

# 以連續式發酵生產PHBV之研究

林家慶、涂瑞澤,張德明

E-mail: 9127890@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

PHB (POLY-HYDROXYBUTYRATE) 與PHBV (POLY-HYDROXYBUTYRATE- CO-HYDROXYVALERATE) 是可被微生物完全分解的熱塑性聚合物(THERMOPLASTIC POLYMERS), 其物理性質與聚丙烯 (POLYPROPYLENE) 相仿, 可應用於目前習用之高分子加工成型程序, 適用範圍相當廣泛。PHB與PHBV可由多種微生物來生產, 其中R -ALSTONIA EUTROPHA、ALCALIGENES LATUS、AZOTOBACTER VINELANDII、METHYLOTROPHS SP.、PSEUDOMO -NAS SP.等, 甚至包括經過基因重組的ESCHERICHIA COLI都是比較具有潛力的菌株。連續式操作常做為探討培養條件或營養限制因子對微生物的生長與產物累積之影響。本實驗使用RALS -TONIA EUTROPHA為實驗菌株以連續式發酵(溫度26、轉速300 RPM, PH值7.0), 探討不同的稀釋率與不同濃度的丙酸鈉對菌體生長、PHBV的累積以及碳源基質消耗的影響。實驗結果得知, 在未添加及添加 1G/L的丙酸鈉時, 皆無HYDROXYVALERATE (HV)的累積。當未添加丙酸鈉時, PHB佔總菌體重之比例從35% ~ 41%, 以稀釋率 $D = 0.102 / H$ 時為最高(41%)。添加丙酸鈉濃度1 G/L時, PHB佔總菌體重之比例為42% ~ 55%, 以稀釋率 $D = 0.1 / H$ 最高(55%)。當添加丙酸鈉濃度5 G/L時, 始有HV的累積, 至於HV與HB的平均莫耳比約為30 : 70。當添加丙酸鈉濃度7 G/L時, PHBV佔總菌體重的比例約為68%, 稀釋率 $D$ 為0.016 / H, HV : HB的平均莫耳比約為40 : 60。添加丙酸鈉濃度15 G/L時, 稀釋率僅能維持於0.016 / H, HV : HB的平均莫耳百分比為60 : 40。連續式饋料丙酸鈉濃度增加時, 菌體產物PHBV中HV的MOLE分率也會提高, 亦即 HB的MOLE分率降低。當進料中丙酸鈉濃度低於5 G/L或未添加丙酸鈉時, 稀釋率可達0.15 / H而不至於有WASHOUT的現象發生, 由實驗結果可知, 當稀釋率 $D$ 在0.1 / H時, PHBV佔菌體重之比例可達最高。若進料中丙酸鈉濃度維持在7 G/L時, 則稀釋率最高可達0.028 / H仍能維持一穩定狀態; 至於丙酸鈉濃度為15 G/L時, 當稀釋率低至 0.016 / H, 穩定狀態仍難以維持。雖然添加濃度較高的丙酸鈉有助於HV的生成, 但當基質中丙酸鈉濃度太高時, 菌體生長反而會受到抑制, 以致菌體濃度降低, PHBV的累積量亦少, 反而不符合經濟效益。

