

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

利用基質黏度改變培養吸水鏈黴菌生產雷帕黴素

與超臨界流體萃取之探討

Effects of cell morphology control by viscosity adjustment on rapamycin
production and supercritical fluid extraction of rapamycin from
Streptomyces hygroscopicus.

研究生：李詠琳 撰

Graduate student : Yung-Lin Li

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

中文摘要

雷帕黴素(Rapamycin)為現存已知之有效免疫抑制劑，且近期發現具有抗腫瘤與延緩老化之功效。本研究以吸水鏈黴菌(*Streptomyces hygroscopicus*)作為實驗菌株發酵生產 Rapamycin，Rapamycin 屬於發酵二級代謝物，由於鏈黴菌之生理型態影響二級代謝物的生產，因此本研究藉由調控培養基之黏度，以改變並觀察菌種在培養時出現的各種菌落型態，篩選出高產量之 Rapamycin 培養條件並利用不同發酵策略進行提高產量之發酵程序。

本研究中，利用 Carboxymethyl cellulose (CMC)調整黏度，使培養基中的黏度提升以降低菌體顆粒大小，並提升 Rapamycin 產量。結果顯示，在 5L 攪拌式發酵槽發酵程序中添加 3 g/L CMC，相較於未添加 CMC 之控制組(260 mg/L)，得到較高 Rapamycin 濃度(510 mg/L)。並且利用氣舉式發酵槽進行通氣量測試，其中添加 CMC 3 g/L 且設定通氣流量變化為 (1 vvm、1.5 vvm、2 vvm)。在 2 vvm 之通氣量設定下，得到較高 Rapamycin 濃度(723 mg/L)。比較結果發現，利用改變黏度及提高通氣量之發酵策略使得氣舉式發酵槽相較於攪拌式具有更大潛力應用於未來之規模放大生產中。

發酵策略後，本研究利用超臨界萃取法萃取純化 Rapamycin，並與傳統萃取法做比較，以 HPLC 圖譜中之主峰面積為比較依據。研究結果發現兩段式添加共溶劑(甲醇& DMSO)之超臨界狀態萃取法能有效地從 *St. hygroscopicus* 乾菌體中萃取出 Rapamycin，使用 DMSO 作為共溶劑，其 Rapamycin 之回收率為 97.2%，且相較傳統萃取法，具有較好之純化效果，並於 HPLC 圖譜中得到 79.5% 之面積。

關鍵字：雷帕黴素、羧甲基纖維素、黏度、吸水鏈黴菌、氣舉式發酵槽



Abstract

Rapamycin and its analogs are clinically important macrolide compounds produced by *Streptomyces hygroscopicus*. They are proven to have antifungal, immunosuppressive, antitumor, neuroprotective and antiaging functions.

Rapamycin is a triene macrolide antibiotic. The production of antibiotics by filamentous organisms is often dependent on the morphology and size distribution of the pellet population within the culture. And an increase in viscosity by adding carboxymethylcellulose (CMC) could reduce pellet size and increase rapamycin production in the cultivation by pellet-form of *St. hygroscopicus* were investigated in this study. A maximum yield of 510 mg/L of rapamycin was obtained when 3 g/L of CMC was added to a 5 L agitation bioreactor, as compared to 260 mg/L in the control batch (without the addition of CMC). Using an airlift bioreactor instead of an agitation tank can avoid the break-down of pellets due to the high shear force with the latter. The results indicate that an aeration rate of 2 vvm could achieve the maximum rapamycin production of 723 mg/L in an airlift bioreactor with 3 g/L of CMC adding. The application of both viscosity control and an airlift bioreactor has great potential with regard to commercialized rapamycin production.

Finally, this study developed a supercritical extraction process of rapamycin. The results showed that the two-stage of supercritical process combined with adding co-solvent has better purification utility as compared to traditional solvent extraction method under the spectrum analysis of HPLC.

Keywords: Rapamycin, CMC, Viscosity, *St. hygroscopicus*, Airlift

謝誌

經過了三個夏天，終於在 2014 今年夏天，我從 203 實驗室畢業了！！這篇謝誌好像在發表得獎感言……。

首先，我要感謝我的爸媽，謝謝他們對我的選擇毫不保留的支持，我才能心無旁騖的安心完成我的學業！擁有家人的陪伴和支持，人生是最幸福的。然後，謝謝 顏宏偉老師，在大一的時候，就開始給我另類的支持與鼓勵。讓我在升大三的暑假，有幸能進到老師的 203 大家庭，謝謝一開始進到實驗室帶領我的學長姊，娟娟、LACO、西瓜學姊、小欣、鴨子、金門、芒果、義成、金杉、嘉豪學長，若沒有他們一開始的照顧與教導，就不可能有今年順利畢業的我。更要感謝，203 實驗室共艱苦共患難的同伴們！毛毛、容慈、小孟、阿凱、CEO、BB，還有後進的同伴，車、于婷、Pin-Pin Chen、國智、俊星、奕璋，無論是在實驗中期的迷惘時期或實驗後期的暴走階段，大家給我的支持和鼓勵，我都牢牢記在心裡。就算畢業了，203 的歡樂和大家一起熱烈討論的景象，都讓我畢生難忘。

還有最後，要感謝在這大學和研究所的五年中幫助過我和照顧過我的人，姿錦，絕對沒有忘記你喔！謝謝你在我獨自做實驗的時候，還會特地跑上來看看我。需要感謝的人太多，無法一一列舉，因為有你們的相處陪伴，才能成就我今天所有的一切，謝謝大家。

最後的最後，給還在為了實驗掙扎的各位：加油！確信目標就在眼前，努力朝向它奔跑吧！最後成功的甜蜜果實，一定是屬於你們的！

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
謝誌.....	IV
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XIII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 菌種介紹.....	3
2.1.1 放線菌(<i>Actinobacteria</i>).....	4
2.1.2 鏈黴菌(<i>streptomycete</i>).....	6
2.2 Rapamycin 介紹.....	7
2.2.1 抗真菌.....	7
2.2.2 免疫抑制劑與抗腫瘤.....	8
2.2.3 延緩衰老.....	9
2.3 基質的選擇.....	9
2.3.1 碳源與氮源影響.....	10
2.3.2 菌體型態.....	11
2.3.3 合成路徑與作用機制.....	13
2.4 發酵策略.....	17

2.4.1 攪拌式發酵槽.....	17
2.4.2 氣舉式發酵槽.....	18
2.4.3 批次發酵(Batch)之發酵策略.....	19
2.5 超臨界流體簡介.....	21
2.5.1 超臨界流體定義.....	21
2.5.2 超臨界流體性質.....	22
2.5.3 影響超臨界流體萃取之因素.....	22
2.6 文獻產值.....	28
第三章 材料與方法.....	29
3.1 實驗材料.....	29
3.1.1 實驗菌株.....	29
3.1.2 實驗藥品.....	30
3.2 實驗儀器.....	31
3.3 分析方法.....	32
3.3.1 菌體濃度分析方法.....	32
3.3.2 醣類濃度分析方法.....	32
3.3.3 葡萄糖濃度分析方法.....	33
3.3.4 代謝產物濃度分析方法.....	33
3.4 實驗方法.....	34
3.4.1 菌種保存.....	34
3.4.2 培養基組成.....	35
3.4.3 接菌.....	36

3.5 實驗架構.....	37
3.6 實驗培養條件(Fermentation process).....	38
3.6.1 搖瓶批次發酵程序(Flasks – Batch experiment)	38
3.6.2 搖瓶饋料批次發酵程序.....	41
3.6.3 5L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 (5L Stirred tank bioreactor)	42
3.6.4 5L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 (5L Air-lift bioreactor).....	43
3.7 Rapamycin 萃取與純化條件(Purification process).....	46
3.7.1 溶劑萃取.....	46
3.7.2 超臨界萃取與純化.....	46
第四章 結果與討論.....	53
4.1 搖瓶批次發酵程序(Flasks – Batch experiment)	53
4.1.1 培養時間之影響.....	53
4.1.2 菌種老化程度之影響.....	54
4.1.3 不同碳源與碳源濃度之影響.....	57
4.1.4 添加 10 g/L 甘油作為組合原料之影響.....	62
4.1.5 混和碳源與單一碳源之比較.....	64
4.1.6 添加 CMC 造成不同黏度之影響.....	66
4.2 搖瓶饋料批次發酵程序.....	69
4.2.1 以碳氮源為饋料之影響.....	69
4.3 5L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 (Stirred tank bioreactor)	71
4.3.1 添加 CMC 之影響.....	71
4.4 5L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 (5L Air-lift bioreactor).....	74

4.4.1 控制通氣量之影響.....	74
4.4.2 比較攪拌式與氣舉式發酵槽之批次發酵程序.....	77
4.5 Rapamycin 萃取與純化條件(Purification process).....	81
4.5.1 溫度及壓力對於超臨界萃取 Rapamycin 之影響	81
4.5.2 共溶劑(Co-Solvent)對於超臨界萃取 Rapamycin 之影響	82
4.5.3 兩段式加入共溶劑對於超臨界萃取 Rpamycin 之純度影響	84
第五章 結論與未來展望.....	92
5.1 結論.....	92
5.2 未來展望.....	94
參考文獻.....	95
附錄.....	103
作者簡歷.....	106

圖目錄

圖 2-1 放線菌之生長週期	4
圖 2-2 產物 Rapamycin 結構式	7
圖 2-3 掃描式電子顯微鏡下的鏈黴菌形態 (石信德、黃振文, 2005)	11
圖 2-4 40 倍顯微鏡下的菌體顆粒-1	11
圖 2-5 40 倍顯微鏡下的菌體顆粒-2	11
圖 2-6 Rapamycin 可能的生物合成途徑和有關 Rapamycin 的生物合成前體的相 關代謝途徑	13
圖 2-7 Rapamycin 的結構與其相似物	14
圖 2-8 細胞中 rapamycin 作用機制示意圖	14
圖 2-9 Rapamycin 合成路徑圖	15
圖 2-10 BioFlo 6000 移動式發酵槽與電腦控制系統	18
圖 2-11 氣舉式發酵槽槽體	19
圖 2-12 物質三相圖	21
圖 2-13 超臨界二氧化碳之壓力與密度變化 (Filippi et al., 1982)	23
圖 3-1 <i>St. hygroscopicus</i> 之生資中心產品說明書	29
圖 3-2 菌種保存流程	34
圖 3-3 氣舉式發酵槽裝置圖	52
圖 3-4 攪拌式發酵槽裝置圖	52

圖 4-1 培養時間對於菌體生長與 Rapamycin 生產之關係.....	54
圖 4-2 種菌在不同的老化時間發酵培養，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響	56
圖 4-3 種菌活化 60 小時，培養 24 小時.....	56
圖 4-4 種菌活化 72 小時，培養 24 小時.....	56
圖 4-5 使用果糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。.....	59
圖 4-6 使用澱粉做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。.....	59
圖 4-7 使用葡萄糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。.....	59
圖 4-8 使用甘露糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。.....	59
圖 4-9 不同碳源對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。.....	60
圖 4-10 不同果糖濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。.....	60
圖 4-11 不同澱粉濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。.....	61
圖 4-12 不同甘油濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。.....	61
圖 4-13 添加 10 g/L 之甘油作為組合原料，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。	63
圖 4-14 使用兩種不同比例濃度碳源，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。	65
圖 4-15 添加不同濃度之 CMC，形成不同黏度之發酵培養基，對菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影響。.....	67

圖 4-16 不同黏度之發酵培養基，對菌體直徑與 Rapamycin 濃度之影響。.....	68
圖 4-17 添加不同濃度之 CMC，形成不同黏度之發酵培養基，其菌體顆粒直徑 變化與 Rapamycin 生長濃度之對照。.....	68
圖 4-18 以不同種類之濃縮碳氮源為饋料成分，在控制組(Control)生長第 96 小 時後添加饋料，觀察饋料成分對菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影 響。.....	70
圖 4-19 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之 Rapamycin 生長濃 度與控制組(未添加)比較.....	72
圖 4-20 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之 pH 變化曲線比較	72
圖 4-21 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之菌體生長濃度比較	73
圖 4-22 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之碳源消耗曲線比較	73
圖 4-23 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之 Rapamycin 生長濃 度比較。(皆添加 3 g/L CMC).....	75
圖 4-24 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之 pH 值變化比較。 (皆添加 3 g/L CMC).....	75
圖 4-25 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之菌體生長濃度比較。	

(皆添加 3 g/L CMC).....	76
圖 4-26 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發 酵程序下之 Rapamycin 生長濃度比較。	78
圖 4-27 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發 酵程序下之菌體生長濃度比較。	70
圖 4-28 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發 酵程序下之 pH 變化曲線比較。	79
圖 4-29 共溶劑種類對超臨界萃取 Rapamycin 之影響	83
圖 4-30 兩段式超臨界萃取純化 Rapamycin 之流程圖	85
圖 4-31 原始乾燥菌粉萃取液於 LC 之分析圖譜	86
圖 4-32 經兩段式超臨界萃取後之 DMSO 萃取液於 LC 之分析圖譜	87
圖 4-33 Rapamycin 標準品於 LC-MASS 之分析圖譜	88
圖 4-34 常溫常壓下萃取乾燥菌粉之甲醇萃取液於 LC-MASS 之分析圖譜	89
圖 4-35 共溶劑 DMSO 超臨界萃取物於 LC-MASS 之分析圖譜	90
圖 4-36 經兩段式超臨界萃取之 DMSO 萃取物於 LC-MASS 之分析圖譜	91

表目錄

表 2-1 吸水鏈黴菌之科學分類	3
表 2-2 流體其密度、黏度、擴散係數在相態間之變化值	22
表 2-2 文獻產值表	28
表 3-1 實驗藥品清單	30
表 3-2 實驗儀器清單	31
表 3-3 固態(左)與液態(右)種菌培養基	35
表 3-4 發酵培養基	36
表 4-1 種菌在不同的老化時間發酵培養，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響	56
表 4-2 比較攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在不同通氣量下之 Rapamycin 產率	78
(添加 3 g/L CMC)	78
表 4-3 文獻與本研究成果之產值比較	80

第一章 緒論

雷帕黴素(Rapamycin)，最早是被發現具有抑制 *Candida albicans*、*Microsporium gypseum* 和 *Trichophyton granulosum* 生長的效果。而後來的研究發現，Rapamycin 及其衍生物最被期待的是它們免疫抑制及減少腫瘤(癌細胞)產生的特性。近來，Rapamycin 更被證實具有延緩小鼠老化的功效，可望將來能被利用於延緩人類的衰老。

而吸水鏈黴菌(*St. hygrosopicus*)為生產雷帕黴素(Rapamycin)之主要菌種。為放線菌門，屬於絲狀微生物，在發酵液中具有在一定參數條件範圍內改變生長形態的特性。例如：剪切速率、接種量、培養液的流變性質、溶氧量、及有效的營養物質和培養容器的設計等，皆會影響絲狀微生物在發酵液中的形態，並間接影響發酵產物的生成。在大部分的放線菌發酵過程中，菌體若處於不斷變化的培養環境，則形態的改變程度也會不同。抗生素的發酵生產則需要解決養分的傳輸問題、培養基的代謝和高溶氧(DO)的環境。則發展一個新的發酵過程，控制策略是必要的，好的控制策略保持溶氧在一個最佳的水平，並誘導有機體從初級代謝物轉換成次級代謝物。有效的發酵策略能促使 Rapamycin 生產量的提升，達到最佳化培養環境，使得整體發酵時間縮短並同時使產率提升的目的。

超臨界萃取法，特別是超臨界二氧化碳，被稱為綠色溶劑，是近幾年來醫藥產業應用於藥物粒子工程及純化效能研究的趨勢。超臨界萃取法具有減少萃取劑用量，及減少藥物毒性殘留的優勢。影響超臨界流體萃取效率之主要因素可分為：壓力、溫度、共溶劑(Co-solvent)種類、共溶劑添加量、流體流速與萃取時間等。通過上述幾種因素的探討，超臨界萃取可用於多種物質的分離純化，以達成縮短製程與提升產物純度之目標。



第二章 文獻回顧

2.1 菌種介紹

吸水鏈黴菌(*St. hygrosopicus*)，最早是在復活節島上的土壤樣品中被分離出的白色念珠菌菌絲體和孢子，並分離純化其生產的抗生素，且被發現有抑制 *Candida albicans*、*Microsporium gypseum* 和 *Trichophyton granulosum* 生長的特性，然而分離出具有抑制菌體生長活性的物質，被取名為 Rapamycin (Sehgal et al., 1975)。

表 2-1 吸水鏈黴菌之科學分類：

Scientific classification 科學分類	中文名稱	英文名稱
Kingdom(域):	細菌域	<i>Bacteria</i>
Phylum(門):	放線菌門	<i>Actinobacteria</i>
Class(綱):	放線菌綱	<i>Actinobacteria</i>
Order(目):	放線菌目	<i>Actinomycetales</i>
Family(科):	鏈黴菌科	<i>Streptomycetaceae</i>
Genus(屬):	鏈黴菌屬	<i>Streptomyces</i>
Species(種):	<i>S. hygrosopicus</i>	<i>S. hygrosopicus</i>

(維基百科)

2.1.1 放線菌(Actinobacteria)

細菌與絲狀的真菌由於許多形態及其它生理上的差異，被分為截然不同的兩類。然而，界於此兩類之間，卻有一過渡性微生物，那就是放線菌 (*actinomycerea*)。放線菌是單細胞的微生物，可以產生細長，分枝的菌絲 (mycelium)，此菌絲能夠進行分段(fragmentation)，或再分(subdivision)而成為無性的孢子(asexual spores)。

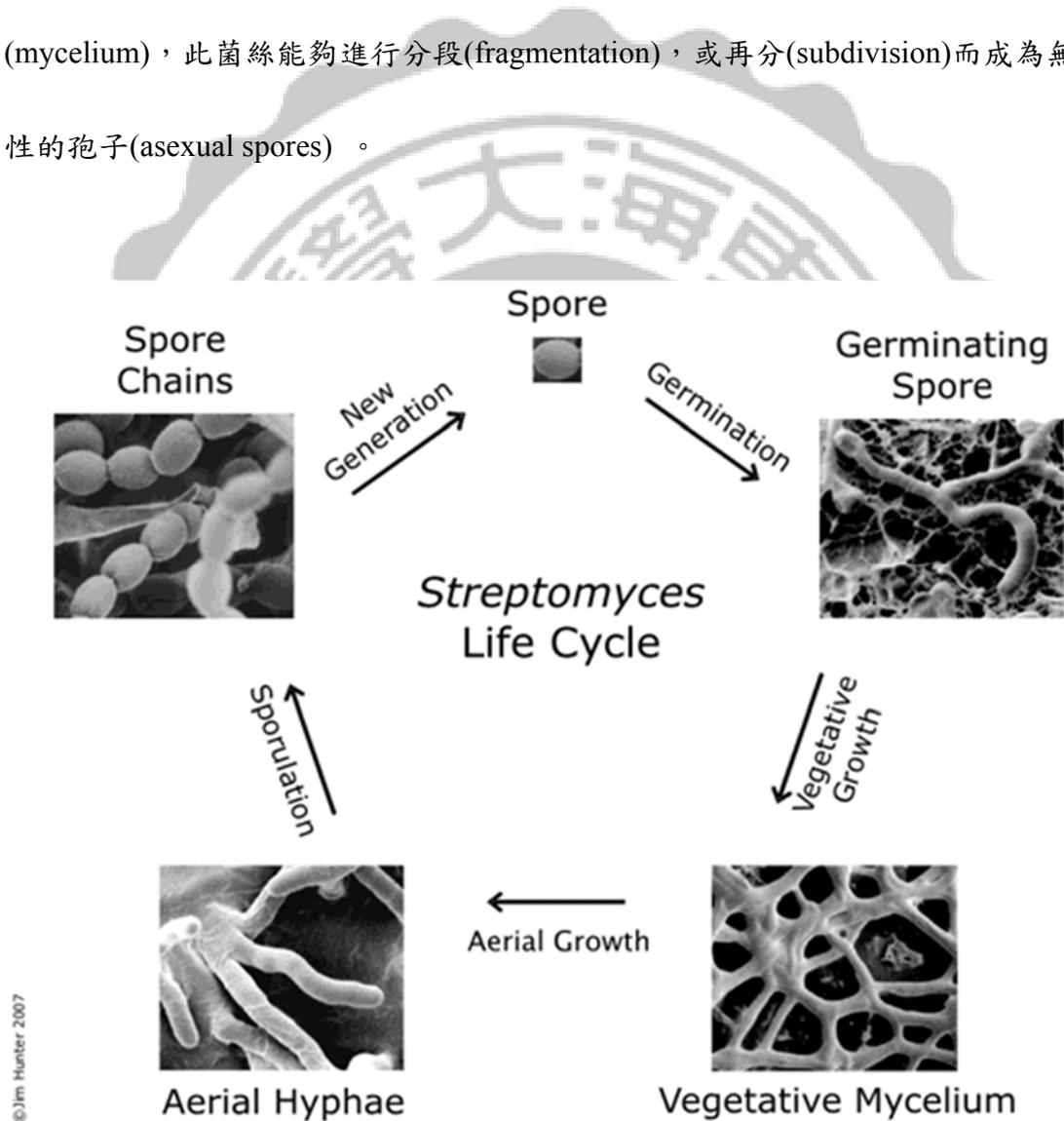


圖 2-1 放線菌之生長週期 (Mc, 1954)

放線菌除了以營養的方法(vegetative means)繁殖外，有些可產生無性的孢子，叫做分生孢子(conidia)，但是放線菌並沒有所謂的有性孢子時期。

放線菌與真菌，特別是不完全菌(fungi imperfecti)，有四點很明顯的關係存在；(1) 較高等放線菌具有類似黴菌(mold)的完全分枝的菌絲。(2) 許多放線菌和真菌一樣可形成棲息於空中的菌絲及分生孢子。(3) 放線菌在液體培養基中培養，並不會像細菌般地造成混濁，反之，卻表現出明顯的塊狀。(4) 若把某些放線菌放在完全不加限制的優良條件下生長，其生長速度並不像一般細菌成指數(exponential)的增加，而是立方的(cubic)增加。

放線菌多數是處在孢子時期，孢子對於不適的環境具有抗力，能在菌絲不能生存的環境下繼續維持生命。但是放線菌的孢子對熱的抗力不如細菌的內孢子來得大，且不活動的孢子之致死溫度也只高於菌絲數度而已。

放線菌的種類很多，廣泛的分布在土壤中，堆肥中，污泥中及湖底。它們既可存在於土表，亦可生存在相當深的土壤中，其數量僅次於細菌。在 pH 高的地帶，土壤中的微生物大多數是放線菌。無論是定性的或是定量的，放線菌都受到其棲息環境的影響，主要影響是有機物質的狀態，pH 值，溫度及濕度，此外，季節的變換，土壤的深度亦有不小的影響力。

放線菌中有許多菌株可以形成有毒的代謝物；幾乎 3/4 以上的菌株能產生抗生素(antibiotics)，其中知名度高的有鏈黴素(streptomycin)、氯黴素(chloramphenicol)、金黴素(chlorotetracycline)、土黴素(oxytetracycline)等。由於放

線菌的發酵產物極具商業價值，所以相關的研究非常多。但是，研究的目標主要是放線菌的發酵生化學及藥理學二方面，所以對於放線菌在自然界的功能，所能明瞭的很有限（簡，2006）。

2.1.2 鏈黴菌(*streptomycete*)

放線菌被分類在 *Actinomycetales* 目，這一目包括絲狀的狹長細胞並有分枝傾向的微生物。此目與真菌不同之處，其一是菌絲較細，直徑稍大於 $1\mu\text{m}$ ；其二是不具真核性細胞的特徵；其三是細胞壁中並無真菌細胞壁中的幾丁質和纖維素的成分。在土壤中量最多的放線菌是 *Streptomyces*，其次是 *Nocardia*，其他的放線菌的量則為少數。

在靜置的培養基中 *Streptomyces* 並不會造成混濁，其細胞在液體表面呈現明顯的片狀；在充氣的液體培養基中，其生長會像細菌一樣的散開，但仍能形成典型的菌絲塊(mycelial pellets)。在洋菜培養基上所形成的菌落是堅實的，常帶有顏色，亦常會產生水溶性色素而在培養基中擴散。*Streptomyces* 會發散出一種霉味，正像新翻泥土的氣息。泥土剛被翻開後的氣味，也許正是這種微生物的存在所導致的（簡，2006）。

2.2 Rapamycin 介紹

Rapamycin 首先在 1975 年由 *St. hygroscopicus* NRRL 5491 生產分離，被認定為吸水鏈黴菌生產之抗真菌劑，隨後被證明是一種有效的免疫抑制劑，用在抑制器官移植的排斥反應。其後標靶藥物 The target of Rapamycin (TOR) 被鑑定出抑制細胞增生的功能 (Law, 2005)。

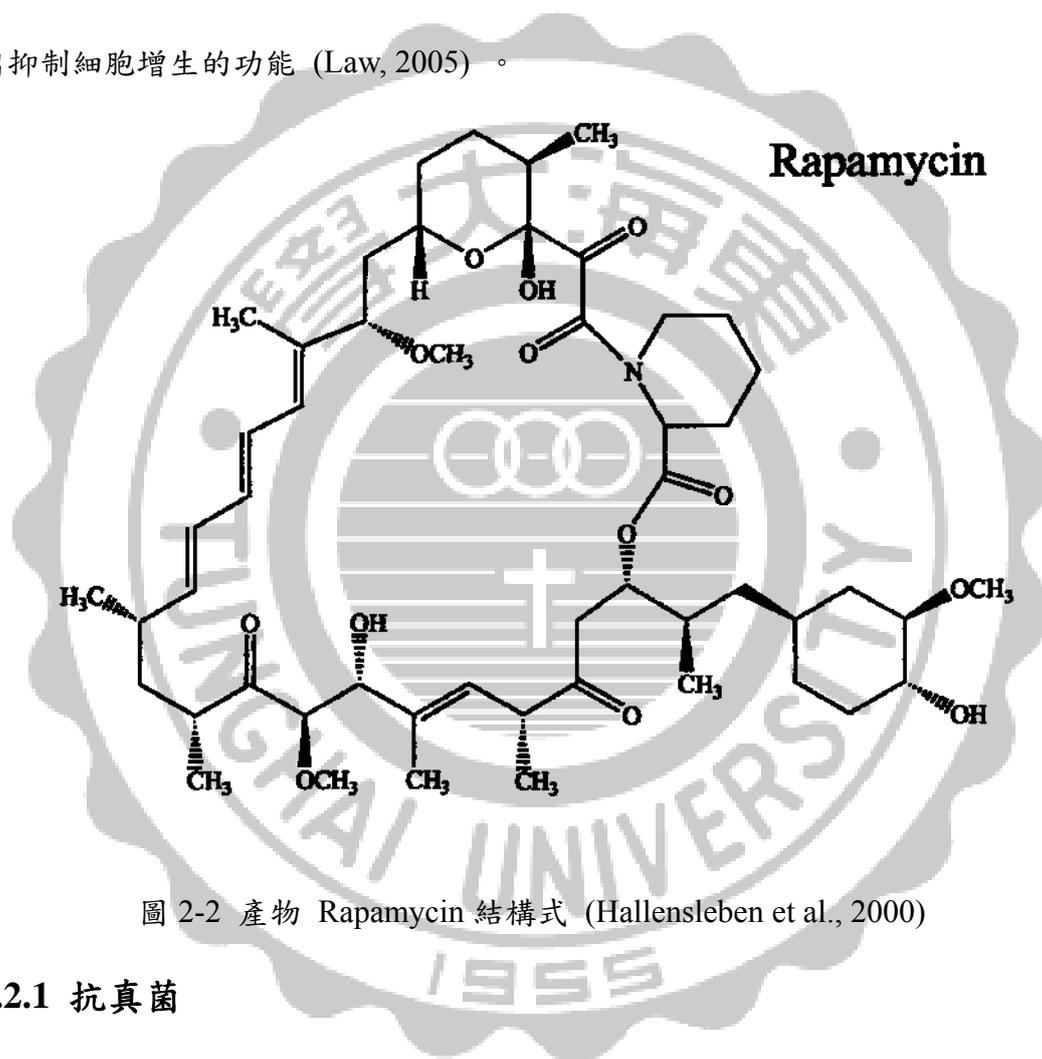


圖 2-2 產物 Rapamycin 結構式 (Hallensleben et al., 2000)

2.2.1 抗真菌

從復活節島土壤養品分離出的鏈黴菌培養物，被發現能有效抑制酵母菌(*the yeast*)，白色念珠菌(*Candida albicans*)，皮膚癬菌(*the dermatophytes*)，小孢癬菌(*Microsporum gypseum*)，毛癬菌(*Trichophyton granulosum*)，抗菌活性較輕微，僅限於一些革蘭氏陽性菌種，如藤黃八疊球菌(*Sarcina lutea*)和金黃色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*)。抗真菌之有效成分是從鏈黴菌的菌絲體中分離和純化得到的結晶物質，被命名為 Rapamycin。經過測試發現，Rapamycin 對於抑制各種白色念珠菌相較於其他菌種，有較明顯的抑制效果 (Sehgal et al., 1975)。

