

聚乙烯醇－海藻酸鈉包埋固定納豆菌以生產菌果聚醣

吳芳禎¹ 李俊緯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

本研究以聚乙烯醇及海藻酸鈉進行 *Bacillus subtilis natto* 之固定化，以回應曲面實驗設計法探討固定化之最佳條件，所得之固定化菌體可用於以批次式及連續式發酵生產菌果聚醣 (Levan)。結果顯示當顆粒製作之最適條件為攪拌時間 2.45 h，聚乙烯醇 (PVA) 濃度 9.05 g/100 mL，海藻酸鈉 (SA) 濃度 0.91 g/100 mL 時，所得菌體顆粒在 SM 生產培養基培養 30 小時後，菌果聚醣 (Levan) 之最高產量為 79.14 g/L，且固定化菌在培養期間顆粒依舊保持完整無破碎。以一次一因子方式探討固定化菌批次發酵生產菌果聚醣條件，發現當硫酸銨濃度為 2%、蔗糖濃度為 250 g/L、溫度為 37°C、pH 值為 6.5 時，Levan 產量高達 80.63 g/L。經過五個批次生產 Levan 後，固定化菌仍依舊完整無破碎，但 Levan 產量已降低至 5.49 g/L。以連續式發酵探討固定化菌生產菌果聚醣時，發現當硫酸銨濃度為 2%、蔗糖濃度為 250 g/L、曝氣量為 0.02 vvm、pH 值為 6.5 時，Levan 產量在第 30 小時達到最高 63.81 g/L，同時發現進行 208 小時連續式發酵生產 Levan 後，菌體顆粒依舊完整無破碎。連續式生產 Levan 之產量雖不及批次式之產量，但於節約能源、減少人力成本及便於自動化控制均有利於連續式生產。本研究可提供工業化大量生產 Levan 之參考依據，對生物高分子方面之研究具有學術及應用上之價值。

關鍵詞：菌果聚醣，聚乙烯醇，海藻酸鈉，固定化

Immobilization of *Bacillus Subtilis* Natto by using Polyvinyl Alcohol and Sodium Alginate for Levan Production

FANG-CHEN WU¹, JUN WEI LEE² and ING-LUNG SHIH^{2*}

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

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

No. 168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

In this study, immobilization of *Bacillus subtilis natto* was performed using polyvinyl alcohol (PVA) and sodium alginate (SA). The optimal conditions for immobilization were investigated using



response surface methodology. The obtained immobilized cell beads can be used for levan production using batch and continuous fermentation. The optimum conditions for immobilization were a mixing time of 2.45 h, PVA concentration of 9.05 g/100 mL, and SA concentration of 0.91 g/100 mL. The highest yield (79.14 g/L) of levan was obtained when the immobilized cells were cultivated in SM medium for 30 h, and the immobilized cell beads remained intact during cultivation. In levan production using batch fermentation, one-factor-at-the-time was used to investigate the optimal conditions. The result showed that levan production was highest (80.63 g/L) when ammonium sulfate and sucrose concentration were 2% and 250 g/L, respectively, temperature was 37 °C, and pH was 6.5. The obtained immobilized cell beads remained intact after five repetitions; however, levan production decreased significantly to 5.49 g/L. In levan production using continuous fermentation of immobilization cells, levan production was highest (63.81 g/L) when ammonium sulfate concentration was 2%, sucrose concentration was 250 g/L, aeration was 0.02 vvm, and pH was 6.5 at 30 h of fermentation. The obtained immobilized cell beads remained intact after 208 h of continuous fermentation. Levan production using continuous fermentation was less efficient than it was in batch mode; however, it was conducive for continuous production because of energy saving, labor cost reduction, and easy automation control. This study can provide a reference basis for industrial mass production of levan and has academic and application values for research on biopolymers.

Key Words: Levan, Polyvinyl Alcohol, Alginate, Immobilization

一、前言

菌果聚醣 (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 [16-18]，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。菌果聚醣具有水溶、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醣及其衍生物於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用 [4, 21, 26]，尤其菌果聚醣具有抗腫瘤、抗糖尿病、免疫增強、降血脂等重要的生物活性 [23, 34]，在醫藥和保健食品方面具有很大的應用潛力。菌果聚醣 (Levan) 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 [16, 20]。

菌果聚醣 (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) 催化進行轉果聚醣反應而形成 [12, 19, 30]。雖然已經有許多關於菌果聚醣生產的研究報導，但普遍存在產率低和產品受污染的缺點。近年來，研究大多著重在提高微生物生產菌果聚醣的策略 [14-15, 24-26]。我們之前的研究 [6-7, 28-29] 中發現在搖瓶實驗，市售枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis* (natto) Takahashi) 能夠在蔗糖培養基中選擇性地生產果聚醣。與其他各種能生產菌果聚醣的菌株相比，在相同條件下培養，此菌株可在最短時間(21小時)

內產生高產量 (30-50 g/L) 的菌果聚醣 [9-11, 32]。最近我們實驗室亦完成該菌株在發酵槽生產菌果聚醣之探討，也是迄今為止以自由懸浮細胞發酵最有效生產菌果聚醣的報導 [3, 33]。

對於工業應用，將生物催化劑 (例如酶或活細胞) 固定在惰性載體上是非常有吸引力的方法，因為它提供了優於自由懸浮細胞發酵的若干優點，它可以促進產物分離和生物催化劑再利用。此外，活細胞的固定化系統具有使用多酶催化合成複雜生物產物的代謝能力。這種方法可能有助於提高催化活性和延長生物催化劑的催化壽命 [31]。

本實驗室曾探討以固定化納豆菌 (*Bacillus subtilis* natto) 來生產Levan [5, 27]，但是固定化菌易產生顆粒破碎及外表受損之情形。文獻已有報導交聯聚乙炔醇及海藻酸鈉將能獲得彈性佳、柔韌性大及吸水率高之複合材料 [1, 8, 13]，且此複合材料可用於菌之固定化以生產生物物質，因此本研究以交聯之海藻酸鈉及聚乙炔醇為固定化納豆菌之材料，期能提高納豆菌之安定性，增加Levan之產量，同時增加固定化菌顆粒之強度，以利重複批次使用。本實驗室曾以回應曲面實驗設計法 (Response surface method, RSM) 探討交聯海藻酸鈉及聚乙炔醇以固定化納豆菌之最適條件 [2]，本研究延續此固定化納豆菌之最適條件探討，同時將此固定化菌進行批次發酵與連續式發酵生產Levan之探討。



二、研究方法及步驟

(一) 菌種

本研究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。

(二) 培養基與培養方法

B. subtilis natto 菌之活化與前培養係依照本實驗室常用之方法 [5, 27]，再將含菌體的前培養基 5 mL 加入含 150 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 SM 生產培養基 100 mL，生產培養基含蔗糖 (250 g/L)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3 g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3 g/L，此培養基在 pH 6.5、37°C、175 rpm 轉速下培養以生產菌果聚醣 (Levan)。

