

具商品化潛力之多功能 液化澱粉芽孢桿菌

撰文/ 謝奉家

前言

在臺灣，許多人提到生物殺菌劑中的芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.)，常只聯想到枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 單一菌種，但事實上，還有其它具有抑菌功能的芽孢桿菌屬菌株已經陸續研發並準備在臺灣上市。同樣的，許多人也認為上述芽孢桿菌屬菌株主要功能就是殺菌或抑菌，但筆者研究團隊已針對枯草桿菌與液化澱粉芽孢桿菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 進行多功能的探討與研發，並已挑選具研發潛力的液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 申請中國大陸、中華民國與美國的專利。由於產生多種抗生物質，有抑菌的功能，所以可作為生物殺菌劑；有溶磷或產生植物激素吲哚乙酸 (indole acetic acid, IAA) 等功能，可促進作物生長，所以可作為微生物肥料；可產生多種消化酵素與抑菌物質，所以可作為動物飼料添加物。若一種微生物具有多種能力但僅應用於一種領域，此微生物的經濟效益將無法彰顯。許多菌株應用範圍都可以從植物保護用的生物農藥與微生物肥料，擴大至雞、豬等動物飼料添加物及應用於水產養殖業，將單一菌種跨領域研發與創新加值，可開闢更多發展方向。本文係針對具商品化潛力之多功能液化澱粉芽孢桿菌進行相關資訊與心得分享。

液化澱粉芽孢桿菌簡介

液化澱粉芽孢桿菌是不是枯草桿菌的一種？最

近臺灣已有廠商進行液化澱粉芽孢桿菌的產品開發，但仍有不少研發人員認為液化澱粉芽孢桿菌就是枯草桿菌，事實並不然。液化澱粉芽孢桿菌，1943年由日本學者 Fukumoto 發現，此菌種可產生大量的 α -amylase 及 protease。在一開始時，由於此菌種外觀及表現特徵和枯草桿菌極為相似，因此當時暫將液化澱粉芽孢桿菌列為枯草桿菌的亞種之一。但在 1967 年 Welker 與 Compbell 利用 DNA 雜交方法發現枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌之基因相似度只有 14.7-15.4% 之間，枯草桿菌的 DNA guanine-plus-cytosine 成份 (G+C%) 是 41.5-43.5%，而液化澱粉芽孢桿菌的 G+C% 是 43.5-44.9%，由此可以判斷枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌是為不同的品種。除了分子基因上可證明枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌不同，另外在其它如枯草桿菌和液化澱粉芽孢桿菌所產生的 α -amylase 特性上也有相當大的差異。1986 年，在 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 書中，將液化澱粉芽孢桿菌分類為一獨立菌株，Priest 在 1987 年正式發表期刊，至此液化澱粉芽孢桿菌才真正被定義出來。目前利用 API (analytical profile index) 簡易鑑定套組與 *gyr B* 基因定序也可將液化澱粉芽孢桿菌、枯草桿菌、地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 及短小芽孢桿菌 (*Bacillus pumilus*) 等四株表現型接近的菌種鑑別出來。

吳文希教授（已從臺大退休）曾從臺灣分離篩選到 2 株液化澱粉芽孢桿菌，編號分別為 B128 與

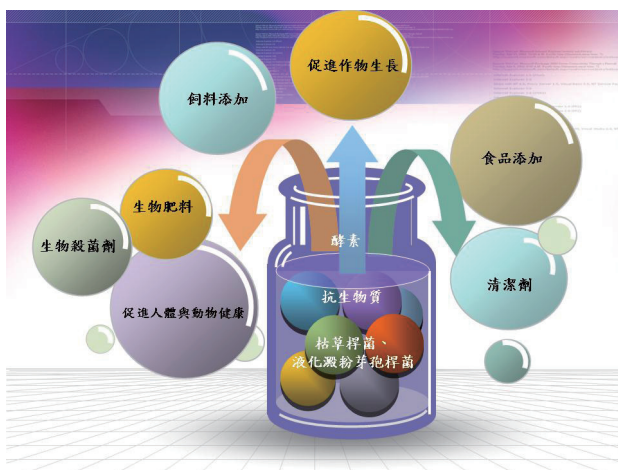
B190。吳教授主要從百合植株上分離 700 株微生物，再與百合灰黴病菌進行對峙及共同培養，最後篩選出對灰黴病菌具有明顯拮抗能力之拮抗菌株。研究結果顯示，B190 菌株與 23 種植物病原菌進行對峙及共同培養，可顯著性地 ($p=0.05$) 抑制其中 16 種病原菌，尤其值得注意的是能特別有效抑制百合灰黴病菌。

