



朝陽科技大學
生物技術研究所

碩士論文

蘇力菌素 (thuringiensin) 先導型試

量產與應用之研究探討

Study on the Pilot-Scale

Production and Utilization of Thuringiensin

指導教授：曾耀銘 博士

研究生：陳志榮

中華民國九十五年七月十六日



朝陽科技大學生物技術研究所
Graduate Institute of Biotechnology
Chaoyang University of Technology

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

蘇力菌素 (thuringiensin) 先導型試

量產與應用之研究探討

Study on the Pilot-Scale

Production and Utilization of Thuringiensin

指導教授：曾耀銘 博士(Yew-Min Tzeng)

研究生：陳志榮(Chih-Jung Chen)

中華民國九十五年七月十六日



蘇力菌素，又稱 β -外毒素或蠅素，為熱穩定性毒素，是一種由腺嘌呤、核糖、葡萄糖、別粘酸與一個磷酸根組成的核苷酸類似物。蘇力菌素為一種廣效性的生物農藥，可有效對抗如鞘翅目 (Coleoptera)、雙翅目 (Diptera)、膜翅目 (Hymenoptera)、等翅目 (Isoptera)、鱗翅目 (Lepidoptera)、直翅目 (Orthoptera)、脈翅目 (Neuroptera)、半翅目 (Hemiptera)、 黍蚧、線蟲及數種蝨類等農業害蟲。在本研究中，我們以震盪方式培養三種品系的蘇力菌—A1-09a, 19-03a 和 HD-199。其中 HD-199 在無機培養基中含碳源—30 g/L 葡萄糖，氮源—45 g/L 大豆蛋白的條件下，可得到最高的蘇力菌素產量 (2.98 g/L)；但以羧基甲基纖維素 (carboxymethyl cellulose) 為溶劑加入培養基中，卻顯著的使產率降低。另外，我們以 5 L 攪拌式發酵槽培養蘇力菌，控制條件為轉速 450 rpm、供氧率 0.5 vvm、酸鹼值 7.0，並額外加入 6 g/L 硫酸銨，則蘇力菌素產率大幅提升達 5.75 g/L；但對培養基外加氧氣未對蘇力菌素的合成產生明顯效果。本研究中也使用 30L 攪拌式發酵槽培養蘇力菌，當轉速維持在 450 rpm 時，蘇力菌素產率有明顯提升的現象。接著，我們進行以葡萄糖為饋料的培養方式，並調控過程中的 pH 值；由結果中發現，在後生長期 (培養開始第 18 小時至第 72 小時間)，將葡萄糖的饋入率固定在 1.2 g/L/h、酸鹼度維持在 7.0，蘇力菌素的產率為 5.46 g/L。然而於



培養開始 36 小時後停止供應葡萄糖，產率最大可達 5.55 g/L。我們更進一步地將轉速由培養剛開始時的 450 rpm，逐漸降低至培養後第 30 小時的 350 rpm，蘇力菌素產量便提高至 6.04 g/L。最後再加入 6 g/L 硫酸銨及羧基甲基纖維素做為溶劑，固定葡萄糖供應效率在 1.2 g/L/h、酸鹼度維持在 7.0，經過 48 小時的培養後，我們得到 7.36 g/L 的蘇力菌素，這是至今所有以 30L 攪拌式發酵槽培養蘇力菌的研究報告中，最高的產率數值。



Thuringiensin (TG) is also called β -exotoxin, fly factor, thermostable toxin, and is a kind of nucleotide analogue composed of adenine, ribose, glucose, and allaric acid with a phosphate group. TG attracted extensive attention for its broad spectrum against lots of agricultural pests, such as Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Neuropera, Hemiptera, aphid, nematode and several species of mites. In the present study, shaker flask cultivations were carried out with three *B. thuringiensis* strains A1-09a, 19-03a and HD-199, among these HD-199 produced maximal TG (2.98 g/L) with mineral medium containing 30 g/L glucose and 45 g/L soy protein as carbon and nitrogen source, respectively. Further, carboxymethyl cellulose addition to the cultivation medium as a dissolving agent has significant impact on the yield of TG production. Next, in the 5 L stirred tank bioreactor cultivations, with agitation speed at 450 rpm, aeration rate at 0.5 vvm and controlled pH at 7.0, by the addition of 6 g/L ammonium sulfate further increased the TG yield to 5.75 g/L. On the other hand, supplementation of external oxygen to the cultivation medium has no considerable effect on TG synthesis in the cultivation. Next, in the 30 L stirred tank bioreactor cultivations, the agitation speed of 450 rpm has noticeable effect on the maximal TG production. Further, glucose fed-batch strategy was developed based on pH-control. In the late cultivation period (18 h later), during the stationary phase, glucose feeding rate at 1.2 g/L/h, and the pH 7.0 greatly improved the TG yield to 5.46 g/L, after 72 h of cultivation. However, when the cultivation stopped after 36 h, the maximal TG yield obtained 5.55 g/L. Furthermore, by applying the agitation speed



reduction from 450 rpm at 0 h to 350 rpm at 30 h, the TG yield further increased to 6.04 g/L. Finally, by the addition of 6 g/L ammonium sulfate, carboxymethyl cellulose as a dissolving agent, glucose feeding rate at 1.2 g/L/h, and controlled pH at 7.0, the TG yield reached to 7.36 g/L after 48 h cultivation. This is the highest TG yield so far reported from a 30 L bioreactor cultivation.



本篇論文之所以能夠順利完成，首先要感謝恩師曾耀銘教授，於實驗、課業及論文上給予的諸多建議及指導，並在生活上學習到如何真誠待人處事與積極認真有效率的工作態度以及在實驗上指引我正確的方向，在此學生由衷感激老師給我在這實驗室學習的機會。

感謝口試委員大葉大學生物產業科技學系張耀南博士在百忙之中撥冗參加我的碩士論文口試，並且在論文各方面上給予指正與建議，使本論文能夠更加完善。感謝劉炳嵐博士於平時忙碌之餘能夠撥空與我討論實驗，使我於實驗規劃及實驗操作有多方想法及不同切入點，著實獲益良多。感謝實驗室博士後研究員 Dr. Rao 於平時不厭其煩的為我講解分析原理，使我於 HPLC 的操作上有所助益，並於論文撰寫上的指導。

感謝生技所辦公室文靜姐、美方姐及怡萍，使我能順利處理學校及實驗室的文件事務。感謝嘉恆、心如、依倩、世川、銘豐、靜如、欣蓓、拯裕及其它學長姐們於課業及實驗上多方面的鼓勵及指教，還要感謝科如、春玲、毓婷及生技所等同窗，於求學過程中的互助合作及相伴，再來感謝學弟妹們騰緯、宗憲、俊斌、柏盛、耀霖、怡均、文泰、智添、晴淇、志誠、聖婷、揮欽、汶欣、韻玲、佩珊、月珍、佩萱等，於實驗上的幫助及生活上所帶來的歡笑。另外，感謝旗艦銀河生物科技公司徐銘豐經理於劑型配方及田間試驗方面所提供的實驗結果及諸多幫助和指



教。

最後要感謝的是一直陪伴在我身邊默默支持我的父母及家人們，謝謝你們的鼓勵及支持，使我在求學過程能無後顧之憂得以順利完成學業，也感謝孝慈多方的包容，一直支持著我。謹以本論文獻給所有幫助及關心過我的人，在此致上最崇高的敬意及感謝。



中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
誌謝.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章 研究實驗範圍與目的.....	1
第二章 文獻簡介.....	2
2-1 蘇力菌的簡介	2
2-1-1 起源.....	2
2-1-2 宿主範圍.....	4
2-1-3 蘇力菌之應用.....	5
2-2 蘇力菌素.....	6
2-2-1 簡介.....	6
2-2-2 結構與致病機制.....	7
2-2-3 安全性.....	9
2-2-4 蘇力菌素的應用.....	12



2-3 發酵槽簡介.....	13
第三章 研究材料與方法.....	15
3-1 菌株.....	15
3-2 培養基.....	15
3-3 實驗流程圖.....	18
3-4 菌種保存及培養之操作方法.....	19
3-5 蘇力菌素之分離純化.....	20
3-6 HPLC 定量分析	22
3-7 酚硫酸法測定殘糖.....	23
3-8 劑型配方(徐銘豐經理提供).....	24
3-9 田間試驗(徐銘豐經理提供).....	25
第四章 結果與討論.....	29
4-1 HPLC 分離之標準品.....	29
4-2 HPLC 分析及內標品檢量線.....	30
4-3 Mass 圖譜.....	31
4-4 菌種比較結果.....	31
4-5 搖瓶測試.....	32
4-6 5 L 攪拌式發酵槽試驗.....	35
4-7 於 30 L 攪拌式發酵槽之不同測試.....	37



4-7-1 30L 發酵槽轉速之比較.....	37
4-7-2 發酵槽生長曲線	37
4-7-3 不同調控對於蘇力菌素之生成趨勢.....	38
4-7-4 Glucose 饋料量與饋料時間之影響	39
4-7-5 發酵後期降轉速測試	40
4-7-6 不同正相關因子調控對於蘇力菌素之生成趨勢.....	41
4-8 劑型配方.....	43
4-9 田間試驗.....	44
第五章 結論與未來展望	69
參考文獻.....	70
附錄.....	76

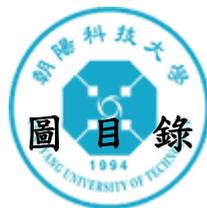


圖 2-1 蘇力菌素之化學結構式.....	8
圖 2-2 三十公升攪拌式發酵槽外觀圖.....	14
圖 2-3 三十公升攪拌式發酵系統示意圖.....	14
圖 3-1 實驗流程圖.....	18
圖 3-2 蘇力菌素之分離純化流程	21
圖 3-3 酚硫酸法測定殘糖流程.....	23
圖 3-4 A 養雞戶的雞舍內部實景.....	26
圖 3-5 A 養雞戶旁比鄰而居的曬雞屎場與傳統養雞戶實景.....	26
圖 3-6 B 戶雞舍外觀（獨立雞舍）實景.....	27
圖 3-7 B 戶通風不良導致蒼蠅肆虐實景.....	27
圖 3-8 機械自動化雞舍實景.....	28
圖 3-9 機械設備雞舍實景	28
圖 4-1 乾燥之標準品	29
圖 4-2 回溶之標準品	29
圖 4-3 蘇力菌素標準品添加 AMP 以分析型 HPLC 分析之層析圖譜	46
圖 4-4 HPLC 分析蘇力菌素標準品添加 AMP 之標準曲線圖.....	47
圖 4-5 蘇力菌素標準品之 ESI-MASS 圖譜.....	48
圖 4-6 蘇力菌素標準品之 ESI-MASS-MASS 圖譜.....	49



圖 4-7 於搖瓶中添加不同濃度硫酸銨對蘇力菌素產量之影響.....	51
圖 4-8 於搖瓶中添加不同分散劑對蘇力菌素產量之影響.....	53
圖 4-9 30 L 攪拌式發酵槽殘糖、蘇力菌素產量及 pH 之趨勢圖.....	58
圖 4-10 30 L 攪拌式發酵槽在不同調控下蘇力菌素生成趨勢圖.....	59
圖 4-11 30 L 攪拌式發酵槽在不同正相關因子調控下蘇力菌素生成趨勢圖.....	63
圖 4-12 蘇力菌素粉末 coating 到樹薯澱粉上之細末造粒成品.....	64
圖 4-13 蘇力菌素粉末 coating 到樹薯澱粉上之粗末造粒成品.....	64
圖 4-14 A 養雞戶的雞舍內部蒼蠅數量減少實景.....	65
圖 4-15 A 養雞戶的雞舍糞便堆蒼蠅數減少實景	65
圖 4-16 B 蒼蠅肆虐情形已大獲改善實景	66
圖 4-17 B 戶雞舍地面有大量死亡蒼蠅實景	66
圖 4-18 C 戶機械自動化雞舍蒼蠅數減少實景	67
圖 4-19 C 戶雞蛋上蒼蠅排洩物減少實景	67
圖 4-20 實驗其間有大量的異變蒼蠅實景.....	68



