

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

子計畫一：由微生物發酵生產功能性 PHA 及其形態探討(III)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2621-Z-002-003-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 10 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：黃世佑

共同主持人：邱文英

計畫參與人員：郭子青，林家裕，楊勝斌

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 22 日

綠色材料-生物可分解聚酯材料 PHA 生產、應用與分解技術
子計劃一：由微生物發酵生產功能性 PHA 及其形態探討(III)

執行單位：台灣大學化學工程研究所暨材料科學與工程學研究所

計畫編號：NSC 92-2621-Z-002-003

計劃主持人：黃世佑

協同主持人：邱文英

研究人員：郭子青(台大高分子所)

林家裕(台大化工所)

楊勝斌(台大材料所)

聯絡方式：Tel：(02)23632542

E-mail：hsyo@ccms.ntu.edu.tw

中文摘要

本研究為利用微生物發酵生產生物可分解性聚合物。使用耐鹽性細菌 *Haloferax mediterranei* 以及 *Pseudomonas oleovorans*，添加各種碳源及調整其他培養基組成濃度，以期獲致具官能基（functional groups）之 PHA（polyhydroxyalkanoates）。

H. mediterranei 菌株在初始 pH 7.0 下進行發酵時，所得菌量最高（36 小時內）乾菌重可達 5.6 g/L；在初始 pH 6.5 下進行發酵，單位菌體所累積之 PHA 量為最高（ $Y_{p/x}=0.09$ ）。培養基中添加 0.1 % KH_2PO_4 進行發酵時，所得菌量為最高達 15.59 g/L；但添加 0.0125 % KH_2PO_4 進行發酵時，所得 PHA 量為最高，約 0.63g/L。

於發酵進行中，饋料各種碳源並以 FT-IR、NMR、DSC 等儀器分析發酵產物之結構與性質。以 olive oil 及 soybean oil 等碳源進行饋料，所得產物 PHA 結構為 PHBV，其 PHV 所佔之比例分別為 8-11 % 及 7-8 %，且隨著 PHV 比例增加，PHBV 的熔點與玻璃轉移溫度隨之下降。

P. oleovorans 菌株以 sodium octanoate 當作碳源，發酵所得菌體量約 3.07 g/L，PHA 累積量約 0.39 g/L，PHA 約佔菌體乾重的 13 %；在限氮條件下，菌體量約為 3.04 g/L，PHA 累積量可提升到 1.09 g/L，PHA 約佔乾菌重 36 %。

當 *P. oleovorans* 以不同碳源進行發酵時，所產生 PHA 的結構也會有所不同；以 sodium octanoate 當作碳源，則產生以 PHO(polyhydroxyoctanoate)為主之共聚物；當使用 undecylenic acid 為碳源時，可產生側鏈末端具有雙鍵之 PHU(Poly(3-hydroxyundec-10-enoate))結構；如使用 nonanoic acid 為碳源，則可產生不同側鏈之 PHHN (Poly(3-hydroxyheptanoate-co-3-hydroxynonanoate))共聚物。

未來將使用以水/乙醇或水/乙二醇(ethylene glycol)為液態培養基之混合劑，饋各種脂溶性碳源(如：arachidonic acid，linolenic acid 等)，以 FT-IR、NMR、TGA、DSC、等儀器分析發酵所得 PHA 之結構與性質，期能獲致特殊官能性 PHA。

關鍵詞：嗜鹽菌、*Pseudomonas oleovorans*、聚羥基烷酯、官能基、壬酸、十一烯酸

英文摘要

Biosynthesis of biodegradable polymers using halophilic bacterium *Haloferax mediterranei* and *Pseudomonas oleovorans* was conducted. Manipulations of carbon source as well as ingredients of fermentation medium were investigated. PHA (polyhydroxyalkanoate) incorporated with functional groups is anticipated.

H. mediterranei grew most rapidly under pH 7.0, dry cell weight reached 5.6 g/L in 36 hrs. Accumulation of PHA in the cells reached a peak under pH 6.5 ($Y_{p/x}=0.09$). Fermentation with dosage of 0.1 % KH_2PO_4 resulted in a high cell concentration (15.59 g/L). Under a limitation of phosphate (0.0125 % KH_2PO_4), high PHA content was obtained (0.63 g/L).

Olive oil and soybean oil were fed during the fermentation producing PHA. The products obtained were PHBV (polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate) whose PHV contents were 8-11 % and 7-8 %, respectively. T_m and T_g of PHBV products obtained decreased with increase of the content of PHV.

3.07 g/L of dry cell weight were obtained using *P. oleovorans* and dosage of sodium octanoates. PHA content was 13 % dry weight. 3.04 g/L of dry cell weight were obtained under a limitation of nitrogen source. PHA content was 36 % dry cell weight.

Different products of PHA were obtained by dosage of different carbon sources. PHOs (polyhydroxyoctanoate) were the major copolymers obtained by dosaging sodium octanoate as a carbon source. PHU [poly(3-hydroxyundec-10-enoate)] and PHHN [poly(3-hydroxyheptanoate-co-3-hydroxynonanoate)] copolymers were obtained as dosaging undecylenic acid and nonanoic acid respectively as a sole carbon source. Introducing the various functional groups into the structure of PHAs facilitates the development of synthesizing new functionality biopolymers for many uses.

Key words : halophilic bacterium, *Pseudomonas oleovorans*, polyhydroxyalkanoate, functional group, nonanoic acid, undecylenic acid.

