

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

非糧生質精煉催化轉換技術及應用評估研究

**Study on catalytic conversion technology and application evaluation  
of non-grain biomass refining**

計畫編號：107A007

受委託機關(構)：國立交通大學

計畫主持人：蘭宜錚

聯絡電話：03-571-2121 ext 59719

E-mail address：ethanilan@nctu.edu.tw

協同主持人：

研究期程：中華民國 107 年 4 月至 107 年 12 月

研究經費：新臺幣 87 萬元

核研所聯絡人員：涂瑋霖

報告日期：107 年 12 月 6 日

## 目錄

壹、中文摘要 .....	3
貳、英文摘要 .....	5
參、計畫緣起與目的 .....	7
肆、研究方法與過程 .....	15
一、化學品、試劑與菌株 .....	15
二、質體建立及轉殖 .....	15
三、菌株培養及生產乙酸正丁酯 .....	16
四、體內酵素活性測試 .....	17
五、體外酵素活性測試 .....	18
六、半批次發酵生產乙酸正丁酯 .....	18
七、成分分析 .....	19
伍、主要發現與結論 .....	20
一、    以大腸桿菌菌株建立乙酸正丁酯生產途徑 .....	20
(一) 大腸桿菌菌株與乙酸正丁酯生產之質體建構.....	20
(二) 乙酸正丁酯對大腸桿菌之毒性測試.....	20
(三) 體外與體內測試 ATF1 表現於大腸桿菌中之活性 .....	21
(四) 共表現丁醇生產途徑與 ATF1 達到以葡萄糖生產乙酸正丁酯 .....	22
(五) ATF1 表現量對乙酸正丁酯產出之影響 .....	23
(六) 以發酵槽進行乙酸正丁酯放大生產 .....	24
二、以藍綠菌利用光合作用轉換二氧化碳為乙酸正丁酯 .....	25
(一) 乙酸正丁酯的揮發性測試.....	25
(二) 乙酸正丁酯對藍綠菌之毒性測試.....	26
(三) 生產乙酸正丁酯之藍綠菌株建構及乙酸正丁酯生產測試.....	26
(四) 藍綠菌之 ATF1 酵素體外活性測試.....	28
(五) 利用大腸桿菌轉換藍綠菌生產之丁醇成乙酸正丁酯 .....	28
三、探討鈎蟲貪銅菌轉換二氧化碳為乙酸正丁酯之可行性 .....	30
(一) 測試 ATF1 在鈎蟲貪銅菌之活性 .....	30
(二) 測試鈎蟲貪銅菌轉換藍綠菌生產之丁醇成乙酸正丁酯 .....	32
陸、參考文獻 .....	33
柒、圖表 .....	38

## 壹、中文摘要

在全球人口的增加下，糧食類作物用於發酵工業生產化學品與生質燃料逐漸成為問題，因此使用非糧食類的生物資源合成生質化學品被視為重要的一項技術，其中利用二氧化碳為碳源合成多樣性化學品不但可降低對石化原料的需求，也能減少工業廢氣中高濃度二氧化碳的排放，是一項環保的碳循環技術。藍綠菌是一種自營光合細菌，透過基因改造可將二氧化碳轉換成多樣有機化合物，此些化合物可用於食品工業、香水或化妝品產品。然而尚未有基因改造之藍綠菌能生產香精類型的酯類化合物，因此本研究擬改造藍綠菌使其利用二氧化碳生產乙酸正丁酯。

本團隊首先於大腸桿菌中建立乙酸正丁酯生產途徑。利用丁醇生產大腸桿菌菌株額外表現來自釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 *ATF1* 基因，本團隊成功在移除發酵途徑的大腸桿菌菌株中建立葡萄糖至乙酸正丁酯的發酵生產途徑，進一步經由移除甲酸脫氫酶 (*fdh*) 基因表現調控 NADH 平衡，並剔除磷酸轉乙醯酶 (*pta*) 基因製造 ATP 的驅動力，新菌株可達到 1.10 g/L 乙酸正丁酯產量，再經由 5L 發酵槽放大發酵則可於四天內產至 23.46 g/L。

將此代謝途徑建立於藍綠菌中，並無法生產乙酸正丁酯，經過體外酵素活性測試發現 ATF1 在藍綠菌中並無活性或活性極低，為達成二氧化碳生產乙酸正丁酯之最終目的，改為兩階段生產方式，首先利用藍綠菌分別生產丁醇及琥珀酸，將帶有 ATF1 之大腸桿菌培養於藍綠菌之琥珀酸培養液中，再將來自藍綠菌生產之丁醇做轉換，整個兩階段流程可利用二氧化碳生產 21 mg/L 之乙酸正丁酯。由於 ATF1 在藍綠菌中表現不佳，本團隊也另外開發可利用二氧化碳、氫氣及氧氣生長之鈎蟲貪銅菌，透過體內酵素活性測試，ATF1 酵素可成功將菌外添加之丁醇轉換成乙酸正丁酯，顯示此菌株有直接轉換二氧化碳至乙酸正丁酯之潛力。

## 貳、英文摘要

As world population increases, traditional bioresources such as sugars are less suitable for use in the production of chemicals and fuels. As an alternative, using non-food feedstock to produce value-added chemicals is attractive. While the overproduction of carbon dioxide, which is the most abundant greenhouse gas over the world, during petrochemical industrial process causing serious greenhouse effect, carbon dioxide utilization attracts significant attention. Cyanobacteria is a photoautotroph microbe, which has been studied for chemical production such as alcohols, acids, hydrocarbons and terpenoids. Fragrances, including terpenoids, ester, ketone and aldehyde, are valuable compounds due to their application on food industry, perfumes and cosmetics. Cyanobacteria has been previously engineered for several different fragrances production, including limonene, isobutyraldehyde, coumaric acid, etc. However, production of ester, which can be biologically produced from esterification of an alcohol and an acyl-CoA, has never been reported in cyanobacteria. In this study, we are interested in metabolic engineering cyanobacteria for the butyl acetate production.

While there was no literature showed the butyl acetate production directly from sole carbon source without external butanol added, we will first demonstrate the butyl acetate in *Escherichia coli* using glucose as feedstock. Based on the known Atf1 gene sequence from *Saccharomyces cerevisiae*, we will bioprospect alcohol acetyltransferase genes for higher butyl acetate production in *E. coli*. Consequently, we demonstrated butyl

acetate production reaching 23.46 g/L by fermentation.

Then, to achieve butyl acetate production in cyanobacteria, we will overexpress Atf1 in the previously constructed butanol constructed cyanobacteria strain. However, engineered cyanobacteria didn't produce butyl acetate. Both in vitro and in vivo assay showed undetectable ATF1 activity in cyanobacteria. To achieve butyl acetate production from carbon dioxide, we design two-steps method to first produce butanol and succinate from cyanobacteria, and then convert them to butyl acetate using *E. coli*. Finally, we showed butyl acetate production with the titer 21 mg/L from carbon dioxide. In addition, we also evaluated the potential of other microorganism, *Ralstonia eutropha* H16, which can utilize carbon dioxide, hydrogen and oxygen to grow. The initial data showed the enzyme activity of ATF1 in *Ralstonia eutropha* H16, indicating that it's a promising host for producing butyl acetate from carbon dioxide.

## 參、計畫緣起與目的

隨著科技發展，現代社會主要仰賴石化工業與火力發電來生產化學品與獲得能源，但在產生能源的過程中，石化燃料的不可再生性、產生大量溫室氣體造成全球暖化皆使得發展替代方案成為重要議題。作為替代方案之一，以生物發酵方法製造工業用化學品或能源的研究已行之有年，如乙醇、琥珀酸、乳酸等產物更已商業化量產，然而，發酵生產主要碳源來自植物製成的醣類，若要更大規模的發展，這些化學品生產原料將與糧食用途相競爭而成為另一大議題。基於這些考量，開發生物利用其他不與糧食競爭的碳源，如：木糖、甲烷、甲醇、二氧化碳等轉換為高價值化學品，成為一重要的研究方向。

具有芳香之化合物目前可以從天然動植物萃取或是利用化學方法合成，其用途廣泛，不只可以用於香水工業的製程，也常被用於食品添加在食品當中，據統計，2016 年全球市場價值 271 億美元，預計於 2021 年可成長至 370 億美元，因此其市場相當龐大，然而目前已知的製程，常以萃取天然動植物或是以化學工業的石化衍生物反應後而得，而萃取天然動植物的製程會面臨到提取的效率不足或是原料來源稀缺，以至於不利工業化生產；若由化工

製程則容易汙染環境，如排放廢氣以加劇溫室效應之影響，因此生產具芳香之化合物仍需尋求替代方法。若借助生物代謝工程產生這類化合物（如：酯、萜類、醛和酮等），其較傳統模式具有三項優點：其一，微生物生長相對於動植物較快，可以縮短獲取原料來源之消耗以及增加原料供給之穩定性，其二，微生物生長不需要大片土地面積，可大量培養以增加生產效率及產量，其三，透過不同微生物之選擇，轉化廢棄物為具附加價值之化合物，如利用空氣中之二氧化碳讓藍綠菌產出香味分子，將是一種對於環境不具汙染性之生產模式。

鑒於主要溫室氣體二氧化碳在大氣中的濃度逐年增長，近年來，許多研究專注於開發利用藍綠菌轉換二氧化碳成為高價值化學品，藍綠菌為光合微生物，能利用光能將二氧化碳固定為代謝產物，相較於利用微藻與植物轉換生產化學品，藍綠菌具有基因轉殖容易、會將代謝產物分泌至培養液中的特性，前者使得代謝工程改造藍綠菌生產各種非天然代謝物的過程更加快速，後者則使得藍綠菌在未來可能的工業化應用上具有無需破菌成本的優勢。目前藍綠菌已被建立的生產途徑包括：乙醇、丁醇、2,3-丁二醇、琥珀酸、乳酸、異丙烯等，主要多為醇類及有機酸。

芳香化合物主要分成酯、萜類、醛和酮四類，由於在天然動植物即可產出，因此透過分析其代謝途徑，再利用基因工程技術將基因轉殖進微生物中，於微生物中重新建構產出特定芳香化合物之代謝途徑，便能利用微生物（如：大腸桿菌、藍綠菌）生產芳香化合物（表一）[1]。由表中可發現過往相關研究中通常以大腸桿菌作為生產平台並利用葡萄糖作為碳源生產芳香化合物。在藍綠菌中利用二氧化碳生產芳香化合物，目前已被證明能合成萜類、醛（表二），其中又以萜類生產最多，但因萜類化合物在生物中產生主要是利用甲羥戊酸途徑或非甲羥戊酸途徑 (MEP pathway) 產生，產量較低。

在多種芳香化合物中，本團隊預計以酯類為目標，利用藍綠菌建立二氧化碳至酯類的轉換平台，主要原因包括 (1) 利用化學工業製程生產酯類，需要高溫且酸性之環境，才有利於酯化反應，這代表在生產過程將會殘留工業廢棄物，對於環境具有潛在性負面影響；(2) 酯類為醇與酸的結合，變化具系統性，不同的有機酸和不同的醇類反應，即可衍生出各種產物，結合已被證明之醇類高產量菌株，能發展出多種不同性質、香味的酯類，變化性高於生產單一醇類、醛類和酮類。而利用光合微生物藍綠菌生產酯類，

具有以下優點: (1) 生物體中的酯化反應由三磷酸腺苷 (ATP) 提供能量驅使反應，不需在生產過程中維持高溫且酸性之環境，能減少提供能量之成本; (2) 工業上由石化資源做為原料以生產酯類，這過程中將產出大量二氧化碳，加劇溫室效應之影響，而利用藍綠菌產出化合物之過程卻能有效減少二氧化碳。

因目前尚未有用藍綠菌轉換二氧化碳為酯類的平台，本團隊將先以生產乙酸正丁酯 (Butyl Acetate) 為首要目標建立二氧化碳至酯類的轉換。傳統工業生產乙酸正丁酯的方法為酸催化丁醇與乙酸進行之化反應，並結合蒸餾技術進行純化[2]，其原料之一丁醇來自於石化產業，可由氫甲醯化丙烯後的產物丁醛還原得到[3]，而乙酸製程則主要使用甲醇羰基化方法制備[4]。乙酸正丁酯於2008年市場價格約為 1.58 美元/公斤[5]，其最主要之應用為作為塗料工業之溶劑[6]，而其對乙基纖維素、醋酸丁酸纖維素、聚苯乙烯、甲基丙烯酸樹酯、氯化橡膠以及多種天然樹膠均有很好的溶解性能，對於塑膠工業有其重要性，也作為石油和醫藥工業中的萃取劑;另一應用為人工香料配製，為香蕉、菠蘿、杏、梨等多種香味的成分之一，且能作為香水原料與食品添加劑，如製造糖果，冰淇淋，奶酪和烘焙食品等。乙酸正丁酯具有多方面之應用，

可做為合適的目標化合物。

在微生物中進行酯化反應，主要是利用 ATP 與以輔酶 A 合成酸的活化形式與醇類結合形成各種酯類，酯化反應由三種酵素主導(表三)[7]：(1) The wax synthase/diacylglycerol acyltransferase (WS/DGAT, AtfA) family; (2) The alcohol acetyltransferase family (Atf1); (3) The condensation family (PapA5)。AtfA 主要活性為進行長碳鏈酸與醇類的反應，該酶具有較低的酵素專一性，它可以分別利用不同碳鏈的醯基-CoA 基團和不同碳鏈長度的脂肪醇或二醯基巯基乙醇 (diacylglycerol, DAG) 來合成蠟質 (waxes, WE) 和三酸甘油酯 (triglycerides, TAG)[8, 9]，對於醯基團受質，AtfA 可和二碳到二十碳的飽和或不飽和醯基-CoA 反應。其中，palmitoyl-CoA 具有最高受質專一性[9];而對於醇類受質，二碳至三十碳的直鏈醇、支鏈醇、環狀和芳香醇和單/二醯基巯基乙醇 (mono/diacylglycerol, M/DAG) 皆能參與反應，中等長度碳鏈的醇有最高的胞外酵素活性[9]；Atf1 主要進行如乙醯輔酶 A 等短碳鏈醯基團與醇類的反應，在釀酒酵母中，大多數產出乙酸酯類由兩種酵素 ATF1 和 ATF2 催化，其中，ATF1 是乙酸酯類生產中最重要酶，佔 80%的乙酸異戊酯生成，75%的苯乙酸乙酯生產和

