

微生物轉換甘蔗汁以生產聚醣及聚酯化合物

吳芳禎¹ 李偉碩² 施英隆^{2*}

¹大葉大學食品暨應用生物科技學系

^{2*}大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*ils@mail.dyu.edu.tw

摘要

近幾年來由於全球暖化、環保意識抬頭、化石燃料之即將用罄與原油價格日漸提升，使得尋找經濟、有效、能永續之替代能源與可再生利用之生質原料以取代傳統石化原料已是追求永續發展之重要課題。以微生物發酵生成之高分子具功能性、生物相容與生物可分解性，是一種非石化資源相關之再生材料（生態材料），因此近年來極受重視並已於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用。結合生質精煉技術與再生性生質原料為基礎以開發生物高分子材料不但可解決環境問題，同時可生產高經濟價值之產品，如此對環境友善之綠色製程，值得開發。本研究探討以甘蔗汁為基質並以納豆菌（*Bacillus subtilis natto*）進行發酵生產菌果聚醣，探討氮源、初始 pH 值、溫度、轉速對其生產菌果聚醣之影響，並找出最佳生產條件。結果發現納豆菌可有效利用甘蔗汁生產菌果聚醣。納豆菌以 NB 培養基活化後，於不額外添加氮源之甘蔗汁培養基，轉速 175 rpm，溫度 37°C、初始 pH 6.5 進行搖瓶培養 48 h，結果顯示菌果聚醣之產量可高達 18.0 g/L（26%，以蔗糖消耗計）。發酵液經過濾膜濃縮後可得純化之菌果聚醣，而其過濾液中含葡萄糖（約 55 g/L）與果糖（約 40 g/L）。以過濾液作為 *Cupriavidus necator* 生產聚酯化合物之碳源並探討初始 pH 值、溫度、轉速對其生產 PHA 之影響，以尋找出最佳生產條件。結果發現 *C. necator* 以 NB 培養基活化後，於含碳源之過濾液培養基，轉速 200 rpm，溫度 30°C、初始 pH 7.0 進行搖瓶培養 48 h，結果顯示可得菌體生質量 12.02 g/L，PHA 濃度為 1.60 g/L，PHA 含量為 13.30 wt%。

關鍵詞：甘蔗汁，菌果聚醣，聚羥基烷基酯

Microbial Conversion of Sugarcane Juice for the Production of Polyfructan and Polyester

FANG-CHEN WU¹, WE-SOE LI² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Food and Applied Biotechnology, Da-Yeh University

^{2*}Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw



ABSTRACT

As fossil fuel supplies dwindle and environmental awareness rises, the biorefinery process has emerged as the most promising method for the production of alternatives to fossil fuels and traditional, oil-based chemicals. In particular, the microbial conversion of biomass for biopolymer production is attractive because of the substantial demand for degradable biopolymers and wide availability of renewable biomass feedstock. Microbial biopolymers are biodegradable, edible, biocompatible, and nontoxic for humans and the environment; they do not rely on oil resources; and their applications are versatile, safe, and environmentally friendly. Microbial biopolymers offer a variety of industrial applications in the fields of cosmetics, foods, pharmaceuticals, and the environment. The purpose of this study is to investigate the feasibility of a tandem production of two invaluable biopolymers, levan and polyhydroxyalkanoates (PHA), by using microbial fermentation with sugarcane juice as a feedstock. In the first section of the study, factors affecting levan production by fermentation of *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi in a medium containing sugarcane juice were studied. The highest yield of levan production (18.0 g/L at 24 h; 26.0% by sucrose consumption) was obtained when the bacteria were cultured in a medium containing sugarcane juice (with 78 g/L sucrose) at a pH of 6.5, temperature of 37°C, and agitation speed of 175 rpm. The fermentation broth was concentrated using ultrafiltration membranes. The levan was harvested from the concentrate through precipitation by adding 4 volumes of cold ethanol; the filtrate containing glucose (~55 g/L) and fructose (~40 g/L) was proven to be a suitable substrate for the production of PHA by *Cupriavidus necator*. In the second section of the study, the factors affecting PHA production by fermentation of *C. necator* in a medium containing waste filtrate from levan fermentation were studied. The highest yield of PHA production (1.60 g/L; 13.30 wt%) was obtained when the bacteria were cultured in the medium for 48 h at a pH of 7.0, temperature of 30°C, and agitation speed of 200 rpm.

