

# 財團法人榮成永續發展環保基金會補助專題研究計畫申請書

## 第二年度期末報告

計畫名稱：以微生物及海藻生成奈米纖維素之製程探討

計畫申請人：黃培安

系(所)單位：生命科學暨生物科技學系

計畫期程：113 年 01 月 01 日至 114 年 12 月 31 日止

(資料期間：114 年 01 月 01 日至 114 年 12 月 31 日止)

中 華 民 國 114 年 11 月 13 日

## 一、計畫執行情形表

計畫名稱：以微生物及海藻生成奈米纖維素之製程探討

資料期間：114 年 01 月 01 日至 114 年 12 月 31 日止

計畫目標 (請依計畫書內容填寫)	實際執行內容 (以實際達成狀況具體詳細填寫,屬計畫 查核點並請以 * 表示)	是否達成原計畫內 容及預定進度	落後原因/ 改善措施	預定趕上 進度時間
第一年期中評估標準 完成專利分析報告一式	已完成，實際執行成果請參閱報告	●是 ○否		
		如期完成		
第一年期末評估標準 材質與菌之相容性	已完成，實際執行成果請參閱報告 ● 細菌纖維素製備配方 ● 細胞纖維素化性分析 ● 細胞纖維素安全性試驗	●是 ○否		
		如期完成		
第二年期中評估標準 不同前處理之替代碳源製備	已完成，實際執行成果請參閱報告 ● 不同碳源之產率比較 ● 微生物共培養對產率之交互作用	●是 ○否		
		進度超前		
第二年期末評估標準 物性分析	已完成，實際執行成果請參閱報告 ● FTIR (傅立葉紅外光譜): 檢測膜中官能基變化。 ● SEM (掃描式電子顯微鏡): 觀察膜的纖維形態與排列。 ● XRD (X 光繞射): 分析結晶度變化。結晶度以 Segal 方法計算。 ● 接觸角測量: 評估膜的親水性，以水滴角度反映表面潤濕能力。	●是 ○否		
		進度超前		

## 摘要

本研究旨在探討以海帶 (*Laminaria japonica*) 萃取物作為替代碳源，並結合共培養策略，提升細菌纖維素 (BC) 之產量與生物醫學應用潛力。實驗中以細菌纖維素生產菌 *Komagataeibacter hansenii* 為主體，搭配枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 共培養，並於培養基中分別添加 10% 與 25% 海帶萃取物 (BC-10、BC-25)，以探討不同條件對 BC 產量、結構及生物活性的影響。結果顯示，海帶萃取物可改變纖維素膜的微結構，增加吸水性與保水性，且在細胞相容性測試中，BC-25 能顯著提高纖維母細胞存活率與傷口修復相關蛋白表現。另一方面，共培養系統能有效提升 BC 產量與結晶度，SEM 觀察亦顯示纖維排列更緻密、直徑更細。綜合而言，利用 *B. subtilis* 與 *K. hansenii* 共培養，並添加海帶萃取物，不僅能提升 BC 的產量與結構特性，亦為開發具生醫功能與永續生產潛力的細菌纖維素材料提供新策略。

## 前言

產奈米纖維素(Nano bacterial cellulose, NBC)的微生物通常為革蘭氏陰性菌、好氧菌、不進行光合作用的醋酸桿菌科(Acetobacteraceae)，這些微生物分泌的胞外多醣即稱為 NBC。醋酸桿菌會從基質中攝取碳源轉換成 Glucose，經一連串的代謝反應轉為 UDP-glucose 再經由 Cellulose synthase 合成 NBC (Jonas and Farah, 1998)。醋酸桿菌會將合成的 NBC 經由菌體表面的微孔洞(Terminal complex subunits)分泌而出，每條纖維間及纖維內均以氫鍵連接，再相互交纏成較大的 3D 立體結構，因大量氫鍵的參與使得 NBC 有良好的機械強度及親水性(Hu et al., 2014)。Komagataeibacter 屬，以前稱為 Gluconacetobacter，所生產的 NBC 被認為是無害且可做為食品工業添加物使用，該屬下的 *K. hanseii*, *K. oboediens*, *K. rhaeticus*, *K. pomaceti* 均已被歸類為公認安全 GRAS (Generally recognized as safe) 菌株。2019 年歐洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)將 *Komagataeibacter sucrofermentans* 物種列入歐盟食品及飼料用安全認可微生物 QPS (Qualified presumption of safety) 清單中((European Food Safety Authority, 2019)，無疑開拓了 *Komagataeibacter* 屬所產 NBC 的應用層面及市場規模。Dourado et al. (2017)證實 *Komagataeibacter* 屬所產 NBC 在口服 50 g NBC/kg of diet 劑量下無毒理反應，Dydak et al. (2022)也證實 *Komagataeibacter* 屬所產 NBC 與小鼠纖維母細胞無接觸毒性反應。

有關以海藻為碳源的相關研究如下，Nóbrega et al. (2019) 將藍綠藻與醋酸桿菌共培，發現共生產生的細菌纖維素與單獨培養無顯著差異，惟螢光顯微鏡顯示纖維素膜含活藻細胞，具供氧功能，有助血管新生與組織修復，顯示此共生系統具生醫應用潛力。Uzyol and Saçan (2017) 以小綠球藻取代葡萄糖作為細菌纖維素的糖源，將藻類分為正常、氮缺乏、硫缺乏及無光照四組，以超聲波破壁後分析澱粉產率。結果顯示，氮缺乏組的澱粉產率最高，因氮不足限制蛋白質合成，光合作用產生的碳轉而儲存為澱粉或三酸甘油酯。利用 SEM 與 FTIR 分析由藻類澱粉與葡萄糖製得的細菌纖維素，顯示其結構特徵相似，證實藻類澱粉為可行糖源。由於藻類能在多樣環境中生長、種類豐富且適應性強，近年成為具潛力的綠色能源來源，並逐漸受到各國重視。Beliah et al. (2020) 研究將石蓴粉末溶於 1% 硫酸中，於 121°C 水解 4 小時，冷卻後以碳酸鈣中和並離心去除硫酸鈣沉澱，所得糖類作為碳源用於細菌纖維素培養。經 SEM、FTIR 與 XRD 分析顯示，以石蓴糖類替代葡萄糖所產生的細菌纖維素，其結構與使用葡萄糖組無顯著差異，且產量有所提升，顯示石蓴水解產糖為有效替代碳源。

在第二年實驗中，已知：海帶萃取物沒有明顯提高細菌纖維素的產量，但它改變了膜的結構，讓膜的吸水能力變好、變得不容易失水（這兩點對醫療材料來說很重要）。進一步分析顯示，海帶萃取物會附著在細菌纖維素表面，並以類似凝膠的狀態填在纖維之間，這也正是這種材料的特色。總結來說，BC-25 這種膜能提高纖維母細胞的存活率，並促進與傷口癒合相關的蛋白質表現，且不會導致細胞過度附著。因此第二年下半年度的實驗執行內容，我們著重在如何透過[共培養系統]提升細菌纖維素產量。共培養系統是合成生物學的發展重點，亦是生產具生物活性次級代謝物的方法之一，共培養意旨在同一培養條件下培養兩種或兩種以上的細胞或微生物，用以研究族群之間的交互作用、提高特定族群的培養成功率及建立族群之間的合成交互作用(Goers et al., 2014)。在 Oh (2006)共培養 *Salinispora arenicola* 與 *Emericella parvathesia* 兩種海洋放線菌，其代謝產物 Emericellamide A、B (一種抗菌活性物質)產量提升了 100 倍。在 Ma et al. (2011)中共培養 *Ketogulonicigenium vulgare* 與 *Bacillus megaterium* 兩株細菌，發酵過程中 *B. megaterium* 細胞裂解後釋放出的嘌呤物質有助 *K. vulgare* 生長並合成 2-keto-gulonic acid (維生素 C 前驅物質)。然共培養系統的困境在於，反應途徑過於多樣化，超過兩個物種可能會導致系統不穩定，以致難以監測、分析及解釋。

## 研究目的

- 探討褐藻萃取物複合 BC 膜(BC-10 和 BC-25 組)之生醫應用。
- 改變褐藻碳源條件，對褐藻萃取物複合 BC 膜產率之影響。
- 以符合環境資源再利用、提升附加價值、完整工業化生產之應用邁進。

## 材料與方法

### 一、菌種來源

*Komagataeibacter hansenii*(LMG 23726)購買於食品工業研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource collection and research center , BCRC)

### 二、褐藻培養基製備及膜製備

褐藻 *L. japonica* 以 1:40 (w/v) 的比例(DD 水)中均質，在 121℃ 下加熱萃取 30 min，爾後將混合物以 12,000 × g 離心 15 min，取其上清液，即為本實驗中的褐藻萃取液。褐藻萃取液依照下表比例進行不同組別培養基的配製，以褐藻萃取液取代 DD 水。

Table BC, BC-10, BC-25 及 BC-40 培養基組成

	BC <sup>1</sup>	BC-10	BC-25	BC-40
<i>L. japonica</i> extract (mL)	0	15	37.5	60
[contained% in medium]	[0%]	[10%]	[25%]	[40%]
Glucose (g)	3	3	3	3
Yeast (g)	0.750	0.750	0.750	0.750
Peptone (g)	0.750	0.750	0.750	0.750
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	0.405	0.405	0.405	0.405
Citric acid (g)	0.172	0.172	0.172	0.172
DD water (mL)	150	135	112.5	90

<sup>1</sup> Hestrin and Schramm (HS) medium base

### 三、細菌纖維素膜(BC membrane)鹼處理及保存

取 0.1 M NaOH 將細菌纖維膜煮沸 20 min，待細菌纖維膜顏色由黃色轉變為透明狀時表示殘菌體及相關代謝產物已被鹼破壞，接續取出細菌纖維膜以二次水沖洗，且浸泡直到細菌纖維膜 pH = 7。

### 四、產率計算

為了測定 BC 的乾重，將膜進行冷凍乾燥，然後記錄其乾重 (Wd)。BC 膜的產率按以下公式計算：其中 C 是培養基中 glucose 的重量(g)。

$$\text{Yield (\%)} = \left( \frac{Wd}{C} \right) \times 100$$

## 五、傅立葉轉換紅外線光譜儀 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) 分析

分子結構使用 FTIR-MIDAC 2000 儀器進行評估，而 FTIR 光譜則在 25°C 下於 500 – 3500 nm 範圍內進行記錄。

## 六、BC membrane 表層及內部單糖組成分析

將 BC, BC-10 及 BC-25 細菌纖維膜以 4 M 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 分別進行 1 h 及 2 h 酸水解，其中 1 h 條件乃水解表層多醣體，爾後取出樣品再添加新的 4 M TFA 進行再一小時的酸水解，乃水解內部多醣體。水解後單糖使用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP) 在 70°C 加熱 50 min 進行衍生化。以高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography, HPLC) 進行單糖組成分析，使用六種褐藻常見之單糖：甘露糖 (Mannose)、鼠李糖 (Rhamnose)、葡萄糖 (Glucose)、半乳糖 (Galactose)、木糖 (Xylose) 與岩藻糖 (Fucose) 作為標準品，依照滯留時間判斷樣品中的單糖組成。

## 七、BC 膜之水合特性分析

為了測量細菌纖維素 (BC) 膜的吸水率 (WHC) 與含水率 (WRC)，將樣品先以去離子水在室溫下浸泡 24 小時，以確保其完全吸水。隨後使用濾紙輕輕吸去多餘水分，並測量濕重 (Ww)。接著將樣品在 60°C 下烘乾至重量不再變化，記錄乾重 (Wd)。

吸水率 (WHC) 與含水率 (WRC) 依以下公式計算：

- $WHC (\%) = (Ww - Wd) / Wd \times 100$
- $WRC (\%) = (Ww - Wd) / Ww \times 100$

其中 Ww 為濕重 (wet weight)，Wd 為乾重 (dry weight)

## 八、BC 膜理化性質分析

- FTIR (傅立葉紅外光譜)：檢測膜中官能基變化。
- SEM (掃描式電子顯微鏡)：觀察膜的纖維形態與排列。
- XRD (X 光繞射)：分析結晶度變化。結晶度以 Segal 方法計算。
- 接觸角測量：評估膜的親水性，以水滴角度反映表面潤濕能力。

## 八、BC 膜之機械力分析

為了測量細菌纖維素 (BC) 膜的機械強度，將樣品在完全濕潤狀態下進行拉伸測試。膜樣品裁剪為長方形，尺寸約為 10 mm × 50 mm，並使用拉力機 (Shimadzu EZTest) 搭配 500 N 感應器進行測試。拉伸速率設定為 10 mm/min，測試於室溫 (25°C) 下進行。測得的機械性質包含：拉伸強度 (Tensile strength, 單位為 MPa)：為材料被拉斷前所能承受的最大應力。延展率 (Elongation at break, %)：表示樣品在拉斷時的伸長比例。

## 九、BC 膜之細胞貼附實驗

將細菌纖維素 (BC) 與含 *Laminaria japonica* 萃取物的複合膜 (BC/LJE) 裁剪為 1 × 1 公分大小，放入 24 孔培養皿中，並使用紫外線照射 1 小時進行消毒。接著，將小鼠成纖維細胞以每孔  $1 \times 10^4$  個細胞的密度接種於膜的表面，並在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的條件下培養 1 天。24 小時後，使用

磷酸鹽緩衝液 (PBS) 清洗樣品，以去除未貼附的細胞，然後用 4% 多聚甲醛固定 15 分鐘。隨後使用 DAPI 染色細胞核，觀察細胞是否貼附於膜的表面，並使用螢光顯微鏡進行觀察與拍攝影像。

