

# 限磷條件下添加葡萄糖與第二碳源丙酸鈉對連續式發酵生產 PHB 和 PHBV 之影響

李志韋<sup>1</sup> 吳淑姿<sup>1,2</sup> 余世宗<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學生物產業科技學系

<sup>2</sup>大葉大學餐旅管理學系

<sup>3</sup>大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

\*yust@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究於限磷條件下，探討添加葡萄糖和第二碳源丙酸鈉於不同稀釋速率對 *Ralstonia eutropha* 菌體生質量、PHB (poly-hydroxybutyrate)、PHBV (poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxy-valerate)) 生合成量及 PHBV 於菌體中含量之影響。以 3 L 之發酵槽進行發酵培養，發酵初期採批次發酵培養，待菌體生長至對數生長期 (exponential phase)，轉換為連續式發酵培養。以葡萄糖為碳源之培養，降低稀釋速率，菌體生質量、PHB 生合成量、PHB 於菌體中含量有先增加而後減少的趨勢。菌體生質量以稀釋速率為  $0.101 h^{-1}$  達最高  $7.31 g/L$ ，PHB 生合成量和 PHB 於菌體中含量以稀釋速率為  $0.151 h^{-1}$  達最高分別為  $1.97 g/L$  和  $27.9\%$ 。葡萄糖平均消耗速率以稀釋速率為  $0.151 h^{-1}$  達最高  $3.04 g/Lh$ ，表示於此稀釋速率下，培養液提供足夠碳源以生合成菌體與 PHB。稀釋速率再下降，饋料流速下降，碳源提供量減少，PHB 生合成量及 PHB 於菌體中含量均降低。以葡萄糖為碳源並添加丙酸為第二碳源之培養，降低稀釋速率，菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於菌體中含量、HV (hydroxyvalerate) 於 PHBV 中含量有先增加而後減少的趨勢。稀釋速率為  $0.0531 h^{-1}$  時，平均菌體生質量達最高  $6.70 g/L$ 。稀釋速率為  $0.0851 h^{-1}$  時，PHBV 生合成量、PHBV 於菌體中含量、HV 於 PHBV 中含量達最高，分別為  $1.90 g/L$ 、 $29.4\%$ 、 $10.5\%$ 。菌體產率以稀釋速率為  $0.165 h^{-1}$  時達最高  $0.804 g/Lh$ 。HB (hydroxybutyrate) 與 PHBV 產率以稀釋速率為  $0.0851 h^{-1}$  達最高，分別為  $0.145$  和  $0.162 g/Lh$ 。HB、HV 和 PHBV 於淨菌體中含量，以稀釋速率為  $0.0851 h^{-1}$  時達最高，表示稀釋速率為  $0.0851 h^{-1}$ 、饋料流速為  $110.7 mL/h$  時，提供足夠碳源以合成 HB 和 HV。稀釋速率下降為  $0.0531 h^{-1}$  時、饋料流速為  $69.0 mL/h$  時，饋料流速較慢，無法提供足夠碳源以合成 HB 和 HV，因而 HB、HV、PHBV 於淨菌體中含量下降。

**關鍵字：**PHBV，*Ralstonia eutropha*，限磷條件，連續式發酵，丙酸鈉，稀釋速率

## Effect of the Addition of Glucose and Sodium Propionate as the Second Carbon Source on Continuous Production of



# Polyhydroxybutyrate and Poly- (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) under a Phosphorus-Limited Condition

ZHI-WEI LI<sup>1</sup>, SHWU-TZY WU<sup>1,2</sup> and SHIH-TSUNG YU<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

<sup>2</sup>Department of Hospitality Management, Da-Yeh University

<sup>3</sup>Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua, Taiwan, 51591, R.O.C.

\*yust@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

This study investigated the effects of glucose and sodium propionate supplementation (as the second carbon source) on the bacterial biomass, polyhydroxybutyrate (PHB) and poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) synthesis, and PHBV content in *Ralstonia eutropha* under phosphorus-limited conditions. Fermentation was performed in a 3-L fermenter. Batch fermentation was conducted in the initial phase, followed by continuous fermentation in the exponential phase. In the culture containing glucose as the carbon source, the biomass of bacteria, the amount of PHB biosynthesis, and the content of PHB in cells initially increased and then decreased when the dilution rate was decreased. The highest biomass of 7.31 g/L was obtained at a dilution rate of 0.101 h<sup>-1</sup>. The highest amount of PHB biosynthesis and the highest content of PHBV in cells were 1.97 g/L and 27.9%, respectively, which were obtained at a dilution rate of 0.151 h<sup>-1</sup>. The highest average glucose consumption rate of 3.04 g/L·h obtained at a dilution rate of 0.151 h<sup>-1</sup> provided adequate carbon content for microbial growth and PHB synthesis. A decrease in the dilution rate resulted in the reduction of the flow rate of feed, supply of the carbon source, amount of PHB biosynthesis, and content of PHB in bacteria. When glucose was used as the carbon source, sodium propionate was added as the second carbon source, and the dilution rate was reduced, the biomass, PHBV synthesis, PHBV content in cells, and hydroxyvalerate (HV) content in PHBV increased and then decreased. When the dilution rate was 0.0531 h<sup>-1</sup>, the average biomass was 6.70 g/L. At a dilution rate of 0.0851 h<sup>-1</sup>, the PHBV synthesis, PHBV content in cells, and HV content in PHBV were the highest (1.90 g/L, 29.4%, and 10.5%, respectively). The cell yield coefficient was 0.804 g/L·h at a dilution rate of 0.165 h<sup>-1</sup>. The yield coefficients of HB (hydroxybutyrate) and PHBV were the highest (0.145 and 0.162 g/L·h, respectively) at a dilution rate of 0.0851 h<sup>-1</sup>. The contents of HB, HV, and PHBV in the residual biomass were the highest when the dilution rate was 0.0851 h<sup>-1</sup>, indicating that a dilution rate of 0.0851 h<sup>-1</sup>, a feed flow rate of 110.7 mL/h, and an adequate carbon source were provided to synthesize HB and HV. The low feed flow rate of 69.0 mL/h at a dilution rate of 0.0531 h<sup>-1</sup> could not provide an adequate carbon content for the synthesis of HB and HV.

