

利用細菌發酵農水產廢棄物生產生物製劑之研究

王啟浩、王三郎；林良平

E-mail: 8809529@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究主要係以農、水產廢棄物為主要碳源，經由微生物發酵後生產真菌抑制劑、生物界面活性劑、植物生長促進劑及抗氧化劑等生物製劑。第一部分係從台灣北部土壤篩選出兩株具有抑制真菌能力之菌株W113及W118，此兩株菌經鑑定結果分別命名為*Bacillus subtilis* W113及*Bacillus subtilis* W118(以下簡稱W113及W118)。第二部分係利用市售幾丁質作為真菌抑制劑生產菌W113及W118之主要碳源，探討其較適培養條件，結果顯示W113以K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、幾丁質(Chitin) 1.75%、中藥殘渣 0.15%、填充50ml/250ml三角錐瓶、72小時、25℃、pH7為較適培養條件，針對*Fusarium oxysporum*而言，抑制活性可達94%。而W118以K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄·7H₂O 0.05%、幾丁質(Chitin) 0.75%、靈芝殘渣 0.05%、填充100ml/250ml三角錐瓶、48小時、30℃、pH7為較適培養條件，針對*Fusarium oxysporum*而言，抑制活性可達91%。第三部分係探討W113及W118所生產真菌抑制劑之性質及生物活性。W113所生產真菌抑制劑在pH7之條件下可保有最高活性(86%)，而加熱40分鐘後仍可維持一定之抑制活性(52%)，但不具幾丁質酶活性，其最小抑制濃度為25%，作用機制經顯微鏡觀察後發現，針對測試菌株*Fusarium oxysporum*之菌絲末端呈現膨大的現象，亦有不完整之菌絲外觀，與控制組的菌絲於外觀上有極大的差異。而W118所產真菌抑制劑在pH7及pH8之條件下可保有最高活性(73%)，而加熱30分鐘後仍可維持一定之抑制活性(51%)，W118亦不具幾丁質酶活性，其最小抑制濃度為23%，作用機制與W113所產真菌抑制劑相同，經顯微鏡觀察後發現，測試菌株*Fusarium oxysporum*之菌絲末端呈現膨大的現象，且亦有不完整之菌絲外觀，與控制組的菌絲於外觀上有極大的差異性。第四部分主要探討二階式培養技術應用於*Bacillus subtilis* W113及W118生產脂質型生物界面活性劑，以探討前述菌株所產之真菌抑制劑物質是否為界面活性物質。經由N.B培養18小時及8小時後，W113及W118培養液表面張力值可下降至40dyne/cm以下；而經二階培養16小時後，W113及W118培養液表面張力值可下降至50dyne/cm，由此可見前述菌株所產之真菌抑制劑物質有可能為界面活性物質，但仍待更深入之研究。第五部分主要探討蝦蟹殼廢棄物之堆肥製造與應用。利用兩株幾丁質酶生產菌*Pseudomonas aeruginosa* K-187及*Bacillus cereus* B1，一株纖維素酶生產菌*Streptomyces actuosus* A-151及一株蛋白質酶生產菌*Bacillus subtilis* W112發酵後生產植物生長促進劑-堆肥，並將其成分特性及實際效果作一比較。結果顯示以*Bacillus cereus* B1效果最佳，其與對照組比較可增加全株長148%，全株重607%。第六部分主要探討以細菌發酵蝦蟹殼廢棄物及中藥殘渣生產抗氧化劑。利用一株幾丁質酶生產菌*Pseudomonas aeruginosa* K-187和一株纖維素酶生產菌*Streptomyces actuosus* A-151及一株蛋白質酶生產菌*Bacillus subtilis* W112，發酵蝦蟹殼粉(shrimp and crab shell powder, SCSP)、綜合中藥殘渣及新鮮蝦殼、新鮮蝦頭等廢棄物後，利用其酵素液進行抗氧化性之分析。結果顯示其效果皆不若合成抗氧劑BHA (butylated hydroxyanisole)佳，但其中以中藥殘渣經K-187發酵，再以恆溫處理所得樣品液顯示出最高的抗氧化性。