#### 十、BC 膜促進傷口癒合之蛋白質表現分析

為了分析 BC 與 BC/LJE 膜對與細胞遷移和血管新生相關蛋白的影響，將 NIH3T3 細胞接種於 6 孔培養皿中，每孔含有一片消毒後的膜樣品 (大小為  $1 \times 1$  公分)，並在  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  的培養箱中培養 24 小時。接著，將細胞以 RIPA 緩衝液裂解，並加入蛋白酶抑制劑以提取總蛋白。使用 BCA 蛋白定量試劑盒測定蛋白濃度後，取等量蛋白樣品進行 SDS-PAGE 分離，隨後轉移至 PVDF 膜。再依序使用對應的一級抗體進行孵育，這些抗體針對  $\beta$ -actin、FAK、p-FAK、ERK、p-ERK、VEGF、VEGFR2 與 HIF-1 $\alpha$  等目標蛋白。再使用 HRP 標記的二級抗體處理，並利用 ECL 化學發光試劑進行訊號顯現。最後使用影像分析系統擷取影像，並以 ImageJ 軟體對蛋白表達量進行半定量分析。

#### 十一、以不同酵素水解方式製備褐藻萃取物

將海帶進行不同方式之前處理，使海藻多醣體轉換成可被 *K. hansenii* 菌使用的替代碳源。

- 熱處理組：將 10% (w/v) 海藻以二次水為溶液，於  $121^{\circ}\text{C}$  下加熱 20 分鐘。
- 酸水解組：將 10% (w/v) 海藻以 1N HCl 為溶液，於  $121^{\circ}\text{C}$  下加熱 20 分鐘，冷卻後以 NaOH 將酸鹼值調整至 6~7。
- 商用酵素組：Celluclast® Novozymes (液態，切位 1,4- $\beta$ -D-glucosidic linkages) 以海藻乾重 3% (v/w) 添加。將 10% (w/v) 海藻以二次水為溶液在室溫，180 rpm 下水解 8 hr
- 海洋真菌酵素組：取 *Paradendryphiella arenaria* 接種與 *K. hansenii* 菌共培養。
- 枯草桿菌酵素組：取 *Bacillus subtilis* 接種與 *K. hansenii* 菌共培養。

#### 十二、以共培養模式使用 *B. subtilis* 與 *K. hansenii* 生產細菌纖維膜

##### 1. *B. subtilis* 菌株活化與保存

將保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫中 *B. subtilis* 菌液解凍，使用接種環以四區劃線法塗劃於 LB 固態培養基，以  $37^{\circ}\text{C}$  培養 10~12 小時，此為一活，待固態培養基上菌落生長至 3 mm 大小，勾取 *B. subtilis* 單一菌落接種於 150 mL 之 LB 液態培養基中，以  $37^{\circ}\text{C}$ 、100 rpm 培養 10~16 小時，此為二活，待吸光值  $\text{OD}_{600} = 0.9$  時，取液態培養菌液與 80% 甘油以 1:1 (v/v) 比例混合於 Eppendorf 內並保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫中保存菌株。

##### 2. 海帶培養基製備

將 5 g 乾燥海帶 (*L. japonica*) 以自來水清洗表面髒污及鹽分，並以二次水浸泡 24 小時，將泡發後海帶切成小碎塊，將 25 g 泡發之海帶碎塊、下表成分及 125 mL 二次水以均質機絞成泥狀，放入錐形瓶內以鋁箔紙封口，在  $121^{\circ}\text{C}$ 、20 min 條件滅菌後即為海帶培養基。

表、海帶培養基配方

組別/成分	Glucose (%)	Yeast (%)	Peptone (%)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (%)	Citric acid (%)	泡發海帶(g)
SW	2	0.5	0.5	0.27	0.115	25
SW-1	1	0.5	0.5	0.27	0.115	25

### 3. *B. subtilis* 與 *K. hansenii* 相容性試驗

#### (1) 平行畫線實驗

探討兩株細菌間是否有拮抗作用，根據 Ma et al. (2019) 方法並加以修飾，在 HS 固態培養基之 Plate 背面畫上長 4 公分間隔 1 公分的 2 條平行線(如示意圖)以方便菌液塗抹，準備 *K. hansenii* 和 *B. subtilis* 之  $OD_{600}=0.5$  菌液，以接種環塗抹在直線上，因兩株細菌生長速度不同，故將組別分為兩組進行如下表所示，拍照記錄 7 天的生長狀況。

#### (2) 液態共培養實驗

準備 *K. hansenii* 和 *B. subtilis* 之  $OD_{600}=0.5$  菌液，各取 500  $\mu$ L 菌液混合成 1 mL，將混合菌液以二次滅菌水連續稀釋至  $10^4$  倍及  $10^5$  倍，取 100  $\mu$ L 稀釋液添加至 HS 固態培養基上並以 L 型玻棒塗抹均勻，拍照紀錄 7 天生長狀況。

### 4. 實驗組別

將上述 *K. hansenii* 與 *B. subtilis* 活化之細菌接種於 150 mL HS 液態培養基及 150 mL 海帶培養基中，將 HS 液態培養基單培養命名為 Mono 組，HS 液態培養基共培養命名為 Co 組，海帶培養基共培養命名為 Co-SW 組，海帶減糖培養基共培養命名為 Co-SW-1 組，依照下表比例接種 *K. hansenii* 與 *B. subtilis* 之  $OD_{600}=0.9$  菌液，單培養組以滅菌二次水補足未添加 *B. subtilis* 之體積，第 1 天至第 3 天各以 180 rpm 搖瓶培養 1 小時，從第 4 天開始靜置培養 25 天共 4 週後收成。

表、單培養及共培養接種比例

組別	Mono	Co	Co-SW	Co-SW-1
<i>K. hansenii</i> (mL)	7.5	7.5	7.5	7.5
<i>B. subtilis</i> (mL)	0	7.5	7.5	7.5
滅菌二次水(mL)	7.5	0	0	0
總體積(mL)	165	165	165	165

### 5. 分析項目

(1) 外觀與產率: 同上

(2) 掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscope, SEM): 同上

(3) X-ray diffraction (XRD) spectra: 同上

(4) 吸水率: 同上

(5) 保水性

根據 Wan et al. (2020) 方法，將 BC 膜凍乾至恆重並以精秤天平秤得其乾重，將凍乾後 BC 膜置於二次水中 24 小時後以精秤天平秤得其濕重，為測試材料保水能力，將浸泡二次水 24 小時後之 BC 膜置於室溫下，以精秤天平秤得並記錄第 0、2、4、6、8、10、12、24 小時之濕重(t)並帶入公式製圖。保水性計算公式如下：

$$\text{保水性(\%)} = \left[ \frac{\text{濕重(t)} - \text{乾重}}{\text{濕重} - \text{乾重}} \right] \times 100 \%$$



## 結果與討論

### 1. 生產與產率 (Production and Yield)

如圖 1A 所示，在靜置培養 14 天後，所有組別皆成功生成細菌纖維素膜，並能順利從培養基表面取出。三組樣品中，純 BC 膜為白色，而添加海帶萃取物 (*L. japonica* extract, LJE) 的 BC-10 與 BC-25 則呈現淡黃色。這種顏色變化可能源於 LJE 中的天然色素或酚類化合物，這些物質可能殘留在纖維素膜中。將這些膜乾燥後，其單位面積的乾燥重量分別為：BC ( $8.38 \pm 1.12 \text{ g/m}^2$ )、BC-10 ( $8.55 \pm 1.02 \text{ g/m}^2$ ) 和 BC-25 ( $8.28 \pm 1.14 \text{ g/m}^2$ )，如圖 1B 所示。統計分析結果顯示三組之間並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，表明即使加入 10% 或 25% 的 LJE，對細菌纖維素的總產量沒有明顯影響。這項結果與先前文獻報導相符，Beliah 等人 (2020) 使用石蓴水解液作為碳源時，同樣觀察到產量未顯著改變，但材料性質有所改善。這表示，海藻萃取物在不抑制菌體活性的前提下，可能改變細菌纖維素的其他物理或化學特性。Keshk (2014) 指出植物萃取物中的某些成分可能參與纖維素纖維形成過程，或嵌入纖維結構中，但對細菌的葡萄糖代謝並無抑制作用。因此，本研究結果證實 LJE 與纖維素生成過程具有良好的相容性，且可作為改質劑應用於細菌纖維素的生醫材料開發，無需擔心對產率造成不利影響。後續將透過其他性質的測試，如化學組成、水合能力與細胞反應等，進一步探討 LJE 的加成效果。

### 2. 膜化學特性分析

BC 可以透過加入水溶性多醣 (如半纖維素、 $\beta$ -葡聚糖與幾丁聚醣) 進行改質，進而改變其物理與化學性質。通常，添加物質會被包覆進纖維素基質中，形成凝膠狀結構。BC 凝膠性質的可塑性，使其在製藥用生物材料領域具有相當潛力。某些多醣能插入纖維素鏈間，形成水凝膠，並干擾纖維素的結晶，降低其結晶度；另一些則傾向附著於纖維素帶的表面。本研究運用傅立葉轉換紅外光譜 (FTIR) 與單醣組成分析，探討海帶 (*Laminaria japonica*) 萃取物與 BC 於共培養過程中的交互作用。

FTIR 可分析樣品中的官能基。其圖譜縱軸為穿透率 (百分比)，100% 代表無吸收。圖 2A 顯示，BC、BC-10 與 BC-25 樣品皆出現四個主要吸收峰： $3,550\text{--}3,100 \text{ cm}^{-1}$  (O-H 或  $\text{CH}_3\text{--OH}$ )、 $2,993 \text{ cm}^{-1}$  (C-H)、 $1,656 \text{ cm}^{-1}$  (C=O) 及  $1,083 \text{ cm}^{-1}$  (C-O-C)，這些為細菌性纖維素的典型特徵。由於褐藻多醣中含有硫酸基， $1,273 \text{ cm}^{-1}$  處的 S=O 吸收峰顯示其與 BC 羥基形成氫鍵，此結果證實海帶萃取物確實存在於 BC-10 與 BC-25 樣品中。BC 是由 D-葡萄糖透過  $\beta$ -1,4 鍵連接而成的線性聚合物，其重複單元為 cellobiose (二聚葡糖)。相比之下，褐藻多醣則以 (1 $\rightarrow$ 3) 和 (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-岩藻糖為主結構。 $\beta$ -鍵因其構型穩定性而較  $\alpha$ -鍵剛硬。為評估海帶萃取物於 BC-10 與 BC-25 中的位置，本研究以 1 小時與 2 小時水解條件進行單醣分析。1 小時條件較溫和，主要破壞  $\alpha$ -1,4 鍵並水解表面多醣；2 小時條件則更強，可破壞  $\beta$ -1,4 鍵並深入纖維內部。結果顯示，海帶萃取物主要含有甘露糖 (15.54 分)、岩藻糖 (36.72 分)、半乳糖、木糖與葡萄糖 (30.79 分)，依峰面積遞減排列。在 BC 組的 1 小時水解液中未檢出單醣，但 BC-10 與 BC-25 組在相同條件下則顯示甘露糖與岩藻糖訊號 (圖 2B)，顯示海帶多醣附著於 BC 膜表面。進一步將膜經過 2 小時水解後，BC 組檢出甘露糖與葡萄糖，BC-10 與 BC-25 則檢出甘露糖、岩藻糖與葡萄糖 (圖 2C)。其中，BC 中的甘露糖可能源自 *K. hansenii* (克雷伯漢森菌) 所分泌的胞外多醣 (EPS)，有文獻指出該菌株在特定條件下能產生含甘露糖的 EPS。至於岩藻糖，則推斷為海帶萃取物所貢獻。綜合圖 2A - 2C 的分析結果可知，海帶萃取物除附著於 BC 表面外，也可能滲入 BC 鏈帶之間的空隙中，以凝膠狀態存在 (圖 2D)，這種分布形式有助於 BC 材料的功能性擴展與應用潛力。

### 3.3 水合特性

進一步評估了 BC 膜的保水特性，結果如圖 2 所示，顯示海帶 (*Laminaria japonica*) 萃取物可能以凝膠形式嵌入 BC 結構中，使 BC-10 與 BC-25 與水的互動性與純 BC 有所不同。理想的傷口敷料應具備良好的濕度保持力、促進活性物質滲透，且癒合後可輕易移除、減少疼痛。因此，我們量測了樣品的含水率、吸水率與離水性，作為評估依據。本研究中，「含水率」指樣品中水分重量佔總重的百分比，一般純 BC 約為 80–90%，有助於細胞移動與組織再生，利於濕潤癒合。我們測得 BC、BC-10 與 BC-25 的含水率分別為 89.5%、91.3%、92.8%，隨海帶添加量略微上升（圖 3A）。這與文獻報導中水溶性多醣提高 BC 含水率的結果一致。高吸水力亦是敷料的重要指標，能減少滲出液滯留與感染風險。我們發現 BC-25 的吸水率（1,806.4%）顯著高於純 BC（1,481.7%），隨海帶含量提升而增高（圖 3B），表示其吸水能力更強。另一方面，離水性（syneresis）代表膜在壓力或乾燥下釋水的傾向，過高可能降低敷料穩定性。一般 BC 的離水率介於 20–40%，本研究中，BC、BC-10、BC-25 分別為 36.2%、34.9%、21.1%，其中 BC-25 顯著降低（圖 3C），顯示其水分固定能力較佳。此結果可能與海帶多醣的凝膠特性有關，可填補纖維間隙、降低水分逸散；此外，XRD 分析指出其結晶度下降，有助提升保水性；海帶中的硫酸多醣亦可透過氫鍵與纖維素網絡結合，加強水分留存。相較之下，先前 Lin 等人發現幾丁聚醣會在 BC 表面形成屏障，反而抑制水分進入。我們推測，海帶的高陰離子多醣能在 BC 中形成交織式凝膠網絡，提升整體保濕與吸水性能。此外，SEM 影像顯示 BC-25 纖維更細密，網絡結構更緊緻，也有助於提升水合作用。整體而言，BC-25 展現出優異的含水性、吸水性與低離水性，適合應用於濕潤傷口癒合環境，具發展為高效敷料的潛力。

