

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用已生產二次代謝產物之植物細胞吸附及回收重金屬 Adsorption of Heavy Metals by Employing Plant Cells Already Used in Secondary Metabolite Production

計畫編號：NSC 88-2214-E-002-016

執行期限：87年8月1日至88年10月31日

主持人：黃世佑 台灣大學化學工程研究所

一、中文摘要

以本研究室多年來用於生產二次代謝物 L-DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)之藜豆植物細胞及經 Ri-質體轉殖之毛狀根做為生物吸附劑吸附重金屬，先對銅離子進行吸附實驗，繼之推廣至 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 等污染性重金屬，為了瞭解植物細胞或毛狀根吸附重金屬之特性及不同濃度時吸附量，進行與吸附平衡相關的實驗，包括等溫吸附曲線及影響平衡曲線因子之探討並與其他生物吸附劑做比較，評估生產二次代謝產物之植物細胞用以吸附及回收重金屬之可行性。

關鍵詞：藜豆植物細胞、重金屬污染、吸附、L-DOPA、黑色素

Abstract

In this investigation, the plant cells obtained from the effluent of bioreactors which serves as a production of a secondary metabolite(s) will be employed to adsorb the heavy metals. The study begins with the adsorption of Cu^{2+} by *Stizolobium hassjoo* cells obtained from the experimental systems of our laboratory. The works will be extended to the adsorption of other heavy metals related with the pollution. The items of experiments are adsorption isotherms, factors affecting the adsorption equilibrium. These data will be useful to evaluate the process feasibility of the heavy metal adsorption by plant cells.

Keywords: *Stizolobium hassjoo* cells,

Heavy metals, Adsorption, L-DOPA, melanin

二、緣由與目的

重金屬中鎘、鉻、銅等對人類、家畜、農作物之危害甚鉅，必須設法去除。近年來以微生物（黴菌及藻類）吸附工業廢水（電池、電鍍、塗料等工業）及飲用水中重金屬的研究受到重視[1,2,3]。一些真菌類能吸附金屬離子的主要因為具有黑色素(melanin)的合成能力[4]。melanin為黑色高分子物質，其合成是由 Shikimate pathway 生成之 L-tyrosine 經 PPO 酵素(Polyphenol oxidase)催化，發生一連串氧化反應之最終產物，含有 carboxyl、phenolic、hydroxyl 及 amino 等官能基可吸附金屬離子[5]。

本研究室以藜豆(*Stizolobium hassjoo*)細胞及 Ri-plasmid 轉殖藜豆細胞獲得之毛狀根為生產 L-DOPA 之研究系統 [6,7]。在懸浮細胞培養系統中獲知提高銅離子濃度(由 basal MS medium 中 0.025 mg/l 增至 0.625 mg/l 之 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)可增加酵素 PPO 的活性使 L-DOPA 之產量達二倍[8]，再加入更多量的銅離子則可促進 melanin 的生成。此外在 *S. hassjoo* 細胞及毛狀根培養系統中，生長超過 stationary phase 常可發現褐化甚至變黑的現象，由該現象之發生便產生了以 *S. hassjoo* 細胞吸附重金屬的構想，由其對重金屬之吸附行為、吸附機構，並測量吸附平衡數據以便進一步探討較大規模的吸附裝置及程序設計。

三、實驗方法

1. 植物細胞及毛狀根之製備

S. hassjoo 懸浮細胞是以 MS medium 經 8 天培養後接種至 2L 攪拌式圓底反應器培養 10-12 天後採收而得（操作體積 1L，接種密度 120g F.W./L，攪拌速率 70rpm，通氣量 0.35vvm），毛狀根則是以 B5 培養基在 250ml 三角錐形瓶中經 14 天培養，獲取大量生質以供實驗所需，收得之細胞及毛狀根置於烘箱中乾燥後磨碎備用，經過烘乾處理後細胞及毛狀根均變成黑色。

2. 吸附平衡曲線

- (1) 0.8g 乾重之吸附劑放入裝有 4mM 金屬離子溶液 200ml 之三角錐形瓶，於 25°C 恆溫下以 100rpm 搖動使其混合，測量金屬離子濃度隨時間之變化。所有金屬離子之濃度皆以火焰式原子吸收光譜 Model 906 AA, GBC Scientific Equipment (Dandenong, Australia) 測量。
- (2) 吸附劑 0.2g 乾重放入裝有各種不同濃度 (1~10mM) 金屬離子溶液 50 ml 之錐形瓶中，同樣在 25°C 恆溫下以 100rpm 搖動，測量平衡時金屬離子濃度，並計算出吸附量。
- (3) 改以幾丁質、幾丁聚醣及煙草之根部做為生物吸附之材料，測量其吸附之平衡濃度。

