

本土微生物發酵刺激生產聚羥基酯類之策略研究

洪昭尹^a, 陳博彥^{*a}, 蕭子昭^a, 魏毓宏^b

^a國立宜蘭大學化學工程與材料工程學系

^b元智大學生物科技與工程研究所

*Email: boryannchen@yahoo.com.tw

摘要

基於綠色科技廢棄物處理回收再利用之永續理念,以微生物生產生物可分解性高分子Polyhydroxyalkanoates (PHAs)作為替代塑料已成為目前環境友善處理之必然趨勢。由於先前發現染料脫色菌株 *Aeromonas hydrophila* NIU01[1,2]具有生產PHAs之能力,因此在此以混合碳源方式來進行提高PHAs生產之可行性分析。在不同可行性碳源月桂酸、椰子油分別搭配油酸以不同碳氮比值條件下,分別進行批次發酵PHAs生產之比較分析,以利於響應迴應面法(RSM)來預測微生物最佳條件下之發酵碳源基質比例,以及後續染料廢水處理同時生產PHAs進行處理回收再利用之發酵生產探討,以刺激碳源組合之處理程序評估。同時在二階段發酵生產模式下,首以椰子油為碳源並探討二階段發酵營養鹽限制下的碳氮比比例分別為8的倍數比進行探討最佳的PHA含量與濃度比例,再進行探討以進料時間模式處理廢水生產PHA之最佳進料模式策略。

關鍵詞：生物刺激碳源、聚羥基酯、生物可分解高分子、混合碳源、二段式發酵

國科會計畫編號：NSC 98-2221-E-197-007-MY3

1 前言

人類長久以來依賴時間的使用石化塑料,雖然傳統塑膠產品帶給大眾生活上的便利,但是由於其生物難分解性,已造成自然生態上累積的嚴重衝擊(例如：北太平洋約有二倍德州大小面積之「塑膠汪洋」)。因此基於永續環境生態之理念,本研究試圖開發利用微生物來生產之聚羥基酯類(Poly-hydroxyalkanoates, PHAs), PHAs是一種具有生物相容性且生物可分解之耐熱與彈性塑料高分子,由於其具有良好之物理及化學特性,而且具有環境生態相容之生物可分解性,因此可應用於取代傳統塑膠之相關研究上。

事實上,自然生態環境中即存在有許多具PHAs生產能力之菌種存在例如 *Alcaligenes eutrophus*、*Alcaligenes latus*、*Azotobacter vinelandii*、*Pseudomonas* sp. 及 *Aeromonas* sp.,而現今論及PHA單體成分、合成代謝路徑與發酵生產相關研究報告文獻中,更以 *Aeromonas hydrophila* NIU01與 *Pseudomonas aeruginosa*與 *P. putida* 菌種居多。例如 *A. hydrophila* 菌株之野生型及基因改造型,約在4或8 g L⁻¹月桂酸條件下,分別可有36~51 wt % [3]與46~69 wt% [4]之高PHAs產率,而這些PHAs生產菌株之所以具有生產P、HAs單體或聚合體能力,乃因此類菌種具有某些PHAs合成相關酵素基因序列(例如：*PhaA*、*PhaB*、*PhaC*),其中以 *PhaC*最主要合成PHA的基因,而 *PhaA*、*PhaB*則為其次,若無 *PhaC*此關鍵基因則無法合成PHA,所以在給予適當碳數碳源基質具特定營養限制條件之刺激下,可產生特定之PHAs單體與聚合體。

再者,由於PHAs為一種微生物胞內能量之儲存物質,因此具生物降解性,更可應用於永續發展之綠色產品用途。事實上,環境中許多具有PHAs合成能力之微生物,當在給予過量碳源與限制某些營養成分時(例如：氮、磷),即可刺激微生物產生PHAs。一般對於微生物生產聚羥基酯類的篩選中,如蘇丹黑B染色(Sudan Black B)、尼羅紅染色(Nile red)等檢測PHAs生成菌的方法已被廣泛使用。此類方法可將微生物體內儲存之酯類先加以染色,以利於定性標示檢測出來,同時再以氣相層析儀決定出微生物生產之PHAs含量及成份單體組成,再來作定量分析。在此,本研究即在於利用以自行篩選之本土脫色菌株來進行同時染料處理並生產PHAs之可行性研究,先前發現[2] *A. hydrophila*具有如此之能力,因此本研究之目的即在於利用汙染處理微生物以應用於廢水處理及材料回收再利用之應用上。事實上,先前研究會以染料廢水模擬可產出PHAs之可行性;在此,本研究取定自行篩選之脫色菌NIU01在以月桂酸、甘油及油酸混搭碳源的方式來進行評估是否具有提升PHB生成之能力,以進行PHB的最佳化生產,以利於未來染整廢水

