

以葡萄糖與戊酸鈉為碳源於限磷條件下連續發酵培養 *Ralstonia eutropha* 生成 PHBV 之探討

李志韋¹ 吳淑姿^{1,2} 余世宗^{3*}

¹大葉大學食品暨應用生物科技學系

²大葉大學餐旅管理學系

³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

本研究探討 *Ralstonia eutropha* 於不同稀釋速率 (0.155、0.115、0.0815、0.0604 和 0.0381 h^{-1}) 下，饋料培養基添加第二碳源戊酸鈉 5.0 g/L 對菌體生質量、聚羥基丁酯和戊酯的共聚物 (poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV) 生成之影響。菌體生質量、PHBV 生成量、PHBV 於總菌體中的含量及羥基戊酯 (hydroxyvalerate, HV) 於 PHBV 中的含量隨稀釋速率調降有先增加而後下降趨勢。稀釋速率為 0.0815 h^{-1} 時，具有最高之菌體生質量 (5.94 g/L)、PHBV 生成量 (1.54 g/L)、PHBV 於總菌體中的含量 (23.6%) 及 HV 於 PHBV 中的含量 (46.5%)。添加戊酸鈉之培養，生成之 PHBV 中 HV 含量可達 39.5-46.5%，較高 HV 含量可以改善 PHBV 脆性。葡萄糖之生質量產率係數 0.713 $g_{biomass}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 0.155 h^{-1})、葡萄糖之羥基丁酯 (hydroxybutyrate, HB) 產率係數 0.056 $g_{HB}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 0.1150 h^{-1})、戊酸鈉之 HV 產率係數 0.123 $g_{HV}/g_{valerate}$ (稀釋速率為 0.0815 h^{-1})。添加戊酸鈉合成 HV 之效率較添加丙酸鈉為高。調整第二碳源添加之種類與添加量，可改變 PHBV 中 HV 含量，進而改變 PHBV 的性質。

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

Continuous Cultivation for Synthesis of PHBV by *Ralstonia eutropha* using Glucose and Sodium Valerate as Carbon Sources under a Phosphorus-Limited Condition

ZHI-WEI LI¹, SHWU-TZY WU^{1,2} and SHIH-TSUNG YU^{3*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Da-Yeh University

²Department of Hospitality Management, Da-Yeh University

³Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

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

*yust@mail.dyu.edu.tw



ABSTRACT

In this study, *Ralstonia eutropha* was cultivated using sodium valerate (5.0 g/L) as a second carbon source to synthesize the biomass and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) under different dilution rates (0.155, 0.115, 0.0815, 0.0604, and 0.0381 h⁻¹). The biomass, PHBV biosynthesis, PHBV content in total cells, and HV content in PHBV increased and then decreased as the dilution rates decreased. When the dilution rate was 0.0815 h⁻¹, the highest bacterial biomass (5.94 g/L), PHBV biosynthesis (1.54 g/L), PHBV content in total cells (23.6%) and HV content in PHBV (46.5%) were achieved. When sodium valerate was added, the HV content in PHBV reached 39.5%–46.5%. The high HV content can improve the brittleness of PHBV. The biomass yield coefficient ($g_{biomass}/g_{glucose}$) for glucose was 0.713 (diluting rate 0.155 h⁻¹), the HB yield coefficient ($g_{HB}/g_{glucose}$) for glucose was 0.056 (diluting rate 0.1150 h⁻¹), and the HV yield coefficient ($g_{HV}/g_{valerate}$) for valerate was 0.123 (dilution rate 0.0815 h⁻¹). The efficiency to synthesize HV using sodium valerate is higher than that using sodium propionate. Adjusting the type and amount of a second carbon source can change the HV content in the PHBV that may modify the properties of the PHBV.

Key Words: PHBV, *Ralstonia eutropha*, phosphorus-limited condition, continuous fermentation, *Ralstonia eutropha*, sodium valerate

一、前言

可分解性塑膠就是塑膠材質之高分子化學結構可經由某些機制 (mechanism) 在暴露的環境中分解。分解過程中，塑膠之物理、化學性逐漸轉弱而變脆，並分裂為碎片，再經由水解、溶解或微生物分解成簡單分子而被環境所吸收循環。

聚羥基烷酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 可由微生物在特殊的生長條件下，發酵生合成。其中聚羥基丁酯 (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) 及聚羥基丁酯和戊酯的共聚物 (poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV) 更是受到廣泛的討論。PHB 及 PHBV 為微生物發酵生產之熱塑性聚酯材料。由於 PHB 是一種脆性材料，其熔點溫度在 175 ~ 180 °C 之間，為容易加工成型的熱可塑性塑膠，因其可被微生物所分解，對公害防治與環境保護而言，是一種優良產品。若含有 30% 以下之羥基戊酯 (hydroxyvalerate, HV) 於 PHB 聚合物主鏈中，可降低 PHB 化合物之結晶性，使材料更柔軟、更具延展性，改善 PHB 高結晶性和易脆性質。因此可視材料應用之需要，調整共聚單體羥基丁酯 (hydroxybutyrate, HB) 與 HV 的含量，即可得到良好均衡物性的 PHBV 聚合物。

