

國立臺灣大學工學院化學工程研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemical Engineering
College of Engineering
National Taiwan University

Master Thesis

生物顆粒之穩定性

Structural stability of biological granule



陳坤柔

Kun-Jou Chen

指導教授：李篤中 博士

Advisor: Duu-Jong Lee, Ph.D.

中華民國九十七年七月

July, 2008

致謝

感謝恩師 李篤中教授這數年教導，老師勤勉不懈的態度和學術上求真的風範是我碩士生涯最大的啟發。

感謝生我育我的父母，這數年間的鼓勵與容忍是我支持下去的動力。大哥和二哥於我在外求學的時候侍奉父母，替我扛起到這段時日無法肩負的責任。

最後感謝所有實驗室的成員，在最後的半年互相砥礪，在學術上邁出小小的步伐。



中文摘要

生物顆粒(granule)是經由細胞自身與細胞外間質(extracellular polymeric substances, EPS)聚集而成近似圓球的生物聚集體。EPS可作細胞之間的架橋，具有強化生顆粒結構的功能，而EPS組成多為蛋白質、多醣類及脂質。研究指出，正二價及正三價金屬陽離子能加速顆粒形成，例如Ca²⁺。

本論文採用3種生物顆粒(granule)作為測試樣品，分別為好氧酚顆粒、厭氧產氫顆粒及厭氧產甲烷顆粒。顆粒中加入螯合劑EDTA、 α - amylase、 β - amylase、proteinase K、lipase、cellulase，藉由螢光探針雜交顆粒中的多醣體、脂質、蛋白質，結合雷射共軛焦顯微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope)掃描，探討金屬陽離子、蛋白質、脂質、多醣體及纖維素對顆粒結構穩定性影響。

結果顯示金屬陽離子、多醣體、脂質及蛋白質對酚好氧顆粒、厭氧產氫顆粒及厭氧產甲烷顆粒結構強度不造成影響，纖維素對酚好氧顆粒及厭氧產甲烷顆粒結構強度不造成影響，但是纖維素是厭氧產氫顆粒網狀結構的支幹物質。

關鍵字: 顆粒、穩定性

Abstract

Granules can be described as a collection of self-immobilized cells and extracellular polymeric substances (EPS) into a somewhat spherical form. EPS can mediate both cohesion and adhesion of cells and play a crucial role in maintaining the structural integrity in a community of immobilized cell and the composition of EPS include proteins, polysaccharides and lipid. In recent research, the presence of divalent and trivalent cations ions, such as Ca^{2+} etc, helps cells to form microbial nuclei that promote further granulation.

The investigation into structural stability of three biochemical granules (one aerobic granules and two anaerobic granules) were examined. Selective enzymes of proteins, lipids, proteinase K, α -amylase, β -amylase, cellulase and EDTA were added to those three granules to influence structural stability. The roles of proteins, α - and β -polysaccharides, and lipids were studied via their selective hydrolysis using enzymes and structural changes of granule were probed using in situ fluorescent staining and confocal laser scanning microscopy.

The results show selective enzymes of proteins, lipids, proteinase K, α -amylase, β -amylase and EDTA are not backbone of those three granules. Also, cellulose are not backbone of methane production by anaerobic granules and Degradation of Phenol by Aerobic Granules. However, cellulose form the backbone of a network-like outer layer with embedded proteins, lipids, α -polysaccharides, and cells to support the mechanical stability of structural integrity of hydrogen production by anaerobic granules.

Key words: granules, stability

目錄

頁次

中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
圖目錄	V
表目錄	VII

第一章 前言	1
--------------	---

第二章 文獻回顧	2
----------------	---

2-1 膠羽和顆粒	2
2-2 生物顆粒的特性與形成	2
2-3 細胞外間質和生物顆粒的關係	3
2-4 細胞外間質的萃取與分佈	3
2-5 好氧顆粒之穩定性	4

第三章 樣品與實驗	6
-----------------	---

3-1 污泥來源	6
3-2 顆粒來源	6
3-3 顆粒結構強度測試	8
3-3-1 實驗藥品	8
3-3-2 生物顆粒降解測試	9
3-4 螢光染色方法	10

3-4-1	實驗染劑.....	10
3-4-2	染色方法.....	10
第四章 結果與討論.....		12
4-1	顆粒結構穩定性檢驗.....	12
4-2	超音波震盪.....	13
4-3	EDTA 螯合顆粒鈣離子.....	14
4-4	粒徑分布實驗.....	15
4-5	五重染色: 酚好氧顆粒.....	18
4-6	五重染色: 厭氧產氫顆粒.....	31
4-7	五重染色: 厭氧產甲烷顆粒.....	44
第五章 結論.....		57
參考文獻.....		58
附錄(一) 酵素特性.....		62



圖目錄

圖 2-1	好氧顆粒加 β -amylase 之共軛焦顯微鏡圖和螢光強度分析圖.....	4
圖 4-1	EDTA 螯合顆粒鈣離子.....	14
圖 4-2	酚好氧顆粒加 cellulase 粒徑分佈.....	15
圖 4-3	厭氧產氫顆粒加 cellulase 粒徑分佈.....	16
圖 4-4	厭氧產甲烷顆粒加 cellulase 粒徑分佈.....	17
圖 4-5	酚好氧顆粒對照組.....	19
圖 4-6	酚好氧顆粒對照組螢光強度分析.....	20
圖 4-7	酚好氧顆粒加 proteinase K.....	21
圖 4-8	酚好氧顆粒加 proteinase K 螢光強度分析.....	22
圖 4-9	酚好氧顆粒加 α - amylase.....	23
圖 4-10	酚好氧顆粒加 α - amylase 螢光強度分析.....	24
圖 4-11	酚好氧顆粒加 β - amylase.....	25
圖 4-12	酚好氧顆粒加 β - amylase 螢光強度分析.....	26
圖 4-13	酚好氧顆粒加 lipase.....	27
圖 4-14	酚好氧顆粒加 lipase 螢光強度分析.....	28
圖 4-15	酚好氧顆粒加 cellulase.....	29
圖 4-16	酚好氧顆粒加 cellulase 螢光強度分析.....	30
圖 4-17	厭氧產氫顆粒對照組.....	32
圖 4-18	厭氧產氫顆粒對照組螢光強度分析.....	33
圖 4-19	厭氧產氫顆粒加 proteinase K.....	34
圖 4-20	厭氧產氫顆粒加 proteinase K 螢光強度分析.....	35
圖 4-21	厭氧產氫顆粒加 α - amylase.....	36
圖 4-22	厭氧產氫顆粒加 α - amylase 螢光強度分析.....	37
圖 4-23	厭氧產氫顆粒加 β - amylase.....	38
圖 4-24	厭氧產氫顆粒加 β - amylase 螢光強度分析.....	39

圖 4-25	厭氧產氫顆粒加 lipase.....	40
圖 4-26	厭氧產氫顆粒加 lipase 螢光強度分析.....	41
圖 4-27	厭氧產氫顆粒加 cellulase.....	42
圖 4-28	厭氧產氫顆粒加 cellulase 螢光強度分析.....	43
圖 4-29	厭氧產甲烷顆粒對照組.....	45
圖 4-30	厭氧產甲烷顆粒對照組螢光強度分析.....	46
圖 4-31	厭氧產甲烷顆粒加 proteinase K.....	47
圖 4-32	厭氧產甲烷顆粒加 proteinase K 螢光強度分析.....	48
圖 4-33	厭氧產甲烷顆粒加 α - amylase.....	49
圖 4-34	厭氧產甲烷顆粒加 α - amylase 螢光強度分析.....	50
圖 4-35	厭氧產甲烷顆粒加 β - amylase.....	51
圖 4-36	厭氧產甲烷顆粒加 β - amylase 螢光強度分析.....	52
圖 4-37	厭氧產甲烷顆粒加 lipase.....	53
圖 4-38	厭氧產甲烷顆粒加 lipase 螢光強度分析.....	54
圖 4-39	厭氧產甲烷顆粒加 cellulase.....	55
圖 4-40	厭氧產甲烷顆粒加 cellulase 螢光強度分析.....	56

表目錄

表 3-1 酚顆粒培養基成份.....	6
表 3-2 厭氧產氫顆粒 Micronutrients 成份.....	6
表 3-3 厭氧產氫顆粒培養基成份.....	7
表 3-4 厭氧產氫顆粒 Micronutrients 成份.....	7
表 3-5 厭氧產甲烷顆粒培養基成份.....	7
表 3-6 厭氧產甲烷顆粒在 UASB 中操作條件.....	8
表 4-1 顆粒和 EDTA、五種酵素反應.....	12
表 4-2 顆粒經超音波震盪結果.....	13



第一章 前言

細胞外間質 (extracellular polymeric substances, EPS)是微生物所產生之高分子量黏性分泌物，存在於活性污泥膠羽 (floc)、生物膜 (biofilm)、厭氧與好氧顆粒 (anaerobic and aerobic granule) 等生物聚集體，可促進細胞與細胞的聚集及交互作用，並藉由聚合架構 (polymeric matrix) 的形成，進一步加強微生物聚集體的結構。生物顆粒是經由細胞自身與細胞外間質聚集而成近似圓球的生物聚集體，相較於活性污泥膠羽 (floc) 而言，生物顆粒具有較快的沉降速度及較高的生物含量，且能有效處理營養物質 (nutrient) 及高有機含量的廢水，在廢水處理方面之應用極具發展的潛力。研究指出，顆粒內部大多為蛋白質、多醣體、脂質，同時顆粒形成跟 Ca^{2+} 等金屬離子有關 (Jiang et al. 2003)。但上述幾種物質在顆粒結構中將扮演何種重要角色，仍有待進一步研究來證實。

螢光染色法的”非侵入”式研究特性，可用來觀測生物聚集體內部胞外聚合物的分佈，因此近年來已有研究利用多重螢光染色法結合雷射共軛焦顯微鏡 (Confocal Laser Microscope) 觀察生物顆粒內部細胞外間質的分佈情形。本論文中應用多重染色法觀察生物顆粒、高倍顯微鏡測量粒徑分佈，試圖了解生物顆粒內部結構和蛋白質、多醣體、脂質及金屬離子間的相關性。

第二章 文獻回顧

2-1 膠羽和顆粒

活性污泥通常以膠羽的形式存在，加入人工培養基培養之後能夠形成生物顆粒。Dofing (1987) 從視覺形態特徵定義膠羽和顆粒，膠羽是不規則形狀且鬆散結構的細胞聚集體，沉降之後形成巨觀勻相層；顆粒是球形且緊密結構的細胞聚集體，沉降之後不會結合仍是單獨個體。Bellouti 等人 (1997) 從 fractional dimension 量化膠羽和顆粒之間的不同，以 equivalent diameter 對 fractional dimension 作圖，得到膠羽不管任何 equivalent diameter，在圖上的分布都是任意隨機 (random)，而顆粒 equivalent diameter 在 $700\mu\text{m}$ 以下呈線性， $700\mu\text{m}$ 呈一定值。

2-2 生物顆粒的特性與形成

生物顆粒可以被區分為兩類：好氧顆粒及厭氧顆粒。生物顆粒本身含有大量不同的微生物，可通過不同的路徑降解污染物，相較於活性污泥，生物顆粒具有高沉降性、結構穩定等優點。一個發展良好的生物顆粒反應器可從顆粒符合 Stokes law 沉降速度檢驗之，在 20m/h 沉降速度下有相對應的最小顆粒直徑 (Schmidt and Ahring 1996)。

好氧顆粒能由多種基質培養出來，例如葡萄糖、醋酸、乙醇、酚、及人工廢水等 (Morgenroth et al. 1997; Beun et al. 1999; Peng et al. 1999; Tay et al. 2001a; Moy et al. 2002; Jiang et al. 2002;)，近年來已有許多文獻進行 SBRs (sequencing batch reactors) 之好氧顆粒的研究 (Morgenroth et al. 1997)，SBRs 沉降時間短且能有效洗出不易沉降的生物質量 (biomass)，有助於沉降性高的好氧顆粒生成。

好氧顆粒生成的因素至今還未十分明白，一般認為高水力剪切力 (hydraulic shear force)、低水力滯留時間 (hydraulic retention time)、短沉降時

間 (settling time) 有助於好氧顆粒生成(Shin HS et al., 1997; Tay et al., 2002b; Qin et al. 2004)。

細胞外間質是種高水合的高分子膠質(hydratedgel)聚合物，包含了不同成分的蛋白質 (protein)、多醣 (polysaccharide)、核酸 (nucleic acid)、腐質酸 (humic acid)、脂質 (lipids) 及醣蛋白 (Eriksson and Alm, 1991; Matthew and John TN, 1997)，在生物膜、膠羽、顆粒系統扮演架橋的角色(Characklis and Marshall 1990)。有研究人員指出細胞外間質和顆粒結構穩定性和顆粒形成有相當大的關聯性 (Tay et al., 2001c)，且 細胞外間質的形成正比與高水力剪切力(Ohashi et al. 1994)、高曝氣量 (Tay et al. 2001)、疏水性程度 (Lili et al. 2007)、適量Ca²⁺等有關 (Jiang et al. 2003)。El-Mamouni等人 (1998) 在厭氧顆粒中加入類似細胞外間質結構的聚合物，發現顆粒的生成速度可達未加控制組的2.5倍。

影響細胞外間質產生及組成的因素可略分為兩大類: (1)環境的改變造成生物群落的變換，進而產生大量細胞外間質以適應新的環境。(2)因環境變化，原本的微生物需重新調節細胞外間質的代謝路徑 (Liu et al. 2004)

2-3 細胞外間質和生物顆粒的關係

在形成生物顆粒的過程中，細胞外間質將相鄰細胞及粒狀物質連結在一起以形成穩定的聚集體。Liu和Fang (2002) 發現細胞外間質可提供鍵結的位置 (electrostatic binding sites) 約為細菌或細胞的20至30倍。由此可知，細胞外間質會形成一個交錯的網狀結構可吸引有機或無機物，進而可強化生物顆粒結構的強度。此外，細胞外間質的降解能提供生物顆粒內部微生物在飢餓狀態時的營養。Wang等人 (2005) 發現生物顆粒處於20天饑餓狀態後，顆粒中心的細胞外間質會大量被降解。

2-4 細胞外間質的萃取與分佈

顆粒經螢光染色或原位雜交 (in situ hybridization) 可透過共軛焦顯微鏡

(confocal laser-scanning microscopy, CLSM) 觀察其內部結構、成份及菌種分佈 (McSwain et al., 2005; Chen et al., 2006; Tay et al., 2002d, 2003a; Toh et al., 2003)。

細胞外間質有不同萃取方法 (Urbain et al., 1993; Frolund et al., 1996)，Tay 等人 (2005) 發現好氧顆粒細胞外間質中 polysaccharide/protein 比率 (PS/PN ratio) 約是 15，但是 McSwain (2005) 的研究則完全相反，PN/PS 約是 6~11，研究指出生物顆粒因萃取細胞外間質方法的不同將導致出不一樣的結果。換句話說，萃取細胞外間質標準方法並不存在。

2-5 好氧顆粒結構之穩定性

Sunil 等人 (2008) 使用 α -amylase、 β -amylase、proteinase K 及 lipase 來水解好氧顆粒，在 150rpm 反應 1 小時後發現 β -amylase 成功使好氧顆粒崩解，其共軛焦顯微鏡和強度分析結果如圖 2-1 所示。研究結果顯示 β -polysaccharide (F 藍色圖譜) 在 β -amylase 作用後總量減少，顆粒整體呈破碎狀態，Sunil et al., (2008) 因而結論 β -polysaccharide 在好氧顆粒網狀結構中扮演重要架橋角色。

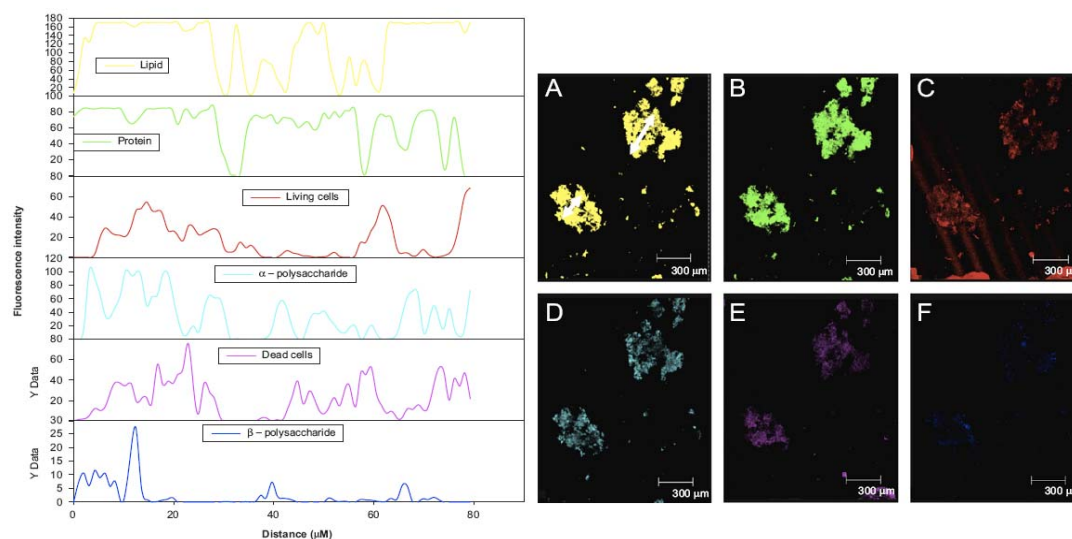


圖 2-1 好氧顆粒加 β -amylase 之共軛焦顯微鏡圖和螢光強度分析圖 (Sunil et al., 2008)

(A)lipid (B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E)dead cells (F) β -polysaccharide

本研究基於上述實驗，改測試厭氧顆粒，並加入好氧顆粒實驗以對照；除 α -amylase、 β -amylase、proteinase K及lipase外，多加EDTA、cellulase測試顆粒結構穩定。



第三章 實驗材料與方法

3-1 污泥來源

本實驗之污泥來源採自桃園縣內壢工業統一麵包廠之污水處理場的活性污泥迴流口。此污水處理廠日處理量為250噸，進料來源為製程及洗滌廢水，污泥產生量為一天五噸，污泥外觀呈深黃色。此處理廠操作穩定，除受特殊天候狀況影響外，其產生之污泥特性穩定。取得之污泥置於冰箱 (4°C) 中保存。

3-2 顆粒來源

本實驗採用之生物顆粒樣品共有三種，分別為

(1) 好氧酚顆粒 (Sunil et al., 2007): 使用長柱型管柱馴養顆粒，加入3-1節所述污泥1升，並以酚作為細菌唯一的碳源 (400mg/L)，其它培養基如表3-1及表3-2所示

表3-1 酚顆粒培養基成分

Composition (1L water)	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgCl ₂	NaCl	FeCl ₃	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	Micronutrients
加藥量	1 g	0.1 g	0.1 g	0.02 g	0.01 g	1.35 g	1.65 g	1 ml

表3-2 酚顆粒培養基Micronutrients成分

Composition (1L water)	H ₃ BO ₃	ZnCl ₂	CuCl ₂	MnSO ₄ · H ₂ O (NH ₄) ₆	Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	AlCl ₃	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	NiCl
加藥量(g)	50	50	30	50	50	50	50	50

(2) 厭氧產氫顆粒 (Zhen et al., 2006): 使用長柱型管柱馴養顆粒，加上3-1節所述污泥1升，以葡萄糖 (10g/L) 為碳源，培養基如表3-3及3-4所示

表3-3 厭氧產氫顆粒培養基成分

Composition (1L water)	NH ₄ Cl	peptone	KH ₂ PO ₄	FeCl ₃ · 6H ₂ O	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Micronutrients
加藥量	0.2 g	0.2 g	0.2 g	0.03 g	0.02 g	1 ml

表3-4 厭氧產氫顆粒Micronutrients成分

Composition (1L water)	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	CaCl ₂ · 2H ₂ O	Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	NiSO ₄ · 6H ₂ O
加藥量(g)	10	5	6	5	5	5

(3) 厭氧產甲烷顆粒 (Bing et al., 2008): 使用4個2.5升上流式厭氧污泥床反應器 (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB)，加入3-1節所述污泥，以乙酸 (acetate) 為碳源在35°C下馴養，培養基如表3-5所示。有機負荷 (organic loading rate, OLR)、化學需氧量 (COD) 及水力滯留時間 (hydraulic retention time, HRT) 操作條件如表3-6所示操作4個月。

表3-5 厭氧產甲烷顆粒培養基成分

Major components	Concentration (mg/L)	Trace	Concentration (mg/L)
COD	20000	ZnCl ₂	0.5
Acetate	20000	CuCl ₂	0.5

CaCl ₂	200	NiCl ₂ · 6H ₂ O	1.0
MgCl ₄ · 6H ₂ O	200	MnSO ₄ · H ₂ O	1.0
FeCl ₂ · 4H ₂ O	50	H ₃ BO ₃	0.5
NH ₄ Cl	1000	(NH ₄) ₆ Mo ₇ · 4H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	500	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.5
Na ₂ S	250	AlCl ₃	0.5
L-cysteine	250	Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	0.5
		EDTA	4
		resazurin	0.5

表3-6 厭氧產甲烷顆粒在UASB中操作條件

OLR (g of COD L ⁻¹ day ⁻¹)	0.82	3.84	5.2	10.4
COD concentration (g of COD L ⁻¹)	20	20	20	20
operating reactor	R1-R4	R1, R2, and R4	R1, R3, and R4	R1-R4
HRT (day)	24.4	5.2	3.8	1.9
operating duration (day)	36	30	39	2.4

3-3 顆泥結構強度測試

3-3-1 實驗藥品

1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid): E5134-100 g, sigma.
2. Proteinase K: 0706-100 mg, 38.6 unit/mg, amresco.

