

第一章 前言

近年來，由於傳統能源的過度使用，產生大量的二氧化碳，石油能源每年價格攀升且石油能源並非永久可利用之能源，因此學者開始尋找環境友善且無污染的能源。生質能為最近開始被討論到的議題，一般生質能由生質能作物轉化而來，若能利用廢棄物來產能，相對可以達成廢棄物的減量、減少焚化爐的二氧化碳排放以及解決廢棄物處理用地之問題。在廢棄物的生物處理上，厭氧處理為一種較為省能以及可高效率之處理方法，厭氧處理時產生的氫氣、甲烷以及醇類可收集作為生質能源。

澱粉是植物貯存主要的碳水化合物，用來當作能源貯存或者作為生長的能源。在食品製程上利用澱粉？來幫助澱粉液化，取代過去使用酸液化的方式。使用澱粉？可減少副產物的產生、有較高的回收率，而且使用澱粉？成本較為低廉。高溫嗜熱厭氧菌具有產生此類酵素之潛能(Aiyer, 2005)。

關於嗜熱菌的研究，近年來主要分為兩方面。在基礎科學方面，新的高溫古細菌不斷被尋找出來，而這些菌種是可生長在 100 °C 甚至更高溫度的環境底下；在生物科技方面，嗜熱菌可產生耐高溫的酵素，也在生物製程上產生了更多的可能性，例如生化合成以及生物感應器(Wiegel, 1991)。

台灣地處於環太平洋火山帶，島上擁有豐富的地熱資源，溫泉密度高。由於溫度高，所以水中溶氧低，因此在這些溫泉可分離出高溫嗜熱厭氧菌，此類菌種所產生的耐高溫酵素，除了可以被利用在處理高溫製程所產生的廢棄物，在食品、工業以及學術研究也有所使用。

本研究從高雄縣十三坑溫泉取得的溫泉水/底泥樣品，進行增富培養並分離菌種，純化出數株厭氧高溫嗜熱菌種，發現其中一株嗜熱純種菌對澱粉具水解功能，因此對於此菌株之生化特性加以定性分析，配合分子生物方法，以 16S rDNA 進行菌種鑑定，並對澱粉? 活性做初步的測試，以期找出本土之厭氧嗜熱澱粉水解菌，可用於產生生質能源之澱粉水解前處理。

第二章 文獻回顧

2.1 生質能(Biomass energy)

近年來，由於石油能源使用過度，出現了能源面臨枯竭的危機，科學家開始尋找可替代性的能源，其中包含了地熱發電、水力潮汐發電、太陽能發電、風力發電、掩埋場氣體(甲烷)、廢棄物再利用等都是不錯的選擇。生質能源的產生可利用廢棄物來生成，是廢棄物在利用的一種方式。

當以生物能源為替代能源時，由於生質能取自植物，因此生質能源中的碳為一種自然循環轉移，所以在碳的總量上並未增加，相對於由地層取得的石油與碳礦，生質能源是個可緩和溫室氣體產生的方式，例如：汽油中加入部分乙醇，可減少 NO_x 的產生(Faaij, 2006)。現在世界各國都在尋找具有高產率的生物能源，並慢慢替換掉舊有的能源產生方式，研究文獻中提到可將工業廢水轉化成可用的能源，亦是處理廢棄物最佳的方式，如含有高濃度有機物及水分的食品工業廢水即是可用以轉化生質能源之材料(Angenent *et. al.*, 2004)。

2.2 生物能源產生之方式

生質能源的產生方式大略如 Table 2.1, 表中包含了好氧與厭氧的生物能量轉換方式，如產生氫氣、產生甲烷與纖維素的生物轉換等。

Table 2.1 Different (bio)process strategies for biomass energy production

Biotic or abiotic process	Reaction	G*
Hydrogen fermentation to acetic acid	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \Leftrightarrow 4H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$	-904.26
Hydrogen fermentation to butyric acid	$C_6H_{12}O_6 \Leftrightarrow 2H_2 + CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2$	-931.42
Fermentation to ethanol	$C_6H_{12}O_6 \Leftrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	-235
Ethanol production with hydrogen	$CH_3COOH + H_2 \Leftrightarrow CH_3CH_2OH + H_2O$	-221.91
Syntrophic propionic acid oxidation	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \Leftrightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	-348.09
Syntrophic butyric acid oxidation	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \Leftrightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	27.16
Syntrophic acetic acid oxidation	$CH_3COOH + 2H_2O \Leftrightarrow 4H_2 + 2CO_2$	95
Hydrogenotrophic methanogenesis	$4H_2 + 2CO_2 \Leftrightarrow CH_4 + 2H_2O$	-98.4
Acetoclastic methanogenesis	$CH_3COOH \Leftrightarrow CH_4 + CO_2$	-97.8
Methane formation from glucose	$C_6H_{12}O_6 \Leftrightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	-1145.24
Catalytic methane conversion to syngas	$CH_4 + H_2O \Leftrightarrow 3H_2 + CO$	206
Catalytic gas-shift reaction	$CO + H_2O \Leftrightarrow H_2 + CO_2$	-19.51
Hydrogen fuel cell	$2H_2 + O_2 \Leftrightarrow 2H_2O + \text{electricity}$	237
Methane fuel cell	$CH_4 + 2O_2 \Leftrightarrow CO_2 + 2H_2O + \text{electricity}$	-800.74
Microbial fuel cell (MFC)	$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \Leftrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{electricity}$	-2870
Cellulose bioconversion	$[-C_6H_{11}O_6-]_n + aH_2O \Leftrightarrow bCH_3COOH + cCH_3CH_2OH + dCO_2 + eH_2$	-2879

*Unit of free energy (G): $KJ mol^{-1}$

(Angenent *et. al.*, 2004)

Figure 2.1 表示出厭氧微生物消化物質過程會生產的物質如氫氣、甲烷、乙醇都可被當成能源所利用。將產生質能的植物或廢棄物破碎後，使用生化(酵素)或化學(酸、熱力)的方式來水解大分子物質，例如蛋白質(protein)、多醣體(polysaccharides)、脂肪(lipids)成為小分子的胺基酸(amino acids)、醣類(sugar)、脂肪酸(fatty acids)後，這些小分子便可被微生物經由醱酵作用後產生乙醇、氫氣，而在醱酵後產生之醋酸亦可經甲烷化產生甲烷，亦是種可被直接利用的生質能源。

生質能源的轉化方式有熱力轉換與生化轉換。使用熱力轉化即是直接燃燒廢棄物，產生熱轉化成可利用的能源，但是直接燃燒廢棄物會產生較多的二氧化碳，會增加地球暖化的負擔。另一個方式為生化轉換，交予微生物消化、醱酵產生氣體或者在經由蒸餾取得生質酒精，也可以從植物種子萃取生質油。生質能源可轉化為熱能、電能與燃料 (Figure 2.2)。

以植物經生化轉化而來可取得的能源如：乙醇、氫氣、甲烷，皆是微生物代謝過程的中間產物或是最終。產物由於地球每年會產生大量的植物廢棄物，澱粉與纖維素又是可由植物最容易取得大量的物質，因此以澱粉、纖維素轉化為生質能源之技術具有相當大的潛能。澱粉是一個較容易被分解取得生質能的物質，例如玉米、稻米、甘藷等物質都可被利用來產生生質能源；植物體細胞壁組成含有木質素、

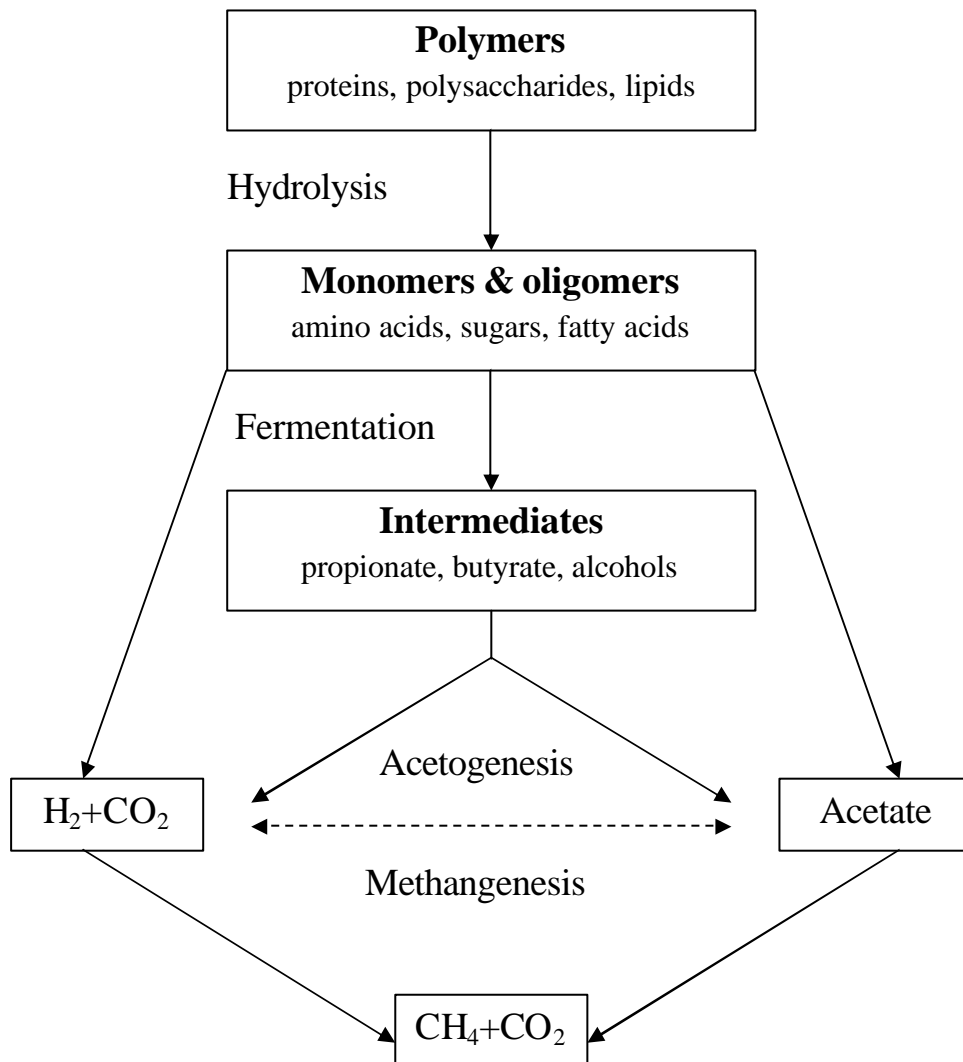


Figure 2.1 Intricate food web of methanogenic anaerobic digestion. Several trophic groups of microorganisms work together to convert complex organic material into methane and carbon dioxide. (Angenent *et al.*, 2004)

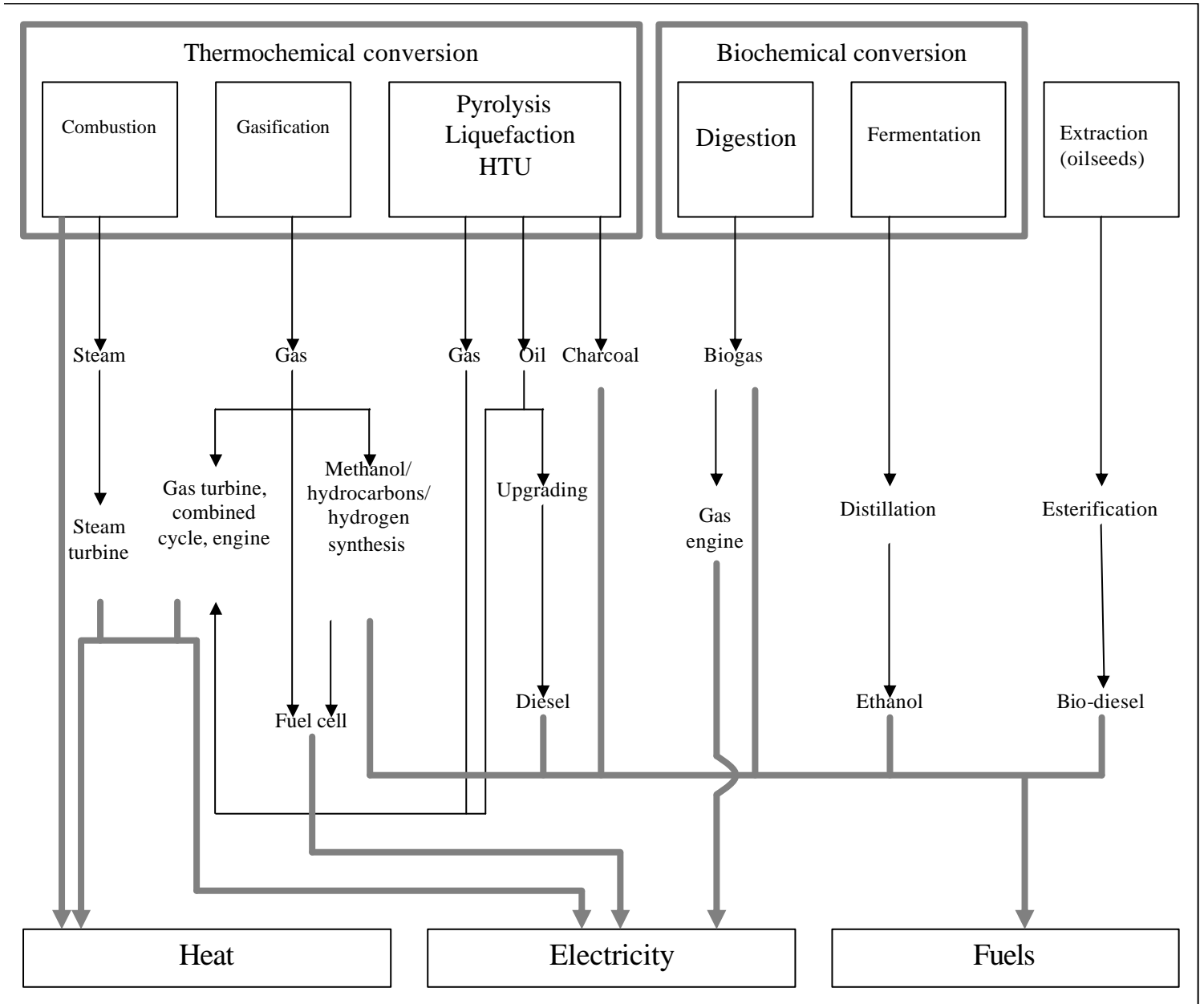


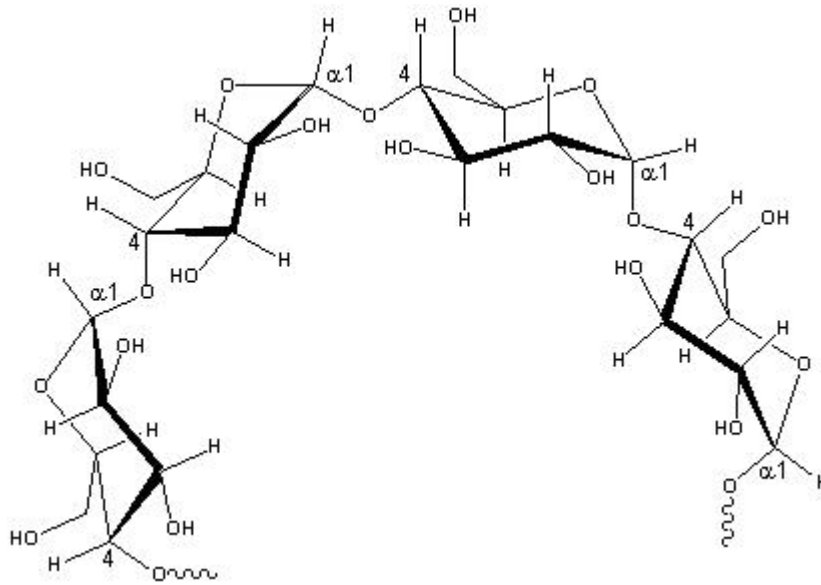
Figure 2.2 Main conversion options for biomass to secondary energy carriers. Some categories represent a wide range of technological concepts as capacity ranges at which they are deployed. (Faaij, 2006).

纖維素、半纖維素，此三個物質屬於比較難以被利用的基質，目前比較被利用為生質能源的是纖維素，因為纖維素屬於這三種物質中較容易被分解成單體的物質。在物質被分解的過程中，水解步驟是耗能較大且關鍵的步驟，一旦高分子物質被水解成小分子的單體後，就可以容易的將廢棄物轉換成能源，水解的方式使用生化(酵素)的方式比物化方式好的原因，是由於酵素具有高度的專一性以及節省能源的關係，所以尋找適合的酵素來分解澱粉或纖維素，是現在生質能議題裡面大家較為感興趣的題目。

2.3 澱粉

澱粉是許多高等植物主要貯存碳水化合物的型態，澱粉在水中是一種不會溶解的顆粒，其顆粒的大小特徵與取得澱粉的來源有關。經加熱之後，維持澱粉顆粒的氫鍵開始變微弱，這使得澱粉開始腫脹且有膠狀的現象，最後會變成漿糊狀，也就是類似麵糰的狀態。在工業上，澱粉可從植物的種子，例如：小麥、高粱、玉米或者稻米取得，也可以由植物的塊莖取得，例如：樹薯、馬鈴薯或者竹芋，其中，小麥是工業上主要澱粉的來源。澱粉主要是由直鏈澱粉(amylose)以及支鏈澱粉(amylopectin) (Figure 2.3)這兩種多醣(polysaccharide)所組成。直鏈澱粉是由 200-1000 個葡萄糖殘基($C_6H_{10}O_5$)以碳原子(1,4)位

Amylose



Amylopectin

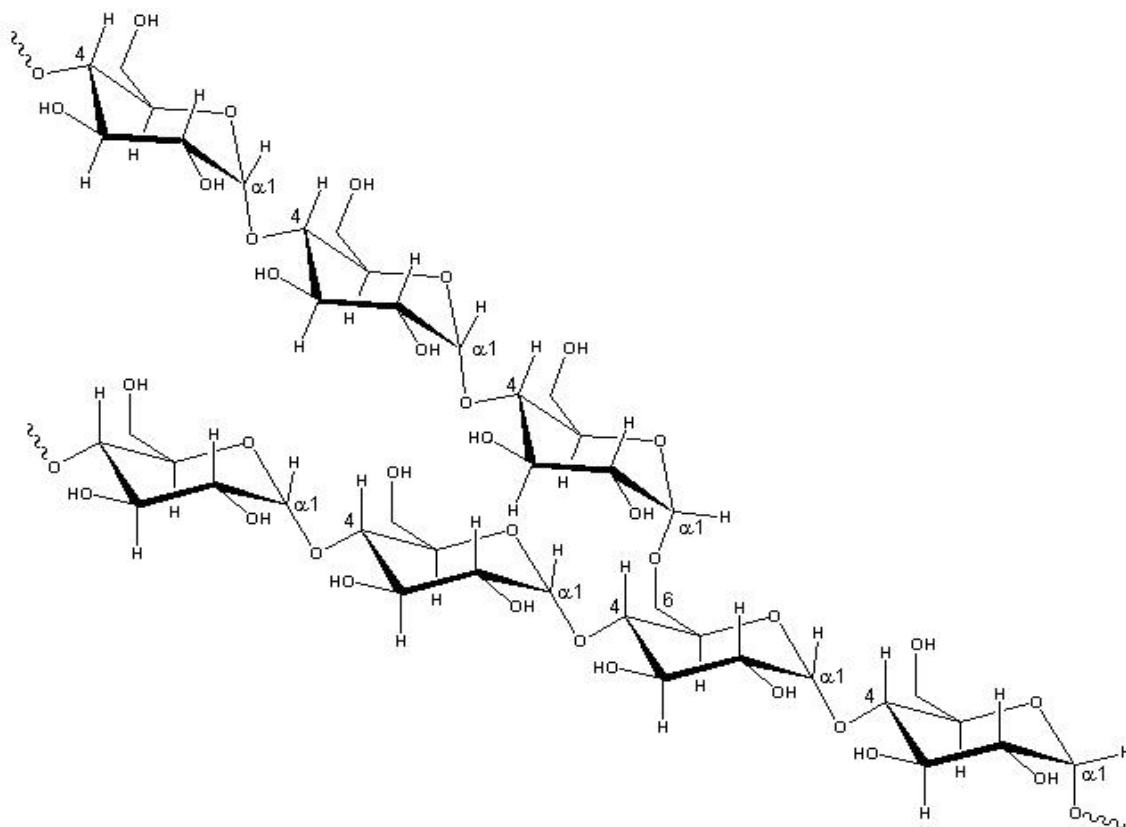


Figure 2.3 Structure of amylose and amylopectin
(Source: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hysta.html>)

置 (1,4-D-glucose)連接而成，沒有支鏈，可被 α -amylase 所分解。支鏈澱粉佔了 75%到 85%的澱粉構造，支鏈澱粉的分子量可以到達 10^7 - 10^8 g/mole，由 600-6000 葡萄糖殘基組成，除了以碳原子(1,4)位置 (1,4-D-glucose)連接成直鏈以外，支鏈澱粉內含 4%-5%的連接方式是在每隔 20-25 個葡萄糖單位以碳原子(1,6)位置(1,6-D-glucose)連接形成支鏈 支鏈澱粉先由 α -(1,6)-glucosidase 分解，之後再由 α -amylase 繼續分解成葡萄糖(Mathews *et al.*, 2000)。

澱粉水解可藉由酸或者酵素作用完成。使用酵素水解有以下幾個優點：具有高度的專一性、副產物少、產率較高、較不會出現如酸水解過程中所產生之褐色化，除此之外，酵素水解是比較溫和的方式，在酵素作用的過程中，只要將雜質去除即可提升到最佳化，因此使用酵素取代傳統的酸化來水解澱粉，尤其較不會出現褐色化這一點在工業上是比較需要的(Aiyer, 2005)。

2.4 嗜熱菌與耐熱酵素

2.4.1 嗜熱性細菌

溫度是影響微生物生存的一個重要的環境因數，依照其最適生長溫度來區分，微生物被分為三個主要的群組：嗜低溫菌 (psychrophiles)、中溫菌(mesophiles)以及嗜熱菌(thermophiles)；其溫

度分別為，嗜低溫菌的生長溫度範圍在 -10°C 到 25°C 之間(最適溫度在 10°C 到 20°C)、中溫菌的溫度範圍在 10°C 到 45°C 之間(最適溫度在 20°C 到 40°C)，而嗜熱菌則是 30°C 到 80°C 之間(最適溫度在 40°C 到 70°C)，如果細菌生長溫度高於 80°C 則是被認定為極端嗜熱菌(extreme thermophiles) (Lim, 1998)。嗜熱菌及極端嗜熱菌通常會在溫泉、火山口或者是工業製程廢水(例如：造紙廠廢水)中被發現，因為這些環境的溫度通常都是高於 50°C ，除了這些地方以外，只要是高溫地區的土壤，或者是經日照強烈地區的土壤都有可能被發現。由於其酵素以及細胞結構在高溫的環境下仍具有穩定的活性及功能，因此嗜熱菌可以在一般微生物無法生存的溫度之下生長(Wiegel, 1991)。

Thermus aquaticus 是第一株從黃石公園分離出的極端嗜熱菌。由於 *T. aquaticus* 的最高生長溫度約為 79°C ，但是這樣的溫度就現代科學來說很難去界定為極端嗜熱菌，因此目前最簡單的分類方式是菌株如果能生存在沸騰的水中就可以認定為極端嗜熱菌，而黃石公園內的水沸點為 92.5°C ，因此 Brock 認為 90°C 可作為界定極端嗜熱菌的溫度 (Brock and Freeze, 1969; Brock, 2002; Wiegel, 1991)。

2.4.2 產生耐熱酵素之嗜熱菌

一般的酵素在 50°C 左右就失去活性，然而由極端環境微生物身上所取得的酵素，可存在於極端環境下，因此較適於工業所利用，且利用酵素的製程對環境的影響較少，符合環境保護的需求。工業上被應用之耐熱酵素有澱粉水解酶、木聚糖酶、纖維水解酶、幾丁質酵素、蛋白質分解酵素及脂肪分解酵素，這些酵素可被應用在食品工業、造紙工業、清潔劑工業、製藥工業等。食品工業上，澱粉類產物為相當大的主要產品，由於澱粉為易於利用之多醣體，且澱粉分解後之產物可被利用，因此工業上也運用不少澱粉水解酶。耐熱性的澱粉水解酶通常從 *Bacillus* sp. 取得(Haki and Rakshit, 2003)。

2.4.3 耐熱酵素之應用

酵素被廣泛的利用在很多製程上已經有很長的歷史，例如麵包烘焙、酒類釀造以及乳酪製造等。耐熱酵素(thermostable enzymes)主要是從嗜熱菌中分離出來，由於嗜熱菌本身菌體構造以及生活環境的關係，由嗜熱菌產生之耐熱酵素在可忍受高溫而不變性，有別於中溫菌所產生之酵素，耐熱酵素可存在於高溫環境下而不會失去活性，被廣泛利用在減少廢水污染之用途上，如：造紙業及紡織業所產生之廢水。工業上的應用如纖維素的降解、造紙業漂白等(Table 2.2)。

Table 2.2 Bioconversion reactions and applications of thermostable enzymes

Enzyme	Temperature range (°C)	Bioconversions	Applications
a-Amylase (bacterial)	90-100	Starch → dextrose syrups	Starch hydrolysis, brewing, baking, detergents
a-Amylase (fungal)	50-60	Starch → dextrose syrups	Production of maltose
Pullulanase	50-60	Starch → dextrose syrups	Production of glucose syrups
Xylanase	45-60, 105 ^a	Craft pulp → xylan + lignin	Pulp and paper industry
Chitinase	65-75 ^b	Chitin → chitobiose	Food, cosmetics, pharmaceuticals, agrochemicals
		Chitin → <i>N</i> -acetyl glucosamine (chitinase)	
		<i>N</i> -acetyl glucosamine → glucosamine (deacetylation)	
Cellulase	45-55, 95 ^c	Cellulose → glucose	Cellulose hydrolysis, polymer degradation in detergents
Protease	65-85	Protein → amino acids and peptides	Baking, brewing, detergents, leather industry
Lipase	30-70	Fat removal, hydrolysis, interesterification, alcoholysis, aminolysis	Dairy, oleo chemical, detergent, pulp, pharmaceuticals, cosmetics, and leather industry
DNA polymerase	90-95	DNA amplification	Genetic engineering/PCR

^aXylanase from *Thermotoga* sp.

(Haki and Rakshit, 2003)

^bWithin this range enzyme activity was high.

^cCellulases from *Thermotoga* sp.

