

# 限磷條件下添加有機酸對菌株 Yu-3 生合成 PHBV 之影響

林宸逸、?瑞澤 ; 余世宗

E-mail: 9806221@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以葡萄糖為碳源，於搖瓶中培養菌株 Yu-3，探討不同硝酸銨與磷源濃度以及戊酸鈉的添加對菌體生質量、PHB/PHBV產量的影響。此外，於限磷環境中，使用批次發酵培養菌株 Yu-3。

首先探討搖瓶 (250 mL) 中，培養基體積對 Yu-3 之菌體生質量與 PHB 產量影響，配製不同體積 (50、100、150 mL) 培養基，培養此菌株，實驗結果顯示，以培養基體積為 100 mL 之培養結果為最佳，菌體生質量為 5.98 g/L，PHB 產量為 1.25 g/L，佔菌體生質量的 20.9%，之後的搖瓶試驗，培養基體積定為 100 mL。

接著探討氮源與磷源濃度對菌株生長的影響。本實驗以硝酸銨為氮源，三種不同濃度為 1.5、2.0 及 2.5 g/L；磷源的濃度以基礎培養基之磷源 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 3.6 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1.5 g/L) 當作一個單位，另外有磷源加倍及磷源減半共三種不同磷源濃度。氮源與磷源各三種濃度，以及戊酸鈉的添加與否，總計 18 個組合，每一種組合重複 2 次，培養時間為 96 h。實驗結果得知，當未添加戊酸鈉培養，而磷源為加倍與硝酸銨濃度為 2.0 g/L 時，其菌體生質量為最高，有 4.89 g/L，PHB 產量為 1.5 g/L，佔菌體生質量有 30.6%；當磷源為加倍與硝酸銨濃度為 1.5 g/L 時，菌體生質量為 3.79 g/L，PHB 產量為最高，有 1.85 g/L，佔菌體生質量 48.8%。添加戊酸鈉培養，當磷源為一個單位，硝酸銨為 1.5 g/L 時，其 PHB 產量為最高，達 1.42 g/L，佔菌體生質量的 44.5%，PHV 的產量有 0.34 g/L，佔菌體生質量的 10.6%；當磷源加倍，硝酸銨濃度為 2.0 g/L 時，PHV 的產量為最高，達 0.43 g/L，佔菌體生質量有 12.2%。

於限磷環境，以批次發酵培養菌株 Yu-3，葡萄糖添加濃度為 30 g/L，硝酸銨為 4.5 g/L，磷源包括 0.72 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。實驗結果得知，培養至 96 h 時，生質量達最高，為 8.85 g/L，PHB 產量為 0.73 g/L，佔菌體的 8.24%。

關鍵詞：菌株 Yu-3、限磷、培養基體積、戊酸鈉

## 目錄

封面內頁
簽名頁
授權書iii
中文摘要v
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 前言3
2.1.1 石化塑膠介紹3
2.2c 可分解性塑膠4
2.2.1 光分解性塑膠6
2.2.2 物理化學性分解塑膠7
2.2.3 生物可分解塑膠7
2.3c PHB 的性質改良12
2.3.1 生物改良12
2.3.2 物理共混13
2.3.3 化學改良13
2.4c 可生合成 PHB 之菌株與代謝路徑15
3. 材料與方法22
3.1 實驗藥品22

- 3.2儀器設備23
- 3.3菌株25
- 3.4培養基25
- 3.5菌株培養25
- 3.5.1篩菌來源25
- 3.5.2篩菌方法33
- 3.5.3菌株活化33
- 3.5.4繼代培養34
- 3.5.5預培養34
- 3.5.6批次發酵培養35
- 3.6營養源的影響35
- 3.6.1氮源35
- 3.6.2氮源濃度36
- 3.6.3碳源36
- 3.6.4磷源濃度37
- 3.6.5培養基體積37
- 3.7硝酸銨濃度與添加戊酸鈉對菌株Yu-3生成PHB /PHBV之影響38

- 3.8分析方法39
- 3.8.1菌體生質量39
- 3.8.2菌體中PHB/PHBV含量測定40
- 3.8.3葡萄糖40
- 3.8.4氮源41
- 3.8.5磷源43
- 3.8.7代謝酸44

