

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

纖維原料水解液高效率發酵菌株之研究  
**Study of fermenting strain for lignocellulosic hydrolysates**

計畫編號：1012001INER052

受委託機關(構)：明志科技大學

計畫主持人：陳錫金 副教授

聯絡電話：02-29089899 ext. 4655

E-mail address：hjchen@mail.mcut.edu.tw

核研所聯絡人員：馬天陽

報告日期：101 年 12 月 5 日

## 目 錄

目 錄 .....	I
中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	2
壹、計畫緣起與目的 .....	3
貳、研究方法與過程.....	7
一、纖維原料水解液共發酵菌株篩選 .....	8
(一)菌種來源篩選 .....	8
(二)菌種純化與分離 .....	8
(三)培養基組成 .....	8
(四)發酵與共發酵實驗 .....	10
(五)HPLC 分析方法.....	10
(六)菌種型態分析 .....	11
(七)pH 生長因子分析 .....	11
(八)微生物生長動力學分析 .....	12
二、共發酵菌株基因改良 .....	12
(一)選殖 NADP <sup>+</sup> 依賴型酵素基因及建構染色體鑲嵌基因表現質體...12	
(二)酵母菌基因轉殖 .....	14
(三)木糖發酵 .....	16
(四)建構染色體鑲嵌 NADP <sup>+</sup> 依賴型 XR 突變株 .....	16
(五) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 20270 營養缺陷型態測試.....	17
(六)馴化試驗 .....	18
(七)抑制物耐受力試驗 .....	19

參、主要發現與結論.....	20
一、纖維原料水解液共發酵菌株篩選 .....	20
(一)菌種篩選 .....	20
(二)革蘭氏染色 .....	21
(三)pH 生長因子分析 .....	23
(四)生長動力學分析 .....	26
(五)發酵和共發酵能力與生長比較 .....	31
(六)發酵與共發酵產物之分析 .....	33
二、共發酵菌株基因改良 .....	41
(一)染色體鑲嵌 NADP <sup>+</sup> 依賴型酵素菌株篩選及木糖發酵測試.....	41
(二)建構染色體鑲嵌 NADP <sup>+</sup> 依賴型 XR 突變株 .....	42
(三) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 20270 營養缺陷型態測試 .....	43
(四)馴化試驗 .....	45
(五)抑制物耐受力試驗 .....	46
三、結論 .....	53
肆、參考文獻 .....	55

## 中文摘要

目前我國生質酒精研究以纖維素酒精為主，其原料主要利用農業廢棄稻稈。稻稈含有大量木質纖維，是由纖維素、半纖維素與木質素組成，其中纖維素可轉化出六碳糖如葡萄糖、半纖維素可轉化出五碳糖如木糖，皆為可發酵轉化成酒精之糖類。

然而大部分微生物是利用葡萄糖當主要碳源，發酵過程中大部分的木糖無法有效利用，造成發酵產率低及材料浪費的情形。因此本計畫為開發纖維原料水解液高效率發酵菌株之研究，分兩階段執行：第一階段希冀找出本土五碳糖轉化菌，以木質纖維素水解後之五碳糖中，佔最大量的木糖作為單一碳源進行篩選。本研究菌源採自宜蘭三星鄉蔥田土，為覆蓋稻草且腐化中的腐土，蘊含大量纖維素之土壤。目前本研究已篩選出四株在 35°C、150rpm 條件下，能以木糖(20 g/L)做為單一碳源之轉化菌，並針對三種 pH3、7 和 9 生長情形、革蘭氏染色與五、六碳糖發酵與共發酵之能力進行探討。最後，菌株 IL03 能在共發酵環境下，具有良好轉化木糖及葡萄糖能力，最大比生長速率  $\mu_{\max}=0.339$  (1/hr)，半飽和常數  $K_s=12.510$ (g/L)。第二階段為改良現有共發酵菌株木糖代謝及轉化酒精能力之研究。本階段研究以分子生物技術置入外源 NADP<sup>+</sup> 依賴型酵素基因 *GDP1*，以改良共發酵菌株胞內氧化還原不平衡問題；並利用單一木糖碳源馴化方式連續繼代培養 40 代，提升基因重組菌株之重組基因穩定性；同時針對纖維水解液中主要抑制物進行分析基因重組菌株之抑制物耐受能力。本研究最終成功建構色體鑲嵌 NADP<sup>+</sup> 依賴型酵素基因菌株，並篩選出三株高木糖代謝效率菌株，酒精產率最高可達 0.36 g/g。此外，在共發酵菌株馴化試驗結果顯示，馴化 40 代菌株之重組基因穩定性有顯著提升。

## **Abstract**

There are considerable studies in recent years in the bioconversion of agricultural residues into ethanol in Taiwan. High ethanol yields from lignocellulosic residues are dependent on efficient use of all the available sugars including glucose and xylose. The *Saccharomyces cerevisiae* is well-known fermentative yeast for ethanol production, but unfortunately, this yeast is unable to ferment xylose.

Therefore, in this study we hoping to find the local pentose transformed bacteria, use the xylose as carbon source which accounted for the greatest amount of lignocellulosic hydrolysis product. The bacteria source is from the Sunshin onion land of Sunshin Township in I-lan , which is cover the great amount of straw. The most of straw had corrupted; therefore, the soil supposed contains a lot of cellulose.

In this study we had been isolated four strain microorganisms which have the ability of xylose fermentation without other carbon sources. The strain IL03 has great bioconversion ability of xylose even base on glucose-xylose co-fermentation. The maximum of growth rate for strain IL03 is 0.339(1/hr), half-velocity constant  $K_s=12.510(\text{g/L})$ . In addition, a new recombinant co-fermenting strain was constructed by molecular biological technique. The recombinant strain was able to express glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, which help redox balance in the xylose metabolic pathway of recombinant co-fermenting strain. The higher ethanol yield was observed and estimated to be 0.36 g/g. The recombinant co-fermenting strain was also adapted by YPX (1% yeast extract, 2% peptone, 4% xylose ) for 40 generation. The adapted strain was observed with higher genetic stability.

## 壹、計畫緣起與目的

隨著工業革命及社會經濟的發展，人類在使用石化燃料(如煤炭、天然氣與石油)時，把大量二氧化碳排放到大氣中，使大氣中二氧化碳濃度增加，導致氣溫上升，進而造成全球暖化現象(國家科學委員會自然處大氣科學審議小組，2007)。除了全球暖化之外，大量使用有限的化石燃料亦導致能源危機，面對這些問題，各國政府無不積極開發永續且潔淨的新替代能源。目前，我國未來能源發展的重要法案「再生能源發展條例」(法務部，2009)，已於2009年6月12日由立法院三讀通過，為台灣再生能源奠定了長遠發展的根基，提高自產能源、能源多元化及對溫室氣體減量成效，此外亦可帶動國內新興再生能源產業之發展。

在眾多發展中的再生能源當中，生質能源是重要的選項，其中生質酒精是最容易直接利用之生質能源，因其具有多項特點，如(1)酒精發酵生產是自古以來最為成熟之技術；(2)可立即添加於石化汽油，且可充分混合使用於目前的內燃機系統；(3)具有碳循環平衡之特點，所以生質酒精一直是世界各國極為重視的再生能源之一(Dale, 2008)。

目前我國生質酒精研究方向以纖維酒精為主，利用農業廢棄稻稈為主要原料。稻稈中含有大量木質纖維是由纖維素、半纖維素與木質素所組成，其中纖維素可轉化出六碳糖如葡萄糖、半纖維素可轉化出五碳糖如木糖，皆為可發酵轉化酒精之糖類。根據核研所2008年資料顯示(行政院原能會，2008)，國內五碳糖發酵的酒精產率可達77%，六碳糖發酵的酒精產率達到95%，所得酒精純度達99.5%以上。

目前最常使用之酒精發酵菌株為 *Saccharomyces cerevisiae*，因其具有高酒精產率與對環境抑制物有高耐受能力，在工業上已廣泛應用，但因其缺乏木糖代謝能力，使得目前纖維酒精製程程序，五碳糖發酵與六碳糖發酵單元利用不同發酵菌株分開進行，因此增加程序設備，因此提高設備成本。

文獻也常以 *Pichia stipites* 作為木糖發酵菌株，因其具有較高之木糖轉化酒精能力，但 *Pichia sp.* 對於酒精濃度與環境抑制物之耐受能力較低，因此在工業應用上有所限制。在纖維原料經由前處理過程，會隨著反應條件的不同而產生若干濃度之醋酸(acetic acid)、糠醛(Furfural)與羥甲基糠醛(Hydroxymethyl furfural)等發酵抑制物，因此現階段前處理所得之木糖水解液通常會經過過鹼化法(Overliming)移除糠醛。但過鹼化法調理過程中，通常會造成木糖損失，同時會產生硫酸鈣污泥，故需投入額外成本與設備，使生產成本提高。

因此，有許多研究開始投入改良 *Saccharomyces cerevisiae* 之木糖代謝能力，作為應用於纖維酒精程序之共發酵菌。*Saccharomyces cerevisiae* 雖不能利用木糖，卻能代謝其異構物木酮糖(xylulose)，但代謝速率相當緩慢；*Saccharomyces cerevisiae* 之基因體中含有木糖代謝途徑所需之基因 *GRE3* (XR)、*ScXYL2* (XDH)與 *XKS1* (XK)，然而這些基因在 *Saccharomyces cerevisiae* 的表現量過低，使得木糖無法被利用。事實上據文獻顯示，經由基因工程大量表現這些內源木糖代謝基因後，*Saccharomyces cerevisiae* 仍然不能有效利用木糖。

為了提升 *Saccharomyces cerevisiae* 代謝木糖之能力，有研究大量表現外源木糖代謝基因 *XYL1* (PsXR)與 *XYL2* (PsXDH)，來自於 *Pichia stipites*，在厭氧條件下能進行木糖發酵，且酒精轉化率接近

理論值。但經基因重組之 *Saccharomyces cerevisiae*，經由表現 PsXR 與 PsXDH 後，卻有大量木糖醇(xylitol)產生，降低酒精產率，因 PsXR 與 PsXDH 對於輔因子(cofactor)依賴性之差異造成氧化還原不平衡所致。PsXR 能利用 NADH 與 NADPH 作為輔因子，但主要是 NADPH，為 NADPH 依賴型酵素，而 XDH 只能利用  $\text{NAD}^+$ ，為  $\text{NAD}^+$  依賴型酵素，因此當 PsXR 與 PsXDH 反應進行會造成大量 NADH 堆積，使得  $\text{NAD}^+$  短缺，使得反應無法繼續進行而造成木糖醇堆積。

有鑑於此，許多文獻提出欲解決此問題，例如 PsXDH 的表現量必須高於 PsXR，才能降低木糖醇之堆積，使酒精產率提高，或是將 PsXDH 進行蛋白質工程，改變 PsXDH 對於輔因子的依賴性，例如 Matsushika *et al.* 研發之基改菌株是將 PsXDH 進行多點突變，使 PsXDH 對於  $\text{NADP}^+$  活性大為提高，輔因子之依賴性也偏向  $\text{NADP}^+$ ，能大幅提高酒精產率與降低木糖醇產生。最近的文獻指出，以隨機突變方式提高 XR 之活性與改變輔因子之專一性，能大幅提升木糖轉化酒精之效率。有一些研究也顯示，PsXR、PsXDH 與 PsXK 之活性必須在一定比例才能達到木糖代謝之最佳效率。

基改之菌株若需於使用於工業用途，菌株之高環境耐受力與穩定性相當重要，對於環境抑制物耐受力與穩定性，通常可採用馴化方式提升與維持，但若基改菌株是利用表現質體建構，則不適用於工業用途，因為表現質體容易流失，通常需用昂貴之抗生素或營養缺陷型培養基維持，因此基改菌株若要表現重組基因，必須將基因鑲嵌至菌株染色體中。

纖維酒精工業之發展為目前世界各國努力之目標，世界各地雖已有許多研究單位投入纖維酒精共發酵菌株之研發工作，但共發酵



菌株應用於纖維酒精工業需要同時具有高木糖轉化酒精效率、高木糖代謝速率，以及對環境抑制物耐受力等特性，技術門檻高，目前仍未見有實際在工業應用之代表性菌株，因此非常具有開發之淺力。

因此本計畫研究目的，在於尋找出台灣本土的五碳糖與六碳糖轉化菌，並且透過選擇性培養基，提供以五碳糖單一碳源及生長所需之微量元素，來篩選出能夠高效率轉化五碳糖之本土菌種，並針對生長條件 pH 值影響，與五、六碳糖共發酵之代謝進行產物分析，探究其轉化效率。並藉由微生物基因改良進一步提高該二醣類作為生質酒精醱酵原料之生產效率，以提高我國生質酒精之生產技術水準。

## 貳、研究方法與過程

本研究分兩階段執行纖維原料水解液高效率發酵菌株之研究計劃：

### 纖維原料水解液共發酵菌株篩選：

第一階段擬篩選可轉化五碳糖與六碳糖之微生物，篩選來源擬自台灣地區富含纖維素之環境中，如宜蘭三星蔥田土、淡水紅樹林沼澤土、陽明山黑土等，將所採樣品與無基營養鹽 MSB 及五碳糖或六碳糖完全混合，於 30°C，150rpm 之恆溫震盪培養箱中以 60 天為一循環進行菌株馴養，於馴養完成後，將菌株以固態洋菜培養基進行繼代培養與分離，於 10 繼代後，以菌體 16S rDNA 定序，以確認菌株之屬種名，並以含五碳糖或六碳糖之液態培養基在 30°C，150rpm 之恆溫震盪培養箱中馴養，檢測菌株生長之 OD<sub>600</sub> 數值，進行菌株生長動力與生長條件因子分析，以藉此尋找出菌株生長與轉換的最佳條件，其後，分析五碳糖與六碳糖生物轉化後之產物，以確立該菌株轉化五碳糖與六碳糖之機制。透過菌種篩選、馴化、鑑定等方式，找出能快速轉化五碳糖和六碳糖之菌種。

### 共發酵菌株基因改良：

第二階段擬針對現有之共發酵菌株進行改善木糖轉化酒精能力之基因改良。現階段之共發酵菌株雖具有較佳之木糖代謝能力，但其酒精轉化產率仍有突破空間，依據文獻回顧及實驗討論結果，發酵菌株內之氧化還原不平衡是造成木糖醇堆積及酒精產率下降之主要原因，因此若能提升菌株細胞內之 NADPH pool，則能改善此問題。

## 一、纖維原料水解液共發酵菌株篩選

### (一)菌種來源篩選

本研究菌種之來源，是選擇位於宜蘭縣三星鄉著名之「三星蔥」田土。原因是由於三星蔥在生長過程中，為了防止雜草叢生以及降低夏天的高溫，需要以稻草覆蓋，腐化後亦可當作土壤營養成分，因此土壤中蘊含豐富木質纖維素，相信會有能轉化五碳糖之菌種。採樣方式是從四戶不同蔥農之三星蔥田畦中覆蓋稻草，且稻草已有腐化現象之土壤，編號為 ILA、ILB、ILC 和 ILD 四組土壤樣品。從各樣品中分別取 2 g 土壤置於 250ml 錐形瓶中，加入 80 ml 的 MSB 與 6.38 g 的木糖，放於 30°C 培養箱中以 150rpm 振盪培養，並做三重複實驗，經過三個階段 15 天、30 天和 45 天後，再採樣劃菌，以篩選並分離出具有能利用木糖為唯一碳源之木糖轉化菌。

### (二)菌種純化與分離

待經過三個階段 15 天、30 天和 45 天篩選出菌種後，以添加 20 g/L 木糖之固態 MSB 培養基，於無菌操作台中，做三區劃菌法繼代培養且三重複實驗，將菌種分離純化 12 個繼代，確保每一盤培養基上菌種為純菌，再以第三區中挑選較為大顆之菌落，轉接到添加 20 g/L 木糖之液態 MSB 錐形瓶中，以溫度 35°C、150rpm 振盪培養，並利用分光光度計，監測其生長情形。

### (三)培養基組成

本研究使用之 MSB 培養基組成如表 1-表 4 所示，分別有 solutionA、B 和 C 三種前置溶液，以 80ml: 20ml: 15.7ml 比例額外添加木糖 20g 配至 1 公升溶液，使碳氮比維持 120: 5 作為標準。

表 1 MSB 緩衝溶液 Solution A

成份	含量(g/L)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	69
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34

表 2 MSB 基本營養源 Solution B

成份	含量(g/L)
NitriloTriacetic acid	10
KOH	23
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	29.55
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.6
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.009
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.099
Trace metal solution	10ml

表 3 微量金屬元素 Trace metal solution

成份	含量(g/L)
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.54
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.4
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.0002

表 4 MSB 氮源 Solution C

成份	含量(g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100

#### (四)發酵與共發酵實驗

針對本研究篩選出之菌種，設計以木糖、葡萄糖與木糖+葡萄糖三種碳源組合進行發酵與共發酵實驗。實驗以 1 公升 LB 培養基加入 20 g 木糖、20 g 葡萄糖以及 20 g 木糖+20 g 葡萄糖作為碳源，取 40 ml 培養液與 10 ml 菌液置入 250 ml 錐形瓶，於 35°C 下、150rpm 震盪培養，於各時間點採取發酵液，以 HPLC 進行代謝產物分析，了解這四株菌對於三種碳源發酵與共發酵能力。

#### (五)HPLC 分析方法

經過 48 小時試管培養之後的發酵液，先以小型離心機 (HERMLE Z206A, German) 在 2500 x g 下離心 10 分鐘，再利用針筒抽取上清液，經過 0.22μm 濾膜滅菌前處理。接著利用高效液相層析 (HPLC, Agilent-1200, USA) 分析水解液中各種糖質與發酵抑制物之濃度，液相層析管柱 (Transgenomic, USA) 型號 87H，長 730 cm、內徑 7.8 mm，填充靜相為磺酸化高分子樹酯 (sulfonic acid polystyrene divinylbenzene, PS/DVB)，8% cross-linked，粒徑 9μm，Capacity：1.7~1.9meq/g，管柱長 30 cm，內徑 7.8 mm，是陽離子交換樹脂，適合分析有機酸和糖類。糖類分析標準品，皆為分析試藥級，純度 98% 以上 (Merck, German)。層析流洗液為 4 mM 硫酸水溶液，流速 0.8 ml/min。輸液壓力上限 80 bar，層析壓力介於 65~75 bar。管柱控溫

65°C 進行分離溶液成分，每一樣品層析時間 38 min。生質物水解濾液以純水體積 1:1 稀釋上機分析，標準品檢量溶液及分析樣品注入量 20 L。以折射率偵檢器偵測，其樣品槽溫度 45°C。

#### (六)菌種型態分析

本研究針對篩選之菌株進行革蘭氏染色，目的在於可以瞭解菌株的外觀及菌體的大小，更重要的是了解本實驗所篩出的菌株為革蘭氏陽性菌或革蘭氏陰性菌，可以讓我們更清楚了解菌株的特性。實驗方法是從繼代培養基上，取適量菌株塗抹於玻片上並過火固定。將欲染色之範圍利用 3 ml 滴管以結晶紫染色約 1 分鐘，染色後以二次水沖洗，此步驟為初染(primary stain)；再以革蘭氏碘液進行染色，染色的時間為 1 分鐘，並以二次水沖洗，此步驟為媒染(Mordant)；媒染完後進行脫色(decolorizing)，脫色的方法以 95% 酒精清洗載玻片上之染料，直至酒精顏色為無色後再用二次水清洗一次，最後將玻片以番紅進行染色 45 sec 後用二次水清洗乾淨，此步驟稱之為復染(counterstain)，即完成染色。用 1000 倍生物顯微鏡觀察其染色情形，並拍照保存。若菌體呈藍紫色表示菌株為革蘭氏陽性菌；若菌體呈紅色則為革蘭氏陰性菌，兩者最大的差異在於細胞壁脂質的含量與厚度不一致。

#### (七)pH 生長因子分析

本研究為明瞭酸性或鹼性環境之生長因子，對於篩選出的菌株有何影響，進行 pH 生長因子測試實驗。實驗設計選定在木糖濃度為 20 g/L 條件下，以三種 pH 值 3、7 和 9 作為因子，使用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 與 KOH 溶液作為 pH 調整劑，以 pH 計於無菌操作台中測定滅菌後

培養基 pH 值。取 40 ml 培養液添加 20 ml 菌液，於 250 ml 錐形瓶中，在溫度 35°C、150rpm 條件下震盪培養，於 0hr、4hr、8hr、12hr、18hr、24hr、36hr 和 48hr 時間點採樣，測定其生長曲線。

