



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I784975 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：106134551

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 06 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12P1/04 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/07 日本

2016-199429

(71)申請人：日商史迪士生物科學股份有限公司 (日本) SDS BIOTECH K.K. (JP)

日本

(72)發明人：森下康行 MORISHITA, YASUYUKI (JP)

(74)代理人：劉法正；尹重君

(56)參考文獻：

JP 2002-176993A

期刊 Monteir SMS et al. "Enhanced spore production of Bacillus subtilis grown in a chemically defined medium" Advances in Microbiology vol.4 Scientific Research 2014/06 p.444-454

期刊 Başal A et al. "Changes in patterns of alkaline serine protease and bacilysin formation caused by common effectors of sporulation in Bacillus subtilis 168" Current microbiology vol.24 Springer-Verlag New York Inc. 1992 p.129-135

期刊 Ochi K et al. "Effect of antibiotics on sporulation caused by the stringent response in Bacillus subtilis" Microbiology vol.129 SGM 1983 p.3709-3720

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：0 共 30 頁

(54)名稱

芽孢形成細菌之培養方法及有用物質之製造方法

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種可有效率地生產芽孢之新穎培養方法，即，提供一種芽孢形成細菌之培養方法，其特徵在於在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養芽孢形成細菌，且前述培養基之碳含量為 9.1g/L 以上，又，提供一種芽孢形成細菌之培養方法，其宜進一步包含在前述培養基中添加芽孢形成促進物質之步驟。



I784975

【發明摘要】

【中文發明名稱】

芽孢形成細菌之培養方法及有用物質之製造方法

【中文】

本發明之課題在於提供一種可有效率地生產芽孢之新穎培養方法，即，提供一種芽孢形成細菌之培養方法，其特徵在於在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養芽孢形成細菌，且前述培養基之碳含量為9.1g/L以上，又，提供一種芽孢形成細菌之培養方法，其宜進一步包含在前述培養基中添加芽孢形成促進物質之步驟。

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】
(無)

【特徵化學式】
(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

芽孢形成細菌之培養方法及有用物質之製造方法

【技術領域】

【0001】本發明關於一種芽孢形成細菌之培養方法。

【先前技術】

【0002】背景技術

芽孢桿菌屬等之芽孢形成細菌被利用在生產酵素及有用物質、生產發酵食品、分解有機物、整腸劑、微生物農藥及微生物肥料等各種領域。

將芽孢形成細菌用作整腸劑及微生物農藥、微生物肥料時必須將活菌體作為有效成分添加到製品中，但一般來說多利用具優異耐久力之芽孢狀態菌體。因此，目前需求可更高效率生產芽孢之方法。

芽孢形成細菌可藉由置於適合增殖之環境而增殖，且可藉由置於適合芽孢形成之環境而於營養細胞中形成芽孢。由於芽孢數量不可能超過原本營養細胞之數量，芽孢生產性之提升至少存有下列兩種層面，即，提升營養細胞之培養生產性與提升源自營養細胞之芽孢形成率。

適合增殖之環境即意指對於該菌株而言具有充分之增殖所需營養成分，且水分量、滲透壓、溫度、pH、氧濃度等皆在落在可行增殖之範圍內。

此外，在酵素及有用物質之生產上，目前需求可更高效率地生產目的代謝物之方法。酵素及有用物質之生產性

提升至少存有下列二種層面，即，朝可高度生產目的物質之代謝狀態來誘導以及長時間維持該狀態。

迄今，提升營養細胞之培養生產性及維持高度生產代謝物之代謝狀態係藉由上述各種條件之最佳化來達成，特別是改良培養基組成及提升其濃度。

【0003】關於芽孢桿菌屬細菌之芽孢高生產技術，舉例來說，如非專利文獻1~3所例示，已有多數報告提出，但其等皆使用改良培養基組成或濃度之手法。於此等之中，非專利文獻3雖是報告最高生產性之文獻之一，但依該文獻，每1L培養基所使用之糖量約100g/L(含批式饋料份)，使用了含非常高濃度之糖的培養基。然而，若將該濃度再逐步提高，將會發生培養裝置之供氧能力無法追上需氧量之增加、營養成分長期殘留於培養基中而造成芽孢形成率低落、培養所需時間趨於長期化等弊端。此外，糖等營養成分本身也有因高濃度而顯示出增殖抑制作用之虞。更進一步來說，若培養中之營養細胞濃度提升，將會感測本身之濃度並受到切換代謝之機制「群體感應(quorum sensing)」影響而誘導芽孢形成，可能會發生不論如何提高營養成分，營養細胞皆不會增殖到特定程度以上的現象。

如上所述，提高添加到培養基中之營養成分濃度來提高培養生產性之習知手法有其限度。

【0004】另一方面，專利文獻1顯示了一種在營養細胞增殖後使溶氧濃度降低以使芽孢形成的方法。此外，專利文獻2則顯示一種在碳源消費殆盡後持續長時間培養以

使芽孢形成之方法。再者，專利文獻3顯示了一種規定培養液之磷酸鹽濃度範圍以及將供氧量及攪拌速度之範圍視為培養條件予以規定，藉此來生產芽孢的方法。然而，此等技術皆是在營養細胞形成芽孢之際給予合適條件，對於根本性提升芽孢生產性所必須之「營養細胞之高濃度增殖」並無助益。

