

溫度變化對*Ralstonia eutropha*於限氮條件下生合成PHB之影響

劉建宏、吳淑姿

E-mail: 9318475@mail.dyu.edu.tw

摘要

聚羥基烷酯類為一完全生物可分解性塑膠材料，可由多種細菌於碳源充足而某種營養素限制的環境下來生合成，其性質與傳統塑膠材料 - 聚丙烯之性質相似，因而被廣為研究。本研究以微生物發酵法來生產PHB (polyhydroxybutyrate)，測試的菌株為*Ralstonia eutropha*，在氮源限制的生長環境，於不同溫度(26、30及35)下進行批次發酵培養，探討菌體量、PHB的產量及碳源與氮源基質消耗的影響。實驗結果顯示，於35 培養時，PHB的產率為最高，約0.099 g/L·h。每克葡萄糖碳源基質平均生產之PHB量，以培養於26 時為佳，約為0.20 gPHB/gGlucose。其代謝酸分析結果，培養於26 時，以檸檬酸之產率最高，約0.136 g/L·h；培養於30 時，亦以檸檬酸之產率為最高，約0.157 g/L·h；而培養於35 時，則以乙酸之代謝產率為最高，約0.109 g/L·h。在30 限制氮源之連續式發酵的培養，於最初以批次發酵進行培養菌體，當菌體生長尚未進入對數生長期時，改以連續式發酵培養，稀釋速率(D)分別0.3028、0.2335、0.1918及0.1213 h⁻¹。由實驗結果得知，培養於D = 0.1213 h⁻¹時，PHB產率為最高，約0.028 g/L·h。而菌體產率則以在D = 0.2335 h⁻¹培養時為最高，約為0.067 g/L·h。

關鍵詞：PHB；*Ralstonia eutrophus*；限氮；批次發酵；代謝酸；連續式發酵；稀釋速率

目錄

目錄封面內頁.....	頁次	簽名頁	授權書.....	iii	中文摘要
.....iv	英文摘要v	誌謝vi	目錄
.....viii	圖目錄xiii	表目錄xvi	符號說明
.....xvii	第一章 緒論1	第二章 文獻回顧3	2.1 塑膠材料
概述3	2.2 生物可分解性塑膠的種類4	2.2.1 生物可分解性塑膠簡介4
2.2.2 微生物生合成類5	2.2.3 天然高分子類5	2.2.4 化學合成類6
2.2.5 其他6	2.3 微生物的代謝7	2.3.1 一級代謝產物8
2.3.2 二級代謝產物9	2.4 微生物羥基烷酯聚合物的介紹14	2.4.1 菌種與顯微鏡觀察14
2.4.1.1 Burdon氏染色法17	2.4.1.2 螢光染色法17	2.4.2 PHA的生合成與代謝路徑18
2.4.3 PHA的物理化學性質21	2.5 生合成PHAs的方式24	2.5.1 搖瓶培養24
2.5.2 批次發酵培養24	2.5.2.1 延滯期25	2.5.2.2 指數生長期25
2.5.2.3 平穩期26	2.5.2.4 死滅期29	2.5.2.5 影響比生長速率的因素29
2.5.3 饋料批次發酵培養32	2.5.3.1 前饋饋料控制32	2.5.3.2 回饋饋料控制33
2.5.3.3 倒傳遞神經網路控制33	2.5.4 連續式發酵培養35	2.5.5 高細胞密度培養35
2.5.6 生化技術的應用36	2.6 產物回收38	2.6.1 溶劑法38
2.6.1.1 熱裂解法39	2.6.1.2 回流萃沖法39	2.6.1.3 界面活性劑 - 鉗合劑法39
2.6.1.4 其他40	2.6.2 非溶劑法40	2.7 PHAs的測定40
2.7.1 氣相層析測定法40	2.7.2 核磁共振測定法41	2.8 經濟評估42
第三章 材料與方法43	3.1 實驗材料43	3.1.1 實驗菌株43
3.1.2 實驗藥品44	3.1.3 培養基46	3.2 儀器設備46
3.3 培養條件與步驟48	3.3.1 發酵培養流程48	3.3.2 活化48
3.3.3 預培養50	3.3.4 發酵槽培養50	3.4 分析方法52
3.4.1 樣品分析之流程52	3.4.2 菌體細胞內PHA之染色鑑定55	3.4.3 生質體55
3.4.4 葡萄糖57	3.4.5 氮源58	3.4.6 磷源59
3.4.7 菌體中PHB的分析60	3.4.7.1 萃取方法60	3.4.7.2 分析條件60
3.4.7.3 PHB的分析61	第四章 結果與討論63	4.1 顯微鏡之鏡檢63
4.1.1 光學顯微鏡之觀察63	4.1.2 位相差顯微鏡之觀察65	4.2 限氮批次培養 <i>Ralstonia eutropha</i> 發酵生產PHB68
4.2.1 26 之批次發酵培養69	4.2.2 30 之批次發酵培養74	4.2.3 35 之批次發酵培養79
4.2.4 不同溫度下批次發酵培養之比較84	4.3 限氮發酵槽之代謝酸分析88	4.3.1 26 之代謝酸分析88
4.3.2 30 之代謝酸分析91	4.3.3 35 之代謝酸分析94	4.3.494

