

私立東海大學化學工程研究所

碩士論文

指導教授: 顏宏偉 博士

培養 *Rhodobacter sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 之程序研究

-使用氣舉式醱酵槽

Co-Q₁₀ production process by *Rhodobacter sphaeroides*

- Use air-lift bioreactor

研究生：施子元 撰

中華民國 97 年 7 月



誌謝

本篇論文的完成，首先要感謝我的指導老師顏宏偉老師，在我研究所兩年來的指導以及教誨，培養我對於實驗研究上獨立的態度以及圓融的待人處事，同時也對於我的過失給予寬宏的態度以及鼓勵，讓我在研究所的兩年光陰受益匪淺，同時感謝楊芳鏘教授、顧野松副教授、劉永銓教授、楊宗樺教授對本論文的細心審閱，惠與寶貴意見，使本論文更臻完善。

在兩年的求學期間，非常感謝學長嘉鴻、宣銘、鳳堯、瑞均，同學馨怡、秀玲、凱欣、孟村以及實驗室成員大姐素敏、宜珈、昌宇、采竹、憶芝、嘉麟、等學弟妹在實驗上面的協助以及鼓勵。另外感謝女友孟琪的陪伴以及校搞，以及在我研究所兩年生涯曾經給予我協助的老師以及同學，感謝有你們讓我的生活多采多姿，最後，僅以本論文獻給我敬愛的父母，因為有你們的支持，同時給予我關懷與鼓勵，才可以讓我在求學階段無後顧之憂的進行研究，謝謝你們。

摘要

本研究內容主要進行以液態培養 *Rhodobacter sphaeroides* 生 Co-Q₁₀ 之醱酵研究。由於 molasses 在過去的實驗中已確定為一良好碳源，因此在三角瓶實驗中，先探討不同氮源的影響性，以及利用 NaCl、KCl 的添加改變培養基滲透壓實驗，最後探討添加非離子型界面活性劑對於 *R.sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 之影響性。在醱酵槽部份，首先針對氣舉式醱酵槽以及攪拌式醱酵槽在相近的 K_La 條件下，對於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 之影響性，確定生物反應器之後，以饋料為主軸，探討在饋料同時改變溶氧的批次實驗，最後將搖瓶實驗得到最佳添加物的濃度放大至氣舉式醱酵槽作探討。

根據實驗結果顯示，非離子型界面活性劑以添加 Tween-80 (6 ml/L) 對於 Co-Q₁₀ 產量增加效果較為明顯，Co-Q₁₀ 濃度從對照組 23.52 mg/L 上升到 29.75 mg/L，整體產量提升 26%，進一步探討 Tween-80 各成分添加對於 Co-Q₁₀ 的影響。實驗結果顯示，棕櫚酸添加濃度為 3 g/L，Co-Q₁₀ 產量從對照組 23.52 mg/L 提升至 40.33 mg/L、硬酯酸添加濃度為 1 g/L，Co-Q₁₀ 產量從對照組 23.36 mg/L 提升至 38.42 mg/L，顯示此兩種飽和脂肪酸有助於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀。

氣舉式醱酵槽部份，實驗結果得知氣舉式醱酵槽以及攪拌式醱酵槽在相近的 K_La 條件下，氣舉式反應器為較適合生產 Co-Q₁₀ 的生化反應器。

饋料批次實驗證實饋料確實有助於延續菌體生長，但是單位菌體的 Co-Q₁₀ 含量卻明顯降低，因此進行兩階段溶氧饋料批次實驗，由實驗證實饋料同時間降低通氣量有助於 Co-Q₁₀ 生產，在醱酵 108 小時候得到最佳 Co-Q₁₀ 產量 45.65 mg/L，以及 Co-Q₁₀ 生產速率 0.42 mg/L hr。

關鍵字：氣舉式醱酵槽、光合菌、界面活性劑、輔酶 Co-Q₁₀、饋料批次

Abstract

The main of the thesis is using purple non-sulfer bacteria *Rhodobacter Sphaeroides* to develop a submerged fermentation process for Co-Q₁₀ production.

Firstly, the effects of different nitrogen sources and screening strategies in flask tests were discussed. After make sure the ferment medium, we discuss the effects of addition non-ion surfactants of Tween series and PEG series, and addition NaCl or KCl to increase medium osmotic. In the fermenter experiment, we use the air-lift fermenter and stirred fermenter in the similar K_La value condition to compare. Make sure the bioreactor then and studying the effect of control strategies by fed-batch were discussed.

The results of Tween series adding experiments show Tween-80 (6 ml/L) can increase the Co-Q₁₀ concentration of control group from 23.52 mg/L reach 29.75 mg/L amounts to 26%, and then we discuss the effects of addition Tween-80 components to medium. The results show addition palmitic acid (3 g/L) can increase the Co-Q₁₀ production of control group from 23.52 mg/L reach 40.33 mg/L, and stearic acid (1 g/L) can increase the Co-Q₁₀ production of control group from 23.36 mg/L reach 38.42 mg/L, these results shows two of saturated fatty acids, palmitic acid and stearic acid can increase *R. sphaeroides* production Co-Q₁₀.

The results of experiment, air-lift fermenter and stirred fermenter in the similar K_La value condition, air-lift has the better Co-Q₁₀ concentration, shows air-lift is the better bioreactor then stirred fermenter when use *R. sphaeroides*

in ferment process to production Co-Q₁₀. In fed-batch experiment, the result shows this control strategy can increase *R. sphaeroides* to growth, but specific Co-Q₁₀ content were decrease. A Co-Q₁₀ production of 45.65mg/L and production rate 0.42 mg/L hr were obtained after 108 hr of two steps of control dissolve oxygen concentration in fed-batch culture

Key word : air-lift bioreactor, photosynthetic, surfactant, Co-Q₁₀, fed-batch

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 Co-Q ₁₀ 簡介.....	2
2.1.1 Co-Q ₁₀ 的發現.....	2
2.1.2 生理功能與應用.....	3
2.1.3 電子傳遞鏈扮演角色.....	4
2.1.4 抗氧化功能.....	5
2.1.5 應用領域.....	5

2.1.6 Co-Q ₁₀ 生產方式.....	6
2.2 生產 Co-Q ₁₀ 菌種.....	10
2.2.1 光合菌介紹.....	10
2.2.2 紫色不含硫菌介紹.....	11
2.3 影響 Co-Q ₁₀ 產量的因子.....	17
2.4 滲透原理.....	19
2.4.1 滲透壓對微生物的影響性.....	19
2.5 界面活性劑介紹.....	20
2.5.1 界面活性劑之原理.....	20
2.5.2 界面活性劑之種類.....	21
2.5.3 界面活性劑對微生物的影響性.....	24
2.6 生物反應器介紹.....	26
2.6.1 攪拌式反應器.....	26
2.6.2 氣舉式反應器.....	27

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料.....	29
3.1.1 菌株.....	29

3.1.2 實驗藥品.....	29
3.2 實驗儀器.....	31
3.3 分析方法.....	33
3.3.1 菌體乾重分析方法.....	33
3.3.2 Co-Q10 的分析方法.....	33
3.3.3 糖蜜的糖度分析方法.....	35
3.4 實驗方法.....	35
3.4.1 菌種培養.....	35
3.4.2 培養基組成.....	36
3.5 實驗培養條件.....	38
3.5.1 不同氮源對產量之影響.....	38
3.5.2 添加氯化鈉、氯化鉀之影響.....	38
3.5.3 添加非離子型界面活性劑之影響.....	39
3.5.4 非離子型界面活性劑各成分添加之影響.....	39
3.5.5 醱酵槽實驗.....	40
第四章 結果與討論	47
4.1 論文架構.....	47

4.2 探討不同氮源之影響.....	49
4.3 探討添加氯化鈉、氯化鉀之影響.....	49
4.4 探討添加非離子型界面活性劑之影響.....	54
4.5 探討 Tween-80 界面活性劑各成分添加之影響.....	58
4.6 氣舉式醱酵槽通氣量探討.....	60
4.7 攪拌式醱酵槽批次實驗.....	60
4.8 氣舉式醱酵槽饋料批次實驗.....	61
4.9 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗 (2 vvm to 1 vvm).....	63
4.10 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 0.5 vvm).....	64
4.11 氣舉式醱酵槽添加 Tween-80 界面活性劑.....	64
4.12 氣舉式醱酵槽添加棕櫚酸實驗.....	65
第 五 章 結 論 與 展 望.....	78
5.1 結 論.....	78
5.2 展 望.....	81
參 考 文 獻.....	82

圖目錄

圖 2-1 Co-Q ₁₀ 結構圖.....	2
圖 2-2 電子傳遞鏈抑制劑的作用點.....	8
圖 2-3 stains 抑制 HMG-COA reductase 路徑圖.....	9
圖 2-4 光合細菌依需氧性與否之分類	16
圖 2-5 界面活性劑之構造及分類.....	25
圖 3-1 biomass 檢量線.....	34
圖 3-2 Co-Q ₁₀ 檢量線.....	34
圖 3-3 溶氧 vs 時間圖.....	42
圖 3-4 手持式糖度計.....	46
圖 3-5 菌種活化平板培養基.....	46
圖 3-6 氣舉式醱酵槽操作照片.....	46
圖 4-1 論文架構圖.....	48
圖 4-2 不同氮源之影響.....	51
圖 4-3 添加 NaCl 對菌體以及 Co-Q ₁₀ 的影響.....	52
圖 4-4 添加 KCl 對菌體以及 Co-Q ₁₀ 的影響.....	53
圖 4-5 氣舉式醱酵槽不同通氣量實驗.....	66

圖 4-6 氣舉式醱酵槽氧氣質傳係數.....	67
圖 4-7 攪拌式醱酵槽氧氣質傳係數.....	68
圖 4-8 攪拌式醱酵槽批次實驗.....	69
圖 4-9 氣舉式醱酵槽饋料批次實驗.....	70
圖 4-10 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 1 vvm)	71
圖 4-11 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 0.5 vvm)	72
圖 4-12 醱酵槽不同控制策略數據比較(biomass)	73
圖 4-13 醱酵槽不同控制策略數據比較($Co-Q_{10}$)	74
圖 4-14 氣舉式醱酵槽添加界面活性劑 Tween-80 實驗.....	75
圖 4-15 氣舉式醱酵槽添加棕櫚酸實驗.....	76

表目錄

表 2-1 不同種類微生物的 Co-Q ₁₀ 產量.....	12
表 2-2 野生菌株和人工改質菌株生產 Co-Q ₁₀ 的結果比較.....	13
表 2-3 <i>R. sphaeoides</i> 在不同碳源以及溶氧環境的生長模式.....	14
表 2-4 不同光合菌所含的 Quinone 成份.....	15
表 2-5 影響 <i>R. sphaeroides</i> Co-Q ₁₀ 產量的因子.....	18
表 3-1 平板培養基配方.....	36
表 3-2 種瓶培養基配方.....	37
表 3-3 醱酵培養基配方.....	37
表 4-1 添加非離子型劑面活性劑對 Co-Q ₁₀ 產量的影響.....	56
表 4-2 界面活性劑 Tween-80 各成分添加對 Co-Q ₁₀ 產量的影響.....	59
表 4-3 醱酵槽不同操作條件下 Co-Q ₁₀ 產量比較.....	77

第一章 緒論

輔酶 Co-Q₁₀ (Coenzyme Q₁₀, Ubiquinone) 存在於生物體的細胞內，主要功能為協助細胞中粒線體酵素所進行的氧化磷酸化反應 (oxidative phosphorylation) 之輔酵素，而產生細胞所需要的能量 ATP，讓細胞能量供應系統能快速運作，並且穩定細胞膜結構不受電子或高能量物質的傷害。因此在代謝旺盛的器官如心臟、腎臟中有著較高的含量。Karl Folkers 教授於 1972 年發表人類心臟病經常伴隨有輔酵素 Co-Q₁₀ 濃度缺乏的臨床現象理論。因此早期大部分的輔酵素 Co-Q₁₀ 臨床試驗會鎖定改善心肌病變 (cardiomyopathy)，由於 Co-Q₁₀ 是一種天然物質，且在長期研究中對人體並沒有明顯的副作用，於是日本首先在 2000 年開放 Co-Q₁₀ 為食品添加原料，廠商也相繼開發出添加 Co-Q₁₀ 的相關產品，以抗老化的訴求廣泛的應用在保健食品、日常飲料，以及美容保養品上。台灣於 2005 年底，將 Co-Q₁₀ 由醫藥品列管名單中排除。行政院衛生署隔年初即公告 ”開放輔酵素 Co-Q₁₀ 為食品原料及其產品應加標警語標示”。2000 年 Co-Q₁₀ 在日本市場需求只有 3.5 噸，產值為 740 百萬日圓；而 2004 年已增加至 9 噸，1650 百萬日圓，不論是產值以及產量都以驚人速度在成長，具有相當大的市場潛力。(蘇，2005)

第二章 文獻回顧

2.1 Co-Q₁₀ 簡介

2.1.1 Co-Q₁₀ 的發現

輔酶 Co-Q₁₀ 首先於 1957 年被 Frederuck Crane 博士從牛心臟細胞的粒腺體中被分離出 (Crane et al., 1957)，分子式 C₅₉H₉₀O₄，分子量 863.36。苯環狀結構的生合成(biosynthesis of benzoquinone)來自於氨基酸—Tyrosine 或 Phenylalanine，尾端是由數個異戊二烯單元 (isoprene units) 組成的長支鏈，異戊二烯單元的數目隨不同物種而不同，人體細胞的輔酶素有 10 個異戊二烯單元故稱之為輔酶素 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀)。

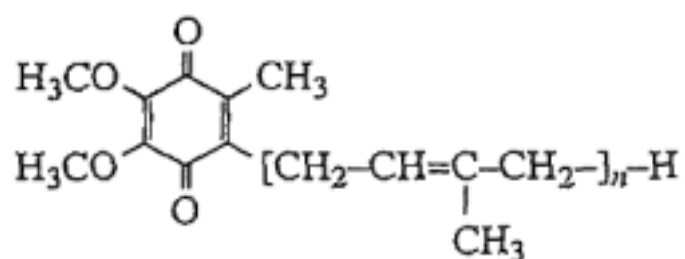


圖 2-1 Co-Q₁₀ 結構 (Ernster & Dallner, 1995)

2.1.2 生理功能與應用

Co-Q₁₀ 主要有協助細胞進行電子傳遞鏈產生能量與抗氧化的兩大生理功能(Ernster and Dallner, 1995)，Co-Q₁₀ 主要扮演粒線體酵素所進行的氧化磷酸化反應(oxidative phosphorylation)之輔酵素，在產生能量的電子傳遞鏈 (electron transport chain) 中負責接收與傳遞電子，將碳水化合物與脂肪之能量轉換成腺核甘三磷酸(adenosine triphosphate, ATP) ，以維持細胞正常運作與生合成的進行(Crane, 2001)，另一方面 Co-Q₁₀ 具有很強的抗氧化作用，在粒線體內層的膜上，可與維生素 E 互相為彼此之還原劑，來保護人體細胞組織不受氧化傷害。此外 Co-Q₁₀ 其他生理機能包括：影響前列腺素之代謝，抑制細胞內磷脂水解酶與維持細胞膜上鈣離子通道之穩定性(Alleva et al, 1995)。臨床試驗結果顯示，每天補充 Co-Q₁₀ 確實可改善充血性心臟衰竭的病症，目前為止的研究報告中並沒有發現 Co-Q₁₀ 對人體會有毒性或是副作用，因此也可以作為保健食品之配方成分。

2.1.3 電子傳遞鏈扮演角色

細胞代謝原理是將電子供體 (electron donor) 氧化，並將質子 (H^+) 排出膜外，而電子則回到膜內的電子受體 (electron acceptor)，讓膜內外因質子濃度不同形成 pH 梯度。而膜外高濃度 H^+ 離子為了進入膜內產生的質子動力 (proton motive force) 推動 ATP 酶作用產生 ATP。由於細胞膜是一層排列緊密的屏障，大部分的分子無法自由穿越細胞膜，因此為了將膜內質子或電子順利轉移便須依靠各式的膜聯性電子載體 (electron carrier) 作用而形成電子傳遞鏈。

如圖 2-2 所示電子從電子供體 NADH 分解出之後，分別經過黃素單核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN)、輔酶 Q (Co-Q)、鐵硫蛋白 (FE-S)，以及幾種細胞色素 (cytochrome) 的作用而轉移到電子受體 O_2 上。而以上各種載體中 Co-Q 是唯一可在膜內自由移動的非蛋白質成份，因此 Co-Q 含量的高低，也直接影響細胞代謝產生 ATP 的能力。

有許多化學物質會干擾電子載體的作用而稱為電子傳遞抑制劑，不同的抑制劑會作用在不同的載體上，例如魚藤酮 (rotenone)、阿米妥 (amytal)、殺粉蝶菌素 A (piericidin A) 以及 myxothiazol 會抑制黃素單核苷酸 (FMN)

到 Co-Q₁₀ 的電子流動，因而阻斷氧化磷酸化的整個流程，疊氮化物(azide, N₃⁻)、氰化物(CN⁻)、以及一氧化碳(CO)會與細胞色素的鐵原子緊密結合，而阻止其氧化還原作用，而抗生素 A (antimycin A)、則作用在細胞色素 a₃ 至 O₂ 的路徑上，但最終都會因中止電子的流動而使 ATP 不再合成。(Brock & Madigan, 1988)

2.1.4 抗氧化功能

在人體代謝的時候常會產生活性氧物質，讓細胞組織因氧化而受到傷害，影響正常的細胞表現成為老化的原因之一，通常人體中會存在維生素 E 等抗氧化物質來保護人體不受氧化傷害，但維生素 E 作用後也會形成引發氧化作用的不穩定狀態，而 Co-Q₁₀ 可幫助維生素 E 恢復穩定，達到抗氧化的效果 (Alleva et al., 1995)，以及抑制粒線體的過氧化，保護生物細胞膜的完整性。

2.1.5 應用領域

由於人體的心臟組織中有較高的 Co-Q₁₀ 濃度，因此早期研究方向偏向心臟病的治療 (Singh et al., 1998)，主要應用於充血性心臟衰竭。但近年因充分了解作用原理後也被用於改善帕金森氏症 (Baeclay, 2002)，降低

高血壓 (Burke et al., 2001) 及對抗癌症 (Portakal et al., 2000)。另外，在服用降低膽固醇的 Statin 系列藥物時會抑制一種 HMG-COA reductase (3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A) 的酵素 (圖 2-3)，因此在降低膽固醇的同時也降低了人體內的 Co-Q₁₀ 濃度 (Leo Marcoff., 2007)，所以醫師常會建議在服用 Statin 系列藥物的同時補充 Co-Q₁₀。

由於 Co-Q₁₀ 是一種天然性的維他命，並且在長期研究中並沒有副作用的產生，因此日本正式在 2000 年將 Co-Q₁₀ 由醫療藥品改列為沒有標示醫療效能的食品原料，而台灣亦於 2005 年底正式跟進，將 Co-Q₁₀ 改為食品添加原料。此後 Co-Q₁₀ 以抗老化、預防皺紋產生等健康訴求廣泛的應用在生活飲料與美容化妝品中。

2.1.6 Co-Q₁₀ 生產方式

目前 Co-Q₁₀ 的生產方式可分為：生物萃取法、化學合成法以及微生物醱酵等，其中生物提取法因成本過高，較無經濟價值，所以目前工業上以化學合成法以及微生物醱酵法做為生產方式。化學合成法的優點是有較低的生產成本，但需耗費大量的酸鹼溶液且反應過程中常合成異構物；而微生物醱酵法生產 Co-Q₁₀ 有較佳穩定性，且反應條件溫和，是較環保的

生產方式，若能改進醱酵產率，即可大量減少生產成本。

自從 1967 年日清製粉公司首先以化學合成法成功量產 Co-Q₁₀ 後，日本就成為最致力於 Co-Q₁₀ 研究的國家之一。全球前四大 Co-Q₁₀ 供應商，KANEKA、日清製粉、旭化成製藥以及三菱氣體化學等皆為日本廠商，其中除了日清製粉公司以化學合成法生產 Co-Q₁₀，KANEKA 公司採用酵母醱酵法，旭化成製藥以及三菱氣體化學皆以細菌醱酵法做為生產方式。

(蘇，2005)

