

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顏宏偉 博士

醋酸根離子與疊氮化鈉對 *Clostridium acetobutylicum*

生產 butanol 影響之探討

Effects of CH_3COO^- and NaN_3 on the butanol production

by *Clostridium acetobutylicum*

研究生：李宜珈 撰

中華民國 98 年 6 月

致謝

首先誠摯感謝指導老師 顏宏偉老師的指導與教誨，使我得以順利完成論文，而在老師嚴謹的做事態度和無私的付出帶領下，建立我在研究上該有的獨立思考精神以及圓融的待人處事態度，同時對於研究上的疏失也都能以寬宏包容的態度給予我支持與鼓勵，使我在研究所的兩年光陰裡受益甚多，在此謹致上由衷的謝意。同時亦要感謝口試委員劉永銓教授、游吉陽副教授、黃啓裕老師及楊芳鏘教授對本論文所提出的寶貴建議與細心審閱，使其得以更臻完善。

在研究所求學期間，承蒙系上教授費心指導外，還要感謝實驗室學長姐嘉鴻、素敏、子元、馨怡、秀玲，同學憶芝、采竹、昌宇以及學弟妹嘉麟、瑞真、宜婷、舒詩，在學業與生活上的協助與照顧，同時亦要感謝學長姐美嬋、琪偉、陞贏、華良、孟村，同學青旂和朋友佳仁、啟銘、聖祐、修吉、孟琪、冠禎等，在念研究所期間給予我鼓勵與幫助，讓我可以順利地完成學業。

最後，謹將此論文獻給我敬愛的母親等家人，因為有你們的支持與鼓勵才能讓我無後顧之憂的全心投入於研究，順利完成學業，並在至均的關懷與照料下使我的人生更加地多彩多姿。另外，對許多未提及的師長及友人的默默相助，在此致上我最誠摯的謝意。謝謝你們！

摘要

本研究方向主要是探討 *Clostridium acetobutylicum* BCRC 10639 液態發酵培養製程中，醋酸根離子 (CH_3COO^-) 以及疊氮化鈉 (NaN_3) 的添加對於丁醇 (butanol) 生成之影響性。在小型搖瓶實驗中，首先探討不同碳、氮源濃度對於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 之影響，待基礎培養基確立後，則各別進行 CH_3COO^- 及 NaN_3 的添加試驗。

文獻中指出醋酸 (acetate) 的添加有助於防止菌體衰退，並增加溶劑生產穩定性，且從代謝路徑分析發現，添加 acetate 可經由 CoA-transferase 的作用進一步將路徑中的丁酸 (butyrate) 轉為 butanol。因此在小型搖瓶實驗中，首先討論不同濃度醋酸鈉 (CH_3COONa) 添加下，對於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 之影響，待確定出適當濃度後，再以改變不同種類的 CH_3COO^- 做進一步探討。

由實驗結果顯示，添加 20 mM CH_3COONa 對於增加 butanol 產量的效果較為明顯，butanol 濃度與對照組相比，發酵 48 hr 後可從 7.89 g/l 上升至 9.33 g/l，產量約提升 18%。由於 CH_3COONa 對於 butanol 的生成有明顯效益，因而進一步探討不同種類的 CH_3COO^- 於 20 mM 添加對 butanol 的影響。實驗結果得知， CH_3COO^- 不論是與帶+1 價、+2 價的金屬離子或是與帶+1 價的非金屬離子結合，對於 butanol 產量的影響都是相近的，顯示出 CH_3COO^- 有助於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol，但與其結合之陽離子無關。

根據文獻提出 acetate 雖可加快 butanol 生成，但卻有降低菌體生長速率之可

能，因此本研究擬進行將添加 20 mM CH_3COO^- 培養基，於發酵 36 hr 後離心移除 CH_3COO^- 培養液，接續置換於 50、70、90 g/l 葡萄糖 (glucose) 培養基的置換實驗，其目的為使 *C. acetobutylicum* 加快進入產 butanol 階段，再利用置換去除 CH_3COO^- 以增進菌體生長，連帶達成提升 butanol 產量之作用。實驗數據顯示，置換於 50 g/l glucose 的與對照組 (未置換) 相比，butanol 最高產量由 9.33 g/l 上升至 9.99 g/l，產量僅提升 7%，而就置換於 70、90 g/l glucose 而言，產量雖可大幅提升 27-40%，但仍有明顯的 butanol 抑制情形。

由前述實驗結果推斷， CH_3COO^- 無法大量提升 butanol 產量可能是 butyrate 濃度不足，因此進一步探討同時添加 acetate、butyrate 對 butanol 產量的影響。而實驗數據表示，以發酵 24 hr 後添加有機酸的效果較好，butanol 產量約提昇 18%，證實 butanol 生成除了在 acetate 的幫助下，還必須要有足夠的 butyrate 才可使產量明顯提升。

NaN_3 添加部份，改變不同的 NaN_3 添加濃度及添加時間去抑制 hydrogenase 活性，探討對 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 之影響。實驗結果發現，添加 NaN_3 不僅有助於 butanol 之生成，還可提升 butanol 於產物 (solvents) 中所佔比例，其中又以 2 mg/l NaN_3 所生產之 butanol 產量較佳，butanol 濃度由 6.7 g/l 上升至 8.8 g/l，產量約提昇 31%。

關鍵字：丁醇、生質燃料、疊氮化鈉、醋酸根離子、*Clostridium*

Abstract

Butanol is an important intermediate in chemical synthesis and also is regarded as a potential fuel or fuel additive as compared to the traditional additive-alcohol. The objective of this study is to investigate the possible influences of CH_3COO^- and NaN_3 added on butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* BCRC 10639. Firstly, the concentrations of carbon source and nitrogen source were tested to determine the optimal ferment medium, then we further discuss the effects of addition CH_3COO^- and NaN_3 on the solventogenesis stage of butanol production.

The results of CH_3COO^- adding experiments showed 20 mM CH_3COONa could increase as high as 18% of butanol concentration. Furthermore, in the experiment of CH_3COO^- medium replacement suggested that biomass was improved by 62% and the butanol productivity was increased by up to 47%.

The addition of NaN_3 in the medium had shown that the production of butanol was enhanced at 2 mg/l NaN_3 added, which led to the increase of ratio of butanol/solvents. The butanol concentration was increased from 6.7 to 8.8 g/l under this fermentation conditions.

Key word: Butanol, biofuel, sodium azide, CH_3COO^- , *Clostridium*

目錄

中文摘要	III
英文摘要	V
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	X
第一章 緒論	1
第二章 文獻回顧	2
2.1 生質燃料	2
2.2 生物丁醇 — Butanol	4
2.2.1 以發酵程序產 butanol 之進展	4
2.2.2 Butanol 的應用	6
2.3 Butanol 生產方式	8
2.3.1 Butanol 的合成和代謝	8
2.3.2 生產 butanol 之菌種	10
2.4 影響 butanol 發酵之環境因子	12
2.4.1 pH 值影響	12
2.4.2 有機酸影響	13
2.4.3 Hydrogenase 影響	14

2.5 Acetate 的添加效應	15
2.6 NaN ₃ 的添加效應	16
第三章 實驗材料與方法	17
3.1 實驗菌株	17
3.2 實驗藥品	17
3.3 實驗儀器	19
3.4 分析方法	20
3.4.1 Biomass 分析	20
3.4.2 代謝產物濃度分析	20
3.4.3 Glucose 分析方法	20
3.5 實驗方法	21
3.5.1 菌種培養	21
3.5.2 培養基組成	22
3.6 實驗培養條件	24
3.6.1 碳源濃度的影響	24
3.6.2 兩段式碳源添加的影響	24
3.6.3 總氮源濃度的影響	24
3.6.4 添加 CH ₃ COONa 的影響	25
3.6.5 添加 CH ₃ COO ⁻ 的影響	25

3.6.6	CH ₃ COO ⁻ 的培養基置換試驗	25
3.6.7	添加 acetate 和 butyrate 的影響	26
3.6.8	添加 NaN ₃ 的影響	26
3.6.9	攪拌式發酵槽實驗	26
第四章 結果與討論		28
4.1	研究架構	28
4.2	碳源濃度之影響	29
4.4	總氮源濃度之影響	35
4.5	CH ₃ COONa 添加之影響	37
4.6	CH ₃ COO ⁻ 添加之影響	40
4.7	CH ₃ COO ⁻ 的培養基置換試驗	42
4.8	添加 acetate、butyrate 之影響	44
4.9	NaN ₃ 添加之影響	46
4.10	攪拌式發酵槽實驗	48
第五章 結論與未來展望		50
5-1	結論	50
5-2	未來展望	52
參考文獻		53
附錄		57

圖目錄

圖 2-1 Butanol 結構式	4
圖 2-2 Fermentation pathways in <i>C. acetobutylicum</i>	9
圖 4-1 實驗架構	28
圖 4-2 不同 glucose 濃度對 butanol 之影響	30
圖 4-3 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 50 g/l)	32
圖 4-4 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 70 g/l)	33
圖 4-5 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 90 g/l)	34
圖 4-6 不同總氮源濃度對 butanol 等產物之影響	36
圖 4-7 CH ₃ COONa 對 biomass 及 glucose 之影響	38
圖 4-8 CH ₃ COONa 對 butanol 等產物之影響	39
圖 4-9 不同 CH ₃ COO ⁻ 添加之影響	41
圖 4-10 NaN ₃ 添加對 butanol 等產物之影響	47

表目錄

表 2-1 液態燃料之特性	3
表 2-2 Butanol 之應用	7
表 2-3 Ethanol 和 Butanol 之特性	7
表 2-4 Solventogenic clostridia 對碳源的利用情形	11
表 3-1 種瓶培養基組成	22
表 3-2 發酵培養基組成	23
表 3-3 Mineral salt solution 組成	23
表 4-1 CH_3COO^- 培養基的置換	43
表 4-2 Acetate 與 butyrate 添加之影響	45

第一章 緒論

自二次世界大戰開始，伴隨著工業化的發展，人們對於能源的依賴程度日益趨增，能源供應問題首當成為世界各國最受關注的焦點。然而在人口急遽膨脹、科技文明迅速拓展的情況下，大多數的非再生能源，如煤、石油、天然氣等經人類大量使用後，其蘊含量日益縮減；面對化石燃料即將耗盡、溫室效應、全球暖化的考量下，尋求乾淨、可再生的新能源已是刻不容緩之課題。

生物丁醇 (butanol) 已被視作替代能源開發主流之一，與同為醇類燃料的生質酒精 (ethanol) 相比，不論是就揮發性、腐蝕性、吸水性、安全性而言，還是在能源含量、與燃料添加結合等方面，皆具有一定的優勢 (Lee et al., 2008)；此外，在使用高比率 butanol 添加的混合汽油燃料時，車輛的引擎系統規格亦不必做變更，因而於 2006 年 6 月美國杜邦公司 (Du Pont) 與英國石油公司 (BP) 共同宣佈，將合作開發次世代生質燃料—butanol 的全球化事業，在研發、生產、商品化等領域全面拓展合作關係；由此可預估生質丁醇將在未來的國際市場上佔有一席之地，具有相當大的發展潛力。

第二章 文獻回顧

2.1 生質燃料

早期所指的生質能源是將都市垃圾、工業廢水、製糖副產物、牲畜排泄物、林業廢棄木屑與農業廢棄物等有機物，藉由自然或人為化學處理轉換成可利用的燃料，這種燃料就是生質能源。不過現今較受人矚目的生質燃料與上述不盡相同，差別在於原料的選擇。利用薯類、玉米、大豆、高粱等農作物中的澱粉成分，或把草、稻桿、豆莢、樹枝等的纖維素水解處理後，經微生物發酵所形成的產物，如氫氣、乙醇、丁醇等即為目前所謂的生質燃料。

生質燃料為一種再生能源，其優勢在於所使用的原料為可永續生產的生質 (biomass) 資源；此外生質燃料還具有多種優點，如提供低硫燃料以降低空氣污染、減少農作殘餘物處理上的負擔、將工業廢料及城市垃圾轉換成電力或熱能來維護環境品質，同時減低堆置掩埋所需的土地等；而與原有的礦物燃料相比更具有高燃點、高含氧、潤滑性佳、燃燒性能好之特質，它的生物可降解性亦對土壤及水的污染傷害低。由此可見，生質燃料對於環境保護和能源替代的效益極佳，為目前能源開發中最具潛力之焦點。

表 2-1 液態燃料之特性 (Ezeji and Blaschek, 2006)

Characteristic	Gasoline	Diesel	Methanol	Ethanol	Butanol
Formula	C ₄ -C ₁₂ hydrocarbons	C ₁₄ -C ₂₀ hydrocarbons	CH ₃ OH	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH
Boiling Point (°C)	32-210	204-343	65	78	118
Energy density (MJ/L)	32	38.6	16	19.6	29.2
Air-fuel ratio	14.7	14.6	6.5	9.0	11.2
Specific energy (MJ/kg air)	2.9	-	3.1	3.0	3.2
Lower heating value (MJ/kg)	44.5	43.0	19.6	26.9	33.1