以葡萄糖為碳源培養 *Ralstonia eutropha*，限氮條件下，可得 80% (w/w) 之 PHB。若加入丙酸鈉 (sodium propionate) 於培養基中，則會有 HB 與 HV 共聚物產生 [11]。HV 在 PHB 中之產量，取決於在聚合物累積階段 (polymer accumulating

stage) 時，丙酸與葡萄糖在培養基中之比值，調整丙酸的添加量可合成 HV 的含量在特定的範圍 [8]。以戊酸 (valeric acid) 為唯一碳源，則聚合物中有 90% 是由 HV 單體所組成 [13]。調整戊酸添加量，可調整 HV 於 PHBV 中之含量 [10]。

PHB 的結構是緊密的螺旋雙摺皺結構 [9]，是一種高度結晶的聚合物，結晶度的範圍在 55~80%，物理上，PHB 較脆且硬 [11]。在 PHB 單聚合物中加入 HV [7]，可使其脆硬性變成軟韌且更耐衝擊性 [6, 12]。

PHB 與 PHBV 為胞內聚合物 (intracellular storage polymer)，在細胞內形成小顆粒，大部分生產菌中，其扮演儲存能量與碳源保存的角色，就像是植物中的澱粉或動物中的脂肪一樣。各種營養成分中，以氮源與磷源對 PHB 與 PHBV 代謝途徑之影響最大 [5]。當氮源缺乏時，會直接影響細胞內蛋白質與酵素的生合成；而磷源缺乏時，多種細胞的生長均受抑制，而其次級代謝物 (PHB 與 PHBV) 則可因此被有效誘發。

本研究以微生物生合成的方法，生合成生物可分解塑膠 PHBV。使用的菌株為 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699; BCRC 13036)，在限磷條件下，饋料中添加戊酸鈉，為維持菌體生長系統可提供充足的營養源，期能提高 PHV 生合成量，採用連續式發酵培養與改變稀釋速率，以探討戊酸鈉對菌體生長、生合成 PHB、PHV 與 PHBV 的影響。

二、材料與方法



實驗菌株 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699; BCRC 13036)，購自財團法人食品工業發展研究所，為革蘭氏陰性好氣性桿菌 [3]，最適生長溫度為 20~30 °C，其特性是生長速率快，易分離，不易受污染，可生長於簡單組成的培養基中，無毒性。

(一) 培養基

以基礎培養基進行繼代培養，基礎培養基 (葡萄糖 20.0g/L, Na₂HPO₄ 3.55g/L, KH₂PO₄ 3.55g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.5g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L, FeSO₄·7H₂O 0.025g/L, CaCl₂ 0.02g/L, trace metal solution 5.0 mL/L)、微量金屬溶液 (trace metal solution) 和限磷培養基的組成與添加丙酸之試驗相同 [3, 4]。連續式培養之饋料為限磷培養基添加葡萄糖和戊酸鈉為碳源。

(二) 連續式發酵培養

實驗以 3 L 發酵槽 (Mituwa KMJ-3B, 日本) 進行培養，先以批次發酵進行培養，待菌體生長至對數生長期 (exponential phase)，轉換為連續式限磷條件培養。接種量、攪拌速度、培養液 pH 值、調整攪拌速率及進氣速率均與添加丙酸之試驗相同 [3]。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 (葡萄糖與戊酸鈉)、磷源、PHB/PHBV 的濃度。

(三) 分析

取樣菌液，分析菌體生質量、淨菌體量 (residual biomass)、碳源 (葡萄糖與戊酸鈉)、磷源、HB 與 HV 的濃度，分析之方法與添加丙酸之試驗相同 [3]。葡萄糖與戊酸鈉以 HPLC 分析，偵測器為 RI (refractive index)，分析管柱為 Bio-Rad Aminex HPX-87H [3]。磷源以分光光度計測其吸光值 [2]。菌體中的 PHB 或 PHV 以 GC 進行分析，偵測器為 FID，分析管柱為 Supelcowax™ 10 (30 m, 0.53 mm ID, Supelco) [1]。菌體生質量為菌體於 80°C 烘箱烘乾 48h 之菌體重。淨菌體量為菌體生質量扣除 PHBV 後之菌體重。

三、結果與討論

本研究於限磷條件添加第二碳源戊酸鈉，以工作體積為 1.30 L 發酵槽進行連續式發酵培養 *R. eutropha*，探討不同稀釋速率對 *R. eutropha* 菌體生質量、PHB、PHBV 生合成量及 PHBV 於菌體中含量之影響。培養之碳源、氮源、磷源分別為葡萄糖、硫酸銨、磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀。以二階段方

