

具高果聚糖產量之海水菌株 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 菌種特性及果聚糖生產條件探討



黃美瑩、陳力豪、曾亮璋、張錦宜
水產試驗所水產養殖組

前言

果聚糖 (levan) 是一種果糖的聚合物 (fructan)，大部分的聚合度 (degree of polymerization) 在 20 以上，分子量則通常大於 3.5 KDa。果糖聚合物主要有 2 種，除了果糖之間的鍵結主要為 $\beta(2-6)$ 的果聚糖外，另一為以 $\beta(2-1)$ 鍵結的菊糖 (inulin)，二者均可能有支鏈，而前者的水溶性高於後者。許多植物組織中有小分子量的果聚糖及菊糖 (分子量通常 < 5 KDa) 存在，此外，已知有多種微生物可以產生果聚糖 (Han, 1990)。果聚糖在食品加工、化妝品及製藥上都被廣泛應用 (Belghith et al., 2012a; Dahech et al., 2012; Kang et al., 2009; Mishra and Jha, 2013; No et al., 2007; Oner, 2013)。果聚糖可作為血漿填充劑 (分子量為 25-250 KDa 者) (Han, 1990; Kang et al., 2009; Mishra and Jha, 2013)，具有抗腫瘤 (分子量為 10-710 KDa 者) (Yoon et al., 2004)、降低膽固醇 (分子量為 4-6,000 KDa 者) (No et al., 2007)、控制糖尿病 (Dahech et al., 2011a)、降低氧化壓力 (Dahech et al., 2011b) 及提升免疫能力 (Liu

et al., 2010; Yoo et al., 2004) 等保健功效，同時具益生菌 (prebiotic) 功能 (Huang et al., 2013; Korakli et al., 2002; Semjonovs and Zikmanis, 2007)。另，合併食用果聚糖及黑豆 (black bean, *Rhynchosia molubilis*) 則有助於增加骨質礦物質之密度 (Kang et al., 2004)。此外，動物試驗結果顯示，果聚糖能夠加速點帶石斑、鯉魚、豬及雞之成長 (Gupta et al., 2015; Huang et al., 2015; Li and Kim, 2013; Zhao et al., 2013)。

雖然植物組織中有果聚糖存在，但其含量並不高，目前商業生產果聚糖的方法主要係以蔗糖利用微生物進行發酵 (Han, 1990)。已知有多種微生物被應用於生產果聚糖，例如 *Acetobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* 及 *Zymomonas mobilis* 等 (Han, 1990)，其中尤其以 *Bacillus* spp. 被研究得最多。這類微生物均以蔗糖為主要培養基質，利用微生物本身分泌的果聚糖蔗糖酶 [levansucrase (sucrose 6-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10)] 將蔗糖合成為果聚糖。

以細菌或果聚糖蔗糖酶生產果聚糖時，

主要以蔗糖當基質進行發酵，依每種細菌或果聚糖蔗糖酶不同，其發酵參數及反應條件會影響果聚糖的產率及所生成果聚糖分子大小等，主要參數包括：碳源、氮源、溫度、蔗糖濃度、攪拌程度及 pH 等 (Abdel-Fattah et al., 2005; Euzenat et al., 1997; Shih et al., 2005)。

本組自海水吳郭魚養殖池中篩選出 1 株合成果聚糖能力較佳之細菌 (黃等, 2011)，經生化特性及 16S rRNA 分析鑑定為 *Bacillus licheniformis*，將其命名為 *B. licheniformis* FRI MY-55。由於不同菌株其生產果聚糖之反應條件不盡相同，有必要進行 *B. licheniformis* FRI MY-55 菌株生產條件之探討；因此，本研究探討不同蔗糖濃度下對該菌株的生長及果聚糖之產量，以作為未來大量生產與應用之參考。