關鍵詞：真菌抑制劑；蝦蟹殼粉；堆肥；幾丁質酶；靈芝殘渣；中藥殘渣；生物界面活性劑；二階式培養技術；抗氧化劑

目錄

封面內頁	簽名頁	授權書	. iii	中文摘要	v	英文摘要	viii	誌謝	xi	目錄	xii	圖目錄	xx	表目錄	xv	第一章	緒言	1	第二章	文獻回顧	4	2.1	農業廢棄物之回收再利用	4	2.2	水產廢棄物之回收再利用	7	2.3	幾丁質之發現及分佈	9	2.4	幾丁質之構造	12	2.5	幾丁質之物理和化學性質	14	2.5.1	物理性質	14	2.5.2	化學性質	15	2.5.3	幾丁質的製備	15	2.6	幾丁質之應用	16	2.6.1	食品方面	16	2.6.2	廢水處理	17	2.6.3	生化方面	17	2.6.4	醫學方面	20	2.6.5	農業方面	20	2.6.6	其它方面	20	2.7	植物病原真菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	21	2.7.1	病徵	22	2.7.2	病害發生與病害環境	22	2.8	真菌抑制劑的分類	23	2.8.1	化學合成真菌抑制劑	23	2.8.2	植物來源的真菌抑制劑	24	2.8.3	微生物來源的真菌抑制劑	26	2.9	真菌抑制劑的作用機制	28	2.9.1	抑制孢子發芽與芽管延長	29	2.9.2	藉由菌絲膨大的抑制作用	30	2.9.3	菌絲的溶解作用	31	2.9.4	營養物質的競爭作用	31	2.9.5	誘發植物的生理抗性	32	2.10	生物界面活性劑	44	2.11	植物生長促進劑--生物技術於有機肥料的應用	53	2.11.1	有機肥料的配製	54	2.11.2	有機廢棄物直接施用之弊端	56	2.12	抗氧化劑	57	第三章	真菌抑制劑生產菌之篩選與鑑定	60	3.1	篩菌	60	3.2	菌株之純化	60	3.3	發酵液之製備	61	3.4	生物分析法	61	3.5	菌種鑑定	62	3.6	結果與討論	62	3.6.1	真菌抑制劑生產菌之分離與鑑定	62	3.6.2	初步試驗	63	3.6.3	分離株W113、W118之探討	63	第四章	<i>Bacillus subtilis</i> W113 及 <i>Bacillus subtilis</i> W118 真菌抑制劑生產條件之探討	65	4.1	實驗材料與方法	65	4.1.1	幾丁質	65	4.1.2	藥品	65	4.2	實驗方法	66	4.2.1	樣品製備	66	4.2.2	生物分析法	67	4.3	<i>Bacillus subtilis</i> W113及 <i>Bacillus subtilis</i> W118之真菌抑制劑生產條件探討	68	4.3.1	前言	68	4.3.2	幾丁質	68	4.3.3	培養液體積	69	4.3.4	培養時間	69	4.3.5	培養溫度	69	4.3.6	碳源	69	4.3.7	基礎培養基酸鹼值	69	4.4	結果與討論	70	4.4.1	幾丁質濃度的影響	70	4.4.2	培養液體積的影響	74	4.4.3	培養時間的影響	74	4.4.4	培養溫度的影響	75	4.4.5	碳源的影響	78	4.4.6	培養基酸鹼值的影響	82	4.5	<i>Bacillus subtilis</i> W113 及 <i>Bacillus subtilis</i>	
------	-----	-----	-------	------	---	------	------	----	----	----	-----	-----	----	-----	----	-----	----	---	-----	------	---	-----	-------------	---	-----	-------------	---	-----	-----------	---	-----	--------	----	-----	-------------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	--------	----	-----	--------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	------	----	-----	----------------------------------	----	-------	----	----	-------	-----------	----	-----	----------	----	-------	-----------	----	-------	------------	----	-------	-------------	----	-----	------------	----	-------	-------------	----	-------	-------------	----	-------	---------	----	-------	-----------	----	-------	-----------	----	------	---------	----	------	-----------------------	----	--------	---------	----	--------	--------------	----	------	------	----	-----	----------------	----	-----	----	----	-----	-------	----	-----	--------	----	-----	-------	----	-----	------	----	-----	-------	----	-------	----------------	----	-------	------	----	-------	-----------------	----	-----	--	----	-----	---------	----	-------	-----	----	-------	----	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	-------	----	-----	--	----	-------	----	----	-------	-----	----	-------	-------	----	-------	------	----	-------	------	----	-------	----	----	-------	----------	----	-----	-------	----	-------	----------	----	-------	----------	----	-------	---------	----	-------	---------	----	-------	-------	----	-------	-----------	----	-----	--	--

