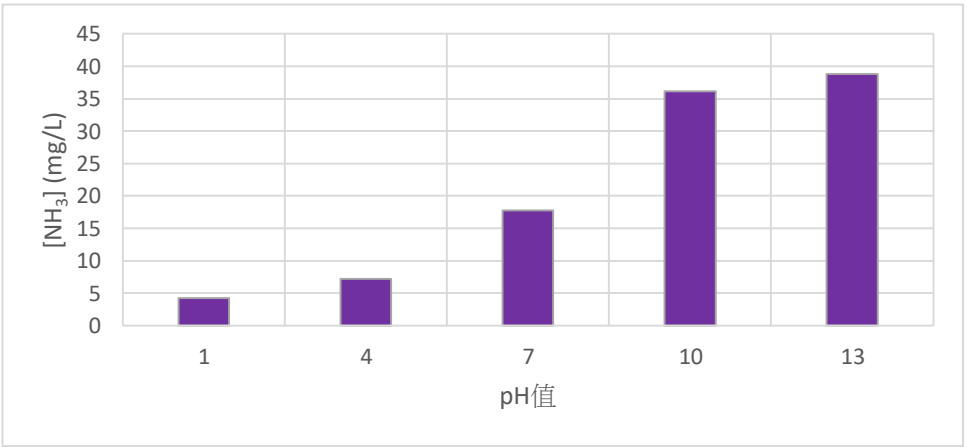


圖 32：不同酸鹼環境中，氨產量的比較

【推測】：脲酶適合中性或鹼性環境中，在酸性環境中，活性會被壓抑。

4. 重金屬銅離子、亞鐵離子抑制劑的存在下，尿素分解百分率的調查

實驗發現：亞鐵離子、銅離子都能使產物氨氣的量變少。銅離子抑制的效果較為明顯。下圖為兩種離子抑制反應的比較圖。

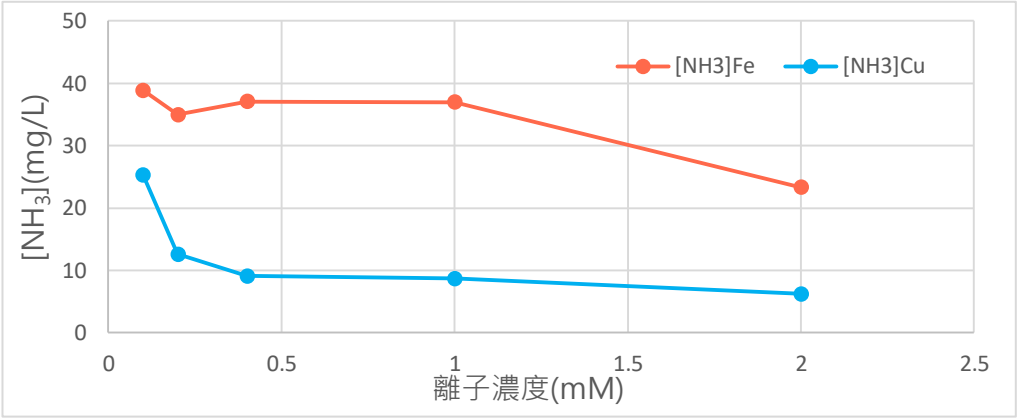


圖 33：兩種離子對催化反應的抑制比較

【推測】:銅離子的抑制效果比鐵離子較為明顯，銅離子濃度的增加可使產率從 37.2%降至 9.1%。而鐵離子濃度的增加，使產率從 57.2%降至 34.4%。

五、其他的酵素催化反應：酵母菌如何催化雙氧水與葡萄糖的分解？

1. 使用酵母做為過氧化氫酶的來源，催化定量的雙氧水分解，分解後溶液變酸嗎？
   實驗發現：水溶液保持 pH= 4.3 上下，無明顯變化。
   【推測】: 雙氧水的酵母催化分解反應屬於自身氧化還原，除了氧氣外，另一產物是 H_2O，而不是 H^+。

