

Study of the immobilization of bacillus subtilis natto with sodiualginate and polyvinyl alcohol (PV)

李俊緯、施英隆

E-mail: 343625@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

In the search of the optimal condition for Immobilization of Bacillus subtilis natto by RSM, there factors (mixing time, PVA, concentration and alginate concentration) were investigated. The results showed that the optimal concentration for immobilization was mixing time 2.45 hr, PVA concentration 9.05 g/100 ml and alginate concentration 0.91 g/100 ml. The immobilization cells thus obtained produced 79.14 g/L of Levan when they were cultivated in SM medium for 30hr, in addition, the immobilized beads were kept intact without any damage. In all nitrogen sources (urea, peptone, yeast extract and ammonium sulfate) tested, only the peak of ammonium sulfate was not overlapped with that of Levan in the analysis using gel permeation chromatography. Therefore, are ammonium sulfate was chosen as the only nitrogen source for later investigation. In the production of Levan by batch fermentation, one-factor-at-the-time was used to investigate the optimal condition for Levan production, the result showed that the highest Levan production was 80.63 g/L when ammonium sulfate, sucrose concentration, temperature and pH was 2%, 250 g/L, 37 and 6.5, respectively. Although the immobilized beads Stayed intact without any damage after 5 repeat batch fermentation, however, the Levan production was significantly decreased to 5.49 g/L. In the production of Levan by immobilized cells in continuous fermentation, the highest Levan production (63.81 g/L) was obtained at 30 hr of fermentation, in addition, high Levan production was maintained during 30~76 hr period. The immobilized beads stayed intact without any damage even after 208 hr fermentation continuously. Although the productivity of Levan in continuous fermentation is not as good as it was in batch mode, the advantage in the energy saving, reduction of labor cost and easy automation control has led continuous fermentation to be a better choice for Levan production. This study has provided valuable information for the mass production of Levan in industrial scale.

Keywords : Levan

Table of Contents

頁次	封面	內頁	簽名頁	中文摘要	iii	ABSTRACT	v	致謝	vii	目錄	viii	圖目錄	xiii	表目錄	xvi	第一章	前言	1	第二章	文獻回顧	4																																																																																																																																																																																																					
2.1	Levan的介紹、化學結構特性與合成機制	4	2.1.1	Levan之介紹	4	2.1.1.2	Levan之化學結構特性	5	2.1.1.3	Levan之合成機制	8	2.1.2	Levan之應用	11	2.1.2.1	Levan於農業領域上之應用	11	2.1.2.2	Levan於醫藥領域上之應用	11	2.1.2.3	Levan於食品領域上之應用	12	2.1.2.4	其它	13	2.2	固定化技術	14	2.2.1	固定化技術之介紹	14	2.2.2	固定化技術之應用研究	15	2.2.2.1	固定化技術於食品工業之應用	15	2.2.2.2	固定化技術於廢水處理中之應用	15	2.2.2.3	固定化技術於酒精發酵中之應用	16	2.2.3	固定化方法之分類	17	2.2.4	固定化包埋法之優點	19	2.3	聚乙烯醇-海藻酸鈉之複合材料	21	2.3.1	固定化材料之特性	21	2.3.2	聚乙烯醇(PVA, Poly vinyl alcohol)	22	2.3.3	海藻酸鈉(Sodium Alginate, SA)	23	2.3.4	海藻酸鈉結合聚乙烯醇	24	2.4	回應曲面法 RSM	25	2.4.1	RSM簡介	25	2.4.2	實驗設計原理	28	2.4.3	二水準因子設計(two-level factorial design)	28	2.4.4	陡升路徑法(Method of path of Steepest Ascent)	30	2.4.5	中心混成設計(Central Composite Design)	30	2.4.6	數據統計分析(Regression model analysis)	31	2.5	批次式生物反應器	32	2.5.1	批次式生物反應器之研究	32	2.5.1.1	停滯期(lag phase)	32	2.5.1.2	對數生長期(logarithmic phase)	33	2.5.1.3	穩定期(stationary)	33	2.6	連續式生物反應器	34	2.6.1	連續式生物反應器之介紹	34	第三章	材料與方法	35	3.1	實驗材料及儀器設備	35	3.1.1	實驗藥品	35	3.1.2	實驗儀器	36	3.2	固定化菌株培養	37	3.2.1	菌株來源	37	3.2.2	菌株活化	37	3.2.3	固定化顆粒製作方法	38	3.2.4	Levan生產培養	40	3.3	以回應曲面法探討固定化菌體顆粒最佳製作條件	41	3.3.1	回應曲面法因子設定	41	3.3.2	陡升實驗設計(Method of path of Steepest Ascent)	43	3.3.3	中心混成實驗設計(Central Composite Design)	45	3.3.4	二次回歸分析(Regression model analysis)	48	3.3.5	固定化菌體顆粒強硬度之測定	48	3.4	分析方法	50	3.4.1	醱類分析	50	3.4.2	Levan之分析	52	3.5	批次式生產Levan	54	3.5.1	添加不同氮源於SM培養基以生產Levan之探討	54	3.5.2	氮源濃度對固定化菌體在SM生產Levan之影響	55	3.5.3	蔗糖濃度對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	55	3.5.4	溫度對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	56	3.5.5	pH值對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	56	3.6	連續式生產Levan	57	3.6.1	固定化菌體在SM生產培養基連續式培養生產Levan之情形	59	3.6.2	氮源濃度對固定化菌體生產Levan之影響	60	3.6.3	曝氣對固定化菌體生產Levan之影響	60	3.6.4	pH值對固定化菌體在SM-N生產培養基生產Levan之影響	61	3.6.5	蔗糖濃度對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	61	第四章	結果與討論	62	4.1	回應曲面法(Response surface method, RSM)	62	4.1.1	一階回歸分析結果	62	4.1.2	陡升實驗之結果	65	4.1.3	中心混成之實驗結果	67	4.1.4	中心混成實驗二階回歸分析結果討論	69	4.2	聚乙烯醇-海藻酸鈉固	

