

中華民國 行政院國家科學委員會科教處補助 大眾科學普及教育計畫

義守大學 醫學院 生物科技學系 謝文權 教授 製作

教師手冊

～～生物可分解掩埋分解實驗科普教具～～

1.前言：

生活富裕化造成很多化學商品的大量使用，塑膠商品在日常生活中廣泛被使用，也是污染我們環境最嚴重的一項商品。如何解決垃圾問題，減少環境污染問題，需要全民一起努力去解決。近年科學家為了解決環境污染問題，致力於生物可分解材料的研究，希望能為地球近一份心力，給下一世代的子孫們，能有一個乾淨清潔的地球。為了提高社會大眾對生物可分解塑膠材料的認識，義守大學生物科技學系生醫材料實驗室，設計開發了一組 [生物可分解掩埋分解實驗科普教具]，讓社會大眾了解，塑膠污染問題以及使用生物可分解商品的好處，加深對環境保護的認識。

2.研究背景：

生體內分解高分子在很早以前就已經被廣泛使用了。這種生體內分解高分子，主要是因為它的生體適合性和生體吸收性對人體不會產生免疫、發炎性而被用在醫療用材料，如縫線、被覆膜、骨折固定材等等方面。1980 年代麻省理工學院的羅伯藍格 (Robert Langer) 教授；哈佛醫學院的約瑟夫瓦肯提 (Joseph Vacanti) 以及其弟查理斯瓦肯提 (Charles Vacanti) 等人，鑑於移植用組織器官取得不易，提出了一個新的構想若是人類的組織或器官，能夠像製造零件一般的利用科學的方法來製造，或許可以降低組織器官的來源不足的問題，於是他們首次利用一系列的實驗，利用生物可分解的高分子材料 (Biodegradable polymer) 結合細胞的植入，可以培養出新生的軟骨組織等，開啓了組織工程 (Tissue engineering) 的新研究領域。這種利用特殊的生物高分子材料，架構出三維空間的立體支架 (Scaffold)，讓植入的細胞可以在其中生長並增生的技術，是嘗試去結合人體組織移植與人工材料修復的優點，使得組織工程原理的確立，而且也讓用生物可分解高分子作為生醫材料的應用更顯得其重要性。

在同個時期 (1980 年代)，地球上的各種環境污染，是世界各國面臨的重大問題。環境污染的防止、環境保全、資源保護的觀點下，能在自然環境下被微生物分解的高分子的研究，已經是非常迫切的需要。現在地球上的環境污染問題，大致有：1.地球溫暖化、2.酸性雨、3.臭氧層的破壞、4.廢棄物等等。特別是化學合成的高分子—塑膠，不僅是在產業、農業活動上，一般的消費者的日常生活中也非常普及化，已經是必要而不可

欠缺的物品。塑膠能大量的普及，像紙張、木材、玻璃和鋼鐵一樣成為主要的工商業材料，主要是因為它有優越的化學性質—耐藥品性、耐久性、質地輕、加工容易等等，而且由於製造價格的便宜，容易大量生產的結果，使得塑膠在大量使用廢棄後，因為不能分解而引起了各種的環境問題。例如塑膠廢棄物隨著河川流向大海，造成海洋生物因誤食不能消化或纏住身體無法解開而死亡；或者由於塑膠的不能分解，造成掩埋土地的不足，使得垃圾大量的不法投棄 (圖 1-1)。若是將塑膠以燃燒來處理又會造成戴奧辛的發生，燃燒時產生的二氧化碳也造成地球溫暖化等等問題。在這種情況下，近年自然環境下能被微生物分解的塑膠的開發：微生物合成的高分子、天然高分子或者是生物分解可能的化學合成高分子等等的研究，被認為是解決環境問題的方法之一，而成了注目的焦點。