### 3.4 微觀及機械特性

本研究透過掃描式電子顯微鏡 (SEM) 與原子力顯微鏡 (AFM) 分析，探討海帶萃取物對 BC 膜結構的影響。SEM 圖像顯示，純 BC 的纖維較粗，局部呈現膜狀；而添加海帶萃取物的 BC-10 與 BC-25 纖維較細，形成較小且緻密的孔洞（圖 4A）。三者的平均纖維直徑分別為 0.28、0.22、0.13  $\mu\text{m}$ ，平均孔徑則為 2.21、1.79、0.66  $\mu\text{m}$ （圖 4B、4C）。BC-25 的纖維與孔洞尺寸皆顯著小於純 BC。此外，BC-10 與 BC-25 的纖維間出現凝膠狀物質（圖 4A 紅圈處），可能源自海帶萃取物與纖維間的作用，類似過去添加木葡聚糖所形成的微型凝膠。其他以海藻水解液生產 BC 的研究中並未觀察到此結構，顯示本研究所用海帶萃取物除了提供營養，亦具生物活性。AFM 結果顯示，純 BC 表面粗糙度為 34.8 nm，而 BC-10 與 BC-25 分別為 26.1 與 12.3 nm，表面更加平滑，可能因海帶萃取物附著於纖維表面。綜合圖 2、3、4 結果，海帶萃取物的親水性有助於提升 BC 含水量與吸水性，同時降低 syneresis。先前研究亦指出，添加多醣可提升複合膜親水性與水分結合力。

XRD 分析顯示，海帶萃取物會降低纖維結晶度，BC、BC-10、BC-25 的結晶指數分別為 58.3%、48.4%、44.5%（圖 5A）。結晶度下降導致硬度降低，形成 BC > BC-10 > BC-25 的趨勢（圖 5B），此結果與文獻中非晶區削弱材料硬度的論點一致。然而，楊氏模數則呈現相反趨勢，為 BC-25 > BC-10 > BC（圖 5C），顯示海帶萃取物提升了 BC 膜的剛性。這可能歸因於其在纖維間形成凝膠狀結構，並與纖維素產生氫鍵作用，強化纖維間的連結並減少滑動。文獻中也有類似觀察，指出多醣–BC 複合膜的剛性提升與凝膠分布有關。總結來看，海帶萃取物可調控 BC 結構與物性，不僅提升吸水性與保水力，也能透過改變纖維排列與凝膠形成，增強膜的機械性能。其中，BC-25 具較高剛性，適合提供支撐力；BC-10 則具柔軟性，可能更適合用於需貼合與透氣性的敷料應用。

### 3.5 BC 膜與纖維母細胞及傷口癒合之關聯性

研究結果顯示，海帶萃取物存在於 BC 膜的表面與內部。為驗證 BC-10 與 BC-25 是否保有海帶促進細胞修復的潛力，進一步進行體外生物活性分析。首先以 NIH3T3 成纖維細胞進行間接接觸細胞毒性測試，檢驗濾紙、純 BC、BC-10 與 BC-25 的生物相容性（圖 6A、6B）。結果顯示，所有樣品對細胞形態無明顯不良影響，細胞維持紡錘形態並能正常貼附於培養皿底部。且 BC 系列樣品均促進細胞存活率，與文獻中 BC 可促進 NIH3T3 增生的報導一致。接著分析細胞直接附著於膜上的存活情況（圖 6C、6D）。經三天培養後，濾紙上的細胞數量高於 BC、BC-10 與 BC-25，可能因濾紙表面粗糙度高，有利細胞貼附。BC 類膜間未顯著差異，但貼附細胞量普遍偏低，且多數細胞呈圓形、未展開，BC-25 尤為明顯（圖 6D），顯示其表面特性不利於細胞附著。此特性可能有助於減輕敷料更換時造成的疼痛與組織損傷，對慢性或敏感傷口尤為重要。

在傷口修復過程中，成纖維細胞會分泌 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、VEGF 與膠原蛋白 I。TGF- $\beta$ 1 可促進細胞增生與分化、調節  $\alpha$ -SMA 表現並加速創口收縮，也能誘導 VEGF 表現，促進血管新生與養分供應，進而促進膠原蛋白生成。本研究中，BC-25 可顯著提升 NIH3T3 細胞中 TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA 與 VEGF 蛋白表現，且在培養第 2 與第 3 天仍維持高於純 BC 的水平。雖然膠原蛋白 I 表現略有增加，但無顯著性差異（圖 7）。綜上所述，BC-25 不僅具良好生物相容性，還能促進傷口癒合，同時減少敷料移除時的疼痛與損傷，具有應用於慢性傷口照護的潛力。

### 3.6 使用不同酵素水解海帶萃取物，對 BC-25 膜產率之影響

從上述實驗中得知，海帶萃取物是以鑲嵌的方式，附在 BC 膜的外部及內部，對於作為 *K. hansenii* 菌的碳源來說，分子量偏大且黏度高會降低溶氧量，不利於 *K. hansenii* 生存。因此採用熱處理、酸水解、Celluclast® Novozyme 酵素、*Paradendryphiella arenaria* 海洋真菌及 *Bacillus subtilis* 細菌，五種條件來水解海帶萃取物。其中 *P. arenaria* 海洋真菌及 *B. subtilis* 細菌均能分泌醣解酶，故乃將真菌/細菌與 *K. hansenii* 菌進行共培養，創建一個可分解海帶多醣成小分子，提供 *K. hansenii* 菌作為碳源的循環環境。

以 BC-25 培養基的配比，加入 *K. hansenii* 菌培養 14 天，並計算其收率。以 BC 組產率為 1，熱處理、酸水解、Celluclast® Novozyme 酵素、*Paradendryphiella arenaria* 海洋真菌及 *Bacillus subtilis* 細菌五組的產率分別為 1.26, 1.03, 1.34, 1.15, 1.35 倍，其中熱處理組、商用酵素組、細菌組顯著高於控制組（圖 8）。然，在實驗過程中觀察到特別之處，將 *B. subtilis* 細菌與 *K. hansenii* 菌共培養能提升 BC 產量達一倍以上（圖 9），因此未來將把“微生物共培養”的概念作延伸強化，並探討其原理。

### 3.7 微生物共培養模式對 BC 的影響

相關說明出自於本實驗室執行計畫許晉維同學之預口試計畫書內容

#### (1) *K. hansenii* 與 *B. subtilis* 相容性試驗

為了探討 *B. subtilis* 的介入是否會影響 *K. hansenii* 的生長，進行了共培養預實驗，由平行畫線實驗可以得知兩株細菌不管是同時畫線或是先接種 *B. subtilis* 再接種 *K. hansenii*，*K. hansenii* 皆正常生長（圖 10），在稀釋塗抹實驗中不論在  $10^4$  倍或  $10^5$  倍稀釋（圖 11），可以觀察到 *B. subtilis* 生長之後 *K. hansenii* 亦有生長。由上述兩個實驗可以推測 *B. subtilis* 的介入並不會影響 *K. hansenii* 的生長，可以進行接下來的共培養生產細菌纖維素的實驗。

## (2) 細菌纖維膜產量

在發酵過程中可以觀察到在第 7 天時共培養組別在氣液交接處有細菌纖維膜產生，而單培養則無形成，可以推測使用 *B. subtilis* 進行共培養可以提升 *K. hansenii* 生產細菌纖維素的速度，在第 28 天時觀察細菌纖維膜(圖 4)，可以發現共培養組別的厚度明顯厚於單培養，在產量結果圖中可以看到 Co 組的產量是顯著高於 Mono 組，Co-SW 組的產量也顯著高於 Mono 組，但 Co 組的產量是顯著高於 Co-SW 組及 Co-SW-1 組，Co-SW 與 Co-SW-1 兩組間雖然 Co-SW 的產量略高，然而兩組間無顯著差異(圖 12)。由上述實驗結果可以證實使用 *B. subtilis* 與 *K. hansenii* 共培養是能有效的提升細菌纖維素的產量，尤其在 HS medium 的條件下，海帶培養基也能夠用於生產細菌纖維素但效益有限，推測海帶加入培養基後使培養基成分過於複雜，不利於細菌的代謝利用，將 Co-SW 組與 Co-SW-1 組的產量比較，兩組間不具顯著差異，可以推測減少一半的葡萄糖後並不會影響海帶培養基中細菌纖維素的生產，可以有效降低生產的成本。

## (3) 細菌纖維膜外觀

*K. hansenii* 在含有葡萄糖環境生長時，能夠利用酵素將葡萄糖轉化成纖維素並排出胞外形成纖維束，在培養基氣液交接處形成細菌纖維膜，收穫的細菌纖維膜受培養基影響呈現米黃色，此時細菌纖維膜含有存活之細菌及雜質，使用 0.1M 的 NaOH 溶液進行加熱鹼處理，移除殘留的細菌和雜質，以利後續實驗進行，經鹼處理後的細菌纖維膜呈現白色透明狀，將鹼處理後之細菌纖維膜裁切後凍乾並觀察(圖 13)，使用共培養生產之細菌纖維膜除了厚度上的差異外，其外觀與單培養生產之細菌纖維膜並無差異，推測共培養並不會對細菌纖維膜產生外觀上的差異。

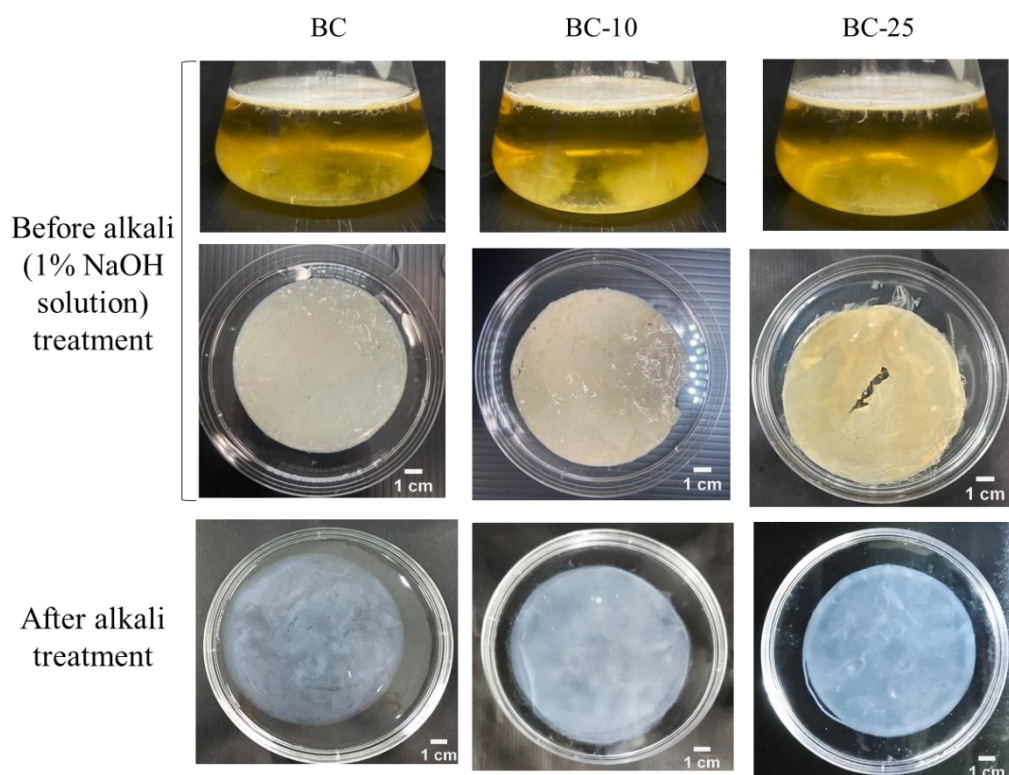
## (4) 微觀觀察及結晶度分析

利用電子顯微鏡來觀察纖維的纖維的結構，放大倍率為 5000 倍，[共培養]條件下，生產的細菌纖維素其纖維密度較高，孔隙較小(圖 14)。通過 Image J 軟體來計算 15000 倍下的纖維直徑，Mono 組纖維直徑為  $39 \pm 7$  nm，Co 組纖維直徑為  $25 \pm 5$  nm，Co-SW 組纖維直徑為  $24 \pm 4$  nm，Co-SW-1 組纖維直徑為  $25 \pm 5$  nm。在 Seto et al. (2006)的研究中提到共培養時細菌之間的交互作用可能會影響彼此的代謝，進而改變細菌纖維素分泌至胞外時的組裝。透過 X-ray 繞射分析來了解共培養是否會對細菌纖維素的晶體產生影響，Santmartí and Lee (2018)報告中提到細菌纖維素屬於纖維素 I $\alpha$ ，其 XRD 圖譜在  $14.5^\circ$  (100)、 $16.9^\circ$  (010)及  $22.9^\circ$  (110)附近會有波峰產生，在圖 15 可以看到 Mono 組、Co 組、Co-SW 組及 Co-SW-1 組在特定角度皆有波峰產生，由此可推定樣品中只存在纖維素，藉由計算結晶度可以得知，Mono 組結晶度為  $77.03 \pm 2.58$ ，Co 組結晶度為  $81.35 \pm 2.59$ ，Co-SW 組結晶度為  $81.54 \pm 1.69$ ，Co-SW-1 組結晶度為  $78.18 \pm 0.67$ 。根據 Jiang et al. (2023)研究指出，使用發酵乳桿菌共培養會使細菌纖維素的結晶度提高，推測使用 *B. subtilis* 進行共培養也會使結晶度略為提高，纖維素晶體排列更加有序。