**Key Words:** PHBV, *Ralstonia eutropha*, phosphorus-limited condition, continuous fermentation, sodium propionate, dilution rate



## 一、前言

塑膠為民生及工業重要材料，隨著塑膠用途的擴大和消費量的日益增長，塑膠廢棄物也與日俱增。由於塑膠使用後於自然環境或垃圾場中均難以分解、腐爛，先進國家正逐漸加以限制使用或強制回收，以降低其對環境生態之衝擊 [1, 2, 3]。台灣於 2018 年開始執行限塑政策，禁止提供免費塑膠袋，包含藥局、飲料店、麵包店、醫療器材行、3C 零售業、書店文具店、洗衣店，總共 7 大類、7 萬家業者，未來都不能提供免費的塑膠袋。因此分解性塑膠的開發研究已成為塑膠與包裝工業界及環保人士之重點課題 [17]。

微生物合成生物分解性塑膠是以聚酯與聚氨基酸產品為主流，可由大腸桿菌、光合成細菌等多種微生物來生產聚酯類。這些微生物主要是在碳源過量及某些營養源不足下，例如：氮源、磷源及氧氣的不足，生合成聚酯類的聚合物 [5]，為備用能量及碳材料的儲存物，累積在此微生物的細胞內。其中，以微生物生合成的生物可分解塑膠聚羧基烷酯類 (polyhydroxyalkanoates, PHAs)，如聚羧基丁酯 (poly-hydroxybutyrate, PHB) 與羧基丁酸 (HB, hydroxybutyrate) 和戊酸 (HV, hydroxyvalerate) 的共聚物 (poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV) 最受到注意，PHBV 具有良好的可塑性 (flexibility) 及加工性 (processing capabilities) [9, 18, 22]，且其可在 10 個月內被分解掉 [7]。此類的聚酯類，其性質與傳統的塑膠相似，如聚乙烯 (polyethylene, PE)、聚丙烯 (polypropylene, PP)；且於使用後，可被自然環境中的微生物分解成水和二氧化碳，可防止堆積於環境中造成污染。增加 PHBV 中 HV 的含量會增加其耐擊力 (impact resistance)、韌性 (toughness) 和可塑性 (flexibility)。利用添加丙酸 (propionic acid) [10, 11]、丙醇 (propanol) [13]、丙酸鈉 (sodium propionate) [4]、戊酸 (valeric acid) [19]、戊醇 [16]、乙酰丙酸 (levulinic acid) [13] 和庚酸 (heptanoic acid) [15, 20] 可以增加 PHBV 中 HV 的含量，因而改善 PHBV 的性質 [6, 8]。

本研究以微生物合成的方法，生合成生物可分解塑膠 PHB 或 PHBV。使用的菌株為 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699; BCRC 13036)，探討在限磷條件下，饋料中添加或不添加丙酸鈉，進行連續式發酵培養，探討不同的碳源對菌體生長、生合成 PHB 與 PHBV 的影響。

## 二、材料與方法

*Ralstonia eutropha* (ATCC 17699; BCRC 13036)，購自財團法人食品工業發展研究所，*R. eutropha* 之特性為產鹼桿菌屬，好氣性革蘭氏陰性桿菌，形態短桿狀，周邊有鞭毛，存在土壤與海洋中。

### (一) 培養基

以基礎培養基 (葡萄糖 20.0 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.55 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.55 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L, Trace metal solution 5.0 mL/L) 進行繼代培養；微量金屬溶液 (Trace metal solution) 組成 (Na<sub>2</sub>EDTA 6.0 g/L, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.29 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6.84 g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.86 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.06 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.026 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002 g/L, g/L)；限磷培養基組成 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L, Trace metal solution 5.0 mL/L) [3]。連續式培養之饋料為限磷培養基添加葡萄糖或丙酸鈉為碳源。

### (二) 連續式發酵培養

以 3 L 發酵槽 (Mituwa KMJ-3B, 日本) 進行發酵培養，實驗初期是批次培養，當培養菌體生長至對數生長期 (exponential phase)，轉換為連續式限磷條件培養。連續發酵培養之初始培養液總體積為 2 L、接菌量為初始培養液體積的 2.5%、連續培養後體積維持 2 L；起始攪拌轉速為 250 rpm，以 2N 的 NaOH 和 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液控制培養液 pH 值於 7.0，調整攪拌速率及進氣速率以維持培養基內的溶氧量不低於飽和溶氧量的 20%。實驗過程記錄 pH 變化、溶氧消耗、轉速與進氣量，並取樣分析菌體生質量、碳源 (葡萄糖與丙酸鈉)、磷源、PHB/PHBV 的濃度。

### (三) 分析

取樣菌液，分析菌體生質量、碳源 (葡萄糖與丙酸鈉)、磷源、HB、HV 與 PHBV 的濃度。菌體生質量以烘乾重量法量測，取 30 mL 菌液於 4,000 rpm 下離心 20 min，以蒸餾水沖洗 2 次，將沖洗離心後之菌體至於 80°C 烘箱乾燥 48 小時，冷卻後稱重。菌體烘乾後的重量為菌體生質量，菌體生質量扣減 PHB 或 PHBV 含量為淨菌體生質量 (residual biomass)。葡萄糖與丙酸鈉以 HPLC 分析，偵測



