

# 環境因子對*Klebsiella sp. Wu1*菌株生產2,3-丁二醇之影響

陳功弦<sup>1</sup> 林雯婷<sup>1</sup> 黃端文<sup>2</sup> 陳小玲<sup>3</sup> 施英隆<sup>4</sup> 吳建一<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學生物產業科技學系大學部

<sup>2</sup>大葉大學生物產業科技學系研究生

<sup>3</sup>大葉大學分子生物科技學系教授

<sup>4</sup>大葉大學環境工程學系教授

<sup>5</sup>大葉大學生物產業科技學系副教授

\*E-mail: jywu@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究自農業廢水中篩選出可生產2,3-butanediol (簡稱2,3-BDO, 2,3-丁二醇)的菌株, 經16S-rDNA鑑定屬於*Klebsiella sp. Wu1* 菌屬, 並進一步的探討環境因子對*Klebsiella sp. Wu1* 菌株生產2,3-BDO之影響。實驗結果顯示以peptone (0.25 g/L)為氮源及甘油(40 g/L)為碳源, 2,3-BDO產量及產力分別為8.4 g/L和0.63 ( $Y_{p/s}$ , g-BDO/g-glycerol), 甘油消耗率為85%, 生長可達3 g/L; 而當初始甘油濃度高於40 g/L時, 則會有基質抑制的現象發生。在環境因子的條件下, 控制初始pH為5.5, 以轉速為150 rpm培養, 2,3-BDO產量為8.5 g/L。另外, 當培養溫度從25°C增加至35°C, 2,3-BDO產量會隨溫度增加而增加。

關鍵字: 2,3-butanediol、甘油、*Klebsiella sp. Wu1*

## 1. 前言

近來, 環境和能源危機這兩種重要的問題越來越受到重視。環境的問題主要為全球暖化。大家都知道使用化石燃料會造成全球暖化, 因此, 需要發展一個可再生之乾淨能源來取代化石燃料來降低CO<sub>2</sub> 的排放。另一個問題是能源危機, 這個問題會使得全球原油價格增加進而使國家的能源處境和地方的社會生活受到很大的衝擊。因此, 為了解決上述重要的問題我們必須發展一個可再生的能源。其中生質柴油即是近十年來熱門的生質能源之一, 生質柴油可以利用植物油和動物油經酯化反應來獲得, 而此反應過程會伴隨著10% (v/v)的副產物甘油(alcohol glycerol) (1,2,3-propanetriol, 又稱作glycerin 或者glycerine)或稱生質甘油(bio-glycerol)產生。近來, 全球的生質柴油生產量由2001 年的912million liters 增加至2008 年的12,225 million liters, 且預測於2013 年末則會增加至23,538 million liters (PRLog.Org - Global Press Release Distribution, 2009), 這也使得生質甘油的量也隨之大幅增加。因為生質甘油中含有高濃度鹽類而無法被利用, 因此目前大都是當成廢棄甘油。若再經過純化製備成較精純之工業級甘油發現其成本非常不符經濟效益。所以, 生質柴油生產過程中之副產物生質甘油的處理與利用已成為現今勢必解決之問題。因此, 本研究最終期能應用於生質甘油轉變為其他有價值的產物, 不但能降低生產的成本也能達到廢棄物回收利用的目的。

## 2. 材料與方法

### 2.1 懸浮污泥馴養與培養基

本研究所使用的活性污泥是來自工業廢水及農業廢水及污泥混合培養而成。使用含有甘油的培養基(培養基成分如表1所示)進行馴養並定期補充新鮮培養基, 定期取點分析產物成分, 直到2,3-BDO的產生。

表1 培養基組成

Composition	concentration (g/L)	Trace Element solution	
Glycerol	20	Ingredients	concentration (g/L)
KCl	0.75	ZnCl <sub>2</sub>	34.2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.38	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.28	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.85
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.26	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.31
Citric acid	0.42	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	23.8
YE	2		
Trace Element solution	0.3 mL/L		

## 2.2 菌株篩選

自馴養後確定具有2,3-BDO生產能力之活性污泥中篩選具有2,3-BDO生產能力之純菌菌株。將採集各階段之污泥樣本隨機取樣，置於滅菌試管並加入無菌水，經振盪混合均勻後，取其懸浮液體作系列稀釋，之後倒入含有前培培養基之Agar plate上進行平板培養，從中挑選不同菌落將其純化。得到單一菌種後，先藉由顯微鏡觀察菌株外觀型態來初步判斷是否為純菌，若判斷屬純菌菌株再藉由16S rRNA進行鑑定。

## 2.3 發酵培養

本研究以150mL的生產培養基，接種比為10% (w/v)之菌體接種至2,3-BDO生產培養基中。為了探討不同pH值的影響，可分一組以6 N HCl或NaOH調整培養基的初始pH值，pH分別為5、5.5、6.2、6.9、7.4、7.8；另一組pH調整則是以磷酸緩衝溶液，pH分別為5.5、6.2、6.9、7.4。除了探討pH值，還探討了不同氮源濃度(0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 g/L)，甘油濃度(0、10、20、30、40、50、60、80、100及120 g/L)，及攪拌速率與溫度的環境因子探討。

### 2.4.1 菌量分析

每個樣品隨著取點時間各取2 mL 發酵液，將菌液離心去除上清液，烘箱設定24小時105°C將離心管中的菌量進行烘乾測量，已確定分析其菌量。

### 2.4.2 pH測定

Mettler Toledo220 酸鹼測定儀測定發酵液中的pH

### 2.4.3 甘油、2,3-BDO及其副產物之分析

利用氣相層析儀(Gas Chromatography, GC, SHIMADZU, GC-14B, Kyoto, Japan)，並裝備火焰離子偵測器(flame ionization detector, FID)及GC 管柱 Stabilwas (30m×0.53mm×1µm, Restex, PA, USA)，而 inject、detector及oven的溫度分別為200、220及225°C，來偵測發酵處理後產生的2,3-BDO及其他副產品。

### 3. 結果與討論

#### 3.1 可生產2,3-butanediol之活性污泥馴養及菌株

為了篩選出適合利用甘油來轉化2,3-butanediol(簡稱2,3-BDO)之菌株，實驗室來自各個地點採集樣品及污泥樣品，如工業廢水、工業污泥等各種不同地點之活性污泥樣品。使用含有甘油的培養基，藉由曝氣方式進行馴養並持續補充新鮮的培養基，進行取點分析產物成分，直到有2,3-butanediol產生，爾後再進行菌株篩選。