近年來發現嗜熱性的古細菌、細菌以及真菌大多生存在極端的環境底下，因此耐熱酵素大多由這類的菌種中被發現並分離出來，並且由於酵素本身具有低耗能、高度的專一性(只能催化一種生化反應)的特性，而受到了工業界之重視。在生化的應用上，最具代表性的，是從 *T. aquaticus* 分離之 Taq polymerase，耐熱的 Taq polymerase 的發現使得聚合？連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)可以減少實驗時間並增加產物量。(Danson *et. al.*, 1996; Vieille and Zeikus, 2001)

2.4.4 澱粉水解？之種類與機制

澱粉在高溫地熱的地區是很少見的物質，微生物具有澱粉？的存在可能是由於生物需要降解肝醣(glycogen)，因此發展出了澱粉水解？。許多的微生物細胞貯存肝醣作為其能量，澱粉水解？為微生物在新陳代謝裡一種豐富的酵素，這類酵素包括了：amylases、pullulanases 以及 glucoamylases，在食品、化學、製藥工業中都被大量的使用。高溫澱粉水解？已經被發現存在幾個高溫古細菌，其中包含了以下四個屬：*Sulfolobus*、*Thermophilum*、*Desulfurococcus*、*Staphylothermus*(Chung *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1997)。

澱粉工業上也應用了不少酵素在製程上，例如 α -amylase、glucoamylase、pullulanase 等，與澱粉製程工業相關使用之酵素與來

源見 Table 2.3(Haki and Rakshit, 2003)。

澱粉是一種容易利用且普遍存在的物質，但由於澱粉的構造相當複雜，生物需先將澱粉分解為較簡單之物質始能利用，因此生物需要組合一些適當的酵素來將澱粉分解成更容易利用的醣類，例如：葡萄糖、麥芽糖。澱粉可分為兩種：內切酵素(endo-acting enzyme or endo-hydrolases)，以 α -amylase 為代表，與外切酵素(exo-acting enzyme or exo-hydrolases)，例如： β -amylase、glucoamylase 以及 α -glucosidase。有關於澱粉的酵素分解見 Figure 2.4。

澱粉水解之種類及功能介紹如下：

A. α -Amylase

α -amylase 為一種內切型酵素，針對澱粉的 α -1,4-glucose linkage 進行分解，而不分解 α -1,6-glucose linkage，因此會使得澱粉黏度快速降低而產生糊精化(dextrin)。最終分解生成物有糊精、麥芽糖以及少量的葡萄糖。其生成的還原糖為 α -型，因此稱為 α -amylase。此一酵素在澱粉內部以隨機的方式水解，將澱粉分解成直鏈澱粉以及支鏈澱粉(鄧氏, 1988; Bertoldo and Antranikian, 2002)。 α -amylase 為含鈣的酵素，添加鈣離子具有安定 α -amylase 結構以及增強酵素對於溫度、酸鹼度、蛋白質水解的耐受度，並可增加活性(Vieille and Zeikus, 2001)。

Table 2.3 Source microorganisms and properties of thermostable starch hydrolyzing enzymes

Enzymes	Organism	Enzyme properties	
		Optimal temperature (°C)	Optimal pH
a-Amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7.0
	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6.0-6.5
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5.0-6.0
	<i>Bacillus subtilis</i>	70	7.0
	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	55	5.5
	<i>Myceliophthora thermophile</i>	100	5.6
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5.5
	<i>Pyrococcus woesei</i>	100	6.5-7.5
	<i>Staphylothermus marinus</i>	65	5.0
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-	-
	<i>Thermococcus aggregans</i>	100	5.5
	<i>Thermococcus celer</i>	90	5.5
	<i>Thermococcus fumicolans</i>	95	4.0-6.3
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85	4.8-7.8
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	5.6
	<i>Thermococcus profundus</i>	80	4.0-5.0

Table 2.3 Source microorganisms and properties of thermostable starch hydrolyzing enzymes (continued)

Enzymes	Organism	Enzyme properties		
		Optimal temperature (°C)	Optimal pH	
β-Amylase	<i>Bacillus circulans</i>	60	-	
	<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>	50	-	
	<i>Bacillus sp.</i>	50	7.5	
	<i>Clostridium thermosulphurogenes</i>	75	5.5	
	<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	60	5.8-6.0	
	Pullulanase	<i>Bacillus sp.</i>	60	-
		<i>Pyrococcus furiosus</i>	98	5.5
<i>Pyrococcus woesei</i>		100	5.5-6.0	
<i>Thermococcus aggregans</i>		100	6.5	
<i>Thermus caldophilus GK24</i>		75	5.5	
<i>Thermococcus celer</i>		90	5.5	
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>		95	5.5	
<i>Thermococcus litoralis</i>		98	5.5	
<i>Thermotoga maritime</i>		90	6.0	
MSB8				

(Haki and Rakshit, 2003)

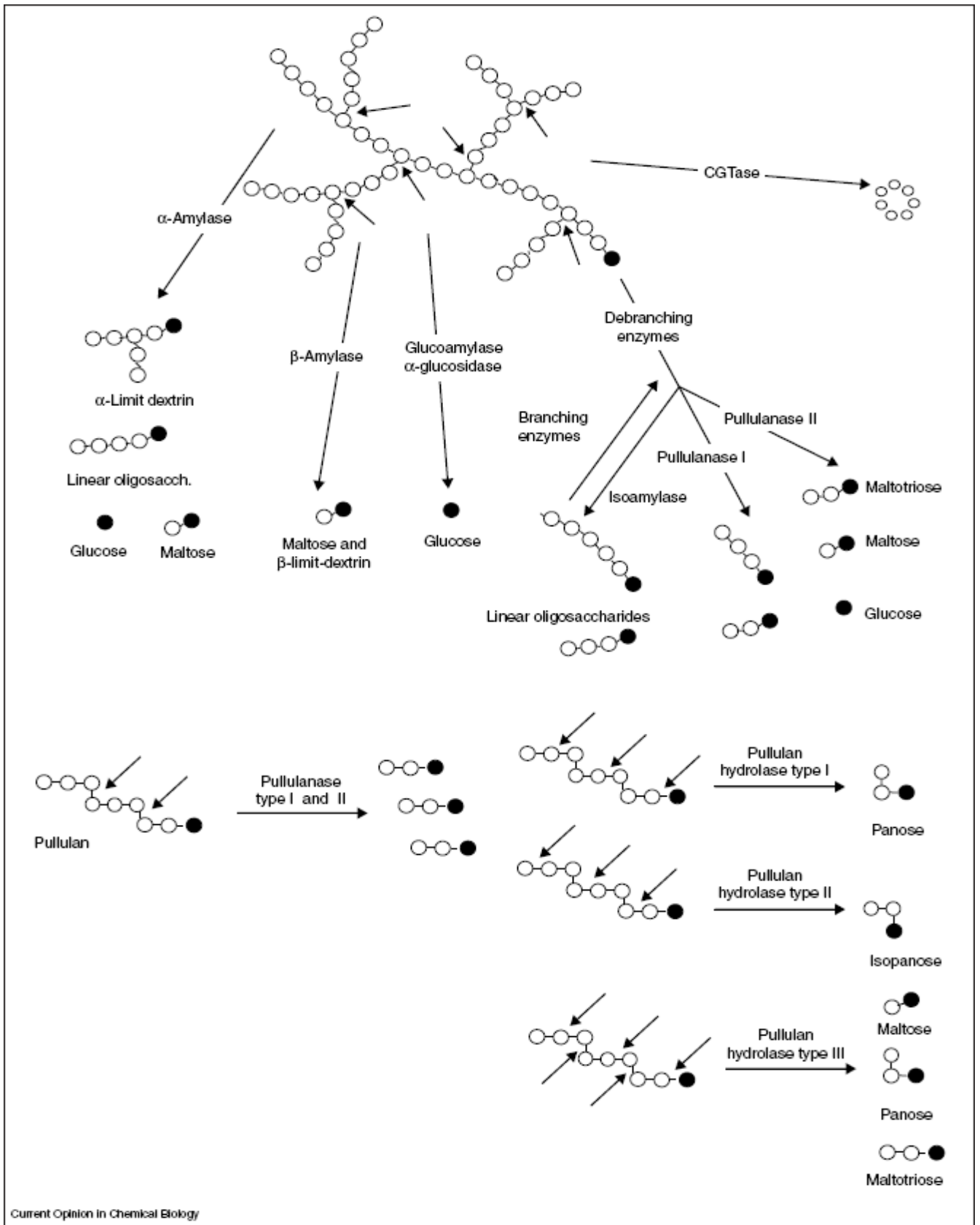


Figure 2.4 Schematic presentation of the action of amylolytic and pullulytic enzymes. Black circles indicate reducing sugars. (Bertoldo and Antranikian, 2002)

具有應用潛力的嗜熱性 α -amylase，其活性溫度大約介於 80-110°C，產生嗜熱性 α -amylase 的代表性菌株有 *Desulfurococcus mucosus*、*Pyrococcus furiosus*、*Pyrococcus woesei*、*Pyrodictium abyssi*、*Staphylothermus marinus*、*Thermococcus profundus*、*Dictyoglomus thermophilum*、*Thermotoga maritima*，這些菌株的嗜熱性 α -amylase 活性溫度介於 80-100°C，活性酸鹼度介於 pH 4.0-7.5，液化澱粉的最佳活性溫度大約為 100°C，最佳酸鹼度大約為 pH 4.0-5.0，且是在不加鈣離子的狀況下 (Vieille and Zeikus, 2001)。

B. β -Amylase

β -amylase 從澱粉的 α -1,4 linkage 所構成分子鏈的非還原末端開始作用，是一種外切型酵素，生成 β 型的麥芽糖，一直作用到 α -1,6 結合分歧點才停止，生成大量的麥芽糖(大約 50%-60%轉化成麥芽糖)，同時生成相當多大分子 β -糊精。因此還原糖量會增加，但粘度並未降低太多。一般 β -amylase 存在甘藷、麥芽、大豆等之中。由於 β -amylase 分解澱粉產生的麥芽糖量較高，因此工業上以此種酵素產麥芽糖漿。(鄧氏, 1988; Anneliese and Wulf, 1990)。嗜熱性的 β -amylase 目前從兩株菌所取得，分別是 *Thermotoga maritima*、*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*，其最佳活性溫度為 95

°C，最佳活性酸鹼度為 pH 4.3-5.5，且是在不外加鈣離子的狀況下 (Vieille and Zeikus, 2001)。

C. Glucoamylase、 α -Glucosidase

Glucoamylase 可以切斷 β -amylase 無法切斷的 α -1,6 linkage，可使澱粉 100% 分解成葡萄糖，工業上用以製造糖漿。目前應用在酵素糖化澱粉製造葡萄糖的 glucoamylase，是從真菌 *Rhizopus delemar* 取得。 α -glucosidase，主要攻擊 α -1,4 的寡糖 linkage。 α -glucosidase 與 glucoamylase 不同的是，glucoamylase 產生 β 型的葡萄糖， α -glucosidase 則是產生 α 型的葡萄糖。與 β -amylase 一樣，目前 glucoamylase 與 α -glucosidase 較少於高溫菌身上被發現，只有少數幾個高溫厭氧菌有發現 glucoamylase (*Clostridium thermosaccharolyticum*、*Methanococcus jannaschii*、*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) 與 α -glucosidase (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) (Vieille and Zeikus, 2001)。

D. Pullulanase、amylopullulanase

Type I pullulanase 分解澱粉的 α -1,6 linkage，可完全將 pullulan 分解成麥芽三糖及麥芽糖，是一種外切型酵素，可被應用在液化澱粉上。目前為止，type I pullulanase 只被發現在中溫菌與嗜熱性的好氧

菌，這些菌株為 *Bacillus flavocaldarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermus caldophilus*、*Fervidobacterium pennavorans*，其最佳活性溫度為 75-90 °C，最佳酸鹼度為 pH 5.5-6.0。amylopullulanase 亦稱為 type II pullulanase，分解澱粉的 α -1,6 linkage 與 α -1,4 linkage，未來可能取代 α -amylase 來液化澱粉，amylopullulanase 可分解澱粉產生麥芽糖、麥芽三糖、麥芽四糖，amylopullulanase 取自高溫嗜熱菌 *Desulfurococcus mucosus* ES4、*Pyrococcus furiosus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus hydrothermalis*、*Thermococcus celer*、*Thermoanaerobacter ethanolicus*，其於偏酸環境下最佳活性溫度為 105-120 °C (Vieille and Zeikus, 2001)。

E. Isoamylase

Isoamylase 可分解支鏈澱粉成 amylose，且僅能分解支鏈澱粉的 α -1,6 結合點，因此不可分解直鏈澱粉之 α -1,4 linkage。Isoamylase 存在於酵母、水稻、馬鈴薯、蠶豆、麥芽中，植物藉著此類酵素來分解貯存在植物體內的澱粉，植物的支鏈澱粉水解酵素也稱為 R-enzyme。Isoamylase 可將葡萄糖轉化成果糖，高溫耐熱性的 isoamylase 用於高果糖糖漿 (HFCS) 的製造，可以提昇約 5% 的產率。工業常用之耐熱性的 isoamylase 取自 *Thermoanaerobacterium*

thermosulfurigenes、*Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489、*Thermus aquaticus*、*Thermotoga maritima* 及 *Thermotoga neapolitana* , 其最佳活性溫度為 95-100 °C , 同時在中性環境下有最佳活性 (Vieille and Zeikus, 2001)。

F. Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase)

Cyclodextrin-glucanotransferase (或稱為 Cyclodextrin glycosyl transferase; CGTase)可將澱粉轉化成環狀糊精或者是較小分子的醣類 , 熱穩定的 CGTase 主要萃取自厭氧菌 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* 以及 *Anaerobranca gottschalkii* , 後者的酵素活性有比較廣的酸鹼值範圍 , 大約在 pH 4.0-10.5 , 而最佳溫度在 65°C , 當以澱粉、支鏈澱粉或者直鏈澱粉培養時 α -環狀糊精(Cyclodextrin)為主要產物 , 若延長培養則會產生 β -環狀糊精以及 γ -環狀糊精。

最近研究發現由 *Thermococcus* sp. 上找到耐熱的 CGTase , 最高耐熱溫度可達 100-105 °C , 於酸性環境(pH 5.0-5.5)下有最佳活性溫度介於 90-100°C。此酵素亦表現出很高的 α -amylase 活性可水解 1,4-glucose linkage , 使澱粉轉化為 dextrine。 *Thermococcus* CGTase 可被用於發展 one step 的環狀糊精生產 , 可能取代 α -amylase 來進行澱粉液化 (Vieille and Zeikus, 2001)。

2.4.5 Amylase 在工業上之應用

Amylase 是一種分解澱粉的酵素，廣泛分佈在微生物、動物、植物身上，於工業上 amylase 被應用在產生醣類、糖漿、糊精等產品，除此之外也被應用在去除澱粉上，如：廢水處理業與紡織業，於生質能源產業來說 amylase 可應用在液化澱粉以提高生質酒精產率。

A. 液化

液化澱粉是使用熱穩定的 amylase 使澱粉部分分解的一個方法，可將澱粉液化程度達到 35% (w/v)，此方法是為了代替過去的酸化法，以達到高產率低副產物的目的。液化後的澱粉較利於之後的酵素水解，用以增加水解產物的效率(Aiyer, 2005; Nigam and Singh, 1995)。

B. 麥芽糖的製造

麥芽糖在澱粉水解過程中是一種常見的物質，在食品工業上普遍被當成糖精或者拿來增加食品的糖度，可從小麥、馬鈴薯、甘藷、樹薯製造出來。工業上雖有使用從 *Bacillus licheniformis* 以及 *B. amyloiquifaciens* 萃取出來具有熱穩定的 α -amylase，但是仍舊普遍以 β -amylase 來產生麥芽糖，因為 β -amylase 產生麥芽糖的產率較高 (Anneliese and Wulf, 1990)。

C. 寡糖混合物(oligosaccharides mixture; maltooligomer mix)的製造

寡糖混合物是由小麥澱粉經由 α -amylase、 β -amylase 以及 pullulanase 作用所製造出來。寡糖混合物是種新的商業產品，通常包含了 2.2%的葡萄糖、37.5%的麥芽糖、46.4%的麥芽三糖以及 14%的麥芽四糖與麥芽寡糖。由於含有較低的葡萄糖量，因此寡糖混合物的黏性較低，在食品工業上，被當成蔗糖或者其他糖類的替代品(Aiyer, 2005)。

D. 麥芽四糖漿(maltotetraose syrup; G4 syrup)的製造

麥芽四糖漿是澱粉經由 α -amylase 製造出來，其甜度大約是蔗糖的 20%，因此使用部分的麥芽四糖漿取代蔗糖，可減低糖度，但是不會減少食物的風味。麥芽四糖漿的粘度高於蔗糖，因此可以提升食物的結構，它的冰點較蔗糖及果糖低，可用來控制冷凍食物的冰點，以便貯存或取用。目前商業上製造麥芽四糖的耐熱酵素 α -amylase 是由 *B. licheniformis* 或者 *B. subtilis* 中所取得(Aiyer, 2005)。

E. Alo mixture (anomalously linked oligosaccharides mixture) 的生產

“Alo mixture”主要包含了異麥芽糖(isomaltose)、盼樂醣(panose)、異麥芽三糖(isomaltotriose)以及四到五個葡萄糖殘基的支鏈寡糖，Alo

mixture 具有低甜度、低粘度、高度保水性之特性。在食品工業中會使用 Alo mixture 的水活性較低的特性，來控制微生物對食物引起的污染，低水活性可延長食品的儲存期限(陳, 2004)。Alo mixture 在製造時，澱粉經由耐熱的 α -amylase 使其糊精化，之後糊精的糖化(sacharification)與葡萄糖的轉移反應(生成 α -1,6 糖苷鍵連結)分別使用 β -amylase 與 α -glucosidase，形成麥芽糖(isomaltose)、盼樂醣(panose)、異麥芽三糖(isomaltotriose) (Aiyer, 2005; Fogarty and Kelly, 1990; Pan and Lee, 2004)。

F. 高分子支鏈糊精的製造

高分子支鏈糊精是以小麥澱粉經由 α -amylase 水解製備，其水解程度與澱粉的種類以及物理特性有關。高分子支鏈糊精可經由噴射乾燥的方式製成粉末，可以當成乾燥食品粉末的補充劑(Martin and Hosney 1991)。

G. 紡織過程的澱粉去除

在紡織業，加入澱粉漿(上漿; sizing)可以增加紡織品的強度，並增加柔軟性，之後需要將澱粉去除(退漿; desizing)才可進行染色的動作，此時去除澱粉的方法即是應用 α -amylase 為退漿劑進行退漿(李,

2003)。

H. 澱粉醱酵產乙醇

α -amylase 被應用在釀酒或者產生乙醇的工業上，其優點為增加糖化的效率、乙醇的產率以及酵母的生長速率。醱酵澱粉時若添加 α -amylase，產乙醇的效率有增加的情形(Aiyer, 2005)。目前美國是以玉米澱粉為原料，經過水解轉化成糖類後，再經醱酵反應製造乙醇，此製程年產約 20 億加侖。乙醇可與脂肪酸進行酯化反應得到生化柴油。由於生化柴油本身含有氧原子，可降低毒性物質的排放。目前生化柴油所用原料在美國以大豆油為主，約佔一半，歐洲則以葡萄籽油為主。回收食用油亦是生化柴油的主要來源(王, 2005)。

I. 澱粉製程廢水的處理

食品工業廢水(如製糖工業)中含有大量的澱粉，而這些澱粉亦會造成污染問題。在以生物處理此類食品廢水時添加 α -amylase，可以增加廢水生物量，加速澱粉之分解，進而淨化出流水。亦有清潔劑加入 α -amylase 來去除澱粉類污垢(楊, 2001; Aiyer, 2005)。

2.5 澱粉水解菌

為解決一些包括皮革染製業 造紙業等工業廢水問題, Martins 從

Ethiopian 蘇打湖尋找可耐鹼的澱粉水解菌，找尋到的耐鹼澱粉水解菌為 *Bacillus* sp. (Martins *et. al.*, 2001)。

早期澱粉水解菌是從反芻動物的胃所取得，因為這些動物所吃的糧食含有大量澱粉，但是過多的澱粉使得動物產生了某些疾病，因此也有針對這方面的澱粉水解菌研究，例如 Cotta 為瞭解決乳牛因吃過量澱粉所產生的一些疾病問題，為增進牛隻對澱粉的消化，開始了澱粉水解菌的研究，這些菌包括了 *Bacteroides rumminicola*、*Ruminobacter amylophilus*、*Butyrivibrio fibrisolvens*、*Selenomonas ruminantium* 及 *Streptococcus bovis*(Cotta, 1988)。

Morion-Guyot 等學者在 1998 發表了一株可水解澱粉並產生乳酸的乳酸菌 *Lactobacillus manihotivorans* (Morion-Guyot *et. al.*, 1998) ，*Lactobacillus* 菌屬通常是從食品所分離出來，*Lactobacillus manihotivorans* 的發現可以進一步被應用在食品工業上。由於目前被分離出來的澱粉乳酸細菌 (amylolytic lactic acid bacteria ; ALAB) 並不多，因此 *Lactobacillus manihotivorans* 的發現可以幫助建立食品相關菌株的資料。目前已被發現之澱粉水解高溫菌包括 *Thermotoga*、*Pyrococcus* 及 *Thermoanaerobacter* 等屬。

高溫嗜熱菌產生的耐熱酵素具有工業應用的潛能，因為其酵素可耐高溫之緣故，而且被認為是比從中溫菌找到的酵素更具有高度的耐

熱度。

Pyrococcus furiosus(最適生長溫度 98°C)與 *Thermococcus litoralis*(最適生長溫度 90°C)擁有分解複雜糖類的能力，此兩株菌的胞外酵素具有不錯的水解效果，例如澱粉的 α -1,4 linkage 或 α -1,6 linkage 分解酵素，在水解澱粉這一方面具有相當大的潛力，此兩株嗜熱菌的澱粉水解酵素，添加 5mM 鈣離子，可增強酵素活性且澱粉水解酵素具有熱穩定性，在 130-140°C 下酵素仍有活性(Brown and Kelly, 1993; Brown, et. al., 1990)。 *Thermococcus profundus* 的最適生長溫度為 80°C，是一株由深海地熱湧泉分離出來的超高溫嗜熱菌，菌株可利用澱粉為碳源，表現出胞外酵素 amylase 的活性， *Thermococcus profundus* 的 amylase 反應最適酸鹼度為 pH 5.5-6.0, 最適酵素活性反應溫度為 80°C，於反應液內添加 5 mM 鈣離子可增加酵素活性(Chung, et. al., 1995)。 *Bacillus stearothermophilus* 的生長溫度介於 70-100°C，會產生耐熱的 amylase，酵素具有活性的酸鹼度在 pH 4.6-5.1，溫度介於 55-70°C，添加 CaCl₂ 可增加 amylase 的活性 (Manning and Campbell, 1961)。 *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T 是一株水解澱粉產乳酸菌，擁有胞外澱粉水解？，其 amylase 在酸鹼度 pH 5.5 與溫度 55°C 有最佳的反應活性，但發現添加鈣離子不會增加 amylase 活性，與其他嗜熱菌產生的酵素特性明顯不同

(Augilar, *et. al.*, 2000)。Welker 與 Campbell(1967)兩位學者測試了 *Bacillus subtilis* 的 α -amylase 活性, *Bacillus subtilis* 在酸鹼度 pH 5.7-6.7 與溫度 70°C 時 α -amylase 有最佳的活性 (Welker and Campbell, 1967)。*Thermococcus hydrothermalis* 是一株從深海熱湧泉分離出來的超高溫嗜熱菌, 它的最適生長溫度為 85°C, 具有完整的澱粉水解? (α -amylase、pullulanase、 α -glucosidase), Legin 等學者在 1998 年研究 *Thermococcus hydrothermalis* 的完整澱粉水解? 活性, 將酵素分別進行萃取研究 α -amylase、 α -glucosidase 及 pullulanase 的活性, 這些澱粉水解? 的活性酸鹼度為 pH 5.5-6.5, 最佳反應溫度為 110-90°C(Legin *et. al.*, 1998)。Haseltine 等學者在 1996 年研究一株從酸性溫泉所分離出來的超高溫嗜熱菌 *Sulfolobus solfataricus* 的 α -amylase 活性, 分別使用了可溶性澱粉、糊精與 α 環狀糊精測試, 結果分解可溶性澱粉時具有最高的比酵素活性(Haseltine *et. al.*, 1996)。Mishar 與 Maheshwari 等學者在 1996 年對 *Thermomyces lanuginosus* 做了 amylase 的研究, *Thermomyces lanuginosus* 為一株嗜熱性的真菌, 這株真菌已經被證實在培養基內會分泌出大量的蛋白質, 酵素活性高, Mishar 與 Maheshwari 等學者在 1996 年以澱粉研究 *Thermomyces lanuginosus* 的酵素活性, 發現其 amylase 的最佳活性溫度為 65°C, 最佳活性酸鹼度為 pH 5.6(Mishar and Maheshwari,

1996)。

2.5.1 *Thermotoga maritima*

Thermotoga maritima 是從海底的地熱湧泉所取得，為革蘭氏陰性菌，形狀為桿狀，菌體大小約 0.6 x 1.5-1.1 μm ，菌株具有可移動性。擁有單邊的極鞭毛，鞭毛半徑大約 17 nm。*Thermotoga maritima* 在固態培養基為白色菌落，使用葡萄糖進行發酵時會產生乳酸、醋酸、二氧化碳與氫氣。*Thermotoga maritima* 可還原元素硫形成硫化氫。生長最高溫度為 90 °C，最佳生長溫度為 80 °C，溫度低於 55 °C 後不會生長，生長酸鹼度範圍在 pH 5.5-9.0，可生長於鹽度 0.25-3.75% 的環境下，是一株絕對厭氧菌，典型菌株為 *Thermotoga maritima*^T (DSM 3109) (Huber *et. al.*, 1986)。目前 *Thermotoga maritima* 被應用的澱粉水解？有 α -amylase (optimal activity at 85-90 °C, pH 7.0)、 β -amylase (optimal activity at 95 °C, pH 4.3-5.5)、pullulanase (optimal activity at 90 °C, pH 6.0)、isomerase (optimal activity at 97 °C, pH 7.1) (Vieille and Zeikus, 2001)。

2.5.2 *Pyrococcus furiosus*

Pyrococcus furiosus 生長溫度範圍在 70-103 °C，最佳生長溫度為 100 °C，是從海底的地熱湧泉所分離出來的嗜熱菌。菌株型態為螺旋

菌，長度約為 0.8-2.5 μm ，具有單邊的極鞭毛，屬於絕對厭氧菌。

Pyrococcus furiosus 可利用澱粉、麥芽糖與 peptone 生長。新陳代謝的產物只有氫氣與二氧化碳。生長後期會受到高濃度的新陳代謝產物所抑制，主要是因為氫氣對於 *Pyrococcus furiosus* 有抑制生長之作用，但是可以藉由添加元素硫產生硫化氫的方式來緩和氫氣的抑制作用。菌株的 DNA G+C content 為 38 G+C mol%，典型菌株為 *Pyrococcus furiosus* Vc 1^T (DSM 3638) (Fiala and Stetter, 1986)。目前 *Pyrococcus furiosus* 被應用的澱粉水解？有 α -amylase (optimal activity at 100 °C, pH 5.5-6.0)、amylopullulanase (optimal activity at 105 °C, pH 6.0) (Vieille and Zeikus, 2001)。

2.5.3 *Thermoanaerobacter ethanolicus*

Thermoanaerobacter ethanolicus 是由黃石公園分離出來的一株嗜熱厭氧菌，生長初期為大小約為 0.3-0.8 x 4-8 μm 的桿菌，到了生長後期，細胞型態為鏈球菌(半徑約 0.8-1.5 μm)。 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 為革蘭氏變異菌。 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 不產生內孢子。生長 50 小時後菌落為平坦的白色圓形狀(半徑約 2-4 mm)。生長溫度介於 37-78 °C。生長酸鹼度介於 pH 4.4-9.9。可利用不同的醣類作為生長碳源，可利用碳源有己糖、核醣、木聚醣、纖維二糖、

蔗糖、澱粉。生長會被氯黴素與 polymyxin B 所抑制。以己糖與澱粉
醱酵時主要產物為乙醇與二氧化碳。菌株會還原硫代硫酸鈉而不會還
原硫酸鹽，菌株的 DNA G+C content 為 32 G+C mol%。典型菌株為
Thermoanaerobacter ethanolicus JW 200^T (ATCC 31550)(Wiegel and
Ljungdahl, 1981)。目前 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 被應用的澱粉
水解？有 α -Glucosidase (optimal activity at 75 °C, pH 5.0-5.5)、
amylopullulanase (optimal activity at 90 °C, pH 5.5) (Vieille and Zeikus,
2001)。

第三章 實驗方法與設計

3.1 實驗流程設計

本研究之實驗流程設計如 Figure 3.1。

3.2 菌株樣本採集

本研究之樣品收集採樣自高雄縣十三坑溫泉(23°7' 25.8''N, 120° 49' 34.4''E)，樣品採自溫泉露頭。本研究中所鑑定之菌株為實驗室之前已分離之菌株(廖經裕, 2004)，使用 PYG 培養基(5g/L peptone、1g/L yeast extract、10g/L glucose 及以下嗜熱厭氧培養基成份)進行高溫厭氧培養，挑選適合在 70°C 高溫下生長之菌株為實驗之鑑定菌株。

3.3 菌種之純化、培養、選取與保存

3.3.1 嗜熱厭氧培養基 (Thermophilic anaerobic medium. TA medium)

