

私立東海大學化學工程研究所
碩士論文

指導教授：顏宏偉 博士

Streptococcus zooepidemicus 生產透明質酸(Hyaluronic Acid)
最適化醱酵條件探討

Optimization of fermentation condition for hyaluronic acid production
using *Streptococcus zooepidemicus*



研究生：廖素敏 撰

中華民國 97 年 7 月

誌 謝

離開大學生活已 18 年，能進入母校東海大學就讀化學工程研究所，要非常感謝永信藥品工業（股）公司與相關主管讓我有在職進修的機會，也要感謝顏宏偉老師、謝樹木老師、楊怡寬老師鼓勵我參加推甄考試。

本論文的完成，要感謝顏宏偉指導老師在這兩年來的悉心指導與關心，同時也以包容寬厚的態度給予我鼓勵跟支持，謹此獻上最誠摯的感謝。並感謝楊芳鏘教授、顧野松副教授、劉永銓教授、楊宗樺教授對本論文的細心審閱，惠與寶貴意見，使本論文更臻完善。

在兩年的求學期間，非常感謝師長們的傳道、授業、解惑，學長嘉鴻，同學子元、馨怡、秀玲，醱酵工程實驗室成員宜珈、昌宇、采竹、憶芝、嘉麟、孟琪等學弟妹，以及曾經在我身邊的朋友、學長姐們，讓我感受到重回學校讀書與學習真好。

最重要的，要感謝我親愛的家人、婆婆、大姐鴻玉、老公炳崑和乖巧的女兒佩君和兒子仕翰，有你們的陪伴與支持，才能讓我的研究所求學過程能無後顧之憂，再來要感謝永信主管與醱酵實驗室同仁們，在這段期間的鼎力相助與體諒，我才能在學業與工作方面兼顧。

僅以本論文獻給我的家人、主管、同仁、師長、學長姐、學弟妹，有你們的關懷與支持，才能順利完成研究所學業。

摘 要

透明質酸 (Hyaluronic Acid, 簡稱 HA) 由葡萄糖醛酸 (D-Glucuronic acid) 和 N-乙醯氨基葡萄糖 (N-Acetyl-Glucosamine) 以 β -1,3 與 β -1,4 糖苷鍵相互重複連接兩個雙糖結構，而形成的直鏈生物高分子，傳統上透明質酸是從雞冠中抽取純化，近年來利用生物技術生產透明質酸有增加的趨勢。

主要探討以經突變與非病源之透明質酸高含量菌株 (*Streptococcus zooepidemicus*)，利用回應曲面法以搖瓶實驗尋找最適化培養基，其包含碳源 (蔗糖)、氮源 (酵母萃出物) 與硫酸鎂 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)，其中 Mg^{2+} 離子為透明質酸合成酶活性之重要關鍵金屬離子。利用最適化之培養基，作搖瓶實驗可得到 2.97 g/L 透明質酸含量，此結果約為起始培養基的 3 倍。

進行醱酵槽 (5L) 批次培養 (Batch Culture) 和饋料培養 (Fed-Batch Culture) 以探討透明質酸最適化醱酵條件，在批次培養以回應曲面最適化培養基，轉速 400 rpm 與通氣量 2.0 vvm 可得到較好的含量 5.78 g/L 與較好的蔗糖轉化率 10.05 %，而在平均分子量方面則以最適化培養基，轉速 400 rpm 與通氣量 1.4 vvm 可得到較好的平均分子量 2.84×10^6 Da。在饋料培養以最適化培養基，通氣量 1.4 vvm，醱酵 8 小時後開始饋料並在 5 小時改變轉速 200 rpm ~ 500 rpm，可得到較好的透明質酸含量 6.94 g/L，此結果比起始批次培養條件 (Batch Culture) 約增加 65 %。

Key words: 透明質酸、鏈球菌 (*Streptococcus zooepidemicus*)、回應曲面法、最適化、醱酵

Abstract

Hyaluronic acid (HA) has a high molecular weight and a linear structure of repeating units of D-glucuronic acid and N-acetyl-glucosamine linked by β (1-3) and β (1-4) glycosidic bonds. It is a valuable biopolymer in the medical and cosmetic market. Traditionally, HA is extracted from rooster combs; in recent years, HA from microbial sources is increased.

The effects of medium compositions on HA production by *Streptococcus zooepidemicus* (a high HA - producing and toxicity-deficient mutant strain) were investigated in flask. The statistical design method (Response Surface Methodology, RSM) was adopted to determine the optimal medium composition; including carbon source (sucrose), nitrogen source (yeast extract) and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, which Mg^{2+} was known to be a key factor for the activity of hyaluronic acid synthase. The maximum HA concentration obtained could reach 2.97 g/L using the optimized medium according to the RSM results, which was about 3-fold of that obtained in the medium before optimization.

Optimizations of fermentation conditions on HA concentration and molecular weight were also studied in batch culture and fed-batch culture with 5L-fermenter. The batch culture conditions for the better concentration (5.78 g/L) and sucrose recovery yield (10.05%) were to use optimized fermentation medium with 400 rpm of agitation and 2.0 vvm of aeration. The conditions for the better molecular weight (2.84×10^6 Da) were to use optimized fermentation medium with 400 rpm of agitation and 1.4 vvm of aeration. The fed-batch culture conditions of the better concentration were to use optimized fermentation medium; 1.4 vvm of aeration; started to feed solution after cultured 8 hrs and changed the agitation (200 rpm ~ 500 rpm) at cultured 5hrs. The maximum HA concentration could reach 6.94 g/L under the optimized fermentation conditions, which concentration increased by 65% as compared with that under the fermentation conditions before optimization.

Key words: hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, response surface methodology, optimization, fermentation

目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
附件.....	XII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2-1 透明質酸簡介.....	2
2-1-1 市場資料.....	6
2-1-2 透明質酸功能與應用.....	7
2-1-3 現有生產技術.....	8
2-1-3-1 雞冠抽取.....	8
2-1-3-2 醱酵法.....	9
2-1-3-3 醱酵生產透明質酸分離純化.....	10
2-2 鏈球菌(<i>Streptococcus</i>)特性.....	10
2-3 透明質酸醱酵生產介紹.....	11

2-4 微生物醱酵培養方式.....	12
2-4-1 批式培養 (Batch)	12
2-4-2 饋料培養 (Fed-batch)	12
2-4-3 半連續培養 (Semi-Continuous)	13
2-4-4 連續式培養 (Continuous)	13
2-5 微生物生產透明質酸之培養基探討.....	13
2-6 微生物生產透明質酸之醱酵培養條件探討.....	14
2-7 實驗設計方法-回應曲面法.....	15
2-7-1 回應曲面實驗設計法.....	15
2-7-2 回應曲面法簡介.....	15
2-7-3 二水準因子實驗設計(two-level factorial design).....	18
2-7-4 陡升路徑設計實驗(path of steepest ascent).....	18
2-7-5 中心混成設計 (Central Composite Design, CCD)	19
2-7-6 統計檢驗.....	19
第三章 實驗材料與方法.....	20
3-1 實驗材料.....	20
3-1-1 菌株.....	20
3-1-2 實驗藥品.....	20
3-2 實驗儀器.....	22
3-3 分析方法.....	23
3-3-1 菌體濕重濃度分析方法.....	23
3-3-2 透明質酸含量的檢測(化學反應法).....	24
3-3-3 透明質酸含量與平均分子量檢測(HPLC-GPC Method).....	26

3-3-4 殘糖分析方法.....	27
3-4 菌種培養與保存.....	28
3-5 菌種活化.....	28
3-6 培養基組成.....	29
3-7 搖瓶實驗步驟.....	32
3-8 醱酵槽(5L)實驗裝置.....	33
3-9 醱酵槽(5L)實驗步驟.....	34
第四章 結果與討論.....	35
4-1 論文研究架構.....	35
4-2 實驗設計法進行培養基組成之最適化測試.....	36
4-2-1 二水準因數實驗設計.....	36
4-2-2 陡升路徑設計實驗 (path of steepest ascent)	39
4-2-3 中心混成(二階)設計實驗.....	41
4-2-4 回應曲面模式適切性之統計檢驗.....	44
4-2-5 回應曲面圖.....	45
4-2-5-1 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖... 45	
4-2-5-2 MgSO ₄ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖.... 46	
4-2-5-3 MgSO ₄ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖..... 47	
4-3 醱酵槽 (5L) 醱酵條件之探討.....	48
4-3-1 批次醱酵實驗.....	48
4-3-1-1 醱酵培養基之探討.....	48
4-3-1-2 溶氧值之探討.....	49
4-3-1-2-1 攪拌速度之探討.....	49

4-3-1-2-2 通氣量之探討.....	52
4-3-2 饋料醱酵.....	59
4-3-2-1 饋料濃度之探討.....	59
4-3-2-2 饋料濃度增加之探討.....	60
4-3-2-3 改變攪拌速度之探討.....	61
4-4 搖瓶實驗結果.....	63
4-5 醱酵槽(5L)批次培養(Batch Culture)實驗結果.....	63
4-6 醱酵槽(5L)饋料培養(Fed-Batch Culture)實驗結果.....	64
第五章 結論與展望.....	70
參考文獻.....	72
附 件.....	75

圖目錄

圖 2-1 透明質酸之分子化學結構單元.....	2
圖 2-2 鏈球菌細胞結構與透明質酸分泌示意圖.....	4
圖 2-3 透明質酸醱酵液電子顯微鏡照片.....	4
圖 2-4 鏈球菌之透明質酸合成途徑.....	5
圖 2-5 透明質酸合成示意圖.....	6
圖 2-6 透明質酸產品應用.....	7
圖 2-7 透明質酸分子量分解示意圖.....	9
圖 2-8 回應曲面法實驗設計流程圖.....	17
圖 3-1 搖瓶實驗步驟.....	32
圖 3-2 醱酵槽(5L)裝置與控制系統.....	33
圖 3-3 醱酵槽(5L)實驗步驟.....	34
圖 4-1 論文研究架構.....	35
圖 4-2 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖.....	45
圖 4-3 MgSO ₄ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖.....	46
圖 4-4 MgSO ₄ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖.....	47
圖 4-5 控制組 (Control) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄.....	53
圖 4-6 回應曲面 (RSM) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄.....	54
圖 4-7 不同醱酵培養基組成之透明質酸含量.....	55
圖 4-8 不同醱酵培養基組成之透明質酸平均分子量.....	55
圖 4-9 不同攪拌速度之透明質酸含量.....	56
圖 4-10 不同攪拌速度之透明質酸平均分子量.....	56

圖 4-11 以純化後之透明質酸成品 0.05%溶液測試攪拌速度.....	57
與攪拌時間對透明質酸平均分子量之影響	
圖 4-12 不同通氣量之透明質酸含量.....	58
圖 4-13 不同通氣量之透明質酸平均分子量.....	58
圖 4-14 回應曲面(RSM)培養基配方之 Fed-Batch 醱酵記錄.....	65
圖 4-15 Control Batch ; RSM Batch ; RSM Fed-Batch 之透明質酸含量.....	66
圖 4-16 Control Batch ; RSM Batch ; RSM Fed-Batch 之平均分子量.....	66
圖 4-17 回應曲面(RSM)Feeding Conc. 2X 之 Fed-Batch 醱酵記錄.....	67
圖 4-18 回應曲面Feeding Conc. 2X 並改變攪拌速度之醱酵記錄.....	68
圖 4-19 RSM Feeding Conc. 1X;2X;2X 並改變攪拌之透明質酸含量.....	69
圖 4-20 RSM Feeding Conc. 1X;2X;2X 並改變攪拌速度之平均分子量.....	69

表目錄

表 2-1 醫藥級透明質酸商品名;分子量與廠商之目錄.....	6
表 2-2 透明質酸結構、性能對皮膚之影響.....	8
表 2-3 動物來源與微生物生產透明質酸之優缺點比較表.....	9
表 3-1 平板培養基(TSB Agar).....	29
表 3-2 菌種培養基(Seed Medium).....	29
表 3-3 緩衝溶液(Buffer Solution).....	30
表 3-4 搖瓶醱酵培養基(Flask Fermentation Medium).....	30
表 3-5 醱酵槽(5L)控制組(Control)醱酵培養基(Fermentation Medium)...	31
表 3-6 醱酵槽(5L)回應曲面(RSM)醱酵培養基(Fermentation Medium)...	31
表 4-1 二水準三因子濃度範圍.....	36
表 4-2 二水準三因子設計.....	37
表 4-3 一階 RSM 實驗設計圖表與實驗結果.....	37
表 4-4 RSM 陡升路徑之實驗設計表.....	39
表 4-5 RSM 陡升路徑之實驗結果.....	40
表 4-6 中心混成(二階)實驗設計濃度範圍.....	41
表 4-7 中心混成(二階)實驗設計圖表.....	41
表 4-8 RSM 中心混成(二階)之實驗結果.....	42
表 4-9 搖瓶數據與回應曲面模式預測值之透明質酸含量比較.....	44
表 4-10 不同醱酵培養基之實驗結果.....	49
表 4-11 不同攪拌速度之實驗結果.....	50
表 4-12 不同通氣量之實驗結果.....	52
表 4-13 回應曲面(RSM)培養基配方之 Batch;Fed-batch 結果.....	59

表 4-14 回應曲面 (RSM) Feeding Conc. 1X ; 2X 之 Fed-batch 結果.....	60
表 4-15 回應曲面 (RSM) Feeding Conc. 2X ; 2X 並改變攪拌速度之結果...	62
表 4-16 搖瓶實驗結果.....	63
表 4-17 醱酵槽 (5L) 批次培養 (Batch Culture) 實驗結果.....	63
表 4-18 醱酵槽 (5L) 饋料培養 (Fed-Batch Culture) 實驗結果.....	64

附件

附件-1 對數期菌體濕重濃度標準曲線.....	75
附件-2 停滯期菌體濕重濃度標準曲線.....	76
附件-3 葡萄糖醛酸標準曲線.....	77
附件-4 HPLC-GPC Method 之透明質酸濃度標準曲線.....	78
附件-5 GPC(Gel Permeation Chromatography) Elution time.....	79
附件-6 GPC(Gel Permeation Chromatography) Detemination of mass.....	79
附件-7 殘糖濃度標準曲線.....	80
附件-8 批次(Batch) 醱酵之 DO(%); rpm 記錄圖表.....	81
附件-9 饋料(Batch-Fed) 醱酵之 DO(%); rpm 記錄圖表.....	81
附件-10 改變攪拌速度(200 ~500 rpm) 之 DO(%); rpm 記錄圖表.....	82

第一章 緒論

透明質酸(Hyaluronic Acid 簡稱 HA)又稱玻尿酸，為生物高分子多醣體，1960年成功的將透明質酸應用在視網膜手術治療後，開啟了眾多研究學者致力於將透明質酸應用在各種領域，透明質酸因其結構的特性，具有高黏性和保水功能，可以廣泛應用在化妝品、醫療方面，像是眼藥水、眼外科的藥和關節炎。

目前生產透明質酸的方式為(1)直接從動物組織萃取(2)利用生化工程技術，藉由微生物醱酵後再從醱酵液中萃取。透明質酸的來源雖有所不同，但透明質酸的化學組成及結構均相同，不過分子量卻隨來源及分離方法不同，而有所差異。

市場需求不斷的增加，從動物組織內萃取透明質酸，不僅含量低，品質來源也不夠穩定，1985年日本資生堂公司首次使用鏈球菌屬(*Streptococci*)生產透明質酸，隨後英、美等國陸續經由醱酵來進行透明質酸之量產，開發微生物醱酵製程，已成為提高透明質酸成品品質與降低生產成本重要的課題。

第二章 文獻回顧

2-1 透明質酸簡介

透明質酸是 Meyer 和 Palmer 於 1934 年首從牛眼球之玻璃体中分離之一種高黏性物質。透明質酸為一種氨基黏多醣，為白色、無定形固體，由圖 2-1 透明質酸之分子化學結構單元，其重複單位 (repeating unit) 是由 Glucuronic acid 及 N-Acetyl-Glucosamine 以 β -(1-3) 鍵結構成之 dimer，再以 β -(1-4) 鍵結成的直鏈聚合物。

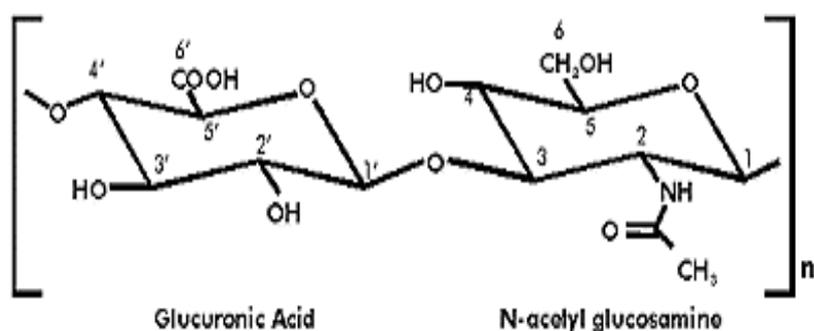


圖 2-1 透明質酸之分子化學結構單元

透明質酸廣泛存在於動物的各種組織細胞間質中，如皮膚、臍帶、關節滑液、軟骨、眼玻璃體、雞冠、雞胚、卵細胞、血管壁等，其中以人臍帶、公雞冠、關節滑液和眼玻璃體含量較高。早期透明質酸主要從人臍帶和雞冠中提取製備，透明質酸是鏈球菌、綠膿桿菌等菌株莢膜的主要成分，這是發酵法生產透明質酸的微生物學基礎。

在不同組織中透明質酸的生理作用也有所不同，在皮膚中主要表現為保水作用，在關節滑液中主要為潤滑作用，在血管壁中主要是調節通透性。無論其來源為何，透明質酸之化學組成及結構均相同，由於透明質酸為人體固有的物質，通常純透明質酸注入人體內時，並不會引起免疫反應。

透明質酸分子鏈的長度及分子量是不均一的，分子量範圍為 $2 \times 10^5 \sim 7 \times 10^7$ Da，雙糖單位數為 300~11000 對，屬於生物大分子。商品透明質酸一般為鈉鹽形式，為白色纖維狀或粉末固體，有較強的吸濕性，溶於水，不溶於有機溶劑，醫藥級分子量為 $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^7$ Da，化妝品級分子量為 $5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ Da，透明質酸水溶液最突出的特點是高黏度，因其結構具有很長的線性分子鏈，且分子鏈上等距離的葡糖醛酸上的羧基所帶的負電荷相互排斥，使分子呈伸展狀態，佔據較大的空間而不捲縮成一團。即使在較低濃度下，分子間也有強烈的相互作用，因此具有很高的黏度，同時也有很好的潤滑作用。透明質酸在水溶液中分子鏈之間形成疏鬆的網狀結構，能夠結合保持大量的水，有較強的保水作用。透明質酸在臨床和化妝護膚方面的應用正是基於其高黏度和保水性質。透明質酸分子鏈長約 10 μm ，由於直鏈軸單醣之間氫鍵作用，透明質酸在空間會呈剛性螺旋柱型，半徑為 200 nm，柱型內側有大量羧基而產生強親水性，透明質酸在溶液中可親和約為自身重量的 1000 倍水，這些水可在螺旋柱內固定不動，不易流失。

工業生產主要是從雞冠中抽取純化，與利用生物技術以醱酵法由非病原菌之鏈球菌屬(*Streptococci*)之細胞莢膜中分離生產，由圖 2-2 鏈球菌細胞結構與透明質酸分泌示意圖，透明質酸是細胞莢膜的主要成分，其為細胞保護膜，圖 2-3 透明質酸醱酵液電子顯微鏡照片，可明顯觀察到醱酵過程，為防止氧對細胞毒害，透明質酸會分泌至胞外，其為胞外產物。

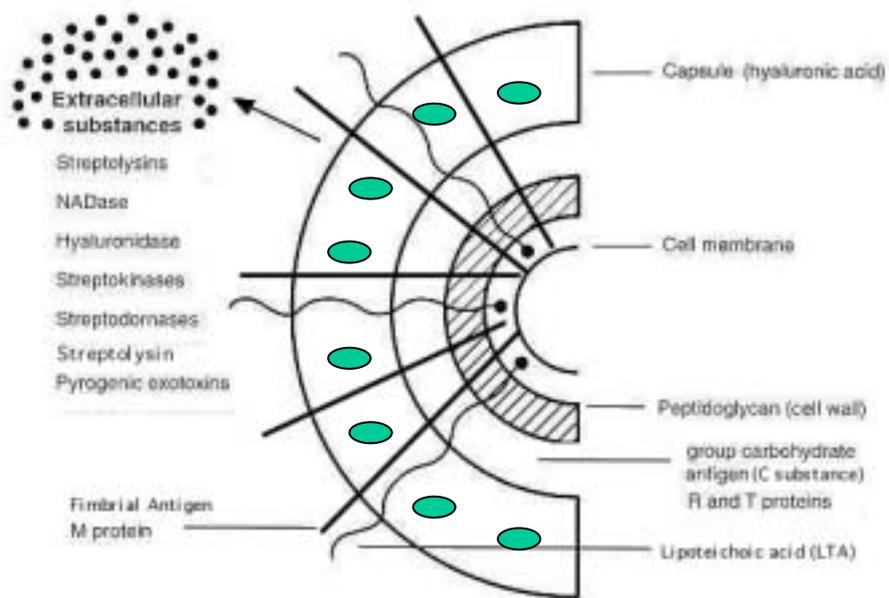


圖 2-2 鏈球菌細胞結構與透明質酸分泌示意圖 (朱兆秀, 2005)

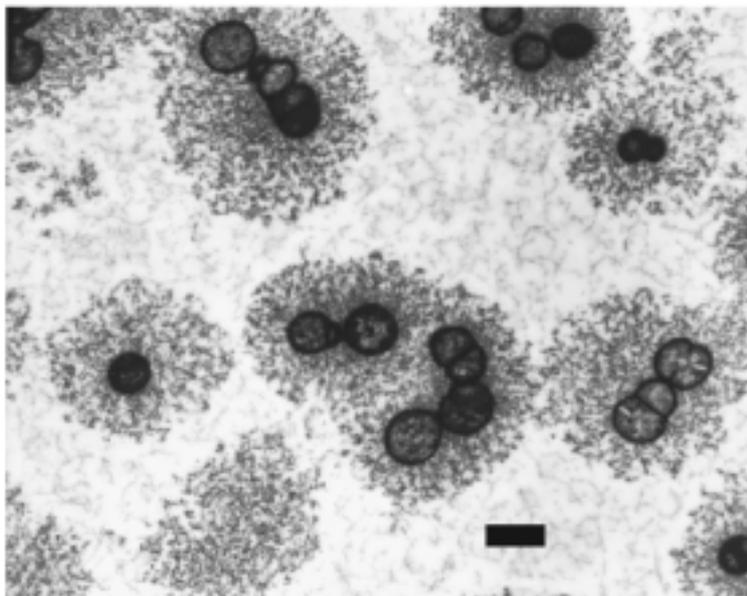


圖 2-3 透明質酸醱酵液電子顯微鏡照片 (Paul Weigel, 1998)

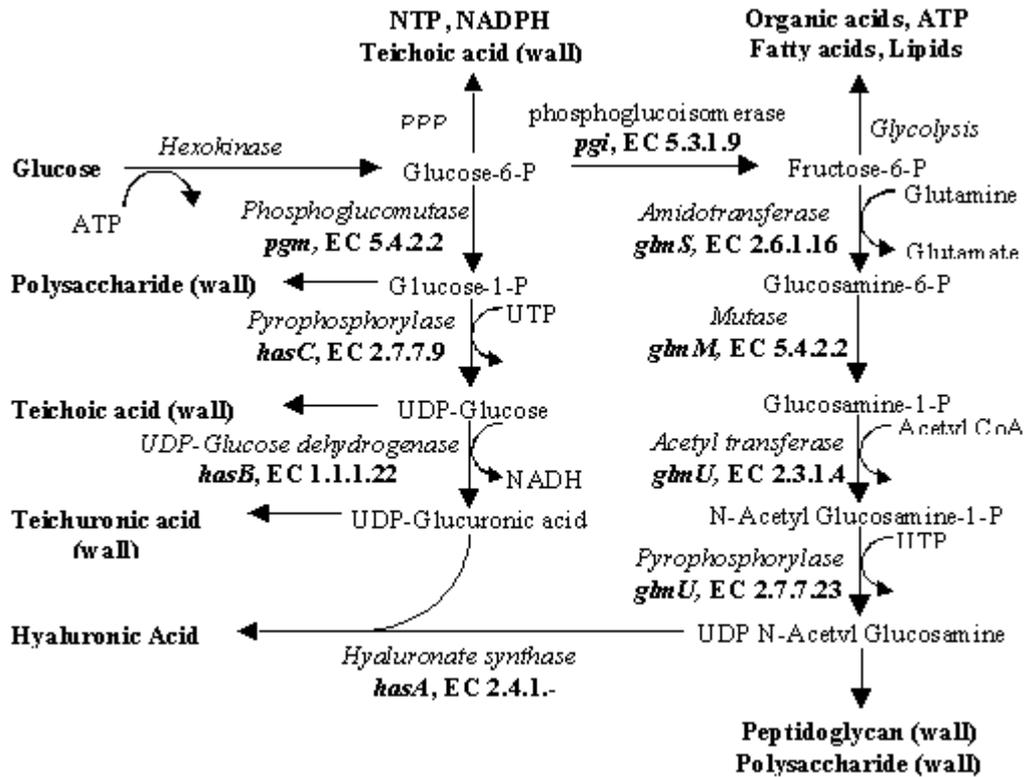


圖 2-4 鏈球菌之透明質酸合成途徑 (Barrie Fong Chong et al , 2003)

