

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

牛糞肥中一株嗜熱厭氧纖維水解菌 *Clostridium* sp.

TCW1 之分離鑑定及纖維素醱化特性研究

Isolation and cellulosic saccharification characterization
of a thermophilic anaerobic *Clostridium* sp. TCW1 from



中華民國 九十八年一月

January 2009

摘要

近年來在眾多替代能源研究中，藉由水解纖維素並衍生生質燃料在生質能領域中受到各國的注目，本研究希望藉由高效率之纖維水解菌株的開發及研究，提升纖維水解並醱化步驟之效能。研究中共 7 株由乳牛糞肥中分離之嗜熱厭氧纖維水解菌中，篩選出具較佳還原醱產生速率者 strain TCW1 與 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 之 16S rDNA 相似度達 96 %。菌體桿狀微彎會產生內孢子，趨向附著於固態纖維素表面，在 60 °C、pH 6.4 環境下有較佳比生長速率。碳源利用上以 mannose、fructose 與 *C. thermocellum* 標準菌株有所區別，代謝產物為乳酸、乙酸、乙醇。菌體細胞水解纖維素時以 65 °C、pH 6.9 之下配合 150 rpm 震盪培養，可以在 20 g/L 起始纖維素培養中還原醱產生速率達 107 mg/L·hr，還原醱轉換率約 60 %。而天然纖維性基質之培養中醱化最佳者為狼尾草粉末，但還原醱轉換率只達 8 %。酵素活性測試方面，strain TCW1 在細胞表面及培養液中皆具有纖維酵素活性，推斷有 cellulosome 結構，而與 *C. thermocellum* 標準菌株酵素活性比較上，strain TCW1 之內切型酵素活性較佳（約 4 倍）但外切型較弱，而在 60 °C 反應溫度下纖維酵素活性較 *C. thermocellum* 標準菌株低約 40 %。從還原醱轉換率可看出 strain TCW1 實為高效纖維水解菌，與 *C. thermocellum* 標準菌株在分生鑑定上相似然而生理特性

上有些差異，未來在天然纖維性基質應用上可考慮基質前處理使纖維素暴露提升效能。

關鍵字：醱化、嗜熱厭氧纖維水解菌、還原糖、*Clostridium thermocellum*、纖維水解酵素

Abstract

The research of biofuel from cellulosic materials has gained much attention worldwide in various territory of bio-energy in recent years. This study was trying to enhance cellulosic saccharification by exploitation and investigation from high cellulolytic bacterium. Seven thermophilic anaerobic cellulolytic bacteria were isolated from cattle manure, one of the strain TCW1 was chose for further study. The 16S rDNA sequence analysis showed strain TCW1 was closed to *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 in 96 % similarity. The cells of strain TCW1 are rod, slight curved and produced endospore. Cells of strain TCW1 found to adhere to solid cellulose fiber during experiments. Strain TCW1 had optimal specific growth rate at 60 °C and pH 6.4. The different carbon source assay showed many same results between strain TCW1 and type strain *C. thermocellum* but mannose and fructose. The metabolites of strain TCW1 culture are lactate, acetate, and ethanol. Cellulosic saccharification rate by strain TCW1 culture could reach 107 mg/L · hr reducing , and 60 % conversion under 65 °C, pH 6.9 and 150 rpm shaking. However, only 8 % conversion in Napier grass substrate culture. Strain TCW1 had cellulose activity both on cells surface and in culture medium,

indicating the existence of cellulosome. In the comparison of cellulase activity between strain TCW1 and *C. thermocellum* type strain, strain TCW1 showed higher endocellulase activity (about 4 times) than *C. thermocellum* type strain, but with lower exocellulase activity. *C. thermocellum* type strain also display higher cellulose activity under 60 °C. Strain TCW1 shows some differences from type strain *C. thermocellum* even the molecular identification indicated that strain TCW1 was closely related to *C. thermocellum*.

Key words : saccharification, thermophilic anaerobic cellulolytic bacteria, reducing sugar, *Clostridium thermocellum*, cellulase

目錄

中文摘要	I
英文摘要	III
表目錄	XI
圖目錄	XII
第一章 前言	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	3
第二章 文獻回顧	4
2.1 能源現況	4
2.2 生質能	5
2.2.1 生質能概略	5
2.2.2 第二代生質燃料	9
2.3 纖維素 (Cellulose)	11
2.3.1 纖維素結構	11
2.3.2 纖維素水解及醱化 (Saccharification)	13
2.4 纖維水解生物	17
2.4.1 纖維水解生物概略	17
2.4.2 <i>Clostridium thermocellum</i> 相關特性	20

2.5 纖維水解酵素	23
2.5.1 內切型纖維酵素 (Endo- β -1,4-D-glucanase)	23
2.5.2 外切型纖維酵素 (Exo- β -1,4-D-glucanase)	24
2.5.3 β -葡萄糖苷酵素 (β -1,4-D-glucosidase)	24
2.5.4 纖維水解酶體 (Cellulosome)	24
2.6 嗜熱性纖維酵素之應用與優點	27
第三章 實驗材料與方法	28
3.1 實驗設計流程	28
3.2 菌株來源	29
3.3 菌種培養與純化	29
3.3.1 厭氧操作	29
3.3.2 嗜熱厭氧培養基	30
3.3.3 菌株分離	33
3.4 分析方法	34
3.4.1 血球計數 (Hemocytometer) 與細胞乾重	34
3.4.2 纖維素濃度測定	35
3.4.3 還原糖濃度測定	35
3.4.4 總溶解糖 (TSS) 濃度測定	37
3.4.5 高效液相層析 (HPLC) 分析代謝產物	37

3.4.6	產氫分析	38
3.4.7	蛋白質濃度分析	38
3.5	分子生物菌種鑑定	39
3.5.1	DNA 萃取	39
3.5.2	核酸純度與濃度定量	41
3.5.3	聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)	42
3.5.4	核酸洋菜膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)	42
3.5.5	16S rDNA 親緣分析 (Phylogenetical analysis)	44
3.5.6	DNA-DNA 雜合 (DNA-DNA hybridization)	44
3.6	菌種型態與生理特性分析	47
3.6.1	革蘭氏染色(Gram staining)	47
3.6.2	菌落剛果紅(Congo red)染色	47
3.6.3	菌相觀察(Morphology)	48
3.6.3.1	位相差顯微鏡	48
3.6.3.2	穿透式電子顯微鏡	48
3.6.4	可利用碳源測試	49
3.6.5	纖維素附著測試	49
3.7	纖維素醱化能力分析	51
3.7.1	溫度因子	51

3.7.2 pH 因子	51
3.7.3 基質濃度	52
3.7.4 震盪培養(Agitation)對纖維水解影響	52
3.7.5 天然纖維性基質測試	53
3.8 纖維水解酵素活性	54
3.8.1 纖維水解酵素類型	54
3.8.1.1 外切型與內切型纖維水解酵素活性	54
3.8.1.2 β -葡萄糖苷酵素 (β -glucosidase) 活性	55
3.8.2 纖維水解酶體 (Cellulosome)	55
第四章 結果與討論	58
4.1 菌株分離	58
4.1.1 纖維水解菌株能力比較	58
4.1.2 菌落剛果紅染色	60
4.2 分子生物法鑑定	61
4.2.1 DNA 萃取與 16S rDNA 擴增	61
4.2.2 親緣樹分析	62
4.2.3 DNA-DNA 雜合	64
4.3 菌株型態與生化特性	66
4.3.1 菌相觀察	66

4.3.2	革蘭氏染色	69
4.3.3	環境因子對生長之影響	70
4.3.4	可利用碳源測試	73
4.3.5	纖維素附著測試	76
4.3.6	培養液相產物分析	77
4.3.7	培養氣相產物分析	81
4.4	纖維素醱化能力分析	82
4.4.1	溫度因子	82
4.4.2	pH 因子	83
4.4.3	基質濃度	84
4.4.4	震盪培養	84
4.4.5	天然纖維性基質測試	87
4.4.6	纖維素醱化能力文獻比較	90
4.5	纖維水解酵素活性	92
4.5.1	纖維酵素分布	92
4.5.2	纖維酵素種類活性	94
4.5.3	纖維酵素溫度測試	96
第五章	結論與建議	99
5.1	結論	99

5.2 建議	103
參考文獻	104
附錄	117
附錄一 細胞乾重檢量線	117
附錄二 纖維素檢量線	118
附錄三 還原糖檢量線	119
附錄四 總溶解糖檢量線	120
附錄五 液相代謝產物標準品 HPLC 停留時間及檢量線	121
附錄六 氫氣標準品 GC-TCD 停留時間及檢量線	125
附錄七 蛋白質檢量線	126
附錄八 Strain TCW1 16S rDNA 序列	127

表目錄

表 2-1 兩代生質燃料的差異性·····	10
表 2-2 具纖維水解酵素之菌株以及所擁有之纖維酵素系統·····	19
表 3-1 TA 培養基成分·····	31
表 3-2 Trace element solution 成分·····	32
表 3-3 Vitamin solution 成分·····	32
表 3-4 PCR 溫度循環設定·····	43
表 3-5 PCR 試劑及濃度·····	43
表 3-6 NaHCO ₃ 添加濃度及相對培養基起始 pH·····	52
表 3-7 超音波細胞破碎儀之設定·····	57
表 4-1 以各式醣類作為碳源比較 strain TCW1·····	75
表 4-2 Strain TCW1 細胞對纖維素糖化能力與先前文獻比較·····	91

圖目錄

圖 2-1 生質能源轉換技術總覽	7
圖 2-2 纖維素結構示意	12
圖 2-3 纖維二糖經由水解轉化為兩個葡萄糖分子	14
圖 2-4 <i>Clostridium cellulolyticum</i> 之纖維寡糖代謝途徑	16
圖 2-5 纖維水解酵素示意圖	26
圖 3-1 實驗設計流程圖	28
圖 3-2 厭氧加氣站示意圖	30
圖 3-3 Labeling efficiency 點分佈示意圖	46
圖 4-1 七株嗜熱厭氧水解纖維菌株的纖維水解速率比較	59
圖 4-2 七株嗜熱厭氧水解纖維菌株的還原糖產生速率比較	59
圖 4-3 以 α -cellulose 為基質的 strain TCW1 滾管	60
圖 4-4 Strain TCW1 的 total DNA (Lane 2)	62
圖 4-5 Strain TCW1 16S rDNA 親緣樹分析圖	63
圖 4-6 Labeling efficiency 經呈色後之點圖	65
圖 4-7 DNA-DNA 雜合經呈色後之點圖	65
圖 4-8 DNA-DNA 雜合點漬色度回歸線圖	66
圖 4-9 Strain TCW1 細胞的穿透式電子顯微鏡照片	67

圖 4-10	以位相差顯微鏡拍攝 Strain TCW1 細胞·····	68
圖 4-11	不同溫度下 strain TCW1 之比生長速率·····	71
圖 4-12	不同起始 pH 下 strain TCW1 之比生長速率·····	72
圖 4-13	以各式醣類作為碳源培養 strain TCW1·····	74
圖 4-14	Strain TCW1 (方形) 以及 <i>C. thermocellum</i> ·····	77
圖 4-15	Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應之培養·····	79
圖 4-16	Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應各式產物·····	80
圖 4-17	Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應之氣體·····	81
圖 4-18	不同培養溫度對還原醣產生速率的影響·····	82
圖 4-19	不同起始 pH 對 strain TCW1 還原醣產生·····	83
圖 4-20	起始基質濃度對纖維素醱化及降解的影響·····	85
圖 4-21	不同起始基質濃度配合固定的震盪培養·····	86
圖 4-22	Strain TCW1 以不同天然纖維性基質進行培養·····	88
圖 4-23	Strain TCW1 針對不同天然基質的生物性醱化·····	89
圖 4-24	培養基中纖維素濃度對 strain TCW1 纖維酵素分布·····	93
圖 4-25	比較 Strain TCW1 (白) 以及 <i>C. thermocellum</i> ·····	96
圖 4-26	不同溫度對 strain TCW1·····	97

第一章 前言

1.1 研究動機

在 21 世紀初期，由於人類活動的快速發展，隨之而來的是能源的大量消耗，根據台灣工研院 IEK (產業經濟與趨勢研究中心) 評估，全球主要能源消耗量為 10,537 百萬噸油當量，每年並維持 2% 以上成長率，顯示出人們在高品質生活之下，換來的是龐大的能源消耗壓力。現今無論燃料或日常用品皆多取自石化原料，然而過度的消耗以及附加的空汙與全球暖化問題，突顯出長久仰賴石化燃料之下所產生的危機。

根據市場機制，石化燃料在未來必隨著其需求上昇，以及供給下降而價格飛漲，如此一來替代性能源的開發便成為全球勢在必行的走向。綜觀國際間，許多替代性能源的研究早已展開，譬如：太陽能、風力、地熱、生質能、水力等等...，許多開發往往由於其經驗尚未成熟或礙於技術無法突破，各式替代能源何者為最佳選擇尚未有明確定論。生質能 (Bioenergy) 是人類最原始的能源之一，不但易取得且對環境友善。相較於其他替代能源，生質能早有國家大力推廣，如美國的玉米、巴西的甘蔗都成為生產生質酒精的原料，不但生產過程貼近自然，亦能助於地球的綠化，減少暖化效應。然而已往利用糧食作物

作為生質燃料進料的方式，將使未來糧食價格因此大幅提升，導致開發中國家更嚴重的糧食問題，針對此一問題唯有開發新一代生質原料才能有所解決。纖維素為陸地最常見有機聚合物，普遍存在於植物細胞壁中，然而據調查台灣每年產生富含纖維素之農產廢棄物，多數農產廢棄物都以自家焚化方式清理，不但浪費且製造出嚴重空污問題，若如此大量纖維素經妥善轉化成為燃料，不但可產能同時還兼具減廢效益，亦或是種植纖維性生質能源作物 (Energy crop)，改良或育種，取得更易利用的纖維素來源，並且沒有糧食問題，可看出轉化纖維素是具有相當潛力的一項作法。

藉由生物酵素法水解纖維素的研究已行之多年，但因能源問題而又重新受到注目。生物性水解纖維素雖不及物化法之效率，然相較之下極少的耗能與污染，加上經濟便宜的程序，無論是商業或環境考量都較物化水解纖維素更具優勢。人類利用自然界中細菌或真菌水解纖維素產生醣類，並吸收轉化為生質燃料等方式，往往主要受限於水解程序的緩慢而無法有所突破，因此高效纖維醣化生物以及其水解酵素的開發與研究，可說是纖維素轉化生質能的主要關鍵。

1.2 研究目的

本實驗由前人研究中取得長期馴養之乳牛糞肥纖維水解菌群，該菌群可在九天內完全降解 10g/L 之纖維素。為了解明該菌群中纖維水解的主要菌株，並期望以純菌培養情形下，進行各項優化測試後能有更佳纖維水解效率，因此嘗試自該菌群分離纖維水解菌，而開發得到高效纖維醣化菌株，其主要實驗目的如下：

1. 分離高效纖維醣化菌株。
2. 菌株的分生鑑定
3. 菌株生化特性調查。
4. 調整環境因子分析該菌株醣化纖維素能力。
5. 測試該菌株纖維水解酵素活性。

第二章 文獻回顧

2.1 能源現況

自 18 世紀中葉工業革命以來，人類的生產及製造活動從原本的工廠手工業開始進入機械式及操作式的型態，人們也從原本散落的鄉村，走入高度密集的都市，這些現象帶來了我們今日便利的生活，凡舉可拋棄式的各項用品，以及隨處可搭的大眾捷運，甚至是人手一機的行動電話，這些都是工業化以及都市化所帶來的成就與結果。

機械如同人類需要食物一樣，必須消耗一定的燃料換取能源。千萬年下來，以前生存於地表的大量有機體死亡後，隨著地殼的變動、加壓、加熱，埋藏於地底深處形成石化燃料，而人類則利用了這些燃料帶來了現今機械化的便利生活，卻也過度開發，造成當初始料未及的問題。石化燃料需要極長時間的形成，然而人們開採速度卻是遠超過形成速度，導致石化燃料日益枯竭，根據經濟部能源委員會 91 年 5 月「臺灣能源統計年報（90 年）」資料顯示，在技術與成本的限制之下，預估全球石油蘊藏量剩下 40 年開採量，而天然氣可開採 62 年，煤炭可開採 227 年（郭氏，2002），可見現行常用燃料如石油、天然氣已不敷我們下一代使用。

石化燃料不但在儲量上發生問題，使用石化燃料所排放的碳氫化

合物、硫化物，高溫氧化伴隨的氮化物，都會帶來直接或間接的空氣污染，或是轉移到水及土壤造成二次污染。二氧化碳是有機物氧化最後的安定型態，而現今甚至認為完全燃燒所排放的二氧化碳即為最主要的溫室氣體，將造成全球暖化而氣候變遷（Joos, 1999）。

由以上觀點來看，若是欲維持如此龐大的能源消耗量以支撐今日的人類活動，開發新一代的能源或是完全轉移為新型能源是我們當前的重要課題，再生能源（Renewable energy）的提倡便是在這樣的情況下開始被大家所注目。再生能源指的是能夠在技術足夠的情況下，可以使用亦可快速再生而不會迅速枯竭，進而循環不息的能源，以往常見的太陽能及水力如是。除此之外，還未商業規模的許多再生能源依然在各國專家學者的努力研發中，像是風力、地熱、潮汐或生質能等，雖然目前多數替代能源因技術面尚未成熟，因此還無法與現行主流石化燃料抗衡，期望在不久的將來，可以真正的將此類能源應用化，成為替代石化燃料的主力能源。

2.2 生質能

2.2.1 生質能概略

生質能（Bioenergy）是眾多再生能源中的一種，指的是以自然界的生物質（Biomass）做為燃料或用以提煉燃料的總稱。人類早在遠

古時期就已經在使用生質能，甚至堪稱是「最早的燃料」，諸如焚燒木頭取暖，回收水肥來灌溉等…，都是生質能的使用例子。然而現代的生質能技術則是希望透過物理化學或是生物的轉換方式，自生物質提煉更精純的燃料，像是甲烷、醇類或是氫氣等…，如此一來可便於儲存利用，或是降低後續汙染。生質能利用的技術範圍相當廣泛，圖 2-1 依目前已知生質能技術歸納整理，包括原料前處理或製備、轉換程序及最終之產品。

綜觀世界生質能研究約在 30 年前展開，目前巴西是全球酒精主要生產國，也是唯一使用車用酒精的國家，在 2003 年就已製造出可使用汽油、酒精或天然氣的混合燃料汽車，便進而發展出酒精為燃料之航空器，巴西生產製造的混合燃料汽車約在巴西新車市場擁有 20% 的佔有率，全國有 3 萬個加油站可提供酒精及汽油。除巴西為例之外，生質能也在最近開始受到各國注目，由於油價不斷攀升，而生質能源技術也有大幅度改善，再加上 2007 年 1 月美國宣佈在未來 10 年內，減少汽油消耗量 20%，而由再生燃料和替代燃料取代，並且根據美國參議院能源委員會 2005 年制定通過的法案，要求該國在 2012 年將乙醇汽油及生質柴油的數量加倍（一般是將 5% 至 15% 的酒精添加在 95% 至 85% 汽油中）。歐盟 27 國也於 2007 年 3 月宣佈在 2020 年之前，總能源使用量中之 20% 必須為再生能源，而運輸系統燃料

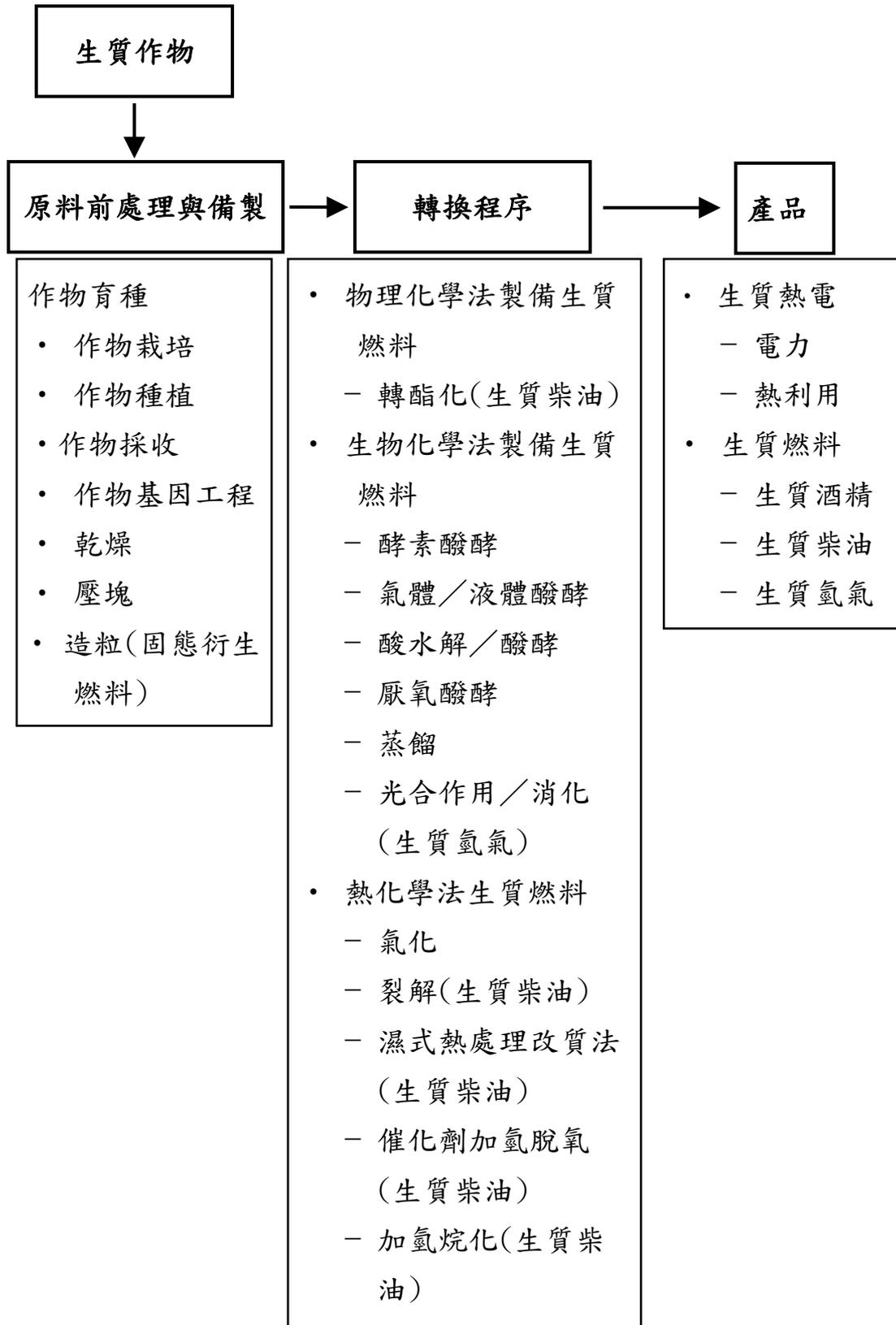


圖 2-1 生質能源轉換技術總覽 (吳氏、李氏， 2007)。

最少 10% 為生質能源。使得生質能源之市場動能急遽升高，已漸有與石油相抗衡之趨勢（左氏，2007）。截至 2001 年止，生質能供應全球約 14% 的初級能源，其中亞洲（不含中國大陸）占 34.2%，非洲占 23.9%，中國大陸占 20.5%，經濟合作發展組織會員國（含歐美澳日等 20 國）則占 13%，而生質能約占全世界再生能源利用的 80%（吳氏、李氏，2004），顯示出此一新興能源逐漸受到各國在政策上的關注。

然而隨著生質能源市場的開發以及生質燃料相關技術的演進，即使已經有如美國或巴西等國家將生質燃料商用化並邁向普及，然而以往像是生質酒精或生質柴油等此類燃料皆提煉自糧食類物質，未來若是推廣至全球規模，將造成糧食作物的價格上漲，這對於許多開發中國家是糧食提供者，卻可能無力購買自身生產的糧食，加速全球的飢餓問題。在第一代生質燃料技術中，許多糧食作物成為生質進料的候選者，如穀物、薯類、豆類等，這些作物能成為提煉油脂的來源或是提供澱粉多醣進行水解醱酵來生產燃料都有相當好的產率，技術面也相當成熟，如今由於發現到可能引發的經濟層面問題，使得人們轉而向第二代非糧食性的生質燃料發展。

2.2.2 第二代生質燃料

由於近年來糧食短缺，價格也持續飛漲，根據聯合國糧食與農業組織（The Food and Agriculture Organization of the United Nations，FAO）的調查，2008年3月全球的糧食價格平均較去年同期上漲57%；另一方面，已有部分環保團體和非政府組織認為發展生質燃料是造成糧食短缺，價格上漲的主因之一，且雨林也會因開墾種植能源作物而遭受破壞，因此生質燃料的利用已造成「奪糧毀地」之效應（吳氏，2008）。而2005年歐盟在盤點生質燃料的達成目標時，發現原訂該年要達成生質燃料（生質柴油、生質酒精）取代2%化石燃料的目標僅達成1.5%，於是轉往積極發展第二代生質燃料技術，也促使生物精煉技術更為被重視，成為未來生質能技術的發展趨勢（吳氏、李氏，2007）。

第二代生質燃料在方法上與第一代有大幅差別，特別是進料的使用，如表2-1表示一、二代生質能的差異，可看出第一代主要以糧食作物作為進料，而到了第二代則轉變為以纖維素物質為主。如前述所說由於第一代進料皆為食物，一旦普及化將導致日益嚴重的糧食缺乏問題，因此人們將注意力放到纖維素上，而纖維素是陸生植物細胞中常見物質，並且無法被人類消化吸收，相對起第一代的澱粉進料將會是較佳的選擇。

表 2-1 兩代生質燃料的差異性 (吳氏、李氏, 2007)。

	第一代生質能	第二代生質能
進料	糖、穀物、種子	<p style="text-align: center;">木質纖維素</p> <p style="text-align: center;">木本植物 (喬木、灌木)</p> <p style="text-align: center;">草本植物 (一年生、二年生、多年生)</p> <p style="text-align: center;">農業廢棄物</p>
主流技術	<p>生質柴油 (Biodiesel)</p> <p style="text-align: center;">油菜籽</p> <p style="text-align: center;">大豆</p> <p style="text-align: center;">葵花籽</p> <p style="text-align: center;">棕櫚油</p>	<p style="text-align: center;">纖維素衍生燃料</p> <p style="text-align: center;">(酒精、氫氣、甲烷)</p>
	<p style="text-align: center;">純植物油</p> <p style="text-align: center;">(Pure plant oils)</p>	<p style="text-align: center;">熱化學燃料</p> <p style="text-align: center;">(Thermochemical fuels)</p> <p style="text-align: center;">Hydrothermal upgrading oils (HTU)</p> <p style="text-align: center;">Gasification</p> <p style="text-align: center;">Pyrolysis oils</p>
	<p style="text-align: center;">生質酒精</p> <p style="text-align: center;">(Bioethanol)</p> <p style="text-align: center;">小麥</p> <p style="text-align: center;">馬鈴薯</p>	

現今各國研究對於降解纖維素衍生酒精燃料之技術已有一定的水準，同樣在開發中國家因其材料的取得便利而成為最成熟之生質能源研發項目。加拿大 Iogen Co. 以 25 年時間研究酵素法分解纖維素，目前已具商業化規模（徐氏，2005）。而美國指出酒精燃料將來甚至可取代汽油總消耗量的 30-50%。澳大利亞則研究使用甘蔗、小麥及玉米或由木材加工副產品等原料來釀製，然我國對木質纖維素衍生生質燃料技術尚待開發，僅有少數研究單位曾進行相關評估。地球每年產生的農業廢棄物中有 1.9×10^9 噸纖維素及半纖維素（Ulbrik, 1991），而根據行政院農委會統計，光是台灣地區農業廢棄物全年產生量估計可達 6×10^6 噸，此大量的纖維廢棄物具有高生質潛能，如何將該生質廢棄物轉為生質燃料則有待深入研發。

2.3 纖維素 (Cellulose)

2.3.1 纖維素結構

纖維素是種有機聚合物，普遍存在於植物體中，是由大量的葡萄糖分子所組成的多醣體，平均每分子約含 10,000 個單體，單醣之間以 β -1,4 糖苷鍵結而形成長鏈，其結構如圖 2-2 (a) 所示。而纖維素在自然界植物體中主要存在於細胞壁中，並且長鏈間以氫鍵形成束狀晶體，如圖 2-2 (b) 而包覆於半纖維素以及木質素之中，稱之為木質

纖維素 (Lignocellulose)，其結構緊密堅固，陸生植物細胞藉此得以保護。木質纖維素大量存在於地表，是地球上最豐富的聚合物 (Rani *et al.*, 2004)，估計纖維素與半纖維素每年約有 8.9×10^{10} 噸透過光合作用被製造出來 (Wiegel, 1982)，在農業廢棄物中佔有很大的比重，可惜這些含有纖維素的農業廢棄物多以現地焚化法清除，不但浪費纖維

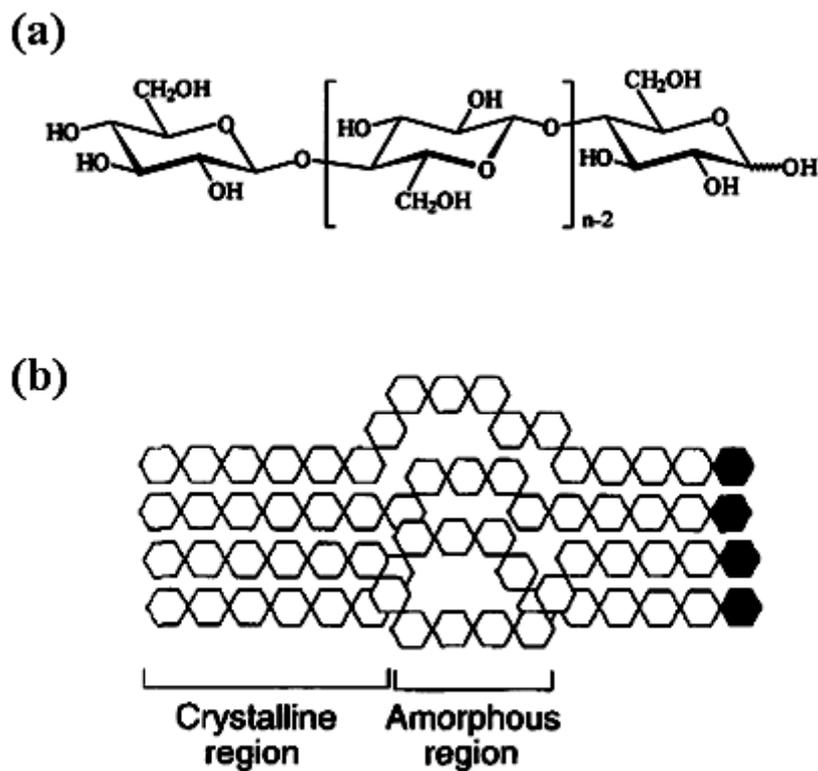


圖 2-2 纖維素結構示意。(a) 纖維素為葡萄糖聚合物，(b) 纖維素長鏈彼此以氫鍵結合形成結晶區以及非晶型區，六角形代表為葡萄糖單位 (Askarieh *et al.*, 2000; Beguin and Aubert, 1994)。

資源，也造成空污問題。為了去除包覆的木質素，許多文獻在進行木質纖維素生物性（以菌體或酵素）水解程序之前先以理化方式如濕氧化（Wet Oxidation）、酸鹼處理、和氨爆破（AFEX）方式去除堅固的木質素（Bjerre *et al.*, 1996; Holtzapple, *et al.*, 1991; Mosier *et al.*, 2005），使纖維晶體暴露出來以利於後續水解的效率。然而木質素即使被去除，纖維素晶體本身不溶於水且架構穩定，使得自然界的木質纖維素難被一般生物所直接分解利用，同時在纖維素衍生生質燃料之程序中，水解步驟不單是速率決定步驟亦為關鍵技術所在（Lai *et al.*, 2001; Noike *et al.*, 1985），因此對利用纖維素衍生生質燃料技術而言，具強效纖維水解能力之菌株是首要開發之務。相關菌株所產生的強效纖維水解酵素也能經由萃取而純化，相較於以生物體水解纖維素，酵素分解纖維素過程中不產生廢棄生物污泥，後續污染也能夠因此避免。

2.3.2 纖維素水解及醱化（Saccharification）

所謂的水解反應（hydrolysis）指的是將化學物質中的氫氧原子鍵結以加入水分子的方式裂解，在多醣類物質的水解過程中，例如：纖維素單個葡萄糖分子中間以氧原子組成 β -1, 4-D-糖苷鍵（ β -1, 4-D-glycosidic bond），水解後兩端各形成 OH 基，圖 2-3 所示為纖維