約 40% 的乙酸乙酯合成[10]，又因 ATF2 酵素催化活性較低，在代謝工程改良上以應用 ATF1 生產酯類為主，如在 2014 年[11]，研究團隊於大腸桿菌共表達來自釀酒酵母的 ATF1 和產出不同醇的代謝途徑以合成不同的醇基乙酸酯(如：乙酸乙酯、乙酸異丁酯等等)，並透過優化乙酸異丁酯之生產代謝途徑，更能增加其產量達 36 g/L[12]，因此 ATF1 較受到矚目；PapA5 類型則主要將支鏈酸與醇類進行酯化，和聚酮化合物 (Polyketide) 相關[13]，於大腸桿菌通過將不同醇類和不同的長鏈脂肪酸反應，結果指出 PapA5 能夠利用單碳到八碳的直鍊和支鏈醇以及兩種短鏈二醇：乙二醇和 1,3-丙二醇，此外，PapA5 還能夠催化 tetramethyl-branched fatty acid (MBFA) 和甲醇、異丙醇進行酯化反應[14]，PapA5 主要被利用於催化反應產出具較複雜結構之長碳鏈酯質。三種類特性相比較下 ATF1 最適合進行乙酸正丁酯的生產

以 ATF1 進行乙酸正丁酯生產主要為將以乙醯輔酶 A 與正丁醇做結合，乙醯輔酶 A 作為生物重要的中央代謝產物，不論在大腸桿菌或藍綠菌中都會天然產生，而正丁醇則非此兩種菌之天然產物，需要利用代謝工程引進外源基因才能產出。乙酸正丁酯在大腸桿菌中已經成功被產出，其方法為利用外加正丁醇的方式供

大腸桿菌利用，使表現 *ATF1* 基因的菌株能利用外來正丁醇與胞內乙醯輔酶 A 合成乙酸正丁酯，雖然經過基因改造大腸桿菌也被證明能在厭氧環境下利用葡萄糖有效生產丁醇[15]，但目前仍未有在無外加丁醇的情況下利用單一碳源如葡萄糖直接生產乙酸正丁酯的文獻。

目前常被利用的正丁醇生產途徑主要改造自 *Clostridium butyricum* 的天然丙酮-丁醇-乙醇發酵途徑 (圖一)，此途徑從乙醯輔酶 A 開始，首先由一個硫解酶 (thiolase) 將兩個乙醯輔酶 A 結合為乙醯乙醯輔酶 A，接著乙醯乙醯輔酶 A 的酮基被還原形成 3-羥基丁醯輔酶 A，再進一步脫水反應會形成巴豆醯輔酶 A，最後丁醯輔酶 A 脫氫酶將巴豆醯輔酶 A 轉換還原為丁醯輔酶 A，並由醛-醇脫氫酶進行還原產出正丁醇。但在將此一途徑轉換至大腸桿菌的途中，發現丁醯輔酶 A 脫氫酶難以表現，因此 trans-enoyl-CoA reductase 被用來取代丁醯輔酶 A 脫氫酶，此一經過改良後的反應途徑能在大腸桿菌中達到更高的丁醇產量。在藍綠菌株的正丁醇生產也曾被發表，將在大腸桿菌中能達到良好厭氧發酵生產正丁醇之途徑表現至藍綠菌中，卻只能在無氧暗環境下生產正丁醇[16]，主要原因為藍綠菌乙醯輔酶 A 濃度較低，使得乙醯乙醯輔酶 A 合

成因熱力學限制難以有效合成;和最終酵素醛-醇脫氫酶 (AdhE2) 會被氧氣破壞，而藍綠菌行光合作用必然會產生氧氣，影響醛-醇脫氫酶的表現。兩大限制藍綠菌生產正丁醇的瓶頸，前者再將硫解酶替代為不可逆的乙醯乙醯輔酶 A 合成酶被克服[17]，後者則在用氧氣環境下仍能穩定表現的醛脫氫酶 (Pdup) 取代 AdhE2 後被解決[18]，使得藍綠菌已可於正常光合作用環境下進行丁醇生產。

本計畫預計利用藍綠菌轉換二氧化碳生產乙酸正丁酯，此代謝途徑會先由大腸桿菌為模型建立，依據本團隊已有的大腸桿菌生產丁醇技術再多表現外源 *ATF1* 基因，預期可生產出乙酸正丁酯。一但此途徑在大腸桿菌內可行，本團隊將此模型套用在藍綠菌株上，透過修正的丁醇代謝途徑及合適的 *ATF1* 基因表現，建構出可生產乙酸正丁酯的藍綠菌株。另外，考量到中間反應物乙醯輔酶 A 可能缺乏的問題，會再進行藍綠菌共培養的研究，將丁醇生產途徑及乙酸正丁酯生產途徑分開表現於兩株藍綠菌，比較此方法和單一生產菌株之差別。透過建立藍綠菌利用二氧化碳生產乙酸正丁酯為平台，未來更可藉由搭配不同輔酶 A 和醇類分子生產多樣性的酯類。

## 肆、研究方法與過程

### 一、化學品、試劑與菌株

實驗用化學品是從 Sigma-aldrich, J.T. Baker, 或 Amresco 購入。高準確 DNA 聚合酶是使用 Merck Biosciences 的 KOD or KOD Xtreme。T4 polymerase 從 New England Biolabs 購入。培養基 LB、Yeast extract 及 tryptone 從 focusBio 購入。Bacto agar 從 BD Bioscience 購入。本計畫使用之菌種為 *Escherichia coli*、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 及 *Ralstonia eutropha* H16。

### 二、質體建立及轉殖

質體建構所需要的 DNA 片段分別利用設計之引子以 PCR 方式合成，再用 Gibson assembly 方法合成質體於 *E. coli* XL1-blue 菌株內保存，接著使用 plasmid mini-prep kit 純化質體，並依照不同菌種的轉殖方式將質體植入胞內。

大腸桿菌轉殖方式為電穿孔方式，將帶有質體將帶有卡納黴素抗性之質體送入大腸桿菌菌株，再用帶有抗生素之培養盤進行篩選，再以 PCR 確認轉殖是否成功。

藍綠菌轉殖方式為適量濃度之質體與 200  $\mu$ l OD 0.6 之藍綠菌液混和於 1.5 ml 之離心管中，以鋁箔紙包覆使離心管避光並將其

放入 30 度培養箱進行培養，待 16 小時後將 100  $\mu$ l 之混和液均勻塗在含抗生素之培養盤上，約 7 至 10 天即可在培養盤上得到成功轉殖之菌落。

貪銅鈎蟲菌轉殖方式為利用電穿孔將帶有卡納黴素抗性之質體送入作為供體細胞的大腸桿菌菌株 *E. coli* S17-1，再和受體細胞貪銅鈎蟲菌 *Ralstonia eutropha* H16 進行 6-16 小時的接合後，將供體細胞極受體細胞混合物塗抹在帶有卡納黴素和慶大黴素 (gentamicin) 之培養盤上做篩選，僅有完成接合並成功帶有質體之貪銅鈎蟲菌才能生長，並以 PCR 確認轉型是否成功。

### 三、菌株培養及生產乙酸正丁酯

大腸桿菌是用 LB 培養液培養於 37 度培養箱，並加入適當之抗生素，生產乙酸正丁酯的培養液則會額外加入葡萄糖，另外藉由加入不同濃度之誘導劑 IPTG 可觀察 ATF1 表現量是否影響乙酸正丁酯之生產。

藍綠菌先從新鮮的 BG11 洋菜膠盤上取一些菌體放入裝有 40 mL BG11 培養液的玻璃錐形瓶內，並加入適當抗生素，放置玻璃錐形瓶於光照培養箱內，以 40  $\mu$ E 的光強度、溫度 30 度及轉速 條件培養，待菌液 OD 至 0.4-0.6 時加入誘導劑 IPTG，之後每天抽取 1

mL 樣品做後續分析。

貪銅鉤蟲菌先以 2mL 的 NYB medium ( Nutrient and Yeast extract Broth)於玻璃試管培養，隔日將菌液以 1%比例以 FNG Medium (Fructose NH<sub>4</sub>Cl Glycerol Medium) 燒瓶培養 30 mL，一天後以光密度測量法 (OD<sub>600</sub> 作為指標) 衡量生長狀況，將菌液以 H16 buffer 沖洗後濃縮加入 5 公升發酵槽和體積 0.6 L 之發酵液 (FN Medium + 5 g/L 甲酸鈉) 混合成 OD 為 0.1，使菌液於發酵槽內生長，並控制溶氧比例為 5 %，控制空氣進氣量為 0.5 vvm，轉速為 300 rpm，pH 值為 6.8。當 OD 600 達到 0.6 時，以 0.1%阿拉伯糖 (arabonose) 進行誘導，以此時做為誘導 0 小時的菌體抽樣點。分別抽出誘導 0 小時及誘導 4 小時的菌液，和處理後的丁醇生產上清液混合進入採血管，進行厭氧生產乙酸正丁酯，並於 24 小時後抽樣。

#### 四、體內酵素活性測試

體內酵素活性測試是以直接額外添加丁醇之方式，有表現 ATF1 之菌株可利用溶液中之丁醇轉換成乙酸正丁酯，三種表現 ATF1 的不同菌種 (大腸桿菌、藍綠菌、貪銅鉤蟲菌) 均使用其適當培養液培養並添加誘導劑 IPTG 表現 ATF1，然後於培養液中添加丁

醇並再培養一天，接著抽取樣品量測其乙酸正丁酯生產量及丁醇消耗量。

## 五、體外酵素活性測試

體外酵素活性測試是將表現 ATF1 之菌體破菌後藉由添加丁醇及乙醯輔酶 A 來測試胞內 ATF1 之活性，當乙醯輔酶 A 反應後會釋放出輔酶 A 分子，此分子會和溶液添加之 5,5'-二硫代雙(2-硝基苯甲酸) DTNB 反應生成 410 nm 有吸收值之化合物，藉由測量此波長的生成速率推算 ATF1 之活性。

## 六、半批次發酵生產乙酸正丁酯

於燒瓶培養 10 mL 大腸桿菌菌株，一天後將菌液以 1% 比例加入 5 公升發酵槽和體積 1 L 之發酵液 (Terrific Broth Medium + 2% 葡萄糖) 混合，使菌液於發酵槽內生長，以光密度測量法 (OD600 作為指標) 衡量生長狀況，並控制溶氧比例為 20 %，當 OD 600 達到 8 時，關閉氧氣供應換以氮氣進氣，使槽內溶氧降至於 0%，始以無氧環境進行丁酸乙酯之生產，此點訂為零小時，過程中控制氮氣進氣量為 0.5 vvm，轉速為 450 rpm，pH 值為 7，葡萄糖濃度維持在 2 %，以 12 小時為單位測量發酵液中之丁酸乙酯濃度、副產物濃度和葡萄糖濃度，此外於發酵槽出氣口處設置 3 道產物萃取程序，

以減少丁酸乙酯揮發後造成產量過分低估，於進氣至萃取裝置前會先經過冷凝管，在分別於第一裝置內以 1 L 常溫水萃取，第二、三裝置為 1 L 之 4□ 冰水萃取，因此於計算產量時可更加精確定量。

## 七、成分分析

液相層析儀分析：所有有機酸是由裝備 Agilent HiPlex-H (700 x 7.7 mm) 有機酸層析管柱的 Agilent 1260 HPLC 所分析，Bio-Rad Micro-Guard Cation H guard column (30 x 4.6 mm) 則是裝置在分析管柱前。偵測儀器分別為 diode array detector (DAD) 及 refractive index detector (RID)。管柱溫度控制在 65°C，而移動相液體是用 5 mM 硫酸，流速為 0.6 mL/min。

氣相層析儀分析：所有揮發性醇類及酯類是由裝備 FID、AoC-20S auto sampler 及 AoC-20i Auto Injector 之 Shimadzu GC-2010 來分析。管柱使用 DB-Wax capillary column (30 m length, 0.32 mm diameter, 0.50  $\mu$ m film thickness)。GC 溫度起始為 40°C 維持 3 分鐘，再以每分鐘 45 °C 增溫至 235 °C 並維持 3 分鐘。Injector 溫度控制在 225 °C，而 FID 溫度控制在 330 °C。注射體積為 1  $\mu$ L，並以 15:1 比例分離。載體氣體為氦氣，而內標準品為正戊醇。

## 伍、主要發現與結論

### 一、以大腸桿菌菌株建立乙酸正丁酯生產途徑

#### (一) 大腸桿菌菌株與乙酸正丁酯生產之質體建構

為了在大腸桿菌中建立乙酸正丁酯生產，我們使用之菌株與建構的質體如表四，包括利用啟動子  $P_{LacO1}$  表現來自酵母菌的 *ATF1*，使其可受異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 濃度調控的 pMW01 與 pMW03。為了結合丁醇生產至乙酸正丁酯的轉換，我們首先將原本丁醇生產質體 pRW13、pRW18、pRW22[19]中 pRW18 的氯黴素 (Chloramphenicol) 抗性基因換成奇黴素 (Spectinomycin) 抗性基因，得到質體 pYA4 以避免外加氯黴素於培養液中也同時加入乙醇，干擾乙酸正丁酯的形成，接著，我們在 pRW22 的 *ter* 基因之後插入 *ATF1*，得到質體 pYA2，用以轉換大腸桿菌生產之丁醇為乙酸正丁酯。菌株 JCL166 剔除了大腸桿菌中的乙醇、乳酸、延胡索酸發酵途徑，已被證明能有效生產丁醇[15]，在 JCL299 菌株中則藉由進一步剔除會生產 ATP 的乙酸途徑達到增加乙醯輔酶 A 濃度的目的。