一、前言

傳統石化工業所製得的塑膠產品由於性質良好、耐用以及價格低廉對人類生活上帶來實質的幫助，不過卻也因為不易分解與回收而造成對環境的破壞。與傳統塑膠相比，生物可分解性塑膠因具有生物可分解性，在自然環境下可經由細菌、真菌及藻類的酵素作用或者水解而被分解成二氧化碳、甲烷及其他自然物質，不會對環境造成負面衝擊，因而近年倍受重視；生物可分解性材料在世界上用量已從 1996 年的 14000 公噸增加到 2001 年的 68000 公噸 (Gross et al., 2002)。

在生物可分解性材料中，聚羥基烷酯(Polyhydroxyalkanoates, PHA)可藉由微生物生產，因此除了生物可分解性及生物相容性之外，其原料可以是再生的，像是澱粉，因此在未來生產上，不受石油短缺的干擾，可說是具有相當的潛力。

然而，由於 PHA 現在性質不如傳統塑膠來的好，再加上生產成本明顯的比傳統塑膠來的高，因此在市場的競爭尚處於劣勢。因此，本研究著手進行相關的研究，期能找出最佳培養條件來大量生產以及修飾高分子的特性以增強利用發酵法生產生物可分解性塑膠的市場競爭力。

二、材料與方法

2-1 藥品與試劑

氯仿、D-chloroform、olive oil、soybean oil、甲醇購自 Acros organics, Geel, Belgium，磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、溴化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂、硫酸鎂購自 Nacalai tesque Inc, Kyoto, Japan，Yeast extract 購自 DIFCO Chemical Co., Detroit, USA，葡萄糖、Sodium octanoate 購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, USA，碳酸氫鈉、硫酸銨購自 Wako pure chemical industries Ltd., 大阪，日本，氯化鈉購自 Mallinckrodt Baker Inc., Paris, Kentucky。

2-2 菌種和培養基

本實驗所用的菌株有兩株，為耐鹽性之 *Haloferax mediterranei* ATTC 33500 及 *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347，皆購自新竹食品工業發展研究所之生物資源保存及研究中心（BCRC）。

Haloferax mediterranei 液態培養基組成 (g/L)：NaCl 215、NaHCO₃ 0.2、NaBr 0.5、MgSO₄、MgCl₂ 19.5、CaCl₂ 1、Glucose 1、

Yeast extract 7.5。

Pseudomonas oleovorans 液態培養基組成 (g/L)：(NH₄)₂SO₄ 4.0、K₂HPO₄ 5.8、KH₂PO₄ 3.7、MgSO₄·7H₂O 0.4、microelement solution 1 ml，其中 microelement solution 組成為 (g/L) (1M HCl)：FeSO₄·7H₂O 2.78、MnCl₂·4H₂O 1.98、CoSO₄·7H₂O 2.81、CaCl₂·2H₂O 1.67、ZnSO₄·7H₂O 0.29，碳源依實驗目的不同而不同（見下文）。

2-3 *Haloferax mediterranei* 之發酵實驗方法

2-3-1 初始 pH 對菌體生長及 PHA 累積之影響

將活化後(先於固態培養基上，37 °C 下活化 4 天，再將單一菌落置入盛有 50ml 已滅菌液態培養基的錐形瓶中，恆溫震盪 36 小時，160 rpm，37 °C)之菌液，取 5ml，置

入盛有已用 1N NaOH 和 1N HCl 調整初始 pH（分別為 5.0、6.5、7.0、8.0 等）的液態培養基的錐形瓶中，並將錐形瓶置於恆溫震盪培養箱內以轉速 160 rpm、溫度 37°C 進行培養，於第 36 小時取樣分析菌體乾重和發酵產物 PHA 含量。

2-3-2 KH_2PO_4 添加濃度對菌體生長及 PHA 累積之影響

於液態培養基添加 0 ppm、20.83 ppm、31.25 ppm、125 ppm、250 ppm、500 ppm、0.1 %、0.2 %、0.4 % (wt/vol) 之 KH_2PO_4 等十組，並將初始 pH 調為 6.5 進行培養，於第 36 小時取樣分析乾菌重和發酵產物 PHA 含量。

2-3-3 以葡萄糖為主要碳源，以含特殊官能基之碳源當饋料進行發酵 (Gomez et al., 1996)

在菌體以葡萄糖為主要碳源進行培養 24 小時後，進行特殊碳源如 olive oil (1ml/ 1 L medium)、soybean oil (1 ml/ 1 L medium) 的饋料，並定時取樣分析菌體乾重和發酵產物 PHA 含量及結構。

2-4 *Pseudomonas oleovorans* 之發酵實驗方法

2-4-1 限氮、醋酸添加實驗 (Guocheng Du et al., 2002)

先將原始菌株畫於固態培養基上活化 4 天(30°C 下)，再挑單一菌落置入盛有 50 ml 已滅菌的培養基之錐形瓶中，恆溫震盪兩天 (30°C，160 rpm)，之後再取 5 ml 菌液置入內含 50 ml 已滅菌培養基之錐形瓶，並置於恆溫震盪培養箱以轉速 160 rpm，溫度 30 °C 進行培養，並且在培養 36 小時後取樣分析。

在醋酸添加實驗中，培養時的碳源為 sodium octanoate(6 g/L) 以及 sodium octanoate 與 acetic acid 混合碳源 (每升各 3 克)；限氮實驗中， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 只添加每升 0.66 克，碳源為 sodium octanoate (6 g/L)。

2-4-2 含官能基之碳源發酵實驗

在培養初始，分別添加 sodium octanoate(6 g/L)、undecylenic acid(6.65 g/L)、nonanoic acid (6.54 g/L) 等碳源進行發酵，於發酵 36 小時後取樣分析。

2-5 產物分析方法

2-5-1 菌體乾重的測定

取 50 ml 發酵液放入 PP 離心管中，以 12000 rpm 轉速離心 15 分鐘後，去除上清液。再加入 15 ml 15 % NaCl 溶液沖洗菌體，並以同樣離心條件再次離心並去除上清液（*Pseudomonas oleovorans* 無此步驟）。之後，再以少量二次水將管壁上菌塊沖下至已稱重的樣品瓶。待冷凍乾燥後取出樣品瓶稱重，其值與原本空樣品瓶重之差值即為 50 ml 菌液中所含之菌體細胞乾重。