(三) 固定化顆粒製作方法

固定化顆粒之製備是參考已知之方法並加以修改 [5]。取 9.05 g 聚乙炔醇 (PVA) 及 0.91 g 海藻酸鈉 (Sodium Alginate) 置於 90 mL 去離子水 (deionized water) 中，充分攪拌。將溶液放入於高溫高壓滅菌釜 (121°C, 20 min) 中滅菌，待溶液冷卻至常溫，再加入 10 mL 之菌液，攪拌均勻後，將此含菌之聚乙炔醇-海藻酸鈉溶液以蠕動幫浦以 200 mL/h 滴入於含氯化鈣 (25 g/L) 與硼酸 (50 g/L) 之混和溶

液中以形成固定化顆粒，持續攪拌 2.45 h 後，將固定化顆粒置入磷酸二氫鉀溶液中靜置 6 小時，製備完成之聚乙炔醇-海藻酸鈉顆粒置於 4°C 冰箱中備用。固定化顆粒使用前之活化係將顆粒置於含 300 mL NB 培養基之 500 mL 三角錐形瓶中，於 37°C、150 rpm 下培養 24 小時，再置入下述生產培養基中培養生產菌果聚醣。

(四) 固定化菌體顆粒強硬度之測定

本實驗室曾探討以回應曲面實驗設計法 (Response surface method, 簡稱 RSM) 探討交聯海藻酸鈉及聚乙炔醇以固定化納豆菌之最適條件 [2]，除探討攪拌時間 (X_1)、PVA 濃度 (X_2) 及海藻酸鈉濃度 (X_3) 對 Levan 產量之影響外，所製作之聚乙炔醇-海藻酸鈉固定化菌體顆粒，並探討其顆粒強硬度 (表 1)。顆粒強硬度之測定係將圓潤且大小均勻之固定化菌體顆粒取 3 顆，置於防滑玻璃片上，將顆粒呈三角形排列，再將已知重量之防滑玻璃輕壓於顆粒上，將已知重量之燒杯輕放於防滑玻璃上，將液體緩慢滴入於燒杯內，待其中一顆小球破裂或表面受損時，停止加入液體，此時顆粒受壓之質量作為測量值，每批測試五次，取平均值。

(五) 以固定化菌批次式生產菌果聚醣

取 20 g 上述製備之菌體顆粒接種於含 300 mL 之 SM 生產培養基 (Sucrose 250 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3 g/L、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3 g/L) 之 500 mL 三角錐形

表 1. 中心混成實驗設計

符號 編號	氯化鈣及硼酸攪拌時間 (h)	PVA 濃度 (g/100 mL)	SA 濃度 (g/100 mL)	Levan 產量 (g/L)	強硬度 (克)
1	2	8	0.8	59.00	107.21
2	3	8	0.8	30.04	115.31
3	2	10	0.8	74.35	136.27
4	3	10	0.8	76.85	*
5	2	8	1	76.30	127.43
6	3	8	1	73.75	130.27
7	2	10	1	72.69	136.29
8	3	10	1	63.86	138.26
9	1.5	9	0.9	29.13	130.28
10	3.5	9	0.9	26.15	133.31
11	2.5	7	0.9	54.67	127.39
12	2.5	11	0.9	50.82	140.29
13	2.5	9	0.7	31.04	128.37
14	2.5	9	1.1	41.42	133.71
15 (C)	2.5	9	0.9	78.82	*
16 (C)	2.5	9	0.9	78.81	*

*15 (C)、*16 (C) 為中心點重覆兩次

(*:表示此顆粒耐重、承受力大於 250g 重量)



瓶中，於 37 °C，pH 值為 6.5，150 rpm 下連續培養 50 小時。觀察菌體顆粒及 Levan 生產之變化情形，發酵完成後將固定化菌體顆粒取出後，將菌體顆粒重新置入新 SM 生產培養基中培養 50 小時，此重複培養步驟至無 Levan 產生為止，同時探討每一批 Levan 生產之變化。將發酵液經 10,000 rpm 離心去除菌體及雜質，上清液過濾後保存於 -20°C 以便於進行各種糖類濃度與 Levan 分子量的分析，所有的實驗皆是重複三次且取其平均值來表示。探討添加不同氮源對固定化菌批式生產菌果聚糖之影響時，係於上述 SM 生產培養基中分別添加氮源 2% 尿素、peptone、yeast extract 或硫酸銨，其餘培養條件如上所述。探討硫酸銨濃度對固定化菌批式生產菌果聚糖之影響時，係於上述 SM 生產培養基中分別添加濃度（0%、1%、2%、3%、4%）之氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其餘培養條件如上所述。上述 SM 生產培養基中若添加 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，此含 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之 SM 培養基稱為 SM-N 生產培養基。探討蔗糖濃度對固定化菌批式生產菌果聚糖之影響時，係於 SM-N 生產培養基添加不同蔗糖濃度（150 g/L、200 g/L、250 g/L、300 g/L、350 g/L），其餘培養條件如上所述。

（六）以固定化菌連續式生產菌果聚糖

本研究使用之連續式生物反應器進行生產，反應器之構造如圖 1 所示。將連續式生物反應器玻璃槽體（如圖 1.(6)）置於高壓滅菌釜中滅菌（滅菌條件為 121°C、40 分鐘），待管柱冷卻至室溫後將管線接上，再將 SM-N（250 mL）生產培養基置於生物反應器玻璃槽體中。取 20 g 聚乙烯醇-海藻酸鈉固定化菌體顆粒並置於生物反應器玻璃槽體中，開啟空氣壓縮機（如圖 1.（1）），進行曝氣，並開啟蠕動幫浦（如圖 1.（10）），將 SM-N 生產培養基液體以 200mL/h 連續導入生物反應器玻璃槽體中反應，並於生物反應器玻璃槽體出料口（如圖 1.（13））定時收集流出液，並分析 Levan 之生產，如此連續式反應連續進行至無 Levan 產生為止。探討硫酸銨濃度對固定化菌連續式生產菌果聚糖之影響時，係於 SM-N 生產培養基中添加不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度（0%、1%、2%、3%、4%），其餘培養條件如上所述。探討曝氣對固定化菌連續式生產菌果聚糖之影響時，係以不同氣體流速（0.02 vvm）導入生物反應器玻璃槽體中進行曝氣，其餘培養條件如上所述。探討 pH 對固定化菌連續式生產菌果聚糖之影響時，係將 SM-N 生產培養基調整至不同 pH 值（pH