圖 2-4 鏈球菌之透明質酸合成途徑，透明質酸分子的 D-Glucuronic acid 及 N-Acetyl-D-Glucosamine 是由葡萄糖六磷酸鹽 (Glucose-6-P) 及果糖六磷酸鹽 (Fructose-6-P)，葡萄糖六磷酸鹽經幾個生化合成步驟轉成 UDP-葡萄糖醛酸 (D-Glucuronic acid)，而果糖六磷酸鹽則轉成 UDP-N-乙醯基-D-葡萄糖胺 (N-Acetyl-D-Glucosamine)，如圖 2-5 透明質酸合成示意圖所示，最後與透明質酸合成酵素 Hyaluronan Synthase 在細胞膜合成透明質酸。

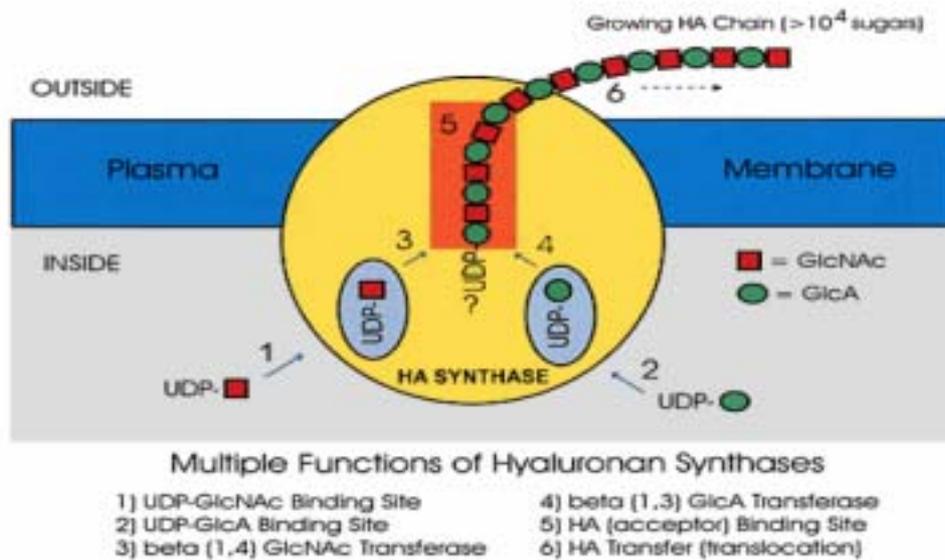


圖 2-5 透明質酸合成示意圖 (Weigel, 1998)

2-1-1 市場資料

從表 2-1 醫藥級之高分子量透明質酸價格甚高(每公斤 4~6 萬美元)，需求量低於 1 噸；而非醫藥級透明質酸分子量較低，價格亦較低(每公斤 1~2 千美元)，需求量約為前者 10~20 倍，每年透明質酸之商機超過十億美元。

表 2-1 醫藥級透明質酸商品名；分子量與廠商之目錄 (魏育群，2005)

Table 1a. Examples of NaHA used in the clinical treatment of osteoarthritis

Trade name	Molecular weight of NaHA*	Manufacturer
Artz®	600,000-1,200,000	Seikagaku (Japan)
Hyalgan®	500,000-730,000	Fidia (Italy)
Synvisc®	mildly cross-linked HA	Biomatrix (USA)

Table 1b. Examples of NaHA used in ophthalmologic surgery

Trade name	Molecular weight of NaHA*	Manufacture
Opegan®	600,000-1,200,000	Seikagaku (Japan)
OpeganHi®	1,900,000-3,900,000	Seikagaku (Japan)
Healon®	1,900,000-3,900,000	Pharmacia-Upjohn (Sweden)
Opelead®	1,530,000-2,130,000	Shiseido (Japan)

*Molecular weight of active ingredient

2-1-2 透明質酸功能與應用

透明質酸分子量高、黏度大、可被人體分解吸收、無過敏或免疫反應，如圖 2-6 透明質酸產品應用所示，主要用於白內障、角膜損傷等眼外科手術、一般創傷癒合及手術後組織抗沾粘。

由表 2-2 透明質酸結構、性能對皮膚之影響可知，因人皮膚真皮含有透明質酸，有保持皮膚水份的功能，並決定皮膚的柔軟性及伸展性，可防止皮膚老化，可應用於化妝品及個人保養品。

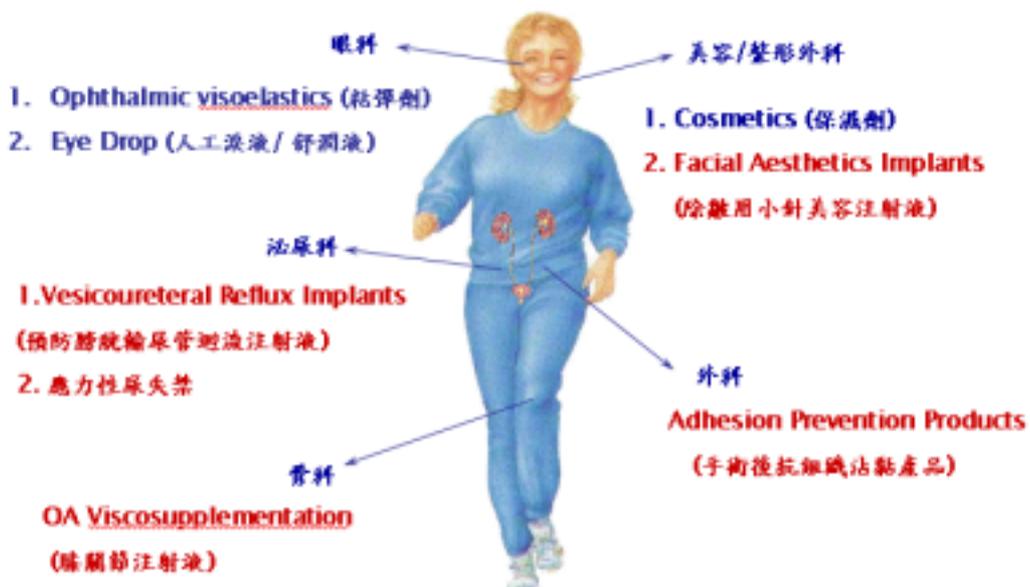


圖 2-6 透明質酸產品應用 (陳瑞祥，2006)

表 2-2 透明質酸結構、性能對皮膚之影響

官能基	相對表現特徵	顯示作用
-COONa	親水性、吸濕性	使皮膚濕潤
-OH；-O	親水性、保濕性	使皮膚濕潤
1,3-Glycoside	緊密結構—彈性	能與皮膚相親和
-NHCO—	與蛋白質親和—親膚性	保持皮膚光滑
生物相容大分子	成膜性 較少皮膚滲透性無刺激	保持皮膚光滑 阻擋外來因素對皮膚毒害

2-1-3 現有生產技術

2-1-3-1 雞冠抽取

由雞冠等含高分子量透明質酸的原料，在除去蛋白質、脂質、核酸等雜質分離純化過程中，透明質酸分子量很容易下降，造成高分子量透明質酸的製備困難及生產成本高，由表 2-3 動物來源與微生物生產透明質酸之優缺點比較表，知道雞冠的取得往往成為雞冠抽取之瓶頸，美國供應市場已被現有廠商壟斷，台灣市場收集雞冠亦不容易，僅大規模之雞肉屠宰商，如卜蜂公司可作雞冠收集作業。

2-1-3-2 醱酵法

某些非病源之鏈球菌屬細菌(如 *Streptococcus equi* 及 *Streptococcus zooepidemicus*)可生產透明質酸，但通常有透明質酸分解酵素產生，其分解方式見圖 2-7 透明質酸分子量分解示意圖，菌株經突變篩選後，可獲得非溶血性且無透明質酸分解酵素之變異株，經醱酵培養後透明質酸含量可達 6.0 g/L 以上，分子量亦可達 1.0×10^6 Da 以上。

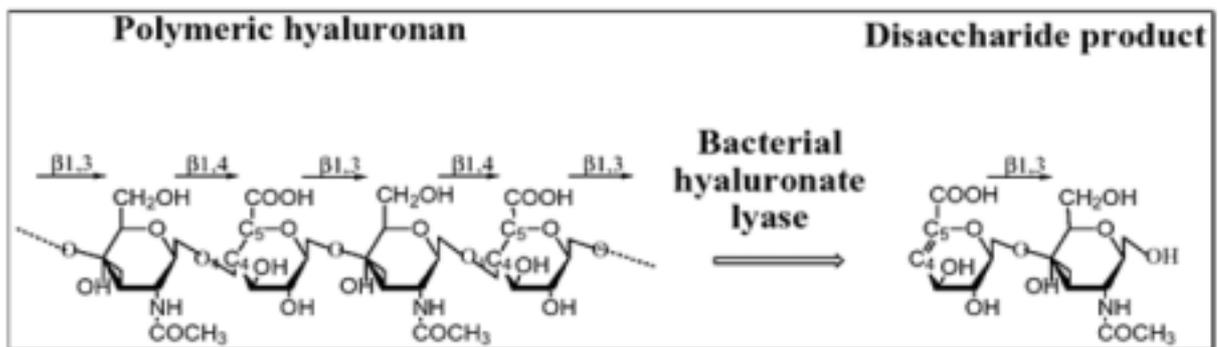


圖 2-7 透明質酸分子量分解示意圖 (Kery Orvisky, 1992)

表 2-3 動物來源與微生物生產透明質酸之優缺點比較表

動物來源(雞冠)	微生物發酵生產
<p>優點</p> <ul style="list-style-type: none"> - 分子量較高。 - 抽取製程較易開發，短期易有產品。 <p>缺點</p> <ul style="list-style-type: none"> - 來源有不穩定之虞。 - 易有病毒感染。 - 分子量固定。 - 規模小，生產成本高，將來含量受制於原料取得而不易擴大規模。 	<p>優點</p> <ul style="list-style-type: none"> - 來源穩定。 - 分子量可調控。 - 無病毒污染。 <p>缺點</p> <ul style="list-style-type: none"> - 開發具競爭力的醱酵製程較耗時。 - 製程及產品專利問題，價格、品質與大廠競爭。

2-1-3-3 醱酵生產透明質酸之分離純化

(陳鵬等人，1999；Abraham Nimrod et al，1988)

透明質酸為胞外產物，醱酵生產透明質酸之分離純化較動物組織提取容易，首先要除去醱酵液中的菌體，通常加入殺菌劑後離心或過濾去除菌體，濾液再經乙醇沉澱、氯代十六烷基吡啶（CPC）沉澱、超濾等方法進行分離純化，最後用有機溶劑沉澱、真空乾燥或凍晶乾燥得到最終產品，為白色纖維狀或粉末狀。

乙醇沉澱在透明質酸的分離純化中佔有重要地位，也是成本最高的步驟，往往需要重複 2~4 次以提高透明質酸純度，用乙醇沉澱透明質酸時，溶液中要有鹽類的存在，否則不會產生沉澱，這是酸性黏多醣的共通性，常用的鹽為 NaCl 和 NaAc，濃度在 1% 左右，乙醇沉澱透明質酸可去除不能沉澱的雜質，還有一個重要的作用就是脫色，經多次乙醇沉澱後，透明質酸成品為純白色。

2-2 鏈球菌(*Streptococcus*)特性

是球形的革蘭氏陽性細菌，屬於厚壁菌門屬，這些細菌在細胞分裂時總是沿一個軸，所以通常成對或者成鏈狀，因為這些特徵，他們被稱作“鏈球菌”，以區別可沿多個軸分裂而形成一團的“葡萄球菌”(Staphylococcus)。鏈球菌屬包含很多個種，其中多數是在人和動物表皮、呼吸道等處的共生菌(commensal flora)，也有對人類有益的菌，如嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)，但其中也有相當數量是致病菌。

2-3 透明質酸醱酵生產介紹

(David A et al, 1990; Abraham Nimrod et al, 1988)

目前透明質酸生產所用的菌種為鏈球菌屬 A 群和 C 群，A 群致病性較強較少使用，C 群致病性較弱多採用此菌種，主要有獸疫鏈球菌、馬鏈球菌和類馬鏈球菌等。菌種可從保存機構獲得或從動物的鼻黏膜或眼結膜分離得到。

鏈球菌的營養要求較高，一般在加血液或血清的培養基上才能生長，這對於工業化生產成本太高。目前專利文獻中所介紹的菌種，其醱酵液中均未加血清。所用的氮源為各種肉湯汁、蛋白胨、氨基酸、酵母萃出物、大豆蛋白水解液、尿素、無機銨鹽等。其中酵母萃出物最常用，它除了作氮源外還含有多種維生素，有些是菌種生長所必須的。碳源主要是各種單糖、雙糖和澱粉水解物，最常用的是葡萄糖和蔗糖。其他還有磷酸鹽、硫酸鹽，鉀、鈉、鈣、鎂等無機鹽，鐵、錳、銅、鋅等微量元素。

透明質酸的醱酵可為好氧醱酵與厭氧醱酵，通氣會刺激鏈球菌產生透明質酸莢膜，形成一個阻隔氧的屏障，阻止氧對菌體的毒害作用。但在厭氧條件下，鏈球菌也能生產透明質酸。目前看來多傾向於好氧醱酵，專利文獻中透明質酸含量較高的多採用通氣好氧醱酵。在透明質酸的醱酵，pH 值是一個重要的因素，一般控制在 6.0~8.5 範圍內，低於 6.0 或高於 8.5，會影響菌體的生長並降低透明質酸的含量，醱酵過程中，菌體會產生乳酸和醋酸等小分子之有機酸，使醱酵液 pH 值降低，需用氫氧化鈉或碳酸鈉溶液進行中和，以維持適當的 pH 值，透明質酸的醱酵溫度通常為 37°C、也有的採用 35°C 或 33°C 等較低的溫度，視菌種而定。

2-4 微生物醱酵培養方式 (David A et al, 1990)

微生物生長分為：遲滯期、對數生長期、穩定期和死亡期。在遲滯期，菌體沒有分裂只有生長，當菌種接種入一個新的環境，細胞內的核酸、酶等被稀釋，這時細胞不能分裂。當細胞內與細胞分裂相關的物質濃度達到一定程度，細胞開始分裂，這時細胞生長很快，比生長速率接近常數，這個時期稱為對數生長期。隨著細胞生長，培養液中的營養物減少，廢物積累，導致細胞生長速率下降，進入減速期和穩定期。最後當細胞死亡速率大於生成速率，進入死亡期。對於初級代謝產物，在對數生長期初期就開始合成並積累，而次級代謝產物則在對數生長期後期和穩定期大量合成。

在工業上，醱酵過程處於嚴格的控制，這種控制稱為培養，一般為批次培養、饋料培養、半連續培養和連續培養。

2-4-1 批次培養 (Batch)

為最簡單的醱酵過程，培養基接入菌種，除了空氣的通入和排氣，沒有物料的加入和取出。整個過程，菌的濃度、營養成分的濃度和產物濃度等參數都隨時間變化。分批培養操作簡單、週期短、污染機率低，生產過程和產品質量容易掌握，然而產物含量較低。

2-4-2 饋料培養 (Fed-Batch)

在批次培養過程中補入新鮮的饋料液，以克服營養不足而導致的醱酵過早結束的缺點。在此過程中只有饋料液的加入並沒有醱酵液的取出，所以醱酵結束時，醱酵液體積會比醱酵開始時增加，在工廠的實際生產大部分採用此種方法。在這樣系統中可以維持低的基質濃度，避免快速地利用碳源而產生遏阻效應，可以透過補料控制，達到最佳的生長和產物合成條件，得到最佳的穩定生產，但也會因補料關係而增加了污染機率。

2-4-3 半連續培養 (Semi-Continuous)

在饋料培養的基礎，間歇放掉部分醱酵液稱為半連續培養，某些產品採取此種方式，如四環素醱酵，放掉部分醱酵液，再補入部分料液，使代謝有害物得以稀釋而有利於產物合成，提高總含量，然而這樣作法也會導致代謝產生的前驅物被稀釋，純化回收的總體積會增大。

2-4-4 連續式培養 (Continuous)

醱酵過程中，一邊補入新鮮饋料，一邊放出等量的醱酵液，使醱酵槽內的體積維持固定，當達到穩定態後，整個醱酵過程之菌體濃度、產物濃度，限制基質濃度都是恆定的。在連續培養中控制稀釋速率，可以使醱酵過程達到最適化，醱酵週期變長，可以得到更高的含量。但若菌種不穩定，長期連續培養會引起菌種退化，降低含量，長時間補料關係也會大大增加污染機率，實際生產並不常用這樣的醱酵方式。

2-5 微生物生產透明質酸之培養基探討

Nimrod et al. (1988) 說明 Mg^{2+} 離子維持在高濃度水準下，可以增加透明質酸含量。

Denki et al. (1993); D.C. Armstrong et al. (1997) 提出 A 群及 C 群鏈球菌，對營養需求極為苛求，使用有機氮源是必要的。

劉成財等人 (2006) 提出在相同碳源濃度 10 g/L; 30 g/L 下，蔗糖比葡萄糖之透明質酸含量約多 20%，以消化蛋白或大豆水解產物作為唯一氮源時，透明質酸含量都較以 Yeast Extract 作為唯一氮源差。

高維毅等人 (2006) 提出在批次醱酵實驗，當碳源和氮源比例為 2.5 時，透明質酸含量有最佳值。

2-6 微生物生產透明質酸之醱酵培養條件探討

Huang et al. (2006) 提出通氣可增加透明質酸生產，當溶氧值維持在 5% 以上，溶氧值不會影響透明質酸含量。

Fong et al. (2003) 提出通氣時透明質酸含量及分子量比不通氣好，可能因好氧反應可產生 32 ATP 而厭氧反應僅產生 3 ATP，且透明質酸生合成路途徑需要 2 個 NADA 來生成其前驅物 UDP-Glucuronic acid (Barrie Fong Chong et al, 2003)。

Johns et al. (1994) 提出攪拌與通氣對細胞生長速率沒有影響，在低轉速透明質酸合成速率減少，乳酸鹽類生成會增加，而在高轉速會破壞透明質酸高分子鍵。

Kim et al. (1996) 提出攪拌速度從 400 rpm 增加到 800 rpm，顯著提高分子量，攪拌速度從 800 rpm 增加到 1200 rpm，分子量維持在 5.0×10^6 Da，而改變通氣量 (0.5 vvm ~ 2.0 vvm) 對菌體生長及透明質酸含量沒有影響，但通氣量為 1.0 vvm 透明質酸分子量最高。

謝慧冰等人 (2005) 提出當攪拌速度 600 rpm，溶氧值為零，透明質酸含量為 1.34 g/L，當溶氧值維持在 25 % 以上，透明質酸含量為 2.2 g/L，因此若溶氧值維持在 25 % 以上，溶氧值不會影響透明質酸含量，攪拌速度從 200 rpm 增加到 600 rpm，顯著提高透明質酸含量，但對分子量影響不明顯。

2-7 實驗設計方法-回應曲面法 (Response Surface Methodology, RSM)

(John, Cornell et al, 1984; Vic Barnett et al, 1987)

此方法是利用電腦軟體作統計運算，迴歸出一階和二階模式，從模式中觀察培養基各成分對透明質酸含量的影響，來找到最適化 (Optimization) 培養基。

2-7-1 回應曲面實驗設計法

「實驗設計」 (Design of experiment) 結合統計學之概念，配合電腦軟體，以最少的實驗在最短的時間來達成我們的目的。對於多變數因子 (Factor) 系統的最適化，傳統上大多以「一次實驗決定一個因子最適值」方法 ("One-Factor at a Time" technique) 來尋找最適點，沒有考慮到系統中多因子之間存在著交互作用 (Interaction effect)，所以當因子間的交互關聯效應極為顯著 (Significance) 時，往往無法達到真正的最適值。

在考慮各成分因子的交互影響效應之下，根據實驗數據建立可描述各成分因子及目標函數 (Objective function) 間相互關係之數學模式，並藉此一回應曲面模式探尋極值所在位置，其中以陡升路徑尋找最適極值所在區域，所有相關實驗之數據迴歸計算皆由套裝軟體 SPSS 進行運算，並搭配使用 MATLAB 繪圖軟體來進行繪圖。

2-7-2 回應曲面法簡介

1951 年回應曲面法首先由 Box 以及 Wilson 所提出，為一種能同時測定各種因子與因子相互影響效應「interactive effect」及尋找最適條件的有效方法。此一方法已被廣泛使用於物理、食品科學、農業化學等領域，近年來更成功應用於生化程序與微生物培養基組成之最適化。

基本構想係結合數據契合 (Fitness) 技巧與統計方法，運用於同時具有數個獨立變數因子對一個目標函數或稱系統回應 (System response) 之數學模式，進行其實驗設計、因子影響效應分析，乃至各因子水準最適組合之搜尋亦即「最適化」，歸納其步驟，主要包含五項分別為：

- (1) 極值點區域之逼近
- (2) 回應曲面數學模式之建立
- (3) 模式適切性之檢驗
- (4) 極值點之決定
- (5) 因子影響效應之分析

其設計流程如下

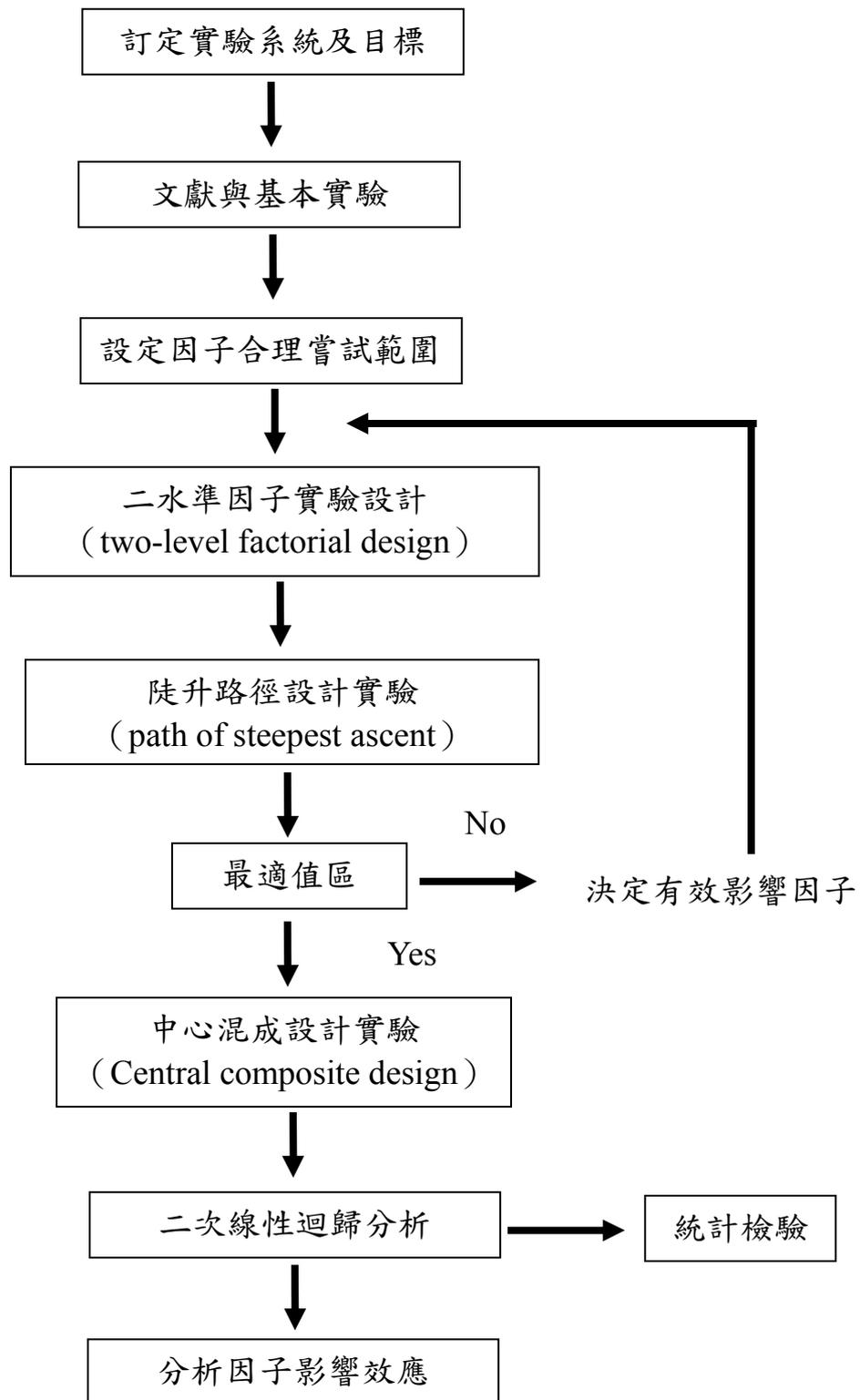


圖 2-8 回應曲面法實驗設計流程圖 (陳玉青, 2004)