關鍵詞 : PHBV、連續式發酵培養、丙酸鈉、稀釋率、RALSTONIA EUTROPHA

## 目錄

第一章 緒論--P1 第二章 文獻回顧--P3 2.1 分解性塑膠之背景--P3 2.2 分解性塑膠之種類--P5 2.2.1 化學合成聚合物--P5 2.2.2 天然聚合物--P6 2.2.3 微生物合成聚合物--P7 2.3 微生物的代謝作用--P7 2.3.1 一次代謝的生合成--P7 2.3.2 二次代謝的生合成--P8 2.3.3 微生物生長和產物形成的關係--P10 2.4 分解性塑膠的應用--P10 2.4.1 PHB與PHBV分解性塑膠--P11 2.4.2 PHB(V)的代謝過程--P21 2.5 PHB(V)製法--P27 2.5.1 菌種--P27 2.5.2 基質--P29 2.5.3 生產技術--P32 2.5.4 產品回收--P35 2.5.4.1 溶劑法--P35 2.5.4.2 非溶劑法--P36 2.5.5 PHB(V)測定--P36 2.5.5.1 GC測定法--P37 2.5.5.2 NMR測定法--P38 2.6 發酵槽簡介--P40 2.6.1 連續式發酵--P40 2.6.2 連續式發酵的特點--P41 2.6.3 連續式發酵的優缺點--P43 2.6.4 連續式發酵的設備和類型--P44 2.6.5 連續發酵的控制--P48 2.6.5.1 確定進料流率--P48 2.6.5.2 防止其他菌種的污染或菌種退化--P49 第三章 材料與方法--P50 3.1 實驗材料--P50 3.1.1 菌株--P50 3.1.2 藥品--P50 3.1.3 培養基--P50 3.1.4 儀器設備--P51 3.2 培養條件--P52 3.2.1 活化--P52 3.2.2 預培養--P53 3.2.3 發酵槽培養--P53 3.3 分析方法--P55 3.3.1 菌體量--P56 3.3.2 葡萄糖消耗量--P56 3.3.3 丙酸鈉消耗量分析--P57 3.3.4 氮源消耗量分析--P57 3.3.5 PHBV分析--P58 第四章 結果與討論--P61 4.1 於未添加丙酸鈉之下的連續式發酵--P61 4.1.1 菌體生長與PHBV生產--P61 4.1.2 葡萄糖與氮源之消耗情形--P64 4.2 於添加1 G/L丙酸鈉之下的連續式發酵--P68 4.2.1 菌體生長與PHBV生產--P69 4.2.2 葡萄糖、丙酸鈉及氮源之消耗情形--P71 4.3 於添加5 G/L丙酸鈉之下的連續式發酵--P74 4.3.1 菌體生長與PHBV生產--P75 4.3.2 葡萄糖、丙酸鈉及氮源之消耗情形--P79 4.4 於添加7 G/L丙酸鈉之下的連續式發酵--P82 4.4.1 菌體生長與PHBV生產--P82 4.4.2 葡萄糖、丙酸鈉及氮源之消耗情形--P86 4.5 於添加15 G/L丙酸鈉之下的連續式發酵--P88 4.5.1 菌體生長與PHBV生產--P88 4.5.2 葡萄糖、丙酸鈉及氮源之消耗情形--P91 4.6 饋料不同濃度丙酸鈉及改變稀釋率之比較--P93 第五章 結論與未來展望--P95 5.1 結論--P95 5.2 未來展望--P96 參考文獻--P100 附錄--P105 附錄一 葡萄糖標準曲線--P105 附錄二 丙酸鈉標準曲線--P106 附錄三 菌體濃度與吸光值對照表--P107

