




行政院環境保護署

108 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛污土 之技術研發

期末報告
(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：國立高雄科技大學／海洋生物技術系
專案主持人：鄭至玉 副教授
專案執行期間：108 年1月4日起至
108 年11 月 30 日止

中 華 民 國 108 年 12 月 印製



利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛汚土之技術研發

主持人 鄭至玉

期末報告(定稿)



行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☐期中報告 ☐修正計畫書 ☒期末報告 **審查意見回覆對照表**

計畫年度	108 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：	鄭至玉 NO：C4
計畫名稱	利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛汚土之技術研發		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 請能補充戴奧辛污染土壤檢測之 QA/AC 資料，以確保胞外菌液體之添加不會影響到戴奧辛檢測，否則無法確定污染土壤是否真是由於胞外酵素之降解而降低戴奧辛之總量或毒性。 2. 請能和國外使用真菌酵素降解戴奧辛之結果比較，才能突顯本研究計畫成果之重要性。 3. 使用之戴奧辛污染土壤之物化特性，請也能補充，因土壤特性可能會影響到降解效率。		1. 感謝委員的提醒，標準曲線與內標驗證之相關 QA/QC 資料以增列於表 31 與表 32。此外，由於加入的酵素於淨化後，連同汚土一併被抽乾萃取分析，因此，此降低現象亦並非吸附造成。 2. 感謝委員的提醒與肯定。的確，學術研究的公開文獻反應時間大多以數周計算（如表 1、表 2），其中只有一篇在 48 小時內完成，然其濃度極低，僅有 6.2 ng/ml。而較具競爭力的案例大多已成立國外實場（整理如表 3）導致實驗數據及資訊封閉匱乏。感謝委員提點，另增列一節 5.5.4 與國外結果相互比較，以凸顯本計畫之重要性。 3. 感謝委員的提醒，已增項”5.4.1 污染土壤基本物化特性分析”。簡言之，汚土平均粒徑約為 0.105~0.250 mm，TOC 和 TN 約為 0.73%與 0.12%；電導率和 pH 分別為 0.16S m-1 和 8.9。	
委員二 1. 利用白腐真菌之胞外酵素有效降低試驗土壤 dioxin 濃度，具突破性。 2. 建議將未來量產規模之生產架構流		1. 感謝委員的肯定。 2. 感謝委員的建議。本計畫結果預計可提供將來以”泛流”等簡易的方式進行	



<p>程列出，但提醒大量生產時 pile agents 是否仍有效降低 dioxin 濃度。</p>	<p>現場處理，但由於液態培養的量產化，還牽涉到醱酵槽體、管線等設計，才能提供適當的培養環境如氧氣與酸鹼度等。雖然本計畫所規劃之培養基質業已考慮到防止菌體酵素弱化的問題，但菌體量化的確還需要費上一番功夫才行。</p>
<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 缺期中報告審查意見回覆情形，請補充。 2. 過去之研究顯示中石化安順廠污染土壤中之戴奧辛物種分布以 OCDD 之含量最高，OCDF 次之，但圖 30 及圖 31 所列各物種分布都以 OCDF 為主，所用以實際測試之中石化污染土壤是否具代表性？宜確認之。 3. 5.4.1 節所列各圖中針對各代號宜有清楚之標示，如 CO、bk、SD...等所指為何？ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員的提醒，已補增列。 2. 感謝委員的提醒，經再次確認，數據確實無誤，亦即此次計畫所實驗之土樣 OCDF 多於 OCDD，造成此差異的實際原因並不清楚。所幸，如圖 30，此系統之胞外酵素無論對 OCDD 或 OCDF 均呈現良好的分解效果，不會因此而降低分解效率。 3. 感謝委員的提醒，已加註“...空白組（水，bk）與污土（Co）...”於圖 28。其於代號請參照 5.2.2。
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本研究中使用之污土來源，及土壤性質差異之可能影響，請說明。 2. 酵素活性是否會影響戴奧辛分解效果上之顯著差異？ 3. 採用生物方式整治污染土壤時，外來 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員的提醒，已增項“5.4.1 污染土壤基本物化特性分析”。 2. 感謝委員的提醒與建議，已使用 SPSS 軟體重新計算皮爾森相關係數分析，且獲得各項顯著性分析值，已增列於如表 28。並確認酵素總活性對與戴奧辛總量的淨化率具顯著高度正相關性，其他描述請詳見 5.4.3。但是如同期中審查報告所描述，此種正相關是來自酵素本身，抑或是不同資材所造成的代謝物分子參與，實在需要更進一步的深入研究，才能一探究竟了！ 3. 外來物種的確會衍生出後續的生態與



<p>物種後續衍生的問題會是考量，請補充看法。</p>	<p>污染問題，因此，本計畫初期試圖篩選更本土、更無害的菇菌類，但由於發現菇菌類（美人豪菇）的酵素與 PC 大異其趣，基於”確定”有效的計畫考量，故以最具可行性的 PC 先做為計畫標的，希望有朝一日可以再試驗完全不同酵素系統的菌菇類，以消彌外來種的相關衍生問題。</p>
<p>委員五</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 針對期中審查委員意見及回覆表亦請予以補列於期末報告定稿中。 2. 結論與建議建請獨立一章節並增加檢討項。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 感謝委員的提醒，已補增列。 2. 感謝委員的建議，已將原 5.6.1 結論與 5.6.2 建議獨立為第六章之 6.1 與 6.2，並增列”6.3 檢討”，內容請詳見期末報告修正版。
<p style="text-align: right;">專案主持人：_____（簽名及蓋章）</p>	



108 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗申請計畫書

一、專案基本資料表

申請編號： (由本署填寫)

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別(單選)	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型		
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他				
申請機構系所	海洋生物技術系				
機構地址	81157 高雄市楠梓區海專路 142 號				
專案主持人	鄭至玉	職等/職稱	副教授		
協同主持人	林啟燦	職等/職稱	教授		
專案名稱	中文	利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛污土之技術研發			
	英文	Investigation of extracellular enzyme of white-rot fungi for the bioremediation of Dioxin-contaminated soil			
	關鍵字	白腐真菌、酵素、多氯戴奧辛、整治			
執行期程	自民國 108 年 1 月 4 日起 ~ 至民國 108 年 11 月 30 日止				
專案主持人	姓名：鄭至玉	E-mail： cycheng@nkust.edu.tw	專線：(07) 3617141-23817 手機：0987383740		
專任助理	姓名：	E-mail：	專線： 手機：		
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估總經費		第一年 申請金額	第二年 申請金額	編列說明
	1.	人事費用	318,000	0	(1~5 項相加之 50%為限)
	2.	貴重儀器使用含維護費	103,394	0	(與計畫實驗相關)
	3.	消耗性器材與主要費用	168,000	0	(與計畫主體相關)
	4.	其它研究相關費用	11,970	0	(含差旅與租賃費用)
	5.	雜項費用	35,000	0	(1~6 項相加之 5%為限)
	6.	行政管理費	63,636	0	(1~5 項相加之 10%為限)
	7.	自籌款	50,000	0	(申請單位自行籌備款項)
	申請補助金額(1~6 項)		700,000	0	總金額：700,000
計畫總金額(1~7 項)		750,000	0	總金額：750,000	

說明：

1. 本署以部份補助為原則，得指定不補助項目，不補助項目應為自籌款項，應自行核銷不得申請。
2. 非實驗性質之專案，若第一項費用編列金額超出比率，須於申請時向本署專簽說明，俾利審查。
3. 補助專案經費編列自申請起經專案核准後，經費編列中各項費用單價與需求只可減少與下修。

專案主持人：鄭至玉 (簽名及蓋章)

日期：2019/1/15



行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會
土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

108 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：108 年 10 月 24 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
申請機構系所	高科大 海洋生物技術系	專案主持人	鄭至玉
專案名稱	利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛汚土之技術研發		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 期末		

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於欄位中。

(一) 學術面

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
A 學術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	1	0	1		(註一)
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	0		(註二)
		(2)研討會論文	1	0	2		(註三)
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告					
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術						
	(2)技術平台						
B 人 才 培 育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士					
		(2)博士					
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊	1	1	1		
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因 或專利、技術轉移 相關詳細資料)
A 智慧 財產 權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申 請 中	發明	1	1	1		(註四)
			新型/設計					
			合計	1	1	1		
B 研 發 技 術 轉 移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	4.技術移轉 (應用技術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
		(2)品種/系(件數)						
C 產 學 研 合 作	6.促成合作 研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額(仟元)						
	8.促成取得 業界科專	件數						
		業界投資金額(仟元)						
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						



(三) 政策面

項目		目標達成程度	申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因或 其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

三、請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果對現況或本署之學術或應用價值。（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500字為限）

白腐真菌胞外酵素對戴奧辛反應的適當條件與可能限制，將可提供學術界了解胞外酵素分解戴奧辛的可能機制。而此計畫之主要技術創新在於利用本土的菌，配合生物回收資材與液態發酵，落實以實務操作的觀點降低生產成本。生化降解法的初設成本相較熱處理法較低，還可以同時規劃解決多類污染物、生資廢料回收等，甚至避免產生廢棄物、能耗、空污、水污等環境二次污染與生態、社會成本等相關問題。此外，大面積污土的整治成功，將有助於當地的土地開發與社區發展，經濟效益龐大。

本計畫除致力於解決本土戴奧辛污染的棘手問題，亦將致力嘗試提出多國專利申請，團隊成員目前已鎖定東南亞國家(越南等)戴奧辛污土案場，持續密切追蹤，若再獲環保署鼎力協助，甚至有機會加速介入海外相關案場，配合政府南向政策拓展本計畫之關鍵核心技術之應用潛力。

**註1:**

黃靖婷、李品柔、黃弘州、Mario Jens Hansen、鄭至玉 (2019) 漆酶生產菌
 菇之篩選、酵素生產與其最適反應活性條件分析。真菌學術研討會暨
 108年度真菌學會年會, 2019/11/2, 台北. (海報詳見附錄1)

註2:

預計投稿至 International Biodeterioration and Biodegradation journal
 “ (impact factor 3.8)

註3:

1. **Chih-Yu Cheng***, Zhi-Feng Zhang, Acharee Kaewlaoyoong and Chitsan Lin.
 (2019) Improved Bioremediation on PCDD/Fs Contaminated Soil by
 Free-Mycelium Liquid Produced with Agro-industrial Residues. Challenges in
 Environmental Science and Engineering (CESE-2019), 2019/11/3~8, National
 Kaohsiung University of Science & Technology, Taiwan. (海報詳見附錄2)
2. **Chih-Yu Cheng***, Zhi-Feng Zhang, Jing-Ting Huang, Acharee Kaewlaoyoong
 and Chitsan Lin (2019) Characterization and potential of extracellular
 multi-enzymes of Phanerochaete chrysosporium for bioremediation of PCDD/Fs.
 The 25th Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community
 (YABEC-2019), 2019/11/22~24, Ewha Womans University, Seoul, Korea.
 (海報詳見附錄3)

註4:

專利申請號：TW108122019

案件名稱: 生物處理劑及其製造方法暨其於含戴奧辛之污染物的應用

性質: 發明專利申請案

申請人：國立高雄科技大學

發明人：鄭至玉/張誌楓/林啟燦/吳子妍/林順富/郭乃彰

(詳見附錄4)



研究成果中文摘要

無論從環境、生態、經濟和社群等各方面綜合觀點來看，運用生化科技整治污染，儼然是綠色且永續導向型（green sustainable remediation, 簡稱 GSR）整治的一種創新典範。由於具強分解木質素能力的白腐真菌對戴奧辛類的持久性有機污染物具有較高分解活性，因此，本計畫主要探討以台灣本土白腐真菌之胞外複合酵素淨化戴奧辛汚土的可行性。

台灣本土 95 件樣品的田野調查分析結果顯示，真菌具有的漆酶活性顯著高於動物與植物，而 8 件市售食用菇的活性，則以美人豪菇最高，經 ITS 基因比對初步鑑定菌種為 *Pleurotus eryngii*。為了降低生產成本，改以農業廢棄資材取代培養基培養白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的研究結果顯示，5 種再生資材包括木屑、米糠、紅茶渣、綠茶渣與咖啡渣除成功降低酵素生產成本之外，以綠茶渣、紅茶渣與咖啡渣所生產的酵素與控制組 PDB 相比較，活性增加約 1.5, 2.4 and 2.3 倍。此胞外複合酵素活性在 pH 5 與 6 有最高過氧化氫酶與去除自由基能力。田口實驗發現，適當有機酸的添加貢獻度高達 66%，而溫度(25-35℃)、1%以內的介面活性劑(Tween、Triton)則較無明顯活性變化，其中丙二酸與蘋果酸的添加可增強酵素活性約 20%。

將未經滅菌、乾燥的污染土壤(PCDD / Fs 濃度為 7100-8000 ng I-TEQ /kg (或約 3-4.75 mg / g) 直接與 *Phanerochaete chrysosporium* 生產的胞外複合酵素以 1:1 混合，並在室溫(約 26±2℃)下進行淨化反應 96 小時。結果發現，各式酵素平均 I-TEQ 去除率可達 49%±6%，其中以咖啡渣再生資材培養 6 天的胞外複合酵素對戴奧辛 I-TEQ 可達 60%，總量去除率高達 91%。由於反應前後，OCDF 與 OCDD 等明顯下降，但 17 種戴奧辛均無明顯增加趨勢，因此初步判定此法是以非專一性的開環方式進行降解，屏除了會有更毒戴奧辛產生的可能性。

分析反應 12-96 小時之間的戴奧辛變化發現，此防治方式在前 12 小時已完成 90%的淨化反應，暗示了再縮短反應時間的可能性。此外，運用木質素過氧化酶(LiP)與錳過氧化酶(MnP)等的介質(mediators)調節特性，添加了一新型介質--硼酸果糖複合體，則又可再一次提高降解效率約 17%，目前業已著手申請專利中。

這提供了以後更易復育戴奧辛汚土，並兼顧節省能耗、減排空污、節省用水與減免廢水、循環使用綠色原物料資材與減廢、提升土地肥力及豐



厚生態多樣性等 GSR 整治，期能儘速實現淨化戴奧辛污土的最佳管理實務。



研究成果英文摘要

As regards to environmental, ecological and social aspects, the use of biochemical technology to remediate dioxin (PCDD/Fs) pollution is more green and sustainable remediation (GSR). White rot fungus degrade the complex and recalcitrant polymer lignin by their ligninolytic enzymes. These enzymes are versatile, extracellular and also able to oxidize various environmental pollutants. Herein, this project mainly explores the bioremediation of the indigenous white rot fungus in Taiwan and its extracellular multiple enzymes to dioxin-contaminated soil.

The field survey of 95 samples from Taiwan showed that the fungi had significantly higher laccase activity than animals and plants. The highest activity of 8 commercially available edible mushrooms is in “the beauty of the oyster mushroom”, and the preliminary identification of the strain by ITS gene is *Pleurotus eryngii*. In order to reduce the production cost, five renewable agricultural waste materials including wood chips, rice bran, black tea residue, green tea residue and coffee grounds was used to cultivate the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. The extracellular multi-enzyme was obtained from the supernatant of 6-day cultivation by five renewable materials. When compared with PDB medium, the total enzyme activity (MnP+LiP) of extracellular multi-enzyme produced by green tea residue, black tea residue and coffee grounds were increased to 1.5, 2.4 and 2.3 times. The optimum pH were pH 5 and 6 for peroxidase and free radical scavenging activities, respectively. Malonic acid and malic acid can enhance the enzyme activity by about 20%; conversely, temperature (25-35°C) and surfactant (Tween 80 or Triton X-100, less than 1%) have no significant influence.

After 6-day of liquid cultivation, extracellular multi-enzyme obtained by centrifugation were used to examine their enzyme activities and to treat the same weight of non-sterilized contaminated soil under $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 96 hours. In comparison with a normal medium (PDB), comparable removal efficiencies by extracellular multi-enzyme cultured with agro-industrial residues were found and the average efficiencies were approximately $49\%\pm 6\%$ for P.C. The highest PCDD/Fs removal efficiency reached 60% by TEQ-concentration unit and 91% by mass-concentration unit by extracellular multi-enzyme cultured with coffee



ground. Besides, OCDF and OCDD were significant decreased and there is no corresponding increasing sign of other dechlorinated dioxins or furans. This results suggest that PCDD/Fs removal mechanism is biased towards oxidation rather than dehalogenative reduction. Besides, the removal efficiency 90% was achieved within the first 12 hours and was increased by 17% by adding borate-fructose complex as mediator. At present, the patent has been applied.

These provides a promising way to regenerate Dioxin soil more easily and to be a good GSR remediation satisfied the best management practice such as saving energy, reducing air pollution, saving water, recycling green raw materials and reducing waste, improving soil fertility and enriching ecological diversity.



目次

目次

圖目錄	5
表目錄	9
一、 前言	11
二、 研究目的	13
三、 文獻探討	15
3.1. 背景與文獻回顧	15
3.1.1 台灣南部安順案場受世紀之毒戴奧辛危害將近整個世紀，亟需積極改善	15
3.1.2. 發展新一代綠色及永續導向型整治（GSR）技術	15
3.1.3. 天生的有機物質分解者---真菌	16
3.1.4.戴奧辛降解先鋒部隊—胞外複合酵素	20
3.1.5 真菌降解戴奧辛之國外實場案例.....	23
3.2. 酵素淨化戴奧辛之可行性、創新性與未來性分析	26
四、 研究方法與過程（含工作進度甘特圖）	29
4.1 實驗架構與計畫構想	29
步驟 1、污土處理	30
步驟 2、白腐真菌胞外複合酵素液體製備	30
步驟 3、淨化反應工程與分析	30
4.2 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	32
4.3 研究方法與步驟	33
4.3.1 研究試劑及設備	33
4.3.2 污染土壤檢測與篩分	34
4.3.3 菌種取得與保存	34
4.3.4 市售菇類酵素活性篩選	35
4.3.5 酵素活性測定	35
4.3.6 田野調查之統計分析方法	36
4.3.7 田口試驗法分析最適酵素反應條件	38
4.3.8 市售菌絲培養與菌種鑑定	39
4.3.9 白腐真菌液態培養方法	40



白腐菌酵素

4.3.10	胞外複合酵素蛋白質電泳	40
4.3.11	淨化反應	40
4.3.12	戴奧辛分析方法	40
4.3.13	有機酸分析方法	41
4.3.14	GC/MS 儀器參數之設定分析	41
4.3.15	戴奧辛檢測方法之品保品	43

五、 結果與討論（含結論與建議） 45

5.1	原生菌菇的篩選與酵素生產能力	45
5.1.1	田間試驗	45
5.1.2	市售菇類酵素活性篩選	48
5.1.3	美人菇的菌絲培養與菌種鑑定	51
5.1.4	美人菇與黃孢原毛平革菌酵素活性比較	54
5.2	以農廢資材生產胞外複合酵素	56
5.2.1	白腐真菌液態培養與酵素分析	56
5.2.2	不同資材對白腐真菌酵素活性影響	57
5.2.3	不同資材對白腐真菌胞外酵素組成影響	60
5.2.4	生產效益表	62
5.3	酵素反應條件測試	63
5.3.1	最適酵素反應條件初步分析	63
5.3.2	最適酸鹼值測試	64
5.3.3	田口試驗	65
5.4	戴奧辛污土淨化測試	69
5.4.1	污染土壤基本物化特性分析	69
5.4.2	淨化測試試驗	69
5.4.3	酵素活性與戴奧辛分解效率關係探討	70
5.4.4	反應產物與反應模式推估	72
5.5	戴奧辛污土淨化條件強化測試	75
5.5.1	界面活性劑與介質對降解效率影響	75

六、 結論與建議 83

6.1	結論	83
6.2	建議	83
6.3	檢討	84



目次

七、 未來展望與未來計畫研究.....	85
八、 參考文獻.....	87
專案成果績效自評.....	93
附件	95
附件 1: 期中審查意見回復表	
附件 2: 國內研討會論文 (真菌學術研討會暨 108 年度真菌學會年會 海報)	
附件 3: 國外研討會論文 (CESE-2019 海報)	
附件 4: 國外研討會論文 (YABEC-2019 海報)	
附件 5: 申請中之發明專利 TW108122019 首頁	





目次

圖目錄

計畫構想示意圖	11
圖 1 木質素（左）、戴奧辛群（POLYCHLORINATED DIBENZO-P-DIOXINS, PCDDs）與呋喃群（POLYCHLORINATED DIBENZOFURANS, PCDFs）之結構圖。由於這些結構上的相似，所以被廣泛認為可以分解木質素就應該可以分解戴奧辛類物質。而白腐真菌就是因為可分解木頭中的木質素而使木頭呈現白色而聞名一類腐生真菌。	17
圖 2 戴奧辛群全代謝圖（KEGG）。預估戴奧辛在生物體內的全代謝包括大量的氧化還原酶（EC 1）、少量的水解酶（EC 3）、裂合酶（EC 4）以及異構酶（EC 5）等，非單類酵素可以獨力完成。（資料整理自 KEGG 網站 HTTPS://WWW.GENOME.JP/KEGG/ ）	20
圖 3 黃孢原毛平革菌（ <i>P. CHRYSOSPORIUM</i> ）對 2,7-雙氯戴奧辛（2,7- DCDD）的代謝途徑圖示（VALLI ET AL., 1992）。顯示藉由 MNP 與 LiP 兩種酵素，戴奧辛將透過氧化開環反應直接被瓦解成毒性較低、較易分解的苯酚衍生物，再繼續代謝分解成二氧化碳。	21
圖 4 漆酶-介質系統酵素 LACCASE MEDIATOR SYSTEM。因為漆酶可藉由介質（例如 ABTS）的參與，間接催化反應各式基質，所以沒有明顯的基質專一性。MNP 與 LiP 也有類似機制，因此推算可進行很多層次的氧化還原反應。	22
圖 5 日本實場試驗的醱酵槽與混合反應槽體	23
圖 6 日本實場的農田（左）與真菌（右）照片	24
圖 7 芬蘭 AALTO 大學實場研究流程與真菌照片	24
圖 8 美國 EARTHFAK 實場分解結果（CELLA: 20% 菌體添加；CELLB:40% 菌體添加）與裝置照片	25
圖 9 加拿大實場的火雞尾巴蘑菇照片	25
圖 10 「利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛污土之技術研發」技術之環境因子核心元素與綠色整治最佳管理實務（BEST MANAGEMENT PRACTICES, BMPs）分析結果，顯示本研究工法預期具有大幅節能、減碳減排、綠色原料、無廢棄物等抑制環境足跡優點，亦具提高土壤肥力與豐富生態性等優勢。	27
圖 11 實驗架構流程圖。	29
圖 12 GC/MS 儀器	42
圖 13 田野調查各類別與酵素活性分佈關係圖。2、3、4、5 各代表真菌(菌絲)、動物、植物以及真菌(子實體)。一個點代表一個樣品的酵素活性。	47



白腐菌酵素

圖 14 市售食用菌菇酵素篩選與黑美人蠔菇。	50
圖 15 蘑菇樣品的 LACCASE 活性比較。1. 鮑魚菇、2. 袖珍菇、3. 黑美人蠔菇、4. 鴻喜菇、5. 白精靈菇、6. 洋菇、7. 金針菇、8. 黑木耳以及 9. 靈芝菌絲體。其中，以未磨碎之 3 號樣品為 100% 活性，約為 OD=0.61。	50
圖 16 生長約三天與三週之美人豪菇 PDA 盤。	51
圖 17 美人豪菇反向定序結果與 <i>PLEUROTUS ERYNGII</i> 、 <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> 基因序列比對圖。	52
圖 18 美人豪菇正向定序結果與 <i>PLEUROTUS ERYNGII</i> 、 <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> 基因序列比對圖。	53
圖 19 黃孢原毛平革菌 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> (左圖)與蠔菇(PP)團聚作用情形。	55
圖 20 白腐真菌培養在木屑(SD)、米糠 RICE BRAN(RB)、紅茶渣 BLACK TEA RESIDUE (BT)、綠茶渣 GREEN TEA RESIDUE (GT) 與咖啡渣 COFFEE GROUNDS (COFFEE)，與 POTATO DEXTROSE (控制組 PDB) 下，不同培養天數與 MNP (上) 及 LiP (下) 變化情形。	57
圖 21 白腐真菌培養在不同資材下培養 4-6 天的 MNP、LiP ((上) 與總酵素 (下) 活性比較圖。液態培養基質包括木屑(SD)、米糠 RICE BRAN (RB)、紅茶渣 BLACK TEA RESIDUE (BT)、綠茶渣 GREEN TEA RESIDUE (GT) 與咖啡渣 COFFEE GROUNDS (COFFEE) 與控制組 POTATO DEXTROSE (PDB)。除了 GT 與 COFFEE (N>5) 之外，其餘數據 N=3。	59
圖 22 白腐真菌培養在不同資材下胞外複合酵素的 SDS-PAGE 分析圖，左圖為 TCA 濃縮後，加水回溶的樣品，右圖則為 TCA 濃縮後，加 GUANIDINE HYDROCHLORIDE 回溶的樣品。主要產出酵素(虛線箭頭所指)預計並非目標酵素，實線箭頭所指分子量與 MNP、LiP 相符合。(MARKER: BIORAD)	60
圖 23 LiP 進行木質素的降解反應時， H_2O_2 是氧的提供者。	63
圖 24 H_2O_2 對白腐真菌 MNP 與 LiP 影響。	64
圖 25 白腐真菌之去除自由基能力、MNP 與 LiP 最適 pH 值。	65
圖 26 試驗控制因子之貢獻度比較圖	66
圖 27 試驗控制因子對 S/N 比的反應圖	67
圖 28 不同液態培養基質生產之胞外酵素對戴奧辛汚土的處理結果。P.C. 以木屑 (SD)、	



目次

米糠 (RB)、紅茶渣 (BT)、綠茶渣 (GT) 與咖啡渣 (COFF) 與控制組 (PDB) 培養 6 天後，其胞外酵素或空白組 (水，BK) 與污土 (Co) 反應 96 小時的戴奧辛比較圖。	70
圖 29 戴奧辛淨化率與酵素活性關係圖	71
圖 30 17 項戴奧辛 (包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃) 的含量變化。	73
圖 31 17 項戴奧辛 (包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃) 的含量比例變化。	74
圖 32 添加界面活性劑 TWEEN 對降解效率影響圖。	75
圖 33 胞外複合酵素的培養天數影響戴奧辛淨化情形。	76
圖 34 胞外酵素處理戴奧辛污土十，戴奧辛濃度與時間變化關係圖。	77
圖 35 添加介質-硼酸果糖複合體對降解效率影響圖。	77





目次

表目錄

表 1 各式木腐菌降解戴奧辛之脫氯步驟、去除效率、反應時間、反應規模整理.....	18
表 2 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> 降解污染物能力與反應條件整理.....	19
表 3 真菌降解戴奧辛之國外實場案例比較圖	26
表 4 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）	32
表 5 實驗用藥品試劑.....	33
表 6 實驗用設備.....	34
表 7 樣本分組及數量表.....	37
表 8 CONTROL FACTORS AND SELECTED LEVELS	38
表 9 ORTHOGONAL ARRAY ($L_9(3^4)$)	39
表 10 氣相層析儀（GC）升溫參數設定	42
表 11 質譜儀升溫參數設定.....	42
表 12 檢測方法品保品管之規定.....	43
表 13 2019 春季 EELAB 田野調查採樣實習活動與菌菇樣品情形.....	46
表 14 各組 LACCASE 活性平均值、標準差統計表	47
表 15 KRUSKAL-WALLIS 檢定平均等級表	48
表 16 KRUSKAL-WALLIS 檢定	48
表 17 無母數 DUNN 事後檢定結果.....	48
表 18 實驗使用之各式市售蘑菇.....	49
表 19 美人豪菇與黃孢原毛平革菌的酵素活性分析比較.....	54
表 20 黃孢原毛平革菌 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> 之分子量介於 25-37 kDa 的酵素整理.....	60
表 21 黃孢原毛平革菌 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> 之 LiP 分子量整理	61
表 22 黃孢原毛平革菌 <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i> 之 MNP 分子量整理	61
表 23 利用咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌之預計生產成本表	62
表 24 利用咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌之預計分解效益表	62
表 25 試驗控制因子與水準表.....	65
表 26 直交試驗統計表.....	65
表 27 因子反應表.....	66



白腐菌酵素

表 28 研究變項之皮爾森相關係數矩陣.....	71
附錄-表 30 污土以不同培養條件之酵素淨化後的 17 項戴奧辛含量變化.....	80
附錄-表 31 VERIFICATION OF INTERNAL STANDARD (LABELED SOLUTION) RECOVERY FOR PCDD/Fs ANALYSIS	81
附錄-表 32 CALIBRATION CURVE VERIFICATION FOR PCDD/Fs ANALYSIS	82

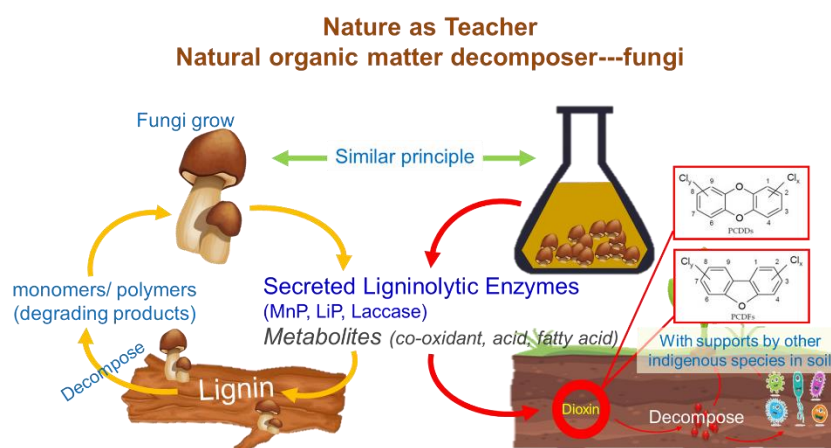


一、前言

一、前言

戴奧辛是約 200 種有毒化合物的總稱，已被世界衛生組織（WHO）列為一級致癌物，曾發生多次污染環境、危害生態甚至食物鏈等問題，所以發展戴奧辛的整治技術，全球不遺餘力。戴奧辛整治處理方法有許多種，包括各類熱處理、物理化學還有生物法。利用物理燃燒法處理戴奧辛的整治技術雖然已達 98% 去除率。然而，無論從環境、生態、經濟和社群等各方面綜合觀點來看，運用生化科技整治戴奧辛污染，儼然是綠色且永續導向型（green sustainable remediation, 簡稱 GSR）整治的一種創新典範。

其中，運用白腐真菌降解戴奧辛，特別受到多國重視及矚目。因為腐生真菌普遍存在於自然環境中進行異營生活，必需分泌分解酵素到環境中(如計畫構想示意圖)，以分解各種有機物質作為自身成長的養分。又因植物纖維中最難分解的木質素與戴奧辛的結構類似，所以咸認具強分解木質素能力的白腐真菌，對戴奧辛類的持久性有機污染物（Persistent organic pollutants, 簡稱 POPs），具有更高分解活性或共代謝（cometabolism）現象。因此，有別於一般常見的生物整治法，本計畫選用木腐真菌取代細菌、以胞外酵素取代體內分解，師法自然以液態醱酵生產酵素去分解環境中的物質，希望能藉此改善微生物因為直接接觸戴奧辛，而受到戴奧辛減緩生物體生長以及降低分解速率的影響，進而增進生物整治的效用以及經濟效益。在復育戴奧辛污土之餘，更能兼顧節省能耗、減排空污、節省用水與減免廢水、循環使用綠色原物料資材與減廢、提升土地肥力及豐厚生態多樣性等 GSR 整治，期能儘速實現淨化戴奧辛污土的最佳管理實務。



計畫構想示意圖



白腐菌酵素



二、實驗目的

二、研究目的

本計畫最終目的在利用白腐真菌胞外酵素處理戴奧辛污染土壤之生物復育，評估白腐真菌之複合胞外酵素與戴奧辛污染土壤混合後，對於土壤中戴奧辛降解之影響。此外，為了符合將來模廠的應用，研發過程的重要考量還包括：1)、原生菌種的酵素分析；2)、降低生產成本的酵素生產方法開發；3)、增進酵素效率的開發等。

為了得到較有利的本土木腐真菌，進行了一場田間試驗以及購入8件市售食用菇，分析相關酵素的強弱分布情形，最後以可以自動形成圓型聚集體的黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 作為主要研究對象。再以5種綠色循環資材取代 PDB 成功降低生產成本、以田口試驗找出酵素最佳反應條件，最後，與無滅菌的乾燥污土以 1:1 室溫下反應 96 小時，找出一最佳降解條件，成功降解戴奧辛達 67% TEQ，並提出此條件之相關專利申請。



白腐菌酵素



三、文獻探討

三、文獻探討

3.1. 背景與文獻回顧

3.1.1 台灣南部安順案場受世紀之毒戴奧辛危害將近整個世紀，亟需積極改善

戴奧辛類毒化物，是 210 種化學物質的總稱，包括 75 種的多氯二聯苯類戴奧辛（polychlorinated dibenzodioxins 或稱 Polychlorinated dibenzo-p-dioxins，簡稱 PCDDs），以及 135 種多氯二聯苯類呋喃（polychlorinated dibenzofurans，或稱 Polychlorinated dibenzofurans，簡稱 PCDFs）之統稱。戴奧辛是一種在工業過程中所產生的污染物，除少數研究外，並無實際用途。他們可以在碳、氧、氫、氯的存在下配合適當環境而產生，例如當有機物質在含有氯的環境下燃燒，就可能產生戴奧辛類物質。目前已有許多文獻證實戴奧辛對人體健康的危害，除了引起免疫系統調節功能障礙外（Fewer, 2003），又由於戴奧辛在體內不易代謝長期累積在脂肪細胞中，隨著侵入 DNA 分子誘發突變，由此具有致畸與致癌作用，被世界衛生組織列為一級致癌物（WHO, 1997），也是環境荷爾蒙中的頭號黑名單。位於台灣南部的台鹼安順廠污染案受到極大的關注，戴奧辛威脅為害生態與人體健康近整個世紀（Chang 等，2015），推估因此受污染的土壤與底泥至少有 52 萬公噸，受污染的陸域與水域面積超過 37 公頃，截至目前為止尚未整治完成。

3.1.2. 發展新一代綠色及永續導向型整治（GSR）技術

淨化戴奧辛污染環境的方法主要有(1)熱處理法、(2)物理化學法、(3)生物整治法等三大類。其中，生物性處理法是指以微生物、植物或動物等生物方法來降解戴奧辛，以最不影響環境的情況下加速自然淨化的時間，處理的成本也比熱處理或物理化學處理技術便宜許多（Nam et al, 2008）、更節能、更減排、更節水、更減廢。又因為此方法可避免對環境的二次污染，所以對於大面積、低劑量的污染更具意義。雖然以微生物處理戴奧辛的機制複雜、速度往往比熱處理法或物理化學法稍慢，但由於生物整治的終產物為二氧化碳、水及對於環境影響較小之化合物（Baker DB et al., 1994），已為歐美日等環保先進國家視為新穎性的綠色且永續導向型整治技術方案。生物處理 PCDD 污染降解過程，不僅在實驗室已被證實可行，近年來也陸續有一些中小規模的先導模廠正在進行中（Ishiguro et al., 2000; Schultz et al., 2001;



白腐菌酵素

Kimura and Urushigawa, 2001; Gesell et al., 2004; Chang, 2008)。無論是以經濟或是生態的角度來看，都是個永續且具潛力的作法。其特點還包括：(1) 可應用於就地(in situ)處理，免除開挖與運輸工程的耗能與空污等碳足跡、(2) 直接將毒化物降解成低毒物質或無毒物質，無二次污染的疑慮、(3) 因為屬於自然界原有的生物性處方，對環境不會造成負擔等優點。

本研究將利用真菌胞外複合酵素處理戴奧辛污土，保持一般微生物整治的優點之外，更擬彌補一般以生物體進行生物整治時冗長耗時的缺點。相關設計理念、參考可行的文獻與理論等論述如下。

3.1.3. 天生的有機物質分解者---真菌

許多真菌可以腐生的型式進行異營性生活，所以會外泌分解酵素參與環境中有機物質分解過程，並以這些分解後的小分子產物作為自身成長的養分。因此，若能有效利用這些真菌的分解酵素，不僅將有利於大自然界的物質循環，還可以促進環境如污土中的減毒反應。

異營性的真菌在生態系中除了扮演著有機物質分解的重要角色之外，有些真菌還具有很好的金屬蓄積功能(hyperaccumulators)，這些分解特性與耐受特性讓真菌對於分解環境污染物上具有一定的潛力。

目前已經有一些研究報告指出，真菌和細菌一樣可以降解或脫氯戴奧辛。一些常見的環境分解真菌，例如木腐真菌(整理如表一)、糞腐真菌(shite-rot fungi. United States Patent US4891320A)等都有降解戴奧辛功能。其中，植物纖維中最難分解的木質素(如圖 1)為六碳環連結而成的長鏈碳氫有機化合物，在結構上與戴奧辛的基本架構類似，而木腐真菌中的白腐真菌又因可分解木頭中的木質素而使木頭呈現白色而聞名，所以咸認具強分解木質素能力的“白腐真菌”具有更高相關分解活性或共代謝(cometabolism)現象。而白腐真菌中又以 *Phanerochaete chrysosporium* 降解污染物的能力最被廣為研究(整理如表二)。



