

液化澱粉芽孢桿菌 BPD1 發酵配方測試

林崇寶^[1] 方關珽^[1] 許資敏^[1] 楊雯馨^[1] 胡淼琳^{[1]*}

摘要 本研究針對液化澱粉芽孢桿菌 BPD1 進行發酵配方試驗，初期以搖瓶進行培養試驗，發現最適配方為糖蜜 0.5%、乳糖 1% 和大豆分離蛋白 2%。以此配方進行培養條件測試，結果顯示接種 24 小時內菌數提升 1000 倍，24 至 48 小時菌數提升 10 倍菌數無顯著差異。其他培養條件如培養溫度於 25°C 和 30°C、不同 pH 值對菌數則皆無影響。透過 10 公升發酵槽的試驗，顯示以糖蜜 0.5%、乳糖 1% 和大豆分離蛋白 2% 作為培養基，轉速 200 至 300 rpm、溫度 30°C，可得到菌數 4×10^9 CFU/mL 以上之發酵液。利用 1 噸大型發酵槽以相同的培養基培養，發酵條件為溫度 30°C、轉速 160 至 200 rpm、通氣量 0.5 vvm，其菌數可達 1.2×10^9 CFU/mL 以上；修改培養基配方後，利用 1 噸大型發酵槽以糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1% 和硫酸亞鐵 0.045% 培養基培養，發酵條件為溫度 30°C、轉速 170 rpm、通氣量 0.5 vvm，其菌數可達 1.4×10^9 CFU/mL。此配方改善高泡問題，減少消泡劑之使用，降低成本。本試驗說明此一發酵配方可以用來大量生產液化澱粉芽孢桿菌。

關鍵詞： 液化澱粉芽孢桿菌、發酵、益生菌。

Test of Fermentation Formulae using *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1

Chung-Pao Lin^[1] Guan-Ting Fang^[1] Tzu-Min Hsu^[1] Wen-Hsin Yang^[1] Miao-Lin Hu^{[1]*}

ABSTRACT This project aimed at using *Bacillus amyloliquefaciens* (BPD1) to conduct fermentation formula test. At the beginning, we engaged in culture test by using shake flask and found that the best formula was 0.5% molasses, 1% lactose, and 2% isolated soy protein. Then we conducted culture condition test with this formula and found that bacterial count increased 1000 times within 24 hours and then 10 times between 24-48 hours, which showed no significant differences. Other culture conditions such as temperature of 25°C or 30°C and pH value made no differences to bacterial count. Through test of 10-liter fermentation tank, BPD1 reached $\geq 4 \times 10^9$ CFU/mL by using 0.5% molasses, 1% lactose, and 2% isolated soy protein as culture medium, with stirring speed from 200 to 300 rpm and temperature of 30°C. As for 1-ton fermentation tank, by using the same culture medium, BPD1 reached $\geq 1.2 \times 10^9$ CFU/mL with temperature of 30°C, 160 rpm, and ventilation 0.5 vvm. After adjusting formula, BPD1 reached $\geq 1.4 \times 10^9$ CFU/mL by using 1-ton fermentation tank and culture medium of 3% molasses, 1% isolated soy protein, and 0.045% FeSO₄, with temperature of 30°C, 170 rpm, and ventilation 0.5 vvm. This formula improves foaming problem, cutting down on antifoaming agent and lowering the cost. Overall, this study shows that the fermentation formula is satisfactory for mass production of BPD1.

Key Words: *Bacillus amyloliquefaciens*, Fermentation, Probiotics.

一、前言

液化澱粉芽孢桿菌於 1943 年由日本學者 Fukomoto 發

現，此菌種可產生大量的澱粉酶 (α -amylase) 及蛋白酶 (protease)。由於此菌種外觀及表現特徵和枯草桿菌極為相似，因此當時暫將此菌種列為枯草桿菌的亞種之一，但在

[1] 國立中興大學食品暨應用生物科技學系

Dept. of Food Science and Biotechnology, National Taiwan University, Taichung 40227, Taiwan.