處理同時回收生產PHAs之相關應用上。再配合後續發酵研究以推廣至實際廢水處理，同時生產PHAs之操作策略上，以進行工業化處理之可行性評估，以達到提高產率與降低生產成本。

Wei 等人亦應用二階段發酵策略，將 *Cupriavidus taiwanensis* 的 PHB 產率由 9.67 wt% (搖瓶培養) 提高至 72% (二階段發酵)[5]。而其它 PHAs 發酵策略應用(例如：連續式、二階段連續式等)也正於研究當中，因此本研究先初步以二階段發酵方式來探討操作可行性期望獲得將 PHAs 實際應用於工業化之可行性。

2 研究方法與實驗設備

2.1 微生物培養方法

本研究使用先前研究自行篩選具不同污染物處理能力之微生物菌種。根據先前研究[6]進行 PHB 含量的測試培養基質與溶液配方、Sudan black B 染色法分析(圖 1.)、批次發酵、GC 分析模式。

2.2 菌體生長

將菌株以 Luria-Bertani (LB) 培養基進行前培養 12-16 小時後，再殖菌 0.05 mL 進入含有 5 mL MR 培養液之 10 mL 試管中(30°C，200 rpm，72 小時。由於各碳源本身顏色之差異，發酵前先將的試管放進分光光度計測定不同碳源，以作試管且記為各碳源空白對照，待發酵後再進行一次測定，最後發酵前後測定值相減所得數據在依統計方法判讀，依此來作為初步判定評估菌體生長之可能性。微生物於菌體生長量測時，定時取樣後以分光光度計測量菌體($\lambda_{\max}=600\text{nm}$)之吸收度。並將對數生長期之數據依 $\ln X$ 對時間作圖，以求出對數生長期之比生長速率。

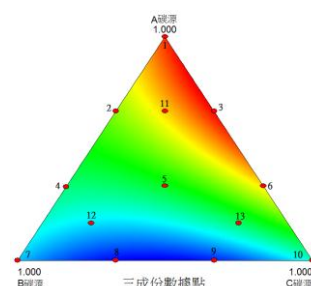
2.3 三成份碳源的選定

根據文獻[7]得知菌體在月桂酸可得到較好的乾菌重與 PHB 含量與濃度、所以藉由菌體生長情形判定結果甘油以及油酸擁有較高的菌體生長情形，所以選定此兩碳源搭配月桂酸進將菌株以 MR 培養液加入菌體生長情形較好的碳源，並配合碳氮比進行生產 PHAs 測試。

2.4 混合分析之實驗設計法

為找尋最佳化之乾菌重與生產 PHAs，採用簡易晶格方式 (Simplex lattice method) 分析，三成份分析以

Simplex-lattice designs：Quadratic function 回歸計算出分析出最佳生產 CDW、PHB 含量與濃度的回歸方程式為 $f(x) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_6X_6$ ($Z=1-X_1-X_2$)，並利用軟體 MATLAB 計算出回歸的方程式，再以軟體 Design-Expert 繪圖，以等高線的方式呈現得知混合碳源最佳化乾菌重與生產 PHAs 所對應的比例，最後再以晶格上 8 點與 13 點進行模擬後的準確性比較，基於平衡原則 8 點則為 (1、2、3、5、7、8、9、10)，13 點則是採用全部的數據點去模擬。



#ID	A碳源	B碳源	C碳源
1	1.00	0.00	0.00
2	0.67	0.33	0.00
3	0.67	0.00	0.33
4	0.33	0.67	0.00
5	0.33	0.33	0.33
6	0.33	0.00	0.67
7	0.00	1.00	0.00
8	0.00	0.67	0.33
9	0.00	0.33	0.67
10	0.00	0.00	1.00
11	0.67	0.17	0.17
12	0.17	0.67	0.17
13	0.17	0.17	0.67

原始碳氮(C/N)比分別為A碳源(月桂酸)(5.86：1)濃度為 10 g L^{-1} 、B碳源(甘油)(7：1)濃度為 10.08 g L^{-1} 、C碳源(油酸)(10：1)濃度為 22.58 g L^{-1} ；取ID#3為例來作說明，表A碳源(月桂酸)：B碳源(甘油)：C碳源(油酸)=0.67：0：0.33，經原始A碳源為(5.86：1) 10 g L^{-1} 調配為 6.70 g L^{-1} 、B碳源為(7：1) 10.08 g L^{-1} 調配為 0 g L^{-1} 、C碳源為(10：1) 22.58 g L^{-1} 調配為 7.53 g L^{-1} ，形成總碳氮比為(7.24：1) 11.99 g L^{-1} 。氮源為固定，而碳源與濃度隨各點不同而有所差異。

