

Optimization of Conidial Production for *Trichoderma virens* in Solid-State Fermentation Using Peat Moss as Substrate

劉惠雯、謝建元

E-mail: 9417968@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

This study was using response surface methodology (RSM) to optimize the conidia production for *Trichoderma virens* (Tv-R42) in solid-state fermentation. Solid state fermentation was carried out in specially designed plastic bags (16 × 8 × 13 cm) containing 50 g peat moss, agricultural wastes (soybean powder, sugar cane bagasse and rice bran), surfactant (Tween 80) with different moisture content. Substrate was inoculated with 5 mL conidial suspension of *T. virens* (1×10^8 conidia/mL), and bags were incubated at 27 °C for 7 days then dry for 2 days. The optimal medium of solid-state fermentation consisted of 4 % soybean powder, 0.62 % Tween 80, 1.3 % sugar cane bagasse, 5.3 % rice bran and with 80.7 % of moisture content. Under optimized conditions, the conidial production was 1.1×10^9 conidia/g-substrate dry weight. However, results showed that, based on central composite design, a medium comprised 5.1 % soybean powder, 0.24 % Tween 80, 1.8 % sugar cane bagasse, 7 % rice bran with moisture content of 86 % was proposed, which gave a yield of 2.4×10^9 conidia/g-substrate dry weight. To solve the discrepancy, more studies on the search of optimal medium applying central composite design experiment is urgently needed.

Keywords : *Trichoderma virens*、solid-state fermentation、peat moss、conidial spore

Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書 iii	中文摘要 iv	英文摘要 v	誌謝 vi	目錄 vii	圖目錄 x	表目錄 xi										
第一章 前言 1	第二章 文獻回顧 3	2.1 木黴菌之分類 3	2.2 木黴菌之型態 3	2.3 木黴菌對病害生物防治機制 4	2.4 固態發酵 5	2.5 泥炭土在固態發酵上的應用 8	2.6 大豆渣、大豆粉在固態發酵上的應用 12	2.7 蔗渣在固態發酵上的應用 14	2.8 米糠在固態發酵上的應用 16	2.9 Tween 80在固態發酵上的應用 18	2.10 固態發酵基質最適化探討 20					
第三章 材料與方法 22	3.1 儀器與設備 22	3.2 試驗培養基 22	3.3 實驗方法 23	3.3.1 菌種與菌源之製備 23	3.3.2 斜面培養 23	3.4 分析方法 24	3.4.1 分生孢子計算方法 24	3.4.2 培養基質含水率之測定 24	3.5 固態發酵最適化條件之探討 25	3.5.1 固態發酵培養試驗 25	3.5.2 回應曲面法 (response surface methodology) 25	3.5.3 部分因子試驗 26	3.5.4 陡升路試驗 27	3.5.5 中心混成設計試驗 27		
第四章 結果與討論 33	4.1 木黴菌生長情形 33	4.2 固態發酵最適化條件之探討 34	4.2.1 固態發酵培養試驗 34	4.2.1 部分因子實驗 39	4.2.2 陡升路徑實驗 39	4.2.3 中心混成實驗 40	第五章 結論 56	參考文獻 58	附錄 64	圖目錄 圖4-1 木黴菌之分生孢子 33	圖4-2 不同營養物及含水量對綠色木黴菌分生孢子產量之影響 36	圖4-3 不同營養物及含水量對綠色木黴菌分生孢子產量之影響 37	圖4-4 不同營養物及含水量對綠色木黴菌分生孢子產量之影響 38	圖4-5 含水量與大豆粉對木黴菌孢子產量之回應曲面圖 53	圖4-6 蔗渣與Tween 80對木黴菌孢子產量之回應曲面圖 54	圖4-7 含水量與米糠對木黴菌孢子產量之回應曲面圖 55
表3- 1 25-2部分因子實驗設計 28	表3- 2 25-2部分因子設計中各自變數的水準與相對濃度 29	表3- 3 陡升路徑實驗設計 (一) 30	表3- 4 中心混成實驗設計 31	表3- 5 中心混成設計中各自變數的水準及相對濃度 (一) 32	表4- 1 25-2部分因子設計及實驗結果 43	表4- 2 根據25-2部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 (一) 44	表4- 3 根據25-2部分因子設計實驗結果所進行之陡升路徑 (二) 45	表4- 4 中心混成設計之實驗結果 (一) 46	表4- 5 中心混成實驗設計之回歸分析表 (一) 47	表4- 6 二階模式之最大值 48	表4- 7 中心混成設計中各自變數的水準及相對濃度 (二) 49	表4- 8 中心混成設計之實驗結果 (二) 50	表4- 9 中心混成實驗設計之回歸分析表 (二) 51	表4- 10 二階模式之變異數分析 52		

REFERENCES

1. 王志玄。2003。以生物反應器進行木黴菌孢子生產最適化條件之探討。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化。
2. 江俊亮。2000。應用生物濾床去除垃圾掩埋場惡臭與有害氣體之研究。國立成功大學環境工程學系碩士論文。臺南。
3. 巫永裕。2001。利用酒糟水進行木黴菌厚膜孢子之液態發酵。大葉大學食品工程學系碩士論文。彰化。
4. 李易芳。1990。木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)原生質體的製備及再生。國立中興大學植物學研究所碩士論文。臺中。
5. 吳志聰。2001。蠟蚧輪枝菌固態發酵培養生產孢子之探討。國立東華大學生物技術研究所碩士論文。花蓮。
6. 倪禮豐。水稻廢棄資材之利用。花蓮區農業專訊 43:21-24。2003。
7. 許志誠。2002。經六年水旱田輪作的土壤在不同施肥管理下的氮收支。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文。臺北。
8. 陳堅華。2001。西瓜?苗猝倒病抑病介質的研製及其抑病的証據。國立中興大學植物病理學系碩士論文。臺中。
9. 梁啟崇。2002。非離子界面活劑對生物濾床去除甲苯之影響。私立中華大學土木工程學系碩士論文。新竹。
10. 曾明寶。1996。四種有機成分介質理化性變化及對盆栽植物的影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。

。臺中。11.黃奕?。2001。PVA/泥炭土/活性炭人工濾料去除乙酸乙酯之動力研究。私立中華大學土木工程學系碩士論文。新竹。12.葉士財。1997。五種有機介質於盆栽使用中之理化性變化。國立中興大學園藝學系碩士論文。臺中。13.廖仁宏。2002。固態培養生產靈芝菌絲體之研究。私立東海大學化學工程學系碩士論文。臺中。14.蔡宜峰和陳俊位。2004。生物性堆肥應用在有機番茄栽培效應。臺中區農業專訊 47:10-12。15.謝建元和高穗生。2002。生物性農藥固態發酵量產開發。化工技術。10(4):152-177。16.羅朝村。1996。生物防治在作物病害管理上的應用。臺灣省農業試驗所特刊 57:141-150。17.羅朝村。1999。作物病害生物防治的應用與展望。農業世界雜誌 35:11-22。18.羅朝村。2003。Development and application of *Trichoderma* spp. in Taiwan. *Fungal Science* 18(1,2):23-31。19.Abd El-Nasser, N. H., Helmy, S. M. and El-Gammal, A. A. 1997. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. *Polymer Degradation and Stability* 55:249-255。20.Adinarayana, K., Prabhakar, T., Srinivasulu, V., Anitha Rao, M., Jhansi Lakshmi, P. and Ellaiah, P. 2003. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry* 39:171-177。21.Adsul, M. G., Ghule, J. E., Singh, H., Bastawde, K. B., Gokhale, D. V. and Varma, A. J. 2004. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. *Carbohydrate Polymers* 57:67-72。22.Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O. and Chet, I. 1986. Increased growth of the plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70:145-148。23.Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions British Mycological Society* 57:25-39。24.El-Batal, A. I. and Abdel Kareem, H. 2001. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. *Food Research International* 34:715-720。25.Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P. and Srinivasulu, B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry* 38:615-620。26.Gutierrez-Correa, M., Portal, L., Moreno, P. and Tengerdy, R. P. 1999. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68:173-178。27.Hsieh, C. and Yang, F. C. 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology* 91:105-109。28.Huang, R. Z. and Hsieh, S. P. Y. 2000. Biocontrol of rice sheath blight and vegetable seedling damping off caused by *Rhizoctonia solani* by chlamyospore formulation of *Gliocladium viride* isolate G-8. Third International Symposium of *Rhizoctonia*. National Chung Hsing Univ. Taiwan。29.Kubicek, C. P. and Harman, G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. p. 1-153. T. J. International Ltd, Padstow, UK。30.Kansoh, A. L. Essam, S. A., and Zeinat, A. N. 1999. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation and Stability* 63:273-278。31.Larena, I., De Cal, A. and Melgarejo, P. 2004. Solid substrate production of *Epicoccum ingrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. *International Journal of Food Microbiology* 94:161-167。32.Lo, C. T. 1997. Biological control of turf disease using *Trichoderma harzianum*. *Plant Protection Bulletin* 39:207-225。33.Narang, S., Sahai, V. and Bisaria, V. S. 2001. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91(4):425-427。34.Naveena, B. J., Altaf, Md., Bhadrappa, K., Madhavendra, S. S. and Reddy, G. 2005. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochemistry* 40:681-690。35.Selvakumar, P. and Pandey, A. 1999. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry* 34:851-855。36.Sivan, A., Elad, Y. and Chet, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 74:498-501。37.Suntornsuk, W., Pochanavanich, P. and Suntornsuk, L. 2002. Fungal chitosan production on food processing by-products. *Process Biochemistry* 37:727-729。38.Wang, R., Chau Sing Law, R. and Webb, C. 2003. Protease production and conidiaition by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry* 40:217-227。39.Xia, L. and Cen, P. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry* 34:909-912。40.Yang, Y. H., Wang, B. C., Xiang, L. J., Duan, Q. H. and Lian, J. 2003. Construction of a microbial consortium used for solid-state fermentation of rice chaff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32:51-56。41.Zhang, W., Wolf, T. M., Bailey, K. L., Mortensen, K. and Boyetchko, S. M. 2003. Screening of adjuvants for bioherbicide formulations with *Colletotrichum* spp. and *Phoma* spp. *Biological Control* 26:95-108。