* Corresponding Author. E-mail: mlhuhu@nchu.edu.tw

1967 年 Welker 與 Compbell 利用 DNA 雜交法(DNA hybridization)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，且枯草桿菌的 DNA guanine-plus-cytosine 成分(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不同的變種。此外，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^[5]，將液化澱粉芽孢桿菌分類為一獨立菌種，Priest 在 1987 年正式發表在期刊上，至此液化澱粉芽孢桿菌才真正被定義出來。

本研究之液化澱粉芽孢桿菌 BPD1 是由農委會藥物毒物試驗所(簡稱藥毒所)自台中梨山的土壤篩選出來，進一步培養、鑑定及保存與開發。BPD1 為芽孢桿菌屬，革蘭氏陽性好氧菌，具周生鞭毛能夠運動，會形成內生孢子，具有耐高溫及在逆境下易於存活之能力。BPD1 可產生纖維素酶(cellulase)、蛋白酶(protease)、脂肪酶(lipase)、澱粉酶(amylase)，且具有溶磷(phosphate-solubilizing)、溶解血栓(fibrinolytic enzyme)與抑制大腸桿菌及沙門氏菌的能力^[4]，此外尚具有產生抗生物質伊枯草菌素(iturin)、豐原素(fengycin)與表面活性素(surfactin)的能力，可以抑制真菌或細菌生長^[3,7]。

本研究以此菌株進行發酵配方試驗，初期先以搖瓶進行培養條件試驗，再以 10 公升發酵槽試驗不同培養條件的培養狀況，並以小型發酵槽所獲得之發酵條件放大培養至大型發酵槽，期達到量產與高菌數之發酵液。

二、材料與方法

(一) 供試菌株來源及其接種源製備

本研究使用之菌株由藥毒所提供之本土液化澱粉芽孢桿菌 BPD1。接種源製備則先將 BPD1 用 LA (Difco, LB Broth, Agar 1.5%)培養基更新培養，再增量培養至 LA 培養基上，於溫度 30°C 培養 1 天後，以移殖環(loop)刮取菌落加入無菌水中，並以分光光度計定量濃度至 1×10^7 CFU/mL (以稀釋之懸浮液測定 $OD_{620} = 0.5$) 備用。

(二) 搖瓶培養試驗

為瞭解液態培養之基礎條件，先以 500 mL 錐形瓶進行搖瓶模擬試驗，實驗如下：

1. 碳源利用試驗

為瞭解 BPD1 對於不同碳源的利用情形，將製備完成之接種源分別接種至添加大豆分離蛋白(Oppenheimer) 2%及不同碳源的培養基中，分別測定二號砂糖(台糖) 1.5%、乳糖(Hoogwegt) 1.5%、黑糖(萬代) 1.5%、糖蜜(光益) 1.5%等，每個處理重複三次，於溫度 30°C、轉速 150 rpm，震盪培養 3 天後計數菌數。

2. 氮源利用試驗

為瞭解 BPD1 對於不同氮源的利用情形，將製備完成之接種源分別接種至含糖蜜 0.5%、乳糖 1%及不同氮源之培養基中，分別測定添加黃豆粉(永全) 2%、酵母粉(台豐) 1%、大豆分離蛋白 2%及玉米浸出液(豐年) 1%等，每個處理重複三次，於溫度 30°C、轉速 150 rpm 震盪培養 3 天後計數菌數。

3. 酸鹼值試驗

為瞭解培養基滅菌前調整 pH 值對於 BPD1 之影響情形，將製備完成之接種源，以糖蜜 0.5%、乳糖 1%和大豆分離蛋白 2%(以下簡稱配方 A)作為培養基，滅菌前分別調整 pH 值為 pH 4、5、6、7、8、9，每個處理重複三次，於溫度 30°C 轉速 150 rpm 震盪培養 3 天後計數菌數。

4. 培養時間試驗

為瞭解 BPD1 培養時，菌數之增加情形，將製備完成之接種源，接種至配方 A 作為培養基，於溫度 30°C、轉速 150 rpm 震盪培養 4 天，每天固定時間取樣計數菌數。

5. 培養溫度試驗

為瞭解溫度對 BPD1 生長的影響，將製備完成之接種源，以配方 A 作為培養基，pH 值未調整約 6.4，固定轉速 150 rpm，分別於溫度 25°C 及 30°C，每個處理重複三次，震盪培養 3 天後計數菌數。

6. 配方調整試驗

為解決大豆分離蛋白使用不便及乳糖成本較高的問題，調整配方後再進行試驗，分別為(1) 糖蜜 0.5%、乳糖 1%和大豆分離蛋白 2%;(2) 糖蜜 3%和大豆分離蛋白 2%;(3) 糊精(Roquette) 3%和大豆分離蛋白 2%;(4) 糖蜜 3%和大豆分離蛋白 1%;(5) 糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1%和硫酸銨(農友) 0.1%;(6) 糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1%和硫酸亞鐵(Sigma) 0.045%;(7) 糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1%、硫酸銨 0.1%和硫酸亞鐵 0.045%等 7 種培養基，每個處理重複三次，固定轉速 150 rpm，於 30°C 震盪培養 3 天後計數菌數。