筆者在行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所（以下簡稱藥毒所）的研究團隊也從臺灣本土篩選到液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1，深具開發潛力，經委託亞太智財科技服務有限公司詳細進行專利蒐尋和佈局之後，已申請美國、中國大陸與中華民國專利中。有下列多項功能：具有伊枯草菌素 (iturin) 與表面活性素 (surfactin) 等抗生物質的高產率能力，具有抑制多種細菌生長的效果，具有抑制多種真菌生長的效果，具有多種酵素活性（圖一）。筆者的研究團隊已與國內不同領域廠商洽談技術移轉，以下分別以生物農藥、微生物肥料、益生菌飼料添加物與未來展望，分述如下。

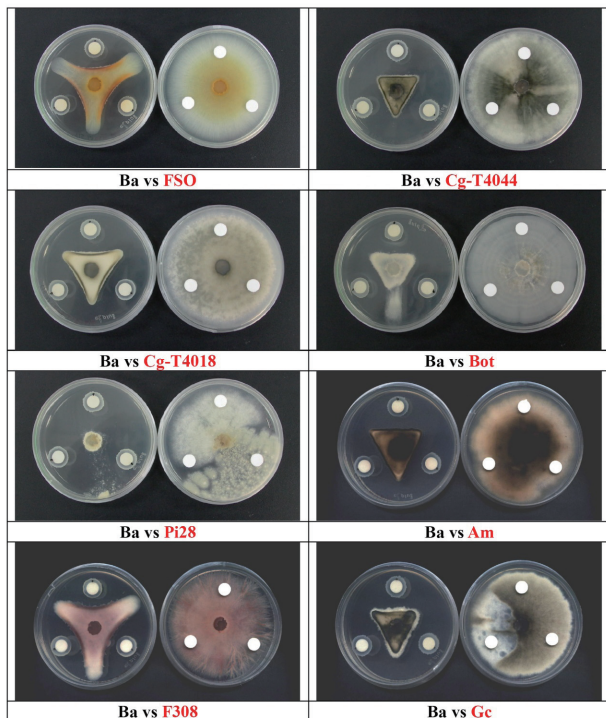
液化澱粉芽孢桿菌的生物農藥功能

本土液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 是由藥毒所自臺中梨山的土壤篩選出來，並且進一步培

養、鑑定及保存與開發。Ba-BPD1 菌株具有高產率並同時產生抗生物質伊枯草菌素 (iturin)、表面活性素 (surfactin) 與豐原素 (fengycin) 的能力，用以抑制真菌或細菌生長。在真菌方面，可抑制百合灰黴病菌 (*Botrytis elliptica*)、玫瑰灰黴病菌 (*Botrytis cinerea*)、檸檬炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)、香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*)、甜柿炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、水稻立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、豌豆镰胞菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*)、番茄镰胞菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、蘭花镰胞菌 (*Fusarium solani*)、荔枝镰胞菌 (*Fusarium solani*)、百合白絹病菌 (*Sclerotium rolfsii* Saccardo)、蘋果褐斑病菌 (*Alternaria mali*)、甜椒疫菌 (*Phytophthora capsici*)、洋蔥黑麴菌 (*Aspergillus niger*)、柑桔青黴菌 (*Penicillium italicum*)、蓮霧果腐菌 (*Pestalotiopsis eugeniae*) 及檸檬蒂腐菌 (*Botryodiplodia theobromae*) 等（圖二）。在細菌方面，可抑制細菌性軟腐桿菌 (*Erwinia chrysanthemi* 及 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、瓜類細菌性斑點菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、癌腫菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、石竹科花卉細菌性萎凋菌 (*Burholderia caryophylli*)、茭白細菌性基腐菌 (*Enterobacter cloacae*)、楊桃細菌性斑點菌 (*Pseudomonas syringae*)、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、柑桔潰瘍菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *cirti*)、茄科植物細菌性斑點菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)、十字花科黑腐菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *compestris*)、水稻白葉枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 等。筆者研究團隊已進行草莓灰黴病的田間防治評估，Ba-BPD1 菌液於大湖草莓田間每週施用 1 次，持續施用 4 次之後，對於草莓灰黴病有一定的防治效果，至少降低罹病率 36%。另於國姓草莓田間試驗結果顯示，Ba-BPD1 對草莓果腐病的預防效果也很顯著；水稻紋枯病初步田間防治結果顯示施用 Ba-BPD1



