

# 連續生產PHBV-丙酸戊酸對菌體生長及PHBV產生之影響

林逸群、?瑞澤

E-mail: 9300181@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

PHBV為可被微生物完全分解的熱塑性聚合物，且可由多種微生物生產。在具有生產能力的菌株當中，*Ralstonia eutropha* (簡稱*R. eutropha*)是被研究最多的菌株，可利用簡單碳源，且可累積大量PHA。對生產PHBV而言，則需在細菌生長進入第二階段時加入有機酸。有機酸加入的速率和濃度需加以控制，因在培養基中，若有有機酸濃度過高就會對*R. eutropha*產生毒性，且會妨害聚合物的合成；然而有機酸濃度太低則很快會被消耗完，若無有機酸持續的存在，則菌體會開始以逆反應分解HV單體或只合成HB單體。PHA是在碳源足夠情況但其生長因素不足(本研究以氮源為限量基質)時，才開始累積。為提高產品產率與碳源轉化率，多重進料批次發酵和連續式發酵常被用以取代批次發酵。本研究使用*Ralstonia eutropha* ATCC 17699為實驗菌株，以連續式發酵(溫度26、轉速300 rpm、pH 7.0)，探討於不同的稀釋速率、不同C/N比(20、30、40)與二種酸類基質(丙酸鈉與戊酸鈉)對菌體生長、PHBV生合成與碳、氮源基質代謝的影響。經由實驗結果得知，在稀釋速率為0.060 h<sup>-1</sup>時，以連續式發酵培養，PHBV佔菌體量的37%(w/w)，PHBV的平均產率為0.094 g/L·h。添加丙酸鈉，當稀釋速率為0.060 h<sup>-1</sup>時，HV佔PHBV的14%(w/w)，HV:HB的平均莫耳比約為10:90，Y<sub>HV</sub>/Propionate = 0.040 gHV/gPropionate；而使用戊酸鈉時，HV佔PHBV的37%(w/w)，HV:HB的平均莫耳比約為40:60，Y<sub>HV</sub>/Valerate = 0.131 gHV/gValerate。由此顯示，添加戊酸鈉較丙酸鈉更有利於HV的合成。本研究的控制因子為稀釋速率、C/N比及酸類基質，利用變異數分析，探討各個控制因子對菌體生長、PHBV生合成與碳、氮源基質代謝的影響。實驗得知稀釋速率對HB產率具有顯著的影響，當稀釋速率增加，HB產率有明顯上升的趨勢；酸類基質對HV產率與HV產量都具有非常顯著的影響，上述結果得知，添加戊酸鈉於菌體代謝途徑中更利於被利用，使戊酸鈉對於HV的累積明顯優於丙酸鈉；C/N比對HB產量具有顯著的影響，發現C/N比越高，其HB產量會相對變低；而PHBV產率對其因子則沒有明顯的影響。