二糖水解為兩個葡萄糖。自然情況下纖維素的水解反應常數極低，而難以自行發生，因此常見水解反應需透過酸或鹼處理，或是以纖維水解酶做為催化劑，而生物水解同樣也是以纖維水解酶來達成。

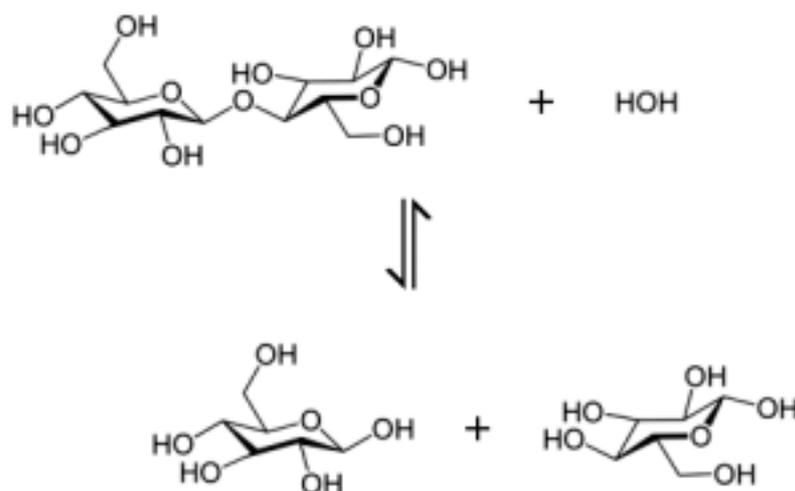


圖 2-3 纖維二糖經由水解轉化為兩個葡萄糖分子。

結晶型的纖維素不溶於水，當被水解為可溶性醣類時稱為醣化 (Saccharification)，指的是多醣水解為更小的醣類如：寡糖、雙糖，或單糖的過程，也是生物在利用不可溶性醣類時必經途徑。例如纖維水解生物利用多種纖維酵素，先將結晶型纖維素轉為可溶性多醣 (Polysaccharide)，再轉化為寡糖 (Oligosaccharide)，最後分解為介於約 1 至 7 醣數的寡醣及單醣 (Monosaccharide)，可以藉主動運輸或擴散進入細胞代謝途徑，達到利用纖維素的目的 (Desvaux *et al.*, 2000)，圖 2-4 即為已知 *Clostridium cellulolyticum* 的葡萄糖代謝途徑。

菌體本身以纖維酵素水解纖維產生還原糖的同時，目的是作為碳源進行同化作用（Assimilation）使細胞增生。但在某些研究結果指出，高效纖維水解菌所產生的還原糖，會因為水解率遠大於利用率而多殘留於培養液中，而細胞會因代謝產物累積而走入死亡期（Desvaux *et al.*, 2000）。本研究期望可以提升此剩餘還原糖，作為進入後續醱酵反應的碳源。由於許多菌株具有水解纖維素並同時產生燃料（如：醇類、氫氣...）之特性，可惜往往在工程上受限於最佳條件操作時較偏袒於某一性質，譬如某菌株在水解纖維素同時產氫的情況下，操作溫度或許最利於纖維素水解但不利於氫氣產率，如此情況下，考慮區分為雙相系統（水解槽、發酵槽），先行高效率水解步驟，再以產氫能力優秀之菌株後續醱酵，雖然相較耗能，卻有利於個別途徑效率，或許整體來說可以有更佳的產能表現。

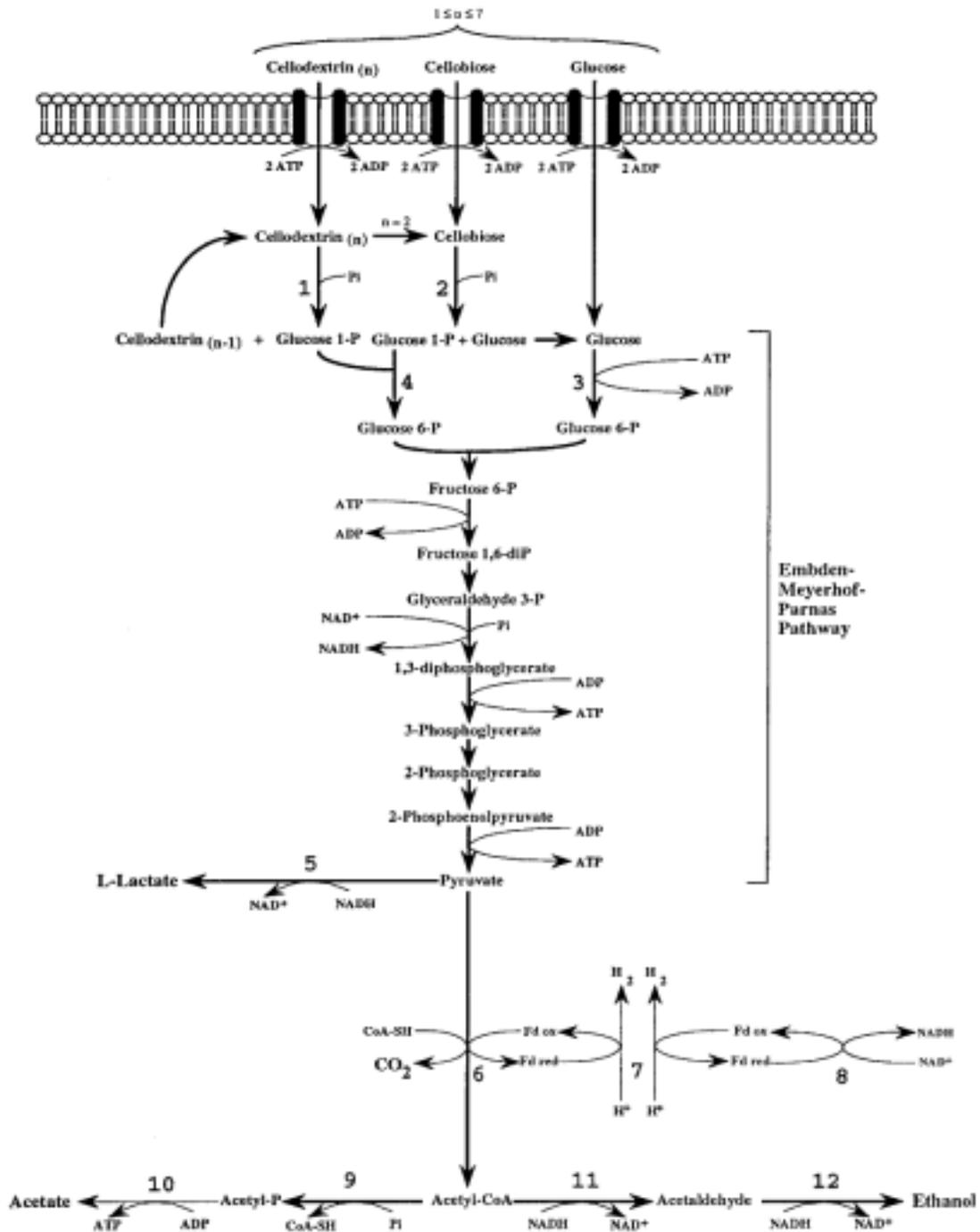


圖 2-4 *Clostridium cellulolyticum* 之纖維寡糖代謝途徑 (1, cellodextrin phosphorylase; 2, cellobiose phosphorylase; 3, glucokinase; 4, phosphoglucomutase; 5, L-lactate dehydrogenase; 6, pyruvate-fd oxidoreductase; 7, hydrogenase; 8, NADH-fd reductase; 9, phosphotransacetylase; 10, acetate kinase; 11, acetaldehyde dehydrogenase; 12, Alcohol dehydrogenase. CoA-SH, coenzyme A; ox, oxidized; red, reduced. Fd, ferredoxin) (Desvaux *et al.*, 2000)。

2.4 纖維水解生物

2.4.1 纖維水解生物概略

纖維素由於普遍存在於大自然中，即使結構穩定不利於生物降解，依然有不少微生物具有纖維水解酵素系統，常見於細菌，放射菌及真菌，而某些原生動物也具有水解纖維之能力，如 *Dictyostelium discoideum* (Jones *et al.*, 1979)，然目前卻未發現有水解晶型纖維之古細菌 (Archaea)，僅部分有水解纖維二糖之能力。一般在自然環境下，纖維素包覆於木質素中，而水解代謝後的酸類也需透過如甲烷菌轉化為甲烷，也就是纖維水解過程式需要透過纖維水解及非纖維水解族群的協同作用方能完全降解，而最終轉化為 CO₂、CH₄ 排入大氣碳循環。

常見好氧性纖維水解生物常聚集於表土層，此區域具有植物所產生的大量纖維物質，相較之下木材因為具有大量木質素而降解最為緩慢，需倚靠如放射菌或 *Phanerochaete chrysosporium* 此類真菌得以去除木質素 (Delignification) 的包覆後方能接近纖維素 (McCarthy, 1987)。在好氧性纖維水解生物中，*Trichoderma reesei* 是株研究最為透徹之真菌，而常見細菌類則有 *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Thermomonospora* 和 *Microbispora* 等菌屬。

在厭氧環境下的纖維水解生物常見於動物消化道、淡水底泥、堆肥、廢水處理污泥等，而像是腸胃道中的纖維水解生物在草食動物營

養吸收上就扮演著重要角色，可將固態纖維素轉化為可吸收的醣類。厭氧環境下的纖維素可被厭氧纖維水解生物醱化而醱酵，可藉由甲烷菌對於醱酵後酸產物的消耗（甲酸、乙酸…），以延續纖維素的共醱化醱酵反應（Simultaneous saccharification and fermentation, SSF）。常見厭氧性纖維水解生物如*Fibrobacter succinogenes*，可水解纖維素及半纖維素，或是瘤胃中的*Ruminococcus albus*及*Ruminococcus flauifaciens*，亦有真菌如*Neocallimastix patriciarum*。

大部分的纖維水解菌都沒有完整的纖維水解酵素系統，這些在纖維水解協同作用時可能扮演了中間的角色（Béguin and Aubert, 1994）。表 2-2 歸納了常見具有纖維水解酵素的菌株，並依特性區分出氧氣感受性以及喜好溫度，可看出依其分佈環境不同而在生理特性上有很大的差別。

表 2-2 具纖維水解酵素之菌株以及所擁有之纖維酵素系統

Oxygen condition	Temp. condition	Species
Aerobic	Thermophilic	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> ¹
	Mesophilic	<i>Bacillus pumili</i> ¹
	Mesophilic, Thermophilic	<i>Cellulomonas</i> sp. ¹
	Mesophilic, Thermophilic	<i>Cellvibrio</i> sp. ¹
	Thermophilic	<i>Caldibacillus celovorans</i> ¹
	Mesophilic	<i>Erwinia carotovora</i> ¹
	Thermophilic	<i>Microbispora bispora</i> ¹
	Thermophilic	<i>Rhodothermus marinus</i> ¹
	Thermophilic	<i>Thermobifida fusca</i> ¹
Anaerobic	Mesophilic	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ²
	Thermophilic	<i>Anaerocellum thermophilum</i> ¹
	Mesophilic	<i>Bacteroides cellulosolvens</i> ²
	Mesophilic	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ¹
	Mesophilic	<i>Clostridium cellulolyticum</i> ²
	Thermophilic	<i>Clostridium thermocellum</i> ²
	Mesophilic	<i>Fibrobacter succinogenes</i> ²
	Mesophilic	<i>Halocella cellulolytica</i> ¹
	Mesophilic	<i>Ruminococcus albus</i> ²
	Mesophilic	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ²
Thermophilic	<i>Spirochaeta thermophila</i> ¹	

1: Cell-free cellulase system bacterium.

2: Complexed cellulase system (cellulosome) bacterium.

(Lynd *et al.*, 2002; Schwarz, 2003)

2.4.2 *Clostridium thermocellum* 相關特性

本實驗研究之strain TCW1根據分生鑑定接近於*Clostridium thermocellum*。這株菌最早在1926年自馬糞中分離 (Viljoen *et al.*, 1926)，然而卻歷經25年時間人們才能取得純培養 (Pure culture) (McBee, 1950)。該菌株普遍存在於自然界許多環境中，諸如都市廢棄物 (蔬果表面)、污水消化槽、土壤、棉花表面、溫泉以及河水底泥都曾經發現 *C. thermocellum* (Ulbrik, 1991)。

根據前人研究，此菌株為絕對厭氧菌且喜好嗜熱環境，最佳生長溫度為60-64°C (Sneath *et al.*, 1986)，最佳pH則為6.1-7.5 (Freier, 1988)，當菌生長在PY-cellobiose培養基中為無移動性，大小約0.5-0.7 × 2.5-5.0 μm，革蘭氏陰性菌，形狀筆直或微彎，細胞單一或成雙，末端常具有卵狀內孢子並膨大，菌落常有黃色不溶性物質產生 (Sneath *et al.*, 1986)。細胞生長緩慢，在批次纖維素培養中細胞倍增時間 (Doubling time) 為7小時，在纖維二糖培養下可達2.5小時，而細胞可在11天達到平穩期 (Maugeri and Goma, 1988; Freier, 1988)。

*C. thermocellum*能利用的物質包括半纖維素 (聚木糖)、纖維二糖，和寡木糖，單糖類則有葡萄糖、果糖，和木糖，而在不少文獻都指出往往需要長時間適應 (Ulbrik, 1991; Freier *et al.*, 1988) 方能利用此類單糖，並在適應之後轉回以纖維素培養而又再失去此能力。*C.*

*thermocellum*以纖維素為碳源培養下細胞主產物為葡萄糖、纖維二糖、乙酸、乳酸、乙醇、二氧化碳，和氫氣，但後來的文獻指出還有琥珀酸及甲酸（Freier, 1988）。

*C. thermocellum*雖然可高效率的利用纖維素，特別的是許多研究結果描述了該菌株對於纖維素單體，也就是葡萄糖卻難以直接利用。之後有學者針對了代謝進行研究，了解到*C. thermocellum*以Embden Meyerhof pathway醱酵葡萄糖（Carreira and Ljungdahl, 1983），並且確立了培養基中yeast extract的存在於否會影響*C. thermocellum*醱酵葡萄糖（Patni and Alexander, 1971; Weimer and Zeikus, 1977）。

在消化不溶性基質（晶型纖維素）時，*C. thermocellum* 會附著於基質表面，而附著程度則會視環境因子而定，譬如在前人研究中指出，瘤胃常見菌株*Ruminococcus flavefaciens*以及*Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes*會受到溫度、可溶性糖類影響細胞附著於纖維素基質上，（Roger *et al.*, 1990）。一般來說一旦細胞黏上基質便不易分離，但醱酵中後期許多中間產物如葡萄糖或纖維寡糖則會抑制附著能力，然而許多最終產物如乙醇、乙酸或乳酸則不影響附著（Wiegel and Dykstra, 1984）。當環境不利於生長時，細胞便會趨向附著或形成內孢子形式存在。

在纖維酵素系統上，*C. thermocellum* 明顯不同於先前研究廣泛的

纖維水解真菌 *Trichoderma reesei*，而是以複合型反應（Complex reaction）進行水解動作，並且由於該複合型酵素相當穩定而難以分離研究。*C. thermocellum* 的纖維水解系統常被稱為纖維水解酶體（Cellulosome），最早cellulosome 一詞由Lamed 所提出，指的是由多種酵素單體（大多為纖維酵素，少數為其他多醣類酵素），有條列性的結合於骨架蛋白上形成的複合型胞外纖維酵素（Wu *et al.*, 1988），此種四級結構讓*C. thermocellum* 得以附著於纖維素並強化水解效果（Roger, 1990），然而此結構在纖維水解菌中並不絕對獨特，某些其他的纖維水解菌株同樣也具有cellulosome（表2-1）。

在纖維酵素附著上纖維素之前，*C. thermocellum* 分泌一種稱為Yellow affinity substance（YAS）的物質，即培養過程或是菌落所產生的黃色物質，此物質不溶於水但溶於乙醇、丙酮，對氧氣敏感（Ljungdahl *et al.*, 1983），在降解纖維素途徑中，YAS最先被分泌而附於纖維素細絲表面，之後分泌的纖維酵素可藉YAS黏著於纖維素，因此YAS具有提升纖維酵素附著於纖維素的能力（Ulbrik, 1991），是*C. thermocellum* 水解纖維的一項重要特徵。

從應用性來看，已有 *C. thermocellum* 纖維酵素的醱化文獻（Johnson *et al.*, 1982），或是與其他菌種共培養的研究（Thomas *et al.*, 1981），然而未有文獻直接以 *C. thermocellum* 菌體進行纖維素醱化條

件的研究，由於酵素的萃取過程昂貴，操作環境嚴苛，若能開發以菌體細胞直接進行醱化將是相當符合經濟的方式。

2.5 纖維水解酵素

生物之所以能降解纖維素之能力，所倚靠的即是纖維水解酵素，藉由能作用於各個區域的酵素協力裂解纖維素，一般依作用位置分為三種形式，分別為內切型纖維酵素（Endoglucanase）、外切型纖維酵素（Exoglucanase），和 β -葡萄糖苷酵素（ β -glucosidase），除此之外，尚有複合型纖維酵素，是由以上三種酵素共同結合在蛋白質骨架上，對於各種作用位置都具有親合性，各式纖維酵素作用區示意圖可見圖 2-5。

2.5.1 內切型纖維酵素（Endo- β -1,4-D- glucanase）

內切型纖維酵素又簡稱 Endo-glucanase 或是 Endo-cellulase，會作用在纖維素的非尾端，也就是能從纖維素長鏈任一位置打斷纖維素，可惜只對於非晶型區域的長鏈有作用（圖 2-5 A），也就是說像是 carboxymethyl cellulose（CMC）這類纖維衍生物質，由於長鏈上具有羥甲基，可以讓纖維長鏈間無法結合為晶型束並可溶於水，是測試此類酵素的最佳基質，類似的衍生物質還有 hydroxypropyl cellulose（HPC）、methyl cellulose。

2.5.2 外切型纖維酵素 (Exo- β -1,4-D- glucanase)

外切型纖維酵素又簡稱 Exo-glucanase 或是 Exo-cellulase，會作用在纖維素的尾端，又可區分為作用於還原端或是非還原端，例如 cellobiohydrolyase I (CBH I) 可作用在還原端，而 cellobiohydrolyase II (CBH II) 則是作用在非還原端，兩者都是自纖維素尾端切下纖維二糖，並且可以對晶型纖維區作用 (圖 2-5 A)，常用代表性基質為晶型纖維素 Avicel。

2.5.3 β -葡萄糖苷酵素 (β -1,4-D-glucosidase)

被切下的纖維二糖可經由 glucosidase，又稱 cellobioase 裂解為兩個葡萄糖，以供糖解途徑利用，代表性基質除了纖維二糖之外，尚有例如 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (ρ NPG) 這種類纖維二糖化合物，由於結構與 cellobiose 相似，cellobioase 同樣可以作用於該物質，並且在水解後產生呈色物質 (4-Nitrophenyl)，可以分光光度計 415nm 波長下測量其吸光度來定義酵素活性。

2.5.4 纖維水解酶體 (Cellulosome)

Cellulosome 可以在纖維水解細菌或真菌中發現，最早也是在 *Clostridium thermocellum* 的培養中發現，是由多種纖維酵素加上一組蛋白質骨架，以及可以與碳水化合物類鍵結的蛋白質，所組成的四級

蛋白酵素結構（如圖 2-5 B），除了可能包含了上述三種纖維酵素單位，亦可能包含其他非纖維酵素如幾丁酵素或聚木糖酵素等。此類複合型的酵素系統，讓酵素本身可以對多種基質或作用區反應，有利在現實環境中植物細胞壁的裂解，而不需倚靠其他菌種，可以更具優勢之外，當 cellulosome 被分泌至菌體細胞表面時，會有團聚現象而產生聚纖維素酶體（polycellulosomal aggregates），可以讓細胞更易於附著在基質表面，對於水解速率或獲取醣類都有增進效果（Mayer *et al.*, 1987）。

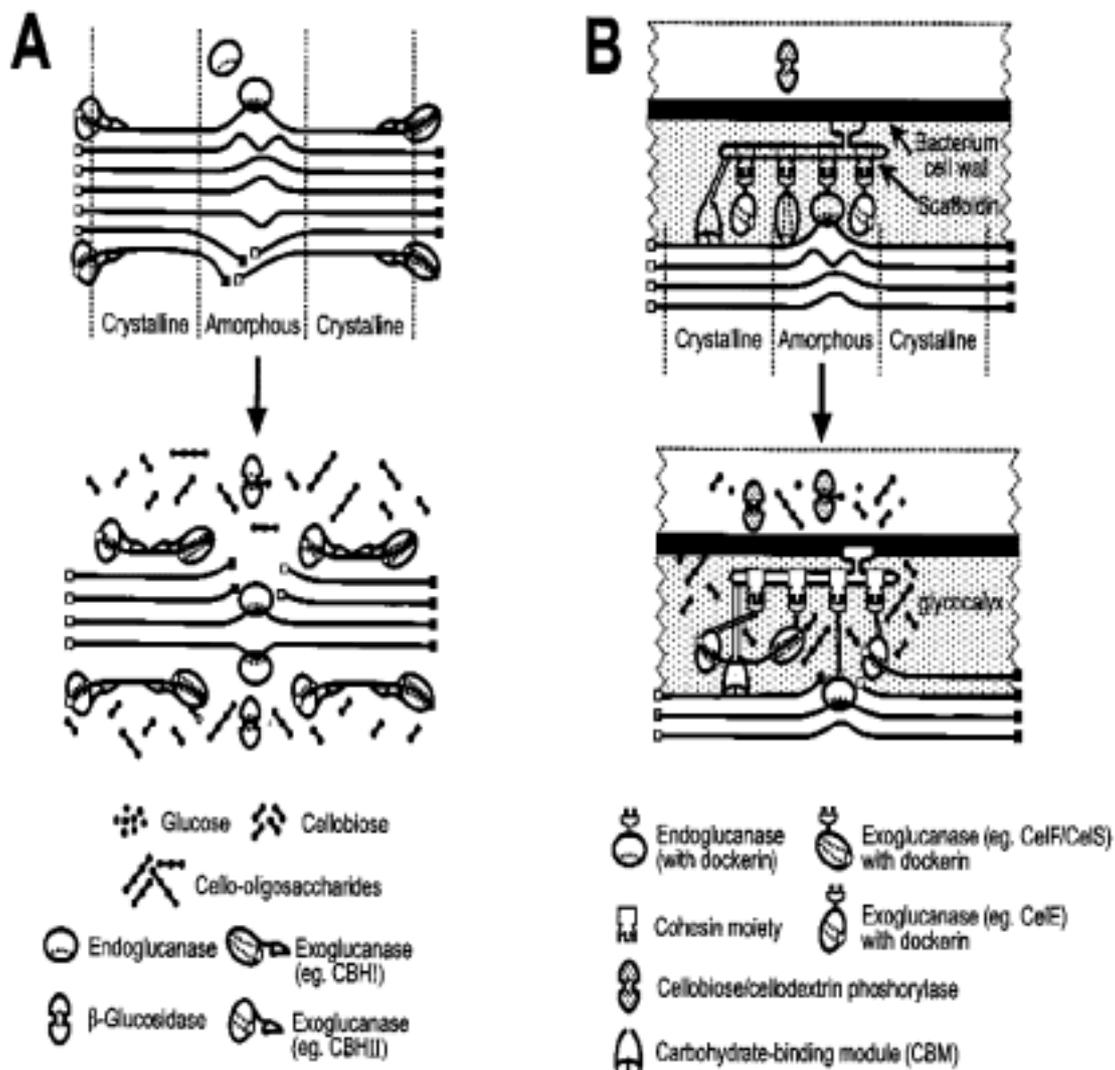


圖 2-5 纖維水解酵素示意圖，(A)三種非複合型纖維酵素共同協力裂解纖維素，纖維素尾端實心方塊為還原端，空心方塊為非還原端；(B)複合型纖維酵素，由一種以上酵素單體，以及能連結纖維素的單元，藉蛋白骨架串連而得以協同裂解纖維素 (Lynd *et al.*, 2002)。

2.6 嗜熱性纖維酵素之應用與優點

纖維水解酵素被普遍應用於各種工業，常見於食品或飼料，以增進食用口感；或是處理布料纖維增加柔軟度；在製藥工業上， β -glucosidase 也受到注目 (Haki and Rakshit, 2003)。而第二代生質能的重心同樣也是放在纖維酵素水解上。相較於嗜中溫的酵素，嗜高溫酵素在應用上要來的方便且有利，一般來說嗜熱性酵素具有：(A)熱穩定性 (B)保存期較長 (C)高溫高活性 (Vieille and Zeikus, 2001) 等特性。在實際應用時，工業環境大多居於 50 °C 以上，自嗜熱性生物所分離的酵素可以在此環境下運作並維持活性，不但具商業利益並且可節省能源，舉例來說，光是以嗜熱纖維酵素處理布料上的棉花以增進柔軟光澤，就需要近 100 °C 的高溫程序 (Ando *et al.*, 2002)，可看出嗜熱性酵素的重要性。

第三章 實驗方法與材料

3.1 實驗設計流程

本實驗自前人研究之嗜熱厭氧纖維水解菌群，分離篩選出一株高效率纖維水解醱化之菌株 strain TCW1，並進行後續研究，其實驗設計流程如圖 3-1 所示。

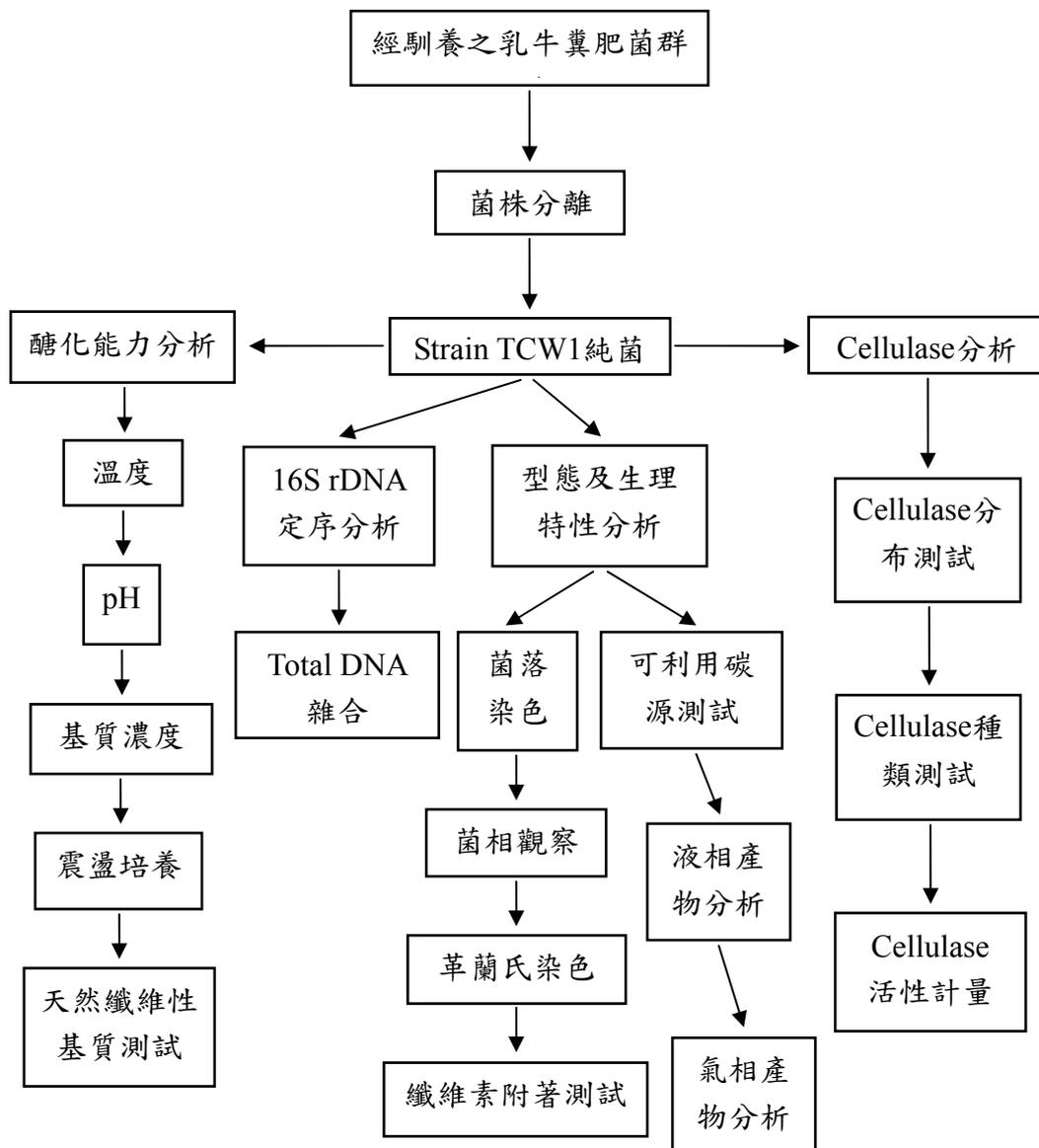


圖 3-1 實驗設計流程圖。

3.2 菌株來源

Strain TCW1 自東海大學乳牛之糞肥中所分離。採樣自牧場之新鮮乳牛排泄物以滅菌 PE 採樣瓶裝取，取回後增富培養以濾紙片 (Whatman No. 1) 在 55 °C 嗜熱環境之下長期馴養。在前人的研究中，已獲得穩定嗜熱厭氧纖維水解產乙醇菌群，可在九天內完全降解 10g/l 之纖維素，當以 8g/l 濾紙為碳源時有最佳乙醇生成率 (王氏，2005)。該菌群以 Hungate Roll-tube 技術分離出共七株纖維水解菌，並根據纖維水解速率及還原糖產率結果篩選而得 strain TCW1 為後續實驗菌株。本研究中亦有自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC) 所提供之 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 菌株。

3.3 菌種培養與純化

3.3.1 厭氧操作

本研究過程中之厭氧操作手續以 Hungate 厭氧技術 (Hungate, 1969; Macy *et al.*, 1972) 來達成，其中主要的操作設施—厭氧加氣站如圖 3-2 所示。主體為三種氣體鋼瓶加上銅絲加熱包並以高氣密性銅管或軟管連接，以供應配製培養基或植種過程之所需氣體。每日使用前待加熱包升溫至約 200~300 °C，通氫氣約 5 分鐘使加熱包中銅絲呈亮粉紅色，此過程讓銅絲還原，並可捕捉後續使用氣體中剩餘氧氣形

成 CuO 而達到厭氧之目的，經除氧之氣體以滅菌針頭來使用。

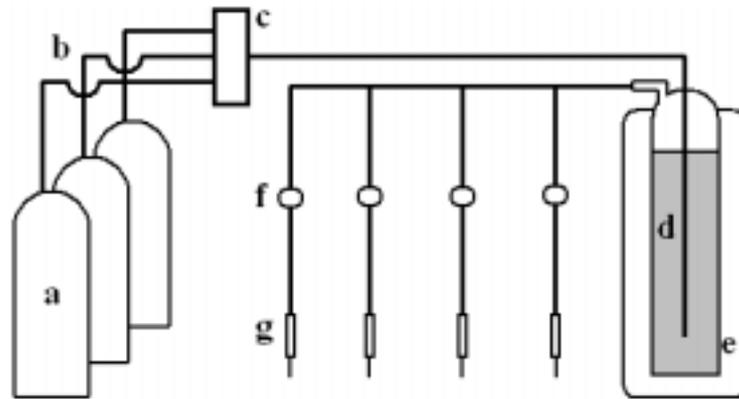


圖 3-2 厭氧加氣站示意圖，(a)氣體鋼瓶，各為氮氣、氫氣和混合氣（20% CO₂, 80% N₂）；(b)銅管或絕氧軟管；(c)集流閥；(d)銅絲；(e)加熱包；(f)氣體閥門；(g)滅菌針頭。

3.3.2 嗜熱厭氧培養基

研究過程中使用之嗜熱厭氧（Thermophilic anaerobic, TA）培養基將配合厭氧操作來配製，其基本成分如表 3-1 所示。配製時將無機鹽類、微量元素以試劑水定量後加入氧氣指示劑 resazurin 煮沸，待沸騰去除溶氧後冷卻至約 60 °C，加入 L-Cysteine hydrochloride 用以還原培養基以及 NaHCO₃ 提供鹼度，最後待培養基冷卻至室溫或轉為透明無色時便完成培養基除氧，再分裝至已裝入纖維性碳源之厭氧血清瓶後滅菌，以上全程以厭氧加氣站曝以混合氣（80% N₂+20% CO₂）維持厭氧狀態。經滅菌後之培養基在植菌前會加入 Na₂S 再次還原培