經由各地點的工業廢水、農業廢水及農業污泥所採集的污泥進行培養，結果如圖1結果所示，2,3-BDO產量分別為(a)0.75；(b) 1.53；(c) 0.66；(d) 0.98；(e) 0.84；(f) 2.12；(g) 2.69；(h) 0.67；(i) 0.70；(j) 1.21；(k) 1.38；(l) 4.96；(m) 3.84；(n) 0.74；(o) 0.92；(p) 1.83；(q) 1.6；(r) 1.23；(s) 1.09；(t) 1.35；(u) 1.31；(v) 1.32；(w) 1.65；(x) 1.54；(y) 1.01；(z) 0.76；(A) 0.77 g/L，由結果看來，從工業廢水所採取的樣品所生產2,3-BDO產量為1.53 g/L是由紡織廠1所採樣，其餘工業廢水的地點的樣品生產2,3-BDO產量皆不到1 g/L，由農業廢水所採集的樣品中，養豬場1採集的樣品2,3-BDO產量為2.05 g/L；養豬場2所採集的樣品2,3-BDO產量為2.69；畜牧場2採集的養品2,3-BDO產量為4.96 g/L；畜牧場3採集的樣品2,3-BDO產量為3.84 g/L；牧場1採集的樣品2,3-BDO產量為1.83 g/L；牧場2採集的樣品2,3-BDO產量為1.6 g/L，由農業污泥所採集的樣品中，以大葉大學門口右側水溝泥巴1所採樣的樣品2,3-BDO產量為1.65 g/L；大葉大學門口水溝泥巴2採集的樣品2,3-BDO產量為1.54 g/L。

因此，接下本研究將從所採集的樣品進行測驗：(b)紡織廠#1；(f)養豬場#1；(g)養豬場#2；(l)畜牧場#2；(m)畜牧場#3；(p)牧場#1；(q)牧場#2；(x)大葉大學門口水溝土壤2；(y)大葉大學附近農田污泥1，以上所述的樣品，產量皆有達到1.5 g/L以上。

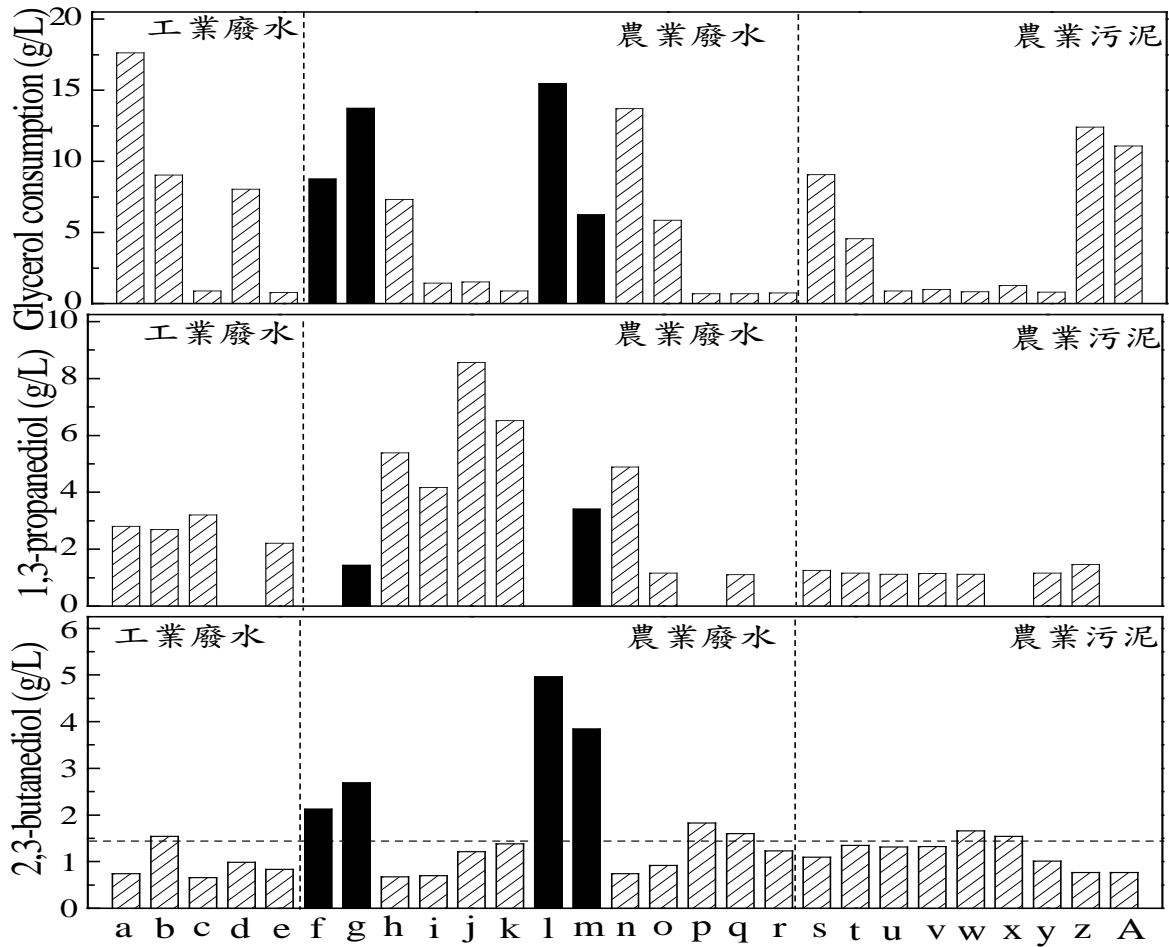


圖1. 以不同來源的工業廢水，工業污泥和微生物農業污泥篩選生產2,3-BDO之菌株

Glycerol, 20 g/L; peptone, 2 g/L, agitation rate 150rpm, 35°C

Industrial wastewater: (a)造紙廠1; (b)紡織廠#1; (c)紡織廠#2; (d)紡織廠#3; (e)紡織廠#4

Agricultural wastewater: (f)養豬場#1; (g)養豬場#2; (h)養雞場#1; (i)養雞場#2;

(j)養殖場#1; (k)養殖場#2; (l)畜牧場2; (m)畜牧場#3;

(n)釣蝦場#1; (o)釣蝦場#2; (p)牧場#1; (q)牧場#2; (r)牧場#3.

Agricultural sludge or soils: (s)農田污泥1; (t)農田污泥2; (u)大葉大學門口樹叢土壤1;

(v)大葉大學門口左側樹叢土壤2; (w)大葉大學門口右側水溝土壤#1;

(x)大葉大學門口水溝土壤#2; (y)大葉大學附近農田污泥#1;

(z)大葉大學附近農田污泥#2; (A)大葉大學附近農田污泥#3.

### 3.2 經由活性污泥篩選出生產2,3-butanediol 之菌株並進行篩選與鑑定

本研究以產量達2g/L以上的9種樣品進行2,3-BDO產量穩定性試驗結果發現(f)養豬場#1及(g)養豬廠#2，兩種樣品中所生產的2,3-BDO產量很穩定，然而(l)畜牧場#2和(m)畜牧場#3，這兩種樣品的穩定性沒有上述兩者來的好。

本研究經由(f)養豬場#1；(g)養豬廠#2採集樣品經馴養後確定有2,3-BDO生成的活性污泥劃線培養於含有甘油的agar plate上，置於shake轉速為150rpm及溫度為35°C培養3-4天，以白金耳勾取單一菌落於固態培養基上進行化線分離，重複上述動作直到出現單一菌落，再將分離出的單一菌落培養於含有甘油之液

