

## 海水吳郭魚養殖池中果聚醣生產菌之篩選

黃美瑩<sup>1,2\*</sup> · 陳柏璇<sup>2</sup> · 黃詩涵<sup>1,2</sup> · 林金榮<sup>1</sup> · 潘崇良<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農委會水產試驗所水產養殖組

<sup>2</sup>國立臺灣海洋大學食品科學系

### 摘要

本研究自海水吳郭魚養殖池中篩選出 5 株具有合成果聚醣能力之細菌 (M1、M3、M6、M11 及 T1)，比較其蔗糖之利用率、果聚醣產生量及所產果聚醣之分子量分佈情形。結果顯示，在含有 12% 蔗糖培養液中培養 168 h (28°C) 期間，菌株 M1、M3 及 M6 於 48 h 所產果聚醣即達較穩定的濃度 (20.35 ~ 23.01 mg/mL)，在該時間點此三菌株之蔗糖利用率為 75 ~ 84%。M11 菌株則培養至 96 h 才產出 19.81 mg/mL 果聚醣，蔗糖利用率為 64%。T1 菌株於培養 24 h 時就產生 12.71 mg/mL 的果聚醣，於培養 48 h 累積達 29.15 mg/mL，蔗糖利用率為 92%，之後果聚醣含量持平 (26.78 ~ 31.73 mg/mL)，培養至 120 h 後逐漸下降。有關所產果聚醣之分子量方面，M1、M3、M6、M11 及 T1 等五菌株所產之主要果聚醣 (以 GPC 結果判斷) 平均分子量分別為 10.79、10.78、10.31、1.78 及 14.71 kDa，約為其所產果聚醣的 64.31 ~ 89.30%。各菌株所產出主要果聚醣以酸液熱水解處理後，發現其單糖組成份中均以果糖為主；分析其 <sup>1</sup>H NMR 及 <sup>13</sup>C NMR 圖譜，顯示與文獻上其他論文報告中所述果聚醣的鍵結資料相當接近，因此推斷該 5 株菌所產果糖聚合物為 β(2-6) 鍵結型態的果聚醣。

關鍵詞：篩選、果聚醣產生菌、海水吳郭魚養殖池

### 前言

果聚醣 (levan) 是一種果糖的聚合物 (fructan)，果糖聚合物主要有 2 種，除了果糖之間的鍵結主要為 β(2-6) 的果聚醣外，另一為菊糖 (inulin)，主要為 β(2-1) 鍵結，二者均可能有支鏈，而前者的水溶性高於後者。許多植物組織中有小分子量的果聚醣及菊糖 (分子量通常 < 5000 Da) 存在，此外，已知有多種微生物可以產生果聚醣 (Han, 1989)。果聚醣具有低黏度高水溶性之特性，在食物加工上可作為乳化劑、成型劑、穩定劑、增稠劑及風味攜帶劑等 (Han, 1990; Jang *et al.*, 2001; Leibovici and Stark, 1985)；且可做為血漿填充劑 (分子量為 25 kDa-250 kDa 者) (Han, 1990)。此外，

果聚醣具有抗腫瘤 (黃等, 2010; Calazans *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2004)、降低膽固醇 (Kang *et al.*, 2006; No *et al.*, 2007)、具益菌質 (prebiotic) 功能 (Dal Bello *et al.*, 2001; Korakli *et al.*, 2002; Semjonovs and Zikmanis, 2007) 及提升免疫能力 (Calazans *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2004) 等保健功效。

在水產養殖研究上，果聚醣對於 2 種鯉魚 (common carp, *Cyprinus carpio*; *Labeo rohita*) 稚魚具有免疫調節的效果，飼料中添加 0.5 ~ 1.25% 的果聚醣可提升鯉魚血液中之總紅血球及血紅素含量、增加血清蛋白質及球蛋白含量、提高呼吸爆裂活性及增強溶菌素活性等免疫指數，並且提升對病原菌 *Aeromonas hydrophila* 之抵抗能力 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008)。此外 Gupta *et al.* (2010) 將果聚醣添加 1.0% 及 1.25% 於鯉魚 (*L. rohita*) 稚魚飼料中餵食 60 天 (26°C) 後，魚隻體內熱休克蛋白質 70 (heat shock protein

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw

70) 含量明顯增加，而且魚隻對於較高溫 (35°C) 環境之耐受能力明顯提高；因為熱休克蛋白質 70 可以維持生物體內功能性蛋白質的穩定性 (Das *et al.*, 2006)，也可以刺激體內非特異性防禦機制 (nonspecific defense mechanism) (Gupta *et al.*, 2008)，因此使魚隻耐較高溫之能力增加。

雖然植物組織中有果聚糖存在，但其含量並不高，目前商業生產果聚糖的方法主要係以蔗糖利用微生物進行發酵 (Han, 1990)。目前已知有多種微生物被應用於生產果聚糖，例如 *Acetobacter xylinum*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* 及 *Zymomonas mobilis* 等 (Han, 1990; Hettwer *et al.*, 1995; Keith *et al.*, 1991)，其中尤其以 *Bacillus* sp. 被研究最多，這類微生物均以蔗糖為主要培養基質，利用微生物本身分泌的果聚糖蔗糖酶 [levansucrase (sucrose 6-fructosyltransferase, EC 2. 4. 1. 10)] 作用蔗糖合成果聚糖。

果聚糖蔗糖酶作用蔗糖主要包括三種反應 (Tieking and Gänzle, 2005)：第一種為單純的水解作用，產物為葡萄糖及果糖。第二種為接受者反應 (acceptor - reaction)，該酵素利用將蔗糖水解所產生之能量，把水解後之果糖接到另一個蔗糖的果糖分子上，形成  $\beta(2-1)$  鍵結型態的蔗果三糖 (kestose)，該蔗果三糖被當作接受者，再度接受自蔗糖水解的果糖時，便形成蔗果四糖 (nystose)，當此反應持續進行，便產生大小不同的果寡糖，其副產物為葡萄糖。第三種為聚合反應 (polymerization)，該酵素將蔗糖水解所產生之果糖逐一加到正在增長的果聚糖鏈上之果糖，而形成較大之  $\beta(2-6)$  鍵結型態的果聚糖，此類反應之副產物也是葡萄糖。因此果聚糖蔗糖酶作用蔗糖之主要產物為果聚糖，其他產物包括果寡糖、葡萄糖及少量果糖 (Han, 1990; Tieking and Gänzle, 2005)。

目前大部份果聚糖產生菌主要分離自食品及泥土，由於某些工業加工屬於極端的溫度、鹽度或酸鹼度之環境，而在此環境下也較能避免其他雜菌污染，因此多數研究均朝向尋求生存在乾燥、極端溫度、壓力、鹽度或酸鹼度之微生物，期望它們能在較特殊的環境下也能發揮作用。本研究自海水吳郭魚養殖池 (鹽度為 32) 中篩選具有生產果聚糖之耐鹽性細菌，比較其產生果聚糖之能

力及所產果聚糖之分子量分佈情形，以進一步探討應用於特殊的水產養殖技術及機能性食品之可行性。

## 材料與方法

### 一、產果聚糖細菌之分離、保存與確認

#### (一) 產果聚糖細菌之分離與保存

海水吳郭魚養殖系統之生物濾床樣品 (鹽度為 32 psu, pH 6.63, 水溫 28°C) 經適當稀釋後塗抹在含有 12% 蔗糖之培養基上，該蔗糖之培養基配方係參考 Park *et al.* (2001)，包括酵母萃取物 (yeast extract, 購自 Difco) 5 g，蛋白胨 (peptone, Difco) 5 g，磷酸氫二鉀 ( $K_2HPO_4$ , Sigma) 1 g，硫酸鎂 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Sigma) 0.2 g，氯化鈉 (NaCl, Sigma) 30 g 與洋菜粉 (agar powder, Himedia) 15 g，蔗糖 (Sigma) 120 g (另外滅菌)，溶於蒸餾水 1 L，於培養基滅菌前調整 pH 為 6.5。將生物濾床樣品塗抹於含蔗糖之培養基後，置於  $28 \pm 0.5^\circ C$  恆溫箱中培養 48 h，挑選菌落外觀具有黏稠狀者進行純化培養 3 次，並以 tryptic soy broth 於  $28^\circ C$  培養 48 h 後，取部分菌液添加 15% 甘油 (glycerol) 於  $-80^\circ C$  進行菌種保存，部分菌液則進行離心 ( $10,000 \times g$  20 min) 去除上澄液後，添加 10% 脫脂牛奶進行冷凍乾燥菌種保存。