此外，非專利文獻4中顯示了可藉由使用較增殖抑制濃度更低濃度之抗生物質來抑制芽孢桿菌屬細菌於培養過程中之芽孢化，以及可藉由對其添加德夸黴素來抵銷芽孢化之抑制效果。然而，非專利文獻4所使用之低濃度培養基(葡萄糖濃度1%、培養基中之含碳量4.0g/L)顯示，形成之芽孢濃度與所添加之抗生物質濃度呈現相依性降低，難謂其係一有助於芽孢高生產之技術。

關於利用芽孢桿菌屬細菌之有用物質生產技術，舉例來說，如專利文獻4~5所例示般已有多數報告被提出，其等皆是記載了改良培養基組成及培養條件之手法。然而，如前所述，因需氧量增加、營養成分造成增殖抑制、群體感應造成誘導芽孢形成等，提高培養基成分之濃度來提高培養生產性之手法有其限度。

又，同份專利文獻中記載了藉由轉形體及突變來取得高度生產目的代謝物之菌株的方法，但因其係使野生型菌株之遺傳性性狀發生變化，而有其他有用性質喪失或減弱之可能性。

先行技術文獻

專利文獻

【0005】[專利文獻1]日本特開2007-236286號公報

[專利文獻2]日本特開2000-217567號公報

[專利文獻3]日本特開2007-195542號公報

[專利文獻4]日本專利第3635638號

[專利文獻5]日本專利第4338080號

非專利文獻

【0006】[非專利文獻1]Biotechnology progress
2005, 21, 4, 1026-1031

[非專利文獻2]Curr Microbiol 2013,66,279-285

[非專利文獻3]Advances in Microbiology 2014, 4,
444-454

[非專利文獻4]Journal of General Microbiology
1983, 129, 3709-3720

【發明內容】

【0007】發明概要

發明欲解決之課題

如上所述，透過提高培養基濃度來提高芽孢形成細菌之芽孢生產性及代謝物等有用物質之生產性的習知手法有其限度，因此，本發明之課題在於提供一種新穎培養方法，其以新途徑提升培養中之營養細胞增殖效率，藉此可有效生產芽孢及代謝物等有用物質。

用以解決課題之手段

【0008】本案發明人為了解決上述課題而精心研

討，結果發現，使用含高濃度碳源之培養基並在芽孢形成抑制物質存在下使營養細胞增殖，之後再誘導芽孢形成，藉此，與未添加芽孢形成抑制物質時相較下可大幅提升芽孢及代謝物等有用物質之生產性，而終至完成本發明。

【0009】本發明如下。

[1]一種芽孢形成細菌之培養方法，其特徵在於包含一在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養芽孢形成細菌之步驟，且前述培養基之碳含量為9.1g/L以上。

[2]如[1]之形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成抑制物質為酶抑制劑。

[3]如[1]或[2]之芽孢製造方法，其中前述芽孢形成抑制物質係選自於由林可黴素、紅黴素、利福平、氯黴素、鏈黴素、咖啡因、咖啡酸、放線菌素、梭鏈孢酸、閏年黴素(Lipiamycin)、嘌呤黴素、大觀黴素(Spectinomycin)、四環黴素及硫鏈絲菌肽所構成群組中之一種以上。

[4]如[1]至[3]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成抑制物質之濃度係在抑制前述芽孢形成細菌增殖之增殖抑制濃度以下。

[5]如[1]至[4]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成抑制物質之濃度為15ppm以下。

[6] 如[1]至[5]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其包含一對前述培養基添加芽孢形成促進物質之步驟。

[7]如[6]之芽孢形成細菌之培養方法，其係於培養開始5~70小時後，於培養基中添加前述芽孢形成促進物質。

[8]如[6]或[7]之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成促進物質為核鹼基類似物、有機酸、胺基酸、銨化合物、硝酸化合物、亞硝酸化合物或礦物質。

[9]如[6]至[8]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成促進物質係選自於由德夸黴素(decoyinine)、咪唑立賓(Mizoribine)、黴酚(Mycophenol)、6-吡尿嘧啶、乳酸及其鹽、乙酸及其鹽、丁酸及其鹽、錳、銨、鈣、丙胺酸、精胺酸、天門冬醯胺、天門冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸、纈胺酸、乳酸銨及乙酸銨所構成群組中之1種以上。

[10]如[6]至[9]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成促進物質係以10~10,000ppm之濃度添加於培養基中。

[11]如[1]至[10]中任一項之芽孢形成細菌之培養方法，其中前述芽孢形成細菌為芽孢桿菌屬細菌。

[12]如[11]之芽孢形成細菌之培養方法，其中芽孢桿菌屬細菌係選自枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)、液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、短小芽孢桿菌(*Bacillus pumilus*)、單純芽孢桿菌(*Bacillus simplex*)、遲緩芽孢桿菌(*Bacillus lentus*)、側孢芽孢桿菌(*Bacillus laterosporus*)、蜂疫桿菌(*Bacillus alvei*)、日本甲蟲芽孢桿菌(*Bacillus popilliae*)、地衣芽孢桿菌(*Bacillus*

