

枯草桿菌液態發酵生產 Iturin A 之最適化研究

林智揚、謝建元；張德明

E-mail: 9511072@mail.dyu.edu.tw

摘要

枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)被用來作為生物製劑，可抑制許多真菌類植物病原菌，其分泌的二次代謝產物 iturin A 是由七個胺基酸所組成的環狀肽類化合物，且為一強效抗菌活性之抗生物質，並擁有生物界面活性劑性質，但其應用上長期受限於產量偏低的瓶頸，因此提高 iturin A 產量的研究成為重要的課題。本研究以回應曲面法進行枯草桿菌液態發酵最適化生產 iturin A 之探討，在搖瓶培養方面，以葡萄糖、果糖、蔗糖與麥芽糖為碳源，其中以葡萄糖為最佳；另一方面，在大豆蛋白、酵母粉、特殊蛋白、玉米浸粉(corn steep powder, C.S.P)的氮源試驗中，則以玉米浸粉為最佳。而在硫酸鎂與磷酸二氫鉀的交互實驗中，以硫酸鎂有較明顯的影響。以回應曲面法所得之最適化培養基組成為：pH 4.5、0.93%麥芽糊精、1.11%葡萄糖、0.72%玉米浸粉、1.5 mM MgSO₄、0.75 mM KH₂PO₄、轉速181 rpm、通氣面積4.35 cm²。在5 L發酵槽試驗中，提高轉速有助於枯草桿菌的生長與 iturin A 的生產。在通氣量方面，以2 vvm通氣量條件下可得較高之 iturin A 產量。而在不同擋板方面，則以添加擋板1有較佳之體積傳係數(KLa)，並可得 iturin A 產量約112.12 mg/L。

