

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 200011

參展科別 環境工程

作品名稱 研究以微生物分解廢食用油降低其對環境汙染

得獎獎項

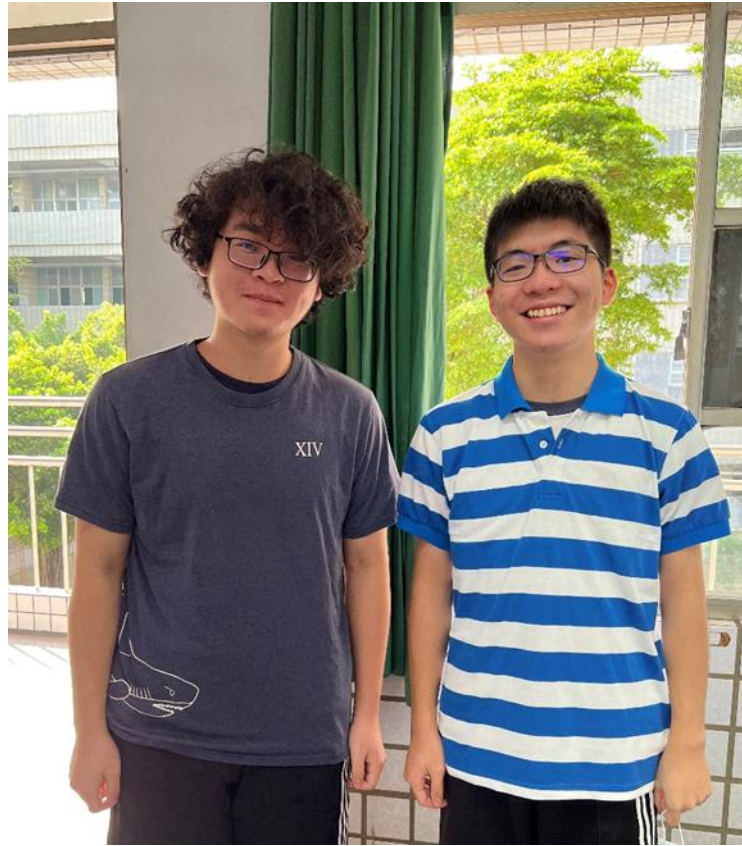
就讀學校 國立鳳山高級中學

指導教師 吳家進

作者姓名 葉智凱、黃聿綸

關鍵詞 廢水油脂處理、油脂分解菌、脂肪分解酶

## 作者簡介



我們來自鳳山高中，成員由葉智凱（右）、黃聿綸（左）組成，因為家中的廢食用油處理問題，讓我們想到以生物分解來處理廢食用油的汙染問題。很高興在研究過程能篩選出適合分解廢食用油的菌種，也學習到科學論文的產出。期待未來能夠對於環境汙染議題有更深入的学习與研究。

## 摘要

本研究從餐廳截油槽中採菌，並以含 Tween80 及  $\text{Ca}^{2+}$  培養基篩選出具 lipase 的五種菌。進一步在大豆沙拉油與豬油中培養，發現一號菌及二號菌有較佳的分解能力，二號菌最佳，且二號菌在分解沙拉油(6.0%)的能力大於豬油(4.9%)。將此兩種菌進行深入探討，發現二號菌在處理截油槽中的廢油效能上優於一號菌，且當一、二號菌混合時更佳；於不同油脂 Nutrient Broth 培養基的生長情況，二號菌表現比一號菌好。經定序後比對序列後，推斷一號菌接近 *Serratia marcescens*，二號菌較接近 *Serratia grimesii*。總結一、二號菌是具備油脂分解潛力的菌種。

未來規劃，將菌加入自行設計的油脂分解截油槽，比較計算其分解能力，運用於含油脂的廢水處理，減少環境汙染。

## Abstract

In this study, bacteria were collected from the restaurant grease trap, and five kinds of bacteria were screened out with lipase by agar plate containing Tween80 and  $\text{Ca}^{2+}$ . Further culturing in soybean oil and pig oil showed that bacteria No. 1 and No. 2 had better decomposing ability, and Bacteria No. 2 was the best. Moreover, the ability of Bacteria No. 2 in decomposing soybean oil (6.0%) was greater than pig oil (4.9 %). After in-depth discussion of these two bacteria, it is found that Bacteria No.2 is better than Bacteria No.1 in the treatment of the waste oil in grease trap, and it is better when Bacteria No.1 and No.2 are mixed. Additionally, concerning the bacteria growth in different oil Nutrient Broth, the performance of Bacteria No.2 is better than Bacteria No. 1. After sequencing and comparing the sequences, it is concluded that the Bacteria No. 1 is close to *Serratia marcescens*, and Bacteria No. 2 is closer to *Serratia grimesii*. To sum up, Bacteria No. 1 and No. 2 have the potential to decompose oil.

In the future, we plan to add bacteria to the decomposing bacteria grease trap that we designed in order to check the decomposing ability, and apply it to the treatment of gease-containing wastewater to reduce environmental gease pollution.

# 壹、前言

## 一、研究動機

廚房污水因油脂含量很高，若沒有先經過適當的攔除就直接排放進下水道，除了會造成環境污染外也可能會造成廚房排水管及下水道油脂阻塞問題。為了避免廚房排水管及下水道被油脂堵塞政府規定要求餐飲業者不論是大型餐廳或小吃廚房通通都要安裝截油槽來維護污水管線暢通內政部營建署建築技術規則，建築設備編第二章第一節第二十九條規定：餐廳、店鋪、飲食店、市場、商場、旅館、工廠、機關、學校、醫院、老人福利機構、身心障礙福利機構、兒童及少年安置教養機構及俱樂部等建築物之附設食品烹飪或調理場所之水盆及容器落水，應裝設油脂截留器。然而油脂截油器並非萬靈丹，依據本組研究成員經長期觀察，仍有部份的油脂無法懸浮在水面上被截留，尤其是餐廳在用餐尖峰期間，瞬間水量經常超過截油槽的最大負荷，導致大量的含油脂的廢水排放至廚房的廢水管線，廚房管線內長期累積的油脂經空氣氧化後會變成固態油脂，會黏附在管壁上而造成堵塞。如果能找出有效油脂分解方法，將能夠解決油脂堵塞水管的問題，更有利於環境保護。在查詢相關解決方案時，發現使用特殊細菌可以分解海中輪船所滲漏的油( Biello, 2015 )。所以，我們想參照這個方式，尋找油脂分解菌，減少油脂對環境的汙染。

## 二、文獻探討

### (一) 利用 Tween 80 檢驗脂肪分解酶

Tween 80 的學名為聚氧乙烯山梨醇單油酸酯，是一種非離子型表面活性劑及乳化劑。Tween80 遇到脂肪分解酶時，會水解並釋放出游離脂肪酸，當 $Ca^{2+}$ 存在時，會產生油酸鈣( $C_{36}H_{66}CaO_4$ )沉澱。故將能產生脂肪分解酶的細菌培養於含有 Tween80 及 $CaCl_2$ 的固態培養基中，將能在培養基上見到明顯不透明物質，因此常用於初步脂肪分解酶活性的測試 ( Lovell & Bibel, 1977 ; Samad et.al., 1989 )。

### (二) 利用分光光度計估算菌數

Koch & Kaplan (1952)提出的以比濁法估算菌數的文獻可知，菌液濁度與細菌數量呈現正比關係。因此可利用菌液濁度作為細菌的數量估計。實驗中常以分光光度計測量菌液的光學密度(optical density, 簡稱 OD)表示，利用菌數與 OD 值成正比關係。由 Vembadi et al. (2019) 所提出細胞計數的回顧與展望文獻中，可以得知藉由計數細胞個數和乘以稀釋倍率，以確定其細胞濃度。故我們搭配細胞計數器測