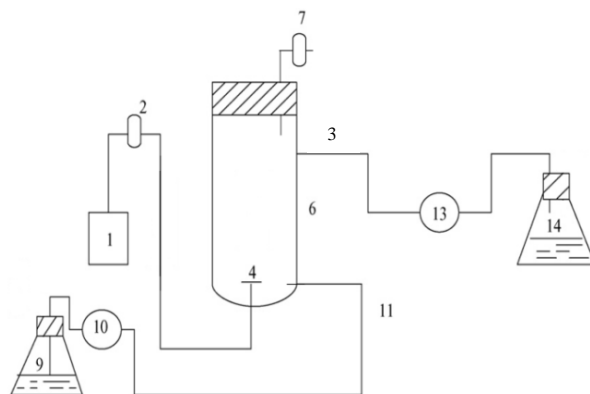


圖 1. 連續式生物反應器運作模式設計圖

（1）空氣壓縮機；（2）空氣過濾器；（3）生物反應器玻璃槽體出料口；（4）空氣壓縮機空氣出口處；（6）生物反應器玻璃槽體（體積 350ml）；（7）風口過濾器；（9）培養基入料瓶；（10）蠕動幫浦；（11）入料管線；（13）採樣口；（14）培養基出料收集瓶。

5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5），其餘培養條件如上所述。探討蔗糖濃度對固定化菌連續式生產菌果聚糖之影響時，係將 SM-N 生產培養基調整不同蔗糖濃度（150 g/L、200 g/L、250g/L、300 g/L、350 g/L），其餘培養條件如上所述。

（七）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 μm 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 μm ），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 μL 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 下分析果聚糖、蔗糖、葡萄糖、果糖的變化。Levan 分子量之分析是以膠體滲透層析（Gel Permeation Chromatography, GPC）分析，該系統裝置有 HITACHI L-6200 輸液系統，使用管柱為（TOSOH TSK-GEL G5000PWXL、G4000PWXL），以 RI 偵測器（Bischoff），在 50°C 下進行分析。沖提液為去離子，沖提流速 0.5 mL/min。用糊精標準品（phenomenex Dextran standard，分子量：7,200、16,230、35,600、74,300、170,000、535,000、1,580,000、與 2,754,000 Da）來製備分



子量的檢量線。Levan 之定量參照本實驗室常用之方法 [27-28]。

(八) 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。

三、結果與討論

(一) 以回應曲面法探討固定化菌顆粒製備之最適條件

本實驗室曾探討以回應曲面實驗設計法 (Response surface method, 簡稱 RSM) 探討交聯海藻酸鈉及聚乙稀醇以固定化納豆菌之最適條件 [2]，以攪拌時間 (X_1)、PVA 濃度 (X_2) 及海藻酸鈉濃度 (X_3) 為自變數，Levan 產量為因變數進行 2^3 之因子設計 (2^3 factorial experimental design)、陡升實驗設計 (steepest experimental design method of path of steepest ascent) 與中心混成實驗設計 (Central Composite Design, CCD)。中心混成實驗設計與結果如表 1 所示。由表 1 得知，第 15、16 組實驗 (攪拌時間 2.5 h、PVA 濃度 9.0 g/100 mL、SA 濃度 0.9 g/100 mL) 可得最高之 Levan (~78.82 g/L)，此結果利用 STATISTICA 軟體進行二階的回歸分析，所得二階回歸方程式 (1) 為

$$Y=80.3202-2.7387X_1-12.7937X_1^2+2.5601X_2-6.5178X_2^2+4.1958X_3-10.646X_3^2+3.1491X_1X_2+1.8873X_1X_3-9.4576X_2X_3 \quad (1)$$

方程式中 Y 為 Levan 之產量 (g/L)，且每項係數 (effect) 皆表示其不同因子對 Levan 產量之影響程度，由方程式可推斷攪拌時間 (X_1) 有負影響，若減少攪拌時間將有助於增加 Levan 產量，而 PVA 濃度 (X_2)、海藻酸鈉濃度 (X_3) 有正影響，其提高將有助於 Levan 產量之提升。為探討極值點，將此二階回歸方程式進行正則分析 (canonical analysis)，可得方程式 (2) 如下：

$$Y=80.3202-4.294Z_1^2-50.9338Z_2^2-1067.1Z_3^2 \quad (2)$$

式中的係數是基於編碼數據的特徵值 (eigenvalues based on coded data)，Y 為 Levan 之產量 (g/L)。由於上述式的所有係數皆為負值，此表示回應曲面具有最高點。最高點為攪拌時間 2.45 h、PVA 濃度 9.05 g/100 mL、海藻酸鈉濃度 0.91 g/100 mL，Levan 之產量理論值為 80.32 g/L。以此最適條件進行重複實驗可以生產出之 Levan 產量實際值為 79.14±0.68 g/L。實際值與理論值契合度很高。利用二次迴歸方程式來描述顆粒製作條件與 Levan 產量關係，可繪製反應曲面與等高線圖，圖 2 為濃度與攪拌時間對固定菌生產菌果聚醣影響之二階回應曲面圖與等高線圖，其他二階回應曲面圖與等高線圖則未顯示。另由表 2 可得知，本實驗中檢定係數 R^2 為 0.96，因此回歸方程式能適切表達此模式於實驗數據上之適切性。另外由於變異數分析中 (表 2) 模式缺適檢定 (Lack of fit) 項不顯著，皆表示此次迴歸所得到的二次多項式模式適切性佳，實驗設計之契合度高。

(二) 聚乙稀醇-海藻酸鈉固定化菌體顆粒強硬度實驗

在以固定化菌探討 Levan 生產時，固定化顆粒易破裂及外表受損之問題須克服，因此本實驗探討聚乙稀醇-海藻酸鈉固定化菌之強硬度測定。在上述 RSM 中心混成實驗中，以不同因子條件所製作之 16 組聚乙稀醇-海藻酸鈉固定化菌，除探討其 Levan 產量 亦同時進行其顆粒強硬度之測定。由表 1 得知，RSM 實驗組第 4、15、16 組之固定化菌不僅不易破裂、耐重、承受力極大，且壓至扁平後，還原依舊保持圓球狀。另表 1 亦顯示，第 15、16 組實驗 (攪拌時間 2.5 h、PVA 濃度 9.0 g/100 mL、SA 濃度 0.9 g/100 mL) 可得最高之 Levan (~78.82 g/L)，因此使用此最佳製作條件製備固定化