關鍵詞：枯草桿菌；液態發酵；iturin A；回應曲面法

目錄

目錄封面內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	v	誌謝	vi	目錄	vii	圖目錄	xi	表目錄	xiii	第一章	緒言	1	第二章	文獻回顧	3	2.1	枯草桿菌之背景及特性	3	2.2	Iturin A	4	2.2.1	Iturin A的結構性質	6	2.2.2	Iturin A的抗菌作用機制	6	2.2.3	營養需求及環境因子對 iturin A 生產之影響	7	2.2.3.1	碳源	7	2.2.3.2	微量金屬	8	2.2.3.3	溫度	9	2.2.3.4	植物油	9	2.3	發酵槽	10	2.3.1	發酵過程中溶解氧對二次代謝產物的影響	11	2.3.2	擋板對二次代謝物的影響	13	2.3.3	KLa對二次代謝產物的影響	13	2.3.4	亞硫酸鹽氧化法	14	2.4	回應曲面法之原理	15	第三章	材料與方法	20	3.1	實驗材料	20	3.1.1	試驗菌種	20	3.1.2	實驗藥品	20	3.1.3	實驗器材	21	3.1.4	Iturin A 標準品	22	3.2	分析方法	23	3.2.1	pH測定	23	3.2.2	菌體乾重測定	23	3.2.3	Iturin A 萃取與分析	23	3.2.4	HPLC之定量分析方法	24	3.2.5	QO ₂ 和KLa測定	24	3.3	實驗方法	26	3.3.1	斜面培養	26	3.3.2	液態種源	27	3.3.3	培養天數對 iturin A 生產之影響	27	3.3.4	添加馬鈴薯澱粉與麥芽糊精對 iturin A 生產之影響	27	3.3.5	不同碳源對 iturin A 生產之影響	28	3.3.6	不同氮源對 iturin A 生產之影響	28	3.3.7	添加鹽類對 iturin A 生產之影響	28	3.3.8	添加油脂對 iturin A 生產之影響	29	3.4	液態發酵最適化條件之探討	29	3.4.1	回應曲面法	29	3.4.2	部分因子試驗	30	3.4.3	陡升路徑試驗	30	3.4.4	中心混成設計實驗	30	3.5	液態發酵槽	31	3.5.1	不同擋板對KLa值之影響	31	3.5.2	不同轉速與通氣量對KLa值之影響	31	3.5.3	不同轉速、通氣量與擋板對電流值之影響	32	3.5.4	不同轉速對 iturin A 生產之影響	32	3.5.5	不同通氣量對 iturin A 生產之影響	32	3.5.6	不同擋板對 iturin A 生產之影響	33	第四章	結果與討論	43	4.1	培養天數對 iturin A 生產之影響	43	4.2	添加馬鈴薯澱粉與麥芽糊精對 iturin A 生產之影響	44	4.3	不同碳源對 iturin A 生產之影響	49	4.4	不同氮源對 iturin A 生產之影響	51	4.5	添加鹽類對 iturin A 生產之影響	51	4.6	添加油脂對 iturin A 生產之影響	52	4.7	液態發酵最適化條件之探討	61	4.7.1	部分因子試驗	61	4.7.2	陡升路徑試驗	61	4.7.3	中心混成設計實驗	62	4.7.4	回應曲面模式適切性之統計檢驗	63	4.8	液態發酵槽	76	4.8.1	不同擋板對KLa的影響	76	4.8.2	不同轉速、通氣量與擋板對KLa之影響	76	4.8.3	不同轉速、通氣量與擋板對電流值之影響	77	4.8.3	不同轉速對 iturin A 生產之影響	78	4.8.4	不同通氣量對 iturin A 生產之影響	86	4.8.5	不同擋板對 iturin A 生產之影響	90	第五章	結論	97	參考文獻	98	附錄一	<i>Bacillus subtilis</i> 菌體濃度檢量線	105	附錄二	擋板圖片與規格	106	附錄三	論文口試會議紀錄	107	圖目錄	圖2- 1	Iturin A之分子結構式	19	圖3- 1	溶解氧濃度對時間t之關係圖	34	圖3- 2	通空氣階段的(QO ₂ X+dc/dt)對溶解氧濃度之關係圖	35	圖4- 1	培養時間在枯草桿菌液態培養下對pH值、乾菌重及 iturin A 之影響	45	圖4- 2	添加馬鈴薯澱粉與麥芽糊精在枯草桿菌液態培養下對pH值之影響	46	圖4- 3	添加馬鈴薯澱粉與麥芽糊精在枯草桿菌液態培養下對乾菌重之影響	47	圖4- 4	添加馬鈴薯澱粉與麥芽糊精在枯草桿菌液態培養下對 iturin A 之影響	48	圖4- 5	添加不同糖類在枯草桿菌液態培養下對pH值、乾菌重及 iturin A 之影響	50	圖4- 6	添加不同氮源在枯草桿菌液態培養下對pH值、乾菌重及 iturin A 之影響	54	圖4- 7	添加不同濃度鹽類在枯草桿菌液態培養下對pH值之影響	55	圖4- 8	添加不同濃度鹽類在枯草桿菌液態培養下對乾菌重之影響	56	圖4- 9	添加不同濃度鹽類在枯草桿菌液態培養下對 iturin A 之影響	57	圖4- 10	添加不同濃度油脂在枯草桿菌液態培養下對pH值之影響	58	圖4- 11	添加不同濃度油脂在枯草桿菌液態培養下對乾菌重之影響	59	圖4- 12	添加不同濃度油脂在枯草桿菌液態培養下對 iturin A 之影響	60	圖4- 13	葡萄糖與玉米浸粉對 iturin A 產量之回應曲面圖	70	圖4- 14	葡萄糖與轉速對 iturin A 產量之回應曲面圖	71	圖4- 15	葡萄糖與通氣面積對 iturin A 產量之回應曲面圖	72	圖4- 16	玉米浸粉與轉速對 iturin A 產量之回應曲面圖	73	圖4- 17	玉米浸粉與通氣面積對 iturin A 產量之回應曲面圖	74	圖4- 18	轉速與通氣面積對 iturin A 產量之回應曲面圖	75	圖4- 19	不同擋板對KLa之影響	80	圖4- 20	不同轉速在枯草桿菌液態培養下對DO值之影響	83	圖4- 21	不同轉速在枯草桿菌液態培養下對乾菌	
--------	-----	-----	-----	------	----	------	---	----	----	----	-----	-----	----	-----	------	-----	----	---	-----	------	---	-----	------------	---	-----	----------	---	-------	---------------	---	-------	-----------------	---	-------	---------------------------	---	---------	----	---	---------	------	---	---------	----	---	---------	-----	---	-----	-----	----	-------	--------------------	----	-------	-------------	----	-------	---------------	----	-------	---------	----	-----	----------	----	-----	-------	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	--------------	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	--------	----	-------	----------------	----	-------	-------------	----	-------	------------------------	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	----------------------	----	-------	------------------------------	----	-------	----------------------	----	-------	----------------------	----	-------	----------------------	----	-------	----------------------	----	-----	--------------	----	-------	-------	----	-------	--------	----	-------	--------	----	-------	----------	----	-----	-------	----	-------	--------------	----	-------	------------------	----	-------	--------------------	----	-------	----------------------	----	-------	-----------------------	----	-------	----------------------	----	-----	-------	----	-----	----------------------	----	-----	------------------------------	----	-----	----------------------	----	-----	----------------------	----	-----	----------------------	----	-----	----------------------	----	-----	--------------	----	-------	--------	----	-------	--------	----	-------	----------	----	-------	----------------	----	-----	-------	----	-------	-------------	----	-------	--------------------	----	-------	--------------------	----	-------	----------------------	----	-------	-----------------------	----	-------	----------------------	----	-----	----	----	------	----	-----	----------------------------------	-----	-----	---------	-----	-----	----------	-----	-----	-------	----------------	----	-------	---------------	----	-------	---	----	-------	--------------------------------------	----	-------	-------------------------------	----	-------	-------------------------------	----	-------	--------------------------------------	----	-------	--	----	-------	--	----	-------	---------------------------	----	-------	---------------------------	----	-------	----------------------------------	----	--------	---------------------------	----	--------	---------------------------	----	--------	----------------------------------	----	--------	-----------------------------	----	--------	---------------------------	----	--------	-----------------------------	----	--------	----------------------------	----	--------	------------------------------	----	--------	----------------------------	----	--------	-------------	----	--------	-----------------------	----	--------	-------------------	--