2. 偵測氧氣氣壓的變化改變，調查不同受質濃度、溫度等下，反應速率的快慢與酵素活性分析。
   (1) 不同基質濃度下，催化分解的反應速率會受影響嗎？

   實驗發現：雙氧水濃度越高，分解速率越快。濃度與速率關係如下圖所示：

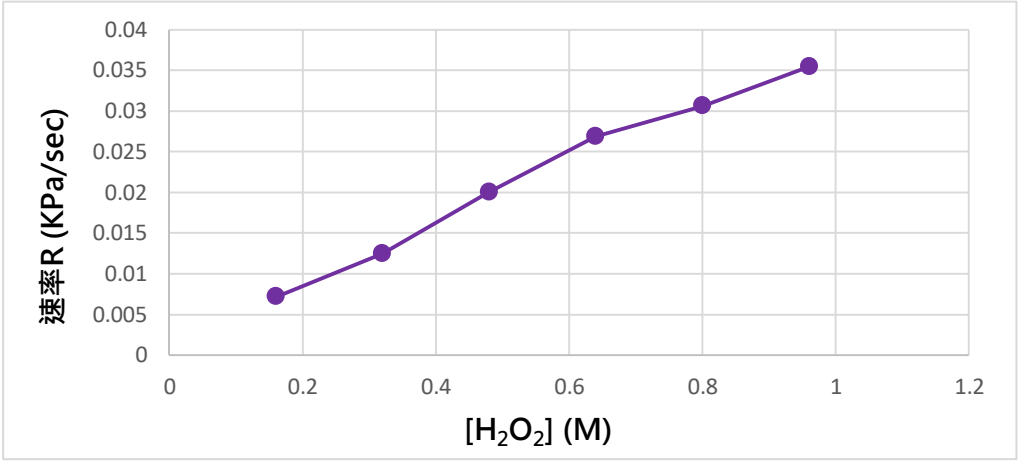


圖 34：酵母催化反應速率與基質濃度的關係

【推測】: 基質濃度越高，分解速率越快，濃度範圍內呈正相關。

(2) 不同酵素濃度下，酵素催化分解速率一樣嗎？

實驗發現:酵母液濃度越高,分解反應速率越快,濃度與速率的相關係數達 0.9989。酵母濃度與速率關係如下圖所示：

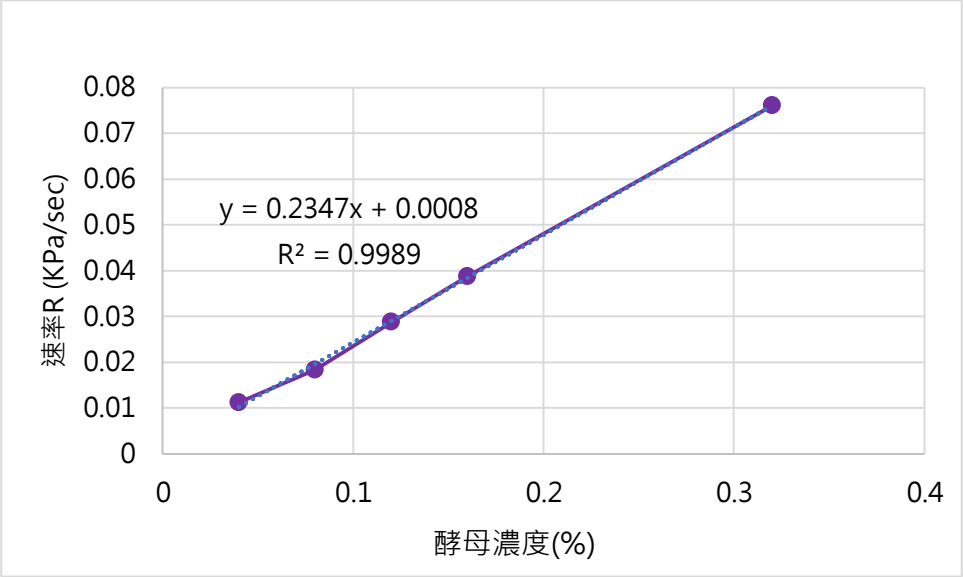


圖 35：酵母催化反應速率與酵素濃度的關係

【推測】：催化劑濃度越高，分解速率越快，兩者呈高度正相關。

(3) 酸鹼值不同的環境，催化分解的反應速率會不同嗎？

實驗發現：酵母於 pH=10 時，分解速率最快；pH=1 時，分解速率最慢。酵母濃度與速率關係如下圖所示：