2.5 二階段式(Two-stage)發酵策略

首先將保存於40% (v/v)甘油並庫存於-85°C超低溫冷凍櫃中菌株，以Luria-Bertani (LB) 25 g L^{-1} 培養液進行以125rpm、30°C前培養12-16小時後。再培養一次將培養液體積配為(0.3L)。

在Two-stage分相(或分槽)進行發酵時，以第一階段作為微生物生長階段，以基礎MR培養液(2.7 L)再加入先前培養液(0.3L)使總體積為3L[8]，培養液中添加 20.21 g L^{-1} 椰子油作為碳源，並添加 0.5 g L^{-1} 胰化蛋白胨(Tryptone)(即 5.0 g L^{-1})作為刺激微生物生長之培養基，給予充足的營養源，以利提高微生物生長；而第二階段則作為刺激 PHAs 生產階段，以限制氮源培養液添加相同濃度之椰子油作為刺激微生物生產 PHB 之策略，以限制營養源等方式刺激微生物大量生產目標產物。

3 結果與討論

3.1 Sudan black B染色

由於先前研究[2]針對各種污染處理微生物進行PHA生產可行性分析發現染料脫色菌株NIU01、KB23、YT11同時具有脫色及PHA生產之能力，因此本研究更深入以其他新近發現[1]之新穎脫色菌株來進行相似之PHA生產能力評估分析。首先取定先前以偶氮及非偶氮染料作為篩選條件，所篩選純化之脫色菌株用來作為篩選是否有可能生產PHB之測試菌株（即取定菌株*Acinetobacter guillouiae* Ax-9、*Pseudomonas* sp. SH98、*Rahnella quatis* DX2b 及 *Microvirgula aerodenitrificans* SH7b、*Aeromonas hydrophila* NIU01)及*Klebsiella pneumoniae* ZMd31[1]，首先在以1000倍之顯微鏡(Leica, Tokyo, Japan)以油鏡方式觀察(圖.1)下，發現各菌株皆有染黑的顆粒存在，由於有被染黑的部分可能代表有酯類之存在，以及有菌體胞內累積現象之可能，故研判有PHAs存在之可能。因此再以此用來進行後續定量分析之評估。

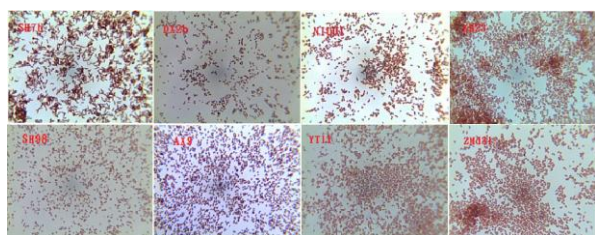


圖 1. 微生物(*Microvirgula aerodenitrificans* SH7b、*Rahnella aquatilis* DX2b、*Pseudomonas* sp. SH98、*Acinetobacter guillouiae* AX9、*Aeromonas hydrophila* NIU01, YT11, KB23 及 *Klebsiella pneumoniae* ZMd31)菌體在 1000 x 油鏡檢及蘇丹黑染色法下可能胞內累積酯類呈色比較(註：黑色及粉紅色分別代表為正負反應)

3.2 菌體生長分析比

由於經Sudan black B染色之結果確定菌體內有酯類累積之定性反應後，再次五株菌進行可資利用之生長碳源基質之探討。將試管菌液與MR培養液培養一天後，進行菌體生長之測試。若菌體濃度於就測反應前後具有顯著差異，因此再依染料脫色優異之NIU01再認定可具有使菌體生長之碳源以作不同碳源能量基質之能力(例如：在油酸、甘油、甘露糖...等之比生長速率比較)，進行PHA生產的相關定量評估探討，對菌體生長較差的碳源則不需要後續的研究探討，菌體生長較好的碳源則再進行菌體生長曲線，以確定後續三成分混合碳源碳源組合選定之研究，以減少研究成本開銷，亦得知NIU01在甘油、油酸與葡萄糖有較佳的生長情形，故在此採用菌體生長情形較佳的碳源以作為後續能量基質，以進行後續PHA生產的相關研究。