三、文獻探討

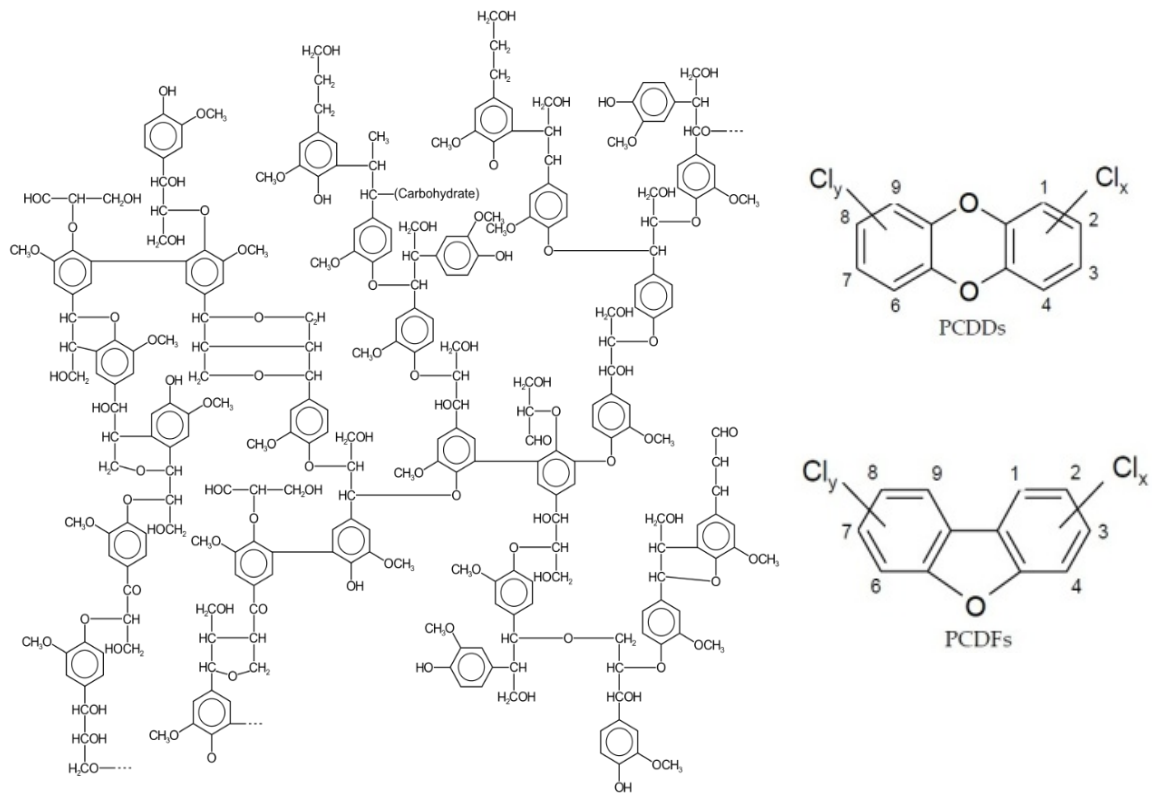


圖 1 木質素（左）、戴奧辛群（polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs）與呋喃群（polychlorinated dibenzofurans, PCDFs）之結構圖。由於這些結構上的相似，所以被廣泛認為可以分解木質素就應該可以分解戴奧辛類物質。而白腐真菌就是因為可分解木頭中的木質素而使木頭呈現白色而聞名一類腐生真菌。



白腐菌酵素

表 1 各式木腐菌降解戴奧辛之脫氯步驟、去除效率、反應時間、反應規模整理

Fungal strain	Degradable xenobiotics	Initial concentration	Removal Efficiency	Duration time	References
<i>Trametes versicolor</i> H-1051	Polychlorinated biphenyls (PCBs)	1,800 mg/L	72.3%	10 days	Ruiz-Aguilar et al., 2001
<i>Lentinus edodes</i> H-925		600 mg/L	70.4%		
<i>Panellus stypticus</i> strain 99-334	2,7-dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (2,7-DCDD)	10 µM	> 98.0%	40 days	Sato et al., 2002
<i>Phlebia brevispora</i> TMIC33929	CNP herbicide 1,3,6,8-tetraCDD (in herbicide)	1 g/100 mL 180 µg/g	28% 84%	28 days	Kamei and Kondo, 2006
<i>fungi</i> 267 (screened fungi)	OctaCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8-PeCDD 2,3,7,8-TeCDD OctaCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 2,3,4,7,8-PeCDF 1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,7,8-TeCDF	61.5 pg-TEQ/kg	5% 7% 18% 10% 28% 10% 5% 8% 20% 12% 22% 5% 12% 23% 21% 28% 58%	30 days	Tachibana et al., 2007
<i>fungi</i> PL1 (screened fungi)	2,3,7,8-TeCDD 1,2,3,7,8-PeCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OctaCDD 2,3,7,8-TeCDF 1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,4,7,8-PeCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OctaCDF		- 76.3% 75.6% 79.4% 79.3% 79.0% 79.0% 80.0% - - - 100.0% 100.0% - 82.3% 70.2% 100.0% 67.4%	30 days	
<i>Bjerkandera adusta</i> <i>Anthracophyllum discolor</i>	Pentachlorophenol (PCP)	100 mg/kg	82% 90%	28 days	Rubilar et al., 2007
<i>Trametes versicolor</i>	Pentachlorophenol (PCP)	1,043 mg/kg	70%	7 weeks	Ford et al., 2007
<i>Irpex lacteus</i> (low-nitrogen mineral medium)	Phenanthrene Anthracene Fluoranthene Pyrene	- - - -	9.7% 22.3% 79% 83%	50 days	Cajthaml et al., 2008
<i>Pseudallescheria boydii</i>	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (2,3,7,8-TCDD)	6.2 ng/ml	86.7%	48 h	Ishii et al., 2008
<i>Phlebia brevispora</i>	1,3,6,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (1,3,6,8-TCDD)	-	50%	90 days	Kamei et al., 2009
<i>Phlebia lindtneri</i> <i>Phlebia brevispora</i> <i>Phlebia aurea</i>	Organo-pesticide trans-chlordane	25 µmol/L	64% (in PDB medium) >50% (for low N medium)	42 days	Xiao et al., 2011
<i>Gymnopilus luteofolius</i> <i>Stropharia rugosoannulata</i>	PCDD/Fs	72,960 ± 13,400 ng-TEQ/kg (WHO)	69.3 ± 6.6% 60.8 ± 1.6%	3 months	Anasonye et al., 2014



三、文獻探討

表 2 *Phanerochaete chrysosporium* 降解污染物能力與反應條件整理

可降解之化學物質	初始濃度	去除效率	時間	參考文獻
Pentachlorophenol (PCP)	30 mg/L	76%	15 days	Won Ryul Ryu et al., 2000
Simazine Trifluralin Dieldrin	10 mg/kg ⁻¹ soil	34~48% 0~30% 40~46%	12 weeks	Silvia Fragoeiro et al., 2008
Polychlorinated Biphenyl (PCB)	600 to 3000 mg/L	34~73%	10 days	Graciela M.L. Ruiz-Aguilar et al., 2002
2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin (2,7-DCDD)	100 µM	50%	27 days	Valli et al., 1992
2,3,7,8-Tetra CDD 1,2,3,7,8-Penta CDD 1,2,3,4,7,8-Hexa CDD 1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDD Octa CDD 2,3,7,8-Tetra CDF 1,2,3,7,8-Penta CDF 1,2,3,4,7,8-Hexa CDF 1,2,3,4,6,7,8-Hepta CDF Octa CDF	5 µg/L	37.1 ± 5.9% 53.9 ± 6.8% 64.9 ± 5.7% 53.6 ± 7.9% 41.1 ± 7.6% 27.3 ± 8.0% 38.5 ± 5.7% 54.7 ± 6.1% 51.9 ± 7.1% 58.6 ± 12.3%	14 days	Takada et al., 1996
Polychlorinated Biphenyl (PCB)	3000 mg/L	32.60%	10 days	Ruiz-Aguilar et al., 2002
Pentachlorophenol (PCP)	30 mg/L	80%	30 days	Shim and Kawamoto, 2002
Phenanthrene Pyrene Benzo[a]pyrene	10 mg/kg	72.8 ± 1.4% 51.2 ± 6.6% 25.5 ± 3.4%	19 days	Wang et al., 2009
PCDD/Fs	72,960 ± 13,400 ng-TEQ/kg (WHO)	67.2 ± 2.6%	3 months	Anasony et al., 2014

由於很多食用菌菇也屬白腐真菌，為了有效避免生物整治後造成的有害微生物或外來菇種肆虐，整理了具有分解戴奧辛能力且在台灣本土有分佈的包括：鱗皮扇菇 *Panellus stypticus* (Sato et al., 2002)、皺環球蓋菇 *Stropharia rugosoannulata* (Winqvist et al., 2014)、糙皮側耳平菇 *Pleurotus ostreatus*、乳白耙菌 *Irpex lacteus*、烟管菌 *Bjerkandera adusta*、雲芝 *Trametes versicolor*、朱紅密孔菌 *Pycnoporus cinnabarinus* (Cajthaml et al., 2008) 等。此外，本計畫做了一次田野調查，檢測田間常見子實體的酵素活性，以期這些本土菌菇將可做為未來計畫研究應用的標的。



白腐菌酵素

3.1.4.戴奧辛降解先鋒部隊—胞外複合酵素

戴奧辛在生物體內的代謝路徑如圖 2，預估整個全代謝包括大量的氧化還原酶 (EC 1)、少量的水解酶 (EC 3)、裂合酶 (EC 4) 以及異構酶 (EC 5)。利用生物體降解戴奧辛，除了須具備這些酵素之外，還要可以吸收戴奧辛以及承受戴奧辛的類激素干擾，所以雖然戴奧辛對很多微生物無立即性的危害，但仍會減緩其生長。因此，若以微生物釋放出的胞外酵素與戴奧辛反應進行分解，即可避免戴奧辛與菌體的正面交鋒。此外，利用專一性低或具有介質系統的酵素，則可解決基質複雜、代謝複雜的情況。

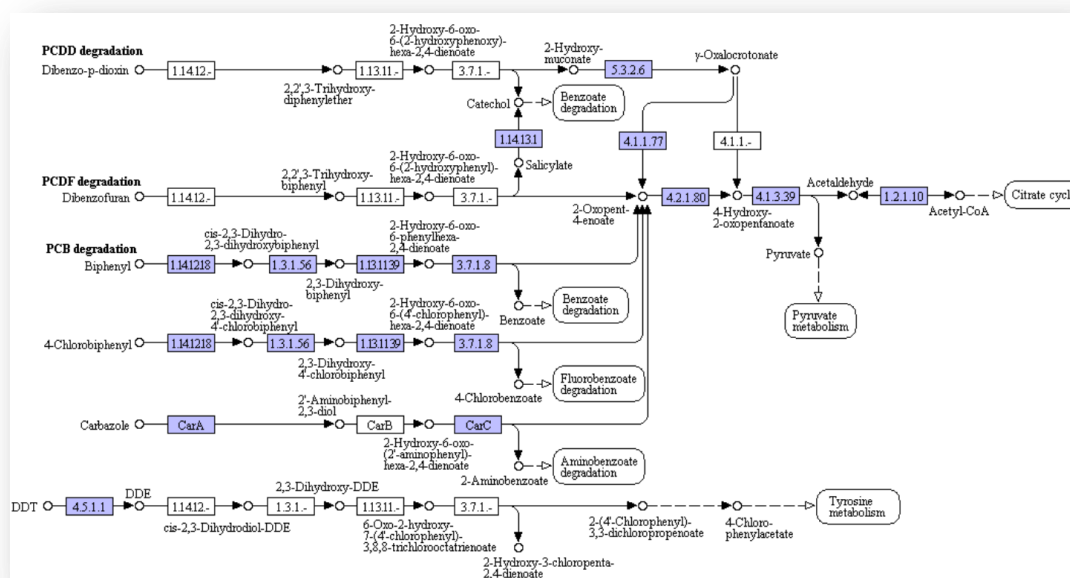


圖 2 戴奧辛群全代謝圖 (KEGG)。預估戴奧辛在生物體內的全代謝包括大量的氧化還原酶 (EC 1)、少量的水解酶 (EC 3)、裂合酶 (EC 4) 以及異構酶 (EC 5) 等，非單類酵素可以獨力完成。(資料整理自 KEGG 網站 <https://www.genome.jp/kegg/>)

一般來說，白腐真菌透過各種木質素分解機制來消化分解結構複雜的木質素 (Kersten and Cullen, 2007; Singh and Chen, 2008)。所以這些微生物可以分泌大量不同的酶到環境中，例如水解酶 (纖維素酶，果膠酶，木聚糖酶) 和木質素降解酶 (木質素過氧化酶 lignin peroxidase (LiP)，錳過氧化酶 manganese peroxidase (MnP) 和漆酶 laccase) (Teerapatsakul et al., 2007) 等。尤其是木質素過氧化酶和錳過氧化酶已被研究證實為降解各種環境污染物的重要酵素 (Mori and Kondo, 2002 a,b; Singh, 2006; Pinedo-Rivilla et al., 2009; Wang et al., 2009)。 *P. chrysosporium* (P.C.) 對 2,7-雙氯戴奧辛 (2,7-DCDD)



三、文獻探討

的代謝途徑在 1992 年 (Valli et al., 1992) 被公開提出如圖 3。其中顯示藉由 MnP 與 LiP 兩種酵素，戴奧辛將透過氧化開環反應直接被瓦解成毒性較低、較易分解的苯酚衍生物，再繼續代謝分解成二氧化碳。由於戴奧辛的結構多樣，加上 MnP、LiP 與 laccase 均為介質 (mediator) 系統酵素 (如圖 4)，可藉由介質的參與催化各式基質，不會受限於專一性，因此第一時間將生成各式中間產物包括苯酚衍生物等，並隨著反應時間的增加繼續裂解成更小的分子。

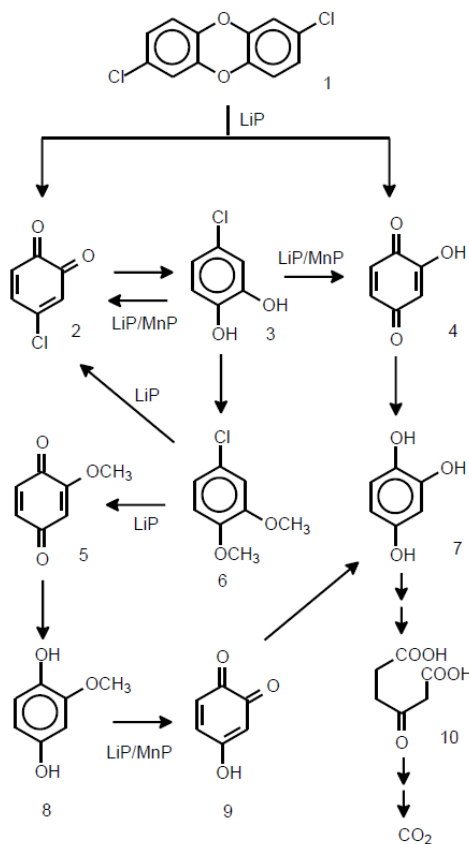


圖 3 黃孢原毛平革菌 (*P. chrysosporium*) 對 2,7-雙氯戴奧辛 (2,7-DCDD) 的代謝途徑圖示 (Valli et al., 1992)。顯示藉由 MnP 與 LiP 兩種酵素，戴奧辛將透過氧化開環反應直接被瓦解成毒性較低、較易分解的苯酚衍生物，再繼續代謝分解成二氧化碳。



白腐菌酵素

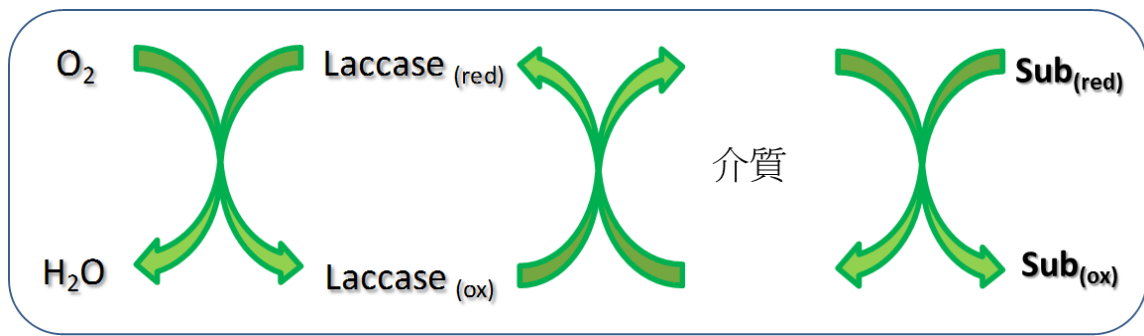


圖 4 漆酶-介質系統酵素 Laccase Mediator System。因為漆酶可藉由介質（例如 ABTS）的參與，間接催化反應各式基質，所以沒有明顯的基質專一性。MnP 與 LiP 也有類似機制，因此推算可進行很多層次的氧化還原反應。

依據美國農業部國家農業圖書館 2014 年 NAL 詞彙表的定義，相對於褐腐真菌，白腐真菌是能夠降解木材中纖維素、半纖維素和木質素的真菌。淺言之，白腐真菌是一類能使木材腐化成為淡色海綿狀的真菌，因為是從功能角度對生物進行描述和界定，不屬於生物系統分類學的範疇術語，因此它既不專指某一種真菌也不是泛指某一些真菌。因此，除了確切菌株的不確定性之外，連生長條件，都可能造成其功能的變異。例如不同培養條件，可能影響相關分解酵素如 MnP、LiP 與 laccase 等的分泌狀況。故其關鍵，乃在評估並且找出適合的真菌，依污染案場環境狀況，及適當誘導條件的培養環境，促進其降解戴奧辛汚土能力。



三、文獻探討

3.1.5 真菌降解戴奧辛之國外實場案例

利用真菌分解戴奧辛的研究很多，但大部分均受限於整治經費與時程，所以以真菌分解戴奧辛的實場案例並不多見，目前找到較具規模的有美國 EarthFax Engineering Group、加拿大 Yukon 案場、芬蘭與日本研究文獻等，其中，日本案例 A 是以胞外液體酵素處理，與本案的做法最為類似。雖然，本計畫尚未進入模廠階段，但將會以這參數作為實驗的參考指標，為未來的模廠做準備。可交互參考的案例分析如下：

(1)、日本實場案例 A

齋藤祐二等人(2006)萃取白腐真菌酵素用以降解戴奧辛。在醱酵槽(如圖 5)控制氧氣含量、酸鹼值等培養真菌。分離真菌所分泌的酵素後，在混合反應槽體中 10 mM Malonic acid, MnSO_4 與 H_2O_2 ，並控制 pH 在 4.0 與 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，可在 1 小時內快速將土壤中多氯聯苯 (PCBs) 去除 84%，對 PCDD、PCDF 效果則更好。PCDD、PCDF、PCB 的總體初始濃度約 497.3 ng-TEQ/kg。



圖 5 日本實場試驗的醱酵槽與混合反應槽體

(2)、日本實場案例 B

橘燦郎(2009)用自行篩選出來的木腐菌(菌種未揭露)，以 7% 菌量添加於受污染稻田中，如圖 6 所示處理 30 天後，戴奧辛去除率達 90%。作者預計至少可以處理 1000 ngTEQ/kg 的污染土壤。



白腐菌酵素



圖 6 日本實場的農田（左）與真菌（右）照片

（3）、芬蘭研究案例

芬蘭 Aalto 大學的 Winqvist 等人（2014）利用大球蓋菇 *Stropharia rugosoannulata* 及白腐白蠟真菌 *Phanerochaete velutina* 處理污染土壤，如圖 7 所示。在 1:1 菌體土壤比例添加、室內通氣控濕度反應 3 個月的情況下，16 種 PAH 總量 400 mg/ kg 的分解率為 94%（Winqvist et al., 2014）；戴奧辛的分解率較差，約為 64%（[網路資料](#)），詳細資料付之闕如。



圖 7 芬蘭 Aalto 大學實場研究流程與真菌照片

（4）、美國 EarthFax 實場

美國 [EarthFax](#) Engineering Group 是一家工程顧問公司。他們根據年 Takada（1996）的研究，利用 *Phanerochaete sordida* 的對戴奧辛降解發展出



三、文獻探討

一 2 立方碼（約 1500 公升）的實場操作。添加 20% 與 40% 真菌培養木屑於污土，反應 282 天（約 10 個月），可將 15 ppb-TEQ 污土分解成 5 ppb-TEQ（如圖 8），分解率約為 65%。

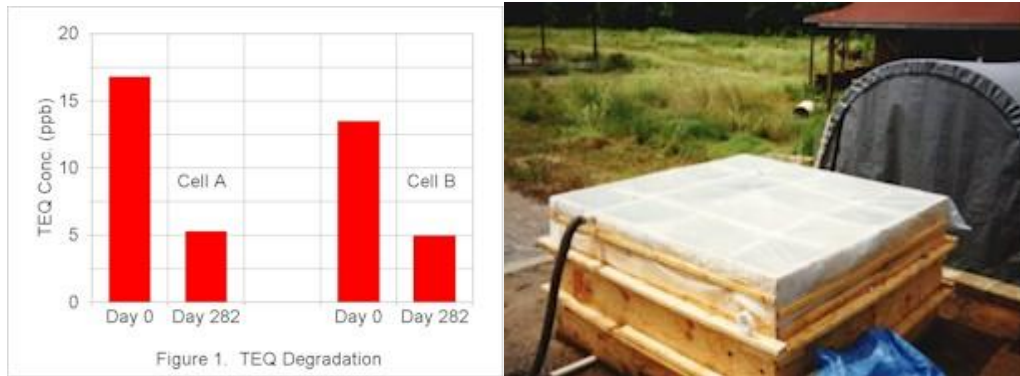


圖 8 美國 EarthFax 實場分解結果（CellA: 20% 菌體添加；CellB:40% 菌體添加）與裝置照片

（5）、其他相關：加拿大 Yukon 實場案例

Kawina Robichaud 等人(2013)在 Yukon 利用火雞尾巴蘑菇 *Trametes versicolor* (turkey tail mushroom)（如圖 9）與鮑魚菇 (*Pleurotus ostreatus*) 配合柳樹與堆肥處理石油烴污染的土壤 (petroleum-hydrocarbon contaminated soils)。其中，火雞尾巴蘑菇強大的酵素系統，還可以有效地分解含氯化合物。使用該系統的好處是它不需要任何化學品或肥料添加來分解污染物，可大量減少碳足跡。



圖 9 加拿大實場的火雞尾巴蘑菇照片



白腐菌酵素

集合以上資訊，整理成圖表 3 如下：

表 3 真菌降解戴奧辛之國外實場案例比較圖

	initial		Final	分解效率	反應條件 (曝光情形)	降解時間	反應相
	ng/Kg -TEQ	ng/Kg					
橘燦郎	1000		100*	90%	室外曝曬	30 天	固體反應
齋藤祐二	497.3		50*	90%	避光	1 小時	酵素液體反應
芬蘭 Aalto	X			37%	室內大廳	90 天	固體反應
EarthFax		15000	5000	67%*	室外遮光	282 天	固體反應
EarthFax		2836000	570000	80%*	X	274 天	固體反應

註：*：利用文獻資料計算結果； X：查無資料

白腐真菌胞外酵素降解其他有機類污染物質，的確已有實證，但仍少見實場大規模的應用，故本計畫特別結合具有諸多豐富實場整治經驗工程實務專家，同步密切共同研討規劃，並且啟動逆向工程，希望能有創新、可行、商轉、加值及國際競爭力等各方面的突破。

3.2. 酵素淨化戴奧辛之可行性、創新性與未來性分析

利用白腐真菌降解戴奧辛在日本、美國、歐洲已有相關專利（例如 US09805127、EP1074611A4、JP 3831784 等），支持其可行性。以酵素分解戴奧辛的技術除了大量的實驗室級的反應被發表在上述所提之國際期刊論文文獻之外，也有美國冀腐真菌的木質素降解酶和過氧化酶來分解戴奧辛的專利（United States Patent US4891320A）以及日本以連續式生產白腐菌酵素整治戴奧辛污土的實例（齋藤等人, 2006）與專利（JP2005034057A）。這些都是值得參考的依據。

本團隊已建立了菇種固態培養技術以及證實至少一株本土菇種具有分解戴奧辛的能力。而液態培養、酵素表現與反應機制正是本實驗室的專長所在；戴奧辛污土分析則由有多年分析經驗與相關設備的協同主持人林啟燦老師負責。

此外，依據 GSR 環境因子核心元素與最佳管理實務（Best Management Practices, BMPs）分析結果，本研發案預期具有下列特性（如圖 10），簡述如下：



三、文獻探討

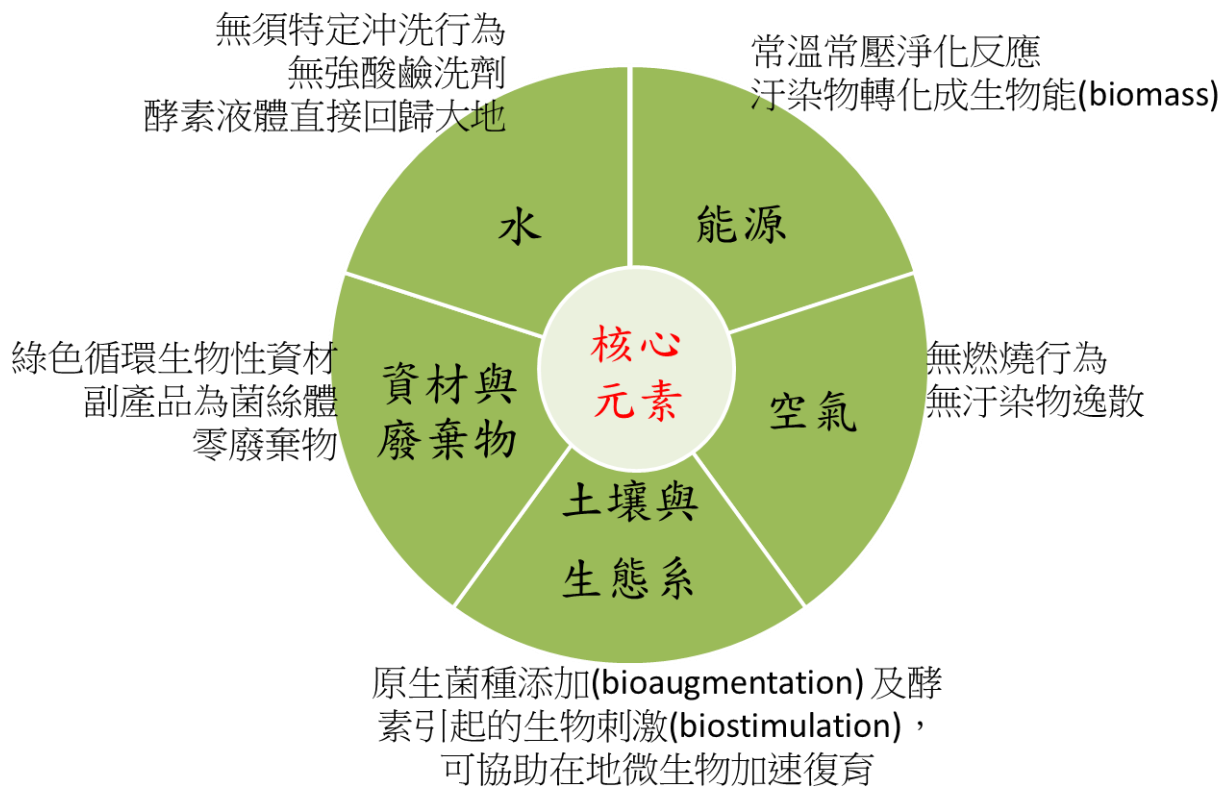


圖 10 「利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛汚土之技術研發」技術之環境因子核心元素與綠色整治最佳管理實務(Best Management Practices,BMPs)分析結果，顯示本研究工法預期具有大幅節能、減碳減排、綠色原料、無廢棄物等抑制環境足跡優點，亦具提高土壤肥力與豐富生態性等優勢。

一、節能

本酵素淨化處理戴奧辛汚土技術，相較於熱處理、物理化學濕處理或其他類的生物處理，僅需緩慢攪動汚土與酵素混合土漿，所需要的批次噸級微量用電，方法流程相對其他技術簡易單純，應是比較節能省電的整治技術。

二、空污減排

此酵素淨化戴奧辛技術，也沒有一般熱處理高溫燃燒或無氧/少氧熱裂解耗能的問題。亦或物理化學激烈的氧化放熱，衍生排碳或其他空氣污染的問題。



白腐菌酵素

三、節水友善環境

由於本技術採催化反應形式進行，沒有萃取處理法的分配係數需要多次流洗或是強酸強鹼的使用問題，所以需水量低，對於環境也較無害。酵素液體可直接降解戴奧辛成為提供本地菌株生長使用之物質，亦不致衍生廢水處理的問題。此外，本團隊將證實何種污土濃度反應後的酵素液體已達放流標準，以直接回歸戴奧辛污土或淨化大地為目標。

四、綠色循環與減廢

開發微生物酵素以降解戴奧辛污土，此類技術所使用的材料，均取自天然物質或環境友善原物料。本團隊亦計畫開發將廢棄資材作為資源再利用，以更環保的方式培養菇種。此外，產物中除了利用酵素淨化污土，少量菌種作為 bioaugmentation 之外，剩餘的菌體可回收繼續生產酵素或以生物能型態再利用，達到零廢棄物的目標。

五、更易復育土壤及生態

戴奧辛污土因使用本酵素催化作用降解而無毒無害化，使污土變為淨土；加上酵素內含有的養分與少量菌種，可引起生物刺激（biostimulation）及菌種添加（bioaugmentation）促進在地微生物的生長以加速復育，甚至成為肥力更佳的沃土，因而同時豐富生態的多樣性。此點相對於其他整治技術，是對土地與生態更加友善的整治技術。

因此，基於上述，預期本技術之開發成果，相較於其他戴奧辛污土整治技術，將更具有創新、可行、商轉、加值等優勢潛力，甚至具有國際競爭力，非常值得進行深入的研究開發，冀能使我國戴奧辛污土的整治技術，不再高不可攀，更有簡易經濟實用與普及應用的推廣價值。



四、研究方法與過程

四、研究方法與過程（含工作進度甘特圖）

4.1 實驗架構與計畫構想

本計畫之實驗架構流程如圖 11 所示。簡言之，計畫開始執行時，先對污染土壤粒徑特徵濃度進行檢測與篩分，以縮小污染程度的變異度；同時，培養白腐真菌找出最佳培養參數並取得其外泌複合酵素；隨後，進行淨化反應並評估降解效率。上述研究方法與計畫期初構想概念輔以文字重點扼要說明如下：

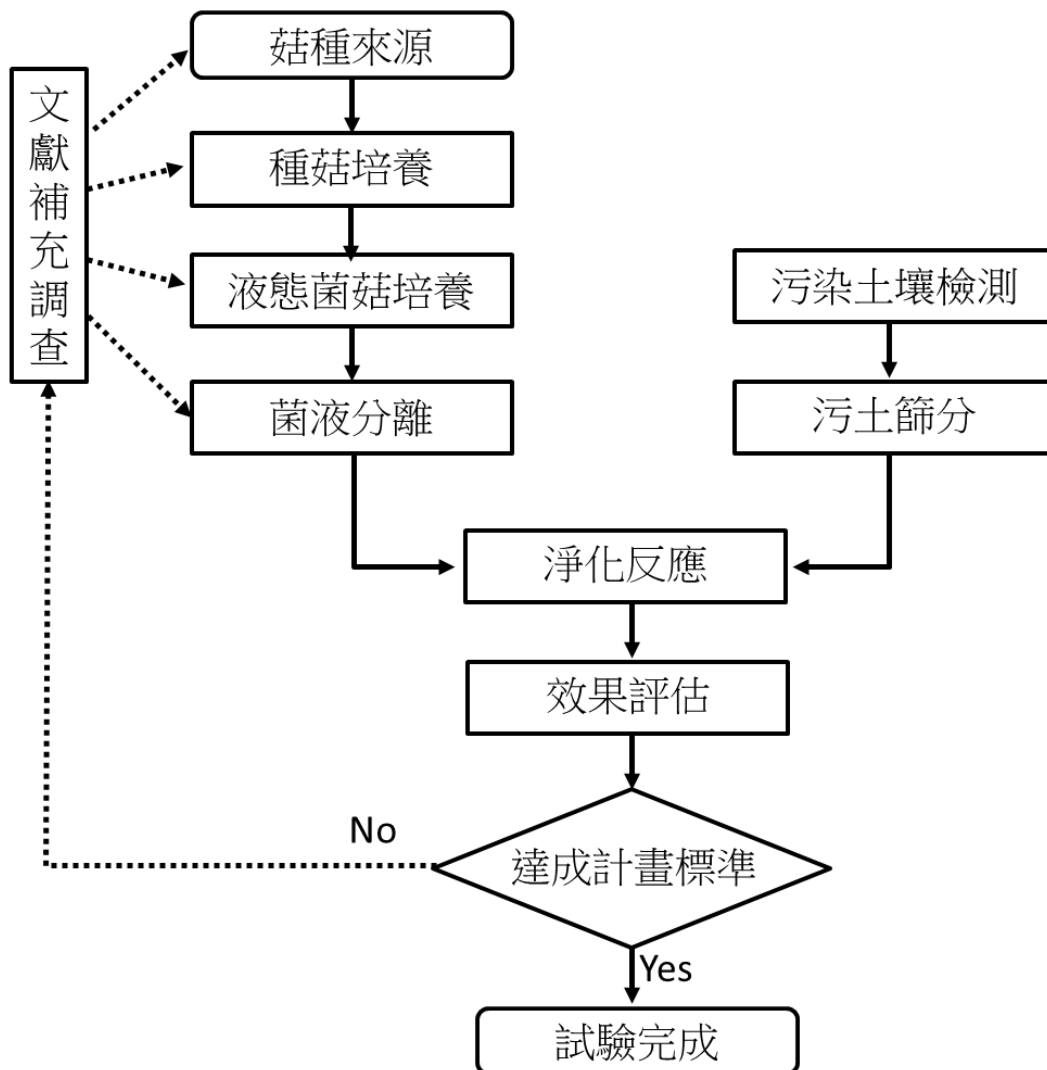


圖 11 實驗架構流程圖。



白腐菌酵素

步驟 1、污土處理

污染土壤檢測與篩分：檢測污染土壤粒徑特徵濃度，並進一步將污土進行篩分以取得適合濕處理之砂質土，預計篩分粒徑約介於 0.105~0.250 mm 間。濕篩方法參考 ASTM E276-13、D422-63 方法，用手工或機械震動篩。

步驟 2、白腐真菌胞外複合酵素液體製備

1. 菌菇種來源：使用目前實驗室既有的真菌、食工所菌種中心購買文獻發表的、市場或田野間的菌株進行酵素活性比較測試。選擇 laccase、MnP 或 LiP 最強的菌株，進行液態培養，收集胞外複合酵素液體。
2. 液態培養：以 PDB 標準製備酵素外，至少嘗試 3 種不同綠色循環資材作為菌體液體培養基，以增加酵素產率（並分析之）或降低成本。改變培養基的主要因素是想降低培養菌體時的成本，但為了防止培養條件優化造成相關分解酵素分泌停止的現象，本計畫原物料選定之綠色循環材料擬以含木質素之原物料為主。
3. 胞外酵素取得：基於成本與實驗基本構想的考量，本計畫乃利用粗分的胞外酵素免去破菌、純化等的龐大的設備與耗材，以符實務應用所需。
4. 最適反應條件測試：除緩衝溶液、pH、溫度等，依據酵素特性加入其他化學物品，測試其最適反應條件，例如引入適當的酵素介質，使更小的分子進入孔隙、增加基質的非專一性分解；在不影響酵素活性的情況下，引入可增加戴奧辛可溶性的界面活性劑等。

由於戴奧辛的檢測昂貴，將配合酵素活性分析（laccase+MnP+LiP）、考慮酵素在不同條件下的產率，做為後續分解戴奧辛能力的參考。

步驟 3、淨化反應工程與分析

1. 基本淨化反應：將酵素液體與污土 1:1 混合後，常溫常壓下緩慢攪動反應 96 小時，測量戴奧辛濃度變化情形。
2. 達標測試：本計畫擬整治之戴奧辛污土濃度，以原污土(篩土後)之戴奧辛濃度為主，預計為 5000-10000 ng I-TEQ/kg 濃度戴奧辛污土，希冀能直接將戴奧辛污土降解至達標；若無法達標，則再開發其他途徑，例如介質添加等，增強其降解率。
3. 污土批次試驗：收集 500 ml 的真菌培養液或不含真菌之培養液，分別在最適條件（適當添加劑下），於戶外日曝的情況下與未滅菌的 0.5 公斤模擬污土反應 72-96 小時後，觀測戴奧辛分解狀況，必要時（依反應週期之效能評估結果而定），再追加 1~2 次的真



四、研究方法與過程

菌培養液或不含真菌之培養液，評估持續分解效能。此實驗將對戴奧辛汚土中之法定 17 種氯化戴奧辛及呋喃同源物進行個別分析，並計算其總毒性當量濃度。



白腐菌酵素

4.2 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

表 4 研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

工作項目	年 月												備 註
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
文獻收集解析													
最佳培養與酵素生產條件													
生物酵素與降解最佳條件試驗													
代謝產物分析													
生物降解批次試驗													
結案準備													
工作進度估計百分比 (累 積 數)	20 %	30 %	35 %	50 %	60 %	65 %	70 %	80 %	85 %	90 %	100 %		
預定查核點	期 中		1. 比較至少 2 種菌株的酵素生產能力 2. 確認至少 3 種資材中的最佳培養用資材 3. 比較至少 5 種酵素反應條件測試										
	期 末		1. 比較至少 3 種戴奧辛分解反應條件測試 2. 至少分析出 3 種代謝產物 3. 至少完成 2 次模擬污土批次降解反應										
說明： 1、工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。 2、「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1) 工作天數，(2) 經費之分配，(3) 工作量之比重，(4) 擬達成目標之具體數字。 3、「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。													