養基後加入 yeast extract、peptone，和 vitamin solution（如表 3-3），最後接種以植入 10 %體積的菌液來達成。

表 3-1 TA 培養基成分

Component	Content (l ⁻¹)	Source
Carbon source		
Cellulosic materials ¹		
K ₂ HPO ₄	0.40g	和光試藥
CaCl ₂	0.05g	和光試藥
MgCl ₂	0.10g	Riedel-de Haën
(NH ₄)Cl	1.00g	Riedel-de Haën
Trace element solution ²	1.0ml	
Resazurin	0.0005g	Sigma
L-Cysteine hydrochloride*	0.50g	Sigma
NaHCO ₃ *	4.00g	Riedel-de Haën
Na ₂ S**	0.25g	Sigma
Yeast extract**	1.00g	CONDA
Peptone**	1.00g	Difco
Vitamin solution ^{3**}	10.0ml	

*: 煮沸後加入，**: 滅菌後植菌前加入，1: 視實驗之需要配以不同成分及濃度之纖維性碳源，2: Trace element solution 成分如表 3-2，3: Vitamin solution 成分如表 3-3。

表 3-2 Trace element solution 成分

Component	Content (l ⁻¹)	Source
Conc. HCl*	1.0ml	Riedel-de Haën
NiCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
H ₃ BO ₃	0.05g	Riedel-de Haën
FeCl ₂	2.00g	Riedel-de Haën
CuCl ₂	0.03g	Riedel-de Haën
ZnCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.05g	Riedel-de Haën
MnCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
CoCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
AlCl ₃	0.05g	Riedel-de Haën
Na ₂ SeO ₃	0.10g	Riedel-de Haën

*: 先以少許水稀釋濃鹽酸調整 pH 至酸性再分別加入各微量金屬。

表 3-3 Vitamin solution 成分

Component	Content (l ⁻¹)	Source
Biotin	2.0mg	Sigma
Thiamine-HCl	5.0mg	Sigma
Pyridoxine-HCl	10.0mg	Sigma
Nicotinic acid	5.0mg	Sigma
Riboflavin	5.0mg	Sigma
Vitamin B12	0.1mg	Sigma
DL-Ca-pantothenate	5.0mg	Sigma
Lipoic acid	5.0mg	Sigma
P-aminobenzoic acid	5.0mg	Sigma
Folic acid	2.0mg	Sigma

3.3.3 菌株分離

本研究所分離的菌株 strain TCW1 以厭氧滾管 (roll-tube) 技術 (Hungate, 1969) 來完成。實驗過程之試管以絕氧橡膠塞配合螺旋蓋或是鋁蓋密封以達到厭氧之目的，試管中以 TA 培養基加上 25 g/L 瓊脂 (agar) 並以 α -cellulose (Sigma) 作為基質來源。已準備好之培養試管先以隔水加熱溶化後混合均勻，並在植菌過程中保持在 50-55 °C 水浴中使瓊脂不至凝固，將來自乳牛糞肥的纖維水解菌群序列稀釋後將各稀釋液分別植入已融溶瓊脂之試管，將試管水平放置於冷水淺盆中並以手快速撥轉，冷卻的試管內部便包覆上一成固態 TA 培養基，放入 55 °C 烘箱培養。

已培養完成之試管可見到菌落產生，以無菌的 Pasteur 玻璃吸管尖將菌落連同瓊脂挑起，植入以濾紙 (Whatman NO.1) 為基質之 TA 培養基試管中，以上過程中開放的試管均以厭氧加氣站曝混合氣維持厭氧態，將植入菌落的試管置入 55 °C 烘箱培養。經植菌的試管一旦觀察到濾紙有瓦解現象便視為陽性反應，將陽性反應菌株作為下一次滾管的植菌來源，此滾管及挑菌步驟需重複三次以上以確保菌株單純，最後以鏡檢觀察菌相確立純化是否完成。

3.4 分析方法

3.4.1 血球計數 (Hemocytometer) 與細胞乾重

在定量 strain TCW1 生長方面，由於實驗培養基包含大量固態纖維素，因此直接定量懸浮固體 (SS) 或是揮發懸浮固體 (VSS) 將不適用，因此在考慮工程應用性及適用性上選擇血球計數器配合細胞乾重與細胞數目檢量線來使用。Strain TCW1 之對數期細胞呈長桿狀，在血球計數器下細胞方便計算因此採用之，觀察位相差顯微鏡下玻片方格中之細胞數，並以 3-1 式換算得到細胞濃度。

The number of cells/mL =

$$\frac{(\text{Number of cells counted} \times \text{dilution} \times 20,000^* \times 1000\text{mm}^3/\text{mL})}{\text{Number of small squares counter}}$$

(3-1)

*: $20,000 = 400 \text{ smaller squares} \times 50$ (Cell depth is $1/50 \text{ mm}$)

若是欲知細胞乾重，可藉由細胞濃度與細胞乾重檢量線(附錄一)換算而得。細胞乾重檢量線假定 strain TCW1 培養在不同纖維性基質時細胞不會因而改變重量，便以纖維二糖 (Cellobiose) 為基質培養，之後在不同時間點每次取 100ml 培養液，以 $0.2\mu\text{m}$ 孔徑濾紙過濾烘乾並取得乾重，同時取得不同細胞濃度。

3.4.2 纖維素濃度測定

纖維素為葡萄糖聚合物，糖分子間的鍵結雖然穩定，卻可以強酸破壞達到水解之目的，再以特定化學物與糖分子結合並且呈色達到定量之目的。本研究中恩酮比色法 (Anthrone colorimetry) 便是先以弱酸配合加熱去除培養液中細胞的干擾 (Updegraff, 1969)，再用濃硫酸水解纖維素，最後以恩酮試劑呈色而有深綠色產生並以分光光度計 (spectrophotometer) 在波長 620nm 之下定量之 (Viles *et al.*, 1949)。

實驗前須配置醋酸/硝酸溶液：將濃醋酸 (80%) 與濃硝酸 (65%) 以 10 : 1 (v/v) 比例混合而得。恩酮試劑：將 0.2g anthrone (Sigma) 以 96% 濃硫酸定量至 100ml 後冷藏保存。以 α -cellulose (Sigma) 作為纖維素標準品配製檢量線 (附錄二)。其詳細實驗步驟如下：

- a. 取 1ml 含纖維素之培養液樣本，離心 ($6,000g \times 5min$) 後棄上澄液。
- b. 加入 0.3ml 醋酸/硝酸溶液均勻混合，置於沸水浴 30min 破除細胞。
- c. 離心 ($6,000g \times 5min$) 後棄上澄液。
- d. 以去離子水清洗剩餘纖維素，離心 ($6,000g \times 5min$) 後棄上澄液。
- e. 加入 0.2ml 濃硫酸 (96%) 混合均勻，每分鐘以 Vortex-Mixer 震盪一次直至纖維素沉澱水解完全，如沉澱較多需較久反應時間。
- f. 將水解後溶液以去離子水稀釋 10 倍體積。

- g. 取稀釋溶液 1ml 加入 2ml 恩酮試劑，混合均勻。
- h. 沸水浴 15min，冷卻置室溫。
- i. 以分光光度計（Shimadzu, UV mini-1240）在 620nm 波長光下測其吸收度。

3.4.3 還原醣濃度測定

還原醣濃度測定法參考 DNS 法（Miller, 1959）並修改之（吳氏, 2006）。DNS 試劑（Dinitrosalicylic acid reagent）在培養液中被還原醣還原而呈紅棕色並以分光光度計定量之。其 DNS 試劑配製如下（100ml）：以少量去離子水先溶解 1.6g NaOH 調整至鹼性，加入 30g 酒石酸鉀鈉（K-Na-tartrate-4H₂O），再加入 1g 3,5-二硝基水楊酸（3,5-Dinitrosalicylic acid）並定量至 100ml，保存於 4 °C 不照光處。考慮以纖維素為基質時水解產生之中間醣類應主要為葡萄糖，因此檢量線配製以葡萄糖（Sigma）作為標準品（附錄三）。

欲測定還原醣時採集約 0.5ml 培養液樣品，離心（6,000g × 5min）取上澄液做適量稀釋，取稀釋液 0.5ml 加入等體積 DNS 試劑混合均勻，以含橡膠墊片之螺旋蓋封於玻璃試管中，置於沸水浴加熱 10 分鐘，以冷水快速冷卻至室溫後，以分光光度計（Shimadzu, UV mini-1240）在 540nm 可見光下測其吸收度。

3.4.4 總溶解糖 (TSS) 濃度測定

總溶解糖以酚-硫酸法 (Phenol-sulfuric acid) 測定之 (Dubois, 1956)。在強酸環境下培養液中的多糖或寡糖將被完全水解轉為單糖，並形成穩定的淡黃色。實驗過程需 98 % 濃硫酸 (J. T. Backer) 以及先配製 5 % 酚溶液 (Riedel-deHaën)，以葡萄糖 (Sigma) 為標準品製作檢量線。分析時取培養液樣品至少 1ml，離心 (6,000g × 5min) 取上澄液做適量稀釋，取稀釋液 1ml 加入 0.5ml 酚溶液並混合均勻，緩慢加入 2.5ml 濃硫酸，過程中應將濃硫酸直接滴入液體避免管壁殘留，以 Vortex-Mixer 做均勻混合，靜置 10 分鐘待反應完全後以冷水冷卻至室溫，利用分光光度計在 490nm 波長下測其吸光度，檢量線以葡萄糖為標準品 (附錄四)。

3.4.5 高效液相層析 (HPLC) 分析代謝產物

為了解纖維性物質經由 strain TCW1 水解後產物，包括寡糖、單糖以及代謝後揮發性脂肪酸，以高效液相層析儀 (Shimadze) 測定其種類及濃度。注射量為 20 μ l，移動相為 0.008N H₂SO₄ 溶液 (流速為 0.6 ml/min)，分析管柱為 *Transgenomic* COREGEL 87H3 (300 mm × 7.8 mm)，偵測器為 RI-detector (Shimadze, RID-10A)。根據 strain TCW1 可能產生之中間糖類以及代謝產物物質，選定之標準品包含葡

萄糖、纖維二糖、木糖、乳酸、乙酸、乙醇，分別配製檢量線以定量（附錄五）。

3.4.6 產氫分析

常見厭氧菌如本研究之 *Clostridium* 屬菌種，主要氣相產物為二氧化碳及氫氣，以氣相層析儀（Shimadzu GC-14B）配合 thermal conductivity detector (TCD) 測定之，所使用管柱以 Molecular Sieve 5A 60/80 mesh 填充在玻璃管柱（長 2.1m，內徑 3.2mm）中，使用之載流氣體為氫氣，流速為 25ml/min，樣品注入體積為 0.2ml。氣相層析儀分析參數為 injector, 120 °C；column, 50 °C；detector, 140 °C。TCD current, 60mA。各式濃度氫氣標準品配製（附錄六），先以氫氣完全置換密閉氣瓶，在以針筒打入不同比例之純氫氣，再將氣瓶洩壓以達外界一大氣壓即可。實驗設計以批次培養，配合時間點排水集氣法釋放生物氣體，監測其氣體量並分析氫氣含量。

3.4.7 蛋白質濃度分析

酵素主要結構為蛋白質，為了測定胞外纖維酵素之比活性，以培養液中總蛋白質量做為活性依據（Yang and Wyman, 2006）。利用市售蛋白質分析套件（Bio-Rad Protein Assay）進行分析，此套件試劑中包含 Coomassie Brilliant Blue G-250，與蛋白質結合時會由紅褐色轉

為藍色，以牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 作為標準品配製檢量線 (附錄七)。實驗進行時先採取至少 0.2 ml 培養液樣品，如有沉澱則先以離心去除雜質，之後將分析試劑與樣品以 1:4 (v/v) 比例均勻混合，如呈色過深則須將培養液重新稀釋再加入反應試劑。加入試劑後讓混合液在室溫下靜置 5 分鐘待呈色完全，以分光光度計在 595nm 波長下測其吸光度。

3.5 分子生物菌種鑑定

3.5.1 DNA 萃取

本研究使用之 total DNA 萃取法利用 lysozyme 破壞細菌細胞壁，並以 SDS 界面活性劑破除細胞膜，最後以 phenol/chloroform 將 DNA 萃取出，方法參考自 Barns *et al.* (1994) 並配合實驗需要修改之。實驗前須準備 Solution I (100ml)：先將 25mM Tris-HCl buffer 100ml 加入 1mmol EDTA，再加入 5mmol glucose，pH 需為 8.0，滅菌後置於 4 °C 保存。Solution II 為 1ml solution I 在實驗前加入 0.02g Lysozyme Egg White (Amresco, USA)，以 Vortex 震盪溶解後，暫放於 4 °C 保存。

DNA 萃取詳細步驟如下：

- a. 以小離心管 Eppendorf tube 裝取 1ml 無菌水置於 70 °C 烘箱預熱。
- b. 將已生長至對數期之菌體以離心 (6,000g × 10min) 收集。

- c. 收集的細胞以無菌水清洗並離心 ($6,000g \times 10min$) 至少 2 次以去除培養液干擾。
- d. 視所收集之細胞量加入 solution II (約 0.5ml wet cells per solution II)，置入 $37^{\circ}C$ 烘箱反應約 30 分鐘，視細胞量多可延長 (反應完全後應有沉殿之現象)。
- e. 每 0.5ml 菌液加入 $25\mu l$ 20 % SDS，上下倒置混合 1 分鐘以破壞細胞膜。
- f. 每 0.5ml 菌液加入 $20\mu l$ proteinase 和 $10\mu l$ RNase 並上下倒置混合，置入 $37^{\circ}C$ 烘箱反應，每 10 分鐘取出溫和搖晃，若其中有黏稠狀物質無法散開，可用 pipet 抽吸方式使之混合均勻。反應完全之菌液應透明，若無可以 over night 使之反應完全。
- g. 若有無法溶解之雜質，以離心 ($9,000g \times 10min$) 去除。
- h. 加入 phenol/chloroform-isoamyl alcohol 以及 chloroform-isoamyl alcohol (混合方式例如：若樣品體積為 $500\mu l$ ，先加入 $250\mu l$ phenol/chloroform-isoamyl alcohol 使蛋白質變性，上下混合均勻約一分鐘，可快速但避免過力使 DNA 斷裂，直到反應液渾濁而非雙層。再加入 $250\mu l$ chloroform-isoamyl alcohol 抓取水相多餘 phenol，混合方式同上述)，離心 ($6,000g \times 5min$) 後取上層水相至滅菌小離心管，應小心避免取到兩相中間白色物質 (變性蛋白質)。

- i. 上層水相重複步驟 h，直至兩相界面間白色物質消失，代表已完成蛋白質去除。
- j. 加入同體積 chloroform-isoamyl alcohol，同步驟 h 混合，離心(6,000g × 5min) 後取上層水相至滅菌小離心管。
- k. 加入 2.5 倍體積冰 Ethanol absolut (保存於-20 °C，使用前才取出) 緩慢混合後可目視到白色絲狀 DNA 析出，離心 (6,000g × 5min) 後棄上澄液。
- l. 以少許 Ethanol absolut 清洗 DNA pellet 以去除多餘鹽類，置入常溫烘箱使之乾燥。
- m. 加 50µl 已預熱的 70 °C 滅菌水到 DNA pellet 上，輕彈小離心管使其溶解，若 DNA 量過多無法溶解則無菌水可以加到 100µl。
- n. 將 DNA 溶液保存於 4 °C (長期保存可置於-20 °C)，應避免多次取用而冷熱交替使 DNA 斷裂。

3.5.2 核酸純度與濃度定量

萃取所得之 DNA 溶液可以利用分光光度計在適當的稀釋倍率下，以波長 260nm 及 280nm 來粗估 DNA 萃取效果及濃度。DNA 結構可以對 260nm 波長光有良好吸收度，因此 DNA 濃度可以藉 3-2 式估算而得。而蛋白質或萃取殘留 phenol 為 DNA 溶液中常見干擾物，

並可在 280nm 波長光之下測得其吸收度，因此 260 及 280 吸收度比值即為 DNA 純度，可反映出 DNA 萃取的效果。

$$\text{DNA concentration } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times 50^* \times \text{dilution} \quad (3-2)$$

*: 50 ($\mu\text{g/mL}$ of DNA = 1 OD)

3.5.3 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR 反應配合適當的引子 (primer) 可以使目標序列擴增，而本實驗的目標序列為細菌的 16S rDNA，該序列在細菌的演化上具有一定的重要性，可由 PCR 擴增後在以序列分析可以得知該菌種類。PCR 反應器 (Bio-Rad, MyCycler) 反應循環設定如表 3-4，考慮到目標為真細菌，使用實驗室中既有引子正端為 Bacteria-specific(27F: 5'-AGC GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')，反端為 Bacteria + Archaea-specific (1522R: 5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3') (W = A, T; M = A, C; R = A, G) (Johnson, 1994; Marteinsson *et al.*, 2001)，其餘反應劑成份及含量如表 3-5。

3.5.4 核酸洋菜膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

核酸物質可以藉由洋菜膠電泳來根據其分子量大小分離，可以檢視 total DNA 的完整程度是否良好，而經由 PCR 所擴增的 DNA 片段也可以判定其片段的長度正確性，以及由亮度來粗略判定濃度是否足

夠進行後續定序。實驗時以 TAE buffer 配製 1% agarose，待膠體凝固後，以 6X loading dye 混合 PCR 產物或是 total DNA (1:5)，注入膠片 well，以 50V 電壓在 TAE buffer 中電泳。之後以 EtBr 溶液(25mg EtBr/1.5ml dH₂O，加入 1L TAE buffer 中) 染色約 10 分鐘，置於 UV 光下攝影，觀察 PCR 或 total DNA 片段。

表 3-4 PCR 溫度循環設定

Reaction	Temperature	Time	Cycle number
Activation	94 °C	10min	1
Denaturation	94 °C	1min	} 30
Annealing	58~53 °C	1min	
Extension	72 °C	1min	
Final extension	72 °C	1min	1

表 3-5 PCR 試劑及濃度

Components	Volume	Final concentration
10X PCR buffer	2.5 µl	1X (Contain 15mM Mg ²⁺)
dNTP Mix	0.5 µl	200 µM of each dNTP
Primer (R)	1.0 µl	0.2 µM
Primer (F)	1.0 µl	0.2 µM
Super taq DNA polymerase	1.0 µl	1.0U/µl
Template DNA	1.0 µl	about 20ng/µl
Steriled distilled water	18.0 µl	
Total	25.0 µl	

3.5.5 16S rDNA 親緣分析 (Phylogenetical analysis)

經擴增之 PCR 產物若是經洋菜膠電泳觀察到片段正確而單一，便以 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (明欣生物科技股份有限公司) 測定 PCR 產物序列。正反端序列利用 BioEdit 軟體進行 ClustalW 分析並結合為單一完整序列。此序列經由 NCBI database 中 nucleotide BLAST 比對後，可取得 16S rDNA 序列相似之菌種，下載多株相似菌種序列後，以 Mega 4 軟體再次 ClustalW 分析，並繪製親緣樹圖，設定為：Distance matrix method 為 Neighbor-joining, tree inference 為 bootstrap 1000 replicates，substitution model 為 Kimura 2-Parameter。

3.5.6 DNA-DNA 雜合 (DNA-DNA hybridization)

Total DNA 雜合相較於 16s rDNA BLAST 可以更針對菌株彼此的相似度作分析，由於比對時是以染色體 DNA 進行分析，所以可信度也較佳。實驗時先藉由 16s rDNA BLAST 之結果選定親緣最相近之標準菌株 (Type strain)，經前述之 DNA 萃取法萃取 type 菌株 (對照組，*Clostridium thermocellum*) 及 unknown 菌株 (實驗組，strain TCW1) DNA。本實驗以 DIG DNA labeling and Detection Kit (Roche) 先將對照組 DNA 製作為探針 (Probes)，所使用的標記物質為 digoxigenin-11-dUTP，並以 Klenow enzyme 反應，之後依所附標準品

DNA (1ng/μl) 序列稀釋進行 labeling efficiency，並經由標準品 DNA 濃度推算探針的濃度，其點分布示意如圖 3-3 (A)。接著將對照組及實驗組兩組 DNA 序列稀釋、加熱變性使之開鏈，點漬 (blot) 在 nylon membrane 上，個別三重複之，其點分布示意如圖 3-3 (B)，並進行 UV-crosslinking 固定。然後將 membrane pre-hybridization 避免背景干擾，接著與定量之探針雜合 overnight，將雜合完畢之 membrane 表面覆以 color substrate solution 並在無光的環境下呈色。以掃描機將 membrane 影像紀錄後，利用 Tina 影像軟體分析各 blots 亮度 (luminance) 並繪製出實驗組及對照組回歸線，而其斜率比值即代表菌株間 total DNA 相似度。

A

10	3	1	0.3	0.1	} 對照組 實驗組
10	3	1	0.3	0.1	

B

0	25	50	75	100	} 對照組
50	75	100	0	25	
100	0	25	50	75	
0	25	50	75	100	} 實驗組
50	75	100	0	25	
100	0	25	50	75	

圖 3-3 Labeling efficiency 點分佈示意圖(A)，數字為核酸量單位為 (pg/μl); DNA-DNA hybridization 點分佈示意圖(B)，數字為核酸量單位為 (ng/μl)。

3.6 菌種型態與生理特性分析

3.6.1 革蘭氏染色 (Gram staining)

革蘭氏染色屬微生物學重要之鑑別染色的一種，可藉此大致確立其細胞壁構造，並依其結果區分為革蘭氏陽性（深紫）及陰性菌（紅色）。本實驗所使用的革蘭式染色為商用套件（Difco），先將培養至對數期細胞塗抹於玻片上並自然風乾固定細胞，以結晶紫（Crystal violet）染色後以試劑水清洗，再以碘液染色並與結晶紫在細胞壁間形成複合物，之後以脫色劑〔Acetone : Isopropanol=1 : 3 (v/v)〕洗滌（若時間過久恐影響實驗結果的判別），此時陰性菌由於胞壁主要成分為脂質，因此結晶紫複合物易隨著胞壁而溶出，而醣蛋白較多的陽性菌則反之，接著以番紅（safranin）再次染色，陰性菌因此染為紅色，而陽性菌由於紅色無法蓋過深紫色故無影響。

3.6.2 菌落剛果紅(Congo red)染色

本實驗所用菌株分離方式為包含 α -cellulose 之滾管，若具有胞外 exo-cellulase 的纖維水解菌株便會在菌落周圍形成 clear zone，此實驗可證明菌株具胞外 exo-cellulase，為了讓結果易以照片方式呈現，故利用剛果紅(Congo red)對於多醣類的結合性(Teather and Wood, 1982; Rensburg *et al.*, 1998) 來讓纖維素呈色。實驗時先配製 1g/l 剛果紅溶

液以及 1M 食鹽水，將培養後已有 clear zone 的滾管注入剛果紅溶液染色約一分鐘，倒出剛果紅溶液，注入食鹽水脫色約五分鐘，可重覆此步驟一兩次以完全去除背景干擾，之後以試劑水將剩餘食鹽水洗掉置入中溫烘箱乾燥，取出並拍照。

3.6.3 菌相觀察 (Morphology)

3.6.3.1 位相差顯微鏡

位相差顯微鏡 (Model BX40, Olympus, Japan) 利用光學顯微鏡的光源通過位相差聚光鏡以及位相環來形成中空光錐，會因為檢體的折射率不同於背景而有強烈的明暗區別，特別適合活體觀察而不需前處理，所以在移動性、內孢子和菌絲形狀檢視上都相當便利。若不需觀察其移動性，可考慮用 agar 固定檢體以方便拍照，操作時將培養至對數期菌液塗抹在玻片上，滴上少量已溶化之 15g/l agar 溶液，均勻混合並快速蓋上蓋玻片後輕壓，滴上礦物油以油鏡觀察之。

3.6.3.2 穿透式電子顯微鏡

前處理時先將 1g/L bacitracin 滴在銅網 (Copper net) 上，待一分鐘後以濾紙吸除，接著將菌液樣品滴上銅網約五分鐘待細胞沉澱，再以濾紙吸除多餘菌液，最後滴上 5g/l 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid, PTA) 進行負染約 1-2 秒，吸除溶液後置於穿透式電子顯微鏡

(JEM-1200CX II) 內觀察。

3.6.4 可利用碳源測試

在細菌的分類上來說，除了藉由分子生物技術來鑑定之外，傳統的分類往往藉由某些生化特性來區分不同的菌種 (Sneath *et al.*, 1986)，其中可利用碳源 (可醱酵的有機物) 的測試是相當重要的一環。本研究參考 *Clostridium* 屬具纖維水解能力之文獻 (Monserrate *et al.*, 2001; Warnick *et al.*, 2002) 挑選測試碳源 (Lignin, Xylan, Avicel, α -Cellulose, Starch, CMC, Inulin, Esculin, Pectin, Sucrose, Cellobiose, Maltose, Salicin, Lactose, Melibiose, Fructose, Arabin, Galactose, Xylose, Phamnose, Mannose, Sorbose, Glucose)，考慮到前人論文所提及之 *C. Thermocellum* 利用許多醣類時須要先有適應期，在實驗進行前以該種碳源 5 g/L 繼代培養兩次好讓菌株習慣此基質，之後植入新培養基中後進行實際監測，以菌體生長情況來判定結果。

3.6.5 纖維素附著測試

之前的文獻指出 *Clostridium thermocellum* 如同許多瘤胃系統中纖維水解菌一般具有附著於纖維細絲 (Cellulose fiber) 的能力 (Bayer, 1983)。為了解 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 是否如同其標準菌株一樣有此特性，本實驗參考先前文獻 (Roger *et al.*, 1990; Gelhaye

et al., 1992) 計量附著率 (Adherent percentage) 方法並修改之。實驗時先準備基礎 TA 培養基 (只有無機鹽類) 並加入 3g/l 濾紙片 (以市售文件打洞器製成, 直徑約 0.6 cm) 代表纖維素物質, 控制組則是以市售塑膠文件夾 (聚丙烯 Polypropylene 材質, 簡稱 PP) 代替濾紙代表非纖維素物質, 由於附著率應與表面積成正比, 故加入和 3g/l 濾紙片相同片數之塑膠片 (約 18 片)。將培養至對數期的細胞離心 (6000g × 5min) 棄上澄液, 以定量之基礎 TA 培養基懸浮後, 加入同體積到兩組試管中, 置於 65 °C 烘箱中水平放置輕微搖晃 (~80rpm) 使細胞與基質充分接觸, 測量時每次將試管取出靜置待濾紙或塑膠片沉澱, 以分光光度計 (Spectronic, 20D⁺) 在 600nm 波長下測其菌體細胞吸光度, 附著率經由 3-3 式估算而得。

Adherent percentage (%) =

$$\frac{\text{Absorptivity of initial} - \text{Absorptivity in supernatant}}{\text{Absorptivity initial} \times 100} \quad (3-3)$$

3.7 纖維素醱化能力分析

3.7.1 溫度因子

纖維水解菌倚靠自身所分泌的纖維水解酵素 (Cellulase) 來達成纖維素的水解，而菌體生長環境的物化因子往往影響著菌體代謝效率或是酵素的活性，溫度便是其中一項，甚至有文獻指出溫度對於纖維水解酵素與基質接合有著重大影響 (Andreas *et al.*, 1999)。實驗選定 α -cellulose作為纖維性碳源的代表，分別自混菌時期馴養溫度 55°C 上下調整培養溫度，分別為 $40, 45, 50, 55, 60, 65$ and 70°C ，各別測定其生長以及醱化速率。

3.7.2 pH 因子

pH 因子關係著物質間如解離或溶解度等問題，對於纖維水解或是細胞本身來說都有著重大影響 (Fulton *et al.*, 1979; Shi and Weimer, 1992)。TA 培養基中本身含有 NaHCO_3 會與瓶頂填充的 CO_2 有交互作用形成碳酸封閉緩衝系統，因此本實驗藉由調整 NaHCO_3 含量來製作不同起始 pH 培養，比較起添加酸性或鹼性緩衝溶液來說，並不影響培養基組成，實驗較具一致性，反應容器以反應體積與瓶頂空間皆為 50 mL 之血清瓶進行，其 NaHCO_3 添加濃度如表 3-6 所示。實際 pH 以培養基滅菌後，加入營養物質並植菌為準，故起始 pH 會再比推論

值略低，培養時監測其生長以及還原糖產率。

表 3-6 NaHCO₃ 添加濃度及相對培養基起始 pH

Concentration of NaHCO ₃ (g/l)	0.126	0.400	1.26	4.00	12.6	40.0
Initial pH	5.93	6.09	6.41	6.87	7.34	7.71

3.7.3 基質濃度

基質為微生物的碳來源，而碳為有機體 (organism) 的主要元素，因此基質濃度便直接關係著微生物的生長、代謝，以及代表著培養封閉系統的碳輸入。以 α -cellulose 為基質，並選定 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 and 10 g/l 不同量添加於培養基中，監測其生長以及還原糖產率。

3.7.4 震盪培養 (Agitation) 對纖維水解影響

震盪培養指的是利用培養箱 (TKS, Orbital shaking incubator OSI500-H) 中的震盪裝置，來達成批次血清瓶培養無法做到的攪拌效果。由於基質為易沉澱的固態纖維素，因此培養並非均質態，而以化學反應來看，反應劑 (酵素) 若有充足的機會與反應物 (基質) 接觸則越有利於反應速率，此論點在許多前人的研究 (Lejeune and Baron, 1995; Freier *et al.*, 1988) 中也有探討到。實驗以 150rpm 的轉速下進行

培養並與不震盪的培養進行比較，大於此轉速可使纖維素基質懸浮而不發生沉澱。

3.7.5 天然纖維性基質測試

纖維素普遍常見於路地植物中，為了測試 strain TCW1 能否實際應用於天然性纖維素基質的水解，分別選擇了狼尾草、稻桿、蔗渣、菜葉為單一碳源進行測試，監測其生長及還原糖濃度。狼尾草 (Napier grass, 學名為 *Pennisetum purpureum*) (台畜二號) 是熱帶及亞熱帶地區重要之牧草，具有高生質量、抗病力強、多年生等優點 (Bhandari *et al.*, 2006)。一般用途為牧草，優點在於容易栽培、生命力強、富含纖維質 (60 % 以上的纖維素與半纖維素)，易繁殖、環境適應性廣、生長快、每年可收穫多次、生產成本低等 (成氏, 2004)。是目前極受注目的生質作物之一，雖然糖分相較其他作物低，但可從育種族群中選育高產量與高糖度的狼尾草。自行政院農業委員會畜產試驗所取得之狼尾草乾粉末，以 30 mash 的篩網過濾後作為培養碳源。

稻桿來自台灣中部地區某農田，經由破碎機破碎之後，同樣以 30 mash 的篩網過濾後去除較大顆粒，作為培養碳源。

蔗渣以及菜葉都來自台灣中部某傳統市場，菜葉以高麗菜為代表，兩者以清水洗淨去除表面髒污以及糖份之後，烘乾至恆重，使用時撕為片狀作為培養碳源。

3.8 纖維水解酵素活性

3.8.1 纖維水解酵素類型

3.8.1.1 外切型與內切型纖維水解酵素活性

本實驗的目的為了解 strain TCW1 的胞外外切型與內切型纖維水解酵素活性大小，方法參考前人文獻 (Adney and Baker, 1996)，外切型纖維水解酵素選用基質為 Avicel；而內切型纖維水解酵素測試基質則為 CMC，其詳細流程如下：

- a. 配製 1M 鈉-檸檬酸緩衝溶液 (Sodium citrate buffer)，調整 pH 至 6.8 (依需要做調整)，儲存於 4 °C 之下，使用前取出待至室溫檢查 pH 是否有異。
- b. 準備容積約為 20ml 的 Hungate tube，秤取 0.03g 的纖維基質，加入 9.25ml 的試劑水，以及 0.75ml 的儲備緩衝溶液 (若纖維基質為 CMC，則需將試管先隔水加熱溶解)。
- c. 將培養至對數期的菌液離心 (6000g × 5min)，將上澄液移置滅菌過之離心管，保存於 4 °C。
- d. 加入 5ml 上澄液至步驟 b 中 Hungate tube 中，則為最終濃度 2g/l 基質，0.05M 鈉-檸檬酸的反應管。
- e. 將反應管置入 65 °C 烘箱反應，依時間點取樣測其還原糖濃度。
- f. 將部分上澄液利用市售蛋白質分析套件 (Bio-Red Protein Assay)

進行蛋白質濃度分析。

g. 酵素活性(U)定義為每分鐘能產生多少 μg 的還原糖，利用 DNS 還原醣測試法 (吳氏, 2006) 測得。

h. 酵素比活性定義為每 mg 蛋白質能產生多少 U。

3.8.1.2 β -葡萄糖苷酵素活性

β -葡萄糖苷酵素活性由於往往反應快速，加上以 DNS 還原醣定量法易受 cellobiose 基質干擾，選用 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (ρNPG)(Sigma) 為測試基質，方法修改於前人文獻 (Otieno, 2007)。測試時反應體積為 6 mL，其中包含 50 μL 培養上澄液，其餘體積為 0.05M 鈉-檸檬酸緩衝溶液，而基質濃度為 1mM。纖維酵素活性 (U) 定義為每分鐘所產生多少 μmol 4-nitrophenol。