2.2.2 免疫抑制劑與抗腫瘤

Rapamycin 及其衍生物最被期待的是它們免疫抑制及抗腫瘤特性。人類的 mTOR 基因是在染色體 1p36.2 的位置，它轉譯的蛋白質大小為 289kDa，它是一種激酶 (serine/threonine kinase)，對於細胞分裂、生長扮演著重要的調節作用，其主要功能為細胞增生訊號之傳遞及細胞週期的進行。mTOR 分子接收來自上游(細胞膜表面生長因子及其受器)的訊息，它扮演著樞紐的角色，mTOR 分子活化之後，可以帶動下游一系列的細胞訊息傳遞，進一步促使細胞產生分化或分裂。而在腫瘤細胞，這樣的調節機制出現了失調現象，導致腫瘤細胞不正常的增生及分化不良，因此，mTOR 分子提供了科學家們在研究抗癌藥物的標靶治療上一個理想的目標。

Rapamycin 及衍生的新一代相似結構物，藉由抑制 mTOR 這個蛋白質分子達到抑制細胞生長及細胞合成蛋白質，進一步達成抑制腫瘤(癌細胞)生長，或促使癌細胞凋零死亡。該 mTOR 信號網絡包含許多腫瘤抑制的基因，以及一些原癌基因和 mTOR 信號被激活成許多類型的腫瘤細胞。這些觀測點是 mTOR 作為抗癌劑的理想靶標。Rapamycin 已經在實驗室中被證實可抑制許多癌細胞的

生長，包括橫紋肌肉瘤、神經母細胞瘤、肺小細胞癌、骨癌、胰臟癌、乳癌、攝護腺癌、白血病細胞及 B 細胞淋巴瘤等 (Law, 2005)。

2.2.3 延緩衰老

近年來，Rapamycin 介入 TOR 蛋白激酶訊號傳導，已經成為一個關鍵途徑，可能涉及延長無脊椎動物的生命，包括酵母菌、線蟲和果蠅。文獻指出，透過 TOR 傳導路徑，可以利用藥物，改變生物體的基因。而 Rapamycin 是已知能抑制或停止 mTOR 途徑的有效分子。透過 Rapamycin 餵食小鼠實驗 600 天，大約 20 個月後，其結果顯示，利用 Rapamycin 確實能延長雄性(9%)和雌性(14%)的壽命。最後研究人員得出結論，透過小鼠實驗證實，Rapamycin 能減少癌症細胞的產生和延緩衰老的過程 (Kaeberlein, 2010)。

2.3 基質的選擇

放線菌是異營(heterotrophic)生物，可利用的碳源由簡單的單糖，有機酸到複雜的多醣類、脂質、蛋白質及鏈狀碳氫化合物都可利用。纖維素可被某些種放線菌所利用，但是分解速率很慢。有些菌株尚可利用澱粉及菊糖(inulin)等。Nocardia spp.可分解利用白蠟(paraffina)、酚(phenols)、固醇(steroids)及嘧啶(pyrimidins)。銨，硝酸根化合物，氨基酸，蛋白(peptones)及一些蛋白質被放線菌用為氮源。較複雜的含氮分子則被分解成氨，做為同化作用上的主要化合物。放線菌廣存於土中，尤其較乾燥而非強酸性，有機質豐富之處，放線菌分解植物與動物之殘體，並吸收分解的產物作為營養而增加它們的數量。在土中

放線菌主以孢子狀態存在，菌絲狀態亦可存在，但一般而言，菌絲僅存於有足夠有機質供孢子發芽與維持營養生長的环境 (簡，2006)。

2.3.1 碳源與氮源影響

在碳源的研究方面，有文獻研究利用 35 種碳源物質(包括多醣、低聚醣、單醣和有機酸)作為培養基進行測試，當中有 12 種碳源被發現能幫助菌株的生長及幫助生產 Rapamycin。並特別指出當中的 7 種碳源，即果糖(Fructose)、甘露糖(Mannose)、半乳糖(Galactose)、肌醇(Inositol)、甘露糖醇(Mannitol)、木糖(Xylose)和纖維二糖(Cellobiose)，能有效刺激 Rapamycin 生產 (Zhu et al., 2010)。

而該研究顯示最佳的碳源組合為 2%的果糖和 0.5%的甘露糖，配合 1.5 g/L 天冬胺酸(aspartic acid)、0.5 g/L 精氨酸(arginine)和 0.5 g/L 組氨酸(histidine)的混和氮源，是較適合 *St. hygroscopicus* 生長及生產 Rapamycin。

在這些初步成果的基礎上，另一個研究團隊補充添加了 18 種氨基酸(包含天冬胺酸、精氨酸和組氨酸)，作為發酵培養基的條件。結果顯示 Rapamycin 的快速生長與賴氨酸(lysine)有關，但若添加苯丙胺酸(phenylalanine)或甲硫氨酸(methionine)則會導致 Rapamycin 的產量下降 (Park et al., 2010)。

2.3.2 菌體型態

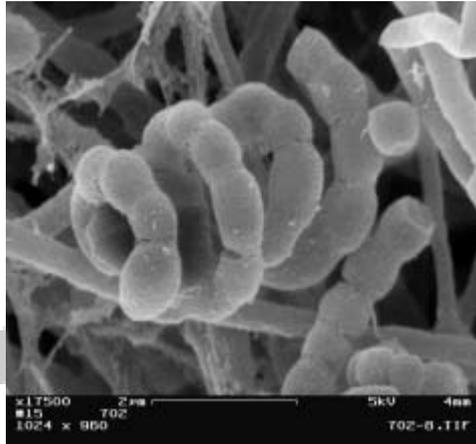


圖 2-3 掃描式電子顯微鏡下的鏈黴菌形態 (石信德、黃振文，2005)

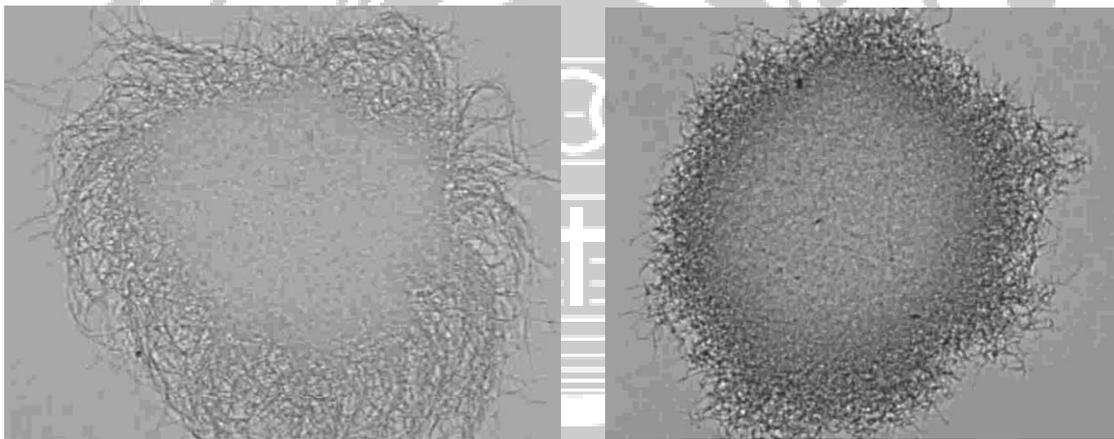


圖 2-4 40 倍顯微鏡下的菌體顆粒-1

圖 2-5 40 倍顯微鏡下的菌體顆粒-2

(Jonsbu et al., 2001)

鏈黴菌屬，放線菌門中特別的成員，它們在培養基上呈放射狀生長，並可產生與真菌一樣的菌絲體、無性孢子、孢子囊與孢囊孢子，主要負責生產大部分目前已知的抗生素。如上圖 2-3 至圖 2-5，抗生素產生主要和絲狀微生物在培養基中的形態和顆粒的大小分佈有關。顆粒的形態則與顆粒在流體中的交互作用與碰撞次數有關，也就是擾流函數。這些微生物的形態變化，如顆粒大小，取決於一個自由的菌絲懸浮於發酵液中並聚集成顆粒的聚合程度。發酵液中，粒子的構成，始於單個孢子或菌絲體之間的聚集。單個孢子或菌絲體之間的互聚集程度，可以通過觀察其組成、結構、疏水性或細胞壁上電荷以及胞外的聚合物質所造成的影響來決定。菌絲的生長，亦決定於菌絲體支鏈結構的多寡，支鏈結構有利於凝聚菌絲，使之糾結成為三維結構的顆粒形態(O' Cleirigh et al., 2003)。

絲狀微生物，如細菌和黴菌，在發酵液中具有在一定參數條件範圍內改變生長形態的特性，例如：剪切速率、接種量、培養液的流變性質、溶氧量、有效的營養物質和培養容器的設計等參數，皆會影響絲狀微生物在發酵液中的形態，並間接影響著生成發酵產物的能力 (O' Cleirigh et al., 2003)。

微生物多醣，黃原膠，常用來調節發酵液的表觀黏度(uA)以控制粒子的相互作用與顆粒的聚集生成，達到控制 *S. hygroscopicus* 的發酵生成沉澱物粒子大小的目的 (O' Cleirigh et al., 2005)。

2.3.3 合成路徑與作用機制

Rapamycin 是一種混和型聚酮化合物-多肽大環內酯類。聚酮部分的生物合成，是從莽草酸合成途徑形成的特殊環己烷單元開始，經過一系列的乙酸縮合，加上丙酸構件，並通過一個共同的聚酮化合物途徑而生成。由此產生的聚酮中間體與賴氨酸衍生的吡啶酸單元合併，形成 31-元大環內酯(圖 2-5)。

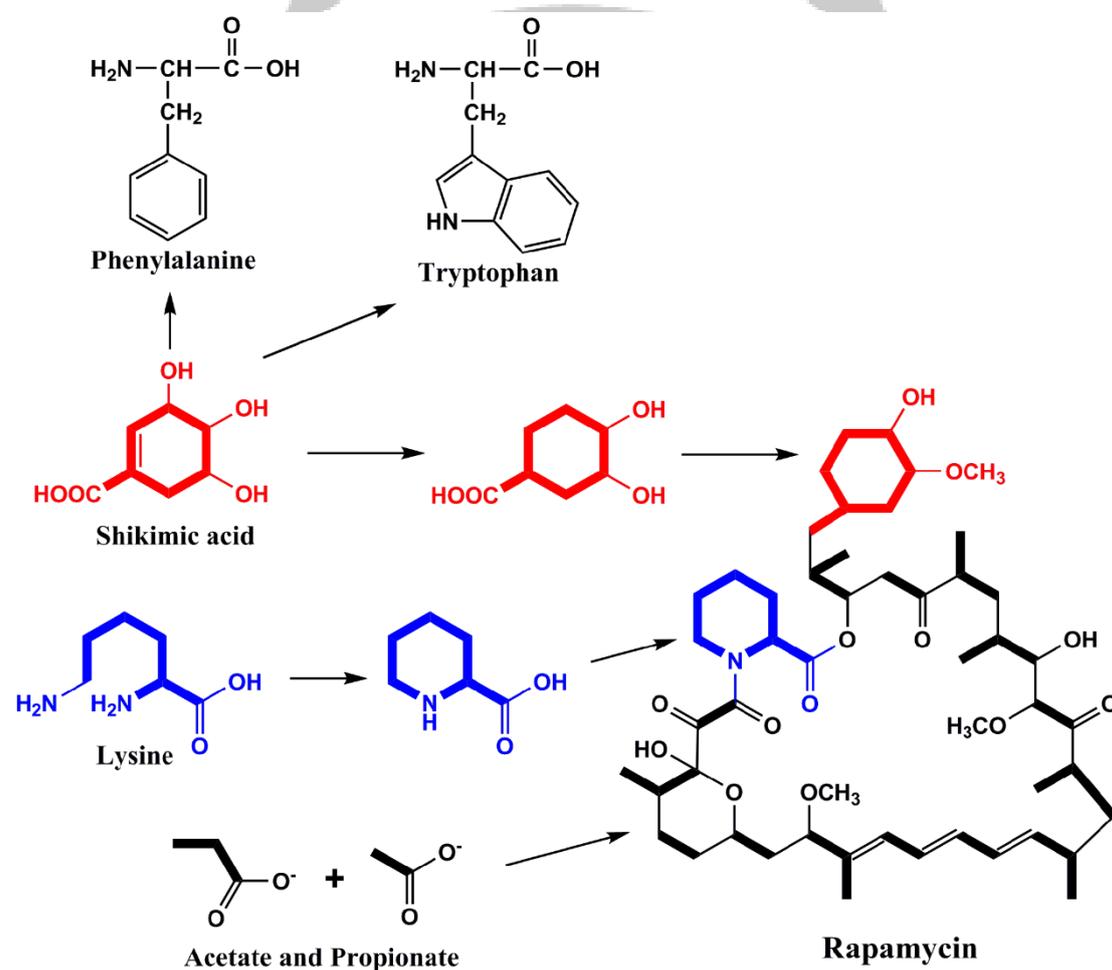


圖 2-6 Rapamycin 可能的生物合成途徑和有關 Rapamycin 的生物合成前體的相關代謝途徑 (Zhu et al., 2010)。

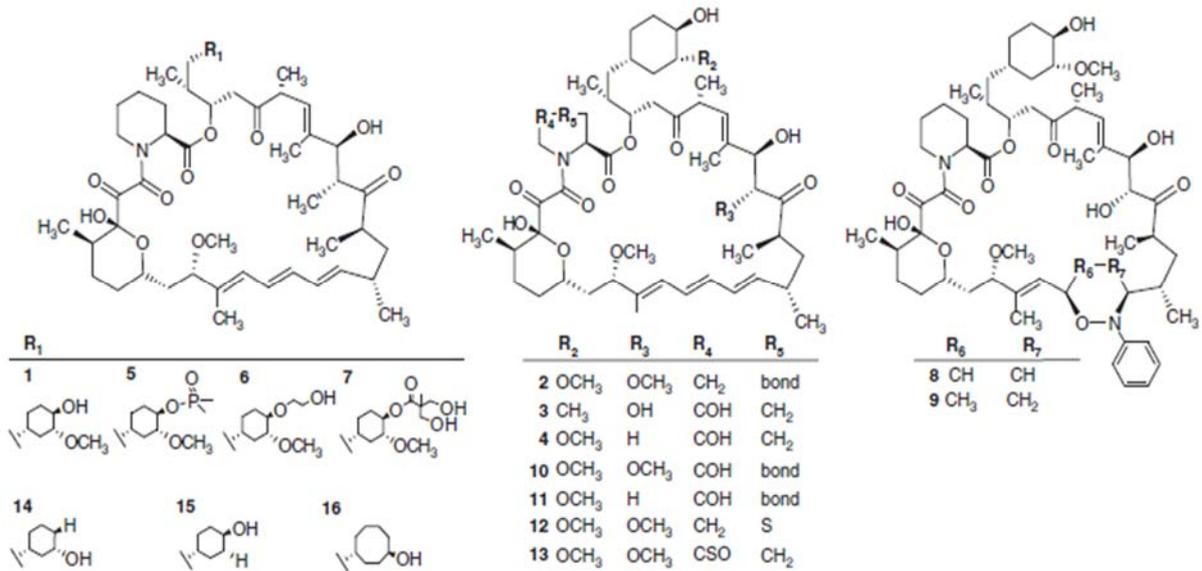


圖 2-7 Rapamycin 的結構與其相似物 (Park et al., 2010)。

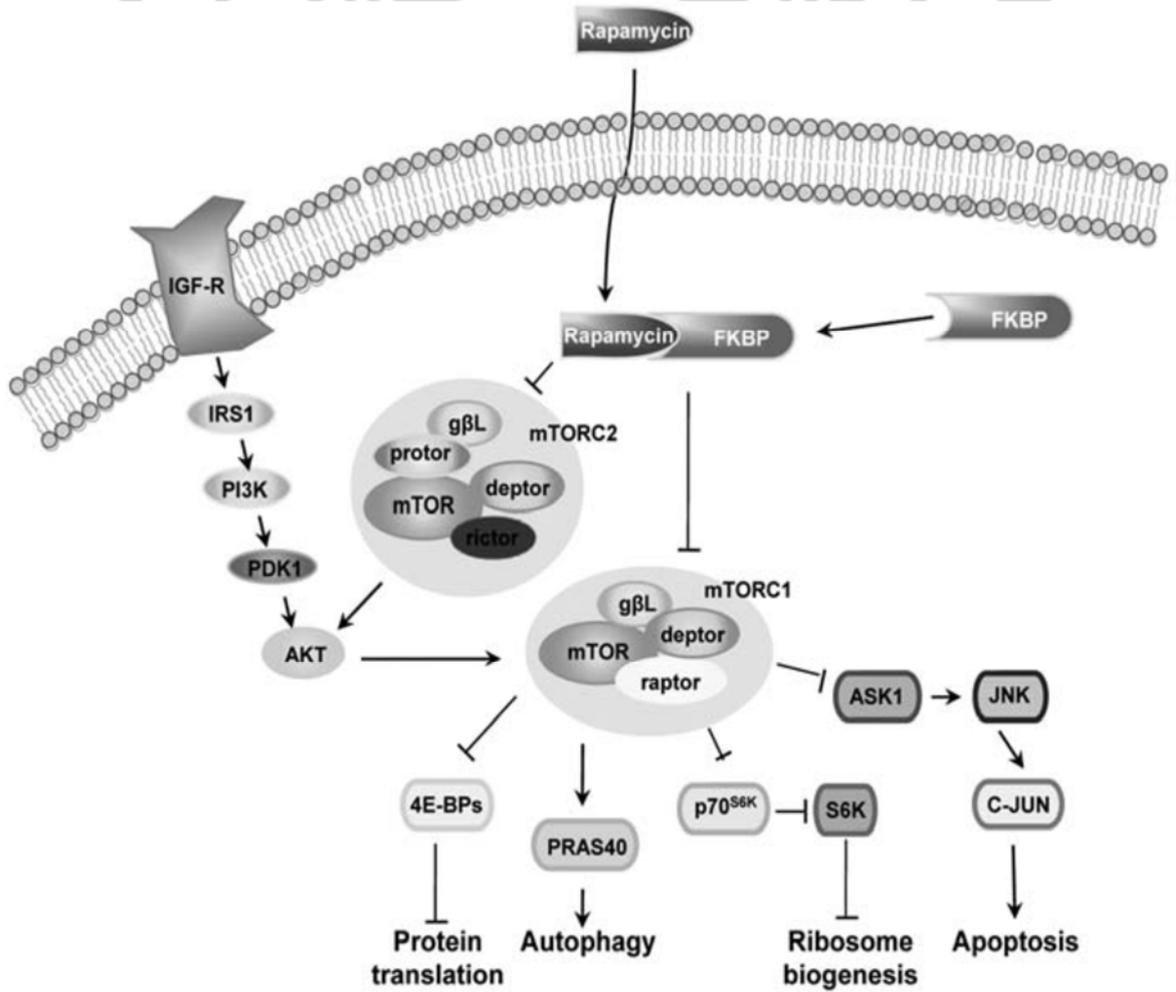


圖 2-8 細胞中 rapamycin 作用機制示意圖 (Park et al., 2010)

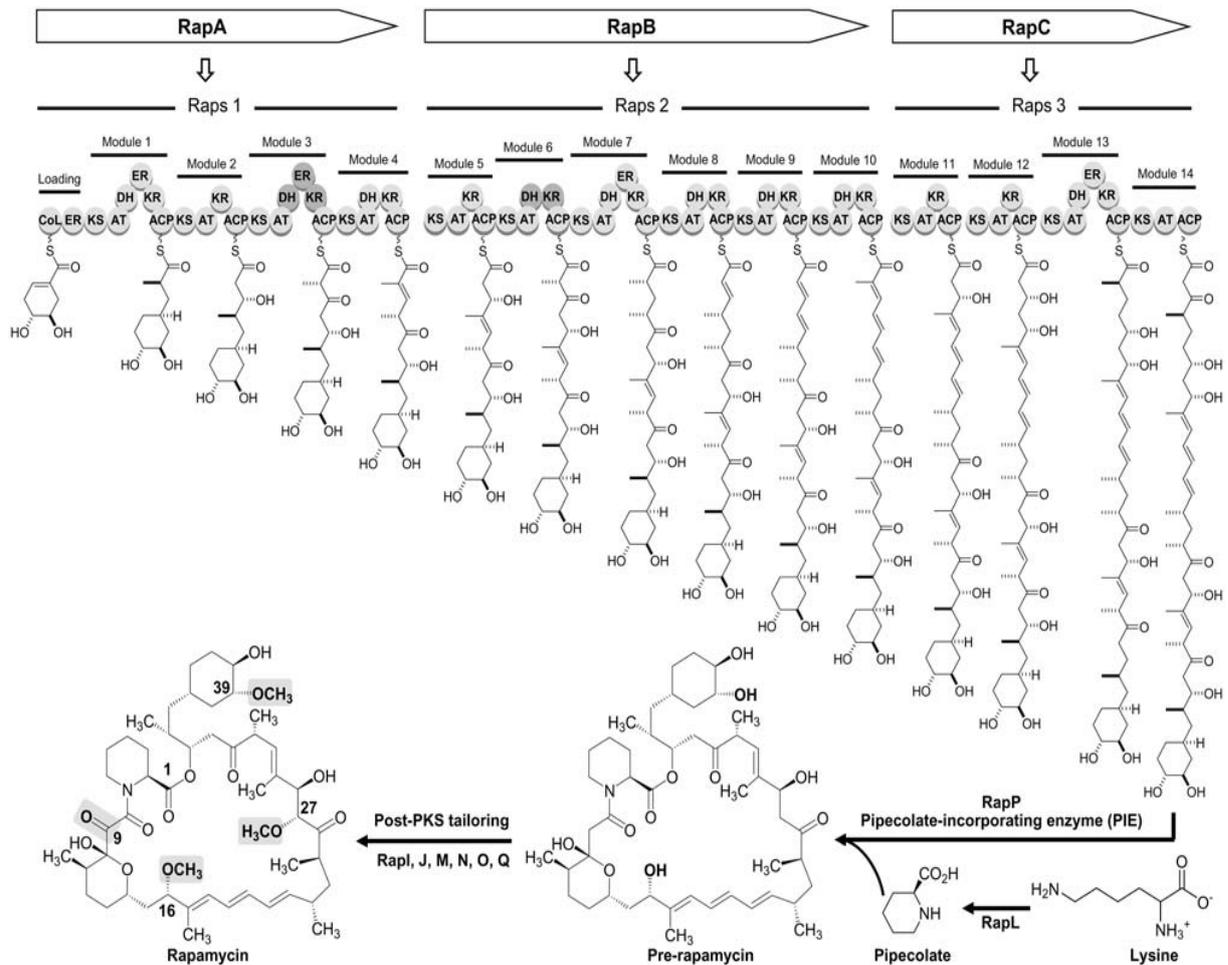


圖 2-9 Rapamycin 合成路徑圖 (Park et al., 2010)

最早從 *St. hygroscopicus* 提煉出的 Rapamycin，利用第 13 號碳被標記的醋酸實驗發現，rapamycin 內的大環內酯環 (macrolide ring) 是由 7 個單位的醋酸 (acetate) 與 7 個單位丙酸 (propionate) 所合成的，而含氧甲基 (O-methyl groups) 則是由蛋氨酸 (methionine) 所轉變成的。而它的合成基因已經被證實是從紅黴素 (erythromycin) 合成的 PKS (Polyketide synthase) 基因透過雜交後得來的。Rapamycin PKS 包含了三個多功能的酵素 (RapA, RapB and RapC) 組成共 14 塊的模組。

後來利用標記過的前驅物再進行研究，證明出 lysine 經由 RapL 酵素轉換成 Pipecolate，與模組 14 在 RapP (pipecolate-incorporating enzyme) 酵素進行下，合成出雜環 (heterocyclic ring) 也就 pre-rapamycin，再經過 post-PKS (RapI, J, M, N, O, Q) 多種酵素合成出最終產物 rapamycin 如下圖所示 (Sung et al., 2010) (Park et al., 2010)。

Rapamycin 的主要作用是抑制細胞週期的進展，和阻斷與抑制多種信號的傳導途徑。目前的證據顯示，這些途徑都是往下誘導並激活 mTOR 的因子。這極有可是通過一個或多個磷酸酶或激酶介入的 mTOR 的磷酸化過程，而這整個串聯事件過程的第一步是受 RAPA 影響的。也就是說 RAPA 獨特的作用機制是個關鍵，其在移植的臨床應用上或其他領域中，扮演著影響細胞增殖的關鍵角色 (Sehgal, 1998)。

2.4 發酵策略

2.4.1 攪拌式發酵槽

此類型反應器具有機械式攪拌葉片、進氣管口於槽體底部，藉由葉片的機械攪拌，由底部進入槽體的氣體能與流體在整個系統中均勻混和，混和性佳、高質傳能力、高剪切力等，是攪拌式發酵槽最主要的優點，是目前工業上應用最廣泛的反應槽型。混和性佳與高質傳能力造就高溶氧環境，但是高度剪切力的特性並不適合微生物發酵，因為剪切力過高容易使菌體受到傷害進而影響菌體生長、代謝機制、生產速率和產量。除此之外，攪拌式發酵槽應用於微生物發酵工業方面，有些缺點必須注意，例如：高度攪拌過程容易產生大量熱能，使槽體溫度上升，破壞菌體生長的最適溫度。而輸入能量使攪拌葉片轉動，會提高生產成本，且機械攪拌裝置的轉動軸，可能會因設計不良，造成雜菌汙染的機會提高。因此，自動控制系統，在攪拌式發酵槽的發酵程序中是必要的，利用自動偵測系統，監測溫度、槽體壓力、溶氧量、酸鹼值，並以電腦調控利用饋料系統控制酸鹼值、控制攪拌速率維持溶氧量、循環水系統控制溫度、以及自動排進氣系統控制槽體壓力，以達到最佳化並穩定之微生物培養環境。

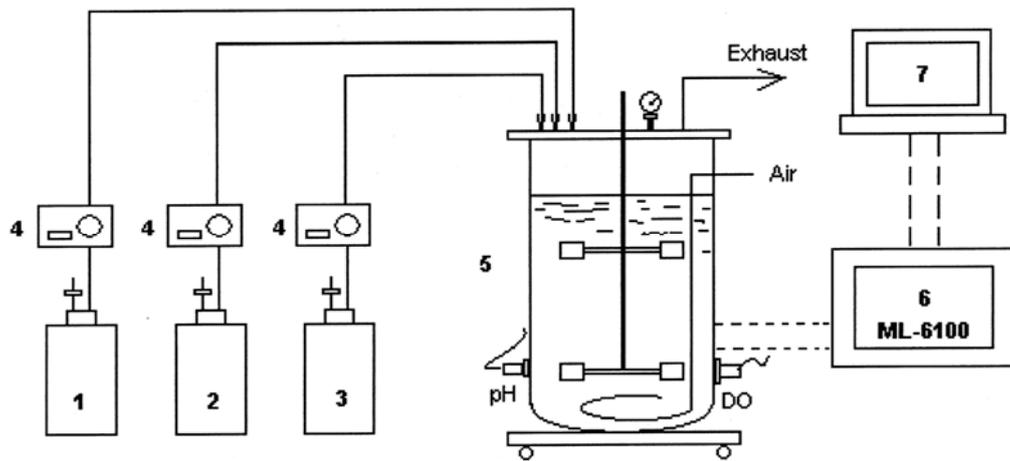


圖 2-10 BioFlo 6000 移動式發酵槽與電腦控制系統：(1)饋料系統；(2)(3)酸鹼溶液；(4)蠕動幫浦；(5)BioFlo 6000 發酵槽體；(6)ML-6100 控制器與監控螢幕；(7)電腦與控制軟體 (Chen et al., 1999)

2.4.2 氣舉式發酵槽

氣舉式發酵槽的主要特色是以導流管分離出流體上升區域與下降區域，氣體由槽體底部進入上升區域並產生氣泡，由於氣泡於上升與下降區域中，大小分布不同而產生密度差，使反應槽內形成迴路流動充分混和發酵液。氣舉式發酵槽具有下列幾項優點：

- (1) 低剪切力傷害：由於沒有機械葉片轉動，因此對於菌體的剪接力傷害可以降到最低，是氣舉式發酵槽適合微生物發酵的主要原因。
- (2) 槽體結構簡單，設備成本低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統和機械軸，因此除了減少設備成本外，亦沒有額外的能量消耗問題。
- (3) 污染機率降低：由於氣舉式發酵槽沒有結構複雜的攪拌系統，因此不會有軸封滲漏污染與隱藏雜菌的問題。

(4) 有較高的能量效率：由於氣舉式發酵槽內導流管的導流作用，使得內部的氣體與其帶動之流體在反應槽中能形成穩定的迴路流動，不需要外在提供的其他能量。

由上述優點可知，氣舉式發酵槽非常適合應用於微生物發酵工業，但應用於高黏度培養液時，氣體輸送效果會明顯下降，使整體循環效果不佳，同時容易產生泡沫。



2.4.3 批次發酵(Batch)之發酵策略

在一般情況下，抗生素的生產受到細胞生長速度的抑制，這是因為在初始的培養環境或成長速率高的環境下，易缺乏抗生素合成酶。在微生物細胞停止分裂後，產生合成酶催化剩餘的初級代謝物轉化生成不同化學組成的次級代謝物。

