

比較不同限制基質對RALSTONIA EUTROPHA合成PHBV的影響

黃俊嘉、

E-mail: 9125430@mail.dyu.edu.tw

摘要

PHAS是以HYDROXYALKANOATES (HAS) 為單體所聚合成的聚合物，是一種可由不同細菌合成，具熱塑性與生物降解熱塑性之聚酯的總稱，而其中以POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB)為最被廣泛研究。本研究在探討培養基中不同限制基質：如氮源或磷源對 RALSTONIA EUTROPHA ATCC17699 在不同溫度下 (26、30及35) 合成 PHB 及其菌體生長、碳源代謝的影響。菌體因限制基質消耗而進入PHB的合成階段，不同限制基質將改變此階段菌體的代謝路徑，不僅影響 PHB於菌體內含量的比例，也影響整個發酵的產率。選擇其中菌體比生長速率較高的條件，連續以50 ML/H的流率，進行半連續式培養，並且在饋料培養基中添加丙酸，使其具有持續穩定累積PHBV的能力。不論是限制氮源或磷源的培養條件，溫度的提高對於縮短菌體的世代時間有明顯的影響。培養於35 時，最大比生長速率(M) 為0.2476 H⁻¹，世代時間(TD) 為2.80 H；而限制磷源在35 的培養條件下， $M = 0.2769$ H⁻¹，TD = 2.50 H。限制氮源在35 培養時，PHB於64 H有最高累積量，佔菌體量的75.6%。限制磷源培養在35 時，PHB有最高累積量，而以26 H時最高，達43.1%。比較在不同的限制基質培養條件下，以限制氮源於30 培養時，YP/GLUCOSE = 0.41 G PHB/G GLUCOSE；而以限制磷源於35 培養時，YP/GLUCOSE = 0.19 G PHB/G GLUCOSE。半連續式培養，在初期將缺乏磷源之培養基，以流率50 ML/H連續饋入發酵槽中，但因培養基缺乏磷源，導致菌體生長趨向死滅，平均HV累積量佔PHBV量的11.3%，而HB佔88.7%。改以在培養基中添加磷源，結果菌體持續生長，HV的累積量佔PHBV量的6.4%，而HB增加為93.6%，據推測可能與葡萄糖對丙酸的濃度有關。

關鍵詞：RALSTONIA EUTROPHA、限制基質、半連續式培養、PHB、PHBV

目錄

第一章 緒論--P1 第二章 文獻回顧--P3 2.1 研究背景--P3 2.2 生物分解性材料的分類--P4 2.2.1 微生物合成--P4 2.2.2 化學合成--P5 2.2.3 天然聚合物--P5 2.3 細菌性分解性塑膠的特性--P5 2.4 PHB的特性--P7 2.4.1 化學結構--P7 2.4.2 PHB(V)的物理特性--P8 2.4.3 合成代謝路徑--P9 2.4.4 生物分解性--P10 2.5 PHB的生產--P11 2.5.1 利用不同限制基質生產PHB--P12 2.5.2 利用不同碳源生產PHB--P12 2.5.2.1 葡萄糖--P12 2.5.2.2 油脂--P13 2.5.2.3 有機廢水--P13 2.5.2.4 有機酸--P14 2.6 生產PHAS的方式--P14 2.6.1 高密度細胞培養--P14 2.6.2 饋料批次培養--P14 2.6.3 基因選殖--P16 2.6.4 植物生產--P18 2.7 產物測定與回收--P18 2.7.1 溶劑法--P18 2.7.2 非溶劑法--P18 2.7.3 PHB(V) 測定--P19 2.8 應用情形--P19 2.8.1 生物相容性與分解性--P19 2.8.2 成本與接受性--P19 2.8.3 法規規範--P20 第三章 材料與方法--P22 3.1 實驗材料--P22 3.1.1 菌株--P22 3.1.2 培養基--P22 3.1.3 儀器--P23 3.1.4 藥品--P24 3.2 實驗方法與流程--P25 3.2.1 種菌預培養--P25 3.2.2 發酵槽批次發酵培養--P25 3.2.3 半連續式發酵培養--P26 3.2.4 發酵槽--P26 3.3 分析方法--P27 3.3.1 菌體濃度分析--P27 3.3.2 培養基中碳源濃度分析--P28 3.3.3 培養基中限制基質分析--P28 3.3.3.1 氮源--P28 3.3.3.2 磷源--P29 3.3.4 菌體中PHB與PHBV的含量分析--P30 3.3.4.1 萃取方法--P31 3.3.4.2 GC條件設定--P31 3.3.4.3 樣品中PHB或PHBV定量--P31 第四章 結果與討論--P33 4.1 前言--P33 4.2 以限制氮源培養基生產PHB--P33 4.2.1 批次發酵培養於26 --P33 4.2.2 批次發酵培養於30 --P38 4.2.3 批次發酵培養於35 --P42 4.2.4 比較不同溫度下限制氮源培養基的生長情況--P46 4.3 以限制磷源培養基生產PHB--P50 4.3.1 批次發酵培養於26 --P50 4.3.2 批次發酵培養於30 --P54 4.3.3 批次發酵培養於35 --P57 4.3.4 比較不同溫度下限制磷源培養基的生長情況--P61 4.4 半連續式培養RALSTONIA EUTROPHA--P66 4.4.1 饋料培養基中不含限制基質磷源--P66 4.4.2 饋料培養基中含有限制基質磷源--P70 4.4.3 比較不同饋料培養基之影響--P73 第五章 結論與展望--P76 5.1 結論--P76 5.2 展望--P77 參考文獻--P79 附錄--P82