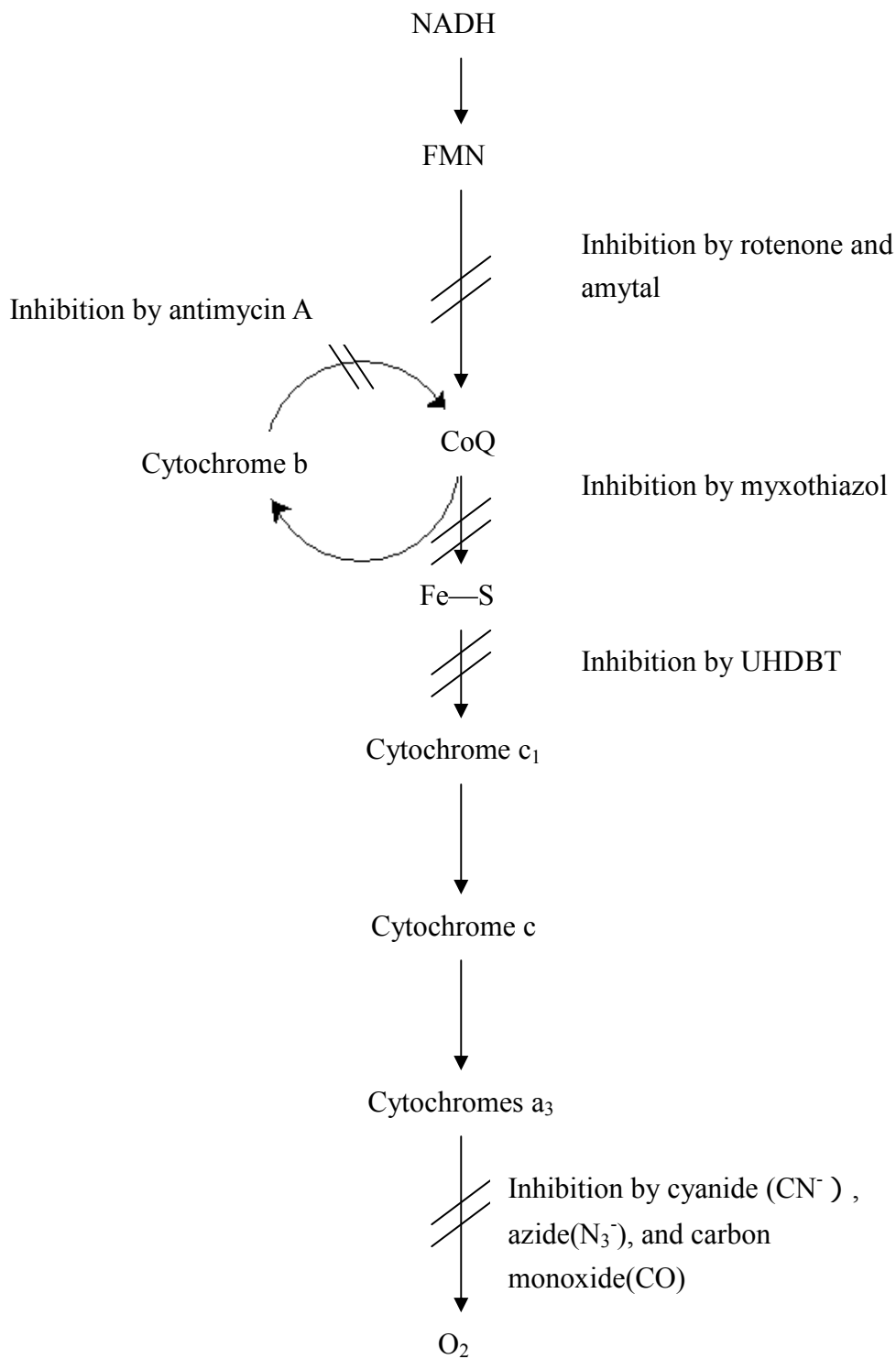


圖 2-2 電子傳遞鏈抑制劑的作用點 (Mary & Shawn, 2006)

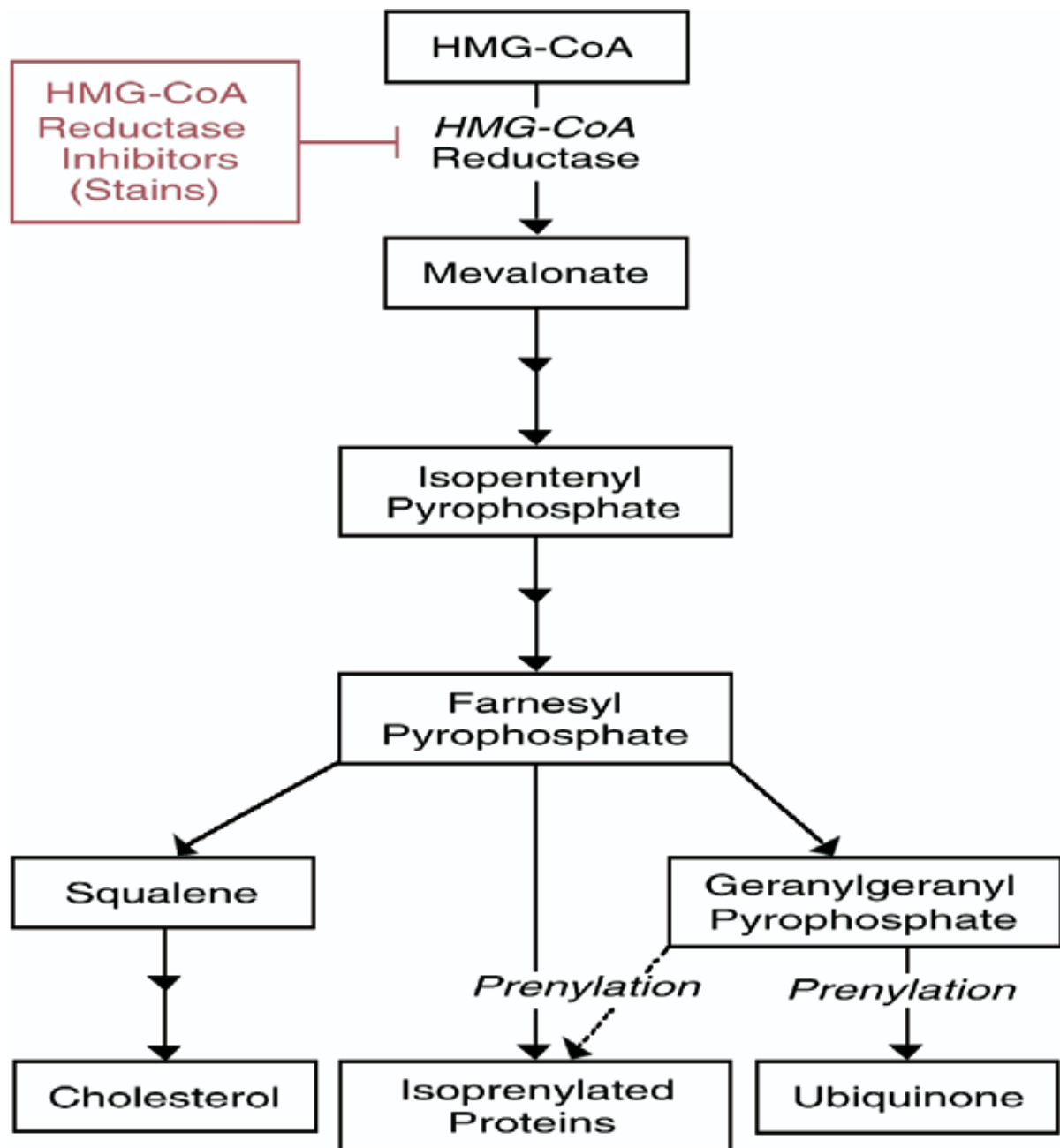


圖 2-3 stains 抑制 HMG-COA reductase 路徑圖 (Leo & Paul D, 2007)

2.2 生產 Co-Q₁₀ 菌種

Co-Q₁₀ 廣泛存在各種微生物中，於過往文獻也探討了各類微生物生產 Co-Q₁₀ 的可能性，在 Sasikala 和 Rammana (1995) 的整理中可看出厭氧光合菌通常有較高的 Co-Q₁₀ 產量 (表 2-1)，另外根瘤菌屬的 *Agrobacterium tumefaciens* (Yoshida et al., 1995) *Rhizobium radiobacter* (Wu et al., 2003) 也是常被應用的野生菌株。在人工改質方面，由表 2-2 可看出目前以化學藥劑突變篩選高產菌種的方法有相當好的成效，遠比基因工程改質能得到更高的 Co-Q₁₀ 產量。

2.2.1 光合菌介紹

光合菌(Phototrophic Bacteria)是一類含細胞葉綠素和多種類胡蘿蔔素等光合色素，能進行光合作用的原始細菌，它們廣泛分佈於土壤及各種水域環境中，分類上屬於真菌綱，紅螺細菌目。

根據其對氧氣的作用機制以及對硫化物代謝的不同可分類為：行有氧光合作用的藍綠菌 (cyanobacteria)，以及無氧光合作用的綠色非硫菌 (green non-sulfur bacteria)、綠色含硫菌 (green sulfur bacteria)、紫色非硫菌 (purple non-sulfur bacteria)、紫色含硫菌 (purple sulfur bacteria) 等。

2.2.2 紫色不含硫菌介紹

紫色不含硫菌一般為兼性細菌，可利用有機物為電子供體，氧氣為電子受體行有氧代謝作用，或是以還原性化合物如氫氣、 H_2S 為電子供體將二氧化碳還原成有機碳源的無氧光合作用（Anoxygenic photosynthesis），代謝方式相當多元。如表2-3所示，菌株*Rhodobacter sphaeroides*可以在不同溶氧與光照條件下代謝生長，而厭氧照光以及有氧異營是較合適的培養條件。在眾多的紫色非含硫菌中，除了生產Co-Q₁₀之外，也會產生不同側鏈的醌系（Quinone）產物，Sasikala整理出一些光合菌的醌系（Quinone）產物如表2-4，由於人體的輔酶僅以Co-Q₁₀的形式存在，因此主要醌系產物也是考量生產菌種的重要因素。

表2-1 不同種類微生物的Co-Q₁₀產量 (Sasikala & Ramana, 1995)

PRODUCTION OF UBTQUINONE BY DIFFERENT GROUPS OF MICROORGANISMS		
Organisms	Growth condition	Ubiquinone produced (umol/g dry wt)
Anoxygenic phototrophic bacteria		
<i>Rb. capsulatus</i>	Aerobic dark	2.68
	Anaerobic light	5.3
<i>Rb. sphaeroides</i>	Aerobic dark	1.51
	Anaerobic light	5.3
<i>Rb. sulfidophilus</i>	Anaerobic light	4.2
<i>Rps. palustris</i>	Aerobic dark	0.20
	Anaerobic light	4.5
<i>Rps. viridis</i>	Anaerobic light	3.0
<i>R. rubrum</i>	Aerobic dark	1.31
	Anaerobic light	6.3
<i>R. fulvum</i>	Anaerobic light	3.8
<i>R. molishianum</i>	Anaerobic light	2.7
<i>Rm. vannicelli</i>	Aerobic dark	0.0
	Anaerobic light	3.0
<i>Rc. gelatinosus</i>	Aerobic dark	1.71
	Anaerobic light	2.78
<i>Chromatium sp</i>	Anaerobic light	2.7
<i>Heliobacterium chlorum</i>	Anaerobic light	0.35
Nonphotosynthetic bacteria		
Gram-positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i>	Aerobic	<0.001
<i>B. megaterium</i>	Aerobic	<0.001
<i>Lactobacillus casei</i>	Aerobic	<0.001
<i>Clostridium sporogenes</i>	Anaerobic	<0.001
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	Aerobic	<0.001
Gram-negative bacteria		
<i>Axotobacter chroococcum</i>	Aerobic	0.48
<i>Escherichia coli</i>	Aerobic	0.41
<i>Proteus vulgaris</i>	Aerobic	0.67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aerobic	1.59
<i>P. denitrificans</i>	Aerobic	
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Aerobic	0.72
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>	Aerobic	0.12
<i>Chromobacter prodigiosum</i>	Aerobic	0.35
<i>Neisseria catarrhalis</i>	Aerobic	2.05
<i>Achromobacter hartlebii</i>	Aerobic	0.45
Protozoa		
<i>Euglena gracilis</i>	Aerobic	0.21

表 2-2 野生菌株和人工改質菌株生產 Co-Q₁₀ 的結果比較(Choi et al.,2005)

Microorganism		Culture collection number	Coenzyme Q ₁₀ conc. (mg/L)	Coenzyme Q ₁₀ content (mg/g)	Reference
Wild type	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ATCC 4452	458	8.5	Ha et al.(2007)
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	ATCC 19367	27.6	0.8	Yoshida et al.(1998)
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Ferm-P4675	350	8.7	Yoshida et al.(1998)
Chemical mutants	<i>A. tumefaciens</i> AU-55		185.0	5	Yoshida et al.(1998)
	<i>R. sphaeroides</i> Co-22-11		346.8	8.7	Yoshida et al.(1998)
	<i>Rhodopseudomas spheroides</i> KY8598		770.0	14.5	Sakato et al. (1992)
Recombinant strain	<i>Escherichia coli</i> BL21/pAcddsA		25.5	0.3	Park et al. (2004)

表 2-3*R. sphaeoides* 在不同碳源以及溶氧環境的生長模式(Koku et al., 2002)

Mode of growth	Carbon source	Energy Source	Notes and relation to hydrogen production
Photoheterotrophy	Organic carbon	Light	Preferred growth mode by PNS bacteria. Only mode resulting in hydrogen production
Photoautotrophy	Inorganic carbon(CO ₂)	Light	In the absence of organic carbon. Result in consumption of hydrogen.
Aerobic respiration (chemoheterotrophy)	Organic carbon	Organic carbon	In the presence of oxygen. Stops hydrogen production.
Anaerobic respiration (chemoheterotrophy)	Organic carbon	Organic carbon	Under anaerobic, low light availability conditions. (Requires terminal electron acceptor other than O ₂ . such as nitrate). No hydrogen production. Marginal growth
Fermentation	Organic carbon	Organic carbon	Under anaerobic-dark conditions. No hydrogen production. Allows marginal growth

表 2-4 不同光合菌所含的 Quinone 成份(Sasikala & Rammana,1995)

Group/species	Presence of			Major homologue(s)	
	Q	RQ	MK		
Purple nonsulfur bacteria					
<i>Rhodospirillum</i>					
<i>R. rubrum</i>		+	+	-	10
<i>R. photometricum</i>		+	+	-	8
<i>R. fulvum</i>		+	-	+	9
<i>R. molischiannum</i>		+	-	+	9
<i>R. salexigens</i>		+	-	+	10
<i>R. salinarum</i>		+	-	+	10
<i>Rhodobacter</i>					
<i>Rb. capsulatus</i>		+	-	-	10
<i>Rb. veldkampii</i>		+	-	-	10
<i>Rb. sphaeroides</i>		+	-	-	10
<i>Rhodovulum</i>					
<i>Rv. sulfidophilus</i>		+	-	-	10
<i>Rv. adriaticus</i>		+	-	-	10
<i>Rhodopseudomonas</i>					
<i>Rps. palustris</i>		+	-	-	10
<i>Rps. rutila</i>		+	-	-	10
<i>Rps. blastica</i>		+	-	-	10
<i>Rps. acidophila</i>		+	+	+	10
<i>Rps. viridis</i>		+	-	+	9
<i>Rps. marina</i>		+	-	+	10
<i>Rps. sulfoviridis</i>		+	-	+	8+10
<i>Rhodomicrobium</i>					
<i>Rm. vannielli</i>		+	+	-	10
<i>Rhodopila</i>					
<i>R. globifarmis</i>		+	+	+	9+10
<i>Rhodocyclus</i>					
<i>Rc. pruprueus</i>		+	-	+	8
<i>Rc. tenuis</i>		+	-	+	8
<i>Rc. gelatinosus</i>		+	-	+	8
<i>Rhodoferax</i>					
<i>Rfe. fermentons</i>		+	+	-	8
Purple sulfur bacteria					
<i>Chromatium sp.</i>		+			7
<i>C. vinosum</i>		+	-	+	8
<i>C. warningii</i>		+	-	+	8
<i>Thiocapsa roseopersician</i>		+	-	+	8
<i>Thiocystis gelatinosa</i>		+	-	+	8
<i>Ectothiorhodospira</i>					
<i>E. mobilis</i>		+	-	+	7

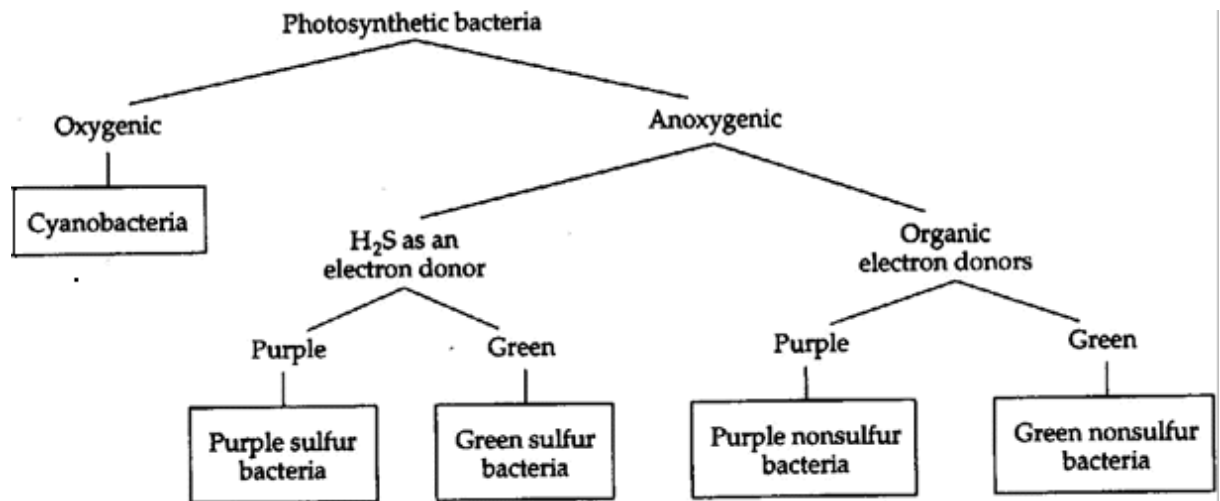


圖 2-4 光合細菌依需氧性與否之分類 (Rollins & Joseph, 2002)

2.3 影響 Co-Q₁₀ 產量的因子

在以微生物法生產 Co-Q₁₀ 的醱酵製程中，除了探討基本的環境因子 pH、溫度對產量的影響外 (Sasaki and Nagai, 1979)，表 2-5 列出一些會影響 Co-Q₁₀ 產量的因子，近幾年研究方向偏向於在針對菌體內的電子呼吸傳遞鏈中，生成 Co-Q₁₀ 的前驅物，例如胺基酸 tyrosine、antimycin，維生素 riboflavin、nicotinic acid、biotin、以及 thiamine hydrochloride，這些物質會參與 Co-Q₁₀ 的合成路徑 (Folkers et al., 1995)，因此能提升 Co-Q₁₀ 的生成，在文獻上 (Choi et al., 2005)，添加抑制菌體內電子呼吸傳遞鏈的抑制劑疊氮化物 (azide)，質子釋放劑 (proton gradient releaser)，以及氧化劑 (H_2O_2) 來探討對於 Co-Q₁₀ 生產的影響性 (Choi et al., 2005)，醱酵槽部份透過溶氧的控制以及饋料批次 (fed-batch) 的操作策略 (Suk et al., 2006)，一方面可以避免初始高濃度的糖蜜導致高滲透壓的抑制菌體生長現象，另一方面可以有效的延續在醱酵過程中菌體的生長時間。

表 2-5 影響 *R. sphaeroides* Co-Q₁₀ 產量的因子

影響因子	影響機制	最高產量 (mg/L)	參考文獻
pH，溫度	影響菌體生長	972.2	Yoshida et al.(1998)
溶氧	菌體代謝	30.51	邱，(2007)
金屬離子 (Mg ²⁺ 、Mn ²⁺ 、Fe ²⁺)	呼吸電子傳遞鏈速率	31.61	劉，(2007)
光照(厭氧)	菌體不同代謝路徑	18.22	Yen and Chiu (2007)
碳源	影響菌體生長	31.24	劉，(2007)
氮源	影響菌體內胺基酸生成	27.41	In this study
碳氮比	影響菌體生長	28.97	劉，(2007)
胺基酸，維生素	合成 Co-Q ₁₀ 的前驅物	60.02	劉，(2007)