3. A-amylase: A6380-500 mg, Type II-A from Bacillus species, 839 units/mg, sigma.
4. B--amylase: A7130-10KU, Type II-B from Barley, 45.2 units/mg, sigma.
5. Lipase: L3126-25 G, Type-II from porcine pancreas, sigma.
6. Cellulase: 034-18752, from Trichoderma viride, 1000 units/g, Wako.
7. PBS buffer: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na₂HPO₄ ; 0.24 g KH₂PO₄ ，加蒸餾水至一升後再用1N HCl調至pH=7.4。

3-3-2 生物顆粒降解測試

本研究採以下方式實驗方法

1. 檢測金屬離子對結構穩定影響: 50 mg EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) 溶於分別在pH 4、pH 7、pH 10的2 ml PBS buffer中，加入granule於室溫反應1天。
2. EDTA 螯合鈣離子結果: 將顆粒和 EDTA 反應過後溶液經原子吸收光譜分析儀 (Automatic Analyzer, AA, 型號 GBC 906AA) 分析鈣離子濃度。
3. 檢測protein對結構穩定影響: proteinase K溶於pH 7.5 50 mM Potassium Phosphate, dibasic buffer中，濃度為7.72 units/ul，加入granule於37°C中振盪兩小時。
4. 檢測 α -polysaccharide對結構穩定影響: α -amylase溶於pH 6.9 buffer (20 mM sodium Phosphate monobasic; 6.7 mM sodium chloride)，濃度為180 units/ul，加入granule於20°C中振盪2小時
5. 檢測 β -polysaccharide對結構穩定影響: β -amylase溶於pH 4.8 PBS buffer中，濃度為9.04 units/ul，加入granule於20°C中振盪2小時
6. 檢測lipid對結構穩定影響: lipase溶於pH 7.4 buffer (200 mM Tris-base)中，濃度0.25 mg/ul，加入granule於37°C中振盪2小時
7. 檢測cellulose對結構穩定影響: cellulase溶於pH 4 PBS buffer中，濃度0.25 units/ul，加入granule於50°C中振盪反應2小時。

8. 粒徑測量分佈實驗:將上述經過 cellulase 反應過後的顆粒做粒徑分佈，使用光學顯微鏡 Optical Microscope (Projectina)，將顆粒置於載玻片上比對目鏡上標示刻度決定顆粒長寬，取長×寬開根號當作粒徑，將粒徑對分率作圖，比較反應前後粒徑是否有變化。

3-4 螢光染色方法

3-4-1 實驗染劑

1. SYTO63核酸染劑，Molecular Probes，伯昂生技，台北，台灣。
2. fluorescein-5-isothiocyanate (FITC 'Isomer I')胺基探針，Molecular Probes，伯昂生技，台北，台灣。
3. Concanavalin A (Con A)–Tetramethylrhodamine，Molecular Probes，伯昂生技，台北，台灣。
4. Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R)，Sigma，友和貿易，台北，台灣。
5. SYTOX Blue dead cell stain，Molecular Probes，伯昂生技，台北，台灣。
6. Nile Red，Molecular Probes。

3-4-2 染色方法

1. 染色流程

將將3-3-2節中酵素測試後的顆粒樣品置於2 ml離心管中，滴入20 μ M SYTO 63 核酸染劑，在震盪機中震盪30分鐘，再以PBS buffer清洗去除多餘染劑。加入1M sodium bicarbonate buffer於樣品後，滴入10 mg/mL的FITC染劑，染色一小時，並以PBS buffer清洗。預先配製2.5 mg/mL Con A儲存溶液，實驗前稀釋至250 mg/mL，加入樣品中染色30分鐘後，以PBS buffer清洗。配製300 mg/L calcofluor

white (fluorescent brightener 28) 加入樣品中染色三十分鐘，以PBS buffer清洗兩次。利用Nile Red偵測樣品內脂質分佈，以丙酮配製10 mg/L儲存溶液，以PBS buffer稀釋100倍後，於calcofluor white染色完成後加入樣品染色，所有染色程序皆需於暗室進行。

2. 冷凍切片

在-35°C操作台上，將染色後樣品以冷凍包埋劑包埋，此時包埋劑會因為低溫而迅速凝固。將冷凍包埋的樣品利用-20°C冷凍切片機進行切片，厚度約為40-60 μm 。切下的薄片置於載玻片上並蓋上玻片後，以指甲油封片。必要時可將樣品暫時儲存至4°C冰箱以待觀察。

3. 雷射共軛焦顯微鏡影像擷取

本研究使用雙光子雷射共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System) 設備，及其配備的軟體進行影像擷取，雷射光源為Ar Laser激發的458、488及514 nm為激發SYTOX Blue、FITC及Nile red螢光原，其各別收光波長設定為460-500、500-550及625-700 nm。He-Ne Laser的543 及633 nm激發光源則分別激發Con A -Tetramethylrhodamine及SYTO63，其收光分別為550-590及650-700 nm。此外，calcofluor white激發光源則利用雙光子光源 (Two-Photon Laser) 取代UV Laser，波長設定為800 nm，收光範圍設定為410-480 nm。利用雷射共軛焦顯微鏡進行螢光擷取時，因儀器限制及避免染劑螢光干擾，除FITC與SYTO63以不同感測器同時收光外，其餘染劑皆各別單獨收光，觀測物鏡為10倍物鏡，掃描解析度為1024×1024。

第四章 結果與討論

4-1 顆粒結構穩定性檢驗

將三種顆粒加入螯合劑EDTA、 α amylase、 β - amylase、proteinase K、lipase及cellulase，得到表4-1之結果。從表4-1可看出，cellulase引起cellulose降解導致厭氧產氫顆粒的破碎，粒徑減少高達70%，因此cellulose可視為厭氧產氫顆粒網狀結構主要支撐物質，另一方面，EDTA、proteinase K、 α -amylase、 β -amylase及lipid並未能造成生物顆粒之破碎。對於酚好氧顆粒及厭氧產甲烷顆粒，EDTA、 α amylase、 β - amylase、proteinase K、lipase及cellulase皆未引起顆粒破碎；換句話說，金屬離子、protein、polysaccharide及lipid在顆粒網狀結構中並非主要支撐物質。

表4-1 顆粒與EDTA、五種酵素反應

Type	exp EDTA pH4	EDTA pH 7	EDTA pH 10	Proteinase K	β - amylase	α - amylase	Lipid	cellulase
酚好氧顆粒	×	×	×	×	×	×	×	未破碎 (radius -6%)
厭氧產氫顆粒	×	×	×	×	×	×	×	破碎 (radius -70%)
厭氧產甲烷顆粒	×	×	×	×	×	×	×	未破碎 (radius -14%)

註: × 表示未破碎

4-2 超音波震盪

將4-1反應過後的顆粒置於室溫水浴以頻率40 kHz超音波振盪檢驗顆粒結構是否受損，得到表4-2。可以看出失去protein跟amylose，酚好氧顆粒經超音波會降解；厭氧產氫顆粒失去protein跟amylose，經超音波震盪之後會破碎；產氧產甲烷顆粒經酵素反應，超音波振盪仍無法讓顆粒破碎。三種顆粒經EDTA螯合金屬，超音波震盪超過360分鐘仍保持不變。

表4-2 顆粒經超音波震盪結果

前處理 type	EDTA pH 4	EDTA pH 7	EDTA pH 10	Proteinase K	α -amylase	β -amylase	Lipase	cellulase
酚好氧 顆粒	×	×	×	180分混濁 210分破碎	210分混濁 270分破碎	×	×	×
厭氧產 氫顆粒	×	×	×	45分混濁 90分完全 破碎	×	60分混濁 120分完全破 碎	×	前處理 已破碎
厭氧產 甲烷 顆粒	×	×	×	150分混濁 ×	150分混濁 ×	150分混濁 ×	150分混濁 ×	150分混濁 ×

x: 超過360分仍無破碎跡象

4-3 EDTA螯合顆粒鈣離子

顆粒和EDTA反應過後溶液經原子吸收光譜分析儀分析鈣離子濃度，得到圖4-1，酚好氧顆粒和厭氧產氫顆粒對到左邊刻度，厭氧產甲烷顆粒對到右邊刻度。從圖中可以看到，反應後溶液鈣離子皆有明顯上升，文獻中指出鈣離子能加速顆粒形成，但是顆粒中鈣離子下降未導致顆粒破碎，也就是鈣離子並非顆粒網狀結構中骨幹。

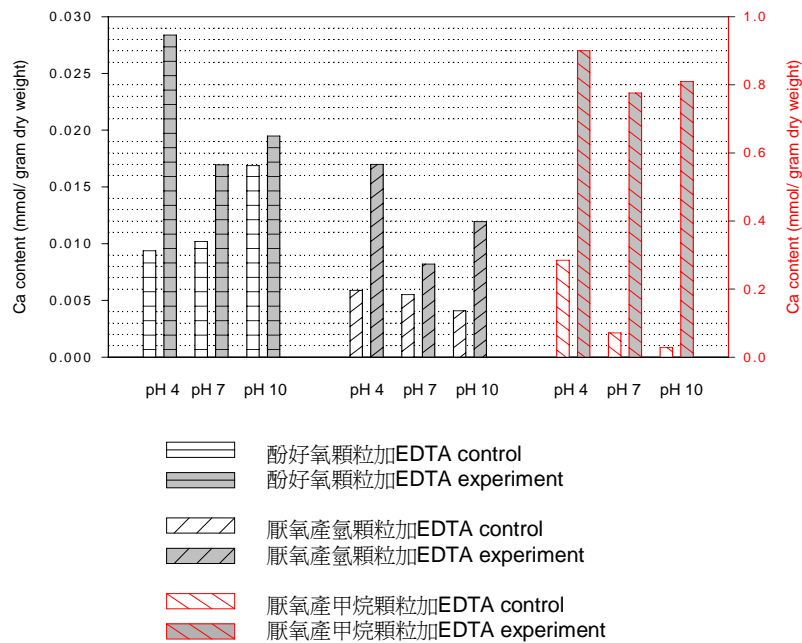


圖4-1 EDTA螯合顆粒鈣離子

4-4 粒徑分布實驗

將三種類粒經由cellulase反應過後，使用Optical Microscope(Scalar, VL-11S)量測粒徑，以粒徑對分率作做，得到表圖4-1、圖4-2、圖4-3，可看出經cellulase反應後，酚好氧顆粒粒徑無大變化，厭氧產氫顆粒粒徑縮減70%，厭氧產甲烷顆粒減少14%。Cellulase對於不同厭氧顆粒能造成不同程度之破壞。

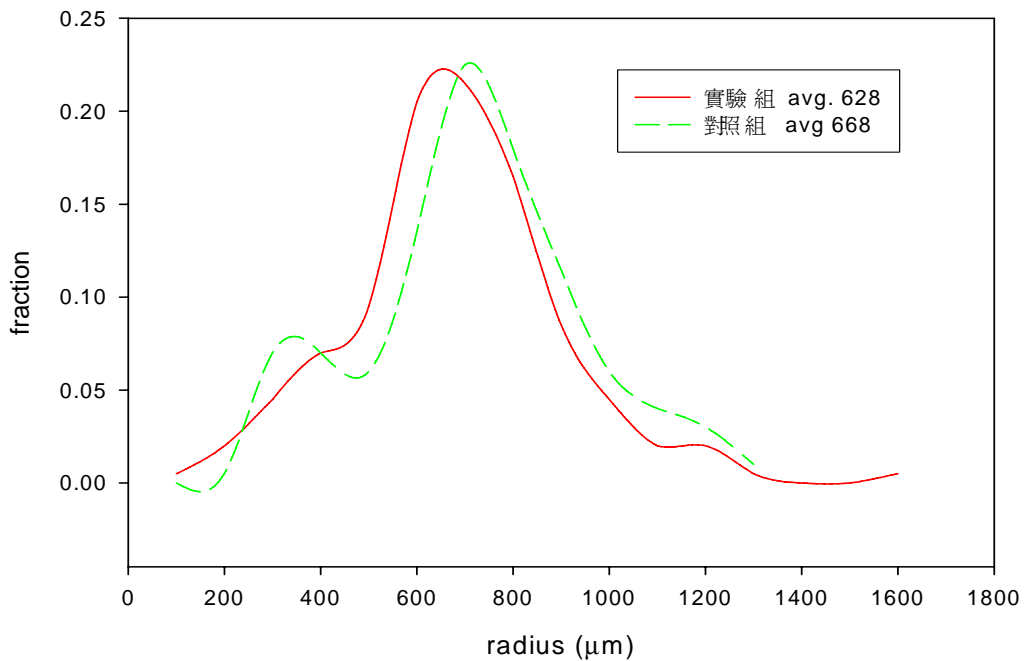


圖4-2 酚好氧顆粒加cellulase粒徑分佈

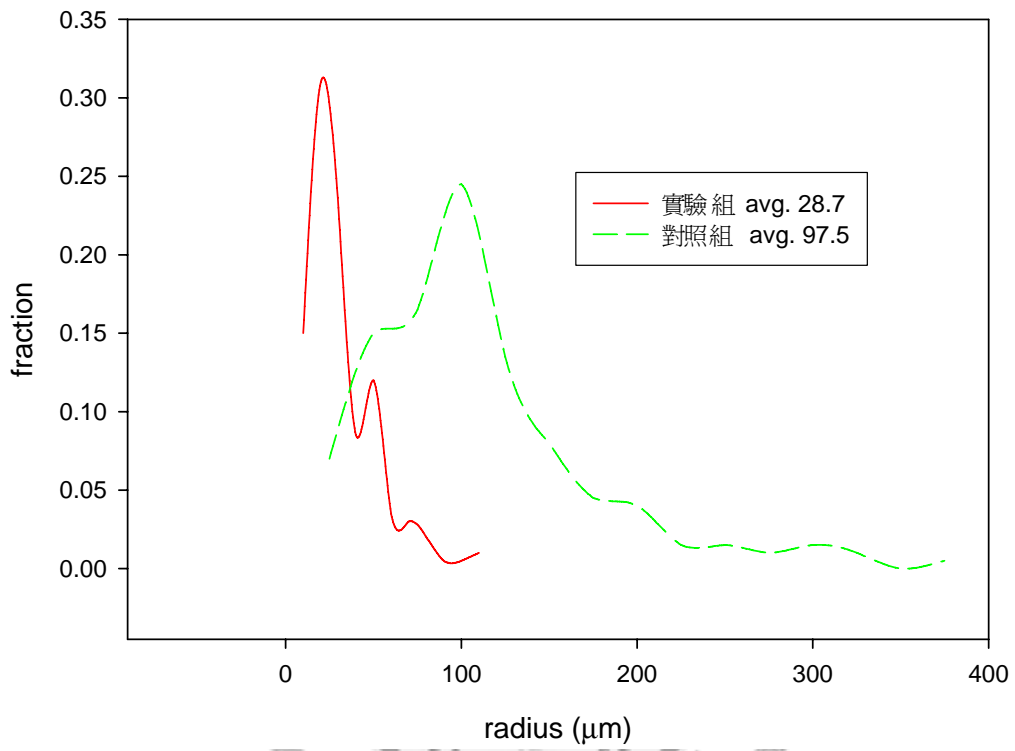


圖4-3 厭氧產氫顆粒加cellulase粒徑分佈

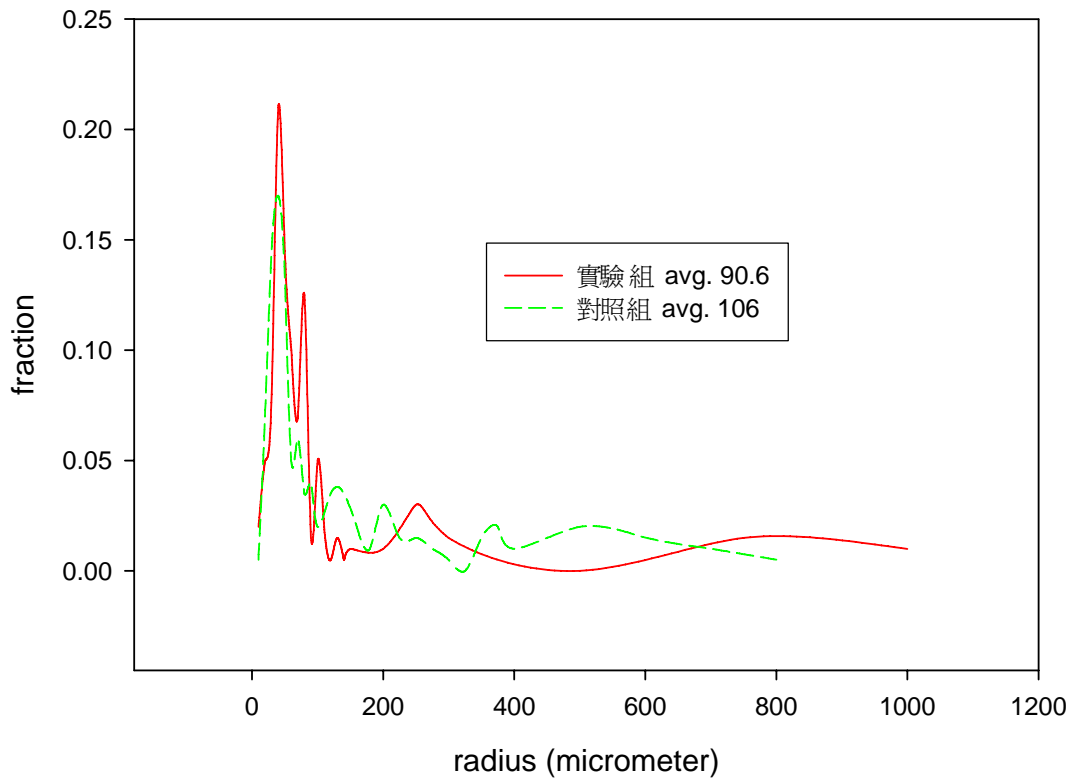


圖4-4 厭氧產甲烷顆粒加cellulase粒徑分佈

4-5 五重染色: 酚好氧顆粒

用酵素處理酚好氧顆粒後再五重染色，經由共軛焦顯微鏡來觀察，得到圖 4-5、4-7、4-9、4-11、4-13 及 4-15 之圖形。

從圖 4-5 可看出 protein 及 lipid 幾乎遍佈整顆酚好氧顆粒， α -和 β -polysaccharide 則呈外圍較多、內部少許之分佈，living cells 則只散布在外圍。細菌會受到酚的毒化影響而使細胞膜功能不健全或喪失，導致微生物成長速率及活性降低。細胞的固定(immobilization)有助於微生物在高濃度酚下生存，而較多的細胞聚集在一起，則能降低酚的抑制及損害 (Keweloh et al. 1989)。由酚顆粒染色結果，其細菌大部分都分佈於外層推測，固定在表層聚集的細胞有助於增加細菌對酚毒性的容忍度 (tolerance)，且在生物顆粒表層較高的微生物密度也可能降低酚的抑制以及增加對有毒物質的質傳阻力。