本研究嗜熱厭氧培養基(Huang *et. al.*, 1998)組成為(per liter)：1.0g NH₄Cl、0.1g MgCl₂·6H₂O、0.05g CaCl₂·6H₂O、2g K₂HPO₄、0.5g cysteine、0.5g HCl、0.5g NaHCO₃、0.5g Na₂S、1g yeast extract、0.05g resazurin、1ml trace mineral。Trace mineral 溶液組成如下(per liter)：1ml HCl、0.5g EDTA、2.0g FeCl₂·6H₂O、0.03g ZnCl₂、0.05g MnCl₂、0.05g AlCl₃、0.05g NiCl₂、0.05g H₃BO₃、0.03g CuCl₂、0.05g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、

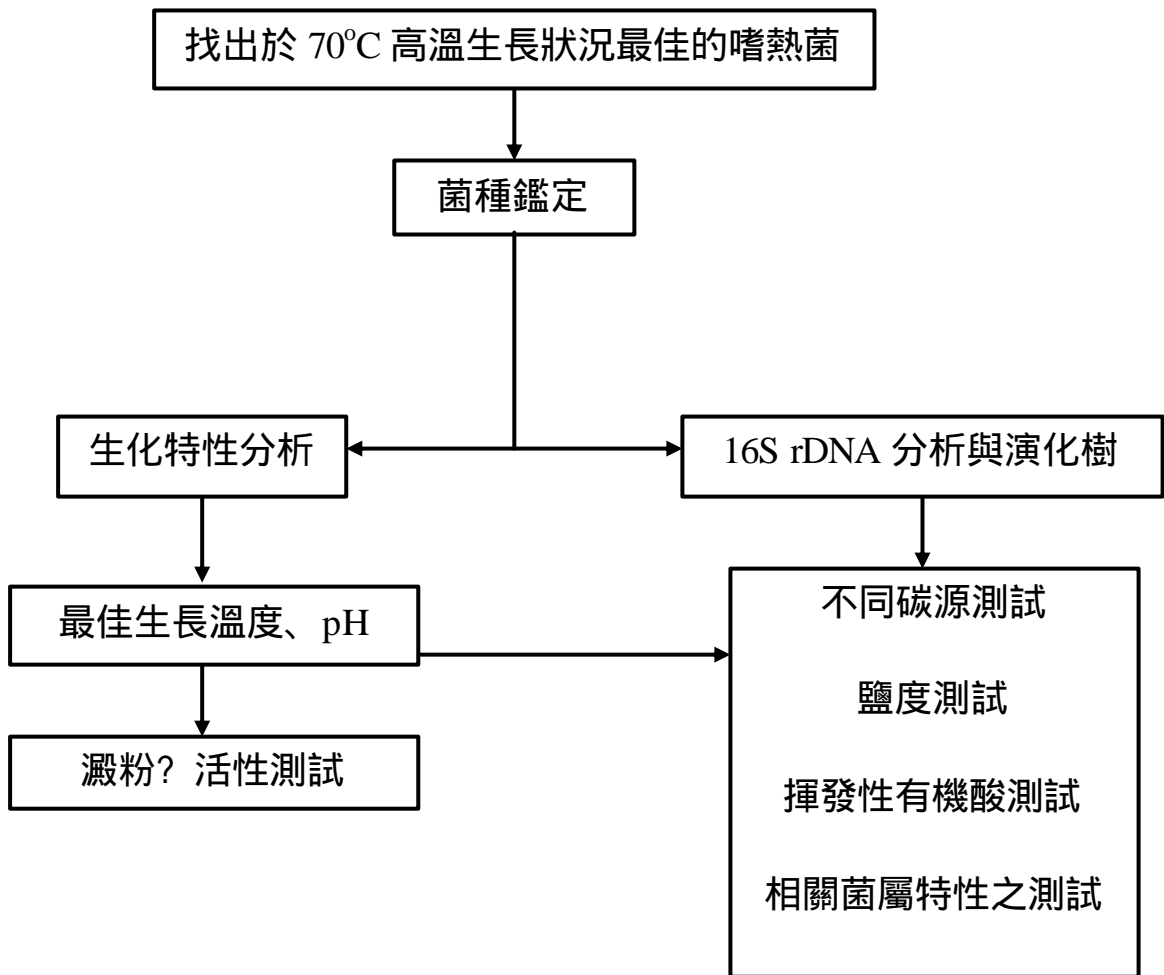


Figure 3.1 Flow chart of the experimental design

0.05g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。另添加 5g/L 之葡萄糖或溶解性澱粉(soluble starch)作為碳源。

製備培養基時，使用圓底燒瓶置於三腳架上，底下放置石棉心網，燒瓶加入所需之去離子蒸餾水與無機鹽，瓶口上以純氮氣曝氣，使用本生燈加熱至沸騰後將曝氣氣體改成 N_2/CO_2 混合氣(70%/30%，v/v)，加入還原劑(cysteine-HCl)，待培養基呈現出金黃色，加入緩衝劑碳酸氫鈉，待培養基冷卻後即可分裝至試管或血清瓶中，以 n-butyl 橡膠塞塞住，蓋上鋁蓋或者螺旋中孔蓋，經 121°C 、15psi 滅菌 20 分鐘後，即為不含有機物之無機培養基，培養基在不添加有機物之狀態下可在常溫下保存一段時間。植菌前再加濃縮之儲備溶液：酵母萃取物(yeast extract)、還原劑(Na_2S)、維生素(vitamin solution)與所需之碳源濃度。維生素成份為(per liter)：5mg *p*-aminobenzoic acid、2mg Biotin、5mg DL-Ca-pantothenate、5mg Folic acid、5mg Lipoic acid、0.1mg Mannitol trituration、5mg Nicotinic acid、10mg Pyrioxine-HCl、5mg Riboflavin、5mg Thiamine-HCl。

3.3.2 菌株之選取與保存

按照上述方式分離菌株後，使用葡萄糖(5g/l)作為碳源，置於 70°C 高溫下暗培養，選取最適合生長於 70°C 之菌株，進行後續之鑑定、

生理生化特性之分析。

菌種保存使用 -70°C 超低溫冷凍櫃 (REVCO, ULT-1386-3D, USA) 保存菌株。首先培養菌株至對數生長期，於厭氧操作箱 (Anaerobic chamber, COY Laboratory Products Inc., Michigan, USA) 內，在厭氧小管中加入 1ml 已滅菌之 100% 甘油，再加入 1ml 之菌液，即可得甘油濃度為 50% 濃度之保存菌液，厭氧小管以橡膠塞封口，旋上螺旋中孔蓋，置入超低溫冷凍櫃中保存。

3.4 菌種鑑定

3.4.1 鑑別染色

本研究使用革蘭氏染色為主要之染色鑑定，Table 3.1 說明染色程式與染色結果。以大腸桿菌 (*Escherichia. Coli*) 為陰性對照菌與黃金葡萄球菌 (*Bacillus.sp*) 為陽性對照菌。

3.4.2 菌株之 16S rDNA 鑑定

16S rDNA 序列鑑定為最近微生物鑑定之趨勢，由於其快速、便利且不需太多樣品量即可鑑定微生物的關係，因此有越來越多的學者使用此法鑑定，經由演化樹的比對來得到結果。

Table 3.1 Procedure and the results of Gram stain

Step	Medical used	Color of gram positive	Color of gram negative	Reaction time (s)
Primary Stain	Crystal violet	purple	Purple	60
Mordant	Gram' s iodine	purple	purple	60
Washing	95% Ethanol	purple	None color	20
Counterstain	Safranin	purple	pink	30

(Mrrray *et. al.*, 1994)

3.4.2.1 菌株 Genomic DNA 之萃取

本研究使用 Lysozyme 與冷熱物理方式破細胞取得 genomic DNA，以 phenol/chloroform 純化 genomic DNA，最後使用純酒精沉澱 DNA(Barns *et. al.*, 1994)。

首先培養菌株至對數生長期之高峰期，取 10ml 於 PE 離心管，用 13000 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液。使用滅菌水清洗沉澱顆粒至少兩次(懸浮菌體後以 13000 rpm 離心 5 分鐘)並移至已滅菌之 1.5 ml 離心管，加入 500 μ l 冰 solution I (per liter)：glucose 50 mM、Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM、EDTA (pH 8.0) 10mM、lysozyme 0.02 mg，置入 37°C 恆溫箱內反應 30 分鐘。加入 25 μ l 的 20% SDS 溶液(最終濃度為 0.95%)，上下翻轉搖晃 1 分鐘。加入 20 μ l 的 10mg/ml proteinase K (最終濃度為 0.36 mg/ml) 與 10 μ l 的 50mg/ml RNase (最終濃度為 0.9 mg/ml)，置於 60°C 水浴槽培養 30 分鐘，每 5 分鐘上下搖晃一次，直到溶液澄清。放入-70°C 底下 10 分鐘後再置於 60°C 水浴 10 分鐘，進行此循環三次後，於 13000 rpm 離心 5 分鐘，上澄液定量取至新的 1.5ml 離心管。以上完成破細胞程式。

使用 phenol/chloroform 去除蛋白質、純化 genomic DNA。加入等量體積的 1:1 (v/v) phenol / chloroform-Isoamyl alcohol，上下搖晃後以 13000 rpm 離心 5 分鐘，取上澄液並定量至新的 1.5ml 離心管。加入

等量體積的 chloroform-Isoamyl alcohol, 上下搖晃後以 13000 rpm 離心 5 分鐘, 取上澄液並定量至新的 1.5ml 離心管。加入 2.5 倍體積預冷的純酒精以沉澱 genomic DNA, 放入 -70°C 15 分鐘, 之後以 13000 rpm 離心 5 分鐘, 倒掉上清液, 待酒精蒸發後加入 50-100 μ l 預熱(70°C 預熱)之無菌水溶解 genomic DNA。genomic DNA 可長時間保存於 -20°C 冷凍櫃。

3.4.2.2 聚合? 連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

萃取出 genomic DNA 後使用 PCR (Sambrook and Russell, 2001) 擴增 16S rDNA, 反應試劑的最終體積為 25 μ l, 試劑包含了: 2 μ g Template DNA、0.2 μ M 27f (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG>), 0.2 μ M 1522r (5'-AGG GAG GTG ATC CA(AG) CCG CA>), 100 μ M deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP), 1x buffer (buffer 所含物質與最終濃度為: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, pH 9.0)、5U Taq DNA polymerase (ProTaq DNA Polymerase, PROTECH, Taiwan)。最後使用滅菌水將反應液總體積調整至 25 μ l, 放入 PCR machine (GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystems, USA), 加溫程式如下: initial denaturation 溫度為 94°C, 持續 3 分鐘; denaturation 溫度為 94°C, 持續 1 分鐘; annealing 溫度為

56°C，持續1分鐘；extension溫度為72°C，持續1分鐘； final extension 溫度為72°C，持續10分鐘 (denaturation、 annealing、 extension持續30個cycle)。

3.4.2.3 TA cloning

為了得到純度更高的 16S rDNA 序列，將 PCR 產物進行選殖 (cloning)，由於使用之載體為 yT & A vector 因此也稱為 TA cloning，實驗步驟分為接合反應(ligation)與轉形作用(transformation)，勝任細胞使用 ECOS 101 (Yeastern, Taiwan)。本研究使用 TA cloning 商業套件(Yeastern, Taiwan)。

A.接合反應：

PCR 產物接合於 yT & A vector，Table 3.7 列出了使用試劑之體積，PCR 產物接合前須先使用 PCR-M Clean up System kit (Viogene, Taiwan)，去除多餘的單股產物。在每個藥品使用前務必確定皆已完全溶解，藥品加入後 vortex 1 秒混合，之後置於 22°C 反應 1 小時後放到 4°C 約 16 小時，此一程式可以增加接合反應的效率。

B.轉形反應：

首先依照製備固態的選別性培養基(differential medium)，選別性

培養基成份為(per liter) : 10g tryptone、 5g yeast extract、 10g NaCl、 15g bacto agar、 50mg ampicillin , 使用前需先塗佈 X-gal (100mM) 100 μ l 與 IPTG (50mg/ml) 20 μ l 在培養基上 , 放入 4 $^{\circ}$ C 備用。從 -70 $^{\circ}$ C 冷凍櫃取出勝任細胞 ECOS 101 (Yeastern, Taiwan), 使用自來水浴解凍 (大約解凍 1/3 , 此時的效率最好) , 加入 2 μ l 已接合完成之混合物 , vortex 1 秒。45 $^{\circ}$ C 水浴 45 秒後 , 將勝任細胞塗佈於選別性培養基 , 將培養基置入 37 $^{\circ}$ C 培養 11-16 小時後觀察。

C.轉形菌之挑選 :

進行藍白測試來篩選成功轉形之菌落。由於 yT & A vector 含有 LacZ a-peptide , 因此若沒有將 PCR 產物放入 vector , 則會在含有似乳糖構造的化合物 X-gal 與 IPTG 存在的培養基中會產生藍色的菌落 , 若細胞有成功轉形則不會表現出 LacZ-peptide 而產生出白色菌落 , 若是未轉型成功之菌落則會出現藍色。挑選出白色菌落後 , 使用滅菌 tip 沾菌落至混合好的 PCR 反應劑 , 反應劑總體積為 25 μ l , 反應劑的成份為 : 0.2 μ M M13f (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3')、 0.2 μ M M13r (5'-GGATAACAATTTTCACACAGG-3')、 100 μ M deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP)、 buffer (buffer 所含物質與最終濃度為 : 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100,

pH 9.0) 5U Taq DNA polymerase (ProTaq DNA Polymerase, PROTECH, Taiwan)、滅菌水(使用滅菌水將體積調整至 25 μ l) , 進行colony PCR。colony PCR的加溫程式如下： initial denaturation溫度為94 $^{\circ}$ C , 持續5分鐘； denaturation溫度為94 $^{\circ}$ C , 持續0.5分鐘； annealing溫度為55 $^{\circ}$ C , 持續0.5分鐘； extending溫度為72 $^{\circ}$ C , 持續0.5分鐘； final extending溫度為72 $^{\circ}$ C , 持續7分鐘 (denaturation、 annealing、 extending持續30個cycle) , 套件的使用說明建議extending的時間每1kb需要1分鐘 , 但是實驗使用0.5分鐘仍可得到大約1.5kb的目標產物。

3.4.2.4 限制內切? 反應

為了確認取得的 TA cloning 的產物為一致的 16S rDNA 序列 , 採用限制內切? 反應(Restriction fragment length polymorphism, RFLP) , 參考結果是否得到一樣的產物 , 以確認菌株是否為純菌。限制? 使用酵素為 *Hinp*1、 *Hinf*1 (BioLabs, Inc., USA)。反應劑總體積為 10 μ l , 其組成為(per 10 μ l) : 1U *Hinp*1、 1U *Hinf*1、 1x NEB buffer2 (buffer 所含物質與最終濃度為 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, pH 7.9) PCR 產物(使用 PCR 產物將體積調整至 10 μ l) , 酵素反應於 37 $^{\circ}$ C 下 16 小時。

3.4.2.5 16S rDNA 定序與分析

將 TA cloning 轉形成功之菌株送至明欣科技代為定序，得到序列後，先使用 Bioedit 將正反兩端序列合成一條完整的序列後，將此一完整序列利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 BLASTN 功能，比對出接近(相似度介於 95%-99%)的菌株序列後，將這些序列利用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)排列整齊，匯入 Mega III 作整理，使用 Mega III 整理時需將目標菌株與比對菌株之間缺漏的基因序列以人工方式刪除，以增加比對的正確度，之後使用 Mega III 製作出演化樹。

3.5 菌株之生理生化特性分析

3.5.1 菌相觀察

直接觀察菌株型態可使用位相差顯微鏡(Phase-Contrast Microscope)或者穿透式顯微鏡(Transmission electron microscope, TEM)。位相差顯微鏡可做初步之觀察與鑑定，由於不需要染色即可觀察微生物，因此廣泛被使用。穿透式顯微鏡照相，是使用中興大學的貴重儀器中心之穿透式顯微鏡，將菌液進行負染前處理後，直接觀察並照相。前處理方式為：將一滴菌液滴在銅網上，靜置兩分鐘，使菌體附著於銅網上，之後取濾紙吸去多餘菌液，使用 3% (w/v) 磷鎢酸

(phosphotungstic acid, PTA)滴在銅網上進行負染色約 1-2 秒，使用濾紙吸去多餘磷鎢酸後，以穿透式顯微鏡(JEM-1200CX ，JOEL, Japan)觀察。

3.5.2 最佳生長條件

為了找出菌株之最佳生長條件，測試不同溫度、酸鹼度與鹽度來探討最佳生長環境，本研究測量生物生長的方式為測量其培養基濁度，使用分光光度計(SPECTRONIC 20D+, USA)，於 600nm 測試吸收度監測生長。

A. 溫度：

微生物產生的酵素受到溫度的影響而改變其活性，因此微生物具有最佳的生長溫度條件，由於菌株是由 70°C 篩選出來，因此測試菌株生長的溫度範圍以 70°C 為主，溫度選擇往更高於 70°C 或者低於 70°C 來選取測試的實驗溫度，使用 5g/l 葡萄糖為測試之生長碳源，分離菌株置於不同溫度下培養，監測生長，實驗溫度分別為 55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C。

B. pH：

微生物使用酵素作為分解有機物的方式，pH 值會影響酵素的活

性，進而影響微生物的生長。為測試菌株對於環境 pH 值改變的耐受度，因此使用 MES (free acid)、HEPES (free acid)、Tris (base)、Glycine 取代碳酸氫鈉，實驗選擇 pH 範圍為 5.5-9.0，配置數種緩衝劑濃縮液，加入培養基的最終濃度為 50mM，實驗時以葡萄糖(5g/l)為生長碳源，並於最佳生長溫度下培養來測試菌株最佳生長 pH 值。

C. 鹽度：

為了測試菌株對鹽度的耐受度，不同的鹽度與微生物對於液體滲透壓改變的耐受度有關，實驗以葡萄糖(5g/l)為生長碳源，於最佳生長溫度與最佳生長 pH 值下測試生長，添加不同 NaCl 至培養基，鹽度範圍為 0%-3% (w/v)。

3.5.3 不同碳源測試

使用不同的碳源測試菌株是否利用並生長，並依此建立出基質利用模式(Substrate utilization profile)。微生物可利用不同的物質來生長，構造簡單的物質通常較容易被微生物所利用，而大分子聚合物則會被預先消化成小分子物質後再被利用，不同的大分子聚合物需要不同的酵素來分解。透過研究菌株的基質利用模式，可大概得知菌株是否可產生哪些酵素，此後若能找出產酵素的基因片段，就可將此基因

接合到 *E.coli* 上，藉由 *E.coli* 來產生大量的酵素，而可以應用於工業生產。

實驗使用了 26 種不同的碳源，分別是 mannose、starch、xylose、glucose、maltose、fructose、sorbose、sucrose、pullulan、lactose、glycine、mannitol、neopeptone、carboxymethyl-cellulose (CMC)、raffinose、arabinose、galactose、rhamnose、cellubiose、glycerol、gelatin、sorbitol、esculin、xylan、cellulose、carbon monoxide。

可溶性基質的生長使用分光光度計測試菌液濁度；cellulose 及 xylan 不溶性基質則使用細胞胞內總蛋白質濃度作為生長之依據，加上還原糖濃度來確認基質是否有被分解；一氧化碳(Carbon monoxide, CO)濃度則是將培養試管內的上層氣體改以充滿一氧化碳，同時培養基中不添加其他有機碳源之方式來培養(Sokolova *et. al.*, 2001)，並使用分光光度計測試濁度。

3.5.3.1 蛋白質測試 (Protein assay)

微生物細胞胞內總蛋白質濃度會隨著微生物生長而上升，因此細胞胞內總蛋白質濃度可作為菌株生長的參考。

實驗使用 Bradford protein assay(Bradford, 1976)分析蛋白質。實驗步驟如下：取 0.5ml 樣品以 12000rpm 離心 10 分鐘後，去除上清液，

使用 1ml 的 Tris buffer (2.0M, pH=7.6)清洗細胞兩次後，加入 0.9ml 的 Tris buffer 及 0.1ml 1N NaOH，放入 100°C 加熱 10 分鐘後離心取 0.8ml 上清液，加入 0.2ml Coomassie brilliant blue G-250 染劑(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)染色，使用分光光度計 (Spectrophotometer ; Shimadzu, UV mini-1240)於 595nm 量測蛋白質溶液之吸收光度。以牛血清蛋白(Bovine serum albumin)作為標準品配製檢量線(附錄 1)。

3.5.3.2 還原糖含量測試

參照 Miller 方法(Miller, 1959)使用 Dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑與還原糖加熱後生成氨基化合物，在過量的 NaOH 溶液中此化合物會呈現橘紅色，此顏色之深淺與測試溶液中還原糖濃度成正比。

實驗前需先配製 DNS 試劑，DNS 試劑成分為(per liter)：2g phenol、10g 3,5-Dinitrosalicylic acid、0.5g Sodium sulfite、200g K-Na-tartrate，試劑溶於 1% NaOH，配置時先配好 2% NaOH 溶液後，加入上述成份在定量至 1L。

使用葡萄糖 glucose (纖維素利用測試)或者木糖 xylose (木聚糖利用測試)為標準品配製檢量線(附錄 2)。取 1ml 已離心過之菌株培養液上清液，加入 1ml DNS 試劑，放入 100°C 加熱 10 分鐘，冰浴至室溫，

使用分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)在 558nm 波長下測試溶液之吸光度。

3.5.4 抗生素感受度

不同的抗生素之機制並不一樣，實驗使用了四種抗生素 (Penicillin、Ampicillin、Polymyxin B、Vancomycin)。Penicillin 的 Beta-lactam 會被微生物的一個重要酵素(glycopeptide transpeptidase, GT)誤以為是基質而結合，結合後會使得此酵素失去活性，因此微生物就無法進行細胞壁的合成，進而抑制微生物生長。Ampicillin 與 Penicillin 不同的是，Ampicillin 多了一個胺基團，這個胺基團可以幫助 Ampicillin 更容易攻擊微生物，機制與 Penicillin 相同。Polymyxin B 會與微生物的細胞膜結合，影響細胞膜的結構，破壞細胞膜的滲透性，微生物的物質輸送受到影響而死亡。Vancomycin 會抑制 N-acetylmuramic acid (NAM)-peptide 與 N-acetylglucosamine (NAG)-peptide 這兩個次單位進入 peptidoglycan (細胞壁的主要構造)，進而抑制了細胞壁的生成，影響微生物的生長(Talaro and Talaro, 1999)。

實驗使用葡萄糖(5g/l)為碳源，抗生素使用前先配置好濃縮 1000 倍的貯備溶液。菌株先於抗生素濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ 下，測試抗生素對

於菌株的效果，若有抑制狀況發生，則降低濃度至 20 µg/ml 測試抗生素是否仍具有抑制性。

若微生物可被 Pencillin 與 Ampicillin 所抑制，則微生物可能無法生成 penicillinase 來水解 Pencillin 與 Ampicillin。若微生物可被 Polymyxin B 所抑制則微生物可能為革蘭氏陰性菌，或者微生物的細胞壁較薄，才使得 Polymyxin B 進入破壞細胞膜。若微生物可被 Vancomycin 所抑制，則表示微生物的細胞壁對 Vancomycin 不具有抵抗力。

3.5.5 過氧化氫？ 測試

微生物於有氧呼吸過程中，會產生氧化氫或者是超氧化物 (superoxide)，這些物質對微生物來說是一種劇毒，為了避免這些物質的堆積，微生物必須藉由過氧化氫？ 分解，因此若不含有過氧化氫？的菌株就屬絕對厭氧菌。為研究菌株是否具有過氧化氫？，可將過氧化氫催化成水及氧氣(eq. 3.1)，準備 3%過氧化氫，實驗時將過氧化氫及菌液依照體積 1:1 混合，觀察是否有出現氣泡，有出現氣泡則是具有過氧化氫？。此實驗使用黃金葡萄球菌為陽性對照組。(Smibert and Krieg, 1994)



3.5.6 硫代硫酸鈉與硫酸鹽還原能力測試

為了測試菌株是否具還原硫代硫酸鈉之能力，於培養基內添加硫代硫酸鈉使其最終濃度為 20mM，且不添加還原劑(Na₂S)，以葡萄糖(5g/l)為碳源，每天採樣一次，測量是否有產生硫化氫，並以分光光度計測量生長，實驗方法參考 Cord-Ruwish 氏硫酸銅與硫化物進行反應(eq. 3.2) (Cord-Ruwisch, 1985)。



實驗前先配製 copper reagent (5mM CuSO₄ 溶於 50mM HCl 溶液)，以硫化鈉為標準品配製檢量線(附錄 3)。取離心過的菌液上層液 0.05ml 加入 1.95ml copper reagent 混合五秒，使用分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)於 480nm 測試，空白組則使用 50mM HCl 與 copper reagent 反應。

本實驗使用 Na₂SO₃、Na₂SO₄ 來測試菌株是否會使用無機硫酸鹽類為電子接受者，以葡萄糖(5g/l)為碳源。硫酸測試使用標準方法 4500-SO₄²⁻ C (Eaton *et. al.*, 1995)，此方法原理是利用氯酸鉍與硫酸反應形成硫酸鉍沈澱，以分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)於 420nm 測試濁度，以 Na₂SO₄ 為標準品製備檢量線(附錄 4)。

亞硫酸使用標準方法 4500-SO₃²⁻ B(Eaton *et. al.*, 1995)，此方法是

以 KI-KIO₃ 滴定液與亞硫酸反應釋放出 I₂ 後與澱粉指示劑反應，利用滴定的方式測試，來測試微生物是否有使用這些無機鹽為電子接受者，若是濃度降低就是會利用這些無機鹽為電子接受者，反之則不能這些無機鹽為電子接受者。使用 Na₂SO₃ 為標準品並製作檢量線(附錄 5)。

若微生物有將硫代硫酸鈉還原成元素硫(S⁰)，則微生物體內或體外會產生元素硫的累積，可藉由位相差顯微鏡直接觀察，微生物體內或體外高反射率發亮的顆粒即為元素硫。

3.5.7 硝酸還原測試

本實驗使用 KNO₃ 來測試菌株是否會使用硝酸鹽為電子接受者，以葡萄糖(5g/l)為碳源，亞硝酸鹽測試使用標準方法 4500-NO₂⁻ B(Eaton *et. al.*, 1995), 方法是磺胺(sulfanilamide)與水中亞硝酸鹽在 pH 2.0-2.5 反應(diazotation)而形成偶氮化合物，此偶氮化合物與 (N -(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride) 偶合，形成紫紅色偶氮化合物，以分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)於 420nm 測試在波長 543 nm 測吸光度，使用 NaNO₂ 為標準品製備檢量線(附錄 6)，硝酸如果被還原成亞硝酸就可偵測到亞硝酸，如果沒有被還原則偵測不到亞硝酸。

3.5.8 產乳酸測試

產乳酸測試使用商業套件 Lactate Reagent 測試(Trinity biotech, USA), 試劑內含有: 400 μ l 乳酸氧化酶 (lactate oxidase)、2400 μ l 過氧化氫 與足量的發光前驅物(Chromogen precursors), 其原理是當乳酸被乳酸氧化酶 轉化成丙酮酸(pyruvate)與過氧化氫後, 過氧化氫 會分解過氧化氫。而缺少過氧化氫時(也就是沒有乳酸被轉化成過氧化氫時), 過氧化氫 則會分解發光前驅物, 因此當樣品乳酸濃度越高, 反應液的顏色越深。

測試時上澄離心醱酵液樣品先於 2500rpm 離心 10 分鐘, 取 1ml 乳酸試劑加入 10 μ l 樣品上清液, 於 25-37°C 下反應 5-10 分鐘後使用分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)於 540nm 測試吸收度, 實驗標準品使用乳酸(Lactic acid)配置檢量線(附錄 7)。