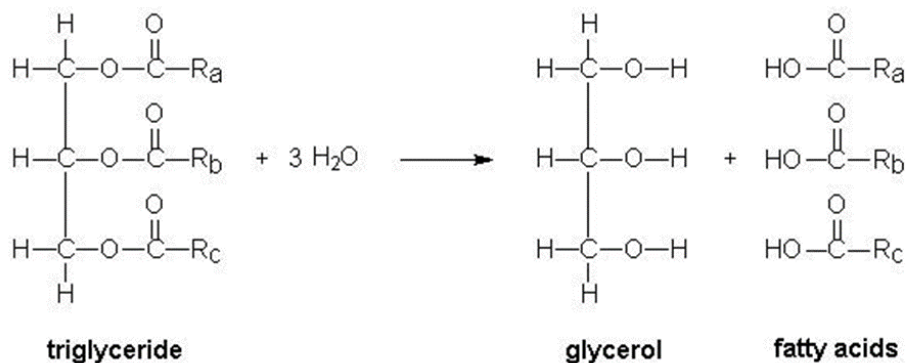
量一定體積液體中的菌數，快速計算出細菌的數量(Maia et al.,2016)。

### (三) 三酸甘油酯

大眾俗成的油脂即是三酸甘油酯 (triglyceride, TG, triacylglycerol, TAG, or triacylglyceride)，為動物性油脂與植物性油脂的主要成分，是由一個甘油分子和三個脂肪酸分子組成的酯類有機化合物。組成三酸甘油酯的脂肪酸分可由「雙鍵」的有無分為飽和脂肪酸 (Saturated Fatty Acid) 與不飽和脂肪酸 (Unaturated Fatty Acid) :飽和脂肪酸，碳數較多，在常溫下多以固態形式存在，稱為脂肪；不飽和脂肪酸，碳數少，在常溫下多以液態存在，稱為油，含有一個雙鍵者稱為「單元不飽和脂肪」酸，兩個以上雙鍵者稱為「多元不飽和脂肪酸」。大部分動物性油脂存在較多飽和脂肪酸 (如豬、牛、羊脂等)，而植物油則普遍含有較多不飽和脂肪酸 (如沙拉油)。此外，油脂的熔點亦受脂肪酸影響，當油脂所含飽和脂肪酸愈多，碳鏈愈長時，其沸點較高，故連接三個飽和脂肪酸的三酸甘油酯沸點較高 (落，2008)。

### (四) 三酸甘油酯的分解與代謝

脂肪酶 (lipase)，是一種水解酵素，能夠催化三酸甘油酯 (triglyceride) 水解成為甘油 (glycerol) 與游離脂肪酸 (free fatty acids) (如下圖一)。細菌的脂肪酶 (lipase) 主要在細胞外，通常在油脂、脂肪酸、甘油或 Tween 存在下製造 (Gupta et al., 2004)。游離脂肪酸在部分生物中，可再經由肉鹼 (carnitine) 穿梭至粒線體中，轉換成脂肪醯基輔酶 A (Nelson and Cox, 2012)。由 Kenzo and Koji (1984) 提出的生產左式肉鹼 (L-carnitine) 的方法中可知，肉鹼能在特定的細菌 (如: *Serratia liquefaciens* 等) 中產生。



圖一、三酸甘油酯水解成為甘油與游離脂肪酸  
(圖片源自 Ignatius and Sagar,2017)

### 三、研究目的

- (一) 從油槽篩選出具脂肪分解能力的菌株
- (二) 比較各油脂分解菌分解沙拉油與豬油的能力
- (三) 了解油脂分解菌是否能真正分解廚房中產生的廢油

## 貳、研究方法或過程

### 一、研究設備及器材

#### (一) 研究設備：

1. 複式顯微鏡	2. 分光光度計	3. 加熱板
4. 電子天平	5. 滅菌釜	6. 水平振盪器
7. 恆溫培養箱	8. 烘箱	9. 垂直震盪器 votex
10. 無菌操作台	11. 抽氣櫃	12. 離心機
13. 聚合酶連鎖反應儀(PCR)	14. 紫外線 DNA 電泳觀察箱	15. 桌上型簡易離心機

#### (二) 研究藥品：

1. 台糖大豆沙拉油	2. 胰蛋白胍大豆培養基 (Tryptone Soy Broth, TSB)	3. 營養培養基 (Nutrient Broth; NB)
4. 高級洋菜粉	5. 二水氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	6. 吐溫 80 (Tween80)
7. 蛋白胍 (peptone)	8. 氯化鈉 (NaCl)	9. 義美純豬油
10. 正己烷 (n-Hexane)	11. 鹽酸 ( $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ )	12. TBE 緩衝液
13. DNA 萃取 kit 組		

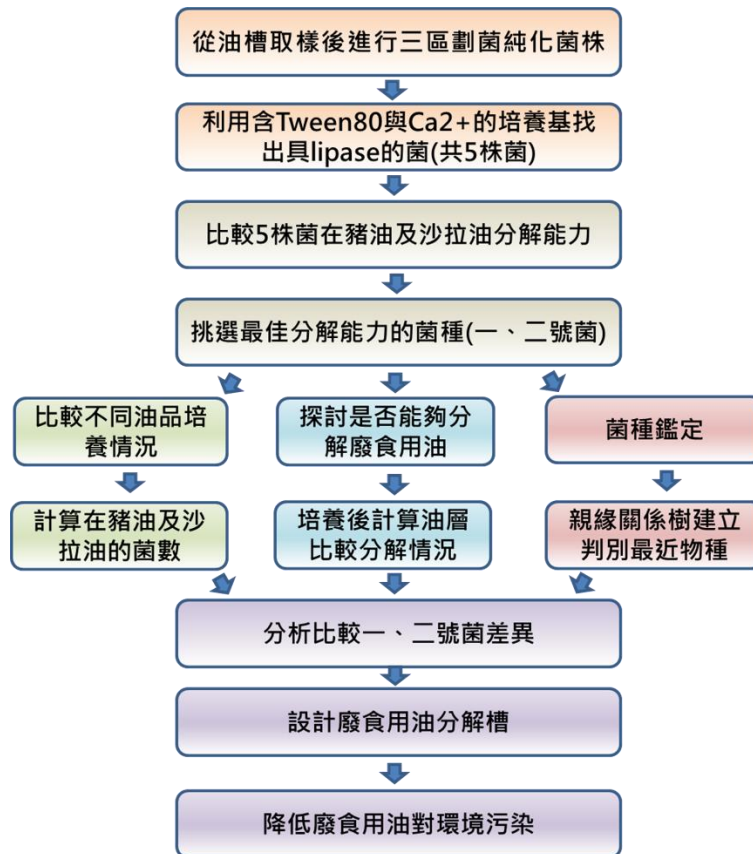
#### (三) 研究器材：

1. Tube & Tube 架	2. 血清瓶 (1000ml)	3. 玻璃漏斗
4. 燒杯	5. 錐形瓶 (250mL)	6. 梨形分液漏斗 (500mL)
7. 塑膠刻度滴管	8. 乳頭玻璃滴管	9. 量筒
10. 圓底燒瓶 (500mL)	11. 刮勺	12. 酒精燈
13. 棉花棒	14. 60ml 平底試管	15. 鋁箔紙
16. 濾紙 (孔徑: $6\ \mu\text{m}$ )	17. 8mm 濾紙	18. 無菌塑膠離心管 (15mL)
19. 計數器	20. 細胞計數器	21. 微量吸管尖 (Pipette Tips)

22. 接種環	23. 無菌塑膠培養皿	24. 橡皮塞
25. 比色管(Cuvette)	26. 定量滴管(Pipette)	

## 二、研究方法及步驟

### (一) 研究架構圖：



### (二) 研究材料製作：

1. 製作數個無菌固態 TSB 培養基 (3% Tryptone Soy Agar、2% Agar)。
2. 製作數個無菌固態 Tween80 蛋白培養基 (1% Peptone、0.5% NaCl、0.01%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.5% Agar、1% Tween80)。
3. 製作 200mL 無菌液態 NB 培養基 (2 g Nutrient Broth、1.6g Agar、200 mL RO 水)。
4. 配製含 15g 沙拉油之 250mL NB 無菌液態 NB 培養基 (2g Nutrient Broth、15 g 沙拉油、250 mL RO 水)。
5. 配製含 15g 豬油之 250mL NB 無菌液態 NB 培養基 (2 g Nutrient Broth、15 g 豬油、250 mL RO 水)。