## 參考文獻

1.王三郎, 生物技術, 高立圖書, 台北 (2000)。 2.王奕隆, 由ALCALIGENES EUTROPHUS 生產生物可分解塑膠的能量模式, 大葉大學碩士論文, 彰化 (1998)。 3.王韻婷, 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(2000)。4.向明，微生物發酵的放大，IN"生物技術的應用"(田蔚城編彙) 151-163。九州圖書，台北(1998)。5.行政院環保署，廢塑膠回收再生策略報告，行政院環保署，台北(1990)。6.何志煌，植物二次代謝物的生產，IN"生物技術的應用"(田蔚城編彙) 207-212。九州圖書，台北(1998)。7.吳欣達，聚- 羥丁酸其衛生聚合物生化製程開發，大葉大學碩士論文，彰化(1998)。8.李吉祥，分解性塑膠之回顧與展望，清潔生產資訊，10:41-56(1997)。9.林碧洲，分解性塑膠之回顧與前瞻，清潔生產資訊，5:29-38(1996)。10.柯志強、邱政文，生物塑膠的經濟面觀及未來展望縱觀歐洲之市場需求，塑膠資訊，1(4):43-49(1996)。11.高銘木，高分子聚合物生物分解的探討，工業污染防治，5:138-145(1986)。12.陳怡如，酸類基質對ALCALIGENES EUTROPHUS生產PHBV組成影響之研究，大葉大學碩士論文，彰化(2001)。13.陳國誠，微生物酵素工程學，藝軒圖書，台北(1988)。14.陳義融譯，日本開發生物分解性塑膠的國家計劃，化工資訊，6(2):84-96(1992)。15.張庭愷，利用ALCALIGENES EUTROPHUS生產POLY- -HDROXYBUTYRIC ACID之發酵與控制策略之研究，大同工學院碩士論文，台北(1998)。16.楊紹榮，生物分解性材料與廢棄物處理環境，塑膠工業，1(15):74-82(1998)。17.蘇遠志、黃世佑，微生物化學工程學，華香園出版社，台北(1993)。18.ANDERSON, A. J., AND E. A. DAWES, OCCURRENCE, METABOLISM, METABOLIC ROLE, AND INDUSTRIA -L USE OF BACTERIAL POLY-HYDROXY- ALKONATES, MICROBIOL., 54:450-472(1990)。19.BARHAM, P. J., AND A. SELWOOD, EXTRACTION OF POLY(BETA-HYDROXYBUTYRIC ACID), EUR. PAT. APPL., 58,480(1982)。20.BERGER,E.,J.A.RAMSAY,B.A.RAMSAY,C.CHAVARIE AND G.BRAUNEGG, PHB RECOVERY BY HYPOCHLORITE DIGESTION OF NON-PHB BIOMASS, BIOTECH. TECH., 3:227-232(1989)。21.BLOEMBERGEN, S., D. A. HOLDEN, G. K. HAMER AND T. L. BLUHUM, MARCHESSAULT RH STUDTES OF COMPOSITION AND CRYSTALLINITY OF BACTERIAL POLY ( HYDROXYBUTYRATE CO HYDROXYVALERATE ), MACROMOLECULES, 19:2865-2871(1986)。22.BRANDL,H.,R.A.GROSS,R.W. LENZ AND R.C. FULLER, PLASTICS FROM BACTERIA AND FOR BACTERIA, BIOCHEM. ENG., 41:77-93(1990)。23.BRAUNEGG G., B. SONNLEITNER AND R. M. LAFFERTY, EXTRACTION OF POLY (BETA-HYDROXYBUTYRIC ACID), EUR. J. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 629(1978)。24.COLLINS, S. H., CHOICE OF SUBSTRATE IN POLYHYDROXYBUTYRATE SYNTHESIS, SPEC. PUBL. SOC. GEN. MICROBIOL., 21:161-168(1987)。25.DOI, Y., M. KUNIOKA, Y. NAKAMURA AND K.SOGA.,NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDIES ON POLY ( -HYDROXYBUTYRATE) AND A COPOLYMER OF -HYDROXYBUTYRATE AND -HYDROXYVALERATE ISOL -ATED FROM ALCALIGENES EUTROPHUS H16, MACROMOLECULES, 19:860-2864(1986)。26.GASSNER, F. AND A. J. OWEN,SOMEPROPERTIES OF POLY (3-HYDROXY -BUTYRATE)-POLY (3-HYDROXY -VALERATE) BLENDS, POLYMER INTERNATIONAL, 39:215-219(1996)。27.GERNGROSS,T. U.,CAN BIOTECHNOLOGY MOVE US TOWARD SUSTAINABLE SOCIETY NATURE BIOTECHNOLO -GY, 17:541-544(1999)。28.GOSTOMSKI, P. A., AND H. R. BUNGAY, EFFECT OF GLUCOSE AND NH4 LEVELS ON POLY (b-HYDROXY -BUTYRATE) PRODUCTION AND GROWTH IN A CONTINUOUS CULTURE OF ALCALIGENES EUTROPHUS,BIOTE -CHNOL. PROG., 12:234-239(1996)。29.HENRY, E. V. AND D. DENNIS, PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXY BUTRATE-CO-4- HYDROXYBUTRATE) IN RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI GROWN ON GLUCOSE, J. BIOTECHNOL., 58:33-38(1997)。30.HOLMES, P. A., APPLICATIONS OF PHB-A MICROBIALLY PRODUCED BIODEGRADABLE THERMOPLASTIC, PHYS. TECHNOL., 16:32-36(1993)。31.HOLMES, P. A., L. F. WRIGHT, AND S. H. COLLINS, BETA-HYDROXYBUTYRATE POLYMERS, EUROPEAN PATENT, 00,52,459(1985)。32.JANES, B., J. HOLLAR, AND D. DENNIS, MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POLY- -HYDROXYBUTYR -ATE BIOSYNTHETIC PATHWAY OF ALCALIGENES EUTROPHUS H16, NEW BIOSYNTHETIC BIODEGRADABLE POLYMERS OF INDUSTRIAL INTEREST FROM MICROORGANISMS, 186:175-190(1990)。33.JUETTNER R. R. , R. M. LAFFERTY AND H. J. KNACKMUSS, BETA-HYDROXYBUTYRATE POLYMERS,EUR. J. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., 1(1975) 233。34.LAFFERTY,R. M., B. KORSATKO AND W. KORSATKO, MICROBIAL PRODUCTION OF POLY b-HYDROXYBUT -YRIC ACID, BIOTECHNOL., 6B:135-176(1988)。35.LEE, E. Y. AND C. Y. CHOI, STRUCTURAL IDENTIFICATION OF POLYHYDROXY ALKANOIC ACID (PHA) CONTAINING 4-HYDROXYBUTYRIC ACIDS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS) AND ITS APPLICATION TO BACTERIA SCREENING, BIOTECHNOL. TECH., 11:167-171(1997)。36.LEE, S. Y., BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, BIOTECHNOL. BIOENG., 49: 1-14(1996)。37.OWEN, A. J., SOME DYNAMIC MECHANICAL PROPERTIES OF MICROBIALLY PRODUCED POLY -HYDROXY -BUTYRATE/ -HYDROXYVALERATE COPOLY- MERS, COLLOID POLYMER SCI., 263:799-803(1985)。38.PAGE, W. J. AND O. KNOSP, HYPERPRODUCTION OF POLY-b-HYDROXYBUTYRATE DURING EXPONENTIAL GROWTH OF AZOTOBACTER VINELANDII UWD, APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 55:1334-1339(1989)。39.AGE, W. J., PRODUCTION OF POLY-b-HYDROXYBUTYRATE BY AZOTOBACTER VINELANDII UWD IN MEDIA CONTAINING SUGARS AND COMPLEX NITROGEN SOURCES, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL.,38:117-121(1992)。40.PARK, C. H. AND V. K. DAMODARAN, BIOSYNTHESIS OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO- 3-HYDROXYV -ALERATE) FROM ETHANOL AND PENTANOL BY ALCALIGENES EUTROPHUS, BIOTECHNOL. PROG.,10: 615 -620(1994)。41.REUSTING, H., R. V. HOUTEN, A. HOEFS, E. K. V. LANGENBERGHE, O. FAVRE-BULLE AND B.WITHO -LT, HIGH CELL DENSITY CULTIVATION OF PSEUDOMONAS OLEOVORANS: GROWTH AND PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXYALKANOATES) IN TWO-LIQUID PHASE BATCH AND FED-BATCH SYSTEMS, BIOTECHNOL. BIOENG., 41:550-556(1993)。42.RAMSAY, B. A., G. M. ZNOJ AND DAVID G. C, FORMAL KINETICS OF POLY- HYDROXYBUTYRIC ACID (PHB) PRODUCTION IN ALCALIGENES EUTROPHUS H16 AND MYCOPLANARUBRA R14 WITH RESPECT TO TH -E DISSOLVED OXYGEN TENSION IN AMMONIUM-LIMITED BATCH

