

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏文義 博士

Advisor : Wen-Yi Yen, Ph.D.

固定化 *Zymomonas mobilis* 菌體以連續式發酵生產果聚糖(levan)  
之研究

Production of levan by continuous fermentation with immobilized  
*Zymomonas mobilis* cells

研究生：詹菁羽

Graduate student : Jing-Yu Zhan

中華民國一〇一年十二月

December, 2012

## 謝誌

感謝恩師 顏文義 博士於求學過程中悉心指導與教誨，讓學生在學業與待人處世上獲益良多，也感謝恩師的包容與關心。論文研究與撰寫論文期間，承蒙恩師給予方向和細心修正，恩師的辛勞，學生永銘於心，師恩浩蕩，謹誌卷首，敬申謝忱。

文稿初成，承蒙 閻立平 博士及弘光科技大學 林聖敦 博士撥冗審閱及詳加修正，並於學生口試時，惠賜寶貴意見，讓論文更臻完善，在此深表最誠摯之敬意與感謝。研究期間感謝系所諸位師長們熱心提供寶貴意見與關心照顧，於此致上萬分之感謝。

研究所期間，感謝實驗室莉娟學姊、俞君學姐、依紋學姐及姿好學姐的傳承與交流，謝謝您們的關照與愛護，使我受益許多。感謝同窗好友天成、佳華、希奇、鈺馨、芄萱、俊麟、冠閔、建廷、靜菽在各方面的協助以及支持與鼓勵，感謝好友瑄閔、子寧，謝謝你們的加油打氣，給我繼續向前的勇氣。感謝所有同屆的朋友，一起走過的回憶與帶來的歡樂。感謝高中好友鈺棋，感謝你一路的相挺，因為有你人生旅途上並不孤單。感謝學弟妹巧俞、俊智，謝謝你們的陪伴以及幫助。

特別感謝最愛的父母及姐姐，謝謝您們辛苦的養育和栽培，陪我走過實驗瓶頸，給我最大的關懷與包容，使我可以順利完成學業。

最後，謹以此論文獻給我最愛的家人與好友們，並致上我深深的祝福。祈願各位平安、順心、健康。

詹菁羽 謹致於  
東海大學食品科學研究所  
中華民國一〇二年一月

## 目錄

摘要.....	XI
Abstract.....	XII
第一章 緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 <i>Zymomonas mobilis</i> 之介紹.....	3
2.1.1 <i>Zymomonas mobilis</i> 之基本特性.....	3
2.1.2 <i>Zymomonas mobilis</i> 之發酵.....	8
2.1.3 <i>Zymomonas mobilis</i> 之相關研究.....	13
2.2 <i>Zymomonas mobilis</i> 之果聚醣(levan)介紹.....	17
2.2.2 levan 之組成及結構.....	17
2.2.3 levan 之來源.....	18
2.2.3.1 levan 之合成.....	20
2.2.3.2 levan 生成之影響因子.....	25
2.2.4 levan 之應用.....	25
2.2.4.1 食品加工層面.....	27
2.2.4.2 保健功效.....	27

2.2.4.3 水產養殖的應用.....	30
2.2.5 levan 產量之測量方式.....	31
2.3 液態培養.....	31
2.3.1 液態培養之影響因素.....	32
2.3.2 發酵方式.....	34
2.4 菌體固定化之介紹.....	36
2.4.1 固定化之方法.....	37
2.4.2 固定化技術之特性.....	41
2.4.3 固定化菌體之優點.....	42
2.4.4 固定化之載體選擇.....	42
2.4.5 以泡棉為固定化載體.....	46
第三章 材料與方法.....	49
3.1 試驗材料.....	49
3.1.1 試驗菌株.....	49
3.1.2 試驗藥品.....	49
3.1.3 培養基成分.....	50
3.1.4 儀器設備.....	50
3.2 試驗方法.....	52
3.2.1 菌種保存.....	52

3.2.2 菌種活化.....	52
3.2.3 菌醃製備.....	52
3.2.4 調整培養基 pH 值.....	52
3.2.5 試驗架構.....	53
3.2.6 分析項目.....	54
3.2.6.1 懸浮(非固定化)菌體批次發酵試驗.....	54
3.2.6.2 懸浮(非固定化)菌體連續式發酵試驗.....	54
3.2.6.3 固定化菌體連續式發酵試驗.....	55
3.3 分析方法.....	58
3.3.1 菌體乾重.....	58
3.3.2 pH 值.....	59
3.3.3 殘糖量分析.....	59
3.3.4 Levan 含量分析.....	61
3.3.5 酒精分析.....	63
3.3.6 多醣分子量分析.....	65
3.4 統計分析.....	67
第四章 結果與討論.....	68
4.1 懸浮(非固定化)菌體批次發酵.....	68
4.2 懸浮(非固定化)菌體連續式發酵.....	71

4.3 固定化菌體連續式發酵.....	73
4.3.1 饋料培養基蔗糖濃度之影響.....	73
4.3.2 不同饋料速度之影響.....	79
4.3.3 載體填充量之影響.....	85
4.4 批次、懸浮(非固定化)菌體連續式以及固定化菌體連續式 發酵生成 levan 之比較.....	94
4.5 文獻中利用 <i>Z. mobilis</i> 發酵生產 levan 與本研究結果之比較.....	94
4.6 固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體於連續式發酵期間之酒精產量.....	97
4.7 批次、懸浮(非固定化)菌體連續式以及固定化菌體連續式 發酵生成酒精之比較.....	102
4.8 文獻中利用 <i>Z. mobilis</i> 發酵生產酒精與本研究結果之比較.....	105
4.9 <i>Z. mobilis</i> 於連續式發酵產生的 levan 之平均分子量分布...	108
第五章 結論.....	112
參考文獻.....	114

## 圖目錄

圖 2-1、 <i>Zymomonas mobilis</i> 生物代謝途徑總覽.....	9
圖 2-2、 <i>Zymomonas mobilis</i> 的 Entner-Doudoroff pathway.....	10
圖 2-3、 <i>Z. mobilis</i> 以蔗糖發酵之 SacA、SacB 與 SacC 的作用示意圖.....	12
圖 2-4、Levan 的化學結構式.....	19
圖 2-5、蔗糖經過 Levansucrase 作用，生產多醣 Levan 的單位步驟.....	22
圖 2-6、固定化方法.....	39
圖 3-1、 <i>Z. mobilis</i> 於批次發酵之情形.....	55
圖 3-2、連續式發酵裝置圖.....	56
圖 3-3、做為載體之泡棉.....	57
圖 3-4、將鉛球固定在泡棉上.....	57
圖 3-5、菌體乾重之標準曲線.....	59
圖 3-6、DNS 反應式.....	60
圖 3-7、DNS 法之標準曲線.....	61
圖 3-8、酚硫酸法之標準曲線.....	62
圖 3-9、氣體液相層析儀.....	64
圖 3-10、酒精濃度之標準曲線.....	64

圖 3-11、膠體滲透層析儀.....	66
圖 3-12、多醣分子量之標準曲線.....	66
圖 4-1 <i>Z. mobilis</i> 在自由菌體批次發酵期間菌體乾重、levan 產 量、殘糖與 pH 值變化.....	69
圖 4-2 以懸浮菌體連續式發酵 <i>Z. mobilis</i> 期間菌體乾重、levan 產量、殘糖與 pH 值變化.....	72
圖 4-3 饋料蔗糖濃度於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過程 中 levan 生產的變化.....	76
圖 4-4 饋料蔗糖濃度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 連續式發酵期間菌體生 長情形.....	77
圖 4-5 饋料蔗糖濃度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體連續式發酵期間殘 糖變化量.....	78
圖 4-6 饋料蔗糖濃度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體連續式發酵期間 pH 值變化.....	80
圖 4-7 饋料速度於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過程中 levan 生產的變化.....	83
圖 4-8 饋料速度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間菌體 生長情形.....	84

圖 4-9 饋料速度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間殘糖 變化量.....	86
圖 4-10 饋料速度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間 pH 值變化.....	87
圖 4-11 載體填充量於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過程 中 levan 生產的變化.....	90
圖 4-12 載體填充量對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間 菌體生長情形.....	91
圖 4-13 載體填充量對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間 殘糖變化量.....	92
圖 4-14 載體填充量對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵期間 pH 值變化.....	93
圖 4-15 饋料蔗糖濃度於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過 程中酒精產量的變化.....	99
圖 4-16 饋料速度於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過程中 酒精產量的變化.....	101
圖 4-17 載體填充量於固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體在連續式發酵過程 中酒精產量的變化.....	104

圖 4-18 不同稀釋速率下之 levan 分子量(a) 大分子分布；(b) 小  
分子分布..... 111

## 表目錄

表 2-1、 <i>Zymomonas mobilis</i> 主要性質.....	5
表 2-2、不同溫度下對於 <i>Zymomonas strains</i> 生長之影響.....	6
表 2-3、不同 pH 值對於 <i>Zymomonas strains</i> 生長之影響.....	7
表 2-4、生產 levan 之微生物.....	21
表 2-5、生產 levansucrase 的微生物種類.....	23
表 2-6、溫度對 levansucrase 進行 transfructosylation reaction 的影響.....	26
表 2-7、 <i>Z. mobilis</i> 所產不同分子量大小之 levan 其抗腫瘤的活性...	29
表 2-8、三種發酵方式之優缺點.....	35
表 2-9、各種菌體固定化方法之比較.....	43
表 2-10、固定化菌體的特性與選擇規範.....	44
表 2-11、選擇固定化載體及方法時需要考量的基本要件.....	45
表 2-12、不同固定化方法常用的載體材料.....	47
表 4-1 連續式發酵的饋料蔗糖濃度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體生產 levan 的影響.....	74
表 4-2 連續式發酵的饋料速度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體生產 levan 的影響.....	81

表 4-3 連續式發酵的載體填充量對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體生產 levan 的影響.....	88
表 4-4 以批次、懸浮菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵 <i>Z. mobilis</i> 生產 levan 的影響.....	95
表 4-5 文獻中利用 <i>Z. mobilis</i> 發酵生產 levan 與本研究結果之比 較.....	96
表 4-6 連續式發酵的饋料蔗糖濃度對固定化菌體 <i>Z. mobilis</i> 酒精 產量的影響.....	98
表 4-7 連續式發酵的饋料速度對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體之酒精產 量的影響.....	100
表 4-8 連續式發酵的載體填充量對固定化 <i>Z. mobilis</i> 菌體之酒精 產量的影響.....	103
表 4-9 以批次、懸浮菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵 <i>Z. mobilis</i> 生產酒精的影響.....	106
表 4-10 文獻中利用 <i>Z. mobilis</i> 發酵生產酒精與本研究結果之比 較.....	107
表 4-11 <i>Z. mobilis</i> 於連續式發酵產生的 levan 之平均分子量分佈..	109

## 摘要

本研究主要是探討固定化 *Zymomonas mobilis* 菌體，以連續式發酵來生產細菌果聚糖(levan)的培養條件。培養基的蔗糖濃度(50、75、100、120 g/l)、饋料速度(36、50、72、84、100 ml/h)與載體的填充量(8、12、16%，載體體積/反應槽體積，v/v)對 levan 生成之影響，並分析 *Z. mobilis* 的懸浮菌體以批次式與連續式進行發酵所得 levan 產量與生產速率。固定化菌體連續式培養結果顯示，饋料基質的蔗糖濃度由 50 至 100 g/l 時，濃度越高，所得之 levan 產量越高，最大之 levan 產量與生產速率分別為 7.70 g/l 和 0.64 g/l/h；而饋料基質濃度達 120 g/l，則不利於 levan 的生成。當饋料速度由 36 ml/h 增加至 84 ml/h，可得之最大 levan 產量及生產速率分別為 13.30 g/l 及 1.11 g/l/h；饋料速度達 100 g/l 時，levan 產量會下降。發酵瓶中的泡棉載體填充量為 8% 有最佳的 levan 產量。三種發酵的方式結果顯示，連續式的 levan 產量比批次式發酵高，而在兩種連續式發酵結果，又以固定化菌體之 levan 產量較懸浮菌體多。經膠體滲透層析法(GPC)檢測，發現 *Z. mobilis* 之 levan 分子量分佈有兩組，分別為 3 kDa 至 22 kDa 以及 388 kDa 至 2540 kDa。而以固定化 *Z. mobilis* 菌體進行連續式發酵生產 levan 之最適條件下，發現在蔗糖環境下也有酒精生成，濃度為 17.16 g/l，可將酒精做為次級產物收集。

## Abstract

Production of microbial levan by continuous fermentation with immobilized *Zymomonas mobilis* cells was studied. Effects of substrate concentrations (50 · 75 · 100 · 120 g/l), medium flow rates (36 · 50 · 72 · 84 · 100 ml/h) and amount of carrier load (8 · 12 · 16%, carrier volume / fermentor volume, v/v) on levan production were examined. Production of levan and biomass from free *Z. mobilis* cells was compared between batch fermentation (BF) and continuous fermentation (CF). Results of continuous culture with immobilized cells shown, sucrose concentration from 50 to 100 g/l, the higher substrate concentration, the higher levan production, the maximum levan production and productivity were 7.70 g/l and 0.64 g/l/h; while substrate concentration was 120 g/l, levan production declined. When medium flow rate increased from 36 ml/h to 84 ml/h, higher levan production and productivity of 13.30 g/l and 1.11 g/l/h, respectively, were observed; while production decreased at flow rate of 100 ml/h. The amount polypropylene foam carrier in fermentor shown that carrier 8% (v/v) was the best for levan production. Three fermentation methods showed that levan production by CF was higher than by BF, and higher levan production was found in immobilized cells as compared to free cells. GPC revealed that two groups molecular weight distribution of levan biopolymer were produced, they were 3 kDa~22 kDa and 388 kDa~2540 kDa. Ethanol was also produced in CF process by immobilized *Z. mobilis* cells at the optimum conditions for levan production. Ethanol concentration was 17.16 g/l.

# 第一章 緒論

## 1.1 前言

現在社會中的文明病叢生，於是具有調節人類生理機能的食品不斷的被開發出來，因此，具有機能性的多醣體產品更是受到矚目。由於細菌生長周期短，經由細菌發酵得到細菌性多醣的時間，相較於菇類多醣產出的時間可大為縮短，且產量也相對較多。

果聚糖 (levan) 為一種天然的聚果糖，為果寡糖 (fructooligosaccharide, FOS) 的一種，內含單體為 D-fructofuranosyl，以  $\beta$ - (2,6) 鍵結為主鏈， $\beta$ - (2,1) 為支鏈 (Rhee et al., 2005)。一開始在植物中被萃取出來，但在某些微生物的代謝產物中發現也含有 levan，目前商業生產大多利用具有 levansucrase 的微生物，在以蔗糖為碳源的環境下生成 levan。此種果聚糖具有低黏性、高水溶性、以及低甜度、保濕性與低熱量的特性，可廣泛應用於食品上，如乳化劑、甜味劑、增稠劑及風味攜帶劑等，而且具有保健功效，如抗腫瘤、降低膽固醇、抗發炎與提升免疫力，以及做為益菌質和膳食纖維等 (黃等人，2010)。

微生物產業的液態培養中，最常被應用的是批次發酵，因為是在密閉的系統中加入固定濃度的培養基，再接入菌體，培養過程中污染機率低；但是每次進行發酵時，都需重新培養菌醃，期間需要清洗、

滅菌、重新置換培養基等，而且菌體也無法重複利用，進而增加成本。因此，利用連續式發酵，可以減少批次發酵操作的停滯時間，而以固定化微生物的方式，菌體即可重複利用，減少在實驗過程中，等待重新培養的時間與培養時所耗損的原料，以便降低成本，也可達到連續發酵的功效，以提升代謝物的生產速率。

## 1.2 研究目的

Levan 在食品及醫藥上有很好的用途，本研究嘗試以蔗糖為碳源，進行固定化 *Zymomonas mobilis* 菌體，以連續式發酵的方法生產 levan，提升 levan 產量以及生產速率，以期用較便宜與經濟的方法應用於工業生產。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 *Zymomonas mobilis* 之介紹

微生物*Zymomonas mobilis*的發現在 1911 年，Barker與Hillier在受到汙染之蘋果汁中，發現果汁的味道改變還有甜味，並此情形常發生在五月至夏季結束，於是取出遭受汙染之蘋果汁，利用啤酒麥汁做成的固態培養基，在 22°C下培養 11 天後，將菌落分離及純化出一未知的細菌，並下了一個描述：此株菌有典型的氣味和味道，遭受汙染之果汁初期會有氣泡產生，且會持續產生氣體，直到幾天後氣體的壓力造成瓶子的爆裂，但當時兩位學者並未給這株細菌命名。直到 1942 年，另一位學者Lindner在龍舌蘭酒中也發現到這株菌，才有一個拉丁名稱*Zymomonas*。從 1920 至 1970 期間，*Zymomonas*相繼的被不同的人分離出來，卻被命名為不同的名稱，沒有一個完整的分類。從 1977 年之後，Swings與De Ley兩位學者將大約 40 種多種的*Zymomonas* strains利用分子生物學技術進行比較，由所得的結果提出一個結論，所有已發現之*Zymomonas*皆為同一屬種，並區分出兩個亞種，分別為*Z. mobilis* supsp. *mobilis*與*Z. mobilis* supsp. *pomaceae* ( Swings and De Ley, 1977 )。

#### 2.1.1 *Zymomonas mobilis* 之基本特性

*Z. mobilis* 為革蘭氏陰性的兼性厭氧菌，但是在有氧的條件下依

然能生長的很好( Bringer et al., 1984 ; Baratti and Bu'Lock, 1986 )，菌體形狀為短桿(表 2-1 )，長度約 2~6  $\mu\text{m}$ ，寬度約 1~2  $\mu\text{m}$ ，有鞭毛但無孢子與莢膜，以液態培養時，菌體呈現單個或依附成雙，生長初期會利用菌體上 1~4 條的極性鞭毛移動，其中約 30%的 *Zymomonas* 菌株可移動，培養液會呈混濁狀，數天之後即停止活動。以固態培養，菌落呈現乳白潮濕，不同 *Zymomonas* 菌株其菌落邊緣會不太一樣，而有些菌株會利用鞭毛運動，使菌落的邊緣出現鋸齒狀(林，2008)。

*Z. mobilis*最適生長溫度範圍為 25~31 $^{\circ}\text{C}$  ( Millis, 1951 )，若溫度提高時，會降低菌體生長以及葡萄糖吸收。但約有 74%的亞種可在 38 $^{\circ}\text{C}$ 生長，而少部分可在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的環境生長，如*Z. mobilis* ATCC10988 可在 33 $^{\circ}\text{C}$  下生長( Forrest, 1967 )，而*Z. mobilis* supsp. *pomaceae*若高於 36 $^{\circ}\text{C}$ 則完全不生長(表 2-2，Rogers et al., 1982 )。當溫度 15 $^{\circ}\text{C}$ 時，菌體生長趨於緩慢，到 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下則停止生長。因此傳統都是利用溫度來區分亞種。

多數 *Zymomonas* 菌株生長的 pH 值範圍為 3.4~7.5 左右，一旦超過此範圍，則菌體無法生長(表 2-3，Swings and Ley, 1977 )。而培養過程中，需要注意培養基中的糖量，當其消耗完畢，則菌體會開始快速且大量死亡(林，2008)。

表 2-1、*Zymomonas mobilis* 主要性質

Table 2-1. Major characteristics of *Zymomonas mobilis*

- 
1. Gram negative
  2. Rod shaped with dimensions 1.0~2.0×4.0~5.0 μm
  3. Motile and usually occur in pairs
  4. No spores, capsules, intracellular lipid or glycogen; no resting stages known
  5. Facultative anaerobe
  6. Metabolize glucose or fructose to equimolar quantities of ethanol and CO<sub>2</sub> using the E-D pathway
  7. Many strains can utilize sucrose and this is often accompanied by levan formation; however, wide variety of other sugars and fatty acids are not utilized
  8. Optimal pH range 6~7.0, temperature range 25~31°C, facilitates growth of the strain
  9. The G+C content of the cellular DNA is about 47.5~49.5% with an average *T<sub>m</sub>* 89.3~89.5 °C

---

( Carr, 1974; Swings and Ley, 1977 )

表 2-2、不同溫度下對於 *Zymomonas* strains 生長之影響

Table 2-2. Growth of *Zymomonas* strains at different temperatures

<b>Incubation temp (°C)</b>	<b>% of strains growing</b>
<b>30</b>	<b>100</b>
<b>34</b>	<b>97</b>
<b>36</b>	<b>97</b>
<b>38</b>	<b>74</b>
<b>40</b>	<b>5</b>

( Rogers et al., 1982 )

表 2-3、不同 pH 值對於 *Zymomonas* strains 生長之影響

Table 2-3. Growth of *Zymomonas* strains at different pH values

Initial pH	% of strains growing
3.05	0
3.5	43
3.7	71
3.85	90
5-7	100
7.50	87
8.0	0

( Swings and Ley, 1977 )

### 2.1.2 *Zymomonas mobilis* 之發酵

*Z. mobilis* 野生菌種僅能夠代謝三種醣類，分別為葡萄糖、果糖與蔗糖(圖 2-1，Sahm et al., 2006)，醣類的代謝途徑主要為 Entner-Doudoroff pathway (E-D pathway)，將葡萄糖轉換成 2-葡萄糖酮酸後，再代謝成丙酮酸，產生酒精(圖 2-2，Panesar et al., 2006)，與酵母菌代謝醣類產生酒精的途徑不同。

當 *Z. mobilis* 以葡萄糖為碳源時，酒精收率達理論值的 95~98% 左右，且對葡萄糖濃度耐受性可高達 30% (Loos et al., 1994)，對酒精的耐受性則可達 13% (Rogers et al., 1982)。此菌株對酒精的耐受性高，其原因為菌體的細胞膜上的脂肪酸改變，所以可以對抗酒精的影響，主要的脂肪酸是 myristic acid、palmitic acid 以及 cis-vaccenic acid。其中二價鎂離子是 E-D pathway 中許多酵素的輔因子，可幫助細胞修復細胞膜外的滲透性(Tanaka et al., 1999)。而且，*Z. mobilis* 可以迅速的消耗葡萄糖並產生酒精超過 15% (w/v) (Nowak, 2000)。此菌藉由 E-D pathway 進行酒精發酵，在厭氧的環境中，一莫耳的葡萄糖可產生一莫耳的 ATP 與 1.8~1.9 莫耳的酒精(Swings and Ley, 1977)，由於 ATP 的產率低，所以基質消耗在菌體的比率也低於酵母菌，故認為 *Z. mobilis* 是生產酒精最具有潛力的菌株(Rogers et al., 1980; Lawford et al., 1984)。

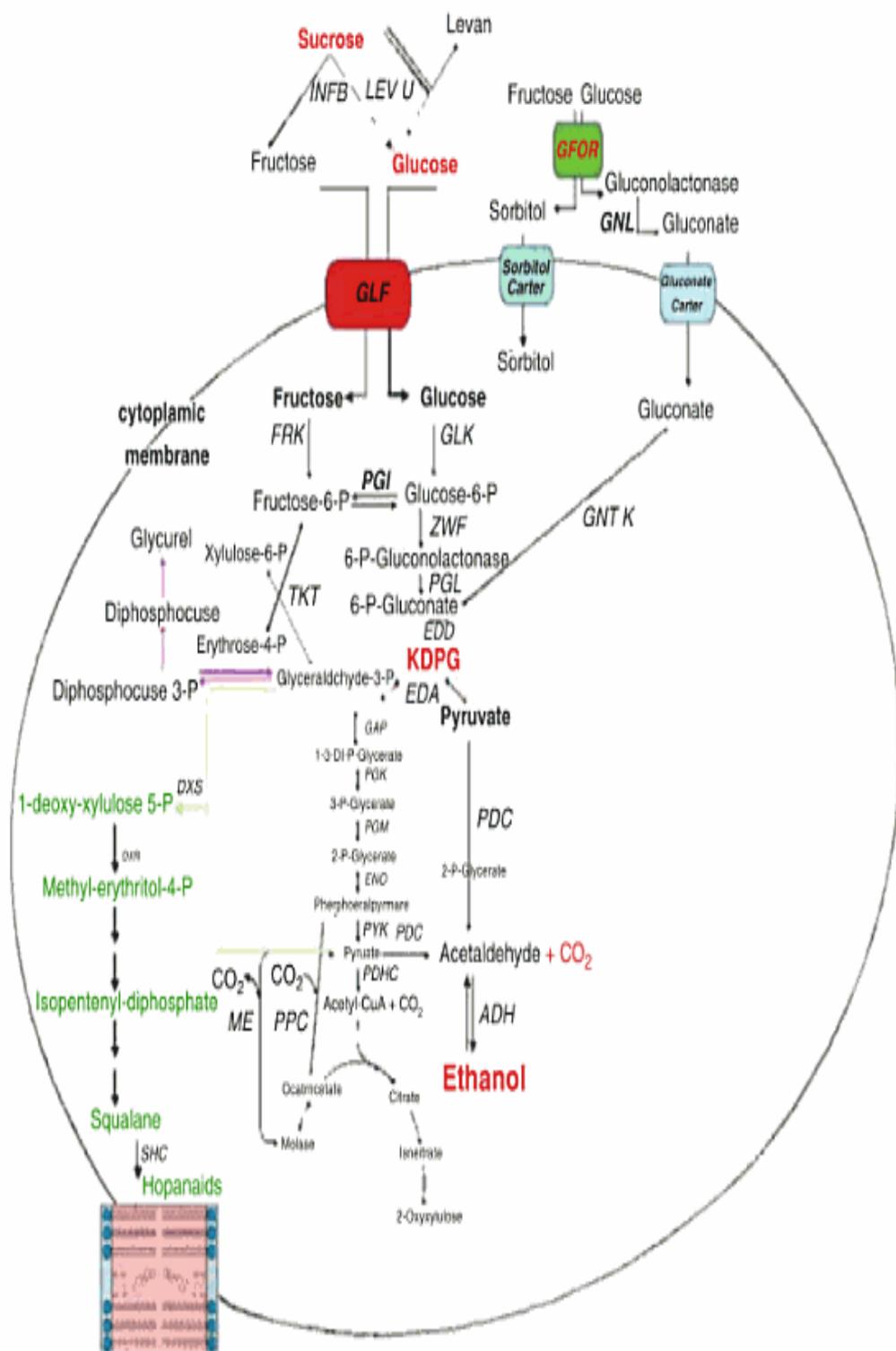


圖 2-1 、*Zymomonas mobilis* 生物代謝途徑總覽

Fig 2-1. Overview of metabolic pathway of *Zymomonas mobilis*

( Sahm et al., 2006 )

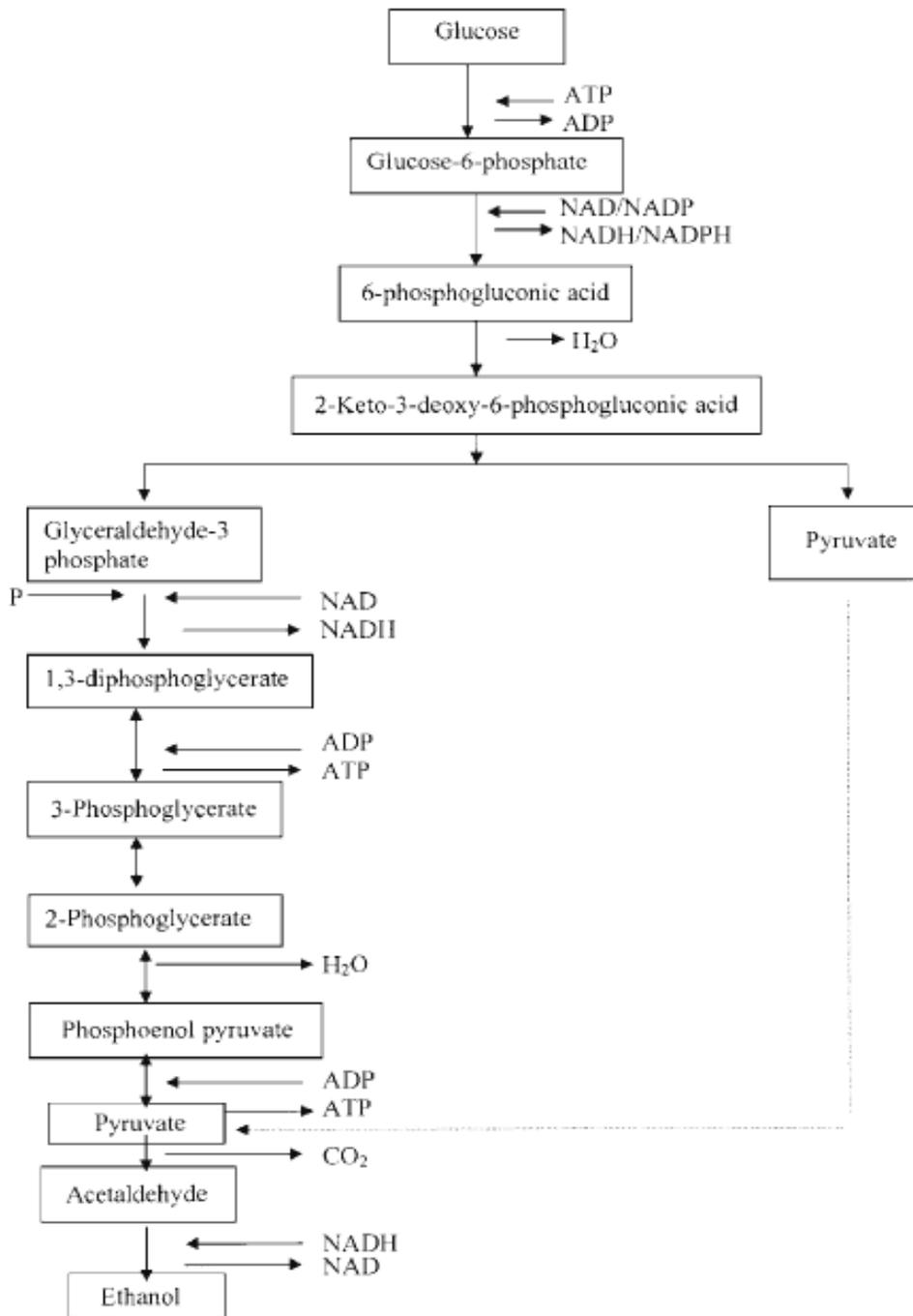


圖 2-2、*Zymomonas mobilis* 的 Entner-Doudoroff pathway

Fig 2-2. Entner-Doudoroff pathway in *Zymomonas mobilis*

( Panesar et al., 2006 )

