

枯草杆菌微生物制剂之产程开发*

谢建元^{1**}, 王惠亮¹, 谢奉家², 高穗生²

(1. 高雄师范大学生物科技系, 台湾高雄 824;

2. 农委会农业药物毒物试验所, 台湾台中县雾峰 413)

摘要: 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 被用来作为生物制剂, 可抑制许多真菌类植物病原菌, 其分泌的二次代谢产物 iturin A 是由 7 个氨基酸所组成的环状胜肽结构物, 为一强效抗菌活性之抗生物物质, 并拥有生物界面活性剂性质。本研究利用一套从菌株筛选特定抗生物物质的方法, 以 iturin A 的 *ituD* 和 *surfactin* 的 *sfp* 两个基因, 设计两组引子对 (primer), 进行聚合酵素连锁反应, 快速并简化传统筛选流程。液态发酵碳源选择上, 葡萄糖和麦芽糖皆可得到较高的 iturin A 产量。在氮源上, 以 0.5% 玉米浸粉为较佳之选择, 其 iturin A 可达 74.37mg/L。盐类方面发现硫酸镁对 *B. subtilis* 生产 iturin A 有较明显的效应, 在其中以添加 1.5mmol/L $MgSO_4$ 和 0.75mmol/L KH_2PO_4 时可得最佳 iturin A 产量约 56.36mg/L。在 5L 发酵槽试验中, 发现当转速提高时, 能同时提高发酵时的菌体浓度和 iturin A 产量, 而提高通气量亦能提高 iturin A 产量, 但却不会提高菌体浓度。在添加不同挡板实验中发现, 以 2vvm 通气量条件下添加挡板 1 能提高体积质传系数 K_La , 并可得到 iturin A 产量 112.12mg/L。

关键词: 枯草杆菌; iturin A; 液态发酵; 挡板; 氧气质传系数

Process Development of Bio-control Agent *Bacillus subtilis**

Chienyan Hsieh^{1**}, Hui-Liang Wang¹, Feng-chia Hsieh², Suey-Sheng Kao²

(1. National Kaohsiung Normal University, Kao-Hsiung County 824, Taiwan;

2. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan 413)

Abstract: *Bacillus subtilis* was used as a biocontrol agent to suppress plant fungal pathogens. The secondary metabolite, iturin A, which produced by *B. subtilis* consists of a peptide ring of seven amino acids. The iturin A exhibits a strong antifungal, and antibacterial activity as well as biosurfactant property. In this study, two primers of *ituD* and *sfp* were used to speed the process for the screening iturin a production bacteria. In the shake flask study, both the glucose and maltose were found to be the better carbon sources for iturin A production; the 0.5% corn steep powder was the best nitrogen source and iturin A was able to reach 74.37 mg/L. Effect of salts on the iturin a production was shown the media with 1.5mM $MgSO_4$ and 0.75 mM KH_2PO_4 the iturin A production was 56.36 mg/L. The iturin A production was further studied in a 5-L fermentor with the variation of agitation speed, aeration and baffles. In the 5-L fermentor, it was found that increased agitation speed improved both of the growth of *B. subtilis* and the production of iturin A. On the other hand the increase aeration rate was found the increase iturin a production only. Aeration at 2 vvm gave excellent production of iturin A (112.12mg/L) at 6 d of fermentation. The addition of baffles in the fermentor has influenced the oxygen mass transfer coefficient (K_La) and iturin

* 基金项目: 农委会科技计划 (94AS-5.2.1-ST-a1); 国科会 (NSC 96-2221-E-017-009)。

** 作者简介: 谢建元, 男, 教授, E-mail: mch@nknu.edu.tw。

A production significantly.

Key words: *Bacillus subtilis*; iturin A; submerged fermentation; baffles; oxygen transfer coefficient

1 前言

枯草杆菌属革兰氏阳性,好气性杆状细菌,具周生鞭毛及内生孢子为其形态上主要特征,此类细菌普遍存在于土壤及植物体表,在食品、饲料添加物、酵素、种子保护剂等生产技术产业发展应用已有多年,为一般认定属于安全性之有益微生物种类。由于可以产生内生孢子,在逆境下易于存活,且在产孢过程中,可产生对多种病原菌具有抑制作用之抗生物质(antibiotic substance),因而在植物病害防治应用性之开发^[1-2],多年来备受重视。枯草杆菌对病原真菌和细菌具有拮抗作用,已有文献报告枯草杆菌可产生许多代谢产物和抗生物质,其中至少有66种不同的抗生物质^[2-4]。iturin A由 β -amino acids长链及7个 α -amino acid残基组成之环状胜肽脂类抗生素 Iturin A。Iturin A在目前主要应用于生物防治的功用上^[5-7],枯草杆菌属内有许多 *Bacillus* spp. 对植物病原真菌和细菌具有拮抗作用,此因枯草杆菌在其代谢过程中,至少会产生66种不同的抗生素。会产生抗生素的枯草杆菌除可将菌体直接喷洒植物叶片保护其免受叶部病害为害外,并可制成粉剂或纯化出其抗生物质,进行种子覆被或土壤处理。枯草杆菌属产生的抗生物质其分子量范围在270~4500Da的胜肽类抗生素,而同一种枯草杆菌常可同时产生分子量相近的多种抗生素,其组成结构为多个氨基酸以环状结构联接,故其较不易被动植物的蛋白酸水解,其所产生不同类之抗生素可对不同的病原菌产生抑制作用,如 *Cercospora kikuchii*、*Verticillium dahliae*、*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*、*Alternaria mali*、*Rhizoctonia solani*、*Pyricularia oryzae*、*Xanthomonas oryzae* 及 *Pseudomonas lachrymans* 拮抗范围广,为一具生物农药发展潜力的菌种。在温室药效部分,它对甜椒疫病也有防治效果。Iturin A在in vitro试验中能抑制不同植物病原菌,在田间试验中针对番茄(tomato)与甜瓜(melon)的种子所作之生物防治是有效的^[8]。枯草杆菌可产生对植物病原真菌、细菌等具有拮抗作用之抗生物质,并已有量产制剂。但国内目前真正以本土菌种为商品上市的制剂,却不多见,主要原因除了业者成本考虑外,尚待克服如何从自然界中快速筛选一株有效的本土拮抗菌。为加速植物保护生物制剂产业之发展,减少农药之使用,本研究拟建立PCR特定基因片段筛选本土性 iturin A生产之枯草杆菌菌株,进行土壤采集,分离筛选菌株,调查本土性枯草杆菌资源,并建立多样分离筛选菌株方法,期能应用并提高获得拮抗菌株的机率。同时进一步在摇瓶探讨 iturin A发酵条件与产量进行探讨,最后则放大致5L发酵槽,进行发酵参数与标的产物量产提升之液态发酵条件建立。

2 材料方法

2.1 材料

本土枯草杆菌菌株与芒果炭疽病真菌筛选自农委会药物毒物试验所。Iturin A与Surfactin标准品购自Sigma。NA与LB购自Difco。PDA购自HiMedia。菌种活化:将枯草杆菌接种于NA斜面,24h后再接种于LB broth作为液态种源。芒果炭疽病真菌取5mm贴于PDA平板中央,培养7天至长满。取3ml液态种源加入上述配置好的培养液,培养30℃,200rpm,7天后进行分析,并且将培养7天的培养液静置7天后进行分析。