圖 4-8 經過 proteinase K 處理過後，可以發現顆粒內部 protein 濃度降低，其它酵素分佈則大致不變。比較圖 4-8 (B)與(G)可看出 protein 強度有明顯的下降。

圖 4-9 經過 α -amylase 處理過後，內部 α -polysaccharide 幾乎消失殆盡，只剩下外圍薄薄地一圈，但是核酸擴散到整個顆粒。比較圖 4-9 (B)跟(G) α -polysaccharide 強度大約變成 1/10 左右。

圖 4-11 經 β -amylase 處理過後，也是內部 β -polysaccharide 反應完全，僅剩下外圍少許分佈。

圖 4-13 可以看出 lipid 只剩外圍少許分佈，強度的變化也顯而易見。

圖 4-15 由於 cellulose 屬於 β -polysaccharide 的一種，可用 β -polysaccharide 的方法來雜交 cellulose，經共軛焦顯微鏡來觀察內部消長。跟圖 4-11 比較，顆粒內部還有一些 β -polysaccharide，或許圖 4-9 外圈的部分多醣就是 cellulose。

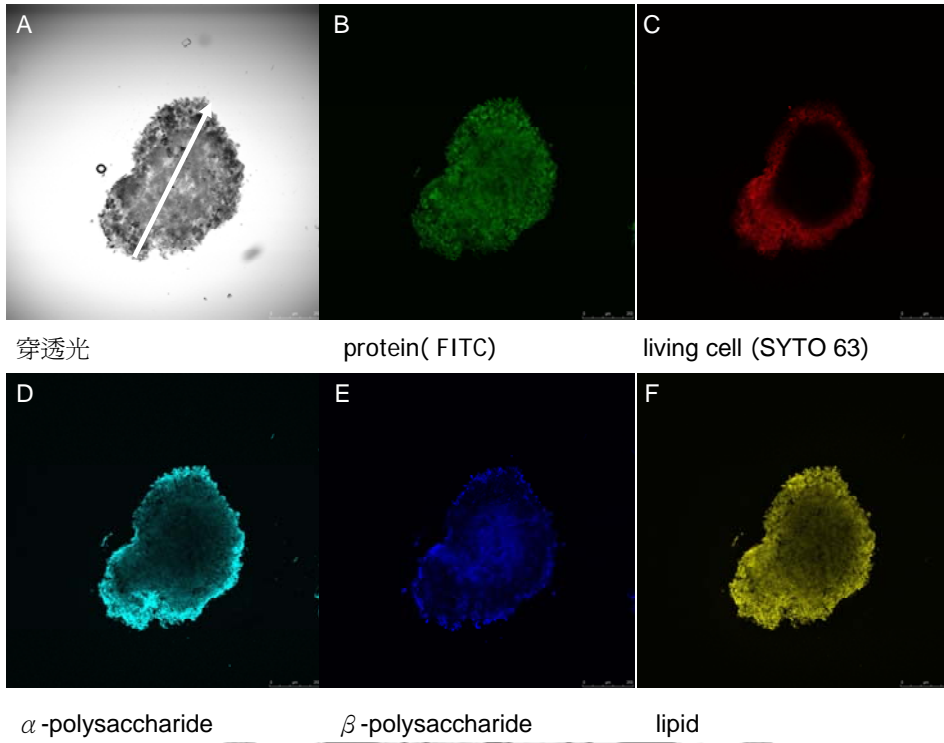


圖4-5 酚好氧顆粒對照組

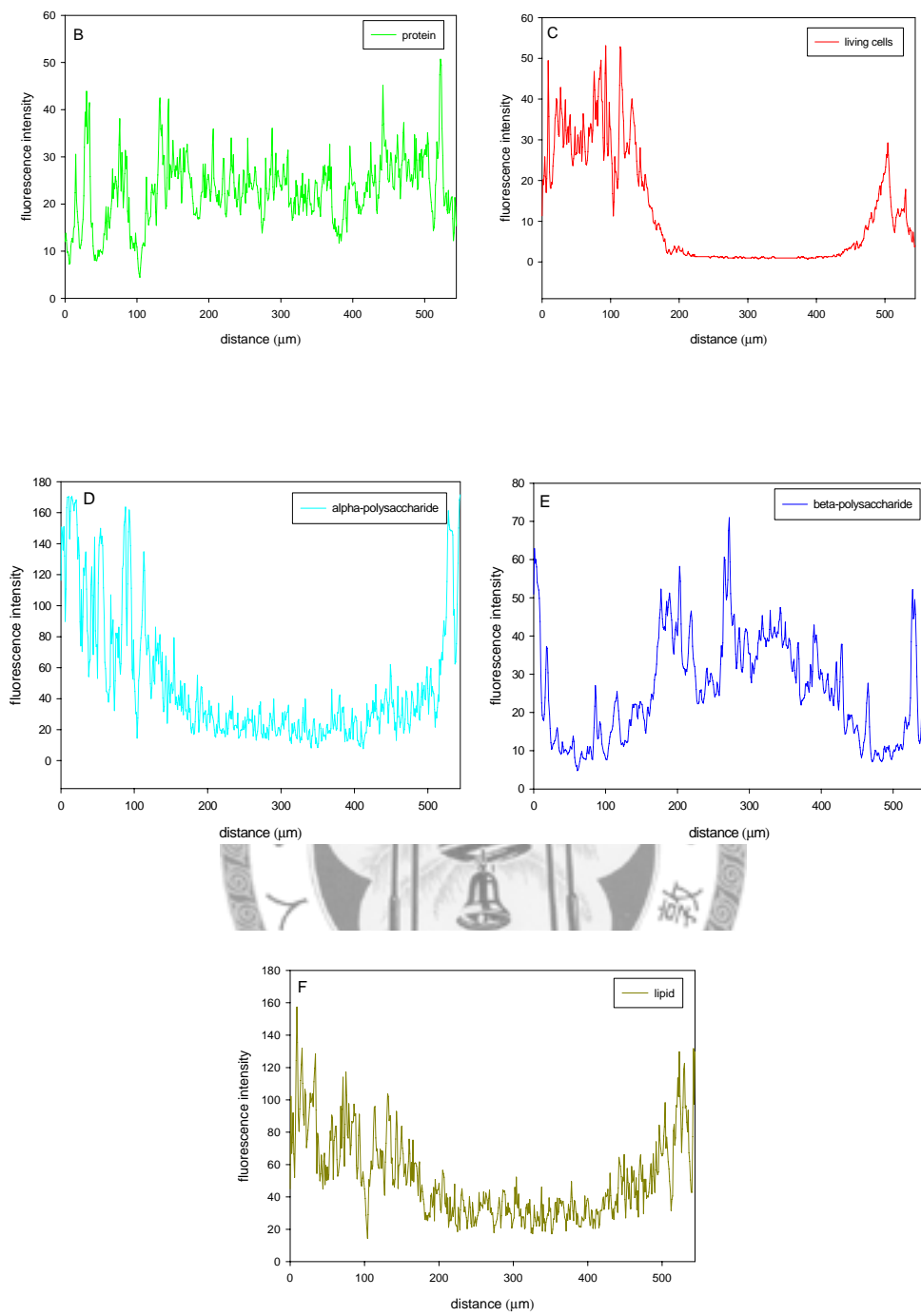


圖4-6 酚好氧顆粒對照組螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid

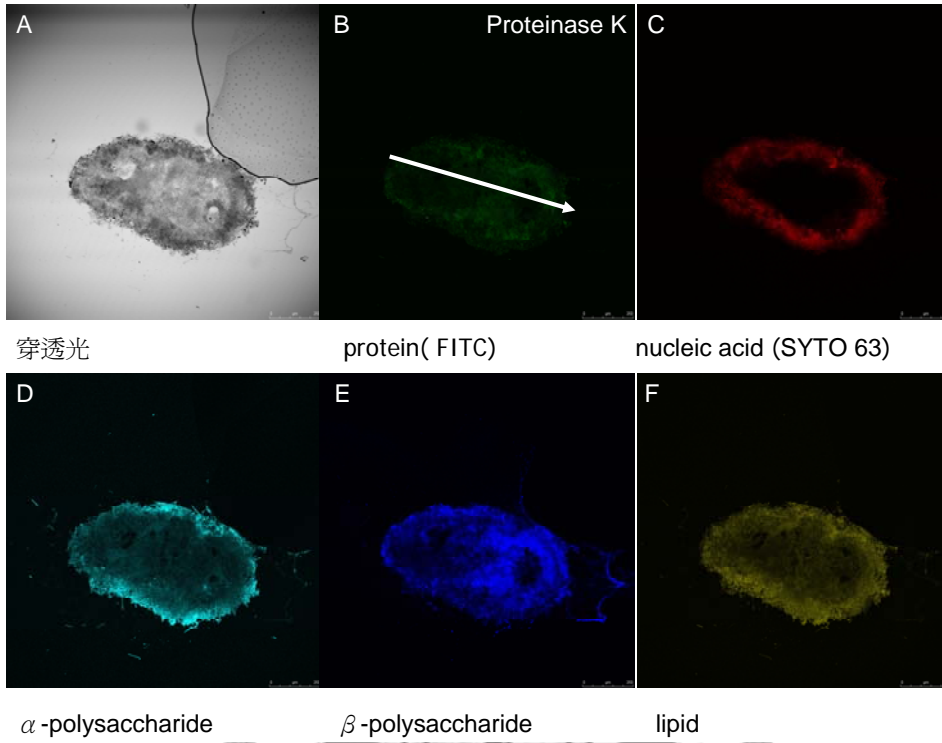


圖4-7 酚好氧顆粒+proteinase K

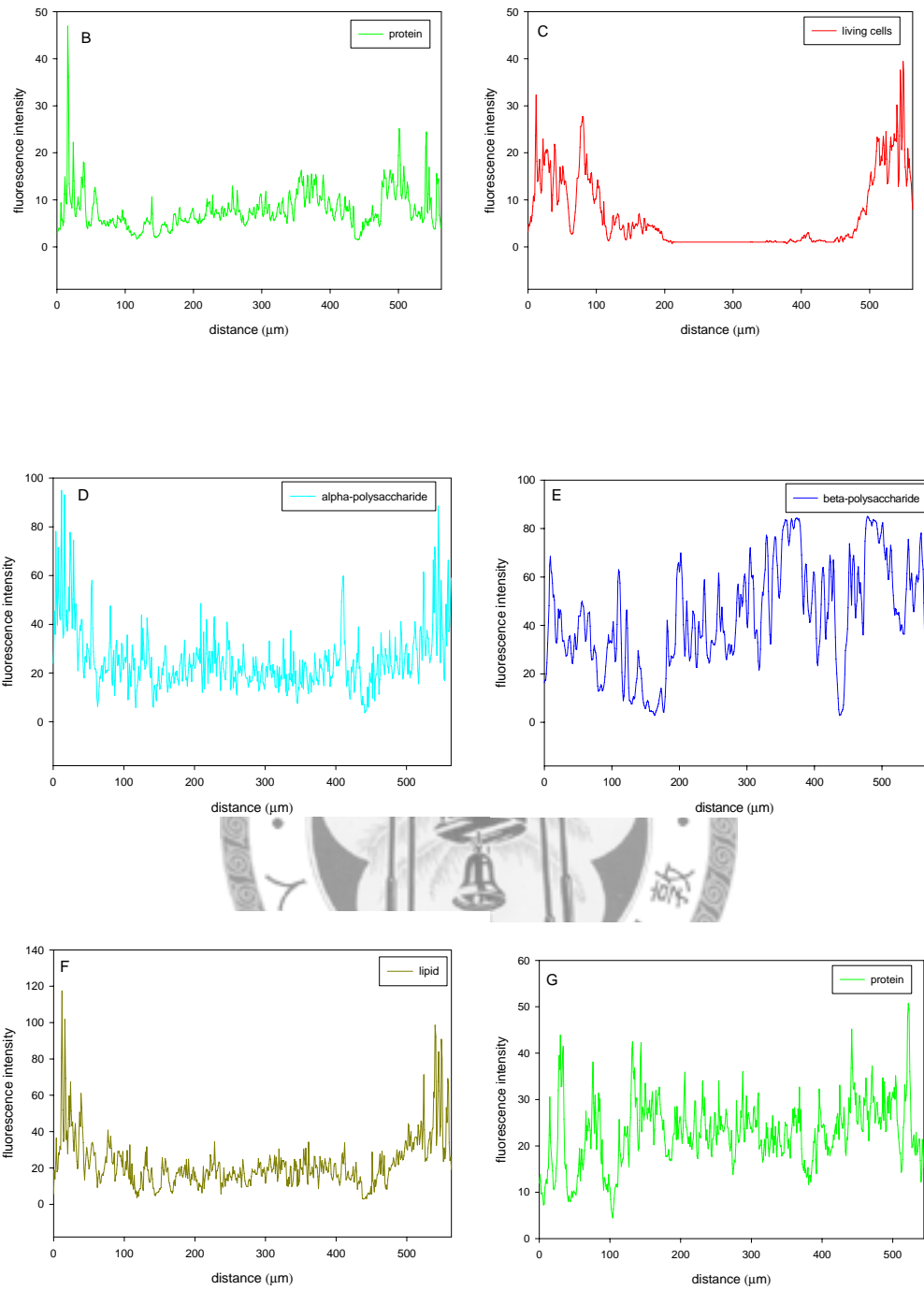


圖4-8 酚好氧顆粒加proteinase K螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組protein

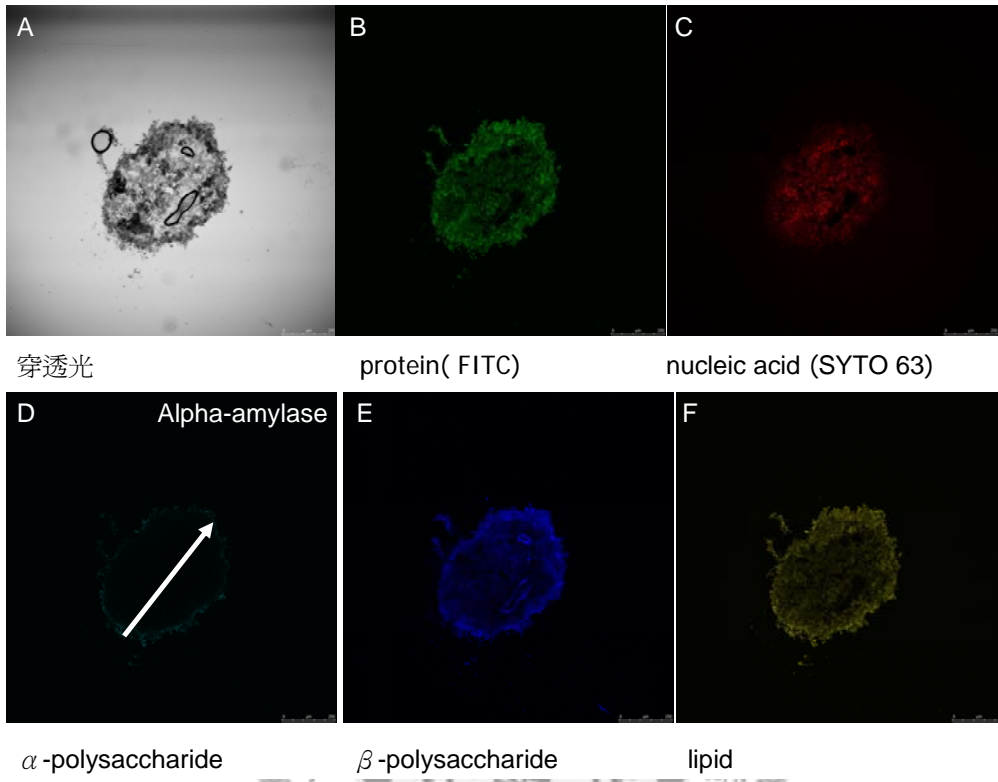


圖4-9 酚好氧顆粒加 α amylase

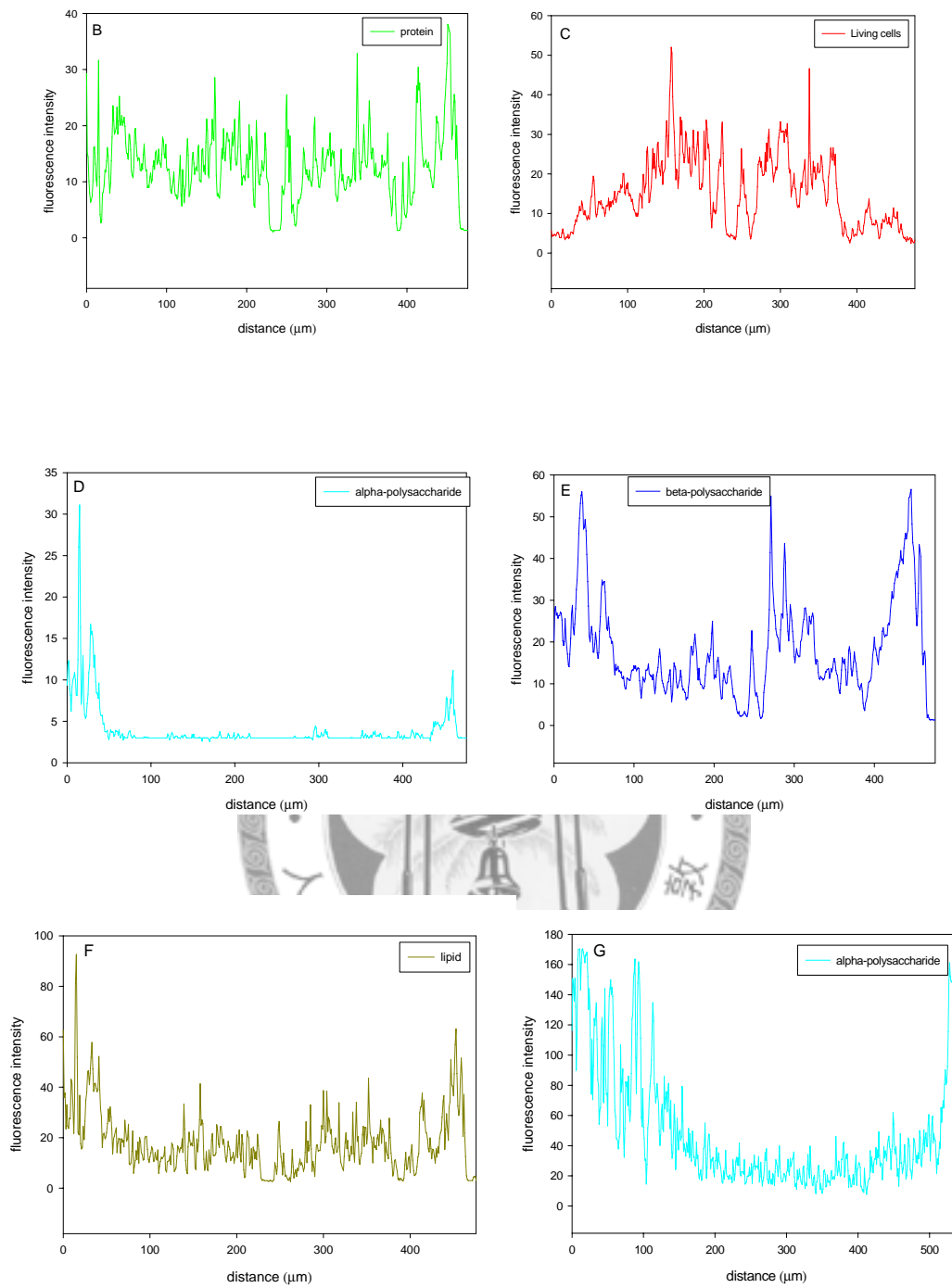


圖4-10 酚好氧顆粒加 α amylase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 α -polysaccharide

