I856554

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I856554 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：112108689 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 03 月 09 日

(51)Int. Cl.： ***C12N1/20*** ***(2006.01)*** ***C12P7/62*** ***(2022.01)***

C12R1/07 (2006.01)

(71)申請人：國家原子能科技研究院 (中華民國) NATIONAL ATOMIC RESEARCH INSTITUTE (TW)

桃園市龍潭區文化路 1000 號

(72)發明人：王滙君 WANG, HUI-JUN (TW) ；歐宗茂 OU, CHUNG-MAO (TW) ；郭家倫 GUO, GIA-LUEN (TW)

(74)代理人：王立成；余宗學

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 911165 2023 年 01 月 12 日

(56)參考文獻：

TW I406948B TW 200846475A

期刊 R. Andler , et al., "Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by Bacillus cereus using grape residues as sole carbon source", International Journal of Biobased Plastics, VOL. 3, NO. 1, 無, 09 February 2021, Pages 98-111

期刊 Vaishnavi Gowda and Srividya Shivakumar, "Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of Bacillus thuringiensis IAM 12077", Braz. arch. biol. technol. , Vol.57, No.1, 無, January-February 2014, Pages 55-61

審查人員：吳思瑩

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：5 共 25 頁

(54)名稱

芽孢桿菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法

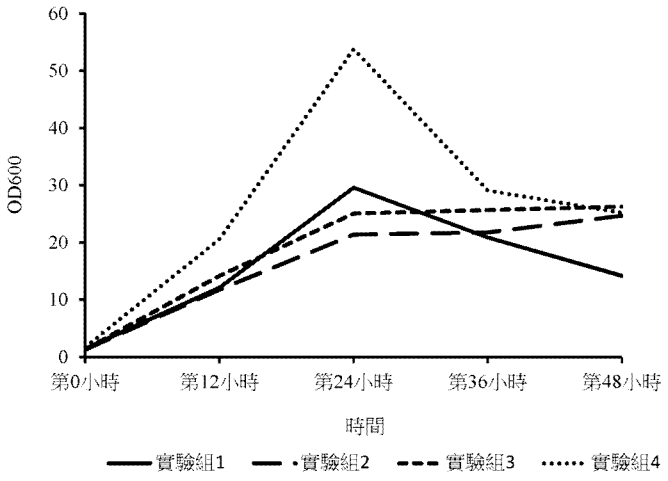
(57)摘要

本發明提供一種聚羥基烷酸酯生產菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法。該聚羥基烷酸酯生產菌能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯。該生產聚羥基烷酸酯的方法包含下列步驟：(a)提供一聚羥基烷酸酯生產菌，其能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯；(b)提供水果液，該水果液中的糖濃度為 90g/L 至 100g/L，並將該水果液的 pH 值調整為 pH 6 至 pH 7，以製得發酵料源；(c)將該聚羥基烷酸酯生產菌加入該發酵料源中，使該聚羥基烷酸酯生產菌在 30℃至 37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。藉由如上所述之聚羥基烷酸酯生產菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法，可以減少在以水果廢棄物發酵生產 PHA 的製程中的能源消耗。

The present invention provides a polyhydroxyalkanoates-producing bacterium and method for producing polyhydroxyalkanoates using same. The polyhydroxyalkanoates -producing is able to ferment sugars in fruits and transform the sugars into polyhydroxyalkanoates. The method of method for producing

polyhydroxyalkanoates comprises (a) providing polyhydroxyalkanoates-producing bacteria which is able to ferment sugars in fruits and transform the sugars into polyhydroxyalkanoates; and (b) providing fruit liquid at a concentration of 90 g/L to 100 g/L, and adjusting the pH value of the fruit liquid to pH 6 to pH 7, thereby preparing a fermentation substrate; and (c) adding the polyhydroxyalkanoates-producing bacteria into the fermentation substrate to make the polyhydroxyalkanoates-producing bacteria perform the fermentation reaction by using the fermentation substrate under 30 to 37℃, thereby producing polyhydroxyalkanoates. By the polyhydroxyalkanoates-producing bacterium and the method for producing polyhydroxyalkanoates using same, the energy consumption in the process of producing PHA by fermenting fruit waste is reduced.

指定代表圖：



【圖1】

I856554

【發明摘要】

【中文發明名稱】 芽孢桿菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法

【英文發明名稱】 *Bacillus* sp. AND METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATES USING SAME

【中文】

本發明提供一種聚羥基烷酸酯生產菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法。該聚羥基烷酸酯生產菌能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯。該生產聚羥基烷酸酯的方法包含下列步驟：(a) 提供一聚羥基烷酸酯生產菌，其能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯；(b) 提供水果液，該水果液中的糖濃度為90 g/L至100 g/L，並將該水果液的pH值調整為pH 6至pH 7，以製得發酵料源；(c) 將該聚羥基烷酸酯生產菌加入該發酵料源中，使該聚羥基烷酸酯生產菌在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。藉由如上所述之聚羥基烷酸酯生產菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法，可以減少在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中的能源消耗。

【英文】

The present invention provides a polyhydroxyalkanoates-producing bacterium and method for producing polyhydroxyalkanoates using same. The polyhydroxyalkanoates -producing is able to ferment sugars in fruits and transform the sugars into polyhydroxyalkanoates. The method of method for producing polyhydroxyalkanoates comprises (a) providing polyhydroxyalkanoates-producing

bacteria which is able to ferment sugars in fruits and transform the sugars into polyhydroxyalkanoates; and (b) providing fruit liquid at a concentration of 90 g/L to 100 g/L, and adjusting the pH value of the fruit liquid to pH 6 to pH 7, thereby preparing a fermentation substrate; and (c) adding the polyhydroxyalkanoates-producing bacteria into the fermentation substrate to make the polyhydroxyalkanoates-producing bacteria perform the fermentation reaction by using the fermentation substrate under 30 to 37℃, thereby producing polyhydroxyalkanoates. By the polyhydroxyalkanoates-producing bacterium and the method for producing polyhydroxyalkanoates using same, the energy consumption in the process of producing PHA by fermenting fruit waste is reduced.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 芽孢桿菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法

【英文發明名稱】 *Bacillus* sp. AND METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATES USING SAME

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種聚羥基烷酸酯生產菌及使用其生產聚羥基烷酸酯的方法，尤其是關於一種能夠以水果和米作為料源來生產聚羥基烷酸酯的聚羥基烷酸酯生產菌。

【先前技術】

【0002】 聚羥基脂肪酸酯（polyhydroxyalkanoates, PHA）為一種供微生物作為碳源儲存或能量儲存的天然高分子聚合物。由於PHA塑膠具有生物相容性及生物可分解性，因此，當PHA塑膠存在於自然環境中，其在數個月內即可被微生物自然分解。基於前述PHA塑膠的優點，故PHA被期待作為取代傳統石化塑膠的潛力替代性產品。

【0003】 目前PHA的生產方式之一為微生物發酵法，在習知PHA的微生物發酵製程中，係以葡萄糖作為碳源，使聚羥基烷酸酯生產菌株利用葡萄糖發酵生產PHA，基於降低成本以及環保考量，習知製程中會使用水果廢棄物（例如，因損傷而要被丟棄的水果或是水果加工製程中的殘餘物）作為葡萄糖來源。