(三) 10 公升小型發酵槽培養條件試驗

本試驗為瞭解 BPD1 於大型發酵槽內培養之狀況，先以 10 公升發酵槽 (Biotop, 頂生實業有限公司) 進行小型發酵培養試驗。10 公升發酵槽內含 7 公升配方 A 培養基，溫度 30°C，調整轉速及通氣量，接種 300 mL 預先培養之搖瓶菌液 (將製備完成之接種源，接種至 300 mL 配方 A 培養基，於 30°C 震盪培養 1 天)，培養 6 天並以 pH 電極與溶氧電極分別偵測 pH 值與溶氧濃度(dissolved oxygen, DO)變化，第 6 天收槽計數菌數。

1. 轉速試驗

為瞭解 10 公升發酵槽的轉速對菌生長的影響，固定通氣量 0.5 vvm，分別試驗培養轉速 200 rpm 及 300 rpm 時 BPD1 之生長情形。

2. 通氣試驗

為瞭解 10 公升發酵槽之通氣量對菌生長的影響，固定轉速 200 rpm，分別試驗通氣量 0.5 vvm 及 0.7 vvm 時 BPD1 之生長情形。

(四) 大型發酵槽培養試驗

為瞭解 BPD1 以大型發酵槽培養之狀況，以 1 噸發酵槽 (百歐生技有限公司) 進行發酵生產試驗。10 公升發酵槽內含 7 公升配方 A 培養基，溫度 30°C，調整轉速 200 rpm、通氣量 0.5 vvm，接種 300 mL 預先培養之搖瓶菌液 (將製備完成之接種源，接種至 300 mL 配方 A 培養基，於溫度 30°C 震盪培養 1 天)，進行發酵培養 1 天後，接種於 1 噸發酵槽，以 700 公升配方 A 培養基，溫度 30°C，以電腦控制桶槽壓力、攪拌轉速、通氣量，分別試驗不同轉速及不同培養基對發酵生產的影響，並記錄發酵完成後之菌數。

(五) 統計分析

本實驗數據以 mean±SD 表示，並使用 SPSS 統計軟體進行變異分析(ANOVA)，其次以 Duncan's Multiple Range Test 來分析不同組別間之差異，並以 P < 0.05 訂為顯著性差異。

三、結果與討論

(一) 搖瓶培養試驗

為了確認 BPD1 的最適合培養基，先以搖瓶進行模擬試驗，分別針對碳源、氮源、酸鹼值逐步分析。試驗結果顯示，糖蜜 0.5% 及乳糖 1% 對於 BPD1 為較好之碳源成分，可培養出最高菌數 $5.1 \pm 1.4 \times 10^9$ CFU/mL，且有顯著差異 (表 1)。氮源試驗結果顯示，除了黃豆粉較差外，其餘三種資材之最終菌數差異不大，可達 $1.1 \pm 0.1 \times 10^{10}$ CFU/mL 以上，且有顯著差異 (表 2)，但酵母粉屬於無法完全溶解之資材，在使用上容易有沉澱；大豆分離蛋白可以完全溶解，但粉質較輕，需慢慢溶解，且容易起泡；玉米浸出液為水溶液不均勻資材，此資材易有沉澱產生，使用此些資材需注意其特性，並留意沉澱情況，方可穩定的進行發酵生產。

在氮源及碳源試驗後，初步覺得糖蜜 0.5%、乳糖 1% 和大豆分離蛋白 2% 為不錯之配方，以此配方進行 pH 值、培養溫度、培養時間等試驗。從 pH 值試驗結果中顯示除了 pH 4 組在培養後 pH 值仍維持在 4.42 左右外，其餘處理酸鹼值約成長至 pH 8.5 以上；而 pH 4 之菌數最低也只有 1.2×10^9 CFU/mL，其餘處理均可達 2.6×10^{10} CFU/mL 以上 (表 3)，顯示該菌於 pH 5~9 均可生長良好，且透過實驗也瞭解只要 BPD1 生長良好，培養過程中會產生鹼性物質。

表 1 不同碳源培養液對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數之影響。

Table 1 Effects of different carbon sources on the count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Treatments ¹	Bacterial count (CFU/mL) ²
1.5% black sugar, and 2% isolated soy protein	$1.9 \pm 0.7 \times 10^9$ ^a
1.5% granulated sugar, and 2% isolated soy protein	$1.1 \pm 0.5 \times 10^9$ ^a
1.5% lactose, and 2% isolated soy protein	$1.2 \pm 0.4 \times 10^9$ ^{ab}
1.5% molasses, and 2% isolated soy protein	$3.5 \pm 1.3 \times 10^9$ ^b
0.5% molasses, 1% lactose, and 2% isolated soy protein	$5.1 \pm 1.4 \times 10^9$ ^c

¹ Initialization bacteria count were 2.3×10^5 CFU/mL.