圖一 液化澱粉芽孢桿菌的多功能示意圖



註：左邊平板為試驗組，右邊平板為對照組。Ba： *Bacillus amyloliquefaciens* Ba-BPD1； FSO： *Fusarium solani*； Cg-T4044： *Colletotrichum gloeosporioides*； Cg-T4018： *Colletotrichum gloeosporioides*； Bot： *Botryodiplodia theobromae*； Pi28： *Penicillium italicum*； Am： *Alternaria mali*； F308： *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*； Gc： *Glomerella cingulata*。

圖二 液化澱粉芽孢桿菌Ba-BPD1對於多種植物病原真菌的平板對峙效果

菌液共 8 次後，相較於對照組，罹病度降低約 30-40%，具有 5% 顯著差異；蝴蝶蘭黃葉病 (*Fusarium solani*) 之溫室盆栽防治試驗顯示，經過 10 週施藥，可明顯降低黃葉病的罹病率約達 58%，尤其對蝴蝶蘭具有內生的能力，不需持續補充菌源，菌體仍可存在於植株內。藥毒所已與台灣肥料股份有限公司完成 3 年期的產學合作計畫，為與市面類似產品有差異化的區隔，除了孢子數提升外，亦提升主要抗生物質伊枯草菌素 (iturin) 的含量，達到治療與預防的雙效功能。目前該公司已有意願洽談相關技術移轉，預期技轉後 2 年內可完成治療與預防的雙效功

能之微生物殺菌劑成品，與市售只注重孢子數或預防功能的一般商品有所區隔。

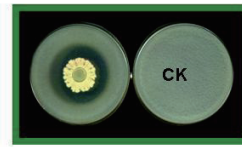
液化澱粉芽孢桿菌的微生物肥料功能

依照過去肥料登記制度，含有機質成分及微生物之肥料產品，僅能籠統的登記於有機質肥料品目之下，而且「肥料種類品目及規格」規範當中並無單獨「微生物肥料」之品目，因此民國 99 年 7 月以前，所有市面上販賣的「微生物肥料」，不論其是否符合檢測規定，皆屬「無法可管」的階段。有鑑於此，行政院農業委員會於民國 99 年 7 月 29 日公告修正「肥料種類品目及規格」，肥料種類分為氮肥類、磷肥類、鉀肥類、次微量要素肥料類、有機質肥料類、複合肥料類、植物生長輔助劑類、微生物肥料類及其他肥料類，共九類，其中新增微生物肥料類。至於微生物肥料類可再分為以下六項：(1) 豆科根瘤菌肥料 (2) 游離固氮菌肥料 (3) 溶磷菌肥料 (4) 溶鉀菌肥料 (5) 複合微生物肥料 (6) 叢枝菌根菌肥料。筆者的研究團隊所研發液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1，分析顯示具有螯鐵蛋白 (siderophore)、IAA 與 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 去胺酵素 (ACC deaminase) 等促進作物生長的多項因子，經田間試驗對於草莓植株的生長具有正面的幫助，其中對於果實數量以及果實之甜度效果更為顯著。由於具有溶磷功能，依現行法規可以申請為微生物肥料類的溶磷菌肥料。液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 是本土生物製劑的新一代具商業發展潛力菌種，由於同時具有預防與治療功能，及促進作物生長之效能，不僅預防與治療雙效合一，更可解決傳統農藥只有病害防治或肥料只有促進作物生長的問題。相信藥毒所此項農藥與肥料雙效無毒生物製劑的研發成果可以促進本土安全農業與無毒農業的發展。藥毒所已與台灣肥料股份有限公司完成 3 年期的產學合作計畫，目前該公司已有意願洽談相關技術移轉。預期技轉後 1 年內可完成具溶磷功能的微生物肥料產品登記。