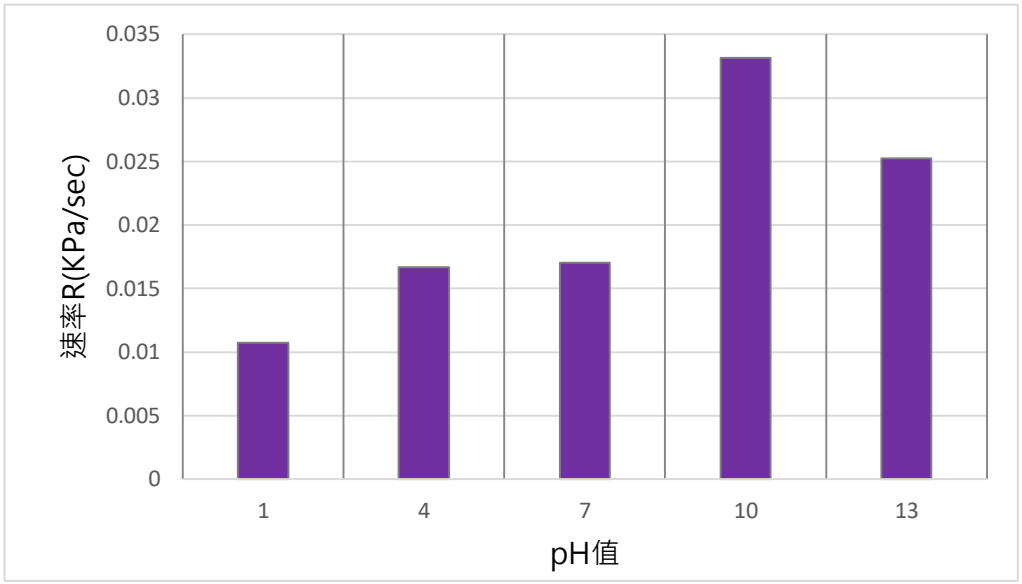


圖 36：H_2O_2 分解反應速率與酸鹼值的關係

【推測】：強酸的環境會壓抑酵母分解 H_2O_2 的活性。

(4) 溫度不同時，催化分解的反應速率會不同嗎？

實驗發現： 當環境於 60 ℃時，酵母分解速率最快；80 ℃時，分解速率最慢。酵母濃度與速率關係如下圖所示：

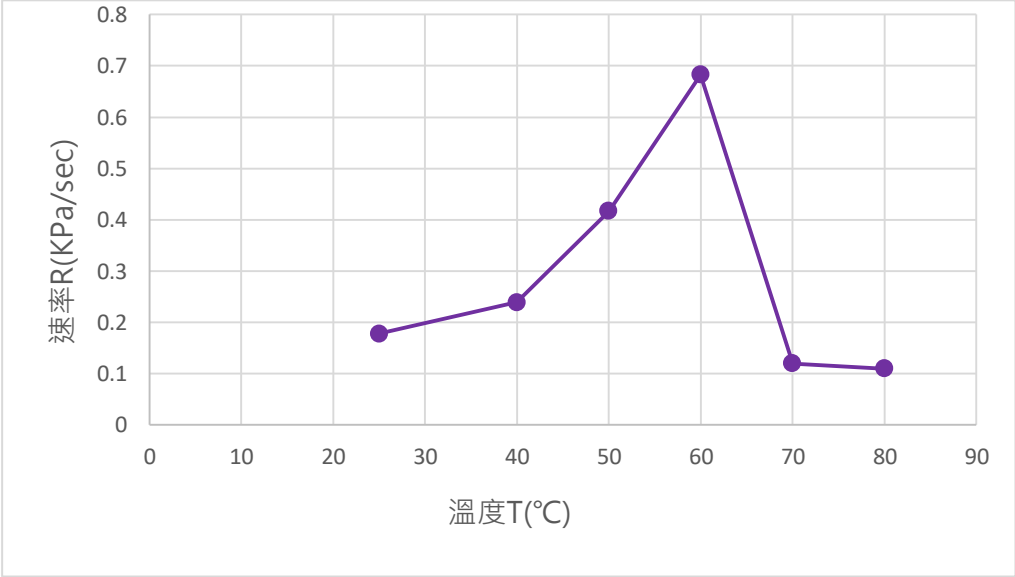


圖 37：酵母催化分解速率與溫度的關係

【推測】：超過 80 ℃的高溫環境會破壞酵母分解 H_2O_2 的活性。

3. 使用酵母菌，催化葡萄分解，並利用自製的微型蒸餾器，分離發酵反應後的產物，並檢測蒸餾前後酒精濃度的改變。

實驗發現：發酵後經過濾後的葡萄酒呈淡紫紅色，味道酸澀，無甜味；發酵濃度經曲折度計測量約為 12.5 度(v/v)。蒸餾後的酒精約 33.5 度(v/v)。下圖為酒精曲折度偵測過程。