#### (二) 乙酸正丁酯對大腸桿菌之毒性測試

在微生物化學品生產中，產物對微生物之毒性時常影響生長，

並進而影響產物產量，因此，為在大腸桿菌中建立乙酸正丁酯生產平台，首先，我們利用外加不同濃度乙酸正丁酯 (0-5 g/L) 於培養液中測試其對生長的影響。測試結果如圖二，可發現大腸桿菌之生長顯著受乙酸正丁酯抑制，並在乙酸正丁酯濃度達到 4 g/L 後停止生長。由此結果可知在利用大腸桿菌大量生產乙酸正丁酯的過程中，如何於培養液中移除產物可能為影響最終產量之重要議題。

### (三) 體外與體內測試 ATF1 表現於大腸桿菌中之活性

為了確認 ATF1 表現於大腸桿菌中是否能對乙酸正丁酯生產具有活性，我們首先利用菌株 JCL16 表現帶有 ATF1 的質體 pMW01 (圖三 A)，在經 1mM IPTG 誘導 ATF1 蛋白表現後，利用 SDS-page、體外酵素活性測試 (圖三 B-C) 確認 ATF1 能有效在大腸桿菌中表現，並生產乙酸正丁酯。由 SDS-page 可發現表現 pMW01 後，在 ATF1 預期大小約 61 kDa 的位置相較未表現此質體的菌株有更為明顯的亮帶，代表 ATF1 在大腸桿菌株中有確實被表現。接著，利用破菌後的粗蛋白進行體外酵素活性測試，發現在只表現 ATF1 於 P<sub>LacO1</sub> 後的菌株中將丁醇與乙醯輔酶 A 進行乙酸正丁酯合成的酵素專一活性約為 0.0385  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ，低於文獻中被測試過的丁醇發酵途徑的酵素活性[19]，在後續實際進行乙酸正丁酯生產時可能會成為速

率決定步驟。

為了進一步測試 ATF1 於大腸桿菌體內實際進行乙酸正丁酯轉換的活性，我們利用於培養液中外加丁醇的方式，讓表現了 pMW01 的大腸桿菌菌株在無氧環境下進行丁醇與乙醯輔酶 A 至乙酸正丁酯的轉換 (圖二 D)，於 24 小時發酵後獲得約 0.61 g/L 乙酸正丁酯，而仍有 1.12 g/L 未被轉換，與前述進行的體外酵素活性測試對照，可能是因為 ATF1 於大腸桿菌中酵素專一活性不足造成轉換效率不佳。

#### (四) 共表現丁醇生產途徑與 ATF1 達到以葡萄糖生產乙酸正丁酯

為了達到從葡萄糖至乙酸正丁酯之轉換，而避免外加丁醇造成額外成本，我們接著利用已被發表之丁醇生產途徑[19]與 ATF1 結合，期望達到不需外加丁醇而利用葡萄糖生產乙酸正丁酯的目的。首先我們在菌株 JCL166 中表現 pRW13、pYA2、YA4 達到乙酸正丁酯產量 0.2 g/L (圖四)，同時我們觀察到此菌株的葡萄糖消耗量 (4.22 g/L) 略低於文獻中丁醇生產菌株之葡萄糖消耗量，可能原因為在丁醇由葡萄糖厭氧發酵的過程中，利用額外表現 *fdh* 基因將甲酸轉換為二氧化碳 (圖一)，可以達到輔酶 NADH 的平衡，大幅提高丁醇產量，而在葡萄糖至乙酸正丁酯的厭氧發酵中，若直接加入

ATF1 基因而不做任何修改，會造成 NADH 過剩，此過剩的 NADH 可能降低葡萄糖進行糖解作用的速率，間接影響乙酸正丁酯產量，而若少表現 *fdh* 雖會使 NADH 短缺，但有可能增進乙酸正丁酯產量，因此我們嘗試不表現 *fdh* 而僅利用 pRW13、pYA2 進行乙酸正丁酯的生產，提升產量達到 0.42 g/L。

為了進一步提高乙酸正丁酯產量，我們將上述兩組包含或不包含 *fdh* 的乙酸正丁酯生產質體放到另一菌株 JCL299，JCL299 為 JCL166 剔除 *pta* 基因後的菌株，此菌株因在厭氧環境下失去利用乙醯輔酶 A 至乙酸的轉換生產 ATP 的能力，僅能依靠糖解作用獲得能量，而使得葡萄糖消耗速率較快，在此菌株中，乙酸正丁酯在不表現 *fdh* 時可以達到產量最高 1.10 g/L，並且，隨著葡萄糖消耗量的提升，菌株生長量也較 JCL166 顯著增加。至此，我們發現不同於丁醇發酵需表現 *fdh* 平衡 NADH 量，乙酸正丁酯的生產質體不需要 *fdh* 表現，並在 JCL299 菌株中有最高的乙酸正丁酯產量。

#### (五) ATF1 表現量對乙酸正丁酯產出之影響

因有文獻指出 ATF1 在大腸桿菌中會形成聚集而失去其水溶性，雖然此聚集具有酵素活性，但仍可能使整體活性大幅下降，因此我們將 ATF1 從 pYA2 中獨立出來至 pMW03，並利用具 IPTG 誘導性

的  $P_{LacO1}$  進行表現，測試表現了 pRW13、pRW22、pMW03 的 JCL299 菌株在不同 IPTG 誘導濃度下產出之乙酸正丁酯產量 (圖五)。由結果可知 ATF1 的表現量在 10  $\mu$ M IPTG 的誘導下能達到最高產量 1.12 g/L，與前述不需 IPTG 誘導之菌株產量接近，在較低或更高的 ATF1 時，乙酸正丁酯產量皆會降低，在極低 (0 或 1  $\mu$ M) 誘導濃度時，因 ATF1 蛋白幾乎不被表現，菌株只能有約 0.2 g/L 的乙酸正丁酯產量，而會產出約 1.7 g/L 的丁醇；在高 (100 或 1000  $\mu$ M) 誘導濃度時，ATF1 能被有效表現，但可能因蛋白質聚集，溶解度下降，而使得整體活性降低，造成較低的乙酸正丁酯產出。

#### (六) 以發酵槽進行乙酸正丁酯放大生產

利用大腸桿菌進行乙酸正丁酯之高濃度生產會受到其對菌株之細胞毒性限制，另外乙酸正丁酯較低的溶解度與高揮發性，使得在培養液中累積高濃度乙酸正丁酯較為困難，因此，在利用發酵槽放大生產的過程中，我們利用 0.5 vvm 的氮氣通入發酵槽創造厭氧環境，並移除氣相中的乙酸正丁酯，並於尾氣後接上一道常溫水與兩道冰浴水進行氣相中乙酸正丁酯的捕捉。生產過程首先利用 10 毫升轉殖了 pRW13 和 pYA2 的 JCL299 菌液接種 1L 培養液並利用空氣與攪拌控制溶氧高於 20% 供菌體生長，在  $OD_{600}$  約 8 時改以

0.5 vvm 氮氣通入，創造厭氧環境誘導生產乙酸正丁酯脂蛋白表現生產乙酸正丁酯，在整個生產過程中，我們利用 2 M 氫氧化鈉溶液與 40% 葡萄糖溶液控制 pH 值落在  $6.8 \pm 0.05$  和葡萄糖濃度高於 1%。經過四天發酵，effective titer 最高達到 23.46 g/L (圖六)。由乙酸正丁酯在培養槽與捕捉槽中的濃度比例可發現，第一道冰浴水對乙酸正丁酯的捕捉效果最好，作為副產物的醇類則多數出現在常溫水槽中，發酵副產物常是干擾後期純化的因素之一，我們可以此方法提升乙酸正丁酯相對於副產物的比例，供後續處理使用。另外，由最後一道冰水捕捉槽中於發酵前 48 小時乙酸正丁酯的低濃度可發現，冰水浴處理尾氣對乙酸正丁酯的捕捉效果良好，能重新捕捉多數產出的乙酸正丁酯，僅在 48 小時後，因第一道冰水捕捉槽濃度接近乙酸正丁酯的最高溶解度，最後一道冰水槽的乙酸正丁酯濃度才顯著上升。

## 二、以藍綠菌利用光合作用轉換二氧化碳為乙酸正丁酯

### (一) 乙酸正丁酯的揮發性測試

由於乙酸正丁酯為具有揮發性之化合物，藍綠菌株進行生產乙酸正丁酯過程中，可能因其揮發性過高導致留在培養液中之濃度過低而無法正確量測，我們先利用培養藍綠菌之玻璃瓶做為測試，分別

加入 2 g/L、0.2 g/L 及 0.02 g/L 之乙酸正丁酯，每天抽取少量樣品並由氣相層析儀進行濃度量測 (圖七)，可觀察出 2 g/L 的乙酸正丁酯在經過五天後只剩下約三分之一的濃度，顯現其揮發性高而不易在藍綠菌生產中累積在培養液，然而此揮發性有助於之後乙酸正丁酯的收集，而 0.2 g/L 及 0.02 g/L 的乙酸正丁酯也同樣在五天後部分揮發，但都至少含有 10 mg/L 的乙酸正丁酯，之後藍綠菌如有生產乙酸正丁酯至毫克等級時不至於全部產物都揮發而量測不到。

## *(二) 乙酸正丁酯對藍綠菌之毒性測試*

利用微生物生產化合物時，都需先了解其對微生物生長影響，我們分析 50 mg/L 及 500 mg/L 乙酸正丁酯對藍綠菌珠生長之影響 (圖八)，和對照組相比，添加此兩種濃度之藍綠菌株生長情形無明顯差別，且透過乙酸正丁酯的揮發性測試結果與在大腸桿菌發酵實驗中通氣移除乙酸正丁酯的成果可知，藍綠菌生產的乙酸正丁酯可經由氣體有效移除，應不會累積過量的乙酸正丁酯抑制藍綠菌生長。

## *(三) 生產乙酸正丁酯之藍綠菌珠建構及乙酸正丁酯生產測試*

如同大腸桿菌乙酸正丁酯生產菌珠，我們於藍綠菌株中也同樣建構丁醇生產途徑和表現 ATF1 基因。首先建構一個含有 ATF1 之

質體 pML55 (圖九)，此 ATF1 基因和我們表現在大腸桿菌之基因同樣來自酵母菌，由  $P_{LacO1}$  啟動子驅動的 ATF1 可藉由添加誘導劑 IPTG 在菌體內表現，另外，此質體帶有藍綠菌株 *aldh* 基因的前半及後半基因片段，讓帶有 ATF1 的操縱子 (operon) 可藉由同源重組方式嵌入至藍綠菌株的基因體上，而丁醇生產途徑之藍綠菌株 (BUOH-SE) 已於先前由本實驗室成功建立出 [18]。接著，將 pML55 質體轉殖進丁醇生產菌株 BUOH-SE，由於藍綠菌在暗環境下可天然獲得外來質體，我們將 pML55 和 BUOH-SE 混合放置黑暗中，於隔天利用家有合適抗生素的菌盤篩選出成功轉殖之菌珠，最終獲得同時擁有丁醇生產途徑和表現 ATF 基因之藍綠菌珠 ML60。

我們首先將藍綠菌珠 ML60 培養於添加碳酸氫鈉作為碳源的 BG11 培養液，當菌珠在有燈源的震盪培養箱中生長至  $OD_{730}$  為 0.4-0.6 時，加入誘導劑 IPTG 使藍綠菌開始表現丁醇生產途徑及 ATF1 基因，並每天抽取樣品和利用氣相層析儀分析乙酸正丁酯之濃度，分析結果顯示此菌株並無生產出乙酸正丁酯 (圖十)，可能原因為 ATF1 基因在藍綠菌中之表現不佳，應利用體外酵素活性測試先確認 ATF1 的表現與否，並設計嘗試使用酵素修飾。

#### (四) 藍綠菌之 ATF1 酵素體外活性測試

為測試 ATF1 在藍綠菌株內是否有活性，我們使用體外酵素活性測試，方法如前段敘述大腸桿菌之測試，結果如圖十一所示，單獨表現 ATF1 和共表現 ATF1 及丁醇生產途徑之菌株 (ML62、ML60)，和未表現 ATF1 (PCC 7942) 相比無明顯差別，顯示 ATF1 酵素並無活性或是極低，而使用表現 ATF1 之大腸桿菌也作為控制組，有測出 ATF1 的活性，確定此次酵素活應測試方式是成功的，

由於酵素活性測試顯示 ATF1 在藍綠菌中表現不如預期，我們根據文獻知悉 ATF1 酵素在頭尾兩端各有一段疏水性的 helix 結構，這在釀酒酵母中可以協助酵素固定在細胞內的脂肪滴 (lipid droplet)，然而這種結構在其它沒有脂肪滴的細菌中卻會導致酵素彼此聚集在一起造成活性降低。因此根據文獻所提供這兩段形成 helix 結構的序列，希望透過將其移除，以達到改善活性的目的。將修改過的酵素利用大腸桿菌表現並做體外活性測試 (圖十二)，發現兩種都沒有活性，顯示此兩段 helix 結構的去除，雖可能使酵素不再固定於脂肪滴，但結構的改變也導致失去活性。

#### (五) 利用大腸桿菌轉換藍綠菌生產之丁醇成乙酸正丁酯

ATF1 酵素在藍綠菌株內無法正常表現，本團隊改利用兩階段

方式將二氧化碳轉換成乙酸正丁酯。首先利用藍綠菌丁醇生產菌株 BUOH-SE 將二氧化碳轉換成丁醇，再由表現 ATF1 基因之大腸桿菌將藍綠菌生產之丁醇轉換成乙酸正丁酯，達成二氧化碳生產乙酸正丁酯之目的。為達成乙酸正丁酯全是由二氧化碳所製成，大腸桿菌之生長是改用琥珀酸而非一般培養液，而琥珀酸的來源是本團隊另一株可生產琥珀酸之藍綠菌株 LAN3，如此合成乙酸正丁酯所需之乙醯輔酶 A 就能由琥珀酸轉換而成。藉由利用藍綠菌生產之丁醇及琥珀酸使乙酸正丁酯都由二氧化碳所轉換而成。

第一階段是生長大腸桿菌於藍綠菌生產琥珀酸之培養液，已有文獻共培養大腸桿菌及藍綠菌，代表大腸桿菌可生長在藍綠菌的 BG11 培養液，由於培養琥珀酸生產藍綠菌株時會添加奇黴素，我們另外將帶有抗奇黴素基因之質體轉殖入 JCL16 + pMW1 菌株成 BA2 菌株。接著，我們使用藍綠菌 LAN3 生產的 3.5 g/L 之琥珀酸培養液生長 BA2，除調整 pH 至 7 外，氮源無法使用藍綠菌所用之硝酸鹽，故額外添加氯化銨至 0.05% 作為其氮源，並同時加入誘導劑 IPTG 讓 BA2 製造 ATF1 酵素一天。

第二階段是將上述之 BA2 菌液和藍綠菌生產丁醇之培養液混和生產乙酸正丁酯，藍綠菌之丁醇培養液是 BUOH-SE 菌株經過

8 天的生產，產出約 150 mg/L 的丁醇，由於 BA2 之菌液濃度及丁醇濃度都會影響到乙酸正丁酯之生產量，我們依照不同體積比例 (3:1、1:1、1:3) 混和 BA2 菌液及丁醇培養液於真空採血管內，採用此容器是為防止乙酸正丁酯揮發太多，並於一天後量測乙酸正丁酯及丁醇含量。結果如圖十三所示，三種比例之混和液都有生產出乙酸正丁酯，其中 1:1 混和可產出最高之 **21 mg/L 的乙酸正丁酯**，另兩種比例可能分別因丁醇濃度或菌液濃度偏低導致乙酸正丁酯含量沒有 1:1 比例混和高。此兩階段方式成功只利用二氧化碳為碳源生產乙酸正丁酯，示範在藍綠菌無法正常表現某些酵素的情況下，可作為一種替代方式轉換二氧化碳為各種化合物。

### 三、探討鈎蟲貪銅菌轉換二氧化碳為乙酸正丁酯之可行性

#### (一) 測試 *ATF1* 在鈎蟲貪銅菌之活性

除了預定的光合自營細菌—藍綠菌，本團隊在計畫中同時開發另外一種化學自營細菌—鈎蟲貪銅菌 (*Ralstonia eutropha* H16) 作為宿主，其可利用二氧化碳與氫氣生長，因此，此菌株經由基因編輯之後可將二氧化碳轉換為丙醇、正丁醇、異丁醇等生質燃料。不同於藍綠菌，鈎蟲貪銅菌不需依賴光能進行生長，只要供予氫氣做為電子來源即可。若日後欲將此技術應用於大規格生產，毋須顧慮

夜間產能降低或是為了維持光照所需的土地及能源成本，是一支相當具有潛力的生產菌株。

ATF1 進行乙酸正丁酯生產主要為將以乙醯輔酶 A 與正丁醇做結合，乙醯輔酶 A 作為生物重要的中央代謝產物，在鈎蟲貪銅菌中會天然產生，而正丁醇則非此菌株之天然產物，需要利用代謝工程引進外源基因才能產出。因 ATF1 在許多菌株中表現會有不可溶，並聚集的情形，且目前尚未有用鈎蟲貪銅菌轉換二氧化碳為酯類的平台，本團隊將先以表現 ATF1，轉換外加正丁醇來生產乙酸正丁酯來確認 ATF1 在鈎蟲貪銅菌中的表現與活性。

借鑒本團隊已在大腸桿菌中成功表現之乙酸正丁酯生產途徑，我們建構之質體 pJYL024 如圖六，利用  $P_{BAD}$  表現來自啤酒酵母之 ATF1，使其可受阿拉伯糖 (arabinose) 濃度調控。在將 pJYL024 轉型進鈎蟲貪銅菌後，將其培養在複合培養液中，當菌體濃度長到  $OD_{600} = 0.4-0.6$  時以阿拉伯糖誘導質體表現 *ATF1* 基因並加入正丁醇於培養液中，接著將整個培養液轉移至密封抽血管當中，確保加入之正丁醇及產出之乙酸正丁酯不會大量揮發。經過 24 小時之培養，我們可得到約 57 mg/L 的乙酸正丁酯產出 (圖十四)，確認了 ATF1 在鈎蟲貪銅菌中能被有效表現並產出乙酸正丁酯。

## (二) 測試鈎蟲貪銅菌轉換藍綠菌生產之丁醇成乙酸正丁酯

首先利用本實驗室生產丁醇隻藍綠菌菌株 BUOH-SE 進行丁醇生產，並在第 10 天時回收含有丁醇之培養上清液，進行酸鹼度及氮源調整。同時另以甲酸(綠能氫)做為碳源及電子來源，在發酵槽中將帶有 ATF1 之鈎蟲貪銅菌培養至 OD 0.5 時進行誘導，將菌體抽出並離心分離。此時再以處理過後的培養上清液回溶鈎蟲貪銅菌菌體，並以採血管作為容器，在微厭氧狀態下使鈎蟲貪銅菌帶有之 ATF1 利用培養液中的丁醇來進行乙酸正丁酯之轉換生產。在將貪銅鈎蟲菌轉換至微厭氧狀態 24 小時後，沒有任何乙酸正丁酯產生。結果如圖十五至圖十七所示，生長情況明顯受到抑制，也幾乎看不到丁醇及甲酸的利用，推測為氮源不夠所致。

## 陸、參考文獻

1. Carroll AL, Desai SH, Atsumi S: **Microbial production of scent and flavor compounds**. *Current opinion in biotechnology* 2016, **37**:8-15.
2. Gangadwala J, Kienle A, Stein E, Mahajani S: **Production of butyl acetate by catalytic distillation: process design studies**. *Industrial & engineering chemistry research* 2004, **43**(1):136-143.
3. Bizzari S, Gubler R: **Chemical economics handbook**. *IHS Chemical, Englewood* 2004:1-29.
4. Jones JH: **The cativa™ process for the manufacture of acetic acid**. *Platinum Metals Review* 2000, **44**(3):94-105.
5. Chang J: **Indicative chemical prices A–Z**. *chemical market reporter, web* <http://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-az/> Updated 2008.
6. **n-Butyl Acetate** [[http://product-finder.basf.com/group/corporate/product-finder/en/brand/N\\_BUTYL\\_ACETATE](http://product-finder.basf.com/group/corporate/product-finder/en/brand/N_BUTYL_ACETATE)]
7. Menendez-Bravo S, Comba S, Gramajo H, Arabolaza A: **Metabolic engineering of microorganisms for the production of structurally diverse esters**. *Applied microbiology and biotechnology* 2017, **101**(8):3043-3053.
8. Janssen HJ, Steinbuchel A: **Production of triacylglycerols in Escherichia coli by deletion of the diacylglycerol kinase gene and heterologous overexpression of atfA from Acinetobacter baylyi ADP1**. *Applied microbiology and biotechnology* 2014, **98**(4):1913-1924.
9. Stoveken T, Kalscheuer R, Malkus U, Reichelt R, Steinbuchel A: **The wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase from Acinetobacter sp. strain ADP1: characterization of a novel type of acyltransferase**. *J Bacteriol* 2005, **187**(4):1369-1376.
10. Verstrepen KJ, Van Laere SD, Vanderhaegen BM, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS, Winderickx J, Thevelein JM, Delvaux FR: **Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters**. *Applied and environmental microbiology* 2003, **69**(9):5228-5237.
11. Rodriguez GM, Tashiro Y, Atsumi S: **Expanding ester biosynthesis in Escherichia coli**. *Nat Chem Biol* 2014, **10**(4):259-265.
12. Tai YS, Xiong M, Zhang K: **Engineered biosynthesis of medium-chain esters in Escherichia coli**. *Metabolic engineering* 2015, **27**:20-28.
13. Menendez-Bravo S, Comba S, Sabatini M, Arabolaza A, Gramajo H: **Expanding the chemical diversity of natural esters by engineering a**

- polyketide-derived pathway into Escherichia coli.** *Metabolic engineering* 2014, **24**:97-106.
14. Onwueme KC, Ferreras JA, Buglino J, Lima CD, Quadri LE: **Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with Mycobacterium tuberculosis PapA5.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(13):4608-4613.
  15. Shen CR, Lan EI, Dekishima Y, Baez A, Cho KM, Liao JC: **Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in Escherichia coli.** *Applied and environmental microbiology* 2011, **77**(9):2905-2915.
  16. Lan EI, Liao JC: **Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide.** *Metabolic engineering* 2011, **13**(4):353-363.
  17. Lan EI, Liao JC: **ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109**(16):6018-6023.
  18. Lan EI, Ro SY, Liao JC: **Oxygen-tolerant coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic n-butanol biosynthesis in cyanobacteria.** *Energy & Environmental Science* 2013, **6**(9):2672-2681.
  19. Wen RC, Shen CR: **Self-regulated 1-butanol production in Escherichia coli based on the endogenous fermentative control.** *Biotechnology for biofuels* 2016, **9**(1):267.
  20. Nielsen DR, Yoon SH, Yuan CJ, Prather KL: **Metabolic engineering of acetoin and meso-2, 3-butanediol biosynthesis in E. coli.** *Biotechnol J* 2010, **5**(3):274-284.
  21. Li SB, Xu N, Liu LM, Chen J: **Engineering of carbonylase activity reaction in Candida glabrata for acetoin production.** *Metabolic engineering* 2014, **22**:32-39.
  22. Zhang X, Zhang R, Bao T, Rao Z, Yang T, Xu M, Xu Z, Li H, Yang S: **The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in Bacillus subtilis.** *Metabolic engineering* 2014, **23**:34-41.
  23. Zhang L, Zhang Y, Liu Q, Meng L, Hu M, Lv M, Li K, Gao C, Xu P, Ma C: **Production of diacetyl by metabolically engineered Enterobacter cloacae.** *Scientific reports* 2015, **5**:9033.
  24. Goh EB, Baidoo EEK, Burd H, Lee TS, Keasling JD, Beller HR: **Substantial**

- improvements in methyl ketone production in E. coli and insights on the pathway from in vitro studies.** *Metabolic engineering* 2014, **26**:67-76.
25. Rodriguez GM, Atsumi S: **Isobutyraldehyde production from Escherichia coli by removing aldehyde reductase activity.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:90.
  26. Kunjapur AM, Tarasova Y, Prather KL: **Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of Escherichia coli.** *Journal of the American Chemical Society* 2014, **136**(33):11644-11654.
  27. Craig T, Daugulis AJ: **Polymer characterization and optimization of conditions for the enhanced bioproduction of benzaldehyde by Pichia pastoris in a two-phase partitioning bioreactor.** *Biotechnol Bioeng* 2013, **110**(4):1098-1105.
  28. Buchhaupt M, Guder JC, Etschmann MM, Schrader J: **Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase.** *Applied microbiology and biotechnology* 2012, **93**(1):159-168.
  29. Tashiro Y, Desai SH, Atsumi S: **Two-dimensional isobutyl acetate production pathways to improve carbon yield.** *Nature communications* 2015, **6**:7488.
  30. Kim EM, Eom JH, Um Y, Kim Y, Woo HM: **Microbial Synthesis of Myrcene by Metabolically Engineered Escherichia coli.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2015, **63**(18):4606-4612.
  31. Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth TS, Adams PD, Keasling JD, Petzold CJ, Lee TS: **Metabolic engineering of Escherichia coli for limonene and perillyl alcohol production.** *Metabolic engineering* 2013, **19**:33-41.
  32. Willrodt C, David C, Cornelissen S, Buhler B, Julsing MK, Schmid A: **Engineering the productivity of recombinant Escherichia coli for limonene formation from glycerol in minimal media.** *Biotechnol J* 2014, **9**(8):1000-1012.
  33. Mi J, Becher D, Lubuta P, Dany S, Tusch K, Schewe H, Buchhaupt M, Schrader J: **De novo production of the monoterpenoid geranic acid by metabolically engineered Pseudomonas putida.** *Microb Cell Fact* 2014, **13**:170.
  34. Vargas-Tah A, Martinez LM, Hernandez-Chavez G, Rocha M, Martinez A, Bolivar F, Gosset G: **Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered Escherichia coli.** *Microb Cell Fact* 2015, **14**:6.

35. Atsumi S, Higashide W, Liao JC: **Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde.** *Nature biotechnology* 2009, **27**(12):1177-1180.
36. Halfmann C, Gu L, Zhou R: **Engineering cyanobacteria for the production of a cyclic hydrocarbon fuel from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O.** *Green Chemistry* 2014, **16**(6):3175-3185.
37. Davies FK, Work VH, Beliaev AS, Posewitz MC: **Engineering limonene and bisabolene production in type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002.** *Front Bioeng Biotechnol* 2014, **2**:1-11.
38. Kiyota H, Okuda Y, Ito M, Hirai MY, Ikeuchi M: **Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO<sub>2</sub>.** *Journal of biotechnology* 2014, **185**:1-7.
39. Wang X, Liu W, Xin C, Zheng Y, Cheng Y, Sun S, Li R, Zhu X-G, Dai SY, Rentzepis PM: **Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016, **113**(50):14225-14230.
40. Formighieri C, Melis A: **Regulation of  $\beta$ -phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in *Synechocystis* transformants.** *Planta* 2014, **240**(2):309-324.
41. Halfmann C, Gu L, Gibbons W, Zhou R: **Genetically engineering cyanobacteria to convert CO<sub>2</sub>, water, and light into the long-chain hydrocarbon farnesene.** *Applied microbiology and biotechnology* 2014, **98**(23):9869-9877.
42. Englund E, Pattanaik B, Ubhayasekera SJK, Stensjö K, Bergquist J, Lindberg P: **Production of squalene in *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *PloS one* 2014, **9**(3):e90270.
43. Xue Y, Zhang Y, Grace S, He Q: **Functional expression of an Arabidopsis p450 enzyme, p-coumarate-3-hydroxylase, in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 for the biosynthesis of caffeic acid.** *Journal of applied phycology* 2014, **26**(1):219-226.
44. Xue Y, Zhang Y, Cheng D, Daddy S, He Q: **Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite p-coumaric acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, **111**(26):9449-9454.
45. Guo DY, Zhu J, Deng ZX, Liu TG: **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of fatty acid short-chain esters through combination of the fatty acid and 2-keto acid pathways.** *Metabolic engineering* 2014,

22:69-75.