材料與方法

一、菌株活化及實驗方法

菌株 *B. licheniformis* FRI MY-55 先於蔗糖培養液 (含 20% 蔗糖) 中活化 36 ± 2 h ($23 \pm 0.5^\circ\text{C}$)。蔗糖培養液配方係參考 Park et al. (2001)，將酵母萃取物 (yeast extract) 5 g、蛋白胨 (peptone) 5 g、磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 1 g、硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g、氯化鈉 20 g 與蔗糖 200 g (另外滅菌)，一起溶於 770 ml 蒸餾水中，於培養基滅菌前調整 pH 為 6.8。使用簡易分光光度計 (WPA CO75, Linton, Cambridge, UK) 於 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 測定吸光值，再以無菌生理食鹽水調整吸光值至 0.3，加入 1% 於下述不同蔗糖濃度之培養液

中分別培養 144 h。培養期間，評估細菌生長情形、培養液中各種糖類濃度變化及果聚糖產量。

二、測試蔗糖濃度

不同蔗糖濃度試驗，將菌株於含有 1、5、10、20、30、40 及 50% 等 7 種蔗糖濃度之蔗糖培養液中，在 40°C 下振盪 (150 rpm) 培養 144 h。

三、評估細菌生長情形

培養期間利用簡易分光光度計測定培養液吸光值，以評估細菌生長情形。

四、果聚糖含量分析

培養液離心 ($10,000 \times g$ 、30 min、 4°C) 後，取上澄液加入 3 倍的冷乙醇 (99%)，於 4°C 放置隔夜後，於 4°C 下以 $10,000 \times g$ 離心 30 min，沉澱物為果聚糖，再以蒸餾水溶解後，重複乙醇沉澱及水洗步驟共 3 次，得到純化之果聚糖，進行凍結乾燥 (EYELA Freeze Dryer FDU-2200; Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) 後稱重，以估算培養液中果聚糖之含量 (Shih et al., 2005)。

結果與討論

一、*B. licheniformis* FRI MY-55 在不同濃度蔗糖培養液培養期間，細菌生長情形及果聚糖產量

(一) 細菌生長情形

B. licheniformis FRI MY-55 在含有 5 及 10% 蔗糖培養液之生長較佳，自 5–72 h 呈現對數生長期，在 72 h 時分別達 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 為 1.70 及 1.73。其他依次為 20 及 1% 蔗糖培養液培養者，其 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 為 1.40 (20%) 及 1.22

(1%、72 h)，以含有 30 及 40% 蔗糖培養者細菌生長較差，在 72 h 時為 0.74 (OD_{600nm} , 30% 蔗糖組) 及 0.27 (40% 蔗糖組)，而培養於含有 50% 蔗糖培養液者， OD_{600nm} 均在 0.06 以下 (圖 1)，細菌生長最不好；可見 *B. licheniformis* FRI MY-55 隨著培養液中蔗糖濃度的上升 (10–50%)，細菌生長明顯下降。

(二) 果聚糖產量

B. licheniformis FRI MY-55 培養於未含蔗糖之培養液中，不會產生果聚糖，而在含蔗糖 (10–50%) 之培養液中，果聚糖產量隨著蔗糖含量增加而上升 (圖 2)。該菌在含有 1 及 5% 蔗糖培養液中，只有在 36 h (5% 蔗糖組) 產生少量果聚糖 (2.19 g/L)，其餘含量均很低 (0–1.98 g/L)。隨著培養液中蔗糖濃度的增加，果聚糖產量明顯上升，以 10 及 20% 蔗糖培養液培養者，均在 36 h 達到較高果聚糖產量，分別為 17.09 g/L (10% 蔗糖組) 及 49.28 g/L (20% 蔗糖組)，之後產量逐漸下降 (0.12 及 23.18 g/L、144 h) (圖 2)。以含有 30 及 40% 蔗糖培養液培養者，分別在 24 及 36 h 達到 94.07 及 131.75 g/L 的果聚糖產量，隨後果聚糖產量逐漸減少，尤其在 72 h 後更明顯，在 144 h 時分別剩下 43.82 g/L (30% 蔗糖組) 及 66.36 g/L (40% 蔗糖組)。在 50% 蔗糖濃度培養液組，果聚糖產量在末期上升至 145.94 g/L，但所需時間長達 96 h。依以上資料顯示，該菌在含 1–50% 蔗糖培養液中，果聚糖之濃度隨著培養基中蔗糖含量提高而上升，當蔗糖濃度為 10% 時，*B. licheniformis* FRI MY-55 產生 17.09 g/L 果聚糖，隨著蔗糖濃度提高為 2.0、3.0 及 4.0 倍時，果聚糖產量約增加 2.88、5.50 及 7.71 倍，