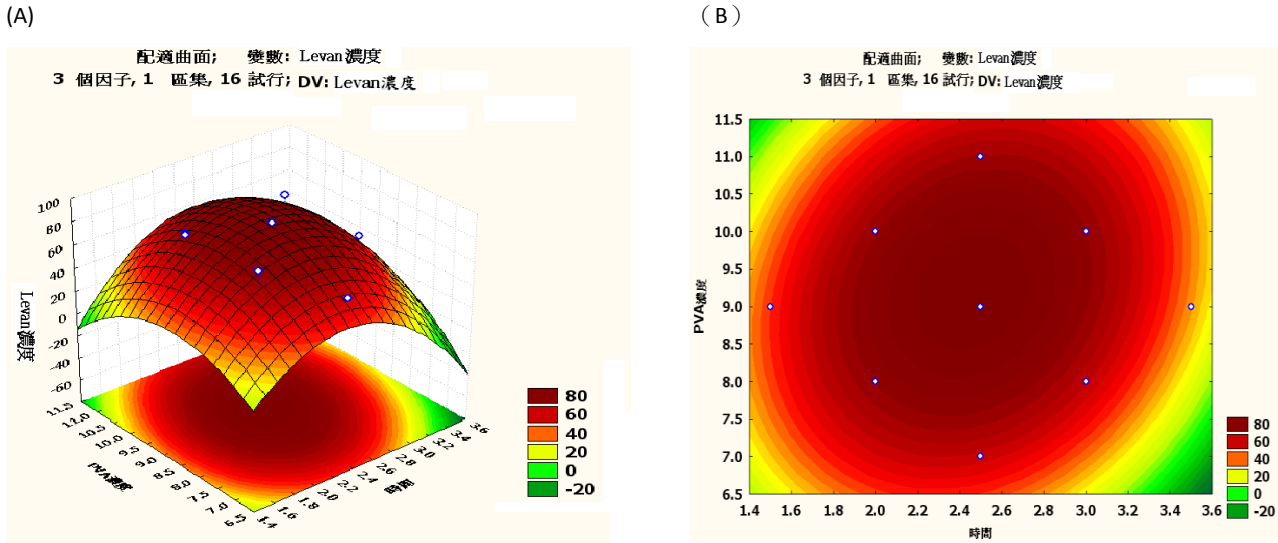


圖 2. PVA 濃度與攪拌時間對固定菌生產菌果聚糖影響之二階回應曲面圖 (A) 與等高線圖 (B)

表 2. 中心混成實驗結果之 ANOVA 分析表

Factor	SS	df	MS	F	P
X ₁	120.00	1	120.00	0.44	0.53
X ₁ ²	2618.85	1	2618.85	9.60	0.02
X ₂	104.86	1	104.86	0.38	0.55
X ₂ ²	679.70	1	679.70	2.49	0.16
X ₃	281.67	1	281.67	1.03	0.34
X ₃ ²	1813.53	1	1813.53	6.64	0.04
X ₁ X ₂	79.33	1	79.33	0.29	0.60
X ₁ X ₃	28.49	1	28.49	0.109	0.75
X ₂ X ₃	715.57	1	715.57	2.62	0.15
Lack of Fit	462.82	9	51.42	0.18	0.17
Pure Error	1636.40	6	272.73		
Total SS	6010.74	15			

R-sqr = 0.96
X₁: 攪拌時間; X₂: PVA 濃度; X₃: SA 濃度

菌粒，並用於進行後續之批次式及連續式實驗之探討。

(三) 固定化菌在 SM 培養基中生產 Levan

本實驗探討以上述方法製備之固定化菌於 SM 生產培養基進行批次發酵生產 Levan，結果如圖 3 所示，由圖 3 顯示於 SM 培養基中 (Sucrose 250 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、NaH₂PO₄·2H₂O 3 g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 3 g/L)，Levan 之產量於第一批次時最高 (77.81 g/L)，第二批次後 Levan 之產量隨之遞減，於第三批次後 Levan 產量低於 10 g/L，此可能原因是由於 SM 培養基不含任何氮源，因此除了第一批次可藉由菌體前培養時帶入部分氮源外，第二批次後則氮源存在已微乎其微，為了探討 Levan 產量之偏低是否因為缺乏氮源之原因，或是由於菌體活性下降之故，故於後續實驗探討

添加氮源之影響。

(四) 批次發酵中添加氮源對 Levan 生產之影響

1. 添加不同氮源對 Levan 生產之影響

本實驗探討在批次發酵時，添加不同氮源對 Levan 生產之影響，將固定化菌置於含不同氮源 (尿素、peptone、yeast extract 及硫酸銨) 之 SM 生產培養基培養，並以膠體滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 進行分析。結果顯示當添加氮源為尿素、peptone、yeast extract 於 SM 生產培養基時，此三種氮源在 GPC 出現之圖譜與 Levan 之波峰時間相重疊干擾，因此不適宜以 GPC 進行分析；僅在添加氮源為硫酸銨時，不與 Levan、sucrose、glucose、fructose 之 GPC 波峰時間重疊干擾 (如圖 4)，因此後續實驗選擇硫



酸銨為添加之氮源，並以 GPC 進行 Levan 生產之分析。

2. 硫酸銨濃度對固定化菌在 SM 生產培養基生產 Levan 之影響

本實驗探討添加不同硫酸銨濃度對固定化菌在 SM 生產培養基生產 Levan 之影響，將不同硫酸銨濃度(0%、1%、2%、3%、4%) 置入含有 300 mL 之 SM 生產培養基中，並以重複批次式探討 Levan 生產之變化，實驗結果如圖 5 所示。由圖 5 得知，無論添加硫酸銨濃度多少，Levan 產量皆於第一批次時產量最高，Levan 產量隨硫酸銨濃度增加而穩定的上升，添加硫酸銨濃度 2% 時效果最佳，Levan 產量為 80.63 g/L，添加硫酸銨濃度超過 2% 時，Levan 產量並無顯著改

變。在添加 2% 硫酸銨之 SM 生產培養基，Levan 產量在第 1、2、3、4、5 批次分別為 80.63 g/L、70.73 g/L、53.61 g/L、28.31 g/L、9.43 g/L，在第五批次時 Levan 產量已經很低，此外由實驗觀察得知進行五個批次培養，在培養期間菌體顆粒依舊完整無破碎。在未添加硫酸銨之 SM 生產培養基中，Levan 產量在第 1、2、3、4、5 批次分別為 77.81 g/L、51.64 g/L、14.4 g/L、8.37 g/L、5.49 g/L，由圖 5 得知未添加硫酸銨時，在第三批時已不利於 Levan 之生產。因此添加 % 硫酸銨可有利於 Levan 之生產。SM 生產培養基中若添加 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，此含 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之 SM 培養基稱為 SM-N

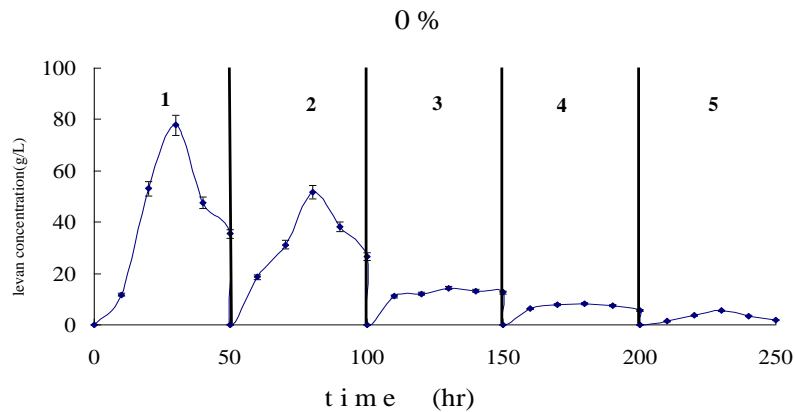


圖 3. 固定化菌於 SM 培養基中進行重複批次生產 Levan;

(1：第一批次、2：第二批次、3：第三批次、4：第四批次、5：第五批次)