態培養基，於轉速為150rpm，35°C培養箱培養3-4天後，利用GC分析來確定是否有生產2,3-BDO能力之菌株，接著以16S rDNA進行菌種鑑定。

經過不斷篩選可獲得不同菌落型態的菌株，將本實驗所篩選出之菌株由本實驗室進行鑑定，再進行16s-rDNA序列分析，所得到的序列分析與NCBI之基因之料庫比對，再利用BioEdit與MEGA4.0兩套軟體繪出菌株之親源圖，此菌株皆屬於*Klebsiella* 菌屬為*Klebsiella* sp. Wu1，結果如圖2所示。已有許多學者篩選出以甘油做為基質生產2,3-butanediol之*Klebsiella* 菌屬，如*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*及*Klebsiella planticola* (Biebl *et al.*, 1998; Hao *et al.*, 2008; Jarvis *et al.*, 1997)。

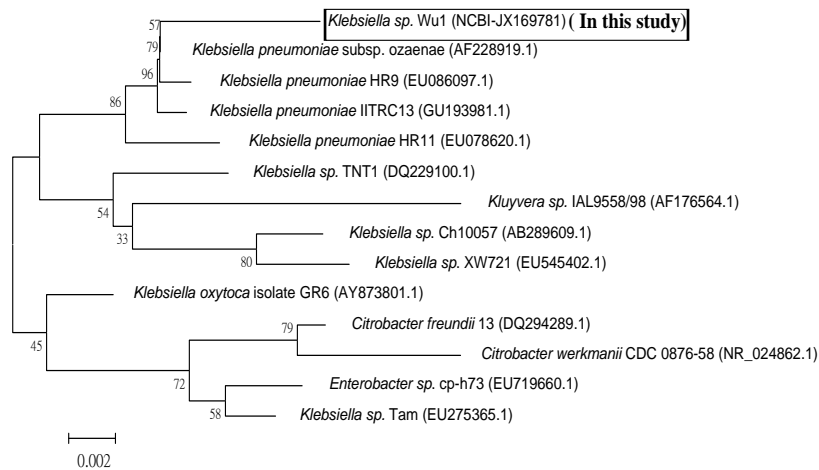


圖2 *Klebsiella* sp. Wu1之親緣圖

### 3.3 pH對篩選菌株生產2,3-BDO之影響

文獻指出pH對2,3-BDO生產是最重要的影響因素(Petrov and Petrova, 2010)。因此，本研究即探討不同初始pH對*Klebsiella* sp. Wu1 菌株生產2,3-BDO之影響。本研究其分為兩組同時進行，一組用6N NaOH及HCl將培養基出使的pH分別調整為5.0~8.0左右；另一組pH調整則是以磷酸緩衝溶液，其結果如圖3所示。

圖3為pH 值 *Klebsiella* sp. Wu1 菌株生長影響及發酵液中pH之變化情形。對此兩菌株，發現以緩衝溶液調整pH值，確實對發酵液之pH較具緩衝效果，pH變化趨勢較少；反觀，以NaOH或HCl調整pH實驗組，發現pH 均在一天之內明顯下降，且之後即不再有變化。另外，亦發現緩衝液調整pH與HCl或NaOH調整pH對兩株菌生長影響不大。

圖4為pH對*Klebsiella* sp. Wu1 菌株生長2,3-BDO及各種生產力之影響。由圖4可知，對*Klebsiella* sp. Wu1菌株而言，pH在5.0-5.5之間；另外，在2,3-BDO生產力部份，而此菌株在以NaOH或HCl調整pH5.0-8.0之間，發現影響不大，但若以磷酸緩衝溶液調整之組別，對兩株菌而言，隨pH愈高，其生產力愈小。

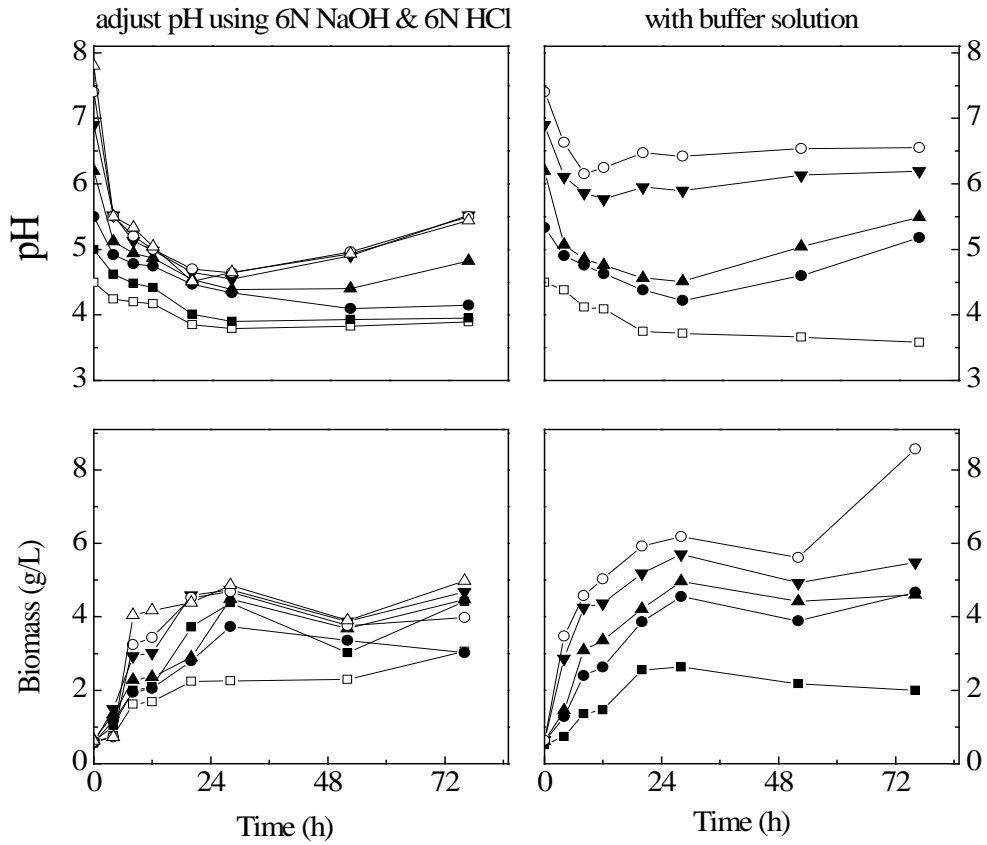


圖3. 在不同pH值條件下 *Klebsiella* sp. Wu1 之生長曲線  
 pH : (□) Blank: pH4.5 ; (■) pH5 ; (●) pH5.5 ; (▲) pH6.2 ; (▼) pH6.9 ; (○) pH7.4 ;  
 (Δ) pH7.8  
 Carbon sources: glycerol (20 g/L); Temperature :35±2°C ; Agitation rate:150 rpm