關鍵詞：PHBV、連續發酵、稀釋速率、*Ralstonia eutropha*、C/N比、變異數分析

## 目錄

第一章 緒論 .....	1	第二章 文獻回顧 .....	3	2.1 前言 .....	3
.....	3	2.2 生物分解性塑膠的檢測方式與標準規範 .....	4	2.3 分解性塑膠的種類 .....	6
.....	6	2.3.1 微生物合成聚合物 .....	6	2.3.2 化學合成聚合物 .....	9
.....	9	2.3.3 天然聚合物 .....	10	2.3.4 光分解性塑膠 .....	10
.....	10	2.4 PHB與PHBV簡介 .....	12	2.4.1 合成 .....	12
.....	12	2.4.2 物理與化學性質 .....	16	2.4.3 PHB(V)的代謝過程 .....	20
.....	20	2.5 微生物的代謝作用 .....	27	2.5.1 初級代謝的生合成 .....	27
.....	27	2.5.2 次級代謝的生合成 .....	27	2.5.3 微生物生長與產物形成的關係 .....	30
.....	30	2.6 發酵工程概述 .....	31	2.6.1 批次發酵 .....	32
.....	34	2.6.2 連續發酵 .....	36	2.6.3 連續式發酵的特點 .....	36
.....	36	2.6.3.1 連續式發酵的特點 .....	36	2.6.3.2 連續發酵的控制 .....	38
.....	39	2.7 生物分解性塑膠的應用 .....	41	2.8 生物分解性塑膠的市場 .....	41
.....	41	2.8.1 國外市場 .....	43	2.8.2 中國大陸市場 .....	43
.....	43	2.8.3 國內市場 .....	46	2.9 PHBV測定 .....	46
.....	46	2.9.1 定性與定量 .....	47	2.9.2 結構測定 .....	47
.....	48	2.10 實驗設計 .....	48	2.10.1 實驗設計的目的與意義 .....	48
.....	48	2.10.2 假設檢定 .....	49	2.10.3 變異數分析 .....	53
.....	53	第三章 材料與方法 .....	53	3.1 實驗材料 .....	53
.....	53	3.1.1 菌株 .....	53	3.1.2 藥品 .....	53
.....	53	3.1.3 培養基 .....	53	3.2 儀器 .....	55
.....	55	3.3 實驗方法與流程 .....	56	3.3.1 活化 .....	56
.....	56	3.3.2 預培養 .....	56	3.3.2 預培養 .....	56
.....	56	3.3.3 連續式發酵培養 .....	57	3.3.3 連續式發酵培養 .....	57
.....	57	3.3.4 發酵槽培養 .....	57	3.4 分析方法 .....	59
.....	59	3.4.1 菌體 .....	59	3.4.2 碳源 .....	59
.....	59	3.4.2.1 葡萄糖 .....	59	3.4.2.2 丙酸鈉與戊酸鈉 .....	59

.....59	3.4.3 氮源 .....	60	3.4.4 PHB與PHBV .....	66
.....61	3.4.4.1 GC條件設定 .....	62	3.4.4.2 樣品中PHB與PHBV定量 .....	66
.....62	3.5 實驗設計 .....	63	第四章 結果與討論 .....	66
4.1 前言 .....	66	4.2 添加丙酸鈉於連續式發酵生產PHBV .....	66	4.2.1 於C/N 20的連續發酵 .....
.....66	4.2.1.1 菌體生長與PHBV生產 .....	67	4.2.1.2 葡萄糖、丙酸鈉與氮源之消耗情形 .....	69
.....69	4.2.2 於C/N 30的連續發酵 .....	74	4.2.2.1 菌體生長與PHBV生產 .....	74
.....74	4.2.2.2 葡萄糖、丙酸鈉與氮源之消耗情形 .....	79	4.2.3 於C/N 40的連續發酵 .....	81
.....81	4.2.3.1 菌體生長與PHBV生產 .....	81	4.2.3.2 葡萄糖、丙酸鈉與氮源之消耗情形 .....	86
.....86	4.3 添加戊酸鈉於連續式發酵生產PHBV .....	88	4.3.1 於C/N 20的連續發酵 .....	88
.....88	4.3.1.1 菌體生長與PHBV生產 .....	89	4.3.1.2 葡萄糖、戊酸鈉與氮源之消耗情形 .....	93
.....93	4.3.2 於C/N 30的連續發酵 .....	95	4.3.2.1 菌體生長與PHBV生產 .....	95
.....95	4.3.2.2 葡萄糖、戊酸鈉與氮源之消耗情形 .....	100	4.3.3 於C/N 40的連續發酵 .....	102
.....102	4.3.3.1 菌體生長與PHBV生產 .....	102	4.3.3.2 葡萄糖、戊酸鈉與氮源之消耗情形 .....	107
.....107	4.4 實驗設計-變異數分析 .....	109	4.4.1 HB產率 .....	109
.....109	4.4.2 HV產率 .....	109	4.4.3 HB產量 .....	115
.....115	4.4.4 HV產量 .....	115	4.4.5 PHBV產率 .....	120
.....120	4.5 結論 .....	122	4.5.1 比較不同稀釋率的生長情況 .....	122
.....122	4.5.2 比較不同C/N比的生長情況 .....	122	4.5.3 比較不同酸類基質的生長情況 .....	122
.....122	第五章 結論與未來展望 .....	128	5.1 結論 .....	128
5.2 未來展望 .....	129	參考文獻 .....	132	附錄 .....
.....	139			