若培養基的碳源為果糖時，則菌體的生長和酒精產率皆較低，這是因為會產生 acetaldehyde、glycerol、dihydroxyacetone 等副產物，同時消耗部分 ATP ( McGill et al., 1971 )。

當 *Z. mobilis* 以蔗糖為碳源時，酒精之產率明顯低於以葡萄糖或果糖為碳源者，原因為菌體無法將蔗糖磷酸化而直接消化，必須分泌酵素將蔗糖水解成葡萄糖與果糖後才可利用，而水解的過程中，同時會產生 levan 和 sorbitol ( Viikari et al., 1984, Kannan et al., 1993 )。而 *Z. mobilis* 利用蔗糖為碳源時，發酵過程中會牽涉到三種酵素，分別為 intracellular invertase (E1)、extracellular levansucrase (E2) 及 extracellular invertase (E3) ( Yanase et al., 1985 ) (圖 2-3)，其中最主要的酵素為 levansucrase，此酵素 90% 的活性發現存在於培養基中，10% 在胞內，並兼負蔗糖水解與果聚糖( levan )的合成兩種作用( Lyness et al., 1983 )。 *Z. mobilis* 只會在含有蔗糖之培養基中，才會生成 levan，但是不會在只有葡萄糖與果糖的混合物為碳源時產生( Leigh et al., 1984 )。

從不同來源分離出之 *Z. mobilis*，其酒精產量也會有所不同，且有些菌株對高糖分有較好的耐受性，而有些則耐高酒精濃度或是較耐高溫培養，有些不能利用蔗糖，有些則可以利用蔗糖為碳源，生產大量的聚果糖複合物( levan ) ( Skotnicki et al., 1981 )。

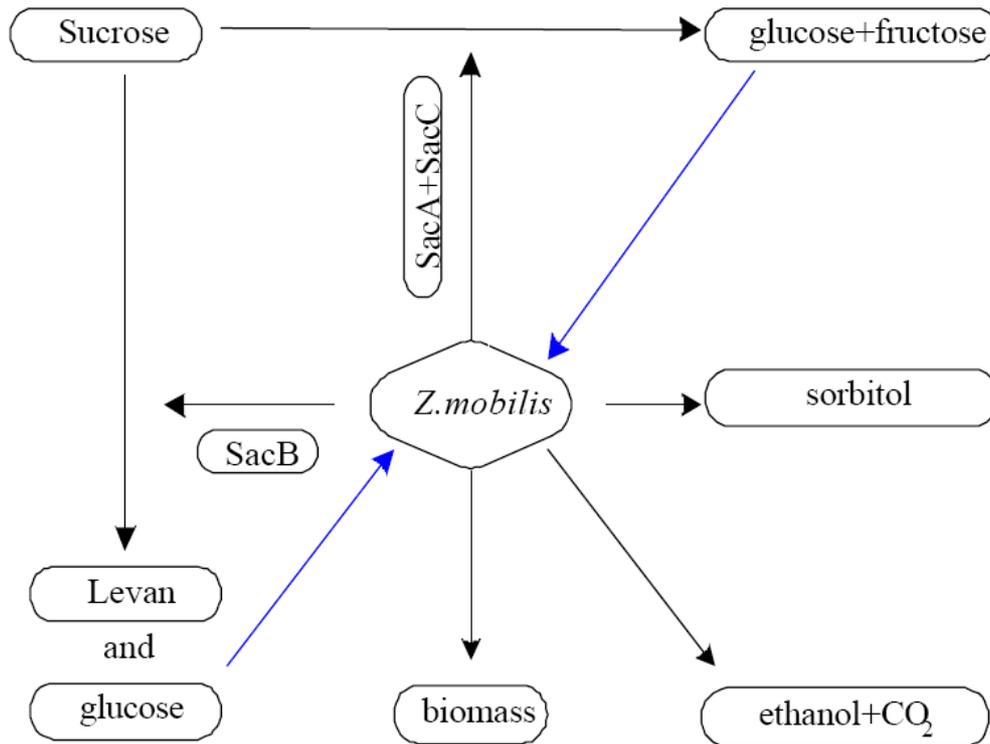


圖 2-3、*Z. mobilis* 以蔗糖發酵之 SacA、SacB 與 SacC 的作用示意圖  
 ( SacA：胞內蔗糖分解酵素、 SacB：胞外蔗糖-6-果糖基轉移酵素、  
 SacC：胞外蔗糖分解酵素)

Fig 2-3. Role schematic diagram of sucrose fermentation with SacA、  
 SacB and SacC by *Z. mobilis* ( SacA: intracellular invertase; SacB:  
 extracellular levansucrase; SacC: extracellular invertase )

( Yanase et al., 1985 )

### 2.1.3 *Zymomonas mobilis* 之相關研究

Rogers 等( 1980 )利用 *Z. mobilis* ATCC10988 與 *Saccharomyces uvarum* 兩株菌，以不同濃度的葡萄糖為碳源進行發酵，研究顯示，*Z. mobilis* 在葡萄糖濃度 25%時，比生長速率( specific growth rate )及葡萄糖利用率( glucose uptake rate )皆高於 *S. uvarum*，在酒精轉換率上，前者為 92.5%，高於後者的 86%，而這兩株菌的最高酒精產量分別為 102 g/l 與 108 g/l，相差不到 6 g。

Carey 和 Ingram ( 1983 )研究利用 *Z. mobilis* 中的脂肪組成來探討此株菌對酒精及葡萄糖的反應。結果顯示，兩者不會對其脂質組成直接造成影響，但是會造成 phosphatidylethanolamine 與 phosphatidylglycerol 的比例，而且酒精也是對細胞膜的一種傷害，因此，*Z. mobilis* 在膜脂質上的改變或許是為了可在酒精中生存所做的調整。

Lee 和 Huang ( 1995 )以蔗糖為主要碳源的培養基，加入固定化的 invertase，以促進 *Z. mobilis* 對蔗糖的水解速率，發現可降低此株菌在發酵過程中產生的副產物，如 levan 與山梨醇，進而提高酒精的產率。

Ohn 等( 1996 )將 *Aspergillus awamori* 與 *Z. mobilis* 兩株菌利用共固定化( co-immobilized )系統同時固定，研究顯示，此兩株菌能夠在共固定化系統中，直接以澱粉為碳源的培養基中發酵生產酒精，因為

*A. awamori* 能產生 amylase 將澱粉水解成葡萄糖後，*Z. mobilis* 即可利用這些葡萄糖來生成酒精。

Kannan 等( 1998 )學者利用突變種的 *Z. mobilis* 來發酵蔗糖生產酒精，因為此突變菌種無法生產 levansucrase 及 intracellular sucrase 這兩種酵素，因此，以蔗糖為碳源時，不會產生 levan 與山梨醇等副產物，即可增加酒精的產量。

Ananthalakshmy和Gunasekaran ( 1999 )探討利用 *Z. mobilis* B-4286 生產 levan 之最適條件，以不同濃度之蔗糖為碳源生產 levan，結果顯示，當蔗糖濃度從 50 g/l 上升至 150 g/l，levan 產量則由 5.7 g/l 增加至 12.6 g/l，但超過 15% 之蔗糖濃度，不會增加 biomass，而在 pH 5、30°C，levan 之產量可提升至 15 g/l。當培養溫度為 35 與 40°C，則無 levan 的產生；若再添加葡萄糖或果糖於培養基中，levan 產量會下降，從 12.6 g/l 分別降至 2.8 g/l 及 6.7 g/l，葡萄糖濃度太高所造成 levan 產量下降的影響較大。

Calazans 等( 2000 )學者利用 *Z. mobilis* CP-4、ZAP、ZAG-12 及 Z-1-81 四株菌株生產 levan，所得的分子量不同(  $3.53 \times 10^5$  至  $1.07 \times 10^6$  Da )，對具有肉瘤細胞的瑞士白鼠之腫瘤細胞的抑制能力測試，研究顯示，以分子量 456.9 kDa 之 levan 對抑制腫瘤之能力最佳( 72% )，其他依次為 720.2 kDa ( 53% )、769.5 kDa ( 43% )、1073.5 kDa ( 43% )、

353.5 kDa (27%)，因此，認為levan之分子量大小會影響抗腫瘤效果。

Amutha 和 Gunasekaran (2001) 將 *Z. mobilis* 與 *Saccharomyces diastaticus* 共固定化(co-immobilized)後，以處理後的樹薯泥為碳源，並且也分別利用 *Z. mobilis* 與 *S. diastaticus* 的個別菌來發酵樹薯泥，研究發現，以單株菌進行發酵時，酒精產量分別為 46.7 g/l 及 37.5 g/l，若是以共固定化系統發酵，則酒精產量可達 53.3 g/l，因為 *S. diastaticus* 會產生 amyloglucosidase，先將樹薯泥做處理，使葡萄糖濃度增加，之後 *Z. mobilis* 再利用這些葡萄糖，使酒精產量提高。

Bekers 等(2001) 以不鏽鋼絲球、氧化鋁顆粒以及褐藻酸鈣為固定化載體，利用固定化 *Z. mobilis* 113S 菌體進行重複批次發酵蔗糖，研究顯示，這三種固定化方式，所得菌量皆相似，而最大之酒精濃度與 levan 產量在第二及第三個發酵週期時，分別為 2.3~2.7%、1.3~1.5%，並可觀察到發酵過程中，levan 會覆蓋在氧化鋁顆粒之表面上，而發酵後期，褐藻酸鈣膠粒會被破壞。

Alegre (2005) 將變種之 *Z. mobilis* CCT 4494 以蔗糖為碳源，發酵生產 levan，結果顯示，levan 之產量可達 42 g/l。

Rebros 等(2005) 利用 polyvinylalcohol 的水凝膠來固定化 *Z. mobilis*，文獻中證明菌體可以固定在這種高分子上，而且可以有效的降低成本，同時增加了酒精產量，對工業及發酵工廠是極有利的。

Oliveira 等( 2007 )學者利用 commercial sucrose、molasses (糖蜜) 以及 sugar cane syrups (甘蔗糖漿)這三種較低成本為碳源，以 *Z. mobilis* ATCC 31821 進行發酵生產 levan，其產量分別為 21.685 g/l、2.533 g/l 與 15.456 g/l，雖然 sugar cane syrups 之 levan 產量較 commercial sucrose 低 28.724%，但是前者之 biomass 是後者的 2.76 倍。

林( 2008 )利用回應曲面實驗設計法( response surface methodology, RSM )進行*Z. mobilis*轉化葡萄糖成酒精之培養基最適化，研究證實，其組成為葡萄糖 166.5 g/l、yeast extract 6.1 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l、 $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  1 g/l與 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/l，可得之酒精濃度、產率及理論轉化率分別為 77.75 g/l、3.24 g/l/h與 91.36%，並利用藻酸鈣做為固定化菌體的載體，進行重複批次發酵，發現固定化系統優於懸浮菌體。

蘇( 2010 )以蔗糖為碳源與以 yeast extracts 為氮源，利用 *Z. mobilis* ATCC 29191 發酵生產 levan，並以泡棉、菜瓜布、發泡煉石及生化濾球為載體，將菌體固定化後進行重複批次發酵，研究結果顯示，以泡棉作為菌體固定化之載體在蔗糖濃度 10.0% 與 yeast extract 濃度 1.0%，以及調整起始 pH 5.0 於靜置不通氣的條件下，進行 *Z. mobilis* 反覆批次發酵，levan 產量可在較低成本與短時間內達最大產量。

## 2.2 *Zymomonas mobilis* 之果聚糖(levan)介紹

Levan 首先是由德國學者 Lippmann 於 1881 年所形容出來的，當初提議之名字為 laevulan，在 1901 年時，另一位學者 Greig-Smith，發現 *Bacillus* 此菌種在利用蔗糖生長代謝的過程中產生了果寡糖，於是將此命名為 levan。

Levan 是一種果糖的聚合物 (frutan)，為果寡糖 (fructooligosaccharide, FOS) 的一種，果寡糖又名低聚果糖，是寡糖中的一類。果寡糖之合成途徑為果寡糖基轉移酶對蔗糖分子與一至多個果糖分子進行反應，藉由酵素催化蔗糖末端的果糖基轉化至另一蔗糖分子上，而產生蔗果三糖，其再被果寡糖基轉移酶催化成蔗果四糖或蔗果五糖，或是由蔗果三糖末端轉移果糖基至另一個聚果糖分子，產生聚合度 (DP; degree of polymerization) 大於三的果聚糖(黃等人，2010)。屬於自然界中高分散性的生物聚合物，主要是由 D-fructofuranosyl 此官能基以  $\beta$ -2,6 與  $\beta$ -2,1 鍵結成同質聚合物，並以 GF<sub>n</sub>, n= 2-10 表示。果寡糖目前是依照鍵結的方式做區分，分為 levan 及 inulin (菊糖) 兩種，而前者之水溶性高於後者。’

### 2.2.2 levan 之組成及結構

Levan 是一種天然的聚果糖，內含單體 D-fructofuranosyl，以  $\beta$ -2,6 方式鍵結的蔗果三糖 (6-kestose; GF<sub>2</sub>) 佔主結構中的大比例，並廣

泛伴隨 $\beta$ -2,1 的支鏈鍵結(圖 2-4, Rhee et al., 2005), 其分子形狀在電子顯微鏡中可看到球狀體, 並觀察到主鏈是依照相同生成代謝速度延伸成放射狀。結構分類上為左旋糖, 沒有固定形狀並有微量結晶, 可溶解於冷水中, 而在熱水中溶解度更高。

而Levan的分子量計算是將許多支鏈殘基上的片段合併起來, 其中細菌產生的levan, 有超過 30%的殘基在側鏈, 所以微生物生產之levan會比植物性levan的分子大。來自植物之levan分子量範圍約在 $2.0 \times 10^3$ 至 $3.3 \times 10^4$  Daltons ( Rhee et al., 2002 ), 而*Z. mobilis*因其聚合度不同所生產的levan分子較大, 其範圍約為 $10^6$  Daltons ( Kennedy et al., 1989 )。且聚合成levan之單體數量以及聚合程度會受到培養基中營養成分濃度與環境因素的影響, 因而會有不同的分子量範圍出現。其化學結構及物理性特徵如: 分子量分級、鍵結形式、糖類成分與黏性等, 都已被廣泛的描述。

### 2.2.3 levan 之來源

許多植物組織中有小分子量的 levan, 分子量通常小於 5000 Da, 其含量通常不高, 目前商業生產 levan 的方法, 以細菌發酵蔗糖為主, 因為其成本低且生產時間較短(黃等人, 2010)。因此, 依照來源及生長條件可分為 plant levan 以及 microbially-produced levan (簡稱 Microbial levan), 兩者有不同的特性。Microbial levan 是指來自微生

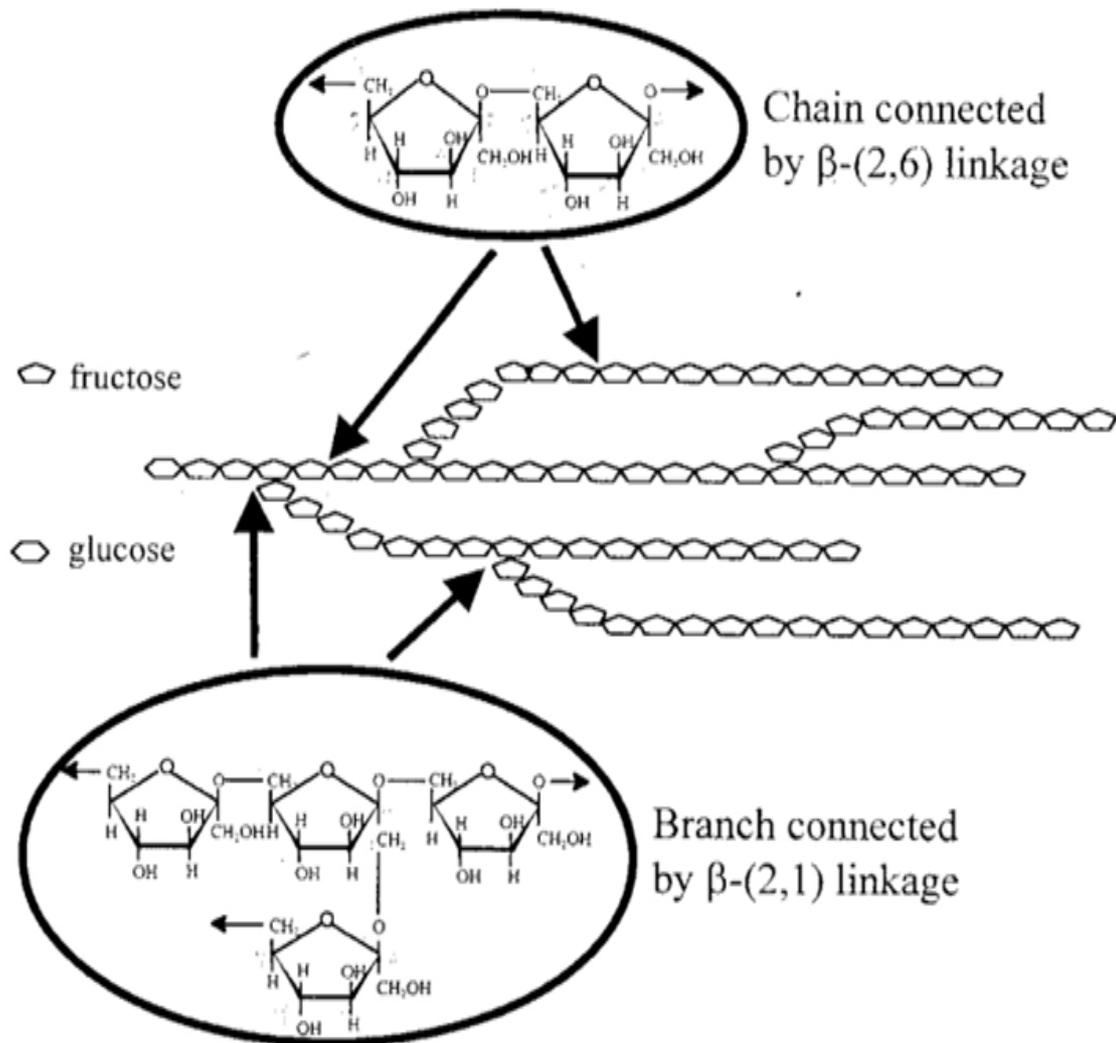


圖 2-4、Levan 的化學結構式。主鏈以  $\beta$ -2,6 鍵結，支鏈則在  $\beta$ -2,1 的分支點上與主鏈鍵結而成；而支鏈仍以  $\beta$ -(2,6) 鍵結為主

Fig 2-4. Structure of levan. The main chain is connected by  $\beta$ - 2,6 linkages and the branch is connected to the main chain by  $\beta$ - 2,1 linkage ; the branch then continues with  $\beta$ - 2,6 linkages

( Rhee et al., 2005 )

物中的 levansucrase 利用 sucrose 及 raffinose 為碳源而生產於細胞外的多醣類，主要由細菌生產，例如 *Bacillus subtilis*、*Zymomonas mobilis*、*Bacillus polymyxa*、*Aerobacter levanicum*、*Erwinia amylovora*、*aquatilis* 與 *Pseudomonas* 等菌株。表 2-4 (Youn, 1990) 列出可產 levan 之菌種。

### 2.2.3.1 levan 之合成

Levan 的合成過程牽涉一胞外酵素 levansucrase (  $\beta$ -2,6 fructan : D-glucose-1-fructosyltransferase, E.C.2.4.1.10 ) 作用，此酵素對蔗糖的作用相當明顯，是被認定由蔗糖轉換合成 levan 的主要原因(圖 2-5，Hehre, 1951)，其本身屬於轉化酶，催化 fructosyl 官能基藉由蔗糖接受不同受器時，而轉換成不同物質。在以蔗糖為碳源時，細菌所分泌之 levansucrase 會逐一將來自蔗糖的單一果糖基，加到正在增長的果聚糖鏈上之非還原端果糖上面( Han, 1990 )。

蔗糖水解成葡萄糖與果糖時會伴隨 levan 的產生，許多研究指出 levan 之形成是由 levansucrase 所催化的，此酵素兼具蔗糖水解與 levan 合成兩種作用( Lyness and Doelle, 1983 )。因此，levansucrase 為細菌生成 levan 的重要關鍵，表 2-5 列出可生產此酵素之菌種( Song and Rhee, 1994 )。

以下簡單介紹 levansucrase 作用的數種反應：

表 2-4、生產 levan 之微生物

Table 2-4. Microorganisms of levan produced

Microorganisms	References
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Loewenburg and Reese (1957)
<i>Actinomyces viscosus</i>	Pabst (1977); Warner and Miller (1978)
<i>Achromobacter</i> sp.	Lindburg (1957)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Srinivasan and Quastel (1958)
<i>Aerobacter levanicum</i>	Evans and Hibbert (1946); Feingold and Cahalia (1957); Takeshita (1973)
<i>Arthrobacter ureofaciens</i>	Tanaka et al. (1985)
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Hestrin and Goldblum (1953); Schlubach and Herndt (1964)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Mantsala and Puntala (1982)
<i>Bacillus megaterium</i>	Evans and Hibbert (1946)
<i>Bacillus mesentericus</i>	Hehre (1951)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Hestrin et al. (1943); Ninomiya and Kizaki, (1970); Han (1989); Murphy (1952)
<i>Bacillus subtilis</i>	Dedonder (1966); Tanaka et al. (1981); Hestrin et al. (1943); Mantsala and Puntala (1982); Perlot and Monson (1984); Yamamoto et al. (1985)
<i>Corynebacterium levaniformans</i>	Dias and Bhat (1962)
<i>Corynebacterium helveticum</i>	Abdou (1969)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Elisashvili (1981)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Corrigan and Robyt (1979)
<i>Micobacterium levaniformans</i>	Fuchs et al. (1985)
<i>Odontomyces viscosus</i>	Krichevsky et al. (1969)
<i>Phytomonas pruni</i>	Evans and Hibbert (1946)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Fuchs (1956); Evans and Hibbert (1946); Gross and Rudolph (1987)
<i>Rothia dentocariosa</i>	Leshner (1976)
<i>Streptococcus</i> sp.	Corrigan and Robyt (1979); Shimamura et al. (1987)
<i>Streptococcus salivarius</i>	Kleczkowski and Wierzchowski (1940); Fuchs (1956); Jung et al. (1987); Ribeiro et al. (1988); Dawes et al. (1966); Park et al. (1983); Lyness and Doelle (1983); Long et al. (1975)
<i>Xanthomonas</i> sp.	Dedonder and Peaud-Lenoel (1957); Fuchs (1959)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ribeiro et al. (1988); Dawes et al. (1966); Lyness and Doelle (1983); Viikari (1984)
Yeast	Fuchs et al. (1985); Loewenburg and Reese (1957)
<i>Aspergillus sydowi</i>	Loewenburg and Reese (1957)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Loewenburg and Reese (1957)

(Youn, 1990)

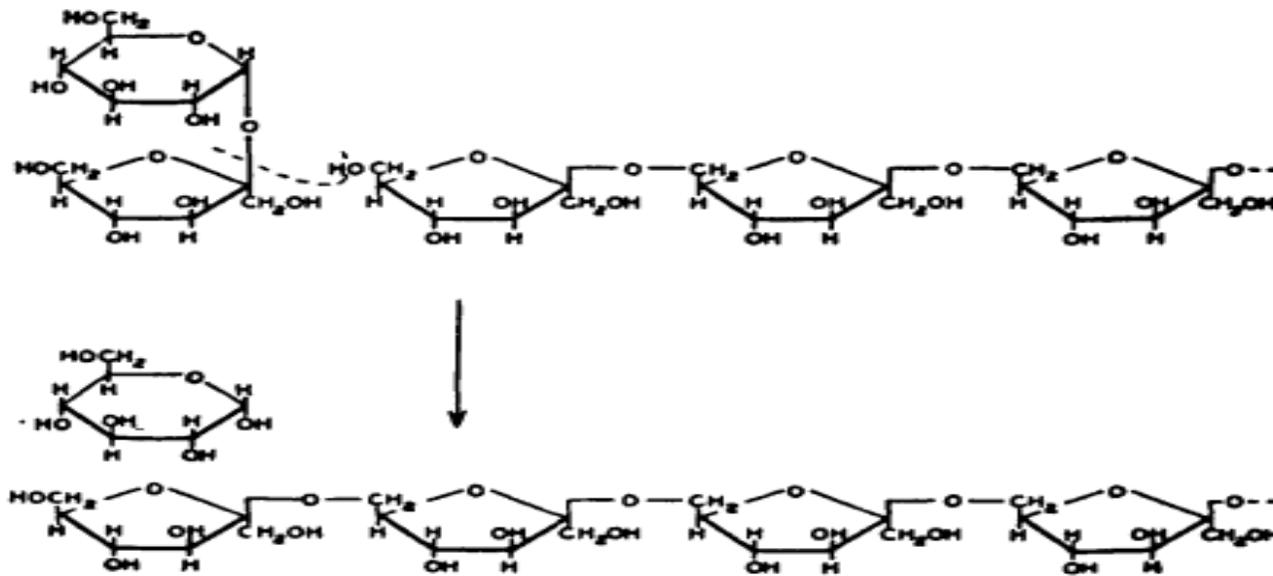


圖 2-5、蔗糖經過 Levansucrase 作用，生產多醣 Levan 的單位步驟

Fig 2-4. Unit step in growth of a levan molecule from sucrose, catalyzed by levansucrase

( Hehre, 1951 )

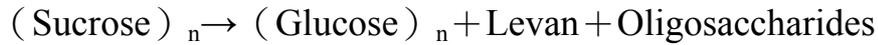
表 2-5、生產 levansucrase 的微生物種類

Table 2-5. Microorganisms producing levansucrase enzyme

Microorganisms	References
<i>Bacillus subtilis</i>	Tanaka et al., 1978
<i>Aerobacter levanicum</i>	Evans and Hibbert, 1946
<i>Bacillus polymyxa</i>	Han and Clarke, 1990
<i>Erwinia herbicola</i>	Keith et al., 1991
<i>Rahnella aquatilis</i>	Ohtsuka et al., 1992
<i>Zymomonas mobilis</i>	Yoshida et al., 1990 ; Dawes and Ribbons, 1966

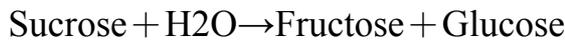
( Song and Rhee, 1994 )

1. Polymerization :



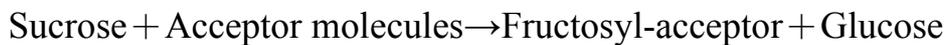
此反應會發生在蔗糖是 fructosyl 的唯一提供者與接受者時，會進行聚合反應生成果糖同質聚合物及自由態的葡萄糖。

2. Hydrolysis :



蔗糖與 levan 在以水為接受器並在 levansucrase 催化酶作用下生成自由態果糖，但此反應速率與以糖作為接受器時的反應速率的慢。

3. Acceptor :



當環境中有某種接受器存在時，levansucrase 可明顯地在此接受器的協助下將蔗糖中的 fructosyl 轉化成醛糖的 C-1 hydroxyl group。

4. Exchange :



此反應可與前述反應 2、3 相互比較，其中不同的是此反應中蔗糖的再生機制中有高能量鍵結。

5. Disproportionation :



此反應為不平衡反應，可觀察到 levan 與寡糖的多分散性程度是經過修飾的 ( Rhee et al., 2005 )。

### 2.2.3.2 levan 生成之影響因子

以細菌生產 levan 時，依每種細菌不同，其培養條件有所差異，發酵參數會影響 levan 的產率以及其分子大小等，主要參數包括培養溫度、蔗糖濃度、攪拌程度與 pH 等(黃等人，2010)，而細胞生長過程消耗碳源、副產物的生成、一些抑制 levansucrase 反應的產物及少數其他酵素生成也會造成影響( Song and Rhee, 1994 )。其中蔗糖濃度與溫度是影響 levansucrase 酵素活性及 levan 產生量的最大因素，許多 levan 是在較低溫的環境下產生的反應化合物，高溫則是有利於自由態果糖或短鏈寡糖的堆積，如表 2-6 ( Song and Rhee, 1994 )所示。

### 2.2.4 levan 之應用

初期的 levan 在工業上的利用較少，因其在工業製程上的產量太低，直到許多可以生產 levan 之微生物相繼被篩選鑑定出來，藉由基因工程技術大規模的將 levansucrase 轉殖到 *E. coli* 上生產 levan ( Seo et al., 1996 )，再將其產物及其衍生物應用在農業、化妝品、食品原料、動物飼料及製藥上( Clarke et al., 1997; Kim et al., 1998; Vijn and Smeekens, 1999 )。除此之外，levan 與其他物質混合後具有不同的功能，例如，levan acetate 與 levan 利用鍵結作用與 epichlorohydrin 混合

表 2-6、溫度對 levansucrase 進行 transfructosylation reaction 的影響

Table 2-6. Effect of temperature on the transfructosylation reaction of levansucrase

Temp. (°C)	Sucrose consumed (%)	Glucose liberated (%)	Fructose liberated (%)	$\frac{G - F^a)}{G}$ (%)	Oligo- saccharide formed <sup>b)</sup> (%)	Levan <sup>c)</sup> formed (%)
10	85.6	85.4	15.4	81.7	11.8	46.4
20	97.6	86.4	21.4	75.0	12.0	37.3
30	99.4	90.0	58.0	35.0	17.0	24.8
40	99.3	91.4	74.0	18.9	22.0	13.0

a) Transfructosylation activity: the ratio of the amount of difference between glucose(G) and fructose(F) liberated to the amount of glucose (G) liberated.

b) Converted into raffinose.

c) Based on the amount of fructose liberated.

