



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202000897 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 01 日

(21) 申請案號：108122974

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 28 日

(51) Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12P7/56 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

(30) 優先權：2018/06/29

中華民國

107122573

(71) 申請人：遠東新世紀股份有限公司 (中華民國) FAR EASTERN NEW CENTURY CORPORATION (TW)

臺北市大安區敦化南路 2 段 207 號 36 樓

(72) 發明人：莊育泉 CHUANG, YU-CHUAN (TW) ; 趙鐸駿 CHAO, TO-CHUN (TW)

(74) 代理人：高玉駿；楊祺雄

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：0 共 43 頁

(54) 名稱

具有高乳酸生產能力之凝結芽孢桿菌 RBE4-4 分離株及其用途

(57) 摘要

本發明揭示一株具有高乳酸-生產能力(high lactic acid-producing ability)的凝結芽孢桿菌(Bacillus coagulans) RBE4-4 分離株，它以寄存編號 BCRC 910831 被寄存於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心(BCRC)。該凝結芽孢桿菌 RBE4-4 分離株可被用於生產乳酸。

Disclosed herein is a Bacillus coagulans RBE4-4 isolate having high lactic acid-producing ability, which is deposited in the Bioresource Collection and Research Center (BCRC) of the Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) under accession number BCRC 910831. The Bacillus coagulans RBE4-4 isolate can be used for producing lactic acid.

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 具有高乳酸生產能力之凝結芽孢桿菌RBE4-4分離株及其用途

【英文發明名稱】 BACILLUS COAGULANS RBE4-4 ISOLATE  
HAVING HIGH LACTIC ACID-PRODUCING ABILITY AND  
USES OF THE SAME

### 【技術領域】

【0001】 本發明是有關於一株具有高乳酸生產能力 (high lactic acid-producing ability) 的凝結芽孢桿菌 (Bacillus coagulans) RBE4-4分離株，它以寄存編號BCRC 910831被寄存於財團法人食品工業發展研究所(FIRDI)的生物資源保存及研究中心(BCRC)，以及以寄存編號CCTCC M 2018310被寄存於中國典型培養物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。該凝結芽孢桿菌RBE4-4分離株可被用於生產乳酸。

### 【先前技術】

【0002】 纖維素生質 (cellulosic biomass) 是一種經由工業與農林業運作而可被大量地生產的可再生能源資源 (renewable energy resources)，其中，利用生物學方法來將纖維素生質轉換成乳酸 (lactic acid) 已被廣泛地研究與探討。

【0003】 當利用微生物來發酵纖維素生質以生成乳酸時，通常需要先將該纖維素生質經過適當的糖化(saccharification)，而使其中的纖維素(cellulose)與半纖維素(hemicellulose)釋出可發酵糖(fermentable sugars){包括六碳糖(hexoses)[主要為葡萄糖(glucose)]與五碳糖(pentoses)[主要為木糖(xylose)]}，藉此而得到一可供後續發酵(fermentation)使用的基質(substrate)，例如，纖維素水解液(cellulosic hydrolysate)。

【0004】 凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*)因可發酵五碳糖與六碳糖來生產乳酸，並且所生產的乳酸幾乎皆為L型(L-form)而具有接近100%的光學純度(optical purity)，因而已被廣泛利用於纖維素生質的發酵以生產乳酸。此外，凝結芽孢桿菌具有耐酸與耐高溫的特性，可於較低的pH值以及較高的溫度下進行發酵，藉此可減低菌體汙染的風險，甚至可以不需無菌操作以及相關滅菌程序(Qin J. et al. (2009), PLoS One, 4(2):e4359 ; Xue Z. W. et al. (2012), Springerplus., 1:43)。

【0005】 在 Patel M.A. et al. (2006), Appl. Environ. Microbiol., 72(5):3228-35中，Patel M.A.等人從土壤中分離出380株能夠利用木糖的細菌菌株，其中，凝結芽孢桿菌17C5以及36D1經由實驗證實可利用經氫氧化鈣超施石灰(calcium hydroxide overliming)處理的甘蔗渣水解液(sugarcane bagasse

hydrolysates)當中的可發酵糖來生產乳酸，並且具有所欲的乳酸產率。

**【0006】** 另外，在Rhee M.S. et al. (2011), *Stand. Genomic. Sci.*, 5(3):331-40中，Rhee M.S.等人進一步將凝結芽孢桿菌36D1拿來進行醣類發酵型態分析(carbohydrate fermentation profile analysis)，分析結果發現，凝結芽孢桿菌36D1可利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖(arabinose)、半乳糖(galactose)、麥芽糖(maltose)、果糖(fructose)以及纖維雙糖(cellobiose)，但無法利用纖維素與木聚糖(xylan)。

**【0007】** 經糖化的纖維素生質除了含有可發酵糖之外，通常還伴隨有因半纖維素與可發酵糖的降解所產生的發酵抑制物[例如醋酸、糠醛(furfural)、羥甲糠醛(hydroxymethyl furfural, HMF)，以及酚類化合物(phenolic compounds)等]，它們會抑制微生物的生長與發酵的進行，進而影響乳酸的產率。

**【0008】** 為了克服發酵抑制物所造成的負面影響，已有許多去毒處理(detoxification)被提出，它們包括：(1)物理去毒處理(physical detoxification)，諸如蒸發(evaporation)以及膜媒介的去毒處理(membrane mediated detoxification)；(2)化學去毒(chemical detoxification)，諸如上述氫氧化鈣超施石灰處理、中和(neutralization)、活性炭處理(activated charcoal treatment)

以及離子交換樹脂(ion exchange resins)；以及(3)生物去毒(biological detoxification)，諸如使用蟲漆酶(laccase)或木質素過氧化酶(lignin peroxidase)等。然而，這些去毒處理不但會使得發酵製程變得繁雜，更會提高所需要的成本，同時可能會使得可發酵糖流失。

**【0009】** CN 103667110 B 揭示一種新穎的凝結芽孢桿菌 CGMCC No. 7635。在該中國專利案的實施例中，凝結芽孢桿菌 CGMCC No. 7635 經由碳源發酵能力測試而被發現能夠利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖(mannose)、半乳糖以及纖維雙糖來發酵產乳酸，並且對於發酵抑制物[包括糠醛、羥甲糠醛、甲酸鹽、乙酸鹽以及香草醛(Vanilin)]具有良好的耐受性。接著，凝結芽孢桿菌 CGMCC No. 7635 被拿來進行同步糖化共發酵(simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF)製程並使用小麥、玉米秸稈(corn stover)、甘蔗渣以及柳枝稷(switchgrass)作為發酵基質。

**【0010】** 另外，在曲阜師範大學生物科學系的彭麗麗所著碩士論文(2014)(名稱：“耐受高濃度糠醛產L-乳酸菌株的篩選鑑定及其對纖維素水解液的發酵工藝研究”)中，彭麗麗自汗水處理場採集所得的樣品中分離並篩選出可生產乳酸的菌株，之後再以糠醛濃度梯度培養基進一步複篩而選出一株能夠耐受6 g/L糠醛的凝結芽孢桿