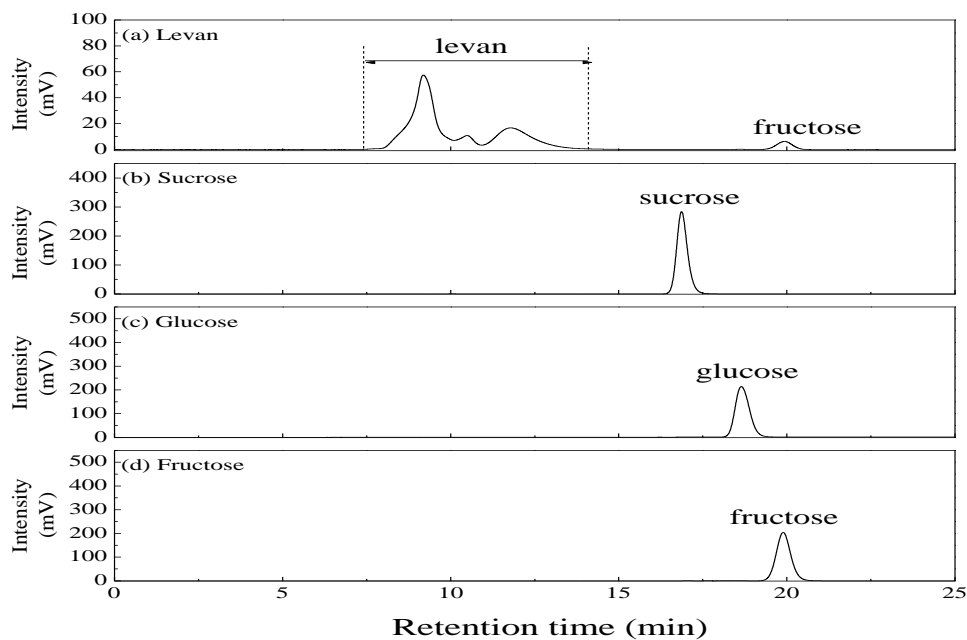


圖 4. 各種醣類之 GPC 圖譜



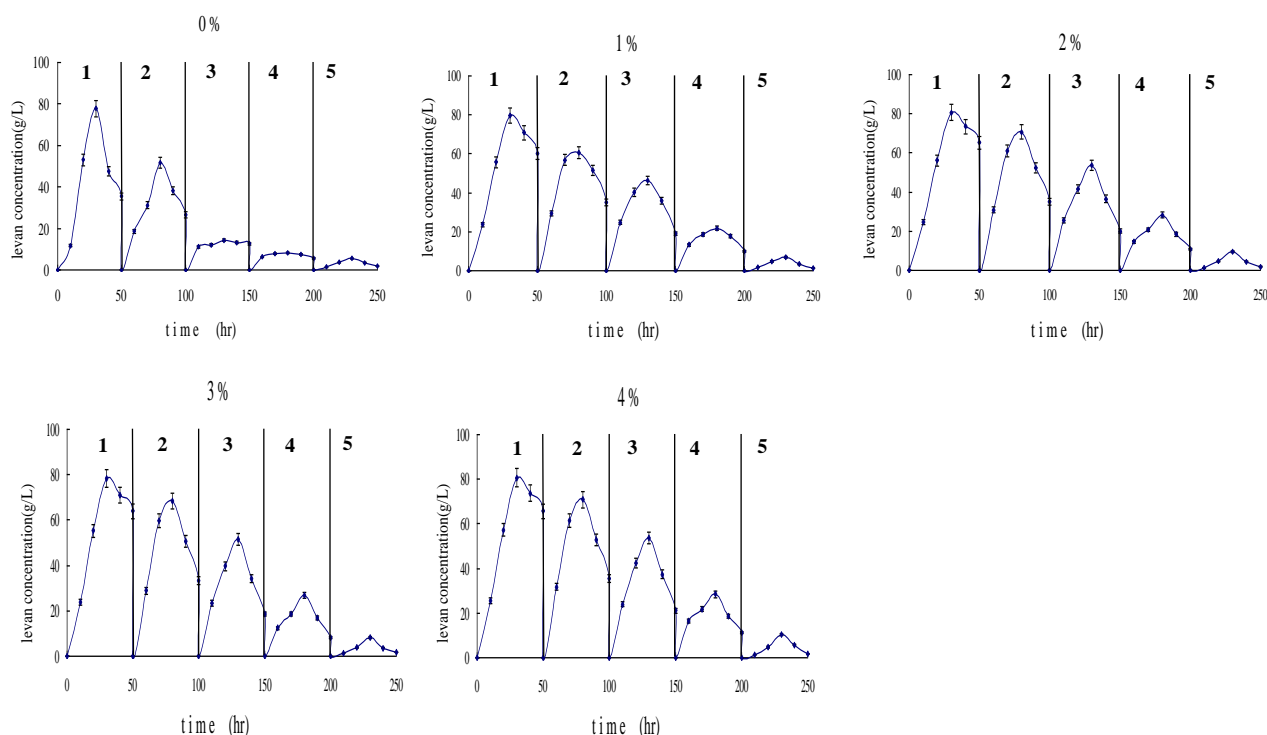


圖 5. 硫酸銨濃度對固定化菌於 SM 培養基中進行重複批次生產 Levan 之影響

(1：第一批次、2：第二批次、3：第三批次、4：第四批次、5：第五批次)

生產培養基。此 SM-N 生產培養基即用於進行後續之批次式及連續式實驗之探討。圖 6 為 Levan 產物經膠體滲透層析 (GPC) 分析分子量之結果，可知 Levan 是具有兩種不同的分子量，分別為高分子量 (>2000 kDa) 與低分子量 (8.0~9.0 kDa)，此結果證明不同硫酸銨濃度並不會影響產物 Levan 之分子量大小。此雙分子量特性與先前此株菌在搖瓶和發酵槽中之自由懸浮細胞的培養所獲得的結果一致 (27-29,33)，然而此雙分子量特性的形成機制仍是未知的。

3. 蔗糖濃度對固定化菌在 SM-N 生產培養基生產 Levan 之影響

本實驗探討不同蔗糖濃度對 Levan 產量之影響，將固定化菌置入不同蔗糖濃度 (150 g/L、200 g/L、250 g/L、300 g/L、350 g/L) 300 mL 之 SM-N 生產培養基中，並以批次式探討 Levan 生產之變化，實驗結果如圖 7 所示。由圖 7 得知，Levan 產量隨蔗糖濃度增加而穩定的上升，蔗糖濃度在 250 g/L 時效果最佳，Levan 最高產量為 80.61 g/L，當蔗糖濃度大於 250 g/L 時，已對 Levan 產量影響不大，在添加 250 g/L 蔗糖之 SM-N 生產培養基，Levan 產量在第 1、2、3、4、5 批次分別為 80.61 g/L、70.69 g/L、53.13 g/L、28.51 g/L、9.61 g/L，Levan 產量隨著培養次數增加而遞減，通常在第五批次時，