在大部分的放線菌發酵過程中，菌絲體的生長在培養過程中會越來越密集。就發酵過程的趨勢而言，若處於不斷變化的培養環境，則形態的改變程度

也會不同。次級代謝物，包括抗生素，通常是在不利於細胞生長的環境下產生。在抗生素的發酵生產則需要解決養分的傳輸問題與培養基的代謝和高溶氧(DO)的環境。在相對較長的發酵培養過程中，特別重要的是，從牛頓流體到非牛頓流體的流變性質轉換。則發展一個新的發酵過程，控制策略是必要的，好的控制策略保持溶氧在一個最佳的水平，並誘導有機體從初級代謝物轉換成次級代謝物。在文獻的研究上，試驗級規模的鏈黴菌發酵過程得到一個高產率抗生素發酵水平。用新的監控系統，控制攪拌速率、通氣速率、容器壓力、溫度，在程序過程中自動改變，避免低溶氧率限制抗生素的生長。(Chen et al., 1998) 另一個獨特的 pH 控制策略也被用在細胞生長與次級代謝產物發酵的過程中，Rapamycin 在更寬的 pH 範圍內生產。當 pH 達到最高極限時，添加極少量的酸，引誘菌體本身之 pH 值一路下滑至最低點，pH 的變化促使 Rapamycin 生產量的提升。達到最佳化培養環境，使得整體發酵時間縮短並同時使產率提升的目的 (Yen et al., 2013)。

2.5 超臨界流體簡介

超臨界流體是指操作溫度及壓力超過其臨界溫度及臨界壓力時的流體。由於二氧化碳的臨界溫度接近室溫，在分離或反應後可藉由減壓而輕易地與其他物質分離，不會產生殘留而造成環保及安全上的問題，因此超臨界二氧化碳是綠色溶劑之一，用以取代傳統的有機溶劑。

2.5.1 超臨界流體定義

由於環境的溫度與壓力變化，可以讓任何一個物質都存在三種相態，固相、液相及氣相，三相成平衡態共存的點為三相點，液、氣兩項成平衡狀態的點為臨界點(Critical point)，此時所對應的溫度、壓力與密度則分別定義為該物質的臨界溫度(T_c)、臨界壓力(P_c)和臨界密度(ρ_c)，各種物質皆有特定的臨界溫度及臨界壓力，當物質所處狀態超過臨界點時，便會形成另一均勻相，此時就稱為超臨界狀態(Supercritical state)，如圖 2-11 中斜線內區域所對應之溫度、壓力，即為該流體的超臨界狀態 (Tabernero et al., 2012)。

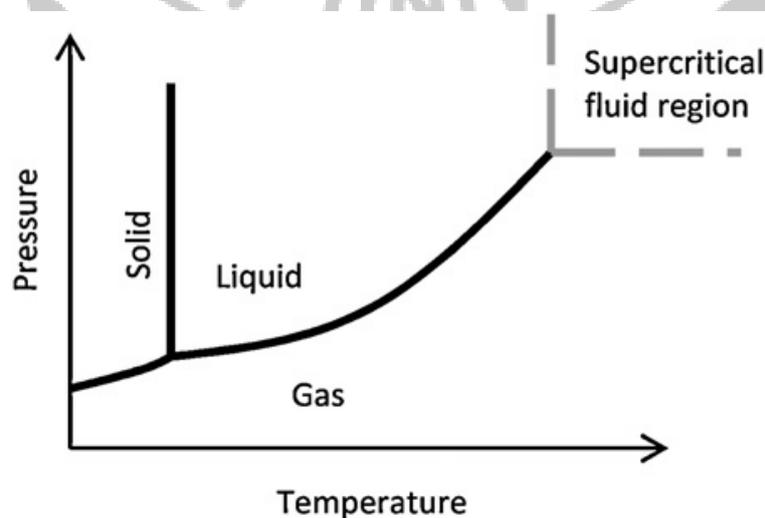


圖 2-12 物質三相圖

表 2-2 流體其密度、黏度、擴散係數在相態間之變化值

	Density (kg/m ³)	Viscosity (mPa·s)	Diffusivity (cm ² /s)
GAS	0.8-1.3	0.01-0.03	0.1-0.2
LIQUID	800-1200	0.4-1.1	0.00001-0.0001
SCF	300-1000	0.05-0.01	0.0001-0.001

2.5.2 超臨界流體性質

物質一旦進入超臨界流體狀態，它的物理性質介於液體和氣體之間，具備有液體及氣體的特性，如表 2-2 所示，超臨界流體的黏度(viscosity)接近氣體，密度則接近液體。黏度低，輸送時所須的功率較液體低；密度高，可輸送較氣體更多的流體。而流體的擴散係數(Diffusion coefficient)高於液體的十至百倍，即質量傳遞阻抗(mass transfer resistance)較液體小，比較容易進入萃取物，將溶質萃出，故萃取速率較液體快。

2.5.3 影響超臨界流體萃取之因素

影響超臨界流體萃取效率之主要因素可分為：壓力、溫度、共溶劑(co-solvent)種類、共溶劑添加量、流體流速與萃取時間等，以下將個別介紹這些因素之影響性。

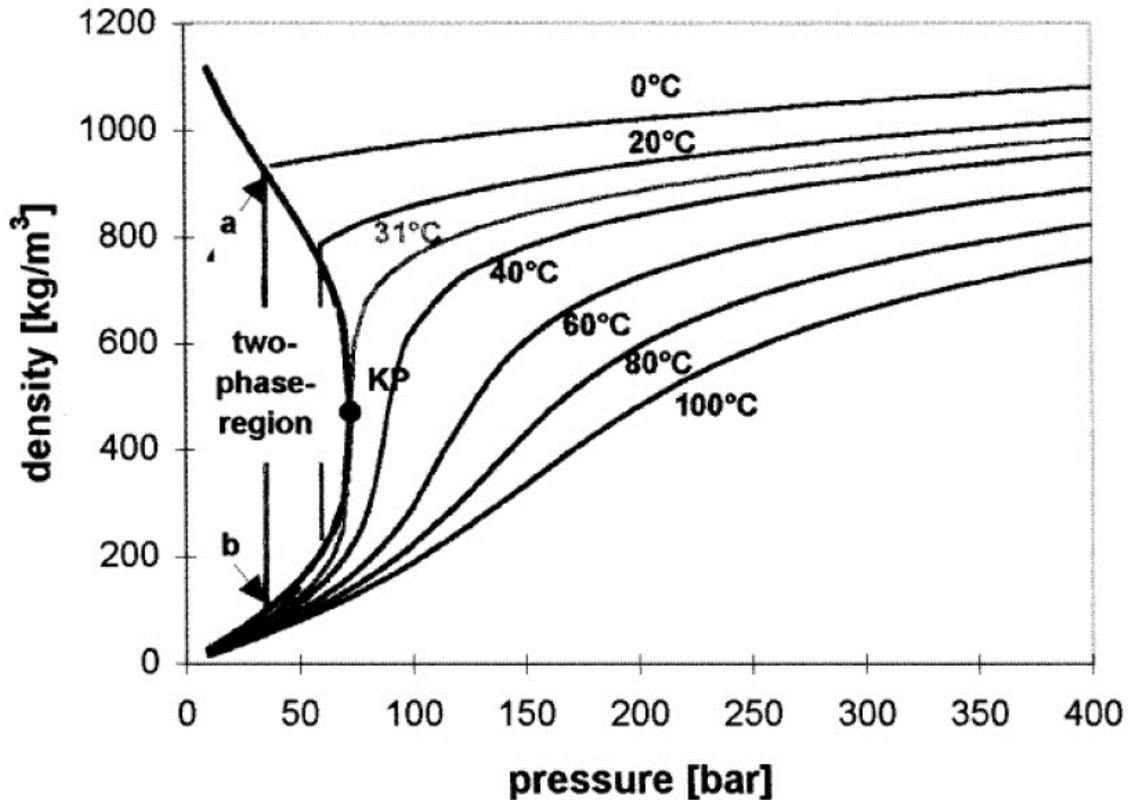


圖 2-13 超臨界二氧化碳之壓力與密度變化 (Filippi et al., 1982)

(1) 壓力

壓力大小是影響超臨界流體溶解能力關鍵因素之一，根據圖 2-13，圖中曲線在 70~200 bar 區域內，壓力對密度增加的影響非常明顯，將溫度固定並且增加壓力時，超臨界流體密度也會隨之增加，由於密度上升使得溶解度也相對提高。但是增加壓力會導致超臨界流體黏滯度增加，進而降低了其擴散性，導致不易擴散至基質孔隙之間，降低了萃取效率。增加超臨界流體壓力也可能會導致基質結構改變，造成孔隙縮小，反而不易進入基質之孔隙，此外也增加破壞基質結構的機率，若基質本身擁有經濟價值時，會導致其價值之喪失。綜合來說，壓力對萃取效率的影響包含了：(a) 增加流體密度，而增加萃取效率；

(b) 減少擴散性與改變基質結構，導致萃取效率降低；(c) 改變基質分子結構，喪失經濟價值。

(2) 溫度

溫度是影響超臨界流體萃取的另一個重要參數，其對超臨界流體中溶質溶解度的影響比壓力來的複雜。在固定壓力，升高溫度有利於溶質揮發性的增加和擴散速度的提高，使超臨界流體更容易擴散進入基質孔隙之間，提高萃取效率。不過提高溫度也可能會破壞基質結構，而導致超臨界流體不易進入基質結構中。此外，基質本身擁有經濟價值，有可能會因溫度致使其價值喪失。綜合來說，溫度對萃取效率的影響包括：(a) 增加溫度時，超臨界流體擴散係數也進而增加，並且減少超臨界流體之黏滯度，使流體更易穿透基質，讓基質內部之分析物萃取出來；(b) 增加溫度，亦可提供分析物脫附基質所須之能量，增加其萃取效率；(c) 增加溫度，導致超臨界流體密度變小，使超臨界流體之溶解度降低，而降低萃取效率；(d) 造成分析物之性質改變，進而降低萃取效率。

(3) 共溶劑(co-solvent)

大部分可以用來做超臨界流體萃取用的物質皆為弱溶劑(weak solvent)，雖然此溶劑的特性提供了較佳的萃取選擇性，但卻也限制了其利用性(Anderson et al., 1989)。所以在超臨界流體萃取過程中，除了調整密度來改變溶解度參數外，亦可以加入少量的共溶劑，將原本溶質在溶劑中偏低的溶解量提高。其機制可用群聚效應(clustering)來說明，添加少量的共溶劑至超臨界流體中，可將共溶劑視為溶質，若溶質分子與超臨界流體分子間的吸引力大於超臨界流體本身分子間的吸引力時，溶質分子的周圍會包圍一圈超臨界流體分子形成的群聚體，使得原本超臨界流體的群聚現象更加明顯。而隨著添加共溶劑的種類或添加量的改變，溶質在超臨界二氧化碳中的溶解度呈非線性改變，其質傳效應也會隨之改變。通常共溶劑選擇種類分為極性分子與非極性分子。原則上，應先考慮超臨界流體、溶質的極性問題之後，再選擇適當的共溶劑。至於共溶劑添加量，一般添加的有機溶劑體積比(vol %)或莫爾比(mol %)約為超臨界流體的1%~10%。對於常用的共溶劑或修飾劑添加方式，常見有下列三種：

(a) 預先混合成固定比例於鋼瓶

此種方式可用於各種共溶劑的相互混合，且方便於流動式超臨界流體操作，但缺點是共溶劑與流體的混合比例，會隨著時間的增加而改變。

(b)將共溶劑添加在樣品上

此種方式適合於靜態式超臨界流體操作，並不適合流動式超臨界流體操作，因為在操作的過程中，共溶劑會被流體帶出而逐漸減少，如此，共溶劑與流體的混合比例便無法固定。

(c)雙幫浦系統

一個幫浦提供主要的超臨界流體，另一個幫浦提供共溶劑，在進入置於恆溫槽的萃取管柱前，兩者先行混合。此種方法可任意改變超臨界流體與共溶劑混合比例，且其混合比例並不會隨時間改變，較易操作，但需要另外購置幫浦，花費較大。

(4) 萃取時間對萃取效率之影響

大部份超臨界流體萃取操作程序可包括靜態萃取 (Static Extraction)、動態萃取 (Dynamic Extraction) 與半流動式萃取方法。靜態萃取原理為萃取管之溫度、壓力維持在一定值下，經由一段時間，使待萃取物與超臨界流體進行充分混合、接觸與交換，最終達到濃度平衡之狀態，再經由萃取管內之流體導出後收集；動態萃取則是萃取過程中不斷的提供新鮮流體以一定流量穿過萃取管，以連續流動之方式，不斷的攜帶出基質中之萃取物至收集系統中，(Berdeaux et al., 1994; Yang et al., 1995)。而半流動式萃取法，是靜態萃取與動態萃取互相搭配使用，在動態萃取前先進行靜態萃取，有助於溶解度與回收率之提升，縮短整個萃取所需之時間並節省流體之浪費。

(5) 流體流速對萃取效率之影響

流體流速快慢主要會影響動態萃取的效率。由於動態萃取需要持續、穩定地提供新鮮的流體，使其穿透萃取槽內固態之基質，並提供足夠流體體積，將分析物帶至收集器中，因此，若流體之流速過低，致使流體無法有效進入固相基質中。相反的，流體流速過高則會導致流體在萃尿管內之停留時間太短，導致流體未能與分析物、固態基質進行充分之接觸，而嚴重影響萃取效率。



2.6 文獻產值

整理文獻上的 Rapamycin 產值，如下表 2-3

表 2-3 文獻產值表，Comparison of rapamycin production by different strains under various fermentation processes.

Microorganism (<i>S. hygroscopicus</i>)	Carbon source	Bioreactor	Mode	Rap titer (mg/L)	Time (h)	Rap productivity (mg/L h)	Refs.
AY-B1206	Fructose, mannose	Shake flask	Batch	40	192	0.21	Kojima et al. (1995)
C9	Fructose, mannose	Shake flask	Batch	97–186	144	0.67–1.29	Lee et al. (1997)
N5632	Soluble starch	Shake flask	Batch	420.0	120	3.5	Xu et al. (2005)
GS-1437	Soluble starch	Shake flask	Batch	445.0	120	3.71	Chen et al. (2009)
HD-04-S	Dextrin, Glycerol,	Shake flask	Batch	450.0	120	3.75	Zhu et al. (2010)
BCRC-16270	Glucose	5 L fermentor	Batch	537	168	3.20	Yen et al. (2013)
NBS-9746	Glycerol, Fructose	130 L fermentor	Fed-batch	110	110	1.0	Chen et al. (1999)
R060107	Glycerol, Fructose	5 L fermentor	Fed-batch	500.0	120	4.17	Chen et al. (2008)
HD-04-S	Dextrin, Glycerol,	120 L fermentor	Fed-batch	812.5	160	5.08	Zhu et al. (2010)

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗菌株

本實驗所採用的菌株 *St. hygrosopicus*，購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)，菌種編號為 BCRC16270，具有生產 Rapamycin—B1547 之能力。

BCRC Strain Administration System

Page 1 of 2

財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心
新竹市食品路331號 <http://www.bcrc.firdi.org.tw/>
TEL: (03)5223191轉509或248 FAX: 03-5224172或03-5223191-510
產品說明書

生資中心編號:	16270
菌種學名:	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> (Jensen) Waksman and Henrici
Author:	(Jensen) Waksman and Henrici
培養基:	46 YEAST EXTRACT-MALT EXTRACT AGAR (ISP MEDIUM 2) Yeast extract 4.0 g Malt extract 10.0 g Dextrose 4.0 g Agar 20.0 g Distilled water 1.0 L Adjust pH to 7.3.
培養條件:	28°C, Medium ID: 46
氧氣需求:	Aerobic
Biosafety Level:	1
特殊需求:	未定義
Characterization:	Production of rapamycin--B1547

圖 3-1 *St. hygrosopicus* 之生資中心產品說明書

3.1.2 實驗藥品

下表 3-1 為本研究所使用之藥品清單。

表 3-1 實驗藥品清單

中文名	英文名	廠牌
雷帕黴素	R-5000 Rapamycin	LC Laboratories
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
果糖	D-Fructose, 99%	Alfa Aesar
甘油	Glycerol	SHOWA
可溶性澱粉	Starch, soluble	Alfa Aesar
甘露糖	D-(+)-Mannose, 99%	Alfa Aesar
乳糖	D-Lactose monohydrate	Lancaster
羧甲基纖維素	Carboxymethyl cellulose	SHOWA
酵母萃取物	Yeast Extract	BD Difco™
麥芽萃取物	MALT EXTRACT R2	ST BIO
馬鈴薯葡萄糖	Potato Dextrose Broth	BD Difco™
冰醋酸	Acetic acid	SHOWA
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
鹽酸	Hydrochloric acid	Scharlau
甲醇	Methanol	AENCORE
乙醇	Ethanol	ECHO
二甲基亞砜	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Scharlau
乙酸乙酯	Ethyl acetate (EA)	Scharlau
二氧化碳	Carbon dioxide	炳輝氣體
瓊脂	Agar, Bacto™	BD Difco™
玻璃棉		

3.2 實驗儀器

下表 3-2 為本研究所使用之儀器設備清單。

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
pH 計	Lutron	PH-206
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
蠕動幫浦	Cole-Parmer	Masterflex L/S Drives
電子天平	Precisa	BJ100M
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
超純水製造機	Millipore	Simplicity
超音波震盪器	DECTA	DC300H
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
低溫恆溫水槽	PROYES	CRC-30L
USB 數位顯微鏡	UPMOST	UPG621
磁石攪拌加熱器	ChromTech	MS-3250B
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
高效能液相層析儀-UV	HITACHI Chromaster	L-2000 Series
高效能液相層析儀-RID	HITACHI Chromaster	5000 Series
紅外線水分分析儀	DENVER	IR35
超臨界二氧化碳萃取設備	Spe-ed SFE model 7070	Applied Separations
5 公升攪拌式發酵槽	頂生	-
5 公升氣舉式發酵槽	頂生	-
40 公升氣舉式發酵槽	頂生	-
中興大學 森林系 王升陽教授 實驗室		
液相層析儀	DIONEX	UltiMate 3000 Series
質譜儀	BRUKER	amazon speed

3.3 分析方法

3.3.1 菌體濃度分析方法

將菌液稀釋成不同濃度，利用分光光度計在波長 660nm 下測量其光學密度 (Optical Density, O.D.)，若 O.D. 值大於 1 時則加入蒸餾水稀釋至 1 以下；取 10ml 不同濃度之菌液置入離心機(7000 rpm, 5 min)，除去上清液取得菌體，再加入 10 ml 蒸餾水，充分震盪使菌體與蒸餾水混和後，再次離心除去上清液，使雜質與菌體分離，此步驟重複兩次。提取清洗後之菌體，置入充分乾燥之鋁皿中，利用紅外線水分分析儀烘乾秤重，烘乾溫度為 120°C，即測得菌體乾重 (Dry cell weight, DCW)。

3.3.2 醣類濃度分析方法

主要為分析碳源濃度(果糖、甘油)。取發酵液至微量離心管中，由離心機以轉速 8000 rpm 離心 5 分鐘後，將菌體與上清液分離，取上清液經由適當稀釋，並以 membrane filter(0.22 μm pore size, Chrom Tech)過濾，再利用高效能液相層析儀(HITACHI 5000 Series)分析。

表 3-3 醣類濃度分析條件

管柱：ICSep ICE-Coregel 87H3 column, Transgenomic

溫度：65±1°C

注射體積：5 μl

偵測器：折光率偵測器 (Refractive index detector)

移動相：0.008N 硫酸水溶液

流速：0.4 ml/min

以波峰面積與醣類濃度作圖，獲得檢量線：

果糖(Fructose)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)} = \text{area}/(2 \times 10^6) - 1.7027$ (附錄 A)

甘油(Glycerol)檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)} = \text{area}/(2 \times 10^6) - 1.0765$ (附錄 B)

3.3.3 葡萄糖濃度分析方法

將發酵液置入離心管中，以離心機轉速 7000 rpm 離心 5 分鐘，分離菌體與發酵液，取上清液並適當稀釋，以 YSI 2300STAT Glucose analyzer 測量上清液濃度。

3.3.4 代謝產物濃度分析方法

分析主產物 Rapamycin 之方法。取發酵液至微量離心管中，由離心機以轉速 8000 rpm 離心 5 分鐘後，將菌體與上清液分離，取上清液經由適當稀釋，並以 membrane filter(0.22 μm pore size, Chrom Tech)過濾，再利用高效能液相層析儀(HITACHI L2000 Series)分析。

表 3-4 Rapamycin 濃度分析條件

管柱：Kromasil 100-5C18 column (250*4.6mm)

溫度：常溫

注射體積：20 μl

偵測器：紫外線偵測器(UV detector)

波長：254 nm

移動相：甲醇：水：醋酸 (80 : 20 : 0.1) 混和水溶液

流速：1.2 ml/min

以波峰面積與代謝產物濃度作圖，獲得檢量線：

Rapamycin 檢量線方程式： $\text{Concentration(g/L)} = \text{area}/(5 \times 10^8) - 0.003$ (附錄 C)

3.4 實驗方法

3.4.1 菌種保存

菌種保存流程如圖 3-2，購自生物資源保存及研究中心，菌種編號 BCRC16270 的 *St. hygroscopicus* 之冷凍乾燥管，接至下表 3-3 之 Seed medium 液態種子培養基活化，在 28°C 恆溫震盪培養箱培養 48 小時後，接種於 ISP MEDIUM 2 固態培養基，亦在 28°C 下培養，等待約莫 20 天後，產生黑色孢子 (如下圖 3-2)，後利用無菌水將孢子收集下來。取 0.8 ml 孢子液和 0.2 ml 甘油於微量離心管中均勻混和，放入 -20°C 冰箱中保存。

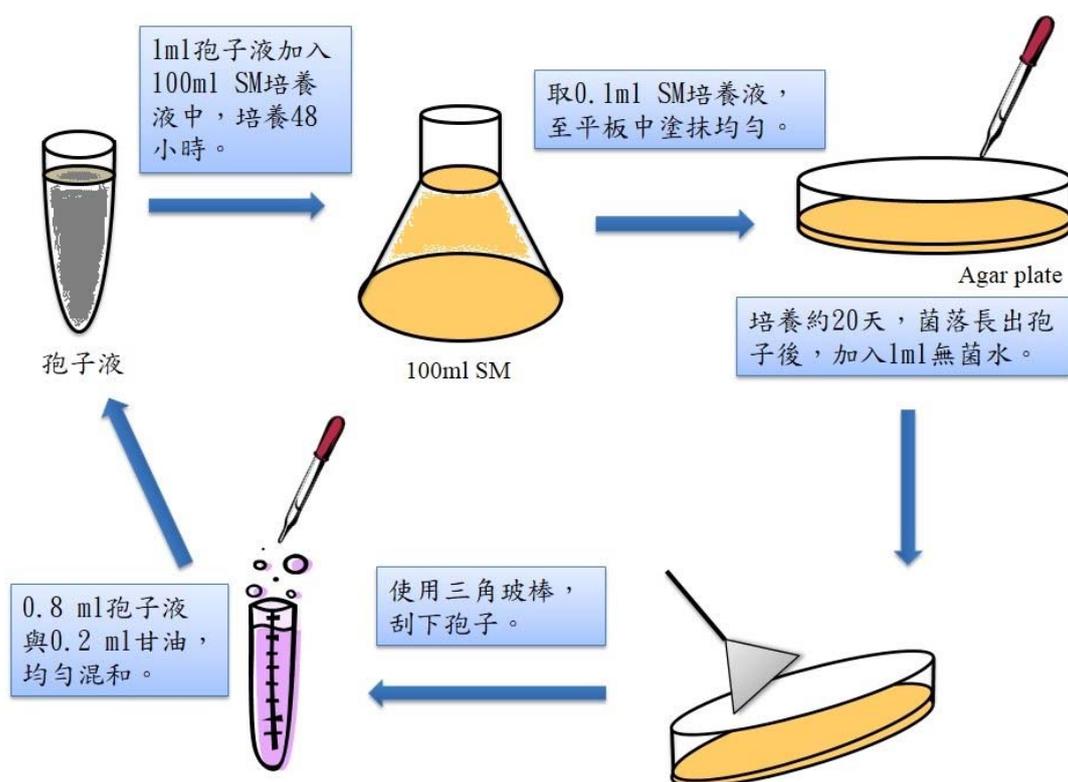


圖 3-2 菌種保存流程

3.4.2 培養基組成

3.4.2.1 種菌培養基(Seed medium, SM)

表 3-3 固態(左)與液態(右)種菌培養基

Solid state – medium (ISP MEDIUM 2)		Seed - medium	
Medium	Concentration (g/L)	Medium	Concentration (g/L)
Yeast Extract	4.0	Yeast Extract	4.0
Malt Extract	10.0	Malt Extract	10.0
Dextrose	4.0	Dextrose	30.0
Agar	20.0	Adjust pH to	7.3
Adjust pH to	7.3		

依據表 3-3 配方，配置 Seed medium 液態種子培養基 100 ml 攪拌均勻且調至 pH 7.3 後，置入 250 ml 三角搖瓶中，放置高壓蒸氣滅菌釜殺菌 20 min（操作壓力為 1.2 kg/cm²，溫度為 121°C）。待培養基滅菌完取出，放置無菌操作台靜置冷卻後，取保存於-20°C 的冷凍菌種，融化後將其倒入培養基中，送至恆溫震盪培養箱以溫度 28°C，轉速 150 rpm 條件下進行培養 48 小時。

3.4.2.2 發酵培養基(Fermentation medium, FM)

表 3-4 發酵培養基

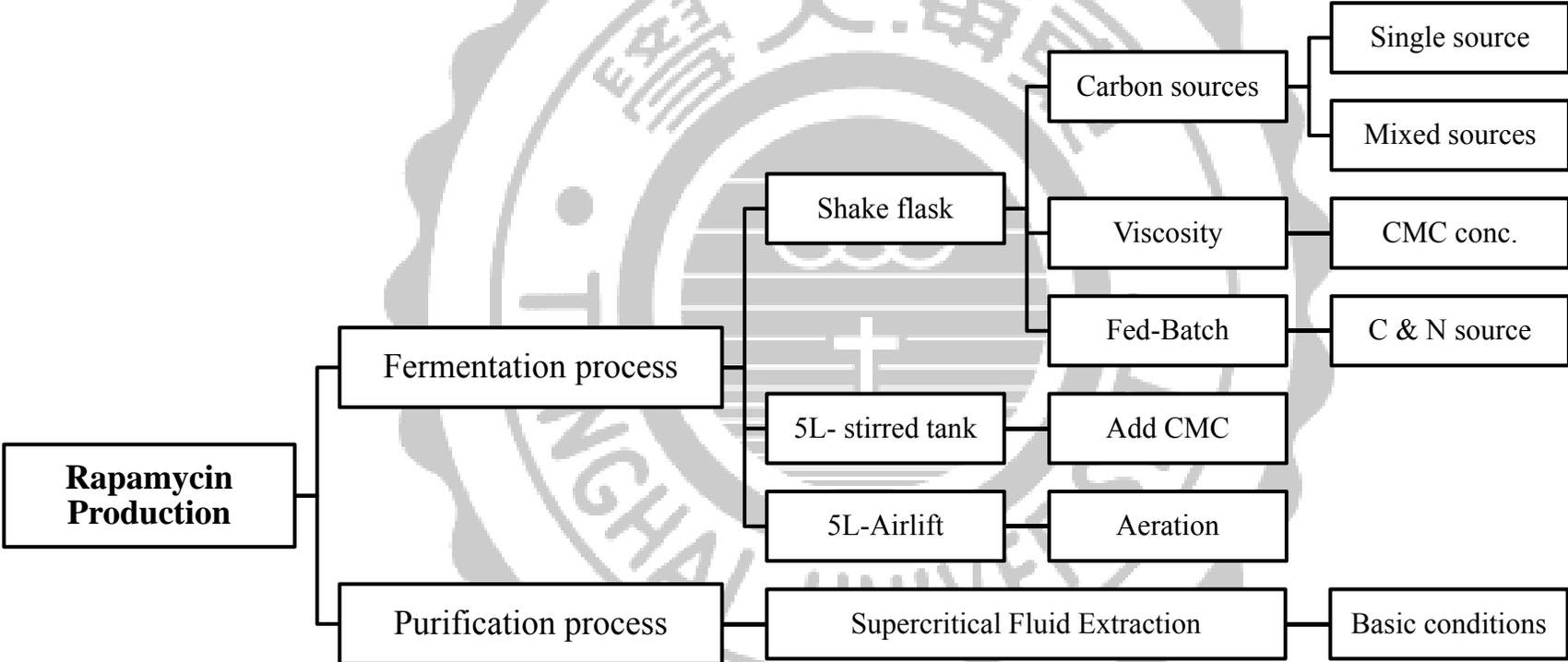
Fermentation - medium	
Medium	Concentration (g/L)
Yeast Extract	4.0
Malt Extract	10.0
Fructose	20.0
Glycerol	10.0
Soluble Starch	10.0
Adjust pH to	7.3