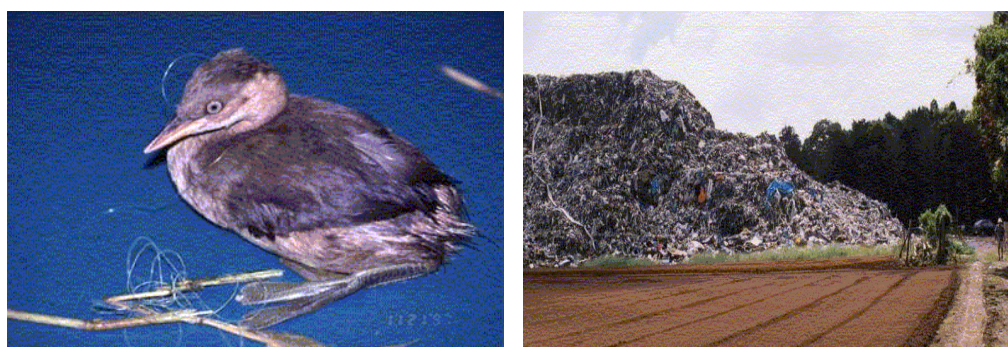


圖 1-1. 塑膠廢棄物對生物的危害以及不法投棄垃圾

天然物誘導、化學合成及微生物合成而來的生物分解性高分子，可以製作成各種塑膠產品，當使用廢棄後存在於土壤中或者是海洋中的微生物，可以將這種塑膠產品分解成低分子的物質最後變成二氧化碳和水。微生物的分解腐植物 (Biomass) 可以作為肥料留在土壤中供植物的生長使用，二氧化碳再循環到大氣中進行光合作用製成各種的糖類、醇類、有機酸，又可以再被微生物吸收利用，形成一個可以循環再利用的系統，所以生物分解性高分子是一種對環境無害，適合環境使用的“綠色高分子”(Green Polymer)*[註 1] (圖 1-2)。

*[註 1]“Green polymer”一詞在環境污染改善有關的生物分解性高分子話題中常被使用。它是指對於環境無害，不會污染環境所新開發出來的高分子。國內常見被翻譯成“綠色高分子”(Green polymer)或是“綠色塑膠”(Green plastic)等等。本人在翻譯時也直接譯成“綠色”一詞，希望“綠色”這名詞能適切的表達出這種高分子的函義，使人一看這名詞就明瞭是這種既能用於日常生活中，使用廢棄後在環境又能分解對環境無害，適合自然環境的高分子。