3.8.2 纖維水解酶體 (Cellulosome)

Clostridium thermocellum 根據文獻 (Lamed *et al.*, 1983; Bayer *et al.*, 1986) 是一株具有纖維水解酶體的菌株，這代表 *Clostridium thermocellum* 能以複合型的纖維酵素酶體來裂解纖維素，此類酵素有機會會在細胞表面形成聚集體，加強纖維水解能力。本實驗目的為確定 strain TCW1 是否如同標準菌株 *Clostridium thermocellum* 具有纖維水解酶體活性，將針對 strain TCW1 細胞碎片進行纖維酵素活性測

定，其詳細實驗流程如下：

- a. 配製 1M 鈉-檸檬酸緩衝溶液，調整 pH 至 6.8（依需要做調整），儲存於 4 °C 之下，使用前取出待至室溫檢查 pH 是否有異。
- b. 準備容積約為 20ml 的 Hungate tube，秤取 0.02g 的纖維基質，加入 8.5ml 的試劑水，以及 0.5ml 的儲備 buffer。
- c. 將菌體培養基自烘箱取出後，用力搖晃使菌體脫離纖維素，靜置約 1 分鐘使大部分纖維素沉澱，取培養液上層 60ml 菌液。
- d. 將菌液離心（6000g × 5min），棄上澄液留取菌球（pellet）。
- e. 以 0.05M 鈉-檸檬酸緩衝溶液沖洗菌球使之再懸浮，重複步驟 d 兩到三次以去除干擾。
- f. 將菌球以 0.05M 鈉-檸檬酸緩衝溶液定量到 5ml，以超音波細胞粉碎機（Branson, Digital sonifier 450D）在冰浴下打破細胞，其設定如表 3-7。
- g. 將細胞碎片離心（9000g × 10min），以 0.05M 鈉-檸檬酸緩衝溶液清洗並離心（9000g × 10min）兩到三次去除干擾。
- h. 將細胞碎片以 0.05M 鈉-檸檬酸緩衝溶液定量到 1ml 並加入步驟 b 反應管，則得到最終濃度 2g/l 基質，0.05M 鈉-檸檬酸的反應管。
- i. 將反應管置入 65 °C 烘箱反應，依時間點取樣測其還原糖濃度。
- j. 酵素活性(U)定義為每分鐘能產生多少 μg 的還原糖，以 DNS 還原

醱測試法（吳氏, 2006）測得。

表 3-7 超音波細胞破碎儀之設定

On time	Off time	Total on time	Output power
10 sec	20 sec	2 min	41W

第四章 結果與討論

4.1 菌株分離

本實驗從前人採樣自東海大學牧場乳牛糞肥（王氏，2005），經濾紙片（Whatman NO.1）長期馴養的纖維水解菌群中，以滾管技術分離出共計 7 株的嗜熱厭氧纖維水解菌，依編號分別為 strain TCW1、TCW3、TCW4、TCW9、TCW10、TCW11，和 TCW12。根據培養情形來看，各菌株確定可在 55°C 厭氧條件下，包含濾紙的 TA 培養基中生長，並且濾紙在培養約 24 小時之後都有破碎或瓦解的情形出現，研判 7 株菌皆為嗜熱性厭氧纖維水解菌種。

4.1.1 纖維水解菌株能力比較

為了從 7 株嗜熱性厭氧纖維水解菌中，篩選出高效纖維醣化菌株，本實驗以 α -cellulose 作為代表性纖維素基質，在 55°C 下 TA 培養基中分別測量還原醣產生速率與纖維素降解率，以選出纖維醣化能力優秀者。從圖 4-1 來看，取 7 株菌對數時期最大纖維水解率，唯 TCW10 和 TCW12 的速率是略低於其他菌株，但從該結果無法看出明顯的高纖維水解速率者。若從還原醣產生速率（圖 4-2）來看，TCW1 可以達到最大約 72.9 mg/L·hr 明顯超出其他菌株，並且配合纖維水解速率來看 TCW1 也有較好的表現，因此以 strain TCW1 為研究目標菌株。

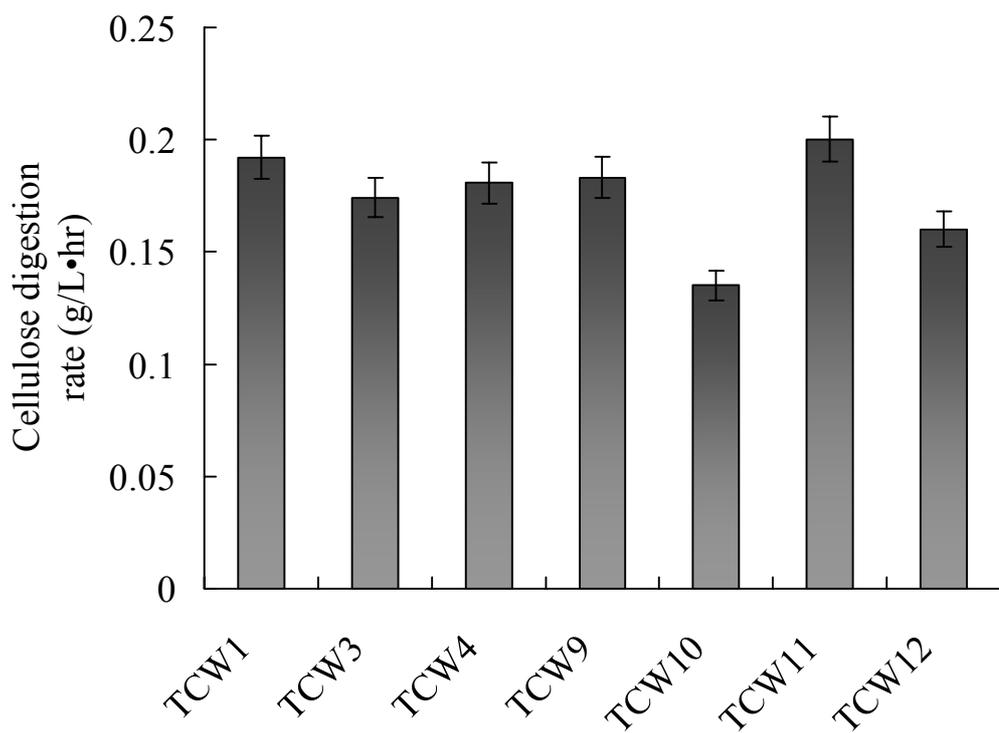


圖 4-1 七株嗜熱厭氧水解纖維菌株的纖維水解速率比較。

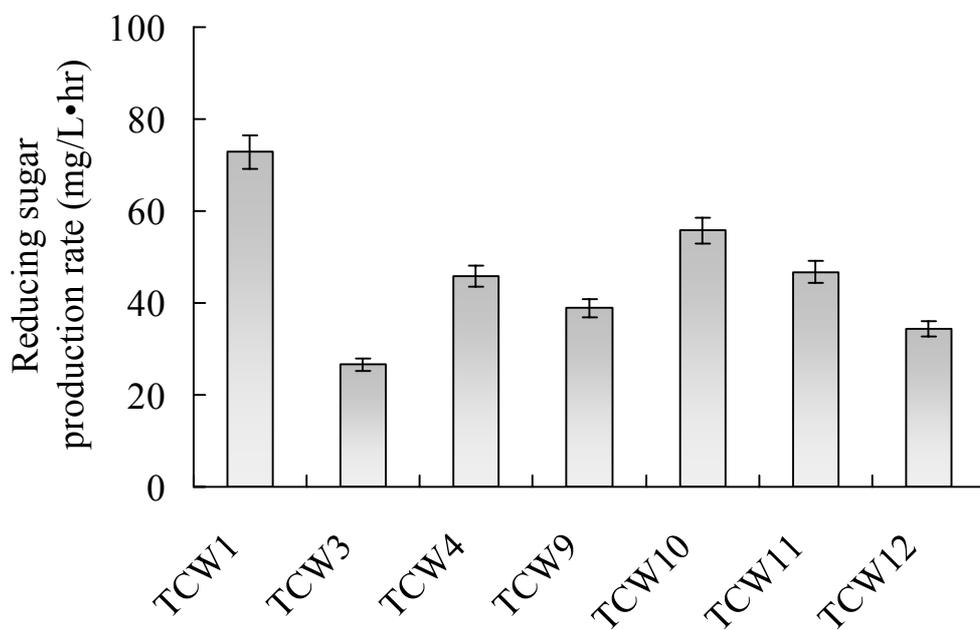


圖 4-2 七株嗜熱厭氧水解纖維菌株的還原糖產生速率比較。

4.1.2 菌落剛果紅染色

在以滾管技術分離纖維水解菌株的過程中，發現到 strain TCW1 可以高效率的水解滾管中的 α -cellulose，在培養約 4 天後能憑肉眼看 出花狀淡黃色菌落產生，而菌落周圍有 clear zone 出現。為了增強結 果的顯像性，拍照前以剛果紅溶液染色纖維素，由於剛果紅可以與多 醣物質結合，所以能看到纖維素被染成紅色，而纖維素被水解後之寡 糖或單醣則不能染上顏色故為無色，其結果如圖 4-3，可看到紅色區 域為纖維素，而菌落周圍 clear zone 則呈現無色。

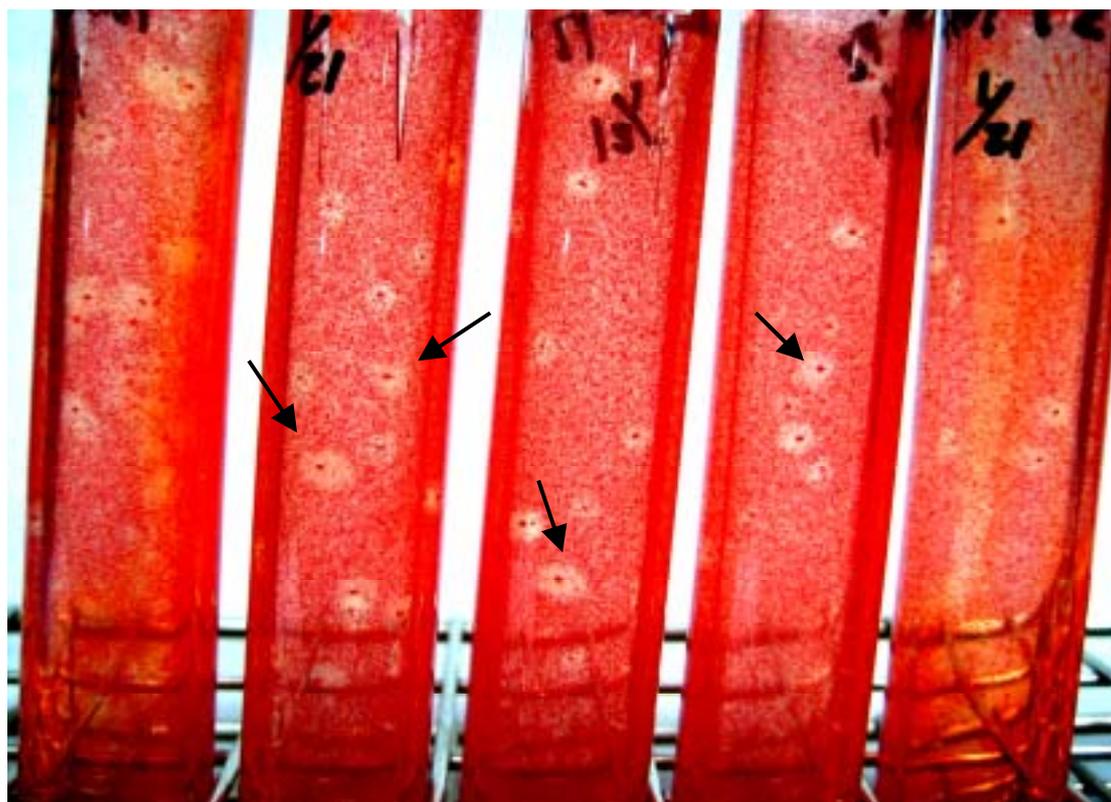


圖 4-3 以 α -cellulose 為基質的 strain TCW1 滾管，經由剛果紅染色顯 像，箭頭標示處淺色區域為降解 α -cellulose 所造成的 clear zone，並 可在中心看到深色的 strain TCW1 菌落。

根據影像結果來看，strain TCW1 相較於發表過纖維水解純菌分離文獻結果，是少有可以讓晶型纖維素在 4-5 天內出現 clear zone 的菌株，除此之外，clear zone 的出現也證明了 strain TCW1 是具有 cell-free 胞外纖維酵素的菌株，並且至少具有外切型纖維酵素，可針對如 α -cellulose、Avicel 這類晶型纖維素進行水解。

4.2 分子生物法鑑定

4.2.1 DNA 萃取與 16S rDNA 擴增

本實驗自 strain TCW1 萃取之 total DNA，以梯度聚合酶連鎖反應對 16S rDNA 進行擴增，同時尋找最佳引子 annealing 溫度以提升反應專一性，最後利用洋菜膠核酸電泳選定較優良之 PCR 產物送交定序。根據圖 4-4 結果，可看到 strain TCW1 之 total DNA band 由於分子量巨大而位於電泳膠上方，其餘 band 為梯度 PCR 產物，主要片段大小對照於 marker 都位於 1500 bp，然而 annealing 溫度在 58.0, 57.6 °C 時都沒有明顯的 PCR 產物出現，推斷是超出引子能承受的反應溫度，而 1500bp 的片段在較低溫之後始被擴增，但考量引子在高溫時專一性較佳，以及除了主要片段的雜訊多寡，選擇編號 5 的 PCR 產物 (annealing 溫度 = 57.0°C) 作為後續定序片段。

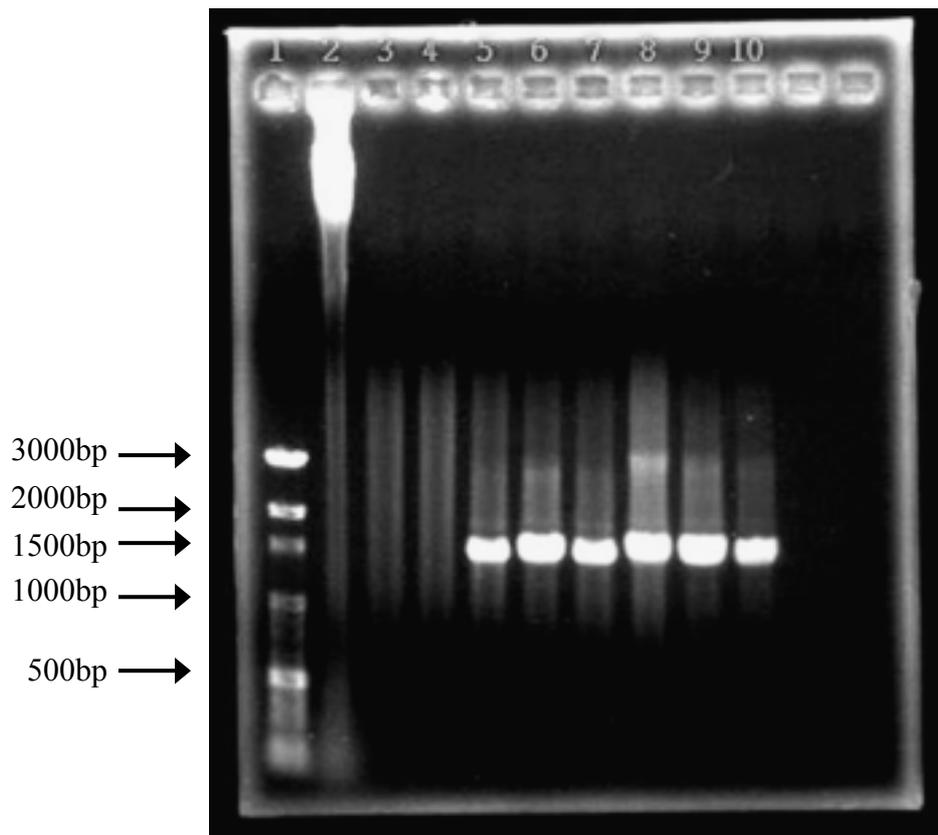


圖 4-4 Strain TCW1 的 total DNA (Lane 2) 以及梯度 PCR 產物片段 (Lane 3-10) 的洋菜膠核酸電泳影像，其 PCR annealing 溫度由編號 3-10 分別為: 58.0, 57.6, 57.0, 56.0, 54.8, 53.9, 53.3, 和 53.0 °C，核酸 marker (Lane 1) 片段如圖所示。

4.2.2 親緣樹分析

透過定序公司的序列分析，將核酸定序結果經由本實驗室之序列軟體處理，讓兩端序列結合為一，並與 *NCBI* 的生物資料庫比對，得到相似度高之菌株 16S rDNA 序列，最後以 *MEGA 4* 軟體繪製親緣樹圖，其結果如圖 4-5 所示。根據親緣樹分析，可看到與 strain TCW1

最接近菌株為 *Clostridium thermocellum* 標準菌株 DSM 1237 (DSM 1237=ATCC 27405=JCM 12338=NCIB 10682)，而根據 *NCBI* 比對 16S rDNA 相似度最高為 96%，一般認為新種菌株 16S rDNA 相似度應介於 98% 之下，由此結果來看，strain TCW1 有可能為新種菌株，後續可以 DNA-DNA 雜合確立。Strain TCW1 16S rDNA 序列已上傳於 *NCBI* 資料庫，accession 編號為 EU916270 (附錄八)。

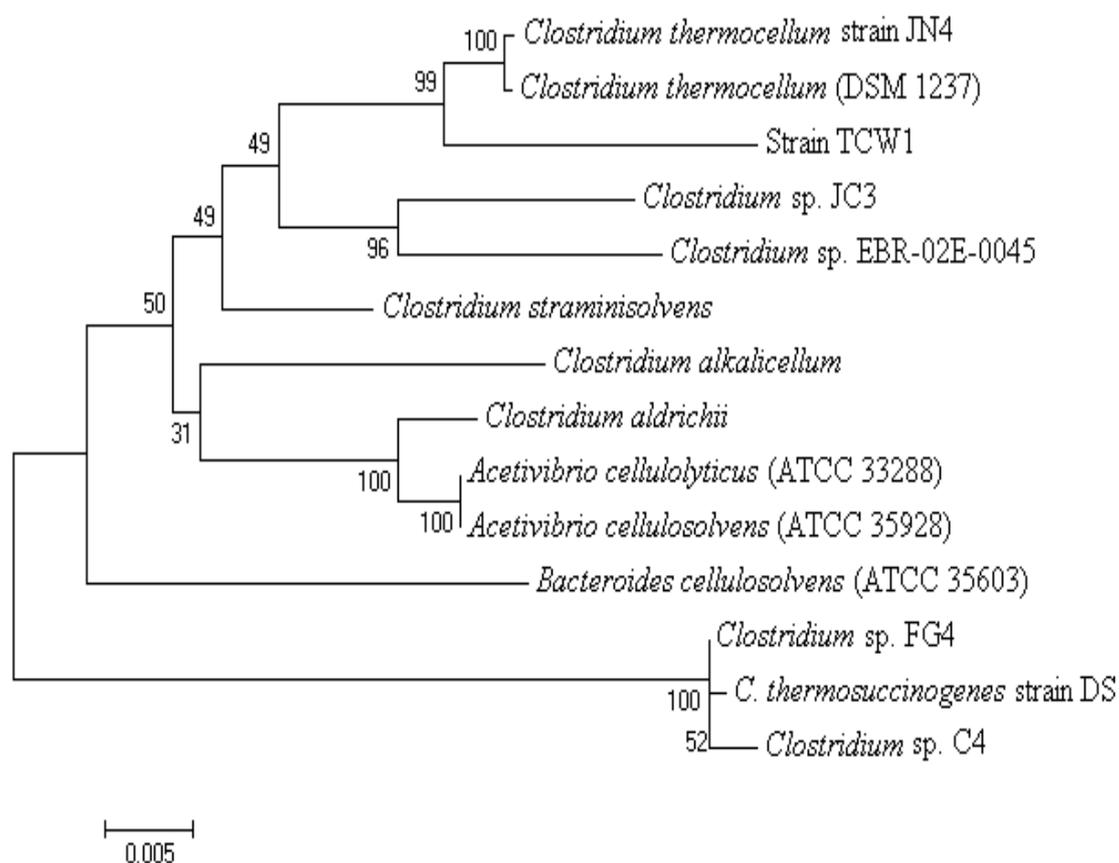


圖 4-5 Strain TCW1 16S rDNA 親緣樹分析圖，bootstrap number 為 500，下方的 bar 代表了 5 substitutions per 100 nucleotides。

4.2.3 DNA-DNA 雜合

此實驗利用核酸雜合技術，比對未知菌株與標準菌株的染色體 DNA，用以確定兩株菌 DNA 相似程度，相較於只利用 16S rDNA BLAST 將更具有意義性。將 strain TCW1 與從菌種保存中心取得之 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 標準菌株，以 DIG DNA labeling and Detection Kit 先將 *C. thermocellum* 的 total DNA 製作為探針，並與套件所附之 control DNA 進行雜合以定量探針，所得點圖結果如圖 4-6，可由 control DNA 濃度推算求得探針量為 457.8 ng。

將成功製作之探針與 *C. thermocellum* 以及 strain TCW1 進行雜合，其點圖結果如圖 4-7，再以掃描機擷取圖檔，並以軟體分析各點色度，做出回歸線，結果如圖 4-8。若根據點分布示意圖[見圖 3-3 (B)] 可發現，某些點色度與濃度稀釋未相符合，推測是在將 DNA 加熱變性時，由於溶液體積太小造成蒸發而濃度不均所造成，色度回歸線圖以去除明顯誤差點所繪出，結果可得兩回歸線分別為 *C. thermocellum* 與本身探針的雜合，以及 strain TCW1 與 *C. thermocellum* DNA 探針雜合，斜率各為 4707、3956 luminance/ng DNA，比值為 0.84，可得知兩菌株染色體 DNA 相似度為 84%，未有足夠證據顯示 strain TCW1 為新種菌。

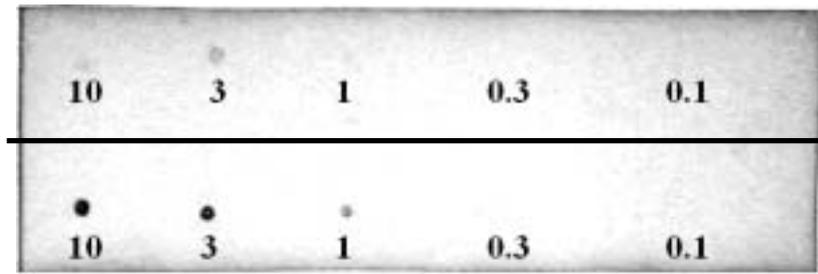


圖 4-6 Labeling efficiency 經呈色後之點圖，上列為探針與 control DNA 雜合，下列為探針與 *C. thermocellum* DNA 雜合，數字為該點漬之核酸量，可由色度比值推得探針總量為 457.8 ng。

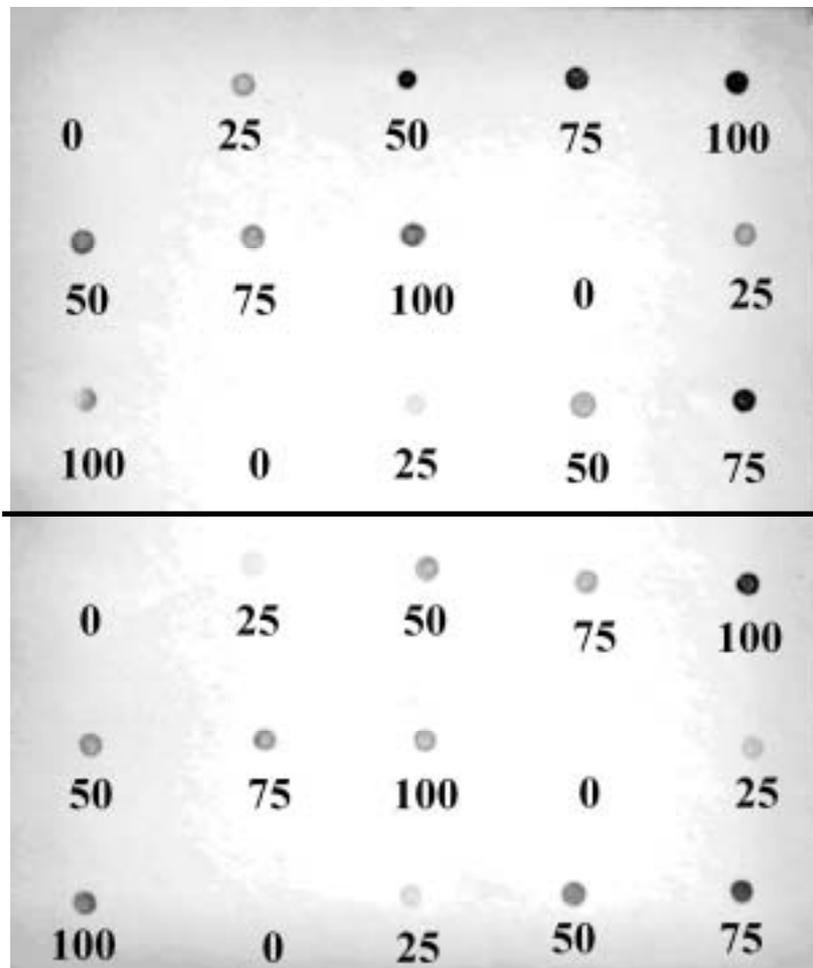


圖 4-7 DNA-DNA 雜合經呈色後之點圖，上方三列為為 *C. thermocellum* 與本身探針的雜合，下方三列為 strain TCW1 與 *C. thermocellum* DNA 探針雜合，數字為點漬核酸量。

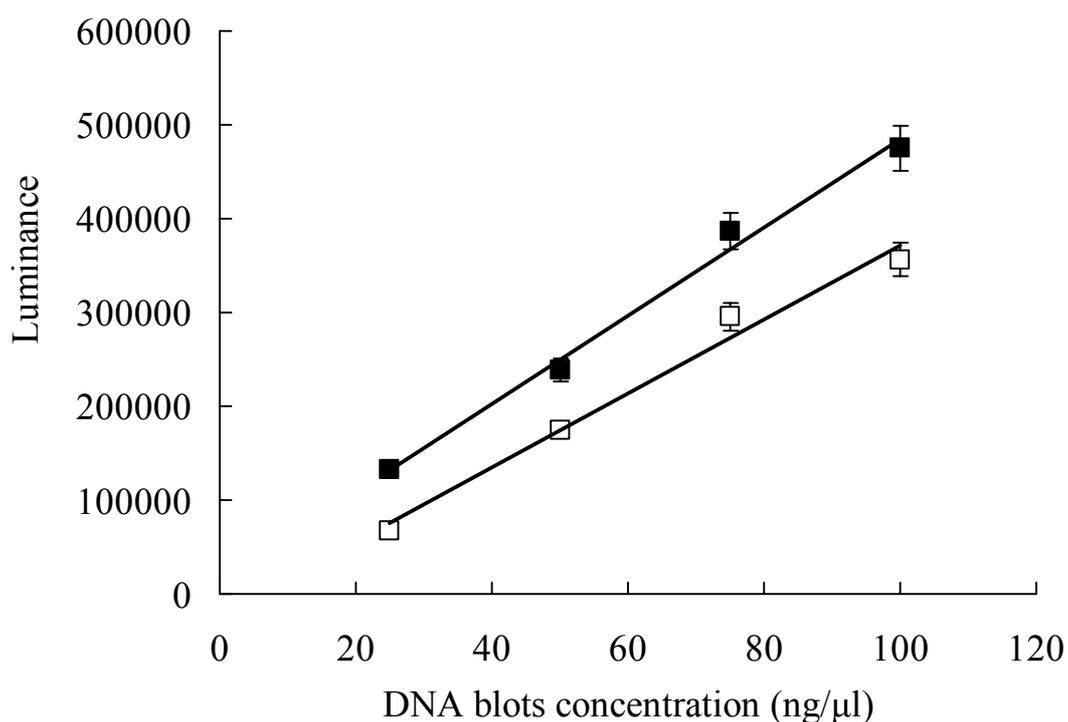


圖 4-8 DNA-DNA 雜合點漬色度回歸線圖，可得 *C. thermocellum* 與本身探針雜合 (■) 斜率為 4707 luminance/ng DNA，strain TCW1 與 *C. thermocellum* DNA 探針雜合 (□) 斜率為 3956 luminance/ng DNA，可得兩菌株相似度為 84 %。

4.3 菌株型態與生化特性

4.3.1 菌相觀察

就培養外觀來看，strain TCW1 的培養液呈現淡黃色，若是以固態纖維素基質培養之下，也可以在細胞對數生長期之後看到纖維素或濾紙表面有淡黃色產生。

Strain TCW1 以纖維二糖 TA 培養基培養至對數生長期後，利用

磷鎢酸進行負染色，經由穿透式電子顯微鏡觀察細胞型態，結果如圖 4-9 所示，菌體呈現長桿狀、微彎，菌體周圍沒有任何鞭毛。

位相差顯微鏡可以直接觀察菌體細胞在液態培養時之菌相狀況，而不須經染色步驟，對於了解菌相來說，破壞性及干擾性相對較少。本實驗利用位相差顯微鏡，觀察菌體細胞在纖維二糖或纖維素基質環境下之菌體，結果如圖 4-10 所示。圖 4-10 a, b, c, d 為 strain TCW1 培養在纖維二糖 TA 培養基中，對數生長期的情形，可見到菌體細胞呈長桿狀、微彎，並且細胞間往往互相黏接（圖 4-10 a, b），偶爾在細胞尖端有內孢子產生（圖 4-10 c, d）。圖 4-10 e, f 為菌體培養在 α -cellulose TA 培養基之情形，兩張照片中心亮光區域為固態的纖維素結晶，並可看到在顯微鏡下呈現黑色長條狀之 strain TCW1 細胞附著於纖維素表面，圖中亦可見到內孢子的產生。