四、研究方法與過程

4.3 研究方法與步驟

4.3.1 研究試劑及設備

本研究所使用之試劑、設備如下表 5、表 6 所示。

表 5 實驗用藥品試劑

主要分析儀器及藥品	廠商及型號
Vial, screw, 2 mL	Agilent Technologies
Vial, insert, 250 μ L	Agilent Technologies
戴奧辛 (Clean up Standard)	SUPELCO
戴奧辛 (spike Standard)	SUPELCO
戴奧辛 (internal Standard)	SUPELCO
戴奧辛 (Stock Standard)	SUPELCO
無水硫酸鈉 (Sodium sulfate)	Macron fine chemicals
二氯甲烷 (Dichloromethane)	C-ECHO
矽膠 (Silica gel) 70 - 230 mesh	Macron fine chemicals
正己烷	C-ECHO
硫酸 2.5 L	C-ECHO
甲苯	C-ECHO
氮氣	錦德



白腐菌酵素

表 6 實驗用設備

主要分析儀器及 藥品	廠商及型號
純化濃縮機	Turbo Vap500
電子分析天秤	AG204
超音波震盪器	VCX750
氣相層析儀 (GC)	Agilent 6890N
質譜儀 (MS)	Agilent 5973N
循環式烘箱	Channel Drying
冷凍乾燥機	EVEL4 FDU-1200
分光光度計	U-5100 HITACHI
震盪攪拌器	TS-520 ORBITAI

4.3.2 污染土壤檢測與篩分

戴奧辛污土的準備分為，濕篩、混合攪拌、四分法取樣及乾燥四步驟。將原污土經濕篩後選擇粒徑範圍為 0.25-0.105 mm 之土壤為原料；經均勻混合後，以四分法的方式取樣 500 g。再秤取 300 g 的污土於燒杯內並記錄之，將污土放入冷凍乾燥機乾燥後待用。

4.3.3 菌種取得與保存

本實驗菌種分成兩大來源：購自台灣市場常見的食用菇類以及菌種中心的兩種白腐真菌。*Phanerochaete chrysosporium* (P.C.) (BCRC 37988) 購買自食品工業發展研究所生資中心 (BCRC)。將菌絲或 1 公分見方的固態菌絲接種於馬鈴薯洋菜盤上 (PDB, 39 g/L; Yeast Extract, 5.1 g/L; agar 20 g/L)，放入 25°C 恆溫培養箱進行固體培養，待白色菌絲長滿整盤，即可轉至液態培養。此外，接種菌絲於 PDA 試管中，帶菌絲生長後保存於 -2°C 環境中，可維持菌種 2 個月以上。



四、研究方法與過程

4.3.4 市售菇類酵素活性篩選

購買市售蘑菇，將其噴酒精置於無菌操作台內，將小刀過火殺菌，利用小刀將其菌柄外皮切開，只取內部菌體，並置於 PDA 培養基上培養。約一周後，可觀察到白色菌絲。之後，將切一小塊菌絲轉到木質素培養皿，可觀察測試菌種分解木質素之能力。木質素培養皿配製如下：取 40 mL 黑液（約含 50% 木質素）加入 200 mL 之 dH₂O 稀釋，混勻後緩慢加入 20 mL 3 N HCl，此時稀釋後之黑液 pH 約 8~9 之間。再利用 0.3 N HCl 將其 pH 調整至 pH7。此溶液約含 8% 木質素。再將其稀釋至含 1% 木質素、加入適量 agar 與不含碳源之 M9 medium（64 g Na₂HPO₄·7H₂O、15 g KH₂PO₄·H₂O、2.5 g NaCl、5 g NH₄Cl、1.2 g MgSO₄、0.055 g CaCl₂ 配製成 1000 mL，即為 5X 儲存溶液），高溫高壓滅菌後，倒入培養皿等待凝固。

此外，或可將各式菇類取樣 0.5 g、磨碎後進行酵素活性測定（如下分析步驟）。

4.3.5 酵素活性測定

白腐真菌所產生的漆酶 Laccase、木素素過氧化氫酶(lignin peroxidase, LiP) 與錳過氧化氫酶(manganeseperoxidase, MnP) 為主要的酵素活性檢測項目 (Juárez et al., 2011; Freitas et al., 2017; Zeng et al., 2015)。其中，所用的溶液包括：雙氧水（5 mM, H₂O₂）、硫酸錳（10 mM, MnSO₄）、蒸餾水（DI）、丙二酸緩衝溶液（pH 5.0 buffer, 350 mM）或廣用緩衝溶液（Britton-Robinson buffer）、ABTS（10 mM）、酚紅（50 mM, Phenol red, PR，飽和態）、甲基藍（30 mM, Methyl blue, MB）。

1. Laccase 活性測定（ABTS 法）（Cheng et al. 2015）

將 600 μ L 的水、100 μ L 的 pH 5.0 buffer、100 μ L 的 ABTS（2,2'-azino-bis-3-ethyl-2,3-dihydro -1,3-benzothiazol- 6-sulfonic acid）與 200 μ L 適當稀釋之酵素混合，置於恆溫乾浴器中 30°C 反應 30 分鐘後，測定 OD_{420 nm}。酵素活性（U）定義為每分鐘形成 1 μ mol ABTS^{•+} 的酵素含量。其中 ABTS 消光係數為 $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。此分析方法亦可用來確認 Lip（含 H₂O₂ 時）和 MnP（含 H₂O₂ 與硫酸錳時）的活性（Fackler et al. 2006）。

2. lignin peroxidase（LiP）活性測定



白腐菌酵素

將 570 μL 的 DI 水、100 μL 的 pH5.0 buffer、100 μL 的 H_2O_2 、30 μL 的 MB 染色劑與 200 μL 適當稀釋之酵素混合，30°C 反應 30 分鐘後，測定 $\text{OD}_{650\text{ nm}}$ 。

3. manganese peroxidase (MnP) 活性測定

將 470 μL 的 DI 水、100 μL 的 pH5.0 buffer、100 μL 的 H_2O_2 、100 μL 的 MnSO_4 、30 μL 的 PR 染色劑與 200 μL 適當稀釋之酵素混合，30°C 反應 30 分鐘後，測定 $\text{OD}_{430\text{ nm}}$ 。

4. 去除自由基活性測定

將 600 μL 的水、100 μL 的 pH 5.0 buffer、100 μL 的 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 與 200 μL 適當稀釋之酵素混合，30°C 反應 30 分鐘後，測定 $\text{OD}_{420\text{ nm}}$ 。

酵素活性 (U) 定義為每分鐘與 1 μmole 染劑 (PR 或 MB) 反應所需要的酶量稱之。計算公式如下：

$$\Delta\text{O.D} = \text{樣品吸光值} - \text{空白吸光值} \dots\dots\dots (\text{公式 1})$$

$$C \text{ (mM)} = \frac{\Delta\text{O.D}}{\epsilon\left(\frac{1}{\text{mM}\cdot\text{cm}}\right)*1(\text{cm})} \dots\dots\dots (\text{公式 2})$$

$$\text{酵素活性} = \frac{C(M)*1000\left(\frac{\mu\text{M}}{\text{mM}}\right)*\text{Final volume(L)}}{T(\text{min})} \dots\dots\dots (\text{公式 3})$$

其中：

O.D (Absorbance) = 吸光值

ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) = 波長係數

C (M) = 化學物質在溶液中的濃度

L (cm) = 石英管長度或光徑

T (min) = 反應時間

V (L) = 反應所用酵素體積

Specific activity (U/L 或 U/g) = 酵素比活性

4.3.6 田野調查之統計分析方法

本研究針對某一農田裡的動、植物之酵素活性進行採樣與分析，依照取樣的樣本來源進行分類，區分為真菌(菌絲)、動物、植物以及菇類(子實體)



四、研究方法與過程

四類共調查樣本數 95 個。其中真菌(菌絲)13 個、動物 14 個、植物 31 個以及菇(子實體)37 個，研究樣本分組及數量如表 7。測量其 Laccase、MnP 與 LiP 活性後，以 SPSS 統計軟體分析進行描述性統計分析、Kruskal-Wallis 檢定(H test)，以探討農田中樣本的類型及 Laccase 活性 4 組樣本是否有差異，再以 Dunn 事後檢定法分析組間差異。

表 7 樣本分組及數量表

取樣分類	個數
真菌(菌絲)	13
動物	14
植物	31
真菌(子實體)	37
總和	95

由於本調查各組樣本數，真菌組及動物組的樣本數較少，且生物樣本資料離散程度較大，不符合常態分配，因此以無母數之 Kruskal-Wallis 檢定進行各組別之組織活性是否有差異。有別於以平均值差異已定的變異數分析(ANOVA)，Kruskal-Wallis 為無母數檢定方法，是檢定在多組樣本間的中位數是否完全相等之統計方法。Kruskal-Wallis 檢定之使用時機為：

- 1.當樣本數(n)較小(通常指 $n < 30$)。但各組樣本數 n 至少要大於 5。
- 2.當資料中包含多組樣本(三組以上之樣本)。

在進行分析資料前，首先建立無假設與對立假設，虛無假設(H_0): 4 組樣本中位數相同，對立假設(H_A): 至少有一組中位數不同。其公式如下：

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \times \left[\frac{R_1^2}{n_1} + \frac{R_2^2}{n_2} + \cdots + \frac{R_k^2}{n_k} \right] - 3(n+1)$$

*H 為 $df = 3 - 1 = 2$ 的 χ^2 分配

Kruskal-Wallis 檢定 H 為卡方值，若 $H > \chi^2_{(d.f., 1-\alpha)}$ ，即 P 小於顯著水準 α (significant level, α)，則推翻虛無假設，表示各組間中位數有顯著差



白腐菌酵素

異，至少有 1 組織中位數(平均等級)與其他組不同。欲分析各組織間的差異，本研究採用 Dunn 法進行事後檢定，以考驗各組平均等級的差異。Dunn 檢定法之公式如下：

$$Q = \frac{\overline{R}_A - \overline{R}_B}{\sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}}$$

\overline{R}_A ：A 組平均秩； \overline{R}_B ：B 組平均秩；N：總樣本數； n_A ：A 組樣本數； n_B ：B 組樣本數；k：組數。

當 $Q > Z_{\left(\frac{\alpha}{k(k-1)}\right)}$ ，表示 A、B 兩組織中位數有顯著差異。

4.3.7 田口試驗法分析最適酵素反應條件

利用田口試驗方法是用最少的實驗個數來決定實驗的參數。表 8 所示為本實驗選定的四項控制因子(Factor)及三個水準值(Level)。為了減少實驗次數，假設四個因子間無交互作用，且因子效應可疊加，選用 $L_9(3^4)$ 直交表為實驗之直交表(如表 9)

表 8 Control factors and selected levels

Levels	Factors			
	Acid	Temp (°C)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)
1	Malonic acid	25	0.0	0.0
2	Tris Phosphate	35	0.5	0.5
3	Malic acid	30	1.0	1.0



四、研究方法與過程

表 9 Orthogonal Array ($L_9(3^4)$)

Experiment No.	Control factors			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

田口試驗中的信號雜音比(S/N ratio)統計方法是將平均值和變異數同時考慮的評估指標，用來衡量實驗結果以及受誤差因素影響的程度。此計畫中，由於是希望目標最佳特性值越大越好，故為一望大特性(Larger-the-better)，選用公式如下：

$$S / N = -10 \log \frac{1}{n} \sum \frac{1}{y_i^2}$$

4.3.8 市售菌絲培養與菌種鑑定

購買市售蘑菇，將其噴酒精置於無菌操作台內，將小刀過火殺菌，利用小刀將其菌柄外皮切開，只取內部菌體，並置於 PDA 培養皿上培養。約一周後，可觀察到白色菌絲。

自 PDA 培養皿上挑取少量菌絲體，並轉移到含有 100 μ l 純水的 1.5 ml 微量離心管中。加入 10 μ l 裂解溶液 (0.5 M NaOH) 混勻後在 95°C 下反應 10 分鐘。在此期間，利用電鑽驅動器 (Black and Decker LXD10-2) 驅動研杵 1200 rpm 研磨 1 分鐘。然後將 1 μ l 上清液用於 PCR。利用 PCR 技術以基因引子對：Forward Primer (ITS1F)-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA，Reverse Primer (ITS4) -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 將 ITS 基因擴增後，送至明欣生技公司進行定序分析。得到基因序列後，再利用 NCBI-BLAST 網站進行基因比對，進行初步菌種鑑定。



白腐菌酵素

4.3.9 白腐真菌液態培養方法

將上述菌絲盤接種於液態培養基(PDB, 39 g/L; Yeast Extract, 5.1 g/L)中, 於 25°C、150 rpm 震盪培養條件下(Cai et al., 2004; Zeng et al., 2013), 至少一周或直到菌絲不再明顯增多, 此為飽和白腐真菌菌液。

再利用資材液態培養測試: 再利用資材(例如: 咖啡渣、木屑、紅茶渣、綠茶渣)冷凍乾燥後、經破碎機研磨 1 分鐘後, 取 5 g 加入 50 ml 去離子水, 滅菌後加入不含碳源之 M9 medium 150 ml。接入 100 mL 飽和白腐真菌菌液後, 於 25°C、150 rpm 進行培養。於適當培養時間後, 將液態培養液經離心(10000 rpm, 15 分鐘)後取得上清液, 此即為真菌之胞外複合酵素。

4.3.10 胞外複合酵素蛋白質電泳

先利用 TCA(Trichloroacetic Acid)沉澱法將真菌之胞外複合酵素適度濃縮, 以利在 SDS-PAGE 上觀察。在 1,000 μ L 樣品中加入 250 μ L 的 100 % 飽和度 TCA 於 4°C 冰箱放置 2 個小時, 離心取下層固體物以 500 μ L acetone 清洗掉多餘上清液後, 靜置室溫 20 分鐘。將 TCA 沉澱出來的蛋白質加 1 μ L Guanidine Hydrochloride 和 6 μ L 水以及 7 μ L 2X loading dye, 於 100 °C 乾浴鍋加熱 10 分鐘, 繼續進行 SDS-PAGE 分析。

4.3.11 淨化反應

胞外複合酵素(20 mL)與篩分後的污土(20 g)混合攪拌後, 置於震盪攪拌器(120 rpm)上進行與戴奧辛污土反應試驗。反應 96 小時後, 冷凍乾燥 1 天, 並存放於 -20°C, 直到進行下一步分析。

4.3.12 戴奧辛分析方法

戴奧辛檢測方法參考自環檢所公告之「戴奧辛及呋喃檢測方法—同位素標幟稀釋氣相層析/高解析質譜法」(NIEA M801.12B), 簡述如下。

1. 除水玻璃管之填裝: 加入玻璃棉於乾淨的去水玻璃管柱中, 再加入 10 g 無水硫酸鈉。
2. 樣品秤重及除水: 秤取乾燥樣品 20 g 於 250 mL 燒杯內, 再加入 20 g 無水硫酸鈉均勻攪拌。
3. 樣品萃取: 加入 60 mL 甲苯於裝有樣品之燒杯內, 再將燒杯放入超音波震盪器震盪 3 分鐘, 過濾收集樣品於濃縮管中, 重複上述動作三次。
4. 濃縮: 放置裝有樣品之濃縮管於濃縮裝置中(turbo vap II)讓樣品濃縮至乾。



四、研究方法與過程

5. 酸性矽膠淨化：加入 100 mL 正己烷於樣品濃縮管內，放入水浴超音波震盪器約 15 分鐘（若樣品太髒可考慮將時間往後調一點），再將樣品倒入三角錐瓶後加入 20 g 酸性矽膠以磁石機攪拌 10 分鐘混合後，讓有機物沉澱後，再將樣品過濾於濃縮管中。
6. 濃硫酸淨化：將上述樣品濃縮至 7 mL，再用巴斯德玻璃移液管將萃取液轉移至 20 mL 玻璃瓶中，並加入 4 mL 濃硫酸後，上下搖動 10 次後靜置分層，吸取上層萃液至濃縮管濃縮至乾，以適量二氯甲烷轉移至注射樣品瓶，同時於 35 °C 左右以氮氣緩緩吹除溶劑等待分析。
7. 濃度檢測：加入二氯甲烷於上述注射樣品瓶中，在加入 $^{13}\text{C}_{12}$ -同位素標幟內標準品溶液濃度為 ($5\ \mu\text{L}$, 100 ng/mL)，再以 GC/MS 檢測。

4.3.13 有機酸分析方法

以 USEPA 8270D 測定 SVOCs 分析方法以及 GC / MS 分析半揮發性有機化合物。加入半揮發性內標混合物 (Sigma-Aldrich Inc., PA, 美國) 添加到樣品後，將 $1\ \mu\text{L}$ 樣品注入 GC 前進樣口，該進樣口以不分流模式保持在 250°C。以氮氣作為載氣流、流速為 $1\ \text{mL min}^{-1}$ 。GC 柱箱的溫度從 45°C 開始，保持 1 分鐘後以每分鐘 10°C 的速率升至 310°C，然後再維持 7 分鐘。

質量保證和質量控制協議遵循 USEPA 方法 8270D 和台灣 NIEA M731.00C。基本上，使用十氟三苯磷 (DFTPP) 作為標準調整來確保系統和檢測器性能。中點標準回收率為 $100\pm 20\%$ 。並將每種化合物的響應因子偏差或線性回歸分別控制為 $<20\%$ 或 > 0.99 。

4.3.14 GC/MS 儀器參數之設定分析

本方法選用氣相層析儀 (Agilent 6890N GC) 搭配質譜儀 (5973 MS) (如圖 12)，分析層析管柱為 J&W 公司之 HP-5MS 毛細管柱，長度為 30 m，內徑為 0.25 mm。有關於儀器之參數設定參考表 10、表 11。每支樣品分析時間為 51.5 分鐘。



白腐菌酵素

表 10 氣相層析儀 (GC) 升溫參數設定

儀器設備	操作條件
Column	HP-5MS
Injection Temperature	280°C
Detector Temperature	350°C
Initial Temperature/ time	40°C / 4 min
Tamping Rate	10°C /min
Final Temperature/time	320°C / 10 min

表 11 質譜儀升溫參數設定

儀器設備	操作條件
MS Source	230 °C
MS Quad Temperature	150 °C
MS Mode	EI
EM Voltage	70 eV
Acq. Mode	SIM Mode



圖 12 GC/MS 儀器



四、研究方法與過程

4.3.15 戴奧辛檢測方法之品保品

本實驗檢測方法，參考環檢所公告之「NIEA M801.12B-戴奧辛及呋喃檢測方法—同位素標幟稀釋氣相層析／高解析質譜法」，對樣品方法之品保品管要求，如表 7 所示。

準備前中間點標準溶液（濃度 40/200/400 微克/升）在每批樣品運作，都須確保儀器性能，在將 1~2 μL 濃縮提取物注入氣相色譜儀再搭配質譜儀（Agilent 5973N MS）測定 17 種化合物中 4 種至 8 種 PCDDs 和 PCDF 異構體的氯含量，經燈絲加熱破壞離子後得到碎片定性其化合物，較容易判別未知化合物及定性定量。可從電腦知道升溫參數條件及化合物的分析結果。

表 12 檢測方法品保品管之規定

項目	標準
檢量線	至少 5 點不同濃度，感應因子相對標準偏差不得超過 30%
內標準品回收率	需要在 4Cl-5Cl: 30-130%、6Cl-8Cl: 40-130%
DFTPP	應全部 pass 通過
查核樣品	回收率應在 70~130%之間
重複樣品	相對標準偏差 RPD>20%
空白樣品	小於 2*MDL
中點標準	恢復 100±20%或偏差<20%





五、結果與討論

五、結果與討論（含結論與建議）

5.1 原生菌菇的篩選與酵素生產能力

本節摘要：

白腐真菌中除了降解能力很強的黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*（簡稱 P.C.）之外，很多食用菌菇也屬於白腐真菌，為了有效避免生物整治後造成外來菇種肆虐以及降低跟食工所買菌株的成本（每株約 5000 元），本實驗室利用田野調查試圖了解這些酵素的分布情形，並自各大通路選購了 8 種本土的食用菇，篩選出一株活性較高的菌菇—美人豪菇，經過 ITS 基因比對初步鑑定菌種為 *Pleurotus eryngii*。

利用不同培養基去培養美人豪菇與白腐真菌 P. C.時，發現美人豪菇具有較強的生成自由基活性（意即氧化力很強、laccase 活性強），反之白腐真菌 P.C.去除自由基的能力則較強（抗氧化力 MnP+LiP 強），各有千秋。詳細實驗過程與結果如下：

5.1.1 田間試驗

為了得到較有利的本土野生木腐真菌，本實驗室進行了一場田間試驗以期獲得較佳活性之物種。11 名大學生針對某一農田裡的真菌、動物、植物進行採樣與分析，每人各自取 10 件樣品共取得 110 件樣品，並分析這些樣品之 laccase、MnP 與 LiP 的活性，活動情形如表 13。依照取樣的樣本來源進行分類，其中真菌依有無有明顯子實體又區分為子實體與菌絲體，一共區分為真菌(菌絲)、動物、植物以及真菌(子實體)四類，共取得有效調查樣本數 95 個。其中真菌(菌絲)13 個、動物 14 個、植物 31 個以及真菌(子實體)37 個，研究樣本分組及數量如表 14。



白腐菌酵素

表 13 2019 春季 EELab 田野調查採樣實習活動與菌菇樣品情形



田野調查樣品中各類別與酵素活性分佈如圖 13，LiP 分佈最為均勻，相較之下 laccase 活性分佈較不均勻，而 MnP 則出現正負值都有的現象。仔細分析可看出 4 種類別的樣品皆可具有 laccase 活性，但真菌(菌絲)(2 及 5)之樣類則擁有較高漆酶活性的樣品。為確定所觀察，以 laccase 活性繼續進行統計分析。四種類別樣本之描述性統計及 Laccase 活性平均值、標準差等如表 14。



五、結果與討論

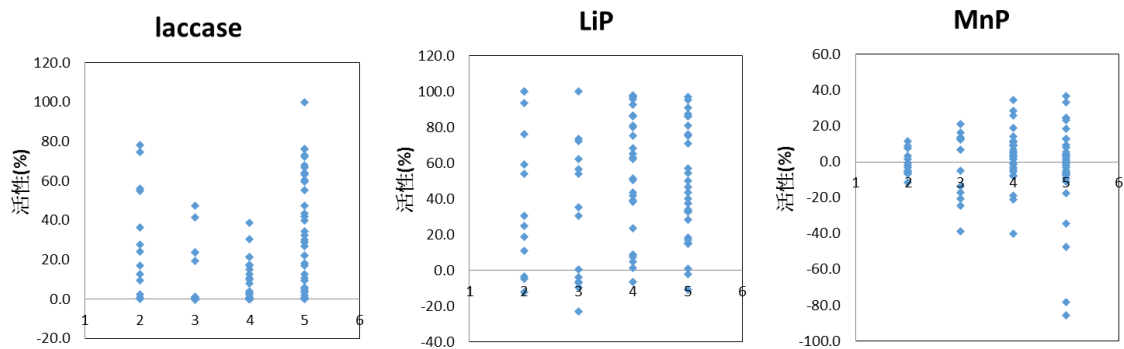


圖 13 田野調查各類別與酵素活性分佈關係圖。2、3、4、5 各代表真菌(菌絲)、動物、植物以及真菌(子實體)。一個點代表一個樣品的酵素活性。

表 14 各組 Laccase 活性平均值、標準差統計表

項目取樣點	個數	活性平均值	標準差	平均數的 95% 信賴區間	
				下界	上界
Laccase 真菌(菌絲)	13	30.27	27.501	13.65	46.89
動物	14	11.24	16.832	1.52	20.95
植物	31	7.09	10.142	3.37	10.81
真菌(子實體)	37	36.08	28.452	26.59	45.56
總和	95	22.16	25.624	16.94	27.38

經 Kruskal-Wallis 檢定各組平均等級如表 15，個組平均等級分別為，真菌(菌絲)：58.65；動物：32.54；植物：32.58；真菌(子實體)：63.03。分析結果卡方值為 27.05($P < 0.05$)，顯示 Laccase 在 4 組間的活性有顯著差異，各組之間的活性不完相同，如表 16。再經無母數 Dunn 事後檢定(表 17)，其結果顯示各組織間 Laccase 活性為：真菌(子實體)組=真菌(菌絲)組>植物組=動物組。



白腐菌酵素

表 15 Kruskal-Wallis 檢定平均等級表

分類	個數	等級平均數
Laccase 真菌(菌絲)	13	58.65
動物	14	32.54
植物	31	32.58
真菌(子實體)	37	63.03
總和	95	

表 16 Kruskal-Wallis 檢定

	Laccase
卡方	27.052
自由度	3
漸近顯著性	.000

表 17 無母數 Dunn 事後檢定結果

組別 1	組別 2	標準化平均差異	顯著性
真菌(菌絲)	動物	2.46	顯著
	植物	2.86	顯著
	真菌(子實體)	0.00	
動物	植物	0.00	
	真菌(子實體)	3.52	顯著
植物	真菌(子實體)	4.54	顯著

田間試驗經 SPSS 以 Kruskal-Wallis 檢定及 Dunn 事後檢定發現，真菌之 Laccase 活性無論以子實體或菌絲體的形式出現，都顯著高於植物組與動物組。

5.1.2 市售菇類酵素活性篩選

田間試驗真菌樣品帶回實驗室進行菌株分離時，大多與細菌(或酵母菌)共生難以有效分離，僅剩 3 株仍在實驗進行分離中。為此，另購入市售八種常見食用菇如表 18，利用 ABTS 法測量 laccase 活性比較如圖 14-15。



五、結果與討論

表 18 實驗使用之各式市售蘑菇

	
1. 鮑魚菇	2. 袖珍菇
	
3. 黑美人蠔菇	4. 鴻喜菇
	
5. 白精靈菇	6. 洋菇
	
7. 金針菇	8. 黑木耳



白腐菌酵素



圖 14 市售食用菌菇酵素篩選與黑美人蠔菇。

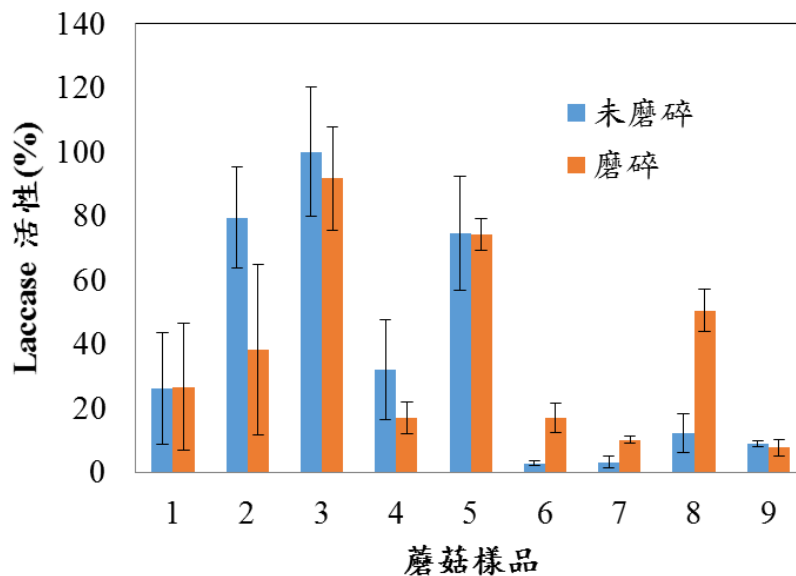


圖 15 蘑菇樣品的 laccase 活性比較。1. 鮑魚菇、2. 袖珍菇、3. 黑美人蠔菇、4. 鴻喜菇、5. 白精靈菇、6. 洋菇、7. 金針菇、8. 黑木耳以及 9. 靈芝菌絲體。其中，以未磨碎之 3 號樣品為 100% 活性，約為 OD=0.61。

如圖 15 所示，3 號與 5 號樣品（美人蠔菇和雪白菇）無論有沒有磨碎，活性都很高，而第八管樣品（木耳）則是磨碎之後產生自由基能力才顯現出來。實驗還發現不同部位例如菌柄、菌傘、皮、菌褶等，活性亦不相同，因此造成較大的活性誤差。由於 3 號樣品美人蠔菇活性最高也較穩定，故進一



五、結果與討論

步進行其菌絲培養與菌種鑑定。

5.1.3 美人菇的菌絲培養與菌種鑑定

市售美人菇，噴酒精置於無菌操作台，以小刀將其菌柄外皮切開，只取內部菌體，並置於 PDA 培養皿上培養，約一周後即可長如附圖 14 之盤子。

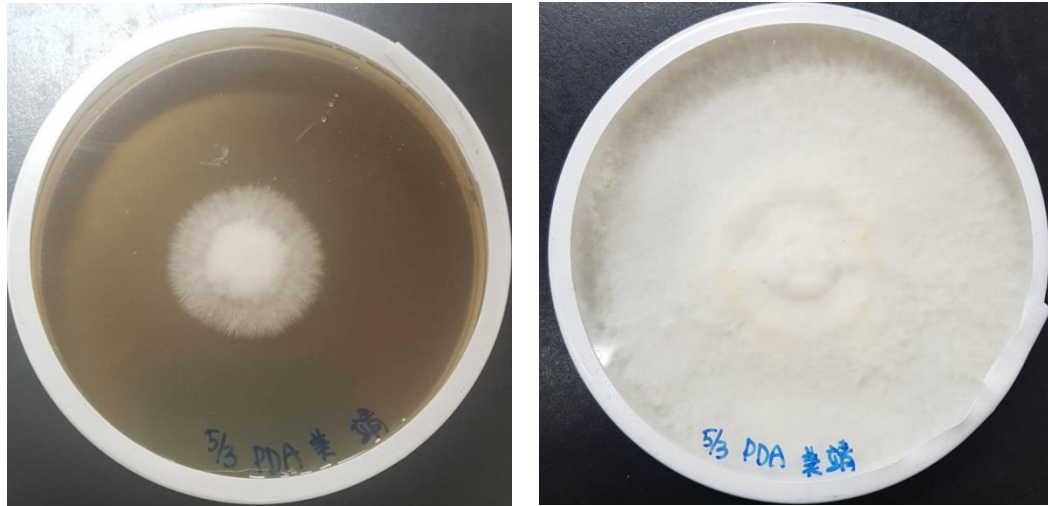


圖 16 生長約三天與三週之美人菇 PDA 盤。

從 PDA 母盤上提取少部分菌絲體，利用 PCR 技術放大 5.8S 及其附近之 ITS 正向與反向部分基因序列之後，利用 NCBI-BLAST 網站分別找出正向基因與反向基因關聯性最高的序列的菌種，分別為 *Pleurotus eryngii*、*Pleurotus ostreatus* 與 *Pleurotus eryngii*、*Pleurotus eryngii*。其基因序列比對結果如圖 17 與圖 18。初步鑑定其為 *Pleurotus eryngii*。



白腐菌酵素

```

R(+) -----
MK785235.1  GTAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATTA ATGAATTCAC TATGGAGTTG TTGCTGGCCT
KX688459.1  ----- ATGAATTCAC TATGGAGTTG TTGCTGGCCT

R(+) -----T CTATTCA--T GCGTGCTATT GATGAGT--- GATAATTATC ACATCATGCG
MK785235.1  CTAGGGGCAT GTGCACGCTT CACTAGTCTT TCAACCACCT GTGAACCTTTT GATAGATCTG TGAAGTCGTC TCTCAAGTCG
KX688459.1  CTAGGGGCAT GTGCACGCTT CACTAGTCTT TCAACCACCT GTGAACCTTTT GATAGATCTG TGAAGTCGTC TTTCAAGTCG

R(+) -CAGAGGCAA TGAGAAGTCC TGCTAATGCA TT--TAAGAG GAGCCGACCT GTCAAGGCCA GCAGCCCCCA ACA---ATCC
MK785235.1  TTAGACTTGG TTTGCTGGGA TGTAAACGTC TCGGTGTGAC TACGCAGTCT ATTTACTTAT AACACCCCAA ATGTATGTCT
KX688459.1  TCAGACTTGG TTTGCTGGGA TTTAAACGTC TCGGTGTGAC AACGCAGTCT ATTTACTTAA CACACCCCAA ATGTATGTCT

R(+) AAACATCACA ATTGAAA-- ----- -AAACCAAG TG--AGTTTG A-----GAAT TTAATGACAC TCAACAGGC
MK785235.1  ACGAATGTCA TTTAAAGGGC CTTGTGCTTA TAAACCATAA TACAACCTTC AACACGGAT CTCTGGCTC TCGCATCGAT
KX688459.1  ACGAATGTCA TTTAATGGGC CTTGTGCTTA TAAACCATAA TACAACCTTC AACACGGAT CTCTGGCTC TCGCATCGAT

R(+) ATGCCCTCG GAATACCAAG GGGCGCAAGG TCGGTTCAA GATTCGATGA TTCACTGAAT TCTGCAATTC ACATTACTTA
MK785235.1  GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACCTTGCGCC
KX688459.1  GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACCTTGCGCC

R(+) TCGCATTTTC CTGCGTTCTT CATCGATGCG AGAGCCAAGA GATCC----- GTTGTGAAA GTTGT----A TTATGGTTTA
MK785235.1  CCTTGGTATT CCGAGGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTATTA AATTCTCAA CTCACTCTGG TTTTTCCTAA TTGTGATGTT
KX688459.1  CCTTGGTATT CCGAGGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTATTA AATTCTCAA CTCACTTTGG TTTTTCCTAA TTGTGATGTT

R(+) TAGGC--ACA AGGCCCTTTA AATGACATTC GTAGACATAC ATTTGGGGTG TGATAAGTAA ATAG-ACTGC GTAGTCACAC
MK785235.1  TGGATTGTTG GGGGCTGCTG GCCTTGACAG GTCGGCTCCT CTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATGTC CTCTGCGCAT
KX688459.1  TGGATTGTTG GGGGCTGCTG GCCTTGACAG GTCGGCTCCT CTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATGTC CTCTGCGCAT

R(+) --CGAGACGT TTACATCCCA GCAAACCAAG TCTGACGACT TGAAAGACGA CTTACAGAT CTATCAAAAG TTCACA----
MK785235.1  GATGTGATAA TTATCACTCA TCAA--TAGC ACGCATGAAT --AGAGTCTG GCTCTCTAAC CGTCCGCAAG GACAATTT--
KX688459.1  GATGTGATAA TTATCACTCA TCAA--TAGC ACGCATGAAT --AGAGTCCA GCTCTCTAAT CGTCCGCAAG GACAATTGTA

R(+) ----
MK785235.1  ----
KX688459.1  CAAT

```

圖 17 美人豪菇反向定序結果與 *Pleurotus eryngii* 、*Pleurotus ostreatus* 基因序列比對圖。

圖 15 代號說明：

R(+) 美人豪菇反向定序結果

MK785235.1: MK785235.1 *Pleurotus eryngii* isolate 24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

KX688459.1 : KX688459.1 *Pleurotus ostreatus* strain 19 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence



五、結果與討論

```

F(+)      -----A TGTGCACGCT TCACTAGTCT
KY962500.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT AATGAATTCA CTATGGAGTT GTTGCTGGCC TCTAGGGGAA TGTGCACGCT TCACTAGTCT
FJ904735.1 -----GGGCA TGTGCACGCT TCACTAGTCT

F(+)      TTCAACCACC TGTGAACTTT TGATAGATCT GTGAAGTCGT CTTTCAAGTC GTCAGACTTG GTTTGCTGGG ATTTAAACGT
KY962500.1 TTCAACCACC TGTGAACTTT TGATAGATCT GTGAAGTCGT CTCTCAAGTC GTTAGACTTG GTTTGCTGGG ATGTAACGT
FJ904735.1 TTCAACCACC TGTGAACTTT TGATAGATCT GTGAAGTCGT CTCTCAAGTC GTTAGACTTG GTTTGCTGGG ATGTAACGT

F(+)      CTCGGTGTGA CTACGCAGTC TATTTACTTA TAACACCCCA AATGTATGTC TACGAATGTC ATTTAAAGGG CCTTGTGCCT
KY962500.1 CTCGGTGTGA CTACGCAGTC TATTTACTTA TAACACCCCA AATGTATGTC TACGAATGTC ATTTAAAGGG CCTTGTGCCT
FJ904735.1 CTCGGTGTGA CTACGCAGTC TATTTACTTA TAACACCCCA AATGTATGTC TACGAATGTC ATTTAAAGGG CCTTGTGCCT

F(+)      ATAAACCATA ATACAACTTT CAACAACGGA TCTCTTGGCT CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAAGTAAT
KY962500.1 ATAAACCATA ATACAACTTT CAACAACGGA TCTCTTGGCT CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAAGTAAT
FJ904735.1 ATAAACCATA ATACAACTTT CAACAACGGA TCTCTTGGCT CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAAGTAAT

F(+)      GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CACCTTGCGC CCCTTGGTAT TCCGAGGGGC ATGCCTGTTT
KY962500.1 GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CACCTTGCGC CCCTTGGTAT TCCGAGGGGC ATGCCTGTTT
FJ904735.1 GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CACCTTGCGC CCCTTGGTAT TCCGAGGGGC ATGCCTGTTT

F(+)      GAGTGTCAAT AAATTCTCAA ACTCACTCTG GTTTTCCCA T-GTGATGTT TGGATTGTTG GGGGTGCTG GCCTTGACAG
KY962500.1 GAGTGTCAAT AAATTCTCAA ACTCACTCTG GTTTTCCCA TTGTGATGTT TGGATTGTTG GGGGTGCTG GCCTTGACAG
FJ904735.1 GAGTGTCAAT AAATTCTCAA ACTCACTCTG GTTTTCCCA TTGTGATGTT TGGATTGTTG GGGGTGCTG GCCTTGACAG

F(+)      GTCGGCTCCT CTTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATGTC CTCTGCGCAT GATGTGATAA CTATCACTCA TCAATAGCAC
KY962500.1 GTCGGCTCCT CTTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATGTC CTCTGCGCAT GATGTGATAA CTATCACTCA TCAATAGCAC
FJ904735.1 GTCGGCTCCT CTTAAATGCA TTAGCAGGAC TTCTCATGTC CTCTGCGCAT GATGTGATAA CTATCACTCA TCAATAGCAC

F(+)      GCATGAATAG AGTCTGGCTC TCTAACCCTC CGCAAGGACA ATTTGACAAT TTGACCTCAA ATCAGGTAGG ACTACCCGCT
KY962500.1 GCATGAATAG AGTCTGGCTC TCTAACCCTC CGCAAGGACA ATTTGACAAT TTGACCTCAA ATCAGGTAGG ACTACCCGCT
FJ904735.1 GCATGAATAG AGTCTGGCTC TCTAACCCTC CGCAAGGACA ATTTGACAAT TTGACCTCAA ATCAGGTAGG ACTACCCGCT

F(+)      GAACTTAAGC ATATCAATA- -----
KY962500.1 GAACTTAAGC ATATCAATAA GCGGAGGAA
FJ904735.1 GAACTTAAGC ATATCAATAA GCGG-----