#### (八)微生物生長動力學分析

以木糖作為一碳源，針對篩選出之菌株進行生長動力學分析，目的在於了解微生物對受質的依賴程度。實驗設計以 20 g/L、15 g/L、12 g/L、10 g/L、8 g/L 和 5 g/L 六種不同木糖濃度之培養液，藉由生長曲線，找出不同濃度對應之比生長速率(Growth Rate,  $\mu$ )，再根據 Monod equation:  $\mu = (\mu_{\max} * S) / (K_s + S)$ ，利用受質濃度(S)與各菌株  $\mu$  值的關係式，求得各菌株之最大比生長速率( $\mu_{\max}$ )與半飽和常數( $K_s$ )。由於生長曲線乃吸光值 OD<sub>600</sub> 與時間之關係，因此必須換算吸光值對應之微生物乾重，方可計算。OD<sub>600</sub> 與微生物乾重換算可由實驗求得，其實驗設計先將孔徑 0.2  $\mu\text{m}$  之濾膜，利用幫浦以二次水過濾一次做前處理後，以烘箱在溫度 105°C 條件下烘乾 2 小時，取出後以精密天平測濾膜前重並記錄下來。待測菌株以不同比例培養基稀釋後測 OD<sub>600</sub>，用已測前重之濾膜過濾，以烘箱在溫度 105°C 條件下烘乾 2 小時，取出測後重，扣除前重可得到微生物乾重，利用微生物乾重與吸光值作散布圖，得到一條截距設為 0 之迴歸曲線與公式，便可換算微生物乾重與吸光值。

## 二、共發酵菌株基因改良

### (一)選殖 NADP<sup>+</sup> 依賴型酵素基因及建構染色體鑲嵌基因表現質體

本研究使用之 NADP<sup>+</sup> 依賴型酵素為來自 *Kluyveromyces lactis* 之 GDP1 基因。本研究以 *K. lactis* 之染色體為模板，使用引子 Primer

F (CATATGATGCCCGATATGACAAACG) Primer R  
 (CTGCAGTTAAACACCAGCTTCGAAGTCC)，以聚合酶鏈鎖反應  
 (PCR)選殖 *GDP1* 基因。並將 *GDP1* 基因與 pGEMT-easy 載體，以  
 TA-cloning 方式進行接合反應，得到 pGEMT-GDP1 質體，如圖 1 所  
 示。

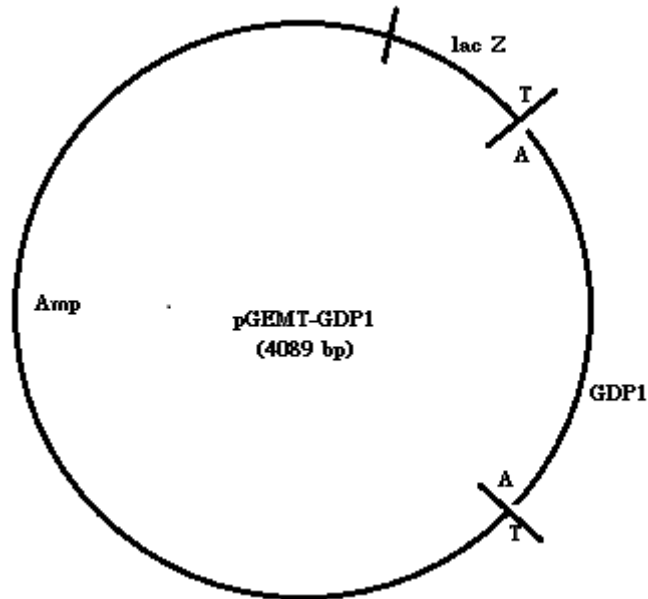


圖 1 pGEMT-GDP1 質體圖譜

再將 pGEMT-GDP1 以 *Nde I* 及 *Pst I* 限制酵素剪切並回收，得  
 到 *Nde I*-GDP1-*Pst I* DNA 片段。再將此 DNA 片段與 *Nde I* 及 *Pst I*  
 剪切之染色體鑲嵌基因表現載體 pGAP5S 進行接合反應，得到  
 pGAP5S -GDP1 染色體鑲嵌基因表現質體，如圖 2 所示。



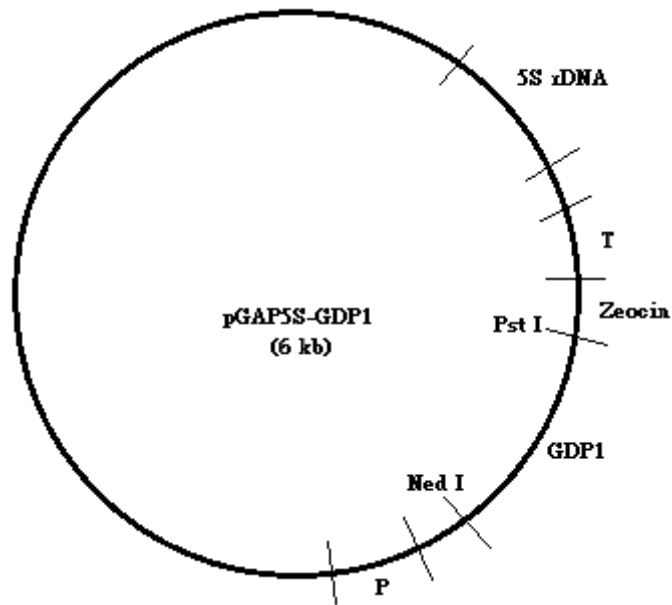


圖 2 pGAP5S-GDP1 基因表現質體圖譜

## (二) 酵母菌基因轉殖

### 1. 酵母菌勝任細胞(competent cells)製備

本研究方法利用電穿孔法進行酵母菌基因轉殖作用實驗。將過夜培養之 *Saccharomyces cerevisiae* 接種至 50 ml YPD 培養液，30°C，250rpm 培養至 OD<sub>600</sub> 為 0.3-0.35 (此為菌液經 10 倍稀釋測得之數值，細胞濃度約  $1 \times 10^8$  cells/ml)，將菌液冰浴 15 分鐘停止生長，再將菌液移至 50 ml 離心管，離心 4000 x g，5 分鐘，4°C。移除上清液(盡量移除)。再以 8 ml 無菌水懸浮菌體(Vortex)，再加入 1 ml 10X TE buffer 及 1 ml Lithium Acetate stock solution，搖晃離心管混合均勻後，在 30°C，85 rpm 震盪培養 45 分鐘。加入 0.25 ml 1M DTT 混合均勻後，於 30°C，85rpm 震盪培養 15 分鐘。加入冰無菌水至體積為 50 ml，離心 4000 x g，5 分鐘，4°C。移除上清液。以 50 ml 冰無菌水懸浮菌液，離心 4000 x g，5 分鐘，4°C。移除上清液。以

2.5-3 ml 冰 1M Sorbitol 懸浮菌液，離心 4000 x g，5 分鐘，4°C。移除上清液。以 0.1-0.2 ml 冰 1M Sorbitol 懸浮菌液，此即為 *Saccharomyces cerevisiae* 勝任細胞，菌體濃度約為  $1 \times 10^{10}$  cells/ml。細胞須保持在冰上並盡快使用。

## 2. 酵母菌轉型作用(transformation)

每一個要做電穿孔的樣品準備一個 0.2 cm 或 0.4 cm 的 Electroporation cuvette 以及 1 ml 1M Sorbitol(置冰上)。將 5-100 ng (約 5 $\mu$ l) DNA (DNA 必須溶於低離子強度之緩衝液中，例如水或 TE buffer)加至勝任細胞中混合均勻冰浴約 5 分鐘(0.2 cm cuvette 使用約 40 $\mu$ l 勝任細胞，0.4 cm cuvette 使用約 80 $\mu$ l 勝任細胞)。將電穿孔儀器打開，在 Home screen 選擇 Pre-set Protocols screen，再選擇 Fungal Protocol screen (按 4, Enter, 再按 2, Enter)。若使用的是 0.2 cm cuvette 按 Enter 進入，若使用的是 0.4 cm cuvette，選擇 2 按 Enter 進入。將混和好之 DNA 與勝任細胞加入 Electroporation cuvette，樣品需置於 cuvette 底部。再將 cuvette 置於 ShockPod，關上蓋子。電擊一次(Pulse once)確認並記錄電擊參數，時間常數(Time constant)需接近 5 milliseconds，電壓約 1.5kV(0.2 cm)、2.5kV(0.4 cm)。將 cuvette 取出並立即加入 1 ml 1M Sorbitol solution，輕緩地與菌液混合。將混勻之菌液轉移至 1.5 ml 離心管後，以 4000 x g 離心 1 分鐘，移除上清液並以 500  $\mu$ l YPD 培養液懸浮菌體，於 37°C 震盪培養 1 小時(180 rpm)。將菌液塗盤於含有篩選抗生素之培養基培養 48-72 小時(本實驗使用之篩選培養基為 YPX(0.5 $\mu$ g/ml Aureobasidin A 或 300-600 $\mu$ g/ml Zeocin))。

### (三)木糖發酵

發酵測試方式是先於 YPX plate (300-600 $\mu$ g/ml Zeocin)挑選欲行共發酵實驗之菌落，接種至含抗生素 YPD 培養液進行過夜培養(30 $^{\circ}$ C, 150 rpm, 16~20 hr)，此時菌體濃度可達 OD<sub>600</sub> = 5~10，再將菌液轉移至新鮮 YPD 培養液稀釋 100 倍進行繼代培養。過夜培養至細胞生長穩定期(stationary phase)，此時菌體濃度可達 OD<sub>600</sub> = 15~20，將菌液與新鮮 YPX 培養液以 1:4 方式進行混合(250 ml Erlenmeyer flask)，混合均勻後馬上取出 1ml 菌液作為發酵初始點(0 小時)之分析樣品，之後將混合均勻之菌液於 150 rpm，30 $^{\circ}$ C 條件下進行發酵，發酵時間 24 小時，於固定時間點取樣。將不同時間取樣之樣品以高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)進行有機酸(Acetic acid)，碳水化合物(Glucose、Xylose)及醇類(Ethanol、Xylitol)等分析。

### (四)建構染色體鑲嵌 NADP<sup>+</sup>依賴型 XR 突變株

本研究所使用之 Xylose reductase(XR)酵素屬於 NADPH 依賴型酵素。為了改善共發酵菌株內氧化還原不平衡問題，本研究利用定點突變方式進行酵素輔因子親合性之改良。本研究設計引子對 CgXRK269R: 5' – CTTGCCGTGATTCCCAGATCGAACAATCCCG-3'，CgXRK269R: 5' – CGGGATTGTTTCGATCTGGGAATCACGGC AAG-3'；CgXRN272E: 5' – GATTCCCAAGTCGAACGAACCCGATAGGTTG-3'，CgXRN272 E:5' – CAACCTATCGGGTTCGTTTCGACTTGGAATC-3'；CgXRS270 T/N271E:5' – GTGATTCCCAAGACGG AAAATCCCG ATAGG-3'，CgX RS270T/N271E : 5' – CCTATCGGGATTTCCGTCTTGGAATCAC-3'。利用三組引子對，以先前

建構之 pGEMT-XYL1 為模板，分別針對 XR 上胺基酸序列 269、270/271 與 272 之位置進行定點突變。分別得到突變株 K269R、N272E 以及 S270T/N271E 後，將三組突變株基因以 *Nde I* 及 *Pst I* 進行剪切，分別與 *Nde I* 及 *Pst I* 剪切之染色體鑲嵌質體 pGAP5S 進行接合得到染色體鑲嵌基因表現質體 pGAP5SC1-269、pGAP5SC1-270/271 與 pGAP5SC1-272。再將突變株基因之染色體鑲嵌表現質體以電穿孔法，轉殖至至 *Saccharomyces cerevisiae* 20270，再利用含抗生素 (300-600 µg/ml Zeocin) 之 YPD 培養基進行篩選得到三株染色體鑲嵌 NADP<sup>+</sup> 依賴型 XR 突變株 SC-C1K269R、SC-C1N272E 及 SC-C1S270TN271E。

#### (五) *Saccharomyces cerevisiae* 20270 營養缺陷型態測試

本研究將 *Saccharomyces cerevisiae* 20270，利用 SD medium (Synthetic Drop-Out medium)，進行營養缺陷型態測試。實驗方法為將過夜培養之 *Saccharomyces cerevisiae* 20270 菌液，分別在 Ura<sup>-</sup>，Leu<sup>-</sup>，His<sup>-</sup>，Trp<sup>-</sup> 之營養缺陷培養基進行塗盤測試，在 30°C，培養 48 hr，觀察菌株是否生長。SD 培養基配方如表 1 所示，胺基酸成分與篩選條件如表 5-表 7 所示。

表 5 SD medium (Synthetic Drop-Out medium)

	g/L
Yeast Nitrogen Base	1.6 g
Ammonium Sulfate	5.0 g
Potassium Chloride	7.6 g

Yeast Synthetic Media	1.4 g
Glucose	20 g

表 6 胺基酸成分

	ml/L
Uracil (20 mg/L)	10 ml
Leucine (60 mg/L)	6 ml
Histidine (20 mg/L)	2 ml
Tryptophan (20 mg/L)	2 ml

表 7 營養缺陷型篩選條件設計

代號	Uracil	Leucine	Histidine	Tryptophan
4 (O)	O	O	O	O
U (X)		O	O	O
L (X)	O		O	O
H (X)	O	O		O
T (X)	O	O	O	
4 (X)				

#### (六)馴化試驗

本研究將現有共發酵菌株 Y15 進行馴化試驗。先將冷凍保存管之菌種接種至新鮮 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 4% Glucose) 培養液稀釋 100 倍進行培養。過夜培養至細胞生長穩定期(stationary phase)，此時菌體濃度可達  $OD_{600} = 15\sim 20$ ，將菌液與新鮮 YPX(1% Yeast extract, 2% Peptone, 4% Xylose)培養液以 1:4 方式進行混合(250

ml Erlenmeyer flask)，混合均勻後馬上取出 1 ml 菌液作為發酵初始點(0 小時)之分析樣品，之後將混合均勻之菌液於 150rpm，30°C 條件下進行馴化(發酵)，批次馴化時間為 24 小時，於固定時間點取樣，連續利用 YPX 馴化 40 代。將不同時間取樣之樣品以高效液相層析儀進行分析。馴化菌株穩定性分析是將未馴化菌株 Y15 與利用 YPX 人工培養基馴化 20 天與 40 天之菌株，利用非木糖碳源之培養基 YPD 人工培養基連續繼代培養 10 代以上，再以 YPX(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Xylose)進行發酵測試進行比較。實驗方法是將冷凍保存管之菌種接種至新鮮 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 4% Glucose) 培養液稀釋 100 倍進行培養。過夜培養至細胞生長穩定期，此時菌體濃度可達  $OD_{600} = 15\sim 20$ ，將菌液與新鮮 YPD 培養液以 1:4 方式進行混合(250 ml Erlenmeyer flask)，混合均勻之菌液於 150 rpm，30°C 條件下進行 10 代繼代培養。再將 YPD 馴化 10 代之菌株，進行 YPX 發酵試驗，觀察菌株代謝木糖及轉化酒精效率，發酵時間 24 小時，於固定時間點取樣。將不同時間取樣之樣品以高效液相層析儀進行分析。

#### (七)抑制物耐受力試驗

將 Y15 進行過夜培養，將菌液與新鮮 YPX 培養液以 1:4 方式進行混合，並額外添加不同濃度之抑制物進行混合，初始醋酸濃度分別為 2、4、6 與 8 mg/L；初始 furfural 濃度分別為 0.5、1、2 與 3 mg/L；以及初始酒精濃度分別為 2、4、6、8 與 10 %，混合均勻後馬上取出 1 ml 菌液作為發酵初始點(0 小時)之分析樣品，之後將混合均勻之菌液於 150 rpm，30°C 條件下進行發酵，發酵時間 32 小時，於固定時間點取樣進行分析。

## 參、主要發現與結論

### 一、纖維原料水解液共發酵菌株篩選

#### (一)菌種篩選

本研究從土壤樣品中，經過三個階段 15 天、30 天和 45 天後，採樣劃菌，經過 12 個繼代培養，將濃度從 6.4 g/L 調整為 20 g/L，總共篩選出 16 株菌株，接著使用 HPLC 做初步木糖代謝分析(表 8-表 9)，發現只有第 15 和 16 號具有有效轉化木糖能力，再經一次分離純化步驟培養 3 個繼代，最後確實篩選出四株具有木糖轉化能力之菌株，分別為 IL01、IL02、IL03 和 IL04，於液態培養基中進行培養，溫度調整為 35°C。

表 8 初步木糖代謝消耗分析

<b>Bacteria No.</b>	<b>01</b>	<b>02</b>	<b>03</b>	<b>04</b>	<b>05</b>	<b>06</b>	<b>07</b>	<b>08</b>
Glucose(g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose(g/L)	10.81	13.73	12.29	15.32	14.30	10.37	18.74	15.28
Arabinose(g/L)	-	-	-	-	0.11	-	0.13	0.10
Xylitol(g/L)	0.44	-	-	-	-	-	-	-
Lactic acid(g/L)	-	-	-	1.36	1.17	1.10	-	-
Formic acid(g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetic acid(g/L)	-	-	-	-	0.15	-	-	0.11

表 9 初步木糖代謝消耗分析(續)

<b>Bacteria No.</b>	<b>09</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
Glucose(g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose(g/L)	19.86	18.55	24.54	6.08	17.06	20.44	2.46	5.41
Arabinose(g/L)	0.19	0.18	-	-	-	0.13	-	-
Xylitol(g/L)	0.39	-	-	-	-	0.44	1.19	0.94

Lactic acid(g/L)	-	1.11	-	-	1.22	-	-	-
Formic acid(g/L)	0.54	0.27	-	-	-	-	-	-
Acetic acid(g/L)	0.41	0.38	-	-	-	-	-	-

## (二)革蘭氏染色

本研究對於被篩選出的 IL01、IL02、IL03 和 IL04 四株菌進行革蘭氏染色，並以 1000 倍生物顯微鏡觀察，發現四株菌之菌體染色結果皆為紅色(圖 3-圖 6)，表示四株菌皆為革蘭氏陰性菌，其細胞壁上之肽聚糖層，會比革蘭氏陽性菌要薄得多，但通常具有脂多醣層等，對抗生素等有很大的抗性，可使其無法到達預期效果。