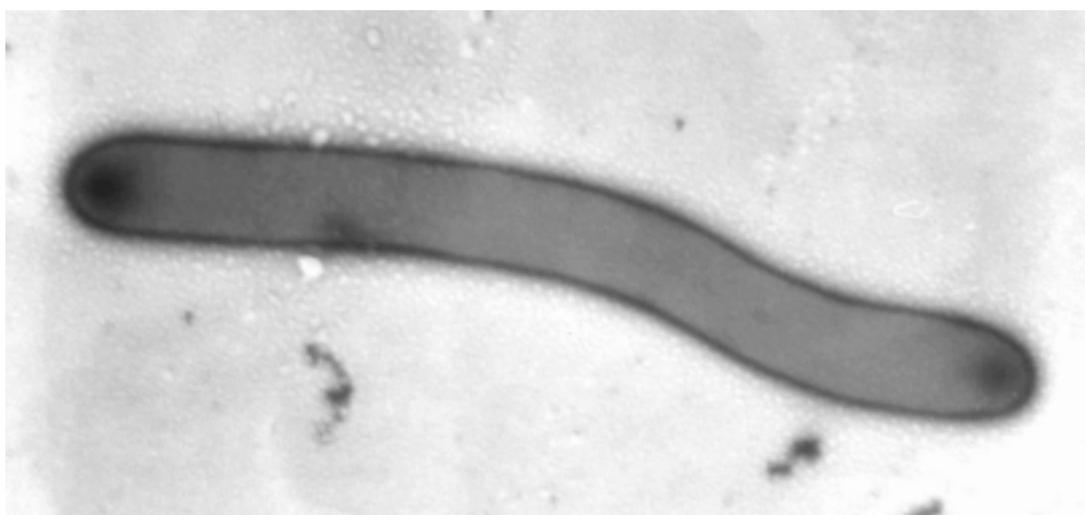


圖 4-9 Strain TCW1 細胞的穿透式電子顯微鏡照片 (x 20,000)。

從圖 4-10 e, f 結果可證實 strain TCW1 有如同前人所述的 *C.*

thermocellum 一般可以趨向固態纖維並附著於表面 (Desvaux, 2005)。

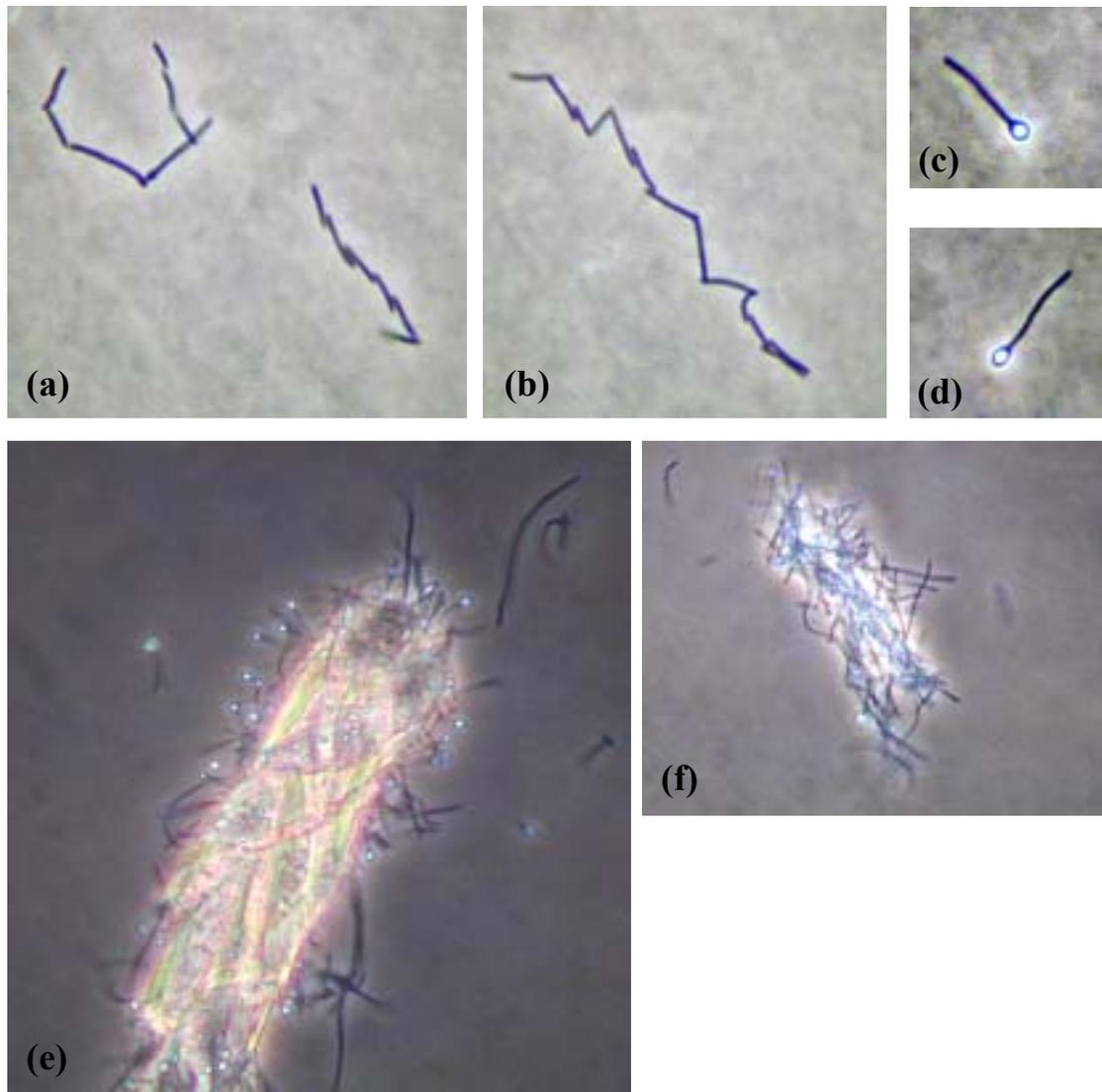


圖 4-10 以位相差顯微鏡拍攝 Strain TCW1 細胞在纖維二糖(a, b, c, d)或固態纖維素(e, f)為基質的 TA 培養基中細胞生長情況，細胞往往互相黏接成長鏈狀(a, b)，少數細胞尖端有內孢子產生(c, d)。若是培養於 α -cellulose 培養基中，則細胞會附著於纖維素表面。

4.3.2 革蘭氏染色

革蘭氏染色是種辨識細胞壁結構的傳統染色法，在細菌的分類上也具有一定意義性。根據 *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* 所描述 (Sneath *et al.*, 1986)，*Clostridium* 屬一項主要特性即為革蘭氏陽性，然而根據試驗結果卻發現，無論是自菌種中心取得之 *C. thermocellum* 標準菌株或是 strain TCW1，在以纖維二糖或是 α -cellulose 為基質的 TA 培養下，比對於 nutrient broth 中的 *Escherichia coli* 及 *Staphylococcus aureus* 兩組對照組，結果皆呈現革蘭氏陰性。

在許多前人的文獻方面，都將 *C. thermocellum* 定義為革蘭氏陽性菌 (Béguin *et al.*, 1985)，然而也有不少文獻有著相反的實驗結果，有文獻曾比較三株來自不同環境的 *C. thermocellum*，結果顯示皆為革蘭氏陰性 (Ng *et al.*, 1977)；也有文獻說明，*C. thermocellum* 染色結果為革蘭氏陰性，卻在電子顯微鏡觀察下細胞壁為陽性型態 (Reynolds *et al.*, 1986)；而根據 *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath *et al.*, 1986)，*C. thermocellum* 也在 PYG medium 培養下定義為革蘭氏陰性菌株。

由以上文獻以及本實驗結果可知，*C. thermocellum* 以及 strain TCW1 在不同培養條件下或許將造成其細胞壁結構改變，可能因此造成革蘭氏染色結果差異，然而根據文獻，認為 *C. thermocellum* 為陽

性反應者，似乎未見有實際測試，皆為引用他人文獻；然而有實際進行測試者，皆說明實驗結果為陰性，就此現象也許可推論 *C.*

thermocellum 確實為 *Clostridium* 這屬菌中的特例。

4.3.3 環境因子對生長之影響

對於細菌來說，溫度與 pH 對於生長有著直接的影響，本實驗為了檢測 strain TCW1 在較佳的醱化條件時細胞生長的概況，以對往後 strain TCW1 在進行醱化應用時有所依據。實驗時先以不同溫度下以 α -cellulose 為碳源之 TA 培養進行測試，並以細胞計數器定量細胞生長，結果如圖 4-11 所示，顯示 strain TCW1 從 55 °C 一直到 65 °C 有較高的比生長速率，然而這之間不會有太大的影響，平均約可得比生長速率為 1.5 day⁻¹，最高為 60 °C 下，比生長速率為 1.6 day⁻¹。

pH 對 strain TCW1 比生長速率的影響，是以改變培養基中既有成分 NaHCO₃ 來調整鹼度，由於培養瓶頂空間填充有部分 CO₂，因此可造成培養基不同起始 pH，而測試時由於為符合較佳醱化溫度，故以 65 °C 條件下測試（見章節 4.4.1），其結果如圖 4-12。可看到在以 α -cellulose 為碳源之 TA 培養下，pH 約在中性微酸是較符合 strain TCW1 細胞生長的，就本實驗結果來看，pH 對 strain TCW1 生長影響頗大，在最高點生長速率 pH 6.4 的兩邊比生長速率都差異甚遠。相較於之前文獻，*C. thermocellum* 有較寬的 pH 耐受性約 6.1-7.5，相較

之下 strain TCW1 喜好微酸性環境，並且受 pH 變動影響較大。

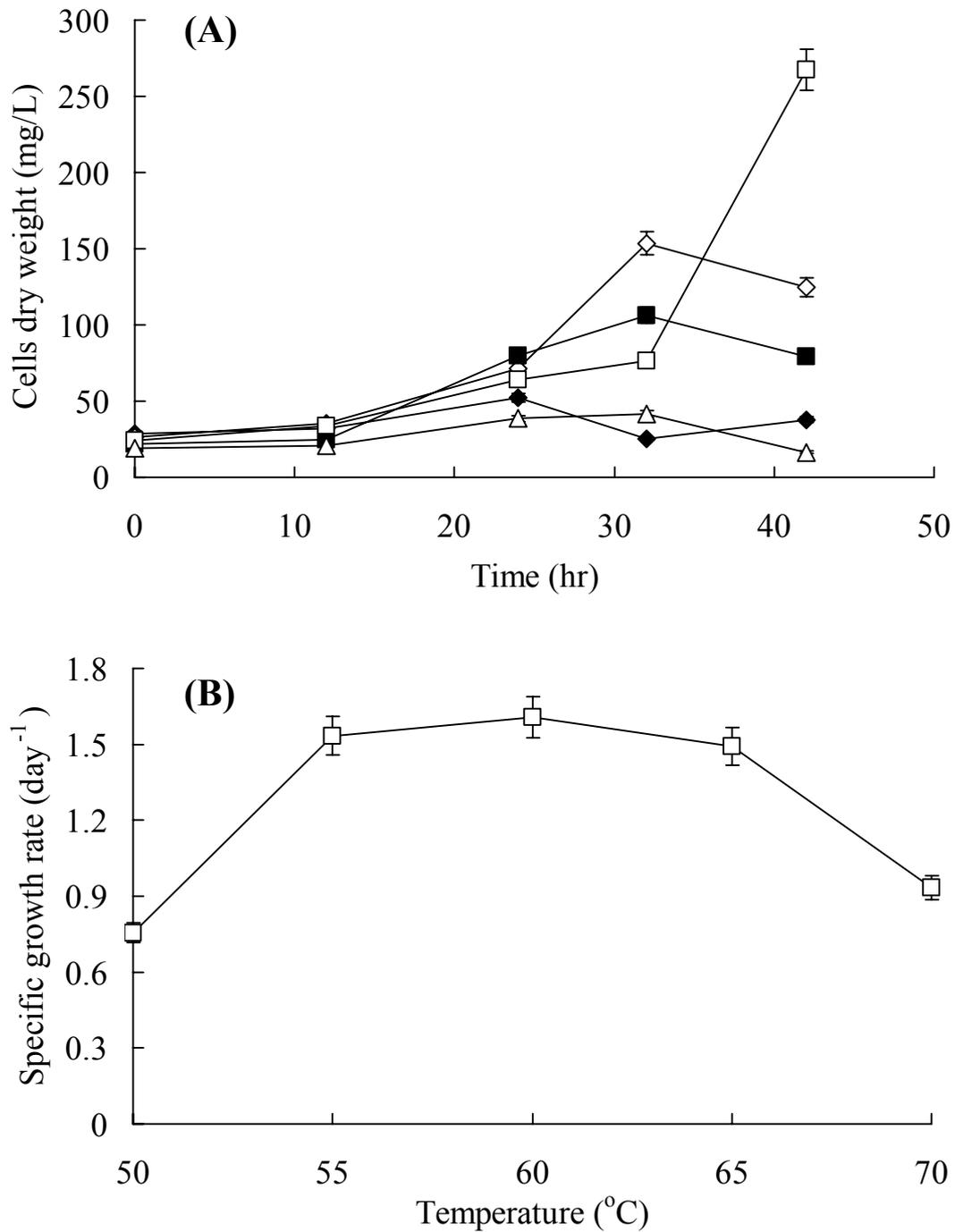


圖 4-11 不同溫度下 strain TCW1 之比生長速率。(A) 細胞以 α -cellulose 為唯一碳源，分別培養在 50 (◆)、55 (◇)、60 (■)、65 (□)、70 °C (△) 下，細胞生長以細胞計數器直接定量。(B) 經由上述生長曲線之對數生長期，所換算之各溫度培養下比生長速率。

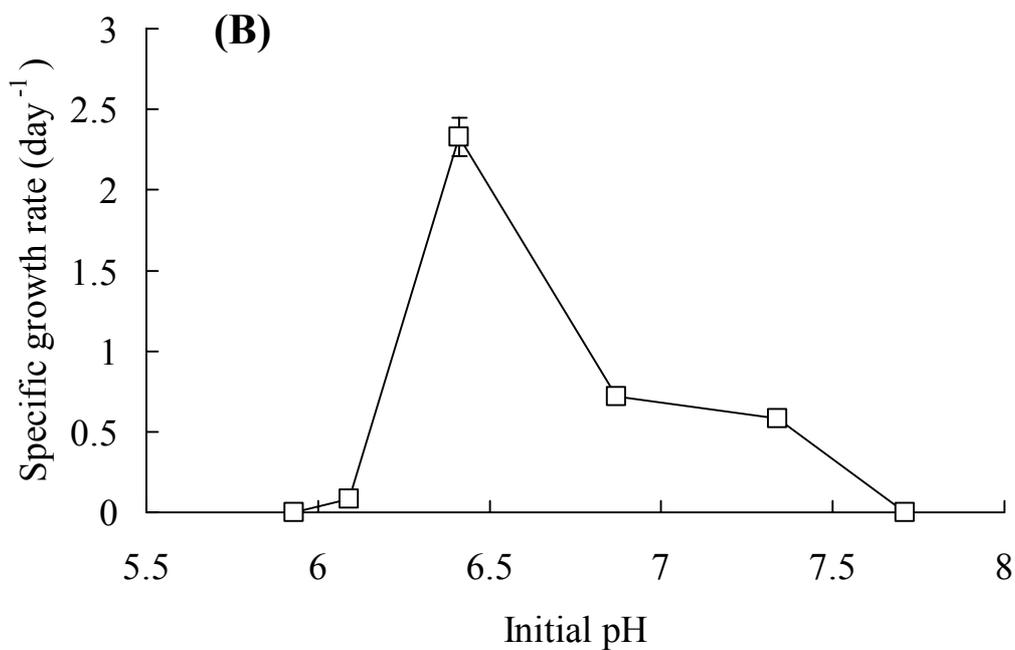
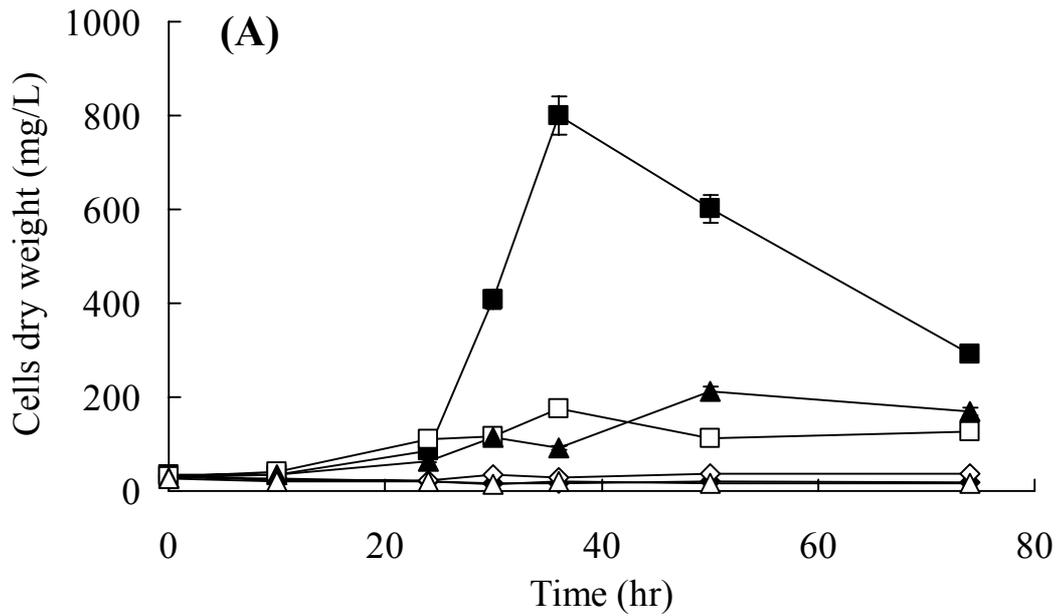


圖 4-12 不同起始 pH 下 strain TCW1 之比生長速率。(A) 細胞以 α -cellulose 為唯一碳源，分別培養在起始 pH 5.93 (◆)、6.09 (◇)、6.41 (■)、6.87 (□)、7.34 (▲)、7.71 (△) 下，細胞生長以細胞計數器直接定量。(B) 經由上述生長曲線之對數生長期，所換算之各起始 pH 培養下比生長速率。

4.3.4 可利用碳源測試

本實驗以多種醣類為基質，並以來自菌種中心 *C. thermocellum* ATCC 27405 以及 strain TCW1 分別進行測試，在各式碳源下比生長速率如圖 4-13 所示，並依多醣、雙糖、單醣區分為 3 類。根據實驗結果，strain TCW1 以及 *C. thermocellum* 在經過三次的測試碳源繼代培養後，的確有部份碳源是需要適應，或是誘導才能加以利用的現象，此現象同於許多前人文獻的描述 (Patni and Alexander, 1971; Weimer and Zeikus, 1977)。根據本研究實際測試結果，只有 xylan、CMC、cellobiose 對於 strain TCW1 和 *C. thermocellum* 是不需要適應期，而可以在第 1 次轉植時細胞就有良好的生長；相較之下，maltose、salicin、glucose 則都需要 2-3 次的轉植適應之後，細胞才有明顯生長。從圖 4-13 兩菌株比生長速率來看，定義比生長速率小於 0.01 hr^{-1} 者為無法利用 (—)，介於 $0.01 \sim 0.05 \text{ hr}^{-1}$ 者為些微利用 (±)，大於 0.05 hr^{-1} 者為可利用 (+)，而匯整後可得表 4-1。可見到 strain TCW1 與 *C. thermocellum* 在碳源利用比較上，mannose 可被 strain TCW1 利用而 *C. thermocellum* 不行；而 fructose 則是反之可被 *C. thermocellum* 利用但是 strain TCW1 不行，兩菌株的生化特徵差異性可由此窺見。然而相較於之前研究 *C. thermocellum* 似乎可在適應之後利用 xylose，然而在本實驗結果中兩株菌在 3 次適應轉植後皆對 xylose 無反應。

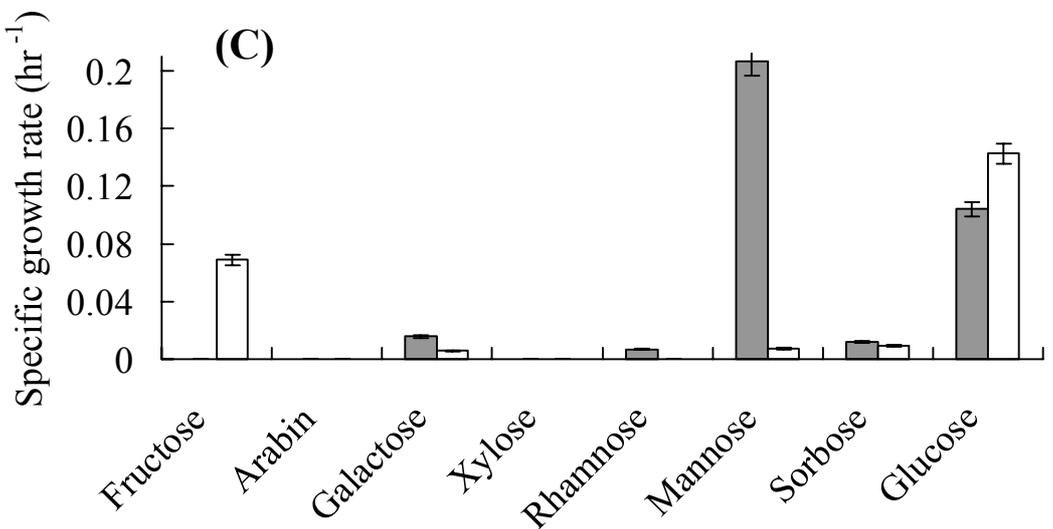
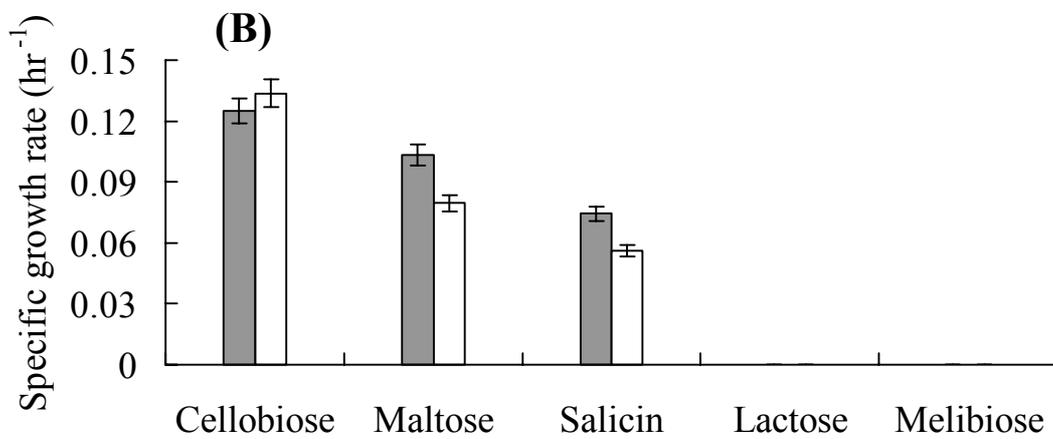
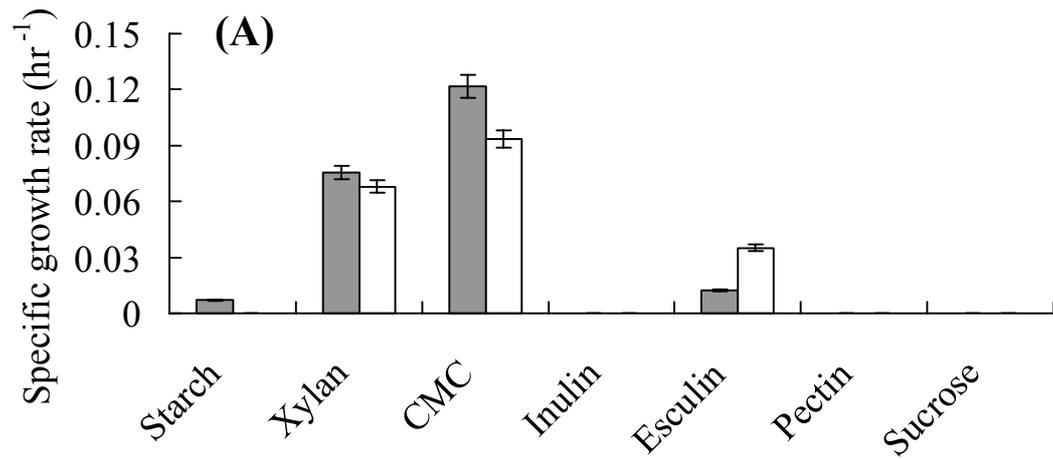


圖 4-13 以各式醣類作為碳源培養 strain TCW1 (灰) 以及 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 (白) 之比生長速率，(A) 為多醣，(B) 為雙糖，(C) 為單醣類。

表 4-1 以各式醣類作為碳源比較 strain TCW1 以及 *Clostridium thermocellum* 之可利用性

Carbon source	Strain TCW1	<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405
Polysaccharide		
Starch	—	—
Xylan	+	+
CMC	+	+
Inulin	—	—
Esculin	±	±
Pectin	—	—
Sucrose	—	—
Disaccharide		
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Salicin	+	+
Lactose	—	—
Melibiose	—	—
Monosaccharide		
Fructose	—	+
Arabin	—	—
Galactose	±	—
Xylose	—	—
Rhamnose	—	—
Mannose	+	—
Sorbose	±	—
Glucose	+	+

+ : Positive, specific growth rate $> 0.05 \text{ hr}^{-1}$; ± : Weak, specific growth rate between 0.01 to 0.05 hr^{-1} ; — : Negative, specific growth rate $< 0.01 \text{ hr}^{-1}$.

4.3.5 纖維素附著測試

在培養 strain TCW1 過程中，發現 strain TCW1 細胞生長進入對數期之後，容易蓄積在纖維素上並造成沉澱現象，推測為細胞附著於纖維素細絲表面，並相互聚集而加速沉澱，因此嘗試以濾紙代表纖維素，塑膠 PP 片代表非纖維素物質，測試 strain TCW1 以及 *C.*

thermocellum 對兩類物質的附著程度，其結果如圖 4-14 所示。

根據實驗結果，strain TCW1 以及 *C. thermocellum* 都具有快速附著於纖維素物質的能力。Strain TCW1 在預熱至 65 °C 的培養基中，經過 5 分鐘已有約 10 % 的細胞附著在濾紙表面，最後在 2 小時後就達到 35 %。而從附著百分比來看，strain TCW1 平均略高於 *C.*

thermocellum，最後附著百分比停留在 25-35 %，推測原因為濾紙表面已不足以提供更多細胞吸附位置而持平，亦或是細胞附著與脫落速率達到平衡。而以塑膠片替代濾紙片的實驗組可發現到，兩株菌對於塑膠片表面完全沒有親合現象，細胞始終懸浮於培養基中而黏不上塑膠材質，證明 *C. thermocellum* 和 strain TCW1 不但會附著於物質表面，而且還是專一性的針對纖維素。雖然實驗中並沒有嘗試多種其他非纖維性材質，但藉由此實驗還是可推論，此類瘤胃中纖維水解細菌擁有這種針對可用基質的專一附著特性，相較於非專一性附著（如：倚靠 extracellular polymeric substances, EPS）生物，可以在真實環境

中更利於接近纖維素而高效率的獲取養分，取得族群優勢。

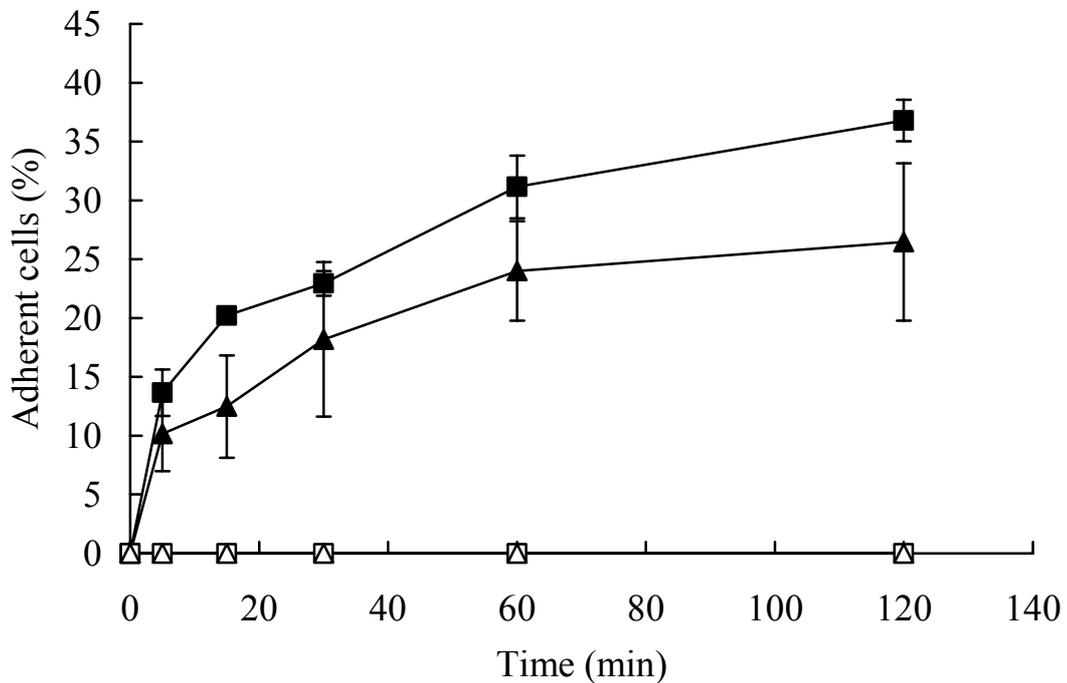


圖 4-14 Strain TCW1 (方形) 以及 *C. thermocellum* (三角形) 對濾紙 (實心) 以及 PP 片 (空心) 附著能力測試。

4.3.6 培養液相產物分析

以本實驗室之 TA 培養基配以 10g/L α -cellulose 為基質，採用培養條件為結果 4.4 章節所描述的適合醱化環境 (65 °C、pH 6.8)，strain TCW1 培養產物層析圖譜為實驗最終 52 小時之採樣點，其結果如圖 4-15，而各時間點監測液相產物濃度如圖 4-16。從層析圖來看，strain TCW1 主產物同於前人文獻 (Freier, 1988) 所描述之 *C. thermocellum*，為纖維二糖、葡萄糖、乳酸、乙酸、乙醇。在圖譜上的 peaks No. 3

以及 No. 5 尚未解明為何種產物，但可根據其停留時間，推測為類纖維二糖和葡萄糖類代謝衍生物，因結構近似而 peak 相連。而在水解固態纖維素後，產生的溶解性纖維寡糖則位於 peak No. 1 之中，然而因包含培養基中鹽類，故無法定量之。

根據圖 4-16 結果，strain TCW1 的產物是伴隨著細胞生長而產出，並伴隨著纖維素濃度的下降，除了乙酸截至 32 小時後始被監測到，約在 6 小時之後細胞進入對數期之後，各式產物都開始有濃度上升的現象，到了 26 小時後細胞進入穩定期，而同時纖維二糖及乳酸也開始趨緩。以轉換率來說，此批次實驗消耗掉約 5.24 g/L 的纖維素，共有 4.92 g/L 的總溶解糖以及 3.31 g/L 還原糖產出，其中有纖維二糖 1.19 g/L、葡萄糖 0.64 g/L，而最終產物方面則各有乙酸 0.32 g/L、乳酸 0.20 g/L、乙醇 0.63 g/L。

本結果可看出 strain TCW1 以纖維素進行共醱化醱酵 (SSF) 時，絕大部分的纖維素都被轉化為總溶解糖 (93.9 % 轉化百分比) 殘留在培養液中，扣除掉纖維二糖及葡萄糖，尚有約 3 g/L 的寡糖在培養液中，而平穩期細胞量也只達約 60 mg/L，最終產物方面乙醇量則略高於乙酸或乳酸。

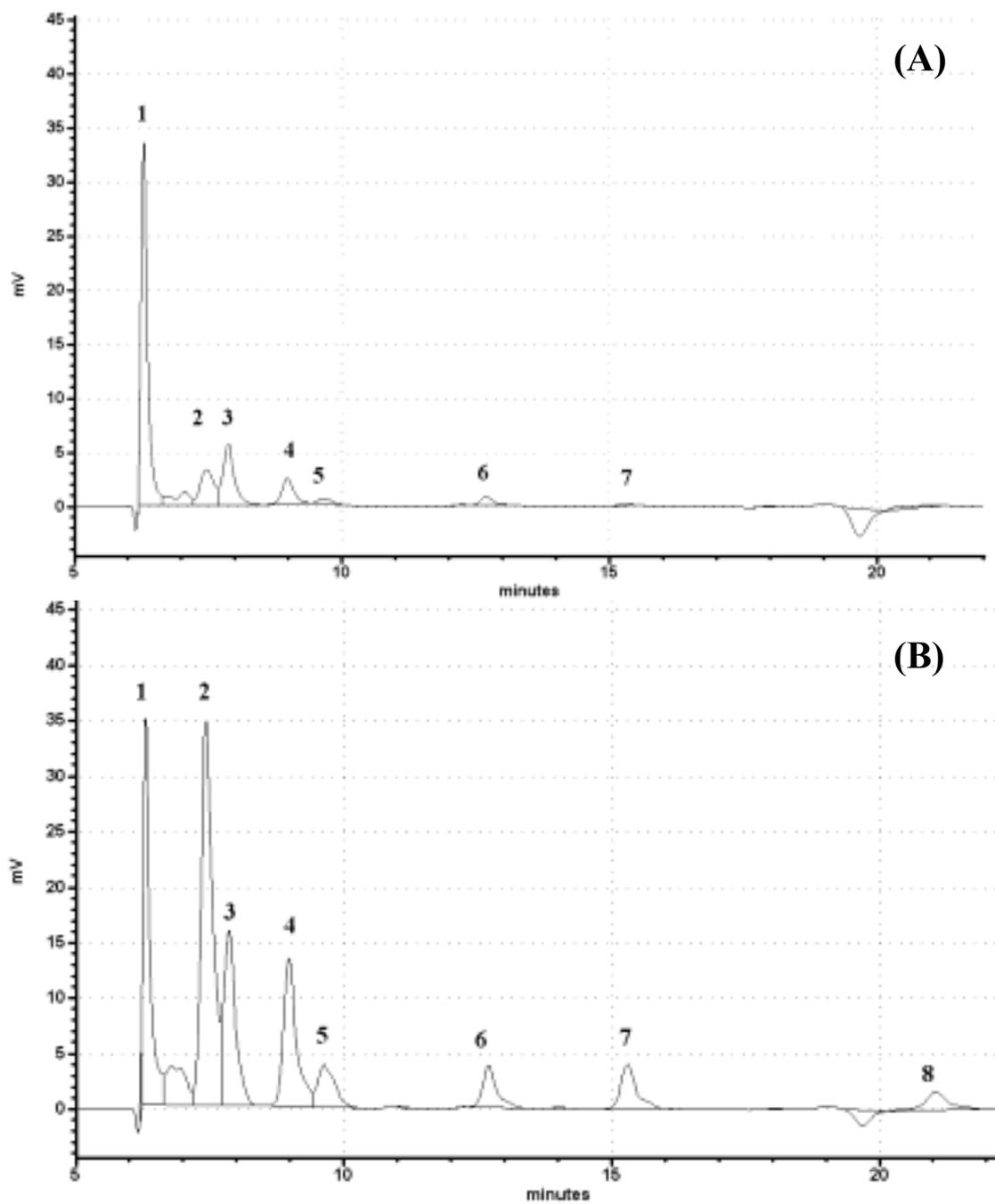


圖 4-15 Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應之培養 0 小時 (A) 以及 52 小時 (B) 之 HPLC 層析圖譜，各式產物包括纖維二糖 (2)、葡萄糖 (4)、乳酸 (6)、乙酸 (7) 和乙醇 (8)，圖譜中亦包含未解明之醣類衍生代謝物 (3, 5) 以及包含可溶性寡糖和培養基鹽類的 peak (1)。