表 3-1 蘇力菌繼代培養及保存用之固態平面培養.....	16
表 3-2 蘇力菌醱酵之前培養基組成成份.....	16
表 3-3 蘇力菌醱酵之主培養基組成成份.....	17
表 4-1 於搖瓶中不同菌種分別於兩種培養基之外毒素產量.....	50
表 4-2 於搖瓶中添加不同比例之黃豆粉蛋白及硫酸銨對蘇力菌素產 量之影響.....	52
表 4-3 於 5L 攪拌式發酵槽中不同量硫酸銨添加對蘇力菌素產量 之影響.....	54
表 4-4 於 5L 攪拌式發酵槽中不同分散劑的添加對蘇力菌素產 量之影響.....	55
表 4-5 5 L 攪拌式發酵槽添加氧氣試驗結果.....	56
表 4-6 30 L 攪拌式發酵槽中不同轉速對於蘇力菌素產量之比較.....	57
表 4-7 30 L 攪拌式發酵槽中不同 Glucose 饋料量對蘇力菌素 產量之影響.....	60
表 4-8 30 L 攪拌式發酵槽中不同 Glucose 饋料時間對蘇力菌素 產量之影響.....	61
表 4-9 30 L 攪拌式發酵槽發酵後期降轉速對蘇力菌素 產量之影響.....	62



一、研究實驗範圍與目的

本實驗之研究範圍包含蘇力菌發酵、菌素分析、純化與應用。蘇力菌發酵部份包含繼代培養、前培養及主培養。主要培養部分又分別於搖瓶、5 L 攪拌式發酵槽及 30 L 攪拌式發酵槽中操作，研究目的在於經由搖瓶及 5 L 攪拌式發酵槽調控所獲得較佳之調控條件或發酵策略延伸於 30 L 攪拌式發酵槽使用，觀察相同的操作方式於不同方式之發酵槽是否得到相同的菌素生產趨勢。另外，菌素分析的部份包含確立分離菌素純度；此部份可藉由 Mass 確立菌素分子量及蘇力菌素於 HPLC 之加成分析達到。菌素純度會影響後續測定菌素產量，是非常重要之步驟。蘇力菌素應用之部分，以 HD-199 開發為環境用藥用以對抗蒼蠅，此外，也能降低人類生活週遭化學藥劑的使用。



2-1 蘇力菌的簡介

2-1-1 起源

蘇力菌為一種好氣性、革蘭氏陽性桿菌，是一種昆蟲病原細菌，常呈長鏈鎖狀，廣泛地存在於土壤之中。若依菌體鞭毛血清抗原性、毒蛋白結晶的形狀、大小及特性，在文獻上可找到許多變種菌。

早在 1901 年日本學者石渡繁胤(S. Ishiwata)在日本蠶絲會報上報導發現日本家蠶(*Bombyx mon*)罹患軟化病造成急劇死亡的現象，並於患病家蠶體液中分離出一種桿狀細菌，培養後其芽孢與菌體分別餵食無患病之家蠶均能使其致死，此發現成為蘇力菌研究之起點。接著，於 1905 年發表“On the sotto Bacillus”等論文，再次證明該菌對於家蠶的毒殺效果。雖然此菌最先是日本發現，但只考慮到其對家蠶的致病性，並未被利用於害蟲的防治上。於 1908 年 Iwabuchi 將此種使日本家蠶感染“猝倒症”之桿菌命名為猝倒芽孢桿菌(*Bacillus sotto*)，這是蘇力菌最早的記載。

1911 年 Berliner 報導於德國蘇雲金省(Thuringen)的一家麵粉廠，其於 1909 年寄出一批染病地中海粉螟(*Ephestia Kuhnella zell*)中，分離出一種致病細菌。直至 1915 年 4 月，Berliner 對 1911 年分離的致病桿菌的型態、培養特徵和致病性作了描述，並命名為 *Bacillus thuringiensis*。

而在歐洲，發現蘇力菌對於一些害蟲有毒殺效果後，便積極的展開防



治的研究。在 1920 年到 1930 年間，大量的論文又肯定了它作為生物防治劑防治玉米螟(*Ostrinia nubibilali*)的效果。為了推行正規的微生物防治，第一個商品製劑 Sporeine 於 1938 年在法國問世。到 50 年代，應用於地中海粉螟(*Ephestia kiihniella*)也有相當好的效用；且 Steinhaus (1951)運用蘇力菌來防治美洲苜蓿粉蝶(*Colias eurytheme*)也有非常好的效果。此後，便陸續的分離出不同的菌株，並開始建立出分類標準。1958 年 Heimpel 和 Angus 提出蠟狀芽孢桿菌群檢索表，並把蘇力菌桿菌種以下區分為亞種，此為第一次出現蘇力菌桿菌亞種的概念。1970 年 Dulmage 以 1967 年爆發疾病的飼養棉紅鈴蟲(*Pectinophora gossypiella*)中，分離出比當時商品製劑菌種毒性高 20-212 倍的 HD-1 菌株。1971 年經 Dulmage 的倡導和努力，以粉紋夜蛾作測試昆蟲，用 HD-1-S-1971 做參考標準品，統一了測定方法和程序，實現了美國蘇力菌桿菌製劑的標準化(Dulmage, 1971)。惟上述的研究。應用與標準化，均是以蘇力菌所產生的 δ -內毒素毒蛋白質結晶為核心來進行。

有關蘇力菌素所產生的 β -外毒素，即蘇力菌素方面的研究與應用發展，自 1959 年 McConnell 及 Richards 發現蘇力菌熱穩定毒素後，經許多學者的系列研究，尤其，於 1985 年經 Carlberg 一系列毒性測試，證明蘇力菌素的安全性後。工業量產方面有防治豬圈、雞舍、堆肥及廁所中蠅類的製劑 Muscabac 由 Farmas Group Ltd 生產，並於芬蘭登記。該製劑於非洲野外用於防治蠅類，並獲得良好的防治效果。



2-1-2 宿主範圍

蘇力菌每個菌株的殺蟲活性隨昆蟲種類不同而有所差異，不同菌株對同一個宿主昆蟲可以顯示出不同程度的殺蟲活性。許多研究報告指出，不管是否為同 H 型或不同 H 型，不同菌株的宿主範圍是不同的，即使是同一變種中的不同菌株，對昆蟲的毒性差異也很大。而毒性的大小與產生的毒素有關，也與細菌的致病機制和宿主昆蟲的特性有關。

根據幾十年來的文獻統計，蘇力菌的各個變種對鱗翅目(Lepidoptera)、雙翅目(Diptera)、鞘翅目(coleoptera)、直翅目(Locusts)、膜翅目(Hymenoptera)、等翅目(Termites)等 522 種昆蟲均具有不同程度的毒殺作用，尤其是以鱗翅目 372 種為最多，對粉蝶科、菜蛾科、天蛾科等尤其有較高的毒性。除了上述六目的昆蟲外，它對脈翅目(Neuroptera)、半翅目(Hemiptera)和、異翅目(Heteroptera)，也同樣產生致病效果(Tanigoshi *et al.*, 1990)，由以上的研究報告可知，蘇力菌確實是一種廣效性的生物殺蟲劑。



2-1-3 蘇力菌之應用

蘇力菌作為基礎之生物殺蟲劑，已經廣泛的被重視。目前全世界每年有 3 千噸以上蘇力菌殺蟲劑運用在農作物、森林植物害蟲防治上。

蘇力菌自 1901 年發現後，長期以來只停留在進行實驗室的研究和利用少量的製劑進行有限的生物試驗。然而較完整的製劑產品是直到由 Fisher 等人在 1959 年報導有關 Thuricide 系統的毒性測試結果後，於 1960 年才由美國食品與藥物管理局(FDA)正式批准美國太平洋酵母公司所開發的 Thuricide 進入市場。此後，蘇力菌殺蟲劑在實際應用上很快的擴大殺蟲範圍且在世界各地均有相關的產品生產，並佔有生物殺蟲劑 90%的市場以上。

1965 年在美國利用蘇力菌製劑防治甘藍葉蛾後，現在已廣泛利用於棉花、玉米、蔬菜、果樹和煙草等農作物害蟲上；英國於 1969 年正式批准蘇力菌製劑用於防治養蜂業中的大蠟螟；而印度等國家試驗顯示，用於防治水稻害蟲是有效的。

在加拿大的森林植物經政府允許的生物防治上，由於森林植物的面積廣大，再加上地勢多變等因素，病蟲害防治是一項浩大的工程。目前已有蘇力菌製劑產品使用在防治赤松芽蟲(*Dendrolimus spectabilis*)的病原菌。此外，應用蘇力菌製劑防治森林害蟲還有美、英、法、日本等 20 多個國家，防治對象幾乎包括了當地主要鱗翅目的森林害蟲。



2-2 蘇力菌素

2-2-1 簡介

毒素是蘇力菌殺蟲的核心，其所產生的殺蟲性毒素包括有：(1) α -外毒素(α -exotoxin)，(2)蘇力菌素(thuringiensin)或稱為 β -外毒素，(3) γ -外毒素(γ -exotoxin)，(4) δ -內毒素(δ -endotoxin)，(5)不穩定外毒素(labile exotoxin)，(6)水溶性外毒素(water-soluble exotoxin)，(7)鼠因外毒素(mouse-factor exotoxin)，(8)孢子(spores) 及 (9)Vips (vegetative insecticidal proteus)等九種 (Rodriguezpadilla *et al.*, 1990; Rowe and Margaritis, 1987; Sebesta *et al.*, 1981)。

蘇力菌素又稱為蘇力菌 β -外毒素或蠅素(fly-factor)(Heimpel, 1967)，為一種類核苷酸物質，最早是於 1959 年由 McConnell 和 Richard 由蘇力菌變種中發現，經高溫高壓滅菌的發酵濾液對昆蟲幼蟲有毒殺的作用，此種毒素產生於蘇力菌的生長階段，是一種具熱穩定性、水溶性對昆蟲有特定毒性的物質。後來，又有許多的專家學者相繼證實了這種可溶性熱穩定的毒性物質對家蠅(*Musca domestica*)的幼蟲具有毒性，所以又有蠅毒素(*Musca* exotoxin)或蠅因子(*Musca* factor)之稱。蘇力菌素具有殺蟲、殺蟎及殺線蟲的特性，是一種廣效性的毒素，且具有專一性。其作用特點是在昆蟲蛻皮或變態期間起作用，使昆蟲無法正常生長發育，導致畸形或死亡(Dunn, 1960)。



2-2-2 結構與致病機制

蘇力菌素的分子式為 $C_{22}H_{32}N_5O_{19}P \cdot 3H_2O$ ，分子量為 701 Da，為一種類核苷酸物質(圖 2-1)，能被酸性或鹼性磷酸單酯酵素脫去磷酸基，在乙酸鹽緩衝液(pH 4.4)中水解時，產生相同的脫磷酸蘇力菌素，脫磷酸蘇力菌素的酸性水解作用，除產生腺嘌呤(Adenine)和別粘酸(Mucic acid)外，還產生一個中性雙糖，此雙糖為葡萄糖和核糖連結而成。蘇力菌素具有毒性的主要官能基為磷酸基($H_2PO_3^-$)部分，由於蘇力菌素會與 ATP 相互競爭，因而抑制核糖核酸聚合酵素(RNA polymerase)之生化合成，尤其昆蟲攝食後，其中腸為鹼性環境，無法去除蘇力菌素的活性，而使其有殺蟲的效果或影響昆蟲的發育成長。因人類的消化道呈酸性，能使得蘇力菌素失去磷酸根而失去活性，所以只要是適當的製劑配方和適量的使用下，對人體並無傷害。此外，蘇力菌素為自然生成，於自然界中能自然分解，不會對環境造成壓力。