參考文獻

王韻婷 (2000) 高分子生物塑膠生產菌之分離，特性分析及其高分子合成基因之選殖，台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北。王建龍、文湘華 (2001) 現代環境生物技術，清華大學出版社，北京。李振綱、吳誌明、蔡有癸 (2001) 高密度微生物細胞發酵培養，化工技術，9(2):163-175。李秀、賴滋漢 (1992) 食品分析與檢驗，精華出版社，台北。金大勇、陳堅、倫世儀 (1999) ALCALIGENES EUTROPHUS 利用不同有機酸生產聚- α -羥基烷酸的比較研究，應用與環境生物學報，5(2):199~202 洪世淇 (2001) 生物分解性塑膠的技術與市場展望，化工資訊，15(5):61-65。許鴻淵、尹維松、蔣淑芬、楊建俊 (1995) 新塑膠時代的來臨，美國穀物飼料協會。許鴻淵 譯 (1996) 生物分解性塑膠發展情形，塑膠資訊，(6):37-39。張增民、賀文楠、胡平、陳國強 (1999) 以葡萄糖為碳源合成降解性聚酯的研究

, 高分子學報, 6:709-714。梅東和、姚善涇、林東強 (2000) 生化生產工藝學, 科學出版社, 北京。ASHBY, R. D., A. M. CROMWICK AND T. A. FOGLIA (1998) RADIATION CROSSLINKING OF A BACTERIAL MEDIUM-CHAIN-LENGTH POLY(HYDROXY-ALKANOATE) ELASTOMER FROM TALLOW, INTER. J. OF BIOL. MACROMOLECULES, 23:61-72. BRANDL, H., R. A. GROSS, R. W. LENZ AND R.C. FULLER (1990) PLASTICS FROM BACTERIA AND FOR BACTERIA, BIOCHEM. ENG., 41:77-93. CROMWICK, A.M., T. FOGLIA AND R.W. LENZ (1996) THE MICROBIAL PRODUCTION OF POLY (HYDROXYAL-KANOATES) FROM TALLOW, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 46:464-469. FUCHTENBUSCH, B., D.WULLBRANDT AND A.STEINBUCHEL (2000) PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOIC ACIDS BY RALSTONIA EUTROPHA AND PSEUDOMONAS OLEOVORANS FROM AN OIL REMAINING FROM BIOTECHNOLOGICAL RHAMNOSE PRODUCTION, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 53:167-172. HAYWOOD G.W., A. J. ANDERSON, L. CHU, E.A. DAWES (1988) CHARACTERIZATION OF TWO 3-KETOTHIOLASES POSSESSING DIFFERING SUBSTRATE SPECIFICITIES IN THE POLYHYDROXY-ALKANOATE SYNTHESIS ORGANISM ALCALIGENES EUTROPHUS, FEMS MICROBIOL. LETT., 52:91-96. HOUMIEL, K. L., S. SLATER, D. BROYLES, L. CASAGRANDE, S. COLBURN, K. GONZALEZ, T. A. MITSKY, S. E. REISER, D. SHAH, N. B. TAYLOR, M. TRAN, H. E. VALENTIN AND K. J. GRUYS (1999) POLY (3-HYDROXY-BUTYRATE) PRODUCTION IN OILSEED LEUCOPLASTS OF BRASSICA NAPUS, PLANTA, 209:547-550. LAFFERTY, R. M., B. KORSATKO AND W. KORSATKO (1988) MICROBIAL PRODUCTION OF POLY-3-HYDROXY-BUTYRIC ACID, BIOTECHNOL., 6B:135-176. LEE, I. Y., G. J. CHOI, G. J. KIM, S. W. NAM, Y. C. SHIN, H. N. CHANG AND Y. H. PARK (1994) OPTIMIZATION OF FED-BATCH FERMENTATION FOR PRODUCTION OF POLY-3-HYDROXY-BUTYRATE IN ALCALIGENES EUTROPHUS, J. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 4:146-150. LUN, S., D. JIN AND J. CHEN (1999) PRODUCTION OF POLY(HYDROXY-ALKANOATE) BY A COMPOSITE ANAEROBIC ACIDIFICATION-FERMENTATION SYSTEM, PROCESS BIOCHEMISTRY, 34:829-833. ODA, Y., H. ASARI, T. URAKAMI AND K. TONOMURA (1995) MICROBIAL DEGRADATION OF POLY(3-HYDROXY-BUTYRATE) AND POLYCAPROLACTONE BY FILAMENTOUS FUNGI, J. FERMENT. BIOENG., 80(3):265-269. PEOPLES, O. P. AND A. J. SINSKEY (1989A) POLY-3-HYDROXYBUTYRATE BIOSYNTHESIS IN ALCALIGENES EUTROPHUS H16: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PHB POLYMERASE GENE (PHBC), J. BIOL. CHEM., 264:15293-15297. PEOPLES, O. P. AND A. J. SINSKEY (1989B) POLY-3-HYDROXYBUTYRATE BIOSYNTHESIS IN ALCALIGENES EUTROPHUS H16: CHARACTERIZATION OF THE GENES ENCODING 3-KETOTHIOLASE AND ACETOACETYL-CO-A REDUCTASE, J. BIOL. CHEM., 264:15298-15303. REHM, B. H. A., A. STEINBUCHEL, B. FUCHTENBUSCH, V. GORENFLO, R. JOSSEK AND S. LANGENBACH (1998) BIOSYNTHESIS OF POLYESTERS IN BACTERIA AND RECOMBINANT ORGANISMS, POLYMER DEGRADATION AND STABILITY, 59:177-182. RIESENBERG, D. AND R. GUTHKE (1999) HIGH-CELL-DENSITY CULTIVATION OF MICROORGANISMS, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 51:422-430. SHIMIZU, K. AND M. TOHYAMA (1999) CONTROL OF A MIXED CULTURE OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII AND RALSTONIA EUTROPHA FOR THE PRODUCTION OF PHB FROM GLUCOSE VIA LACTATE, BIOCHEM. ENG. J., 4:45-53. SLATER S., K. L. HOUMIEL, M. TRAN, T. A. MITSKY, N. B. TAYLOR, S. R. PADGETTE AND K. J. GRUYS (1998) MULTIPLE 3-KETOTHIOLASES MEDIATE POLY (3-HYDROXYALKANOATE) COPOLYMER SYNTHESIS IN RALSTONIA EUTROPHA, J. BACTERIOL., 180:1979-1987. SONG, C., L. ZHAO, S. ONO, C. SHIMASAKI AND M. INOUE (2001) PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-HYDROXYVALERATE) FROM COTTONSEED OIL AND VALERIC ACID IN BATCH CULTURE OF RALSTONIA SP. STRAIN JC-64, APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 94:169-178. STEINBUCHEL, A. AND H. E. VALENTIN (1995) DIVERSITY OF BACTERIAL POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID, FEMS MICROBIOL. LETT., 128:219-228. TAN, I. K., K. S. KUMAR, M. THEANMALAR, S. N. GAN AND B. GORDON (1997) SAPONIFIED PALM KERNEL OIL AND ITS MAJOR FREE FATTY ACIDS AS CARBON SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXY-ALKANOATES IN PSEUDOMONAS PUTIDA PGA1, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 47:207-211.