Keywords: Sugarcane juice, Levan, Polyhydroxyalkanoates

一、前言

近幾年來由於全球暖化、環保意識抬頭、化石燃料之即將用罄與原油價格日漸提升，使得尋找經濟、有效、能永續之替代能源與可再生利用之生質原料以取代傳統石化原料以為因應，已是追求永續發展與永續經濟之重要課題 [8, 15, 23]。以微生物發酵生成之高分子具功能性、生物相容與生物可分解性，是一種非石化資源相關之再生材料（生態材料），這些材料之使用對人體是無害且不會對環境造成污染，因此近年來極受重視。已知其可用於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用 [1, 19, 20]。生物質是一種重要的再生資源，有取之不盡、用之不竭的特性。由於作物的生長可以吸收二氧化碳，減少溫室氣體的累積，且所使用材料多為廢棄物，可降低對環境之衝擊。結合生質精煉技術與再生性生質原料為基礎以開發生物高分子材料不但可以解決環境問題，同時可生產高經濟價值之產品，如此對環境友善之綠色製程，值得開發 [2, 6, 9-13, 22]。因此本研究擬建立以甘

蔗為原料並透過生質精煉與發酵過程生產包括聚醣類與聚羥基烷基酯類之生態材料。如此之永續綠色化學程序將可促使化學產業革新，同時不但可解決石化原料短缺及環境問題，又可生產高經濟價值之生化產品，是經濟與環保雙贏之科技，有極高之學術與工業價值。

菌果聚糖 (Levan) 是一類含有大量 β -(2,6)-果糖苷鍵主鏈和少量 β -(2,1)-果糖苷鍵支鏈的天然果糖聚合物，它可由很多微生物生產且釋放於培養基中之胞外天然性高分子聚合物。菌果聚糖具有水溶、可食及生物可分解等特性且其本身或分解之產物對人體無害，因此，近年來已有開發菌果聚糖及其衍生物於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用 [1, 3, 21]，尤其菌果聚糖具有抗腫瘤、抗糖尿病、免疫增強、降血脂等重要的生物活性，在醫藥和保健食品方面具有很大的應用潛力。其他潛在應用包括可作為乳化劑、配方助劑、穩定劑、增稠劑、表面處理劑、包覆劑和香料和香水的載體 [3, 21]。菌果聚糖 (Levan) 可藉由以蔗糖為基質，



通過各種微生物之果聚醣蔗糖酶 (β -2,6果聚醣:D-葡萄糖-果糖基轉移酶, EC 2.4.1.10) 催化進行轉果醣基反應而形成 [12, 21]。

聚羥基烷基酯類 (Poly-hydroxyalkanoate, PHA) 為微生物胞內能量之儲存物。由於微生物生產之PHA為具有生物相容性與生物可分解性之耐熱塑膠與彈性物質, 因此具有良好之物理特性, 可作為永續發展之綠色材料用途。事實上, 環境中許多微生物具有PHA合成能力, 當給予過量碳源與限制某些營養成分時 (例如: 氮、磷、硫、氧及鎂) 即可刺激微生物生產PHA。以微生物生產PHA, 除了蔗糖、甲醇、乙酸可為碳源外, 葡萄糖是最為有效且常用之碳源。能經濟有效的量產PHA, 碳源之成本扮演一個重要角色, 能發展以最便宜之碳源, 並經有效發酵程序轉換成PHA產品至為重要。因此利用廢棄生質為原料生產PHA, 除可降低處理成本亦可生產高附加價值產品 [10]。廢棄生質如廢棄糖蜜、馬鈴薯澱粉廢液、纖維素或廢棄纖維素廢料及以甘油廢料皆有被用於生產PHA[6, 10, 16-18, 22], 但成效尚不明顯。

本實驗室曾以蔗糖為基質, 並有效的利用 *Bacillus subtilis natto* 發酵生產菌果聚醣 (Levan) [21], 甘蔗汁含高濃度蔗糖, 應可為生產levan之有效基質, 因此本研究第一部分主要探討以納豆菌發酵甘蔗汁以生產菌果聚醣 (Levan) 之最適培養條件, 以期得到高產量之菌果聚醣; 探討培養基之起始pH、溫度、及攪動速率等因素對菌體生長及菌果聚醣產量之影響。另外, 發酵液中菌果聚醣產物與副產物葡萄糖分離純化亦將一並探討。第二部分將利用生產菌果聚醣之發酵廢液 (含葡萄糖) 為原料, 探討以 *Cupriavidus necator* 菌株發酵生產PHA之培養方法及培養條件。

二、研究方法及步驟

(一) 菌種:

本研究第一部份所使用於生產菌果聚醣 (Levan) 之菌株為 *Bacillus subtilis natto*, 此菌株可自日本高橋祐藏研究所購得, 第二部份所用於生產聚羥基烷基酯類 (PHA) 之菌株為 *Cupriavidus necator* BCRC17389, 可由生物資源保存及研究中心購得。甘蔗汁取自台灣彰化員林市場, 品種為台灣埔里地方種。

(二) 培養基與培養方法:

第一部份生產菌果聚醣, 係將 *B. subtilis natto* 菌粉加入含 5 mL NB 培養基 (牛肉萃取物 3 g/L、蛋白胨 5 g/L) 之試

管, 在 175 rpm、37°C 培養 24 小時進行第一次活化。將此含菌體的培養基加入含 95 mL NB 培養基之 250 mL 三角錐形瓶中, 在 175 rpm、37°C 培養 24 小時進行第二次活化。將活化的菌液以 10% (v/v) 轉接於 250 mL 錐形瓶, 瓶內含蔗汁的生產培養基 100 mL, 生產培養基含甘蔗汁 100mL、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3g/L, 此培養基在初始 pH6.5、37°C、175 rpm 轉速下培養 48 小時。第二部份生產聚羥基烷基酯類, 係將菌粉加入含 5 mL NB 培養基之試管中, 在 200 rpm、30°C 培養 24 小時進行第一次活化後, 將此含菌體的培養基加入含 95 mL NB 培養基之 250 mL 三角錐形瓶中, 培養基在 100 rpm、30°C 培養 12~15 小時進行第二次活化。將活化完成之菌液 10% (v/v) 轉接至 250 mL 錐形瓶, 瓶內置 Levan 發酵液之過濾液 100 mL (含 Glucose 55 g/L、Fructose 40 g/L 並添加 KH_2PO_4 2.8 g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.32 g/L、urea 0.54 g/L) 的生產培養基。培養基在初始 pH7、30°C、200 rpm 轉速之條件下培養 48 小時。培養期間以下述分析法分析果聚醣、蔗糖、葡萄糖、果糖的濃度 (g/L) 變化。所得果聚醣之產率 (以%表示) 係為所得果聚醣濃度除以蔗糖所消耗之濃度。

(三) 醣類分析

本實驗採用高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分析法。先將試樣以 0.45 μ m 過濾膜過濾後, 注入 HPLC 分析, HPLC 分析裝置使用之管柱為 SUGAR KS-802 column (L=300mm, ID=8.0 mm, particle size=5 μ m), 偵測器為 RI Detector (Bischoff 8020, Germany), 幫浦使用 HITACHI L-2130, 每次試樣的注射量 (Injection volume) 為 20 μ l, 以去離子水做為沖提液 (mobile phase), 在流速 (Flow rate) 0.5 ml/min、溫度 (Temperature) 50°C 下分析果聚醣、蔗糖、葡萄糖、果糖的變化 [3, 21]。

(四) Levan 之分離純化

本實驗室採用實驗型分離膜系統進行 Levan 之分離純化, 實驗型分離膜系統為一種掃流式 (cross flow) 分離膜設備, 使用之分離膜為 5、300kDa 之陶瓷膜 (Tami, 10 mm x 600 mm 管柱)。操作時, 以循環幫浦將原料液在系統內循環, 以適當的流速流經膜面, 且在膜面造成掃流作用, 以降低堵塞物質在膜面的堆積。當原料液流經膜面時, 較小分子物質會穿透膜面, 而無法穿過膜面的大分子物質會留在原料液中。經數次循環後原料液被分為兩種液體, 即為含有大分



子物質的濃縮液與含有小分子物質過濾液。運用此系統可將 *B. subtilis natto* 生產之 Levan 與其他醣類加以分離，將培養 48 小時後之發酵液以超高速冷凍離心機分離菌體及雜質，上清液即可利用實驗型分離膜系統分離出 Levan。*B. subtilis natto* 菌株產出的 Levan 有兩種不同型態分子量群，分別為高分子量群(分子量介於 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ Da 之間)與低分子量群(分子量介於 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ Da 之間)。本實驗使用 5、300kDa 兩種分離膜來分離出高分子量群、低分子量群以及低於 5kDa 的其他分子。含高、低分子量 Levan 之濃縮液加入 4 倍體積之冷凍酒精並於 4°C 下靜置 24 小時，再以離心機分離酒精與沉澱物，將沉澱物以去離子水回溶後經冷凍乾燥機凍乾，即可得純化之高、低分子量 Levan。

(五) PHA 分析

將培養完畢後之發酵液以離心機在 4°C、10000 rpm 下離心並去除上清液。每次離心為 50 ml，將除去上清液之菌體靜置於恆溫烘箱，在 60°C 烘乾，烘乾後之菌體以 50 ml 次氯酸鈉浸泡並靜置於 37°C 培養箱 1~2 小時。靜置後之混合液以離心機在 4°C、10000 rpm 下離心、去除上清液並保留固體顆粒，將收集的固體顆粒以 50 ml 之去離子水清洗兩次後以離心機在 4°C、10000 rpm 下離心並去除上清液，再以丙酮與乙醚(比例為 1:1)清洗兩次並離心，最後將顆

粒溶於氯仿中以減壓濃縮機濃縮並將氯仿加熱至沸騰，濃縮所得顆粒靜置風乾後可得 PHA 粉末。將 PHA 粉末秤取 0.001g 溶於 10 mL 濃硫酸中，加熱至 100°C 並持續 10 分鐘，當呈現棕色後冷卻。利用分光光度計在波長 260 nm 量測，並以濃硫酸作為空白試劑。PHA 之濃度可對照 PHA 標準品之檢量線求出，所得數據再換算成發酵液中 PHA 之濃度。

三、結果與討論

(一) 不同搖瓶速度對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

本實驗室曾以 250 g/L 蔗糖為基質，利用 *B. subtilis natto* 發酵生產 Levan，並以 50 rpm、100 rpm、175 rpm、250 rpm 搖瓶速度進行培養實驗，發現在轉速為 50 rpm 及 250 rpm 的條件下，菌體生長速度較快，但 Levan 生產速度較慢，須到 40 小時後產量才會到達 50-60 g/L。當轉速為 175 rpm 下，Levan 產量在 24 小時時達到穩定，產量約為 50-60 g/L，在 Levan 生產時間上相較於在其他轉速下之生產時間短[21]。本實驗探討 *B. subtilis natto* 在含蔗汁(蔗糖濃度為 78 g/L)的培養基中，不同搖瓶速度下生產 Levan 之影響，培養基在初始 pH 值 6.5、37°C 條件下培養 48 小時，培養期間 pH 值、菌體生長、Levan 生產與各種糖類的消長情形如圖 1。結果