( Song and Rhee, 1994 )

後可用於製作塑膠薄膜；亦可作為膠黏劑，或是與 ethylcellulose 混合或參雜在溶液或薄膜中 (Barone, 2007)。

Levan 的應用大致可分為食品加工層面、保健功效以及在水產養殖的應用上。

#### 2.2.4.1 食品加工層面

在食品應用上 levan 可代替糊精(dextran)，因其具有低黏性、高水溶性、高生物相容性與對酸水解敏感(Huber et al., 1994)。也可當乳化劑、成型劑、穩定劑、甜味劑、增稠劑及風味攜帶劑等(Han, 1990; 黃等人, 2011)，或是取代阿拉伯膠使用在食物上以及做為食品外層可食用的外膜(Huber et al., 1994)。Levan 是一種低熱量的天然水溶性植物纖維，具有低甜度與保濕性等特性，所以被廣泛應用於飲品、乳製品、糖果及麵食等 (Izzo and Niness, 2001)。

#### 2.2.4.2 保健功效

身體保健方面的功效，如抗腫瘤(Calazans et al., 1997; Yoo et al., 2004; 黃等人, 2010)、降低膽固醇(Yamamoto et al., 1999)、抗發炎(Vigants et al., 2001)以及提升免疫力(Calazanas et al., 2000; Yoo et al., 2004)等，也可做為血漿填充劑(Han, 1990; Liepa et al., 1993)。

Levan 會隨著分子大小的不同，具有許多不同的生理活性。文獻指出，當細菌生長在蔗糖環境中，可生產較大分子的levan，分子量約

為  $10^6$  Da，具有在血清中可誘發抗體形成的功能；而levan分子量範圍介於 30 kDa至 100 kDa則是可做為血液增量劑的功用( Rairakhwada et al., 2007 )。分子量為 25 kDa至 250 kDa則可做為血漿填充劑，因其打入血管後會自身體緩慢排出，因此無毒性。

較小分子之 levan 則具有高度抗腫瘤活性，文獻中表示，最佳抗腫瘤活性的平均分子量約在 456.9 kDa，顯示 levan 抗腫瘤活性是根據其分子大小，並且分子量不同分級也會影響 levan 的效用（表 2-7，Calazans et al., 2000 ）。除了 levan 之分子量大小左右其抗腫瘤活性外，也有學者探討其支鏈的影響，認為 levan 之化學結構對於抗腫瘤活性扮演著很重要的角色。

levan 也被發現能降低血中的三酸甘油酯與膽固醇濃度，學者推測其可能機制有四種，其中第一種為類似膳食纖維的效果，可以和膽酸及膽鹽結合，把它們排出體外，防止它們的再吸收，因此人體內會促進膽固醇在肝臟進行氧化作用，產生更多的膽酸，因而降低血膽固醇的濃度( Yamamoto et al., 1999 )。其他三種主要為 levan 是益生菌質，可促進乳酸菌生長，而乳酸菌本身及其代謝 levan 之產物具有降低膽固醇的特性( 黃等人，2010 )。

表 2-7、*Z. mobilis* 所產不同分子量大小之 levan 其抗腫瘤的活性

Table 2-7. Antitumour activities of different levan molecular weight by *Z. mobilis* produced

$\overline{M}_v$	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	Inhibition (%)	DP
75 650	353 500	25 300	27	14.0
170 100	1 073 500	68 400	43	15.7
210 897	456 900	28 200	72	16.2
230 851	720 200	45 900	53	15.7
313 940	769 500	50 100	43	15.4

<sup>a</sup>  $\overline{M}_v$ , viscosity average molecular weight;  $\overline{M}_w$ , weight average molecular weight;  $\overline{M}_n$ , number average molecular weight; DP, polydispersity degree.

(Calazans et al., 2000 )

而近期研究顯示，levan 具有刺激老鼠脾臟淋巴球之效果，且與 levan 施用之劑量呈正相關(黃等人，2010)，淋巴球增生為細胞及體液免疫反應活化的決定性因子，因此，levan 與提升免疫反應有密切關係。而也有文獻提到，levan 具有當作益菌質( prebiotic )的特性，所謂益菌質是人體無法消化吸收的食物成分，會在大腸中選擇性的刺激益菌生長，當這類益菌生長同時，所產代謝物會抑制害菌，所以可以調整腸道菌叢生態，進而增進宿主的健康。

#### 2.2.4.3 水產養殖的應用

而近年來已有學者將 levan 應用在水產養殖研究上(黃等人，2011)。因為 levan 可促進乳酸菌等在動物腸道繁殖，進而抑制有害細菌，因此，推測 levan 也可用在調整魚類腸道之菌相、增加菌叢生態平衡、降低不良細菌數量並增強免疫能力等，進而提升魚類養殖成效。

研究指出，levan 可提升魚類免疫調節功能，因為其能增加血液中白血球數量與血清中溶菌酶、減輕魚隻內臟受病原菌攻擊後受傷之程度( Gupta et al., 2008 )、提高血液中總紅血球和血紅素含量、血清之總蛋白及球蛋白含量與提高魚隻抵抗病原菌之能力等( Rairakhwada et al., 2007 )，levan 也可增強魚隻在高溫環境的耐受情形。如上述所示，有關 levan 應用於水產養殖之潛力值得關注。

## 2.2.5 levan 產量之測量方式

Levan 的測量方式有許多方式，較常使用的是高效能液相層析法 (high-pressure liquid chromatography, HPLC) 進行分析，選用離子交換管柱，搭配以四元素所組成的梯度幫浦及分別以金、Ag/AgCl 為電擊的脈衝安培檢測器來記錄發酵液中的 levan 含量( Rairakhwada et al., 2007)。另外也有使用酸水解的方式，先將 levan 用 0.1N HCl 在 100°C 下水解一小時後，利用 3,5-Dinitrosalicylic 測量水解液中果糖的單位數進行換算( Kannan et al., 1993)。除此之外，還有利用酚硫酸法的呈色反應來換算 levan 產量，利用其不溶於高濃度酒精的特性，將 levan 析出後經過酸水解並與酚結合產生橙黃色物質，記錄其吸光值帶入標準曲線後，換算求得產量( Vikari, 1984)。本試驗使用的方式為酚硫酸法進行 levan 的測定。

## 2.3 液態培養

液態培養( liquid-state culture )又可稱作深層培養或深層發酵培養( submerged cultures )，培養方式是將微生物接種於液態培養基中，在生物反應器中進行相關的生化反應，並控制培養基的基質、溫度、pH 值、通氣量、攪拌速率等影響因子，使微生物生長，而產生具有生理活性之代謝物，常用於真菌與細菌的培養。優點為可有效控制微生物生長所需的條件，相較於固態發酵，液態培養的週期短、成本低、

產量較穩定，以及可提供細菌較高的含水量環境生長。

### 2.3.1 液態培養之影響因素

培養的過程中影響的因素很多，如不同的菌種及其生長特性、培養基組成，包括碳源、氮源、微量元素、接種濃度與 pH 值，以及是否有攪拌、氧氣需求與發酵槽的型態。

液態培養可能影響菌體生長及代謝產物的關鍵因子，可分為化學與物理因素兩大類。

#### (一)、化學因素

化學因素中主要是培養基的組成，它是微生物所需營養的來源，而培養基中最主要的就是碳源與氮源。

##### 1. 碳源：

主要是構成細胞質的重要物質，並提供菌體生長所需的能源 ( Keith et al., 1991 )。一般來說，愈高之碳源濃度愈有利於菌體生長，但是過高的濃度反而會產生抑制的作用 ( Hsu et al., 2002 )，本試驗之菌株 *Z. mobilis*，其碳源濃度最少為 2%，最多可達 20% ( Litchfield, 1979 )，但依不同來源之菌種，使用的碳源濃度會有不同。

##### 2. 氮源：

是菌體構成蛋白質與核酸之主要元素，不同種類之氮源及含量多寡皆會對菌體造成影響。氮源又分成無機和有機氮源，後者可轉換成

碳源，可進一步使碳源增加，以供菌體生長，因此，較常選用有機氮源。

### 3. 無機鹽類：

可做為培養基中的緩衝物質，穩定發酵過程中的環境，進而影響菌體生長及代謝產物的產量，但添加濃度不宜過高，無機鹽類如硫酸銨、磷酸二氫鉀、硫化鐵等。

### 4. 微量元素：

對菌體的生長也有正面影響，包含構成細胞組成，做為酵素輔因子、維持酵素作用及調節新陳代謝等功能，微量元素如 Fe、Mn、Co、Mo、Mg 等。

### 5. pH 值：

培養基之 pH 值會影響細胞膜的通透、酵素活性以及改變培養基中離子的狀態，造成菌體對營養物質攝取的改變，也會使代謝產物種類不同及產量受到影響。

## (二)、物理因素

### 1. 攪拌：

攪拌速率也會影響到菌體的生長情況，而攪拌速率高低會隨著菌體適合生長的環境做改變。

### 2. 氧氣：

氧氣對於微生物生長、營養物質的傳遞與代謝產物的生成有很大的影響，因此，在好氣性微生物的液態發酵中，氣體的供應也是重要因素。單位以通氣量(vvm)表示，代表每分鐘每公升培養液體積通入的氣體體積 ( gas volumn/ liquid volumn/ minute )。氧氣的供給會依照微生物種類與其生長特性而有所不同，如厭氧菌培養時，可在培養液中通入氮氣或二氧化碳以利其生長。

### 2.3.2 發酵方式

在液態培養中，進行生化相關反應的裝置，稱之為生物反應器 ( bioreactor )或俗稱發酵槽( fermentor )。生物反應器的操作方式大致上可分為三類，批式發酵、饋料批次發酵以及連續式發酵。這三種發酵方式各有其優缺點，如表 2-8 (梅，1999； 林，2003 )。

#### 1. 批式發酵 ( batch fermentation )：

是最常應用於各類發酵產品上之方式，將營養物質及菌種一次加入，在密閉系統中進行培養，期間除了 pH 值的控制、空氣的進入及排出外，與外部沒有物料的交換，故污染機率低；但由於對外隔絕以及發酵培養液之體積固定，導致產物的抑制作用大，再加上清洗、滅菌、重新置換培養基等停滯時間長，故生產速率相對偏低。

#### 2. 連續式發酵 ( continuous fermentation )：

指以一定速度向發酵槽內添加新鮮培養基，同時以相同的速度取

表 2-8、三種發酵方式之優缺點

Table 2-8. Advantages and disadvantages of three types of fermentation

發酵方式	優點	缺點
批次	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 發酵週期短</li> <li>2. 菌種退化率小</li> <li>3. 汙染機率低</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 因清洗、滅菌、重新置換培養基等停滯時間長</li> <li>2. 經常滅菌會降低儀器壽命</li> <li>3. 前培養和種子花費大</li> </ol>
饋料批次	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 染菌、退化機率低</li> <li>2. 使反應系中營養物質濃度保持一段較長的時間，又不造成不利的影響，進而達到提高產率的目的</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 非生產時間長</li> <li>2. 只根據一、兩個一次檢測的靜態參數（基質殘留量、pH、溶氧等）設定控制點，帶有一定的盲目性，不太能同時滿足微生物生長以及產物的生成</li> </ol>
連續式	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 提供一個穩定且高速生長環境</li> <li>2. 在工業生產上，可減少清洗、裝料、滅菌及接菌等的操作時間，以提高生產效率</li> <li>3. 產物質量較穩定</li> <li>4. 設備的體積可以減小</li> <li>5. 便於自動化管理，節省人力物力，生產費用較低</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在長時間培養過程中，微生物菌種容易發生變異，也較易被汙染</li> <li>2. 新加入之培養基與原有培養基若沒有完全混合，易影響培養和營養物質的利用</li> </ol>

(梅，1999； 林，2003)

出發酵液，因而使得反應器內的液體容量維持一定，微生物得以在穩定的環境下生長，在操作正確之下，菌體可以有效的延長批式培養中對數期的時間。穩定狀態下，微生物所處的環境條件，如營養物質濃度、產物濃度、pH 值等等都能保持恆定，則菌體濃度及生長速度也能維持不變，甚至可以依需要來調整生長速度。因此，相較於批次發酵，連續式發酵可以減少批次發酵之停滯時間，使生產速率相對增快。

### 3. 饋料批次發酵( fed-batch fermentation )：

介於批式發酵及連續式發酵間的一種發酵技術，又稱半連續發酵，指微生物在批式發酵時，以某種方式向反應系統內加入一定新鮮培養基的技術，以維持菌體生長或是誘導產物生成。透過此技術操作，可以使反應系中營養物質濃度保持一段較長的時間，又不造成不利的影響，進而達到提高產率的目的。缺點在於只能根據一、兩個一次檢測的靜態參數（基質殘留量、pH、溶氧等）設定控制點，帶有一定的盲目性，不太能同時滿足微生物生長以及產物的生成，亦不可能完全避免基質的濃度調控反應。

## 2.4 菌體固定化之介紹

菌體固定化( cell immobilization )的定義為利用人工技術將微生物細胞限制在固定的空間中，以物理或化學的方法將生物觸媒( biocatalyst )固定在一載體上，此處生物觸媒可泛指為細胞或酵素

( Scott, 1987 )，使微生物細胞附著於載體表面而形成生物膜 ( biofilm )，或是將微生物包埋於載體內而成的生化觸媒(卓，2008)。

固定化後的微生物，利用載體所擁有的物理特性或化學活性，能給予生長代謝過程中更好的環境與使用效率。而固定化菌體大致可分為兩種型態，其一為自然固定化，另一種為人工固定化( Cohen et al., 2001 )。

#### 1. 自然固定化( self-attachment immobilization )

在人為提供的環境下，微生物細胞自然附著或凝集於支持物、載體表面或是多孔性載體內部，而形成生物膜，又可稱為 attached growth。

#### 2. 人工固定化( artificial immobilization )

以人工技術將有活性的微生物細胞固定在載體表面或內部，而形成生化觸媒。

### 2.4.1 固定化之方法

不同的固定化方法會影響菌體的活性，所以，菌體的可利用性與再利用性，以及穩定性等都是在選擇固定化方法時，需要考慮到的因素。近幾年來，依照固定化方法與載體的不同，大致可分成四大類，分別為附著或吸附於載體表面上、包埋多孔隙的載體中、以自然或是人工的方式誘導使生物絮凝，以及利用機械方法限制菌體的活動空

間( Pilkington et al., 1998 )。個別說明如下：

(一) 附著或吸附於載體表面上

1. 吸附法( adsorption )：

利用生物體與載體間的物理作用力，如凡德瓦力、氫鍵等靜電力與疏水性的作用力，來進行吸附並固定在載體之表面(圖 2-6 (a))。由於利用生物體與載體間的表面作用力，使之附著於載體上，所以不需要額外的化學活化，因此，相較於其他固定化方法，具有操作簡單、固定化條件溫和、載體可重複使用以及細胞活性損失小等優點；但是作用力較微弱，因此，很多因素會造成脫附的發生，如 pH 值、溫度、離子強度、培養基濃度改變、進料的流動速率與攪拌、顆粒之間的磨損，皆會造成生物體的損失，同時也增加產品的回收難度(吳等人，2006)。

2. 共價鍵結法( covalent binding )：

藉由共用電子對所形成的共價鍵，使微生物與載體緊緊連在一起(圖 2-6 (b))。兩者之間的連結，可直接結合，及利用特殊試劑活化載體之後，加入生物體進行偶合反應；另一種是透過間隔基( spacer )結合，此間隔基會改變微生物與載體之間的共價鍵的鍵長，以此提高生物體的移動性。相較於吸附法，結合較堅固及不易脫附等優點；但是因為此法所需的反應條件嚴苛，導致生物體易失去活性，以及載體不

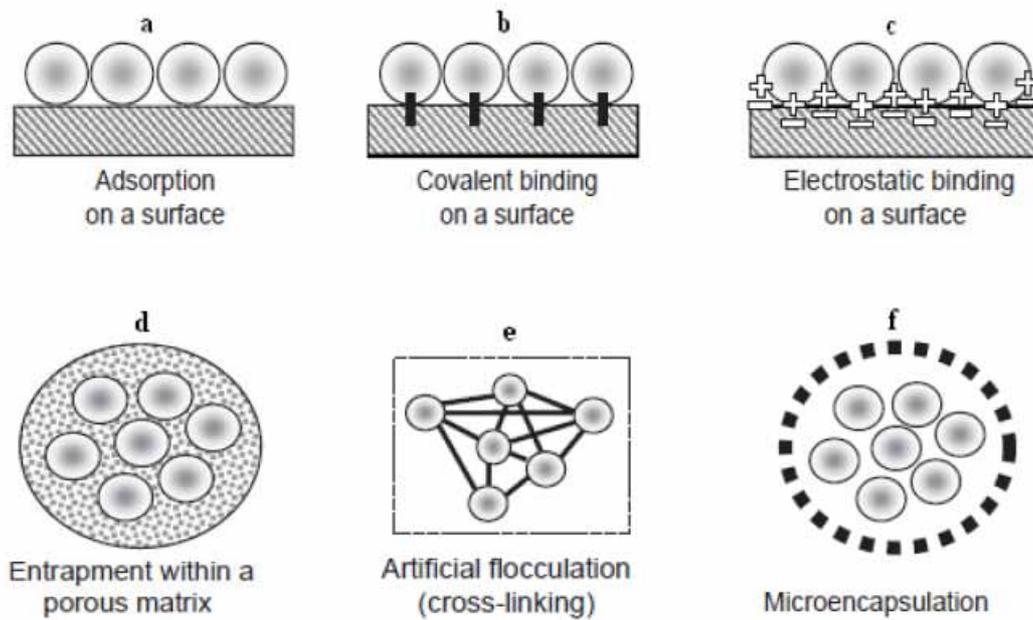


圖 2-6、固定化方法(a) 吸附法；(b) 共價鍵結法；(c) 離子鍵結法；  
(d) 包埋法；(e) 交聯法；(f) 包覆法

Fig 2-6 . Immobilization methods (a) adsorption; (b) covalent binding;  
(c) ionic binding; (d) entrapment; (e) cross-linking; (f) encapsulation

(李，2011)

方便重複利用(吳等人，2006)。

### 3. 離子鍵結法( ionic binding )：

是利用微生物與載體間帶相反電荷所形成之靜電吸引力，使兩者結合(圖 2-6 (c))。相較於吸附法，連結得更牢固，而且程序簡易，不會對生物體造成傷害；但相較於共價鍵結法，生物體與載體之間的鍵結仍不足，容易被外在環境影響，如 pH 值、溫度、離子強度及緩衝溶液(吳等人，2006)。

#### (二)包埋多孔隙的載體中

##### 包埋法( entrapment )：

利用高分子聚合物在凝膠時，將微生物包埋在分子鏈交錯而成之網狀結構內部(圖 2-6 (d))，此網狀結構孔隙不可以過大，一方面可防止包埋的生物體脫落，同時可進行基質與產物的擴散作用(林，2005)。常用載體材料為高分子聚合物，如藻酸鈉、果膠、鹿角酸鈉與瓊脂。其特點會隨使用目的不同，可將固定化微生物的外觀形狀制成不同的，如球狀、圓柱狀、似纖維狀及似平板狀等，具有固化、成型方便、對生物體活性影響小以及固定化菌體密度高等優點(吳等人，2006)；但菌量的累積會使基質與微生物在質傳上有一定的影響( Kourkoutas et al., 2004 )。

#### (三)以自然或是人工的方式誘導使生物絮凝

交聯法( cross-linking )：

為一種不使用載體的固定化技術，利用物理或化學方式使微生物相互鍵結在一起，而形成三級的立體交織網(圖 2-6 (e))。如細菌的細胞壁是由肽聚糖(peptidoglycan)聚合而成，以肽鍵結合，再利用醛類化合物做為交聯劑，如己二醛(glyoxal)或戊二醛(glutaraldehyde)，與肽聚糖形成亞胺(imine)鍵結，以達到細胞相互鍵結的效果(Fride, 1995)。相較於其他固定化方法，此法的製備簡單；但是製備出的凝聚物不堅固，而且基質會因質傳限制無法進入凝聚物內部，導致微生物活性降低(吳等人，2006)。

(四)利用機械方法限制菌體的活動空間

包覆法(encapsulation)：

利用外層高分子半透膜來限制菌體活動，其內部為一液態環境，微生物以懸浮方式生長(圖 2-6 (f))。優點是可提供菌體足夠的生長空間；但固化生物體之膜有生物淤積(Gryta, 2002)、質傳限制(Lebeau et al., 1998)、機械性質差(Yoo, 1996)與膜污染等問題。

## 2.4.2 固定化技術之特性

相較於懸浮菌體，固定化菌體由於有載體的保護，較不易受外界環境的影響，並且還可以重複使用，得以延長菌體的使用時間及維持操作系統的穩定性。各種固定化方法在應用上都有不同的限制在，如

表 2-9 (陳，2003)，因此，可依照不同需求，選擇所需要的特點加以應用如表 2-10 (林等人，2002)。

### 2.4.3 固定化菌體之優點

菌體固定化後，可減少生物催化劑原本所具有的不安定性，以及不易掌握與無法重複利用等缺點。因此，菌體固定化具有以下優點 (林，2008)：

1. 菌體密度高，進而提高代謝速率與縮短產出代謝物的時間。
2. 固定化的菌體可重複使用，減少在實驗過程中，等待重新培養的時間與培養時所耗損的原料，以便降低成本。
3. 顯著的增加保存及使用期間的安全性。
4. 可提高反應生產物的純度與效率，並且產物容易分離。
5. 因為微生物的流失少，可用於反應的連續化。
6. 方便設計成適合使用的形狀與性質。

### 2.4.4 固定化之載體選擇

固定化的載體材料會影響菌體的發酵，理想的載體應該要不影響菌體活性、質傳性能良好、化學與物理性質穩定、機械強度高，而且在安全與環境的考量下，載體本身要無毒性、生物相容性、生物可降解性、載體再生容易以及使用壽命長與價格低廉等(李，2011)，如表 2-11 (吳等人，2006)。載體和固定化條件對菌體生長皆有很大的影

表 2-9、各種菌體固定化方法之比較

Table 2-9. Comparison of different immobilized cell techniques

Characteristic	Cross-linking	Physical adsorption	Ionic binding	Covalent binding	Entrapment
Preparation	Intermediate	Simple	Simple	Difficult	Difficult
Binding force	Strong	Weak	Intermediate	High	Intermediate
Enzyme activity	Low	Intermediate	High	High	Low
Regeneration of carrier	Impossible	Possible	Possible	Possible	Possible
Cost of immobilization	Intermediate	Low	Low	Intermediate	Intermediate
Stability	High	Low	intermediate	High	High
Protection of enzyme from microbial attack	Possible	No	No	No	Yes

(陳，2003)

表 2-10、固定化菌體的特性與選擇規範

Table 2-10. Characteristics of the immobilized cells and selection specification

固定化菌體的特性	固定化菌體的規範
溶解度	低
生物分解度	低
穩定度	高 材質必須有好的機械強度和黏彈性質 因此對於摩擦敏感度不高
擴散係數	高
成長	必須的 菌體必須能夠在固定化程序中存活 並在固定化材質中繁殖
固定化程序	簡單的 固定化在大規模操作上是可能的
價錢	低

(林等人，2002)

表 2-11 、選擇固定化載體及方法時需要考量的基本要件

Table 2-11. Basic requirements of immobilization carrier for microbial cells

特性	考慮因素
物性、化性	強度，非壓縮顆粒，有效表面區域，形狀(顆粒、薄膜、纖維狀)，孔洞程度，顆粒體積，滲透性，密度，微生物生長空間，流動速率。親水性(載體與水的鍵結)，對微生物不具反應性，載體的再生性及重複使用。
穩定性	微生物產率，微生物活性再生與維持，載體穩定性。
抗性	外來菌體的侵害，化學藥劑分解，pH，溫度，有機溶劑，微生物防禦機制(蛋白質)。
安全性	生物相容性(免疫反應)，添加反應劑之毒性，製備過程及最終產物對人體健康和安全的影響，應用於食品、醫藥及醫學上需特殊之固定化製備。
經濟效益	載體的取得及成本，化學藥劑，特殊設備，技術需求，環境衝擊，工廠規模，放大製程的可行性，連續製程，載體的重複使用性，CRL*或 zero 汙染。
反應	流動速率，微生物負荷量及生產率，反應動力學，子反應，多微生物系統，批次、CSTR、PBR、FBR、ALR**等，基質與產物質傳限制。

\*CRL：推測所承受風險程度( calculated risk level )

\*\*CSTR：連續攪拌槽反應器( continuous stirred tank reactor )、PBR：填充床反應器( packed bed reactor )、FBR：流體化床反應器( fluidized bed reactor )、ALR：氣舉式反應器( air lift reactor )

(吳等人，2006)

響，不同載體適用於不同菌種，而不同的固定化方法有不同的載體，如表 2-12。(吳等人，2006； Kourkoutas et al., 2004)。

#### 2.4.5 以泡棉為固定化載體

吸附法為一種簡易的技術，製備流程較簡單，可直接於反應槽中進行吸附作用，且不需要經過化學反應以達到固定化的成效，降低固定化對微生物的傷害，成本也較低。吸附法常用的載體有焦炭 ( coke )、磚頭 ( brick )、泡棉( polypropylene foam )以及含有木質纖維成分之天然載體，如木屑( sawdust )、木柴碎片( wood chips )、米殼 ( rice husks )、棉( cotton )與麥稈( straw )等。

Nagamube 等( 1988 )學者指出，以泡棉做為載體培養 *Penicillium chrysogenum* 進行生產 penicillin 時，發現菌體吸附在泡棉上後，可以使菌體較容易與培養液分離，而且菌體不會分散於培養基中，因此，培養液的黏度下降，有利於氧氣傳送，相較於懸浮菌體進行培養時，penicillin 濃度可提高 6 倍。

游( 1992 )中也提到以不同密度和孔隙度之泡棉為載體，固定化白腐真菌( *Phanerochaete chrysosporium* )進行染整廢水之脫色，研究顯示菌體在泡棉上之固定情形良好，沒有懸浮在培養基中。