2.4 滲透原理

所謂滲透是指以半透膜隔開兩種不同濃度的溶液，其中溶質不能透過半透膜，則濃度較低的一方水分子會通過半透膜到達濃度較高的另一方，直到兩側的濃度相等為止。在還沒達到平衡之前，可以在濃度較高的一方逐漸施加壓力，則前述之水分子移動狀態會暫時停止，此時所需的壓力叫作 "滲透壓 (osmotic pressure)"，如果施加的力量大於滲透壓時，則水份的移動會反方向而行，也就是從高濃度的一例流向低濃度的一方，這種現象就叫作"逆滲透"。

2.4.1 滲透壓對微生物的影響性

在高滲透壓的環境下，會導致菌體水分往細胞外移動，使菌體水分流出細胞外，而使菌體有脫水萎縮的現象產生，造成菌體內酵素活性降低，進而影響菌體的代謝以及生長。低滲透壓的環境下，會導致水分進入細胞使細胞產生膨脹的現象。文獻當中指出(Tjakko, 1989)，在培養基內添加 NaCl 以及 KCl，對於 *R. sphaeroides* 生長有抑制的效果，並且在不同 NaCl 濃度下，菌體的代謝路徑也會不同，但是文獻中並沒有探討對於 Co-Q₁₀ 產量的影響性，因此本研究中添加 NaCl 以及 KCl，探討對於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 的影響性。

2.5 界面活性劑介紹

人類使用最早的界面活性劑俗稱肥皂，其化學簡式為 RCOOM (R：長鏈烷基，M：鹼鹽)，所謂界面活性劑就是一個分子中同時含有長鏈烷基（如脂肪酸等）之親油基及足以使油性部份在水中分散或溶解之親水基的化學物質總稱。界面活性劑除了肥皂之外，出現最早的年代約在 1830 年，當時為改善染色助劑肥皂不耐硬水之缺點而由橄欖油或蓖麻油以硫酸處理之後，再以鹼中和得到土耳其紅油，其後逐漸發展合成界面活性劑(王，1975)。此外界面活性劑必須具有下列基本性質：(1) 表面吸附性。(2) 表面面膜形成性及排列性。(3) 表面張力降低性。(4) 微胞 (micell) 形成性。

2.5.1 界面活性劑之原理

界面活性劑為吸附於兩相 (two phases) 之界面，使其表面張力或界面張力降低，在分子中兼具有非極性 (nonpolar) 之油性基及具極性 (polar) 之親水基，由此二基適當的平衡 (hydrophilic lipophilic balance, HLB) 而表現界面活性，表 2-6 顯示不同界面活性劑的 HLB 值。易言之，界面活性劑為促進油脂易溶於水中，可以降低兩相間之表面張力，或油水間之界面張力。

2.5.2 界面活性劑之種類

界面活性劑分子可分為親油基 (lipophilic group)、連結基與親水基 (hydrophilic group) 三部分，溶於水後可視親油部分解離成陰離子、陽離子、兩性離子 (因水溶液之 pH 而解離成陽或陰離子) 或不解離成離子，而分為陰離子型界面活性劑、陽離子型界面活性劑、兩性離子型界面活性劑和非離子型界面活性劑等四大類，如圖 2-7 所示。

1. 陰離子型界面活性劑

皂類可以簡式 RCOOM 表示之，最簡單的分子是醋酸鹽 (CH_3COOM)，鹼鹽除 Na、K、Ca 外，尚有有機胺鹽。在水溶液中可解離，疏水基端含負電荷，呈中低至弱鹼性。

目前來說用途最廣的是陰離子型界面活性劑，佔全部界面活性劑用量的大半，但不適用於低 pH 值及高溫場合。製造成本低、價格低廉為其特色，常被用為濕著劑，清潔劑與乳化劑等。

2. 陽離子型界面活性劑

典型的陽離子型界面活性劑為有機胺鹽類和第四級銨鹽類等，前者構造式如氯化銨，但其中最至少有一個 H 原子被長鏈烷基所取代，長鏈烷基為鹼性，但其磺酸鹽水溶液却呈現弱酸性。後者除氮元素之

第四級銨鹽外，尚包括磷、硫等元素與四個烷基鍵結後，以陰離子之 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 $\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OSO}_3^-$ 等配位結合而成。

純粹之第四級銨鹽為近中性，具有極大之表面吸附、表面活性。與其他相同碳數基之陰離子型、非離子型界面活性劑比較時，其水溶液最大，亦即此界面活性劑本身之 HLB 值較大（親水性—親油性之平衡值）。再者，第四級銨氫氧化物具強鹼性，可利用為觸媒。

而陽離子型界面活性劑之一般應用方面，是在具有殺菌、防黴、殺蟲性者甚多。其他尚有適合於均染緩染劑、直接染料堅牢度增進劑、織物柔軟劑、防水劑、對於紡織之靜電防止劑、軟式洗濯劑、塑膠凝固液之噴嘴梗塞防止及溶液之澄清劑、硫化礦等之浮選劑、銅之酸蝕抑制劑、橡膠加硫促進劑等。

3. 非離子型界面活性劑

前述之鹽類除陰陽二型以外，尚有非鹽類型者，即非離子型界面活性劑。所謂非離子型活性劑，均為多價醇之誘導，其水溶液所具有之界面活性，曾被認為分子全體所發出者。代表性之非離子型界面活性劑如聚氧乙烯烷基醚 $[\text{RO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}]$ 之水溶液為酸性（ $\text{pH}=5\sim 6$ ），但一般製品仍以調製成中性者為多。其他多元醇之脂肪酸如山梨糖脂肪酸酯，因山梨糖醇中有 5 個—OH 基，其結合之脂肪酸個

數可自由調整，結合數愈少對水之親和性愈大，而結合之脂肪酸碳數，亦可由辛酸至硬脂酸任意選擇，所產生之多元醇脂肪酸酯之 HLB 值可由低值至高值間變化，也就是可合成自油溶性至水溶性。

而聚氧乙烷系、聚氧乙烯—聚氧丙烯系非離子型界面活性劑，會因聚合度之不同，水溶液開始完全透明溶解，但在一定溫度下會立刻變濁的現象，亦即所謂的濁點（clouding point）。此乃因活性劑分子中氧化乙烯基水和現象改變所致，在加熱至一定溫度時，產生脫水（dehydration）現象而使溶解性消失。

非離子型活性劑之一般應用在合成高分子聚合用乳化劑、可塑劑、金屬清淨劑、纖維度保持劑，纖維加工劑、醫藥化粧品、潤滑劑、電染色劑等。

4.兩離子型界面活性劑

常見的兩離子型界面活性劑的構造類似胺基酸（ $RR'C(NH_2)COOH$ ），即分子中有胺基和酸基，在酸性溶液中，分子中的胺基與酸作用而溶解；在鹼性溶液中，酸基與鹼中和而有水溶性，因此純物質具有等電點。此外尚有內銨鹽型，磺化內銨鹽型，磺化胺基酸型等。兩離子型界面活性劑主要用途有洗髮精基劑、潤絲精基劑、柔軟劑（毛髮、纖維）、防銹劑等，其特性是幾乎無蛋白凝結性。

2.5.3 界面活性劑對於微生物的影響性

界面活性劑依其性質而言，其吸附配向力大，不難想像其具有某些生理活性，在目前實際的應用領域上，陽離子性界面活性劑對於革蘭陽性及陰性菌具有強大抗菌性；其次，兩性離子以及陰離子型界面活性劑亦具有抗菌性，而非離子型界面活性劑則被認為是抗菌性最弱，並且在文獻當中指出，以非離子型界面活性劑 Tween-80 為培養基碳源，對於以油脂類為碳源的微生物而言，Tween 80 的水解速率較慢，在培養過程中以控制釋放的模式，可以有效地避免了油酸抑制的問題(Chen, 2001)，也有研究顯示在培養基內添加非離子型界面活性劑 Tween 系列，有助於微生物降解碳氫化合物，對於生態的保育有相當好的助益(莊, 2003)，顯示非離子型界面活性劑對於微生物是有正面效益的。

本研究探討非離子型界面活性劑的添加效應，是由於文獻上指出，添加非離子型界面活性劑 Tween-80 會增加細胞膜上的滲透性(Kitatsuji et al.,1996)，使得細胞膜內的離子容易移動至細胞外，可以避免菌體內代謝物的累積，讓胞內酵素活性較於穩定。因此本研究中選定 tween 以及 PEG 系列兩種非離子型界面活性劑添加於培養基探討對於 *R. sphaeroides* 的影響。

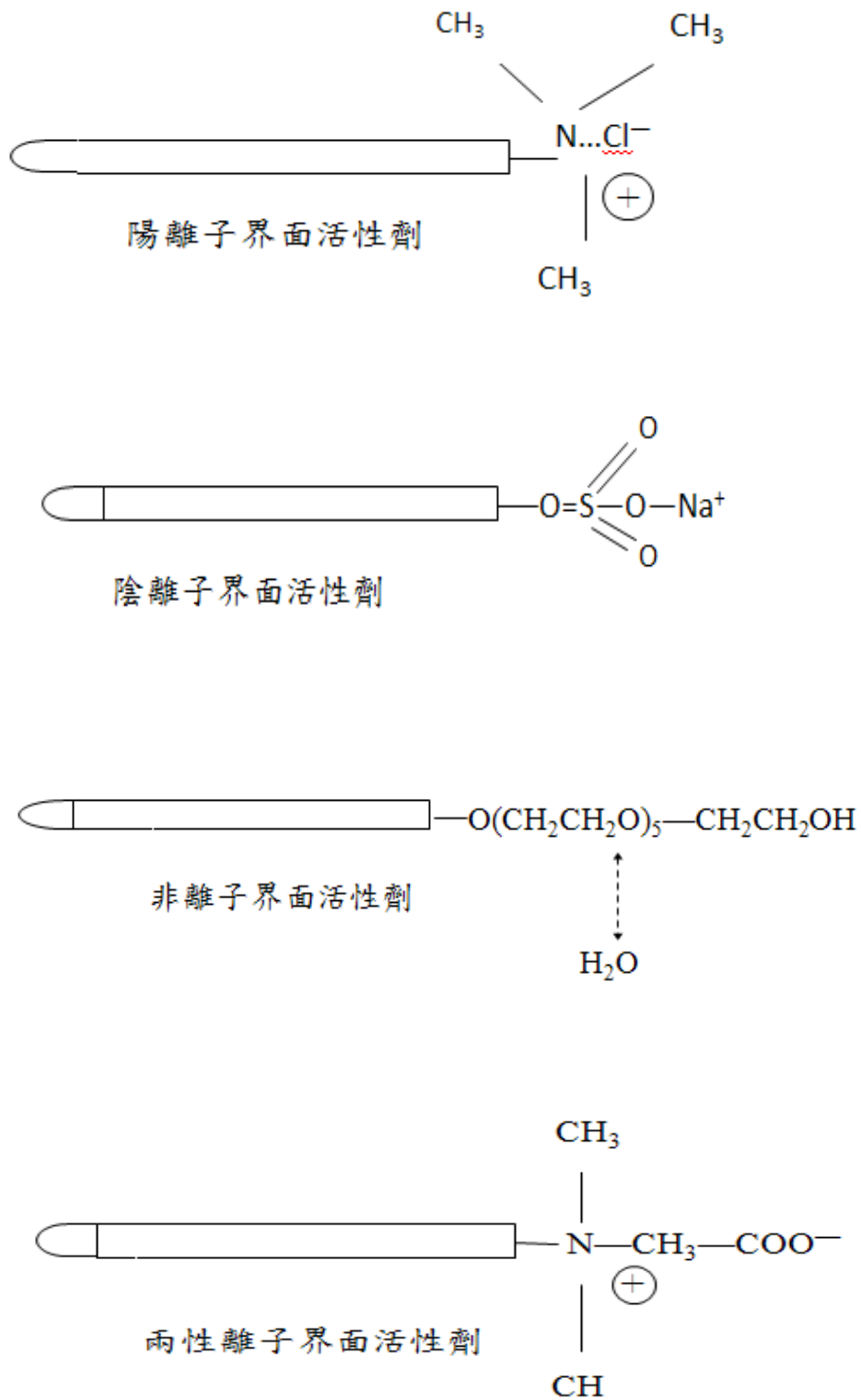


圖 2-5 界面活性劑之構造及分類(王鳳英，1976)

2.6 生物反應器介紹

人類在數千年前便已知利用微生物釀造酒類飲料以及醱酵麵包，但直到 1913 年，英國 Strange 和 Graham 建立醱酵工廠生產丁醇來合成橡膠，才開啟了量產微生物的工業應用。而量產微生物的生物反應器本質上跟製造化學產品的化工反應器類似，皆提供最適且穩定的反應環境來得到最大的產能，但設計上還須注意到是否能有效滅菌、不易污染以及溶氧能力優劣等生化特性。由於不同反應器有著不同的優缺點，所以在選擇最佳生化反應器前一定要徹底了解生產菌種的生物特性，才能達到最好的經濟效益。以下列舉兩個常見的生物反應器作介紹。

2.6.1 攪拌式反應器

攪拌式醱酵槽乃是利用機械攪拌方式以提高醱酵槽之質傳效能，增加醱酵液中的溶氧量，去營造出一個適合耗氧性微生物生長的環境。傳統的攪拌槽是一個由攪拌翼組及數片擋板所構成的攪拌系統，所需的空氣通常由槽底之氣體分散器 (Sparger) 通入槽中，藉由攪拌翼的旋轉與擋板的配合使氣泡及流體均勻分佈於醱酵槽中，故其具有高氣液質傳能力及流體混合佳等特性。

在過去化學工業上攪拌式反應器使用十分普遍，尤其對於高黏度的流體系統則更為適用。而在醱酵工業上，此類反應器亦經常被用來進行微生物的培養，雖然目前攪拌式醱酵槽已普遍地應用在耗氧醱酵程序上，但仍存在著一些缺點，如：在細胞的培養上，快速攪拌時，攪拌翼附近所產生的高剪應力極可能會對細胞造成傷害，對細胞的生長形態、代謝、成長速率及產物之產率都會有很大的影響。

2.6.2 氣舉式生物反應器

氣舉式反應器首先在 1955 年 Lefrancois 所提出，特徵為具備迴路循環的反應器，設計上是以導流管分離出上昇區域與下降區域，並在上昇區域通入空氣而產生氣泡，由於氣泡在上昇區域與下降區域分佈不同而產生密度差，造成醱酵液在反應器內形成迴路流動。以下列舉幾項氣舉式反應器優點

1. 有較高的能量效率(energy efficiency)

氣舉式反應器因為槽內導流管的導流作用，可使進入反應器內部的氣體與其所帶動的流體，做一穩定的循環流動使得氣舉式反應器的軸向混合較好。

2.對微生物傷害較低

氣舉式反應器由於沒有機械攪拌葉片轉動，因此沒有剪切力的產生，對於菌體的剪切損害可以降至最低，尤其適合動物細胞及組織的培養應用上。

3.結構簡單，投資成本較低

氣舉式反應器由於沒有機械攪拌器，所以不需要安裝結構複雜的攪拌系統以及昂貴的機械軸承，也因此不需要大量的動力消耗，更符合工業上的需求。

4.操作和維修方便

氣舉式反應器因為沒有機械攪拌系統，具有結構較簡單，低耗能以及不易發生軸封出現滲漏汙染問題之優點外；也沒有機械攪拌熱產生，熱交換系統的裝設容易。但應用於高黏度醱酵製程中，會導致氧氣運送能力下降，且較容易產生泡沫。

本研究的醱酵製程中所選用的生物反應器為氣舉式生物反應器，因為醱酵液的黏度並不會隨著菌體生長而顯著提高，*R. sphaeroides*本身也是低溶氧需求的兼氣性細菌，故以氣舉式醱酵槽取代攪拌式醱酵槽，達到減少能源損耗的目的。（邱，1995；吳，2000）

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 菌株

本實驗所採用的菌株，是購自生物資源保存及研究中心，菌種編號 BCRC 13100 的 *Rhodobacter sphaeroides*。

3.1.2 實驗藥品

中文名	英文名	廠牌
硫酸銨	Ammonium Sulfate	SHOWA (試藥級)
氯化鈉	Sodium Chloride	SHOWA (試藥級)
磷酸氫二鉀	Dipotassium Hydrogenphosphate	SHOWA (試藥級)
磷酸二氫鉀	Potassium Dihydrogenphosphate	SHOWA (試藥級)
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	SHOWA (試藥級)
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide	OSAKA
鹽酸	Hydrochloric Acid	OSAKA
甲醇	Methanol	ECHO
氯仿	Chloroform	TEDIA
甘油	Glycerol	KANTO

乙醇 95%	Alcohol	台糖
乙醇 99%	Alcohol	台糖
聚氧乙烯山梨醇 酐單油酸酯	Tween-80	SIGMA
聚氧乙烯失水山 梨醇單硬脂酸酯	Tween-60	SHOW
聚氧乙烯山梨醇 單月桂酸酯	Tween-20	SHOW
氯化鉀	KCl	KANTO
聚乙二醇(4000)	PEG 4000	SHOW
聚乙二醇(6000)	PEG 6000	SHOW
油酸	oleic acid	SHOW
棕櫚酸	palmitic acid	ALFA
亞麻油酸	linoleic acid	SIGMA
大豆蛋白朊	Soytone	DIFCO
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO
瓊脂	Agar	DIFCO
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
糖蜜	Molasses	味丹
蛋白朊	Peptone	DIFCO
硬脂酸	stearic acid	Acos

3.2 實驗儀器

儀器設備	廠牌	型號
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	海天	3BH-24
恆溫振盪培養箱	亮盛	LUS-150
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD2000
高速冷凍離心機	Hettich	EBA3S/10ml
電子天平	PRECISA	BJ100M
磁石攪拌加熱器	CHROMTECH	MS-3250B
超音波振盪器	BRANSON	5210
5 公升液態醱酵槽	頂生	
8 公升氣舉式醱酵槽	頂生	
高效能液相層析幫浦	HITACHI	
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
烘箱	亮盛	LO-150
分光光度計	THERMO	GENESYS UV10
pH 計	LUTRON	PH-206
光度計	LUTRON	LUX-101

糖度計	ATAGO	N-10E
-----	-------	-------

3.3 分析方法

3.3.1 菌體乾重分析

1. 將 1 ml 醱酵液用分光光度計在波長為 660 nm 測定其光學密度 (Optical density, O.D.)，若 O.D. 值大於 0.8 時則加入純水稀釋至 0.8 以下。
2. 將 10 ml 醱酵液用真空抽氣幫浦過濾掉醱酵液，並將殘留在濾紙上的菌體放入 70 °C 烘箱烘乾 72 小時，得到菌體乾重 (Dry Cell Weight)。
3. 依照各個時間點的菌體乾重以及 OD 值，即可得到菌體乾重與 OD 值間的關係，檢量線如圖 3-1 所示 $1 \text{ OD (660nm)} = 0.484(\text{g DCW/L})$ 。

3.3.2 Co-Q₁₀ 濃度分析

取出 10 ml 的菌液，以離心機轉速 7000 rpm 離心 5 分鐘，分離出菌體與上清液，並將上清液丟棄，以甲醇與氯仿 1:2 濃度的混合溶劑 10 ml 進行萃取，12 小時後，取上清液以高效能液相層析儀來分析 Co-Q₁₀ 濃度，分析條件為甲醇與乙醇以 1:2 的濃度為移動相，流速設為 1 ml/min，管柱為 Veropak Inertsil 5 ODS 4.6x250mm C18 層析管柱，偵測波長為 275 nm (劉，2001)，檢量線如圖 3-2 所示。