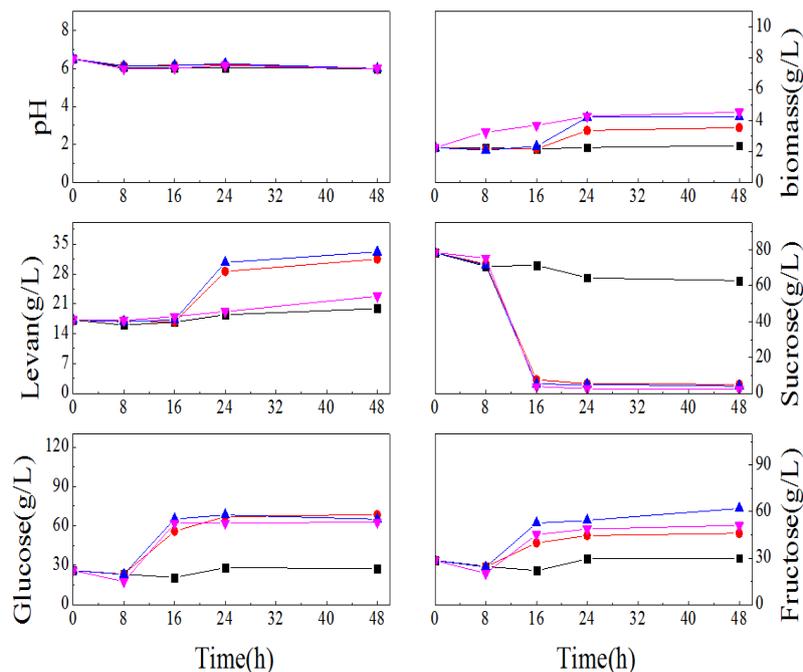


圖 1. 不同搖瓶速度對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響
轉速 (rpm): (■) 0; (●) 150; (▲) 175; (▼) 200



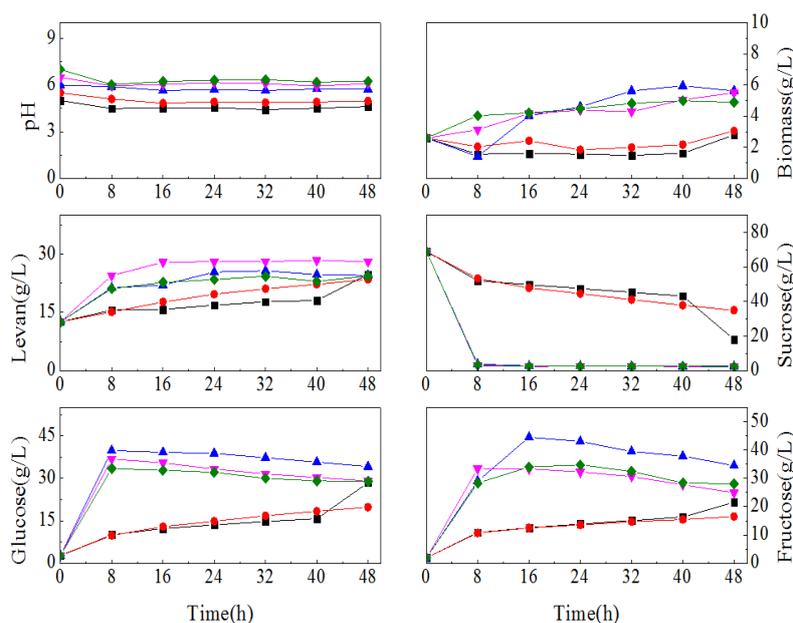


圖 2. 不同 pH 值對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

pH 值：5 (■)；5.5 (●)；6 (▲)；6.5 (▼)；7 (◆)

顯示當在靜置培養 (0 rpm) 48 小時，菌體幾乎不會生長，生產 Levan 所需消耗之蔗糖也僅減少 14 g/L，Levan 產量相對較低。*B. subtilis natto* 在 200 rpm 下培養 48 小時後，其菌體產量最多，蔗糖的消耗量與其它在不同轉速下培養的情況相同，但生產 Levan 的速度明顯較為緩慢。在 150 rpm、175 rpm 條件下，培養 24 小時後，Levan 的生產皆達到穩定狀態，此時蔗汁中的蔗糖幾乎已經消耗完，但在 175 rpm 條件下培養所得到的 Levan 為 16 g/L 較 150 rpm 條件下培養所得到之 Levan 14 g/L 高，故 175 rpm 為 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之最合適搖瓶速度，並以此速度進行後續之實驗。

