

溫度變化對 *Ralstonia eutropha* 在限磷條件下饋料批次 發酵生合成 PHB 之探討

陳建璋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

聚-β-羥基丁酸酯 (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) 是生物可分解聚合物可用以替代石化塑膠降低環境汙染。本研究以 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699) 為實驗菌株，於 5 L 之發酵槽進行不同溫度 (26、30 及 35°C) 限磷條件饋料批次發酵培養，探討菌體量、PHB、淨菌體量之生成量，葡萄糖、氮源及磷源之消耗率，並比較三種溫度之菌體與 PHB 產率、基質消耗率及產率係數。不同溫度培養，以 30°C 培養之葡萄糖消耗率較高，因而菌體量、PHB 生成量、淨菌體量較高。氮源消耗率隨培養溫度升高而下降，顯示 *R. eutropha* 於較低溫或較高溫生長會受抑制，進而影響菌體量、PHB 生成量、淨菌體量。30°C 培養菌體量產率最高 0.74 g/L·h，淨菌體量產率最高 0.25 g/L·h，PHB 產率最高 0.57 g/L·h。不同培養溫度 26、30 及 35°C，其菌體量產率分別可達 0.45、0.74 和 0.63 g/L·h，PHB 產率分別可達 0.35、0.57 和 0.50 g/L·h。Y_{P/X} (PHB yield coefficient on biomass) 於 30°C 培養最大值為 0.79。Y_{R/G} (residual biomass yield coefficient on glucose) 於三種不同溫度培養，Y_{R/G} 最大值分別為 0.23、0.17 和 0.23。Y_{R/N} (residual biomass yield coefficient on nitrogen) 於三種不同溫度培養，Y_{R/N} 最大值分別為 7.28、7.12 和 6.10。實驗結果顯示，30°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 具有較高的菌體量、PHB 和淨菌體量的產率，且其 Y_{P/X} 產率係數亦以 30°C 培養較佳。

關鍵詞：聚-β-羥基丁酸酯，*Ralstonia eutropha*，產率，產率係數

Effect of Temperature on the Biosynthesis of Poly-β-Hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* under Phosphorus-Limited Batch Fermentation

JIAN-CHANG CHEN¹, SHWU-TZY WU^{1,2} and SHIN-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

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable polymer that can substitute petroleum-based plastics. *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699) was cultivated in a 5-L fermentation tank at different temperatures (26, 30, and 35°C) under phosphorus-limited batch fermentation. The biosynthetic rates of biomass, PHB, and residual biomass and the consumption rates of glucose, nitrogen source, and phosphorus source were measured. The productivities of biomass and PHB and the consumption rate of the matrix and yield coefficients at the three temperatures were compared and studied. The glucose consumption rate was highest at 30 °C, and this temperature yielded a higher production of biomass, PHB, and residual biomass. The nitrogen consumption rate decreased with increasing culture temperature. *R. eutropha* growth was inhibited at lower or higher temperatures, which in turn affected PHB biosynthesis and the yields of biomass and residual biomass. Cultivation at 30°C yielded the highest productivities of biomass, residual biomass, and PHB (0.74, 0.25, and 0.57 g/L/h, respectively). At 26, 30, and 35°C, the productivities of biomass were 0.45, 0.74, and 0.63 g/L/h and of PHB were 0.35, 0.57, and 0.50 g/L/h, respectively. The maximum value of the PHB yield coefficient for biomass was 0.79, at a temperature of 30°C. The residual biomass yield coefficient for glucose was 0.23, 0.17, and 0.23, at 26, 30, and 35°C, respectively. The residual biomass yield coefficient for nitrogen was 7.28, 7.12, and 6.10 at 26, 30, and 35°C, respectively. The experimental results indicated that the batch fermentation of *R. eutropha* at 30°C produced the highest bacterial biomass, residual biomass, and PHB yields and PHB yield coefficient of biomass.

Key Words: PHB, *Ralstonia eutropha*, productivity, yield coefficient

一、前言

塑膠為民生及工業重要之材料，隨著石化塑膠材料大量生產和使用，塑膠廢棄物與日俱增，為解決石化塑膠廢棄物造成的環境影響，分解性塑膠遂應運而生。分解性塑膠與一般塑膠性質相似，並於使用完畢後，能於自然環境中快速分解。

PHB (poly- β -hydroxybutyrate) 為微生物之胞內儲存物質，其特性為熱塑性、抗水性、生物分解性，且其分子量、脆度、硬度、熔點及玻璃轉換溫度等物性與一般石化塑膠-PP (polypropylene) 相似，因此在應用上，PHB 可取代傳統塑膠，也應用於醫藥、工業和農業等 [7]。研究指出，限磷條件培養 *Azotobacter vinelandii* 可提高 PHB 生合成量，因磷酸鹽為能量轉換為 ATP 之必需物，缺乏磷源使 ATP 再生作用受抑制，因此碳源基質用於合成 PHB，以獲得部分能量 [10]。多種微生物於不利生長之條件下可累積 PHB，如缺乏氮、磷、硫、鎂或氧之生長環境 [3, 4]。常用於生合成 PHB

之菌株包括 *Alcaligenes latus*、*Azotobacteriaceae*、*Cyanobacteria*、*Methylophilus*、*Ralstonia eutropha* 及 *Azohydromonas australica* DSM 1124 等 [6, 9]。

R. eutropha 可生合成 PHB，為普遍用於生產 PHB 之微生物。饋料批次培養 (fed-batch cultivation) 為最常用於高細胞密度與高產物產率與產量之培養方法 [12]。Kim 等人以 on-line glucose analyzer 監控饋料葡萄糖濃度，可得總細胞濃度與 PHB 分別為 164 與 121 g/L，PHB 含量最高佔乾細胞重的 76%，PHB 產率為 2.42 g/L·h，平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30 g [5]。為使用較經濟的碳源以降低 PHB 之生產成本，Tsuge 等人以 L-乳酸 (L-lactic acid) 與乙酸 (acetic acid) 混合物為碳源，控制 pH-stat 基質饋料法培養 *R. eutropha*，細胞與 PHB 濃度分別為 75.0 與 54.8 g/L，PHB 含量約 73.1%，PHB 之最高產率為 1.30 g/L·h [11]。Pena-Jurado 等人以乳酪乳清 (cheese whey) 為碳源，饋料批次發酵培養 *Bacillus subtilis* EPAH18，PHB 生合成量為



0.54 g/L [8]。Yustinah 等人以油棕空果串 (oil palm empty fruit bunch) 水解物為碳源，以錐形瓶培養 *Bacillus cereus suaeda* B-001，PHB 生成量可達細胞重 55.4% [13]。

本研究以 *R. eutropha* 為實驗菌株，於限磷條件下培養 *R. eutropha* 生產 PHB，提高培養基之氮源和碳源，以維持磷源為培養過程中唯一受限之營養源，並適時饋料葡萄糖溶液以維持充足的碳源，*R. eutropha* 於不同溫度 (26、30 及 35°C) 培養，探討菌體量、PHB、淨菌體量之生成量，葡萄糖、氮源及磷源之消耗率，並比較三種溫度之菌體與 PHB 產率、基質消耗率及產率係數。

二、材料與方法

實驗菌株 *R. eutropha* (BCRC 13036, ATCC 17699)

係向新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心購買，為革蘭氏陰性好氣性桿菌，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) 基礎培養基