W118真菌抑制劑之較適生產條件 84 第五章 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118所生產真菌抑制劑性質及生物活性探討 89 5.1藥品 89 5.2材料 90 5.3真菌抑制劑性質之探討 90 5.3.1 真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討 90 5.3.2 真菌抑制劑於100 之熱穩定性探討 91 5.3.3 懸浮態幾丁質之製備 91 5.3.4 幾丁質?活性測定之呈色劑 91 5.3.5 幾丁質?活性之測定 92 5.4真菌抑制劑生物活性測定 92 5.4.1 樣品製備 92 5.4.2 測試菌株孢子液的製備 92 5.4.3 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118真菌抑制劑之抑制實驗 93 5.4.4 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118真菌抑制劑之最小抑制濃度實驗 93 5.4.5 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118真菌抑制劑抑制作用之探討 94 5.4.6 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 95 5.5結果與討論 96 5.5.1 真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討 96 5.5.2 真菌抑制劑於100 之熱穩定性探討 98 5.5.3 幾丁質分解? (chitinase) 活性之測定 100 5.5.4 Bacillus subtilis W113及 Bacillus subtilis W118真菌抑制劑之最小抑制濃度試驗 100 5.5.5 Bacillus subtilis W113及 Bacillus subtilis W118真菌抑制劑之作用機制 102 5.5.6 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 106 5.5.7 綜合討論 109 第六章 二階式培養技術應用於Bacillus subtilis W113 及Bacillus subtilis W118生產脂肪?型生物 界面活性劑 112 6.1前言 112 6.2材料與方法 114 6.2.1 標準品 114 6.2.2菌種 114 6.2.3 培善基 115 6.2.4 種培養 115 6.2.5 初級培養 115 6.2.6 二階培養 115 6.2.7菌體生長測定 117 6.2.8表面張力值之測定 117 6.3結果與討論 118 6.3.1 Bacillus subtilis W113及Bacillus subtilis W118之生長曲線與培養液表面張力 118 6.3.2 枯草桿菌Bacillus subtilis W113 及 Bacillus subtilis W118之二階培養 123 第七章 蝦蟹殼廢棄物之堆肥製造與應用 130 7.1前言 130 7.2材料與方法 131 7.2.1 材料 131 7.2.2 藥品 131 7.2.3 菌株 131 7.3方法 132 7.3.1 材料處理 132 7.3.2 發酵液之配製 132 7.3.3 碳氮比調整 132 7.3.4 堆積 133 7.3.5 發酵微生物 133 7.3.6 加水與翻堆 133 7.3.7 水分及肥料成分之分析 134 7.3.8 堆肥之應用-小白菜栽培實驗 136 7.4結果與討論 137 7.4.1 不同微生物堆肥之成分與性質分析 137 7.4.2 堆肥之應用-小白菜栽培實驗 140 7.5結論 147 第八章 以細菌發酵蝦蟹殼廢棄物及中藥殘渣生產抗氧化劑 148 8.1前言 148 8.2材料 148 8.3藥品 149 8.4菌種 149 8.5樣品製備 150 8.6分析藥品之配製 150 8.7方法步驟 151 8.7.1 《方法一》 151 8.7.2 《方法二》 152 8.8結果與討論 153 8.8.1 不同濃度下BHA的抗氧化性 153 8.8.2 不同濃度BHA無恆溫條件對抗氧化性之影響 153 8.8.3 不同濃度BHA經恆溫條件後對抗氧化性之影響 153 8.8.4 以細菌發酵中藥殘渣及蝦蟹殼廢棄物之抗氧化性 156 8.8.5 以細菌發酵中藥殘渣及蝦蟹殼廢棄物經恆溫處理後 之抗氧化性 156 第九章 結論 159 參考文獻 162 附錄一 186