圖 38：圖左蒸餾前後的葡萄酒，圖中、圖右為酒精度測量過程

【推測】：估計葡萄中的葡萄糖已大部分分解，蒸餾可以有效提高酒精度

4. 藉由透過偵測二氧化碳氣壓的變化，調查不同葡萄糖濃度、溫度等條件下，反應速率的快慢差異。

(1)基質越濃，酵母分解葡萄糖的反應速率會有所不同嗎？

實驗發現：酵母的催化在葡萄糖濃度 10 %時分解速率最快，超過 10%時，分解速率變慢。下圖為葡萄糖濃度與分解速率的關係圖。

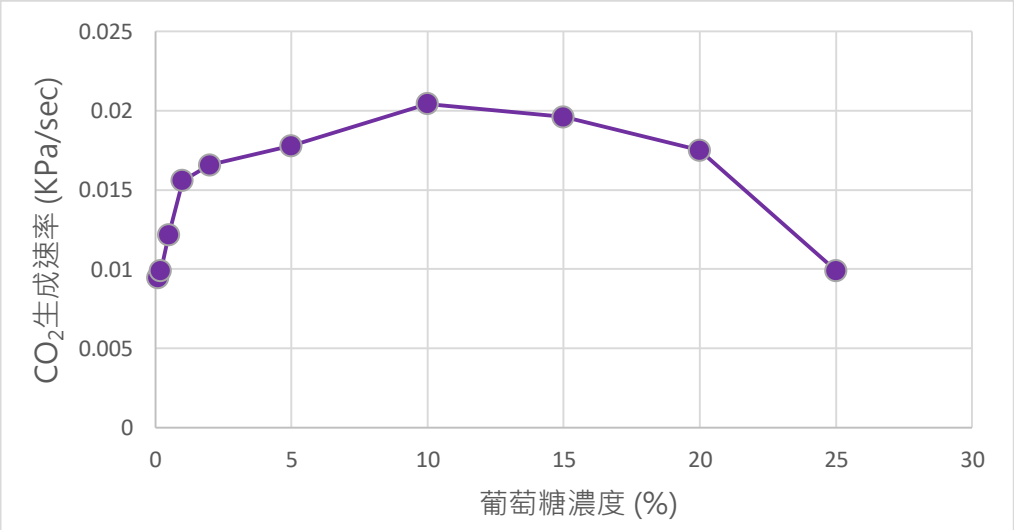


圖 39：發酵速率與酒精濃度的關係

【推測】：高濃度，高滲透壓，酵母的活性可能會被壓抑。

(2)酵素增加，酵母分解葡萄糖的反應速率會加快嗎？

實驗發現：酵母添加的質量 0.1~1.5 克時添加量越多，速率越快；超過 1.5 克後，速率下降。下圖為反應速率與酵母添加量的關係。

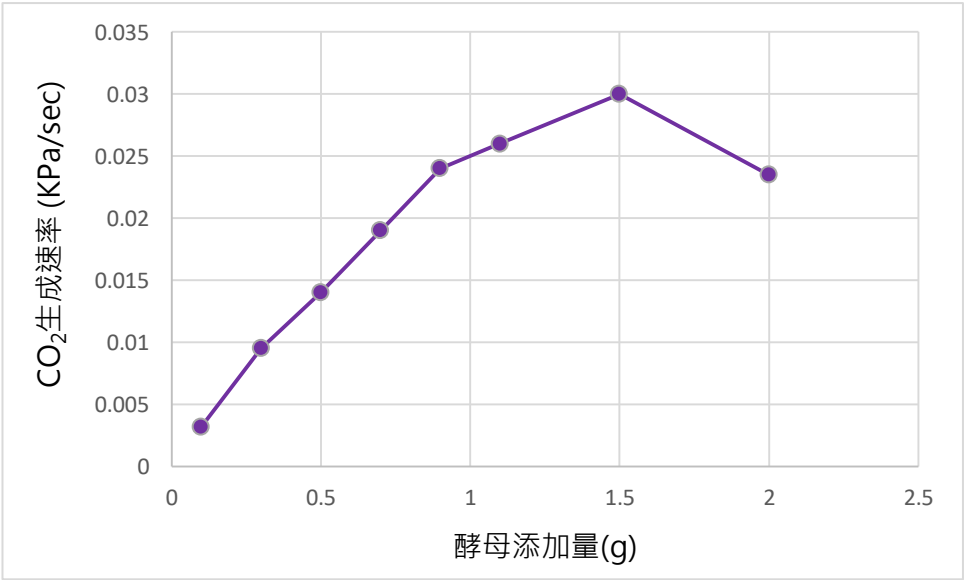


圖 40：酵母添加量與生成速率的關係

【推測】：添加量在 0.1~0.9 克時，與生成速率具高度相關，相關係數達 0.997；過多的酵母，速率減慢，活性被壓抑。

陸、 結論

一、微型電熱加熱瓶，可 3~27V 的變壓器，電壓越高，加熱速度最快，最高可達 230℃可應用在中學實驗室的微型加熱上；使用環保矽膠吸管、銅管應用在微型蒸餾器冷凝管的製作上，除價格低廉，製作方便外，也免去燒製玻璃容器的高難度技術，可循環的冷卻水，亦可有效提升中小學物質分離實驗的方便性。

二、使用無毒的生黃豆萃取液、酵母作為反應的催化劑（生豆漿），取代重金屬催化劑，如二氧化錳的使用，減少環境的衝擊。

三、使用隨手可得的手機 APP 色彩分析工具，利用指示劑 G/B 值的變化，進行尿素分解動力學的探討，所得的趨勢與結果，跟直接利用靛酚比色法來偵測產物的存在，相去不遠；唯不能探討在不同的 pH 環境中尿素的分解速率，及尿素的分解產率，這兩個部分仍然必須透過測量水中 NH_3 的濃度來得知。