菌P38分離株。該凝結芽孢桿菌P38經生理生化特徵鑑定而被發現可利用葡萄糖、蔗糖以及木糖來發酵產乳酸，並且對於糠醛、甲酸、乙酸以及香草醛具有耐受性。

**【0011】** 雖然已存在有上述文獻報導，本技藝中仍然存在有一需要去開發出具有高乳酸-生產能力以及對發酵抑制物具有高度耐受性的菌株。

#### **【發明內容】**

##### **【0012】 發明概要**

**【0013】** 於是，在第一個方面，本發明提供一種凝結芽孢桿菌RBE4-4，它以寄存編號BCRC 910831被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，以及以寄存編號CCTCC M 2018310被寄存於中國典型培養物保藏中心。

**【0014】** 在第二個方面，本發明提供一種用於生產乳酸的方法，其包括：使用一如上所述的凝結芽孢桿菌RBE4-4來發酵一含有可發酵糖的基質，而使得乳酸被生成。

**【0015】** 本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例後，將變得明顯。

#### **【實施方式】**

##### **【0016】 發明的詳細說明**

**【0017】** 要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

**【0018】** 為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有(comprising)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括(comprises)”具有一對應的意義。

**【0019】** 除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。一熟悉本技藝者會認知到許多與那些被描述於本文中者相似或等效的方法和材料，它們可被用於實施本發明。當然，本發明決不受到所描述的方法和材料之限制。為表清楚，下面的界定被使用於本文中。

**【0020】** 目前利用微生物來將纖維素生質轉換成乳酸的方法已被廣泛地研究與探討。然而，在對纖維素生質進行前處理以及水解處理的過程中，常會伴隨產生發酵抑制物(例如，醋酸、糠醛、羥甲基糠醛以及酚類化合物等)，進而影響微生物發酵產生產乳酸的能力。因此，申請人積極致力於開發出具有高乳酸-生產能力以及對發酵抑制物具有高度耐受性的乳酸菌株。

**【0021】** 申請人從土壤中分離與篩選出5株乳酸菌分離株，繼而藉由評估其發酵五碳糖與六碳糖的能力，而進一步篩選出一株可共發酵五碳糖與六碳糖來生產大量乳酸的乳酸菌分離株，接著使用纖

維素水解液來對該乳酸菌分離株進行馴化，而得到一對於發酵抑制物具有良好的耐受性的乳酸菌分離株RBE4-4。該乳酸菌分離株RBE4-4經特徵鑑定而被歸屬於凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*)，它被申請人命名為“凝結芽孢桿菌RBE4-4”，並已於西元2018年3月2日以寄存編號BCRC 910831被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)。這個分離株亦有依據布達佩斯條約(the Budapest Treaty)的規定，於西元2018年5月28日以寄存編號CCTCC M 2018310被寄存於中國典型培養物保藏中心(CCTCC)。

**【0022】** 申請人接著在以纖維素水解液作為基質(substrate)的情況下使用凝結芽孢桿菌RBE4-4來進行分步水解共發酵(separate hydrolysis and co-fermentation, SHCF)以及同步糖化共發酵(simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF)製程，而結果顯示，無論是SHCF或SSCF製程，本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4皆能展現優異的乳酸發酵能力。

**【0023】** 基於上述，申請人認為：本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4可供用於大量生產乳酸。於是，本發明亦提供一種用於生產乳酸的方法，其包括：使用一如上所述的凝結芽孢桿菌RBE4-4來發酵一含有可發酵糖的基質，而使得乳酸被生成。

**【0024】** 如本文中所使用的，術語“可發酵糖(fermentable sugars)”意指任何水溶性且可以被凝結芽孢桿菌作為碳源來使用的糖類，包括單醣(monosaccharide)、雙醣(disaccharide)以及寡醣(oligosaccharide)。適用於本發明的可發酵糖包括，但不限於：葡萄糖、木糖(xylose)、阿拉伯糖(arabinose)、果糖(fructose)、半乳糖(galactose)、纖維雙糖(cellobiose)、甘露糖(mannose)、鼠李糖(rhamnose)、麥芽糖(maltose)、乳糖(lactose)、蜜二糖(melibiose)、海藻糖(trehalose)。較佳地，該可發酵糖是選自於下列所構成的群組：葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、纖維雙糖、半乳糖，以及它們的組合。

**【0025】** 依據本發明，該含有可發酵糖的基質是使用一糖化(saccharification)製程而由生質(biomass)所製得。

**【0026】** 如上所述之用於製備該含有可發酵糖的基質的“糖化”製程可以在發酵製程之前被終止，或者可以在發酵製程的期間被持續地進行。當該用於製備含有可發酵糖的基質的糖化製程要在該發酵製程之前被終止時，該糖化製程可以被設計為在該發酵製程之前實質上(substantially)完全地或部分地水解該生質的纖維素。當該用於製備含有可發酵糖的基質的糖化製程要在發酵製程期間被持續地進行時，該糖化製程可以被設計為在該發酵製程的期間實質上完全地或部分地水解剩餘的纖維素。

**【0027】** 因此，依據本發明的方法可進一步包括令一生質進行糖化，以生成該含有可發酵糖的基質。

**【0028】** 依據本發明，該糖化可在該發酵期間被進行，或者在該發酵之前被進行。換言之，該發酵製程可為SSCF或SHCF製程。當意欲進行SHCF製程時，該糖化製程可在該發酵製程之前被進行來實質上完全地水解該生質中的纖維素，因而可以在該發酵製程之前被終止。當意欲進行SSCF製程時，該糖化製程可在發酵製程之前被進行來部分地水解該生質中的纖維素，因而可以在該發酵製程期間被持續地進行來水解在該含有可發酵糖的基質中剩餘的纖維素。

**【0029】** 如本文中所使用的，術語“生質”、“纖維素生質 (cellulosic biomass)”與“木質纖維素生質 (lignocellulosic biomass)”可被交替地使用，並且意指任何包括纖維素、半纖維素、木質素、澱粉、寡醣和/或單醣之纖維素材料。

**【0030】** 依據本發明，該生質可以衍生自一單一來源，或者該纖維素生質可以包含一衍生自多種來源的混合物。例如，該纖維素生質可以為一由玉米秸稈(corn stover)與玉米穗軸(corn cobs)所構成之混合物，或者一由禾草(grass)與葉所構成之混合物。

**【0031】** 適用於本發明的生質包括，但不限於：生物能源作物 (bioenergy crops)、農業殘餘物 (agricultural residues)、都市固體廢棄物 (municipal solid waste)、工業固體廢棄物 (industrial

solid waste)、來自造紙的淤泥(sludge from paper manufacture)、庭園廢棄物(yard waste)、廢材(wood waste)與林業廢棄物(forestry waste)，以及它們的組合。

**【0032】** 較佳地，該生質是選自於下列所構成的群組：芒草(miscanthus)、軟木(softwood)、硬木(hardwood)、玉米穗軸、作物殘渣(crop residues)[諸如玉米殼(corn husks)]、玉米秸稈、禾草、麥稈(wheat straw)、大麥稈(barley straw)、乾草(hay)、稻稈(rice straw)、柳枝稷(switchgrass)、廢紙(waste paper)、甘蔗渣(sugarcane bagasse)、蜀黍植物材料(sorghum plant material)、大豆植物材料(soybean plant material)、得自穀粒(grains)之研磨的組分、樹木、樹枝、根、葉、木屑(sawdust)、灌木(shrubs)與灌木叢(bushes)、蔬菜、水果以及花，以及它們的組合。在本發明的一個較佳具體例中，該生質是稻稈。

