

# 以有機鹽培養 *Ralstonia eutropha* 合成 PHBV 之研究

羅暉勳、?瑞澤；余世宗

E-mail: 9417964@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

中文摘要 聚羥基烷酯類為一種生物可分解性塑膠材料，可藉多種菌株於不平衡之環境下生合成，其性質與傳統塑膠相近，因此被廣為研究。但由於其生產成本過高導致無法被廣泛使用，所以近來科學家們均致力於尋求降低生物可分解性塑膠生產成本。本研究探討添加不同有機鹽對生合成 PHBV (poly-hydroxy- butyrate-co-hydroxyvalerate) 之影響。實驗過程中葡萄糖濃度為 20 g/L，並以 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 為其限制營養源(濃度為 1.2 g/L)，另外添加有機鹽為第二碳源。首先，分別將不同濃度之乙酸鈉、丙酸鈉、丁酸鈉、戊酸鈉及乳酸鈉添加於基礎培養基中，探討各種有機鹽最佳之添加濃度。實驗結果顯示：添加乙酸鈉 1 g/L 時羥基丁酸酯 (hydroxybutyrate, HB) 的累積量為最高 2.1 g/L，佔菌體的 25.9%；添加丙酸鈉 1 g/L 時，HB 累積量最高約 4.22 g/L，佔菌體 53.0%；添加丙酸鈉濃度為 3 g/L 時，羥基戊酸酯 (hydroxyvalerate, HV) 生合成量最高 0.314 g/L，佔菌體量 5.22%；添加丁酸鈉 1 g/L 時有最高 HB 累積量 2.23 g/L，佔菌體 25.2%；添加戊酸鈉 1 g/L 時可生成 1.64 g/L HB，佔菌體 21.2%，添加戊酸鈉濃度 3 g/L 時，最大值的 HV 合成量 0.23 g/L，佔菌體 5.7%；添加乳酸鈉為 6 g/L 時有最高 HB 累積量 2.54 g/L，佔菌體 40.4%，HV 生合成量亦在此濃度達最大值約 0.0043 g/L，佔菌體量 0.068%。將最佳之有機鹽添加濃度作為混合有機鹽濃度添加量，以設計之混合配方添加至培養基中，探討最佳有機鹽混合比例。選擇 3 g/L 丙酸鈉、1 g/L 乙酸鈉及 1 g/L 丁酸鈉為混合有機鹽成分，結果顯示，混合 (丙酸鈉 + 乙酸鈉) 及 (丙酸鈉 + 丁酸鈉) 兩組生合成 HV 量為 0.21 及 0.19 g/L，混合三種有機鹽 (乙酸鈉 + 丙酸鈉 + 丁酸鈉) 則僅累積了 0.11 g/L 之 HV。關鍵字：PHB、*Ralstonia eutropha*、有機鹽