#### (二) 菌株產果聚糖之確認

##### 1. 還原糖的測定

將純化之菌株培養於含有 12% 蔗糖之液體培養基，於  $28 \pm 0.5^\circ C$  振盪培養 (150 rpm)  $48 \pm 2$  h，取菌液離心  $10,000 \times g$  20 min，依據 Miller (1959) 先以 DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) 溶液確認其上澄液中還原糖的產生，若有還原糖產生者再進一步以高效能液相色層分析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 檢測上澄液中蔗糖、葡萄糖、果糖、果寡糖及果聚糖的含量 (Euzenat *et al.*, 1997)。

##### 2. 蔗糖、葡萄糖、果糖、果寡糖及果聚糖的測定

將測試菌株培養液離心，取上澄液以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後，使用高效能液相色層分析儀檢測上澄液中的不同糖類。本試驗使用高效能液相色層分析儀 (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 搭配 HPLC 管柱 Sugar-Pak™ 1 (6.5  $\times$  300 mm column) 進行分析，並且以折射計 [refractive index (RI) detector; Waters, 2414] 為檢測器來檢測蔗糖、葡萄糖、果糖、果寡醣及果聚醣等。溶媒為 50 mg/L EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)，流速為 0.5 mL/min，管柱維持在 90°C。

蔗糖、葡萄糖及果糖標準品均購自 Sigma。果寡醣主要分析蔗果三糖 (kestose)，標準品購自 Fluka。果聚醣標準品來自 *Erwinia herbicola* (Sigma)。有關各醣類之定量方面，先以各標準醣類配製 1 ~ 10 mg/mL 的不同濃度標準液，以 HPLC 分析後，確定各標準醣類之特殊波峰位置，並計算出各標準醣類濃度對波峰面積之標準曲線，再將樣品中各特殊波峰滯留時間上的面積帶入標準曲線換算各醣類之濃度。

## 二、比較篩選出的果聚醣產生菌株培養在含蔗糖的培養基之生長情形及培養液中各種糖類之變化

純化菌株先於含有 12% 蔗糖培養液中活化 48  $\pm$  2 h (28  $\pm$  0.5°C) 後，使用簡易分光光度計 (WPA CO75, Linton Cambridge, UK) 於 600 nm 測定濁度，再以無菌生理食鹽水調整濁度至 0.3，再加入 1% 於蔗糖培養液中，於 28  $\pm$  0.5°C 培養 168 h，培養期間定時採樣，測定菌株生長情形及培養液中各種醣類之變化。

### (一) 果聚醣產生菌株培養在含蔗糖的培養基之生長情形

將定時採樣之細菌培養液利用上述簡易分光光度計測定濁度，以評估細菌生長情形。

### (二) 果聚醣產生菌株培養在含蔗糖的培養基中各種醣類之變化

將定時採樣之細菌培養液於 10,000  $\times$  g 離心 20 min 後，進行蔗糖、葡萄糖、果糖、果寡醣及果聚醣的測定。

## 1. 蔗糖、葡萄糖、果糖及果寡醣的測定

採用上述高效能液相色層分析儀之檢測方法。

## 2. 果聚醣含量分析

將細菌培養液離心後，加入 3 倍的冷乙醇，於 4°C 放置隔夜後，以 10,000  $\times$  g 離心 30 min，沉澱物為果聚醣，再以蒸餾水溶解後重複乙醇沉澱及水洗步驟共 3 次，得到純化之果聚醣，進行凍結乾燥後稱重 (Shih *et al.*, 2005)。

## 三、分析果聚醣生產菌株所產果聚醣的平均分子量

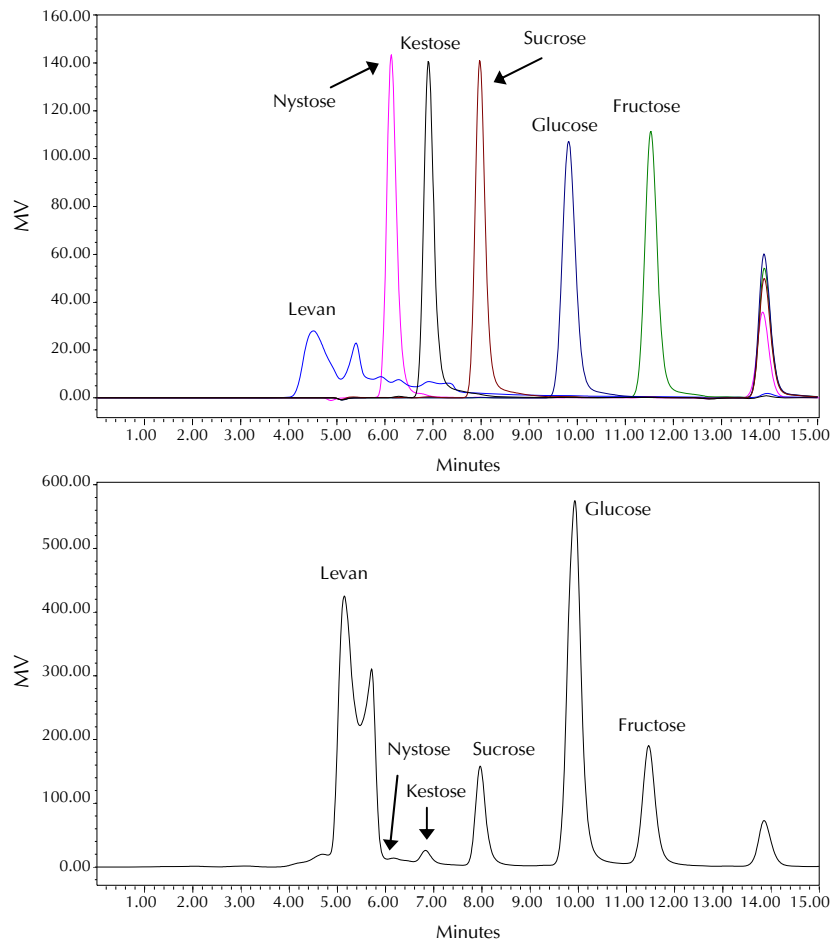
篩選出的果聚醣產生菌株培養在含有 12% 蔗糖之培養液，於 28  $\pm$  0.5°C 培養 48 h，將測試菌株培養液於 10,000  $\times$  g 離心 20 min，取澄清液以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後，使用膠體過濾層析 (gel permeation chromatography, GPC) 分析果聚醣產物的平均分子量，並評估其組成比率。本試驗以高效能液相色層分析儀 (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 搭配膠體過濾層析管柱 - Ultrahydrogel TM 125 (7.8  $\times$  300 mm column) 及 Ultrahydrogel TM 250 (7.8  $\times$  300 mm column)，並以折射計 (Waters, 2414) 為檢測器。使用 dextran 標準品 (分子量為 5.2 K、11.6 K、23.8 K、48.6 K、148 K、273 K、410 K 及 668 K, Polymer Standards Service-USA, Inc.) 建立標準曲線，溶媒為去離子水，流速為 1.0 mL/min，管柱維持在 80°C。

## 四、果聚醣單醣組成之分析

依果聚醣含量分析方法純化之果聚醣，利用酸及加熱處理以水解聚醣後分析單糖組成，果聚醣樣品加入 15% Perchloric acid (70%) 於 80°C 加熱 1 h 進行水解，水解液再以 5 M KOH 中和，於 10,000  $\times$  g 離心 40 min，取上澄液以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後，以上述 HPLC 方法分析反應產物 (Tiekling *et al.*, 2003)。

## 五、果聚醣 NMR 光譜分析

將果聚醣以乙醇沉澱，再以蒸餾水溶解，重



**Fig. 2** Chromatogram of standard fructooligosaccharides and levan (up), and levan produced by strain T1 (low), after 48 h of incubation (28°C) on medium containing 12% sucrose. Column, Sugar-Pak™ 1; temperature, 90°C; eluent, 50 mg/L EDTA; flow rate, 0.5 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.