**【0033】** 如本文中所使用的，術語“糖化(saccharification)”與“水解(hydrolysis)”可被交替地使用，並且意指從生質中的多醣(polysaccharide)(例如，纖維素以及半纖維素等)產生可發酵糖。

**【0034】** 依據本發明，該用於製備含有可發酵糖的基質的糖化是一使用纖維素酶(cellulase)的酵素水解處理。有關使用纖維素酶的酵素水解處理的操作程序與參數條件等是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。除了纖維素酶之外，該酵素水解

處理可以進一步使用半纖維素酶(hemicellulase)(亦即，一由纖維素酶與半纖維素酶所構成之混合物可以被用來進行該酵素水解處理)。

**【0035】** 在本發明的某些具體例中，使用該纖維素酶與半纖維素酶混合物的糖化製程可以在一範圍落在50至65°C內的溫度下於歷時48至72小時的攪拌下被進行，俾以在該發酵製程之前實質上完全地水解該生質中的纖維素。在一個示範性具體例中，當意欲進行SHCF製程時，該用於在該發酵製程之前實質上完全地水解該生質中的纖維素的糖化製程是在一為50至55°C的溫度下於歷時48小時的攪拌下被進行。

**【0036】** 在本發明的其他具體例中，使用該纖維素酶與半纖維素酶混合物的糖化製程可以在一範圍落在50至55°C內的溫度下於歷時8至12小時的攪拌下被進行，俾以在該發酵製程之前部分地水解該生質中的纖維素，因而該糖化製程可以在該發酵製程期間被持續地進行來水解該剩餘的纖維素。在一個示範性具體例中，當意欲進行SSCF製程時，該用於部份地水解該生質中的纖維素的糖化製程是在一為50至55°C的溫度下於歷時12小時的攪拌下被進行，並且在該發酵製程期間(亦是使用該纖維素酶與半纖維素酶混合物)被持續地進行來水解剩餘的纖維素。

【0037】 依據本發明，該含有可發酵糖的基質是一包含有葡萄糖以及木糖的纖維素水解液。

【0038】 如本文中所使用的，術語“纖維素水解液(cellulosic hydrolysate)”、“木質纖維素水解液(lignocellulosic hydrolysate)”與“生質水解液(biomass hydrolysate)”可被交替地使用。

【0039】 依據本發明，該生質在進行該糖化之前可被進行一前處理(pretreatment)。

【0040】 依據本發明，該前處理可破壞該生質所含有的木質素以及纖維素的結構和/或促進該生質所含有的半纖維素水解，進而提高後續糖化的效率。適用於本發明的前處理包括，但不限於：蒸氣爆裂(steam explosion)、熱化學前處理法(thermal chemical pretreatment)、機械粉碎、酸處理、有機溶解(organosolv)、亞硫酸鹽前處理(sulfite pretreatment)，以及它們的組合。在本發明的一個較佳具體例中，該前處理是酸催化的蒸氣爆裂(acid-catalyzed steam explosion)。有關前處理的操作程序與參數條件等是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。

【0041】 依據本發明，該含有可發酵糖的基質可進一步含有至少一種選自於由下列所構成之群組中的發酵抑制物：甲酸、醋酸、羥甲糠醛、糠醛以及酚類化合物。

**【0042】** 較佳地，該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至6 g/L的甲酸。更佳地，該含有可發酵糖的基質含有0.5至3 g/L的甲酸。

**【0043】** 較佳地，該含有可發酵糖的基質進一步含有1至45 g/L的醋酸。更佳地，該含有可發酵糖的基質含有1至35 g/L的醋酸。

**【0044】** 較佳地，該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至7 g/L的羥甲糠醛。更佳地，該含有可發酵糖的基質含有1至5 g/L的羥甲糠醛。

**【0045】** 較佳地，該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至8 g/L的糠醛。更佳地，該含有可發酵糖的基質含有1至5 g/L的糠醛。

**【0046】** 較佳地，該含有可發酵糖的基質進一步含有0.3至4 g/L的酚類化合物。更佳地，該含有可發酵糖的基質含有0.5至2.5 g/L的酚類化合物。

**【0047】** 依據本發明，該發酵是在一範圍落在5至8的pH值的條件下被進行。較佳地，該發酵是在一範圍落在5.5至7.0的pH值的條件下被進行。

#### **【0048】 較佳實施例之詳細說明**

**【0049】** 本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

## 實施例

### 一般實驗材料：

1. 高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)分析：

**【0050】** 在下面的實施例中，纖維素水解液以及發酵培養物中所含有的葡萄糖、木糖、乳酸、醋酸、羥甲糠醛和/或糠醛及其等成份之濃度(g/L)是參考美國國家再生能源實驗室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)所頒布的有關標準生物質分析之實驗室分析程序(laboratory analytical procedures, LAPs)，並藉由使用一配備有一個折射率(RI)偵測器[refractive index (RI) detector]的高效能液相層析儀(DIONEX Ultimate 3000)來進行測定，而有關HPLC的各項操作參數與條件被顯示於下面的表1中。

表 1. HPLC 的操作參數與條件

| 操作參數  | 條件   |
|-------|--|
| 分離管柱  | Aminex HPX-87H 管柱(BioRad, Cat No. 1250140) |
| 管柱規格  | 300 mm × 7.8 mm                            |
| 管柱溫度  | 65 °C                                      |
| 偵測器溫度 | 45 °C                                      |
| 移動相   | 5 mM 硫酸溶液                                  |
| 流速    | 0.6 mL/分鐘                                  |

**實施例1. 具有高乳酸生產能力之可共發酵五碳糖與六碳糖的乳酸菌分離株的篩選 (Screening of pentose-and-hexose-co-fermenting lactic acid bacteria isolates having high lactic acid-producing ability)**

**A、 分離與篩選具有高乳酸生產能力的乳酸菌分離株：**

**【0051】** 申請人使用採集自台北市陽明山國家公園的土壤作為樣品來源。具有乳酸生產能力的乳酸菌的分離、篩選以及純化方法如下。首先，將2 g的土壤樣品加入至50 mL之含有10 g/L酵母萃取物(yeast extract)以及20 g/L木糖的液態培養基中並予以混合均勻，繼而置於一恆溫振盪培養箱(50 °C、150 rpm)中進行培養歷時12至16小時。將所得到的培養物以無菌水進行10倍連續稀釋(10-fold serial dilution)而配製成多個具有不同稀釋倍數

( $10^1 \sim 10^7$  倍)的培養物，然後分別取出0.1 mL並將之均勻塗佈於第一碳酸鈣瓊脂培養盤[含有10 g/L酵母萃取物、20 g/L木糖、5 g/L碳酸鈣以及15 g/L瓊脂(agar)，pH 6]上，繼而在50°C下靜置培養24至48小時。依據乳酸菌所生產出的乳酸會與碳酸鈣反應而形成無色的乳酸鈣之特性，挑選出能在該第一碳酸鈣瓊脂培養盤上快速生長並形成透明圈之菌落(colony)，接著以四區劃線法(four-quadrant streak method)將所挑選出的菌落分別塗佈於第二碳酸鈣瓊脂培養盤(含有10 g/L酵母萃取物、50 g/L木糖、15 g/L碳酸鈣以及15 g/L瓊脂，pH 6)上，繼而在50°C下靜置培養24至48小時。申請人挑選出菌落面積以及透明圈面積較大之乳酸菌分離株，並以該第二碳酸鈣瓊脂培養盤予以篩選與純化數次，而得到5株經純化的乳酸菌分離株RBE1、RBE2、RBE3、RBE4以及RBE5。