(二) 不同 pH 值對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

由文獻可得知 *B. subtilis natto* 在 pH 偏中性時較能進行 Levan 的合成 [3]，若 pH 值偏低 (<5) 或偏高 (>8) 時其 Levan 產量會降低，甚至不會生產。當 *B. subtilis natto* 以蔗糖為基質生產 Levan 時，在蔗糖濃度為 250 g/L，搖瓶培養速度 175 rpm，溫度 37°C，而 pH 在 6 與 7 時相較，兩者 Levan 產量在 24 小時後皆達到穩定狀態，但在 pH 7 時可以得到最大產量為 60 g/L (28%，以蔗糖消耗計)，與 pH 6 的 50 g/L (23%，以蔗糖消耗計) 相比較，pH7 有利於 Levan 的生產 [21]。本實驗探討 *B. subtilis natto* 在含蔗汁 (蔗糖濃度為 69 g/L) 的培養基中，不同初始 pH 對生產 Levan 之影響，培

養基在 37°C、175 rpm 條件下培養 48 小時，培養期間 Levan 生產，pH 值、菌體生長與各種糖類的消長情形如圖 2。結果發現初始 pH 值在 5 與 5.5 時，菌體生長較為緩慢，Levan 產量也較少。當初始 pH 為 6、6.5、7 時，菌體生長速度、蔗糖消耗速度與 Levan 之產量相當接近。但在初始 pH 值 6.5 的條件下，Levan 產量為 16 g/L (28%，以蔗糖消耗計) 為最高，因此初始 pH 6.5 為 *B. subtilis natto* 以蔗糖為基質生產 Levan 時的較適 pH 值，並以此 pH 值進行後續之實驗。

(三) 不同溫度對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

本實驗室曾以 250 g/L 蔗糖為基質利用 *B. subtilis natto* 發酵生產 Levan，在 20°C、25°C、37°C、50°C 培養時發現在 20°C 條件下蔗糖的消耗、菌體的成長及 Levan 的產量皆沒有太大變化，在 37°C 條件下 Levan 的產量則高於其他溫度條件下之產量，最高可以達到 60 g/L (28%，以蔗糖消耗計) [3, 21]。本實驗探討 *B. subtilis natto* 在含蔗汁 (蔗糖濃度為 69 g/L) 的培養基中，不同溫度對生產 Levan 時之影響，培養基在初始 pH 6.5、175 rpm 條件下培養 48 小時，在培養期間之 pH 值、菌體生長、Levan 之生產與各種糖類的消長情形如圖 3。結果發現菌體在 40°C 下生長較多，且蔗糖消耗也較快，培養 48 小時後，Levan 生產已接近平穩狀態，但溫度為 37°C 之條件下 Levan 產量為最高 18 g/L (26%，以蔗糖消耗計)，而溫度為 30°C、40°C 條件時產量約為 14 g/L，故



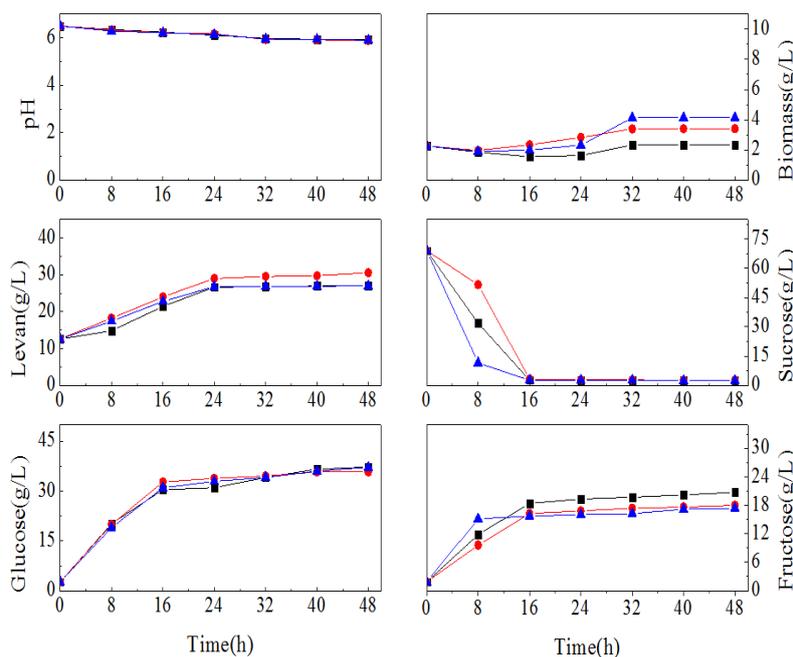


圖 3. 不同溫度對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響
培養溫度 (°C): 30 (■); 37 (●); 40 (▲)