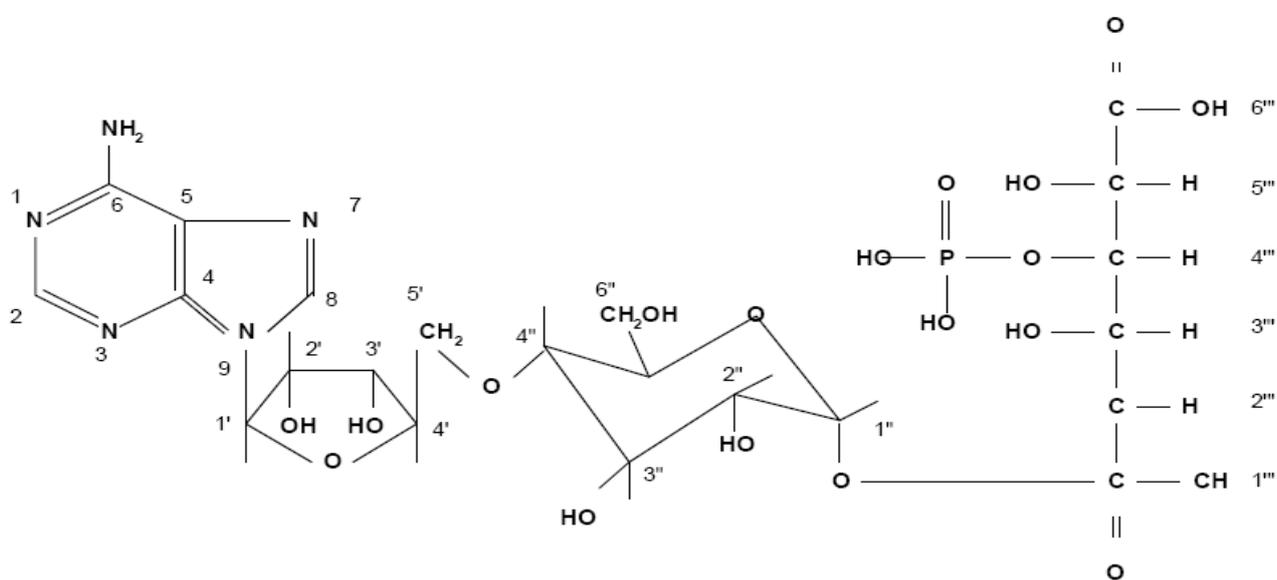


圖 2-1 蘇力菌素之化學結構式



2-2-3 安全性

微生物殺蟲劑是一種生物製劑，與化學殺蟲劑相比，生物殺蟲劑其優點包含：(1)選擇性強，具有高度專一性之特點；(2)對人、畜等生物較安全，對環境相容性較高；(3)通常對天敵較安全；(4)不容易有抗藥性產生。雖然對人畜較無害且不會造成環境污染。但這種安全性不是絕對的，因為它們是活體或活體的代謝物，所以還是有可能存在不同程度的危險性。1988 年美國環保署(USEPA)訂定微生物試劑安全評估指引時，即針對不同的菌株對標的物具有不同程度的致病性和毒性加以探討，並提出微生物製劑應給予較高或最高的菌量，以不同的毒理投予途徑作為安全評估依據，目的在增加瞭解微生物是否具感染性或致病性，以避免人類及環境暴露於高劑量下可能受到危險之衝擊。

於早期蘇力菌素研究中曾發現，此種毒素除了會對無脊椎動物造成遺傳性或突變性的病變外，對哺乳動物也有相同的致病作用(Yu, 1990)。當時基於安全性的考量，人們對於蘇力菌素方面研究進展因此而停滯不前。直至 1989 年 Marec 等人利用果蠅做翅斑實驗(*drosophila* wing spot test)與 Cantwell (1983)所做的 Ames Test 試驗，兩相對應，才排除蘇力菌素所可能造成遺傳性或致變性之疑慮，蘇力菌素的研究再度成為十分熱門的課題，目前美國、英國及芬蘭等國多家公司已將蘇力菌素做為商品進行登記，並致力於蘇力菌素之研究與生產(Paige and Cooper, 1990)。



實驗顯示，將蘇力菌素對大鼠進行長期口服試驗，經醫學檢查並無病理變化(蔡等, 1998)。而用小白鼠餵食有放射標記的 ^{32}P -蘇力菌素試驗，24小時內可由糞便中回收，並沒有固定在所觀察的任何器官上，包括肝、心、脾腎和腎上腺體，可能是蘇力菌素無法穿透腸壁(喻, 1990)。在腹膜注射或皮下接種試驗發現，在大鼠或小白鼠的肝內發現病變損傷，主要是因為蘇力菌素抑制肝中 RNA 的合成，對蛋白質和 DNA 的合成並無影響，而脫磷的蘇力菌素對昆蟲或對小白鼠都沒有毒性(Sebesta *et al.*, 1969)。

口服試驗的大鼠進行細胞分析，證實蘇力菌素對於骨髓中期細胞、骨髓瘤細胞和血細胞的染色體發生畸變的程度是沒有影響的(Meretoja and Garlberg, 1977)。在對人類細胞試驗方面，雖然能生產蘇力菌素的菌株之培養濾液對人類淋巴細胞、胚胎肺細胞和 U-細胞具有促進有絲分裂活性，但不產蘇力菌素的菌株之培養濾液、枯草桿菌和大腸桿菌的培養濾液，也都具有促有絲分裂活性(Meretoja and Garlberg, 1977)。不過，純化之蘇力菌素卻無法促進有絲分裂的活性，且對人類胚胎肺細胞和 U-細胞也未顯示出有毒性、致病性或細胞病變(Sebesta *et al.*, 1981)。接著研究發現，蘇力菌素對昆蟲和哺乳動物兩者的作用，在其有效致病劑量上有著明顯的差別(鍾, 1994；熊, 1995)。換句話說，若要使其對哺乳動物造成像昆蟲同等致病程度或甚至致命，在劑量上必須有極多倍數的增加才有可能。而人類的消化道呈酸性，使得蘇力菌素失去磷酸根進而失去活性，故在予以適當的配方製



劑並適量的施用之下，蘇力菌素對人類的健康不會造成不良的影響(Yu, 1990；Sebesta *et al.*, 1981)。此外，蘇力菌素為天然生成之產物，且不會在自然環境中累積，所以在施用後藥劑可以自然的分解不會有殘餘的隱憂發生亦不會造成環境污染。

所以，若是將含蘇力菌素的製劑以適當濃度防治害蟲，對其他動物引起細胞遺傳改變的可能性很小。Holmberg 等(1980)認為，蘇力菌素經過毒性和突變性試驗結果顯示，蘇力菌與其毒素對哺乳動物是無害的，適合用於工業生產。



2-2-4 蘇力菌素的應用

蘇力菌素對許多昆蟲具有毒效，是一種較重要的致病因子，但其作用機制尚不十分清楚。利用家蠶幼蟲以腹腔注射純化後的蘇力菌素，經生物試驗証實具有殺蟲特質；家蠶幼蟲對蘇力菌素非常敏感，感染三天後會引起死亡或造成畸形等症狀，幼蟲發育明顯受到影響。

在防治的工作上面，蘇力菌素已成功的防治鋸角蜂(*Diprion pini*)。在蘇聯，一種含蘇力菌素的“Bitoxibacillin”殺蟲劑用於田間防治棉鈴蟲(*Heliothis obsoleta*)和甜菜葉蛾(*Spodoptera exigua*)，對馬鈴薯甲蟲(*Leptinotarsa decemlineata*)和棉紅蜘蛛(*Tetranychus telarius*)也有效果(Krieg, 1968)；在芬蘭蘇力菌製劑用來防治廁所中的各種蠅類，可以長期的抑制蠅類幼蟲的滋生(鄒, 2003)。另有文獻指出蘇力菌素可應用於防治三葉蟎(*Tetranychidae urticae*)，抑制其幾丁質的產生使其無法正常蛻變，因無法進行蛻變造程無法正常生長或死亡。而本省在 1975 年即引入蘇力菌素製劑使用，目前則廣泛的運用在小菜蛾、菜心螟、紋白蝶、松毛蟲和茶蠶的防治上。



2-3 發酵槽簡介

攪拌式發酵槽

發酵系統

本實驗所採用的發酵系統為 30 公升攪拌式發酵槽(BTF-B,頂生公司, 台中市), 整個發酵系統包括槽體本身不鏽鋼本體、氣體分析系統及監控系統。整個槽體由不鏽鋼製成, 槽內裝有攪拌式扇葉。偵測及監控系統方面, 利用熱電偶溫度計、消泡電極、酸鹼電極 (Inpro 3030/120, Mettler Toledo, Switzerland) 及溶氧電極 (P/N 322756800, Mettler Toledo, Switzerland) 來控制溫度、消泡、酸鹼值與監測溶氧。在整個培養過程所偵測到的數據均可由電腦儲存接收控制器之訊號, 並使用軟體 Biotop 在個人電腦上顯示發酵槽的狀況 (圖 2-2, 圖 2-3)。



圖 2-2 三十公升攪拌式發酵槽外觀圖

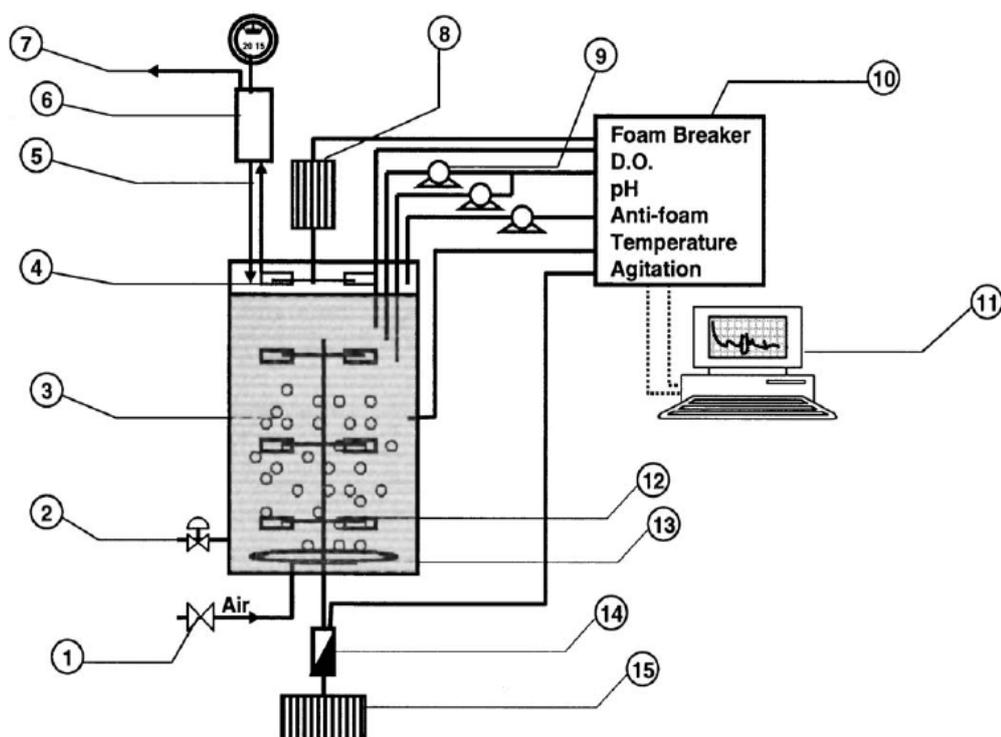


圖 2-3 三十公升攪拌式發酵系統示意圖：(1)熱質氣體流量計(2)取樣口(3)氣泡(4)泡沫消除器(5)濃縮管(6)冷凝管(7)氣體出口(8)泡沫消除馬達(9)蠕動幫浦(10)PLC 控制板(11)訊號接收器(12)扇葉(13)氣體分散器(14)轉速計(15)攪拌馬達。



三、研究材料與方法

3-1 菌株

於本研究中所採用之實驗菌株為蘇力菌達姆斯塔丁斯亞種 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *Darmstadiensis*, HD-199)，是屬於好氣性菌，革蘭氏陽性菌，會產內孢子的芽孢桿菌。平時保存於 1.5 mL 之冷凍小管中，以 10% 甘油保存於 $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