2.2 菌种筛选

小量培养筛选分离的菌株与抽取 DNA^[9]，接着根据两种抗生物质“surfactin”与“iturin A”，设计引子对^[10-11]并进行聚合酶链反应（Polymerase chain reaction; PCR），反应条件为 94℃ 加热 5min，接着以 94℃ 1min、50℃ 1min、72℃ 90s 为一循环，进行 30 个循环后，取 PCR 反应产物进行电泳分析。由电泳结果鉴别可同时产生“surfactin”与“iturin A”的菌株。初步结果，一个缺乏 *ituD* 和不完全的 *1pa-14* 枯草杆菌菌株^[12]是不能生产 iturin A，以 iturin A 的 *ituD* 和 surfactin 的 *sfp* 两个基因，设计两组引子对（primer），进行聚合酶链反应，所得产物用电泳方法检测，发现可获得两个预期的区带（band）分别为 *ituD* 1 203bp 及 *sfp* 675bp 明显的区分，经序列比对后证实为所要的基因。

2.3 液态发酵条件之探讨

本实验以 1% 葡萄糖、0.5% 玉米浸粉、1.5mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.75mmol/L KH_2PO_4 为基础培养基，经 121℃、20min 灭菌冷却后接入 5% 的液态种源，于 30℃、200rpm 恒温振荡培养 7 天，7 天后取样分析其 pH 值、干菌重及 iturin A 产量。探讨淀粉类碳源添加：马铃薯淀粉与麦芽糊精分别添加 1%、1.5% 及 2% 的马铃薯粉与麦芽糊精。探讨不同单糖与双糖碳源对 iturin A 生产之影响，分别添加 1% 葡萄糖、蔗糖、果糖及麦芽糖。探讨不同氮源对 iturin A 生产之影响，分别添加 0.5% 玉米浸粉、大豆蛋白、酵母粉及特殊蛋白胨。探讨不同盐类对 iturin A 生产之影响，分别添加 1.5mmol/L、0.75mmol/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 KH_2PO_4 。

2.4 HPLC-PDA 分析方法

标准品：将 1mg “iturin A” 溶于 1ml methanol 中，在 220nm 与 280nm 波长的条件下以 HPLC 分析，作为标准品。样本中的 iturinA 之萃取：于 30℃ 下培养 7 天的培养液，在 4℃ 下，以 8 000rpm 离心 20min，取上清液以浓盐酸滴定至 pH 值 = 2 ± 0.5 。在 4℃ 下，以 8 000rpm 离心 20min，取沉淀物，以 25ml methanol (100%) 将沉淀悬浮于分液漏斗，重复萃取二次，过滤，并藉由真空浓缩仪将有机溶剂挥发，此沉淀物即为粗 (crude) “iturin A”。将粗 “iturin A” 溶于 NaOH (pH 值 8) 溶液中，最后经 0.22 μ m 过滤膜过滤，便可进行 HPLC 分析。HPLC 分析条件：利用 Lichrocart 250-4 Lichrospher 100 RP-18 column，以 acetone: 10 mmol/L ammonium acetate = 3 : 2 (v/v) 为冲提液，流速为 0.8ml/min，以光二极管侦测器 (HPLC/PDA) 在 210nm 到 350nm 波长进行扫描，再对图谱比对分析。

2.5 5L 发酵槽操作

5L 发酵槽批次式液态发酵：利用上述在摇瓶所得到的结果，在 5L 的发酵槽上进行规模放大的实验。此阶段将进行单纯的批次培养与饲料批次培养，所以 3L 为工作体积，培养基经灭菌冷却后，接入 5% 之种源，液态种源为摇瓶中生长 1 天后之菌体，发酵槽操作条件为不同转速 (250RPM、350RPM、450RPM)、温度控制、不同通气量 1v/v 或 0.5v/v、不同添加物 (植物油脂与界面活性剂)、消泡剂添加、防止污染等条件。每天取样进行分析，并将所产得之生理活性物质 (iturin A) 与菌体在摇瓶上所得之结果做一比较。发酵槽使用文件板的规格如下，挡板长度、宽度、孔径大小分别为挡板 1 : 21cm, 1.5cm, 0.2cm; 挡板 2 : 22cm, 3cm, 0.2cm; 挡板 3 : 21cm, 3cm, 0.5cm; 挡板 4 : 22cm, 3cm, 0.5cm^[12]。

2.6 Q_{O_2} 和 $K_L a$ 测定

在本研究中采用亚硫酸盐氧化法与动态测定法,其测定方法如下:①亚硫酸盐氧化法:将一定温度的 RO 水加入发酵槽内,开始搅拌,加入亚硫酸钠晶体,使 SO_3^{2-} 浓度约 0.2mol/L ,再加入硫酸铜晶体,使 Cu^{2+} 浓度约为 0.003mol/L ;待完全溶解后,开阀通气,空气阀一开就接近预定的流量,并在几秒钟内调整至所需要的空气流量,而当气泡从喷管中冒出的同时,立即计时,为氧化作用的开始。氧化时间为 10min ,到时停止通气和搅拌,准确地记录氧化时间。通气前后各取样 20ml ,立即移入新吸取的过量标准碘液之中,然后用标准的硫代硫酸钠溶液以淀粉为指示剂滴定达到终点,再利用下式计算出 $K_L a$,

$$N_v = \frac{V \times m}{1000 \times V_0 \times t \times 4} \left(\frac{\text{mol } O_2}{\text{ml min}} \right) = K_L a \times (c^* - cL)$$
 其中 N_v = 体积溶氧速率, V = 两次取样液体用 $Na_2S_2O_3$ 滴定所用体积的差 (ml), m = $Na_2S_2O_3$ 浓度 (mol/L), V_0 = 取样的体积 (ml), t = 两次取样的间隔,即氧化时间 (min), c^* = 槽中液体的饱和溶氧, 30°C 下为 7.7mg/L , cL = 槽中液体的溶氧值,在此条件下为 0, $K_L a$ = 体积质传系数 (min^{-1})。

②动态测定法:在非稳定状态的批式培养过程中,连续通气供氧时由氧的物料衡算得: $dc/dt = K_L a (c^* - c) - Q_{O_2} \times X$, 式中 dc/dt 为单位时间内发酵液溶解氧的变化 [$\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$]; K_L 为氧质传系数 (m/h); a 为比界面面积 (m^2/m^3); $[do]^*$ 为氧在发酵液中的饱和浓度 (mmol/L); c 为发酵液中测得的溶解氧浓度 (mmol/L); Q_{O_2} 为比呼吸速率 ($\text{mmol } O_2/\text{g cell} \cdot \text{h}$); X 为菌体浓度 (g/L)。如果于发酵过程中,某一短暂时间,进行停止供气 (stop) 并将搅拌转速调小,再恢复供气、搅拌转速操作。而假设此短时间内, X , c^* , Q_{O_2} , $K_L a$ 皆为常数,并用溶氧电极连续测定 c 随时间的变化。这时氧的供应速率为 0, 即 $K_L a (c^* - c) = 0$, c 直线下降,由直线斜率可求出 $-Q_{O_2} \cdot X$, 如果我们利用 OD 值而获得菌体浓度 X 值,则可计算 Q_{O_2} 值。然后再开始通气, c 又逐渐上升,最后恢复到原来浓度, c 的记录曲线,则: $c = c^* - \frac{1}{K_L a} (Q_{O_2} X + dc/dt)$ 根据恢复通气后 c 的变化曲线求出不同时刻的 dc/dt , 用 c 对 $(Q_{O_2} X + dc/dt)$ 做图,可绘得一直线,直线斜率的负倒数即为 $K_L a$ ^[13]。