另外，以泡棉為載體進行蘆筍與胡蘿蔔植物細胞固定化培養，結果顯示，三角瓶之懸浮培養時，胡蘿蔔細胞產率 0.12，蘆筍則為 0.28，

表 2-12、不同固定化方法常用的載體材料

Table 2-12. Carrier materials commonly used in different immobilization methods for microbial cells

methods	metarials
adsorption	aluminium、propylagarose、titania-activited glass、synthetic resin、silica gel、wood、sawdust、coke、bonechar、brick
covalent binding	cellulose、dextran、starch、porous glass、porous silica、polyacrylamide、nylon-acrylate copolymer
ionic binding	polygorskite、montmorilonite、hydromica、porous porcelain
entrapment	alginates、 $\kappa$ -carrageenan、agar、chitosan、gelatin、collagen
cross-linking	glutaraldehyde、toluene diisocyanate、hexamethylene diisocyanate
encapsulation	glycol、polyphenols、bishalogen formiate、polystyrol

(吳等人，2006； Kourkoutas et al., 2004)

若固定化後，產率分別為 0.41 與 0.26，固定化效率則為 60~90%及 91~95%，而在填充床反應器中固定化植物細胞培養，胡蘿蔔產率為 0.45，表示固定化的方式對於植物細胞的培養有利(劉，1993)。

另有文獻指出利用泡棉進行固定化靈芝生產胞外多醣，而固定化後之多醣產量為 50 mg/100 ml，相較於懸浮菌體培養時的多醣產量少 了 10 mg/100 ml，但前者之黏度下降了 50%，而較低的黏度有利於進行連續式發酵，也有利於發酵液的回收及純化(楊，1997)。

林(2005)研究顯示，泡棉與褐藻膠做為固定化載體，以重複批次方式發酵樟芝生產胞外多醣與 GABA，載體為泡棉時，胞外多醣及 GABA 產量分別為 0.21 mg/ml、9.3 mg/ml，固定化之菌體可重複使用 5 次；褐藻膠為載體時，兩者產量分別為 0.33 mg/ml 與 8.6 mg/ml，可重複使用此固定化菌體 3 次。文獻指出，而且泡棉在發酵過程中，不易瓦解，相較於褐藻膠比較穩定。

蘇(2010)的研究指出，以泡棉、市售菜瓜布、發泡煉石與遠紅外線生化濾球四種載體，進行固定化 *Z. mobilis* 重複批次發酵生產 levan，結果顯示，菌體吸附在泡棉上的能力優於其他三者載體，而且可在短時間內快速生產 levan，泡棉之效益最好。

因此，本試驗選用泡棉做為固定化 *Z. mobilis* 菌體之載體，進行連續式發酵生產 levan。

## 第三章 材料與方法

### 3.1 試驗材料

#### 3.1.1 試驗菌株

本試驗菌株為 *Zymomonas mobilis* ( ATCC29191 )，購買自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，以乾燥粉末方式保存。

#### 3.1.2 試驗藥品

- 3,5-dinitrosalicylic acid 購自西班牙 Panreac Quimica, S.A.U. 公司。
- Ethanol absolute ( 99.8% )購自德國 Ferak 公司。
- Fructose、yeast extract ( YE )、potato dextrose agar ( PDA )、等微生物級藥品購自印度 Himedia 公司。
- $H_2SO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、NaOH、phenol、sodium sulfite等試藥一級購自台灣聯工化學廠。
- Glucose 試藥級購自美國 Sigma 公司。
- Sucrose (台糖精製細砂)購自台灣糖業股份有限公司。
- Potassium sodium(+)-tartrate tetrahydrate 購自日本林純藥工業株式會社。
- 藥用酒精( 95% )購自景明化工公司。
- 菌體固定化載體材料 ( 泡棉，Polypropylene foam ) 購自喬

福泡棉股份有限公司。

### 3.1.3 培養基成分

活化培養基組成為

Glucose 20 g/l、Yeast extract 5.0 g/l

菌醃培養基組成為

Glucose 20 g/l、Yeast extract 5.0 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/l、

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g/l

發酵培養基組成為

Sucrose 100 g/l、Yeast extract 10.0 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/l、

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g/l

### 3.1.4 儀器設備

- 分光光度計( Spectronic 20 Genesys, model 4001, 大成儀器, 美國)
- 高溫蒸氣直立式滅菌釜( Huxleyhl-340, 永大明儀器, 台灣)
- 高溫蒸氣臥式殺菌釜 (永大明儀器, 台灣)
- 恆溫培養箱( Firstek, model: S302R, 一升科技, 台灣)
- 烘箱(熱風循環乾燥箱, 光勝儀器製造所, 台灣)
- 超音波震盪器( Power sonic 405, Hwashin Technol. Seoul, 韓國)
- 桌上型高速離心機( EBA 12, Hettich, 德國)

- 高速冷凍離心機( Hitachi himac CR22G II, 日立儀器公司, 日本)
- 恆溫循環水浴槽( EBCA-20PTS, 豪曉精密有限公司, 台灣 )
- 無塵無菌操作台 ( 海天科學股份有限公司, 台灣 )
- 電磁攪拌機 ( HMS-102, 弘宇儀器有限公司, 台灣 )
- pH meter ( SP-2200, Suntex, 台灣 )
- 氣相層析儀( HITACHI, G-5000A, 日立儀器公司, 日本)
- 膠體滲透層析儀( HITACHI, L-6000, 日立儀器公司, 日本)
- 蠕動幫浦 ( WATSON MARLOW, Model-505S, 323E, and 323S, 道遠企業有限公司, 英國)

## 3.2 試驗方法

### 3.2.1 菌種保存

將菌種培養於中，經 30°C 培養 48 h 後取 0.5 ml 之菌液至 eppendorf 管中，並加入 1 ml 無菌之 50% 甘油，混合均勻後放入 -80°C 冰箱保存之。

### 3.2.2 菌種活化

將上述菌株保存液培養於含活化培養基之試管中，經 30°C 培養 48 h 活化後，再取其菌液於活化培養基活化第二次，以同樣條件培養即可使用。

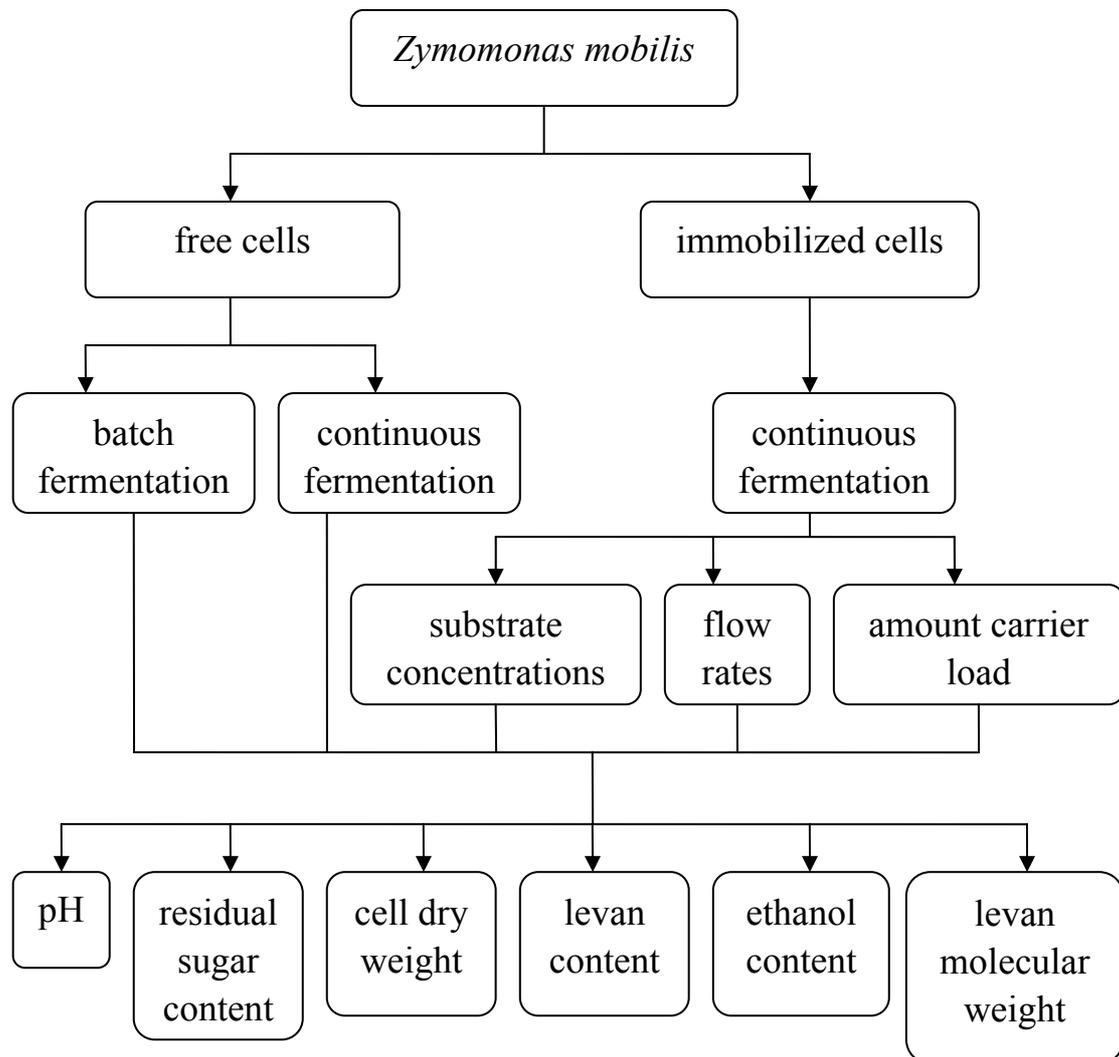
### 3.2.3 菌醃製備

將上述活化好的菌種，震盪混合均勻後，於 100 ml 菌醃培養基中接種 5% (v/v)，經 30°C 培養 24 h。培養好的菌醃經過震盪混合均勻後即可利用。

### 3.2.4 調整培養基 pH 值

pH 值的調整方法為在未滅菌前的培養基中加入 HCl 或 NaOH 來調整起始之 pH 至 pH 5。

### 3.2.5 試驗架構



### 3.2.6 分析項目

將 *Z. mobilis* 菌醃接種於發酵培養基中，分別進行批次、懸浮菌體以及固定化菌體連續式發酵試驗，培養溫度為 30°C，每 12 h 取樣分析，各條件下均進行三重複試驗。將取出的發酵液分別進行測定其菌體乾重、pH 值、殘糖量、levan 產量、酒精產量與 levan 分子量分析。

#### 3.2.6.1 懸浮(非固定化)菌體批次發酵試驗

批次發酵試驗目的是觀察 *Z. mobilis* 在此發酵期間，菌體生長及 levan 生成的情形，並決定後續進行連續式發酵試驗時，啟動饋料的時間。

試驗利用 125 ml 三角瓶加入 100 ml 發酵培養基，先以鋁箔紙封住瓶口，以 121°C 進行 20 min 滅菌，冷卻後接種 5% (v/v) 菌醃，再以一層保鮮膜與鋁箔紙封住瓶口，並使用橡皮筋將瓶口束緊(圖 3-1)，置於恆溫培養箱以 30°C 靜置培養 72 h，每 12 h 取一瓶，分別測量發酵液之 pH 值、菌體乾重、levan 產量、酒精含量以及 levan 分子量。各試驗重複三次取平均值進行統計分析。

#### 3.2.6.2 懸浮(非固定化)菌體連續式發酵試驗

連續式發酵試驗目的為探討相較於批次發酵，菌體生長及 levan 生成的情形。



圖 3-1、*Z. mobilis* 於批次發酵之情形

Fig 3-1. Growth of *Z. mobilis* on batch fermentation

本試驗利用連續式裝置(圖 3-2)，在發酵瓶中加入 1000 ml 的發酵培養基，接種量 5% (v/v)，於 30°C 靜置 36 h 後，饋料培養基蔗糖濃度為 100 g/l，在第 36 h 啟動連續式饋料新鮮培養基培養 132 h，饋料速度為 50 ml/h，每 12 h 取樣。

### 3.2.6.3 固定化菌體連續式發酵試驗

本試驗利用吸附法進行菌體固定化，取用泡棉作為菌體吸附的載體(圖 3-3)，固定化菌體的連續式發酵，如圖 3-2，與懸浮菌體連續式發酵相同。

使用的泡棉尺寸為長、寬各 4 cm，高 1 cm，於每 1000 ml 培養液放置 5 塊，泡棉總體積為 80 cm<sup>3</sup>，其載體的填充量為 8% (v/v)，並將鉛球固定在每塊泡棉上(圖 3-4)，浸在發酵瓶的培養基中。

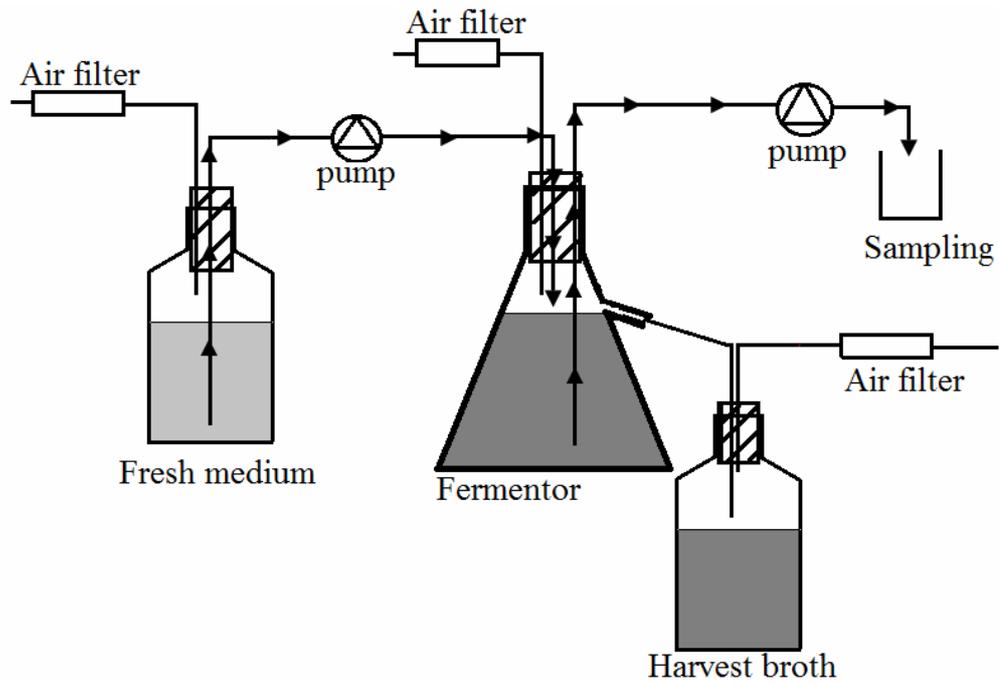


圖 3-2、連續式發酵裝置圖

Fig 3-2. Device of continuous fermentation

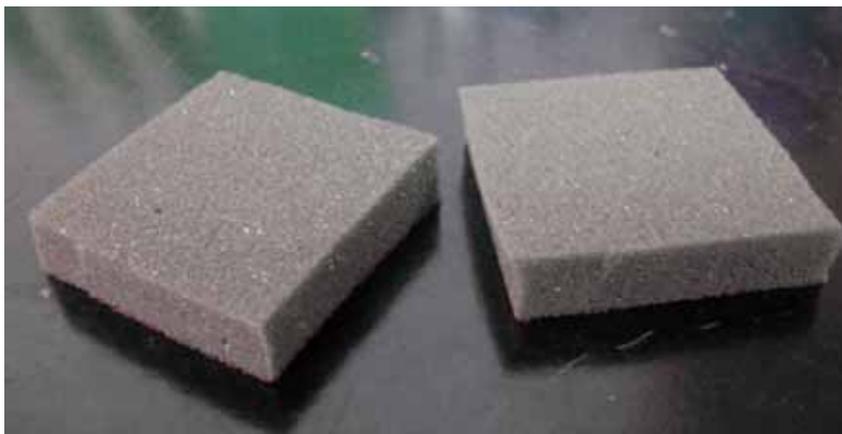


圖 3-3、做為載體之泡棉

Fig 3-3. Carrier of polypropylene foam

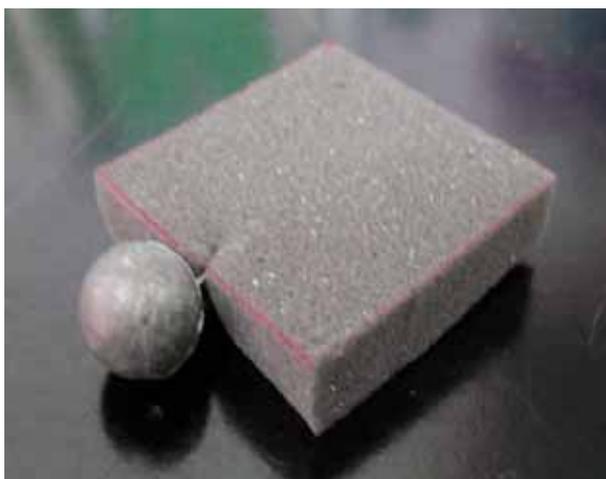


圖 3-4、將鉛球固定在泡棉上

Fig 3-4. Polypropylene foam fix with lead ball

## 1.不同饋料蔗糖濃度試驗

饋料的培養基蔗糖濃度試驗有四組，分別為 50 g/l 、75 g/l 、100 g/l、120 g/l。本試驗利用連續式裝置，在 1 公升玻璃發酵瓶的培養基中蔗糖濃度 100 g/l，泡棉填充量 80 cm<sup>3</sup>，接種量 5% (v/v)，於 30°C 靜置培養 168 h，第 36 h 啟動連續式饋料新鮮培養基，饋料速度為 50 ml/h。

## 2.不同饋料速度試驗

確定饋料的蔗糖濃度後，進一步探討不同饋料速度的影響，饋料速度有五組，分別為 36 ml/h、50 ml/h、72 ml/h、84 ml/h、100 ml/h，其稀釋速率(D)分別為 0.036 h<sup>-1</sup>、0.050 h<sup>-1</sup>、0.072 h<sup>-1</sup>、0.084 h<sup>-1</sup>、0.100 h<sup>-1</sup> (D = 饋料速度/發酵液體積)。

## 3.不同載體填充量試驗

確定饋料的蔗糖濃度以及饋料速度後，在發酵槽中的載體填充量的試驗有三組，分別為 80 cm<sup>3</sup>、120 cm<sup>3</sup>、160 cm<sup>3</sup>，佔發酵瓶的體積分別為 8%、12%與 16%。

## 3.3 分析方法

### 3.3.1 菌體乾重

本試驗以分光光度計來觀察菌體生長情況，在波長 600 nm 下測其吸光值( Toma ea al., 2003 )。標準曲線為將菌液經序列稀釋後，並

以波長 600 nm 測其吸光值，再將菌液於 20°C 10000 rpm 離心 15 min，倒出上清液，並將沉澱物於 70°C 烘箱烘乾達恆重後，稱取菌體乾重，以菌體乾重與吸光值製作標準曲線(圖 3-5)。將發酵液樣品測得的吸光值代入標準曲線之回歸方程式中，經由換算可得樣品的菌體乾重。

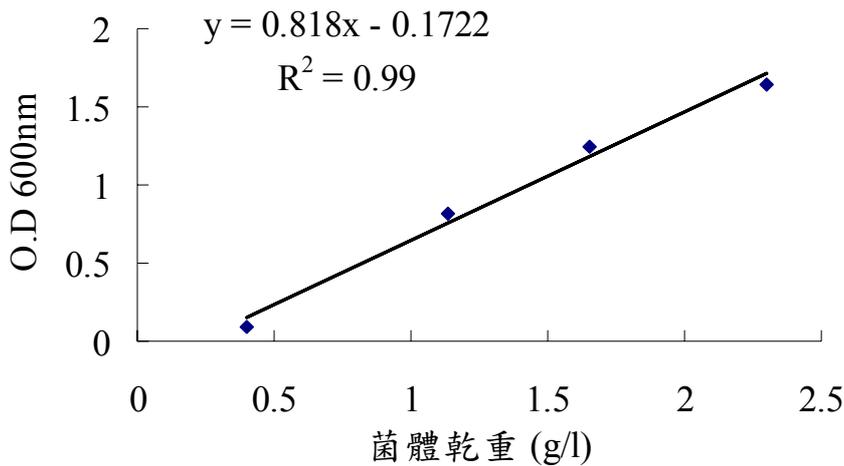


圖 3-5、菌體乾重之標準曲線

Fig 3-5. Standard curve of cell dry weight

### 3.3.2 pH 值

利用 pH meter 測定發酵液之 pH 值。

### 3.3.3 殘糖量分析

本試驗利用修正後的二硝基水楊酸法 ( dinitrosalicylic acid, DNS method ) ( Miller, 1959 ) 測定殘糖量，含有醛酮基的糖類，可使黃色之 3,5-二硝基水楊酸在強鹼及高溫下還原成深色之 3-氨基-5-硝基水楊酸 (圖 3-6)，其產物安定，在波長 575 nm 有最大吸光值。

將發酵液於 20°C 10000 rpm 離心 15 min 後，取上清液經過適當稀釋。取 1 ml 之稀釋液加入 1 ml D 液震盪混合，經 100°C 水浴 15 min，再加入 0.5 ml C 液以穩定顏色，經震盪混勻後，沖水冷卻 10 min 至室溫，於 575 nm 之波長偵測其吸光值。標準曲線為配置不同濃度的果糖溶液以 D- Fructose 為標準品，濃度分別為 0.5、0.4、0.3、0.2 及 0.1 g/l (圖 3-7)。將測得的吸光值代入標準曲線之回歸方程式中，經由換算可得樣品中殘糖量。

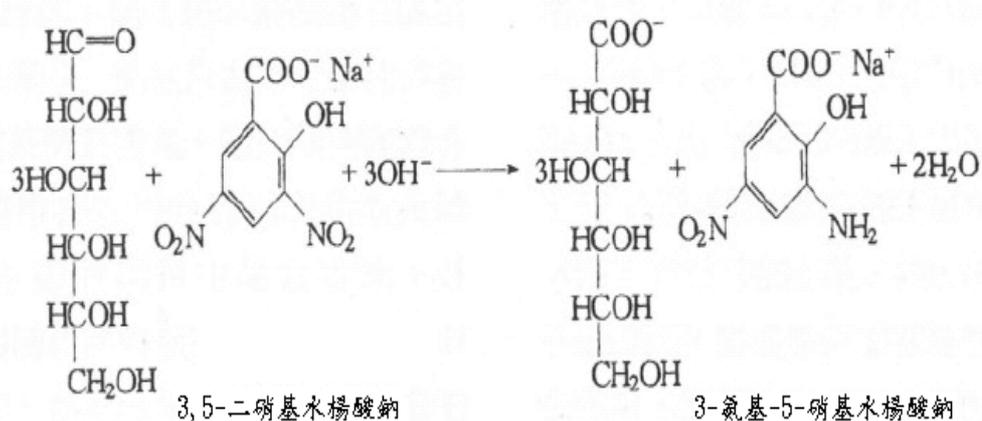


圖 3-6、DNS 反應式

Fig 3-6. The reaction of DNS reagent

A 液：1% 3,5-dinitrosalicylic acid、0.2% Phenol、1%NaOH

B 液：5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

C 液：40% Potassium sodium tartrate (酒石酸鉀鈉)

D 液：於使用前將 1 ml B 液加入 99 ml A 液中

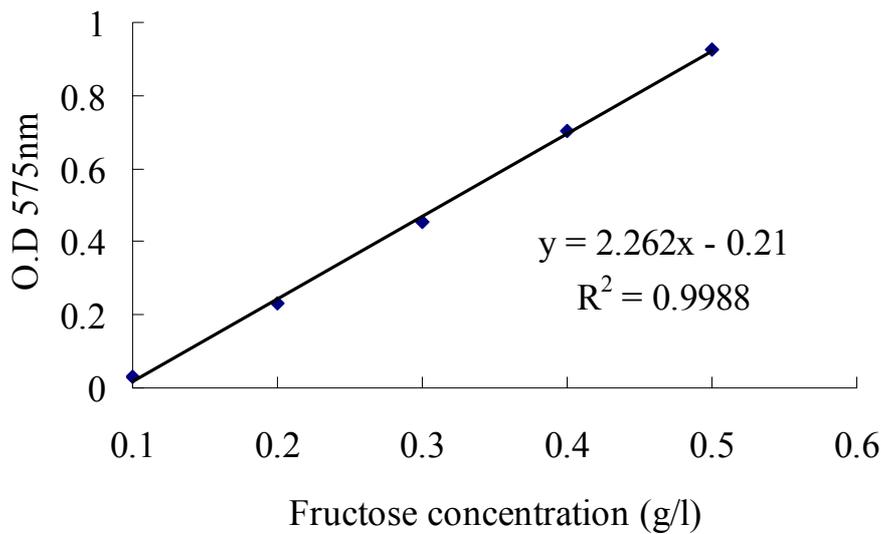


圖 3-7、DNS 法之標準曲線

Fig 3-7. Standard curve of DNS method

### 3.3.4 Levan 含量分析

本試驗採用修正後的酚硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) (Dubois et al., 1956) 來測定 levan 的含量。Levan 在強酸和加熱的條件下會進行水解反應，釋出單糖並脫水產生醣醛衍生物，再與酚生成橙黃色物質，在波長 490 nm 有最大吸光值。

Levan 的製備為發酵液於 20°C 10000 rpm 離心 15 min，取 1 ml 上清液加入四倍體積的 75% 酒精，於 4°C 下靜置 24 h 進行沉澱，加酒精之目的為 levan 會溶於水，而酒精會和 levan 搶水，使 levan 沉澱出來，並且發酵液中不只含有 levan，還包括一些小分子的糖類和雜質，也會溶於酒精中，使沉澱物中只含 levan，再於 5500 rpm 離心 20 min 後，

加入四倍體積的 75%酒精，經 5500 rpm 離心 20 min，將沉澱物 70°C 烘乾，回溶於 d.d H<sub>2</sub>O 並使用超音波震盪器將 levan 打碎溶於水中備用。

將上述樣品經適當稀釋後，取 1 ml 加入 0.5 ml 5% 酚及 2.5 ml 濃硫酸混合均勻後靜置 10 min，再以 25°C 水浴 10 min，於波長 490 nm 測其吸光值 (Viikari, 1984)。

標準曲線為配置不同濃度的果糖溶液以 D- Fructose 為標準品，濃度分別為 0.12、0.10、0.08、0.06、0.04、0.02 及 0.01 g/l (圖 3-8)。將測得的吸光值代入標準曲線之回歸方程式中，經由換算可得樣品中 levan 量。

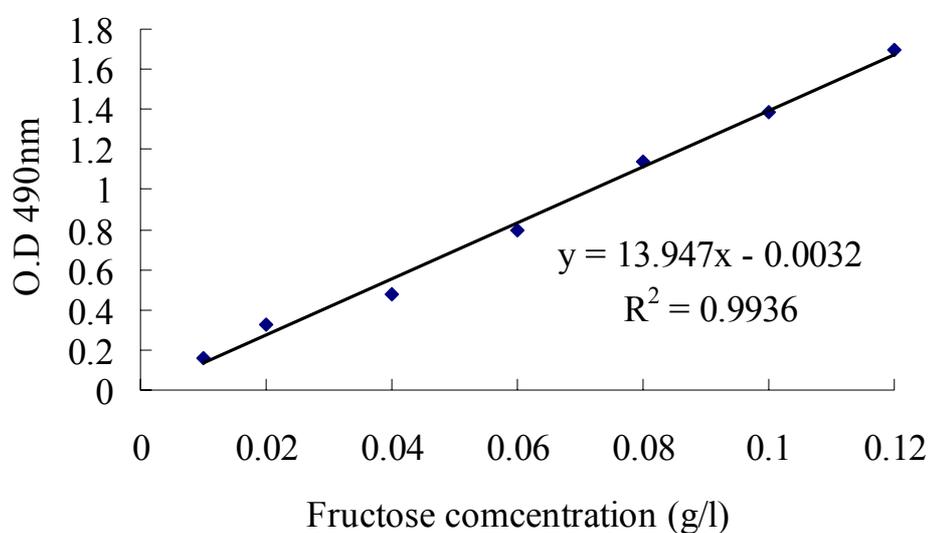


圖 3-8、酚硫酸法之標準曲線

Fig 3-8. Standard curve of phenol-sulfuric acid method

### 3.3.5 酒精分析

將發酵液於 20°C 10000 rpm 離心 15 min，取上清液以 0.22  $\mu\text{m}$  filter 過濾，利用氣體液相層析儀( gas Chromatography, GC )進行分析(圖 3-9)，依其波峰之積分面積與標準品對照推算其酒精濃度。分析條件如下：

1. Detector : FID (flame ionization detector)
2. Colume: capillary column
3. Detector temp : 240 °C
4. injector temp : 240 °C
5. Column initial temp : 40 °C
6. Column final temp : 240 °C
7. Carrier gas : N<sub>2</sub>
8. Flow rate : 1.5 ml/min
9. 升溫速度 : 10 °C/min
10. 注射量 : 0.2  $\mu\text{l}$

