

限氮條件下不同溫度對*Bacillus megaterium* YU-1生合成PHB之影響 = Effect of temperature on the biosynthesis of PHB by ...

葉騰元、?瑞澤；余世宗

E-mail: 9708286@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以微生物發酵生合成PHB，使用之菌株為*Bacillus megaterium* YU-1，在氮源限制的生長環境下，於不同溫度(26、30及35)進行批次培養，探討溫度對生質量、PHB產量及營養源消耗之影響。實驗結果顯示，於30下不調控pH值之培養，生質量與PHB產量分別為6.27與4.26 g/L，PHB為菌體生質量的68%；於26下，生質量與PHB產量分別為7.72與3.54 g/L，PHB為菌體生質量的48%；於35下，生質量與PHB產量分別為5.74與2.29 g/L，PHB佔菌體生質量為41%，其中以30為最佳之培養條件。在調控pH為5.5時，於不同溫度下進行批次培養，探討溫度對菌體生質量、PHB產量及營養源消耗之影響。實驗結果顯示，於26下培養，可得最高之生質量與PHB產量，分別為8.31與5.59 g/L；但在PHB佔菌體之百分比中，以培養於30下，PHB佔菌體生質量(74%)為最高，而生質量與PHB產量分別為6.33與4.71 g/L；於35中，由於培養溫度較高，菌體的生長週期較短，生質量與PHB無法持續累積，因此產量較其它培養溫度下為低。實驗結果顯示，於不同溫度下調控pH為5.5之培養，菌體生質量與PHB產量，比不調控pH值的條件下來得高，其中又以30 pH 5.5為最佳之生長環境。

關鍵詞：聚羥基烷酯類；限氮；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vi 目錄vii 圖目錄x 表目錄xii 1. 緒論1 2. 文獻回顧2 2.1 前言2 2.1.1 石化塑膠概述2 2.1.2 生物可分解性塑膠5 2.2 PHAs6 2.2.1 PHAs之介紹6 2.2.2 PHAs的結構與性質6 2.2.3 可生合成PHA之菌株9 2.2.4 PHAs的代謝過程14 2.3 *Bacillus megaterium*生合成PHAs之探討17 3. 材料與方法22 3.1 實驗材料22 3.1.1 菌株22 3.1.2 實驗藥品22 3.1.3 儀器設備24 3.2 培養條件與步驟26 3.2.1 培養基26 3.2.2 菌株活化26 3.2.3 繼代培養26 3.2.4 預培養30 3.2.5 批次發酵培養30 3.3 分析方法31 3.3.1 菌體之生質量31 3.3.2 葡萄糖之測定31 3.3.3 氮源之測定33 3.3.4 代謝酸之測定34 3.3.5 PHB含量測定34 4. 結果與討論37 4.1 不同溫度對不調控pH之批次發酵培養37 4.1.1 26之批次發酵培養37 4.1.2 30之批次發酵培養41 4.1.3 35之批次發酵培養49 4.1.4 不同培養溫度之比較55 4.2 在控制pH為5.5條件下探討批次發酵PHB之影響60 4.2.1 26之批次發酵培養60 4.2.2 30之批次發酵培養62 4.2.3 35之批次發酵培養68 4.2.4 不同培養溫度之比較73 4.3 不調控pH與pH 5.5下培養*Bacillus megaterium* YU-1之比較76 5. 結論82 5.1 結論82 5.2 展望83 參考文獻84 附錄89 圖目錄 圖2.1 *Alcaligenes eutrophus* 生產PHA的合成與降解代謝路徑17 圖3.1 實驗架構圖23 圖3.2 樣品分析流程圖32 圖4.1 26不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化39 圖4.2 26不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化42 圖4.3 30不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化(硝酸鉍：1.5 g/L)44 圖4.4 30不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化(硝酸鉍：0.75 g/L)46 圖4.5 30不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化50 圖4.6 不同硝酸鉍濃度批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之PHB與PHB含量之變化51 圖4.7 35不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化53 圖4.8 35不調控pH之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化56 圖4.9 不同溫度批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量與PHB變化57 圖4.10 不同溫度批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之PHB佔菌體生質量百分比的變化59 圖4.11 26 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮源的變化61 圖4.12 26 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化64 圖4.13 30 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮源的變化66 圖4.14 30 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化69 圖4.15 35 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB、葡萄糖及氮源的變化71 圖4.16 35 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸變化74 圖4.17 不同溫度批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量與PHB變化75 圖4.18 不同溫度批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之PHB佔菌體生質量百分比的變化77 表目錄 表2.1 各國廢棄塑膠佔都市垃圾含量之比較4 表2.2 微生物生合成PHAs之限制營養源7 表2.3 經由*Alcaligenes* sp. A-04生合成的三共聚合物的熱特性10 表2.4 經由*Alcaligenes* sp. A-04生合成三共聚合物的機械特性11 表2.5 能生合成PHB的微生物12 表2.6 利用基因轉殖菌株生合成PHAs15 表2.7 不同碳源培養*B. megaterium*於MSM培養基中對細胞濃度及PHB累積之影響19 表2.8 不同氮源培養*B. megaterium*於MSM培養基中對細胞濃度及PHB累積之影響20 表2.9 在不同溫度下培養*Bacillus* sp. INT005, *B. megaterium* ATCC 11561, 及*R. eutropha* ATCC 17699 生合成PHA之比較21 表3.1 基礎培養基的組成27 表3.2 微量金屬元素的組成28