3 结果与讨论

3.1 菌种筛选

对于具备特殊功能性的微生物筛选需通过一特定的方式,特别是枯草杆菌是在普遍存在于土壤中的细菌,在筛选上会面临繁重的筛选工作,对于特定生产某些代谢产物的枯草杆菌筛选,需建立一些具专一性的做法。由 *B. subtilis* 所产生之 Iturin A 及 *B. subtilis* 及 *B. licheniformis* 所产生之表面素 (surfactin) 皆为脂胜肽类生物界面活性剂^[14]。首先,对非核糖体模式生产的环状 lipopeptide 类抗生物质的菌株,以生产 surfactin^[10] 与 iturin A 基因^[11] 建立的台湾枯草杆菌 PCR 筛选菌种方法,曾成功的分离到较高 iturin a 产量菌株,在台湾枯草杆菌资源调查及研发应用,菌株搜集与筛选方法之建立。以加热处理法分离筛选枯草杆菌属 (*Bacillus* spp.) 菌株,菌体悬浮液涂抹于培养基上培养菌株,以菌落外观形态,配合镜检生理生态特性,作菌株初步鉴定。目的之一就是尝试建立更快速且有效筛选出高生物活性潜力菌株的筛选模式。利用 *ituD* 与 *sfp* 两组引子 (primers) 进行复合式

PCR, 发现可获得两个预期的区带 (band) 分别为 *ituD* 1 203bp 及 *sfp* 675bp 明显的区分, 成功建立枯草杆菌 “surfactin” 与 “iturin A” 的 PCR 筛选方法。接着利用建立的筛选模式筛选出 45 株含有 “surfactin” 与 “iturin A” 基因之台湾本土 *Bacillus* spp. 菌株, 其中利用 API 50 CHB 人工鉴定套组、VITEK 与 BIOLOG 自动微生物鉴定分析仪进行部分菌株鉴定, 鉴定结果确认已至少得到 16 株台湾本土枯草杆菌、5 株液化淀粉芽孢杆菌与 3 株仙人掌杆菌菌株 (表 1)。13 株筛到菌种中, 有 9 株同时含有 *ituD* 与 *sfp* 基因片段者, 经培养经 HPLC 皆可测得 iturin A 的产生。进一步分析含有 *ituD* 与 *sfp* 基因片段者, 同时进行生物活性检定, 目前至少有 6 株生物活性高。其中, 枯草杆菌菌株编号 S3 对于香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*)、檬果炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)、豌豆镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) 与西红柿镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 等具有良好的防治效果。在表 1 中, 菌种编号 6004 虽然只有基因片段 *sfp* 但仍有高产量的 Iturin A, 这也显示, 没有 *ituD* 基因片段, 不代表无法生产 Iturin A。

3.2 液态发酵条件之探讨

不同浓度的马铃薯淀粉与麦芽糊精在不同培养天数的发酵液其 pH 值相差并不大, 而以 2% 麦芽糊精培养至第七天为最高, 约为 5.81, 干菌重则以 1.5% 马铃薯淀粉培养至第七天为最高, 约为 0.0097g/L 而以 1% 麦芽糊精培养至第七天亦可得到较高之干菌重, 约为 0.0091g/L, iturin A 产量以 1% 麦芽糊精培养至第五天为最高, 约有 70.37mg/L, 其次则为 2% 马铃薯淀粉培养至第五天, iturin A 产量约有 62.28 mg/L (图 1)。由于马铃薯淀粉在加热灭菌后使得淀粉颗粒集结凝固成块状, 造成其均匀分散结果不佳, 且在发酵槽实验中更发现马铃薯淀粉会结块并沉积在底部, 难以均匀分散在槽内, 而麦芽糊精则无此现象, 麦芽糊精在经加热灭菌后依然能保有其分散程度。不同碳源对 iturin A 生产之影响, 有糖类的发酵液其 pH 值皆较没添加的高, 而在干菌重方面, 培养七天后的发酵液中, 有添加糖类的发酵液其干菌重较没添加的低。而在 iturin A 产量方面, 有添加糖类的发酵液均较没添加的高。Nicholson 和 Chambliss (1985) 指出发酵液中若含有糖类与淀粉能温和的活化 *B. subtilis* 中的淀粉酶产生, 并促进其分解作用的表现^[16]。因此, 在添加糖类与淀粉的发酵液中, 其菌体生长较为快速, 在培养结束时其 iturin A 的产量亦较高, 除了果糖例外。在添加果糖并不能提高 iturin A 产量, 其可能原因是 *B. subtilis* 并无果糖分解酵素。实验结果中亦发现, 添加葡萄糖、蔗糖与麦芽糖并无非常大的差异存在, 其 iturin A 产量分别为 73.40mg/L、71.84mg/L 与 71.62mg/L (图 2)。

不同氮源对 iturin A 生产之影响, 在干菌重方面, 含玉米浸粉的培养基与对照组的干菌重相差不大, 分别为 0.0033g/L 与 0.0018g/L, 而添加酵母粉跟大豆蛋白则能提高干菌重, 有助于微生物生长。添加玉米浸粉能明显得到较高 iturin A 的产量, 约为 74.22mg/L, 而添加酵母粉和大豆蛋白的效果则次之 (图 3)。添加 peptone 则无明显的 iturin A 增加, 此一结果和文献上报道有差异, 但进一步分析文献所使用的 peptone 浓度高达 30g/L, 因此玉米浸粉作为 iturin A 发酵培养时的适当氮源。氮源为供应菌体细胞合成之主要氨基酸来源, 有些产物的合成会受氮源的诱导与抑制, 这些在胜肽类的生产中尤为明显, 通常蛋白酶的生产受培养基中蛋白质或多肽的诱导, 而受铵盐、硝酸盐和铵基氮的抑制, 这时在培养基氮源选取时应考虑以有机氮源 (蛋白质类) 为主。盐类对 iturin A 生产之影响, 在干菌重方面, 添加 1.5mmol/L 的 $MgSO_4$ 和 KH_2PO_4 时可得最大干菌重, 约 0.0097g/L。在