3.5.9 Alanine 測試

文獻指出微生物會經由葡萄糖的異化作用(catabolism)產生 alanine 為最終產物, 為測試分離菌株新陳代謝過程中是否產生胺基酸 alanine, 以 HPLC 分析培養液中 alanine 之濃度(Lin *et. al.*, 1995)。此方法的原理是 *o*-phthalaldehyde(OPA)於鹼性時, 與 2-mercaptoethanol 於室溫可迅速與胺基酸反應成 OPA 胺基酸衍生物, 而 OPA 胺基酸衍

生物具有良好的螢光檢測感度(Roth, 1971)。因此可使用螢光偵測器 (Fluorescence Detector)測試 (以激發波長 $E_x=330\text{nm}$ 能釋放波長 $E_m=450\text{nm}$)。

菌液先於 13000rpm 離心 2 分鐘，取 25-50 μl 加入三倍體積之乙
? 去除蛋白質, 之後於 13000rpm 離心 2 分鐘後可以貯存在 -20°C 一個
月。製備 OPA(*o*-phthaldialdehyde)試劑：50mg OPA 先溶解於 1.25ml
的乙醇, 然後加入 50 μl 2-mercaptoethanol與 11.2ml 0.4M sodium borate
buffer (pH 9.5)。用滅菌水將樣品稀釋到 10^{-5} 後，10 μl 的稀釋樣品加入
10 μl OPA 試劑，於室溫下放置 1 分鐘，立即加入 40 μl 0.1M 的醋酸鈉
(pH 7.2)，取 40 μl 反應液注入裝載螢光偵測器的高效能液相層析儀
(HPLC, Waters 501, Waters, USA; Fluorescence detector, Waters 470,
Waters, USA)。分析管柱為 C_{18} 管柱 (15cm length, 3.9mm i.d. particle
size 4 μm)，使用梯度系統模式(Table 3.2)，梯度使用兩種溶液，溶液 A
組成為 0.1M 醋酸鈉含 10% 甲醇，溶液 B 為甲醇。使用 alanine 為標
準品配製檢量線, 在此條件下 alanine 之 retention time 為 16.406 ± 0.014
分鐘(附錄 8)。

3.5.10 氫氣測試

氫氣測試使用氣相層析儀(Gas Chromatograph, Shimadzu GC-14B, Japan), 使用 Thermal Conductivity Detector (TCD)作為偵測器。

產氫氣測試使用 starch、xylose、glucose、sucrose 為碳源, 濃度皆為 5g/l, 每天測試產氫氣量與生物生長, 使用填充管柱(Molecular Sieve 5A 60/80 mesh), GC-TCD 條件為: detector 120°C、injector 120°C、oven 70°C、TCD 100°C, TCD 電流設定為 50mA。以純氫氣為標準品, 使用 120ml 血清瓶配置, 先在瓶中灌滿純氮氣之後, 以橡膠塞封住瓶口, 使用針筒依照所需的比例取出一定體積的氮氣後, 再打入同樣體積的氫氣(例如配置 1% 氫氣時, 從血清瓶取出 1.2ml 的氮氣, 再打入 1.2ml 的氫氣)以配製不同比例的標準品來製作氫氣檢量線(附錄 9)。

3.5.11 揮發性有機酸測試

揮發性有機酸測試則使用氣相層析儀(Gas Chromatograph, Shimadzu GC-14B, Japan), Flame Ionization Detector (FID)作為偵測器。揮發性有機酸測試以葡萄糖(5g/l)為碳源, 使用毛細管柱(DB-WAX 30m x 0.319mm x 0.5µm), GC-FID 的程式與條件為: injector 230°C、detector 210°C, 管柱增溫程式以 150°C 開始先保持 0.5min, 以 20

Table 3.2 Gradient program for HPLC analysis of alanine

Step	Time (min)	*Solvent A/Solvent B
1	0	100% / 0%
2	0.5	75% / 25%
3	5	70% / 30%
4	15	20% / 80%
5	20	100% / 0%

*Solvent A: 0.1M sodium acetate with 10% methanol
Solvent B: methanol, Merck (HPLC grade)

°C/min 的速度昇溫，增溫至 200°C 後保持 2min。上澄離心醱酵液注入 1 μ l。實驗結果對照市售揮發性有機酸標準品(Supelco, USA) (附錄 10-1)與乙醇(附錄 10-2)的標準品所出現的停滯時間。

3.6 澱粉? 酵素活性分析

菌株之澱粉? 酵素分析使用間接的方式測試，以可溶性澱粉(5g/L)為碳源培養至對數生長期(12-14 小時)，取菌液於 7500rpm 離心 10 分鐘後，取上清液為粗酵素萃取液(Crude enzyme extract)，保存於 4°C。取 5ml 1% 可溶性澱粉溶液加上 500 μ l 粗酵素，於菌株之最佳生長溫度底下(70°C)反應 30 分鐘，測試反應液中還原糖濃度，並使用蛋白質測試法測量粗酵素內蛋白質濃度，以求得比酵素活性。

3.7 不同澱粉來源植物水解測試

為研究菌株是否對於無純化過的澱粉仍具有水解能力，實驗使用在來米、玉米、甘藷的澱粉來測試。實驗前先將米、玉米、甘藷經過乾燥並磨碎前處理後，不經加熱滅菌，直接加入培養基，做為菌株的生長碳源。實驗過程紀錄還原糖與總糖，細菌生長使用血球計數器直接計算細菌數量的變化。

3.7.1 總糖濃度之定量

實驗方法使用酚-硫酸法(phenol-sulfuric acid)測定樣品中的總糖濃度(吳, 2006; Dubois, et. al., 1965)。先將上澄離心醱酵液樣品稀釋到適當濃度後,取 2.0ml 上澄離心醱酵液樣品至試管中,加入 1ml 的 5% phenol 與 5ml 濃硫酸,實驗使用去離子水做空白校正,靜置一小時,反應冷卻後,以分光光度計(UV mini-1240, Shimadzu, Japan)於 490nm 測試吸光值。實驗以葡萄糖為標準品,檢量線如附錄 11。

3.7.2 可溶性澱粉濃度測定

由於 amylose 會與碘試劑形成藍色反應,主要是因為 amylose 會形成中空螺旋抓住碘而出現顏色。實驗先配製呈色試劑,其組成有 5ml KI-I₂ 溶液(取 5g KI 與 0.5g I₂ 定量至 100ml),加上 5ml 0.9524N HCl 混合後加入去離子水。取 0.1ml 上澄離心醱酵液,加入 1ml 呈色試劑,再加入 9.9ml 去離子水,混合後於 589nm 下測試吸光值(Kumar and Das, 2000; 吳, 2006)。檢量線如附錄 12。

3.8 不同基質濃度對生長之影響

為計算出 strain S2302 的最大比生長速率與半飽和速率常數,於培養基分別使用 1g/L、2g/L、4g/L、5g/L、10g/L、15g/L 的可溶性澱

粉，紀錄細胞生長後推算出最大比生長速率與半飽和速率常數。並紀錄還原糖與可溶性澱粉濃度的變化。

第四章 結果與討論

4.1 研究菌株之選取

本研究菌株取自實驗室之前由高雄十三坑溫泉之水樣分離之數株嗜熱性厭氧菌株，分別編號為 S2302、S2308、S2312、S2316、S2321、S2323、S2334，使用 5g/l 葡萄糖為碳源培養 24 小時後觀察生長狀況。這些菌株的混合樣品在分離時的溫度設定為 70°C，因此本研究根據比生長速率選取較適合生長在 70°C 高溫之菌株(Figure 4.1)。高溫的嗜熱性厭氧菌株，可產生耐熱酵素，依據其生長溫度所找出的酵素，耐熱度會相對的提高。依照最大比生長速率，選定菌株 S2302 為本研究之研究菌株。

4.2 菌相觀察

經由位相差顯微鏡 (System Microscope Model BX40, Olympus, Japan) 與穿透式電子顯微鏡 (JEOL JEM-1200CX)，觀察 strain S2302 菌株型態、大小以及活動能力。菌株經位相差顯微鏡觀察，得到菌株大小約為 0.8-1 μ m x 6.0-9.0 μ m, Figure 4.2 為穿透式電子顯微鏡的結果，strain S2302 屬桿菌，不會移動。菌株生長過程並沒有觀察到孢子的產生，將菌株置於 100°C 沸水 60 分鐘後，亦無孢子產生，但是進行繼代培養後 strain S2302 菌株仍舊出現生長，因此 strain

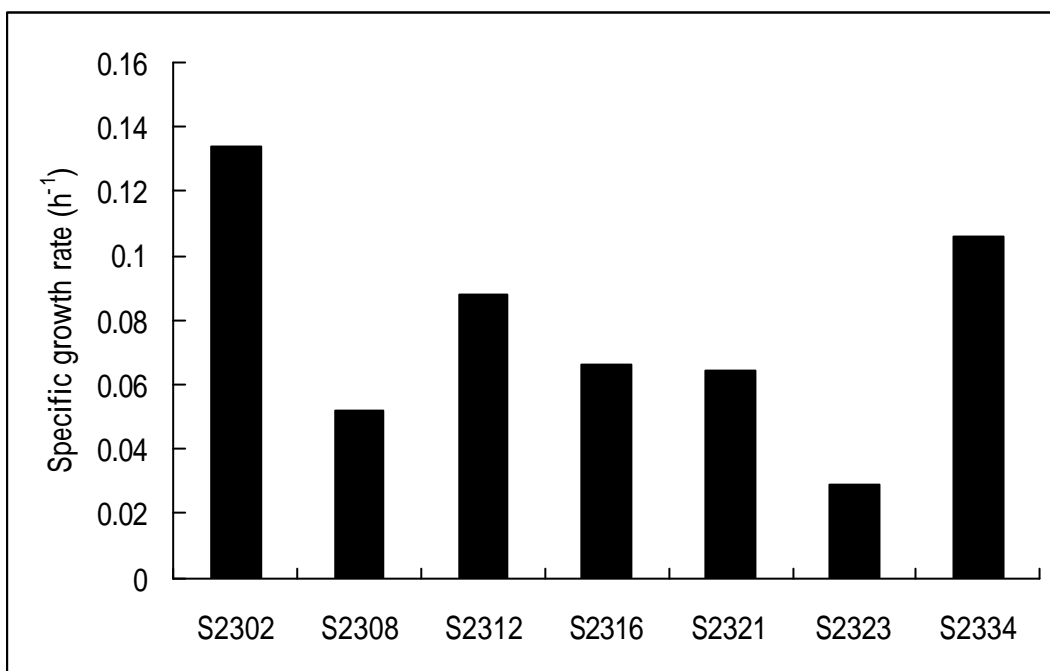


Figure 4.1 Specific growth rates of 7 isolated thermophilic anaerobic bacteria on glucose (5g/L). Cells were grown at 70°C without light.

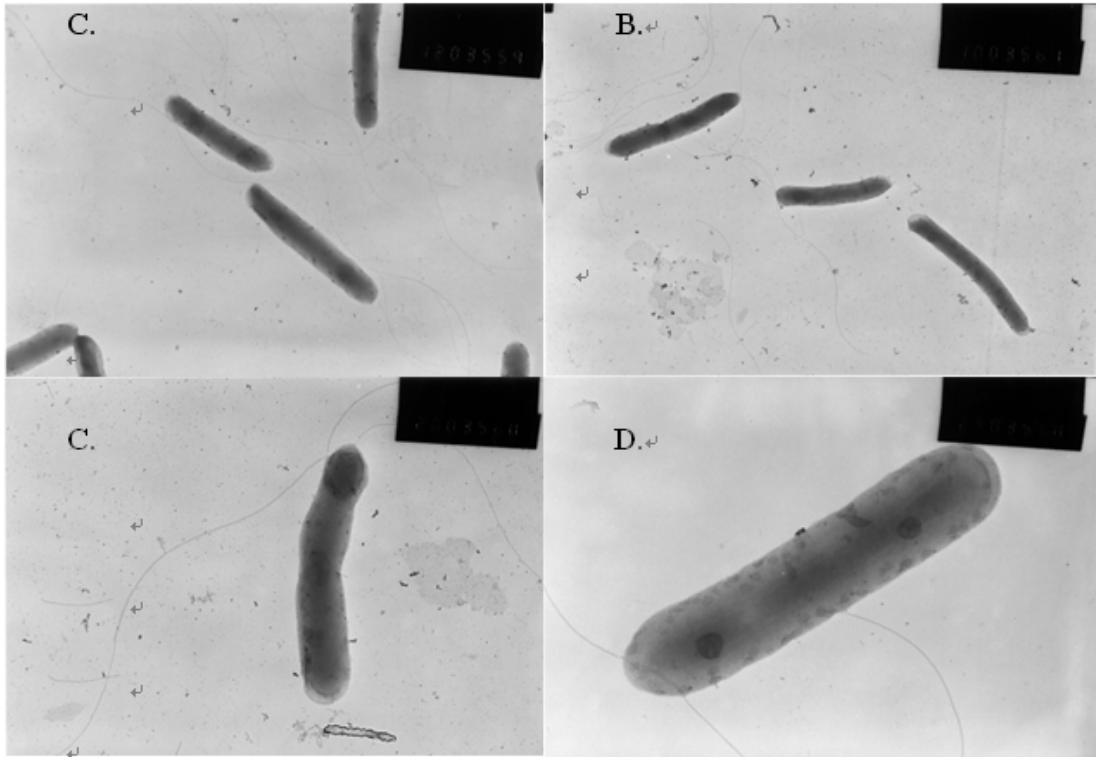


Figure 4.2 Photomicrographs of negative-stained S2320 (magnification: A: 120000x; B: 100000x; C: 200000x; D: 290000x)

S2302 屬於耐高溫的嗜熱菌。

4.3 菌種鑑定

4.3.1 革蘭氏染色

革蘭氏染色以大腸桿菌 (*Escherichia. Coli*) 與黃金葡萄球菌 (*staphylococcusBacillus.sp*) 為對照組，於對數生長期與遲滯期對菌株進行染色，於顯微鏡觀察後發現菌株為革蘭氏陰性菌。

4.3.2 16S rDNA 序列分析

本研究使用傳統 Phenol-chloroform 方式抽取 Genomic DNA，經聚合？連鎖反應 (PCR) 擴增 16S rDNA，使用電泳層析確定產物大小為 1500bp 後(Figure 4.3)，再進行 TA cloning 以提升序列純度與正確度，使用限制性內切？(*Hinp1*、*Hinf1*)確定取得產物為一致(Figure 4.4)。最後將產物送至明欣生物科技有限公司(Mission Biotech)進行定序，所得之序列結果(附錄 13)使用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) blastn 進行序列比對工作。

從 NCBI 的基因資料庫選取相似度為 95%-99% 菌株，使用 Mega III 製作親源樹 (Figure 4.5)。根據親源樹，比對 S2302 發現與四株菌有較為接近的關係，此四株菌分別為 *Thermoanaerobacter*

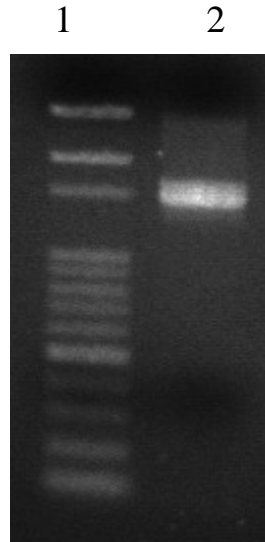


Figure 4.3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA segment of strain S2302. The sample was electrophoresed on a 1% agarose gel. Lane 1: Bio-100TM DNA ladder from top to bottom were 3000, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, and 100 bp. Lane 2: PCR-amplified 16S rDNA segment of strain S2302.

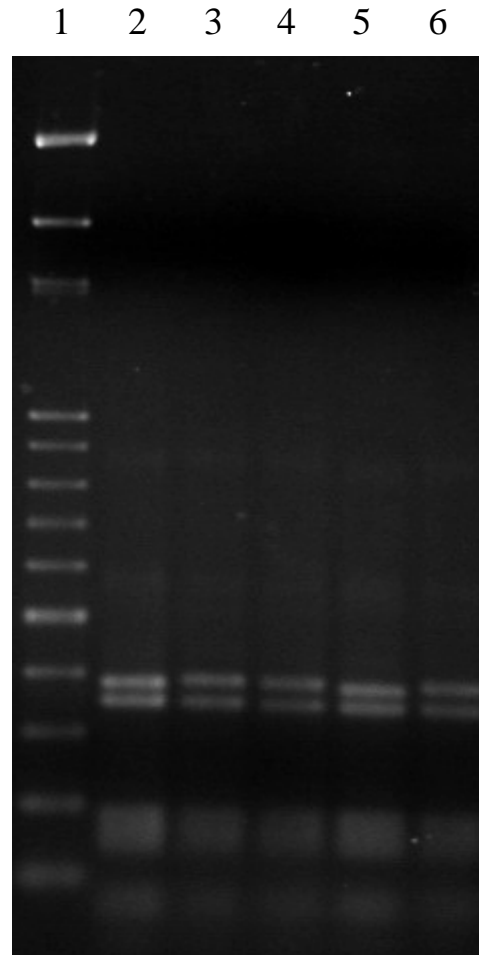


Figure 4.4 Segments of 16S rDNA after TA cloning digested by restriction enzymes *Hinp*1 and *Hinf*1. Lane 1: Bio-100TM DNA ladder from top to bottom were 3000, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, and 100 bp. Lanes 2-6: colony 1-5 digested by restriction enzymes *Hinp*1 and *Hinf*1.

tengcongensis, *Carboxydobrachium pacificus*, *Thermoanaerobacter subterraneus* & *Thermoanaerobacter yonseiensis*, 序列比對上有 97%-99% 相似度。此四株菌於 2004 年經 Fardeau 重新更名並歸屬於同一個菌屬 *Caldanaerobacter*, 分別為 *Caldanaerobacter tengcongensis*, *Caldanaerobacter pacificus*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Caldanaerobacter yonseiensis* (Fardeau *et al.*, 2004), 下段文章說明 *Caldanaerobacter* 屬的特性。Table 4.1 列出 strain S2302 與 *Caldanaerobacter* 屬四株菌之 16S rDNA 序列相似度。

4.3.3 *Caldanaerobacter* 屬

Thermoanaerobiaceae 科包含了兩個屬, 分別是 *Thermoanaerobacter* 與 *Thermoanaerobacterium*, 此兩屬菌種時常從低鹽度的水域被分離出來。而此兩屬主要以其還原硫代硫酸鹽 (thiosulfate) 的程度來分別, 其中 *Thermoanaerobacter* 可還原硫代硫酸鈉為硫化氫 (H_2S), 而 *Thermoanaerobacterium* 將硫代硫酸鈉還原為元素硫 (S^0) (Fardeau *et al.*, 1994)。2004 年由 Fardeau 等人提出, 根據系統分類學 DNA 雜交的結果 (互相有 70% 以上的相似度) 以及新陳代謝的不同, 將 *Thermoanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* 與

Carboxydibrachium pacificus 四株菌重新歸類到 *Caldanaerobacter* 屬，同為 *Caldanaerobacter subterraneus* 的亞種。新陳代謝方面，Fardeau 研究發現，L-alanine 是 *Caldanaerobacter* 屬在葡萄糖進行異化作用 (catabolism) 的一種主要代謝產物。因此 *Thermoanaerobiaceae* 科除了原本的 *Thermoanaerobacter* 屬與 *Thermoanaerobacterium* 屬以外，又多增加了 *Caldanaerobacter* 屬。

Caldanaerobacter 屬菌株的特性包括：細胞為直桿菌、革蘭氏染色為陽性或者陰性、可能有內孢子、屬於絕對厭氧菌、*Thermoanaerobiaceae* 科、碳水化合物為其可用以醱酵的基質、醋酸與 L-alanine 是主要的最終產物 (大約每 1mole 的葡萄糖會產 1mole L-alanine)、DNA G+C content 大約是 33-41 mol%。模式種(type species)為 *Caldanaerobacter subterraneus*。而 *Caldanaerobacter subterraneus* 的生理特性為：醋酸、L-alanine、乳酸、氫氣與二氧化碳為其主要葡萄糖醱酵產物，會利用硫代硫酸鈉為電子接受者，但不會利用硫酸鹽為電子接受者(Fardeau *et al.*, 2004)。

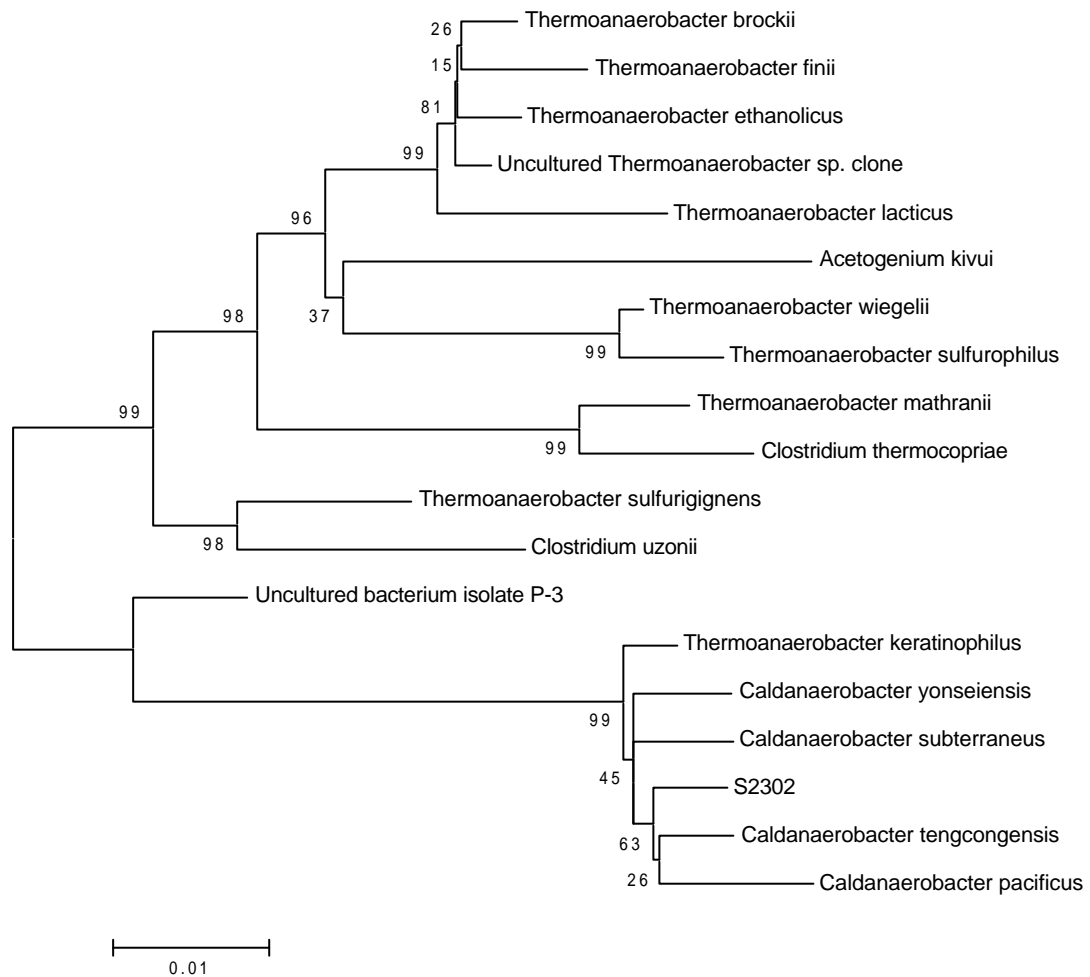


Figure 4.5 Phylogenetic trees showing the relationship of strain S2302 with related organisms. The numbers at nodes show the bootstrap values obtained with 1000 resampling analyses. Bar, 10 substitutions per 100 nucleotides.

Table 4.1 Similarity index derived from 16S rDNA sequences of S2302, *Caldanaerobacter yonseiensis*, *Caldanaerobacter tengcongensis*, *Caldanaerobacter subterraneus* and *Caldanaerobacter pacifius*.

Species	% Similarity with:			
	Strain S2302	<i>Caldanaerobacter yonseiensis</i>	<i>Caldanaerobacter tengcongensis</i>	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>
Strain S2302				
<i>Caldanaerobacter yonseiensis</i>	98			
<i>Caldanaerobacter tengcongensis</i>	98	98		
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i>	99	98	98	
<i>Caldanaerobacter pacifius</i>	98	97	98	97

4.4 生化特性分析

本段探討菌株之生理特性，主要為最佳生長溫度、最佳生長 pH 值、基質利用測試、過氧化氫測試、硫代硫酸鈉還原能力測試、鹽度測試、抗生素感受度、產乳酸測試、不同電子接受者測試等。

4.4.1 最佳生長條件

溫度、pH 值、鹽度對於微生物是一個相當重要的生長因數，尤其對於嗜熱厭氧菌來說，溫度為相當重要的特徵。

Strain S2302 在不同溫度之生長曲線圖 Figure 4.6 與比生長速率 (specific growth rate) 如 Figure 4.7 strain S2302 之生長溫度範圍在 60°C 至 80°C 之間，最佳生長溫度在 70°C。不同 pH 值的實驗結果如 Figure 4.8 與 Figure 4.9，起始 pH 值實驗範圍在 pH 值大約 5-8。如同不同溫度測試，本實驗使用波長 600nm 代表菌株之生長，使用葡萄糖為碳源，培養至遲滯期為止，大約每 2 個小時紀錄一次數據，結果顯示 pH 值在 7.2 時 strain S2302 表現出較高的比生長速率。

鹽度測試方面，由於 strain S2302 與 *Caldanaerobacter subterraneus pacificus* 在 16S rDNA 比對上有 98% 的相似度，雖然 strain S2302 並非由含鹽度的水樣所取得，但是由於 DNA 相似度高，strain S2302 在耐鹽度上可能具有某些程度的耐受度，因此進行不同

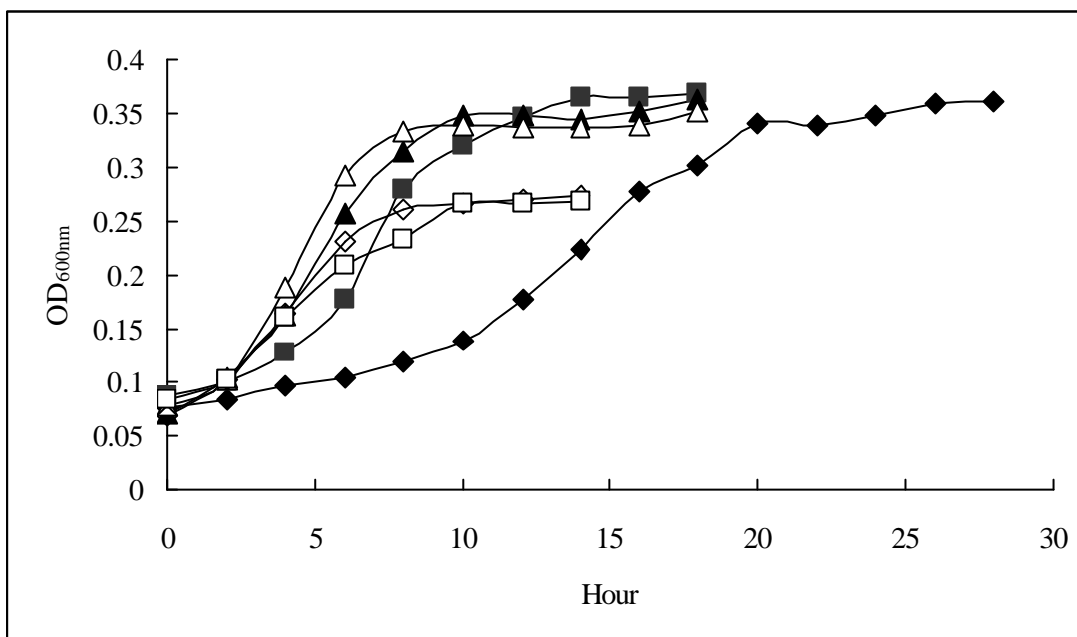


Figure 4.6 Growth curves of strain S2302 under different temperatures.
 (○ : 55°C; ◻ : 60°C; ◐ : 65°C; ◑ : 70°C; ◒ : 75°C; ◈ : 80°C)

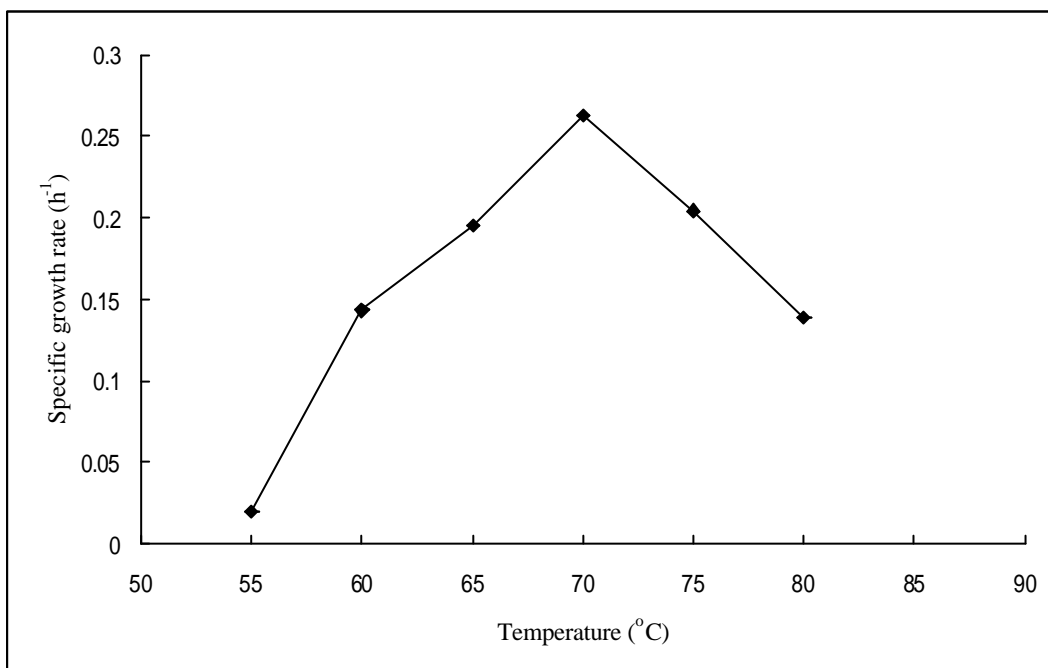


Figure 4.7 Specific growth rates of strain S2302 at different temperatures. S2302 was grown in TA medium with glucose as the carbon source.