複 5 次後，得到更精純之果聚糖，經凍結乾燥後以 D<sub>2</sub>O 溶液充份溶解後，於國立清華大學貴重儀器使用中心，以 Varian Unity Inova 600 spectrometer 進行 <sup>1</sup>H NMR 及 <sup>13</sup>C NMR 圖譜分析。

## 結果與討論

### 一、自海水魚池中分離篩選果聚糖生產菌

海水吳郭魚養殖系統之生物濾床樣品經適當稀釋後，在含有 12% 蔗糖之固體培養基中篩選到 5 個菌落之外觀具有黏稠狀特性 (Fig. 1)，推測其具有產生胞外多醣的能力，經進一步將該 5 株菌 (M1、M3、M6、M11 及 T1) 以蔗糖培養液進行測試發現，其培養液中均有還原醣產生，以 HPLC 分析其上澄液發現，均有果寡糖及果聚糖存在 (Fig. 2)。同時，也發現葡萄糖累積量高於果糖的

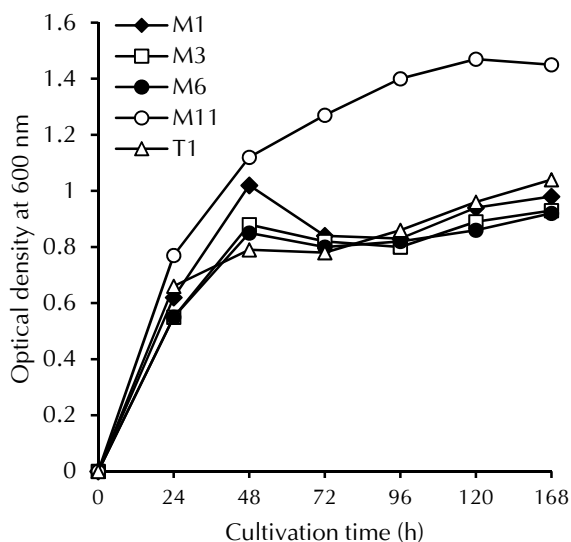
情形，此現象推測為菌株所產果聚糖蔗糖酶作用蔗糖之結果，該酵素除了水解蔗糖產生葡萄糖和果糖外，會將果糖轉移到另一蔗糖、果寡糖或正在增長的果聚糖鏈上之果糖，放出葡萄糖，導致培養液中葡萄糖含量高於果糖之現象 (Han, 1990)。



**Fig. 1** Colony of strain T1 grown on medium with 12% (W/W) sucrose showed mucoid appearance.

## 二、比較篩選出的果聚醣生產菌株在含蔗糖的培養液中之生長情形

為了比較自海水魚池中篩選出的 5 株菌株在蔗糖培養液中生長狀況，將它們在含有 12% 蔗糖培養液中培養 168 h (28°C)。結果顯示，菌株 M1、M3、M6 及 T1 均在培養 24 h 達到對數生長期，濁度為 0.55 ~ 0.66 (OD<sub>600 nm</sub>)，培養 48 h 後進入穩定期，濁度為 0.79 ~ 1.02 (Fig. 3)。菌株 M11 的成長較其它菌株佳，培養 120 h 後的濁度為 1.47，可見該 5 株菌株在含有 12% 蔗糖培養液中成長良好。



**Fig. 3** Growth curves of strains M1, M3, M6, M11, and T1 in the media of sucrose with initial concentration 12%, temperature 28°C, initial pH 6.5, shaking rate 150 rpm.

## 三、比較篩選出的果聚醣生產菌株在含蔗糖的培養液中不同糖類變化情形

### (一) 蔗糖、葡萄糖與果糖含量之變化

菌株 M1、M3 及 M6 在含有 12% 蔗糖培養液中培養 24 h，培養液中蔗糖剩下 81.34 ~ 92.66 mg/mL (Fig. 4)，以培養液中原來蔗糖含量扣除所剩餘之蔗糖量，推估為該菌株的蔗糖利用量，並與原來蔗糖含量相比較，估算為蔗糖利用率 (%)，因此推算出菌株 M1、M3 及 M6 培養 24 h 對蔗糖利用率為 23 ~ 32%，此階段菌株處於對數

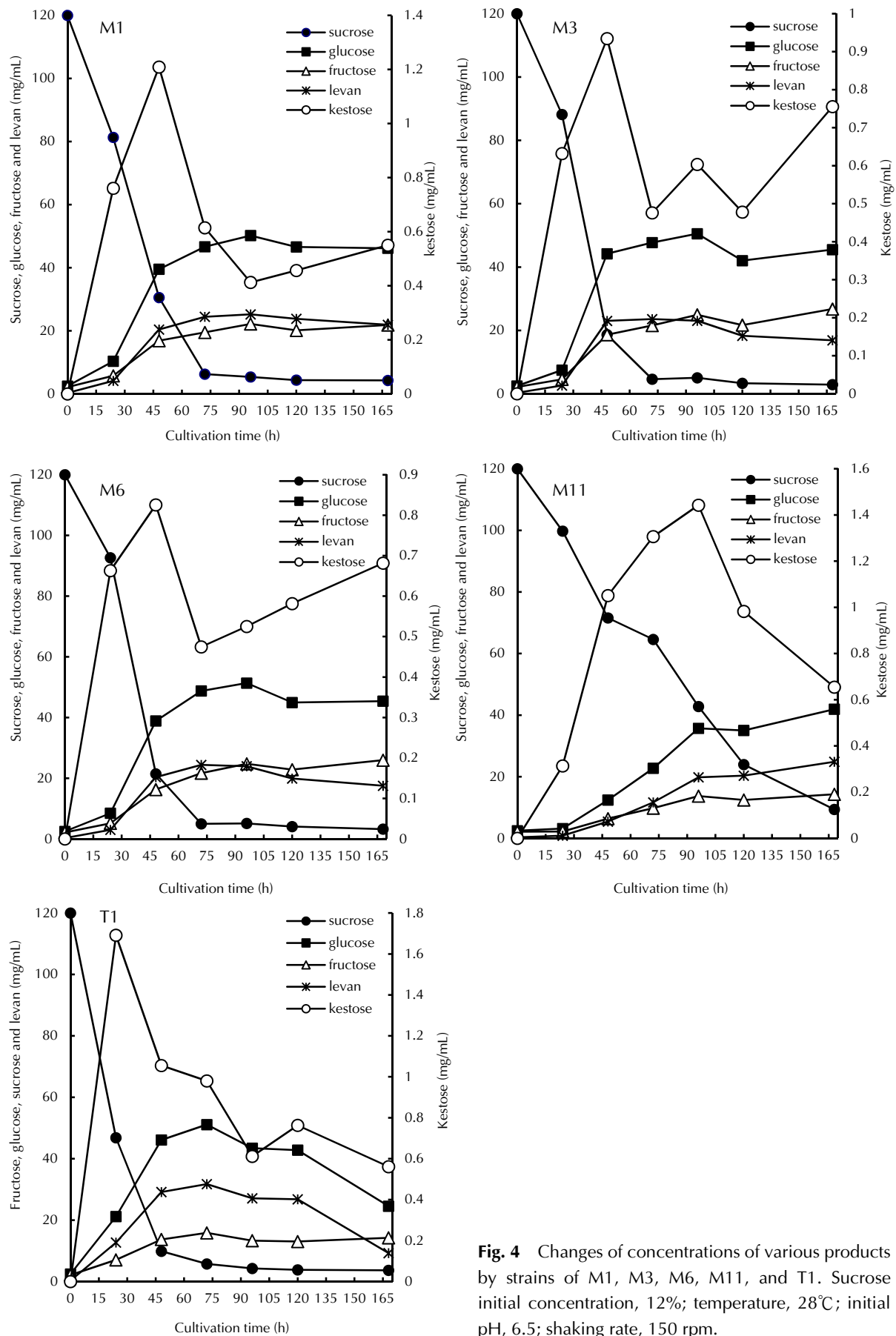
生長期，培養 48 h 後其蔗糖利用率上升為 75 ~ 84%，此時細菌進入穩定期，培養 72 h 後，培養液中蔗糖殘餘 4.61 ~ 56.26 mg/mL，利用率達 95% 以上，之後持續到 168 h。有關葡萄糖含量方面，菌株 M1、M3 及 M6 培養液中葡萄糖含量在培養 24 h 後只有 7.47 ~ 10.35 mg/mL，此時期蔗糖之利用率為 23 ~ 32%，培養 48 h 後其利用率上升為 75 ~ 84% 時，葡萄糖迅速增多 (38.88 ~ 44.22 mg/mL)，培養 96 h 後達較高量 (50.21 ~ 51.35 mg/mL)，之後稍下降，而果糖的產生趨勢類似葡萄糖，但含量明顯較少，於 48 h 達到穩定量 (16.26 ~ 18.65 mg/mL)，也在 96 h 達較高量 (22.19 ~ 24.94 mg/mL)，隨後持平。