2-5-2 PHA 萃取與純化 (Kim et al.,2000)

將冷凍乾燥後的菌體粉末磨碎，置放在血清瓶中，並加入 80 ml 的氯仿，然後予以攪拌四小時。攪拌完後將燒杯中的氯仿倒入減壓濃縮瓶中，利用減壓濃縮機在 50 °C 的熱水浴中進行濃縮。濃縮完成後即可得到一層為粉紅色薄膜，即為 PHA。之後，再加入適量甲醇於濃縮瓶中，以洗除 PHA 上粉紅色色素成分。

2-5-3 核磁共振儀 (NMR) 分析

將 50mg 之 PHA 溶於 1ml CDCl_3 並置於 NMR sample tubes 中，送至台大貴重儀器分析中心進行 ^1H -NMR (300MHz) 及 ^{13}C -NMR (300MHz) 分析。

2-5-4 微差熱掃描分析儀(DSC)分析

取約 5~10mg 之 PHA，在氮氣流量為 50 ml/min 下，以 10 °C/min 之升溫速率加熱，觀察 PHA 之玻璃轉移溫度 (T_g) 及熔點 (T_m) 之變化，測試溫度範圍為 -30 °C ~ 220 °C (*P. oleovorans* 之測試溫度範圍則為 -70 °C ~ 120 °C)

2-5-5 熱重量損失分析儀 (TGA) 分析

取約 3~10 mg 之 PHA 置於白金盤上，在氮氣下定溫於 100 °C 維持 10 分鐘，再以 20 °C/min 的升溫速率升溫至 600 °C 進行熱裂解，觀察 PHA 的重量損失變化及殘餘量。

三、結果與討論

3-1 初始 pH 對 *H. mediterranei* 菌體生長及 PHA 累積之影響

由圖一得知，以初始 pH 值為 7.0 之培養基進行培養可得較高菌體量(乾菌重達 5.59 g/L)；以初始 pH 值為 6.5 之培養基進行培養，單位菌重可得較高 PHA 量 ($Y_{p/x}=0.09$)。而初始 pH 為 5.0 時，對菌體生長和 PHA 累積有明顯的抑制效應。

3-2 KH_2PO_4 添加濃度對 *H. mediterranei* 菌體生長及 PHA 累積之影響 (Lillo et al.,

1990)

由於磷酸根為合成 ATP 的重要基質之一，又根據 Lillo (1990) 等人的研究，磷酸根濃度對菌體的生長以及 PHA 累積會有影響，故本研究嘗試添加 KH_2PO_4 ，探討其影響。

實驗結果如圖二所示，發現 KH_2PO_4 添加的濃度對菌體生長及 PHA 累積的影響並沒有一定的趨勢，不過當 KH_2PO_4 添加濃度過高 ($>0.1\%$) 時，對菌體及 PHA 累積就有明顯的抑制。

當培養基中添加 0.1% KH_2PO_4 發酵所得菌量最高達 15.59 g/L 。在 PHA 累積量方面，以添加 0.0125% KH_2PO_4 發酵生產之 PHA 累積量最高達 0.63 g/L (約佔菌體乾重的 4.7%)。

3-3 葡萄糖為主要碳源，以 *H. mediterranei* 及含特殊官能基之碳源當饋料進行發酵

3-3-1 Olive oil 饋料發酵

由實驗結果 (圖三)，在第 44 至 56 小時階段，PHA 累積量由 0.46 g/L 提升為 0.69 g/L ，推測在此階段微生物開始利用 olive oil 生產 PHA。

3-3-1-1 核磁共振儀分析

對照圖四、圖五、圖六與表一可得知，以 olive oil 饋料發酵生產之 PHA 其結構應為 PHBV。

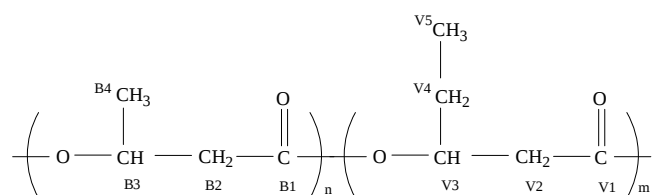
因為 PHB 與 PHV 末端皆各有一甲基 ($-\text{CH}_3$)，因此計算兩者甲基面積之比值，即可算出 PHB 所佔之百分比。計算方式如下 (Heinze et al., 2000)：

$$\text{PHB}\% = \frac{\text{Area}(\text{B4})}{\text{Area}(\text{B4}) + \text{Area}(\text{V5})}$$

由計算結果得知，PHB 的含量由 91% 降低至 89% ，因此推測 olive oil 的存在會促使菌體在代謝過程中偏向 PHV 生成的路徑。

表一 PHBV 之 $^1\text{H-NMR}$ 對照表

PHBV	B2	B3	B4	V2	V3	V4	V5
Chemical shift (δ)	2.5	5.2	1.2	2.5	5.2	1.6	0.9



PHBV 結構圖

3-3-1-2 微差熱掃描分析儀分析

根據圖七、圖八、圖九，在 32 (OL32)、38 (OL38)、44 (OL44) 小時產物之 T_g 和 T_m 的溫度分別如表二所示，因此可以確定此化合物有兩種組成，且其產物之 T_m 隨著 PHV 佔 PHA 比例的上升而降低。

表二 以 olive oil 饋料發酵後所得 PHA 之 DSC 分析結果

Sample	T_g (°C)	T_m (°C)	PHV (%)
OL 32	-	146.55, 162.30	9
OL 38	1.21	143.14, 162.49	8
OL 44	-1.73	137.23, 157.61	11

3-3-2 Soybean oil 饋料發酵

由實驗結果圖十所示，菌量在發酵過程中大致維持穩態(約 8 g/L 至 10 g/L)，而 PHA 累積量隨著發酵過程而增加，在第 46 小時 PHA 累積量達 0.53 g/L，推測 soybean oil 在發酵末期有助益 PHA 之生產。