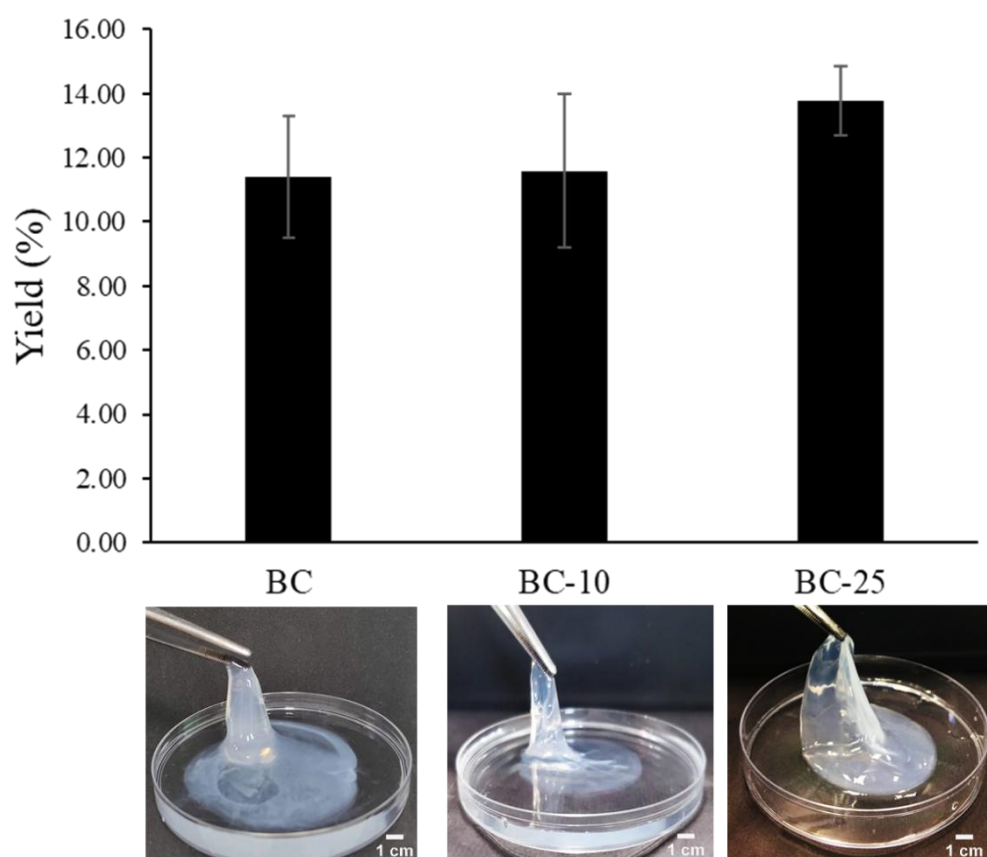
## (5) 吸水性及保水性分析

吸水率會影響材料作為吸收傷口滲出液的能力，Mono 組、Co 組、Co-SW 組及 Co-SW-1 組的吸水率分別為  $569.47 \pm 94.26$ 、 $727.78 \pm 78.62$ 、 $682.86 \pm 99.14$  及  $633.50 \pm 92.07$ (圖 16)，共培養組別相較於單培養組別雖然沒有統計上顯著差異，但有較高吸水率的趨勢。保水性與離水性皆關於材料留住水分的能力，在圖 17 可以看到四組材料隨時間變化的保水性，保水性由高至低為 Co 組 > Co-SW 組  $\geq$  Co-SW-1 組 > Mono 組，推測氫鍵的作用越強，更能夠保留住水分。

(A)

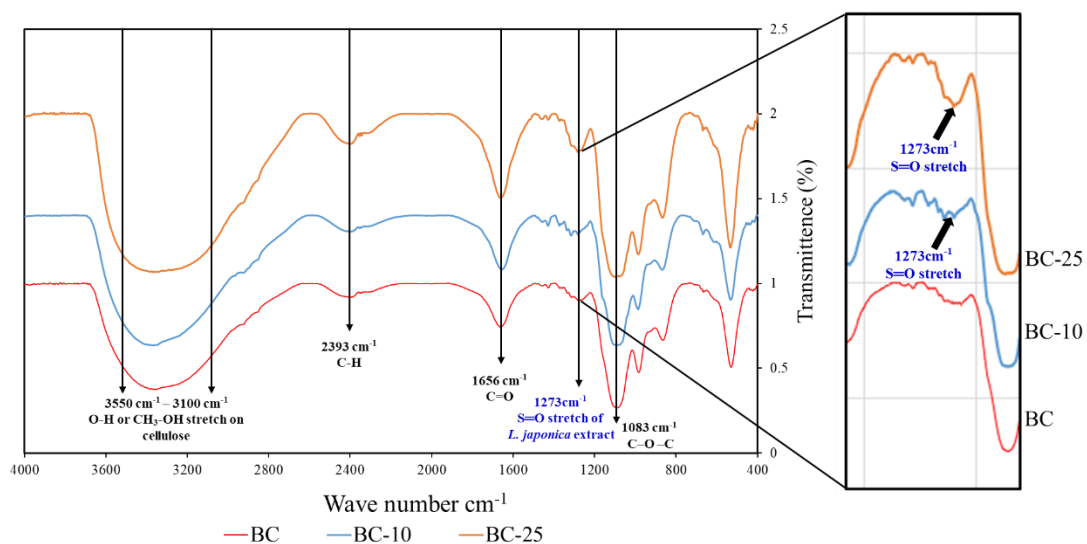


(B)



**Fig. 1.** Membrane appearance (A) and yield (B) from BC, BC-10, and BC-25 media harvested after 14 days.

(A)



(B)

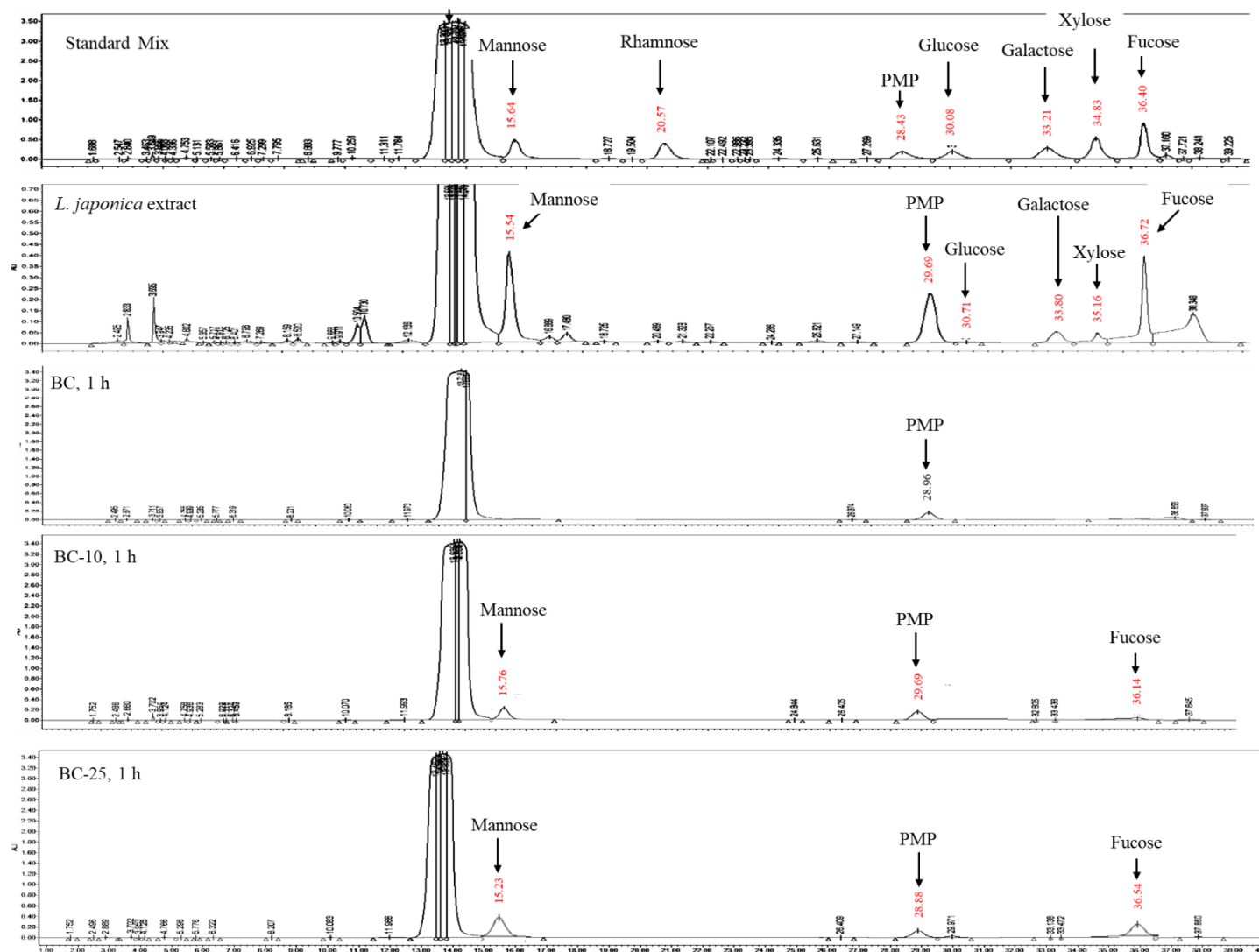
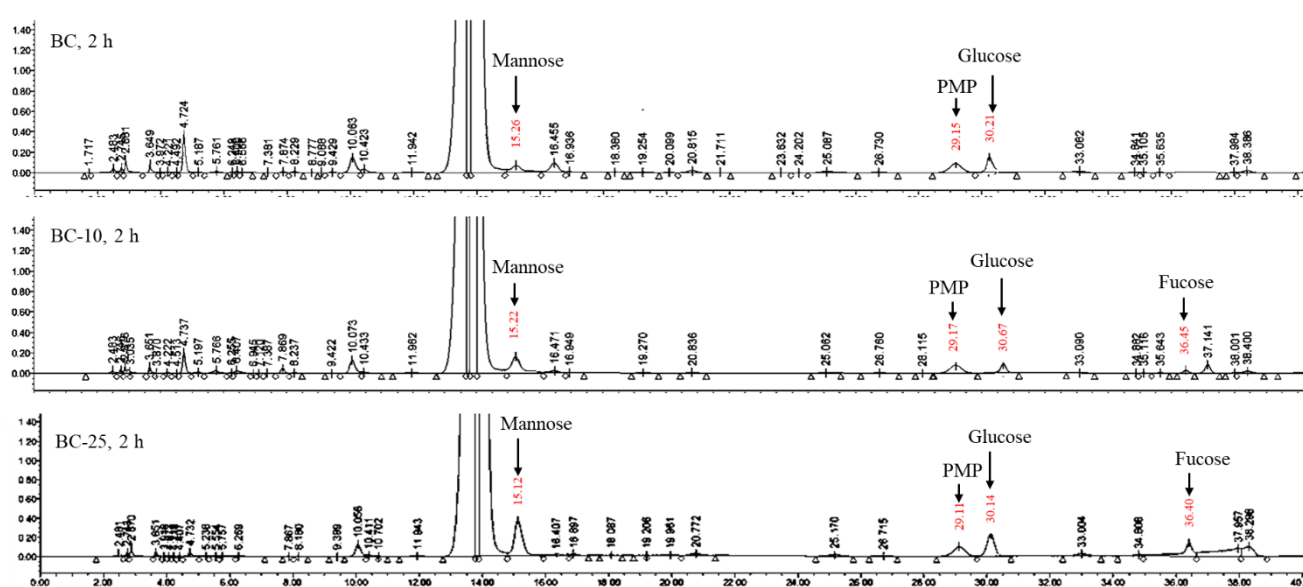


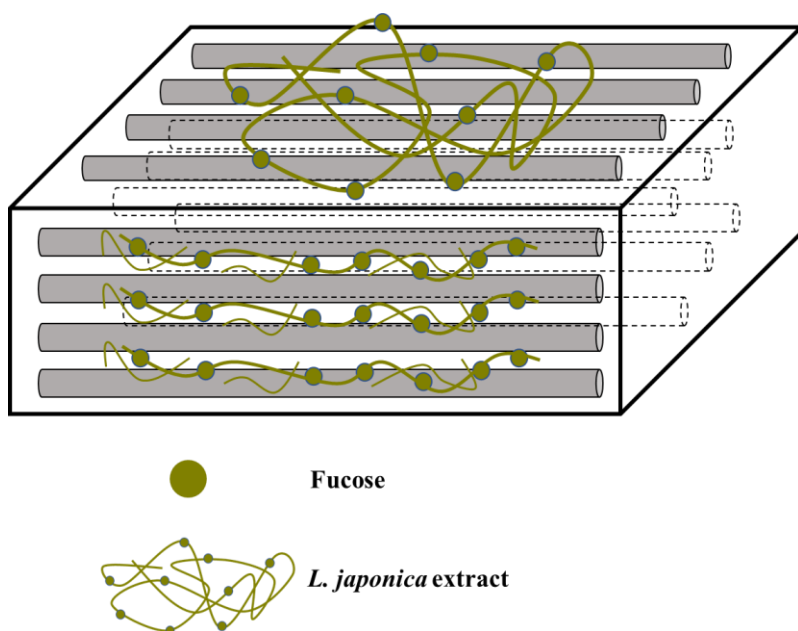
Fig.2 (continued)