定化菌體顆粒強硬度實驗	74
4.3 固定化菌在SM培養基中生產Levan之情形	76
4.4 在批次發酵中添加氮源對Levan生產之影響	80
4.4.1 添加不同氮源對Levan生產之影響	80
4.4.2 硫酸銨濃度對固定化菌在SM生產培養基生產Levan之影響	80
4.4.3 蔗糖濃度對固定化菌在SM-N生產培養基Levan產量之影響	85
4.4.4 溫度對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	88
4.4.5 pH值對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	91
4.5 連續式發酵生產Levan之探討	94
4.5.1 硫酸銨濃度對固定化菌體生產Levan之影響	94
4.5.2 蔗糖濃度對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	97
4.5.3 曝氣量對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	100
4.5.4 pH值對固定化菌體在SM-N生產Levan之影響	103
第五章 結論	106
參考文獻	108
圖目錄 頁次	
圖 1 實驗流程圖	3
圖 2-1 Levan 和 inulin化學結構圖	7
圖 2-2 Levansucrase之酵素合成機制	10
圖 2-3 「一次實驗決定一個因子最適值」之結果	26
圖 3-1 固定化顆粒製作方法	39
圖 3-2 製備完成之聚乙烯醇-海藻酸鈉固定化菌體顆粒	49
圖 3-3 固定化顆粒強度的測定方法	49
圖 3-4 Levan 標準溶液檢量線	51
圖 3-5 各種醣類之HPLC圖	51
圖 3-6 Levan 分子量檢量線	53
圖 3-7 連續式生物反應器運作模式設計圖	58
圖 3-8 連續式生物反應器運作模式實際圖	58
圖 3-9 生物反應器玻璃槽體管柱設計圖及實際圖	59
圖 4-1 PVA濃度與攪拌時間對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	71
圖 4-2 PVA濃度與攪拌時間對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	71
圖 4-3 SA濃度與攪拌時間對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	72
圖 4-4 SA濃度與攪拌時間對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	72
圖 4-5 PVA濃度與SA濃度對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	73
圖 4-6 PVA濃度與SA濃度對菌果聚醣生成量之回應曲面圖	73
圖 4-7 固定化菌於 SM培養基中生產Levan之情形	77
圖 4-8 各種醣類及硫酸銨之GPC圖譜	79
圖 4-9 硫酸銨濃度對Levan產量之影響	82
圖 4-10 不同硫酸銨濃度在第一批次對Levan產量之影響	82
圖 4-11 不同硫酸銨濃度在第三批對Levan產量之影響	83
圖 4-12 以批次式探討不同硫酸銨濃度對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物之分子量分析	84
圖 4-13 蔗糖濃度對Levan產量之影響	86
圖 4-14 不同蔗糖濃度在第一批次對Levan產量之影響	86
圖 4-15 以批次式探討不同蔗糖濃度對固定化菌於第30小時之 SM-N生產培養基中Levan產物之分子量分析	87
圖 4-16 溫度對Levan產量之影響	89
圖 4-17 不同溫度在第一批次對Levan產量之影響	89
圖 4-18 以批次式探討不同溫度對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物之分子量分析	90
圖 4-19 pH值對Levan產量之影響	92
圖 4-20 不同pH值在第一批次對Levan產量之影響	92
圖 4-21 以批次式探討不同pH值對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物之分子量分析	93
圖 4-22 進行208小時連續式生產Levan之顆粒	95
圖 4-23 氮源濃度對固定化菌生產Levan之影響	95
圖 4-24 以連續式探討不同硫酸銨濃度對固定化菌於第30小時之SM生產培養基中Levan產物分子量分析	96
圖 4-25 蔗糖濃度對固定化菌體生產Levan之影響	98
圖 4-26 以連續式探討不同蔗糖濃度對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物分子量分析	99
圖 4-27 不同曝氣量對Levan產量之影響	101
圖 4-28 以連續式探討不同曝氣量對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物分子量分析	102
圖 4-29 不同pH值對Levan產量之影響	104
圖 4-30 以連續式探討不同pH值對固定化菌於第30小時之SM-N生產培養基中Levan產物分子量分析	105
表目錄 頁次	
表2.1 比較不同的固定化方法之原理、材料及特色	18
表2.2 各固定化方法之比較	19
表3-1 培養基組成 (NB)	40
表3-2 Levan生產培養基之組成(SM蔗糖培養基)	40
表3-3 23因子設計表	42
表3-4 23因子設計層階表	43
表3-5 陡升路徑之實驗設計結果	45
表3-6 中心混成實驗設計表	46
表3-7 中心混成實驗層階表	47
表4-1 23因子設計層階表	64
表4-2 23因子設計法之回歸分析表	64
表4-3 23因子設計一階回歸ANOVA分析表	65
表4-4 陡升路徑之實驗設計結果	66
表4-5 中心混成實驗	68
表4-6 中心混成實驗結果之ANOVA分析表	70
表4-7 不同聚乙烯醇-海藻酸鈉固定化菌體顆粒強硬度	75