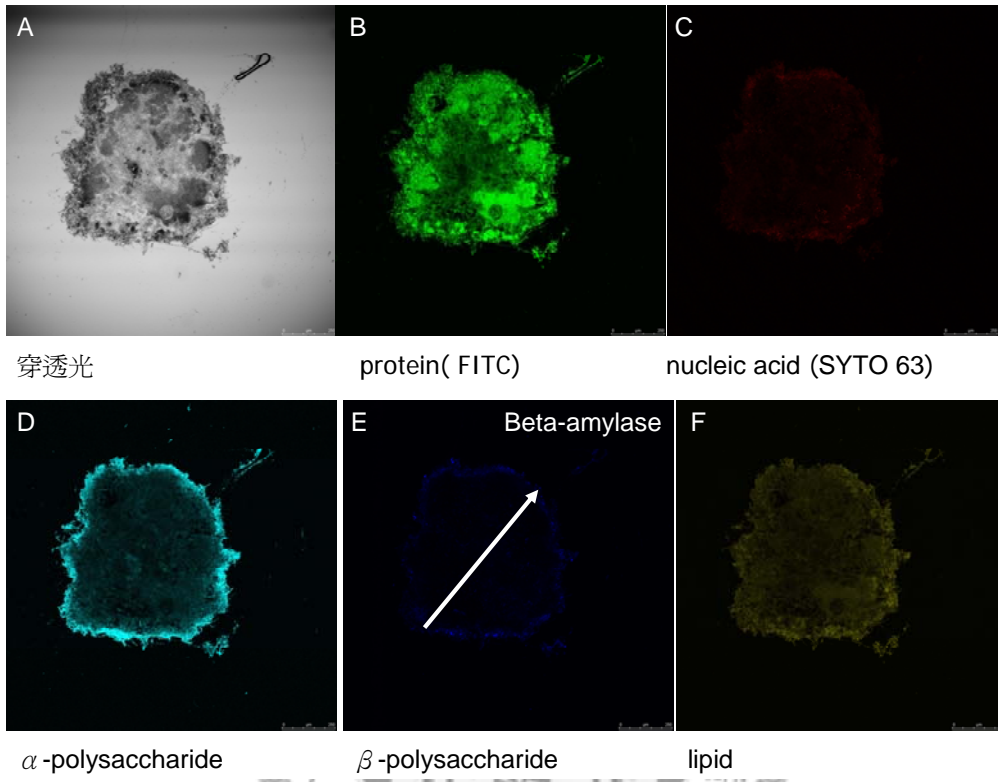


圖4-11 酚好氧顆粒加 β - amylase

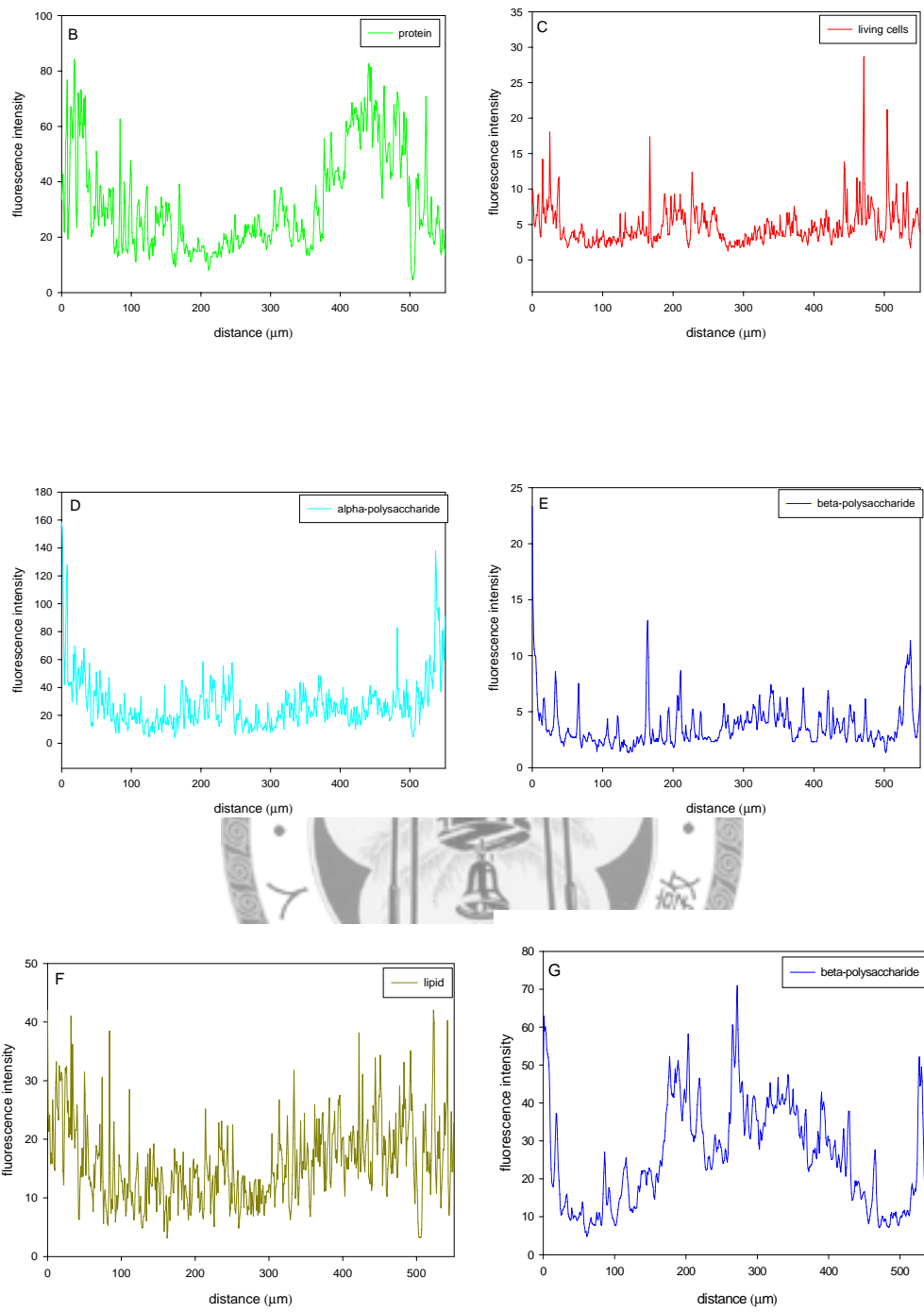


圖4-12 酚好氧顆粒加 β - amylase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

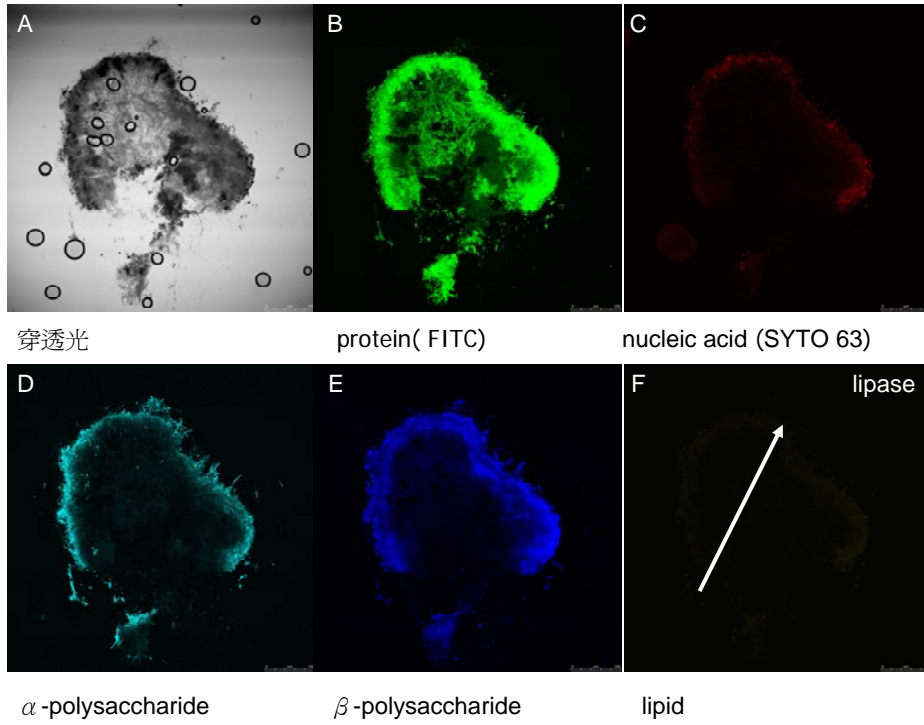


圖4-13 酚好氧顆粒加lipase

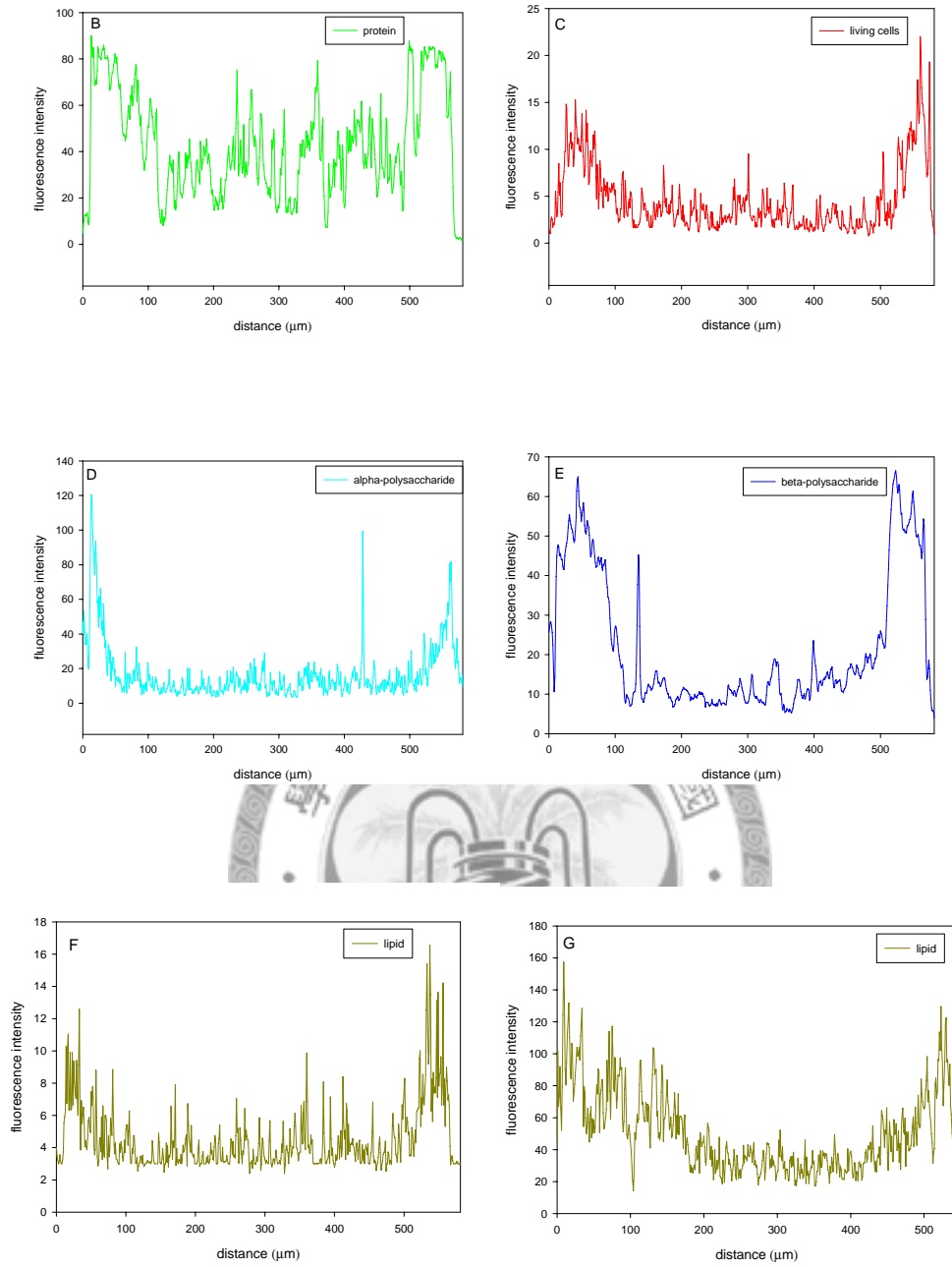


圖4-14 酚好氧顆粒加lipase

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組lipid

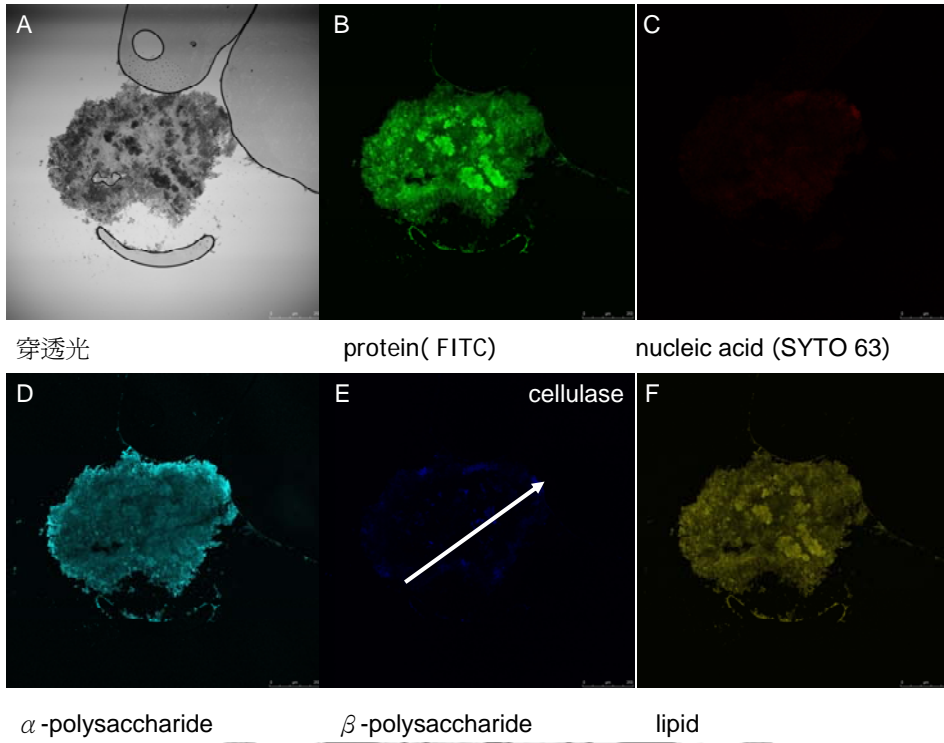


圖4-15 酚好氧顆粒加cellulase

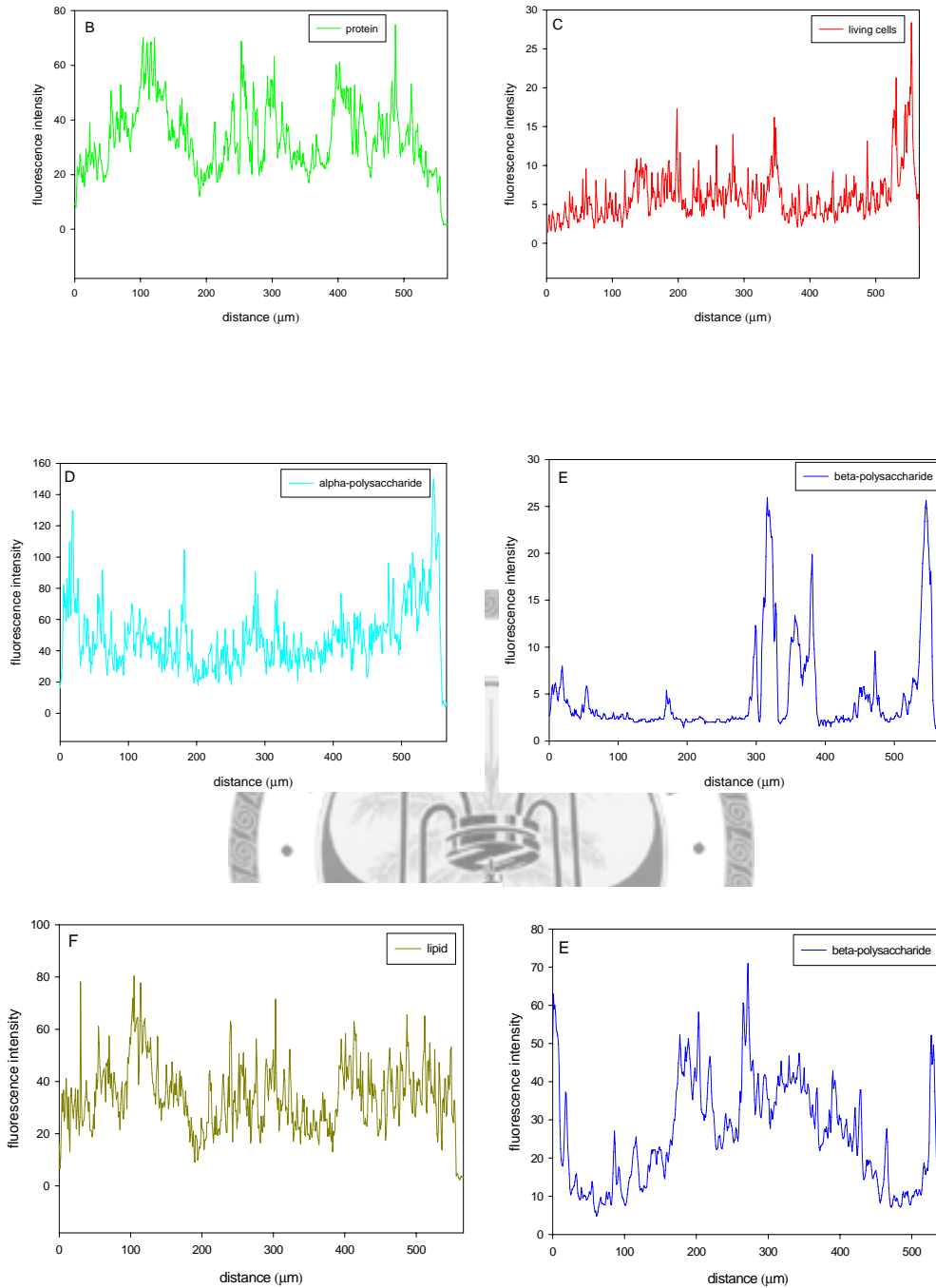


圖4-16 酚好氧顆粒加celluase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

4-6 五重染色: 厭氧產氫顆粒

用酵素處理厭氧產氫顆粒後再五重染色，經由共軛焦顯微鏡來觀察，得到圖 4-17、4-19、4-21、4-23、4-25及4-27之圖形。

厭氧產氫顆粒在圖 4-17 呈現整顆幾乎遍佈 protein 及 lipid、 α -polysaccharide、 β -polysaccharide 和 living cells 外圍較少，living cells 也較好氧顆粒來得少。從功能上看來，厭氧產氫顆粒產生的氫氣要從顆粒中向外溢出，結構較為鬆散，不如好氧顆粒結實。

經過 proteinase 處理過後，圖 4-19 可以發現顆粒內部 protein 濃度有降低，但是結構仍在。比較圖 4-20 (B)與(G)可看出強度有明顯的下降。

經過 α -amylase 處理過後，圖 4-21 內部 α -polysaccharide 只剩下外圍一圈。比較 4-22 (B)跟(G) α -polysaccharide 強度大約變成 1/10 左右。

圖 4-23、4-24 顯示經過 β -amylase 反應，結構仍在， β -polysaccharide 非網狀結構主要支撐物質。

圖 4-25 lipid 經 lipase 降解後只剩外圍一點點，強度的變化參見圖 4-26。

由於cellulose屬於 β -linkage多糖體的一種，可用雜交 β -polysaccharide的prober同樣來雜交cellulose。圖4-27顯示厭氧產氫顆粒幾乎完全破碎，圖4-28顯示殘存的 β -polysaccharide螢光強度。跟圖4-11比較，圖4-27內部還有一些 β -polysaccharide，或許厭氧產氫顆粒外圍的部分就是cellulose而內圈是 β -amylose。由於cellulose的降解導致顆粒的粉碎，即cellulose為厭氧產氫顆粒網狀結構的主要支撐物質。