² Data are means ± SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

BPD1 在溫度 25°C 與 30°C 培養都可達菌數 $3.4 \pm 0.8 \times 10^9$ CFU/mL 以上之菌數，且無顯著差異 (表 4)。透過不同培養時間的偵測，可知道 BPD1 是一株生長快速的菌株，在接種後 24 小時內菌數顯著上升，有顯著差異，至 48 小時之後進入平穩期 (表 5)，所以未來在接種後的 2 天內，應給與充份的養份及空氣，讓該菌有較好的生長。

(二) 配方調整試驗

為解決大豆分離蛋白使用不很容易起泡及乳糖成本較高的問題，分別試驗 7 種培養基配方，結果顯示修改碳源為糖蜜 3% 和大豆分離蛋白 2% 配方培養 3 天，菌數可達 $9.6 \pm 1.0 \times 10^9$ CFU/mL (表 6)。此外，將大豆分離蛋白比例降低，以

其他資材取代，其中以糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1% 和硫酸亞鐵 0.045% 配方培養 3 天，菌數可達 $6.8 \pm 0.6 \times 10^9$ CFU/mL，且有顯著差異 (表 6)。

(三) 小型發酵槽培養 BPD1 試驗

1. 轉速試驗

以 10 公升發酵槽培養 7 公升，固定溫度為 30°C 及通氣量 0.5 vvm，進行培養試驗，分別測定轉速 200 rpm 及 300 rpm 時之培養情形。結果顯示培養 6 天後，其菌數分別為 $4.2 \pm 1.9 \times 10^9$ CFU/mL 及 $4.8 \pm 0.8 \times 10^9$ CFU/mL，無顯著差異 (表 7、表 8)。培養期間轉速 200 rpm 於第 3 天達最高菌數 $4.6 \pm 1.1 \times 10^9$ CFU/mL (圖 1)，DO 值在接種後第 3 小時

表 2 不同氮源培養液對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數之影響。

Table 2 Effects of different nitrogen sources on the count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Treatments ¹	Bacterial count (CFU/mL) ²
0.5% molasses, 1% lactose, and 2% soy flour	$3.6 \pm 0.5 \times 10^9$ ^a
0.5% molasses, 1% lactose, and 1% yeast powder	$5.4 \pm 0.7 \times 10^{10}$ ^c
0.5% molasses, 1% lactose, and 1% maize lixivium	$1.7 \pm 0.4 \times 10^{10}$ ^b
0.5% molasses, 1% lactose, and 2% isolated soy protein	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{10}$ ^{ab}

¹Initialization bacteria count were 2.9×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

表 3 不同 pH 值培養液對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數之影響。

Table 3 Effects of different pH values on the count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Treatments ¹	pH value after culture	Bacterial count (CFU/mL)
pH4	4.42	1.2×10^9
pH5	8.86	6.4×10^{10}
pH6	8.77	7.4×10^{10}
pH7	8.94	3.6×10^{10}
pH8	8.70	2.6×10^{10}
pH9	8.51	5.4×10^{10}

¹Initialization bacteria count was 2.5×10^5 CFU/mL. No significant differences exist in the means among different groups.

表 4 不同培養溫度對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數生長之影響

Table 4 Effects of different incubation temperature on count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Incubation temperature (°C) ¹	Bacterial count (CFU/mL) ²
25	$3.4 \pm 0.8 \times 10^9$ ^a
30	$4.0 \pm 0.3 \times 10^9$ ^a

¹Initialization bacteria count were 1.1×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

快速下降至 0% (圖 2); 轉速 300 rpm 於第 2 天因高泡使發酵液從冷凝管流出, 故調整轉速至 200 rpm, 此時達最高菌數 $6.1 \pm 0.9 \times 10^9$ CFU/mL (圖 1), DO 值在接種後第 3 小時快速下降, 但未達 0% (圖 2), 顯示當提高轉速, 可使培養基溶氧提高, 減少達到最高菌數的時間, 但此時容易產生

高泡問題, 提高污染機率, 故需選擇適當的轉速與該配方配合, 選擇降低轉速或降低產泡培養資材的含量。

2. 通氣試驗

以 10 公升發酵槽培養 7 公升, 固定溫度為 30°C 及轉速 200 rpm, 分別測定通氣 0.5 及 0.7 vvm 時之培養情形。結

表 5 不同培養時間對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數之影響。

Table 5 Effects of different incubation time on count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Incubation time (day) ¹	Bacterial count (CFU/mL) ²
1	$6.1 \pm 1.5 \times 10^8$ ^a
2	$5.4 \pm 0.5 \times 10^9$ ^b
3	$5.3 \pm 0.3 \times 10^9$ ^b
4	$6.5 \pm 1.1 \times 10^9$ ^b

¹Initialization bacteria count were 3.8×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

表 6 不同培養配方對 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 菌數之影響。

Table 6 Effects of different formulae on count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1.