以基礎培養基進行繼代培養，其組成係以葡萄糖 (20 g/L) 為碳源，添加無機鹽液 (Na_2HPO_4 3.6 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/L, CaCl_2 0.02 g/L, trace metal solution 5.0 mL/L) 配製而成。微量金屬溶液 (trace metal solution) 成分為 Na_2EDTA 6.0 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g/L, H_3BO_3 6.84 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.86 g/L, ZnCl_2 0.06 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.026 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L，磷源為磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀，氮源為硫酸銨。以上試藥均為分析級，購自片山公司和 Merck 公司。

(二) 饋料批次發酵之培養基

饋料批次發酵之限磷培養基，係以葡萄糖 (45 g/L) 為碳源，磷源為磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀的濃度，濃度分別為 0.1 和 0.2 g/L，限制培養基中磷源含量，提高硫酸銨之濃度至 10 g/L。饋料為葡萄糖溶液，當培養基葡萄糖濃度降至 15 g/L，即進行葡萄糖饋料。

(三) 饋料批次發酵培養

饋料批次發酵培養係以 5 L 之發酵槽 (F-5-D, Firstek Science, 台灣) 進行，工作體積為 3 L。利用冷卻循環水槽，設定培養溫度分別為 26、30 及 35°C。起始攪拌轉速為 250 rpm，起始空氣流率為 1 vvm，使其溶氧量達飽和，培養過程中調整攪拌轉速與空氣流速以維持培養基的溶氧量在飽和溶氧量 20% 以上。利用 pH 自動監控儀監控

培養過程之 pH，並以 2 N 氫氧化鈉和 2 N 硫酸溶液調整 pH 於 7.0。

(四) 分析方法

1. 菌體量

菌體量 (biomass) 以烘乾重量法量測。以離心機 (Z 200 A, Hermle) 將 30 mL 之菌液於 2,800 g 離心 20 min，以蒸餾水洗菌 2 次，離心，於 80°C 烘乾至恆重，即得菌體之生質量。淨菌體量 (residual biomass) 為不包含 PHB 之菌體量，即菌體量減去 PHB 含量。

2. 葡萄糖

以 HPLC 分析，偵測器為 RI (refractive index, RID-6A, Shimadzu, Japan)，分析管柱為 MetaCarb 87H (300 x 7.8 mm, Agilent)。

3. 磷源和氮源

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 (OD₇₀₀) (U-2000, Hitachi) 測其吸光值 [2]。培養基之殘留氮源，以凱氏法 (Kjeldahl method) 測定。

4. PHB

利用硫酸切斷 PHB 聚合物之鏈結，形成單體，以甲醇進行甲酯化反應生成 β -羥基丁酸甲酯 (methyl β -hydroxybutyrate)，以氯仿萃取酯化物，再以 GC (G-3000, Hitachi) 分析，分析管柱為 SUPELCOWAXTM-10 capillary column (30 m x 0.53 mm, Supelco) [1]。取烘乾之菌體粉末 0.1 g 於螺紋試管，依序加入甲醇 1.7 mL、硫酸 0.3 mL、氯仿 2.0 mL，以 100°C 恆溫水浴反應 150 min，待溫度降至室溫，加入 0.2 mL 3% (v/v) 苯甲酸甲酯為內標，再加入去離子水 2 mL，充分混勻靜置隔夜，取下層有機相 1 μ L 注入 GC 分析。

三、結果與討論

本研究以 5 L 之發酵槽進行饋料批次發酵培養，工作體積為 3 L。發酵槽之起始轉速 250 rpm，空氣流率 1 vvm，於培養過程中適時調整攪拌速率與空氣流率以維持培養基的溶氧量在飽和溶氧量的 20% 以上。利用 pH 自動監控儀監控培養過程之 pH，以 2 N 氫氧化鈉和 2 N 硫酸溶液調整培養基之 pH 於 7.0。

以硫酸銨為氮源，磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀為磷源，培養過程是以磷源作為限量之營養源，促使 *R. eutropha* 合成



PHB。培養過程分析培養基之葡萄糖濃度，適時進行葡萄糖饋料以提高培養基之葡萄糖濃度，供給菌體足夠之碳源。

本研究以 26、30 及 35°C 為發酵之培養溫度，分析 *R. eutropha* 於此三種培養溫度下，菌體之生質量、PHB 產量、培養基之葡萄糖、氮源及磷源濃度。

(一) 26°C 之饋料批次發酵培養

1. 菌體生長、PHB 合成及基質消耗

圖 1 為 26°C 下培養時程圖，葡萄糖、磷源及氮源之起始濃度分別為 44.56、0.08 及 2.14 g/L，起始菌體量為 0.03 g/L，培養至 12 h，菌體量為 0.20 g/L。培養至 22 h，培養基之磷源被耗盡，磷源消耗率為 $3.64 \times 10^{-3} \text{ g/L} \cdot \text{h}$ ，此時開始

進入無磷之培養狀態。培養至 24 h，菌體量與 PHB 分別為 4.84 與 1.42 g/L，PHB 佔菌體 29.5%，淨菌體量為 3.42 g/L。

培養至 34 h，葡萄糖濃度降至 13.61 g/L，進行第一次饋料葡萄糖溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 19.99 g/L。培養至 36 h，菌體量與 PHB 分別為 14.28 與 8.92 g/L，PHB 佔菌體之 62.5%，淨菌體量為 5.36 g/L。培養至 42 h，葡萄糖濃度再度降至 7.52 g/L，進行第二次饋料葡萄糖溶液，將葡萄糖濃度提高至 17.39 g/L。培養至 48 h，菌體量與 PHB 分別為 20.87 與 11.41 g/L，PHB 佔菌體之 54.7%，淨菌體量為 9.46 g/L，此時葡萄糖濃度為 9.55 g/L，進行第三次饋料葡萄糖溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 18.39 g/L。