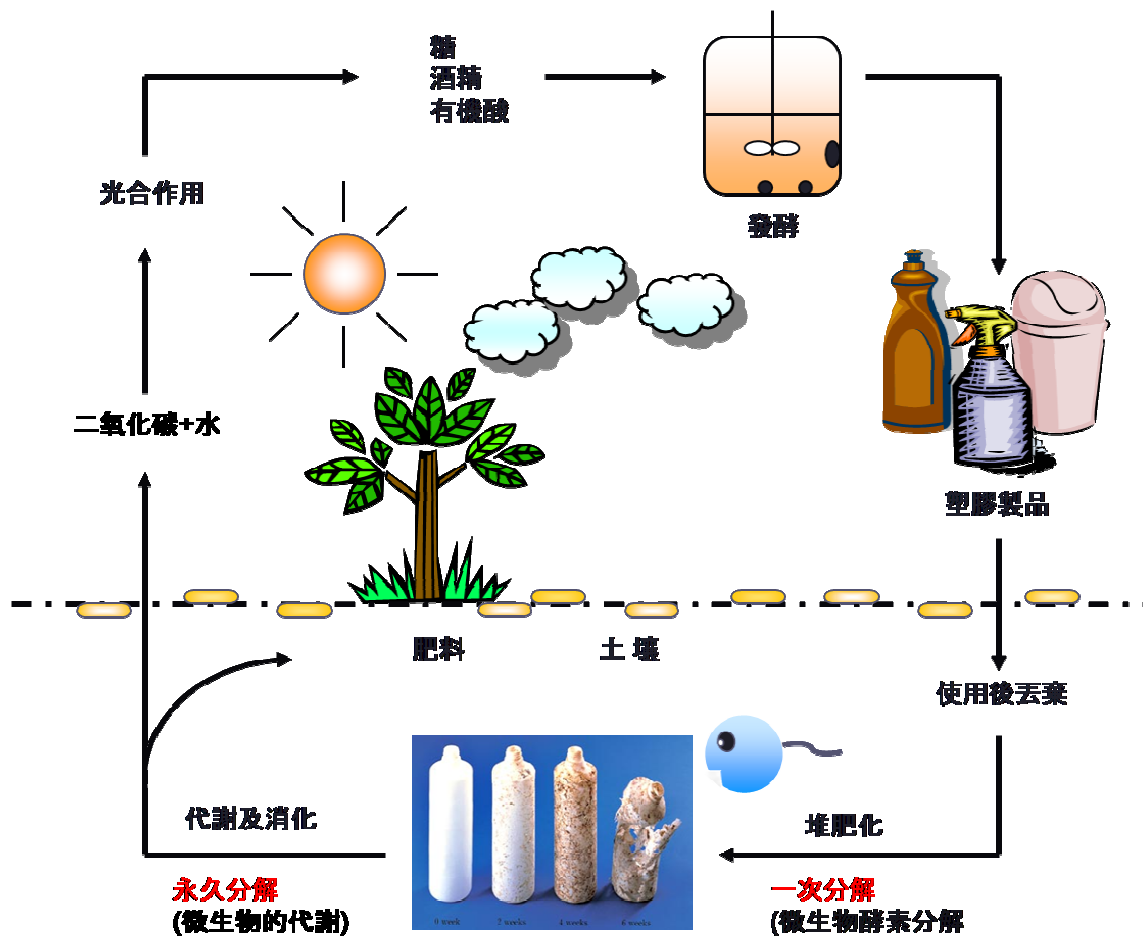


圖 1-2. 生物可分解塑膠的循環使用示意圖

3. 生物可分解材料的合成與分解原理：

自然界存在的微生物，可以合成一種的聚酯高分子物質，作為生命的能源 (ATP) 而貯藏在身體內。當沒有營養源時，為了能源 (ATP) 的獲得或是蛋白質的合成，此時貯藏在身體內的聚酯高分子物質會被分解而被代謝利用。這種微生物合成代表性的聚酯高分子是 R 體的羥基丁酸物質 [3-Hydroxybutyric acid] 所構成的聚羥基烷酯高分子 Poly(3-hydroxybutyric acid) [P(3HB)] (圖 2-1)。

1925 年法國巴黎的 Pasutul 研究所的微生物學者 Lemoigne，首次從微生物 *Bacillus megaterium* 的體內將高分子萃取出。1958 年 Macrae 和 wilkinson 學者利用醃酵合成法進行 P(3HB) 高分子的合成。終於在 1961 年由 Schlegel 學者利用微生物 *Ralstonia eutropha*，成功的生物合成出 P(3HB) 高分子。由於生物分解性高分子的醃酵合成法的成功，1980 年英國的 ICI 公司將培養條件像基質量、PH、溶存酸素濃度(DO)、炭素源以及

窒素源的比率等等的控制，而醃酵合成量產出 P(3HB) 高分子，此時醃酵合成的工業生產法大致被確立出來。現在自然界中存在的微生物中，體內可以蓄積 P(3HB) 高分子的微生物已經有大多數被篩選出來。這種由微生物所製作出來的高分子，因為是 1. 生物可分解性，2. 生體相容性，3. 熱可塑性等等的優點，所以除了應用在環境污染的保護外，在組織工程(再生醫療)以及醫藥製劑上，也開始被大量研究使用。