2.2 生物丁醇 — Butanol

2.2.1 以發酵程序產 butanol 之進展

丁醇 (*n*-butanol, 簡稱 butanol) 為透明無色液體，具腐臭味，分子量為 74.12 g/mol，可溶於醇、醚及其他有機溶劑之中，且微溶於水，是重要的精細化工原料；其分子式為 $C_4H_{10}O$ ，分子結構如圖 2-1 所示。

採用微生物發酵方式生產 butanol 早在 1861 年就由 Louis Pasteur 所發表；其後又有 Weizmann 在 1912 年所提出的 ABE (acetone-butanol-ethanol) 發酵法，更是將 butanol 於發酵領域之研究向前推進了一步 (Ezeji et al., 2006)，同時亦被世界各地的學者們持續研究、探討；此外也因其具備相當廣泛之用途，可做為化學合成中間物、溶劑、萃取劑和增塑劑等，更有其他企業將之工業化生產。但在石化合成技術迅速發展的 1960 年代，由於發酵生產所需原料成本高、程序複雜且產物回收不便，此發酵程序則逐漸被較具經濟效應的化學合成法取代，造成以生物方式生產 butanol 之研究停滯，僅剩南非、蘇聯等國因受到國際禁運而缺乏石油，所以仍持續進行發酵製程。而在 1973 年能源危機發生，隨著石油資源日益緊缺造成原油價格竄升，世界各地紛紛投入利用可再生資源來取代石油原料的研究，進一步促使以各種微生物發酵之研究重新顯示出其優勢並再次興起。

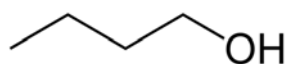


圖 2-1 Butanol 結構式

在這近 150 年的漫長歷史中，以微生物產 butanol 之方法不僅累積豐富的生產經驗，更奠定往後發酵程序上的基礎；由於產物本身具有嚴重的抑制效應，當 butanol 濃度達 1% 即抑制細胞生長，影響發酵生產，造成 butanol 產量難以有較高濃度之生成，所以在過去幾年亦嘗試利用各式方法來克服低產量之問題，包括 gas stripping、liquid-liquid extraction、perstraction 和 pervaporation 等方法 (Ezeji et al., 2007)。

目前，butanol 已被認定可作為生質能源的醇類燃料，其本身獨特的化學結構與 ethanol 相比更具多方面優勢，所以現今已有杜邦 (Du Pont) 和英國石油公司 (British Petroleum, BP) 一起合作開發、生產更為完善的 ethanol 替代品— butanol，此研究不僅能改善石油危機所帶來之衝擊，也為人們製造更具環保的能源，富有相當的發展前景。

2.2.2 Butanol 的應用

Butanol 為重要的有機化學原料，主要用途是做植物油、生物鹼、有機染料和印刷油墨之溶劑，它可溶解油類、樹脂、蠟質等，也用於生產鄰苯二甲酸二丁酯 (DBP)、鄰苯二甲酸苯基丁酯 (BBP) 等增塑劑及醋酸丁酯、丙烯酸丁酯等化學品；除了在塗料、製藥、化妝品、有機合成和塑膠工業等方面有著廣泛的應用外，還可做為醫療上殺菌用，此外亦被視作現今熱門的生質燃料 (表 2-2)。

其引人之處不只在於它的生物可再生性，更取決於可和傳統能源一併使用，且能直接應用於原有機械上之優勢，如此一來便可大幅降低傳統能源損耗，以及減少機械改造之問題。與同屬醇類燃料的 ethanol 相比，其本身獨特的化學結構使之享有多項優點 (表 2-3)，不僅與燃料添加劑和潤滑劑的結合性較好，同時對水的溶解度、吸收度也比 ethanol 小的多，相較之下具有更高的能源含量；且在運輸儲存方面，butanol 可利用現有管線輸送至所需各地，而無運送安全上的顧慮，因此被歸為是更優於 ethanol 之替代能源 (Qureshi et al., 2007)。

表 2-2 Butanol 之應用

Applications	Used / Methods*
Solvents	for paints, varnishes, resins, gums, camphor, fats and waxes
Plasticizers	to improve how a plastic material processes
Coatings	as a solvent for a variety of applications, such as curable lacquers
Chemosynthesis	for producing other chemicals and plastics, including safety glass
Textiles	as a swelling agent and manufacturing garments from fabric
Cosmetics	including eye makeup, foundations, lipsticks & shaving products
Medicine	Drugs and antibiotics, hormones, and vitamins
Fuel	as a direct replacement of gasoline or as a fuel additive
Others	Cleaners, flotation agents, floor polishes etc.

*<http://www.dow.com/webapps/lit/litorder.asp?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00247>

表 2-3 Ethanol 和 Butanol 之特性 (David Ramey, 2007; Smith, 2008)

	Ethanol	Butanol
Energy content (Btu/gal)	84,000	105,000
Solubility (ml/100 ml H ₂ O)	infinite	9.1
Air/fuel ratio	9.0	11.2
Mileage (mpg)	17.6	25
Additive ratio (%)	85	100
Corrosive	higher	lower
Shipment	rail, barge or truck	fuel pipelines

2.3 Butanol 生產方式

2.3.1 Butanol 的合成和代謝

透過發酵來生產 butanol 的反應代謝路徑如圖 2-2 所示，主要依其生成產物不同而分為產酸期 (acidogenesis) 和產溶劑期 (solventogenesis) 兩階段。首先，於發酵前期 *Clostridium acetobutylicum* 利用 glucose 行經 glycolysis 路徑產生 acetyl-CoA、acetoacetyl-CoA 和 butyryl-CoA，同時釋放出 CO₂ 和 H₂，接著再由 acetyl-CoA、butyryl-CoA 進一步生成大量的有機酸 (acetate、butyrate)，導致此時期的 pH 值有迅速下降之趨勢。

當有機酸的含量超過一定值，尤其是在 butyrate 的濃度大於 2 g/L 且 pH 值下降至低於 5 時，便開始正式進入發酵後期 (Bahl et al., 1982)，此時期的主要行徑則是先藉由 acetoacetyl-CoA 轉變成 acetone 之反應途徑，促使前發酵產物 acetate、butyrate 還原成 acetyl-CoA 及 butyryl-CoA，再進一步利用 butyraldehyde dehydrogenase (BYDH) 和 butanol dehydrogenase (BDH) 之催化，讓中間產物 butyryl-CoA 還原成主產物—butanol，此外亦會伴隨著 acetone、ethanol 等副產物之生成。

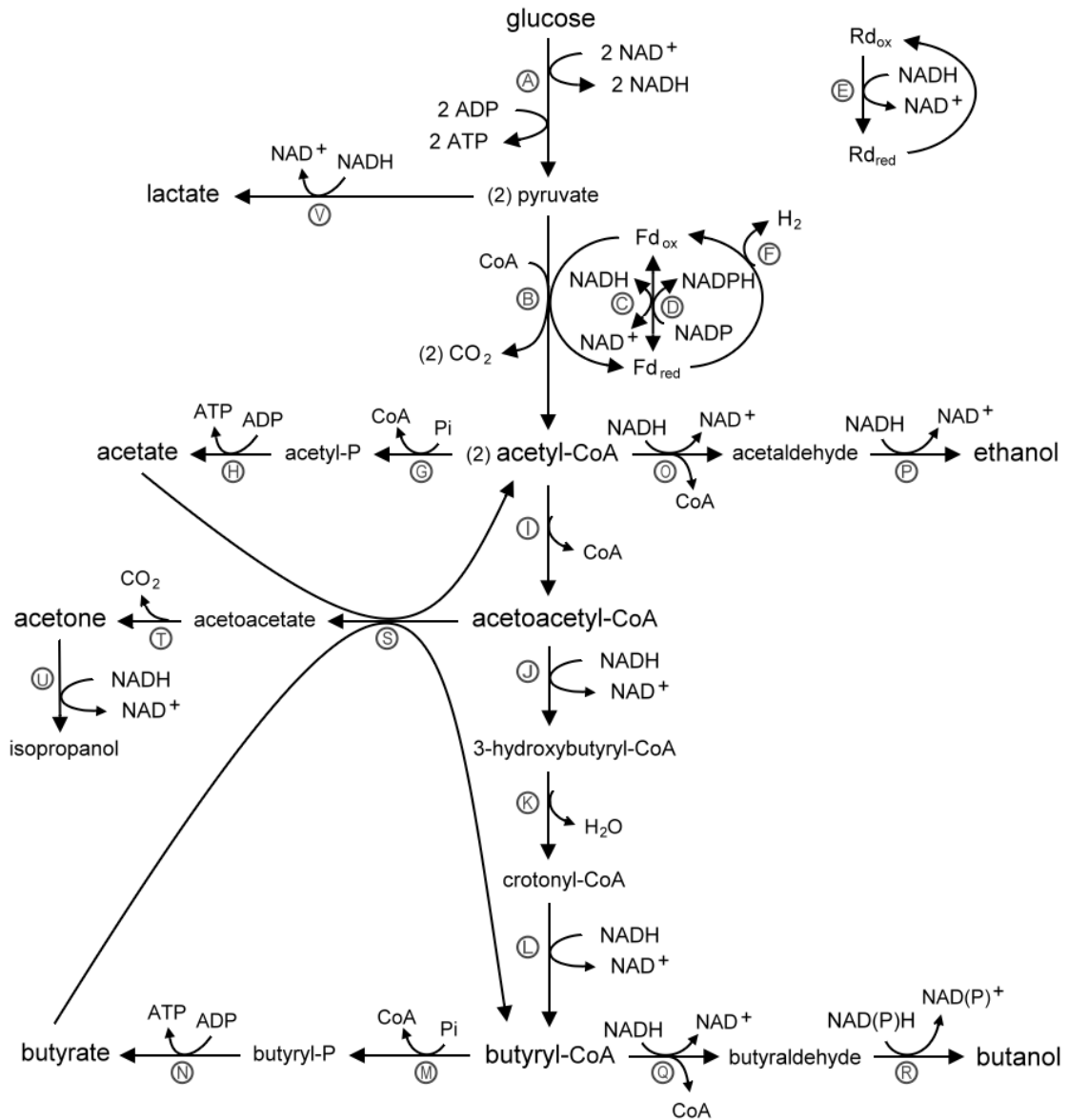


圖 2-2 Fermentation pathways in *C. acetobutylicum* (Jones and Woods, 1986). Enzymes are indicated by letters as follows: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase; (H) acetate kinase; (I) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.

2.3.2 生產 butanol 之菌種

Butanol發酵程序之菌種主要為*Clostridium*屬的絕對厭氧菌。而依照其對碳源的喜好程度不同大致可分為兩大類，一種是發酵澱粉類，常見的如*C. acetobutylicum* ATCC 824和*C. acetobutylicum* DSM 1731；另一種是發酵糖蜜，如*C. beijerinckii*、*C. acetobutylicum* NCIMB 8052和*C. saccharoperbutylacetom* N1-4。其中，又以*C. acetobutylicum*之探討較為普遍。

*C. acetobutylicum*為革蘭氏陽性菌 (Gram-positive)，於1974年被Smith和Hobbs所提出，因此菌株可產生acetone和butyl alcohol而命名之。外觀上呈直桿狀且具移動性，細胞周圍有鞭毛，屬於典型的嚴格厭氧菌。一般存在於土壤、人和牛的排泄物、污水、湖裡的沉積物和蛤的內臟；適合生長的溫度為15-69°C，但在pH值為6.5-7及溫度30-37°C的環境中生長較快。由於能將多種碳氫化合物經發酵轉成acetone-butanol-ethanol (ABE) 和H₂、CO₂而獲得學者們極大的興趣，但也因產物butanol達12-16 g/l時會對*Clostridium*產生毒化作用，使得此研究陷入一定的瓶頸之中；而現今已發展至可透過gas stripping、liquid-liquid extraction、perstraction和pervaporation等方式，經由移除培養基中的butanol以達成高產量之目標 (Ezeji et al., 2007)。

文獻指出在進行發酵過程時，以溫度 37°C 最為適當，此外 biotin、p-aminobenzoic (PABA) 這兩種必須營養素之含量亦會影響菌種生長情形 (Soni et al., 1987)。

表2-4 Solventogenic clostridia對碳源的利用情形 (Ezeji and Blaschek, 2006)

Organisms	Sugar preference*
<i>C. acetobutylicum</i> 260	Glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. acetobutylicum</i> 824	Glucose > arabinose, xylose > cellobiose > galactose > mannose
<i>C. saccharobutylicum</i> 262	Glucose > arabinose > galactose > cellobiose > xylose > mannose
<i>C. butylicum</i> NRRL 592	Glucose > cellobiose > mannose > arabinose > galactose > xylose
<i>C. beijerinckii</i> BA 101	Cellobiose > glucose > xylose > arabinose > mannose > galactose

* 依生成最大ABE產量之速度而定

2.4 影響 butanol 發酵之環境因子

影響微生物生產 butanol 的原因諸多，包括 pH 值、溫度、碳氮源及其添加濃度等等的不同培養條件，另外在培養基中添加不同種類的有機酸，如 acetate、butyrate，或是加入不同濃度的 iron 都對 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 具有相當的影響性。唯獨在最佳的操作條件下才能使製程發揮至最高效率，以獲取最大生產量。