Treatments ¹	Bacterial count (CFU/mL) ²
05 % molasses, 1% lactose, and 2% isolated soy protein	$7.4 \pm 1.0 \times 10^9$ ^e
3% molasses, and 2% isolated soy protein	$9.6 \pm 1.0 \times 10^9$ ^f
3% dextrin, and 2% isolated soy protein	$1.6 \pm 0.5 \times 10^9$ ^a
3% molasses, and 1% isolated soy protein	$4.9 \pm 1.0 \times 10^9$ ^c
3% molasses, 1% isolated soy protein, and 01 % ammonium sulfate	$5.6 \pm 0.4 \times 10^9$ ^{cd}
3% molasses, 1% isolated soy protein, and 0.045% ferrous sulfate	$6.8 \pm 0.6 \times 10^9$ ^{de}
3% molasses, 1% isolated soy protein, 0.1% ammonium sulfate, and 0.045% ferrous sulfate	$3.4 \pm 0.9 \times 10^9$ ^b

¹Initialization bacteria count were 2.2×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

表 7 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗, 培養條件為 30°C、200 rpm、0.5 vvm。

Table 7 Fermentation test for *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 in a 10-liter tank, with fermentation conditions 30°C, 200 rpm and 0.5 vvm.

Incubation time (day) ¹	pH	DO (%)	Bacterial count (CFU/mL) ²
1	7.51	25.6	$1.8 \pm 0.4 \times 10^9$ ^a
2	8.30	65.6	$2.2 \pm 0.5 \times 10^9$ ^{ab}
3	8.87	108.1	$4.6 \pm 1.1 \times 10^9$ ^{ab}
4	8.73	108.6	$3.8 \pm 1.0 \times 10^9$ ^{ab}
5	8.73	111.3	$4.5 \pm 2.1 \times 10^9$ ^{ab}
6	8.74	113.5	$4.2 \pm 1.9 \times 10^9$ ^b

¹Initialization bacteria count were 2.2×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

果顯示通氣量分別為 0.5 及 0.7 vvm，兩者皆於第 3 天達最高菌數 $4.6 \pm 1.1 \times 10^9$ CFU/mL 及 $5.7 \pm 1.7 \times 10^9$ CFU/mL (表 7、表 9)，到第 6 天菌數分別為 4.2×10^9 CFU/mL 及 5.0×10^9 CFU/mL (圖 3)。整體而言，提高通氣量可提升菌數 (圖 1)，也無起泡增加之情形。

3. 培養條件確認

透過 10 公升發酵槽培養的試驗，以糖蜜 0.5%、乳糖 1% 和大豆分離蛋白 2% 作為培養基，轉速 200 至 300 rpm、溫度 30°C，培養 5 天，培養時同時偵測 DO 值及 pH 值，並取樣以塗佈平板法計數菌數，可得到菌數 4.0×10^9 CFU/mL 以上之發酵液。

表 8 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗，培養條件為 30°C、300 rpm、0.5 vvm。

Table 8 Fermentation test for *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 in a 10-liter tank, with fermentation conditions 30°C, 300 rpm and 0.5 vvm.

Incubation time (day) ¹	pH	DO (%)	Bacterial count ± SD (CFU/mL) ²
1	8.41	84.9	$3.2 \pm 0.5 \times 10^9$ ^a
2(改為 200 rpm)	8.74	79.7	$6.1 \pm 0.9 \times 10^9$ ^b
3	8.87	88.2	$5.6 \pm 0.5 \times 10^9$ ^b
4	8.86	93	$5.4 \pm 1.2 \times 10^9$ ^b
5	8.72	92.1	$5.3 \pm 0.6 \times 10^9$ ^b
6	8.75	93.5	$4.8 \pm 0.8 \times 10^9$ ^b

¹ Initialization bacteria count were 2.4×10^5 CFU/mL.