CULTURES, APPL. ENVIRON. MICROBIOL., JULY :152-156 (1986). 43. RIIS V. AND W. MAI, GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID IN MICROBIAL BIOMASS AFTER HYDROCHLORIC ACID PROPANOLYSIS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., 445: 285-289 (1988). 44. WALKER, J., J. R. WHITTON AND B. ALDERSON, EXTRACTION OF POLY(BETA-HYDROXY- BUTYRIC ACID), EUR. PAT. APPL. , 46,017 (1982). 45. WANG, D. I. C., FERMENTATION AND ENZYME TECHNOLOGY. WILEY, NEW YORK, 1979. 46. WILLIAMS, J. P., PRODUCTION OF POLY- $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE BY AZOTOBACTER VINELANDII STRAIN UWD DURING GROWTH ON MOLASSES AND OTHER COMPLEX CARBON SOURCES, APPL. MICROBIOL. BIOTECHNO -L., 31:329-333 (1989). 47. WILLIAM, J. P., J. MANCHAK AND B. RUDY., FORMATION OF POLY (HYDROXYBUTYRATE CO HYDROXYVALER -ATE) BY AZOTOBACTER VINELANDII UWD, APPL. AND ENVIRON. MICROBIOL., SEPT.:2866-2873 (1992). 48. YIM, K.S., S.Y. LEE AND H.N. CHANG, SYNTHESIS OF POLY-(3-HYDROXY- BUTYRATE-CO-3-HYDROXY -BUTYRATE) BY RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI, BIOTECHNOL. AND BIOENG., 49:495-503 (1996).