37°C 為 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之較適溫度。

(四) 不同氮源種類對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

本實驗室曾探討添加氮源對 *B. subtilis natto* 在含蔗糖的培養基中生產 Levan 的影響，發現添加氮源並不會增加 Levan 產量 [3]。為探討添加氮源之影響，本實驗先以 NB 培養基將 *B. subtilis natto* 二次活化後，取 10% 菌液接種於含甘蔗汁之生產培養基，其中添加氮源分別為 Yeast Extract、Beef Extract、Peptone、 NaNO_3 、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 g/L)，轉速依前述實驗定於 175 rpm，並進行搖瓶培養 48 小時，在培養期間之 pH 值、菌體生長、Levan 之生產與各種糖類的消長情形如圖 4。結果發現，當加入有機氮源時，菌體生長情況較為佳，其中添加 Yeast Extract 與 Beef Extract 的培養基在培養 48 小時後，Levan 產量呈平穩狀態，分別達到 10 g/L 與 12 g/L。在添加 Peptone 的培養基中，Levan 產量最高則只有 5 g/L，而大部份蔗糖皆被水解。加入無機氮源的培養基，菌體幾乎不生長，蔗糖僅消耗 10-15 g/L，Levan 產量也只有 1-2 g/L。由上述結果可得知，*B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 時，添加氮源無助於增加 Levan 的產量，故以後實驗選擇不額外添加氮源

於生產培養基。生產培養時所需之氮源，將只利用活化菌株時所使用之氮源來提供。

(五) Levan 之純化

將上述在最適條件下培養 48 小時後之發酵液 1 L，以實驗型分離膜系統進行分離，分離出大、小分子量的 Levan 及過濾液，流程如圖 5 所示。發酵液經離心後，先通過 300k Da 管柱掃流後，所得濃縮液含高分子量 Levan (分子量介於 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ Da 之間)，而所得過濾液再通過 5k Da 管柱掃流後，所得濃縮液含低分子量 Levan (分子量介於 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ Da 之間)，而所得過濾液則含葡萄糖 55 g/L 與果糖 40 g/L。分別將含高、低分子量 Levan 之濃縮液加入 200 ml 與 400 ml 體積之冷凍酒精，在 4°C 下靜置 24 小時後，以冷凍離心機在 4°C，10000 rpm 離心，沉澱物經去離子水回溶後冷凍乾燥，即分別可得高、低分子量之 Levan。由於 Levan 純化後剩下的分離液含有高濃度的單醣，適合用來做為生產高分子聚酯之原料。故本研究之第二部份將利用生產 Levan 之過濾廢液為基質以發酵生產 PHA。

(六) 以生產 Levan 之過濾液為基質在不同溫度下生產 PHA 之影響

由上述 Levan 生產之發酵液，經超過濾膜過濾後，過濾液含高含量之單醣 (葡萄糖 55 g/L、果糖 40 g/L)，因此利



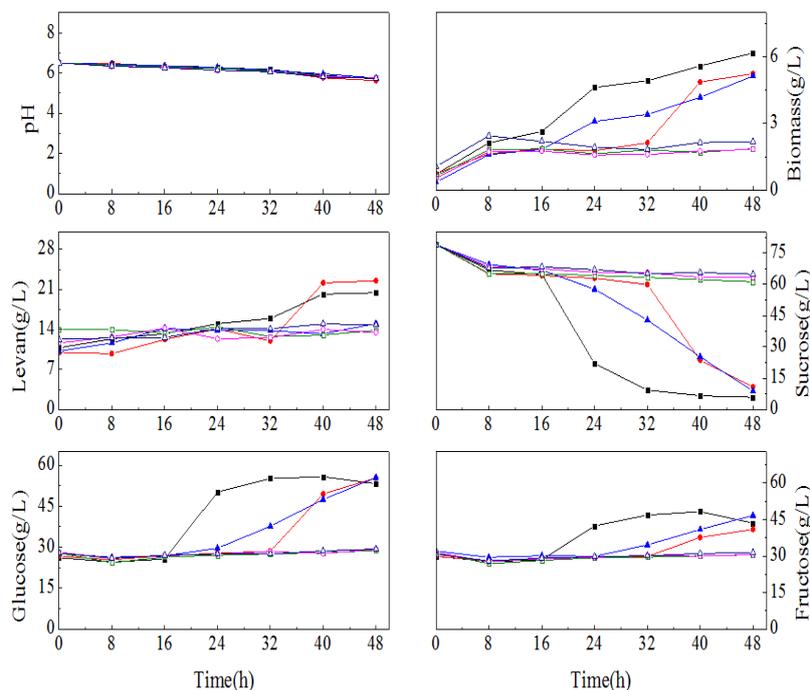


圖 4. 不同氮源種類對 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 之影響

氮源種類：(■) Yeast Extract；(●) Beef Extract；(▲) Peptone；
(□) NaNO_3 ；(○) KNO_3 ；(△) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

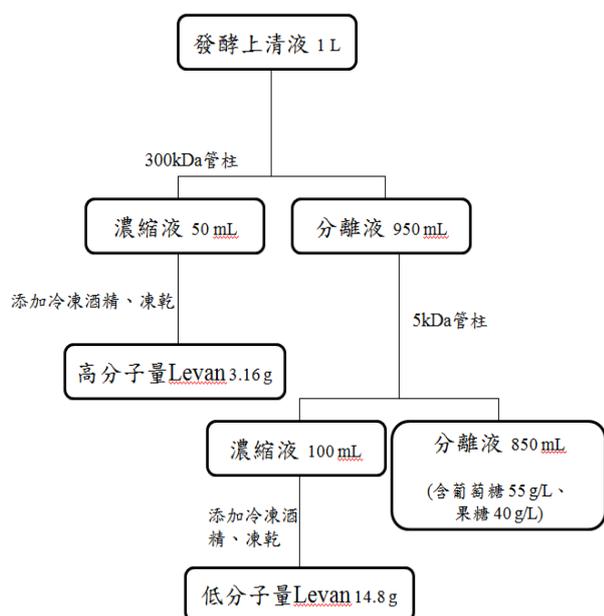


圖 5. Levan 純化所得高、低分子量 Levan 之產量
及分離液中單醣濃度

用此過濾液為基質並添加 2.8 g/L KH_2PO_4 ，3.32 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 及 0.54 g/L 尿素為氮源，並以 *C. necator*