3-3-2-1 核磁共振儀分析

對照表一以及圖十一、圖十二、圖十三，以 soybean oil 當饋料發酵生產之 PHA 的結構應為 PHBV，且 PHV 的含量會隨時間增加而遞減(由 8 %降為 7 %)。因此推測 soybean oil 的存在會促使菌體在代謝過程中偏向於合成 PHB 的路徑。

3-3-1-2 微差熱掃描分析儀分析

根據圖十四、圖十五及圖十六，在 28 (SO28)、34 (SO34)、38 (SO38) 小時產物之 T_g 和 T_m 的溫度分別如表三所示，因此可以確定此化合物有兩種組成，且其產物之 T_m 隨著 PHV 佔 PHA 比例的上升而降低。

表三 以 soybean oil 饋料發酵生產 PHA 之 DSC 分析結果

Sample	T _g (°C)	T _m (°C)	PHV (%)
SO 28	1.72	144.2, 163	8
SO 34	1.89	146.8, 165.3	8
SO 38	1.99	148.9, 165.4	7

3-4 *P. oleovorans* 之限氮、醋酸添加實驗

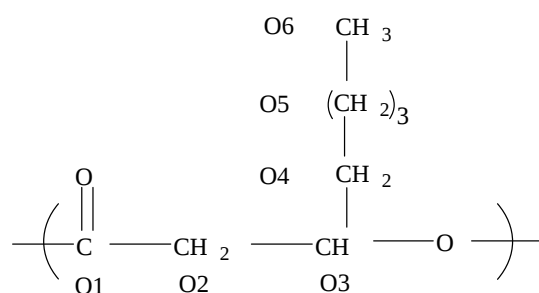
根據 Du et al. 的敘述，當使用 octanoic acid 為碳源時，acetic acid 為代謝路徑中主要的中間產物，如添加 acetic acid，其將會比碳源更容易被利用，acetic acid 主要會被用在菌體及能量之供給，而碳源將可大部分利用在 PHA 的合成。在實驗上分別使用混合碳源及限氮配方等特殊培養基，以利比較。

實驗結果(圖十七)顯示，有添加醋酸的混合碳源的菌量及 PHA 都比原配方來的不好；另一方面，限氮策略的確有助 PHA 累積，最高可達 1.09 g/L，其約佔乾菌重的 36 % (圖十八)。

3-5 以 *P. oleovorans* 及含官能基碳源之發酵實驗

3-5-1 以 Sodium octanoate 為碳源發酵結果

由 ¹H-NMR 圖譜 (圖十九) 及 ¹³C-NMR 圖譜(圖二十)分析的結果，可證實其結構為以 PHO(polyhydroxyoctanoate)為主之共聚物。



PHO 結構圖

所得之產物 PHO 根據熱重分析儀分析(圖二十一)，熱裂解溫度大約為 280°C，由微差熱掃描分析儀分析，其 first run 及 second run 的結果如(圖二十二)，玻璃轉移溫度及熔點分別為-34.4°C及 58.4°C；經由 GPC 測定，可得重量平均分子量約為 36 萬，分子

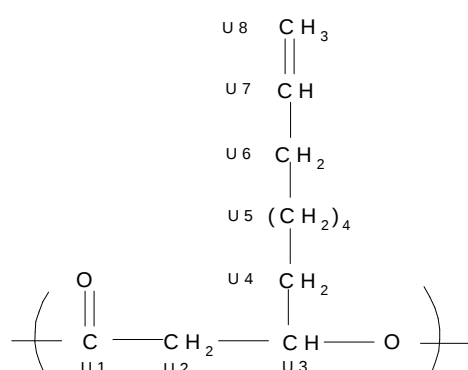
量分布為 1.73。

3-5-2 以 Undecylenic acid 為碳源發酵結果

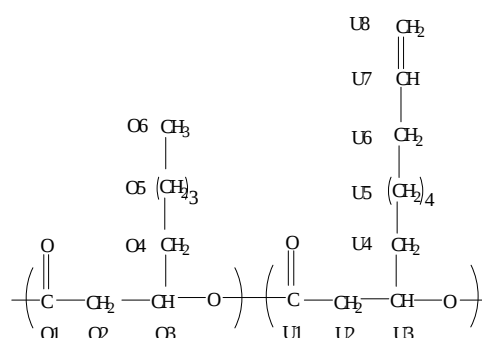
當使用 Undecylenic acid 為碳源時，菌體將能夠保留下雙鍵，產生末端具有雙鍵之 PHU 結構，如使用混和碳源(sodium octanoate 及 undecylenic acid)，將可產生 PHOU 之共聚物結構；雙鍵結構在 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜(圖二十三)上可由 4.9 及 5.7 的 peak 所證實(Kurth et al., 2002)，及 $^{13}\text{C-NMR}$ (圖二十四)上 114 與 138 附近的 peak 佐證(Lee et al., 2000)；而 PHOU 結構從 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜上可藉由 O6 及 U7 位置(表四)之面積比，得知其共聚物比例。

表四 PHOU 之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜 peak 位置表

O2 U2	O3 U3	O4 U4	O5	U5	O6	U6	U7	U8
2.5	5.2	1.6	1.2	1.36	0.9	2.0	5.7	4.9



PHU 結構圖



PHOU 結構圖

從 GPC 測定 PHOU 分子量約 25 萬，分子量分佈約為 1.73。DSC 測定可知 PHU 之玻璃轉移溫度約為 -48.8°C ，熔點為 33.5°C ，PHOU 之玻璃轉移溫度為 -46.3°C ，熔點為 57.1°C ；所得溫度均較 PHO 為低，且帶有雙鍵結構的組成含量越多， T_g 及 T_m 越低。