Levan 產量已經很低。此外經由實驗觀察得知進行五個批次培養後，菌體顆粒依舊完整無破碎。過去探討以自由懸浮細胞 (free suspended cells) 生產 Levan 之研究，發現不同生產菌株可得 Levan 之最高產量分別是 *Bacillus subtilis* 50-60g/L (約可用蔗糖基質之 20-25%)、*Bacillus. polymyxa* (NRRL B-18475) 36g/L (約可用蔗糖基質之 24%)、*Zymomonas mobilis* 50g/L (約可用蔗糖基質之 23%)、*Erwinia herbicola* 15g/L (約可用蔗糖基質之 30%) [11, 17, 22, 28-29]。本研究以聚乙烯醇及海藻酸鈉固定化的枯草芽孢桿菌可生產 Levan 最高產量 80.61g/L (約可用蔗糖基質之 40%) 比經由自由懸浮細胞的發酵所獲得的產量大大提高。圖 8 為 Levan 產物經膠體滲透層析 (GPC) 分析分子量之結果，可知 Levan 是具有兩種不同的分子量，分別為高分子量 (>2,000 kDa) 與低分子量 (8.0~9.0 kDa)。此結果顯示不同蔗糖濃度並不會影響產物 Levan 之分子量大小。

(五) 以連續式發酵生產 Levan 之探討

1. 硫酸銨濃度對固定化菌在 SM-N 生產培養基中生產 Levan 之影響

本實驗探討添加不同硫酸銨濃度對固定化菌在 SM-N 生產培養基生產 Levan 之影響，將不同硫酸銨濃度 (0%、



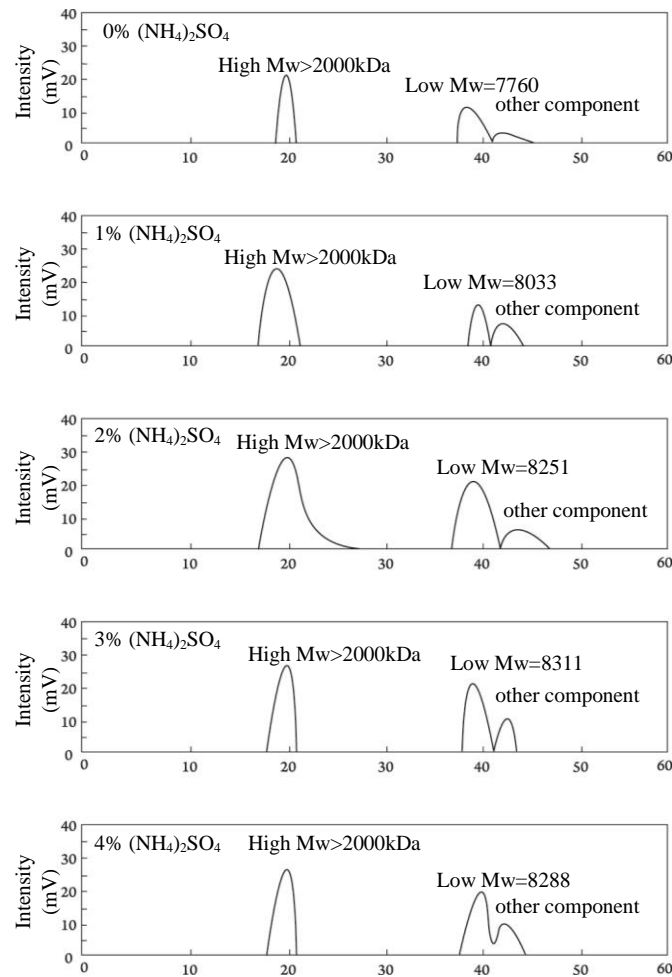


圖 6. 以批次式探討不同硫酸銨濃度對固定化菌於 SM-N 生產培養基中生產 Levan 產物之分子量分析

1%、2%、3%、4%) 置入含有 SM-N 生產培養基之生物反應器玻璃槽體中，並進行連續發酵生產 Levan，實驗結果如圖 9 所示。由圖 9 得知，無論 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度多少，Levan 產量均在培養第 30 小時達到最高，當 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度分別為 0%、1%、2%、3%、4% 時，Levan 最高產量分別為 50.47 g/L、55.5 g/L、63.67 g/L、63.73 g/L、63.76 g/L。雖然較高 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度可增加 Levan 產量，但並無顯著之增加，以 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度為最適添加量。由實驗結果得知進行 208 小時連續式生產 Levan 後，菌體顆粒依舊完整無破碎如圖 10 所示。與批次發酵一樣，Levan 產物同樣呈現兩種不同的分子量，分別為高分子量 (>2000 kDa) 與低分子量 (8.0~9.0 kDa) (GPC 層析圖未列)。

2. 蔗糖濃度對固定化菌在 SM-N 生產培養基中生產 Levan 之影響

本實驗探討不同蔗糖濃度對對固定化菌在 SM-N 生產培養基生產 Levan 之影響。將固定化菌置入生物反應器玻璃槽體中，內含不同蔗糖濃度 (150 g/L、200 g/L、250 g/L、300 g/L、350 g/L) 之 SM-N 生產培養基，並進行連續發酵生產 Levan，實驗結果如圖 11 所示。由圖 11 得知，無論蔗糖濃度多少，Levan 產量均在培養第 30 小時達到最高，當蔗糖濃度為 150 g/L、200 g/L、250g/L、300 g/L、350 g/L 時，Levan 最高產量分別為 43.61 g/L、56.37 g/L、63.81 g/L、64.15 g/L、64.33 g/L，雖然較高蔗糖濃度可增加 Levan 產量，但並無顯著之增加，以 250 g/L 蔗糖濃度為最適量。如上述，此實驗結果亦顯示進行 208 小時連續式生產後，菌體顆粒依舊完整無破碎。Levan 產物亦同樣呈現兩種不同的分子量，分別為高分子量 (>2000 kDa) 與低分子量 (8.0~9.0 kDa) (GPC 層析圖未列)。