依據表 3-4，配置 Fermentation - medium 液態發酵培養基 50 ml 攪拌均勻且調至 pH 7.3 後，置入 250 ml 三角搖瓶中，放置高壓蒸氣滅菌釜殺菌 20 min（操作壓力為 1.2 kg/cm²，溫度為 121°C）。待培養基滅菌完取出，放置無菌操作台靜置冷卻後，取 Seed Medium 培養後之活化菌種 5 ml，倒入培養基中，送至恆溫震盪培養箱以溫度 28°C，轉速 150 rpm 條件下進行培養 120 小時。

3.4.3 接菌

將培養 48 小時之 Seed medium 接至 Fermentation medium 中，接菌量為 Fermentation medium 體積之 10 %。

3.5 實驗架構



3.6 實驗培養條件(Fermentation process)

3.6.1 搖瓶批次發酵程序(Flasks – Batch experiment)

3.6.1.1 培養時間之影響

目的：探討培養時間對菌體生長與 Rapamycin 生產之關係。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以 10% 接菌量將上述 SM 接種至 50 ml 以葡萄糖為碳源之 FM 搖瓶中，製備 21 瓶。
3. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中培養 264 小時，在第 24、48、72、96、144、192、240 小時各取樣三瓶。

3.6.1.2 菌種老化程度之影響

目的：探討種菌在不同的老化時間接入發酵培養基，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中培養。
2. 將上述 SM 搖瓶在第 24、36、48、60、72 小時取出預備。
3. 以 10% 接菌量將上述老化時間之 SM，各自接種至三瓶 50 ml 以葡萄糖為碳源之 FM 搖瓶中，共製備 15 瓶。
4. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養 168 小時後，取樣分析。

3.6.1.3 不同碳源與碳源濃度之影響

目的：探討不同碳源(葡萄糖、乳糖、果糖、甘露糖、甘油、澱粉)對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 配製每瓶 50 ml 各自以 10 g/L 之葡萄糖、乳糖、果糖、甘露糖、甘油、澱粉作為碳源之 FM 搖瓶。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述 FM 搖瓶中。
4. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養 168 小時後，取樣分析。

3.6.1.4 添加 10 g/L 甘油作為組合原料(Combination Feeding)之影響

目的：探討添加 10 g/L 之甘油作為組合原料，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 配製每瓶 50 ml 各自以 10 g/L 之葡萄糖、果糖、甘露糖、澱粉作為碳源並加入 10 g/L 甘油之 FM 搖瓶。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述 FM 搖瓶中。
4. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養 168 小時後，取樣分析。

3.6.1.5 混和碳源與單一碳源之比較

目的：比較混和碳源與單一碳源，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 配製每瓶 50 ml，以葡萄糖、果糖、甘油、澱粉等，各種混和碳源條件之 FM 搖瓶。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述 FM 搖瓶中。
4. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養 168 小時後，取樣分析。

3.6.1.6 添加 CMC 造成不同黏度之影響

目的：探討添加 CMC 後，造成不同黏度之培養基，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備每瓶 50 ml 並各自添加不同重量 CMC 之 FM 搖瓶。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 搖瓶中。
4. 於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養 168 小時後，取樣分析。

3.6.2 搖瓶饋料批次發酵程序

3.6.2.1 以碳氮源為饋料之影響

目的：探討以不同濃縮碳氮源(原始培養基、Yeast Extract、Malt Extract、Glycerol、Fructose)饋料，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備每瓶 50 ml 之 FM 搖瓶。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 搖瓶中，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中各自培養。
4. 配製 5 ml 濃縮液，以表 3-6 培養基、Yeast Extract 4 g/L、Malt Extract 10 g/L、Glycerol 10 g/L、Fructose 10 g/L 等濃度，取 50 ml 之克數，溶解於 5 ml 蒸餾水中。
5. 將上述濃縮液滅菌冷卻後，在培養後第 120 小時饋料至 FM 搖瓶中。
6. 饋料後繼續培養於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中直至總培養時間為 168 小時後，取樣分析。

3.6.3 5L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 (5L Stirred tank bioreactor)

3.6.3.1 添加 CMC 之影響

目的：探討利用 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序，並且同時於培養基中添加 3 g/L 之 CMC，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備 3000 ml 且添加 3 g/L CMC 之 FM 培養基，於 5L 攪拌式發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 培養基中，於通氣量 1 vvm、控溫 28°C、攪拌速率 150 rpm 之條件下進行培養。
4. 每 9~12 小時取樣分析，培養時間為 168 小時。

3.6.4 5L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 (5L Air-lift bioreactor)

3.6.4.1 控制通氣量之影響

目的：探討利用 5L 氣舉式發酵槽進行發酵程序，並以通氣量作為變因，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備 5000 ml 且添加 3 g/L CMC 之 FM 培養基，於 5L 氣舉式發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 培養基中，於各別通氣量為 1 vvm、1.5 vvm、2 vvm，28°C 之條件下進行培養。
4. 每 9~12 小時取樣分析，培養時間為 168 小時。

3.6.4.2 一次性饋料之影響

目的：探討利用 5L 氣舉式發酵槽進行一次性饋料批次發酵程序，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備 5000 ml 且添加 3 g/L CMC 之 FM 培養基，於 5L 氣舉式發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 培養基中，於通氣量 1.5 vvm，28°C 之條件下進行培養。
4. 配製 500 ml 濃縮液，以 Yeast Extract 8 g/L 之濃度，取 5000 ml 之克數，溶解於 500 ml 蒸餾水中。
5. 將上述濃縮液滅菌冷卻後，在培養後第 96 小時饋料至發酵槽中。
6. 每 9~12 小時取樣分析，培養時間為 180 小時。

3.6.4.3 固定時間饋料之影響

目的：探討利用 5L 氣舉式發酵槽進行固定時間饋料批次發酵程序，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

1. 配製每瓶 100 ml 之 SM 培養基，於 28°C、150 rpm 震盪培養箱中進行前培養 48 小時。
2. 以表 3-4 配方製備 5000 ml 且添加 3 g/L CMC 之 FM 培養基，於 5L 氣舉式發酵槽中。
3. 以 10% 接菌量將 SM 接種至上述之 FM 培養基中，於通氣量 1.5 vvm，28°C 之條件下進行培養。
4. 配製 500 ml 濃縮液，以 Yeast Extract 8 g/L 之濃度，取 5000 ml 之克數，溶解於 500 ml 蒸餾水中。
5. 將上述濃縮液滅菌冷卻後，在培養後第 96 小時，將 500 ml 濃縮液以 10 ml/hr 之速率，連續饋料 50 小時至發酵槽中。
6. 每 9~12 小時取樣分析，培養時間為 220 小時。

3.7 Rapamycin 萃取與純化條件(Purification process)

3.7.1 溶劑萃取

1. 取發酵液 1 ml，於 7000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，保留濕菌。
2. 將離心後之菌體再加入 1 ml 甲醇，震盪均勻混和，並靜置至少一小時。
3. 靜置後，再於 7000 rpm 離心 5 分鐘，取出上清液約 1 ml，是為 Rapamycin 甲醇萃取液。

3.7.2 超臨界萃取與純化

3.7.2.1 超臨界萃取之控制條件與設備參數設定

1. 取發酵液 5 ml，於 7000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，以同體積去離子水均勻混和，並再次離心，重複兩次上述動作，取菌體。
2. 將離心後菌體，至於冷凍乾燥機 24 至 48 小時，去除水分。
3. 取乾菌 1 g，置於管柱中間位置，前後端以玻璃棉填充。
4. 設定超超臨界設備：恆溫水槽循環水 4°C、空氣壓縮機 6~8 kg/cm³、烘箱溫度 50°C、出口溫度 170°C、壓力幫浦 220 bar。
5. 置入空管柱於烘箱中，並打開入口閥使流體進入管柱中，等待約一小時，使溫度達到穩定。
6. 將出口端管線與封蓋空血清瓶連接且將血清瓶置於冰水浴中。

7. 烘箱溫度達 50°C 並維持穩定時，打開流體出口閥並調整微調閥，使出口流量維持在 2000 ml/min，使流體流動約 30 分鐘。
8. 上述步驟 4~6 為穩定設備與管線清洗之步驟，待確定管線無阻塞後換入填充完成之管柱，改變設備參數，開始以下實驗。

3.7.2.2 Rapamycin 超臨界萃取之溫度影響

目的：探討二氧化碳在超臨界狀態下之溫度對 Rapamycin 的萃取性質。

1. 重複一次 3.7.2.1 之步驟後，固定壓力幫浦 150bar，將步驟四之烘箱溫度依序改變為 50°C、80°C、90°C、100°C、120°C，並打開入口端使流體進入管柱，每次改變溫度皆等待 30 分鐘，使溫度達到穩定後，繼續下一步驟。
2. 更換出口端空血清瓶，並將出口端管線與封蓋血清瓶連接且將血清瓶置於冰水浴中。
3. 打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2000 ml/min，持續流體流動約 1 小時。
4. 收集冷凝之萃取物，並於常溫下回溶於 15 ml 甲醇，使用 HPLC 分析。

3.7.2.3 Rapamycin 超臨界萃取之壓力影響

目的：探討二氧化碳在超臨界狀態下之壓力對 Rapamycin 的萃取性質。

1. 重複一次 3.7.2.1 之步驟後，固定溫度 50°C，將步驟四之壓力幫浦依序改變為 150 bar、220 bar、200 bar、250 bar，並打開入口端使流體進入管柱，每次改變溫度皆等待 30 分鐘，使溫度達到穩定後，繼續下一步驟。
2. 更換出口端空血清瓶，並將出口端管線與封蓋血清瓶連接且將血清瓶置於冰水浴中。
3. 打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2000 ml/min，持續流體流動約 1 小時。
4. 收集冷凝之萃取物，並於常溫下回溶於 15 ml 甲醇，使用 HPLC 分析。

3.7.2.4 Rapamycin 超臨界萃取之共溶劑影響

目的：探討不同共溶劑在二氧化碳之超臨界狀態下對 Rapamycin 的萃取性質。

1. 重複一次 3.7.2.1 之步驟後，固定溫度 50°C、壓力 250 bar，等待 30 分鐘，使溫度達到穩定後，並打開入口端使流體進入管柱。
2. 更換出口端空血清瓶，並將出口端管線與封蓋血清瓶連接且將血清瓶置於冰水浴中。

3. 打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2000 ml/min，持續流體流動約 1 小時。
4. 準備待測之共溶劑：甲醇、乙醇、DMSO、乙酸乙酯各 30 ml。
5. 關閉出口閥，更換乾淨之血清瓶，打開共溶劑幫浦，排空管線內空氣與殘留之溶劑，並用待測共溶劑潤洗(潤洗體積約 15 ml)。
6. 設定共溶劑幫浦流速 0.5 ml/L，打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2500 ml/min，計時 30 分鐘，經過管柱之溶劑總體積共 15 ml。
7. 收集冷凝之萃取溶劑，待 15 ml 溶劑全數留出口端管線血清瓶後，關閉進口閥與出口閥。更換血清瓶，打開出口閥使管柱內壓力排空至常壓，取出管柱。
8. 取出管柱，取出菌粉並秤重。
9. 重複 3.7.1 之步驟 2、3，取得菌體萃取液，使用 HPLC 分析共溶劑萃取液與菌體萃取液，計算 Rapamycin 總量，與 Rapamycin 乾菌粉甲醇萃取液作比較，計算回收率。
10. 使用 HPLC 分析樣品之樣品圖譜得到共溶劑萃取物之 Rapamycin 主結構峰面積。

3.7.2.4 兩段式加入共溶劑對於超臨界萃取 Rapamycin 之純度影響

目的：探討利用兩階段式方法加入共溶劑在二氧化碳之超臨界狀態下對萃取 Rapamycin 的純度影響。

1. 重複一次 3.7.2.1 之步驟後，固定溫度 50°C、壓力 250 bar，等待 30 分鐘，使溫度達到穩定後，並打開入口端使流體進入管柱。
2. 更換出口端空血清瓶，並將出口端管線與封蓋血清瓶連接且將血清瓶置於冰水浴中。
3. 打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2000 ml/min，持續流體流動約 1 小時。
4. 準備共溶劑：甲醇、DMSO 各 30 ml。
5. 關閉出口閥，更換乾淨之血清瓶，打開共溶劑幫浦，排空管線內空氣與殘留之溶劑，並用待測共溶劑潤洗(潤洗體積約 15 ml)。
6. 設定加入甲醇共溶劑幫浦流速 0.5 ml/L，打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2500 ml/min，計時 30 分鐘，經過管柱之溶劑總體積共 15 ml。
7. 收集冷凝之萃取溶劑，待 15 ml 溶劑全數留出口端管線血清瓶後，關閉進口閥，利用步驟 3 吹乾菌粉後，更換血清瓶。

8. 利用 DMSO 潤洗幫浦後，設定並加入 DMSO 共溶劑幫浦流速 0.3 ml/L，打開出口閥並控制微調閥，使出口流量維持在 2500 ml/min，計時 50 分鐘，經過管柱之溶劑總體積共 15 ml。
9. 收集冷凝之萃取溶劑，待 15 ml 溶劑全數留出口端管線血清瓶後，關閉進口閥與出口閥。更換血清瓶，打開出口閥使管柱內壓力排空至常壓，取出管柱。
10. 取出管柱，取出菌粉並秤重。
11. 使用 HPLC 分析共溶劑萃取液與菌體萃取液，計算 Rapamycin 總量，與 Rapamycin 乾菌粉甲醇萃取液作比較，計算回收率。
12. 使用 HPLC 分析樣品之樣品圖譜得到共溶劑萃取物之 Rapamycin 主結構峰面積。



圖 3-3 氣舉式發酵槽裝置圖

左圖 3-3 為本研究使用之 5 公升內部循環氣舉式生物反應器，

規格如下：

上部：

高 30 公分

外徑 10 公分

下部：

內管直徑 7.7 公分

氣流循環工作體積 3 公升



圖 3-4 攪拌式發酵槽裝置圖

左圖 3-4 為本實驗使用之攪拌式生物反應器，配備如下：

BioTop 發酵槽與電腦控制系統：

循環水系統：

連接恆溫水槽，隨時控制溫度

饋料系統：

電腦監控進料與酸鹼溶液

控制器與監控螢幕：

可連接電腦軟體，24 小時不間斷紀錄數值，如 pH 值與 DO 值。

第四章 結果與討論

4.1 搖瓶批次發酵程序(Flasks – Batch experiment)

4.1.1 培養時間之影響

此實驗為測試 *St. hygroscopicus* 培養條件之首要探討，藉由時間作為變因，觀察 *St. hygroscopicus* 之生物質量生長與 Rapamycin 生長濃度曲線，並藉由觀察碳源之消耗曲線與 pH 值曲線，作為往後實驗探討變因之基礎條件。實驗結果由圖 4-1 可知，在葡萄糖持續消耗下，pH 值曲線在前段生長期由初始值 6.5 上升至 8.7，而後隨著生物質量開始增加，pH 值曲線開始下降，下降至大約 7.0~6.5 後持平無明顯升降。而生物質量則在前 100 小時期間持續累積，待生物質量累積至一定，Rapamycin 濃度開始上升，在生長期後半段持續增加，最後葡萄糖消耗至接近零點，生物質量生長至 7.3 g/L 持平停滯，Rapamycin 濃度則累積至相對最大值 670.7 mg/L。由此實驗可知，*St. hygroscopicus* 由消耗葡萄糖開始生長，生長期間會造成 pH 值的持續變化，因此，後續實驗可由 *St. hygroscopicus* 對不同碳源種類的消耗情形開始，並觀察 pH 值的變化狀況，判斷 *St. hygroscopicus* 的生長狀態，且藉由測量生物質量的累積程度，推測 Rapamycin 的生產情形。

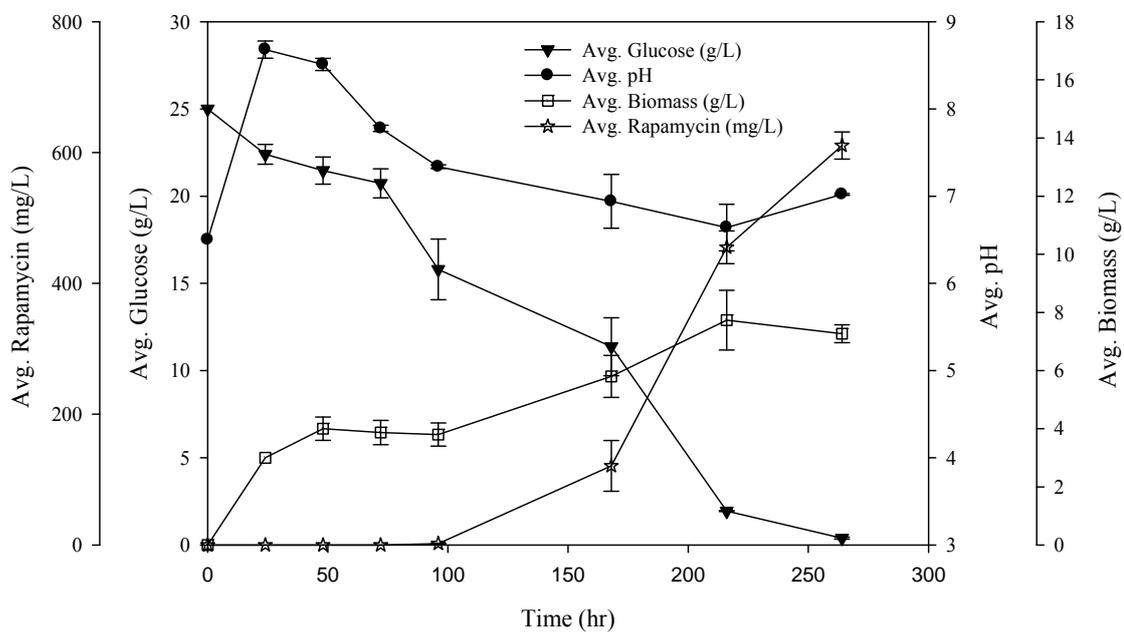


圖 4-1 培養時間對於菌體生長與 Rapamycin 生產之關係

4.1.2 菌種老化程度之影響

此實驗目的為探討種菌在不同的老化時間接入發酵培養基，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。以孢子液接入種子培養基(表 3-5 右)之時間開始做計算，取樣後直接接入發酵培養基(表 3-6)進行發酵程序。下圖(圖 4-2)數據為各活化時間點取樣後，進入發酵培養 7 天後之發酵培養基分析數值。下表(表 4-1)數據之 OD 值為活化時間點之種子培養基取樣直接分析得到之數值，而平均 CFU 值 (Colony-Forming Unit)則為活化時間點之種子培養基取樣稀釋再接入固態種子培養基(表 3-5 左)約 48 小時後，計算平均菌落數而得。實驗結果由表 4-1 觀察，可推測孢子液進入種子培養基活化後開始生長的情形。孢子在活化後 24 小時開始分

化為菌體，平均菌落數為 2.27×10^8 ，在活化 36 小時後，菌落數達到相對最大值 7.99×10^8 。而在前 36 小時，OD 值尚無明顯變化(1.221~1.222)，可推測此時菌體尚未成長為菌絲體。直到 48 小時後，OD 值上升(1.311)但平均 CFU 值下降至 1.50×10^8 ，而 60 小時後，OD 值來到相對最大值(1.385)，推測此時菌體已成長至較大濃度，且種子培養基已些微可見細小顆粒，判斷此階段培養基中菌絲體已分裂至較大濃度且開始纏繞為顆粒。活化後之種菌培養基於上述各階段接入發酵培養基，並於培養 7 天後分析得到數據結果。由圖 4-2 觀察得知，在孢子液尚未活化完全時(24 小時前)接入發酵培養，種菌仍會在發酵培養基內繼續生長，但菌體生產及 Rapamycin 之生產能力較低於活化完全(36 小時後)之種菌。種菌老化持續進行至第 48 小時與第 60 小時，觀察結果發現，在 36 至 60 小時之間接入發酵培養之種菌，其菌體生長與 Rapamycin 生產能力持續增加，而第 60 小時取樣之種菌，Rapamycin 生長濃度為此實驗分析樣本之相對較大值。由此實驗可得推論，*St. hygroscopicus* 之孢子液，經過 24~72 小時之種菌活化與老化，種菌在第 60 小時的老化程度相對在發酵培養程序中，較適合生產 Rapamycin。

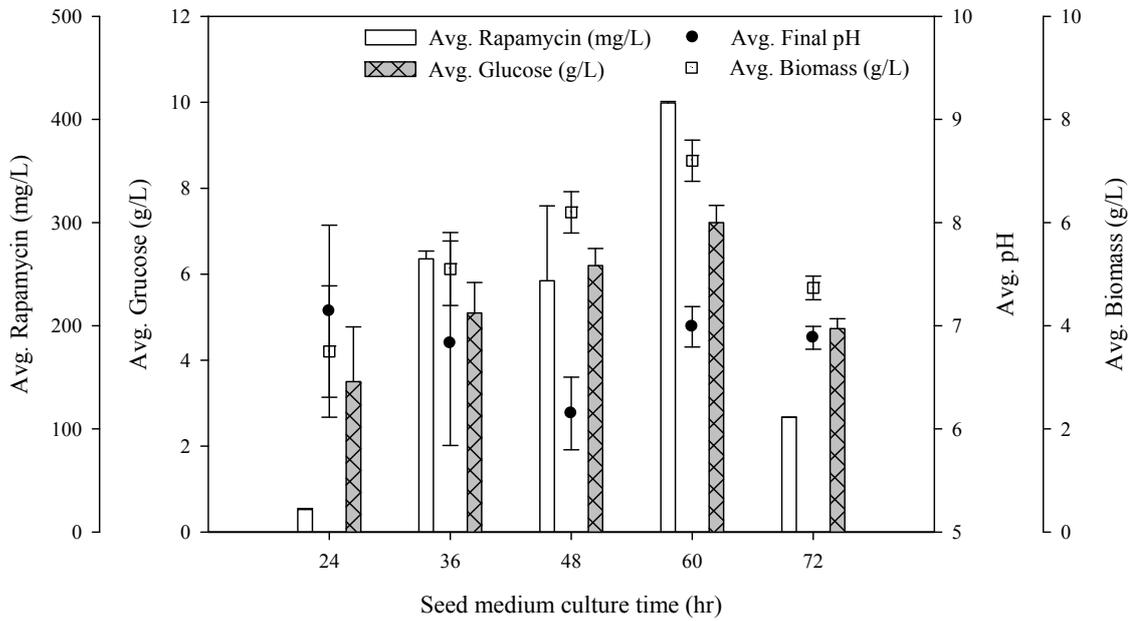


圖 4-2 種菌在不同的老化時間發酵培養，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響
 表 4-1 種菌在不同的老化時間發酵培養，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響

Culture Time (hour)	Avg. Final Glucose (g/L)	Avg. Final pH	Avg. Biomass(g/L)	Avg. Rapamycin (mg/L)	OD (660 nm)	Avg. CFU(*10 ⁸)
24	16.10±2.0	7.14±0.8	3.50±1.3	21.98±0.8	1.221	2.27
36	10.87±4.2	6.83±1.0	5.10±0.7	264.79±7.7	1.222	7.99
48	4.47±0.5	6.15±0.4	6.20±0.4	243.62±72.6	1.311	1.50
60	7.67±4.0	6.99±0.2	7.20±0.4	416.12±1.2	1.385	1.96
72	14.67±0.8	6.88±0.1	4.73±0.2	111.08±0.5	1.355	1.40



圖 4-3 種菌活化 60 小時，培養 24 小時



圖 4-4 種菌活化 72 小時，培養 24 小時

4.1.3 不同碳源與碳源濃度之影響

此實驗的目的在於探討不同碳源對 *St. hygrosopicus* 的菌體生長與 Rapamycin 生產情形之影響，由文獻中找出常見且具有對 *St. hygrosopicus* 較好影響之 6 種碳源(葡萄糖、乳糖、果糖、甘露糖、甘油、澱粉) (Kojima et al., 1994)。實驗開始以不同種類之碳源皆設定添加 10 g/L 做為比較值，圖 4-9 為此次實驗之結果，由觀察可得，添加乳糖(Lactose)作為主要碳源時，可得到較高之菌體生長濃度，但在比較 Rapamycin 生長濃度時，乳糖並不是其中較適合生產 Rapamycin 之主要碳源。由菌體形態觀察，由 10 g/L 澱粉(Starch)作為主要碳源時，菌體之平均直徑有相對較大，且菌體較其他碳源來說，較為緻密，雖然 Rapamycin 生長濃度並非最佳，但在後續實驗中亦有探討價值。若以 Rapamycin 生長濃度為主要探討條件，由 10 g/L 果糖(Fructose)作為主要碳源時，其 Rapamycin 生長濃度為相對最大值 294.31 mg/L，其實驗結果與文獻相符(Kojima et al., 1994)，因此後續實驗，考慮使用果糖為主要碳源。

因此，後續實驗探討果糖添加濃度對 *St. hygrosopicus* 的影響，結果由圖 4-10 可得，果糖添加濃度為 20 g/L 時，Rapamycin 生長濃度為相對最大值 335.5 mg/L。另外考慮文獻中曾有使用澱粉與甘油作為碳源的例子(Chen et al., 2009)，因此接著討論澱粉添加濃度與甘油添加濃度 *St. hygrosopicus* 的影響。實驗結果由圖 4-11、圖 4-12 觀察得到，隨著澱粉添加濃度的增加，Rapamycin 生長濃度也

隨之上升，但添加濃度到達 50 g/L 時，澱粉未能完全溶於水中，因此無法得出澱粉濃度對 Rapamycin 生長濃度之相對最大值，且因培養基之黏度隨著澱粉添加濃度增加而明顯上升，培養基黏度是否影響 *St. hygrosopicus* 的生長與 Rapamycin 生長濃度，將於後續實驗進行討論。而甘油添加濃度對 Rapamycin 生長濃度，於圖 4-12 中可發現，甘油添加濃度於 20 g/L 時，Rapamycin 生長濃度明顯提升，為 354.3 mg/L，甚至稍高於果糖添加濃度為 20 g/L 時之 335.5 mg/L。且文獻中曾經提及，若使用甘油作為組合原料，可能促使 *St. hygrosopicus* 提升 Rapamycin 之生長(Zhu et al., 2010)。因此，後續實驗亦增加討論使用甘油作為組合原料對 *St. hygrosopicus* 生產 Rapamycin 之影響。