REFERENCES

- 戴昕, 2007, 微生物固定化技術的研究及其在生物脫氮方面的應用, 南京理工大學, 碩士學位論文。
- 李俊緯、謝雨澄、廖靖華、許嘉文, 2009, 生物滴濾塔結合固定化技術處理異丙醇廢氣之研究, 大葉大學專題製作報告, 彰化。
- 李友榮, 2002, 現代工業發酵調控學, 北京, 化學工業出版社。
- 劉宏斌、劉轉年等, 2002, 固定化微生物在廢水處理中的應用, 環境汙染治理技術及設備 3(5):61-65。
- 林海琳, 2005, 海藻酸鈉超吸水樹酯的製備與性能研究, 廣東工業大學博士學位論文。
- 林啟文、葉啟輝、Quoc-Khanh Dam, 2009, 結合實驗室級透水性反應牆與固定化技術處理受MTBE與BTEX污染之地下水研究, 大葉大學碩士論文, 彰化。
- 郭肖青, 2007, 海藻纖維的製備及結構與性能研究, 青島大學碩士論文。
- 賈樹彪, 陳世忠, 李盛賢等, 固定化酵母在酒精連續發酵中的問題【J】, 黑龍江大學自然科學學報, 2000, 17(1):82。84。
- 秦力, 2006, 固定化微球製備技術及相關性能研究, 重慶大學, 碩士學位論文。
- 謝

