

限氮條件下添加有機酸對菌株 Yu-3 生合成 PHBV 之影響

蕭正明、瑞澤；余世宗

E-mail: 9806219@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究於限氮條件添加戊酸鈉為第二碳源(葡萄糖為第一碳源)，培養菌株 Yu-3 生合成 PHBV。先以一次一因子方式進行搖瓶培養，探討不同葡萄糖濃度、戊酸鈉不同添加時機及戊酸鈉不同添加濃度對菌體生合成 PHBV 之影響，以上述之結果，利用中心混成實驗，探討最適化培養條件。

經一次一因子實驗結果得知，葡萄糖添加濃度為(10、20、30、40、50 g/L)，而最佳添加濃度為20 g/L，菌體生質量為4.29 g/L，PHB可達0.84 g/L，佔菌體重的19.6%，PHV可達0.25 g/L；戊酸鈉添加時機為(12、24、36、48、72 h)，最適添加時機為培養後12 h，菌體生質量為6.25 g/L，PHB可達1.56 g/L，佔菌體重的25.0%，PHV可達0.47 g/L；戊酸鈉添加濃度為(1、2、3、4、5 g/L)最佳添加濃度為5 g/L，菌體生質量為4.84 g/L，PHB可達0.29 g/L，佔菌體重的5.99%，PHV可達0.76 g/L。之後，於限氮條件下，以上述之初步結果結果為依據，進行中心混成之實驗設計，探討最適培養條件，經實驗設計法設計實驗，最適化培養條件為，添加葡萄糖19.78 g/L，戊酸鈉於培養後16.5 h添加，添加濃度為7.97 g/L。

經由搖瓶培養驗證最適化條件，菌體生質量可達5.22 g/L，PHB產量可達0.35 g/L，PHV產量可達0.93 g/L，佔菌體生質量17.8%，與預測值(18.3 ± 2.93%)互相吻合。改用批次發酵槽以最適條件進行培養，菌體生質量可達7.31 g/L，PHB的含量為0.43 g/L，而PHV達到2.36 g/L，佔菌體量32.3%。

關鍵詞：菌株 Yu-3、PHBV、戊酸鈉、中心混成實驗

目錄

封面內頁
簽名頁
授權書iii
中文摘要iv
英文摘要vi
誌謝viii
目錄ix
圖目錄xiii
表目錄xv

1. 緒論1
2. 文獻回顧3
2.1 石化塑膠簡介3
2.2 生物分解性塑膠概述4
2.3 生物可分解塑膠種類7
2.3.1 微生物合成聚合物7
2.3.2 化學合成聚合物8
2.3.3 天然聚合物8
2.3.4 光分解塑膠8
2.4 微生物的代謝產物9
2.4.1 初級代謝9
2.4.2 次級代謝9
2.5 PHAs介紹10
2.6 PHAs生合成之代謝途徑15
2.6.1 微生物利用不同碳源生合成 PHAs 之影響18
2.6.2 <i>Ralstonia eutropha</i> 利用有機酸生合成 PHAs18
2.7 PHAs生合成條件探討21
2.7.1 搖瓶培養21

2.7.2	批次發酵培養	22
3.	材料與方法	23
3.1	菌株	23
3.1.1	培養基	23
3.1.2	實驗藥品	23
3.1.3	儀器設備	31
3.2	菌株培養	33
3.2.1	篩菌	33
3.2.2	篩菌方法	33
3.2.3	菌株活化	34
3.2.4	繼代培養	34
3.2.5	預培養	34
3.3	氮源的影響	35
3.4	碳源的影響	35
3.5	添加不同有機酸鹽對PHBV生合成之影響	36
3.6	一次一因子條件探討	36
3.6.1	葡萄糖濃度對Yu-3生合成PHBV之影響	36
3.6.2	戊酸鈉添加時機對Yu-3生合成PHBV之影響	36
3.6.3	戊酸鈉添加濃度對Yu-3生合成PHBV之影響	37
3.7	中心混成實驗設計	37
3.8	批次發酵培養	38
3.9	分析方法	41
3.9.1	生質量	41
3.9.2	葡萄糖	41
3.9.3	戊酸鈉	42
3.9.4	代謝酸	42
3.9.5	氮源	43
3.9.6	磷源	44
3.9.7	菌體中PHB含量	45
4.	結果與討論	48
4.1	篩菌結果	48
4.2	氮源對菌株Yu-3生合成PHB之影響	48
4.3	碳源對菌株Yu-3生合成PHB之影響	52
4.4	菌株Yu-3添加不同有機酸鹽對PHBV生合成之影響	52
4.5	菌株Yu-3於限氮培養基之生長曲線	52
4.6	一次一因子條件探討	60
4.6.1	添加葡萄糖濃度對菌株Yu-3生合成PHBV影響	55
4.6.2	戊酸鈉添加時機對菌株Yu-3生合成PHBV的影響	58
4.6.3	添加戊酸鈉濃度對菌株Yu-3生合成PHBV的影響	58
4.6.4	中心混成實驗	58
4.7	批次發酵培養	73
4.7.1	限氮條件之批次發酵培養	73
4.7.2	批次發酵培養之最適條件	78
5.	結論	85
5.1	結論	85
5.2	未來展望	86
	參考文獻	87
	附錄	92