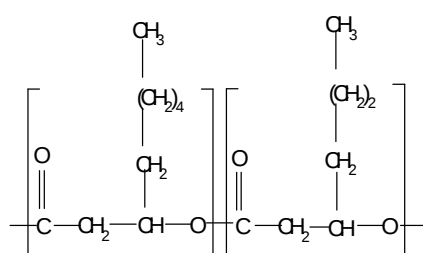
3-5-3 以 Nonanoic acid 為碳源發酵結果

對照圖二十五、圖二十六及表五，可證實使用 nonanoic acid 當作碳源時，可得到不同側鏈之 PHHN (Poly(3-hydroxyheptanoate-co-3-hydroxynonanoate)) 共聚物。

表五 PHHN 之 ^{13}C -NMR 圖譜 peak 位置表(Gross et al., 1989)

PHH- ¹³ C-NMR(ppm)								
169.38	39.11	70.82	33.49	27.14	22.40	13.89		
PHN- ¹³ C-NMR(ppm)								
169.4	39.10	70.84	33.81	25.01	29.0	31.69	22.56	14.04

經 GPC 測定，其分子量約為 23 萬，分子量分佈約 1.78；由 DSC 獲得其 Tg 點為 -41.4°C ，結晶溫度及熔點各為 47.5°C 及 54.21°C 。

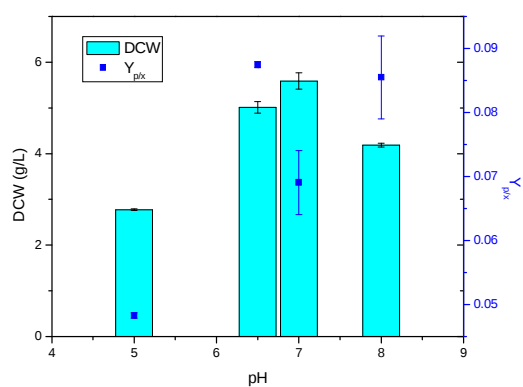


PHNH 結構圖

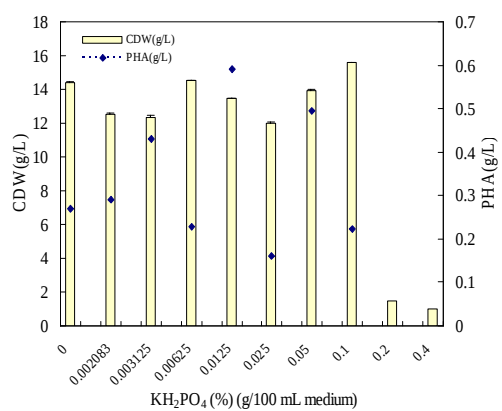
四、參考文獻

- Du, D. and Yu, J., 2002, "Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans* : mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation", Process Biochemistry, 38, 325-332.
- Gomez, J. G. C., et al., 1996, "Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding poly-hydroxyalkanoic acid from carbohydrates and propionic acid", Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 785-791.
- Gross, R. A. and Kalra, B., 2002, "Biodegradable Polymers for the Environment", Science, 297, 803-807.
- Gross, R. A., DeMello C. and Lenz, R. W., 1989, "Biosynthesis and characterization of Poly (β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*", Macromolecules, 22, 1106-1115.
- Heinze, T., Talaba1, P. and Heinze, U., 2000, "Starch derivatives of high degree of functionalization. 1. Effective, homogeneous synthesis of *p*-toluenesulfonyl (tosyl)

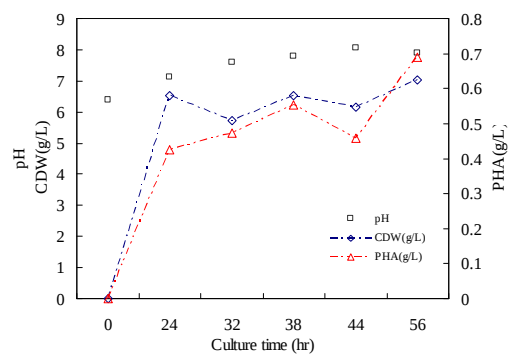
- starch with a new functionalization pattern”, Carbohydrate Polymers, 42, 411–420.
- Kim, D. Y., Kim, Y. B., Rhee, Y. H., “Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*”, International Journal of Biological Macromolecules, 28, 23–29.
- Lee, M. Y., Park, W. H. and Lenz, R. W., 2000, ” Hydrophilic bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups”, Polymer, 41, 1703-1709.
- Lillo, J. G. and Rodriguez-Valera, F., 1990, “Effects of culture conditions on Poly(β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*”, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2517-2521.