不同溫度之代謝酸比較	97	4.4 連續式發酵培養	101	4.4.1 不同稀釋速率之連續式發酵培養	102
.....	102	4.4.2 不同稀釋速率下發酵培養之比較	105	4.5 核磁共振儀分析	111
.....	114	5.1 結論	114	5.2 展望	115
.....	117	附錄	123	參考文獻	

參考文獻

- 參考文獻 1.王西華、王進琦 (1992) 食品微生物學, 藝軒圖書出版社, 台北。 2.王建龍、文湘華 (2001) 現代環境生物技術, 清華大學出版社, 北京。 3.王進琦編著 (2000) 基礎微生物學, 藝軒圖書出版社, 台北。 4.行政院環保署 (1999) 減少廢棄塑膠袋, 行政院環保署, 台北, <http://www.epa.gov.tw/news/en881123.htm>。 5.任凌波、辛思規、任曉蕾 (2002) 生物化工產品生產工藝, 化學工業出版社, 北京。 6.李吉祥 (1997) 分解性塑膠的回顧與展望, 清潔生產, 10: 41-56。 7.何志煌 (1998) 生物技術的發展與應用 (田蔚城彙編), 眾光出版社, 台北, 207-212。 8.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。 9.林家慶 (2002) 以連續式發酵槽生產PHBV之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化。 10.洪哲穎、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。 11.姜燮堂 (2001) 分解性塑膠, 產業調查與技術, 137: 28-40。 12.徐惠美 (2000) 生物分解性塑膠, 化工資訊, 14(10): 81-84。 13.徐敬衡、胡長良、劉文佐 (2002) 探討氧氣供給對 *Kineosphaera limosa* 生產 PHB 之關係, 第七屆生化工程研討會論文集, 台北, 台灣。 14.梁永芳 (1991) 環保新產品: 可分解塑膠, 科學月刊, 22: 771-778。 15.陳怡如 (2001) 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。 16.梅東和、姚善涇、林東強 (2000) 生化生產工藝學, 科學出版社, 北京。 17.張庭愷 (1998) 利用 *Alcaligenes eutrophus* 生產 poly- γ -hydroxybutyric acid 之發酵與控制策略之研究, 大同大學碩士論文, 台北。 18.曾義雄 (1993) 細菌代謝, 藝軒圖書出版社, 台北。 19.楊正昌、陳俊男、陳聯泰 (2002) 《生化工程技術》在聚酯纖維產業之應用, 化工資訊, 16(11): 43-53。 20.董崇民、邱文英、陳信龍、劉小萍、廖茗名 (2002) 生物可分解性塑膠 PHA 的結構分析、摻合及應用, NSC-90-2621-Z-032-002-, 永續發展科技與政策研討會, 台北。 21.蔡宏明 (1998) 線上學習神經網路控制器在程序控制上之應用, 大葉大學碩士論文, 彰化。 22.劉英俊編著 (1996) 最新微生物應用工業 (Applied Industrial Microbiology 4th Ed.), 中央圖書出版社, 台北。 23. Bailey, J. E. (1991) Towards a science of metabolic engineering, Science, 252: 1668-1675。 24. Brauegg, G., B. Sonnleitner and R. M. Lafferty (1978) A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- γ -hydroxybutyric acid in Microbial Biomass, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 6: 39-37。 25. Burdon, K. L., J. C. Stokes and C. E. Kimbrouge (1942) Studies of The Common Aerobic Spore-Forming Bacilli. I. Staining for Fat with Sudan Black B-Safranin, Journal of Bacteriology, 43: 717-724。 26. Chen, Y., J. Chen, C. Yu, G. Du and S. Lun (1999) Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system, Process Biochemistry, 34: 153-157。 27. Clesceri, L. S., A. E. Greenberg and A. D. Eaton Ed. (2001) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, pp. 409-421, American Public Health Association, Washington, D. C. 28. Curley, J. M., R. W. Lenz, Fuller, R. Clinton, Browne, Sheila Ewing and Gabriel, Chelvanaya B. (1997) ¹³C n.m.r. spectroscopy in living cells of *Pseudomonas oleovorans*, Polymer, 38: 5313-5319。 29. de Koning, G. J. M. and B. Witholt (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 1: Solubilization, Bioprocess Engineering, 17: 7-13。 