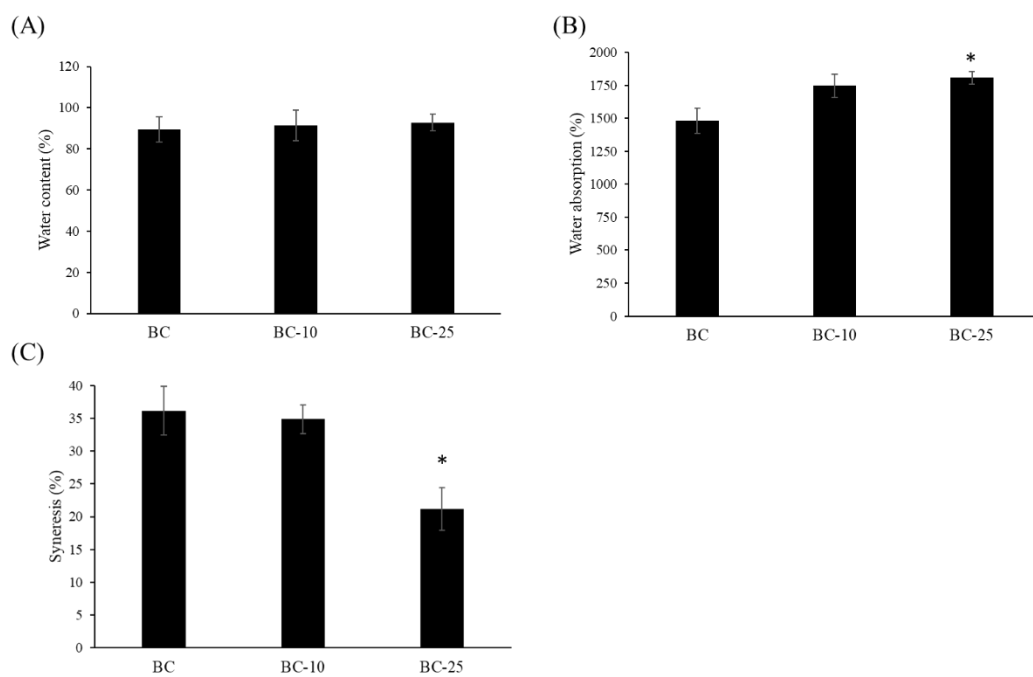
(C)



(D)



**Fig. 2.** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra (A) and monosaccharide composition, as evaluated via HPLC analysis, of BC-10 and BC-25 hydrolyzed for 1 h (B) and 2 h (C). Simulation diagram of the BC-*Laminaria japonica* extract (D).

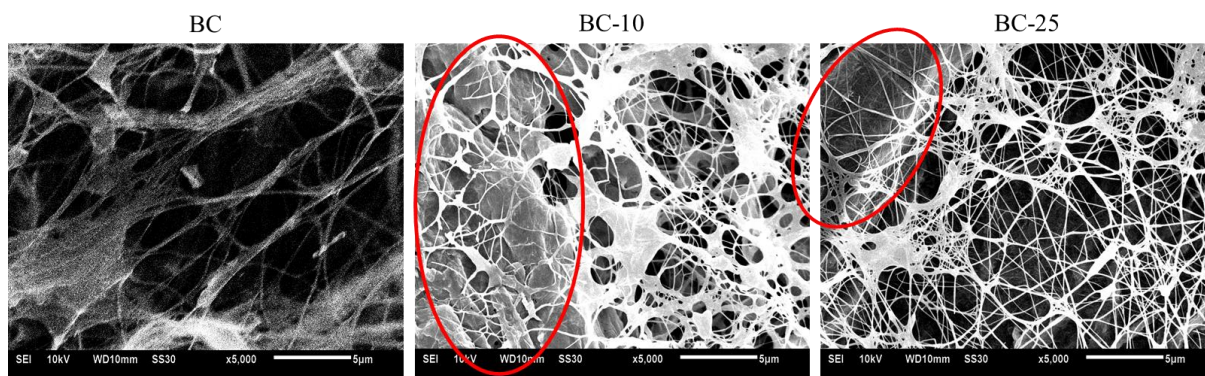


**Fig. 3.** Water content (A), water absorption (B), and syneresis (C) of the BC, BC-10, and BC-25 membranes.

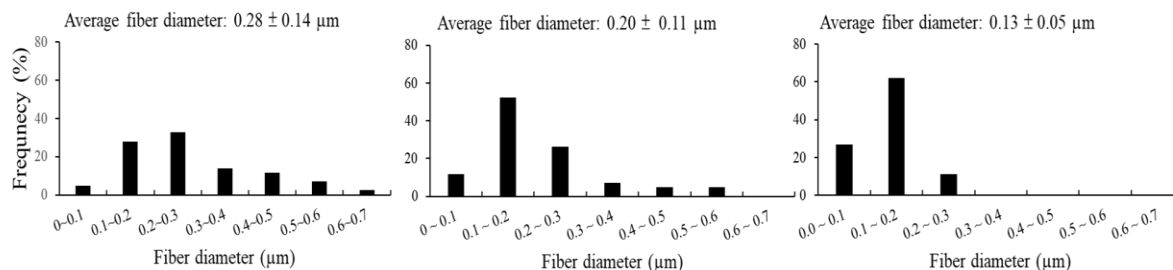
\* indicates a significant difference from BC at  $p < 0.05$  in comparison.



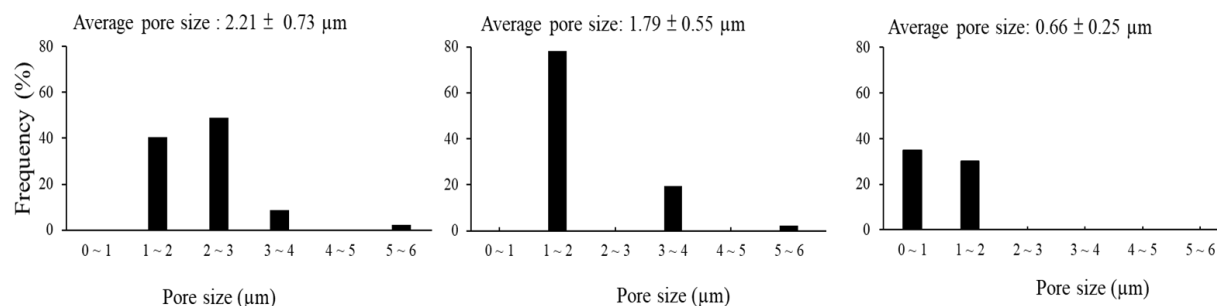
(A)



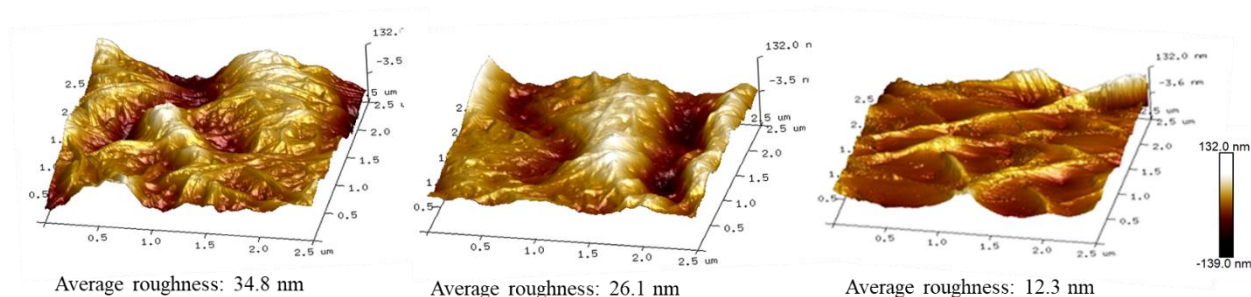
(B)



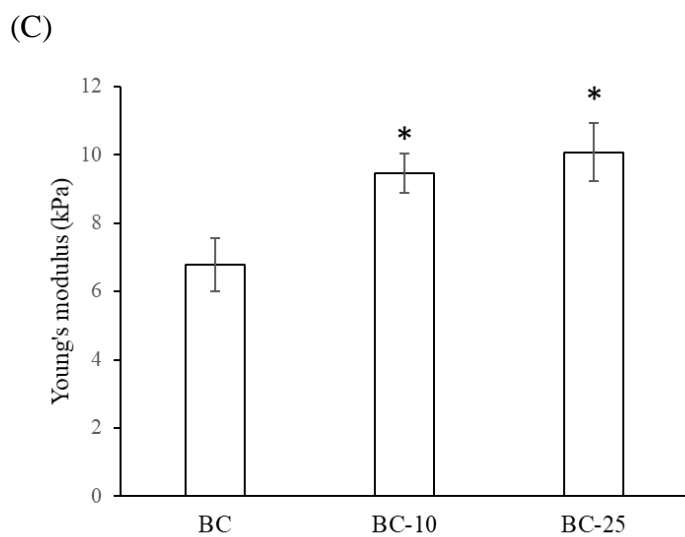
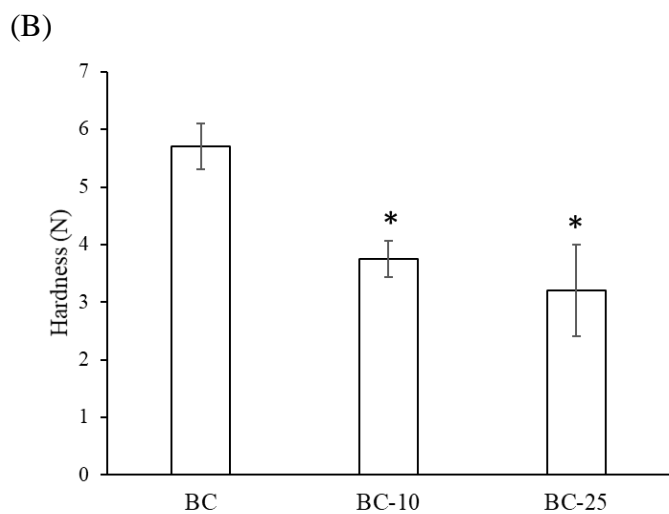
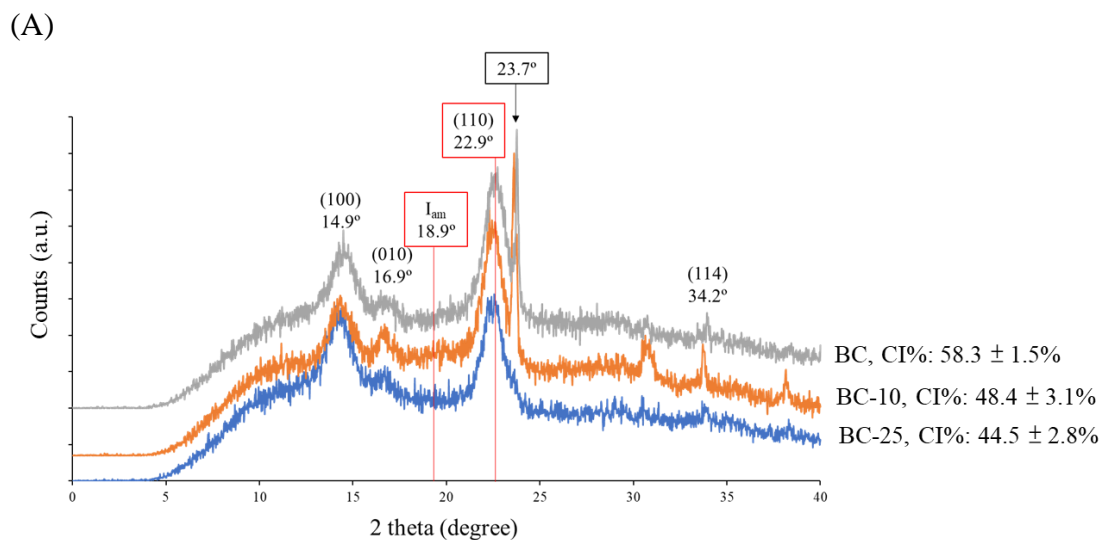
(C)



(D)