分別為 49.28、94.07 及 131.76 g/L。又，當蔗糖濃度提高時，*B. licheniformis* FRI MY-55 產生大量果聚糖所需的時間也增長。所以就生產果聚糖而言，該菌在含有 30 及 40% 蔗糖培養液培養較短時間 (24 及 36 h)，可得到較高產量果聚糖 (94.07 及 131.75 g/L)；而較大果聚糖之產率為 3.92 g/L/h (含 30% 蔗糖、24 h)。

本研究中，菌株 *B. licheniformis* FRI MY-55 在含 5 及 10% 蔗糖培養液中生長較佳，含較高蔗糖組成長較差，但有較大量之果聚糖的形成，其中以含有 40 及 50% 蔗糖培養液組的果聚糖產生量分別高達 131.75 及 145.94 g/L (36 及 96 h、40°C)，該 2 組細菌生長狀況並不良好， OD_{600nm} 分別為 0.27 (72 h) 及 0.06 (96 h)，菌數分別約為 4.7×10^7 及 1.2×10^7 CFU/ml。

B. polymyxa 培養於含有 4–16% 蔗糖培養液中 (30°C)，以含有 8% 蔗糖組的果聚糖產量較高 (57.3 g/L，約含 50% 的水分)，在較高或較低蔗糖含量組其果聚糖產量均降低 (Han, 1989)。Elisashvili (1984) 報告中指出，*Bacillus* sp. 果聚糖產量與培養基中蔗糖濃度成正相關 (含 0.2–12.0% 蔗糖、30°C)，以含有 12.0% 蔗糖培養液培養時，果聚糖產量較高 (27 g/L)。**B. subtilis* (natto) Takahashi 培養於含有 200 g/L 蔗糖培養液有最大之果聚糖產生量 (49.40 g/L)，而蔗糖含量較低 (20–100 g/L) 或更高 (300 g/L) 均降低果聚糖產量 (Shih et al., 2005)。Belghith et al. (2012a) 報導 *Bacillus* sp. 於含有 30% 蔗糖之培養液中產生最強的果聚糖蔗糖酶活性 (試驗範圍含 5–40% 蔗糖，40°C)。一般產