標準曲線為配置不同濃度的酒精溶液，濃度分別為 80、64、48、32、16、8、4 及 0.8 g/l，其波峰之積分面積與酒精濃度可製得標準曲線(圖 3-10)。



圖 3-9、氣體液相層析儀

Fig 3-9. Gas chromatography

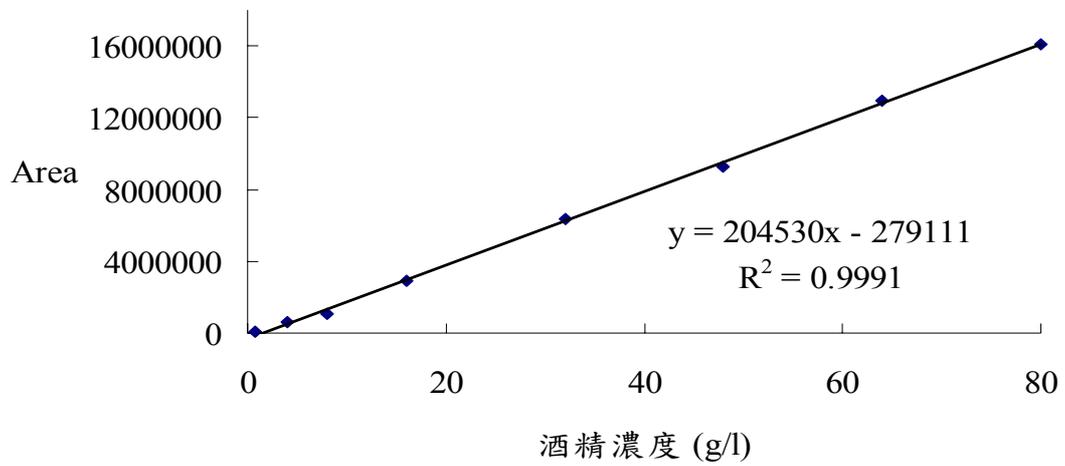


圖 3-10、酒精濃度之標準曲線

Fig 3-10. Standard curve of ethanol concentration

### 3.3.6 Levan 分子量分析

Levan 的分子量以膠體滲透層析法( gel permeation chromatography, GPC ) (圖 3-11)進行分析，又稱為分子排斥層析法( size exclusion chromatography )或膠體過濾層析法( gel filtration chromatography )。分離不同分子量之原理為利用分子的大小，當分子通過相同孔徑的管柱，分子量大者較難進入管柱中填充物孔徑內，故停留在管柱中的時間短，較快被沖提出；分子量小者則較易進入孔徑中，故停留時間較長，藉此達到分離效果。

將樣品以 0.45  $\mu\text{m}$  filter 過濾，取 20  $\mu\text{l}$  濾液進行分析，依其滯留時間與標準品對照推算其分子量。以標準品 pullulan 之分子量對數與滯留時間作標準曲線(圖 3-12)。分析條件如下：

1. Mobile phase : 去離子水
2. Flow rate : 0.8 ml/min
3. Column : polySep-GFC-P 4000 , 300 $\times$ 7.8 mm
4. Column temperature : 40  $^{\circ}\text{C}$
5. Pump : Hitachi model L-6000
6. Detector : Bischoff model 8110 RI
7. Integrator : Hitachi model D-2500



圖 3-11、膠體滲透層析儀

Fig 3-11. Gel permeation chromatography

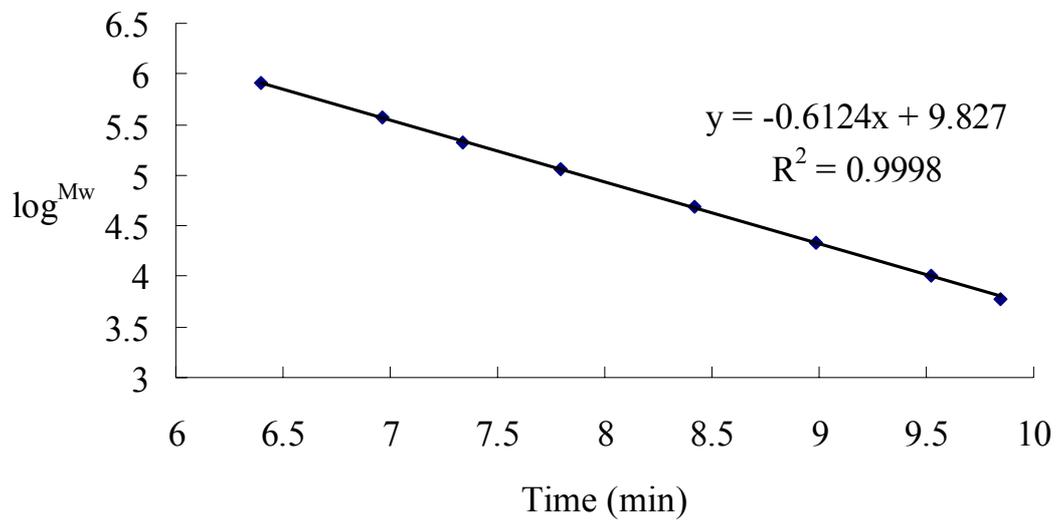


圖 3-12、分子量之標準曲線

Fig 3-12. Standard curve of polysaccharide molecular weight

### 3.4 統計分析

試驗所得結果以平均值±標準偏差(Mean ± SD)表示，數據採用 SAS 系統(windows 9.0)，以 ANOVA 變方分析、Duncans's test 進行分析，顯著水準為 0.05 ( $p < 0.05$ )。並使用 SigmaPlot 10.0 (Systat software, USA)軟體進行作圖。

## 第四章 結果與討論

根據文獻指出，*Zymomonas mobilis* 在不同的碳源種類下會影響新陳代謝的途徑，而會有不同的代謝產物。當碳源為葡萄糖時，*Z. mobilis* 主要生成酒精；若碳源為蔗糖時，合成路徑轉換，為主要生成果聚糖 (levan)，因此蔗糖成為主要生成 levan 的碳源 (Swings and Ley, 1977; Leigh et al., 1984; Kannan et al., 1993; Sprenger, 1996)。因為本研究主要目標是得到 levan 的產量，所以後續的實驗選用蔗糖作為碳源。

本研究方向主要是利用固定化 *Z. mobilis* 菌體進行連續式發酵來生產 levan，比較其發酵期間，培養基的蔗糖濃度、不同饋料速度以及做為固定化菌體的載體(泡棉)在培養基中的填充量(%，v/v)對發酵的影響，找出最適合 *Z. mobilis* 生長及 levan 生成的條件。並且探討 *Z. mobilis* 的自由菌體以批次與連續式兩種方法分別進行發酵，比較三種不同發酵方式之 levan 的產量與生產速率。

### 4.1 懸浮(非固定化)菌體批次發酵

本試驗探討非固定化的 *Z. mobilis* 自由菌體在批次發酵期間菌體生長、levan 產量、殘糖與 pH 值的變化，如圖 4-1 所示，其結果顯示，從發酵開始至 12 h 間，菌體大量生成，而 12 至 24 h 之間菌體增殖速

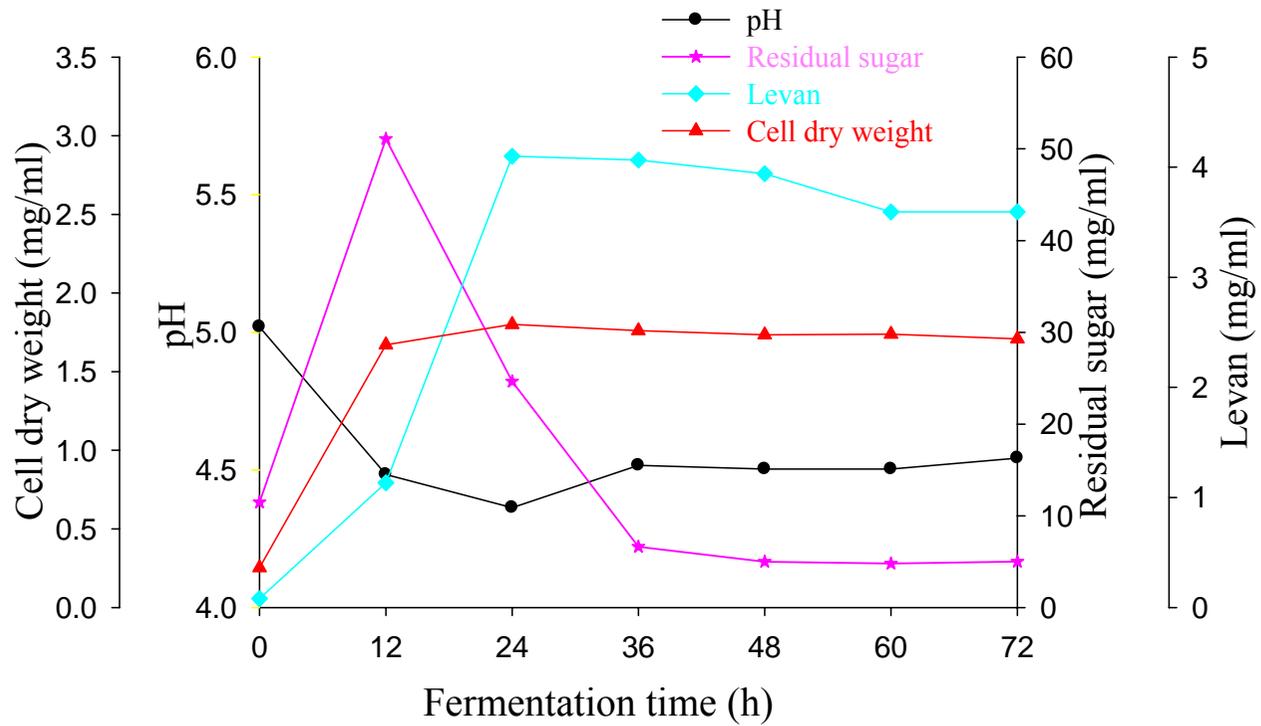


圖 4-1 *Z. mobilis* 在自由菌體批次發酵期間菌體乾重、levan 產量、殘糖與 pH 值變化

Fig 4-1 Changes of cell dry weight, levan production, residual sugar and pH during batch fermentation with free cells of *Z. mobilis*

度減緩，在第 24 h 時菌體生長達到最高峰為 1.80 g/l，之後菌體開始衰老，所以菌體生長趨於平緩。在菌體快速生長期間( 0~12 h )，levan 的生成較緩慢，而菌體增殖速度減緩期( 12~24 h )，levan 的生成速度開始增加，且在第 24 h 達到最大值為 4.10 g/l，第 36 h 之後 levan 產量有下降的趨勢，推測是因為發酵液裡提供的碳源不足，在此情況下菌體可能轉而利用 levan，導致曲線下降。

在菌體快速增長( 0~12 h )期間，培養基中的蔗糖被快速分解成葡萄糖和果糖，導致殘糖量快速增加，直到第 12 h 達到最大量為 51.08 g/l，在第 36 h 時發酵液中的碳源幾乎消耗殆盡，殘糖量為 6.62 g/l。在 0~24 h 期間，pH 值呈下降趨勢，其原因為 *Z. mobilis* 代謝碳源而產生酸性物質，造成 pH 值下降，而 24~36 h 期間，由於發酵液中可利用的碳源不足，菌體的代謝轉換至利用氮源(蘇，2010)，以提供菌體生長所需養分，利用氮源的結果會釋放出氨離子於發酵液中或是菌體改變自體代謝作用而產生鹼性物質，使得發酵液之 pH 值增加，從 36 h 之後，pH 值趨於平緩。

由以上試驗得知，在 36 h 後 *Z. mobilis* 生長趨於穩定，levan 的生成也達到高點，因此後續的連續式發酵試驗，皆在第 36 h 啟動連續式新鮮培養基饋料。

## 4.2 懸浮(非固定化)菌體連續式發酵

本試驗探討非固定化的 *Z. mobilis* 自由菌體在連續式發酵期間菌體生長、levan 產量、殘糖與 pH 值的變化，如圖 4-2 所示，在 1 公升發酵瓶的培養基中蔗糖濃度 100 g/l，饋料的培養基蔗糖濃度為 100 g/l，在以批次發酵進行 36 h 之後啟動連續式饋料新鮮培養基，饋料速度為 50 ml/h，培養 132 h。試驗結果顯示，從開始發酵至 36 h 期間的生長趨勢與批次發酵相同，由啟動饋料後至第 60 h 這段時間，發酵槽中發酵液的菌體濃度有下降趨勢，菌體乾重從 1.86 g/l 降至 1.50 g/l，其原因應該是有些菌體會隨著發酵液流出且前期菌體生長較緩慢，而發酵液被饋入的新鮮培養基稀釋，導致菌量在發酵液中的濃度降低，所以測得之菌體乾重會下降，不過在 60 h 之後，菌量開始遞增，因為菌體增長的速度大於發酵液流出的速度，在 96 h 菌體乾重達到 1.89 g/l 後趨於平緩，推測其原因為菌體生長減緩，增長的速度約等於發酵液流出的速度。

至於 levan 產量在 12 至 24 h 之間快速生成(圖 4-2 )，但是第 36 至 48 h 之間下降，由 3.92 g/l 降至 2.71 g/l，其原因應為在這段期間菌體生長較緩慢，還無法大量生成 levan，再加上連續式發酵中的 levan 會隨著發酵液流出，所以測得的 levan 濃度下降。在 48 h 之後，levan 的產量就逐漸增加，平均濃度為  $5.53 \pm 0.28$  g/l (平均濃度= 全部 levan

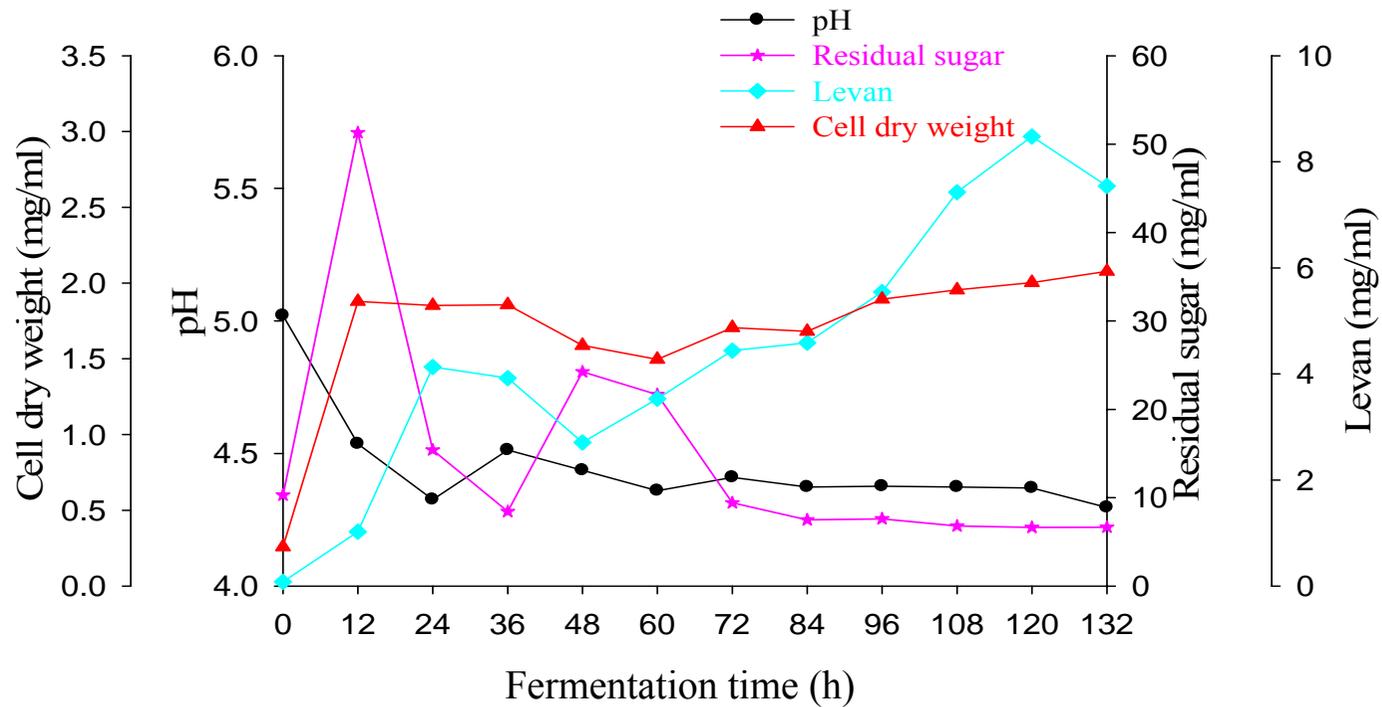


圖 4-2 以懸浮菌體連續式發酵 *Z. mobilis* 期間菌體乾重、levan 產量、殘糖與 pH 值的變化

Fig 4-2 Changes of cell dry weight, levan production, residual sugar and pH during continuous fermentation with free cells of *Z. mobilis*

產量/取樣次數)，其生產速率為 0.46 g/l/h (生產速率= 全部 levan 產量/發酵時間)。在 60hr 之後菌體濃度開始增加，同時碳源被充分利用，使殘糖量開始下降，到 72 h 後趨於平緩。pH 值在 36~60 h 期間會稍微下降，從 60 h 後就趨於平緩。

### 4.3 固定化菌體的連續式發酵

本試驗是利用固定化 *Z. mobilis* 菌體的方式，進行連續式發酵，探討饋料培養基碳源的濃度、饋料速度以及固定化載體(泡棉)之填充量(% , v/v)，對於菌體生成 levan 的影響，以尋求生產 levan 的最適條件。

#### 4.3.1 饋料培養基蔗糖濃度之影響

本試驗探討不同饋料基質的濃度對於發酵固定化 *Z. mobilis* 期間菌體生長、levan 產量、殘糖與 pH 值變化之影響，如圖 4-3 至圖 4-6 所示，在 1 公升發酵瓶的培養基蔗糖濃度 100 g/l，泡棉填充量為 80 cm<sup>3</sup> (8%, v/v)，第 36 h 啟動連續式饋料新鮮培養基，饋料速度為 50 ml/h，饋料的蔗糖濃度分別為 50 g/l、75 g/l、100 g/l 和 120g/l。由表 4-1 可知，當饋料之新鮮培養基蔗糖濃度為 50 g/l 時，平均 levan 濃度為 1.29 g/l、饋料濃度 75 g/l、100 g/l 及 120 g/l 時，則平均 levan 濃度分別為

表 4-1 連續式發酵的饋料蔗糖濃度對固定化 *Z. mobilis* 菌體生產 levan 的影響

Table 4-1 Effect of sucrose concentrations in feed medium on the production of levan during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Sucrose concentration ( g/l )	Levan ( g/l )*	Productivity of levan ( g/l/h )**
50	1.29 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.11 <sup>c</sup>
75	2.14 ± 0.19 <sup>c</sup>	0.18 <sup>c</sup>
100	7.70 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>
120	6.24 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>

\* Levan ( g/l ): total production ( g/l ) / times of sampling

\*\* Productivity of levan ( g/l/h ): total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

2.14 g/l、7.70 g/l 及 6.24 g/l；levan 生產速率分別為 0.11、0.18、0.64 以及 0.52 g/l/h。以圖 4-3 來看，隨著饋料的蔗糖濃度增加，levan 的產量及生產速率也跟著提升，饋料濃度達 100 與 120 g/l，在啟動饋料初期(36~96 h)，levan 產量就已高於其他兩組。當蔗糖濃度為 100 g/l 時，levan 的生產速率最高，從 96 h 後 levan 產量快速增加，在 108 h 已高於其他三組的 levan 產量。不過蔗糖濃度達到 120 g/l 時，levan 生產速率則下降，雖然在 36 至 96 h 期間，levan 產量最高，但是 96 h 之後，levan 產量就趨於穩定不再增加，推測是因為蔗糖濃度過高，反而不利於菌體的生長而抑制 levan 的生成( Lyness and Doelle, 1983 )。

如圖 4-4 所示，圖中 cell dry weight 所代表的是懸浮於發酵液中的菌體量而非附著於載體上的菌體，由圖可知，在低濃度下 *Z. mobilis* 生長較不佳，饋料濃度 50 g/l 及 75 g/l 之菌量低於其他兩組，平均菌體乾重分別為 1.25 g/l 及 1.33 g/l，在第 36 h 之後，曲線皆會呈現下降的趨勢，然後趨於平緩，而饋料濃度為 100 g/l 時，第 60 h 懸浮菌量最低，之後開始遞增，到 108 h 後菌量高於其他三組，平均菌體乾重可達 1.97 g/l，之後達到穩定。但饋料濃度達 120 g/l，菌體乾重在 36 h 後趨於平緩，曲線沒有上升的趨勢，平均菌體乾重只有 1.52 g/l。

以殘糖量來看(圖 4-5)，饋料濃度為 50 g/l、75 g/l 和 120g/l 時，

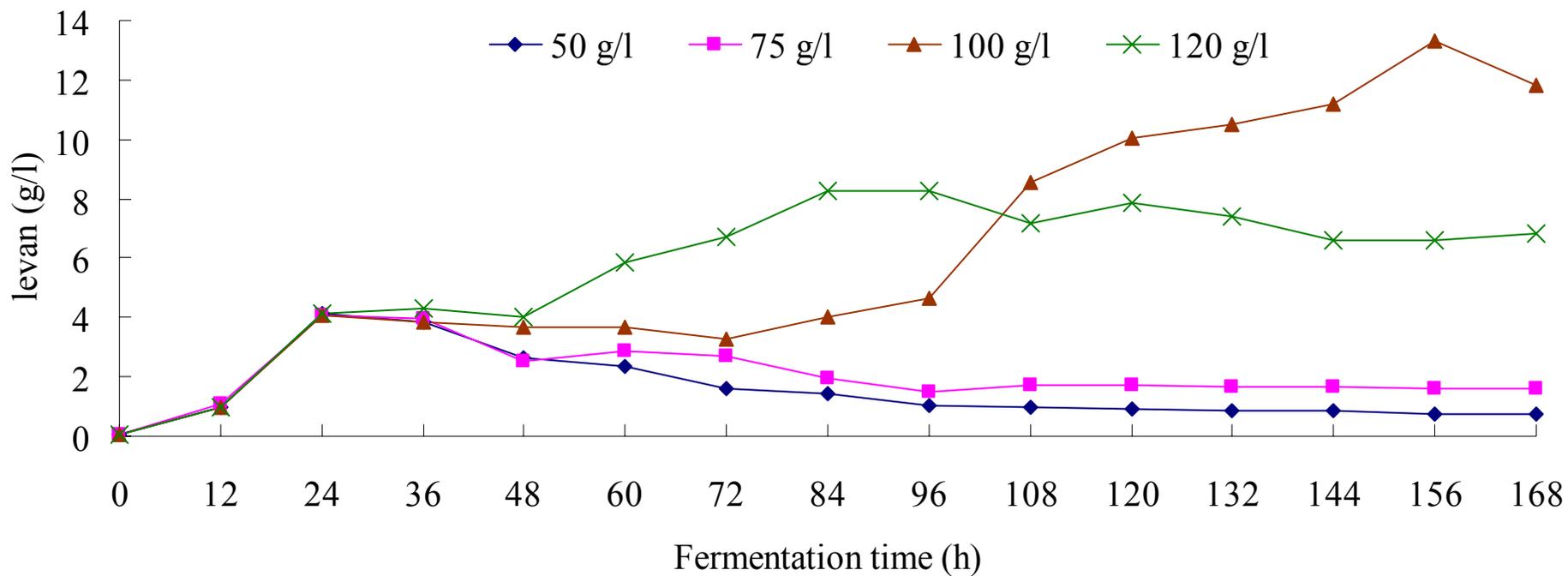


圖 4-3 饋料蔗糖濃度於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中 levan 生產的變化

Fig 4-3 Effect of sucrose concentrations in feed medium on levan production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

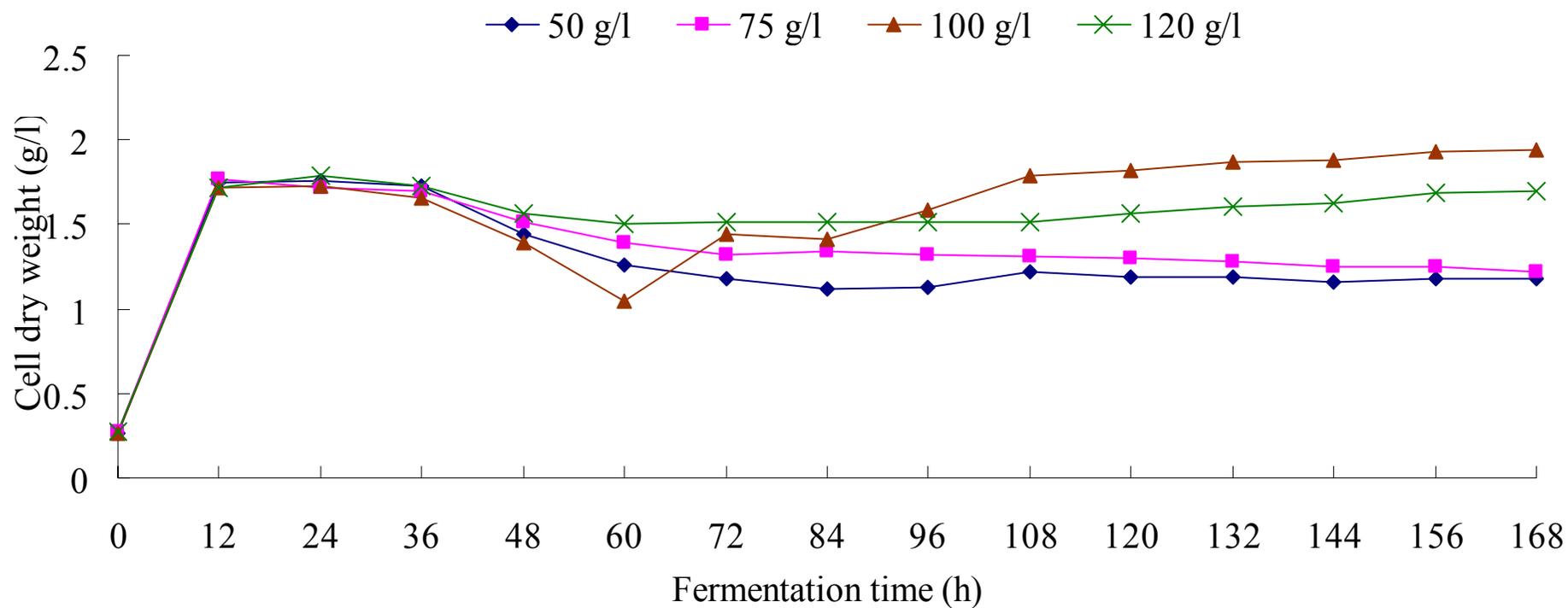


圖 4-4 饋料蔗糖濃度對固定化 *Z. mobilis* 連續式發酵期間菌體生長情形

Fig 4-4 Effect of sucrose concentrations in feed medium on cell growth during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

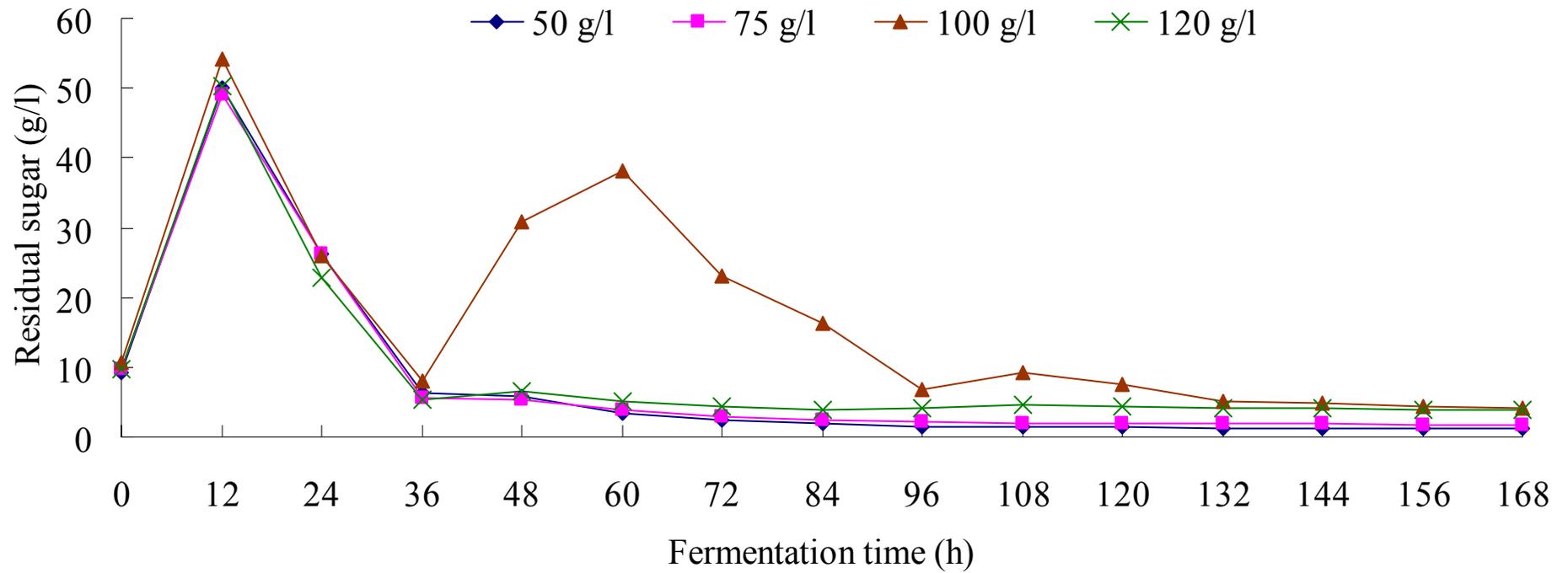


圖 4-5 饋料蔗糖濃度對固定化 *Z. mobilis* 菌體連續式發酵期間殘糖變化量

Fig 4-5 Effect of sucrose concentrations in feed medium on residual sugar during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