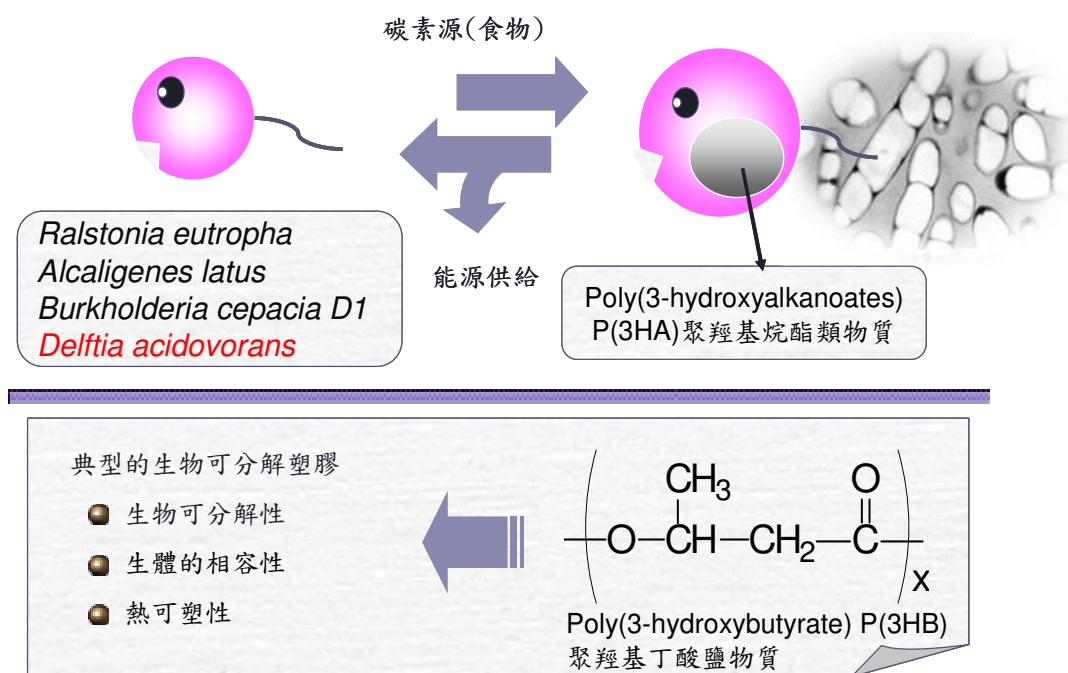


圖 2-1. 微生物合成典型的生物可分解高分子的原理與其特性

在自然的環境中 P(3HB) 分解微生物會在體外分泌出 PHB 分解酵素，將水不溶解的 P(3HB) 加水分解成水溶性的(R)-3-Hydroxybutyric acid (3HB) 二量體或是單體，而且將這些分解生成物會被吃進微生物體內當作是碳素源或是能量取得的原料而被代謝。還有 P(3HB) 分解微生物的數量，有報告指出大約是佔土壤中所含有的全微生物數量的 0.1-10% 左右而已。到目前為止從各式各樣的自然環境中大約有 50 種類的 P(3HB) 分解微生物被分離出來，而且已被確定。代表性的 P(3HB) 分解微生物，像是從土壤中分離的 *Pseudomonas lemoigeei* 或是從活性污泥中分離出來的 *Alcaligenes faecalis* T1 或是像真核生物(黴菌類)的 *Penicillium funiculosum* 等等。還有從海水中分離出 *Comamonas testosterone*；從湖水中分離出 *Pseudomonas stutzeri*、*Comamonas acidovorans* 等等，而在實驗中也分離出 *Ralstonia pickettii*，因此 P(3HB) 可以被在各種的自然環境中所棲息的微生物(黴菌、放線菌、格蘭姆陰性菌、格蘭姆陽性菌)所分解。

關於 P(3HB) 分解菌的分解酵素的分泌機制，我們使用數種類的分解微生物做說明。*A. faecalis* T1 使用以 fructose、glucose、(R)-3-hydroxybutyric acid 以及 P(3HB) 為單一的

碳素源時，PHB 分解酵素會在菌體外分泌；另一方面 *Comamonas* sp. 只有使用以 P(3HB) 為單一的碳素源時才會分泌出 PHB 分解酵素，而且在 P(3HB) 以外加入其他的碳素源時，很容易利用的碳素源會很顯著的抑制分解酵素的合成，由此可知，這個菌株的分解酵素的合成會根據 P(3HB) 而受到誘導，反之會因為其他易利用的碳素源代謝物而受到抑制。還有 *C. acidovorans* 的 PHB 分解酵素的分泌機構，也是和 *Comamonas* sp. 時會受到同樣的抑制。使用 *P. stutzeri* YM1006 的分解酵素的分泌機制作調查的結果 P(3HB) 以及其共聚合物的 P(3HB-co-3HV) 或是分解生成物的 R 體 3-hydroxybutyric acid 以及 4-hydroxybutyric acid 作為唯一的碳素源時，讓 *P. stutzeri* YM1006 生殖之時就會分泌出 PHB 分解酵素，但是使用有 R 體光學異性體的 S 體 3-hydroxybutyric acid 為唯一的碳素源時，和 *P. stutzeri* YM1006 菌的 R 體作同樣程度的生殖培養時，培養液的上清液是完全沒有觀測到 P(3HB) 分解活性。從這些結果得到的結論是，在 *P. stutzeri* YM1006 菌株 P(3HB) 的分解生成物的 (R)-3-hydroxybutyric acid 是分解酵素分泌的誘導物質。