四、結果與討論

1. 新鮮之細胞因黑色素生成之同時吸附作用一併發生，故其達平衡所需時間較長，約為 5 小時，因此吸附劑的製備方法選擇為將所有收得之細胞及毛狀根置於惡劣環境中使其死亡，目的在於使黑色素能盡量生成，圖一顯示變黑之細胞及毛狀根在短時間內能達吸附平衡。

2. *S. hassjoo* 細胞及毛狀根 25°C 時之吸附等溫線如圖二所示，顯示其趨勢在吸附等溫線之分類上大致呈良性吸附，在中間部分有一平緩的區域，吸附量變化不大，毛狀根在較高濃度部分有吸附量增加的傾向，而細胞方面情況較不明顯，若只考慮低濃度範圍及平緩區段則大致類似 Langmuir

isotherm

$$Q_e = \frac{Q_0 K C_e}{1 + K C_e}$$

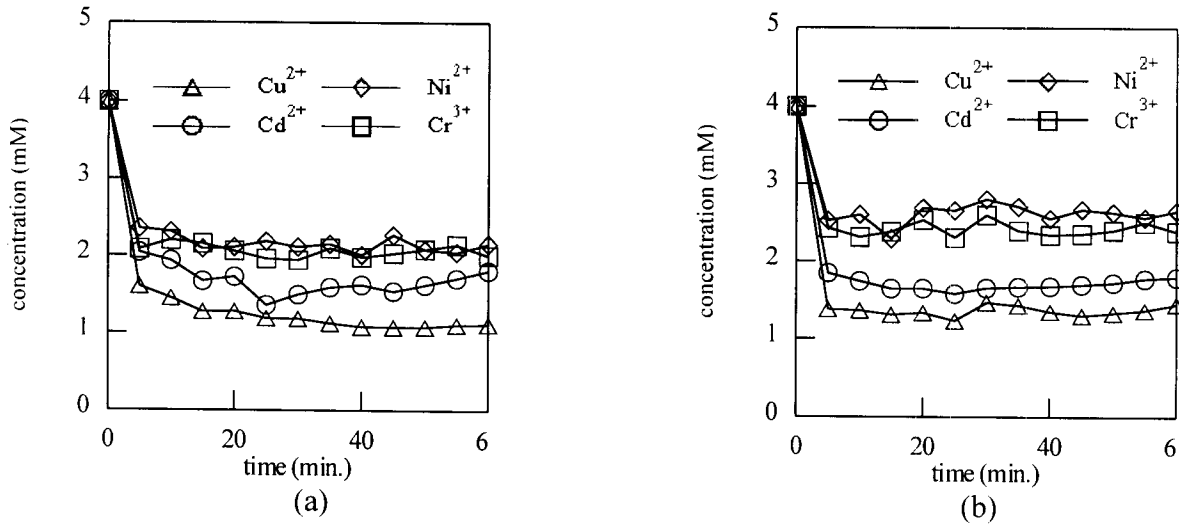
其中 Q_e 為達平衡時之吸附量 [mmole/g]， Q_0 為單層吸附之飽和吸附量 [mmole/g]， K 為平衡常數 [mM^{-1}]， C_e 為平衡濃度 [mM]。

表一列出 *S. hassjoo* 懸浮細胞及毛狀根對不同金屬之 Langmuir 飽和吸附量以及一些其他生物吸附劑的結果，由此結果顯示 *S. hassjoo* 懸浮細胞比毛狀根有較高的吸附量，而比較其對不同金屬的吸附結果，銅、鎘的吸附量較鉻及鎳高，另外比較幾丁質、幾丁聚醣及煙草之根對銅的吸附結果，顯示幾丁聚醣有相當高的吸附量，約為 *S. hassjoo* 細胞之 4 倍。