菌株 M11 作用蔗糖之速度較為緩慢，雖然該菌之成長較其它菌株為佳。培養 48 h 後，其利用率只達 40%；96 h 後，其蔗糖之利用率為 64%，120 h 後才達到 80%。該菌於培養 96 h 之後，逐漸產生較大量之葡萄糖 (35.71 mg/mL) 與果糖 (13.70 mg/mL)；培養 168 h 之後，才累積達 41.92 mg/mL 的葡萄糖及 14.30 mg/mL 的果糖。

T1 菌株培養 24 h 後就達到 61% 的蔗糖之利用率，其蔗糖量在培養 48 h 後就降至 9.86 mg/mL，利用率為 92%，後持平。該菌於培養 24 h 後產生 21.17 mg/mL 的葡萄糖，此時期蔗糖之利用率為 61%，於培養 48 h 後蔗糖之利用率達 92% 時，葡萄糖 (46.10 mg/mL) 與果糖 (13.72 mg/mL) 形成量達穩定值，在培養 72 h 後分別產生較大量的葡萄糖 (51.10 mg/mL) 及果糖 (15.85 mg/mL)，隨後葡萄糖稍降而果糖持平到實驗結束 (168 h)。

比較以上 5 株菌，以 T1 菌株較能快速利用蔗糖。該 5 菌株的培養液中蔗糖被作用後，殘存在其中的葡萄糖最高量時約為被作用蔗糖的 89%，推測此部份係果聚醣蔗糖酶作用蔗糖後放出，其餘葡萄糖 (約 11%) 可能為菌株用於生物體能量代謝。

葡萄糖與果糖相差的量主要為菌株所產果聚醣蔗糖酶作用蔗糖產生果寡醣及果聚醣的成份，因此其差值反應出果寡醣及果聚醣的含量 (Ozimek *et al.*, 2006)。菌株 M1、M3 及 M6 葡萄糖與果糖差值在培養 24 h 後為 2.91 ~ 4.60 mg/mL，培養 48 h 後增加為 22.61 ~ 25.56 mg/mL，培養 72 h 後為 18.76 ~ 28.02 mg/mL。菌株 M11 其葡萄糖與



**Fig. 4** Changes of concentrations of various products by strains of M1, M3, M6, M11, and T1. Sucrose initial concentration, 12%; temperature, 28°C; initial pH, 6.5; shaking rate, 150 rpm.

果糖差值在培養 24 h 只有 0.95 mg/mL，隨後逐漸緩慢增加，在培養 168 h 才達 27.62 mg/mL；而 T1 菌株其葡萄糖與果糖兩者之間的差值於培養 24 h 就達 14.12 mg/mL，培養 48 h 後增加為 32.39 mg/mL，在培養 72 h 達 35.26 mg/mL，持平後稍下降。由以上資料推測，菌株 M1、M3、M6 及 T1 在培養 48 h 後果寡醣及果聚醣的含量大增，又，T1 菌株其葡萄糖與果糖差值較其他菌大，因此推測其形成之果寡醣及果聚醣的含量高於其他菌株。

*B. subtilis* NCIMB 11872 培養在含 2% 蔗糖培養液中 6 h (37°C) 後，其蔗糖剩下約 4.8 mg/mL (約為原蔗糖之 24%，利用率約 76%)，同時葡萄糖 (5 mg/mL) 與果糖 (7.5 mg/mL) 累積，培養 8 h 後蔗糖已接近檢測不出，此時葡萄糖稍降而果糖持平，此葡萄糖低於果糖之原因可能是該菌將葡萄糖氧化為葡萄糖酸 (gluconic acid) 所致，因為在培養 6 h 後，於培養液中出现 1.4 mg/mL 的葡萄糖酸；而果聚醣蔗糖酶於培養 7 h 後有較高的活性 (Gorrec *et al.*, 2002)。 *B. licheniformis* ATCC 9945 在含 5% 蔗糖培養液中 30 h (30°C) 後，其蔗糖降為約 5 mg/mL (約為原蔗糖之 10%，利用率約 90%)，此時菌處於穩定期後的衰老期 (Ghaly *et al.*, 2007)。 Belghith *et al.* (1996) 將轉殖具有 *Z. mobilis* 果聚醣蔗糖酶的基因 (*levU*) 之 *E. coli* 在含 20% 蔗糖培養液中培養 40 h (0°C) 後，蔗糖剩下約 20 mg/mL (約為原蔗糖之 10%，利用率約 90%)，同時有大量葡萄糖 (約 90 mg/mL) 與較少量果糖 (約 20 mg/mL) 累積。本試驗所分離之菌株除了 M11 對於蔗糖之利用率較差外，M1、M3、M6 及 T1 在培養 48 h 後對於蔗糖之利用率達 75 ~ 92%，其中 T1 菌株 (92%) 稍高於上述高蔗糖利用率者。

## (二) 果寡醣-蔗果三糖產生之情形

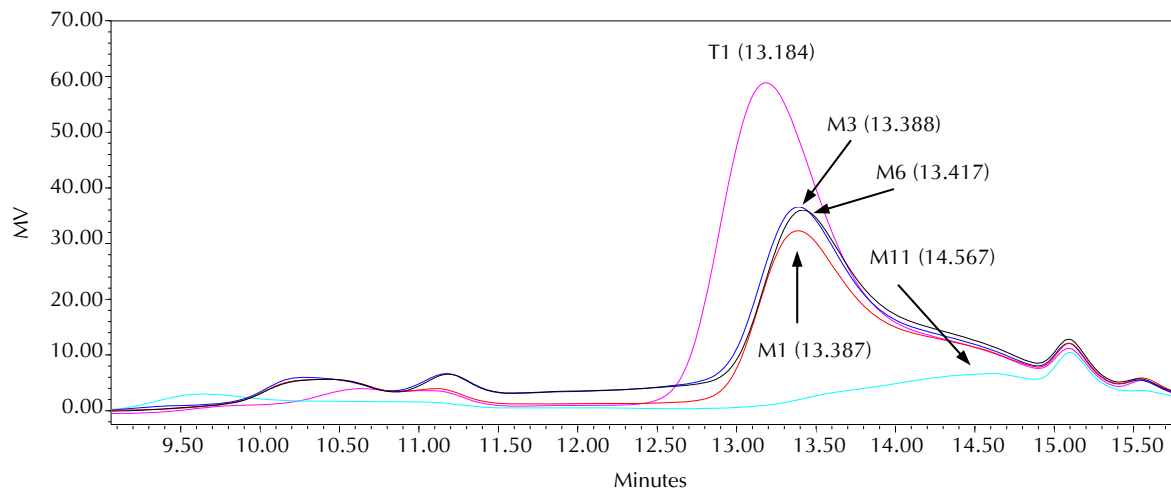
該 5 株菌在含有 12% 蔗糖之培養液中培養 168 h (28°C) 期間，以 HPLC 分析果寡醣中的蔗果三糖產量，結果發現 M1、M3 及 M6 菌株均在培養 48 h 時達到較高量 (Fig. 4)，分別為 1.21 mg/mL、0.93 mg/mL 及 0.83 mg/mL，之後下降為 0.41 ~ 0.76 mg/mL，M11 菌株在培養 48 h 之後達 1.05 mg/mL，之後持續上升到 1.44 mg/mL