式培養，第一階段採批次發酵培養，主要以菌體生長為主，待菌體生長至對數生長期 (exponential phase)，轉換為第二階段之連續式發酵培養。第二階段之發酵培養過程，以磷源為限制條件，使 *R. eutropha* 在磷源饋乏下增進生合成 PHBV。實驗過程定時取樣，分析菌體生質量、葡萄糖、戊酸鈉、磷源殘留量和 PHBV 生合成量 [3]。

(一) 限磷條件下添加戊酸鈉連續式發酵培養

於限磷條件下培養 *R. eutropha*，以葡萄糖為碳源，首先進行批次發酵培養，待菌體生長至對數生長期，轉換為連續式發酵培養，饋料培養基之碳源為葡萄糖 13.85 g/L 和戊酸鈉 5.0 g/L。

批次發酵培養之起始菌體濃度為 0.05 g/L，葡萄糖與磷源起始濃度分別為 19.98 與 0.088 g/L。批次培養至 24 h，主要以生合成菌體生質量為主，如圖 1 (a) 所示。而後菌體快速生長進入對數生長期，葡萄糖與磷源濃度分別為 4.33 g/L 與 0.001 g/L，葡萄糖的消耗速率為 0.65 g/L·h，磷源消耗速率為 3.63 × 10⁻³ g/L·h，生質量為 4.66 g/L，此時開始進行饋料，進入連續式發酵培養。

起始之稀釋速率為 0.1550 h⁻¹ (24~63 h)。圖 1 (b) 顯示，培養於 34 h 之前，磷源快速被消耗，培養至 34 h，培養基中的磷源被消耗殆盡，開始進入限磷條件下之培養。圖 1 (a) 顯示，培養於 34 h 有最大生質量為 5.13 g/L，轉換為連續式培養，菌體會被流出，因而生質量與淨菌體量會有減少現象發生，但此期間菌體已開始生合成少量 HB；培養至 63 h 時，殘餘葡萄糖濃度為 8.79 g/L，殘餘戊酸濃度為 2.33 g/L。此培養期間 (24~63 h)，葡萄糖平均消耗速率為 0.83 g/L·h，戊酸平均消耗速率為 0.36 g/L·h。培養於 63 h 有最大濃度的 HB、HV 及 PHBV，分別為 0.30、0.22 及 0.52 g/L。此稀釋速率培養期間，PHBV 佔總菌體量的 11.3%，PHBV 中 HV 的含量為 40%。

培養至 63 h 時，稀釋速率調整為 0.1150 h⁻¹ (63~104 h)，培養期間，菌體生長穩定增加。培養於 99 h 有最大濃度的生質量、HB、HV 及 PHBV，分別為 5.34、0.76、0.56 及 1.32 g/L。培養期間，菌體平均生質量為 5.25 g/L，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 0.71、0.51 及 1.22 g/L，PHBV 佔總菌體量的 23.2%，PHBV 中 HV 的含量為 41.8%。培養至 104 h，殘餘葡萄糖濃度為 0.78 g/L，殘餘戊酸濃度約 0.13 g/L。此培養期間 (53~103 h)，葡萄糖平均消耗速率為 1.46 g/L·h，戊酸平均消耗速率為 0.49 g/L·h，葡萄糖與戊酸平均消耗速



率達最高。菌體生質量、HB、HV 及 PHBV 快速被合成，因而葡萄糖與戊酸平均消耗速率達最高。

培養至 104 h 時，稀釋速率調整為 0.0815 h^{-1} (104~157 h)。培養基中葡萄糖與戊酸濃度被消耗殆盡。培養於 119 h 有最大濃度的生質量、HB、HV 及 PHBV，分別為 5.94、0.81、0.73 及 1.54 g/L ，此結果亦為不同稀釋速率下，具有最大濃度的生質量、HB、HV 及 PHBV。此稀釋速率，具有最大平

均濃度的生質量、HV 及 PHBV。PHBV 約佔總菌體量的 23.6%，PHBV 中 HV 的含量為 46.5%，添加丙酸鈉之實驗亦以相近的稀釋速率 (0.0851 h^{-1}) 有較佳的結果[3]。此階段，生質量與 PHBV 皆沒有明顯增加的趨勢。此培養期間 (104~157 h)，葡萄糖平均消耗速率為 $1.23 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ ，戊酸平均消耗速率為 $0.40 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ ，葡萄糖與戊酸平均消耗速率較前一稀釋速率稍減。