皆在 36 h 後趨於平緩，而饋料濃度 100 g/l 時，由啟動饋料後至 60 h 殘糖量會增加，從 7.92 g/l 增至 38.16 g/l，之後開始遞減，直到 108 h 趨於平緩，因此 36~60 h 期間懸浮菌量較低的原因，推測是 *Z. mobilis* 在饋料濃度為 100 g/l，比較利於菌體吸附在泡棉上，使其可以更有效的生長及生成 levan。

而四組基質發酵的 pH 值變化情形相似(圖 4-6)，皆在第 36 h 之後下降，然後趨於平緩，在 84 h 之後可明顯發現饋料濃度 100 g/l 的 pH 值較其他三組低，推測其原因為 *Z. mobilis* 在此饋料濃度的分解碳源能力較好，菌體可充分的利用碳源，相對應其產酸的狀況也較其他三組好，且 levan 產量隨著發酵時間而有顯著的增加。

不同饋料蔗糖濃度試驗中，結果顯示最佳為 100 g/l，可得到平均 levan 濃度為 7.70 g/l，其生產速率為 0.64 g/l/h。

#### 4.3.2 不同饋料速度之影響

本試驗探討不同饋料速度對於發酵固定化 *Z. mobilis* 期間菌體生長、levan 產量、殘糖與 pH 值變化之影響。如圖 4-7 至圖 4-10 所示，在 1 公升發酵瓶的培養基蔗糖濃度 100 g/l，載體填充量為 8% (v/v)，饋料濃度為 100 g/l，第 36 h 啟動連續式發酵，饋料速度分別為 36 ml/h、50 ml/h、72 ml/h、84 ml/h 和 100 ml/h。由表 4-2 可知，當饋料速度 36 ml/h 時，平均 levan 濃度為 7.82 g/l、饋料速度 50 ml/h、72

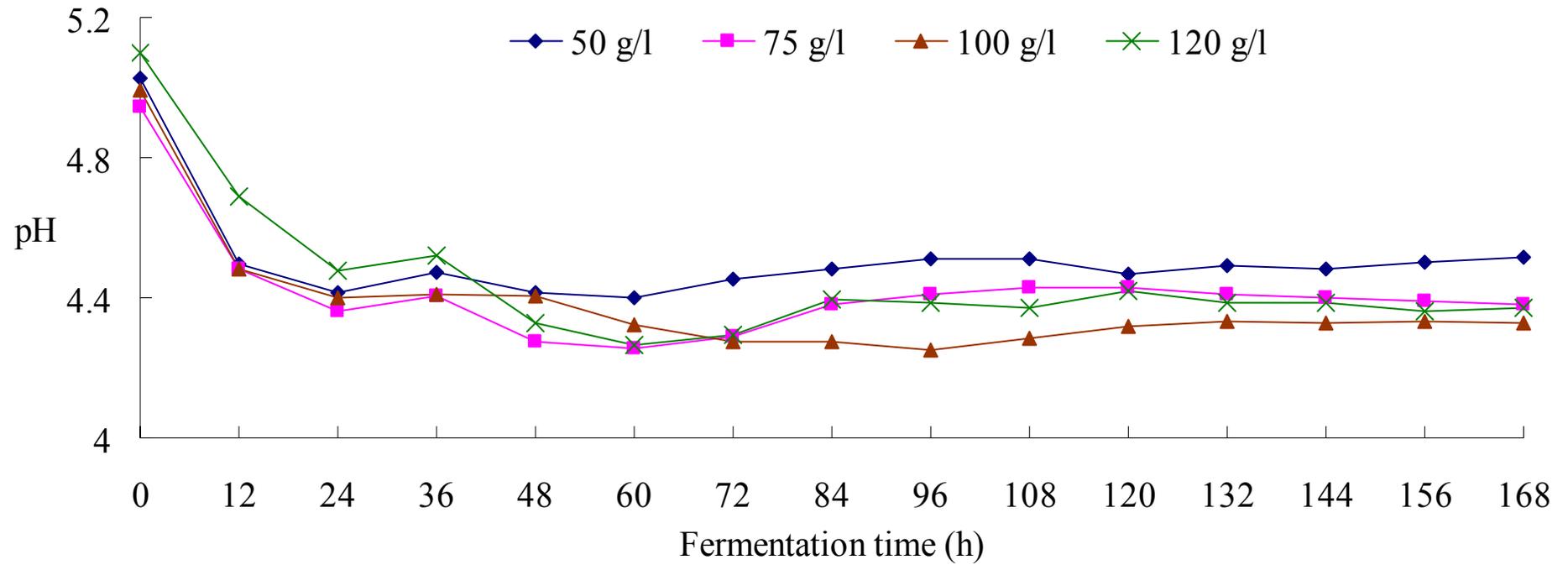


圖 4-6 饋料蔗糖濃度對固定化 *Z. mobilis* 菌體連續式發酵期間 pH 值變化

Fig 4-6 Effect of sucrose concentrations in feed medium on pH during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

表 4-2 連續式發酵的饋料速度對固定化 *Z. mobilis* 菌體生產 levan 的影響

Table 4-2 Effect of flow rates on the production of levan during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Dilution rate ( h <sup>-1</sup> )*	Levan ( g/l )**	Productivity of levan ( g/l/h )***
0.036	7.82 ± 0.23 <sup>c</sup>	0.65 <sup>c</sup>
0.050	7.70 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.64 <sup>c</sup>
0.072	8.85 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.74 <sup>b</sup>
0.084	13.30 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>
0.100	7.82 ± 0.28 <sup>c</sup>	0.65 <sup>c</sup>

\* Dilution rate ( h<sup>-1</sup> ): flow rates / fermentor volume

\*\*Levan ( g/l ): total production ( g/l ) / times of sampling

\*\*\* Productivity of levan ( g/l/h ): total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different ( p < 0.05 ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

ml/h、84 ml/h 及 100 ml/h 時，則平均 levan 濃度分別為 7.70 g/l、8.85 g/l、13.30 g/l 以及 7.82 g/l；levan 生產速率分別為 0.65、0.64、0.74、1.11 以及 0.65 g/l/h。饋料速度 36 與 50 ml/h 的 levan 生產速率沒有差異，以圖 4-7 所示，當饋料速度上升至 72 與 84 ml/h 時，levan 產量及生產速率也隨之增加，尤其是饋料速度 84 ml/h 時，levan 生產速率最快，在 48 至 108 h 期間，levan 產量迅速增加，且在第 72 h 就已高於其他四組的產量，而 108 h 之後 levan 產量趨於平穩。當饋料速度增加至 100 ml/h 時，levan 生產速率反而下降，從 36 至 72 h 之啟動饋料初期，levan 產量較低於其他四組，推測原因為饋料速度過大，菌體隨著發酵液流出，導致前期菌體濃度被大量稀釋，而無法大量生成 levan；但當時間增長，菌體生長穩定後 levan 產量上升(72~132 h)，直至發酵後期達到穩定狀態，levan 產量不再明顯上升。

如圖 4-8 所示，在饋料速度較低的情況下，*Z. mobilis* 菌體生長較不佳，饋料速度 36 ml/h 及 50 ml/h 之菌體濃度低於其他三組，平均菌體乾重分別為 1.57 g/l 及 1.56 g/l，而較高饋料的其他三組之平均菌體乾重分別為 1.81、1.77 及 1.74 g/l。在 36~60 h 期間，隨著饋料速度增加，菌體濃度下降越快，這是因為饋料速度增快，導致發酵液在瓶內的滯留時間縮短，且菌體濃度被稀釋，使菌體無法完全利用新鮮培養基而生長緩慢，所以測得之菌體乾重會下降。但饋料速度 72 ml/h 及

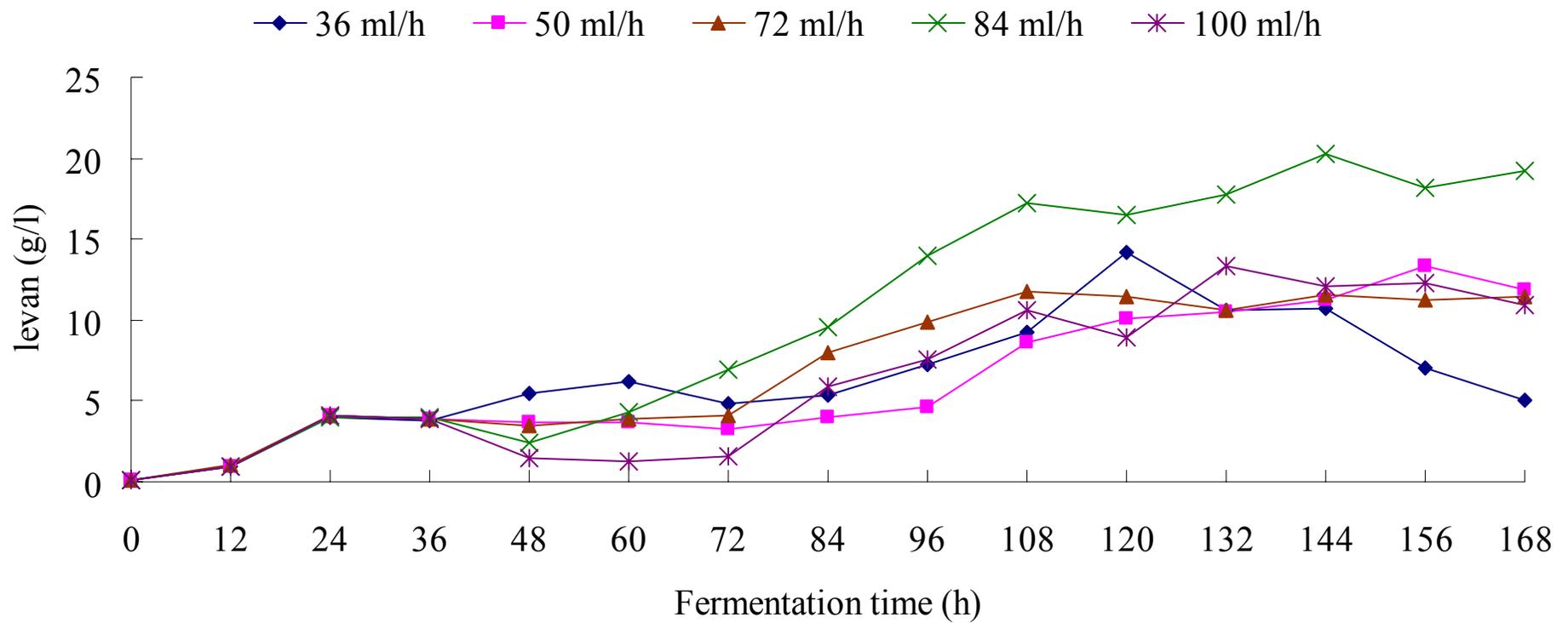


圖 4-7 饋料速度於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中 levan 生產的變化

Fig 4-7 Effect of flow rates in feed medium on levan production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

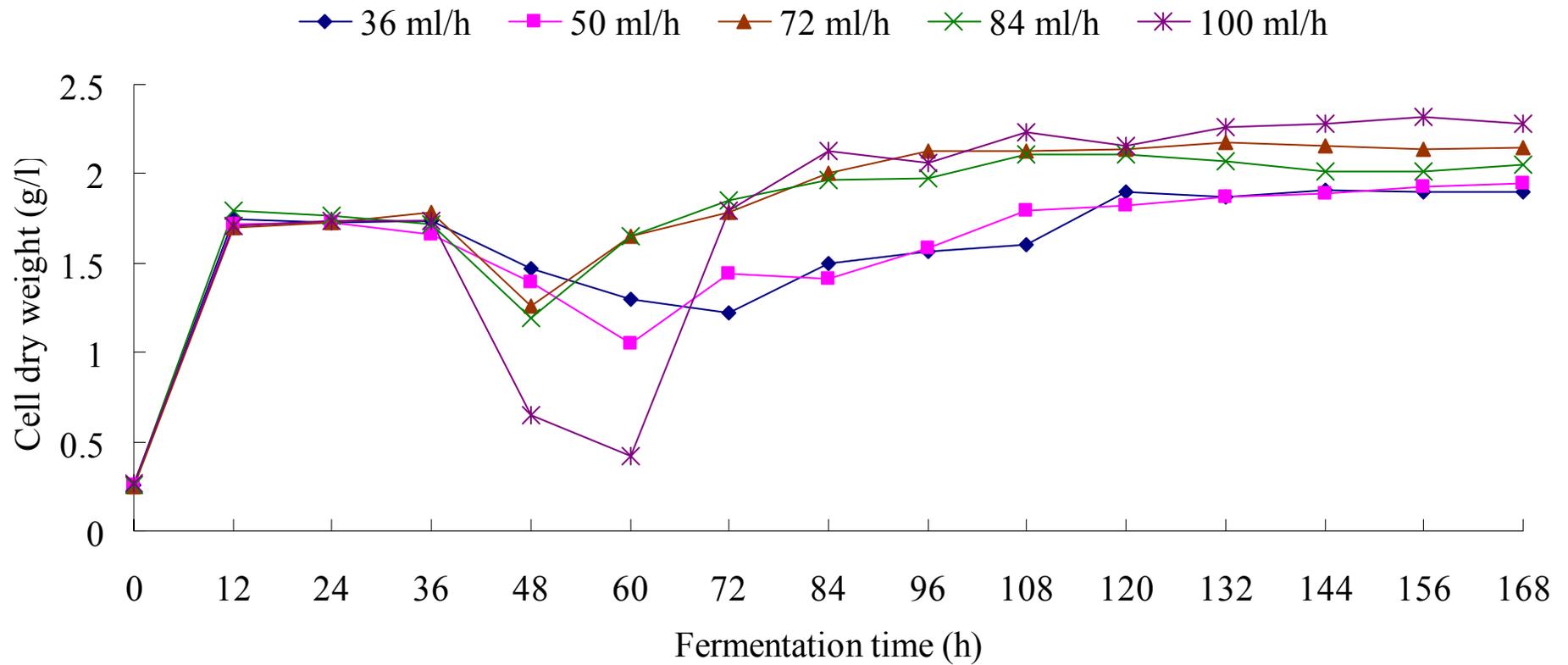


圖 4-8 饋料速度對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間菌體生長情形

Fig 4-8 Effect of flow rates on cell growth during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

84 ml/h 在 48 h 後菌量即開始增加，對照其 levan 產量，亦是在此刻增加，而饋料速度 84 ml/h 之 levan 產量較前者上升趨勢較快，並在 72 h 之後，菌體生長趨於穩定，此時 levan 大量的生成，levan 產量也高於其他四組。

由圖 4-10 可得知，饋料速度 100 ml/h 在 36~60 h 期間，pH 值反而上升，和其他四組之趨勢有所不同，對照其殘糖量(圖 4-9)和菌體濃度(圖 4-8)，可得知 *Z. mobilis* 在此饋料速度下，菌體濃度會迅速下降，在 60 h 後又快速上升，至 84 h 之後達到穩定並略高於其他四組，但 levan 產量低於饋料速度 72 及 84 ml/h 時，所以反而不利於 levan 的生成。

不同饋料速度試驗中，結果顯示最佳為 84 ml/h，可得到平均 levan 濃度為 13.30 g/l，其生產速率為 1.11 g/l/h。

#### 4.3.3 載體填充量之影響

本實驗探討不同的載體填充量對於發酵 *Z. mobilis* 期間菌體生長、levan 產量、殘糖與 pH 值變化之影響，如圖 4-11 至圖 4-14 所示，饋料培養基蔗糖濃度為 100 g/l，第 36 h 啟動連續式饋料新鮮培養基，饋料速度為 84 ml/h，泡棉在發酵槽中的填充量分別為 80 cm<sup>3</sup>、120 cm<sup>3</sup> 以及 160 cm<sup>3</sup>，也就是發酵瓶體積的 8、12 以及 16% cm<sup>3</sup>。由表 4-3

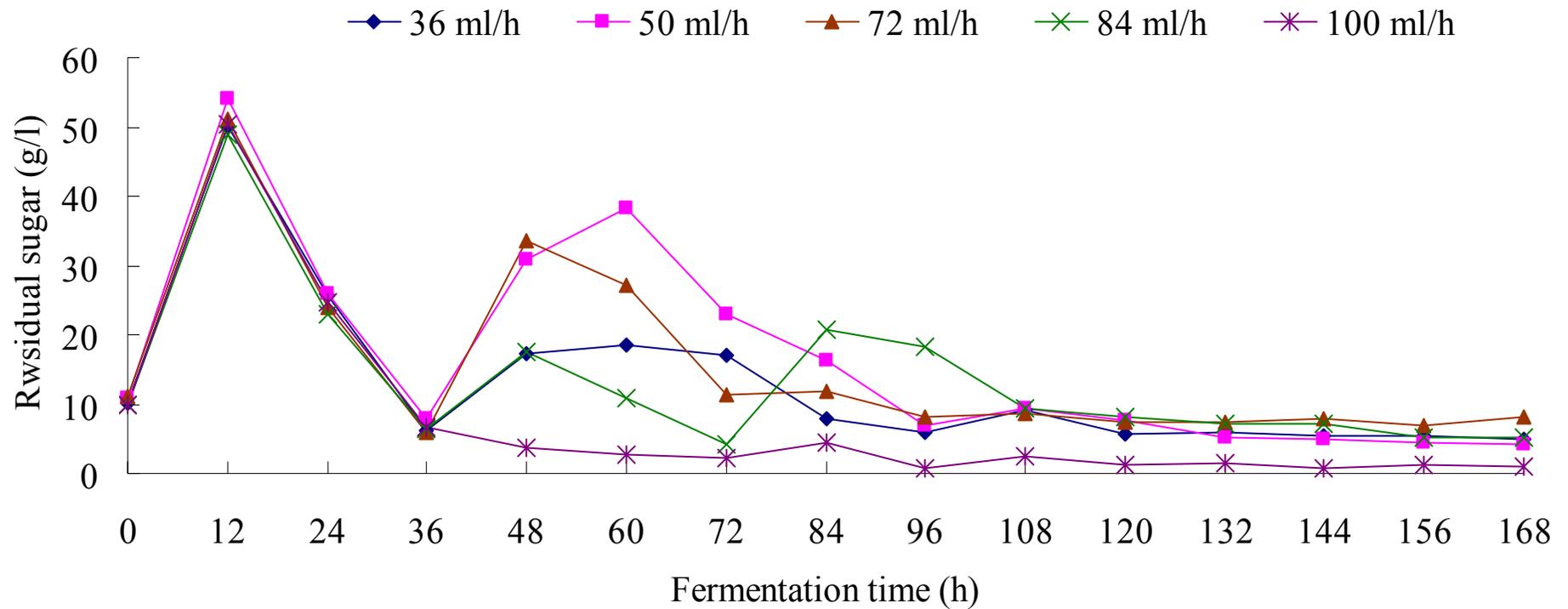


圖 4-9 饋料速度對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間殘糖變化量

Fig 4-9 Effect of flow rates on residual sugar during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

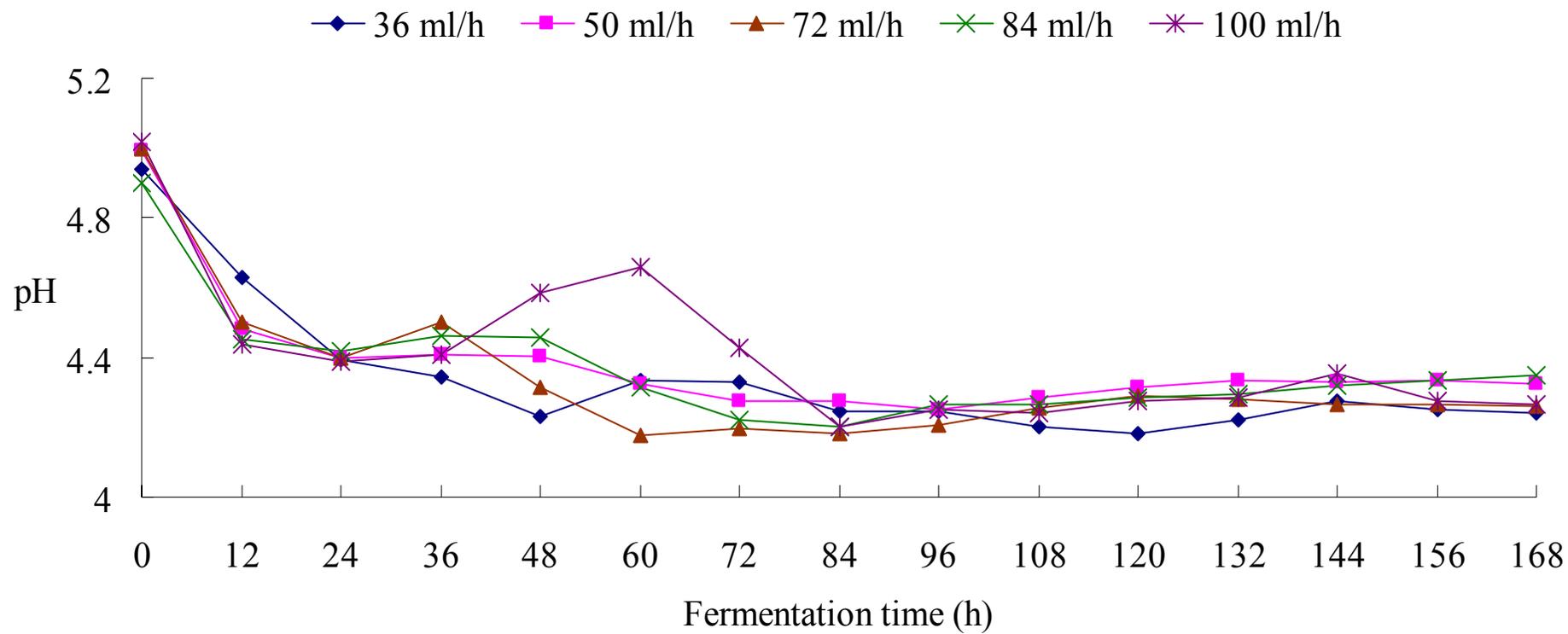


圖 4-10 饋料速度對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間 pH 值變化

Fig 4-10 Effect of flow rates on pH during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

表 4-3 連續式發酵的載體填充量對固定化 *Z. mobilis* 菌體生產 levan 的影響

Table 4-3 Effect of amount carrier load on levan production during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Carrier load ( v/v )*	Levan ( g/l )**	Productivity of levan ( g/l/h )***
8%	13.30 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>
12%	7.40 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.62 <sup>b</sup>
16%	6.00 ± 0.26 <sup>b</sup>	0.50 <sup>b</sup>

\*Carrier load ( v/v ): carrier volume / fermentor volume

\*\*Levan ( g/l ): total production ( g/l ) / times of sampling

\*\*\*Productivity of levan ( g/l/h ): total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

可知，當泡棉填充量  $80\text{ cm}^3$  時，平均levan濃度為  $13.30\text{ g/l}$ 、填充量  $120\text{ cm}^3$  時，則平均levan濃度為  $7.40\text{ g/l}$ 、填充量  $160\text{ cm}^3$  時，平均levan濃度為  $6.00\text{ g/l}$ ；levan生產速率分別為  $1.11$ 、 $0.62$ 、 $0.50\text{ g/l/h}$ 。圖 4-11 所示，當泡棉填充量增加，levan的產量以及生產速率反而下降，8%的填充量在 48 至 108 h 期間，levan產量快速增加，而且 60 h 之後就高於其他兩組，推測原因為泡棉量多時，導致基質傳到菌體的速度變慢，影響菌體吸收養分，連帶影響levan濃度偏低。

由圖 4-12 來看，所表示的是發酵液中的懸浮菌體，而非固定化的菌體，填充量 8%、12%及 16%之平均菌體乾重分別為  $1.77\text{ g/l}$ 、 $1.49\text{ g/l}$ 及  $1.78\text{ g/l}$ ，在 48~96 h 期間，菌體濃度皆為上升的趨勢，從 96 h 之後就趨於穩定。但是當泡棉填充量增至  $120\text{ cm}^3$  時，所測得之懸浮菌量較低，推測是因為泡棉量增加，有較多的菌體附著於載體上，但當泡棉填充量增至  $160\text{ cm}^3$  時，懸浮菌量反而增加，推測原因為泡棉量影響菌體吸收培養基中的養分，導致附著在載體上的菌量減少。

而圖 4-13 與 4-14 所示，在菌體生長穩定( 96 h )之前，殘糖量與 pH 值的趨勢皆有些波動，當達到菌體生長穩定期間( 96~168 h )，殘糖量以及 pH 值也趨於平緩。

不同載體填充量試驗中，結果顯示最佳為 8%，可得到平均 levant 濃度為  $13.30\text{ g/l}$ ，其生產速率為  $1.11\text{ g/l/h}$ 。

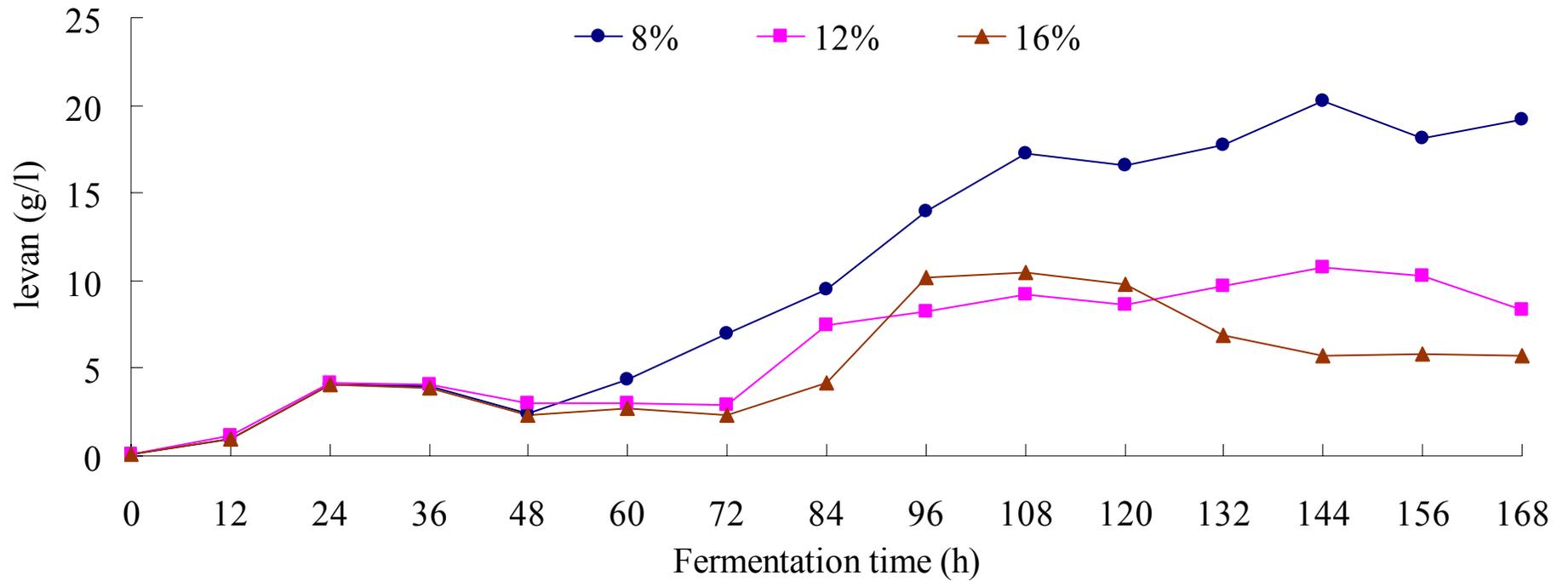


圖 4-11 載體填充量於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中 levan 生產的變化

Fig 4-11 Effect of amount carrier load in feed medium on levan production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