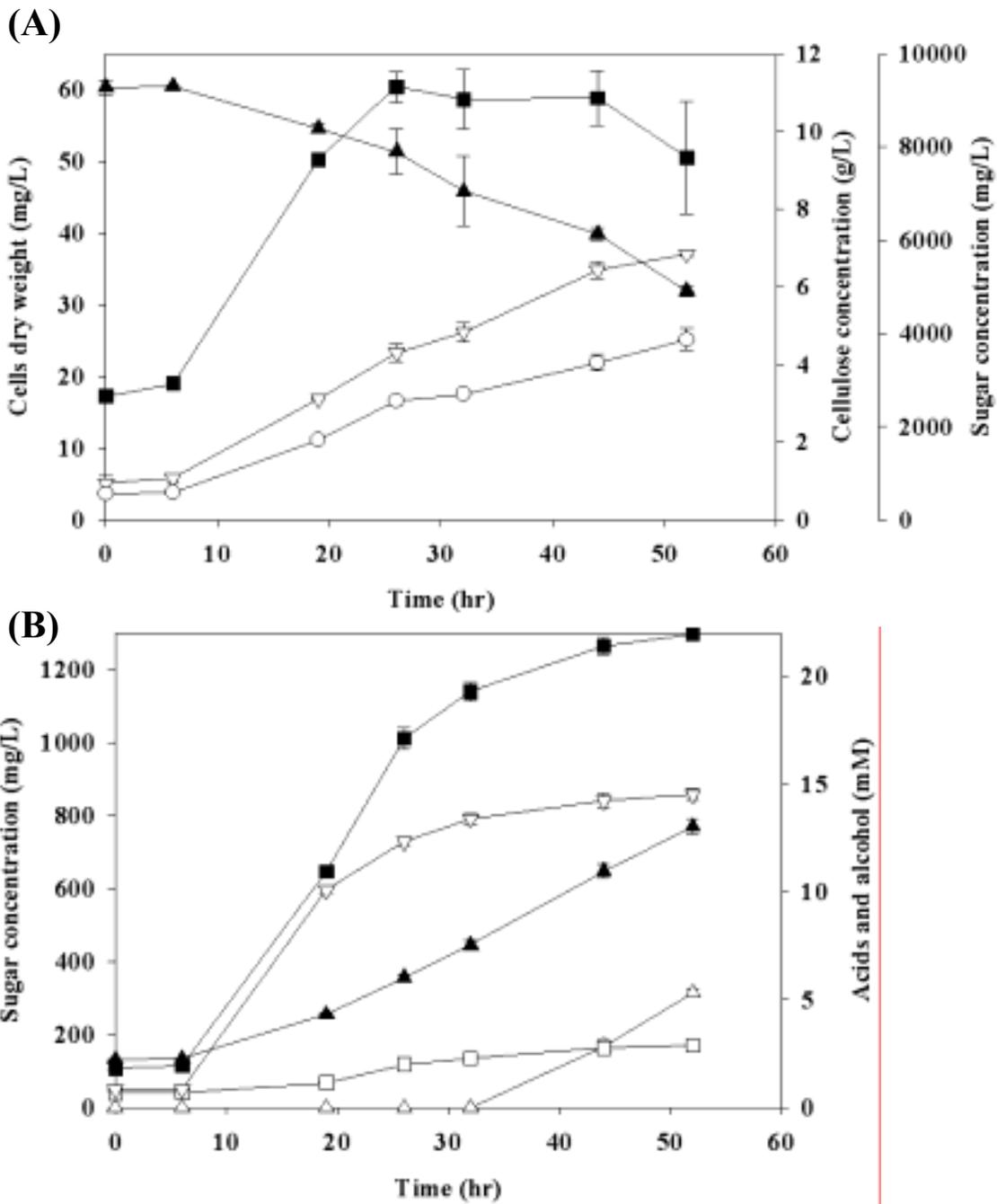


圖 4-16 Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應各式產物濃度圖。(A)為細胞生長 (■) 以及纖維素濃度下降 (▲)，並伴隨總溶解糖 (▽) 及還原糖 (○) 上升。(B)為層析監測之纖維二糖 (■) 及葡萄糖 (▲)，以及最終產物包括乙酸 (△)、乳酸 (□) 和乙醇 (▽)。

4.3.7 培養氣相產物分析

以批次培養方式，針對 strain TCW1 對纖維素 SSF 反應產生之生物氣 (Biogas) 進行調查，採用監測點排水集氣方式記錄其生物氣產量以及分析氫氣濃度，其結果如圖 4-17 所示。在一開始的 6 小時雖然已有約 330 ml/L liquid 的生物氣產出，但卻幾乎不含氫氣，推測主要以 CO₂ 為主，之後氫氣以 2.2 ml/L liquid·hr 的速率伴隨著 CO₂ 產出，並且每天的氫氣產生濃度逐漸上升，而約在 44 小時之後細胞停止產生生物氣。

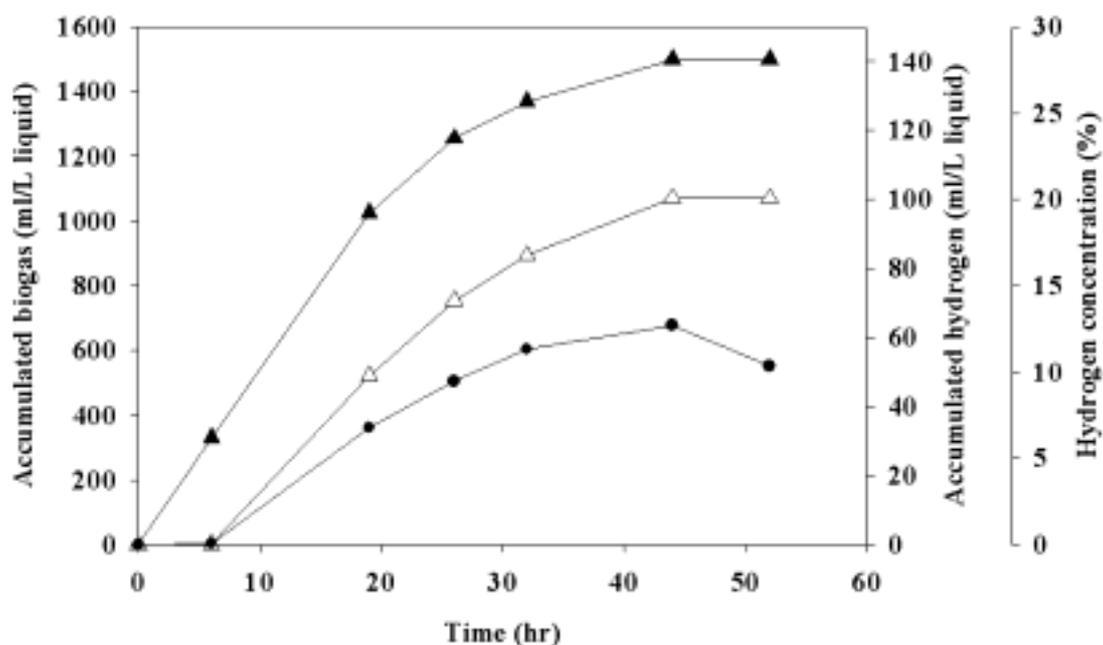


圖 4-17 Strain TCW1 以纖維素進行 SSF 反應之氣體產物圖，生物氣累積為各時間點釋放生物氣以排水集氣法測量後累計量，並藉由各點氫氣濃度推算累積氫氣產量。各點標示分別為累積生物氣產量 (▲)、累積氫氣產量 (△) 和氫氣濃度 (●)。

4.4 纖維素醱化能力分析

4.4.1 溫度因子

本實驗在不同培養溫度之下，比較 strain TCW1 的還原醱產生速率，以了解溫度對纖維素醱化反應之影響，其結果如圖 4-18 所示，可以看出 strain TCW1 的醱化反應對溫度的變動是相當敏感的，若相較於溫度對細胞生長影響結果（圖 4-11），細胞在 55-65 °C 下生長並無太大差異，而從醱化速率來看則在 65 °C 下有最大之還原醱產生速率，速率相差可達 60 °C 的 3 倍左右。從趨勢來看，自 45 °C 之後始有明顯的還原醱產率，逐漸上升到 65 °C 後，到 70 °C 已經沒有還原醱的產出，但細胞卻還有生長現象（圖 4-11），推測是纖維酵素已超過反應溫度而失活，而藉由此實驗可以決定之後的培養反應溫度為 65 °C。

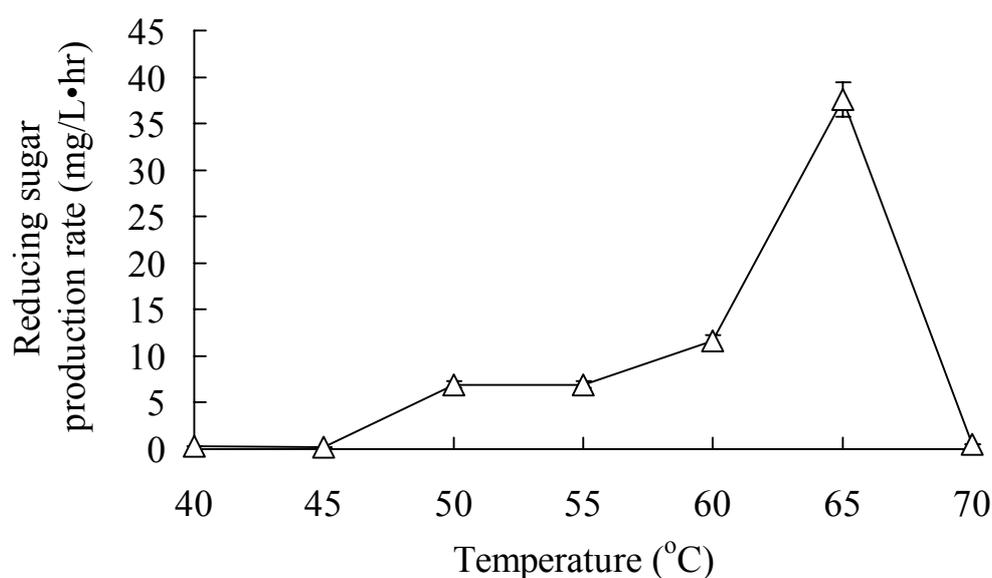


圖 4-18 不同培養溫度對還原醱產生速率的影響。

4.4.2 pH 因子

本實驗以調整培養基中鹼度 NaHCO_3 來改變培養基起始 pH，分別測試不同起始 pH 下纖維素醱化速率，並以還原糖產生速率代表之，其結果如圖 4-19，可以看到介於 pH 6.4-6.9 之間有較佳的還原糖產生速率，相較於 pH 對細胞生長影響，strain TCW1 在 pH 6.4 有一比生長速率的高峰（圖 4-12），而對醱化來說似乎影響較為緩和，pH 6.4-6.9 兩時間點並無太大差異，約可達 $50 \text{ mg/L}\cdot\text{hr}$ 。

結果顯示，strain TCW1 的生長以及醱化反應都是偏好弱酸環境，往後的試驗可以選用原本的鹼度添加量（ 4g/L ）來配置培養基，可達到約起始 pH 6.9。

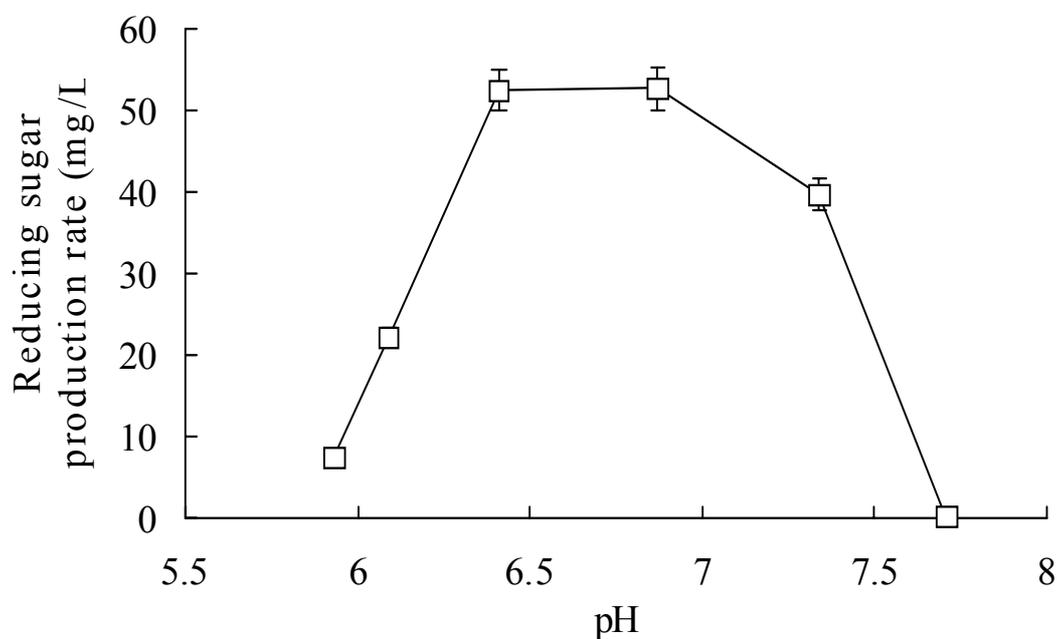


圖 4-19 不同起始 pH 對 strain TCW1 還原糖產生速率的影響。Strain TCW1 以 10 g/L 纖維素為基質，在 65°C 下培養。

4.4.3 基質濃度

本實驗以不同濃度之纖維素為基質進行培養，測試對 strain TCW1 的醱化影響，結果如圖 4-20 所示。根據實驗結果，隨著起始纖維素量提升，自低纖維素濃度時水解百分率可以達 100 % (指由固態纖維素轉化為液態寡糖)，直到起始纖維素濃度上升到約 7g/L 時，則剩下約 60 % 纖維素未被水解，可看出過多的纖維素已無法被利用而大量殘留。相反的，還原糖產生速率則是隨著起始纖維素濃度增加，最後產生速率約可達 60 mg/L·hr。從還原糖產率 (Yield) 來看，在低濃度纖維素時呈現些微下降而後上升的趨勢，之後直線上升，而同樣在約 7 g/L 的纖維素時開始產率持平，約為 600 mg reducing sugar/g cellulose，代表纖維素轉化為還原糖比例已可達 60 %。

4.4.4 震盪培養

在培養 strain TCW1 過程中發現，若是基質纖維素量較多時，往往在靜態培養時纖維素會有沉澱產生，而沉澱的上層會呈現較為黃色，推測是纖維素的沉澱過於快速，而菌體細胞只能接觸到部份上層纖維素，考慮到之前的實驗結果，strain TCW1 會附著於纖維素進行水解反應，若是能讓菌體細胞與基質充分接觸，也許能助於提升醱化速率。

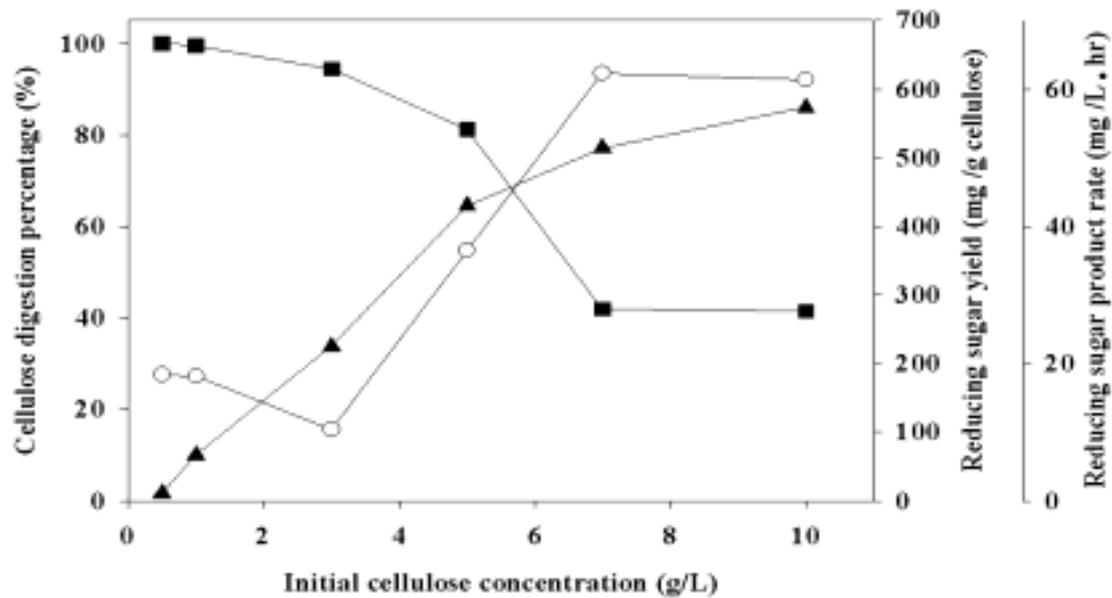


圖 4-20 起始基質濃度對纖維素醱化及降解的影響。(■) 纖維素水解百分率，(▲) 還原糖產生速率，(○) 還原糖產率。測試纖維素濃度為分別為 0.5、1、3、5、7、10 g/L，培養溫度為 65 °C，培養時間為 64 hr。

本實驗以一定轉速的震盪培養 (150 rpm)，並結合不同起始纖維素濃度測試之，目的是希望纖維素在培養時能藉由振盪而完全揚起，達到均質狀態，讓菌體有充分機會接觸到基質，其結果如圖 4-21 所示。比對沒有震盪的基質濃度測試 (圖 4-20)，纖維水解百分率同樣隨著基質濃度上升，下降到約 30% 而持平，然而此時起使纖維素濃度已達 15 g/L，相較於沒有震盪的實驗可多出約 2 倍濃度的纖維素，證明適當的震盪培養的確有助於 strain TCW1 對於纖維素的水解。在醱化速率方面，從原本近 60 mg/L·hr 的還原糖產生速率，可提升到

100 mg/L·hr 左右。然而值得注意的是，產率方面相對於靜態的培養並沒有提升或是下降，而都同樣維持在 600 mg/g cellulose，此現象說明了培養的均質化有助於讓 strain TCW1 細胞充分接觸基質，不但加速細胞捕捉基質並水解，也代表可水解更多纖維素，產生更高濃度之還原糖，然而均質攪拌不同於如溫度或 pH 影響，實質上均質化對菌體本身醱化的代謝機制並無加速效果，因此還原糖產率實則不變，根據結果還原糖轉換率為 600 mg/g cellulose，與靜態培養相同。

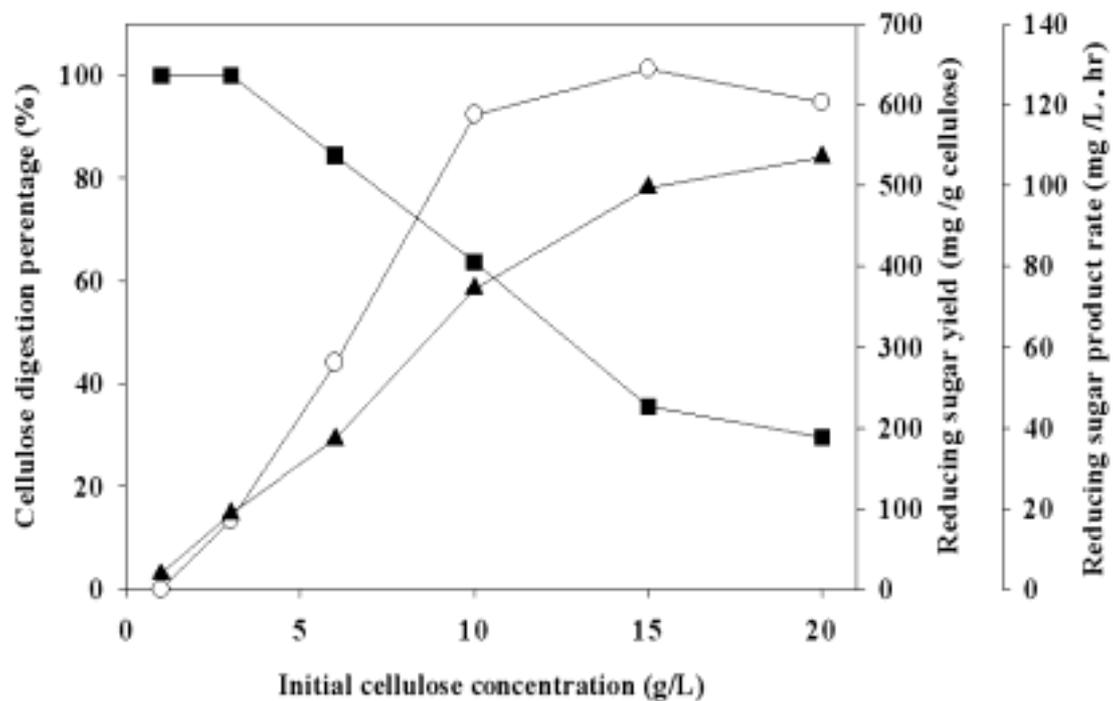


圖 4-21 不同起始基質濃度配合固定的震盪培養 (150 rpm) 對纖維素醱化及降解的影響。(■) 纖維素水解百分率，(▲) 還原糖產生速率，(○) 還原糖產率。

4.4.5 天然纖維性基質測試

本實驗藉由純纖維素基質的前實驗，尋找較佳的纖維水解環境因子，並以 4 種常見纖維性天然基質作為碳源進行測試，分別為狼尾草、稻桿、蔗渣、菜葉，實驗操作條件為 65 °C、pH6.8，基質濃度為 10 g/L，在 150 rpm 震盪之下培養，其各別細胞生長結果如圖 4-22 所示。就細胞生長總量來看，4 種基質彼此間不會有太大差異，然而趨勢方面蔗渣以及狼尾草較為類似，都在第 4 天達到生長高峰，不同於稻桿則是在第 3 天，而在菜葉基質的生長則是呈現穩定上升趨勢。相較於純纖維素基質來說，細胞的生長需要拉長到近一週的時間才進入死亡期，較純纖維素基質中只需 2 天時間緩慢許多，而特別的是，在 4 種天然基質培養下，生長似乎比純纖維基質來的多（見圖 4-16 A），但實際在顯微鏡的觀察下，菌體細胞比較細小而短，理論上應該環境較不利於生長，推測是此次實驗植菌的起始細胞量較多所造成。

醱化反應方面，以還原糖濃度作為醱化產物代表，其結果如圖 4-23。根據實驗結果，以狼尾草為基質的培養，在第二天有還原糖的高峰，之後下降並維持在約 1200 mg/L，也都相近於稻桿或菜葉培養的還原糖濃度，唯獨蔗渣的還原糖較低，自起始點只有些微上升，而維持在 400 mg/L 左右。

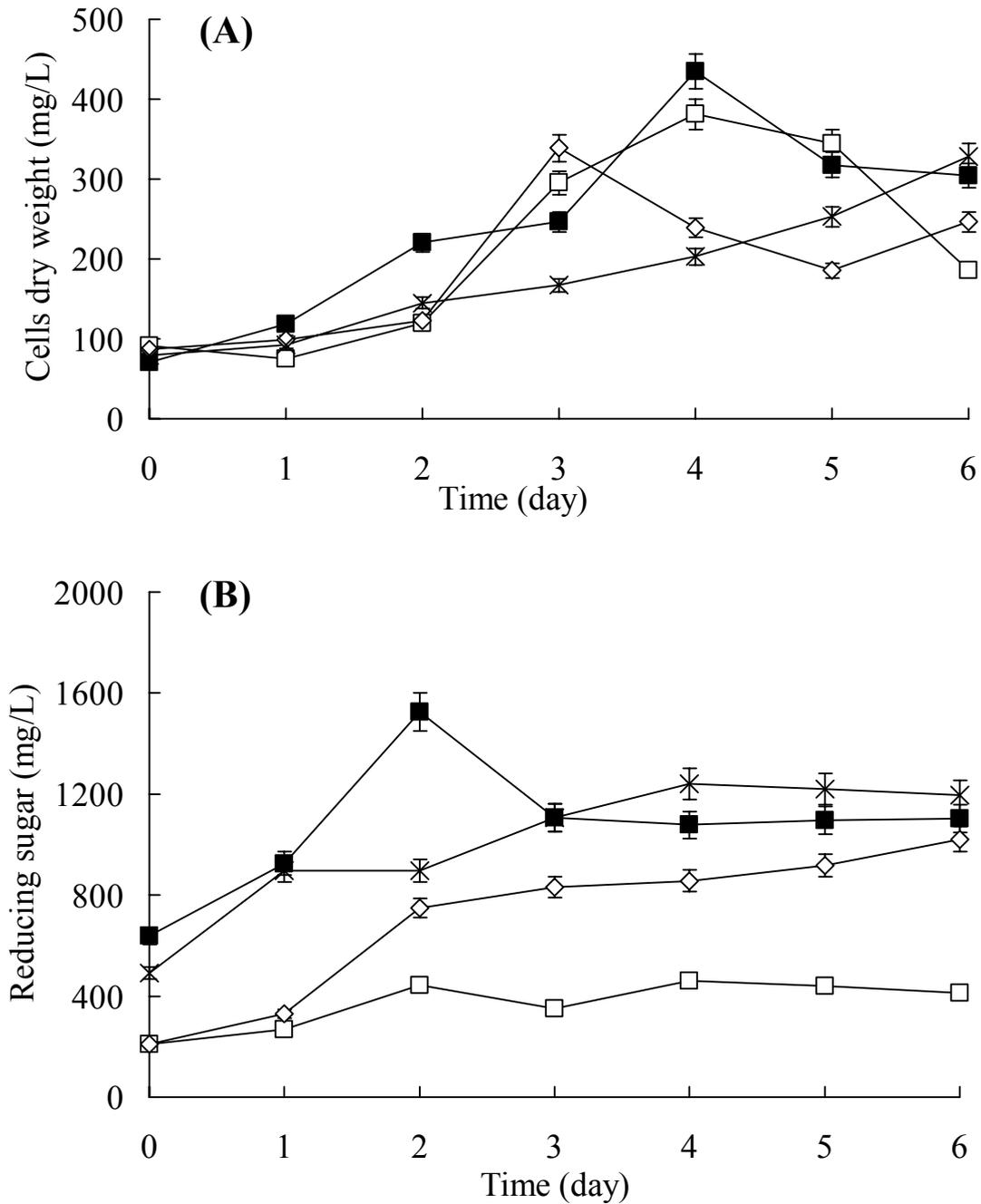


圖 4-22 (A) Strain TCW1 以不同天然纖維性基質進行培養之生長曲線，各基質均為 10 g/L，培養在 65 °C 下，以 150 rpm 搖瓶培養。(B) Strain TCW1 以不同天然纖維性基質進行培養之還原糖濃度，符號分別代表狼尾草 (■)、稻桿 (◇)、蔗渣 (□)、菜葉 (×)。

就圖 4-22 實驗結果來看，若比較累積還原醣量而言，醣化較佳者為以狼尾草或菜葉為基質，然而天然基質結構並不單純，在 strain TCW1 高溫培養（65 °C）時，應該會有高溫造成的醣類溶出，檢視生物反應所造成的效果時，應扣除掉該部分即為實際的生物性醣化。除此之外，各式基質起始醣份已有區別，故計算其生物性醣化產率以比較之，結果如圖 4-23 所示，由於天然基質所含纖維素未能定量，產率計算時以基質添加量為分母，而非實際水解量。

根據結果可看出，生物性醣化產生之總溶解醣以及還原醣都以狼尾草基質為最高，顯示出狼尾草相較其他基質的確具有較好的生質能潛力。然而原本還原醣濃度近似狼尾草的菜葉，在此結果卻產率偏低，說明了實際上由生物造成的醣化並不多，大部分是來自高溫培養所造成醣類溶出。

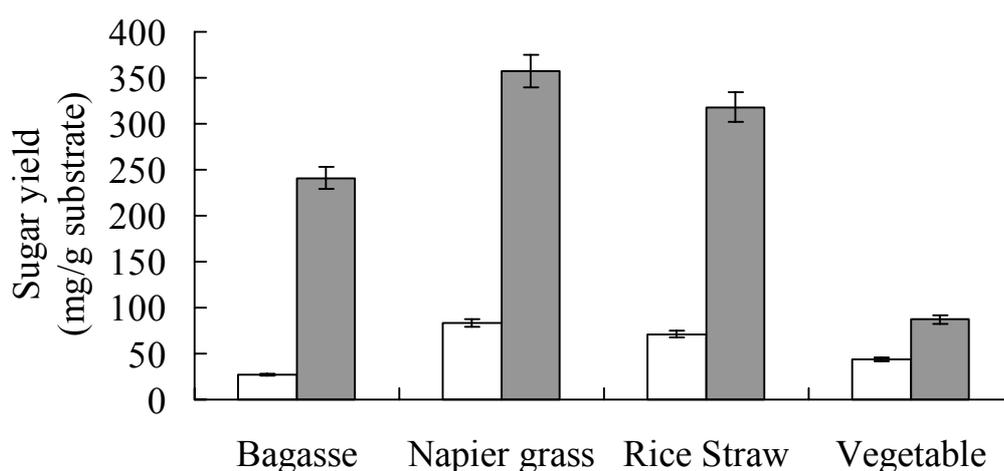


圖 4-23 Strain TCW1 針對不同天然基質的生物性醣化產率比較圖，分別為總溶解醣（灰），以及還原醣產率（白）。

藉由還原糖及總溶解糖的比例，可以看出糖化後水解液的可利用性，比值越是接近 1 代表水解產生的糖類糖數越少，即接近單糖、二糖，此類還原糖較易被微生物吸收利用；反之比值越小代表偏向多糖產物，若做為後續的醱酵產能則較不利。從結果還原糖及總溶解糖的比例來看，狼尾草及稻桿情況較為類似，而蔗渣的總溶解糖雖不是最低，但是與還原糖的比值卻最小，可看出水解後糖類偏向多糖，後續利用性較低；相對的菜葉基質，無論是生物性糖化的總糖或還原糖都相對偏低，但是比例上卻最為接近，後續利用性應較高。

從結果來看，strain TCW1 針對這些具潛力的生質原料有著不同的水解特性，雖然糖類產率遠不及純纖維素，但至少可看到對於此 4 類天然基質都可進行水解並產生糖類，顯示出 strain TCW1 能適應這些不同基質環境，具有廣泛的利用性。

4.4.6 纖維素糖化能力文獻比較

將本研究之 strain TCW1 細胞對纖維素糖化能力，與其他先前相關研究作一比較，其中包括以纖維水解生物本身細胞進行反應，亦或是利用商用、純化之纖維水解酵素，其結果比較如表 4-2 所示。由該表可看出 strain TCW1 以細胞糖化纖維素之轉換效率高於其他許多文獻，證實 strain TCW1 是株具高纖維素糖化能力的菌種。

表 4-2 Strain TCW1 細胞對纖維素糖化能力與先前文獻比較

Cellulolytic microorganism or cellulase	Substrate	Saccharification efficiency* (Produce)	Literature
Endocellulase (<i>Trichoderma reesei</i>) β-glucosidase (<i>Aspergillus niger</i>)	Cellulose (Sigmacell-100)	2.1 % (RS ^a)	Orgeta <i>et al.</i> , 2001
Cellulase (<i>Penicilinium funiculosum</i>)	Avicel	75 % (TSS ^b)	Kim and Hong, 2001
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Filter paper (Whatman NO. 1)	75 % (RS)	Parce and Bauchop, 1985
Cellulase (Multifect B)	Untreated alfalfa	26 % (RS)	Sreenath <i>et al.</i> , 1999
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Cellulose (MN 300)	35 % (TSS)	Giallo <i>et al.</i> , 1985
Rude cellulase from <i>Trichoderma reesei</i>	Steam explosion sunflower stalks	38 % (RS)	Sharma <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Cellulose (Solka-floc)	16 % (CB ^c) 33 % (GC ^d)	Giuliano and Khan, 1984
Strain TCW1	α-cellulose	94 % (TSS) 63 % (RS) 23 % (CB) 12 % (GC)	This study

a: RS, reducing sugar; b: TSS, total soluble sugar; c: CB, cellobiose; d: GC, glucose.

*: Saccharification efficiency calculated based on conversion of cellulose material to sugary produces.