licheniformis)、仙人掌桿菌(*Bacillus brevis*)、嗜熱脂肪芽孢桿菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜鹼芽孢桿菌(*Bacillus alcalophilus*)、凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*)、環狀芽孢桿菌(*Bacillus circulans*)、西姆芽孢桿菌(*Bacillus siamensis*)、燦爛芽孢桿菌(*Bacillus lautus*)、克勞氏芽孢桿菌(*Bacillus clausii*)、巨大芽孢桿菌(*Bacillus megaterium*)、蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)、蠟樣芽孢桿菌(*Bacillus cereus*)、堅強芽孢桿菌(*Bacillus firmus*)、貝萊斯芽孢桿菌(*Bacillus velezensis*)、芽孢桿菌屬 *pichinotyi*(*Bacillus pichinotyi*)、酸熱芽孢桿菌(*Bacillus acidocaldarius*)、芽孢桿菌屬 *alkalicola*(*Bacillus alkalicola*)、產氮芽孢桿菌(*Bacillus azotoformans*)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、栗褐芽孢桿菌(*Bacillus badius*)、巴達維亞芽孢桿菌(*Bacillus bataviensis*)、環庚烷芽孢桿菌(*Bacillus cycloheptanicus*)、解硫胺素芽孢桿菌(*Bacillus aneurinilyticus*)、米氏芽孢桿菌(*Bacillus migulanus*)、芽孢桿菌屬 *abyssalis*(*Bacillus abyssalis*)、海岸芽孢桿菌(*Bacillus aestuarii*)、多黏芽孢桿菌(*Bacillus polymyxa*)及芽孢桿菌屬菌(*Bacillus sp.*)之芽孢桿菌屬細菌。

[13] 一種有用物質之製造方法，其特徵在於：使用如[1]至[12]中任一項之培養方法使有用物質生成。

[14] 如[13]之有用物質之製造方法，其中前述有用物質為前述芽孢形成細菌之芽孢。

[15]如[13]之有用物質之製造方法，其中前述有用物質為前述芽孢形成細菌之代謝物。

[16]如[15]之製造方法，其中前述代謝物為環狀脂肽。

[17] 如[16]之製造方法，其中前述環狀脂肽係選自由伊枯草菌素、表面素、巴斯他汀、豐原素、桿菌抗黴素、地衣素、kurstakin、抗黴枯草菌素(Mycosubtilin)、黏菌素、殺鐮孢菌素(fusaricidin)、Paenibacterin、多黏菌素及Pumilacidin所構成群組中之至少1種。

發明效果

【0010】芽孢形成細菌會因感知營養份枯竭及群體感應而將代謝狀態從營養細胞狀態下之增殖切換為芽孢形成。本發明之方法不依賴提升培養基濃度之習知手法，而是透過抑制代謝朝芽孢切換，可較一般手法更長久保持營養增殖期間，就結果而言，則可獲得高營養細胞濃度及代謝物濃度。此外，進行芽孢形成促進物質之添加以及抑制物質之去除來確保充分長度之培養期間，藉此使芽孢形成，而可根本性地增加最終芽孢生產性及代謝物等之有用物質生產性。

【實施方式】

【0011】用以實施發明之形態

本發明之芽孢形成細菌之培養方法特徵在於包含一在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養芽孢形成細菌之步驟，且前述培養基之碳源含量為9.1g/L以上。

藉由使用本發明之芽孢形成細菌之培養方法，可以良

好之生產性獲得芽孢形成細菌之芽孢及代謝物等有用物質。

【0012】於本發明中，芽孢形成細菌之種類並未特別受限，但可例示如芽孢桿菌屬細菌、類芽孢桿菌屬細菌、地芽孢桿菌(*Geobacillus*)屬細菌、梭菌屬、芽孢八疊球菌(*Sporosarcina*)屬。

【0013】芽孢桿菌屬細菌只要是被分類為芽孢桿菌屬之細菌即未特別受限，但可舉例如：枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)、液化澱粉芽孢桿菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、短小芽孢桿菌(*Bacillus pumilus*)、單純芽孢桿菌(*Bacillus simplex*)、遲緩芽孢桿菌(*Bacillus lentus*)、側孢芽孢桿菌(*Bacillus laterosporus*)、蜂疫桿菌(*Bacillus alvei*)、日本甲蟲芽孢桿菌(*Bacillus popilliae*)、地衣芽孢桿菌(*Bacillus licheniformis*)、仙人掌桿菌(*Bacillus brevis*)、嗜熱脂肪芽孢桿菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜鹼芽孢桿菌(*Bacillus alcalophilus*)、凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*)、環狀芽孢桿菌(*Bacillus circulans*)、西姆芽孢桿菌(*Bacillus siamensis*)、燦爛芽孢桿菌(*Bacillus lautus*)、克勞氏芽孢桿菌(*Bacillus clausii*)、巨大芽孢桿菌(*Bacillus megaterium*)、蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)、蠟樣芽孢桿菌(*Bacillus cereus*)、堅強芽孢桿菌(*Bacillus firmus*)、貝萊斯芽孢桿菌(*Bacillus velezensis*)、芽孢桿菌屬 *pichinotyi*(*Bacillus*

pichinoty)、酸熱芽孢桿菌(*Bacillus acidocaldarius*)、芽孢桿菌屬alkalicola(*Bacillus alkalicola*)、產氮芽孢桿菌(*Bacillus azotoformans*)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、栗褐芽孢桿菌(*Bacillus badius*)、巴達維亞芽孢桿菌(*Bacillus bataviensis*)、環庚烷芽孢桿菌(*Bacillus cycloheptanicus*)、解硫胺素芽孢桿菌(*Bacillus aneurinilyticus*)、米氏芽孢桿菌(*Bacillus migulanus*)、芽孢桿菌屬abyssalis(*Bacillus abyssalis*)、海岸芽孢桿菌(*Bacillus aestuarii*)、多黏芽孢桿菌(*Bacillus polymyxa*)或芽孢桿菌屬菌(*Bacillus sp.*)。