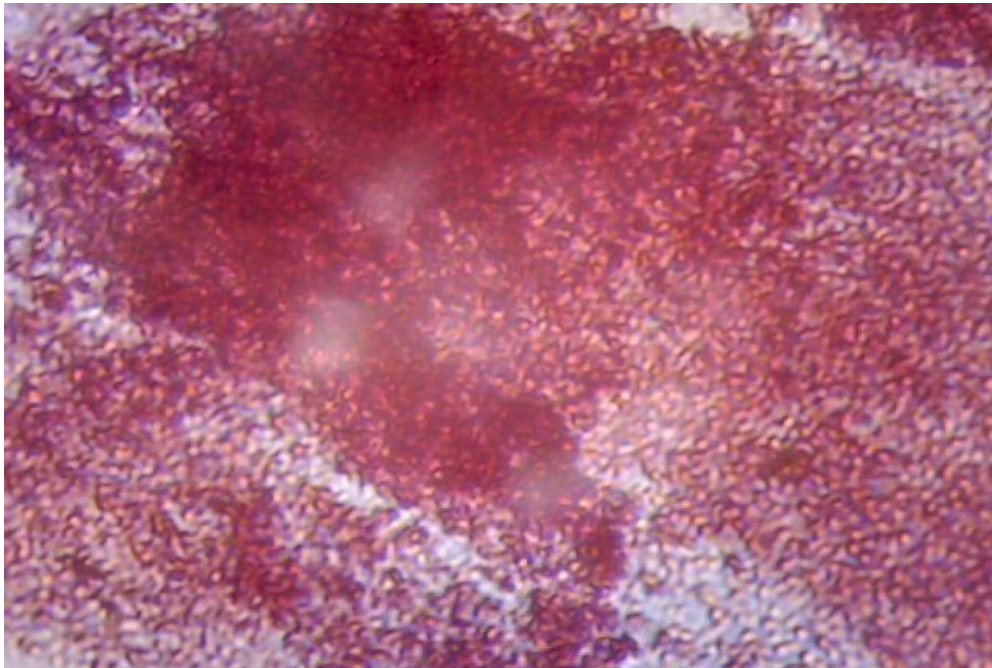


圖 3 革蘭氏染色圖菌體呈紅色表示 IL01 為革蘭氏陰性菌



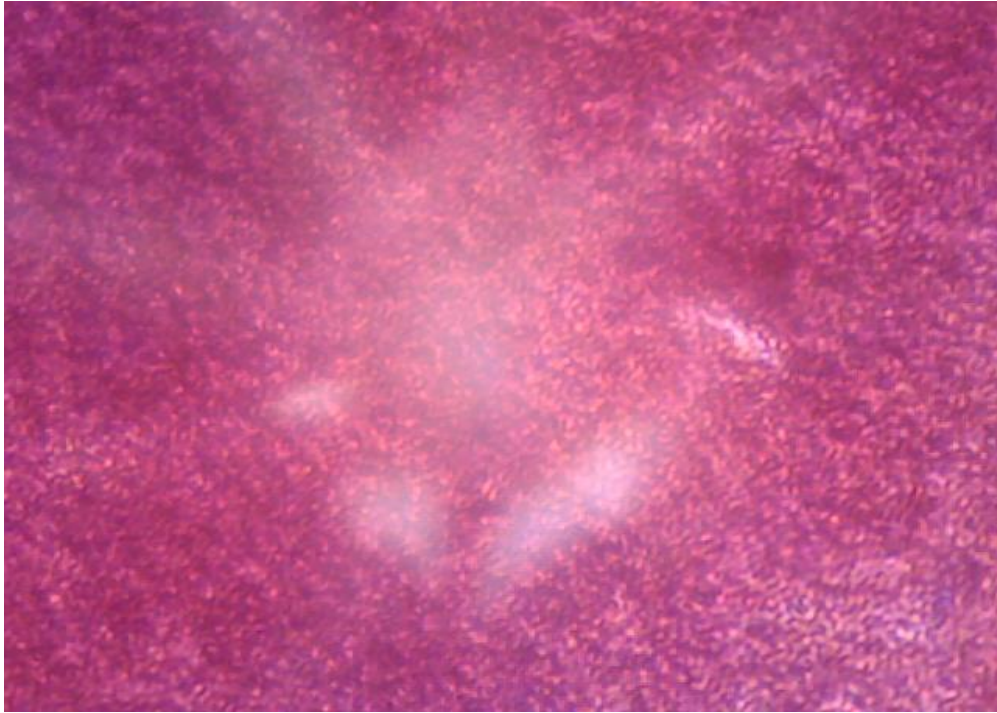


圖 4 革蘭氏染色圖菌體呈紅色表示 IL02 為革蘭氏陰性菌

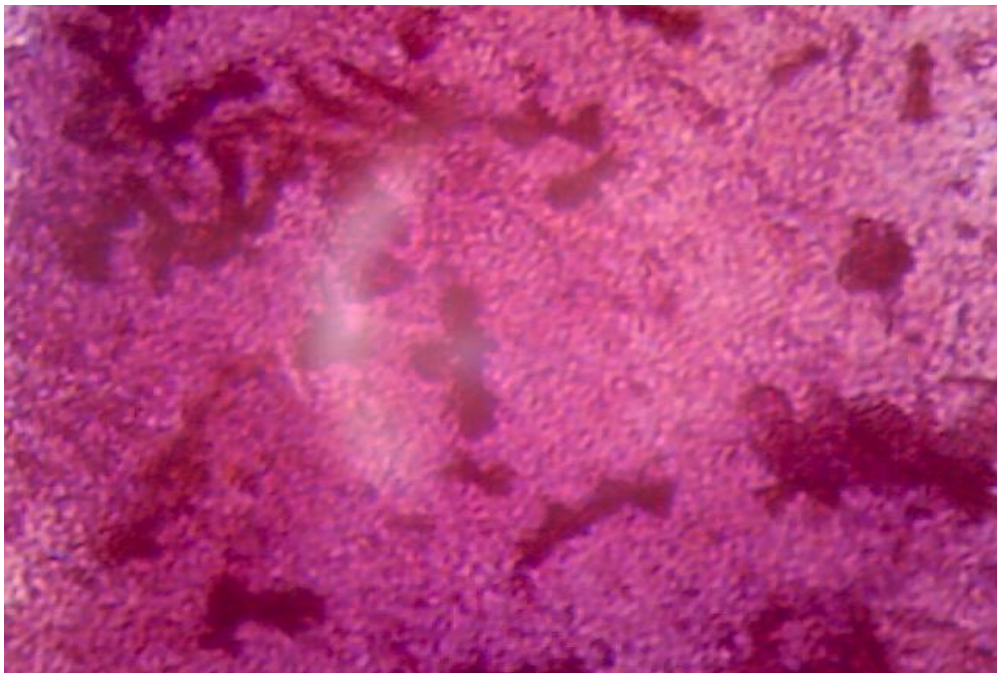


圖 5 革蘭氏染色圖菌體呈紅色表示 IL03 為革蘭氏陰性菌

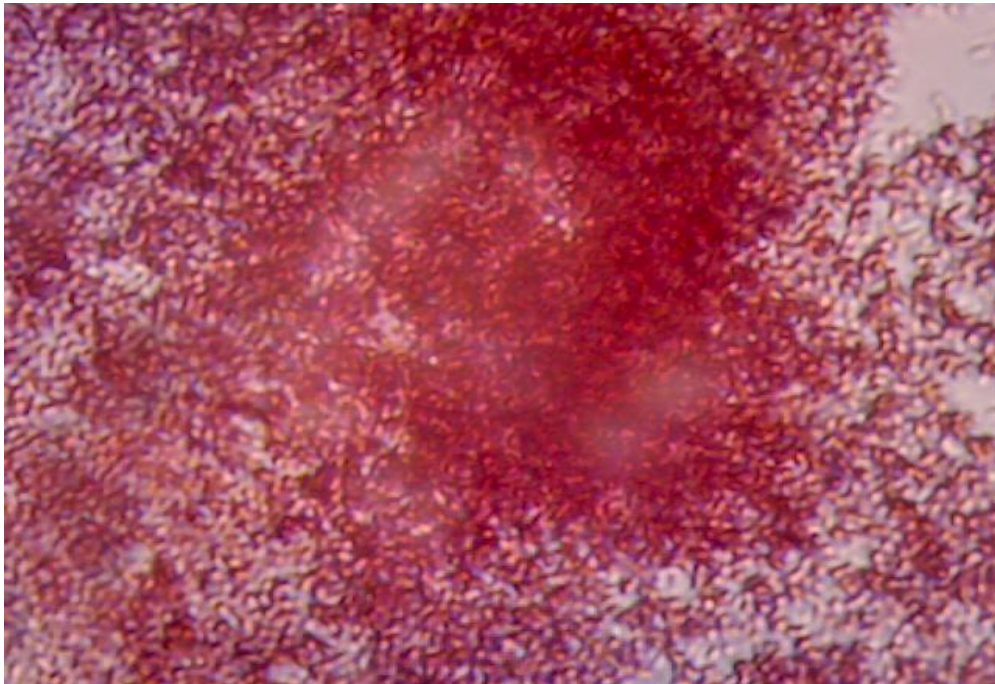


圖 6 革蘭氏染色圖菌體呈紅色表示 IL04 為革蘭氏陰性菌

### (三)pH 生長因子分析

本研究針對被篩選出的 IL01、IL02、IL03 和 IL04 四株菌，進行三種 pH 值對生長影響之實驗。四株菌株在相同木糖濃度 20 g/L、溫度 35°C、震盪速度 150rpm，不同 pH 值 3、7 和 9 條件下培養，觀察其生長曲線。各菌株生長情形如圖 7-圖 10 所示：

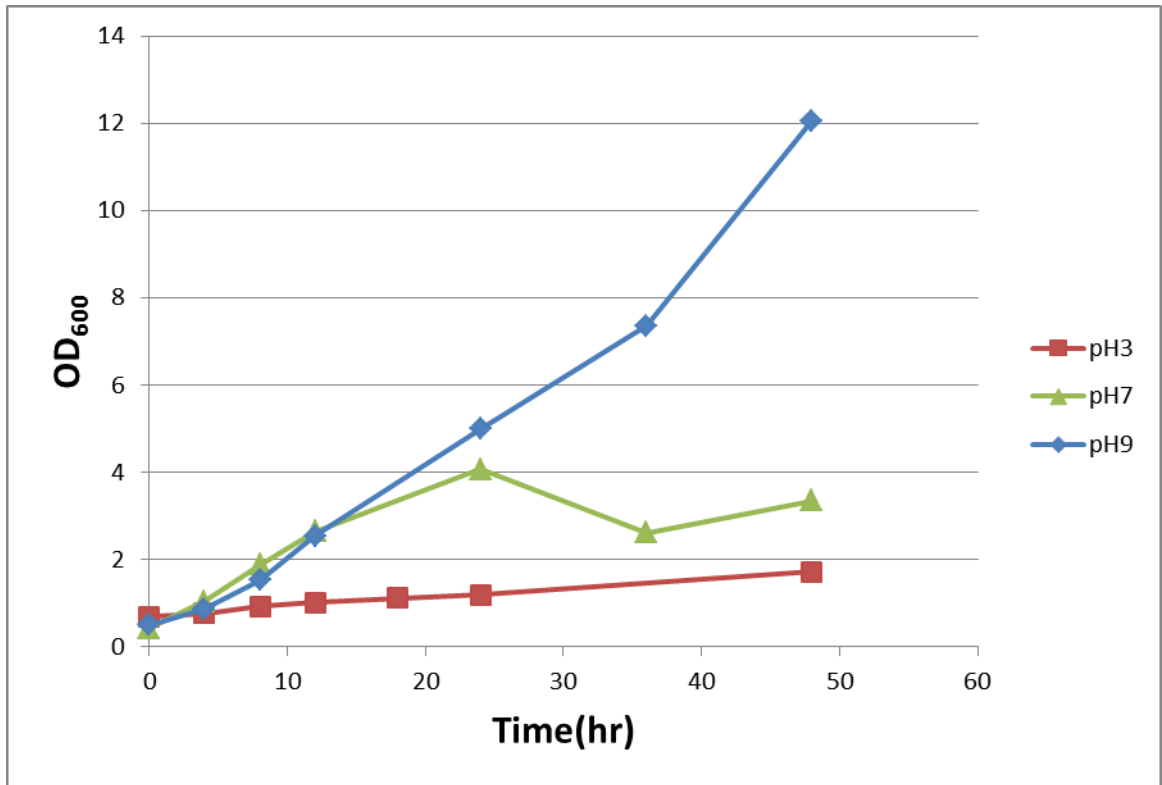


圖 7 三種不同 pH 對 IL04 菌株生長之影響

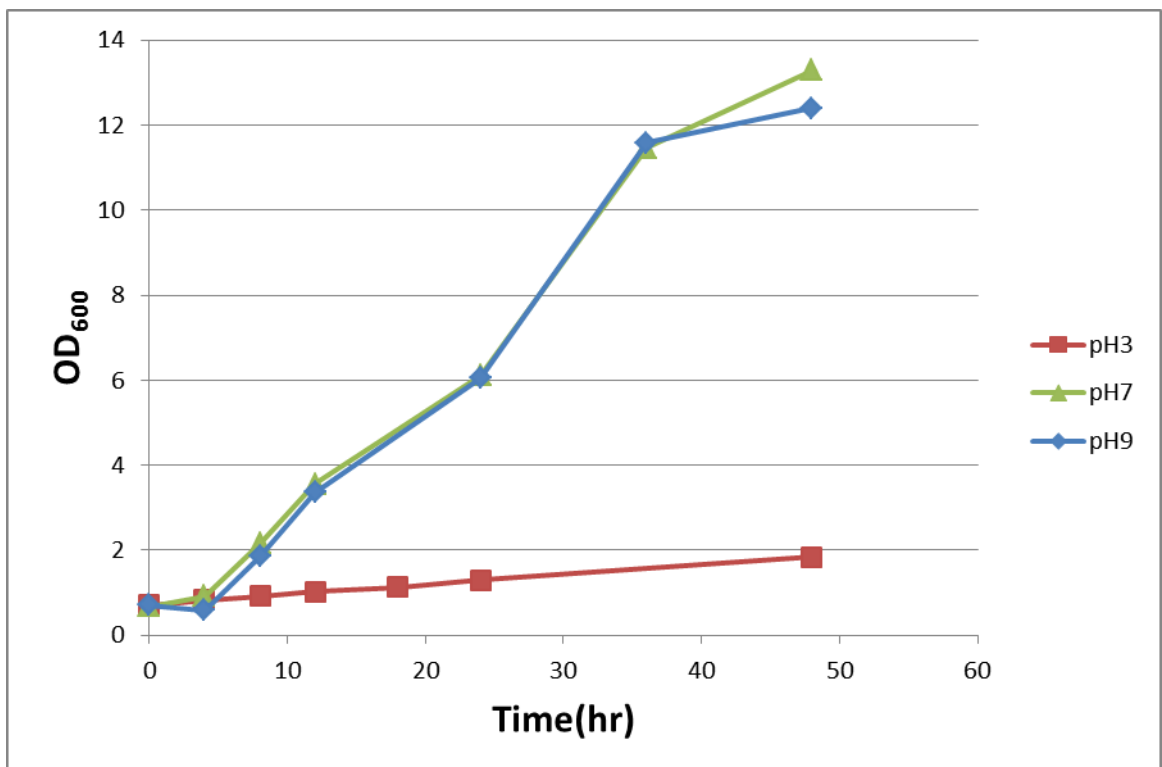


圖 8 三種不同 pH 對 IL03 菌株生長之影響

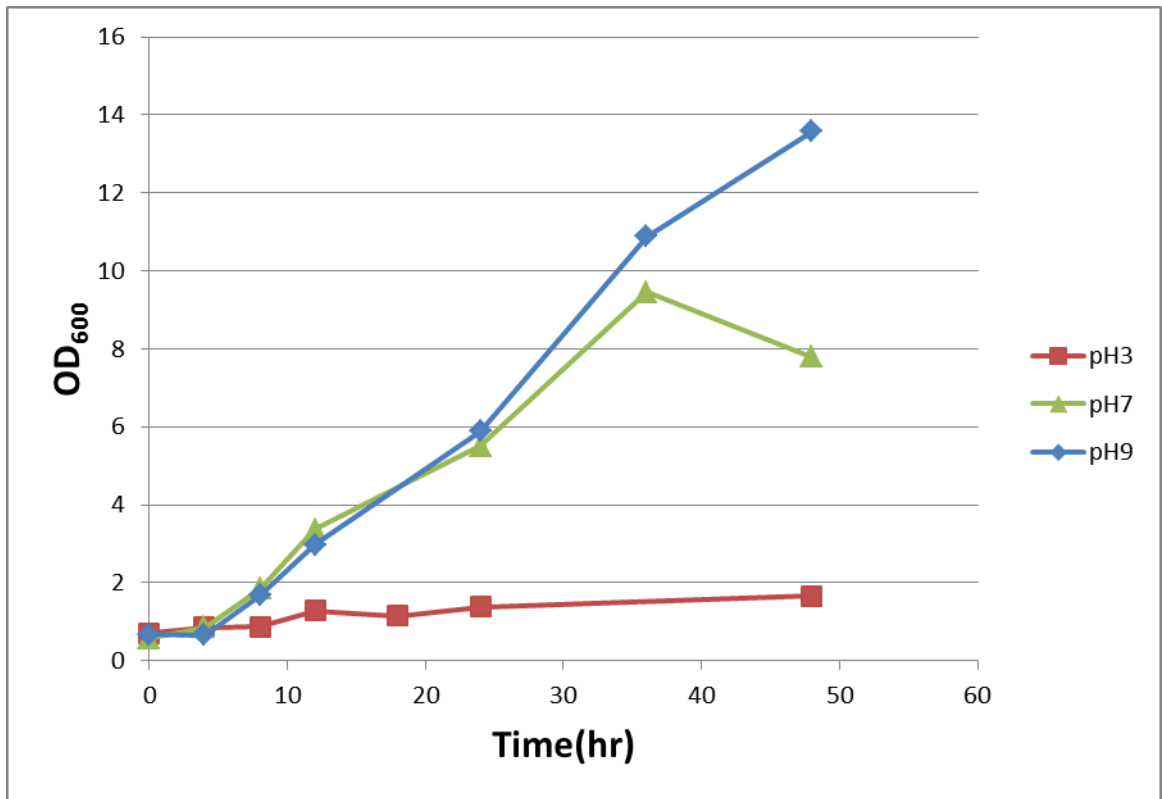


圖 9 三種不同 pH 對 IL02 菌株生長之影響

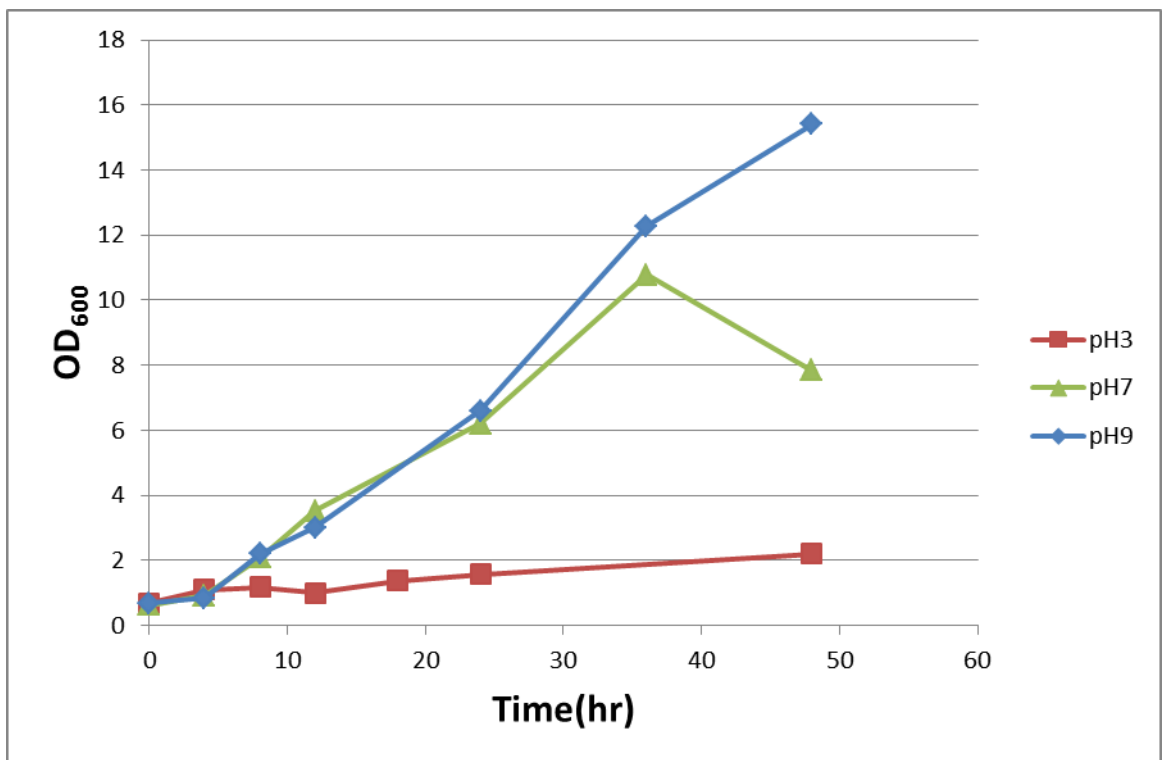


圖 10 三種不同 pH 對 IL01 菌株生長之影響

由圖 7-圖 10 可以發現本研究篩選出這四株菌，在鹼性環境 pH=9 的情況下生長情形，除了菌株 IL04 以外，皆與在中性環境 pH=7 時生長情形差異不大，與酸性環境 pH=3 時有顯著的差異。而 IL04 菌株在三種 pH 下生長情形，都有明顯的差異，以鹼性環境 pH=9 時最好，中性環境 pH=7 次之，酸性環境 pH=3 最差。綜合上述結果，判定本研究篩選之四菌株，是屬於可適應中性或鹼性環境之嗜鹼菌種。

#### (四)生長動力學分析

本研究針對被篩選出的 IL01、IL02、IL03 和 IL04 四株菌，進行生長動力學分析，以不同木糖濃度 20 g/L、15 g/L、12 g/L、10 g/L、8 g/L 和 5 g/L 來求得四株菌的  $\mu$  值，如圖 11-圖 15 與表 10 所示：