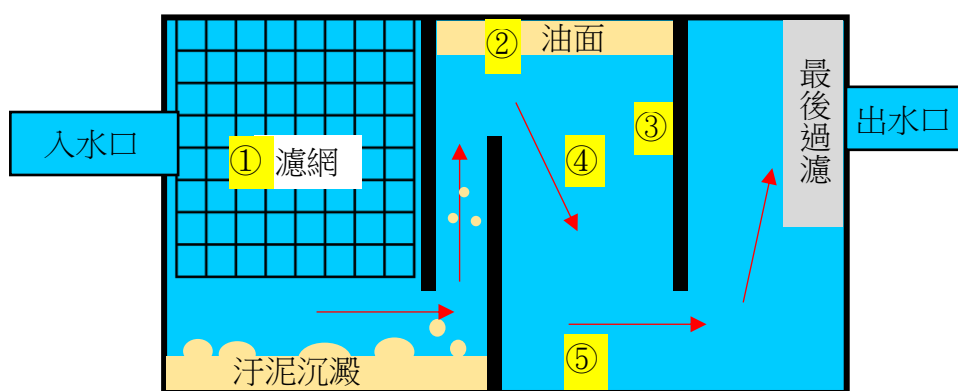
### (三) 前置實驗：

#### 1. 菌的純化及油脂分解菌的篩選

- (1) 用棉花棒於刮取油水分離槽（圖二）內部（①過濾網、②油面、③槽壁、④汗水中、⑤槽底）取得樣本（圖三）。
- (2) 將棉花棒上的物質均勻塗抹在固態無菌 TSB 培養基」上，放進恆溫培養箱恆溫（30°C）培養一天。
- (3) 利用三區畫菌法將菌株分離至另一「無菌固態 TSB 培養基」中，重複數次取得純菌種，並且分出各菌種備用（如表一的第二欄）。
- (4) 利用接種環將菌株由菌盤勾至「200 mL 無菌液態 NB 培養基」中，瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 2 日（30 °C, 150 rpm.）。
- (5) 利用鑷子夾取無菌 8 mm 濾紙放入菌液沾濕，並將其擺放至「無菌固態 Tween80 蛋白培養基」上，於 30 °C 恆溫培養箱培養 2 日。
- (6) 重複（5）數次，挑出五種產生沉澱環的菌種進行下一階段的實驗（如表一的第三、六欄）。













圖二、油水分離槽



圖三、油水分離槽側視圖（採菌處）

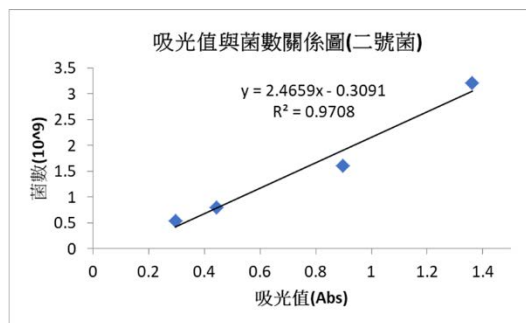
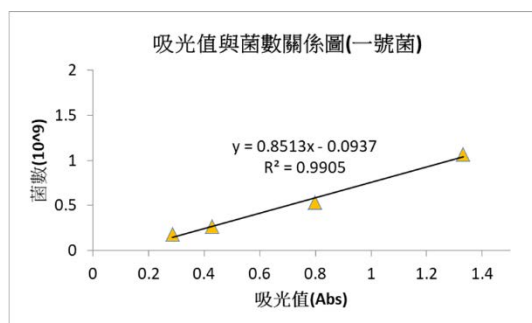


表一、將菌培養於 TSB 固態培養基與固態 Tween80 蛋白培養基

	一號菌	二號菌	四號菌
培養於 TSB 固 態培養 基			
培養於 固態 Tween8 0 蛋白 培養基			
	五號菌	六號菌	
培養於 TSB 固 態培養 基			
培養於 固態 Tween8 0 蛋白 培養基			

## 2. 菌的濃度測定與定量

- (1) 篩選出具有沉澱環的五種菌種利用接種環將菌株由菌盤勾至「200 mL 無菌液態 NB 培養基」(2 g Nutrient Broth、1.6g Agar、200 mL RO 水)中，瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 2 日 (30 °C, 150 rpm.)。
- (2) 使用 Pipette 吸取上述所培養之菌液與 NB 液態培養基，吸入 tube 中稀釋 100 倍，放置在垂直震盪器上均勻混合。滴入細胞計數器中，放至顯微鏡進行計數，利用公式計算 $\left(\text{數量} = \frac{(A+B+C+D)}{4} \times 10^4 \times \text{稀釋倍率}\right)$ 並且紀錄其濃度 (個/mL)。
- (3) 將二種菌液分別利用如 (2) 之稀釋方法，稀釋 2 倍，分別以 Pipette 吸取菌液 3 mL 加入至 cuvette 中，每種菌取兩管。利用分光光度計測量其全波段光譜，並紀錄此圖之高峰波長，取平均後，作為該菌的吸光波長。
- (4) 利用如 (2) 之稀釋方法，將菌液稀釋成 2 倍、4 倍、8 倍、12 倍、16 倍。
- (5) 將步驟 (3) 測得上述各菌種紀錄之高峰波長，分別輸入至分光光度計。再將各濃度之稀釋菌液及原菌液，以 Pipette 吸取菌液 3 mL 加入至 cuvette 中，每種菌取兩管，放入分光光度計中取得各菌種不同濃度的 abs 值。
- (6) 繪製各菌種 abs 值對菌液濃度的關係圖，若發現繪製後關係圖之 R 平方值小於 0.95，因濃度較大時測量 abs 值換算菌種濃度會較不準確，剔除濃度較大的數據。並記錄此圖在 R 平方值大於 0.95 時，所能測量之菌液最大濃度。之後由此關係圖得知以 abs 值與菌液濃度的直線方程式，後面實驗可使用分光光度測量菌液 abs 值，換算成菌液濃度。
- (7) 以分光光度計測量全光譜找出高峰值後，以此波長測量不同濃度的吸光值，另以細胞計數器計算菌數後繪製其關係圖以利後續實驗計算菌數使用 (僅呈現一號菌及二號菌結果)。本次一號菌所使用的最高波長為 441 nm，二號菌為 433 nm，可發現  $R^2$  值均超過 0.97，顯示後續實驗菌數計算可由吸光值估計。