46. Elbahloul Y, Steinbuchel A: **Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered Escherichia coli strain harboring the p(Microdiesel) plasmid.** *Applied and environmental microbiology* 2010, **76**(13):4560-4565.
47. Yu KO, Jung J, Kim SW, Park CH, Han SO: **Synthesis of FAEEs from glycerol in engineered Saccharomyces cerevisiae using endogenously produced ethanol by heterologous expression of an unspecific bacterial acyltransferase.** *Biotechnol Bioeng* 2012, **109**(1):110-115.
48. Menendez-Bravo S, Roulet J, Sabatini M, Comba S, Dunn R, Gramajo H, Arabolaza A: **High cell density production of multimethyl-branched long-chain esters in Escherichia coli and determination of their physicochemical properties.** *Biotechnology for biofuels* 2016, **9**:215.

## 柒、圖表

表一、利用異營微生物生產芳香化合物[1] 菌株名稱縮寫: *E. coli* : *Escherichia coli* ; *L. lactis* : *Lactococcus lactis* ; *C. glabrata* : *Candida glabrata* ; *B. subtilis* : *Bacillus subtilis* ; *E. cloacae* : *Enterobacter cloacae* ; *P. pastoris* : *Pichia pastoris* ; *S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae* ; *P. putida* : *Pseudomonas putida*

Type	Target chemical	Flavor	Host	substrate	Titer (g/L)	Ref.
Ketone	Acetoin	butter	<i>E. coli</i> ; <i>L. lactis</i>	glucose	0.87	[20]
				glucose	7.3	[21]
				glucose	57	[22]
	Diacetyl	butter	<i>E. cloacae</i>	glucose	1.5	[23]
Methyl ketones	oils	<i>E. coli</i>	glucose	3.4	[24]	
Aldehyde and alcohol	Isobutyraldehyde	malt-like	<i>E. coli</i>	glucose	35	[25]
	Vanillin	vanilla	<i>E. coli</i>	glucose	0.119	[26]
	Benzaldehyde	cherry; almond- like	<i>E. coli</i>	glucose	0.35	[26]
				benzyl alcohol	5	[27]
	Hexenal	grass	<i>S. cerevisiae</i>	linolenic acid	0.06	[28]
Ester	Isobutyl acetate	raspberries;	<i>E. coli</i>	glucose	36	[23]
		pears;	<i>E. coli</i>	glucose	17.5	[11]
		pineapples	<i>E. coli</i>	glucose	19.7	[29]
Butyl butyrate	pineapples	<i>E. coli</i>	glucose	0.0149	[11]	
Terpenes	Myrcene	pleasant	<i>E. coli</i>	glycerol	0.058	[30]
	Limonene	oranges	<i>E. coli</i>	glucose	0.435	[31]
			<i>E. coli</i>	glycerol	2.7	[32]
	Perillyl alcohol	lavender	<i>E. coli</i>	glucose	0.105	[31]
	Geranic acid	sweet; woody	<i>P. putida</i>	glycerol	0.193	[33]
Phenylpropanoids	Cinnamic acid	cinnamon	<i>E. coli</i>	arabinose	0.151	[34]
	P-hydroxy- cinnamic acid	cinnamon	<i>E. coli</i>	sugar mixture	0.058	[34]

表二、利用藍綠菌轉換二氧化碳生產芳香化合物 菌株名稱縮寫如下:PCC7942, *Synechococcus elongatus* PCC7942; PCC6803, *Synechocystis* sp. PCC 6803; PCC7002, *Synechococcus* sp. PCC 7002; 7102, *Calothrix desertica* PCC 7102.

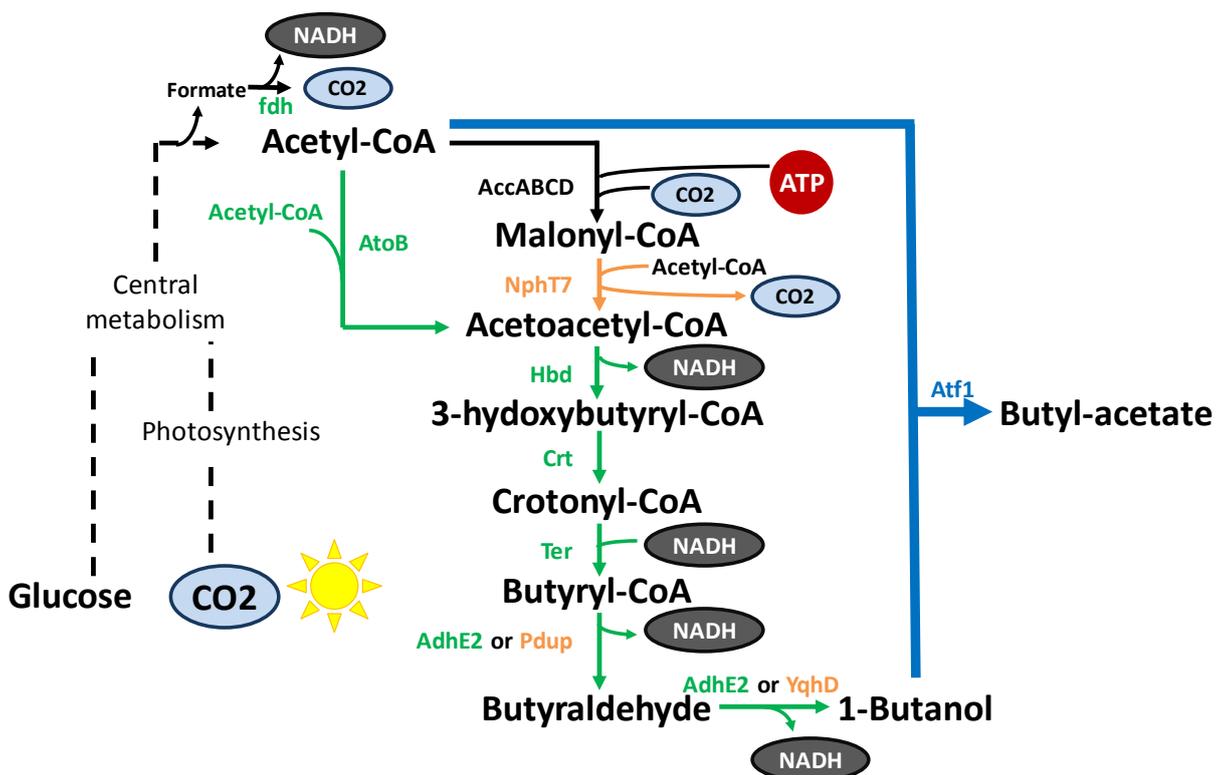
Type	Target Chemical	Host strain	Titer (mg/L)	Culture time (day)	Ref.
Aldehyde	Isobutyraldehyde	PCC7942	1,100	8	[35]
		PCC7120	0.52	12	[36]
Terpenes	Limonene	PCC7002	4	4	[37]
		PCC6803	1	30	[38]
		PCC7942	885.1 $\mu\text{g/L/OD/d}$		[39]
	Bisabolene	PCC6803	0.6	4	[37]
	$\beta$ -Phellandrene	PCC6803	0.9	2	[40]
	Farnesene	PCC7120	0.3	15	[41]
	Squalene	PCC6803	0.5 mg/L/OD		[42]
Phenylpropanoids	Caffeic acid	PCC6803	7.2	3	[43]
	<i>p</i> -Coumaric acid	PCC6803	82.6	4	[44]

表三、進行酯化反應的酵素及其產物 三類酵素分別為：(1) AtfA, Wax synthase/diacylglycerol acyltransferase family; (2) Atf1, Alcohol acetyltransferase family; (3) PapA5, Condensation family ; 菌株縮寫: *E. coli* : *Escherichia coli* ; *S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

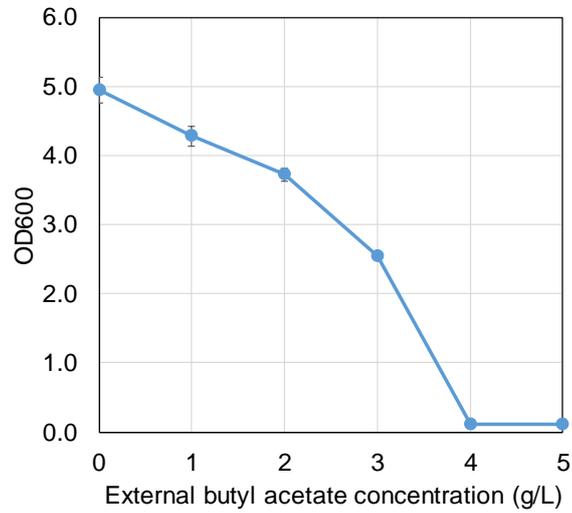
Condensing Enzyme	Host	Product	Maximum Titer (g/L)	Ref
AtfA	<i>E. coli</i>	fatty acid short ester	1	[45]
		fatty acid ethyl ester	14.8	[46]
	<i>S. cerevisiae</i>	fatty acid ethyl ester	0.52	[47]
ATF1	<i>E. coli</i>	ethyl acetate	0.33	[11]
		butyl acetate	1.7	[11]
		propyl acetate	0.02	[11]
		3-/2-methyl-butyl acetate	0.04	[11]
		2-phenylethyl acetate	0.02	[11]
		tetradecyl acetate	0.14	[11]
		isobutyl acetate	17.2	[11]
			19.7	[29]
	36	[12]		
PapA5	<i>E. coli</i>	multi-methyl-branched ester	0.79	[48]

表四、使用之大腸桿菌菌株與乙酸正丁酯生產質體

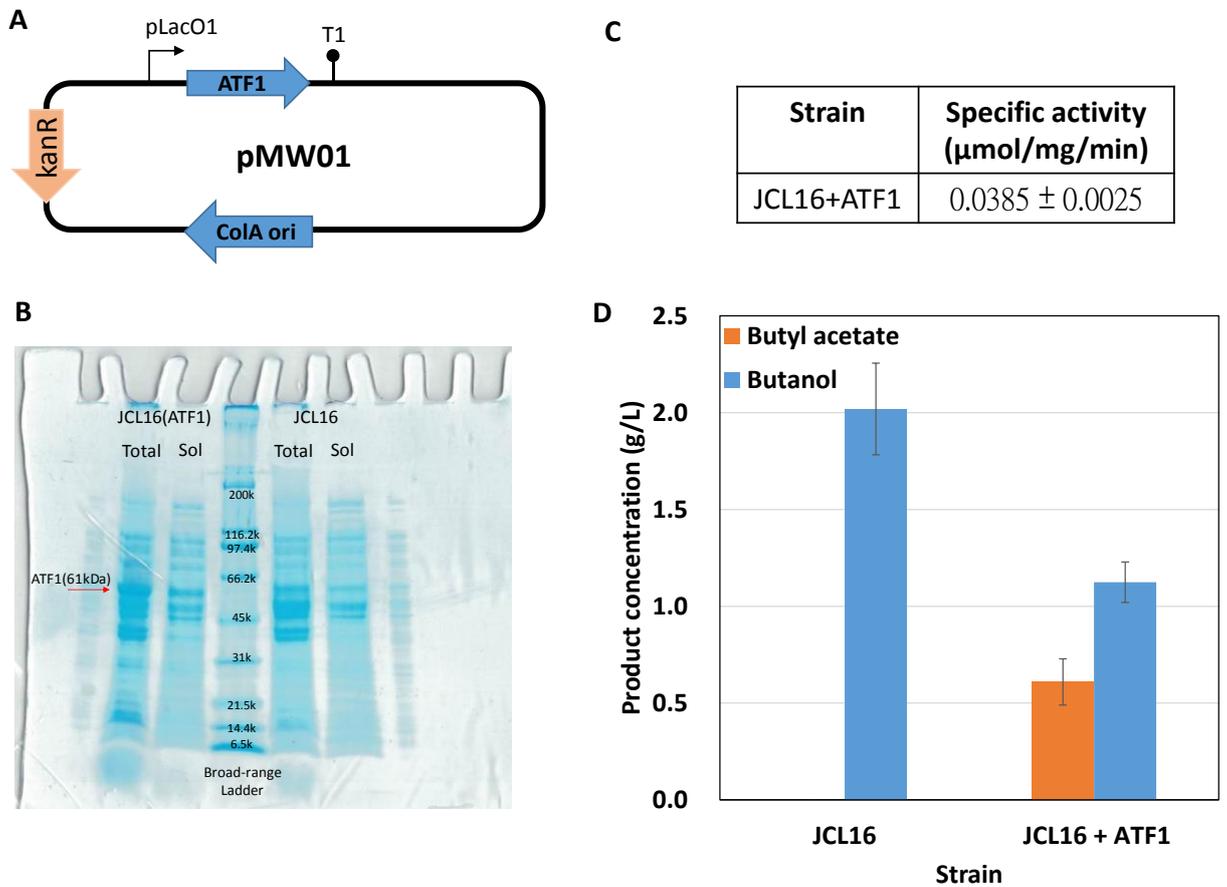
Strain	Relevant Genotype	Ref.
BW25113	Wild-type <i>Escherichia coli</i> BW25113	
JCL16	BW25113/F' [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacIqZΔM15</i> (Tet <sup>r</sup> )]	[15]
JCL166	JCL16 $\Delta adhE \Delta dhA \Delta frdBC$	[15]
JCL299	JCL16 $\Delta adhE \Delta dhA \Delta frdBC \Delta pta$	[15]
PCC 7942	Wild-type <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	
BUOH-SE	P <sub>Trc</sub> ::His-tagged <i>ter</i> integrated at NSI and P <sub>LacO1</sub> :: <i>nphT7</i> , pduP_ <i>S. enterica</i> , <i>yqhD</i> , <i>crt</i> , <i>hbd</i> integrated at NSII	[18]
Plasmid	Relevant Genotype	Ref.
pMW01	P <sub>LacO1</sub> :: <i>ATF1</i> ; Cola ori; Kan <sup>r</sup>	This w
pMW03	P <sub>LacO1</sub> :: <i>ATF1</i> ; pSC101 ori; Spec <sup>r</sup>	This w
pRW13	P <sub>ack</sub> :: <i>atoB</i> , <i>adhE2</i> , <i>crt</i> , <i>hbd</i> ; ColE1 ori; Amp <sup>r</sup>	[15]
pRW18	P <sub>adhE</sub> :: <i>fdh</i> ; pSC101 ori; Cm <sup>r</sup>	[15]
pRW22	P <sub>adhE</sub> :: <i>ter</i> ; Cola ori; Kan <sup>r</sup>	[15]
pYA2	P <sub>adhE</sub> :: <i>ter</i> , <i>ATF1</i> ; Cola ori; Kan <sup>r</sup>	This w
pYA4	P <sub>adhE</sub> :: <i>fdh</i> ; pSC101 ori; Spec <sup>r</sup>	This w
pML55	cm <sup>R</sup> ; Aldh targeting; P <sub>LacO1</sub> :: <i>atf1</i> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	This w