菌株發酵生產 PHA。培養基在 200 rpm、初始 pH 7 及不同溫度 (20°C、30°C、40°C、50°C) 之條件下培養 48 小時後，以分光光度計測量其菌體的生長量，並分析 PHA 產物之產量。結果如表 1 所示，當培養溫度在 30°C 時 PHA 的產量最高達 1.87 g/L，經換算得每 100 g 乾菌含 12.87 g PHA。文獻顯示 *Aeromonas hydrophila* 在溫度 30°C 條件下培養時，PHA 產量最高達 0.9 g/L，PHA 含量達 24% [4]，而 *Pseudomonas fluorescens* 及 *Pseudomonas putida* W619 在 30°C 條件下培養時，PHA 含量最高分別為 32.98% 及 26.8% [7]。多數生產 PHA 之溫度條件結果與本研究結果相似，因此將 30°C 做為後續探討之較適條件。

表 1. 不同溫度對 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 之影響

溫度 (°C)	乾菌重 (g/L)	PHA 濃度 (g/L)	PHA 含量 (wt%)
20	13.24	1.21	9.14
30	14.56	1.87	12.87
40	13.05	1.23	9.45
50	11.23	1.17	10.37



(七)以生產Levan之過濾液為基質在不同pH值下生產PHA之影響

本實驗探討培養基初始 pH 值對 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 之影響。發酵過濾液如前述添加 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 及尿素後調整 pH 值為 6、6.5、7、7.5 及 8，並加入菌株 *C. necator*。培養基在 200 rpm、30°C 條件下培養 48 小時。結果如表 2 所示，結果發現在初始 pH 值為 7 時 PHA 產量最高，可達 1.60 g/L，其菌體乾重為 12.02 g/L，換算得每 100 g 乾菌含 13.30 g 之 PHA。因此初始 pH 7 為後續以 Levan 發酵過濾液生產 PHA 時的最適合 pH 值。文獻顯示，當使用 *Hydrogenophaga palleronii* 菌株生產 PHA 時，在 pH 7 條件下生產 PHA，最高濃度為 16.79 g/L，PHA 含量可達 68% [17]，使用 *Pseudomonas pseudoflava* 菌株在 pH 7 條件下生產 PHA，最高濃度為 20 g/L，PHA 含量最高達 62% [18]。*C. necator* 使用廢甘油為基質生產 PHA 時，在 pH 7 條件下，PHA 最高濃度為 51.2 g/L，PHA 含量可達 62% [6]。以本研究之相同菌株 (*C. necator*) 並使用消化過濾液為基質生產 PHA 時，在 pH 7 條件下，PHA 濃度最高為 12 g/L，PHA 含量為 14% [16]。多數使用 *C. necator* 菌株做為生產 PHA 菌株之研究皆發現 pH 7 為最適之條件，此結果與本研究結果相似。

(八)以生產Levan之過濾液為基質在不同轉速下生產PHA之影響

本實驗探討轉速對 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 之影響。培養基之製備如前述，培養基在不同搖瓶速度 (0、50、100、150、200 rpm)，初始 pH 7 及 30°C 條件下培養 48 小時，結果如表 3 所示。結果發現在搖瓶培養速度為 200 rpm 時 PHA 產量最高達 1.76 g/L，其菌體乾重為 13.41 g/L，經換算得每 100 g 乾菌含 13.13 g 之 PHA。因此搖瓶培養速度 200 rpm 為 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 時的最適合搖瓶培養速度。文獻顯示，菌株 *C. necator* 使用褐藻為基質生產 PHA 時，在 200 rpm 條件下，PHA 產量可達 3.93 g/L，PHA 含量為 74% [5]，以本研究相同菌株 (*C. necator*) 並使用棕櫚油精和果糖的混合物為基質生產 PHA 時，在 200 rpm 條件下 PHA 最高濃度為 5.13 g/L，PHA 含量可達 67% [14]。使用 *C. necator* 做為生產 PHA 菌株之研究發現搖瓶培養速度在 150~200 rpm 皆有較佳的 PHA 產量，此結果與本研究結果相似。

表 2. 不同 pH 值對 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 之影響

pH 值	乾菌重 (g/L)	PHA 濃度 (g/L)	PHA 含量 (wt%)
6	10.18	1.22	11.98
6.5	10.97	1.37	12.45
7	12.02	1.60	13.30
7.5	10.36	1.31	12.50
8	10.03	1.02	10.15