(96 h)，隨後緩慢下降至 0.65 mg/mL，T1 菌株則在培養 24 h 時迅速累積到 1.69 mg/mL，之後逐漸降到 0.56 mg/mL (168 h)。以上資料顯示，該 5 菌株所產蔗果三糖含量均不高。

## (三) 果聚醣產生之情形

將 5 菌株的蔗糖培養液進行 HPLC 分析，並以 50 mg/L EDTA 進行流洗，由實驗結果發現，在流洗 5.0 ~ 6.0 min 處有果聚醣波峰，但由於培養基中的鹽類在該時間點也有波峰出現，因此無法直接估算果聚醣之濃度，改採用以乙醇沉澱、水洗及凍結乾燥後稱重之方法。結果顯示，菌株 M1、M3 及 M6 在培養初期幾乎檢測不到果聚醣，在培養 24 h 後產生 2.61 ~ 4.14 mg/mL (Fig. 4)，於培養 48 h 後達較穩定的量 (20.35 ~ 23.01 mg/mL)，此時間點蔗糖之利用率為 75 ~ 84%，於 72 h 後果聚醣稍上升後持平 (最高達 25.22 mg/mL)。M11 菌株在培養 24 h 時只有少量果聚醣 (0.85 mg/mL) 生成，48 h 才增加為 5.43 mg/mL，後持續緩慢上升到 96 h (19.81 mg/mL)，之後持平，在培養 168 h 時達到較高量，但只有 24.85 mg/mL。而 T1 菌株於 24 h 時就產生 12.71 mg/mL 的果聚醣，於培養 48 h 大量累積達 29.15 mg/mL，在培養 72 h 後其果聚醣含量為 31.73 mg/mL，於培養 120 h 後逐漸下降到 9.26 mg/mL (168 h)。

細菌之生長與果聚醣產生的關係因菌而異，*B. polymyxa* 在細菌生長進入穩定期的中間時段才開始大量產生果聚醣 (Han and Clarke, 1990)。*B. subtilis* (natto) Takahashi 與 *B. licheniformis* ATCC 9945 在細菌培養過程中其果聚醣在成長穩定期開始時大量合成 (Shih *et al.*, 2005; Ghaly *et al.*, 2007)，期間果聚醣含量並無太大變化。好鹽菌 *Halomonas* sp. 也在細菌生長穩定期前期有較高的果聚醣產生量 (Poli *et al.*, 2009)。*Pseudomonas caryophylli* 的果聚醣之生物合成在生長穩定期達較高量，但該細菌也會產生果聚醣酶 (levanase)，導致一段時間後果聚醣水解，果聚醣產量下降 (Elisashvili, 1984)。本試驗之菌株 M1、M3、M6、T1 及 M11 其果聚醣也是在細菌生長進入穩定期 (48 h 及 96 h) 有較大的累積量，之後持平，但在 120 h 後，前 4 株菌其果聚醣含量有下降的趨勢，尤其以 T1 菌株較為明



**Fig. 5** GPC chromatogram of levan produced by strains M1, M3, M6, M11, and T1 after incubation at 28°C for 48 h on medium containing 12% sucrose. Column, Ultrahydrogel series (250 and 125) columns (7.8 × 300 mm); temperature, 80°C; eluent, deionized water; flow rate, 1.0 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.

顯，推測可能為果聚醣蔗糖酶造成果聚醣水解 (Euzenat *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998)，或者該菌也會產生果聚醣酶，致使果聚醣降解。

M1、M3、M6 及 M11 菌株蔗果三糖含量較高時，也是果聚醣大量產生的時間點 (48 h 及 96 h)，而 T1 菌株則是蔗果三糖先形成後 (24 h) 才大量累積果聚醣 (48 h)；由果聚醣及蔗果三糖含量相差近 30 倍之狀況而言，該 5 菌株作用蔗糖之主要產物為果聚醣。

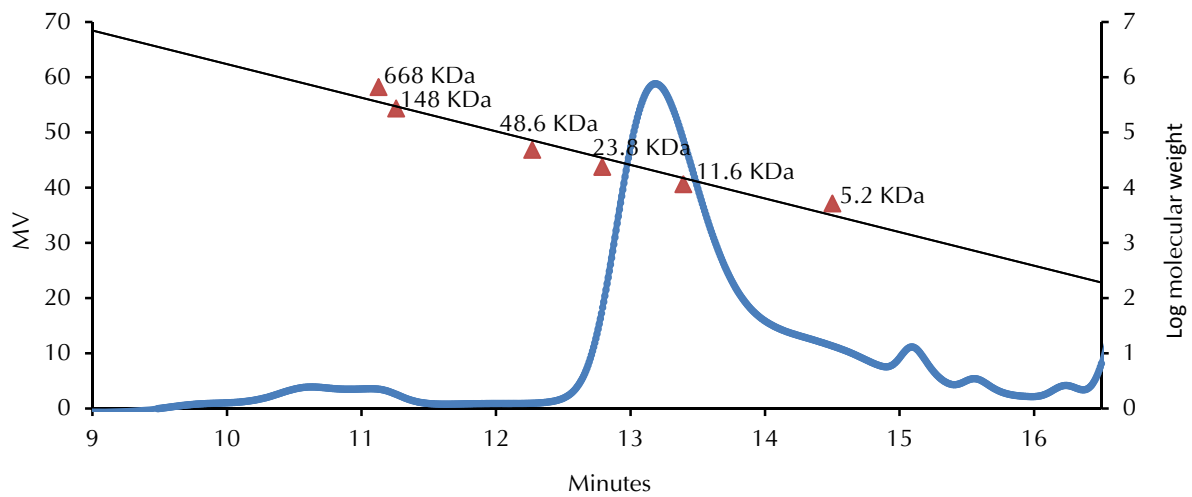
目前文獻上顯示細菌較高果聚醣之產量如下：Shih *et al.* (2005) 將 *B. subtilis* 培養在含 20% 蔗糖培養液中 21 h (37°C) 後，果聚醣產生量為 50 ~ 60 mg/mL (約為可利用蔗糖之 20 ~ 25%)；*B. polymyxa* 以含有 15% 蔗糖之培養液中培養 10 天 (30°C) 後，產生 36 mg/mL 果聚醣 (約為可利用蔗糖之 24%) (Han and Clarke, 1990)；Ghaly *et al.* (2007) 指出，*B. licheniformis* ATCC 9945 在含 5% 蔗糖培養液中培養 24 h (30°C) 後，約可以產生 18 mg/mL 的果聚醣 (約為可利用蔗糖之 36%)。*Z. mobilis* 在含 20% 蔗糖培養液中培養 29 天 (7°C)，產生果聚醣 41 mg/mL (約為可利用蔗糖之 21%) (Muro *et al.*, 2000)；Keith *et al.* (1991) 培養 *E. herbicola* 於含有 5% 蔗糖培養液 72 h (25°C) 後，產生 15 mg/mL 之果聚醣 (約為可利用蔗糖之 30%)。Belghith *et al.* (1996) 將轉殖具有 *Z. mobilis* 果聚醣蔗糖酶的基因之 *E. coli* 在含 20% 蔗糖培養液中培養 40 h (0°C) 後，果聚醣形