2-7-3 二水準因子實驗設計 (two-level factorial design)

根據文獻資料或實驗數據，從眾多因子選取適當之關鍵因子，推斷其有效範圍，設定因子合理嘗試範圍。其次可利用二水準因子實驗設計 (two-level factorial design) 及陡升路徑設計實驗 (path of steepest ascent) 來找極值點區域。

此設計是為了探討各因子間之交互關係，找出各因子對實驗影響效應之大小，但由於各因子的嘗試範圍不盡相同，為了設計上方便，將其簡化成 $-1 \sim +1$ 之間的正規化水準 (Coded level)。

$$\text{Code } x_1 = (X_1 - ((X_{\text{high}} + X_{\text{low}})/2)) / ((X_{\text{high}} - X_{\text{low}})/2)$$

所得數據利用最小平方迴歸得到下列方程式：

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n + a_{12}x_1x_2 + a_{23}x_2x_3 + \dots + a_{n-1,n}x_{n-1}x_n$$

此一方程式中每一項係數稱為 effect，表示每一個因子對目標函數之影響程度， a_i 為正值表示對目標函數具正面之影響程度，反之 a_i 為負值表示對目標函數具負面之影響程度。

2-7-4 陡升路徑設計實驗 (path of steepest ascent)

陡升實驗設計係以因子設計的中心點為起點，若將其以平面來看，沿一角度的方向設定為實驗點、固定距離和方向，然後比較前後的實驗值。若次一個實驗點的回應值較前一個實驗值大，則表示仍可繼續往極值逼近，直到該回應值不再上升或已開始下降為止。如果有脫離其範圍，則參考此實驗之最大值再設計一組因子實驗，依其結果決定下一個陡升實驗。依此方式逐步地修正搜索方向，直到實驗之最大值落在設計範圍內。

2-7-5 中心混成設計 (Central Composite Design, CCD)

為了彌補測試水準的不足，可利用中心混成設計實驗來加強準確性，星點是由原點向中心軸方向延伸 $N^{1/4}$ 的距離，而 N 為因子設計之總實驗點數；而中心點實驗則是進行重覆實驗，其目的除了提供二階模式迴歸數據，也可估計人為造成的誤差。

2-7-6 統計檢驗

由實驗數據進行統計迴歸所得之回應曲面模式，對於實驗數據的適切程度，可以利用變異數分析法 (Analysis of Variance, ANOVA) 和檢定係數 (Correlation coefficient, R^2) 來檢驗，除了確認回應曲面模式之可靠性外，亦可藉此統計檢驗步驟，說明實驗數據之規則性。同時，由中心混成設計的中心點重覆實驗，也可估計純粹由實驗上所產生的誤差。

檢定係數 Correlation coefficient

R^2 其定義為： $R^2 = SS_R / SS_T$

SS_R 為迴歸平方和 (Regression sum of squares)

SS_T 為總平方和 (Total sum of squares)

R^2 可用於描述實驗模式之適切程度 (Goodness of fit)， R^2 值愈接近於 1，表此數學模式可適切地描述實驗數據，若 R^2 值遠低於 1，表此數學模式與實驗數據之總差值相當大。

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗材料

3-1-1 菌株

本實驗所採用永信藥品工業(股)公司醱酵生產透明質酸的生產菌，是經突變改良無病毒之 *Streptococcus zooepidemicus* 菌株，在 Lancefield 分類法，屬於 C 群鏈球菌。

3-1-2 實驗藥品

中文名	英文名	廠牌
透明質酸分解酵素	hyaluronase (608 IU/mg)	sigma
四硼酸鈉	Sodium tetraborate decahydrate	林純藥
喹唑	Carbazole	sigma
葡萄糖醛酸	Glucuronic acid	sigma
硫酸鈉	Sodium Sulfate anhydrous	林純藥
玻尿酸標準品	hyaluronic acid Standard	科妍
二硝基苯甲酸單鈉鹽	3,5-dinitrosalicylic acid	sigma
酚	phenol (solid)	林純藥
碳酸鈉	Sodium carbonate anhydrous	林純藥
胰酶大豆肉湯	TSB (Tryptic Soy Broth)	DIFCO
碳酸鈣	Calcium Carbonate	林純藥
蔗糖	Sucrose	台糖
硫酸鉀	Potassium sulfate	林純藥

碳酸氫鈉	Sodium bicarbonate	林純藥
消泡劑	Antifoam LG-109	ADEKANOL
氯化鈉	Sodium Chloride	林純藥
磷酸氫二鉀	Dipotassium Hydrogenphosphate	SHOWA
磷酸二氫鉀	Potassium Dihydrogenphosphate	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium sulfate heptahydrate	林純藥
氫氧化鈉	Sodium Hydroxide	林純藥
鹽酸	Hydrochloric Acid	林純藥
甘油	Glycerol	林純藥
乙醇 95%	95% Alcohol	台糖
乙醇 99%	99% Alcohol	台糖
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO
瓊脂	Agar	DIFCO
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
酸鹼電極校正液	pH 7.00±0.02	METTLER
酸鹼電極校正液	pH 4.01±0.02	METTLER
溶氧電極補充液	O ₂ -Electrolyte	METTLER
溶氧電極歸零膠液	O ₂ zero gel -Electrolyte	METTLER
純氧鋼瓶	Oxygen Gas	喬緯氣體

3-2 實驗儀器

儀器設備	廠牌	型號
高壓蒸氣滅菌釜	RISEN	HL-343
無菌操作台	造鑫	LM-240
恆溫振盪培養箱	HSIANGTAI	Orbital
桌上型離心機	HSIANGTAI	Centrifuge
桌上型微量離心機	Beckman	Microfuge 18
電子天平	AND	HF-2000
精密電子天平	METTLER	AB104
磁石攪拌加熱器	CORNING	Stirrer/Hot Plate
5 公升液態醱酵槽	頂生 Biotop	BTF-A5L
高效能液相層析	HITACHI	L-7400
分光光度計	HITACHI	U-1100
pH 計	SUNTEX	SPH-701
顯微鏡	ZEISS	Axioskop 40
振盪器	VORTEX-MIXER	VM 2000
黏度計	BROOKFIELD	LVF
攪拌器	HSIANGTAI	DC-CH40RM
4°C 冰箱	大同	TRG-4RT
-80°C 超低溫冷凍櫃	SANYO	MDF-U72V

3-3 分析方法

3-3-1 菌體濕重濃度分析方法

利用分光光度計在波長 660 nm 測量菌體濃度，因醱酵過程中菌體型態會改變，分為對數生長期與停滯期，各作菌體濕重濃度標準曲線。

菌體濕重濃度標準曲線方法

取對數生長期（醱酵 5 hrs）與停滯期（醱酵 10 hrs）之醱酵液，連續稀釋（稀釋 5; 10; 20; 50 倍，吸收值小於 2.0），各準備 2 組。

1. 第一組加透明質酸分解酵素

1.1 10ml 稀釋醱酵液+ 1.0 ml 透明質酸分解酵素溶液（60 mg HAase（608 IU/mg）/ 30 ml DI）混合均勻並反應 30 mins。

1.2 將反應完成之醱酵液放入已知空重之 1.5 ml 微量離心管，秤重並記錄重量（精確度小數第四位），於 12000 r.p.m 離心 6 mins，去除上清液，將菌體和微量離心管一起秤重，並記錄重量，經計算求得菌體濕重（Y 值），此實驗為三重覆測試，求平均值。

2. 第二組連續稀釋之醱酵液

測定波長 660 nm 之吸收值（X 值），對應第一組之菌體濕重，得菌體濕重濃度標準曲線。

菌體濕重濃度的測定以分光光度計測定：

1. 將醱酵液以 D.I. Water 作適當的稀釋。

2. 測定波長 660 nm 之吸收值，代入菌體濕重濃度標準曲線

對數生長期標準曲線 $Y=1.485 \times \text{Abs}_{660} + 0.395$ $R^2=0.994$

停滯期標準曲線 $Y=0.505 \times \text{Abs}_{660} + 0.756$ $R^2=0.996$

3. 菌體濕重濃度為（代入標準曲線所得之值）×（稀釋倍數）。

3-3-2 透明質酸含量的檢測（化學反應法）

以濃硫酸將透明質酸水解成不穩定之己糖醛酸（hexuronic acid），再與 Carbazole 試劑反應形成粉紅色之發色基團。

1. 試劑配製

硼砂硫酸液：稱取四硼酸鈉 4.77 g 溶於 500 ml 的濃硫酸。

吡啶試液：稱取吡啶 0.125 g，溶於 100 ml 的 99.5% 乙醇中，然後置於棕色瓶，保存於 4°C 冰箱。

2. 標準曲線的製作

1. 精密稱取葡萄糖醛酸標準品約 20 mg，置於 100 ml 的定量瓶中，加 D.I Water 溶解並定量至刻度，搖勻備用。

2. 精密量取標準溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml，分別加入 10 ml 的定量瓶，加 D.I Water 定量至刻度，得約 10、20、30、40 和 50 mg/L 濃度的標準品溶液。

3. 取 6 支具塞子之玻璃試管，分別加入硼砂硫酸溶液 5 ml，置於冰浴中冷卻至 4 左右。

4. 然後分別取空白溶液（D.I Water）和不同濃度的標準品溶液各 1.0 ml 於硼砂硫酸溶液試管中，先輕輕震盪再充分混勻，這些操作均在冰浴中進行。

5. 於沸水中煮沸 10 min 後，放入冷水中冷卻至室溫。

6. 加入吡啶試劑 0.2 ml 混勻，再於沸水中加熱 15 min，冷卻至室溫。

7. 測定 530 nm 吸光值，以吸光值對應的標準濃度作圖，作出葡萄糖醛酸標準曲線。

3. 醱酵液中透明質酸含量的測定

- 1.量取 5 ml 醱酵液 (5.20 g ~ 5.24 g)，加入 20 ml 95% 乙醇，充分混勻靜置後，於 3000 rpm 離心 5 min，倒掉上清液，用 D.I water 將沈澱物完全溶解，並進行適當稀釋 (20~100 倍)。
- 2.取具塞子之玻璃試管，分別加入硼砂硫酸溶液 5 ml 置於冰浴中冷卻至 4°C 左右。
- 3.加入 1.0 ml 稀釋液於硼砂硫酸溶液試管中，先輕輕震盪，再充分混勻，這些操作均在冰浴中進行。
- 4.將試管置於沸水中煮沸 10 min 後，放入冷水中冷卻至室溫。
- 5.加入吡啶試劑 0.2 ml，混勻，再於沸水中加熱 15 min，冷卻至室溫。
- 6.測定 530 nm 吸光值，按照下列公式計算醱酵液中透明質酸的含量：

透明質酸含量 (g/L)

$$= (\text{標準曲線上查出的濃度} \times \text{稀釋倍數} \times 2.067) / 1000$$

根據透明質酸結構，每 100 mg 純品透明質酸完全水解後可產生 48.38 mg 葡萄糖醛酸濃度 (透明質酸：葡萄糖醛酸=2.067：1)，因此得到葡萄糖醛酸濃度再乘 2.067，即為透明質酸濃度。

二. 注意事項

1. 樣品中加入吡啶試劑後，一定要將其充分搖勻，否則會使反應不充分，水浴後樣品分層，影響測定結果。
2. 反應結束樣品冷卻至室溫後，應立即檢測吸光度，放置時間過長會使吸光值發生較大改變。

3-3-3 透明質酸含量與分子量檢測 (HPLC-GPC Method)

(Michael R. Johns et al, 1994 ; [http:// www.waters.com](http://www.waters.com) - Separation by chromatography method)

1. 取 5 ml 醱酵液 (5.20 g~5.24 g)，加入 20 ml 95% 乙醇，充分混勻。
2. 於 3000 rpm 離心 10 min，倒掉上清液，用 D.I water 將沈澱物完全溶解並作適當稀釋 (倍數 20 ~ 100)。
3. 12000 rpm 離心 6 min，取上清液作 HPLC-GPC 分析。

HPLC-GPC 分析條件:

層析管柱：TSK gel column G6000 PWWL 7.8 mm ID × 30 cm.

移動相：0.2 M Na₂SO₄

流速：0.6 ml/min.

波長：210 nm.

透明質酸含量測定

透明質酸含量 (g/L) = (標準曲線上查出的濃度 × 稀釋倍數) / 100

透明質酸分子量的測定

HPLC-GPC 滯留時間 (Retention Time) 越久其相對分子量越小，兩者之關係，為取 Log 值後呈反比線性。

(Log (Average Molecular Weight of sample)) / (Log (Average Molecular Weight of standard))

Retention Time of standard / Retention Time of sample

3-3-4 殘糖分析方法

DNS溶液:

稱10 g 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) ; 20 g phenol ; 5 g sodium carbonate (Na_2CO_3) ; 10 g NaOH以D.I water溶解並定量至1000 ml。

蔗糖標準曲線測定方法

1. 取蔗糖標準溶液 0.02 % ; 0.04 % ; 0.06 % ; 0.08 % ; 0.10 % 各1 ml置入試管中。
2. 試管中加入0.5 ml之6 % HCl溶液，置於100°C水浴加熱10分鐘。
3. 冷卻至室溫，再加入0.5 ml之6N NaOH溶液，混合均勻。
4. 加入2 ml之DNS溶液，混勻後置於100°C水浴中加熱5分鐘。
5. 冷卻至室溫，加入D.I water 10 ml。
6. 混合均勻，測定O.D 540 nm之吸收值。
7. 蔗糖標準曲線 = 斜率 \times O.D._{540nm} + 截距

殘糖值測定方法

1. 取醱酵液，以D.I water作適當稀釋（20 ~ 100倍）
2. 將稀釋之醱酵液於12000 rpm離心6 min，取上清液1 ml置入試管中
3. 試管中加入0.5 ml之6 % HCl溶液，置於100°C水浴中加熱10分鐘。
4. 冷卻至室溫，再加入0.5 ml之6N NaOH溶液，混合均勻。
5. 加入2 ml之DNS溶液，混勻後置於100°C水浴中加熱5分鐘。
6. 冷卻至室溫，加入D.I water 10 ml。
7. 混合均勻，測定O.D 540 nm之吸收值。
8. 醱酵液殘糖值（RS %）為（代入標準曲線所得之值） \times （稀釋倍數）。

3-4 菌種培養與保存

一. 試劑配置

1. 配置 80% 甘油溶液 (glycerol solution)，以滅菌釜 121°C; 20 mins 滅菌。
2. 配置 TSB Agar，以滅菌釜 121°C; 20 mins 滅菌。

二. 實驗步驟：

1. 在無菌操作台以無菌白金鉤環沾滿菌液後，塗抹均勻於 TSB Agar plate，於 37°C 培養 16±2 hrs，以無菌白金鉤環括取菌體並置於無菌水，均勻混合菌體溶液。
2. 菌體溶液與 80% 甘油溶液以 1:1 (v/v) 比例混合均勻，各取 3.0 ml 40% 甘油菌體溶液分裝於 5 ml 無菌瓶，並保存於 -80°C 冷凍櫃。
3. 冷凍管保存期限為一個月，每個月再從細胞系 (working cell bank) 取出一支冷凍管 (frozen stock)，重新作菌種培養與保存。

3-5 菌種活化

取出一支冷凍管 (frozen stock) 溶解後，接入菌種培養基 (Seed Medium)，於 200 rpm ; 37°C 培養 16±2 hrs。

3-6 培養基組成

本實驗所使用培養基組成份 (Gao Hai-Jun et al, 2000) 配方如下：

表 3-1 平板培養基 (TSB Agar)

Compound	Concentration (g/L)
Peptone from casein	17
Peptone from soymeal	3
Glucose	2.5
K ₂ HPO ₄	2.5
NaCl	5
Agar	15
pH	7.0 ± 0.1

以滅菌釜 121°C; 20 mins 高溫滅菌後，降溫至 50~60°C，再於無菌操作台分裝至塑膠培養皿內，凝固後並將培養皿水平開蓋，待其培養皿表面之水蒸氣完成蒸發後，關蓋放入塑膠袋封套，於 4°C 冰箱保存備用。

表 3-2 菌種培養基 (Seed Medium)

Compound	Concentration (g/L)
Yeast extract	20
Glucose	20
KH ₂ PO ₄	2.0
Buffer Sol'n	40
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.0
CaCO ₃	20
pH	7.0 ± 0.1

以滅菌釜 121°C; 20 mins 高溫滅菌後，作為菌種培養用。

表 3-3 緩衝溶液 (Buffer Solution)

Compound	Concentration (g/L)
Na ₂ HPO ₄	36.76
NaH ₂ PO ₄	15.98
NaHCO ₃	12.5

於 4°C 冰箱保存備用。

表 3-4 搖瓶醱酵培養基 (Flask Fermentation Medium)

Compound	Concentration (g/L)
Yeast extract	20
*Sucrose	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.0
Na ₂ HPO ₄	6.2
Buffer Sol'n	40
CaCO ₃	20
K ₂ SO ₄ .H ₂ O	1.3
pH	7.0 ± 0.1

* Sucrose 須和其它培養基分開滅菌後，再混合使用。

以滅菌釜 121°C; 20 mins 高溫滅菌後，作為醱酵培養用。

表 3-5 醱酵槽 (5L) 控制組(Control)醱酵培養基(Fermentation Medium)

Compound	Concentration (g/L)
Yeast extract	20
*Sucrose	50
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.0
Na ₂ HPO ₄	6.2
K ₂ SO ₄ .H ₂ O	1.3
Antifoam LG-109	0.5
pH	7.0 ± 0.1

* Sucrose 須和其它培養基分開滅菌後，再混合使用。

以滅菌釜 121°C; 35 mins 高溫滅菌後，作為醱酵培養用。

表 3-6 醱酵槽 (5L) 回應曲面(RSM)醱酵培養基(Fermentation Medium)

Compound	Concentration (g/L)
Yeast extract	16.03
*Sucrose	57.50
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.47
Na ₂ HPO ₄	6.2
K ₂ SO ₄ .H ₂ O	1.3
Antifoam LG-109	0.5
pH	7.0±0.1

* Sucrose 須和其它培養基分開滅菌後，再混合使用。

以滅菌釜 121°C; 35 mins 高溫滅菌後，作為醱酵培養用。

3-7 搖瓶實驗步驟

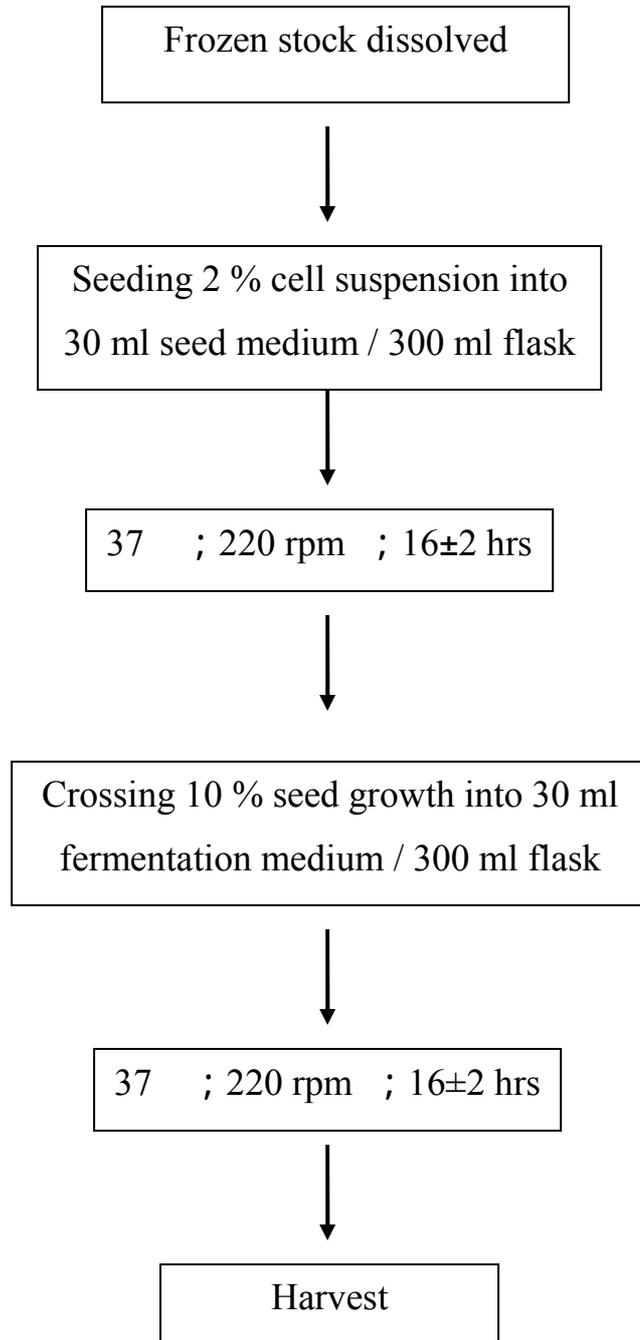


圖 3-1 搖瓶實驗步驟

3-8 醱酵槽 (5L) 實驗裝置

醱酵槽 (5L) 裝置圖如下圖 3-2 所示，在醱酵槽實驗前置作業，先校正 pH 電極和溶氧電極，先以 pH 7.00 ± 0.02 之校正液校正 pH 電極，再以 pH 4.02 ± 0.02 之校正液校正 pH 電極，直到 pH 值不變 (醱酵槽電源不可關掉)；溶氧電極先以溶氧電極歸零液歸零，校正後 pH 電極；溶氧電極與醱酵培養基一起滅菌，滅菌後，進行通氣、攪拌、控溫等參數之設定，等醱酵條件穩定後，將溶氧校正為飽和溶氧值 100%。