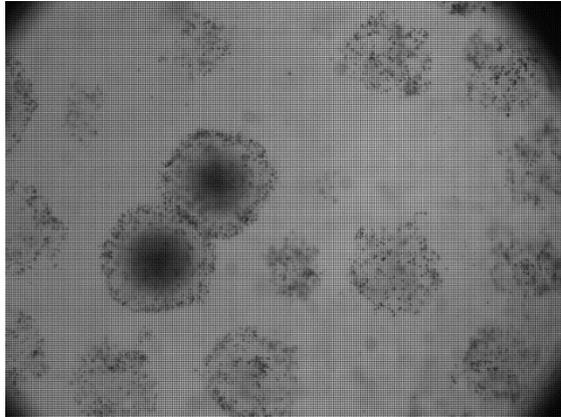


圖 4-5 使用果糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。

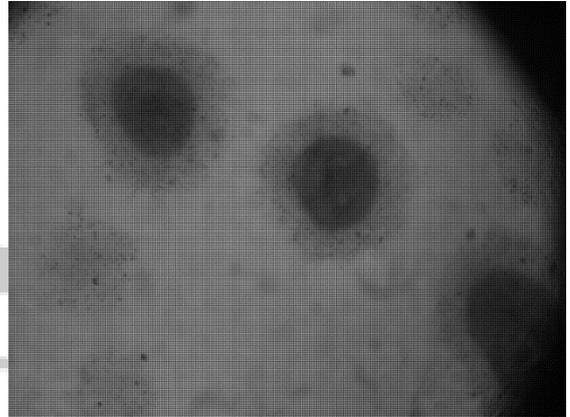


圖 4-6 使用澱粉做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。

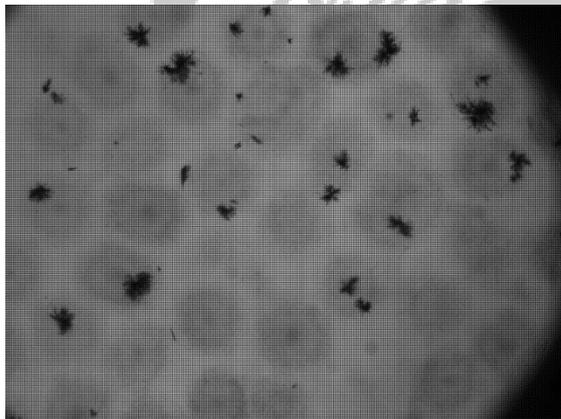


圖 4-7 使用葡萄糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。

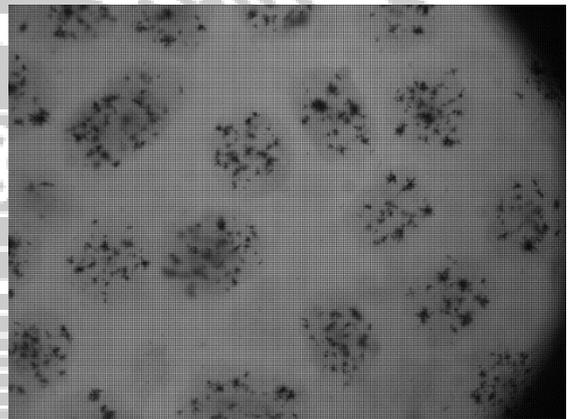


圖 4-8 使用甘露糖做為碳源培養後之菌體在 400 倍率光學顯微鏡下之形態。

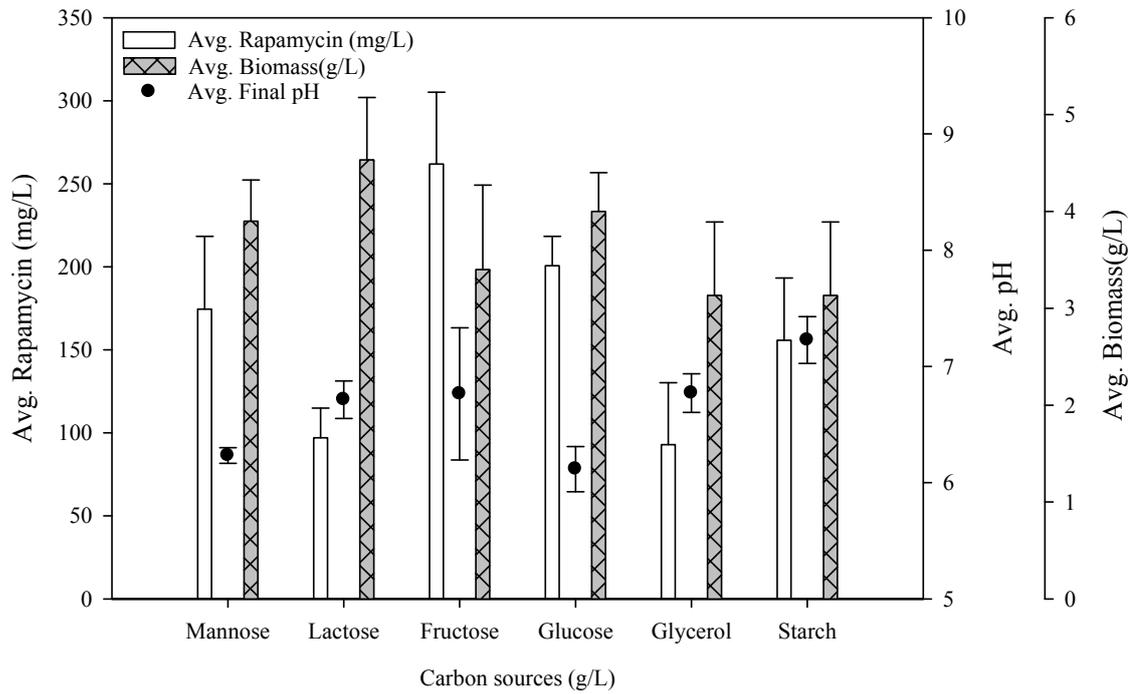


圖 4-9 不同碳源對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。

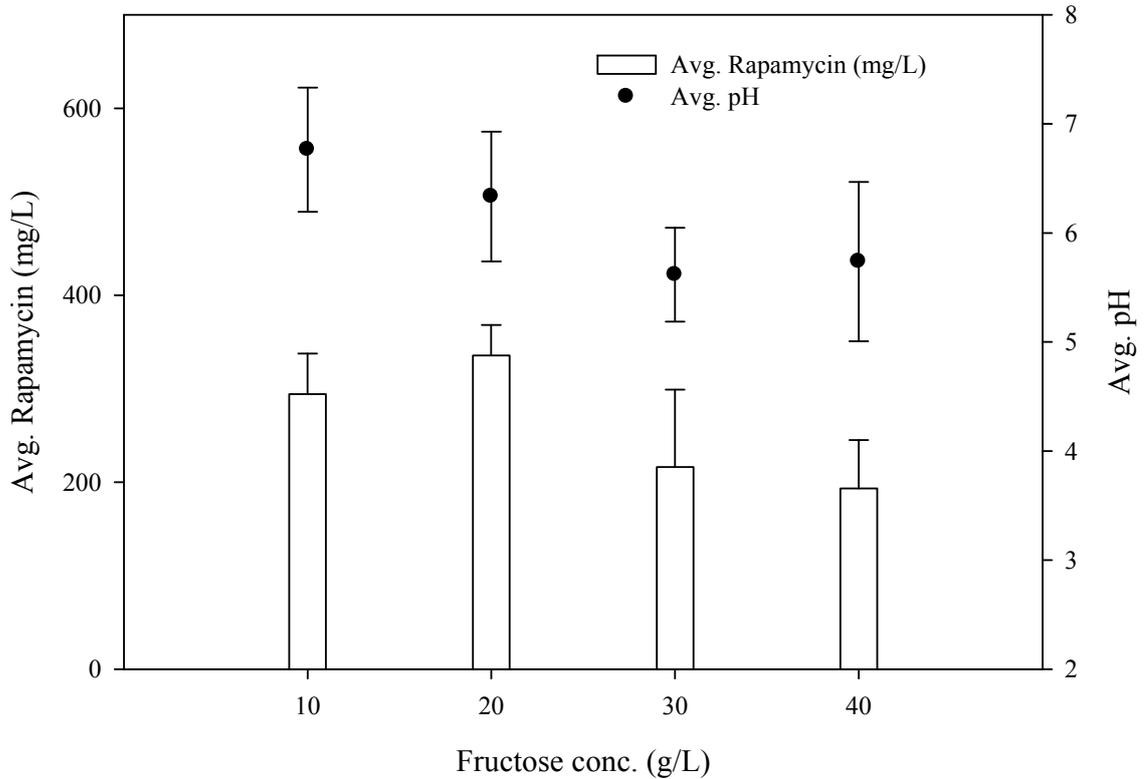


圖 4-10 不同果糖濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。

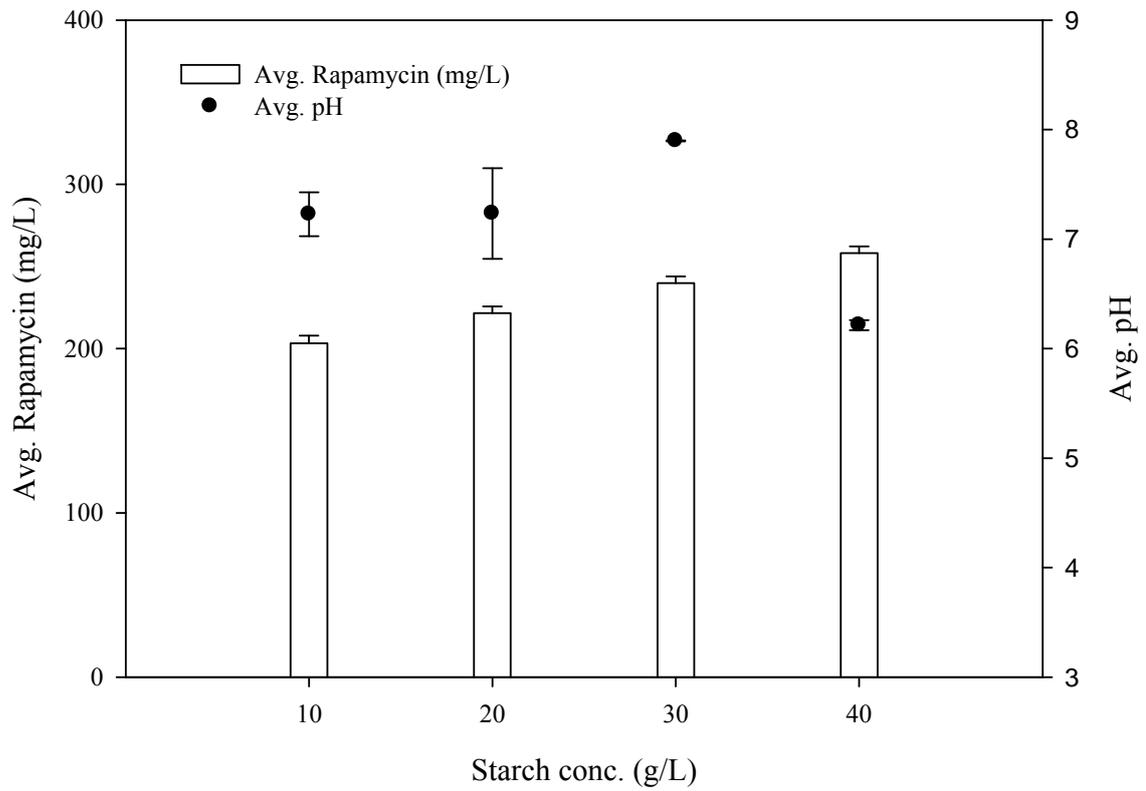


圖 4-11 不同澱粉濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。

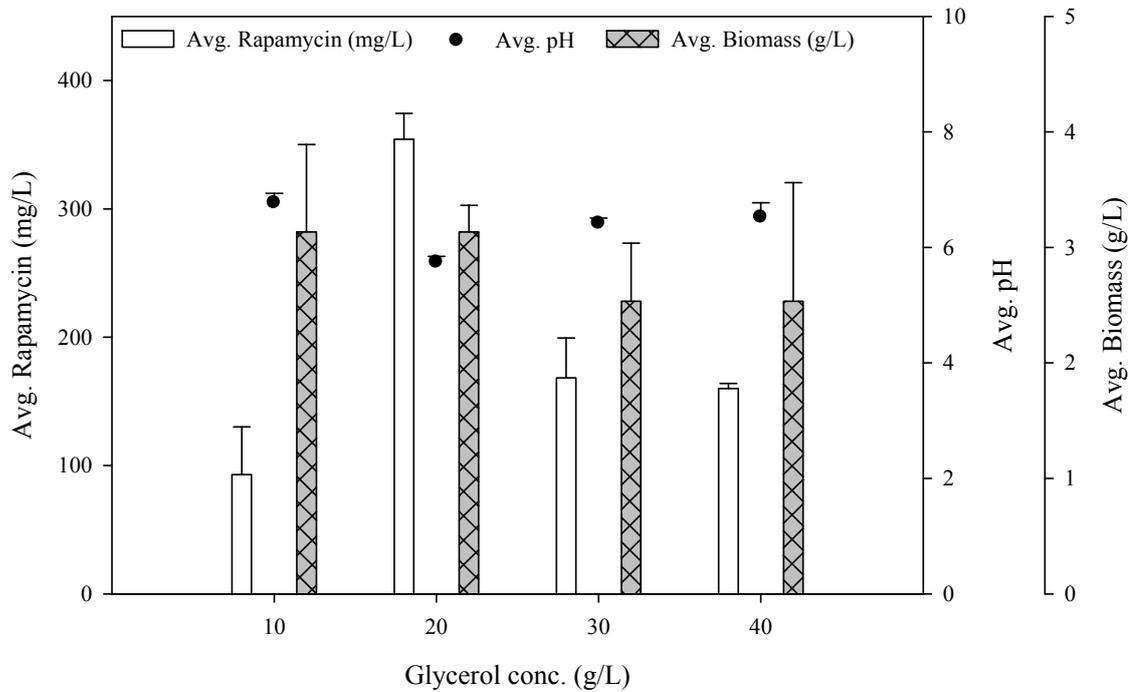


圖 4-12 不同甘油濃度對 pH 值與 Rapamycin 生產之影響。

4.1.4 添加 10 g/L 甘油作為組合原料之影響

由文獻得知(Zhu et al., 2010)，甘油在培養基中，除了作為碳源外，亦有作為組合原料(combination feedings)，結合賴氨酸誘導*St. hygroscopicus*生成Rapamycin之效果。此次實驗目的為在培養基中添加甘油作為組合原料，討論不同碳源添加相同濃度之甘油後，培養*St. hygroscopicus*對Rapamycin生長濃度之影響。實驗結果觀察得知，添加甘油後之其他主碳源培養基，經7天培養過後，與未添加甘油相比，效果皆明顯提升。由圖4-13，主要碳源為澱粉10 g/L時，混和10 g/L甘油，其Rapamycin生產濃度較主碳源為澱粉20 g/L時，增加277.4 mg/L。而主要碳源為果糖10 g/L時，混和10 g/L甘油，其Rapamycin生長濃度較主碳源為果糖20 g/L時，增加117.8 mg/L。其他主碳源添加過甘油培養後，其Rapamycin生長濃度亦有些微提升。根據文獻，甘油可提升Rapamycin生產濃度達450 mg/L (Zhu et al., 2010)，而本研究由實驗結果證實，添加甘油作為組合原料，的確有助提升Rapamycin之生長濃度，與文獻相符。但由於甘油也屬於碳源的一種，因此，增加後續混和碳源與單一碳源之比較實驗，以佐證甘油的確為提升Rapamycin生長濃度之組合原料。

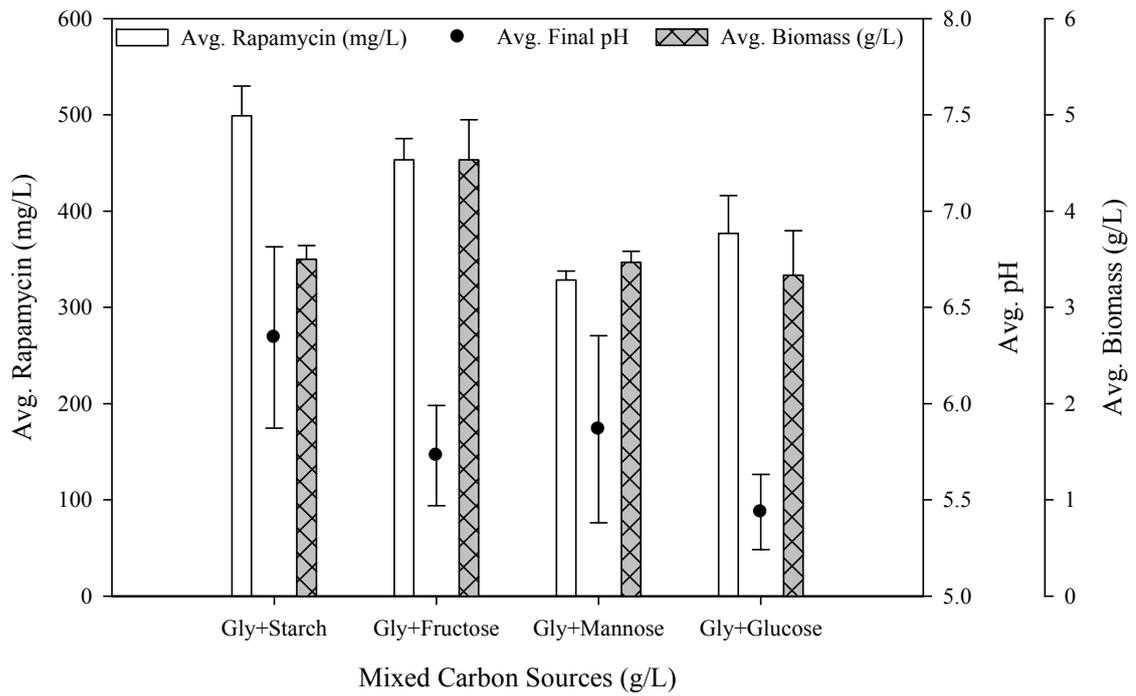


圖 4-13 添加 10 g/L 之甘油作為組合原料，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。



4.1.5 混和碳源與單一碳源之比較

此次實驗目的為比較混和碳源與單一碳源，對 Rapamycin 生長濃度之影響。

以混和 4.1.3 實驗之主碳源(果糖、澱粉)為主要條件，以確認甘油為組合原料之功能，並增加總碳源濃度，以排除碳源總濃度不同可能影響 Rapamycin 生長濃度之疑慮。實驗結果由下圖 4-14 觀察得知混和碳源對於 Rapamycin 生長濃度之影響相較於添加甘油而言來的小，且混和果糖 20 g/L 與澱粉 10 g/L 時，比較只有果糖 20g/L 時之 Rapamycin 生長濃度，兩著差異不大，但前者之總碳源濃度卻已達到 30 g/L。但由菌落形態而言，果糖 20 g/L 與澱粉 10 g/L 之混和碳源所產出之菌體顆粒較為緻密，因此，後續之實驗將探討菌落形態對於 Rapamycin 生長濃度之影響。而後續實驗之培養基碳源將定義為果糖 20 g/L 與澱粉 10 g/L 並加入 10 g/L 甘油作為組合原料。

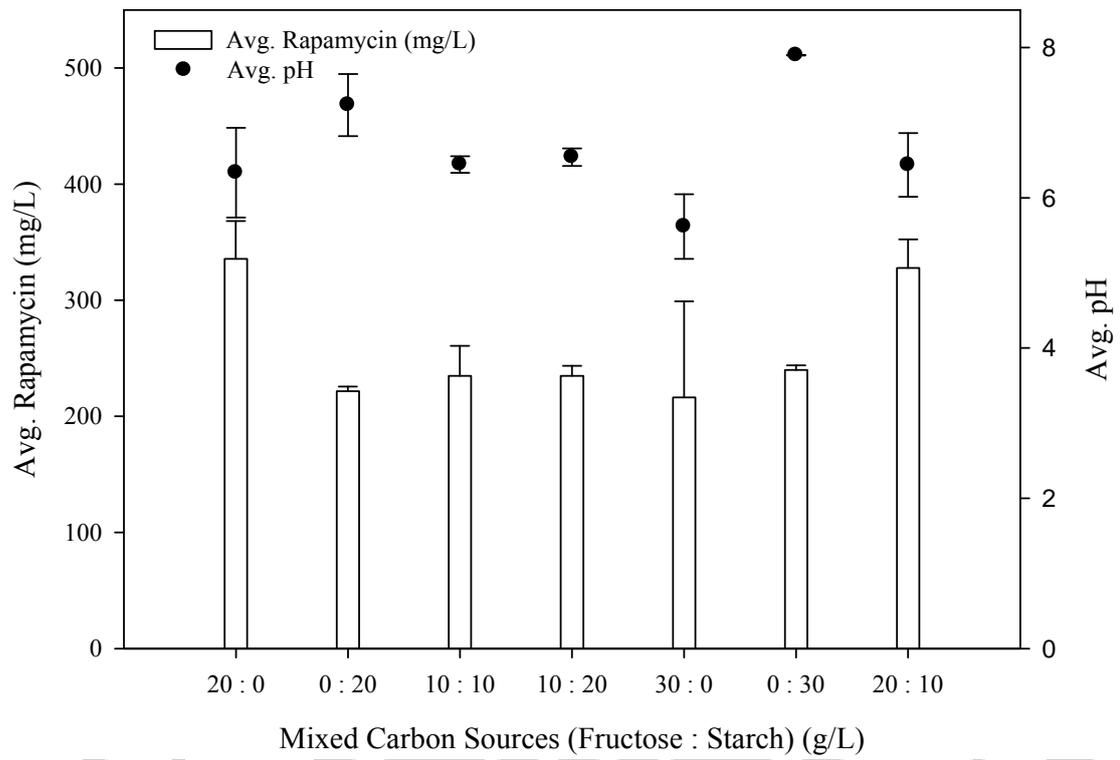


圖 4-14 使用兩種不同比例濃度碳源，對菌體生長與 Rapamycin 生產之影響。



4.1.6 添加 CMC 造成不同黏度之影響

由文獻指出，培養基的黏度與菌體在培養基中的形態可能影響抗生素的生產 (Slavica et al., 2008)。因此，本實驗在 50 ml 發酵培養基中加入不同濃度之 CMC，探討不同發酵液之黏度，對於 *St. hygroscopicus* 生長之菌體形態與 Rapamycin 之生產造成的影響。實驗結果由圖 4-15 觀察得到，於發酵培養基中添加微量 CMC(約 0.1 g/L)，造成培養基黏度些微上升時(約 4.3 CP，原發酵培養基為 3.3 CP)，菌體形態(菌體顆粒直徑)由 0.34 mm 下降至 0.29 mm，而由文獻得知，菌體形態改變伴隨影響二次代謝產物的生產。(Slavica et al., 2008)，證實結果，Rapamycin 濃度由原始之 311.9 mg/L，提升至 375.6 mg/L。爾後，隨著添加 CMC 之克數增加，菌體直徑便隨之下降，並且 Rapamycin 生產濃度亦隨之增加。而當 CMC 克數向上添加至 3 g/L 時，培養基黏度到達(12.3 CP)，而菌落直徑下降至 0.19 mm，此時之 Rapamycin 生產濃度到達相對最大值的 490 mg/L。此後，CMC 克數繼續增加至 5 g/L 與 7 g/L，培養基黏度達到 22.8 CP 與 127.7 CP，菌落直徑亦隨之下降到達 0.186 mm 與 0.182 mm，但 Rapamycin 之生產濃度卻逐漸下降至 300 mg/L 以下。由此實驗結果可知，當培養基黏度提升時，影響菌絲糾結形成顆粒，造成菌體直徑下降，伴隨影響 Rapamycin 之生產。在培養基黏度到達一定值時，菌體顆粒形態大小處於 Rapamycin 生產濃度之相對高點，但若培養基黏度向上增加，菌體培養時產生之剪接力增大，產生較不適合菌體糾結成顆

粒的培養環境，便會造成 Rapamycin 之生產濃度下降，而此實驗結果與文獻結果相似。因此，由此實驗的結果可推論，於發酵培養基內添加 3 g/L 之 CMC，提升培養基黏度至 12.3 CP，可產生較適合 *St. hygroscopicus* 菌體生產 Rapamycin 之環境。

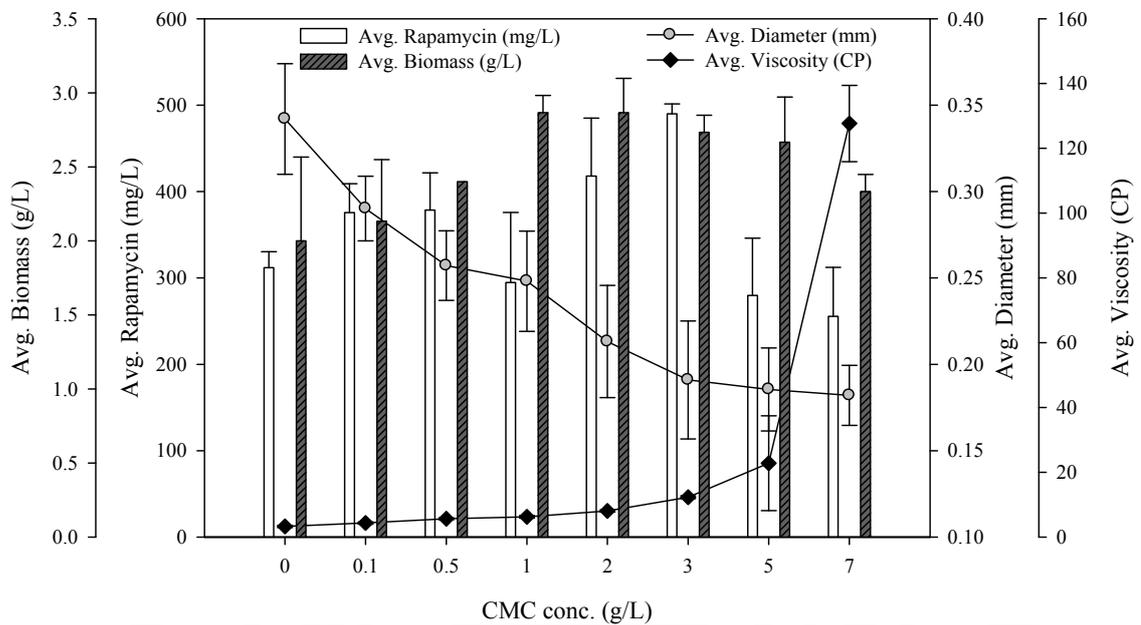


圖 4-15 添加不同濃度之 CMC，形成不同黏度之發酵培養基，對菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影響。

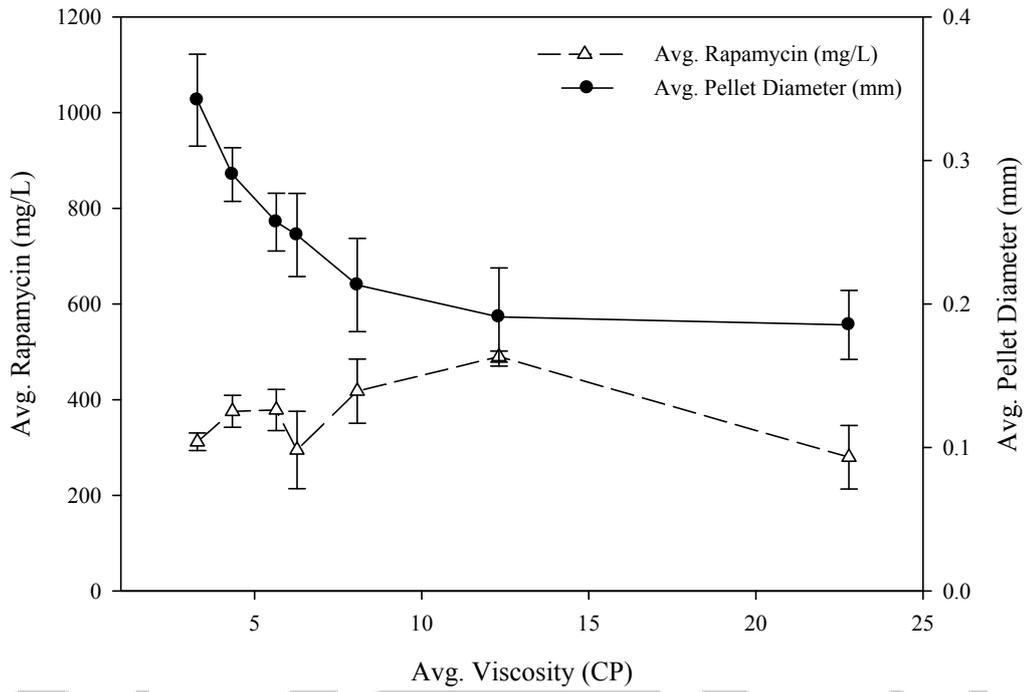


圖 4-16 不同黏度之發酵培養基，對菌體直徑與 Rapamycin 濃度之影響。

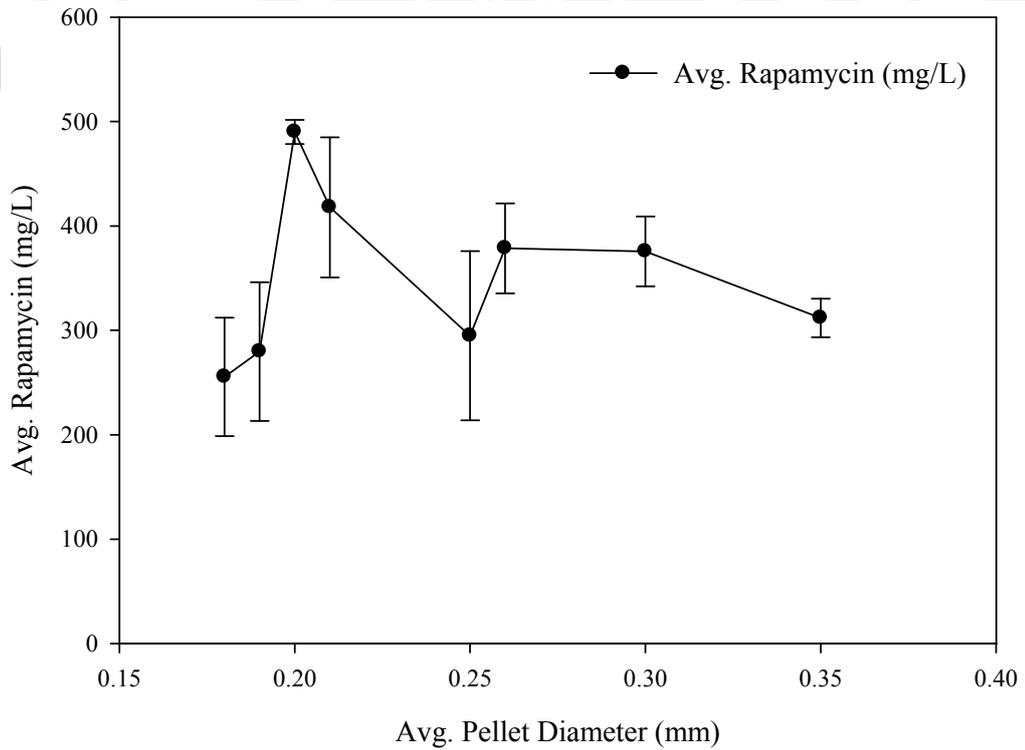


圖 4-17 添加不同濃度之 CMC，形成不同黏度之發酵培養基，其菌體顆粒直徑變化與 Rapamycin 生長濃度之對照。

4.2 搖瓶饋料批次發酵程序

4.2.1 以碳氮源為饋料之影響

在文獻中，曾有研究指出，饋料可能提升 Rapamycin 產率(Zhu et al., 2010)。

因此，此實驗以不同種類之濃縮碳氮源作為饋料成分，使用之饋料成分有原始培養基(表 3-6)、酵母萃取物(Yeast Extract)、麥芽萃取物(Malt Extract)、甘油(Glycerol)、果糖(Fructose)等，觀察以不同的饋料成分，在控制組(Control)生長至第 96 小時添加後，其對菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影響。實驗結果如圖 4-18，添加碳源為饋料成分(果糖、甘油、麥芽萃取物)時，Rapamycin 濃度與 *St. hygrosopicus* 之生物質量皆無明顯成長，而在添加氮源(酵母萃取物)為饋料後，生物質量較控制組稍微增長，但 Rapamycin 的平均濃度卻有明顯的成長幅度，由此推論，在整個 *St. hygrosopicus* 的培養後期，在培養基組成中，可能是因缺乏氮源(酵母萃取物)，而導致 Rapamycin 停止生長，因此，以添加酵母萃取物在培養後期作為饋料以增加氮源，可能是促進 Rapamycin 繼續生產的方法。但由圖 4-16 之第一組實驗，添加原始培養基作為饋料時，Rapamycin 的濃度並無明顯成長，反而是 *St. hygrosopicus* 的生物質量明顯成長。以 4.1.1 之實驗結果推測，在碳源與氮源皆充足的培養環境下，*St. hygrosopicus* 可傾向於首先生長生物質量，在生物質量生長至相對極大值後，才開始生產 Rapamycin。因此，在 *St. hygrosopicus* 的培養後期(第 96 小時後)，直接添加酵母萃取物，可能刺激 *St.*