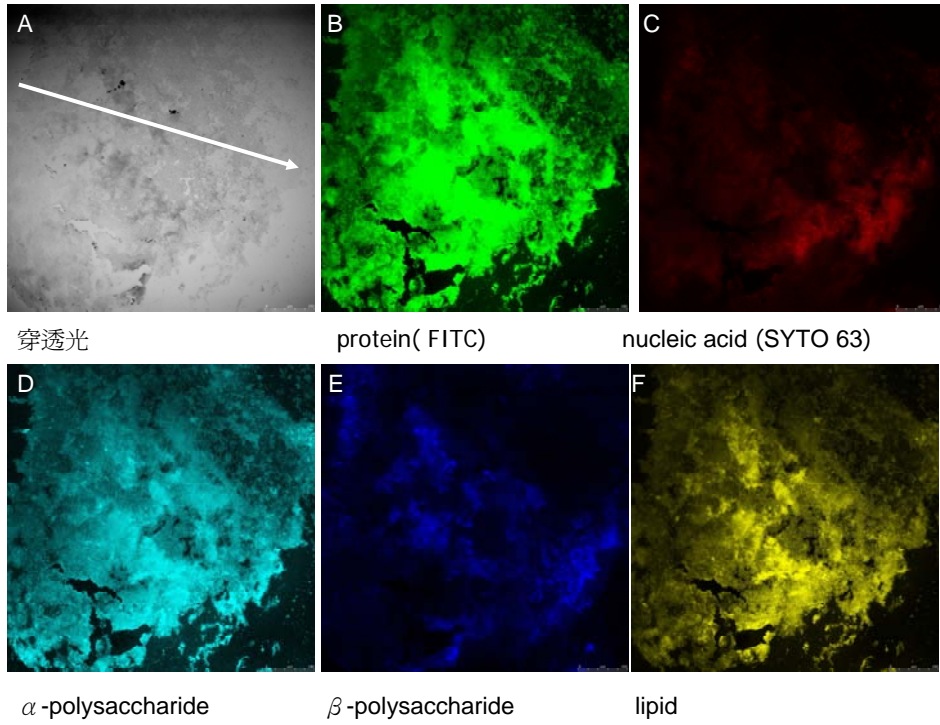


圖4-17 厭氧產氫顆粒對照組

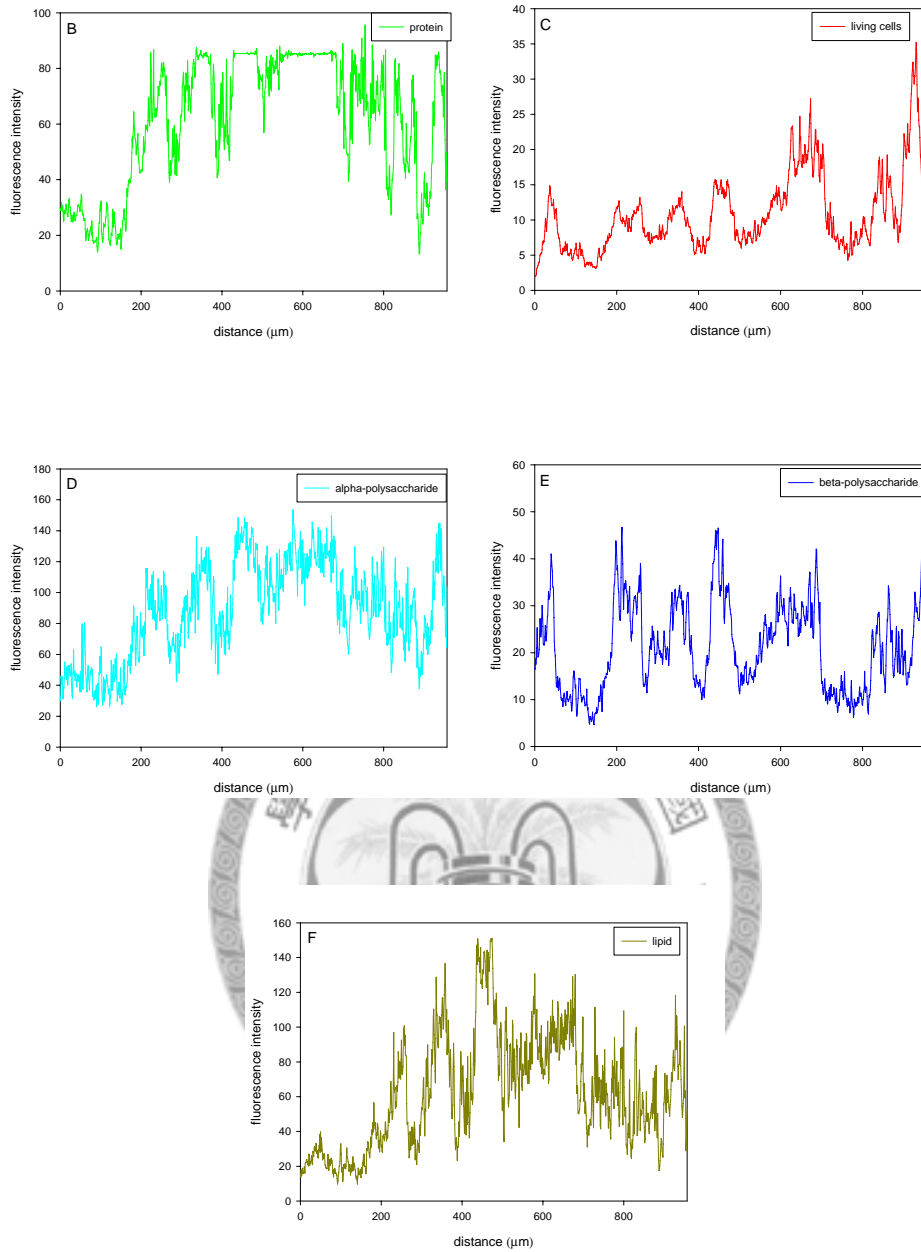


圖4-18 厭氧產氫顆粒對照組螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid

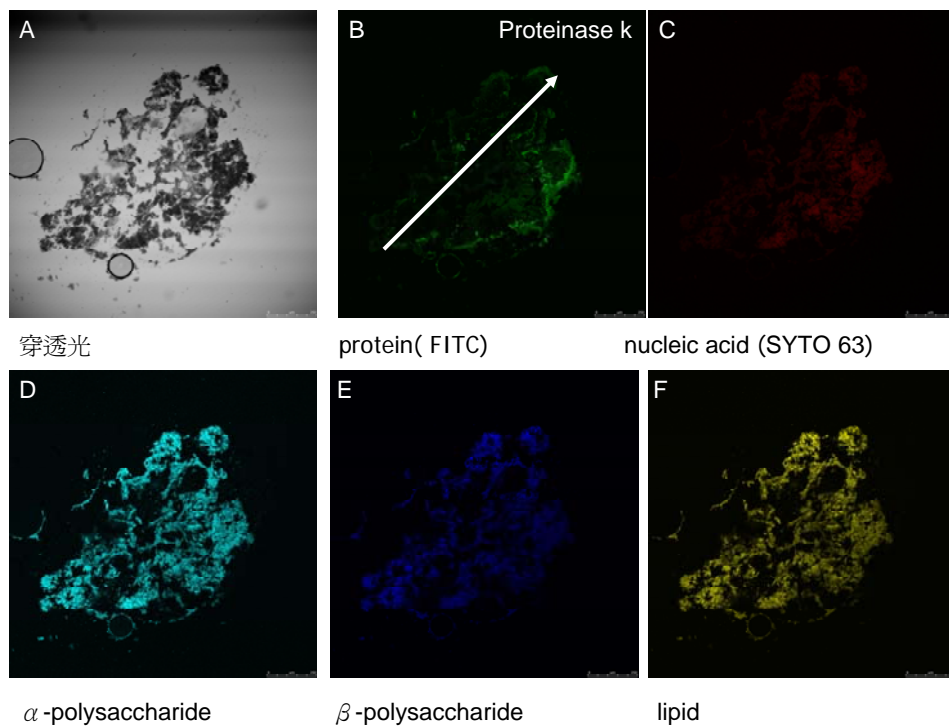


圖4-19 厭氧產氫顆粒加proteinase K

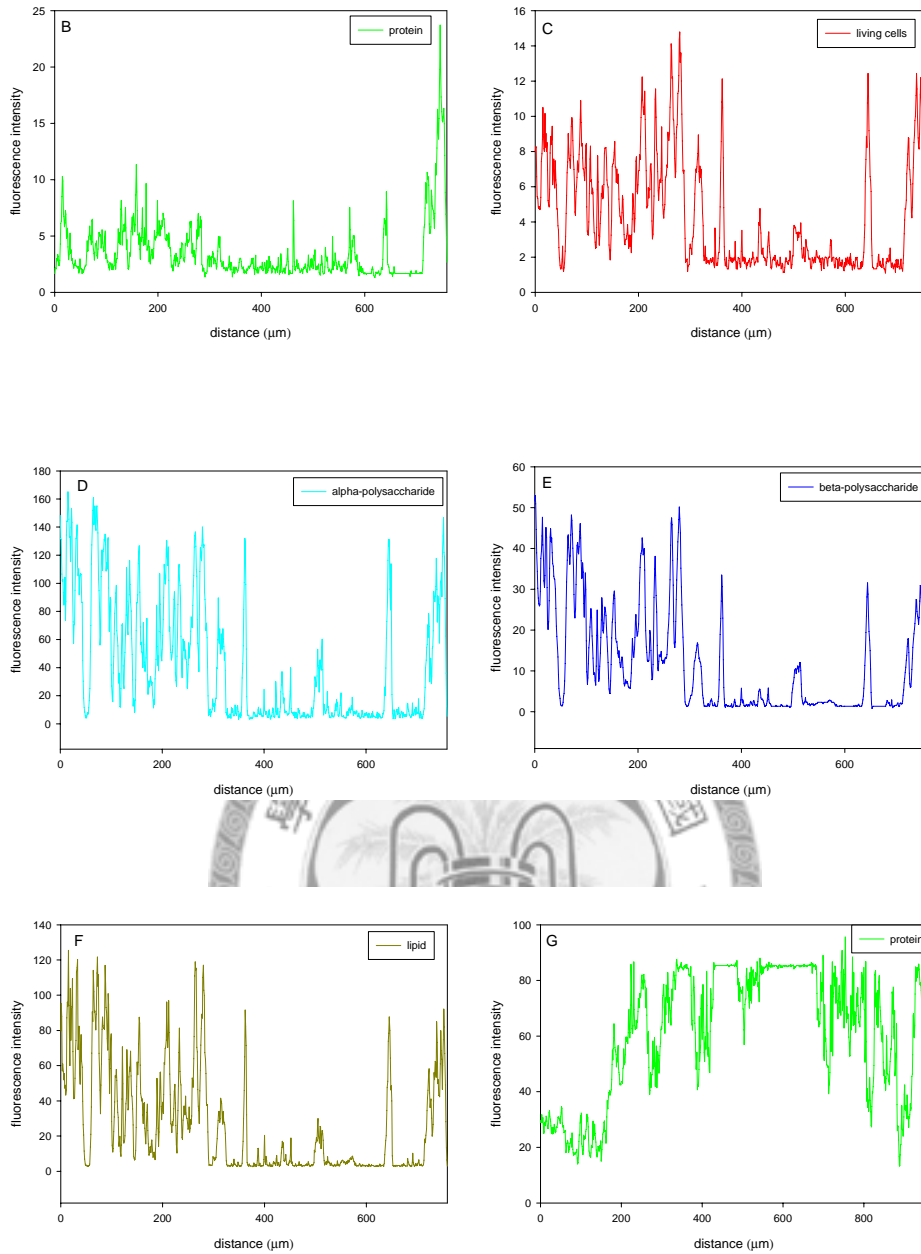


圖4-20 厭氧產氫顆粒加proteinase K螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組protein

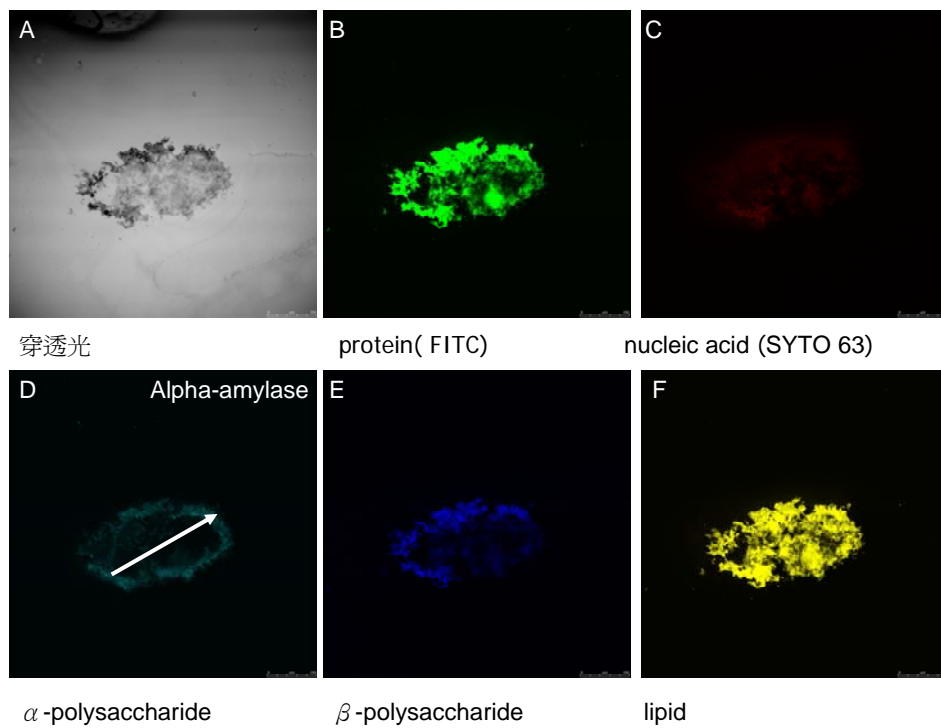


圖4-21 厭氧產氫顆粒加 α - amylase

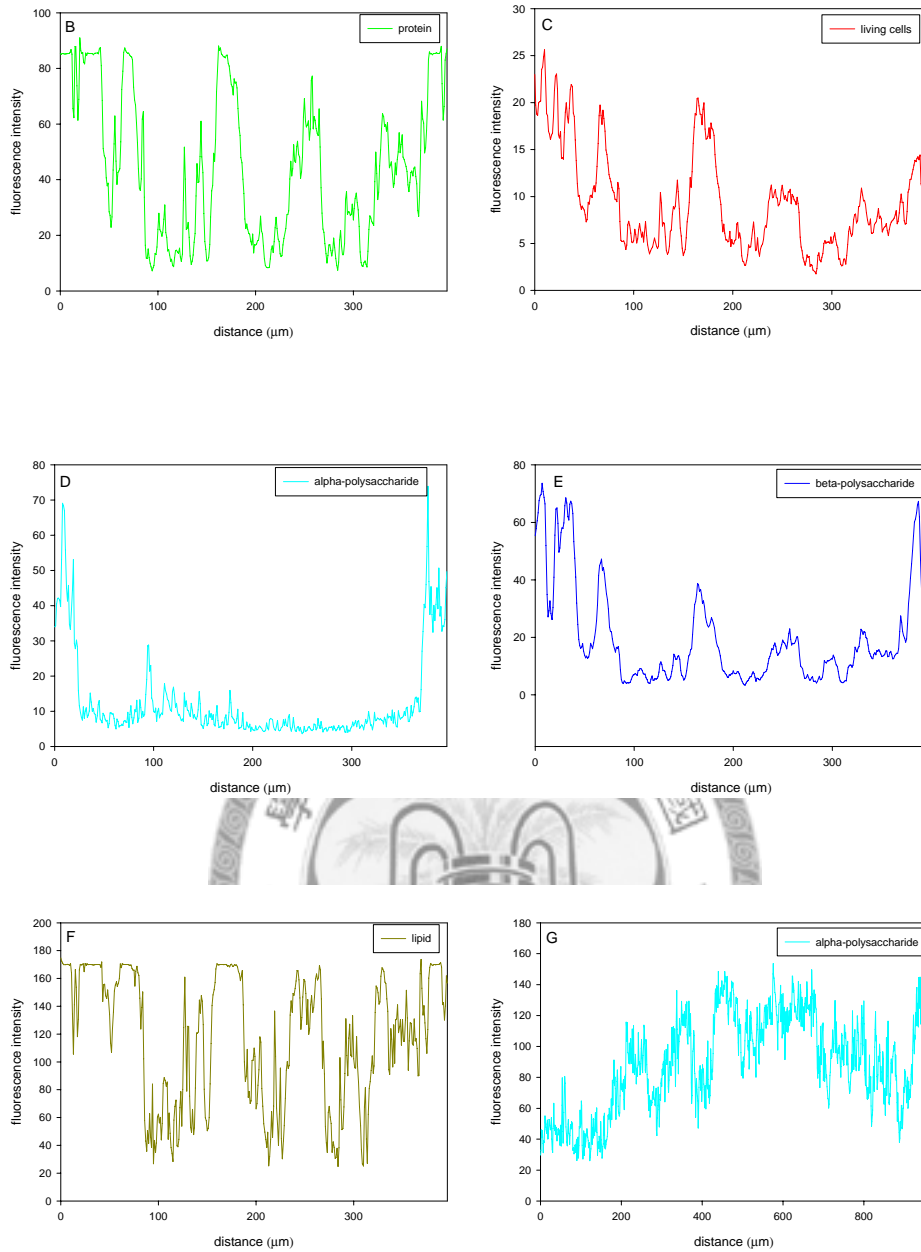


圖4-22 厭氧產氫顆粒加 α - amylase 螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 α -polysaccharide