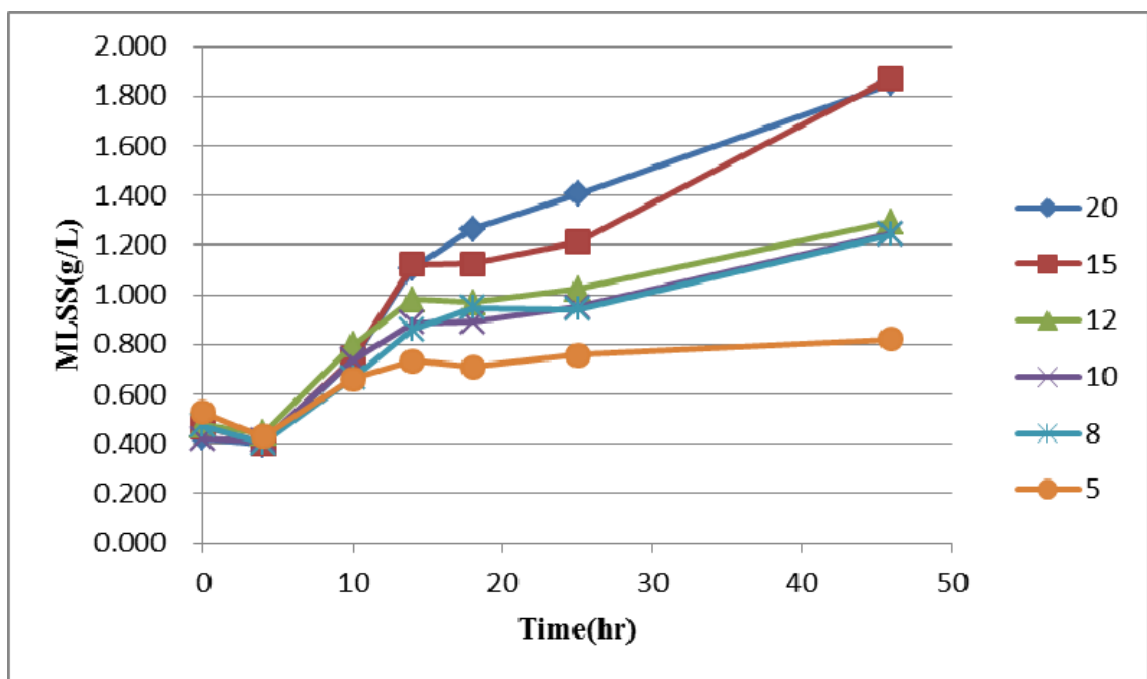


圖 11 菌株 IL01 不同木糖濃度之生長曲線

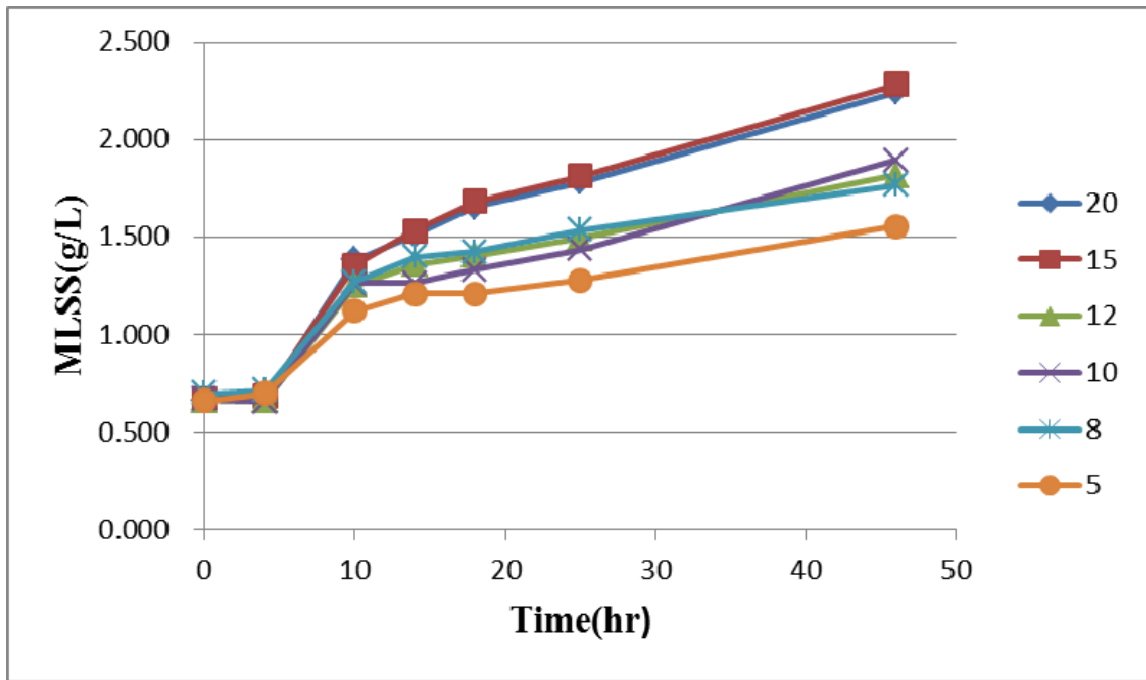


圖 12 菌株 IL02 不同木糖濃度之生長曲線

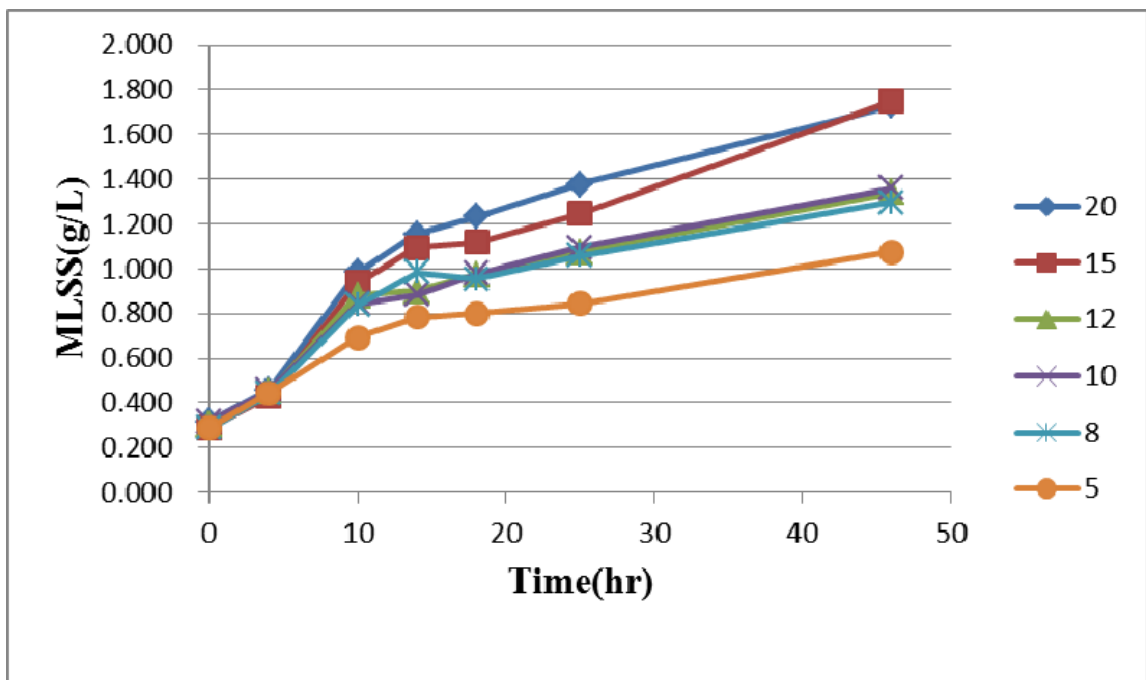


圖 13 菌株 IL03 不同木糖濃度之生長曲線



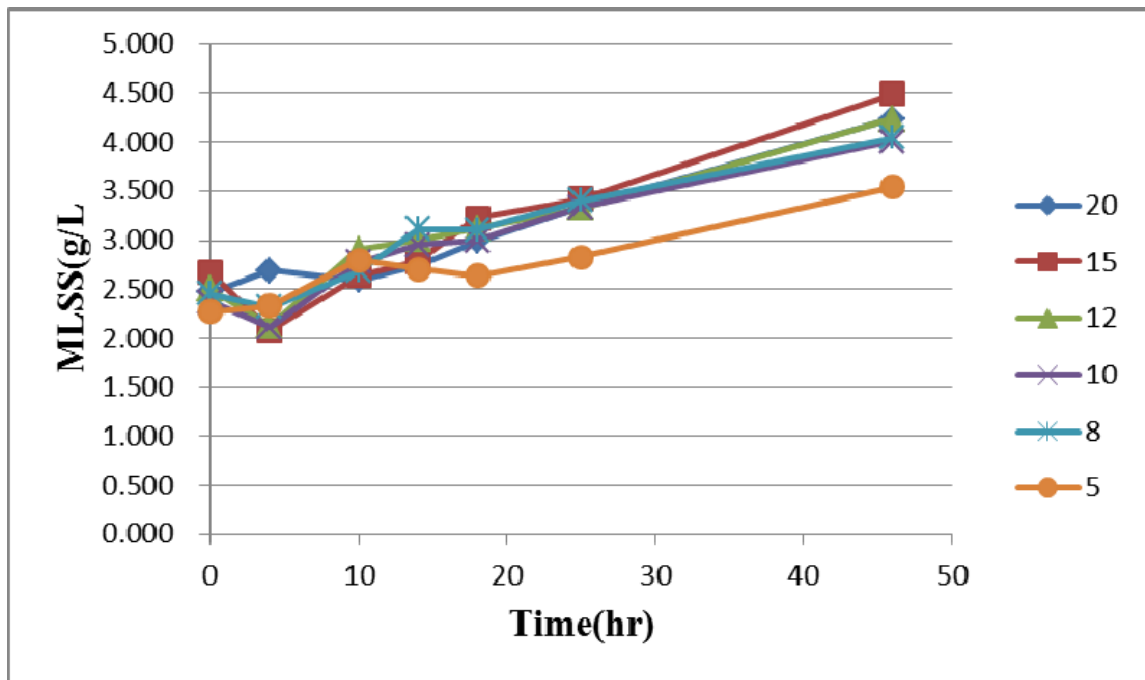


圖 14 菌株 IL04 不同木糖濃度之生長曲線

表 10 不同濃度對應菌株之比生長速率  $\mu(\text{hr}^{-1})$

S(g/L)	IL01( $\text{hr}^{-1}$ )	IL02( $\text{hr}^{-1}$ )	IL03( $\text{hr}^{-1}$ )	IL04( $\text{hr}^{-1}$ )
20	0.180	0.178	0.192	0.017
15	0.179	0.164	0.197	0.039
12	0.122	0.149	0.161	0.061
10	0.116	0.153	0.143	0.053
8	0.113	0.130	0.150	0.034
5	0.071	0.101	0.094	0.033

S:木糖濃度

藉由表 10 木糖濃度與比生長速率之倒數，使用 Excel 作 XY 散布圖，作一迴歸線並取得迴歸線公式(圖 15-圖 18)，接著對應動力公式 Monod equation:  $\mu = (\mu_{\max} * S) / (K_s + S)$ ;  $1/\mu = (1/s) * (K_s/\mu_{\max}) + (1/\mu_{\max})$ ，便可求得每株菌之最大比生長速率  $\mu_{\max}$  與半飽和常數  $K_s$ 。

本研究四株菌之動力分析於表 11 所示：

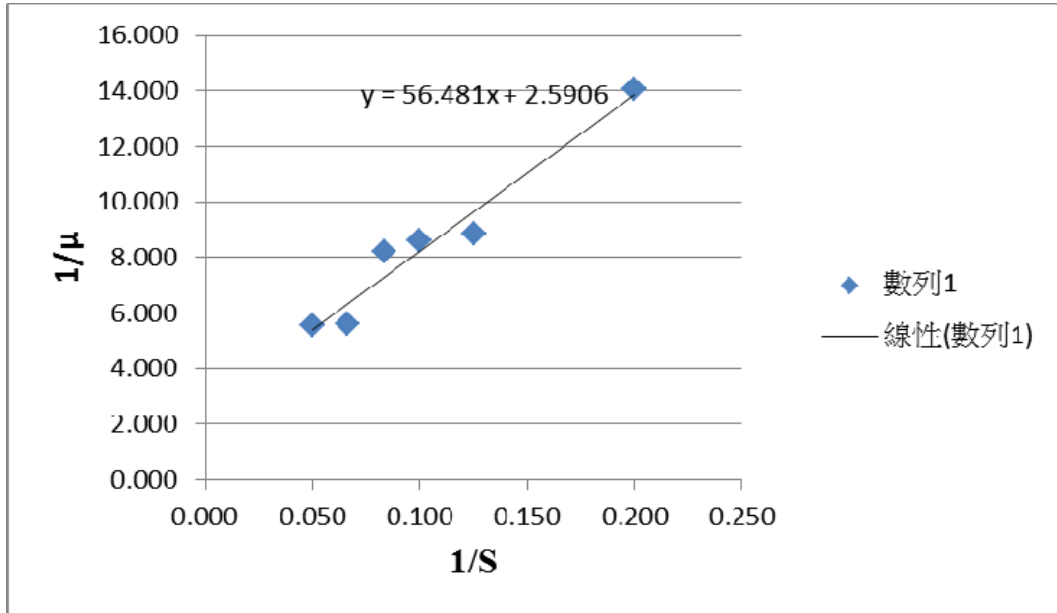


圖 15 菌株 IL01 迴歸線與公式

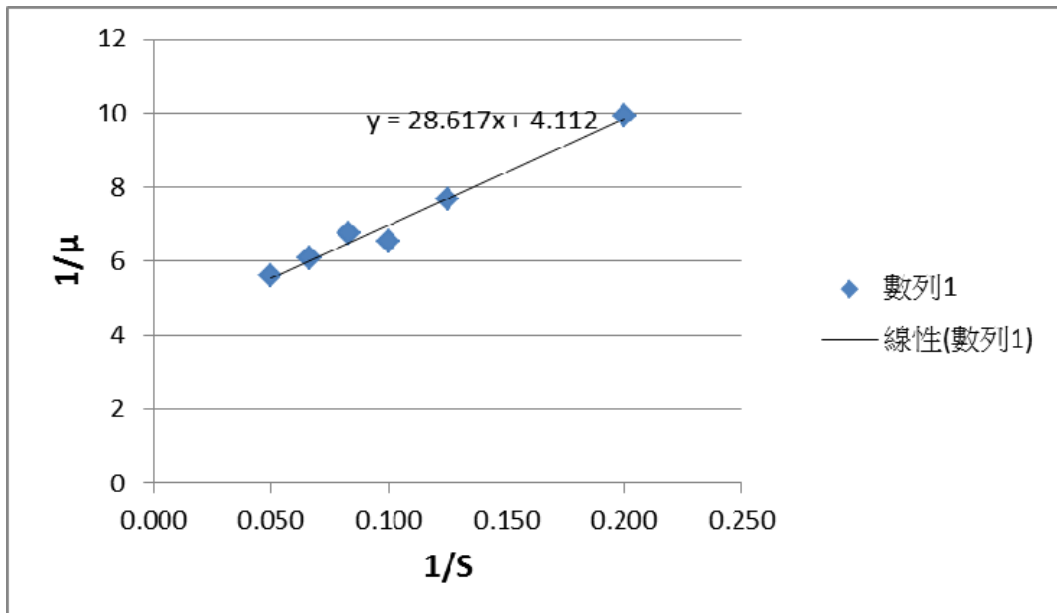


圖 16 菌株 IL02 迴歸線與公式



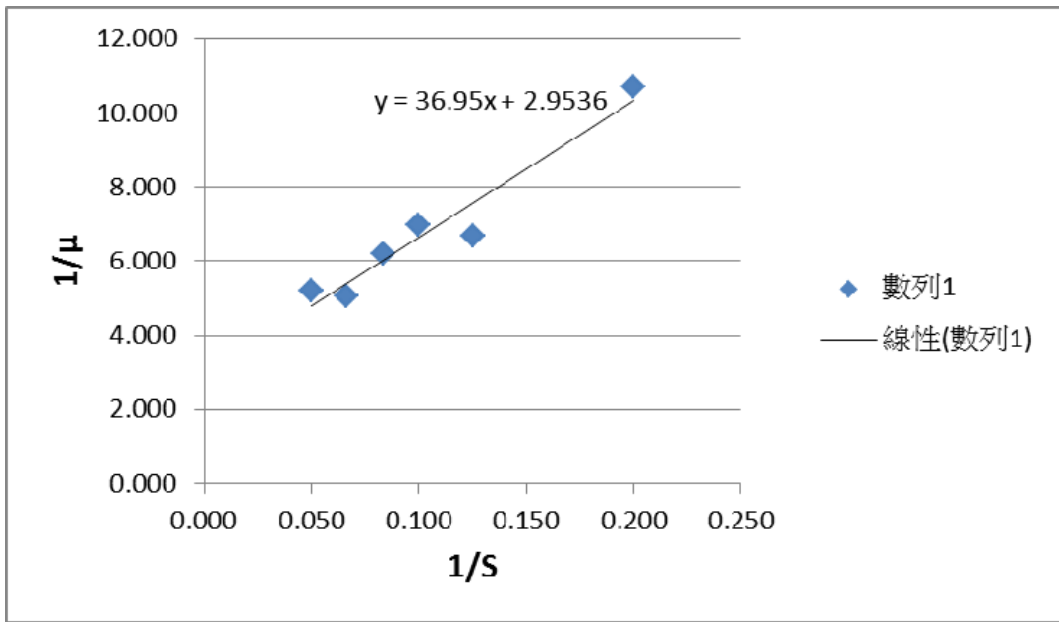


圖 17 菌株 IL03 迴歸線與公式

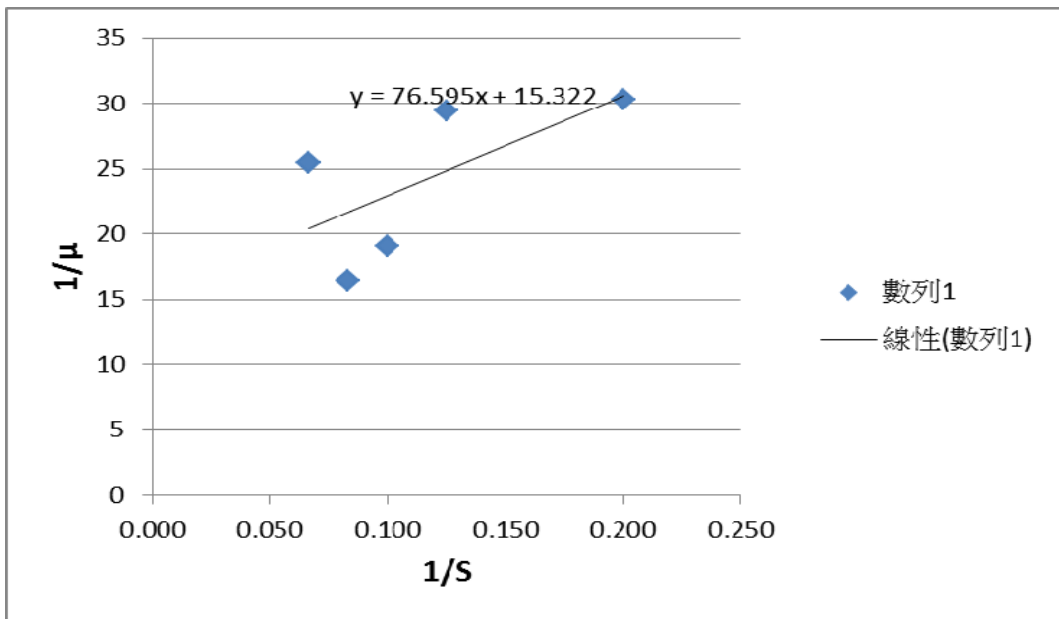


圖 18 菌株 IL04 迴歸線與公式

表 11 木糖轉化之微生物生長動力分析

Strain	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	$K_s(\text{g/L})$
IL01	0.386	21.802
IL02	0.243	6.959
IL03	0.339	12.510
IL04	0.065	4.999