hygroscopicus 繼續生產 Rapamycin 至 686 ± 72 mg/L。而文獻中，添加甘油

(Glycerol)作為饋料可提升 Rapamycin 生產(Zhu et al., 2010)，此實驗結果雖與不盡

相同，推測可能原因為本實驗之主要碳源果糖(Fructose)，在饋料時尚未完全消

耗，而本實驗之氮源酵母萃取物(YE)在初始添加濃度亦稍少於文獻，以至於本實

驗之結果為添加氮源，在促進 Rapamycin 生成時較有效。推測結果，當本實驗之

碳源完全消耗時，添加碳源為饋料，亦可能促使 Rapamycin 生長濃度提升。

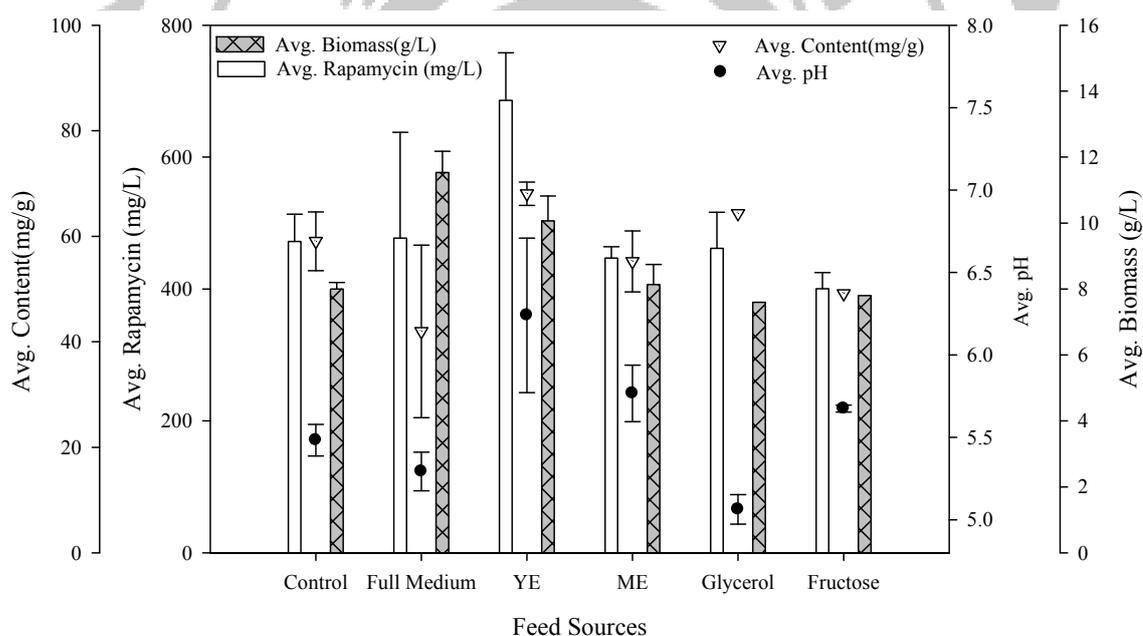


圖 4-18 以不同種類之濃縮碳氮源為饋料成分，在控制組(Control)生長第 96 小時後添加饋料，觀察饋料成分對菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影響。

4.3 5L 攪拌式發酵槽批次發酵程序 (Stirred tank bioreactor)

4.3.1 添加 CMC 之影響

本次實驗利用 5L 攪拌式發酵槽進行規模放大之發酵程序，以上述 4.1.5 實驗所定義之培養基做為控制組，對照並比較於相同培養基中添加 3 g/L CMC，對菌落形態及 Rapamycin 生長濃度之影響，且證實 4.1.6 之實驗結果，於放大發酵程序中仍具有相同之效果。實驗結果由圖 4-19 至由圖 4-22 觀察而得，於圖 4-21 之菌體生長濃度比較圖觀察得知，添加 3 g/L CMC 於發酵培養基中，促使菌體顆粒之生長速率提升，且由圖 4-22 之碳源消耗曲線比較圖觀察得到，添加 CMC 3 g/L 之實驗組在發酵程序中，較控制組而言，較快消耗掉碳源。而圖 4-19 中，pH 曲線變化比較圖中顯示，添加 CMC 之實驗組在前期之 pH 下降時機，較控制組稍微提前，爾後僅在最後 30 小時有較大差異。比較 pH 變化與菌體生長速率，CMC 實驗組與控制組之趨勢相似，但 pH 變化與菌體生長皆稍微提前。而在圖 4-19，Rapamycin 生長濃度曲線圖中，Rapamycin 生長濃度相較控制組亦向前平移約 50 小時，但後期 Rapamycin 之生長濃度於穩定值時，較控制組向上提升近 200 mg/L。由此實驗得知，於培養基中添加 3g/L CMC 確實有助於提升 Rapamycin 之生長濃度，其結果與實驗 4.1.6 之推測相符。且推測其原因為 Rapamycin 為混和型二次代謝物，其生長濃度與菌體生長速率相關。於是在培養基中加入適量 CMC，提升 *St. hygrosopicus* 之生長速率，並同時提升 Rapamycin 之生長濃度。

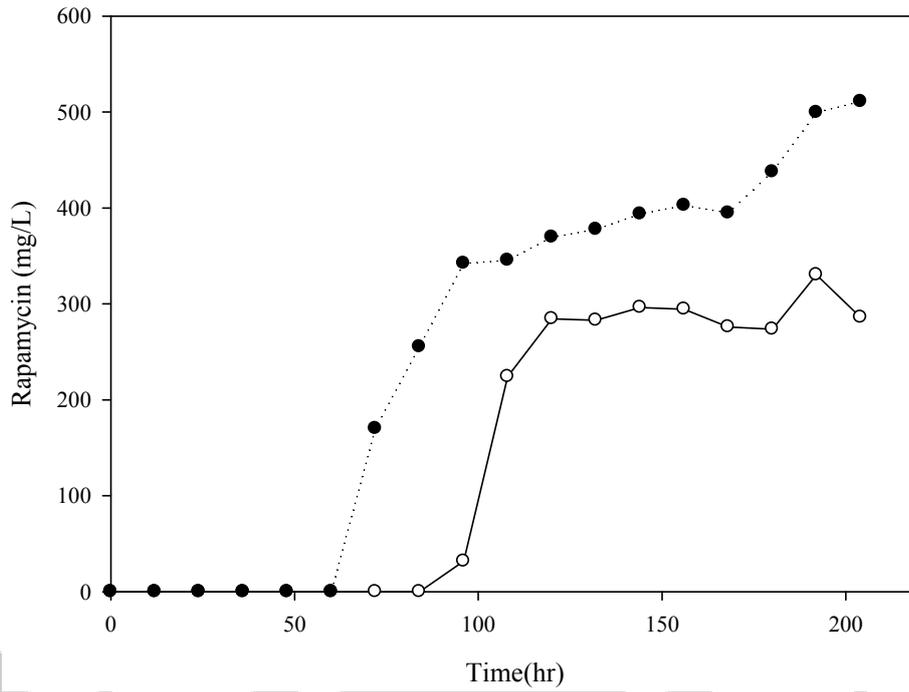


圖 4-19 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之 Rapamycin 生長濃度與控制組(未添加)比較

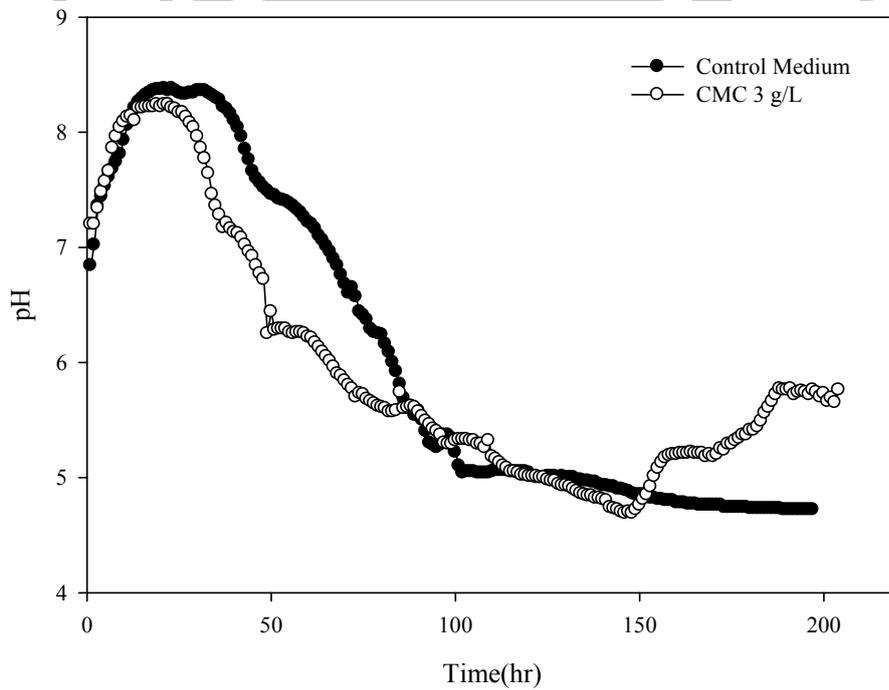


圖 4-20 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之 pH 變化曲線比較

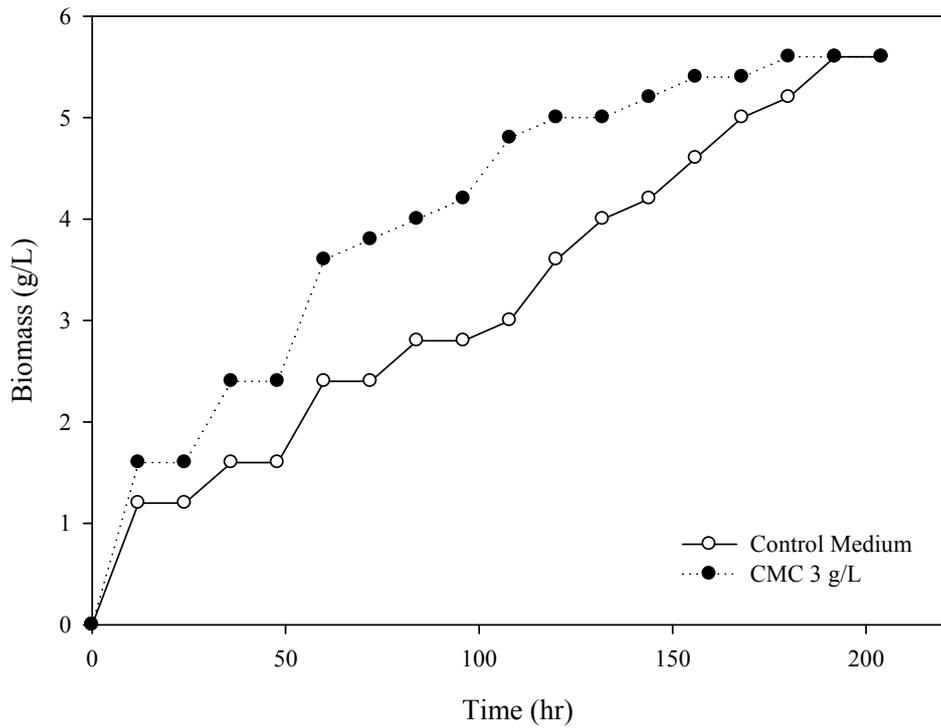


圖 4-21 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之菌體生長濃度比較

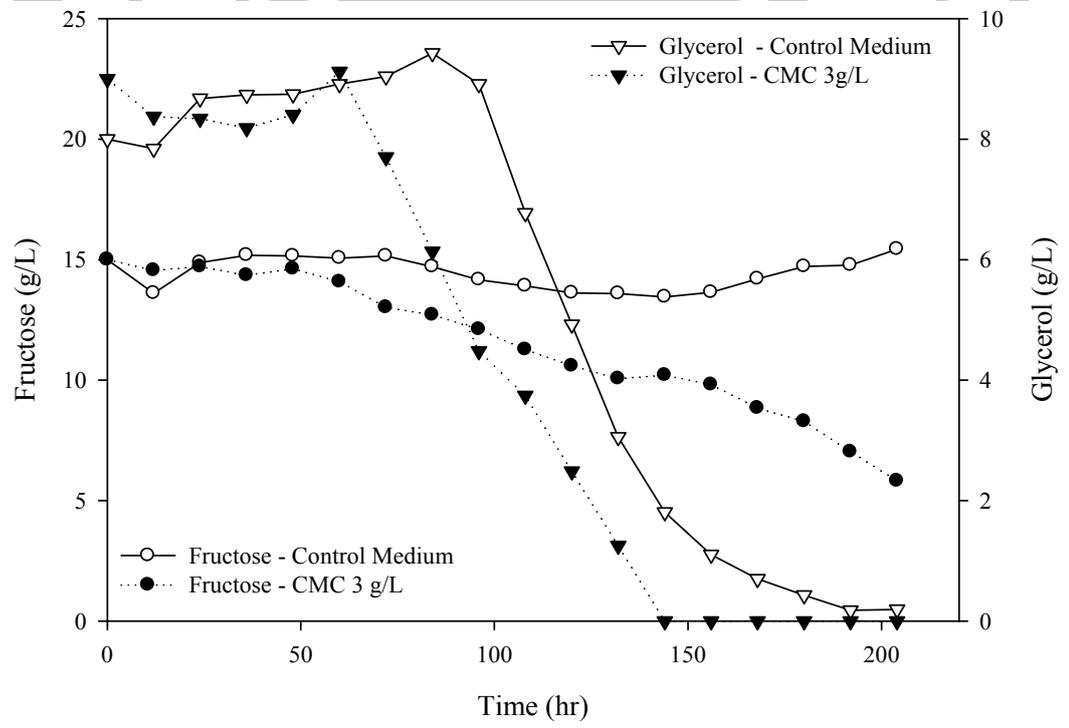


圖 4-22 添加 3 g/L CMC 於 5L 攪拌式發酵槽進行發酵程序之碳源消耗曲線比較

4.4 5L 氣舉式發酵槽批次發酵程序 (5L Air-lift bioreactor)

4.4.1 控制通氣量之影響

文獻指出經由改變溶氧量大，可能增進菌體之生長速率(Yen et al., 2013)。

因此，本次實驗目的是利用氣舉式發酵槽發酵生產 *St. hygrosopicus*，並經由改變通氣量之大小，(1 vvm、1.5 vvm、2 vvm)，探討通氣量對 *St. hygrosopicus* 之菌體生長與 Rapamycin 生長濃度之影響性。實驗結果由下圖 4-23 至圖 4-25 觀察可得到，隨著通氣量的提升(由 1 vvm 增加至 2 vvm)，*St. hygrosopicus* 菌體之生長速率也隨之提升，pH 變化曲線上下震盪時機往前推進約 50 小時，並由圖中觀察發現當 pH 值向下掉落並回升時，菌體濃度累積速率最大，同時 Rapamycin 開始生產。

由此實驗結果推測，增加通氣量大小改變溶氧量，可增進菌體生長速率，並同時提升 Rapamycin 之生長濃度，且實驗結果與文獻相符。本文將在下一小節(4.4.2)討論並比較氣舉式發酵槽與攪拌式發酵槽之結果與動力學參數。

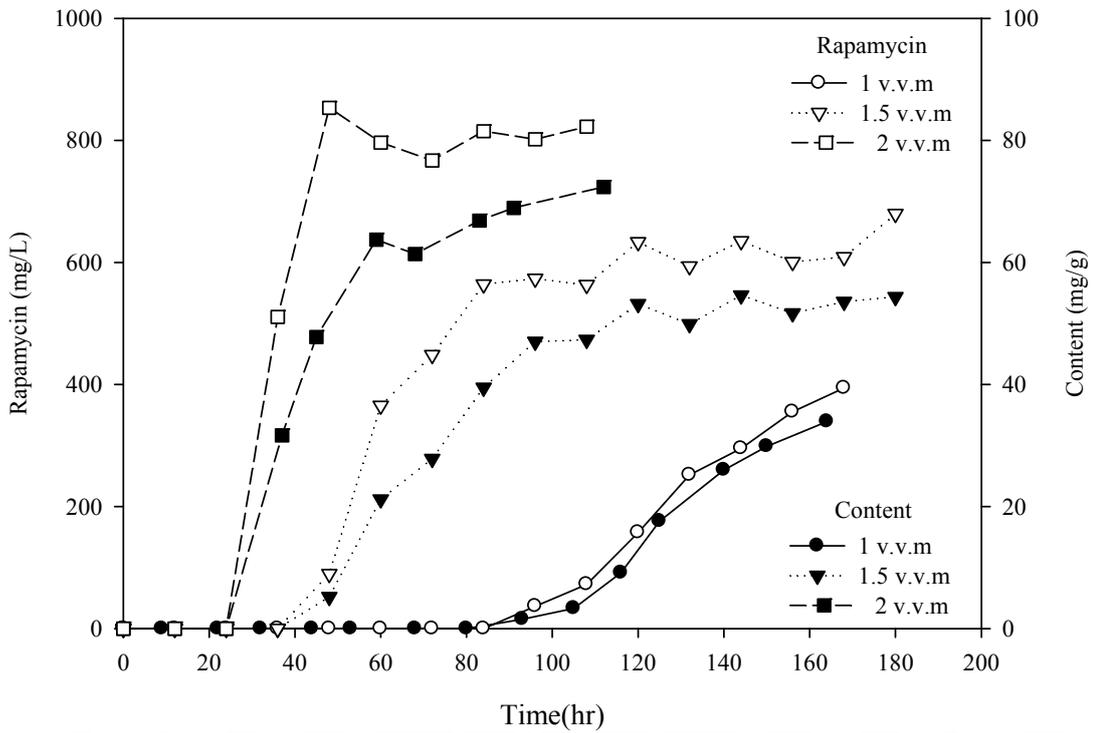


圖 4-23 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之 Rapamycin 生長濃度比較。(皆添加 3 g/L CMC)

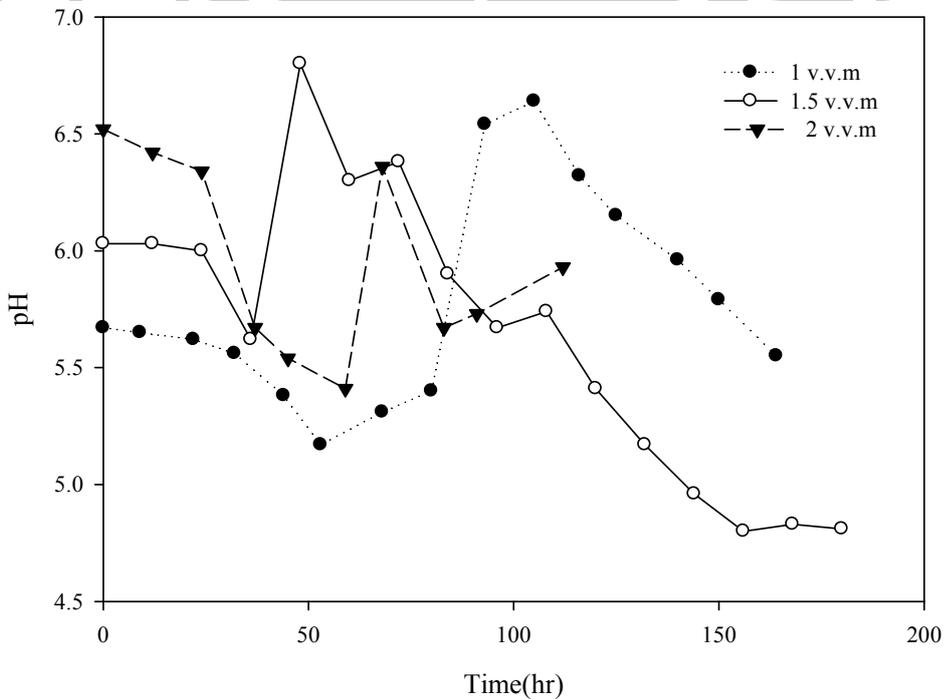


圖 4-24 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之 pH 值變化比較。(皆添加 3 g/L CMC)

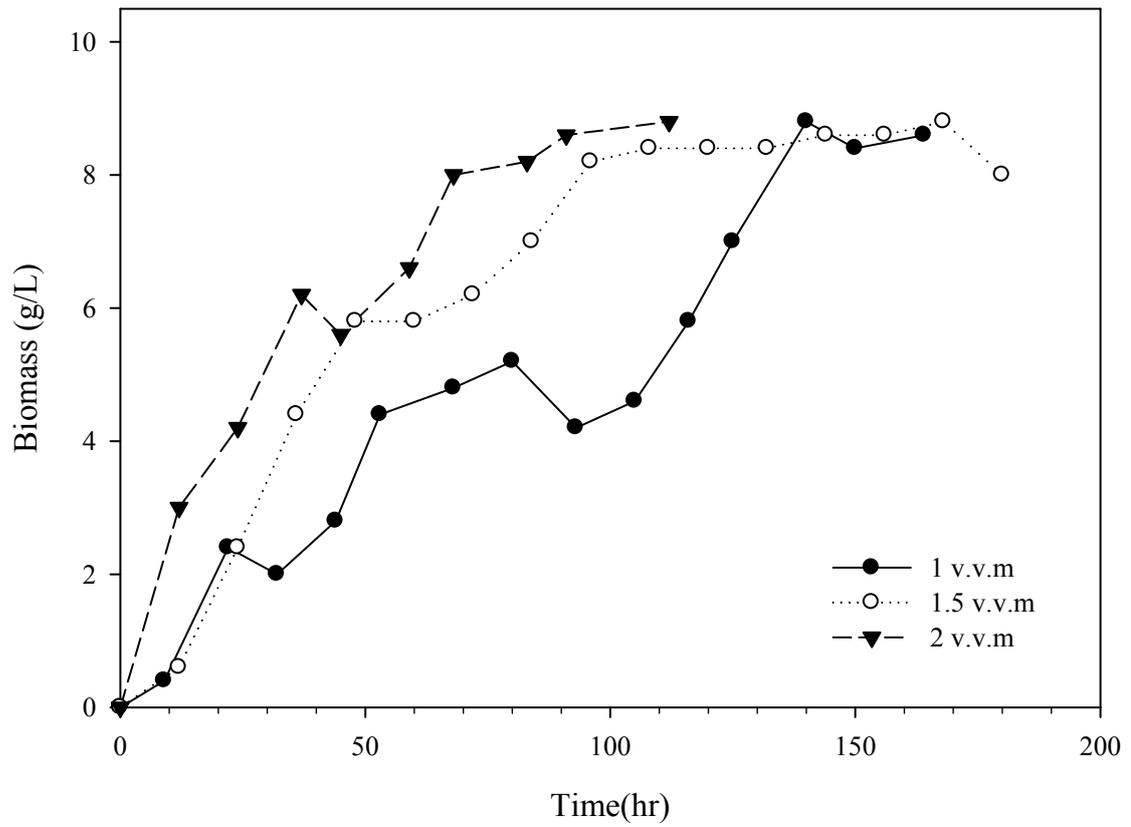


圖 4-25 利用氣舉式發酵槽在不同通氣量條件下發酵培養之菌體生長濃度比較。
(皆添加 3 g/L CMC)

4.4.2 比較攪拌式與氣舉式發酵槽之批次發酵程序

比較攪拌式與氣舉式發酵槽之批次發酵程序由下圖 4-26 至圖 4-28 結果可發現，在通氣量為 1 vvm 時，氣舉式發酵槽之生物質量明顯大於攪拌式發酵槽，但 Rapamycin 生產濃度卻相對較小。推測原因可能是在相同 1 vvm 通氣量與相同發酵液黏度下，氣舉式發酵槽之剪切力遠小於攪拌式發酵槽，以至於氣舉式發酵槽之生物質量相對較大。但相同條件下，氣舉式發酵槽之溶氧量卻較小於攪拌式發酵槽，使得 Rapamycin 之最大生長濃度小於攪拌式發酵槽。

而氣舉式發酵槽之溶氧量缺點，可用增加通氣量之策略彌補。在下表 4-2 結果表示，當氣舉式發酵槽增加通氣量達 1.5 vvm 時，Rapamycin 之最大生長濃度已高於攪拌式發酵槽在 1 vvm 時之最大濃度，且最大生物質量不變，表示其單位菌體之 Rapamycin 含量小於攪拌式發酵槽。但增加氣舉式發酵槽之通氣量後，其單位菌體之 Rapamycin 含量逐漸增加。以此可推論，發酵液中之溶氧量可能影響 Rapamycin 之生產，此推論與文獻相符。且使用氣舉式發酵槽進行發酵程序，其剪切力小於攪拌式發酵槽，菌體不易受剪切力破壞而能完整形成菌體顆粒，使其菌體產量相對較大，並可同時增加通氣量以提升其單位菌體之 Rapamycin 含量。

以下表 4-3 將此實驗結果與文獻結果作比較，觀察此表得知，雖然本實驗最後獲得之 Rapamycin 濃度並未超越文獻中之最高濃度，但本實驗利用氣取式發酵槽之發酵策略，整體之發酵程序時間僅只有 120 小時，與相當濃度之文獻比較，

可謂縮短整體發酵時間。利用 5L 氣舉式發酵槽，以 2 vvm 通氣量進行

Rapamycin 發酵程序，可將 Rapamycin 之生產速率提升至 6.0 mg/L h。

表 4-2 比較攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在不同通氣量下之 Rapamycin 產率 (添加 3 g/L CMC)。

	Agitate	Airlift		
	1vvm	1vvm	1.5vvm	2vvm
Max. Biomass (g/L)	5.6	8.6	8.8	8.8
Max. Rapamycin (mg/L)	510	339	543	723
Rapamycin Content (mg/g)	91.1	39.4	61.7	82.2
Rapamycin Productivity (mg/L-h)	2.5	2.1	3.0	6.5

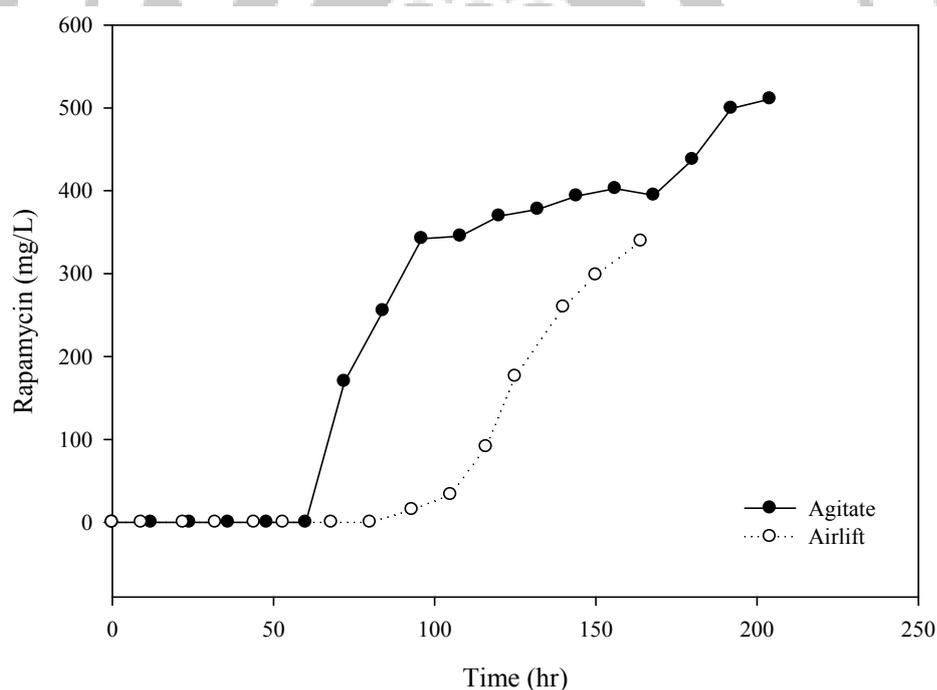


圖 4-26 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發酵程序下之 Rapamycin 生長濃度比較。