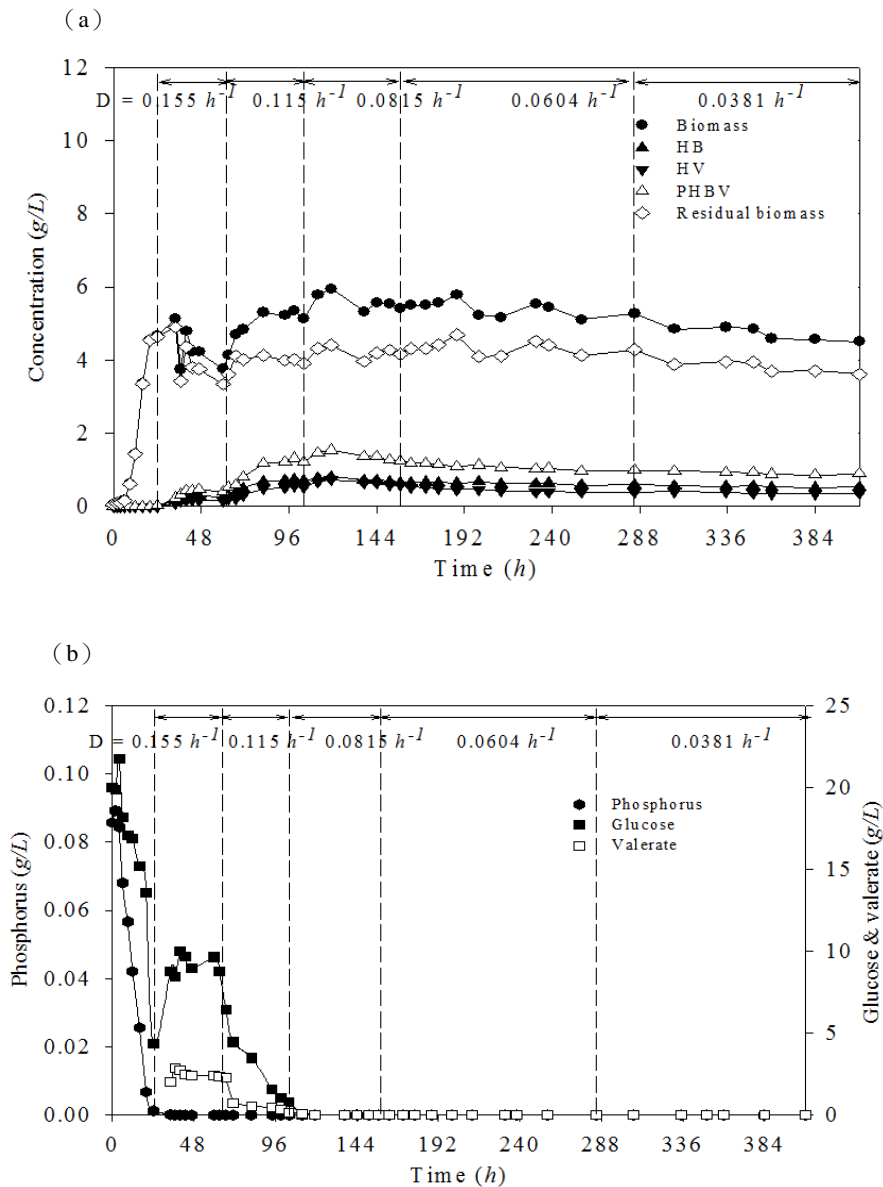


圖 1. 限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha* (饋料添加戊酸鈉 5.0 g/L)

- (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；□：valerate



培養至 157 h 時，稀釋速率調整為 $0.0604 h^{-1}$ (157~285 h)，此培養期間，培養基中碳源被消耗殆盡。培養於 188 h 有最大生質量為 $5.78 g/L$ ；培養於 200 h 有最大濃度的 HB 為 $0.67 g/L$ ；培養於 163 h 有最大濃度的 HV 與 PHBV，分別為 0.52 與 $1.18 g/L$ 。菌體平均生質量為 $5.20 g/L$ ，HB、HV 及 PHBV 平均濃度分別為 0.59 、 0.39 及 $0.98 g/L$ ，PHBV 約佔總菌體量的 18.8%，PHBV 中 HV 的含量為 39.8%。此階段中，除了 HV 的含量變化不大，生質量、HB、HV 及 PHBV 的濃度比起上一培養階段有減少的趨勢。此培養階段 (157~285 h)，葡萄糖平均消耗速率為 $0.89 g/L \cdot h$ ，戊酸平均消耗速率為 $0.29 g/L \cdot h$ 。

培養至 285 h 時，稀釋速率調整為 $0.0381 h^{-1}$ (285~408 h)。培養於 335 h 有最大生質量為 $4.86 g/L$ ；培養於 307 h 有最大濃度的 HB、HV 及 PHBV，分別為 0.57 、 0.41 與 $0.98 g/L$ 。PHBV 約佔總菌體量的 19.3%，PHBV 中 HV 的含量為 40.9%。此培養階段，生質量、HB、HV 及 PHBV 的濃度比上一階段都有顯著減少的趨勢。此期間葡萄糖平均消耗速率為 $0.56 g/L \cdot h$ ，戊酸平均消耗速率為 $0.18 g/L \cdot h$ 。