【0014】類芽孢桿菌屬細菌可舉如軟化類芽孢桿菌(*Paenibacillus macerans*)、溶澱粉類芽孢桿菌(*Paenibacillus amylolyticus*)、類芽孢桿菌屬peoriate(*Paenibacillus peoriate*)、類芽孢桿菌屬elgii(*Paenibacillus elgii*)等。

【0015】地芽孢桿菌屬細菌可舉如熱葡萄糖苷酶地芽孢桿菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)、解熱木糖地芽孢桿菌(*Geobacillus caldxylosilyticus*)及嗜熱脂肪地芽孢桿菌(*Geobacillus stearothermophilus*)等。

【0016】梭菌屬細菌可舉如丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、胺基丁酸梭菌(*Clostridium aminobutyricum*)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、糖乙酸多丁醇梭菌(*Clostridium*

saccharoperbutylaceticum)、熱纖梭菌(*Clostridium thermocellum*)、楊氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)及肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)等。

【0017】芽孢八疊球菌屬細菌可舉如巴氏芽孢八疊球菌(*Sporosarcina pasteurii*)、脲芽孢八疊球菌(*Sporosarcina ureae*)、嗜冷芽孢八疊球菌(*Sporosarcina psychrophila*)及耐熱芽孢八疊球菌(*Sporosarcina thermotolerans*)等。

【0018】芽孢桿菌屬細菌等之芽孢形成細菌可為非基因重組細菌亦可為基因重組細菌，但宜為不含抗生物質耐性基因之細菌。

【0019】於本發明中，有用物質意指顯示出動植物生長促進作用、殺菌/制菌作用、基因活性化作用等生理活性之物質、各種酵素、乳酸、胺基酸等產業上可活用之物質、納豆及酸酪乳等可作為食品等使用之發酵物本身，具體來說則可舉如芽孢桿菌屬細菌之芽孢及芽孢桿菌屬細菌之代謝物。芽孢桿菌屬細菌之代謝物為透過培養而生產之活菌以外之有效成分，可舉如具抗菌性及界面活性作用之環狀肽及蛋白酶、脂酶等酵素。

屬芽孢桿菌屬細菌代謝物之環狀脂肽可舉如：選自於由伊枯草菌素、表面素、巴斯他汀、豐原素、桿菌抗黴素、地衣素、kurstakin、抗黴枯草菌素、黏菌素、殺鏈孢菌素、Paenibacterin、多黏菌素及Pumilacidin所構成群組中之至少一種。

【0020】用於培養芽孢桿菌屬細菌之培養基含有碳源與氮源，但就芽孢桿菌屬細菌可進行異化之碳源而言，可例示如芽孢桿菌屬細菌可異化之糖(澱粉、葡萄糖、乳糖、丙三醇、阿拉伯糖、核糖、木糖、半乳糖、果糖、甘露糖、肌醇、甘露醇、山梨糖醇、葡萄糖胺、N-乙醯基葡萄糖胺、纖維雙糖、麥芽糖、蔗糖、海藻糖及木糖醇等)或糖源原料、醇類、有機酸、有機酸鹽、烷類或其他一般碳源，芽孢桿菌屬細菌等之芽孢形成細菌可異化之氮源則可例示如大豆來源成分、酵母來源成分、玉米來源成分、動植物蛋白質及其分解物、硝酸銨、硫酸銨、氯化銨及乙酸銨等銨鹽、氨、硝酸鈉、硝酸鉀、麩胺酸鈉及脲等。

【0021】就本發明所使用之液體培養基而言，碳含量為9.1g/L以上，且以15g/L以上為佳。更宜為18g/L以上。

另，培養基成分之中，天然系原料之碳含量可各自以全糖量之40%重量及全蛋白質量之50%重量來予以概算。全糖量可在酸中以100℃進行2.5小時水解後藉梭摩基法(Somogyi's method)而以還原糖濃度形式來予以定量。全蛋白質量則可先以凱耳達法(Kjeldahl method)進行全氮量之定量後乘以換算係數6.25來概算出蛋白質質量。

培養基之碳源濃度較低時，伴隨碳源枯竭而開始形成芽孢。此時，若添加芽孢形成抑制(延遲)物質，營養細胞狀態之菌體將會長期暴露在營養成分枯竭之下。因此，與不添加芽孢形成抑制物質時相較，營養細胞提早死亡，結果造成培養生產性降低(可想見非專利文獻4相當於此一情

況)。另一方面，培養基之碳源濃度夠高時，伴隨營養細胞增殖，因群體感應等而開始形成芽孢。此時，若添加芽孢形成抑制物質，營養增殖期間會變得較不添加芽孢形成抑制物質時更長。營養細胞增殖而大幅超出一般情況下會因群體感應等而芽孢化之菌體密度，結果使得菌體及代謝物之培養生產性提升。

另一方面，液體培養基中之碳含量上限並未特別受限，但舉例來說，碳含量以100g/L以下為宜，更宜為72g/L以下。

【0022】於本發明中，培養宜使用C/N比(碳含量與氮含量之重量比)為3~12之液體培養基。

C/N比係如下算出。

$$C/N \text{ 比} = \text{各培養基成分所含碳含量之合計} \div \text{各培養基成分所含氮含量之合計}。$$

【0023】就其他培養基成分而言，只要不對芽孢形成或目的代謝物之生產造成不良影響，也可添加通常用於培養芽孢桿菌屬細菌之微量金屬鹽等培養基成分，更可視需要添加胺基酸或維生素等。