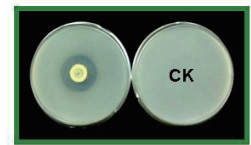
液化澱粉芽孢桿菌的益生菌飼料添加物功能

抗生素可以抑制家禽病原菌、防止疾病產生然而過度廣泛的使用這些化學藥品會造成耐藥菌株的產生，並伴隨著在畜群產品中的殘留與二次感染等問題，抗生素殘留問題已經受到國際社會普遍的關注與擔憂。歐盟自 2006 年已全面禁止抗生素作為飼料添加物的使用，因此尋找抗生素的替代物就顯得相當重要，像是疫苗的開發、益生菌與中草藥的發展，即是取代抗生素的一條途徑。根據農委會民國 99 年農業統計年報資料顯示，國內雞隻屠宰總隻數約為 3.3 億隻，其產值約為新臺幣 367 億元，占全國畜牧業總產值 25.3%，而國內豬隻全年供應屠宰數約為 858 萬頭，產值約為新臺幣 707 億元，占全國畜牧業總產值 48.7%。上述統計資料顯示人們對於禽畜動物的需求很大，而其養殖所需之動物用藥、動物用疫苗、飼料添加物及其他應用於這些動物之產品皆有龐大商機。日本可爾必思公司 (Calpis) 所生產的可速必寧 (Calsporin®) 為枯草桿菌單一菌種的動物飼料添加物產品，該知名產品已在美國、巴西、泰國與日本，廣泛應用於畜牧業，可增加雞、豬的換肉率、育成率和減少畜產品污染，為暢銷的動物飼料添加物，但進口單價約為 1 公斤新臺幣 3,400 元，雖每公斤產品可使用於 1 公噸的飼料量，禽畜業者長期使用的生產成本仍過高，無法負荷，因而轉為使用複合菌種或是價格低廉但品質不穩定之產品。

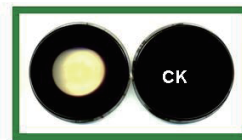
為解決產業問題並考量產業技術發展趨勢，筆者研究團隊進行動物飼料添加物的跨領域產學合作計畫，主要進行保育豬、蛋雞與肉雞的生長相關特性試驗。液化澱粉芽孢桿菌菌株 Ba-BPD1 具有產生纖維素分解酵素 (cellulase)、蛋白質分解酵素 (protease)、脂質分解酵素 (lipase)、澱粉分解酵素 (amylase) (圖三) 與植酸分解酵素 (phytase) 等多種酵素活性的能力，亦對大腸桿菌與沙門氏桿菌具有抑菌能力。Ba-BPD1 菌株有些功能不亞於「可速必



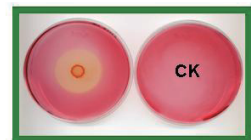
蛋白質分解酵素



脂質分解酵素



澱粉分解酵素



纖維素分解酵素

註：左邊平板為試驗組，右邊平板為對照組。

圖三 液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 可以產生至少 4 種主要酵素的分解能力

寧®」菌株，甚至優於「可速必寧®」菌株。其中，在肉雞、蛋雞與保育豬試驗中，Ba-BPD1 菌株對於換肉率、雞蛋品質、腸道菌相、血清中免疫球蛋白 IgG 與 IgA 含量 (表一) 等皆有顯著提升效果。上述結果顯示 Ba-BPD1 菌株若開發為動物飼料添加物確實很有競爭力，足以與日本知名產品 - 可速必寧 (Calsporin®)，互相抗衡甚至超越，技轉後相信可以建立臺灣自行研發之飼料添加物旗艦品牌，進行世界性的行銷。藥毒所已與沅漢生物科技股份有限公司完成產學合作計畫，目前該公司已有意願洽談相關技術移轉。

液化澱粉芽孢桿菌的國內發展現況與成果

液化澱粉芽孢桿菌分離菌株 TCB428 是臺中區農業改良場從農田土壤篩選出的新型本土微生物菌種之一。本菌種具有快速分解有機質之功能，並具有適應性廣的特性，可以促進有機廢棄物分解，縮短堆肥腐熟時程，適合應用在堆肥製作上。福壽實業股份有限公司於民國 98 年 11 月與臺中區農業改良場簽署「製造生物性堆肥之液化澱粉芽孢桿菌種 TCB428」技術移轉授權合約。目前本技術已完成產品正式量產及商品化。

表一 藥毒所跨領域研發本土益生菌與日本益生菌飼料添加物旗艦產品的比較

	藥毒所跨領域研發 本土益生菌	日本益生菌飼料添加物 旗艦產品
蛋雞 平均蛋重(g)	75.33 	71.32
蛋雞 蛋殼強度(kg)	1.57 	1.39
肉雞 飼料換肉率FCR (FCR值愈低愈好)	1.62 	1.78
保育豬 IgA抗體含量 (mg/ml)	1.02 	0.97
保育豬 腸內菌相 Lactobacillus/Coliforms 比值	1.68	1.72 