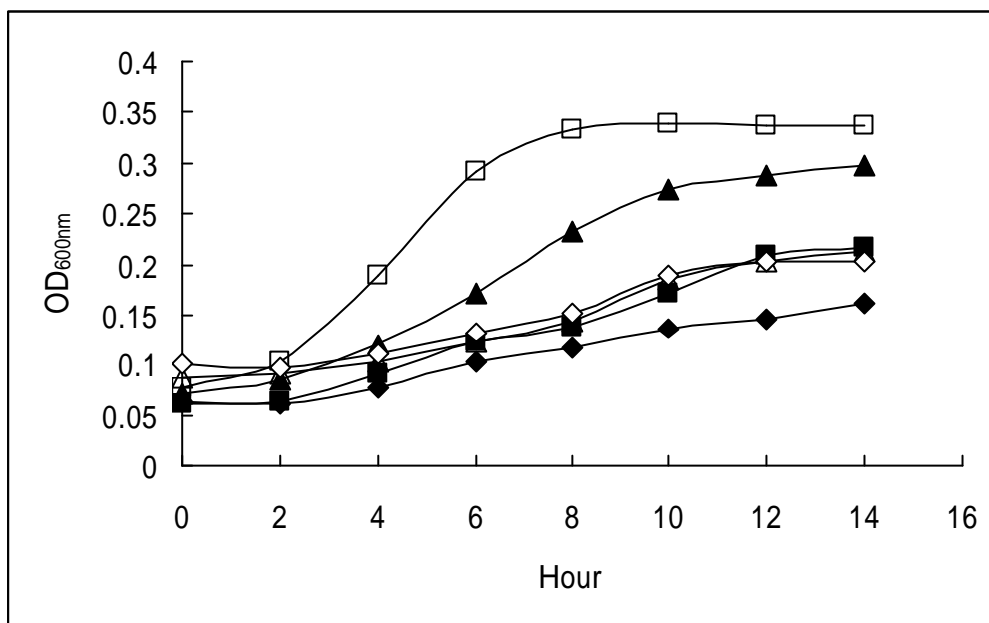


Figure 4.8 Growth curves of strain S2302 under different pH's. (□ : pH 5.22; △ : pH 5.63; ◇ : pH 6.4; ■ : pH 7.2; ○ : pH 7.6; ◆ : pH 8.05)

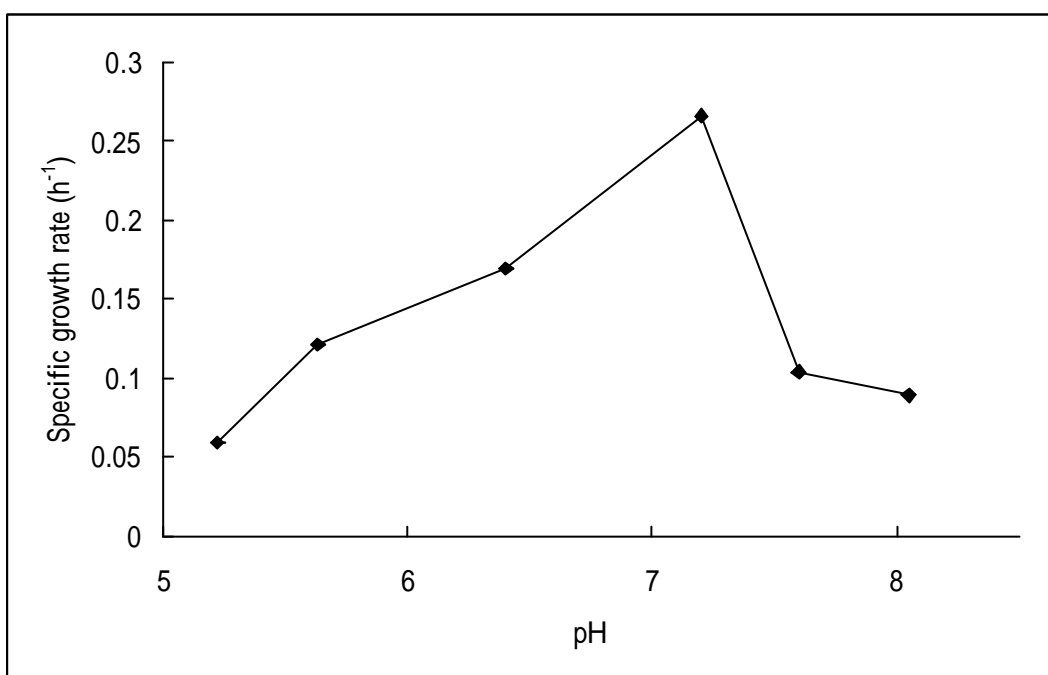


Figure 4.9 Specific growth rates of strain S2302 at different pH. Strain S2302 was grown in TA medium at 70°C with glucose as the carbon source.

鹽度的生長條件測試。確定了最佳生長溫度與最佳生長 pH 值後，在 70°C 與 pH7.2 條件下，於鹽度 0% 至 3% 培養測試其耐鹽性，結果如 Figure 4.10 與 Figure 4.11，可得知 strain S2302 在有鹽度的環境下生長會遭到抑制，在 0.5% 與 1% 還有些微的生長狀況出現，當鹽度提升到 1.5% 後便完全抑制了菌株的生長。

4.4.2 基質利用模式

為瞭解 strain S2302 對於不同基質的利用能力，使用了 26 種碳源對 strain S2302 進行測試。yeast extract 對 *Thermoanaerobacter* species 而言為一種重要的生長因子，因此基質測試先對 strain S2302 對於 yeast extract 的需要程度做實驗，實驗分為三組：yeast extract + glucose、yeast extract only、glucose only，依照 TA medium 中 yeast extract 使用濃度為 1 g/l, glucose 使用濃度為 5 g/l, 實驗結果如 Figure 4.12，由此實驗結果可得知 yeast extract 是 strain S2302 的重要生長因子且不能只單一提供碳源，在只有 yeast extract 的時候 strain S2302 有稍微生長的狀況，表示 strain S2302 之生長需要 yeast extract，因此不同碳源測試都添加 1g/l yeast extract 為生長因子。

可溶性碳源與一氧化碳部份使用吸光度代表菌株生長，不溶性的基質如 cellulose 與 xylan 則使用生物總蛋白質濃度為生長之依據並測

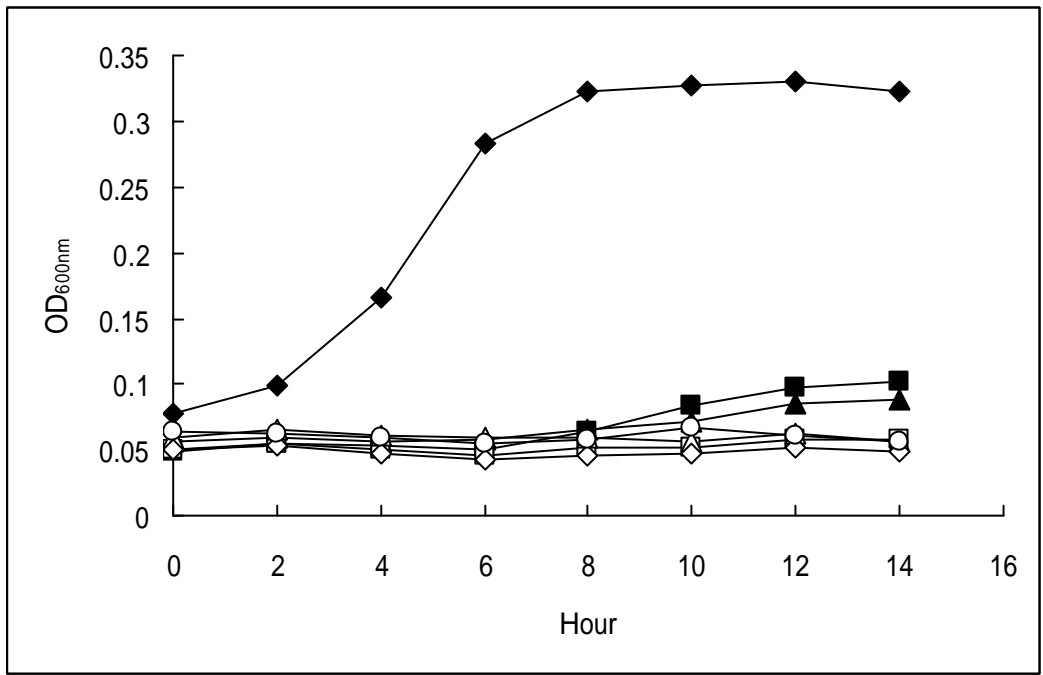


Figure 4.10 Growth curves of strain S2302 under different salt concentrations.

(: 0%; | : 0.5%; ? : 1%; ? : 1.5%; : 2%; : 2.5%; ? : 3%)

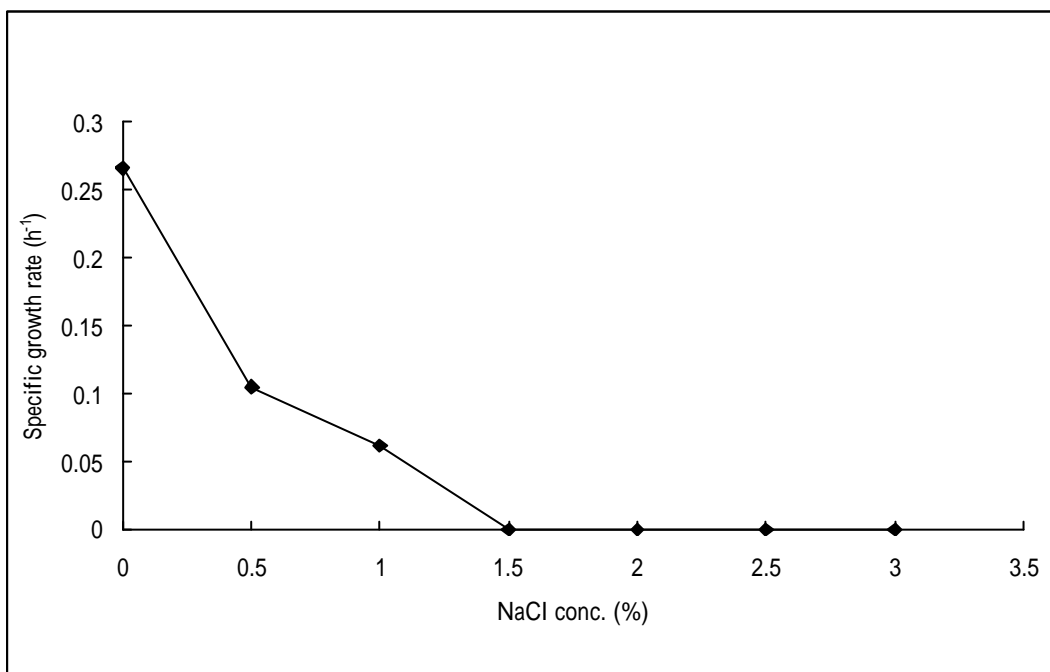


Figure 4.11 Specific growth rates of strain S2302 at different salt concentrations. S2302 was grown in TA medium at 70°C with glucose as the carbon source.

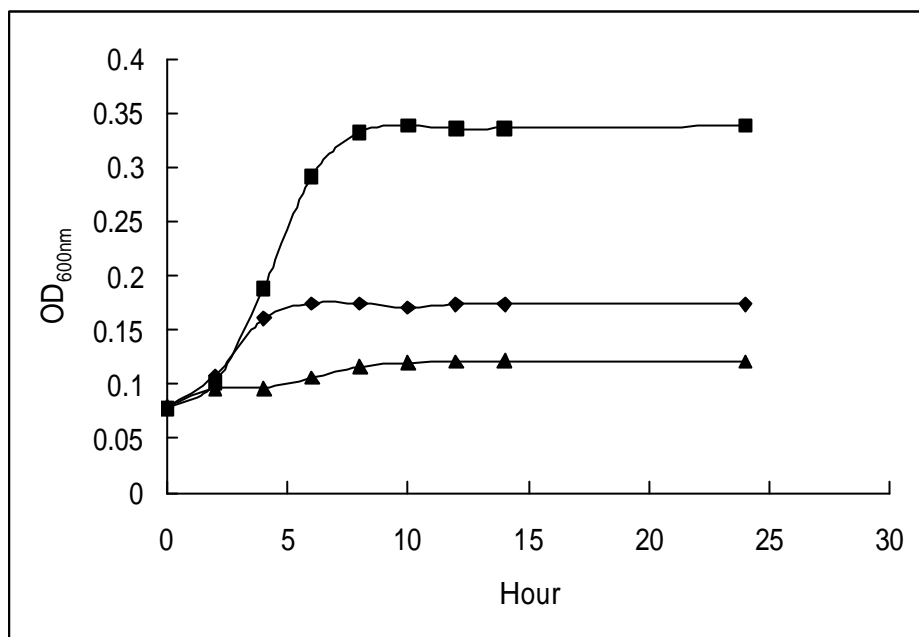


Figure 4.12 Effect of yeast extract on growth of strain S2302. Cell growth was measured as optical density at 600nm. (□ : yeast extract with glucose; ◇ : yeast extract only; △ : glucose only)

試是否有還原糖的產生。實驗結果可得知 strain S2302 可利用 mannose, starch, xylose, glucose, maltose, fructose, sorbose, sucrose, pullulan 為碳源進行生長，但無法使用 lactose, glycine, mannitol, neopeptone, carboxymethyl cellulose, raffinose, arabinose, galactose, rhamnose, cellobiose, glycerol, gelatin, sorbitol, esculin, xylan, cellulose, carbon monoxide 為碳源生長。Strain S2302 可利用 glucose 六碳糖與 xylose 五碳糖，但是卻無法利用大分子 cellulose 及 xylan，顯示 strain S2302 缺乏 cellulase 及 xylanase。由結果得知 strain S2302 可利用 starch 為碳源，而 starch 為一個較大的醣類，分解 starch 需要澱粉水解？，在生質能源上有研究的價值；Fardeau 在比較 *Caldanaerobacter* 的已知四株菌時有比較是否會利用 carbon monoxide，而 strain S2302 不會利用 carbon monoxide，是與 *Caldanaerobacter subterraneus* 較為接近。

4.4.3 抗生素感受性測試

實驗使用 Ampicillin、Polymyxin B、Penicillin、Vancomycin 四種抗生素添加至培養基中，使用固定濃度 100 µg/ml 測試 strain S2302 對各個抗生素的感受性。實驗結果發現 Ampicillin 與 Penicillin 對菌株並無抑制性，而 Polymyxin B 與 Vancomycin 則有抑制的情形，之後

將 Polymyxin B 與 Vancomycin 的濃度改為 20 µg/ml 再進行一次實驗，結果在較低的濃度下持續培養 50 小時，polymyxin B 與 vancomycin 仍對 strain S2302 之生長有抑制的情形 (Figure 4.13)。

由 Ampicillin 與 Penicillin 不會抑制 strain S2302 生長來推測，strain S2302 可能會產生 penicillinase 來分解 Ampicillin 與 Penicillin，基本上這兩個抗生素屬於同一種抗生素，作用類似。Polymyxin B 對 strain S2302 的抑制顯示菌株的細胞壁較薄，容易被抗生素入侵，strain S2302 的革蘭氏染色為革蘭氏陰性，說明 strain S2302 之細胞壁較薄，也因此對 Polymyxin B 較不具有抵抗力。Vancomycin 會阻止細胞壁的生成，對於細菌有極大的抑制性，一般的細菌對於 Vancomycin 都不具有抗性，在醫學上一般將 vancomycin 作為最後一線的抗生素使用，而 strain S2302 不具有 Vancomycin 的抗藥性。

4.4.4 過氧化氫？測試

實驗結果發現 strain S2302 並無氣泡產生，可得知此 strain S2302 並不具有過氧化氫？，無法以氧氣為電子接受者，且無法分解掉過氧化氫或者是超氧化物，屬絕對厭氧菌(Lim, 1998)。

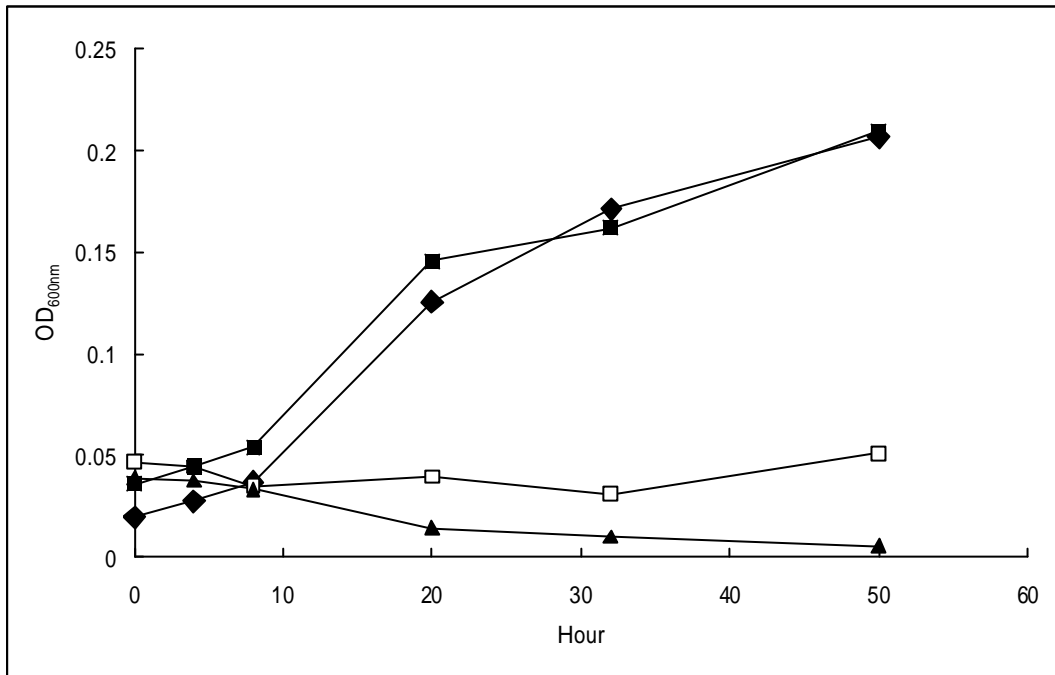


Figure 4.13 Effect of various antibiotics on growth of strain S2302 with 5g/l glucose as substrate. Cell growth was measured as optical density at OD_{600nm} . (□ :penicillin 100µg/ml; ◆ :Ampicillin 100µg/ml; △ :vancomycin 20µg/ml; ▲ :Polymyxin 20µg/ml)

4.4.5 硫代硫酸鈉還原能力測試

添加硫代硫酸鈉以測試 strain S2302 是否會還原產生硫化氫 (H_2S)，實驗同時紀錄生長以 OD_{600} 表示，實驗結果如 Figure 4.14，發現 strain S2302 在第一天生長已經到達高點，硫化氫產生部份，隨著時間到第三天到達最大約 14 mM，由於硫代硫酸鈉只給予 20mM，硫的轉換率很高，大約為 0.7。由此可知菌株會還原硫代硫酸鈉而產生硫化氫。

4.4.6 代謝產物、氫氣與揮發性有機酸測試

氫氣測試實驗使用 GC-TCD，氮氣為載流氣體分別，以 starch、xylose、glucose、sucrose 為碳源。實驗結果如 Figure 4.15，strain S2302 使用 glucose 為碳源時可產生最多 24% 的氫氣，使用 starch 為碳源時可產生最多 24.8% 的氫氣，使用 sucrose 則最多產生 20.7% 的氫氣，使用 xylose 時則產生的氫氣較少，大約只有 12.6%，結果可知 strain S2302 將六碳糖轉化成氫氣的比率比五碳糖高。

Strain S2302 使用 5g/l glucose 培養 24 小時後之揮發性有機酸氣相層析圖譜如 Figure 4.16，strain S2302 主要的醱酵產物為：ethanol、acetic acid、butyric acid。

4.4.7 L-alanine 測試

由於 strain S2302 與 *Caldanaerobacter* 菌屬相近，而此菌屬的特性之一是當菌株以 glucose 為碳源生長時會產生 L-alanine，大約每 1 mol glucose 會發酵產生 1 mol L-alanine，表示 *Caldanaerobacter* 菌屬可將 glucose 經由糖酵解為 pyruvate 後，pyruvate 與 L-glutamate 經由 alanine aminotransferase 反應後產生 L-alanine 與 α -ketoglutarate (Mathews *et. al.*, 2000; Ward *et. al.*, 2000)，因此本實驗亦針對 L-alanine 的產生做出測試。L-alanine 使用 HPLC 測試，待測物加上螢光衍生物 (*o*-phthaldehyde)，使用螢光偵測器測試，方法偵測極限為 0.245 μ M。實驗結果發現 strain S2302 以 5g/L glucose 為碳源培養會產生 1.42 mM 的 alanine，與 *Caldanaerobacter* 菌屬相比，分離菌株 strain S2302 發酵所生成之 L-alanine 明顯低很多 (0.05 mole L-alanine/ mole glucose)，與已知之 *Caldanaerobacter* 菌種特性不同。

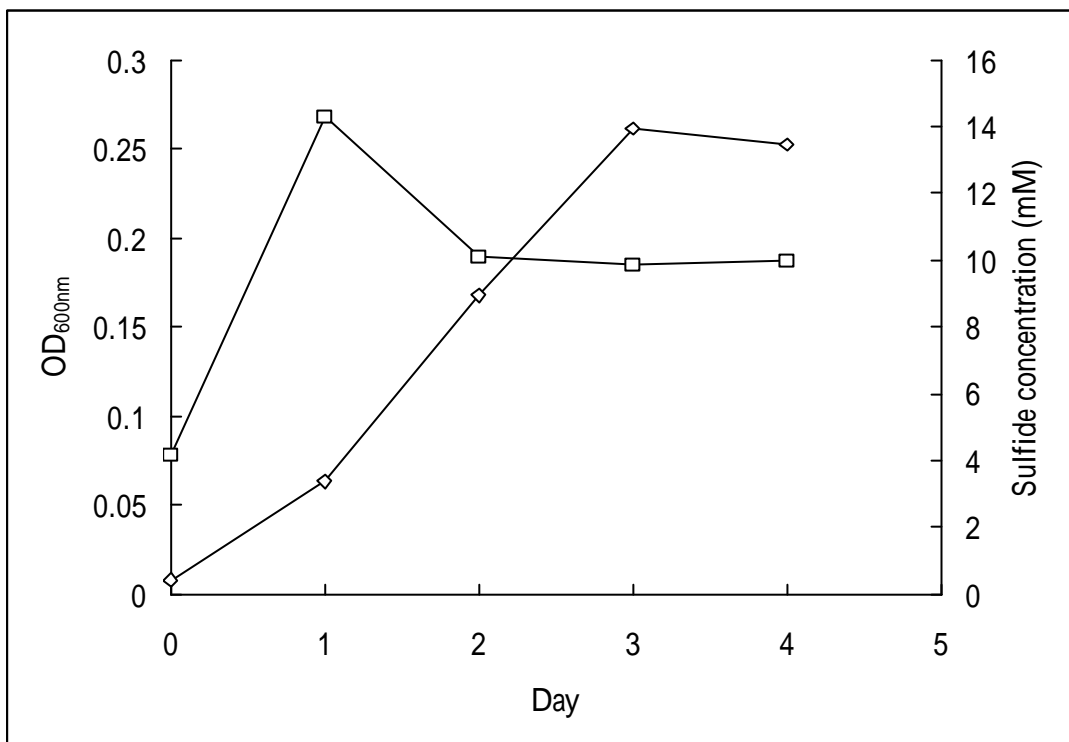


Figure 4.14 Production of sulfide and cell growth from thiosulfate reduction by strain S2302. Cells were grown in TA medium supplemented with 20mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in the absence of reducing agent Na_2S . Cells were incubated at 70°C for 4 days. (\square : cell growth; \diamond : sulfide concentration)

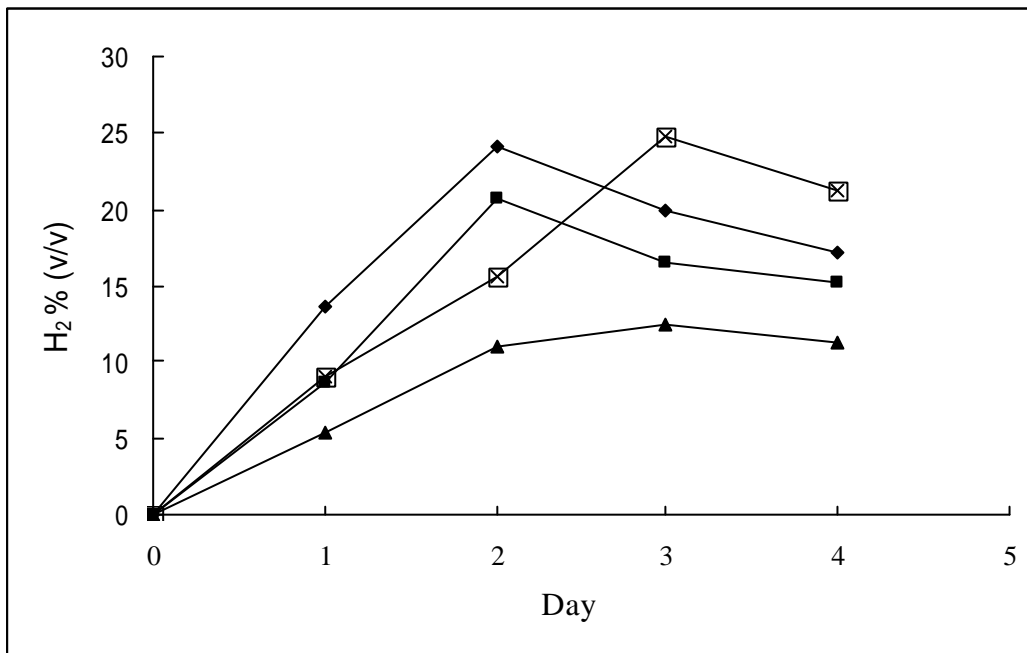


Figure 4.15 Hydrogen production from fermentation of various growth substrates by strain S2302. (● : glucose; ■ : sucrose; ⊠ : starch; ▲ : xylose)