#### B、製備乳酸菌分離株RBE1至5的接種源(inoculum)：

【0052】 將依據上面第A項中所得到的乳酸菌分離株RBE1至5分別以一為 $5 \times 10^9$ 細胞/mL的接種量接種至90 mL的YPD40培養基[含有10 g/L酵母菌萃取物、40 g/L葡萄糖以及20 g/L蛋白腴(peptone)]，並加入適量之 $\text{CaCO}_3$ 將pH值調整至5至7，繼而將之置於一恆溫振盪培養箱(50°C、150 rpm)內進行培養歷時24小時。由此所得到的培養物被使用作為下面實施例中的乳酸菌分離株的接種源。

### C、篩選可共發酵五碳糖與六碳糖來生產乳酸的乳酸菌分離株

**【0053】** 將依據上面第B項中所得到的乳酸菌分離株RBE1至5的接種源各自分成1個五碳糖組、1個六碳糖組以及1個雙糖組(dual sugar group)，繼而將各組以一為10% (v/v)的接種量分別接種至含有對應的醣類組成之具有如下面表2中所示的配方的發酵培養基(90 mL)中。

表2. 各組發酵培養基的配方

| 組別   | 葡萄糖<br>(g/L) | 木糖<br>(g/L) | 碳酸鈣<br>(g/L) | 酵母萃取物<br>(g/L) |
|------|--------------|-------------|--------------|----------------|
| 五碳糖組 | -            | 50          | 30           | 10             |
| 六碳糖組 | 100          | -           | 60           | 10             |
| 雙糖組  | 85           | 45          | 75           | 10             |

**【0054】** 接著，將五碳糖組、六碳糖組以及雙糖組在一厭氧條件下於一恆溫振盪培養箱(50至52°C、150 rpm)中分別進行發酵反應歷時16、24以及54小時。之後，將所得到的各組發酵培養物於12,000 rpm下予以離心歷時6分鐘，而所得到之發酵產物(fermentation product)是依據上面“一般實驗方法”的第1項「高效能液相層析分析」當中所述的方法來進行乳酸的含量分析。

**【0055】** 乳酸產率是參考Y. C. Kuo et al. (2015), *Bioresour. Technol.*, 198:651-7當中所述的方法將所測得的乳酸含量以及發酵時間代入下列公式(1)而被計算出：

公式(1)：  $A = B/C$

其中：A = 乳酸產率(g/L/h)

B = 所測得的乳酸含量(g/L)

C = 發酵時間(h)

【0056】 所得到的結果被顯示在下面的表3中。

表3. 各組所測得的乳酸產率

| 乳酸菌分離株 | 乳酸產率(g/L/h) |      |      |       |      |
|--------|-------------|------|------|-------|------|
|        | RBE1        | RBE2 | RBE3 | RBE4  | RBE5 |
| 五碳糖組   | 1.04        | 2.1  | 1.23 | 2.837 | 2.3  |
| 六碳糖組   | 3.2         | 3    | 2.4  | 3.95  | 2.8  |
| 雙糖組    | 1.25        | 2.2  | 1.32 | 2.314 | 2    |

【0057】 由表3可見，無論是五碳糖組、六碳糖組以及雙糖組，乳酸菌分離株RBE4的產率皆高於其他乳酸菌分離株所具者。申請人據此而認為：乳酸菌分離株RBE4具有開發潛力，因此將它拿來進行下面的馴化。

**實施例2. 以纖維素水解液對乳酸菌分離株RBE4進行馴化(acclimatization)**

【0058】 於本實施例中，申請人以纖維素水解液來對乳酸菌分離株RBE4進行馴化，藉此提升其對纖維素水解液中之發酵抑制物的耐受性，進而提高乳酸產量。

**實驗材料：**

**【0059】** 首先，將作為纖維素生質的稻稈(購自於宏遠農業商行)切成0.5 cm的長度，繼而以粉碎機予以粉碎，接著加入30 g/L硫酸溶液予以混合均勻，並在121℃下進行反應歷時120至180分鐘。之後，將所得到的混合物置於一立式圓筒型高壓蒸煮槽(購自於七福工業股份有限公司)，繼而通入蒸氣並在一為190至200℃的溫度下進行加熱處理歷時5分鐘。接著，使用一板框式壓濾機(購自於水麗科技股份有限公司，型號FP500-5)來對藉由上述酸催化蒸氣爆裂前處理(acid-catalyzed steam explosion pretreatment)所得到的蒸煮液進行高壓過濾處理以將其固形物含量調整至約25%。接著，以25%的氨水來將pH值調整至4.8-5.5，繼而加入一由纖維素酶(cellulase)與半纖維素酶(hemicellulase)所構成之酵素混合物(Novozymes Cellic<sup>®</sup> CTec3，使用量為15至30 FPU/g纖維素生質)，並在一為50至55℃的溫度以及一為70 rpm的攪拌速率下進行纖維素分解處理(cellulolytic processes)歷時48小時。之後，進行高壓過濾處理以去除固形物，藉此而得到一纖維素水解液。

**【0060】** 所得到的纖維素水解液是依據上面“一般實驗方法”的第1項「高效能液相層析分析」當中所述的方法來進行醣類以及發酵抑制物的含量分析。所得到的結果被顯示在下面的表4中。

表4. 纖維素水解液中的醣類與發酵抑制物的含量

| 成分   | 含量(g/L) |
|------|---------|
| 葡萄糖  | 97      |
| 木糖   | 17      |
| 醋酸   | 3-5     |
| 糠醛   | 2-3.5   |
| 羥甲糠醛 | 1-2     |

**【0061】** 最後，對該纖維素水解液添加3 g/L的酵母萃取物，繼而在121℃下進行滅菌處理歷時20分鐘，藉此而得到一經滅菌的纖維素水解液。

#### 實驗方法：

**【0062】** 將於上面實施例1的第B項「製備乳酸菌分離株RBE1-5的接種源」當中所得到的乳酸菌分離株RBE4的接種源以一為1% (v/v)的接種量接種至99 mL的經滅菌的纖維素水解液中，繼而在一厭氧條件下於一恆溫振盪培養箱中(50至52℃、150 rpm)進行培養歷時72小時。

**【0063】** 接著，將所得到的培養物塗佈於第二碳酸鈣篩選培養盤上，並在50℃下靜置培養24至48小時，繼而從中挑選出生長快速之菌落。上述接種-培養-篩選步驟被重複進行100次，而得到一經馴化的乳酸菌分離株RBE4-4。

#### 實施例3. 乳酸菌分離株RBE4-4對於發酵抑制物的耐受性之評估

**實驗方法：**

**【0064】** 有關乳酸菌分離株RBE4-4對於發酵抑制物(包括糠醛、羥甲糠醛、醋酸以及甲酸)的耐受性之評估大體上是參考CN 103667110 B當中所述的方法來進行。首先，申請人將乳酸菌分離株RBE4-4以一為 $5 \times 10^9$ 細胞/mL的接種量接種至90 mL的YPD40培養基中，繼而置於一恆溫振盪培養箱中(50°C、150 rpm)進行培養過夜。接著，將所得到的乳酸菌分離株RBE4-4的培養物分為1個對照組以及10個實驗組(亦即實驗組1至10)，並將實驗組1至10以一為1% (v/v)的接種量分別接種至添加有不同濃度的糠醛(亦即1、2、3、4、5、6、7、8、9與10 g/L)之MRS乳桿菌肉湯培養基(Difco™ Lactobacilli MRS broth)(BD Bioscience，購自於啟新生物科技有限公司)(99 mL)中，而對照組則是以相同的接種量被接種至未添加糠醛的MRS乳桿菌肉湯培養基(99 mL)中。