重之影響 84 圖4- 22 不同轉速在枯草桿菌液態培養下對iturin A之影響 85 圖4- 23 不同通氣量在枯草桿菌液態培養下對DO值之影響 87 圖4- 24 不同通氣量在枯草桿菌液態培養下對乾菌重之影響 88 圖4- 25 不同通氣量在枯草桿菌液態培養下對iturin A之影響 89 圖4- 26 不同擋板在枯草桿菌液態培養下對DO值之影響 92 圖4- 27 不同擋板在枯草桿菌液態培養下對QO₂之影響 93 圖4- 28 不同擋板在枯草桿菌液態培養下對KLa值之影響 94 圖4- 29 不同擋板在枯草桿菌液態培養下對乾菌重之影響 95 圖4- 30 不同擋板在枯草桿菌液態培養下對iturin A之影響 96 表目錄 表2- 1 枯草桿菌產生之拮抗生物質 18 表2- 2 影響需氧的因素 19 表3- 1 26-3部分因子實驗設計 36 表3- 2 26-3部分因子設計中各自變數的水準與相對濃度 37 表3- 3 橡皮塞直徑與棉花重量之比例 38 表3- 4 陡升路徑實驗設計 39 表3- 5 中心混成實驗設計 40 表3- 6 中心混成設計中各自變數的水準與相對濃度 42 表4- 1 26-3部分因子設計及實驗結果 64 表4- 2 根據26-3部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 65 表4- 3 中心混成設計及其實驗結果 66 表4- 4 中心混成實驗設計之回歸分析表 68 表4- 5 中心混成設計回應值之變異數分析 69 表4- 6 不同轉速、通氣量與擋板對KLa之影響 81 表4- 7 不同轉速、通氣量與擋板對電流值之影響 82