```

圖 18 美人豪菇正向定序結果與 *Pleurotus eryngii* 、*Pleurotus ostreatus* 基因序列比對圖。

圖 16 代號說明：

F(+) 美人豪菇正向定序結果

KY962500.1 : KY962500.1 *Pleurotus eryngii* isolate P84 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

FJ904735.1 : FJ904735.1 *Pleurotus eryngii* isolate 12PL internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence



白腐菌酵素

5.1.4 美人菇與黃孢原毛平革菌酵素活性比較

8 株市售菌菇中 laccase 最強的美人豪菇 *Pleurotus eryngii* 與文獻中降解能力很強的黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* (P. C.) 同時利用 6 種不同的培養基培養，並比較其 laccase 活性時（如表 19）發現，在大部分的培養基培養下，美人豪菇都有很好的 laccase 活性，然而，白腐真菌 P. C. 卻沒有任何 laccase 活性。反之，卻有很高的去除自由基活性。

此外，由於豪菇對培養基較為挑剔，僅對”改 3”系列配方有較佳的反應。由於改 1、改 2、改 3 與田口為本實驗室用來發展球狀真菌之未發表配方，主要成分以 PDB、YE 為主，其成本與原 PDB 相仿，甚至價格更高。因此，無法有效控制其培養基成本。因此，選用對培養基較不挑剔、文獻上大家公認有強大分解力的黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* (P. C.) 作為後續的主要實驗標的。

此外，黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* (P. C.) 的團聚作用(圖 19)，能讓將來分離酵素與菌體時以簡單沉澱或過濾即可完成，不必使用到離心設備，將是另一項降低成本的利機，但目前可團聚成球的培養基配方，仍屬高單價的。

表 19 美人豪菇與黃孢原毛平革菌的酵素活性分析比較

$\triangle OD_{420\text{ nm}}$	豪菇		P.C.	
不同培養基	生成自由基	去除自由基	生成自由基	去除自由基
改1	0.358	-	-	0.793
改2	1.313	-	-	0.778
改3-1	1.556	-	-	0.794
改3-2	1.657	-	-	0.754
改3-3	1.688	-	-	0.792
田口4	0.643	-	-	0.786

註：改 1、改 2、改 3、田口為本實驗室用來發展球狀真菌之未發表配方。主要成分以 PDB、YE 為主，成本與原 PDB 相仿。



五、結果與討論

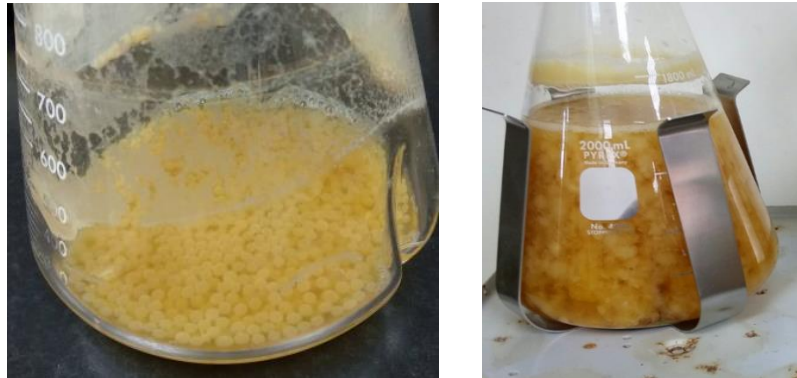


圖 19 黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* (左圖)與蠔菇 (PP)團聚作用情形。



白腐菌酵素

5.2 以農廢資材生產胞外複合酵素

本節摘要：

由於實驗室研究用的真菌培養基大多使用馬鈴薯澱粉培養基（PDB），價格昂貴（HIMEDIA 500 g 粉末約 2300 元），因此，除了以 PDB 標準製備胞外複合酵素外，本計畫嘗試了木屑 wood chips（SD）、米糠 rice bran（RB）、紅茶渣 black tea residue（BT）、綠茶渣 green tea residue（GT）與咖啡渣 coffee grounds（Coffee）5 種不同循環資材作為菌體之液體培養基，一來用以降低生產成本，二來亦用以防止培養條件過於優化所造成相關分解酵素分泌停止的現象。

因此，實驗先進行以 PDB 標準培養基以液態培養方式製備胞外複合酵素與以進行相關酵素定量分析，找到最佳培養時間約為 4-6 天。再利用此標準製備作為指標，進行最佳培養用資材的培養分析，五種綠色資材與控制組 potato dextrose（PDB）相比較結果顯示，綠茶渣與咖啡渣可以增加總抗氧化酵素活性 2 倍以上。其詳細實驗過程與結果如下：

5.2.1 白腐真菌液態培養與酵素分析

白腐真菌以 PDB 標準培養基以液態培養方式培養至飽和後（時間約為 7-14 天），接入含 2.5% 循環資材的液體培養基中，培養 6 天，並每天觀測其胞外酵素液之木質素過氧化酶（lignin peroxidases，簡稱 LiP）與錳過氧化酶（manganese peroxidases，簡稱 MnP）活性。結果如圖 19 所示，白腐真菌約在培養 4-6 天之間，無論 LiP 或是 MnP 都有較好的酵素活性表現。綠茶渣（GT）與咖啡渣（Coffee）對 MnP 的活性影響明顯，並在第 5 天有最高產量（上）。整體而言，總酵素活性（MnP+LiP）在第 6 天時較穩定且活性較高

為了了解綠茶渣與咖啡渣的長時間培養會不會影響酵素活性的變化，因此把培養時間增加至 28 天，此次實驗觀察到在第 6 到 12 天活性會緩慢地下降，在第 15 天之後活性又開始緩慢上升，直到第 28 天活性約為 6 天培養的 2 倍（數據未呈現）。由於長時間的培養（約 5 倍）只造成 2 倍的酵素增加，基於時間成本考量，故之後的實驗以一周培養菌液為主要研究對象。



五、結果與討論

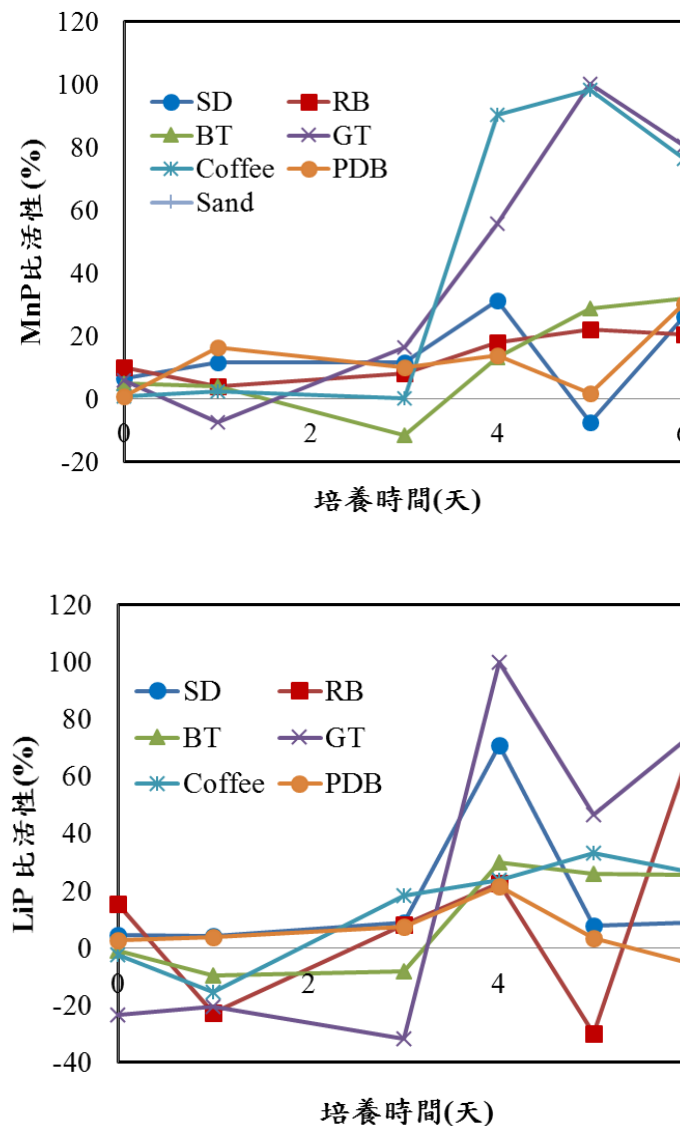


圖 20 白腐真菌培養在木屑 (SD)、米糠 rice bran (RB)、紅茶渣 black tea residue (BT)、綠茶渣 green tea residue (GT) 與咖啡渣 coffee grounds (Coffee)，與 potato dextrose (控制組 PDB) 下，不同培養天數與 MnP (上) 及 LiP (下) 變化情形。

5.2.2 不同資材對白腐真菌酵素活性影響

以不同綠色循環資材作為菌體培養基，除了用來降低成本外，亦為了防止培養條件過於優化所造成相關分解酵素分泌停止的現象。因此，選用以含木質素之原物料為主。此外，考慮以後模廠或是大規模應用時的發展，不易受細菌或病毒污染（低營養源），以防止造成培養時的污染、廢棄易回收、



白腐菌酵素

容易取得、容易處理、來源品質穩定、較不易受到氣候與時節的影響，等皆為本計畫採用原物料之其他依循指標。因此，雖然文獻中提到白腐真菌以小麥、稻稈這兩種材料做培養時，有助於菌體獲得養分並增加酵素活性以降解木質素 (Dinis et al., 2009)，但在此計畫中，並未加入實驗，而以最常見的 PDB 培養作為實驗的對照組。

本實驗的綠色循環資材，以木屑 (SD)、米糠 rice bran (RB)、紅茶渣 black tea residue (BT)、綠茶渣 green tea residue (GT) 與咖啡渣 coffee grounds (Coffee) 為主要研究對象。當白腐真菌培養在不同資材下 4-6 天的 MnP、LiP 以及總酵素活性分析如圖 20。其中，綠茶渣與咖啡渣分別對生產 MnP 與 LiP 較具有顯著效果。整體而言，綠茶渣、咖啡渣與紅茶渣比控制組 PDB 的總酵素活性 (MnP+LiP) 分別增加了 1.4、1.3 與 0.5 倍，其餘資材則無增強效果。

依據綠色循環資材的選用，由於米糠含米量多寡不一，且由於澱粉較多容易造成細菌污染；綠茶渣與紅茶渣則是因為回收之後，尚須要經過乾燥、輾碎處理；咖啡渣廢棄物由於是較低營養、木質素含量 18%、廢棄時大多已碾碎無需再行粉碎處理，且本計畫合作廠商為咖啡進口商，有鑑以上因素，鎖定咖啡渣為之後的研究標的。



五、結果與討論

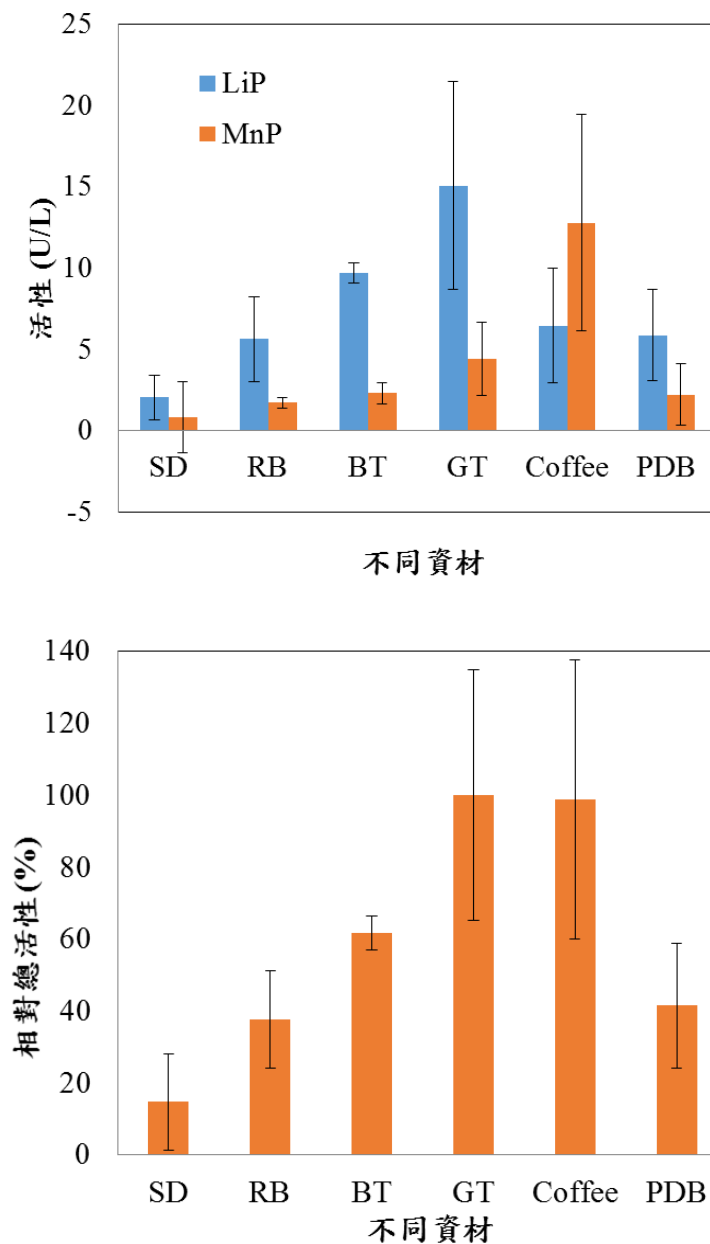


圖 21 白腐真菌培養在不同資材下培養 4-6 天的 MnP、LiP ((上)與總酵素 (下) 活性比較圖。液態培養基質包括木屑 (SD)、米糠 rice bran (RB)、紅茶渣 black tea residue (BT)、綠茶渣 green tea residue (GT) 與咖啡渣 coffee grounds (Coffee) 與控制組 potato dextrose (PDB)。除了 GT 與 Coffee ($n>5$) 之外，其餘數據 $n=3$ 。



白腐菌酵素

5.2.3 不同資材對白腐真菌胞外酵素組成影響

以不同綠色循環資材作為菌體培養基所取得之胞外酵素以 SDS-PAGE 分析如圖 22。其中，在 25-37 kDa 之間有一主要蛋白質出現，分子量約 33 kDa (虛線箭頭)，然而，*Phanerochaete chrysosporium* 之分子量介於 25-37 kDa 的酵素(表 20)主要是分解醣類之酵素，且活性較好的綠茶、咖啡組，反而蛋白質質量很少，因此，估計並非此條帶。

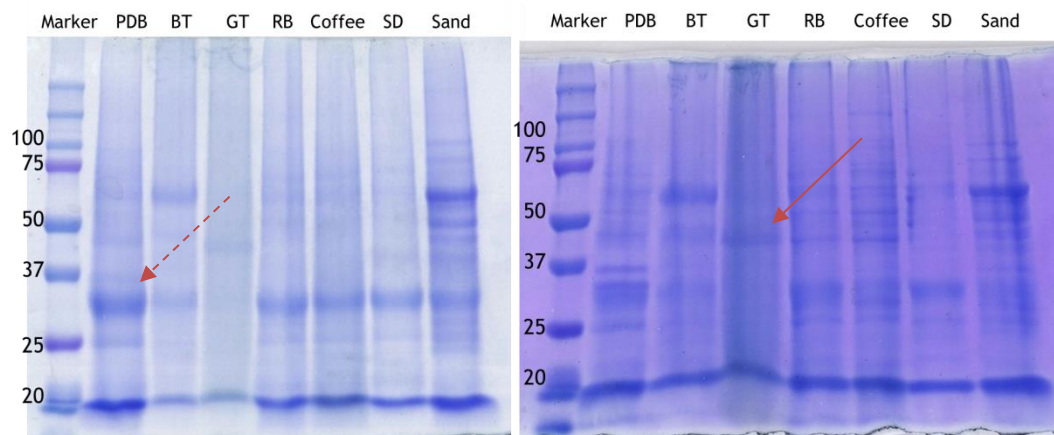


圖 22 白腐真菌培養在不同資材下胞外複合酵素的 SDS-PAGE 分析圖，左圖為 TCA 濃縮後，加水回溶的樣品，右圖則為 TCA 濃縮後，加 Guanidine Hydrochloride 回溶的樣品。主要產出酵素(虛線箭頭所指)預計並非目標酵素，實線箭頭所指分子量與 MnP、LiP 相符合。(Marker: BioRad)

表 20 黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 之分子量介於 25-37 kDa 的酵素整理

EC Number ▼▲	Recommended Name ▼▲	Molecular Weight [Da] ▼▲	Molecular Weight Maximum [Da] ▼▲	Commentary ▼▲	Organism ▼▲	Prt Acc No.
EC 3.1.1.72	acetylxylin esterase	37000	-	x * 63000, recombinant His-tagged enzyme, SDS-PAGE, x * 55000, partially deglycosylated His-tagged enzyme, SDS-PAGE, x * 37000, about, sequence calculation	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.1.1.72	acetylxylin esterase	37000	-	x * 63000, recombinant His-tagged enzyme, SDS-PAGE, x * 55000, partially deglycosylated His-tagged enzyme, SDS-PAGE, x * 37000, about, sequence calculation	Phanerochaete chrysosporium	H2f
EC 3.2.1.6	endo-1,3(4)-beta-glucanase	36000	-	x * 36000, SDS-PAGE	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.2.1.8	endo-1,4-beta-xylanase	28600	-	x * 41600, isoform xynA, x * 28600, isoform xynB, x * 40300, isoform xynC, calculated, x * 52000, isoform xynA, x * 50000, isoform xynB, x * 32000, isoform xynC, SDS-PAGE	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.2.1.8	endo-1,4-beta-xylanase	32000	-	x * 41600, isoform xynA, x * 28600, isoform xynB, x * 40300, isoform xynC, calculated, x * 52000, isoform xynA, x * 50000, isoform xynB, x * 32000, isoform xynC, SDS-PAGE	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.2.1.99	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinanase	33000	-	x * 33000, SDS-PAGE	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.2.1.99	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinanase	33000	-	x * 33000, SDS-PAGE	Phanerochaete chrysosporium	I6X
EC 3.2.1.99	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinanase	33900	-	x * 33900, calculated from amino acid sequence	Phanerochaete chrysosporium	-
EC 3.2.1.99	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinanase	33900	-	x * 33900, calculated from amino acid sequence	Phanerochaete chrysosporium	I6X

註：整理自 BRENDA 資料庫 (Placzek et al., 2017; BRENDA)



五、結果與討論

由於樣品受到農廢資材的干擾很大，即使經 TCA 濃縮後，仍有嚴重干擾，經幾次丙酮清洗後再加入 Guanidine Hydrochloride，較能回溶出較多的酵素，其中，圖 22 中實線箭頭所指的條帶分子量約 43 kDa，與 LiP(表 21)、MnP(表 22)有相類似的分子量大小，且活性較好的綠茶、咖啡組，都有此蛋白質出現，將可做為初步的參考指標。

表 21 黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 之 LiP 分子量整理

MOLECULAR WEIGHT ▲▼	ORGANISM ▲▼	UNIPROT ▲ ▼	COMMENTARY ▲▼	×
38000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	SDS-PAGE	
39000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	x * 39000, isozyme I, SDS-PAGE	
40000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	SDS-PAGE	
41000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	x * 41000, isozyme II, SDS-PAGE	
42000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	x * 42000, SDS-PAGE	
43000	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	x * 43000, isozyme III, SDS-PAGE	

註：整理自 BRENDA 資料庫 (Placzek et al., 2017; BRENDA)

表 22 黃孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 之 MnP 分子量整理

MOLECULAR WEIGHT ▲▼	ORGANISM ▲▼	UNIPROT ▲ ▼	COMMENTARY ▲▼	×
40000 □	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	around 40 kDa, gel filtration	
		-	-	
43000 □	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	1 * 45000, PCH4 and PCH6, 1 * 43000, PCH5, SDS-PAGE	
		-	determined by Western blot analysis	
45000 □	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	1 * 45000, PCH4 and PCH6, 1 * 43000, PCH5, SDS-PAGE	
		-	gel filtration	
46000 □	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	-	
		-	x * 46000, SDS-PAGE	
		-	x * 46000, wild-type and mutants R177D, R177E, R177N and R177Q, SDS-PAGE	
		-	-	
		-	x * 46000, SDS-PAGE	

註：整理自 BRENDA 資料庫 (Placzek et al., 2017; BRENDA)



白腐菌酵素

5.2.4 生產效益表

利用咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌以獲得木質素相關分解酵素的流程，除了可以讓廢棄的咖啡渣再生、獲得更佳酵素活性之外，還可以有降低生產成本。此流程的生產效益表，整理如表 23。其中，除了菌體生長的時間略為延長之外，最終預計能提高每天每元的產能約 4.7 倍。

表 23 利用咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌之預計生產成本表

		價格(元/g)	PDB培養(/L)			咖啡渣培養(/L)		
			用量(g)	價格(元)	生產狀況	用量(g)	價格(元)	生產狀況
培養基成本	YE	3.2	5.0	16.0		1.67	5.33	
	PDB	4.6	24.0	110.4		8.00	36.80	
	coffee*	0.003	0	0		25.00	0.08	
	M9	0.015	0	0		200.0	2.90	
	總價			126.40			45.11	
培養天數					3-4 天			4-6 天
酵素產出					8 U			19 U
生產效益					0.018 U/元/天			0.084 U/元/天

* 以每噸 3000 元運費計算

表 24 利用咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌之預計分解效益表

	PDB 培養	咖啡渣培養
生產成本(元/L)	126.40	45.11
生產天數(天/批次)	3.50	5.00
處理污土量(Kg)	1.00	1.00
處理戴奧辛量(ng-TEQ/L)	2945.00	3906.00
處理戴奧辛量(mg/L)	3.63	4.33
反應天數	4	4
戴奧辛處理效益(ng-TEQ/元)	23.30	86.59
戴奧辛處理效益(mg/元)	0.03	0.10

進一步評估此方法降低土壤中戴奧辛濃度所需酵素之生產效益如表 24，簡言之，處理一噸污土(約 7100 ng I-TEQ/kg)需酵素 1000 公升，以 PDB 培養約需花費 12.6 萬，咖啡渣可降至 4.5 萬。若以戴奧辛淨值計算，分解每公克戴奧辛約需花費 3.5 萬降至 1 萬元。利用食品級的淨化工法，相對成本本來就比較高。但若一併考量社會成本與其他環境議題，仍有很大的參考空間。



五、結果與討論

5.3 酵素反應條件測試

本節摘要：

為因應將來現場的實務應用，嚴格考驗酵素反應時所需考量之酸鹼、溫度等環境因素之外，由於戴奧辛的疏水特性，使之容易吸附在塵土上與酵素形成較不利的兩相反應等，因此，測試酵素反應條件除了基本的酸鹼與溫度之外，還考慮界面活性劑（例如 Tween 80、Triton-100）以及不同添加劑（例如丙二酸、磷酸、檸檬酸、蘋果酸、硼酸）的影響。

結果發現，酵素在偏酸的環境（pH 5-6）具有較佳的反應性，此外，有機酸的添加對酵素活性最具影響力，雖然界面活性劑的添加不利於酵素反應，但所幸影響不大，因此，實務進行戴奧辛污土處理時，仍會考慮添加。詳細實驗過程與結果如下：

5.3.1 最適酵素反應條件初步分析

MnP 與 LiP 是 peroxidase 類的酵素，所以需要 H_2O_2 當作反應時氧的接受者如圖 22，因此，對於 H_2O_2 具有一定的需求，但是，由於 H_2O_2 是強活性物質，容易對蛋白質造成傷害，因此，過多的 H_2O_2 也必然會對 MnP 與 LiP 造成傷害。因此，我們測試了 H_2O_2 對白腐真菌 MnP 與 LiP 的活性影響（如圖 23），結果發現， H_2O_2 確實有其存在的必要性，尤其是測量 MnP 時，但隨著濃度的增加，漸漸對酵素活性造成影響。

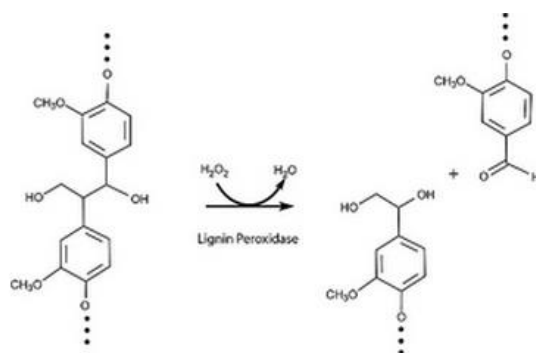


圖 23 LiP 進行木質素的降解反應時， H_2O_2 是氧的提供者。

資料來源：http://2015.igem.org/Team:_Purdue/Enzymes



白腐菌酵素

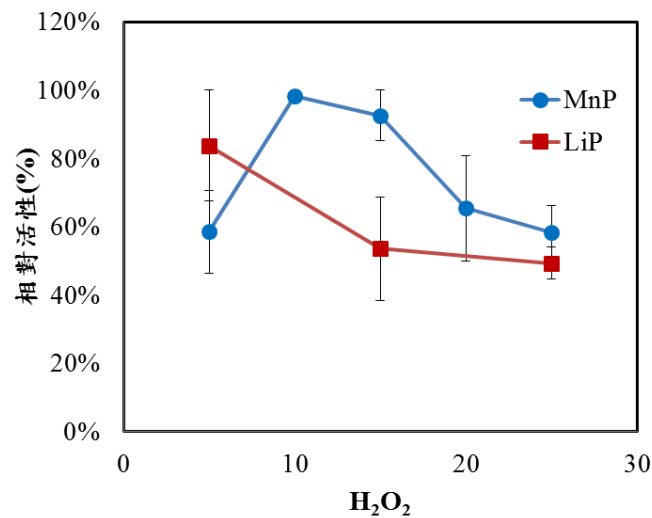
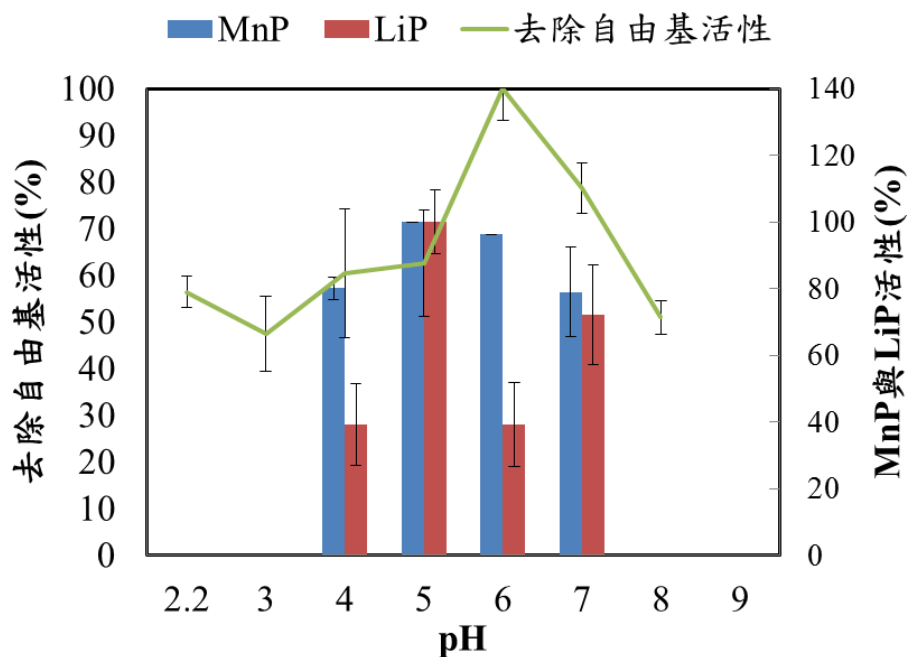


圖 24 H₂O₂ 對白腐真菌 MnP 與 LiP 影響。

5.3.2 最適酸鹼值測試

酸鹼值會改變蛋白質與基質的電荷，造成反應性的改變。為了瞭解白腐真菌之最適反應酸鹼度，同時測了 P.C. 之去除自由基能力、MnP 與 LiP 的最佳 pH 條件，其最適 pH 分為 pH 6、pH 5 與 pH 5 如圖 24 所示。整體而言，P.C. 這三類酵素在偏酸的環境（pH 5-6）具有較佳的反應性。例如白腐真菌 *Pleurotus ostreatus* 的胞外酵素 laccase，在 pH 2~7 下活性平均都在 50% 以上，但當 pH 大於 9 時，活性即迅速下降。因此，偏酸的酵素並不利於將來對污土直接應用，因為目前測得的污土大多偏向鹼性（本次實驗污土 pH 7-8）。





五、結果與討論

圖 25 白腐真菌之去除自由基能力、MnP 與 LiP 最適 pH 值。

5.3.3 田口試驗

為了有效測得酵素反應條件，引進田口試驗同時對有機酸、溫度 (°C) 及界面活性劑 Tween 80 (%) 與 Triton-100 (%) 四個試驗因子進行 P.C. 的去除自由基能力實驗 (如表 25)。分別進行了 9 組實驗，其反應條件與酵素活性測定結果如表 26，其中以 4、5、6 組的活性明顯較差。進一步以“望大”實驗分析並以下列公式計算其 S/N 值。

$$S / N = -10 \log \frac{1}{n} \sum \frac{1}{y_i^2}$$

表 25 試驗控制因子與水準表

因素 水平	有機酸	溫度 (°C)	Tween 80	Triton-100
1	丙二酸	25	0.0	0.0
2	廣用	35	0.5	0.5
3	蘋果酸	30	1.0	1.0

表 26 直交試驗統計表

因素 實驗組	有機酸	溫度 (°C)	Tween 80 (%)	Triton-100 (%)	平均值 (%)	S/N 比
1	丙二酸	25	0.0	0.0	97.87±1.59	39.81
2	丙二酸	35	0.5	0.5	99.32±0.96	39.94
3	丙二酸	30	1.0	1.0	98.04±0.19	39.83
4	廣用	25	0.5	1.0	65.94±5.42	36.30
5	廣用	35	1.0	0.0	58.14±3.69	35.23
6	廣用	30	0.0	0.5	49.85±3.85	33.88
7	蘋果酸	25	1.0	0.5	90.77±4.33	39.13
8	蘋果酸	35	0.0	1.0	94.11±0.26	39.47
9	蘋果酸	30	0.5	0.0	89.3±1.91	39.01

四個試驗因子的實驗分析結果發現，有機酸影響反應最為明顯，貢獻度約佔 66% (如表 27 與圖 26)。值得一提的是，這些有機酸都是文獻中提到可以促進 MnP 或 LiP 酵素反應的促進劑，其中，廣用緩衝溶液 (Britton-Robinson



白腐菌酵素

buffer) 中含有磷酸與檸檬酸，然而，還是以丙二酸與蘋果酸的活性較佳且不相上下（如圖 27，有機酸的 level 1 與 level 3）。

表 27 因子反應表

	有機酸	溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)
Level 1	39.9	38.4	37.7	38.0
Level 2	35.1	38.2	38.4	37.6
Level 3	39.2	37.6	38.1	38.5
貢獻度	66%	12%	10%	12%

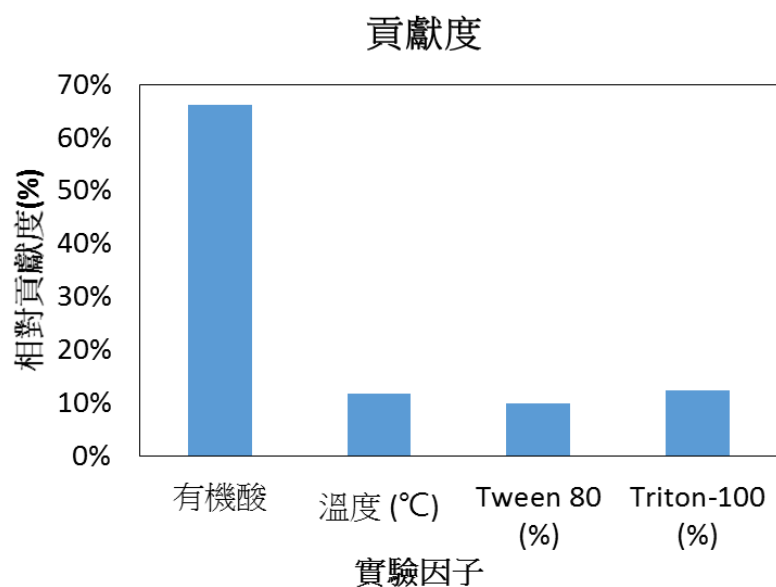


圖 26 試驗控制因子之貢獻度比較圖



五、結果與討論

四因子三水準分析圖

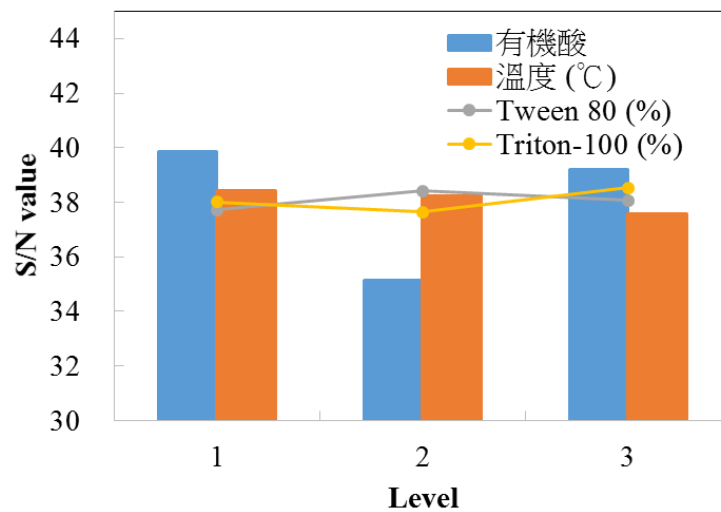


圖 27 試驗控制因子對 S/N 比的反應圖

此外，為了讓疏水特性戴奧辛容易與酵素反應，預計應添加少量界面活性劑以協助其溶解。由以上實驗發現，少量界面活性劑的存在並不會明顯降低酵素活性（無顯著差異）。由於 Tween-80 比 Triton X-100 影響較低（如圖 26）且價格更低（Tween-80: 360 元/ 500 ml 低於 Triton X-100: 5000 元/ 500 ml），因此，Tween-80 將作為將來預計添加的物質之一。此外，此酵素活性在 25℃ 與 35℃ 之間，都具有相當的酵素活性。





五、結果與討論

5.4 戴奧辛汚土淨化測試

本節摘要：

為了瞭解戴奧辛分解與不同資材、不同酵素活性強弱之間的關係。我們將不同資材下培養的胞外菌液體與戴奧辛汚土進行降解反應之後，個別分析 17 項戴奧辛（包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃）的含量變化。得到以咖啡渣培養的胞外酵素分解效果最好，分解效率為 60% I-TEQ，以總量計算高達 91% 分解效率。這些數據繼以統計計算出酵素活性的總和與戴奧辛分解效率具有高度的正相關。此外，嘗試分析產物以推估此防治的可能反應機制，避免防治過程中，產生毒害更大的脫氯產物。結果發現，此系統以非特異性的氧化開環作用將戴奧辛分解。詳細實驗過程與結果如下：

5.4.1 污染土壤基本物化特性分析

本研究中所使用的 PCDD / F 污染土壤是從台灣南部知名案場而來。由於原始土壤粒徑大小、物質組成不一，對污染物吸收能力的差異很大，因此導致 PCDD / F 濃度變化很大。為了獲得較為均質的污染土壤，按照美國材料試驗學會（ASTM）E276-13 進行濕篩。使用平均粒徑範圍為 0.105~0.250 mm，所篩得的土壤約占原土的 67%，TOC 和 TN 約為 0.73% 與 0.12%；電導率和 pH 分別為 0.16S m⁻¹ 和 8.9。經風乾後，保存於棕色瓶中。

5.4.2 淨化測試試驗

將 20 ml 在不同資材下培養 6 天的 P.C. 胞外菌液體與相同體積的戴奧辛汚土進行室溫 96 小時的降解反應之後，個別分析 17 項戴奧辛（包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃）的含量變化。結果顯示（詳細數據如附錄）使用綠茶渣與咖啡渣培養之後的胞外酵素，可將戴奧辛總量處理至最低（圖 28-GT 與 Coff），然後依序為米糠、PDB、紅茶與木屑。整體而言，酵素處理組戴奧辛總量的平均淨化率達 81%±8%。使用 I-TEF 計算其 I-TEQ 後，淨化率則為 49%±6% I-TEQ。



