

限氮條件添加有機酸鹽對 *Ralstonia eutropha* 生合成 PHBV 之影響

吳尚訓、?瑞澤；余世宗

E-mail: 9510865@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究探討於限氮條件添加有機酸鹽，培養 *Ralstonia eutropha* 生合成 PHBV 之最適化條件。先以一次一因子方式進行搖瓶培養，探討各單一有機酸鹽 (乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、戊酸钠及乳酸钠) 不同添加時機與限氮條件單一有機酸鹽 (丙酸钠、戊酸钠及乳酸钠) 不同添加濃度對菌體生合成 PHB(V) 之影響。經一次一因子實驗結果得知，各單一有機酸鹽最佳添加時機為：於培養之初 (0 h) 添加乙酸钠，可得最高 HB 產量，為 1.34 g/L，佔菌體重 53.50%；於培養 24 h 後添加丙酸钠，可得最高 HV 產量，為 0.72 g/L，佔菌體重 12.60%；於培養 24 h 後添加丁酸钠，可得最高 HB 產量，為 1.81 g/L，佔菌體重 72.50%；於培養 24 h 後添加戊酸钠，可得最高 HV 產量，為 0.80 g/L，佔菌體重 12.67%；於培養 24 h 後添加乳酸钠，可得最高 HB 產量，為 5.66 g/L，佔菌體重 59.00%。之後，於限氮條件下，以各單一有機酸鹽最佳添加時機，進行丙酸钠、戊酸钠及乳酸钠之不同添加濃度 (2、4、6、8 及 10 g/L) 探討。實驗結果得知，添加丙酸钠 2 g/L，可得最高 HV 產量，為 0.18 g/L；添加戊酸钠 8 g/L，可得最高 HV 產量，為 0.11 g/L；添加乳酸钠 8 g/L，可得最高 HB 產量，為 4.98 g/L。以一次一因子條件探討結果為依據，進行中心混成之實驗設計，探討混合有機酸鹽最適添加濃度。

關鍵詞：有機酸鹽；中心混成實驗

目錄

授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 v 誌謝 vii 目錄 ix 圖目錄 xiii 表目錄 xv 第一章 緒論 1 第二章 文獻回顧 3 2.1 PHAs 3 2.1.1 PHAs 之介紹 3 2.1.2 PHAs 生合成之代謝途徑 6 2.2 微生物利用不同碳源生合成 PHAs 之影響 7 2.3 *Ralstonia eutropha* 利用有機酸生合成 PHAs 9 2.3.1 添加單一有機酸生合成 PHAs 11 2.3.2 添加混合有機酸生合成 PHAs 15 2.4 有機酸之不同碳氮比對於生合成 PHAs 之影響 16 2.5 有機酸之生合成 HV 單體 17 2.6 實驗設計 19 2.6.1 一次一因子探討 19 2.6.2 中心混成實驗 19 2.6.3 變異數分析 21 第三章 材料與方法 26 3.1 菌株 26 3.2 培養基組成 26 3.2.1 基礎培養基 26 3.2.2 限氮培養基 26 3.3 實驗藥品 26 3.4 儀器設備 30 3.5 菌株培養 32 3.5.1 菌株活化 32 3.5.2 預培養 33 3.6 實驗流程 33 3.7 菌體顯微鏡觀察 35 3.8 一次一因子條件探討 35 3.8.1 氮源濃度對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 35 3.8.2 有機酸鹽添加時機對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 36 3.8.3 限氮條件下有有機酸鹽濃度對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 36 3.8.4 中心混成實驗設計 37 3.9 分析方法 44 3.9.1 生質體 44 3.9.2 葡萄糖 44 3.9.3 有機酸 46 3.9.4 代謝酸 47 3.9.5 氮源 47 3.9.6 PHB/PHBV 48 第四章 結果與討論 51 4.1 氮源濃度對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 51 4.2 有機酸鹽添加時機對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 51 4.2.1 乙酸钠 53 4.2.2 丙酸钠 57 4.2.3 丁酸钠 61 