30. de Koning, G. J. M., M. Kellerhals, C. van Meurs and B. Witholt (1997) A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 2: Process development and Engineering, Bioprocess Engineering, 17: 15-21。 31. Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soga (1986) Nuclear magnetic resonance studies on poly(γ -hydroxybutyrate) and a copolymer of γ -hydroxybutyrate and γ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, Macromolecules, 19: 2860-2864。 32. Du, G. C., J. Yu and S. Lun (2001) Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*, Biochemical Engineering Journal, 8: 103-110。 33. Gorenflo, V., A. Steinbuchel, S. Marose, M. Rieseberg and T. Scheper (1999) Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining, Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 765-772。 34. 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 Microbiology Letters, 52: 91-96。 35. Hourniel, K. L., S. Slater, D. Broyles, L. Casagrande, K. Gonzalez, T. A. Mitsky and S. E. Reiser (1999) Poly(hydroxybutyrate) production in oilseed leucoplasts of *Brassica napus*, Planta, 209: 547-550。 36. Huisman, L. A. (1982) Isolation and identification of the reserve material of *Bacillus megaterium*, In: Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology, pp. 233-241, S. B. Primrose and A. C. Wardlaw Ed., Academic Press, London。 37. James, S., R. Legge and H. Budman (2002) Comparative study of black-box and hybrid estimation methods in fed-batch fermentation, Journal of Process Control, 12: 113-121。 38. Jan, S., C. Roblot, J. Courtois, B. Courtois, J. N. Barbotin and J. P. Seguin (1996) ¹H NMR spectroscopic determination of poly-3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, Enzyme and Microbial Technology, 18: 195-201。 39. Kacser, H. and J. A. Burns (1973) The control of flux, Symposia of the Society for Experimental Biology, 27: 65-104。 40. Kim, Y. B. and R. W. Lenz (2001) Polyesters from Microorganisms, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 71: 51-79。 41. Lafferty, R. M., B. Korstko and W. Korsatko (1988) Microbial production of poly(γ -hydroxybutyric acid), In: Biotechnology, 6: 135-176, H. J. Rehm and G. Reed Ed., Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany。 42. Leaf, T. A. and F. Srienc (1998) Metabolic Modeling of Polyhydroxybutyrate Biosynthesis, Biotechnology and Bioengineering, 57: 557-570。 43. Lee, I. Y., G. Y. 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- γ -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 4: 146-156。 44. Lee, S. Y. (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49: 1-14。 45. Lemoigne, M. (1925) Etudes sur l'autolyse microbie