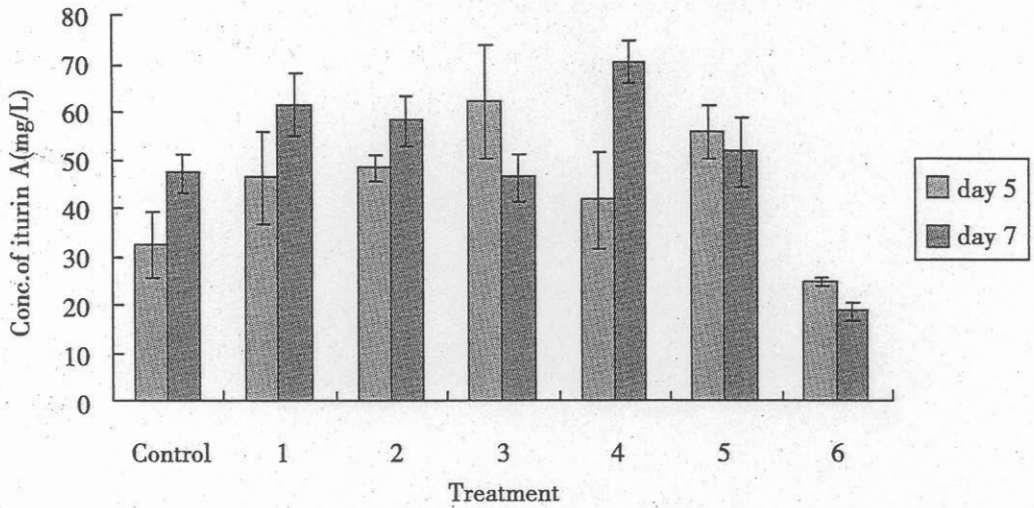


图1 添加马铃薯淀粉与麦芽糊精在枯草杆菌液态培养下对 iturin A 之影响
 1. 马铃薯粉 1%；2. 马铃薯粉 1.5%；3. 马铃薯粉 2%；4. 麦芽糊精 1%；
 5. 麦芽糊精 1.5%；6. 麦芽糊精 2%。

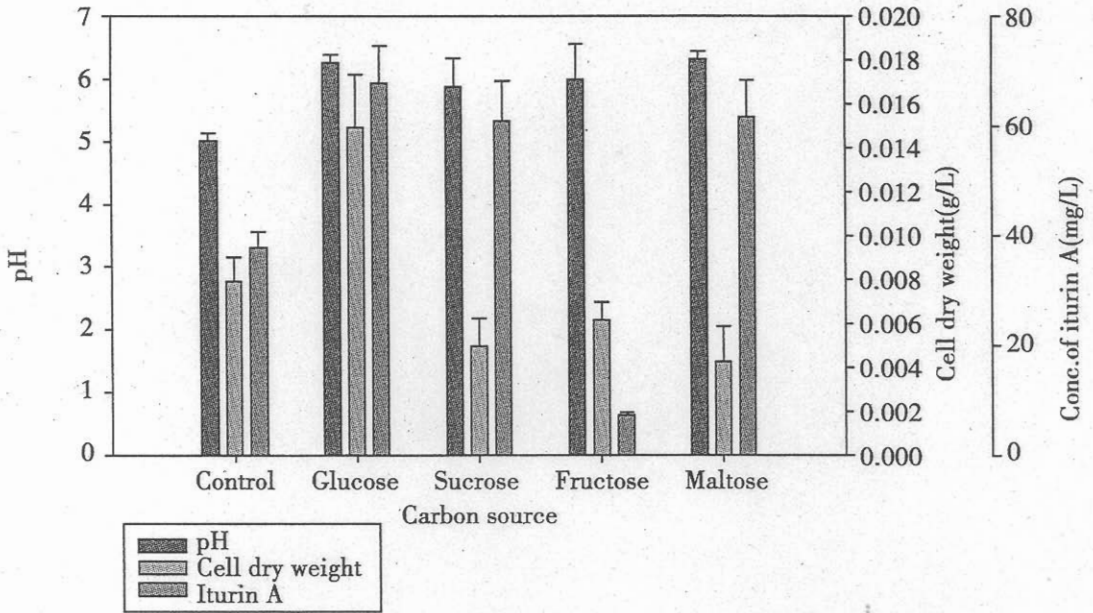


图2 添加不同糖类在枯草杆菌液态培养下对 pH 值、干菌重及 iturin A 之影响

iturin A 产量方面，同时添加 1.5mmol/L 的 $MgSO_4$ 与 KH_2PO_4 时，明显提高 iturin A 产量。若将 $MgSO_4$ 浓度降低至 0.75mmol/L， KH_2PO_4 浓度维持不变，则 iturin A 产量明显下降（图 6）。反之，降低 KH_2PO_4 浓度至 0.75mmol/L，而 $MgSO_4$ 浓度维持不变，则 iturin A 产量并无明显下降。由此可知， $MgSO_4$ 对 iturin A 产量的提高较 KH_2PO_4 来得明显（图 4）。Cooper 指出利用 *B. subtilis* 发酵中，将金属离子添加于矿物盐培养基中将对脂胜肽表面素 (surfactin) 之生成有所影响，可作为同为脂胜肽类 iturin A 的指标^[17]。Catherine 等于 1990 年培养 *B. subtilis* 生产 surfactin 和 iturin A 时添加多种的金属盐类，其中包括 KH_2PO_4 、 $MgSO_4$ 、 KCl 、 $FeSO_4$ 和 $CuSO_4$ ^[18]。Gu 等人（2005）利用 RSM 搜寻 *B. subtilis* 生产脂胜肽

产物之最优化条件时,亦添加多种的金属盐类,包括 NH_4Cl 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 FeSO_4 及 ZnSO_4 ^[19]。林氏于2002年发表的论文中采用多种金属盐类来探讨对液化淀粉芽孢杆菌生产 iturin A 之影响,发现唯有铁离子和镁离子有显著性影响^[20]。