表3.3 限氮培養基的組成29 表4.1 26 不調控pH之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率40 表4.2 30 不調控pH之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1 之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗率(硝酸鉍：1.5 g/L)45 表4.3 30 不調控pH之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1 之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗率(硝酸鉍：0.75 g/L)48 表4.4 35 不調控pH之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率54 表4.5 26 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率63 表4.6 30 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率67 表4.7 35 pH5.5之批次發酵槽培養*Bacillus megaterium* YU-1之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率72 表4.8 不同溫度下分別在不調控pH與pH 5.5之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1之比較79 表4.9 不同溫度下分別在不調控pH與pH 5.5之批次發酵培養*Bacillus megaterium* YU-1之代謝酸比較80

參考文獻

- 1.王奕隆。1998。由*Alcaligenes eutrophus*生產生物可分解塑膠的能量模式。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化。
- 2.林東恩。2002。利用活性污泥合成可生物降解塑料-聚羧基脂肪酸酯的研究。華南理工大學博士論文。中國。
- 3.張庭愷。1998。利用 *Alcaligenes eutrophus* 生產polyhydroxy -butyric acid 之發酵與控制策略之研究。大同工學院碩士論文。台北。
- 4.莊露。2006。紅樹林土壤中PHAs合成菌的研究。華南熱帶農業大學博士論文。海南省。
- 5.許琮詠。2007。不同pH培養*Bacillus megaterium*生合成PHB之研究。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 6.黃建銘。2002。生物可分解購物袋與傳統塑膠袋之分析比較。塑膠資訊, 67: 70-76。
- 7.詹彩鑾。2003。生物可分解材料面面觀。食品工業 9(35): 3-11。
- 8.廖聖茹、何明嫌、余鐸堂、汪進忠。2006。從植物來的綠色塑膠。中國工程師學會會刊 79(6): 96-108。
- 9.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。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 10.蘇遠志。2004。生物可分解性塑膠開發商機無限。生技時代30: 56-63。
- 11.蘇濤、周河治、梁靜娟。1997。微生物合成可降解塑料聚羧基鏈烷酸 (PHA)。工應微生物 3(27): 37-48。
- 12.Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A. 2002. The synthesis of short and medium-chain-length poly (hydroxyalkanoates) mixtures from glucose or alkanolic acid grown *Pseudomonas oleovorans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 147-53.
- 13.Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B. and Sell, I. 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing* 24: 564-571.
- 14.Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism, technology and economics. *Biotech.* 5: 246-250.
- 15.Chanpratep, S. and Kulpreecha, S. 2006. Production and Characterization of Biodegradable Terpolymer Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-4-Hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *J. Bioscience and Bioengineering* 101: 51-56.
- 16.Dayong, J., Jian, C. and Shiyi, L. 1999. Production of poly(hydroxyalkanoate) by a composite anaerobic acidification-fermentation system. *Process Biochemistry* 34: 829-833
- 17.Delafield, F. P., Doudoroff, M. N., Paileroni, J., Lusty, J. and Contopoulos, R. 1965. Decomposition of poly- -hydroxybutyrate by *Pseudomonads*. *J. Bacterial* 91: 1455-1466.
- 18.Eggink, G., Wal, V. H., Huijberts, G. N. M. and Waard, D. P. 1993. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxybutyrate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Ind. Crop. Prod.* 1: 157-63.
- 19.Fidler, S. and Dennis, D. 1992. Polyhydroxyalkanoate production by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 231-6.
- 20.Fukui, T., Kichise, T., Yoshida, Y. and Doi, Y. 1997. Biosynthesis of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co- 3-hydroxy- heptanoate) terpolymers by recombinant *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 19(11): 1093-1097.
- 21.Hahn, S. K., Chang, Y. K. and Lee, S. Y. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 34-9.
- 22.Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y. 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability.* 83: 79-86.
- 23.Khanna, S. and Srivastava, A. K. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 40: 2173-2182.
- 24.Kim, B. S., Kim, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chan, Y. K. and Woo, S. I. 1994. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 892-898.
- 25.Kim, B. S., Lee, S.Y. and Chang, H. N. 1992. Production of poly-beta-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14: 811-6.
- 26.Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
- 27.Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 8: 770-782.
- 28.Mona, K. G., Swellam, A. E. and Omar, S. H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.* 156: 201-207.
- 29.Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Vob, I. and Steinbuchel, A. 2001. Optimization of cell growth and poly(hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letter.* 23: 1119-1123.
- 30.Pflug, S., Richter, S. M. and Urlacher, V. B. 2007. Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from *Bacillus megaterium* in *E. coli*. *Journal of Biotechnology* 129: 481-488.
- 31.Preusting, H., Hazenberg, W. and Witholt, B. 1993. Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *P. oleovorans* in a high cell density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 311-316.
- 32.Quillaguaman, J., Degado, O., Mattiasson, B. and Rajni, H. K. 2006. Poly(-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 148-154.
- 33.Shang, L., Yim, C. Y., Park, H. G. and Chang, H. N. 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.
- 34.Taguchi, S., Nakamura, H., Kichise, T., Tsuge, T., Yamato, I. and Doi, Y. 2003. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. *Biochemical Engineering Journal* 16: 107-113.
- 35.Tajima K., Igari, T., Nishimura, D.,

Nakamura, M., Satoh, Y. and Munekata, M. 2002. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulation polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1: 77-81. 36. Volova, T., Shishatskaya, E., Sevastianov, V., Efremov, S. and Mogilnaya, O. 2003. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochem. Eng. J.* 16: 125-133. 37. Wang, W., Sun, J., Hollmann, R., Zeng, A. P. and Deckwer, W. D. 2006. Proteomic characterization of transient expression and secretion of a stress-related metalloprotease in high cell density culture of *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology* 126: 313-324. 38. 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.