2.4.1 pH 值影響

pH 值的影響被視作決定 butanol 發酵結果的重要因子，據文獻顯示 butanol 等溶劑之生成只會在 pH 值下降至 4.5 到 5.0 之間才開始發生，相對當培養基維持在高 pH 時主要產物為有機酸。然而促使生產 butanol 之 pH 值範圍是相當廣泛的，主要依照培養條件和使用菌種而有差異，針對 *C. acetobutylicum* ATCC 824 最適 pH 值應介於 4.3 至 5.5。

低 pH 形成和有機酸產物濃度、細胞數的增加，以及 H₂ 產量減少有密切關係，由此可見，雖然當培養基抵達適當低的 pH 值時會觸發 butanol 產生，但 pH 本身並非啟動裝置。

2.4.2 有機酸影響

有機酸的形成本身會為微生物細胞帶來毒化作用。當有機酸的濃度增加到一定值時，將破壞細胞膜間的 pH 梯度而造成 NTP/NDP 比迅速下降，導致細胞體內的代謝機制被抑制住；而在較低濃度時，酸的累積亦會牽連到 pH 值降低形成比生長速率下降。為防止有機酸所帶來的抑制現象，微生物細胞會做適當的調適而轉向生產 butanol 等溶劑，由此可知，酸的累增接連著 pH 值的下降將關係到 butanol 產量之提升。

文獻上提出，添加 acetate 或 butyrate 於培養基中使之維持在 pH 5.0，皆可誘導加快 butanol 等溶劑的形成速率，同時亦伴隨著比生長速率和 H₂ 生產速率的下降 (Gottschal and Morris, 1981)。依據上述原因，則有學者實驗證明當 butyrate 的未解離濃度達到 0.5-0.8 g/L 將抑制細胞生長，若持續增加至 1.5-1.9 g/L 則會引發 butanol 溶劑生成 (Monot et al., 1984)，此外加入 acetoacetate 亦可達到同樣的效果。

2.4.3 Hydrogenase 影響

Butanol 發酵製程中除了有 acetone、ethanol 等副產物的產生，還會伴隨著 H₂ 的生成，其中 H₂ 的形成主要受到 hydrogenase 的活性所影響，而 hydrogenase 又會隨著不同階段所造成的 pH 值之差異而改變。

由 acidogenesis 階段的代謝路徑顯示，當氧化態 ferredoxin (Fd_{Ox}) 轉化為還原態 ferredoxin (Fd_{Red}) 時，會使 NADH 氧化成 NAD⁺且釋放出質子 (H⁺)，而 H⁺ 將於 hydrogenase 的作用下生成 H₂，並進一步氧化 ferredoxin；當代謝路徑從 acidogenesis 轉向 solventogenesis 階段，pH 值的變化將影響 hydrogenase 活性造成 H₂ 產量下降，這時代謝路徑會在 NADPH-ferredoxin oxidoreductase 的催化下氧化 ferredoxin 並產生大量的 NADPH、NADH，而由代謝路徑分析可知 NADPH、NADH 產量的提昇，有助於 butanol、ethanol 之生成；此外 Yerushalmi 等亦証實 H₂ 產量下降有利於 butanol、ethanol 濃度之提升 (Yerushalmi et al., 1985)，所以抑制 hydrogenase 的活性，促使代謝路徑改變進而生成 NADPH、NADH 可增進 butanol 產量。

2.5 Acetate 的添加效應

文獻中指出，添加 acetate 於培養基中使其維持 pH 5.0 時，將促使溶劑生產速度加快，並伴隨著比生長速率及產 H₂ 速率之降低 (Gottschal and Morris, 1981)。除此之外，acetate 的添加亦有助於防止菌體衰退 (degeneration)、增加溶劑生成穩定性等優點；研究結果顯示，acetate 的添加濃度於 20 mM 時可達成減少 degeneration 和穩定 butanol 生產之作用，而在 60 mM acetate 添加下，對於 *C. beijerinckii* 生成 butanol 效果最好，butanol 濃度為 13.9 g/l，整體產量約提升 22 倍 (Chen and Blaschek, 1999)。

另一方面從代謝路徑中發現，acetate 的添加可使其經由 CoA-transferase 的作用下轉換成 acetyl-CoA，並促使 acetoacetyl-CoA、butyrate 連帶反應生成 acetoacetate 和 butyryl-CoA，而所形成的 butyryl-CoA 則會更進一步於 butyraldehyde dehydrogenase (BYDH)、butanol dehydrogenase (BDH) 作用下轉變成最終所需之產物—butanol，亦有利於 butanol 產量的提升。因此在本研究中將藉由 acetate 的添加，探討對於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 所產生之影響性。

2.6 NaN₃ 的添加效應

文獻指出抑制的 hydrogenase 活性將造成反應代謝路徑改變；透過 NADPH-ferredoxin oxidoreductase 將 Fd_{Red} 氧化成 Fd_{Ox} 增加 NADH、NADPH 生成，而在 NADH 和 NADPH 的同時參與下可促使 butyryl-CoA 轉化成為 butanol，進而達成提升 butanol 產物濃度之目的。在文獻中，典型的 hydrogenase 抑制劑為 CO，研究發現當 CO 含量處於低分壓 (2-10%) 時，比生長速率有下降之現象，而值得探討的是低濃度 CO，亦可降低 hydrogenase 活性並減少 H₂ 的生成，並且具有提升 butanol 產率之效果；其中，以含有 15% CO 濃度可達 butanol 產量 105.6 mM 最佳，整體產量約提升 61% (Kim et al., 1984)。

然而 CO 為常見的有毒氣體，易與人體內的血紅蛋白結合導致缺氧死亡，所以在執行 CO 的操作上具有一定的危險性及不便利性；相對而言，NaN₃ 雖與 CO 同具有抑制細胞生長之作用，但在使用操作上卻較 CO 安全許多，且亦可有效降低 hydrogenase 活性。因此本研究將探討添加 NaN₃ 抑制 hydrogenase 活性後，對 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 之影響。

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗菌株

本研究所使用的菌株為購自生物資源保存及研究中心，菌種編號 BCRC 10639 (同等於 ATCC 824) 的 *Clostridium acetobutylicum*。

3.2 實驗藥品

中文名	英文名	廠牌
鉬酸鈉	Sodium molybdate dihydrate	昭和化學株式會社
硫酸鈉	Sodium sulfate (Na ₂ SO ₄)	聯工
硫酸銅	Cupric sulfate (CuSO ₄)	SHOWA
硫酸錳	Manganese sulfate monohydrate	Scharlau
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸鋅	Zinc sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸	Sulfuric acid	SHOWA
磷酸氫二鉀	Dipotassium hydrogenphosphate	SHOWA
對氨基苯甲酸	p-aminobenzoic acid	MP Biochemical
生物素	Biotin	SIGMA
氯化鈣	Calcium dichloride dihydrate	聯工
氯化鈷	Cobalt dichloride hexahydrate	Hanawa
氯化鐵	Ferric chloride	SHOWA

中文名	英文名	廠牌
醋酸	Acetic acid	SHOWA
醋酸鈉	Sodium acetate	SHOWA
醋酸鉀	Potassium acetate	SHOWA
醋酸鎂	Magnesium acetate	SHOWA
醋酸銨	Ammonium acetate	KANTO
丁酸	Butanoic acid	ACROS
丁酸鈉	Sodium butyrate	Alfa
疊氮化鈉	Sodium azide	KANTO
丙酮	Acetone	景明
丁醇	Butanol	Riedel-de Haën
乙醇 95%	Ethanol	景明
甘油	Glycerol	KANTO
鹽酸	Hydrochloric Acid	Scharlau
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide	SHOWA
胰化蛋白朊	Tryptone	DIFCO BD
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO BD
RCM	Reinforced clostridial medium	DIFCO BD
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE

3.3 實驗儀器

儀器設備	型號	廠牌
烘箱	LO-150	亮盛
pH meter	PH-206	Lutron
電子天平	BJ 100M	Precisa
試管震盪器	MS1 minishaker	IKA
磁石攪拌加熱器	MS-3205B	ChromTech
高壓蒸氣滅菌釜	EA635	TRIDENT
無菌操作台	3BH-24	海天
分光光度計	GENESYS 10UV	Thermo
氣相層析儀	Focus GC	Thermo
葡萄糖分析儀	2300STAT	YSI
超音波震盪器	5210	BRANSON
加熱反應器	CR 2200	Weilheim
恆溫震盪培養箱	LUS-150	亮盛
5 L 液態發酵槽	BTF-A 5L	頂生
桌上型微量離心機	MCD-2000	HSIANGTAI
高速中型離心機	Universal-32R	Hettich
高速冷凍離心機	HARRIER 18/80	SANYO
超純水製造機	Simplicity	MILLIPORE
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	FISTREEM

3.4 分析方法

3.4.1 Biomass 分析

將菌液以適當濃度稀釋後，利用分光光度計在波長 620 nm 下測量其光學密度(Optical density, O.D.)。取 1 ml 菌液離心去除上清液，放入 60°C 烘箱烘乾 24 hr，測得菌體乾重(Dry cell weight, DCW)。依各個時間點所量測的 DCW 和 O.D.值作圖，即可獲得 DCW 與 O.D.值間的關係；檢量線如附錄 A 所示， $1 \text{ O.D.}_{620 \text{ nm}} = 1.433 \text{ (g DCW/L)}$ 。

3.4.2 代謝產物濃度分析

先將菌液以 7,000 rpm 轉速下離心 5 min，取得離心後所得之上清液，並以二次去離子水做 15 倍稀釋，利用氣相層析儀 (Thermo model Focus GC series with FID detector) 並藉由毛細管柱 SEG BP20 (25 m × 0.22 mm, 0.25 μm) 來進行各產物濃度之分析。GC 操作條件如下：以 nitrogen 作為 carrier gas，injector 和 detector 溫度分別設為 200°C、250°C，管柱則設定起始溫度 120°C (3 min) 以 16°C/min 之速率升溫至 200°C (5 min)；各產物檢量線如附錄 B-F 所示。

3.4.3 Glucose 分析方法

取菌液至離心管中，經離心機 (9,000 rpm, 5 min) 分離出菌體和上清液後，取上清液做 10 倍稀釋，再利用 YSI 1500 Sport L-Lactate analyzer 來量測 glucose 之濃度。

3.5 實驗方法

3.5.1 菌種培養

原始菌種保存

將購自菌種中心的 *C. acetobutylicum* 之冷凍乾燥管，接至 RCM (Reinforced Clostridial Medium) 液態培養基活化，並放入 37°C 恆溫震盪培養箱內，以厭氧產氣包進行 72 hr 培養。取 0.8 ml 菌液和 0.2 ml 甘油於微量離心管中均勻混合，通入含有 50% CO₂ 和 50% N₂ 之混合氣體後，放至 -20°C 冰箱保存。

菌種活化培養

取保存於 -20°C 的冷凍種菌進行 heat-shocked (70°C, 2 min)，將其倒至種瓶培養基 (SM) 並放入含有厭氧產氣包之厭氧罐中，送至恆溫培養箱以 37°C 進行厭氧培養 30 hr。

3.5.2 培養基組成

本實驗所使用的營養來源主要來自此兩類基礎培養基，除特殊章節因實驗目的而採用特定組成外，使用的培養基配方如表 3-1、3-2。

表 3-1 種瓶培養基 (Seed Medium, SM) 組成

Compound	Concentration (g/L)
'Lab-lemco' powder	10
Peptone	10
Soluble starch	1
Glucose	5
Cysteine · HCl	0.5
NaCl	5
CH ₃ COONa	3
Agar	0.5
Yeast extract	3

依上述比例配製成的培養基 (即 Reinforced clostridial medium, RCM)，以 0.5 N NaOH 調整至 pH 6.8，作為前培養使用。

表 3-2 發酵培養基 (Fermentation Medium, FM) 組成

Compound	Concentration (g/L)
Tryptone	1
Yeast extract	5
Glucose	50
Biotin	0.01
p-aminobenzoic acid	0.01
Na ₂ SO ₄	0.18
K ₂ HPO ₄	0.175
Mineral salt solution	1 ml

依上述比例配製成的培養基，以 1 N HCl 調整至 pH 4.8，作為發酵培養使用。

其中無機鹽溶液 (Mineral salt solution) 的組成比例，如表 3-3 所示。

表 3-3 Mineral salt solution 組成

Compound	Concentration (g/L)
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.24
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.24
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5
FeCl ₃	16.203
CuSO ₄	0.1598
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5164
MnSO ₄ · H ₂ O	1.7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.574
H ₂ SO ₄ (6M)	28 ml

3.6 實驗培養條件

3.6.1 碳源濃度的影響

目的：探討培養基中不同 glucose 濃度對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加 50、70、90 g/l glucose
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，填充混合氣體 (50% CO₂, 50% N₂)
達厭氧環境後，於 37°C 培養 120 hr

3.6.2 兩段式碳源添加的影響

目的：藉由分段進料使碳源維持在低濃度以加快 butanol 生成，探討兩段式添加

對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加 0.625、0.875、1.125 g glucose
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下培養 120 hr
4. 將上述 FM 於發酵 24 hr 後，各別添加 0.625、0.875、1.125 g glucose，使最終
培養基內 glucose 的總添加濃度分別為 50、70、90 g/l 後，接續進行培養

3.6.3 總氮源濃度的影響

目的：探討培養基中不同總氮源濃度對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加 1.5、6、12 g/l 的總氮源，其中氮源組成比例