(三) 實驗 (一): 比較不同菌種於沙拉油及豬油的分解能力

1. 培養菌液: 利用接種環將菌株由菌盤勾至「200 mL 無菌液態 NB 培養基」中, 瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 2 日 (30 °C ; 150 rpm)。
2. 將菌液加入沙拉油與豬油中: 利用 (三) 前導實驗 2. 測出各菌種 abs 值對菌液濃度的關係圖, 與當下菌液測得之 abs 值, 計算其菌液每 mL 所含菌數, 加入菌至「含 15g 沙拉油之 250mL NB 無菌液態 NB 培養基」及「含 15g 豬油之 250 mL NB 無菌液態 NB 培養基」中, 使其濃度為  $2 \times 10^7$  個 / mL, 瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 3 日 (30°C ; 150 rpm)。
3. 於恆溫培養箱震盪培養 3 日後, 改封上鋁箔紙, 放入滅菌釜滅菌 (121°C ; 15 分鐘), 滅菌後待進行萃取。
4. 本實驗對照組:
  - (1) 「含 15 g 沙拉油之 250 mL NB 無菌液態 NB 培養基」
  - (2) 「含 15 g 豬油之 250 mL NB 無菌液態 NB 培養基」
5. 利用正己烷萃取培養液中的沙拉油 (豬油)
  - (1) 測量空圓底燒瓶重 ( $W_1$ )
  - (2) 把要萃取的液體加入鹽酸, 直至 pH 值小於 2 (圖四)。
  - (3) 倒入分液漏斗, 再拿正己烷沖洗進原本的錐形瓶, 再倒入分液漏斗 (圖五)。
  - (4) 搖晃分液漏斗持續數分鐘 (圖六), 接著靜置 5~10 分鐘 (圖七)。
  - (5) 將下層液體漏回原萃取瓶中 (圖八), 倒出上層有機層至圓底燒瓶, 再以正己烷淋洗分液漏斗再收集有機層 (圖九), 並重複 (2) - (5) 步驟至少兩次。
  - (6) 將萃取完的有機層以減壓濃縮裝置蒸乾正己烷與水, 接著放入烘箱烘乾 (圖十一), 重複直至重量前後兩次重量差小於 0.01 克, 再測量總重 ( $W_2$ ) (圖十二)。註: 但因為學校設備有限, 我們把減壓濃縮裝置改成以加熱板於抽氣櫃內加熱蒸發 (圖十)。
  - (7) 萃取所得油重為  $W_2 - W_1$ 。
  - (8) 油脂分解率 =  $\frac{\text{對照組萃取所得克數} - \text{菌放入油生長後萃取油脂所得克數}}{\text{對照組萃取所得克數}} \times 100\%$



圖四、將鹽酸滴入培養基



圖五、倒入分液漏斗



圖六、均勻搖晃



圖七、靜置



圖八、將下層液體漏出



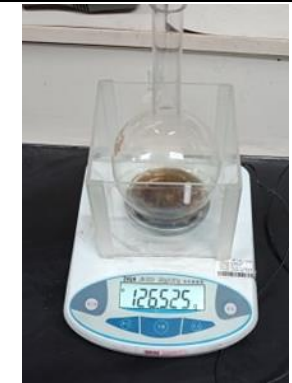
圖九、收集上層



圖十、加熱板上蒸發



圖十一、烘箱中烘乾



圖十二、電子天平秤重

(四) 實驗 (二): 比較一號菌及二號菌不同濃度對於廢食用油的分解能力

1. 培養菌液: 利用接種環將一、二號菌的菌株由菌盤勾至「200 mL 無菌液態 NB 培養基」中, 瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 2 日 (30°C ; 150 rpm)。

2. 將廢油分裝及加入菌液培養:

(1) 至油水分離槽的第二槽撈取廢油並以血清瓶放入滅菌釜中確保無其他菌殘留

(2) 將滅菌後的廢油搖晃均勻並分裝至試管中, 每管 25 mL。

(3) 利用 (三) 前導實驗 2. 測出各菌種 abs 值對菌液濃度的關係圖, 與當下菌液測得之 abs 值, 計算其菌液每 mL 所含菌數, 分別加入菌使每管  $2 \times 10^7$  個 / mL 及  $2 \times 10^8$  個 / mL。(若兩種菌液濃度不一, 則先進行稀釋至等倍率, 再換算加入相同毫升入廢油中)

(4) 瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 3 日 (30°C ; 150 rpm)。

(5) 於恆溫培養箱震盪培養 3 日後, 改封上鋁箔紙, 放入滅菌釜滅菌 (121°C ; 15 分鐘)。

3. 離心查看其分解力:

(1) 將試管利用橡皮塞封口並搖晃均勻, 每管抽出分別抽出 10 mL 廢油至無菌塑膠離心管中離心。

(2) 將無菌塑膠離心管以 3000 rpm 離心 10 分鐘。

(3) 離心後利用測油層毫升數, 並以無菌之廢油離心作為對照組。

(4) 計算分解油層毫升數 = 對照組油層毫升數 - 各菌於廢油中培養後油層毫升數。

(五) 實驗 (三): 比較一、二號菌在不同油脂培養基之生長情況

1. 培養菌液: 利用接種環將菌株由菌盤勾至「200 mL 無菌液態 NB 培養基」中, 瓶口封上濾紙並於恆溫培養箱震盪培養 2 日 (30°C; 150 rpm)。

2. 製作培養基並加入菌液:

(1) 分別製作含「5 g 沙拉油+ 20 mL NB 培養基」、「5 g 豬油+ 20 mL NB 培養基」、「5g 廢油+ 20 mL NB 培養基」、「20 mL NB 空白培養基」於 60mL 平底試管中, 並將瓶口封上鋁箔紙放入滅菌釜 (121°C; 15 分鐘)

(2) 前導實驗 2. 測出各菌種 abs 值對菌液濃度的關係圖, 與當下菌液測得之 abs 值, 計算 1. 培養之菌液每毫升所含菌數, 加入  $2 \times 10^7$  個/mL 至試管中。

(3) 瓶口封上濾紙後並於恆溫培養箱震盪培養 3 日 (30°C; 150 rpm)。

3. 計算培養三天後的菌數:

(1) 將平口改封上鋁箔紙放入滅菌釜 (121°C; 15 分鐘)

(2) 將平底試管裝上橡皮塞子並搖晃均勻, 再吸入離心管離心

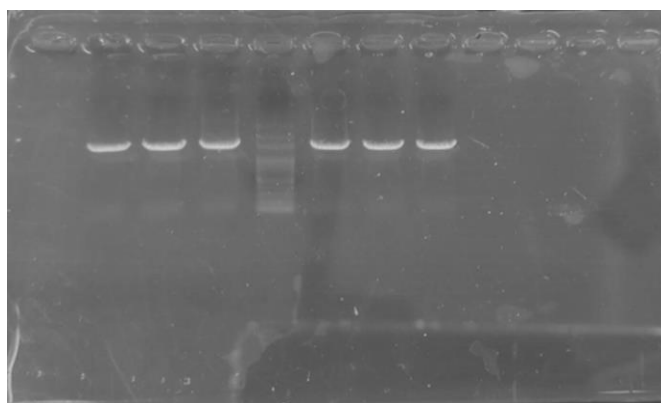
(3) 將上層油層吸出後, 將下方菌吸出稀釋 100 倍, 再滴入細胞計數器中, 放

至顯微鏡進行計數, 利用公式計算 $\left( \text{數量} = \frac{\text{四個角落菌數總和}}{4} \times 10^4 \times \text{稀釋倍率} \right)$  (此實驗稀釋倍率為 100 倍)

(六) 實驗 (四): 以 DNA 序列建構一、二號菌親緣關係找尋最相近物種

1. 抽取 DNA 及 PCR

- (1) 利用 DNA 萃取 kit 組，抽取本研究篩選出來之細菌。
- (2) 以學校添購之 PCR 機器進行菌種 PCR 實驗，選用之引子為 16S rDNA 片段，引子序列如下，序列由大學實驗室設計提供。序列長度約 1500 bps 左右。  
**27F      AGRGTTYGATYMTGGTCCAG**  
**1492R    GGTTACCTTGTTACGACTT**
- (3) 總反應為 30  $\mu$ L。反應條件 28 cycles。94°C 5 分鐘後，進行循環 94°C 30 秒 → 52°C 30 秒 → 72°C 90 秒，循環 28 次後，72°C 5 分鐘，反應停止於 25°C。
- (4) 反應完成後，以 1% 洋菜膠進行 15 分鐘電泳，觀察是否為正確片段，如下圖十三。
- (5) 確認正確後，送交生技公司協助定序，本次請基龍米克斯生技公司協助定序。
- (6) 獲得序列後將序列進行 BLAST 比對，以 NCBI 網站資料庫進行比對，得到屬名或相近物種後，因菌種鑑定相對其他生物困難，故再以 LPSN 網站資料庫 (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) 找到正確相關物種之 16S rDNA 進行比對。
- (7) 以軟體 MEGA 建立親緣關係樹，以 Neighbor Joining 方法，Bootstrap 值 =1000，進行親緣關係樹建立



