

限氮條件下培養Bacillus megaterium 生合成PHB之研究

陳裕憲、涂瑞澤；余世宗

E-mail: 9607804@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究於限氮條件下，進行搖瓶與批次發酵培養Bacillus megaterium。搖瓶實驗中葡萄糖(主要碳源)濃度為20 g/L，以NH₄NO₃為氮源，並限制其濃度於0.6 g/L，另外添加有機鈉鹽(乙酸鈉、丙酸鈉、丁酸鈉及戊酸鈉)為第二碳源，探討各種有機鈉鹽最佳之添加濃度。批次發酵實驗中葡萄糖(主要碳源)濃度為40 g/L，以NH₄NO₃為氮源，並限制其濃度於0.6 g/L，另外添加有機鈉鹽(丙酸鈉與戊酸鈉)為第二碳源，探討含奇數碳鏈之有機酸鹽對菌體生合成PHB(V)之影響。搖瓶實驗結果顯示：添加乙酸鈉2 g/L時具最高HB產量，為1.86 g/L，佔菌體重57.2%；添加丙酸鈉0.5 g/L時具最高HB產量，為0.62 g/L，佔菌體重27.6%；添加丁酸鈉0.5 g/L時具最高HB產量，為1.77 g/L，佔菌體重39.18%；添加戊酸鈉1 g/L時，具最高HB產量，為0.77 g/L，佔菌體重31.0%。在搖瓶試驗中，第二碳源的添加均無HV的產生。批次發酵實驗結果顯示：添加丙酸鈉3 g/L時，培養至12 h，具最高菌體生質量與HB產量，分別達3.96與0.72 g/L，之後，隨著培養時間的增加而菌體生質量與HB產量均遞減；添加戊酸鈉3 g/L時，結果顯示：HB產量有明顯增加，從未添加的0.73 g/L增加至添加後的1.70 g/L，增加了133.0%；添加兩種有機鈉鹽亦皆無HV的產生。

關鍵詞：有機鈉鹽；批次發酵

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	v	誌謝.....	vii	目錄.....	viii	圖目錄.....	xii	表目錄.....	xiv																																																																																																														
1. 緒論.....	1	2. 文獻回顧.....	3	2.1 塑膠的介紹.....	3	2.2 生物分解性塑膠發展概況.....	4	2.2.1 分解性塑膠的分類.....	6	2.2.2 生物可分解性塑膠簡介.....	6	2.2.3 生物可分解性塑膠應用.....	8	2.3 微生物的代謝產物.....	8	2.3.1 一次代謝物的生合成.....	10	2.3.2 二次代謝物的生合成.....	10	2.4 PHAs簡介.....	10	2.4.1 PHAs的物理化學性質.....	12	2.4.2 PHB之萃取.....	16	2.5 生合成PHA的方式.....	18	2.5.1 搖瓶培養.....	18	2.5.2 批次發酵培養.....	18	3. 材料與方法.....	21	3.1 培養基.....	21	3.2 實驗藥品.....	21	3.3 儀器設備.....	26	3.4 菌株培養.....	27	3.4.1 篩菌.....	27	3.4.2 篩菌方法.....	28	3.4.3 活化.....	28	3.5 碳、氮源的影響.....	29	3.5.1 限制氮源.....	29	3.5.2 不同氮源.....	29	3.5.3 添加不同碳源的探討.....	29	3.5.4 添加最適碳源濃度探討.....	30	3.6 添加有機鈉鹽.....	30	3.6.1 添加有機鈉鹽的時機探討.....	30	3.6.2 添加不同濃度有機鈉鹽之探討.....	31	3.7 批次發酵槽培養.....	31	3.7.1 預培養.....	31	3.7.2 發酵槽培養.....	31	3.8 分析方法.....	33	3.8.1 生質體.....	33	3.8.2 葡萄糖.....	34	3.8.3 氮源.....	34	3.8.4 菌體中PHB / PHBV的分析.....	35	4. 結果與討論.....	38	4.1 篩菌結果.....	38	4.1.1 菌株B. megaterium之生長曲線.....	38	4.1.2 起始pH值對菌株B. megaterium生長之影響.....	43	4.2 碳、氮源之影響.....	43	4.2.1 硫酸銨濃度對B. megaterium生質量之影響.....	43	4.2.2 氮源對B. megaterium生合成PHB之影響.....	43	4.2.3 碳源對B. megaterium生合成PHB之影響.....	47	4.2.4 碳源濃度對B. megaterium生合成PHB之影響.....	47	4.3 添加有機鈉鹽時機探討.....	47	4.4 添加不同濃度之有機鈉鹽探討.....	50	4.4.1 乙酸鈉.....	50	4.4.2 丙酸鈉.....	53	4.4.3 丁酸鈉.....	53	4.4.4 戊酸鈉.....	53	4.5 限氮條件下添加丙酸鈉之批次發酵培養.....	57	4.6 限氮條件下添加戊酸鈉之批次發酵培養.....	61	5. 結論.....	66	5.1 結論.....	66	5.2 未來展望.....	67	參考文獻.....	68	附錄.....	72