$\mu_{\max}$ :最大比生長速率

$K_s$ :半飽和常數

由表 11 可得知本研究所篩選出四株菌株當中，IL01 與 IL03 最大比生長速率明顯大於 IL02 與 IL04，其中以 IL01 最好，而  $K_s$  值也是以菌株 IL01 最高，表示對木糖的親和力差，可適宜在更高濃度的環境當中，因此，IL01 是一株相當有發展潛力之菌株。

#### (五)發酵和共發酵能力與生長比較

本研究針對菌株 IL01、IL02、IL03 和 IL04 轉化木糖能力與生長進行分析，如圖 19 所示，可以發現菌株 IL03 生長較為快速，且木糖消耗量也是當中最多的，48 小時木糖轉化量為 68.1%，其他三株菌轉化量在 43.2%到 44.8%之間。而四株菌對於葡萄糖轉化能力與生長分析如圖 20 所示，可以發現依舊是菌株 IL03 生長較為快速，且葡萄糖消耗量最多的，48 小時葡萄糖幾乎被消耗完，轉化量為 98.4%。在木糖-葡萄糖共發酵部分，由於產物分析結果發現各菌株糖類起始濃度皆不同，因此無法做轉化的比較，但是由圖 21 還是可以看出，各菌株之木糖與葡萄糖消耗曲線是平行一致的，並未有葡

萄糖先消耗完才消耗木糖的情形，與一般微生物先利用六碳糖後利用五碳糖途徑不同，表示這四株菌即使在共發酵的環境下，對於木糖還是有好的利用程度。

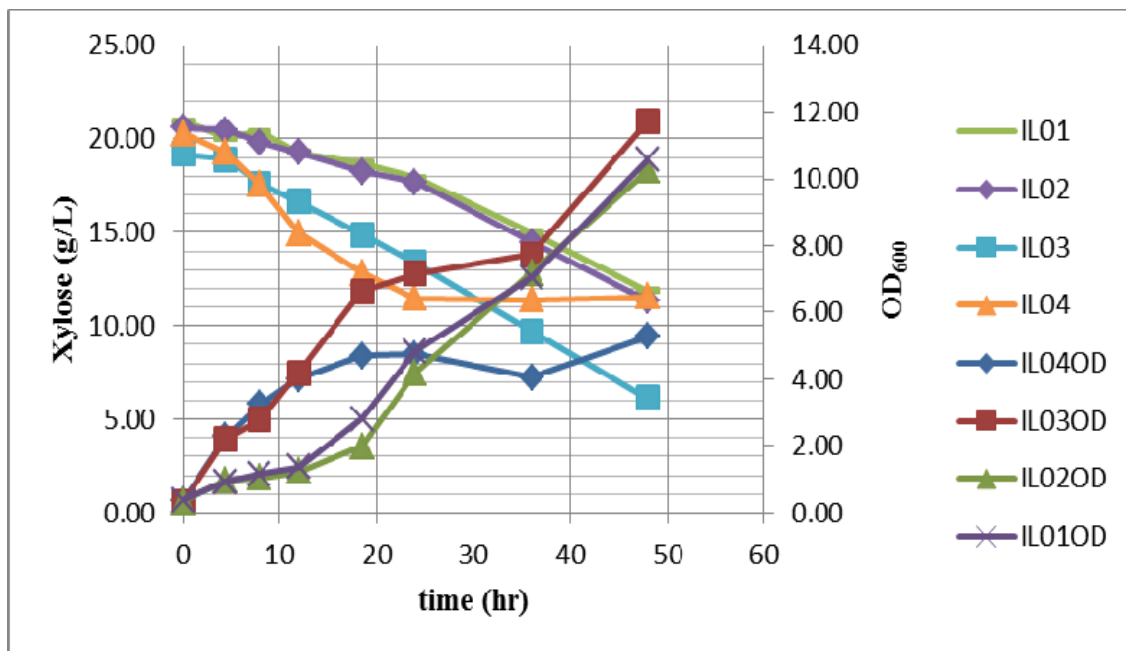


圖 19 四種菌株木糖代謝能力與生長比較

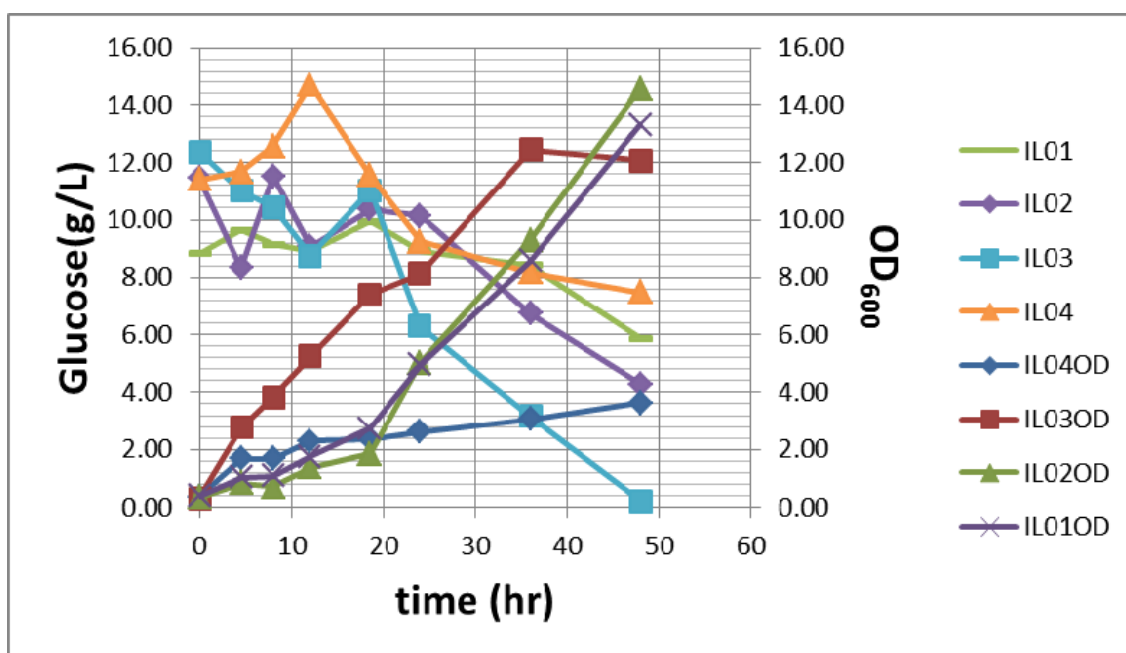


圖 20 四種菌株葡萄糖代謝能力與生長比較

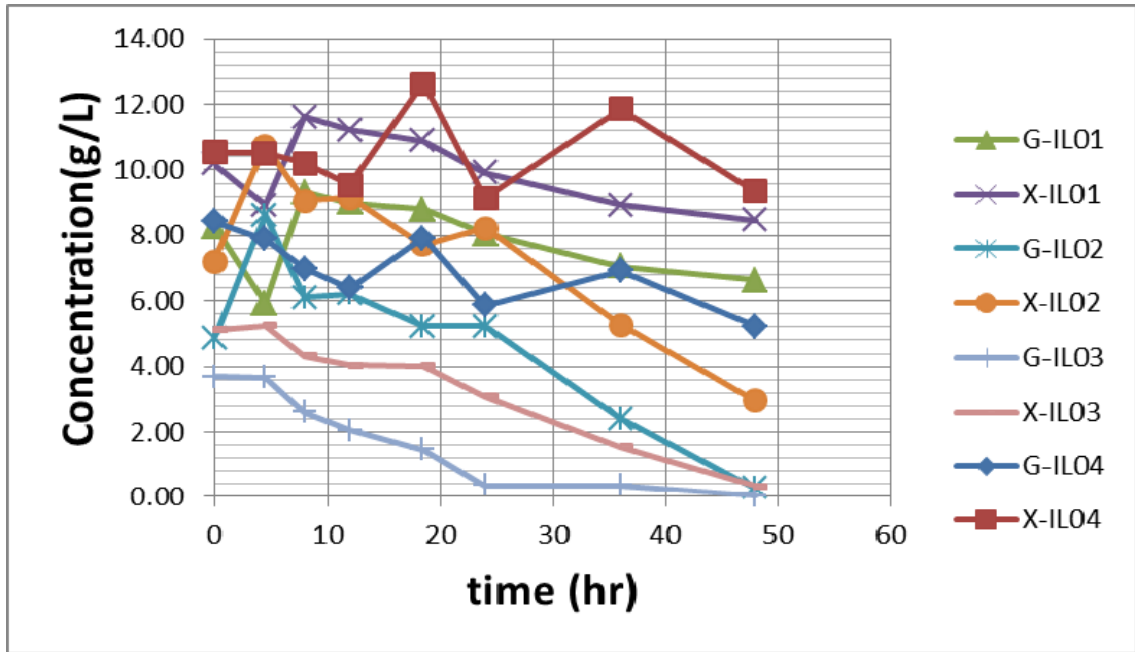


圖 21 四種菌株木糖-葡萄糖共發酵能力比較

#### (六) 發酵與共發酵產物之分析

根據圖 22-圖 25 可發現四種菌株消耗木糖過程中，菌株 IL01 與 IL02 有 formic acid 與 lactic acid 產生，但 lactic acid 並未隨著木糖代謝量增加而增加，反而是維持一定的量；而 formic acid 則是有明顯的與木糖代謝量成正比。而菌株 IL03 則有明顯的 formic acid 與 lactic acid 產生，直到木糖快消耗完才開始下降。菌株 IL04 在一開始就很快速的產生 formic acid 與 lactic acid，但當木糖濃度從 20g/L 降至 10 g/L 左右時便不再下降，兩種產物也不再增加，說明的確與木糖代謝量有顯著的關係。而四種菌株在代謝木糖過程中，皆無 Xylitol 與 EtOH 等產物。

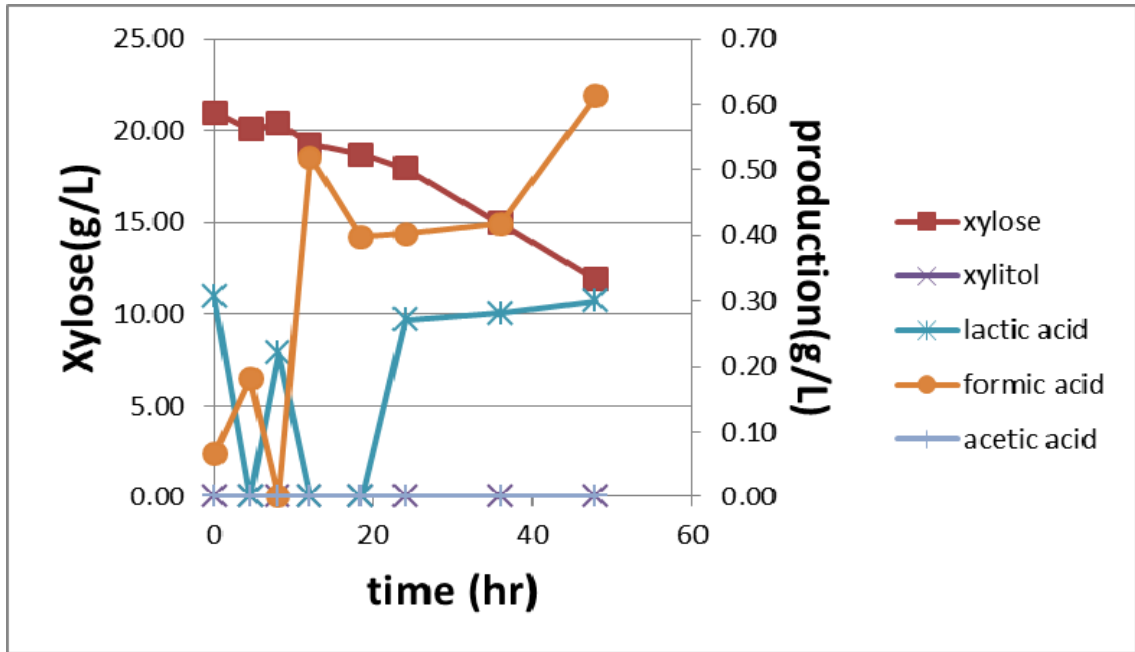


圖 22 菌株 IL01 木糖代謝產物

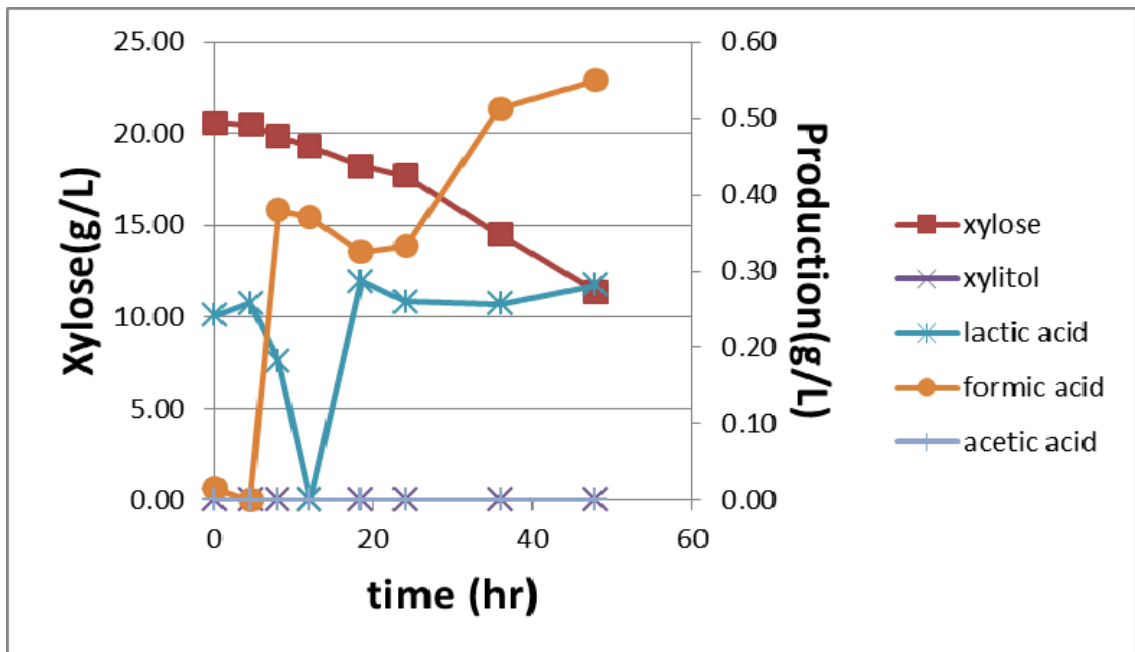


圖 23 菌株 IL02 木糖代謝產物

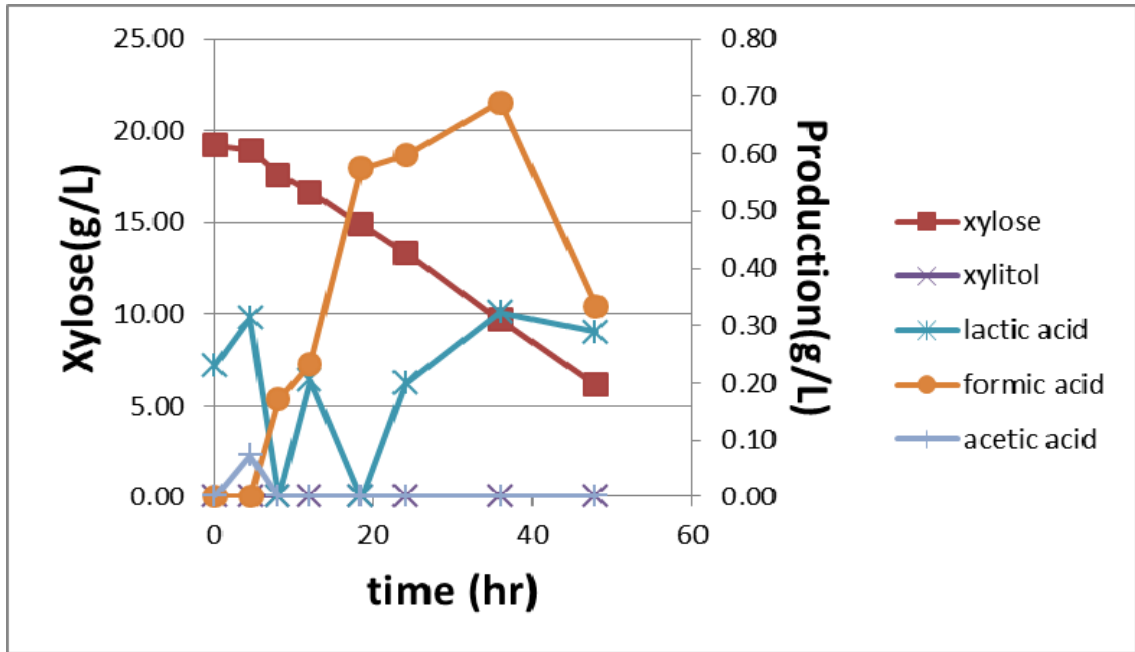


圖 24 菌株 IL03 木糖代謝產物

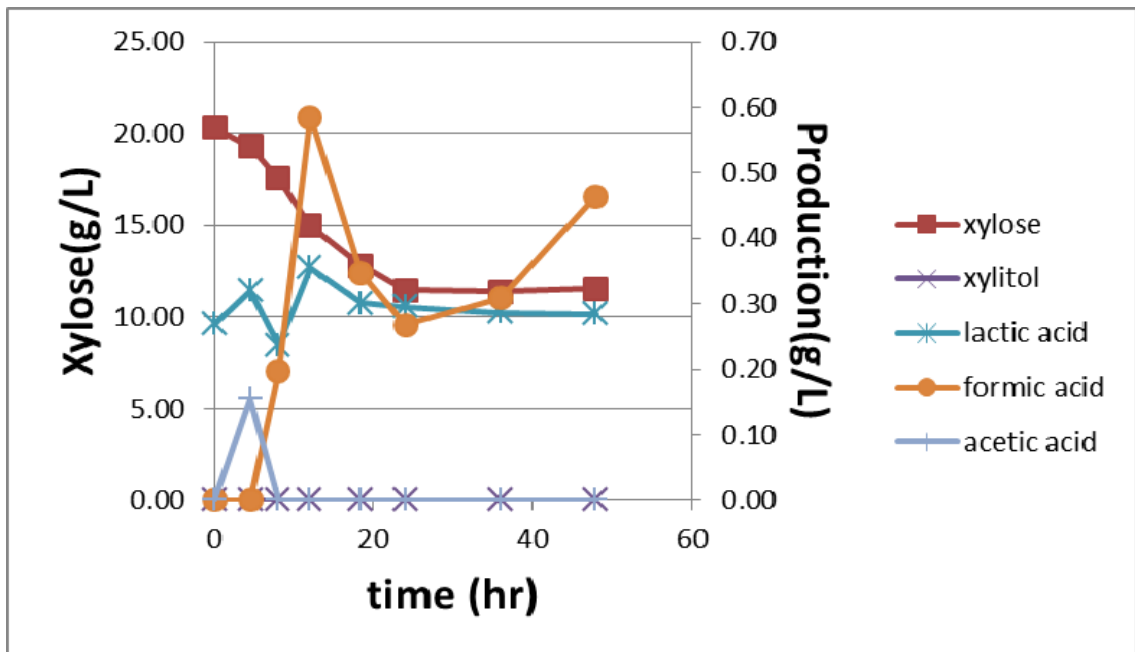


圖 25 菌株 IL04 木糖代謝產物

從圖 26-圖 29 可以看出四株菌代謝葡萄糖情況，發現菌株 IL01 與 IL02 雖然有少量的 acetic acid 與 lactic acid 產生，但皆無明顯上

升趨勢，只有 formic acid 有較為受葡萄糖代謝量影響。菌株 IL03 則是只有 formic acid 有明顯受影響，而原本代謝木糖有 lactic acid 產生在代謝葡萄糖時卻沒有，很可能 lactic acid 是與木糖代謝有關，與葡萄糖代謝無關。而菌株 IL04 只有 formic acid 有些微產生，因此很可能有其他代謝產物，需另外分析才可得知。