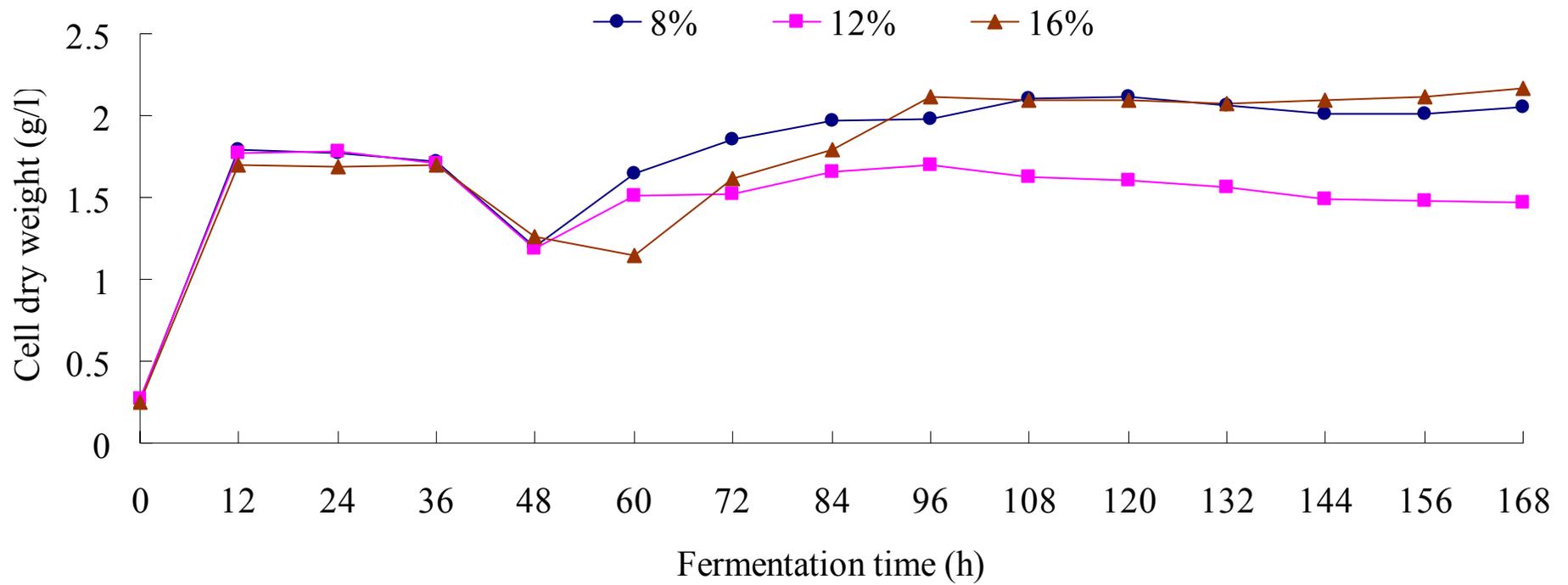


圖 4-12 載體填充量對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間菌體生長情形

Fig 4-12 Effect of amount carrier load on cell growth during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

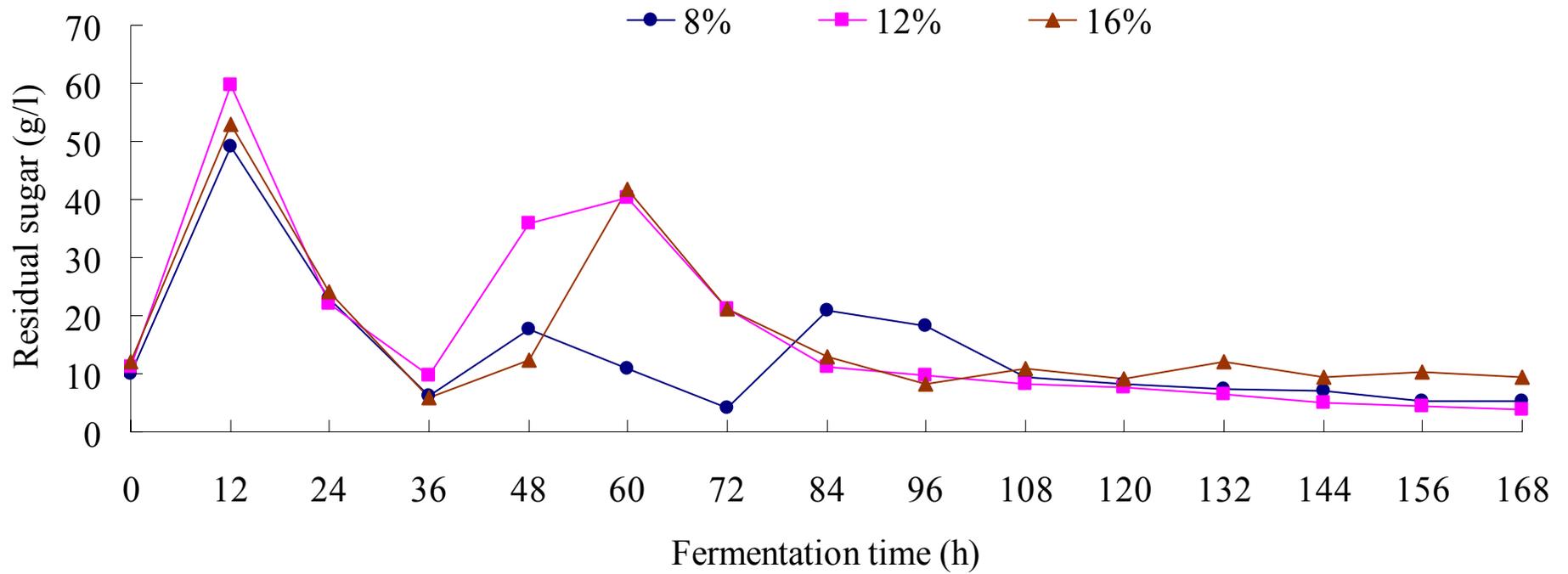


圖 4-13 載體填充量對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間殘糖變化量

Fig 4-13 Effect of amount carrier load on residual sugar during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

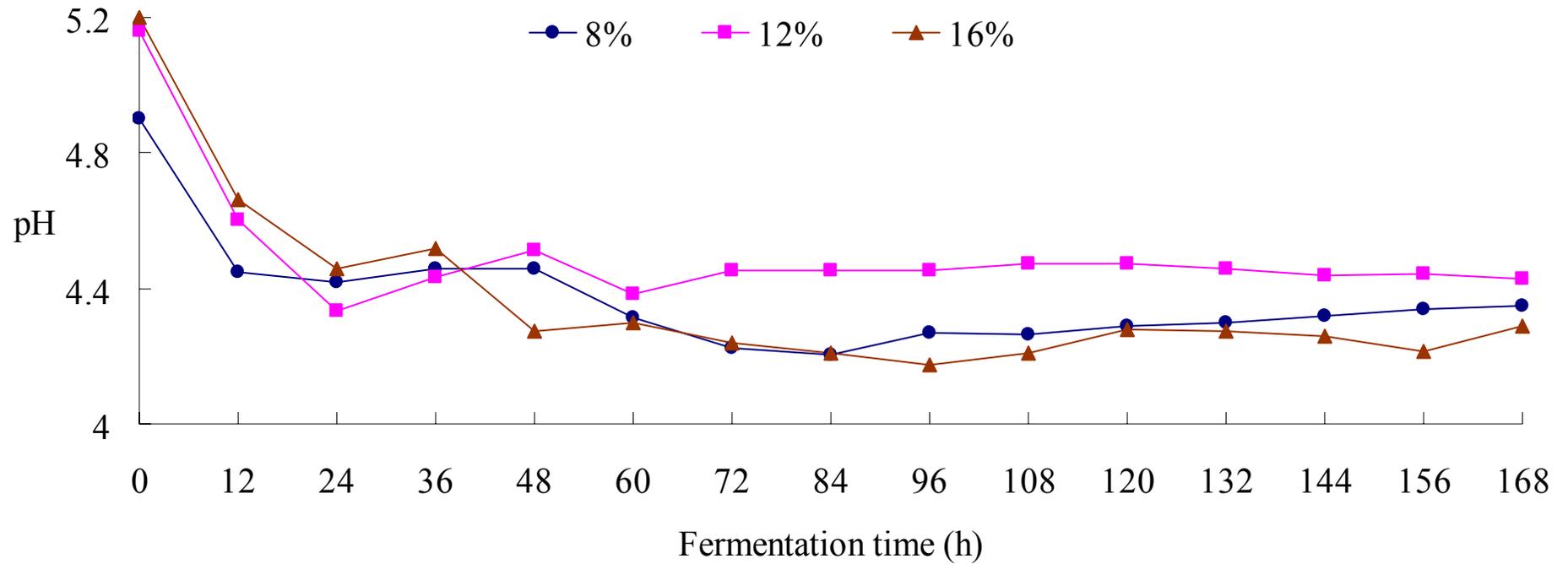


圖 4-14 載體填充量對固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵期間 pH 值變化

Fig 4-14 Effect of amount carrier load on pH during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

#### 4.4 批次、懸浮(非固定化)菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵生成 levan 之比較

如表 4-4 所示，以批次、非固定化菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵 *Z. mobilis* 生產 levan 之平均 levan 濃度分別為 4.10、5.53 及 13.30 g/l；levan 生產速率分別為 0.17、0.46 及 1.11 g/l/h。結果顯示，利用固定化菌體進行連續式生產 levan 的方式較佳，levan 的產量在三種發酵方式中最好，產量較其他兩者分別可提升 224%與 140%，而且 levan 生產速率相較於批次與非固定化菌體，分別可提升約 553%與 141%，這顯示利用泡棉做為載體固定化菌體對於提升 levan 的生成與生產速率方面具有一定的效果。

#### 4.5 文獻中利用 *Z. mobilis* 發酵生產 levan 與本研究結果之比較

由表 4-5 比較結果可得知，不同來源之 *Z. mobilis* 菌株與培養條件等的不同，導致 levan 產量及生產速率會有所不同，而雖然本研究之平均 levan 濃度略低於文獻所得；但由 levan 生產速率方面來看，則大於文獻的結果。顯示連續式發酵可以減少批次發酵之停滯時間(清洗、滅菌、重新置換培養基等)。此外，相較於懸浮菌體，固定化菌體具有菌體密度高、反應速度快，方便使菌體可重複利用，得以節省成本，也可以維持培養環境中高濃度的菌體，進而提高代謝速率並

表 4-4 以批次、懸浮菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵 *Z. mobilis* 生產 levan 的影響

Table 4-4 Effect of levan produced by batch, continuous fermentation with free cells and continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Fermentation methods	Levan ( g/l )	Productivity of levan ( g/l/h )	Fermentation time ( h )
batch	4.10 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.17 <sup>c</sup>	24
continuous with free cells	5.53 ± 0.28 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	132
continuous with immobilized cells	13.30 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>	168

\* Levan ( g/l ) : total production ( g/l ) / times of sampling

\*\* Productivity of levan ( g/l/h ) : total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-5 文獻中利用 *Z. mobilis* 發酵生產 levan 與本研究結果之比較

Table 4-5 Comparison of levan produced by fermentation of *Z. mobilis* for reference and in the study

Strain	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	<i>Z. mobilis</i> ATCC 31821	<i>Z. mobilis</i> ATCC 31821	<i>Z. mobilis</i> ATCC 31821	<i>Z. mobilis</i> 113S	<i>Z. mobilis</i> 113S	<i>Z. mobilis</i> B-4286	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191
Carrier	Polypropylene foam	-	-	-	Stainless steel wire spheres	Ca-alginate gel	-	Polypropylene foam
Fermentation method	Repeated batch with IM*	batch	batch	batch	Repeated batch with IM	Repeated batch with IM	batch	Continuous with IM
Carbon source	sucrose	commercial sucrose	molasses	sugar cane syrops	sucrose	sucrose	sucrose	sucrose
Levan production ( g/l )	6.44	21.685	2.533	15.456	12.6	13.6	14.5	13.30
Levan productivity ( g/l/h )	0.27	0.90	0.10	0.64	0.26	0.28	0.60	1.11
Reference	蘇(2010)	Oliveira et al. (2007)	Oliveira et al. (2007)	Oliveira et al. (2007)	Bekers et al. (2001)	Bekers et al. (2001)	Ananthalakshmy et al. (1999)	This work

\*IM: Immobilized cells

縮短代謝物的時間等優點，對於提升 levan 的產量與生產速率有很大的幫助。

#### 4.6 固定化 *Z. mobilis* 菌體於連續式發酵期間之酒精產量

本研究的目標產物雖然為 levan，但是 *Z. mobilis* 同時會產生酒精，因此同時分析 *Z. mobilis* 在蔗糖環境下生產酒精的能力。由試驗得知(表 4-6)，當饋料的蔗糖濃度越高，則酒精產量越高，從 17.89 g/l 升至 38.65 g/l，提高 116%，由圖 4-15 可知，饋料濃度 120 g/l 時的酒精產量為四組中最高，平均酒精濃度可達 38.65 g/l (平均酒精濃度=全部酒精產量/取樣次數)，其生產速率為 3.22 g/l/h (生產速率=全部酒精產量/發酵時間)。

如表 4-7 所示，當饋料速度為 36 ml/h、50 ml/h 和 72 ml/h，發酵液中酒精的平均濃度為 26~29 g/l，其差異不大( $p < 0.05$ )，生產速率則皆接近 2 g/l/h 左右，而饋料速度增加至 84 ml/h，酒精產量有下降的趨勢，平均酒精濃度降至 17.16 g/l，生產速率只有 1.43 g/l/h，且以圖 4-16 來看，發酵中每個階段之酒精濃度低於其他四組，推測原因為此條件下，levan 的產量為最高(圖 4-7)，*Z. mobilis* 代謝蔗糖在此主要生產 levan，所以酒精產量較低。當饋料速度至 100 ml/h 時，雖然後期(96~144 h)酒精濃度較饋料速度 84 ml/h 高，但是在 36~60 h 期

表 4-6 連續式發酵的饋料蔗糖濃度對固定化菌體 *Z. mobilis* 酒精產量的影響

Table 4-6 Effect of sucrose concentrations on ethanol production during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Sucrose concentration ( g/l )	Ethanol ( g/l )*	Productivity of ethanol ( g/l/h )**
50	17.89 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.49 <sup>c</sup>
75	24.57 ± 0.21 <sup>bc</sup>	2.05 <sup>bc</sup>
100	27.79 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.32 <sup>b</sup>
120	38.65 ± 0.11 <sup>a</sup>	3.22 <sup>a</sup>

\* Ethanol ( g/l ) : total production ( g/l ) / times of sampling

\*\* Productivity of ethanol ( g/l/h ) : total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

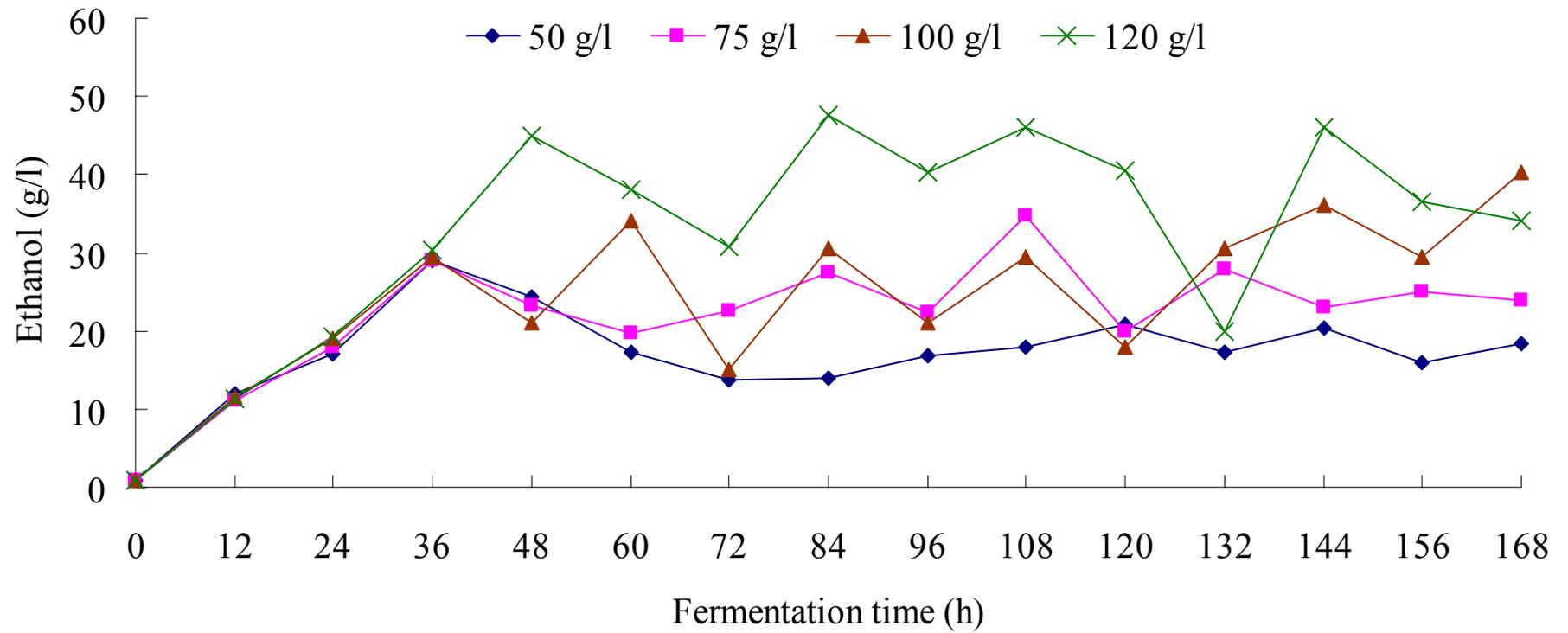


圖 4-15 饋料蔗糖濃度於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中酒精產量的變化

Fig 4-15 Effect of sucrose concentrations in feed medium on ethanol production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

表 4-7 連續式發酵的饋料速度對固定化 *Z. mobilis* 菌體之酒精產量的影響

Table 4-7 Effect of flow rates on ethanol production during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Dilution rate ( h <sup>-1</sup> )*	Ethanol ( g/l )**	Productivity of ethanol ( g/l/h )***
0.036	26.84 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.24 <sup>a</sup>
0.050	27.79 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.32 <sup>a</sup>
0.072	29.29 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.44 <sup>a</sup>
0.084	17.16 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.43 <sup>b</sup>
0.100	19.14 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.59 <sup>b</sup>

\* Dilution rate ( h<sup>-1</sup> ) : flow rates / fermentor volume

\*\* Ethanol ( g/l ) : total production ( g/l ) / times of sampling

\*\*\* Productivity of ethanol ( g/l/h ) : total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

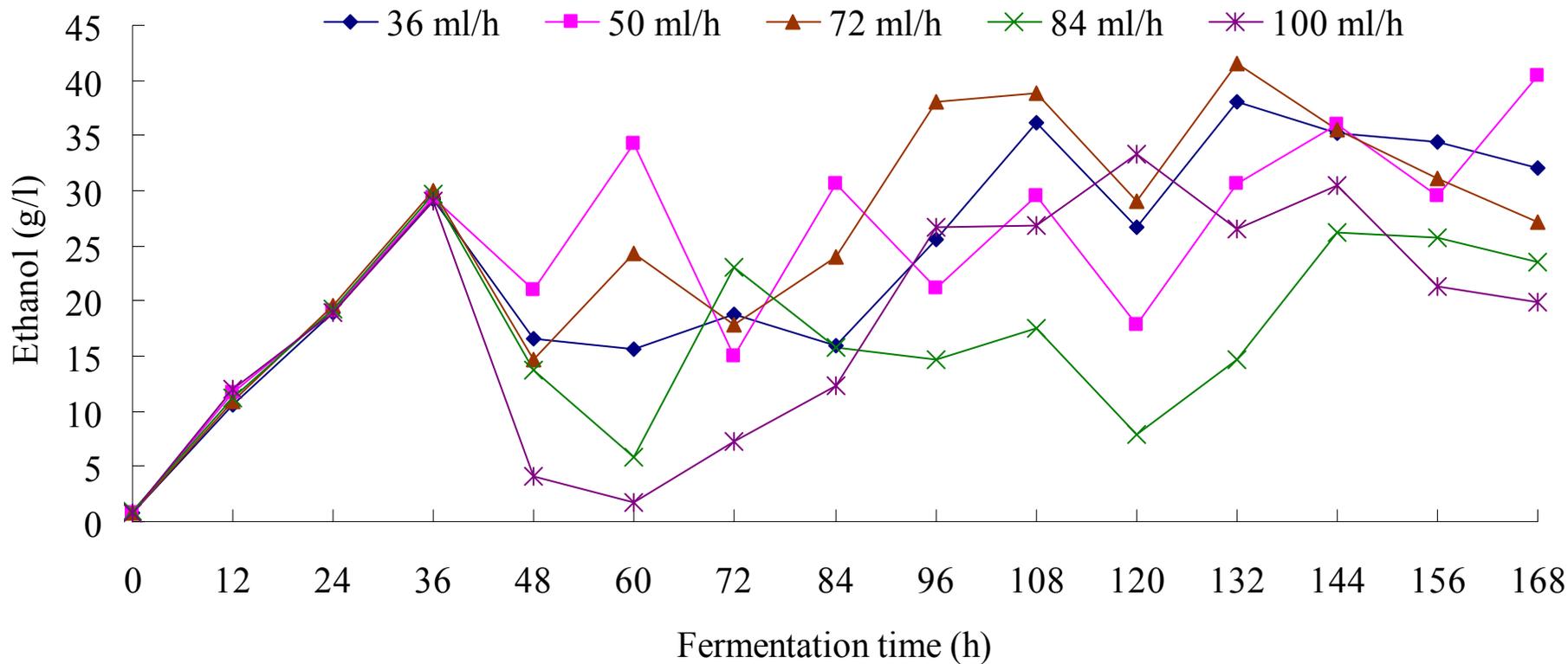


圖 4-16 饋料速度於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中酒精產量的變化

Fig 4-16 Effect of flow rates in feed medium on ethanol production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

間，因饋料速度過快，使發酵液在瓶內的滯留時間縮短，再加上菌體濃度被稀釋，導致菌體無法有效利用新鮮培養基，因而酒精產量迅速降低，所以酒精的平均濃度只有 19.14 g/l，生產速率為 1.59 g/l/h，也是比前三個低饋料速度時低。

而不同泡棉填充量對於 *Z. mobilis* 生產酒精的影響，由表 4-8 與圖 4-17 來看，在生成 levan 時，填充量之不同對酒精產量與生產速率差異不大，當填充量從 8%提高至 16%時，平均酒精濃度以及生產速率皆提高了 16%，但是同時 levan 的產量會降低。

#### 4.7 批次、懸浮(非固定化)菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵生成酒精之比較

因為 *Z. mobilis* 代謝葡萄糖的途徑較特殊(E-D pathway)，與酵母菌發酵產生酒精的過程相比，可以縮短許多轉換步驟而將葡萄糖快速分解生產酒精，其產量約可達 13~15% (v/v) (Rogers et al., 1980 ; Sprenger, 1996 ; Panesar et al., 2006)，酒精收率達理論值的 95%至 98% 左右。也因為代謝過程的不同，以致 *Z. mobilis* 於蔗糖環境下的酒精之收率明顯的較以葡萄糖為碳源時低，酒精收率只有理論值的 57% (Lee and Huang, 1995)。

若是以表 4-6 來看，固定化 *Z. mobilis* 菌體，饋料培養基蔗糖濃

表 4-8 連續式發酵的載體填充量對固定化 *Z. mobilis* 菌體之酒精產量的影響

Table 4-8 Effect of amount carrier load on the production of ethanol during continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Carrier load ( v/v )	Ethanol ( g/l )	Productivity of ethanol ( g/l/h )
8%	17.16 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.43 <sup>b</sup>
12%	16.84 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.40 <sup>b</sup>
16%	19.98 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>

\* Carrier load ( v/v ): carrier volume / fermentor volume

\*\* Ethanol ( g/l ): total production ( g/l ) / times of sampling

\*\*\* Productivity of ethanol ( g/l/h ): total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

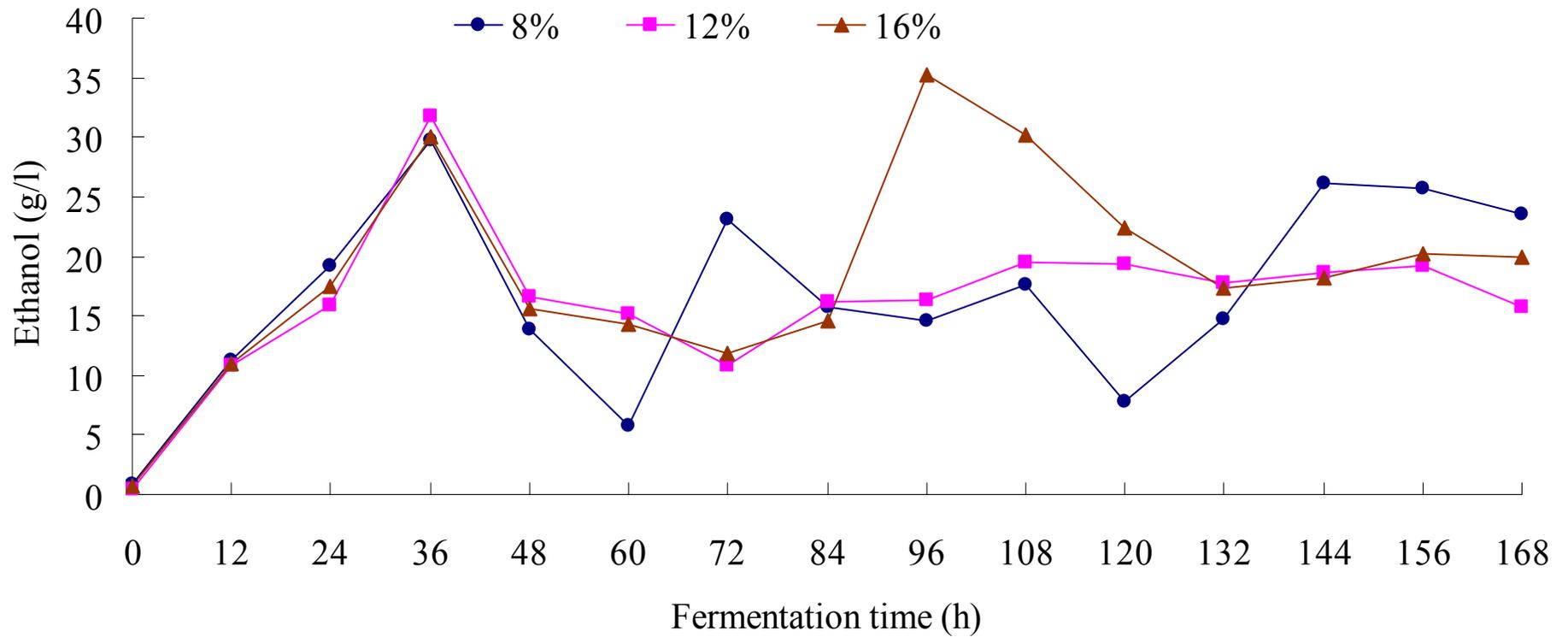


圖 4-17 載體填充量於固定化 *Z. mobilis* 菌體在連續式發酵過程中酒精產量的變化

Fig 4-17 Effect of amount carrier load in feed medium on ethanol production from immobilized *Z. mobilis* cells during continuous fermentation

度 120 g/l 時，在本試驗中有最高的酒精產率及生產速率，但是相對的 levan 產量會降低。而本研究之目標產物是 levan，酒精則是當作副產物，因此，將得到 levan 之最佳條件所得之酒精產量，與懸浮菌體在批次及連續式發酵時的酒精產量進行比較。

由表 4-9 可得知，當 *Z. mobilis* 以批次發酵方式發酵蔗糖時，平均酒精濃度為 29.75 g/l，生產速率為 0.83 g/l/h，而利用連續式發酵生產酒精，自由菌體之平均酒精濃度為 16.74 g/l，固定化菌體之酒精濃度則為 17.16 g/l，酒精生產速率則兩者皆為 1.4 g/l/h 左右。結果顯示，*Z. mobilis* 以蔗糖為碳源並利用連續式發酵的方式，相較於批次發酵也可以增加酒精的生產速率，但是懸浮菌體與固定化菌體兩種方式，對於酒精的生產則無影響。