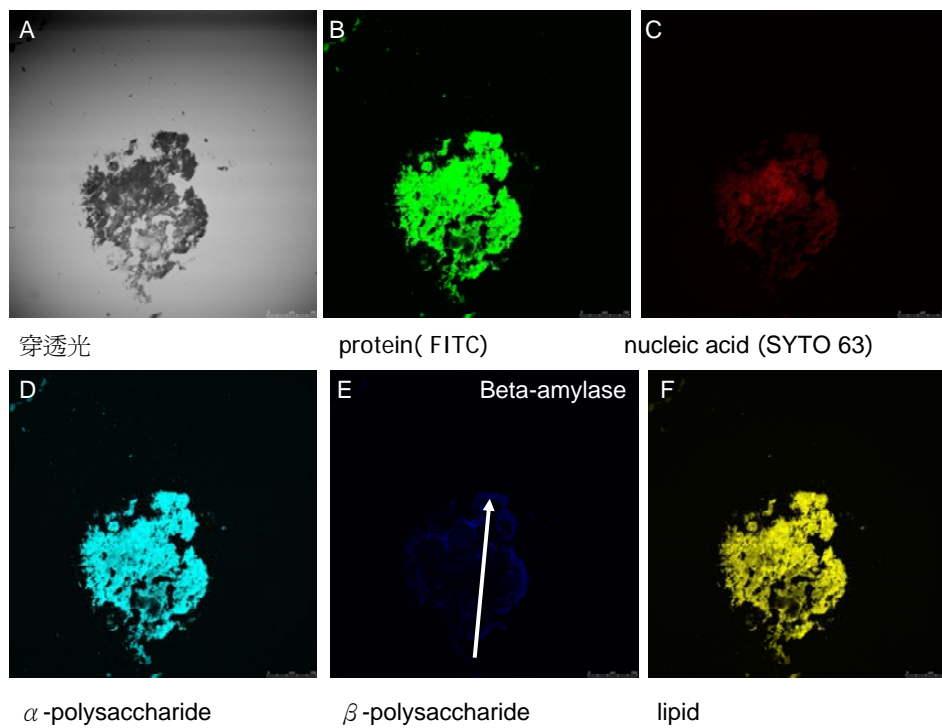


圖4-23 厭氧產氫顆粒加 β - amylase

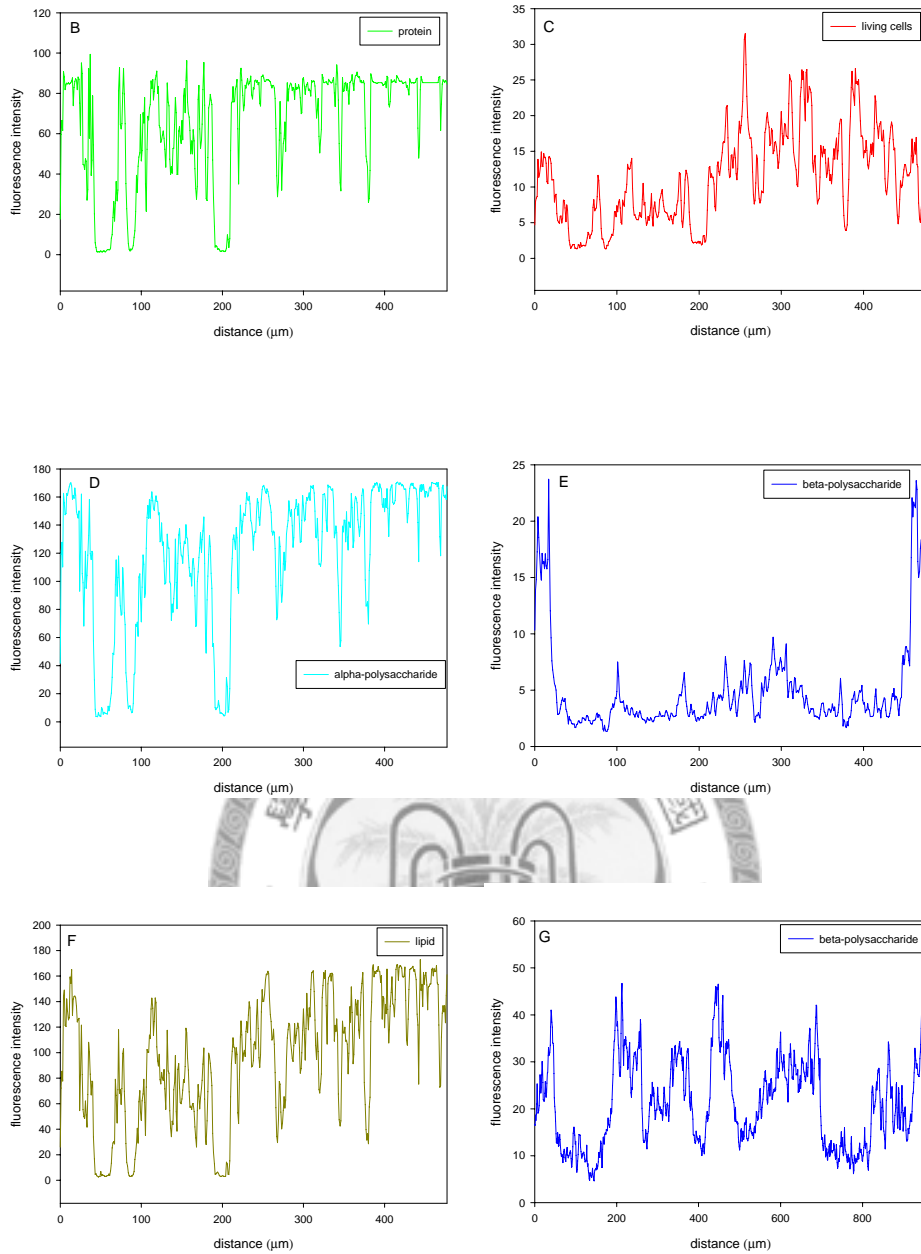


圖4-24 厭氧產氫顆粒加 β - amylase 螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

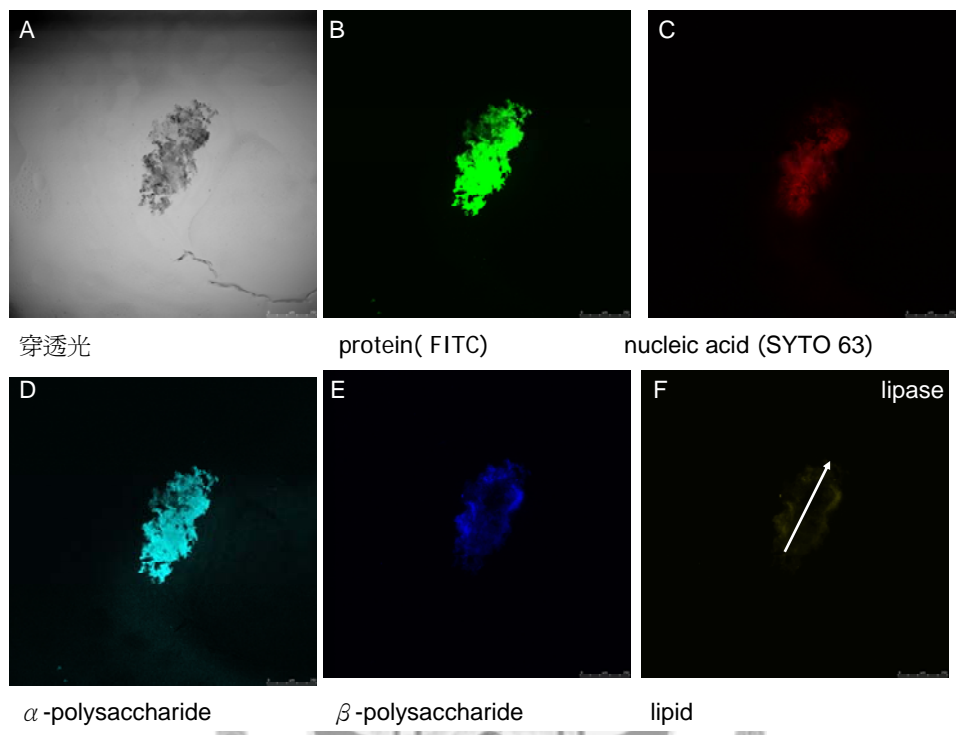


圖4-25 厭氧產氫顆粒加lipase

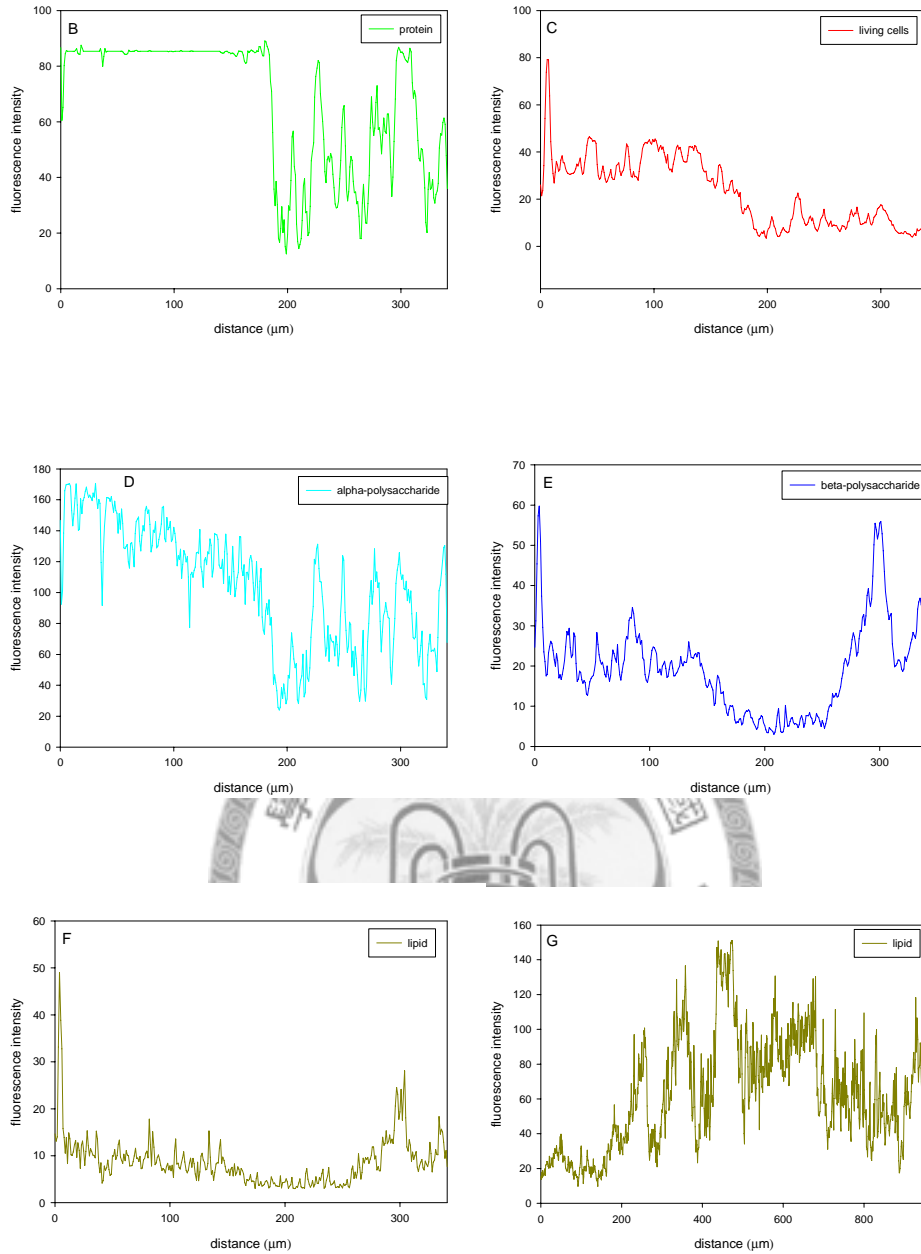


圖4-26 厭氧產氫顆粒加lipase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組lipid

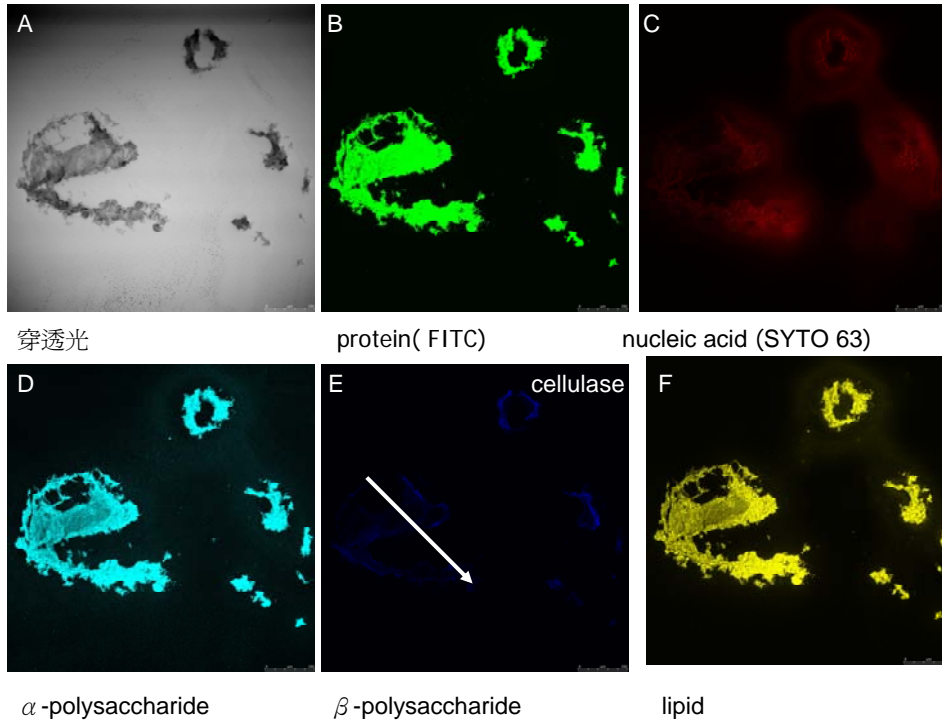


圖4-27 厭氧產氫顆粒加cellulase

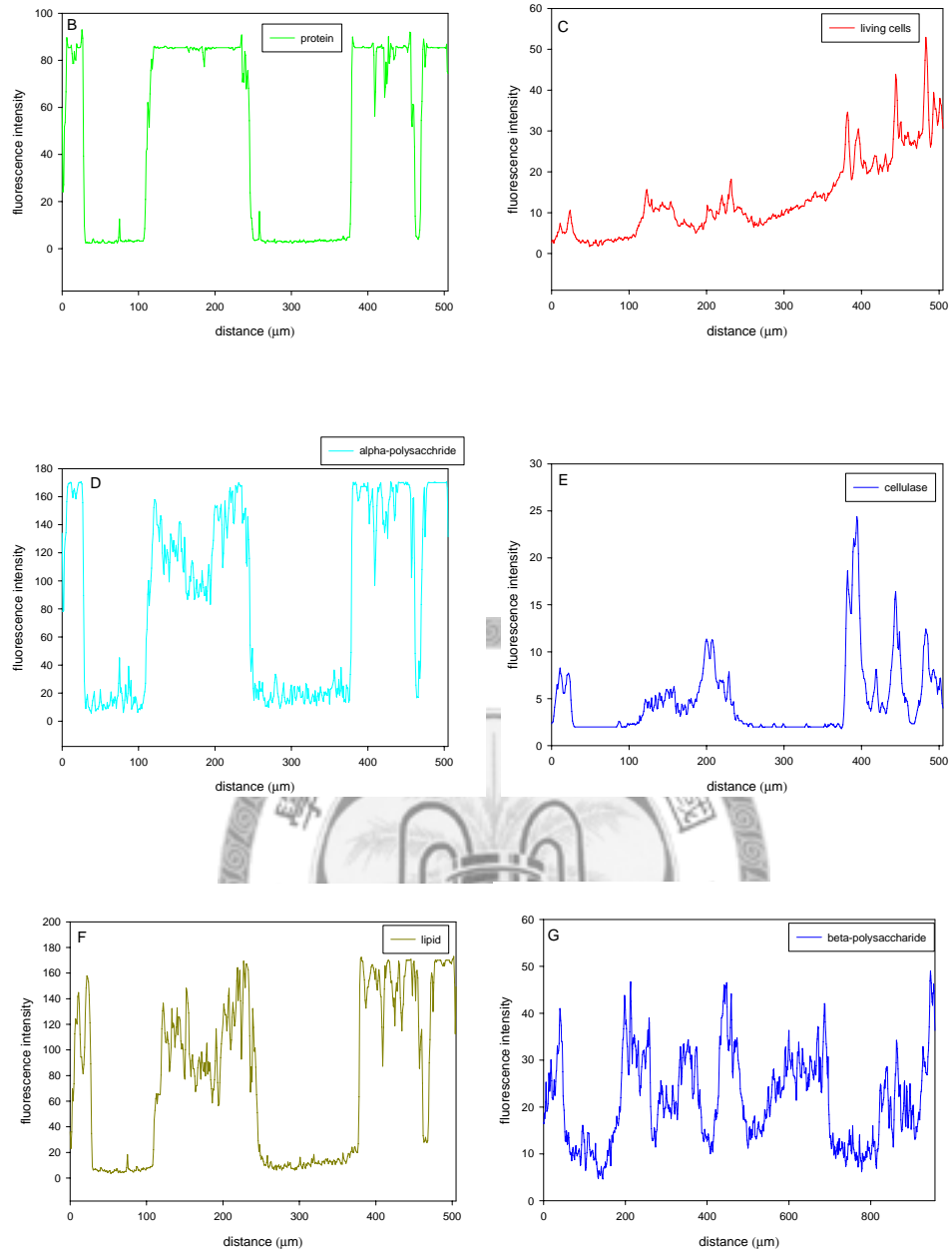


圖4-28 厭氧產氫顆粒加cellulose螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

4-7 五重染色: 厭氧產甲烷顆粒

用酵素處理厭氧產甲烷顆粒後再五重染色，經由共軛焦顯微鏡來觀察，得到圖4-29、圖4-31、圖4-33、圖4-35、圖4-37及圖4-39之圖形。

厭氧產氫顆粒在圖4-29呈現整顆遍佈protein及lipid、 α -polysaccharide、 β -polysaccharide和living cells。厭氧產甲烷顆粒和厭氧產氫顆粒一樣，內部產生的甲烷要從顆粒中向外溢出，結構較為鬆散，沉降性低，不如好氧顆粒結實。