3-2 培養基

由於菌株保存於 $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，所以在實驗進行之前必須先活化菌株，接續進行前培養(preculture)，以作為主培養(main culture)之接菌來源。所以，實驗培養基分別為活化菌株及菌種保存之固態平面培養基，以及前培養和主培養的液態培養基，分別如下：

(1) 固態平面培養基

採用平面培養方式，一方面用於菌株活化，另一方面則可作為短期的菌種保存。平面培養基的組成如表 3-1 所示。培養基的組成成份置入滅菌釜內($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 1.2 kg/cm^2)滅菌 20 分鐘，趁熱倒入無菌培養皿中。待培養基凝固之後，將甘油保存之菌株接種於平面培養基上以進行實驗。



表 3-1 蘇力菌繼代培養及保存用之固態平面培養

成份	含量 (g/去離子水L)
Nutrient broth	8
Agar	20

(2)前培養之液態培養基

前培養為主培養的種菌活化培養。在發酵程序上，須經由不同規模的逐步培養，最後才能將擴大培養後的種菌菌液接入生產用的發酵槽中。本實驗的主培養發酵槽為先導型規模，容積分別為 5 L 及 30 L，故前培養於搖瓶中進行即可。前培養之液態培養基之組成如表 3-2 所示。

表 3-2 蘇力菌醱酵之前培養基組成成份

成份	含量 (g/去離子水L)
Nutrient broth	8
Yeast extract	5

(3)主培養之液態培養基

菌體在生長過程中，於外界生長環境，不斷吸取各種營養成份，提供生命活動所需之能量，合成新的細胞物質與代謝產物。而培養基中最主要的營養為碳源及氮源。以蘇力菌發酵所使用的培養基而言。Holmberg (1980) 等人採用糖蜜(molasses)與黃豆粉(soya)為主要碳氮源。由於糖蜜的成分複雜，造成分析上的困難，故鍾(1994)與熊(1995)根據 Holmberg (1980)的培養基組成，將糖蜜改為葡萄糖(Glucose)。Arcas (1984)等人發現單純使用無機氮源，如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，無法提供蘇力菌的生長所需，故有機氮源，諸如黃豆



粉、酵母萃取物(yeast extract)、玉米桿浸泡液(corn steep liquor)等常應用於蘇力菌發酵上。又有鑒於市售黃豆粉品質及組成成份難於一致，故本實驗主要採用鍾(1994)與熊(1995)的配方，改以黃豆粉蛋白來代替以往的黃豆粉。氮源方面，根據熊(1995)的結果，以 30 g/L 的葡萄糖培養所得的結果遠比 10 g/L 來得好，故葡萄糖採用 30 g/L，培養基組成如表 3-3 所示。由於葡萄糖屬還原糖於滅菌過程中易與黃豆粉蛋白起作用形成結塊，使菌體不易分解使用，故將碳源(Glucose)與其他成份分開溶解，單獨於滅菌釜內滅菌 20 分鐘。

表 3-3 蘇力菌醱酵之主培養基組成成份

成份	含量 (g/L)
Glucose	30
黃豆蛋白	45
KH_2PO_4	5
K_2HPO_4	5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{NaNH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.5



3-3 實驗流程圖

本實驗流程圖如圖 3-1 所示。於主培養部份 30 L 攪拌式發酵槽的通氣量為 2 vvm 且轉速為 450 rpm，但 5 L 攪拌式發酵槽的通氣量為 0.5 vvm 且轉速為 450 rpm。通常通氣量應相同但若以 2 vvm 通氣量操作於 5 L 攪拌式發酵槽中，會造成大量泡沫生成，故減低通氣量。至於轉速部份，若以 5 L 環境換算 30 L 環境則轉速只需 285,6 rpm 左右，測試產量極低，故以後續最佳轉速為實驗依據。

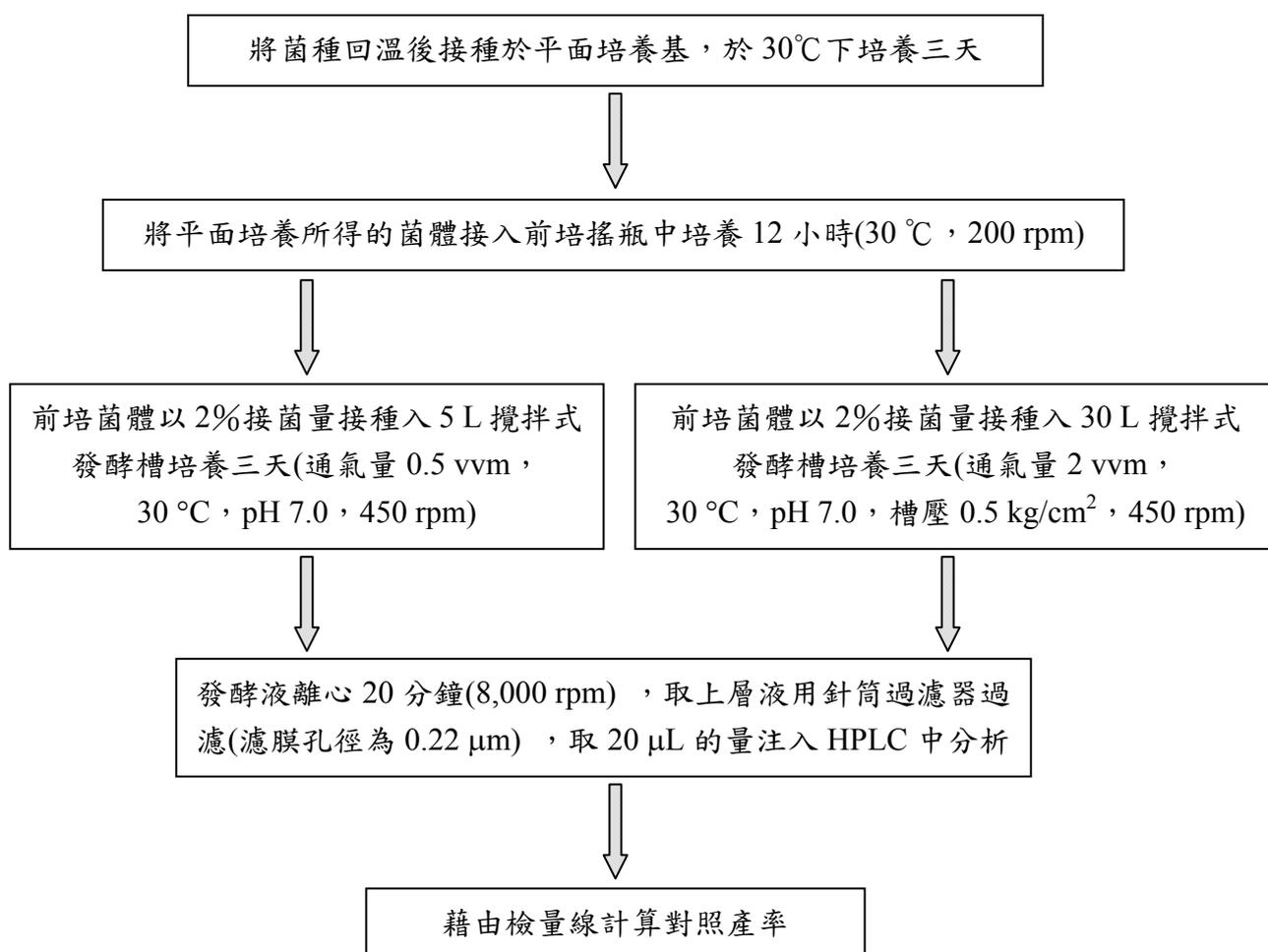


圖 3-1 實驗流程圖



3-4 菌種保存及培養之操作方法

菌種保存及繼代培養

將冷凍保存的菌株取定量(一白金耳)接種於平面培養上大量培養，3 天後以無菌水（10 % 甘油+ 90 % 無菌水）將其菌與孢子洗下，分裝於冷凍小管內保存於-84 °C 冰箱。

前培養

將冷凍保存的菌株於無菌操作台中接種至平面培養基上，大量培養三天，將每片培養皿所獲得之菌液接種至含 150 mL 活化培養基之 500 mL 含溝槽三角錐形瓶後，置於 30 °C、200 rpm 的振盪培養箱中培養 12 小時。

主培養

待前培養 12 小時後，以 2 % 接菌量接種於搖瓶及攪拌式發酵槽中。於搖瓶部份，接入裝有 200 mL 培養基的 500 mL 含溝槽三角錐形瓶中，培養條件為 30 °C、450 rpm 且培養三天。於發酵槽部份，包含 5 L 及 30 L 攪拌式發酵槽，於 5 L 攪拌式發酵槽，將前培液接種於含有 3 L 培養基的 5 L 發酵槽中，其培養條件為通氣量 0.5 vvm、30 °C、pH 7.0、450 rpm 並培養三天。若於 30 L 攪拌式發酵槽，將前培液接種於含有 15 L 培養基的 30 L 發酵槽中，其培養條件為通氣量 2 vvm、30 °C、pH 7.0、450 rpm、槽壓 0.5 kg/cm²，培養三天。



3-5 蘇力菌素之分離純化

在此方面曾嘗試以實驗室既有之分離純化流程為基礎，將發酵液利用矽酸鈣來吸附蘇力菌素，但如須完全吸附發酵液中之蘇力菌素，則需用到 10% 的矽酸鈣，考慮到矽酸鈣使用量太大，所以選擇以下的分離純化方法。

首先將培養 3 天的發酵液經 8000 rpm、20 分鐘離心後取上清液，再將上清液以真空減壓濃縮機使其體積濃縮約 10 倍。取 10 mL 經減壓濃縮之發酵液加入 90% acetone 反應 15 分鐘之後，離心(10 分鐘，10,000 rpm)。沉澱物再加入 90% acetonitrile，離心(10 min，10,000 rpm，4°C)。待離心完成後，將沉澱物以 buffer solution 回溶，離心，過濾。再配合半製備型 HPLC 將發酵液加以分離純化，得到純化之 β -外毒素(圖 3-2)。

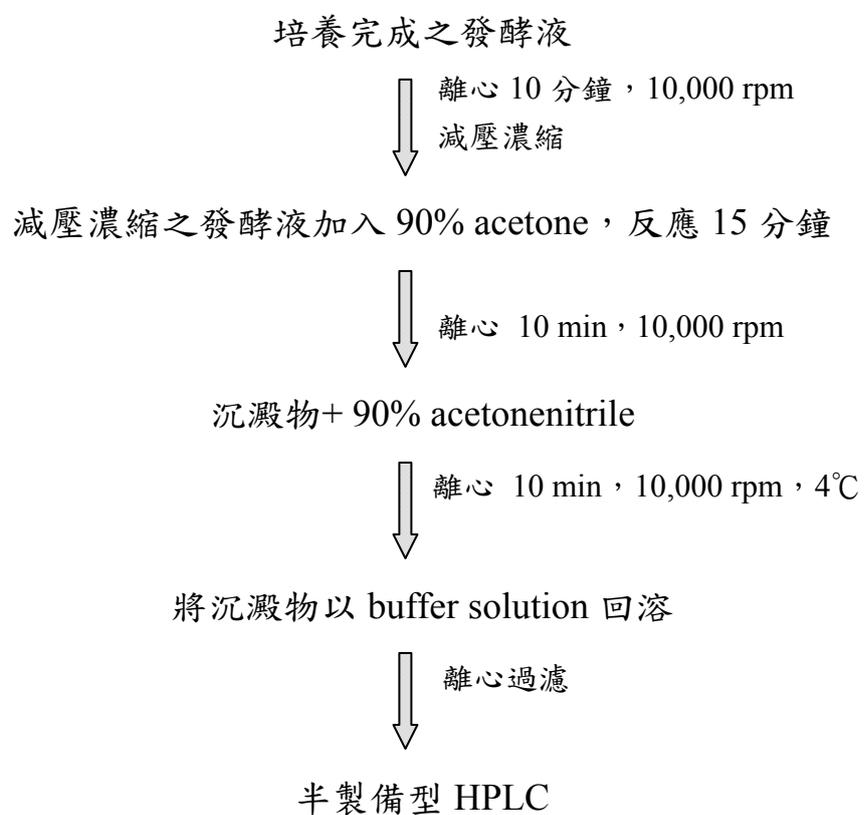


圖 3-2 蘇力菌素之分離純化流程



3-6 HPLC 定量分析

以 HPLC 分析蘇力菌素，提沖液為 50 mM 的磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)。以磷酸將 pH 調整至 2.8，經 0.22 μm 之過濾膜過濾後經抽氣除氣後備用。所採用的儀器為 Hitachi L-7100 pump、L-7400 UV detector 之 Hitachi HPLC 系統(Tokyo, Japan)。層析管柱是 Hypersil BDS- C_{18} column (4.0 \times 100 mm)。樣品注入量為 20 μL (樣品須先以過濾膜過濾)，檢測器波長設定為 260 nm，流速為 1.0 mL/min。