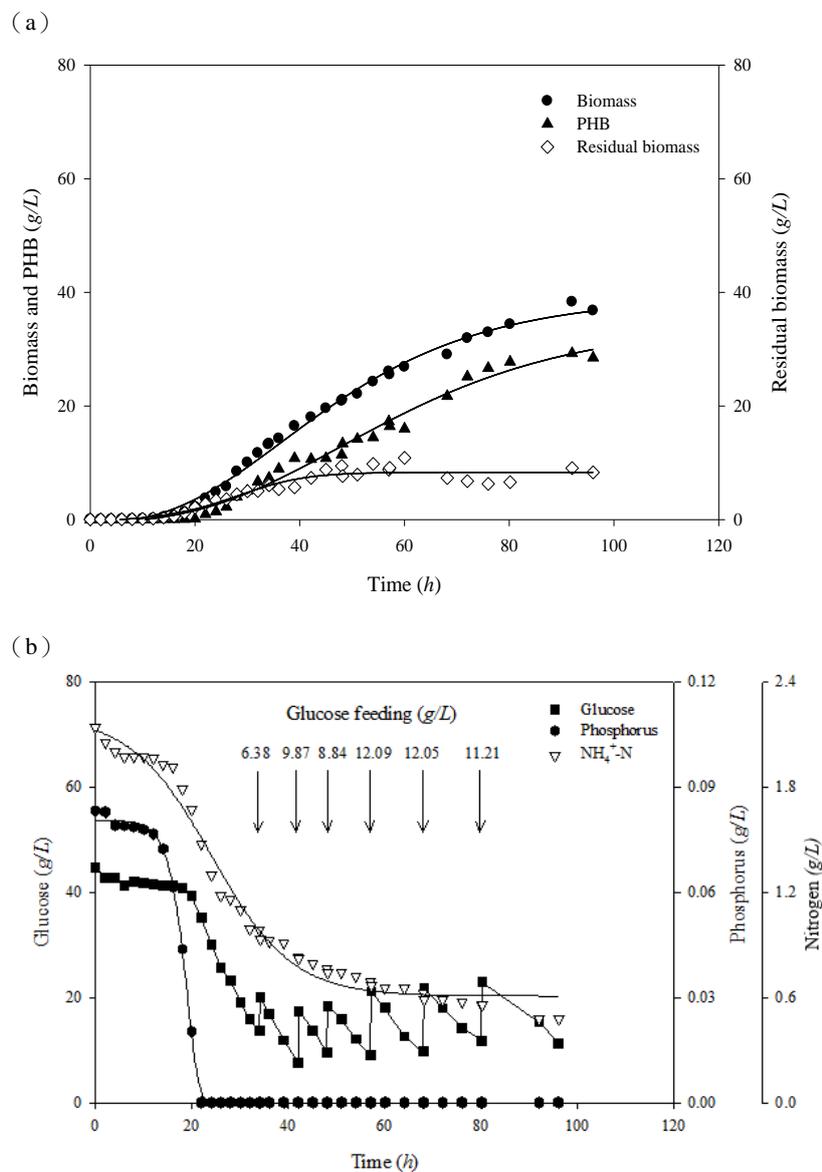


圖 1. 26°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量、葡萄糖、磷源及氮源的變化



培養於 57 h，培養基之葡萄糖濃度降至 9.01 g/L，進行第四次饋料葡萄糖溶液，提高葡萄糖至 21.10 g/L。培養至 60 h，菌體量與 PHB 分別為 26.88 與 15.99 g/L，PHB 約佔菌體之 59.5%，淨菌體量為 10.89 g/L。培養於 68 h，培養基之葡萄糖濃度降至 9.68 g/L，進行第五次饋料葡萄糖溶液，提高葡萄糖濃度至 21.73 g/L。培養至 72 h，菌體量與 PHB 分別為 31.92 與 25.15 g/L，PHB 約佔菌體之 78.8%，淨菌體量為 6.77 g/L。此結果比 Kim 等人以葡萄糖為碳源培養 *Alcaligenes eutrophus*，研究之 PHB 含量最高佔菌體之 76% 為高 [5]。

於 80 h，葡萄糖濃度再度降至 11.711 g/L，此時進行饋料葡萄糖溶液，提高葡萄糖濃度至 22.92 g/L。最終培養至

96 h，葡萄糖與氮源濃度分別為 11.28 與 0.48 g/L，代表此發酵培養基的碳源與氮源仍然充足，確定磷源為唯一限量之營養源，菌體於整個培養過中消耗葡萄糖與氮源分別為 93.72 與 1.66 g/L，而菌體量與 PHB 為 36.79 與 28.49 g/L，PHB 約佔菌體的 77.4%，淨菌體量為 8.30 g/L。

2. 菌體產率與基質消耗率

圖 2 為 26°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量產率與葡萄糖、氮源消耗率。培養於 0~12 h，PHB 產率低，此階段葡萄糖與氮源之消耗率快速上升。培養於 0~24 h，淨菌體量產率大於 PHB 之產率，代表大部分之葡萄糖與氮源於 0~24 h 主要用於菌體生長，圖 1 (b) 顯示磷源於 22 h 耗盡，PHB 產率於此時大幅度增加，顯示

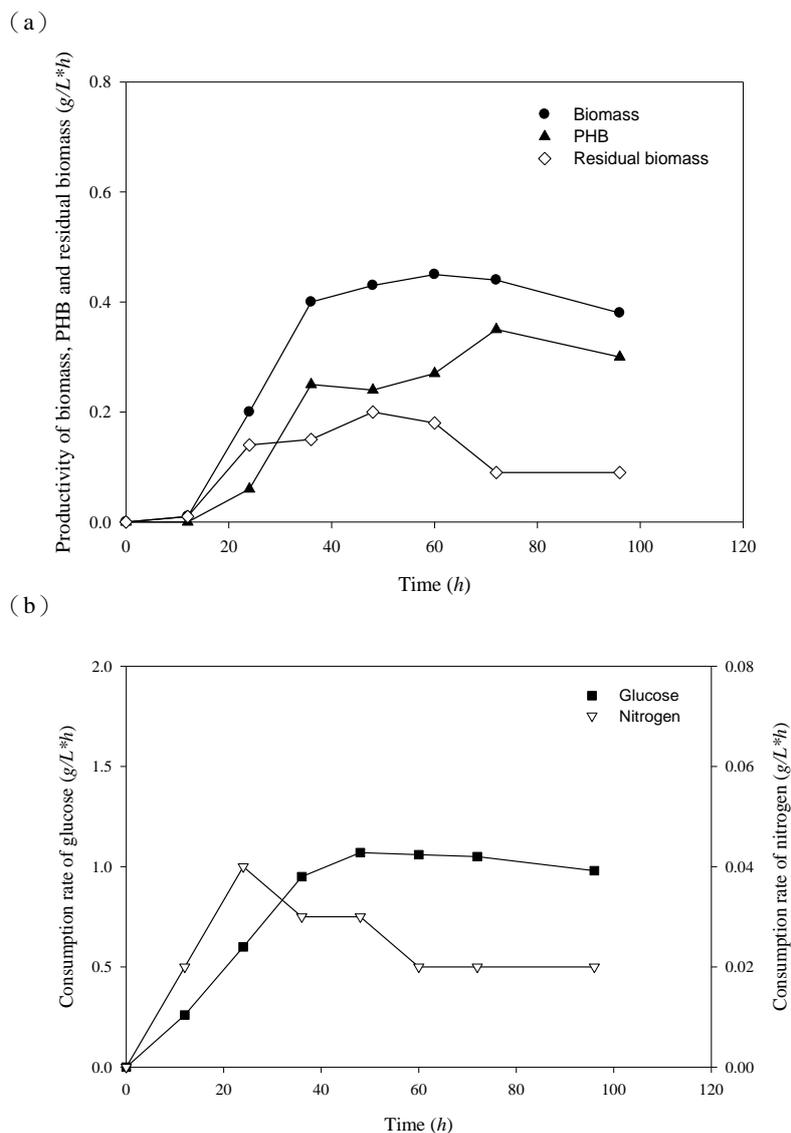


圖 2. 26°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量產率與葡萄糖、氮源消耗率的變化



限磷條件之培養可促使菌體合成 PHB。培養於 36 h，PHB 產率高於淨菌體量產率，菌體量產率隨 PHB 產率而增加，且葡萄糖消耗率仍在增加，氮源消耗率有下降之趨勢，顯示大部分葡萄糖用於菌體合成 PHB。培養至 48 h，淨菌體量產率為 0.20 g/L·h，而後開始下降，表示淨菌體量已逐漸平緩，葡萄糖消耗率 1.07 g/L·h，而後趨於平緩，PHB 產率持續上升，菌體仍穩定地利用葡萄糖合成 PHB。培養至 72 h，菌體量與 PHB 產率分別為 0.44 與 0.35 g/L·h。此結果比 Tsuge 等人以 L-乳酸 (L-lactic acid) 與乙酸 (acetic acid) 混合物為碳源培養 *R. eutropha* 之 PHB 產率 1.30 g/L·h 為低 [11]。因實驗之菌體量較低，導致 PHB 產率低。