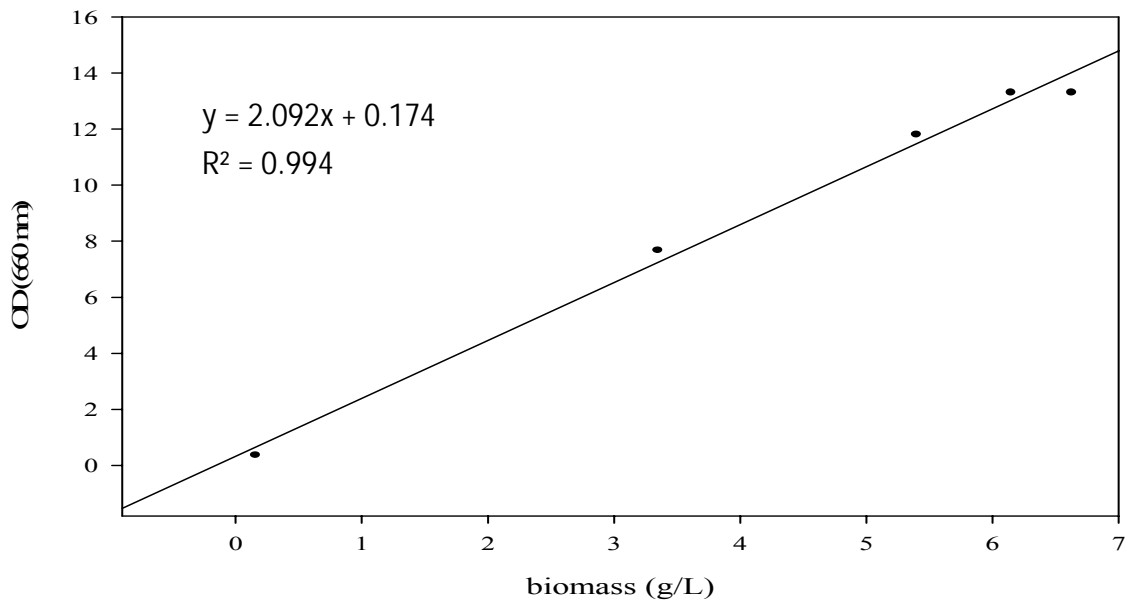


圖 3-1 biomass 檢量線

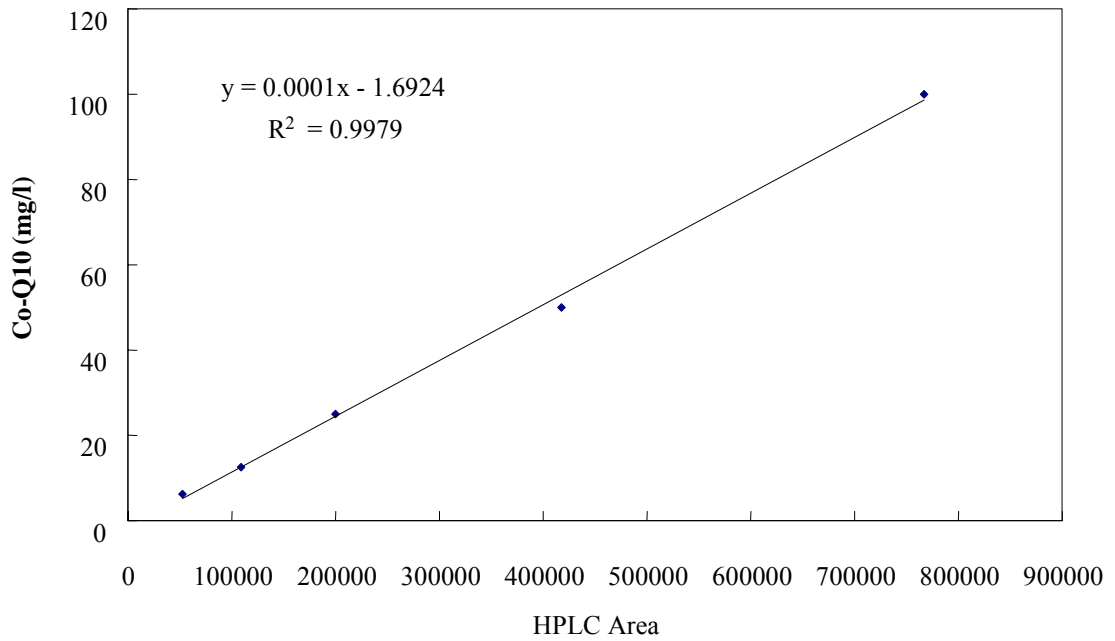


圖 3-2 Co-Q₁₀ 檢量線

3.3.3 糖蜜的糖度分析方法

1. 取 1ml 醱酵液至離心管，使用離心機在轉速 9000 rpm，5 min 分離出菌體與上清液。
2. 取適量上清液滴在糖度計上測量其刻度。
3. 紀錄不同時間點的糖度計刻度，即可約略得知糖蜜濃度下降趨勢。

3.4 實驗方法

3.4.1 菌種培養

原始菌種保存

將購自菌種中心的 *R. sphaeroides* 的冷凍乾燥管，取出菌體粉末接入種瓶培養基活化，並放入恆溫培養箱中以 30 °C 培養 24 小時，取 0.7 ml 菌液和 0.3 ml 無菌甘油均勻混合後，放入 -20 °C 冰箱保存。

菌種活化培養

取出保存於 -20 °C 冰箱內冷凍保存的種菌，回溫至室溫下，以無菌牙籤沾取菌液接種於平板培養基上，每個培養基上接種數十個菌落後，放置於恆溫培養箱以 30 °C 培養菌落至適當大小，並保存於 4 °C

冰箱中，作為種瓶接種之用，而保存於 4 °C 冰箱中的平板培養基每半個月更新一次。(圖 3-4)

配製種瓶培養基於 250 ml 三角瓶中，利用白金鉤將菌體由平板培養基接種一菌落至種瓶中，並以 30 °C，150 rpm 培養 36 小時作為種瓶。

3.4.2 培養基組成

本實驗所使用營養來源主要來自此三類基礎培養基，除特殊章節因為實驗目的採用特定組成外，所使用的配方如下：

表 3-1 平板培養基（菌種保存中心配方）

Compound	Concentration(g/L)
Tryptone	15
Soytone	5
NaCl	5
Agar	15

將上述比例配置好培養基後，以 1N NaOH 和 1N HCl 調整 pH 至 7，放入滅菌釜以高溫滅菌後，於無菌操作台中，將液態的培養基分裝至塑膠培養皿內降溫凝固，當降至室溫後放入 4°C 冰箱保存以備使用。

表 3-2 種瓶培養基（菌種保存中心配方）

Compound	Concentration(g/L)
Tryptone	15
Soytone	5
NaCl	5

將上述比例配置好培養基後，以 1N NaOH 和 1N HCl 調整 pH 至 7，作為種瓶培養用。

表 3-3 醱酵培養基（劉，2001）

Compound	Concentration (g/L)
molasses	20
Yeast Extract	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	7
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25

將上述比例配置好培養基後，以 1N NaOH 和 1N HCl 調整 pH 至 7，作為醱酵培養用。

3.5 實驗培養條件

3.5.1 不同氮源對產量之影響

目的:探討不同的培養基氮源對於 Co-Q₁₀ 產量的影響

1. 前培養 30 ml 種瓶培養液兩瓶。
2. 在醱酵培養基內各別添加濃度為 10 g/L 的 yeast extract、soytone、tryptone、peptone。
3. 接種 2.5ml 種瓶培養液到上述 50 ml 醱酵培養基中，在 30 °C、150 rpm 培養 60 小時。
4. 分析菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量。

3.5.2 添加氯化鈉、氯化鉀之影響

目的: 探討改變培養基滲透壓對 Co-Q₁₀ 產量的影響

1. 前培養 30 ml 種瓶培養液兩瓶。
2. 在醱酵培養基內各別添加不同濃度的 NaCl (1 g/L、3 g/L、5 g/L、10 g/L)，KCl (1 g/L、3 g/L、5 g/L、10 g/L)。
3. 接種 2.5ml 種瓶培養液到上述 50 ml 醱酵培養基中，在 30 °C、150 rpm 培養 60 小時。
4. 分析菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量。

3.5.3 添加非離子型界面活性劑之影響

目的: 探討添加非離子型界面活性劑對 Co-Q₁₀ 產量的影響

1. 前培養 30 ml 種瓶培養液兩瓶。
2. 在醱酵培養基內各別添加不同濃度的非離子型界面活性劑
Tween-80 (2 ml/L、6 ml/L、10 ml/L、20 ml/L)，Tween-60(2 ml/L、6 ml/L、10 ml/L、20 ml/L)，Tween-20(2 ml/L、6 ml/L、10 ml/L、20 ml/L)，PEG-4000(0.5 g/L、1 g/L、5 g/L)，PEG-6000(0.5 g/L、1 g/L、5 g/L)。
3. 接種 2.5ml 種瓶培養液到上述 50 ml 醱酵培養基中，在 30 °C、150 rpm 培養 60 小時。
4. 分析菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量。

3.5.4 非離子型劑面活性劑各成分添加之影響

目的: 探討 Tween-80 界面活性劑中各成分對 Co-Q₁₀ 產量的影響

1. 前培養 30 ml 種瓶培養液兩瓶。
2. 油酸以及亞麻油酸為油類不溶於水，因此在醱酵培養基內先添加最佳濃度的 Tween-80(6 ml/L)，之後在添加不同濃度的油酸(2 ml/L、6 ml/L、10 ml/L、20 ml/L)，以及亞麻油酸(2 ml/L、6 ml/L、

10 ml/L、20 ml/L)，探討額外添加是否有助於 Co-Q₁₀ 產量。

3. 在醱酵培養基內添加不同濃度的硬酯酸 (0.1 g/L、0.5 g/L、1 g/L、3 g/L、5 g/L)，以及棕櫚酸(0.1 g/L、0.5 g/L、1 g/L、3 g/L、5 g/L) 探討額外添加是否有助於 Co-Q₁₀ 產量。
4. 接種 2.5 ml 種瓶培養液到上述 50 ml 醱酵培養基中，在 30 °C、150 rpm 培養 60 小時。
5. 分析菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量。

3.5.5 醱酵槽實驗

氣舉式醱酵槽通氣量探討

由於溶氧對於 Co-Q₁₀ 產量有極大的影響性，因此在醱酵槽實驗部分，首先對於不同通氣量(1vvm、2vvm)做批次實驗，探討不同的通氣量對於菌體生長以及 Co-Q₁₀ 生成的影響性，目的為找出最適合 Co-Q₁₀ 生成的最佳通氣量。

1. 前培養 75ml 種瓶培養液三瓶。
2. 接種 300 ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為 pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 分別以 1 vvm 跟 2 vvm 的通氣流量作為溶氧條件的探討。

4. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

醱酵槽氧氣質傳係數 K_La 測量

實驗目的：測量醱酵槽在不同操作條件下槽內氧氣質傳係數 K_La

1. 先在醱酵槽內通入氮氣，使 DO 值降為 0。
2. 開啟氣動機輸送空氣進入醱酵槽內，操作條件分別為氣舉式通氣量 (1 vvm、2 vvm)，傳統攪拌式通氣量 1vvm (轉速、100 rpm、200 rpm、300 rpm)，通氣量 2 vvm (轉速 50 rpm、100 rpm、200 rpm)，測量時間為開始輸送空氣進入醱酵槽內開始計算，每 10 秒鐘紀錄一次溶氧值。
3. 對時間 vs 溶氧值(DO)作圖，取斜率最高的時間點(如圖 3-3 所示)計算氧氣質傳係數 K_La 。
4. K_La 計算:由質量平衡的角度，溶氧在醱酵槽內的改變如下列方程式所示(Van't Riet, 1979)

$$K_La($$

經過積分後

$$dC_{AL} = K_L a \int_0^t dt$$

即可得

$$\ln \frac{C_{AL} - C_{AL2}}{C_{AL} - C_{AL1}} = K_L a (t_2 - t_1)$$

對 $\ln \frac{C_{AL} - C_{AL2}}{C_{AL} - C_{AL1}}$ vs $(t_2 - t_1)$ 作圖，即可得到斜率 $K_L a$

t_1 為開始計算的起始點(常數)， t_2 為下一個時間點(變數)

C_{AL1} : 時間為 t_1 的醱酵槽實際溶氧值(常數)

C_{AL2} : 時間為 t_2 的醱酵槽實際溶氧值(變數)

$K_L a$: 氧氣質傳係數

C_{AL}^* : 30 °C 下飽和溶氧值

air-lift 2vvm

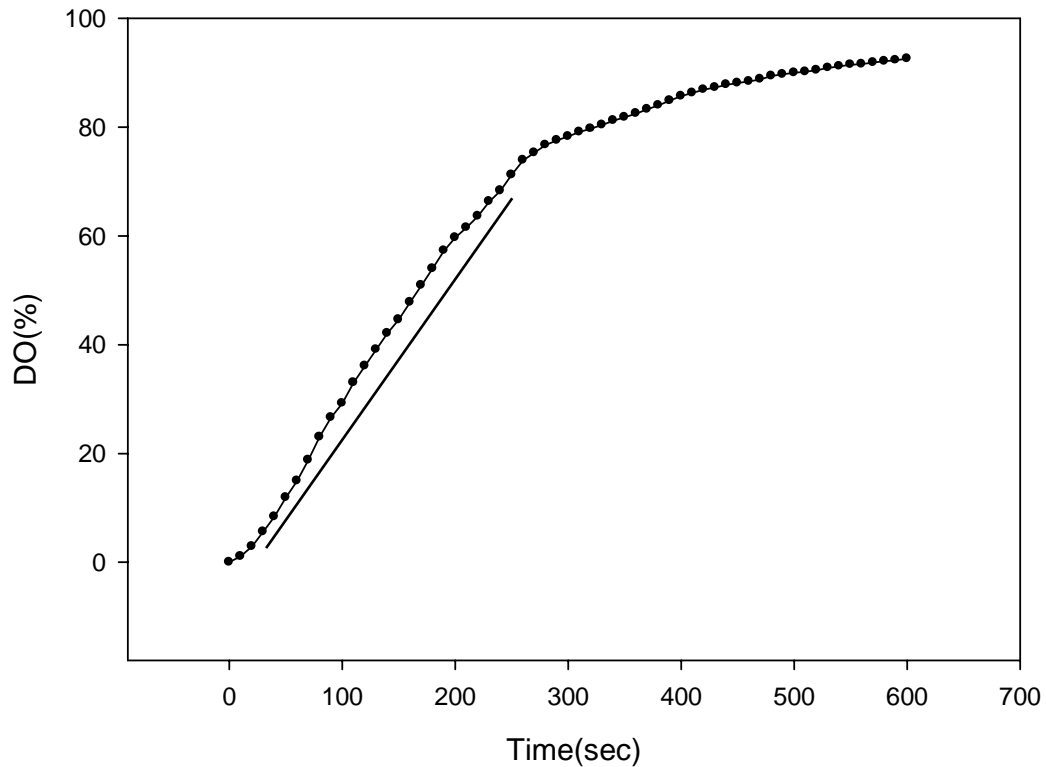


圖 3-3 時間 vs 溶氧值

攪拌式醱酵槽批次實驗

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。
2. 接種 300 ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為通氣量 1 vvm、轉速 200 rpm、pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

氣舉式醱酵槽饋料批次實驗

由上述實驗結果得知，氣舉式醱酵槽通氣量 2 vvm 為適合 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 的生物反應器，輔佐以糖度計分析糖蜜結果發現，氣舉式醱酵槽通氣量 2 vvm 在醱酵時間 48 小時之後，醱酵槽內的糖蜜濃度幾乎消耗完畢，因此決定進行醱酵槽饋料實驗，探討饋料(feeding)對於菌體生長以及 Co-Q₁₀ 生成的影響性。

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。
2. 接種 300 ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為 pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 在 48 小時開始進行糖蜜饋料(feeding)，饋料速度以及濃度是依據醱酵培養基初始的糖蜜濃度(20 g/L)，假設菌體在接菌後 12 小時開始進入對數生長期，因此開始消耗培養基碳源，而在 48 小時完全消耗完畢，依照此消耗速率約略計算出饋料濃度以及速率為 0.55 g/L hr。
4. 配置 500 ml 糖蜜(濃度 288 ml/L)，在醱酵時間進入 48 小時之後，開始饋料進入醱酵槽內。
5. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料批次實驗(2 vvm to 1 vvm)

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。

2. 接種 300 ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為 pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 在 48 小時開始進行糖蜜饋料(feeding)，饋料速率為 2.5 g/hr。
4. 進行饋料同時改變通氣量，由原先 2 vvm 改變為 1vvm。
5. 定時取樣並分析菌種的乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料批次實驗(2 vvm to 0.5 vvm)

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。
2. 接種 300 ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為 pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 在 48 小時開始進行糖蜜饋料(feeding)，饋料速率為 2.5 g/hr。
4. 進行饋料同時改變通氣量，由原先 2 vvm 改變為 0.5 vvm。
5. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

氣舉式醱酵槽添加界面活性劑 Tween-80

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。
2. 接種 300ml 種瓶培養液到 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為 pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。
3. 在 36 小時之後，開始添加由搖瓶實驗得到的最佳 Tween-80 濃度

(6 ml/L)饋料(feeding)，並且在進行饋料同時間改變醱酵槽通氣量，由原先通量 2 vvm 改變為 0.5 vvm 。

4. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。

氣舉式醱酵槽添加棕櫚酸實驗

1. 前培養 75 ml 種瓶培養液三瓶。

2. 接種 300 ml 種瓶培養液到含有濃度為 3 g/L 的棕櫚酸 4500 ml 醱酵槽培養基中，培養條件為通氣量 2 vvm、pH=7、30°C，槽壓設為 0 kg/cm²。

3. 定時取樣並分析菌體乾重、Co-Q₁₀ 及糖蜜的變化。



圖 3-4 手持式糖度計



圖 3-5 菌種活化平板培養基



圖 3-6 氣舉式醱酵槽操作照片

第四章 結果與討論

4.1 論文架構

如圖 4-1 所示，本研究主要分為三角瓶實驗和醱酵槽實驗兩大主軸；首先在三角瓶實驗中，因為實驗室學長已經對於培養基碳源做過探討(邱，2007)，確認糖蜜為最佳培養基碳源，因此在三角瓶部份，先探討不同培養基氮源，找出最佳氮源之後，探討利用 NaCl、KCl

的添加，改變培養基滲透壓的搖瓶實驗；添加 PEG 系列以及 Tween 系列此 2 種非離子型界面活性劑，探討對菌體以及 Co-Q₁₀ 生產的影響性，得到 Tween-80 為較佳非離子型界面活性劑，因此針對 Tween-80 界面活性劑中各成分的單獨添加作探討，最後將三角瓶實驗得到的最佳棕櫚酸添加濃度，放大到氣舉式發酵槽作探討。

發酵槽部份首先探討氣舉式發酵槽和攪拌式發酵槽在相近的氧氣質傳係數 K_La 條件下，找出適合菌體生長以及 Co-Q₁₀ 生產的生物反應器之後，分析實驗結果，進行下一階段饋料批次實驗(fed-batch)，由實驗結果修正發酵槽控制策略，改變通氣量進行兩階段溶氧饋料批次實驗。

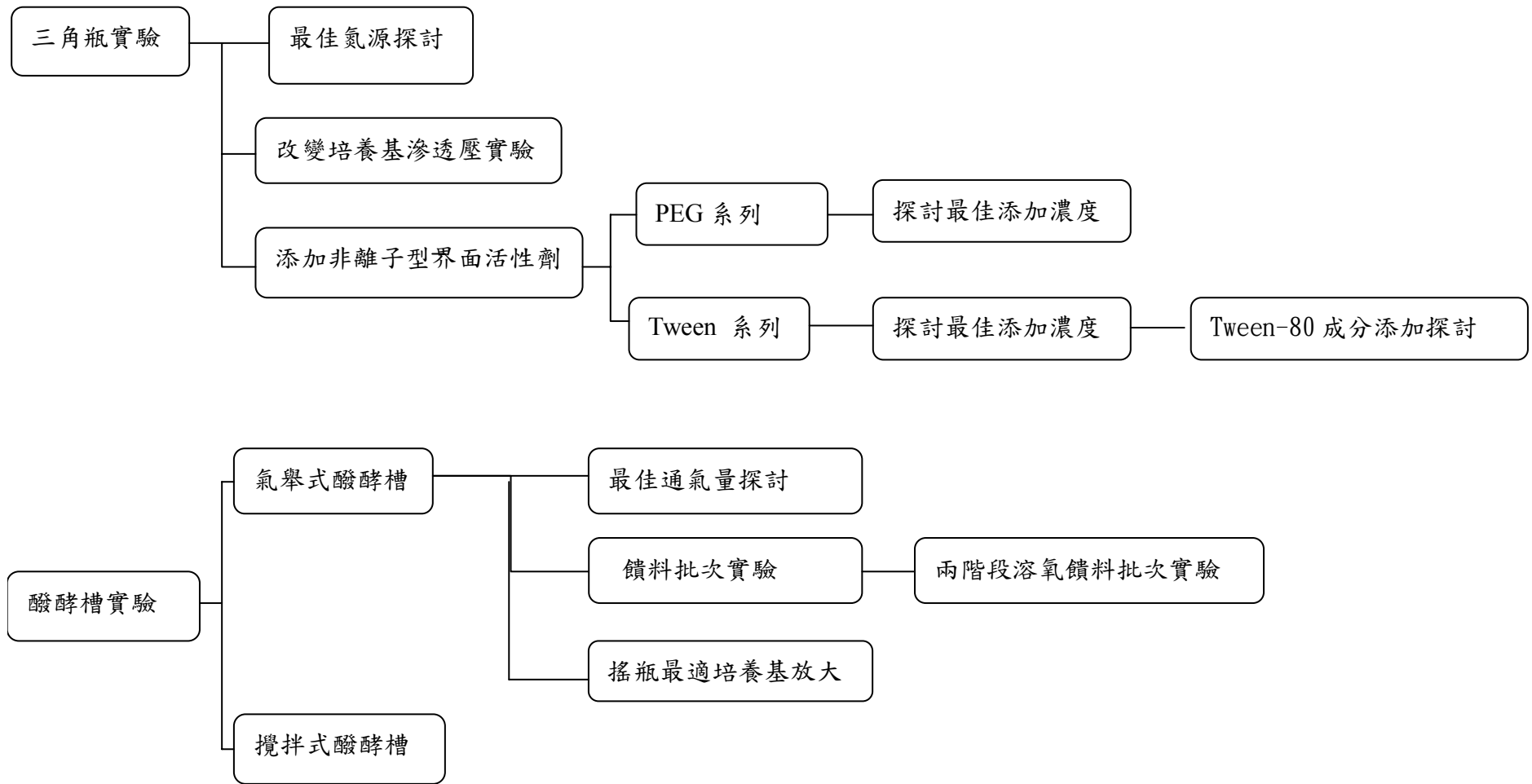


圖 4-1 論文架構

4.2 探討不同氮源之影響

此次實驗目的在於探討不同的培養基氮源對於 *R. sphaeroides* 生長以及生產 Co-Q₁₀ 的影響性，實驗結果如圖 4-2，四種不同的氮源中，Co-Q₁₀ 產量以酵母萃取物(yeast extract)的 27.40 mg/L 和胰化蛋白凍(tryptone) 的 23.72 mg/L 為較佳培養基氮源而以；酵母取出物對於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 為較佳，因此以酵母取出物為基礎培養基氮源，作為搖瓶實驗以及醱酵槽實驗的基礎培養基。