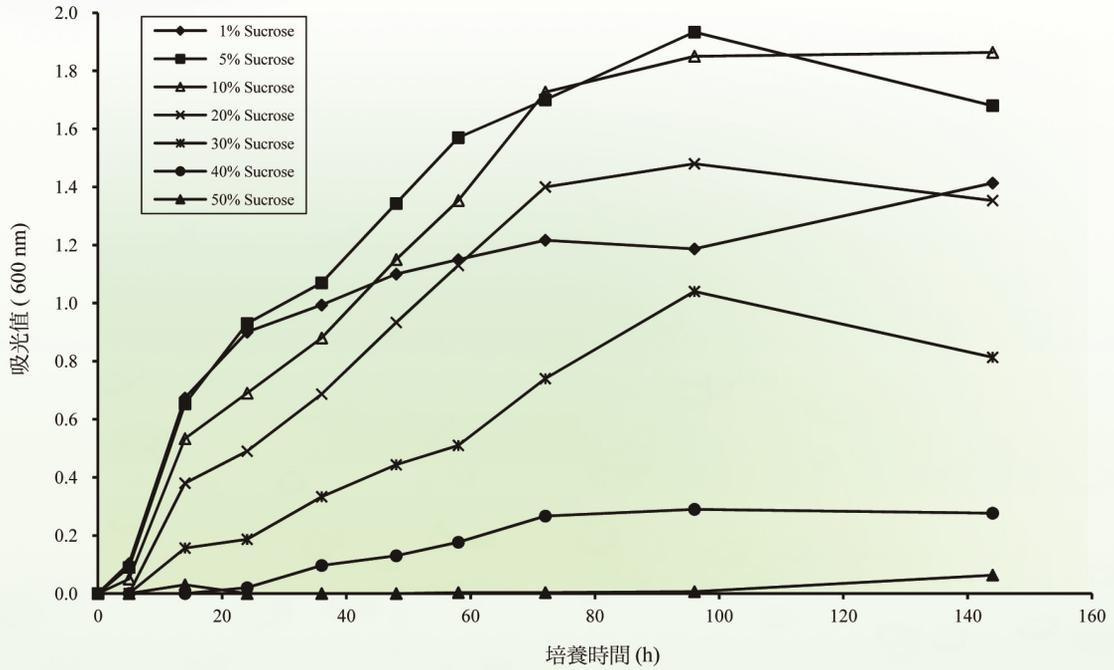


圖 1 *B. licheniformis* FRI MY-55 以含不同蔗糖濃度蔗糖培養液培養期間之生長情形 (40°C、起始 pH 7.0 及振盪 150 rpm) (n = 3; 500 ml)

