

利用回應曲面法尋求白殭菌生產白殭菌素之培養基組成份最適化探討

施玫?、張耀南；曾耀銘

E-mail: 9417921@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以搖瓶培養方式，並利用碳氮源二次交叉試驗法與回應曲面法進行本土白殭菌(*Beauveria bassiana* A1)生合成白殭菌素(Beauvericin; BEA)所需最佳培養基組成份及其濃度最適化之探討。實驗結果顯示，若以5.0mL/L玉米萃取物、10.0g/L NZM broth、2.0g/L磷酸氫二鉀、25.0g/L蔗糖、25.0mL/L糖蜜、10.0g/L麥芽萃取物為起初培養基組成份時，其起始酸鹼值為pH 5.7，在26℃下振盪培養(150rpm)至第六天時，BEA產量可達到最高值0.75mg/L。此起初培養基經碳氮源二次交叉試驗法與回應曲面法之實驗探討後，其組成份修改為5.0mL/L玉米萃取液、10.0g/L NZM broth、2.0g/L磷酸氫二鉀、25.0g/L葡萄糖時，培養基起始酸鹼值亦為pH 5.7，在26℃下振盪培養(150rpm)六天時，BEA產量可達到4.18mg/L。若培養基組成份理論上修改為5.24mL/L玉米萃取液、10.01g/L NZM broth、1.98g/L磷酸氫二鉀、25.56g/L葡萄糖時，在相同培養基起始酸鹼值及培養條件下，BEA產量之理論預測值應為4.47mg/L。

關鍵詞：白殭菌；白殭菌素(BEA)；回應曲面法；環狀胜?