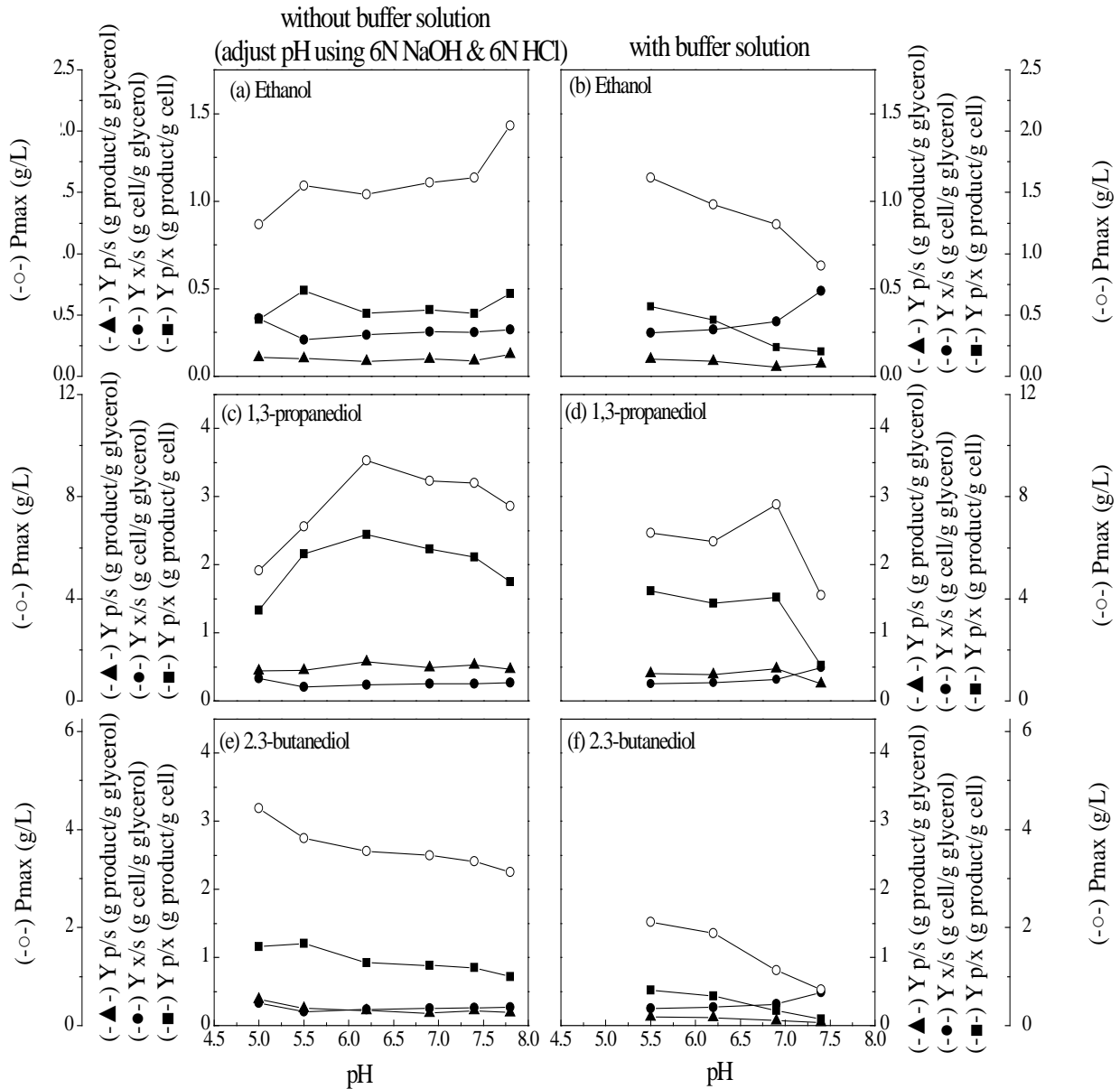


圖4. 不同pH對*Klebsiella sp. Wu1*生產2,3-BDO產量及產力之影響  
Carbon sources: glycerol (20 g/L); Temperature :35±2°C; Agitation rate:150rpm.

### 3.4 探討不同氮源種類對2,3-BDO生產之影響

#### 3.4.1 氮源對篩選菌株*Klebsiella sp. Wu1*生產2,3-BDO之影響

本研究探討了*Klebsiella sp. Wu1*，如圖5所示，亦利用11種不同氮源種類生產2,3-BDO及副產物的實驗結果。結果顯示在沒有添加任何氮源的條件下，*Klebsiella sp. Wu1* 生產2,3-BDO產量只有1.5g/L，其中以corn steep liquor及peptone為氮源有較佳之產量。當以peptone 為氮源時，2,3-BDO產量可達4 g/L，ethanol產量為1.5 g/L，1,3-PDO產量為3.8 g/L，當以corn steep liquor為氮源時，2,3-BDO產量約有3.5 g/L。在其他文獻中有提到yeast extract通常作為*Bucilles polymyxa* 菌株生產2,3-BDO的氮源 (Laube *et al.*, 1984a,b)，然而，本研究中，以yeast extract作為氮源生產2,3-BDO的產量為2.3g/L，結果顯示yeast extract沒有比peptone產量為4g/L來的高。

由上述的實驗結果，當*Klebsiella sp. Wu1* 菌株利用peptone生產2,3-BDO的產量明顯比其它的氮源來

的高，產量為4 g/L，所以往後的實驗皆以peptone作為最佳氮源。

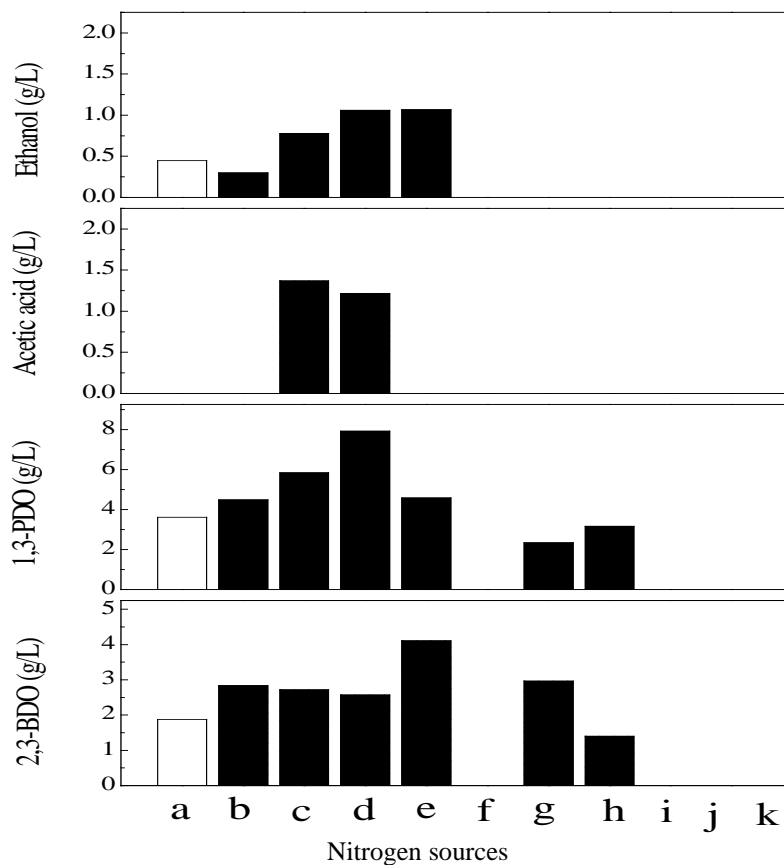


圖5. 不同氮源對*Klebsiella sp. Wu1*生產2,3-BDO產量之影響

Carbon sources: glycerol (20 g/L); initial pH :7.0 ; Temperature :35±2°C;  
Agitation rate: 150rpm

Nitrogen sources : (a) no nitrogen sources; (b) corn steep liquor; (c) Urea ;  
(d) yeast extract; (e) Peptone; (f)(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O;  
(g) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (h) NH<sub>4</sub>Cl; (i) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; (j) NaNO<sub>2</sub>;  
(k) NaNO<sub>3</sub>