【發明內容】

【0004】 由於在PHA發酵製程中使用水果廢棄物作為葡萄糖來源來發酵生產PHA時，較容易滋生雜菌，因此，在進行發酵反應之前，必須先對來自水果廢棄物的發酵料源和發酵培養基進行高溫高壓滅菌，以避免在發酵反應中造成發酵料源和發酵培養基中產生雜菌，進而造成發酵環境污染。然而，前述的高溫高壓滅菌步驟需要消耗大量能源，這增加了PHA發酵生產製程的額外成本，因此，如何減少在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中因高溫高壓滅菌步驟所產生的能源消耗，仍為有待解決的問題。

【0005】 本發明之目的即針對上述問題，提供一種聚羥基烷酸酯生產菌，其能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該聚羥基烷酸酯生產菌寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165。

【0006】 為達上述目的及其他目的，提供一種生產聚羥基烷酸酯的方法，其包含下列步驟：(a) 提供一聚羥基烷酸酯生產菌，其能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該聚羥基烷酸酯生產菌寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165；(b) 提供水果液，該水果液中的糖濃度為90 g/L至100 g/L，並將該水果液的pH值調整為pH 6至pH 7，以製得發酵料源；及(c) 將該聚羥基烷酸酯生產菌加入該發酵料源中，使該聚羥基烷酸酯生產菌在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。

【0007】 如上所述之方法，在(b)步驟中，將濃度為5 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該發酵料源中。

【0008】 如上所述之方法，在(b)步驟中，將濃度為20 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該發酵料源中。

【0009】 如上所述之方法，在(b)步驟中，將該水果液的pH值調整為pH 6至pH 6.5。

【0010】 如上所述之方法，進一步包含下列步驟：(d) 在該發酵反應進行完畢後，回收已進行該發酵反應之發酵料源以製成回收發酵料源，該回收發酵料源的糖濃度為50 g/L至60 g/L；及(e) 將濃度為20 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該回收發酵料源中，已加入該酵母菌萃取物的回收發酵料源用於供該聚羥基烷酸酯生產菌生產聚羥基烷酸酯。

【0011】 為達上述目的及其他目的，提供一種生產聚羥基烷酸酯的方法，其包含下列步驟：(a) 提供一聚羥基烷酸酯生產菌，其能夠將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該聚羥基烷酸酯生產菌寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165； (b) 提供米水解液，該米水解液中的糖濃度為100 g/L至150 g/L，將濃度為20 g/L至40 g/L的酵母菌萃取物加入該米水解液中，以製得發酵料源；及 (c) 將該聚羥基烷酸酯生產菌加入該發酵料源中，使該聚羥基烷酸酯生產菌在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。

【0012】 如上所述之方法，在(b)步驟中，將濃度為25 g/L至30 g/L的酵母菌萃取物加入至該米水解液中。

【0013】 如上所述之方法，在(b)步驟中，該米水解液中的糖濃度為120 g/L至130 g/L。

【0014】 藉由如上所述之聚羥基烷酸酯生產菌及生產聚羥基烷酸酯的方法，可以減少在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中因高溫高壓滅菌步驟所產生的能源消耗。

【圖式簡單說明】

【0015】

圖1示出本發明實施例1的HSIP-5菌株在不同條件下的生長趨勢。

圖2A示出本發明實施例1的HSIP-5菌株糖份消耗測試中控制組的HPLC圖譜中代表不同糖類的訊號峰型。

圖2B示出本發明實施例1的HSIP-5菌株糖份消耗測試中實驗組的HPLC圖譜中代表不同糖類的訊號峰型。

圖3示出本發明實施例1的HSIP-5菌株所產出的PHA之NMR圖譜。

圖4示出本發明實施例2的HSIP-5菌株所產出的PHA之GC圖譜。

圖5示出本發明實施例3的HSIP-5菌株的生長趨勢及PHA產率。

圖6示出YL-5菌株所產出的PHA之GC圖譜。

圖7示出YL-5菌株在不同條件下的生長趨勢。

【實施方式】

【0016】 為充分瞭解本發明之目的、特徵及功效，茲藉由下述具體之實施例，並配合所附之圖式，對本發明做一詳細說明，說明如後：

【0017】 聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5的保存

【0018】 本文中所使用的聚羥基烷酸酯生產菌經定序後確認為芽孢桿菌(*Bacillus* sp.)，該菌株係寄存於財團法人食品工業發展研究所，其被命名為HSIP-5，寄存編號為BCRC 911165。

【0019】 聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5的培養方法

【0020】 準備營養培養液(Nutrient Broth)（其中含有10 g/L的葡萄糖），將1 mL的營養培養液裝於3 mL的試管中，將1 mg的菌體接種於試管內的營養培養液中，前述試管放置於培養箱中以30℃（培養溫度可控制在30℃至37℃此菌株適合生長的溫度範圍內）的條件進行菌株培養，當培養至菌液達到吸光值OD_{600}接近2時，從前述試管取出菌液，並在菌液中加入甘油，所加入的甘油量佔菌液-甘油混合液總體積的20%，前述菌液-甘油混合液保存於-80℃冰箱，以供後續製程或實驗使用。

【0021】 實施例1之生產聚羥基烷酸酯的方法

【0022】 首先，取前述冷凍保存的HSIP-5菌液，將其放入37℃水浴槽進行解凍。待HSIP-5菌液解凍完成後，將菌液以體積百分比為10%的接種比例接種至1 mL的R2A agar培養液中，前述R2A agar培養液置於3 mL的試管中，將前述試管置於36℃培養箱中，將轉速設定為250 rpm培養 24小時，以進行菌種活化培養。

【0023】 同時，準備水果液作為發酵料源，水果液製備方式如下。

【0024】 首先，從市場收集預期將要丟棄的柳橙和橘子（即水果廢棄物，亦可選用其他種類的水果廢棄物），將前述水果廢棄物以均質機打碎成果漿，打碎程度為果漿中的果粒直徑大約小於5 mm，前述果漿以網孔大小為1 mm^2的濾網進行過濾，前述經過濾的果漿再放入離心機中以4000 rpm的轉速離心20分鐘。

【0025】 前述果漿上清液中的糖濃度為95 g/L（果漿上清液中的糖濃度會隨著料源不同而變動，例如在90 g/L至100 g/L的範圍之間變動，或是在90 g/L至95 g/L的範圍之間變動），並將前述上清液的pH值調整為pH 6.5（pH值可視需

求在pH 6至pH 7的範圍之間調整），上述果漿上清液的pH值調整完畢後，本實施例1之作為發酵料源的水果液即製備完成。

【0026】 上述果漿上清液的糖濃度測定方式為透過高效液相層析儀來定量分析水果液中的糖含量。

【0027】 如前所述，在準備已活化的HSIP-5菌株和作為發酵料源的水果液完成後，將HSIP-5菌株加入前述水果液中，使HSIP-5菌株在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，即可產生聚羥基烷酸酯。具體的聚羥基烷酸酯發酵製程條件，見於下列製程條件測試。