² Data are means ± SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

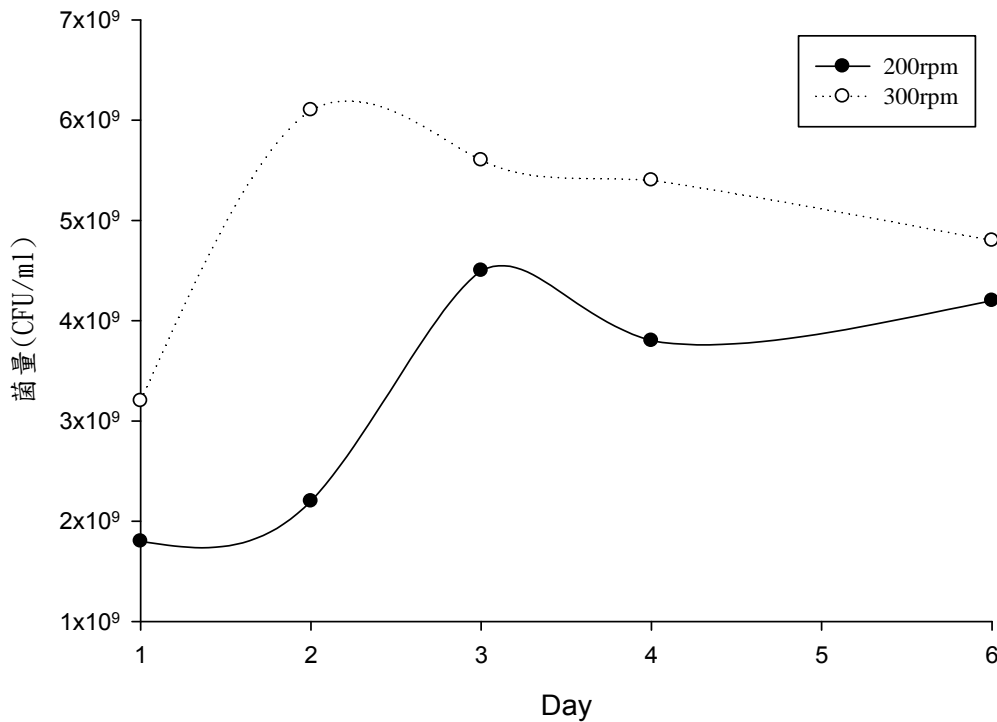
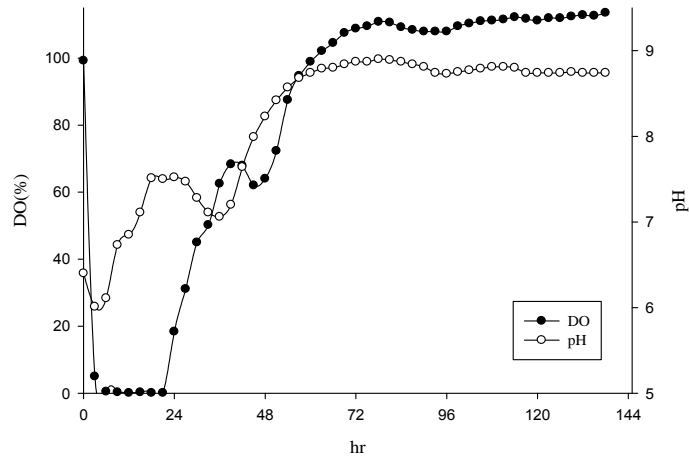
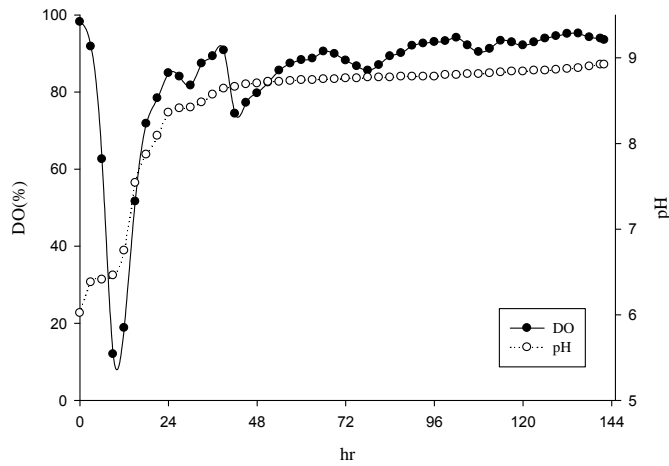


圖 1 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗。在溫度 30°C，通氣量 0.5 vvm，轉速分別為 200 rpm 及 300 rpm 以培養 6 天之菌數趨勢圖。