成量約為 50 mg/mL (約為可利用蔗糖之 25%)。而本試驗所分離之菌株 M1、M3、M6、M11 及 T1，以含 12% 蔗糖培養液培養期間，果聚醣產量較高者分別為 25 mg/mL (48 h)、24 mg/mL (48 h)、24 mg/mL (48 h)、25 mg/mL (168 h) 及 32 mg/mL (72 h)，約為可利用蔗糖之 20 ~ 26%，其利用蔗糖合成果聚醣之成效與文獻上較高果聚醣產量之菌株接近，尤其是 T1 菌株在培養 48 h 後就產生將近 30 mg/mL 的果聚醣 (約為可利用蔗糖之 25%)，值得進一步探討其較佳的果聚醣產生條件，以利將來應用。

#### 四、比較篩選出的果聚醣產生菌所產果聚醣分子量大小

由於果聚醣之分子量大小影響其應用功能，因此比較該 5 株菌所產果聚醣之大小，將它們在含有 12% 蔗糖培養液中培養 48 h (28°C) 後取出樣品，以 GPC 分析其果聚醣平均分子量，並以 dextran 標準品進行估算。結果顯示，該 5 株菌所產果聚醣在 GPC 上各約有 2 ~ 4 個不同分子量大小的波峰 (Fig. 5)，其中各菌株均以出現在流洗 12.7 ~ 15.0 min 之間者為最多數，以 dextran 標準品進行估算後發現 (Fig. 6)，菌株 M1 約產 3 種不同大小之果聚醣，其平均分子量及其百分比分別為 1067.98 KDa (13.19%)、352.31 KDa (8.24%) 及 10.79 KDa (78.57%) (Table 1)；M3 菌株所產之果聚



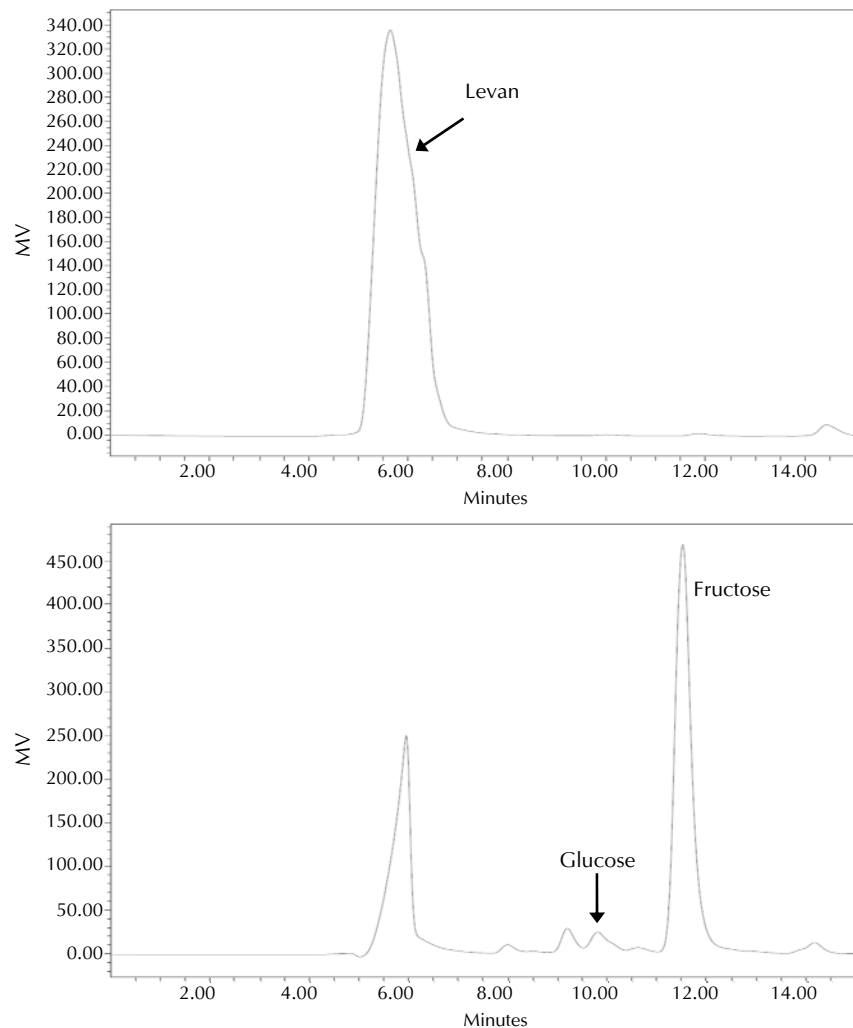


**Fig. 6** GPC chromatogram of levan produced by strain T1 after incubation at 28°C for 48 h on medium containing 12% sucrose. Dextran standards (molecular weight, 5.2, 11.6, 23.8, 48.6, 148, and 668 KDa) were used to construct a calibration curve. Column, Ultrahydrogel series (250 and 125) columns (7.8 × 300 mm); temperature, 80°C; eluent, deionized water; flow rate, 1.0 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.

**Table 1** Comparison of the molecular weight of levans produced by strains M1, M3, M6, M11, and T1 after 48 h incubation at 28°C on media with 12% (W/W) sucrose

Strain	Elution time* (min)	Log molecular weight	Molecular weight (KDa)	Percentage (%)
<b>M1</b>				
Peak 1	10.38	6.03	1067.98	13.19
Peak 2	11.10	5.50	352.31	8.24
Peak 3	13.39	4.03	10.79	78.57
<b>M3</b>				
Peak 1	10.26	6.11	1276.66	10.89
Peak 2	11.17	5.50	317.60	10.81
Peak 3	13.39	4.03	10.78	78.30
<b>M6</b>				
Peak 1	10.39	6.04	1096.04	10.83
Peak 2	11.19	5.49	309.94	11.45
Peak 3	13.42	4.01	10.31	77.72
<b>M11</b>				
Peak 1	9.66	6.50	3188.42	22.73
Peak 2	11.03	5.59	391.42	12.13
Peak 3	12.18	4.83	67.73	0.83
Peak 4	14.57	3.25	1.78	64.31
<b>T1</b>				
Peak 1	10.63	5.86	724.92	5.78
Peak 2	11.09	5.55	357.73	4.93
Peak 3	13.18	4.17	14.71	89.30

\*GPC chromatogram. Column, Ultrahydrogel series (250 and 125) columns (7.8 × 300 mm); temperature, 80°C; eluent, deionized water; flow rate, 1.0 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.



**Fig. 7** HPLC of levan by strain T1 (up) and its hydrolytic products (low). Levan was hydrolyzed with 15% of perchloric acid (70%) at 80°C for 1 h. The hydrolysates were neutralized with 5 M KOH.