器為 RI (refractive index), 分析管柱為 Bio-Rad Aminex HPX-87H。磷源測定方法是利用鉬酸銨與磷酸鹽結合形成磷鉬酸銨 (ammonium phospho- molybdate), 以分光光度計 (OD<sub>700</sub>) 測其吸光值 [2]。菌體中的 PHB 或 PHBV 利用硫酸將其長鏈聚合物之鍵結打斷, 使其形成 HB 或 HV 之單體, 以甲醇進行甲酯化反應, 以 GC 進行分析, FID 為偵測器, 分析管柱為 Supelcowax™ 10 (30 m, 0.53 mm ID, Supelco, USA) [1]。分析流程為取乾燥菌體 0.1 g, 加 0.3 mL 硫酸、1.7 mL 甲醇、2.0 mL 氯仿, 置於螺帽試管中, 將試管置於 98 °C 恆溫水浴反應 150 min, 加入 0.1 mL 的 3% (v/v) 內標 (3 mL methyl benzoate 以 methanol 定量至 100 mL), 再加 2.0 mL 水使其分層, 混合均勻後, 隔夜靜置, 取 1.0 µL 氯仿層溶液以 GC 分析。其結果參照 PHB 和 PHBV 標準品之分析。

### 三、結果與討論

本研究於限磷條件下, 探討添加添加葡萄糖和第二碳源丙酸鈉於不同稀釋速率對 *R. eutropha* 菌體生質量、PHB、PHBV 生成量及 PHBV 於菌體中含量之影響。以 3 L 之發酵槽進行發酵培養, 發酵初期採批次發酵培養, 待菌體生長至對數生長期 (exponential phase), 轉換為連續式發酵培養。以磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀為磷源, 硫酸銨為氮源, 葡萄糖為起始碳源。發酵培養過程, 以磷源為限制條件, 促使 *R. eutropha* 生合成 PHB 與 PHBV。發酵槽之起始轉速為 250 rpm, 起始空氣流率為 1 vvm, 溫度控制在 30 °C, 於培養過程中控制攪拌轉速與空氣流率, 以維持培養基溶氧量在飽和溶氧量的 20% 以上。發酵槽之 pH 值利用自動控制, 以 2 N 氫氧化鈉溶液與 2 N 硫酸溶液調整培養基於 pH 7.0。實驗過程定時取樣, 分析菌體生質量、碳源 (葡萄糖、丙酸鈉)、磷源殘留量、PHB 和 PHBV 生成量。

#### (一) 限磷條件下以葡萄糖為碳源之培養

於限磷條件下以葡萄糖為碳源培養 *R. eutropha*, 培養初期以批次發酵方式先行培養, 待菌體生長至對數生長期, 轉換為連續式發酵培養, 饋料培養基中碳源為葡萄糖 20.0 g/L。1. 菌體生長與 PHB 生合成

本實驗之葡萄糖與磷源之起始濃度分別為 19.74 g/L 與 0.092 g/L。圖 1 (a) 顯示培養初期, 碳源主要用於菌體的生長, 培養至 18 h 時, 此時菌體生長已經進入對數生長期, 菌體之生質量 (biomass) 與淨菌體量 (residual biomass) 差異不大, 表示於此期間菌體著重於生質量之生成 (2.03 g/L), 僅有少量 PHB 被生合成 (0.11 g/L)。培養至 18 h 時, 培養基中葡萄糖與磷源濃度分別為 4.33 與 0.017 g/L, 磷源消耗速率為  $4.17 \times 10^{-3}$  g/Lh, 碳源消耗速率為 0.87 g/Lh, 此時開始轉換為連續式培養, 進行饋料。

起始之稀釋速率為 0.232 h<sup>-1</sup>, 經過 26 h 培養 (即培養於 18~44 h 期間)。圖 1 (b) 顯示, 初期培養之前 24 h, 磷源的消耗快速, 僅有少量的 PHB 生合成, 此時的菌體量增加快速, 大部分的葡萄糖用於菌體生長。培養至 24 h, 培養基中的磷源被消耗殆盡, 此時開始進入限磷源條件的培養, PHB 合成速率增加。於此培養期間, 菌體平均濃度為 3.50 g/L, PHB 平均濃度為 0.46 g/L, PHB 佔總菌體量 13.1%。當培養至 t = 44 h 時, 殘餘葡萄糖濃度約 16.56 g/L, 此期間 (18~44 h) 葡萄糖平均消耗速率為 0.97 g/Lh, 如表 1 所示。

培養至 44 h, 調整稀釋速率為 0.192 h<sup>-1</sup>, 經過 30 h 培養 (即培養於 44~74 h 期間), 圖 1 (a) 顯示, 菌體生長增加。於此培養期間, 菌體平均濃度為 5.41 g/L, PHB 平均濃度為 1.23 g/L, PHB 佔總菌體量 22.7%。持續培養至 74 h, 殘餘葡萄糖濃度約 7.34 g/L, 此期間 (44~74 h) 葡萄糖平均消耗速率為 1.84 g/Lh, 如表 1 所示。

培養至 74 h, 調整稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup>。經過 42 h 培養 (即培養於 74~116 h 期間), 圖 1 (b) 顯示, 培養至 96 h

表 1. 不同稀釋速率之限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha*

|                                    | Dilution rate (h <sup>-1</sup> ) |       |       |       |        |
|------------------------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|--------|
|                                    | 0.232                            | 0.192 | 0.151 | 0.101 | 0.0518 |
| Flow rate (mL/h)                   | 302.0                            | 250.0 | 196.8 | 131.7 | 67.4   |
| Residual biomass (g/L)             | 3.04                             | 4.18  | 5.08  | 5.66  | 5.63   |
| PHB/Residual biomass (%)           | 15.13                            | 29.43 | 38.78 | 29.15 | 14.56  |
| Consumption rate of glucose (g/Lh) | 0.97                             | 1.84  | 3.04  | 1.98  | 1.15   |



培養基中碳源被消耗殆盡，碳源利用率達到最高點。圖 1(a) 顯示，菌體生長增加。於此培養期間，菌體平均濃度為 7.05 g/L，PHB 平均濃度為 1.97 g/L，PHB 佔總菌體量的 27.9%。間 (74~116 h)，碳源葡萄糖平均消耗速率達最高為 3.04 g/L·h，如表 1 所示，PHB 平均濃度與 PHB 佔總菌體量亦以此稀釋速率的培養達最高。