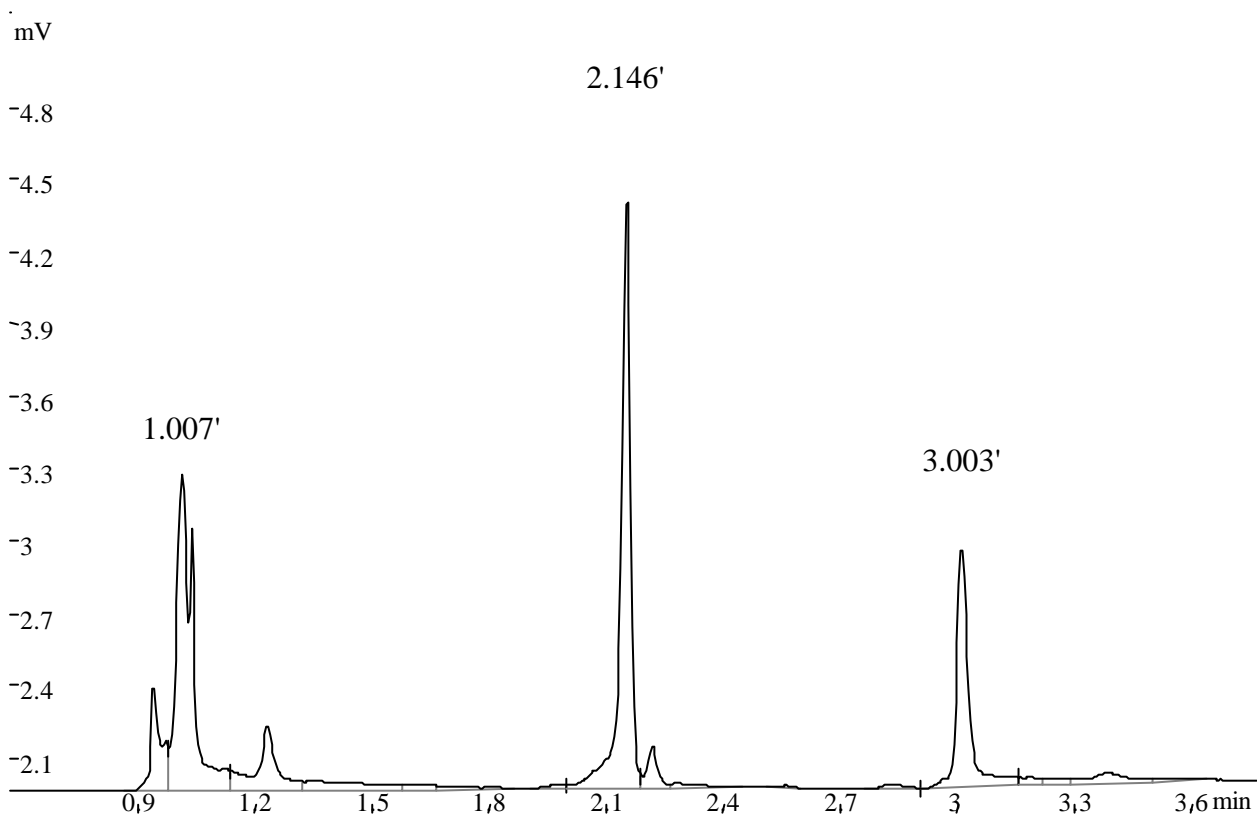


Figure 4.16 Gas chromatogram of volatile fatty acids produced from fermenting glucose by strain S2302. Injection volume was 1 μ l. (retention time: ethanol, 1.007min; acetate, 2.146min; butyric acid, 3.003min)

4.4.8 乳酸測試

Fardeau 比較 *Caldanaerobacter* 菌屬時，有比較 *Caldanaerobacter subterraneus*、*Caldanaerobacter yonseiensis*、*Caldanaerobacter tengcongensis* 與 *Caldanaerobacter pacificus* 四株菌，使用 glucose 為碳源發酵產生乳酸這一點特性。其中 *Caldanaerobacter subterraneus* 與 *Caldanaerobacter yonseiensis* 使用 glucose 為碳源發酵時，會產生乳酸，而 *Caldanaerobacter tengcongensis* 與 *Caldanaerobacter pacificus* 使用 glucose 為碳源發酵時，不會產生乳酸。因此本實驗也將 strain S2302 使用 glucose 為碳源發酵來比較是否有產生乳酸。實驗結果菌株並沒有產生乳酸，此特性與 *Caldanaerobacter tengcongensis*、*Caldanaerobacter pacificus* 相近，但是 strain S2302 沒有高耐鹽度，且與 *Caldanaerobacter pacificus* 的採樣地點大不相同，所以 strain S2302 與除了同樣不具有高耐鹽度且採樣地點也是溫泉的 *Caldanaerobacter tengcongensis* 較為接近。

4.5 研究菌株與相近菌株之比較

由 16S rDNA 序列分析顯示與 strain S2302 較為接近的菌屬為 *Caldanaerobacter*，Table 4.2 比較了已知之 *Caldanaerobacter* 菌種與研究菌株的特性。Strain S2302 為革蘭氏陰性菌，使用 glucose 培養時能

產生少量的 L-alanine, 使用硫代硫酸鈉培養產生硫化氫而不產生元素硫。碳源利用方面, strain S2302 不會利用纖維二糖、乳糖、一氧化碳, 可利用五碳糖的木糖, 與其他菌株一樣可利用甘露糖、澱粉、葡萄糖、麥芽糖、果糖, 且需要 yeast extract 才可生長。由以上菌株特性研究比較, 得知 strain S2302 與 *Caldanaerobacter tengcongensis* 十分相似, 僅在基質利用方面, *Caldanaerobacter tengcongensis* 可利用 lactose、cellubiose 及 carbon monoxide, 而 strain S2302 不能利用, 因此推測分離菌株 strain S2302 為 *Caldanaerobacter tengcongensis* 之亞種。

Table 4.2 Characteristic comparison of the isolate strain S2302, *C. subterraneus*, *C. tengcongensis*, *C. yonseiensis* and *C. pacificus*. (+: positive; -:negative; NA: not available)

	S2302	<i>C. subterraneus</i> ¹	<i>C. tengcongensis</i> ²	<i>C. yonseiensis</i> ³	<i>C. pacificus</i> ⁴
Cell length (um)	0.8-1 x 6.0-9.0	0.5-0.7 x 2.0-8.0	0.5-0.6 x 1.0-10.0	0.4-0.8 x 1.0-3.0	0.3 x 4.0-10.0
Spore	-	-	-	+	-
Gram reaction	-	+	-	+	+
Motility	-	+	-	+	+
Optimum temperature (°C)	70	65	75	75	70
Growth temperature range (°C)	60-80	40-75	50-80	50-85	50-80
Optimum pH	7.2	7.5	7.0-7.5	6.5	6.8-7.2
Fermentation products:					
Acetate	+	+	+	+	+
Lactate	-	+	-	+	-
Ethanol	+	-	+	+	-
L-alanine	+	+	+	+	+
Thiosulfate reducing:					
to S ⁰	-	-	-	-	NA
to sulfide	+	+	+	+	NA

Table 4.2 (continued) Characteristic comparison of the isolate strain S2302, *C. subterraneus*, *C. tengcongensis*, *C. yonseiensis* and *C. pacificus*. (+: positive; -:negative; NA: not available)

	S2302	<i>C. subterraneus</i> ¹	<i>C. tengcongensis</i> ²	<i>C. yonseiensis</i> ³	<i>C. pacificus</i> ⁴
Antibiotic inhibition:					
Penicillin	-	NA	-	NA	-
Ampicillin	-	NA	NA	NA	+
Polymyxin B	+	NA	NA	NA	NA
Vancomycin	+	NA	NA	+	NA
Substrate utilize:					
Mannose	+	+	+	+	NA
Lactose	-	+	+	+	NA
Starch	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	NA	+	NA
Glucose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	NA
D(-)Fructose	+	+	+	+	+
Cellubiose	-	+	+	NA	+
Carbon monoxide	-	-	+	+	+
Requirement for yeast extract for growth	+	+	+	+	NA

¹Fardeau *et al.*, (2000); ²Xue *et. al.*, (2001) ; ³Kim *et. al.*, (2001) ; ⁴Sokolova, *et. al.*, (2001)

4.6 酵素分析

針對分離菌株 strain S2302 對澱粉分解的 α -amylase 酵素進行探討，使用 DNS reagent 測量還原糖生成量作為分析酵素活性的方式，酵素活性定義為 α -amylase 在 70°C 下每分鐘釋放出 1 μmol 的還原糖 (以葡萄糖為標準品) 所需要的酵素量為一個酵素的活性單位 (U)。取 strain S2302 培養液上澄液反應 30 分鐘後，反應初始還原糖濃度為 47.02 mg/L，30 分後還原糖濃度增為 94.64 mg/L，經計算可知 strain S2302 每分鐘釋放出 0.05 μmol 還原糖。酵素反應液的蛋白質濃度為 2.51 mg/L，反應總體積為 5.5ml。根據以上數據計算 strain S2302 的 α -amylase 酵素活性為 0.276 U。比酵素活性為 20 U/mg。Table 4.3 整理 strain S2302 與一些嗜熱菌 *Pyrococcus furious*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus profundus* DT5432、*Bacillus stearothermophilus*、*Lactobacillus manihotivorans*、*Bacillus subtilis*、*Thermococcus hydrothermalis*、*Thermomyces lanuginosus*、*Thermococcus hydrothermalis* 的澱粉水解酵素的活性比較，可發現 strain S2302 粗萃取液之 α -amylase 活性較其他已知嗜熱菌之活性為高，具有繼續研究之價值。

Table 4.3 Specific activities of Strain S2302, *Pyrococcus furious*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus profundus* DT5432, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Bacillus subtilis*, and *Thermomyces lanuginosus*. All data were compared as crude enzyme, except *Thermococcus hydrothermalis* and *Sulfolobus solfataricus* that was purified.

	Specific activity (U*/mg)
Starin S2302 ¹	20
<i>Pyrococcus furious</i> ²	1.75
<i>Thermococcus litoralis</i> ³	0.95
<i>Thermococcus profundus</i> DT5432 ⁴	1.4
<i>Thermococcus hydrothermalis</i> ⁵ – partially purification with ion exchange column	1.2
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ⁶ – extract with Superdex 75 H/R 10/30 column	340
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ⁷	2.11
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> ⁸	0.74
<i>Thermomyces lanuginosus</i> ⁹	6.45
<i>Bacillus subtilis</i> ¹⁰	0.47

1.This study; 2.Data from Brown *et. al.*, (1990); 3.Data from Chung *et. al.*, (1995); 4.Data from Brown and Kelly (1993); 5.Data from Legin *et. al.*, (1998); 6.Data from Hastine *et. al.*, (1996); 7.Data from Manning and Campbell (1961); 8.Data from Augilar *et. al.*, (2000); 9.Data from Mishra and Maheshwari (1996); 10.Data from Welker and Campbell (1967).

*Definition of enzyme activity: 1.~6. One unit was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of reducing sugar (as glucose standard) per min; 7.~9. One unit was defined as the amount of enzyme that hydrolyze 10mg of starch per min; 10. One unit was defined as the amount of enzyme that released 1mg of reducing sugar (as maltose standard) per 3 min.

4.7 澱粉濃度對 strain S2302 生長之探討

實驗研究不同濃度之澱粉與 strain S2302 生長速度之關係，菌株分別培養在 0.5、1、2、4、5、8、10、15 g/L 的濃度之下，紀錄生長狀況後計算比生長速率，結果如 Figure 4.17，結果可知 strain S2302 於低濃度時生長狀況較差，於高濃度時並沒有被抑制生長的現象，之後生長狀況趨於一個穩定的狀態。

依照 Monod 模式探討澱粉濃度與微生物生長速率之關係(Figure 4.18)，由於不同濃度澱粉會影響微生物的生長代謝活性，因此可依照此方法找尋出微生物的最大比生長速率與半飽和速率常數 (Half-saturation constant)。

其方程式如下：

$$m = m_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

S：基質濃度，單位 g/L μ ：比生長速率， time^{-1}

μ_{\max} ：最大比生長速率， time^{-1}

K_s ：半飽和常數，到達最大比生長速率一半時之基質濃度，單位 g/l

將上面的式子取倒數可得：
$$\frac{1}{m} = \frac{K_s}{m_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{m_{\max}}$$

取 Figure 4.13 中各點迴歸線之斜率與截距，可求得

$\mu_{\max} = 0.345 \text{ h}^{-1}$ ， $K_s = 0.613 \text{ g/L}$

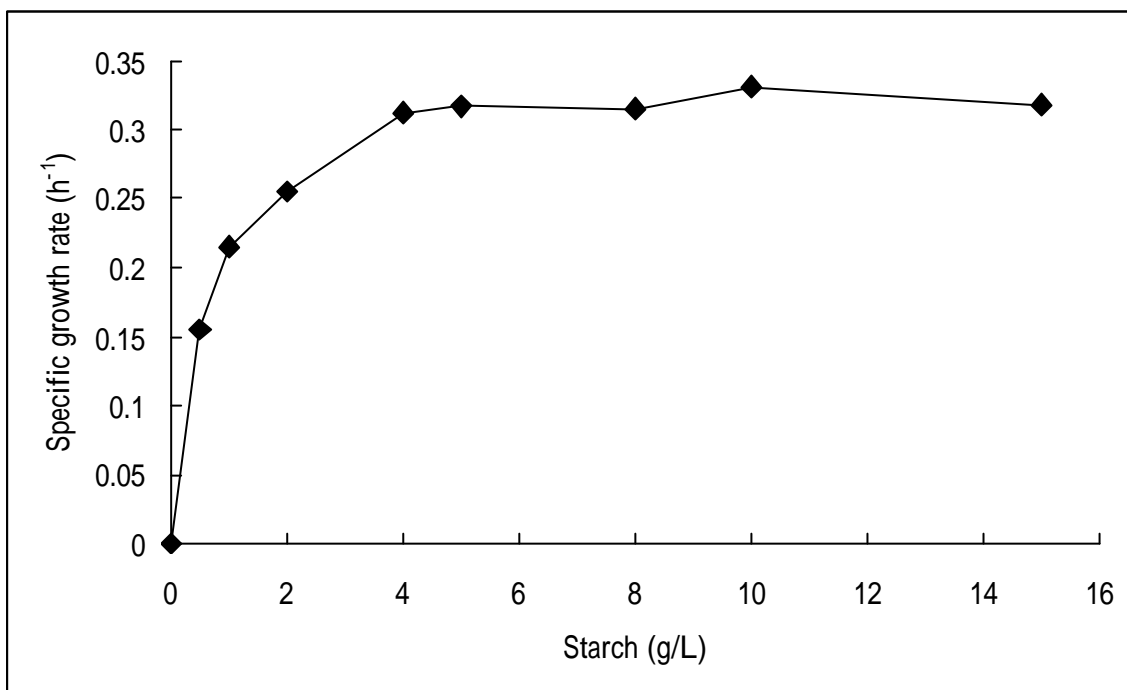


Figure 4.17 Specific growth rates of strain S2302 with different starch concentrations. The initial pH value of TA medium was 7.2 and cells were incubated at 70°C.

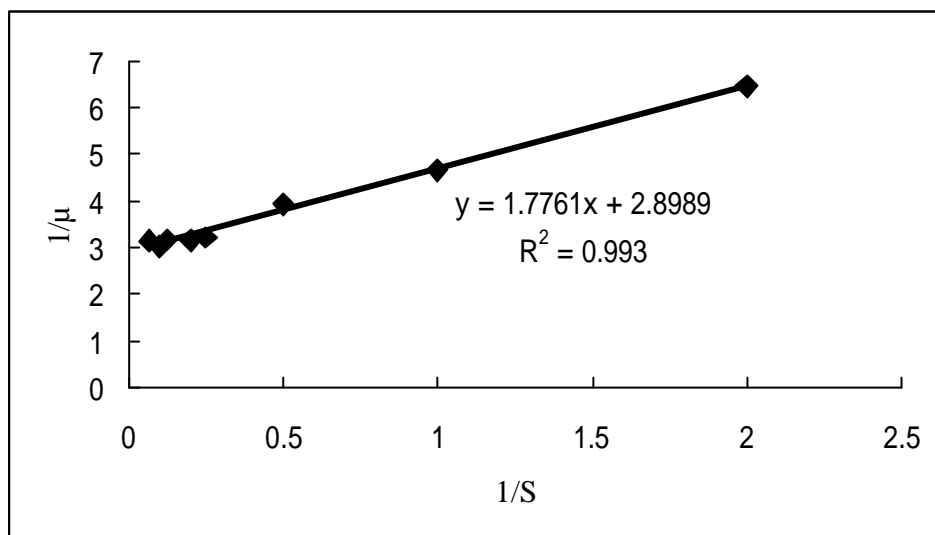


Figure 4.18 Relationship of reciprocal of starch concentration and specific growth rate of strain S2302.

4.8 不同來源澱粉水解測試

為了了解 Strain S2302 是否可分解未經純化的自然澱粉，實驗使用了米、玉米、甘藷三种植物的澱粉。實驗所選擇之米為在來米，其成份中直鏈澱粉含量大約 25%。甘藷的澱粉含量為 13-24%，玉米澱粉直鏈澱粉含量為 20-25%。前處理時，經切碎後乾燥研磨，得到粉末，將這些粉末做為碳源，以 10g/L 的濃度直接加入培養基，實驗時以直接計算細胞數量紀錄生長，並紀錄還原糖(以葡萄糖為標準品)與總糖之變化。

實驗結果細胞生長狀況如 Figure 4.19，Strain S2302 在利用米、玉米、甘藷生長時，於第一天開始就出現了生長的狀況；其中利用甘藷生長時 Strain S2302 於第一天生長後，細胞生長停滯，到了第三天開始又出現了生長狀況，且生長的細胞數量是三种植物中最高的，之後到第五天後利用甘藷生長的狀況開始下降，細胞不再生長。而利用玉米時，Strain S2302 從第一天到第三天皆有生長的狀況，之後就停止了生長。利用米生長時細胞從第一天到第四天皆有生長的狀況，在第五天之後，細胞生長狀況下降，到了第六天之後停止生長。此時利用米、玉米、甘藷生長時的生長速率分別是：米 1.45 day^{-1} 、玉米 1.79 day^{-1} 、甘藷 0.99 day^{-1} 。

還原糖產生部分，實驗結果如 Figure 4.20，Strain S2302 使用米、

玉米、甘藷產生還原糖時，到了第四天才開始有還原糖的產生；其中利用米生長時，從第四天開始出現還原糖累積，一直到第十一天才停止產生還原糖，Strain S2302 於 10g/L 的米粉末濃度下產生了大約 12g/L 的還原糖；Strain S2302 利用甘藷生長時，還原糖的累積從第四天開始，到了第九天停止了還原糖的產生，Strain S2302 於 10g/L 的甘藷粉末濃度下產生了大約 7g/L 的還原糖；利用玉米粉末生長時，還原糖並沒有出現累積的狀況。此時利用米、玉米、甘藷生長時產生還原糖的速率分別是：米 0.81 g 還原糖/ day、玉米 0.06 g 還原糖/ day、甘藷 0.42 g 還原糖/ day。

Strain S2302 產生總糖的實驗結果如 Figure 4.21；利用米生長時從第三天開始出現總糖的累積，第三天到第七天的總糖累積速度較快，到了第七天之後總糖累積開始趨緩，並在第十天後停止了總糖的累積，大約為 12g/L；在利用甘藷生長時，總糖在一開始就出現了大約 7g/L 的濃度，這可能是甘藷本身含有的糖類，到了第二天總糖稍微下降，之後又開始慢慢提升到 7g/L 的濃度，但是從整體來看，Strain S2302 分解甘藷所產生總糖的變化並不大；利用玉米粉末生長時，總糖則是沒有出現太大的變化。

從細胞生長、還原糖、總糖的變化討論。利用米、玉米、甘藷生長的三個實驗組到第四天時，還原糖累積的量並不多，但是第四天的

細胞生長卻已經生長了不少，可能是初期的還原糖都被 Strain S2302 轉化為細胞量。利用米生長時，還原糖濃度在細胞停止後有持續上升的狀況，可能是在細胞停止生長後，分解澱粉的胞外酵素仍持續分解澱粉的緣故。利用甘藷生長的實驗結果可能也是因為胞外酵素持續反應的關係，而使得還原糖在細胞生長結束後出現持續累積的狀況，但是利用玉米生長的實驗組並沒有出現還原糖累積的狀況，推測是因玉米澱粉含有較高量之支鏈澱粉，較難被 strain S2302 的胞外酵素分解，而造成還原糖沒有累積的狀況。利用米生長的還原糖與總糖實驗結果發現，還原糖產生時，總糖也有相對的產生，且在第十一天時總糖與還原糖濃度大約都是 12g/L，可推知總糖在後期可能都被分解成還原糖；利用甘藷生長的實驗結果，還原糖最終的累積量與總糖的量相當，可能是 Strain S2302 利用還原糖生長到了第五天後，細胞生長停止，細胞停止使用還原糖，所以開始出現還原糖的累積，但是總糖變化不大的原因，可能是 strain S2302 缺乏酵素系統來繼續轉化甘藷澱粉被分解後釋出的糖類；玉米粉末則可能是因為澱粉含有的支鏈澱粉較多之緣故，使得總糖與還原糖的實驗結果都沒有太大的變化。

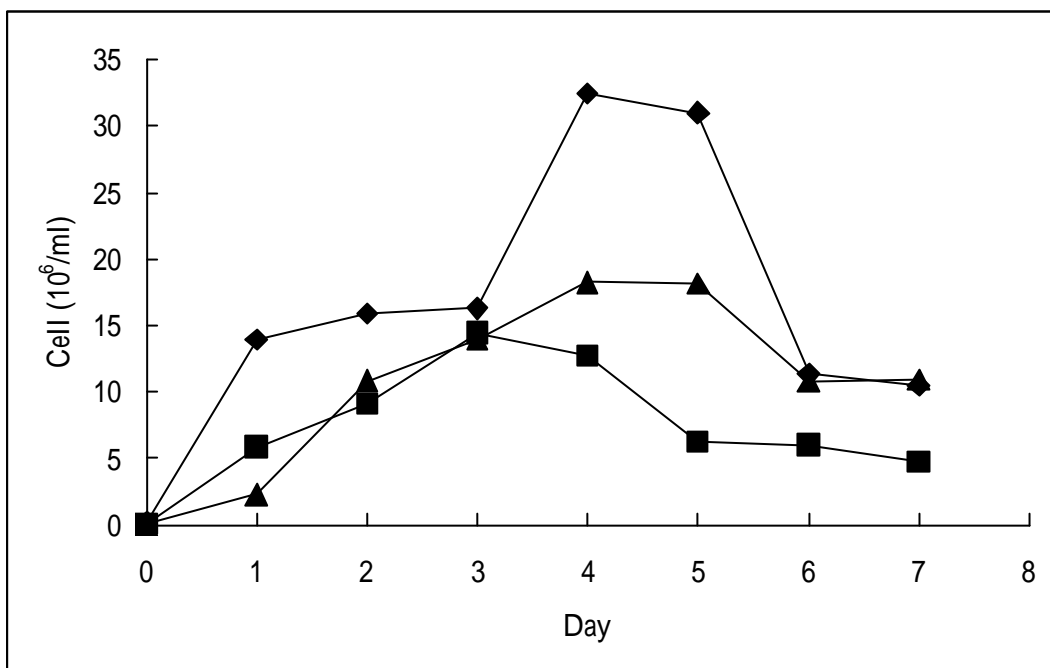


Figure 4.19 Cell growth from fermentation of various growth substrates by strain S2302. (\blacklozenge :sweet potato; \blacktriangle : corn; \blacksquare : rice)

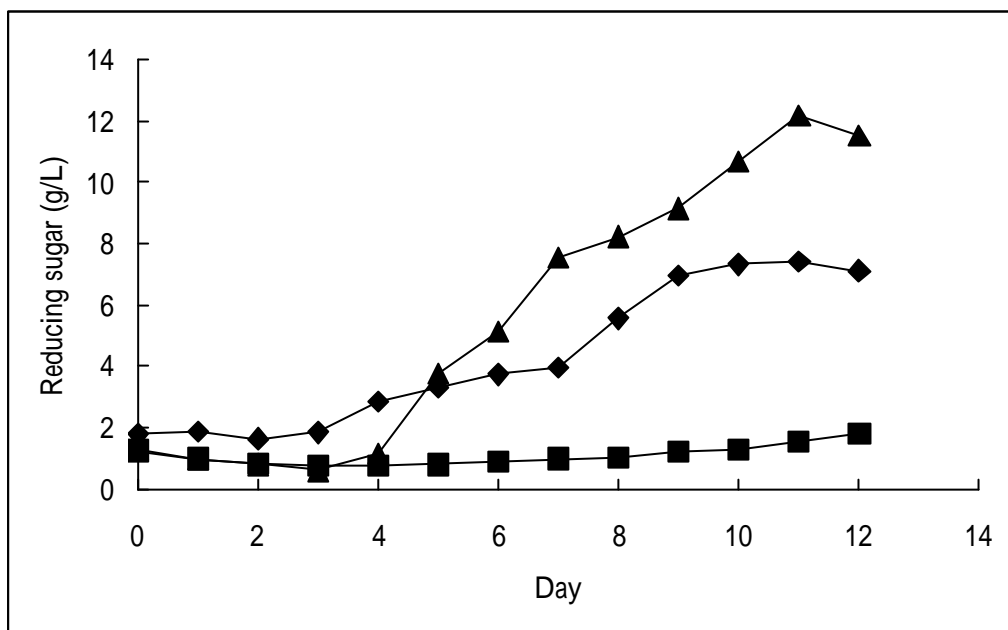


Figure 4.20 Production of reducing sugar from fermentation of various growth substrates by strain S2302. (:sweet potato; : corn; : rice)

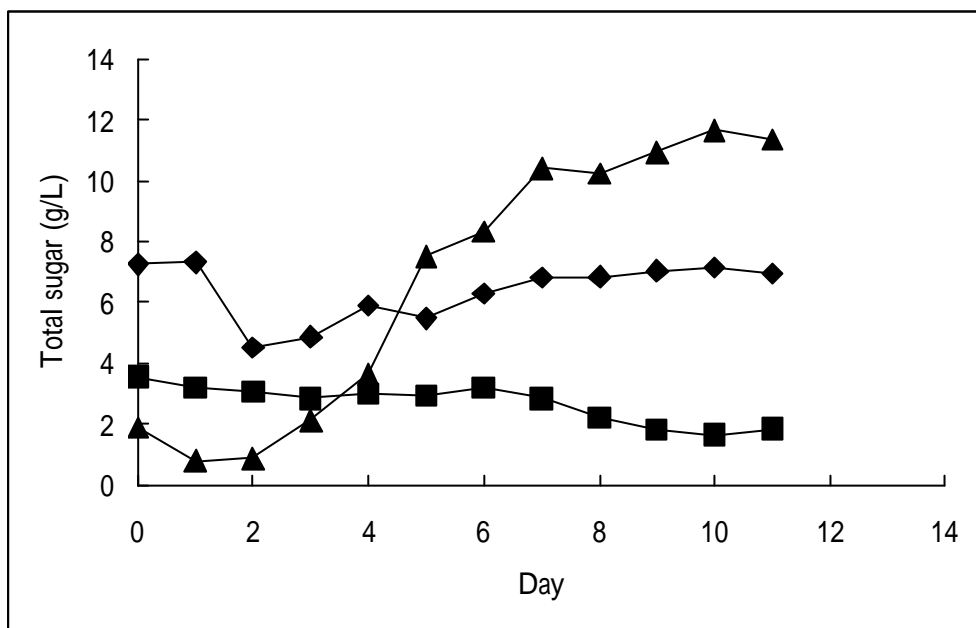


Figure 4.21 Total sugar produced in culture medium from fermentation of various growth substrates by strain S2302. (:sweet potato; : corn; : rice)