目錄

目錄	頁次	封面內頁	目錄	頁次	封面內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv
要	iv	ABSTRACT	v	誌謝	vi	目錄	viii	
錄	xi	表目錄	xiii	第一章 緒論	1	第二章 文獻回顧	4	
論	1	2.1 微生物農藥	4	2.2 蟲生真菌的簡介	5	2.3 白殭菌	8	
菌	8	2.4 白殭菌素	10	2.5 回應曲面統計實驗設計法	14	2.5.1 二水準因子設計	19	
法	14	2.5.2 陡升路徑	21	2.5.3 中心混成設計	21	2.6 回應曲面模式適切性之統計檢驗	24	
法	21	2.7 因子影響效應之分析	24	第三章 材料與方法	27	3.1 前言	27	
驗	24	3.1 前言	27	3.2 材料與方法	27	3.2.1 實驗材料	27	
法	27	3.2.1 實驗材料	27	3.2.2 儀器設備	28	3.2.3 培養方法	29	
備	28	3.2.3 培養方法	29	3.2.4 白殭菌素萃取方法	30	3.3 白殭菌素之定量分析	30	
法	30	3.3 白殭菌素之定量分析	30	3.4 培養基組成份最適化探討	32	3.4.1 不同培養基分別進行搖瓶及5L發酵槽對白殭菌生產白殭菌素之比較	32	
討	32	3.4.1 不同培養基分別進行搖瓶及5L發酵槽對白殭菌生產白殭菌素之比較	32	3.4.2 培養基酸鹼值最適化之探討	33	3.4.3 碳氮源二次交叉試驗法	33	
論	32	3.4.2 培養基酸鹼值最適化之探討	33	3.4.3 碳氮源二次交叉試驗法	33	3.5 回應曲面法之實驗設計	34	
計	34	3.5.1 一階因子設計	35	3.5.2 陡升路徑	35	3.5.3 中心混成設計	35	
法	35	3.5.2 陡升路徑	35	3.5.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗	40	第四章 結果與討論	43	
驗	40	3.5.3 中心混成設計	35	3.5.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗	40	4.1 培養基組成份最適化之結果與討論	43	
論	43	第四章 結果與討論	43	4.1 培養基組成份最適化之結果與討論	43	4.1.1 不同培養基分別進行搖瓶及5L發酵槽對白殭菌生產白殭菌素之實驗	43	
論	43	4.1 培養基組成份最適化之結果與討論	43	4.1.1 不同培養基分別進行搖瓶及5L發酵槽對白殭菌生產白殭菌素之實驗	43	4.1.2 培養基酸鹼值最適化實驗	46	
最	46	4.1.1 不同培養基分別進行搖瓶及5L發酵槽對白殭菌生產白殭菌素之實驗	43	4.1.2 培養基酸鹼值最適化實驗	46	4.1.3 碳氮源二次交叉試驗	46	
適	46	4.1.2 培養基酸鹼值最適化實驗	46	4.2 回應曲面法實驗設計之結果與討論	50	4.2.1 一階因子設計實驗	50	
化	50	4.1.3 碳氮源二次交叉試驗	46	4.2 回應曲面法實驗設計之結果與討論	50	4.2.2 陡升路徑實驗	52	
之	50	4.2 回應曲面法實驗設計之結果與討論	50	4.2.1 一階因子設計實驗	50	4.2.3 中心混成設計實驗	52	
探	52	4.2.1 一階因子設計實驗	50	4.2.2 陡升路徑實驗	52	4.2.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗	64	
討	52	4.2.2 陡升路徑實驗	52	4.2.3 中心混成設計實驗	52	第五章 結論與展望	64	
探	64	4.2.3 中心混成設計實驗	52	4.2.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗	64	參考文獻	68	
討	64	4.2.4 回應曲面模式適切性之統計檢驗	64	第五章 結論與展望	66	附錄	77	
論	66	第五章 結論與展望	66	參考文獻	68	作者簡介	81	
與	68	參考文獻	68	附錄	77	圖目錄	12	
展	68	附錄	77	作者簡介	81	圖2.1 白殭菌素與恩鐮孢菌素之化學結構	12	
望	81	圖目錄	12	圖2.2 白殭菌素與恩鐮孢菌素之化學結構式	13	圖2.3 回應曲面圖	17	
.....	81	圖2.1 白殭菌素與恩鐮孢菌素之化學結構	12	圖2.2 白殭菌素與恩鐮孢菌素之化學結構式	13	圖2.4 回應曲面進行步驟流程圖	18	
.....	81	圖2.2 白殭菌素與恩鐮孢菌素之化學結構式	13	圖2.3 回應曲面圖	17	圖2.5 回應曲面法實驗設計之概念圖	20	
.....	81	圖2.3 回應曲面圖	17	圖2.4 回應曲面進行步驟流程圖	18	圖2.6 回應曲面法之陡升路徑圖	23	
.....	81	圖2.4 回應曲面進行步驟流程圖	18	圖2.5 回應曲面法實驗設計之概念圖	20	圖4.1 白殭菌在DY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	44	
.....	81	圖2.5 回應曲面法實驗設計之概念圖	20	圖2.6 回應曲面法之陡升路徑圖	23	圖4.2 白殭菌在CY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	45	
.....	81	圖2.6 回應曲面法之陡升路徑圖	23	圖4.1 白殭菌在DY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	44	圖4.3 培養基起始酸鹼值對白漿菌素產量之影響	47	
.....	81	圖4.1 白殭菌在DY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	44	圖4.2 白殭菌在CY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	45	圖4.4 第一次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	48	
.....	81	圖4.2 白殭菌在CY培養基中生合成白殭菌素及孢子數之產量曲線	45	圖4.3 培養基起始酸鹼值對白漿菌素產量之影響	47	圖4.5 第二次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	49	
.....	81	圖4.3 培養基起始酸鹼值對白漿菌素產量之影響	47	圖4.4 第一次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	48	圖4.6 玉米萃取液與NZM broth對BEA產量之回應曲面	49	
.....	81	圖4.4 第一次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	48	圖4.5 第二次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	49	49	
.....	81	圖4.5 第二次碳氮源交叉試驗對白殭菌素產量之影響	49	圖4.6 玉米萃取液與NZM broth對BEA產量之回應曲面	49	49	