白腐菌酵素

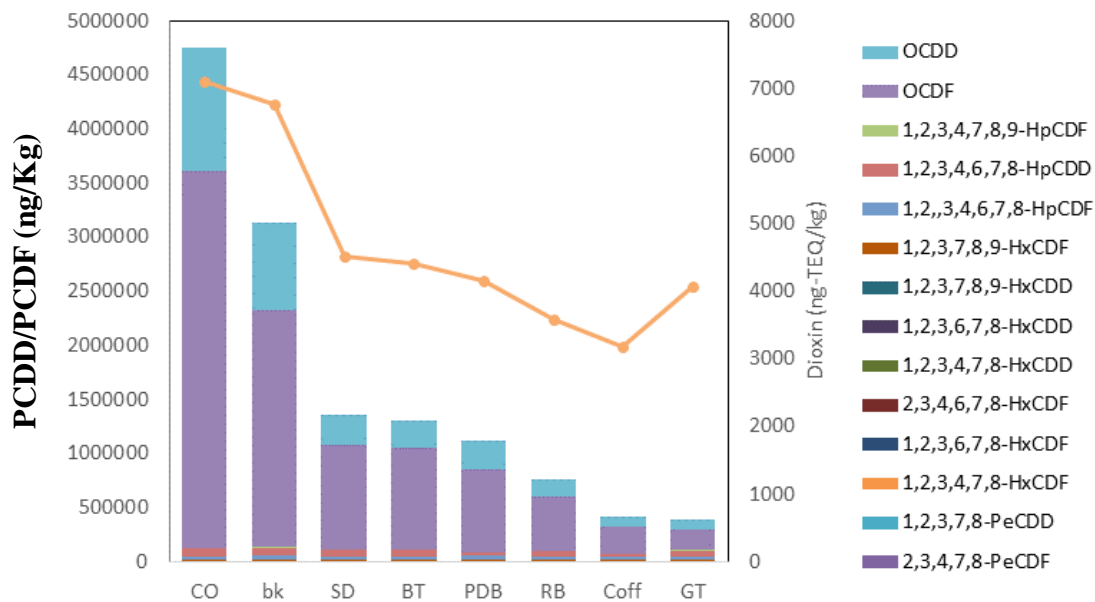


圖 28 不同液態培養基質生產之胞外酵素對戴奧辛汚土的處理結果。
P.C. 以木屑 (SD)、米糠 (RB)、紅茶渣 (BT)、綠茶渣 (GT)
與咖啡渣 (Coff) 與控制組 (PDB) 培養 6 天後，其胞外酵素或
空白組 (水，bk) 與汚土 (Co) 反應 96 小時的戴奧辛比較圖。

5.4.3 酵素活性與戴奧辛分解效率關係探討

將戴奧辛淨化率與酵素活性並排作圖 (如圖 29)，戴奧辛淨化率似乎跟酵素活性成一定的正相關。為了進一步確認這兩者之間的關係，分析了幾個相關研究變項的皮爾森相關係數 (Pearson's correlation coefficient) (如表 28)。此分析結果發現，MnP 與 LiP 的加總活性 ($r=0.896$) 比單一酵素活性 ($r=0.821$ 與 0.818) 與戴奧辛的淨化率更具有正相關性，且更具顯著性 ($p=0.006$)。



五、結果與討論

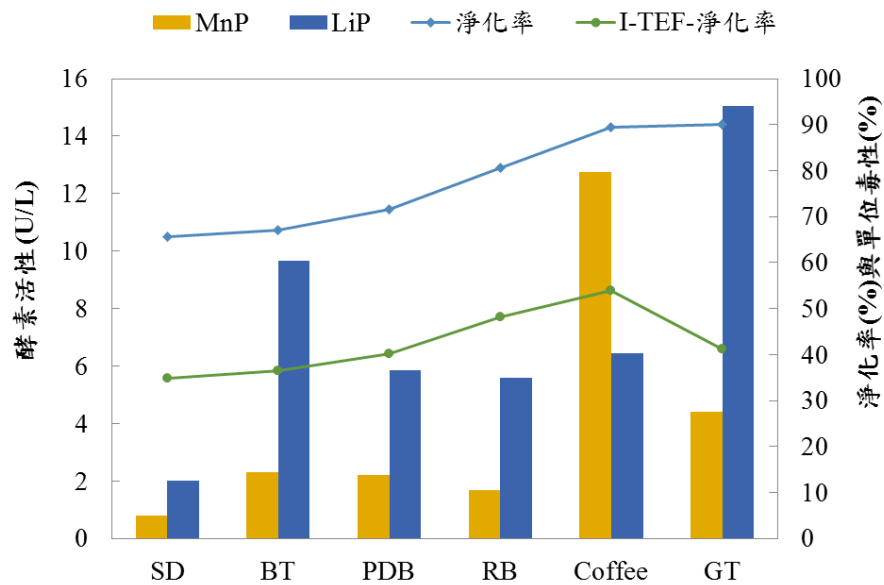


圖 29 戴奧辛淨化率與酵素活性關係圖

表 28 研究變項之皮爾森相關係數矩陣

		淨化率 (總量)	淨化率 (TEF)	毒性密 度	MnP	LiP	酵素總 活性
淨化率(總 量)	Pearson 相關	1.000	0.819	0.910	0.821	0.818	0.896
	顯著性 (雙尾)		0.024	0.004	0.024	0.025	0.006
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
淨化率(TEF)	Pearson 相關	0.819	1.000	0.521	0.707	0.537	0.673
	顯著性 (雙尾)	0.024		0.230	0.076	0.214	0.097
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
毒性密度	Pearson 相關	0.910	0.521	1.000	0.802	0.834	0.897
	顯著性 (雙尾)	0.004	0.230		0.030	0.020	0.006
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
MnP	Pearson 相關	0.821	0.707	0.802	1.000	0.668	0.898
	顯著性 (雙尾)	0.024	0.076	0.030		0.101	0.006
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
LiP	Pearson 相關	0.818	0.537	0.834	0.668	1.000	0.927
	顯著性 (雙尾)	0.025	0.214	0.020	0.101		0.003
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000
酵素總活性	Pearson 相關	0.896	0.673	0.897	0.898	0.927	1.000
	顯著性 (雙尾)	0.006	0.097	0.006	0.006	0.003	
	個數	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000	7.000



白腐菌酵素

註：酵素總活性=MnP+LiP；高度相關： $|r|=0.7-0.99$ ；中度相關： $|r|=0.4-0.69$ ；
低度相關： $|r|=0.1-0.39$ 。

此外，戴奧辛總量 (ng/kg) 淨化率與平均 TEF(平均每分子的單位毒性) 成正相關($r=0.91$)，意即淨化效果越好，單位毒性愈高。這是因為我們此次所採到的污土中 OCDF (I-TEF 0.001) 與 OCDD (I-TEF 0.001) 的比例高達 95% 以上 (如圖 28) (註：本場污土目前所測得 OCDF 與 OCDD 均在 60% 以上)，因為他們的 I-TEF 是 17 項戴奧辛中最低的，所以，任何會造成含量比例變化的過程，例如：非”非專一性降解”、開環、脫氯反應等，都可能造成單位毒性的升高。

表 28 中還可發現，利用戴奧辛總量 (ng/kg) 變化比戴奧辛 I-TEQ 總量變化，更能顯現出與 MnP 或 LiP 的線性相關。例如酵素總活性與淨化率總量 (ng/kg) 呈現高度相關 ($r=0.896$) 且具顯著差異 (0.006)，與淨化率 (I-TEQ) 卻只呈現相中度相關 ($r=0.673$) 且無顯著差異 (0.097)。這個經驗顯示，分析酵素活性或降解反應時，應更注意到總量 (ng/kg)，而非只重視毒性當量 (TEQ) 的分析才是。

5.4.4 反應產物與反應模式推估

戴奧辛的降解方式主要分為氧化開環反應與還原脫氯反應，而好氧細菌和厭氧細菌分別較有利於用在低氯和高氯 PCDD/Fs 的降解上 (Field and Sierra-Alvarez, 2008)。由於本實驗污土的高氯戴奧辛含量較多，因此若進行脫氯反應可能會引起毒性更高的四氯戴奧辛累積，因此試圖繼續以產物推估其反應模式。降解反應前後，由於 OCDF 與 OCDD 明顯下降，卻沒有相對應的戴奧辛產生 (如圖 30)，因此，初步估計 P.C. 對戴奧辛的淨化反應較偏向”裂解”而非”脫氯”反應。這也間接證明”氧化酵素”例如 LiP、MnP 的確在此扮演著舉足輕重的角色。



五、結果與討論

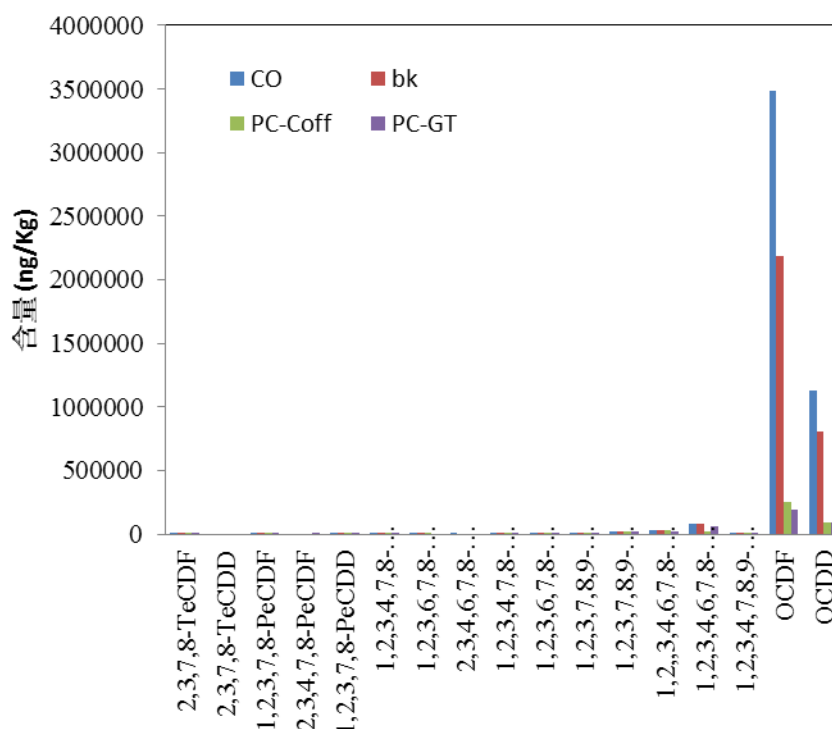


圖 30 17 項戴奧辛（包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃）的含量變化。

此外，由於綠茶渣與咖啡渣的總量處理效果相仿，但是綠茶渣處理結果的 I-TEQ 卻比咖啡渣來得高，因此，繼續做了成分比例分析圖如圖 31。透過成分比值的分析可以發現，成份含量比例會依照戴奧辛總量 (ng/kg) 的變化而循序漸進地變化。其中，OCDF (I-TEF 0.001) 與 OCDD (I-TEF 0.001) 的比例明顯降低，而 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (I-TEF 0.01)、1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (I-TEF 0.01) 與 1,2,3,7,8,9-HxCDF (I-TEF 0.1) 則隨著淨化效果越好，含量比例越高。因此，當戴奧辛總量相當時 (例如：綠茶渣與咖啡渣)，高 I-TEF 物質 (例如 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF) 的含量比例較高時，反而會造成較高的戴奧辛的 I-TEQ 總量表現。換言之，綠茶渣酵素對於高 I-TEF 物質的分解效率優於咖啡渣的。

整體而言，此反應對高氯低氯並無明顯偏好，且為一氧化開環作用，很符合 MnP、LiP 的氧化特性以及介質調節所導致的基質無專一性催化特性。



白腐菌酵素

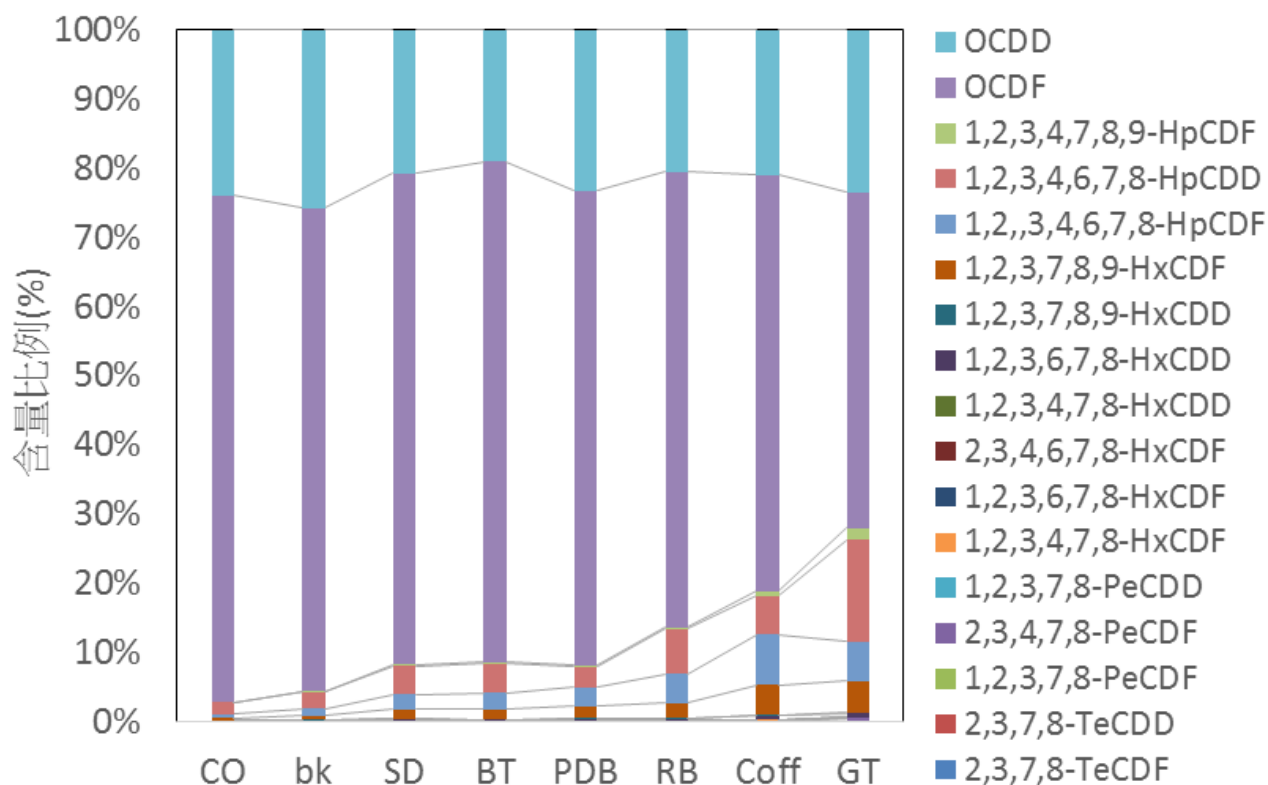


圖 31 17 項戴奧辛（包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃）的含量比例變化。

雖然這些反應後的物質曾嘗試去分析其 VOC 以及 SVOC，但因為基質（戴奧辛）濃度太低，導致產物濃度低，嚴重受到到咖啡渣、綠茶渣等的干擾，因此，只測得一些推測為咖啡渣、綠茶渣被酵素或菌體所分解的酸、醇與界面活性劑等。根據文獻，農業廢棄物的添加不僅可以有效促進真菌生長，還能刺激木質素分解酶的生產(Ergun and Urek, 2017)以及生物表面活性劑和/或生物乳化劑的生成(Mulligan, 2005; Bustamante et al., 2012)。而這些物質有些會協助疏水物質(如戴奧辛)溶解，有些將成為 MnP、LiP 這類酵素的介質，負責傳遞電子以促進此類酵素進行氧化反應。因此，對於使用純化過的酵素進行產物偵測時，不但酵素活性會不明顯，嚴重時(完全缺乏介質與小分子基質時)可能導致酵素完全沒有活性，例如 MnP 需酚類來增進氧化木質素的效率等(Nousiainen et al., 2014)。因此，若有機會應同時偵測酵素與介質及基質三者間的關係，才有機會得到可能要的資訊。



五、結果與討論

5.5 戴奧辛汚土淨化條件強化測試

本節摘要：

有鑑於酵素是一種”蛋白質”，容易被環境中的其他微生物消化分解，因此，此計畫亦試圖將酵素的活性藉由介質及界面活性劑的添加以重新規劃降低反應時間來達成。實驗結果發現，如同酵素試驗一樣，界面活性劑的添加無造成太大的降解效率改變，而介質硼酸果糖複合體的添加則可增進淨化率約 17%，此配方正申請專利中。此外，為了讓添加的農業廢棄物可以完全分解，培養時間調整至 28 天，但是事實證明並無明顯增強趨勢，反而導致時間效益的損耗。最後，在時間曲線的試驗中發現，其實 12 小時就已經完成 91% 的淨化能力，這說明了酵素的活性可能被低估了。詳細實驗過程與結果如下：

5.5.1 界面活性劑與介質對降解效率影響

為了讓疏水特性戴奧辛更容易與酵素反應，一般會考慮添加少量界面活性劑。之前的實驗得知（如圖 26），少量界面活性劑的存在並不會明顯降低酵素活性，因此，以添加 Tween-80 觀察胞外複合酵素對戴奧辛降解的影響。實驗結果如圖 32，如同酵素試驗一樣，界面活性劑的添加無造成太大的降解效率改變，

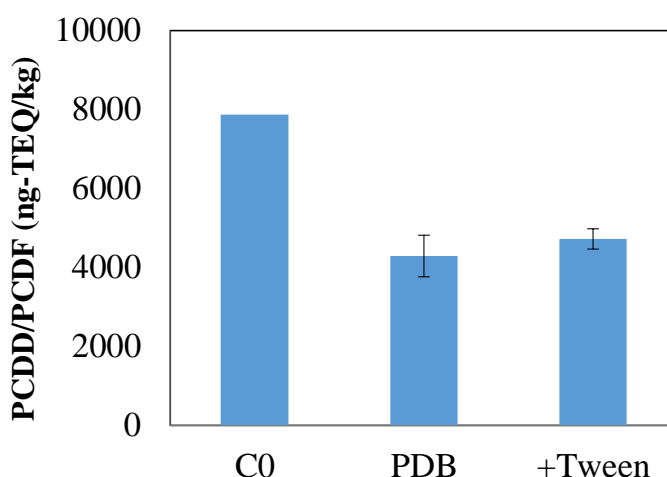


圖 32 添加界面活性劑 Tween 對降解效率影響圖。



白腐菌酵素

5.5.2 胞外複合酵素的培養 6 天與 28 天對降解效率影響

為了讓添加的農業廢棄物及培養基可以完全分解吸收，讓菌絲完全進入雙期生長(Diauxic Growth)第二階段，菌體培養時間自 6 天調整至 28 天，相當於菇類固態發酵時的”走菌”時間，再取胞外酵素去進行淨化反應。實驗結果顯示，延長培養時間不僅不會增加酵素的淨化能力(如圖 34)，延長菌體培養時間反而還會導致時間效益上的損耗。但本實驗也證實了老化的菌體仍擁有一定的酵素淨化能力，不會受培養時間有太大的波動。

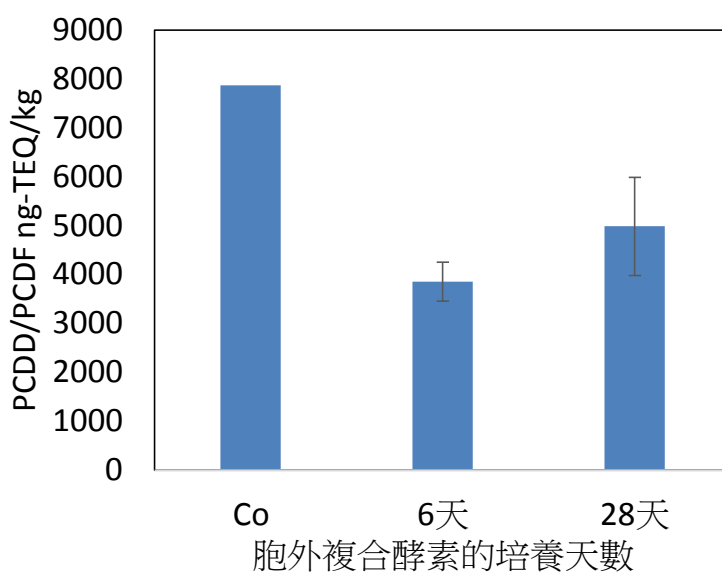


圖 33 胞外複合酵素的培養天數影響戴奧辛淨化情形。

5.5.3 戴奧辛汚土淨化時間曲線

之前本實驗室研究添加了一新型介質--硼酸果糖複合物可讓介質(mediators)調節特性的漆酶成功提高酵素反應效率(Cheng *et al.*, 2018)。由於木質素過氧化酶(LiP)與錳過氧化酶(MnP)有一樣的介質(mediators)調節特性，因此計畫添加硼酸果糖複合物以提高其降解效率。我們比較酵素對兩組汚土(添加介質與未添加)淨化反應時間 12、24、96 小時與剩餘戴奧辛含量之間的關係如圖 35。12 小時戴奧辛含量已經幾乎降到預定目標值(50%)，但 24 小時回升的數據可能來自汚土的高度差異所造成。添加介質的影響要到 96 小時才顯現出來，且由於 96 小時所檢測的酵素活性與剛添加時的酵素活性相差不大(80-90%)，因此沒再繼續追加酵素。這些實驗觀察推測，12 小時後裂解不再繼續反應的原故，可能是因為介質或其他有效小分子用罄所導致。但詳細原因，還需再進一步的實驗了解。



五、結果與討論

有趣的是在這個時間曲線的試驗中並無法得知真正酵素的作用時間，也許會更小於 12 小時！這說明了白腐真菌胞外複合酵素的活性可能被遠遠低估了。

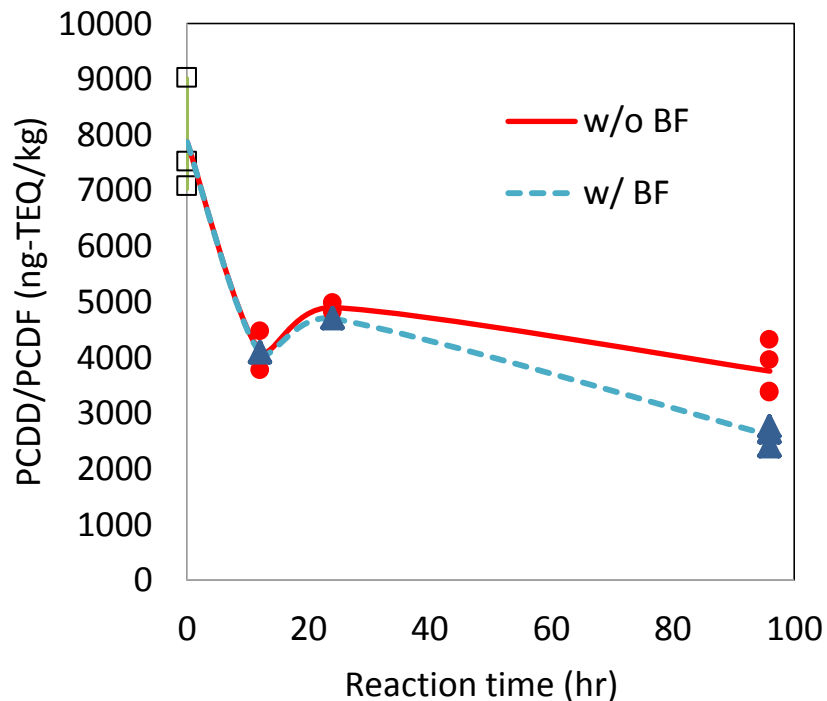


圖 34 胞外酵素處理戴奧辛汚土十，戴奧辛濃度與時間變化關係圖。

重新計算 96 小時的介質影響數據如圖 35，此介質成功提高降解效率 17%，此配方正申請專利中。

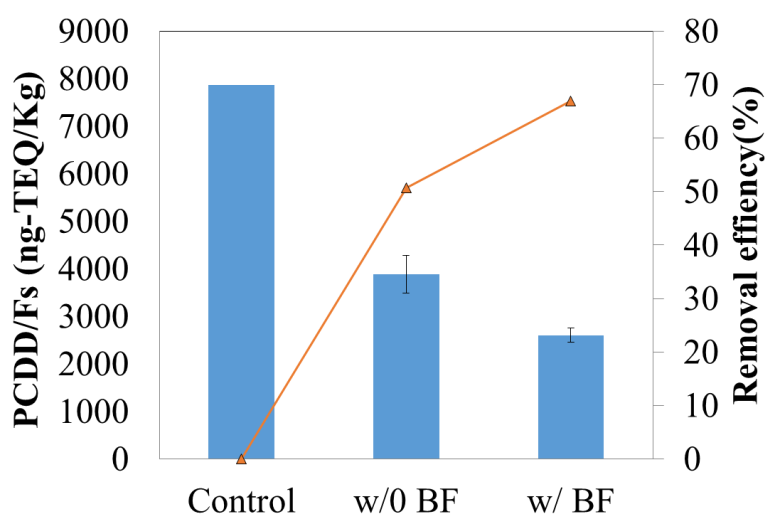


圖 35 添加介質-硼酸果糖複合體對降解效率影響圖。



白腐菌酵素

5.5.4 與國外結果比較

利用真菌整治戴奧辛的風潮繼細菌整治而起，但如同表 1 表 2 整理所示，學術研究的公開文獻指出真菌的整治時間都偏長，多以數周計算甚至到 3 個月。其中只有一篇利用 *Pseudallescheria boydii* 在 48 小時內完成 86.7% 的降解 (Ishii et al., 2008)，然其濃度極低起始濃度僅有 6.2 ng/ml。而較具競爭力的案例大多已成立國外實場 (整理如表 3) 導致實驗數據及資訊封閉匱乏。就僅搜尋到的實廠資料與本次計畫結果簡單整理如下：

表 29 戴奧辛降解實驗與國外結果比較表

	initial		Final	分解效率	反應條件	降解時間	反應相
	ng/Kg-TEQ	ng/Kg			(曝光情形)		
橘燦郎	1000		100*	90%	室外曝曬	30 天	固體反應
齋藤祐二	497.3		50*	90%	避光	1 小時	酵素液體反應
芬蘭 Aalto	X			37%	室內大廳	90 天	固體反應
EarthFax		15000	5000	67%*	室外遮光	282 天	固體反應
EarthFax		2836000	570000	80%*	X	274 天	固體反應
This study (以 TEQ 計算)	7100		3194	55%*	室內光	96 小時	酵素液體反應
This study (以總量計算)		4750190	415000	91%	室內光	96 小時	酵素液體反應

註：*利用文獻資料所計算之結果；X: 查無相關資料



五、結果與討論

由表 29 可明顯看出，液態酵素在反應速率上有絕對的優勢，也明顯顯現在本研究與齋藤祐二結果的反應時間上。此外，本實驗系統所整治的戴奧辛濃度高於其他案場，則是另一個亮點。(註：本實驗數據僅為實驗室規模，非現地模廠量化整治數據)

本計畫之分解效率約為 55% 與 91% (以咖啡渣培養之最佳化計算)，之所以相差很大，是由於本計畫所使用之污土中主要含量為低毒性的 OCDD/F，但也因此明顯證實了此整治系統不會經脫氯反應而產生更毒的 tetra-OCDD/F 的代謝優勢。

附錄-表 30 汚土以不同培養條件之酵素淨化後的 17 項戴奧辛含量變化

ng-TEQ/kg

Compound Name	Sample Name	CO	bk	SD	RB	BT	GT	Coff	PDB	I-TEF
2,3,7,8-TeCDF	(# 2) Amount	18.50496	29.81634	24.49081	14.09192	15.0533	17.3201	19.86352	18.99826	0.1
2,3,7,8-TeCDD	(# 5) Amount	0	0	3.787879	4.335976	5.639564	0	0	0	1
1,2,3,7,8-PeCDF	(# 8) Amount	4.041563	5.487881	4.120094	2.905104	3.74938	6.222084	3.325062	7.485104	0.05
2,3,4,7,8-PeCDF	(# 10) Amount	0	0	0	0	0	744.1377	0	0	0.5
1,2,3,7,8-PeCDD	(# 12) Amount	73.63524	119.0655	74.11202	63.98662	58.65766	20.96774	124.2246	63.05859	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	(# 14) Amount	40.15509	74.25662	59.05365	42.00322	30.3173	34.03846	32.3201	58.44712	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	(# 16) Amount	18.77792	28.62944	17.56085	14.35208	16.38572	0	7.531017	18.20382	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	(# 18) Amount	17.43797	0	0	17.74034	18.41225	0	0	0	0.1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	(# 20) Amount	26.09801	42.51	28.26006	23.72398	25.60114	23.70968	35.52109	28.61842	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	(# 22) Amount	211.005	324.3128	273.1868	162.8035	213.504	224.8077	195.9801	267.6701	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	(# 24) Amount	57.88462	103.3608	65.31918	53.85282	54.96406	59.8263	63.56079	66.52805	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	(# 26) Amount	1684.957	1804.479	1850.466	1699.058	1893.908	1794.057	1812.854	1915.864	0.1
1,2,,3,4,6,7,8-HpCDF	(# 28) Amount	300.0589	321.9347	293.2725	316.6198	304.4559	226.7239	302.1787	314.676	0.01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	(# 30) Amount	793.2959	772.3669	560.426	496.7678	557.4033	582.1253	233.9783	338.1833	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	(# 32) Amount	25.73821	34.78636	24.63674	20.73959	23.39799	66.04342	24.96216	25.78389	0.01
OCDF	(# 34) Amount	3483.345	2190.325	965.3759	501.6723	942.1177	192.2573	250.739	770.5392	0.001
OCDD	(# 35) Amount	1133.96	808.9968	281.6685	156.0797	247.739	93.12177	86.92395	261.8366	0.001
Total-Dioxins		7100.123	6777.819	4525.737	3590.733	4411.306	4085.359	3193.962	4155.893	
I-TEQ 淨化率(%)			5%	36%	49%	38%	42%	55%	41%	
淨化率(%)			34%	71%	84%	73%	92%	91%	76%	
平均 TEF		0.00149	0.00216	0.00333	0.00471	0.00339	0.0103	0.00768	0.00370	

五、結果與討論

附錄-表 31 Verification of internal standard (labeled solution) recovery for PCDD/Fs analysis

Compound	Curve level	1	2	3	4	5	6	Average response	Sample response	Recovery %	Check	Acceptable Range
	Conc. (ug/L)	0.8/4/8	8/40/80	40/200/400	120/600/1200	200/1000/2000	280/1400/2800					
	Response											
*13C12-2,3,7,8-TeCDF	20	5417	7879	8458	9382	9184	10164	8414	4092	49	PASS	30-130%
*13C12-2,3,7,8-TeCDD	20	3004	4030	3504	4999	5105	5639	4380	2753	63	PASS	30-130%
*13C12-1,2,3,7,8-PeCDF	20	5215	7383	7917	8332	7926	8707	7580	3666	48	PASS	30-130%
*13C12-2,3,4,7,8-PeCDF	20	4810	5900	7811	8116	7927	8102	7111	3468	49	PASS	30-130%
*13C12-1,2,3,7,8-PeCDD	20	3625	5094	4757	5088	4605	5081	4708	1926	41	PASS	30-130%
*13C12-1,2,3,4,7,8-HxCDF	20	3041	3798	5251	5984	5746	6212	5005	2194	44	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,6,7,8-HxCDF	20	9484	8954	9321	7998	7552	7789	8516	3483	41	PASS	40-130%
*13C12-2,3,4,6,7,8-HxCDF	20	4973	6208	6598	6706	6199	6192	6146	2814	46	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,4,7,8-HxCDD	20	2764	5692	4218	3327	4031	3946	3996	2212	55	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,6,7,8-HxCDD	20	4888	4721	5753	6106	5627	5879	5496	2307	42	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,7,8,9-HxCDF	20	3029	4042	4607	5396	4684	5167	4488	1821	41	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	20	4179	5857	5624	6260	6187	7317	5904	2529	43	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	20	2536	3566	4184	4275	4126	4525	3869	1959	51	PASS	40-130%
*13C12-1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	20	2028	2699	3451	4060	4015	4841	3516	2373	67	PASS	40-130%
*13C12-OCDD	40	2887	3315	5365	6313	6645	7225	5292	2261	43	PASS	40-130%



白腐菌酵素

附錄-表 32 Calibration curve verification for PCDD/Fs analysis

Compound Name	Avg. response factor	Linear regression	Criteria	Evaluation
2,3,7,8-TeCDF	20.11	0.9956	>0.990	PASS
2,3,7,8-TeCDD	13.13		< 20%	PASS
1,2,3,7,8-PeCDF	11.12		< 20%	PASS
2,3,4,7,8-PeCDF	10.93		< 20%	PASS
1,2,3,7,8-PeCDD	16.25		< 20%	PASS
1,2,3,4,7,8-HxCDF	10.81		< 20%	PASS
1,2,3,6,7,8-HxCDF	12.81		< 20%	PASS
2,3,4,6,7,8-HxCDF	10.55		< 20%	PASS
1,2,3,4,7,8-HxCDD	16.18		< 20%	PASS
1,2,3,6,7,8-HxCDD	10.66		< 20%	PASS
1,2,3,7,8,9-HxCDD	21.42	0.9951	> 0.990	PASS
1,2,3,7,8,9-HxCDF	14.10		< 20%	PASS
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	10.12		< 20%	PASS
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	17.88		< 20%	PASS
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	5.58		< 20%	PASS
OCDF	5.18		< 20%	PASS
OCDD	5.58		< 20%	PASS



六、結論與建議

六、 結論與建議

6.1 結論

在同時考慮生產成本與量化潛力的前提下，經過實驗室海選，還是選用具有酵素活性強、團聚力強、對培養基不挑剔的白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 做為實驗目標。不同再生資材均可以替代 PDB 培養出有效的酵素，平均 96 小時的淨化效率約 50%。因此，選用方便取得、可直接應用的咖啡渣做為培養材料，並成功降低成本並提高每天每元的產能約原來的 4.7 倍（請參考表 10）。

由於能增進酵素活性的介質--硼酸果糖複合物，已在此計畫證實能增進淨化效率；而不影響酵素反應的界面活性劑，亦對淨化效率沒有影響；加上皮爾森的相關係數分析、氧化裂解的反應特性，這些都指出氧化酵素在此所扮演的重要角色。更藉由淨化時間的監控試驗得知此淨化速率嚴重被低估，真正淨化可能可以更少於 12 小時。

此胞外複合酵素不只是酵素而已還包含了培養基裡被分解的小分子，她提供了酵素、介質、界面活性劑，甚至是誘導菌體內分解系統的脂肪酸等，均是參與淨化的重要因子，也是很引人入勝的一環，因此，在發表的海報與未來要發表的文章，將正名為無菌絲液體(FMLs: free mycelium liquid)，並持續進行相關學術研究。

此計畫證實了白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的無菌絲液體可有效復育戴奧辛污染土壤，此處理後的污土，雖然仍不及土壤標準，但以這種對環境影響最低、防治後自動消失變成現地原生生物養分、能促進土壤自體原地持續降解的生物防治法，不僅在復育戴奧辛污土之餘，更能兼顧節省能耗、減排空污、節省用水與減免廢水、循環使用綠色原物料資材與減廢、提升土地肥力及豐厚生態多樣性等 GSR 整治，實現淨化戴奧辛污土的最佳管理實務。

6.2 建議

1. 戴奧辛的 I-TEQ 是針對生物毒性所設計的定量方法，所以，對於淨化本身的分析時，例如本計畫的酵素反應，可能會造成分析上的困擾。因此，建議分析此類數據的學者，應適度考量 17 項戴奧辛的真正總量或參考各個物質的穩定度，而非只關心 I-TEQ 的變化。但無可厚非的，戴奧辛的 I-TEQ



白腐菌酵素

仍會是”對人類”安全與否的最終指標。

2. 對於戴奧辛此類的”世紀”難分解的毒物，尤其是台灣南部的知名高濃度案場，無論是總量上的降低或是百分比上的降低，都應該考慮鼓勵研發。例如，若能由高污染濃度先降到一般細菌可容許的濃度範圍，即可加速大自然的自淨功能，對大面積的污染，也不乏是個可行的策略，而非只以達”放流標準”為主臬。否則，將會間接鼓勵適度稀釋或只取少量進行反應的不良示範。

6.3 檢討

未能測得反應產物，是本計畫最遺憾的環節。依據此計畫經驗與推估，若有機會研究時，除了應將基質中的小分子移除之外，要同時考慮酵素、介質及基質三者間的關係，才有機會得到可能要的資訊。



七、未來展望

七、未來展望與未來計畫研究

生物修復法 (bioremediation) 最令人擔憂的是生產成本，除了菌體的培養基之外，一般的酵素生產成本，還有破菌、純化分離、儲存等的設備與耗費成本；本計畫成功利用綠色循環材料降低菌體培養成本、利用免純化的胞外酵素，免除離心的胞外液體收集技術。根據此次的成功經驗，未來的研究計畫如下：

在污染防治應用上，根據此次的成功經驗，改以”柱狀”反應器進行模擬污土的淨化實驗，了解在無動力混勻的情況下或是計算淨化的理論板數，用以判斷將來能否以”漫流”的防治方法進行現場的污染防治。

在成本考量上，致力發展球體化菌絲，以類似固定化菌體發酵，連續式串聯培菌，以降低生產胞外酵素的時間。或同步啟動逆向工程，自業界現已量產之各類酵素中，尋求可能料源。預計這些都應有相當機會可以大大降低傳統的生物整治成本，更符實務應用所需。

在學術研究上，以 CV 偵測各物質的電壓變化，找出酵素、介質、基質（污染物）三者之間的關聯，以期能在咖啡渣培養液中或自然界中找到更天然的、能力更好的、或是比硼酸果糖更無害的介質；更甚者，以基因工程的方式，製備出氧化力更強、基質特異性更廣泛的漆酶、木質素過氧化酶 (LiP) 或錳過氧化酶 (MnP)。

考慮較低的初設成本，同時規劃解決多類污染土，減少甚至避免產生廢棄物、能耗、空污、水污等環境二次污染與生態、社會成本等相關問題，與本計畫類似的生化整治法，對於全球重視的綠色且永續導向型整治 (green sustainable remediation, 簡稱 GSR) 絕對都是一件相當值得考慮投資的選項。



白腐菌酵素



八、參考文獻

八、參考文獻

2014 詞彙表的定義資料來源「<https://agclass.nal.usda.gov/glossary.shtml>」

Anasonye F., Winqvist E., Kluczek-Turpeinen B., Räsänen M., Salonen K., Steffen K.T., Tuomela M.(2014) Fungal enzyme production and biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in contaminated sawmill soil. *Chemosphere*, 110, 85-90.