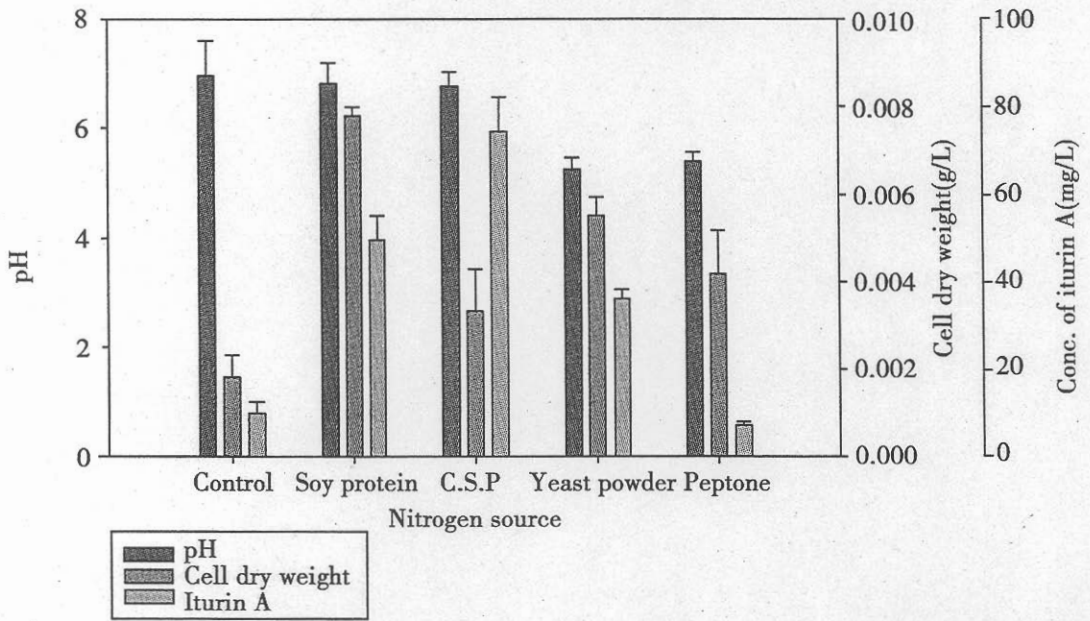


图3 添加不同氮源在枯草杆菌液态培养下对 pH 值、干菌重及 iturin A 之影响

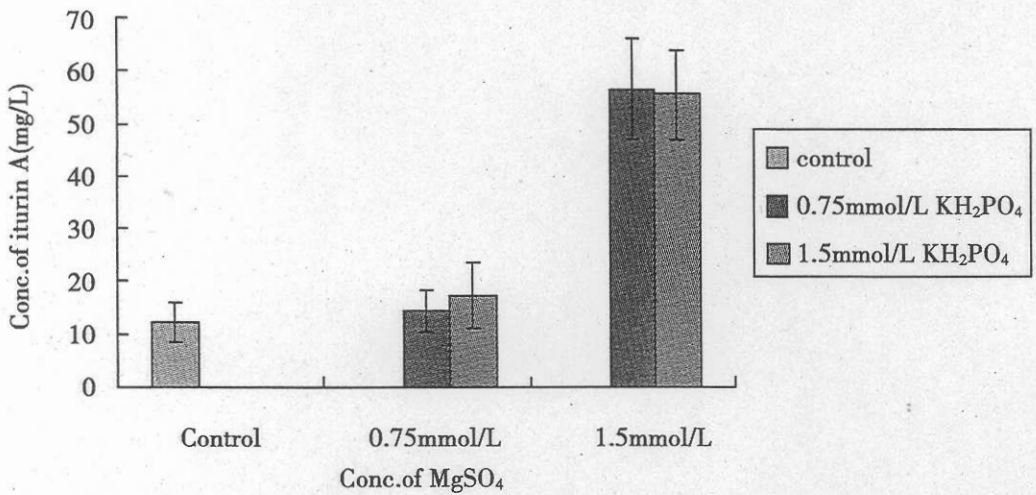


图4 添加不同浓度盐类在枯草杆菌液态培养下对 iturin A 之影响

3.3 液态发酵槽

不同转速对 iturin A 生产之影响,转速为 100rpm 时, *B. subtilis* 的生长缓慢,直到第 3 天才升高为干菌重(约 0.0064g/L),转速升高为 200rpm 与 300rpm 时,培养 1 天就可分别得到 0.0066g/L 与 0.006g/L 的干菌重(图 5)。不同转速下 iturin A 的产量,当转速提高时 iturin A 的产量亦会提高,在菌体浓度较高的 300rpm 下,其 iturin A 的浓度会较 100rpm 与 200rpm 时为高,当菌体浓度提高时能有效的提高 iturin A 的产量。当培养至第七天时以条件为 100rpm 的 iturin A 产量为最低,约为 27.36mg/L;而以条件为 300rpm 的