經proteinase反應後，圖4-31 (B)顯示內部空心反應完全，圖4-32中protein螢光強度也降低。

在 α -amylase反應後，圖4-33 (D)顯示 α -polysaccharide幾乎消失殆盡，但是結構仍維持。

圖4-35 (E)顯示 β -amylase反應非常完全，藍色圖譜幾不可見，可是結構仍然維持， β -polysaccharide非網狀結構支撐主要物質。

經lipase反應後，圖4-37 (F)亮度變低，圖4-38 (F)強度變低。

厭氧產甲烷顆粒經cellulase反應，圖4-39 (E)、圖4-40 (E)顯示內部cellose的確降解，但是結構並未破碎。



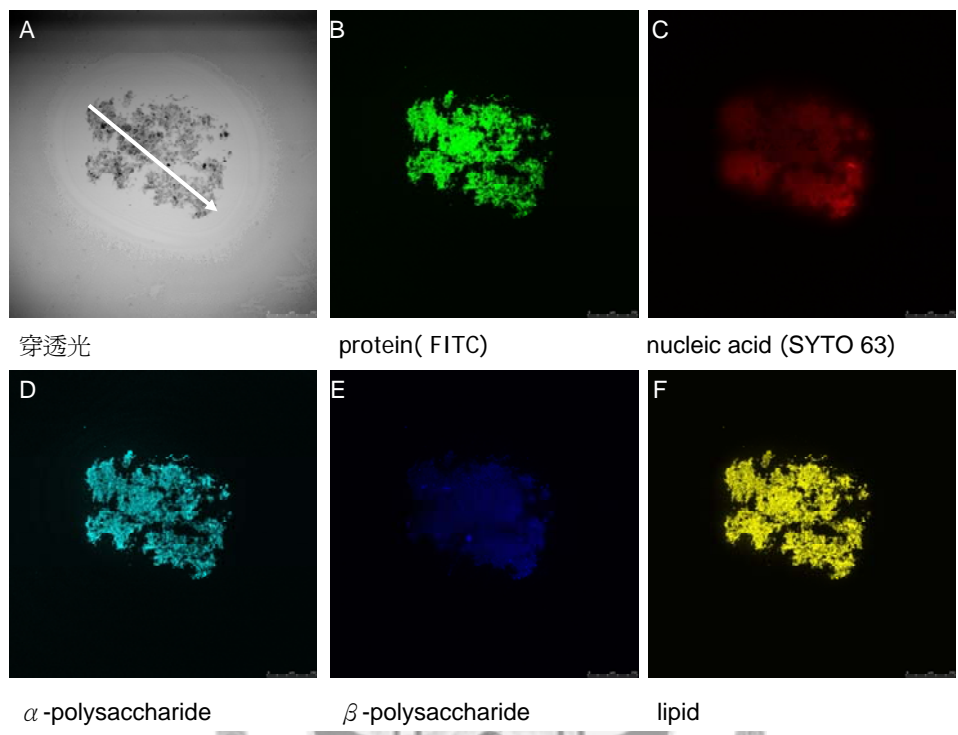


圖4-29 厭氧產甲烷顆粒對照組

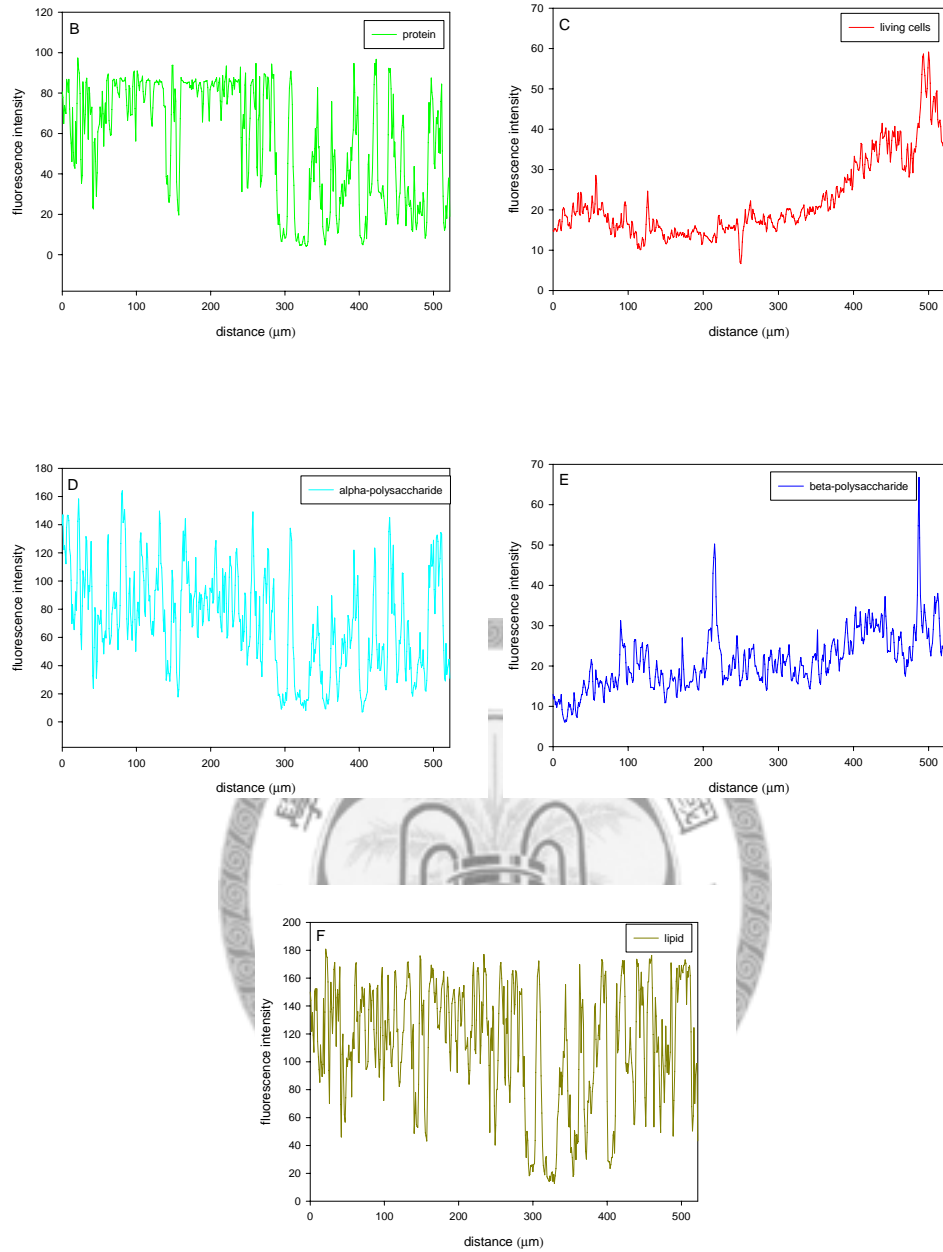


圖4-30 厭氧產甲烷顆粒對照組螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid

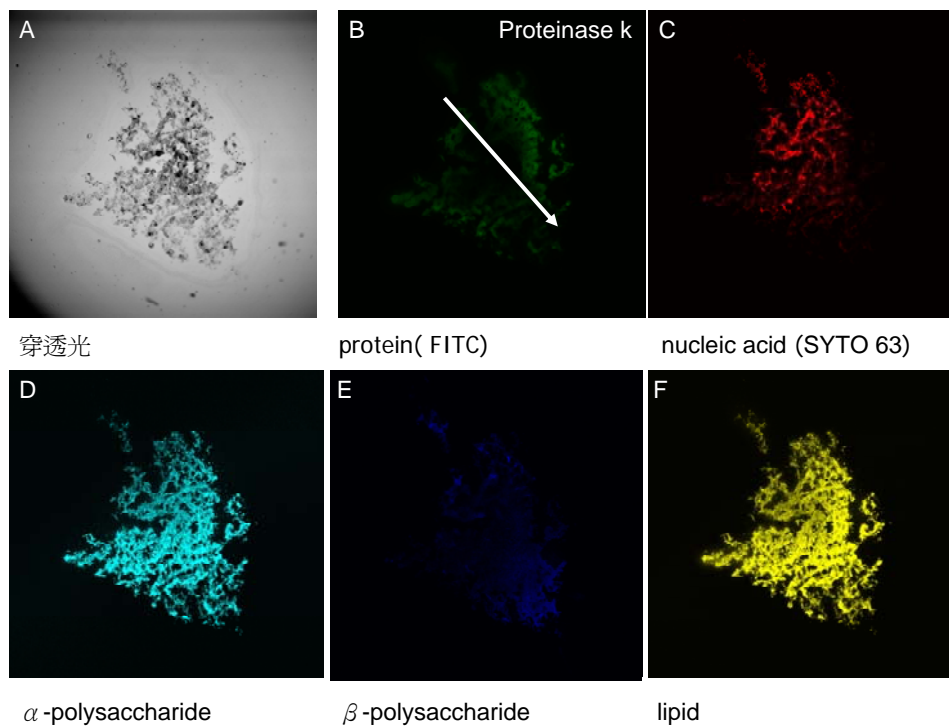


圖4-31 厭氧產甲烷顆粒加proteinase K

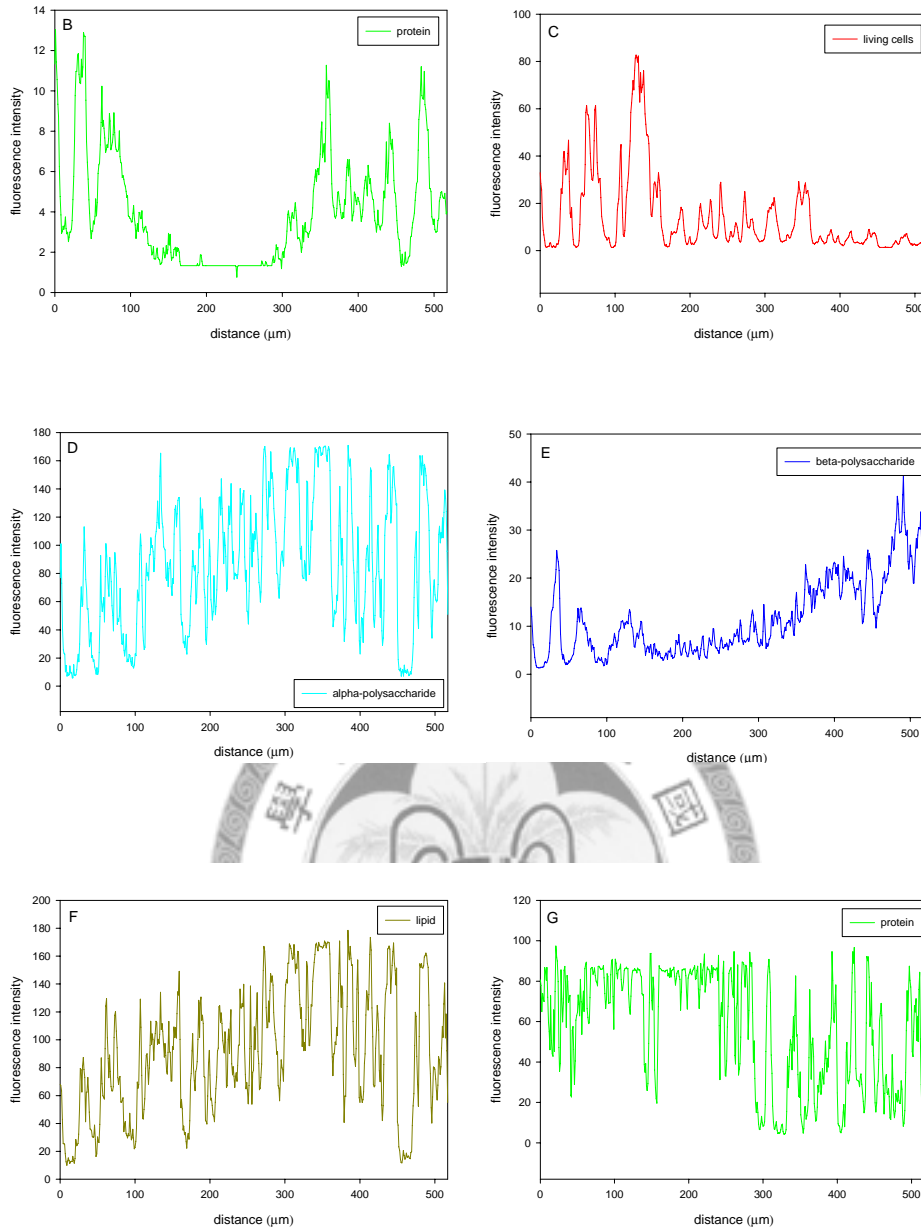


圖4-32 厭氧產甲烷顆粒加proteinase K螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組protein

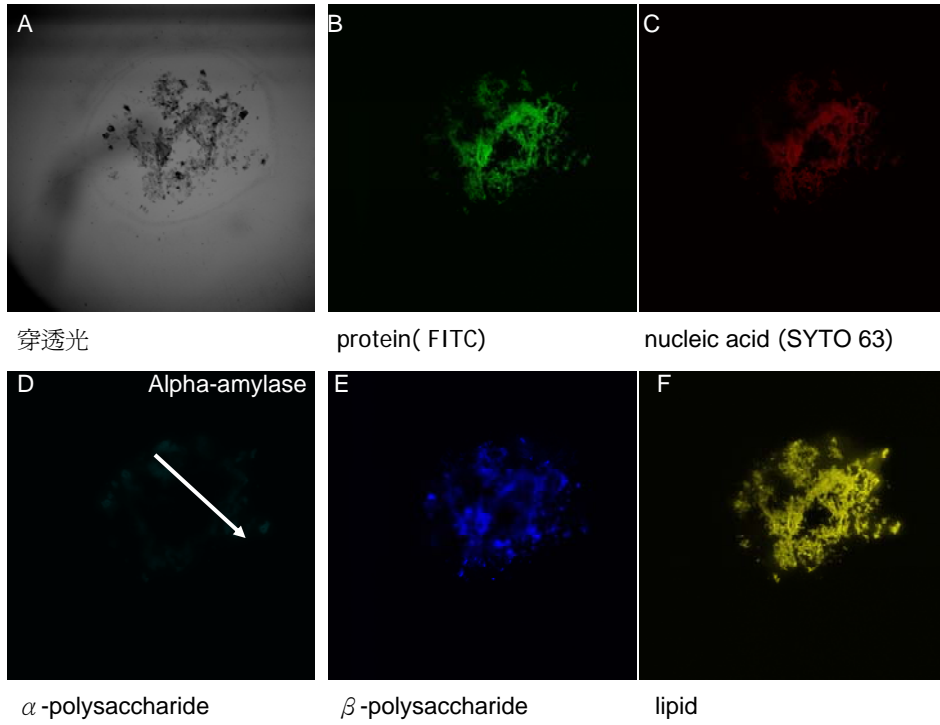


圖4-33 厭氧產甲烷顆粒加 α -amylase

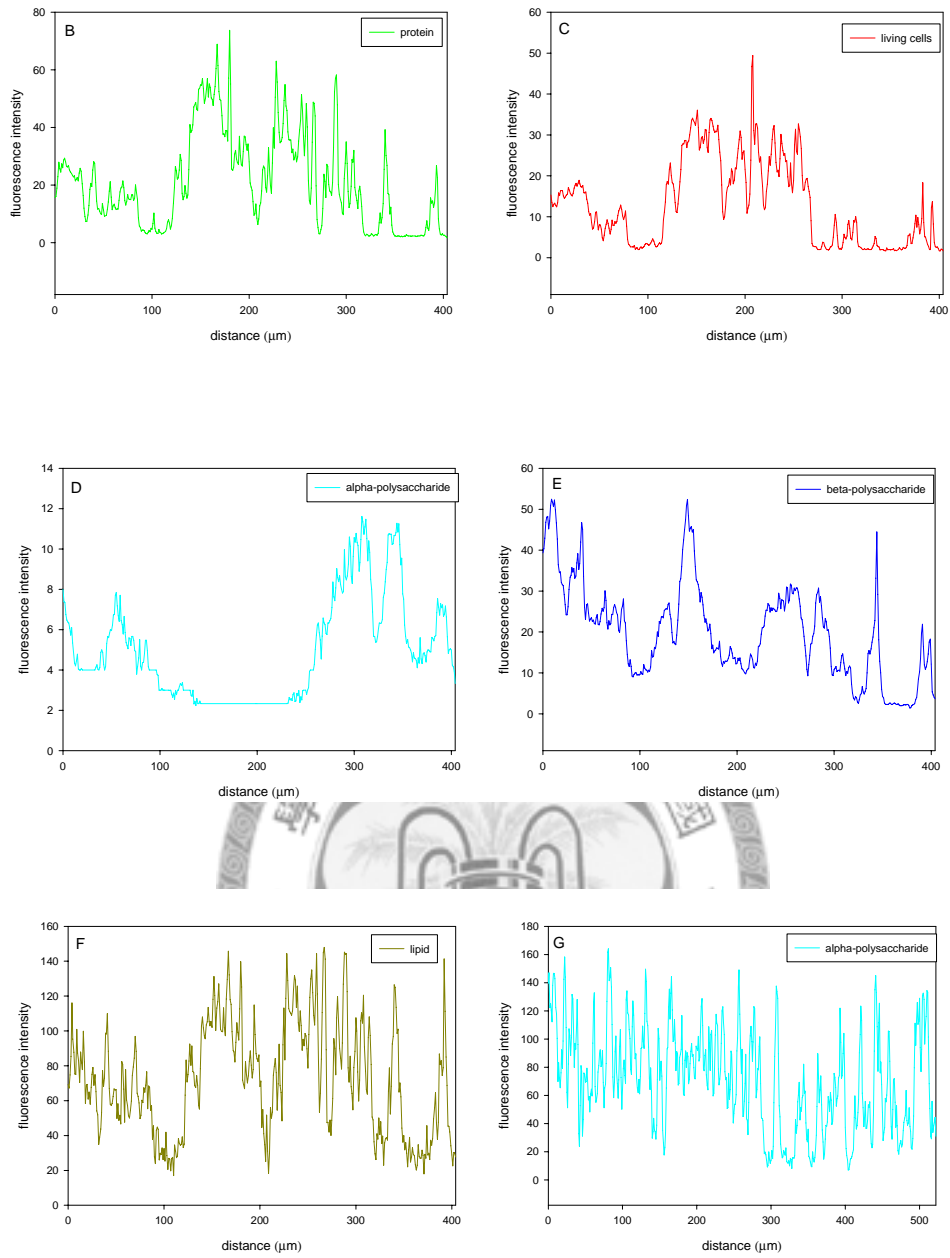


圖4-34 厭氧產甲烷顆粒加 α -amylase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 α -polysaccharide