【0028】 HSIP-5菌株的製程條件比較測試

為了測試在不同製程條件下，HSIP-5菌株的生長量及其PHA產率，進行如下測試。

【0029】 首先，準備四個250mL的錐形瓶，第一個錐形瓶中加入100 mL的水果液作為實驗組1，第二個錐形瓶中加入100 mL之其中含5 g/L酵母菌萃取物的水果液作為實驗組2，第三個錐形瓶中加入100 mL之其中含15 g/L酵母菌萃取物的水果液作為實驗組3，第四個錐形瓶中加入100 mL之其中含25 g/L酵母菌萃取物的水果液作為實驗組4。實驗組1-4中所使用的水果液即本實施例1之水果液，水果液中的糖作為碳源，上述的酵母菌萃取物作為氮源。

【0030】 接著，將已活化之前述HSIP-5菌株的菌液以體積百分比為1%的接種比例（接種比例可視需求調整，例如可為1-2%）分別接種至實驗組1至4的水果液中，接種完畢後，將實驗組1至4置於培養箱中，在36℃環境中以250 rpm的轉速搖瓶培養72小時，在開始培養的第0小時，從實驗組1至4中分別取出1 mL的樣本，以分光光度計測量實驗組1至4的OD_{600}吸光值，隨後，在培養發酵

後第12小時、24小時、第36小時及第48小時，依據前述測量方式，測量實驗組1至4的OD_{600}吸光值。並且，在實驗組1至4發酵完畢後，測量實驗組1至4的單位菌體乾重、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比，上述實驗組1至4的單位菌體乾重、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比之測量方式如下所述。

【0031】 單位菌體乾重的測量方式為，在實驗組1至4發酵完畢後，取實驗組1至4中1 mL的菌液在25℃下以4000 rpm的轉速離心10分鐘，離心完成後，分別去除實驗組1至4中的上清液，前述離心步驟重複五次後，再取出實驗組1至4的沉澱菌塊，隨後將取出的實驗組1至4的沉澱菌塊再加入1 mL的去離子水回溶，接著根據上述離心條件重複前述的離心步驟進行兩次清洗，最後取出實驗組1至4的最終沉澱菌塊，將其放置於烘乾箱中以60℃進行烘乾，待水分去除完全後即可秤取實驗組1至4的單位菌體乾重（每公升菌液的菌體重量，單位為g/L）。

【0032】 PHA產率的測量方式為，在實驗組1至4發酵完畢後，取實驗組1至4中1 mL的菌液在-80℃環境中進行冷凍乾燥來取得菌粉，取前述透過冷凍乾燥製得之實驗組1至4的菌粉，將其分別放入安瓿瓶內，各安瓿瓶內再加入2 mL的氯仿並震盪5分鐘，震盪完畢後，於前述實驗組1至4的菌粉-氯仿反應物中加入2 mL的5%硫酸甲醇（甲醇與硫酸的比例為19：1），前述實驗組1至4的菌粉-氯仿-硫酸甲醇反應物接著放入水浴槽中在100℃下反應4小時，反應完畢後置於冰上冷卻，冷卻完畢後待反應物分層完畢，即可取下層有機相以氣相層析儀(GC)(Agilent 7890A with FID)分析實驗組1至4的PHA濃度，進而計算出實驗組1至4的PHA產率。並且，根據前述測得之實驗組1至4的單位菌體乾重，計算PHA佔菌體乾重比。

【0033】前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試之測試結果如圖1及下表1所示，如實驗組1結果所示，當在完全不添加作為氮源的酵母菌萃取物進行發酵反應的情況下，HSIP-5菌株即可利用水果液生長並生產PHA，又如實驗組4結果所示，在添加25 g/L酵母菌萃取物進行發酵反應的情況下，其於培養至第24小時可以達到最高的OD_{600}吸光值53.8，PHA產率達2.39 g/L，PHA佔菌體乾重比為17.94%，亦即，本實施例1之生產聚羥基烷酸酯的方法可以進一步透過添加氮源來促進菌株生長、提高PHA產率和PHA佔菌體乾重比（即表示在同等菌量下可以得到更高的PHA量）。在本實施例1係使用酵母菌萃取物作為氮源，但亦可選用其他氮源替代，例如胺基酸、牛肉蛋白腖等氮源。

【0034】上述實驗結果證明，利用HSIP-5菌株來發酵生產PHA時，作為料源的水果液不須進行高溫高壓滅菌步驟（此步驟是為了確保將培養基中的所有雜菌完全殺滅，使培養基保持在完全無菌狀態），由於HSIP-5菌株其生長速度快，因此HSIP-5菌株在發酵環境中能夠與一般雜菌進行營養競爭，即使培養基中存在雜菌，HSIP-5菌株在發酵環境中可以抑制其他雜菌順利生長並生產PHA，而不會有發酵環境受到雜菌污染造成聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5無法順利生長且無法產出PHA的問題（若發酵環境中雜菌可以長成至優勢菌株，則本實施例1的實驗組1-4的菌液中將測不到PHA，因為雜菌會抑制本實施例1的HSIP-5菌株之生長）。因此，藉由上述聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5及生產聚羥基烷酸酯的方法，在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中，可以省去習知製程中的以高溫高壓對培養基進行滅菌之步驟，即可將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，而無須進行耗費較多能源的高溫高壓滅菌步驟，藉此減少在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中的能源消耗。

【0035】 表1-實驗組1至4在發酵第48小時的單位菌體乾重、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比

	單位菌體乾重(g/L)	PHA 產率(g/L)	PHA 佔菌體乾重比(%)
實驗組 1(0 g/L)	6.68	0.07	1.06
實驗組 2(5 g/L)	6.84	0.43	6.26
實驗組 3(15 g/L)	13.30	2.12	15.96
實驗組 4(25 g/L)	7.20	1.29	17.94

【0036】 HSIP-5菌株糖份消耗測試

為了確認HSIP-5菌株是透過代謝何種糖類來生產PHA產率，進行如下測試。

【0037】 首先，參照前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試中實驗組1的發酵流程進行發酵。在HSIP-5菌株開始培養的第0小時以及發酵完畢的第48小時，分別在上述兩個實驗間從菌液中取1 mL的樣本作為控制組（發酵前）與實驗組（發酵後）。接著，將控制組與實驗組的樣本分別以液相層析儀(Agilent 1200 with FID)來分析HPLC圖譜，進而比較控制組與實驗組的HPLC圖譜中代表不同糖類的訊號峰型。測試結果參考圖2A及圖2B及下表2，控制組與實驗組中皆有糖類之訊號峰存在，但實驗組（發酵後）與控制組（發酵前）相比，實驗組的各種糖類之濃度皆有下降的趨勢，由圖2A及圖2B結果可知，葡萄糖、纖維二糖、果糖、蔗糖皆可被HSIP-5菌株用來發酵生產PHA。

【0038】 表2-HSIP-5菌株糖份消耗測試在進行發酵不同時間點的發酵料源的糖濃度

時間(小時) / 糖濃度 (g/L)	第 0 小時	第 48 小時
纖維二糖	1.10	0.00
葡萄糖+蔗糖	33.35	11.03

果糖+蔗糖	56.05	41.51

【0039】 PHA之NMR圖譜分析

為了確認HSIP-5菌株所產出的PHA種類，進行如下分析。

【0040】 首先，重複前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試中實驗組1的發酵流程，在HSIP-5菌株發酵完畢的第48小時，從菌液中取出1 mL的菌液樣本，並依據前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試中取得沉澱菌塊的步驟，從菌液樣本中取得沉澱菌塊。