## 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。
- 王奕隆 (1998) 由 *Alcaligenes eutrophus* 生產生物可分解塑膠的能量模式, 大葉大學食品工程學系碩士論文, 彰化。
- 王鼎 (2001) 統計學, 鼎茂圖書出版有限公司, 台北。
- 王建龍和文湘華 (2001) 現代環境生物技術, 清華大學出版社, 北京。
- 沈曉復 (2000) 生物分解性塑膠之發展及認識, 塑膠資訊, 49: 20-32。
- 沈明來 (2000) 生物檢定統計法, 九州圖書文物有限公司, 台北。
- 向明 (1998) 生物技術的發展與應用(田蔚城編彙), 九州圖書, 台北, 151-164。
- 何志煌 (1998) 生物技術的發展與應用(田蔚城編彙), 九州圖書, 台北, 207-212。
- 吳易凡 (2001) 生物分解性塑膠之發展動向, 塑膠資訊, 50: 41-49。
- 林碧洲 (1996) 分解性塑膠的回顧與展望, 產業透析, 34-39。
- 林家慶 (2002) 連續式發酵生產PHBV之研究, 大葉大學食品工程學系碩士論文, 彰化。
- 洪哲穎和陳國誠 (1992) 回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用, 化工, 39(2): 3-18。
- 洪世淇 (2001) 生物分解性塑膠的技術與市場展望, 化工資訊, 61-65。
- 柯志強 (1997) 生物分解性塑膠之發展及認識, 塑膠資訊, 12: 59-71。
- 姜燮堂 (2001) 分解性塑膠, 產業調查與技術, 173: 28-40。
- 黃建銘 (2001) 生物可分解塑膠對環境的益處與未來發展趨勢, 環保月刊, 2(1): 176-181。
- 黃泰銘 (1997) 纖維材料之環保新意識-生物分解性高分子, 紡織速報, 9(5): 18-23。
- 徐惠美 (2000) 生物分解性塑膠, 化工資訊, 81-84。
- 梅樂和 (1999) 生化生產工藝學, 科學出版社, 北京。
- 楊建俊 (1996) 生物分解性高分子之發展及應用, 生物產業, 7(2): 123-127。
- 劉世忠 (2000) 生物可分解性塑膠業, 華銀月刊, 595: 34-38。
- 鄭瑞洲 (1999) 可分解性塑膠, 科技博物, 5(3): 96-100。
- Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial use of bacterial polyhydroxyalkonates, *Microbiol.*, 54 : 450-472.
- Barham, P. J. and A. Selwood (1982) Extraction of poly(beta-hydroxybutyric acid), *Eur. Pat. Appl.* 58480.
- Berger, E., J. A. Ramsay, B. A. Ramsay, C. Chavarie and G. Braunegg (1989) PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass, *Biotech. Tech.*, 3 : 227-232.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz and R. C. Fuller (1990) Plastics from bacteria and for bacteria, *Biochem. Eng.*, 41 : 77-93.
- Braunegg G., B. Sonnleitner and R. M. Lafferty (1978) Extraction of poly(beta-hydroxybutyric acid), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 629.
- Bolebergen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer and T. L. Bluhm (1986) Studies of composition and crystallinity of Bacterial poly( -hydroxybutyrate-co- -hydroxyvalerate), *Macromolecules.*, 19 : 2865-2871.
- Byrom, D. (1987) Polymer synthesis by microorganism, technology and economics, *Biotech.*, 5 : 246-250.
- Chen, Y., G. Yang; Q. Chen (2002) Solid-state NMR study on the structure and mobility of the noncrystalline region of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate), *Polymer*, 43 : 2095-2099.
- Chung, D. M., M. H. Choi, J. J. Song, S. C. Yoon, I. K. Kang and N. E. Huh (2001) Intracellular degradation of two structurally different polyhydroxyalkanoic acids accumulated in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas citronellolis* from mixtures of octanoic acid and 5-phenylvaleric acid, *Macromolecules.*, 29 : 243-250.
- Cornibert, J. and R. H. Marchessault (1972) Physical properties of Poly- -hydroxybutyrate, IV. Conformational analysis and crystalline structure, *J. Mol. Biol.*, 71 : 735-756.
- Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga (1998) Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate, *Macromolecules.*, 21 : 2722-2727.
- Du, G., J. Chen, J. Yu and S. Lun (2001) Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system, *Biotech.*, 88 : 59-65.
- Du, G., J. Chen, J. Yu and S. Lun (2001) Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*, *Biochem. Eng.*, 8 :