藥毒所近年來積極進行本土優良安全菌株液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 的產業化研發，落實農業科技研發成果產業化及推動本土菌株產品上市之商品化政策，已有豐碩成果。但行政院農業委員會各地區的農業改良場（臺中區農業改良場、高雄區農業改良場等）與大專院校（國立中興大學、國立屏東科技大學、國立高雄師範大學等）也逐年新篩獲很多具開發潛力的液化澱粉芽孢桿菌菌株，研發成果的商品化亦是指日可待，將可以讓農民有更多樣化的產品選擇。

未來願景

筆者研究團隊預期液化澱粉芽孢桿菌 Ba-BPD1 上述多功能研發成果可以在技轉後 2 年開發為生物農藥產品、微生物肥料產品與益生菌動物飼料添加物產品並成功上市，提供本地農民需求並擴展至海外市場；對於有機栽培業者，可透過液化澱粉芽孢桿菌增加抗病性與降低罹病率，促進作物發育及生長；亦能促進作物對於土壤養份吸收，提高產量及品質；也可配合吉園圃栽培生產，減少化學農藥與化學肥料使用，改善化學農藥與化學肥料殘留於蔬果、土壤與水源的問題，以及減少連作障礙；亦能減少動物飼料抗生素的使用，增加畜產農戶的產值，提升消費者的健康保障。由於化學農藥的使用在未

來 10 年有可能下降至目前使用量的 60%，而生物農藥的利用則會增加，市場占有率可能接近 40%。至於化學肥料每年銷售金額已達新臺幣 63 億元，有機質肥料銷售金額約新臺幣 41 億元，未來微生物肥料約可占國內肥料市場 20%，估計有新臺幣 10 億元以上的銷售金額。另外，有鑒於化學農藥及抗生素長期使用已形成生態環境的破壞，2000 年丹麥開始禁用飼料添加抗菌劑後，各國開始跟進，2006 年歐盟全面禁止飼料添加化學抗菌劑，目前已經成為全世界潮流。整體而言，生物農藥、微生物肥料與益生菌飼料添加物的市場開發潛力很大。

目前臺灣的菌株篩選策略，幾乎都是不同領域各自篩選該領域需要的菌株，例如，植物病理學系所主要篩選抑制作物病原菌效果較強者，土壤系所主要篩選溶磷、固氮或促進作物生長較好者，禽畜系所主要篩選促進腸道消化或可使動物換肉率較佳者，水產業者主要篩選可使水質淨化或抑制水產病原菌效果較顯著者，因此，各自領域皆花費龐大的人力與物力，資源重複，甚為可惜。期望本文可以拋磚引玉，讓篩菌的研發人員重新思考如何從不同角度深掘窮究單一菌株的潛在多功能特性，跨領域連結或整合，發揮菌株的最大效益。筆者相信跨領域且多功能的研發將是未來菌株開發的重要方向。

AgBIO

謝奉家 行政院農業委員會 農業藥物毒物試驗所 副研究員

參考文獻

1. 邱安隆 (2002) 應用生物製劑防治百合灰黴病。花蓮區農業專訊，42:22-25。
2. 高穗生 (2010) 微生物農藥研發進展與產業潛力。農業生技產業季刊，24:28-37。
3. 高穗生、謝奉家 (2010) 液化澱粉芽孢桿菌之生物農藥與生物肥料商品化產品開發。生物科技產學論壇，p.23-27。臺中，中興大學。
4. 許嘉伊 (2010) 全球生物農藥產業概況與未來展望。農業生技產業季刊，24:1-7。
5. 曾德賜 (2010) 臺灣生物農藥開發與產業化應用之問題與展望。農業生技產業季刊，24:8-16。
6. 謝奉家、李美珍、高穗生 (2003) 枯草桿菌菌體及其代謝產物對病原真菌之抑菌效果評估。植物保護學會會刊，45:155-162。
7. 謝奉家 (2004) 本土生物農藥資源及其應用（病害防治資材）－芽孢桿菌。植物保護論壇。農業生物技術國家型科技計畫辦公室。臺中。
8. 謝奉家 (2005) 植物病害的殺手明星－枯草桿菌。科學發展月刊，391:18-21。
9. 謝奉家 (2011) 臺灣芽孢桿菌生物殺菌劑的研發與應用現況。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊，205:1-11。
10. 謝奉家 (2012) 液化澱粉芽孢桿菌防治外銷蝴蝶蘭黃葉病之研發。農政與農情月刊，237:91-94。