平, 1997, , 海藻酸及其鹽的食用和藥用價值, 開封區專學報, 16(4):28~31. 11.許蘇葵、何秀良, 固定化?胞發酵酒精研究的進展【J】 , 微生物學雜誌, 2003, 11(15):61 . 65. 12.趙玉強, 2009, PVA/SA/ST複合凝膠微球的製備及性能研究, 西南交通大學碩士論文. 13.周孝儒, 2010, 以生物反應槽生產果聚糖之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化. 14.張治根, 固定化?胞發酵生產酒精進展【J】 , 工業微生物, 1988, 18(6):19 ~ 24. 15.張宸璋, 2010, 以納豆菌發酵生產凝乳酵素之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化. 16.張生虎, 1999, 結合RSM和田口方法改進產品/過程質量, 天津大學碩士論文. 17.陳立達, 2009, 利用固定化技術生產果糖聚合物之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化. 18.陳功, 2007, 重複利用細胞固定化載體體的研製, 陝西科技大學, 碩士學位論文. 19.陳順宇, 1999, STATISTICA手冊(II):工業統計, pp.6.1-6.58, 華泰書局, 台北市. 20.沈名豪, 2004, 生物合成聚離胺酸之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化. 21.蔡佳汝, 2006, 以固定化菌體顆粒進行甲苯與乙酸乙酯分解及基質抑制效應之研究, 碩士論文, 中華大學土木工程學系. 22.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, 碩士論文, 東海大學食品科學研究所. 23.孫靜, 2003, 固定化技術及其在生物?氮中的應用研究, 南京理工大學碩士論文. 24.游芸悌, 2004, 以納豆菌生產生物性高分子之研究, 大葉大學碩士論文, 彰化. 25.楊志清, 2002, 海藻酸鈉在經?上漿中的應用. 現代紡織技術, 10 (4):21~22. 26.吳建榮, 2006, PVA/SA複合水凝膠粒的製備及藥物緩釋規律的研究, 四川大學碩士論文. 27.王杏文, 2007, 游離及固定化酵母連續發酵制取乙醇, 南京林業大學博士論文. 28. Angela V. Biggs R. Haworth D, Redon K. Ca uptake by heart cells: II. Most entering Ca appears to leave without mixing with the sarcoplasmic reticulum Ca pool, Cell Calcium, Volume 23, Issue 4, April, 1998, Pages 199-205. 29. Atkinson B, Mavittuna F, Immobilized Cell Systems【M】. Biochem Eng&Biotee Handbook, 1991:768. 30. Avigad G. 1965. Levan. In Whistler, R. L. (Ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry. 161-165. Academic Press, New York, London. 31. Avigad G., Levans. 1968. In Encyclopedia of polymer Science and Technology, Microbial Polysaccharides Vol. 8, ed. N. M. Bikales and J. Conrad. John Wiley & Sons, New York. pp. 711-718. 32. Bekers M., Laukevics J., Karsakevich E., Ventina E., Kaminska E., Upite D., V? na I., Linde R., Scherbaka R. 2001. Levan-ethanol biosynthesis using Zymomonas mobilis cells immobilized by attachment and entrapment. Process Biochemistry 36: 979-986. 33. Bielecka, El?bieta B. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization, Original Research Article. Trends in Food Science & Technology, Volume 15, Issues 3-4, March-April 2004, Pages 170-175. 34. Calazans G. , Lima R., Franca F., Lopes C., 2000. Molecular weight and antitumor activity of Zymomonas mobilis levans. International Journal of Biological Macromolecules 27:245-247. 35. Campbell D, Luescher E and Lerman L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1951, 37:575. 36. Chambert R. and Petit G. 1993. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. Carbohydrate Research 244: 129-136. 37. Chambert, Genevieve G, Raymond D, Levansucrase of Bacillus subtilis: Reexamination of some physical and chemical properties, Biochimie, Volume 57, Issue 1, 7 April 1975, Pages 17-28. 38. Clarke M., Roberts E. and Garegg P. 1997. New compounds from microbiological products of sucrose, Carbohydrate Polymer, 34, 425. 39. Dedonder R, (1966), Levansucrase from Bacillus subtilis. Methods Enzymol. 8 , 500-505. 40. Elisashvili, V. I., (1984). Levan synthesis by Bacillus sp. Appl. Biochem. Microbiol. 20, 82-87. 41. Fuchs, A. 1959. On the synthesis and breakdown of levan by bacteria. PhD Thesis. University of Leiden. Holland. 42. Fuchs R., Marc B., 1985, DNA binding and mutation spectra of the carcinogen N-2-aminofluorene in Escherichia coli : A correlation between the conformation of the premutagenic lesion and the mutation specificity, Original Research Article, Journal of Molecular Biology, Volume 183, Issue 3, 5 June 1985, Pages 341-351. 43. Grubhofer N and Schleith L. Naturwissenschaftler, 1958, 40:508. 44. Han Y., 1990. Microbial levan. Advances in Applied Microbiology 35: 171-194. 45. Han Y., and Clarke M., (1990). J. Production and Characterization of Microbial Levan. J. Agric. Food Chem. 38(2), 393-396. 46. Hestrin S. and Avineri-S., 1944. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Biochemical Journal 38: 2-10. 