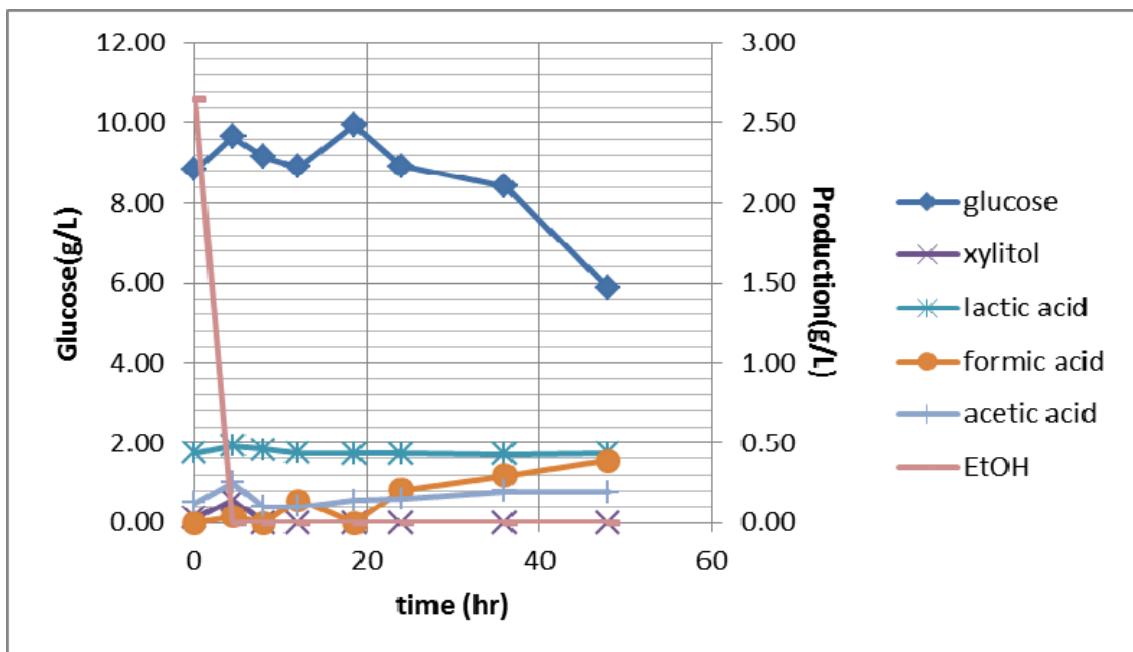


圖 26 菌株 IL01 葡萄糖代謝產物

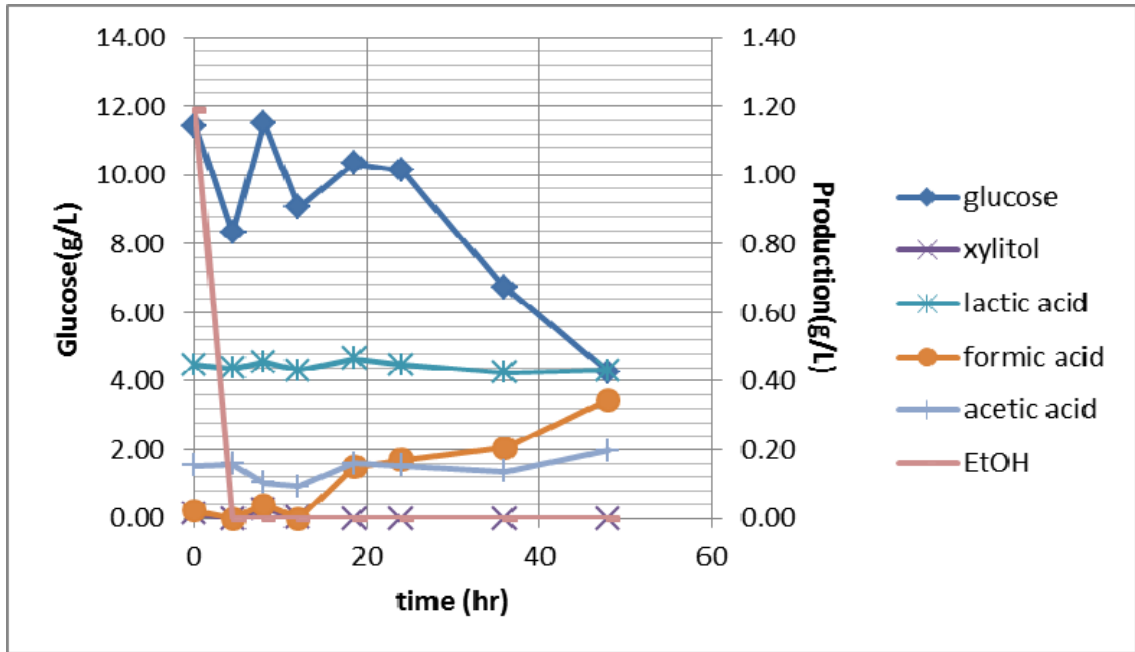


圖 27 菌株 IL02 葡萄糖代謝產物

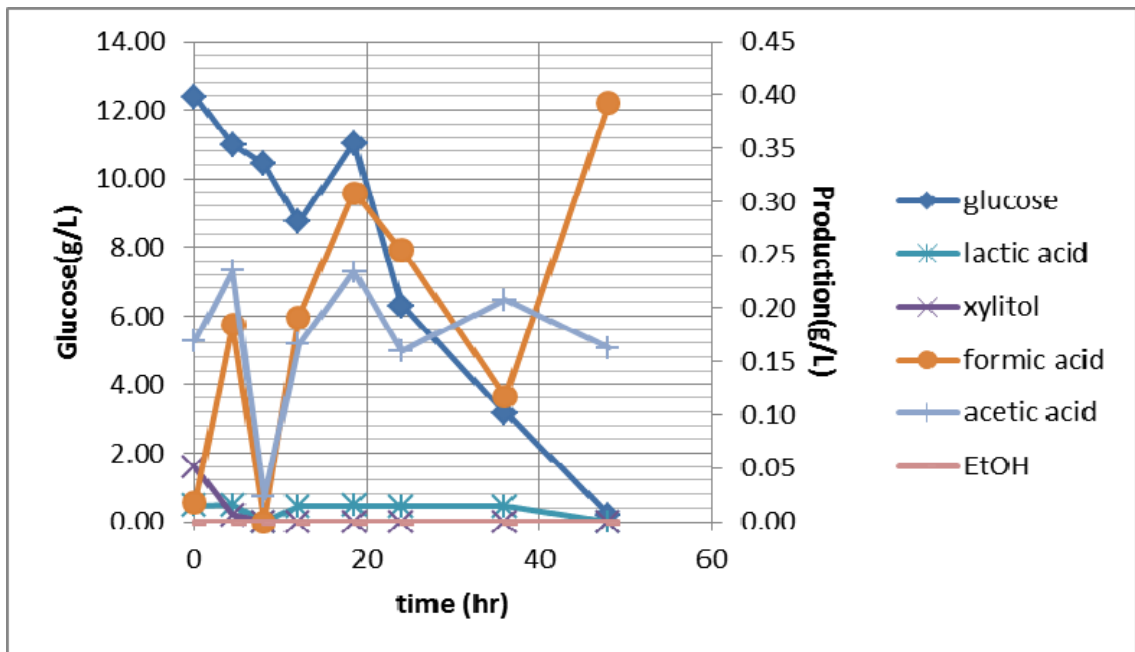


圖 28 菌株 IL03 葡萄糖代謝產物



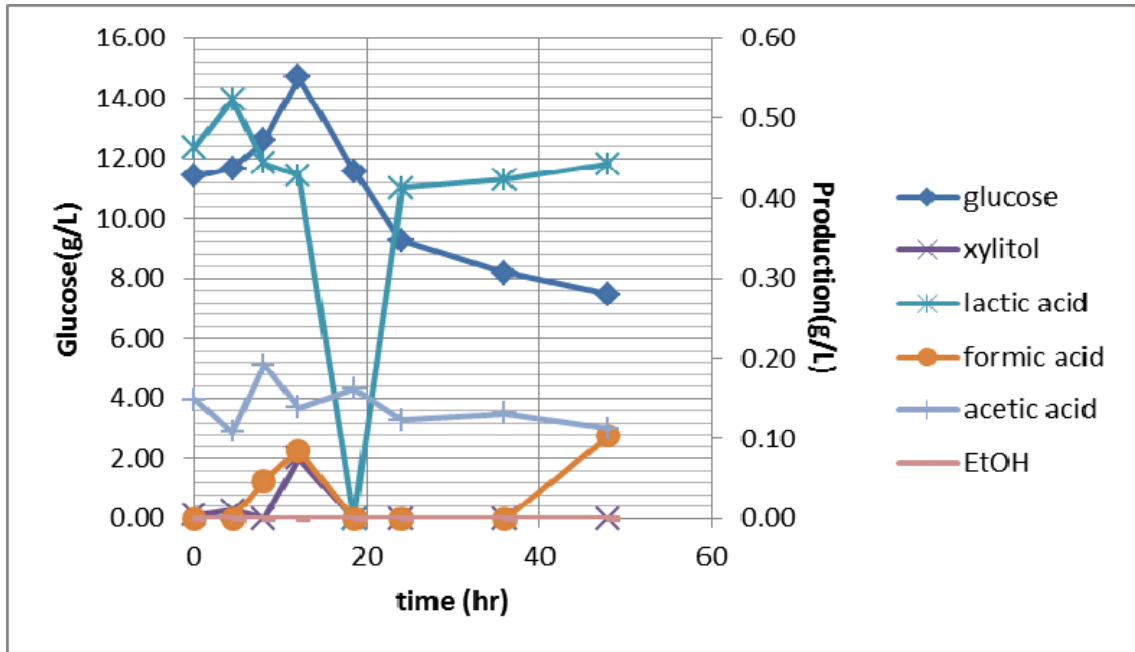


圖 29 菌株 IL04 葡萄糖代謝產物

從圖 30-圖 33 可以看出四株菌共發酵之產物，發現菌株 IL01 與 IL02 除了 acetic acid 與 lactic acid 一樣有產生外，還多了 Xylitol 產生，但這在木糖代謝與葡萄糖代謝時都沒有出現。菌株 IL03 則是可以明顯看出 Xylitol 產生是受木糖影響，因為木糖一消耗完便沒有 Xylitol 產生。而菌株 IL04 由於糖類消耗很少，與各個產物的關係不明顯，推斷在共發酵環境中的效率較其他三株菌差。

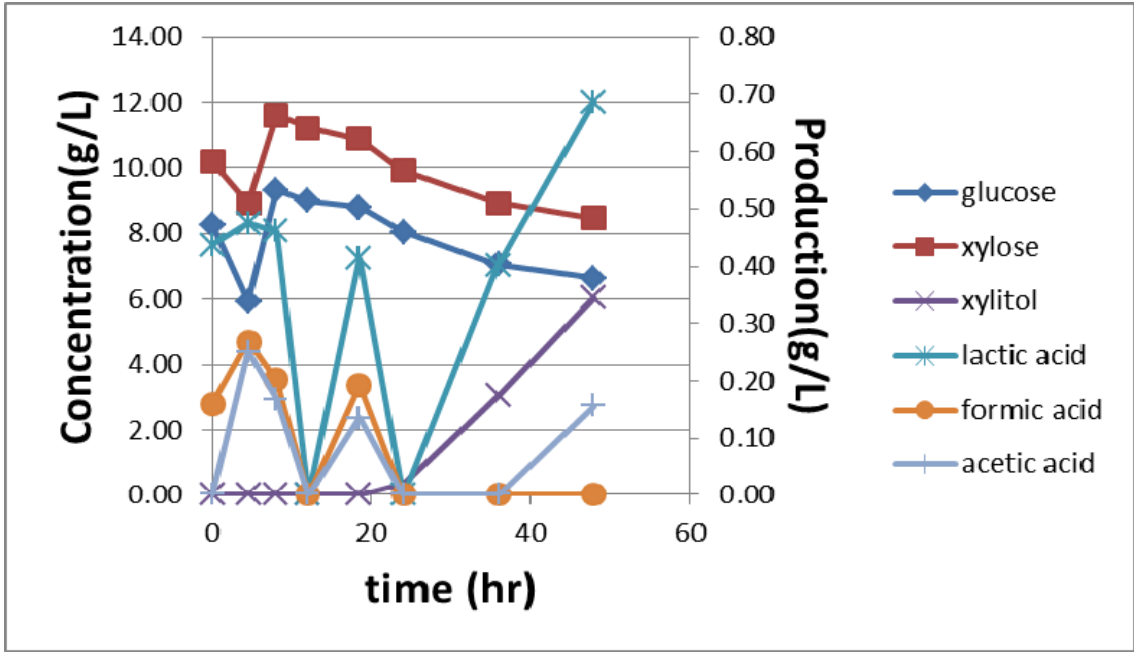


圖 30 菌株 IL01 共發酵代謝產物

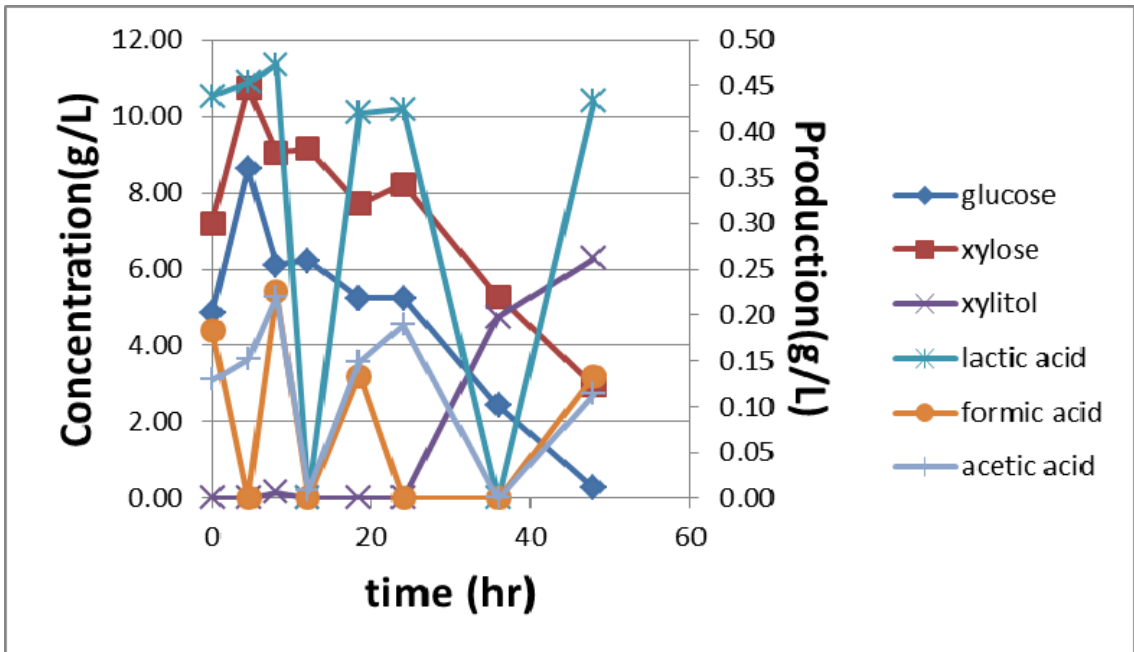


圖 31 菌株 IL02 共發酵代謝產物

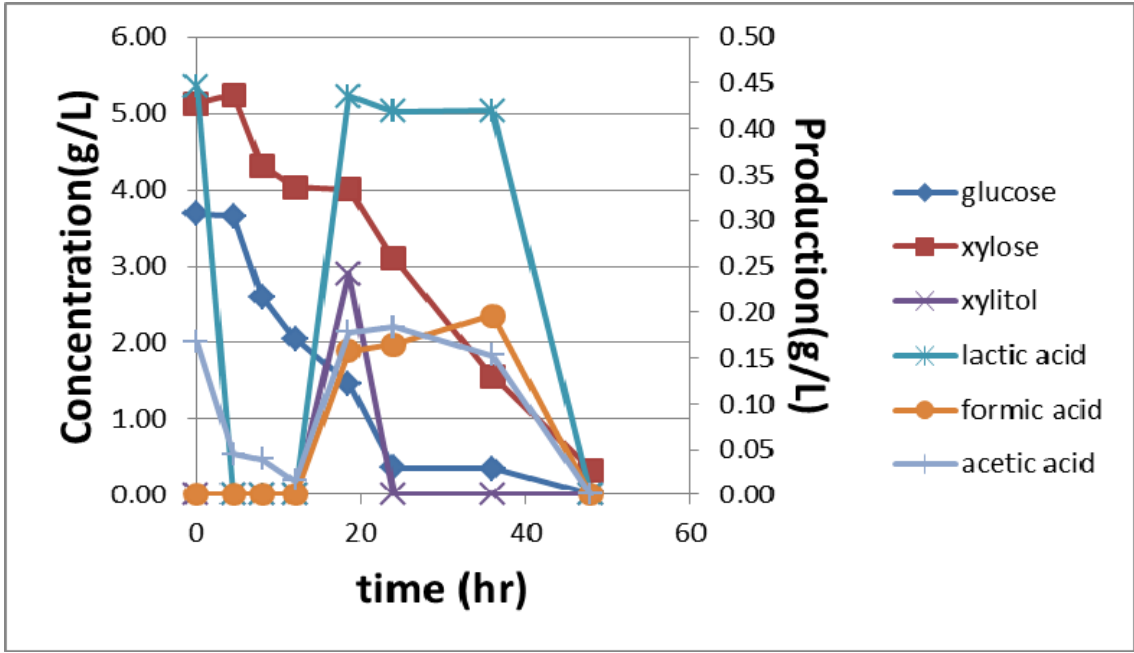


圖 32 菌株 IL03 共發酵代謝產物

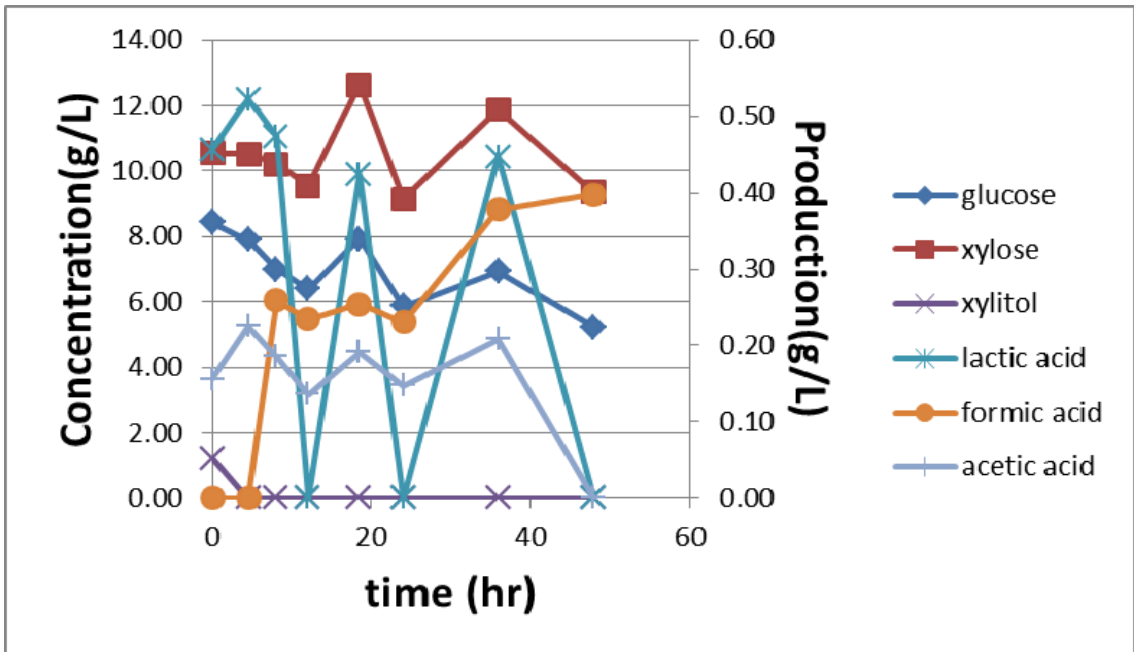


圖 33 菌株 IL04 共發酵代謝產物

## 二、共發酵菌株基因改良

### (一) 染色體鑲嵌 $\text{NADP}^+$ 依賴型酵素菌株篩選及木糖發酵測試

將建構完成之基因表現質體 pGAP5S-GDP1 與先前建構之染色體基因表現質體 pGAP5S-XK(攜帶有 xylulose kinase 基因(XKS1))以及 pGAP5S-XDH(攜帶有 Xylitol dehydrogenase 基因(XYL2))，以電穿孔法，同步轉殖三種基因表現質體至 YEA1 酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* 20270 攜帶外源基因 *CXYL1*)中。再利用含抗生素(300-600  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin)之 YPX 培養基進行篩選(基因轉殖之菌落生長情形如圖 34)，挑選生長較快速之菌落進行後續發酵測試(發酵測試結果如圖 35-圖 36)。由木糖發酵結果顯示，基因重組菌株經由置入 *GDPI* 基因後，酒精產率由控制組(Y15)之 0.33 g/g 提升至 0.34-0.36 g/g (菌株 9,14,16)。此外，木糖消耗率亦在 90 % 以上。