3. 產率係數

26°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之產率係數的變化如表 1 所示。培養於 0~12 h， $Y_{P/X}$ 與 $Y_{P/G}$ 皆為 0，表示此階段菌體之 PHB 合成量極少。培養於 12~24 h， $Y_{X/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 快速增加，菌體開始生長並合成 PHB， $Y_{R/G}$ 大於 $Y_{P/G}$ ，表示葡萄糖主要用於菌體生長， $Y_{R/N}$ 迅速提高，菌體大量利用氮源生長。 $Y_{R/G}$ 於培養 24 h 為 0.23，之後開始下降，淨菌體量不再大量合成，大部分葡萄糖用於合成 PHB， $Y_{P/G}$ 開始上升。 $Y_{X/G}$ 於培養 36 h 之後趨於穩定。培養至 72 h， $Y_{P/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 皆達到最大值，分別為 0.33 與 0.79。 $Y_{R/G}$ 和 $Y_{R/N}$ 二者之產率係數隨培養時程先上升而後下降，表示淨菌體量於前期大量合成後，即不再持續快速增加。 $Y_{X/G}$ 、 $Y_{P/G}$ 和 $Y_{P/X}$ 產率係數隨培養時程先快速增加，而後趨於穩定， $Y_{P/X}$ 於培養 72 h 具最大值，表示菌體量合成趨於穩定後，PHB 於菌體內被合成，因而增加產率係數 $Y_{P/X}$ 。 $Y_{P/G}$ 於培養 72 h 為 0.33，平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.33 g，比 Kim 等人研究 *R. eutropha* 之平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30 g 稍高 [5]。

(二) 30°C 之饋料批次發酵培養

1. 菌體生長、PHB 合成及基質消耗

圖 3 為 30°C 培養之菌體量、PHB、淨菌體量、葡萄糖、磷源及氮源的變化。葡萄糖、磷源及氮源之起始濃度分別為 46.03、0.08 及 2.06 g/L，起始之菌體量為 0.01 g/L。培養至 12 h，菌體量與 PHB 分別為 1.08 與 0.21 g/L，PHB 佔菌體之 19.1%，淨菌體量為 0.87 g/L。培養至 16 h，培養基之磷源被耗盡，磷源消耗率為 5.00×10^{-3} g/L·h，開始進入無磷源狀態培養。培養至 24 h，菌體量與 PHB 分別為 13.24

表 1. 26°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之產率係數

Time (h)	$Y_{X/G}$	$Y_{P/G}$	$Y_{P/X}$	$Y_{R/G}$	$Y_{R/N}$
12	0.05	0	0	0.05	0.94
24	0.33	0.10	0.3	0.23	4.02
36	0.42	0.26	0.63	0.16	4.37
48	0.41	0.22	0.55	0.18	6.83
60	0.42	0.25	0.60	0.17	7.28
72	0.42	0.33	0.79	0.09	4.35
96	0.39	0.30	0.78	0.09	4.98

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

$Y_{P/G}$: PHB yield coefficient on glucose

$Y_{P/X}$: PHB yield coefficient on biomass

$Y_{R/G}$: Residual biomass yield coefficient on glucose

$Y_{R/N}$: Residual biomass yield coefficient on nitrogen

與 7.35 g/L，PHB 佔菌體之 55.5%，淨菌體量為 5.89 g/L。培養至 27 h，葡萄糖降至 4.24 g/L，為維持培養基之碳源濃度，進行第一次饋料葡萄糖溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 43.93 g/L。培養至 36 h，菌體量與 PHB 分別為 25.96 與 19.28 g/L，PHB 佔菌體之 74.2%，淨菌體量為 6.68 g/L。培養至 39 h，葡萄糖濃度再度降至 12.23 g/L，進行第二次饋料葡萄糖溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 26.24 g/L。培養至 48 h，菌體量與 PHB 分別為 35.51 與 26.84 g/L，PHB 佔菌體之 75.6%，淨菌體量為 8.67 g/L，此時培養基葡萄糖濃度為 9.35 g/L，進行第三次饋料葡萄糖溶液，饋料後葡萄糖濃度為 47.97 g/L。

培養至 60 h，菌體量與 PHB 分別為 43.47 與 34.21 g/L，PHB 佔菌體之 78.7%，淨菌體量為 9.26 g/L。培養至 72 h，菌體量與 PHB 分別為 49.53 與 38.27 g/L，PHB 約佔菌體之 77.3%，淨菌體量為 11.26 g/L。此時葡萄糖降至 13.91 g/L，再次進行饋料葡萄糖溶液，提高培養基之葡萄糖濃度至 48.21 g/L。

最終培養至 80 h，葡萄糖與氮源濃度分別為 41.48 與 0.48 g/L，代表此發酵培養基的碳源與氮源仍然充足，確定磷源為唯一限量之營養源，菌體於整個培養過中消耗葡萄糖與氮源分別為 131.17 與 1.58 g/L，菌體量與 PHB 為 49.20 與 39.68 g/L，PHB 佔菌體的 80.7%，淨菌體量為 9.52 g/L。研究結果 PHB 佔菌體的 80.7%，較 Tsuge 等人饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之 PHB 含量 73.1% 為高 [11]。

2. 菌體產率與基質消耗率

培養於 0~12 h，PHB 產率相當低，如圖 4 (a) 所示。而後葡萄糖與氮源消耗率開始上升，此時淨菌體量產率大於 PHB 之產率，代表大部分之葡萄糖與氮源於 0~12 h 主要用