4.3 探討添加氯化鈉、氯化鉀之影響

文獻上(Tjakko and Ronald, 1989)指出，在培養基內添加NaCl，KCl，會提高培養基的滲透壓，使菌體內部水分流出細胞，產生脫水的現象，抑制細胞內酵素的活性，進而對*R. sphaeroides*的生長造成抑制的效果；菌體為了抵抗外在的高滲透壓環境，勢必改變代謝路徑，增強細胞內離子鍵強度，因此在培養基中添加不同濃度的NaCl、KCl，探討是否對於菌體乾重以及Co-Q₁₀產量有影響。

實驗結果如圖 4-3 顯示，NaCl 添加的濃度以 5 g/L 效果較明顯，菌體乾重由對照組 6.08 g/L 略降低至 5.66 g/L，Co-Q₁₀ 產量由對照組 24.54 mg/L 略上升至 28.43 mg/L，KCl 添加濃度以 3 g/L 結果較明顯，菌體乾重由對照組 5.60 g/L 略降低至 5.44 g/L，Co-Q₁₀ 產量由對照組 29.14 mg/L 略上升至 33.73 mg/L，實驗結果和文獻上 (Tjakko, 1989) 的結果較符合，證實提高外在環境的滲透壓時，對於菌體的生長是有抑制的現象，而菌體為了抵抗外在的高滲透壓環境而改變代謝路徑的結果，是有利於 Co-Q₁₀ 的生成。

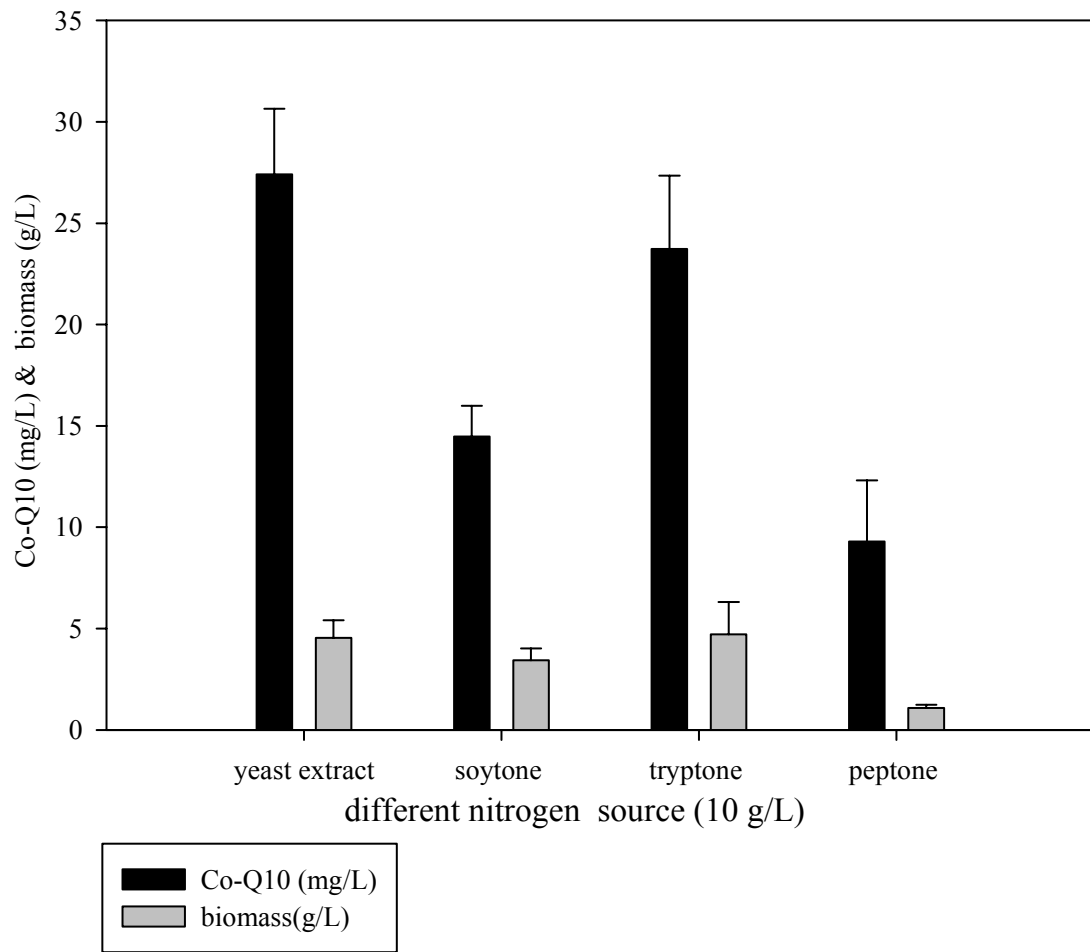


圖 4-2 不同氮源對菌體以及 Co-Q₁₀ 之影響

培養條件： 基礎培養基 初始 pH = 7，培養過程不調控
 轉速 150 rpm 溫度 30°C
 培養時間 60 小時

註：以上標準差為四重複的結果

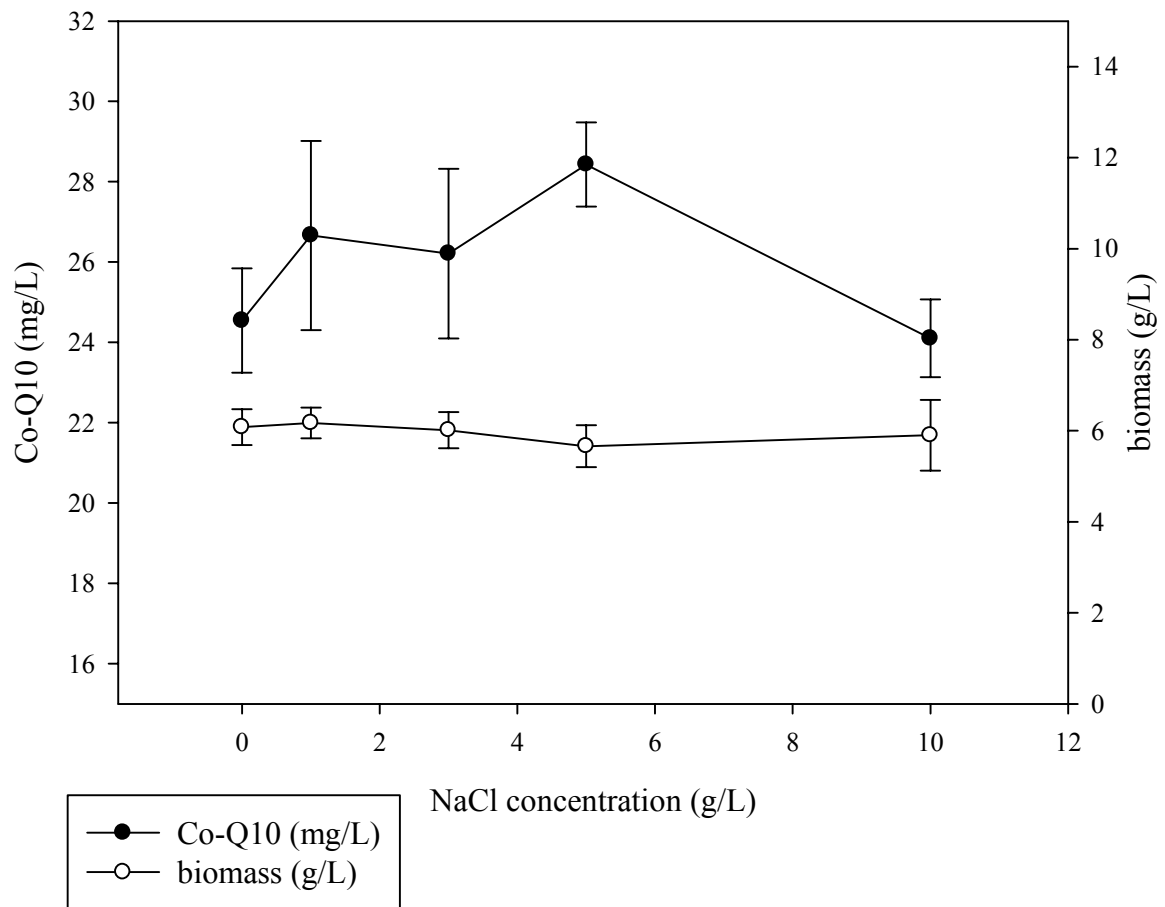


圖 4-3 添加 NaCl 對菌體以及 Co-Q₁₀ 之影響

培養條件： 基礎培養基 初始 pH = 7，培養過程不調控
 轉速 150 rpm 溫度 30°C
 培養時間 60 小時

註：以上標準差為四重複的結果

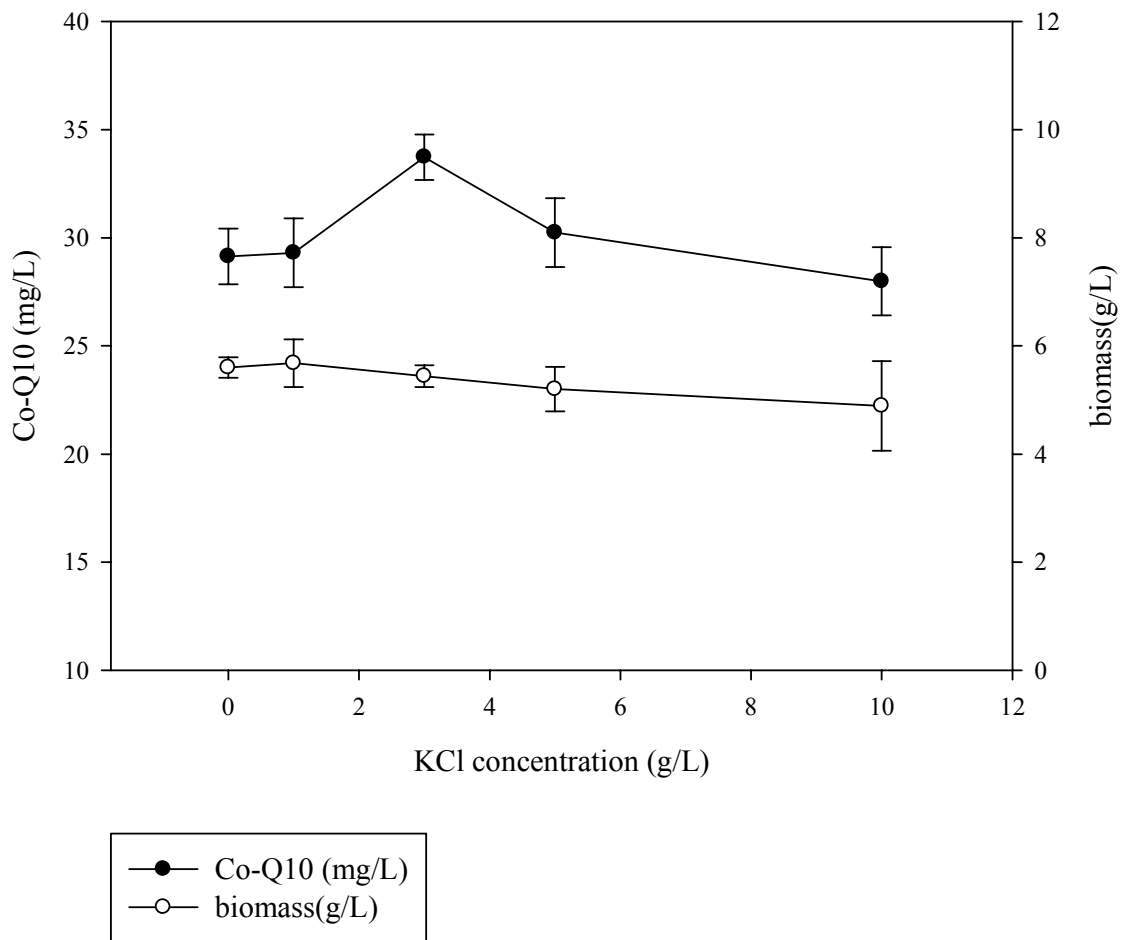


圖 4-4 添加 KCl 對菌體以及 Co-Q₁₀ 之影響

培養條件： 基礎培養基 初始 pH = 7，培養過程不調控
 轉速 150 rpm 溫度 30°C
 培養時間 60 小時

註：以上標準差為四重複的結果

4.4 探討添加非離子型界面活性劑之影響

文獻上指出，添加非離子型界面活性劑 Tween-80 會增加細胞膜上的滲透性(Kitatsuji et al.,1996)，使得細胞膜內的離子容易移動至細胞外，可以避免菌體內代謝物的累積，使胞內酵素活性趨於穩定。因此本研究中選定 Tween 系列以及 PEG 系列兩種非離子型界面活性劑添加於培養基，探討是否有助於 *R. sphaeroides* 生長以及 Co-Q₁₀ 產量。

實驗結果如表 4-1 所示，在 Tween 系列非離子型界面活性劑以 Tween-80(6 ml/L) 對於 Co-Q₁₀ 產量增加效果較為明顯，菌體乾重由對照組 4.57 g/L 略上升至 4.97 g/L，增加 8.7%，Co-Q₁₀ 產量由對照組 23.52 mg/L 上升至 29.75 mg/L，產量增加約 26 %。

此外在醱酵培養 36 小時之後，添加 Tween-80 (6 ml/L) 進入培養基，探討添加時間點對於 *R. sphaeroides* 生長以及生產 Co-Q₁₀ 影響性，實驗結果顯示，在醱酵進入 36 小時之後加入 Tween-80，相較於初始添加 Tween-80 於培養基，菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量皆有提升，菌體濃度由 4.97 g/L 提升至 5.7 g/L，約增加 14.6 %，Co-Q₁₀ 產量由 29.75 mg/L 提升至 32.1 mg/L。顯示在菌體對數生長期中添加會是較理想的時間點。

PEG 系列以 PEG-4000，濃度 0.5 g/L 添加效果較為明顯，菌體乾重由對照組 4.7 g/L 略上升至 5.07 g/L，Co-Q₁₀ 產量由對照組 28.41 mg/L 上升至 30.68 mg/L，產量增加約 7.9%。

結果顯示，兩種非離子型界面活性劑以 Tween-80 的添加效果對於 Co-Q₁₀ 產量增加較為明顯，而 PEG 系列對於 Co-Q₁₀ 產量影響較不明顯。本研究以提升 Co-Q₁₀ 產量為主要的目的，因此實驗方向針對 Tween-80 對於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 的影響作探討。

表 4-1 添加非離子型界面活性劑對 Co-Q₁₀ 產量之影響

	Non-ion surfactant (ml/L)	Co-Q ₁₀ (mg/L)	Biomass (g/L)	Co-Q ₁₀ Content (mg Q ₁₀ /g biomass)
control	0	23.52±0.75	4.57±0.42	5.15
Tween-80	2	22.68±1.66	4.33±0.12	5.24
	6	29.75±4.31	4.97±0.22	5.24
	10	25.22±1.25	4.95±0.07	5.09
	20	26.02±0.76	4.84±0.13	5.38
Tween-80 adding at 36 hr	6	32.10±0.17	5.70±0.17	5.63
	10	29.14±1.29	5.60±0.19	5.21
	20	28.56±1.45	5.52±0.47	5.17
Tween-60	2	20.17±2.24	4.03±0.47	5.00
	6	22.15±1.17	4.17±0.54	5.31
	10	20.67±3.69	4.51±0.44	4.58
	20	23.82±2.05	4.44±0.19	5.41
Tween-20	2	21.31±0.17	4.43±0.14	4.81
	6	21.11±0.51	4.61±0.47	4.57
	10	20.15±0.61	4.02±0.17	5.01
	20	17.09±1.32	4.22±0.14	4.04

培養條件： 基礎培養基 初始 pH = 7 培養過程不調控

轉速 150 rpm 溫度 30°C 培養時間 60 小時

註：以上標準差為四重複的結果

	Non-ion surfactant(g/L)	Co-Q ₁₀ (mg/L)	Biomass (g/L)	Co-Q ₁₀ Content (mg Q ₁₀ /g Biomass)
PEG-4000	0	28.41±3.41	4.73±0.19	6.83
	0.5	30.68±6.05	5.07±0.25	5.68
	1	30.10±4.78	5.09±0.37	5.02
	5	29.99±3.45	5.10±0.51	5.88
PEG-6000	0	28.90±4.14	4.18±0.09	6.91
	0.5	25.32±6.02	4.83±0.13	5.24
	1	24.17±4.17	4.54±0.14	5.32
	5	25.07±3.72	4.37±0.50	5.74

培養條件: 基礎培養基 初始 pH = 7 培養過程不調控

轉速 150 rpm 溫度 30°C 培養時間 60 小時

註：以上標準差為四重複的結果

4.5 探討 Tween-80 界面活性劑各成分添加之影響

實驗結果發現，醱酵 36 小時之後於基礎培養基內添加 Tween-80 對於菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 濃度增加有更明顯的效益，推斷 Tween-80 可能為 *R. sphaeroides* 的營養源之一。Tween-80 本身為側鏈含有不飽和脂肪酸的長鏈型結構，推測可能是由於 Tween-80 中的脂肪酸對於 *R. sphaeroides* 生長以及 Co-Q₁₀ 產量有正面的效益，因此針對 Tween-80 界面活性劑中各成分的添加作探討。

Tween-80 主要是由兩種不飽和脂肪酸：油酸(oleic acid, C18:1, 約佔 70%)、亞麻油酸(linoleic acid, C18:2) 以及兩種飽和脂肪酸：硬酯酸(steric acid, C18:0)、棕櫚酸(palmitic acid, C16:0)所組成，針對各成分的添加作探討，實驗結果如表 4-2。

實驗結果發現，在培養基內添加 1 g/L 硬酯酸(steric acid)以及 3 g/L 棕櫚酸(palmitic acid)兩種飽和脂肪酸，和對照組相比較，菌體乾重分別增加約 33.4% 以及 29.8%，Co-Q₁₀ 產量分別增加約 65.8% 以及 74.1%，顯示添加飽和脂肪酸對於 *R. sphaeroides* 生長以及 Co-Q₁₀ 產量有明顯的效益。