稀釋速率下降至 0.0604 和 $0.0381 h^{-1}$ ，葡萄糖和戊酸鈉幾乎完全被消耗掉，進料提供之營養源被用於生合成菌體生質量、HB、HV 及 PHBV。於此稀釋速率，進料的速率是控制生合成菌體生質量、HB、HV 及 PHBV 的主要因素。

(二) 不同稀釋速率下發酵培養之比較

於限磷條件下連續式發酵培養，稀釋速率由高稀釋速率至低稀釋速率，饋料以葡萄糖與戊酸鈉為碳源，濃度分別為

13.85 與 $5.0 g/L$ ，進行不同稀釋速率之實驗。

本實驗發酵槽工作體積為 $1.30 L$ ，稀釋速率為 0.155 、 0.115 、 0.0815 、 0.0604 及 $0.0381 h^{-1}$ 。不同稀釋速率對生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於總菌體中的含量及 HV 於 PHBV 中的含量之比較如圖 2 所示。菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於總菌體中的含量及 HV 於 PHBV 中的含量隨稀釋速率調降有先增加而後下降趨勢，此趨勢與添加丙酸鈉之結果相似[3]。添加戊酸鈉實驗結果，以稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$ 時，具有最高之菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於總菌體中的含量及 HV 於 PHBV 中的含量，表示稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$ 時，饋料之碳源足夠菌體及 PHBV 之生合成。添加丙酸鈉之實驗亦以相近的稀釋速率 ($0.0851 h^{-1}$) 有較佳的結果 [3]。

不同稀釋速率限磷條件下連續式發酵培養 *R. eutropha* (饋料添加戊酸鈉 $5.0 g/L$) 之饋料流速、HB 和 HV 生合成量、淨菌體量、葡萄糖和戊酸消耗速率列於表 1。降低稀釋速率即降低饋料流速，HB 生合成量以稀釋速率為 $0.1150 h^{-1}$ 時達最高，表示於此稀釋速率菌體能善用葡萄糖以生合成 HB。HV 生合成量，以稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$ 時達最高，表示此稀釋速率菌體能利用足夠的戊酸鈉以生合成 HV。饋料流速下降，葡萄糖與戊酸鈉的消耗速率先增加而後下降，添加戊酸鈉之葡萄糖與戊酸鈉的消耗速率以稀釋速率為 $0.1150 h^{-1}$ 時達最高，添加丙酸鈉則以稀釋速率為 $0.1210 h^{-1}$ 時達最高[3]。

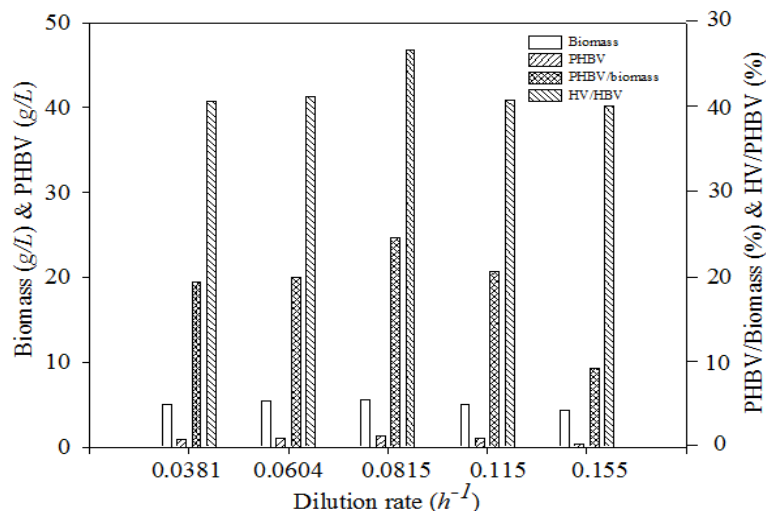


圖 2. 限磷條件下連續式發酵培養 *R. eutropha* (饋料添加戊酸鈉 $5.0 g/L$)，不同稀釋速率對總菌體量、PHBV 累積量、PHBV 在總菌體中含量及 HV 在 PHBV 中含量之比較



表 1. 在不同稀釋速率下限磷條件連續式發酵培養 *R. eutropha* (饋料添加戊酸鈉 5.0 g/L)