Baker K.H. and Herson D.S., 1994. Introduction and overview of bioremediation. In: Baker KH and Herson DS *Bioremediation*, McGraw-Ha, Inc. New York, 1-7.

Bustamante, M., Duran, N., Diez, C., 2012. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: A review. *J. soil Sci. plant Nutr.* 12, 667 – 687. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012005000024>

Cai Y, Li G, Nie J, Lin Y, Nie F, Zhang J, Xu Y., (2010). Study of the structure and biosynthetic pathway of lignin in stone cells of pear. *Journal of Scientia Horticulturae* 125:374 – 379.

Cajthaml, T., Erbanova, P., Kollmann, A., Novotny, C., Sasek, V., Mougin, C., 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53, 289 – 294. doi:10.1007/s12223-008-0045-7

Chang, H.-J., Wu, Y.-J., Lin, T.-F., 2015. Human health risk management of a mercury, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans, and pentachlorophenol contaminated site: Remediation action. *Sustain. Environ. Res.* 25, 207 – 215.

Chang, Y.-S., 2008. Recent Developments in Microbial Biotransformation and Biodegradation of Dioxins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 152 – 171.

Cheng, C.-Y., Chia-I. Liao and Shuen-Fuh Lin (2015) Borate-fructose complex: A novel mediator for laccase and its new function for fructose determination. *FEBS letters* 589(20):3107-3112. (7 Oct 2015) (SCI-2014:3.1) (SCI-IF-2016:3.6, Biophysics Q1) 2014:3.2

Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M.M., Cone, J.W., Marques, G.S.M., Barros, A.R.N., Rodrigues, M.A.M., (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with



白腐菌酵素

- white-rot fungi. *Bioresource Technology* 100, 4829-4835.
- Ergun, S.O., Urek, R.O., 2017. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Ann. Agrar. Sci.* 15, 273 – 277.
<https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>
- Fewer CTL, not enhanced NK cells, are sufficient for viral clearance from the lungs of immunocompromised mice. *Cell Immunol.* 2003 Nov; 226 (1): 54-64.
- Field, J.A., Sierra-Alvarez, R., 2008. Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere* 71, 1005 – 1018.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.039>
- Freitas, E.N.D., Bubna, G.A., Brugnari, T., Kato, C.G., Nolli, M., Rauen, T.G., Peralta Muniz Moreira, Regina de Fátima, Peralta, R.A., Bracht, A., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M., (2017). Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. *Chemical Engineering Journal* 330, 1361-1369.
- Gesell, M., Hammer, E., Mikolasch, A., Schauer, F., 2004. Oxidation and ring cleavage of dibenzofuran by the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Arch. Microbiol.* 182, 51 – 59. doi:10.1007/s00203-004-0695-z
<http://earthrepair.ca/bioremediation-in-the-yukon-using-fungi-plants-and-compost-to-heal-petroleum-contaminated-soils-up-north/>
- Ishiguro, T., Ohtake, Y., Nakayama, S., Inamori, Y., Amagai, T., Soma, M., Matsusita, H., 2000. Biodegradation of Dibenzofuran and Dioxins by *Pseudomonas Aeruginosa* and *Xanthomonas Maltophilia*. *Environ. Technol.* 21, 1309 – 1316. doi:10.1080/09593330.2000.9619020
- Ishii K, Furuichi T, Tanikawa N, Kuboshima M. (2008) Estimation of the biodegradation · rate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by using dioxin-degrading fungus, *Pseudallescheria boydii*. *J. Hazard. Mater.* 162(1), 328-332.
- Juárez, R.A., Gordillo Dorry, L.L., Bello-Mendoza, R., Sánchez, J.E., (2011). Use of spent substrate after *Pleurotus pulmonarius* cultivation for the treatment of chlorothalonil containing wastewater. *Journal of Environmental*



八、參考文獻

- Management 92, 948-952.
- Kimura, N., Urushigawa, Y., 2001. Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. J. Biosci. Bioeng. 92, 138 – 143. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80214-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80214-0)
- Kondo, R., Kamei, I., 2006. Biodegradation of Dioxins and PCBs by Mushroom Fungi. BioIndustry 23, 68 – 76.
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. 133, 183 – 198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Nam, I.-H., Kim, Y.-M., Murugesan, K., Jeon, J.-R., Chang, Y.-Y., Chang, Y.-S., 2008. Bioremediation of PCDD/Fs-contaminated municipal solid waste incinerator fly ash by a potent microbial biocatalyst. J. Hazard. Mater. 157, 114 – 121. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.086>
- Nousiainen, P., Kontro, J., Manner, H., Hatakka, A., Sipilä, J., 2014. Phenolic mediators enhance the manganese peroxidase catalyzed oxidation of recalcitrant lignin model compounds and synthetic lignin. Fungal Genet. Biol. 72, 137 – 149. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.008>
- Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, M., Tillack, J., Schomburg, D. BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA, Nucleic Acids Research, Volume 45, Issue D1, January 2017, Pages D380 – D388, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw952>
- Sato, A., Watanabe, T., Watanabe, Y., Harazono, K., Fukatsu, T., 2002. Screening for basidiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin. FEMS Microbiol. Lett. 213, 213 – 217.
- Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., 2001. Dehalogenation of Chlorinated Hydroxybiphenyls by Fungal Laccase. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4377 – 4381. doi:10.1128/AEM.67.9.4377-4381.2001
- Takada, S., M. Nakamura, T. Matsueda, R. Kondo, and K. Sakai. 1996. Degradation of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4323-4328.



白腐菌酵素

- Tu, Y.T., J.K. Liu, W.C. Lin, J.L. Lin, and C.M. Kao. (2014). Enhanced anaerobic biodegradation of OCDD-contaminated soils by *Pseudomonas mendocina* NSYSU: Microcosm, pilot-scale, and gene studies. *J. Hazard. Mater.* 278, 433 – 443.
- Valli, K., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1992). Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 174(7), 2131-2137.
- Wang, C.P., Sun, H.W., Li, J.M., Li, Y.M., Zhang, Q.M., 2009. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere* 77, 733 – 738. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.028>
- WHO, I. (International A. for R. on C., 1997. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans.
- Winquist, E., 2014. Fungi clean oil-polluted soil [WWW Document]. URL <http://phys.org/news/2014-05-fungi-oil-polluted-soil.html> (accessed 5.21.14).
- Winquist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K.T., Jørgensen, K.S., Tuomela, M., 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – From laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 86, Part C, 238 – 247. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.012>
- Zeng, G., Cheng, M., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Wei, Z., Li, N., Zhang, C., He, X., He, Y., (2015). Study of the degradation of methylene blue by semi-solid-state fermentation of agricultural residues with *Phanerochaete chrysosporium* and reutilization of fermented residues. *Waste Management* 38, 424-430.
- Zeng, G., Zhao, M., Huang, D., Lai, C., Huang, C., Wei, Z., Xu, P., Li, N., Zhang, C., Li, F., Cheng, M., (2013). Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 166-172.

行政院環境保護署環境檢驗所，(2013)，戴奧辛及呋喃檢測方法－同位素標



八、參考文獻

熾稀釋氣相層析／高解析質譜法（NIEA M801.12B）。

行政院環境保護署環境檢驗所，(2013)，戴奧辛及呋喃檢測方法－同位素標
熾稀釋氣相層析／高解析質譜法（NIEA M801.13B）。

齋藤祐二、萩原純一、飯星茂 (2006) ダイオキシン類及び PCB 汚染土の
浄化システムの開発 大成建設技術センター報 第 39 号

橘燦郎 (2009) 『木材腐朽菌を用いたバイオレメディエーションによるダイオキシ
ン及び環境ホルモン汚染土壤の浄化』15 卷 一般社団法人 国際環境研究協会。





自評

專案成果績效自評

本實驗方向上完全符合原計畫規劃，並且得到許多正面的實驗結果。在與污土反應期間，不僅消彌了酵素可能失活無效的疑慮，更提供了以後利用酵素分解戴奧辛時可以考慮的有利因素，例如酵素的嗜酸性反應、最適溫度約 25-35°C、有機酸（丙二酸與蘋果酸）是增強劑（原因不明）、界面活性劑的添加無明顯影響等。其中，以硼酸果糖作為介質以增進戴奧辛被酵素降解的配方，目前業已著手申請專利（詳見附錄）。

為了瞭解是否有更毒的戴奧辛被累積產生，本計畫預計檢測至少 3 個產物，以釐清其反應機制，但因為農廢資材的訊號太多，導致無法得到有效訊號以解開酵素代謝的路徑，是本計畫最大的遺憾。所幸，由於降解效果很好，短時間內並無相對應的脫氯產物，因此，推論為氧化開環反應，消彌了會有更毒戴奧辛產物的疑慮。

十一月是豐收的一個月，這些實驗數據除了完成此期末報告之外，還將陸續發表 1 份國內研討會（詳見附錄），2 份國際研討會（詳見附錄），希望能藉由交流，將這個值得發展的消息散播出去。此外，期刊論文已鎖定發表至 "International Biodeterioration and Biodegradation journal" (impact factor 3.8)。

能以生化學者的角度去觀察這個議題，是之前從未想過的，這還得感謝海洋環境工程系的協同主持人林啟燦老師的知遇以及其實驗室人員（吳子妍、張誌楓等）在戴奧辛分析上的鼎力相助，此外，還得感謝樹德科大黃弘州老師的數據統計協助以及第一校區博士後研究員馬力歐的鑑定真菌，當然還得感謝一邊唸書、一邊當兼任助理還時時被叨念的兩個寶貝學生黃靖婷與陳師睿以及目前實驗室一堆還在努力學會做實驗的大一臨時工。更感謝土基會給予這個超跨領域的團隊執行這個酷炫有意義的研究。





附件

附件

附件 1: 期中審查意見回復表

附件 2: 國內研討會論文 (真菌學術研討會暨 108 年度真菌學會年會 海報)

附件 3: 國外研討會論文 (CESE-2019 海報)

附件 4: 國外研討會論文 (YABEC-2019 海報)

附件 5: 申請中之發明專利 TW108122019 首頁



行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☒期中報告 ☐修正計畫書 ☐期末報告 **審查意見回覆對照表**

計畫年度	108 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：鄭至玉 NO：C4	
計畫名稱	利用白腐真菌胞外酵素淨化戴奧辛污土之技術研發		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一			
1. 請補計畫書審查意見表。		感謝委員的提醒，已補上。	
2. 未來鎖定東南亞國家戴奧辛污土案場，值得鼓勵與肯定。		感謝委員的肯定。目前本計畫中的合作廠商在印尼設有工廠、計畫兼任助理中亦有一泰國博士生，希冀將來能順利循序漸進南向發展。	
委員二			
1. 白腐真菌與其胞外酵素都可分解戴奧辛，請比較兩者間之異同。		感謝委員的提醒，實驗將更小心操作，盡可能釐清此兩者的作用。簡言之，白腐真菌的胞外酵素以非專一性的氧化反應為主，菌體本身的反應則可能是生物性吸附或是吸收到菌體內後，藉由一系列的酵素進行分解及再利用(如圖 2)。為防止菌體"吸附"戴奧辛，除以高速離心去除菌絲之外，戴奧辛分析時，也已設計連同酵素、菌絲與污土一起進行萃取儘量降低菌絲效應。當然，將來進行模場試驗時，將不再使用高速離心以降低成本，但也能預期因為菌絲的存在可以得到更好的去除效率。	
2. 酵素製備過程涉及很多操作因子，對酵素活性影響與選用考量為何？酵素活性是否會影響戴奧辛分解效果上之顯著差異？		酵素製備過程的確涉及很多操作因子，為了避免此類問題，此計畫選用耐環境因子的"胞泌"酵素，並選用較不利生長的培養基(例如咖啡渣)取代 PDB，期許能夠建立適當的天然環境。 酵素活性似乎跟戴奧辛淨化率成一定的正相關(如圖 22)，但是此種正相關是	



	來自酵素本身，抑或是不同資材所造成的代謝物分子參與，實在需要更進一步的深入研究，才能一探究竟了！
委員三	
1. 符合 GSR 原則，即綠色技術、低碳與低成本等誘因。	感謝委員的肯定。
2. 擬用之污染土為何應予說明？係取乾淨土壤再行添加 dioxin？或取安順廠土壤(或其他可能場址)；土壤性質可能會嚴重影響酵素的反應效果，例如 pH、有機碳、微生物活性等，建議最適酵素反應條件實驗結束後，能考慮上述之土壤條件。	感謝委員的提醒，目前所使用之土壤雖然源自台南污染案場，但已經乾燥存放於實驗室很長一段時間。因此，小量的測試縱然有效，但微生物相恐怕已然喪失；此外，污土偏向鹼性 (pH 7-8) 不利目前酵素反應，所幸已找到適當處理方式，目前正在申請專利中。再次感謝委員的提醒。
委員四	
1. 本計畫基於永續導向，針對受戴奧辛污染之土壤開發生物整治技術。	感謝委員的肯定。
2. 圖 11 中，樣品 2、4 及 9 Laccase 活性下降之原因為何？	<p>感謝委員的細心觀察，菌菇磨碎後活性下降的原因經仔細推敲後，有以下可能：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 由於樣品係購自大賣場，可能存放時間、菇齡等略有差異所引起之實驗誤差；因為 laccase 在不同菇期有所變化，例如出菇前，此酵素活性會驟減。 2. 菇菌體內抗氧化物質被萃出所影響。普遍認為，菇類有很好的去除自由基活性，而此活性正好與 laccase 測量相反，互相干擾。因此，當 laccase 活性大於抗自由基活性時，才會測得 laccase 活性，而在此，可能因為這些抗氧化物質被磨碎釋出，所以，導致 laccase 活性下降。此兩者活性在菇體內產生的交互作用，的確也是個值得研究的話題。由於本團隊無菇類發育生態專家，故將研究限定在液態醱酵階段，以防止此類



酵素更迭的影響。

3. 根據 5.4 節指出 P.C.對戴奧辛之淨化反應偏向裂解反應，是否可以反應前後 17 種戴奧辛同源物之濃度變化示之，以證實其裂解反應？

感謝委員的建議。17 項戴奧辛（包括 7 種戴奧辛及 10 種呋喃）的含量變化已增列為圖 22。由此分析的確可以更明顯看出 OCDF 與 OCDD 量下降卻沒有相對的同源物變化，足以證實裂解反應為主要的催化作用。

4. 圖 21 之圖例標示不甚清楚，長條圖深淺所代表意義為何？宜加以釐清。

感謝委員的提醒，已修正，詳見圖 21。

委員五

1. 日本、瑞典、美國之實場案例，可以降解戴奧辛達 62~84%，宜說明實場中戴奧辛(Dioxins)之起始與終了濃度，增加本研究可行性探討。

感謝委員的提醒，文獻已更新。相信很多技術應該已進入轉移階段，因此，很多資料都付之闕如。就找到的實場案例資料與目前研究資料結果整理如下：

	initial ng/Kg-TEQ	Final ng/Kg	分解效率	反應條件 (曝曬情形)	降解時間	反應相
橋樑郎	1000	100*	90%	室外曝曬	30天	固體反應
齊藤治二	497.3	50*	90%	避光	1小時	酵素液體反應
芬蘭Aalto	X		37%	室內大廳	90天	固體反應
EarthFax	15000	5000	67%*	室外避光	282天	固體反應
EarthFax	2836000	570000	80%*	X	274天	固體反應
This study	7100	3194	55%*	室內光	4天	酵素液體反應
This study		4750190	91%*	室內光	4天	酵素液體反應

註：*利用文獻資料計算結果

在低污染濃度下，真菌系統的確有機會讓處理後的土壤達到放流標準；但高污染(例如本研究與 EarthFax)下，即使效率已達 80-90%，仍尚無有力實證可一次達標。相信，若將來可配套不同菌株、再次投入新生成酵素反應或依賴原生菌株繼續淨化，應該有機會讓土壤再次潔淨。

2. 承第 1 點，上述研究有無曝露於陽光下，亦請說明。

除了日本橋樑郎的稻田試驗外，沒有直接曝曬的案例。這可能是因為曝曬會導致溫度過高，不利菌菇生長的緣故。例如加拿大 Yukon 案場，還利用柳樹遮陰，避免菌菇直接曝曬於陽光底下。這將成為我們之後應用的考量之一。

3. 紫外線也有降解戴奧辛功能，本研究降解戴奧辛(Dioxins)百分比陽光和生物(酵素)各佔多少百分比？

感謝委員的建議。由於本研究目前均為實驗室內反應，無特殊照明，小量在塑膠瓶中(50 ml 離心管)，大量則預計使用桶裝反應，故尚未考慮紫外光的作



用。若來日能進行模廠試驗時，將考慮委員建議，衡量兩者作用。

4. 是否有更多支持微生物分解環境中戴奧辛(Dioxins)研究，支持本研究之可行性？

微生物，尤其是細菌分解環境中戴奧辛(Dioxins)的研究已有很多，即使體內代謝的相關酵素也都被描繪出來(如圖2)，但此方法的主要瓶頸是戴奧辛會干擾微生物生長，導致防治時間太過冗長，因此，大多無法被大量應用。此計畫為了避開此瓶頸而大膽設計採用較少人研究的真菌胞外酵素，相關論述詳見於 3.1.4。

委員六

本計畫已針對咖啡渣取代 PDB 培養白腐真菌以獲得木質素相關分解酵素進行生產效益分析，後續可考慮再進一步，評析降低土壤中戴奧辛濃度所需使用白腐真菌量之生產效益，作為選用未來此技術之參考。

感謝委員的建議，經計算結果分解每公克戴奧辛約需花費 3.5 萬降至 1 萬元，詳細分析結果已增列表 11。

利用食品級的淨化工法，相對成本本來就比較高。但若一併考量社會成本與其他環境議題，仍有很大的參考空間。

專案主持人：

鄭至玉



(簽名及蓋章)



漆酶生產菌菇之篩選、酵素生產與其最適反應活性條件分析

黃靖婷¹、李品柔¹、黃弘州²、Mario Jens Hansen³、鄭至玉^{1*}

1. 國立高雄科技大學 海洋生物技術系
2. 樹德科技大學 生活產品設計系
3. 國立高雄科技大學 環境與安全衛生工程系

Abstract

漆酶（Laccase，EC 1.10.3.2）可藉由介質的參與間接催化各種基質，因此應用廣泛。為了得到較具有活性的本土菌株，在田野調查中以ABTS測試漆酶活性，發現95個樣品中，菌菇類的漆酶活性顯著高於其他物種。因此購入市售八種菇類測試，發現美人蠔菇具有最佳之漆酶活性。以PDA盤分離出單一菌株後，利用PCR技術放大5.8S及其附近之ITS基因後，初步比對的鑑菌結果為*Pleurotus* sp.。最適酵素生產配方為每100 mL中含0.75 g馬鈴薯萃取物、0.25 g葡萄糖、0.25 g酵母萃取物以及0.25 g蛋黃粉。漆酶活性初步測試結果顯示，漆酶在酸性環境（pH5）下有最高活性，而中性環境（pH7）下酵素活性約40%，除非同時再添加硼酸與果糖。

利用田口方法規劃最適反應活性條件的實驗，並以L9直交表計算S/N比以分析四個反應因子的影響，結果顯示各反應因子的貢獻度依次為有機酸（49%）、Triton X-100（23%）、Tween 80（18%）與溫度（11%）。其中，使用廣用緩衝液（磷酸/檸檬酸混合）比丙二酸與蘋果酸活性還要高，而兩種界面活性劑都會導致酵素活性降低。因此獲得之最適反應條件為廣用緩衝液（pH5）與溫度25℃，實驗結果顯示最高每毫升每分鐘可形成0.75 μmol的ABTS⁺。整體而言，反應參數影響程度為pH>>有機酸>介面活性劑/硼酸果糖混合液>溫度。本研究闡明如何利用本土真菌生產漆酶酵素，有利於未來開發綠色能源及生技產業應用。

Introduction

漆酶為一種氧化還原酶，可催化多種芳香族基質的氧化。在這些基質的氧化還原作用後，副產物只有水，為一種環境友善酵素，並且可以有效降解酚類、非酚類如合成染料、戴奧辛等有毒物質。

本研究目的為利用ABTS法篩選出可產生漆酶酵素之台灣本土菌株，並找出其最適酵素生產配方及反應條件。

1

田野調查

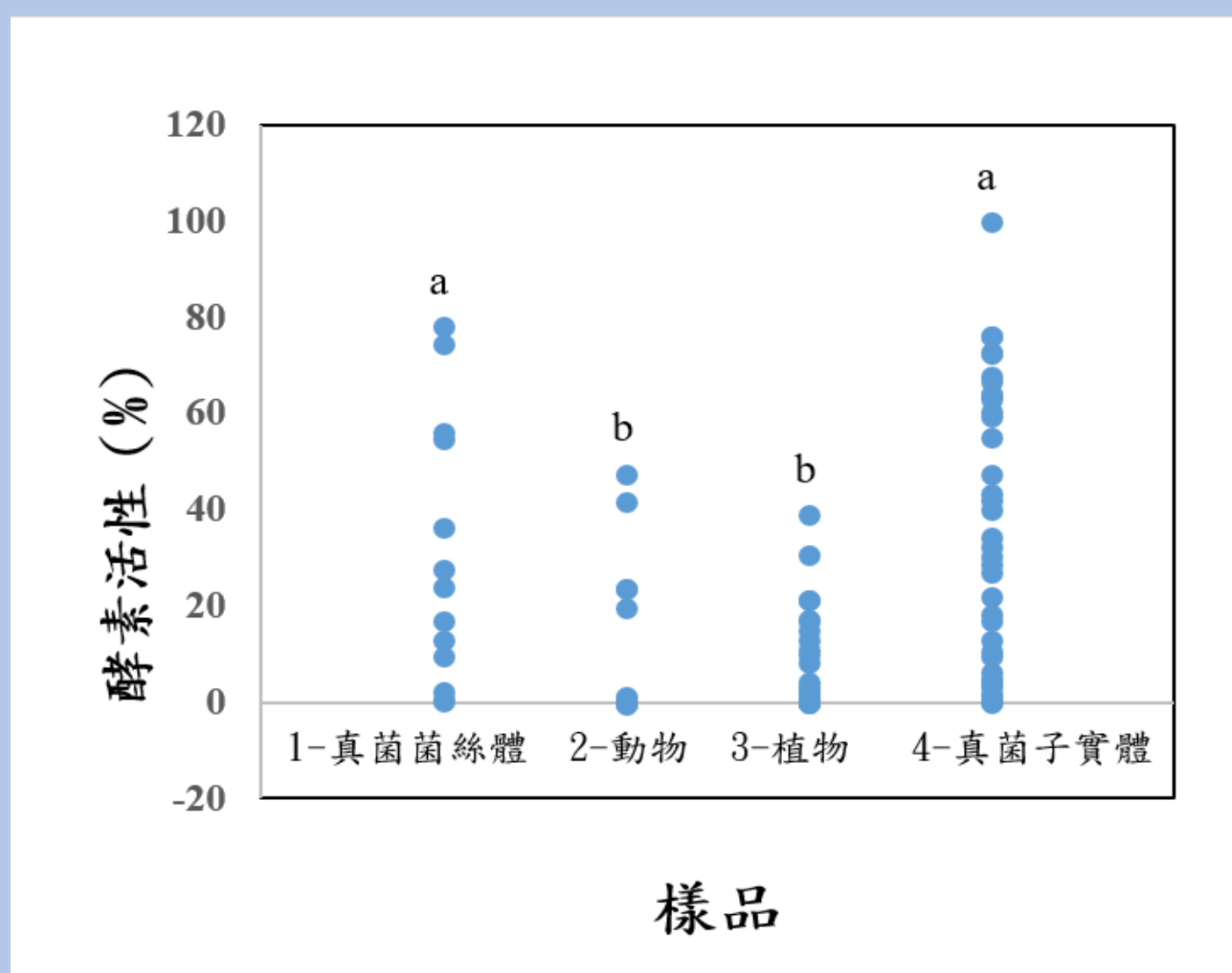


Fig 1. 田野調查樣品分析。利用ABTS法測試樣品之酵素活性。95個田野調查樣品中，4種類型樣品皆有活性，但可看出編號1及4之樣品，即真菌類有較高之漆酶活性，所以選用真菌當作實驗目標。經無母數Dunn事後檢定後發現，真菌子實體與真菌菌絲體對動植物有顯著差異。

2

市售菇類酵素活性篩選

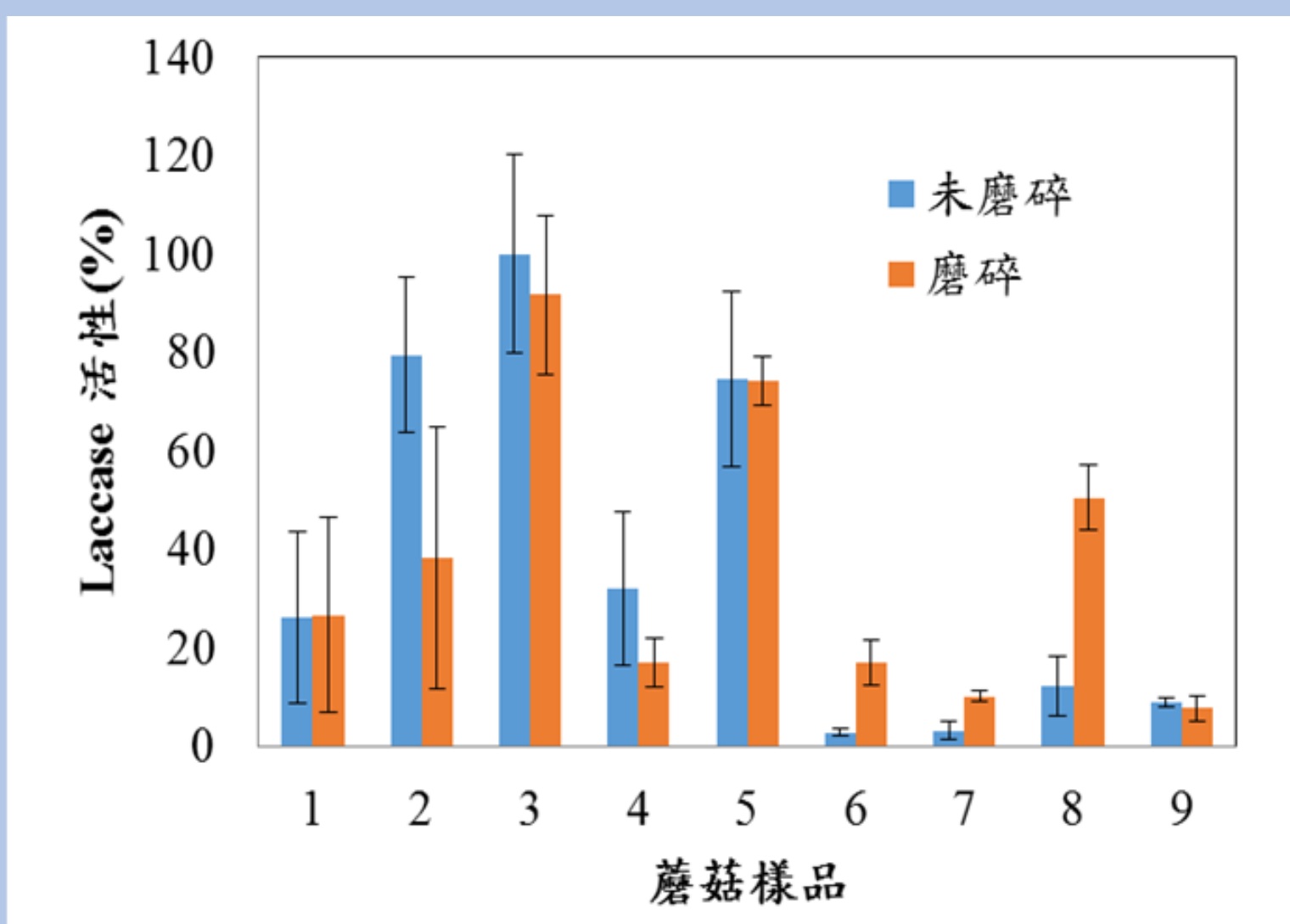


Fig 2. 市售八種菇類及靈芝菌絲體（9號）產生自由基能力分析。3號與5號樣品（美人蠔菇和雪白菇）無論有沒有磨碎，活性都很高，而第八管樣品（木耳）則是磨碎之後產生自由基能力才顯現出來。由於3號樣品美人蠔菇活性最高也較穩定，故進一步進行其菌絲培養與菌種鑑定。

3

菌種培養及鑑定



Fig 3. 實驗選定之菌種（左圖）與培養約三天（中圖）及三週（右圖）之PDA盤。本實驗選擇美人蠔菇當作後續實驗之目標物。將樣品噴酒精置於無菌操作台，以小刀將其菌柄外皮切開，只取內部菌體，並置於PDA培養皿上培養。圖三為培養約三天與三週之PDA盤。於PDA盤勾取少許菌絲體，利用PCR技術放大5.8S及其附近之ITS正向與反向部分基因序列，其反相基因定序結果與*Pleurotus eryngii*、*Pleurotus ostreatus*比對，初步判別為*Pleurotus* sp.。

4

最適酵素生產配方測試

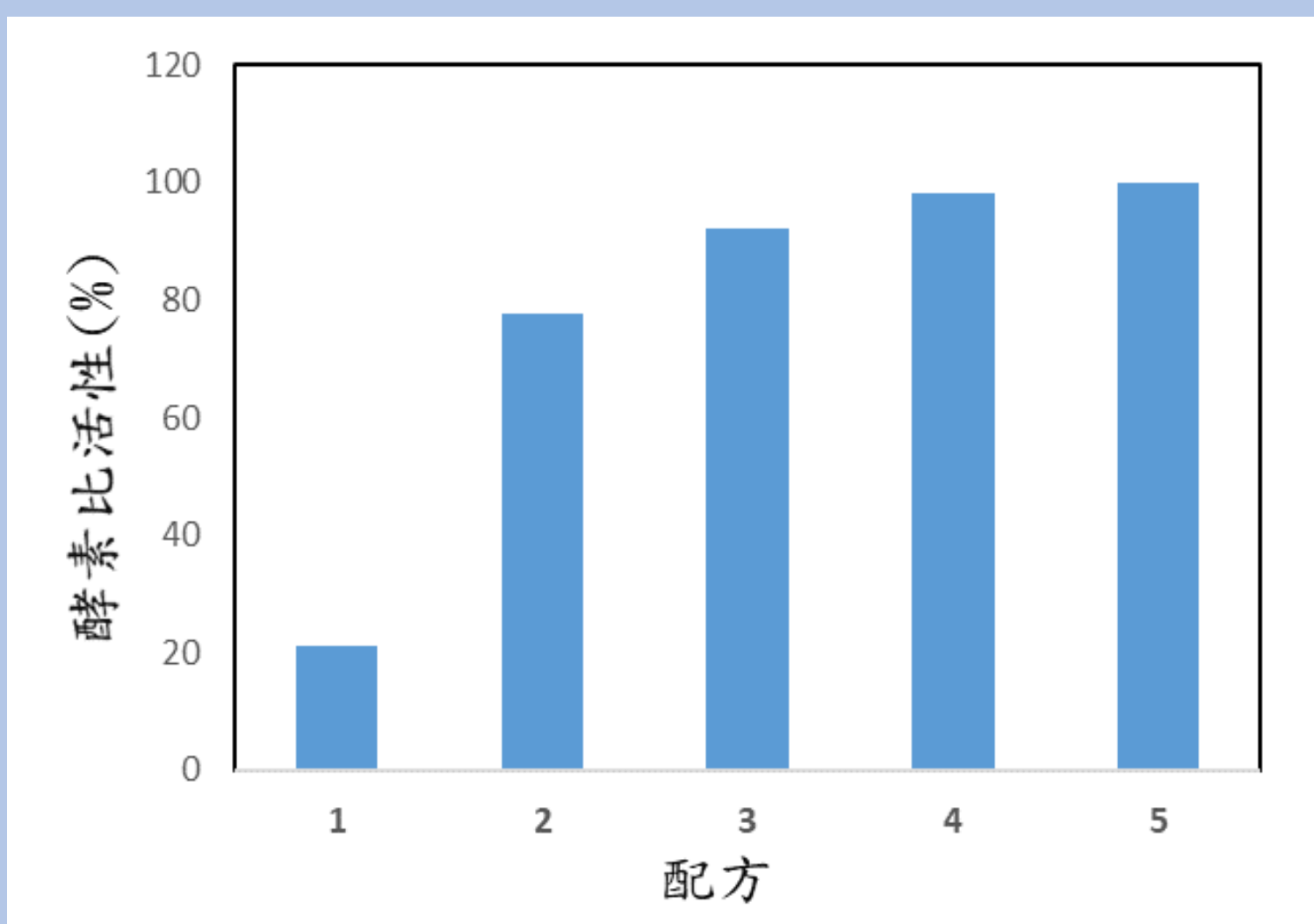


Fig 4. 最適酵素生產配方測試。配方組成為不同比例之馬鈴薯萃取物、葡萄糖、酵母萃取物、蛋黃粉。由圖可看出配方3、4、5皆有較高酵素活性，但因為其酵素活性差異不大，所以採用較低成本之配方3當作最適酵素生產配方，其配方成分為每100 mL中含0.75 g馬鈴薯萃取物、0.25 g葡萄糖、0.25 g酵母萃取物以及0.25 g蛋黃粉。

5

最適酵素反應pH值測試

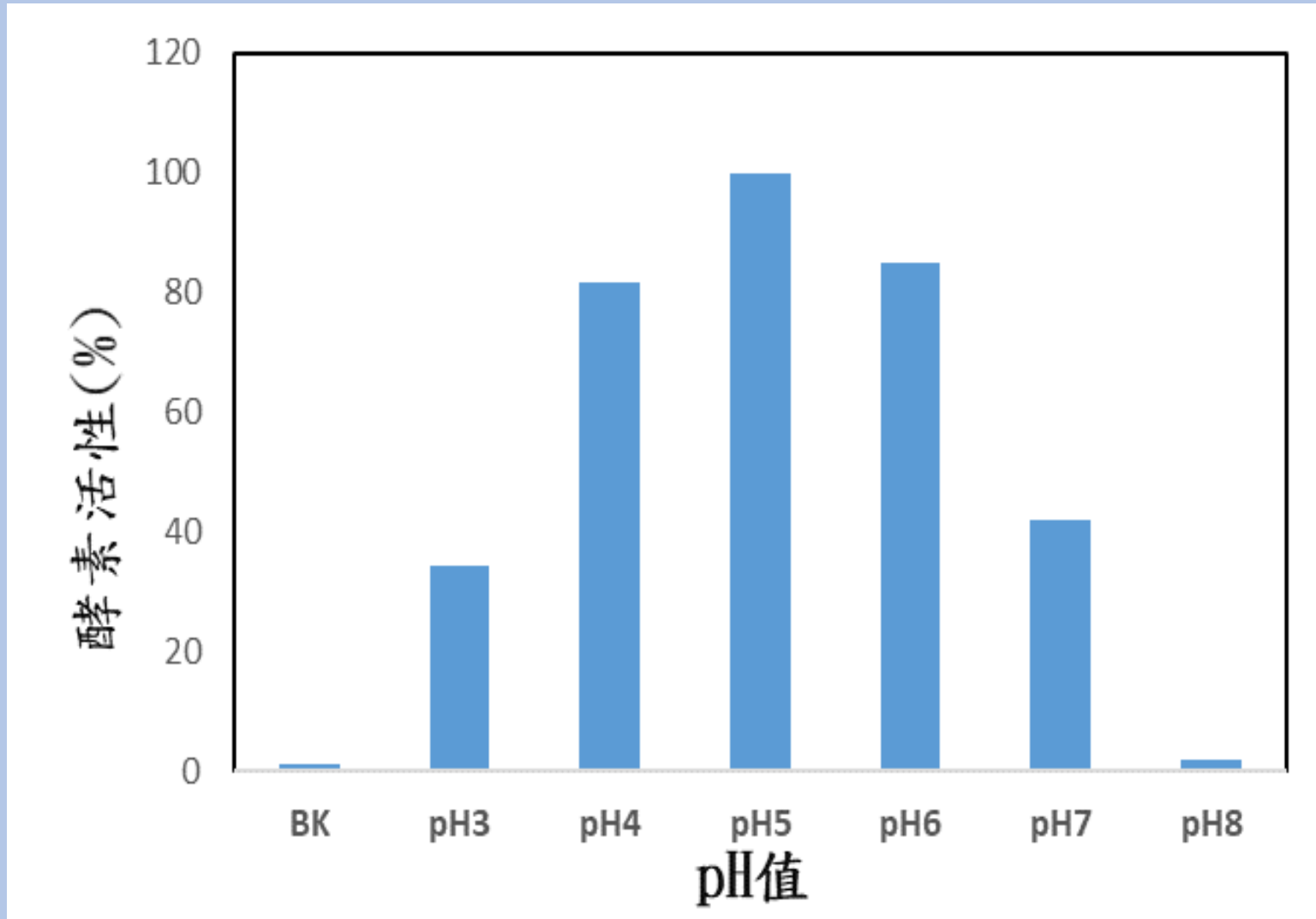


Fig 5. 最適酵素反應pH值測試。利用配方3產生之酵素，調整ABTS法中緩衝液的pH值，以測試最適反應的pH條件，pH緩衝液為磷酸/檸檬酸緩衝液系統。由圖可看出於pH5時有最好之酵素活性，而pH7只有40%之酵素活性，因此發現酵素較適合在酸性環境反應。

