

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 環境學科

第一名

052608

以甲醇與甲酸為營養源評估甲醇利用菌的碳利
用效能

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 俞詠懿	指導老師： 陳怡旻
---------------	--------------

關鍵詞：零碳排、甲醇利用菌、甲醇

得獎感言

科展——一場全方位的自我提升之旅

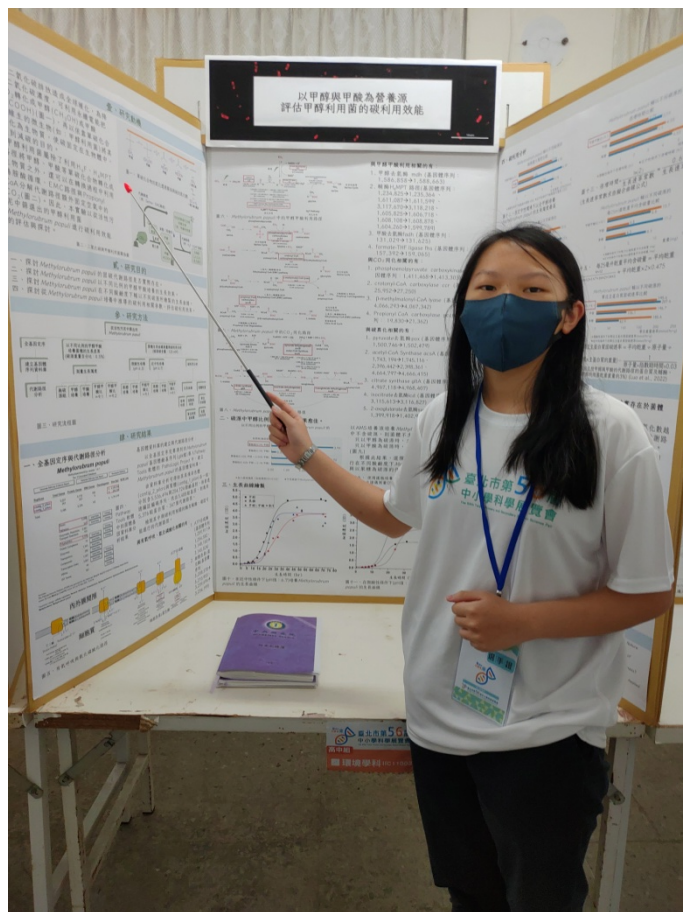
一年級開始做科展，起初只是做實驗，後來想把它變成一份成果，所以在懵懂的狀況下參加科展。始料未及的是這是一場全方位的自我提升之旅。

從校內、北市，再到全國的舞台，歷經了數次的選拔和比賽，逐步鍛煉了自己的實力和信心。每一次的勝利都包含許多人對我的幫助，而每一次的挫折也是我不斷前進的動力。

隨著比賽的推進，逐漸意識到科展不僅僅是展示成果，更是一個全方位的挑戰。從科學研究的深入，到項目的設計與製作，再到現場的展示和答辯，每一個環節都在考驗著專業知識和應變能力。往返在迎接新的難題及解決問題的反覆過程中，快速累積自己的實戰經驗值。

這些努力和堅持，不單是為了一個名次，更是一場持續不斷超越自我的成長之旅。每一次的準備和練習都在不斷地反思、優化，不斷提高自己的專業素養和表達能力。尤其在賽前的準備階段，需要請假、調整時間表，花費大量的心力去練習和準備。其中的辛苦和付出，只有自己能夠體會。然而，也正是這些，讓我在賽場上能夠更加從容自信地展現自己，最終獲得了評委的肯定。

回首這段科展的歷程或許會感嘆這一路的辛苦，但更多的是自豪和感激。最終的成績只是這段歷程的一個縮影，而獲得的遠不止於此。感謝這次機會、感謝所有人幫助、感謝這段歷程，為我的人生累積了許多寶貴的經驗，讓我更加堅韌、自信，並樂於迎接未來的一切挑戰。



北市賽佈展後的試講



在全國展上與指導老師的合影

摘要

本研究以化工廠的活性污泥中篩出的甲醇利用菌 *Methylobacterium populi* 進行研究，經全基因定序得知其具備染色體與質體各一組，再經序列分析找出 5488 組基因、對應 5376 組蛋白質與 347 個代謝路徑，其中包含可以利用甲醇、甲酸進行生合成的多條路徑。在不同的酸鹼值下，以不同比例的甲醇、甲酸為碳源，輔以鉍鹽礦物鹽基礎培養液培養，測量此菌生長曲線的變化，由此推得生長半生期、倍增時間等各項參數，並分析乾燥後菌體的氮、碳、氫元素比例，以評估其碳利用效率。分析結果在 pH 6.7、以甲醇為碳源的狀況下，以其碳排 46.7% 減去碳利用率 53.3%，顯示此反應甚至可達到負碳排。

壹、前言

一、研究動機

現今科技快速發展的同時，也造成二氧化碳（CO₂）的過度排放，使得全球暖化加劇。因應此問題，目前已有利用永續電能，如太陽能、風電、潮汐能等，以電化學技術把 CO₂ 先轉化成較易儲存的液態甲醇（CH₃OH）或甲酸（HCOOH），再轉換為碳數較高的乙醇、乙烯供利用。藉由 CO₂ 再利用來減低碳排之技術已臻成熟，邁入量產階段。（Masel et al., 2021）然而，產製乙醇、乙烯需要耗費大量能源，是美中不足的地方。若能利用微生物替代此反應，可以將空氣中的 CO₂ 以低耗能且高碳利用的方式成為資源，並有效延緩溫室效應。

目前已知能夠利用單碳化合物的細菌大致可歸納為三類：

- （一）嗜甲烷菌，又稱甲烷利用菌，可以將甲烷轉換成生物質（Biomass）。過去研究發現，其中特定菌系能夠利用絲胺酸循環（serine cycle）與卡爾文循環（Calvin cycle）（Henard et al., 2021），同時固定 CO₂ 與甲烷等兩大溫室氣體來源。
- （二）嗜二氧化碳菌，代表菌系為 *Cupriavidus necator* 或 *Ralstonia eutropha*，體內具備卡爾文循環，可運用 CO₂ 加氫氣或是直接以甲酸培養，是可以固定溫室氣體中 CO₂（Claassens et al., 2020）的少數菌系之一。

(三) 嗜甲醇菌，又稱甲醇利用菌 (*Methylobacterium* 屬) (Vuilleumier et al., 2009;

Šmejkalová et al., 2010) 可將甲醇、甲酸等單碳化合物轉化成生物質。而在轉換過程中，絲胺酸循環、乙基丙二酰輔酶 A 路徑 (Ethylmalonyl CoA pathway) 與丙醯輔酶 A 分解代謝路徑 (Propionyl CoA Degradation pathway) 會額外固定空氣中的 CO₂，產生生物質。

植物是典型的負碳生物，可將 CO₂ 固定為生物質，減少空氣中的 CO₂。以大氣中原有的 CO₂ 量作為基準 (400ppm)，生物代謝反應後的大氣 CO₂ 濃度增加，即為正碳生物；若反應前後的大氣中的 CO₂ 量不變，即為零碳排。

甲醇利用菌除了可以利用單碳化合物之外，還可進行額外的固碳，因此本研究以實驗室從石化精煉廠的活性污泥中篩選出甲醇利用菌 *Methylobacterium populi* (以下簡稱 *M. populi*) 進行研究。*M. populi* 是革蘭氏陰性桿形菌 (Gram-negative soil bacterium)，長度約為 0.8~1.0μm × 1.0~10.0μm (圖 1) (Li et al., 2020) 在液態培養時可觀察到其自行產生的粉色素 (pink-pigmented) (圖 2)。

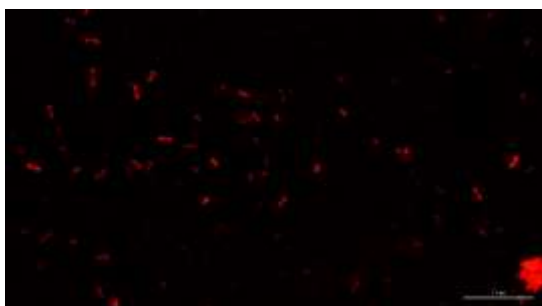


圖 1、螢光顯微鏡下的 *M. populi* (附尺標) (張宗瀚，2021)



圖 2、*M. populi* 培養兩天後，菌液明顯轉為粉色 (張宗瀚，2021)

為了解 *M. populi* 的碳利用效能，設計實驗以永續電能所產製的甲醇或甲酸等單碳化合物進行細菌培養，確認其生長狀況，並經由回收的菌體測量碳元素的挹注與消耗，以計算其能量利用率，並與已知的植物系統及藍綠菌做比較。

二、文獻探討

基於甲醇利用菌的主體染色體基因體數據中找出的基因序列訊息 (coding sequence, CDS)，可了解到在甲醇利用菌代謝甲醇與甲酸的過程中，具備完整的單碳循環路徑 (圖 2 及圖 3)。其中，在利用四氫甲基蝶呤 (Tetrahydromethanopterin, H₄MPT) 作為輔酶的路徑

中（圖 2），甲醇會先由甲醇去氫酶轉為甲醛、再異化成甲酸，釋放四個電子的還原能，以產製 NADH，再與有氧呼吸作用配合，產生 ATP；若以甲酸為碳源培養甲醇利用菌或甲醇經分解變為甲酸，輔酶 H₄F 可能進行異化作用或同化作用。在異化作用中，會透過甲酸去氫酶使甲酸分解成二氧化碳排出菌體，釋放出兩個電子的還原能；若進行同化作用，甲酸會在輔酶四氫葉酸（Tetrahydrofolate, H₄F）的幫助下，和葉酸同化、形成甘胺酸（glycine），進入絲胺酸循環、乙基丙二酰輔酶 A 路徑與丙醯輔酶 A 分解代謝路徑，與 CO₂ 合成，進行生合成（圖 3）。

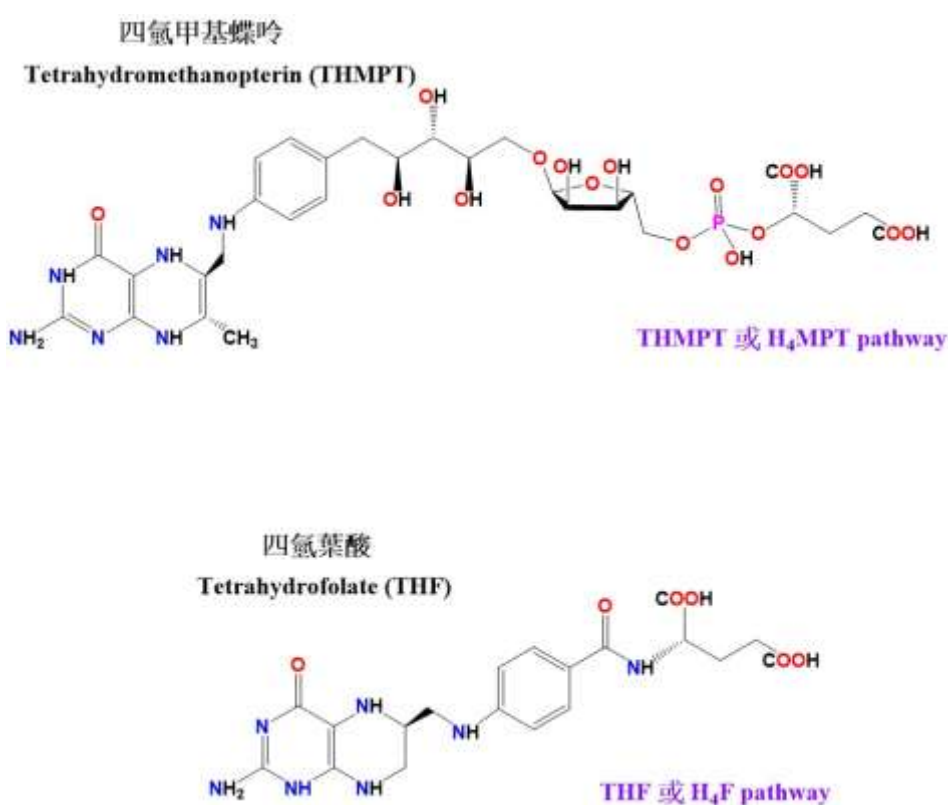


圖 2、負責單碳循環的輔酶四氫甲基蝶呤（Tetrahydromethanopterin, H₄MPT）與四氫葉酸（Tetrahydrofolate, H₄F）之化學結構（以 ChemDraw Professional 軟體，（PerkinElmer Informatics, Inc.）繪製）

在絲胺酸循環中，三碳的 phosphoenolpyruvate 加上一分子 CO₂，產製 ATP，生成四碳的 oxaloacetate（基因圖譜序列 1,411,684 → 1,413,303 bp, 25.5 centisomes）；在乙基丙二酰輔酶 A 路徑中，四碳的 crotonyl CoA 與一分子的 CO₂ 結合，生成五碳的 ethylmalonyl CoA（基因圖譜序列 25,952 → 27,250 bp, 0.47 centisomes），再轉成β-methylmalyl CoA，透過分

解酶（基因圖譜序列 1,580,305 → 1,581,279 bp，28.54 centisomes 或 4,066,293 → 4,067,342 bp，73.45 centisomes）生成二碳的 glyoxylate 與三碳的 propionyl CoA。glyoxylate 可進入絲胺酸循環合成甘氨酸。propionyl CoA 則會進入丙醯輔酶 A 分解代謝路徑，與 CO₂ 或 HCO₃⁻ 同化，形成四碳的(2s)-methylmalonyl CoA（基因體序列：19,830 → 21,362 bp，0.36 centisomes），這些路徑可將甲醇與甲酸經分解代謝（catabolism）後產生的 CO₂，再回收進行碳利用（圖 3）。



圖 3、甲醇利用菌合成代謝路徑中的絲胺酸循環、乙基丙二酰輔酶 A 路徑、丙醯輔酶 A 分解代謝路徑與檸檬酸循環 (參考 Šmejkalová et al., 2010，以 ChemDraw Professional 軟體，(PerkinElmer Informatics, Inc.) 重新繪製)

在甲醇利用菌的基因體分析裡，亦可找出進行有氧呼吸作用的檸檬酸循環（圖 3），與細胞膜上的細胞色素 *c* 氧化酶、*bc*₁ 暨 *bd* 暨 *bo*₃ 利用細胞內膜內外質子濃度的差異，產製 ATP（圖 4）。但由於本研究均在曝氣環境下進行培養，生物體會進行有氧呼吸排出 CO₂，如圖 3 中磷酸烯醇丙酮酸（phosphoenolpyruvate）產生乙醯輔酶 A（Acetyl CoA），進入檸

檸檬酸循環。這個反應雖會降低整體的碳利用效率，卻可提供 NADH 與 ATP 等，維繫甲醇利用菌生存或產製醱類分子等生物質的能量。因此，在此研究條件下，即便在利用永續電能的狀況下可有效率地將 CO₂ 還原為還原性的甲醇與甲酸，仍不預期整體微生物系統的碳利用效率可達到百分之百。但若適當地調整其生長方式，或許可透過高固碳效率，達到 CCUS (CO₂ Capture, Utilization, Storage) 的目標。

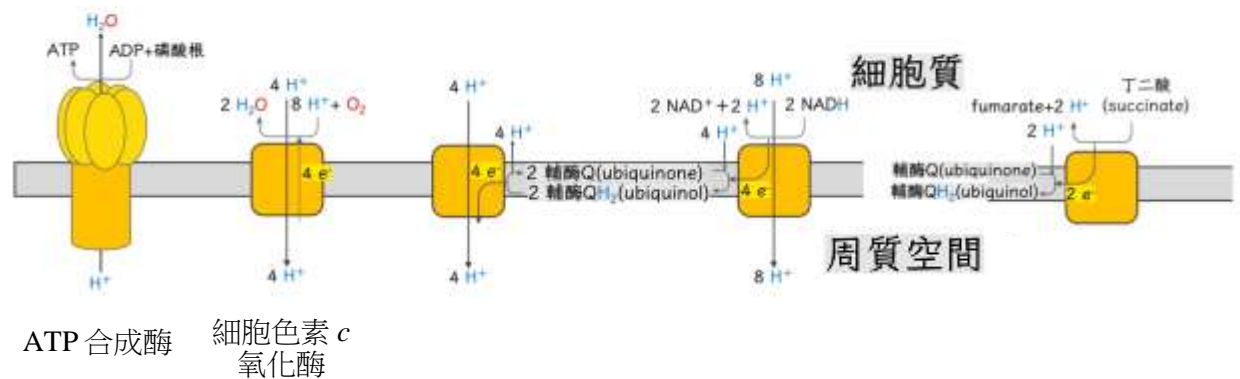


圖 4、有氧呼吸與氧化磷酸化路徑 (oxidative phosphorylation) (擷取自 Pathway Tools 軟體 (Karp et al., 2021) 內之圖示重繪)

三、研究目的

本研究從以下幾點探討 *M. populi* 的碳利用：

- (一) 以全基因定序探討 *M. populi* 是否具有碳利用相關代謝路徑。
- (二) 以不同比例的甲醇與甲酸為碳源培養 *M. populi*，了解不同碳源對其生長狀況的影響。
- (三) 探討 *M. populi* 在不同酸鹼度下的生長趨勢。
- (四) 利用從生長趨勢推導出的參數，評估其生長速率。
- (五) 以 *M. populi* 的乾重與其中各項元素佔比，評估其碳利用效能。

貳、研究設備及器材

<p>二位分析天平 (2-Decimal Balance) Denver Instrument TP-3120</p> 	<p>四位分析天平 (4-Decimal Balance) METTLER YOLED0, AG 204</p> 	<p>高溫高壓滅菌釜 (Autoclave) TOMIN, TM-329, 121°C, 1.2 Kg/cm</p> 	<p>精密熱風循環烘箱 DOS60</p> 
<p>生物安全櫃 (BSC) NUAIRA Biological Safety Cabinets, Class II TYPE A/B3 標準型 附有紫外光滅菌燈, 鼓風車及無菌蜂鳴警報器</p> 	<p>旋轉式恆溫震盪培養箱 (Orbital Shaker Incubator) FIRSTEK SCIENTIFIC, S300R</p> 	<p>微量離心機 (Microcentrifuge) Thermo, Heraeus Pico 最高轉速 13300rpm</p> 	<p>相位差光學顯微鏡 LEICA, DMLB; 接目鏡: 10X, 20X, 40X, 100X (油鏡) 附多種濾鏡, 可調光源及照相鏡頭</p> 
<p>桌上型離心機 Z 326K, HERMLE Labortechnik GmbH 使用轉子 220.78, 最大轉速 15000rpm</p> 	<p>紫外光-可見光光譜儀 (Ultraviolet-Visible Spectrophotometer) HP 8453, 含有恆溫槽, 紫外光 (氙燈) 與單光束可見光 (鎢絲燈)</p> 	<p>酸鹼度測定儀 (pH Meter) Sutex, SP-2200</p> 	<p>微電腦智慧操控酸鹼度計 Great & Best GL01-PL-700PV, 測量範圍: pH -2.0~16.0</p> 

參、研究過程或方法

一、研究流程圖

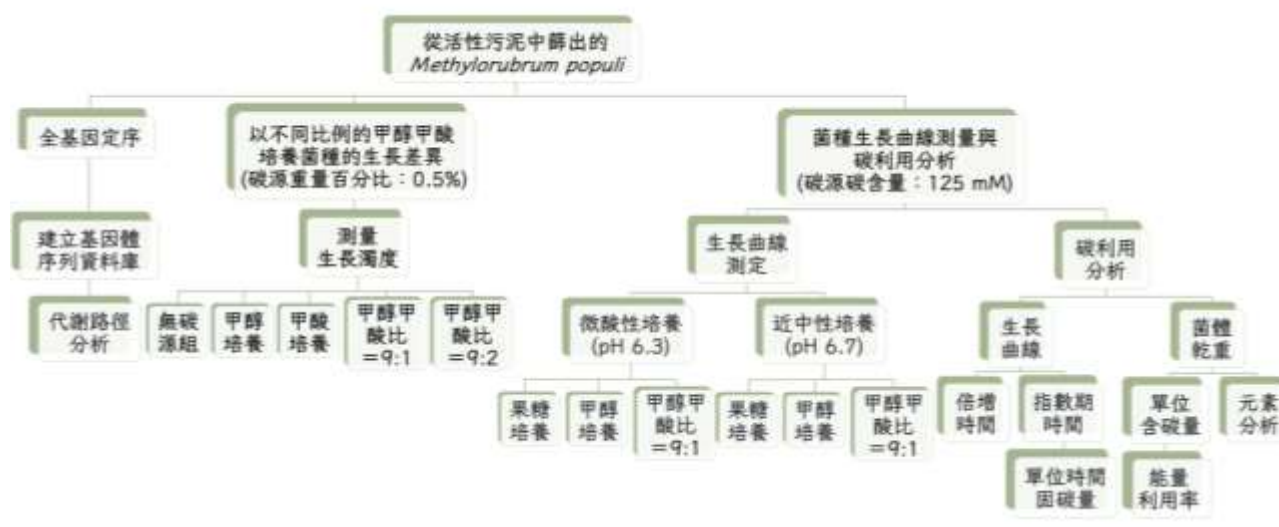


圖 5、研究流程圖

二、菌種篩選與培養

(一) 配製 AMS 培養液

培養步驟如下：

1. 溶液調製

溶液 1：在 1000ml 的蒸餾水中加入 7g 的 Na_2HPO_4 、5g 的 KH_2PO_4 與 10g 的 NH_4Cl ，配置成稀釋 10 倍的 AMS Salt solution 1L。

溶液 2：在 71 毫升的蒸餾水中加入 50g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，配置成 50% Mg solution 100.0 毫升。

溶液 3：在 35.5 毫升的蒸餾水中，加入 25g 的 CaCl_2 ，配置成 50% Ca solution 50 毫升。

溶液 4 分別將：1 毫升的 10N HCl、1g 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.20g 的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.30g 的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05g 的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.03g 的 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05g 的 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g 的 H_3BO_3 與 0.05g 的 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ，溶入蒸餾水中，再加蒸餾水調整到 100.0 毫升，配置成稀釋 1000 倍的 Trace metal 100 毫升。

溶液 5：在 20 毫升的蒸餾水中加入 0.11g $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 與 0.15g 的 Na_2EDTA ，配置成 5.5g/L Chelated Iron Solution 20 毫升。

2. 組合成 AMS 培養液

將步驟 1 中配置完畢的五瓶溶液，各取如下：溶液 1（10X AMS Salt solution）取 2.5 毫升；溶液 2（50% Mg solution）取 50 μ l；溶液 3（Ca solution）取 5 μ l；溶液 4（1000X Trace metal）取 25 μ l；溶液 5（5.5g/L Chelated Iron Solution）取 20 μ l；加蒸餾水 22.267 毫升，配置成 25 毫升的 AMS 培養液。加入菌液後，測量 600nm 的吸光度，OD_{600nm}=0.03，以此為菌液起始濃度。

（二）菌種培養

各組培養液的配置與培養如表 1。無菌操作取 20 毫升的培養液（碳源 0.10g~0.11g，起始菌濃度 OD_{600nm}=0.03）加入錐形瓶，蓋上透氣塞後置入培養箱中，在 30°C、195rpm 的條件下，培養兩天。

表 1、*M. populi* 輔以不同碳源的培養液的配置

	控制組	操縱組 A	操縱組 B	操縱組 C	操縱組 D
碳源	無碳源，只 加培養液	甲醇 0.1g (0.5%)	甲酸 0.1g (0.5%)	甲醇 0.09g(0.45%)+ 甲酸 0.01g(0.05%)	甲醇 0.09g(0.45%)+ 甲酸 0.02g(0.1%)

（三）濃度測量

培養兩日後，從錐形瓶中取少量菌液，以去離子水稀釋十倍後置入比色管（以遵守比爾定律）。將待測液放入紫外光-可見光光譜儀，開啟白熾燈後以 600 nm 的可見光測量細菌濁度（OD_{600nm}），以反應菌液的生長狀態。

三、基因體分析

以三代定序法 Oxford Nanopore 透過偵測含氮鹼基通過奈米孔（Nanopore）的電流訊號辨識其序列，但 Oxford Nanopore 受限於其所測定的序列約有 10-15% 的錯誤率。而二代定序法 Illumina 的正確率達到 99.9%，但須將長片段基因打碎至可定序之長度，定序完畢後再重組。若使用二代定序法 Illumina 定序之序列中具高度重複序列、複雜結構或高變化性序列，容易造成無法確定其序列位置的情況。（Justin, n.d.）

因此本研究委由圖爾思生技（BIOTOOLS）進行全基因體定序，以三代定序法 Oxford Nanopore 的定序結果為模板，重組二代定序法 Illumina 的定序結果。以全基因定序完畢得到

的 *M. populi* 基因體鹼基序列 (gbk 檔) 導入 Pathway Tools 軟體的 PathoLogic Project 中，建立其基因體資料庫。

四、生長曲線測定

(一) 配製不同酸鹼度的 AMS 培養液

1. 調製微酸性 AMS 緩衝溶液

在 1000 毫升的蒸餾水中加入 20 μ l 的 1.8M 硫酸配置成 1000 毫升的含稀硫酸蒸餾水。再加入 7g 的 Na₂HPO₄、5g 的 KH₂PO₄ 與 5.4g 的 NH₄Cl，配置成稀釋 10 倍的微酸性 AMS 緩衝溶液 1L。

2. 調製近中性 AMS 緩衝溶液

在 1000 毫升的蒸餾水中加入 7g 的 Na₂HPO₄、5g 的 KH₂PO₄ 與 5.4g 的 NH₄Cl，配置成稀釋 10 倍的近中性 AMS 緩衝溶液 1L。

3. 溶液調製

不同酸鹼度下的 AMS 培養液配置如表 2。各碳源碳元素均控制在 125mM (果糖為 6 個碳，因此稀釋後的濃度為 20.8mM)，每份培養液加入碳源中的碳重均為 37.5 毫克，加入菌液後，以紫外光-可見光光譜儀測量濁度均為 OD_{600nm}=0.03。

表 2、*M. populi* 在不同酸鹼度下輔以不同碳源的培養液配置表

	微酸性 AMS 培養液 (pH 值：6.3)			近中性 AMS 培養液 (pH 值：6.7)		
	控制組	操縱組 A	操縱組 B	控制組	操縱組 A	操縱組 B
碳源	果糖 188 μ l	甲醇 128 μ l	甲醇 115 μ l、 甲酸 43 μ l (甲醇甲酸比 =9:1)	果糖 188 μ l	甲醇 128 μ l	甲醇 115 μ l、 甲酸 43 μ l (甲醇甲酸比 =9:1)

AMS 培養液 配置	微酸性 AMS 緩衝溶液取 2.5 毫升； 溶液 2 (50% Mg solution) 取 50 μ l； 溶液 3 (Ca solution) 取 5 μ l； 溶液 4 (1000X Trace metal) 取 25 μ l； 溶液 5 (5.5g/L Chelated Iron Solution) 取 20 μ l； 加蒸餾水 22.267 毫升，配置成 25 毫升的微酸性 AMS 培養液 (pH 值：6.3)。	近中性 AMS 緩衝溶液取 2.5 毫升； 溶液 2 (50% Mg solution) 取 50 μ l； 溶液 3 (Ca solution) 取 5 μ l； 溶液 4 (1000X Trace metal) 取 25 μ l； 溶液 5 (5.5g/L Chelated Iron Solution) 取 20 μ l； 加蒸餾水 22.267 毫升，配置成 25 毫升的近中性 AMS 培養液 (pH 值：6.7)。
------------------	--	--

(二) 菌液培養

無菌操作取 25 毫升的菌液 (起始菌濃度 $OD_{600nm}=0.03$) 加入錐形瓶，蓋上透氣塞後置入培養箱中，在 30°C、195rpm 的條件下，培養 72 小時。培養初期約兩個小時間隔進行取樣，至指數期後，延長至 12 至 24 小時進行取樣，以紫外光-可見光光譜儀，測量細菌濁度。

(三) 測量菌重

1. 菌種濕重

經過 72 小時培養後，取 12.5 毫升菌液離心。去除上清液後，放入已秤重並烘乾的微量離心管，在微量離心機中再次離心，去除上清液後以四位分析天秤秤重四次取平均數即可得到菌種平均濕重。

2. 菌種乾重

將測過濕重的菌加入去離子水回溶，滴在 EBL Biotechnology 公司的 PTFE 疏水膜上進 100°C 烘箱烘乾。以四位分析天秤秤重四次取平均數即可得到菌種平均乾重。

(四) 元素分析

將烘乾的菌種進行氮、碳、氫元素分析。採用高溫動態燃燒法，樣品掉入燃燒管前，使其瞬間燃燒溫度達 1800，故樣品在燃燒管內的高濃度氧氣流中氧化分解，再與還原管中的銅粉反應，轉為成 N_2 、 CO_2 、 H_2O 等氣體，並通過吸附/脫附管分離。最終由熱傳導檢測器 (TCD) 進行檢測，經過內建軟體計算得出氮、碳、氫的重量百分比。

肆、研究結果

一、菌種培養

活性污泥以四區畫線法畫在培養皿上取得單一菌落（圖 6），經培養基培養後，接種至含 20 毫升 AMS 基礎培養液的 250 毫升錐形瓶內，進行為期兩天的培養後，再次以紫外光-可見光光譜儀測量濁度，實驗結果如表 3，其中以純甲醇組生長最佳，無碳源組菌體無法生長。（圖 7）



圖 6、*M. populi* 以四區畫線法培養結果

表 3、*M. populi* 輔以不同碳源培養兩日的結果比較表

	控制組	操縱組 A	操縱組 B	操縱組 C	操縱組 D
碳源	無碳源，只加培養液	甲醇 0.1g (0.5%)	甲酸 0.1g (0.5%)	甲醇 0.09g(0.45%)+ 甲酸 0.01g(0.05%)	甲醇 0.09g(0.45%)+ 甲酸 0.02g(0.1%)
濁度	OD _{600nm} ≈ 0.03 (與起始菌濃度相仿)	OD _{600nm} = 3.94	OD _{600nm} = 0.31	OD _{600nm} = 3.72	OD _{600nm} = 3.0

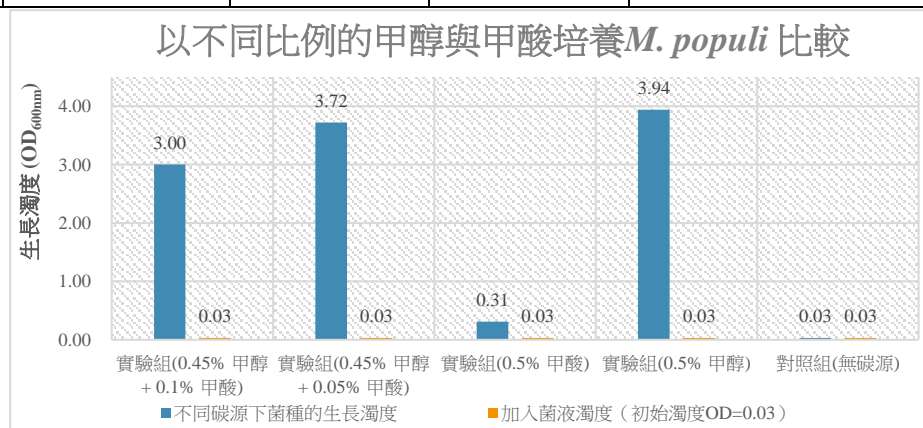


圖 7、以不同碳源培養 *M. populi* 兩日的生長結果

培養後以光學顯微鏡進行鏡檢，*M. populi* 呈現長桿狀，與文獻相符。（圖 8）



圖 8、光學顯微鏡底下的 *M. populi*

二、基因體分析

由資料庫分析可得知其具備染色體（contig_2_pilon）與質體（contig_1_pilon）各一組，分別含有 5,536,494 與 254,724 個鹼基對。接著再透過編註編碼序列，找出 *M. populi* 應有 5,488 組基因，對應到 5,376 組蛋白質，檢測其中相關的酶及輔酶，確認其可能進行的代謝路徑有 347 個（圖 9）。

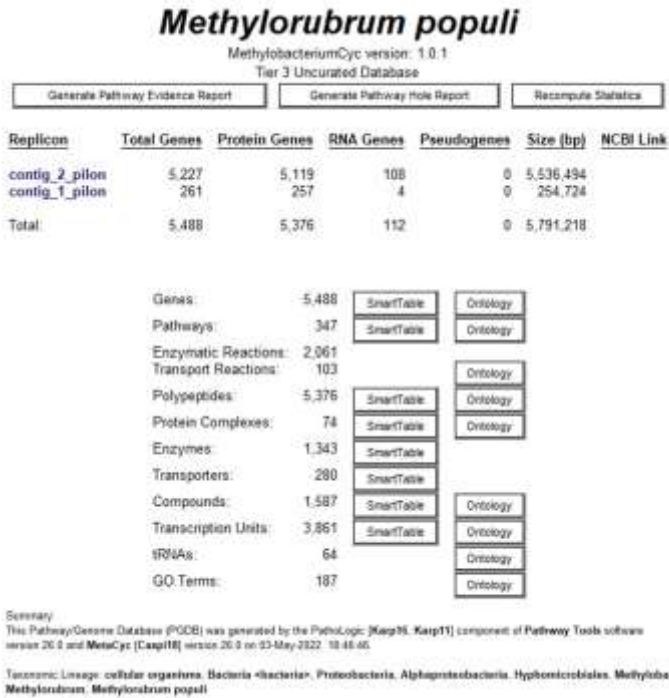


圖 9、*M. populi* 經定序後的數據導入 Pathway Tools 後呈現的基因組訊息（擷取自 Pathway Tools 軟體內之圖示）

三、生長曲線測定

（一）在微酸性條件下（pH 值：6.3）培養

在菌種培養過程中取樣，透過各時間點求得的濁度，以 OriginPro 軟體（OriginLab Corporation），進行非線性曲線擬合求得生長曲線（圖 10）：

只以果糖為碳源培養，細菌的最大濁度可達 $OD_{600nm}=2.70$ ；

只以甲醇為碳源培養，細菌的最大濁度可達 $OD_{600nm}=1.85$ ；

但以碳源的甲醇甲酸比為 9：1 培養的菌液，細菌的最大濁度優於果糖組，可達 $OD_{600nm}=3.86$ 。（圖 12）

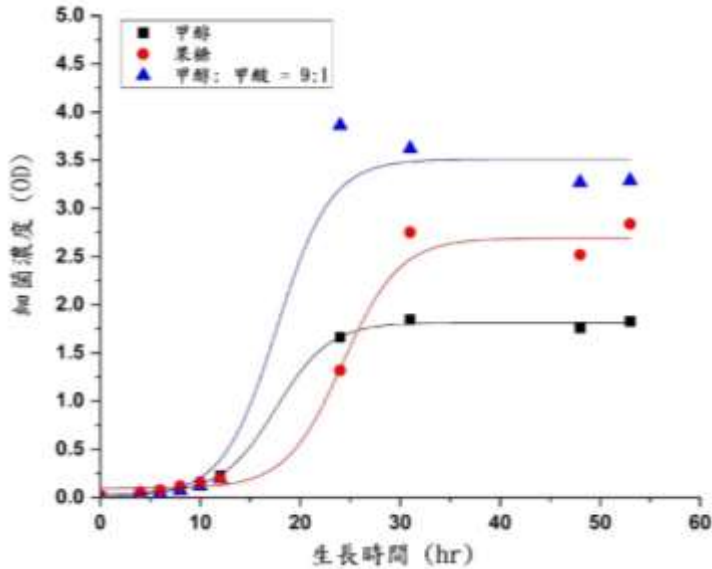


圖 10、*M. populi* 在微酸性條件下輔以不同碳源培養之生長曲線

（二）在近中性條件下（pH 值：6.7）培養

在菌種培養過程中取樣，透過各時間點求得的濁度，以 OriginPro 軟體，進行非線性曲線擬合求得生長曲線（圖 11）：

只以甲醇為碳源培養的菌液，細菌的最大濁度為各組中最大，可達 $OD_{600nm}=4.97$ 。

（圖 12）

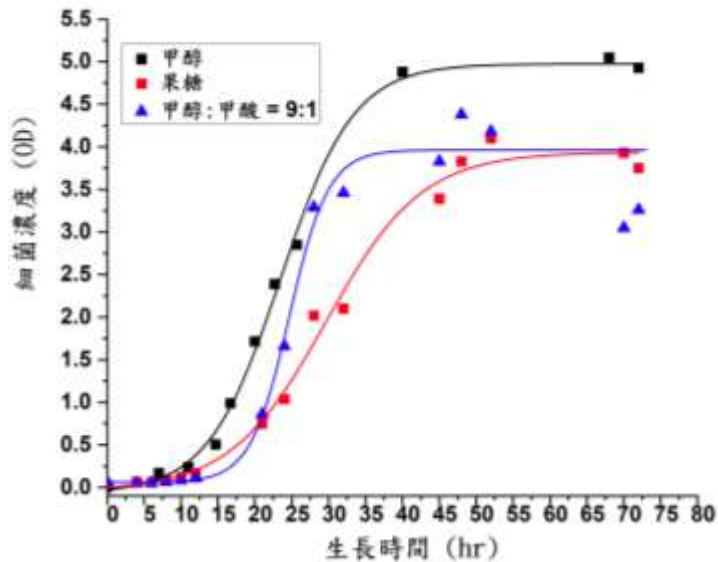


圖 11、*M. populi* 在近中性條件下輔以不同碳源培養之生長曲線

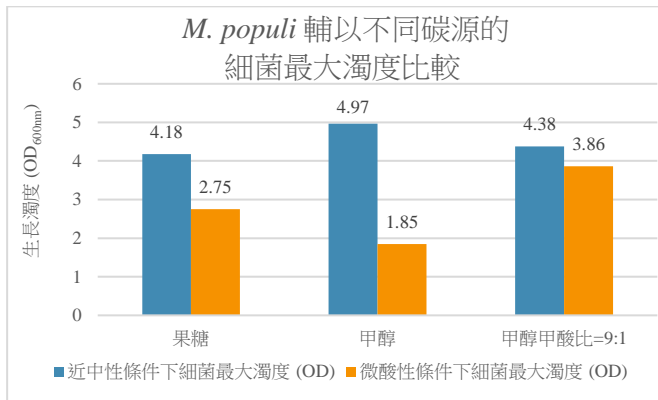


圖 12、*M. populi* 輔以不同碳源的細菌最大濁度比較

不論微酸性還是近中性的培養過程中，當生長進入指數期時，濁度均在 1.0 至 1.5 以上，此時菌液逐漸呈現粉紅色（圖 13），與文獻相同。



圖 13、*M. populi* 進入指數期後呈粉色

當細菌生長達停滯期（約 72 小時），即收集菌液並離心以測量濕重，將濃縮沉澱後的菌體以去離子水回溶，置於疏水膜上，在高溫烘箱乾燥後，測量乾重（圖 14、圖 15 與圖 16）。



圖 14、以甲醇為碳源的 *M. populi* 烘乾情況



圖 15、碳源甲醇甲酸比為 9:1 的 *M. populi* 烘乾情況



圖 16、以果糖為碳源的 *M. populi* 烘乾情況

(三) 以不同營養源培養 *M. populi* 的各項參數

由圖 10 與圖 11 擬合求得的生長曲線，可推導下列參數：

$$1. \text{ 生長半生期} = \frac{\text{菌體生長到最大值所需時間}}{2} \text{ (式一)。}$$

透過細菌最大濁度（圖 12）求得生長半生期。在微酸性的條件下，以甲醇與甲醇甲酸比=9:1 為碳源的生長半生期皆低於 18 小時以下；而在近中性的條件下，各營養源的生長半生期皆在 24 小時以上（附錄-表 1 與圖 17）。

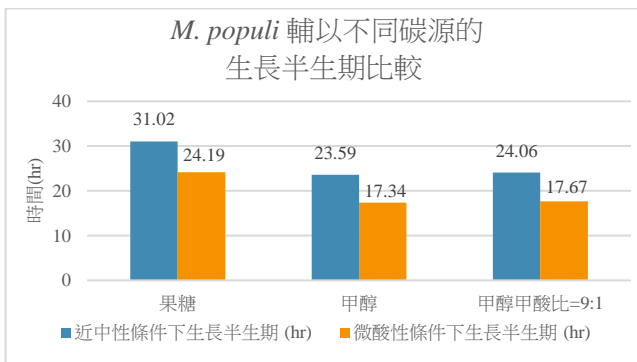


圖 17、*M. populi* 輔以不同碳源的生長半生期比較

2. 利用細菌濁度在離開生長對數期的曲線點，根據軟體 OriginPro 中指數擬合 (Exponential (Category)) 的公式 $N = N_0 e^{kx}$ (式二) (Exp2PMod1 (Function)) 得到生長速率常數，再由倍增時間 $= \frac{\ln(2)}{\text{生長速率常數}} \approx \frac{0.693}{\text{生長速率常數}}$ (式三)，得到各組的倍增時間。

透過軟體非線性曲線擬合生長曲線時（圖 10 與圖 11）求得的生長速率常數，可換算成菌體增加一倍的平均時間。其中 *M. populi* 以甲醇甲酸比=9:1 為營養源的倍增時間最短，平均 3.26 小時；以甲醇為營養源的 *M. populi* 介於中間，平均為 3.77 小時；而果糖的倍增時間

最長、生長最慢，平均為 5.08 小時（附錄-表 1 與圖 18）。此結果顯示，在相同碳元素的濃度下（125 mM），使用不同的營養源的生長效果明顯具有差異，其中甲酸的使用效率極可能高於甲醇，而甲醇又高於果糖，此結果顯示，碳利用效率與營養源高度相關。

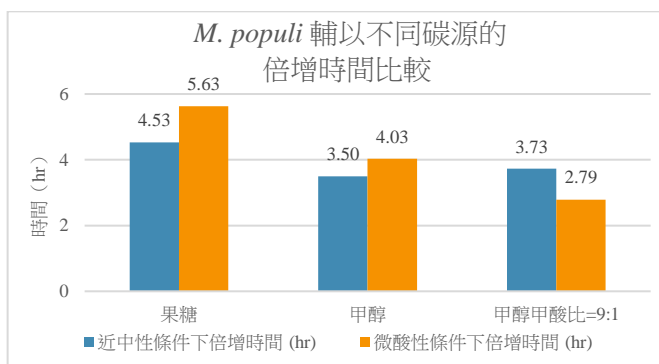


圖 18、*M. populi* 輔以不同碳源的倍增時間比較

3. 同時由平均濕重 = $\frac{\sum_{i=1}^4 (\text{微量離心管重} + \text{含水菌重})_i}{4} - \frac{\sum_{i=1}^4 \text{微量離心管重}_i}{4}$ (式四) 與

平均乾重 = $\frac{\sum_{i=1}^4 \text{疏水膜重} + \text{烘乾菌重}}{4} - \frac{\sum_{i=1}^4 \text{疏水膜重}}{4}$ (式五)，得到 平均菌體含水百分比 =

$(1 - \frac{\text{平均乾重}}{\text{平均濕重}}) \times 100\%$ (式六)。

由細菌培養取得的乾重可以推導出每 25 毫升培養液的平均乾重。培養上，以近中性的培養條件下甲醇為營養源的平均菌乾重最高（23.5 毫克）；而在微酸性的培養條件下，以甲醇甲酸比 = 9:1 為營養源的平均菌乾重（22.6 毫克）高於同酸鹼度下以其他營養源培養的 *M. populi*（附錄-表 1 與圖 19）。

透過濕重與乾重可推得菌體的菌體含水百分比。在不同酸鹼度、不同碳源之培養菌體含水量不同，約 77% 至 86%，由此推得，不同的營養源供給與些微的酸鹼度差異會造成碳源代謝利用的不同，使得含水比例有差異（附錄-表 1 與圖 20）。

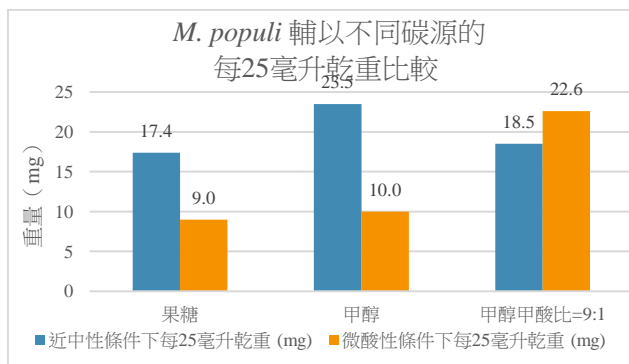


圖 19、*M. populi* 輔以不同碳源的每 25 毫升乾重比較

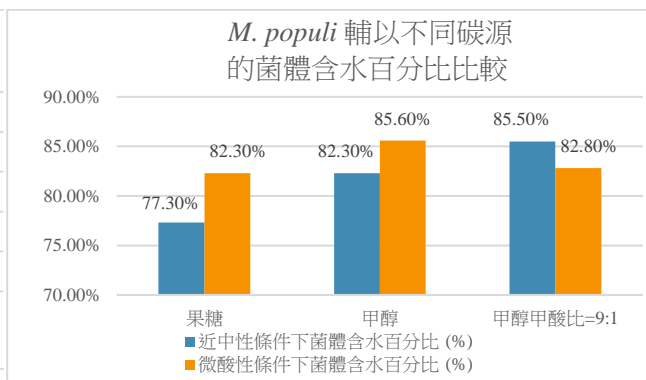


圖 20、*M. populi* 輔以不同碳源的菌體含水百分比比較

(四) 評估甲醇利用菌在碳利用效率

將高溫烘乾的菌體 (圖 14、圖 15、圖 16) 送往臺大進行元素分析後 (附錄-表 2)，得到以不同碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比 (附錄-表 2、圖 21、圖 22 與圖 23)。基於微生物菌體組成大致相同，又大腸桿菌的乾重簡式 $C_4H_7O_2N_1$ (Milo & Philips, 2015; von Stockar et al., 1999)，可得出大腸桿菌的碳重比例約 47.5%，實驗結果與文獻大致相符 (圖 24)。

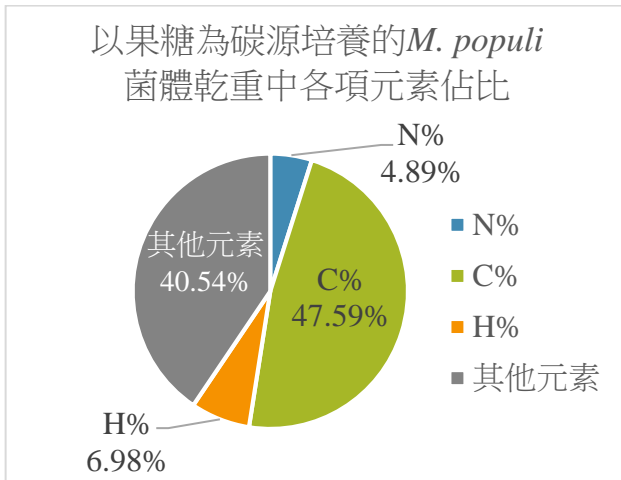


圖 21、以果糖為碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比

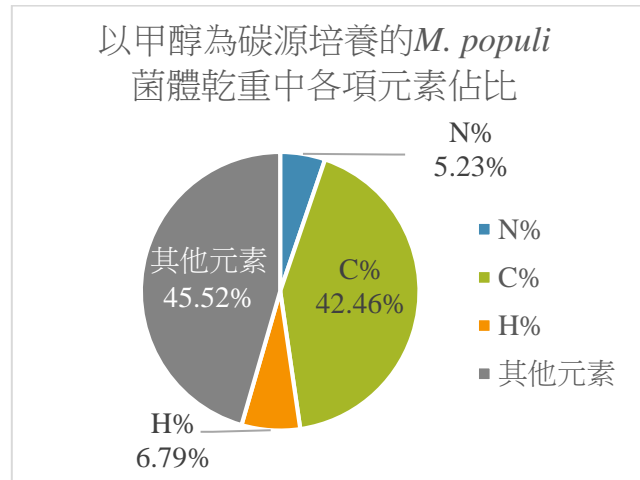


圖 22、以甲醇為碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比

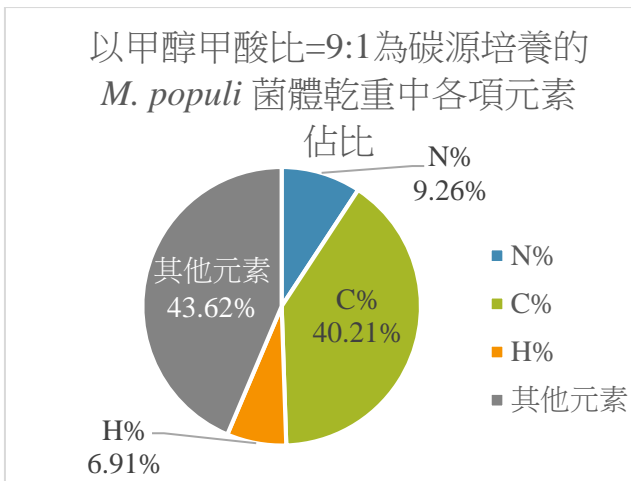


圖 23、以甲醇甲酸比=9:1 為碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比

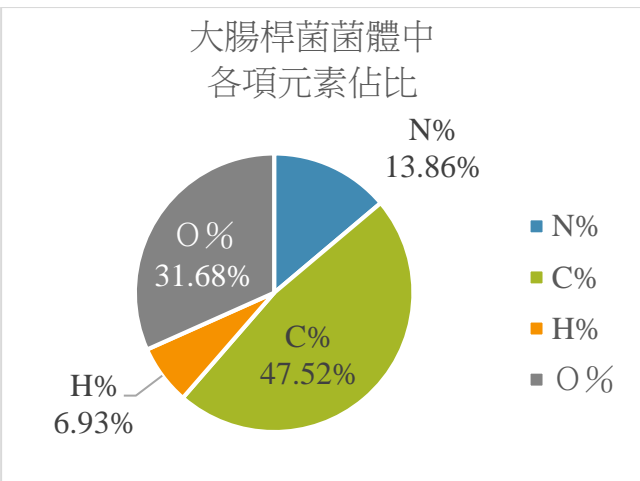


圖 24、大腸桿菌菌體中各項元素佔比

- 基於元素分析得到的碳元素在 *M. populi* 中的重量百分比，可推得 *M. populi* 的每 25 毫升菌乾重平均含碳量 = 25 毫升菌乾重 × 菌中碳佔比 (式七)。再從中推得 碳利用率 = $\frac{\text{評估菌體含碳量}}{\text{碳源的含碳量}} \times 100\% = \frac{\text{每 25 毫升菌乾重平均含碳量}}{37.5 \text{ mg}} \times 100\%$ (式八)。其中，碳源中碳元素的濃度均為 125 mM，加入碳源中的碳重為 37.5 毫克。

透過將乾重重量乘以碳元素在菌中佔比，在微酸性的條件下以甲醇甲酸比=9:1 為碳源的 *M. populi*，碳利用率可達到 24.23%，僅次於碳利用率最好的在近中性條件下以甲醇為碳源培養 *M. populi* 的 26.61%（附錄-表 3 與圖 25）。

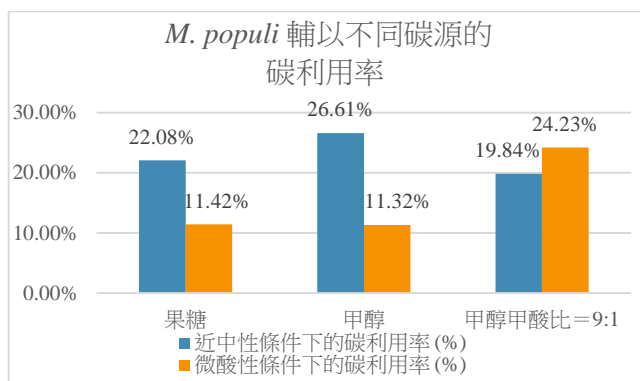


圖 25、*M. populi* 輔以不同碳源的碳利用率比較

- 全部蛋白質佔菌乾重的 50%（Luo et al., 2022），又微生物生長曲線指數期時間長度約等於生長曲線微分後四分之一高的寬度（圖 10 與圖 11），估算

$$\text{單位總蛋白質固碳速率} = \text{平均乾重} \div \text{原子量} \div (\text{生長曲線微分後四分之一高寬} \times \text{總蛋白質重量}) = \frac{1}{\text{原子量} \times \text{生長曲線指數期時間} \times 0.5} \text{ (式九)}。$$

評估 *M. populi* 生長曲線指數期時間長度約為生長曲線微分後的四分之一高寬，可藉此計算在微酸性與近中性的培養條件下以甲醇甲酸比=9:1 為營養源的線性生長期分別為，14.2 與 13.8 小時，其單位總蛋白固碳速率，為 12.5 與 11.7 mmol/hr·g（附錄-表 3 與圖 26），是藍綠菌（4 mmol/hr·g）的三倍左右（Luo et al., 2022），若在微酸性與近中性的培養條件下以甲醇為營養源，其線性生長期分別為 26.2 與 14.1 小時，其單位總蛋白固碳速率為 11.8 與 6.4 mmol/hr·g（附錄-表 3 與圖 26），亦優於藍綠菌的固碳速率。

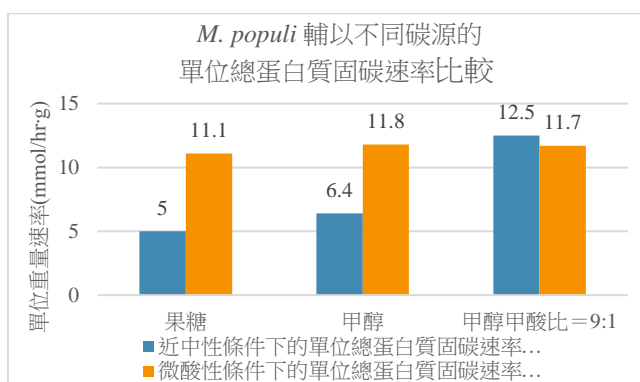


圖 26、*M. populi* 輔不同碳源的單位總蛋白質固碳量比較

伍、討論

化合物的氧化數越高，所含的還原能越低；反之亦然（圖 27）。以甲醇為碳源培養 *M. populi* 時，其代謝路徑會將甲醇轉化成 CO_2 ，並釋出六個電子（相當於三分子的 NADH 或 NADPH 所需的能量）；而以甲酸為碳源時，將甲酸轉化成 CO_2 只會釋出兩個電子。因同單位下，將甲醇轉為 CO_2 所得的能量約是甲酸的三倍，可用來固碳的能量較多，預期甲醇為碳源的生長效能較好。

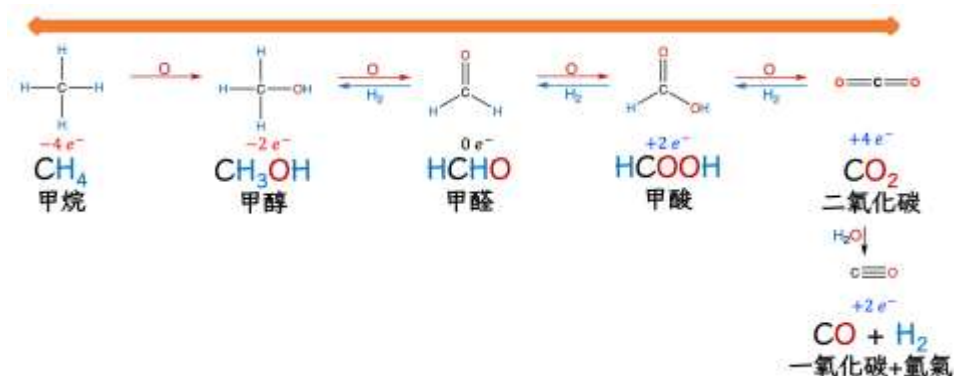


圖 27、單碳化合物的氧化還原關係與碳的氧化數比較

若改以甲酸為單一碳源，從實驗結果顯示（附錄-表 1），甲醇利用菌的生長狀況較以甲醇為碳源差。其原因在於以甲酸做唯一營養源供給時，甲酸除了作為碳源被轉為生物質以外，尚需要將甲酸進一步轉換成二氧化碳，透過甲酸水解酶（formate hydrolyase）將其轉為 NADH，提供菌體進行氧化磷酸化、產製 ATP 的能量來源。此外，一般微生物生長的最佳環境為 pH 6.5-7.0 左右，但甲酸分子的酸解離常數（ pK_a ）為 3.74（Yang et al., 2021），所以在加入甲酸的培養液中，甲酸大部分是以甲酸鹽（formate）的方式存在。革蘭氏陰性菌進行氧化磷酸化作用是利用其周質空間（periplasm）與細胞質（cytoplasm）的質子梯度差（proton gradient）推動質子泵（proton pump），以產生 ATP。但甲酸鹽的存在會抑制質子驅動力（proton motive force）（Mao et al., 2020），讓微生物無法製造足夠的 ATP 以維持微生物的生長。所以通常在以甲酸為碳源的狀況下，多半需合併其他的碳源，如甲醇或果糖一起培養，或以這些碳源為先驅營養源後，再加入甲酸做後續主要的碳源供給。

從近中性改為微酸性培養的條件下，以甲醇甲酸比=9:1 為碳源培養的 *M. populi* 生長的倍增速率明顯從 3.73 hr 增快至 2.79 hr（附錄-表 1 與圖 18），但菌種乾重仍比近中性下以甲

醇為唯一碳源 *M. populi* 低，這個結果顯示即便是低量的甲酸，仍可能對甲醇利用菌的生長造成影響。

在最少的營養源的供應下，光合作用轉換 CO₂ 成化合物的效率通常以藍綠菌 (cyanobacteria) 最高，可達 8-10% (Melis, 2009)，三碳及四碳植物則為 4.6-6% (Zhu et al., 2008)。以最低能量損耗的情況計算，除去無法被植物吸收的波長與光線反射、穿透造成的損耗，在 1000 KJ 的太陽光中大約僅有 37.2% 可以被三碳及四碳植物利用，再扣除呼吸作用 (三碳 80 kJ 與四碳 25 KJ)、醣類轉化與生物質合成 (三碳 246 kJ 與四碳 287 KJ) 所消耗的能量。實際上三碳及四碳植物固定的生物質能量，分別為 46 KJ 與 60 KJ，則能量利用率分別為 12.4% 與 16.1% (Zhu et al., 2008)。又由於其所固定的碳均來自大氣裡的 CO₂，所以是單純的負碳程序，但是如何其增加受光面積與固碳速率是它目前的瓶頸。

在以不同碳源培養 *M. populi* 時，僅研究給予的碳源具有可供菌體能量的還原能，故可將它視為菌體培養上唯一能量來源，經由能量利用率 = $\frac{\text{被菌固定下的生物質能量}}{\text{碳源提供的能量}} = \frac{\text{評估菌體含碳量}}{\text{碳源的含碳量}}$ = 碳利用率，可直接將碳利用率換算為能量利用效率。在近中性條件下，以甲醇作為碳源培養 *M. populi* 時，其能量利用效率為 26.61% (附錄-表 3 與圖 25)，高於三碳的 12.4% 與四碳植物的 16.1%。(Zhu et al., 2008) 若在相對微酸性的條件下，以甲醇為碳源培養的 *M. populi* 的能量利用率，大幅降低至 11.32%。但若在培養時碳源除甲醇外，輔以甲酸 (甲醇甲酸比=9:1)，則甲酸與甲醇的能量利用率升至 24.23% (附錄-表 3 與圖 25)。推測在相對酸性的條件下，甲醇的利用效率將會降低；但除甲醇外，輔以甲酸為碳源的 *M. populi*，可持續在微酸性的條件下進行有氧呼吸，而不會因質子梯度的過度衰減降低能量的利用效率，同時，甲酸利用完畢後，可使甲醇在較鹼性的環境下被利用。

甲醇的沸點為 65°C，在常溫下具揮發性。利用質子核磁共振光譜分析甲醇的逸散量，每天約揮發 20%-25%，培養三天的甲醇逸散率大約為 50%。(吳盈萱, 2022) 以未散逸的甲醇量做計算，則碳利用率應高達 53.3%。依此邏輯，碳源給予的碳中約有 53.3% 被 *M. populi* 利用來進行絲胺酸循環、乙基丙二酰輔酶 A 路徑等生合成路徑；而 46.7% 被應用在檸檬酸循環、丙酮酸氧化與氧化呼吸作用上，釋放 CO₂。則此反應對大氣中碳含量的影響應為 46.7% - 53.3% = -6.4%，達到負碳排。

永續電能將空氣中 CO₂ 轉化成為甲醇，再以此作為培養 *M. populi* 的碳源進行固碳程序，將生物質轉化成為燃料或可分解性塑膠（PHB），不但可以降低碳排，還可以進一步利用 CO₂。後續將評估如何降低甲醇利用菌的呼吸作用，增進減碳的效能，達到零碳排或負碳排的目標。

陸、結論

M. populi 在以甲醇為碳源時，生長狀況和細菌濁度皆較以甲酸為碳源時佳。且若要單純以甲酸為碳源，應輔以其他較營養之碳源或先以其他較營養的碳源培養至一定程度後，再將碳源改為甲酸。若在 pH 6.7 的狀況下培養，甲醇的碳利用率可達 26.61%，若視甲醇為唯一能量來源，將碳利用率換成能量利用率，約是三碳、四碳植物能量利用率的 2 倍；在相對酸性的條件下培養（pH 6.3），因在甲酸使用完畢後，pH 值會升到較適合 *M. populi* 使用甲醇的狀態，故除甲醇外，輔以甲酸可使酸性條件下的 *M. populi* 甲醇與甲酸的利用率提高至 24.23%（附錄-表 3 圖 25）。這兩種培養方式，能量利用率均較三碳、四碳植物高。

若考慮甲醇每日揮發比例，*M. populi* 的碳利用率高達 53.3%，超過檸檬酸循環與有氧呼吸作用產生的碳排，46.7%，對大氣中 CO₂ 量的影響達到 -6.4%。若甲醇與甲酸百分之百由大氣中的 CO₂ 經過電化學還原轉換獲得，則此系統可達到零碳排之目標。

此研究顯示，以甲醇培養 *M. populi* 可接近零碳排，甚至負碳排的目標。然而與有氧呼吸相關的排碳程序，仍在代謝路徑中占有相當重的比例。之後將評估降低甲醇利用菌的曝氣量，甚至嘗試利用無氧密閉的方式進行培養，應可減少甲醇揮發的影響，期待若永續電能可有效率地產製甲醇的程序量產工業化後，以甲醇作為碳源，基於 *M. populi* 的單位總蛋白質固碳速率優於進行光合作用的藍綠菌或植物系統，若可將其碳排推升至零碳，甚至負碳，則相關程序可有效利用於改善大氣 CO₂ 濃度，減緩溫室效應的衝擊，達到 CO₂ 的捕獲、封存及再利用的目標。

柒、參考文獻資料

吳盈萱（2022）。實驗記錄。中央研究院化學研究所。

張宗瀚 (2021) 。實驗記錄。中央研究院化學研究所。

Claassens, N. J., Bordanaba-Florit, G., Cotton, C. A. R., De Maria, A., Finger-Bou, M., Friedeheim, L., Giner-Laguada, N., Munar-Palmer, M., Newell, W., Scarinci, G., Verbunt, J., de Vries, S. T., Yilmaz, S., & Bar-Even, A. (2020). Replacing the Calvin cycle with the reductive glycine pathway in *Cupriavidus necator*. *Metabolic Engineering*, 62, 30-41.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.004>

Henard, C. A., Wu, C., Xiong, W., Henard, J. M., Davidheiser-Kroll, B., Orata, F. D., Guarnieri, M. T., & Cann, I. (2021). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO). Is essential for growth of the methanotroph *Methylococcus capsulatus* Strain Bath. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(18), e00881-00821. <https://doi.org/10.1128/AEM.00881-21>

Justin T. Li. (n.d.). Illumina, PacBio or Oxford Nanopore: Which one to choose? AccuraScience. https://www accurascience.com/blogs_3_0.html

Karp P. D., Midford, P. E., Billington, R., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse, M., Ong, W. K., Subhraveti P., Caspi R., Fulcher C. A., Keseler I. M., & Paley S. M. (2021). Pathway Tools version 23.0 update: software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in Bioinformatics* 22(1), 109-126. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz104>

Li, X., Wang, J., Jia, Y., Reheman, A., & Yan, Y. (2020). The Genome analysis of *Methylobacterium populi* YC-XJ1 with diverse xenobiotics biodegrading capacity and degradation characteristics of related hydrolase. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4436. <https://doi.org/10.3390/ijms21124436>

Luo, S., Lin, P. P., Nieh, L Y., Liao G.-B., Tang P.-W., Chen C., & Liao, J. C. (2022). A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system. *Nature Catalysis* 5, 154–162. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00746-x>

Mao, W., Yuan, Q., Qi, H., Wang, Z., Ma, H., Chen, T. (2020). Recent progress in metabolic engineering of microbial formate assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 6905-6917. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10725-6>

- Masel, R. I., Liu, Z., Yang, H., Kaczur, J. J., Carrillo, D., Ren, S., Salvatore, D., & Berlinguette, C. P. (2021). An industrial perspective on catalysts for low-temperature CO₂ electrolysis. *Nature Nanotechnology*, *16*(2), 118-128. <https://doi.org/10.1038/s41565-020-00823-x>
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, *177* (4), 272-280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.005>
- Milo R. & Philips R. (2015, July). Cell biology by the numbers. <http://book.bionumbers.org/what-is-the-elemental-composition-of-a-cell/>
- Šmejkalová, H., Erb, T. J., & Fuchs, G. (2010). Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: Demonstration of all enzymes and their regulation. *PLoS ONE*, *5*(10), e13001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013001>
- von Stockar, U. Liu, J. (1999). Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1412*(3), 191-211. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00065-1)
- Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M.-C., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J., Cruveiller, S., Dossat, C., Gillett, W., Gruffaz, C., Haugen, E., Hourcade, E., Levy, R., Mangenot, S., Muller, E., Nadalig, T., Pagni, M., Penny, C., Peyraud, R., Robinson, D. G., Roche, D., Rouy, Z., Saenampechek, C., Salvignol, G., Valennet, D., Wu, Z., Marx, C. J., Vorholt, J. A., Olson, M. V., Kaul, R., Weissenbach, J., Médigue C., & Lidstrom, M. E. (2009). *Methylobacterium* genome sequences: A reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS ONE*, *4*(5), e5584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005584>
- Yang, Q., Guo, X., Liu, Y., & Jiang, H. (2021). Biocatalytic C-C Bond formation for one carbon resource utilization. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1890. <https://doi.org/10.3390/ijms22041890>

Zhu, X.-G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.004>

捌、附錄

附錄-表 1、在不同酸鹼度下，利用果糖、甲醇與甲醇甲酸比=9:1 作為甲醇利用菌的營養源，保持營養源固定碳濃度 125 mM 下，由生長曲線所求得各參數數值

	微酸性條件下培養(pH 值：6.3)			近中性條件下培養(pH 值：6.7)		
	控制組	操縱組 A	操縱組 B	控制組	操縱組 A	操縱組 B
碳源	果糖	甲醇	甲醇甲酸比：9:1	果糖	甲醇	甲醇甲酸比：9:1
細菌最大濁度 (OD _{600nm})	2.75	1.85	3.86	4.18	4.97	4.38
生長半生期 (hr)	24.19	17.34	17.67	31.02	23.59	24.06
生長速率常數 (k)	0.123	0.172	0.248	0.153	0.198	0.186
倍增時間(hr)	5.63	4.03	2.79	4.53	3.50	3.73
平均濕重(mg)	50.7	69.5	131.6	77.2	79.0	128.0
平均乾重(mg)	9.0	10.0	22.6	17.4	23.5	18.5
平均菌體含水百分比 (%)	82.3%	85.6%	82.8%	77.3%	82.3%	85.5%

附錄-表 2、以不同碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比

	N%	C%	H%	其他元素
果糖	4.89%	47.59%	6.98%	40.54%
甲醇	5.23%	42.46%	6.79%	45.52%
甲醇甲酸比=9:1	9.26%	40.21%	6.91%	43.62%

附錄-表 3、*M. populi* 在中性、酸性條件下輔以不同碳源的固碳狀況比較

	微酸性條件下培養(pH 值：6.3)			近中性條件下培養(pH 值：6.7)		
	控制組	操縱組 A	操縱組 B	控制組	操縱組 A	操縱組 B
	果糖	甲醇	甲醇甲酸 比：9:1	果糖	甲醇	甲醇甲酸 比：9:1
每 25 毫升菌乾重 平均含碳量 (mg)	4.3	4.2	9.1	8.3	10.0	7.4
能量利用百分比 (%)	11.42%	11.32%	24.23%	22.08%	26.61%	19.84%
單位總蛋白質固 碳速率(mmol/hr · g)	11.1	11.8	11.7	5.0	6.4	12.5

【評語】 052608

本作品以化工廠的活性污泥中篩出的甲醇利用菌(Methylorubrum populi)，在不同的 pH 值(6.3 與 6.7)下，以不同比例的甲醇、甲酸為碳源，輔以銨鹽礦物鹽基礎培養液，測量此菌生長曲線的變化，以求得生長半生期、倍增時間等各項參數。經分析乾燥菌體的碳、氫、氮元素比例，以評估其碳利用效率。建議作者詳細列出實驗方法與步驟如利用高通量分析法配合生物資訊資料庫的搜尋，提供更完整的數據來源，並對如何達到負碳的概念說明更清楚，如果需要靠甲醇或甲酸做為甲醇利用菌生長碳源，製造甲酸或甲醇的碳排是否也應考慮。

作品海報

以甲醇與甲酸為營養源
評估甲醇利用菌的碳利用效能

10um

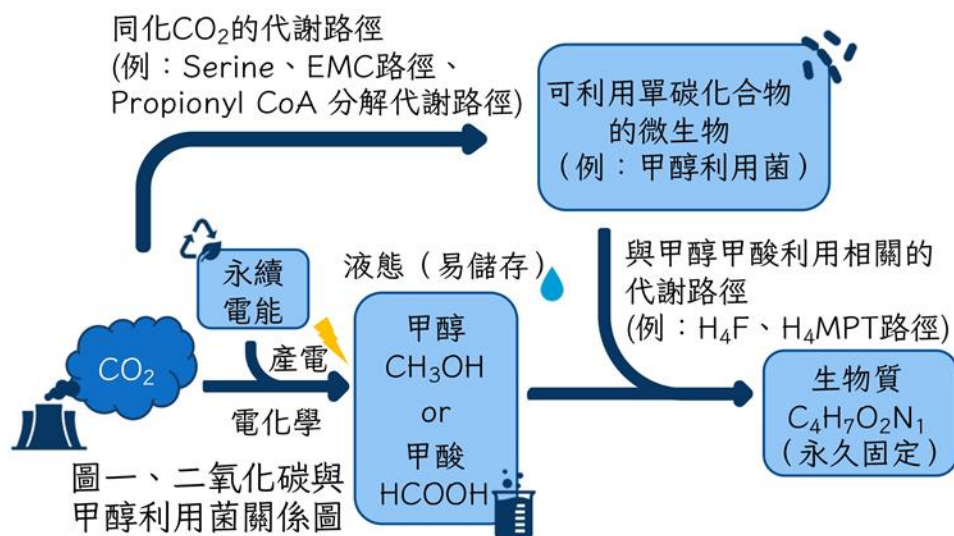
摘要

全球暖化造成氣候危機，對人類生存的威脅愈來愈大，達成巴黎協定的淨零碳排刻不容緩。本研究擬以甲醇利用菌(*Methylobacterium populi*)做為碳捕集封存與再利用(Carbon Capture Utilisation and Storage/CCUS)的生物工廠，將甲醇(CH₃OH)及甲酸(HCOOH)等單碳化合物合成生物質。經全基因定序及序列分析得知，*M. populi*具有可以利用甲醇、甲酸進行生合成的多條路徑。同時將菌液以不同比例的甲醇與甲酸為碳源，在不同酸鹼值中培養，測量其生長曲線，由此推得倍增時間等各項參數，並分析乾燥後的菌體各元素佔比。分析結果顯示，在pH 6.3、以甲醇甲酸比9:1培養*M. populi*，碳儲存率可達46.0%且在指數期生長快速，可達到有效減少溫室逸散至大氣的目的。

研究動機

阻止地球升溫，唯有利用森林碳匯與負碳技術抵消碳排，才能達成淨零目標。但林地面積減少，而以物理化學方法進行碳捕捉封存(CCS)成本高且捕捉量有限。若以異營微生物進行碳捕捉封存再利用(CCUS)，便宜、不需光照且可避免建置設備所造成的環境問題。

CO₂轉成單碳化合物耗能最少，但能利用有機單碳化合物的生物也少，甲醇利用菌屬除了可以利用H₄F、H₄MPT等路徑將甲醇、甲酸等單碳化合物轉成生物質之外，還可以在轉換過程中利用絲胺酸(serine)循環、Ethylmalonyl CoA(EMC)路徑與Propionyl CoA分解代謝路徑，額外固定空氣中的CO₂(圖一)。因此本研究以從石化精煉廠活性污泥中篩出的甲醇利用菌(*M. populi*)進行碳利用效能的評估與探討。

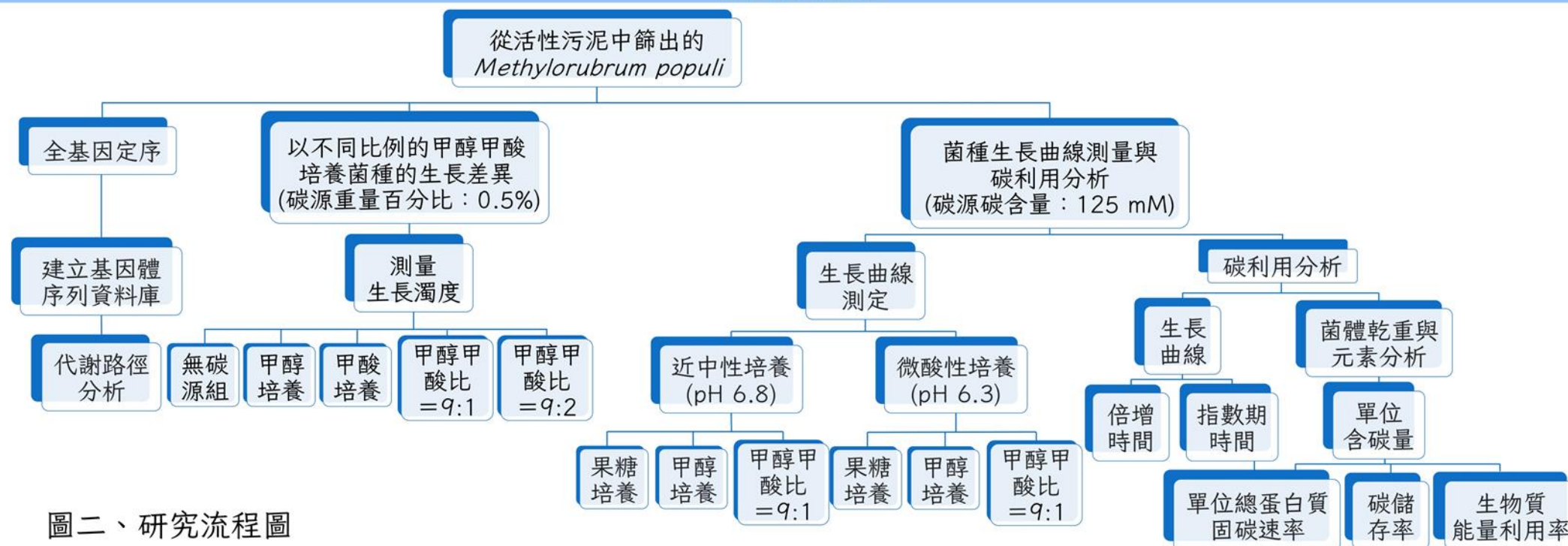


圖一、二氧化碳與甲醇利用菌關係圖

研究目的

- 一、以全基因定序探討*M. populi*是否具有碳利用相關代謝路徑。
- 二、以不同比例的甲醇與甲酸為碳源培養*M. populi*，了解不同碳源對其生長狀況的影響。
- 三、探討*M. populi*在不同酸鹼度下的生長趨勢，並利用從中推導出的參數，評估其生長速率。
- 四、以*M. populi*的乾重與其中各項元素佔比，評估其碳利用效能。

研究方法



圖二、研究流程圖

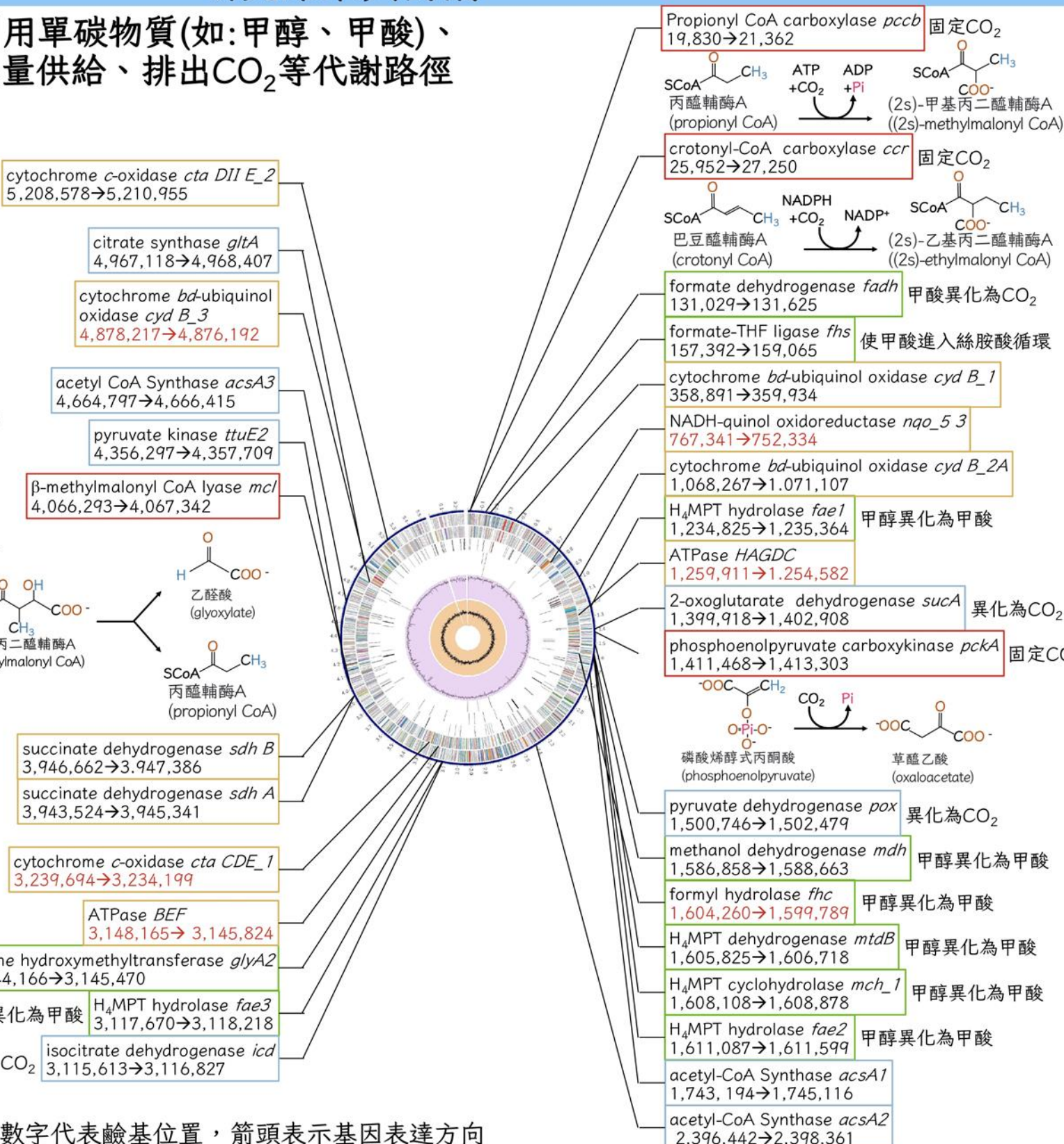
研究結果與討論

一、*M. populi*中具有利用單碳物質(如:甲醇、甲酸)、吸收空氣中CO₂、能量供給、排出CO₂等代謝路徑

以全基因定序得到的*M. populi*基因體序列導入Pathway Tools軟體PathoLogic Project中與PATRIC網站中的Comprehensive Genome Analysis功能，建立基因體資料庫與基因圖譜(圖三)。

由資料庫分析得知*M. populi*具備染色體與質體各一組。再透過編註編碼序列，找出5488組基因，對應5376組蛋白質、347個代謝路徑。

其中與單碳化合物利用、固碳與能量供給相關的代謝路徑所需要酵素的基因皆存在*M. populi*的基因組中。

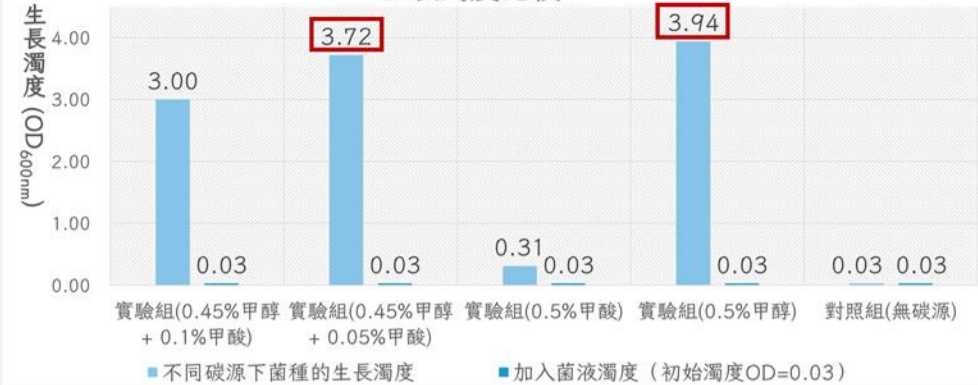


- 與CO₂同化相關的基因
- 與氧化磷酸化路徑相關的基因
- 與碳異化相關的基因
- 與甲醇甲酸利用相關的基因

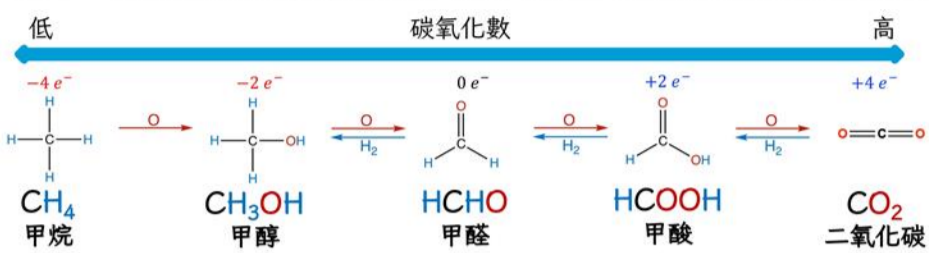
圖三、*M. populi*的基因圖譜，數字代表鹼基位置，箭頭表示基因表達方向

二、碳源中甲醇比例愈高，生長效果愈佳。

以不同比例的甲醇與甲酸培養 *M. populi* 的生長濁度比較



圖四、液態培養 *M. populi* 2日後以可見光-紫外光光譜儀測量OD值。



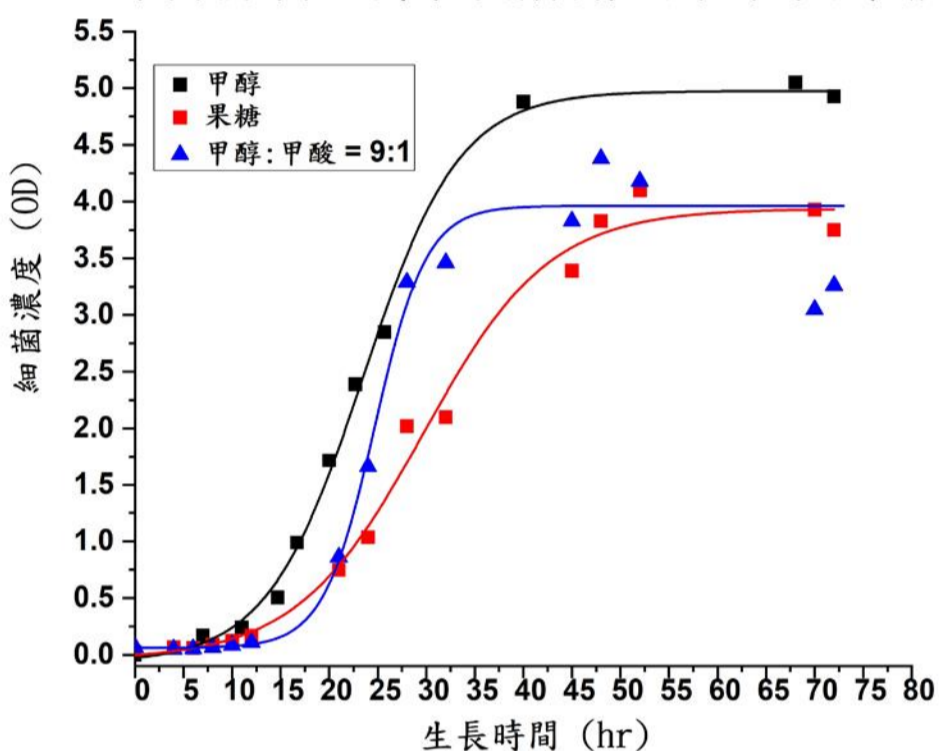
圖五、單碳化合物的氧化還原關係與碳的氧化數

以AMS培養液培養 *M. populi*，當培養液中不含碳源，則菌體不生長，菌液維持澄清 (OD_{600nm}=0.03)。只以甲酸為碳源時，生長效果較差，濁度僅0.31；只以甲醇為碳源時，生長效果最佳，濁度達3.94。(圖四)

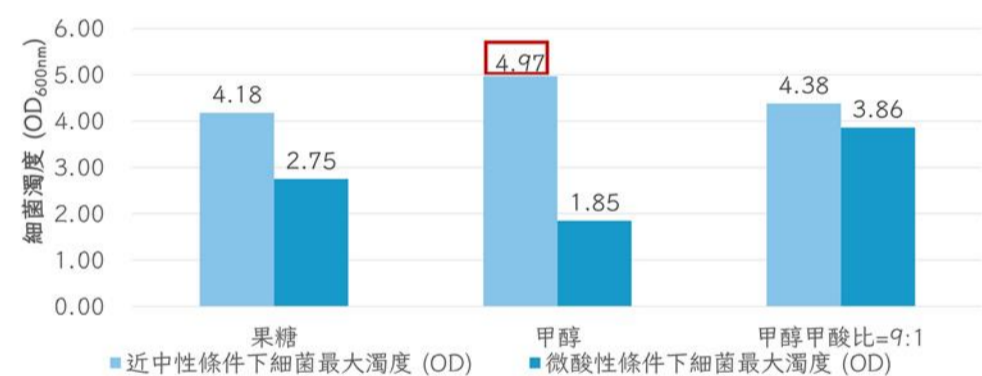
而有機物中氫含量越少，其所含的還原能越低。所以在以甲醇為碳源培養 *M. populi* 時，代謝路徑將甲醇轉化成CO₂時會釋出6個電子；而以甲酸為碳源時，只能得到2個電子。同單位下，將甲醇轉為CO₂所得的能量約是甲酸的三倍，所以可用來產生生物質的能量較多，符合預期。但在CO₂轉換成甲醇時，因為涉及6個電子的轉移，轉換率較低且耗能較高，故傾向在碳源中使用部分甲酸進行培養。(圖五)

根據結果，後續選擇純甲醇與甲醇甲酸9:1此兩組進行在不同酸鹼度下 *M. populi* 的培養，並與 *M. populi* 較偏好的醣類果糖作對照，繪製生長曲線。

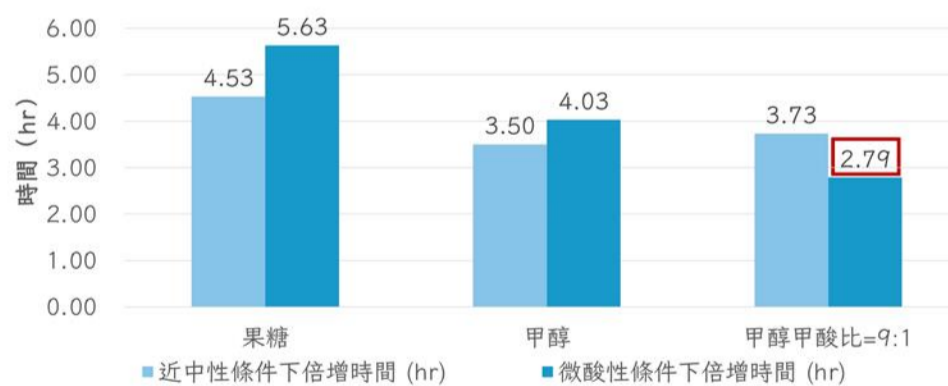
三、以不同碳源在近中性及微酸性環境下培養菌體的生長曲線



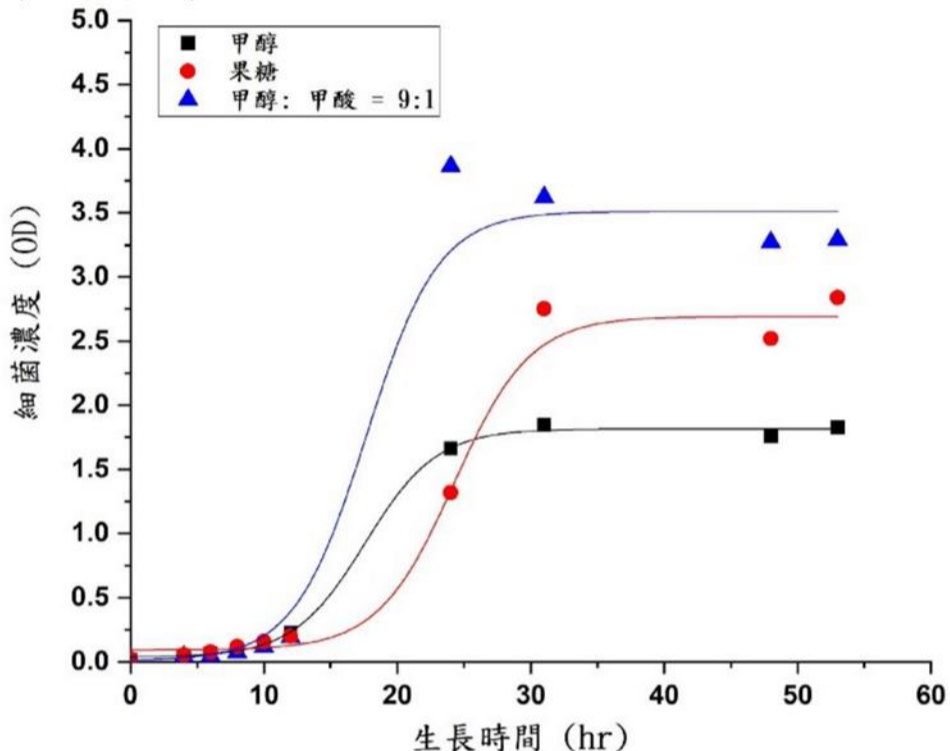
圖六、在近中性條件下(pH值：6.8)培養 *M. populi* 的生長曲線



圖八、 *M. populi* 輔以不同碳源的最大濁度比較



圖九、 *M. populi* 輔以不同碳源的倍增時間比較



圖七、在微酸性條件下(pH值：6.3)培養 *M. populi* 的生長曲線

一般微生物生長的最佳環境為pH 6.5-7.0，此時pKa值為3.74的甲酸在培養液中會以甲酸鹽的形式存在，而甲酸鹽會抑制氧化磷酸化作用的質子驅動力，抑制ATP產生，使ATP不足以維持微生物生長 (Yang *et al.*, 2021)。故本實驗分別在pH 6.3與pH 6.8的環境下培養 *M. populi*。

結果顯示微酸性下(pH 6.3) 培養 *M. populi* 的生長狀況，大多不及在近中性(pH 6.8)的狀況下培養的。生長狀況最好的是在近中性下以純甲醇培養的 *M. populi* 濁度4.97，而在微酸性下的各組中，培養效果最佳的是甲醇甲酸9:1的3.86(圖八)。

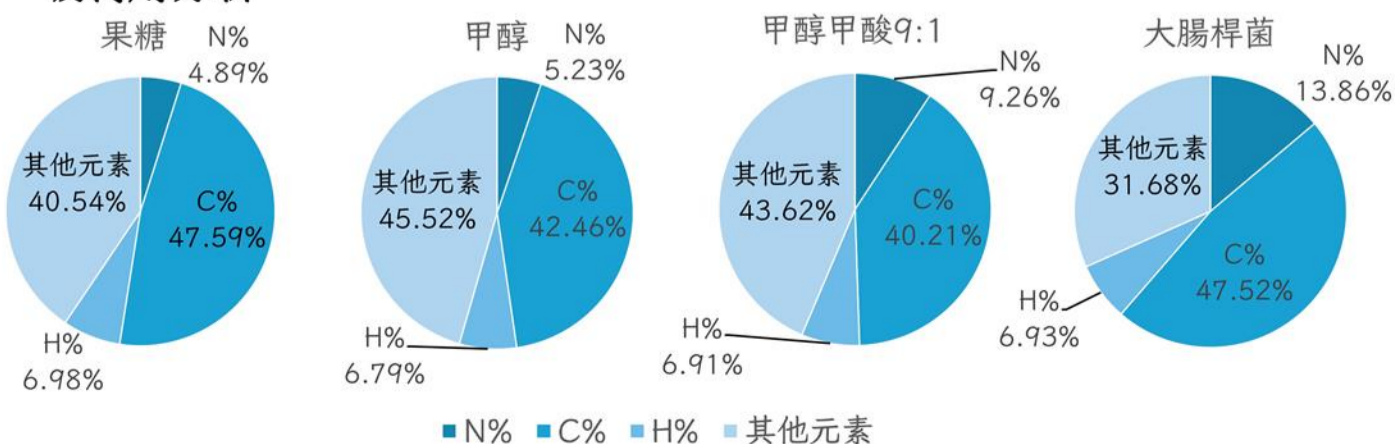
$$\text{倍增時間} = \frac{\ln(2)}{\text{生長速率常數}} \approx \frac{0.693}{\text{生長速率常數}}$$

透過擬合生長曲線時求得的生長速率常數，可換算成菌體增加一倍的平均時間。其中在微酸性條件下以甲醇甲酸9:1為營養源培養的 *M. populi* 倍增時間是全部實驗組中最短的，僅2.79小時，而在近中性條件中，以純甲醇培養的 *M. populi* 的倍增時間最短，約為3.5小時(圖九)。

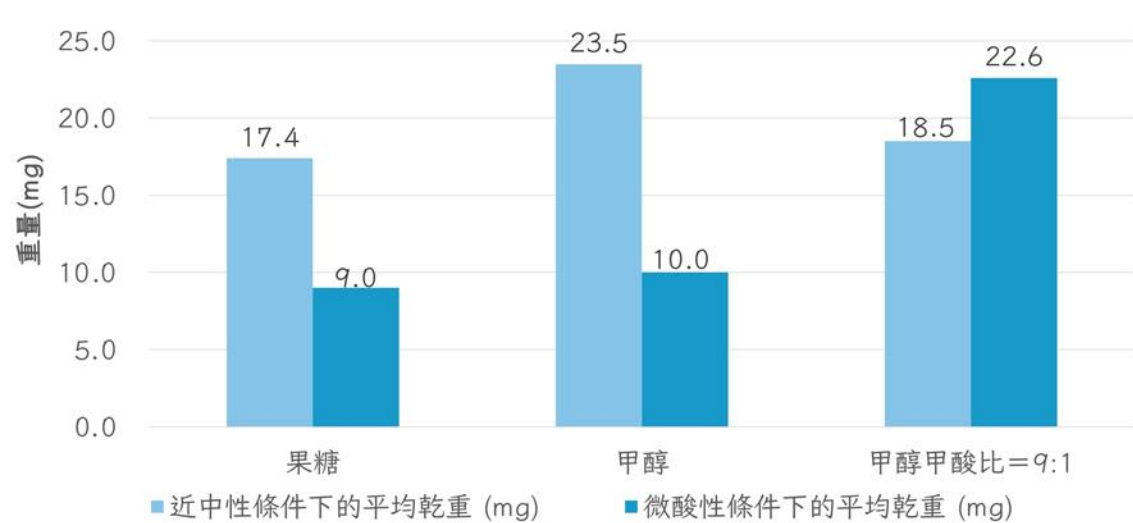
將高溫烘乾的菌體送往實驗機構以NCHS元素分析法進行分析後，得到以不同碳源培養的 *M. populi* 菌體乾重中各項元素佔比(圖十)。

基於微生物菌體組成大致相同，而大腸桿菌與 *M. populi* 皆為革蘭氏陰性菌，故由大腸桿菌的乾重簡式 C₄H₇O₂N₁ (Milo & Philips, 2015; von Stockar *et al.*, 1999)，可得出大腸桿菌的碳重比例約47.5%，實驗結果與文獻大致相符(圖十)。

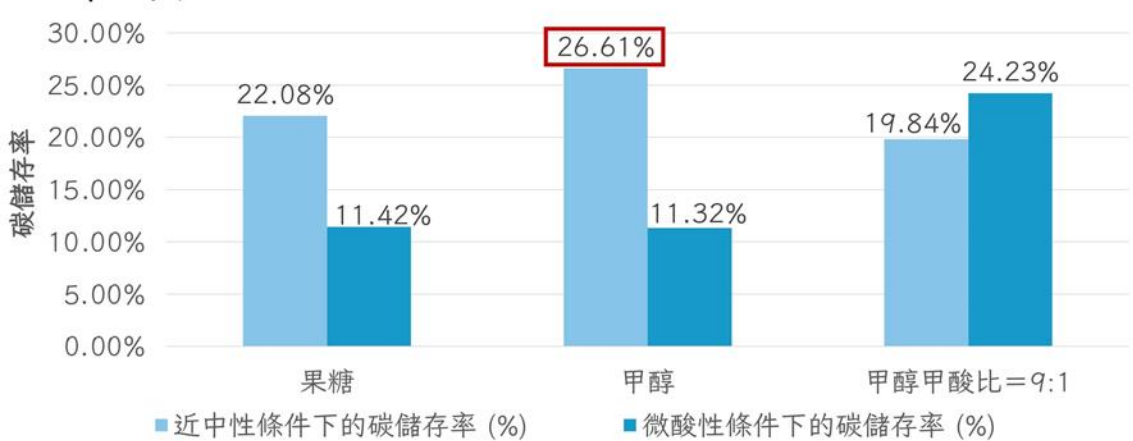
四、碳利用分析



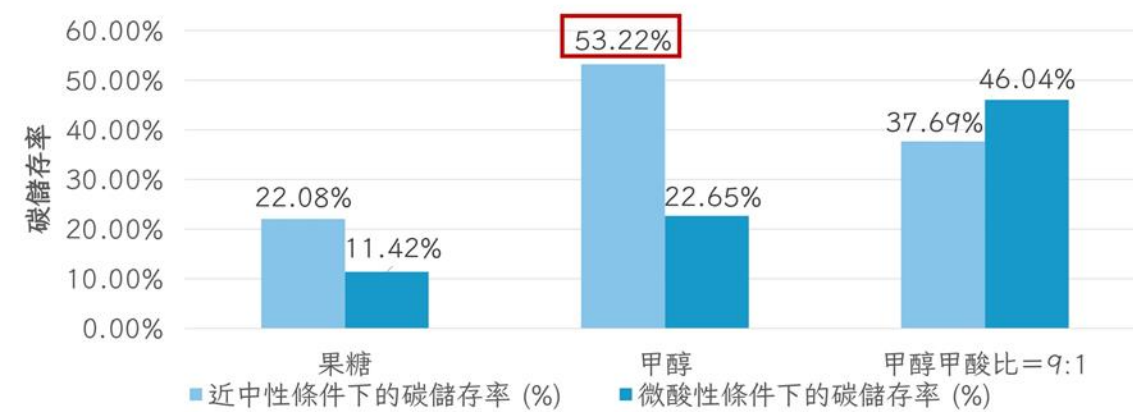
圖十、以不同碳源培養 *M. populi* 的菌體各項元素佔比與大腸桿菌菌體的元素佔比比較



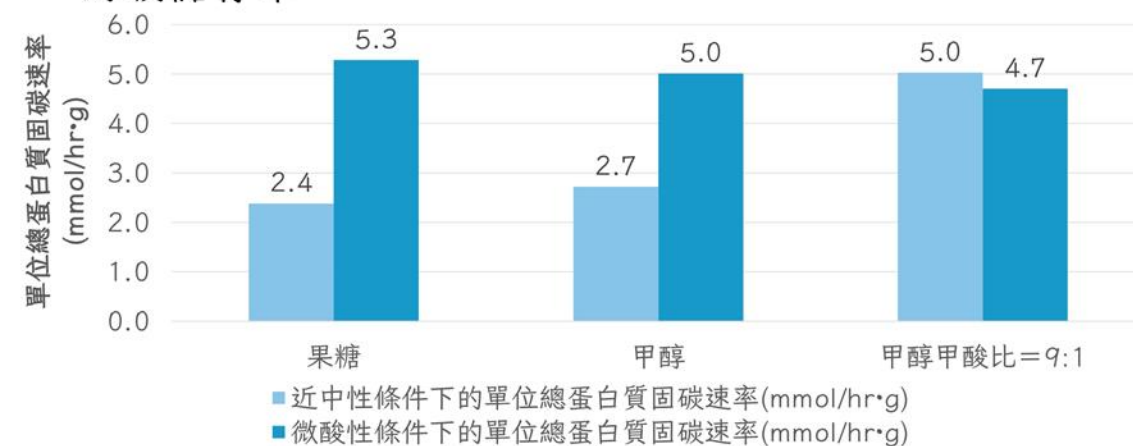
圖十一、*M. populi* 輔以不同碳源的每25毫升平均乾重



圖十二、*M. populi* 輔以不同碳源的碳儲存率



圖十三、去除甲醇逸散影響後 *M. populi* 輔以不同碳源的碳儲存率



圖十四、*M. populi* 輔以不同碳源的單位總蛋白質固碳速率

$$\text{碳儲存率} = \frac{\text{平均乾重菌體含碳量}}{\text{加入碳量}} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{每25毫升乾重平均含碳量}}{37.5\text{mg}} \times 100\%$$

透過將乾重(圖十一)乘以菌體中碳元素佔比可計算碳儲存率。其中在近中性條件下以甲醇培養 *M. populi* 的碳儲存率最佳，達到 26.61%，而在微酸性下以甲醇甲酸 9:1 為碳源 *M. populi* 次之，也達到 24.23%(圖十二)。

甲醇在常溫下具揮發性，菌體培養三天的甲醇逸散率大約為 50% (吳，2022)。以未散逸的甲醇量做計算，則在近中性條件下以甲醇培養 *M. populi* 的碳儲存率高達 53.2%(圖十三)，超過有氧呼吸產生的碳排 46.8%，則此反應對大氣中碳含量的影響應為 -6.4% (46.8%-53.2%=-6.4%)，達到負碳排。

$$\text{單位總蛋白質固碳速率} = \frac{\text{平均乾重菌體含碳莫耳數}}{(\text{指數期時間} \times \text{總蛋白質的重量})} \times \frac{\text{菌體中碳元素佔比}}{\text{原子量} \times \text{指數期時間} \times 0.5}$$

總蛋白質指菌體中的全部蛋白質，其含量約佔乾重的 50%，又總蛋白質的多寡與菌中酵素含量成正比，所以藉由單位總蛋白質固碳速率可了解 *M. populi* 在指數期時酵素的固碳效率。微酸性下的 *M. populi* 單位總蛋白質固碳速率均優於進行光合作用生物中固碳速率最快的藍綠菌：4 mmol/hr·g (Luo *et al.*, 2022)(圖十四)。顯示若將 *M. populi* 以繼代培養之方式應用在 CCUS 上，應可達到良好的生長固碳效率。

M. populi 為異營性細菌，只能利用有機碳含有的還原能，所以其被固定下來的生物質所含的能量的多寡，也就是生物質能量利用率與碳儲存率大致相符。C3 及 C4 植物的生物質能量利用率為 12.4% 與 16.1% (Zhu *et al.*, 2008)。 *M. populi* 以近中性純甲醇培養的生物質能量利用率超過 25%，高於 C3 與 C4 植物的生物質能量利用率。

結論

- 一. 確認絲胺酸循環、EMC 路徑、Propionyl CoA 分解路徑等固碳路徑確實存在於菌體中，並在過程中會吸收三個 CO₂ 生成生物質。
- 二. *M. populi* 需要碳源才能生長，並且可利用單碳化合物為碳源，其中以甲醇為碳源時 *M. populi* 生長狀況優於以甲酸為碳源。
- 三. 在微酸性培養下，甲醇甲酸 9:1 的生長效果優於以甲醇培養，甚至接近在近中性環境下以純甲醇培養的生長狀況，倍增時間更是僅 2.79 小時，顯示以甲醇甲酸 9:1 為碳源培養 *M. populi* 較適合在微酸性環境下進行。
- 四. *M. populi* 以近中性環境下純甲醇培養的生物質能量利用率超過 25%，遠高於 C3(12.4%) 與 C4(16.1%) 植物的生物質能量利用率。
- 五. 考慮甲醇每日揮發比例，在近中性條件下以甲醇為碳源培養 *M. populi* 的碳儲存率極高，對大氣中 CO₂ 量的影響為 -6.4%，達到負碳排。
- 六. 微酸性下以甲醇甲酸 9:1 為碳源培養 *M. populi* 的碳儲存率達 46.0%，單位總蛋白質固碳速率 4.7 mmol/hr·g，高於藍綠菌的 4.0 mmol/hr·g，評估用電化學催化 CO₂ 轉換成甲酸的能源利用效率較好，應是較佳的碳捕集封存與再利用 (CCUS) 路徑。
- 七. 總結各實驗，微酸性下以甲醇甲酸 9:1 為碳源培養 *M. populi* 執行繼代培養，應可高效能地將單碳化合物轉為生質能，以異營微生物進行 CCUS 的手段，達到有效減少溫室逸散至大氣的目的。

參考資料

- 吳盈萱. (2023). *The characterization and C₁ metabolism of methanol dehydrogenase (MDH) for Methylococcus capsulatus (Bath) and Methylobacterium populi* [Unpublished Master Thesis]. National Taiwan University.
- Luo, S., Lin, P. P., Nieh, L. Y., Liao, G.-B., Tang, P.-W., Chen, C., & Liao, J. C. (2022). A cell-free self-replenishing CO₂-fixing system. *Nature Catalysis*, 5, 154-162. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00746-x>
- Mao, W., Yuan, Q., Qi, H., Wang, Z., Ma, H., & Chen, T. (2020). Recent progress in metabolic engineering of microbial formate assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 6905-6917. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10725-6>
- Yang, Q., Guo, X., Liu, Y., & Jiang, H. (2021). Biocatalytic C-C Bond formation for one carbon resource utilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1890. <https://doi.org/10.3390/ijms22041890>
- Zhu, X.-G., Long, S. P., & Ort, D. R. (2008). What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? . *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.004>