	Dilution rate (h^{-1})				
	0.1550	0.1150	0.0815	0.0604	0.0381
Flow rate (mL/h)	201.20	149.00	105.88	78.55	49.37
HB (g/L)	0.26	0.71	0.69	0.59	0.52
HV (g/L)	0.17	0.51	0.61	0.39	0.36
PHBV (g/L)	0.43	1.22	1.30	0.98	0.88
Residual biomass (g/L)	3.39	4.03	4.21	4.22	3.66
HB/Residual biomass (%)	7.67	17.62	16.39	13.98	14.21
HV/Residual biomass (%)	5.01	12.66	14.49	9.24	9.84
PHBV/Residual biomass (%)	12.68	30.28	30.88	23.22	24.05
Consumption rate of glucose (g/L·h)	0.83	1.46	1.23	0.89	0.56
Consumption rate of valerate (g/L·h)	0.36	0.49	0.40	0.29	0.18

表 2. 不同碳源限磷條件下連續式發酵培養 *R. eutropha* 之生質量、HB、HV 與 PHBV 產率

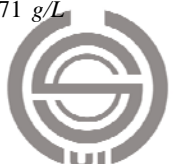
	Dilution rate (h^{-1})				
	0.2320	0.1920	0.1510	0.1010	0.0518
Glucose*					
Productivity of biomass (g/L·h)	0.812	1.038	1.064	0.738	0.549
Productivity of HB (g/L·h)	0.108	0.236	0.298	0.167	0.070
	Dilution rate (h^{-1})				
	0.165	0.123	0.0851	0.0531	0.0387
Glucose with 5.0 g/L propionate*					
Productivity of biomass (g/L·h)	0.804	0.781	0.550	0.356	0.196
Productivity of HB (g/L·h)	0.044	0.134	0.145	0.071	0.033
Productivity of HV (g/L·h)	0.012	0.025	0.017	0.011	0.006
Productivity of PHBV (g/L·h)	0.056	0.159	0.162	0.082	0.039
	Dilution rate (h^{-1})				
	0.1550	0.1150	0.0815	0.0604	0.0381
Glucose with 5.0 g/L valerate					
Productivity of biomass (g/L·h)	0.592	0.604	0.449	0.314	0.173
Productivity of HB (g/L·h)	0.040	0.081	0.056	0.036	0.020
Productivity of HV (g/L·h)	0.026	0.059	0.049	0.024	0.014
Productivity of PHBV (g/L·h)	0.066	0.140	0.105	0.060	0.034

(三) 各種不同碳源培養之比較

比較於限磷條件下，添加葡萄糖 [3]及於饋料培養基添加不同第二碳源(丙酸鈉 [3]或戊酸鈉)於 30 °C 進行連續式發酵培養 *R. eutropha*。表 2 為不同碳源限磷條件下連續式發酵培養 *R. eutropha* 之生質量、HB、HV 與 PHBV 產率。添加丙酸鈉和戊酸鈉。HV 產率以添加戊酸鈉較高 0.059 g/L·h(稀釋速率為 0.1150 h^{-1})，添加丙酸鈉為 0.025 g/L·h(稀釋速率為 0.1230 h^{-1}) [3]。PHBV 產率以添加丙酸鈉為較高，因丙酸鈉對菌體生質量合成抑制較緩和，有較高之菌體生質量，因而 PHBV 產率較高。調整第二碳源添加之種類與添加葡萄糖之生質量產率 (productivity of biomass) 最高為 1.064 g/L·h(稀釋速率為 0.1510 h^{-1}) 較添加第二碳源為高，0.804 g/L·h(添加丙酸鈉，稀釋速率為 0.1650 h^{-1}) 和 0.592 g/L·h(添加戊酸鈉，稀釋速率為 0.1550 h^{-1})。實驗結果顯示，添加丙酸鈉和戊酸鈉會降低菌體生質量產率，即抑制菌體的生合成。HB 產率亦以添加葡萄糖為碳源者最高，其次

依序為添加量，可改變 PHBV 中 HV 含量，進而改變 PHBV 的性質。

表 3 為為連續式發酵培養 *R. eutropha* 之基質消耗率與菌體、HB、HV 產率係數。在相近稀釋速率下，對磷的消耗速率相近，但饋料添加有機酸鹽(丙酸鈉或戊酸鈉)的葡萄糖消耗速率較低，僅添加葡萄糖為碳源之葡萄糖消耗速率為 3.04 g/L·h(稀釋速率為 0.1510 h^{-1})，添加丙酸鈉之葡萄糖消耗速率為 1.03 g/L·h(稀釋速率為 0.1650 h^{-1}) [3]，添加戊酸鈉之葡萄糖消耗速率為 0.83 g/L·h(稀釋速率為 0.1550 h^{-1})，表 3。僅添加葡萄糖為碳源之生質量 7.05 g/L(稀釋速率為 0.1510 h^{-1})，添加丙酸鈉之生質量 6.70 g/L(稀釋速率為 0.0531 h^{-1}) [3]，添加戊酸鈉之生質量 5.51 g/L(稀釋速率為 0.0815 h^{-1})，圖 2，添加有機酸鹽(丙酸鈉或戊酸鈉)會抑制菌體的生合成。僅添加葡萄糖為碳源之 HB 總生合成量 1.97 g/L(稀釋速率為 0.1510 h^{-1})，較添加第二碳源丙酸鈉 1.70 g/L(稀釋速率為 0.0851 h^{-1}) [3]和戊酸鈉 0.71 g/L