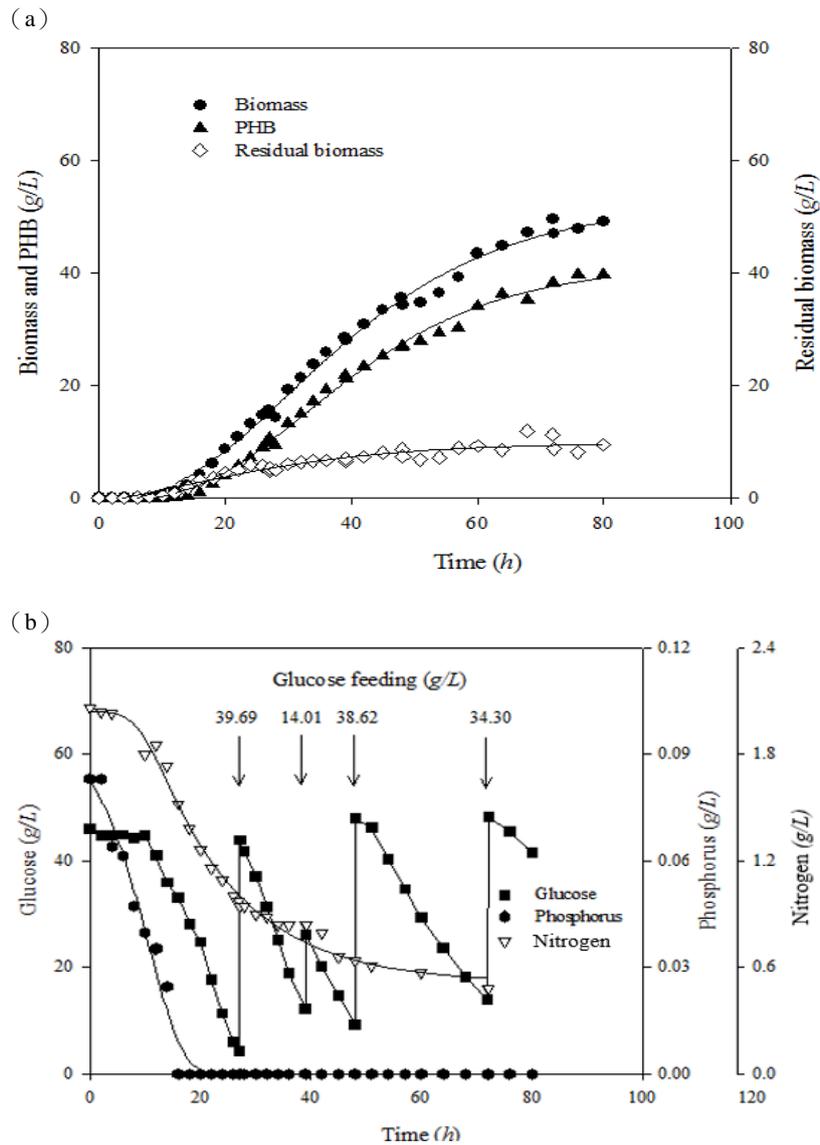


圖 3. 30°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量、葡萄糖、磷源及氮源的變化

於菌體生長。磷源於 16 h 耗盡 (圖 3 (b))，PHB 產率開始大幅增加，證實無磷源之培養可促進菌體合成 PHB，PHB 與菌體量產率皆急遽上升，葡萄糖消耗率增加，PHB 產率高於淨菌體量產率，顯示大部分葡萄糖用於合成 PHB，淨菌體量產率與氮源消耗率皆於 24 h 達到最高，分別為 0.25 與 0.04 g/L · h。培養至 36 h，菌體量產率隨 PHB 產率而增加，葡萄糖消耗率持續增加，氮源消耗率有下降之趨勢，淨菌體量產率開始下降，表示淨菌體量已逐漸有平緩之趨勢。培養至 48 h，菌體量產率達到 0.74 g/L · h，葡萄糖消耗率 1.88 g/L · h，PHB 產率為 0.56 g/L · h。因培養之菌體量較低，PHB 產率仍較 Tsuge 等人之培養 *R. eutropha* 之 PHB 產率 1.30 g/L · h 為低[11]。

3. 產率係數

如表 2 所示，於 12 h， $Y_{P/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 分別為 0.04 與 0.20，顯示菌體已開始累積 PHB， $Y_{R/G}$ 大於 $Y_{P/G}$ ，表示大部分葡萄糖主要用於菌體生長。於 24 h， $Y_{P/G}$ 大於 $Y_{R/G}$ ， $Y_{R/G}$ 開始些微下降， $Y_{P/G}$ 開始上升，表示大部分葡萄糖用於菌體合成 PHB， $Y_{R/N}$ 於 0~24 h 大幅度上升，之後漸趨於平緩，代表淨菌體量在培養初期大量被合成。於 36 h， $Y_{P/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 皆開始趨於平緩，代表菌體合成 PHB 之量漸趨於穩定。於 60 h， $Y_{X/G}$ 、 $Y_{P/X}$ 及 $Y_{P/G}$ 分別達到最大值，依序為 0.40、0.79 及 0.31。培養至 48、60 和 72 h，平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30-0.31 g，與 Kim 等人研究 *R. eutropha* 之平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30 g 相當 [5]。



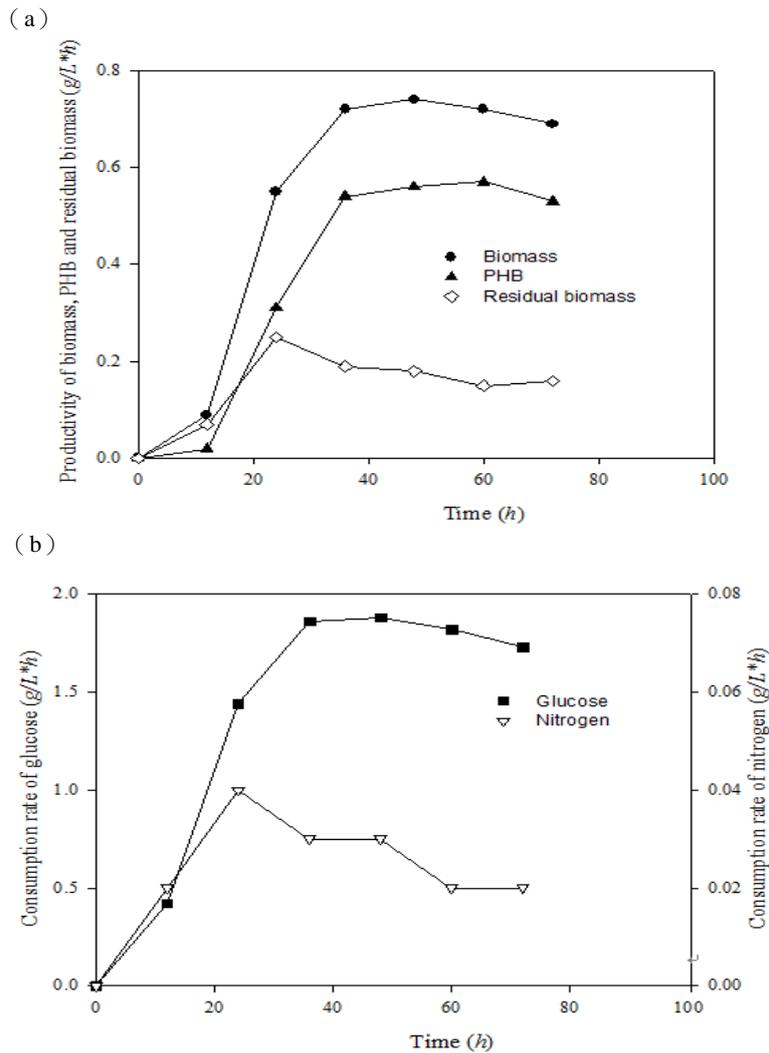


圖 4. 30°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量產率與葡萄糖、氮源消耗率的變化

表 2. 30°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之產率係數

Time (h)	Y_{XG}	Y_{PG}	Y_{PX}	Y_{RG}	Y_{RN}
12	0.21	0.04	0.20	0.17	4.14
24	0.38	0.21	0.56	0.17	6.06
36	0.39	0.29	0.74	0.10	5.48
48	0.39	0.30	0.76	0.10	6.10
60	0.40	0.31	0.79	0.08	6.21
72	0.40	0.31	0.77	0.09	7.12

$Y_{XG}, Y_{PG}, Y_{PX}, Y_{RG}, Y_{RN}$ 如表 1 之備註

(三) 35°C 之饋料批次發酵培養

1. 菌體生長、PHB 合成及基質消耗

圖 5 為 35°C 下培養時程圖，葡萄糖、磷源及氮源之起始濃度分別為 46.83、0.09 及 1.95 g/L，起始菌體量為 0.03 g/L。培養至 12 h，菌體量與 PHB 分別為 1.75 與 0.59 g/L，