4.5 纖維水解酵素活性

4.5.1 纖維酵素分布

在培養 strain TCW1 過程中，可以發現培養液以及纖維素轉為淡黃色，而纖維素由於細胞附著於表面，會相對來的容易沉澱，甚至是形成培養液澄清的狀態，假若 strain TCW1 的附著特性跟其纖維水解特性若相關，可根據上述現象觀察推論出 strain TCW1 應該如同 *C. thermocellum*，具有複合型的纖維水解酶體 (cellulosome)，而細胞的附著極有可能就是倚靠 cellulosome 配合 YAS (Yellow affinity substance) 協同，在表面聚集形成 polycellulosomal aggregates 形成對纖維素的親合性，若真如此則纖維酵素活性應可在細胞表面被偵測到。本實驗為解明 strain TCW1 是由外泌三種纖維酵素協同水解纖維素，亦或是分泌複合型纖維水解酶體，並可在細胞表面聚集水解纖維素，以上兩類途徑差別在於後者可在細胞表面發現具纖維酵素活性，而前者酵素應只能外泌到培養液中。

在前期實驗中發現，為了避免培養中纖維素干擾，strain TCW1 以 1g/L 的纖維素培養之下進行細胞表面先為酵素活性測試，結果發現幾乎無活性產生，而卻在胞外監測到纖維酵素活性，此現象與之前研究中指出 *C. thermocellum* 細胞表面具有 cellulosome 並不相符；然而當以 10 g/L 的纖維素培養時，胞外的纖維酵素活性卻又大幅下降，

因此推論，strain TCW1 或許會因為培養基質濃度不同而纖維酵素分布上有所不同，本實驗便利用不同纖維素濃度之前培養，分別測試其培養液以及細胞表面纖維酵素活性，活性測試基質以 α -cellulose 為代表，其結果如圖 4-24。

根據實驗結果，strain TCW1 的細胞破片的確具有纖維水解活性，可證明了 strain TCW1 細胞上具 cellulosome 結構可水解纖維素，因此具有纖維素附著的能力。

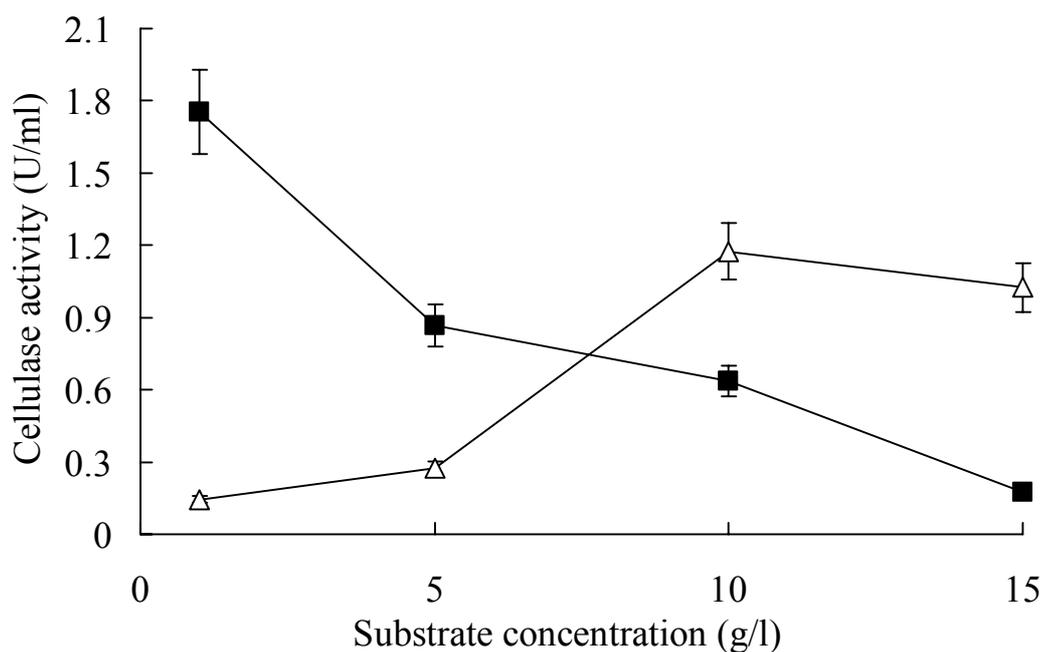


圖 4-24 培養基中纖維素濃度對 strain TCW1 纖維酵素活性分布的影響。分別有 cell-free cellulase (■); 以及 cell-associated cellulase (△)。

除此之外，纖維酵素活性在不同基質濃度之下，也呈現出不同的分布情形，可看出當固態基質濃度低時，酵素活性偏向在培養液中，也就是脫離細胞直接攻擊纖維素，而此時細胞表面的酵素活性偏低；然而當基質濃度提升時，菌體則偏向將酵素聚集於細胞表面，而少有脫離細胞的酵素，此時細胞本身須附著上基質才能進行水解。從此現象可推論，strain TCW1 在基質濃度低時，由於酵素相對於細胞要容易傳輸，因此偏向讓酵素脫離細胞攻擊纖維素，藉此獲得足量醣類；反之基質濃度高時，細胞本身有足夠機會接近纖維素，只需倚靠細胞表面酵素攻擊纖維素，相對在擷取纖維寡糖時可以更有效率，並且有酵素活性的濃縮效果。然而當基質濃度提升到 10 g/L 以上時，細胞表面的活性就沒有大的差異性，推測是細胞表面的纖維酵素已接近飽和狀態。

此現象說明了 strain TCW1 在不同濃度的基質下培養時，可以藉誘導出不同纖維水解策略以應付各式環境，不但節省耗能也相對的更具效率，此種策略性的水解途徑能有助於 strain TCW1 在多變的真實環境中脫穎而出，成為優勢菌種。

4.5.2 纖維酵素種類活性

Cellulosome 是由多種纖維水解酵素單體所組成，協同裂解纖維素。本研究比較 strain TCW1 以及 *C. thermocellum* ATCC 27405 之三

種纖維酵素比活性，方法針對低基質濃度（1 g/L cellulose）培養液中胞外纖維酵素活性，結果如圖 4-25 所示。

從兩株菌之三種纖維酵素比活性結果，可看出外切型纖維酵素（Avicelase）以 *C. thermocellum* 較強，然而 strain TCW1 內切型纖維酵素（CMCase）活性卻達 *C. thermocellum* 4 倍，至於 β -glucosidase 兩者則無太大差異，可由此發現 strain TCW1 以及 *C. thermocellum* 在不同纖維酵素單體的活性上是有所區別的。

一般認為外切型纖維酵素在協同水解纖維素中地位十分重要，能否生產該酵素決定了此細胞是否能水解晶型纖維素，可以將纖維素的晶型區或是非晶型區域的纖維長鏈邊緣直接裂解為 cellobiose 以利用，因此對於裂解天然纖維基質扮演著重要角色。然而根據培養液相產物分析結果發現雖然 strain TCW1 水解纖維素時會產生大量的 cellobiose，理論上應具有良好的外切型纖維酵素活性，然而結果卻顯示 strain TCW1 外切型纖維酵素活性卻只達 *C. thermocellum* 活性 1/2，推論是因 strain TCW1 具有較強的內切型纖維酵素活性，可以替外切型纖維酵素製造較多的作用區（Enzyme active site），進而提升實際水解反應中外切型纖維酵素反應速率。

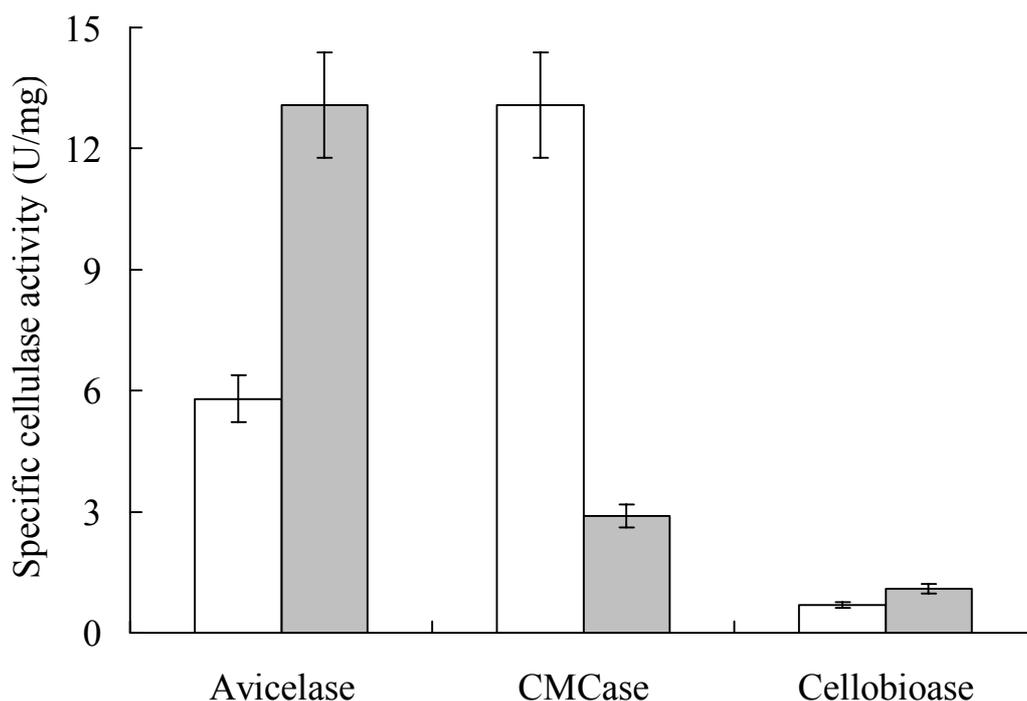


圖 4-25 比較 Strain TCW1 (白) 以及 *C. thermocellum* (灰) 之三種纖維水解酵素比活性。

4.5.3 纖維酵素溫度測試

根據溫度對 strain TCW1 醱化影響結果，發現醱化反應對溫度的敏感性，在 65 °C 時醱化速率較其他溫度要高出許多 (圖 4-18)，然而介於 55-65 °C 的比生長速率卻無顯著差異，加上前人的研究指出 *C. thermocellum* 酵素適合於 60 °C 反應 (Sneath *et al.*, 1986)，然而本研究卻發現 strain TCW1 在 60 °C 下醱化能力偏低。綜合以上觀點，推論是 strain TCW1 的纖維酵素本身對溫度感受性造成此一現象。本實驗為了解溫度對 strain TCW1 纖維酵素活性的影響，嘗試在不同溫度下，以 α -cellulose 為基質進行酵素活性測試，並與 *C. thermocellum*

作一比較，結果如圖 4-26。

從結果可以看出，兩菌株的纖維酵素活性只在 60 °C 的反應下呈現出較大的差異，*C. thermocellum* 的下酵素活性較 strain TCW1 高出約 40%，而 *C. thermocellum* 在 60-65 °C 間纖維酵素活性無明顯差別，解釋了前人研究所決定的活性測試溫度為何為 60 °C。反觀溫度對 strain TCW1 酵素活性影響，趨勢則雷同於溫度對細胞醱化的影響，在 65 °C 有一明顯高峰，可以推論 strain TCW1 在 65 °C 的高醱化效率部分原因是來自其纖維水解酵素的喜好溫度，加上 strain TCW1 最適溫度在 65 °C 下，細胞量多使得可以有更多纖維酵素產生，進而造成 65 °C 醱化反應的高峰。

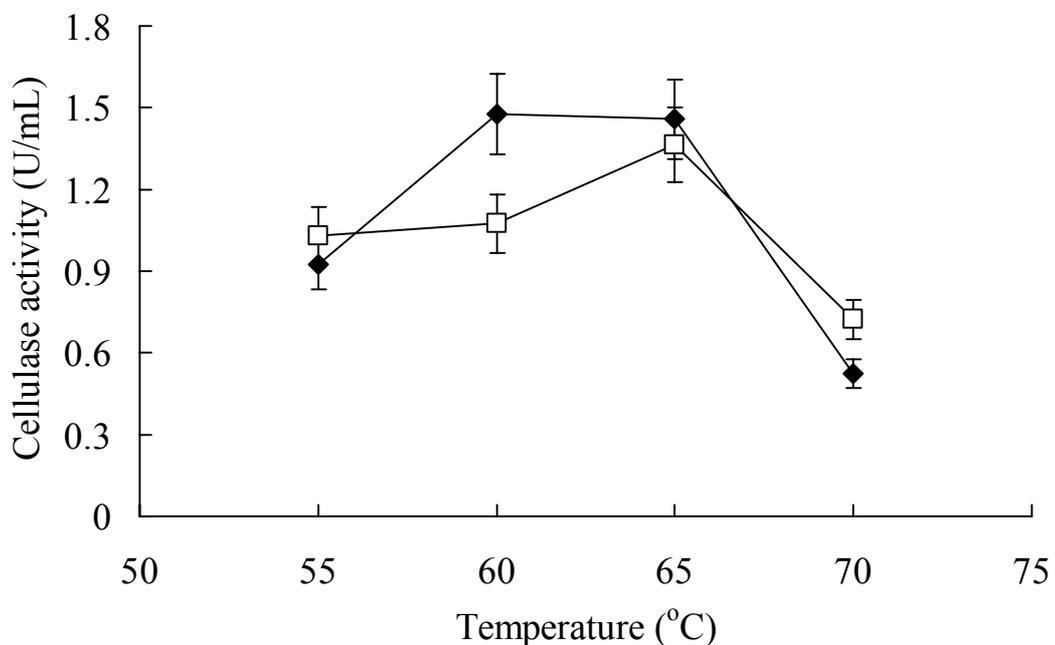


圖 4-26 不同溫度對 strain TCW1 (□)，以及 *C. thermocellum* (◆) 纖維酵素之影響。

在嗜熱性酵素的應用來看，酵素的熱穩定性是相當重要，此點 strain TCW1 能力弱於 *C. thermocellum* 是可惜之處，即使如此，從此結果也能了解到 strain TCW1 與 *C. thermocellum* 在纖維酵素的特性上的不同。因此雖然本研究分離純化菌株 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 在細胞分子生物系統鑑定上與 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 極為相似，但應足以認定 strain TCW1 為一株異於 *C. thermocellum* ATCC 27405 之菌株。

第五章 結論與建議

5.1 結論

1. 本研究自東海大學牧場的乳牛糞肥中，分離出共計 7 株嗜熱厭氧纖維水解菌分別為 strain TCW1、TCW3、TCW4、TCW9、TCW10、TCW11，和 TCW12，其中 strain TCW1 醱化纖維素的還原糖產生速率以及纖維降解速率皆為七株菌中最佳者，因此選定 strain TCW1 為後續研究目標。
2. Strain TCW1 的物種藉由分子生物方法鑑定之，首先以原核生物的 16S rDNA 序列分析進行，結果得到 strain TCW1 與 *Clostridium thermocellum* 相似度為 96 %。之後以 *C. thermocellum* ATCC 27405 標準菌株與 strain TCW1 進行 DNA-DNA 雜合，結果得到兩株菌的 DNA 相似度為 84 %。綜合以上結果 strain TCW1 應與 *C. thermocellum* ATCC 27405 在分生鑑定中顯示為相同菌株。
3. Strain TCW1 以厭氧滾管技術進行菌株分離時，在以 α -cellulose 為基質的固態 TA 培養基中，可見到菌落周圍有纖維素 clear zone，證明 strain TCW1 具有晶型纖維酵素（外切型）。在菌相觀察方面結果，菌體在 cellobiose 為基質的 TA 培養下呈現長桿狀、微彎，

菌體尖端會有內孢子產生。在固態纖維素為基質的培養下，菌體會有著於纖維細絲表面的現象。Strain TCW1 與 *C. thermocellum* ATCC 27405 在革蘭氏染色中皆呈現陰性結果，可推論出 Strain TCW1 與 *C. thermocellum* ATCC 27405 是 *Clostridium* 屬中的特例，或是由於培養環境不同所造成的革蘭氏雙性結果。Strain TCW1 喜好的生長環境因子中，培養溫度介於 55-65 °C 之間有較好的比生長速率約可達 1.5 day⁻¹，而 pH 在 6.4 有較好的比生長速率約可達 2.3 day⁻¹。以各式醣類作為碳源分別測試 strain TCW1 與 *C. thermocellum* 利用性，結果顯示兩株菌呈現大部份相同利用性結果 (xylan、CMC、cellobiose、maltose、salicin、glucose)，比生長速率都可達 0.05 hr⁻¹ 以上，然而兩株菌中唯有 *C. thermocellum* 能利用 fructose，而 strain TCW1 能利用 mannose 而 *C. thermocellum* 不能。除了以鏡檢方式觀察到菌體細胞對纖維素的附著，在纖維素附著實驗中也是得到再次的証實，並且該類菌株的附著特性是對於纖維素物質的專一性表現，因此兩株菌極可能都是藉由細胞表面纖維酵素來達成附著。以 10 g/L 纖維素基質在 65 °C 下進行共醱化醱酵反應，經過 52 小時代謝過程所得 strain TCW1 液相中包含有 4.92 g/L 的總溶解醱以及 3.31 g/L 還原醱，實際醱類包含有纖維二糖 1.19 g/L、葡萄糖 0.64 g/L，最終產物有乳酸 0.20 g/L、乙酸

0.32 g/L 和乙醇 0.63 g/L。其中除了乙酸是在 32 小時之後始被觀察到，其餘產物濃度皆同於生長趨勢自 6 小時後開始上升。Strain TCW1 的生物氣在培養 6 小時後已達最終累積產氣之 1/5(330 ml/L liquid)，然而其中幾乎不含氫氣成分，直到 6 小時之後氫氣濃度同於細胞生長趨勢而上升，其累積量約可達 100 ml/L liquid。綜合生化特性比較，本研究所分離出 strain TCW1 雖然在分生技術鑑定上呈現與 *C. thermocellum* 相似的結果，然而卻在某些生理特徵如：可利用基質、纖維酵素特性上有所區別，此結果代表著 strain TCW1 與 *C. thermocellum* 或許源自相同親緣，卻因生存環境的差異而在某些特徵上產生了分化。

4. 溫度對於 strain TCW1 醱化纖維素的影響可發現還原糖產生速率在 65 °C 時有一明顯相對鄰近溫度的高峰，可選定 65 °C 為較佳醱化溫度。藉由 pH 對於 strain TCW1 醱化纖維素的影響試驗，可得到 pH 6.4-6.9 之間有較佳的還原糖產生速率，之後可選定 TA 培養基原本之鹼度添加量 4 g/L (pH 6.9)。未搖瓶之基質濃度測試中，最高 10 g/L 起始纖維素時可達到還原糖產生速率約 60 mg/L·hr，而起始纖維素濃度自 7 g/L 以上約達 40 %水解率，還原糖產率約為 600 mg/g cellulose。一旦以 150 rpm 進行搖瓶培養，還原糖產生速率可提升到約 100 mg/L·hr 左右，而水解率也可在 20 g/L 起始纖

維素濃度達到 30%，然而還原糖產率依然維持在 600 mg/g cellulose 左右。顯示出適當的反應均勻化可增加細胞接觸基質的機會，意即細胞水解糖化纖維素速率的提升，但並非影響菌體本身的代謝，此時 strain TCW1 針對纖維素糖化成還原糖的轉換率可達約 60%。以 4 種天然纖維性基質分別為狼尾草、稻桿、蔗渣、菜葉各別測試之，相對於純物質基質的培養，天然基質培養下生長緩慢可拉長到約一週時間。扣除掉經由高溫培養所產生的可溶性糖類後，其中最高者狼尾草培養的還原糖產率約為 83 mg/g substrate，總溶解糖產率為 357 mg/g substrate。此實驗顯示出 strain TCW1 菌體的廣泛利用性，也驗證了狼尾草相對於其他天然纖維素基質是具有較佳生質潛能的。

5. 藉由纖維酵素分布試驗，發現到 strain TCW1 在細胞表面以及培養液中皆具有纖維酵素活性，證實 strain TCW1 具有 cellulosome 結構。實驗結果亦發現複合的纖維水解酶會因為培養時基質濃度不同而調整其分布，一旦濃度低時活性偏向酵素脫離細胞，而濃度高時則偏向位於細胞表面。針對三種纖維酵素單體比活性，結果顯示出外切型纖維酵素以 *C. thermocellum* 較 strain TCW1 強；但是內切型纖維酵素則是以 strain TCW1 較強，而兩株菌 β -glucosidase 比活性並無明顯差異。溫度對纖維酵素活性影響同時測試了 strain

TCW1 以及 *C. thermocellum*，發現唯獨在 60 °C 時 *C. thermocellum* 的酵素活性高於 strain TCW1，其餘溫度活性都相近。此結果驗證了醱化反應對溫度的敏感便是來自於纖維酵素而非菌體本身，也可看出 strain TCW1 以及 *C. thermocellum* 兩者纖維酵素對溫度喜好的差異性。

5.2 建議

本研究針對了 strain TCW1 菌株的生理特徵進行調查，以及決定醱化操作之主要準則，目的在於實際應用時如何因應而設計。相對於許多纖維水解菌株，strain TCW1 因為其獨特的附著能力而衍生了工程應用上的問題，例如生長不易監測以及細胞表面纖維酵素不易分離等特性，而 strain TCW1 的醱化程序對溫度敏感，也是操作上需注意之要點。

實驗中未對天然纖維性基質進行深入探討，然而從結果可看出相對於純纖維素基質，天然基質肇因於被其他結構性物質包覆而導致醱化及生長緩慢，之後可針對基質的前處理做調整以增進醱化效果。

本研究對於 strain TCW1 的纖維酵素活性進行簡單的定量，然結果卻遠不及細胞醱化反應，此現象可能來自酵素活性條件未優化，未來可針對 strain TCW1 酵素操作條件或分析方法加以修改，以得到較好的酵素活性條件。

参考文献

- Ando, S., Ishida, H., Kosugi, Y., and Ishikawa, K. (2002)
Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*,
Applied and Environmental Microbiology, 68: 430–433.
- Andreas, J., Azevedo, H. and Cavaco-Paulo, A. (1999) Effects of
temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes,
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 233–239
- Askarieh, M. M., Chambers, A. V., Daniel, F. B. D., FitzGerald, P. L.,
Holtom, G. J., Pilkington, N. J., and Rees, J. H. (2000) The chemical
and microbial degradation of cellulose in the near field of a repository
for radioactive wastes, *Waste Management*, 20: 93-106.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., and Pace, N. R. (1994)
Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National
Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:
1609-1613.
- Bayer, E. A., and Lamed, R. (1986) Ultrastructure of the cell surface
cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with
cellulose, *Journal of Bacteriology*, 167: 828-836.

- Bayer, E. A., Kenig, R. and Lamed, R. (1983) Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose, *Journal of Bacteriology*, 156: 818-827.
- Béguin, P. and Aubert, J. (1994) The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 25-58.
- Béguin, P., Cornet, P., and Aubert, J. (1985) Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*, *Journal of Bacteriology*, 162: 102-105.
- Bhandari, A. P., Sukanya, D. H., Ramesh, and C. R. (2006) Application of isozyme data in fingerprinting Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for germplasm management, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 253–264.
- Bjerre, A. B., Olesen, A. B., Fernqvist, T., Ploger, A., and Schmidt, A. S. (1996) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 568-577.
- Carreira, L. and Ljungdahl, L. G. (1983) Liquid Fuel Developments, Chapter Production of Ethanol from Biomass using Anaerobic Thermophilic Bacteria, *CRC Series in Bioenergy Systems*, CRC Press, Inc.,

- Desvaux, M. (2005) *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia, *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 741–764.
- Desvaux, M., Guedon, E., and Petitdemange, H. (2000) Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2461–2470.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Freier, D., Mothershed, C. P., and Wiegel, J. G. (1988) Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20, *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 204-211.
- Fulton, W. R., Klopfenstein, T. J., and Britton, R. A. (1979) Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. II. Effect of rumen pH alteration on rumen fermentation and voluntary intake of wheat diets, *Journal of Animal Science*, 49: 785-789.
- Gelhaye, E., Claude, B., Cailliez, C., Burle, S., and Petitdemange, H. (1992) Multilayer adhesion to filter paper of two mesophilic,

- cellulolytic Clostridia, *Current Microbiology*, 25: 307-311.
- Giallo, J., Gaudin, C., and Belaich, J. (1985) Metabolism and solubilization of cellulose by *Clostridium cellulolyticum* H10, *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1216-1221.
- Giuliano, C. and Khan, A. W. (1984) Cellulase and sugar formation by *Bacteroides cellulosolvens*, a newly isolated cellulolytic anaerobe, *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 446-448.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology*, 89: 17–34.
- Holtzapple, M. T., Jun, J., Ashok, G., Patibandla, S. L., and Dale, B. E. (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process A practical lignocellulose pretreatment, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29: 59-74.
- Hungate, R. E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In Methods in Microbiology*, vol. 3B, pp. 117. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. New York.
- Johnson, E. A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A., and Demain, A. L. (1982) Saccharification of complex cellulosic substrates by the

- cellulase system from *Clostridium thermocellum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1125-1132.
- Johnson, J. L. (1994) Similarity analysis of DNAs. *In Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 655-682. Edited by P. Gerhardt. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Jones, T. H. D., de Renobales, M., and Pon, N. (1979) Cellulases released during the germination of *Dictyostelium discoideum* spores, *Journal of Bacteriology*, 137: 752-757.
- Joos, F., Plattner, G., Stocker, T. F., Marchal, O., and Schmittner, A. (1999) Global warming and marine carbon cycle feedbacks on future atmospheric CO₂, *Science*, 284, 464.
- Kim, K. H., and Hong, J. (2001) Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis, *Bioresource Technology*, 77: 139-144.
- Lai, T. E., Nopharatana, A., Pullammanappallil, P. C., and Clarke, W. P. (2001) Cellulolytic activity in leachate during leach-bed anaerobic digestion of municipal solid waste, *bioresource technology*, 80: 205–210.
- Lamed, R., Setiter, E. and Bayer, E. A. (1983) Characterization of a

Cellulose-Binding, Cellulase-Containing Complex in *Clostridium thermocellum*, *Journal of Bacteriology*, 156: 828-836.

Latham, M. J., Brooker, B. E., Pettipher, G. L., and Harris, P. J. (1978)

Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 1166-1173.

Lejeune, R., Baron, G. V. (1995) Effect of agitation on growth and

enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 249-258.

Ljungdahl, L. G., Pettersson¹, B., Eriksson¹, K. and Wiegel, J. (1983) A

yellow affinity substance involved in the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum*, *Current Microbiology*, 9: 195-199.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. (2002)

Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.

Macy, J. M., Snellen, J. E. and Hungate, R. E. (1972) Use of syringe

methods for anaerobiosis, *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1318-1323.

- Maugeri, F. and Goma, G. (1988) Thermophilic degradation of cellulose by *C. thermocellum*, *Microbiological Reviews*, 19(3): 271-276.
- Marteinsson, V. T., Hauksdottir, S., Hobel, C. F., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G. O. and Kristjansson, J. K. (2001) Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4242-4248.
- Mayer, F., Coughlan, M. P., Mori, Y., and Ljungdahl, L. G. (1987) Macromolecular organization of the cellulolytic complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy, *Applied and environmental microbiology*, 53: 2785-92.
- McBee, R. H. (1950) The anaerobic thermophilic cellulolytic bacteria, *Microbiological Reviews*, 14: 51-63.
- McCarthy, A. J. (1987) Lignocellulose-degrading actinomycetes, *FEMS Microbiology Reviews*, 46: 145-163.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Ng, T. K., Weimer, P. J., and Zeikus, J. G. (1977) Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*, *Archives of Microbiology*, 114: 1-7.

- Noike, T., Endo, G., Chang, J., Yaguchi, J., and Matsumoto, J. (1985) Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion, *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1482–1489.
- Monserrate, E., Leschine, S. B. and Canale-Parola, E. (2001) *Clostridium hungatei* sp. nov., a mesophilic, N₂-fixing cellulolytic bacterium isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 123–132.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., and Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 96: 673–686.
- Ortega, N., Busto, M. D., and Perez-Mateos, M. (2001) Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47: 7–14.
- Otieno, D. O., and Shah, N. P. (2007) Endogenous β -glucosidase and β -galactosidase activities from selected probiotic micro-organisms and their role in isoflavone biotransformation in soymilk, *Journal of Applied Microbiology*, 103: 910–917.

- Patni, N. J. and Alexander, J. K. (1971) Utilization of glucose by *Clostridium thermocellum*: presence of glucokinase and other glycolytic enzymes in cell extracts, *Journal of Bacteriology*, 105: 220-225.
- Pearce, P. D., and Bauchop, T. (1985) Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates, *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1265-1269.
- Rani, D. S., Thirumale, S., and Nand, K. (2004) Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 629–632.
- Rensburg, P. V., Vanzyl, W. H. and Pretorius, I. S. (1998) Engineering yeast for efficient cellulose degradation, *Yeast*, 14: 67–76.
- Reynolds, P. H. S., Sissons, C. H., Daniel, R. M., and Morgan, H. W. (1986) Comparison of cellulolytic activities in *Clostridium thermocellum* and three thermophilic, cellulolytic anaerobes, *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 12-17.
- Roger, V., Fonty, G., Komiserczuk-Bony, S. and Gouet, P. (1990) Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose Avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter*

succinogenes subsp. *Succinogenes*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3081-3087.

Schwarz, W. H. (2004) A list of cellulolytic bacteria,

<http://www.wzw.tum.de/mbiotec/cellmo.htm>

Sharma, S. K., Kalra, K. L., and Grewal, H. S. (2002) Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks, *Biomass and Bioenergy*, 23: 237–243.

Shi, Y. and Weimer, P. J. (1992) Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2583-2591.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, vol. 2, USA, Sec. 13, 1141-1197.

Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W., and Straub, R. J. (1999) Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment, *Process Biochemistry*, 35: 33-41.

Teather, R. M., Wood, P. J. (1982) Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic

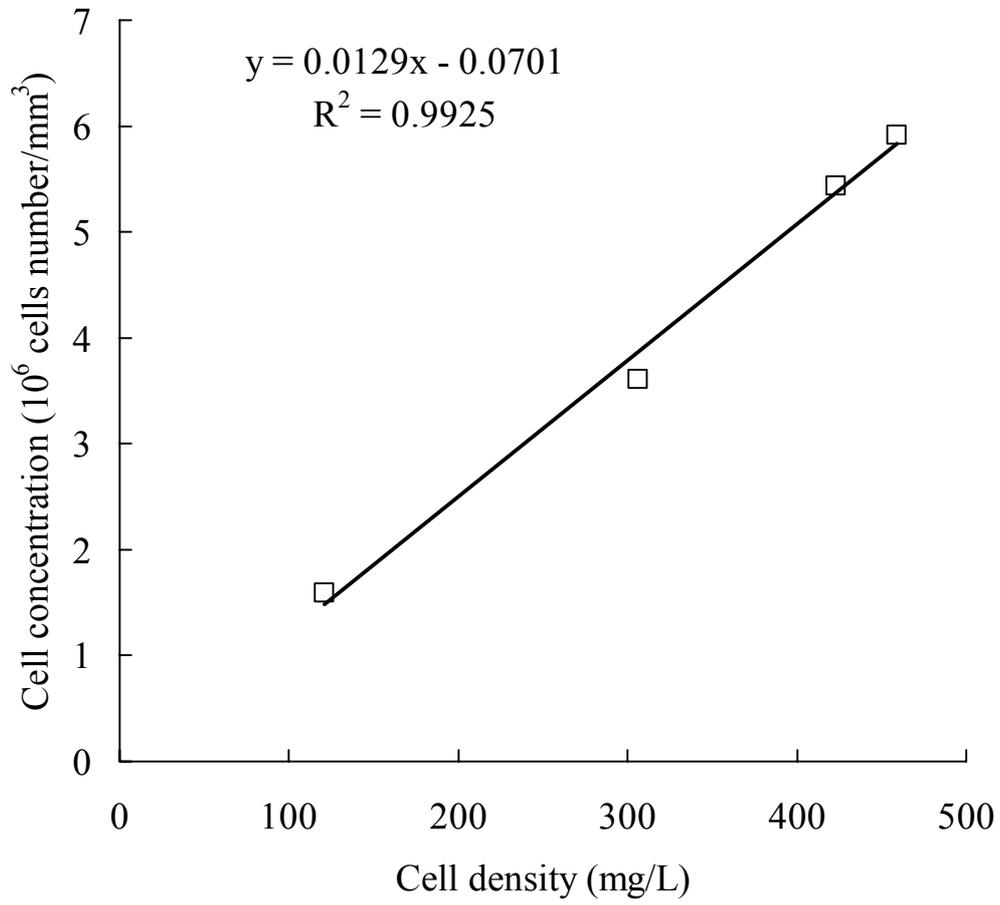
- bacteria from the bovine rument, *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 777-780.
- Thomas, K. N., Ben-Bassat, A., and Zeikus, J. G. (1981) Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Applied and Environmental Microbiology*, June: 1337-1343.
- Ulbrink, T. Y. L. (1991) Cellulolytic fermentation by *Clostridium thermocellum*, *Smartech. Gatech. Edu.*
- Updegraff, D. M. (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials, *Analytical Chemistry*, 32: 420-424.
- Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65: 1-43.
- Viles Jr., F. J., and Silverman, L. (1949) Determination of starch and cellulose with anthrone, *Analytical Chemistry*, 21: 950-953.
- Viljoen, J. A., Fred, E. B., and Peterson, W. H. (1926) The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria, *The Journal of Agricultural Science (Cambridge)*, 16: 1-17.