培養至 116 h 時，調整稀釋速率為 0.101 h<sup>-1</sup>。經過 56 h 培養 (即培養於 116~172 h 期間)，圖 1(a) 顯示，菌體生長趨於穩定。於此稀釋速率培養基之碳源亦被消耗殆盡。於此培養期間，菌體平均濃度達最高為 7.31 g/L，PHB 平均濃度為 1.65 g/L，PHB 佔總菌體量的 22.6%，圖 1(b) 顯示，碳源被消耗殆盡，菌體雖有生成，但 PHB 的生成開始減緩，菌體內的 PHB 含量有下降趨勢。於此稀釋速率培養期間 (116~172 h)，葡萄糖平均消耗速率亦下降為 1.98 g/L·h。

培養至 172 h 時，調整稀釋速率為 0.0518 h<sup>-1</sup>。經過 72 h 培養 (即培養於 172~244 h 期間)，圖 1(a) 顯示，菌體生長略為下降。於此培養期間，菌體平均濃度為 6.45 g/L，PHB 平均濃度為 0.82 g/L，PHB 佔總菌體量的 12.7%，菌體生質量和 PHB 生合成量有減少的趨勢，菌體內的 PHB 含量持續下降。於此稀釋速率培養期間 (172~244 h)，菌體生質量和 PHB 生合成量減少，葡萄糖平均消耗速率亦降低為 1.15 g/L·h。

## (二) 不同稀釋速率下發酵培養之比較

於限磷條件下由高稀釋速率至低稀釋速率的連續式發酵培養，探討不同稀釋速率對菌體生質量、PHB 生合成量及 PHB 於菌體中含量之影響，如圖 2 所示。降低稀釋速率，菌體生質量、PHB 生合成量及 PHB 於菌體中含量皆有先增加後下降趨勢。菌體生質量以稀釋速率為 0.101 h<sup>-1</sup> 達最高 7.31 g/L (稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup>，菌體生質量 7.05 g/L)，PHB 生合成量以稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup> 達最高 1.97 g/L，PHB 於菌體中含量以稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup> 時達最高 27.9%。表 1 顯示，葡萄糖平均消耗速率以稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup> 達最高 3.04 g/L·h，提供足夠碳源以生合成菌體與 PHB。稀釋速率再下降，饋料流速下降，碳源提供量減少，PHB 生合成量及 PHB 於菌體中含量均降低。

不同稀釋速率之菌體產率與 PHB 產率之比較如圖 3 所示。降低稀釋速率，菌體產率與 PHB 產率有增加趨勢，以稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup> 時，菌體產率與 PHB 產率達最高，分

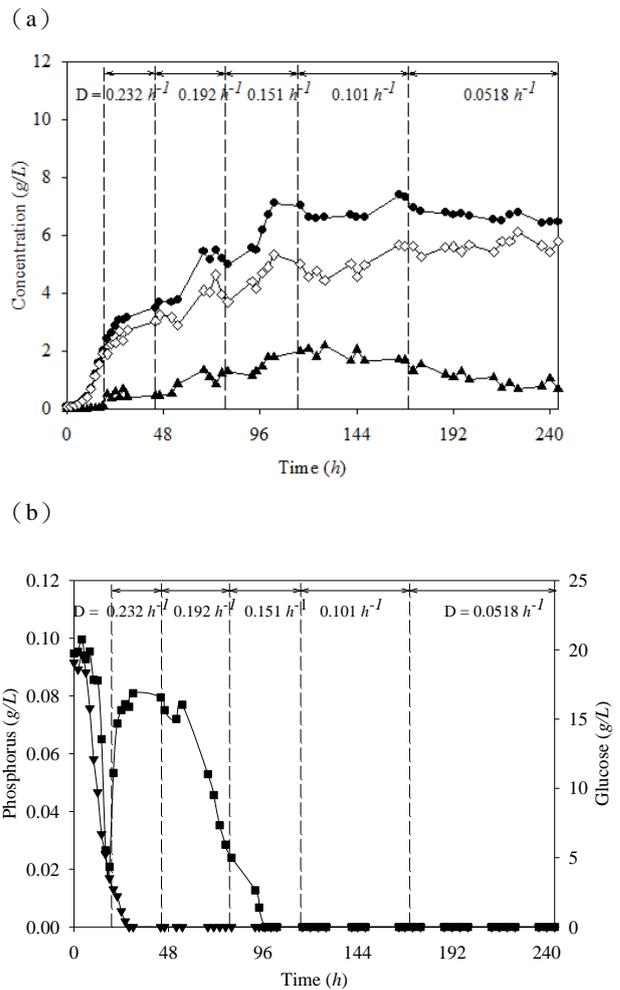


圖 1. 限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha*，(a) 菌體生質量、PHB 及淨菌體，●：biomass；▲：PHB；◇：residual biomass；(b) 基質消耗，■：glucose；▼：phosphorus

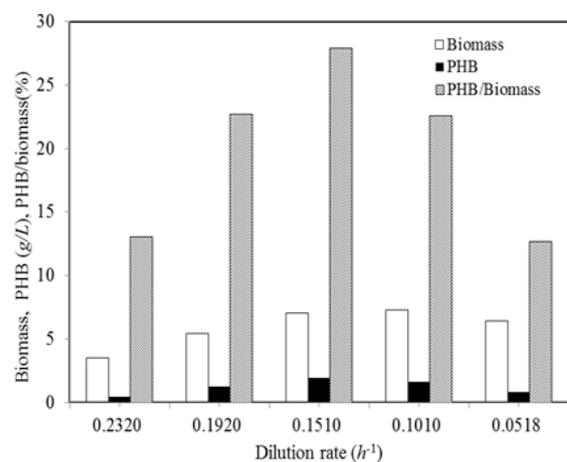


圖 2. 限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha*，不同稀釋速率之菌體生質量、PHB 生合成量及 PHB 在總菌體生質量含量