6

硼酸/果糖混合液對酵素活性之影響

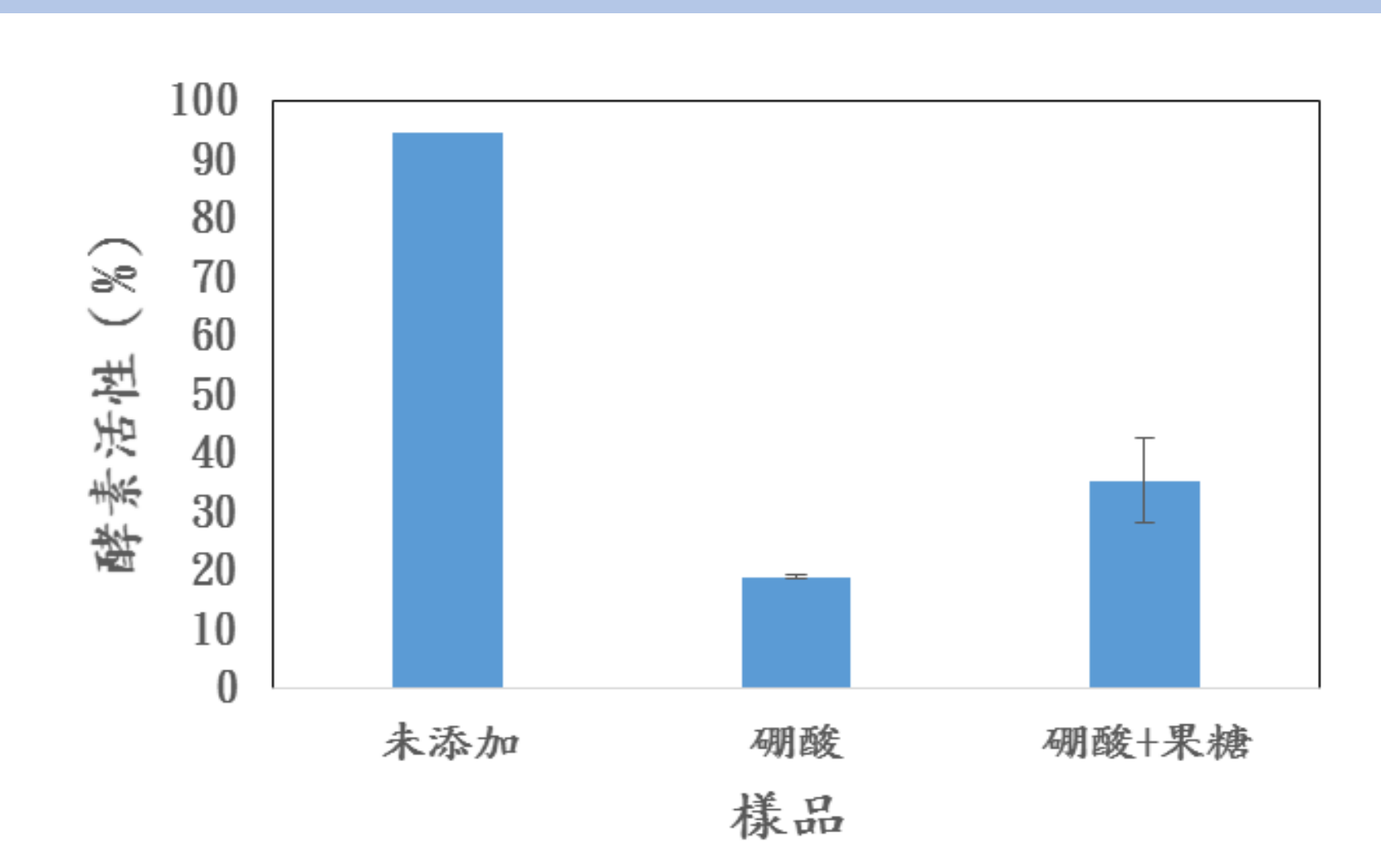


Fig 6. 硼酸/果糖混合液對酵素活性之影響。由圖可看出只添加硼酸會影響酵素活性（因硼酸為pH7，酵素於中性環境生長不佳），但同時添加硼酸與果糖則會提高其酵素活性。

Conclusions

1. 市售本土菇類中發現美人蠔菇有最佳且較穩定之酵素活性，鑑菌後初步判別為*Pleurotus* sp.。
2. 最適生產Laccase酵素配方為每100 mL中含0.75 g馬鈴薯萃取物、0.25 g葡萄糖、0.25 g酵母萃取物以及0.25 g蛋黃粉。
3. 利用田口法測試Laccase最適反應活性條件為pH 5廣用緩衝液、25℃及不添加任何界面活性劑。酵素活性最高每毫升每分鐘可形成0.75 μmol的ABTS⁺。
4. 本研究未來將會朝降解有毒物質方面進行相關實驗研究。

7

田口法測試最適酵素反應活性條件

Table 1. 田口法試驗之控制因子與水準表。

水準 \ 因素	有機酸	溫度 (°C)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)
1	丙二酸	25	0	0
2	廣用	30	50	50
3	蘋果酸	35	100	100

因子即為四種條件，水準即為各條件之不同濃度。本次田口法使用因子為有機酸、溫度、Tween 80、Triton X-100。各因子之水準表如上表。

Table 2. 田口法之直交試驗統計表。

實驗組 \ 因素	有機酸	溫度 (°C)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)	平均值	S/N 比
1	丙二酸	25	0	0	45.2±3.2	33.05
2	丙二酸	30	50	50	25.2±0.7	28.01
3	丙二酸	35	100	100	12±3.1	20.46
4	廣用	25	50	100	79.7±3	38.01
5	廣用	30	100	0	93.1±0.2	39.38
6	廣用	35	0	50	100±0	40.00
7	蘋果酸	25	100	50	46.2±3.5	33.22
8	蘋果酸	30	0	100	45.9±1.1	33.23
9	蘋果酸	35	50	0	62.5±2.4	35.89

S/N比公式為 $\frac{S}{N} = -10 \log \frac{1}{n} \sum \frac{1}{y_i^2}$ ，為望大之公式。使用9組實驗組依照上表不同條件進行三重複實驗，並取平均值，利用公式計算其S/N比。

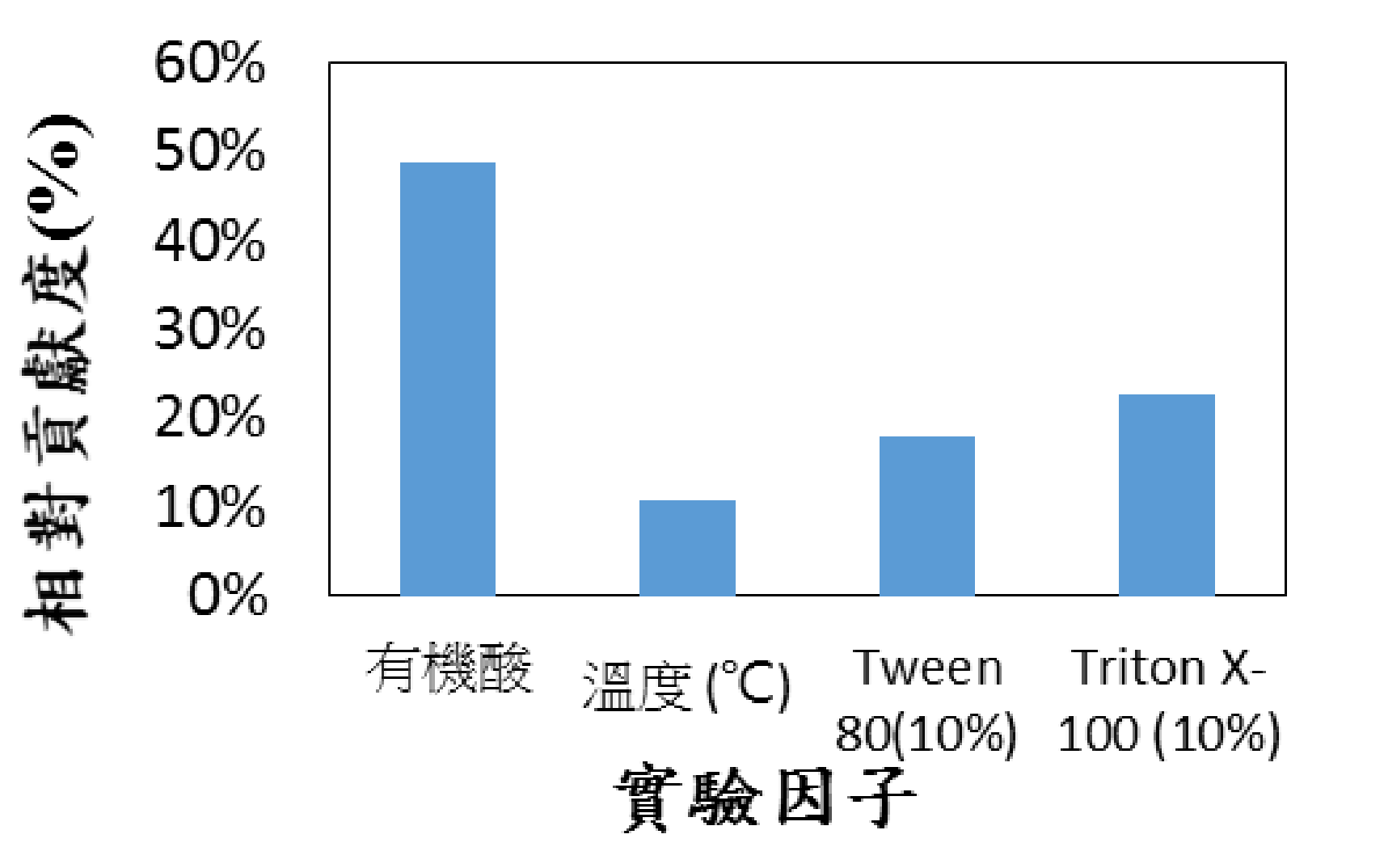


Fig 7. 實驗因子貢獻圖。由圖可看出有機酸貢獻度在四因子中最高，所以使用不同的有機酸會大幅影響實驗結果。

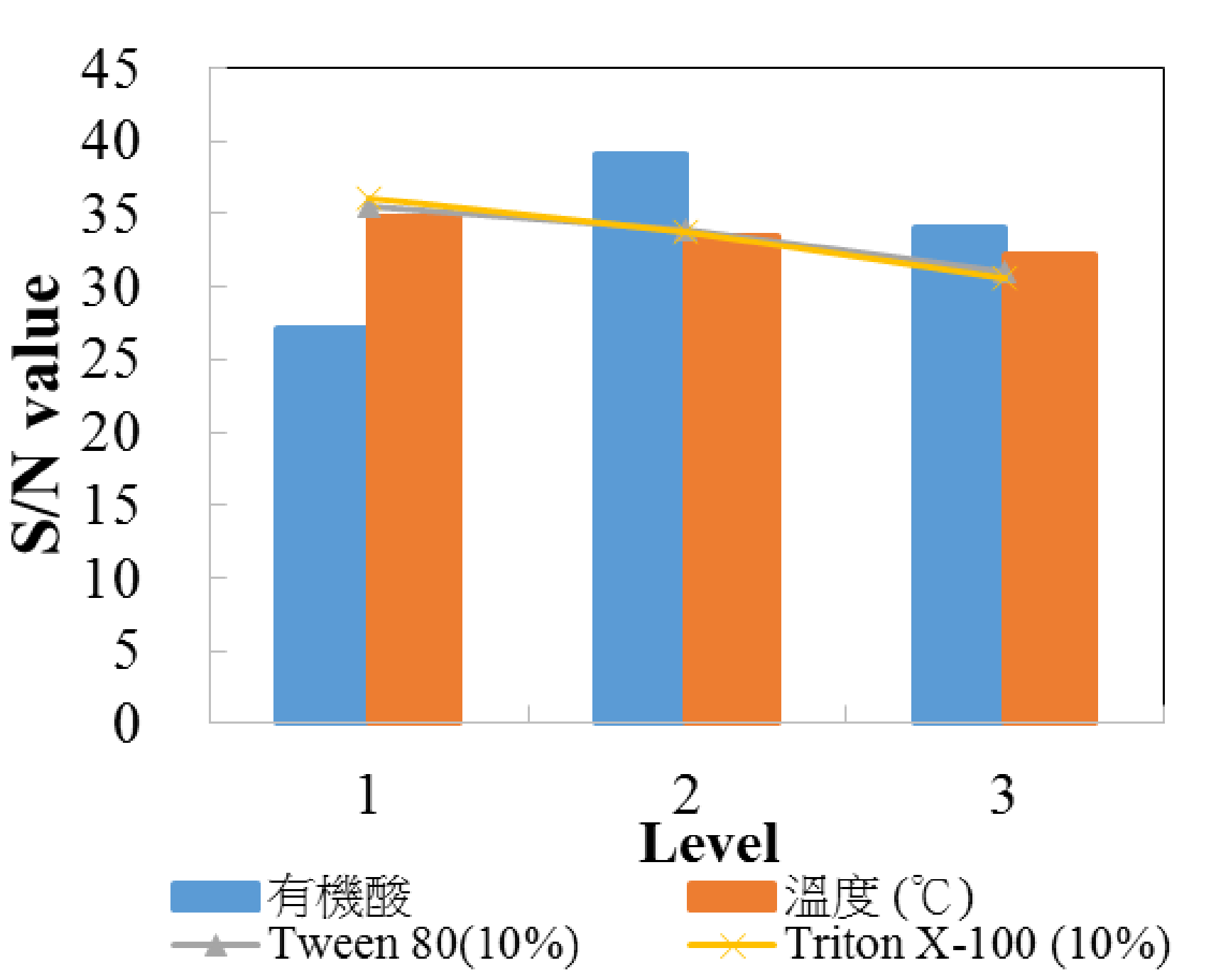


Fig 8. 實驗控制因子對 S/N 比的反應圖。由圖可看出有機酸S/N比最高的是Level 2的廣用緩衝液，溫度則為Level 1的25℃，而Tween 80、Triton X-100都在Level 1，即都不加最好。

由田口法得出結果，美人蠔菇最適條件為pH5的廣用緩衝液，並於25℃反應，介面活性劑皆不添加。利用最佳條件倒算回去其酵素活性約73%，與樣品6（100%）相比，不同的條件為溫度與一種介面活性劑，但兩者對實驗結果影響皆不大。雖然樣品6活性為100%，但田口法的初衷為比對不同水準以找出最適條件，所以不能把活性最高的條件當作最適條件。

Acknowledgements

感謝雅婷、崇裕、威志、重良、筑云、詩萱、學修、珮鈺協助完成田野調查。本研究為行政院環境保護署所補助之計畫。在本報告中提及之觀點，不代表行政院環境保護署的意見。報告中所提及之商品、供應商名稱或商業產品皆非行政院環境保護署所指定。

Improved Bioremediation on PCDD/Fs Contaminated Soil by Free-Mycelium Liquid Produced with Agro-industrial Residues

Chih-Yu Cheng ^{a*}, Zhi-Feng Zhang ^b, Acharee Kaewlaoyoong ^c and Chitsan Lin ^b

^a Department of Marine Biotechnology, National Kaohsiung University of Science and Technology, Kaohsiung, Taiwan. (E-mail: cycheng@nku.edu.tw)

^b Department of Marine Environmental Engineering, National Kaohsiung University of Science and Technology, Kaohsiung, Taiwan. (E-mail: ctlin@nku.edu.tw)

^c Department of Safety, Health and Environmental Engineering, National Kaohsiung University of Science and Technology, Kaohsiung, Taiwan. (E-mail: meen-AK@hotmail.com)

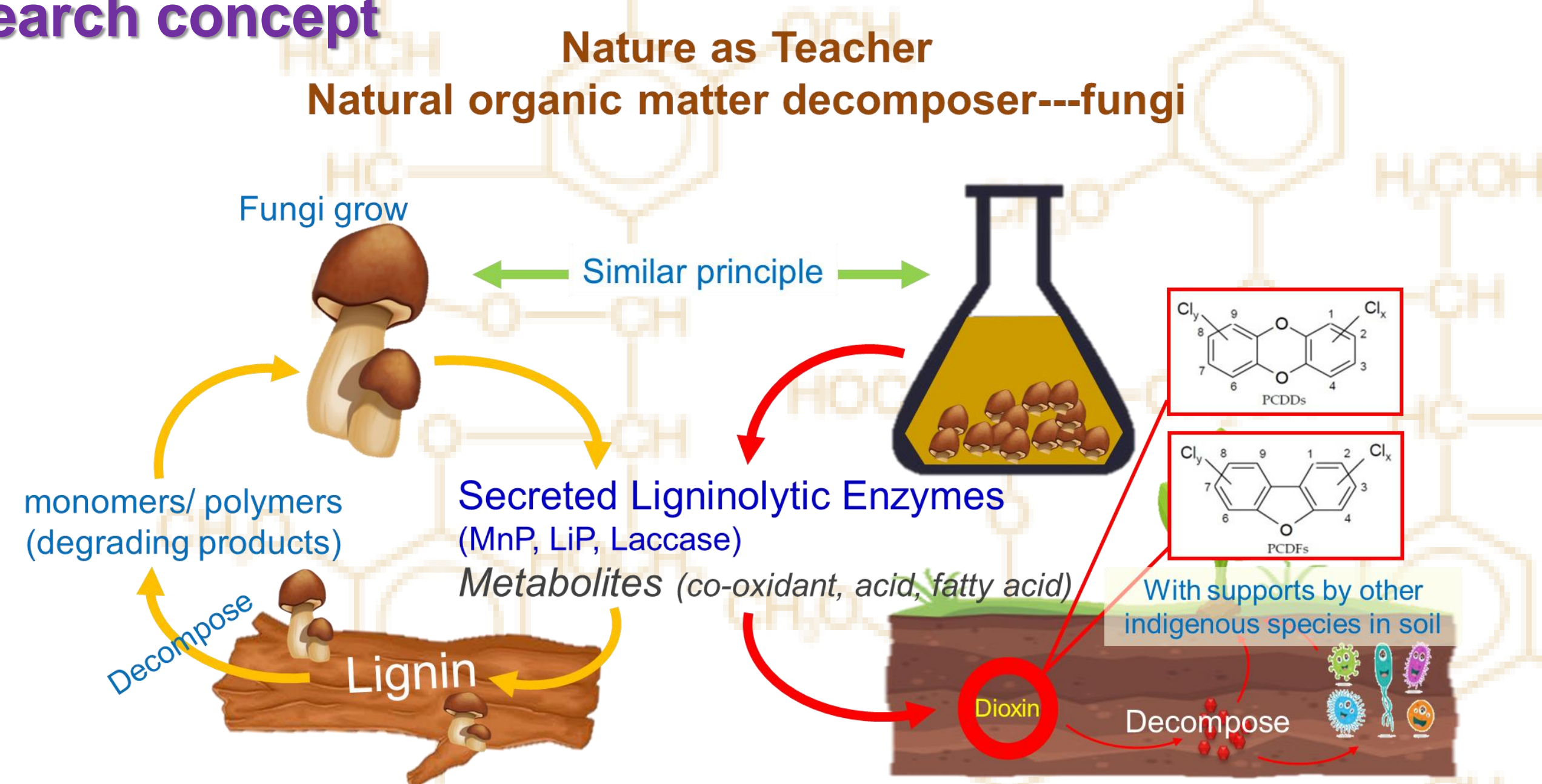
Abstract

Phanerochaete chrysosporium (PC) and *Pleurotus pulmonarius* (PP) which are effective to degrade the recalcitrant polymer like lignin as well as other persistent organic pollutants were used to treat the PCDD/Fs contaminated soil from Southern Taiwan. After 56 days degradation by solid-state incubation (pre-test), PCDD/Fs concentration decreased from 7,864 ng-TEQ/kg to 3,493 ng-TEQ/kg (56%) and 4,002 ng-TEQ/kg (49%) by PC and PP, respectively.

To reduce the remediation duration and cost, five agro-industrial residues e.g., wood chips, rice bran, black tea leaves, green tea leaves and coffee grounds were used as supplemental materials to induce their productivity of ligninolytic enzymes. After 6-day of liquid cultivation, free-mycelium liquids (FMLs) obtained by centrifugation were used to examine their enzyme activities and to treat the same weight of non-sterilized contaminated soil under 26±2°C for 96 hours. In comparison with a normal medium (PDB), comparable removal efficiencies by FMLs cultured with agro-industrial residues were found and the average efficiencies were approximately 49%±6% and 48%±6% for PC and PP, respectively. The highest PCDD/Fs removal efficiency reached 60% by TEQ-concentration unit and 91% by mass-concentration unit by FMLs of PC cultured with coffee ground. The further experiments employed PC reveals that dibenzofurans are significant reduced compared with dibenzo-dioxins and the removal efficiency 90% was achieved within the first 12 hours. Besides, OCDF and OCDD were significant decreased and there is no corresponding increasing sign of other dechlorinated dioxins or furans. This results suggest that PCDD/Fs removal mechanism is biased towards oxidation rather than dehalogenative reduction. Besides, the removal efficiency is increased by 17% by adding borate-fructose complex as mediator. These provide a promising way to regenerate PCDD/Fs contaminated soil more efficiently.

Keywords: bioremediation; white-rot fungus; PCDD/Fs; ligninolytic enzymes

Research concept



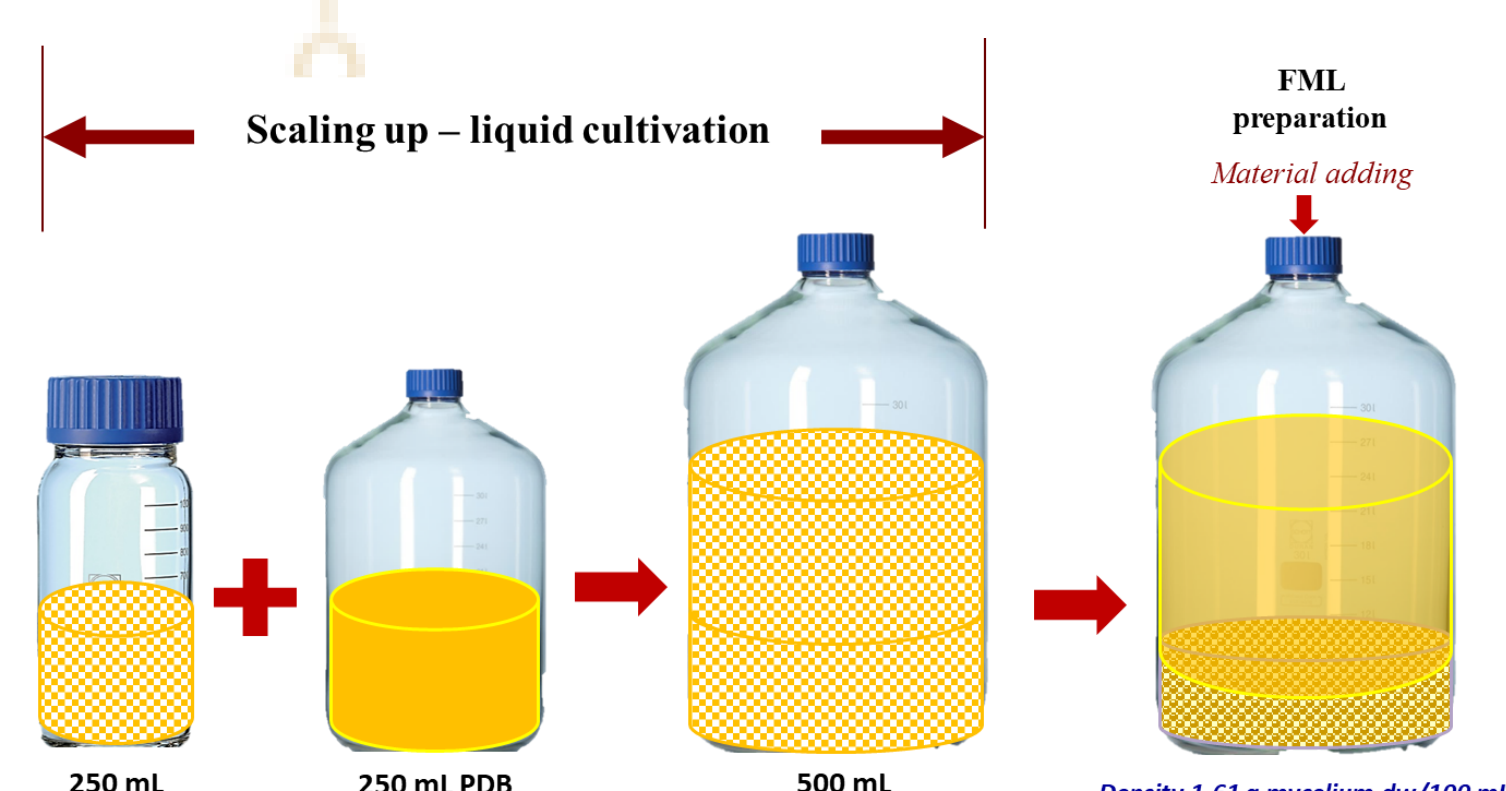
Introduction

As regards to environmental, ecological and social aspects, the use of biochemical technology to remediate dioxin (PCDD/Fs) pollution is more green and sustainable remediation (GSR). White rot fungus degrade the complex and recalcitrant polymer lignin by their extracellular multi-enzyme. These enzymes are versatile, extracellular and also able to oxidize various environmental pollutants. Herein, two native white rot fungus namely *Phanerochaete chrysosporium* (PC) and *Pleurotus pulmonarius* (PP) were cultured with five agro-industrial residues by liquid cultivation and their FMLs were used to remediate the dioxin contaminated soil in Southern Taiwan.

Methodology

1. FML preparation

Fungi were cultivated under these conditions:
Control temp: 26 °C
Shaking: 120 rpm (orbital)
Light: lamp (24 hours).



2. Treatment of PCDD/Fs contaminated soil using FML

Mixed the contaminated soil with FML ratio 1:1 and shook to create the contacting between soil and FML for 96 hours



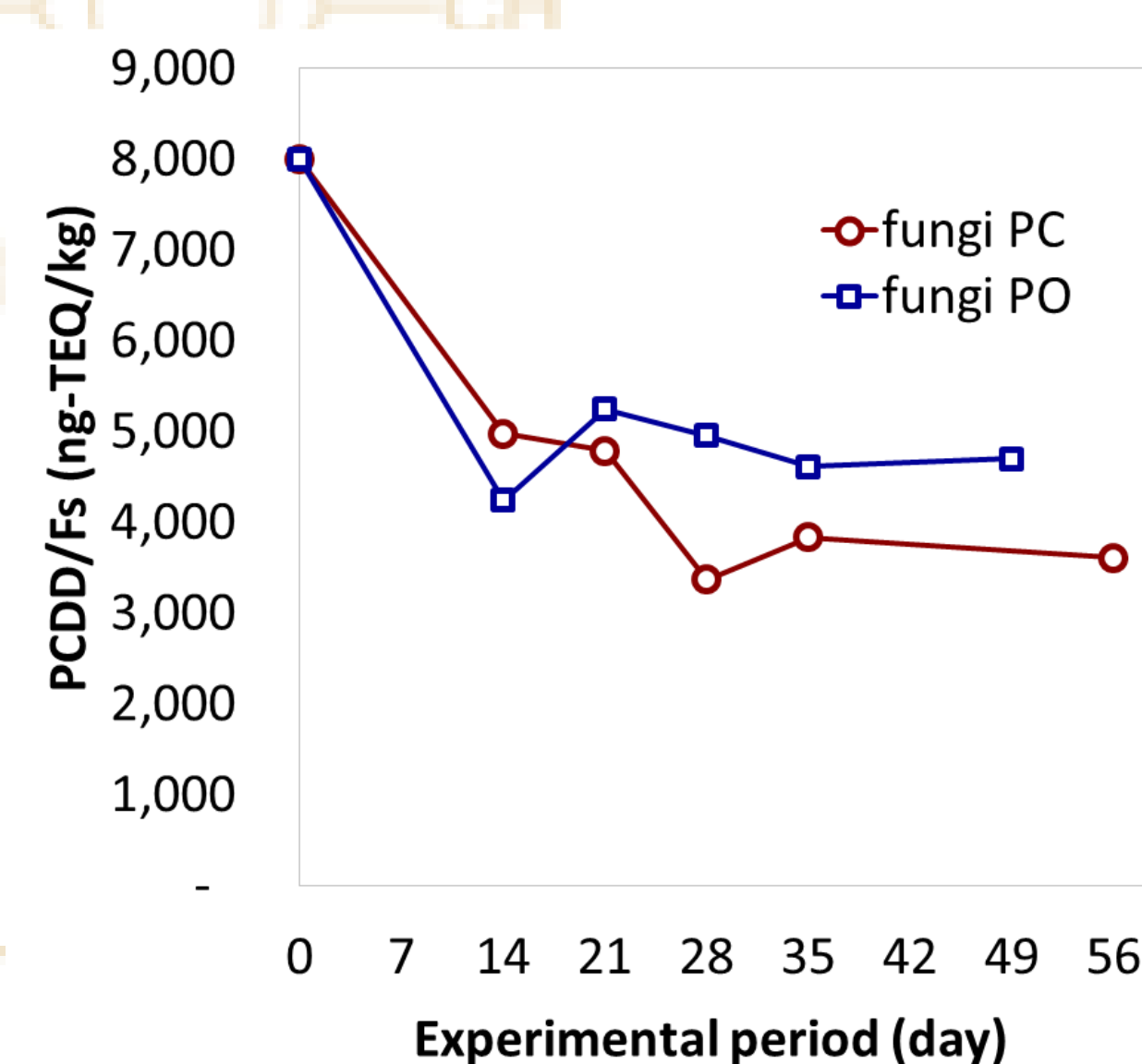
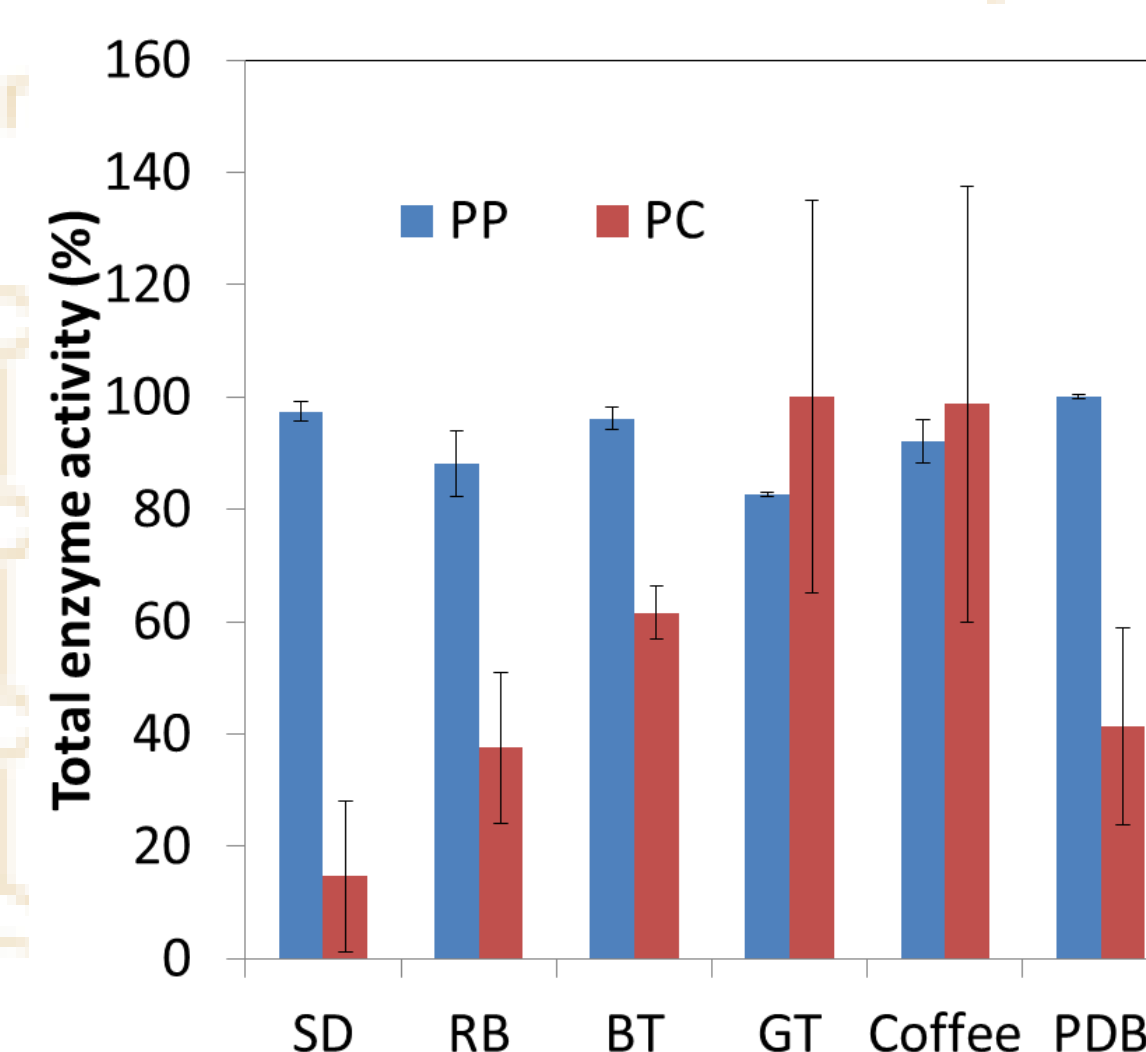
3. PCDD/Fs analysis

All 17 PCDDs and PCDFs were analyzed by GC/MS.

Results and discussion

1. Preliminary test in solid state fermentation.

After 56 days degradation by solid-state incubation, PCDD/Fs concentration decreases 56% and 49% by PC and PP, respectively.

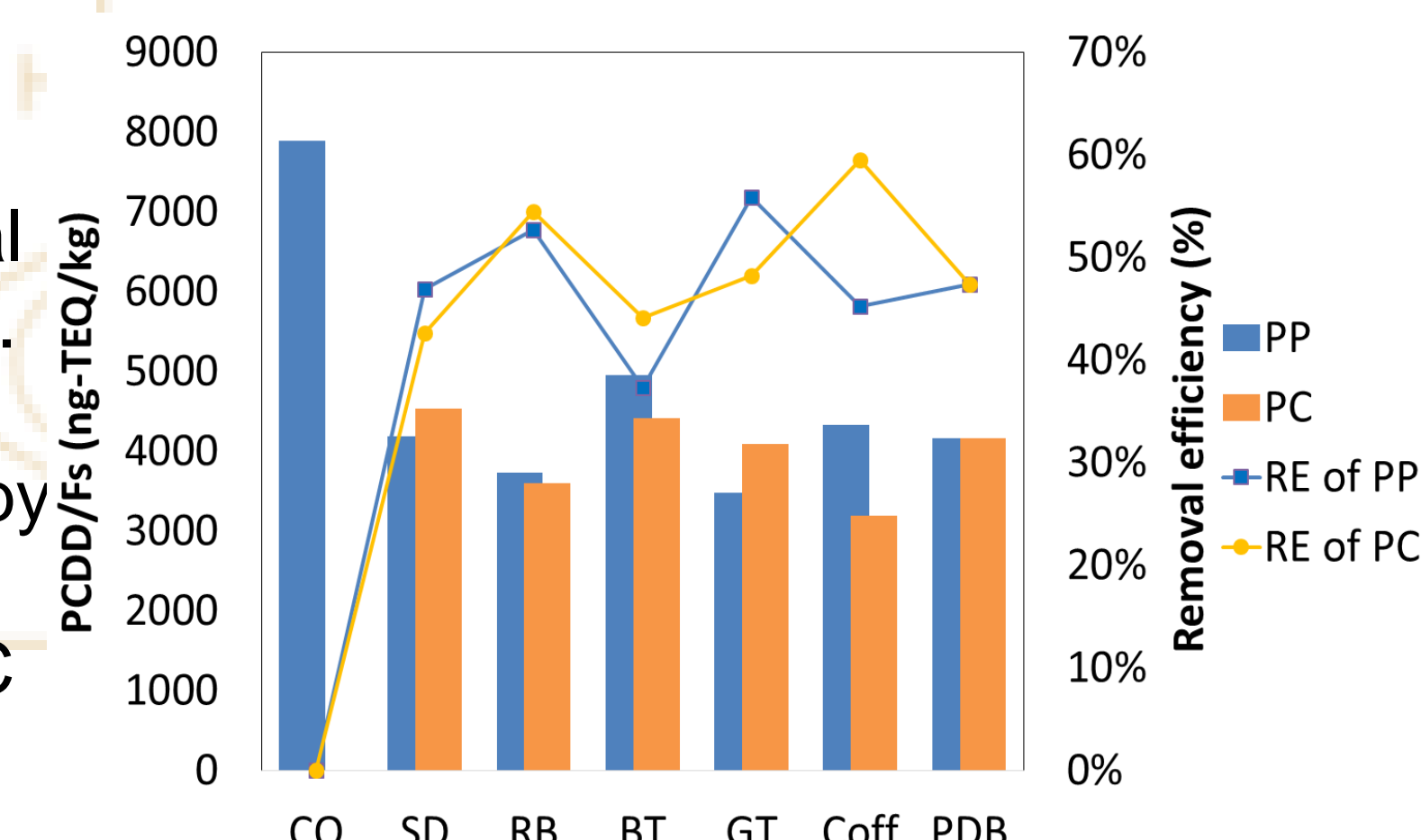


2. Ligninolytic enzyme activities in FMLs.

Cultivation with material adding induces more enzyme production of PC but not PP.