圖.....	58	圖4.7 玉米萃取液與磷酸氫二鉀對BEA產量之回應曲面圖.....	59	圖4.8 玉米萃取液與葡萄糖對BEA產量之回應曲面圖.....	60
圖4.9 NZM broth與磷酸氫二鉀對BEA產量之回應曲面圖.....	61	圖4.10 NZM broth與葡萄糖對BEA產量之回應曲面圖.....	62	圖4.11磷酸氫二鉀與葡萄糖對BEA產量之回應曲面圖.....	63
表目錄		表2.1 目前發展中或已發展之真菌殺蟲劑.....	6	表2.2 具有生物活性化合物製成之藥物.....	7
表2.3 不同菌珠之生產白殭菌素所需成份及產量或被污染農作物中白殭菌之含量...	15	表3.1 培養基組成成分之第一次碳氮源交叉試驗設計表.....	36	表3.2 培養基組成成分之第二次碳氮源交叉試驗設計表.....	37
表3.3 24實驗設計之變數及層階.....	38	表3.4 陡升路徑實驗設計.....	39	表3.5 中心混成實驗設計圖表(the 2nd order RSM model).....	41
表3.5 中心混成實驗設計圖表(the 2nd order RSM model) (續).....	42	表4.1 比較不同單一碳氮源對白殭菌素產量之影響.....	47	表4.2 比較不同複合碳氮源對白殭菌素產量之影響.....	49
表4.3 一階RSM實驗設計之結果.....	51	表4.4 陡升路徑實驗設計之結果.....	53	表4.5 中心混成實驗設計之結果(the 2nd order RSM model).....	54
表4.6 四種因子中心混成實驗之迴歸分析表.....	55	表4.7 回應曲面模式之變異數分析表(the 2ed-order RSM model).....	57	表4.9 回應模式中心預估測試點實驗值.....	65

參考文獻

- 參考文獻 1.王三郎。1997。應用微生物學。第513-543頁。高立出版社。台北。 2.李增智，韓寶瑜，樊美珍。1991。中國蟲生真菌新記錄屬。真菌學報10(2): 177-179。 3.李建慶，張永安，張星耀，楊忠歧，袁鋒。2003。昆蟲病原真菌毒素的研究進展。林業科學研究16(2): 233-239。 4.吳文騰 主編。2003。微生物農藥。第59-106頁。生物產業技術概論，國立清華大學出版社，新竹。 5.呂世欽。2004。白殭菌蛋白質分解酵素發酵製備之研究探討:25-34。朝陽科技大學碩士論文。台中。 6.林雅蘭，黃秀梨。2000。現代微生物學與實驗技術。科學出版社。北京。 7.洪哲穎，陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用。化工39(2): 3-18。 8.洪哲穎。1998。回應曲面品質工程技術研習。經濟部工業局八十八年度工業技術人才培訓計畫:1-72。1998年11月24日。經濟部工業局。工研院台南工服部。 9.高穗生，蔡勇勝。1995。蟲生病原真菌在蟲害防治上之利用(上)。藥試所專題報導38: 122-130。 10.高穗生，蔡勇勝。1995。蟲生病原真菌在蟲害防治上之利用(下)。藥試所專題報導39: 1-16。 11.Ambrosino, P., Galvano, F., Fogliano, V., Logrieco, A., Fresa, R. and Ritieni, A. 2004. Supercritical fluid extraction of Beauvericin from maize. *Talanta*. 62: 523-530. 12.Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G. 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology*. 12: 161-168. 13.Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*. 13: 1-45. 14.Butt, T. M. and Copping, L. 2000. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*. 11: 186-191. 15.Butt, T. M., Jackson, C. and Magan, N. 2001. *Fungi as Biocontrol Agents*. p.1-8. CABI Publishing, UK. 16.Calo, L., Fornelli, F., Ramires, R., Nenna, S., Tursi, A., Caiaffa, M. F., and Macchia, L. 2004. Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacological Research*. 49(1): 73-77. 17.Cook, J. L., Routes, B. A., Walker, T. A., Colvin, K. L. and Routes, J. M. 1999a. E1A Oncogene induction of cellular susceptibility to killing by cytolytic lymphocyte through target cell sensitization to apoptotic injury. *Experimental Cell Research*. 251: 414-423. 18.Cook, J. L., Routes, B. A., Leu, C. Y., Walker, T. A., and Colvin, K. L. 1999b. E1A Oncogene-induced cellular sensitization to immune-mediated apoptosis is independent of p53 and resistant to blockade by E1B 19 kDa protein. *Experimental Cell Research*. 252: 199-210. 19.Desjardin, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. and Maragos, C. M. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1020-1025. 20.Ganassi, S., Moretti, A., Maria, A., Pagliai, B., Logrieco, A. and Sabatini, M. A. 2002. Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 80: 90-96. 21.Genthner, F. J., Cripe, G. M. and Crosby, D. J. 1994. Effect of *Beauveria bassiana* and Its Toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). *Toxicol*. 26(1): 90-94. 22.Grove, J. F. and Pople, M. 1980. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia*. 70: 103-105. 23.Gupta, S., Krasnoff, S. B., Underwood, N. L., Renwick, J. A. A. and Roberts, D. W. 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var, *subglutinans*. *Mycopathologia*. 115: 185-189. 24.Hamill, R. L., Higgins, C. E., Boaz, H. E. and Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrajedron Lett*. 49: 4255-4258. 25.Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., Nishizawa, Y. and Hibi, T. 1993. Induction and Purification of *Beauveria bassiana* Chitinolytic Enzymes. *Journal of Invertebra Pathology*. 61: 97-102. 26.Huxham, I. M., Lackie, A. M. and McCorkindale, N. J. 1989. Inhibitory effect of cyclodipeptides, destruxins from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. *Journal of Insect Physiology*. 35: 97-105. 27.Lee, M. D., Galazzo, J. L., Staley, A. L., Lee, J. C., Warren, M. S., Fuernkranz, H., Chamberland, S., Lomovskaya, O. and Miller, G. H. 2001. Microbial fermentation-derived inhibitors of efflux-pump-mediated drug resistance. *IL Farmaco*. 56: 81-85. 28.Lemmens-Gruber, R., Rachoy, R., Steininger, E., Kouri, K., Salch, P., Krska, R., Josephs, R. and Lemmens, M. 2000. The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on electromechanical and physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. *Mycopathologia*. 149(1): 5-12. 29.Logrieco, A., Moretti, A., Altomare, C., Bottalico, A. and Carbonell, T. E. 1993a. Occurrence and toxicity of *Fusarium* subglutinans from Peruvian maize. *Mycopathologia*. 122: 185-190. 30.Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Chelkowschi, J., Altomare, C. and Randazzo, G. 1993b. Natural occurrence of beauvericin in preharvest