圖十三、本次研究 PCR 電泳圖

## 參、研究結果與討論

### 一、實驗一：比較不同菌種於沙拉油及豬油的分解能力

#### (一) 對照組

1. 「含 15 g 沙拉油之 250 mL NB 無菌液態 NB 培養基」進行萃取：萃取所得克數平均為 14.864 g；標準差為 0.043。
2. 「含 15 g 豬油之 250 mL NB 無菌液態 NB 培養基」進行萃取：萃取所得克數平均為 14.867 g；標準差為 0.046。

#### (二) 實驗結果

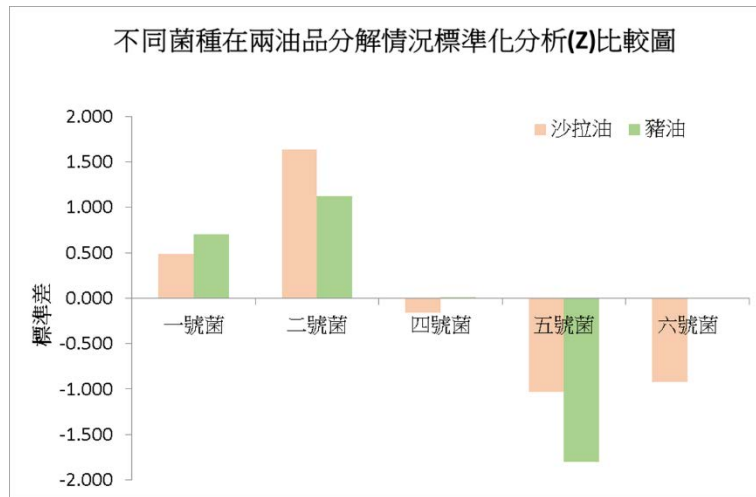
本實驗每種菌種至少進行 5 次以上的實驗再將其萃取回收計算平均的分解率。每次均已相同細菌濃度進行實驗，在不同細菌相同濃度（ $2 \times 10^7$ ）對於沙拉油及豬油分解的比較中（表二、圖十四）可以得知二號菌無論在沙拉油或豬油均有最佳的分解效果，平均 5.51%，其次是一號菌平均 4.08%，而五號菌效果不佳 0.66%。而比較兩種油品，沙拉油的平均分解率 2.92%，豬油平均分解率 3.22%，顯示豬油在各菌種間分解率較好；但值得注意的是二號菌在沙拉油的分解能力高出豬油（6.04% > 4.99%），且更高於其他菌種，顯示二號菌對於沙拉油分解有很好的效果，此點將於討論中說明。

備註：油脂分解率 =  $\frac{\text{對照組萃取所得克數} - \text{菌放入油生長後萃取油脂所得克數}}{\text{對照組萃取所得克數}} \times 100\%$

表二、沙拉油與豬油分解效果比較表

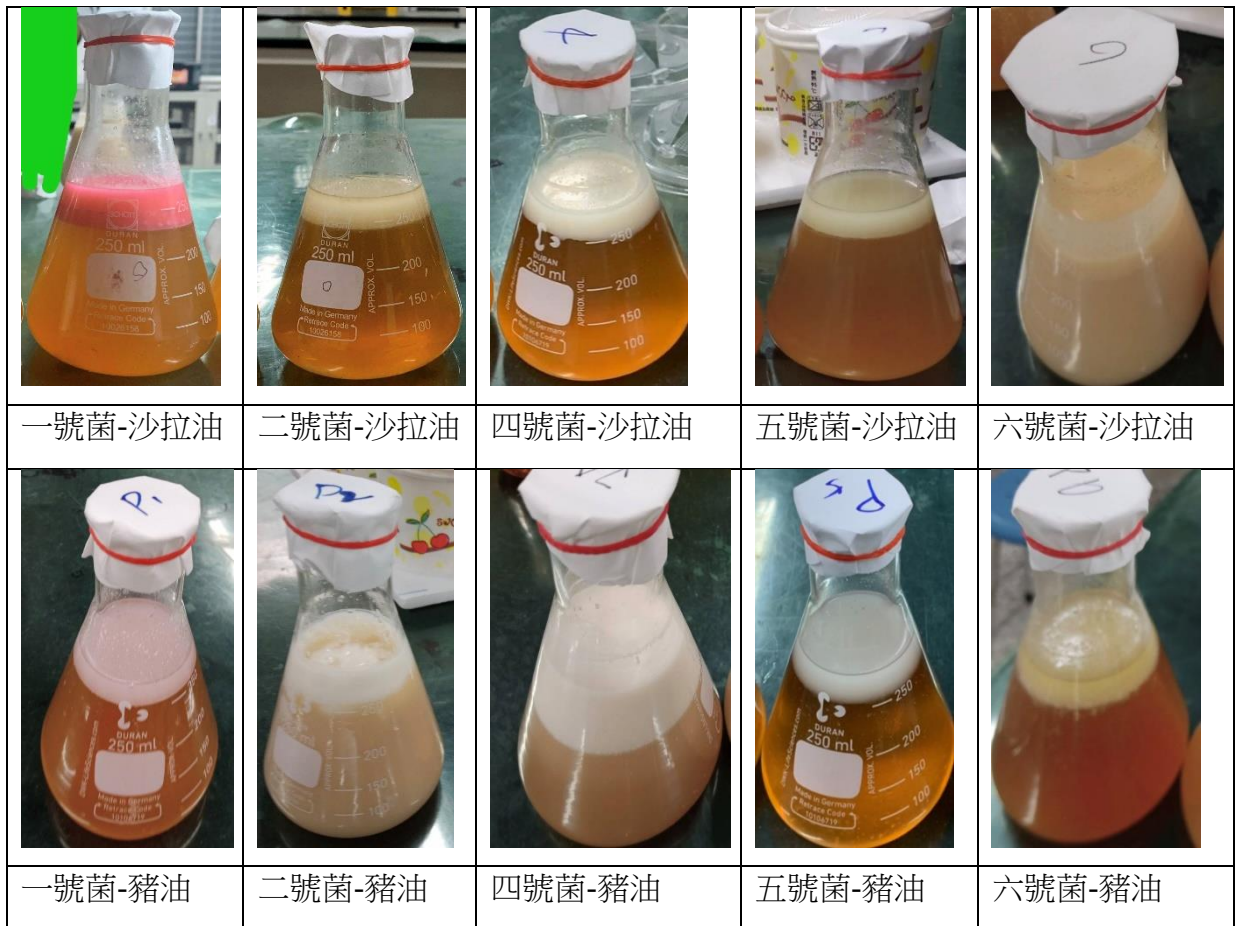
	沙拉油		豬油		兩種油平均
	平均	標準差	平均	標準差	
一號菌	3.84 %	2.52	4.32%	2.41	4.08%
二號菌	6.04 %	2.77	4.99%	2.51	5.51%
四號菌	2.61 %	1.44	3.23%	1.44	2.92%
五號菌	0.95 %	0.50	0.37%	0.28	0.66%
六號菌	1.17 %	1.27	3.21%	1.30	2.16%
平均	2.92%		3.23%		3.07%





圖十四、不同菌種平均分解率標準化分析比較圖

(三) 實驗照片：各菌於豬油、沙拉油中培養三日後結果照片（僅各挑一張範例）：



(三) 討論：

1. 從實驗數據看來，一、二號菌對油脂具有顯著的分解能力。不管沙拉油或是豬油的分解率，二號菌的皆居最高，而一號菌分解力皆僅次於二號菌，我們推測影響油脂分解率可能是以下原因：

- (1) 此溫度、酸鹼度環境下，對於某些菌類生長較不利。
- (2) 不同菌類生產的脂肪酶量與性質不盡相同。
- (3) 某些菌類可能產生特殊物質以分解油脂。

因此我們決定將一、二號菌進行定序，得知其屬名或接近的物種，並查詢該屬或該物種的適當生存環境，或是是否有特殊的分解油脂方式。(即本報告的實驗(四))