醣為 1276.66 KDa (10.89%)、317.60 KDa (10.81%) 及 10.78 KDa (78.30%) 等共約 3 種；而菌株 M6 也產生約 3 種果聚醣，其平均分子量大小及其百分比分別為 1096.04 KDa (10.83%)、309.94 KDa (11.45%) 及 10.31 KDa (77.72%)；M11 菌株則產生分別為 3188.42 KDa (22.73%)、391.42 KDa (12.13%)、67.73 KDa (0.83%) 及 1.78 KDa (64.31%) 等共約 4 種不同大小之果聚醣；而菌株 T1 所產果聚醣約 3 種，其平均分子量及其百分比則分別為 724.92 KDa (5.78%)、357.73 KDa (4.93%) 及 14.71 KDa (89.30%)。由以上結果顯示，菌株 M1、M3、M6、M11 及 T1 所產之主要果聚醣平均分子量分別為 10.79、10.78、10.31、1.78 及 14.71 KDa，約各佔其所產果聚醣的 64.31~89.30% (Table 1)。

不同菌株所產果聚醣之分子量有差異，而且其培養狀況也影響其分子量大小；*B. polymyxa* 於含有 15% 蔗糖之培養液中培養 10 天 (30°C)

後，主要產生 2000 KDa 之果聚醣 (Han and Clarke, 1990)。好鹽菌 *Halomonas* sp. 於含 5% 蔗糖培養液中 96 h (39°C) 後，其果聚醣以 1000 KDa 為主 (Poli *et al.*, 2009)。*B. licheniformis* 8-37-0-1 生長在含 10% 蔗糖培養液中 48 h (30°C) 後，主要產生 28 KDa 之果聚醣 (Liu *et al.*, 2010)。即使相同菌種，若為不同菌株，其所產果聚醣之分子量亦有差異，*B. subtilis* NCIMB 11872 在含 20% 蔗糖培養液中培養 7 h (37°C) 後，其果聚醣主要為 70 KDa 者，而另一株菌 *B. subtilis* NCIMB 11871 則產生 21 KDa 及 900 Da 的果聚醣 (Gorrec *et al.*, 2002)。Shih and Yu (2005) 將 *B. subtilis* (natto) Takahashi 以含 20% 蔗糖培養液培養 21 h (37°C) 後，產生 2 種主要的果聚醣 (1794 KDa 及 11 KDa)；Euzenat *et al.* (1997) 以 *B. subtilis* C4 培養在含 36% 蔗糖培養液中 8 h (37°C) 後，產生 2 類主要的果聚醣 (>10000 KDa

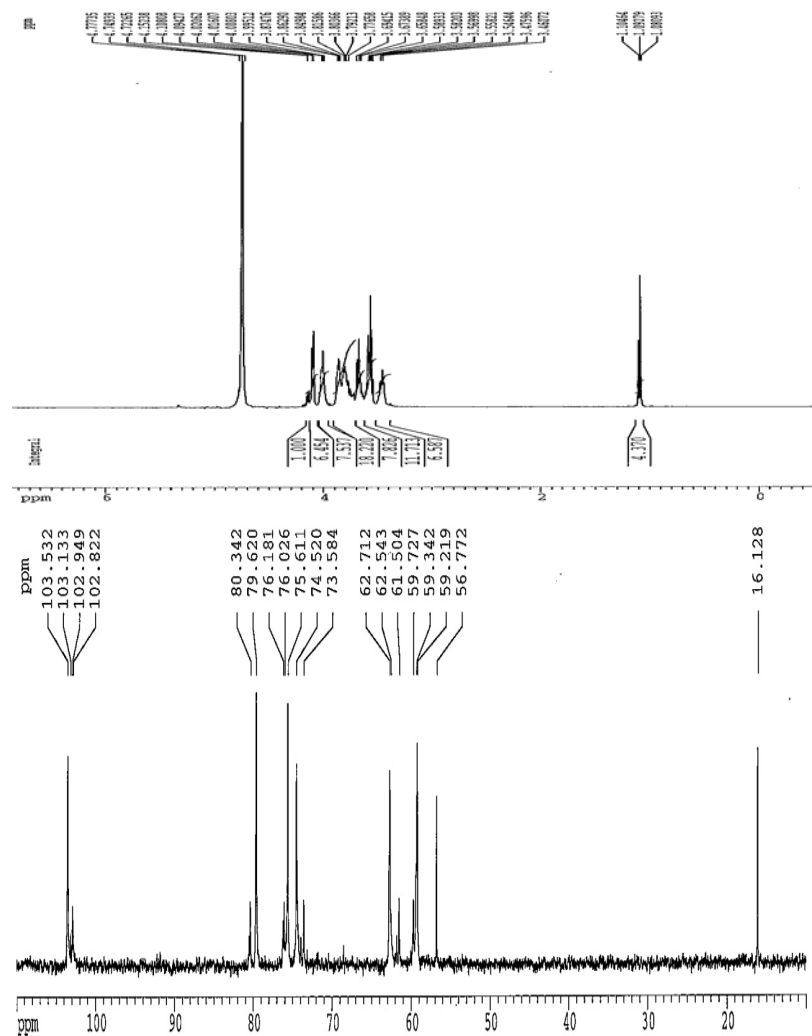


Fig. 8  $^1\text{H}$  NMR (up) and  $^{13}\text{C}$  NMR (low) of the levan produced by strain T1.

及 500 Da ~ 10 KDa)。比較以上資料顯示，本試驗的 5 株果聚醣產生菌株其所產主要的果聚醣 (1.78 ~ 14.71 KDa) 屬於較小分子量者。

## 五、果聚醣單糖組成之分析

將篩選出的 5 菌株 (M1、M3、M6、M11 及 T1) 所產果聚醣以乙醇沉澱及水洗後，利用過氯酸熱水解處理，以 HPLC 分析發現，在原來果聚醣的位置 (5.0 ~ 6.5 min) 之波峰明顯變小許多 (Fig. 7)，推測該波峰可能來自果聚醣以酸水解後加入鹼中和所形成之鹽類或果聚醣未完全水解所致。果糖含量由原先未能檢出上升為 47 mg/mL，而且有少量葡萄糖產生，因此推斷此聚醣類主要由果糖組成，而少量葡萄糖出現之原因，可能是該果聚醣另一終端原有葡萄糖存在，因此水解後

有少量葡萄糖出現。本試驗菌株所產果聚醣以過氯酸熱水解處理後，主要產物為果糖，此結果與 *B. subtilis* NRC 33a 及 *Z. mobilis* 所產果聚醣水解產物主要為果糖之反應相當接近 (Abdel-Fattah *et al.*, 2005; Marx *et al.*, 1999)，而 *B. megaterium* 1 之果聚醣水解產物也是以果糖為主，並且有少量葡萄糖 (Rairakhwada *et al.*, 2007)，與本試驗菌株所產果聚醣水解產物反應一致。故推測本實驗所篩選出的 5 菌株在含蔗糖培養液中所產聚醣為果糖的聚合物。

## 六、果聚醣 NMR 光譜分析

將篩選出的 5 菌株 (M1、M3、M6、M11 及 T1) 所產果聚醣經乙醇多次沉澱及水洗後，分析其  $^1\text{H}$  NMR 及  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜，結果顯示， $^1\text{H}$  NMR

**Table 2** Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of inulin, levan, and the fructan produced by strain T1

Carbon atom	Chemical shifts (ppm)		
	Inulin <sup>a</sup>	Levan <sup>b</sup>	Isolate
C-1	60.9	60.7	59.3
C-2	103.3	104.2	103.5
C-3	77.0	77.0	75.6
C-4	74.3	75.7	74.5
C-5	81.1	80.5	79.6
C-6	62.2	63.6	62.7

<sup>a</sup>Cited from French (1989)<sup>b</sup>Cited from Han and Clarke (1990)

於 3.4 及 4.2 ppm 之間有 7 個質子 (Fig. 8)，與 *B. subtilis* (natto) Takahashi 及 *B. licheniformis* 8-37-0-1 所產果聚糖之  $^1\text{H}$  NMR 圖譜相當類似 (Liu *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2005)。 $^{13}\text{C}$  NMR 在 59.3 ppm、62.7 ppm、74.5 ppm、75.6 ppm、79.6 ppm 及 103.5 ppm 有 6 個主要的共振 (Fig. 8)，該  $^{13}\text{C}$  NMR 與 *B. polymyxa* 與 *A. levanicum* 所產的果聚糖圖譜相近 (Table 2)，與 *B. subtilis* (natto) Takahashi 及 *B. licheniformis* 8-37-0-1 所產果聚糖之  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜很類似 (Liu *et al.*, 2010; Shih *et al.*, 2005)；雖然共振位置與文獻上的稍有差異，但相對空間卻很相近，文獻上有關菊糖及果聚糖之特性顯示，菊糖其主要的碳 (C1 及 C6) 較接近，而果聚糖其環狀碳 (C3、C4 及 C5) 則比較相近 (French, 1989)，本試驗所篩選出的 5 株菌其果聚糖之 C3、C4 及 C5 較接近，因此推斷該 5 株菌所產果糖的聚合物為  $\beta(2-6)$  鏈結型態的果聚糖。