表 3. 不同轉速對 *C. necator* 使用 Levan 發酵過濾液生產 PHA 之影響

轉速 (rpm)	乾菌重 (g/L)	PHA 濃度 (g/L)	PHA 含量 (wt%)
0	1.20	0.02	1.37
50	2.76	0.06	2.12
100	4.52	0.48	10.69
150	12.94	1.64	12.66
200	13.41	1.76	13.13

四、結論

本研究已成功的利用甘蔗生質 (甘蔗汁) 經連續發酵生產兩種經濟價值高且安全、生物可分解之菌果聚糖 (levan) 及聚羥基烷基酯類 (PHA)。實驗結果發現 *B. subtilis natto* 在含蔗汁的培養基中生產 Levan 時，最適合條件為不添加氮源、轉速 175 rpm、初始 pH 6.5、溫度 37°C 培養 48 小時，菌果聚糖產量最高為 18.0 g/L (26%，以蔗糖消耗計)。將發酵液經超過濾膜濃縮後可得純化之菌果聚糖，而其過濾液中含大量葡萄糖與果糖，經以 *C. necator* 菌株在 200 rpm、初始 pH 7、30°C 培養 48 小時，結果顯示可得菌體生質 12.02 g/L，PHA 濃度為 1.60 g/L，PHA 含量為 13.30 wt%。結合生質精煉技術與再生性生質原料為基礎以開發生物高分子材料不但可解決環境問題，同時可生產高經濟價值之產品。所生產之生物高分子化合物於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用廣因此具有產業商品開發之潛力。

參考文獻

1. 施英隆 (民 95)，微生物生產生物高分子及其應用，化學，64(1)，105-118。
2. 張光偉 (民 102)，從綠色材料到藍色革命，工業材料雜誌，323，70。
3. 廖國森 (民 96)，納豆菌生產果糖聚合物之研究，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。



4. 顏嘉儀、余秉樺、陳博彥、魏毓宏 (民 99), 本土染料脫色菌生產聚羥基酯類之可行性評估, 中國鑛冶工程學會會刊, 212, 147-156。
5. Azizia, N., G. Najafpoura and H. Younesi (2017) Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxy-butyrates (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 101, 1029-1040.
6. Cavalheiro, J. M. B. T., M. C. M. D. De Almeida, C. Grandfils, and M. M. R. Da Fonseca (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509-515.
7. Davis, R., R. Kataria, F. Cerrone, T. Woods, S. Kenny, A. O'Donovan, M. Guzik, H. Shaikh, G. Duane, V.K. Gupta, M. G. Tuohy, R. B. Padamatti, E. Casey and K. E. O'Connor (2013) Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150, 202-209.
8. De Jong, E., A. Higson, P. Walsh and M. Wellisch (2012) Product developments in the bio-based chemicals arena. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 6(6), 606-624.
9. De Oliveira, M. R., R. S. S. F. Da Silva, J. B. Buzato and M. A. P. C. Celligoi (2007) Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2), 177-183.
10. Du, C., J. Sabirova, W. Soetaert, C. Ki and S. Lin (2012) Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14-25.
11. Gobina, E. (2013). Biorefinery Technologies: Global Markets. BCC Research report EGY054B, ISBN: 1-56965-626-6. See more at: <http://www.bccresearch.com/market-research/energy-and-resources/biorefinery-global-markets-egy054b.html>
12. Han, Y. W. and M. A. Watson (1992) Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3), 257-260.
13. Koller, M., R. Bona, G. Braunegg, C. Hermann, P. Horvat, M. Kroutil, J. Martinz, J. Neto, L. Pereira and P. Varila (2005) Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), 561-565.
14. Murugan, P., C. Y. Gan and K. Sudesh (2017) Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) with improved molecular weights from a mixture of palm olein and fructose by *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113. *International Journal of Biological Macromolecules*. 102, 1112-1119.
15. Nigam, P. S. and A. Singh (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. 37(1), 52-68.
16. Passanha P, S. R. Esteves, G. Kedia, R. M. Dinsdale and A. J. Guwy (2013) Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology*, 147, 345-352.
17. Reddy M. V., Y. Mawatari, Y. Yajima, K. Satoh, S. V. Mohan and Y. C. Chang (2016) Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*. *Bioresource Technology*, 215, 155-162.
18. Reddy M. V., Y. Mawatari, R. Onodera, Y. Nakamura, Y. Yajima and Y.C. Chang (2017) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas pseudoflava*: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii*. *Bioresource Technology*, 234, 99-105.
19. Shih, I. L., M. H. Shen and Y. T. Van (2006) Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 97(9), 1148-1159.
20. Shih, I. L. and Y. T. Van (2001) The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, 79(3), 207-225.
21. Shih I. L., Y. T. Yu, C. J. Shieh and C. Y. Hsieh (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(21), 8211-8215.
22. Silva, L., M. Taciro, R. M. Michelin, J. Carter, J. Pradella and J. Gomez (2004) Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 245-254.
23. Werpy T and G. Petersen, Ed. (2004) *Top Value Added*



*Chemicals From Biomass. Volume I: Results of Screening
for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas.*
(The US DOE Office of Energy Efficiency and Renewable

Energy). Oak Ridge, TN.

收件：107.09.04 修正：107.11.21 接受：107.12.18