四、豆類煮熟後，不管毛豆、皇帝豆或黃豆 BTB 指示劑皆不會變色，代表高溫可使酵素蛋白質發生變性，活性降低。而生皇帝豆變色速率較生毛豆和生黃豆慢，推測皇帝豆內尿酶的活性較小。

五、尿素的分解速率受到很多的因素左右，基質尿素、酵素濃度、溫度、酸鹼值及抑制劑的存在與否都會影響催化分解的百分比；當基質、脲酶酵素的濃度越高時，分解速率越快，不過酵素有活性限制，超過某一個濃度，分解速率就會減慢。溫度約在 40℃時，活性最高，溫度超過 80℃，分解速率急速減慢，酵素活性明顯降低。酸性的環境也不利尿素的分解，活性明顯被抑制。

六、重金屬抑制劑的存在可有效抑制尿素的分解，其中銅離子的抑制效果高於亞鐵離子；實驗發現有趣的現象就是基質的濃度越高，少量的銅離子存在下，反應速率不變，推測應該是屬於非競爭型的抑制作用，抑制劑直接與酵素特異位置作用，不跟基質競爭。

七、海藻酸鈉晶球的包埋，能有效降低尿素的分解速率，最高達 99.42 %，此項研究適合近一步發展包埋技術，在農牧業上可能有發展潛力。

八、利用靛酚法檢測水中的氨濃度，是相當精準的檢測，舉凡濃度、溫度等變因探討，本實驗所得到的分解速率趨勢跟手機色彩 APP 法接近；而從分解百分率來看，最低濃度時為 62.4 %，高濃度時降至 7.5%，基質濃度升高，某一個時間點，酵素分解百分率急速下降，證實酵素活性有其極限。從溫度來看，都是 40 ℃左右反應速率最快，產率也最高。

九、麵包酵母催化雙氧水的分解，因在分解過程中會產生過氧化氫酶，可有效分解雙氧水，利用常見的壓力感測器，取代氧氣偵測器，可及時連續偵測氧氣增加所帶來氣壓的變化，作為反應速率，精準記錄各種變因下，氣壓的變化。基質的濃度、酵母的添加量越高，反應速率越快；酵母在 60℃時活性最高，高於 80℃反應速率大幅度降低；酸鹼環境中，

pH=10，分解速率最快，pH=1 時分解速率最慢，兩者速率比約 3.1 倍，代表酵母在強酸的環境中，活性會被抑制。

十、麵包酵母可催化葡萄糖的分解，此反應速率相當緩慢，不適合最多只有 100 分鐘的高中實驗，而作為 H_2O_2 的分解催化劑，速率較快，有機會發展作為探究實驗之課程。