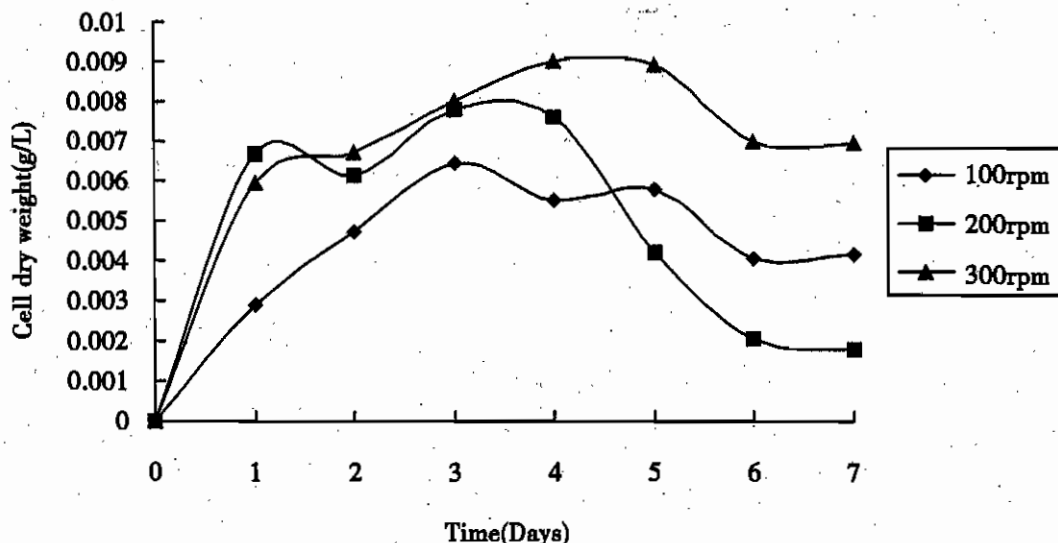


图5 不同转速在枯草杆菌液态培养下对干菌量之影响

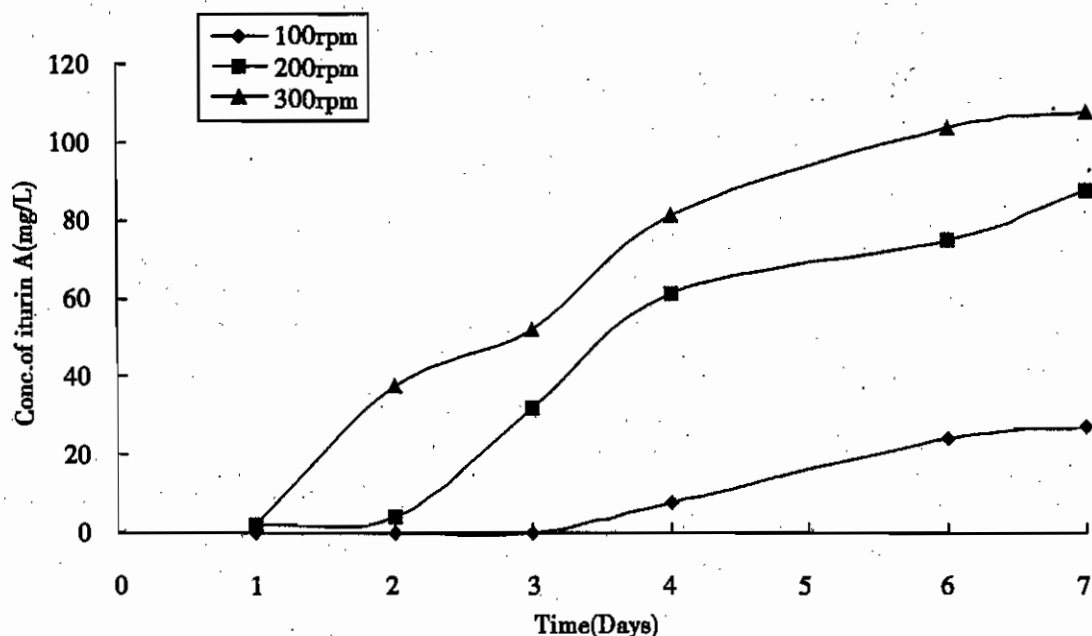


图6 不同转速在枯草杆菌液态培养下对 iturin A 之影响

iturin A 产量为最高, 约为 88.13mg/L (图6)。搅拌速度越高, 菌体所承受的剪应力越大, 本研究的搅拌速度介于 100 ~ 300rpm, 剪应力对于菌体细胞的影响不显著。搅拌作用在 iturin A 的发酵中是一个很重要的物理参数, 不仅关系到溶解氧的浓度, 也与发酵基质的传递和菌体生长相关, 进而影响到 iturin A 的产量。在发酵过程中, 较低的搅拌速度会限制氧的传递, 造成菌体干重的下降, 进而影响到 iturin A 的产量。适当地提高搅拌速度会提高其产量。搅拌对发酵体系的质传起着重要的作用, 已经有研究^[21-25]证实, 菌体之形态会因为机械力 (mechanical force) 之影响而有所改变, 包括搅拌翼形式与搅拌速度, 因此太高的搅拌转速, 会产生很大的剪切作用, 有可能对所培养的 *B. subtilis* 细胞造成伤害, 进而影响到 iturin A 的产量。不同通气量对 iturin A 生产之影响, 当通气量为 0.5vvm

时, 菌体快速生长, 于第四天时达到最高, 干菌重约 0.01g/L, 其后干菌重随着时间开始减少, 而在 iturin A 方面则无法有效的增加, 由此可知, 太低的通气量有可能会使 *B. subtilis* 无法得到充足的氧气进而抑制了 iturin A 的生成。当通气量为 1vvm 时, 干菌重会随着时间而增加, 于第五天时达到最高, 约 0.09g/L, 第五天后则会开始下降, 当培养至第七天时可得 iturin A 产量约 88.13mg/L。当通气量为 2vvm 时, 培养至第七天可得最大 iturin A 产量约 97.52mg/L (图 7)。由此可知, 提高通气量能有效提高 iturin A 产量。溶解氧在好气性微生物的发酵过程中是一个很重要的限制因子, 通气量是影响供氧的一个重要因素, 提高通气量同时可以增加发酵液的含氧率, 从而使气-液比面积增大, 有利于氧的传递。但是, 通过增加通气量以提高氧传递速率的效果是递减性的, 即当气流速度较大时, 再增加其速度对提高氧质传效率的作用变小。

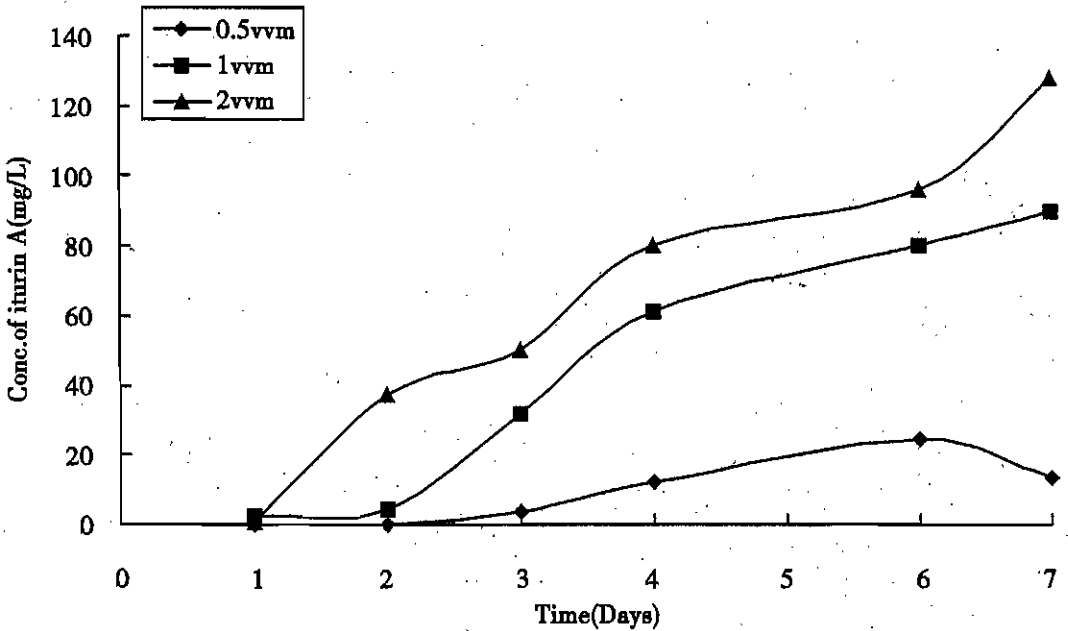


图 7 不同通气量在枯草杆菌液态培养下对 iturin A 之影响

3.4 不同挡板对菌体生产 iturin A 之影响

使用挡板的 $K_L a$ (氧气质传系数) 可有效的提高, 挡板能增加发酵槽中紊流的形成, 进而使气泡在槽中上升的时间增加^[22,25]。挡板 1、3 是没有孔洞的挡板, 且挡板 3 之表面积较挡板 1 为大, 而挡板 2、4 则有两种不同大小的孔洞 (表 2)。挡板 2 和挡板 4 比较, 发现孔径较小的挡板比孔径较大挡板有较高的 $K_L a$, 而挡板 2 和挡板 3 的比较, 有孔洞的挡板较没孔洞的挡板有较高的 $K_L a$ 。若提高通气量, 则 $K_L a$ 值亦会提高, 另一方面提高转速亦能提高 $K_L a$ 值, 若同时提高通气量与转速所增加的 $K_L a$ 值, 则转速提高 $K_L a$ 值的增加较通气量提高为大 (表 2)。在低转速与低通气量的条件下, 不使用挡板与使用挡板 1、2 时, 其 $K_L a$ 值差异并不大, 而在高转速与高通气量下, 使用挡板 2, 在转速与通气量条件分别为 300rpm 与 2vvm 下可得到较大的 $K_L a$ 值约 3.36min^{-1} (表 2)。在不使用挡板, 菌体浓度随着时间而渐渐上升, 于第五天时可得最大菌体浓度, 约 0.0134g/L, 随后开始递减。培养至第二天时即得较大 Q_{O_2} 值约 $18.47 \text{mmol O}_2/\text{g cell}\cdot\text{min}$ (图 8), 由于此时菌体处于对数生长期, 快速生长并消化培养基中的营养源, 因此会有较高的 Q_{O_2} 值。当培养至