比生長速率 μ (圖2)比較， μ 值(單位： hr^{-1})分別為甘油(Glycerol)(0.311) > 葡萄糖(Glucose)(0.2945) > 甘露糖(Mannose)(0.2852) > 蔗糖(Sucrose)(0.2846) > 油酸(Oleic Acid)(0.2106)，因此最佳碳源基質為甘油之條件下將甘油置入三成分碳源，進行後續PHA生產發酵討論。

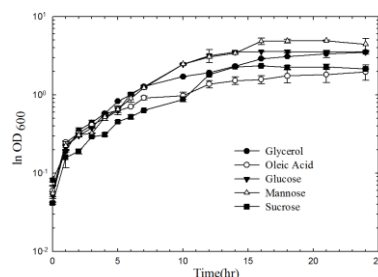


圖 2. NIU01 在五種碳源下菌體生長曲線圖

3.3 最佳碳氮比

先前研究Wei等人[5]發現在不同的碳氮比之下提供以評估生產PHB之最高效率，發現以*Cupriavidus taiwanensis* 184提供不同碳氮比(C/N ratio)生產PHB之培養條件下，發現當提供碳氮比為8/1時為最佳，其微生物的乾菌重、PHB含量及濃度各別為 4.15 g L^{-1} 、58.81 wt%及 2.44 g L^{-1} ，但是當提供碳氮比為20/1時，其乾菌重(1.69 g L^{-1})、PHB含量(52.77 wt%)及PHB濃度(0.89 g L^{-1})則不如提供碳氮比為8/1時之培養條件。由此可知當將碳源濃度提高至某種程度時，仍可能具有抑制微生物菌體生長及PHAs生產能力之影響。故本研究以NIU01在MR培養液下並以不同碳氮比甘油與油酸進行對進行測試，發現甘油(7:1)與油酸(10:1)分別皆有PHB含量較佳的生產情形如(圖2)所示，其甘油(7:1)乾菌重(2.54 g L^{-1})、PHB含量(5.80 wt%)及PHB濃度(0.16 g L^{-1})以及油酸(10:1)，其乾菌重(0.97 g L^{-1})、PHB含量(10.42wt%)及PHB濃度(0.10 g L^{-1})，得知甘油可使菌體生長情形好，而油酸亦可生產PHB，故以此碳氮搭配比例作為後續三成份混合碳源之研究。

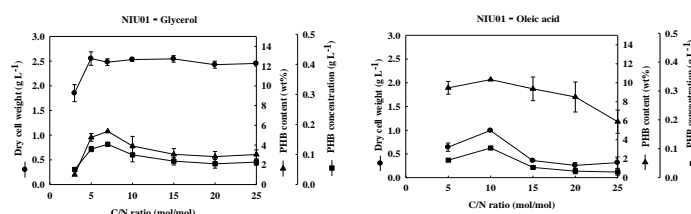


圖 3. 微生物發酵生產 PHB 之最佳碳氮比

3.4 PHB成分分析比較

在以Sudan black B染色法觀察出可能具有生產酯類反應的菌株後，再評估篩選可能之配對之菌株與碳源(表1)。其結果發現，可具有PHB累積能力菌株僅有2種，即 *Aeromonas* sp. NIU01(PHB含量約為36 wt%)及 *Klebsiella pneumoniae* ZMd31(PHB含量18.25%)。而其他四株以偶氮及非偶氮染料篩選純化之菌株 *Acinetobacter guillouiae* Ax-9、*Pseudomonas* sp. SH98、*Rahnella quatis* DX2b及 *Microvirgula aerodenitrificans* SH7b[1]，發現(例如：油酸、甘油、甘露糖...)並無顯著之PHB生成累積能力，代表在目前所使用試測的碳源條件下，實際上並不利於此四種菌株進行微生物生產PHB，亦或可能是其酯類之單體結構，並非3HB，而另有其他，此點會在後續再以探討研究後續會搭配利用不同碳源混搭配比的方式來刺激菌株生產PHAs之評估，亦會針對所累積之酯類物種作深入調查分析，以利於推論如何進行生物程序及生產策略之改善。再者，亦可能由於以兩種不同性質染料(即偶氮及非偶氮染料；[1])進行菌種篩選時，可能造成菌株雖具有多種染料處理功能，但並非具有最佳處理功能之菌株(亦即雖具廣譜處理能力，但卻並無最佳特性功能，可優於具高專一性之脫色菌株)，因此間接導致PHA生成不見理想之結果。由上述結果可得，未來在後續研究上，篩菌策略之選定及評估方法極可能相當是重要之關鍵。