【0041】 接著，將100 mL的0.1 M硫酸溶液分別加入前述沉澱菌塊中，使前述沉澱菌塊與硫酸溶液所形成的反應物在110℃下加熱反應2小時，以進行破菌並萃取出PHA，反應完畢後，在實驗組1至4的破菌反應物中加入鹼液以將破菌反應物的pH值調整至pH 10。

【0042】 然後，將上述破菌反應物溶於純水中混合清洗1小時，再取上述破菌反應物進行離心，離心條件為轉速4000 rpm離心10分鐘，離心完畢後，取出離心沉澱物，將離心沉澱物與116.1 mL的體積百分濃度為6%之次氯酸鈉攪拌混合持續2小時，隨後再根據上述離心條件進行離心，離心完畢後，取出固體沉澱物，此即從前述HSIP-5菌株中取得之PHA固體萃取物，然後取50 mg的PHA固體萃取物將其溶解在1.0 mL的氘化氯仿(deuterated chloroform, CCl_3D)中，以核磁共振光譜儀(Oxford 300 MHz NMR Mercury Plus spectrometer (Varian, USA))分析前述PHA固體萃取物的NMR，分析結果如圖3所示，樣品經NMR鑑定種類為P(3HB)，在圖譜觀測到P(3HB)結構中(CH_3)、(CH_2)、(CH)與(C=O)官能基的化學位移。

【0043】 實施例2之生產聚羥基烷酸酯的方法

本實施例2之生產聚羥基烷酸酯的方法為將發酵完畢的料源再次回收使用來生產聚羥基烷酸酯之製程，本實施例2之具體聚羥基烷酸酯發酵製程條件，見於下列步驟。

【0044】 首先，回收前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試中實驗組4的發酵完畢後剩下的發酵產物，將發酵完畢後剩下的發酵產物以轉速4000 rpm離心20分鐘，離心完畢後取上清液，該上清液即回收發酵料源，該回收發酵料源的糖濃度為55 g/L（糖濃度會隨前次發酵程度而有不同，例如可能為50 g/L至60 g/L的範圍），然後將濃度為25 g/L的酵母菌萃取物（ 酵母菌萃取物濃度可在20 g/L至25 g/L的範圍間調整）加入至該回收發酵料源中，以供後續製程使用。

【0045】 接著，利用本實施例2的回收發酵料源，根據前述HSIP-5菌株的製程條件比較測試中實驗組4的發酵流程進行發酵，即在培養後第48小時停止發酵並收菌。發酵完畢後的菌液根據實施例1中測量OD_{600}吸光值、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比的方法，測量本實施例2中發酵完畢的菌液其OD_{600}吸光值、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比；並且根據實施例1中以氣相層析儀(GC)(Agilent 7890A with FID)分析待測物中PHA的分析方法，分析本實施例2所得之PHA的GC-MS圖譜。

【0046】 上述測量結果同時參考圖4及下表3，發酵至第48小時的菌液其OD_{600}吸光值為23.1，PHA產率為0.78 g/L，PHA佔菌體乾重比為14.10%，本實施例2的方法所生產的PHA種類如圖4中GC-MS圖譜所示為P(3HB)。由上述結果可知，使用回收發酵料源，菌株也能夠利用此料源持續生長，並且能夠生產PHA，藉由本實施例之回收料源生產製程，可以減少PHA生產製程中發酵料源的消耗量。

【0047】 表3-實施例2之生產聚羥基烷酸酯的方法中菌液不同發酵時間OD_{600}吸光值

發酵時間(小時)	第 0 小時	第 24 小時	第 48 小時
OD_{600}吸光值	2.14	21.4	23.1

【0048】 實施例3之生產聚羥基烷酸酯的方法

【0049】 首先，根據實施例1之菌種活化培養步驟，提供活化的HSIP-5菌液。

【0050】 接著，準備米水解液作為發酵料源，米水解液製備方式如下。

【0051】 將來自倉儲的1公斤生米與5公斤水混合形成米水混合物，即米和水的重量比為1：5，然後以100℃加熱前述米水混合物，直到當米水混合物被加熱至形成粥狀物時停止加熱，待前述粥狀物降溫到90℃時，在前述粥狀物中添加糖化酵素(Novozyme AMG300L)（作用濃度為1.21 g/1 kg澱粉）和糊化酵素 (Nomozyme Liquozyme Supra)（作用濃度為0.8 g/1 kg澱粉）以進行水解反應，前述的水解反應進行至隔夜，藉此形成米水解液，米水解液經過前述糖化酵素和糊化酵素的反應，已將米中的澱粉水解為葡萄糖，前述米水解液的葡萄糖濃度為125.9 g/L（米水解液的葡萄糖濃度會隨不同批次的米以及處理條件而有所不同，例如米水解液中的葡萄糖濃度可為120 g/L至130 g/L）。最後，將濃度為30 g/L的酵母菌萃取物（酵母菌萃取物濃度可在20 g/L至40 g/L的範圍之間調整，例如可在25 g/L至30 g/L的範圍之間調整）加入該米水解液中，以製得發酵料源。

【0052】 如前所述，在準備已活化的HSIP-5菌株和作為發酵料源的水果液完成後，根據實施例1中HSIP-5菌株的製程條件比較測試的發酵步驟進行發

酵反應，並在發酵完畢後（HSIP-5菌株發酵培養後第48小時），根據實施例1中測量OD_{600}吸光值、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比的方法，測量本實施例3中發酵完畢的菌液其OD_{600}吸光值、PHA產率以及PHA佔菌體乾重比。

【0053】 上述測量結果同時參照圖5及下表4，發酵完畢的菌液其OD_{600}吸光值為102.6，PHA產率為6.28 g/L，PHA佔菌體乾重比為22.51 %。由上述結果可知，HSIP-5菌株亦可利用米水解液來生產PHA，藉由本實施例3之PHA生產製程，可以提供HSIP-5菌株另一種生產料源。由於水果廢棄物的數量可能隨著季節或其他因素而有變化，當水果廢棄物的料源不足用來生產PHA時，即可將倉儲米製成發酵料源來生產PHA。

【0054】 表4-實施例3菌液在發酵第48小時的OD_{600}吸光值及PHA產率

	0 小時	12 小時	24 小時	36 小時	48 小時
OD_{600}吸光值	21.1	46.3	78.4	80.2	102.6
PHA 產率(g/L)	未測量	未測量	未測量	未測量	6.284792

【0055】 其他聚羥基烷酸酯生產菌株生產PHA效果測試

在本測試中將對其他聚羥基烷酸酯生產菌株以未滅菌的水果液進行發酵培養，以測試其他聚羥基烷酸酯生產菌株是否能在未滅菌的發酵環境中生長並生產PHA，測試方式如下所述。在本測試中是以YL-5菌株為測試對象，YL-5菌株與HSIP-5菌株同樣為芽孢桿菌且具有生產PHA的能力。

【0056】 為了證明YL-5菌株具有生產PHA的能力，先使YL-5菌株在無雜菌的發酵環境中生長以進行初步測試，確認YL-5菌株在無雜菌的發酵環境中確實具有生產PHA的能力。YL-5菌株的測試流程及結果如下所述。