為 yeast extract : tryptone = 5 : 1

3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下培養 48 hr

3.6.4 添加 CH₃COONa 的影響

目的：探討不同濃度 acetate 添加對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加 20、40、60、80 mM 的 CH₃COONa
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下培養 120 hr

3.6.5 添加 CH₃COO⁻ 的影響

目的：探討 CH₃COO⁻ 與不同陽離子結合時對 butanol 產量影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加最適濃度 (20 mM) 的 CH₃COONa、
CH₃COOK、(CH₃COO)₂Mg、CH₃COONH₄
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下培養 120 hr

3.6.6 CH₃COO⁻ 的培養基置換試驗

目的：利用 CH₃COO⁻ 加速進入 solventogenesis 階段，並在比生長速率將降低的

考量下進行實驗，探討 CH₃COO⁻ 的置換對於 butanol 產量之影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基添加 20 mM CH₃COONa
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中培養 36 hr

4. 配製新的 FM 培養基各添加 50、70、90 g/l glucose
5. 將培養 36 hr 發酵液離心，取下層菌體置換到上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下
接續培養 36 hr

3.6.7 添加 acetate 和 butyrate 的影響

目的：因 acetate 添加所提升之產量並不顯著，推斷是由於 butyrate 的濃度不足導致，進一步探討同時添加 acetate、butyrate 對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 FM 中
3. 分別在 0、24 hr 的時間點添加 20 mM acetate 和 butyrate 於 FM 中，在 37°C 厭氧環境下培養 72 hr

3.6.8 添加 NaN₃ 的影響

目的：探討不同濃度 NaN₃ 添加對於 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 於 25 ml FM 培養基內各別添加 0、5、10 mg/l 的 NaN₃
3. 以 10% 接菌量將 SM 接至上述 FM 中，於 37°C 厭氧環境下培養 72 hr
4. 將上述 0 mg/l NaN₃ 添加之 FM 於培養 24 hr 後，額外加入 5 mg/l NaN₃ 接續培養

3.6.9 攪拌式發酵槽實驗

目的：探討當製程放大後對於菌體生長以及 butanol 產量的影響

1. 前培養 50 ml SM 培養液
2. 以 10% 接菌量將 SM 接至 2000 ml FM 中培養 120 hr
3. 培養條件為溫控 37°C、轉速 150 rpm、初始 pH 4.8 (培養過程不調控)

第四章 結果與討論

4.1 研究架構

本研究主要分為 CH_3COO^- 添加以及 NaN_3 添加兩大實驗主軸，如圖 4-1 所

示；以下章節將依探討順序而訂定。

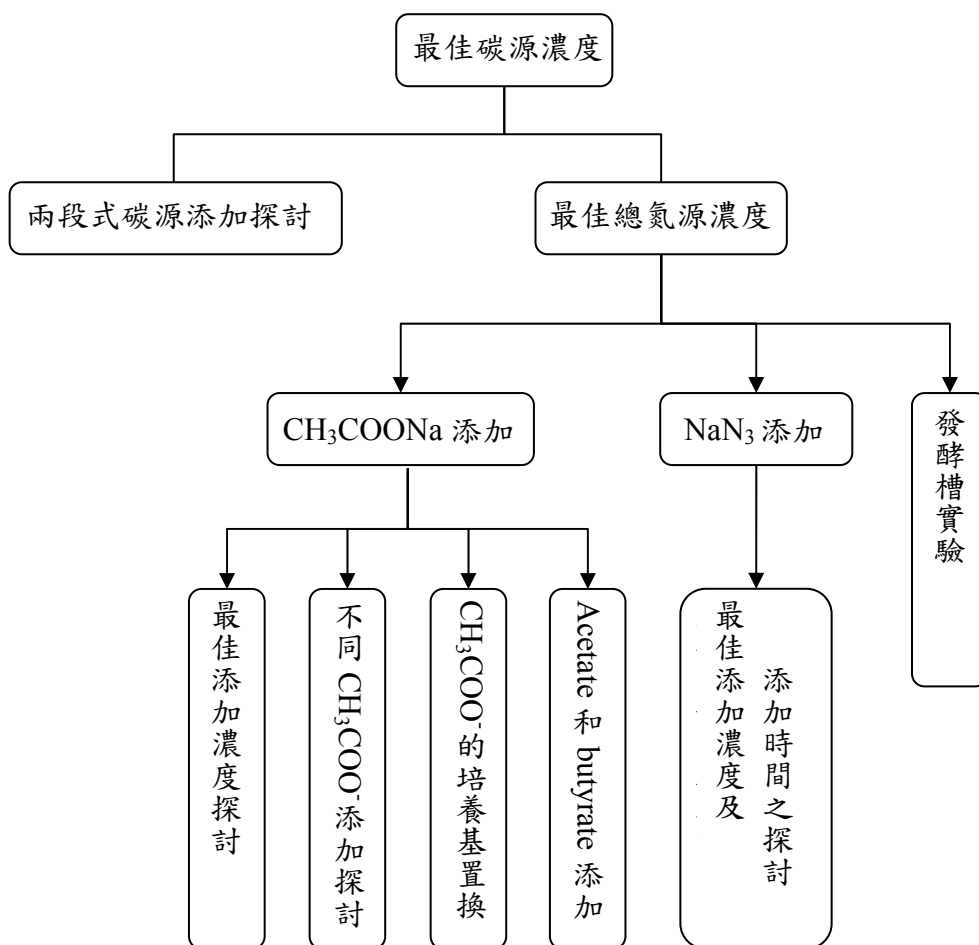


圖 4-1 實驗架構

4.2 碳源濃度之影響

此實驗目的在於探討培養基中不同 glucose 濃度對於 *C. acetobutylicum* 生長以及 butanol 產量的影響。實驗結果如圖 4-2，於發酵 24 hr 可看到在 50、70、90 g/l glucose 添加中，以 50 g/l 所消耗的碳源速度最快，此時對 butanol 的生產速率也較 70、90 g/l 來的高；而在 24 hr 後發現，隨著 glucose 添加濃度上升，菌體對碳源的消耗量增加，造成 butanol 產量亦跟著提升，因此以 70、90 g/l glucose 添加對於提升 butanol 產量效果較佳，發酵 72 hr 可達 butanol 濃度 12.1 g/l，相較於 50 g/l 添加僅能獲得 9.4 g/l。

但從 glucose 殘餘量來看，70、90 g/l 的添加組於 48 hr 後即維持一定，且並未像 50 g/l 添加可將 glucose 消耗完，推斷是由於 butanol 產量在 48 hr 達到 12 g/l 左右，而此濃度正與文獻中提到的抑制 *C. acetobutylicum* 生長濃度 12-16 g/l 相當，引發抑制現象並造成培養基中的碳源濃度不再下降，進一步促使 butanol 產量趨於定值。因此本研究將以 50 g/l 為主要碳源添加濃度，並作為後續各個實驗的基礎培養基。

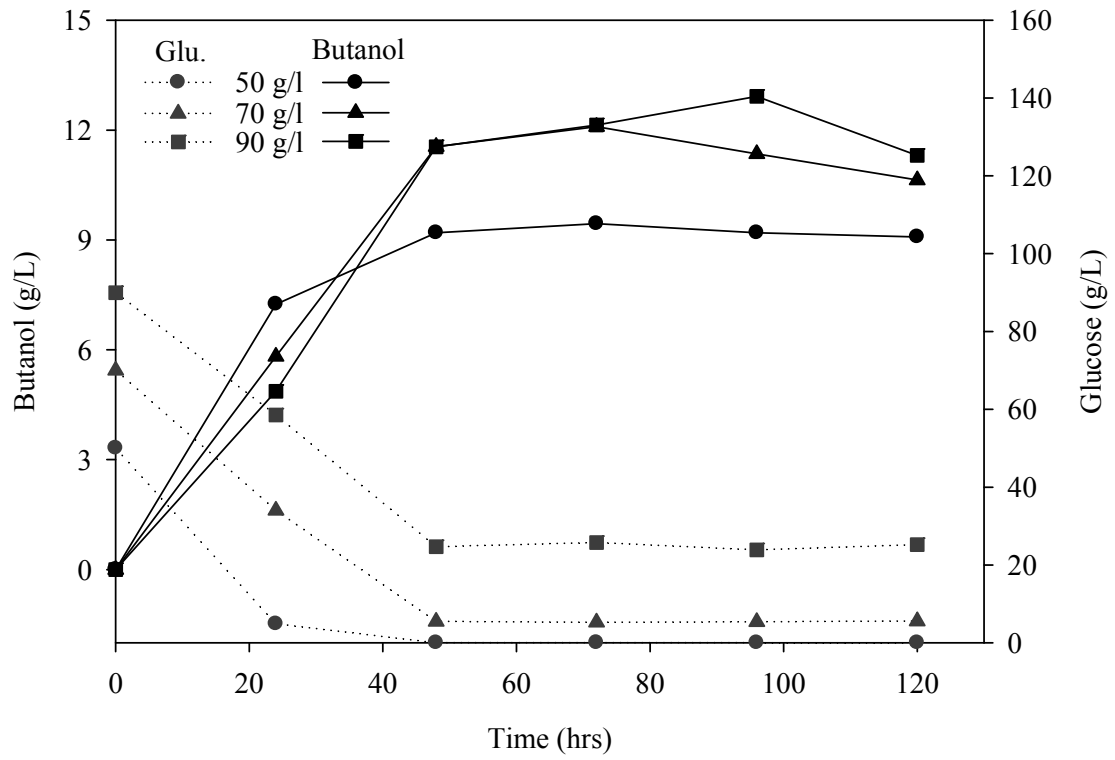


圖 4-2 不同 glucose 濃度對 butanol 之影響

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 120 hr

4.3 兩段式碳源添加之影響

由上述實驗結果得知，發酵前 24 hr 在低碳源濃度下有利於提升 butanol 的生產速率，但在高濃度碳源添加下可增進 butanol 的生成濃度，因此將進一步利用兩階段添加碳源於培養基中，探討對於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 產量之影響。

實驗結果如圖 4-3 至圖 4-5，在 50 g/l 總碳源添加濃度發現，glucose 於兩段式批次添加下對 butanol 產量的增加效益較大，且與對照組相比於發酵前 72 hr 可維持較高的生產速率，butanol 濃度可由 9.44 g/l 上升至 11.84 g/l，增加 25%；但就總碳源添加濃度為 70、90 g/l 而言影響不大，且於發酵 48 hr 同樣會有 glucose 殘餘的情形發生。

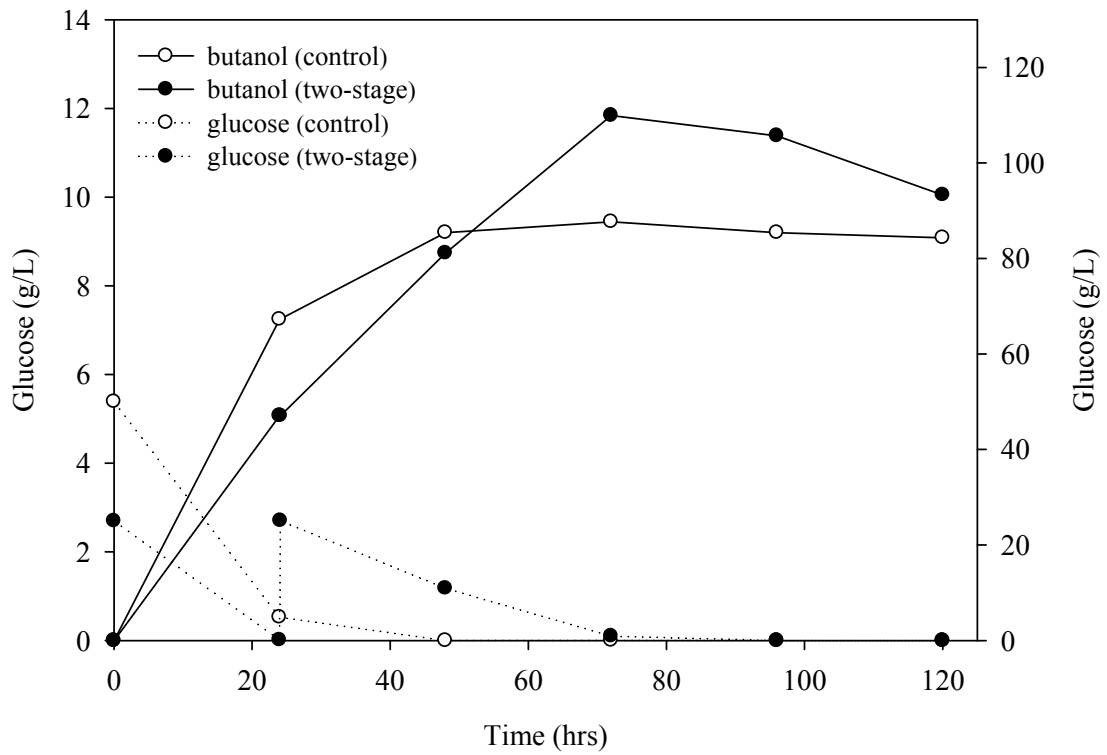


圖 4-3 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 50 g/l)