### 3.5 氮源濃度對篩選菌株生產2,3-BDO之影響

#### 3.5.1 peptone及(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>對*Klebsiella sp. Wu1* 菌株生產2,3-BDO之影響

圖6為peptone對*Klebsiella sp. Wu1* 菌株生產2,3-BDO及其它副產物之影響。圖6結果顯示當以peptone為氮源時，2,3-BDO產量隨著peptone濃度增加而降低，當peptone濃度為0.25 g/L時，2,3-BDO產量約可達4.27 g/L，但菌株細胞生產力卻是在peptone濃度為1.0~1.5 g/L時較佳，約為1.5~2.0 g-BDO/g-cell。圖7為*Klebsiella sp. Wu1* 菌株的結果得知，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度在6g/L時，2,3-BDO產量為3.74 g/L，也比其他濃度來的好些。

綜合以上結論可知，濃度在6 g/L對*Klebsiella sp. Wu1* 菌株有良好的利用。由於(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>價格較為低廉，且用來作為氮源時，2,3-BDO產量最高。因此，往後研究實驗中，會採用(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以及peptone兩種氮源種類。



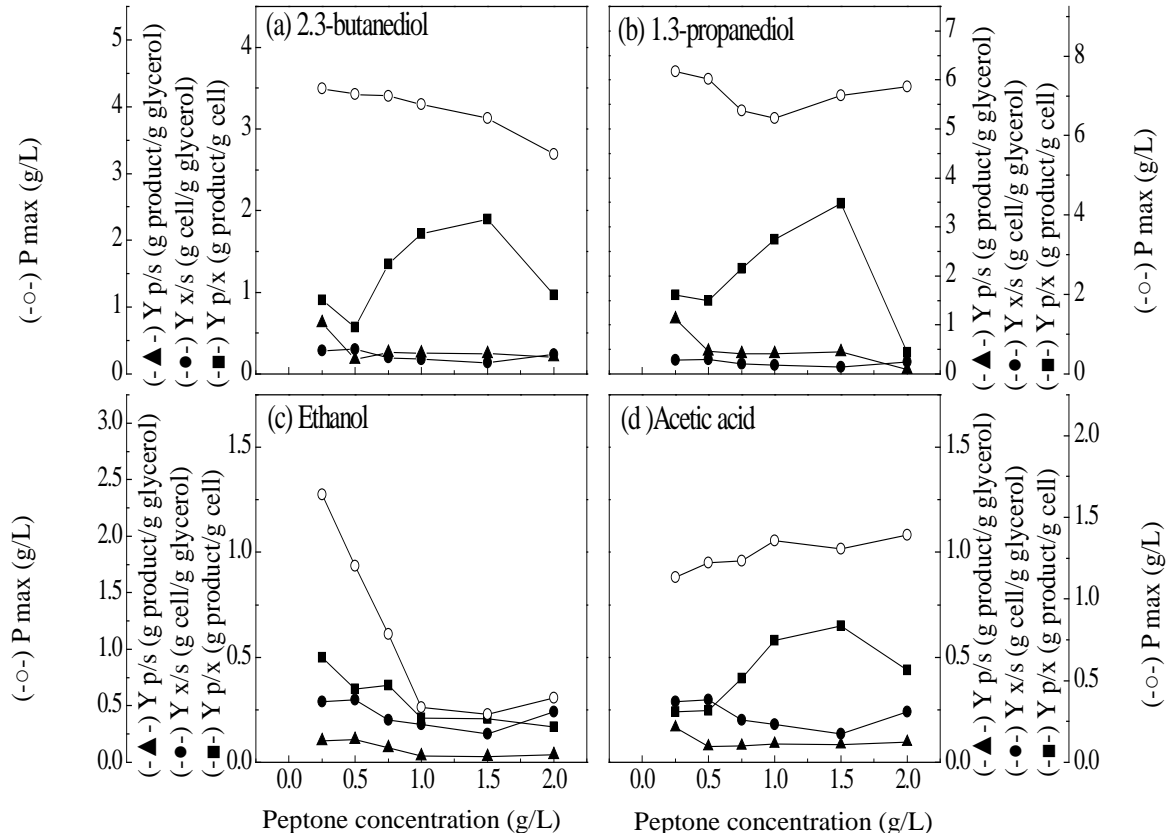


圖6. 不同peptone濃度對*Klebsiella* sp.生產2,3-BDO產量和產力之影響  
(Carbon sources: glycerol (20 g/L); Temperature: 35±2°C; Agitation rate: 150rpm; initial pH5.5).

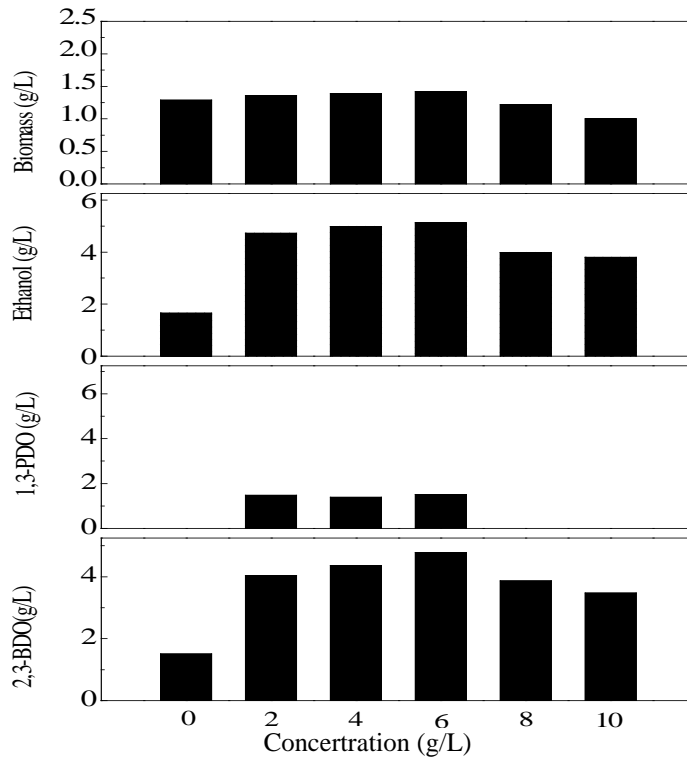


圖7. 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度對*Klebsiella* sp.生產2,3-BDO產量和產力之影響  
(Carbon sources: glycerol (20 g/L); Temperature: 35±2°C; Agitation rate: 150rpm; initial pH5.5)