- Warnick, T. A., Methé, B. A. and Leschine, S. B. (2002) *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1155–1160.
- Weimer, P. J. and Zeikus, J. G. (1977) Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 289-297.
- Wiegel, J. (1982) Ethanol from cellulose, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 38: 151-155.
- Wiegel, J. and Dykstra, M. (1984) *Clostridium thermocellum*: adhesion and sporulation while adhered to cellulose and hemicellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 59-65.
- Wu, J. H. D., Orme-Johnson, W. H., and Demain, A. L. (1988) Two components of an extracellular protein aggregate of *C. thermocellum* together degrades crystalline cellulose, *Biochemistry*, 27: 1703-1709.
- Yang, B., and Wyman C. E. (2006) BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, 94: 611-617.

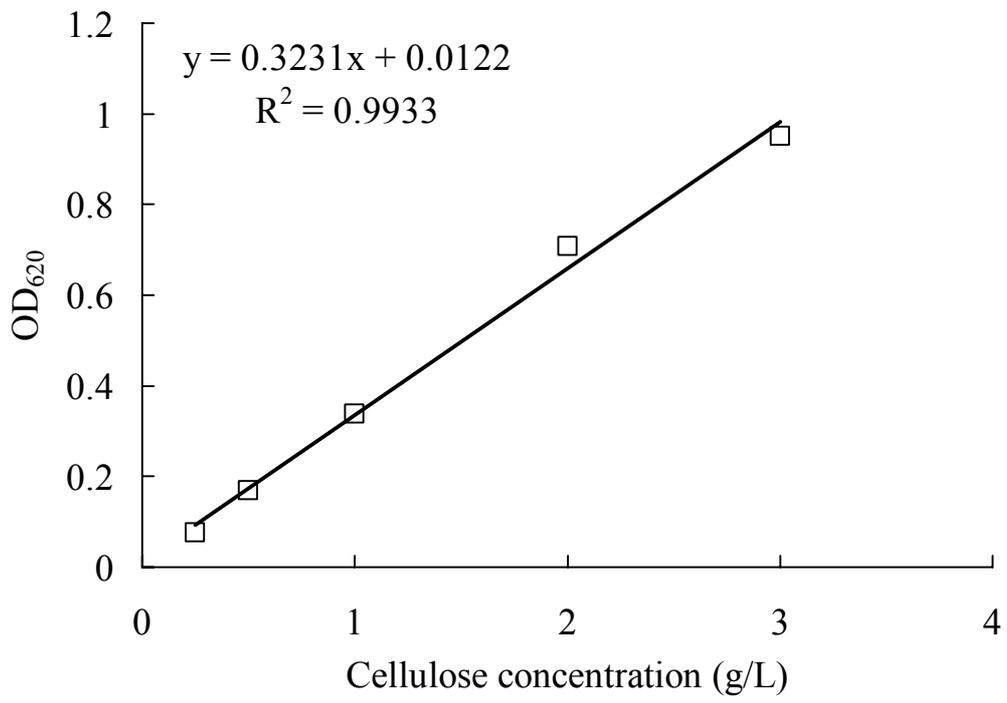
- 王馨儀。(2005)。以牛糞中嗜熱厭氧菌群分解纖維素產乙醇之研究，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 左峻德。(2007)。我國發展生質能源產業之可行性，農業生技產業季刊，植物種苗生技，第九期，56-61 頁。
- 成游貴。(2004)。畜產生物品種資源 狼尾草，行政院農業委員會畜產試驗所專輯，第 89 號，66-67 頁。
- 吳季芳。(2006)。以澱粉為碳源基質進行生物產氫。國立成功大學碩士論文。
- 吳耿東。(2008)。認識生質能源，物理雙月刊，30 卷 4 期。
- 吳耿東，李宏台。(2004)。生質能源—化腐朽為能源，科學發展，383 期，20-27 頁。
- 吳耿東，李宏台。(2007)。全球生質能源應用現況與未來展望，林業研究專訊，Vol. 14，No.3。
- 徐敬衡。(2005)。生質酒精之能源開發，化工技術月刊，147，179-189 頁。
- 徐維廷。(2007)。纖維水解菌群中嗜熱產氫菌 *Clostridium* sp. C4 之分離及其產氫特性研究，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 郭博堯。(2002)。國政研究報告—全球化石能源危機時代與我國所面臨挑戰。財團法人國家政策研究基金會。

附錄

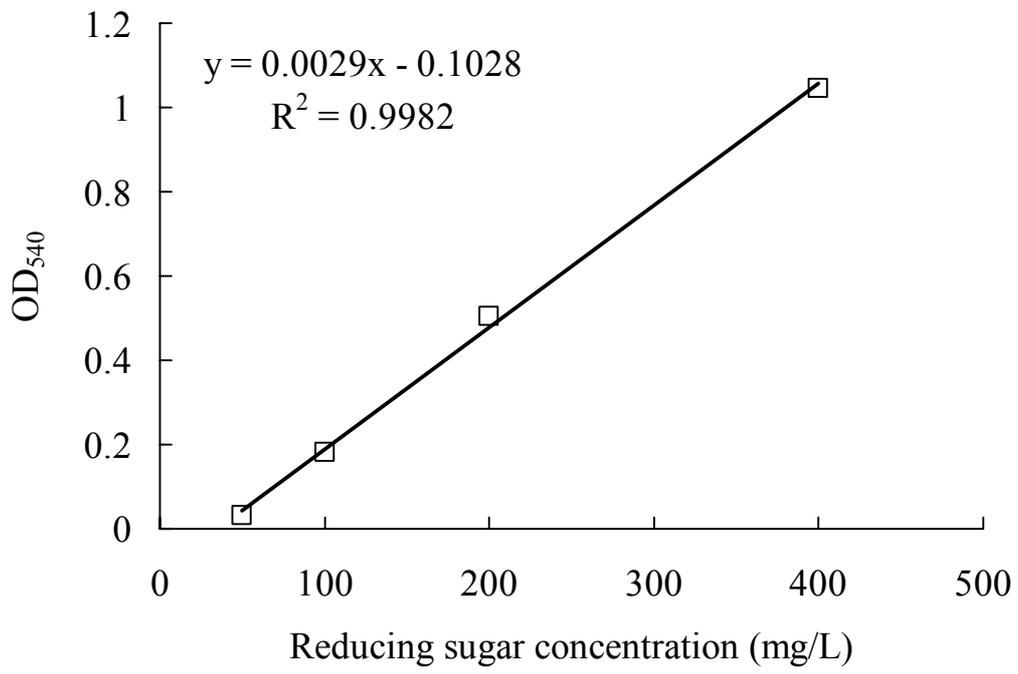
附錄一 細胞乾重檢量線



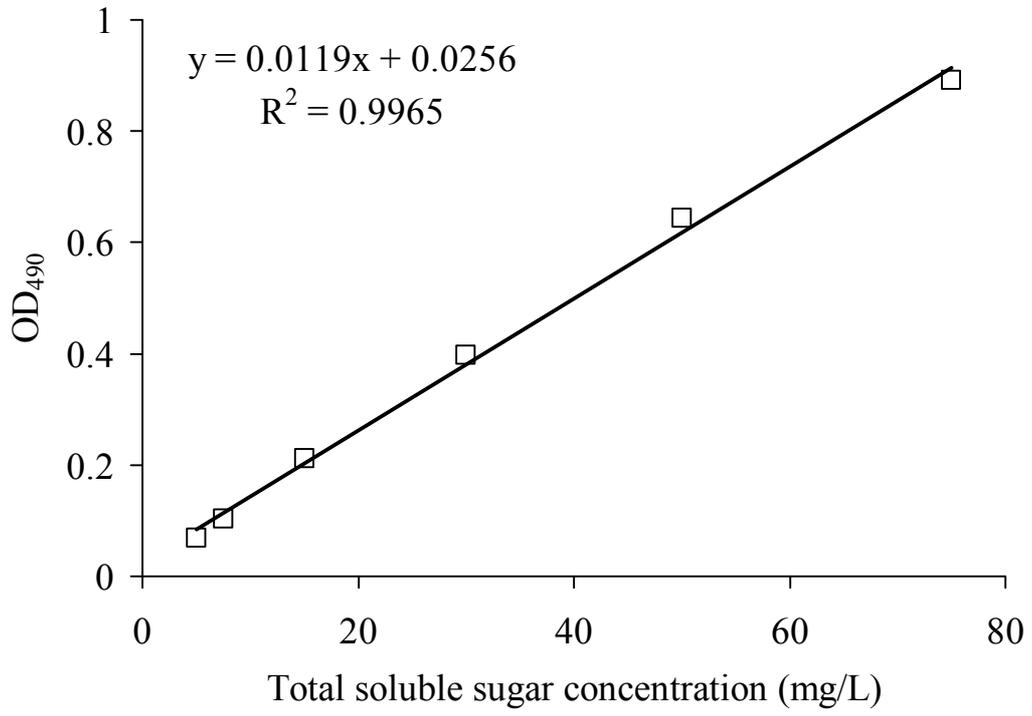
附錄二 纖維素檢量線



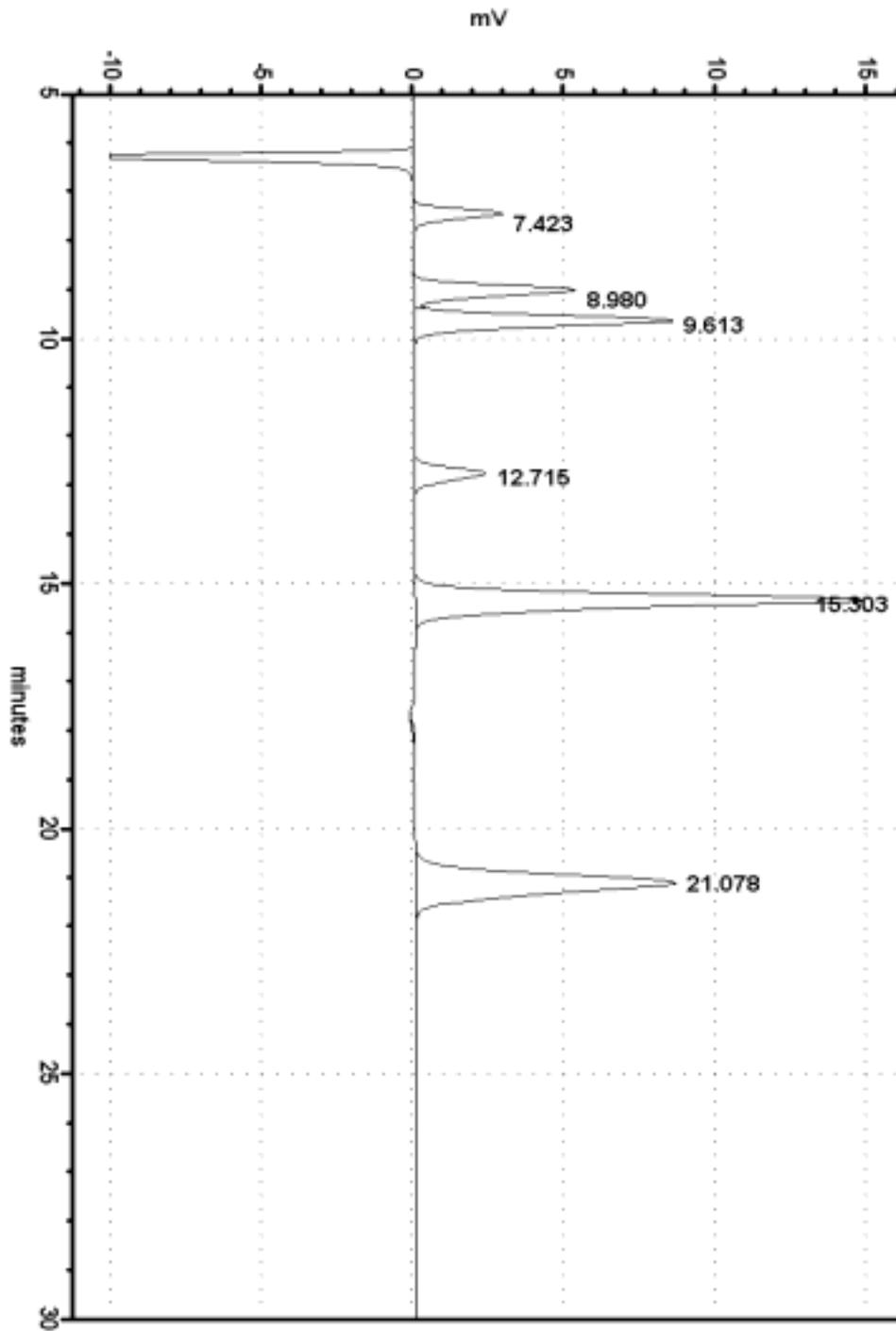
附錄三 還原糖檢量線



附錄四 總溶解糖檢量線

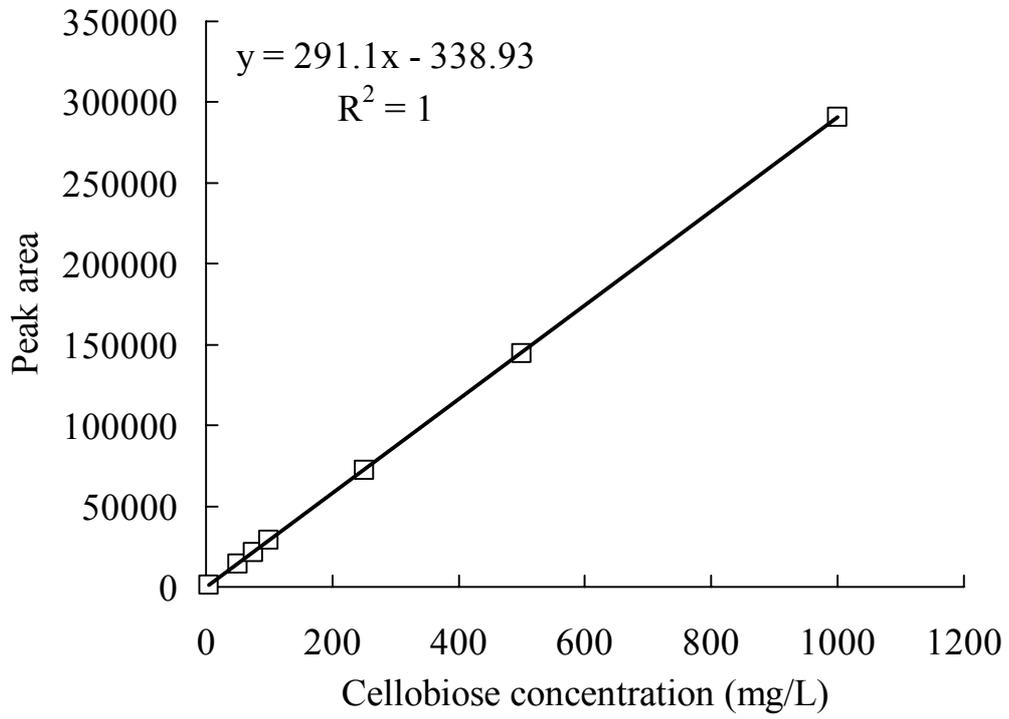


附錄五 液相代謝產物標準品 HPLC 停留時間及檢量線

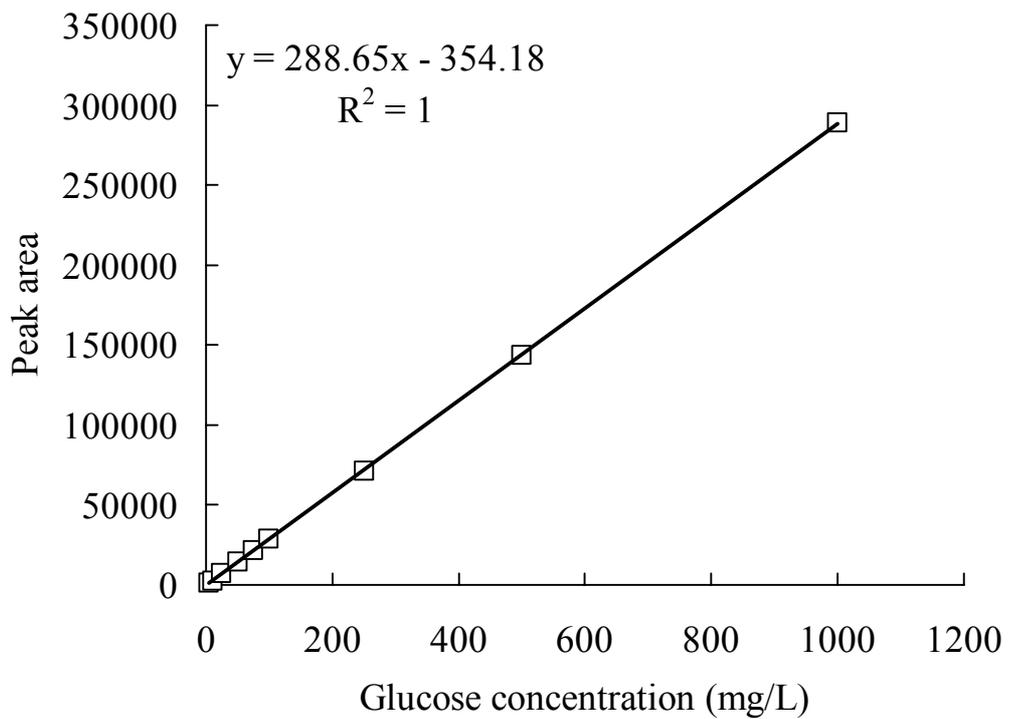


Retention time = Cellobiose 7.423 min
Glucose 8.980 min
Xylose 9.613 min
Lactate 12.715 min
Acetate 15.303 min
Ethanol 21.078 min

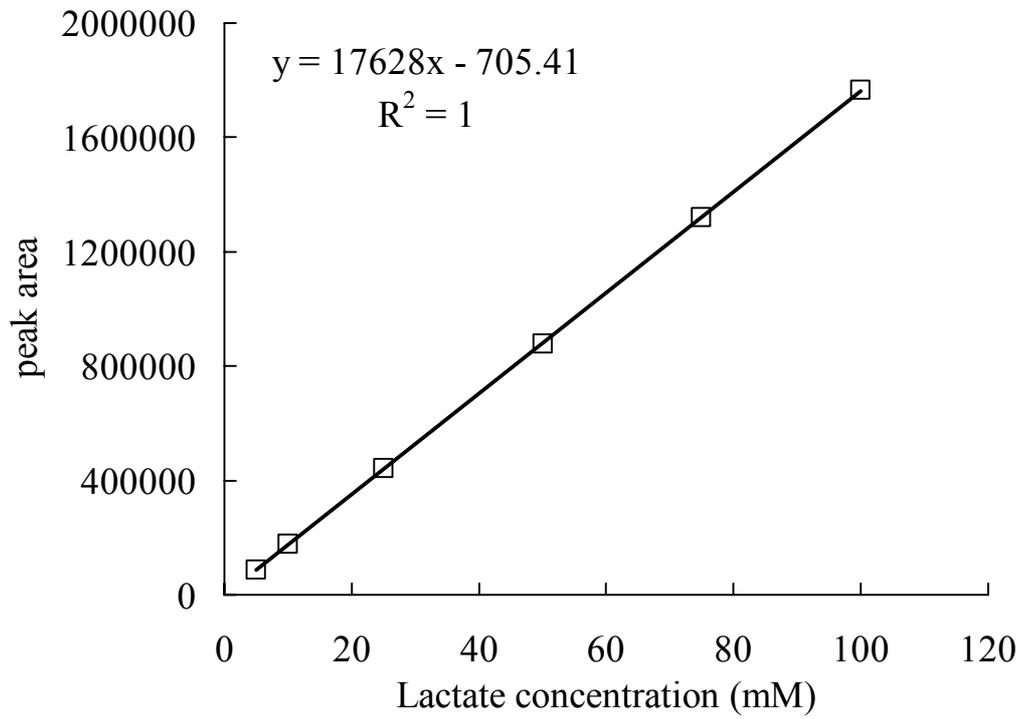
纖維二糖檢量線



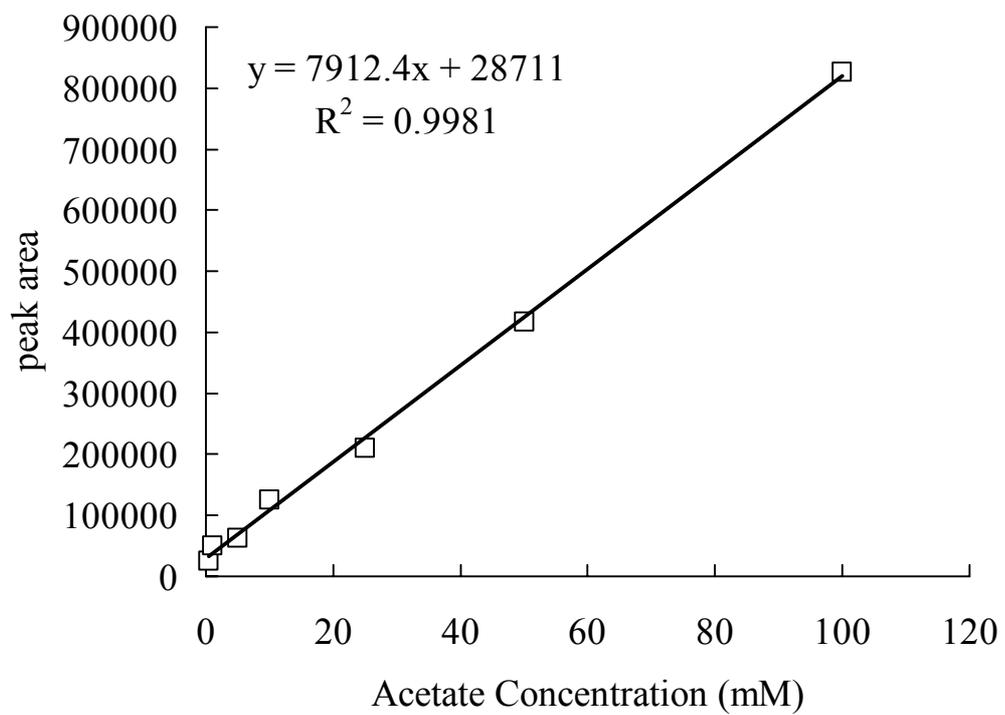
葡萄糖檢量線



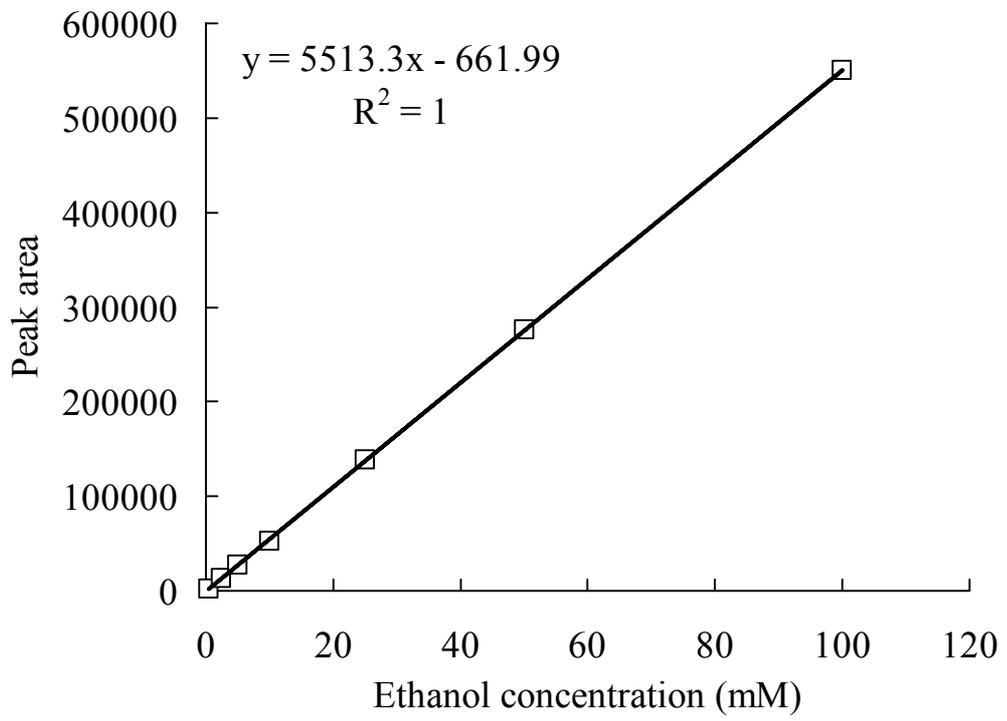
乳酸檢量線



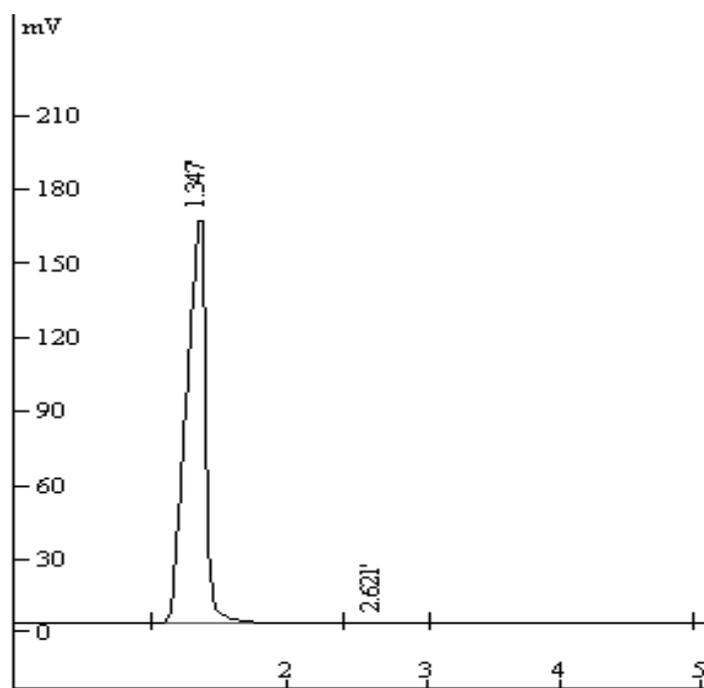
乙酸檢量線



乙醇檢量線

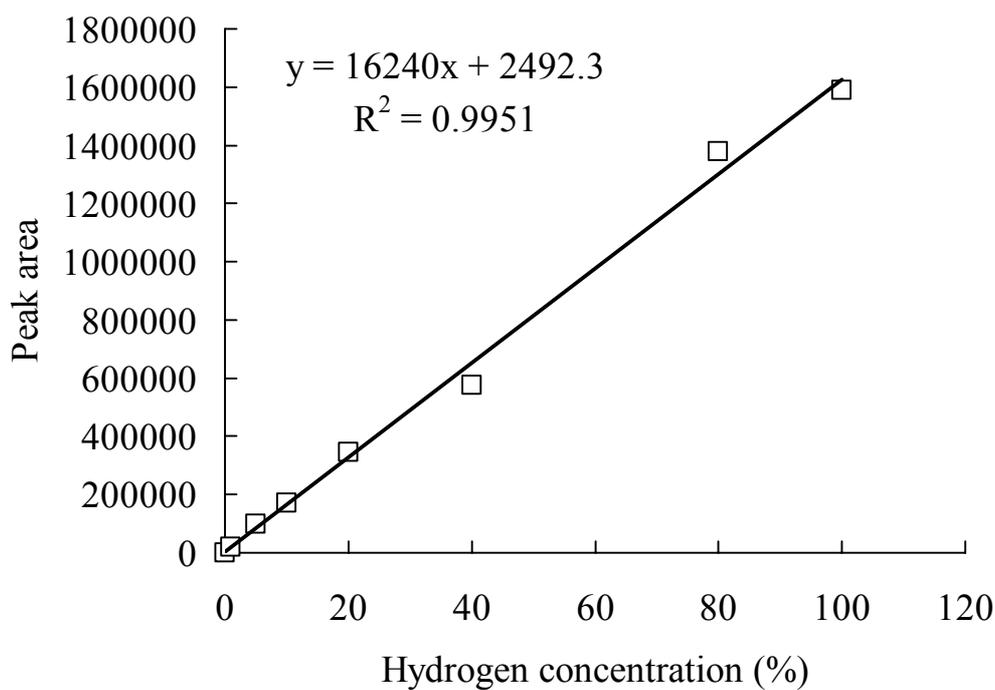


附錄六 氫氣標準品 GC-TCD 停留時間及檢量線

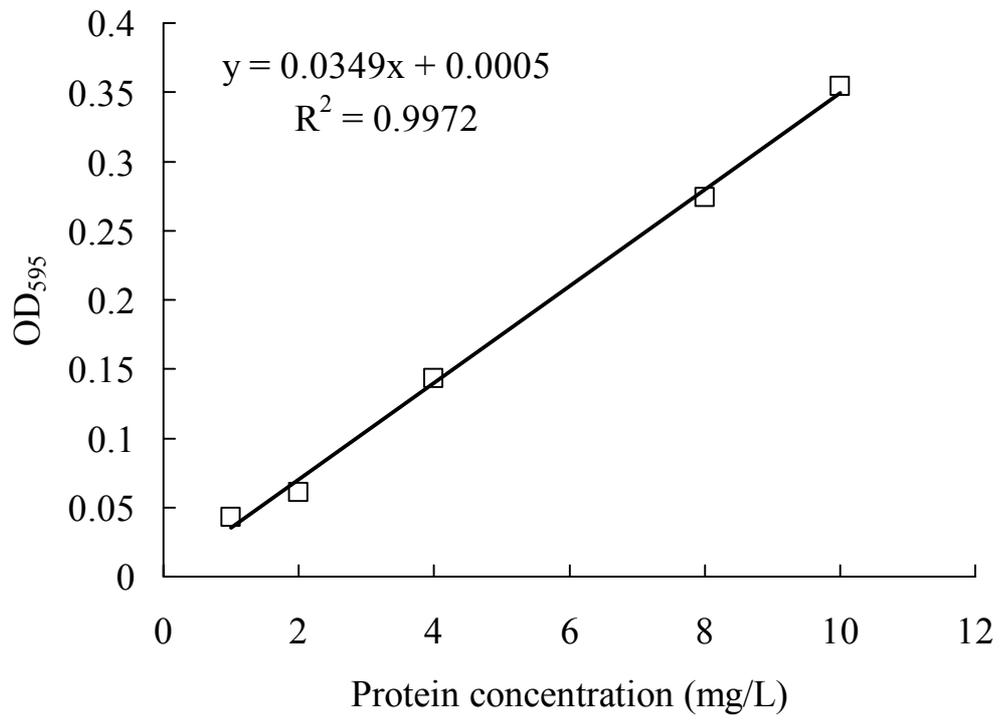


Retention time = Hydrogen 1.347 min

氫氣檢量線



附錄七 蛋白質檢量線



附錄八 Strain TCW1 16S rDNA 序列

(Accession NO: EU916270)

AAGTCGTATGTAGAATGATATACAGGAAGCGAGTACGCGTGCAC
GTTTCATCTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAAC
CTACCTCATAAGGGGATAACACAGGGAAACCTGTGCTAATAC
CGCATAATATAACGGGGCGGCATCGTCCTGTTATCAAAGGAGAA
ATCCGGTATGAGATGGGCCCGCGTCCGATTAGCTGGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGAACCTGAGAGG
TTGGTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTG
ACGCAGCACCGCGGGAAGAAGGCCTTCGGTTGTAATCTTTGAT
GGGGACGAGGAAGTGACGGTACCAAACAGCAGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGGAA
TTACGGGTGTAAAGGGCGGTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGT
GAAATTCCGGGGCTTAACCGGCGCGCATCTGAAACTGTATCTCT
TGAGTGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTC
TGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATAC
TAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCCCGGAGTTAACAC
AATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGG
TTTAATTCGAAGCAACGCGAAACCTTACCAGGGCTGACATCCCT
CTGACAGCTCTAGAGATAGGGCTTCCCTCGGGGCAGAGGAGAC
AGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTCGTAGTGCCAGCACGT
TAAGTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGCGACAAGTCGGAGA
AGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTCCTGGGC
TACACACGTACTACAATGGCTGCTACAAAGGGAAGCGATACCG
CGAGGTGGAGCAAATCCCCAAAAGCAGTCCCAGTTCGGATTGC
AGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGG
CAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGT
AGTCTAACCGCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTGGGGCAGATG
ATTGGGGTGAAGTCGT