【0057】 首先，根據實施例1之菌種活化培養步驟，提供活化的YL-5菌液，接著將菌液以體積百分比為10%的接種比例接種至30 mL的R2A agar培養液

（培養液已滅菌，其中含有重量百分濃度為4.5%的葡萄糖）中，前述R2A agar培養液置於100 mL的離心管中，將前述離心管置於36℃培養箱中，將轉速設定為250 rpm進行發酵培養 48小時。

【0058】 發酵完畢後，依據前述實施例1中的方法測定YL-5菌株的PHA產率和PHA佔菌體乾重比，並分析YL-5菌株所產生的PHA種類，初步測試的實驗結果顯示，YL-5菌株的PHA產率可達0.84 g/L；PHA佔菌體乾重比為36.71%，YL-5菌株所產生的PHA種類如圖6所示為P(3HB)。基於上述結果可知，YL-5菌株所生產的PHA種類與本案的HSIP-5菌株所生產的PHA種類相同。因此，下列將以YL-5菌株作為本案HSIP-5菌株的比較對象，並選用實施例1中使用的水果液進行比較測試，以確認YL-5菌株在未經過高溫高壓滅菌步驟的發酵環境中，能否如本案HSIP-5菌株一樣抑制其他雜菌順利生長並生產PHA。YL-5菌株的比較測試流程如下所述。

【0059】 首先，分別提供前述實施例1中的水果液（不含酵母菌萃取物）、含5 g/L酵母菌萃取物的水果液、含15 g/L酵母菌萃取物的水果液、含25 g/L酵母菌萃取物的水果液作為實驗組1-4，取前述實施例1中的實驗組1-4發酵完之發酵廢液進行回收並混合前述實驗組1-4之發酵廢液，接著在前述混合後的發酵廢液中進一步添加25 g/L的酵母菌萃取物後作為實驗組5。然後，準備五個250 mL的錐形瓶，其中分別加入100 mL的實驗組1-5樣本。接著，將已活化之前述YL-5菌株的菌液以體積百分比為1%的接種比例分別接種至實驗組1至5的水果液中，接種完畢後，將實驗組1至5置於培養箱中，在36℃環境中以250 rpm的轉速搖瓶培養48小時，並且依照實施例1中的方式測定實驗組1-5在培養第0小時、第12小時、第24小時、第36小時及第48小時的OD值，同時，依照前述實

施例1中的PHA檢測方式，以氣相層析儀檢測實驗組1-5的發酵液中是否有PHA存在。前述比較測試的結果如圖7及下列表4所示所示，實驗組1-5的YL-5菌株生長效率遠低於實施例1的HSIP-5菌株，並且實驗組1-5的YL-5菌株都未產出PHA。

【0060】 表4-YL-5菌株的比較測試中實驗組1-5菌液不同發酵時間OD_{600}吸光值

OD_{600}	第 0 小時	第 12 小時	第 24 小時	第 36 小時	第 84 小時
實驗組 1	0.89	0.82	0.70	1.14	1.52
實驗組 2	0.91	0.81	1.12	0.93	1.71
實驗組 3	0.85	0.89	1.10	1.20	1.84
實驗組 4	0.82	0.86	1.36	1.54	1.89
實驗組 5	0.96	1.03	0.93	1.09	1.26

【0061】 由上述YL-5菌株的比較測試結果可知，一般的聚羥基烷酸酯生產菌株無法在未滅菌的發酵環境中（因其生長受到雜菌的抑制）生長並生產PHA，因而仍需對發酵料源進行高溫高壓滅菌，才能讓一般的聚羥基烷酸酯生產菌株順利生長並生產PHA。基於上述比較測試結果可證明聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5其具有抑制其他雜菌順利生長並生產PHA的能力，進而達到使得如上所述利用聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5生產PHA的製程所欲達成之功效，即在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中，可以省去習知製程中的以高溫高壓對培養基進行滅菌之步驟。

【0062】 如上所述之聚羥基烷酸酯生產菌HSIP-5及生產聚羥基烷酸酯的方法，可以減少在以水果廢棄物發酵生產PHA的製程中的能源消耗。並且，透過在前述生產聚羥基烷酸酯的製程中添加氮源，可以進一步提升促進菌株生長、提高PHA產率和PHA佔菌體乾重比。另一方面，藉由前述的回收料源生產

製程，可以減少PHA生產製程中發酵料源的消耗量。此外，前述聚羥基烷酸酯生產菌亦可利用米水解液來生產PHA，藉此提供前述聚羥基烷酸酯生產菌另一種生產料源。

【0063】本發明在上文中已以較佳實施例揭露，然熟習本項技術者應理解的是，該實施例僅用於描繪本發明，而不應解讀為限制本發明之範圍。應注意的是，舉凡與該實施例等效之變化與置換，均應設為涵蓋於本發明之範疇內。因此，本發明之保護範圍當以申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】

【0064】無

【生物材料寄存】

【0065】

國內寄存資訊

中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center,BCRC)

2023年1月12日

BCRC 911165

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種芽孢桿菌HSIP-5 (*Bacillus* sp. HSIP-5)，其能夠在存在雜菌的發酵環境中將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該糖類包含葡萄糖、纖維二糖、果糖或蔗糖，該糖類濃度為90 g/L至100 g/L，該芽孢桿菌HSIP-5寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165。

【請求項2】 一種生產聚羥基烷酸酯的方法，其包含下列步驟：

(a) 提供一芽孢桿菌HSIP-5 (*Bacillus* sp. HSIP-5)，其能夠在存在雜菌的發酵環境中將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該糖類包含葡萄糖、纖維二糖、果糖或蔗糖，該芽孢桿菌HSIP-5寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165；

(b) 提供水果液，該水果液中的糖濃度為90 g/L至100 g/L，並將該水果液的pH值調整為pH 6至pH 7，以製得發酵料源；及

(c) 將該芽孢桿菌HSIP-5加入該發酵料源中，使該芽孢桿菌HSIP-5在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。

【請求項3】 如請求項2所述之方法，其中，在(b)步驟中，將濃度為5 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該發酵料源中。

【請求項4】 如請求項3所述之方法，其中，在(b)步驟中，將濃度為20 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該發酵料源中。

【請求項5】 如請求項2所述之方法，其中，在(b)步驟中，將該水果液的pH值調整為pH 6至pH 6.5。

【請求項6】 如請求項2所述之方法，進一步包含下列步驟：

(d) 在該發酵反應進行完畢後，回收已進行該發酵反應之發酵料源以製成回收發酵料源，該回收發酵料源的糖濃度為50 g/L至60 g/L； 及

(e) 將濃度為20 g/L至25 g/L的酵母菌萃取物加入至該回收發酵料源中，已加入該酵母菌萃取物的回收發酵料源用於供該芽孢桿菌HSIP-5生產聚羥基烷酸酯。

【請求項7】 一種生產聚羥基烷酸酯的方法，其包含下列步驟：

(a) 提供一芽孢桿菌HSIP-5 (*Bacillus* sp. HSIP-5)，其能夠在存在雜菌的發酵環境中將水果中糖類發酵轉化為聚羥基烷酸酯，該糖類包含葡萄糖、纖維二糖、果糖或蔗糖，該芽孢桿菌HSIP-5寄存於食品工業發展研究所，寄存編號為BCRC 911165；