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 120 hr

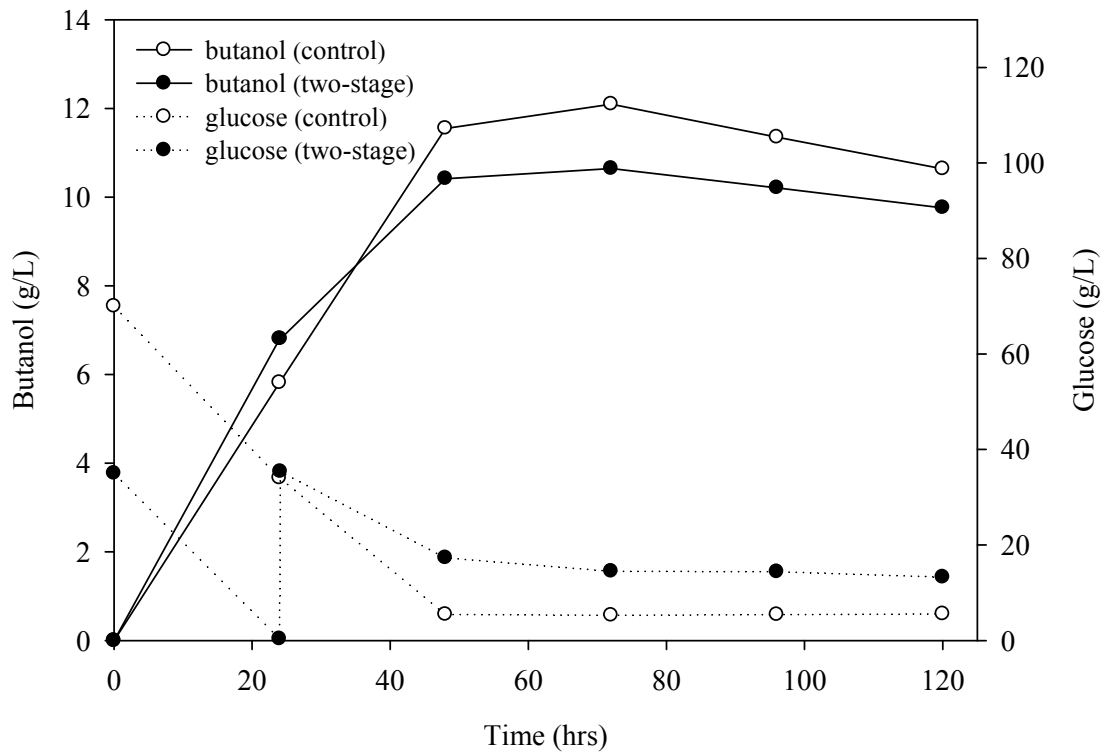


圖 4-4 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 70 g/l)

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 120 hr

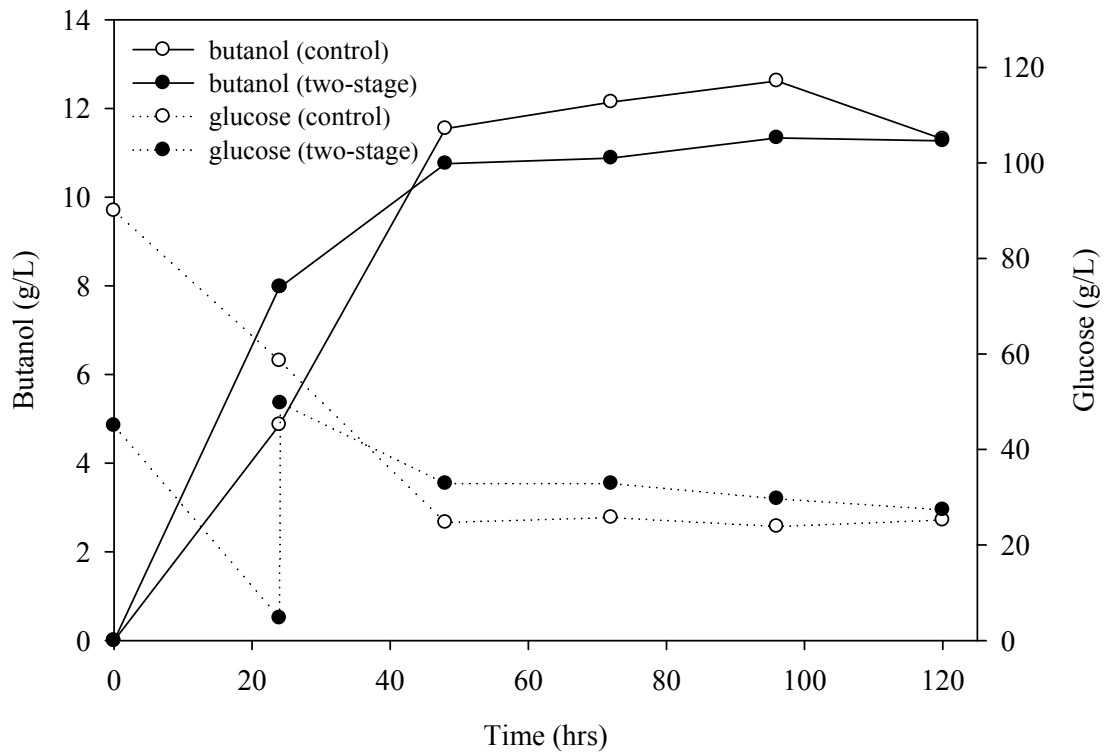


圖 4-5 兩段式 glucose 添加對 butanol 之影響 (總碳源濃度 90 g/l)

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 120 hr

4.4 總氮源濃度之影響

此實驗主要探討不同總氮源濃度於 50 g/l glucose 培養基中，對於 butanol 產量之影響，其中 Yeast extract : Tryptone = 5:1 為總氮源組成。實驗結果如圖 4-6，經發酵 48 hr 可看到在高總氮源濃度下 butanol 產量增加，雖於 12 g/l 添加量可達較高 butanol 產量 8.85 g/l，但與 6 g/l 添加量所生成 butanol 產量 8.55 g/l 相差不大，因而以 6 g/l 為主要總氮源添加濃度，並同樣作為後續各個實驗的基礎培養基。

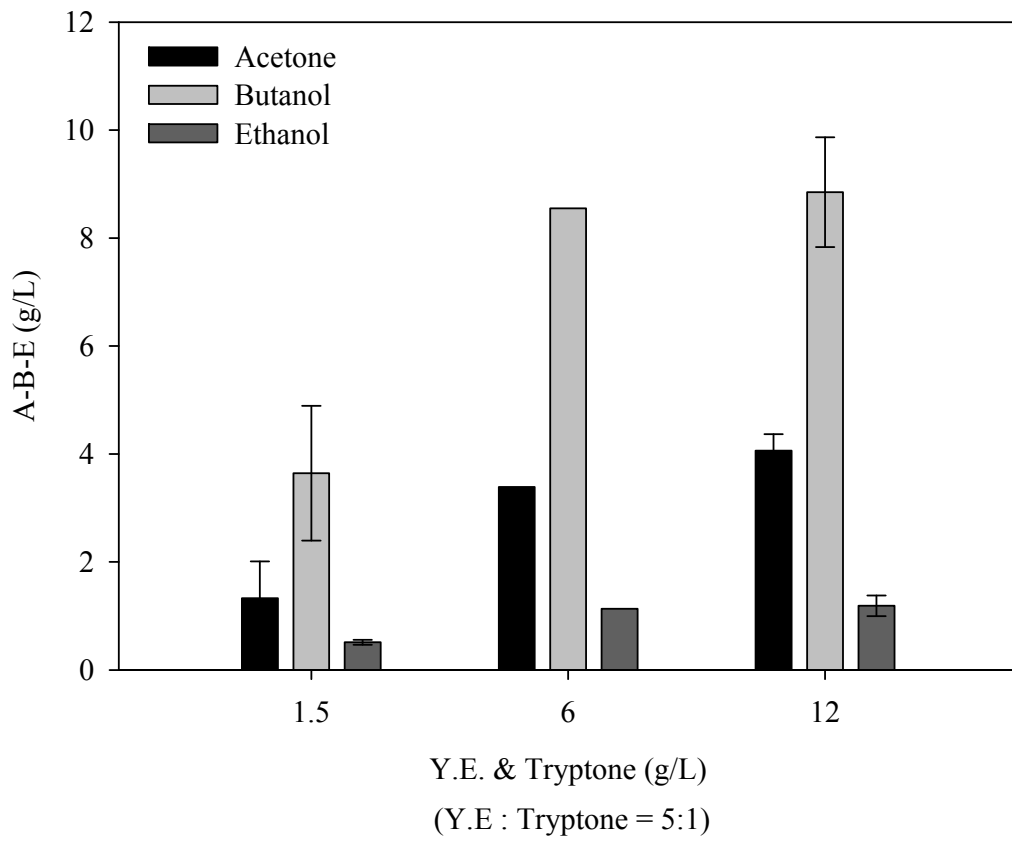


圖 4-6 不同總氮源濃度對 butanol 等產物之影響

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 48 hr

4.5 CH₃COONa 添加之影響

文獻中指出，添加 acetate 可避免菌體衰退、增加 butanol 生成的穩定性，而從代謝路徑發現，增加 acetate 濃度可促使路徑中的 butyrate 轉為 butanol。因此，在培養基中添加不同濃度的 CH₃COONa，探討對 *C. acetobutylicum* 生長以及 butanol 產量之影響。

實驗結果如圖 4-7、圖 4-8，發酵 24 hr 可看到 biomass 因 CH₃COONa 濃度增加而下降，但於 72 hr 後發現，biomass 的下降速度隨著 CH₃COONa 添加濃度上升而減慢，證實 *C. acetobutylicum* 於 CH₃COONa 作用下的確有減少衰退之情形。而在 butanol 生產方面，由於 CH₃COONa 降低生長速率引發 glucose 消耗速度減慢，使得 butanol 產量亦受影響；其中 CH₃COONa 添加濃度以 20 mM 的影響成效和其他濃度相比較佳，butanol 產量於發酵 48 hr 後，由對照組 7.89 g/l 上升至 9.33 g/l，證實添加 CH₃COONa 雖不利於菌體生長，但對 butanol 生成還是有一定的幫助。