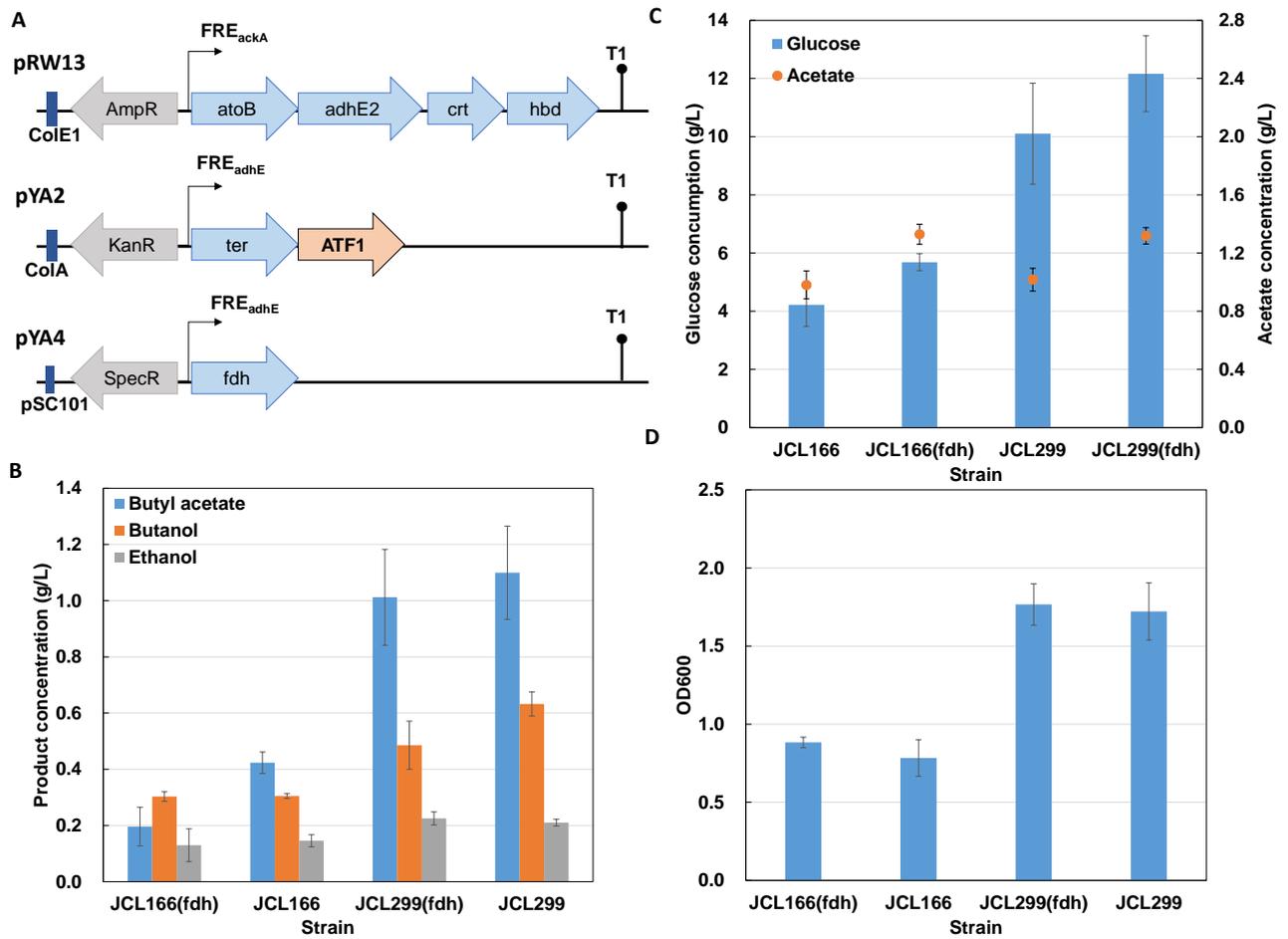
圖一、乙酸正丁酯 (Butyl-Acetate)之代謝途徑 綠色圖示表示大腸桿菌生產乙酸正丁酯使用酯外源基因;橘色圖示表示藍綠菌生產乙酸正丁酯使用酯替代基因;藍色圖示表示合成乙酸正丁酯使用之受質與基因。縮寫: AtoB, acetyl-CoA acetyltransferase; NphT7, acetoacetyl-CoA synthase; Hbd, beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; Crt, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase; Ter, trans-enoyle-CoA reductase; AdhE2, aldehyde/alcohol dehydrogenase; Pdup, aldehyde dehydrogenase; YqhD, alcohol dehydrogenase; Atf1, alcohol acetyltransferase.



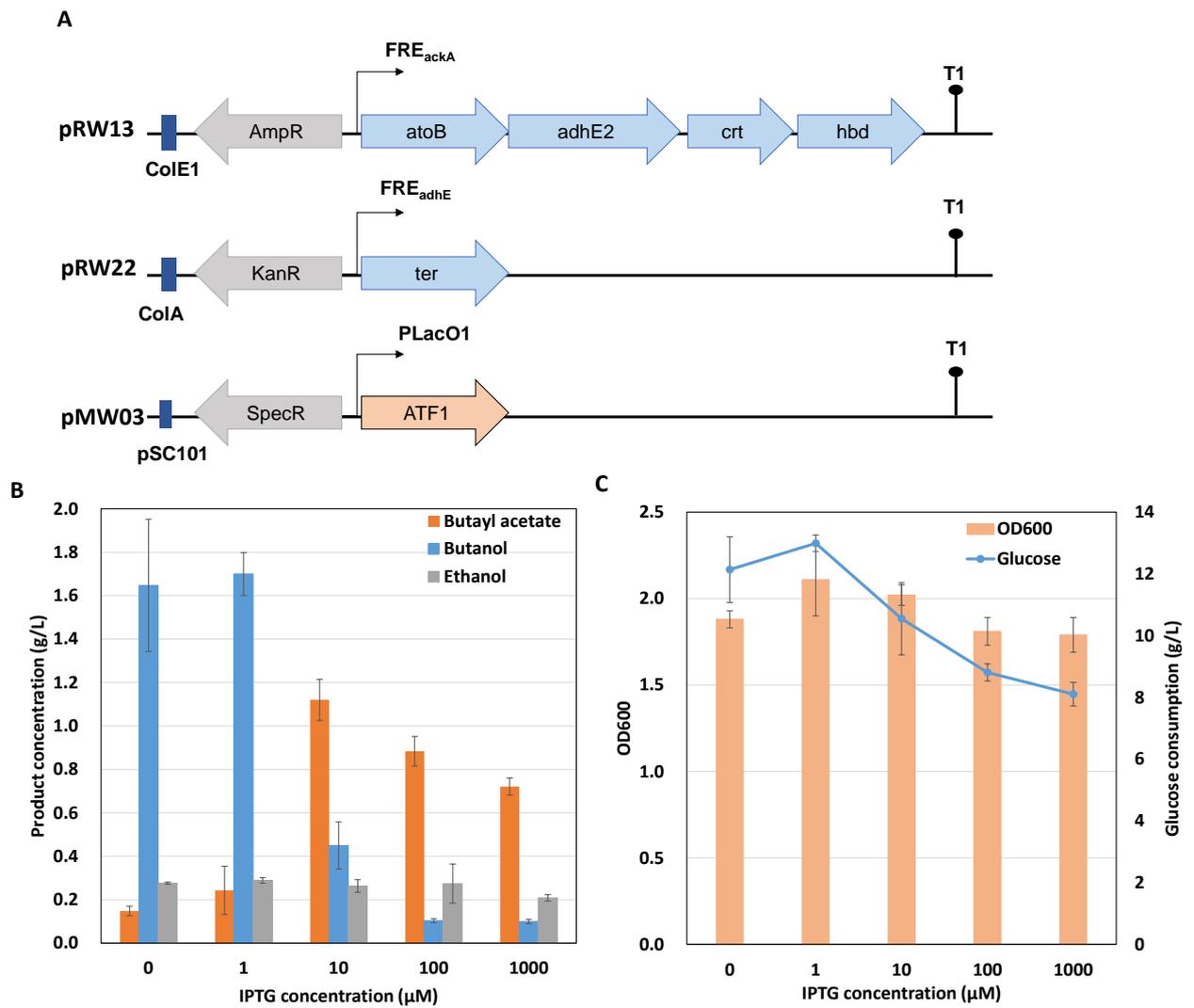
圖二、不同濃度乙酸正丁酯對大腸桿菌 BW25113 菌株生長之影響 以起始  $OD_{600nm}=0.04$  培養大腸桿菌於不同濃度的乙酸正丁酯，並測試其於第五小時之生長情況，以了解乙酸正丁酯對大腸桿菌之毒性。



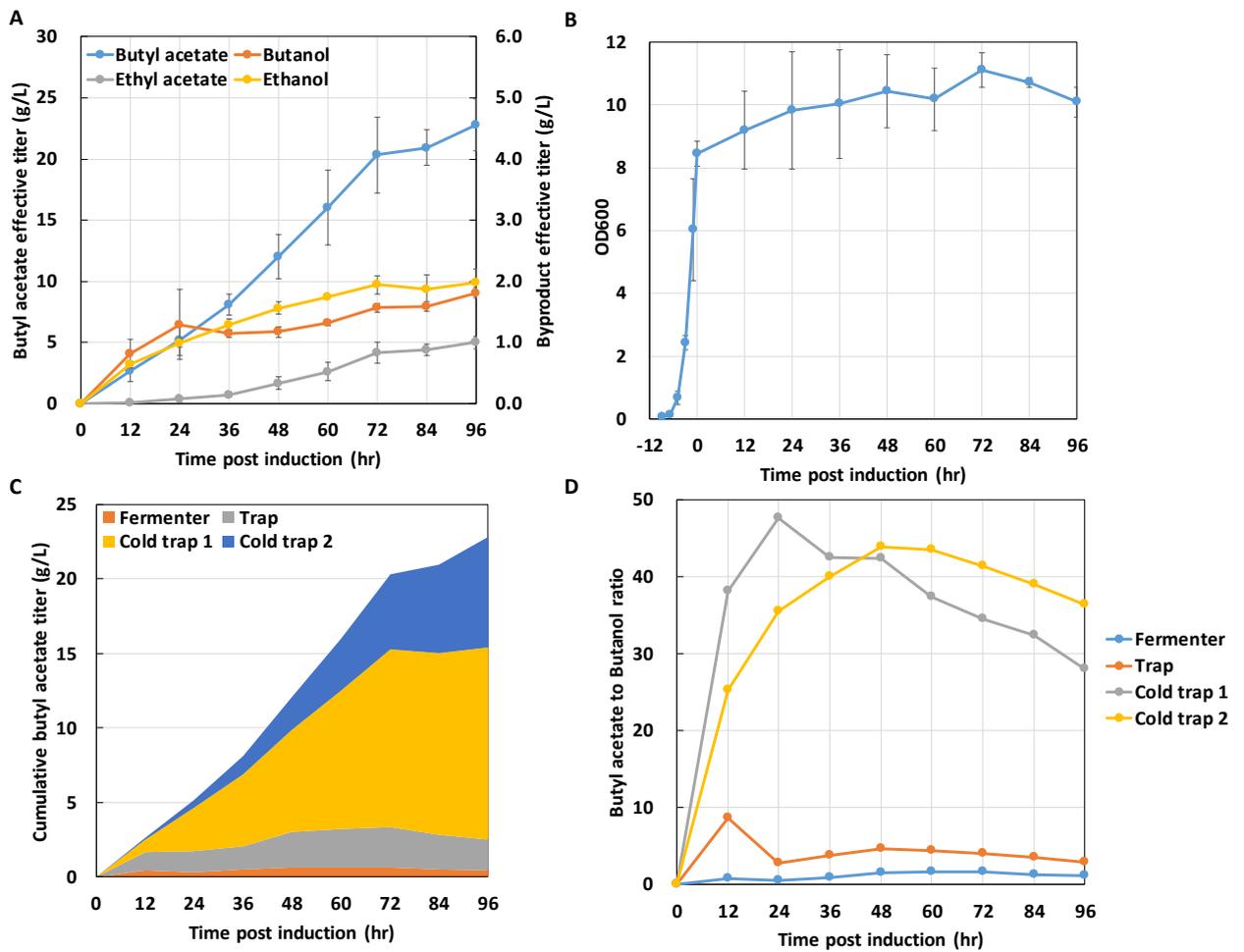
**圖三、體內與體外活性測試大腸桿菌表現 ATF1 生產乙酸正丁酯**  
 (A)pMW01 質體利用  $P_{\text{LacO1}}$  表現 ATF1 於大腸桿菌。(B) SDS-page 確認 ATF 表現，ladder 左側與右側分別為表現與不表現 ATF1 的菌株，ATF1 大小約為 61 kDa。(C)將表現 ATF1 的大腸桿菌破後進行體外活性測試 ATF1 對乙酸正丁酯合成的專一活性。(D)培養大腸桿菌株於添加 0.3% (v/v)丁醇的培養液中 24 小時，並量測其剩餘的丁醇與產出的乙酸正丁酯。