參考文獻

1. 王三郎 (1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社.
2. 王三郎 (1998) 應用微生物學, 高立圖書出版社.
3. 方云、夏詠梅(1992)生物表面活性劑.中國輕工業出版社,北京 中國大陸. pp:4-5.
4. 王啟浩、王三郎 (1998) 林產資源有用成分回收再利用. 工業 減廢暨永續發展研討會, 379.
5. 呂明洲 (1994) Pseudomonas aeruginosa K-181 所產幾丁質 分解酵素之探討.大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
6. 邱少華(1995) 利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁 質?之應用及量產條件之研究.大葉工學院食品工程研究所碩 士論文.
7. 張文智(1995) 蝦蟹殼加工之廢棄物回收與再利用.大葉工學院 食品工程研究所碩士論文.
8. 李汪章(1999) 生物資源生物技術, 1:9.
9. 許為群(1991)蝦蟹殼的微生物轉化和菌種的篩選.水產學報, (3):193~196.
10. 吳思敏、顏國欽(1998)桑葉甲醇萃取物抗養化機制之探討.食 品科學,25(2):128-137.
11. 徐泰浩、曾耀銘(1994a)生物界面活性劑發酵產程與分離純化. 生物產業,5(1、2):55-65.
12. 徐泰浩、曾耀銘(1994b)生物界面活性劑生產技術之開發與應用.41(6):42~56.
13. 翁瑞光(1996)苜蓿芽、豌豆芽及油菜芽抗氧化性之研究.宜蘭 農工學報,14:34-38.
14. 翁瑞光(1997)蘿蔔嬰萃取物於模式系統之抗氧化性.宜蘭農工學 報,18:29-35.
15. 陳天、張皓冰、葉秀蓮 (1991) 殼聚糖常溫保鮮獼猴桃的研究. 食品科學,10:34-41.
16. 陳勁初(1995) 抗真菌之食品添加物.食品工業, 28(9):24-30.
17. 張圓笙、周正俊 (1981) 荖藤對於 Aspergillus parasiticus, Aspergillus niger、 Mucor mucedo 孢子發芽之影響.中國農 業化學會誌,19(1/2):99-107.
18. 黃文瑛(1994)Geotrichum candidum 菌株生物乳化劑之回收與 特性之探討. 中國農業化學會誌,32(4):439-448.
19. 葉志超(1996)利用綠膿桿菌發酵蝦蟹殼廢棄物生產真菌抑制劑 之研究.大葉工學院食品工程研究所碩 士論文.
20. 楊政國、王三郎(1998)工業減廢暨永續發展研討會論文集. 353-366
21. 孫守恭(1995) 鐮胞菌之變異行為與其在經濟作物抗病育種之運用.行政院國家科學委員會.
22. 高銘木、謝得上(1998)真菌代謝物純化鑑定其毒害甘蔗之機轉. 台灣糖業公司糖業研究所.
23. 楊秋忠(1991)土壤有機質的地力維持.土壤管理手冊,60~170.
24. 蔡永纂(1994)有機質添加物在防治作物線蟲病害之永續作為.農 藥世 界,126(2):56~65.
25. 蔡永皞(1996)農水產廢棄物堆肥化之開發及應用()瓜類育苗 介質之研製及其理化性質.高雄場研究彙報,8(1):43~54.
26. 蔡永皞(1997)農水產廢棄物堆肥化之開發及應用()送風式堆 肥槽之建立及快速堆肥製造.高雄場研究彙報,9(1):44~59.
27. 蔡永皞(1993) 施用雞糞堆肥對轉作田間土壤及作物氮素動態之 影響.高雄區農業改良場研究彙報, 5(1):49~61.
28. 蔡宜峰、莊作權、黃裕銘(1993) 一般有機質在土壤礦化潛能及 礦化速率之估算.永續農業研討會專集,69~77.
29. 錢明賽(1998)蔬果中之抗氧化物質.食品工業,30(8):24-34.
30. 謝順堂(1994)Pseudomonas aeruginosa M-1001所產溶菌酵素抑 制劑之研究.大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
31. 張榮倫(1995)二階式培養結合休止細胞固定化技術應用於 Bacillus subtilis 生物界面活性劑之生成.大葉工學院食品工 程研究所碩士論文.