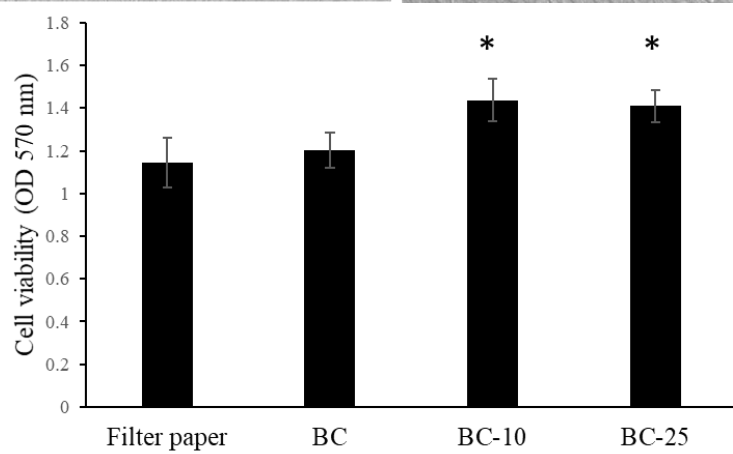
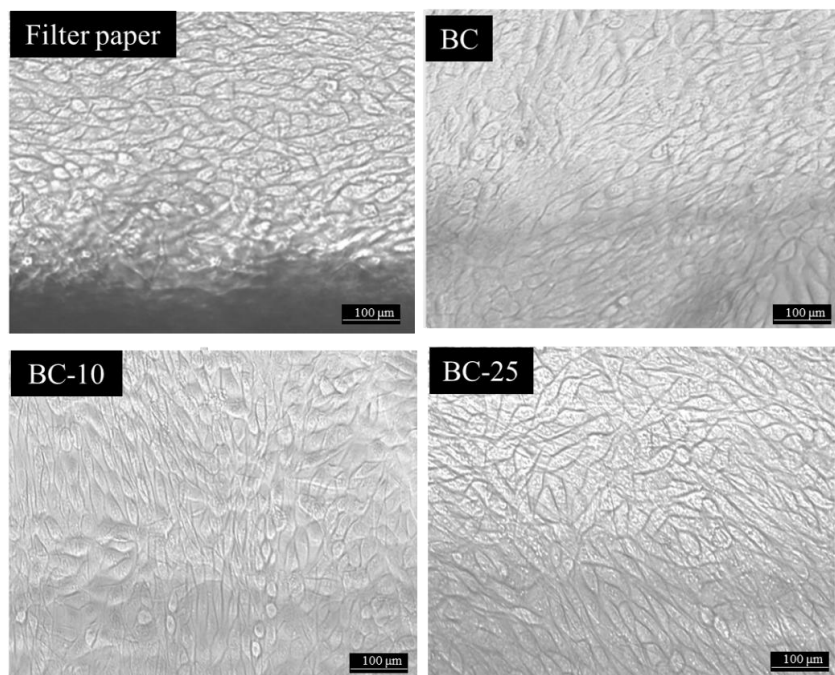


**Fig. 4.** Scanning electron microscopy (SEM) images (A), fiber diameter distribution (B), pore size distribution (C), and AFM images (D) of the BC, BC-10, and BC-25 membranes.

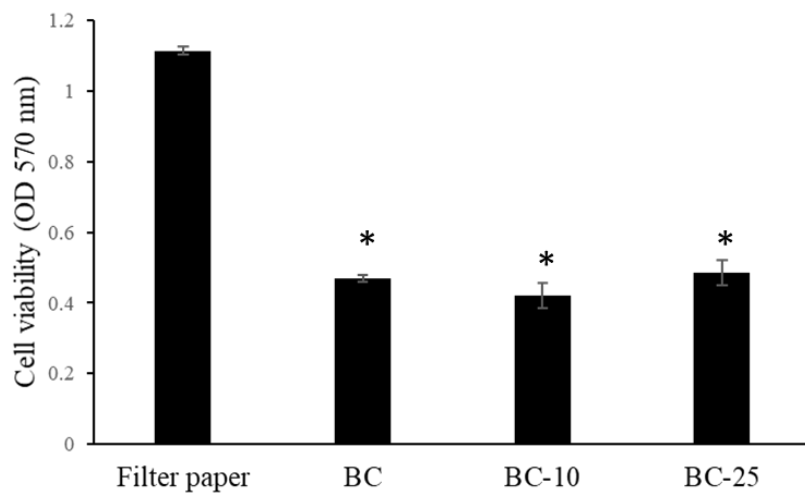


**Fig. 5.** X-ray diffraction (XRD) spectra (A), hardness (B), and Young's modulus (C) of the BC, BC-10, and BC-25 membranes. \* indicates a significant difference from BC at  $p < 0.05$  in comparison.

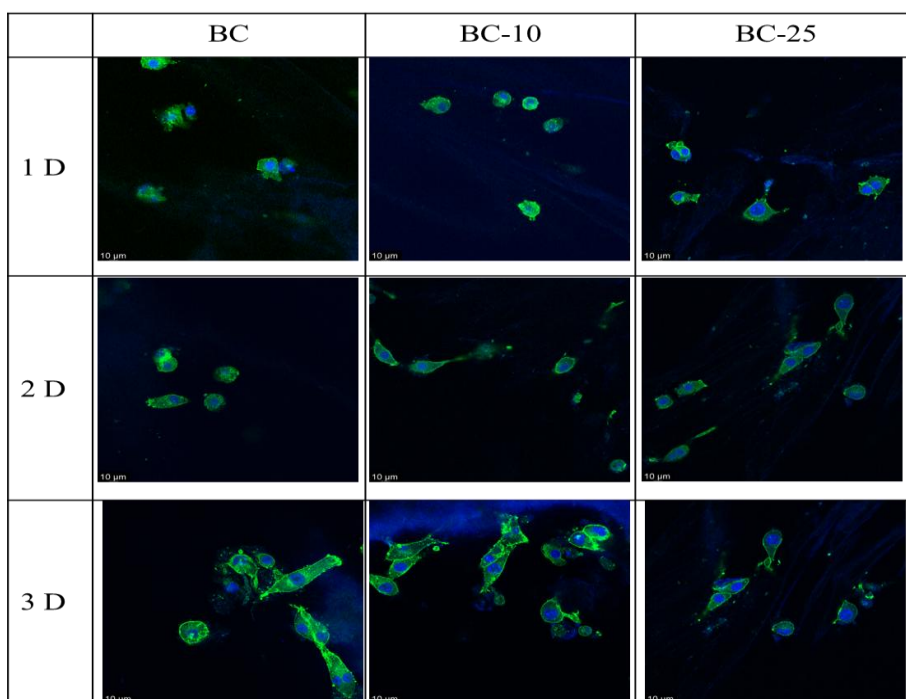
(A)



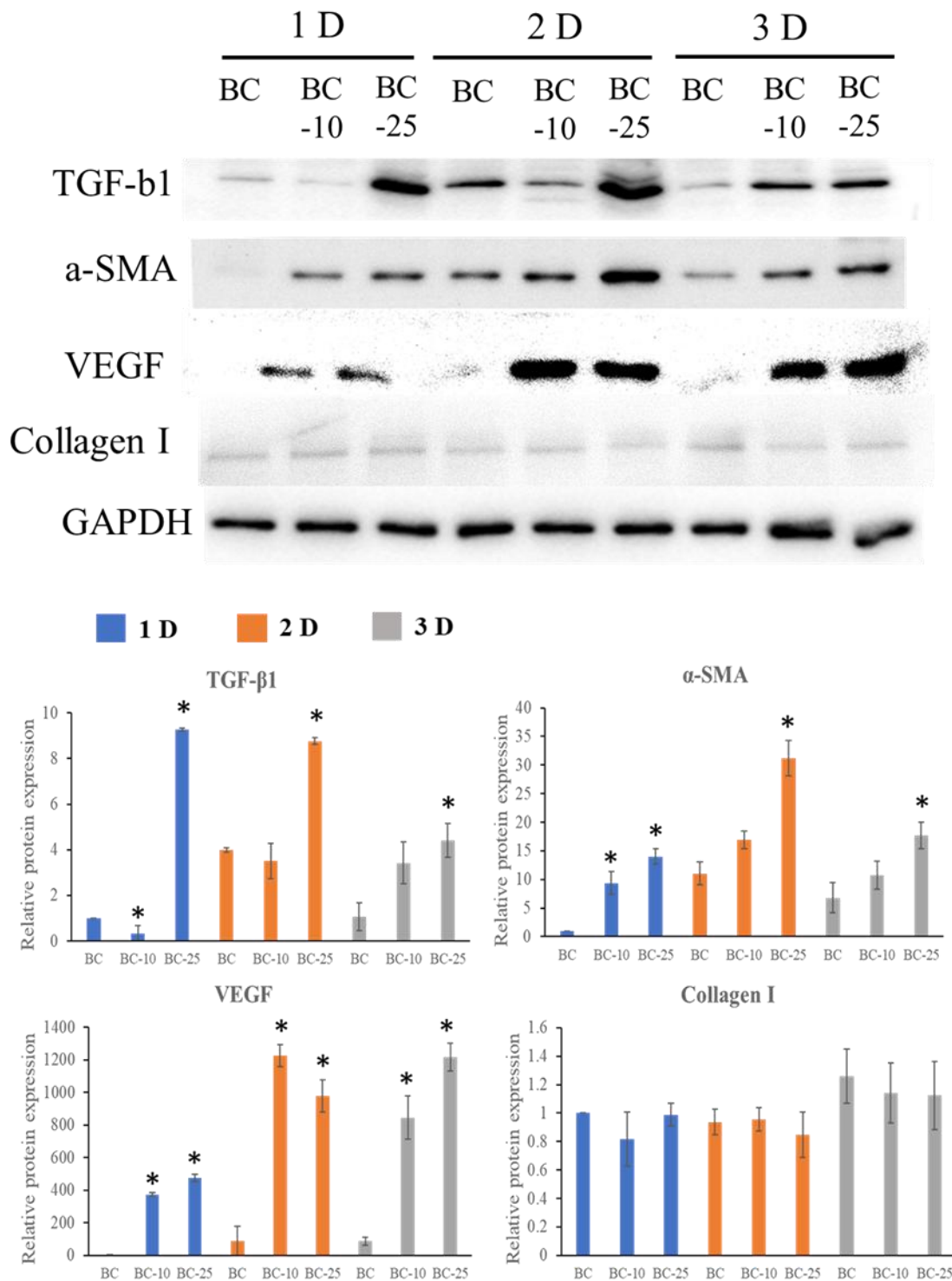
(C)



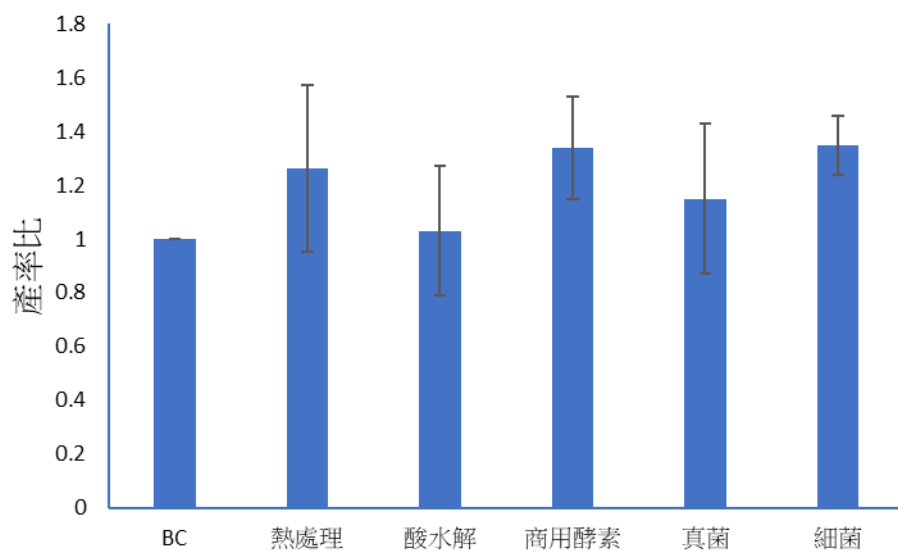
(D)



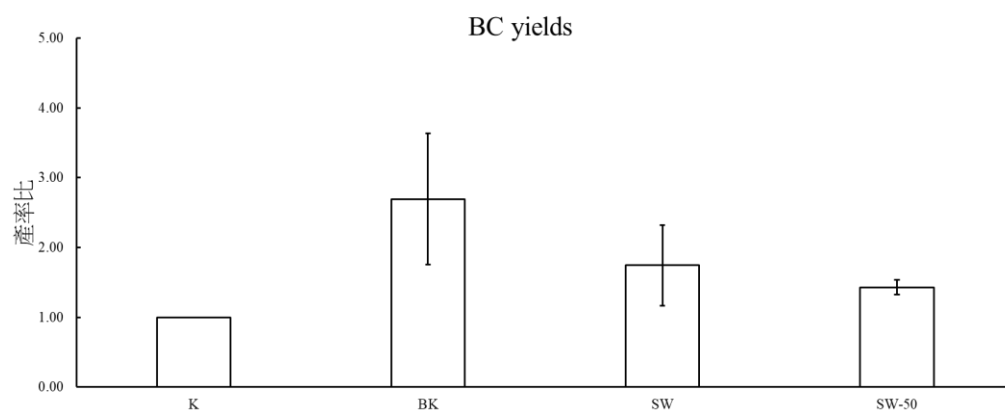
**Fig. 6.** Representative morphological pictures (A) and cell viability (B) of NIH3T3 cells cultured with filter paper, BC, BC-10, and BC-25 extract for 24 h under the cell toxicity test. The cell viability (C) and cytoskeletal status (D) for 1, 2, and 3 days under the adhesion test.



**Fig. 7.** The protein expression of TGF-β 1, α-SMA, collagen I, and VEGF was quantified with BC, BC-10, and BC-25 membranes. NIH3T3 cells were cultured with membranes for 1, 2, and 3 days. \* indicates a significant difference from BC for 1 day at  $p < 0.05$  in comparison.