3-7 酚硫酸法測定殘糖

於試管中加入 2 mL 稀釋後的樣本或標準溶液(濃度介於 0~30 $\mu\text{g/mL}$)

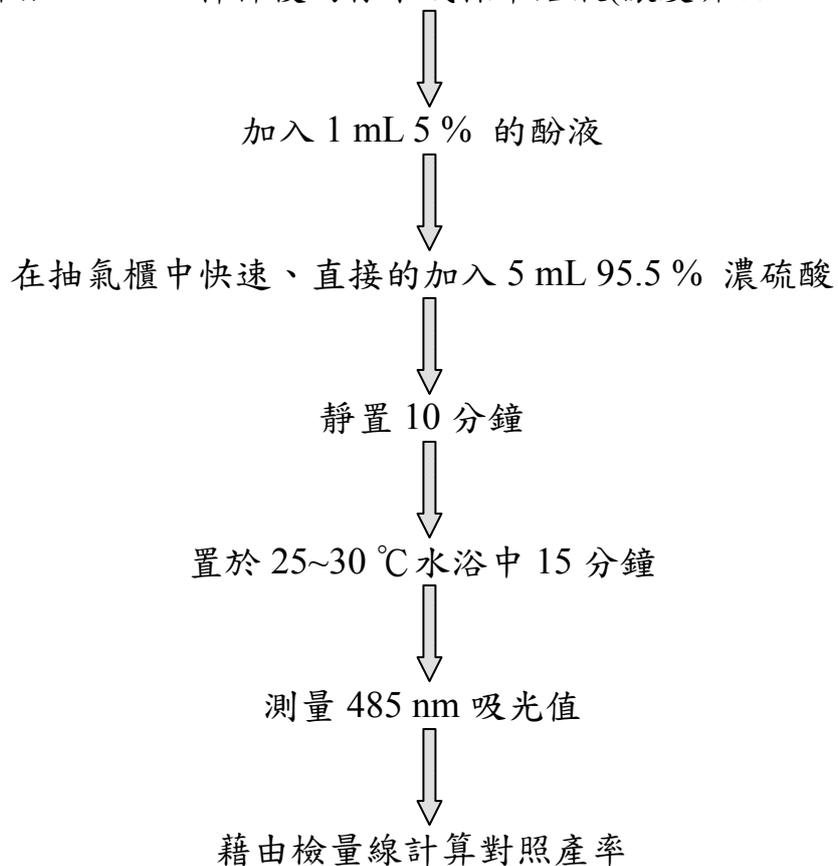


圖 3-3 酚硫酸法測定殘糖流程



3-8 劑型配方

為了配合農民不同的使用方式，研究不同狀態的劑型。首先研發粉狀水懸劑。粉劑的優點為體積小、保存方式簡單、應用範圍廣汎與方便運輸等，故先以粉狀水懸劑做為研究目標。此部份為旗艦銀河生物科技公司徐銘豐經理所提供之研究結果。

粉狀水懸劑製作步驟如下

- 一、將蘇力菌發酵液離心後取上清液。
- 二、使用減壓濃縮機將發酵液中蘇力菌素濃度作有效控管。
- 三、使用流動床乾燥機造粒成型。
 - A、入口溫度 70°C、出口溫度 50°C。
 - B、篩網每分鐘震動 12 次。
 - C、液體注入流速 2.5 mL/min。
 - D、載體為 1.0 Kg
 - E、操作時間以每四十分鐘為一單位，作反覆循環。
- 四、載體選擇（玉米粉、米粉、黃豆粉、樹薯澱粉）。
- 五、粉劑完成。

分別使用不同的載體與注入體積研究成型產品之型態與所含蘇力菌濃度。



3-9 田間試驗

為了能夠得到實際應用的成果，遂先以蘇力菌發酵液原體提供給中部雞農使用，用以對抗困擾雞農已久的雞舍蒼蠅問題。此部份為旗艦銀河生物科技公司徐銘豐經理所提供之研究結果。本研究先以三間雞舍做為實地測試，分別為 A 戶：擁有約三百坪的養雞場，通風良好，比鄰而居的有六百坪的傳統雞舍，環境較為複雜（圖 3-4、圖 3-5）。B 戶：擁有一百二十坪的獨立雞舍，通風不良，但是周邊環境干擾因素小（圖 3-6、圖 3-7）。C 戶：擁有兩百四十坪的獨立雞舍，採用機械化的先進養雞設備，環境干擾因素適中（圖 3-8、圖 3-9）。分別給予三戶雞舍不同濃度的蘇力菌發酵液原體進行測試，期間為一個月。

蘇力菌發酵液的作用效果乃對幼蟲與成蟲期較有成效，因此需要配合蒼蠅生長期（雌蠅產卵在腐爛物上，1 天左右，卵就孵化成幼蟲，幼蟲蛻皮三次就變成褐色的蛹，經約 6 日後蛹羽化為成蟲；由卵到成蟲，生長所需時間約 12 天。此外雄蠅壽命 7~23 天，雌蠅則為 8~22 天，家蠅每年約能繁殖 30 代），給予不同的噴灑方式。在幼蟲時期，發酵液主要噴灑於幼蟲寄生的糞便上，每週噴灑兩次；在成蟲期間，發酵液主要噴灑於成蟲所棲息的雞舍設備上，每週噴灑一次。



圖 3-4 A 養雞戶的雞舍內部實景。



圖 3-5 A 養雞戶旁比鄰而居的曬雞屎場與傳統養雞戶實景。



圖 3-6 B 戶雞舍外觀（獨立雞舍）實景。



圖 3-7 B 戶通風不良導致蒼蠅肆虐實景。



圖 3-8 機械自動化雞舍實景。



圖 3-9 機械設備雞舍實景。



四、結果與討論

4-1 HPLC 分離之標準品

將發酵液經由一系列離心(8000 rpm, 20 min)過濾(0.22 μ m)的過程取得其上清液並以半製備型 C-18 管柱經 HPLC 分析發酵液以將標準品分離出，所取得之標準品水溶液由於濃度過低，因此須經由真空減壓濃縮機使其體積濃縮約 20 倍，將濃縮液置入-84 $^{\circ}$ C 使其內含液體結凍，接著經由冷凍乾燥機將液體排除後形成粉末(圖 4-1)。由於蘇力菌素純物質於粉末狀態下保存易裂解，故將粉末秤重後以去離子水回溶並計算濃度，將回溶之標準品水溶液置入 eppendorf 中(圖 4-2)，保存於 -20 $^{\circ}$ C 中備用可減低其裂解之可能性。相較於粉末約可保存半年，由於水溶液保存之蘇力菌素其液體均勻含有磷酸根，此磷酸根可使蘇力菌素不易裂解為去磷酸蘇力菌素，故可保存數年而不容易裂解。



圖 4-1 乾燥之標準品



圖 4-2 回溶之標準品



4-2 HPLC 分析及內標品檢量線

蘇力菌素屬於一種類似核苷酸之化學結構，其與 ATP、ADP 或 AMP 之結構均相類似，如果此類化合物在 HPLC 與蘇力菌素有不同之滯留時間 (retention time)，則可將已知定量之 ATP、ADP 或 AMP 與含蘇力菌素之過濾液混合，然後注入 HPLC，在結果的層析圖譜上比較此類核苷酸之波峰面積與蘇力菌素之波峰面積。從波峰面積之比值計算其與蘇力菌素濃度之間的相關性，依其良好之相關性即可建立一標準曲線，並由此標準曲線可推算每一種溶液中所含蘇力菌素之濃度。

將分離純化之蘇力菌素標準品回溶並計算其濃度，依其濃度對半稀釋成五種不同濃度(0.46875、0.9375、1.875、3.75 及 7.5 mg/mL)，每種濃度皆添加相同體積 50 $\mu\text{g/mL}$ 的內標品 AMP，混合均勻後以 0.22 μm 之過濾膜過濾取 20 μL 注入分析型 HPLC 中分析，可得蘇力菌素添加 AMP 於分析型 HPLC 中的層析圖譜(圖 4-3)，根據層析圖譜所積分出之 AMP 與蘇力菌素之 peak area，換算其比例以求得蘇力菌素添加 AMP 之校正曲線(圖 4-4)。



4-3 Mass 圖譜

將蘇力菌素溶於水與 MeOH 等量混合之溶液中，以 ESI MASS 對蘇力菌素做進一步分析，圖 4-5 為 MASS 鑑定圖譜，質荷比為 702.6 的位置推測此純化物質為蘇力菌素。此外，質荷比為 585.0 推測為蘇力菌素斷裂腺嘌呤後之片斷；質荷比為 453.4 推測為蘇力菌素斷裂腺嘌呤及核糖後之片斷，並針對質荷比 702.6 再做一次 MASS 鑑定圖譜(圖 4-6)。其目的在於減低雜訊之影響以期更進一步確認蘇力菌素所在之分析位置。

4-4 菌種比較結果

本實驗研究目標在於促使產量提升，測試菌種分別為 A1-09a、I9-03a 及 HD-199 三株，由於兩種培養基 Molasses 15 g/L、黃豆粉蛋白 30 g/L 及 Glucose 30 g/L、黃豆粉蛋白 45 g/L 對於每一株菌的影響不同，因此針對不同培養基於搖瓶中測試其所生成之產量(表 4-1)，於不同培養基但相同的培養方式操作之下 HD-199 產量皆明顯高於其他菌株。所以，目前還是使用 HD-199 為蘇力菌發酵蘇力菌素之主要菌種。以期能發現產量提升差異更大之菌株。



4-5 搖瓶測試

搖瓶測試包含兩個部份，分別於起始培養基中添加硫酸銨或分散劑。添加硫酸銨的考量為有機氮源及無機氮源之間的關係，且包含有機氮源及無機氮源添加量之差異性。於分散劑添加部份，由於觀察培養基於實驗過程中之均質狀況，而嘗試添加並觀測結果。

硫酸銨添加部份，根據詹(1999)提及，硫酸銨為無機氮分子小，使菌體先適應了無機氮源有助於菌體於發酵初期快速獲得所需之氮源。也因此，待硫酸銨即將用盡銜接上的黃豆粉蛋白接續提供氮源。但其於論文中提及，此改變方式將會引起內部代謝路徑的改變，使得菌活性無法提高。而且無機氮源的濃度不足，菌體在利用無機氮時就有不足之感，使得一開始活性就非常的低，然後再由無機氮轉成有機氮，內部代謝路徑改變，活性依舊無法提升。後續，又提及如果初始的無機氮濃度較高，則菌體因為有足夠的氮源，可以得到較高的活性與菌體量。然而在無機氮源用罄之際，依舊會有代謝路徑改變的影響。但因為本身菌體活性高，並且菌體量大，所以溶氧回升的現象也不如一般發酵過程提升的那麼高。至於有機氮高時，滲透壓較大，較易進入菌體，因此無機氮有機氮同時利用，故不會有明顯代謝途徑改變的跡象。

因此，嘗試於 500 mL 搖瓶中測試硫酸銨濃度對於菌體生成之影響。除原先含有之培養基含量外，額外以六個不同濃度(2、4、6、8、10 及 12 g/L)