【0024】本發明之方法係將芽孢形成抑制(延遲)物質添加至培養基中來培養芽孢形成細菌。芽孢形成抑制物質僅須為可抑制芽孢桿菌屬細菌等之芽孢形成細菌的芽孢形成即可，可舉如酶抑制劑，更具體來說，可利用林可黴素、紅黴素、利福平、氯黴素、鏈黴素、咖啡因、咖啡酸、放線菌素、梭鏈孢酸、閏年黴素、嘌呤黴素、大觀黴素、四

環黴素及硫鏈絲菌肽。

此等中有不少物質在某種濃度下會顯示出營養細胞之增殖抑制效果，但以較其低出甚多之極低濃度作使用時，可在幾乎不對營養細胞增殖顯示出抑制效果的情況下抑制芽孢形成。

【0025】於本發明之方法中，添加至培養基之芽孢形成抑制物質濃度宜在抑制前述芽孢形成細菌增殖之增殖抑制濃度以下，舉例來說，宜為15ppm以下，更宜為10ppm以下。另一方面，濃度下限僅需為可發揮芽孢形成抑制作用之濃度即可，但宜在0.01ppm以上。

舉例來說，林可黴素宜為0.05~15ppm。以0.05~1ppm為宜，更宜為0.05~0.75ppm。紅黴素宜為0.05~1ppm，利福平宜為5~10ppm，氯黴素宜為0.1~2ppm，鏈黴素宜為5~15ppm，咖啡因宜為5~10ppm，咖啡酸宜為5~10ppm，放線菌素宜為0.1~10ppm，梭鏈孢酸宜為0.1~10ppm，閏年黴素宜為0.1~10ppm，嘌呤黴素宜為0.1~10ppm，大觀黴素宜為0.1~10ppm，四環黴素宜為0.1~10ppm，硫鏈絲菌肽宜為0.1~10ppm。

【0026】芽孢形成抑制物質可於培養開始時即含在培養基中，亦可於培養途中添加。於培養途中添加時，舉例來說，宜從培養開始0~10小時之間進行添加。

宜在已添加芽孢形成抑制物質之狀態下，將芽孢桿菌屬細菌等芽孢形成細菌培養至菌體濃度呈高濃度，例如 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 以上，具體來說，則宜培養5~80小時。

【0027】另，在芽孢形成抑制物質存在之條件下進行長期培養，也有可促進芽孢形成之情況。以林可黴素的情況為例，可藉添加0.05~0.5ppm並培養40~80小時來促進芽孢形成。氯黴素的情況是，可藉添加0.1~0.5ppm並培養40~80小時來促進芽孢形成。紅黴素的情況則是可藉由添加0.05~0.2ppm並培養40~80小時來促進芽孢形成。

【0028】於本發明之方法中，也可在芽孢形成抑制物質存在之條件下將營養細胞培養至高濃度後，進行添加芽孢形成促進劑之操作。藉此，可促進芽孢形成。

【0029】於此，芽孢形成促進物質僅需為可促進芽孢桿菌屬細菌等芽孢形成細菌之芽孢形成的物質即可，可舉如核鹼基類似物、有機酸、胺基酸、銨化合物、硝酸化合物、亞硝酸化合物及礦物質等。更具體來說，可例示如德夸黴素、咪唑立賓、黴酚、6-吡尿嘧啶、乳酸及其鹽、乙酸及其鹽、丁酸及其鹽、錳、銨、鈣、丙胺酸、精胺酸、天門冬醯胺、天門冬胺酸、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸、纈胺酸、乳酸銨及乙酸銨。

【0030】由於芽孢形成促進物質在營養細胞增殖中或增殖後添加甚有效果，宜在菌體濃度為 1×10^8 /ml以上時進行添加，舉例來說，宜在芽孢形成抑制物質存在下培養5~70小時後進行添加，例如，以培養開始5~70小時後進行添加為宜。

接著，可藉由在添加有芽孢形成促進物質之狀態下，例如進行培養10~30小時來獲得高濃度之芽孢。

【0031】就芽孢形成促進物質之濃度而言，舉例來說，德夸黴素宜為10~1,000ppm，咪唑立賓宜為10~1,000ppm，黴酚宜為10~1,000ppm，6-吡尿嘧啶宜為10~1,000ppm，乳酸宜為500~10,000ppm，乙酸宜為500~10,000ppm，丁酸宜為500~10,000ppm，錳宜為100~1,000ppm，鉍宜為500~10,000ppm，鈣宜為100~1,000ppm，丙胺酸宜為500~10,000ppm，精胺酸宜為500~10,000ppm，天門冬醯胺宜為500~10,000ppm，天門冬胺酸宜為500~10,000ppm，半胱胺酸宜為500~10,000ppm，麩醯胺酸宜為500~10,000ppm，麩胺酸宜為500~10,000ppm，甘胺酸宜為500~10,000ppm，組胺酸宜為500~10,000ppm，異白胺酸宜為500~10,000ppm，白胺酸宜為500~10,000ppm，離胺酸宜為500~10,000ppm，甲硫胺酸宜為500~10,000ppm，苯丙胺酸宜為500~10,000ppm，脯胺酸宜為500~10,000ppm，絲胺酸宜為500~10,000ppm，蘇胺酸宜為500~10,000ppm，色胺酸宜為500~10,000ppm，酪胺酸宜為500~10,000ppm，纈胺酸宜為500~10,000ppm。

【0032】就其他如培養容器、培養基組成及濃度、溫度、pH、氧濃度等各種條件而言，只要是一般用於液體培養芽孢桿菌屬細菌等芽孢形成細菌之條件即可，舉例來說，可例示如在20~40℃且好氧條件(例如氧濃度15~50%)