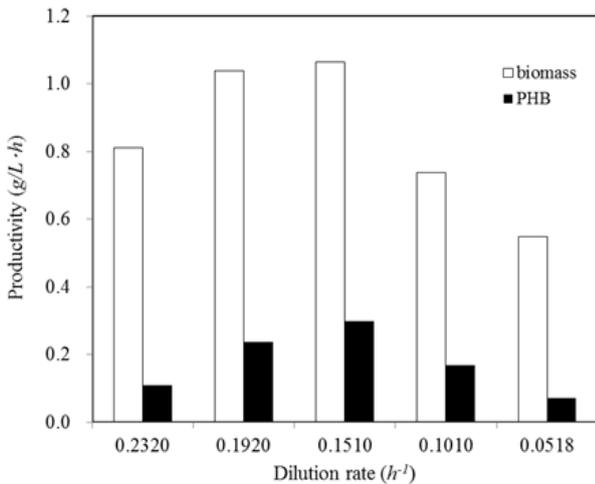


圖 3. 限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha*，不同稀釋速率之菌體產率與 PHB 產率

別為 1.064 和 0.298  $g/L \cdot h$ 。再降低稀釋速率，菌體產率與 PHB 產率下降，稀釋速率為 0.101  $h^{-1}$ ，菌體產率和 PHB 的產率分別減少 0.326  $g/L \cdot h$  與 0.131  $g/L \cdot h$ 。稀釋速率為 0.0518  $h^{-1}$ ，菌體產率也大幅減少約 0.549  $g/L \cdot h$ ，PHB 產率下降較緩和，PHB 產率減少約 0.07  $g/L \cdot h$ 。整體發酵過程中，稀釋速率為 0.151  $h^{-1}$  時，有最高的菌體產率與 PHB 產率。

在不同稀釋速率下限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha* 之饋料流速、淨菌體量、PHB 於淨菌體中含量和葡萄糖平均消耗速率列於表 1。降低稀釋速率即降低饋料流速，饋料提供碳源以生合成菌體，淨菌體量先增加而後減少，以稀釋速率為 0.101  $h^{-1}$  時，淨菌體量達最高 5.66  $g/L$ ，但 PHB 於淨菌體中含量，以稀釋速率為 0.151  $h^{-1}$  時達最高 38.78%，表示於稀釋速率為 0.151  $h^{-1}$ 、饋料流速為 196.8  $mL/h$  時，提供足夠碳源以合成 PHB。稀釋速率為 0.101  $h^{-1}$  時、饋料流速為 131.7  $mL/h$  時，因饋料流速較慢，無法提供足夠碳源以合成 PHB，因而 PHB 於淨菌體中含量較低 29.15%。葡萄糖平均消耗速率於稀釋速率為 0.151  $h^{-1}$  時為 3.04  $g/L \cdot h$ ，較稀釋速率為 0.101  $h^{-1}$  時 1.98  $g/L \cdot h$  為高。以葡萄糖為碳源之連續式發酵培養，高稀釋速率會降低菌體生長因而降低 PHB 的生合成，於稀釋速率 0.101  $h^{-1}$  可獲得較高的菌體生質量與生合成 PHB，此結果與培養 *R. eutropha* [12, 21] 和 *Pseudomonas oleovorans* 相似 [14]。

### (三) 限磷條件下添加丙酸鈉之發酵培養

於限磷條件下培養 *R. eutropha*，初期進行批次發酵培養，以葡萄糖為碳源，待菌體生長至對數生長期，再轉換為

連續式發酵培養，饋料培養基之碳源為葡萄糖 (15.31  $g/L$ ) 和丙酸鈉 (5.0  $g/L$ )。

#### 1. 菌體生長與 PHBV 生產

實驗初期批次發酵培養之葡萄糖與磷源起始濃度分別為 19.94  $g/L$  與 0.096  $g/L$ 。圖 4 (a) 顯示培養初期，碳源主要用於菌體的生長，菌體之生質量與淨菌體量相近，表示於此期間菌體著重於菌體生質量之生成。培養至 19  $h$  時，葡萄糖與磷源濃度分別為 4.43  $g/L$  與 0.005  $g/L$ ，葡萄糖的消耗速率為 0.82  $g/L \cdot h$ ，磷源消耗速率為 4.79  $\times 10^{-3}$   $g/L \cdot h$ ，菌體生質量為 4.23  $g/L$ ，此時開始進行饋料，轉換為連續式發酵培養。

稀釋速率為 0.165  $h^{-1}$ ，經過 34  $h$  培養 (培養期間 19~53  $h$ )，此時菌體進入對數生長期。圖 4 (a) 顯示，培養的前 29  $h$ ，磷源的消耗快速，有少量的 HB 累積，此時大部分的碳源用於生產菌體。圖 4 (b) 顯示，培養至 29  $h$ ，培養基中的磷源被消耗殆盡，開始進入限磷源條件的培養，PHBV 合成速率增加。培養於 47  $h$  有最大的菌體生質量 5.00  $g/L$ ；培養 53  $h$  有最大的 HB、HV 及 PHBV 生合成量，分別為 0.33、0.09 及 0.42  $g/L$ 。菌體平均生質量為 4.87  $g/L$ ，HB、HV 及 PHBV 平均濃度約分別為 0.27、0.07 及 0.34  $g/L$ ，PHBV 佔總菌體量的 7.0%，HV 於 PHBV 中的含量為 20.6%。培養至 53  $h$  時，殘餘葡萄糖濃度約 11.08  $g/L$ ，殘餘丙酸濃度約 2.38  $g/L$ 。此期間 (19~53  $h$ ) 葡萄糖平均消耗速率為 1.03  $g/L \cdot h$ ，丙酸平均消耗速率為 0.54  $g/L \cdot h$ ，如表 2 所示。