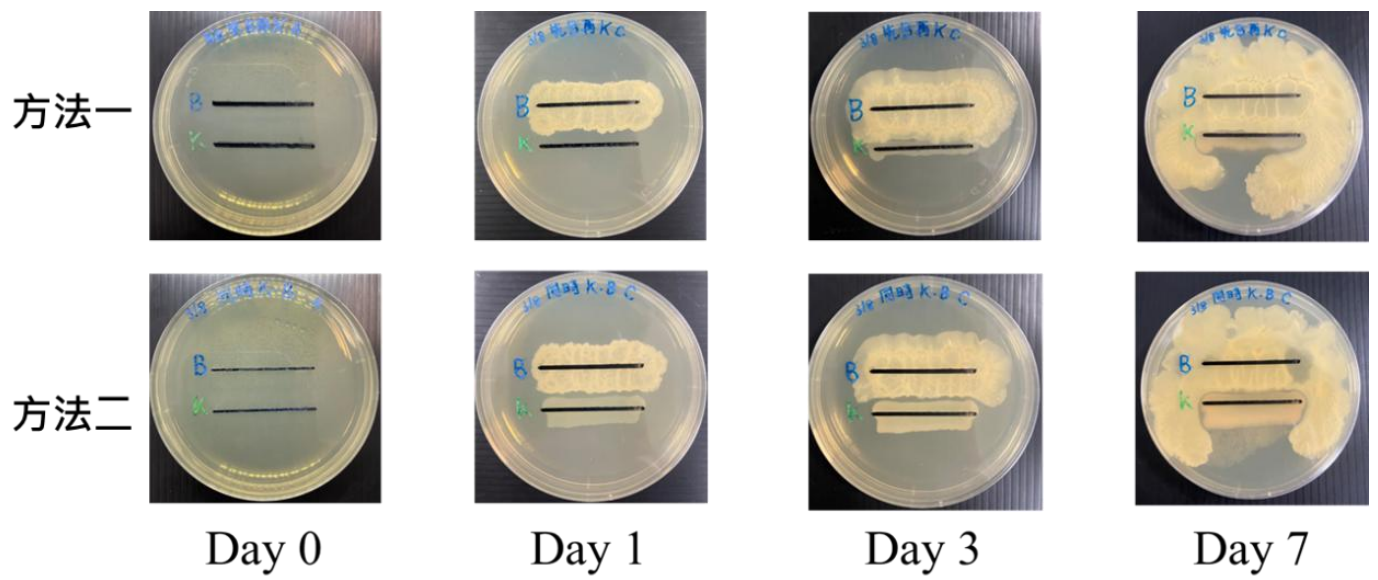


**Fig. 8.** Effects of different pre-treatments of seaweed extracts on BC production

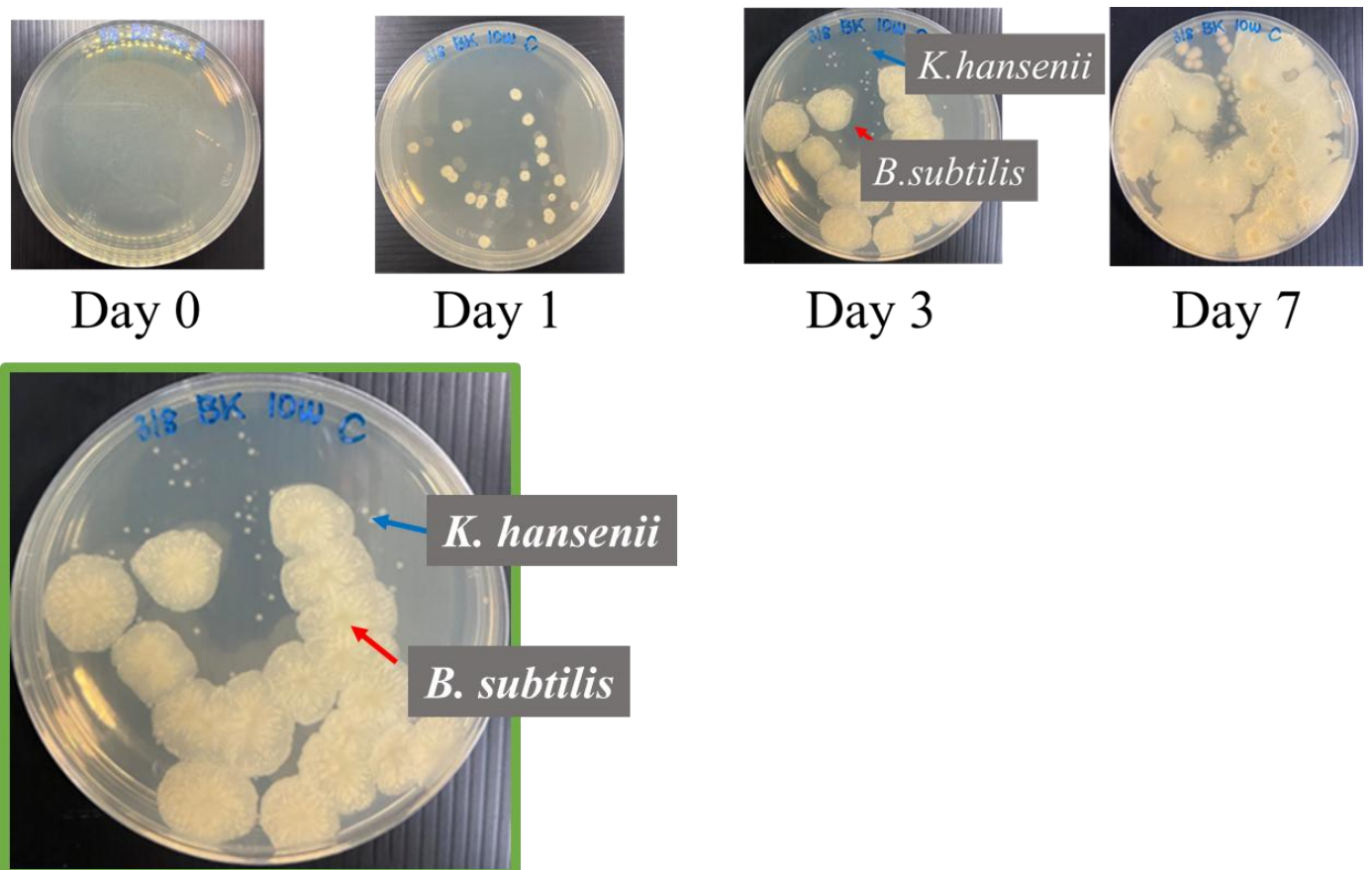


**Fig. 9.** Effect of co-culture of two microorganisms with algae on yield

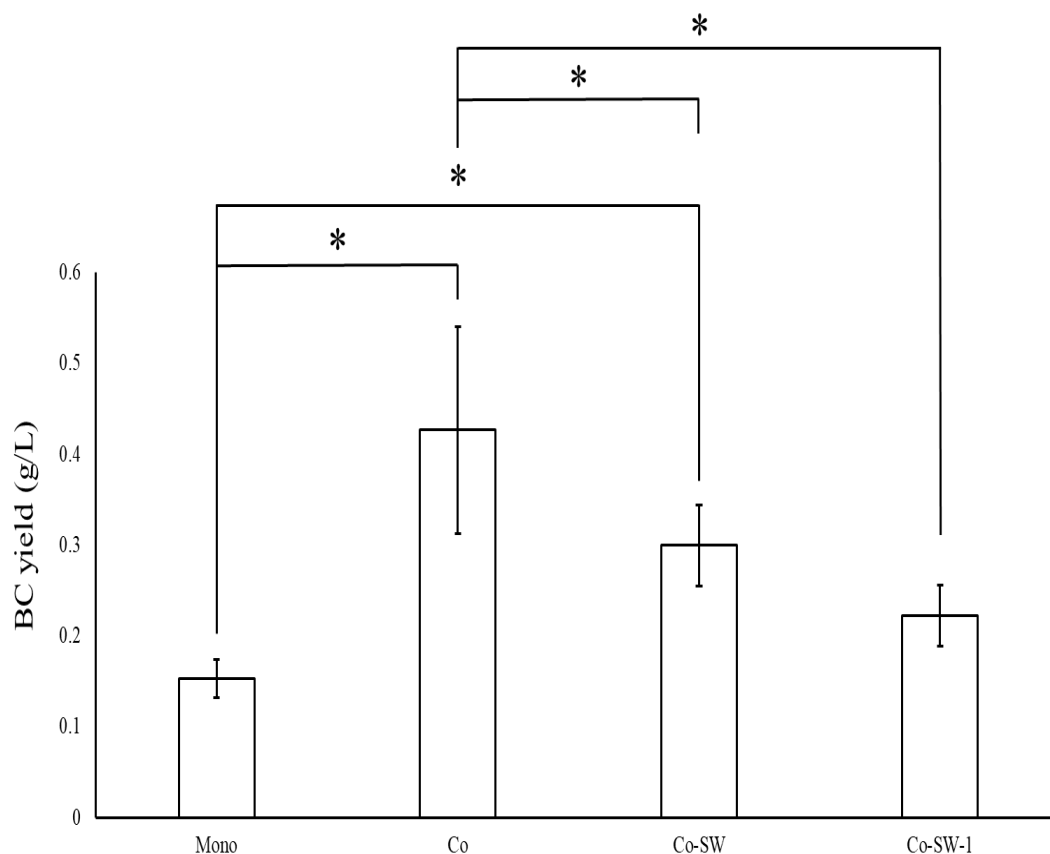




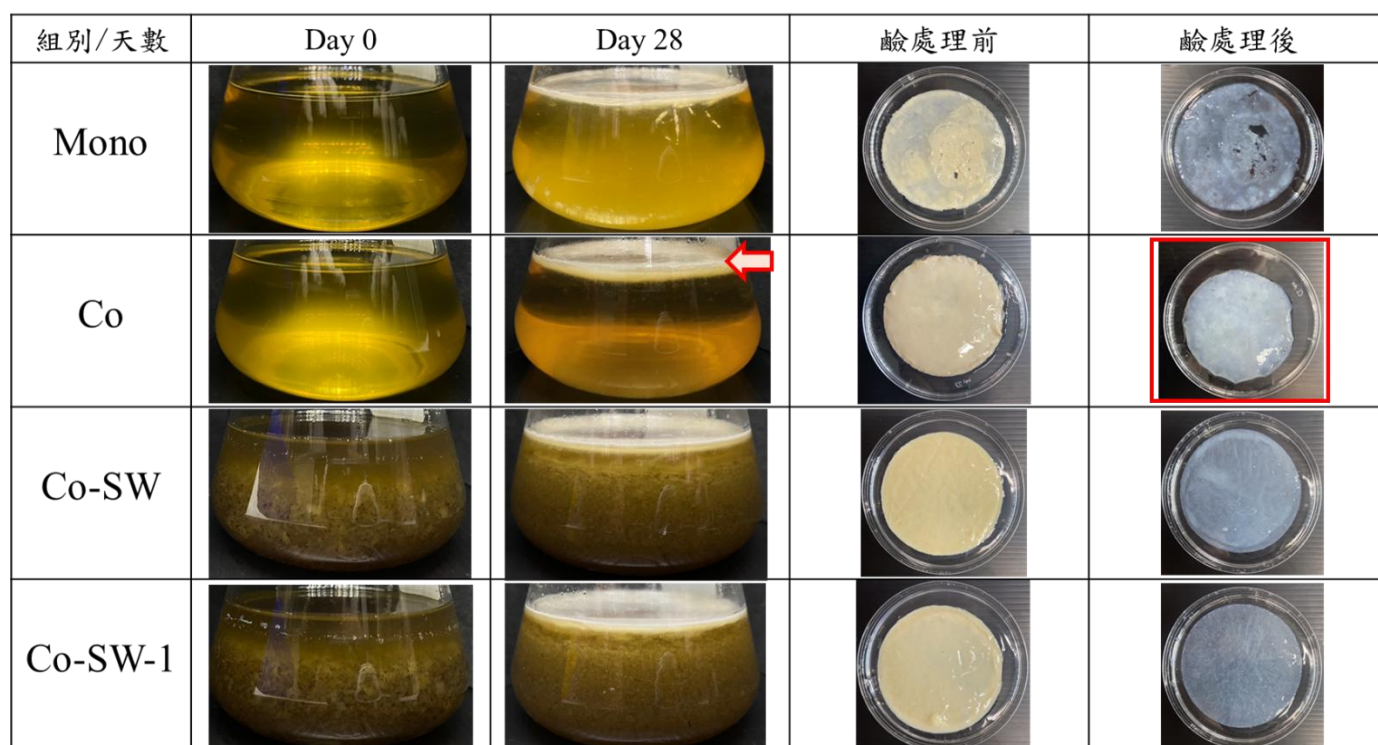
**Fig. 10.** Compatibility test of *B. subtilis* and *K. hansenii* by cross-streak assay