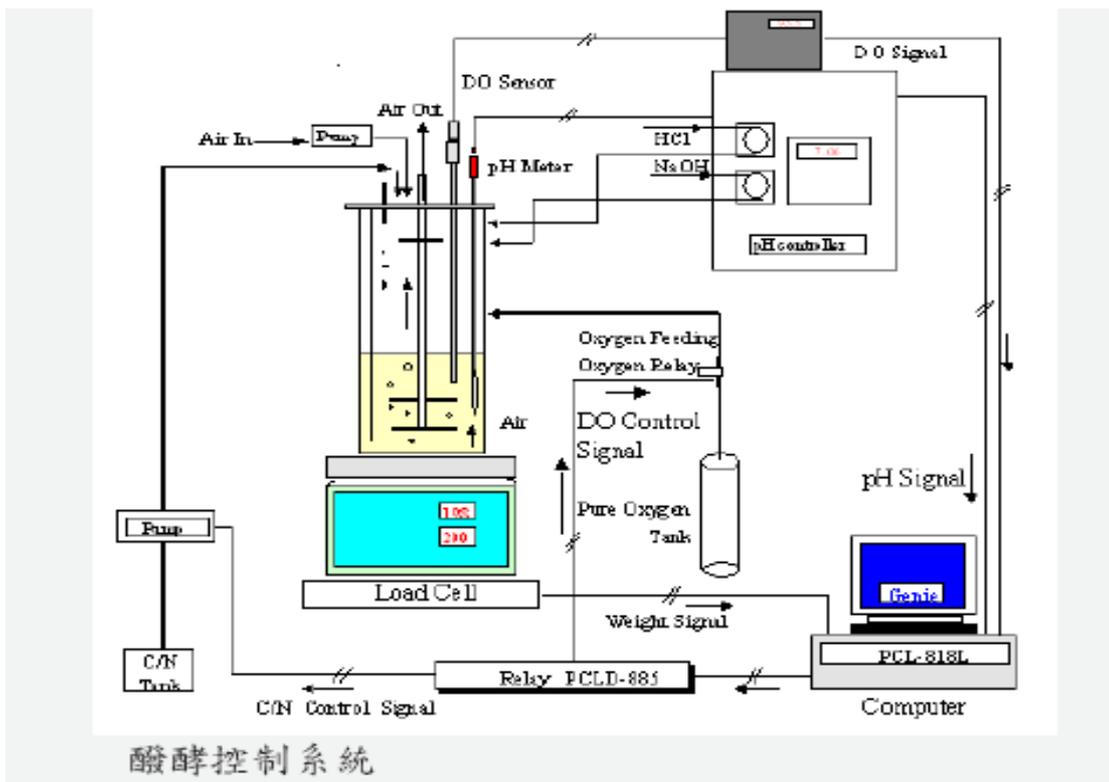


圖 3-2 醱酵槽 (5L) 裝置與控制系統

3-9 醱酵槽 (5L) 實驗步驟

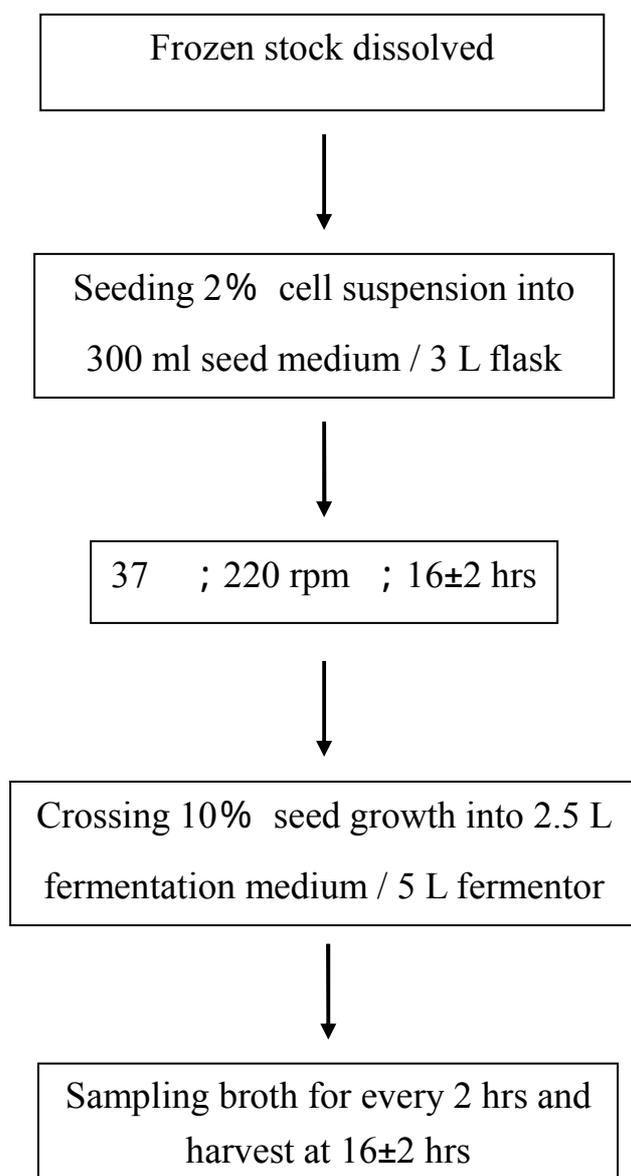


圖 3-3 醱酵槽 (5L) 實驗步驟

第四章 結果與討論

4-1 論文研究架構

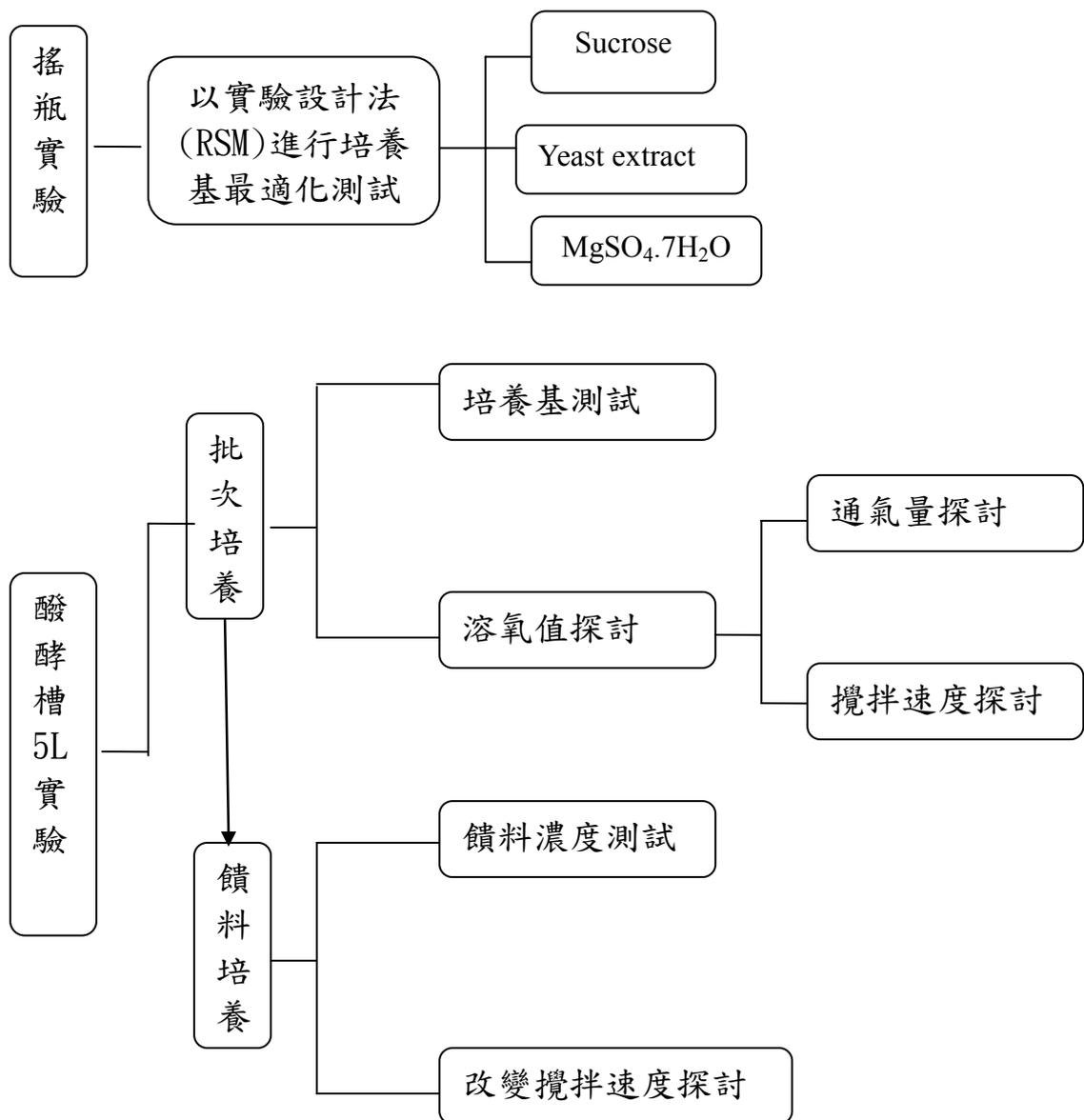


圖4-1論文研究架構

4-2 實驗設計法進行培養基組成之最適化測試

利用回應曲面法尋找醱酵生產透明質酸最適化培養基，從微生物生產透明質酸文獻，得知以 Yeast Extract 作為氮源（劉成財等人，2006），碳源為蔗糖（劉成財等人，2006）以及鎂離子（Nimrod et al., 1988）維持在高濃度水準下，可以得到較好的透明質酸含量，搖瓶實驗選擇 Yeast extract（以 X1 表示）、Sucrose（以 X2 表示）及 MgSO₄·7H₂O（以 X3 表示）作為回應曲面法之自變數（independent variable），而透明質酸含量（以 Y 表示）為因變數（dependent variable）。

4-2-1 二水準因數實驗設計

為了簡化實驗，以二水準三因子之設計實驗，是為了探討各因子間之交互關係，找出各因子對實驗結果之影響效應大小，為了設計上方便，將其簡化成 -1（low level）~ +1（high level）之間的正規化水準（Coded level）。

$$\text{Code } x1 = (X1 - ((X_{\text{high}} + X_{\text{low}})/2)) / ((X_{\text{high}} - X_{\text{low}})/2)$$

實驗結果以 SPSS 軟體進行一階模式之迴歸運算分析，結果如下：

表 4-1 二水準三因子濃度範圍

Factor	Low level (g/L)	High level (g/L)
Yeast extract	15	25
Sucrose	40	60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	2.5

表 4-2 二水準三因子設計

x1 (Yeast extract)	x2 (Sucrose)	x3 (MgSO ₄ .7H ₂ O)
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1

表 4-3 一階 RSM 實驗設計表與實驗結果

Exp no.	Yeast extract (g/L)	Sucrose (g/L)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	Code x1	Code x2	Code x3	Y (HA g/L)
1	15	40	1.5	-1	-1	-1	2.81
1	15	40	1.5	-1	-1	-1	2.83
2	25	40	1.5	+1	-1	-1	2.29
2	25	40	1.5	+1	-1	-1	2.64
3	15	60	1.5	-1	+1	-1	2.64
3	15	60	1.5	-1	+1	-1	2.67
4	25	60	1.5	+1	+1	-1	2.27
4	25	60	1.5	+1	+1	-1	2.19
5	15	40	2.5	-1	-1	+1	2.90
5	15	40	2.5	-1	-1	+1	2.85
6	25	40	2.5	+1	-1	+1	2.29
6	25	40	2.5	+1	-1	+1	2.30
7	15	60	2.5	-1	+1	+1	2.29
7	15	60	2.5	-1	+1	+1	2.25
8	25	60	2.5	+1	+1	+1	2.09
8	25	60	2.5	+1	+1	+1	2.10

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.053	3	.351	21.835	.000(a)
	Residual	.193	12	.016		
	Total	1.246	15			

a Predictors: (Constant), x3, x2, x1

b Dependent Variable: Y

$R^2 = 0.845$ $F(3,12,0.05) = 3.49$ 查表 $F(3,12,0.01) = 5.95$ 查表

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
	(Constant)	2.463	.032		77.714	.000
	x1	-.192	.032	-.688	-6.054	.000
	x2	-.151	.032	-.540	-4.752	.000
	x3	-.079	.032	-.284	-2.504	.028

a Dependent Variable: Y

F 值=21.835 大於 $F(3,12,0.05)=3.49$ 亦大於 $F(3,12,0.01)=5.95$ 且 $R^2 = 0.845$ ，表示此一階線性能適切地描述本實驗數據，在 Coefficients(a)表中數據 Probability (Sig) 其值越小代表著 model 成立之機率越大，當 Probability (Sig) < 0.05 表達到顯著的水準 (95 % 信心度)。

經由 SPSS 軟體統計得：

$$Y = 2.463 - 0.192x_1 - 0.151x_2 - 0.079x_3 \quad \text{一階線性迴歸方程式}$$

4-2-2 陡升路徑設計實驗 (path of steepest ascent)

為了確定透明質酸含量之極值，使用陡升路徑中之正規化水準 (Coded level) 如表 4-4 RSM 陡升路徑之實驗設計表，實驗結果如表 4-5 RSM 陡升路徑之實驗結果。

表 4-4 RSM 陡升路徑之實驗設計表

* μ	0	5	10	15	20	-2	-4	-6	-8	-10
x1	1.186	0.726	0.266	-0.194	-0.654	1.37	1.554	1.738	1.922	2.106
x2	0.933	1.178	1.423	1.668	1.913	0.835	0.737	0.639	0.541	0.443
x3	0.488	0.143	-0.202	-0.547	-0.892	0.626	0.764	0.902	1.04	1.178
Yeast extract (g/L)	25.93	23.63	21.33	19.03	16.73	26.85	27.77	28.69	29.61	30.53
Sucrose (g/L)	49.33	51.78	54.23	56.68	59.13	48.35	47.37	46.39	45.41	44.43
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	2.24	2.07	1.90	1.73	1.55	2.31	2.38	2.45	2.52	2.59

* μ 為適當之倍數值。

$$Y = 2.463 - 0.192x_1 - 0.151x_2 - 0.079x_3 \quad (\text{一階線性迴歸方程式})$$

經陡升路徑數學方程式計算，得到新的陡升路徑 (路徑之方向，垂直於一階線性迴歸方程式之平面) 方程式為：

$$x_1 = 1.186 + \mu \times (-0.092)$$

$$x_2 = 0.933 + \mu \times (+0.049)$$

$$x_3 = 0.488 + \mu \times (-0.069)$$

表 4-5 RSM 陡升路徑之實驗結果

Exp No.	Yeast extract (g/L)	Sucrose (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	HA (g/L)
1	25.93	49.33	2.24	1.26
1	25.93	49.33	2.24	1.25
2	23.63	51.78	2.07	1.76
2	23.63	51.78	2.07	1.75
3	21.33	54.23	1.9	2.12
3	21.33	54.23	1.9	2.12
4	19.03	56.68	1.73	2.74
4	19.03	56.68	1.73	2.76
5	16.73	59.13	1.55	2.56
5	16.73	59.13	1.55	2.58
6	26.85	48.35	2.31	1.66
6	26.85	48.35	2.31	1.69
7	27.77	47.37	2.38	1.57
7	27.77	47.37	2.38	1.58
8	28.69	46.39	2.45	1.79
8	28.69	46.39	2.45	1.59
9	29.61	45.41	2.52	1.54
9	29.61	45.41	2.52	1.60
10	30.53	44.43	2.59	1.62
10	30.53	44.43	2.59	1.71

由表 4-5 可知在實驗數據 No. 4，可得到最好的透明質酸含量，故以第 4 組的成份 Yeast extract : 19.03 g/L ; Sucrose : 56.68 g/L ; MgSO₄·7H₂O : 1.73 g/L 作為新的原點 (0,0,0)，進行下一步極值點之尋找。

4-2-3 中心混成(二階)設計實驗

根據陡升路徑之實驗結果與回應曲面概念，以第 4 組的培養基為新的原點 (0,0,0)，將中心混成(二階)實驗設計如表 4-6；4-7，實驗結果如表 4-8 RSM 中心混成(二階)之實驗結果。

表 4-6 中心混成(二階)實驗設計濃度範圍

Code level		-1.68	-1	0	+1	+1.68
Yeast extract (g/L)	X1	15.17	16.73	19.03	21.33	22.89
Sucrose (g/L)	X2	52.55	54.23	56.68	59.13	60.80
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	X3	1.43	1.55	1.73	1.91	2.03

表 4-7 中心混成(二階)實驗設計圖表

Exp no.	Yeast extract (x1)	Sucrose (x2)	MgSO ₄ .7H ₂ O (x3)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1.68	0	0
10	+1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	+1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	+1.68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0

表 4-8 RSM 中心混成 (二階) 之實驗結果

No.	Yeast extract (g/L)	Sucrose (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	Code x1	Code x2	Code x3	Y (HA g/L)
1	16.73	54.23	1.55	-1	-1	-1	2.68
1	16.73	54.23	1.55	-1	-1	-1	2.65
2	16.73	54.23	1.91	-1	-1	+1	3.17
2	16.73	54.23	1.91	-1	-1	+1	3.17
3	16.73	59.13	1.55	-1	+1	-1	2.79
3	16.73	59.13	1.55	-1	+1	-1	2.79
4	16.73	59.13	1.91	-1	+1	+1	2.65
4	16.73	59.13	1.91	-1	+1	+1	2.77
5	21.33	54.23	1.55	+1	-1	-1	2.42
5	21.33	54.23	1.55	+1	-1	-1	2.41
6	21.33	54.23	1.91	+1	-1	+1	2.69
6	21.33	54.23	1.91	+1	-1	+1	2.77
7	21.33	59.13	1.55	+1	+1	-1	2.37
7	21.33	59.13	1.55	+1	+1	-1	2.42
8	21.33	59.13	1.91	+1	+1	+1	2.35
8	21.33	59.13	1.91	+1	+1	+1	2.29
9	15.17	56.68	1.73	-1.68	0	0	3.04
9	15.17	56.68	1.73	-1.68	0	0	2.98
10	22.89	56.68	1.73	+1.68	0	0	2.44
10	22.89	56.68	1.73	+1.68	0	0	2.42
11	19.03	52.55	1.73	0	-1.68	0	2.64
11	19.03	52.55	1.73	0	-1.68	0	2.65
12	19.03	60.80	1.73	0	+1.68	0	2.46
12	19.03	60.80	1.73	0	+1.68	0	2.37
13	19.03	56.68	1.55	0	0	-1.68	2.87
13	19.03	56.68	1.55	0	0	-1.68	2.96
14	19.03	56.68	2.03	0	0	+1.68	2.86
14	19.03	56.68	2.03	0	0	+1.68	2.85
15(C)	19.03	56.68	1.73	0	0	0	2.76
15(C)	19.03	56.68	1.73	0	0	0	2.91
15(C)	19.03	56.68	1.73	0	0	0	2.91
15(C)	19.03	56.68	1.73	0	0	0	2.94

(0,0,0) 四重覆

ANOVA (b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.777	9	.197	30.217	.000(a)
	Residual	.144	22	.007		
	Total	1.920	31			

a Predictors: (Constant), x2x3, x1x3, x1x2, x3x3, x3, x2, x1, x2x2, x1x1

b Dependent Variable: y

$R^2=0.926$ $F_{(9,22,0.05)}=2.34$ 查表 $F_{(9,22,0.01)}=3.35$ 查表

Coefficients (a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2.885	.040		71.620	.000
*	x1	-.180	.015	-.677	-11.603	.000
*	x2	-.084	.015	-.318	-5.454	.000
*	x3	.041	.015	.156	2.673	.014
*	x1x1	-.069	.019	-.246	-3.660	.001
*	x2x2	-.136	.019	-.487	-7.241	.000
	x3x3	-.010	.019	-.037	-.550	.588
	x1x2	-.012	.020	-.034	-.588	.563
	x1x3	-.023	.020	-.067	-1.144	.265
*	x2x3	-.122	.020	-.352	-6.032	.000

a Dependent Variable: y

F 值=30.217 大於 $F_{(9,22,0.05)}=2.34$ 亦大於 $F_{(9,22,0.01)}=3.35$ 且 $R^2=0.926$ ，表示此二階線性能適切地描述本實驗數據，在 Coefficients(a)表中數據 Probability (Sig) < 0.05 表達到顯著的水準，故 Yeast extract (x1)、

Sucrose (x2) 及 MgSO₄·7H₂O (x3) 皆達顯著的水準，至於因子之間交連項，除了 x2x3 對透明質酸含量有顯著影響外，其餘交連項皆未達顯著的水準 (Probability (Sig) 其值 > 0.05)，簡化二階線性迴歸方程式如下：

$$Y = 2.885 - 0.180x_1 - 0.084x_2 + 0.041x_3 - 0.0698x_1^2 - 0.136x_2^2 - 0.122x_2x_3$$

對二階線性迴歸方程式作 x₁; x₂; x₃ 偏微分並令其值為零，解聯立方程式求極值，(x₁^{*}; x₂^{*}; x₃^{*}) 解為 (-1.340; +0.336; -1.438) 即 Yeast extract : 16.03 (g/L); Sucrose : 57.50 (g/L); MgSO₄·7H₂O : 1.47 (g/L) 時，透明質酸含量有極值，其預測極值為 2.96 (g/L)。

4-2-4 回應曲面模式適切性之統計檢驗

在回應曲面模式適切性之統計檢定，以檢定係數來檢驗，R² 值愈接近於 1，越可描述此實驗模式之適切程度，本實驗檢定係數 R² = 0.926，另外搖瓶測試最適化培養基與回應曲面模式預測值含量之比較，差異性很小。

表 4-9 搖瓶數據與回應曲面模式預測值之透明質酸含量比較

No.	Yeast extract (g/L)	Sucrose (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	實驗數據 (HA g/L)	預測值 (HA g/L)	誤差值 (HA g/L)
1	16.03	57.5	1.47	2.92	2.96	-0.04
2	16.03	57.5	1.47	2.98	2.96	+0.02
3	16.03	57.5	1.47	3.00	2.96	+0.04
平均值				2.97	2.96	+0.1

RSD : 0.042

4-2-5 回應曲面圖

4-2-5-1 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖

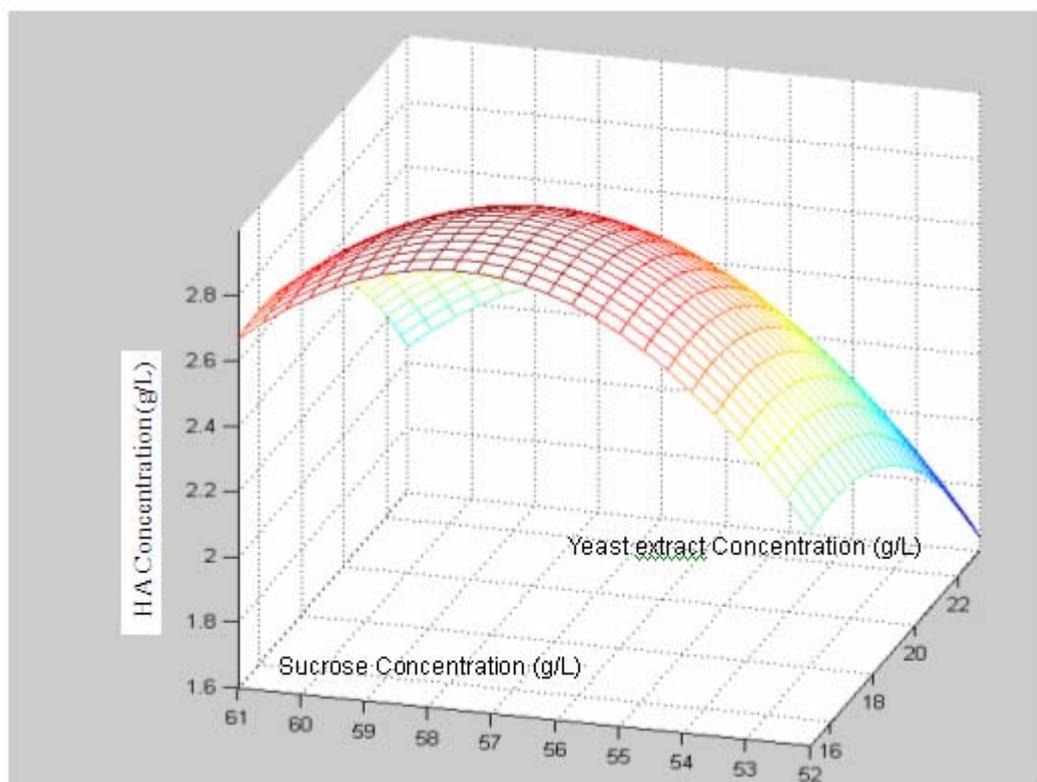


圖 4-2 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖

X 軸：Sucrose Concentration (g/L)

Y 軸：Yeast extract Concentration (g/L)

Z 軸：HA Concentration (g/L)

圖 4-2 為 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration 為固定值 1.47(g/L)，Sucrose Concentration 範圍為 52~61 (g/L) 與 Yeast extract Concentration 範圍為 15~23 (g/L) 時之 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量回應曲面圖。

4-2-5-2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖

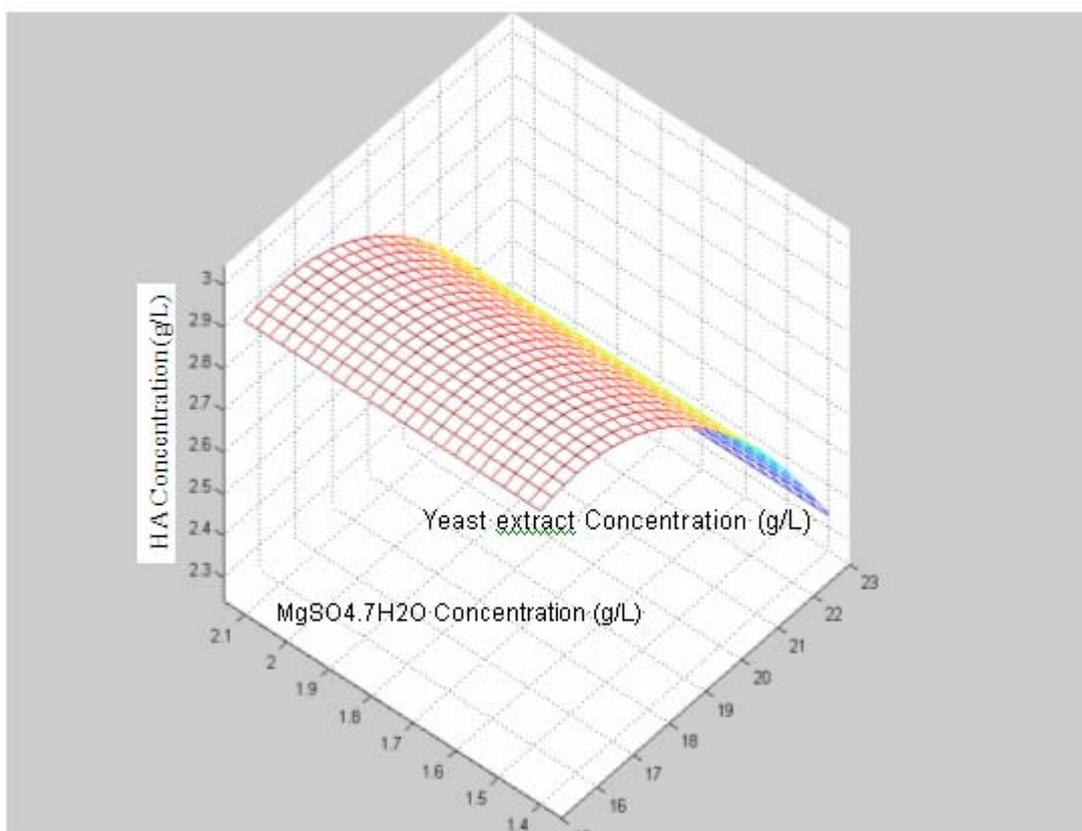


圖 4-3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖

X 軸： $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration (g/L)