4.9 不同濃度澱粉水解測試

為了解澱粉濃度對 strain S2302 之生長及還原糖產生速率之影響，實驗以不同濃度的可溶性澱粉為碳源，並定時紀錄可溶性澱粉濃度、還原糖(以葡萄糖為標準)濃度與細胞生長。實驗結果如 Figure 4.22(生長曲線圖)、Figure 4.23(還原糖產生量)、Figure 4.24(澱粉水解)。由實驗結果可知 strain S2302 利用可溶性澱粉時會產生還原糖，還原糖的濃度在 18 小時開始快速增加，生長也隨時間增加，其中 2g/L、4g/L、5g/L 三組實驗組在 18 小時開始生長速度增快，可溶性澱粉濃度也在 18 小時開始快速的減少，此三組數據顯示 strain S2302 生長到了 18 小時後分解水溶性澱粉的活性開始增加。在 1g/L 與 2g/L 兩個實驗組部份，可溶性澱粉在 30 小時之後都已經被降解，30 小時之後的還原糖慢慢增加，表示酵素分解可溶性澱粉時可能將澱粉分解成較小具還原端的糖類(例如：葡萄糖等)。4g/L 與 5g/L 的澱粉降解、還原糖產生與微生物的生長狀況相當接近，可溶性澱粉都是在 36 小時降解到了最低點，都可產生大約 0.7g/L 的還原糖。如此清楚的證明了 strain S2302 確實會分解可溶性澱粉產生還原糖。實驗最高的產率為 0.1618 g 還原糖/g 澱粉 (4g/L 實驗組：可溶性澱粉濃度初始值為 4.3390g/L，終點值為 0.0085g/L；還原糖濃度初始值為 0.0020g/L，終點值為 0.7027g/L)，轉換率為 99%。

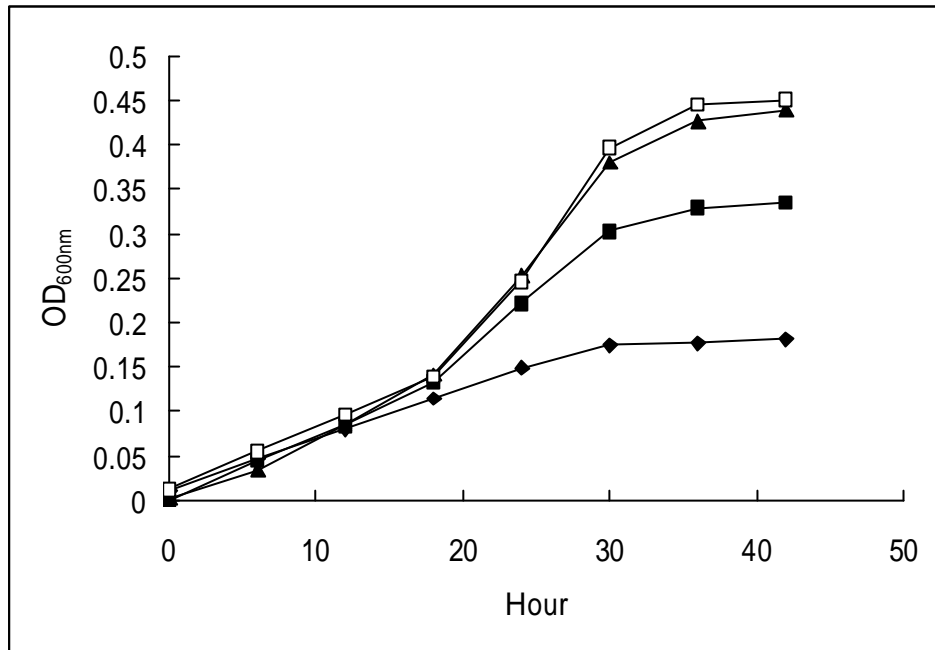


Figure 4.22 Growth curve of strain S2302 with different concentration of soluble starch. (□ :1g/L ; ■ :2g/L ; ▲ :4g/L ; ◆ :5g/L)

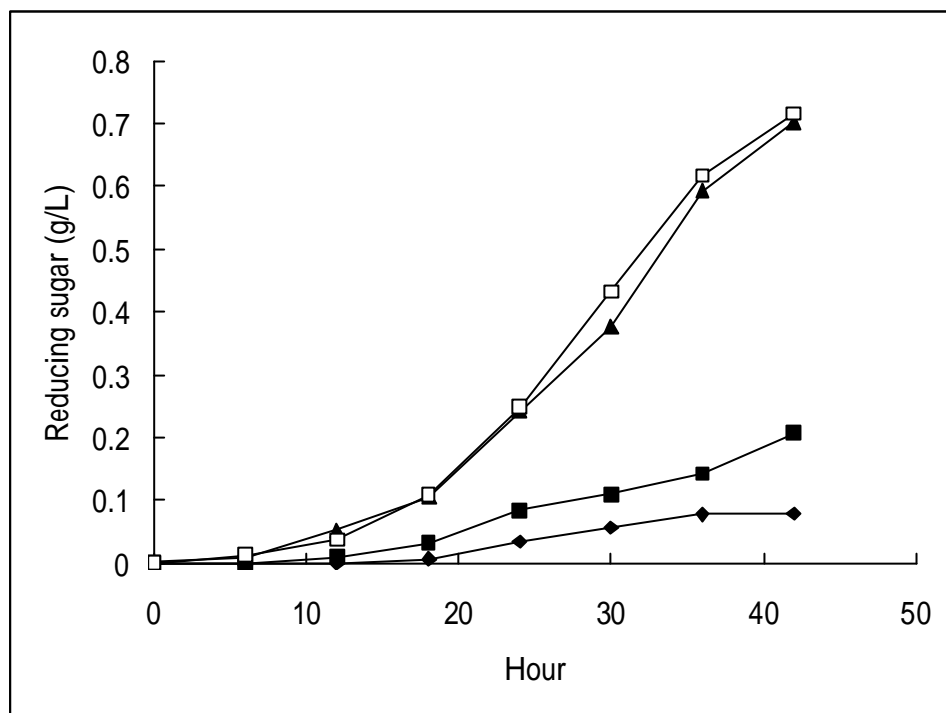


Figure 4.23 Production of reducing sugar (equivalent to glucose) from fermentation of different concentration starch by strain S2302.
 (□ :1g/L ; ■ :2g/L ; ▲ :4g/L ; ◆ :5g/L)

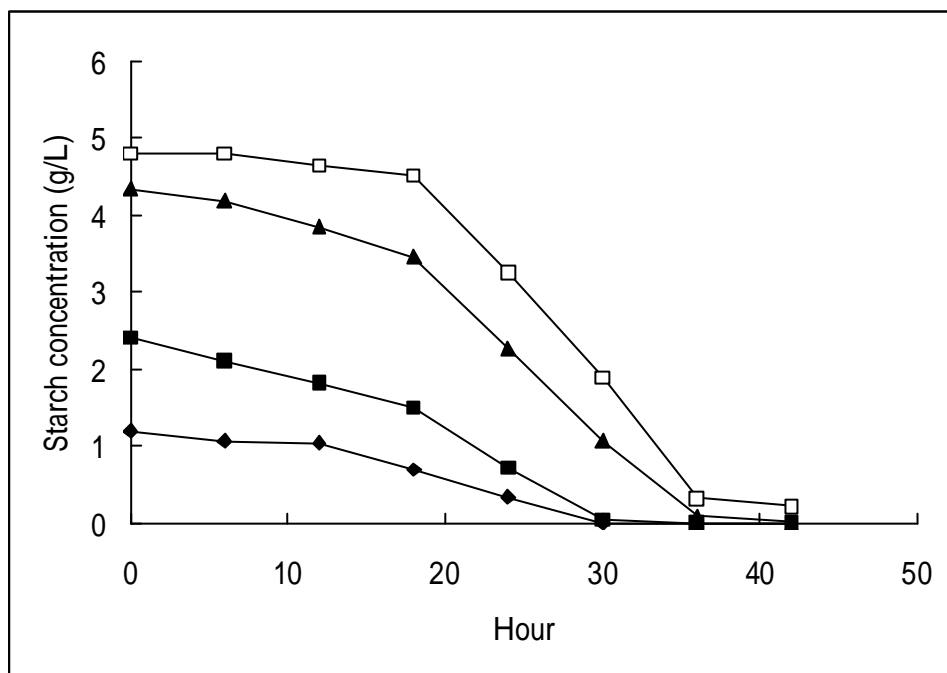


Figure 4.24 Change of starch concentration when strain S2302 was grown with different concentration of soluble starch. (□ :1g/L ; ▲ :2g/L ; ■ :4g/L; ◆ :5g/L)

第五章 結論與建議

本研究由高雄十三坑溫泉取得樣品，分離出菌株 strain S2302，型態為桿菌，菌株的大小約 0.8-1 x 6.0-9.0 μm ，屬於革蘭氏陰性菌，菌株 strain S2302 不具移動性，不會產生孢子，但是菌株為耐熱菌體，可忍受 100°C 高溫沸騰 1 小時後，仍出現生長的狀況。

氫氧化？測試為陰性反應，不會產生氫氧化？，氧氣會抑制 strain S2302 的生長，因此為絕對厭氧菌。strain S2302 生長時需要 yeast extract 為生長因子，提供生長所需的輔因子(growth factor)。

菌株之生長溫度介於 60-80°C(最適生長溫度 70°C)，最佳生長酸鹼度 pH 7.2。strain S2302 於鹽度 0-1% (w/v)時可生長，但到了鹽度 1.5% (w/v)時生長被抑制，可知 strain S2302 生長於高於 1% (w/v)的鹽度中可能會被抑制生長。

在碳源利用方面，strain S2302 可利用的碳源有 mannose、starch、xylose、glucose、maltose、fructose、sorbitol、sucrose、pullulan；不可利用 lactose、glycine、mannitol、neopeptone、carboxymethyl cellulose、raffinose、arabinose、galactose、rhamnose、cellubiose、glycerol、gelatin、sorbitol、esculin、xylan、cellulose、carbon monoxide 為碳源生長。strain S2302 能使用澱粉，因此本研究也從澱粉水解酵素的方向來測試菌株。初步測試 strain S2302 的 crude amylase 酵素比活性為 638.9 U/mg

strain S2302 之生長可被抗生素 Polymyxin B 與 Vancomycin 所抑制，對 Ampicillin 與 Penicillin 具有抵抗力。利用葡萄糖為碳源醱酵會產生少量的 ethanol、acetic acid、butyric acid。可還原硫代硫酸鈉為硫化氫，但不會將硫代硫酸鈉還原為元素硫，這項特性與 *Thermoanaerobacter* 屬相符 (Fardeau *et. al.*, 1994)，加上 16S rDNA 序列比對結果可得知 strain S2302 為 *Thermoanaerobacter* 屬的可能性很高。

經由 16S rDNA 序列比對結果可知，雖然 strain S2302 與 *Caldanaerobacter yonseiensis*、*Caldanaerobacter tengcongensis*、*Caldanaerobacter subterraneus*、*Caldanaerobacter pacifius* 四株菌較為接近，且被歸類為同一個群組，但 strain S2302 產生的 L-alanine 較少量，是否為 *Caldanaerobacter* 屬或者 *Thermoanaerobacter* 屬仍需要進行 DNA 雜交以進一步確認，且實驗並未取得 *Caldanaerobacter* 屬的菌株作為測試 L-alanine 的控制組，所以更無法確定菌株是否為 *Caldanaerobacter* 屬。

以可溶性澱粉產生還原糖的實驗結果顯示，實驗最高的產率為 0.1618 g 還原糖/g 澱粉，轉換率為 99%。大多數的還原糖可能被轉化成生物量，所以產率並不高，若是能在 strain S2302 產生酵素後讓細胞停止生長，或許可以提升還原糖的產量，可讓其他菌種如：產氫菌

來做後續的能源生產。

strain S2302 所產生之澱粉水解? 目前只進行了初步的測試, 未來若可將酵素進行萃取純化, 應可得到較為顯著的結果, 且如果能進一步確定酵素的種類, 就可以增加酵素的應用性。菌株比對方面, 若能再進行 G+C content 與雜交測試, 則可更進一步確定 strain S2302 的菌種。於生質能源方面, 可利用 strain S2302 對澱粉做出初步的分解, 以進行後續的能源生產, 如產氫。

參考文獻

- Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., Guyot, J. P. 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 406-413.
- Aiyer, P. V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1525-1529.
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., Domínguez-Éspinosa, R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trend in Biotechnology*, 22(9):477-458.
- Anneliese, C. and Wulf, C. 1990. Glucose transforming enzymes. In *Microbial enzymes and biotechnology*, 2th ed, chapter 5, pp. 117-226, edited by Fogarty, W. M. and Kelly, C. T. Elsevier applied science, Essex, England.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedure of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 1609-1613.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 151-160.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analtical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brock, T. D. and Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus*, a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1): 289-297.
- Brock, T. D. 2002. The origins of research on thermophiles. In

- Thermophiles biodiversity, ecology, and evolution*, Chapter 1, pp.1-9, edited by Reysenbach, A. L., Voytek, M., Mancinelli, R., Springer Press, Berlin, Germany.
- Brown, S. H., Costantion, H. R., Kelly, R. M. 1990. Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7): 1985-1991.
- Brown, S. H. and Kelly, R. M. 1993. Characterization of amylolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8): 2614-2621.
- Chung, C. Y., Kobayashi, T., Kanai, H., Akiba, T., Kudo, T. 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus Profundus* DT5432. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1502-1506.
- Cord-Ruwisch, R. 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 4(1): 33-36.
- Cotta, M. A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3): 772-776.
- Danson, J. M., Hough, D. W., Russell, R. J. M., Taylor, G. L., Pearl, L. 1996. Enzyme thermostability and thermoactivity. *Protein Engineering*, 9(8):629-630.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A., Zeikus, J. G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3569-3576.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. 1995. Standard methods: for examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Faaij, A. P. C. 2006. Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy*, 34: 322-342.
- Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Maagot, M., Ollivier, B. 1994. Hydrogen oxidation abilities in the presence of thiosulfate as electron acceptor within the genus *Thermoanaerobacter*. *Current Microbiology*, 29: 269-272.
- Fardeau, M. L., Magot, M., Patel, B. K. C., Thomas, P., Garcia, J. L., Ollivier, B., 2000. *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oil field water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2141-2149.
- Fardeau, M. L., Salinas, M. B., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhé, F., Cayol, J. L., Patel, B. K. C., Garcia J. L., Ollivier, B. 2004. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacifium* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 467-474.
- Fiala, G. and Stetter, K. O. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacterial growing

- optimally at 100 °C. *Archives of Microbiology*, 145: 56-61.
- Fogarty, W. M. and Kelly, C. T. 1990. Recent advances in microbial amylases. In *Microbial enzymes and biotechnology*, 2th ed, chapter 3, pp. 71-132, edited by Fogarty, W. M. and Kelly, C. T., Elsevier applied science. Essex, England.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, 89: 17-34.
- Haseltine, C., Rolfsmeier, M., Blum, P. 1996. The glucose effect and regulation of α -amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 178(4): 945-950.
- Huang, C. Y., Patel, B. K., Mah, R. A., Baresi, L. 1998. *Caldicellulosiruptor owensensis* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, xylanolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 91-97.
- Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B., Stetter, K. O. 1986. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Archives of Microbiology*, 144: 324-333.
- Kim, B. C., Grote, R., Lee, D. W., Antranikian, G., Pyun, Y. R. 2001. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 °C. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1539-1548.
- Kumar, N. and Das, D. 2000. Production and purification of α -amylase from hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Bioprocess Engineering*, 23: 205-208.
- Legin, E., Copinet, A., Duchiron, F. 1998. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*.

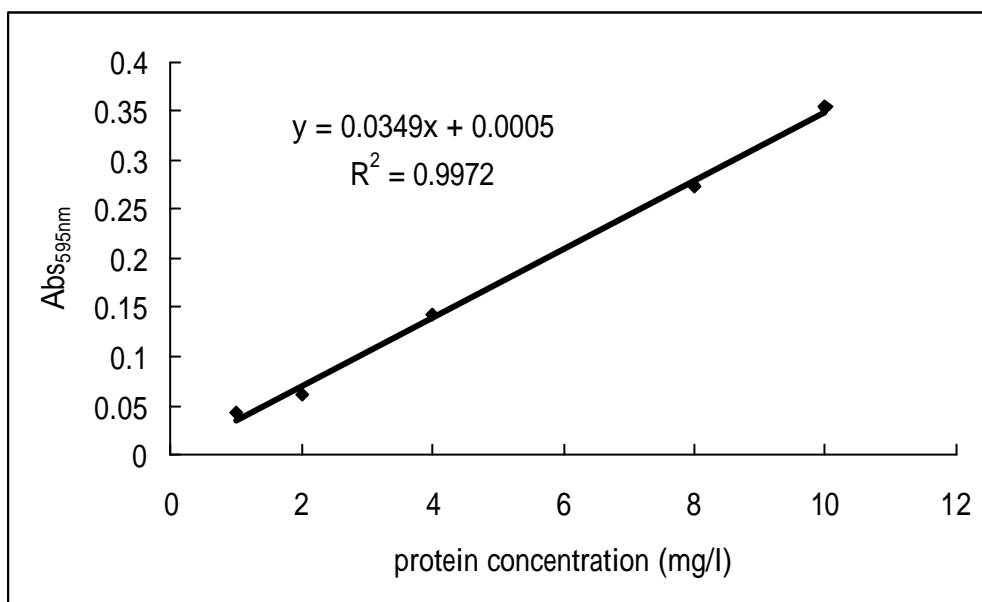
- Biotechnology Letters*, 20(4): 363-367.
- Lim, D. 1998. Nutrition and environmental influence. In: *Microbiology*, 2th ed. Chapter 4, pp.79-104, WCB McGraw-Hill Press, Boston, USA.
- Lin, B. F., Zhu, H. M., Lua, A. C., Lee, M. L. 1995. Rapid quantitative analysis of OPA-derivatized amino acid from physiological fluids by high performance liquid chromatography. *Tzu Chi Medicine*, 7(4): 233-241.
- Manning, G. B. and Campbell, L. L. 1961. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 236(11): 2952-2957.
- Martin, M. L. and Hosenev, R. C. 1991. A mechanism of bread firming II: role of starch hydrolyzing enzymes. *Cereal Chemistry*, 68(5): 503-507.
- Martins, R. F., Davids, W., Al-Soud, W. A., Levander, F., Rådström, P., Hatti-Kaul, R. 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*, 5: 135-144.
- Mathews, C. K., Holde, K. E. V., Ahern, K. G. 2000. Carbohydrate metabolism I: anaerobic processes in generating metabolic energy. In *Biochemistry* 3rd ed., Chapter 13, pp.446-482, Addison Wesley Longman Press, San Francisco, CA, USA.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Mishra, R. S. and Maheshwari, R. 1996. Amylase of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and response to heat. *Journal of Bioscience*, 21(5): 653-672.
- Morion-Guyot, J., Guyot, J. P., Haut, I. J. D., Raimbault, M. 1998. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing

- lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48: 1101-1109.
- Murray, R. G. E., Doetsch, R. N., Robinow, C. F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In *Methods for general and molecular bacteriology*, Chapter 2, pp. 21-41, edited by Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R., ASM Press, Washington, DC, USA.
- Nigam, P. and Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 770-778.
- Pan, Y. C. and Lee, W. C. 2004. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(7): 797-804.
- Roth, M. 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, 43(7): 880-882.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. In Vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Chapter 8. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.
- Smibert, R. M. and Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*, Chapter 25, pp.607-654, edited by Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R., ASM Press, Washington, DC, USA.
- Sokolova, T. G., González, J. M., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Tourova, T. P., Kato, C., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Robb, F. T. 2001. *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, co-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and*

- Evolutionary Microbiology*, 51: 141-149.
- Talaro, K. P. and Talaro, A. 1999. Drugs, microbes, host: The elements of chemotherapy. In *Foundations in microbiology*, Chapter 12, pp.359-390, WCB McGraw-Hill Press, Boston, USA.
- Vieille, C. and Zeikus, G. J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1): 1-43.
- Ward, D. E., Kengen, S. W. M., Oost, J. V. D., Vos, W. M. D. 2000. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production. *Journal of Bacteriology*, 182(9): 2559-2566.
- Welker, N. E. and Campell, L. L. 1967. Comparison of the α -amylase of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 94(4): 1131-1135.
- Wiegel, J. and Ljungdahl, L. G. 1981. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 128: 343-348.
- Wiegel, J. 1991. The obligately anaerobic thermophilic bacteria. In *Thermophilic bacteria*, Chapter 6, pp. 105-169, edited by Kristjansson, J. K., CRC Press, Florida, USA.
- Xue, Y., Xu, Y., Liu, Y., Ma, Y., Zhou, P. 2001. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1335-1341.
- 王鈺鎔。2005。漫談生質能。綠基會通訊 7月 第1期, 12-16頁。
- 李文龍。2003。澱粉葡萄糖化酵素固定在幾丁聚醣之研究。國立雲林

- 科技大學工業化學與災害防治研究所碩士論文。
- 吳季芳。2006。以澱粉為碳源基質進行生物產氫。國立成功大學化學工程系碩士論文。
- 陳文賢。2004。水活性控制與食品儲存。科學發展 379 期, 18-23 頁。
- 楊慶成。2001。相約過生活-品味現代科學文明。科學知識 54 期, 52-62 頁。
- 廖經裕。2004。以分子生物方法與培養方式分析台灣兩處溫泉之嗜熱菌族群。東海大學環境科學系研究所碩士論文。
- 鄧德豐。1988。應用微生物學。226-331 頁。