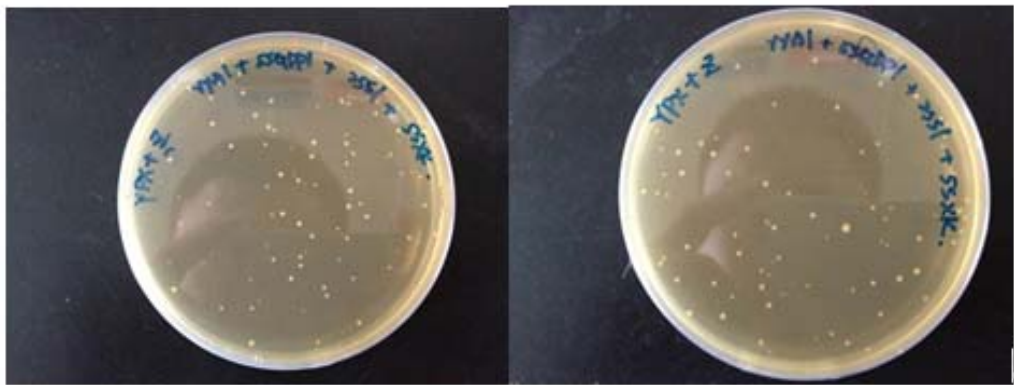


圖 34 重組質體基因轉殖之結果

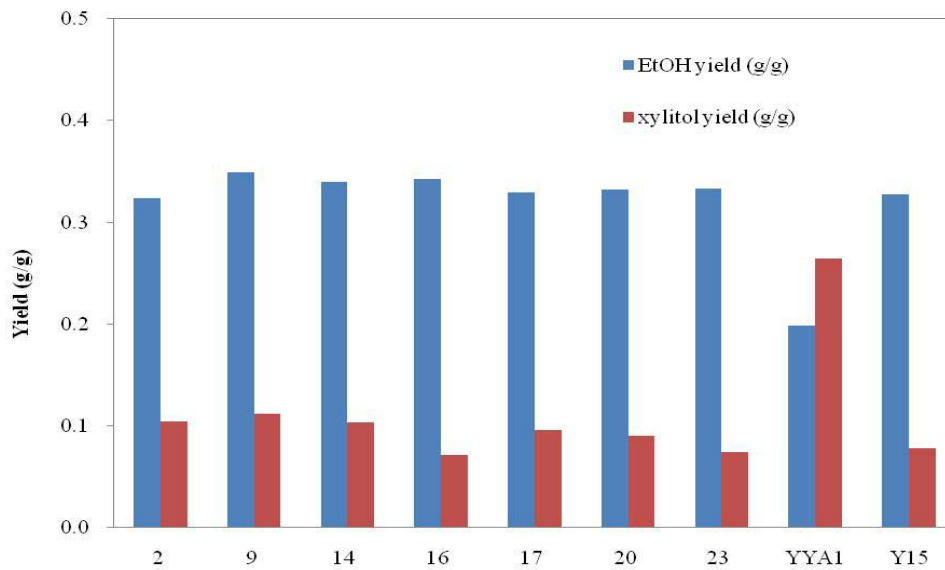


圖 35 木糖發酵測試結果(酒精產率及木糖醇產率)

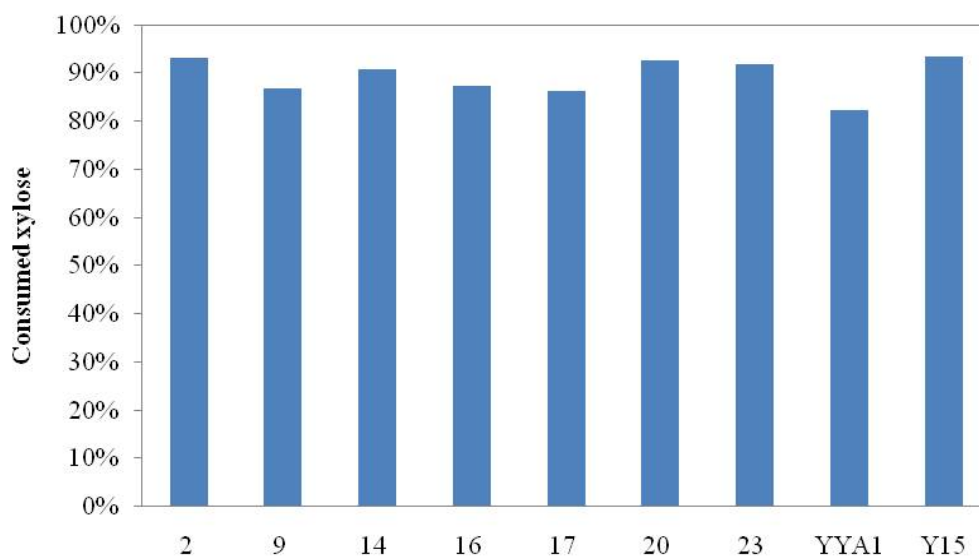


圖 36 木糖發酵測試結果(木糖消耗率)

## (二) 建構染色體鑲嵌 $\text{NADP}^+$ 依賴型 XR 突變株

本研究將建構完成之染色體鑲嵌基因表現質體 pGAP5SC1-269、pGAP5SC1-270/271 與 pGAP5SC1-272 經由定序

(sequencing)確認突變點正確無誤後，將三種突變基因質體基因轉殖至 *Saccharomyces cerevisiae* 20270。再以含抗生素(300-600  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin)之 YPD 培養基進行篩選得到三株染色體鑲嵌  $\text{NADP}^+$  依賴型 XR 突變株 SC-C1K269R、SC-C1N272E 及 SC-C1S270TN271E。此突變株可供未來進行蛋白純化及酵素活性分析使用。

### (三) *Saccharomyces cerevisiae* 20270 營養缺陷型態測試

本研究將 *Saccharomyces cerevisiae* 20270，利用 SD medium (Synthetic Drop-Out medium)，進行營養缺陷型態測試。實驗方法為將過夜培養之 *Saccharomyces cerevisiae* 20270 菌液，分別在 Ura-，Leu-，His-，Trp- 之營養缺陷培養基進行塗盤測試，在  $30^\circ\text{C}$ ，培養 48 hr，觀察菌株是否生長，結果如圖 37 至圖 42 所示。

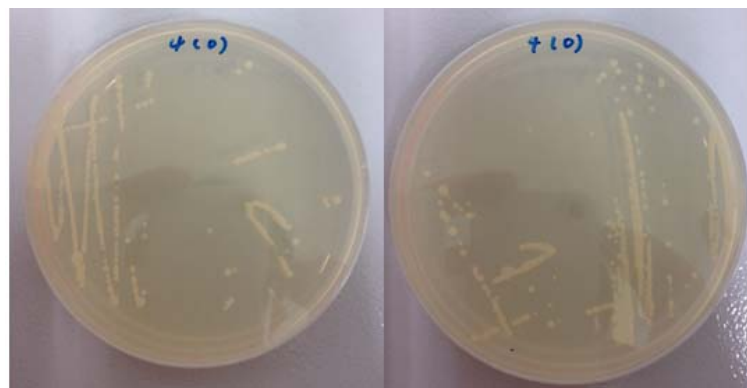


圖 37 營養缺陷型篩選條件 4 (O)

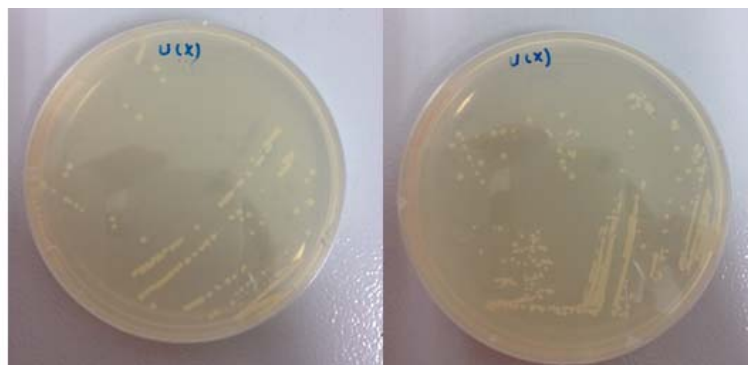


圖 38 營養缺陷型篩選條件 U (X)

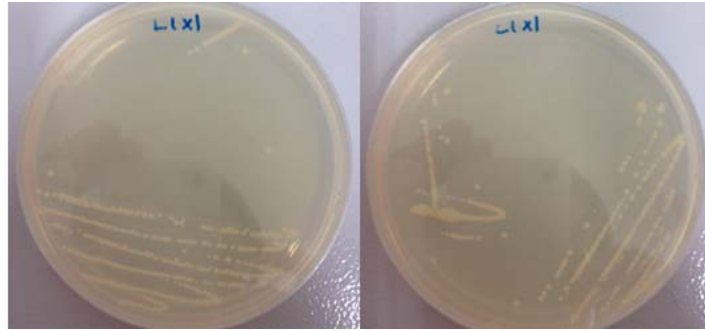


圖 39 營養缺陷型篩選條件 L (X)

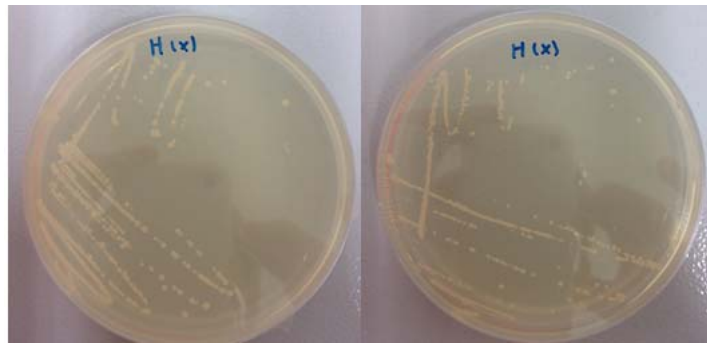


圖 40 營養缺陷型篩選條件 H (X)

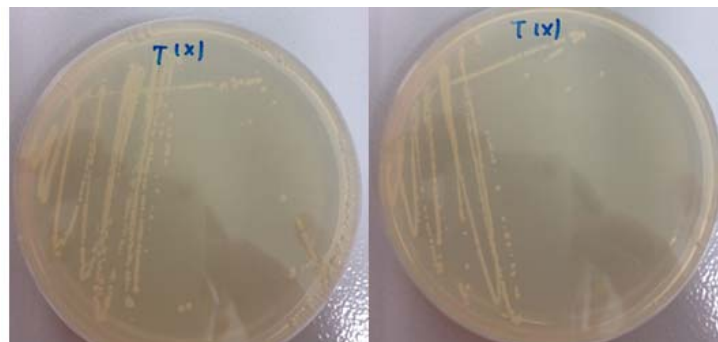


圖 41 營養缺陷型篩選條件 T (X)

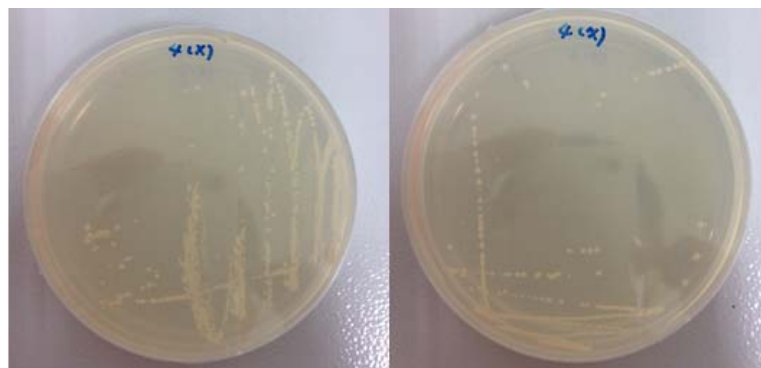


圖 42 營養缺陷型篩選條件 4 (X)



由上述結果得知，*Saccharomyces cerevisiae* 20270 在 4 種胺基酸都不添加的條件下 4(X)，菌株依然能夠生長，表示菌株沒有營養缺陷型態存在。

#### (四)馴化試驗

本研究將現有之共發酵菌株 Y15，利用 YPX(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Xylose)人工培養基繼代培養馴化 20 代及 40 代。再利用 YPD(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose)人工培養基連續繼代培養 10 代，進行菌株穩定性測試，結果如圖 43 所示。

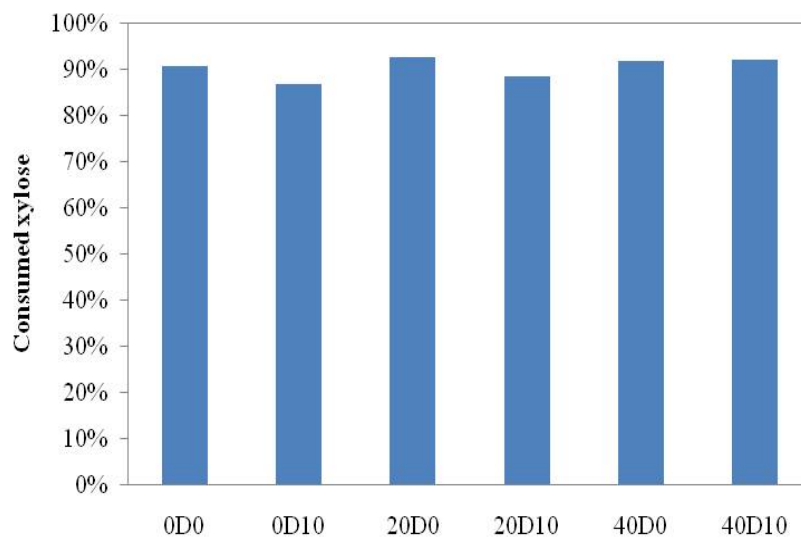


圖 43 共發酵菌株穩定性測試

實驗結果顯示，未馴化菌株 Y15 之木糖消耗率從 90.7%降低至 86.9%，馴化 20 代之菌株木糖消耗率從 92.7%降低至 88.4%，馴化 40 代之菌株木糖消耗率無顯著差異，維持在 92.0%。因此，由實驗結果得知共發酵菌株經由馴化後，穩定性有上升的趨勢。然而，酒



精產率與木糖醇產率並無顯著差異。(0D0 表示未馴化共發酵菌株 Y15，20D0 表示 Y15 利用 YPX 人工培養基馴化 20 代，40D0 表示 Y15 利用 YPX 人工培養基馴化 40 代，0D10 表示未馴化菌株 Y15 以 YPD 人工培養基繼代培養 10 代，20D10 表示 20D0 以 YPD 人工培養基繼代培養 10 代，40D10 表示 40D0 以 YPD 人工培養基繼代培養 10 代。)

#### (五)抑制物耐受力試驗

圖 44 結果顯示，發酵 24 小時，發酵初始醋酸濃度為 2、4、6 與 8 g/L 時，菌體濃度分別是控制組(C)的 99.9%、94.1%、84.3%與 77.1%。因此，隨著發酵初始醋酸濃度的增加，菌株生長被抑制的效果也越明顯；發酵 28 小時，發酵初始醋酸濃度為 2、4、6 與 8 g/L 時，菌體濃度分別是對照組的 99.9%、96.7%、86.2%與 77.8%。因此，當發酵初始醋酸濃度大於 4 g/L 以上時，菌株生長被醋酸抑制之程度可達 15-23%。

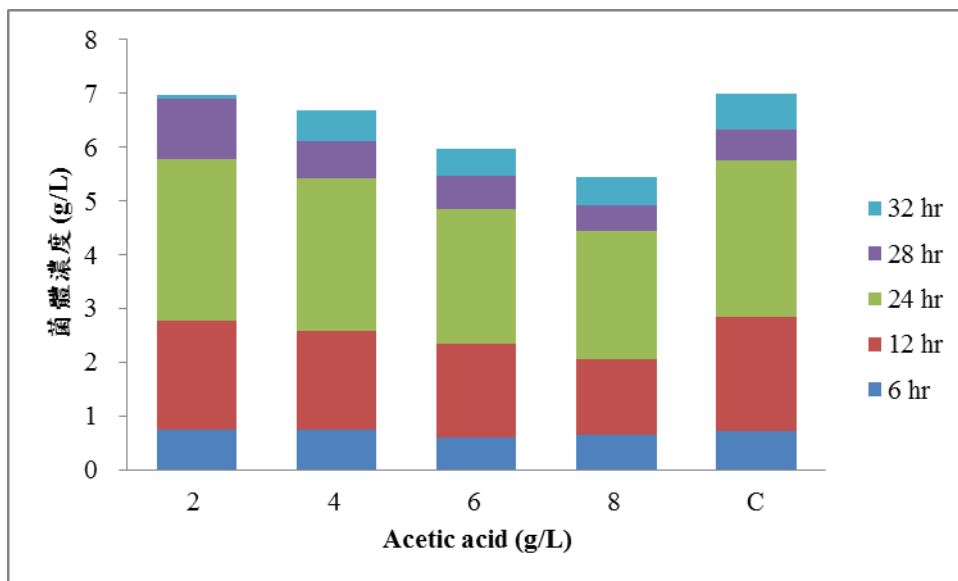


圖 44 醋酸對菌株生長之影響

圖 45 結果顯示，經 24 小時發酵，當發酵初始 Furfural 濃度為 0.5、1、2 與 3 g/L 時，菌體濃度分別為控制組(C)之 93.7%、92.9%、71.3%與 44.9%。因此，隨著發酵初始 Furfural 濃度的增加，菌株生長明顯地被抑制；經 28 小時發酵，當發酵初始 Furfural 濃度為 0.5、1、2 與 3 g/L 時，菌體濃度分別為控制組(C)之 97.5%、94.5%、80.8%與 62.3%。由以上結果得知，當發酵初始 Furfural 濃度大於 1 g/L 時，菌株生長被 Furfural 抑制之程度在 7-55%。

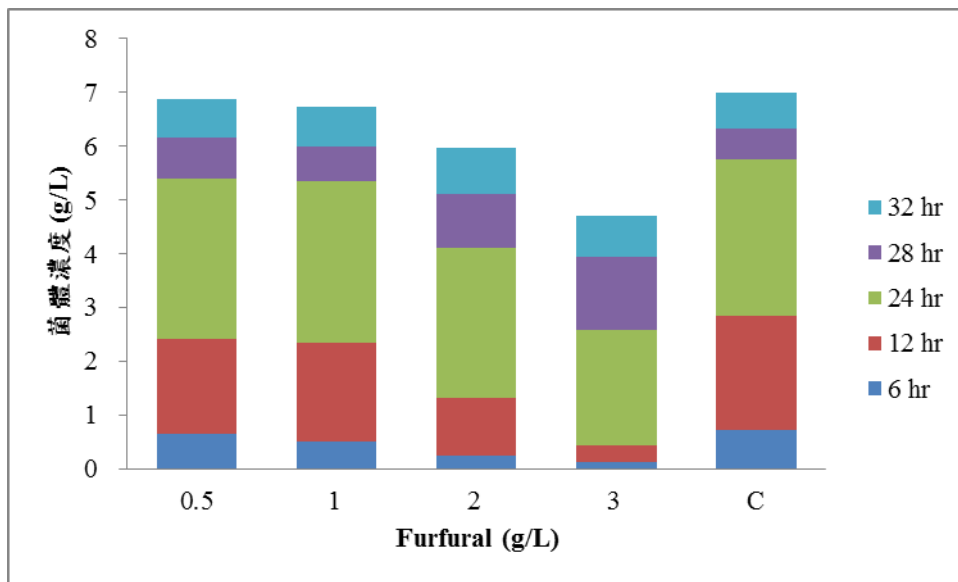


圖 45 Furfural 對菌株生長之影響

由圖 46 結果得知，經發酵 24 小時，當發酵初始 EtOH 濃度為 2、4、6、8 與 10%時，菌體濃度分別為控制組(C)之 79.0%、74.1%、22.1%、1.9%與 1.6%。因此，隨著發酵初始 EtOH 濃度之增加，菌株生長被抑制的效果也越明顯；經 28 小時發酵，當發酵初始 EtOH 濃度為 2、4、6、8 與 10%時，菌體濃度分別為控制組(C)之 84.2%、84.8%、20.9%、2.6%與 1.8%。由以上結果得知，當發酵初始 EtOH