Y 軸：Yeast extract Concentration (g/L)

Z 軸：HA Concentration (g/L)

圖 4-3 為 Sucrose Concentration 為固定值 57.50(g/L)， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration 範圍為 1.3~2.2 (g/L) 與 Yeast extract Concentration 範圍為 15~23 (g/L) 時之 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖。

4-2-5-3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖

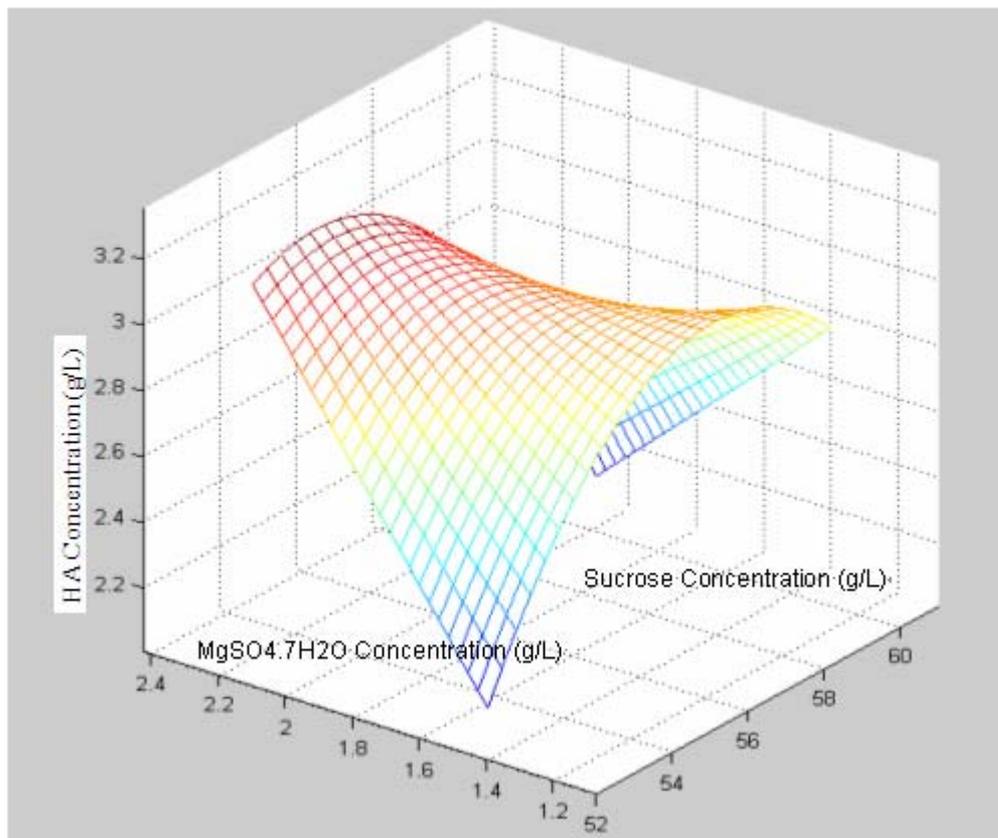


圖 4-4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖

X 軸： $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration (g/L)

Y 軸：Sucrose Concentration (g/L)

Z 軸：HA Concentration (g/L)

圖 4-4 為 Yeast extract Concentration 為固定值 16.03(g/L)， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration 範圍為 1.1~2.4 (g/L)與 Sucrose Concentration 範圍為 52~61 (g/L) 時之 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖。

4-3 醱酵槽 (5L) 醱酵條件之探討

醱酵槽 (5L) 醱酵實驗，先以批次醱酵(Batch)，測試 Control (控制組) 與 RSM(最適化)培養基在相同醱酵條件，比較其透明質酸含量與分子量分佈，再以最佳之培養基，進行溶氧值探討 (改變通氣量、攪拌速度)，找出最佳批次醱酵條件。

以最佳批次醱酵(Batch)條件，進行饋料醱酵 (Fed-Batch) 實驗，探討饋料濃度和改變攪拌速度，找出最適化醱酵條件，提高透明質酸含量與平均分子量，以達到降低生產成本之目標。

4-3-1 批次醱酵實驗

4-3-1-1 醱酵培養基之探討

在 400 rpm；1.4 vvm 相同醱酵條件，測試不同醱酵培養基之影響，其醱酵記錄如圖 4-5 控制組 (Control) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄；圖 4-6 回應曲面 (RSM) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄，實驗結果如圖 4-7 不同醱酵培養基組成之透明質酸含量；圖 4-8 不同醱酵培養基組成之透明質酸平均分子量，實驗結果整理如表 4-10 不同醱酵培養基之實驗結果。

表 4-10 不同醱酵培養基之實驗結果：

項目	控制組(Control)培養基	回應曲面(RSM)培養基
HA 最高含量 (g/L)	4.20	4.94
平均分子量 (Da)	2.40×10^6	2.84×10^6
蔗糖含量 (g/L)	50.0	57.5
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	8.40	8.59
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.300	0.353
HA 含量變化 (%)	-----	+17.67

(HA Standard 平均分子量 $M_w=1.5 \times 10^6$ Da HPLC-GPC retention time = 12.36 min)

回應曲面(RSM)培養基優於控制組(Control)培養基，增加率約為 17.67%，RSM(最適化)培養基之平均分子量 2.8×10^6 Da，亦優於 Control 培養基之平均分子量 2.4×10^6 Da。

4-3-1-2 溶氧值探討

4-3-1-2-1 攪拌速度之探討

在回應曲面(RSM)培養基、1.4vvm 通氣量醱酵條件，測試不同攪拌速度之影響，實驗結果如圖 4-9 不同攪拌速度之透明質酸含量；圖 4-10 不同攪拌速度之透明質酸平均分子量，實驗結果整理如表 4-11 不同攪拌速度之實驗結果。

表 4-11 不同攪拌速度之實驗結果：

項目	300 rpm	400 rpm	500 rpm	600 rpm
HA 最高含量 (g/L)	4.83	4.94	4.52	4.83
平均分子量 (Da)	8.27×10^5	2.84×10^6	9.50×10^5	7.22×10^5
蔗糖含量 (g/L)	57.5	57.5	57.5	57.5
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	8.40	8.59	7.86	8.40
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.345	0.353	0.323	0.345
HA 含量變化 (%)	-2.23	----	-8.50	-2.23

攪拌速度對透明質酸醱酵過程之影響：

(一) 攪拌速度對溶氧值之影響

隨著時間之增長，產物濃度不斷增加，醱酵液黏度亦會逐漸增加，同時細胞量 (wet cell weight g/ 100g broth) 也會增加，耗氧速度也增加，當醱酵一段時間，溶氧值幾乎為零，如附件-8 批次醱酵之 DO(%)；rpm 記錄圖表；附件-9 饋料醱酵之 DO(%)；rpm 記錄圖表之醱酵溶氧值變化，可知有相當時間溶氧值為零或近乎為零的狀態，如附件-10 改變攪拌速度(200 ~500 rpm)之 DO(%)；rpm 記錄圖表之醱酵溶氧值變化，轉速不同其溶氧值為零的時間長短亦不同。

(二) 攪拌速度對產物合成之影響

透明質酸初期合成速率較慢，當醱酵 7~8 小時後，透明質酸合成速率變快，這個時期之透明質酸含量佔整體醱酵過程 50 % 以上，醱酵後

期菌體可繼續生長，但透明質酸停止合成。在低轉速下，攪拌速度由 300 rpm 增加至 400 rpm，透明質酸含量會隨著攪拌速度增加而提高，可能原因為攪拌速度增加養份之質傳速率與增加氧氣之傳送速率，攪拌速度由 400 rpm 增加至 600 rpm 透明質酸含量反而下降，可能是高轉速造成之剪切力太大而傷害了菌體，透明質酸醱酵在固定轉速條件下，存在一個最佳攪拌速度，其原因可能為攪拌有助於透明質酸莢膜脫落，促進養分之吸收利用，另一為透明質酸莢膜是防止氧對細胞毒害的保護膜，由於攪拌加速了氧氣的溶解，增加了細胞與氧氣的接觸，故攪拌速度若超出一定值，會出現氧氣對細胞的毒害作用，而使透明質酸含量降低。

(三) 攪拌速度對平均分子量之影響

透明質酸是在細胞膜上合成並分泌至胞外，由於剪切力作用，一方面可能使正在鏈延長階段之透明質酸分子提早脫落，而未達一定分子量，另一方面在攪拌剪切力作用下，可能使已經分泌到胞外之長鏈分子產生斷裂而降低產物的平均分子量，攪拌速度由 400 rpm 增加至 600 rpm 透明質酸平均分子量反而下降，可能是高轉速之剪切力太大，而造成分子鏈斷裂。

由圖 4-11 以純化後之透明質酸溶液(0.05%)，測試攪拌速度與攪拌時間對透明質酸平均分子量之影響，攪拌速度 200 rpm 增加至 400 rpm 對純化後之透明質酸溶液之分子量無影響，但攪拌速度由 400 rpm 增加至 600 rpm 對純化後之透明質酸溶液之平均分子量有明顯之差異。

4-3-1-2-2 通氣量之探討

在 RSM(最適化)培養基、400 rpm 操作條件，測試不同通氣量之影響，實驗結果如圖 4-12 不同通氣量之透明質酸含量；圖 4-13 不同通氣量之透明質酸平均分子量，實驗結果整理如表 4-12 不同通氣量之實驗結果。

表 4-12 不同通氣量之實驗結果：

項目	1.0 vvm (2.5 L/min)	1.4 vvm (3.5 L/min)	2.0 vvm (5.0 L/min)
HA 最高含量 (g/L)	3.97	4.94	5.78
平均分子量 (Da)	1.42×10^6	2.84×10^6	2.50×10^6
蔗糖含量 (g/L)	57.5	57.5	57.5
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	6.90	8.59	10.05
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.284	0.353	0.413
HA 含量變化 (%)	-19.64	----	+17.00

高通氣量 2.0 vvm 透明質酸含量優於通氣量 1.4 vvm；1.0 vvm，但透明質酸平均分子量方面，則以 1.4 vvm 通氣量之平均分子量 2.84×10^6 Da 較佳。