(稀釋速率為 $0.1150 h^{-1}$ ，表 1) 之 HB 生合成量為高。添加丙酸鈉之 PHBV 生合成量 $1.90 g/L$ (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$) 較添加戊酸鈉 $1.30 g/L$ (稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$) 高，因添加戊酸鈉抑制菌體生合成生質量 $5.51 g/L$ (稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$) 較添加丙酸鈉生合成生質量 $6.47 g/L$ (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$) 低，因而添加戊酸鈉生合成 PHBV 總量較低。添加葡萄糖為碳源之 HB 佔生質量最高達 27.9% (稀釋速率為 $0.1510 h^{-1}$)，添加丙酸鈉 PHBV 佔生質量最高達 29.4% (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$)，添加戊酸鈉 PHBV 佔生質量最高達 23.5% (稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$)，添加不同碳源會影響菌體生合成 PHB (V) 總量。不同稀釋速率之添加丙酸鈉培養，其 PHBV 中 HV 最高含量為 14.9-31.8% [3]，而添加戊酸鈉 PHBV 中 HV 含量可達 39.5-46.5%，圖 2。添加戊酸鈉 PHBV 生合成總量雖較低，但可生合成 HV 比例較高，因而欲生合成較高 HV 含量以改善 PHBV 脆性，以添加戊酸鈉之效益較大。

添加葡萄糖培養的最大葡萄糖之生質量產率係數 ($Y_{X/G}$, biomass yield coefficient on glucose) $0.838 g_{biomass}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.232 h^{-1}$)，表 3，添加丙酸鈉培養 $Y_{X/G}$ $0.781 g_{biomass}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.165 h^{-1}$)，添加戊酸鈉培養 $Y_{X/G}$ $0.713 g_{biomass}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.155 h^{-1}$)，添加有機酸會些微抑制菌體生長，因而影響菌體生質量生合成，進而影響葡萄糖之生質量產率係數。降低稀釋速率，葡萄糖在培養基中的濃度漸減， $Y_{X/G}$ 變低。最大葡萄糖之 HB 產率係數 ($Y_{HB/G}$, HB yield coefficient on glucose)，以葡萄糖為碳源之 $Y_{HB/G}$ 為 $0.128 g_{HB}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.1920 h^{-1}$)，添加丙酸鈉 $Y_{HB/G}$ $0.112 g_{HB}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$)，添加戊酸鈉 $Y_{HB/G}$ $0.056 g_{HB}/g_{glucose}$ (稀釋速率為 $0.1150 h^{-1}$)，饋料添加戊酸鈉的葡萄糖用於合成 HB 的量相對較少。最大丙酸鈉之 HV 產率係數 ($Y_{HV/propionate}$, HV yield coefficient on propionate) $0.042 g_{HV}/g_{propionate}$ (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$)，最大戊酸鈉之 HV 產率係數 ($Y_{HV/valerate}$, HV yield coefficient

表 3. 不同碳源限磷條件下連續式發酵培養 *R. eutropha* 之基質消耗速率與菌體、HB、HV 產率係數

Glucose*	Dilution rate (h^{-1})				
	0.2320	0.1920	0.1510	0.1010	0.0518
Consumption rate of phosphorus ($g/L \cdot h$)	0.021	0.015	0.014	0.009	0.005
The maximum of HB/Biomass (%)	23.0	24.8	26.7	33.1	22.9
$Y_{X/G}$ ($g_{biomass}/g_{glucose}$)	0.838	0.564	0.350	0.373	0.478
$Y_{HB/G}$ ($g_{HB}/g_{glucose}$)	0.111	0.128	0.098	0.084	0.061
Glucose with 5.0 g/L propionate*	Dilution rate (h^{-1})				
	0.165	0.123	0.0851	0.0531	0.0387
Consumption rate of phosphorus ($g/L \cdot h$)	0.014	0.011	0.008	0.005	0.003
The maximum of PHBV/Biomass (%)	8.36	23.8	31.8	31.4	23.1
The maximum of HV/PHBV (%)	27.1	31.8	15.5	14.9	18.2
$Y_{X/G}$ ($g_{biomass}/g_{glucose}$)	0.781	0.429	0.427	0.456	0.337
$Y_{HB/G}$ ($g_{HB}/g_{glucose}$)	0.043	0.074	0.112	0.091	0.057
$Y_{HV/propionate}$ ($g_{HV}/g_{propionate}$)	0.023	0.035	0.042	0.038	0.029
Glucose with 5.0 g/L valerate	Dilution rate (h^{-1})				
	0.1550	0.1150	0.0815	0.0604	0.0381
Consumption rate of glucose ($g/L \cdot h$)	0.83	1.46	1.23	0.89	0.56
Consumption rate of valerate ($g/L \cdot h$)	0.36	0.49	0.40	0.29	0.18
Consumption rate of phosphorus ($g/L \cdot h$)	0.014	0.010	0.007	0.005	0.003
The maximum of PHBV/Biomass (%)	12.6	24.7	25.9	21.8	20.1
The maximum of HV/PHBV (%)	41.7	42.7	47.1	44.0	42.1
$Y_{X/G}$ ($g_{biomass}/g_{glucose}$)	0.713	0.414	0.365	0.353	0.309
$Y_{HB/G}$ ($g_{HB}/g_{glucose}$)	0.048	0.056	0.046	0.040	0.036
$Y_{HV/valerate}$ ($g_{HV}/g_{valerate}$)	0.073	0.115	0.123	0.081	0.075