#### 4. 結果與討論45

- 4.1 篩菌結果45
- 4.2 菌株Yu-3之生長曲線45
- 4.3 營養源之影響49
- 4.3.1碳源49
- 4.3.2氮源52
- 4.3.3硝酸銨濃度52
- 4.3.4磷源濃度52
- 4.4培養基體積55
- 4.5 硝酸銨濃度與添加戊酸鈉58
- 4.5.1 基礎培養基58
- 4.5.2 磷源加倍61
- 4.5.3 磷源減半64
- 4.6 培養基體積對菌株生長影響比較67
- 4.7 批次發酵培養69
- 4.7.1限磷條件之批次發酵培養74

#### 5. 結論81

- 5.1 結論81
- 5.2 未來展望82

參考文獻84

附錄87

#### 圖目錄

- 圖2.1 PHAs之結構8
- 圖2.2 PHB之結構10
- 圖2.3 PHBV之結構14
- 圖2.4 電子顯微鏡下Thylosinus trichosporium細胞中的PHB顆粒16

圖2.5 利用不同碳源來生產PHA之合成代謝路徑	19
圖2.6 <i>Ralstonia eutropha</i> 之PHB代謝調節	20
圖3.1篩選菌株流程圖	26
圖3.2菌株培養條件探討流程圖	27
圖3.3分析流程圖	28
圖3.4 PHB的水解與甲酯化	42
圖4.1篩菌結果圖	46
圖4.2以位相差顯微鏡 (1,000x) 觀察Yu-347	
圖4.3菌株Yu-3添加有機酸對菌體生質量、PHB/PHBV之影響	48
圖4.4以基礎培養基培養菌株Yu-3之生長曲線	50
圖4.5 不同碳源對菌株Yu-3之菌體生長與PHB產量之影響	51
圖4.6 不同氮源對菌株Yu-3之菌體生長與PHB產量之影響	53
圖4.7 硝酸銨濃度對菌株Yu-3生質量與PHB之影響	54
圖4.8 磷源濃度對菌株Yu-3生質量與PHB之影響	56
圖4.9基質體積對菌株Yu-3生質量與PHB之影響	57
圖4.10基礎培養基磷源濃度與硝酸銨濃度對Yu-3生質量與PHB之影響	59
圖4.11 基礎培養基磷源濃度與硝酸銨濃度與戊酸鈉對Yu-3生質量與PHBV之影響	60
圖4.12 磷源加倍時硝酸銨濃度對Yu-3生質量與PHB之影響	62
圖4.13磷源加倍時硝酸銨濃度與戊酸鈉對Yu-3生質量與PHBV之影響	63
圖4.14磷源減半時硝酸銨濃度對Yu-3生質量與PHB之影響	65
圖4.15磷源減半時硝酸銨濃度與戊酸鈉對Yu-3生質量與PHBV之影響	66
圖4.16基礎培養基之批次發酵槽培養菌株Yu-3之生質量、PHB、葡萄糖、氮源、磷源的變化	72
圖4.17以基礎培養基批次發酵槽培養菌株Yu-3之代謝酸變化	75
圖4.18限磷培養基之批次發酵槽培養菌株Yu-3之生質量、PHB、葡萄糖、氮源、磷源的變化	76
圖4.19以限磷培養基批次發酵槽培養菌株Yu-3之代謝酸變化	80

## 表目錄

表2.1 塑膠的分解方式	5
表2.2 以不同基質及廢水生合成PHB	11
表2.3 能生合成PHB的微生物	17
表2.4 可生合成PHB之基因改造菌株	18
表3.1 基礎培養基的組成	29
表3.2 微量金屬元素的組成	30
表3.3 洋菜平板培養基的成分	31
表3.4 限磷培養基的組成	32
表4.1磷源與氮源濃度對菌株Yu-3菌體生質量與PHB之影響	68
表4.2 磷源與氮源濃度並添加戊酸鈉對菌株Yu-3菌體生質量與PHB/PHBV之影響	70
表4.3基礎培養基之批次發酵槽培養菌株Yu-3之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率	73
表4.4 限磷培養基之批次發酵槽培養菌株Yu-3之生質量、PHB產率及葡萄糖消耗速率	78