的硫酸銨置入搖瓶中以測試其產量差異。根據圖 4-7 可觀察到以添加硫酸銨 6 g/L 為最佳，但由於此實驗是在搖瓶中完成的，可能會因搖瓶中含氧量不足或 pH 異動的影響而影響產量，故後續嘗試於 5 L 攪拌式發酵槽中再次進行測試。

由於硫酸銨每公斤價格約 40 元而黃豆粉蛋白每公斤價格約 250 元，基於成本上的差異，因此希望能以硫酸銨置換黃豆粉蛋白所需的量。以不同比例及相近的碳氮比做測試，培養基除了黃豆粉蛋白及硫酸銨置換外，其餘培養基成分均無變動。其結果如表 4-2 所示，結果還是以無置換硫酸銨為最佳。主要原因在於，雖然無機氮因為分子小，容易為菌體所利用，但於合成胺基酸時必須有碳架，而碳架的來源乃是葡萄糖的中間代謝物。因此菌體利用無機氮時，會使得葡萄糖用於產蘇力菌素的比率降低。而在有機氮源中許多的胺基酸可以不經代謝直接利用，減少合成胺基酸時碳源的消耗。而且在無機氮源不足的情況下，菌體被迫使用不同氮源，被迫改變代謝途徑，因此並不適以無機氮源取代有機氮源。

分散劑添加部份，由於培養基中黃豆粉蛋白於配製過程易結塊且隨著發酵的持續進行培養基的黏稠度也漸漸提昇，未避免營養成分無法被菌完全吸收而造成實驗上的誤差。因此，嘗試於培養基中添加不同的分散劑以期能將培養基中之營養份分散均勻使菌體能有效吸收。另外，培養基除了額外添加分散劑外，其餘培養基成分均無變動。



於 500 mL 搖瓶測試的分散劑包含木質硫酸鈉、甲基纖維素、羥甲基纖維素及 pc67 等四種，其添加量皆為 0.3 g/L。結果顯示(圖 4-8)，木質硫酸鈉、甲基纖維素及羥甲基纖維素皆可使產量提升，其中以羥甲基纖維素為最佳其產量可提升 14.5 %。但由於搖瓶質傳效果較差，對於培養基均質的效果較差，故後續嘗試於 5 L 攪拌式發酵槽中再次進行測試。



4-6 5 L 攪拌式發酵槽試驗

此部份測試之主要目的除了延續搖瓶初步測試的後續討論外，由於蘇力菌屬好氧菌，對於氧氣的需求量也相對較多，因此，嘗試於發酵過程中注入氧氣，觀測期後續影響及變化。

硫酸銨添加部份，由於通氣量及 pH 值的調控上，搖瓶無法達到發酵槽的效果，故於 5 L 攪拌式發酵槽中進行不同硫酸銨添加量之測試。依循搖瓶測試所得之結果，以三個不同濃度(4、6 及 8 g/L)的硫酸銨置入 5 L 攪拌式發酵槽中以測試其產量差異。此外，培養基除了額外添加硫酸銨之外，其餘培養基成分均無變動。根據表 4-3 可觀察到硫酸銨添加量仍以添加 6 g/L 為最佳，此添加量可為後續實驗之參考。

分散劑添加部份，由於質傳效果及培養基均質效果的差異，搖瓶無法達到發酵槽的效果，故於 5 L 攪拌式發酵槽中進行不同分散劑添加之測試。依循搖瓶測試所得之結果，以四個不同的分散劑以 0.3 g/L 的量置入 5 L 攪拌式發酵槽中以測試其產量差異。此外，培養基除了額外添加分散劑外，其餘培養基成分均無變動。根據表 4-4 可觀察到分散劑添加仍以添加羥甲基纖維素為最佳，此添加可為後續實驗之參考。

添加氧氣部份，於 5 L 攪拌式發酵槽的發酵過程中，通氣量為 0.5 vvm，於此實驗中測試期間以一半的通氣量置換為純氧。培養基成分均無變動。根據結果表 4-5 所示，通入氧氣的時機以對數生長期結束前添加可顯現出效



果，其中又以培養後 12~24 小時最為重要，可得知於對數生長期後期除槽體內含氧量不足外，由於菌數增多因此耗氧情形也相對增加，故於此期間提升氧氣含量可使菌素含量增加。後續可依據此結果，將饋入純氧的時間縮短，期以最短之通氣時間達到相同之產率以節省成本。

雖然以純氧代替原本空氣，可使同通氣量下氧氣含量提高有助於提升產率。但目前純氧所使用的量還是太多，於成本的考量上並不適用，雖然增加溶氧的目的可以增加通氣量或增加轉速代替。但若增加通氣量於發酵的過程中氣泡生成將大增，若以消泡劑解決此問題又將影響產量。另外，若以增加轉速代替，剪應力提高對於菌的生長將有所阻礙，其原因在於菌體將耗費更多的能量以修復本身受損的情形，因此，產量勢必有所影響。

所以，除非能減短使用的時間及減少使用的含量，否則此一結果不適用於更大規模之發酵槽中，因此後續測試更顯重要。



4-7 於 30 L 攪拌式發酵槽之不同測試

4-7-1 30L 發酵槽轉速之比較

於選定使用菌株之後，蘇力菌於發酵槽之運轉條件幾乎可依據文獻操作，唯獨攪拌轉速必須做進一步之測試。因為，每一個發酵槽之微環境如：扇葉直徑、扇葉間距及扇葉與槽內壁距離，種種環境不同導致產量也相對有影響。因此，測定不同轉速對於產量之差異是有所必要。且培養基成分均無變動。表 4-6 呈現出不同轉速對於蘇力菌素產量之影響，由表可知於轉速 450 rpm 對於蘇力菌素生產為最佳轉速。

4-7-2 發酵槽生長曲線

確定發酵菌株、轉速及發酵條件之後，於 30 L 攪拌式發酵槽中發酵且不調控其 pH 值並觀察所得之實驗結果。且培養基成分均無變動。由圖 4-9 30 L 攪拌式發酵槽之生長曲線可得知，葡萄糖於開始發酵後 21 hr 後使用殆盡。pH 值從開始發酵起便開始下降直至發酵後期才慢慢爬升，其原因在於蘇力菌於葡萄糖代謝過程有許多有機酸的累積與消耗。累積時會導致 pH 值降低，反之則使 pH 上升。所以 pH 值可做為葡萄糖及其代謝物含量變化的訊號，因此 pH 值的變化可做為調整培養策略時的參考，發酵後 72 hr 所獲得之蘇力菌素產量為 3.59 g/L。



4-7-3 不同調控對於蘇力菌素之生成趨勢

根據前人文獻(Zhou, 2007)，當 pH 值為 7 時有利於菌素生成，故嘗試將 pH 值調控於 7 測試是否能有效提升菌素產量。所以嘗試於對數生長期結束後將 pH 值調控於 7，以觀察其菌素生成趨勢。培養基部份均無變動。如圖 4-10 可觀察到於對數生長期終止時調控 pH 值於 7 其蘇力菌素產量為 4.42 g/L，產量提升 0.83 g/L。其較於發酵過程全程調控 pH 值於 7 其產量為 3.99 g/L 還高出許多。因此，此於對數生長期後調控 pH 值將有助於產量之提升。

此外，根據先前發酵之生長曲線(圖 4-9)可得知，Glucose 於發酵後 21 hr 使用殆盡，因此嘗試除了於對數生長期結束時調控 pH 值於 7 之外，且於對數生長期前後額外饋入 Glucose，曾嘗試於對數生長期結束時饋入 Glucose，可是結果發現對於產量提升並無影響，可能是饋入 Glucose 的時間太慢，所以饋入的 Glucose 不被菌所分解吸收。因此，嘗試於對數生長期結束前 3 hr 饋入 Glucose(圖 4-10)，所得之蘇力菌素產量為 5.46 g/L，較只是單純調控 pH 值還要高出 1.04 g/L。因此，此時間調控饋入 Glucose 將有助於產量之提升。



4-7-4 Glucose 饋料量與饋料時間之影響

初次嘗試於發酵過程中額外饋入葡萄糖是依前人研究(陳,1995)所添加的量(Glucose 1.2 g/L/h)做嘗試，其測試出的結果為產量 5.462 g/L，相較於於發酵過程中無饋入葡萄糖提升 23.5 %。但基於考量是否添加過量及添加時間是否過長接續著完成下列兩項實驗。

關於添加的量是否過量的問題上，嘗試饋入兩種不同的劑量 Glucose 1.2 g/l/h 及 Glucose 0.8 g/l/h 以觀察其產量。結果發現(表 4-7)，減量(Glucose 0.8 g/l/h)添加相較於無饋入產量提升 0.3 g/L，雖有提升但與饋入 Glucose 1.2 g/l/h 相比產量並無正向成長。因此，後續實驗暫時維持以(Glucose 1.2 g/L/h)為添加的量，後續實驗將測試是否將饋入的量提升有助於產量增加。

另外，嘗試將饋料的時間縮短，由原先設定的發酵後 18~72 h 縮減為發酵後 18~36 h。結果發現，縮短饋料時間對於菌素的產量並無明顯影響，顯示出發酵後期菌體對於 Glucose 的養分需求不高甚至不需要(表 4-8)。因此，後續實驗將繼續嘗試將饋料時間縮短，以期以最經濟的方式得到最高的產量。



4-7-5 發酵後期降轉速測試

根據前人文獻(徐, 2005)指出，於發酵後期即對數生長期之後，將轉速調降減少剪應力對菌體所造成的破壞，使菌體得以休息以增加蘇力菌素之產量。因此，嘗試於不同的時段將轉速由 450 rpm 調降至 350 rpm，根據先前觀察經驗得知若轉速降低則泡沫形成也將隨著減緩，但於此處若將轉速調降至 350 rpm 以下，泡沫將持續增加，其原因可能在於，高轉速運轉時最上方之扇葉能將所形成之泡沫打散，有效抑制泡沫生成，故若將轉速降低則消泡能力減低將無法抑制泡沫形成，且消泡劑雖可抑制泡沫產生，但多少對於產量有所影響，故只將轉速降至 350 rpm。調控的時間為些微小時之差距並觀察其結果。且培養基部份均無變動。結果顯示(表 4-9)，於發酵後 30 小時將轉速調降對於產量有大幅的提升，產量由先前的 4.42 g/L(表 4-7)提升至 6.04 g/L(表 4-9)，產量提升 36.7 %。後續將重複測試以觀察其再現性。



4-7-6 不同正相關因子調控對於蘇力菌素之生成趨勢

統合目前所完成之測試，由實驗數據可得知除原本起始培養基外額外添加硫酸銨、分散劑、於對數生長期間通入純氧、於對數生長期中調控 pH 7 和饋入 Glucose 1.2 g/h/L，最終，於對數生長期後將轉速降低。此六種調控因子皆可使蘇力菌素產量提升。因此，嘗試將這些因子合併，期望菌素產量能因此而更向上提升。但由於注入氧氣暫時無法達到放大化，因此，僅以剩餘條件調控於 30 L 攪拌式發酵槽，並觀察蘇力菌素生成趨勢，期能將此趨勢稍作修正達到更高產量。

除原始培養基外於起始培養基中添加硫酸銨和分散劑，其所示如圖 4-11，以方形代號線條表示，其對數生長期結束之時間約為發酵後 18 小時，有別於無做任何調控提早約 3 小時，由此可證明添加硫酸銨可有助於加快發酵時間，即縮短對數生長期所需時間。並且，無機氮源耗盡時接續利用有機氮源時能有效銜接，無明顯代謝途徑改變的跡象，此由蘇力菌素生成趨勢可觀察得知。因此，在發酵前於培養基中添加硫酸銨及分散劑有助於產量提升，產量由原先無做任何調控的 3.59 g/L 至 6.37 g/L，蘇力菌素產量提升 2.78 g/L，提升 177.44%。

接續，除於培養基中添加硫酸銨及分散劑外，並於對數生長期中調控 pH 7 且饋入 Glucose 1.2 g/h/L，結果如圖 4-11 三角形代號所示，由於調控於 pH 7 為菌素生成有利之 pH 值且添加 Glucose 增加可利用之能源，因此