**【0065】** 將各組的培養物置於一恆溫振盪培養箱中(50°C、150 rpm)進行培養歷時24小時後，分別自各組的培養物中取100  $\mu$ L的體積並加入至一96-井培養盤的各井中，繼而於420 nm的波長下以一分光光度計(Thermo Scientific, BioMate™ 3S)來讀取各井的吸光值(OD<sub>420</sub>)。

**【0066】** 各組的相對光學密度(%) (relative optical density, ROD)是藉由將所測得的OD<sub>420</sub>代入下列公式(2)而被計算出：

$$\text{公式(2)} : D = (E/F) \times 100$$

其中：D = ROD (%)

E = 各組所測得的OD<sub>420</sub>

F = 對照組所測得的OD<sub>420</sub>

**【0067】** 乳酸菌分離株RBE4-4對於羥甲糠醛、醋酸以及甲酸的耐受性評估大體上是參照上面針對糠醛所描述的方式來進行實驗，不同之處在於：分別將不同濃度的羥甲糠醛(1、2、3、4、5、6與7 g/L)、醋酸(10、20、30、35、40與45 g/L)以及甲酸(1、2、3、4、5、6與7 g/L)添加至對應數量的實驗組中來替代糠醛。此外，為供比較，未經馴化的乳酸菌分離株RBE4被拿來進行相同實驗來評估乳酸菌分離株RBE4對於糠醛、羥甲糠醛以及醋酸的耐受性評估。

**【0068】** 針對不同的發酵抑制物所得到的實驗結果分別被顯示於下面的表5、表6、表7以及表8中。

表5. 在不同的糠醛濃度下所測得的各組ROD

| 組別     | 糠醛濃度<br>(g/L) | ROD (%)        |                  |
|--------|---------------|----------------|------------------|
|        |               | 乳酸菌分離株<br>RBE4 | 乳酸菌分離株<br>RBE4-4 |
| 對照組    | 0             | 100            | 100              |
| 實驗組 1  | 1             | 96.8           | 100              |
| 實驗組 2  | 2             | 96.3           | 99               |
| 實驗組 3  | 3             | 30.3           | 97               |
| 實驗組 4  | 4             | 0              | 60.9             |
| 實驗組 5  | 5             | 0              | 50.6             |
| 實驗組 6  | 6             | -              | 45.3             |
| 實驗組 7  | 7             | -              | 31.4             |
| 實驗組 8  | 8             | -              | 18.5             |
| 實驗組 9  | 9             | -              | 1.2              |
| 實驗組 10 | 10            | -              | 1                |

表6. 在不同的羥甲糠醛濃度下所測得的各組ROD

| 組別    | 羥甲糠醛<br>濃度<br>(g/L) | ROD (%)        |                  |
|-------|---------------------|----------------|------------------|
|       |                     | 乳酸菌分離株<br>RBE4 | 乳酸菌分離株<br>RBE4-4 |
| 對照組   | 0                   | 100            | 100              |
| 實驗組 1 | 1                   | 100            | 100              |
| 實驗組 2 | 2                   | 92.4           | 100              |
| 實驗組 3 | 3                   | 15.3           | 97.4             |
| 實驗組 4 | 4                   | 0              | 80.2             |
| 實驗組 5 | 5                   | 0              | 57.5             |
| 實驗組 6 | 6                   | -              | 31.4             |
| 實驗組 7 | 7                   | -              | 16.4             |

表7. 在不同的醋酸濃度下所測得的各組ROD

| 組別    | 醋酸濃度<br>(g/L) | ROD (%)        |                  |
|-------|---------------|----------------|------------------|
|       |               | 乳酸菌分離株<br>RBE4 | 乳酸菌分離株<br>RBE4-4 |
| 對照組   | 0             | 100            | 100              |
| 實驗組 1 | 10            | 100            | 100              |
| 實驗組 2 | 20            | 76.5           | 99               |
| 實驗組 3 | 30            | 36.86          | 82.7             |
| 實驗組 4 | 35            | 0              | 77.8             |
| 實驗組 5 | 40            | 0              | 38.1             |
| 實驗組 6 | 45            | -              | 25.9             |

表8. 在不同的甲酸濃度下所測得的各組ROD

| 組別    | 甲酸濃度<br>(g/L) | ROD (%)       |
|-------|---------------|---------------|
|       |               | 乳酸菌分離株 RBE4-4 |
| 對照組   | 0             | 100           |
| 實驗組 1 | 1             | 91.9          |
| 實驗組 2 | 2             | 60.2          |
| 實驗組 3 | 3             | 58.2          |
| 實驗組 4 | 4             | 49.5          |
| 實驗組 5 | 5             | 22.8          |
| 實驗組 6 | 6             | 11.4          |
| 實驗組 7 | 7             | 1.6           |

【0069】 由表5可見，無論在何種濃度的糠醛的存在下，乳酸菌分離株RBE4-4所測得的ROD皆高於乳酸菌分離株RBE4所具者，這表示乳酸菌分離株RBE4-4在糠醛的存在下的生長情形是優於乳酸菌分離株RBE4所具者。特別地，當糠醛的濃度達至4 g/L以上時，乳酸菌分離株RBE4即已無法生長，而乳酸菌分離株RBE4-4在濃度

達至5 g/L時仍可大量生長，並且在7 g/L的糠醛的存在下的生長情形近似於乳酸菌分離株RBE4在3 g/L的糠醛的存在下所具者。

**【0070】** 由表6可見，當羥甲糠醛濃度為2 g/L以上時，乳酸菌分離株RBE4-4所測得的ROD皆高於乳酸菌分離株RBE4所具者，這表示乳酸菌分離株RBE4-4在羥甲糠醛存在下的生長情形是優於乳酸菌分離株RBE4所具者。特別地，當羥甲糠醛的濃度達至4 g/L以上時，乳酸菌分離株RBE4即已無法生長，而乳酸菌分離株RBE4-4在濃度達至5 g/L時仍可大量生長，並且在7 g/L的羥甲糠醛的存在下的生長情形近似於乳酸菌分離株RBE4在3 g/L的羥甲糠醛的存在下所具者。

**【0071】** 由表7可見，當醋酸濃度為20 g/L以上時，乳酸菌分離株RBE4-4所測得的ROD皆高於乳酸菌分離株RBE4所具者，這表示乳酸菌分離株RBE4-4在醋酸存在下的生長情形是優於乳酸菌分離株RBE4所具者。特別地，當醋酸的濃度達至35 g/L以上時，乳酸菌分離株RBE4即已無法生長，而乳酸菌分離株RBE4-4在濃度達至40 g/L時仍可大量生長，並且在40 g/L的醋酸的存在下的生長情形近似於乳酸菌分離株RBE4在30 g/L的醋酸的存在下所具者。