103-110. 36. Gao, H. J., Q. Wu and G. Q. Chen (2002) Enhanced production of D-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*, *Microbiology Letters*, 213 : 59-65. 37. Holmes, P. A. (1985) Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic, *Phys. Technol.*, 16 : 32-36. 38. Haywood G.W., A. J. Anderson, L. Chu and E.A. Dawes (1988) Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxy-alkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 52 : 91-96. 39. 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-hydroxybutyrate) production in oilseed leucoplasts of *Brassica napus*, *Planta*, 209 : 547-550. 40. Jan, S., C. Roblot, J. Courtois, B. Courtois, J. N. Barbotin and J. P. Seguin (1996) <sup>1</sup>H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme and Microbial Technology*, 18 : 195-201. 41. Juettner R. R., R. M. Lafferty and H. J. Knackmuss (1975) Beta-hydroxybutyrate polymer, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1 : 233-236. 42. Kunioka, M., Y. Kawaguchi and Y. Doi (1989) Production of biodegradable co-polyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30 : 569-573. 43. Lafferty, R. M. and E. Heinzle (1978) Microbiological methods, U.S. Pat. 4,138,291. 44. Lafferty, R. M. and W. Korsatko (1988) Microbial production of poly-3-hydroxybutyric acid, *Biotechnol.*, 6b : 135-176. 45. Liu, F. W., L. D. Ridgway, T. Gu and Z. Shen (1998) Production of poly-3-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*, *Biotechnology letters.*, 20 : 345-348. 46. Park, C. H. and V. K. Damodaran (1994) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Prog.*, 10: 615-620. 47. 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. 48. Ramsay, B. A., G. M. Znoj and G. C. David (1986) Formal kinetics of poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplasma rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, July : 152-156. 49. Schmidt, J., B. Biederman and H. Schmiechen (1985) Ger.(East) Pat. DD 223,428. 50. Slater S., K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett and K. J. Gruys (1998) Multiple 3-ketothiolases mediate poly(3-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*, *J. Bacteriol.*, 180 : 1979-1987. 51. Vanlautern, N. and J. Gilain (1982) Process for separating poly-beta-hydroxybutyrate from a biomass, U.S. Pat. 4,310,684. 52. Wendlandt, K. D., M. Jechorek, J. Helm and U. Stottmeister (2001) Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane, *Biotech.*, 86 : 127-133. 53. Williams, J. P. (1989) Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31 : 329-333. 54. Yamane, T. (1993) Yield of poly-D-(3)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study, *Biotechnol. Bioeng.*, 41 : 165-170. 55. Yan, Y. B., Q. Wu and R. Q. Zhang (2000) Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by <sup>13</sup>C NMR, *Microbiology Letters*, 193 : 269-273. 56. Yim, K. S., S. Y. Lee and H. N. Chang (1996) Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-hydroxybutyrate) by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, 49 : 495-503. 57. Yu, G. E., R. H. Marchessault (2000) Characterization of low molecular weight poly(3-hydroxybutyrate)s from alkaline and acid hydrolysis, *Polymer*, 41 : 1087-1098.