參考文獻

1. 王建龍與文湘華。2001。現代環境生物技術。清華大學出版社。北京。
2. 向明。1998。微生物發酵的放大。生物技術的應用。151-163。九州圖書。台北。
3. 朱惟君。2001。化作春泥更護花神奇的「生物可分解塑膠」。行政院環境保護署資源回收月刊。
4. 李吉祥。1997。分解性塑膠的回顧與展望。清潔生產資訊，10:41-56。
5. 胡恆達、陳建宏。1993。分解性塑膠市場/技術現況。化工資訊，7(8):68-70。
6. 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。
7. 姜燮堂。2001。分解性塑膠。產業調查與技術，137:28-40。

8.徐惠美。2000。生物分解性塑膠。化工資訊, 14(10): 81-84。 9.徐敬衡、胡長良、劉文佐。2002。探討氧氣供給對Kineosphaeralimosia 生產PHB之關係。第七屆生化工程研討會論文集。台北。台灣。 10.張庭愷。1998。利用Alcaligenes eutrophus生產poly- β -hydroxybutyric acid之發酵與控制策略之研究。大同大學碩士論文。台北。 11.梁永芳。1991。環保新產品:可分解塑膠。科學月刊, 22:771-778。 12.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。 13.楊紹榮。1993。分解性塑膠在農業栽培之評估。台南區農業專訊, 3:27-30。 14.簡志青。2003。淺談微生物系生物可降解性塑膠。化工資訊與商情, 5: 66-71。 15.嚴群、堵國成、陳堅。2003。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, 54(11):1580-1585。 16.Bailey, J. E. 1991. Towards a science of metabolic engineering, Science. 252: 1668-1675。 17.Beun, J. J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 2002. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. Water Res., 36:1167-1180。 18.Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria. Biochem. Eng., 41:77-93。 19.Carmen, K., Hans, E.B., Rene, A., Claudia, N., Thomas, F., Sven, K., Burkhard, K., and Klaus-Peter, S. 2006. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (β -hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. Biomaterials, 27:192 – 201。 20.Chen, Y., Chen, J., Yu, C., Du, G. and Lun, S. 1999. Recovery of poly- β -hydroxybutyrate from Alcaligenes eutrophus by surfactant-chelate aqueous system. Process Biochem., 34:153-157。 21.Chen, Y., Yang, H., Zhou, Q., Chen, J. and Gu, G. 2001. Cleaner recovery of poly(β -hydroxybutyric acid) synthesized in Alcaligenes eutropha. Process Biochem., 36: 501-506。 22.de Koning, G. J. M. and Witholt, B. 1997. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 1: Solubilization. Bioprocess Engineer., 17: 7-13。 23.Du, G. C., Yu, J. and Lun, S. 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) with Ralstonia eutropha. Biochem. Eng. J., 8:103-110。 24.Hahn, S. Y., Chang, Y. K., Kim, B. S. and Chang, H. N. 1994. Optimization of microbial poly(β -hydroxybutyrate) recovering using disruptions of sodium hypochlorite solution and chloroform. Biotechnol. Bioeng., 44:256-261。 25.Holmes, P. A. Wright, L. F., and Collins, S. H. 1985. Betahydroxybutyrate polymers, Eur. Pat., 0052459。 26.Kacser, H. and Burns, J. A. 1973. The control of flux. Symposia of the society for experimental Biology., 27: 65-104。 27.Leaf, T. A. and Srienc, F. 1998. Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis. Biotechnol. and Bioeng., 57: 557-570。 28.Lemoigne, M. 1925. Etudes sur l'autolyse microbienne acidification par formation d'acide β -oxybutyrique. Annales de L'Institut Pasteur (Paris). Microbiology 39:144-146。 29.Mahishi, L. H., Tripathi, G., and Rawal, S. K. 2003. Poly(β -hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant Escherichia coli harbouring Streptomyces aureofaciens PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. Microbiol. Res., 158: 19 – 27。 30.Mallick, N., Sharma, L., and Kumar, S. A. 2007. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in Nostoc muscorum: Effects of metabolic inhibitors. J. PlantPhysiol., 164:312-317。 31.Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C. and Ramsay, B. A. 1994. Extraction of poly- β -hydroxybutyrate using chlorinated solvents. Biotechnol. Technol., 8:589-594。 32.Schubert, P., Steinbuechel, A. and Schlegel, H. G. 1988. Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in Escherichia coli. J. Bacteriol., 170:5837-5847。 33.Shi, H., Shiraishi, M. and Shimizu, K. 1997. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly(β -hydroxybutyric acid) in Alcaligenes eutrophus from various carbon sources. J. Ferment Bioeng., 84: 579-587。 34.Shimizu, H., Tamura, S., Shioya, S. and Suga, K. 1993. Kinetic study of poly-D(-)- β -hydroxybutyric acid (PHB) production and its molecular distribution control in a fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus. J. Ferment Bioeng., 76:465-469。 35.Slater, S. C., Voige, W. H. and Dennis, D. E. 1988. Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol., 170: 4431-4436。 36.Steinbuechel, A. and Valentin, H. E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid, FEMS Microbiol. Lett., 128: 219-228。 37.Wang, J. G. and Bakken, L. R. 1998. Screening of soil bacteria for poly- β -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. Microbiol. Ecology., 35:94-101。 38.Wong, H. H., van Weegen, R. J., Choi, J., Lee, S. Y. and Middelberg, A. P. J. 1999. Metabolic analysis of poly(β -hydroxybutyrate) production by recombinant Escherichia coli. J. Microbio. Biotechnol., 9: 593-603。