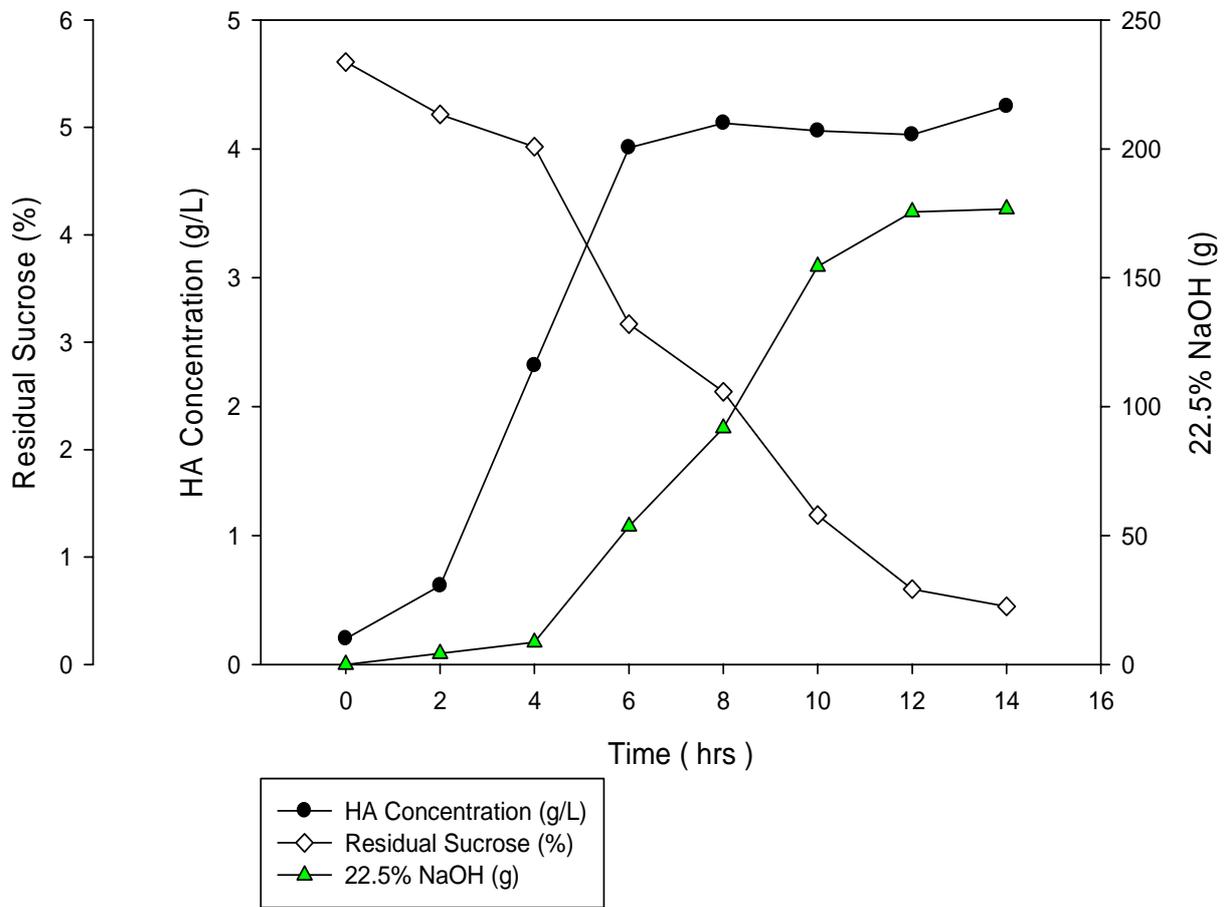


圖 4-5 控制組 (Control) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄

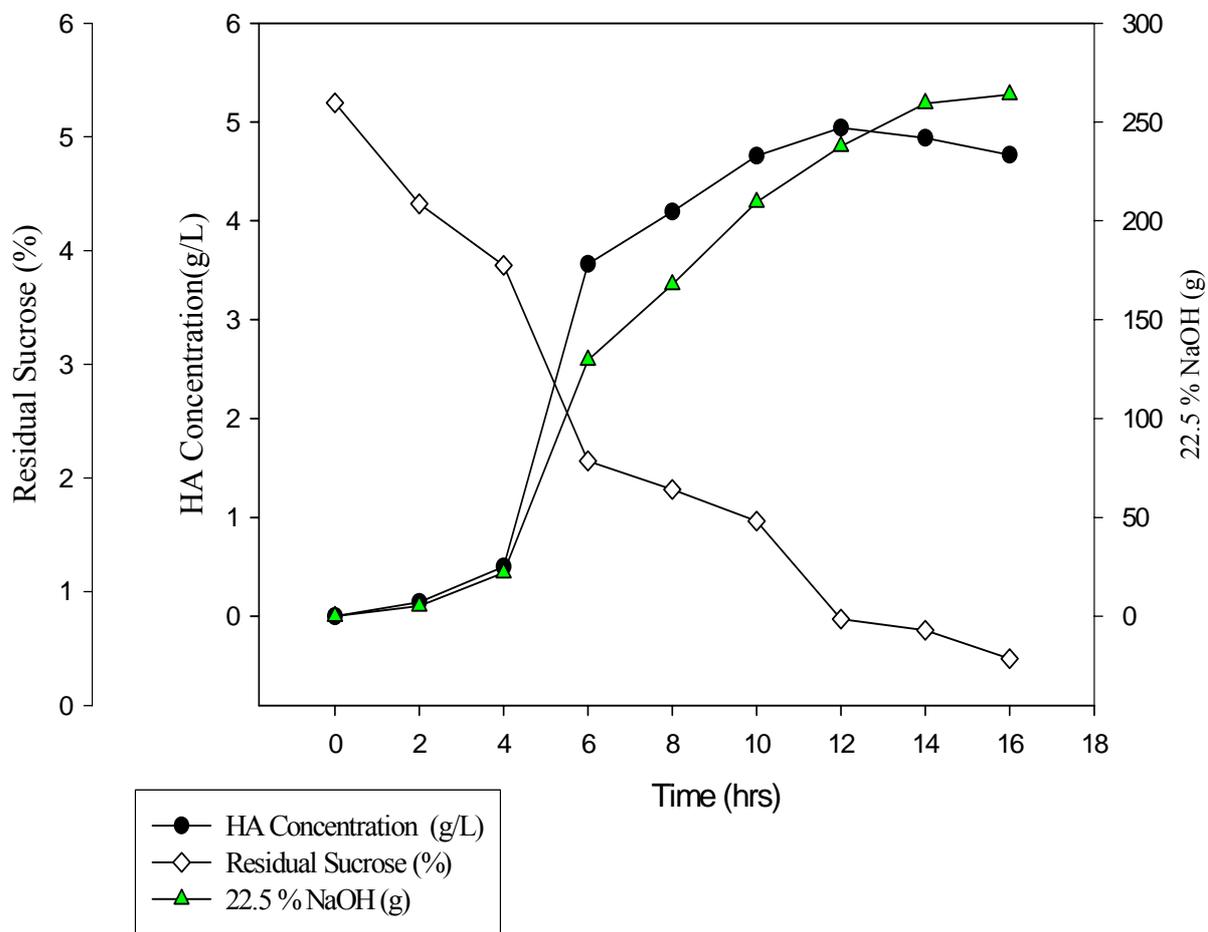


圖 4-6 回應曲面 (RSM) 培養基配方之 Batch 醱酵記錄

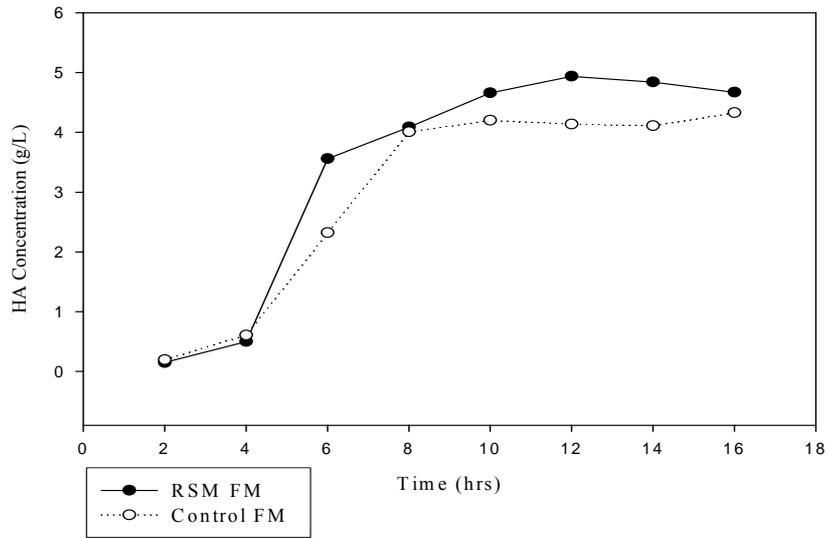


圖 4-7 不同醱酵培養基組成之透明質酸含量

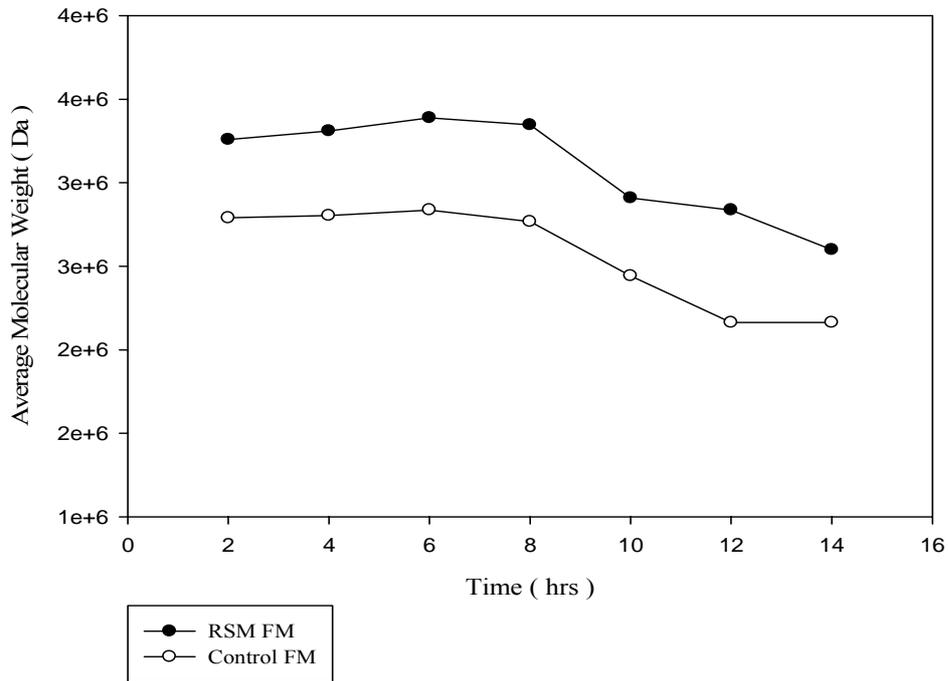


圖 4-8 不同醱酵培養基組成之透明質酸平均分子量

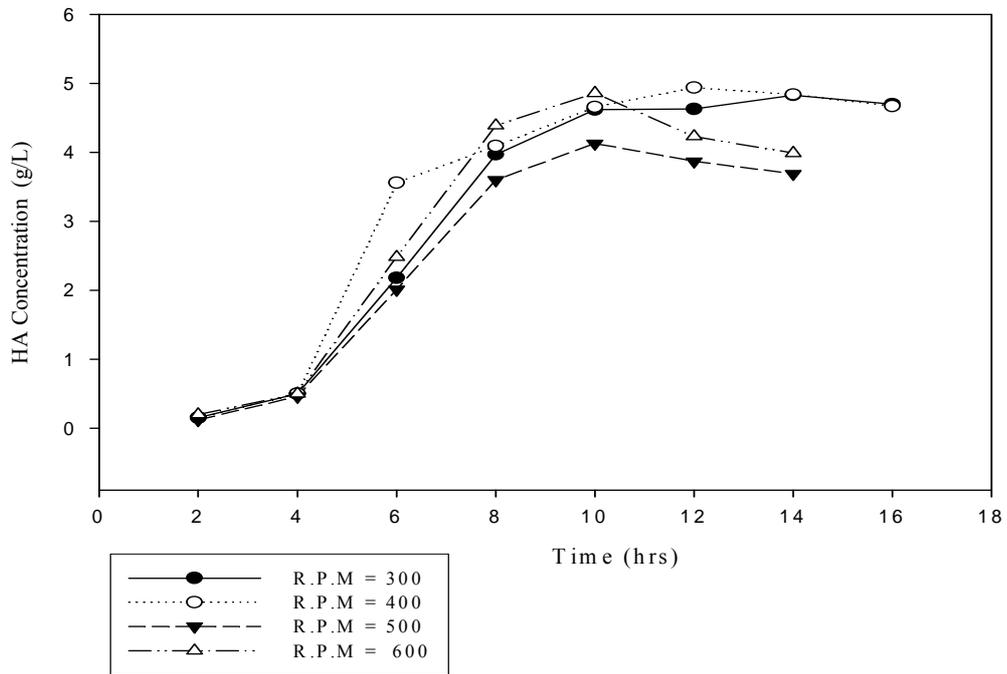


圖 4-9 不同攪拌速度之透明質酸含量

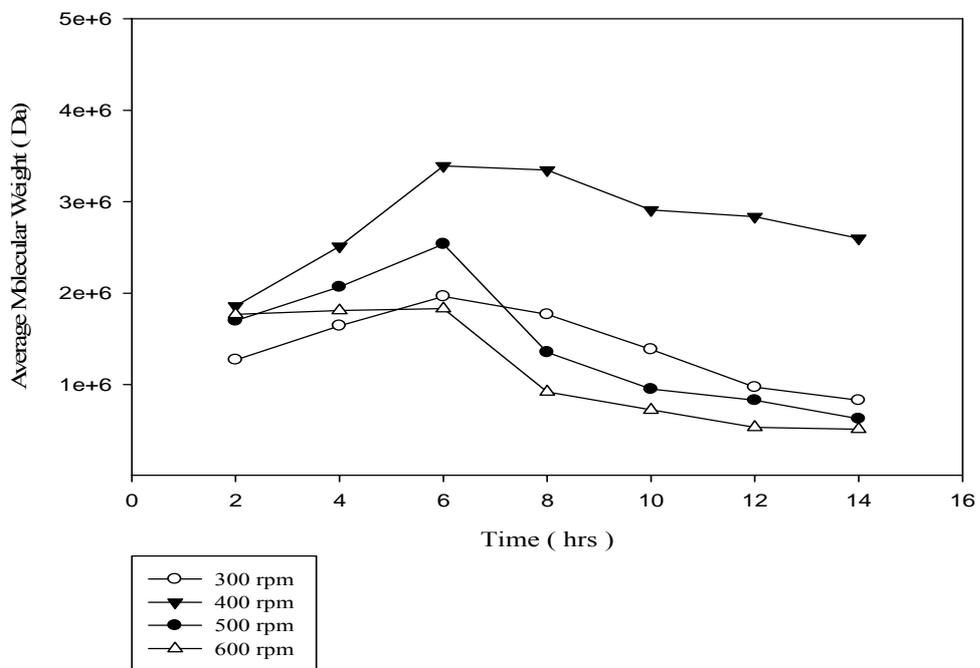


圖 4-10 不同攪拌速度之透明質酸平均分子量

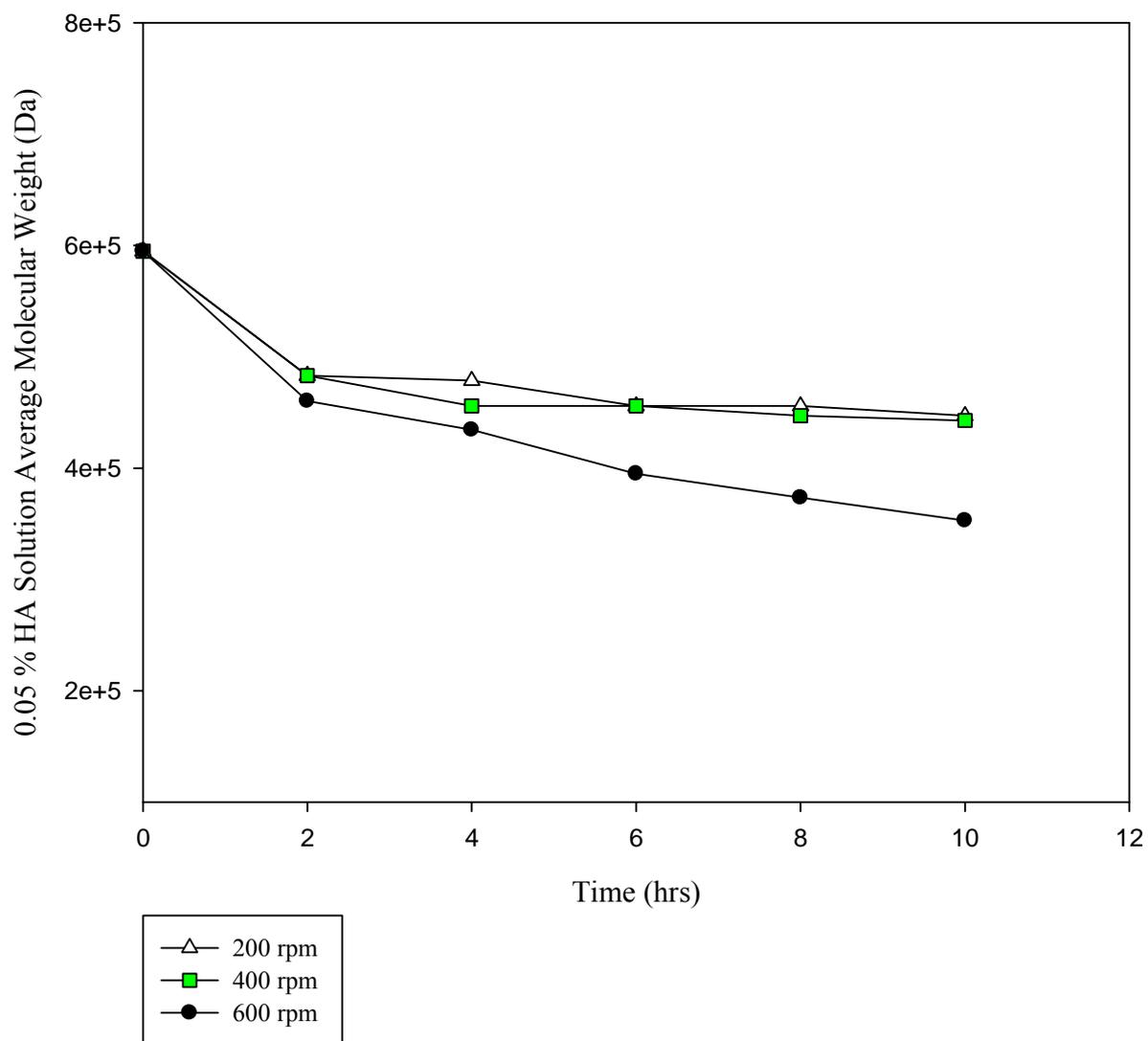


圖 4-11 以純化後透明質酸成品 0.05 % 溶液，測試攪拌速度與攪拌時間對透明質酸平均分子量之影響

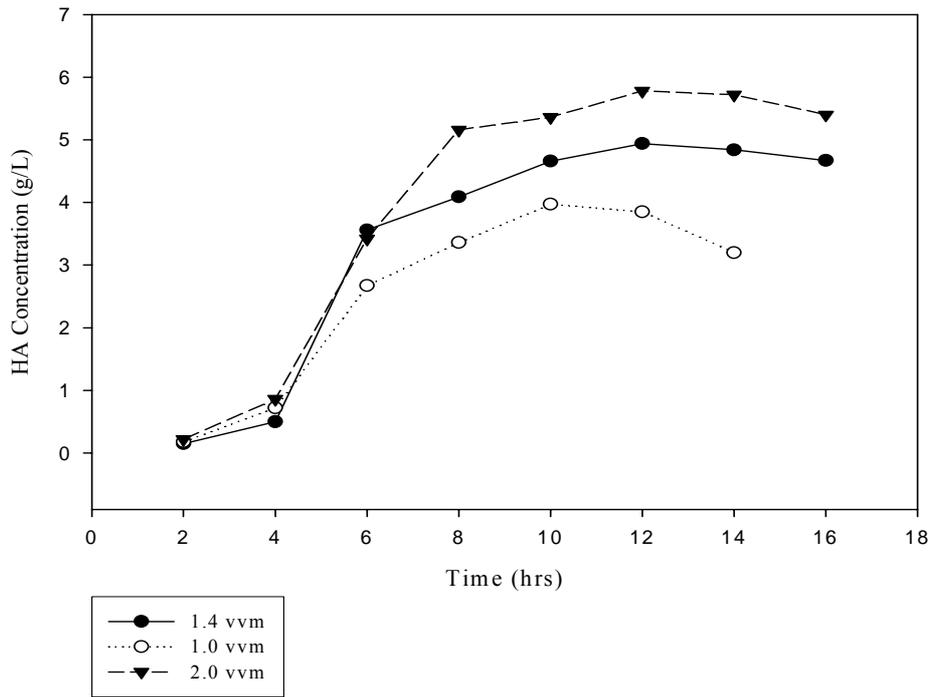


圖 4-12 不同通氣量之透明質酸含量

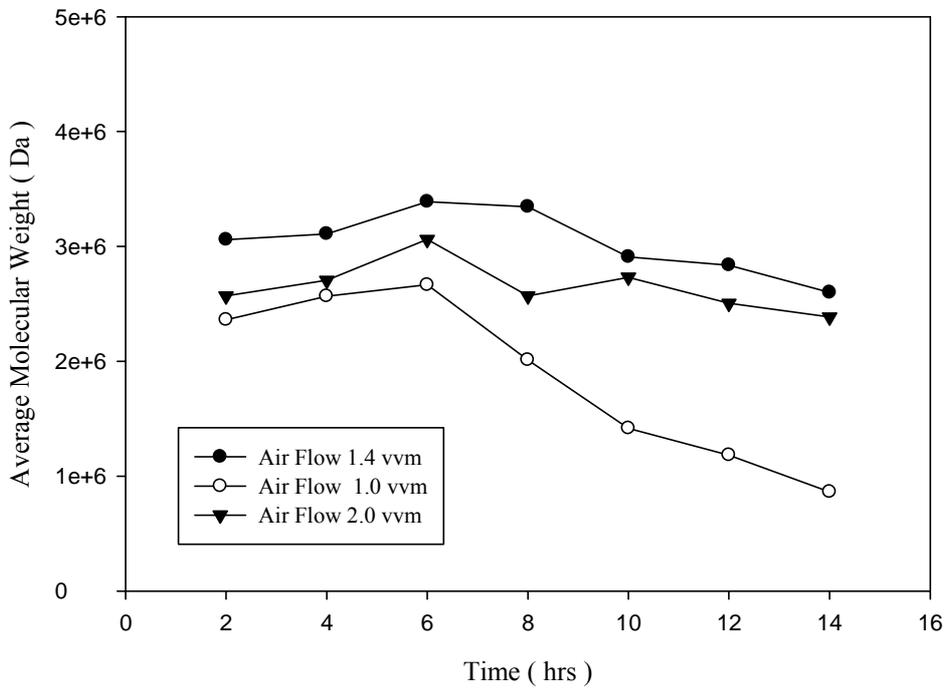


圖 4-13 不同通氣量之透明質酸平均分子量

4-3-2 饋料醱酵

4-3-2-1 饋料濃度之探討

在 400 rpm；1.4 vvm 醱酵條件，以回應曲面 (RSM) 培養基進行饋料醱酵，於 8hrs (此時之殘糖值約在 2.0%，此值之透明質酸合成速率最高) 開始饋料，饋料濃度為 5.3% Yeast extract 和 19.2% Sucrose，饋料體積 300 ml，饋料速度為連續式每小時約 100 ml。

醱酵記錄如圖 4-14 回應曲面(RSM)培養基配方之 Fed-Batch 醱酵記錄，實驗結果如圖 4-15 Control Batch；RSM Batch；RSM Fed-Batch 透明質酸含量；圖 4-16 Control Batch；RSM Batch；RSM Fed-Batch 平均分子量，實驗結果整理如表 4-13。

表 4-13 回應曲面 (RSM) 培養基配方之 Batch；Fed-Batch 結果：

項目	Batch	Fed-Batch
HA 最高含量 (g/L)	4.94	5.82
平均分子量 (Da)	2.84×10^6	2.06×10^6
蔗糖含量 (g/L)	57.5	78.0
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	8.59	7.46
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.353	0.416
HA 含量變化 (%)	----	+18.2
HA 產量變化 (g)	----	+31.95

回應曲面 (RSM) 培養基，其 Fed-Batch 之含量由 4.94 g/L 增加為 5.82 g/L，增加 18.2%，若考慮饋料造成收槽體積增加之效應，其 Fed-Batch

之總產量可由 12.35 g (4.94 g/L×2.5 L)增加 16.30 g (5.82 g/L×2.8 L)，明顯增加 31.95%，但對平均分子量提升無幫助。

4-3-2-2 饋料濃度增加之探討

在 400 rpm；1.4 vvm 醱酵條件，以回應曲面 (RSM) 培養基進行饋料醱酵，於 8hrs 開始饋料，饋料濃度增加為 10.6% Yeast extract 和 38.4% Sucrose，饋料體積 300 ml，饋料速度為連續式每小時約 100 ml。

醱酵記錄如圖 4-17 回應曲面 (RSM) Feeding Conc.2X 之 Fed-Batch 醱酵記錄，實驗結果如圖 4-19 RSM Feeding Conc. 1X; 2X; 2X 並改變攪拌速度之透明質酸含量；圖 4-20 RSM Feeding Conc. 1X; 2X; 2X 並改變攪拌速度之平均分子量，實驗結果整理如表 4-14。

表 4-14 回應曲面 (RSM) Feeding Conc. 1X；2X 之 Fed-Batch 結果

項目	Feeding Conc. 1X	Feeding Conc. 2X
HA 最高含量 (g/L)	5.82	6.46
平均分子量 (Da)	2.06×10^6	1.57×10^6
蔗糖含量 (g/L)	78.0	98.6
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	7.46	6.55
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.416	0.461
HA 含量變化 (%)	----	+11.00

回應曲面 (RSM) 培養基配方，饋料濃度增加，其透明質酸含量可由 5.82 g/L 增加至 6.46 g/L，但對平均分子量提升無幫助，且其增幅已不顯著，蔗糖轉化率明顯下降。

4-3-2-3 改變攪拌速度之探討

在 1.4 vvm 相同醱酵條件下，以回應曲面 (RSM) 培養基進行饋料醱酵，於 8hrs 開始饋料，饋料濃度為 10.6% Yeast extract 和 38.4% Sucrose，饋料體積 300 ml，饋料速度為連續式每小時約 100 ml，一組為固定攪拌速度 400 rpm，另一組 0~5hrs 攪拌速度固定為 200 rpm；5hrs (此時醱酵液開始變黏且溶氧值開始明顯下降) 以後改變攪拌速度為 200 ~ 500 rpm。醱酵記錄如圖 4-18 回應曲面 (RSM) Feeding Conc. 2X 並改變攪拌速度醱酵記錄，實驗結果如圖 4-19 RSM Feeding Conc. 1X；2X；2X 並改變攪拌速度之透明質酸含量；圖 4-20 RSM Feeding Conc. 1X；2X；2X 並改變攪拌速度之平均分子量，實驗結果整理如表 4-15。

表 4-15 回應曲面 Feeding Conc.2X；2X 並改變攪拌速度之結果：

項目	固定攪拌速度 400 rpm	改變攪拌速度 200 ~ 500 rpm
HA 最高含量 (g/L)	6.46	6.94
平均分子量 (Da)	1.57×10^6	1.45×10^6
蔗糖含量 (g/L)	98.6	98.6
蔗糖轉化率 (HA g/ 100g sucrose)	6.55	7.04
HA 生產速率 (g/L/hr)	0.461	0.496
HA 含量變化 (%)	----	+6.92

採用此控制策略，雖然醱酵前期透明質酸含量沒有提昇，但細胞量（菌體濕重）較多，對最終透明質酸含量有提昇，原因可能是前期(0~5 小時固定 200 rpm)可降低剪切力對菌體的傷害，5 小時醱酵液開始變黏，溶氧不足時，增加攪拌速度以提高氧氣之傳送速率，比較有利於透明質酸生產，但可能維持 500 rpm 時間太久，造成分子鏈斷裂，故對平均分子量提升無幫助。

4-4 搖瓶實驗結果

表 4-16 搖瓶實驗結果

FM Type	Yeast extract (g/L)	Sucrose (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	HA 含量 (g/L)
Control	20.00	50.00	2.00	0.96
RSM	16.03	57.50	1.47	2.97

4-5 醱酵槽 (5L) 批次培養(Batch Culture)實驗結果

表 4-17 醱酵槽 (5L) 批次培養(Batch Culture)實驗結果

Type	HA 含量 (g/L)	平均分子量 (Dalton)	蔗糖轉化率% (HA g/ sucrose g)	HA 生產速率 (g/L/hr)
Control; 1.4 vvm; 400 rpm	4.20	2.40×10^6	8.40	0.300
RSM; 1.4 vvm; 400 rpm	4.94	2.84×10^6	8.59	0.353
RSM; 1.4 vvm; 300 rpm	4.83	8.27×10^5	8.40	0.345
RSM; 1.4 vvm; 400 rpm	4.94	2.84×10^6	8.59	0.353
RSM; 1.4 vvm; 500 rpm	4.52	9.50×10^5	7.86	0.323
RSM; 1.4 vvm; 600 rpm	4.83	7.22×10^5	8.40	0.345
RSM; 400 rpm; 1.0 vvm	3.97	1.42×10^6	6.90	0.284
RSM; 400 rpm; 1.4 vvm	4.94	2.84×10^6	8.59	0.353
RSM; 400 rpm; 2.0 vvm	5.78	2.50×10^6	10.05	0.413

4-6 醱酵槽（5L）饋料培養(Fed-Batch Culture)實驗結果

表 4-18 醱酵槽（5L）饋料培養(Fed-Batch Culture)實驗結果

Type	HA 含量 (g/L)	平均分子量 (Dalton)	蔗糖轉化率% (HA g/ sucrose g)	HA 生產速率 (g/L/hr)
RSM ; 1.4 vvm ; 400 rpm 饋料條件： 時間：醱酵 8hrs 饋料 濃度：5.3 % yeast extract 和 19.2 % sucrose 體積：300 ml 速度：100 ml/hr	5.82	2.06×10^6	7.46	0.416
RSM ; 1.4 vvm 饋料條件： 時間：醱酵 8hrs 饋料 濃度：10.6 % yeast extract 和 38.4 % sucrose 體積：300 ml 速度：100 ml/hr 攪拌速度條件：400 rpm	6.46	1.57×10^6	6.55	0.461
RSM ; 1.4 vvm 饋料條件： 時間：醱酵 8hrs 饋料 濃度：10.6 % yeast extract 和 38.4 % sucrose 體積：300 ml 速度：100 ml/hr 攪拌速度條件： 0~5hrs : 200 rpm 5hrs~end : 200 ~ 500 rpm	6.94	1.45×10^6	7.04	0.496