## 參考文獻

- 于慧敏、沈忠耀。2001。可生物降解塑料聚- $\beta$ -羥基丁酸酯 (PHB) 的研究與發展, 精細與專用化學品, 生物化工, 8: 11-14。
- 王建龍、文湘華。2001。現代環境生物技術, 清華大學出版社, 北京。
- 王鐵柱、趙強、成國祥。2004。聚-(3-羥基丁酸酯) 的化學改性研究進展, 塑料, 33(1): 48-53。
- 辛嘉英、?穎鑫、陳林林、夏春谷。2008。新型食品包裝材料PHB的生物合成。中國食品學報, 3(8): 5-11。
- 李吉祥。1997。分解性塑膠之回顧與展望, 清潔生產資訊, 10: 41-56。
- 李荷、歐陽少平、吳?、陳國強。2003。丁醇對發酵生產3-羥基丁酸與3-羥基己酸共聚酯 (PHBHHx) 單體組成的影響, 中國生物工程雜誌, 23(11): 72-75。
- 林逸群。2004。連續生產PHBV-丙酸戊酸對菌體生長及PHBV生產之影響, 大葉大學食品工程學系碩士論文, 彰化。
- 高銘木。1986。高分子聚合物生物分解的探討, 工業污染防治, 5: 138-145。
- 張庭愷。1998。利用 *Alcaligenes eutrophus* 生產 poly- $\beta$ -hydroxy- butyric acid 之發酵與控制策略之研究, 大同大學碩士論文, 台北。
- 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。
- 李吉祥。1997。分解性塑膠的回顧與展望。清潔生產 10: 41-56。
- 徐惠美。2000。生物分解性塑膠。化工資訊 14(10): 81-84。
- 朱惟君。2001。化作春泥更護花-神

奇的「生物可分解塑膠」。環保署資源回收月刊，九十年七月號。14.姜燮堂。2001。分解性塑膠，產業調查與技術，137: 28-40。

15.Anderson, A. J. and E. A. Dawes 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, 54: 450-472.16.Bengtsson S., A. Werker, M. Christensson and T. Welander 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, *Bio-resour. Technol.*, 99: 509 – 516.17.Chanprateep S. and S. Kulpreecha 2006. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04, *The Society for Biotechnology*, 101: 51-56.18.Du G., J. Chen, J. Yu and S. Lun 2001. Continuous production of poly-3-hydroxy butyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system, *J. Biotechnol.*, 88: 59-65.19.Greenberg A. E., L. S. Clesceri and A. D. Eaton 2001. Standard methods for the examination of water and wastewater, p. 409-421, American Public Health Association, Washington, DC.20.Goris J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergey, K. Kersters and P. Vandamme 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1773 – 1782.21.Jung Y. M. and Y. H. Lee 2000. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly-3-hydroxybutyrate and poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxy valerate) in *Ralstonia eutropha*, *J. of Biosci. Bioeng.*, 90 (3): 266-270.22.Khardenavis A., P. K. Guha, M. S. Kumar, S. N. Mudliar and T. Chakrabarti 2005. Activated sludge is a potential source for production of biodegradable plastics from wastewater. *Environ. Technol.* 26: 545 – 552.23.Khardenavis A., P. K. Guha, M. S. Kumar, S. N. Mudliar and T. Chakrabarti 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly-3-hydroxybutyrate, *Bioresour. Technol.*, 98: 3579 – 3584.24.Lemoigne M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of 3-hydroxy butyric acid, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 8:770-782.25.Lee I. Y., M. K. Kim, H. N. Chang and Y. H. Park 1995. Regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol Lett*, 131: 35-39.26.Skoog D. A., D. M. West and F. J. Holler. 1993. The determination of amine nitrogen by the Kjeldahl method, *Anal. Chem.*, 6: 575-578.27. Tokiwa Y. and C. U. Ugwu 2007. Biotechnological production of (R)-3-hydroxy butyric acid monomer, *J. Biotechnol.*, 132: 264-272.28.Wang J. G. and L. R. Bakken 1998. Screening of soil bacteria for poly-3-hydroxy butyric acid production and its role in the survival of starvation, *Microb. Ecol.*, 35: 94-101.29.Yim K. S., S. Y. Lee and H. N. Chang 1996. Synthesis of poly(3-hydroxy -butyrate-co-hydroxy-butyrate) by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. and Bioeng.*, 49: 495-503