第四天时, Q_{O_2} 下降趋缓, 此时菌体只需维持生理活性, 因此 Q_{O_2} 减少至一定程度并维持平衡, 再此同时菌体亦开始产生二次代谢物 iturin A。当继续培养至第七天时, Q_{O_2} 值再度下降, 菌体进入死灭期, 此时 Q_{O_2} 值几乎接近为 0, 约只有 $1.78 \text{ mmol O}_2/\text{g cell}\cdot\text{min}$ (图 8)。而在体积质传系数 $K_L a$ 方面, 当培养至第五天时可得较大 $K_L a$ 值约 1.48 min^{-1} , 而在第三天时会得到较低之 $K_L a$ 值, 约 0.97 min^{-1} (图 9), 可能原因是发酵液中菌体开始分泌酵素, 从而改变了发酵液的组成导致 $K_L a$ 下降。当使用挡板 3 时, 可得到较好的 Q_{O_2} 和 $K_L a$ 值, iturin A 的产量方面却不佳, 使用挡板 1 则可得到最大的 iturin A 产量 112.12 mg/L (图 10), 此结果说明较高的 Q_{O_2} 和 $K_L a$ 值虽然对菌体生长较为有利, 但有可能影响到 *B. subtilis* 生产二次代谢物 iturin A, 故在本研究中, 使用挡板 1 作为发酵条件较为理想。通常在好氧菌发酵控制系统中, 氧传送系数的好坏会影响到系统中溶解氧的浓度, 然后进一步的影响到微生物的生长和酵素的生成, 在先前的文献回顾中, 不同的发酵槽设计也会影响到氧质传系数的变化。在菌体生长部分, 可藉由氧吸收速率 (oxygen uptake rate, Q_{O_2}) 来说明, 当菌体在对数生长期时, 菌体本身会快速生长, 同时快速吸收发酵液中的营养源并开始产生所需的酵素。但当菌体细胞成长达到稳定期时, 此时的菌体只需维持其生命, 因此氧吸收速率会减小并维持在一定范围内。

表 1 筛选本土枯草杆菌菌株

菌株编号	代号	采集地点	PCR <i>ituD/sfp</i>	HPLC-Iturin A (mg/L)	Vitek 菌种鉴定
42401	3-1	大雪山林道 5K	+ / +	23.6	<i>B. subtilis</i>
60006	Case-24	嘉义分所	- / +	29.4	<i>B. subtilis</i>
64601	A1	云林古坑樟湖	+ / +	12.7	<i>B. subtilis</i>
64611	C1	云林古坑桂龙	+ / +	0.7	<i>B. subtilis</i>
64625	D4	云林古坑桂龙	+ / +	8.4	<i>B. subtilis</i>
64688	D6	云林古坑桂龙	+ / +	5.4	<i>B. subtilis</i>
64670	S3	云林古坑荷包村	+ / +	30.2	<i>B. subtilis</i>
55325	W5	南投水里明潭	+ / +	28.2	<i>B. subtilis</i>
55337	Z2	南投水里明潭	+ / +	25	<i>B. subtilis</i>
Kao03	Kao03	福莲韩式泡菜	+ / +	2.2	<i>B. subtilis</i>
Kao04	Kao04	福莲韩式泡菜	+ / +	28.9	<i>B. subtilis</i>
P13164	P13164	中油楠梓炼油厂	+ / +	14.1	<i>B. subtilis</i>
NHE01	NHE01	北港东湖东 1	+ / +	3.8	<i>B. subtilis</i>

表 2 不同转速、通气量与挡板对 $K_L a$ 之影响

rotation speed (rpm): aeration (vvm)	no baffle	baffle 1	baffle 2
200 : 1	0.54026	0.54026	0.748052
300 : 2	1.246753	2.701299	2.742857
300 : 0.5	1.080519	1.412987	1.163636
100 : 2	0.706494	0.498701	0.54026
100 : 0.5	0.249351	0.166234	0.166234