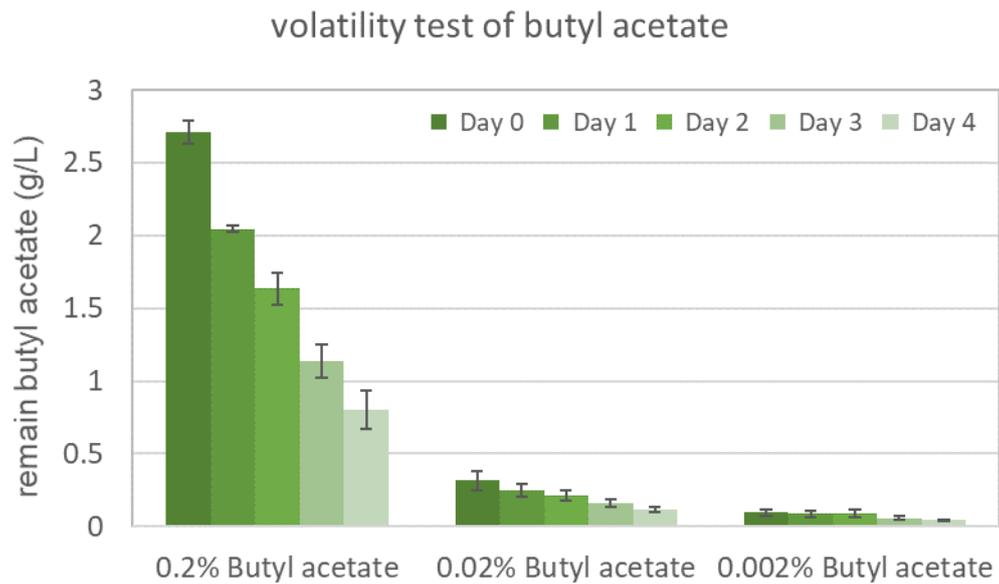
圖四、將 ATF1 與丁醇生產途徑共表現生產乙酸正丁酯 (A)將 ATF1 與丁醇生產途徑基因共同表現的質體示意圖。於 JCL166 與 JCL299 中分別表現乙酸正丁酯生產途徑後 24 小時之(B)乙酸正丁酯、丁醇、乙醇產量、(C)葡萄糖消耗與副產物乙酸產量、(D)菌量。括號中有標示 fdh 代表有表現，未標示則沒有表現 fdh。



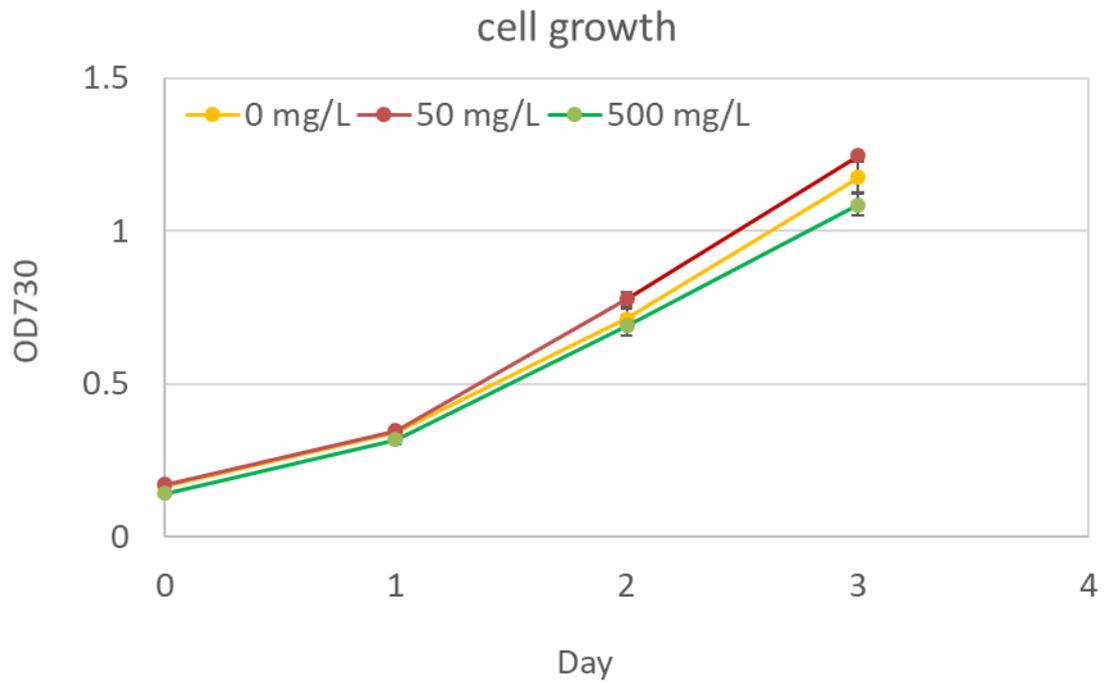
圖五、利用 IPTG 濃度改變 ATF1 表現量對乙酸正丁酯生產之影響 (A)將 ATF1 獨立使用  $P_{LacO1}$  調控並與丁醇生產途徑共表現之質體示意圖。於 JCL299 中表現乙酸正丁酯生產途徑並以不同 IPTG 濃度誘導後 24 小時之(B)乙酸正丁酯、丁醇、乙醇產量、(C)菌量與葡萄糖消耗量。



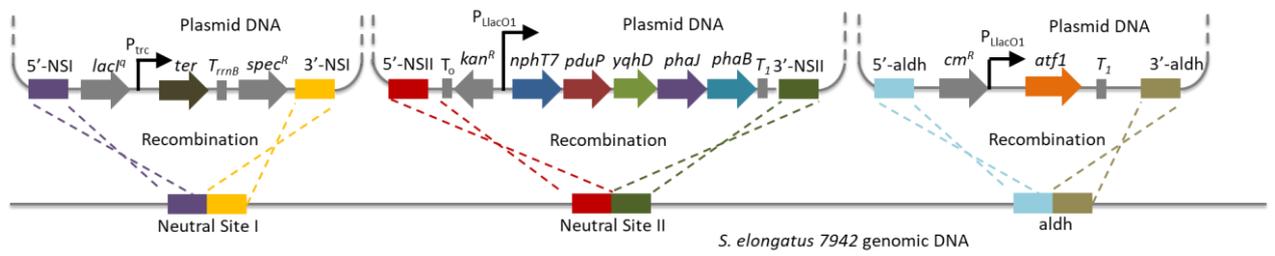
圖六、以發酵槽進行乙酸正丁酯放大生產 (A) 乙酸正丁酯、乙酸乙酯、乙醇與丁醇的 Effective titer (B) 菌體濃度 (C) 發酵槽與各捕捉槽的乙酸正丁酯濃度貢獻 (D) 各槽中乙酸正丁酯對丁醇的比例。



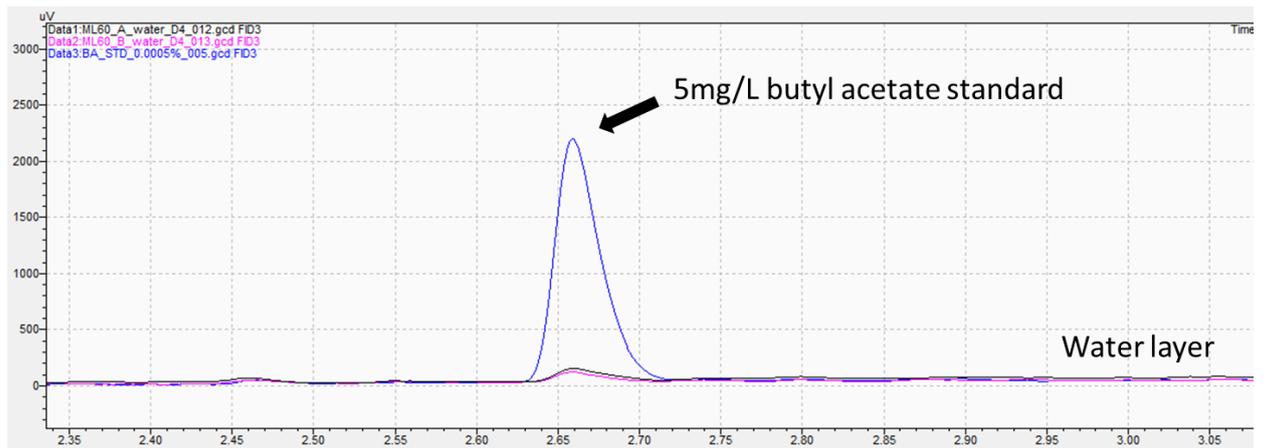
圖七、乙酸正丁酯的揮發性測試 將三種濃度(2 g/L、0.2 g/L、0.02 g/L)之乙酸正丁酯放入培養藍綠菌珠時所用之玻璃瓶內，並放置於 30 度、100rpm 之震盪培養箱，每天抽取少許樣品利用氣象層析儀量測乙酸正丁酯濃度。



圖八、不同濃度乙酸正丁酯對藍綠菌株 PCC7942 生長之影響 將藍綠菌株培養於添加 50 mg/L 及 500 mg/L 乙酸正丁酯之培養液中，並每天測試其生長濃度(OD<sub>730</sub>)，以觀察乙酸正丁酯對藍綠菌珠之生長影響。



圖九、藍綠菌生產乙酸正丁酯所需之質體建立 丁醇生產途徑所需之基因分別表現在由可同源重組至 NSI 及 NSII 之質體，來自 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *atf1* 單獨表現於可同源重組至 *aldh* 之質體。



圖十、藍綠菌珠生產乙酸正丁酯 將已建構好之藍綠菌珠利用震盪培養箱培養，抽取之樣品利用氣相層析儀分析，藍線為 5 mg/L 乙酸正丁酯標準液，黑線及紅線為第四天抽取樣品之二重複。