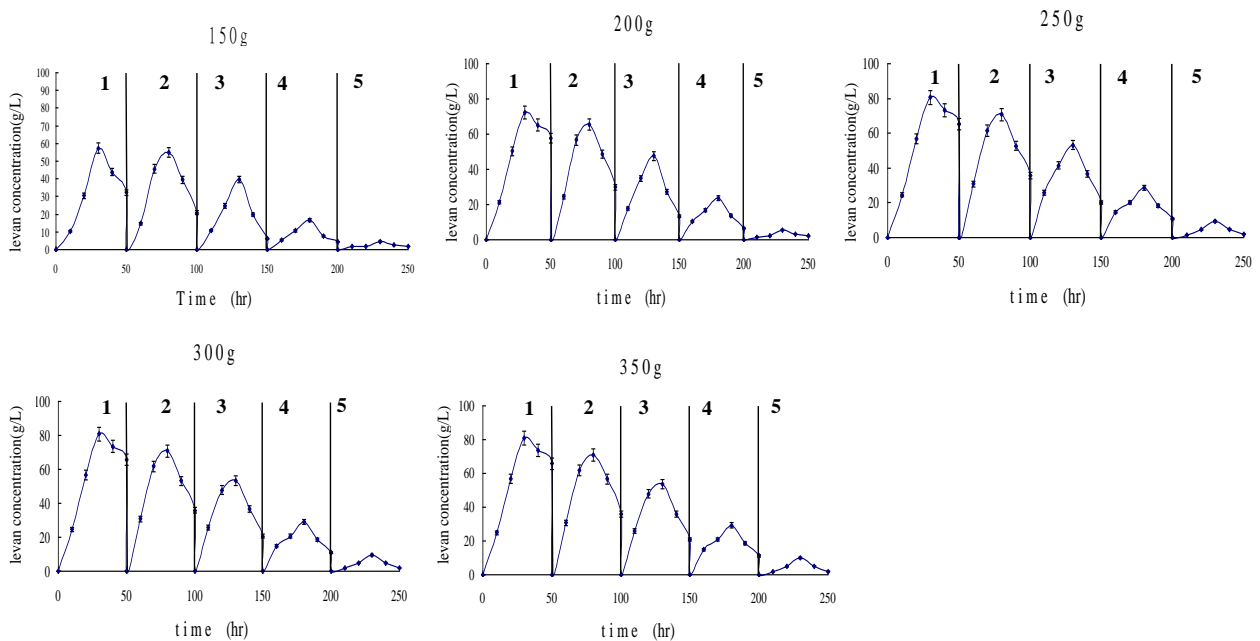


圖 7. 蔗糖濃度對固定化菌於 SM-N 培養基中進行重複批次生產 Levan 之影響

(1：第一批次、2：第二批次、3：第三批次、4：第四批次、5：第五批次)

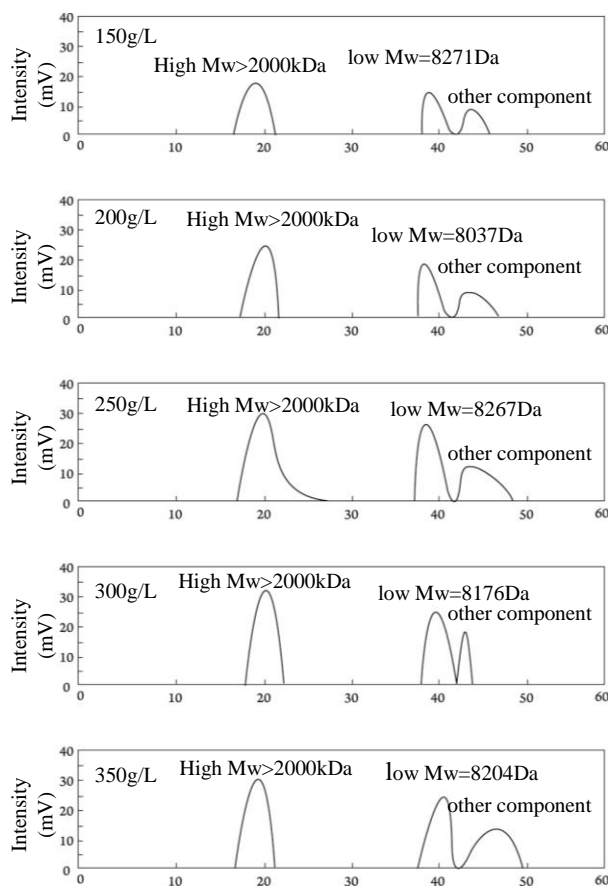


圖 8. 以批次式探討不同蔗糖濃度對固定化菌於 SM-N 生產培養基中生產 Levan 產物之分子量分析



圖 10. 固定化菌於 SM-N 培養基中進行連續發酵 208 小時後之菌體顆粒

四、結論

本研究以聚乙烯醇及海藻酸鈉進行納豆菌之固定化，並以回應曲面實驗設計法探討固定化之最佳條件，所得之固定化菌體可用於以批次式及連續式發酵生產 Levan，在探討期間菌體顆粒保持完整無破碎，穩定性相當高。且在批次式發酵及連續式發酵之最佳條件下，可得最高產量之 Levan，分別為 80.63 g/L 及 63.81 g/L。連續式生產 Levan 之產量雖不及批次式之產量，但於節約能源、減少人力成本及便於自動



化控制均有利於連續式生產。本研究可提供工業化大量生產 Levan 之參考依據，對生物高分子方面之研究具有學術及應用上之價值。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。