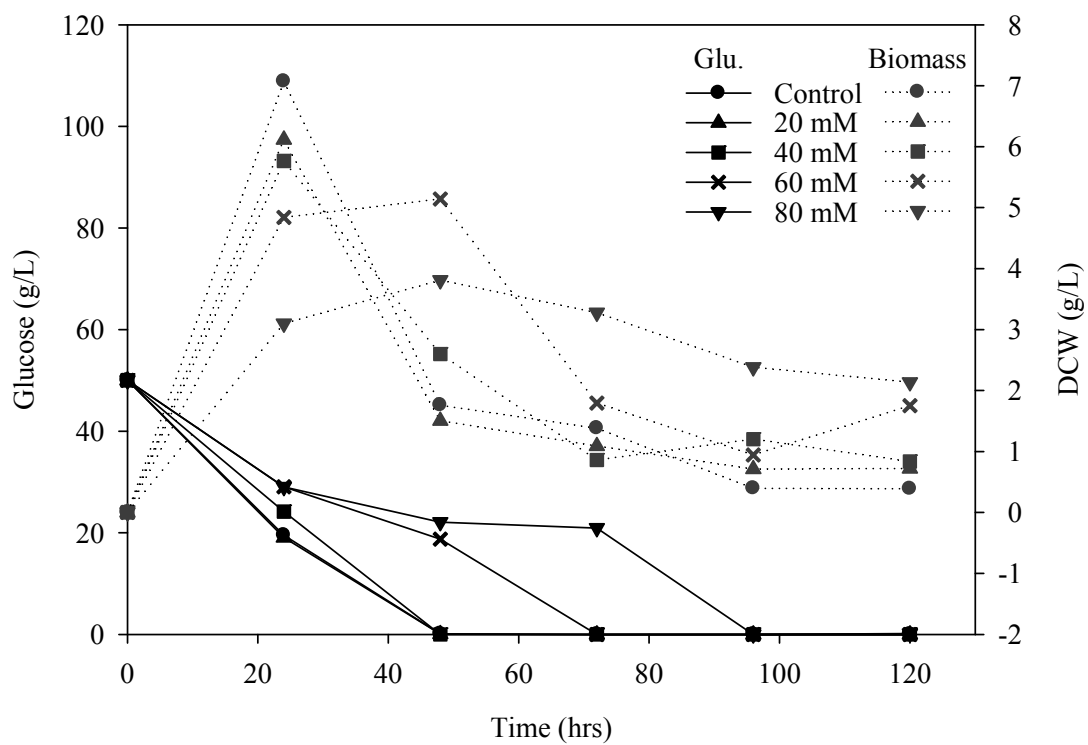


圖 4-7 CH₃COONa 對 biomass 及 glucose 之影響

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 120 hr

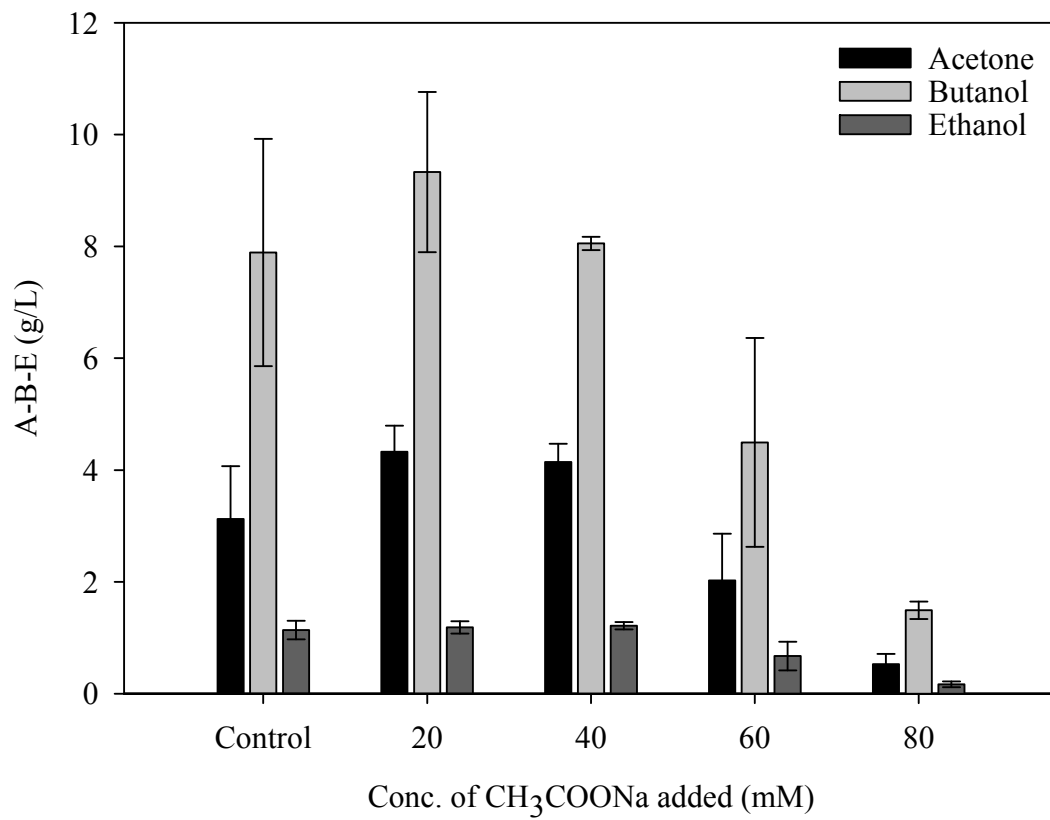


圖 4-8 CH₃COONa 對 butanol 等產物之影響 (發酵 48 hr)

4.6 CH₃COO⁻添加之影響

由前述實驗結果得知，CH₃COONa 有助於提升 butanol 之生成，為確定主要因素是受 CH₃COO⁻影響而非 Na⁺，因此針對不同的 CH₃COO⁻於 20 mM 添加下做進一步探討。

實驗結果如圖 4-9，butanol 產量於 CH₃COOK、(CH₃COO)₂Mg、CH₃COONH₄ 添加下，大致上都與對照組 (CH₃COONa) 相近，經發酵 48 hr 產量約達 8.0 g/l，且對 biomass 的影響程度亦相同；由此可知 CH₃COO⁻不論是和帶+1 價、+2 價的金屬離子或是與帶+1 價的非金屬離子結合，對於 butanol 產量的影響都是相近的，顯示出 CH₃COO⁻有助於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol，但與其結合之陽離子無太大關係。

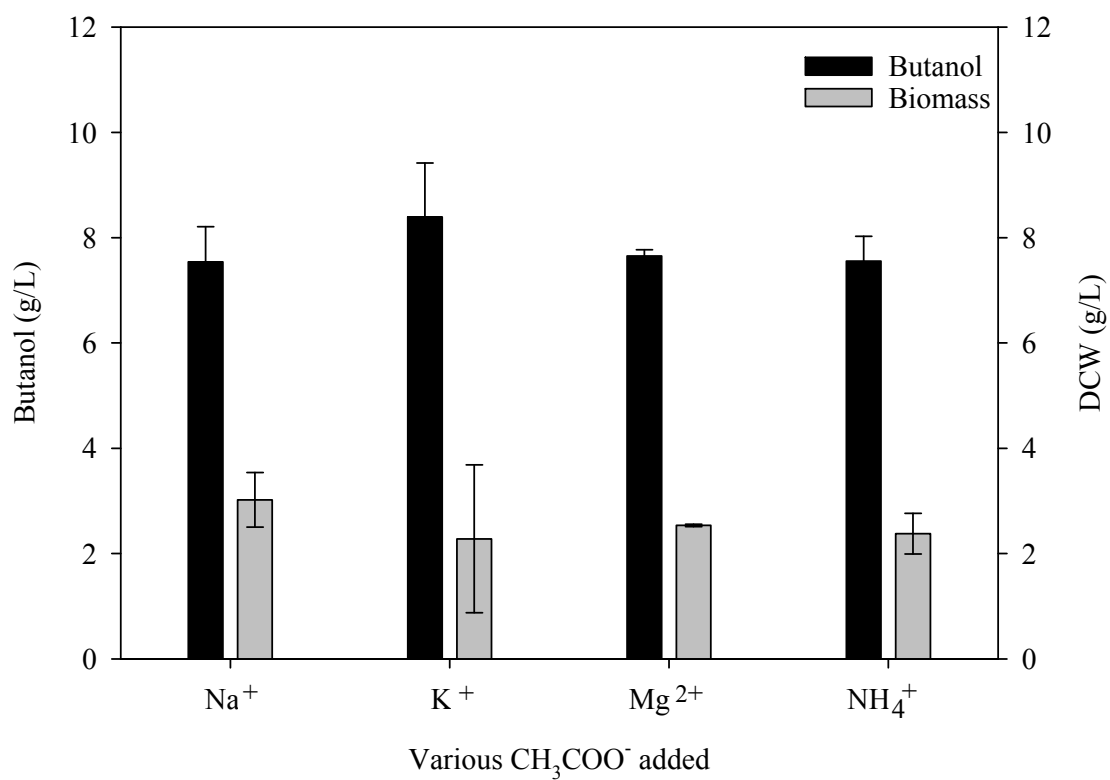


圖 4-9 不同 CH₃COO⁻ 添加之影響

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 48 hr

4.7 CH₃COO⁻的培養基置換試驗

文獻提到 acetate 可幫助 *Clostridium* 快速進入 solventogenesis 階段，但相對而言，卻會降低 *Clostridium* 的比生長速率，且在前幾項實驗發現 butanol 生成是伴隨菌體生長所產生的，根據以上幾點因素進一步設計 20 mM CH₃COO⁻ 培養基的置換實驗。利用 CH₃COONa 加速 butanol 生成，並於置換培養基後提升菌體生長速率，探討置換效果對 butanol 產量之影響。

實驗結果如表 4-1 所示，butanol 產量於 50 g/l glucose 置換濃度與對照組 (20 mM CH₃COONa) 相比，置換效果並不顯著，但在 biomass 方面卻有一定程度的提升，菌體乾重由 1.50 g/l 上升至 2.43 g/l，增加 62%；而以 50、70、90 g/l glucose 與相應之對照組 (0 mM CH₃COONa) 相比，butanol 產量雖略為提升但同樣對 70、90 g/l 添加而言，會因 butanol 達抑制濃度而使產量依舊無法突破至較高濃度，但值得一提的是置換效果對於 butanol 產率 (productivity) 有相當大的提升效果，約增加 0.5-1.8 倍，而在 biomass 方面亦有不錯的效果。

$$\text{產率 (productivity)} = \text{產物濃度 (g/l)} / \text{生產所需時間 (hr)}$$

表 4-1 CH₃COO⁻培養基的置換

	Glucose (g/l)	Max. Butanol (g/l)	Biomass (g/l)	Productivity (g/L·hr)
Control* 0 mM CH ₃ COO ⁻	50	7.89±2.03	1.76±1.11	0.16
	70	12.09±0.25	0.72±0.30	0.17
	90	12.14±1.10	0.63±0.17	0.17
20 mM CH ₃ COO ⁻	50	9.33±1.43	1.50±0.16	0.19
Replace**	50	9.99±0.03	2.43±1.15	0.28
	70	12.24±0.16	2.49±0.62	0.34
	90	12.80±0.13	3.13±0.22	0.36

* 未置換培養基之對照組

** 置換前培養基含 50 g/l glucose、20 mM CH₃COO⁻，置換後培養基如表所示（未添加 CH₃COO⁻）

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 72 hr

4.8 添加 acetate、butyrate 之影響

前述 CH_3COO^- 添加實驗發現，butanol 產量的增加無預期中理想，且從代謝路徑分析得知，欲利用 acetate 提升 butanol 濃度需在 acetoacetyl-CoA 及 butyrate 同時存在下，才可行經 butyrate 轉換為 butyryl-CoA 路徑以促使 butanol 生成，因而猜測為培養基內的 butyrate 濃度不足，造成 butanol 無法達到大幅提升之效果。因此，在培養基中同時添加 20 mM CH_3COONa 及 butyrate，探討對 *C. acetobutylicum* 生長以及 butanol 產量之影響。

實驗結果如表 4-2 所示，就對照組 (none addition) 而言，同時添加 acetate 和 butyrate 於培養基中確實可提升 butanol 產量，其中以發酵 24 hr 後添加有機酸的效果較好，butanol 產量約提昇 18%，此外也較單獨添加 acetate 之效果來的好，證實 butanol 的生成除了在 acetate 作用下有幫助外，還必須要有足夠的 butyrate 才能使產量明顯的提升。

表 4-2 Acetate 與 butyrate 添加之影響

Addition	Biomass (g/l)	Butanol (g/l)	Productivity (g/L·hr)	Yield (g/g glu.)
None	2.77±1.57	8.88±0.54	0.19	0.18
20 mM Acetate	1.50±0.16	9.13±0.80	0.19	0.18
20 mM Acetate + 20 mM butyrate				
addition at 0 hr	5.71±0.03	9.15±0.75	0.19	0.21
addition at 24 hr	3.13±0.22	10.50±0.37	0.22	0.22

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 72 hr

4.9 NaN₃ 添加之影響

文獻中証實，hydrogenase 活性抑制有助於 butanol 產量之提升，而 NaN₃ 為常見的電子傳遞抑制劑，雖對細胞生長有抑制作用，但可有效降低 hydrogenase 活性，因此在培養基中添加不同濃度 NaN₃，探討對於 *C. acetobutylicum* 生產 butanol 之影響。實驗結果如圖 4-10，NaN₃ 添加濃度以 2 mg/l 效果較好，butanol 產量與對照組相比，發酵 72 hr 產量由 6.67 g/l 上升至 8.80 g/l，約提升 31%；此外實驗發現，ethanol 產量隨著 NaN₃ 濃度增加反而有下滑之趨勢，亦代表 NaN₃ 對於 ethanol 生產也有一定的影響性，由此可見，NaN₃ 添加不僅有助於提升 butanol 產量，還可改變 butanol 於產物 (solvents) 中的比例，使其提升。

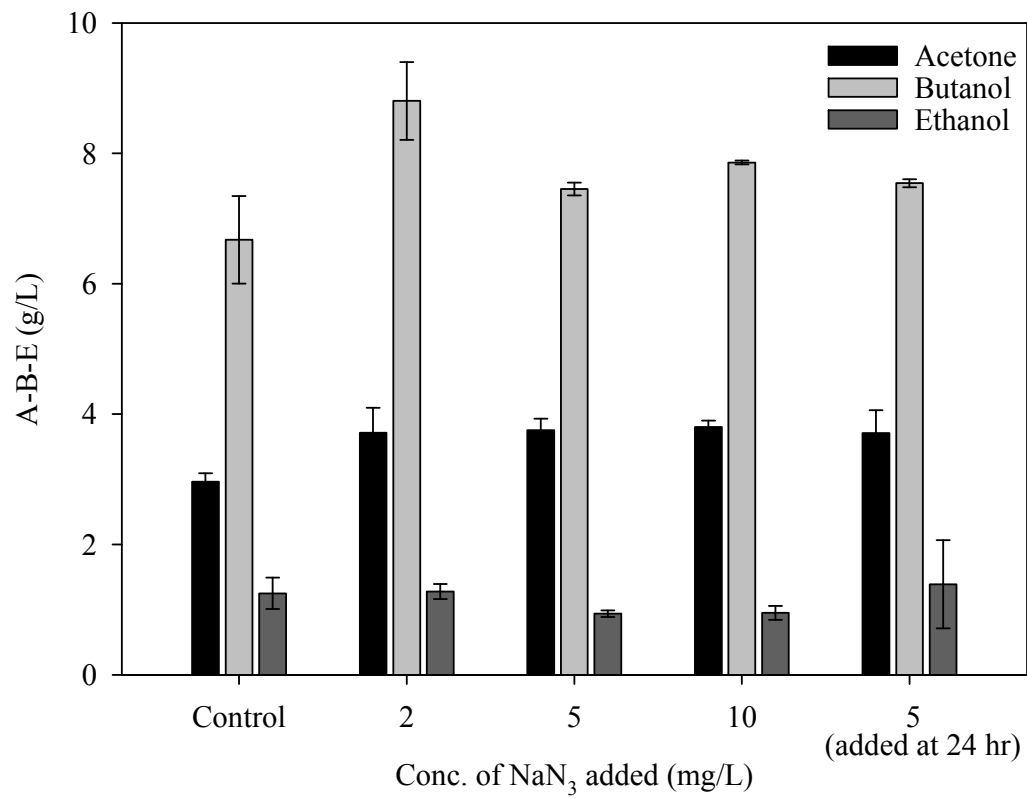


圖 4-10 NaN_3 添加對 butanol 等產物之影響

培養條件： 溫度 37°C

初始 pH 4.8，培養過程不調控

轉速 0 rpm

培養時間 72 hr

4.10 攪拌式發酵槽實驗

此次實驗在於將小型搖瓶試驗放大至 5 L 攪拌式發酵槽，探討在放大過程中，是否能獲得與搖瓶培養相同之結果。實驗結果如圖 4-11，在發酵前 30 hr，菌體生長情形和 glucose 消耗速度皆為緩慢，且無任何 butanol 產生；而在 42 hr 取樣分析得知，此時的 glucose 已開始明顯下降，並於大量消耗碳源的同時持續生成產物 butanol。