下，一邊攪拌一邊進行培養之條件。培養基之pH宜為6.5~8.5，7.0~8.0更佳。

【0033】如此，可得高芽孢化率(例如50%以上，更宜80%以上)之芽孢桿菌屬細菌等芽孢形成細菌之菌體及芽孢桿菌屬細菌代謝物。此種高芽孢化率之芽孢桿菌屬細菌等芽孢形成細菌之菌體及芽孢桿菌屬細菌代謝物可在適當進行培養基之濃縮或去除、乾燥等操作後使用於所欲目的上。

【0034】以下，舉實施例俾更具體說明本發明，但本發明不侷限於下列實施例。

【0035】(實施例1)

<利用抑制芽孢形成之高濃度增殖(枯草芽孢桿菌)>

使用500mL三角燒瓶(附檔板)，將表1所載之培養基分別製作100mL，進行熱壓釜滅菌。此外，為了避免梅納反應，葡萄糖係另行滅菌後以無菌方式混合。

另，培養基成分中，葡萄糖、脫脂大豆粉、玉米浸液、酵母萃取之碳含量分別以全糖量之40%重量及全蛋白質質量之50%重量算出。全糖量係在酸中以100℃進行2.5小時水解後藉梭摩基法以還原糖濃度之形式來定量。全蛋白質量則先以凱耳達法進行全氮量之定量後乘以換算係數6.25來算出。

【0036】 [表1]

表 1 培養基組成

成分	製造商	濃度(g/L)
葡萄糖	和光純藥	12.500
脫脂大豆粉	AJINOMOTO HEALTHY SUPPLY CO., INC.	10.000
玉米浸液	Roquette	2.500
酵母萃取	Difco	2.000
MnCl ₂ · 4H ₂ O	和光純藥	0.090
NaCl	和光純藥	0.500
KH ₂ PO ₄	和光純藥	0.250
MgSO ₄ · 7H ₂ O	和光純藥	0.313
CaCl ₂	和光純藥	0.094
FeSO ₄	和光純藥	0.00019
碳含量		9.1
氮含量		1.1

【0037】 如表2所載般設定試驗區。依各試驗區之條件，將經過濾器滅菌之芽孢形成抑制物質水溶液以無菌方式添加至培養基。自生長在普通洋菜培養基上之枯草芽孢桿菌MBI-600之菌落刮取1接種環並植菌後，於30℃且150rpm下進行64小時振盪培養。

【0038】 就所得培養液以滅菌水稀釋至10倍後，使用光學顯微鏡及細菌用細胞計數器計測出菌體濃度(營養細胞及芽孢)及芽孢形成率(芽孢濃度÷菌體濃度)。茲將結果示於表2。

【0039】[表2]

表 2 試驗結果

試驗區 編號	所添加之芽孢 形成抑制物質	添加濃度 (ppm)	菌體濃度 (/mL)	芽孢 形成率	芽孢濃度 (/mL)
1	-	-	3.2e+9	87%	2.8e+9
2	林可黴素	0.1	4.7e+9	100%	4.7e+9
3	林可黴素	1.0	7.0e+9	0%	-
4	紅黴素	0.1	3.5e+9	80%	2.8e+9
5	紅黴素	1.0	6.2e+9	0%	-
6	鏈黴素	12.5	4.3e+9	100%	4.3e+9
7	鏈黴素	15.0	5.5e+9	54%	3.0e+9

【0040】雖然在林可黴素濃度為0.1ppm之試驗區中未見對芽孢形成之抑制效果，但在1ppm之試驗區則可見到對芽孢形成之抑制效果。另一方面，菌體濃度顯示出呼應林可黴素濃度而增高之傾向。

同樣地，在紅黴素濃度為0.1ppm之試驗區中未見對芽孢形成之抑制效果，但在1ppm之試驗區則可見到對芽孢形成之抑制效果。另一方面，菌體濃度顯示出呼應紅黴素濃度而增高之傾向。

此外，在鏈黴素濃度為12.5ppm之試驗區中未見對於芽孢形成之抑制效果，但在15.0ppm之試驗區則可見到對芽孢形成之抑制效果。另一方面，菌體濃度顯示出呼應鏈黴素濃度而增高之傾向。

【0041】(實施例2)

<因抑制芽孢形成而造成之營養細胞高濃度增殖與因誘導芽孢形成而造成之芽孢高度生產(枯草芽孢桿菌)>

使用500mL三角燒瓶(附檔板)，將表1所載之培養基分別製作100mL，進行熱壓釜滅菌。此外，為了避免梅納反

應，葡萄糖係另行滅菌後以無菌方式混合。

如表3所載般設定試驗區。依各試驗區之條件，將經過濾器滅菌之芽孢形成抑制物質水溶液以無菌方式添加至培養基。自生長在普通洋菜培養基上之枯草芽孢桿菌MBI-600之菌落刮取1接種環並植菌後，於30℃且150rpm下進行64小時振盪培養。

【0042】從培養開始經過16小時後，依各試驗區之條件添加芽孢形成促進物質後繼續培養。從培養開始經45小時後停止培養。

就所得培養液以滅菌水稀釋至10倍後，使用光學顯微鏡及細菌用細胞計數器計測出菌體濃度(營養細胞及芽孢)及芽孢形成率(芽孢濃度÷菌體濃度)。茲將結果示於表3。

【0043】[表3]