圖目錄

圖2.1	由 <i>H. boliviensis</i> 生合成的PHB於電子顯微鏡之觀察	11
圖2.2	PHA之結構式	12
圖2.3	利用葡萄糖生合成PHB之代謝路徑	32

- 圖3.1 篩菌實驗流程圖24
- 圖3.2 最佳化條件實驗流程圖25
- 圖3.3 批次發酵實驗流程圖26
- 圖3.4 PHB的水解與甲酯化46
- 圖4.1 菌株Yu-3之篩菌結果49
- 圖4.2 以位相差顯微鏡觀察Yu-350
- 圖4.3 不同氮源對菌株Yu-3之菌體生長與PHB產量之影響51
- 圖4.4 不同碳源對菌株Yu-3之菌體生長與PHB產量之影響53
- 圖4.5 菌株Yu-3添加戊酸鈉與丙酸鈉之菌體生長與PHBV產量之影響54
- 圖4.6 菌株Yu-3生長曲線及氮、磷源之消耗56
- 圖4.7 葡萄糖濃度對菌株Yu-3生質量、PHB及PHV之影響57
- 圖4.8 戊酸鈉添加時間對菌株Yu-3生質量、PHB及PHV之影響59
- 圖4.9 戊酸鈉濃度對菌株Yu-3生質量、PHB及PHV之影響60
- 圖4.10 HV產量預測值與觀測值之殘差分析圖63
- 圖4.11 葡萄糖與戊酸鈉添加時間對菌體生質量之反應曲面圖65
- 圖4.12 葡萄糖與戊酸鈉濃度對HV之反應曲面圖66
- 圖4.13 戊酸鈉添加時間與戊酸鈉濃度對HV在菌體之生質量中之反應曲面圖67
- 圖4.14 菌株Yu-3於最適條件培養72
- 圖4.15 限氮條件之批次發酵槽培養Yu-3之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化74
- 圖4.16 限氮條件之批次發酵槽培養Yu-3之代謝酸變化77
- 圖4.17 最適條件之批次發酵槽培養Yu-3之生質量、PHB、葡萄糖及氮的變化79
- 圖4.18 最適條件之批次發酵槽培養Yu-3之HV佔PHBV百分比的變化81
- 圖4.19 最適條件之批次發酵槽培養Yu-3之代謝酸變化83

表目錄

- 表2.1 生物可分解材料的ISO檢測標準5
- 表2.2 生物可分解材料的中國國家檢測標準6
- 表2.3 PHAs與聚丙烯的性質比較14
- 表2.4 經由Alcaligenes sp. A-04生合成聚合物的熱特性16
- 表2.5 經由Alcaligenes sp. A-04生合成聚合物的機械特性17
- 表2.6 R. eutropha 利用不同碳源生合成PHB20
- 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 洋菜平板培養基的成分29
- 表3.4 限氮培養基的組成30
- 表3.5 中心混成設計實驗之控因39
- 表3.6 中心混成實驗設計表40
- 表4.1 中心混成設計之試驗安排與試驗結果62
- 表4.2 中心混成設計之實驗結果64
- 表4.3 HV於菌體生質量中所佔比例之變異數分析69
- 表4.4 HV於菌體生質量中所佔比例之聯合檢測分析70
- 表4.5 利用脊形分析評估HV於菌體生質量中所佔比例之最大值71
- 表4.6 限氮條件之批次發酵槽培養Yu-3之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率76
- 表4.7 最適條件之批次發酵槽培養Yu-3之生質量、PHB、PHV產率、葡萄糖與戊酸鈉消耗速率72

參考文獻

- 1.丁兆運。2008。回收利用治理白色污染的根本途徑。商場現代化。550: 19-12。
- 2.王雲平、王金煌、陳志成。2008。生物分解性塑膠的世界市場展望。化工55(4): 11-153.
- 3.王建龍和文湘華。2001。現代環境生物技術。清華大學出版社。北京。
- 4.李愛萍和李光吉。2004。聚羧基脂肪酸酯生物合成的研究進展。高分子通報。5: 20-26。
- 5.呂桂英、屈媛、劉煦晴、林安。2006。白色污染及其防治技術的思考。環境科學與技術。28: 178-1806.
- 6.何奕波。2006。白色污染與可降解塑膠。漯河職業技術學院學報。5: 28-307.
- 7.吳宇。2008。中國治理白色污染在行動。生態經濟。8: 14-21。
- 8.吳尚訓。2006。限氮條件添加有機酸鹽對Ralstonia eutropha生合成PHBV之影響。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。彰化。
- 9.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。
- 10.