最後在培養 68 hr 發現，glucose 於培養基中已被完全消耗完，同時 butanol 產量亦到達最高濃度 10.78 g/l，而就菌體乾重則降至 0.47 g/l。由此可見，攪拌式發酵槽其機械攪拌所產生的高剪切力，在細胞培養上可能對菌體造成一定的傷害而影響其成長速率，但就整體而言，將 *Clostridium* 生產 butanol 的發酵製程放大至 5 L 發酵槽是可行。

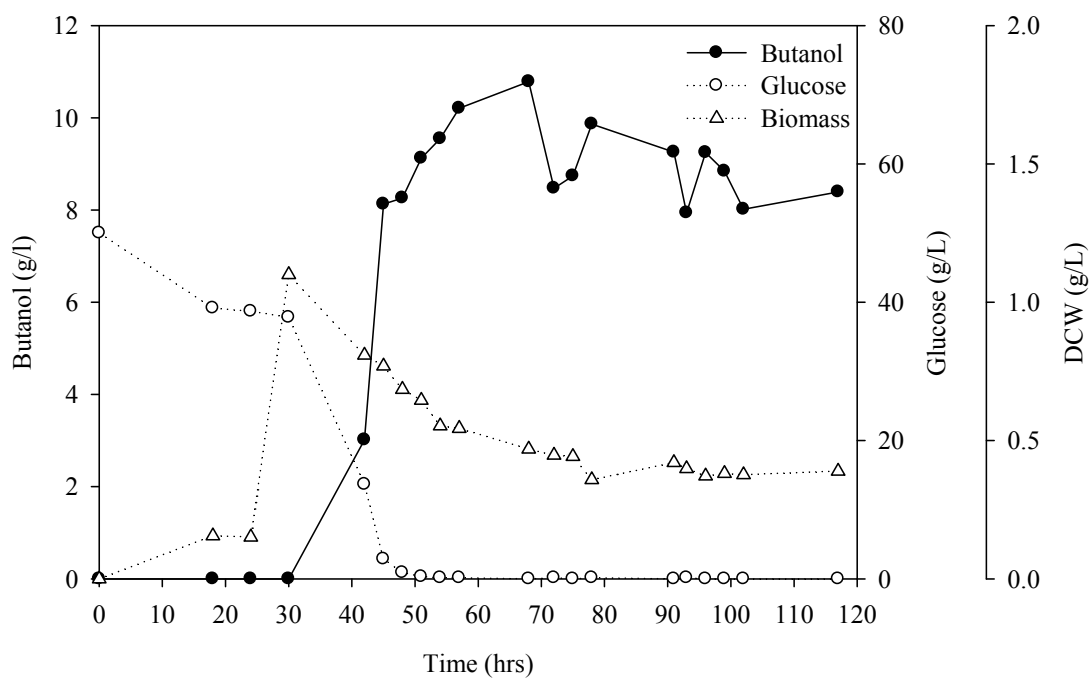


圖 4-11 攪拌式發酵槽實驗

培養條件： 基礎培養基

初始 pH 4.8，培養過程不調控

溫度 37°C

轉速 150 rpm

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

1. 搖瓶培養基中以 glucose 為碳源，隨著碳源添加濃度上升、butanol 產量增加，且在低碳源濃度環境下可提升 butanol 生產速度，而由於 butanol 本身對 *C. acetobutylicum* 具有毒化作用，故當 butanol 達 12-16 g/l 即產生抑制作用，促使 butanol 產量僅能達 12 g/l 左右。
2. 搖瓶內氮源添加，在充足的供應下有助於 butanol 生成，而當碳氮比降至 8 左右對生產 butanol 影響較佳，butanol 濃度可得 8.55 g/l，故於 50 g/l glucose 培養基中添加 6 g/l 複合氮源 (Yeast extract + Tryptone) 為適合 *Clostridium* 生產 butanol 之總氮源濃度。
3. CH_3COO^- 添加實驗顯示， CH_3COO^- 添加會使菌體乾重降低 15%，butanol 濃度上升 18%，顯現出 CH_3COO^- 雖會減低菌體生長速度，但於適當的濃度下將有利於提升 butanol 生成。而利用 CH_3COO^- 特性進行培養基置換實驗顯示，菌體乾重上升 62%，生產速率提升 47%，butanol 濃度增加 7%，顯示置換程序雖對 butanol 產量提升不明顯，但可有效增加菌體生長及提高生產速率。
4. Acetate、butyrate 添加實驗顯示，發酵 24 hr 後添加有機酸會使菌體乾重增加 13%，butanol 濃度上升 18%，產率提升 22%，表示當 acetate、butyrate 同時添加的確可使 butanol 產量更為提升，有助於 butanol 之生成。
5. NaN_3 添加實驗顯示，於適量添加下可提高 butanol 產量 31%，且增加 butanol

於 solvents 中所佔比例，表示 NaN_3 確實可有效抑制 hydrogenase 活性、改變代謝途徑以利於 butanol 之生成。

5-2 未來展望

1. Butanol 對於 *C. acetobutylicum* 具有毒化作用，造成產量始終無法突破 12 g/l，因此透過突變方式進行菌種改良，找出耐受性較高的 *Clostridium* 為必需之程序。
2. 本研究中發現 butyrate 的添加，對於 *Clostridium* 生產 butanol 之產量有明顯提升，因此可對 butyrate 做更進一步探討，包括單獨添加之效果以及找出最適濃度等。
3. 文獻中表示，為提高 butanol 產量可藉由 replace 移除培養基中具毒化作用之 butanol，而固定化方式則較適合菌體回收及進行 replace 動作，因此可嘗試使用固定化方式，找出最適的載體以提升 butanol 之生產。

參考文獻

- 周仕凱、許梅娟 (2009) 新能源—生物產丁醇。科學發展，433: 26-31。
- Bahl, H., W. Andersch, K. Braun, and G. Gottschalk. (1982) Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:17-20.
- Chen, C.-K. and H. P. Blaschek. (1999) Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 170-173.
- Chen, C.-K. and H. P. Blaschek. (1999) Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. Appl. Environ. Microbiol 65: 499-505.
- Datta, R. and J. G. Zeikus. (1985) Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. Appl. Environ. Microbiol 49: 522-529.
- Ezeji, T. and H. P. Blaschek. (2006) Fermentation of Dried Distillers' Grains and Solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. Midwest Consortium for Biobased Products & Bioenergy.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, and H. P. Blaschek. (2007) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology 18: 220-227.
- Ezeji, T.C., N. Qureshi, P. Karcher, H. P. Blaschek. (2006) Butanol production from corn. In *Alcoholic Fuels: Fuels for Today and Tomorrow*. Edited by Minteer SD.

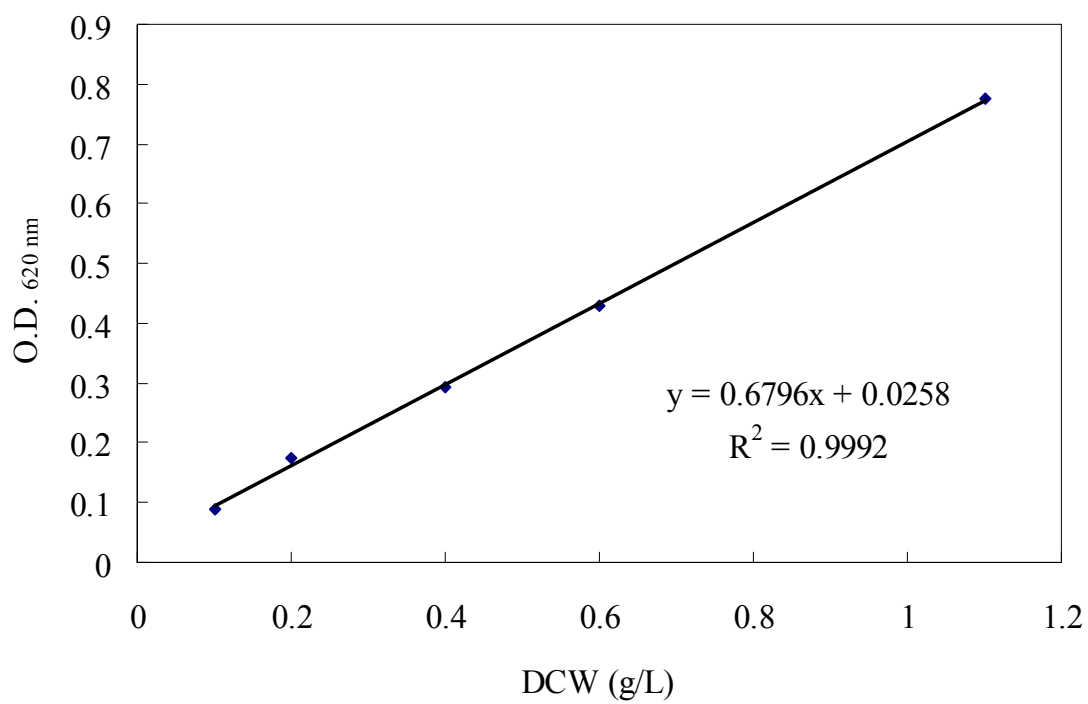
- New York, NY: Taylor & Francis; 2006:99-122.
- Fond, O., G. Matta-Ammouri, H. Petitdemange, and J. M. Engasser. (1985) The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 195-200.
- Gottschal, J. C., and J. G. Morris. (1981) The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate. FEMS Microbiol. Lett. 12: 385-389.
- Gottwald, M., H. Hippe, and G. Gottschalk. (1984) Formation of n-butanol from D-glucose by strains of the “*Clostridium tetanomorphum*” group. Appl. Environ. Microbiol 48: 573-576.
- Hüsemann, M. H. W. and E. T. Papoutsakis. (1990) Effects of propionate and acetate additions on solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol 56: 1497-1500.
- Jones, D. T. and D. R. Woods. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol. Rev. 50: 484-524.
- Junelles, A.M., R. Janati-Idrissi, H. Petitdemange, and R. Gay. (1988) Iron effect on acetone-butanol fermentation. Curr. Microbiol., 17: 299-303.
- Kim, B.H., P. Bellows, R. Datta, J.G. Zeikus. (1984) Control of carbon and electron flow in *C. acetobutylicum* fermentations: Utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. Appl. Environ. Microbiol 48: 764-770.
- Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim, K. S. Jung. (2008) Fermentative butanol production by Clostridia. Biotechnol. Bioeng. 101: 209-228.

- Meyer, C. L., J. K. McLaughlin, and E. T. Papoutsakis. (1985) The effect of CO on growth and product formation in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Lett.* 7: 37-42.
- Monot, F., J. M. Engasser, and H. Petitdemange. (1984) Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 19: 422-426.
- Monot, F., J.-R. Martin, H. Petitdemange, and R. Gay. (1982) Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 44: 1318-1324.
- Qureshi, N., B. C. Saha, R. E. Hector, and M. A. Cotta. (2008) Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors. *Biomass and Bioenergy.* 32: 1353-1358.
- Ramey, D. (2007) Butanol: The Other Alternative Fuel. *Agricultural Biofuels: Technology, Sustainability and Profitability.*
- Ramey, D. and S.-T. Yang. (2004) Production of butyric acid and butanol from biomass. U.S. Department of Energy Morgantown, WV.
- Smith, J. L. and J. P. Workman. (2008) Alcohol for motor fuels. Colorado State University Extension. No.5.010.
- Soni, B. K., P. Soucaille, and G. Goma. (1987) Continuous acetone-butanol fermentation: influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1-5.
- Yerushalmi, L., B. Volesky, and T. Szczesny. (1985) Effect of increased hydrogen

partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 103-107.

Zhou, X. and R. W. Traxler. (1992) Enhanced butanol production and reduced autolysin activity after chloramphenicol treatment of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 293-297.