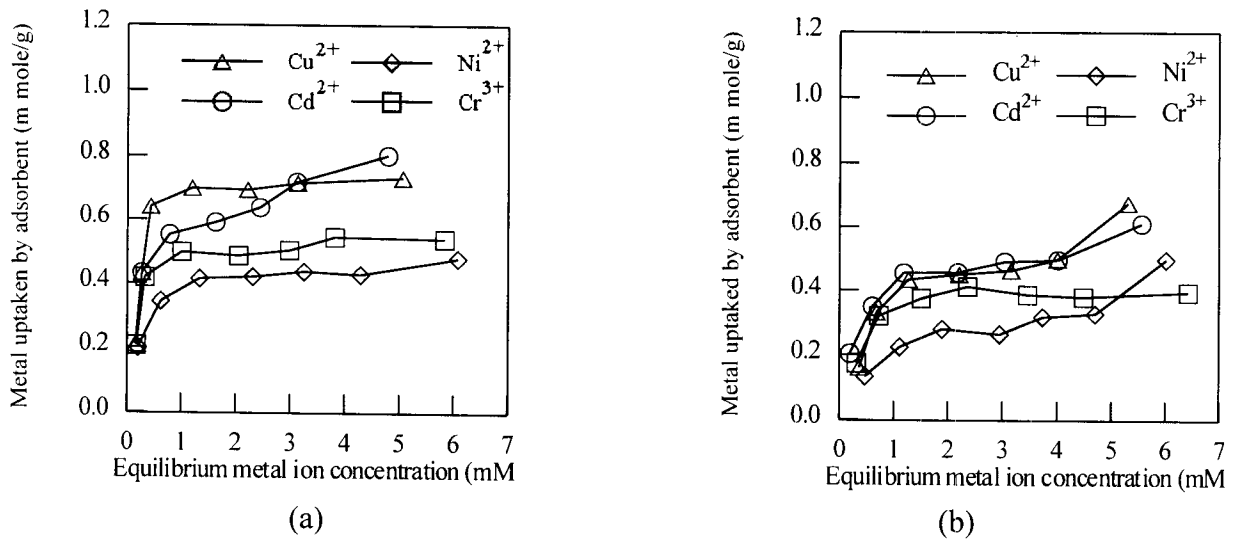
五、參考文獻

- [1] Macaskei, L.E. (1990) An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J.Chem.Tech.Biotechnol.* 49, 357-379
- [2] 王西華, 蔡珊珊 (1989) 重金屬與微生物之關係 *中華民國環境保護學會會誌* 12, 21-37
- [3] Jang, L.K. et al. (1991) Recovery of copper and cobalt by biopolymer gels. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 266-273
- [4] Fogarty, R.V. and J.M. Tobin, (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 311-317
- [5] Froncisz, W., T Sarna, and J.S. Hyde (1980) Cu^{2+} probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance spectroscopy. I. Synthetic melanins. *Arch. Biochem Biophys.* 202, 289-303
- [6] Huang, S.Y., L.S. Sung, and S.Y. Chen, (1996) Transgenesis of *Stizolobium hassjoo* by Riplasmid and Its Effect on the Production of L-DOPA. *Proceedings of the 5th World Congress of Chemical Engineering, Vol II*, 365-370, San Diego, USA (Aug. 1996).
- [7] 吳國隆 (1992) 由 *Stizolobium hassjoo* 植物細胞培養生產二次代謝產物 L-DOPA 之研究。國立台灣大學化工所碩士論文。
- [8] Huang, S.Y., S.Y. Chen, K.L. Wu and W.T. Taung (1995) Strategy for Inducing Pertinent cell Line and Optimization of the Medium for *Stizolobium hassjoo* Producing L-DOPA. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 342-347

六、圖表



圖一 *S. hassjoo* 懸浮細胞及毛狀根吸附金屬濃度隨時間變化情形
(a)懸浮細胞(b)毛狀根



圖二 *S. hassjoo* 懸浮細胞及毛狀根在 25°C 時對幾種不同金屬之吸附平衡曲線(a)懸浮細胞(b)毛狀根

表一 *S. hassjoo* 懸浮細胞及毛狀根對不同金屬之 Langmuir 吸附等溫線參數

	Q ₀ [mmole/g]				K[mM ⁻¹]			
	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Ni ²⁺	Cr ³⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Ni ²⁺	Cr ³⁺
<i>S. hassjoo</i> 懸浮細胞	0.76	0.85	0.45	0.56	4.56	4.57	5.21	4.80
<i>S. hassjoo</i> 毛狀根	0.59	0.56	0.37	0.43	1.52	2.93	1.18	2.86
幾丁質	0.26				2.02			
幾丁聚醣	2.91				2.19			
煙草根	0.26				1.82			