acidification par formation d'acide γ -oxybutyrique, Annales de L'Institut Pasteur (Paris), Microbiology, 39: 144-146. 46. Mckee, T. and J. R. Mckee (2003) Biochemistry: The Molecular Basis of Life, 3rd Ed., McGraw-Hill Co., Inc., New York. 47. MEROPS - the Protease Database (2003) <http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/SP000854.htm>. 48. Monod, J. (1949) The growth of bacterial cultures, Annual Review of Microbiology, 3: 371-394. 49. Ostle, A. and J. G. Holt (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly- γ -Hydroxybutyrate, Applied and Environment Microbiology, 44: 238-241. 50. Peoples, O. P. and A. J. Sinskey (1989a) Poly- γ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of PHB polymerase gene (phbC), The Journal of Biological Chemistry, 264: 15293-15297. 51. Peoples, O. P. and A. J. Sinskey (1989b) Poly- γ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: characterization of the genes encoding γ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase, The Journal of Biological Chemistry, 264: 15298-15303. 52. Poirier, Y., D. Dennis, K. Klomprens, C. Nawrath and C. Somerville (1992) Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants, FEMS Microbiology Letters, 103: 237-246. 53. Preusting, H., R. V. Houten and A. Hoefs (1993) High Cell Density Cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: Growth and Production of Poly(3-hydroxyalkanoates) in Two-Liquid Phase Batch and Fed-Batch Systems, Biotechnology and Bioengineering, 41: 550-556. 54. Riesenber, D. and R. Guthke (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms, Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 422-430. 55. Riis, V. and W. Mai (1988) Gas chromatographic determination of poly- γ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis, Journal of Chromatography, 445: 285-289. 56. Schubert, P., A. Steinbuchel and H. G. Schlegel (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for Synthesis of Poly- γ -Hydroxybutyric Acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 170: 5837-5847. 57. Shi, H., M. Shiraishi and K. Shimizu (1997) Metabolic Flux Analysis for Biosynthesis of Poly(γ -Hydroxybutyric Acid) in *Alcaligenes eutrophus* from Various Carbon Sources, Journal of Fermentation and Bioengineering, 84: 579-587. 58. Shimizu, H., S. Tamura, S. Shioya and K. Suga (1993) Kinetic study of poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular distribution control in a fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*, Journal of Fermentation and Bioengineering, 76: 465-469. 59. Slater S. C., W. H. Voige and D. E. Dennis (1988) Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 Poly- γ -Hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway, Journal of Bacteriology, 170: 4431-4436. 60. Slater S., K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett and K. J. Gruys (1998) Multiple γ -ketothiolases mediate poly (γ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*, Journal of Bacteriology, 180: 1979-1987. 61. Slater, S., T. A. Mitsky, K. L. Houmiel, M. Hao, S. E. Reiser, N. B. Taylor, M. Tran, S. R. Padgett, G. Kishore and K. J. Gruys (1999) Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production, Nature Biotechnology, 17: 1011-1016. 62. Taguchi, K., T. Tsuge, K. Matsumoto, S. Nakae, S. Taguchi and Y. Doi (2001) Investigation of metabolic pathways for biopolyester production, RIKEN Review: Focused on Ecomolecular Science Research, 42: 71-74. 63. Wong, H. H., van Weegen R. J., Choi J., Lee S. Y. and Middelberg A. P. J. (1999) Metabolic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*, Journal of Microbiology and biotechnology, 9: 593-603. 64. van Wegen, R., J., S. Y. Lee and A. P. J. Middelberg (2001) Metabolic and Kinetic Analysis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Production by Recombinant *Escherichia coli*, Biotechnology and Bioengineering, 74: 69-80.