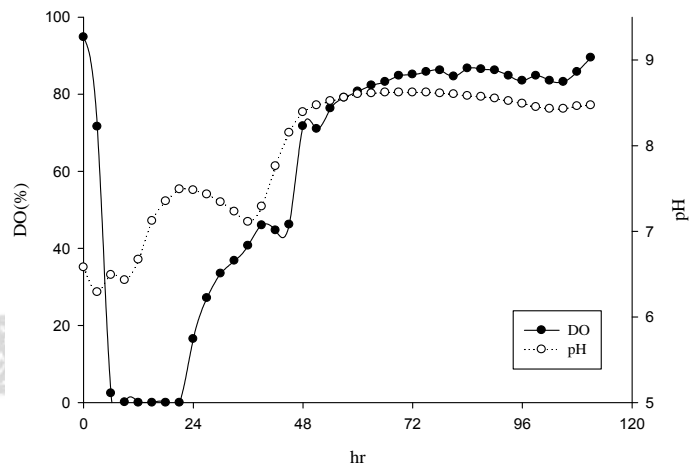
Fig. 1 Count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 fermented in a 10-liter tank. BPD1 was incubated for six days, under the condition of ventilation 0.5 vvm and stirring speed 200 rpm and 300 rpm, respectively at 30°C.



A. 通氣量 0.5 vvm 轉速 200 rpm



B. 通氣量 0.5 vvm 轉速 300 rpm



C. 通氣量 0.7 vvm 轉速 200 rpm

圖 2 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗，在溫度 30°C 培養 6 天之 pH 值及溶氧濃度(dissolved oxygen, DO)趨勢圖。

Fig. 2 Fermentation test for *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 in a 10-liter tank. Dissolved oxygen (DO) and pH which were obtained six days after incubation, at 30°C.

(四) 大型發酵槽培養 BPD1 試驗

大型發酵槽與 10 公升發酵槽的差異，在於可調整的參數較多，包括：培養溫度、轉速、通氣量、槽壓、消泡方式等，可偵測之參數有培養溫度、DO 值及 pH 值。先以糖蜜 0.5%、乳糖 1% 和大豆分離蛋白 2% 作為培養基，於溫度

30°C、轉速 160 rpm、通氣量 0.5 vvm 條件下，培養 5 天，其菌數可達 6.0×10^8 CFU/mL。調整轉速及通氣量可以增加溶氧量，故改變轉速為 200 rpm，相同條件下培養，結果顯示菌數可達 1.2×10^9 CFU/mL，比較於低轉速菌數略為提升。雖然轉速提高可提升菌體生長，但配方內之大豆分離蛋白在高速攪拌下易產生高泡問題，所以培養條件需跟著配方調整。

表 9 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗，培養條件為 30°C、200 rpm、0.7 vvm。

Table 9 Fermentation test for *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 in a 10-liter tank, with fermentation conditions 30°C, 200 rpm and 0.7 vvm.

Incubation time (days) ¹	pH	DO (%)	Bacterial count (CFU/mL) ²
1	7.48	16.5	$3.2 \pm 0.7 \times 10^{9a}$
2	8.39	71.7	$4.8 \pm 1.0 \times 10^{9ab}$
3	8.62	84.8	$5.7 \pm 1.7 \times 10^{9ab}$
4	8.52	84.8	$5.6 \pm 1.1 \times 10^{9b}$
5	8.47	89.5	$5.0 \pm 0.6 \times 10^{9b}$

¹Initialization bacteria count were 2.4×10^5 CFU/mL.

²Data are means \pm SD (n = 3). Means sharing an alphabetic letter are not significantly different (P < 0.05).