**Fig. 11.** Compatibility test of *B. subtilis* and *K. hansenii* in liquid co-culture medium

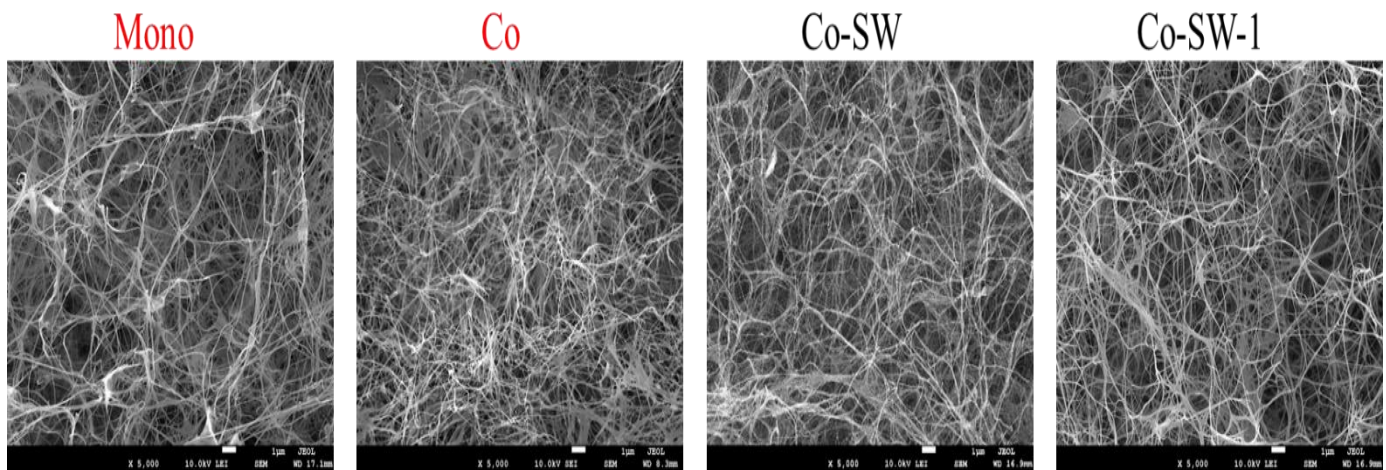


**Fig. 12.** Bacterial cellulose yields in Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups

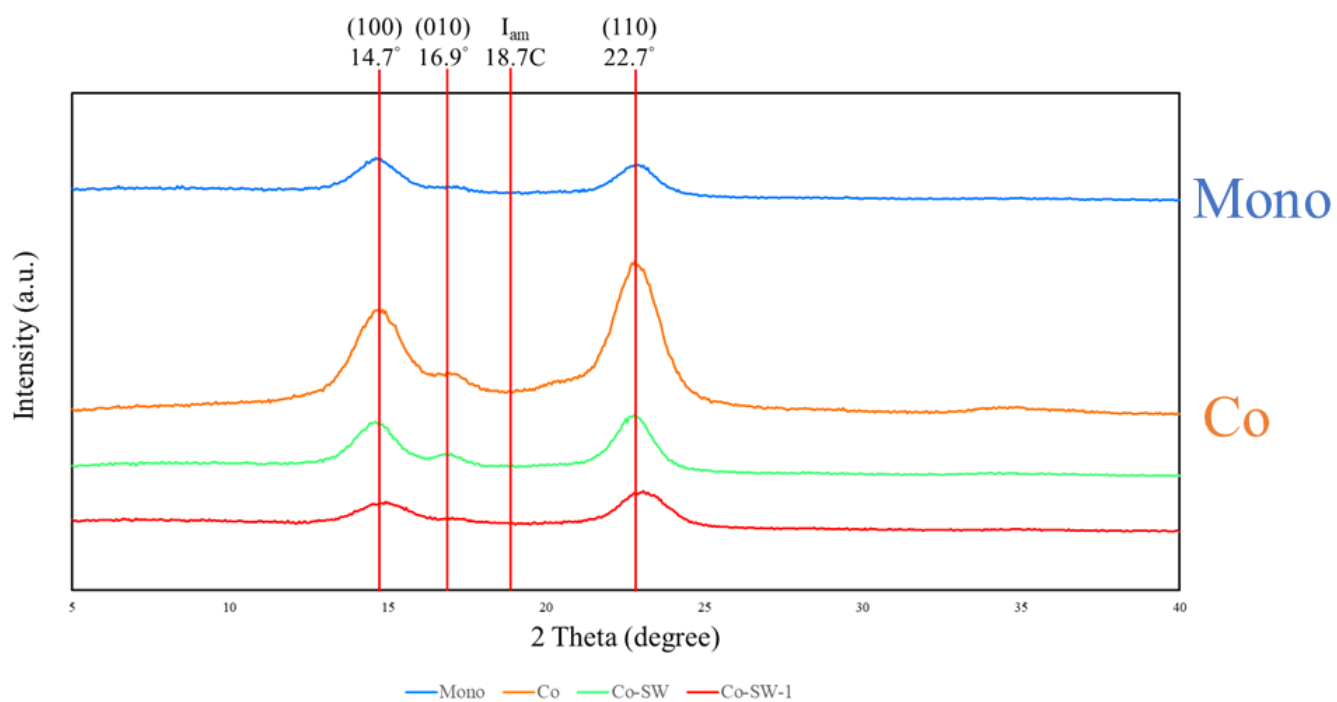


**Fig. 13.** Morphological appearance of bacterial cellulose in Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups

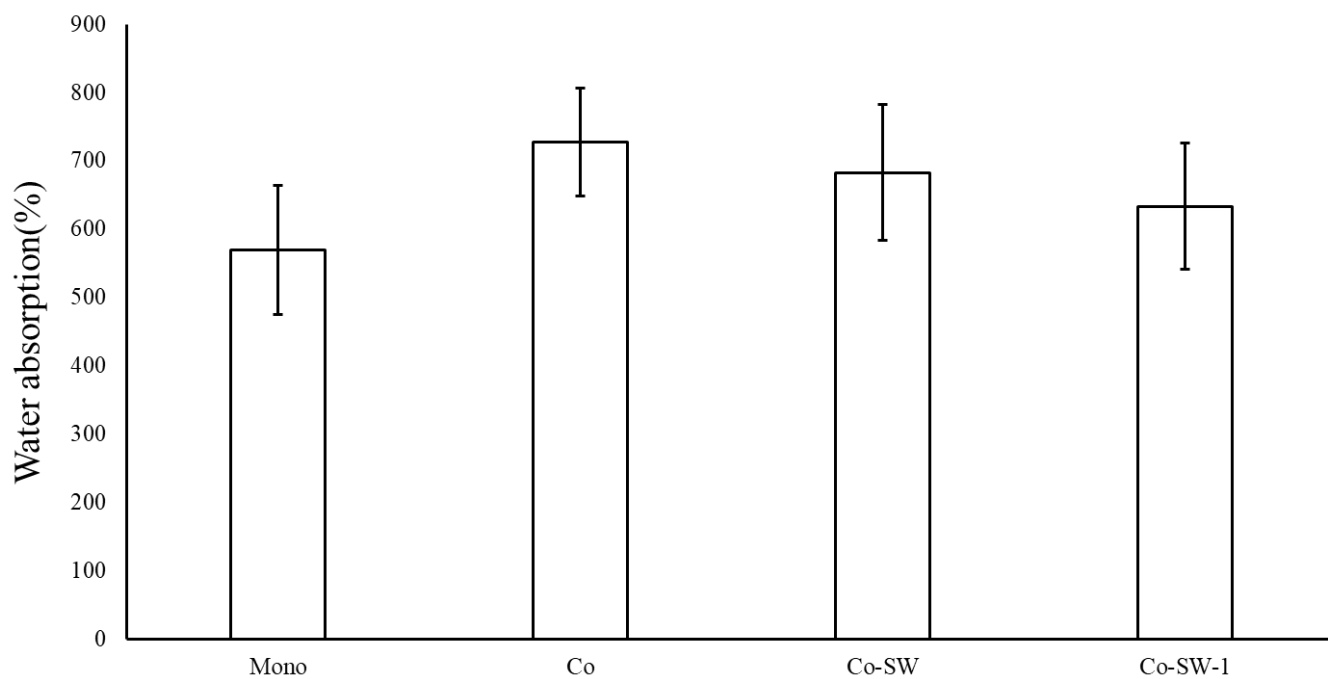




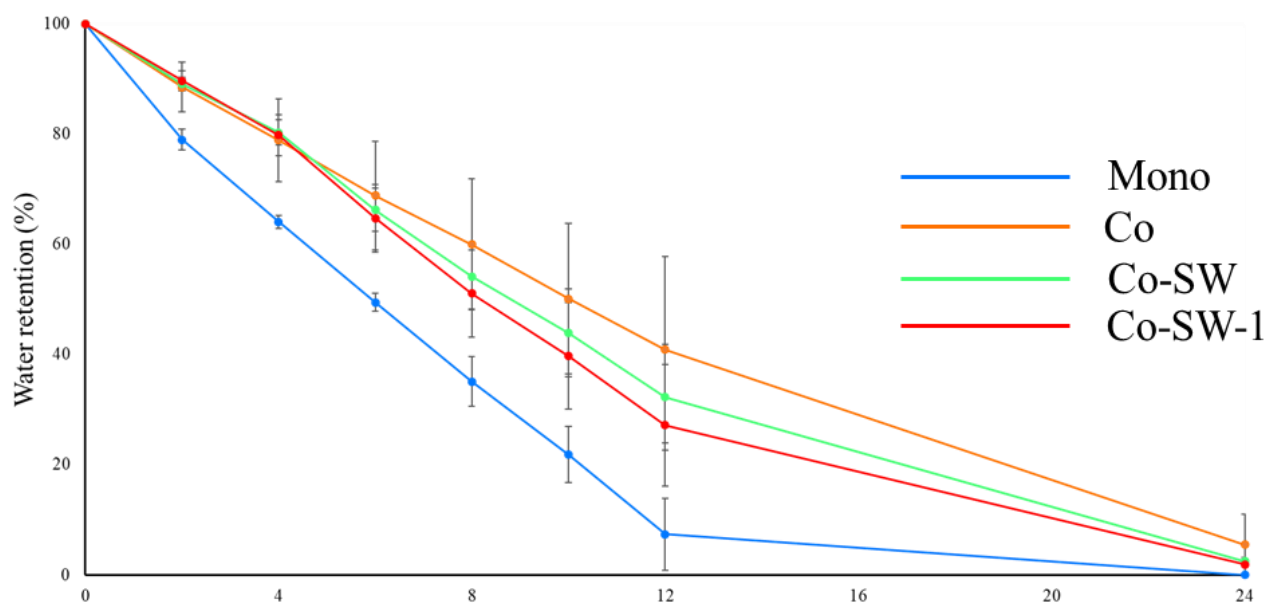
**Fig. 14.** SEM appearance of bacterial cellulose in Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups



**Fig. 15.** X-ray diffraction (XRD) spectra of Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups



**Fig. 16.** Water absorption of Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups



**Fig. 17.** Water retention of Mono, Co, Co-SW, and Co-SW-1 groups

## 成果產出—學術發表

Pai-An Hwang\*, Yu-Ching Lu & Fu-Yin Hsu. (2025, May) Enhancement of the mechanical and hydration properties of biomedical-grade bacterial cellulose using *Laminaria japonica* extract. *International Journal of Biological Macromolecules* 308: 142688. (SCI IF: 7.7; Discipline: POLYMER SCIENCE; Ranking: 5/95 =95.26%) (First author; Corresponding author)

## 與環境永續之相關性

- 以海帶萃取殘物作為替代碳源，可取代傳統細菌纖維素（BC）培養中常用的高純度葡萄糖或工業級碳源，達到資源再利用與降低生產成本的效果。海帶為再生性海洋資源，其萃取副產物在食品與藥品產業中常被棄置，若能有效轉化為 BC 生產原料，將大幅提升廢棄生物質的利用價值。
- 透過微生物共培養策略（*B. subtilis* 與 *K. hansenii*），可在不依賴基因改造的前提下，自然提升 BC 產量與品質，符合綠色生物製程與生態友善原則。共培養系統降低外加化學誘導或能源需求，並透過代謝互補提高生產效率，展現環保且具低碳排潛力的生物製造模式。
- 所得 BC 具可生物降解與生物相容性，可應用於醫療敷料、組織工程等生醫材料，減少對石化基材的依賴，呼應循環經濟與永續材料開發的全球趨勢。

綜合而言，本研究兼顧生物資源再利用、綠色製程與永續材料開發三項核心理念，具明顯的環境永續價值與產業應用潛力。

## 參考文獻

- Authority, E. F. S. (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
- Beliah, M., Ibrahim, H., M Farag, A., El-Ahwany, A., & Sabry, S. (2020). Utilization of marine algae as a carbon source for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(6), 497-518.
- Dourado, F., Gama, M., & Rodrigues, A. C. (2017). A review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. *Toxicology reports*, 4, 543-553.
- Dydak, K., Junka, A., Nowacki, G., Paleczny, J., Szymczyk-Ziółkowska, P., Górzyńska, A., ... & Bartoszewicz, M. (2022). In vitro cytotoxicity, colonisation by fibroblasts and antimicrobial properties of surgical meshes coated with bacterial cellulose. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4835.
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society Interface*, 11(96).
- Hu, W., Chen, S., Yang, J., Li, Z., & Wang, H. (2014). Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 101, 1043-1060.
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer degradation and stability*, 59(1-3), 101-106.
- Ma, Q., Zhou, J., Zhang, W. W., Meng, X. X., Sun, J. W., & Yuan, Y. J. (2011). Integrated Proteomic and Metabolomic Analysis of an Artificial Microbial Community for Two-Step Production of Vitamin C. *Plos One*, 6(10).
- Nóbrega, V., Faria, M., Quintana, A., Kaufmann, M., Ferreira, A., & Cordeiro, N. (2019). From a basic microalga and an acetic acid bacterium cellulose producer to a living symbiotic biofilm. *Materials*, 12(14), 2275.
- Oh, D. C. (2006). New secondary metabolites from the marine actinomycete, *Salinispora*, and microbial co-cultures. University of California, San Diego.
- Uzyol, H. K., & Saçan, M. T. (2017). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 11154-11162.