表 4-2 界面活性劑 Tween-80 各成分添加對 Co-Q₁₀ 產量之影響

	adding	Co-Q ₁₀ (mg/L)	Biomass (g/L)	Co-Q ₁₀ Content (mg Q ₁₀ /g biomass)
control	0	23.16±3.49	4.93±0.23	5.66
oleic acid	2	27.99±5.76	4.63±0.41	6.04
(ml/L)	6	25.22±1.39	5.36±0.82	4.71
	10	28.66±2.68	5.46±1.21	5.24
	20	0	0	0
linoleic acid	2	25.08±1.53	6.08±0.24	4.16
(ml/L)	6	23.53±2.63	6.03±0.84	3.90
	10	20.67±2.02	5.99±0.65	3.45
	20	0	0	0
Steric acid	0.1	27.15±1.62	4.86±0.33	5.59
(g/L)	0.5	28.86±2.01	4.57±0.12	6.31
	1	38.42±0.69	6.58±0.12	5.84
	3	32.59±2.18	4.79±0.30	6.80
Palmitic acid	0.1	29.21±1.11	5.01±0.37	5.83
(g/L)	0.5	39.59±4.55	6.46±0.17	6.12
	1	35.85±1.79	6.16±0.29	5.81
	3	40.33±4.87	6.40±0.54	6.30
	5	22.90±4.60	4.82±0.12	5.44

培養條件: 基礎培養基 初始 pH = 7 培養過程不調控

轉速 150 rpm 溫度 30°C 培養時間 60 小時

4.6 氣舉式醱酵槽通氣量探討

醱酵槽部份，首先利用氣舉式醱酵槽作為生化反應器，首先針對醱酵槽通氣量 1 vvm 以及 2 vvm 作探討，目的為找到適合菌體生長以及 Co-Q₁₀ 生產的通氣量。

實驗結果如圖 4-5，結果相比較後發現，在醱酵槽通氣量 2 vvm 條件下，菌體在進入醱酵 48 小時即可達到最大菌體乾重 5.41 g/L，以及 Co-Q₁₀ 產量 27.81 mg/L，Co-Q₁₀ 生產速率達到 0.57 mg/L hr，相較於通氣量 1 vvm 條件下，不論是在菌體生長以及 Co-Q₁₀ 產量，通氣量 2 vvm 皆有明顯的優勢，因此選定通氣量 2 vvm 作為醱酵槽的通氣條件。

4.7 攪拌式醱酵槽批次實驗

溶氧對於 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 有極大的影響性，此次實驗目的為藉由測量氣舉式醱酵槽在最佳操作條件下的氧氣質傳系數 K_{La} ，和攪拌式醱酵槽在各種操作條件下的氧氣質傳系數 K_{La} 作比較，找出近似的操作條件之後實際利用攪拌式醱酵槽進行批次實驗，探討是否和氣舉式醱酵槽有相同的實驗結果。

實驗結果測量結果顯示，攪拌式醱酵槽的飽和溶氧速率以通氣量 1 vvm 轉速 200 rpm 的 0.059 (1/sec，圖 4-6)和氣舉式醱酵槽通氣量

2 vvm 的 0.048 (1/sec，圖 4-7)最為接近，因此實際進行醱酵槽批次實驗作探討。

實驗結果如圖 4-6，在醱酵進入 72 小時，可得到最大菌體濃度 5.61 g/L 以及最大 Co-Q₁₀ 產量 23.20 mg/L，Co-Q₁₀ 生產速率為 0.32 mg/L hr，和氣舉式醱酵槽實驗數據相比較，氣舉式醱酵槽在通氣量 2 vvm 條件下醱酵經過 48 小時即可得到最大 Co-Q₁₀ 產量 27.81 mg/L，Co-Q₁₀ 生產速率為 0.57 mg/L hr，因此由實驗結果證實氣舉式醱酵槽和攪拌式醱酵槽在相近的氧氣質傳系數 K_{La} 條件下，氣舉式醱酵槽為適合 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 的生物反應器。

4.8 氣舉式醱酵槽饋料批次實驗

確認氣舉式醱酵槽為適合的生物反應器後，根據實驗結果顯示，在通氣量 2 vvm 操作條件下，醱酵經過 48 小時之後，菌體生長明顯趨緩，推測可能原因在於培養基內的主要營養源碳源消耗完畢，輔佐以糖度計分析不同時間點的醱酵上清液後發現，在醱酵 48 小時之後，糖度計刻度便無下降的趨勢，證實醱酵槽內的碳源在醱酵 48 小時之後已經消耗完畢。

得到上述結論後，決定採用饋料批次的控制策略，目的為延續

菌體生長以及提升 Co-Q₁₀ 產量。饋料濃度及速率的計算方式為假設在醱酵 12 小時後菌體進入對數生長期，此時開始消耗培養基糖蜜，在 48 小時培養基內的糖蜜已經完全消耗完畢，糖蜜的消耗速率大約為 0.55 g/hr L，因此設定每小時饋料約 2.5 g 糖蜜進入醱酵槽內。

實驗結果如圖 4-6，實驗結果顯示，在醱酵 48 小時後饋料糖蜜進入醱酵槽內，有助於菌體在對數生長期的生長，菌體乾重由 48 小時的 5.71 g/L 提升至 90 小時的 9.95 /L，也可證實前一次實驗菌體乾重在 48 小時趨於平緩是因為培養基內碳源不足所導致，但是菌體乾重大幅提升的同時，單位菌體的 Co-Q₁₀ 產量從 48 小時的 5.14 mg/g 到 90 小時下降至 3.54 mg/g，推測可能原因是碳源充足以及通氣量較高的環境下，菌體本身並不需要產生多餘的 Co-Q₁₀ 來增強其體內的電子傳遞鏈，因此導致單位菌體的 Co-Q₁₀ 產量降低。

4.9 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 1 vvm)

在饋料批次實驗中證實，饋料確實有助於菌體生長，但是相較於菌體的大幅提升，單位菌體的 Co-Q₁₀ 產量反而有下降的趨勢，因此改變醱酵槽控制策略，在饋料同時改變溶氧，由原先通氣量 2 vvm 改變為 1 vvm，藉由改變通氣量使醱酵槽內溶氧降低，使得當菌體得到養分的同時，無法同時得到充足的溶氧，菌體在對數生長期時，因為氧氣不足而無法有效進行代謝路徑，為了增強電子傳遞鏈效率，預期勢必會增加菌體內 Co-Q₁₀ 含量，達到提升單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度的結果。

實驗結果如圖 4-7，證實在饋料同時改變溶氧確實能提升單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度，Co-Q₁₀ 產量由 48 小時的 27.81 mg/L 提升至在 108 小時得到 45.65 mg/L，Co-Q₁₀ 產量提升約 64%，單位菌體的 Co-Q₁₀ 為 4.50 mg/g，證實在饋料同時降低溶氧有助於單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度的提升。

4.10 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗 (2 vvm to 0.5 vvm)

在兩階段溶氧實驗結果中證實，饋料同時改變通氣量，確實能提升單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度，因此，此次實驗在饋料同時改變溶氧，由原先通氣量 2 vvm 改變為 0.5 vvm，探討是否能更進一步的提升單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度。

實驗結果如圖 4-8，在培養 120 小時候得到最大 Co-Q₁₀ 濃度 35.38 mg/L，將兩次改變饋料溶氧實驗結果放在一起比較，發現在饋料同時把通氣量降低至 0.5 vvm 時，菌體生長速率明顯較緩慢，經由實驗結果比較得知，饋料同時把通氣量降低至 0.5 vvm，造成菌體生長緩慢，因此導致不論是 Co-Q₁₀ 濃度或是單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度，皆明顯有下降的趨勢。

4.11 氣舉式醱酵槽添加 Tween-80 界面活性劑

此次實驗目的在於將培養基中界面活性劑的最適濃度以及時間點由搖瓶放大至氣舉式醱酵槽，探討添加界面活性劑在放大過程中是否能得到和搖瓶一樣的實驗結果，而因為界面活性劑加入培養基中容易起泡，因此在添加界面活性劑 Tween-80 時須降低通氣量，將原先通氣量 2 vvm 降低為 0.5 vvm，避免因為添加界面活性劑而引

起的起泡現象產生。

實驗結果如圖 4-11，實驗結果顯示，在醱酵進入 36 小時之後加入 Tween-80 界面活性劑，在 48 小時取樣分析發現，菌體乾重為 4.12 g/L，相較於不添加 Tween-80 有明顯的偏低，並且 Co-Q₁₀ 產量也從醱酵 36 小時之後便沒有明顯增加的趨勢，顯示在添加 Tween-80 並且改變醱酵槽通氣量，明顯抑制菌體生長導致 Co-Q₁₀ 產量偏低，可能的原因在於在菌體對數生長期時，降低通氣量使得菌體無法得到充足的氧氣，導致菌體生長趨緩，此一現象和兩階段溶氧饋料實驗 (2 vvm to 0.5 vvm) 有類似的實驗結果，因此界面活性劑在氣舉式醱酵槽的放大過程中有起泡的問題產生，因而不利於製程的放大。

4.12 氣舉式醱酵槽添加棕櫚酸實驗

此次實驗在於將搖瓶實驗得到的最佳棕櫚酸添加濃度，放大到氣舉式醱酵槽，探討在放大過程中，是否能得到和搖瓶一樣的實驗結果，實驗結果如圖 4-12，在醱酵 102 小時之後，可得到最大的菌體乾重 7.81 g/L 以及 Co-Q₁₀ 濃度 62.64 mg/L，證實棕櫚酸確實可以有效提升菌體乾重以及 Co-Q₁₀ 產量。

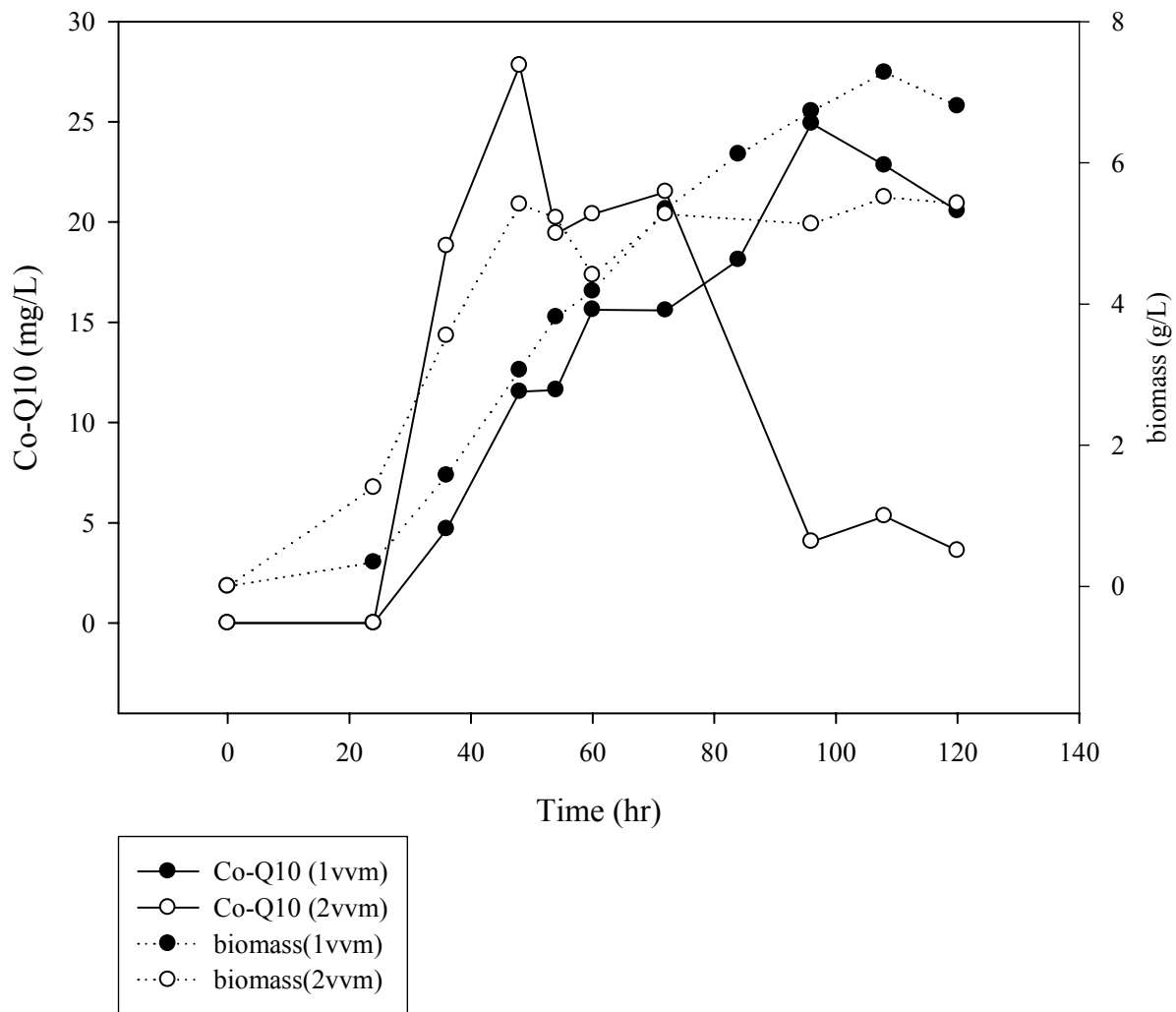


圖 4-5 氣舉式醱酵槽不同通氣量實驗

培養條件： 基礎培養基

培養過程控制 pH = 7

溫度 30°C

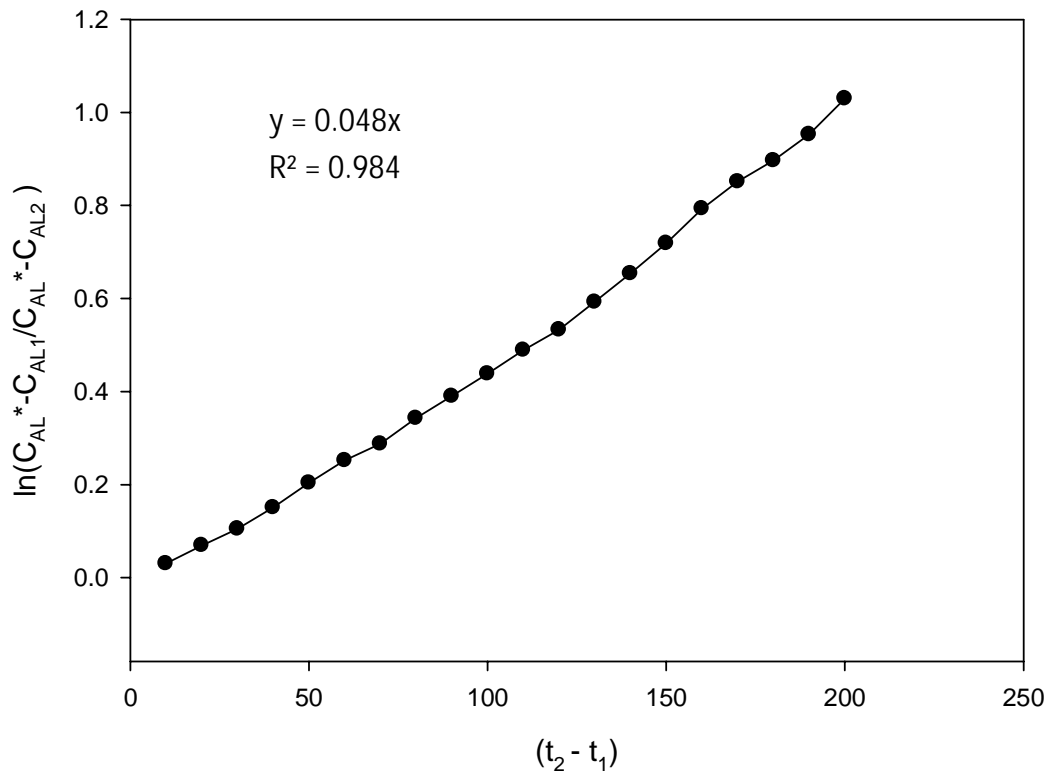


圖 4-6 氣舉式醱酵槽氧氣質傳係數

操作條件: 通氣量 2 vvm , 30 °C

t_1 為開始計算的起始點(常數), t_2 為下一個時間點(變數)

C_{AL1} : 時間為 t_1 的醱酵槽實際溶氧值(常數)

C_{AL2} : 時間為 t_2 的醱酵槽實際溶氧值(變數)

$K_L a$: 氧氣質傳係數

: 30 °C 下飽和溶氧值

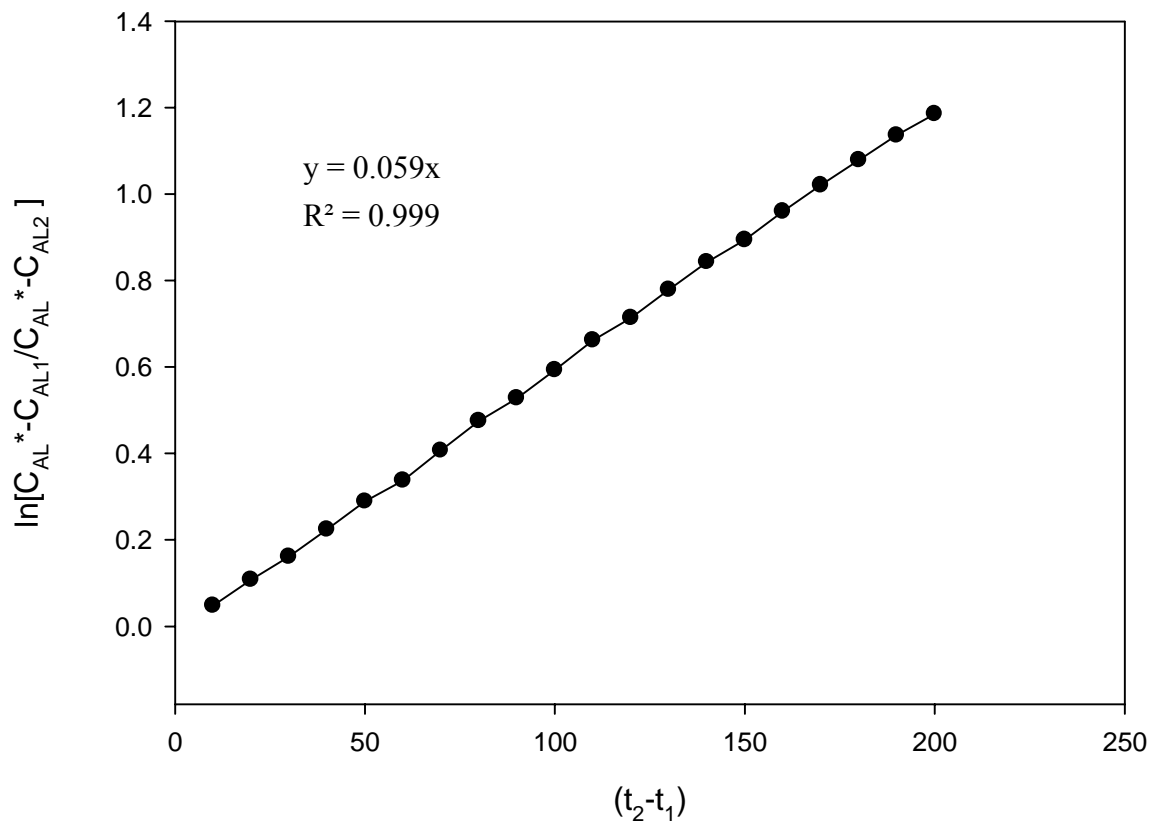


圖 4-7 攪拌式醱酵槽氧氣質傳係數

操作條件: 通氣量 1 vvm 轉速 200 rpm , 30 °C

t_1 為開始計算的起始點(常數), t_2 為下一個時間點(變數)

C_{AL1} : 時間為 t_1 的醱酵槽實際溶氧值(常數)

C_{AL2} : 時間為 t_2 的醱酵槽實際溶氧值(變數)