#### 4.8 文獻中利用 *Z. mobilis* 發酵生產酒精與本研究結果之比較

本研究與其他文獻比較以 *Z. mobilis* 發酵生成酒精，如表 4-10 所示，本研究之酒精濃度與生產速率略低於其他文獻之結果。根據文獻指出，不同來源所分離出的 *Z. mobilis* 其酒精產量也會不同，而且若以葡萄糖為碳源，則酒精產量以及生產速率較高，而連續式發酵之酒精生產速率最高。再以 *Z. mobilis* ATCC29191 此菌株來看，以糖蜜為碳源之酒精產量較蔗糖的好，但利用連續式發酵之方式，可以提升酒

表 4-9 以批次、懸浮菌體連續式以及固定化菌體連續式發酵 *Z. mobilis* 生產酒精的影響

Table 4-9 Effect of ethanol produced by batch, continuous fermentation with free cells and continuous fermentation with immobilized *Z. mobilis* cells

Fermentation	Ethanol ( g/l )*	Productivity of ethanol ( g/l/h )**	Fermentation time ( h )
batch	29.75 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.83 <sup>b</sup>	36
continuous with free cells	16.74 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.39 <sup>a</sup>	132
continuous with immobilized cells	17.16 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.43 <sup>a</sup>	168

\*\* Ethanol ( g/l ) : total production ( g/l ) / times of sampling

\*\*\* Productivity of ethanol ( g/l/h ) : total production ( g/l ) / fermentation time ( h )

Values followed by different letters in the same column are significantly different (  $p < 0.05$  ). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-10 文獻中利用 *Z. mobilis* 發酵生產酒精與本研究結果之比較

Table 4-10 Comparison of ethanol produced by fermentation of *Z. mobilis* for reference and in the study

Strain	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	<i>Z. mobilis</i> NBRC 13756	<i>Z. mobilis</i> NBRC 13756	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	<i>Z. mobilis</i> 113 S	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191
Carrier	Polypropylene foam	-	Ca-alginate gel	-	-	Pectin beads	-	Polypropylene foam
Fermentation method	Repeated batch with IM*	Batch	Repeated batch with IM	Batch	Continuous	Repeated batch with IM	Batch	Continuous with IM
Carbon source	sucrose	cellulose	cellulose	molasses	glucose	glucose	sucrose	sucrose
Ethanol production ( g/l )	32	2.5	18	55.8	34.0	58.2	89.3	17.16
Ethanol productivity ( g/l/h )	0.89	0.10	0.375	1.16	6.8	2.33	3.72	1.43
Reference	蘇(2010)	Yamashita et al. (2008)	Yamashita et al. (2008)	Cazetta et al. (2007)	Toma et al. (2003)	Kesava et al. (1995)	Lee et al. (1995)	This work

\*IM: Immobilized cells

精的生產速率。因此本研究在生產 levan 的同時，也可以將酒精當作次級產物收集。

#### 4.9 *Z. mobilis* 於連續式發酵產生的 levan 之平均分子量分佈

本試驗的連續式發酵期間，測定發酵進行中發酵液之 levan 產量的同時，也分析 levan 分子量。由表 4-11 中所示，各樣品中皆有兩組不同分子量分佈，由分子量來看，小分子的 levan 大多集中在 3 kDa~22 kDa，而大分子的 levan 分子量分布範圍為 388 kDa~2540 kDa。

levan 分子量範圍會因不同菌株、不同生長條件、環境中的 pH 值、所含離子濃度以及一些環境因素，而有不同的分子大小。例如文獻指出 *Erwinia herbicolau* 培養於蔗糖 5%，初始 pH 7.2，並添加硫化鎂、硫化鐵、磷酸鹽等無機鹽類之發酵液時，levan 分子量範圍在 1000 至 1750 kDa ( Keith et al., 1991 )。Levan 隨著分子大小不同，具有不同的生理活性，且不同分子大小的 levan 其抗腫瘤的活性也有所不同 ( Calazans et al., 2000 )，文獻指出分子量 456.9 kDa~1073.5 kDa 具有抗腫瘤活性，其中又以分子量 456.9 kDa 抗腫瘤的活性最佳。而分子量在 1000 kDa 具有在血清中可誘發抗體的形成，在 30 kDa~100 kDa 的分子量範圍則具有血液增量劑的功能( Rairakhwada et al.,2007 )。高分子量的 levan (分子量 > 2000 kDa )，則具有降低膽固醇( Yamamoto

表 4-11 *Z. mobilis* 於連續式發酵產生的 levan 之平均分子量分佈

Table 4-11 Molecular weight of levan produced by continuous fermentation with *Z. mobilis*

Carrier ( v/v )	Dilution rate ( h <sup>-1</sup> )	Sucrose concentration ( g/l )	Molecular weight of levan ( Da )	
8%	0.050	50	1.65×10 <sup>4</sup>	2.25×10 <sup>6</sup>
8%	0.050	75	1.76×10 <sup>4</sup>	2.34×10 <sup>6</sup>
8%	0.050	100	2.01×10 <sup>4</sup>	2.35×10 <sup>6</sup>
8%	0.050	120	1.44×10 <sup>4</sup>	2.30×10 <sup>6</sup>
8%	0.036	100	2.76×10 <sup>3</sup>	3.88×10 <sup>5</sup>
8%	0.072	100	5.87×10 <sup>3</sup>	6.33×10 <sup>5</sup>
8%	0.084	100	5.21×10 <sup>3</sup>	4.73×10 <sup>5</sup>
8%	0.100	100	5.21×10 <sup>3</sup>	6.33×10 <sup>5</sup>
12%	0.084	100	9.52×10 <sup>3</sup>	7.84×10 <sup>5</sup>
16%	0.084	100	1.14×10 <sup>4</sup>	9.71×10 <sup>5</sup>
Free cells	0.050	100	2.29×10 <sup>4</sup>	2.54×10 <sup>6</sup>

et al., 1999 )以及有當作益菌質的特性(黃等人, 2010)。

以圖 4-18 所示, 在稀釋速率  $0.050 \text{ h}^{-1}$  時, 懸浮菌體與固定化菌體連續式發酵 *Z. mobilis* 時, 產生之 levan 分子量較大, 相較於其他四組稀釋速率, 分子量可大到 4 至 6.5 倍。

因此, 利用不同的發酵條件得到不同大小之 levan 分子量, 可依照需求以有效應用。而根據上述試驗結果, 顯示本試驗所得之 levan 分子量, 其較大分子量部分( 388 kDa~2540 kDa )的生理活性與抗腫瘤、降低膽固醇以及可做為益菌質有關( Calazans et al., 1997; Yamamoto et al., 1999; Yoo et al., 2004; 黃等人, 2010)。因此, 以 *Z. mobilis* 發酵果聚糖( levan ), 具開發為保健食品的潛力, 是相當有經濟效益的。

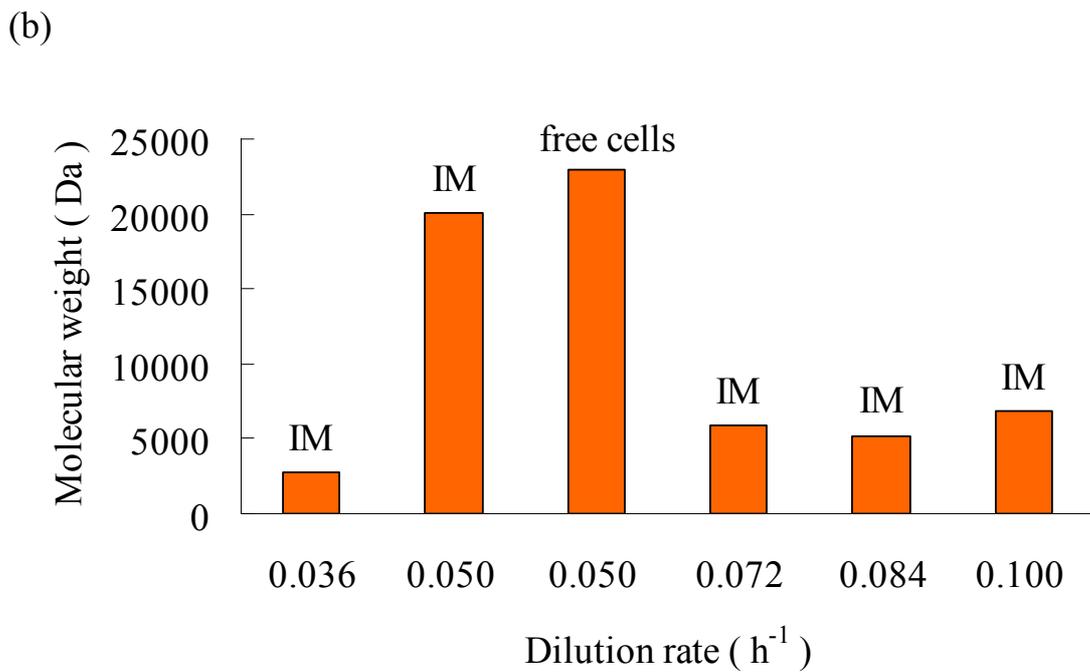
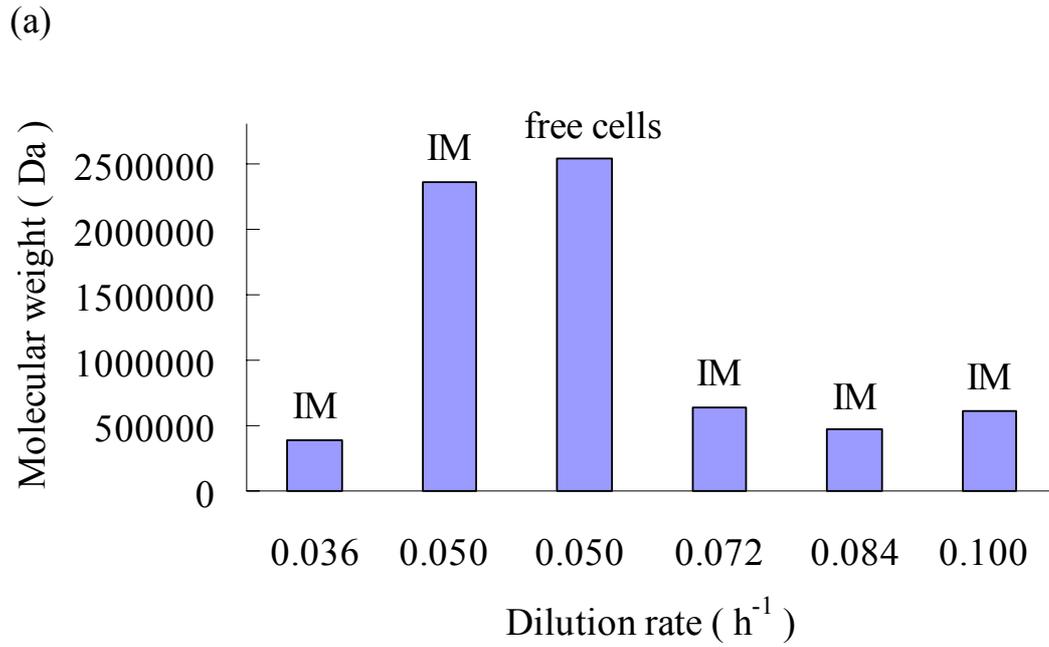


圖 4-18 不同稀釋速率下之 levan 分子量(a) 大分子分布；(b) 小分子分布

Fig 4-18 Effect of different dilution rates on molecular weight of levan (a) distribution of large molecules; (b) distribution of small molecules

IM stands for immobilization

## 第五章 結論

本研究主要是利用固定化 *Z. mobilis* 菌體進行連續式發酵來生產 levan，以提升 levan 的產量及生產速率。

1. 固定化菌體連續式發酵試驗顯示，饋料基質的蔗糖濃度由 50 至 100 g/l，濃度越高，所得的產物 levan 濃度從 1.29 g/l 上升至 7.70 g/l，而 levan 的生產速率也隨之提升，由 0.11 g/l/h 上升至 0.64 g/l/h，但當饋料基質濃度達 120 g/l 時，不利於菌體的生長與 levan 的生成。因此，饋料濃度為 100 g/l 時，levan 產量最高。
2. 當饋料速度由 36 ml/h 提升至 84 ml/h，則 levan 產量由 7.82 g/l 增加至 13.30 g/l，提升了 70%；生產速率從 0.65 g/l/h 提高至 1.11 g/l/h，增加了 71%，饋料速度提升至 100 ml/h 時，levan 產量下降。因此，饋料速度為 84 ml/h 時，levan 產量最高。
3. 以泡棉為固定化菌體的載體填充量方面，當發酵瓶中的泡棉填充量從 8% 增至 16% (v/v)，levan 產量由 13.30 g/l 降至 6.00 g/l，生產速率則從 1.11 g/l/h 降至 0.50 g/l/h，泡棉量多時，導致基質與菌體傳導速度變慢，連帶影響 levan 產量偏低。因此，填充量為 8% 時，levan 產量最高。
4. 根據固定化 *Z. mobilis* 連續式發酵試驗，得知生產 levan 之最佳條件為饋料的蔗糖濃度 100 g/l、饋料速度為 84 ml/h 以及載體泡棉的

填充量 8% (v/v)，平均 levan 濃度為 13.30 g/l，其生產速率為 1.11 g/l/h。

5. 批次、懸浮菌體連續式以及固定化菌體連續式三種發酵方式的結果顯示，連續式發酵之 levan 產量比批次發酵高，而在二種連續式發酵試驗結果，又以固定化菌體之 levan 產量( 13.30 g/l)比懸浮菌體( 5.53 g/l)高 140%；生產速率則由 0.46 g/l/h 增加至 1.11 g/l/h，提高了 141%。
6. 在固定化 *Z. mobilis* 菌體以連續式發酵生產 levan 之最適條件，同時也發現其生長在蔗糖環境下，也有酒精生成，平均酒精濃度為 17.16 g/l，生產速率為 1.43 g/l/h，可將酒精作為次級產物收集。
7. *Z. mobilis* 生產出的 levan 經 GPC 分析後，得知此分子量分佈主要有兩組，分別為 3 kDa~22 kDa 及 388 kDa~2540 kDa。其中較大分子量分佈(388 kDa~2540 kDa)，可能具有抗腫瘤、降低膽固醇及做為益菌質功效的生理活性。

## 參考文獻

- 王伯徹(2004)。菇類菌種之長期保存。食品工業 36, 16-24。
- 吳建一、鍾宛真、葉修鋒(2006)。固定化酵素之演進與展望。化工 53, 175-198。
- 李瑞真(2011)。固定化 *Clostridium acetobutylicum* 進行連續式發酵生產丁醇之研究。東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文。
- 卓裕盛(2008)。PVA 固定化硫酸還原菌體顆粒處理含銅廢水之研究。交通大學環境工程研究所碩士論文。
- 林祺能、吳石乙。(2002)。以三相流體化床進行固定化細胞產氫。逢甲大學化學工程研究所碩士論文。
- 林逸群(2003)。連續生產PHBV-丙酸戊酸對菌體生長及PHBV生產之影響。大葉大學食品工程系研究所論文。
- 林葦郁(2005)。利用固定化菌體進行樟芝 (*Antrodia camphorata*) 的深層培養生產菌體代謝物之研究。東海大學食品科學系研究所碩士論文。
- 林志明(2008)。 *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 轉化葡萄糖成生質乙醇之培養基開發與固定化發酵策略探討。台北科技大學化學工程所碩士論文。
- 陳嘉宏(2003)。共固定化 *Zymomonas mobilis* 與糖化菌或酵素對澱粉

- 發酵之研究。屏東科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 梅樂和(1999)。生化生產工藝學。科學出版社。北京。
- 黃政達(1993)。利用固定酵素之競爭性反應改進微生物發酵速率。中原大學化學工程研究所碩士論文。
- 黃美瑩、黃詩涵、方佩琪、林金榮(2010)。以微生物生產果寡糖及其應用。水試專訊 31, 20-24。
- 黃美瑩、張志堅、黃詩涵、林金榮(2011)。果聚糖在水產養殖的應用。水試專訊 35, 20-23。
- 游繼宗(1992)。利用固定化白腐真菌去除染整廢水色度之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 楊明哲(1997)。靈芝菌絲體固定化培養之研究。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 劉英偉(1993)。蘆筍及胡蘿蔔植物細胞固定化培養之應用。東海大學化學工程研究所碩士論文。
- 劉宏秀(2003)。以 Silicone 固定化厭氧汙泥進行連續式產氫。逢甲大學化學工程學系碩士論文。
- 蘇莉娟(2010)。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糖(levan)之研究。東海大學食品科學系研究所碩士論文。

Adinarayana, K., Srinivasulu, B., Bapi Raju, K.V.V.S.N., Ellaiah, P. (2004). Continuous neomycin production by immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in an airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, 39: 1407-1414.

Alegre, R.M., Rigo, R.W. e M. (2005). Levan production by isolated mutants of *Zymomonas mobilis*. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, 7: 103-112.

Amutha, R., and Gunasekaran, P. (2001). Production of ethanol from liquefied Cassava Starch using co-immobilized cells of *Z. mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Jour. Biosc. Bioeng.*, 92: 560-564.

Ananthalakshmy, V.K. and Gunasekaran, P. (1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz. Arch. Boil. Technol.*, 42: 291-298.

Baratti, J and Bu'Lock, J. (1986). *Zymomonas mobilis*: A bacterium for ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, 4: 95.

Barone, J.R., and Medynets, M. (2007). Thermally processed levan polymers. *Carbohydrate polymers*, 69: 554-561.

Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, A., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., Vina, I., Linde, R., Scherbaka, R. (2001). Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, 36: 979-986.

Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38: 701-706.

Bringer, S., FinnRK, Sahm, H. (1984). Effect of oxygen on the

metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol, 139: 376.

Calazans, G.M.T., Lopes, C.E. and Lima, R.M.O.C. (1997). Antitumour activity of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnol. Lett., 19: 19-21.

Calazans, G.M.T., Lima, R.C., França, F.P. de, Lopes, C.E. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. International Journal of Biological Macromolecules, 27: 245-247.

Carey, V.C., and Ingram, L.O. (1983). Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effect of ethanol and glucose. Journal of Bacteriology, 154: 1291-1300.

Carr, J.G. (1974). Bergey,s Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., Scarmino, I.S. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. Bioresource Technology, 98: 2824-2828.

Clarke, M.A., Roberts, E.J., Garegg, P.J. (1997). New compounds from microbiological products of sucrose. Carbohydr. Polym., 34:425.

Cohen, Y. (2001). Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource technology, 77: 257-274.

Dawes, E.A., and Ribbons, D.W. (1966). Sucrose utilitation by *Zymomonas mobilis*: Formation of a Levan. Biochem. J., 98: 804-812.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F.

(1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

Forrest, W.W. (1967). Energies of Activation and Uncoupled Growth in *Streptococcus faecalis* and *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.*, 94: 1459-1463.

Fried, E. (1995). Anandamides: tolerance and cross-tolerance to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Brain Research*, 697: 83-90.

Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Schoham, G., Danino, D., and Shoham, Y. (2008). Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase : an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *Journal of biological chemistry*, 283: 32209-32217.

Gryta, M. (2002). The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142: 79-88.

Gupta, S.K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Dalvi, R., Kumar, V. and Mukherjee, S.C. (2008). Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 31: 649-657.

Gupta, S.K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Dalvi, R.S., Akhtar, M.S., Jha, A.K. and Baruah, K. (2010). Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. *Aquaculture*, 306: 398-402.

Han, Y.W. (1990). Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol*, 35: 171-194.

Hehre, E.J. (1951). Enzymic synthesis of polysaccharides: a biological type of polymerization. *Adv. Enzymol.*, 11: 297-337.

Hsu, T.H., Shiao, L.H., Hsieh, C.Y., and Chang, D.M. (2002). A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Chemistry*, 78: 463-469.

Huber, A.E., Stayton, P.S., Viney, C., and Kaplan, D.L. (1994). Liquid crystallinity of a biological polysaccharide: the levan/water phase diagram. *Macromolecules*, 27: 953-957.

Ichiro, C. and Wingaed, L.B. (1983). Immobilized Microbial Cells. Volume 4 in *Applied Biochemistry and Bioengineering*, edited by Lemuel B. Wingaed, Jr., Ephraim Katchalski-Katzir and Leon Goldstein, Academic Press: 190-245.

Izzo, M., and Niness, K. (2001). Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. *Cereal foods world*, 46: 102-106.

Kang, H.S. (2004). The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobile* ZM4. *Nature Biotechnology*, 23: 63-68.

Kannan, T.R., Mukundan, A.G., and Gunasekaran, P. (1993). Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 75: 265-270.

Kannan, T.R., Sangiliyandi, G., Gunasekaran, P. (1998). Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 179-184.

Keith, K., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., Kaplan, D. (1991). Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 557-560.

Kennedy, J.F., Stevenson, D.L., White, C.A., Viikari, L. (1989). The chromatographic behaviour of a series of fructo-oligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. Carbohydrate Polymers, 10: 103-113.

Kim, M.G., Seo, J. W., Song, K.B., Kim, C.H., Chung, B.H., Rhee, S.K. (1998). Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. Biotechnol. Lett., 20: 333-336.

Kluyver, A.J., and Hoppenbrouwers, W.J. (1931) Ein merkwürdiges Gärungsbakterium : Lindner's *Termobacterium mobile*. Arch. Mikrobiol., 2: 245-260.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., and Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiology, 21: 377-397.

Kunamneni, A., Prabhakar, T., Jyothi, B., Ellaiah, P. (2007). Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. Enzyme and Microbial Technology, 40: 1538-1542.

Kunst, F., Rapoport, G. (1995). Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 177: 2403-2407.

Lawford, R.G., Lavers, B.H., Good, D., Charley, R., Fein, J. and Lawford, H.G. (1984). Ethanol from biomass. Royal Society of Canada, Ottawa: 482-507.

Lebeau, T., Jouenne, T. and Junter, G.A. (1998). Diffusion of sugar and alcohols through composite membrane structures immobilising viable yeast cells. Enzyme and Microbial Technology, 22: 434-438.

Lee, W.C., Huang, C.T. (1995). Enhancement of ethanol production from sucrose by *Zymomonas mobilis* by addition of immobilize invertase. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 79-84.

Lee, W.C., Huang, C.T. (2000). Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobile* ATCC10988 grown on the media contain glucose and fructose. *Biochem. Engin. J.*, 45: 217-227.

Leigh, D., Scopes, R.K. and Roger, D.A. (1984). A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobils*. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 20: 413-415.

Liepa, V., Zakenfelds, G., Valpe, E., Koronova, Z., Lapsa, R., Laivenieks, M., Bekers, M. and Pospishil, I. (1993). Levan prolongs the lifespan of tumor-bearing or irradiated mice and enhances the antitumor activity of leukocytes. *Proc. Latv. Acad.*, B5: 59-64.

Litchfield, J.H. (1979). Production of single cell protein for use in food and feed. In: *Microbial Technology*, 2nd ed. (New York, Academic Press).

Loos, H., Kramer, R., Sahm, H., Sprengel, G.A. (1994). Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentration of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.*, 176: 7688-7693.

Lu, C.J., Lee, C.M., and Huang, C.Z. (1996). Biodegradation of chlorophenols by immobilized pure-culture microorganisms. *Water Science and Technology*, 34: 67-73.

Lyness, E.W., and Doelle, H.W. (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5: 345-350.

McGill, D.J. and Dawes, E.A. (1971). Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas mobils* anaerobia. *Biochem. J.*, 125: 1059-1068.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.

Millis, N.F. (1951). Some bacterial fermentations of cider. (Ph.D. Thesis). Univ. of Bristol, U.K..

Min-tian, G., Koide, M., Gotou, R., Takanashi, H. (2005). Development of a continuous electro dialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. *Process Biochemistry*, 40: 1033-1036.

Mohagheghi, A., Ruth, M., Schell, D.J. (2006). Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effect of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*, 41: 1806-1811.

Nagamune, T., Endo, I., Hato, N., Nishimura, M. and Kobayashi, T. (1988). The effect of cultivation conditions on the penicillin production using a urethane foam-supported *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Engineering*, 3: 173-176.

Nigam, S.C., Tsao, I-Fu, Akiyoshi Sakoda and Wang, H.Y. (1988). Techniques for Preparing Hydrogel membrane capsules. *Biochem. Tech.* (2): 271-276.

Nowak, J. (2000). Ethanol yield and productivity of *Zymomonas mobilis* in various fermentation methods. *Food Science and Technology*, 3.

Ohn, G., Eberhardt, I., Zeitz, A., Hellendoorn, L., Schugerl, K. (1996). Coimmobilized aerobic/anaerobic mixed cultures in shaken flasks. *Journal of Biotechnology*, 46: 209-219.

Oliveira, M.R. de, Silva, R.S.S.F. da, Buzato, J.B., Celligoi, M.A.P.C. (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, 37:

177-183.

Panesar, P.S., Marwaha, S.S., Kennedy, J.F. (2006). *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 623-635.

Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. and Russell, I. (1998). Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104: 19-31.

Rairakhwada, D., Pal, A.K., Bhathena, Z.P., Sahu, N.P., Jal, A., Mukherjee, S.C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish immunology*, 22: 477-486.

Rebros, M., Rosenberg, M., Stloukal, R., Kristofikova, L'. (2005). High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into Lentikats. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 412-416.

Rhee, S.K., Song, K.B., Yoon, B.D., Kim, C.H. (2002). Animal fed containing simple polysaccharides, PCT-KR00-0156.

Rhee, S.K., Song, K.B., Kim, C.H., Park, B.S., Jang, E.K., Jang, K.H. (2005) Levan. In "Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry". Steinbüchel, A. and Rhee, S. K. : 323-349.

Roberfroid, M.B., and Slavin, J. (2000). Nondigestible Oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 461-480.

Roberfroid, M.B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1660-1664.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Tribe, D.E. (1980). High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. Proc. Bioch., 15: 7-11.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicku, M.L., Tribe, D.E. (1982) .Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem.Eng., 23: 37-84.

Sahm, H., Meyer, S.B., Georg, A. (2006). The Genus *Zymomonas*. Prokaryotes, 5: 201-221.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., and Prapulla, S.G. (2005). Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. Process Biochemistry, 40: 1085-1088.

Siva Kesava, S., Panda, T. and Rakshit S.K. (1996) Production of ethanol by immobilized whole cells of *Zymomonas mobilis* in an expanded bed bioreactor. Process Biochemistry, 31: 449-456.

Scott, C.D. (1987). Immobilized cell: a review of recent literature. Enzyme Microb Technol., 9: 66-73.

Seo, J.S., Chong, G., Park, H.S., Yoon, K.O., Jung, C., Kim, J.J., Hong, J.H., Kim, H., Kil, J.I., Park, C.J., Oh, H.M., Lee, J.S., Jin, S.J., Um, H.W., Lee, H.J., Oh, S.J., Kim, J.Y., Kang, H.L., Lee, S.Y., Lee, K.J., Song, K.B., Belghith, H., Rhee, S.K. (1996). Production of levan, a fructose polymer, using an overexpressed recombinant levansucrase. Ann. N. Y. Acad. Sci., 799: 601-607.

Skotnicki, K.L., Lee, K.J., Tribe, D.E. and Rogers, P.L. (1981). Comparison of ethanol production by different *Zymomonas mobilis* strains. Appl. Environ. Microbiol., 41: 889-893.

Sprenger, G.A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* :a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microb.

Lett., 145: 301-307.

Song, K.B., and Rhee, S.K. (1994). Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 16: 1305-1310.

Swings, J., and De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.*, 41: 1-41.

Tanaka, K., Hilary, Z.D., Ishizak, A. (1999). Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation *Zymomonas mobilis*. *Jour.Biosc.Bioeng.*, 87: 642-646.

Toma, M.M., Kalnenieks, U., Berzins, A., Vigants, A., Rikmanis, M., Viesturs, U. (2003). The effect mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. *Process Biochemistry*, 38: 1347-1350.

Vigants, A., Hicke, H.G. and Marx, S.P. (2001). A simple and efficient method for the purification of membrane bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr. Microbiol.*, 42: 415-418.

Viikari, L. (1984). Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 19: 252-255.

Vijn, I., and Smeekens, S. (1999). Fructan: more than reserve carbohydrate. *Plant Physiol.*, 120: 351-359.

Winfried, H. (1988). Methods of immobilization. Chapter 6 in *Immobilized Biocatalysts*, translated by Joy Wieser, printed in Germany: 22-50.

Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S. and Yamaguchi, H. (1999). In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterlemic effects in rates. *J. Nutr. Biochem.* 10: 13-18.

Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C., Nakamura, Y. (2008). Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 42: 314-319.

Yanase, H., Kotani, T. and Tonomura, K. (1985). Fusion of spheroplasts and genetic recombination of *Zymomonas mobilis*. *Agric. Boil. Chem.*, 49: 133-140.

Yoo, I.K., Seong, G.H., Chang, H.N. and Park, J.K. (1996). Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technol.*, 19: 428-433.

Yoo, S.H., Yoon, E.J., Cha, J. and Lee, H.G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol*, 34: 37-41.

Youn, W.H. (1990). Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology*, 35: 171-194.

Yun, W.Y. (1996) Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and application. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 19: 107-11.