*參考文獻[3]

$Y_{X/G}$: Biomass yield coefficient on glucose

$Y_{HB/G}$: HB yield coefficient on glucose

$Y_{HV/propionate}$: HV yield coefficient on propionate

$Y_{HV/valerate}$: HV yield coefficient on valerate



on valerate) 0.123 $g_{HV}/g_{valerate}$ (稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$)，結果顯示，添加戊酸鈉合成 HV 之效率較添加丙酸鈉為高。

四、結論

本研究探討 *R. eutropha* 於不同稀釋速率下，饋料培養基添加第二碳源戊酸鈉 5.0 g/L 對菌體生質量、PHBV 生合成之影響，並與不添加第二碳源和添加丙酸鈉之結果進行比較。

饋料添加戊酸鈉 5.0 g/L 為第二碳源，以稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$ 時，具有最高之菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於總菌體中的含量及 HV 於 PHBV 中的含量。表示稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$ 時，饋料之碳源足夠菌體及 PHBV 之生合成。菌體生質量、PHBV 生合成量、PHBV 於總菌體中的含量及 HV 於 PHBV 中的含量隨稀釋速率調降有先增加而後下降趨勢，此趨勢與添加丙酸鈉之結果相似。

添加丙酸鈉和戊酸鈉會抑制菌體的生合成，因而影響 PHBV 之生合成量。HB 產率以添加葡萄糖為碳源者最高，其次依序為添加丙酸鈉和戊酸鈉。HV 產率以添加戊酸鈉較高 $0.059 g/L \cdot h$ (稀釋速率為 $0.1150 h^{-1}$)，添加丙酸鈉為 $0.025 g/L \cdot h$ (稀釋速率為 $0.1230 h^{-1}$)。PHBV 產率以添加丙酸鈉為較高。

添加丙酸鈉培養，其 PHBV 中 HV 最高含量為 14.9-31.8%，而添加戊酸鈉 PHBV 中 HV 含量可達 39.5-46.5%。添加戊酸鈉 PHBV 生合成總量雖較低，但可生合成 HV 比例較高，因而欲生合成較高 HV 含量以改善 PHBV 脆性，以添加戊酸鈉之效益較大。

丙酸鈉之 HV 產率係數 ($Y_{HV/propionate}$, HV yield coefficient on propionate) $0.042 g_{HV}/g_{propionate}$ (稀釋速率為 $0.0851 h^{-1}$)，戊酸鈉之 HV 產率係數 ($Y_{HV/valerate}$, HV yield coefficient on valerate) $0.123 g_{HV}/g_{valerate}$ (稀釋速率為 $0.0815 h^{-1}$)，結果顯示，添加戊酸鈉生合成 HV 之效率較添加丙酸鈉為高。

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. 李志韋、吳淑姿、余世宗 (民 107)，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，科學與工程技術期刊，14，57-66。
4. 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。
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. 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.
8. Bolemborgen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer and T. L. Bluhm (1986) Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 19, 2865-2871.
9. Cornibert, J. and R. H. Marchessault (1972) Physical properties of poly- β -hydroxybutyrate, IV. Conformational analysis and crystalline structure. *Journal of Molecular Biology*, 71, 735-756.
10. Ghysels, S., S. I. Mozumder, H. De Wever, E. I. P. Volcke, L. Garcia-Gonzalez (2018) Targeted poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bioplastic production from carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 249, 858-868.
11. Holmes, P. A. (1985) Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16, 32-36.
12. 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.

Biotechnology and Bioengineering, 41, 165-170.

13. Yamane, T. (1993) Yield of poly-D-(3)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study.

收件：108.03.14 修正：108.06.21 接受：108.11.04