關鍵詞：PHB；*Ralstonia eutropha*；有機鹽

## 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	vi
誌謝	viii
目錄	x
圖目錄	xiv
表目錄	xvi
第一章 緒論	1
第二章 文獻回顧	3
2.1 石化塑膠的介紹	3
2.1.1 目前有關廢棄塑膠處理方法	4
2.2 分解性塑膠	5
2.2.1 光分解性塑膠	5
2.2.2 生物分解性塑膠	7
2.3 PHB及PHBV的介紹	8
2.3.1 PHAs的生合成	8
2.3.2 PHAs之物理與化學性質	11
2.3.3 PHB (V) 的代謝過程	14
2.4 PHAs的發展現況	16
2.4.1 生物分解性塑膠的應用	20
2.4.2 生物分解性塑膠發展上的困難	20
2.5 有機酸之產生方式	22
2.5.1 厭氧消化的中間產物-有機酸	23
2.5.2 農業廢棄物以乾燥發酵產生有機酸	23
2.5.3 食品廢棄物經厭氧消化後產生有機酸	24
2.6 添加有機酸對於 <i>Ralstonia eutropha</i> 生合成 PHAs 的影響	24
2.6.1 添加各種單一有機酸對生合成 PHAs 的影響	25
2.6.2 添加混合有機酸對生合成 PHAs 的影響	25
第三章 材料與方法	27
3.1 菌株	27
3.2 實驗藥品	27
3.3 儀器設備	29
3.4 菌株培養	30
3.4.1 篩菌	30
3.4.2 培養基	31
3.4.3 篩菌方法	31
3.4.4 活化	31
3.5 添加有機鹽	34
3.5.1 添加有機鹽的時機探討	34
3.5.2 添加不同有機鹽的探討	34
3.5.3 添加單一有機鹽最佳濃度之探討	36
3.5.4 添加有機鹽之混合比例的探討	36
3.6 分析方法	36
3.6.1 菌體細胞內 PHA 之染色鑑定	36
3.6.2 樣品處理分析	37
3.6.3 生質體	38
3.6.4 葡萄糖	38
3.6.5 氮氫之量測	39
3.6.6 有機鹽	40
3.6.7 PHB/PHBV 的分析	40
第四章 結果與討論	43
4.1 篩菌成果	43
4.1.1 位相差顯微鏡鏡檢	43
4.1.2 GC 分析	43
4.2 實驗菌株之生長曲線	43
4.3 添加有機鹽時機之探討	49
4.4 添加不同有機鹽之探討	52
4.5 添加不同濃度之有機鹽的探討	52
4.5.1 乙酸鈉	52
4.5.2 丙酸鈉	55
4.5.3 丁酸鈉	58
4.5.4 戊酸鈉	60
4.5.5 乳酸鈉	60
4.6 添加混合有機鹽	62
第五章 結論與展望	66
5.1 結論	66
5.2 未來展望	67
參考文獻	68
附錄	72
圖目錄	頁次
圖 2.1 不同碳源生產 PHA 的合成代謝路	17
圖 2.2 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產 PHA 的合成與降解代謝路徑	18
圖 2.3 由 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 生產 PHBV 的合成路徑	19
圖 4.1 菌株紅3於固態培養基生長情形	44
圖 4.2 菌株 13036 於固態培養基生長情形	45
圖 4.3 菌株紅3-1之位相差顯微鏡照像，1,000x	46
圖 4.4 菌株紅3-2之位相差顯微鏡照像，1,000x	47
圖 4.5 菌株紅3與 <i>R. eutropha</i> BCRC 13036 產率比較圖	48
圖 4.6 <i>Ralstonia eutropha</i> BCRC 13036 生長曲線	50
圖 4.7 添加丙酸鈉時機的探討	51
圖 4.8 添加不同有機鹽對 <i>R. eutropha</i> 於菌體生長、生合成 PHB 與 PHBV 產量之比較	53
圖 4.9 添加不同濃度乙酸鈉對 <i>R. eutropha</i> 於生質量與生合成 PHB 之影響	54
圖 4.10 添加不同濃度丙酸鈉對 <i>R. eutropha</i> 於生質量、生合成 PHB 與 PHBV 之影響	57
圖 4.11 添加不同濃度丁酸鈉對 <i>R. eutropha</i> 於生質量與生合成 PHB 之影響	59
圖 4.12 添加不同濃度戊酸鈉對 <i>R. eutropha</i> 於生質量、生合成 PHB 與 PHBV 之影響	61
圖 4.13 添加不同濃度乳酸鈉對 <i>R. eutropha</i> 於生質量、生合成 PHB 與 PHBV 之影響	63
圖 4.14 添加不同混有機鹽組合對 <i>R. eutropha</i> 於生質量、生合成 PHB 與 PHBV 之影響	65
表目錄	頁次
表 2.1 塑膠的分解方式	6
表 2.2 PHAs 與聚丙烯的性質比較	12
表 2.3 生物可分解性塑膠的主要用途	21
表 3.1 <i>Ralstonia eutropha</i> 的生物學分類	27
表 3.2 基礎培養基的組成	32
表 3.3 微量金屬元素的組成	33
表 3.4 發酵培養基的組成	35
表 4.1 不同基質與有機酸濃度對生質量與 HB, HV 的影響	56