$K_L a$: 氧氣質傳係數

: 30 °C 下飽和溶氧值

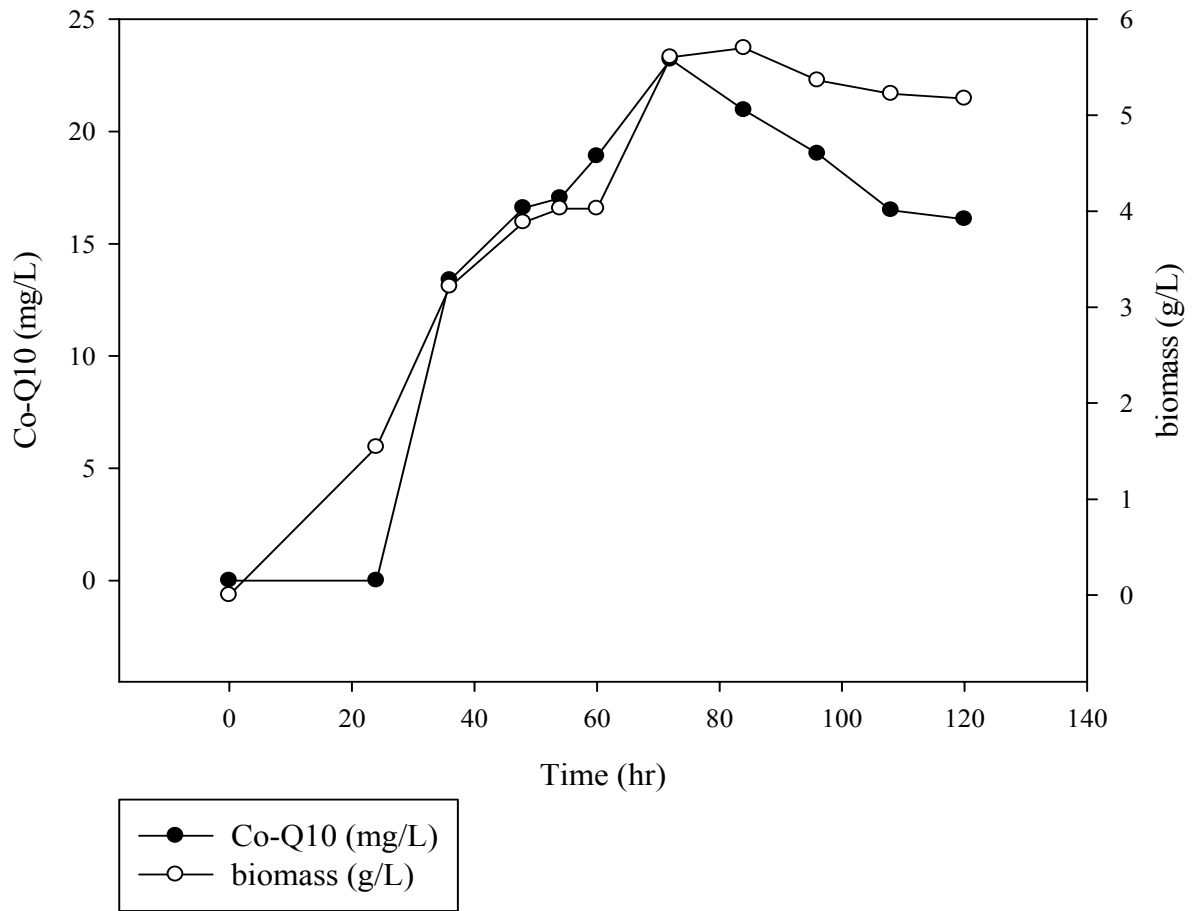


圖 4-8 攪拌式醱酵槽批次實驗

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

通氣量: 1 vvm 溫度 30°C

轉速: 200 rpm

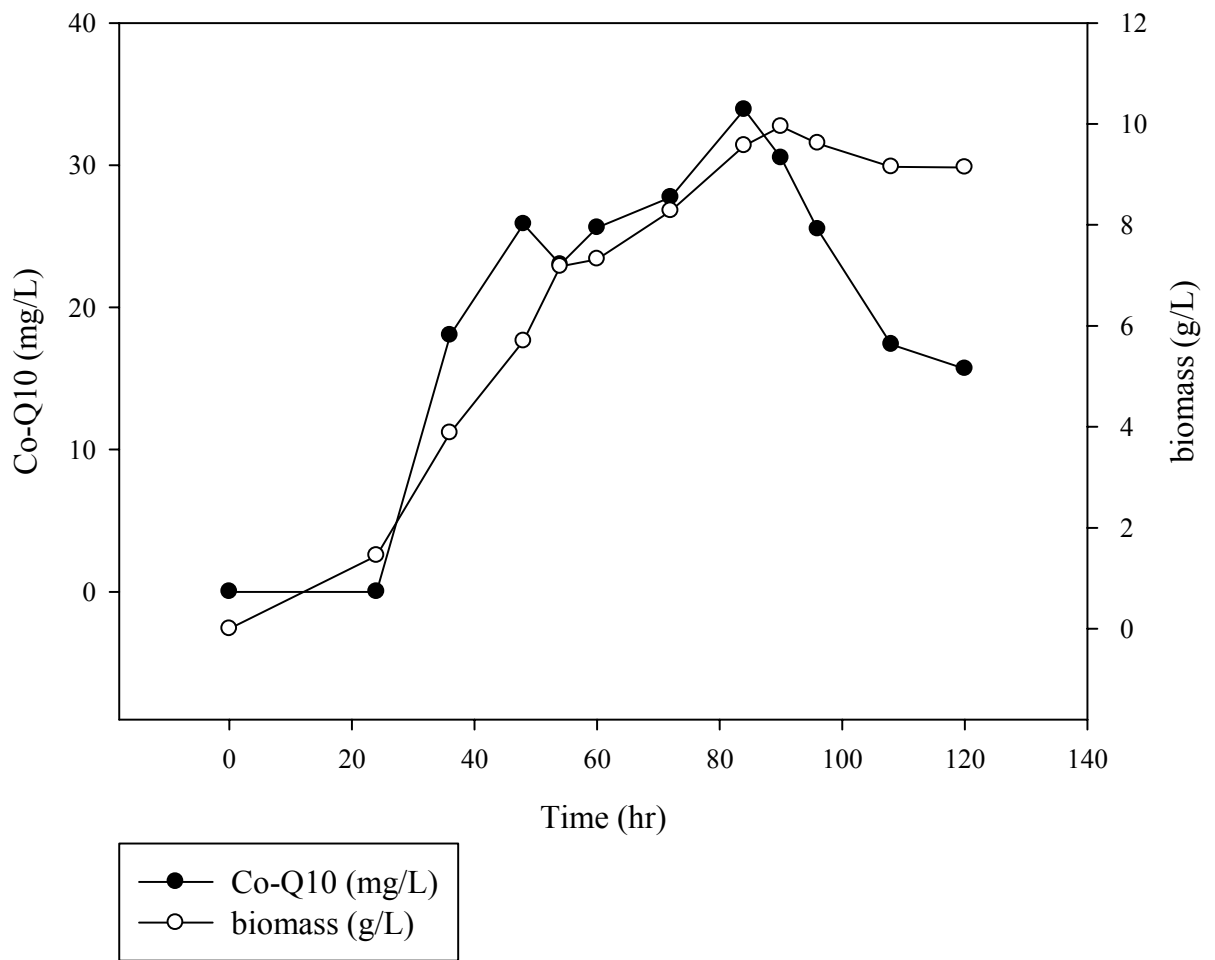


圖 4-9 氣舉式醱酵槽饋料批次實驗

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

醱酵 48 小時開始饋料 溫度 30°C

饋料速率: 2.5 g/hr

通氣量: 2 vvm

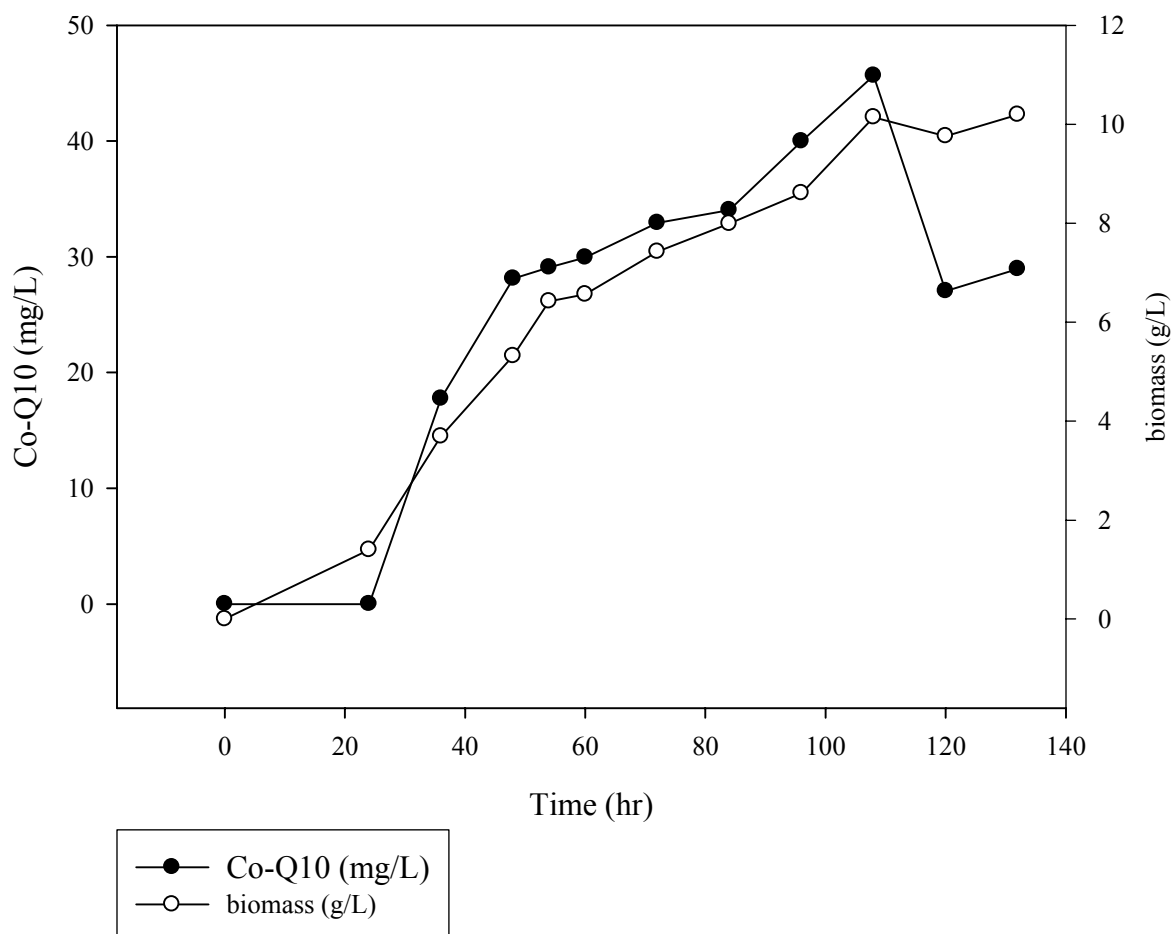


圖 4-10 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 1 vvm)

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

醱酵 48 小時開始饋料 溫度 30°C

饋料速率: 2.5 g/hr

通氣量: 48 小時之前 2 vvm

48 小時之後 1 vvm

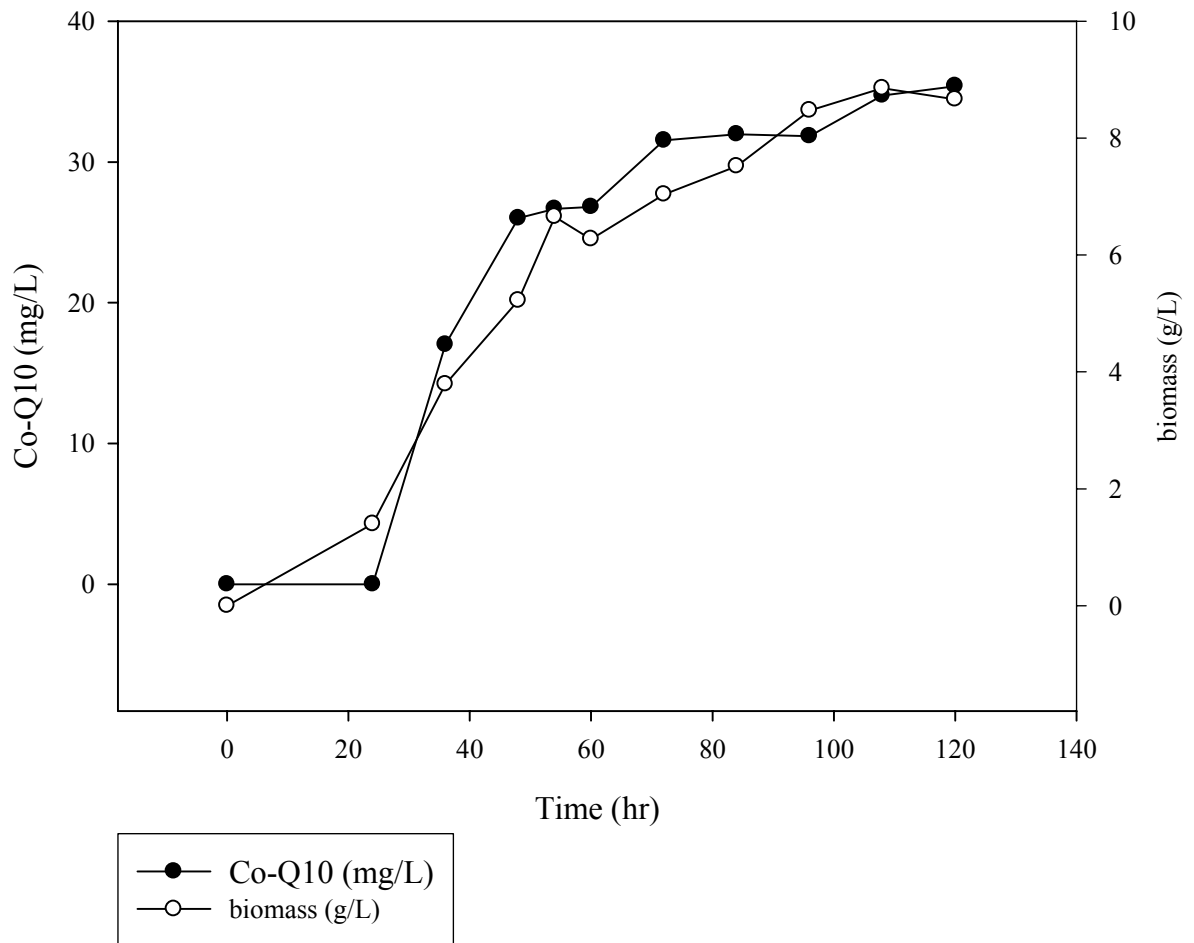


圖 4-11 氣舉式醱酵槽兩階段溶氧饋料實驗(2 vvm to 0.5 vvm)

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

醱酵 48 小時開始饋料 溫度 30°C

饋料速率: 2.5 g/hr

通氣量: 48 小時之前 2 vvm

48 小時之後 0.5 vvm

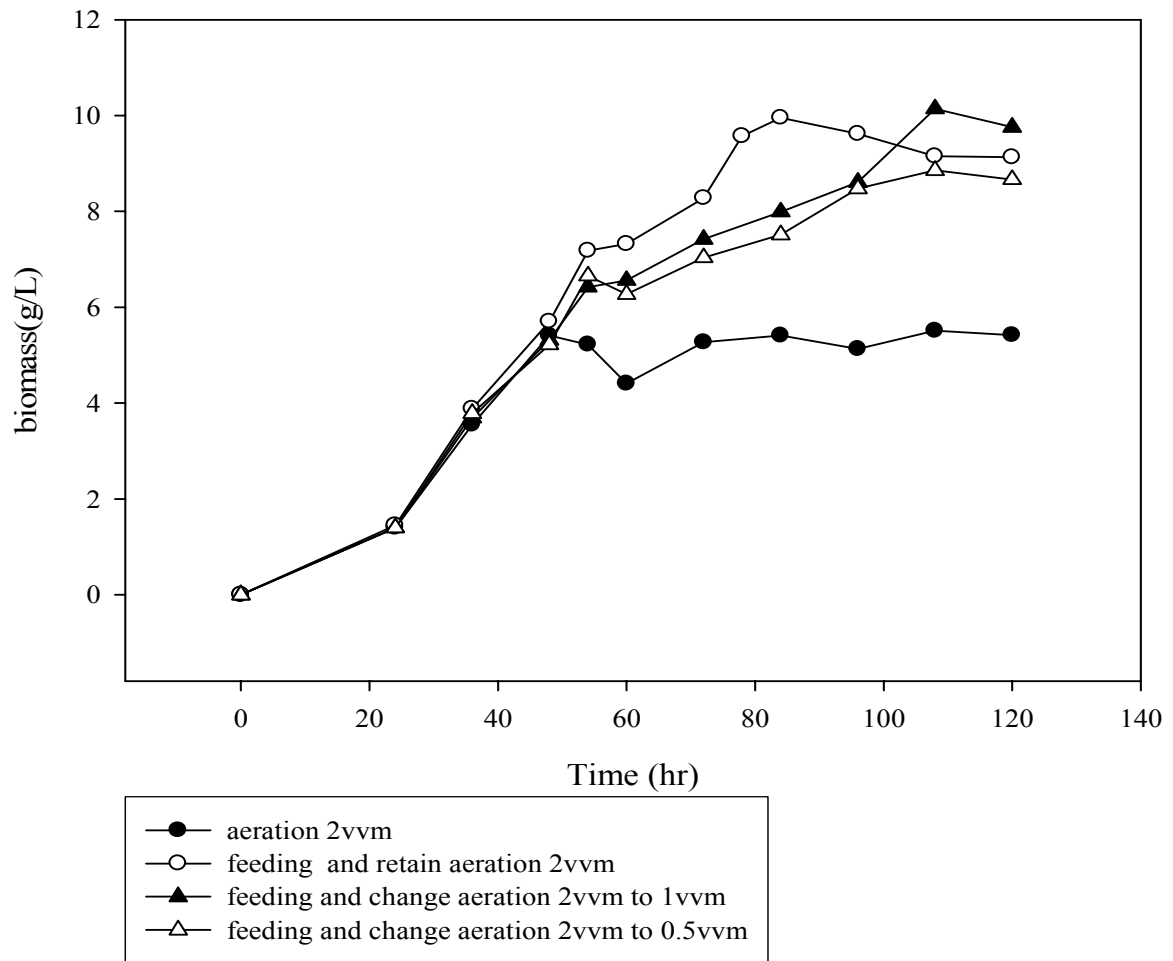


圖 4-12 醱酵槽不同控制策略數據比較(biomass)

培養條件： 基礎培養基

培養過程控制 pH = 7

溫度 30°C

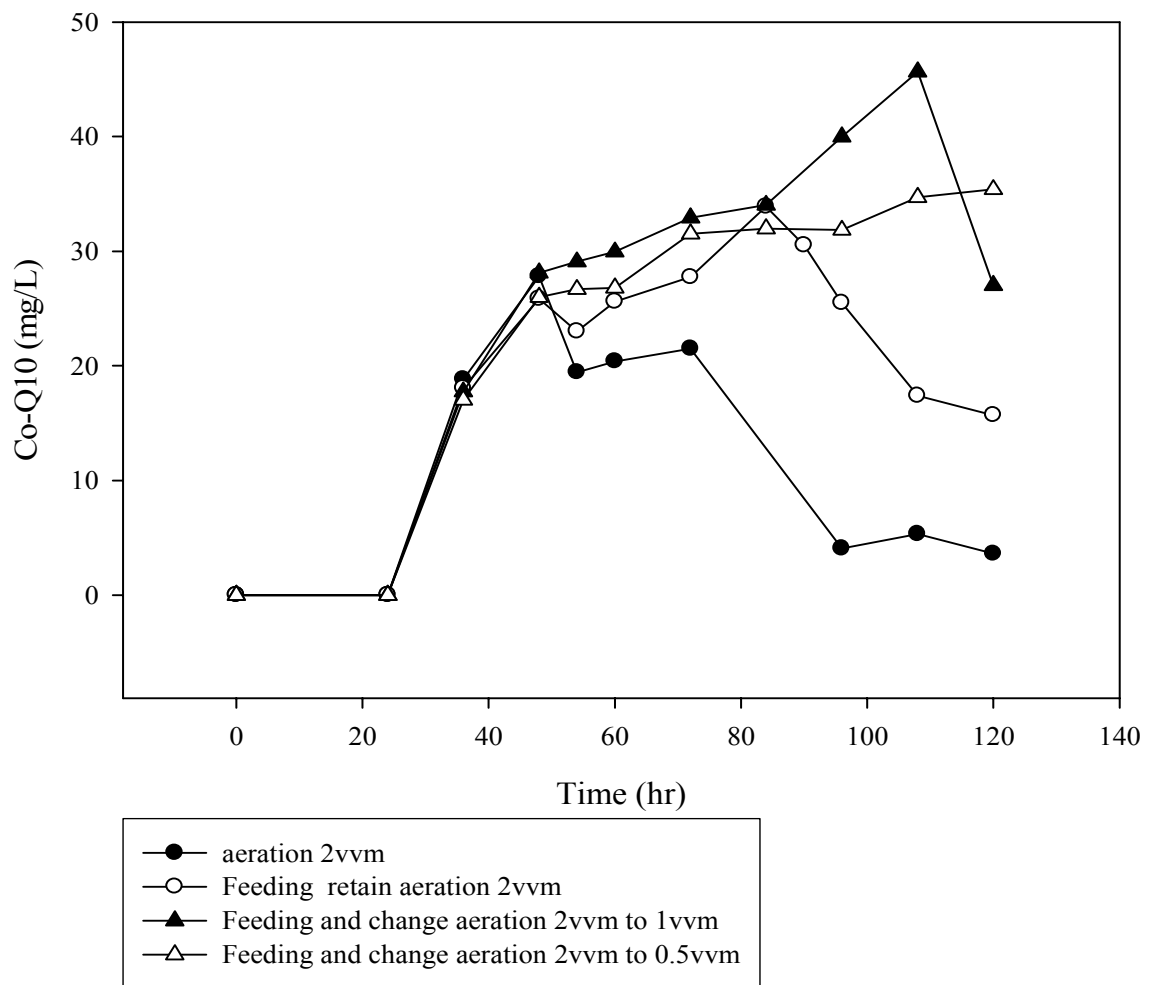


圖 4-13 醱酵槽不同控制策略數據比較(Co-Q₁₀)