表1. 碳氮比(8：1)條件下各種菌體生長及PHB生成比較

文獻 出處	菌種名稱	菌種代 號	碳源基質	乾菌重 (g L ⁻¹)	PHB 濃度 (g L ⁻¹)	PHB 含量 (wt%)
[9]	<i>Aeromonas hydrophila</i>	YT11	月桂酸	3.27±0.50	0.80±0.11	24.48±0.36
[10]		KB23	月桂酸	3.15±0.58	0.70±0.06	22.52±2.2
		NIU01	月桂酸(3:1)	2.72±0.46	0.52±0.015	19.54±2.7
			月桂酸(5.86:1)	4.05±0.19	1.46±0.011	36.02±1.0
			油酸	0.97±0.15	0.10±0.064	10.33±0.10
			甘油	2.5±0.068	0.13±0.042	5.4±2.2
[9]	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ZMd31	月桂酸	0.70±0.015	0.13±0.011	18.25±0.25
[11]	<i>Pseudomonas</i> sp.	SH98	甘露糖	0.10±0.071	N.D.	N.D.
			葡萄糖-右旋	1.28±0.14	N.D.	N.D.
			油酸	2.36±1.66	N.D.	N.D.
			甘油	4.22±0.022	N.D.	N.D.
	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>	SH7b	乳糖	2.89±0.20	N.D.	N.D.
			葡萄糖-右旋	1.32±0.041	N.D.	N.D.
			葡萄糖	1.28±0.14	N.D.	N.D.
	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	AX9	油酸	3.71±0.32	N.D.	N.D.
			甘油	3.13±0.88	N.D.	N.D.
	<i>Rahnella aquatilis</i>	DX2b	甘露糖	1.92±0.042	N.D.	N.D.
			木糖	1.74±0.031	N.D.	N.D.
			蔗糖	3.60±0.022	N.D.	N.D.
			葡萄糖-右旋	0.52±0.11	N.D.	N.D.
			油酸	4.02±0.20	N.D.	N.D.

3.5 NIU01 三成份分析

表 2. 實驗數據取 13 點響應曲面模擬回歸數值比較

#ID	月桂酸	甘油	油酸	CDW (g L ⁻¹)		PHA content (wt%)		PHA conc.(g L ⁻¹)	
				實驗值	預測值	實驗值	預測值	實驗值	預測值
1	1.00	0.00	0.00	3.67±0.20	3.55(-3.38%)	23.96±1.3	26.31(10.1%)	0.88±0.22	0.84(-4.32%)
2	0.67	0.33	0.00	2.11±0.20	2.40(13.7%)	19.52±4.0	18.53(-4.99%)	0.41±0.10	0.50(22.1%)
3	0.67	0.00	0.33	0.35±0.011	1.27(262%)	33.51±6.0	27.52(-17.6%)	0.11±0.020	0.31(183%)
4	0.33	0.67	0.00	1.93±0.10	1.97(3.84%)	13.82±0.35	12.09(-12.4%)	0.27±0.010	0.26(-2.77%)
5	0.33	0.33	0.33	0.61±0.20	1.04(70.6%)	7.20±0.24	14.18(97.1%)	0.04±0.011	0.14(222%)
6	0.33	0.00	0.67	0.91±0.010	0.53(-42.25%)	18.64±0.53	21.89(17.4%)	0.17±0.012	0.08(-51.6%)
7	0.00	1.00	0.00	2.54±0.20	2.29(-9.77%)	5.81±0.020	7.39(27.2%)	0.15±0.014	0.13(-10.8%)
8	0.00	0.67	0.33	1.12±0.010	1.60(-42.9%)	4.63±0.010	2.49(-45.9%)	0.05±0.011	0.07(35.1%)
9	0.00	0.33	0.67	1.57±0.22	1.28(-23.1%)	3.61±0.17	3.29(-8.70%)	0.05±0.025	0.08(-46.0%)
10	0.00	0.00	1.00	0.97±0.20	1.36(40.2%)	10.42±0.15	9.74(-6.38%)	0.10±0.10	0.15(48.7%)
11	0.67	0.17	0.17	2.72±0.12	1.80(-33.7%)	22.35±0.41	22.19(-0.72%)	0.61±0.010	0.40(-34.2%)
12	0.17	0.67	0.17	1.57±0.11	1.60(1.80%)	9.21±2.0	8.26(-10.2%)	0.14±0.012	0.13(-9.09%)
13	0.17	0.17	0.67	1.42±0.10	0.81(-43.1%)	13.65±0.71	12.46(-8.69%)	0.20±0.14	0.07(-64.9%)