**【0072】** 由表8可見，當甲酸濃度達至3 g/L時，乳酸菌分離株RBE4-4仍可大量生長。

**【0073】** 這個實驗結果顯示，相較於未經纖維素水解液馴化的乳酸菌分離株RBE4，經馴化的乳酸菌分離株RBE4-4對於糠醛、羥甲糠醛以及醋酸具有更高的耐受性。另外，經馴化的乳酸菌分離株RBE4-4對於甲酸亦具有良好的耐受性。

#### **實施例4. 乳酸菌分離株RBE4-4的特徵鑑定**

**【0074】** 為了確認在上面實施例中所篩選出的乳酸菌分離株RBE4-4之所屬菌種，乳酸菌分離株RBE4-4被拿來進行下面的初步試驗、醣類發酵型態(carbohydrate fermentation profile)分析、16S rDNA序列分析，以及不同碳源的發酵測試。

##### **A、 初步試驗：**

**【0075】** 申請人對乳酸菌分離株RBE4-4進行初步試驗，試驗項目包括：形態觀察(morphological observation)以及是否具有抗生素抗性(antibiotic resistance)。

**【0076】** 依據初步試驗結果，乳酸菌分離株RBE4-4為桿菌，並且對於安比西林(ampicillin)、氯黴素(chloramphenicol)、康那黴素(kanamycin)，以及四環黴素(tetracycline)不具有抗性。

##### **B、 醣類發酵型態分析：**

**【0077】** 關於醣類發酵型態的分析是委託財團法人食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)的生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and

Research Center, BCRC)並使用API 50 CHB鑑定套組V4.1 (API 50 CHB identification kit V4.1)(bioMérieux)來進行，而所得到的分析結果被顯示於下面的表9中。

表 9. 乳酸菌分離株 RBE4-4 的醣類發酵型態分析結果

| 醣類   | 能否利用所測試的醣類進行發酵並產酸 |
|--|-------------------|
| 甘油(glycerol)   | +                 |
| 赤藻糖醇(erythritol)   | +                 |
| D-阿拉伯糖(D-arabinose)  | -                 |
| L-阿拉伯糖(L-arabinose)  | +                 |
| 核糖(ribose)   | +                 |
| D-木糖(D-xylose)   | +                 |
| L-木糖(L-xylose)   | -                 |
| 核糖醇(adonitol)  | -                 |
| 甲基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷<br>(methyl- $\beta$ -D-xylopyranoside)      | -                 |
| 半乳糖(galactose)   | +                 |
| 葡萄糖(glucose)   | +                 |
| 果糖(fructose)   | +                 |
| 甘露糖(mannose)   | +                 |
| 山梨糖(sorbose)   | -                 |
| 鼠李糖(rhamnose)  | +                 |
| 半乳糖醇(dulcitol)   | -                 |
| 肌醇(inositol)   | -                 |
| 甘露糖醇(mannitol)   | -                 |
| 山梨糖醇(sorbitol)   | +                 |
| 甲基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷<br>(methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside)  | -                 |
| 甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃糖苷<br>(methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside) | -                 |
| N-乙酰葡萄糖胺<br>(N-acetylglucosamine)                                | +                 |
| 苦杏仁苷(amygdalin)  | -                 |
| 熊果苷(arbutin)   | +                 |

|   |   |
|---|---|
| 栗糖苷(esculin)                            | + |
| 柳苷(salicin)                             | + |
| 纖維雙糖(cellobiose)                        | + |
| 麥芽糖(maltose)                            | + |
| 乳糖(lactose)                             | + |
| 蜜二糖(melibiose)                          | + |
| D-蔗糖(D-saccharose)                      | - |
| 海藻糖(trehalose)                          | + |
| 菊糖(inulin)                              | - |
| 松三糖(melezitose)                         | - |
| 棉子糖(raffinose)                          | - |
| 美沙酮(amidon)                             | - |
| 肝醣(glycogen)                            | - |
| 木糖醇(xylitol)                            | - |
| 龍膽二糖(gentiobiose)                       | - |
| D-松二糖(D-turanose)                       | - |
| D-來蘇糖(D-lyxose)                         | - |
| 塔格醣(tagatose)                           | - |
| D-鹿角藻糖(D-fucose)                        | - |
| L-鹿角藻糖(L-fucose)                        | - |
| D-阿拉伯糖醇(D-arabitol)                     | - |
| L-阿拉伯糖醇(L-arabitol)                     | - |
| 葡萄糖酸(gluconate)                         | - |
| 2-酮葡萄糖酸鉀<br>(potassium 2-ketogluconate) | - |
| 5-酮葡萄糖酸鉀<br>(potassium 5-ketogluconate) | - |

註：“+”表示能夠利用所測試的醣類進行發酵並產酸，而“-”表示無法利用所測試的醣類進行發酵。

**【0078】** 將上述分析結果與APIWEB™線上細菌與酵母菌資料庫(APIWEB™ on-line bacterial and yeast database)進行比對後發現：本發明的乳酸菌分離株RBE4-4的醣類發酵型態與凝結芽孢桿菌(Bacillus coagulans)所具者之間具有95.5%的相同性(identity)。

**C、 16S rDNA序列分析：**

**【0079】** 首先，使用一細菌基因組DNA純化套組(Bacterial genomic DNA purification kit)(購自於賽恩斯生物科技股份有限公司)來萃取乳酸菌分離株RBE4-4的基因組DNA，繼而以所得到的基因組DNA作為模板(template)，並使用習知針對細菌的16S rDNA基因所設計之一前向引子(forward primer) 27F (Weisburg W.G. et al. (1991), J. Bacteriol., 173(2): 697-703)(序列辨識編號：1)以及一反向引子(reverse primer) pH' (Edwards U. et al. (1989), Nucleic Acids Res., 17(19): 7843-53)(序列辨識編號：2)來進行聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)，俾以擴增出乳酸菌分離株RBE4-4的16S rDNA片段。之後，委託明欣生物科技股份有限公司來進行定序分析，而得到乳酸菌分離株RBE4-4的16S rDNA序列(序列辨識編號：3)。經與NCBI網站中的基因資料庫比對後發現，乳酸菌分離株RBE4-4的16S rDNA序列與凝結芽孢桿菌36D1的部分16S rDNA序列[Genbank登錄編號(accession number) CP003056.1]之間具有99%的相似性。

**【0080】** 依據上面第A至C項的實驗結果，本發明的乳酸菌分離株RBE4-4被初步鑑定是凝結芽孢桿菌，而為了確認凝結芽孢桿菌RBE4-4是否為一種新穎的凝結芽孢桿菌分離株，凝結芽孢桿菌RBE4-4被進一步拿來進行下面的分析。

**D、不同碳源的發酵測試：**

**【0081】** 依據Rhee M.S. et al. (2011)(同上述)的揭示內容，凝結芽孢桿菌36D1可利用葡萄糖作為生長或發酵所需的碳源，但無法利用纖維素(cellulose)與木聚糖(xylan)。因此，申請人選用葡萄糖、纖維素以及木聚糖作為碳源來對凝結芽孢桿菌RBE4-4進行發酵測試。