2.二號菌對於沙拉油分解力較豬油佳，與其他菌種不同。可能原因為：

- (1) 單位體積油脂下與酵素接觸表面積：沙拉油屬不飽和脂肪酸，為彎曲型結構，單位體積下與酵素接觸表面積大，使酵素較易與之作用；反之，豬油屬於飽和脂肪酸，為直線型結構，單位體積下與酵素接觸表面積小，使酵素較不易與之作用。
- (2)  $\pi$  鍵較易斷開：不飽和脂肪酸的沙拉油具有  $\pi$  鍵，較斷  $\sigma$  鍵容易。因此  $\sigma$  鍵斷開後，接上其他官能基，形成其他物質。

## 二、實驗二：比較一號菌及二號菌不同濃度對於廢食用油的分解能力

### (一) 對照組

從廢油槽撈取油水分離後的廢油滅菌後備用，將其震盪均勻混合後，取至平底試管，每管 25mL 取 3 管，並分別加入與實驗組加入菌液等量的無菌 NB 液態培養基。再從平底試管中，各取 2 管至無菌塑膠離心管，每管 10mL，共 6 管，進行離心 10 分鐘後，計算油層平均毫升數。

結果：6.52 毫升

### (二) 實驗結果-油層分解比較

本實驗進行 3 組測試，一號菌組、二號菌組及混合組（兩菌 1:1 混合），並將菌的濃度進行 10 倍濃度差進行實驗，所選取濃度為  $2 \times 10^7$  及  $2 \times 10^8$  進行實驗，每一條件下於平底試管中 3 管培養後，各取 2 管至無菌塑膠離心管，每管 10mL，共 6 管，離心 10 分鐘，計算油層平均毫升數。

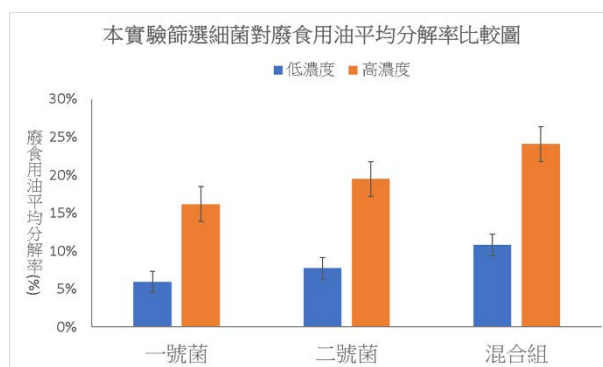
表三及圖十五得知，二號菌的分解能力最佳，在低濃度及高濃度均有很好的效果，將菌種 1:1 混合後分解能力大於單一菌種，顯示混合組的效果更好，約能提升 3.0% 至 8.0% 的效果。而高濃度的分解情況則能夠提升 10.1% 至 13.4% 效果，顯示

濃度高、混菌組有最好的分解效果。另從圖十六分解後油品中菌數統計比較，也可看出在混合組的高濃度中有較明顯的菌數增長，可能與兩菌的交互作用有關

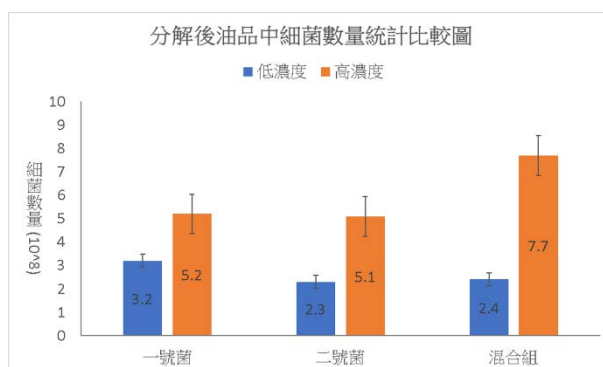
表三、一號菌及二號菌在不同濃度下廢油分解能力比較表

原始油層 6.52 ml	A.低濃度 $2 \times 10^7$		B.高濃度 $2 \times 10^8$		高低濃度差異 分解率 B-A
	分解毫升	分解率(%)	分解毫升	分解率(%)	
一號菌	0.39 ± 0.31	6.0%	1.05 ± 0.26	16.1%	10.1%
二號菌	0.50 ± 0.27	7.7%	1.27 ± 0.28	19.5%	11.8%
混合組	0.70 ± 0.20	10.7%	1.57 ± 0.21	24.1%	13.4%
混合組與一號菌差異	0.31	4.7%	0.52	8.0%	3.3%
混合組與二號菌差異	0.2	3.0%	0.3	4.6%	1.6%

備註：油脂分解率 =  $\frac{\text{對照組油層毫升數} - \text{各菌於廢油中培養後油層毫升數}}{\text{對照組油層毫升數}} \times 100\%$



圖十五、本實驗篩選細菌對廢食用油平均分解率比較圖



圖十六、分解後油品中細菌數量統計比較圖

### (三) 討論：

從實驗數據看來，一、二號菌加入廢油中培養三天後進行離心，對照無加菌的廢油，有加入菌液的油層皆有明顯的減少。另外，當菌數增加時，油層分解更多，可以證明菌的量與油脂分解量有明顯的關係。此外，二號菌所分解的油量不管菌量

在 $2 \times 10^7$ 個/mL 或 $2 \times 10^8$ 個/mL 時，皆比一號菌所分解的油量多，此結果與實驗（一）將菌加入沙拉油或豬油的實驗結果相同。

### 三、實驗三：比較一、二號菌在不同油脂培養基之生長情況

（一）由表六結果得知，二號菌的生長情況比一號菌好，且二號菌在沙拉油環境之下生長最佳。而兩菌差異最大的是在廢油環境，二號菌高於一號菌 18.4%的菌落數。綜規實驗結果，二號菌有最好的生長情況。

表六、不同環境中一、二號菌之生長比較表

	一號菌		二號菌		兩菌差異值(%)
	平均	標準差	平均	標準差	二號菌-一號菌/二號菌
無油環境	$5.00 \times 10^8$ 個 / mL	3.00	$5.25 \times 10^8$ 個 / mL	4.00	4.76%
沙拉油	$5.00 \times 10^8$ 個 / mL	2.16	$5.57 \times 10^8$ 個 / mL	1.70	10.23%
豬油	$4.92 \times 10^8$ 個 / mL	1.70	$5.42 \times 10^8$ 個 / mL	0.47	9.23%
廢油	$4.22 \times 10^8$ 個 / mL	0.47	$5.42 \times 10^8$ 個 / mL	1.25	22.14%
平均	$4.83 \times 10^8$ 個 / mL		$5.41 \times 10^8$ 個 / mL		10.72%