依取定 13 點數據進行回歸方程式結果：
CDW(g L⁻¹)
=7.04X²+1.77Y²+5.49XY-4.86X-0.833Y+1.36
PHA content (wt%)
=-30.22X²+25.67Y²-11.51XY+46.79X-28.01Y+9.736
PHA conc. (g L⁻¹)
=1.36X²+0.29Y²+1.17XY-0.67X-0.31Y+0.15

表 3. 實驗數據 8 點響應曲面模擬回歸數值

#ID	月桂酸	甘油	油酸	CDW (g L ⁻¹)		PHA content (wt%)		PHA conc.(g L ⁻¹)	
				實驗值	預測值	實驗值	預測值	實驗值	預測值
1	1.00	0.00	0.00	3.67±0.20	3.81(3.68%)	23.96±1.3	26.0(8.77%)	0.88±0.22	0.87(-1.47%)
2	0.67	0.33	0.00	2.11±0.20	2.31(9.45%)	19.52±4.0	13.57(-30.4%)	0.41±0.10	0.43(5.38%)
3	0.67	0.00	0.33	0.35±0.011	0.55(56.0%)	33.51±6.0	30.47(-9.04%)	0.11±0.020	0.13(20.9%)
4	0.33	0.67	0.00	1.93±0.10	1.82(-3.97%)	13.82±0.35	7.01(-49.2%)	0.27±0.010	0.19(-30.5%)
5	0.33	0.33	0.33	0.61±0.20	0.53(-13.92%)	7.20±0.24	13.19(83.3%)	0.04±0.011	-0.004(-100%)
6	0.33	0.00	0.67	0.91±0.010	-0.37(-100%)	18.64±0.53	25.21(35.2%)	0.17±0.012	-0.13(-100%)
7	0.00	1.00	0.00	2.54±0.20	2.38(-6.38%)	5.81±0.020	6.72(15.7%)	0.15±0.014	0.14(-1.92%)
8	0.00	0.67	0.33	1.12±0.010	1.59(42.8%)	4.63±0.010	1.95(-57.6%)	0.05±0.011	0.07(31.9%)
9	0.00	0.33	0.67	1.57±0.22	1.16(-30.1%)	3.61±0.17	3.24(-10.0%)	0.05±0.025	0.05(-2.59%)
10	0.00	0.00	1.00	0.97±0.20	1.11(14.2%)	10.42±0.15	10.51(1.08%)	0.10±0.10	0.10(-1.88%)
11	0.67	0.17	0.17	2.72±0.12	1.41(48.2%)	22.35±0.41	21.02(-5.94%)	0.61±0.010	0.28(-54.2%)
12	0.17	0.67	0.17	1.57±0.11	1.42(-9.46%)	9.21±2.0	5.74(-37.6%)	0.14±0.012	0.07(-51.1%)
13	0.17	0.17	0.67	1.42±0.10	0.26(81.6%)	13.65±0.71	13.51(-1.00%)	0.20±0.14	0.063(-100%)

相類似原理可依 Simplex-lattice designs：Quadratic function 回歸計算出為下各式，依取定 8 點(1、2、3、5、7、8、9、10)回歸方程式結果：

CDW (g L⁻¹)
=10.72X²+1.65Y²+7.73XY-8.02X-0.383Y+1.11
PHA content (wt%)
=-43.34X²+27.24Y²-43.55XY+58.83X-31.03Y+10.51
PHA conc. (g L⁻¹)
=2.17X²+0.27Y²+1.56XY-1.41X-0.23Y+0.10