PHB 佔菌體之 33.8%，淨菌體量為 1.16 g/L。培養至 18 h，培養基之磷源已被耗盡，磷源消耗率為 $5.00 \times 10^{-3} \text{ g/L} \cdot \text{h}$ ，開始進入無磷源之培養。培養至 24 h，菌體量與 PHB 分別為 10.53 與 5.56 g/L，PHB 佔菌體之 52.8%，淨菌體量為 4.97 g/L。培養基之葡萄糖濃度為 17.58 g/L，進行第一次饋料葡萄糖溶液，提高培養基之葡萄糖濃度至 55.90 g/L。

培養至 36 h，菌體量與 PHB 分別為 21.85 與 15.83 g/L，PHB 約佔菌體之 72.4%，淨菌體量為 6.02 g/L。培養至 42 h，葡萄糖濃度降至 15.87 g/L，進行第二次饋料葡萄糖溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 51.82 g/L。培養至 48 h，菌體量與 PHB 分別為 30.07 與 22.66 g/L，PHB 佔菌體之 75.4%，淨菌體量為 7.41 g/L。培養至 60 h，菌體量與 PHB 分別為 37.63 與 30.20 g/L，PHB 約佔菌體之 80.3%，淨菌體量為 7.43 g/L。培養至 68 h，葡萄糖降至 12.59 g/L，進行饋料葡萄糖



溶液，饋料後培養基之葡萄糖濃度為 53.26 g/L。培養至 72 h，菌體消耗葡萄糖與氮源分別為 112.02 與 1.44 g/L，此時菌體量與 PHB 分別為 40.60 與 33.44 g/L，PHB 約佔菌體之 82.4%，淨菌體量為 7.16 g/L。此結果較 Kim 等人以葡萄糖為碳源培養 *Alcaligenes eutrophus*，PHB 含量 76% 為高 [5]。

最終培養至 80 h，葡萄糖與氮源分別為 42.39 與 0.48 g/L，代表此發酵培養基的碳源與氮源是充足，確定磷源為唯一限量之營養源，菌體於整個培養過中消耗葡萄糖與氮源分別為 116.04 與 1.47 g/L，而菌體量與 PHB 為 45.12 與 34.94 g/L，PHB 約佔菌體的 77.4%，淨菌體量為 10.18 g/L。

2. 菌體產率與基質消耗率

如圖 6 所示，培養於 0~12 h，PHB 產率相當低 0.05 g/L·h，葡萄糖與氮源消耗率開始上升，淨菌體量產率大於 PHB

之產率，代表大部分之葡萄糖與氮源於 0~12 h 主要用於菌體生長。圖 5 (b) 顯示磷源於 18 h 耗盡，PHB 產率於此時開始大幅度增加。培養至 24 h，PHB 產率高於淨菌體量產率，顯示有部分葡萄糖用於合成 PHB，淨菌體量產率與氮源消耗率皆於 24 h 達到最高，分別為 0.21 與 0.03 g/L·h。

培養於 12~36 h，PHB 與淨菌體量產率急遽上升，葡萄糖消耗率增加，菌體量、PHB 產率與葡萄糖消耗率於 36 h 之後，逐漸趨於平緩。培養至 36 h，菌體量產率、PHB 產率與葡萄糖消耗率緩慢增加，淨菌體量產率下降。培養至 48 h，菌體量產率 0.63 g/L·h，PHB 產率為 0.47 g/L·h，葡萄糖消耗率 1.70 g/L·h。培養至 60 h，PHB 產率 0.50 g/L·h。培養至後期，菌體量、PHB 產率與葡萄糖消耗率皆有下降之趨勢。

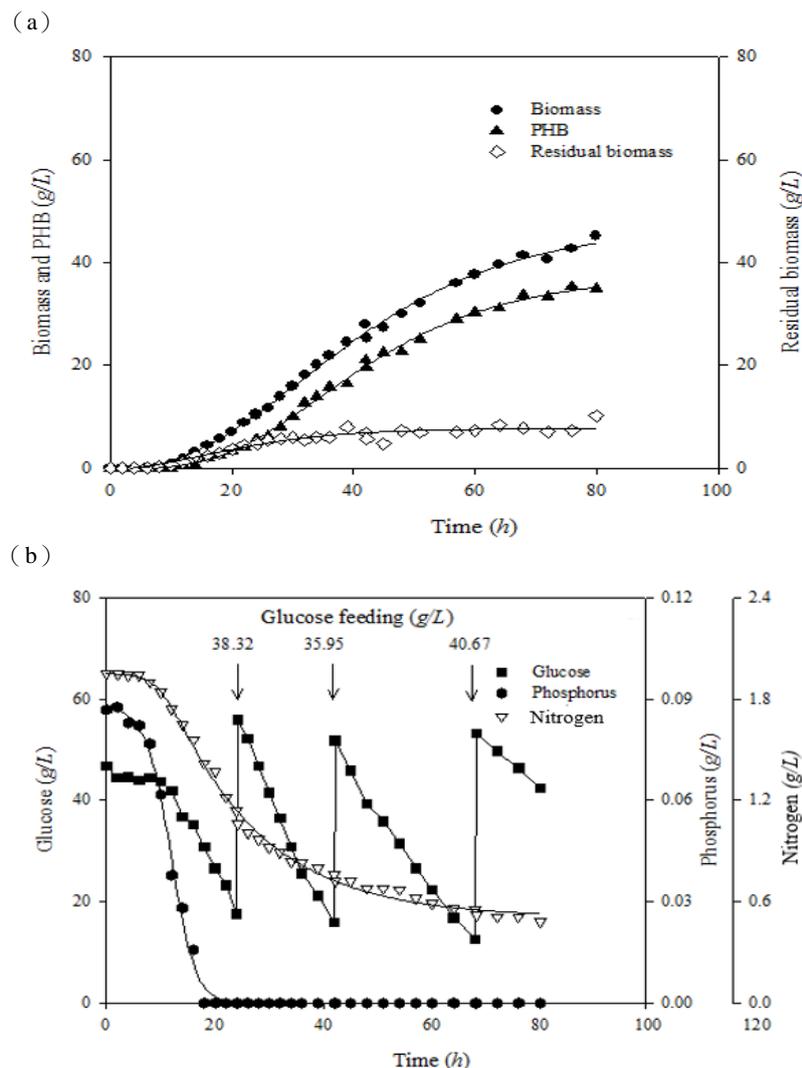


圖 5. 35°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之菌體量、PHB、淨菌體量、葡萄糖、磷源及氮源的變化