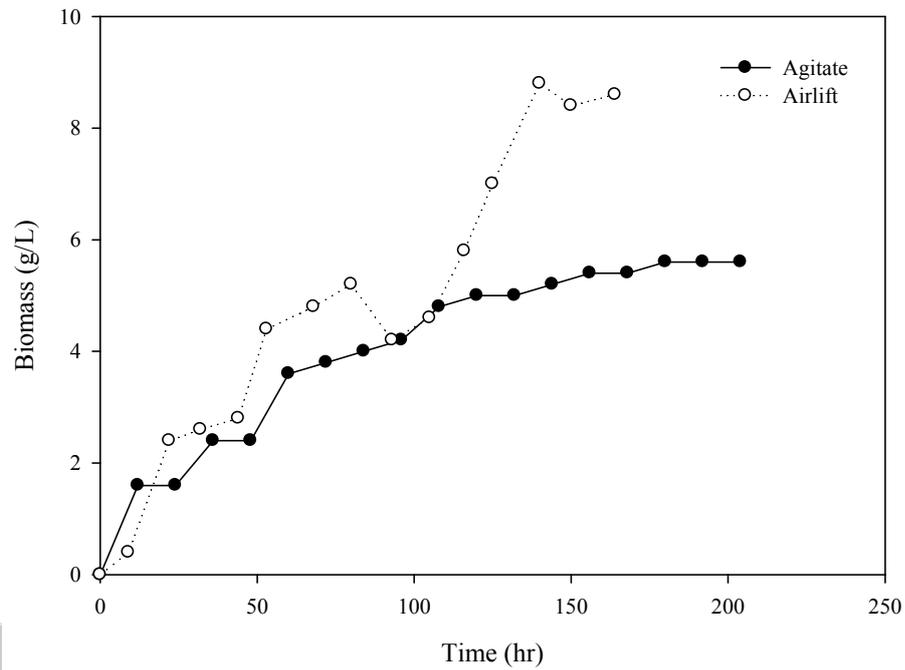


圖 4-27 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發酵程序下之菌體生長濃度比較。

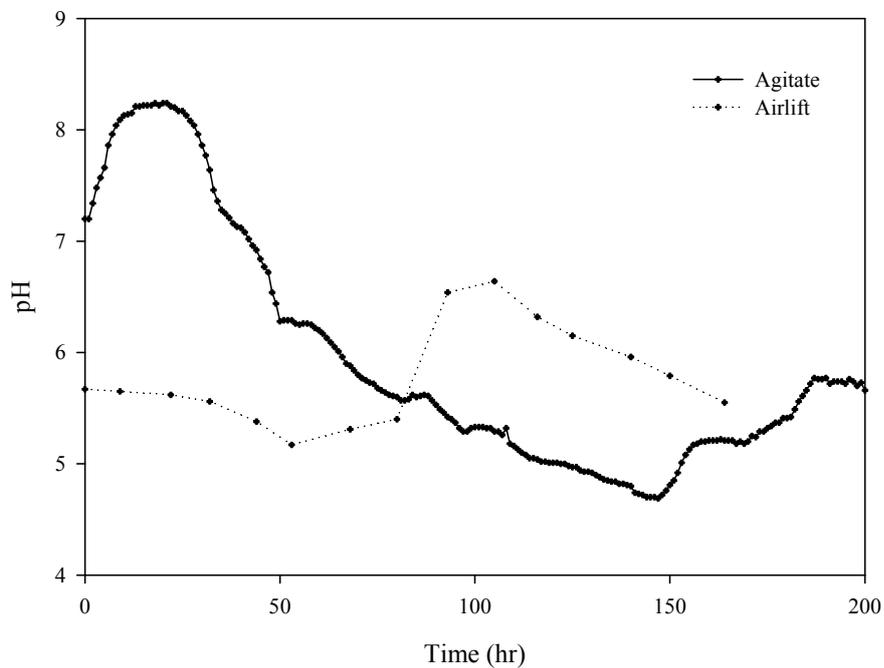


圖 4-28 攪拌式發酵槽與氣舉式發酵槽在通氣量 1 vvm 與相同發酵液黏度之發酵程序下之 pH 變化曲線比較。

表 4-3 文獻與本研究成果之產值比較

Comparison of rapamycin production by different strains under various fermentation processes.

Microorganism (<i>St. hygroscopicus</i>)	Carbon source	Bioreactor	Mode	Rap. titer (mg/L)	Time (h)	Rap. productivity (mg/L h)	Refs.
AY-B1206	Fructose, mannose	Shake flask	Batch	40	192	0.21	Kojima et al. (1995)
C9	Fructose, mannose	Shake flask	Batch	97–186	144	0.67–1.29	Lee et al. (1997)
N5632	Soluble starch	Shake flask	Batch	420.0	120	3.5	Xu et al. (2005)
GS-1437	Soluble starch	Shake flask	Batch	445.0	120	3.71	Chen et al. (2009)
HD-04-S	Dextrin, Glycerol,	Shake flask	Batch	450.0	120	3.75	Zhu et al. (2010)
BCRC-16270	Glucose	5 L fermentor	Batch	780	168	4.33	Yen et al. (2013)
BCRC-16270	Fructose	5 L fermentor	Batch	723	120	6.0	This study
NBS-9746	Glycerol, Fructose	130 L fermentor	Fed-batch	110	110	1.0	Chen et al. (1999)
R060107	Glycerol, Fructose	5 L fermentor	Fed-batch	500.0	120	4.17	Chen et al. (2008)
HD-04-S	Dextrin, Glycerol,	120 L fermentor	Fed-batch	812.5	160	5.08	Zhu et al. (2010)

4.5 Rapamycin 萃取與純化條件(Purification process)

4.5.1 溫度及壓力對於超臨界萃取 Rapamycin 之影響

此實驗一開始首先在固定壓力為 150 bar 下，測試溫度對於 Rapamycin 萃取在超臨界條件下之影響，在經過 6 種不同溫度改變後(50°C、80°C、90°C、100°C、120°C)，皆無 Rapamycin 自乾燥菌粉中被萃取出來，但在溫度為 50°C 時，有些許菌粉中之雜質被帶出，因此後續實驗將溫度設定為 50°C，開始壓力測試。

壓力測試實驗中，利用不同壓力變化(150 bar、220 bar、200 bar、250 bar)，測試溫度對於 Rapamycin 萃取在超臨界條件下之影響，但經過測試後，改變壓力條件亦無法將 Rapamycin 自菌粉中被提取出來，但在壓力為 250 bar 時，有較多雜質被帶出菌粉，因此測試結果為 50°C、250 bar 時，能將菌粉中大部分之雜質(判斷可能為菌體中之酯質或蛋白質)由菌粉中分離出，此結果亦為後續實驗所使用。

4.5.2 共溶劑(Co-Solvent)對於超臨界萃取 Rapamycin 之影響

共溶劑(Co-Solvent)定義為超臨界萃取法中，以額外添加少量溶劑至二氧化碳萃取系統中之方式，利用添加溶劑之極性，將產物自系統中帶出，用以增加超臨界萃取法之可行性。

在反覆經過多次變換不同壓力及溫度條件下，皆無法將 Rapamycin 由乾燥菌粉中提取出來，因此本研究決定採用加入共溶劑之方式，測試共溶劑對 Rapamycin 萃取在超臨界條件下之影響，但在加入共溶劑前，首先經過提取菌粉中雜質之步驟，再加入不同共溶劑測試萃取效果，由下圖 4-29 觀察可知，在環境條件為 50°C、250 bar 時，加入不同共溶劑(總體積皆為 15 ml)，只有二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide 或 DMSO)在二氧化碳超臨界狀態下對 Rapamycin 有萃取效果，對比傳統甲醇在常溫常壓下萃取出之 Rapamycin 總量為基準(100 ml、1 g 菌粉)，DMSO 在二氧化碳超臨界狀態下亦可萃取出大部分約 97.2%之 Rapamycin，可見以 DMSO 作為共溶劑，在二氧化碳超臨界狀態下萃取 Rapamycin 是有效的。但由下圖 4-29 HPLC 圖譜觀察可知，DMSO 雖能帶出大部分之 Rapamycin，但也帶出所有雜質，因此純度不高，與傳統溶劑萃取相當，因此後續實驗將探討純化 Rapamycin 萃取液之方法。

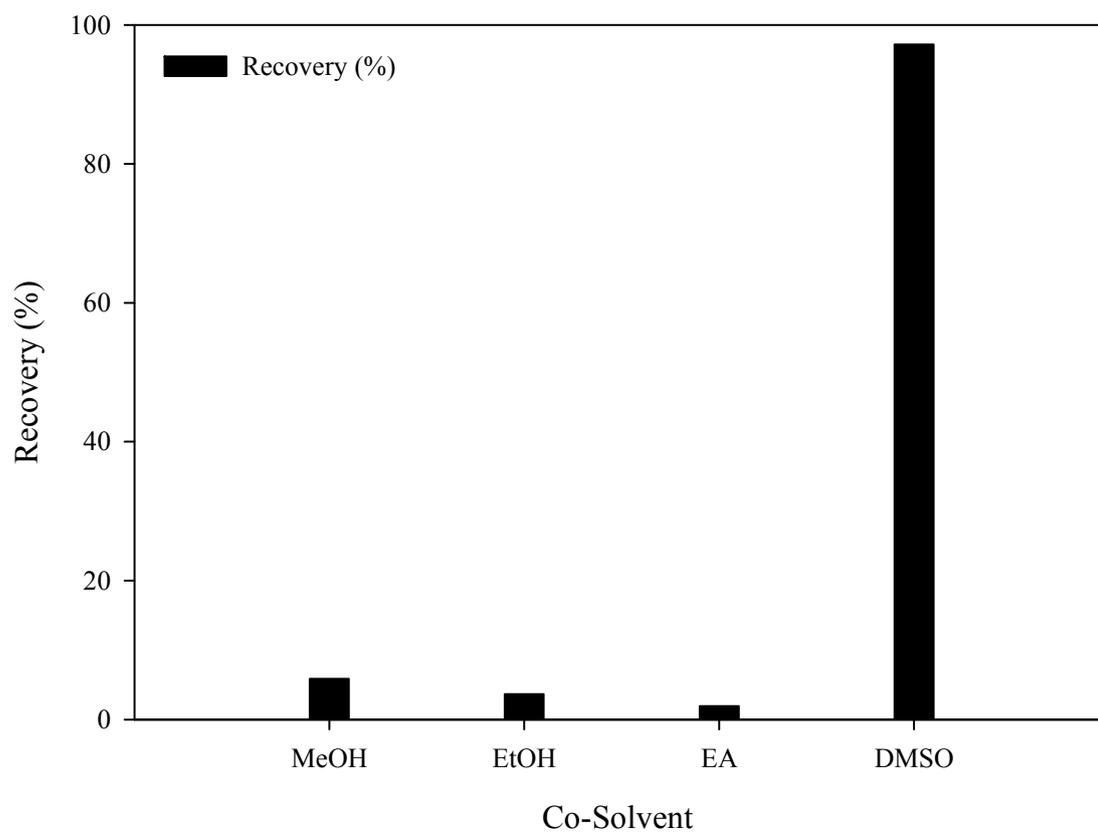


圖 4-29 共溶劑種類對超臨界萃取 Rapamycin 之影響

4.5.3 兩段式加入共溶劑對於超臨界萃取 Rapamycin 之純度影響

以上段 4.3.2 之實驗可知，若單純以甲醇作為共溶劑萃取，萃取液中只帶出雜質，但無法萃取出 Rapamycin，而若單純使用 DMSO 作為共溶劑萃取，則 Rapamycin 與雜質成分便一同被帶出，降低萃取液之純度。

因此，此實驗接下來討論利用甲醇與 DMSO 作為共溶劑分段進行 Rapamycin 萃取之策略。圖 4-30 為此實驗之流程圖，在利用甲醇作為共溶劑測試中，雖只有稀薄甚至無任何 Rapamycin 被提取出，但利用甲醇共溶劑萃取，可將乾燥菌粉中存在之大部分雜質自菌粉中被提取出，爾後，再利用 DMSO 作為共溶劑在二氧化碳超臨界下萃取之 Rapamycin 萃取液，以 HPLC 分析圖譜所佔有之主結構峰面積為標準，可得到較高純度之 Rapamycin 萃取物。因此利用兩階段式分次加入甲醇與 DMSO 共溶劑做為分別萃取雜質與 Rapamycin 之策略，可達到純化 Rapamycin 萃取液之目的。由下圖 4-31 與 4-32 觀察得知，兩階段式利用共溶劑萃取，可使得 Rapamycin 萃取液之主結構峰面積比例提升至 79.48%，相較傳統萃取液主峰面積比例僅佔有 50%，因此證實，兩段式共溶劑萃取策略，可達到純化 Rapamycin 萃取液之目的。

以中興大學森林系 王升陽教授所借之液相層析質譜儀(LC-MASS)分析，得到圖 4-33 至 4-36 之 LC-MASS 分析圖譜，證實利用兩段式超臨界萃取策略取得之萃取液中，確實含有 Rapamycin 之主要結構，圖 4-33 為 Rapamycin 標準品於

LC-MASS 之分析圖譜，觀察此圖譜得知，Rapamycin 之主結構峰為 936.6 m/z，而圖 4-34 至圖 4-36 為超臨界法萃取液於 LC-MASS 之分析圖譜，圖譜中皆存在 936.6 m/z 之 Rapamycin 主結構峰，可驗證，以超臨界萃取法萃取 Rapamycin 是可行的。

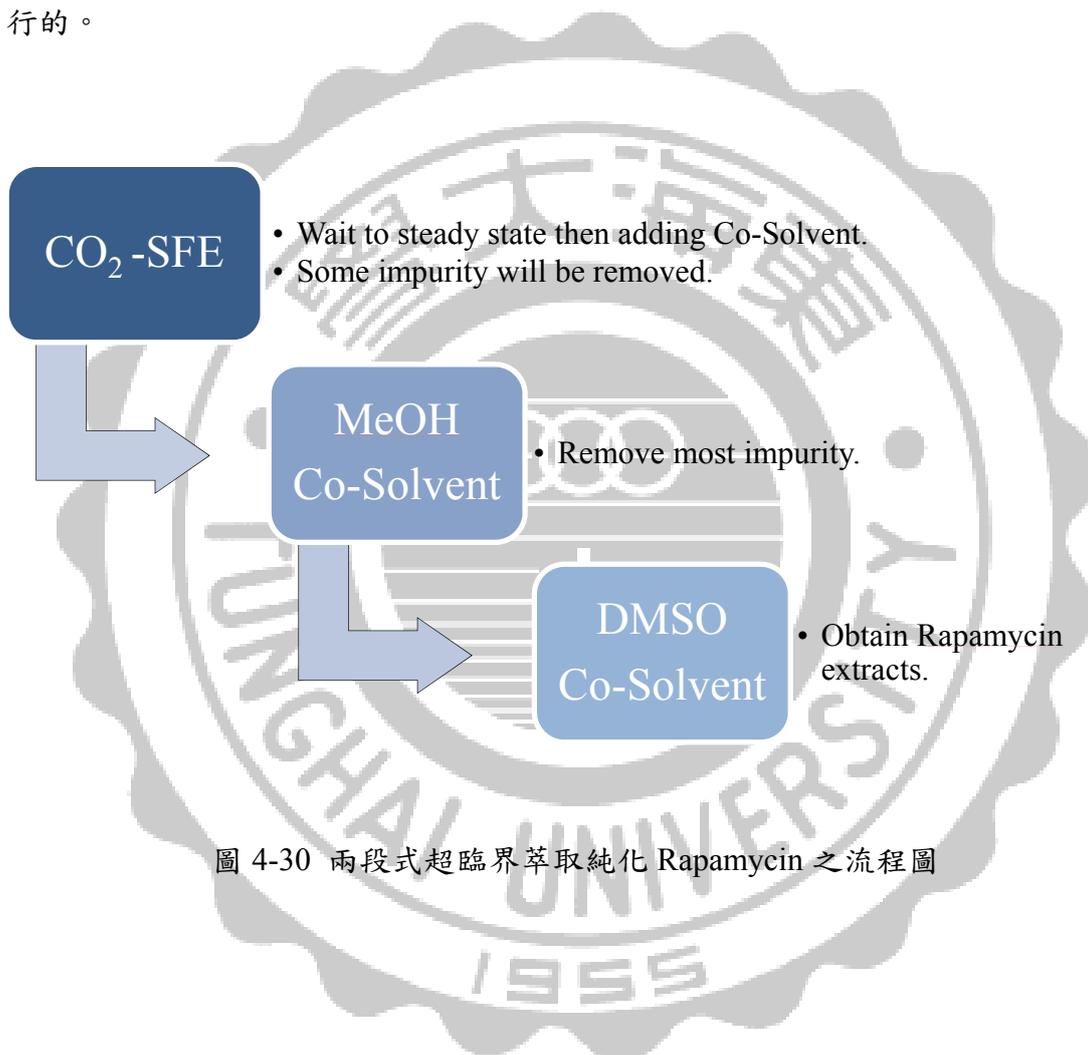
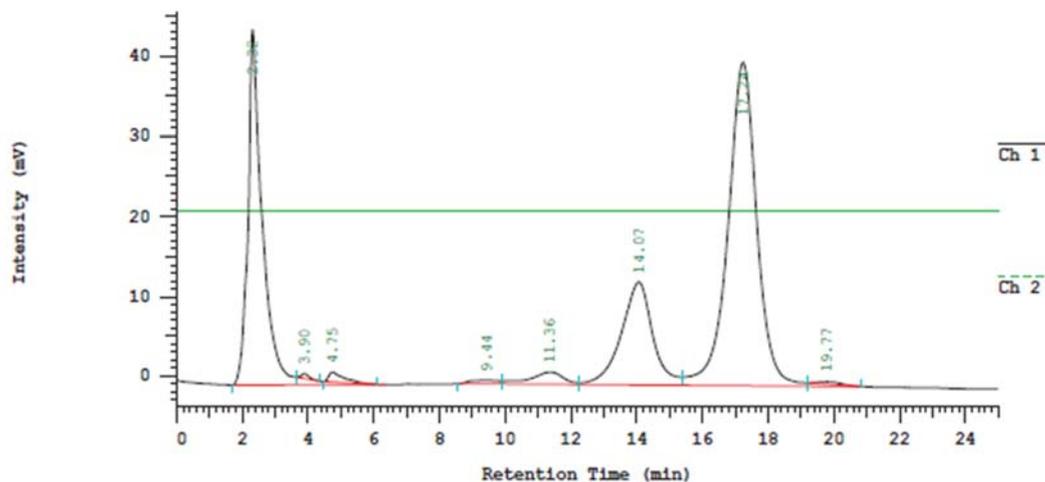


圖 4-30 兩段式超臨界萃取純化 Rapamycin 之流程圖



Acquisition Method: Rapamycin

Column Type: c18

Method Description:

Developed by: Rapamycin

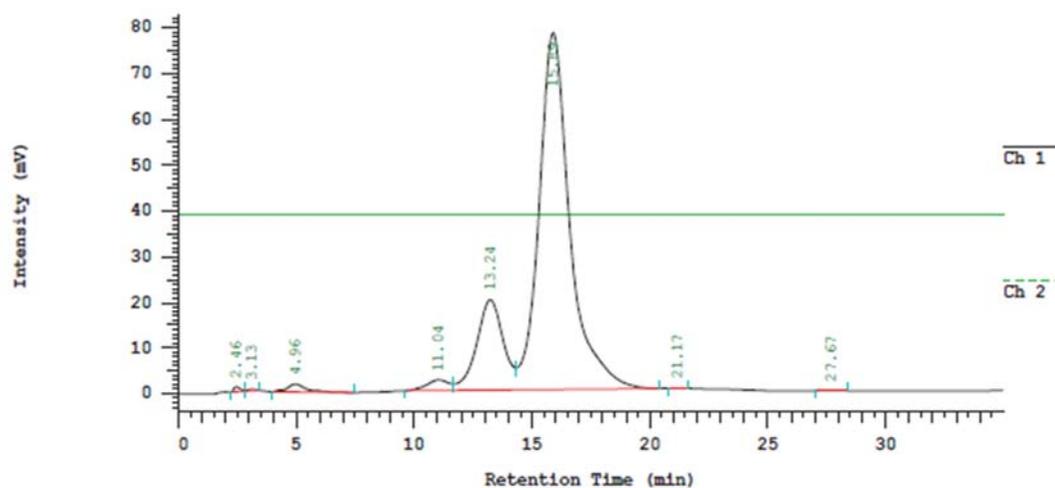
Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: AREA%

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	2.32	1376555	28.068	BV
2	3.90	10085	0.206	TBB
3	4.75	39682	0.809	TBB
4	9.44	25956	0.529	BV
5	11.36	106118	2.164	VV
6	14.07	852383	17.380	VV
7	17.24	2478344	50.533	VV
8	19.77	15285	0.312	TBB
		4904408	100.000	

圖 4-31 原始乾燥菌粉萃取液於 LC 之分析圖譜



Acquisition Method: Rapamycin

Column Type: c18

Developed by: Rapamycin

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: AREA%

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	2.46	20125	0.226	BV
2	3.13	8762	0.099	VB
3	4.96	100387	1.129	BB
4	11.04	152184	1.711	BV
5	13.24	1539757	17.311	VV
6	15.89	7069979	79.486	VB
7	21.17	1315	0.015	BB
8	27.67	2105	0.024	BB
		8894614	100.000	

圖 4-32 經兩段式超臨界萃取後之 DMSO 萃取液於 LC 之分析圖譜

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Julia\RAP\RAP-standar_GB1_01_262.d
Method 262.m
Sample Name RAP-standar
Comment

Acquisition Date 3/27/2014 2:29:05 PM

Operator NCHU
Instrument amaZon speed

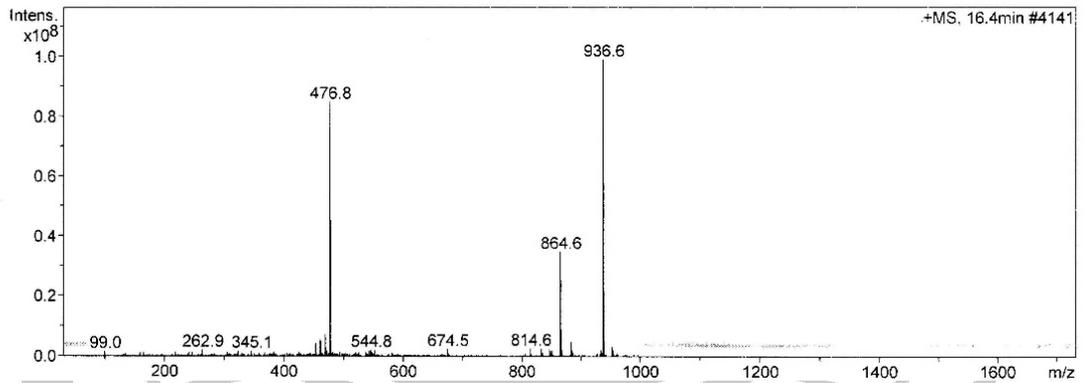
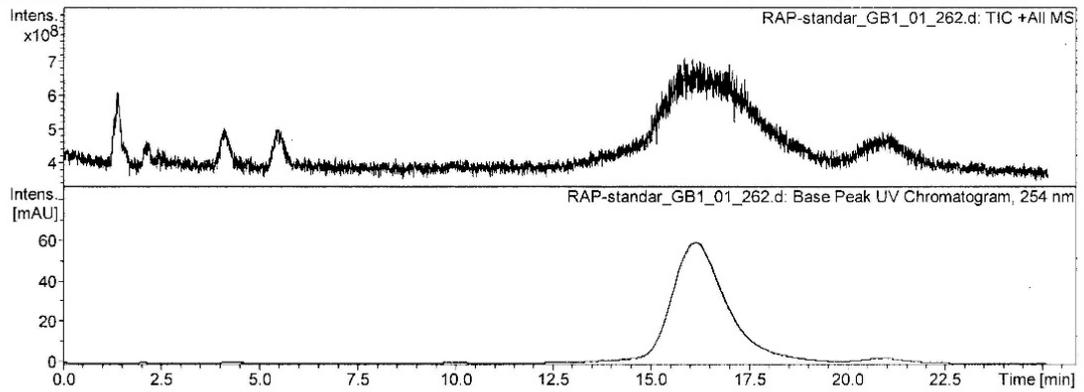


圖 4-33 Rapamycin 標準品於 LC-MASS 之分析圖譜

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Julia\RAP\RAP-sample_GB2_01_263.d
Method 263.m
Sample Name RAP-sample
Comment

Acquisition Date 3/27/2014 3:04:08 PM

Operator NCHU
Instrument amaZon speed

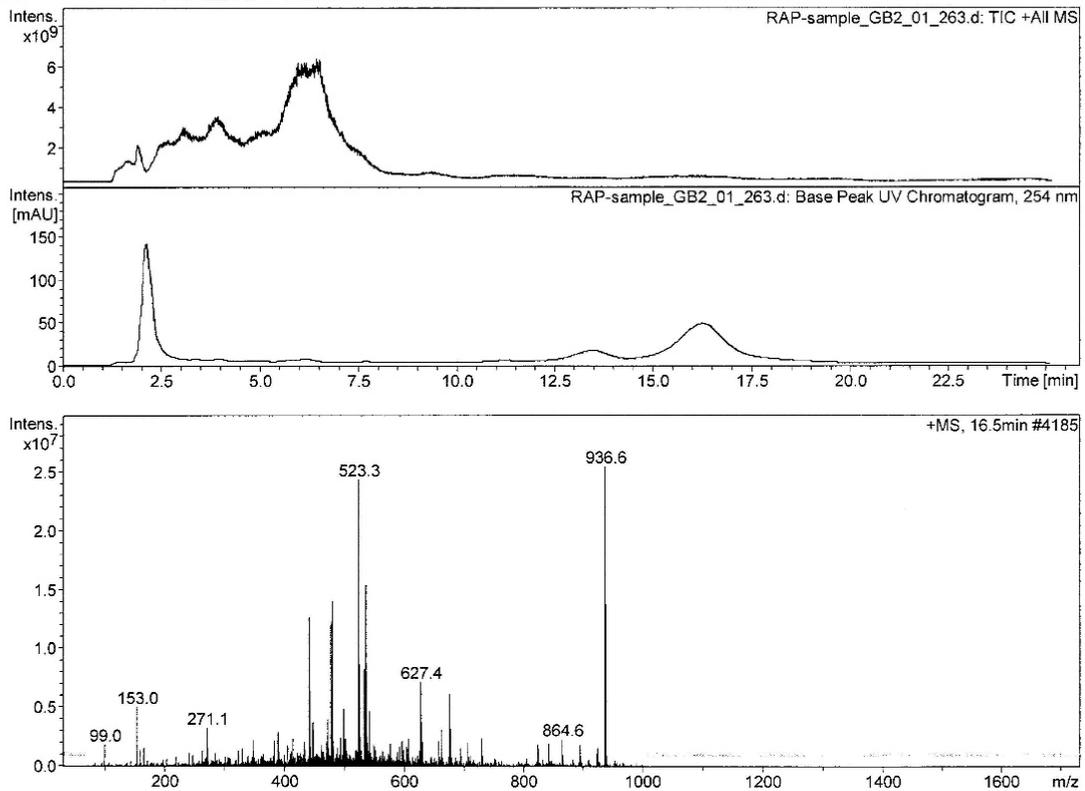


圖 4-34 常溫常壓下萃取乾燥菌粉之甲醇萃取液於 LC-MASS 之分析圖譜

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Julia\RAP\SFE-DMSO_RE7_01_461.d
Method 461.m
Sample Name SFE-DMSO
Comment