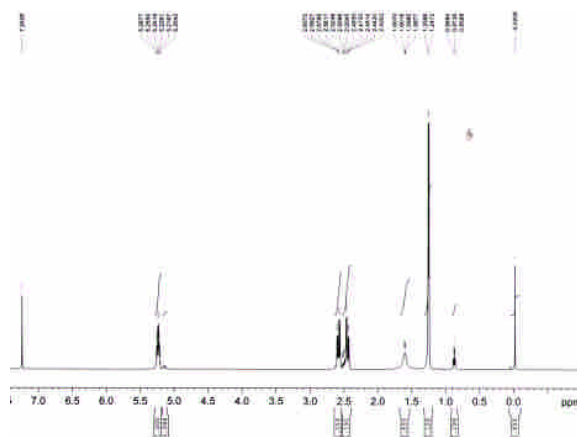
圖一 初始 pH 值對菌體生長及 PHA 累積之影響



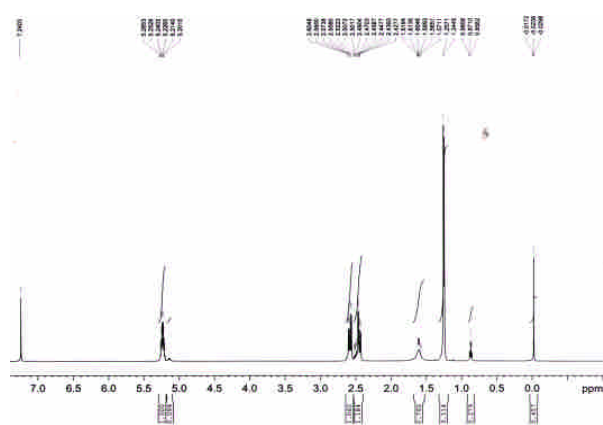
圖二 KH₂PO₄ 濃度對菌體生長和 PHA 累積之影響



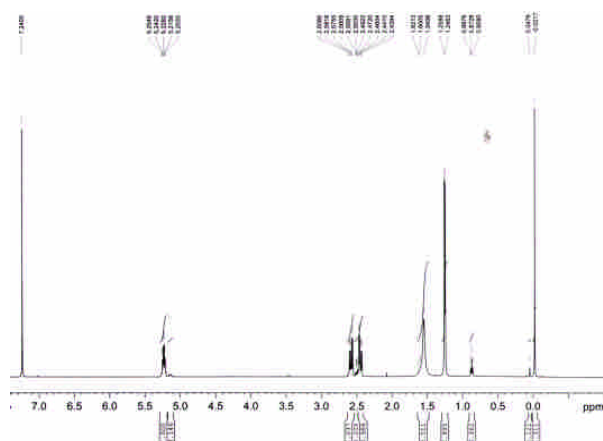
圖三 以 olive oil 饋料發酵之菌體生長曲線和 PHA 累積狀況



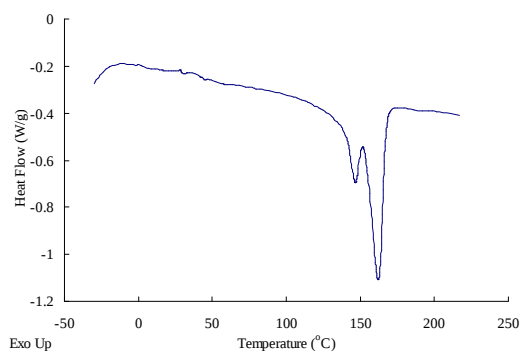
圖四 以 olive oil 饋料發酵培養後 32 小時取樣所之 PHA ¹H-NMR 圖譜



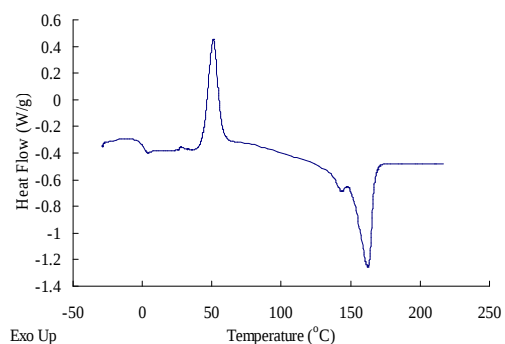
圖五 以 olive oil 饋料發酵培養後 38 小時取樣所得之 PHA ¹H-NMR 圖譜



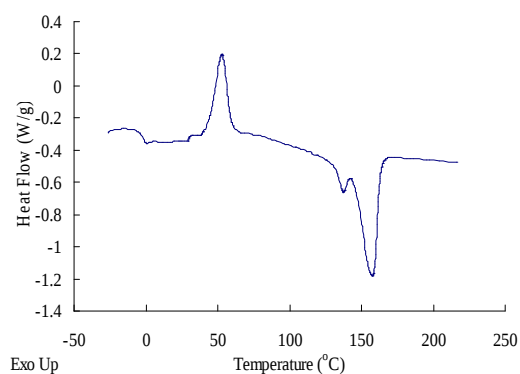
圖六 以 olive oil 饋料發酵培養後 44 小時取樣所得之 PHA ¹H-NMR 圖譜



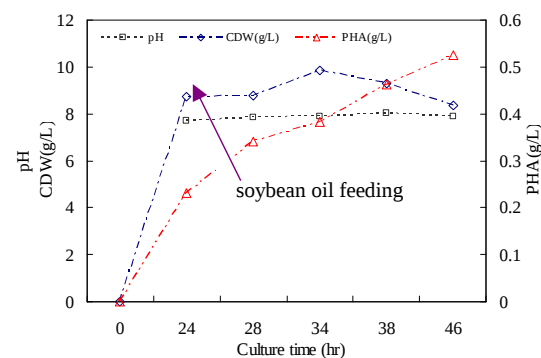
圖七 以 olive oil 饋料發酵培養後 32 小時取樣所得之 DSC 分析圖



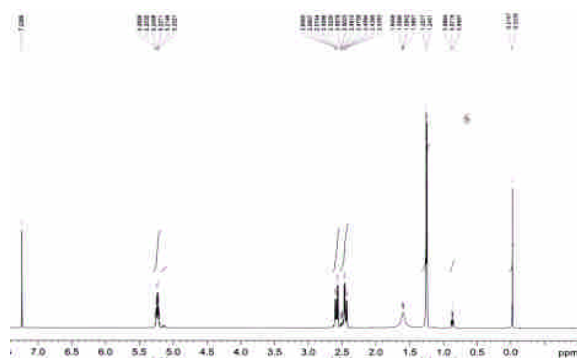
圖八 以 olive oil 饋料發酵培養後 38 小時取樣所得之 DSC 分析圖