## 參考文獻

- 參考文獻 1. 王建龍和文湘華。2001。現代環境生物技術。第372-387頁。清華大學出版社。北京。2. 曲靜霞、姜洋、何光設、潘業洁。2004。農業廢棄物乾法厭氧發酵技術的研究。研究與試驗 2: 40-41。3. 李吉祥。1997。分解性塑膠之回顧與展望。清潔生產資訊 10: 41-56。4. 林家慶。2002。連續式發酵生產PHBV之研究: 49-50。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化, 台灣。5. 林逸群。2003。連續生產PHBV-丙酸戊酸對菌體生長及PHBV生產之影響: 38-48。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化, 台灣。6. 柯志強。1997。生物分解性塑膠之發展與認識。塑膠資訊 12: 59-71。7. 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。8. 徐惠美。2000。生物分解性塑膠。化工資訊: 81-84。9. 姜燮堂。2001。分解性塑膠。產業調查與技術 173: 28-40。10. 陳國強、賀文楠、陳金春、張增民。1997。由細菌產生的新型生物高分子材料—具新型結構的聚羥基脂肪酸酯PHAs簡介。生物技術 7(4): 1-7。11. 黃建銘。2001。生物可分解性塑膠對環境的益處與未來發展趨勢。環保月刊 2 (1): 176-181。12. 黃俊嘉。2002。比較不同限制基質對 *Ralstonia eutropha* 合成PHBV的影響: 48-59。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化, 台灣。13. 張庭愷。1998。利用 *Alcaligenes eutrophus* 生產 poly- $\gamma$ -hydroxybutyric acid 之發酵與控制策略之研究: 69-75。大同工學院碩士論文。台北, 台灣。14. 楊紹榮。1998。生物分解性材料與廢棄物處理環境。塑膠工業 1(15): 74-82。15. 趙慶良、王寶貞、庫格爾。1996。厭氧消化中的重要中間產物—有機酸。哈爾濱建築大學學報 29(5): 32-38。16. 劉建宏。2004。溫度變化對 *Ralstonia eutropha* 於限氮條件下生合成PHB之影響: 55。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化, 台灣。17. 鄭瑞洲。1999。可分解性塑膠。科技博物 5(3): 96-100。18. 蘇濤。1995。真養產鹼桿菌 *Alcaligenes eutrophus* 從不同碳源合成可降解塑料: 發酵過程及產物種類確定。工業微生物 25(3): 38-42。19. 嚴群、堵國成、陳堅。2002。真氧產鹼桿菌利用短鏈有機酸合成聚羥基烷酸酯。過程工程學報 2(5): 453-458。20. 嚴群、堵國成、陳堅。2003。真氧產鹼桿菌利用混合有機酸生物合成聚羥基烷酸酯。化工學報 54(11): 1580-1585。21. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism, Technology and economics, Biotech., 5: 246-250。22. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. 1990. Plastics from bacteria, Biochem. Eng., 41: 77-93。23. Bolebergen, S., Holden, D. A., Hamer, G. K. and Bluhm, T. L. 1986. Studies of composition and crystallinity of Bacterial poly( $\gamma$ -hydroxybutyrate-co- $\gamma$ -hydroxyvalerate), Macromolecules. 19: 2865-2871。24. Cornibert, J. and Marchessault, R. H. 1972. Physical properties of Poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate, IV. Conformational analysis and crystalline structure, J. Mol. Biol. 71: 735-756。25. Delafield, F. P., Doudoroff, M. N., Paileroni, J., Lusty, J. and Contopoulos, R. 1965. Decomposition of poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate by Pseudomonads. J. Bacterial. 91: 1455-1466。26. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. 1988. Nuclear magnetic resonance studies on poly( $\gamma$ -hydroxybutyrate) and a copolymer of  $\gamma$ -hydroxybutyrate and  $\gamma$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, Macromolecules, 19: 860-2864。27. Holmes, P. A., Wright, L. F., and Collins, S. H. 1985. Beta-hydroxybutyrate polymers, European patent, 0, 052, 459。28. Holmes, P. A. 1993. Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys. Technol., 16: 32-36。29. Kunioka, M., Kawaguchi, Y. and Doi, Y. 1989. Production of biodegradable co-polyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 569-573。30. Lageveen. R. G., Huisman G. W., Preusting. H., Ketelaar. P., Eggink. G., Witholt. B. 1988. Formation of polyesters by Pseudomonads oleovorans: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2924-2932。31. Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bio eng. 49: 1-14。32. Marangoni, C., A. Furigo, Jr. and G. M. F. de Aragao. 2002. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding, Process Biochemistry. 38: 37-141。33. Schlegel, H. G., Steinbuchel, A. and Schubert, P. 1998. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate synthetic pathway and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. J. Bacterial. 170:5837-5847。34. Steinbuchel, A. and Valentin, H. E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid, FEMS Microbiol. Lett. 128: 219-228。35. Wang, J. G. and Bakken, L. R. 1998. Screening of Soil Bacteria for Poly- $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid Production and Its Role in the Survival of Starvation, Microbial Ecology. 35: 94-101。36. Yamane, T. 1993. Yield of poly-D-(3)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study, Biotechnol. Bioeng. 41: 165-170。37. Yim, K. S., Lee, S. Y. and Chang, H. N. 1996. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxybutyrate) by recombinant *Escherichia coli*, Biotechnol. and Bioeng. 49: 495-503。38. Yan, Q., Du, G. and Chen, J. 2003. Biosynthesis of polyhydroxy-alkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*, Process Biochemistry. 39: 387-391。39. Zhang, Y. and Yang, C. X. 2000. Output and component analysis of solid wastes of Shanghai residential area. Environ Sanit. Eng. 8(3): 104-106。