（二）討論：

由此實驗發現，二號菌在不同環境下的生長情況均優於一號菌，尤其在沙拉油環境中二號菌的生長情況良好，此點與實驗一中二號菌對於沙拉油分解力吻合。

### 四、實驗四：以 DNA 序列建構一、二號菌親緣關係找尋最相近物種

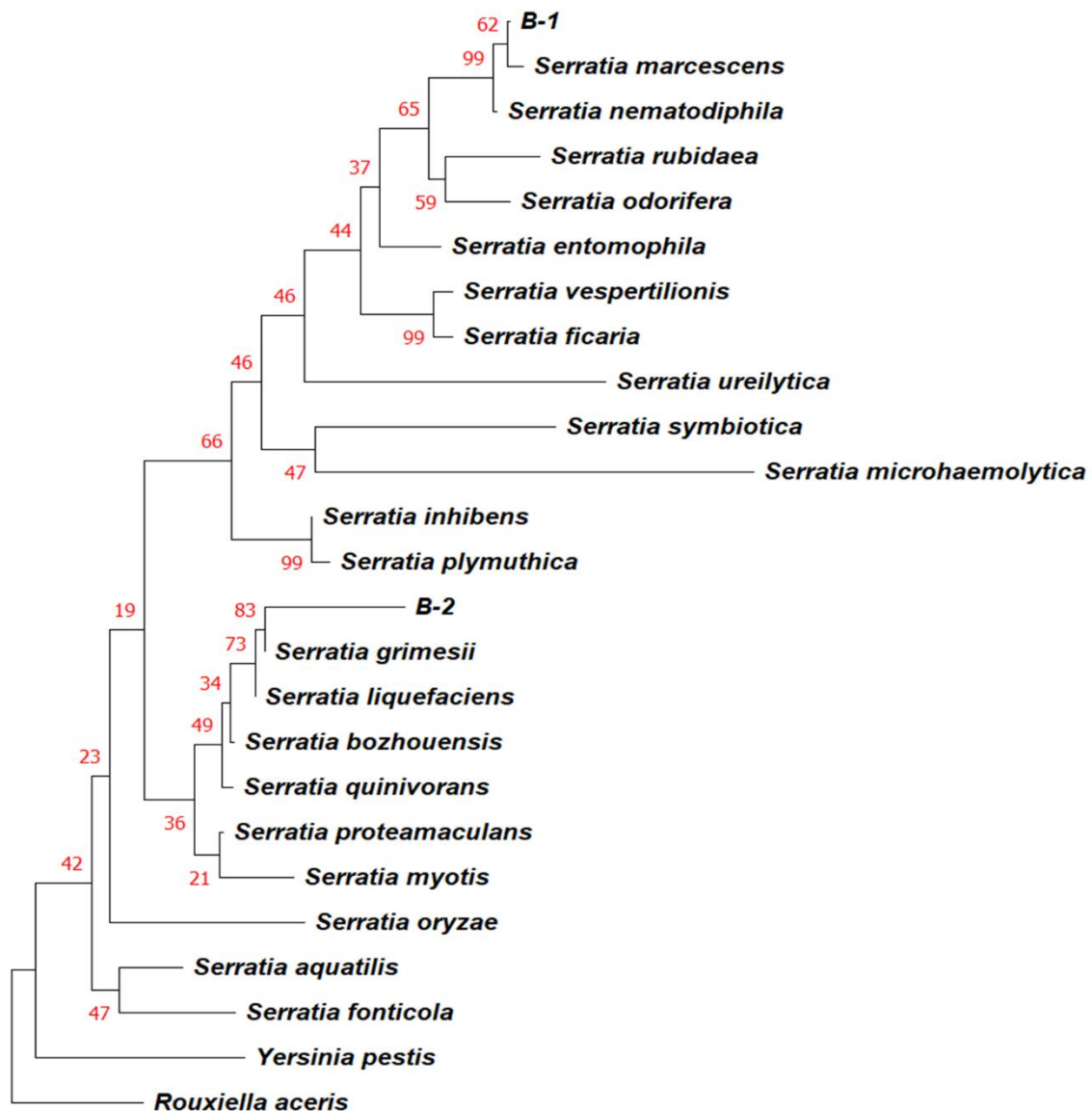
（一）將一、二號菌培養後以菌體 DNA 萃取 kit 組將兩菌種 DNA 萃取，再以 16s rDNA 之序列引子進行 PCR 後將其產物交由生技公司定序。獲得產物約 1050 bps，經過 NCBI 網站資料庫進行比對後，一號菌與 *Serratia marcescens*，二號菌與 *Serratia grimesii* 最為相近。接著從 LPSN 網站，找尋同科不同屬兩物種作為外群 (*Yersinia pestis*、*Rouxiella aceris*)，同屬共 21 物種，繪製親緣關係圖。繪製親緣關係樹，能夠更正確了解一號菌及二號菌是否與此兩物種最接近。由圖十九得知，一號菌(B-1)與 *Serratia marcescens* 及 *Serratia nematodiphila* 較為相近；而二號菌(B-2)與 *Serratia grimesii* 較為相近。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Serratia marcescens strain RBS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	1877	1877	99%	0.0	99.23%	1197	<a href="#">MH279667.1</a>
<a href="#">Serratia sp. A49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia sp. A49</a>	1875	1875	99%	0.0	98.96%	1262	<a href="#">EU675665.1</a>
<a href="#">Serratia sp. strain 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia sp.</a>	1869	1869	99%	0.0	98.68%	1248	<a href="#">MN719975.1</a>
<a href="#">Serratia marcescens strain J-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia marcescens</a>	1864	1864	99%	0.0	98.68%	1443	<a href="#">MK473381.1</a>

圖十七、一號菌序列於 NCBI 網站中比對出最接近之物種名稱

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Serratia grimesii strain JZY1-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia grimesii</a>	1796	1796	99%	0.0	97.54%	1192	<a href="#">MT071358.1</a>
<a href="#">Serratia grimesii strain N505 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia grimesii</a>	1796	1796	99%	0.0	97.71%	1107	<a href="#">MK629819.1</a>
<a href="#">Serratia liquefaciens strain N502 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia liquefac...</a>	1796	1796	99%	0.0	97.62%	1157	<a href="#">MK629816.1</a>
<a href="#">Serratia liquefaciens strain N112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Serratia liquefac...</a>	1792	1792	99%	0.0	97.53%	1190	<a href="#">MK629784.1</a>

圖十八、二號菌序列於 NCBI 網站中比對出最接近之物種名稱



圖十九、隨機選取 21 條序列及本研究之一、二號菌繪製之親緣關係圖

### (三) 討論：

經過定序比對後，我們得知一號菌較可能為 *Serratia marcescens*，二號菌較可能為 *Serratia grimesii*。以下討論該屬及兩種細菌的特性

#### 1. *Serratia* 屬（沙雷氏菌屬）的特性：

是耶爾森氏菌科的革蘭氏陰性，隸屬於細菌域，變形菌門， $\gamma$ -變形菌綱，腸桿菌目，腸桿菌科。產生 DNA 酶及脂溶性靈菌紅素（Prodigiosin）是其獨特之處，兼性厭氧。通常周生鞭毛運動。菌落大多數不透明，有些虹彩；白色、粉紅或紅色。幾乎所有的菌株能在 10~36°C、pH 5~9 下生存。

#### 2. *Serratia marcescens* 的特性

一號菌，學名 *Serratia marcescens*，其顏色為紅色，於 1819 年在義大利帕拉瓦首次被發現，會產生靈紅菌素，脂肪酶等物質，其中靈紅菌素（Prodigiosin）有抗癌性，但會破壞粒線體。此外 *Serratia marcescens* 適合生長在 30-37 度之間。

(Sehdev, & Donnenberg, 1999 ; 郭, 2019)

#### 3. *Serratia grimesii* 的特性：

二號菌，學名 *Serratia grimesii*，其顏色為白色，在 Grimont et al. (1982)等人提出，目前已知可以產生左旋肉鹼、脂肪酶等物質，這些物質皆可有效利用脂肪來製造自己所需的能量，此脂肪酶在 10°C 時觀察到最大活性，最適 pH 值為 8.0，酶在 5 – 30°C 穩定。(Aysel & Rukiye, 2014)

經序列比對後，一號菌較接近 *Serratia marcescens*，二號菌較接近 *Serratia grimesii*。查詢相關文獻後，得知 *Serratia grimesii* 含有肉鹼（carnitine），可能能幫助油脂的分解，所以使二號菌在沙拉油、豬油、廢油的分解力優於一號菌。此外，二號菌與 *Serratia grimesii* 的 Bootstrap 值僅 68，故二號菌值得我們再深入研究。