表 3 試驗結果

試驗區 編號	所添加之 芽孢形成 抑制物質	添加 濃度 (ppm)	所添加之 芽孢形成 促進物質	添加濃度 (ppm)	菌體濃度 (/mL)	芽孢 形成率	芽孢濃度 (/mL)
1	-	-	-	-	3.2e+9	87%	2.8e+9
2	-	-	乳酸銨	3,000	5.2e+9	91%	4.8e+9
3	-	-	乙酸銨	3,000	4.6e+9	91%	4.2e+9
4	林可黴素	0.3	-	-	3.3e+9	80%	2.7e+9
5	林可黴素	0.5	-	-	4.4e+9	0%	-
6	林可黴素	1.0	-	-	5.1e+9	0%	-
7	林可黴素	2.0	-	-	5.9e+9	0%	-
8	林可黴素	0.3	乳酸銨	3,000	5.6e+9	91%	5.1e+9
9	林可黴素	0.5	乳酸銨	3,000	7.2e+9	79%	5.7e+9
10	林可黴素	0.5	乙酸銨	2,000	6.4e+9	64%	4.1e+9
11	林可黴素	0.5	乙酸銨	3,000	7.6e+9	71%	5.4e+9
12	林可黴素	0.5	乙酸銨	4,000	8.4e+9	72%	6.1e+9
13	氯黴素	1.4	-	-	5.4e+9	0%	-
14	氯黴素	1.4	德夸黴素	200	5.4e+9	76%	4.1e+9

【0044】雖然在林可黴素濃度為0.3ppm之試驗區中

未見對芽孢形成之抑制效果，但在0.5ppm之試驗區則可見對芽孢形成之抑制效果。另一方面，菌體濃度顯示出呼應林可黴素濃度而增高之傾向。

在添加乳酸銨作為芽孢形成物質之試驗區中，無論林可黴素濃度，與未添加時相較，皆可在芽孢形成率上見到改善。尤其是在林可黴素濃度0.3ppm及0.5ppm且添加了乳酸銨之試驗區，與未添加之試驗區相較，芽孢之生產性皆大幅提高。

在林可黴素濃度為0.5ppm且添加了乙酸銨之試驗區中，可見菌體濃度及芽孢形成率有呼應乙酸銨添加量而增加之傾向。與未添加之試驗區相較，皆顯示出芽孢之生產性大幅提高。

在氯黴素濃度為1.4ppm之試驗區中，雖可見對芽孢形成之抑制效果，但除了氯黴素之外，途中添加了德奎黴素之區可在芽孢形成率見到改善，與未添加之試驗區相較，芽孢之生產性皆獲提升。

【0045】(實施例3)

<因抑制芽孢形成而造成之營養細胞高濃度增殖與芽孢高度生產(蘇雲金芽孢桿菌)>

使用500mL三角燒瓶(附檔板)，將表1所載之培養基分別製作100mL，進行熱壓釜滅菌。此外，為了避免梅納反應，葡萄糖係另行滅菌後以無菌方式混合。

如表4所載般設定試驗區。依各試驗區之條件，將經過濾器滅菌之芽孢形成抑制物質水溶液以無菌方式添加至

培養基。自生長在普通洋菜培養基上之蘇雲金芽孢桿菌 NBRC 101235 菌株之菌落刮取 1 接種環並植菌後，於 30℃ 且 150rpm 下進行 40 小時振盪培養。

【0046】就所得培養液以滅菌水稀釋至 10 倍後，使用光學顯微鏡及細菌用細胞計數器計測出菌體濃度(營養細胞及芽孢)及芽孢形成率(芽孢濃度÷菌體濃度)。茲將結果示於表 4。

【0047】[表 4]

表 4 試驗結果

試驗區 編號	所添加之芽孢 形成抑制物質	添加濃度 (ppm)	菌體濃度 (/mL)	芽孢形成率	芽孢濃度 (/mL)
1	-	-	1.0e+9	54%	5e+8
2	林可黴素	5.0	1.4e+9	86%	1.2e+9
3	林可黴素	10.0	1.4e+9	71%	1.0e+9
4	林可黴素	12.5	9e+8	13%	1e+8
5	氯黴素	2.0	1.6e+9	79%	1.3e+9
6	氯黴素	6.0	8e+6	0%	-
7	紅黴素	0.05	1.5e+9	73%	1.1e+9
8	紅黴素	0.1	2.0e+9	16%	3e+8

【0048】在林可黴素濃度為 12.5ppm 之試驗區中可見對芽孢形成之抑制效果。另一方面，在 10.0ppm 以下之試驗區中，菌體濃度與及芽孢濃度顯示出增高之傾向。

氯黴素濃度 6.0ppm 時可見對增殖及芽孢形成之抑制效果。另一方面，於 2.0ppm 之試驗區中，菌體濃度及芽孢濃度顯示出增高之傾向。

紅黴素濃度 0.1ppm 時可見對芽孢形成之抑制效果。另一方面，於 0.05ppm 之試驗區中，菌體濃度及芽孢濃度顯示出增高之傾向。

藉由添加特定量之抗生物質使菌體濃度提升且進行

充分時間(40小時)之培養，無須添加芽孢化促進物質即可成功提高芽孢之生產性。

【0049】(實施例4)

<因抑制芽孢形成而造成之表面素高度生產(枯草芽孢桿菌)>

使用500mL三角燒瓶(附檔板)，將表5所載之培養基分別製作100mL，進行熱壓釜滅菌。此外，為了避免梅納反應，葡萄糖係另行滅菌後以無菌方式混合。

如表6所載般設定試驗區。依各試驗區之條件，將經過濾器滅菌之芽孢形成抑制物質水溶液以無菌方式添加至培養基。依各試驗區之條件，自生長在普通洋菜培養基上之枯草芽孢桿菌MBI-600之菌落刮取1接種環並植菌後，於30℃且150rpm下進行振盪培養。