菌素產量進一步向上提升，由原先無做任何調控的 3.59 g/L 至 7.36 g/L，蘇力菌素產量提升 3.77 g/L，提升 205.01%。

後續，除了上述四項外將加入降轉速因子做嘗試，希望能找到合適降轉速的時間，以期將產率再提高。



4-8 劑型配方

經由流動床乾燥機所製作出的粉劑成品，初步可得蘇力菌濃度約 8 g/Kg，其中所使用的濃度為蘇力菌發酵液的兩倍濃縮液共 1500 mL，造出的粉末非常的小，如同樹薯澱粉原本的大小（圖 4-12）。因此判定若使用原液則發酵液原體可使用約 3000 mL，與一般工業上的造粒比例 1:20 比較，原本實驗中所用的載體與原體的比例 1:3 差距甚遠，因此嘗試增加載體與原體間的比例。取濃縮五倍的發酵液以原操作條件等速注入流動床乾燥機中，直至所造顆粒無法再吹起始停止機器運作，可得粗顆粒的產品（圖 4-13），蘇力菌素濃度 10.8 g/Kg，使用發酵液體積為 2100 mL。造粒時發現載體所能承受的原體量可達 1:10，遠比先前所操作的原體體積多三倍，但礙於使用之原體為濃縮五倍的發酵液，所以推測其造粒時載體所能承受的原體量可達 1:10 以上。

本實驗使用濃縮發酵液是為確保每次所使用之發酵液中蘇力菌素之濃度相同，此乃將來量產化時能夠維持穩定發酵液中的蘇力菌素濃度的品管做為。所以先使用濃縮過的發酵液測試載體的承載量。實驗期間也分別使用了不同的載體（玉米粉、米粉、黃豆粉、樹薯澱粉）。

發現，若是使用蛋白含量越高的產品，則造粒過程越是容易結塊，容易形成大小不一的顆粒，所以最後選定蛋白質含量最低的樹薯澱粉。



4-9 田間試驗

28 天後觀察 A 戶雞舍，可明顯觀察到蒼蠅數量大量減少（圖 4-14、圖 4-15）；B 戶雞舍戶外已無大量蒼蠅棲息，且雞舍內地板有大量蒼蠅死亡屍體與變態的成蠅（圖 4-16、圖 4-17）；C 戶機械化雞舍內機器上只有少量成蠅棲息，雞蛋上的排洩物明顯減少，但機械自動雞糞堆積處出口仍有大量成蠅棲息（圖 4-18、圖 4-19）。

綜合前述觀察，蘇力菌發酵液原體能夠有效果的降低蒼蠅的危害，降低雞蛋的污染率提高雞蛋的商品價值。而且在本次實驗其間也發現為數不少的異變蒼蠅（圖 4-20），其外型前端如一般蒼蠅，尾端膨大，像似蛻變不完全的蛹，就如同 Carlberg (1985) 情況一樣。造成這樣的異變讓蒼蠅的飛行能力喪失，相對的也減少了蒼蠅的活動力與遷徙能力，如此便能減少蒼蠅的族群數量，能夠在小範圍的區域內作有效果的撲滅。

實地實驗結果顯示，蘇力菌發酵液能夠有效抑制蒼蠅的繁殖，但是農民的配合使用需要長時間的溝通與教育；蘇力菌發酵液並非化學農藥其毒殺的作用機制需要一段時間才能發揮，所以無立即毒殺效果（即噴即死）因此農民使用蘇力菌發酵液的意願降低；蒼蠅對化學農藥多數具有抗藥性但對蘇力菌發酵液並無抗藥性，因此蘇力菌發酵液能夠有效降低蒼蠅數量，唯獨需要長時間使用便能有效降低蒼蠅的數量；並應設立蘇力菌發酵液對蒼蠅使用規範或時間表，於蒼蠅不同生長時期給予不同濃度的蘇力菌



發酵液，以期能夠用最小的成本達到最好的效果。

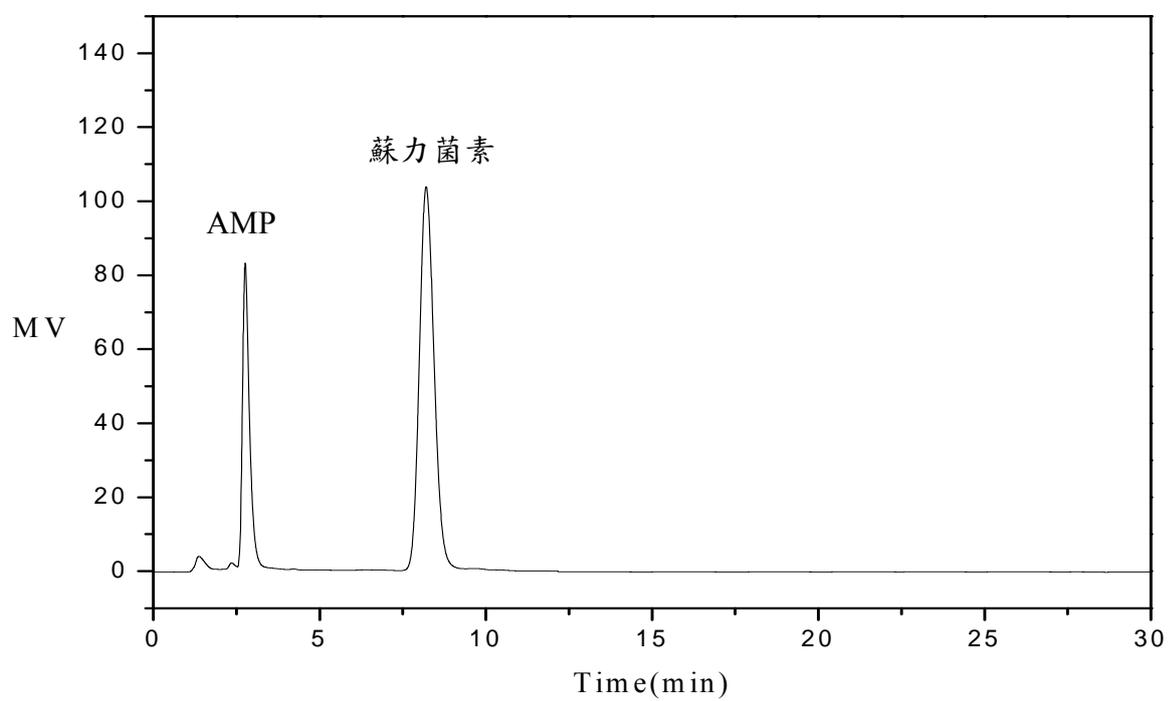


圖 4-3 蘇力菌素標準品添加 AMP 以分析型 HPLC 分析之層析圖譜

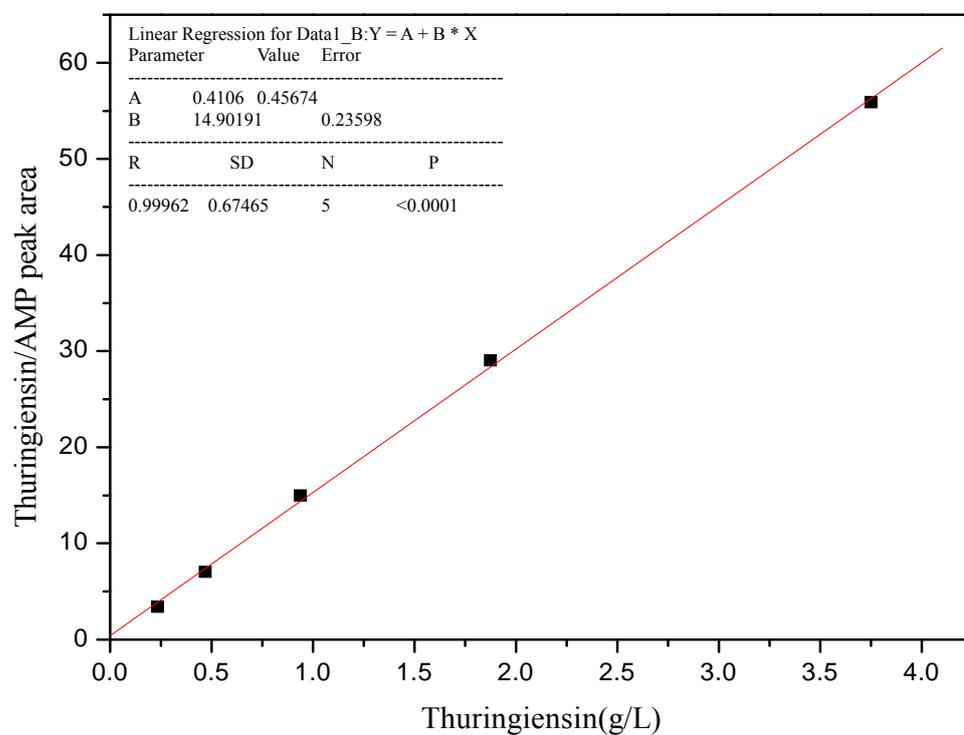


圖 4-4 HPLC 分析蘇力菌素標準品添加 AMP 之標準曲線圖



other0824-2_060824153513 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.53E7
T: + c Full ms [50.00-750.00]

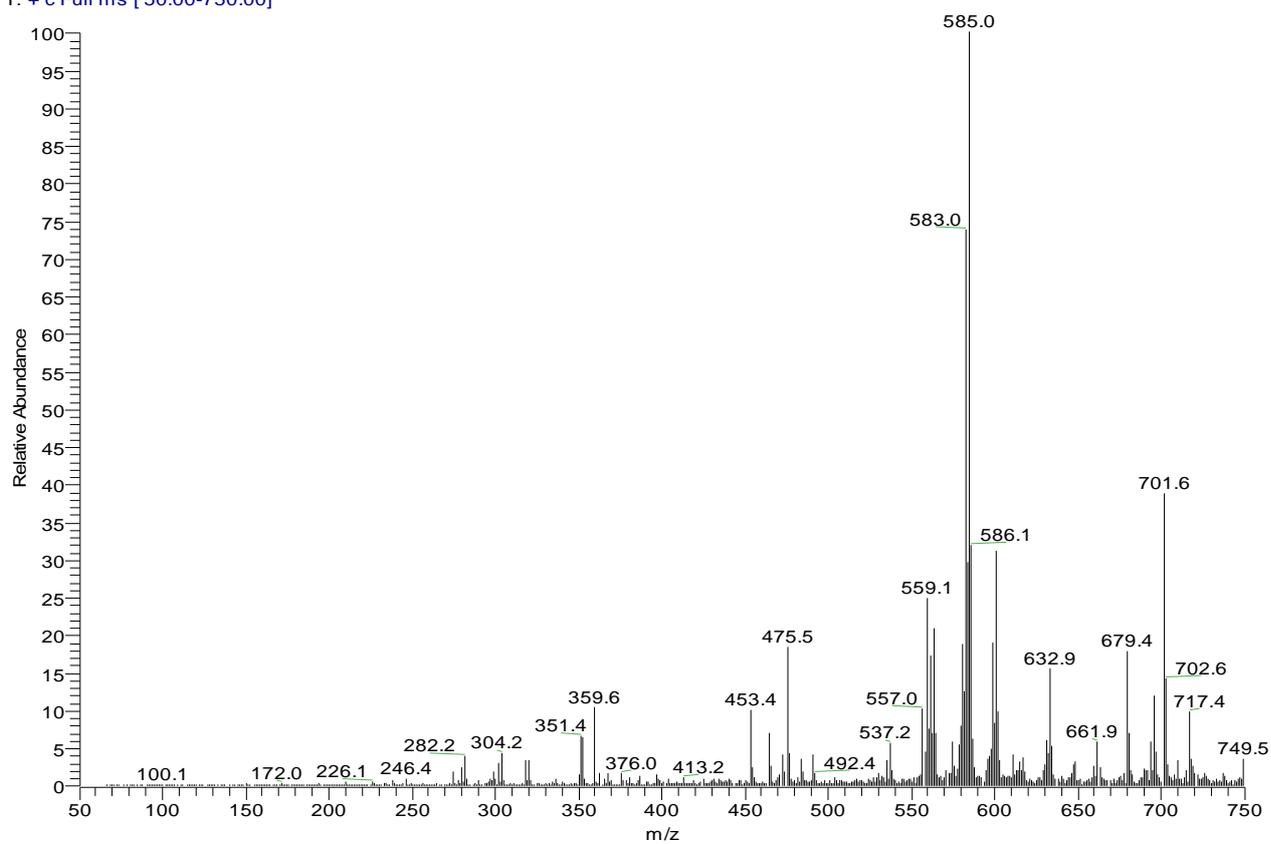


圖 4-5 蘇力菌素標準品之 ESI-MASS 圖譜



other0824-2_060824152740 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.12E6
T: + c Full ms2 702.00@55.00 [190.00-750.00]