培養至 53  $h$ ，調整稀釋速率為 0.121  $h^{-1}$ ，經過 50  $h$  培養 (即培養於 53~103  $h$  期間)，菌體生長增加。圖 4 (b) 顯示，培養至 100  $h$ ，培養基中葡萄糖被消耗殆盡，此時培養基中的丙酸濃度為 0.033  $g/L$ ，此期間菌體、HB、HV 及 PHBV 生合成量有增加。培養於 100  $h$  有最大的 HB 與 PHBV 濃度，分別為 1.11 與 1.30  $g/L$ 。培養至 103  $h$ ，丙酸濃度為 0.022  $g/L$ ；培養 103  $h$  有最大的菌體生質量與 HV 生合成，分別為 6.37 與 0.21  $g/L$ ；於此稀釋速率下之培養，菌體平均濃度為 6.35  $g/L$ ，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 1.10、0.20 及 1.30  $g/L$ ，PHBV 佔總菌體量的 20.5%，HV 於 PHBV 中的含量為 15.4%。此期間 (53~103  $h$ ) 葡萄糖平均消耗速率為 1.82  $g/L \cdot h$ ，丙酸平均消耗速率為 0.71  $g/L \cdot h$ 。

培養至 103  $h$ ，調整稀釋速率為 0.0851  $h^{-1}$ 。經過 48  $h$  培養 (即培養於 103~151  $h$  期間)，菌體生長穩定。圖 4 (b) 顯示，培養基中葡萄糖與丙酸被消耗殆盡。培養至 116  $h$ ，



表 2. 不同稀釋速率下限磷條件添加丙酸鈉連續式發酵培養 *R. eutropha*

|   | Dilution rate ( $h^{-1}$ ) |       |        |        |        |
|---|----------------------------|-------|--------|--------|--------|
|   | 0.165                      | 0.121 | 0.0851 | 0.0531 | 0.0387 |
| Flow rate ( $mL/h$ )                      | 214.7                      | 160.2 | 110.7  | 69.0   | 50.1   |
| HB ( $g/L$ )                              | 0.27                       | 1.10  | 1.70   | 1.34   | 0.85   |
| HV ( $g/L$ )                              | 0.07                       | 0.20  | 0.20   | 0.20   | 0.14   |
| PHBV ( $g/L$ )                            | 0.34                       | 1.30  | 1.90   | 1.54   | 0.99   |
| Residual biomass ( $g/L$ )                | 4.53                       | 5.05  | 4.57   | 5.16   | 4.06   |
| HB/Residual Biomass (%)                   | 5.96                       | 21.78 | 37.20  | 25.97  | 20.93  |
| HV/Residual Biomass (%)                   | 1.55                       | 3.96  | 4.37   | 3.87   | 3.45   |
| PHBV/Residual Biomass (%)                 | 7.51                       | 25.74 | 41.57  | 29.84  | 24.38  |
| Consumption rate of glucose ( $g/Lh$ )    | 1.03                       | 1.82  | 1.29   | 0.78   | 0.58   |
| Consumption rate of propionate ( $g/Lh$ ) | 0.54                       | 0.71  | 0.41   | 0.28   | 0.19   |

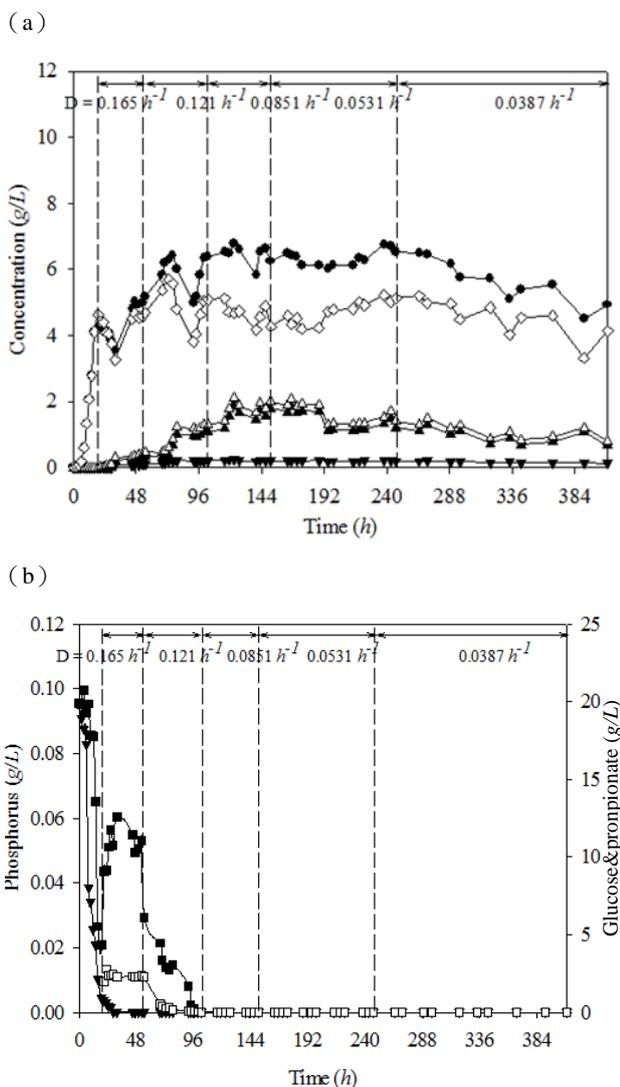


圖 4. 限磷條件添加丙酸鈉連續式發酵培養 *R. eutropha*, (a) 菌體生質量、HB、HV、PHBV 及淨菌體，其中●：biomass；▲：HB；▼：HV；△：PHBV；◇：residual biomass；(b) 基質消耗，其中■：glucose；▼：phosphorus；□：propionate

HV 濃度趨於穩定，圖 4 (a)；培養至 123 h 有最大菌體生質量、HB、HV 及 PHBV 生合成，分別為 6.79、1.85、0.26 及 2.11 g/L。於此稀釋速率下之培養，菌體平均濃度為 6.47 g/L，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 1.70、0.20 及 1.90 g/L，PHBV 佔總菌體量的 29.4%，此結果較限氮條件下培養 *R. eutropha* 為低 [18]。HV 於 PHBV 中的含量為 10.5%。此階段中，菌體生質量與 PHBV 皆沒有明顯增加的趨勢。此期間 (103~151 h) 葡萄糖平均消耗速率為 1.29 g/Lh，丙酸平均消耗速率為 0.41 g/Lh，均比稀釋速率為 0.121  $h^{-1}$  為低。