蕭志強。2006。圖解生物可分解塑膠。世茂出版社。台北。11.蘇濤。1995。好氧產鹼桿菌 *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。12.Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. and Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 99: 509 – 516.13.Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B. and Sell, I. 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polym. Test.* 24: 564-571.14.Bhubalan, K., Lee, W. H., Loo, C. Y. L., Yamamoto, T. and Tsuge, T. 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polym. Degrad. Stab.* 93: 17 – 23.15.Chee, J. W., Amirul, A. A., Muhammad, T., Sifzizul, T., Majid, M. I. A. and Mansor, S. M. 2008. The influence of copolymer ratio and drug loading level on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by *Cupriavidus* sp. (USMAA2-4). *Biochem. Eng. J.* 38: 314 – 318.16.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. Biosci. Bioeng.* 101: 51-56.17.Coats, E. R., Loge, F. J., Wolcott, M. P., Englund, K. and McDonald, A. G. 2008. Production of natural fiber reinforced thermoplastic composites through the use of polyhydroxybutyrate-rich biomass. *Bioresour. Technol.* 99: 2680 – 2686.18.Du, G. C., Chen, J., Yu, J. and Lun, S. 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Eng. J.* 8: 103 – 110.19.Dai, Y., Lambert, L., Yuan, Z. and Keller, J. 2008. Characterisation of poly-hydroxyalkanoate copolymers with controllable four-monomer composition. *J. Biotech.* 134: 137 – 145.20.Douglas, D. A. and James E. B. 1995. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng.* 47: 8-1.21.Gouda, M. K., 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 – 207.22.Galindo, E., Pena, C., Nunez, C., Segura, D. and Espin, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb. Cell Fact.* 6: 1182-1202.23.Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C. and Shao, W. 2008. High poly(-hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 167 – 172.24.Kelley, A. S. and Srienc, F. 1999. Production of two phase polyhydroxyalkanoic acid granules in *Ralstonia eutropha*. *Int. J. Biol. Macromol.* 25: 61 – 67.25.Koutinas, A. A., Xu, Y., Wang, R. and Webb, C. 2007 Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1035 – 1044.26.Khanna, S. and Srivastava, A. K. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process. Biochem.* 40: 2173 – 2182.27.Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y. Chang, H. N., Chang, 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: 892.28.Kunioka, M., Ninomiya, F. and Funabashi, M. 2007. Novel evaluation method of bon-14 concentration using accelerator mass spectrometry based on ISO14855-2 in controlled compost. *Polym. Degrad. Stab.* 92: 1279 – 1288.29.Kale, G., Auras, R, Singh, S. P. and Narayan, R. 2007. Biodegradability of polylactide bottles in real and simulated composting conditions. *Poly. Test.* 26: 1049 – 1061.30.Kasemsap, C. and Wantawin, C. 2007. Batch production of polyhydroxy-alkanoate by low-polyphosphate-content activated sludge at varying pH. *Bioresour. Technol.* 98: 1020 – 1027.31.Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E. R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 251 – 260.32.Lemoigne, M. 1925. Products of dehydration and of polymerization of -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 8: 770-782.33.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): 255-258.34.Lawford, H. G. and Rousseau, J. D. 1993. Effect of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanogenic *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotech.* 39: 301-32.35.Mohee, R. and Unmar, G. 2007. Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments. *Was. Man.* 27: 1486 – 1493.36.Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S. and Desai, A. J. 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresour. Technol.* 99: 5749 – 5755.37.Patwardhan, P. and Srivastava, A. K. 2008. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. *Bioresour. Technol.* 99: 1787 – 1792.38.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: 148-154.39.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): 767-77.40.Rusell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 54(2): 191-19.41.Singh, B. and Sharma, N. 2007. Optimized synthesis and characterization of polystyrene graft copolymers and preliminary assessment of their biodegradability and application in water pollution alleviation technologies. *Polym. Degrad. Stab.* 92: 876-885.42.Suwantong, O., Waleetorncheepsawat, S., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Cheepsunthorn, P., Bunaprasert, T. and Supaphol, P. 2007 In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *Int. J. Biol. Macromol.* 40: 217 – 223.43.Sheu, D. S., Chen, W. M., Yang, J. Y. and Chang, R. C., 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme Microb. Technol.* 44(5): 289-294.44.Xie, W. P. and Chen, G. Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes phaPCJ. *Biochem. Eng. J.* 38: 384 – 389.45.Yang, H. S., Yoon, J. S. and Kim, M. N. 2005. Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Poly. Degstab.* 87: 131-135.46.Yu, J. and Wang, J. P. 2001. Metabolic flux modeling of detoxification of acetic acid by *Ralstonia eurtropha* at slightly alkaline pH levels. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 458-464.47.Zhang, K., Cao, W. and Zhang, J. 2004. Solid-phase photocatalytic degradation of PVC by Tungstophosphoric acid a novel method for PVC plastic degradation.