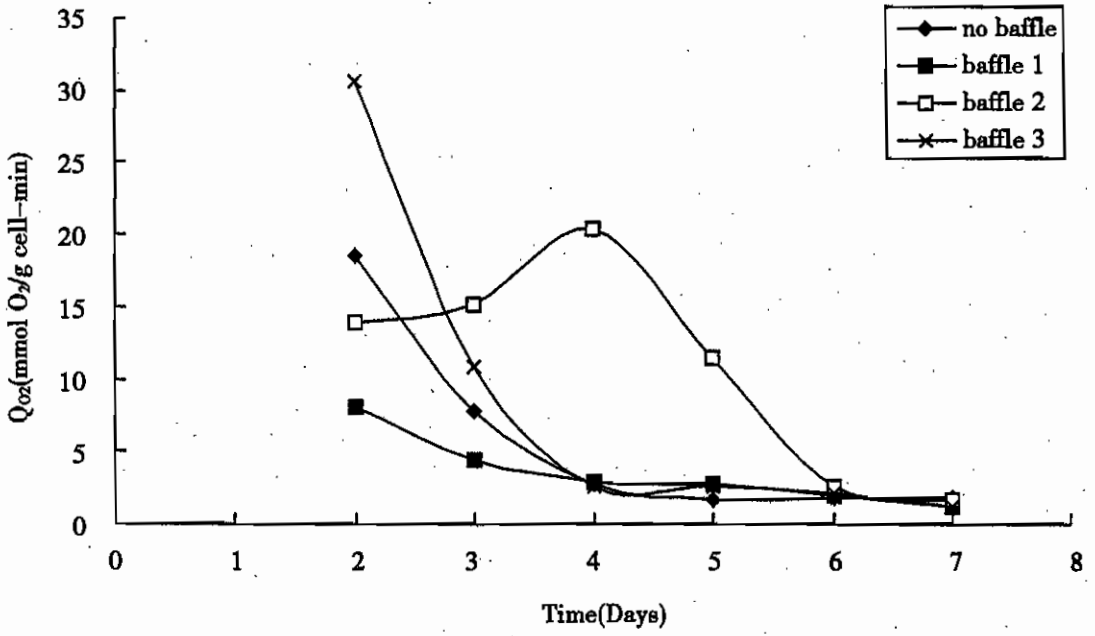


图8 不同挡板在枯草杆菌液态培养下对 Q_{ox} 之影响

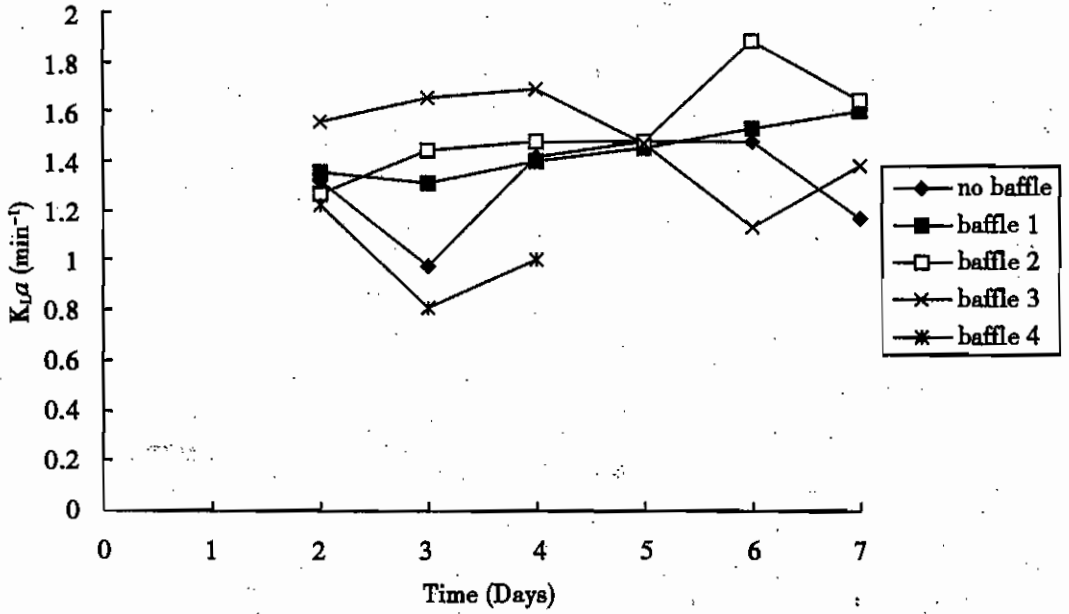


图9 不同挡板在枯草杆菌液态培养下对 K_La 值之影响

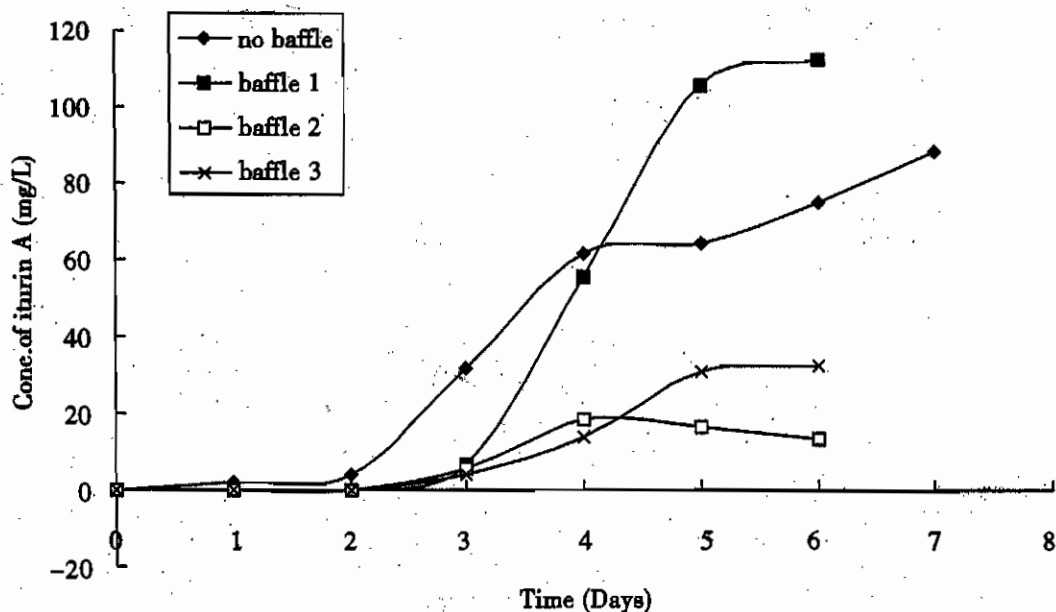


图 10 不同挡板在枯草杆菌液态培养下对 Iturin A 之影响

参考文献

- [1] 谢奉家, 李美珍, 高穗生. 枯草杆菌菌体及其代谢产物对病原真菌之抑菌效果评估 [J]. 植物保护学会会刊, 2003, 45: 155 - 162.
- [2] 谢奉家. 植物病害的杀手明星——枯草杆菌 [J]. 科学发展月刊, 2005, 391: 18 - 21.
- [3] Klich M A, Arthur K S, Lax A R, Bland J M. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains [J]. Mycopathologia, 1994, 127: 123.
- [4] Klich M A, Lax A R, Bland J M. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis* [J]. Mycopathologia, 1991, 116: 77.
- [5] Besson F, Peypoux F, Michel G. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this Antifungal activity by lipid antagonists [J]. Journal of Antibiotics, 1979, 32: 828.
- [6] Heins S D, Manker D C, Jimenez D R, McCoy R J, Marrone P G, Orjala J E. Compositions and methods for controlling plant pests. U. S. Patent, 2000, 6, 103, 228.
- [7] Peypoux F, Besson F, Michel G. Preparation and antifungal activity upon *Micrococcus luteus* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L, antibiotics from *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Antibiotics, 1979, 32: 136.
- [8] Ohno A, Ano T, Shoda M. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A by *Bacillus subtilis* NB22 [J]. Process Biochemistry, 1996, 31 (8): 801 - 806.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Hsieh F C, Li M C, Lin T C, Kao S S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR [J]. Current Microbiology, 2004, 49: 186 - 191.
- [11] Hsieh F C, Lin T C, Meng M, Kao S S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A [J]. Current Microbiology, 2008, 56: 1 - 5.

- [12] Huang C C, Ano T, Shoda M. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14 [J]. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 1993, 76: 445 - 450.
- [13] Shih I L, Kuo C Y, Hsieh F C, Kao S S, Hsieh C. Use of Surface Response Methodology to Optimize Culture conditions for Iturin A Production by *Bacillus subtilis* in Solid State Fermentation [J]. *Journal of the Chinese Chemical Engineering*, 2008, 39: 635 - 643.
- [14] Lin S C, Sharma M M, Georgiou G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2 [J]. *Biotechnology Progress*, 1993, 9: 138.
- [15] Jacques P, Hbid C, Destain J, Razfindralambo H, Paquot M, Pauw E De, Thonart P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S449 by Plackett-Burman design [J]. *Apply Biochemical Biotechnology*, 1999, 77: 223 - 233.
- [16] Nicholson W L, Chambliss G H. Isolation and characterization of a cis-acting mutation conferring catabolite repression resistance to α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161: 875 - 881.
- [17] Cooper D G, MacDonald C R, Duff S J B, Kosaric N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition [J]. *Apply Environment Microbiology*, 1981, 42: 408.
- [18] Catherine S, Françoise P, Georges M. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1990, 12: 370 - 375.
- [19] Gu X B, Zheng Z M, Yu H Q, Wang J, Kiang F L, Liu R L. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3196 - 3201.
- [20] 林弘裕. 液化淀粉芽孢杆菌胜肽抗生物质之分析与回收纯化探讨. 东华大学生物技术研究所硕士论文. 花莲. 2002.
- [21] Kapat A, Jung J K, Park Y H, Hong S Y, Choi H K. Effects of agitation and aeration on the production of extracellular glucose oxidase from a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioprocess Engineering*, 1998, 18: 347 - 351.
- [22] Amanullah A, Serrano-Carreón L, Castro B, Galindo E, Nienow A W. The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1998, 57: 95 - 108.
- [23] Amanullah A, Jústén P, Davies A, Paul C G, Nienow A W, Thomas C R. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum* [J]. *Journal of Biochemical Engineering*, 2000, 5: 109 - 114.
- [24] Amanullah A, Jústén P, Davies A, Paul C G, Nienow A W, Thomas C R. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostate cultures of recombinant *Aspergillus oryzae* [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1999, 62: 434 - 446.
- [25] Paul C G, Jústén P, Nienow A W, Thomas C R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1996, 52: 634 - 648.