十一、　本實驗利用黃豆中的脲酶分解尿素，製備氨氣，與氮氧化物作用，在 230℃的高溫中與機車尾管用的觸媒轉化器作用，結合可編程的 ARDUINO 氨氣感測器，偵測氨氣的濃度；不過因為氨易溶於水，我們一直無法清除整個機構中的水蒸氣干擾，如果可以將反應的器材改成耐溫材質，讓整個系統處於密閉的高溫下，較為有利，因設備、時間受限，無法成功，不過空汙議題很值得近一步研究。

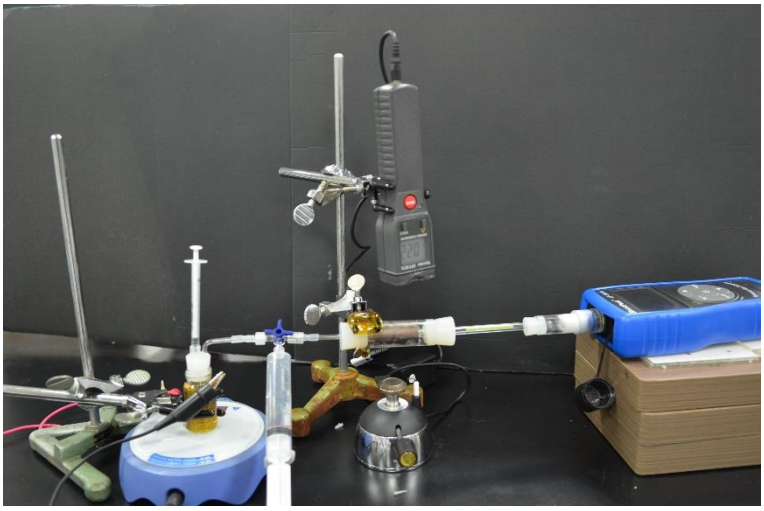


圖 41：待完成的實驗

柒、 安全注意事項及廢棄物處理

一、纏繞電熱線時，務必戴上布手套，以免割傷；電熱瓶溫度超過 100℃，當電熱瓶進行尿素熱分解時，請勿以手碰觸，以免燙傷；操作時務必戴上安全眼鏡。

二、銅離子廢液可使用電解法收集，其他的依規定傾倒置廢液回收桶。

捌、 參考文獻

1. SCR 脫硝技術應用(民 102 年 10 月 15 日)。台肥電子報。民國 109 年 9 月 19 日，取自：https://www.taifer.com.tw/PublicationArticleDetailC004000.aspx?Cond=3ee94a27-57b7-43b8-b56e-2a82cd23955a

2. 慶峰有料(民 105 年 12 月 22 日)。尿素可以餵牛嗎？怎樣餵才科學，才正確。每日頭條。民國 109 年 9 月 16 日，取自：https://kknews.cc/agriculture/l84o2bb.html

3. 令人驚奇的分子料理是這樣來的：食品科學中的晶球技術（2019/08/09）。犯科學。民國 109 年 9 月 20 日，取自：https://pansci.asia/archives/164992

4. 水中氨氮檢測方法－靛酚比色法(NIEA W448.52B)。環保署環境檢驗所網站。民國 109 年 12 月 1 日，取自：https://www.epa.gov.tw/niea/949A5BFA0E2CB27。

5. 廖旭茂。綠色創客-3：微型電熱式蒸餾器的設計與製作。台灣化學教育電子期刊，期 40，2020 年 12 月，參考 http://chemed.chemistry.org.tw/?p=39263.

6. 廖旭茂、林翊菲、陳淳煜。利用智慧型手機結合 App 探究化學平衡移動。台灣化學教育電子期刊，期 37，2020 年 12 月，參考 http://chemed.chemistry.org.tw/?p=39263.

7. Kyle Kimble et al.(2006). Progress Toward the Development of a Point-of-Care Photonic Crystal Ammonia Sensor. Analytical and Bioanalytical Chemistry 385(4):678-85. 2020 年 11 月參考 https://www.researchgate.net/publication/7040736_Progress_Toward_the_Development_of_a_Point-of-Care_Photonic_Crystal_Ammonia_Sensor.

8. 莊榮輝（2007）。生物化學基礎酵素篇。2020 年 12 月，參考 http://juang.bst.ntu.edu.tw/files%20BC/BC2007/Enzyme%202007.pdf.