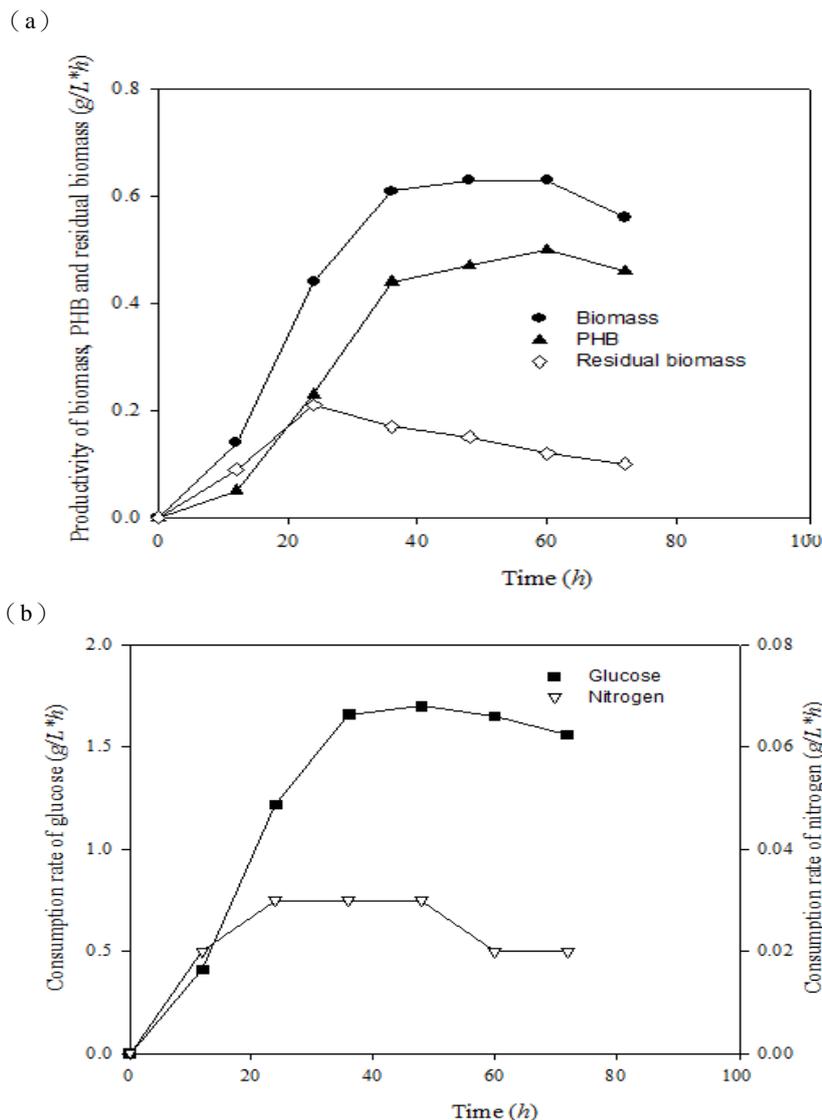


圖 6. 35°C 饋料批次發酵培養 *R. etrophia* 之菌體量、PHB、質量產率與葡萄糖、氮源消耗率的變化

3. 產率係數

如表 3 所示，培養於 12 h， $Y_{P/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 分別為 0.12 與 0.34，代表菌體已開始累積 PHB， $Y_{R/G}$ 大於 $Y_{P/G}$ ，表示葡萄糖用於菌體生長。培養於 24 h， $Y_{P/G}$ 大於 $Y_{R/G}$ ， $Y_{R/G}$ 開始些微下降，大部分葡萄糖用於菌體合成 PHB， $Y_{X/G}$ 趨於平穩， $Y_{R/N}$ 於 0~12 h 大幅度上升，之後漸趨於平緩。培養於 36 h， $Y_{P/G}$ 與 $Y_{P/X}$ 趨於平緩，代表菌體所合成 PHB 漸趨於一定值。培養於 60 h， $Y_{X/G}$ 與 $Y_{P/G}$ 達到最大值，分別為 0.38 與 0.31， $Y_{P/X}$ 為 0.80。於 72 h， $Y_{P/X}$ 為 0.82。培養至 60 和 72 h，平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30-0.31 g，與 Kim 等人研究 *R. etrophia* 之平均葡萄糖 1 g 可合成 PHB 0.30 g 相當 [5]。

(四) 26、30 及 35°C 饋料批次發酵培養之比較

1. 菌體量與 PHB 產率

比較圖 2 (a)、4 (a) 和 6 (a) 之菌體量和 PHB 產率，0-12 h 培養之菌體量產率隨著培養溫度增加而增加。培養至 12 h 後，以 30°C 培養之菌體量產率和 PHB 產率較高，三種溫度培養之菌體量產率和 PHB 產率皆於 36 h 後趨於平緩。26°C 培養至 60 h，菌體量產率最高 0.45 g/L·h，30°C 培養至 48 h，菌體量產率最高 0.74 g/L·h，35°C 培養至 48 h，菌體量產率最高 0.63 g/L·h，表示提高培養溫度，可縮短達最高菌體量產率之時程。26°C 培養至 72 h，PHB 產率達最高 0.35 g/L·h，30°C 培養至 60 h，PHB 產率達最高 0.57 g/L·h，35°C 培養至 60 h，PHB 產率達最高 0.50 g/L·h，與菌體量產率趨勢類似，提高培養溫度，可縮短最高 PHB 產率之時程。



表 3. 於 35°C 饋料批次發酵培養 *R. eutropha* 之產率係數

Time (h)	$Y_{X/G}$	$Y_{P/G}$	$Y_{P/X}$	$Y_{R/G}$	$Y_{R/N}$
12	0.35	0.12	0.34	0.23	5.38
24	0.36	0.19	0.53	0.17	6.10
36	0.37	0.27	0.73	0.10	5.36
48	0.37	0.28	0.75	0.09	5.80
60	0.38	0.31	0.80	0.07	5.44
72	0.36	0.30	0.82	0.06	4.95

$Y_{X/G}$, $Y_{P/G}$, $Y_{P/X}$, $Y_{R/G}$, $Y_{R/N}$ 如表 1 之備註

如圖 2 (a)、4 (a) 和 6 (a) 之淨菌體量產率所示，與菌體量產率相同，12 h 前之淨菌體量產率隨著溫度而提高，30 與 35°C 培養之淨菌體量產率較 26°C 培養之淨菌體量產率高，提高培養溫度可加速淨菌體量產率。培養於 12-24 h，30°C 培養之淨菌體量產率較高，而後 30 與 35°C 之淨菌體量產率開始下降。26°C 培養之淨菌體量產率持續增加，於 48 h 之淨菌體量產率才開始下降。26°C 培養至 48 h，淨菌體量產率達最高 0.20 g/L · h，30°C 培養至 24 h，淨菌體量產率達最高 0.25 g/L · h，35°C 培養至 24 h，淨菌體量產率達最高 0.21 g/L · h。

綜合以上實驗結果，30°C 的培養具有最高之菌體量產率、淨菌體量產率和 PHB 產率，顯示於三種溫度之饋料批次發酵培養，30°C 是較適宜的培養溫度。

2. 基質消耗率

培養過程葡萄糖消耗率列於圖 2 (b)、4 (b) 和 6 (b)，大小依序為 30、35 及 26°C。培養於 12 h 後，30 與 35°C 之葡萄糖消耗率明顯高於 26°C，且三種溫度之葡萄糖消耗率皆於 36 h 起趨於平穩。較低溫度之培養，抑制菌體生長與 PHB 合成，因而葡萄糖消耗率較低。培養於 48 h，26、30 及 35°C 之葡萄糖消耗率達到最大值，分別為 1.07、1.88 及 1.70 g/L · h，此時是菌體量產率和 PHB 產率接近最高點，因而對葡萄糖消耗率達最大值。30 與 35°C 培養之葡萄糖消耗率於培養後期有些微下降之趨勢，表示培養後期菌體與 PHB 已不再大量生長與合成，因而下降。氮源消耗率如圖 2 (b)、4 (b) 和 6 (b) 所示，菌體生長於培養初期需要氮源，培養於 24 h，三種培養溫度之氮源消耗率皆達到最大值，依序為 0.04、0.04 及 0.03 g/L · h。