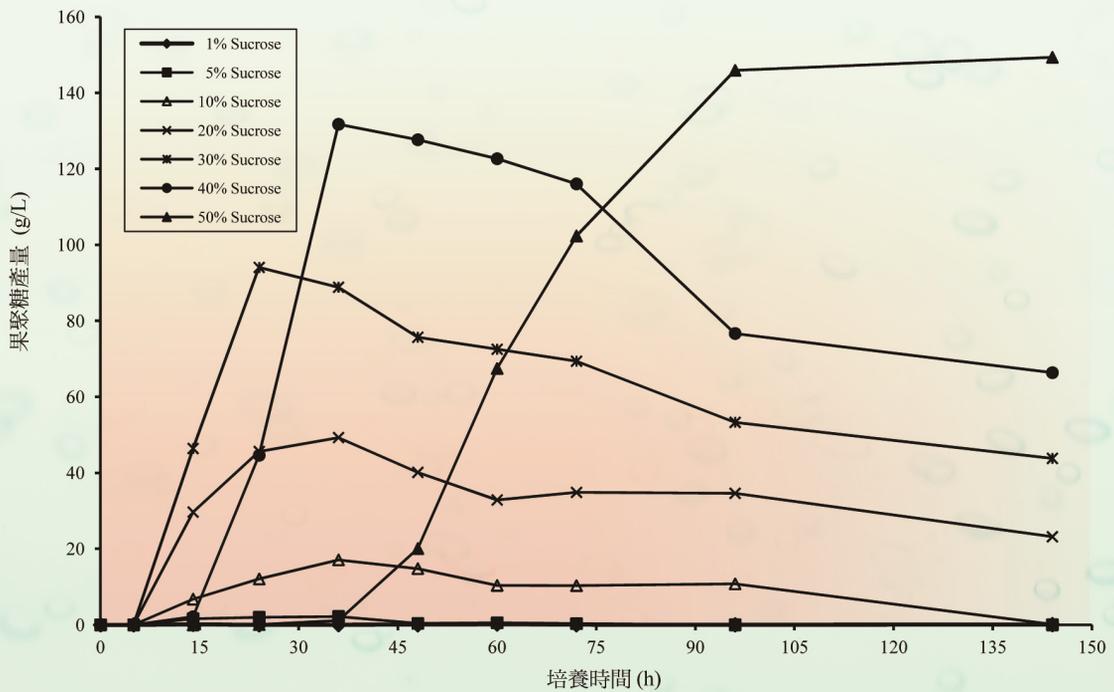


圖 2 不同蔗糖濃度蔗糖培養液對於 *B. licheniformis* FRI MY-55 振盪培養 (40°C, pH 7.0, 150 rpm) 期間產生果聚糖量之影響 (n = 3; 500 ml)

果聚糖細菌以含 20% 蔗糖之培養液為較適產果聚糖的上限，本研究 *B. licheniformis* FRI MY-55 雖然在較高蔗糖組 (40 及 50% 蔗糖) 成長較差，但果聚糖產量卻相當高，推測為該菌分離自海水魚池，可能耐受滲透壓之能力較強，所產果聚糖蔗糖酶在高蔗糖含量時作用蔗糖的效率仍高，故果聚糖產量高，是相當獨特之處。

二、與其他高果聚糖產量菌株之比較

Liu et al. (2010) 指出，*B. licheniformis* 8-37-0-1 在含有 100 g/L 蔗糖之培養液中 60 h (30°C)，可產生 38 g/L 的果聚糖 (如表)。Muro et al. (2000) 述及，*Z. mobilis* 在含 20% 蔗糖培養液中培養 29 天 (7°C)，產生果聚糖 41 g/L。Belghith et al. (1996) 將具有 *Z. mobilis* 果聚糖蔗糖酶基因的 *E. Coli*，在含 20% 蔗糖培養液中培養 40 h (0°C) 後，果聚糖形成

量約為 50 g/L。Shih et al. (2005, 2011) 指出，*B. subtilis* (natto) Takahashi 分別培養在含 20 及 25% 蔗糖培養液中 21 及 24 h (37°C) 後，果聚糖產生量為 40–60 g/L。而本試驗菌株 *B. licheniformis* FRI MY-55 以含 30 及 40% 蔗糖培養液培養，果聚糖產量分別達 94 g/L (40°C、24 h) 及 132 g/L (40°C、36 h)，其蔗糖利用率分別為 31 及 33%，與上述文獻中 (如表) 所提較高果聚糖產量之菌株相當接近 (20–38%)，且以生產速率而言，*B. licheniformis* FRI MY-55 培養在含 30 及 40% 蔗糖培養液時，產率分別可達 3.92 及 3.66 g/L/h，高於前述 (如表) 之較高果聚糖產量菌株 *B. subtilis* (natto) Takahashi (2.38–2.50 g/L/h)，顯示其為一值得開發之高果聚糖產量菌株。

不同微生物的果聚糖產率比較

微 生 物	蔗 糖 含 量 (%)	蔗 糖 利 用 率 (%)	溫 度 (°C)	果 聚 糖 產 率 (g/L/h)	參 考 文 獻
<i>Erwinia herbicola</i>	5	30	25	0.21	Keith et al., 1991
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945	5	36	30	0.75	Ghaly et al., 2007
<i>B. polymyxa</i>	15	24	30	0.15	Han and Clarke, 1990
<i>B. licheniformis</i> 8-37-0-1	10	38	30	0.63	Liu et al., 2010
<i>Zymomonas mobilis</i>	20	21	7	0.06	Muro et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> (containing an overexpressed levansucrase of <i>Z. mobilis</i>)	20	25	0	1.25	Belghith et al., 1996
<i>B. subtilis</i> (natto) Takahashi	20	20-25	37	1.90-2.38	Shih et al., 2005
<i>B. subtilis</i> (natto) Takahashi	25	20-24	37	2.08-2.50	Shih et al., 2011
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55	30	31	40	3.92	本研究
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55	40	33	40	3.66	本研究