**【0082】** 首先，參照實施例1的第B項「製備乳酸菌分離株RBE1-5的接種源」當中所述的方法來製備乳酸菌分離株RBE4-4的接種源。接著，將所得到的乳酸菌分離株RBE4-4的接種源分為1個葡萄糖組、1個纖維素組以及1個木聚糖組，並將各組以一為10% (v/v)的接種量分別接種至含有20 g/L的對應碳源(包括葡萄糖、纖維素以及木聚糖)以及10 g/L酵母萃取物之液態培養基(90 mL)中。

**【0083】** 各組在一厭氧條件下於一恆溫振盪培養箱中(50°C、150 rpm)進行發酵反應歷時48小時之後，自各組的培養物中取100  $\mu$ L並加入至一96-井培養盤的各井中，繼而於420 nm的波長下以一分光光度計來讀取各井的吸光值(OD<sub>420</sub>)，而所得到的結果被顯示於下面的表10中。

表10. 各組在不同的碳源下所測得的OD<sub>420</sub>

| 組別   | 所測得的 OD <sub>420</sub> |
|------|------------------------|
| 葡萄糖組 | 5.93                   |
| 纖維素組 | 9.18                   |
| 木聚糖組 | 23.6                   |

**【0084】** 由表10看來，乳酸菌分離株RBE4-4可利用葡萄糖、纖維素以及木聚糖作為生長所需的碳源。特別地，當以木聚糖作為碳源時，乳酸菌分離株RBE4-4的生長速度最快。

**【0085】** 綜合以上各項的特徵鑑定結果，申請人認為：本發明的乳酸菌分離株RBE4-4是一株新穎的凝結芽孢桿菌分離株。

**【0086】** 本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4於西元2018年3月2日以寄存編號BCRC 910831被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心(300新竹市食品路331號，台灣)，以及於西元2018年5月28日以寄存編號CCTCC M 2018310被寄存於中國典型培養物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。

**【0087】** 之後，本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4進一步被拿來與習知的凝結芽孢桿菌分離株進行發酵抑制物的耐受性比較如下。

**E、對於發酵抑制物的耐受性的比較：**

**【0088】** 首先，申請人將上面實施例3當中參考CN 103667110 B所述的方法來進行評估之本發明凝結芽孢桿菌RBE4-4對於發酵

抑制物的耐受性拿來與CN 103667110 B所揭示的凝結芽孢桿菌CGMCC No. 7635的耐受性進行比較如下。

表11. 凝結芽孢桿菌RBE4-4與凝結芽孢桿菌CGMCC No. 7635對於不同發酵抑制物的最大耐受濃度(g/L)

| 發酵抑制物 | 凝結芽孢桿菌<br>CGMCC No. 7635 | 乳酸菌分離株<br>RBE4-4 |
|-------|--------------------------|------------------|
| 糠醛    | 2                        | 5                |
| 羥甲糠醛  | 2                        | 5                |
| 醋酸    | 30                       | 40               |
| 甲酸    | 1                        | 3                |

【0089】 由表11可見，本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4對於糠醛、羥甲糠醛、醋酸以及甲酸的耐受性皆是顯著地優於凝結芽孢桿菌CGMCC No. 7635所具者。

【0090】 接著，申請人進一步參考彭麗麗所著碩士論文(2014)(同上述)當中所述的方法，藉由葡萄糖消耗(glucose consumption)以及L-乳酸產量來評估本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4對於不同發酵抑制物的耐受性，並將所得到的結果拿來與該碩士論文所揭示的凝結芽孢桿菌P38的耐受性進行比較如下。

表12. 凝結芽孢桿菌RBE4-4與凝結芽孢桿菌P38對於不同發酵抑制物的最大耐受濃度(g/L)

| 發酵抑制物 | 凝結芽孢桿菌 P38 | 乳酸菌分離株<br>RBE4-4 |
|-------|------------|------------------|
| 糠醛    | 10         | 10               |
| 醋酸    | 6          | >10              |
| 甲酸    | 1          | 3                |

**【0091】** 由表 12 可見，對糠醛而言，本發明凝結芽孢桿菌 RBE4-4 的最大耐受濃度與凝結芽孢桿菌 P38 所具者相同；而對醋酸以及甲酸而言，本發明凝結芽孢桿菌 RBE4-4 的最大耐受濃度皆顯著地優於凝結芽孢桿菌 P38 所具者。

**【0092】** 基於上述，本發明凝結芽孢桿菌 RBE4-4 對於發酵抑制物的耐受性是明顯優於習知的凝結芽孢桿菌分離株所具者。

### **實施例 5. 使用纖維素水解液作為基質來進行乳酸發酵**

**【0093】** 為了探討本發明的凝結芽孢桿菌 RBE4-4 在使用纖維素水解液作為基質的情況下的乳酸發酵能力，下面的實驗被進行。此外，為供比較，凝結芽孢桿菌 RBE4 以及凝結芽孢桿菌 DSM1 (BCRC 10606，對應於 ATCC 7050)(購自於台灣的食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心)被拿來進行相同的實驗。

#### **A、分步水解共發酵 (separate hydrolysis and co-fermentation, SHCF) 製程：**

**【0094】** 首先，將依據上面實施例 2 的實驗材料中所得到的纖維素水解液(其具有一如上面表 4 所示的醣類以及發酵抑制物)添加以 10 g/L 的酵母萃取物，繼而加入適量的 25% 的氨水以將其 pH 值調整至 5.5-7.0。

**【0095】** 接著，參照實施例 1 的第 B 項「製備乳酸菌分離株 RBE1-5 的接種源」當中所述的方法來製備乳酸菌分離株 RBE4-4、

RBE4以及DSM1的接種源。之後，將凝結芽孢桿菌RBE4-4、RBE4以及DSM1的接種源以一為10% (v/v)的接種量分別接種至纖維素水解液(90 mL)中，繼而在一厭氧條件下於一恆溫振盪培養箱中(50 °C、150 rpm)進行發酵反應歷時48小時。在發酵反應開始之後的第6、12以及24小時，對培養物添加適量的25%的氨水以使其pH值被維持在5.5-7.0。

**【0096】** 之後，將所得到的發酵培養物於12,000 rpm下予以離心歷時6分鐘，而所得到的發酵產物是依據上面“一般實驗方法”的第1項「高效能液相層析分析」當中所述的方法來進行乳酸的含量分析。

**【0097】** 實驗被重複進行3次，而所得到的實驗數據是以“平均值(mean)±平均值的標準誤差(standard error of the mean, SEM)”來表示。所得到的結果被顯示在下面的表13中。

表13. 不同的凝結芽孢桿菌分離株所得到的乳酸產率

| 凝結芽孢桿菌分離株 | 乳酸產率(g/L/h) |
|-----------|-------------|
| DSM1      | 0.697±0.2   |
| RBE4      | 1.69±0.18   |
| RBE4-4    | 2.11±0.14   |

**【0098】** 由表13可見，利用分步水解共發酵製程來發酵纖維素水解液生產乳酸時，使用凝結芽孢桿菌RBE4-4所得到的乳酸產率明顯高於凝結芽孢桿菌RBE4以及DSM1所具者。

**B、 同步糖化共發酵 (simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF) 製程：**

**【0099】** 首先，參照上面實施例2的實驗材料當中所述的操作程序來進行纖維素水解液的製備，不同之處在於：纖維素分解處理是在一為50至55℃的溫度以及一為150 rpm的攪拌速率下進行歷時12小時，而使得纖維素未被完全分解，並且沒有進一步去除固形物。所得到的纖維素水解液是依據上面“一般實驗方法”的第1項「高效能液相層析分析」當中所述的方法來進行醣類以及發酵抑制物的含量分析。所得到的結果被顯示在下面的表14中。