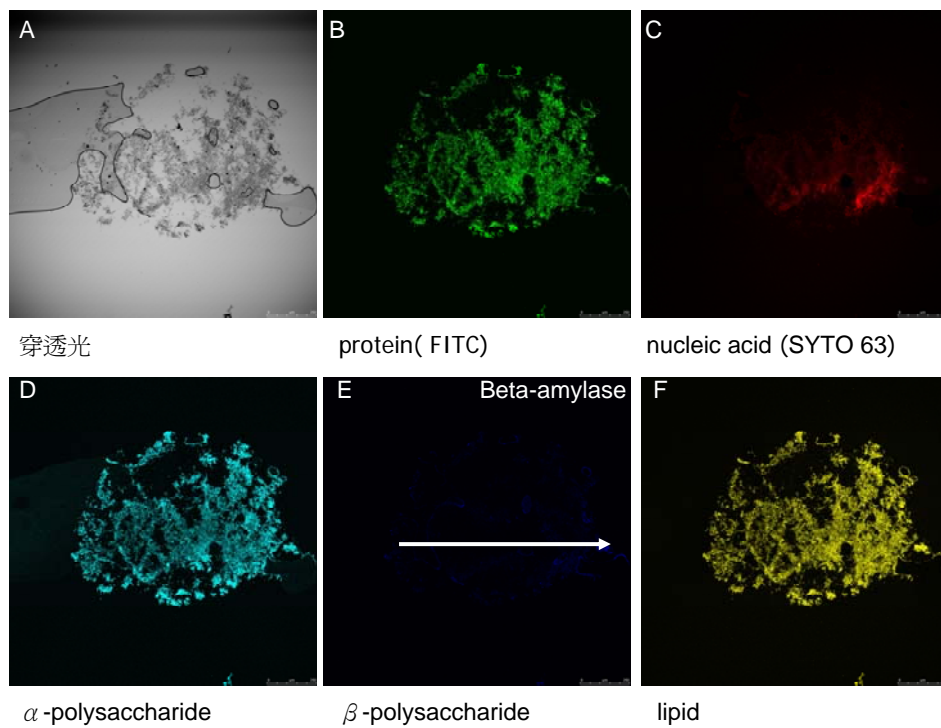


圖4-35 厭氧產甲烷加 β -amylase

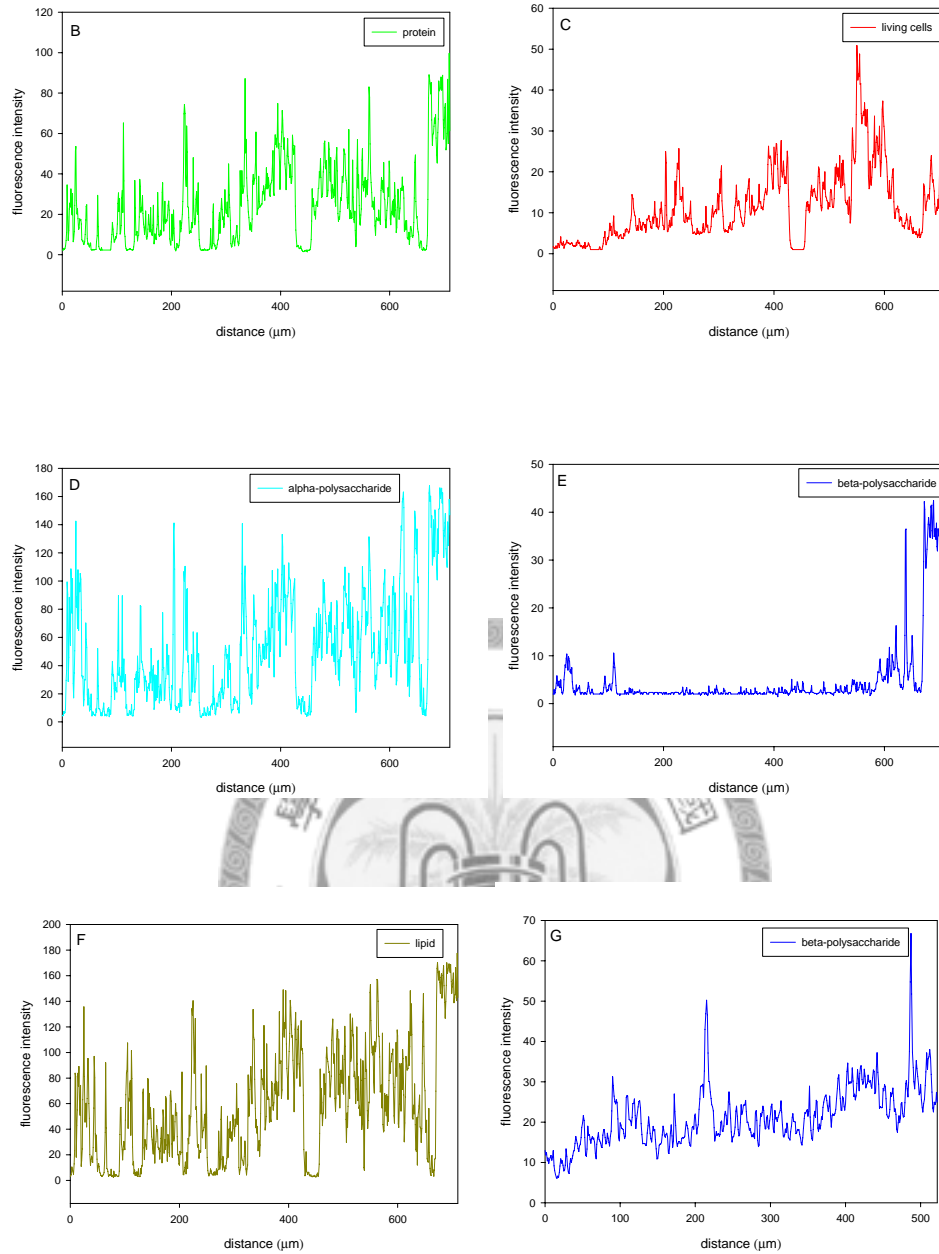


圖4-36 厭氧產甲烷加 β -amylase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

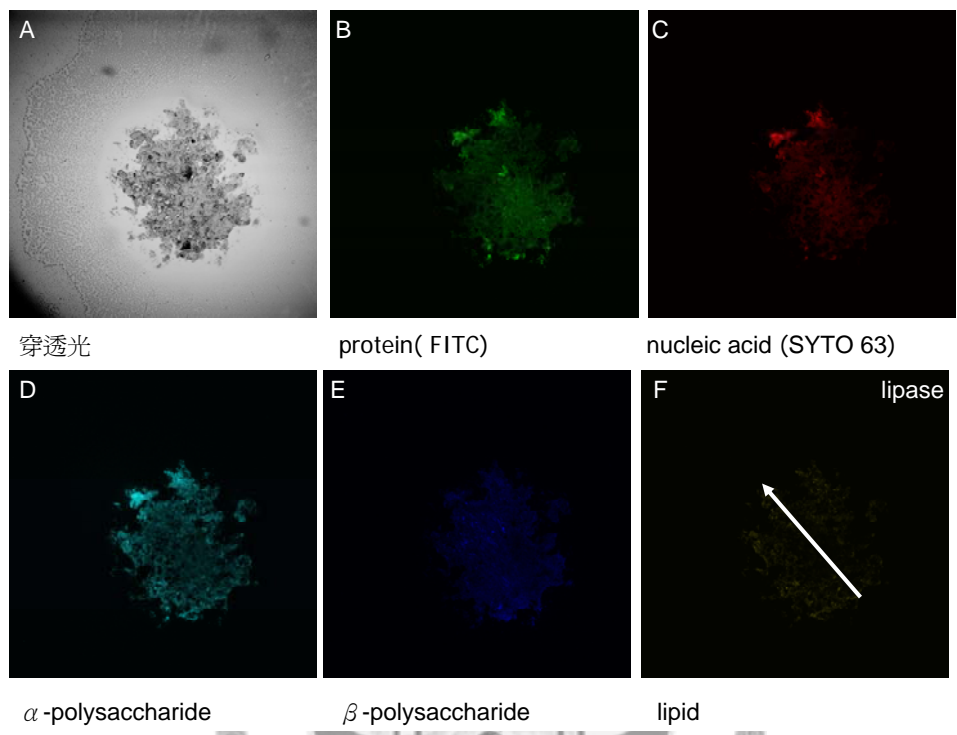


圖4-37 厭氧產甲烷顆粒加lipase

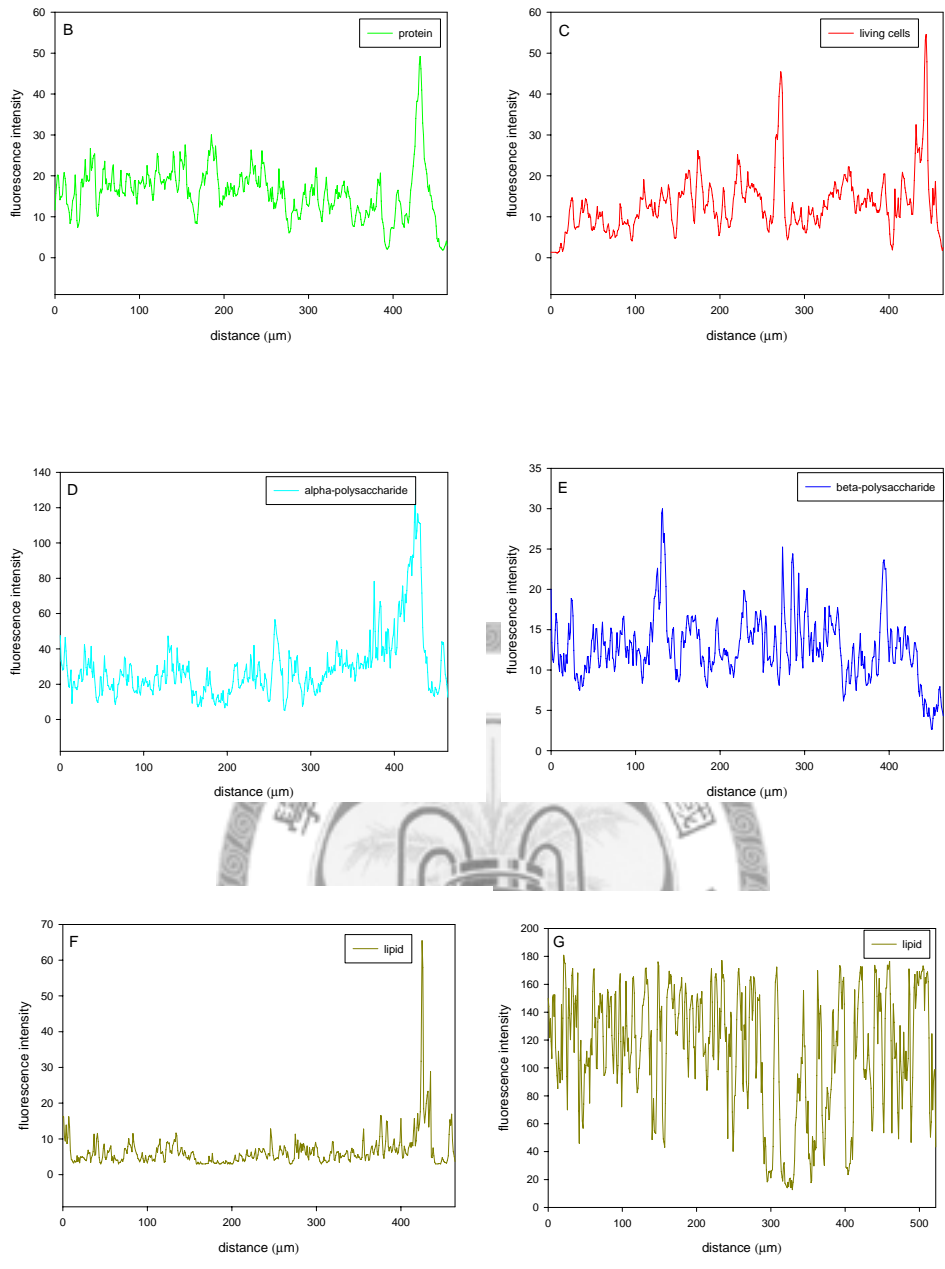


圖4-38 厭氧產甲烷顆粒加lipase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組lipid

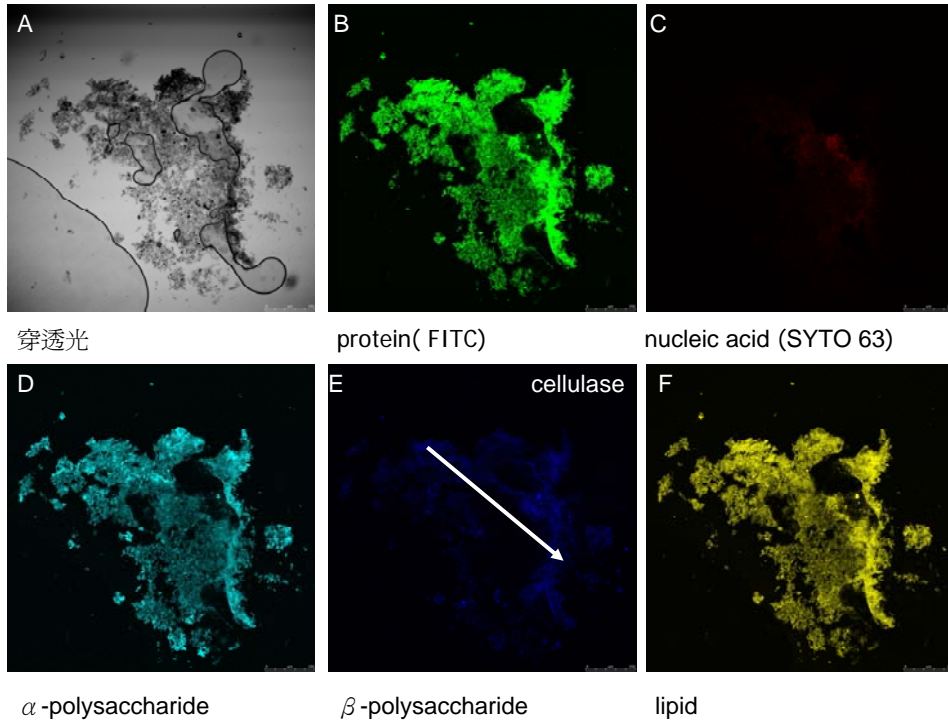


圖4-39 厭氧產甲烷顆粒加cellulase

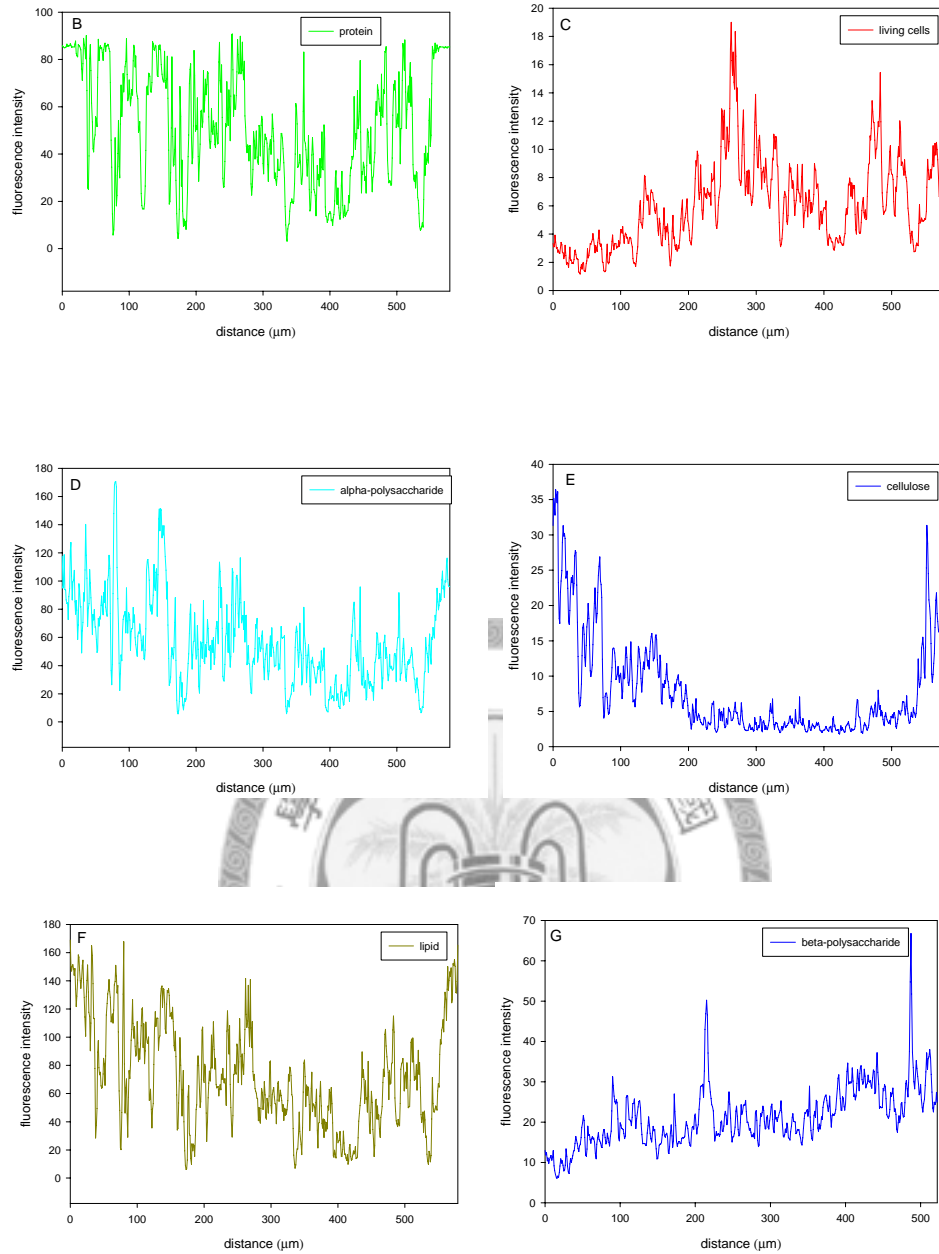


圖4-40 厭氧產甲烷顆粒加cellulase螢光強度分析

(B)protein (C)living cells (D) α -polysaccharide (E) β -polysaccharide

(F)lipid (G)對照組 β -polysaccharide

第五章 結論

生物顆粒內部之細胞外間質包含蛋白質、多醣、核酸、脂質等，形成顆粒體內部之結構，然而文獻中之研究方法只限於量測內部成分，對於結構探討有限。本研究利用同時染五種染劑之方案構思，可提供酵素作用在生物顆粒內部之資訊。

本論文發現，金屬鈣離子、蛋白質、多醣體、脂質、纖維素均不是構成酚好氧顆粒和厭氧產甲烷結構的主要成分。對厭氧產氫顆粒，纖維素遭到破壞會引起顆粒崩解，意謂著纖維素是其內部結構主體。



參考文獻

- 陳明源, 2006. 多重染色方案-胞外聚合物於生物聚集體之分佈, 碩士論文, 國立台灣大學化學工程研究所, 台北
- Bellouti M, Alves MM, Novais JM, Mota M, 1997. Flocs vs granules: Differentiation by fractal dimension. *WATER RESEARCH*. 31(5), 1227-1231.
- Beun, J. J., A. Hendriks., M. C. M. van Loosdrecht., E. Morgenroth., P. A. Wilderer., and J. J. Heijnen., 1999. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 33, 2283–2290.
- Biing-Teo Wong, Kuan-Yeow Show, Ay Su, Rui-jyun Wong, Duu-Jong Lee, 2008. Effect of Volatile Fatty Acid Composition on Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Performance. *Energy & Fuels*. 22, 108–112.
- Characklis WG, Marshall K., 1990. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis WG, Marshall K (eds) *Bio-films*. Wiley, New York, pp 3-15
- Chen, MY., Lee, DJ., Tay, JH., 2007. Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 73(6), 1463-1469.
- Dolfing J., 1987. Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- El-Mamouni R., Leduc R., Guiot SR., 1998. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci Technol*. 38(8-9), 341–347.
- ERIKSSON, L., ALM, B., 1991. Study of flocculation mechanisms by observing effects of a complexing agent on activated-sludge properties. *WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY*. 24(7), 21-28.

- Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen PH., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *WATER RESEARCH*. 30(8), 1749-1758.
- Jiang HL., Tay JH., Tay STL., 2002. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett Appl Microbiol*. 35(5), 439–445.
- Jiang HL., Tay JH., Liu Y., Tay STL., 2003. Ca²⁺ + augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnol Lett*. 25, 95- 99.
- Keweloh H., Heipieper H.J., and Rehm H.J., 1989. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 31, 383–389.
- Lili Zhang, Xinxing Feng, Nanwen Zhuc, Jianmeng Chen, 2007. Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 551–557.
- Liu H., and Fang H.H.P., 2002. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng*. 80, 806-811.
- Liu Y.Q., Liu Y., and Tay J.H., 2004. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol. Biot*. 65, 143-148.
- Matthew JH., John TN., 1997. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J Environ Eng*. 123(5), 479–85.
- McSwain BS., Irvine RL., Hausner M., Wilderer PA., 2005. Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1051–1057.

- Morgenroth, E., T. Sherden., M. C. M. van Loosdrecht., J. J. Heijnen., and P. A. Wilderer., 1997. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 31, 3191–3194.
- Moy BYP., Tay JH., Toh SK., Liu Y., Tay STL., 2002. High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett Appl Microbiol.* 34(6), 407– 412.
- Ohashi A., Harada H., 1994. Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Sci Technol.* 29(10-11), 281-288.
- Peng D., Bernet N., Delgenes JP., Moletta R., 1999. Aerobic granular sludge—a case report. *Water Res.* 33, 890–893.
- Qin L., Tay JH., Liu Y., 2004. Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochem.* 39, 579–584.
- Schmidt JE., Ahring BK., 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sledge blanket (UASB) reactors. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING.* 49(3), 229-246.
- Shin HS., Lim KH., Park HS., 1992. Effect of shear stress on granulation in oxygen aerobic upflow sludge reactors. *Water Sci Technol.* 26, 601–605.
- Sunil S. Adav, Chen MY, Lee DJ, Ren NQ, 2007. Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING.* 96(5), 844-852.
- Sunil S. Adav, Duu-Jong Lee, Joo-Hwa Tay, 2008. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Res.* 42, 1644-1650.
- Tay JH., Liu QS., Liu Y., 2001a. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J Appl Microbiol.* 91(1), 168– 175.
- Tay JH., Liu QS., Liu Y., 2001c. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett Appl Microbiol.* 33(3), 222–226.

- Tay JH., Yang SF., Liu Y., 2002b. Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 332–337.
- Tay JH., Ivanov V., Pan S., Tay STL., 2002d. Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett Appl Microbiol.* 34(4), 254–257.
- Tay JH., Tay STL., Ivanov V., Pan S., Liu QS., 2003a. Biomass and porosity profile in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Lett Appl Microbiol.* 36(5), 297–301.
- Toh SK., Tay JH., Moy BYP., Ivanov V., Tay STL., 2003. Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60, 687–695.
- Urbain V., Block JC., Manem J., 1993. Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach. *Water Res.* 27, 829–38.
- Wang Z.W., Liu Y., and Tay J.H., 2005. Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69, 469-473.
- Zhen-Peng Zhang, Kuan-Yeow Show, Joo-Hwa Tay, David Tee Liang, Duu-Jong Lee, Wen-Ju Jiang, 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry.* 41, 2118–2123.

附錄(一)酵素特性

Proteinase K: an endolytic protease that cleaves peptide bonds at the carboxylic sides of aliphatic, aromatic, or hydrophobic amino acids was utilized for protein hydrolysis tests.

α -Amylase: endohydrolysis of 1,4- α -D-glucosidic linkages in polysaccharides containing three or more 1,4- α -linked D-glucose units. The term ' α ' relates to the initial anomeric configuration of the free sugar group released and not to the configuration of the linkage hydrolysed.

β -Amylase: hydrolysis of 1,4- α -D-glucosidic linkages in polysaccharides so as to remove successive maltose units from the non-reducing ends of the chains. The term ' β ' relates to the initial anomeric configuration of the free sugar group released and not to the configuration of the linkage hydrolysed.

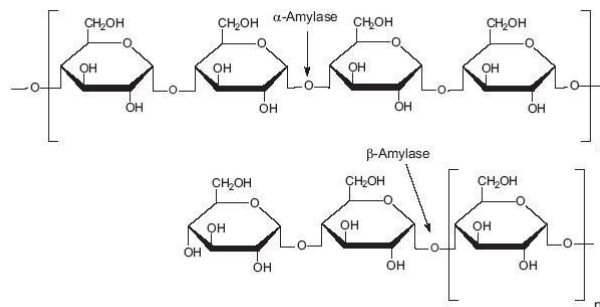


圖 A-1 α -跟 β -amylase 反應位置

Lipase: it was used to enzymatically break down lipids into di- and mono-glycerides, glycerol and free fatty acids.

Cellulase: endohydrolysis of 1,4- β -D-glucosidic linkages in cellulose and liberate glucose from cellulose.