Fusarium subglutinans infected corn ears, in Poland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 2149-2152. 31. Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecki, M., Golinski, P. and Ritieni, A. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3084-3088. 32. Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Caraffa, M. F. and Macchia, L. 2001. Beauvericin: chemistry, biology and significance. In R. K. Upadhyay (ed.). *Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation*, in press. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. The Netherlands. 33. Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R. and Ritieni, A. 2002. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 82-85. 34. Lucia, Calo., Francesca, Fornelli., Rossella, Ramires., Saverio, Nennaa, Alfredo., Tursi, Maria., Filomena, Caiaffa. and Luigi, Macchia. 2004. Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacological Research*. 49: 73-77. 35. Khuri, A. I. and Cornell, J. A. 1987. *Response Surface-Designs and Analyses*. Marcel Dekker, Inc, New York. 36. Kouri, K., Lemmens, M. and Lemmens-Gruber, R. 2003. Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1609: 203-210. 37. Krška, R., Schuhmacher, R., Grasserbauer, M. and Scott, P. M. 1996. Determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin at $\mu\text{g/kg}$ levels in corn by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*. 746: 233-238. 38. Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Randazzo, G. and Corda, P. 1995. Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research*. 99: 282-286. 39. Munkvold, G., Stahr, H. M., Logrieco, A., Moretti, A. and Ritieni, A. 1998. Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium*-contaminated livestock feed in Iowa. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3923-3926. 40. Jim, D. 2005. *Fungal Biology*. The University of Edinburgh. Blackwell Publishing, UK. 41. Ojcius, D. M., Zychlinsky, A., Zheng, L. M. and Young, J. D. 1991. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Experimental Cell Research*. 197(1): 43-9. 42. Que, F. G., Phan, V. A., Phan, V. H., LaRusso, N. F. and Gores, G. 1999. GUDC inhibits cytochrome c release from human cholangiocyte mitochondria. *The Journal of Surgical Research*. 83: 100-105. 43. Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In H. D. Burges (ed.). *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. p. 441-446. Academic Press, London, UK. 44. Richard, J. M. 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information*. 21(2): 47-50. 45. Sam?inakova, A. 1966. Growth and Sporulation of Submersed Cultures of the Fungus *Beauveria bassiana* in Various Media. *Journal of Invertebrate Pathology*. 8: 395-400. 46. Suzuki, A., Kanaoka, M., Isogai, A., Murakoshi, S., Ichinoe, M. and S. Tamura. 1977. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Lett*. 25: 2167-2170. 47. Thomson, D. 1982. Response Surface experimentation. In *Food Processing Preservation*. 6: 155-188. 48. Tomoda, H., Huang, X. H., Cao, J., Nishida, H., Nagao, R., Okuda, S., Tanaka, H. and ?mura, S. 1992. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *Journal of Antibiotics*. 45: 1626-1632. 49. Vey, A. and Fargues, J. 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinortarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 207-215.