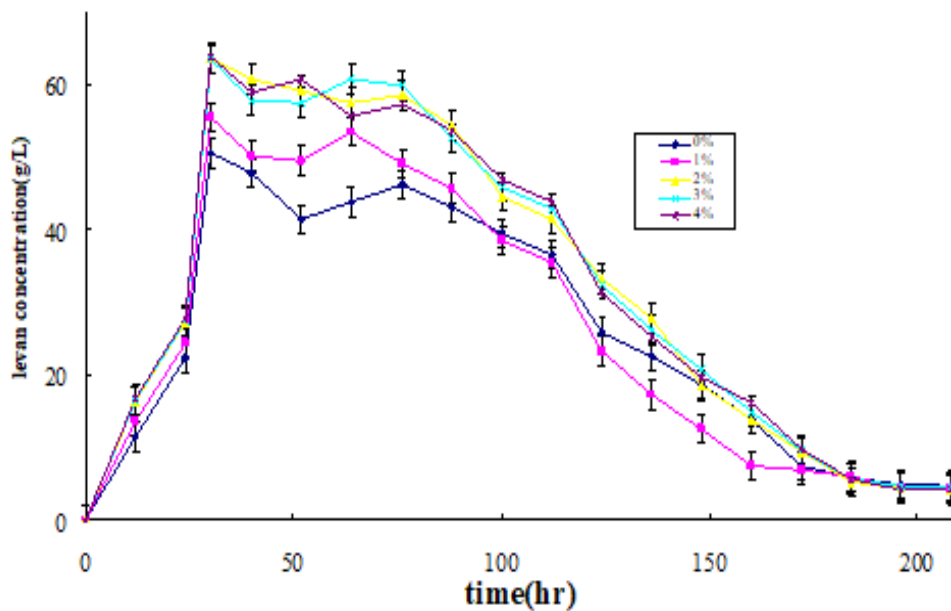


圖 9. 硫酸銨濃度對固定化菌於 SM-N 培養基中進行連續發酵生產 Levan 之影響

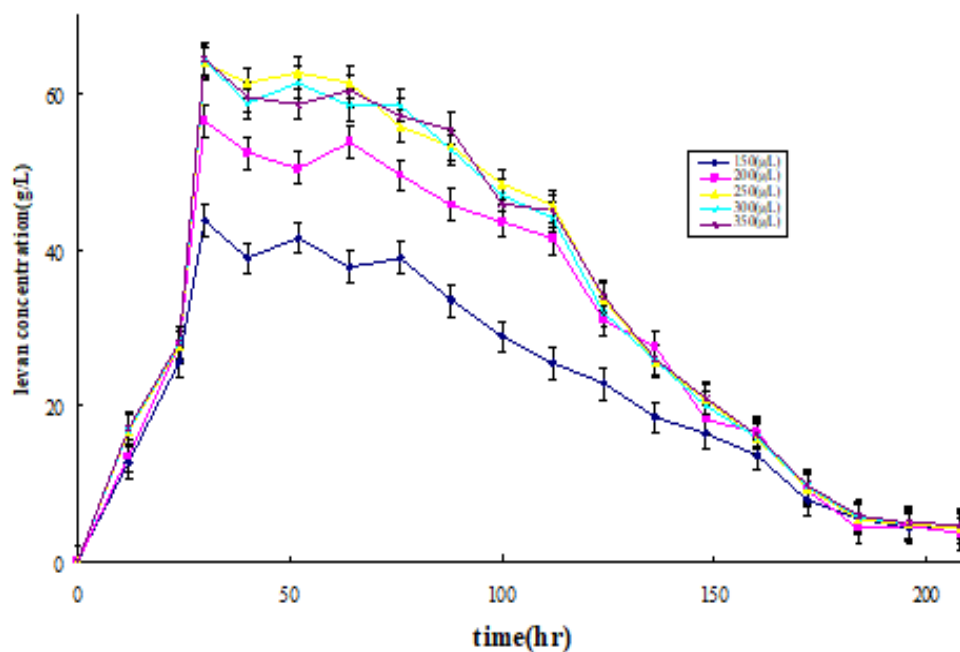


圖 11. 蔗糖濃度對固定化菌於 SM-N 培養基中進行連續發酵生產 Levan 之影響



參考文獻

1. 王杏文 (民 96), 游離及固定化酵母連續發酵制取乙醇, 南京林業大學博士論文。
2. 李俊緯 (民99), 聚乙烯醇-海藻酸鈉包埋固定納豆菌生產菌果聚醣之研究, 大葉大學環境工程學系碩士論文。
3. 周孝儒 (民99), 以生物反應槽生產果聚糖之研究, 大葉大學環境工程學系碩士論文。
4. 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。
5. 陳立達 (民98), 利用固定化技術生產果糖聚合物之研究, 大葉大學環境工程學系碩士論文。
6. 游芸悌 (民93), 以納豆菌生產生物性高分子之研究, 大葉大學環境工程學系碩士論文。
7. 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。
8. 蘇莉娟 (民99), 以蔗糖為基質及菌體固定化進行 *Zymomonas mobilis* 的液態培養生產細菌聚果醣(levan) 之研究, 東海大學食品科學研究所碩士論文。
9. Ananthalakshmy, V. K. and P. Gunasekaran P. (1999) Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(92), 214-217.
10. Beker, M. J., J. E. Shvinka, L. M. Pankova, M. G. Laivenienks and I.N. Mezharde (1990) A simultaneous sucrose bioconversion into ethanol and levan by *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25(1), 265-274.
11. Bekers, M., D. Upite, E. Kaminska, J. Laukevics, M. Grube, A. Vigants and R. Linde (2005) Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1535-1539.
12. Dedonder, R. (1966) Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, 8, 500-505.
13. Gough, S., N. Barron, A. Zubov, V. I. Lozinsky and A. P. McHale (1998) Production of ethanol from molasses at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IM3 immobilised in calcium alginate gels and polyvinyl alcohol. *Journal of Bioprocess Engineering*, 19(2), 87-90.
14. Gu, Y., J. Zheng, J. Feng, M. Cao, W. Gao, Y. Quan, Y. Dang, Y. Wang, S. Wang and C. Song (2017) Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4163-4174.
15. Hamid, K. R. A., E. A. Elsayed, H. A. E. Enshasy, M. Esawy and R. A. Malek (2018) Bioprocess Optimization for Levan Production by *Bacillus subtilis* B58. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 77(7), 386-393.
16. Han, Y. W (1990) Microbial levan. *Advanced Applied Microbiology*, 35, 171-194.
17. Han, Y. W. and M. A. Clarke (1990) Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(2), 393-396.
18. 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.
19. Hestrin, S., S. Avineri-Shapiro and A. Aschner (1943) The enzymatic production of levan. *Biochemical Journal*, 37(4), 450-456.
20. Jang, K. H., K. B. Song, C. H. Kim, B. H. Chung, S. A. Kang, U. H. Chun, R. W. Choue and S. K. Rhee (2001) Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 23(5), 339-344.
21. Kang, S., K. Jang, J. Seo, K. Kim, Y. Kim, D. Rairakhwada, M. Seo, J. Lee, S. Ha, C. Kim and S. Rhee (2009) Levan: Applications and Perspectives. In: *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*, pp. 152-155. Norfolk - UK: Caister Academic Press.
22. Keith, J., B. Wiley, D. Ball, S. Arcidiacono, D. Zorfass, J. Mayer, J. and D. Kaplan (1991) Continuous culture system for the production of the biopolymer levan using the bacterium *Erwinia herbicola*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(5), 557-560.
23. Leibovici, J and Y. Stark (1985) Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cellular and molecular biology*, 31(5), 337-341.
24. Melo, I. R., M. F. Pimentel, C. E. Lopes and G. M. Y. Calazans (2007) Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazil Journal of Microbiology*, 38(1), 45-51.



25. Muro, A. C., E. Rodríguez, C. M. Abate and F. Siñeriz (2000) Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnology Letters*, 22(20): 1639-1642.
26. Rhee, S. K., K. B. Song, C. H. Kim, B. S. Park, E. K. Jang and K. H. Jang (2002) Levan, pp. 351-377. In: Vandamme, E., S. De Baets and A. Steinbuchel Eds. *Biopolymers*, Vol. 5. Polysaccharides 1: Polysaccharids from Prokaryotes. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany.
27. Shih, I. L., L. D. Chen and J. Y. Wu (2010) Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymer*, 82(1), 111-117.
28. 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.
29. Shih, I. L. and Y. T. Yu (2005) Simultaneous and selective production of levan and poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 27(2), 103-106.
30. Tanaka, T., O. Susumu and T. Yamamoto (1979) Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *Journal of Biochemistry*, 85(1), 287-293.
31. Vignoli, J. A., M. A. P. C. Celligoi and R. S. F Silva (2006) Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*, 41(1), 240-243.
32. Viikari, L. and R. Gisler R. (1986) By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23 (3-4) 240-244.
33. Wu, F. C., S. Z. Chou and I. L. Shih (2013) Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineering*, 44 (6), 846-853.
34. Yamamoto, Y., Y. Takahashi, M. Kawano, M. Iizuka, T. Matsumoto, S. Saeki and H. Yamaguchi (1999) *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(1), 13-18.

收件：107.10.24 修正：107.12.27 接受：108.05.16