3. 產率係數

比較不同培養溫度之產率係數，如表 1、表 2 和表 3 所示。26、30 及 35°C 培養之 $Y_{X/G}$ (biomass yield coefficient on glucose) 分別於 36、24 及 12 h 趨於平穩，顯示增加培養溫

度可縮短 $Y_{X/G}$ 達平衡的時間。26°C 培養至 36 h $Y_{X/G}$ 最大值 0.42，30 與 35°C 培養至 60 h， $Y_{X/G}$ 之最大值分別為 0.40 與 0.38。

培養於 0~12 h，除 26°C 培養外， $Y_{P/G}$ (PHB yield coefficient on glucose) 隨培養溫度增加而急速上升。26°C 於 0~12 h 培養，其 $Y_{P/G}$ 值為 0，表示於此期間無 PHB 被合成，葡萄糖主要用於合成菌體量，而 30 與 35°C 於 0~12 h 培養，已有 PHB 被合成。三種溫度之 $Y_{P/G}$ 於 36 h 趨於平穩。

$Y_{P/X}$ (PHB yield coefficient on biomass) 隨培養溫度增加而增加。26°C 培養之 $Y_{P/X}$ 於 12~36 h 開始急速上升，30 與 35°C 培養之 $Y_{P/X}$ 於開始培養即快速上升。三種溫度培養之 $Y_{P/X}$ 於 36 h 趨於平穩，培養過程，以 30 與 35°C 培養之 $Y_{P/X}$ 值接近。26°C 培養至 72 h $Y_{P/X}$ 最大值 0.79，30°C 培養至 60 h $Y_{P/X}$ 最大值 0.79，35°C 培養至 72 h $Y_{P/X}$ 最大值 0.82。

於 0~12 h， $Y_{R/G}$ (residual biomass yield coefficient on glucose) 隨溫度增加而上升，其中 26°C 之 $Y_{R/G}$ 於 12~24 h 開始急速上升，而 30 與 35°C 之 $Y_{R/G}$ 於 0~12 h 已開始上升，26°C 之 $Y_{R/G}$ 於 24 h 後開始下降，而 30 與 35°C 之 $Y_{R/G}$ 則是於 12 h 開始下降，於整個培養過程中，以 30 與 35°C 之 $Y_{R/G}$ 變化較為接近。26°C 培養至 24 h，可得 $Y_{R/G}$ 之最大值 0.23，30°C 培養至 12 h，可得 $Y_{R/G}$ 之最大值 0.17，35°C 培養至 12 h，可得 $Y_{R/G}$ 之最大值 0.23。

於 0~24 h， $Y_{R/N}$ (residual biomass yield coefficient on nitrogen) 隨培養溫度增加而增加，三種溫度之 $Y_{R/N}$ 皆於 24 h 趨於平穩，但 26°C 之 $Y_{R/N}$ 於 36~60 h 仍上升，整個培養過程中，以 30 與 35°C 之 $Y_{R/N}$ 較為接近。以 26°C 培養至 60 h，可得 $Y_{R/N}$ 之最大值 7.28，以 30°C 培養至 72 h，可得 $Y_{R/N}$ 之最大值 7.12，以 35°C 僅培養至 24 h，即可得 $Y_{R/N}$ 之最大值 6.10。

四、結論

本研究係以 *R. eutropha* 為實驗菌株，限制培養基之磷源含量，於發酵培養過程中給予菌株足夠之氮源與碳源，以 26、30 及 35°C 作為培養溫度，探討 *R. eutropha* 於不同溫度下，其菌體量、PHB、淨菌體量之生長情形，葡萄糖、氮源及磷源之消耗情形，並比較三種溫度之產率係數。

提高培養溫度可縮短菌體進入對數生長期時程。不同培養溫度，以 30°C 培養之菌體量、PHB 生合成量、淨菌體量較高，其葡萄糖消耗率較高。氮源消耗率隨培養溫度升高而



下降，顯示 *R. eutropha* 於較低溫或較高溫生長會受抑制，進而影響菌體量、PHB 合成量、淨菌體量。不同培養溫度 26、30 及 35°C，其菌體量產率分別可達 0.45、0.74 和 0.63 g/L · h，PHB 產率分別可達 0.35、0.57 和 0.50 g/L · h。

26°C 於 0~12 h 培養，其 $Y_{P/G}$ (PHB yield coefficient on glucose) 值為 0，表示於此期間無 PHB 被合成，葡萄糖主要用於合成菌體量，而 30 與 35°C 於 0~12 h 培養，已有 PHB 被合成。 $Y_{X/G}$ 、 $Y_{P/G}$ 和 $Y_{P/X}$ 產率係數，26°C 培養，三種產率係數最高依序為 0.42、0.33 及 0.79，30°C 培養，三種產率係數最高依序為 0.40、0.31 及 0.79，35°C 培養，三種產率係數最高依序為 0.38、0.31 及 0.82。實驗結果顯示，30°C 的培養具有較高之菌體量產率、淨菌體量產率和 PHB 產率，顯示於三種溫度之饋料批次發酵培養，30°C 是較適宜的培養溫度，於較短時間內可得到較高之 PHB 產量。

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. Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiology Reviews*, 54(4), 450-472.
4. Arias, D. M., E. Uggetti, M. J. García-Galán and J. García (2018) Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: Effect of nutrients limitation and photoperiods. *New Biotechnology*, 42, 1-11.
5. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang and S. I. Woo (1994) Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnology and Bioengineering*, 43(9), 892-898.
6. Liebergesell, M., K. Sonomoto, M. Madkour, F. Mayer, A. Steinbüchel (1994) Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules, *European Journal of Biochemistry*, 226(1), 71-80.
7. Nygaard, D., O. Yashchuk and É. B. Hermida (2019) Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon*, 5, Article e01374, 1-18.
8. Pena-Jurado, E., S. Perez-Vega, F. J. de la Serna, I. Perez-Reyes, N. Gutierrez-Mendez, J. Vazquez-Castillo and I. Salmeron (2019) Production of poly(3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development and simulation. *Biochemical Engineering Journal*, 151, Article 107324, 1-9.
9. Sharma, V., S. Misra and A. K. Srivastava (2017) Developing a green and sustainable process for enhanced PHB production by *Azohydromonas australica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 122-129.
10. Tsai, J. C., S. L. Aladegbami and G. R. Vela (1979) Phosphate-limited culture of *Azotobacter vinelandii*, *Journal of Bacteriology*, 139(2), 639-645.
11. Tsuge, T., K. Tanaka and A. Ishizaki (2001) Development of a novel method for feeding a mixture of L-lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-D-3-hydroxybutyrate production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91 (6), 545-550.
12. Yamane, T. and S. Shimizu (1984) Fed-batch techniques in microbial processes, *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*, 30, 147-194.
13. Yustinah, N. H., R. Alamsyah, A. M. Rosland, H. Hermansyaha and M. Gozana (2019) Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus suaeda* B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, Article 101019, 1-7.

收件：109.03.19 修正：109.05.27 接受：109.07.08