其模擬預測(曲線)與實驗數據差異如下(圖 4)表示：

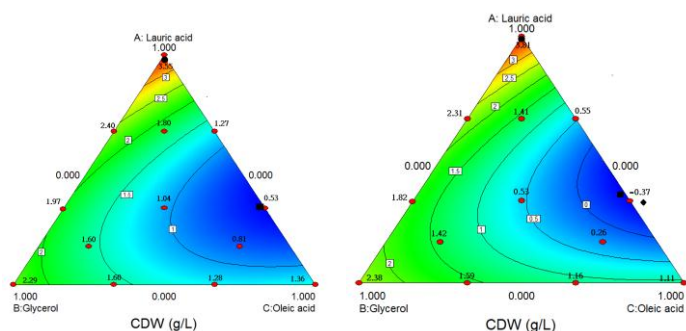


圖4. CDW(g L^{-1})實驗數據(左) 13點(右)8點，回歸後數據，再以Design-Expert以三角座標圖最大值●、最小值■、負值◆

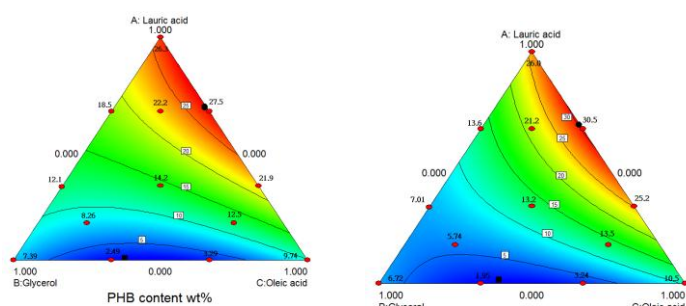


圖5. PHB 含量(wt%)實驗數據(左) 13點(右)8點，回歸後數據，再以Design-Expert以三角座標圖最大值●、最小值■、負值◆

三成份分析以 Simplex-lattice designs : Quadratic function 回歸計算出分析出最佳生產CDW、PHB含量與濃度的回歸方程式為 $f(x) = b_0 + b_1 X^2 + b_2 Y^2 + b_3 XY + b_5 X + b_6 Y$ ，以PHB含量探討，圖4與圖5的比較結果得知CDW較佳的情況是在AB側，而且從圖推論月桂酸與甘油應該沒有共同刺激CDW的提升，因為CDW較佳的情形反而是呈現在AB側兩端，所以猜測月桂酸與甘油並無共同刺激CDW提升的趨勢；由圖亦得知PHB含量為最佳化的比例方面，月桂酸：甘油：油酸(2:0:1)PHB含量應為33.51 wt%，推論NIU01以月桂酸與油酸當作碳源皆可產生PHB，而以甘油為碳源生產PHB的能力則較差，所以不論在實驗值或是回歸數據顯示上，PHB含量較多的部分也幾乎都在該圖的AC側的中上方，故月桂酸與油酸有共同激發生產PHB的可能性，且月桂酸與油酸比為2:1。由模擬圖發現在月桂酸與甘油可能並無共同刺激菌體生長的跡象，而月桂酸與油酸則有共同刺激PHB的可能性，而且所得PHB含量數值大於原本單一碳源月桂酸下PHB的含量，會朝向共同刺激菌體生

長的混合碳源作為主要考量，例如以更換其他碳源的方式(如:葡萄糖)，藉由找尋可共同刺激菌體生長或是提高PHAs含量或濃度為未來的研究方向。其回歸數據方面，因為8點模擬數據有負值的產生，所以已結果觀察得知13點模擬較8點模擬的準確，其原因也因8點模擬的取點不是均相，這導致部分模擬點產生較大的誤差。

3.6 批次發酵與兩階段式發酵比較

第一階段當添加椰子油(20.21 g L^{-1})和胰化蛋白胨(Tryptone) (5.0 g L^{-1})刺激微生物生長，故於第96小時之培養下，其微生物乾菌重可高達(7.33 g L^{-1})，與同時期之批次發酵(5.06 g L^{-1})相比成長約1.45倍，確實達到刺激微生物生長之目的。第一階段已加入胰化蛋白胨提高微生物之菌體濃度，再將已滅菌之過濾系統裝置(孔徑為 $0.14 \mu\text{m}$)及管線接於發酵槽槽體，以蠕動幫浦抽出槽內菌液，由下往上過濾濃縮菌液並回流至槽中，沖洗過濾系統陶瓷管柱內之殘餘菌體回到槽中，過濾速度過快將會導致管線因壓力太大而爆開，所以過濾時間約18小時完成微生物培養液置換(菌體所耗約10.5%)。第二階段以限制氮源培養液添加相同濃度之椰子油(C/N由10調整為64)，經培養204小時(即第300小時)後，可達到乾菌重(16.8 g L^{-1})、PHB含量($62.1 \text{ wt}\%$)與濃度(10.4 g L^{-1})，之後其PHB含量開始逐漸降低。因此未來研究方向可朝向尋找第二階段應該250~300小時添加之最佳碳源濃度，或是串聯饋料批次(Fed-batch)之操作策略以持續提高PHB產量。

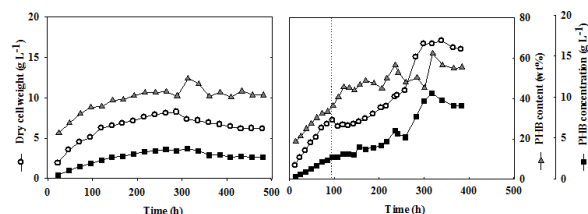


圖 6. (左)批次發酵(右)兩階段式發酵，*Aeromonas hydrophila* NIU01 之 CDW、PHB 含量與濃度關係

4 結論

經由Sudan black B染色法觀察之結果，再進行試管碳源測試條件後，然後採可生長菌體的15種配對方式來進行PHAs的生產測試，並篩選五種菌株進行是否具有PHAs生成能力，結果發現主要仍是以*Aeromonas* sp. (NIU01) 菌種之PHB生成能力為佳。在模擬最佳化時，應採用所有的實驗設計點去探討，由此便可得到回歸的數值會相似於實驗值的數據；其回歸方面數據比較上來推論，13