參考文獻

- 中文部份 1. 向明。1998。台灣生物農藥研發及其產業-枯草桿菌。生物產業與製藥產業(上)。2. 沈炫孚。1993。溶氧濃度對嗜鹼性*Bacillus* sp. No. 17-1發酵生產環狀糊精葡萄糖??鈺?) 的v響。大同工學院化學工程研究所碩士論文。台北。3. 林弘裕。2002。液化澱粉芽孢桿菌拮抗萘町娃鏊坐艦R與回收純化探討。東華大學生物技術研究所碩士論文。花蓮。4. 高博敏。2002。臘蚘輪枝菌液態發酵生產幾丁質分解酵素之研究。朝陽科技大學應用化學系碩士論文。台中。5. 郭嘉誠。2001。以酵母菌*Candida* sp.生產木糖醇之研究。雲林科技大學工業化學與災害防治研究所碩士論文。雲林。6. 陳俊位。1999。生物性農藥枯草桿菌在植物病害防治上之應用。台中區農業專訊, 第26期, 第19頁 7. 陳堅、堵國成、李演和華兆哲。2004。發酵工程實驗技術。化學工業出版社。北京。8. 陳榮玉。1999。生物技術在農業產業之研發與應用。台中區農業專訊, 第26期, 第4頁 9. 黃秀華。1999。生物技術在植物病害生物防治之應用。台中區農業專訊, 第26期, 第22頁 10. 蔡坤助。2001。液化澱粉芽孢桿菌抑制百合灰黴病檢測及其發酵產孢程序之探討。東華大學生物技術研究所碩士論文。花蓮。英文部份 1. Abraham L. S., James A. H. and Richard L.. 1993. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology. 2. Ahimou F., Jzcques P. and Deleu M.. 2000. Surfactin and iturin A on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme microb. technol.* 27: 749 3. Amanullah A., J?鄧ten P., Davies A., Paul C. G., Nienow A.W. and Thomas C. R.. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *J. Biochem. Engineer.*, 5: 109-114. 4. Amanullah A., J?鄧ten P., Davies A., Paul C. G., Nienow A.W. and Thomas C. R.. 1999. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostate cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 62: 434-446. 5. Bastin G. and Dochain D.. 1990. On-line estimation and adaptive control of bioreactors, Elsevier. 6. Besson F. and Michel G.. 1987. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. *J. antibiot.* 40: 437. 7. Besson F., Peypoux F. and Michel G.. 1979. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their dervivatives; inhibition of this Antifungal activity by lipid antagonists. *J. antibiot.* 32: 828. 8. Besson F., Peypoux F., Miche G. and Delcambe L.. 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *J. antibiot.* 31: 284. 9. Blanch H. W. and Clark D. S.. 1997. *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker, Inc. 10. Box and Wilson. 1951. On the experiment attainment of optimum condition. *JRSS-B*, 13, 1-45. 11. Catherine Sandrin, Françoise Peypoux and Georges Michel. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and applied biochemistry* 12, 370-375. 12. Cho Soo-Jin, Lee Sam Keun, Cha Byeong Jin, Kim Young Hwan and Shin Kwang-Soo. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters* 223 47-51. 13. Cooper D. G., MacDonald C. R., Duff S. J. B. and Kosaric N.. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ Microbiol.* 42: 408. 14. Delcambe L. and Devignat R.. 1957. L' iturine, nouvel antibiotique d' origine congolaise. *Acad. R. Sci. Coloniales.* 6: 1. 15. Drauin C. M. and Copper D. G.. 1992. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 40: 86. 16. Feignier C., Besson F. and Michel G.. 1995. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of iturin-,surfactin+ mutants. *FEMS micro. biol. lett.* 127: 11. 17. Fiechter A.. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Tibtech.* 10: 208 18. Galaction A. I., Cascaval D., Oniscu C. and Turnea M.. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeast and fungus broths. *Biochemical engineering journal* 20 85:94 19. Gu Xiao-Bo, Zheng Zong-Ming, Yu Hai-Qing, Wang Jun, Kiang Feng-Lai and Liu Ru-Lin. 2005. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. *Process Biochemistry.* 20. Heins S. D., Manker D. C., Jmenez D. R., McCoy R. J., Marrone P. G. and Orjala J. E.. 2000. Compositions and methods for controlling plant pests. U.S. Patent 6,103,228 21. Ho C.S. and Olshus J.Y.. 1987. Biotechnology processes scale-up and mixing. *American Institute of Chemical Engineering* pp. 128. 22. Hwang W. I.. 1993. Biosurfactant production from *Klebsiella Oxytoca*. *J. Chinese Arg. Chem. Soc.* 31: 466 23. Isao Yumoto, Koji Yamazaki, Megumi Hishinuma, Yoshinobu Nodasaka, Norio Inoue and Kosei Kawasaki. 2000. Identification of facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. strain YN-2000 and its fatty acid composition and cell-surface aspects depending on culture pH. *Extremophiles* 4: 285-290. 24. Jung Y. E., Lee J. D. and Chang Y. K.. 1999. Development of a new device for on-line measurement of high cell concentration, *Biotechnology Technique* 13:459-462. 25. Klich M. A., Arthur K. S., Lax A. R. and Bland J. M.. 1994. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia.* 127: 123 26. Klich M. A., Lax. A. R. and Bland J. M.. 1991. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia.* 116: 77 27. Kondoh Maki, Hirai Mitsuyo and Shoda

Makoto.. 2001. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB-14C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 91, No. 2, 173-177.