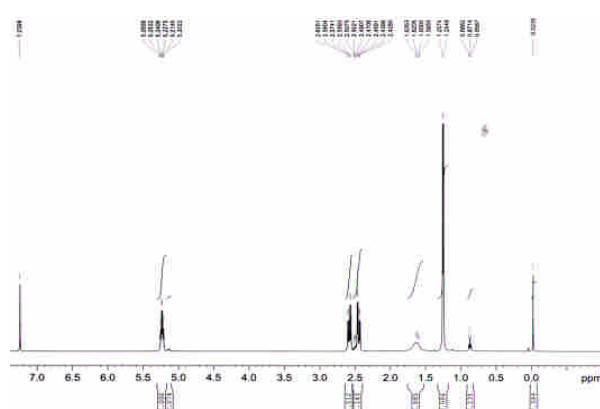
圖九 以 olive oil 饋料發酵培養後 44 小時取樣所得之 DSC 分析圖



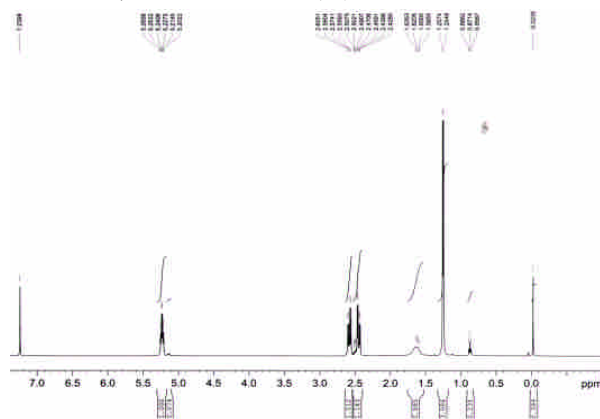
圖十 soybean oil 饋料發酵之菌體生長曲線和 PHA 累積狀況



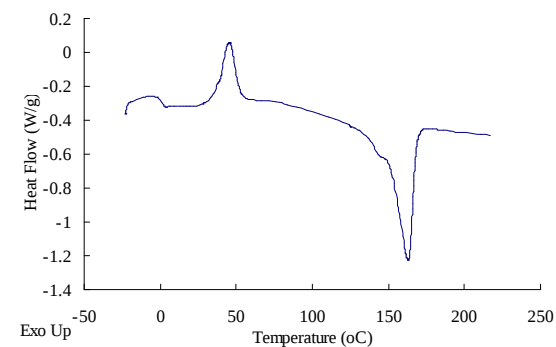
圖十一 以 soybean oil 饋料發酵培養後 28 小時取樣所得之 PHA¹H-NMR 圖譜



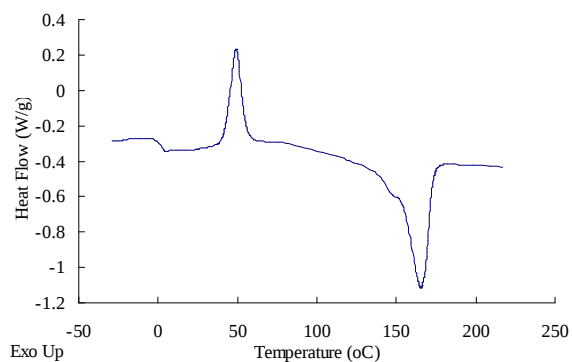
圖十二 以 soybean oil 饋料發酵培養後 34 小時取樣所得之 PHA¹H-NMR 圖譜



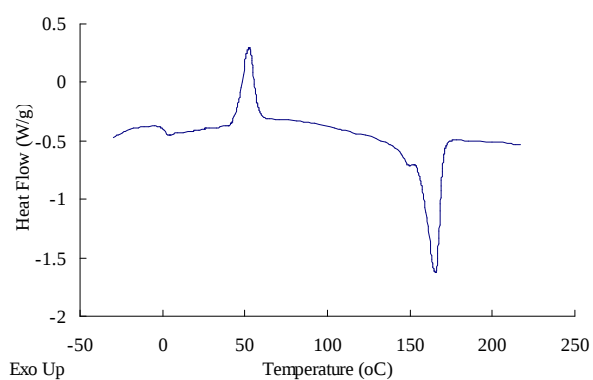
圖十三 以 soybean oil 饋料發酵培養後 38 小時取樣所得之 PHA¹H-NMR 圖譜



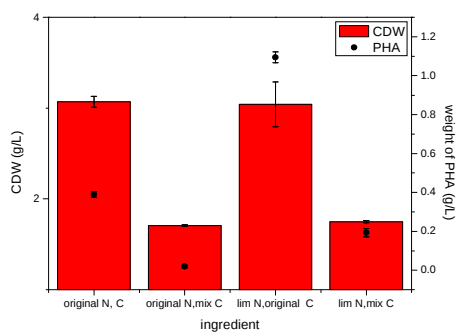
圖十四 以 soybean oil 饋料發酵培養後 28 小時取樣所得之 DSC 分析圖



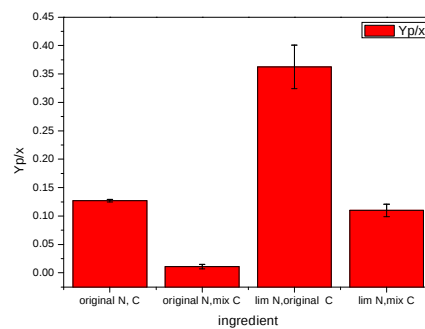
圖十五 以 soybean oil 饋料發酵培養後 34 小時取樣所得之 DSC 分析圖



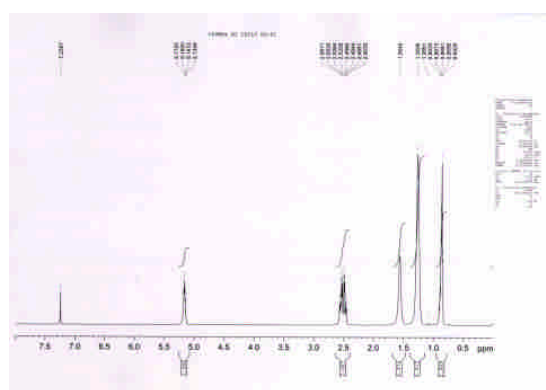
圖十六 以 soybean oil 饋料發酵培養後 38 小時取樣所得之 DSC 分析圖