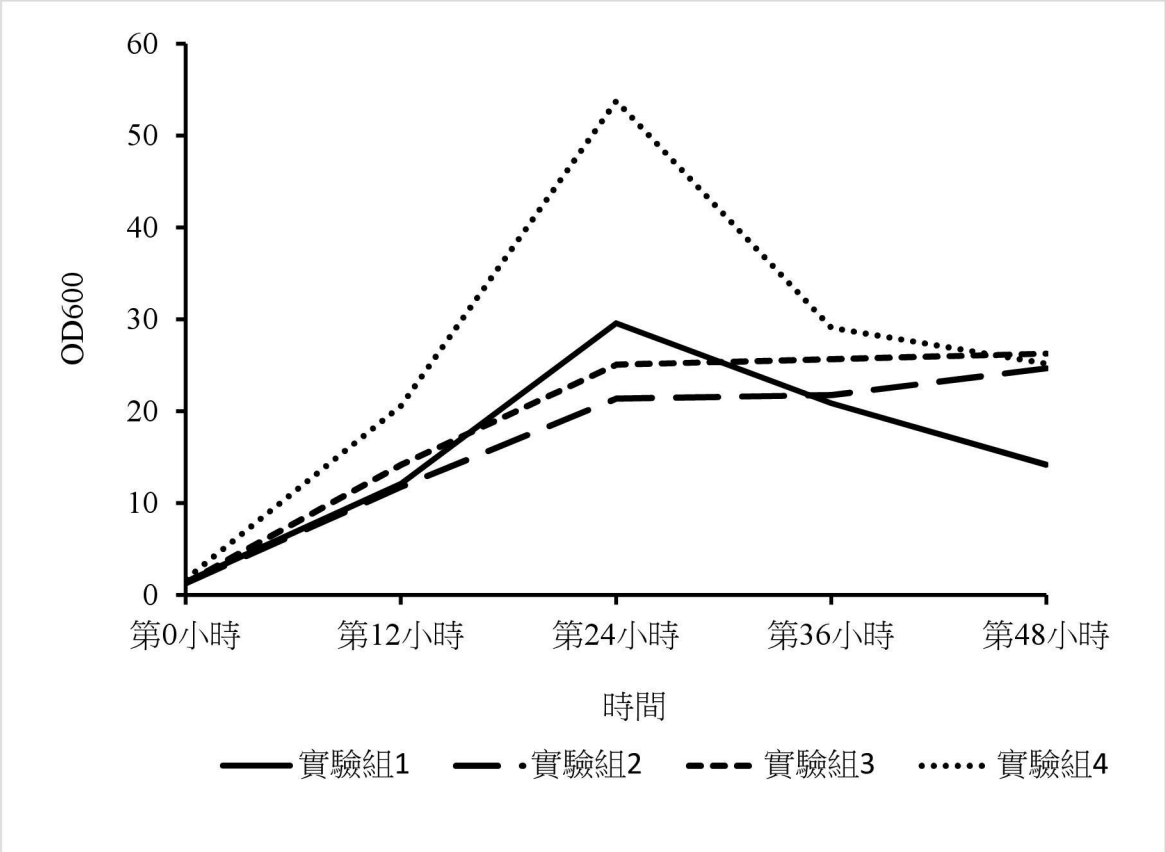
(b) 提供米水解液，該米水解液中的糖濃度為100 g/L至150 g/L，將濃度為20 g/L至40 g/L的酵母菌萃取物加入該米水解液中，以製得發酵料源；及

(c) 將該芽孢桿菌HSIP-5加入該發酵料源中，使該芽孢桿菌HSIP-5在30℃至37℃的環境中利用該發酵料源進行發酵反應，藉此產生聚羥基烷酸酯。

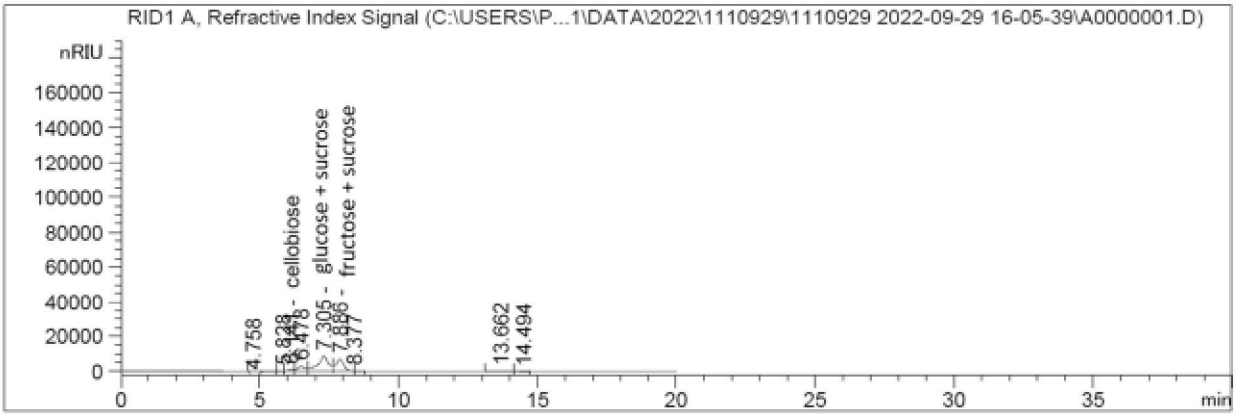
【請求項8】 如請求項7所述之方法，其中，在(b)步驟中，將濃度為25 g/L至30 g/L的酵母菌萃取物加入至該米水解液中。