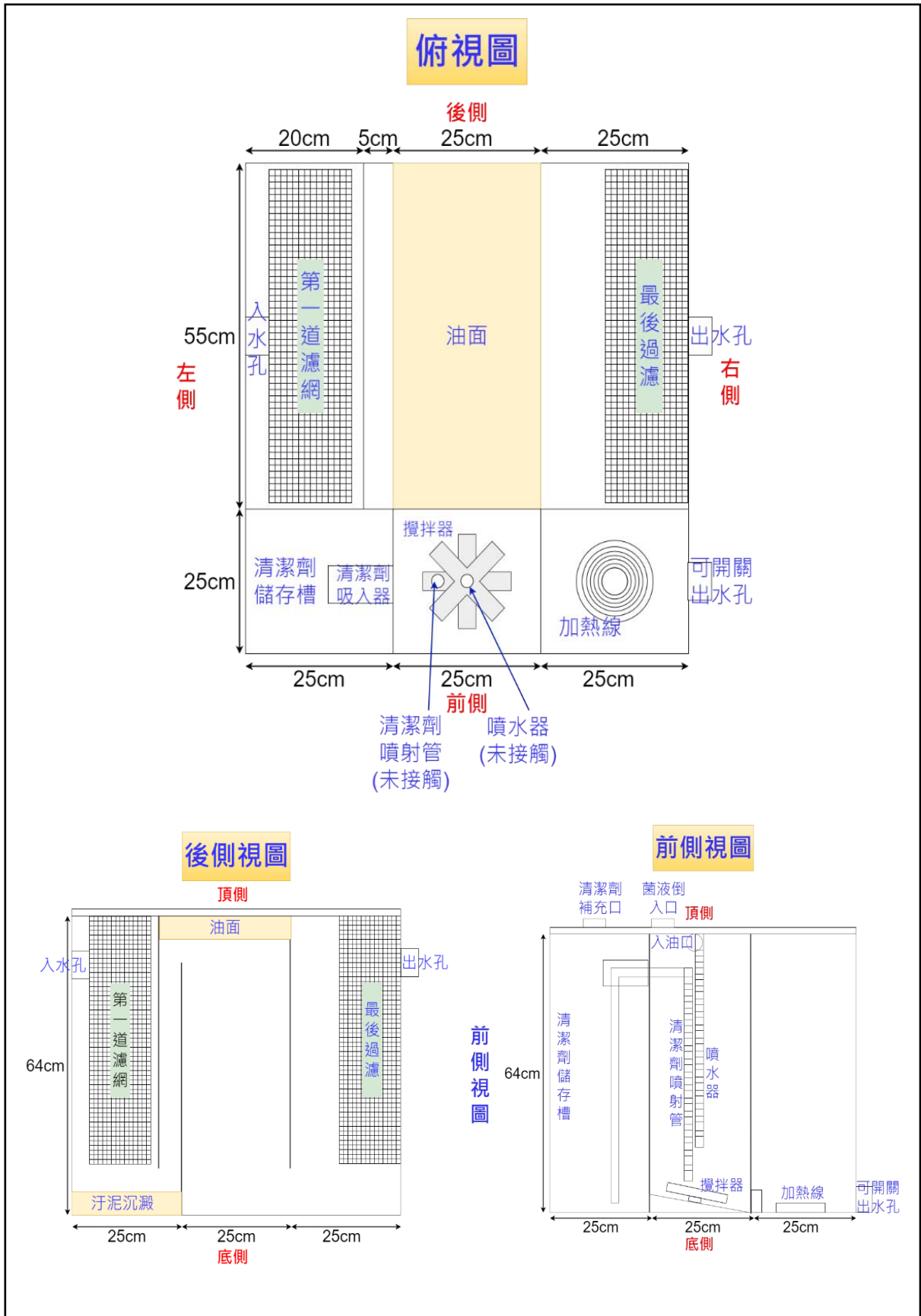
## 肆、結論與應用

### 一、結論：

- (一) 二號菌在沙拉油與豬油分解實驗中，有最高分解率(5.51%)，而一號菌分解沙拉油與豬油能力次之(4.08%)。且二號菌分解沙拉油最佳(6.04%)。
- (二) 在廢油處理實驗中，二號菌對於廢油分解較一號菌佳，且濃度增加時效果增加；且在一、二號菌混合的加成效果中，可比二號菌再增加 19.1%的分解能力，顯示混合菌對於分解廢油有更好效果。
- (三) 經序列比對後，一號菌較接近 *Serratia marcescens*，二號菌較接近 *Serratia grimesii*。二號菌在沙拉油、豬油、廢油的分解力優於一號菌，推測可能和 *Serratia grimesii* 含有肉鹼 (carnitine) 有關。
- (四) 二號菌在不同環境下（無油、廢油、沙拉油、豬油）的生長情況均優於一號菌，尤其在沙拉油環境中二號菌的生長情況良好。

### 二、應用：

未來規劃可以設計特殊油脂分解槽（圖二十），置於餐廳廚房中，分解油脂以減少環境汙染。在傳統油水分離槽加上可以使菌加入分解油脂的槽。該設計含有自動清洗及滅菌功能，當菌分解完油之後，利用加熱滅菌，再流入排水系統中。



圖二十、本研究自行設計之油脂分解槽



## 伍、參考文獻

1. 行政院環保署 (2020), 水中油脂檢測方法—液相萃取重量法 (Nia W506.23b)
2. 郭育淵 (2019) 固態培養 *Serratia marcescens* NCHU05 用於食品廢棄物轉換靈菌紅素。中興大學化學工程所碩士論文。
3. 黃雁萍 (2012)。油脂分解菌之分離及其降解油脂能力之探討。國立中興大學環境工程學系在職專班碩士學位論文
4. 落合敏 (2008)。降低膽固醇·三酸甘油酯大百科。暢文出版社。
5. Aysel Ugur & Rukiye Boran (2014) Production and characterization of a cold-active and n-hexane activated lipase from a newly isolated *Serratia grimesii* RB06-22, Biocatalysis and Biotransformation, 32:4, 222-230
6. Biello D(2015).How Microbes Helped Clean BP's Oil Spill. Scientific american April 2015.
7. CoxMM., and Nelson DL (2012). Lehninger principles of biochemistry. New York: W.H. Freeman.
8. David L. Nelson; Michael M. Cox.著,林榮耀、張智芬、詹迺立、吳華林、施桂月、李明學、呂紹俊、李德章、莊榮輝譯 (2004), 生物化學 (第五版), 歐亞書局有限公司出版
9. Grimont, P.A.D., Grimont, F. & Irino, K.(1982). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens sensu stricto*, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov.. Current Microbiology 7, 69–74.
10. Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied microbiology and biotechnology, 64(6), 763–781.
11. Ignatiu IB and Sagar SA (2017) Cavitation Report: Hydrodynamic Cavitation & Applications for Production of Biofuel from Waste Cooked Oil. Project: Modelling and Simulation of Cavitation Phenomena.DOI:10.13140/RG.2.2.32994.73928.
12. KenzoY, and Koji K (1984) Method of Producing L-Carnitine,U.S. Pat. US-4650759-A.
13. Koch, W., & Kaplan, D. (1952). Turbidimetric estimation of number of bacteria. American journal of clinical pathology, 22(12), 1181–1185.
14. Lovell, D. J., & Bibel, D. J. (1977). Tween 80 medium for differentiating nonpigmented *Serratia* from other Enterobacteriaceae. Journal of clinical microbiology, 5(2), 245–247.
15. Maia, M.R., Marques, S., Cabrita, A.R., Wallace, R.J., Thompson, G., Fonseca, A.J., & Oliveira, H.M. (2016). Simple and Versatile Turbidimetric Monitoring of Bacterial Growth in Liquid Cultures Using a Customized 3D Printed Culture Tube Holder and a Miniaturized Spectrophotometer: Application to Facultative and Strictly Anaerobic Bacteria. Frontiers in

Microbiology, 7.

16. Samad, M.Y.A.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Yunus, W.Z.W.; Ampon, K.; Basri, M. (1989)A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Meth.* 9, 51–56
17. Sehdev, P. S., & Donnenberg, M. S. (1999). Arcanum: The 19th-century Italian pharmacist pictured here was the first to characterize what are now known to be bacteria of the genus *Serratia*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(4), 770–925.
18. Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 147.

## 【評語】 200011

本作品從餐廳截油槽中採菌，經培養並篩選出五種具 lipase 的菌種，進一步比較菌種分解沙拉油與豬油之能力。經定序比對，得知一號與二號菌種均是具備油脂分解潛力的菌種。本研究油脂之分析，並未依照環保署公告之水質檢驗法，僅以手搖晃分液漏斗數分鐘，雖經兩次萃取，由標準差幾達平均值 50% 以上來看，實驗誤差並未予以控制。此外，宜探討為何混合菌種之分解能力較佳，並說明分解之可能機制。