### 3.6 探討以甘油為主要碳源，額外添加不同碳源條件對 *Klebsiella sp. Wu1* 生產2,3-BDO之影響

#### 3.6.1 額外添加不同碳源對 *Klebsiella sp. Wu1* 菌株生產2,3-BDO之影響

由圖 8 明顯看出，當培養基中含有甘油時，搭配其他碳源，雖然額外添加之碳源消耗降低，但是甘油消耗率除了 glucose 未達 60%，其餘的碳源甘油消耗率均可 60% 以上，尤其是 lactose 更可達 80% 之消耗率。另外，Figure 3-20 中可看出培養基中含有甘油確實 2,3-BDO 高於不含甘油之組別，有趣的是 1,3-PDO 更加明顯，若培養基中不含甘油，完全沒有 1,3-PDO 產出。也就是說當天加兩種碳源時，2,3-BDO、1,3-PDO、ethanol 的產量明顯的比 blank 的 2,3-BDO、1,3-PDO、ethanol 產量還要來的少，以甘油和碳源的消耗來看，甘油幾乎有被消耗，而碳源除了 glucose 消耗 65%，其餘的碳源種類幾乎沒被消耗。在添加碳源且不添加甘油的情況下，實驗結果發現 *Klebsiella sp. Wu1* 利用碳源生產 2,3-BDO 與其它副產物，但產量明顯的少於許多，1,3-PDO 則沒有產量，ethanol 的產量明顯增加，而碳源幾乎被消耗與文獻所提到的實驗結果相同(Hartlep et al., 2002)。由上述可知，*Klebsiella sp. Wu1* 菌株在添加兩種碳源情況下，優先選擇利用甘油轉化 2,3-BDO、1,3-PDO，額外添加碳源則不被利用。相反地，只添加單一碳源的情況下，雖然碳源皆被消耗完，但 2,3-BDO 之產量明顯不多。

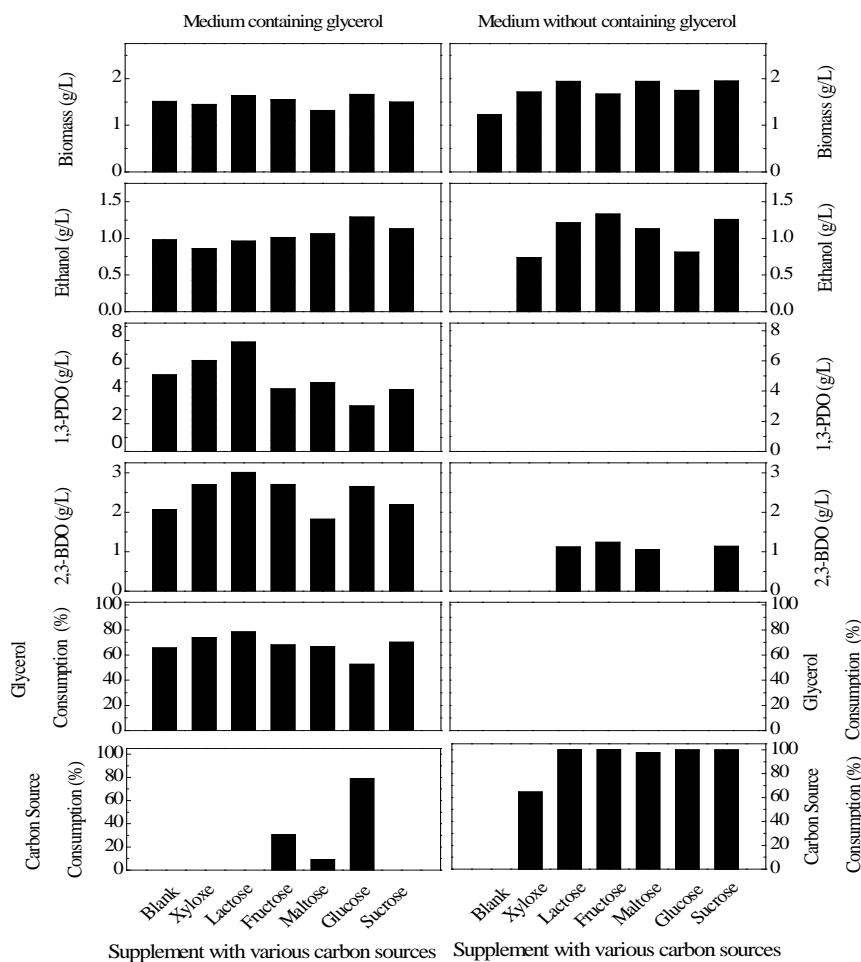


圖8. 有/無添加甘油，額外添加不同碳源對 *Klebsiella sp. Wu1* 生產2,3-BDO之影響

(Carbon sources: glycerol (20 g/L); Temperature: 35±2°C; Agitation rate: 150rpm; initial pH5.5)

### 3.7 甘油濃度對篩選菌株生產2,3-butanediol之影響

由圖9可知，不論培養基中含有lactose，*Klebsiella* sp. Wu1 菌株隨甘油濃度增加至50 g/L才會抑制；但若不含lactose則甘油濃度高於80 g/L則菌株生長便受到抑制。含有lactose條件下時，在甘油濃度為40 g/L，2,3-BDO有最佳產量(7.8 g/L)，而ethanol在甘油濃度為40 g/L亦有最好的產量為1.94 g/L；1,3-PDO則在甘油濃度為60 g/L產量有(8.92 g/L)；acetic acid在甘油濃度為100 g/L時，產量為1.62 g/L。從碳源的消耗及甘油的消耗來看，在低甘油濃度時(0~10 g/L)，lactose被消耗的比較多，隨著甘油由濃度提高(> 10 g/L)，lactose被消耗的相對愈來愈少，這代表著甘油會先被*Klebsiella* sp. Wu1 菌株利用，且在甘油濃度為0 g/L時，*Klebsiella* sp. Wu1 菌株利用lactose最多，但並沒有生產2,3-BDO，這可能是因為*Klebsiella* sp. Wu1 菌株不會優先利用lactose生產2,3-BDO。此外，未添加lactose的條件下，甘油的消耗明顯的會因為甘油濃度增加而有抑制的情形，與文獻提到的高濃度的碳源會抑制細胞生長，活性下降而造成代謝速率下降(Jansen and Tsao., 1983)結果相似。因此，往後實驗*Klebsiella* sp. Wu1 最佳的甘油濃度為40 g/L，持續作為探討其它條件因子。

由*Klebsiella* sp. Wu1所探討出來的結果得知，甘油濃度的大小會對菌株轉換2,3-BDO而有所影響，以lactose作為增加菌量來探討2,3-BDO是否會因菌量增加而增加是不可行的，且甘油濃度愈高，對菌量也會有生長抑制，2,3-BDO也會相對的減少。