培養至 151 h，調整稀釋速率為 0.0531  $h^{-1}$ ，經過培養 96 h (即培養於 151~247 h 期間)，菌體生長趨於穩定。圖 4 (a) 顯示，培養至 238 h 有最大的菌體生質量為 6.74 g/L；培養至 167 h 有最大濃度的 HB、HV 及 PHBV，分別為 1.85、0.21 與 2.06 g/L。於此稀釋速率下之培養，菌體平均濃度為 6.70 g/L，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 1.34、0.20 及 1.54 g/L，PHBV 約佔總菌體量的 23.0%，HV 於 PHBV 中的含量為 13.0%。此階段中，HV 的濃度變化不大，菌體生質量與 PHBV 比起上個階段有減少的趨勢。此期間 (103~151 h) 葡萄糖平均消耗速率為 0.78 g/Lh，丙酸平均消耗速率為 0.28 g/Lh。

培養至 247 h 後，調整稀釋速率為 0.0387  $h^{-1}$ ，經過培養 162 h (即培養於 247~409 h 期間)，菌體生長有下降趨勢，圖 4(a) 顯示，培養至 265 h 有最大的菌體生質量為 6.49 g/L；在培養至 271 h 有最大濃度的 HB、HV 及 PHBV，分別為 1.30、0.20 與 1.50 g/L。於此稀釋速率下之培養，菌體平均濃度為 5.05 g/L，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 0.85、0.14 及 0.99 g/L，PHBV 約佔總菌體量的 19.6%，HV 於 PHBV 中的含量為 14.1%。此階段中，生質量與 PHBV 比起上個階



段都有顯著減少的趨勢。此期間葡萄糖平均消耗速率為 0.58 g/Lh，丙酸平均消耗速率為 0.19 g/Lh。

## 2. 不同稀釋速率下添加丙酸發酵培養之比較

於限磷條件下添加丙酸，由高稀釋速率至低稀釋速率進行連續式發酵培養，探討不同稀釋速率對菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於菌體中含量及 HV 於 PHBV 中含量之影響，如圖 5 所示。降低稀釋速率，菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於菌體中含量及 HV 於 PHBV 中含量均有增加而後下降趨勢，菌體平均生質量以稀釋速率為 0.0531 h<sup>-1</sup> 達最高 6.70 g/L，PHBV 生合成量以稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 達最高 1.90 g/L，PHBV 以稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 達最高 29.4%，HV 於 PHBV 中含量以稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 達最高 10.5%。

不同稀釋速率之菌體產率、HB、HV 與 PHBV 產率之比較如圖 6 所示。降低稀釋速率，菌體產率有下降趨勢，實驗結果顯示，以實驗最大的稀釋速率為 0.165 h<sup>-1</sup> 時，菌體產率達最高為 0.804 g/Lh。HB 與 PHBV 產率以稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 達最高，分別為 0.145 和 0.162 g/Lh。HV 產率以稀釋速率為 0.121 h<sup>-1</sup> 達最高 0.025 g/Lh。

在不同稀釋速率限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha* 之饋料流速、淨菌體量、HB、HV、PHBV 於淨菌體中含量和葡萄糖與丙酸之平均消耗速率列於表 2。降低稀釋速率即降低饋料流速，HB、HV 和 PHBV 於淨菌體中含量，以稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 時達最高，分別為 37.20%、4.37% 和 41.57%，表示稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup>、饋料流速為 110.7 mL/h 時，提供足夠碳源讓菌體生合成 HB 和 HV。稀釋速率為 0.0531 h<sup>-1</sup> 時、饋料流速為 69.0 mL/h 時，因饋料流速較慢，無法提供足夠碳源以合成 HB 和 HV，因而 HB、HV、PHBV 於淨菌體中含量下降，分別為 25.97%、3.87% 和 29.84%。葡萄糖與丙酸之平均消耗速率以稀釋速率為 0.121 h<sup>-1</sup> 時最高，分別為 1.82 與 0.71 g/Lh。

以葡萄糖和丙酸為碳源之連續式發酵培養，於稀釋速率為 0.0531 h<sup>-1</sup>，有最大的菌體生質量為 6.74 g/L；於稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup>，可獲得最高的 PHBV 生合成量。

## 四、結論

本研究以 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699; BCRC 13036) 為實驗菌株，於限磷條件下進行連續式發酵培養，饋料添加第二碳源丙酸鈉 5.0 g/L，探討 *R. eutropha* 於不同

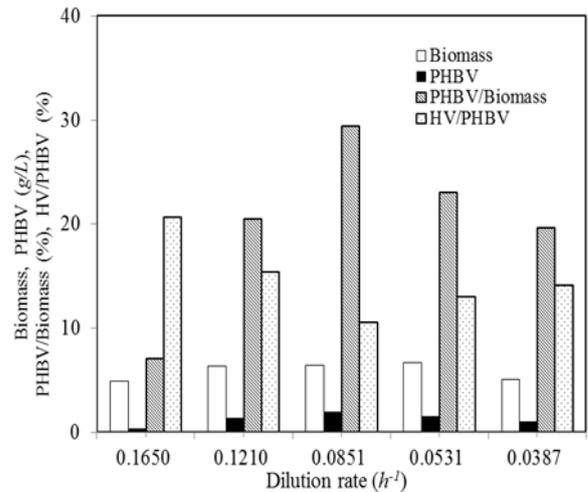


圖 5. 限磷條件添加丙酸鈉連續式發酵培養 *R. eutropha*，不同稀釋速率之總菌生質量、PHBV 累積量、PHBV 在總菌體中含量及 HV 在 PHBV 中含量