【請求項9】 如請求項7所述之方法，其中，該米水解液中的糖濃度為120 g/L至130 g/L。

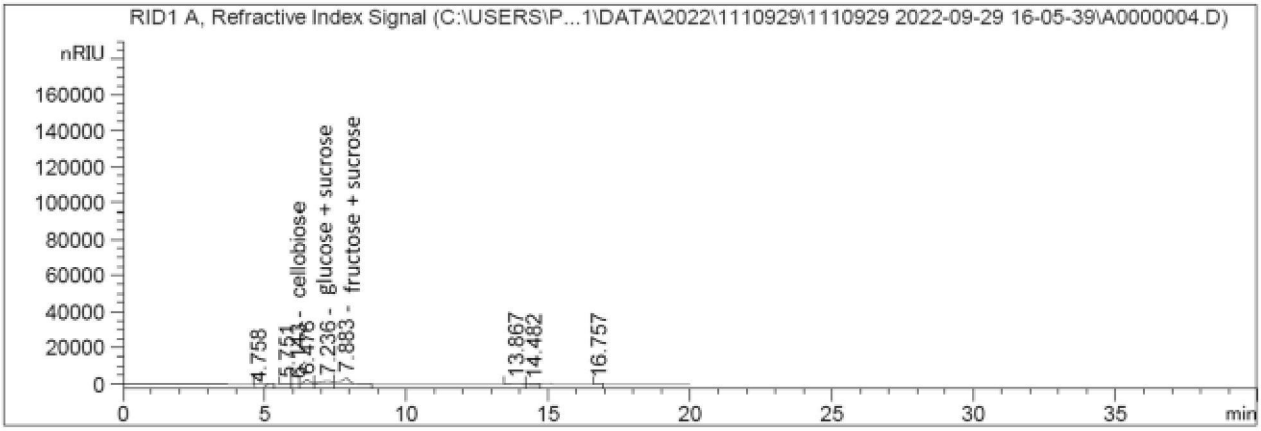
【發明圖式】


60
50
40
30
20
10
0
OD600
第0小時
第12小時
第24小時
第36小時
第48小時
時間
實驗組1
實驗組2
實驗組3
實驗組4

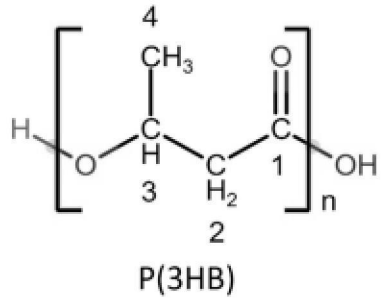
【圖1】


RID1 A, Refractive Index Signal (C:\USERS\P...1\DATA\2022\1110929\1110929 2022-09-29 16-05-39\A0000001.D)
nRIU
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
4.758
5.838 - cellobiose
6.478
7.305 - glucose + sucrose
7.886 - fructose + sucrose
8.377
13.662
14.494
0
5
10
15
20
25
30
35
min

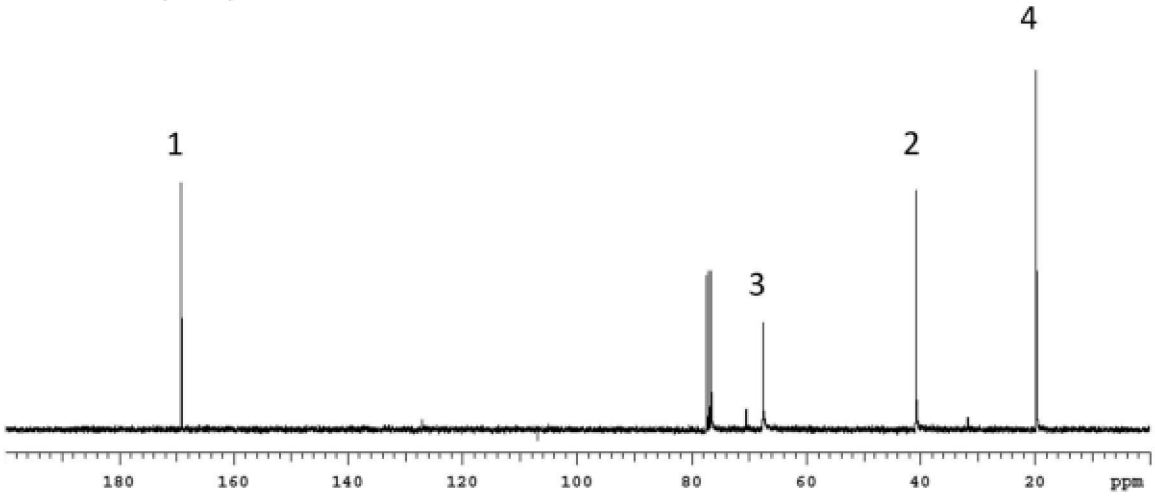
【圖2A】


RID1 A, Refractive Index Signal (C:\USERS\P...1\DATA\2022\1110929\1110929 2022-09-29 16-05-39\A0000004.D)
nRIU
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
4.758
5.751 - cellobiose
6.478
7.236 - glucose + sucrose
7.883 - fructose + sucrose
13.867
14.482
16.757
0
5
10
15
20
25
30
35
min

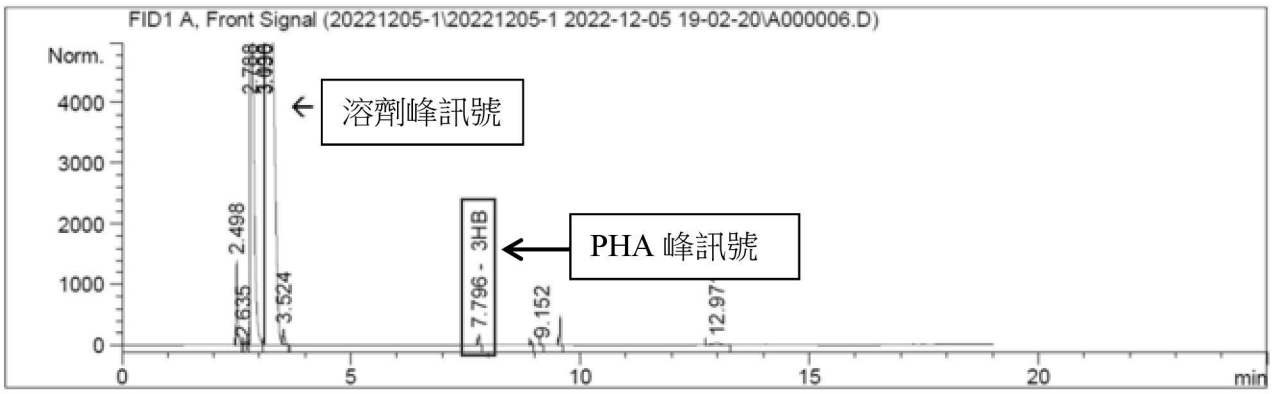
【圖2B】



P(3HB)