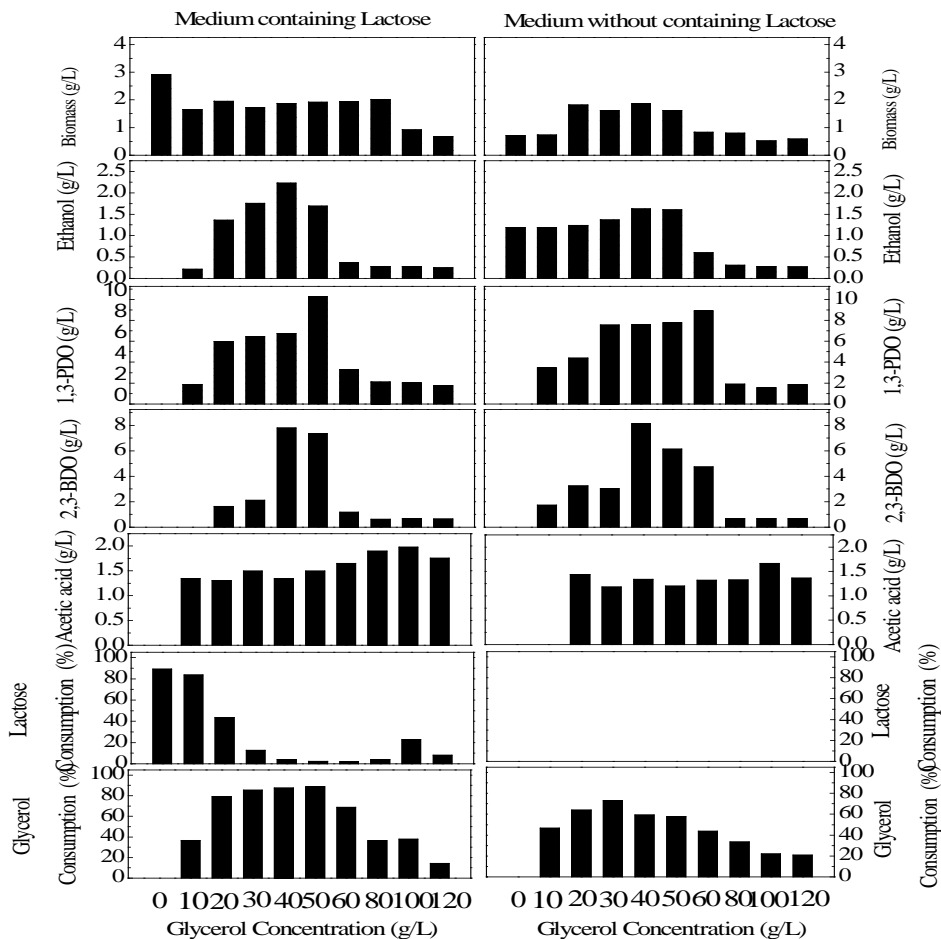


圖9. 有/無添加乳糖在添加不同甘油濃度對*Klebsiella* sp.生產2,3-BDO之影響

(Carbon sources: Lactose concentration: 10 g/L; Temperature: 35±2°C ;Agitation rate: 150rpm;

initial pH5.5)

### 3.8 振盪速率及曝氣速率對篩選菌株生產2,3-BDO之影響

由圖10 結果顯示, *Klebsiella* sp. Wu1 菌株在曝氣量為 0.5 vvm 的情況下, 菌量為1.19 g/L, 2,3-BDO產量為4.02 g/L; 曝氣量為1.0 vvm, 菌量為1.09 g/L, 2,3-BDO產量為1.26 g/L; 靜置情況下, 菌量為0.42 g/L, 2,3-BDO產量為0.78 g/L, 此外, 在振盪速率方面, 結果顯示, 菌量, 2,3-BDO以及1,3-PDO產量會隨著振盪速增加而增加2,3-BDO產量, 除了1,3-PDO之外。

本研究發現, *Klebsiella* sp. Wu1 菌株的菌量會隨著轉速的升高而增加, 且2,3-BDO的產量也明顯的隨著轉速升高而增加, 由這些結果可以發現, 曝氣和攪拌的影響對2,3-BDO的產量相當重要與先前文獻中所提到的結果一致(Ledingham and Neish, 1954; Long and Patrick, 1963), 因此, 控制適當的溶氧量, 會使菌體有效的生產2,3-BDO(Jansen *et al.*, 1984)。

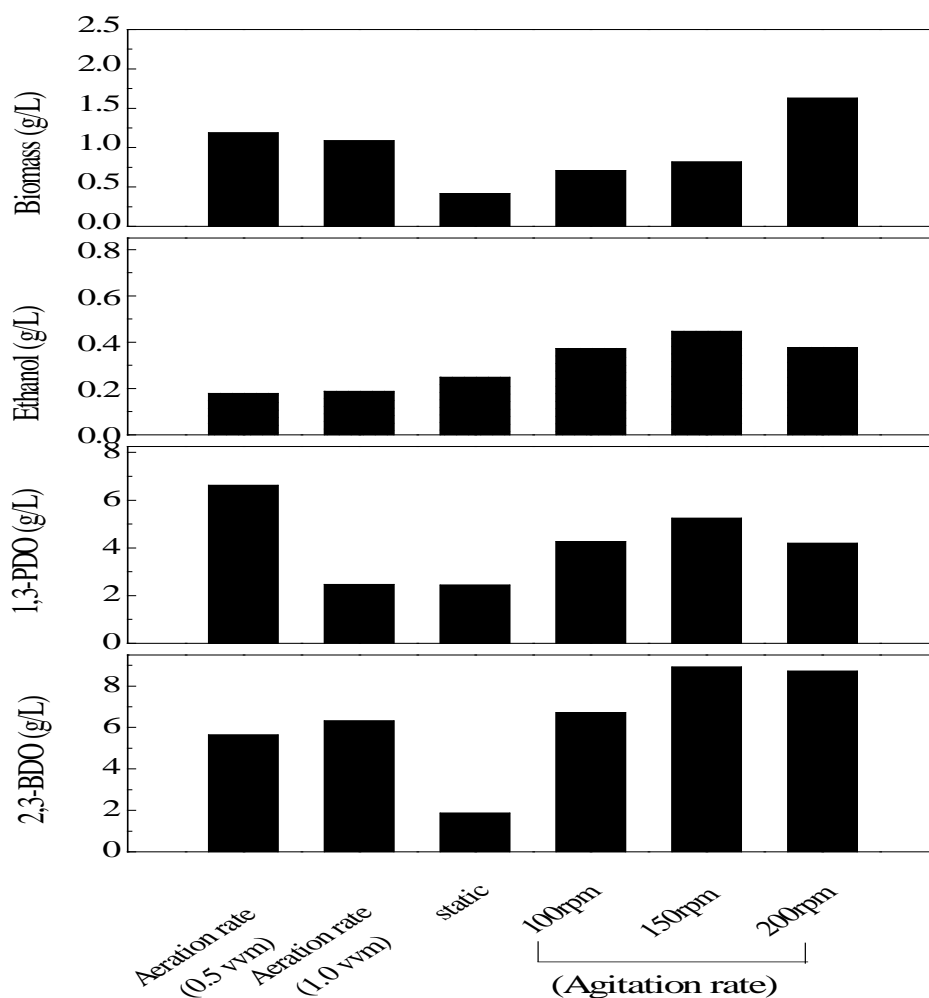


圖10. 在曝氣條件與攪拌速率下 *Klebsiella* sp. Wu1 對2,3-BDO產量之影響  
(Carbon sources: glycerol (60 g/L); Lactose concentration: 10 g/L; Temperature: 35±2°C;  
initial pH6.0)

### 3.9 溫度對篩選菌株生長及生產2,3-BDO之影響

對微生物而言, 在最適生長溫度時, 繁殖速度最快, 酵素也能發揮最大的作用。在一般情況下, 細菌發酵生產2,3-BDO 最適溫度範圍為30-35°C (Perlman *et al.*, 1994)。