Acquisition Date 6/23/2014 4:13:57 PM

Operator NCHU
Instrument amaZon speed

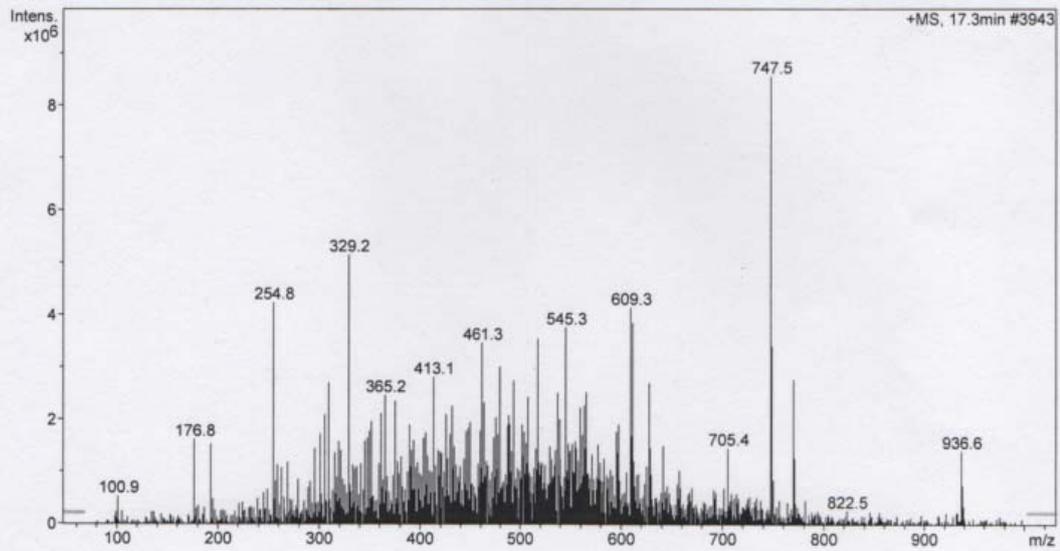
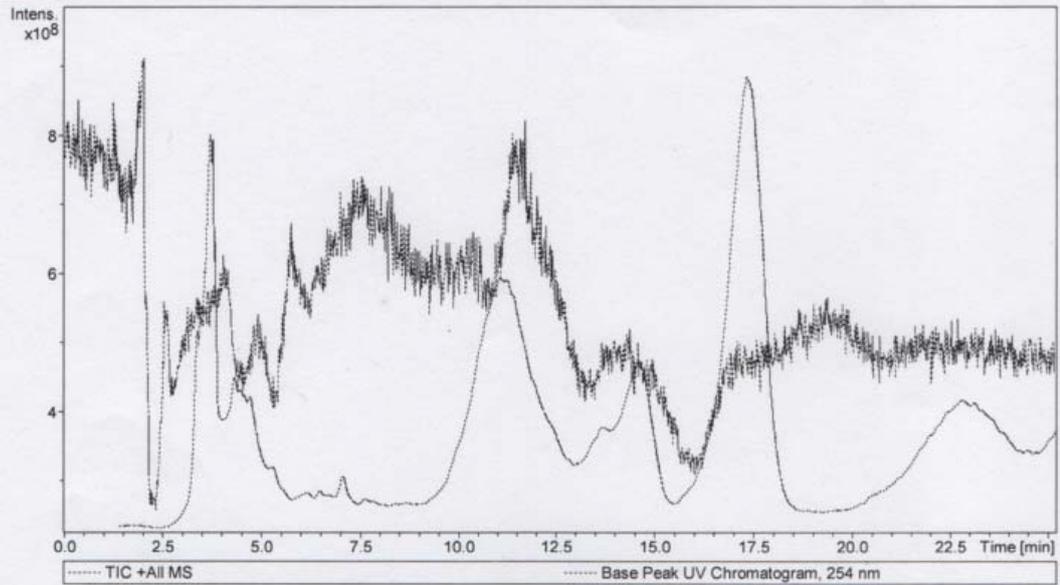


圖 4-35 共溶劑 DMSO 超臨界萃取物於 LC-MASS 之分析圖譜

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Julia\RAP\SFE-MeOH_RE6_01_460.d
Method 460.m
Sample Name SFE-MeOH
Comment

Acquisition Date 6/23/2014 3:46:29 PM

Operator NCHU
Instrument amaZon speed

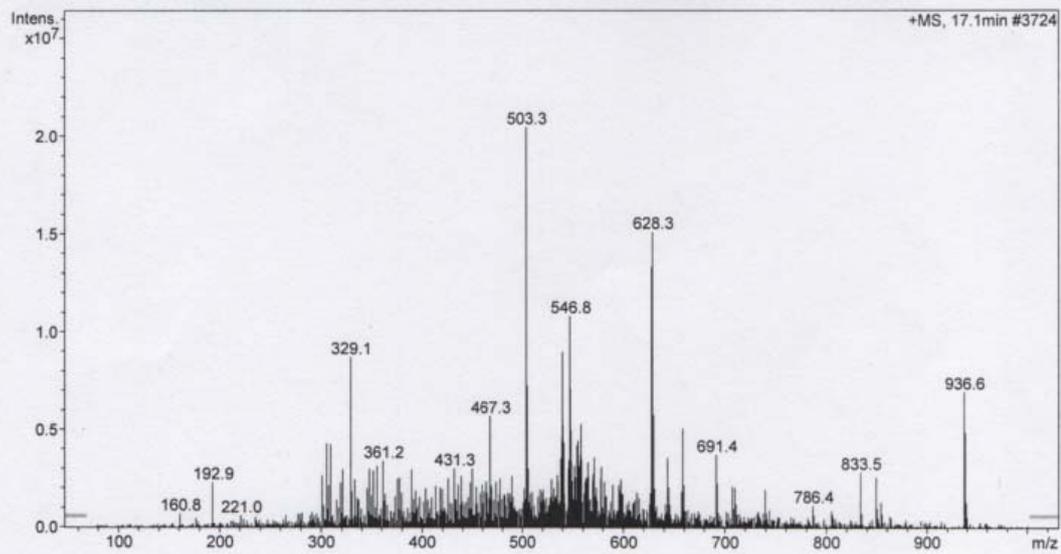
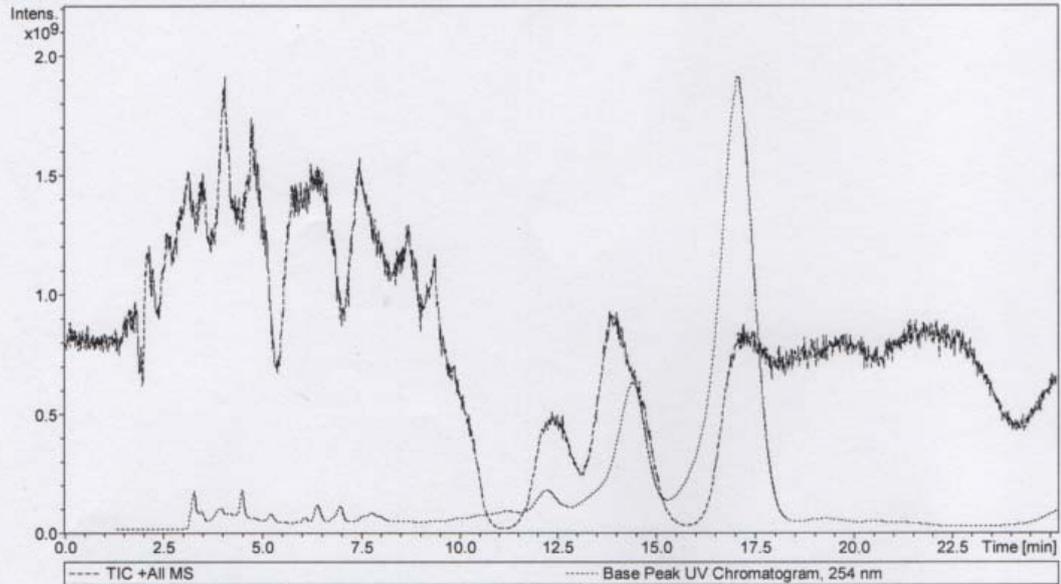


圖 4-36 經兩段式超臨界萃取之 DMSO 萃取物於 LC-MASS 之分析圖譜

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本實驗探討不同之培養條件、發酵策略下對菌體生長及生產 Rapamycin 之影響，以及對於 Rapamycin 之萃取及純化策略。總和以上實驗結果，整理出以下幾點討論：

1. 由培養時間實驗中得知，發酵培養 7 天期間，於培養基及反應器的不同，pH 值會從起始值 6.5 開始有向下後往上或向上後往下震盪一次隨後於 pH 5.5~6.5 間平緩之現象。此 pH 值之變化，可用來研判菌體生長與 Rapamycin 生產情形。
2. 在菌種老化程度實驗中，以活化 48~60 小時後之種菌進行培養程序，得到較大 *St. hygroscopicus* 菌體生長與 Rapamycin 生產濃度。
3. 在搖瓶批次發酵實驗中，以果糖 20 g/L、澱粉 10 g/L 為碳源，甘油 10 g/L 為組合原料，並添加 CMC 3g/L 等條件下培養所得到之 Rapamycin 濃度可達相對較大值。
4. 在搖瓶批次發酵實驗中，在 96 小時發小培養後，加入氮源 YE，可幫助 *St. hygroscopicus* 繼續生長，並同時繼續累積更高之 Rapamycin 濃度至 686 ± 72 mg/L。

5. 5L 攪拌式發酵槽批次發酵實驗中，添加 CMC 3 g/L 進行培養，可得較大 Rapamycin 濃度(510 mg/L)、生產速率(2.5 mg/L-h)、產率(91.1 mg/g)。
6. 5L 氣舉式發酵槽批次實驗中，添加 CMC 3 g/L 進行培養，並改變通氣量為 2 vvm，菌體生長濃度明顯提升(8.8 g/L)，且可得較大 Rapamycin 濃度(723 mg/L)、生產速率(6.5 mg/L-h)、產率(82.2 mg/g)。
7. 5L 氣舉式發酵槽相較於攪拌式發酵槽，無機械攪拌葉片之剪切力產生，具有較好的菌體產率(8.8 g/L)且有助於 Rapamycin 的生產(723 mg/L)。
8. 超臨界二氧化碳萃取 Rapamycin，改變溫度與壓力條件，無法達到萃取效果。而二氧化碳超臨界狀態下添加 DMSO 作為共溶劑，可達到 97.2% 之回收率。
9. 兩階段式超臨界利用共溶劑萃取 Rapamycin，以 HPLC 之圖譜面積做為純化標準，可達到 Rapamycin 萃取液主峰面積比例為 79.48%，相較傳統萃取液主峰面積比例僅有 50%，兩段式共溶劑萃取，可達到純化 Rapamycin 萃取液之目的。

5.2 未來展望

雷帕黴素(Rapamycin)在醫療上被發現具有越來越多的用途，但在規模放大製程的研究上卻始終無法有更大的突破，使得目前 Rapamycin 的價格持續居高不下。文獻中最高的批次產量有 537 mg/L (Yen et al., 2013)，在本研究中，利用氣舉式發酵槽增加通氣量至 2 vvm 並添加 3 g/L CMC 進行培養下，Rapamycin 的培養濃度可達到 723 mg/L。總和本研究所得，增加黏度與提高通氣量的策略對 Rapamycin 的生產濃度具有提升的效果，未來可嘗試配合饋料策略，並於更大規模之氣舉式發酵槽中進行測試，以期達到更高的 Rapamycin 免疫抑制劑之產率。

參考文獻

石信德、黃振文(2005)。保護植物的重要菌源-鏈黴菌，科學發展，391 期。

簡道南(2006)。土壤中的放線菌，台肥月刊，第 47 卷，第 1 期。

孫證雄(2011)。自營環境下培養柵藻生成葉黃素與超臨界流體萃取葉黃素之探討，東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文。

江偉誠(2012)。自營環境下連續式培養柵藻與超臨界流體萃取葉黃素最佳化之探討，東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文。

蕭欣培(2012)。利用 *Streptomyces hygroscopicus* 發酵生產免疫抑制劑 Rapamycin 之探討，東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文。

李芳慈(2014)。探討不同發酵策略對於 *Klebsiella sp. Ana-WS5* 生產 1,3-丙二醇與 2,3-丁二醇之影響，東海大學化學工程與材料工程學系碩士論文。

Backus, E. J., & Tresner, H. D. (1956). A broadened concept of the characteristics of *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol*, 4(5), 243-250.

Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S. N., & Vezina, C. (1978). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot*, 31(6), 539-545.

Chen, Y., Krol, J., Huang, W., Cino, J. P., Vyas, R., Mirro, R., & Vaillancourt, B. (2008).

DCO₂ on-line measurement used in rapamycin fed-batch fermentation process.

Process Biochemistry, 43(4), 351-355.

Chen, Y., Krol, J., Sterkin, V., Fan, W., Yan, X., Huang, W., . . . Julien, C. (1999). New

process control strategy used in a rapamycin fermentation. *Process*

Biochemistry, 34(4), 383-389.

Choi, D. B., Park, E. Y., & Okabe, M. (1998). Improvement of tylosin production from

Streptomyces fradiae culture by decreasing the apparent viscosity in an air-lift

bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(4), 413-417.

Earla, R., Cholkar, K., Gunda, S., Earla, R. L., & Mitra, A. K. (2012). Bioanalytical

method validation of rapamycin in ocular matrix by QTRAP LC-MS/MS:

application to rabbit anterior tissue distribution by topical administration of

rapamycin nanomicellar formulation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed*

Life Sci, 908, 76-86.

Gesheva, V., Ivanova, V., & Gesheva, R. (2005). Effects of nutrients on the production

of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol*

Res, 160(3), 243-248.

- Hallensleben, K., Raida, M., & Habermehl, G. (2000). Identification of a new metabolite of macrolide immunosuppressant, like rapamycin and SDZ RAD, using high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *11*(6), 516-525.
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., . . . Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, *460*(7253), 392-395.
- Ilic, S. B., Konstantinovic, S. S., Veljkovic, V. B., Savic, D. S., Lazic, M. L., & Gojic-Cvijovic, G. (2008). Impact of carboxymethylcellulose on morphology and antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Curr Microbiol*, *57*(1), 8-11.
- Jonsbu, E., McIntyre, M., & Nielsen, J. (2002). The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology*, *95*(2), 133-144.
- Kaeberlein, M. (2010). Resveratrol and rapamycin: are they anti-aging drugs? *Bioessays*, *32*(2), 96-99.

Kanda, M., Yamamoto, E., Hayashi, A., Yabutani, T., Yamashita, M., & Honda, H.

(2010). Scale-up fermentation of echinocandin type antibiotic FR901379. *J Biosci Bioeng*, *109*(2), 138-144.

Kojima, I., Cheng, Y. R., Mohan, V., & Demain, A. L. (1995). Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Ind Microbiol*, *14*(6), 436-439.

Law, B. K. (2005). Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant? *Crit Rev Oncol Hematol*, *56*(1), 47-60.

Mc, G. J. (1954). Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces sp.* *J Gen Microbiol*, *11*(1), 52-56.

Morelon, E., Mamzer-Bruneel, M. F., Peraldi, M. N., & Kreis, H. (2001). Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, *16*(1), 18-20.

O'Cleirigh, C., Casey, J. T., Walsh, P. K., & O'Shea, D. G. (2005). Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl Microbiol Biotechnol*, *68*(3), 305-310.

O'Cleirigh, C., Walsh, P. K., & O'Shea, D. G. (2003). Morphological quantification of pellets in *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* fermentation broths using a flatbed scanner. *Biotechnol Lett*, 25(19), 1677-1683.

Park, S. R., Yoo, Y. J., Ban, Y. H., & Yoon, Y. J. (2010). Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. *J Antibiot*, 63(8), 434-441.

Pereira, M. J., Palming, J., Rizell, M., Aureliano, M., Carvalho, E., Svensson, M. K., & Eriksson, J. W. (2013). The immunosuppressive agents rapamycin, cyclosporin A and tacrolimus increase lipolysis, inhibit lipid storage and alter expression of genes involved in lipid metabolism in human adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 365(2), 260-269.

Sallama, L. A. R., El-Refai, A. F., Osman, M. E., Hamdya, A. A., Ahmeda, E. M., & Mohameda, M. A. (2010). Some Physiological Factors Affecting Rapamycin Production by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. *Journal of American Science*, 6(6), 188-194.

Sehgal, S. N. (1993). Immunosuppressive Profile of Rapamycin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 696(1), 1-8.

Sehgal, S. N. (1998). Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clinical Biochemistry*, 31(5), 335-340.

Sehgal, S. N., Baker, H., & Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot*, 28(10), 727-732.

Sinha, R., Singh, S., & Srivastava, P. (2014). Studies on process optimization methods for rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. *Bioprocess Biosyst Eng*, 37(5), 829-840.

Škerget, M., Knez, Z. e., & Knez-Hrnčič, M. a. (2011). Solubility of Solids in Sub- and Supercritical Fluids: a Review. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(4), 694-719.

Sujatha, P., Bapi Raju, K. V., & Ramana, T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res*, 160(2), 119-126.

Taberner, A., Martín del Valle, E. M., & Galán, M. A. (2012). Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and

modelling. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 60, 9-25.

- Tamura, S., Park, Y., Toriyama, M., & Okabe, M. (1997). Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(6), 523-528.
- Vezina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot*, 28(10), 721-726.
- Xu, Z. N., Shen, W. H., Chen, X. Y., Lin, J. P., & Cen, P. L. (2005). A high-throughput method for screening of rapamycin-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus* by cultivation in 96-well microtiter plates. *Biotechnol Lett*, 27(15), 1135-1140.
- Yen, H.-W., Hsiao, H.-P., & Chen, L.-J. (2013). The enhancement of rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* through a simple pH-shifted control. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(5), 743-747.
- Zhu, X., Zhang, W., Chen, X., Wu, H., Duan, Y., & Xu, Z. (2010). Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis

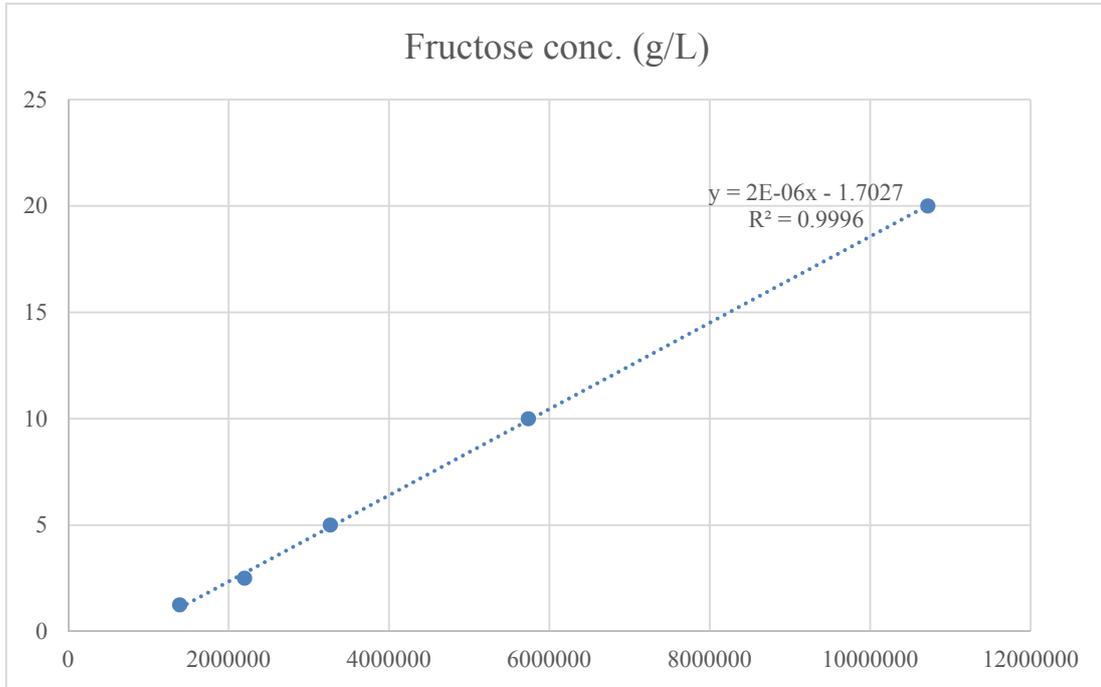
and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization.

Biotechnol Bioeng, 107(3), 506-515.

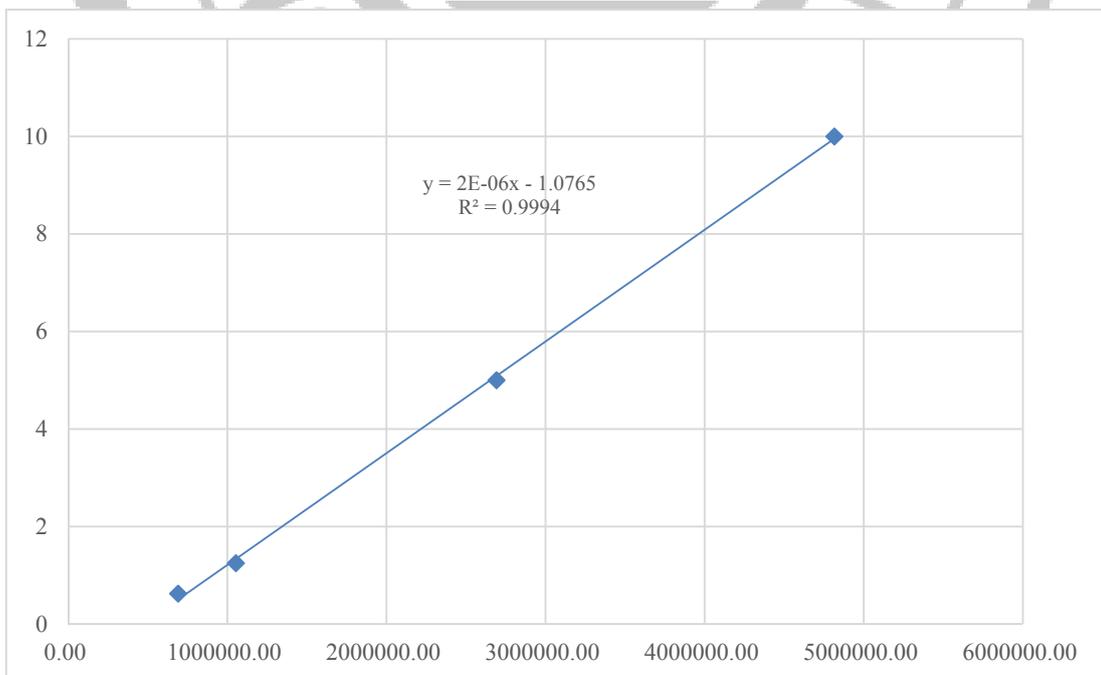


附錄

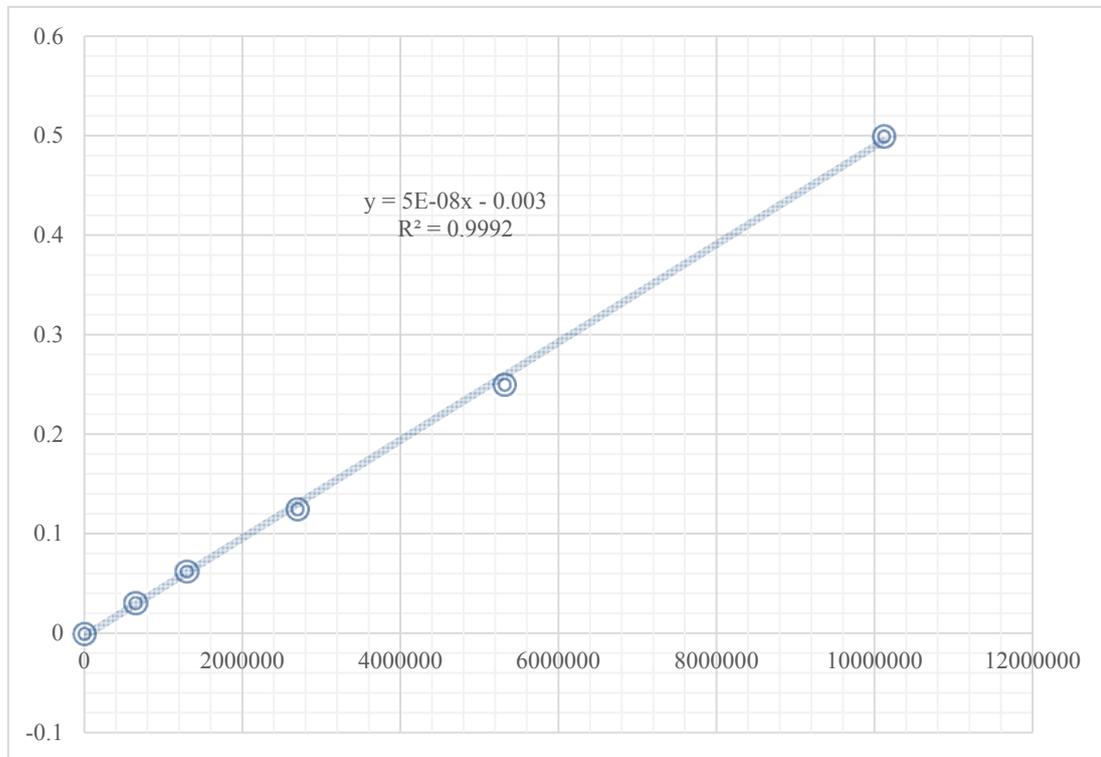
附錄 A：果糖 (D+Fructose)檢量線



附錄 B：甘油(Glycerol) 檢量線



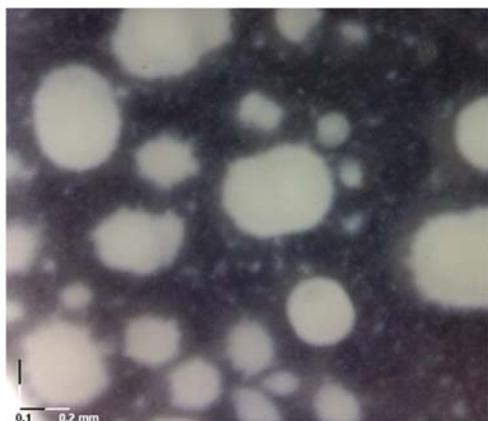
附錄 C：雷帕黴素 (Rapamycin) 檢量線



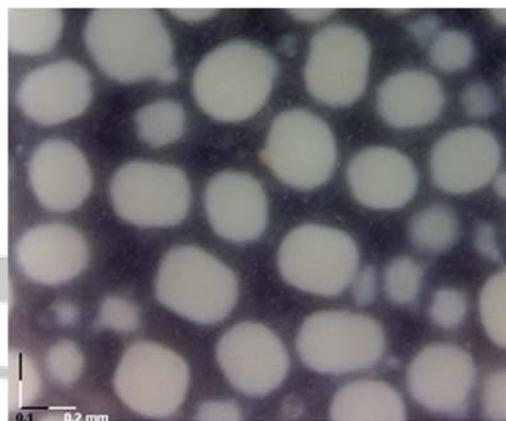
附錄 D：不同碳源對菌體長與 Rapamycin 生產之影響

Carbon source(10g/L)	Avg. Final pH	Avg. Biomass(g/L)	Avg. Rapamycin (mg/L)
Mannose	6.23±0.1	3.90±0.4	174.48±43.9
Lactose	6.71±0.2	4.53±0.6	97.08±17.9
Fructose	6.76±0.6	3.40±0.9	294.31±43.3
Glucose	6.12±0.2	4.0±0.4	213.99±17.7
Glycerol	6.77±0.2	3.13±0.2	120.86±37.2
Starch	7.23±0.2	3.13±0.2	155.75±37.6

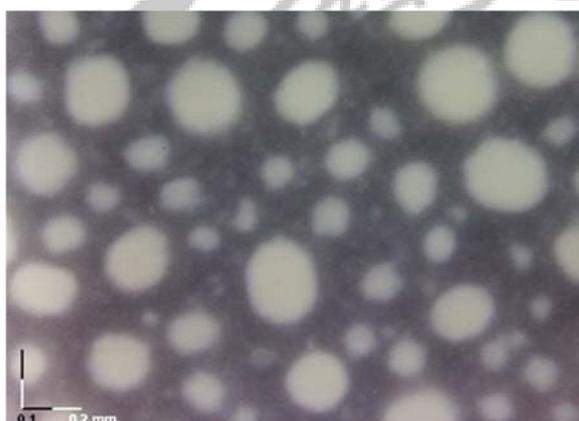
附錄 E：菌體在 200 倍率顯微鏡下之形態



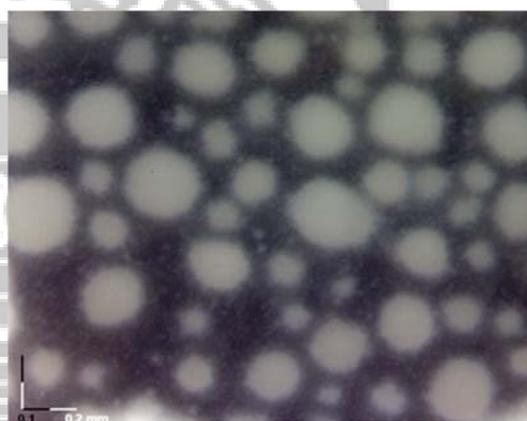
Control 未添加 CMC



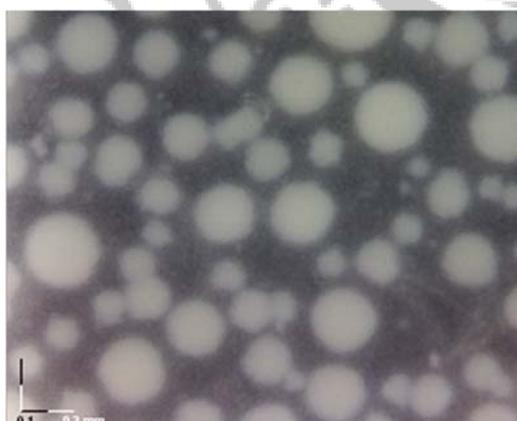
添加 CMC 0.1 g/L



添加 CMC 0.5 g/L



添加 CMC 1 g/L



添加 CMC 2 g/L



添加 CMC 3 g/L

2012.09.15 203 實驗室成員 於新竹司馬庫斯