【0050】[表5]

表 5 培養基組成

成分	製造商	濃度(g/L)
葡萄糖	和光純藥	25.000
脫脂大豆粉	AJINOMOTO HEALTHY SUPPLY CO., INC.	20.000
玉米浸液	Difco	5.000
酵母萃取	Roquette	4.000
MnCl ₂ · 4H ₂ O	Difco	0.180
NaCl	和光純藥	1.000
KH ₂ PO ₄	和光純藥	0.500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	和光純藥	0.625
CaCl ₂	和光純藥	0.188
FeSO ₄	和光純藥	0.00038
碳含量		18.2
氮含量		2.2

【0051】從培養開始經過50小時後，停止培養。

就所得培養液使用冷卻離心機使用冷卻離心機(TOMY SEIKO CO.,LTD.製MX-307)，以10,000rpm、20℃進行30分鐘離心分離後回收上清液。

於固相萃接管柱(Nihon Waters K.K.製，Oasis HLB 3cc(400mg)LP Extraction Cartridge)中加入含0.1%TFA之乙腈3mL並使其通過後，加入含0.1%TFA之蒸餾水3mL並使其通過。加入所回收之培養液離心上清液2mL使其通過，再依序使含0.1%TFA之蒸餾水6mL、含0.1%TFA之乙腈/蒸餾水(20:80, v/v)3mL依序通過並洗淨。接著，使含0.1%TFA之乙腈/蒸餾水(90:10, v/v)3mL通過，回收溶出液。添加含0.1%TFA之乙腈/蒸餾水(90:10, v/v)，使回

收液成為4mL，於下列條件下進行HPLC分析。

HPLC：安捷倫科技股份有限公司 1260 Infinity

管柱：Nihon Waters K.K. XBridge C18 5 μ m 4.6 x
250mm

移動相：A：含0.1%TFA之蒸餾水、B：含0.1%TFA
之乙腈

0~5分鐘 A80%/B20%

5~25分鐘 A80%/B20%→B100%

25~30分鐘 B100%

30~40分鐘 A80%/B20%

流量：1mL/分鐘

溫度：40℃

檢測：UV205nm

注入量：20 μ L

標準品：Surfactin Sodium Salt(和光純藥工業股份
有限公司)

濃度：30ppm、120ppm

溶劑：含0.1%TFA之乙腈/蒸餾水(90:10, v/v)

就溶出時間27.6分鐘及28.4分鐘所檢測出之尖峰面
積，經由與標準品比較而算出培養液中之表面素濃度。

茲將結果示於表6。

【0052】[表6]

表 6 試驗結果

試驗區 編號	所添加之芽孢 形成抑制物質	添加濃度 (ppm)	菌體濃度 (/mL)	芽孢 形成率	芽孢濃度 (/mL)	表面素 濃度 (ppm)
1	-	-	5.8e+9	100%	5.8e+9	38.4
2	紅黴素	0.1	8.1e+9	99%	8.0e+9	58.5
3	紅黴素	0.2	6.9e+9	100%	6.9e+9	75.7

【0053】紅黴素濃度在0.1ppm及0.2ppm時芽孢濃度與表面素濃度顯示出增高之傾向。

藉由添加特定量之抗生物質，不僅止於芽孢，也成功提升了屬有用物質之表面素的生產性。

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)之培養方法，特徵在於包含一在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養枯草芽孢桿菌40~80小時之步驟，前述芽孢形成抑制物質是選自於0.1~0.3ppm之林可黴素及0.1~0.2ppm之紅黴素，且前述培養基之碳含量為9.1g/L以上。

【第2項】 一種蘇雲金芽孢桿菌(*Bacillus thuringiensis*)之培養方法，特徵在於包含一在培養基中添加芽孢形成抑制物質來培養蘇雲金芽孢桿菌40~80小時之步驟，前述芽孢形成抑制物質是選自於5.0~10.0ppm之林可黴素、2.0ppm之氯黴素及0.05ppm之紅黴素，且前述培養基之碳含量為9.1g/L以上。

【第3項】 一種枯草芽孢桿菌之培養方法，包含如下步驟：將0.3~0.5ppm之林可黴素添加在碳含量為9.1g/L以上之培養基中並培養枯草芽孢桿菌5~70小時後，對前述培養基以2000~4000ppm之濃度添加芽孢形成促進物質並再進一步培養，前述芽孢形成促進物質是選自於乳酸銨及乙酸銨。

【第4項】 一種有用物質之製造方法，特徵在於：使用如請求項1至3中任一項之培養方法使有用物質生成。

【第5項】 如請求項4之有用物質之製造方法，其中前述有用物質為前述芽孢桿菌屬細菌之芽孢。

【第6項】 如請求項4之有用物質之製造方法，其中

第 106134551 號專利申請案申請專利範圍替換本 修正日期：111 年 3 月 16 日

前述有用物質為前述芽孢桿菌屬細菌之代謝物。

【第7項】 如請求項6之製造方法，其中前述代謝物為環狀脂肽。

【第8項】 如請求項7之製造方法，其中前述環狀脂肽係選自由伊枯草菌素、表面素、巴斯他汀、豐原素、桿菌抗黴素、地衣素、kurstakin、抗黴枯草菌素(Mycosubtilin)、黏菌素、殺鐮孢菌素(fusaricidin)、Paenibacterin、多黏菌素及Pumilacidin所構成群組中之至少1種。