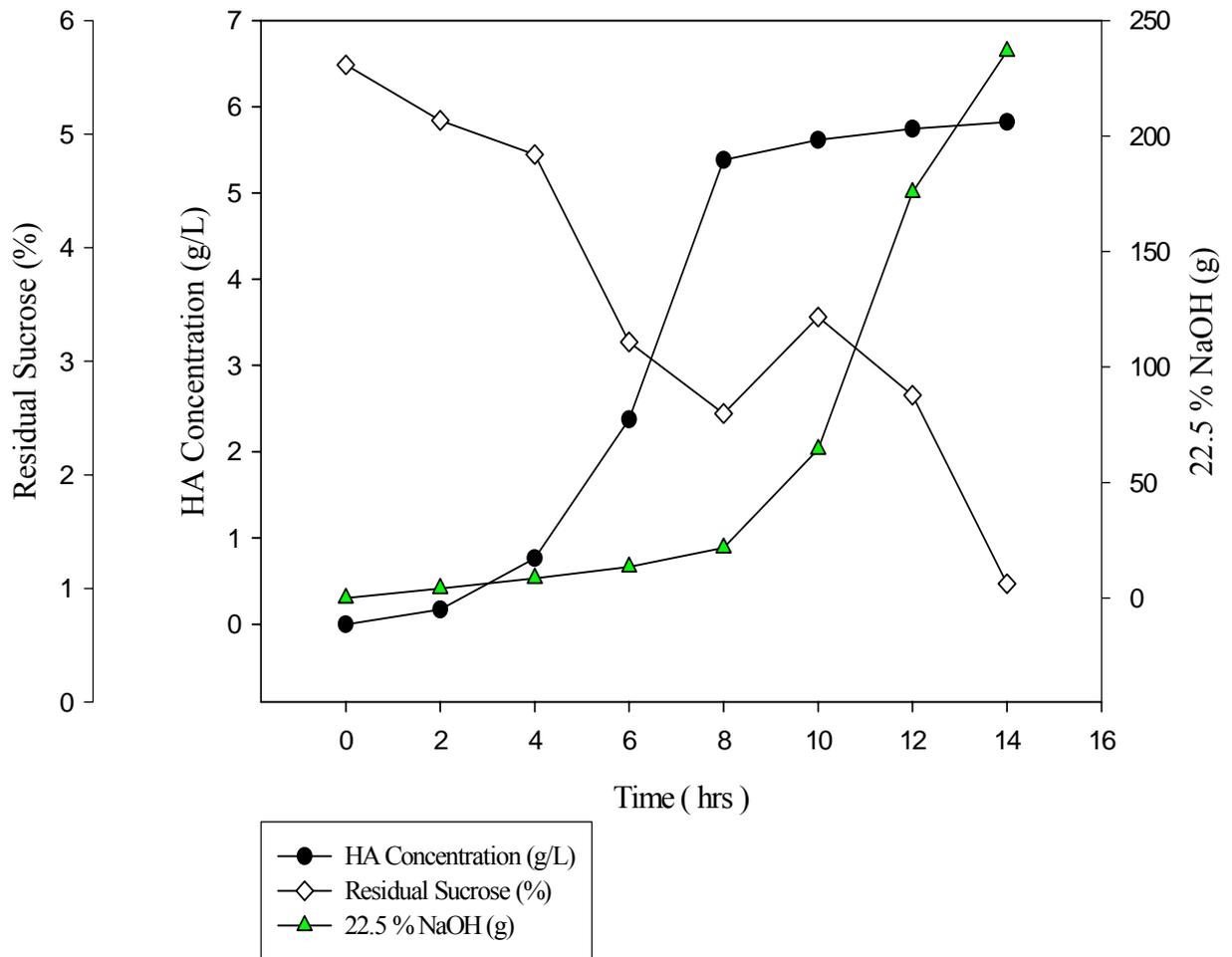


圖 4-14 回應曲面 (RSM) 培養基配方之 Fed-Batch 醱酵記錄

饋料條件：

饋料時間：醱酵 8hrs 開始饋料

饋料濃度：5.3% Yeast extract 和 19.2% Sucrose

饋料體積：300 ml

饋料速度：連續式每小時約 100 ml

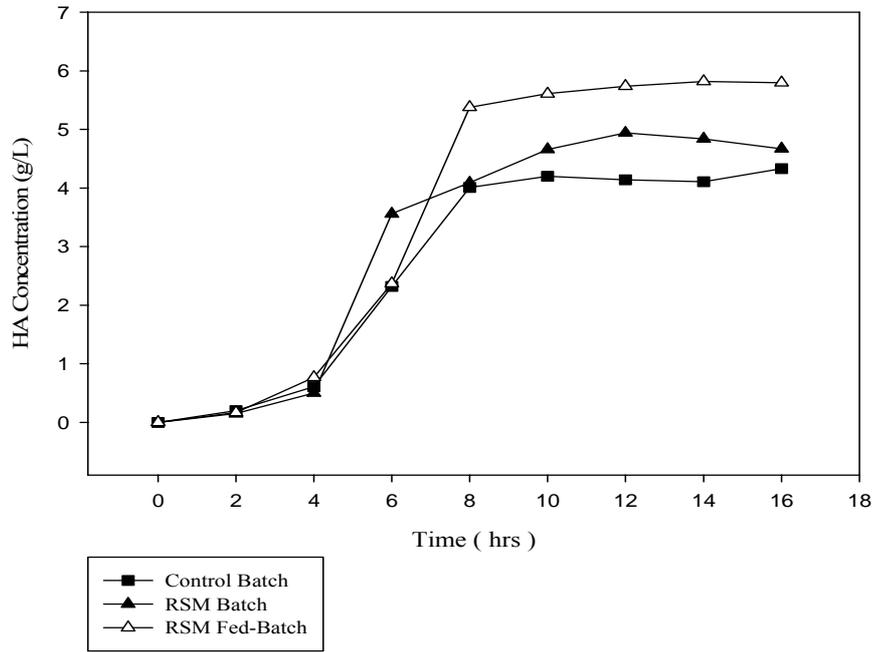


圖 4-15 Control Batch ; RSM Batch ; RSM Fed-Batch 透明質酸含量

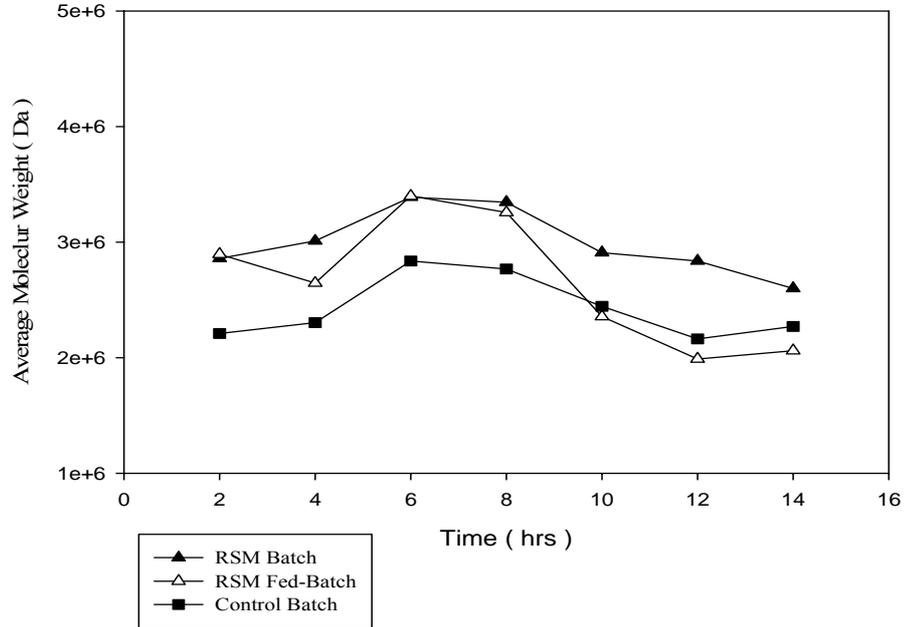


圖 4-16 Control Batch ; RSM Batch ; RSM Fed-Batch 平均分子量

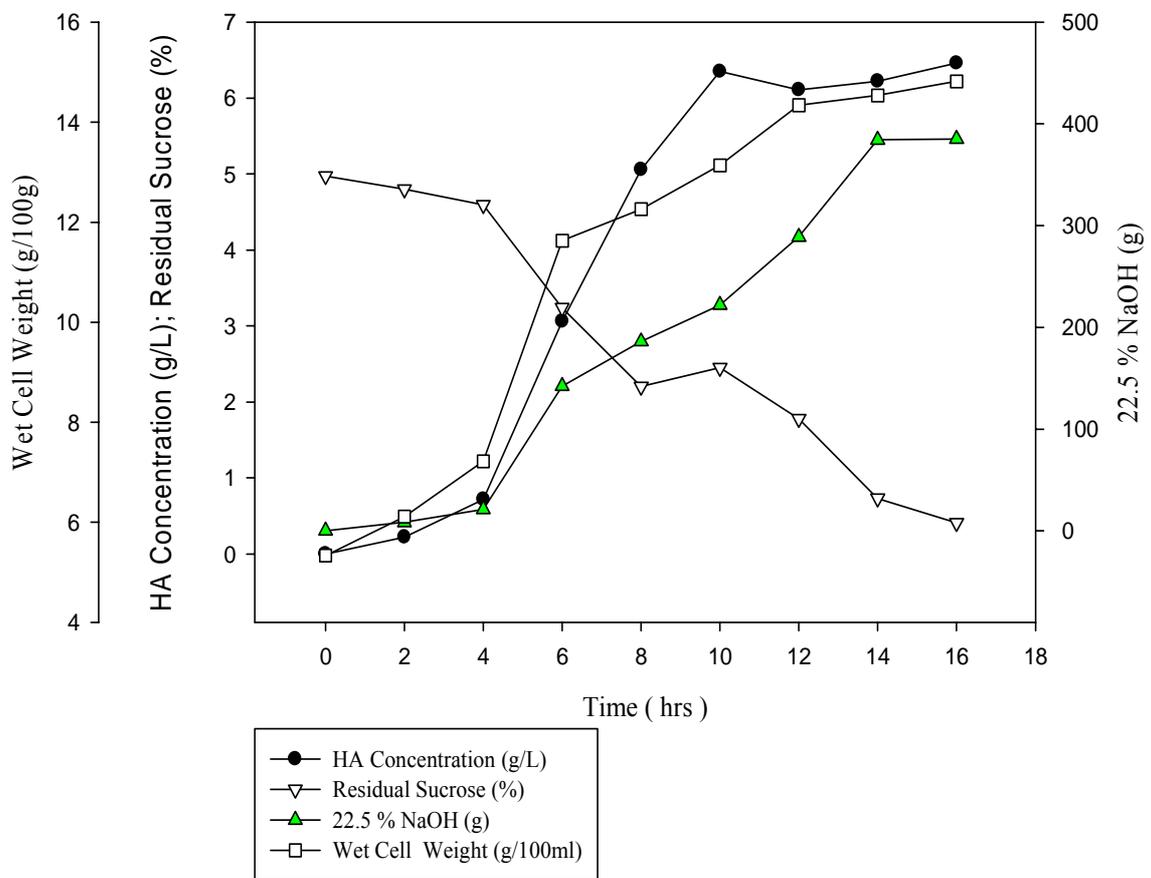


圖 4-17 回應曲面 (RSM) Feeding Conc. 2X 之 Fed-Batch 醱酵記錄

饋料條件：

饋料時間：醱酵 8hrs 開始饋料

饋料濃度：10.6% Yeast extract 和 38.4% Sucrose

饋料體積：300 ml

饋料速度：連續式每小時約 100 ml

攪拌速度條件：固定為 400 rpm

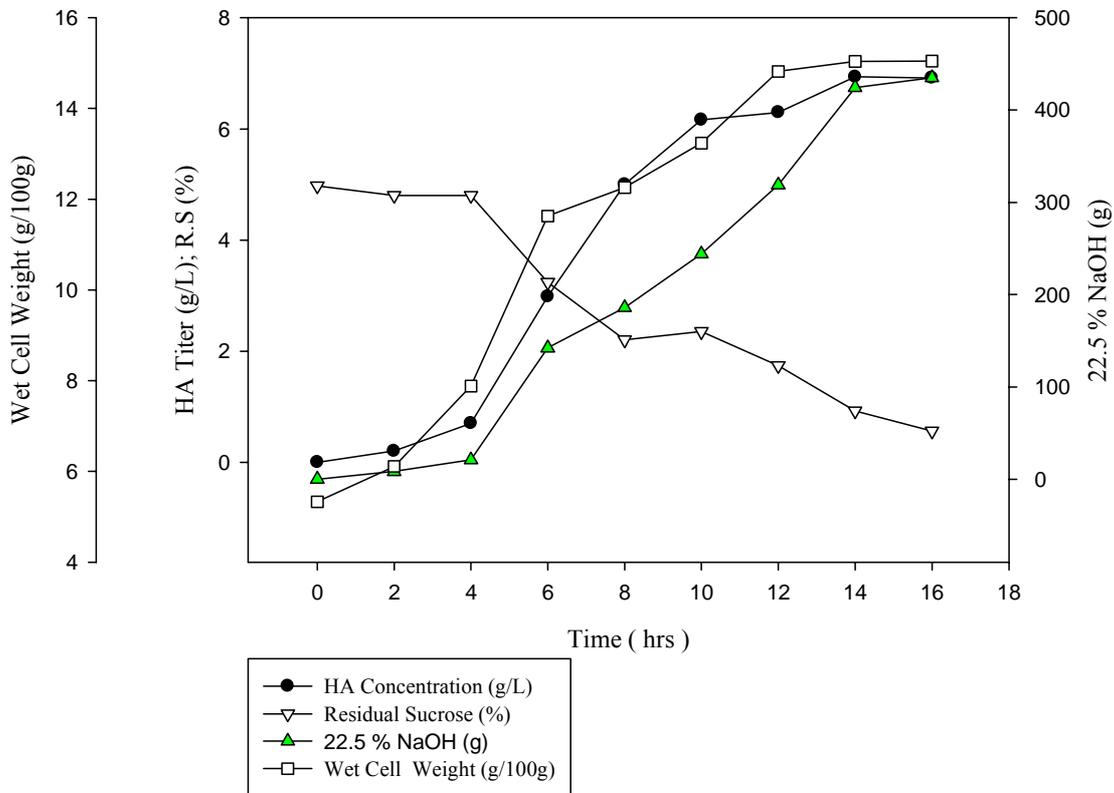


圖 4-18 回應曲面 Feeding Conc. 2X 並改變攪拌速度之醱酵記錄

饋料條件：

饋料時間：醱酵 8hrs 開始饋料

饋料濃度：10.6% Yeast extract 和 38.4% Sucrose

饋料體積：300 ml

饋料速度：連續式每小時約 100 ml

攪拌速度條件：

0~5hrs：攪拌速度固定為 200 rpm

5hrs~end：攪拌速度為 200 rpm ~ 500 rpm

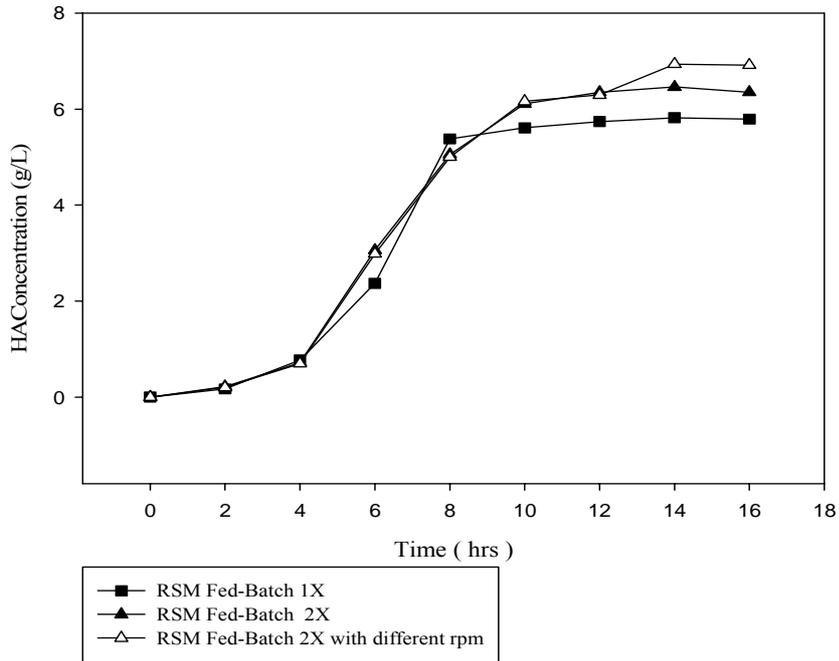


圖 4-19 RSM Feeding Conc. 1X ; 2X ; 2X 並改變攪拌速度之透明質酸含量

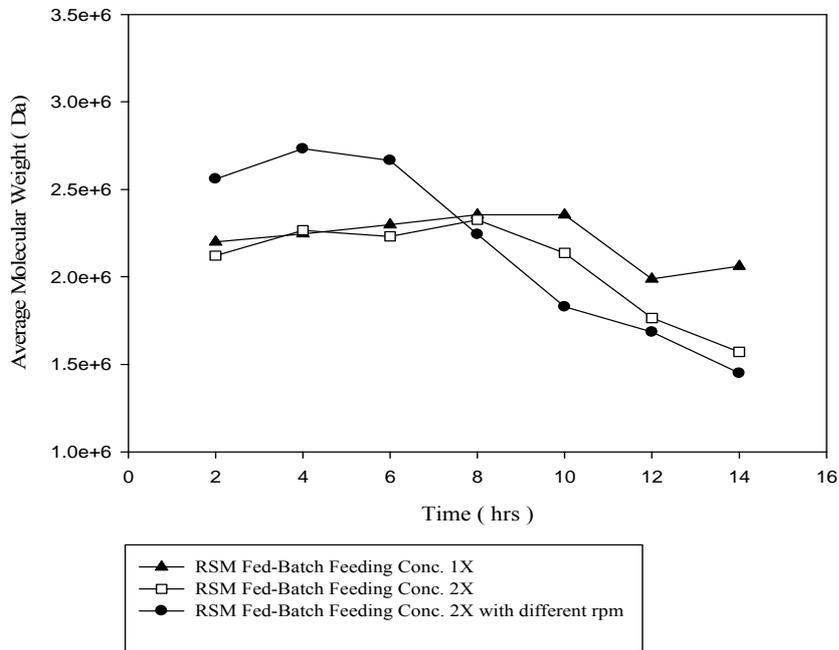


圖 4-20 RSM Feeding Conc. 1X ; 2X ; 2X 並改變攪拌速度之平均分子量

第五章 結論與展望

1. RSM (最適化) 培養基搖瓶測試，透明質酸含量為 2.96 g/L 約為起始配方的 3 倍。
2. 搖瓶不能對 pH 進行控制，若不額外添加緩衝液與碳酸鈣 (收瓶 pH 值會低於 4.5)，透明質酸含量非常低，加入緩衝液與碳酸鈣緩衝 pH 變化 (收瓶 pH 值 5.5 ± 0.3)，亦無法達到其最佳生產 pH 值，搖瓶最佳透明質酸含量為 3.0 g/L 左右。
3. 醱酵槽可以 NaOH 溶液控制 pH 值維持在 7.0 ± 0.1 ，可以通氣、攪拌增加其溶氧值與養份混合之均勻度，可由饋料方式提供養份，最適化醱酵條件之 5L 醱酵槽透明質酸最高含量可達 6.94 g/L。
4. 回應曲面法有其困難度，僅圖 4-2 Yeast extract 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖，是完美的曲面圖，圖 4-3 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 Yeast extract 對透明質酸含量之回應曲面圖，在 Sucrose 含量固定下，透明質酸含量與 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 含量無關，圖 4-4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 Sucrose 對透明質酸含量之回應曲面圖，在 Yeast extract 含量固定下， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 在 1.47 g/L 與 2.2~2.4 g/L 各有極大值，故 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 含量範圍須再擴大作測試。
5. 平均分子量之趨勢說明：透明質酸於對數期後段 (約 6~8 hrs) 之平均分子量較高，與 David C. Armstrong et al., 1997 文獻之實驗結果相似，而後隨著醱酵時間增加 (靜置期) 平均分子量會下降，除了剪切力作用外，可能原因為醱酵過程中，透明質酸分解酶的產生，造成平均分子量分解與下降。一般低蔗糖濃度，雖然其透明質酸含量較低，但平均分子量相

對較高。除了通氣量 1.0 vvm 透明質酸含量低且平均分子量亦較低外，其餘平均分子量之趨勢皆為透明質酸含量較低，平均分子量較高。

6. 蔗糖轉化率之趨勢說明：較低之蔗糖濃度與較高之通氣量是有利於蔗糖轉化率。
7. 透明質酸為高黏度醱酵之特性（醱酵液最黏狀況可達 4000 cps 以上），溶氧值控制（利用攪拌速度；通氣量；通純氧）不易且起伏很大，無法控制溶氧在固定值，造成欲探討溶氧值對透明質酸含量與平均分子量之影響，有實驗操作方面之困難度。
8. 攪拌速度的控制策略：最適化條件為 RSM（最適化）培養基；1.4 vvm；於 8hrs 開始饋料，饋料濃度為 10.6 % yeast extract 和 38.4 % sucrose，饋料體積 300 ml，饋料速度為連續式每小時約 100 ml，0~5hrs 攪拌速度固定為 200 rpm；5hrs 時改變攪拌速度為 200 ~ 500 rpm，整個醱酵過程在不同的階段採用不同攪拌速度的控制策略（陳堅、堵國成、李寅，2002），也是提高透明質酸含量的手段之一。
9. 透明質酸成品之平均分子量，除了可藉由醱酵最適化控制條件與良好的純化回收操作來提昇外，主要決定於生產菌株是否優異，平均分子量分解與下降，與所用的菌種是否產生透明質酸分解酶有關，若能利用菌種突變與篩選策略（Jeong Hyun Kim, et al., 1996），找出不會分泌透明質酸分解酶之生產菌株，是提高透明質酸平均分子量最好且最有效的方式。

參考文獻

朱兆秀 "透明質酸 (HA) 生產菌之開發 (生物資源之收集保存與開發專案計畫)" 食科所 2005 年。

朱兆秀 "利用鏈球菌醱酵生產透明質酸" 化工技術第 13 卷 7 期 2005 年。

郭振武、陳特良 "比生長速率對以鏈球菌醱酵生產玻尿酸之影響" 國立成功大學化學工程系 2007 年。

高維毅、陳特良 "玻尿酸菌醱酵中均衡培養基之探討" 國立成功大學化學工程系 2006 年。

陳堅、堵國成、李寅 "醱酵法生產透明質酸" 無錫輕工大學生物工程學院 2002 年。

陳玉青、陳齊聖 "酵母菌發酵木糖生產木糖醇—培養基組成之最適化" 朝陽科技大學應用化學系 2004 年。

陳瑞祥 "透明質酸產業應用技術及產品開發" 工研院生醫所 2006 年。

陳鵬、陸文雄、周勤夫、嚴雅靜 "透明質酸的應用及制備研究進展" 上海大學學報 1999 年。

劉成財、陳特良 "鏈球菌醱酵生產玻尿酸之培養基設計" 國立成功大學化學工程系 2006 年。

謝慧冰、陳特良 "攪拌剪應力是玻尿酸醱酵放大設計之關鍵因素" 國立成功大學化學工程系 2005 年。

魏育群 "Hyaluronic Acid (透明質酸)" Seminar 生醫工程中心醫藥技術組 2005 年。

Abraham Nimrod, Benjamin Greenman, Dov Kanne; United States Patent : 4,780,414, "Method of Producing High Molecular Weight Sodium Hyaluronate by Fermentation of *Streptococcus*" (1988)

Barrie Fong Chong, Lars K. Nielsen "Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and role of NADH oxidase" Biochemical Engineering Journal 16 : 153~162 (2003)

Barrie Fong Chong, Lars M. Blank, Richard Mclaughlin, Lars K. Nielsen "Microbial Hyaluronic Acid Production" Applied Microbiol Biotechnology 66 : 341~351 (2005)

Bjorn Holmstrom and Jricica "Production of Hyaluronic Acid Producing by *Streptococcus* Strain in Batch Culture" Applied Microbiology, 15 : 1409~1413 (1967)

David A. Swann, Lexington, Bernard P.Sullivan, Andover, Gordon Jamieson, Kenneth R. Richardson, Tarlach Singh , United States Patent : 4,897,349, "Biosynthesis of Hyaluronic Acid" (1990)

David C. Armstrong and Michael R. Johns "Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*" Applied and Environmental Microbiology, 2759 ~ 2764 (1997)

D.C. Armstrong, M.J. Cooney, M.R. Johns "Growth and Amino Acid Requirements of Hyaluronic Acid Producing by *Streptococcus zooepidemicus*" Appl Microbiol Biotechnol, 47 : 309~312 (1997)

Gao Hai-Jun, Chen Jian, Zhang Yan-Fang, Du Guo-Cheng "Nutrition Condition of Hyaluronic acid Fermentation with *Streptococcus zooepidemicus*" Chinese Journal of Biochnology, 16 : 396~399 (2000)

ISHAS : International Society of Hyaluronan Sciences (Hyaluronan Today
[http:// www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/ hyaluronan E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronan E.html))

Jeong Hyun Kim, Seung Jong Yoo, Deok Kun Oh, Young Gi Kweon, Dong Woo Park, Chul Hoon Lee, and Gwang Hoon Gil "Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Condition for Production High Molecular Weight Hyaluronic Acid" *Enzyme and Microbial Technology*, 19 : 440~445 (1996)

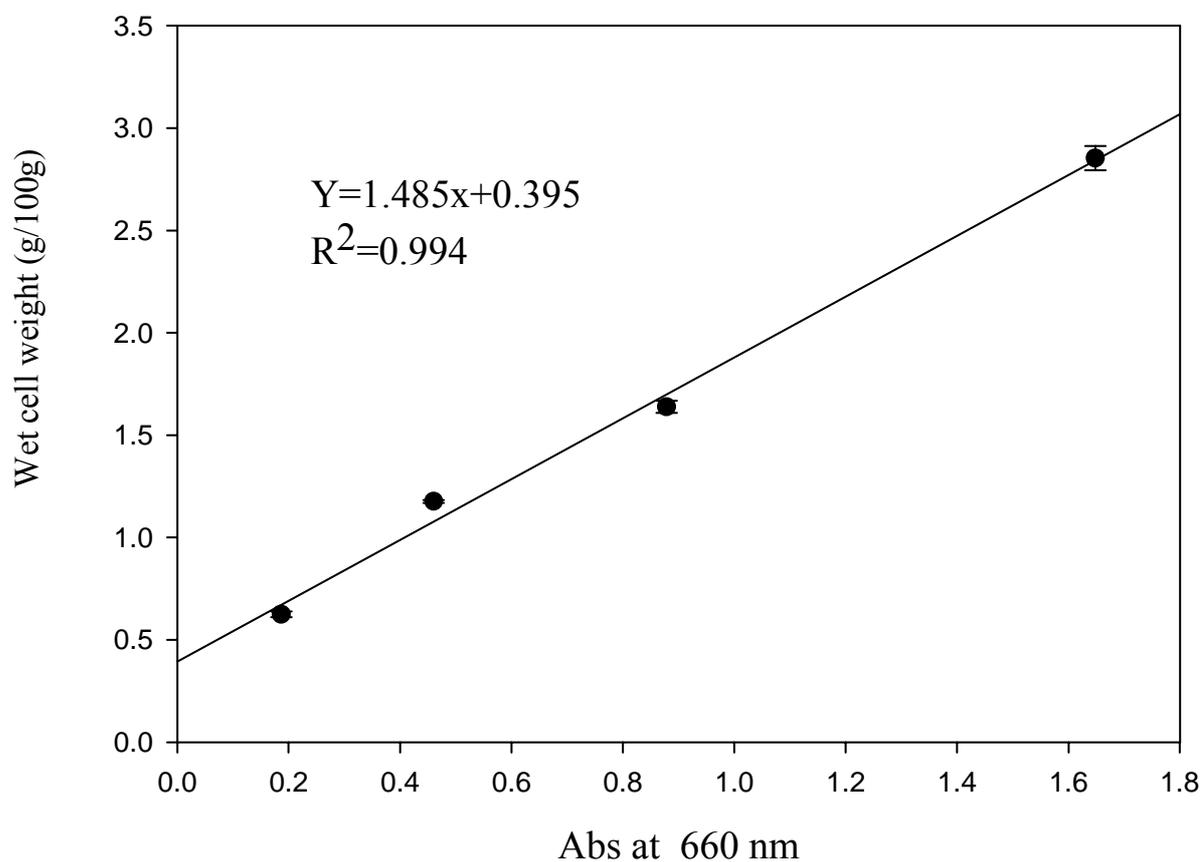
John A. Cornell "How to Apply Response Surface Methodology" *American Society for Quality Control Volume 8* (1990)

Leslie C. Benchetrit, Sham L. Pahuja, Ernest D. Gray, Ronald Edstrom "A Sensitive Method for the Assay of Hyaluronidase Activity" *Analytical Biochemistry* 79 : 431~437 (1977)

Michael R. Johns, Lin Tang Goh and Andreas Oeggerli "Effect of pH , Agitation and Aeration on Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus*" *Biotechnology Letters*, 16 : 507~512 (1994)

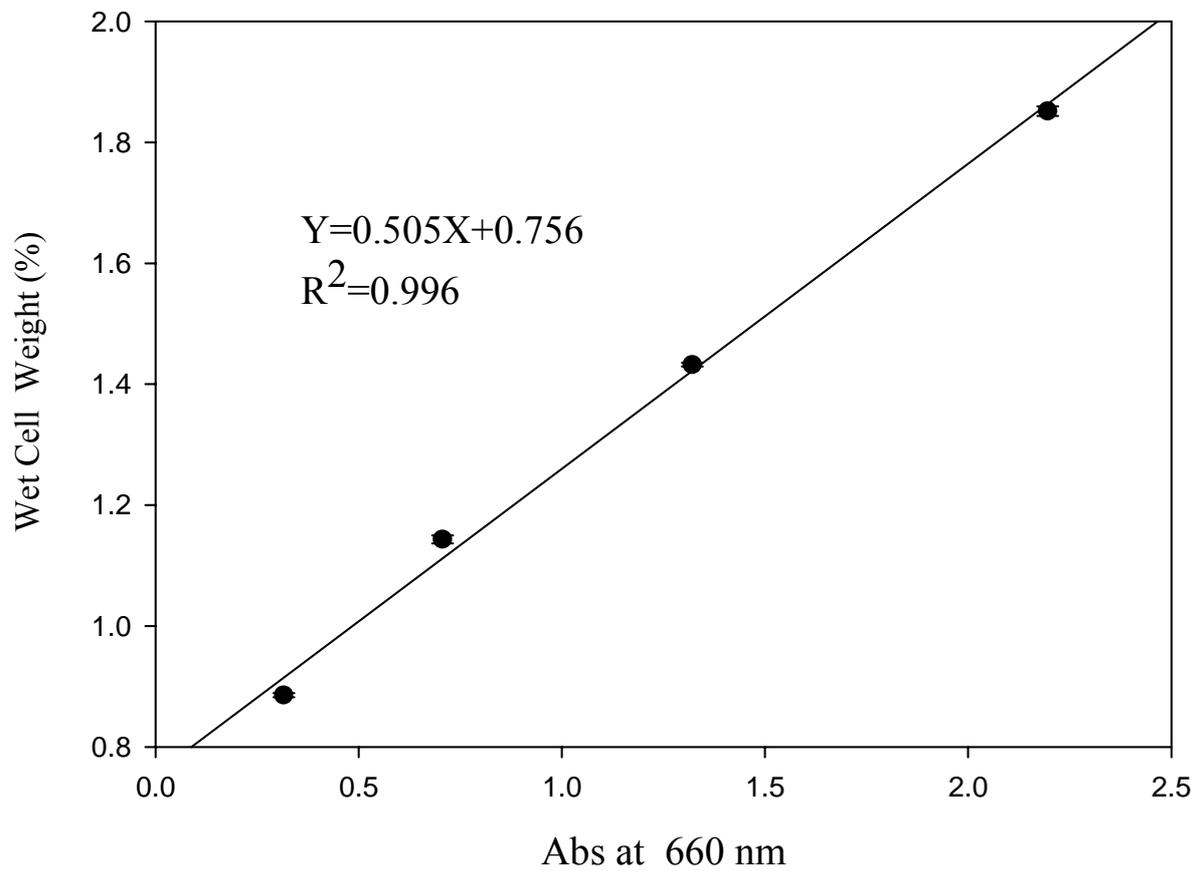
Vic Barnett, Ralph A. Bradley, J. Stuart Hunter, David G. Kendall, Rupert G. Miller, Geoffrey S. Watson "Empirical Model-Building and Response Surfaces" *Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics* (1987)