4.2.4 戊酸钠 64 4.2.5 乳酸钠 68 4.3 限氮條件下有有機酸鹽濃度對 *R. eutropha* 生合成 PHAs 之影響 72 4.3.1 丙酸钠 75 4.3.2 戊酸钠 78 4.3.3 乳酸钠 81 4.4 丙酸钠與乳酸钠之混合有機酸鹽中心混成實驗設計 85 第五章 結論與未來展望 91 5.1 結論 91 5.2 未來展望 92 參考文獻 91 附錄 97 圖目錄 圖 2.1 實驗設計之概念圖 20 圖 3.1 實驗流程圖 34 圖 3.2 樣品分析流程圖 45 圖 4.1 硫酸銨濃度對 *R. eutropha* 生質量、PHB 及殘留硫酸銨之影響 52 圖 4.2 乙酸钠添加時機對 *R. eutropha* 生質量與 HB 生合成量之影響 54 圖 4.3 乙酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之碳源消耗影響 55 圖 4.4 乙酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之代謝酸變化 56 圖 4.5 丙酸钠添加時機對 *R. eutropha* 生質量、HB 及 HV 生合成量之影響 58 圖 4.6 丙酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之葡萄糖變化 59 圖 4.7 丙酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之代謝酸變化 60 圖 4.8 丁酸钠添加時機對 *R. eutropha* 生質量與 HB 生合成量之影響 62 圖 4.9 丁酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 碳源消耗情形之影響 63 圖 4.10 丁酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之代謝酸變化 ... 65 圖 4.11 戊酸钠添加時機對 *R. eutropha* 生質量、HB 及 HV 生合成量之影響 66 圖 4.12 戊酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 碳源消耗情形之影響 67 圖 4.13 戊酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之代謝酸變化 69 圖 4.14 乳酸钠添加時機對 *R. eutropha* 生質量、HB 及 HV 生合成量之影響 70 圖 4.15 乳酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 碳源消耗情形之影響 71 圖 4.16 乳酸钠添加時機對於培養 *R. eutropha* 之代謝酸變化 73 圖 4.17 限氮條件添加不同濃度丙酸钠對 *R. eutropha* 生合成 pH、生質量、HB、HV、殘留葡萄糖及丙酸钠濃度之影響 77 圖 4.18 限氮條件添加不同濃度丙酸钠對 *R. eutropha* 之代謝酸變化 78 圖 4.19 限氮條件添加不同濃度戊酸钠對 *R. eutropha* 生合成 pH、生質量、HB、HV、殘留葡萄糖及戊酸钠濃度之影響 80 圖 4.20 限氮條件添加不同濃度戊酸钠對 *R. eutropha* 之代謝酸變化 81 圖 4.21 限氮條件添加不同濃度乳酸钠對 *R. eutropha* 生合成 pH、生質量、HB、殘留葡萄糖及乳酸钠濃度之影響 83 圖 4.22 限氮條件添加不同濃度乳酸钠對 *R. eutropha* 之代謝酸化 84 圖 4.23 丙酸钠與乳酸钠對 HV 產量影響之回應曲面圖與等高線圖 89 表目錄 表 2.1 微生物生合成 PHAs 之限制營養源 4 表 2.2 常見的 PHAs 命名 5 表 2.3 微生物利用不同碳源生合成 PHAs 8 表 2.4 微生物利用有機酸生合成 PHAs 10 表 2.5 *Ralstonia eutropha* 利用不同有機酸生合成 PHAs 12 表 2.6 變異數分析表 25 表 3.1 *R. eutropha* 菌株特性 27 表 3.2 無機鹽液之組成 28 表 3.3 微量金屬溶液之組成 28 表 3.4 混合有機酸 (丙酸钠與乳酸钠) 22 因子設計控制因子與水準 38 表 3.5 混合有機酸 (丙酸钠與乳酸钠) 中