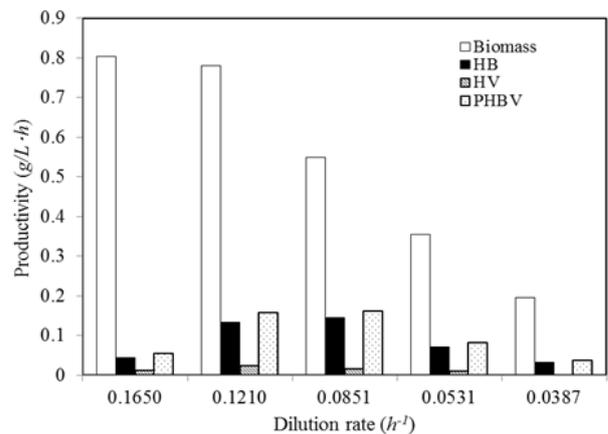


圖 6. 限磷條件添加丙酸鈉連續式發酵培養 *R. eutropha*，不同稀釋速率之菌體產率、HB 產率、HV 產率及 PHBV 產率

的稀釋速率下，菌體生質量、淨菌體生質量、HB、HV 及 PHBV 之生合成量，並量測葡萄糖、磷源及丙酸鈉之消耗量。

以葡萄糖為碳源之培養，稀釋速率為 0.151 h<sup>-1</sup> 時，PHB 的最佳平均產率為 0.298 g/Lh。饋料添加丙酸鈉 5.0 g/L 為第二碳源，葡萄糖添加量為 15.31 g/L，稀釋速率為 0.0851 h<sup>-1</sup> 時，PHBV 的最佳平均產率 0.162 g/Lh，HV 的平均產率為 0.017 g/Lh，平均每克丙酸生成之 HV ( $Y_{HV/P}$ ) 約為 0.042 克。由實驗結果顯示，在限磷條件下之培養，淨菌體生質量呈穩定狀態，而 PHB (V) 則隨著稀釋速率與培養基中碳源的含量而改變，菌體生質量與 PHB (V) 的變化趨勢相似。



培養基中有碳源存在時，稀釋速率調降，菌體產率與 PHB (V) 產率會增加。若碳源消耗殆盡，菌體產率會呈現緩慢減少，但 PHB (V) 的產率減少比較顯著，此時的碳源以生產菌體為主。隨著稀釋速率再調降，碳源的饋入速率也隨之減少後，已無法維持菌體的生合成量，故菌體產率大量減少。

### 參考文獻

1. 王奕隆 (民 87)，由 *Alcaligenes eutrophus* 生產生物可分解塑膠的能量模式，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
2. 王進坤、柯文慶、洪瑞良、陳重文、盧榮錦、賴茲漢 (民 91)，食品營養儀器分析，富林出版社，台中。
3. 陳建璋 (民 93)，溫度變化對 *Ralstonia eutropha* 在限磷條件下發酵生產 PHB 之探討，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
4. Alias, Z. and I. K. P. Tan (2005) Isolation of palm oil-utilizing: polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 96, 1229-1234.
5. Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, 54, 450-472.
6. Aramvash, A., S. Hajizadeh-Turchi, F. Moazzeni-zavareh, N. Gholami-Banadkuki, N. Malek-sabet, and Z. Akbari-Shahabi (2016) Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in *Cupriavidus necator* and its characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 397-404.
7. Arcos-Hernandez, M. V., B. Laycock, S. Pratt, B. C. Donose, A. L. Nikoli, P. Luckman, A. Werker, and P. A. Lant (2012) Biodegradation in a soil environment of activated sludge derived polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polymer Degradation and Stability*, 97, 2301-2312.
8. Berezina, N. and B. Yada (2016) Improvement of the poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) production by dual feeding with levulinic acid and sodium propionate in *Cupriavidus necator*. *New Biotechnology*, 1, 231-236.
9. Carli, L. N., J. S. Crespo, and R. S. Mauler (2011) PHBV nanocomposites based on organomodified montmorillonite and halloysite: the effect of clay type on the morphology and thermal and mechanical properties. *Composites Part A-Applied Science*, 42, 1601-1608.
10. Choi J. I. and S.Y. Lee (1999) High-level production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4363-4368.
11. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura, and K. Soga (1987) Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from <sup>13</sup>C-labeled acetate and propionate. *Macromolecules*, 20, 2988-2991.
12. Du, G, J. Chen, J. Yu, and S. Lun (2001) Kinetic studies on poly-3-hydroxybutyrate formation by *Ralstonia eutropha* in a two-stage continuous culture system. *Process Biochemistry*, 37, 219-227.
13. Gogotov, I. N., V. A. Gerasin, Y. V. Knyazev, and E. M. Antipov (2010) Composite biodegradable materials based on polyhydroxyalkanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 659-665.
14. Hazenberg, P. H. and B. Witholt (1993) Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 311-316.
15. Hu, W. F., S. N. Sin, H. Chua, and P. H. F. Yu (2005) Synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from excess activated sludge under various oxidation-reduction potentials (ORP) by using acetate and propionate as carbon sources. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121, 289-301.
16. Keenan, T. M., S. W. Tanenbaum, A. J. Stipanovic, and J. P. Nakas (2004) Production and characterisation of poly-β-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnology Progress*, 20, 1697-1704.
17. Ray, S., V. Prajapati, K. Patel, and U. Trivedi (2016) Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 741-749.
18. Richards, E., R. Rizvi, A. Chow, and H. Naguib (2008) Biodegradable composite foams of PLA and PHBV using subcritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Polymers and the Environment*, 16, 258-266.
19. Shang, L., S. C. Yim, and P. Chang (2004) Sequential



- feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-hydroxyvalerate fraction. *Biotechnology Progress*, 20, 140-144.
20. Sheu, D. S., W. M. Chen, J. Y. Yang, and R. C. Chang (2009) Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanesis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 289-294.
21. Yu, S. T., C. C. Lin, and J. R. Too (2005) PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 40, 2729-2734
22. Zhao, Q., S. F. Wang, M. M. Kong, W. T. Geng, R. K. Y. Li, and C. J. Song (2012) Phase morphology, physical properties, and biodegradation behavior of novel PLA/PHBHHx blends. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 100B, 23-31.

收件：107.02.22 修正：107.05.07 接受：107.07.16