## 謝 辭

本研究承蒙周前助理研究員賢鏘提供試驗材料，使試驗得以順利進行，特此致謝。本研究經費來源為本所科技計畫—「以細菌生產益菌質及其應用」。

## 參考文獻

- 黃美瑩, 黃詩涵, 方佩琪, 林金榮 (2010) 以微生物生產果聚糖及其應用. 水試專訊, 31: 20-24.
- Abdel-Fattah, A. F., D. A. R. Mahmoud and M. A. T. Esawy (2005) Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr. Microbiol.*, 51: 402-407.
- Belghith, H., K. B. Song, C. H. Kim and S. K. Rhee (1996) Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnol. Lett.*, 18(4): 467-472.
- Calazans, G. M. T., C. E. Lopes, R. M. O. C. Lima and F. P. de França (1997) Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.*, 19(1): 19-21.
- Calazans, G. M. T., R. C. Lima, F. P. de França and C. E. Lopes (2000) Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27: 245-247.
- Dal Bello, F. D., J. Walter, C. Hertel and W. P. Hammes (2001) In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.*, 24: 232-237.
- Das, T., A. K. Pal, S. K. Chakraborty, S. M. Manush, N. Chatterjee, S. K. Apte (2006) Metabolic elasticity and induction of heat shock protein 70 in *Labeo rohita* acclimated to three temperatures. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:1033-1039.
- Elisashvili, V. I. (1984) Levan synthesis by *Bacillus* sp. *Appl. Biochem. Microbiol.* 20: 82-87.
- Euzenat, O., A. Guibert and D. Combes (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Proc. Biochem.*, 32(3): 237-243.
- French, A. (1989) Chemical and physical properties of fructans. *J. Plant Physiol.*, 134: 125-136.
- Ghaly, A. E., F. Arab, N. S. Mahmoud and J. Higgins (2007) Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. *Am. J. Biotech. Biochem.*, 3(2): 47-54.
- Correc, K. L., C. Connes, A. Guibert, J. L. Uribelarrea and D. Combes (2002) Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB

- 11871 and 11872 supernatant. *Enzyme Microb. Tech.*, 31: 44-52.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar and S. C. Mukherjee (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., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. S. Dalvi, M. S. Akhtar, A. K. Jha and K. Baruah (2010) Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. *Aquaculture*, 306: 398-402.
- Han, Y. W. (1989) Levan production by *Bacillus polymyxa*. *J. Ind. Microbiol.*, 4: 447-452.
- Han, Y. W. (1990) Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.*, 35: 171-194.
- Han, Y. W. and M. A. Clarke (1990) Production and characterization of microbial levan. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 393-396.
- Hettwer, U., M. Gross and K. Rudolph (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.*, 177: 2834-2839.
- Jang, K. H., K. B., Song, C. H., Kim, B. H., Chung, S. A., Kang and U. H. Chun (2001) Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 23: 39-44.
- Kang, S. A., K. Hong, K. H. Jang, Y. Y. Kim, R. Choue and Y. Lim (2006) Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J. Nutri. Biochem.*, 17: 419-426.
- Keith, J., B. Wiley, D. Ball, S. Arcidiacono, D. Zorfass and J. Mayer (1991) Continuous culture system for the production of the biopolymer levan using the bacteria *Erwinia herbicola*. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 557-560.
- Kim, M. G., J. W. Seo, K. S. Song, C. H. Kim, B. H. Chung and S. Ki-Rhee (1998) Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Biotech. Lett.*, 20: 333-336.
- Korakli, M., M. G. Gänzle and R. F. Vogel (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 958-965.
- Leibovici, J. and Y. Stark (1985) Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cell. Mol. Biol.*, 31: 337-341.
- Liu, C., J. Lu, L. Lu, Y. Liu, F. Wang and M. Xiao (2010) Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.*, 101: 5528-5533.
- Marx, S., S. Koning and W. Hartmeier (1999) Synthesis of fructooligosaccharides by native and immobilized levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Thirteenth Forum for Applied Biotechnology. Hept Pand, Gent, Belgium. Proceeding, Part I 64: 246-251.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Muro, A. C., E. Rodriguez, C. M. Abate and F. Sineriz (2000) Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnol. Lett.*, 22: 1639-1642.
- No, J. R., S. Y. Park, M. K. Kim, H. Y. Jo, I. Y. Lee and S. Y. Ly (2007) The effects of levan on blood lipids and the absorption of calcium in rats fed a low calcium diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 36(1): 51-57.
- Ozimek, L. K., S. Kralj, M. J. E. C. van der Maarel and L. Dijkhuizen (2006) The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152: 1187-1196.
- Park, J. P., T. K. Oh and J. W. Yun (2001) Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Proc. Biochem.*, 37: 471-476.
- Poli, A., H. Kazak, B. Gürleyendağ, G. Tommonaro, G. Pieretti, E. T. Öner and B. Nicolaus (2009) High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydr. Polym.*, 78: 651-657.
- Rairakhwada, D., A. K. Pal, Z. P. Bhatena, N. P. Sahu, A. Jha and S. C. Mukherjee (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 477-486.
- Semjonovs, P. and P. Zikmanis (2007) An influence of levan on the fermentation of milk by a probiotic ABT-type starter. *J. Food Tech.*, 5(2): 123-130.

- Shih, I. L., Y. T. Yu, C. J. Shieh and C. Y. Hsieh (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8211-8215.
- Shih, I. L. and Y. T. Yu (2005) Simultaneous and selective production of levan and poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.*, 27: 103-106.
- Tieking, M., M. Korakli, M. A. Ehrmann, M. G. Gänzle and R. F. Vogel (2003) In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 945-952.
- Tieking, M. and M. G. Gänzle (2005) Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Tech.*, 16: 79-84.
- Yoo, S. H., E. J. Yoon, J. Cha and H. G. Lee (2004) Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 37-41.
- Yoon, E. J., S. H. Yoo, J. Cha and H. G. Lee (2004) Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 191-194.

## Screening of Levan-producing Bacteria from Brackish Water Tilapia Culture Pond

Mei-Ying Huang<sup>1,2\*</sup>, Po-Hsuan Chen<sup>2</sup>, Shih-Han Huang<sup>1,2</sup>,  
Kin-Jong Lin<sup>1</sup> and Chorng-Liang Pan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

### ABSTRACT

This study was devoted to screening of levan-producing bacteria from brackish water tilapia culture pond. Five strains with levan-producing capability were isolated. To investigate the sucrose utilization of the isolates, the yield amount and average molecular weight of produced levan were examined. In addition, the structural characteristics of the levans were analyzed by partial acid hydrolysis and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. During the 168 h incubation period in the medium containing 12% sucrose at 28°C, strains M1, M3, and M6 produced 20.35-23.01 mg/mL levan after 48 h incubation, while the sucrose in the medium has been used in the range of 75-84%. The amount of levan produced by strain M11 was 19.81 mg/mL after 96 h incubation, and its sucrose utilization rate only reached 64%. Strain T1 from 24 h to 48 h incubation had produced levan 12.71 mg/mL and 29.15 mg/mL, respectively. After 48 h and till 120 h, the amount of produced levan is keeping evenly to 29 mg/mL, as its sucrose utilization rate was 92%. The amount of levan then decreased gradually with prolonged incubation time after 120 h incubation. The main average molecular weight of levans produced by the isolates M1, M3, M6, M11, and T1 were 10.79, 10.78, 10.31, 1.78 and 14.71 KDa, respectively. The hydrolysates of derived from acid and heating treatments of the levan were mainly fructose. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of the products of the 5 isolates were very similar to peak positions for levan produced. Based on obtain data, the fructans produced by the 5 isolates were found to be the levan containing  $\beta(2-6)$ -linked backbone.

**Key words:** screen, levan-producing bacteria, brackish water tilapia cultured pond

---

\*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw