

綠殭菌發酵最適化條件之探討=optimization of fermentation process for nomuraea rileyi

薛一祥、謝建元

E-mail: 9019815@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以回應曲面法分別進行綠殭菌 (*Nomuraea rileyi* CCRC 35515) 液態與固態發酵，最適化生產菌絲體和分生孢子之探討。在液態發酵方面，以葡萄糖、果糖、蔗糖、麥芽糖與糖蜜為碳源，其中以葡萄糖為最佳；另一方面，在酵母萃出物、neopeptone與玉米澱粉的氮源試驗中，則以玉米澱粉為最佳。於葡萄糖及玉米澱粉培養基中添加綜合蔬果汁 (V8 juice) 具有促進菌體生長之功效，而搖瓶培養的其它物理因子：培養液起始酸鹼值以pH 6 為最佳，菌體絲乾重亦隨搖瓶轉速上升而提高。以回應曲面法所得之最適化培養基組成為葡萄糖3.2%、V8 juice 29% 及玉米澱粉0.15%，可得到最高菌絲體乾重為12.1 g/L。將此最適化培養基條件應用於5 L液態發酵槽試驗中，在1 vvm通氣量條件下，較高的發酵槽攪拌速率可得到較佳的菌絲體產量，且排出氣體的含氧量較低；但是當通氣量為2 vvm時，不同攪拌速率 (250、350及450 rpm) 對菌絲體生長並無明顯影響，而菌絲體乾重可高達16.4 g/L。在固態發酵方面，RSM同樣應用在最適化分生孢子的生產，糖蜜、玉米澱粉、酵母粉、魚漿及高粱仁等培養基對綠殭菌生長最佳，且產孢量可達 4.79×10^9 conidia/g-dry weight。在固態發酵量產方面，將平板及太空包之結果轉移至22-L固態發酵槽，以2800 Lumens/m²且光照週期為L/D = 12/12，其產孢量最佳可達 6.8×10^9 conidia/g-dry weight。固態發酵槽所生產之分生孢子，其對四齡甜菜夜蛾的致死率為 $56.05 \pm 5.43\%$ ，與SMAY斜面培養基比較其活性並無明顯差異。

關鍵詞：綠殭菌；固態發酵；液態發酵；分生孢子；菌絲體

目錄

封面內頁 簽名頁 大葉大學碩士論文全文授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 viii 目錄 ix 圖目錄 xii 表目錄 xv 第一章 緒論 1 第二章 文獻回顧 3 2.1 綠殭菌之背景及特性 3 2.2 化學農藥對綠殭菌抑制作用 5 2.3 綠殭菌對哺乳類動物之安全性 6 2.4 營養需求及環境因子對綠殭菌產孢之影響 7 2.5 農產品廢棄物之應用 8 2.6 固態與液態發酵 9 2.7 回應曲面法 11 2.7.1 回應曲面法之原理 11 2.7.2 二水準因子設計 13 2.7.3 陡升路徑法 14 2.7.4 中心混成設計 15 2.7.5 回應曲面模式適切性之統計檢驗 16 第三章 實驗材料與方法 17 3.1 試驗設備 17 3.2 試驗材料 17 3.2.1 試驗培養基 18 3.2.2 菌種 18 3.3 試驗方法 19 3.3.1 種菌製備 19 3.3.2 分析方法 19 3.3.3 液態發酵最適化培養條件之探討 20 3.3.4 固態發酵最適化培養條件之探討 28 第四章 結果與討論 38 4.1 綠殭菌液態發酵最適化培養條件之探討 38 4.1.1 培養天數及起始酸鹼值對生長之影響 38 4.1.2 搖瓶轉速對生長之影響 38 4.1.3 綜合蔬果汁對生長之影響 41 4.1.4 碳源對生長之影響 41 4.1.5 氮源對生長之影響 46 4.1.6 基本培養液與碳、氮源之交互作用對生長之影響 46 4.1.7 培養基最適組成份之探討 46 4.1.8 液態發酵槽操作因子對生長之影響 60 4.2 以固態發酵方式生產綠殭菌分生孢子之探討 67 4.2.1 接種濃度對產孢量的影響 67 4.2.2 光照週期對產孢量的影響 67 4.2.3 維他命添加液對產孢量的影響 72 4.2.4 碳源對產孢量的影響 72 4.2.5 氮源對產孢量的影響 76 4.2.6 培養基質對產孢量的影響 76 4.2.7 培養基最適組成份之探討 79 4.2.8 固態發酵槽 (系統一) 光照強度對產孢量之影響 90 4.2.9 固態發酵槽 (系統二) 量產試驗 90 第五章 結論與展望 97 參考文獻 100 附錄一、米酒酒槽水之主要成分 108 附錄二、回應曲面進行步驟流程圖 109 附錄三、培養基之碳、氮、氫元素分析表 110 附錄四、酵母粉及玉米澱粉之成份表 111 附錄五、22L固態發酵槽示意圖 112 附錄六、220 L固態發酵槽示意圖 113 圖目錄 頁次 圖 4-1 起始酸鹼值及培養時間對綠殭菌液態培養之影響 39 圖 4-2 培養箱轉速對綠殭菌液態培養之影響 40 圖 4-3 不同濃度酒水對綠殭菌液態培養之影響 42 圖 4-4 不同濃度V8 juice對綠殭菌液態培養之影響 (接種孢子懸浮液) 43 圖 4-5 不同濃度V8 juice對綠殭菌液態培養之影響 (接種菌絲體) 44 圖 4-6 不同碳源對綠殭菌液態培養之影響 45 圖 4-7 不同氮源對綠殭菌液態培養之影響 47 圖 4-8 不同濃度V8 juice添加碳、氮源對綠殭菌液態培養之影響 48 圖 4-9 玉米澱粉與葡萄糖對綠殭菌菌絲體乾重之回應曲面圖 54 圖 4-10 玉米澱粉與葡萄糖對綠殭菌菌絲體乾重之等高線圖 55 圖 4-11 玉米澱粉與V8 juice對綠殭菌菌絲體乾重之回應曲面圖 56 圖 4-12 玉米澱粉與V8 juice對綠殭菌菌絲體乾重之等高線圖 57 圖 4-13 葡萄糖與V8 juice對綠殭菌菌絲體乾重之回應曲面圖 58 圖 4-14 葡萄糖與V8 juice對綠殭菌菌絲體乾重之回應曲面圖 59 圖 4-15 液態發酵槽通氣量對綠殭菌液態培養之影響 62 圖 4-16 液態發酵槽通氣量對綠殭菌氧氣消耗速率之影響 63 圖 4-17 液態發酵槽攪拌速率對綠殭菌液態培養之影響 64 圖 4-18 液態發酵槽攪拌速率對綠殭菌氧氣消耗速率之影響 65 圖 4-19 液態發酵槽氧氣質傳對綠殭菌液態培養之影響 66 圖4-20、不同攪拌速率對綠殭菌於液態發酵槽培養之影響 (非中心混成點) 68 圖 4-21 液態發酵槽氧氣質傳對綠殭菌氧氣消耗速率之影響 69 圖 4-22 接種不同濃度孢子懸浮液對綠殭菌產孢量之影響 70 圖 4-23 不同光照週期對綠殭菌產孢量之影響 71 圖 4-24 不同濃度酒水對綠殭菌產孢量之影響 73 圖 4-25 不同濃度V8 juice對綠殭菌產孢量之影響 74 圖 4-26 不同碳源對綠殭菌產孢量之影響 75 圖 4-27 不同氮源對綠殭菌產孢量之影響 77 圖 4-28 不同培養基質及培養基組成份對綠殭菌產孢量之影響 78 圖 4-29 玉米澱粉與糖蜜對綠殭菌產孢量之回