附錄 A

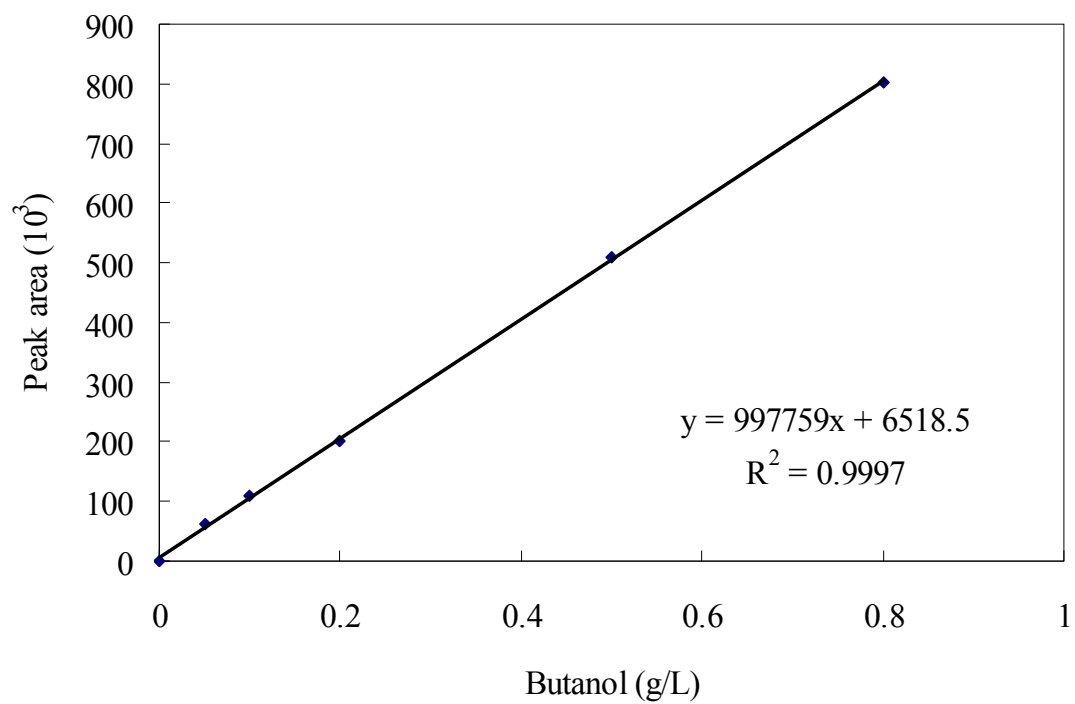


Biomass 檢量線

Biomass 檢量線方程式：

$$(\text{O.D. } 620 \text{ nm}) = 0.6796 \times (\text{DCW}) + 0.0258$$

附錄 B

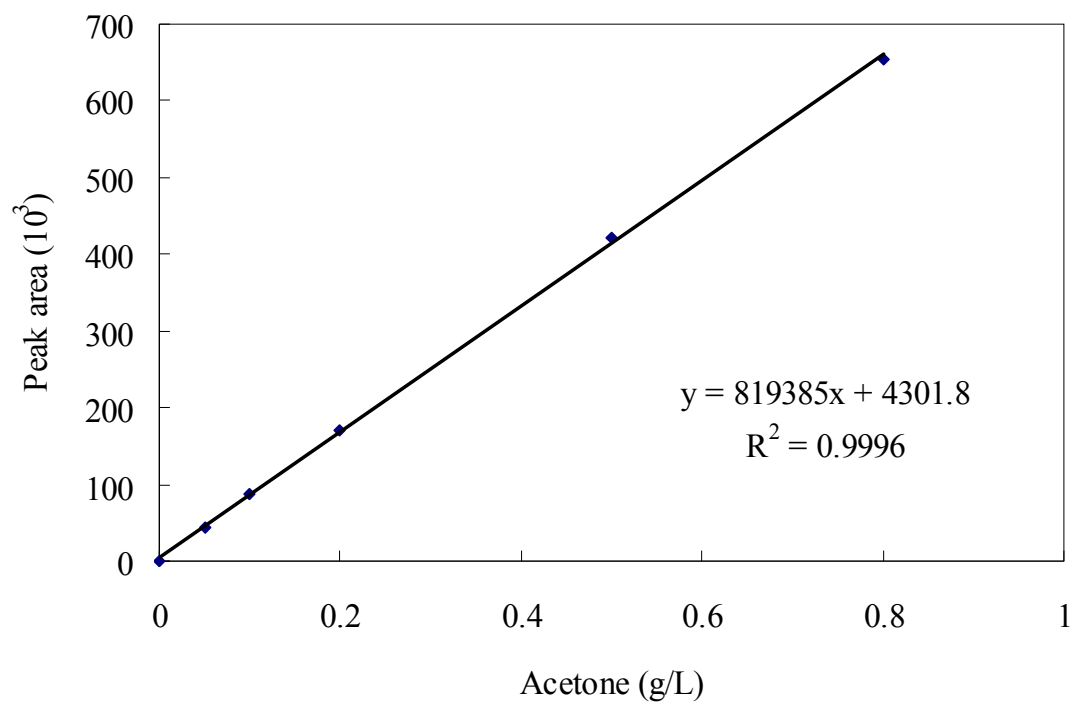


Butanol 標準檢量線

Butanol 標準檢量線方程式：

$$(\text{Peak area}) = 997759 \times (\text{Butanol conc.}) + 6518.5$$

附錄 C

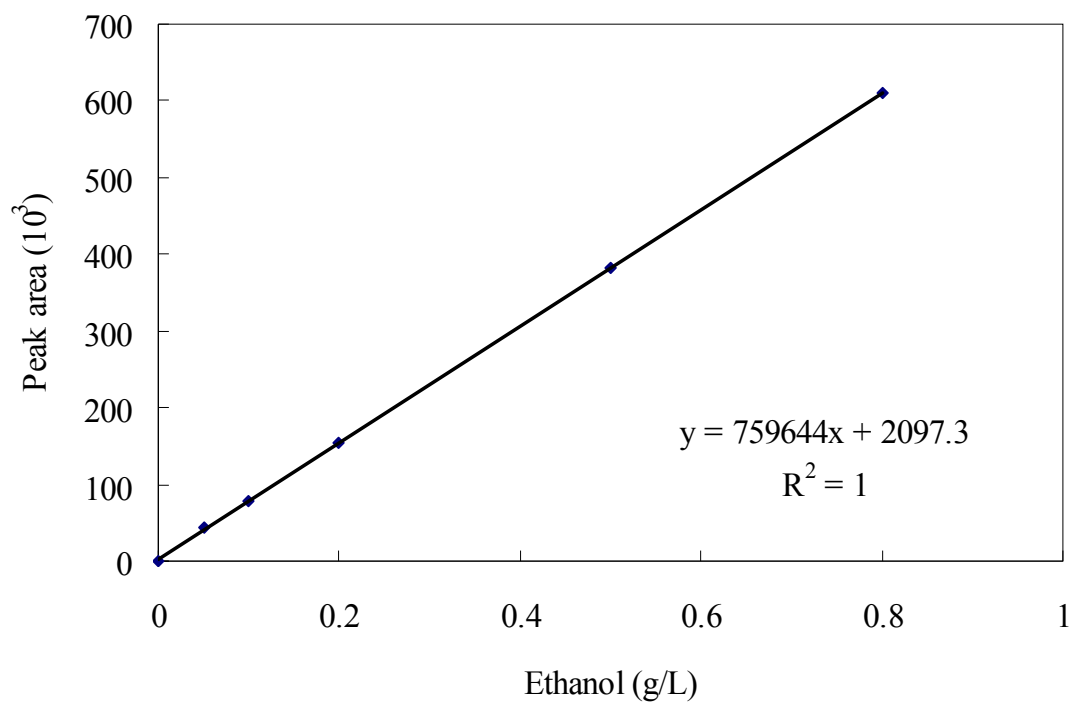


Acetone 標準檢量線

Acetone 標準檢量線方程式：

$$(\text{Peak area}) = 819385 \times (\text{Acetone conc.}) + 4301.8$$

附錄 D

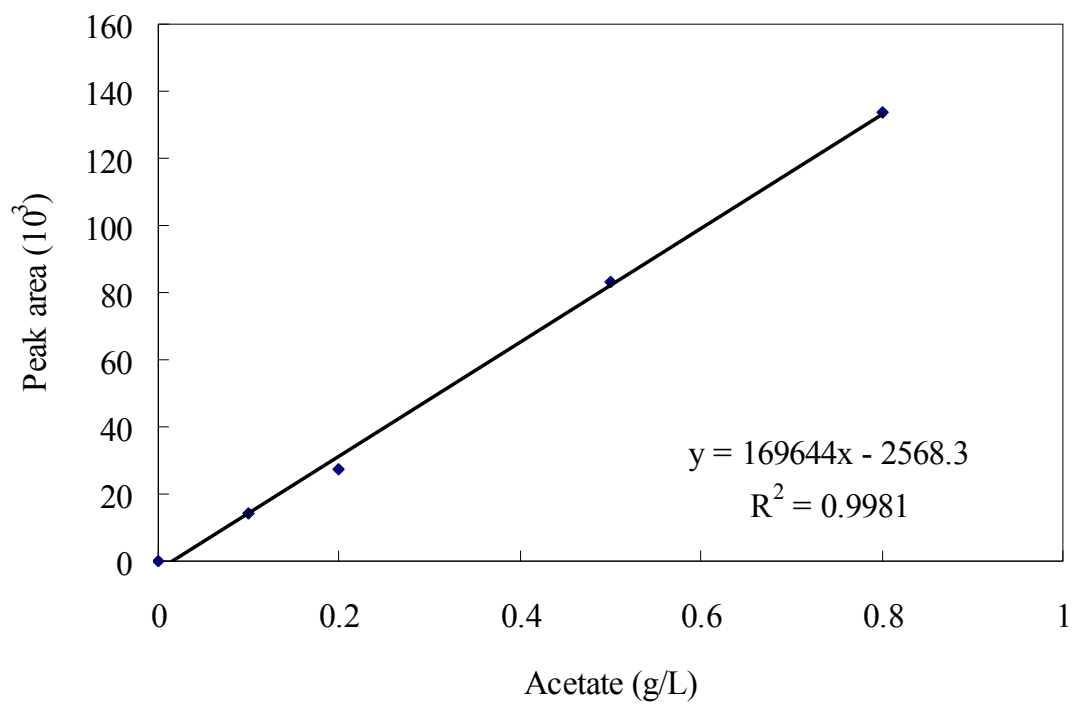


Ethanol 標準檢量線

Ethanol 標準檢量線方程式：

$$(\text{Peak area}) = 759644 \times (\text{Ethanol conc.}) + 2097.3$$

附錄 E

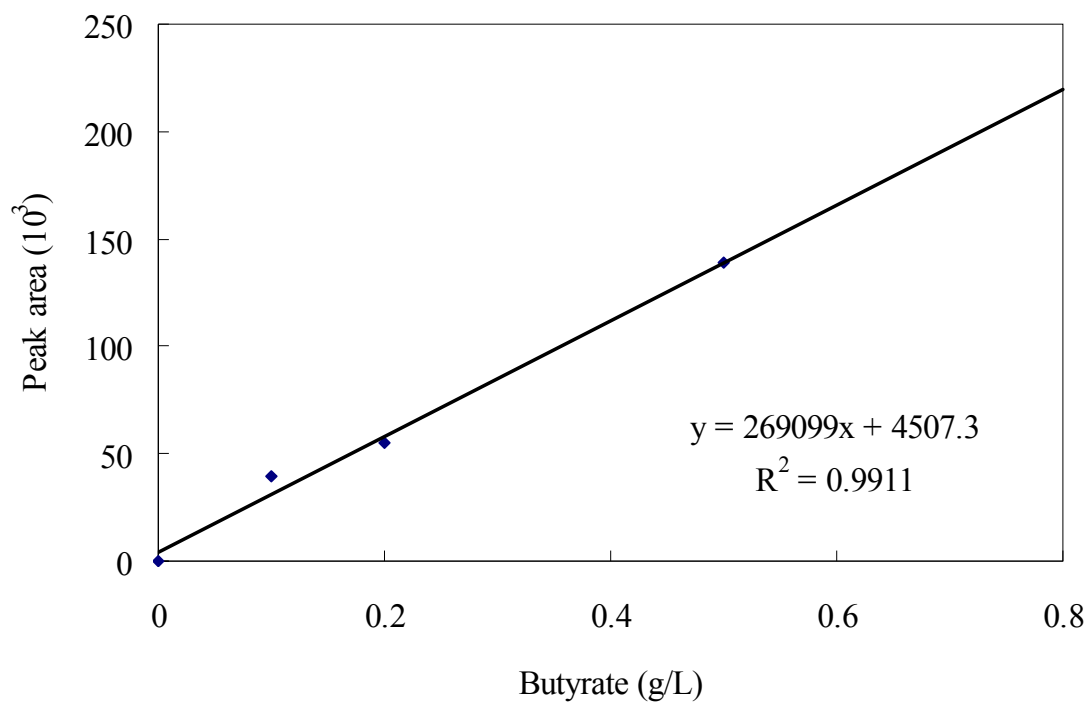


Acetate 標準檢量線

Acetate 標準檢量線方程式：

$$(\text{Peak area}) = 169644 \times (\text{Acetate conc.}) - 2568.3$$

附錄 F



Butyrate 標準檢量線

Butyrate 標準檢量線方程式：

$$(\text{Peak area}) = 269099 \times (\text{Butyrate conc.}) + 4507.3$$