表14. 經初步分解處理的稻稈纖維素水解液中的醣類與發酵抑制物的含量

| 成分   | 含量(g/L) |
|------|---------|
| 葡萄糖  | 80.5    |
| 木糖   | 27      |
| 醋酸   | 2.5     |
| 糠醛   | 2       |
| 羥甲糠醛 | 1.2     |

**【0100】** 之後，參照上面第A項當中所述的操作程序來進行發酵反應，不同之處在於：發酵反應被進行歷時20小時，並且在發酵反應開始之後的第6和12小時，對培養物添加適量的25%的氨水以使其pH值被維持在5.5-7.0。

**【0101】** 所得到的結果被顯示在下面的表15中。

表15. 不同的凝結芽孢桿菌分離株所得到的乳酸產率

| 凝結芽孢桿菌分離株 | 乳酸單位時間產率(g/L/h) |
|-----------|-----------------|
| DSM1      | 1.92±0.48       |
| RBE4      | 3.91±0.78       |
| RBE4-4    | 4.95±0.825      |

【0102】 由表15可見，利用同步糖化共發酵製程來發酵纖維素水解液生產乳酸時，使用凝結芽孢桿菌RBE4-4所得到的乳酸產率明顯地高於凝結芽孢桿菌RBE4以及DSM1所具者。

【0103】 綜合以上的實驗結果，申請人認為：當使用纖維素水解液作為基質時，無論是分步水解共發酵製程或同步糖化共發酵製程，本發明的凝結芽孢桿菌RBE4-4皆能展現優異的乳酸發酵能力。

【0104】 於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

【0105】 雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

#### 【生物材料寄存】

【0106】 TW中華民國；食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)；2018/03/02；BCRC 910831。

**【0107】** CN 中國；中國典型培養物保藏中心(CCTCC)；

2018/05/28；CCTCC M 2018310。

## 【序列表】

<110> 遠東新世紀股份有限公司

<120> 具有高乳酸生產能力之凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*) RBE4-4分離株及其用途

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的序列

<220>

<223> 用於擴增細菌的16S rDNA基因的前向引子27F

<400> 1

agagtttgat cmtggctcag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的序列

<220>

<223> 用於擴增細菌的16S rDNA基因的反向引子pH'

<400> 2

aaggaggtga tccagccgca

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1546

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 凝結芽孢桿菌RBE4-4

&lt;400&gt; 3

```

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgtgc      60
ggacctttta aaagcttgc tttaaaaggt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggc      120
aacctgcctg taagatcggg ataacgccgg gaaaccgggg ctaataccgg atagtttttt      180
cttccgcgat gaggaaaaag gaaagacggc ttcggctgtc acttacagat gggcccgcgg      240
cgcattagct tgttgggtgg gtaacggctc accaaggcaa cgatgcgtag cgcacctgag      300
agggtgatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tectacggga ggcagcagta      360
gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgcgtgagt gaagaaggcc      420
ttcgggtcgt aaaactctgt tcccggggaa gaacaagtgc cgttcgaaca gggcggcgcc      480
ttgacggtac ccggccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt      540
aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggcgg cttcttaagt      600
ctgatgtgaa atcttgcggc tcaaccgcaa gcggtcattg gaaactggga ggcttgagtg      660
cagaagagga gagtggaaat ccacgtgtag cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca      720
ccagtggcga aggcggctct ctggtctgta actgacgtg aggcgcgaaa gcgtggggag      780
caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgagtgcta agtgttagag      840
ggtttccgcc ctttagtgct gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacggcc      900
gcaaggctga aactcaaagg aattgacggg ggccccgaca agcgggtggag catgtggttt      960
aattcgaagc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat cctctgacct ccttggagac     1020
agggccttcc ccttcggggg acagagtgac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt     1080
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct tgaccttagt tgccagcatt     1140

```

第 2 頁，共 3 頁(序列表)

|   |      |
|---|------|
| cagttgggca ctctaaggtg actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca | 1200 |
| aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatgg tacaaagggc | 1260 |
| tgcgagaccg cgaggttaag ccaatcccag aaaaccattc ccagttcgga ttgcaggctg | 1320 |
| caacccgect geatgaagcc ggaatcgcta gtaatcgagg atcagcatgc cgcggtgaat | 1380 |
| acgttcccgg gctttgtaca caccgcccgt cacaccacga gagtttgtaa cacccgaagt | 1440 |
| cggtgaggta acctttacgg agccagccgc cgaaggtggg acagatgatt ggggtgaagt | 1500 |
| cgtaacaagg tagccgtatc ggaaggtgcg gctggatcac ctccctt               | 1546 |



202000897

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 具有高乳酸生產能力之凝結芽孢桿菌RBE4-4分離株及其用途

【英文發明名稱】 BACILLUS COAGULANS RBE4-4 ISOLATE  
HAVING HIGH LACTIC ACID-PRODUCING ABILITY AND  
USES OF THE SAME

### 【中文】

本發明揭示一株具有高乳酸 - 生產能力 (high lactic acid-producing ability) 的凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*) RBE4-4 分離株，它以寄存編號 BCRC 910831 被寄存於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (BCRC)。該凝結芽孢桿菌 RBE4-4 分離株可被用於生產乳酸。

### 【英文】

Disclosed herein is a *Bacillus coagulans* RBE4-4 isolate having high lactic acid-producing ability, which is deposited in the Bioresource Collection and Research Center (BCRC) of the Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) under accession number BCRC 910831. The *Bacillus coagulans* RBE4-4 isolate can be used for producing lactic acid.

【指定代表圖】 無

## 【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*) RBE4-4，其以寄存編號BCRC 910831被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心。
- 【第2項】 一種用於生產乳酸的方法，其包括：使用一如請求項1的凝結芽孢桿菌RBE4-4來發酵一含有可發酵糖的基質，而使得乳酸被生成。
- 【第3項】 如請求項2的方法，其進一步包括令一生質進行糖化，以生成該含有可發酵糖的基質。
- 【第4項】 如請求項3的方法，其中該糖化是在該發酵期間被進行。
- 【第5項】 如請求項3的方法，其中該糖化是在該發酵之前被進行。
- 【第6項】 如請求項4或5的方法，其中該糖化是在一為50至55℃的溫度下被進行。
- 【第7項】 如請求項3的方法，其中該含有可發酵糖的基質進一步含有至少一種選自於由下列所構成之群組中的發酵抑制物：甲酸、醋酸、羥甲糠醛以及糠醛。
- 【第8項】 如請求項7的方法，其中該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至6 g/L的甲酸。
- 【第9項】 如請求項7的方法，其中該含有可發酵糖的基質進一步含有1至45 g/L的醋酸。
- 【第10項】 如請求項7的方法，其中該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至7 g/L的羥甲糠醛。
- 【第11項】 如請求項7的方法，其中該含有可發酵糖的基質進一步含有0.5至8 g/L的糠醛。

【第12項】如請求項2的方法，其中該可發酵糖是選自於由下列所構成之群組：葡萄糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、甘露糖、纖維雙糖、半乳糖，以及它們的組合。

【第13項】如請求項2的方法，其中該發酵是在一範圍落在5.5至7.0的pH值下被進行。