培養條件： 基礎培養基

培養過程控制 pH = 7

溫度 30°C

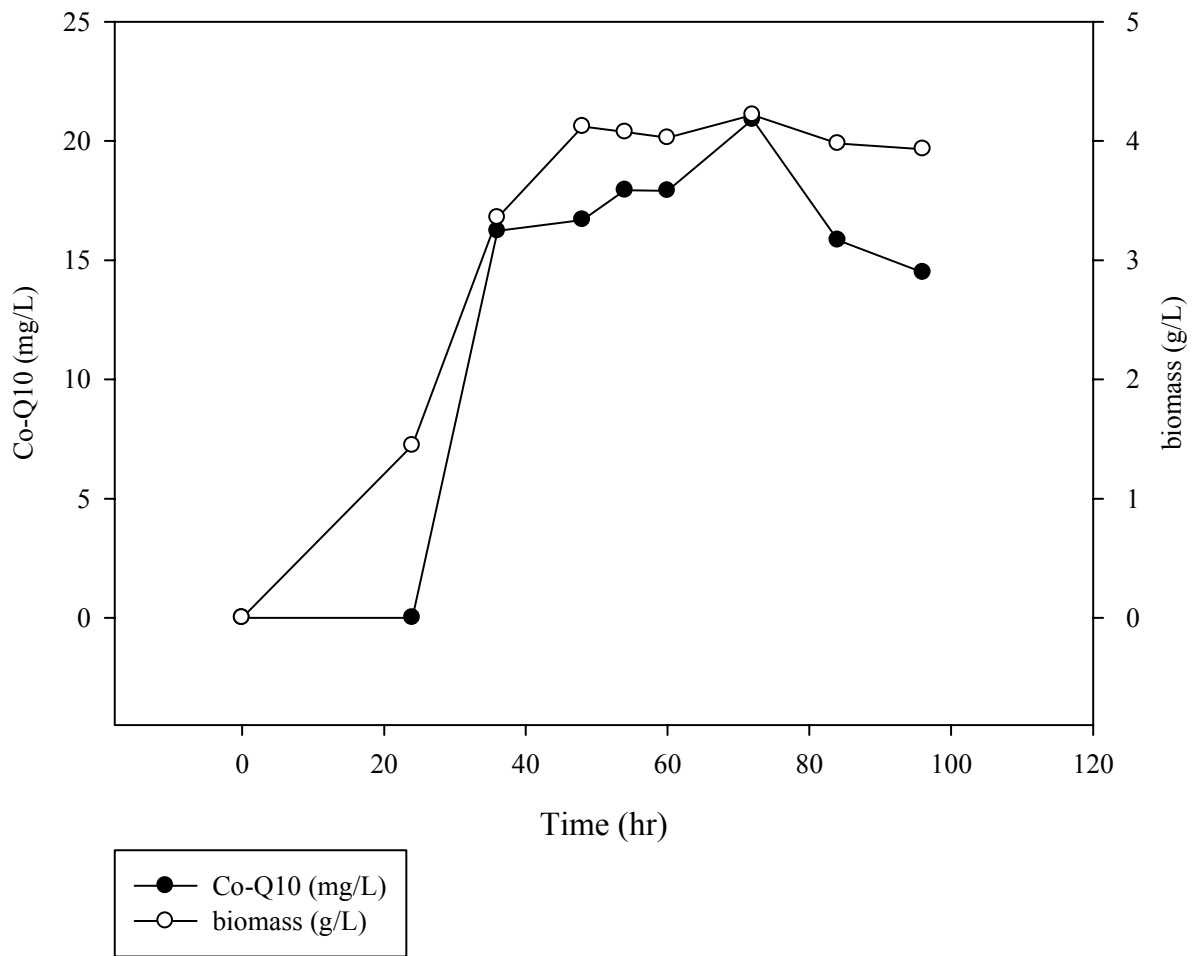


圖 4-14 氣舉式醱酵槽添加界面活性劑 Tween-80 實驗

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

通氣量： 36 小時之前: 2 vvm 溫度 30°C

36 小時之後: 0.5 vvm 36 小時添加 Tween-80

濃度: 6 ml/L

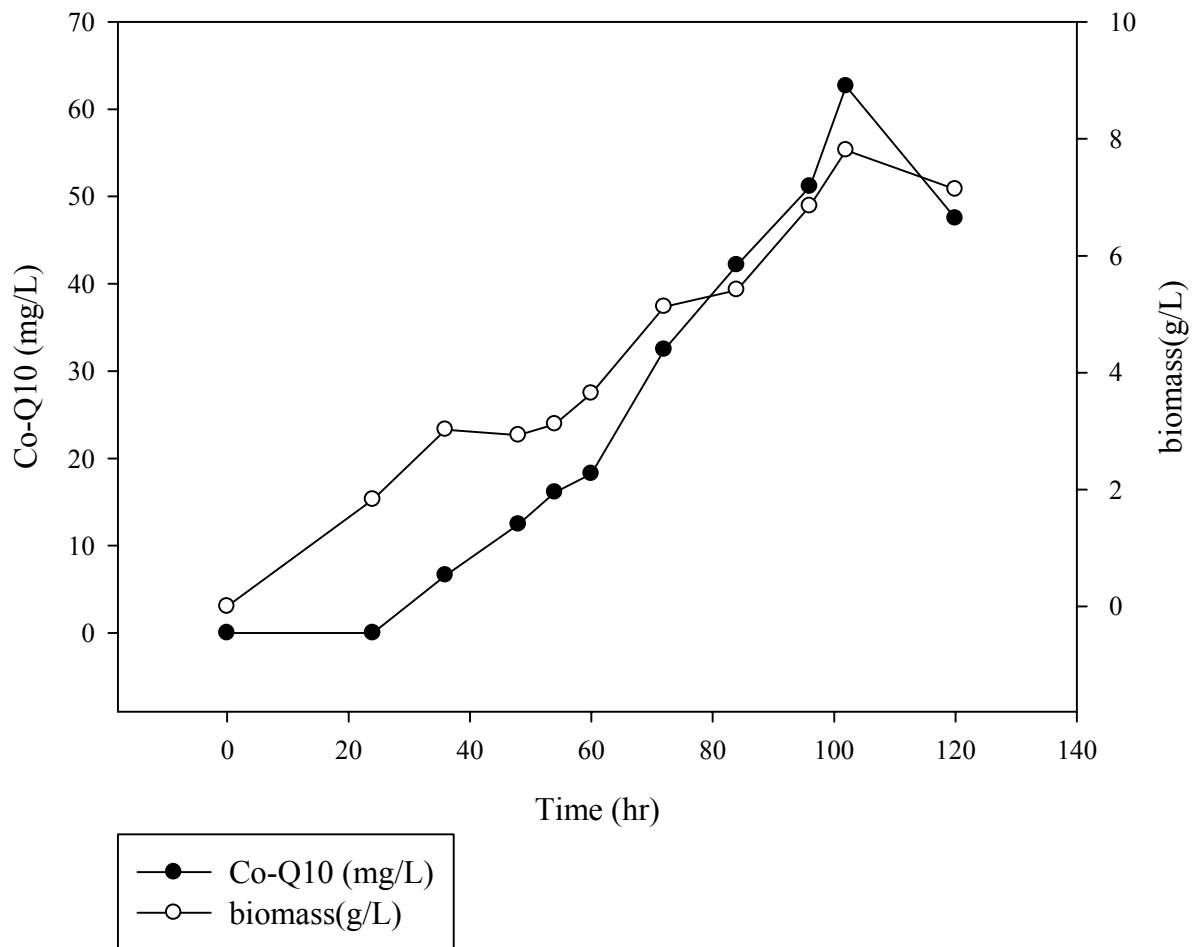


圖 4-15 氣舉式醱酵槽添加棕櫚酸實驗

培養條件： 基礎培養基 培養過程控制 pH = 7

通氣量: 2 vvm 溫度 30°C

棕櫚酸添加濃度(3 g/L)

表 4-3 醱酵槽不同操作條件下 Co-Q₁₀ 產量比較

	Max Co-Q ₁₀ Concentration (mg/L)	Co-Q ₁₀ Production Content ^a (mg Co-Q ₁₀ /g biomass)	Co-Q ₁₀ Production rate ^a (mg Co-Q ₁₀ /L hr)
Air-lift (1 vvm)	24.92	3.70	0.26
Air-lift (2 vvm)	27.81	5.01	0.57
Air-lift feeding(2 vvm)	33.91	3.54	0.40
Air-lift feeding(2 vvm to 1 vvm)	45.65	4.50	0.42
Air-lift feeding(2 vvm to 0.5 vvm)	34.71	3.92	0.32
Add palmitic acid(3 g/L)	62.64	8.03	0.61
Stirred fermenter(1 vvm , 200 rpm)	23.20	4.14	0.32

a:Based on Max Co-Q₁₀ Concentration time

第五章 結論與展望

5-1 結論

1. 三角瓶實驗中以酵母萃取物(yeast extract)為培養基氮源，菌體乾重為 4.55 g/L，Co-Q₁₀ 濃度為 29.97 mg/L，為適合 *R. sphaeroides* 生長以及生產 Co-Q₁₀ 的培養基氮源。
2. 利用 NaCl、KCl 的添加提高培養基滲透壓實驗顯示，NaCl 的添加使菌體乾重降低 7.4%，Co-Q₁₀ 濃度上升 15.8%，而 KCl 的添加使菌體乾重略降低 2%，Co-Q₁₀ 產量上升 15.7%，顯示當提高培養基滲透壓時，對於菌體的生長有抑制現象，而適當的提高培養基滲透壓是有利於 Co-Q₁₀ 的生成。
3. Tween-80 可提高菌體乾重 7.8% 以及 Co-Q₁₀ 產量 26%，為較理想的添加物。PEG-4000 可提高菌體乾重 7.8% 以及 Co-Q₁₀ 產量 7.9%，影響性比較不明顯，但是 Tween-80 界面活性劑添加於氣舉式醱酵槽中容易大量起泡，因此不利於製程的放大。
4. 硬脂酸、棕櫚酸兩種飽和脂肪酸的添加對於 *R. sphaeroides* 生長以及 Co-Q₁₀ 產量有明顯的提升，菌體乾重分別增加 33.4% 以及 29.8%，而 Co-Q₁₀ 產量分別增加 65.8% 以及 74.1%，顯示這兩種脂肪酸為較理想的添加物。

5. 在氣舉式醱酵槽中通氣量 2 vvm 在醱酵 48 小時即可達到最大菌體乾重 5.41 g/L 以及 Co-Q₁₀ 產量 27.81 mg/L，最高的 Co-Q₁₀ 生產速率 0.57 mg/hr L，不但可以有效的縮短菌體的潛伏期(lag phase)，並且有較高的 Co-Q₁₀ 生產速率 0.57 mg/L hr，因此為生產 Co-Q 較佳的通氣量。
6. 由實驗結果得知，氣舉式以及攪拌式醱酵槽在相近的氧氣質傳係數條件下，仍然以氣舉式反應器可以得到較佳的 Co-Q₁₀ 產量，顯示對於以 *R. sphaeroides* 生產 Co-Q₁₀ 而言，氣舉式醱酵槽可以取代攪拌式醱酵槽，不但有較低的能源消耗，並且可以得到較高的 Co-Q₁₀ 的生產速率。
7. 醱酵槽饋料實驗證實，饋料確實有助於延續菌體的生長，但是在營養源以及溶氧皆為充足的情況下，會造成單位菌體的 Co-Q₁₀ 產量下降，而在饋料兩階段溶氧實驗結果證實，菌體在獲得營養源的同時降低醱酵槽通氣量(2 vvm to 1 vvm)，有助於單位菌體 Co-Q₁₀ 的生成，Co-Q₁₀ 產量由 48 小時的 27.81 mg/L 提升至在 108 小時得到 45.65 mg/L，然而過低的通氣量(2 vvm to 0.5 vvm)反而會對菌體生長造成抑制，因此不利於 Co-Q₁₀ 的生成。

8. 棕櫚酸最佳的添加濃度放大至氣舉式醱酵槽批次實驗，在醱酵 102 小時可得到最高 Co-Q₁₀ 產量 62.64 mg/L、單位菌體 Co-Q₁₀ 濃度 8.03 mg/g、Co-Q₁₀ 生產速率 0.61 mg/L hr，皆為本研究中的最高數值，顯示棕櫚酸對於 *R. sphaeroides* 生長以及生產 Co-Q₁₀ 有相當明顯的效益。

5-2 展望

1. 菌種改良，由於野生菌株生產 Co-Q₁₀ 的能力相較於基因改良後的菌株產量明顯的較低，對於工業化的角度而言，產量的高低對於生產成本有相當大的影響性，因此菌種的改良為必須進行的。
2. 在本研究中發現飽和脂肪酸的添加，對於 *R. sphaeoides* 生長以及 Co-Q₁₀ 產量有明顯的提升，因此可以針對不同的飽和脂肪酸以及添加時間點作進一步探討。

參考文獻

- 吳文騰，”醱酵槽之設計”，生物產業，11：2：91-97 (2000)
- 吳柏宏，”光合細菌的培養與應用”，食品工業，34(12):16-25 (2002)
- 邱紫文，劉懷勝，”生物反應器概述”，化工技術，3:3，86-92 (1995)
- 邱嘉鴻，”液態培養 *Rhodobacter sphaeroides* 生產 CoQ10 之醱酵研究”，東海大學化學工程研究所碩士論文(2007)
- 洪嘉男，”應用液態培養 *Ganoderma lucidum* 生產 Polysaccharide-油脂及界面活性劑添加效應之探討”，中興大學化學工程學系研究所碩士論文(2007)
- 莊晟榜，” Tween 系列界面活性劑對微生物降解碳氫化合物之影響”，中原大學化學工程學系研究所碩士論文(2002)
- 許嘉燕，”探討不同培養條件對光合菌 *Rhodobacter sphaeroides* 生產輔酶 Q10 之影響”，屏東科技大學食品科學系研究所碩士論文 (2006)
- 郭秋媚，劉恆仲，”輔酶 Q10 之簡介”，食品工業，36(12):42-56 (2004)
- 劉昌鋒，”探討不同培養基組成對光合菌 *Rhodobacter sphaeroides* 生產 Coenzyme Q10 之研究”，中央大學化學工程研究所碩士論文 (2001)
- 劉倉豪，”利用光合菌 *Rhodobacter sphaeroides* BCRC 13100 生產 Coenzyme Q10 醱酵製程之開發”，元智大學化學工程研究所碩士論文(2007)
- 賴怡君，”輔酶 Q10 及其功效簡介”，食品工業，36(7)：29-34 (2004)
- 賴進此，”光合菌相關潛力產品之開發”，食品工業，34(12):3-15 (2002)
- 駱呈欣，黃世傑，”氣舉式生化反應器”，化工技術，12-12 (2004)
- 蘇遠志，”Coenzyme Q10 的應用及市場概況”，生物產業，16:4:62-68 (2005)

- Alleva R, Tomasetti M., Battino M., Curatola G., Littarru G. P., and Folkers K., "The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:9388–939 (1995)
- Baeclay Laurie, "CoQ10 may slow progression of Parkinson disease", *Medscape Medical News*, (2002)
- Brock T. D. and, Madigan Michael T., *Biology of microorganisms*, (1988)
- Burke B.E., Neuenschwander R., and Olson, RD., " Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in isolated systolic hypertension", *South Medical Journal*, 94: 1112-1117 (2001)
- Chen-You Li, Chu-Yuan Cheng, Teh-Liang Chen, "Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source", *Enzyme and Microbial Technology*, 29 : 258–263 (2001)
- Choi Gi-Sub, Kim Tong-Sung, Seo Jin-Ho and Ryu YW., "Restricted electron flux increases coenzyme Q10 production in *Agrobacterium tumefaciens* ATCC4452", *Process Biochemistry*, 40: 3225–3229 (2005)
- Choi Jin-Ho, Ryu Yeon-Woo, Seo Jin-Ho, "Biotechnological production and application of coenzyme Q10", *Applied microbiology and biotechnology*, 68: 9-15(2005)
- Crane F.L., Harefi Y, Lester RL., and Widner C., "Isolation of q quinone from beef heart mitochondria", *Biochim biophys Acta*, 25:220-221 (1957)
- Crane F. L., *Biochemical functions of coenzyme Q10*, *J Am Coll Nutr*, 20:591-598.(2001)
- David M. Rollins, "BSCI 223 General Microbiology", http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/BSCI223WebSiteFiles/P_hotosyntheticBacteria.htm, (2002)
- Ernster L., and Dallner G. "Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function", *Biochimica et biophysica Acta* , 1271:195-204 (1995)

- Folkers K., Langsjoen P., Willis R., Richardson P., Xia L J, Ye C Q and Tamagawa H., "Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87:8931–8934 (1990)
- Hong-Wei Yen, Chia-Hung Chiu, "The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation on CoQ10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter", Enzyme and Microbial Technology, 41: 600–604 (2007)
- K. Kitatsuji, H. Miyata and T. Fukase, "Lysis of filamentous bacteria by surfactants, Water Science and Technology ", 34:145–153(1996)
- Koku Harun, Eroğlu Inci, Yücel Meral, and Türker Lemi, "Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*", International, Hydrogen Energy , 27:1315~1329 (2002)
- Kyowa Hakko kogyo Co. Ltd., Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP, 82:146, 285 (1983)
- Leo Marcoff, MD, Paul D. Thompson, MD, "The Role of Coenzyme Q10 in Statin-Associated Myopathy", New Haven, Hartford, and Farmington, Connecticut, 49: 23, 2231-2237(2007)
- Mary K. Campbell, Shawn O. Farrell, Biochemistry, Thomson, 544-74 (2006)
- Natori Y., Nagasaki T., "Enhancement of coenzyme Q10 accumulation by mutation and effects of medium components on the fermentation of coenzyme Q homologs by *Pseudomonas* N842 and mutants", Agricultural and biological chemistry, 45:2175-2182 (1981)
- Portakal O., Özkaya O., Erden Inal M, Bozan B, Kosan M, and Sayek I., "Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of Breast cancer patients", Clinical biochemistry , 33: 279-284 (2000)
- Sasaki K., Nagai S., "The optimum pH and temperature for the aerobic growth of *Rhodospirillum rubrum*, and vitamin B12 and ubiquinone formation on a starch medium", Fermentation Technology, 57:383-386 (1979)
- Sasilaka C., Rammana, C. V., "Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I: Production of single cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones and enzymes and use in waste treatment".

Advances in applied microbiology, 41:173-226 (1995)

Singh RB, Wander GS, Rastogi A, Shukla PK, Mittal A, Sharma JP, Mehrotra SK, Kapoor R, Chopra RK, "Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in patients with acute myocardial infarction", Cardiovascular drugs and therapy, 12: 347–353 (1998)

Tjakko Abee, Ronald Palmen, Klaas J. Hellingwerf, Wil N. Konings, "Osmoregulation in *Rhodobacter Sphaeroides*", bacteriology, 149-154(1989)

Urakami, T. and Yoshida, T., "production of ubiquinone and bacteriochlorophyll a by *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter sulfidophilus*", Fermentation and Bioengineering, 76:191-194 (1993)

Van't Riet, K., "Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels", Ind Eng Chem Process Des Dev, 18: 357–364 (1979)

Wu Zufang, Du Guocheng and Chen Jian, "Effects of dissolved oxygen concentration and DO-stat feeding strategy on CoQ10 production with *Rhizobium radiobacter*", Microbiology & Biotechnology, 19:925-928 (2003)

Yoshida H, Katani Y, Ochiai K, Araki K., "Production of ubiquinone-10 using bacteria", general and applied microbiology, 44:19–26 (1998)