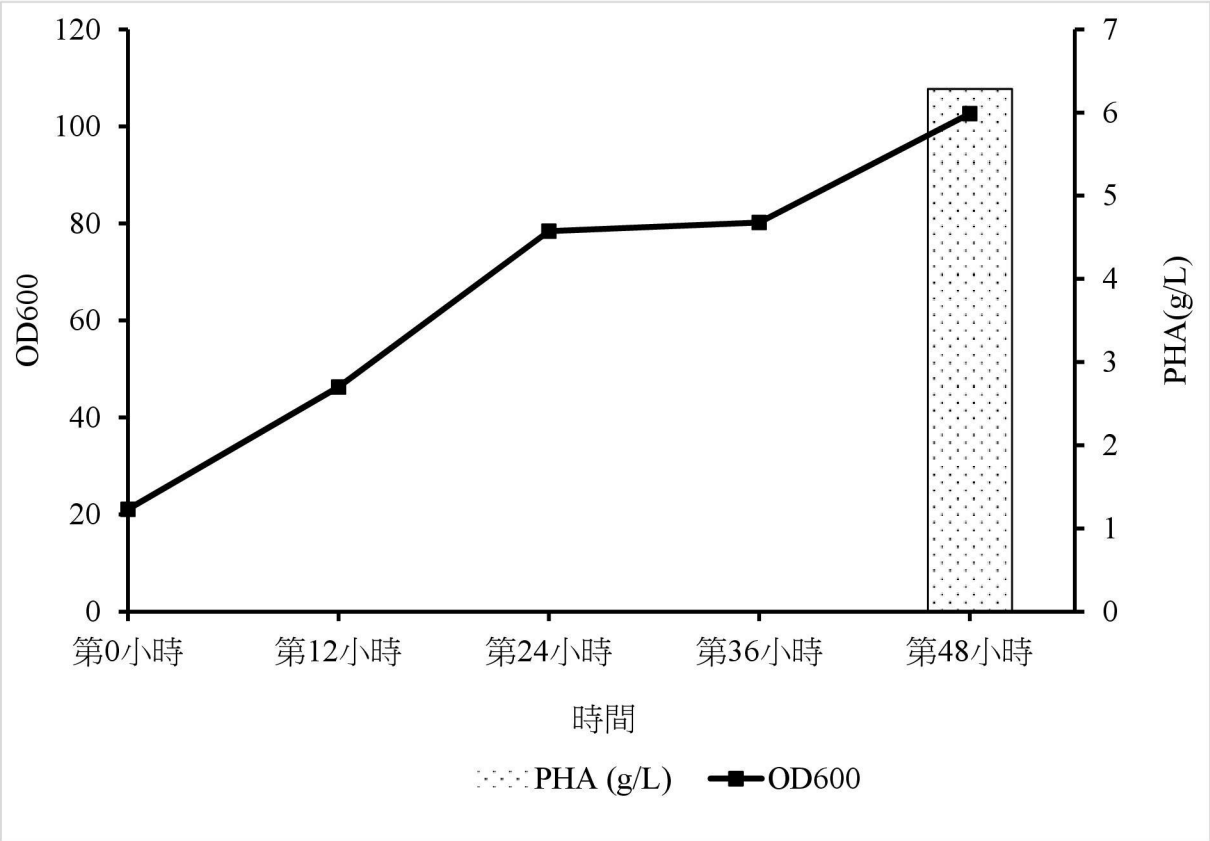


【圖3】

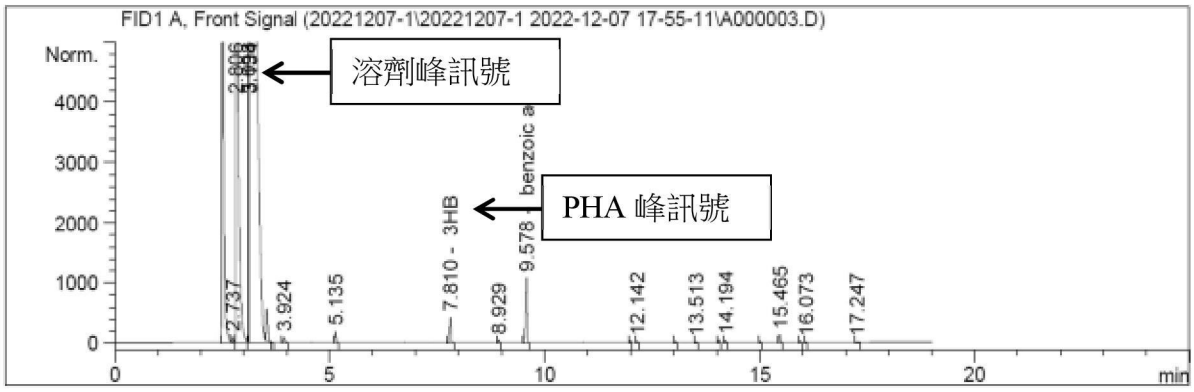


遲滯時間(分鐘)

【圖4】

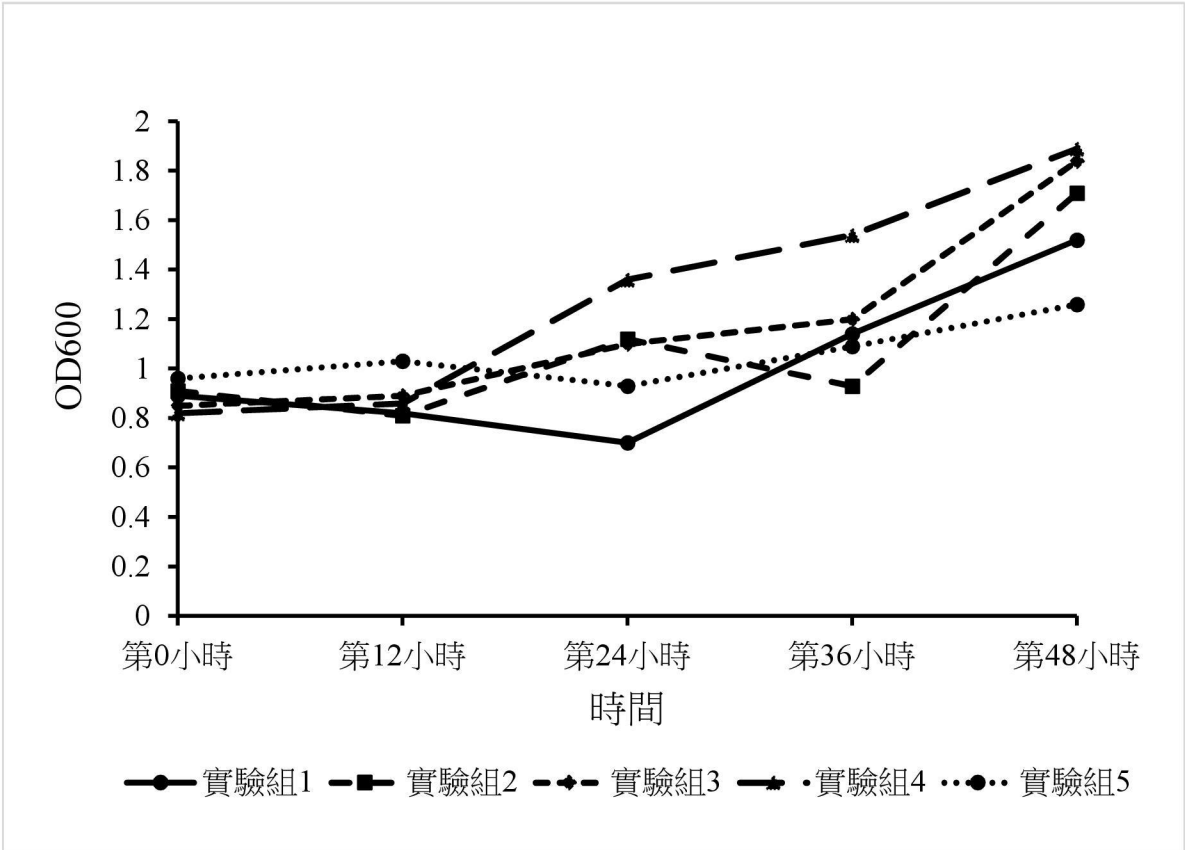

120
100
80
60
40
20
0
OD600
7
6
5
4
3
2
1
0
PHA(g/L)
第0小時
第12小時
第24小時
第36小時
第48小時
時間
PHA (g/L)
OD600

【圖5】


FID1 A, Front Signal (20221207-1\20221207-1 2022-12-07 17-55-11\A000003.D)
Norm.
溶劑峰訊號
PHA 峰訊號
benzoic a
7.810 - 3HB
9.578
2.737
3.924
5.135
8.929
12.142
13.513
14.194
15.465
16.073
17.247
min

遲滯時間(分鐘)

【圖6】


OD600
時間
第0小時
第12小時
第24小時
第36小時
第48小時
實驗組1
實驗組2
實驗組3
實驗組4
實驗組5

【圖7】