4. P(3HB)分解酵素的性質

自然界的微生物為了分解高結晶性的 P(3HB) 薄膜或是粒子，微生物會在菌體外分泌出一種的分解酵素分解 P(3HB) 薄膜或是粒子，而分解生成物則會被微生物利用作為生命活動的能源。生物分解性高分子的分解，一般是微生物先在菌體外分泌出分解酵素而附著在材料的表面開始分解過程。酵素會將酯(Ester)結合或是胜肽(Peptide)結合等等的化學結合由加水分解反應而切斷。其結果產生出一量體或是二量體的低分子生成物，這種分解被稱為一次分解過程。分解後的低分子生成物會被微生物吸收進入體內，經過各種的代謝路徑，合成為生體高分子或是能源生產利用，而變成二酸化炭素和水，這種分解被稱為完全分解過程。菌體外分解酵素和菌體內分解酵素（結晶性的 P(3HB) 不能分解）的最大的差別，就是結晶化後硬的 P(3HB) 薄膜或是粒子等等的製品可以被分解 [*註 2]。

現在菌體內能分泌分解酵素的細菌從土壤、活性污泥、海水、湖等等的環境中已經有 15 種類以上被分離、鑑定出來。從土壤、活性污泥、海水、湖等等的環境中所篩選出菌體內能分泌分解酵素的細菌。其分解酵素的分子量大約 38000~60000 的範圍，是從單量體的多胜肽(polypeptide)所構成，等電點大約是存在於中性到鹼性，最適合的 pH 值除了 *R. Pickettii* YM-b 以及 *P. funiculosum* ATCC9644 分解酵素是存在於酸性領域中之外，其他的分解酵素都是存在於中性到鹼性。

[*註 2] 通常微生物會產生二種類的酵素一是菌體內分解酵素，二是菌體外分解酵素。菌體內分解酵素可以分解菌體內的 P(3HB) 物質，留在菌體內的 P(3HB) 通常是非結晶狀態如海綿一樣，分子和分子之間有非常多的水分存在。當從菌體內將 P(3HB) 物質抽出時，由於各種的物理處理或是加熱處理，P(3HB) 會變成高結晶性的物質。結晶後的 P(3HB) 是無法被菌體內的分解酵素所分解，但是菌體外的分解酵素卻可以將結晶性的 P(3HB) 分解。

5. 教具：

★如包裝內所附【生物可分解蔬菜】二枚。

6.對象：

★國民小學 3-6 年級以及國民中學學生。

7.實驗所需要時間：

★實驗說明：1-2 小時

★實驗觀察：30-50 天

★結果整理：1-2 小時

8.實驗方法：

老師們請先閱讀上面有關生物可分解塑膠之詳細資料，在實驗開始之前先與同學說明這類產品的資訊，讓同學了解生物可分解的原理以及微生物的運作，並明瞭環境清潔的重要性。之後實驗說明如下：老師們可以自由發揮如下所述三點，最後再整合同學的實驗經過以及報告。讓同學了解實驗室隨著時間、地點以及環境有所差異。

1. 同學們請將實驗觀察用的生物可分解蔬菜上，寫上實驗開始的日期，將二枚的生物可分解蔬菜，在學生們各自所想到的場所作掩埋（例如：花園中、花盆內、腐葉土中、堆肥中、水槽內、生活廢水中等等），做一掩埋實驗觀察並做紀錄。
2. 經過一定時間之後，開始觀察各掩埋場所中，生物可分解蔬菜的分解速度是如何變化(例如:色澤的變化或是蔬菜的分解劣化等等)，做一調查。還有在各自選擇的掩埋場所中，其分解過程的差異以及其他在實驗中影響微生物分解塑膠所注意到的部份，詳細考慮之後可以用繪圖或是文章方式做一整理說明(請將實驗過程記錄在心得報告中)。
3. 同學們做完報告後，可以將選擇相似的掩埋場所的同學，分組在一起討論其實驗分解過程的結果，是否有所差異？其造成實驗差異的問題點，做一整理報告。

9.學習的思考方向：

1. 現在所使用的塑膠產品大部分都是以垃圾處理而被丟棄。由於如此的丟棄處理方式，而產生了像因燃燒產生戴奧辛的問題；或是因所產生的二氧化碳造成地球溫暖化問題；或是因無法分解而造成垃圾掩埋場場地不足等問題。在這些各種問題之中，同學們多加思考環保問題點。
2. 生物可分解蔬菜的原料是什麼？為什麼可以分解？這類商品其功用或是作為環境污染對策的可能性等等請加以思考。在思考的同時，對於環境中微生物的活動與作用；對分解塑膠的原理也可以找資料一併作說明。