

Biosynthesis of PHBV by *Ralstonia eutropha* with Organic Salts

羅暉勛、?瑞澤；余世宗

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

ABSTRACT

Abstract Polyhydroxyalkanoate, a kind of biodegradable plastics, can be biosynthesized by various microbes during a limitation of certain critical nutrient. The properties of polyhydroxyalkanoates are similar to those of conventional plastics. Due to its high production cost, polyhydroxyalkanoates have not been widely used in many fields. Recently, scientists have worked hard to reduce the production cost of biodegradable plastics. In this study, the effect of organic salts on the biosynthesis of PHBV (poly-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) was investigated. The concentration of glucose in the medium maintained 20 g/L, and the limiting nutrient ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) was 1.2 g/L. In addition, one of organic sodium salts (sodium acetate, sodium propionate, sodium butyrate, sodium valerate and sodium lactate) was used as a second carbon source. To obtain high yield of PHB (or PHBV), exploration of the optimal timing for adding these organic salts and their optimal concentrations was performed. Experimental results showed that the HB (hydroxybutyrate) biosynthesis (about 25.9% of the biomass) could be maximized, if the concentration of sodium acetate in the medium was 1 g/L. Similarly, the HB biosynthesis (about 53.0% of the biomass) was maximized at 1 g/L of sodium propionate. However, adding 3 g/L sodium propionate was best to maximize HV (hydroxyvalerate) synthesis (about 5.22% of the biomass). Adding 1 g/L sodium butyrate maximized HB yield (about 25.2% of the biomass). Added 1 g/L sodium valerate maximized HB biosynthesis (about 21.2% of biomass), and adding 3 g/L sodium valerate maximized HV biosynthesis (0.23 g/L, about 5.7% of biomass). Adding 6 g/L sodium lactate maximized HB (40.4% of the biomass) and HV (0.068%) yields. From the above study, the optimal concentrations were as follows: sodium propionate 3 g/L, sodium acetate 1 g/L and sodium butyrate 1 g/L. Various combinations of mixed organic salts were used to maximize the PHBV yield. However, experiments results showed the HV yields for the cases of (sodium propionate + sodium acetate) and (sodium propionate + sodium butyrate) were about 0.21 and 0.19 g/L, respectively. The yield of HV was 0.11 g/L if the medium contained sodium propionate (3 g/L), sodium acetate (1 g/L) and sodium butyrate (1 g/L). Key words: PHB, *Ralstonia eutropha*, organic salts

Keywords : PHB ; *Ralstonia eutropha* ; organic salts

Table of Contents

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 厳氧消化的中間產物-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 食品廢棄物經嚴氧消化後產生有機酸 24 2.6 添加有機酸對於 *Ralstonia eutropha* 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 氨氮之量測 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 *Alcaligenes eutrophus* 生產 PHA 的合成與降解代謝路徑 18 圖 2.3 由 *Alcaligenes eutrophus* 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 *R. eutropha* BCRC 13036 產率比較圖 48 圖 4.6 *Ralstonia eutropha* 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 *R. eutropha* 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 *R. eutropha* 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 *R. eutropha* 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 *R. eutropha* 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 *R. eutropha* 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 *R. eutropha* 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R. eutropha於生質量、生合成PHB與PHBV之影響
65 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
Ralstonia eutropha 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

REFERENCES

- 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- - 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.
Bolemborgen, S., Holden, D. A., Hamer, G. K. and Bluhm, T. L. 1986. Studies of composition and crystallinity of Bacterial poly(
-hydroxybutyrate-co- -hydroxyvalerate), Macromolecules. 19: 2865-2871. 24. Cornibert, J. and Marchessault, R. H. 1972. Physical properties
of Poly- -hydroxybutyrate, IV. Conformational analysis and crystalline structure, J. Mol. Biol. 71: 735-756. 25. Delafield, F. P., Doudoroff, M. N.,
Paileroni, J., Lustig, J. and Contopoulos, R. 1965. Decomposition of poly- -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(-hydroxybutyrate) and a copolymer of
-hydroxybutyrate and -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-hydroxy- butyrate 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- -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- -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)-hydroxylbutyrate from various carbon sources: a theoretical study, Biotechnol. Biogen. 41:
165-170. 37. Yim, K. S., Lee, S. Y. and Chang, H. N. 1996. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxylbutyrate) by recombinant Escherichia
coli, Biotechnol. and Bioeng. 49: 495-03. 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.