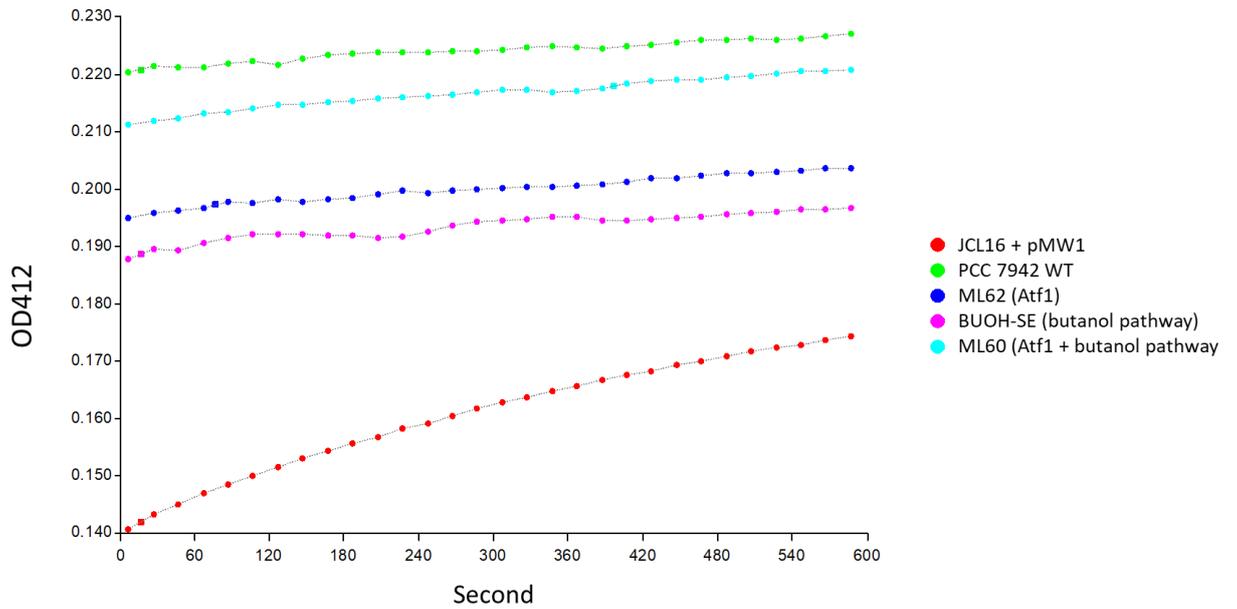
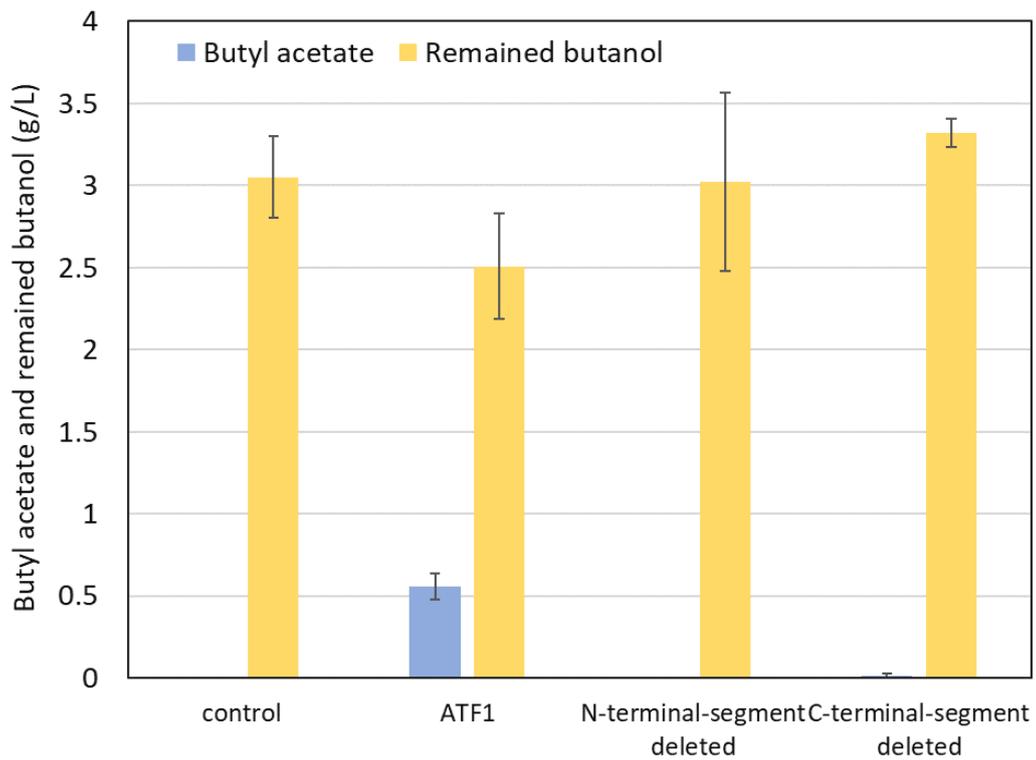
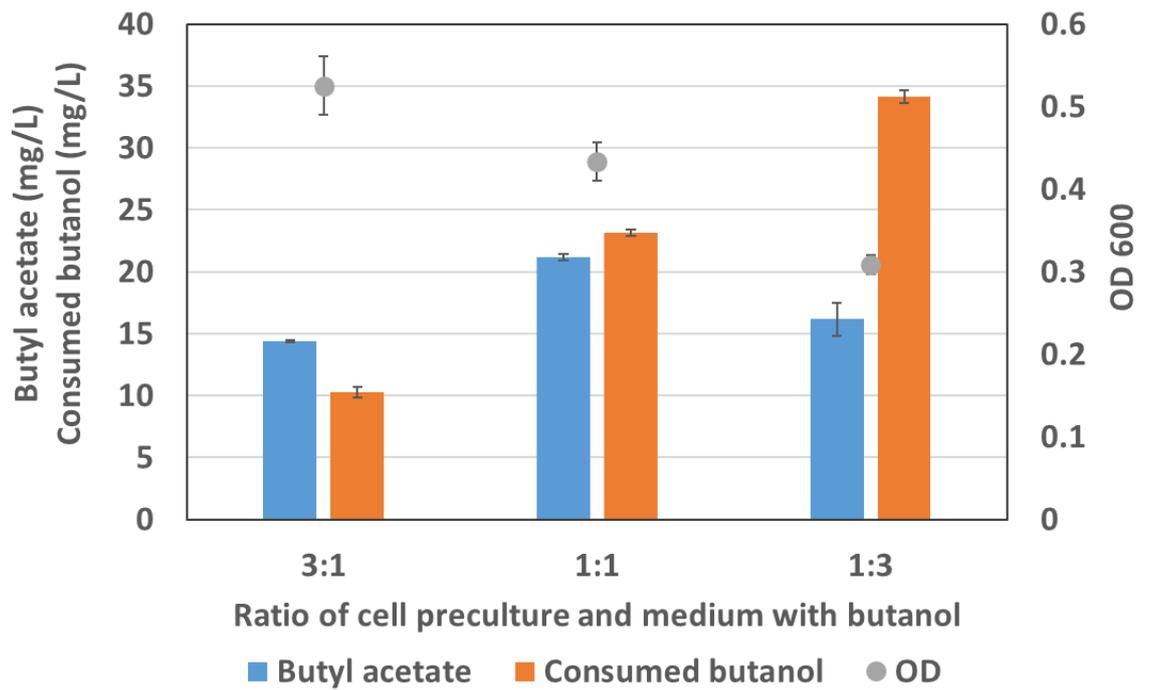


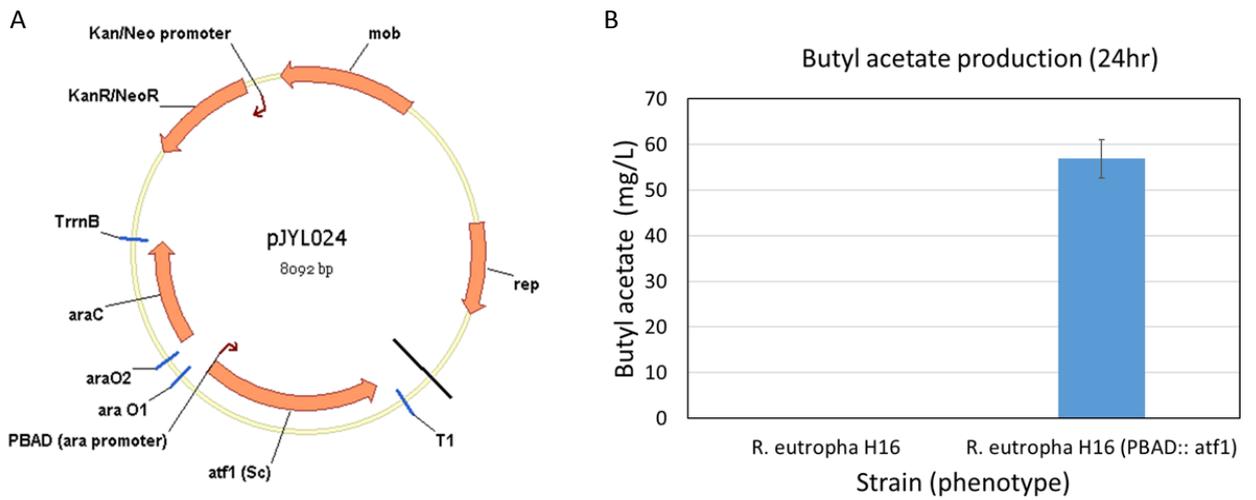
圖 十一、藍綠菌之 ATF1 體外酵素活性測試 利用破菌後之溶液做 ATF1 之酵素活性測試，JCL16 + pMW1 代表表現 ATF1 之大腸桿菌作為活性測試的控制組; PCC 7942 WT 代表 *Synechococcus elongatus* PCC 7942; ML62 代表 PCC 7942 中表現 ATF1; BUOH-SE 代表 PCC 7942 中表現丁醇生產途徑; ML60 代表 PCC 7942 中表現 ATF1 及丁醇生產途徑



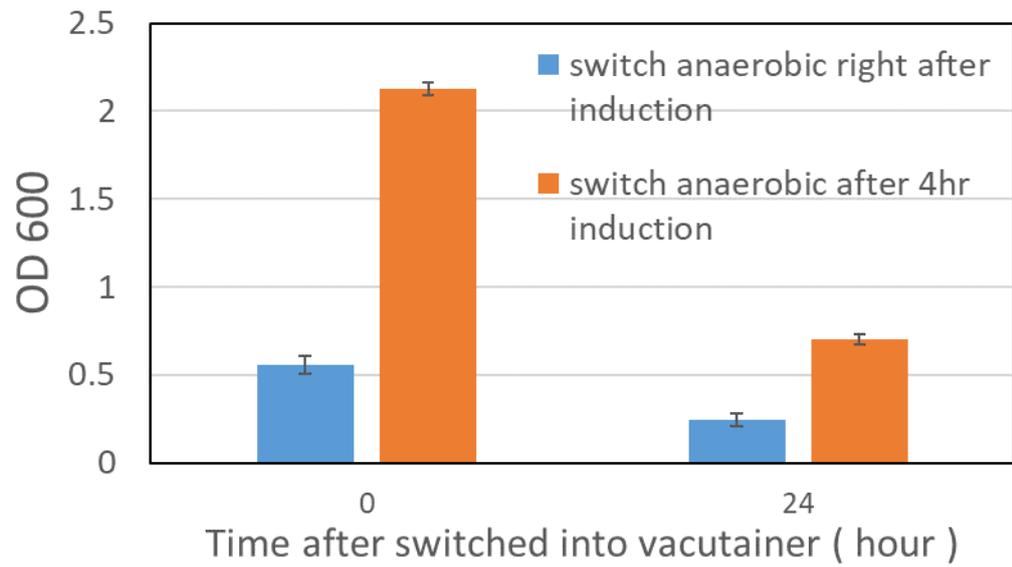
圖十二、測試 ATF1 蛋白結構改變後之活性 利用額外添加丁醇的體內活性  
 測試方式觀察 ATF1 在大腸桿菌內之活性，Control 代表 *E. coli*；ATF1 代表  
 JCL16 + pMW1；N-terminal-segment deleted 代表 ATF1 失去 N 端部分胺基酸；  
 C-terminal-segment deleted 代表 ATF1 失去 C 端部分胺基酸



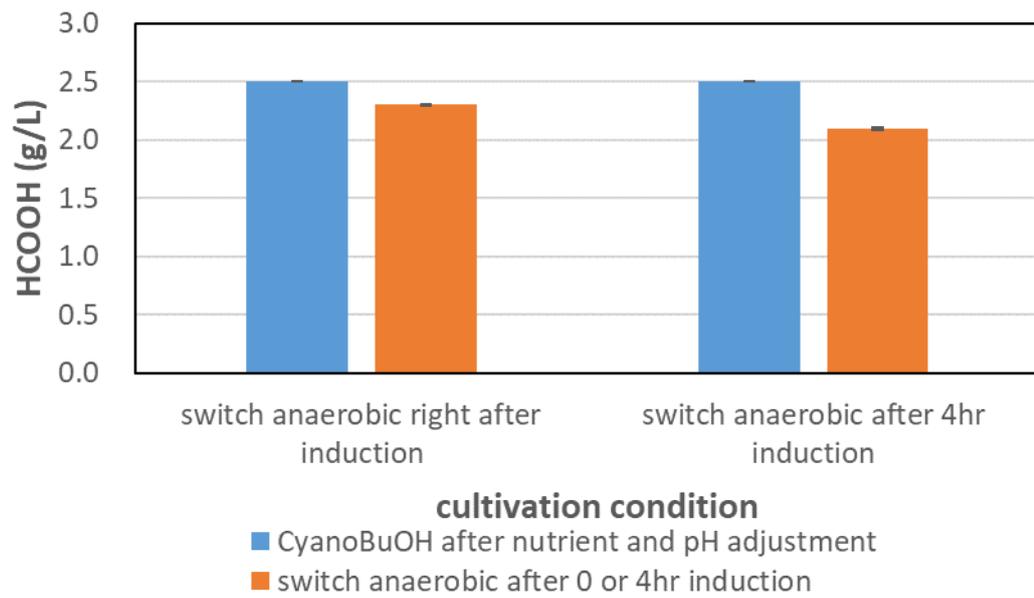
圖十三、兩階段生產乙酸正丁酯 由三種不同體積比例混和利用琥珀酸生長之大腸桿菌 BA2 和藍綠菌生產之丁醇溶液於真空採血管 (微氧狀態)，一天後量測乙酸正丁酯 (藍色)及丁醇並推算其消耗量 (橘色)。



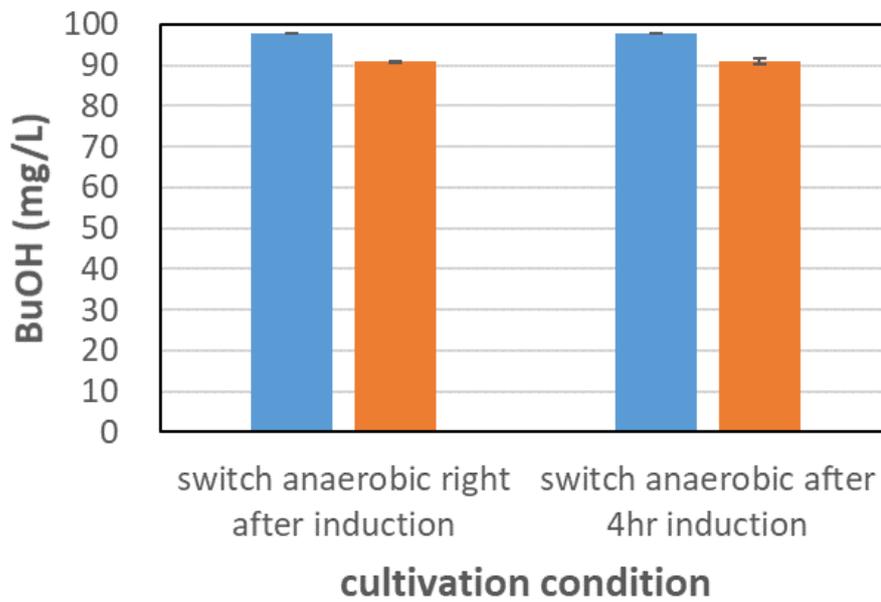
圖十四、測試鈎蟲貪銅菌表現 ATF1 轉換乙酸正丁酯 (A)鈎蟲貪銅菌可使用之 pJYL024 質體是意圖，此質體利用可被阿拉伯糖誘導的 P<sub>BAD</sub>表現 ATF1(B)培養鈎蟲貪銅菌菌株於添加 4 g/L 丁醇的培養液中 24 小時，並量測其產出的乙酸正丁酯。



圖十五、貪銅鈎蟲菌在藍綠菌生產丁醇之培養液中之生長 兩種不同將貪銅鈎蟲菌轉換培養液之時間，加入誘導劑後直接換入藍綠菌生產丁醇之培養液 (藍色) 及加入誘導劑後 4 小時換入藍綠菌生產丁醇之培養液 (橘色)，分別量測其培養一天後之 OD。



圖十六、貪銅鈎蟲菌在藍綠菌生產丁醇之培養液中對甲酸之使用情況 額外添加 2.5 g/L 之甲酸作為貪銅鈎蟲菌之生長碳源及能量來源。



圖十七、貪銅鈎蟲菌在藍綠菌生產丁醇之培養液中對丁醇之使用情況 測量貪銅鈎蟲菌培養一天後消耗藍綠菌生產之丁醇量。