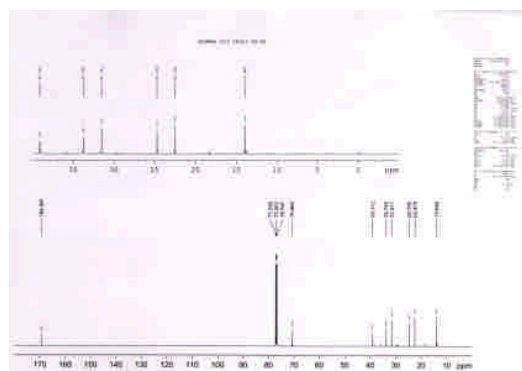
圖十七 限氮及醋酸添加對菌體生長與 PHA 累積之影響



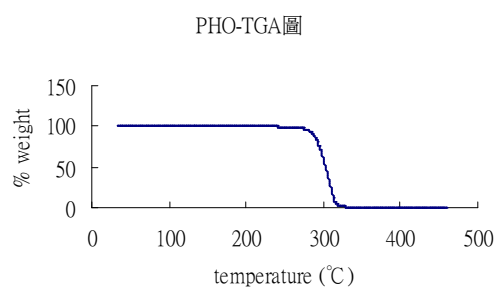
圖十八 限氮及醋酸添加對單位菌重所產生之 PHA 量之影響



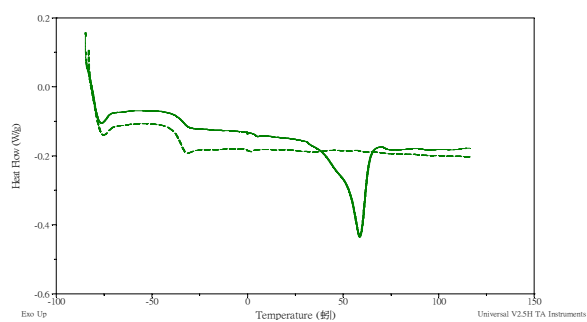
圖十九 以 Sodium octanoate 發酵所得 PHA 之 ^1H -NMR 圖譜



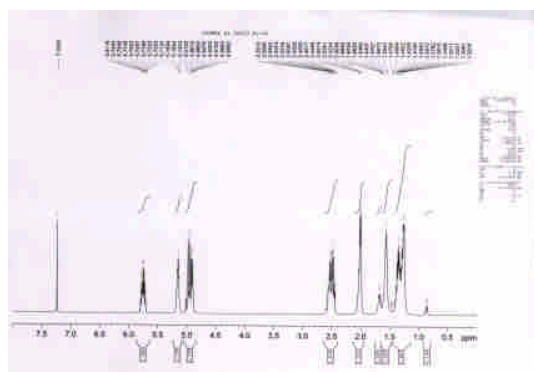
圖二十 以 Sodium octanoate 發酵所得 PHA 之 ^{13}C -NMR 圖譜



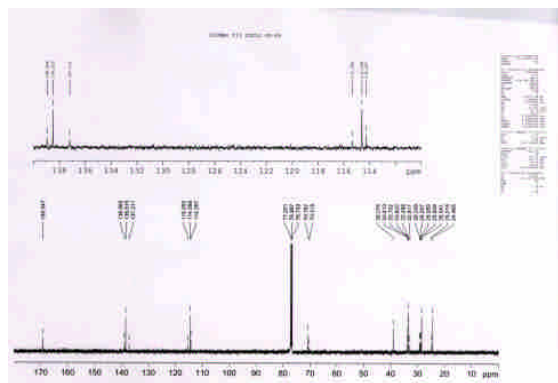
圖二十一 以 Sodium octanoate 發酵所得 PHA 之熱重分析



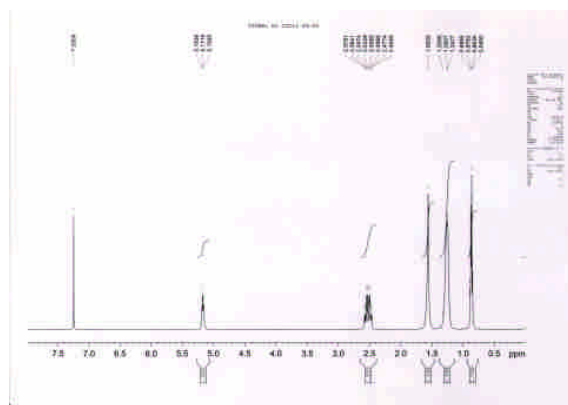
圖二十二 以 Sodium octanoate 發酵所得 PHA 之 DSC 分析圖



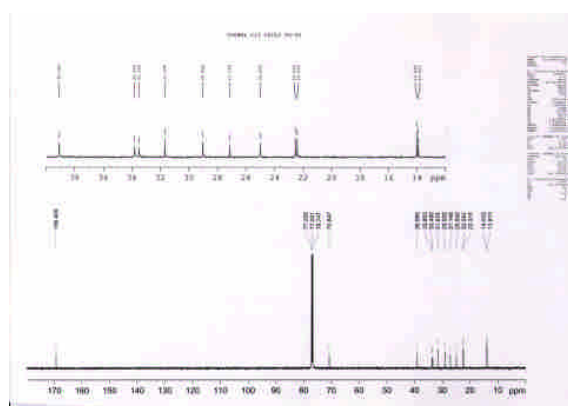
圖二十三 使用混合碳源發酵所產生 PHOU 之 ^1H -NMR 圖譜



圖二十四 使用混合碳源發酵所產生 PHOU 之 ^{13}C -NMR 圖譜



圖二十五 利用 nonanoic acid 發酵所得 PHHN 之 ^1H -NMR 圖譜



圖二十六 利用 nonanoic acid 發酵所得 PHHN 之 ^{13}C -NMR 圖譜