

限磷條件下添加丙酸鈉/戊酸鈉對連續式生產 PHBV 之影響

李志章、?瑞澤；余世宗

E-mail: 9511027@mail.dyu.edu.tw

摘要

聚羥基烷酯類 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 為一種微生物合成的可分解塑膠，其性質與傳統塑膠材料聚丙烯相似，其中以聚羥基丁酯 (polyhydroxybutyrate, PHB) 與聚羥基丁酯和戊酯的共聚物 (poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), PHBV) 最受到注意。Ralstonia eutropha 在簡單碳源，以葡萄糖為單一碳源基質可生成累積 PHB；若以有機酸鹽 (如：丙酸鈉或戊酸鈉) 作為第二碳源，即可生產含 HV 的聚合物。有機酸鹽的含量不宜過高，否則會影響菌體的生長。本研究於限磷條件下，以微生物進行連續式發酵生產 PHB (V)。使用菌株為 R. eutropha (ATCC 17699; BCRC 13036)，以葡萄糖為第一碳源 (20 g/L)，硫酸銨為氮源 (10 g/L)，磷酸氫二鈉與磷酸二氫鉀為磷源 (分別為 0.1 與 0.2 g/L)，於限磷條件下，進行連續式發酵，溫度維持 30℃，可得最大 PHB 含量，約 2.20 g/L，佔總菌體 33.0%，隨著時間增加，碳源使用殆盡，可看出生質量仍在增加，PHB 含量卻在減少。添加有機酸鈉 (丙酸鈉或戊酸鈉) 於饋料溶液中，添加丙酸鈉 5 g/L，可得到較多 PHBV 含量，約 2.1 g/L，佔總菌體的 31.8% (生質量 6.79 g/L)。添加戊酸鈉 5 g/L，可得 HV 含量較高的 PHBV，約 1.61 g/L，佔總菌體的 25.9% (生質量 5.94 g/L)。比較兩種添加有機酸鹽生成之 PHBV，以添加戊酸鈉可累積較多的 HV。

關鍵詞：PHBV；Ralstonia eutropha；限磷條件；連續式發酵；丙酸鈉；戊酸鈉；稀釋速率

目錄

封面內頁 i 簽名頁 ii 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 viii 目錄 x 表目錄 xiii 圖目錄 xv 符號說明 xvii 第一章 緒論 1 第二章 文獻回顧 3 2.1 可分解性塑膠 3 2.2 PHB 與 PHBV 介紹 10 2.2.1 PHB 與 PHBV 的結構 10 2.2.2 物理與化學性質 12 2.2.3 合成 13 2.3 連續式發酵生產 PHB 與 PHBV 21 2.3.1 反應器類型 21 2.3.2 連續式發酵 22 2.3.3 微生物的代謝作用 26 2.3.4 連續式生產 PHB 與 PHBV 26 2.4 菌體之 PHB 與 PHBV 的測定 28 第三章 材料與方法 30 3.1 實驗材料 30 3.1.1 菌株 30 3.1.2 培養基 30 3.1.3 藥品 30 3.2 儀器設備 34 3.3 實驗流程與方法 35 3.3.1 活化 35 3.3.2 預培養 37 3.3.3 發酵槽培養流程 37 3.3.4 連續式發酵培養 38 3.3.5 收菌 40 3.4 分析 40 3.4.1 生質量 40 3.4.2 碳源 42 3.4.3 磷源 43 3.4.4 PHB 與 PHBV 44 第四章 結果與討論 46 4.1 限磷條件下添加葡萄糖進行連續式發酵 47 4.1.1 菌體生長與 PHB 生產 47 4.1.2 不同稀釋速率下發酵培養之比較 51 4.2 限磷條件下添加丙酸鈉進行連續式發酵 54 4.2.1 菌體生長與 PHB(V) 生產 58 4.2.2 不同稀釋速率下發酵培養之比較 60 4.3 限磷條件下添加戊酸鈉進行連續式發酵 65 4.3.1 菌體生長與 PHB(V) 生產 65 4.3.2 不同稀釋速率下發酵培養之比較 69 4.4 各種不同碳源培養之比較 74 第五章 結論與未來展望 79 5.1 結論 79 5.2 展望 80 參考文獻 82

參考文獻

中文部份 1. 王先登。1996。環保標章商品項目?可分解塑膠產品規格標準之誕生，環保標章簡訊，第五期。 2. 王奕隆。1998。由 Alcaligenes eutrophus 生產生物可分解塑膠的能量模式，大葉大學碩士論文，彰化，臺灣。 3. 王建龍、文湘華。2001。現代環境生物技術，清華大學出版社，北京，中國。 4. 王進坤、柯文慶、洪瑞良、陳重文、盧榮錦、賴茲漢 編著。2002。食品營養儀器分析，富林出版社，台中，臺灣。 5. 李尚凡、林振隆、陳寶祺、張漢昌、蔡明瞭。1995。化學反應工程，高立圖書有限公司，台北，臺灣。 6. 柯志強、邱文雄。1996。生物塑膠的經濟面觀及未來展望縱觀歐洲之市場需求，塑膠資訊，1 (4) :43-49。 7. 姜燮堂。2001。分解性塑膠，產業調查與技術季刊，137:28-40。 8. 梅樂和、姚善涇、林東強。2000。生化生產工藝學，科學出版社，北京，中國。 9. 陳建璋。2004。溫度變化對 Ralstonia eutropha 在限磷條件下發酵生產 PHB 之探討，大葉大學碩士論文，彰化，臺灣。 10. 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，大同工學院碩士論文，台北，臺灣。 11. 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。 12. 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) :18-23。 13. 劉建宏。2004。溫度變化對 Ralstonia eutropha 在限氮條件下發酵生產 PHB 之影響，大葉大學碩士論文，彰化，臺灣。 英文部份 1. Anderson, A. J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev, 54:450-472. 2. Bolemborgen, S., D. A. Holden, G. K. Hamer and T. L. Bluhm. 1986. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(γ -hydroxybutyrate-co- γ -hydroxyvalerate), Macromolecules, 19 : 2865-2871. 3. Brauneegg, 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 : 29-37. 4. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism, technology and economics, Biotech., 5 : 246-250. 5. Cornibert, J. and R. H. Marchessault 1972. Physical properties of Poly(γ -hydroxybutyrate,

IV. Conformational analysis and crystalline structure, *J. Mol. Biol.*, 71 : 735-756. 6. 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. 7. 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. 8. Holmes, P. A. 1985. Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermo- plastic, *Phys. Technol.*, 16 : 32-36. 9. Juettner, R. R. , R. M. Lafferty and H. J. Knackmuss. 1975. Beta-hydroxy- butyrate polymer, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1 : 233-236. 10. Lafferty, R. M. and W. Korsatko. 1988. Microbial production of poly- -hydroxybutyric acid, *Biotechnol.*, 66 : 135-176. 11. Liu, F. W., L. D. Ridgway, T. Gu and Z. Shen. 1998. Production of poly- -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *E. coli*, *Biotechnology Letters.*, 20 : 345-348. 12. 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. 13. Yamane, T. 1993. Yield of poly-D-(3)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study, *Biotechnol. Bioeng.*, 41 : 165-170. 14. Yan, Y. B. , Q. Wu and R. Q. Zhang. 2000. Dynamic accumulation and degradation of poly(3- hydroxyalkanoates) in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ¹³C NMR, *Microbiology Letters*, 193 : 269-273. 15. 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.