心混成設計補充實驗之控因39 表3.6 混合有機酸(戊酸鈉與乳酸鈉)22因子設計控制因子與水準40 表3.7混合有機酸(戊酸鈉與乳酸鈉)中心混成設計補充實驗之控因41 表3.8混合有機酸(丙酸鈉與乳酸鈉)中心混成實驗設計表42 表3.9混合有機酸(戊酸鈉與乳酸鈉)中心混成實驗設計表43 表 4.1有機酸鹽最佳添加時機對*R. eutropha*生合成生質量HB及HV產量之影響74 表 4.2有機酸鹽最佳添加時機對*R. eutropha*之代謝酸影響75 表4.3限氮條件有機酸鹽最佳添加濃度對*R. eutropha*生合成生質量、HB及HV產量之影響85

參考文獻

- 中文部份 1.王亦隆。1998。由 *Alcaligenes eutrophus* 生產生物可分解性塑膠的能量模式，大葉大學食品工程研究所碩士論文，彰化。台灣。 2.王鼎。2001。統計學。鼎茂圖書出版有限公司。台北。 3.李愛萍、李光吉。2004。聚羥基脂肪酸酯生物合成的研究進展。高分子通報 5:20-26。 4.沈明來。2000。生物檢定統計法。九州圖書文物有限公司，台北。 5.林東恩。2002。利用活性污泥合成可生物降解塑料-聚羥基脂肪酸酯的研究。華南理工大學博士論文。中國。 6.吳國雄。2003。食品廢棄物好氧生物降解(堆肥化)。高雄第一科技大學環境與安全衛生工程系碩士論文。高雄。台灣。 7.金大勇、陳堅、倫世儀。1999。*Alcaligenes eutrophus* 利用不同有機酸生產聚-羥基脂肪酸的比較研究。應用與環境生物學報5(2):199-202。 8.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。 9.陳清泉。1993。最適化實驗設計在食品工業產品開發上的應用食品工業 25 (2):50-62。 10.楊世民、林讚峰。1994。簡介利用回應曲面實驗設計法決定工業微生物的最佳培養基。製酒科技專論彙編 (16):135-150。 11.謝光健、李家洲。2005。利用有機廢水生產聚羥基脂肪酸 (PHAs) 的進展。廣東化工 7:34-36。 12.蘇濤。1995。真氧產鹼桿菌 *Alcaligenes eutrophus* 以不同碳源合成可降解塑料:發酵過程及產物種類確定。工程微生物25(3):38-42。 13.蘇濤、周河治、梁靜娟。1997。微生物合成可降解塑料聚羥基鏈烷酸 (PHA)。工應微生物 3(27):37-48。 14.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脂肪酸酯。過程工程學報 2(5):454-458。 15.嚴群、堵國成、陳堅。2003。真氧產鹼桿菌利用混合有機酸合成聚羥基脂肪酸酯。過程工程學報 54(11):1580-1585。 英文部份 1.Bruce, A., Ramsay, K. L., Claude, C., Brigitte, D., Pierre, B. and Juliana A. R. 1990. Production of poly-(p-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(7):2093-2098. 2.Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5:246-250. 3.Chen, G. Q., Wu, Q. and Zhao, K. 2000. Functional polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms. *Chinese J Polym Sci.*, 18:389-396. 4.Choi, J. and Lee, S. Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17:335-342. 5.Dayong, J., Jian, C. and Shiyi, L. 1999. Production of poly(hydroxyalkanoate) by a composite anaerobic acidification-fermentation system. *Process Biochemistry*. 34:829-833. 6.Douglas, D. A. and James E. B. 1995. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng*, 47:8-1. 7.Haywood, G. W., Anderson, A. J. and Dawes, E. A. 1989. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoates) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Biotechnol. Letters*. 11(7):417-476. 8.Holmes, F. A., Wright, L. F. and Collins, S. H. 1981. *Eur. Pat. Appl.*, 0052459 and 0069497. 9.Holmes, P. A. 1985. Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* 16:32-36. 10.Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y. Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo, S. I. 1994. *Biotechnol. Bioeng.* 43:892. 11.Lawford, H. G. and Rousseau, J. D. 1993. Effect of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotech.* 39:301-32. 12.Lee, I. Y., Kim, M. K., Kim, G. J., Chang, H. N. and Park, Y. H. 1995. Production of poly(-hydroxybutyrate-co- -hydroxyvalerate) from glucose and valerate in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 17:571-574. 13.Lee, I. Y., Kim, G. J., Shin, Y. C., Chang, H. N. and Park, Y. H. 1995. Production of poly(-hydroxybutyrate-co- -hydroxyvalerate) by two-stage fed-batch fermentation of *Alcaligenes eutrophus*. *J.Microbial.Biotechnol.* 5:292-296. 14.Lee, I., Kim, M. K., Choi, D. K., Yeon, B. K. and Park, Y. H. 1996. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly (-Hydroxybutyrate-co- -Hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ferment Bioeng.* 81(3):255-258. 15.Longan, S., Seong, C. Y., Hyun, G. P. and Ho, N. C. 2004. Sequential feeding of glucose and valerate in a fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with high 3-Hydroxyvalerate Fraction. *Biotechnol. Prog.* 20:140-144. 16.Peoples, O. P. and Sinskey, A. J. 1989. *J. Bio. Chem.* 264(26):15293-15297. 17.Qun, Y., Du, G. and Chen, J. 2003. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 39:387-391. 18.Roe, A. J., McLaggan, D. and Davidson, I. 1998. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J Bacteriol.* 180(4):767-77. 19.Ruan, W., Jian, C. and Shiyi, L. 2003. Production of biodegradable polymer by *A. eutrophus* using volatile fatty acids from acidified wastewater. *Process Biochemistry*. 39:295-299. 20.Rusell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *Bioresource Tech.* 54(2):191-19. 21.Salmond, C. M., Kroll, R. G. and Booth, H. I. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 130:2845-2850. 22.Shang, L., Doi, J. H., Fan, D., Ming, J. and Chang, H. N. 2003. Optimization of propionic acid feeding for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Chinese J. Chem. Eng.* 11(2):220-223. 23.Shi, H. D., Shiraishi, M. and Shimizu, K. 1997. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly(-hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. *J. Ferment Bioeng.* 84(6):579-587. 24.Shilpi, K. and Ashok, K. S. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40:607-619. 25.Shilpi, K. and Ashok, K. S. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 40:2173-2182. 26.Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. 2000. *Process in Polymer Science.* 25:1503-1555. 27.Takeharu, T., Kenji, T., Mitsuya, S. and Ayaaki, I. 1999. Optimization of L-Lactic Acid Feeding for the Production of

poly-D-3-Hydroxybutyric Acid by *Alcaligenes eutrophus* in Fed-Batch Culture. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 88(4):404-409. 28. Yu, J. and Wang, J. P. 2001. Metabolic flux modeling of detoxification of acetic acid by *Ralstonia eutropha* at slightly alkaline pH levels. *Biotechnol. Bioeng.* 73:458-464. 29. Yan, Q., Du, G. and Chen, J. 2003. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 39:387-391.