28. Lin Jyhshium, Lu Chin, Yu I-Te and Wu Jih-Fang. 1998. Effects of starch sources on the production and activity of amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of the Agricultural Association of China* new vol. 185 29.

Lin S. C., Sharma M. M. and Georgiou G.. 1993. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Biotechnol. Prog.* 9: 138-140.

Liu B-L. and Tzeng Y-M.. 2000. *Biotechnol Bioeng.*, 68, 11-17.

31. Miyachi M., Iguchi A., Uchida S. and Koide K.. 1981. *Can. J. Chem. Eng.* 59 640.

32. Nicholson, WL, and GH Chambliss. 1985. Isolation and characterization of a cis-acting mutation conferring catabolite repression resistance to α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 161:875-881.

33. Nielsen J.. 1993. A simple morphologically structure model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 715-727.

34. Ohno Akihiro, Ano Takashi and Shoda Makoto. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of fermentation and bioengineering* vol.80, no.5, 517-519.

35. Ohno Akihiro, Ano Takashi and Shoda Makoto. 1996. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A by *Bacillus subtilis* NB22. *Process biochemistry*, Vol.31, No.8, pp. 801-806.

36. Ota Y. and Yamada K. 1966. Lipase from *Candida parapolityca*: Part 1 Anionic surfactant as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*, vol.30, p. 351-358.

37. Paul C. G., J?n?ten P., Nienow A.W. and Thomas C. R.. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 634-648.

38. Paul C. G., J?n?ten P., Nienow A.W. and Thomas C. R.. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation and productivity in fed-batch fermentation on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, 59: 762-775.

39. Peypoux F., Besson F. and Michel G. 1979. Preparation and antifungal activity upon *Micrococcus luteus* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L, antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. antibiot.* 32: 136-140.

40. Peypoux F., Guinand M., Michel G., Delcambe L., Das B. C. and Lederer E. 1978. Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 17: 3992-3994.

41. Phae Chae-Gun and Makoto Shoda 1990. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of fermentation and Bioengineering* Vol. 71, No. 2, 118-121.

42. Qurrat A. Maqbool, Sarojini Johri, Lata Verma, S. Riyaz-ul-Hassan, Vijeshwar Verma, Surrinder Koul, Subhash C. Taneja, Rajinder Parshad and Ghulam N. Qazi. 2002. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 227-234.

43. Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. 1987. Solid-state fermentation for production of α amylase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnology Letters* 9, 323-328.

44. R?m?ine Maget-Dana and Peypoux F.. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* 87: 151-155.

45. R?m?ine Maget-Dana, Thimon L., Peypoux F. and Ptak M.. 1996. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie.* 74: 1047-1051.

46. Riet K. van 't and Tramper J. 1991. *Basic bioreactor design.* Marcel Dekker, New York, pp. 236-240.

47. Sandrin C., Peypoux F. and Michel G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied biochemistry* 12, 370-375.

48. Shuler M. L., Mufti N., Donaldson M. and Taticek R.. 1994. A bioreactor experiment for the senior laboratory, *Chemical Engineering Education*, 24-28.

49. Smith J. J., Lilly M.D. and Fox R. I. 1990. The effects of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 35: 1011-1023.

50. Tsuge Kenji, Akiyama Takanori and Shoda Makoto. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of bacteriology* Vol. 183, No. 21, p. 6265-6273.

51. Winkelmann G. 1983. Iturin AL-a new long chain iturin A possessing an unusual high content of C16- amino acids. *J. antibiot.* 36: 1451-1455.

52. Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M. and Riet K. van't. 1990. Modeling of the bacterial growth curve, *Applied and Environment Microbiology*, 1875-1881.