應曲面圖 84 圖 4-30 玉米浸粉與糖蜜對綠殭菌產孢量之等高線圖 85 圖 4-31 玉米浸粉與V8 juice對綠殭菌產孢量之回應曲面圖 86 圖 4-32 玉米浸粉與V8 juice對綠殭菌產孢量之等高線圖 87 圖 4-33 V8 juice與糖蜜對綠殭菌產孢量之回應曲面圖 88 圖 4-34 V8 juice與糖蜜對綠殭菌產孢量之等高線圖 89 圖 4-35 固態發酵槽光照強度對綠殭菌產孢量之影響 92 圖 4-36 22L 固態發酵槽以光照強度2800 Lumens/m² 所生產之綠殭菌孢子經熱處理之發芽率 94 圖 4-37 22L 固態發酵槽以光照強度6500 Lux 所生產之綠殭菌孢子經熱處理之發芽率 95 表目錄 頁次 表 3-1 25-1部分因子實驗設計 28 表 3-2 25-1部分因子設計中各自變數的水準與相對濃度 24 表 3-3 陡升路徑實驗設計 25 表 3-4 中心混成實驗設計 26 表 3-5 25-1部分因子實驗設計 27 表 3-6 25-1部分因子設計中各自變數的水準與相對濃度 31 表 3-7 陡升路徑實驗設計 33 表 3-8 中心混成實驗設計 34 表 4-1 25-1部分因子設計及實驗結果 50 表 4-2 根據25-1 部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 51 表 4-3 中心混成設計及其實驗結果 53 表 4-4 實際實驗數據與回應模式所預估的預測值比較表 61 表 4-5 25-1部分因子設計及實驗結果 80 表 4-6 根據25-1 部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 81 表 4-7 中心混成設計及其實驗結果 83 表 4-8 實際實驗數據與回應模式所預估的預測值比較表 91 表 4-9 固態發酵槽不同光照強度所生產之分生孢子粉經水浴加 熱處理對綠殭菌感染甜菜夜蛾四齡幼蟲之致死率 93

參考文獻

參考文獻 吳幸娟。1990。以固定化酵母釀造米酒之試驗。文化大學家政所碩士論文。 吳美貌。1993。蘇力菌素的發酵產製、分離純化與生物檢定。大葉大學食品工程研究所碩士論文。 林意欣。1997。以米酒槽液產製酸性蛋白質分解酵素之試驗。東海大學化學工程研究所碩士論文。 唐立正。1997。本地產綠殭菌感染玉米穗夜蛾之研究。國立中興大學昆蟲學系博士論文。 高穗生、蔡勇勝。1995。蟲生病原真菌在蟲害防治上之利用。藥試所專題報導 38、39:16-18。 黃賜源。1996。靈芝液態培養及氣舉式生物反應器應用之實驗。東海大學化學工程研究所碩士論文。 楊世民、林讚峰。1994。簡介利用回應曲面實驗設計法決定工業微生物的最佳培養基。製酒科技專論彙編 16:135-150。 蔡淑珍。1988。蟲生真菌之調查及綠殭菌感染斜紋夜盜之生理學與病理學。國立台灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文。 蕭文鳳、莊凱順、鄭峰銘。1997。溫溼度和十字花科植物與白殭菌對偽菜蚜毒力之影響。嘉義農專學報52:101-108。 謝建元、洪文凱、高穗生、王順成、曾耀銘。1998。本土黑殭菌以固態和液態發酵生產黑殭菌素之探討。中國農業化學會誌36(4):371-379。 Boucia, D. G. and Pendland, J. C. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 288-292. Cherry, A. J., Jenkins, N E., Heviefio, G., Batemen, R. and Lomer, C. J. 1999. Operational and economic analysis of a West African pilotscale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* spp. for use as a mycoinsecticide against locust and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 35-51. Cliguet, S. and Scheffer, R. J. 1997. Influence of culture conditions on growth and survival of conidia of *Trichoderma* spp. coated on seeds. *Biocontrol Science and Technology*. 7: 171-181. Gardner, W. A., Sutton, R. M. and Noblet, R. 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomurea rileyi* and *Nosema necatrix* on soybean foliage. *Environ. Entomol.* 6: 616-618. Garcia, C. and Ignoffo, C. M. 1977. Dislodgment of *Nomurea rileyi* from cadavers of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 114-116. Getzin, L. W. 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomopathogenic fungus of *Trichoplusia ni* (Huebner). *J. Insect Pathol.* 50: 67-69. Glare, T. R. (1987) Effect of host species and light conditions on production of conidia by an isolate of *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 67-69. Holdom, D. G. and Van de Klashorst, G. 1986. Inexpensive culture media and methods for *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 246-248. Horton, D. L., Carner, G. R. and Turnipseed, S. G. 1980. Pesticide inhibition of the entomogenous fungus *Nomurea rileyi* in soybean. *Environ. Entomol.* 9: 304-308. Ignoffo, C. M. 1981. The fungus *Nomurea rileyi* as a microbial insecticide. In "Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980." (H. D. Burges, ed.), Academic Press, New York. pp. 513-537. Ignoffo, C. M. and Garcia, C. 1985b. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadorian and a Mississippian biotype of *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 45: 346-352. Ignoffo, C. M., Garcia, C. 1978. In vitro inactivation conidia of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi* by human gastric juice. *Environ. Entomol.* 7: 217-218. Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Gardner, W. A. 1985a. Temperature stability of wet and dry conidia of *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson. *Environ. Entomol.* 14: 87-91. Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Hostetter, D. L. 1976. Effects of temperature on growth and sporulation for the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. *Environ. Entomol.* 5: 935-936. Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Hostetter, D. L. and Pienll, R. E. 1977. Vertical movement of conidia of *Nomurea rileyi* through sand and loam soil. *J. Econ. Entomol.* 70: 163-164. Ignoffo, C. M., Garcia, C. and Kroha, M. J. 1982a. Susceptibility of larvae of *Trichoplusia ni* and *Anticarsia gemmatilis* to intrahemocoelic injections of conidia and blastospores of *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 198-202. Ignoffo, C. M., Garcia, C. Kapp, R. W. and Coate, W. B. 1979. An evaluation of the risk to mammals of the use of an entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*, as a microbial insecticide. *Environ. Entomol.* 3: 354-358. Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L. Garcia, C. and Pienll, R. E. 1975. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. *Environ. Entomol.* 4: 765-768. Ignoffo, C. M., McIntosh, A. H., Garcia, C., Kroha, M. J. and Johnson, J. M. 1982b. Effect of successive in vitro and in vivo passages of the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*. *Entomophaga*. 27: 371-378. Ignoffo, C. M., Puttler, B., Hostetter, D. L. and Dickerson, W. A. 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 259-262. Kish, L. P., Samon, R. A. and Allen, G. E. 1974. The genus *Nomurea* Maublanc. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 154-158. Tang, L. C. and Hou, R. F. 1998. Potential application of the entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*, for control of the corn worm, *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Exp. Appl.* 88: 25-30. Liu, B. L. and Tzeng, Y. M. 1999. Water content and water activity for the production of

cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Lett.* 21: 657-661. Lonsane, B. K., Saucedo, C. G., Rainbault, M., Roussos, S., Viniegera, G. G., Ghildyal, N. P. and Ramakrishna, M. M. 1992. Scale-up strategies for solid state fermentation system (review). *Process Biochem.* 27: 259-273. Maurice, R. and Didier, A. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209. Mohamed, A. K. A., Sikorowski, P. P. and Bell, J. V. 1977. Susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi* at various temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 414-417. Ooijkaas, L. P., Tramper, J. and Buitelaar, R. M. 1998. Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22: 480-486. Ramesh, M. V. and Lonsane, B. K. 1990. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid state system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 501-501. Roukas, T. and Maria, L. K. 1999. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *J. Food Eng.* 40: 89-94. Stuart, D. M., Mitchell, D. A., John, M. R., and Lister, J. D. 1999. Solid-State Fermentation in Rotating Drum Bioreactors : operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 383-391. Sun, T. L., Beihui, L. P., Liu, D. and Li, Z. 1998. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem.* 33: 419-422. Throvilson, H. G. and Pedigo, L. P. 1984. Epidemiology of *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromcotina) in *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Iowa soybeans. *Environ. Entomol.* 13: 1491-1497. Throvilson, H. G. and Pedigo, L. P. and Lewis, L. C. 1985. Soybean leaf consumption by *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromcotina) infected *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae .*J. Invertebr. Pathol.* 46: 265-271. Vimala Deri, P. S. 1994. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 145-150. Yang, Z., Wieger, K., Jan, P. S. and Jan, B. 1996. Medium Optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carries. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18: 108-112.