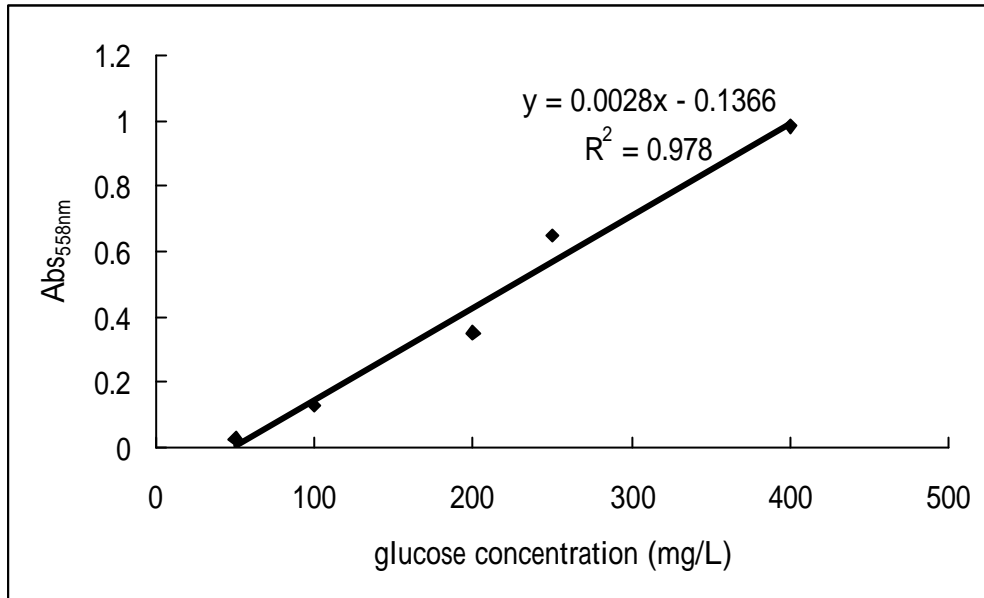
附錄 1 蛋白質測試檢量線



Method detection Limit (MDL): 0.3 mg/L

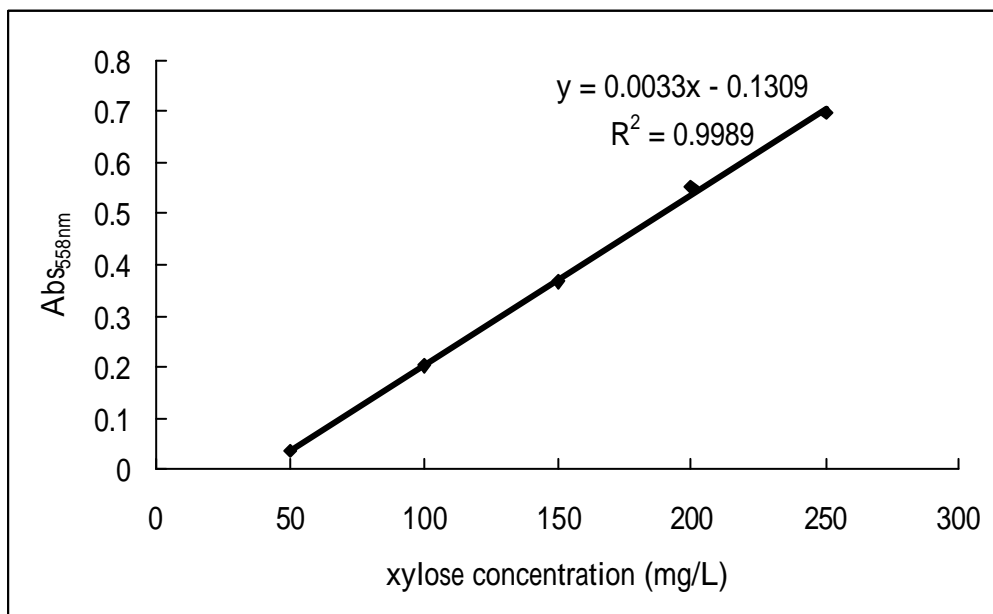
附錄 2 還原糖含量測試檢量線

A. 還原糖含量測試檢量線以葡萄糖為標準品



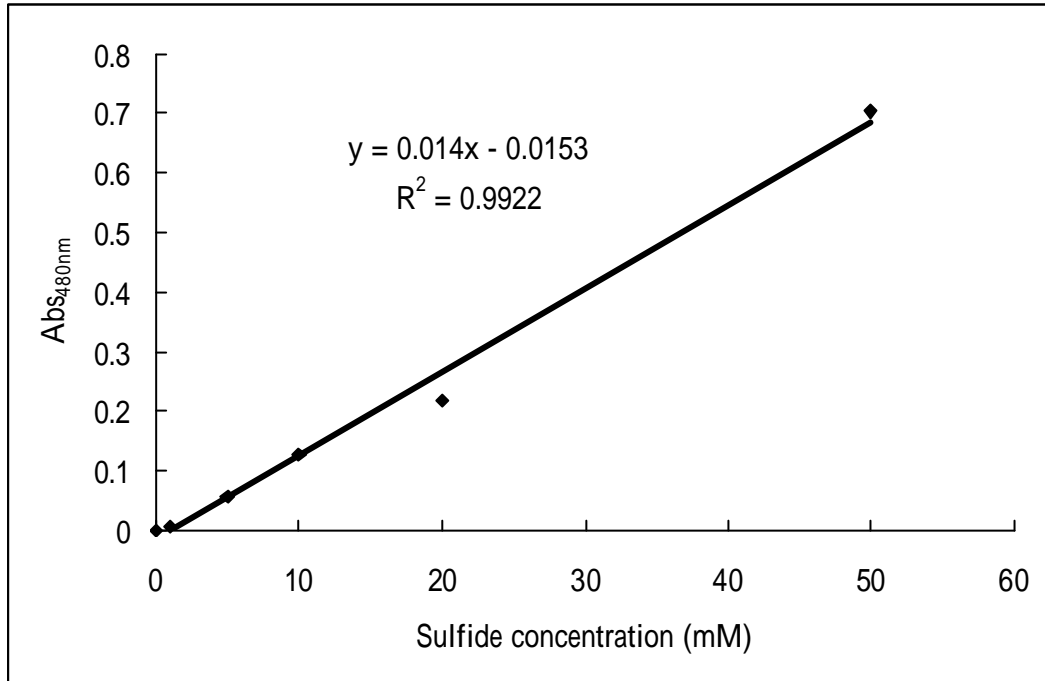
Method detection Limit (MDL): 4.86mg/L

B. 還原糖含量測試檢量線以木糖為標準品



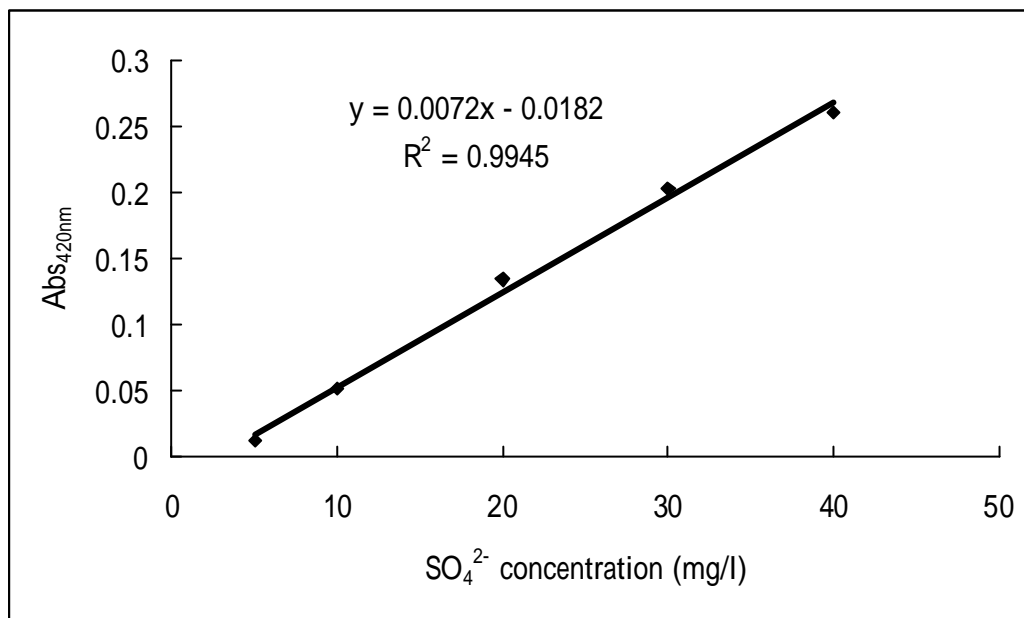
Method detection Limit (MDL): 4.87 mg/L

附錄 3 硫化氫測試檢量線



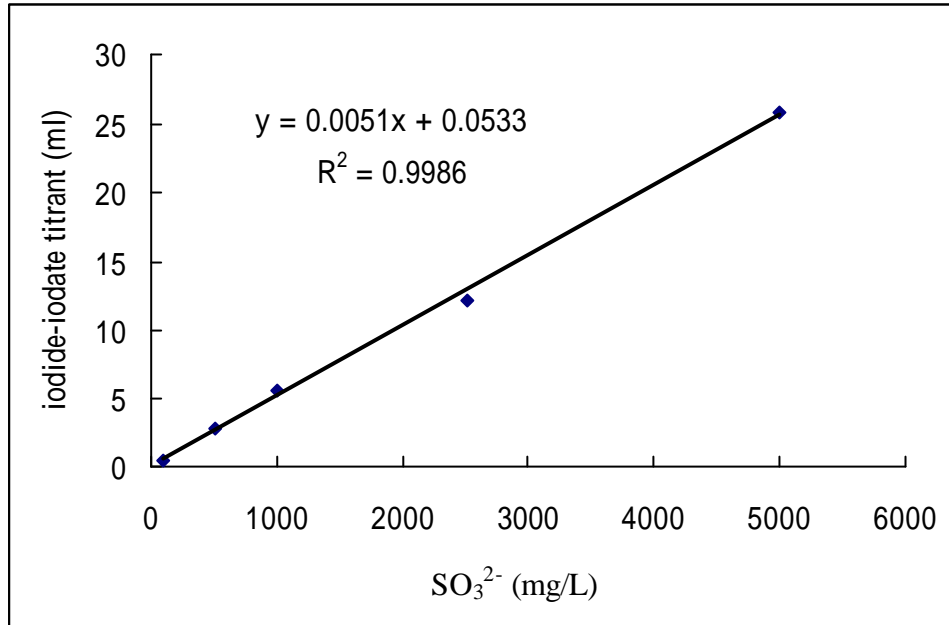
Method detection Limit (MDL): 0.32 mM

附錄 4 硫酸鹽檢量線



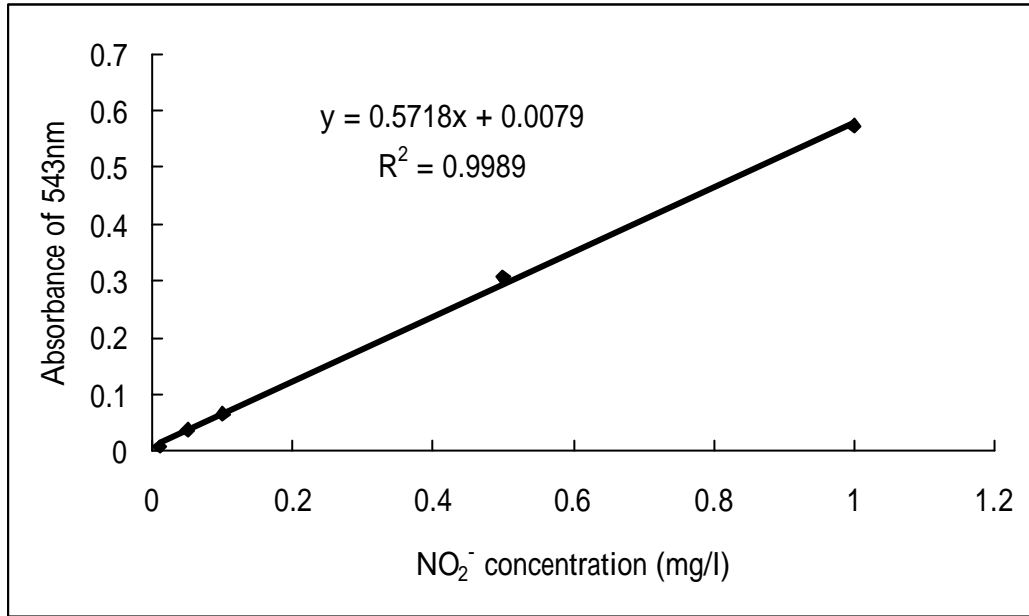
Method detection Limit (MDL): 3.13 mg/L

附錄 5 亞硫酸鹽檢量線



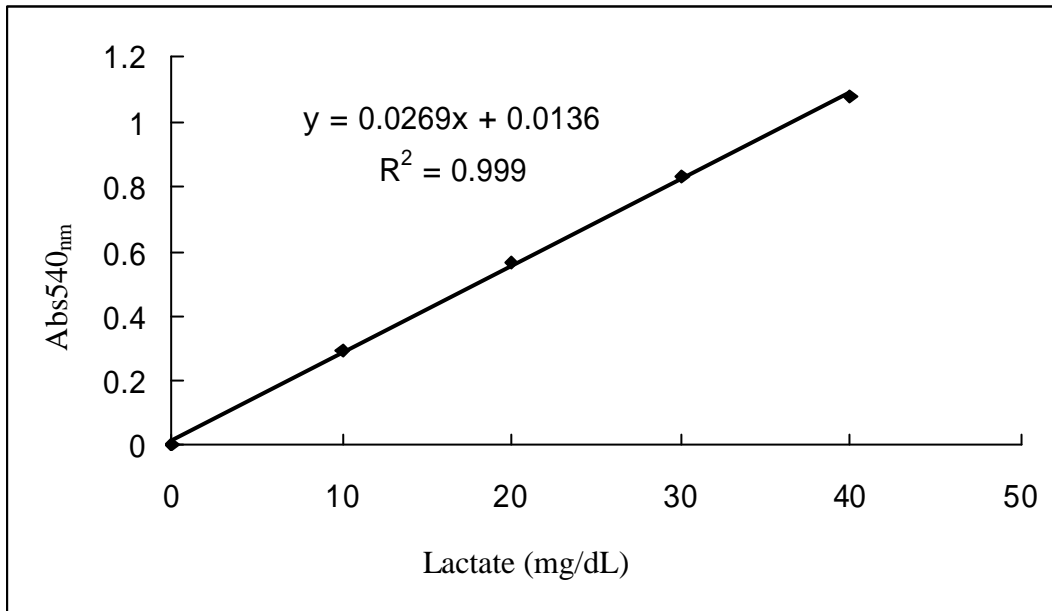
Method detection Limit (MDL): 86.59mg/L

附錄 6 亞硝酸鹽檢量線



Method detection Limit (MDL): 0.01 mg/L

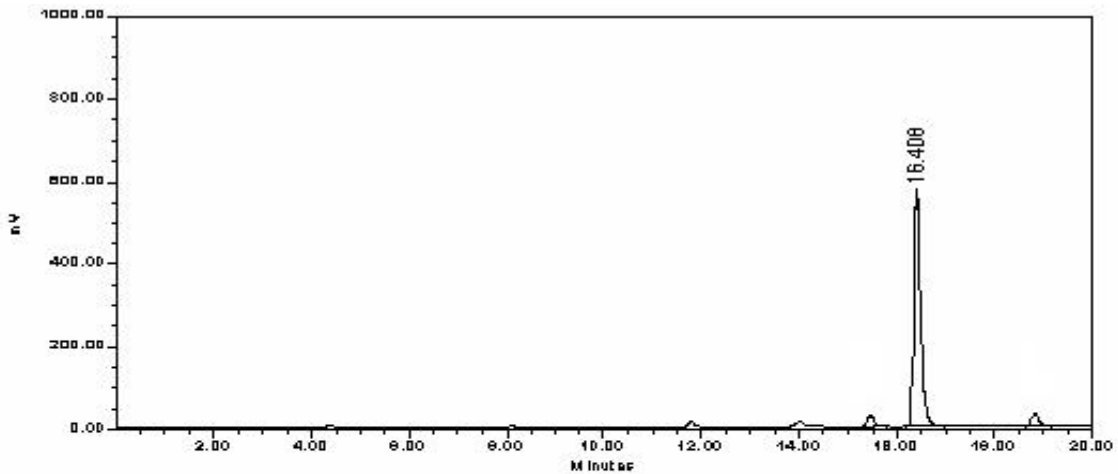
附錄 7 乳酸檢量線



Method detection Limit (MDL): 0.82 mg/dL

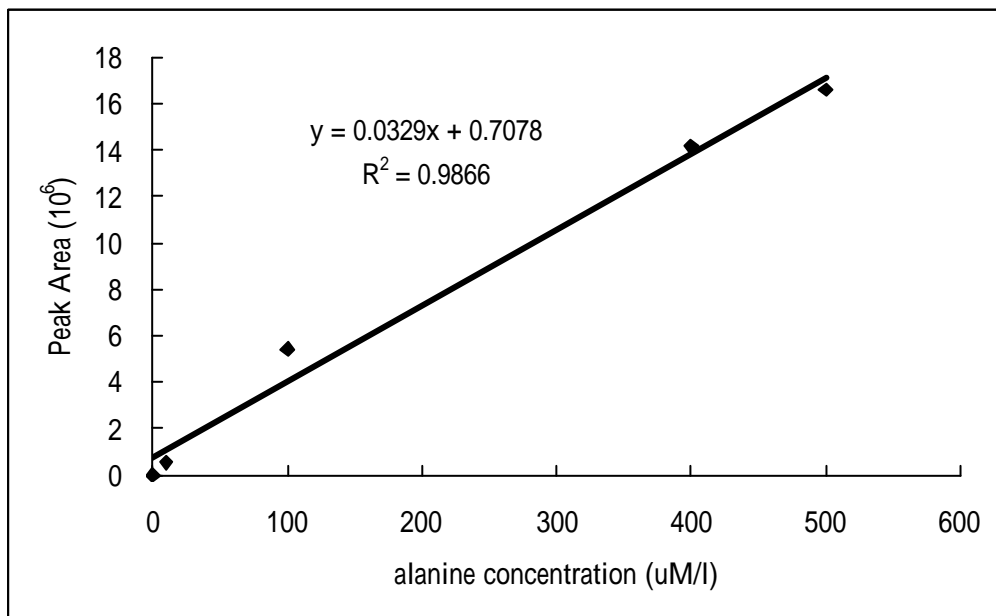
附錄 8 alanine 測試檢量線與標準品停留時間

A. 100 μ M alanine



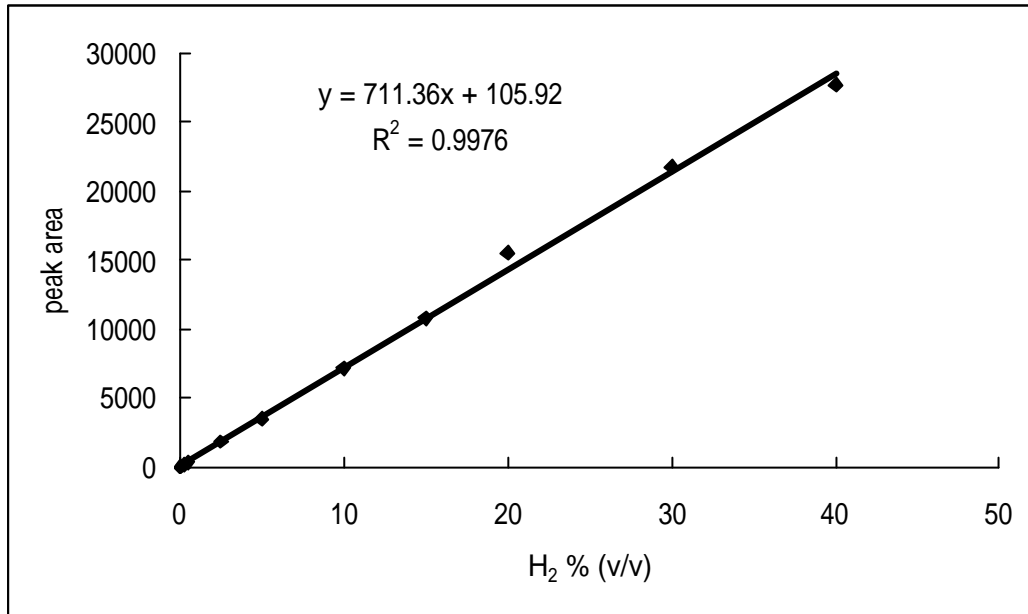
Retention time = 16.406 \pm 0.014min

B. alanine 測試檢量線



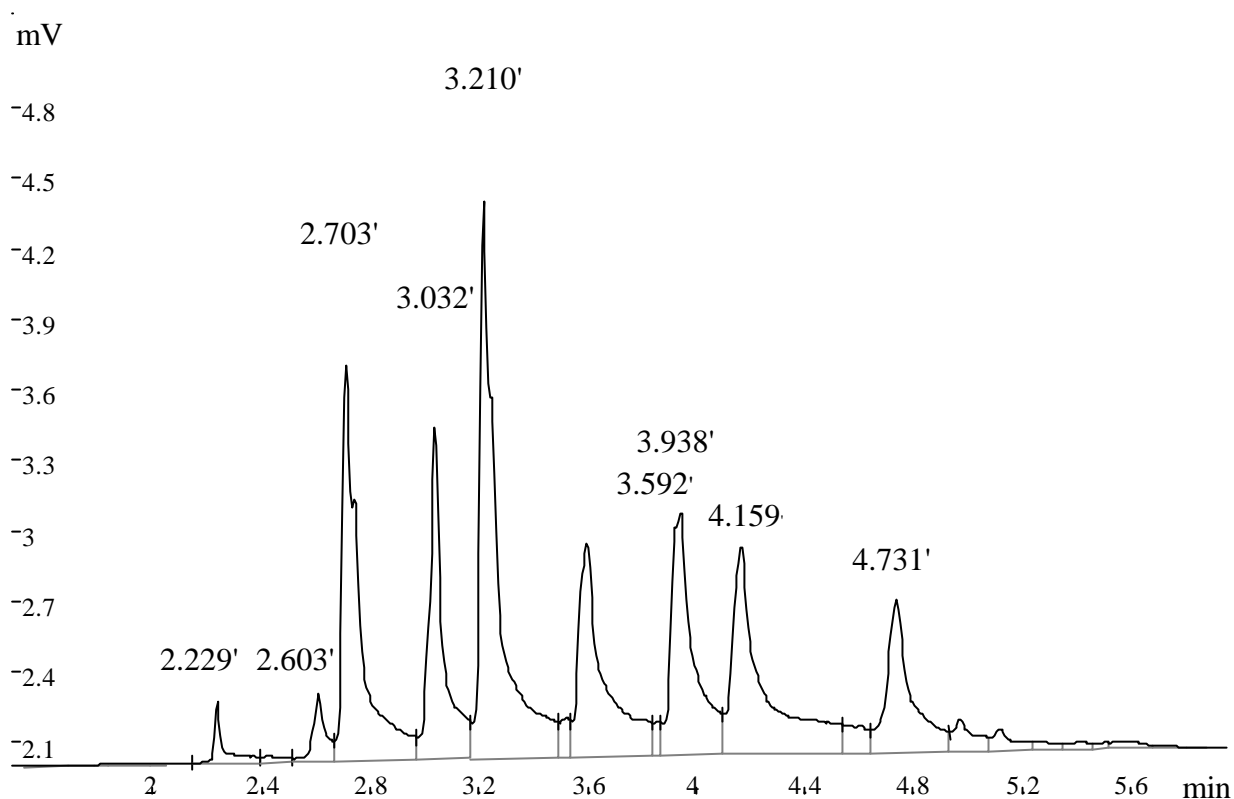
Method detection Limit (MDL): 0.25 mg/L

附錄 9 氫氣檢量線



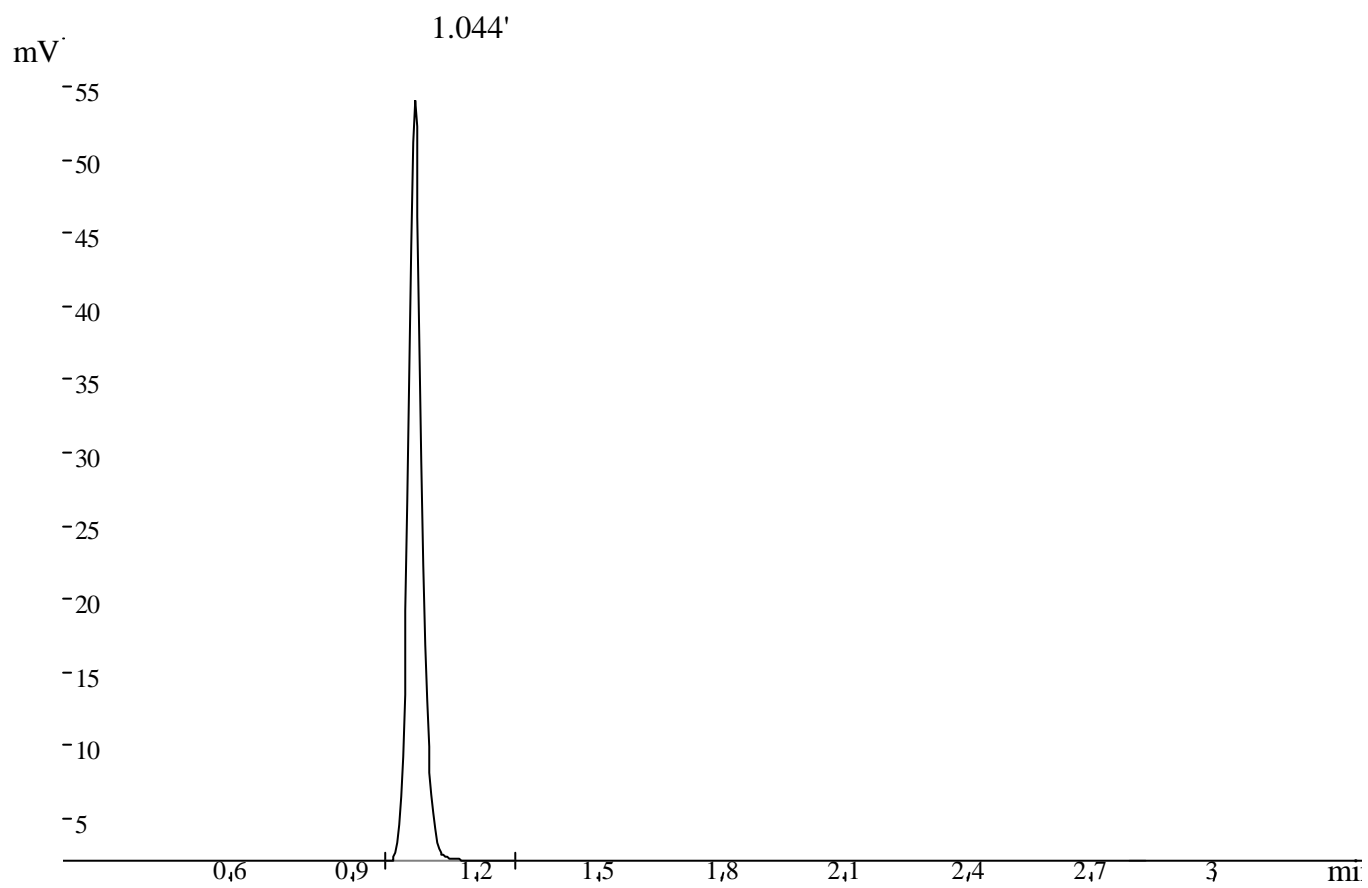
Method detection Limit (MDL): 0.03 % (v/v)

附錄 10-1 GC-FID chromatogram of volatile acid standard mixture



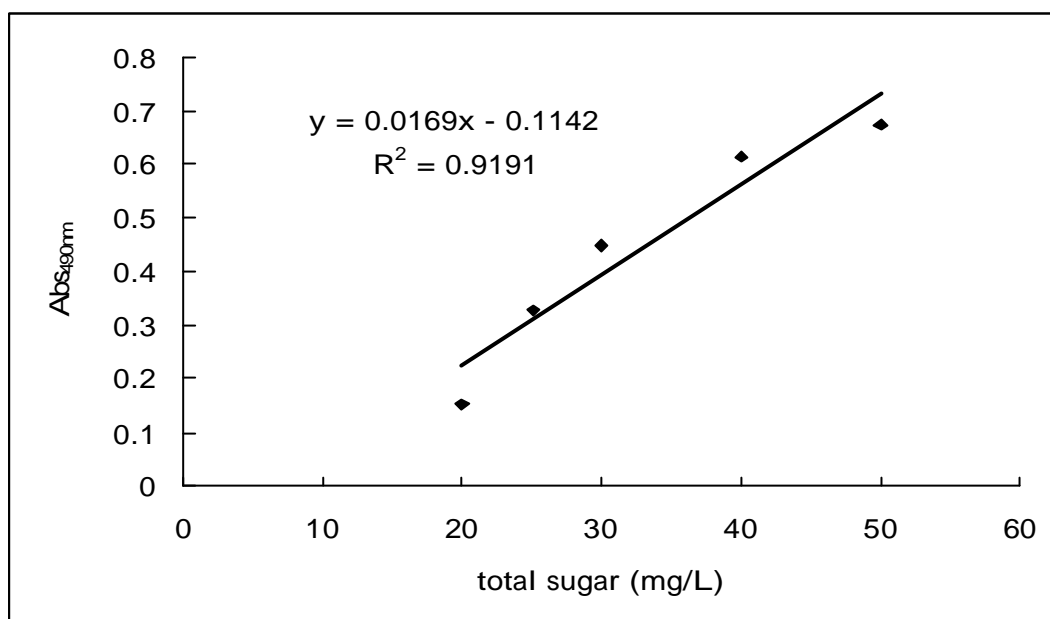
Retention time:acetate 2.229min; Propionic acid 2.603min; Isobutyric acid 2.703min; Butyric acid 3.032min; Isovaleric acid 3.210min; n-Valeric acid 3.592min; Isocaproic acid 3.938min; n-Caproic acid 4.159min; Heptanic acid 4.731min.

附錄 10-2 GC-FID chromatogram of ethanol



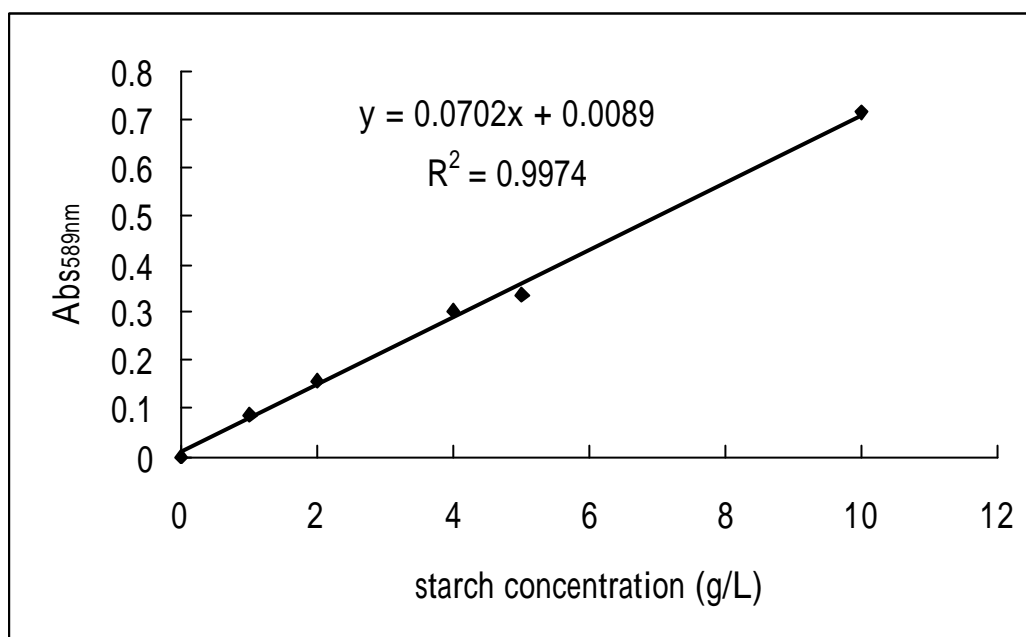
Retention time: ethanol 1.044min \pm 0.021min

附錄 11 總糖檢量線



Method detection Limit (MDL): 1.84 mg/L

附錄 12 澱粉檢量線



Method detection Limit (MDL): 0.66 mg/L

附錄 13 Strain S2302 16S rDNA 定序結果

GGACGGTCGTGATTGTATACGACTCACTATAGGGCGAGCTCGGTACCCGGG
CGAATTCCAAGCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCG
TGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGCCTGTCAAGGCGTTATGTTTTGGCA
GGTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTACCCTTGAGAC
AGGGATAACCCTGGGAAACCGGGGCTAATACCTGATATACTCTATTAGGGCA
TCCTGATGGAGGAAAGGGCGGGAAGCCGCTCAAGGATGGGCTCGCGTCCC
ATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGGTCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGAACG
GAGGCGACGCCGCGTGGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCGAT
AGTGTGGGAAGAAGGGATGACGGTACCACACGAAAGCCCCGACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAGTTACTGGG
CGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTAGCAAGTCAGGTGTAAAAGGCCACGGC
TCAACCGTGGATATGCATCTGAAACTGCTAGGCTAGAGGGCAGGAGAGGG
GAGTGGAAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAATAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCCCTGGACTGGCCCTGACGCTGAGGCGCGAGAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGAT
GGGTGCTAGGTGTGGGGAGCGGAAGCTTTCGGTGCCGTAGGAAACCCAAT
AAGCACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCAGGTAGTAGCGAGCCGAAAGGTGA
GCGACCCTCTCTTATGGGAGGGAGCCTGCACAGGTGGTGCATGTTGTCGTC
AGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT
GCCTCTAGTTGCCAGCGGGTGTATGCCGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGTCG
ATAAGACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTATATGCC
CTGGGCCACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGAAGCGAAGGAGT
GATCTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGC
AACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA
GTCTGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCGAAGAGGGAGGGAGCCG
TCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAC
GGGAACGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAGATCTGGATCCCCTCTAGAGTCG
ACCTGCAGGCATGCAAGCTGCGTACTC