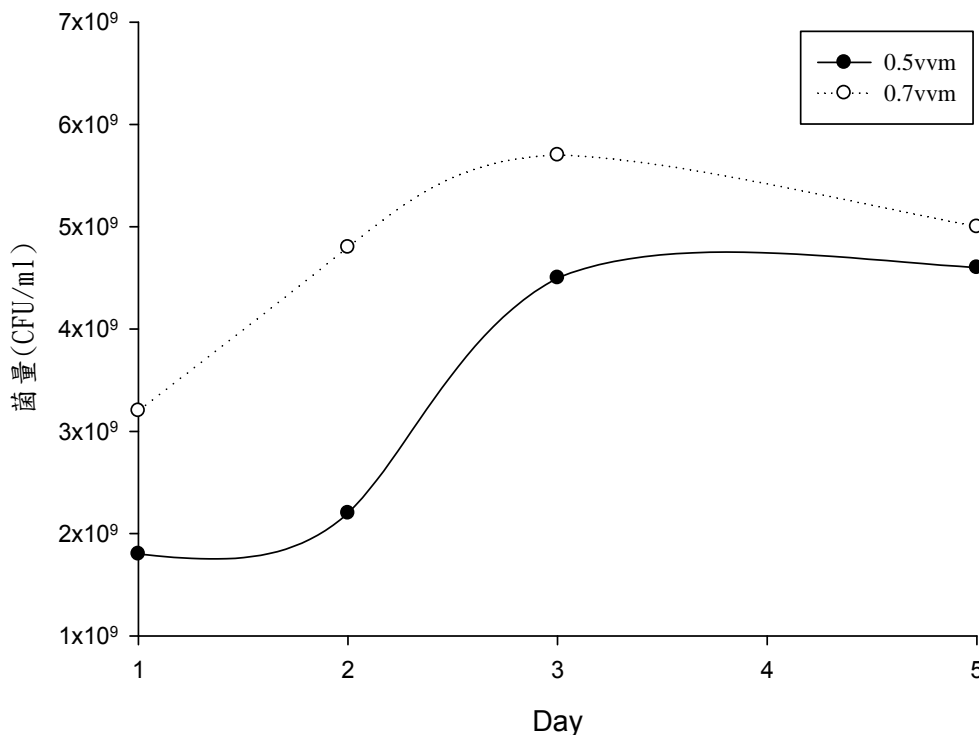


圖 3 10 公升發酵槽 *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 發酵試驗。在溫度 30°C、轉速 200 rpm、通氣量分別為 0.5 及 0.7 vvm 培養 5 天之菌數趨勢圖。

Fig. 3 Count of *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 fermented in a 10-liter tank. BPD1 was incubated for six days with ventilation of 0.5 vvm and 0.7 vvm, respectively at 30°C.

在幾次試驗後，發現大豆分離蛋白有容易起泡的特性，在進行量產過程中會有困擾，且大豆分離蛋白成本較高，因此希望可以降低它的含量。根據文獻指出培養基添加硫酸銨^[2]與硫酸亞鐵^[1]可以提高菌數，故我們使用相關資材進行試驗，先以搖瓶及 10 公升發酵槽進行試驗，發現起泡情形有改善而培養之菌數相當，均可達 4.5×10^9 CFU/mL 以上，故將此配方(糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1%和硫酸亞鐵 0.045%)應用於 1 噸發酵槽，以發酵條件溫度 30°C、轉速 170 rpm、通氣量 0.5 vvm 培養 6 天後，其菌數可達 1.4×10^9 CFU/mL。這些結果可供未來量產時參考使用。

四、結論

液化澱粉芽孢桿菌 BPD1 為一株多功能有益微生物，以搖瓶、10 公升發酵槽、1 噸發酵槽進行培養試驗，結果都顯示培養溫度於 25 和 30°C 皆不影響菌株生長；培養基起始 pH 值 4~9 也不影響菌株生長；菌株培養第 2 天後，菌數並無顯著差異；而培養基配方糖蜜 0.5%、乳糖 1%和大豆分離蛋白 2%，可有效提升菌數。在 10 公升發酵槽轉速 200 至 300 rpm、溫度 30°C，培養 5 天，可得到菌數 4.0×10^9 CFU/mL 以上之發酵液，而在 1 噸發酵槽以修改培養基配方糖蜜 3%、大豆分離蛋白 1% 和硫酸亞鐵 0.045% 培養，發酵條件為溫度 30°C、轉速 170 rpm、通氣量 0.5 vvm，培養 6 天，其菌數可達 1.4×10^9 CFU/mL，觀察其發酵情形，不只改善高泡問題，減少消泡劑之使用，降低成本，此配方較適於大型發酵槽生產。

量產時需考量的問題不只產品品質(菌數)，還有成本及產程最佳化等，需透過適度修改配方，符合生產線的狀況，才可減少未來量產時所發生的問題。

參考文獻

- [1] 林弘裕 (2002)。「液化澱粉芽孢桿菌胜肽抗生物質之分析與回收純化探討」，國立東華大學生物科技碩士論文。
- [2] 蔡坤助 (2001)。「液化澱粉芽孢桿菌抑制百合黴病檢測及其發酵產孢程序之探討」，國立東華大學生物科技碩士論文。
- [3] 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。
- [4] 謝奉家、高穗生 (2011)。「具商品化潛力之多功能液化澱粉芽孢桿菌」，海峽兩岸生物防治研討會論文摘要集。P28-29。
- [5] Claus, D. and Berkeley, R. C. W. (1986). "Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: Sneath, P.H.A. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. Section 13, vol. 2. pp. 1105-1139.
- [6] Fukumoto, J. (1943). "Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution (in Japanese)." *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 19: 487-503.
- [7] Kao, S. S., Hsieh, F. C. (2011). "A multifaceted strain of *Bacillus amyloliquefaciens* with commercialization potential." *The 4th International Conference for Development of Integrated Pest Management (IPM) in Asia and Africa*, January 20-22, Mymensingh, Bangladesh. (oral presentation)
- [8] Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A. and Berkeley, R. C. W. (1987). "*Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. Int." *J. Sys. Bacteriol* 37: 69-71.