先前研究文獻指出, 關於 *Klebsiella* sp. Wu1 菌株培養條件為pH5.0以及35°C 最適合生產2,3-BDO和乙醇

(Grover *et al.*, 1990)。本研究以*Klebsiella sp. Wu1* 菌株，探討溫度對其生產2,3-BDO之影響。由圖11結果顯示，*Klebsiella sp. Wu1* 菌株在25-30°C時對2,3-BDO產量影響不大。而甘油的消耗分別為55%、60%、63%、51%，Biomass則分別為0.225 g/L、0.231 g/L、0.242、0.132 g/L，由此結果得知*Klebsiella sp. Wu1* 菌株再35°C時，2,3-BDO的產量最高。由上述結果得知，*Klebsiella sp. Wu1* 菌株菌株生產2,3-BDO最佳的溫度皆在25-30°C，與文獻中提到的最佳生產2,3-BDO的溫度為30-35°C類似(Perlman *et al.*, 1994)。

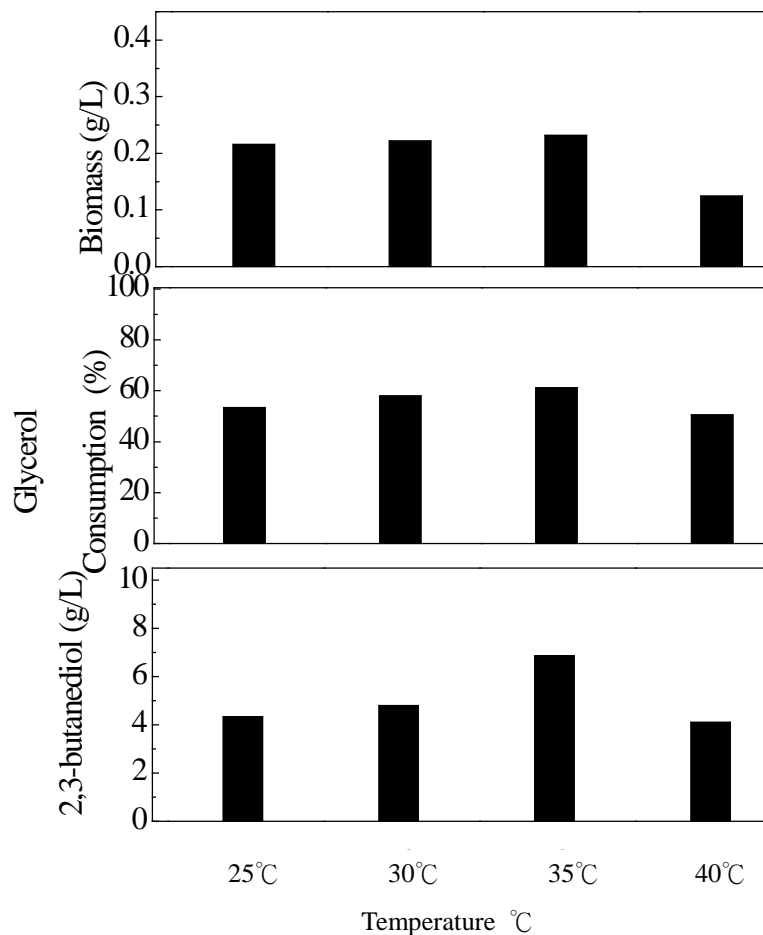


圖11 不同溫度對篩選的菌株生產2,3-BDO之影響

■ *Klebsiella sp. Wu1*; Carbon sources: glycerol (40 g/L); Lactose concentration: 10 g/L; Agitation rate: 150rpm; initial pH5.5

#### 4. 結論

本研究由工業廢水及農業污泥取的活性污泥馴養，篩選能利用甘油生產2,3-BDO之純菌菌株，並以16S rDNA進行鑑定及NCBI基因資料庫進行比對結果顯示為*Klebsiella* 菌屬初步命名為*Klebsiella sp. Wu1*，之後進一步探討*Klebsiella sp. Wu1* 生產2,3-BDO之最適條件(pH、氮源(濃度)、碳源(濃度)、轉速及溫度)的探討。本研究結果，在pH為5時，最佳的2,3-BDO產量為4.2 (g/L)； $Y_{p/x}$ 為1.16 (g BDO / g cell)； $Y_{x/s}$ 為0.33 (g cell / g glycerol)； $Y_{p/s}$ 為0.38 (g BDO / g glycerol)。最佳氮源為peptone，濃度為0.25 g/L，2,3-BDO產量為4.27g/L； $Y_{p/x}$ 為0.9 (g BDO/g cell)； $Y_{x/s}$ 為0.28 (g cell / g glycerol)； $Y_{p/s}$ 為0.63 (g BDO/ g glycerol)。以甘油為主要碳源，而外添加不同碳源的條件下，添加甘油(20 g/L)以lactose為碳源2,3-BDO產量為3 g/L碳源消耗達78 %菌量為1.63 g/L，由實驗結果發現

在lactose情況下，甘油消耗比較高，菌量也提高，因此，接下來以改善甘油濃度探討固定lactose濃度，甘油隨著增加，2,3-BDO產量是否會隨著提高。在不同甘油濃度時，添加lactose時，最佳甘油濃度為40g/L，2,3-BDO產量為7.8g/L；未添加lactose時，最佳甘油濃度為40g/L，2,3-BDO產量為8.4g/L，在lactose固定情況下，甘油濃度提高甘油消耗提高但2,3-BDO產量並未提高Lactose消耗降低，且2,3-BDO產量並未提高，可能是lactose被轉換成醋酸或提高菌的生長。當振盪速率為200rpm，菌量為1.45 g/L，2,3-BDO產量為8.5 g/L；最佳溫度為35°C時，菌量為0.23 g/L，甘油消耗為62%，2,3-BDO產量為8.5 g/L。

## 5. 致謝

感謝國科會提供經費補助本研究計畫。計畫編號：100-2632-B-212-001-MY3。

## 6. 參考文獻:

- Biebl H, Zeng A.P, Menzel K, Deck WD. 1998. Glycerol fermentation to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 24-29.
- Grover, B. S., Garg, S. K., Verma, J. 1990. Production of 2,3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 328-32.
- Hao J, Lin R, Zheng Z, Liu H, Liu D. 2008. Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1731-1740.
- Jansen, N. B. & Tsao, G. T. 1983. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Adv. Biochem. Engng Biotechnol* 27: 85-100.
- Jansen, N.B., Flickinger, M.C., Tsao, G.T., 1984. Production of 2,3-butanediol from Dxylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 362-369.
- Jarvis GN, Moore ERB, Thiele JH. 1997. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol* 83: 166-174.
- Laube VM, Groleau D, Martin SM. 1984. The effect of yeast extract on the fermentation of 1221 glucose to 2,3-butanediol by *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol Lett.* 6: 535-40.1222.
- Ledingham, G. A., Neish, A. C. 1954. Fermentative production of 2,3-butanediol. In *Industrial Fermentations*, Vol. 2, ed. L. A. Underkofler, R. J. Hickey. Chemical Publishing Company, New York, USA, pp: 27-94.
- Long, S. K. & Patrick, R. 1963. The present status of the 2,3-butylene glycol fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 5: 135-55.
- Perlman, D. 1994. Production of 2,3-butylene glycol from wood hydrolysates. *Ind. Engng Chem.* 36: 803-4.
- Qin JY, Xiao ZJ, Ma CQ, Xie NZ, Liu PH, Xu P. 2006. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. *Chin J Chem Eng* 14: 132-136.