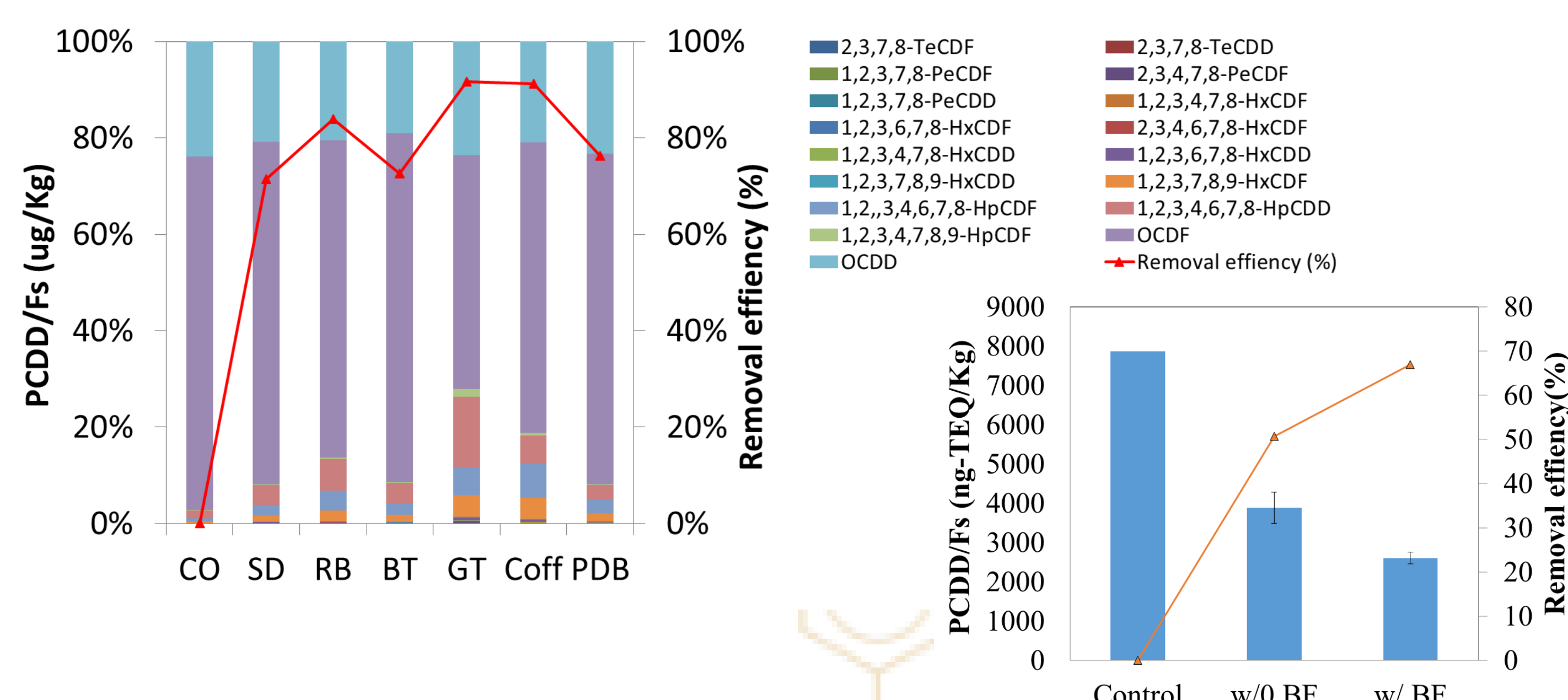
3. Removal of PCDD/Fs after treatment.

In comparison with FML prepared with PDB (normal one), comparable removal efficiencies (RE) are found and the avg. RE are 49%±6% and 48%±6% for PC and PP. The highest RE reaches 60% by TEQ-concentration unit and 91% by mass-concentration unit by FMLs of PC cultured with coffee ground.



4. The proportions of 17 toxic dioxins/furans and removal efficiencies by PC.

It indicates that dibenzofurans are remarkable reduced compared with dibenzo-dioxins and the removal efficiencies of GT and Coff were 92% and 91%, respectively. PCDD/Fs removal mechanism is biased towards oxidation rather than dehalogenative reduction.



5. Enhancement of FMLs bioremediation by adding borate-fructose complex (BF)

The PCDD/Fs concentration are significant different between with (w/) and without (w/o) borate-fructose complex (BF) and removal efficiencies are increased from 50% to 67%.

Acknowledgement

This study was funded by the research project supported by the Taiwan EPA. The views or opinions expressed in this article are those of the writers and should not be construed as opinions of the Taiwan EPA. Mention of trade names, vendor names, or commercial products does not constitute endorsement or recommendation by Taiwan EPA.

Characterization and potential of extracellular multi-enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* for bioremediation of PCDD/Fs

Chih-Yu Cheng^{*1}, Zhi-Feng Zhang², Jing-Ting Huang¹, Acharee Kaewlaoyoong³ and Chitsan Lin²

¹ Department of Marine Biotechnology; ² Department of Marine Environmental Engineering; ³ Department of Safety, Health and Environmental Engineering, National Kaohsiung University of Science and Technology, Kaohsiung, Taiwan.

Abstract

As regards to environmental, ecological and social aspects, the use of biochemical technology to remediate dioxin (PCDD/Fs) pollution is more green and sustainable remediation (GSR). White rot fungus degrade the complex and recalcitrant polymer lignin by their ligninolytic enzymes. These enzymes are versatile, extracellular and also able to oxidize various environmental pollutants. Herein, extracellular multi-enzyme with two ligninolytic activities, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP), of white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* are prepared, characterized and explored for PCDD/Fs contaminated soil remediation.

To reduce production cost, five renewable materials including wood chips, rice bran, black tea residue, green tea residue and coffee grounds were used as sub-materials to replace PDB medium. The extracellular multi-enzyme was obtained from the supernatant of 6-day cultivation by five renewable materials. When compared with PDB medium, the total enzyme activity (MnP+LiP) of extracellular multi-enzyme produced by red tea residue, black tea residue and coffee grounds were increased to 1.5, 2.4 and 2.3 times. The optimum pH were pH 5 and 6 for peroxidase and free radical scavenging activities, respectively. Malonic acid and malic acid can enhance the enzyme activity by about 10%; conversely, temperature (25-35°C) and surfactant (Tween 80 or Triton X-100, less than 1%) have no significant influence.

Non-sterilized dry contaminated soil (7100 ng-TEQ/kg) was mixed with extracellular multi-enzymes in 1:1 w/w ratio and incubated under 26±2°C for 96 hours. The highest removal of PCDD/Fs is reached approx. 91% by mass-concentration unit and 55% by TEQ-concentration unit by using coffee grounds. It is expected that the dioxin of contaminated soil can be rapidly degraded by a non-specific open-ring oxidation via mediator-regulated oxidative enzymes, i.e., MnP and LiP. These provides a promising way to regenerate Dioxin soil more easily.

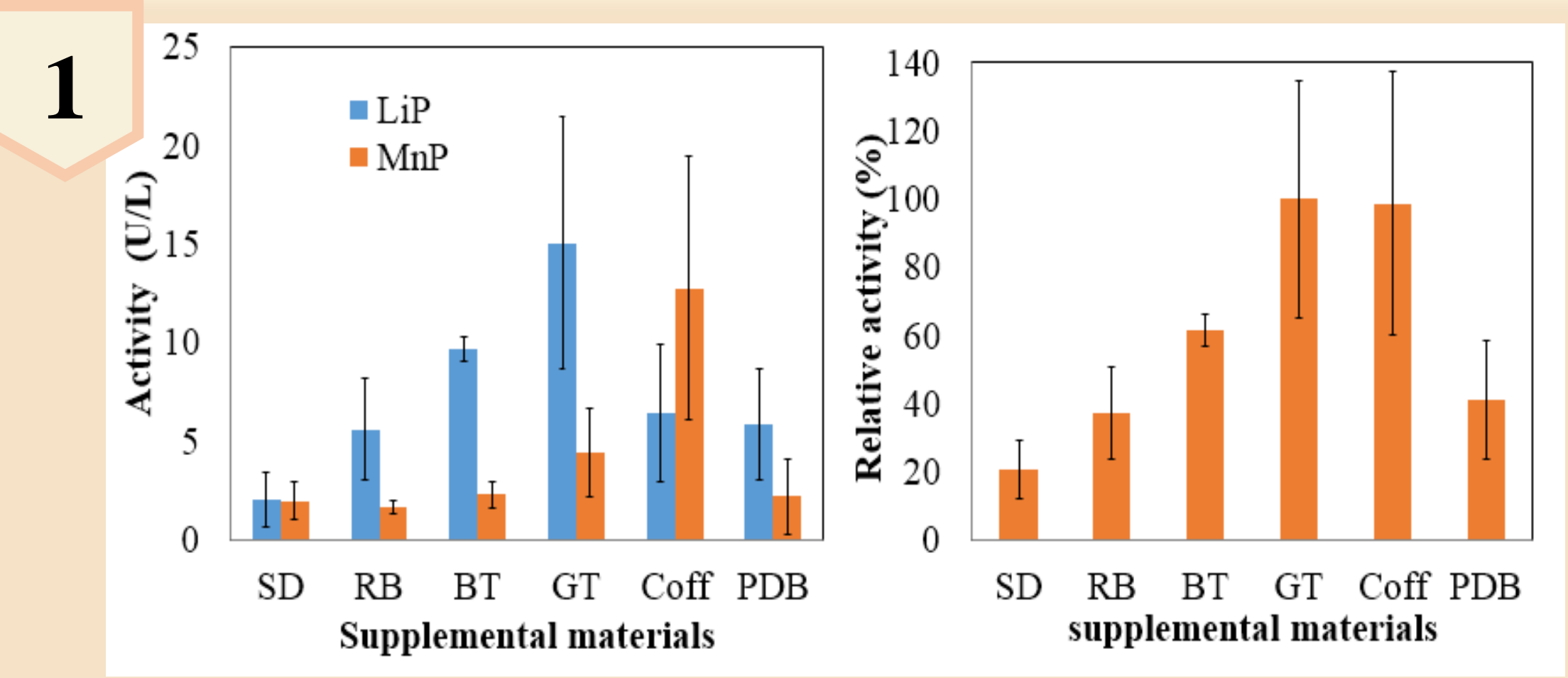


Fig. 1 Enzymatic (A) and relative activities (B) of MnP and LiP obtained from 6-day broth cultured by five renewable materials including wood chips (SD), rice bran (RB), black tea residue (BT), green tea residue (GT) and coffee grounds (Coff). When compared with PDB medium, the total enzyme activity produced by black tea residue, green tea residue and coffee grounds were increased to 1.5, 2.4 and 2.3 times. (Coff and GT: n>5; others: n=3)

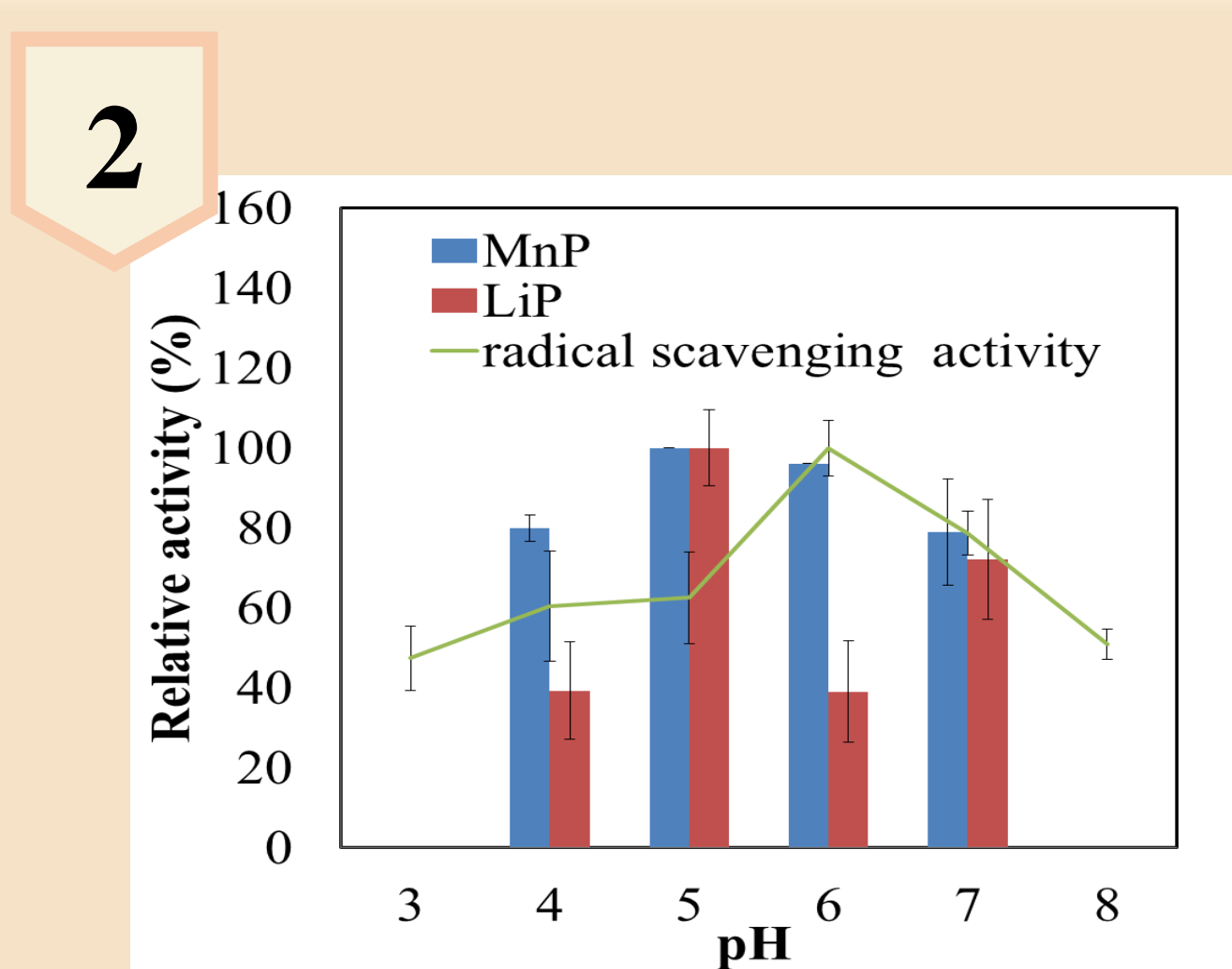
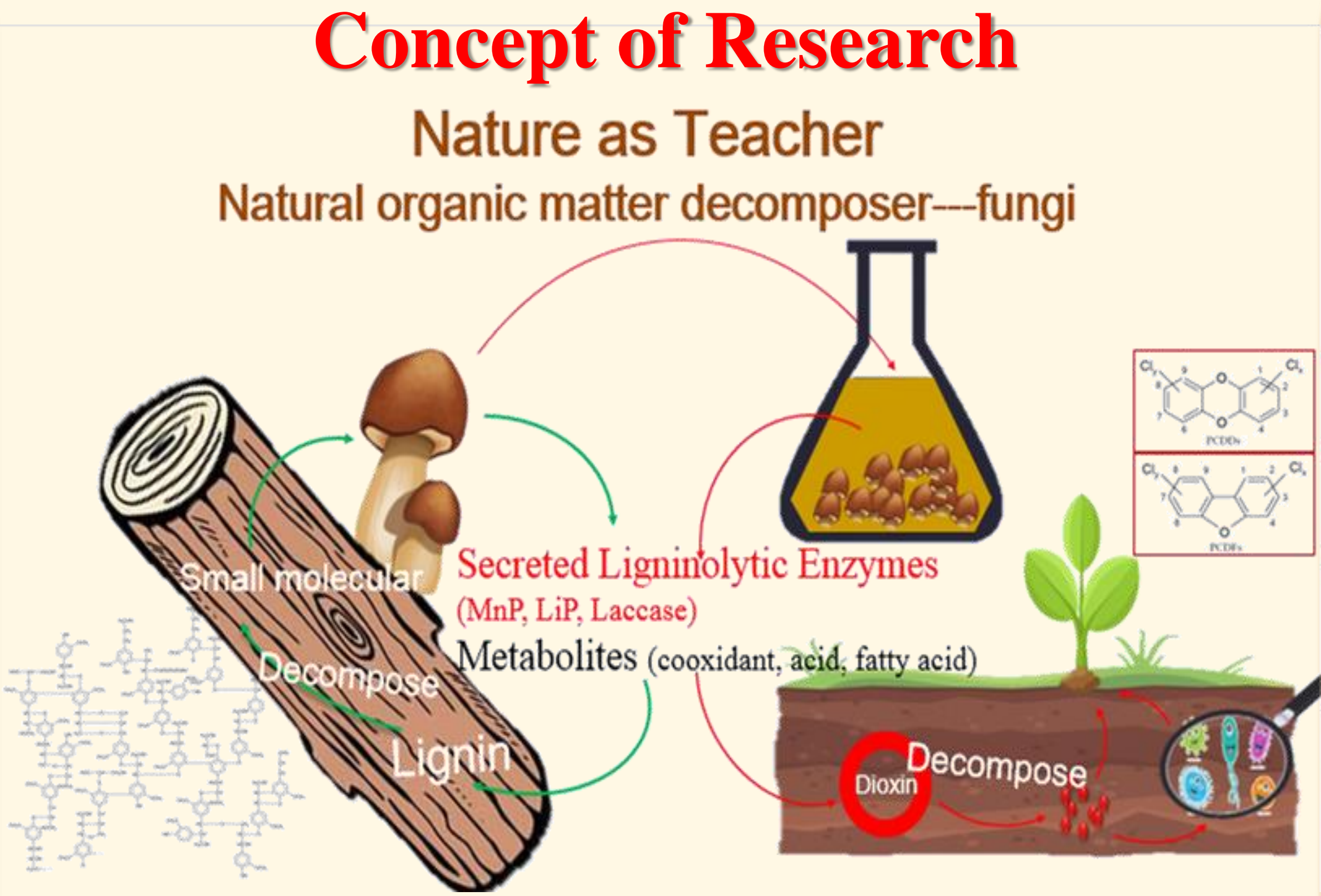


Fig. 2 The optimum pH of MnP, LiP and radical scavenging activities which are pH5, 5 and 6, respectively.

3 Taguchi Method to evaluate the effluent factors on enzyme activity

Table 1 Control factors and selected levels

Levels	Factors			
	Acid	Temp (°C)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)
1	Malonic acid	25	0.0	0.0
2	Tris Phosphate	35	0.5	0.5
3	malic acid	30	1.0	1.0

Table 2 Orthogonal Array ($L_9(3^4)$) with factors and measured values

Experiment No.	Control factors				Enzyme activity(%)	Large-the-Best S/N ratios
	Acid	Temp (°C)	Tween 80 (%)	Triton X-100 (%)	mean±std	
1	Malonic acid	25	0.0	0.0	97.9±1.6	39.81
2	Malonic acid	35	0.5	0.5	99.3±1.0	39.94
3	Malonic acid	30	1.0	1.0	98.0±0.2	39.83
4	Tris Phosphate	25	0.5	1.0	65.9±5.4	36.30
5	Tris Phosphate	35	1.0	0.0	58.1±3.7	35.23
6	Tris Phosphate	30	0.0	0.5	49.9±3.9	33.88
7	malic acid	25	1.0	0.5	90.8±4.3	39.13
8	malic acid	35	0.0	1.0	94.1±0.3	39.47
9	malic acid	30	0.5	0.0	89.3±1.9	39.01

The S/NL ratio for Larger-the-Better is used where the largest value is desired.

$$S/N = -10 \log \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2}$$

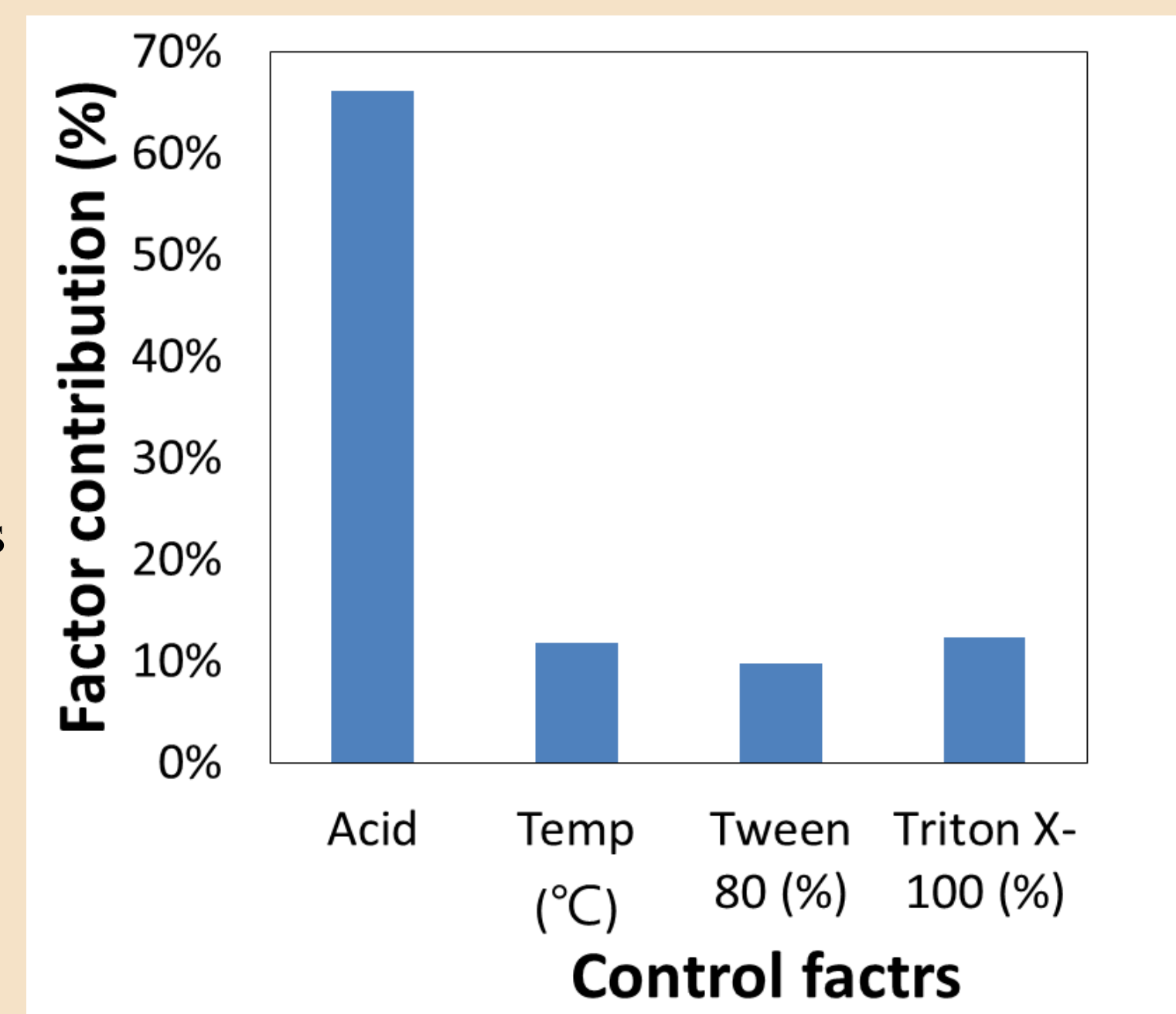


Fig. 3 Factor contribution on enzyme activity. The most effluent control factor on radical scavenging activities is acid supplementation.

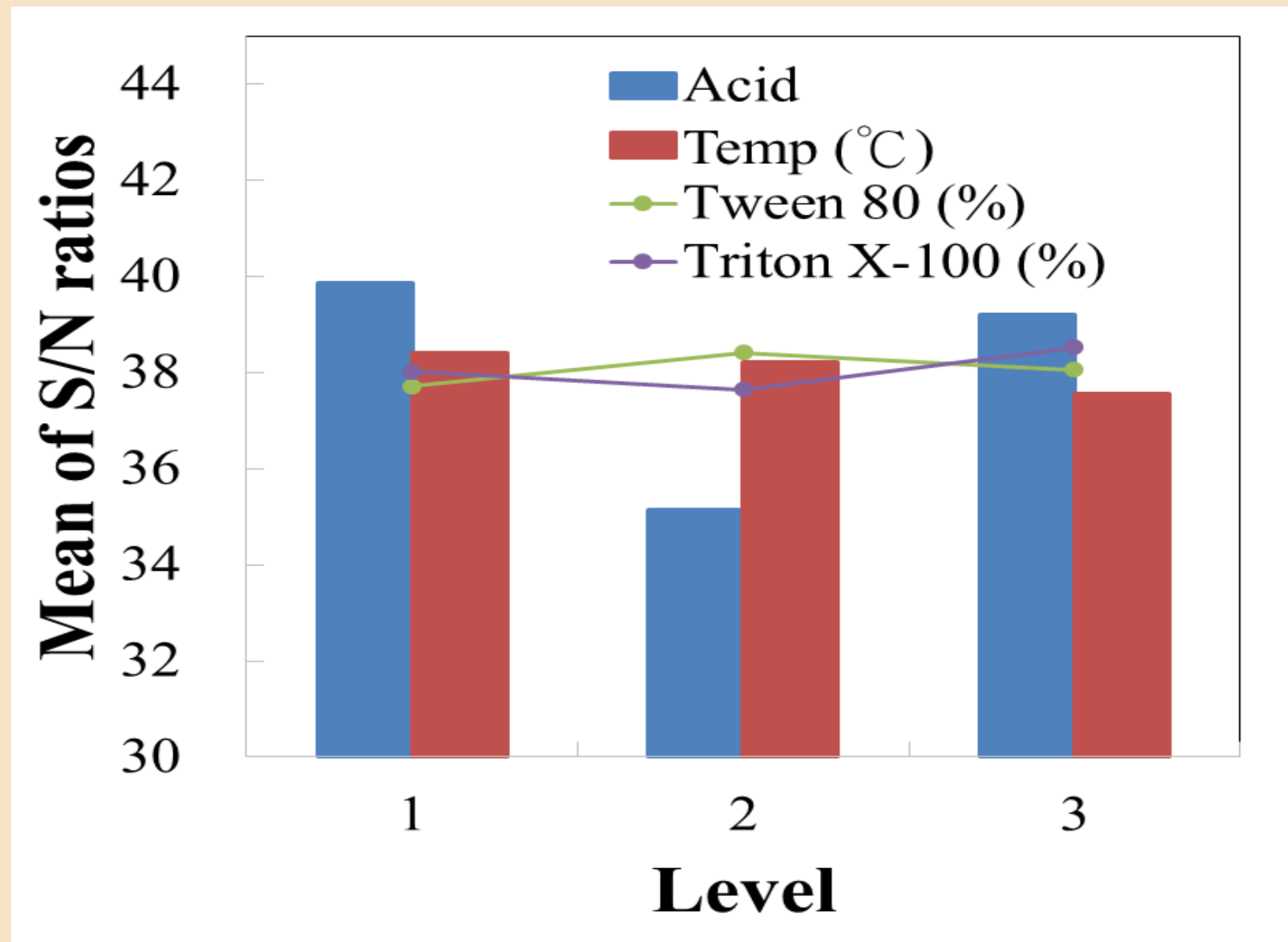


Fig. 4 Main effect plots for S/N Ratios. Radical scavenging activities are enhanced both by malonic and malic acid supplementations by about 20% (data not shown); conversely, temperature (25-35°C) and surfactant (Tween 80 or Triton X-100, <1%) have no significant influence.

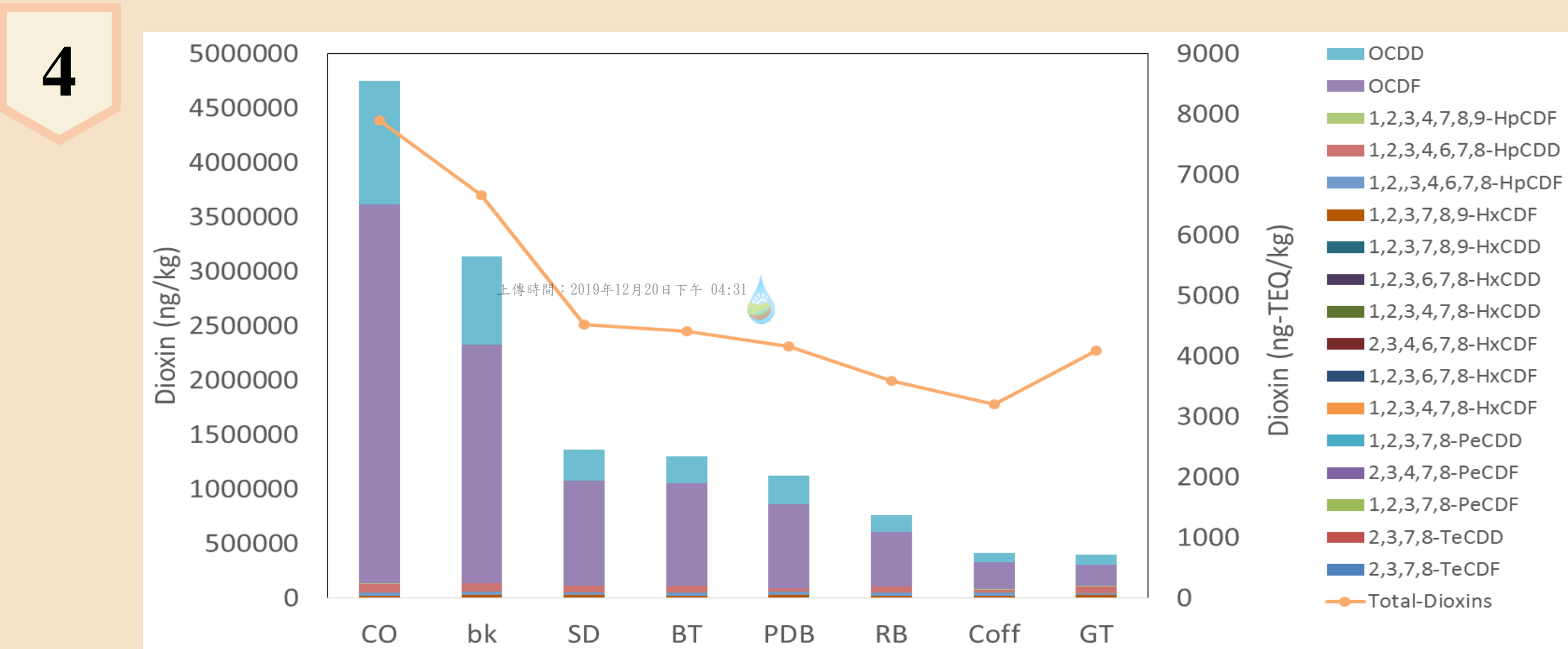


Fig. 5 Degradation of Dioxin by extracellular broth cultured with SD, RB, BT, GT and coffee grounds. Non-sterilized dry contaminated soil was mixed with extracellular multi-enzymes in 1:1 w/w ratio and incubated under 26±2°C for 96 hours. The highest removal of PCDD/Fs is reached approx. 91% by mass-concentration unit and 55% by TEQ-concentration unit by using coffee grounds. It is expected that the dioxin of contaminated soil can be rapidly degraded by a non-specific open-ring oxidation via mediator-regulated oxidative enzymes, i.e., MnP or LiP.

Conclusion

- Total ligninolytic enzyme of FMLs of white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* was more productive by black tea residue, green tea residue and coffee grounds which also reduce production cost.
- The favorable condition for reaction were pH 5-6 with malonic acid or malic acid adding under ambient temperature.
- The highest removal of PCDD/Fs is reached approx. 91% by mass-concentration unit and 55% by TEQ-concentration unit by using coffee grounds.
- These provides a promising way to regenerate Dioxin soil more easily.

5 Correlation between enzyme activity and removal efficiency

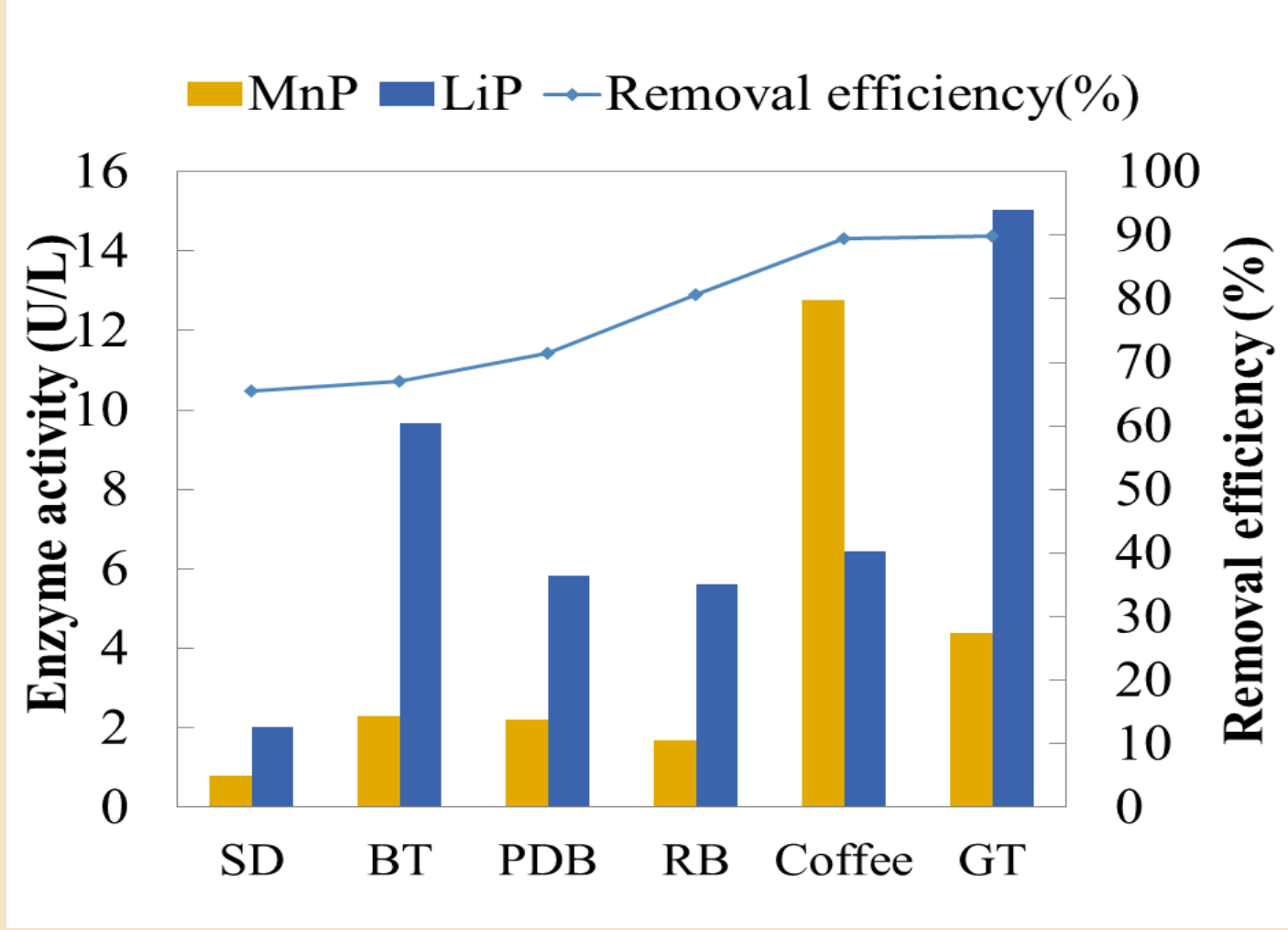


Fig. 6 Correlation between enzyme activity and removal efficiency of extracellular broth cultured with SD, RB, BT, GT and coffee grounds.

Table 3 Pearson's correlation coefficient matrix

	Total	MnP	LiP	RE (%)
Total	1.00			
MnP	0.77	1.00		
LiP	0.83	0.28	1.00	
RE(%)	0.85	0.73	0.63	1.00

Note: Total =MnP+LiP; RE: removal efficiency; high correlation ($|r|=0.7-0.99$); low correlation ($|r|=0.1-0.39$).

Fig. 6 and Table 3 show a strong positive correlation ($r=0.8$) between total enzyme activity and removal efficiency.

Acknowledgement

This study was funded by the research project supported by the Taiwan EPA. The views or opinions expressed in this article are those of the writers and should not be construed as opinions of the Taiwan EPA. Mention of trade names, vendor names, or commercial products does not constitute endorsement or recommendation by Taiwan EPA.



發明專利申請書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※案 由：10000

※ 申請日：

☒ 本案一併申請實體審查

一、發明名稱：(中文/英文)

生物處理劑及其製造方法暨其於含戴奧辛之污染物的應用 /
BIOLOGICAL TREATING AGENT, METHOD OF
MANUFACTURING THE SAME AND APPLICATION ON
DEGRADATION OF DIOXIN POLLUTANT USING THE SAME

二、申請人：(共 1 人)(多位申請人時，應將本欄位完整複製後依序填寫，姓名或名稱欄視身分種類填寫，不須填寫的部分可自行刪除)

(第 1 申請人)

國 籍：☒ 中華民國 ☐ 大陸地區 (☐ 大陸、☐ 香港、☐ 澳門)
☐ 外國籍：_____

身分種類：☐ 自然人 ☒ 法人、公司、機關、學校

ID：

名稱：(中文) 國立高雄科技大學

(英文) NATIONAL KAOHSIUNG UNIVERSITY OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

(簽章)

代表人：(中文) 楊慶煜

(英文) YANG, CHING-YU

(簽章)

地址：(中文) 高雄市三民區建工路 415 號

(英文) NO. 415, JIANGONG RD., SANMIN DIST., KAOHSIUNG
CITY, TAIWAN, R.O.C.

☐ 註記此申請人為應受送達人

聯絡電話及分機：