47. Huber A., Stayton P., Viney C., and Kaplan D. (1994). Liquid crystallinity of a biological polysaccharide: the levan/water phase diagram. Macromolecules , 27:953-957. 48. Hattori T., Furusaka J., Biochem J., Tokyo, 48, 1959:831. 49. Kang, K., and Cottrell, I. W. (1979), In " Microbial Technology " (H. J. Pepler and D. Perlmen, eds.) 2nd Ed., Vol. 1, pp. 417-481. Academic Press, New York. 50. Keith J., Wiley B., Ball D., Arcidiacono A., Zorfass D., Mayer J. and Kaplan D., 1991. Continuous culture system for production of biopolymer levan using Erwinia herbicola. Biotechnology and Bioengineering 38: 557-560. 51. Krichevsky P., Keyes., 1969, Considerations in designing a system for developing dental caries models, Biosystems, Volume 3, Issue 2, November 1969, Pages 202-210. 52. Leibovici J., Kopel S., Siegal A. and Gal-Mor O. 1986. Effect of tumor inhibitory and stimulatory doses of levan, alone and in combination with cyclophosphamide, on spleen and lymph nodes. International Journal of Immunopharmacology 8: 391-403. 53. Leibovici J.; Stark Y. 1985. Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. Cellular and Molecular Biology 31:337-341. 54. Lindberg B., Lonngren J. and Thompson J., 1973. Methylation studies on levans. Acta Chemica Scandinavica 27: 1819-1821. 55. Loewenburg J., and Reese E., 1957. Observations on microbial fructosans and fructosanas. Canadian Journal of Microbiology 3: 643-650. 56. Long G., Sprott J., Labelle W., Martin H., Schneider, Thermal events associated with active membrane transport in Escherichia coli , Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 64, Issue 2, 19 May 1975, Pages 656-662. 57. Mayer., Roger E., Alexander., 1996, Continuity of pediatric ambulatory care in a universally insured population : Mustard CA, T, Black C, et al. Pediatrics 98:1028, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Volume 55, Issue 7, July 1997, Pages 783-784. 58. Newburn R., Lacy T., Christie, The morphology and size of the extracellular polysaccharides from oral streptococci , Archives of Oral Biology, Volume 16, Issue 8, August 1971, Pages 863-872, IN5-IN7. 59. Park T., Shin H., Lee Y., Characterization of the cyclodextrin glucanotransferase gene of Bacillus firmus var. alkalophilus and its expression in E. coli. J Microbiol Biotechnol 1999; 9:811 - 9. 60. Pilon S., Michel J., Ebskamp M., Jeuken., Ingrid M., Richard G., Visser, Peter J., Sjeff C., Smeekens , Microbial fructan production in transgenic potato plants and tubers , Industrial Crops and Products, Volume 5, Issue 1, March 1996, Pages 35-46. 61. Rhee S., Chung B., Kim W., Song K., and Kim C., 2000. Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system and protein partitioning method using thereof. Korean Patent. 262769. 62. Rhee S., Song K., Kim C., Park B., Jang E., and Jang

K., 2002. Levan. In: Biopolymers. (Vandamme E. J., De Baets S. and Steinbuchel A., eds.) p. 351-377. Wiley-Vch, KGaA, Weinheim.

63. Tanaka, Ruiko iwa, Shigekazu M., Satoshi mura., Amphomycin inhibits phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase in peptidoglycan synthesis of Bacillus, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 86, Issue 3, 14 February 1979, Pages 902-908.

64. Tanaka K., Hilary Z., 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.

65. Van K., Boels I., Kleerebezem M., 1999. Genetic and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 498-504.

66. Vandamme., Derycke., 1983, Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 5, Issue 6, November 1983, Pages 403-416.

67. Vijn I., And Smeekens S., 1999. Fructan: more than reserve carbohydrate. *Plant Physiology* 120: 351 – 359.

68. Vina I., Karaskevich A., Gonta S., Linde R., Bekers M. 1998. Influence of some physiochemical factors on the viscosity of aqueous levan solution of *Zymomonas mobilis*. *Acta Biotechnologica* 18:167-174.

69. Xu Q., Yajima T., Li W., Saito K., Ohshima Y. and Yoshikai Y. 2006. Levan (α -1, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clinical and Experimental Allergy* 36: 94-101.