濃度大於 2%時，菌株生長被 EtOH 抑制之程度可達 20-98%以上。

由以上實驗結果得知，菌株生長皆會受到這些抑制物的影響，發酵初始醋酸濃度大於 4 g/L、初始 Furfural 濃度大於 1 g/L，以及 EtOH 濃度大於 2%時，菌株生長會受到不同程度之抑制。

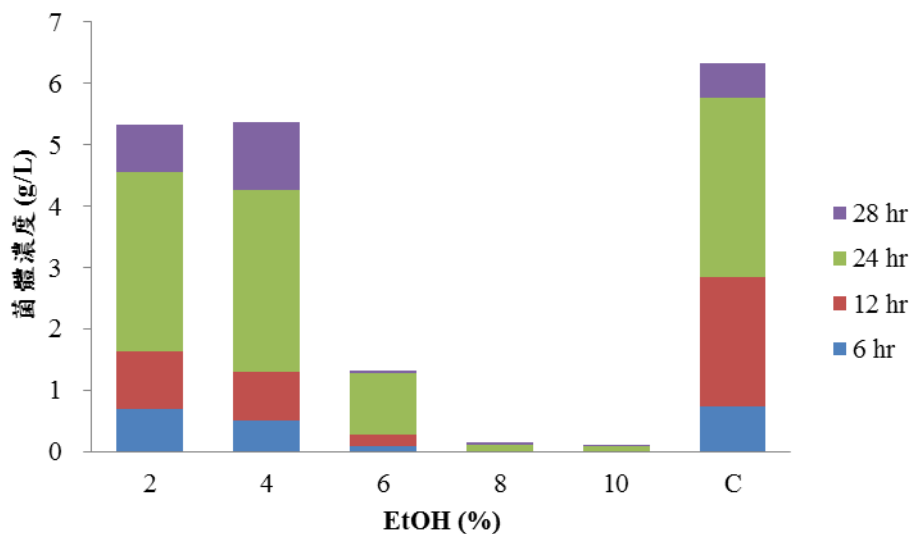


圖 46 EtOH 對菌株生長之影響

由圖 47 結果得知，經 24 小時發酵，控制組木糖利用率為 88%，當發酵初始醋酸濃度為 2、4、6 與 8 g/L 時，木糖利用率分別為 88、87、85 與 81%，木糖利用率抑制的程度在 10%以內；經 28 小時發酵，控制組木糖利用率為 94%，控制組木糖利用率為 94、94、92 與 90%。因此，由以上結果得知，木糖利用率在發酵初始醋酸濃度為 2、4、6 與 8 g/L 情況下，被醋酸抑制的程度在 5-10%。

由圖 48 結果得知，經 24 小時發酵，控制組之酒精產率為 0.32 g/g，當發酵初始醋酸濃度為 2、4、6 與 8 g/L 時，酒精產率也可達 0.29~0.30 g/g。而木糖醇產率則無顯著影響。

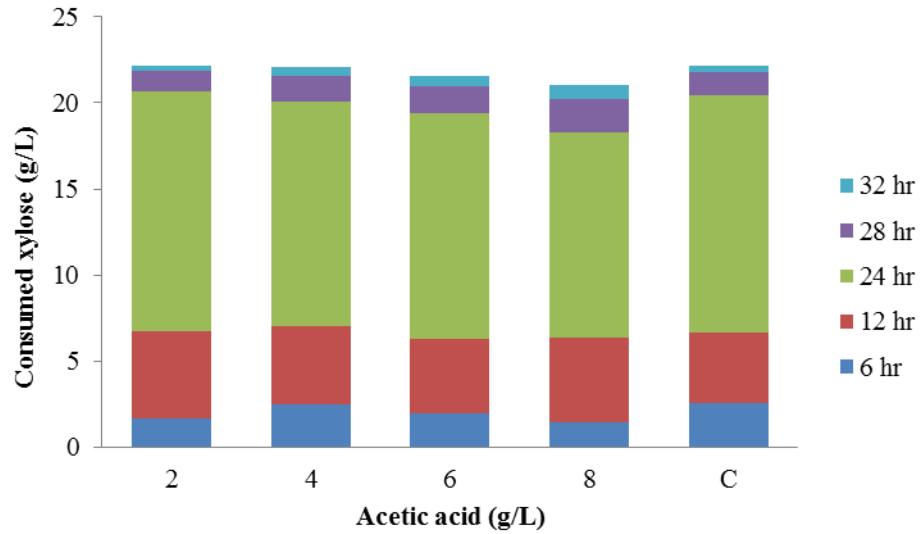


圖 47 醋酸對木糖利用率之影響

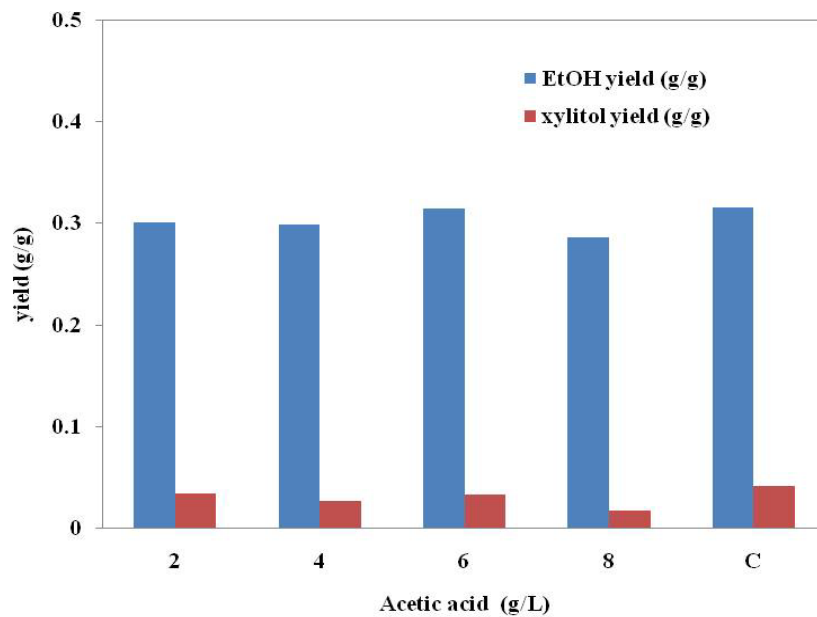


圖 48 醋酸對木糖轉化酒精及木糖醇產率之影響

由圖 49 結果得知，經 24 小時發酵，控制組之木糖利用率為 88 %，當發酵初始 Furfural 濃度分別為 0.5、1、2 與 3 g/L 時，木糖利用率分別為 85、80、63 與 41 %，可見當發酵初始 Furfural 濃度大於 1 g/L 時，木糖利用率有顯著下降趨勢，抑制程度在 3-50%；經 28

小時發酵，控制組之木糖利用率為 94 %，控制組木糖利用率分別為 92、91、81 與 59 %。因此，由以上結果得知，當發酵初始 Furfural 濃度大於 1 g/L 時，木糖利用率受到較明顯的抑制情況，抑制的程度在 10% 以上。

由圖 50 結果得知，經 24 小時發酵，控制組之酒精產率為 0.32 g/g，而控制組之酒精產率分別為 0.30 g/g、0.29 g/g、0.29 g/g 與 0.16 g/g。因此，當發酵初始 Furfural 濃度大於 3 g/L 時，酒精產率受到較顯著之影響。然而，Furfural 對木糖醇產率並無顯著影響。

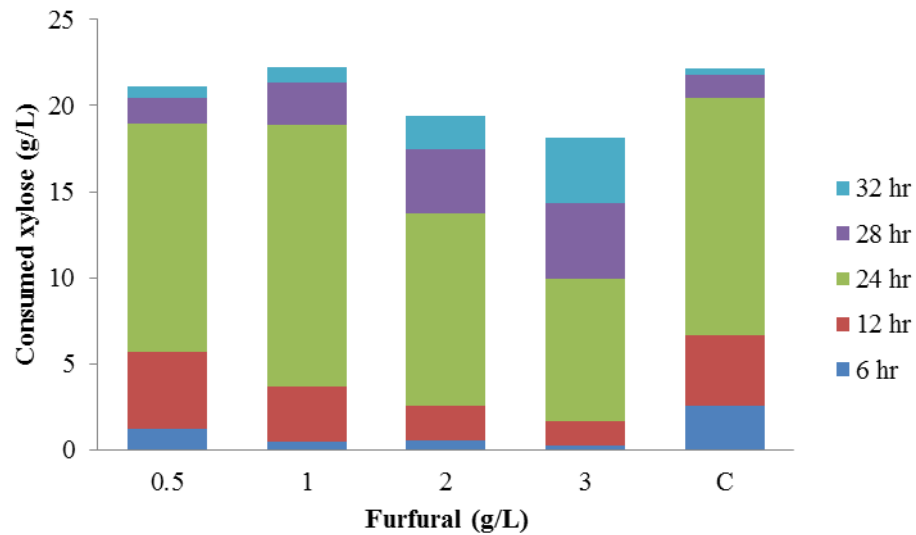


圖 49 Furfural 對木糖利用率之影響

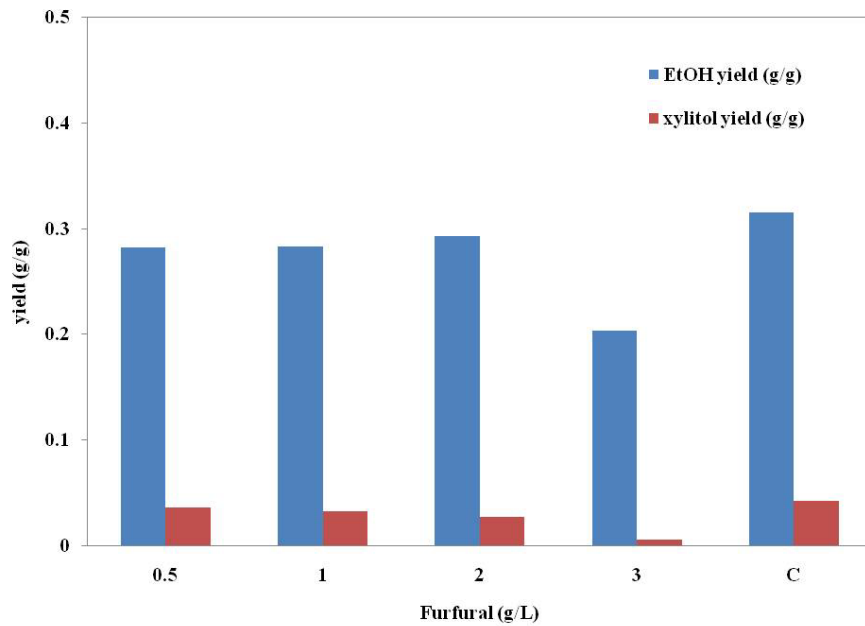


圖 50 Furfural 對木糖轉化酒精及木糖醇產率之影響

由圖 51 結果得知，經 24 小時發酵，控制組木糖利用率為 88%，當發酵初始 EtOH 濃度分別為 2、4、6、8 與 10%，木糖利用率分別為 84、64、28、6 與 1%。因此，當發酵初始酒精濃度在 2-10%時，木糖利用率抑制範圍在 5-99%以上；經 28 小時發酵，對照組木糖利用率為 94%，控制組之木糖利用率分別為 91、82、29、6 與 2%。由以上結果得知，當發酵初始酒精濃度大於 6%時，木糖利用率受到顯著抑制影響，抑制程度在 70%以上。

由圖 52 結果得知，經 24 小時發酵，控制組之酒精產率為 0.32 g/g，而當發酵初始 EtOH 濃度分別為 2、4、6、8 與 10%時，酒精產率分別為 0.27 g/g、0.13 g/g、0.07 g/g、0.07 g/g、0.03 g/g。因此當發酵初始酒精濃度在 2-10%時，酒精產率抑制範圍在 15-80%。

綜合上述結果，發酵初始抑制物濃度對菌株有相當程度之影響。針對共發酵菌株 Y15 之發酵策略，初始發酵醋酸濃度應在 4 g/L

以內，Furfural 濃度應在 1 g/L 以內，以及初始 EtOH 濃度應在 2% 以內對菌株的發酵影響較低。

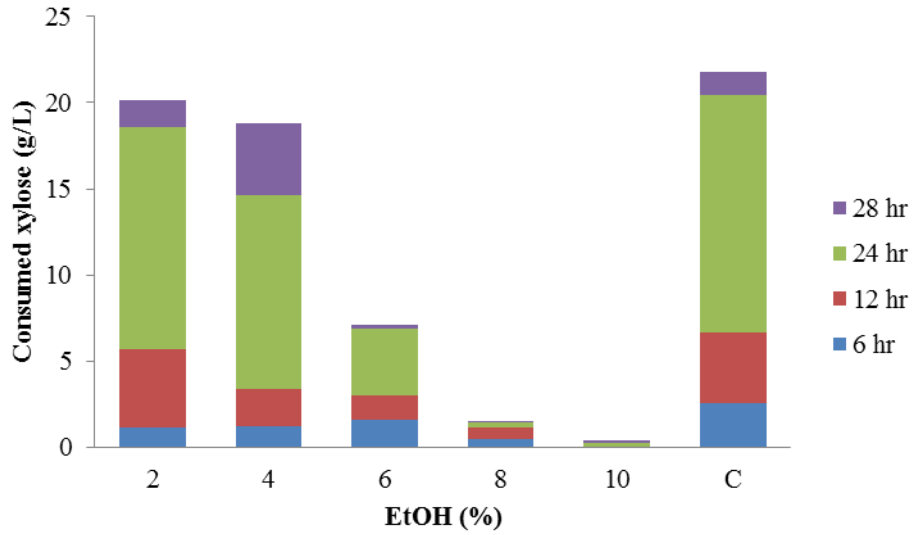


圖 51 酒精對木糖利用率之影響

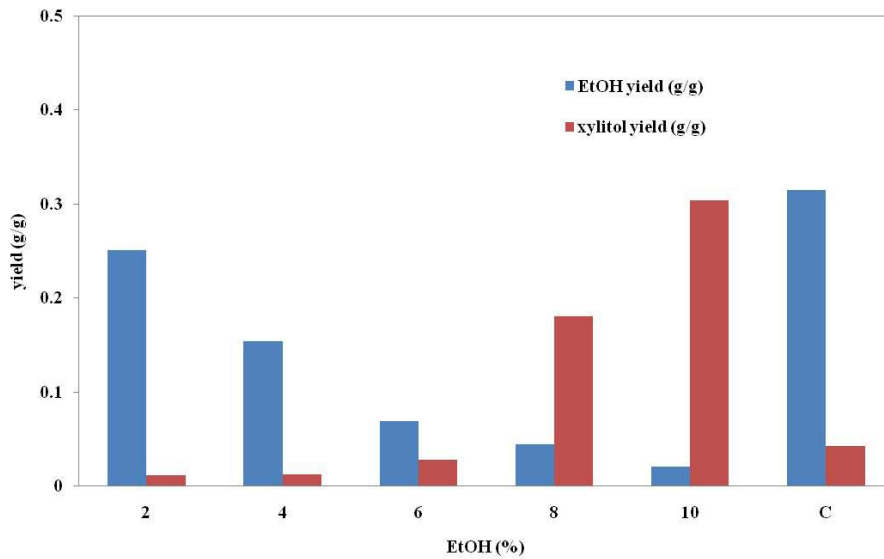


圖 52 酒精對於木糖轉化酒精及木糖醇產率之影響

### 三、結論

#### (一) 纖維原料水解液共發酵菌株篩選

1. 本研究篩選出四株菌皆為革蘭氏陰性菌，均是屬於能適應鹼性環境且生長較好之嗜鹼菌，菌株在中性環境條件下，亦可有良好之成長及分解效果。
2. 從微生物動力學角度來看，菌株 IL01 生長動力分析結果較其他三株要好，其  $\mu_{\max}=0.386(1/\text{hr})$  最快且  $K_s=21.802(\text{g/L})$  最高，但菌株 IL03 的  $\mu_{\max}=0.339(1/\text{hr})$ 、 $K_s=12.510(\text{g/L})$ ，是四株菌中第二高，加上高效率的轉化能力，潛力相對比 IL01 更高。
3. 從四株菌發酵與共發酵代謝產物分析發現，lactic acid 的產生只與木糖代謝有關，在以葡萄糖當碳源時並未產生。而 Xylitol 只有共發酵時才出現在產物當中，但還是能看出與木糖的濃度有顯著的關係。
4. 本研究確實從土壤中篩選出具有高效率轉化木糖之菌株 IL03，且在葡萄糖與木糖共發酵環境下也有高效率表現，為一株具有發展潛力之木糖轉化菌。

#### (二) 共發酵菌株基因改良

1. 本研究成功建構染色體鑲嵌 NADP<sup>+</sup> 依賴型酵素基因重組菌株，並從 48 株重組菌株中篩選出 7 株生長速率較快之菌株進行木糖發酵測試。其中菌株 9,14,16 酒精產率可達 0.35-0.36 g/g。此外，24 小時發酵木糖利用率可達約 90% 以上。
2. 本研究將基因重組共發酵菌株經由單一木糖碳源培養基繼代馴化 40 代後，進行重組基因穩定性測試結果顯示，馴化 40 代菌株之重組基因穩定性有顯著提升。未來將進行馴化菌株之放大



規模發酵測試，分析菌株在大規模發酵之穩定性。

3. 本研究針對重組菌株對纖維水解液抑制物耐受能力進行分析，在菌株生長之影響分析顯示，發酵起始醋酸濃度大於 4 g/L 時，抑制程度範圍約為 15-23%；Furfural 濃度大於 1 g/L 時，抑制程度範圍約為 30-55%；酒精濃度大於 2%時，抑制程度範圍在 20-90%。在木糖代謝影響分析顯示，發酵起始醋酸濃度在 8 g/L 以下，對木糖代謝抑制程度範圍在 10%以下；Furfural 濃度大於 1 g/L 時，抑制程度範圍在 10%以上；酒精濃度大於 2%時，抑制程度範圍在 10%以上。瞭解菌株之基本抑制物耐受能力，未來可依據此實驗結果規劃纖維水解液之馴化測試。
4. 共發酵菌基因改良部分已有初步結果，在後續發酵測試部分將加入實際纖維水解液發酵測試以及水解液馴化測試，以增加菌株抑制物耐受能力及應用潛力。

#### 肆、參考文獻

1. 行政院原子能委員會，第二代生質能源-纖維酒精，2月18日訊息公告(2008)。
2. Eliasson A, Christensson C, Wahlbom CF and Hahn-Hagerdal B, “Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures,” *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 8, pp.3381-2286(2000).
3. Zaldivar J, Nielsen J and Olsson L, “Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.56, No.1-2, pp17-34(2001).
4. 國家科學委員會自然處大氣科學審議小組，氣候變遷論壇會議紀錄，全球變遷通訊雜誌，53期，第13-19頁(2007)。
5. 法務部，再生能源發展條例，全國法規資料庫，7月8日公布法規(2009)。
6. Dale, B., “Biofuels: Thinking Clearly about the Issues,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, pp.3885-3891(2008).
7. Vonsivers M and Zacchi G, “A Technoeconomic Comparison of 3 Processes for the Production of Ethanol from Pine,” *Bioresource Technology*, Vol.51, No.1, pp43-52(1995).
8. 許原彰，“溫度對於 *Pseudomonas putida* 鄰苯二酚加氧酵素之活性與結構的效應”，碩士論文，中央大學生命科學研究所，中壢市(2000)。
9. Akinori Matsushika and Shigeki Sawayama, 2011. Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces*

- cerevisiae strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 48, 466–471.
10. Mingyong Xiong, Guohua Chen, John Barford, 2011. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. *Bioresource Technology*. Vol. 102, 9206–9215.
  11. Paramjit K. Bajwa, Dominic Pinel, Vincent J.J. Martin, Jack T. Trevors, Hung Lee, 2010. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 81, 179–186.
  12. Thomas Miosga and Friedrich K. Zimmermann, 1996. Cloning and characterization of the first two genes of the non-oxidative part of the *Saccharomyces cerevisiae* pentose-phosphate pathway. *Current Genetics*. Vol. 30, 404–409.
  13. V Senthilkumar and P Gunasekaran, 2005. Bioethanol production from cellulosic substrates: Engineered bacteria and process integration challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 64, 845–853.