附件



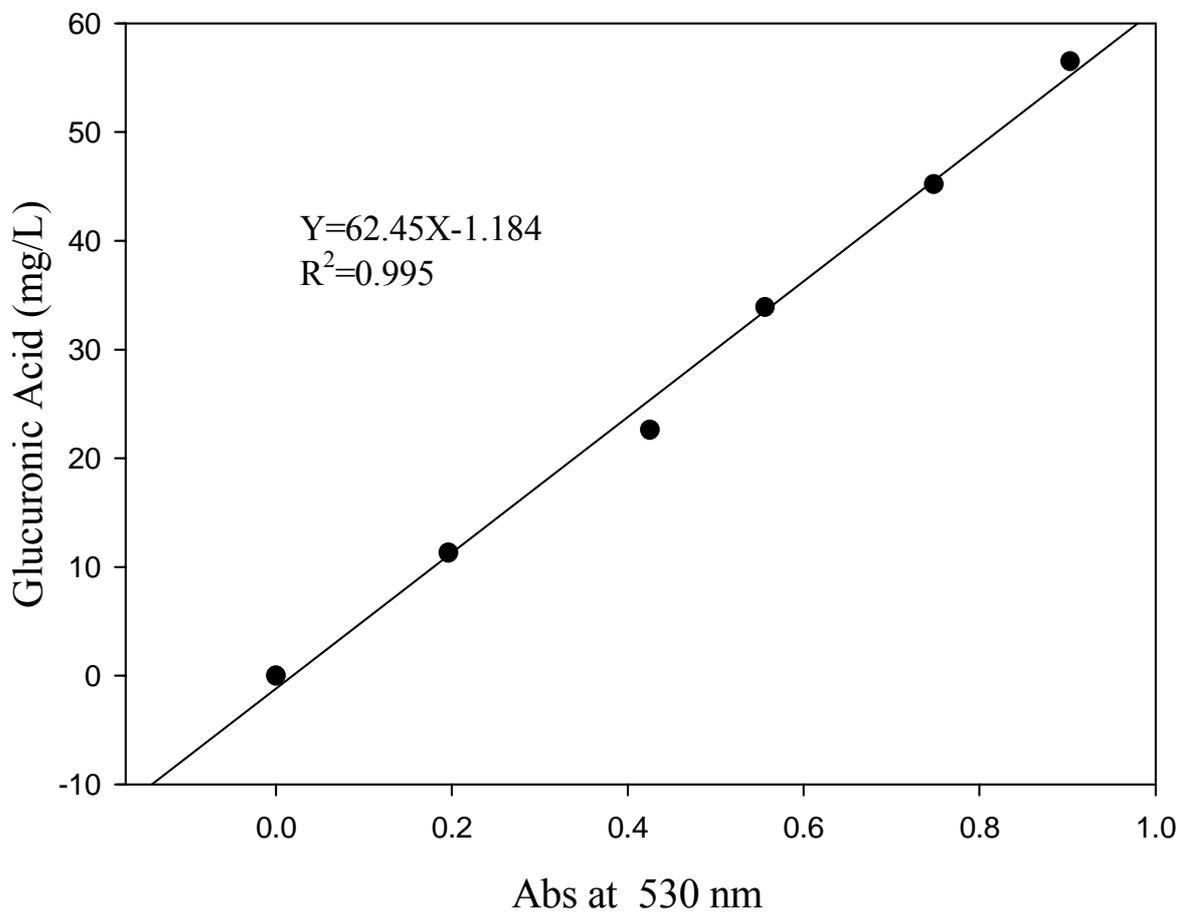
附件-1 對數期菌體濕重濃度標準曲線

$$\text{Wet Cell Weight (\%)} = (1.485 \times \text{Abs}_{660} + 0.395) \times \text{dilution factor} \quad R^2=0.994$$



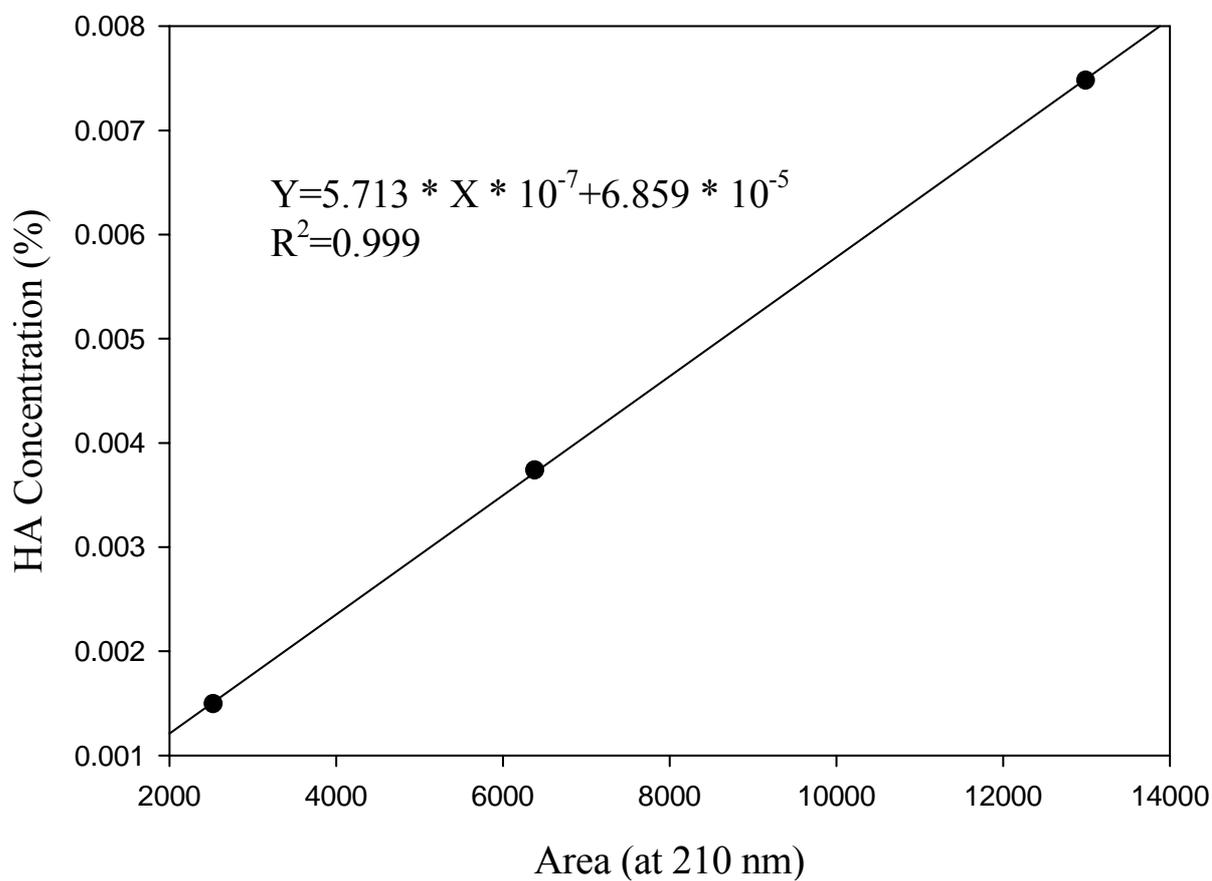
附件-2 停滯期菌體濕重濃度標準曲線

$$\text{Wet Cell Weight (\%)} = (0.505 \times \text{Abs}_{660} + 0.756) \times \text{dilution factor} \quad R^2 = 0.996$$



附件-3 葡萄糖醛酸標準曲線

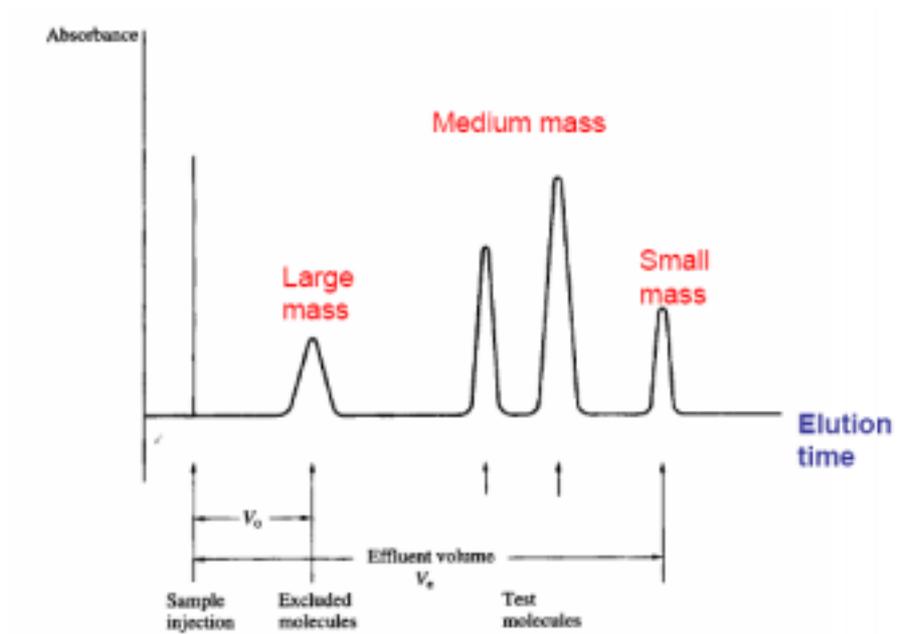
$$\text{Glucuronic Acid (mg / L)} = 62.45 \times \text{Abs}_{530} - 1.184 \quad R^2=0.995$$



附件- 4 HPLC-GPC Method 之透明質酸濃度標準曲線。

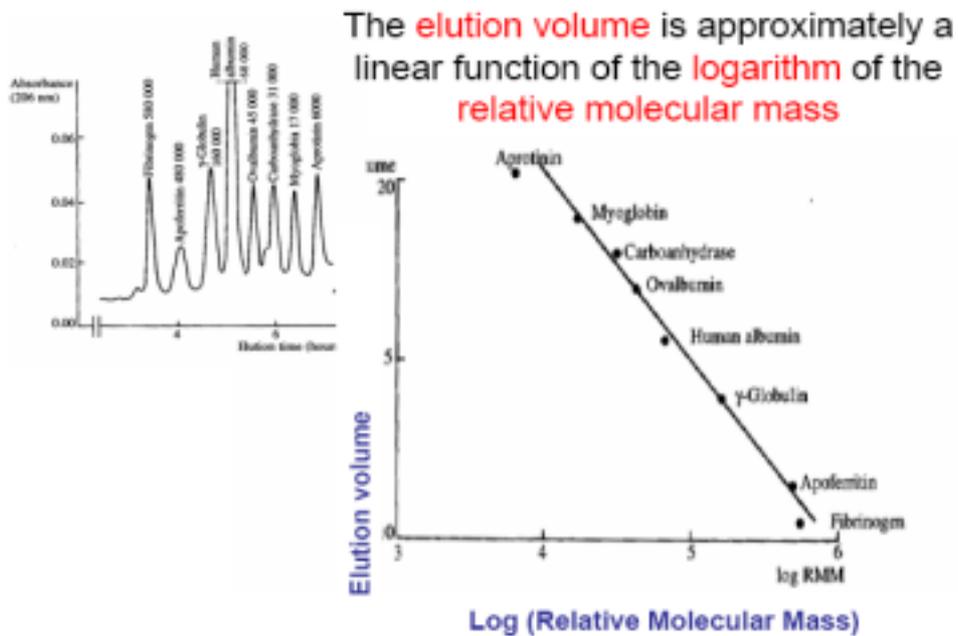
$$\text{HA} (\%) = 5.713 \times \text{Area} \times 10^{-7} + 6.859 \times 10^{-5} \quad R^2=0.999$$

透明質酸含量 (g/L) = (標準曲線上查出的濃度 × 稀釋倍數) / 100

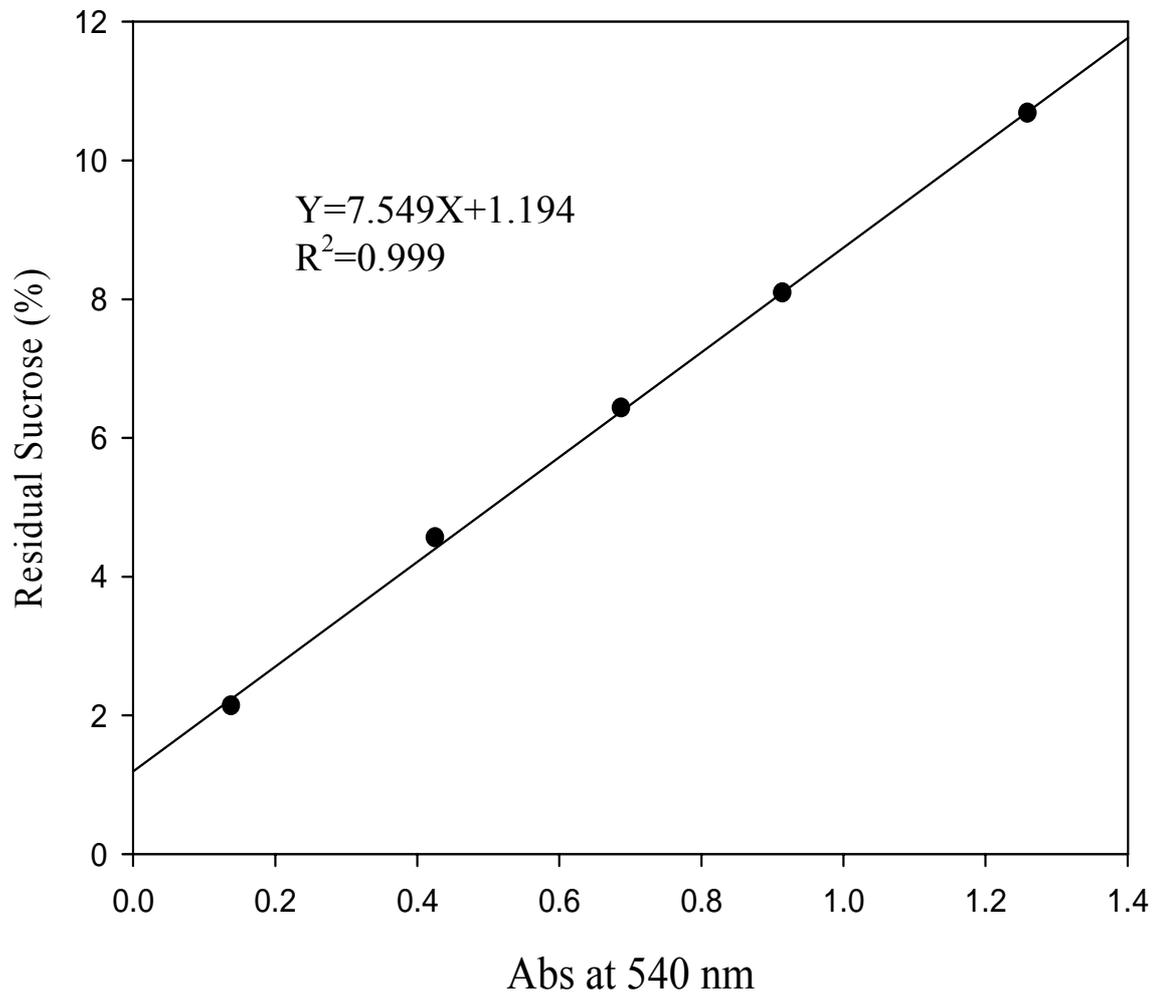


附件- 5 GPC (Gel Permeation Chromatography) Elution time

Determination of Mass

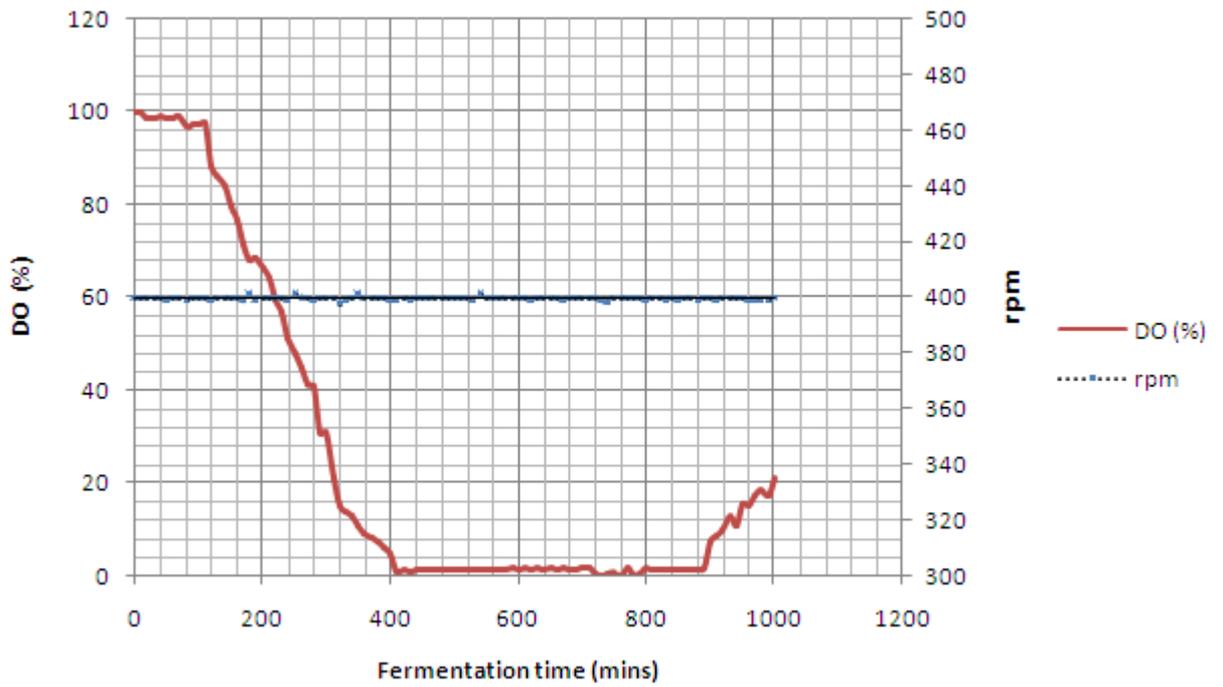


附件- 6 GPC (Gel Permeation Chromatography) Detemination of Mass

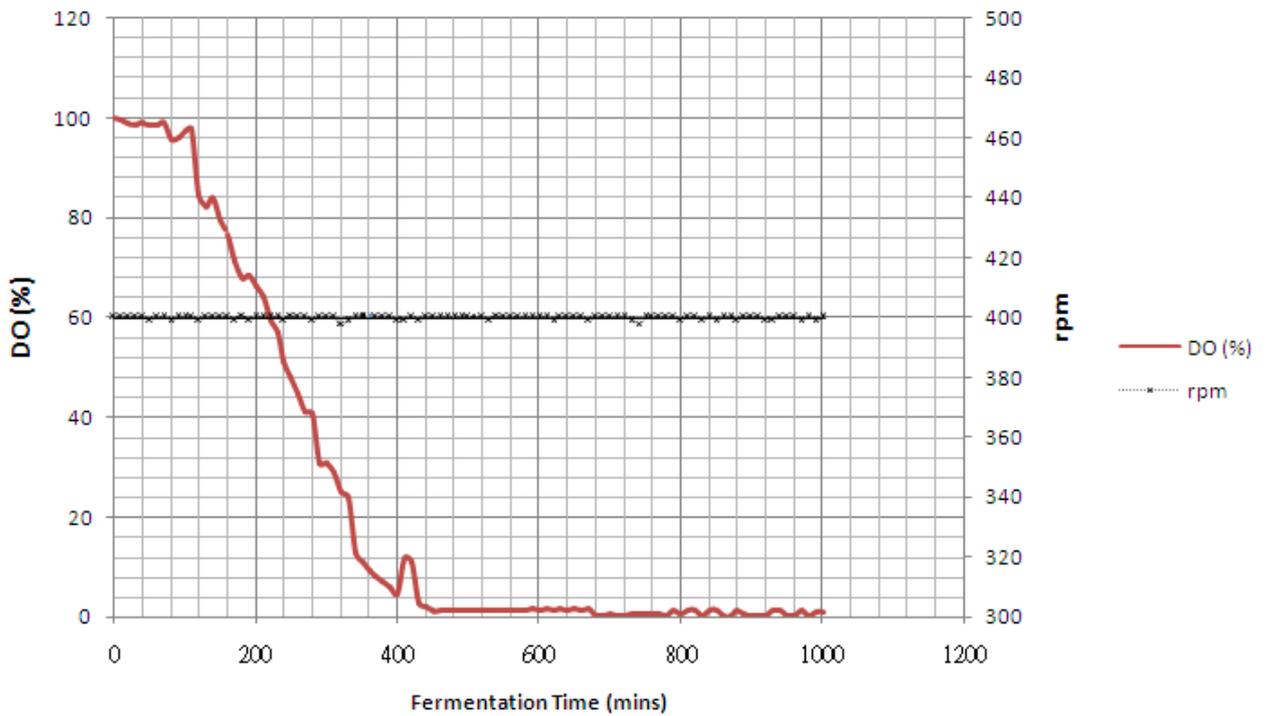


附件- 7 殘糖濃度標準曲線

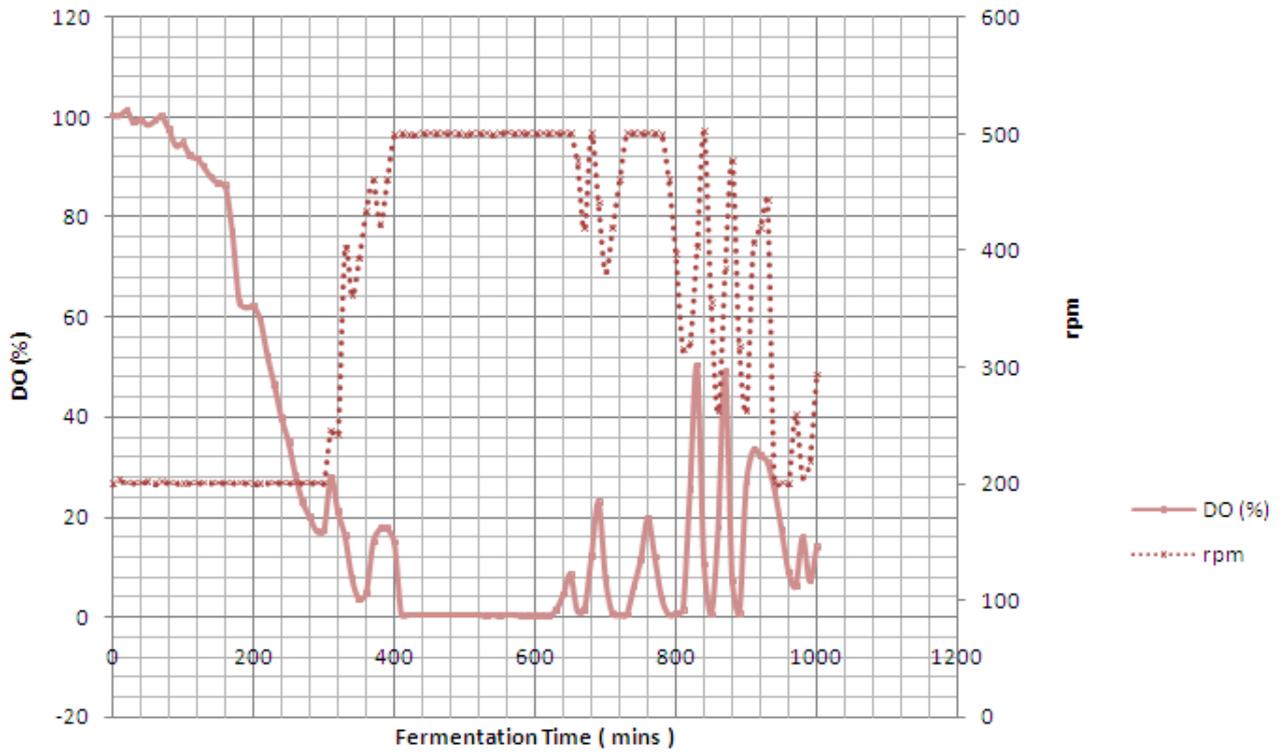
$$\text{Residual Sucrose (\%)} = 7.549 \times \text{Abs}_{540} + 1.194 \quad R^2 = 0.999$$



附件-8 批次 (Batch) 醱酵之 DO(%) ; rpm 記錄圖表



附件-9 饋料 (Fed-Batch) 醱酵之 DO(%) ; rpm 記錄圖表



附件-10 改變攪拌速度(rpm = 200~500)之 DO (%) ; rpm 記錄圖表