點的模擬圖會來的準確許多，因為是以全部數據點來做響應曲面所以在等高線的呈現上會比8點回歸的模擬圖來的準確許多。二階段式發酵雖然多更換一次基質，但可以使用菌體生長較快速，此發酵策略可以減少2~3倍的工作時間與動力成本，並且提高乾菌重至(16.8 g L⁻¹)、PHB含量(62.1 wt%)與濃度(10.4 g L⁻¹)，未來研究方向可朝向尋找第二階段之最佳碳源饋料時間，已獲得最佳生產 PHB 含量與濃度之結果。未來將會採用本研究混和碳源搭配的方式，再配合先前研究[6]處理染整廢水的方式，希望藉由此研究方向，可得到處理廢水同時之外並且得到PHAs，以利於廢水處理的成本降低與提升其附加價值。

致謝

本研究首先感謝國科會計畫 NSC 98-2221-E-197-007-MY3 給予經費上的支持。同時感謝元智大學生物科技與工程研究所 魏毓宏教授、宜蘭大學化學與材料工程系 薛仲娟教授。宜蘭大學化學與材料工程系 蕭子昭學長 觀念上的指導與協助。烟台大學環境與材料學院 王岩妮之菌種純化與鑑定。

文獻

[1] J. L. Han, C. T. Wang, Y. C. Hu, Y. Liu, W. M. Chen, C. T. Chang, H. Z. Xu, and B. Y. Chen, "Exploring power generation of single-chamber microbial fuel cell using mixed and pure cultures", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 41, pp. 606-611, 2010.

[2] B. Y. Chen, T. J. Shiau, Y. H. Wei, W. M. Chen, B. H. Yu, C. Y. Yen, and C. C. Hsueh, "Feasibility study of polyhydroxyalkanoate production for materials recycling using naturally occurring pollutant degraders", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 43, pp. 455-458, 2012.

[3] Y. Z. Qiu, S. P. Ouyang, Z. Shen, Q. Wu, and G. Q. Chen, "Metabolic Engineering for the Production of Copolyesters Consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*", *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, pp. 255-261, 2004.

[4] Y. Z. Qiu, J. Han, and G.-Q. Chen, "Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)", *Applied Microbiology and*

Biotechnology, vol. 69, pp. 537-542, 2006.

[5] Y. H. Wei, W. C. Chen, C. K. Huang, H. S. Wu, Y. M. Sun, C. W. Lo, and O. M. Janarthanan, "Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, pp. 252-265, 2011.

[6] B. Y. Chen, T. J. Shiau, Y. H. Wei, and W. M. Chen, "Feasibility study on polyhydroxybutyrate production of dye-decolorizing bacteria using dye and amine-bearing cultures", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 43, pp. 241-245, 2012.

[7] H. F. Zhang, L. Ma, Z. H. Wang, and G. Q. Chen, "Biosynthesis and characterization of 3-hydroxyalkanoate terpolyesters with adjustable properties by *Aeromonas hydrophila*", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 104, pp. 582-589, 2009.

[8] N.A. Dierick, J.A. Decuyper, K. Molly, E.V. Beek, E. Vanderbeke, "The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition: II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance", *Livestock Production Science*, vol. 76, pp. 1-16, 2002.

[9] M. M. Zhang, W. M. Chen, B. Y. Chen, C. T. Chang, C. C. Hsueh, Y. Ding, K. L. Lin, and H. Xu, "Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers", *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 2651-2656, 2010.

[10] B. Y. Chen, W. M. Chen, F. L. Wu, P. K. Chen, and C. Y. Yen, "Revealing azo-dye decolorization of indigenous *Aeromonas hydrophila* from fountain spring in Northeast Taiwan", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, vol. 39, pp. 495-501, 2008.

[11] J. L. Han, C. T. Wang, Y. C. Hu, Y. Liu, W. M. Chen, C. T. Chang, H. Z. Xu, and B. Y. Chen, "Exploring power generation of single-chamber microbial fuel cell using mixed and pure cultures", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 41, pp. 606-611, 2010.