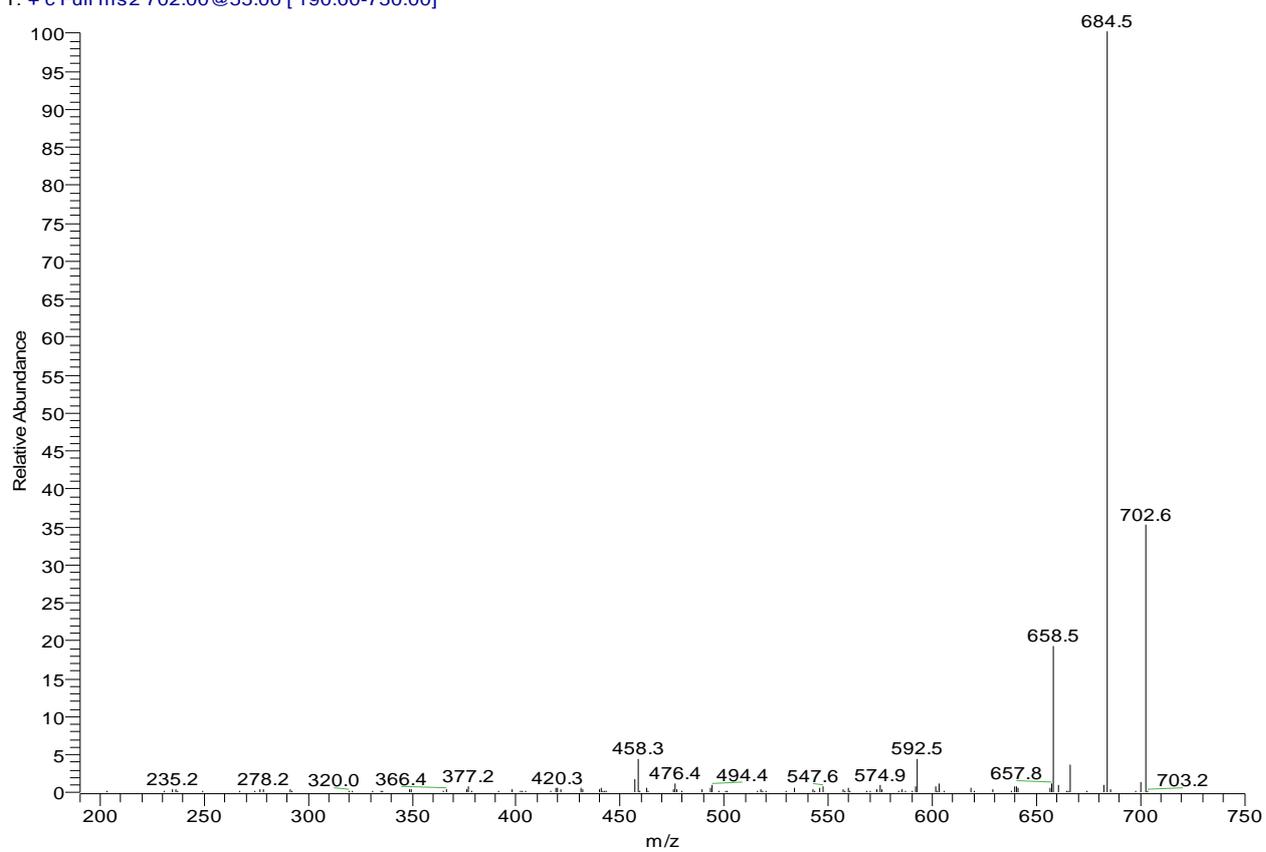


圖 4-6 蘇力菌素標準品之 ESI-MASS-MASS 圖譜



表 4-1 於搖瓶中不同菌種分別於兩種培養基之外毒素產量

培 養 基(g/L)		A1-09a	I9-03a	HD-199
碳源	氮源			
Molasses 15 g/L	黃豆蛋白 30 g/L	1.73±0.03	1.43±0.03	2.05±0.08
Glucose 30 g/L	黃豆蛋白 45 g/L	2.29±0.03	0.59±0.02	2.98±0.04

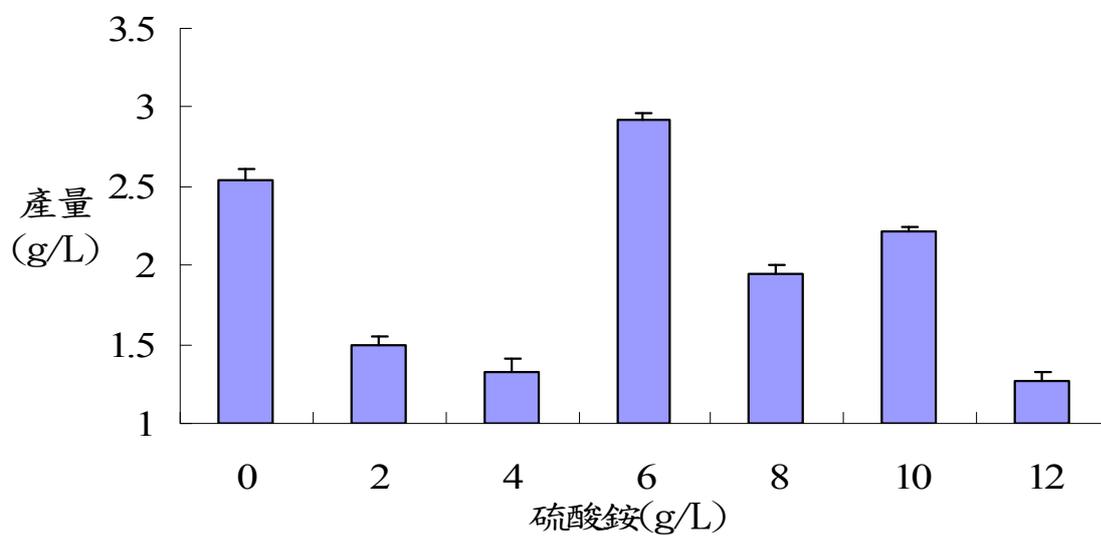


圖 4-7 於搖瓶中添加不同濃度硫酸銨對蘇力菌素產量之影響
(培養條件：培養基為主培培養基且額外添加不同濃度硫酸銨，
於 30 °C、200 rpm 下培養三天)



表 4-2 於搖瓶中添加不同比例之黃豆粉蛋白及硫酸銨

對蘇力菌素產量之影響

黃豆粉(g/L)	硫酸銨(g/L)	產量(g/L)
45	0	2.54±0.06
35	5	1.21±0.04
35	10	0.49±0.06
25	10	0.60±0.01
25	20	0.56±0.04
15	15	0.02±0.003
15	30	0.52±0.02
5	20	1.05±0.04
5	40	1.11±0.04

(培養條件:培養基為主培培養基除黃豆粉蛋白與硫酸銨進行置換

外，其餘成分均無變動，於 30 °C、200 rpm 下培養三天)

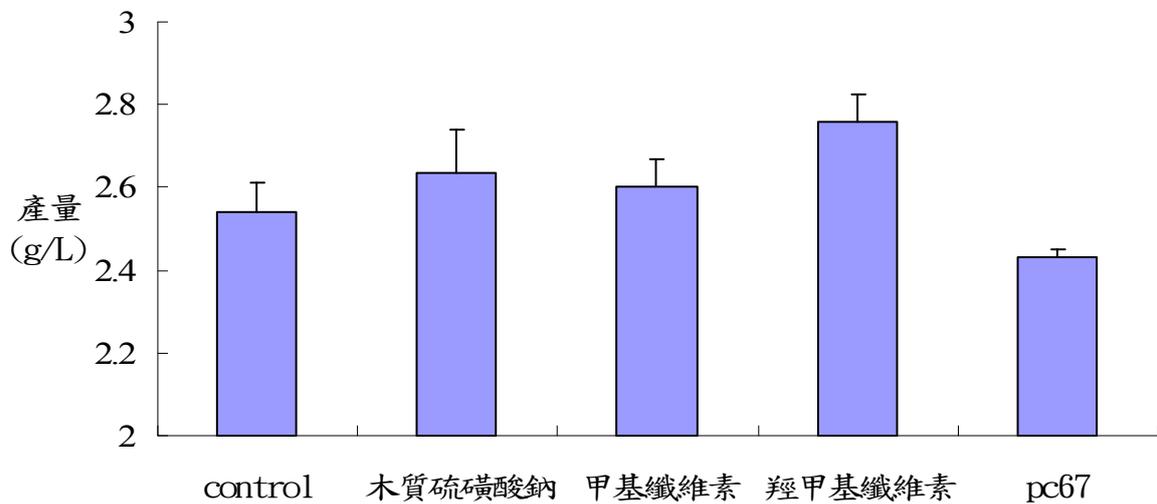


圖 4-8 於搖瓶中添加不同分散劑對蘇力菌素產量之影響

(培養條件：培養基為主培培養基額外添加不同種類分散劑

0.3 g/L，於 30 °C、200 rpm 下培養三天)



表 4-3 於 5L 攪拌式發酵槽中不同量硫酸銨添加
對蘇力菌素產量之影響

培養基	產量(g/L)
control	4.37±0.08
30 g/L Glucose 45 g/L 黃豆粉蛋白 4 g/L 硫酸銨	3.17±0.1
30 g/L Glucose 45 g/L 黃豆粉蛋白 6 g/L 硫酸銨	5.75±0.1
30 g/L Glucose 45 g/L 黃豆粉蛋白 8 g/L 硫酸銨	2.09±0.07

(培養條件：培養基為主培培養基額外添加不同濃度硫酸銨，

於 30 °C、450 rpm、pH 7、0.5 vvm 下培養三天)



表 4-4 於 5L 攪拌式發酵槽中不同分散劑的添加
對蘇力菌素產量之影響

分散劑(0.3 g/L)	產量(g/L)
木質硫磺酸鈉	4.61
羥甲基纖維素	4.84
control	4.37±0.08

(培養條件：培養基為主培培養基額外添加不同種分散劑 0.3 g/L，
於 30 °C、450 rpm、pH 7、0.5 vvm 下培養三天)



表 4-5 5 L 攪拌式發酵槽添加氧氣試驗結果

培養基		添加方式	添加時間	產量(g/L)
Glucose	30 g/L	Air 1.5 LPM	全培養期	2.77
黃豆粉蛋白	45g/L	純氧 0.75 LPM	開始培養後	0.67
KH ₂ PO ₄	5 g/L	Air 0.75 LPM	0 ~ 10 h	
K ₂ HPO ₄	5 g/L	純氧 0.75 LPM	開始培養後	4.69
NaNH ₄ PO ₄ · 4H ₂ O	1.5 g/L	Air 0.75 LPM	12 ~ 24 h	
		純氧 0.75 LPM	開始培養至	3.12
		Air 0.75 LPM	對數生長期結束	
		純氧 0.75 LPM	開始培養至	3.08
		Air 0.75 LPM	培養結束	

(培養條件：30 °C、450 rpm、pH 7、0.5 vvm 下培養三天)



表 4-6 30 L 攪拌式發酵槽中不同轉速對於蘇力菌素產量之比較

30L 攪拌式發酵槽 HD-199			
轉速(rpm)	400	450	500
產量(g/L)	3.12	3.97	3.97

(培養條件：培養基為主培培養基，於 30 °C、pH 7、2 vvm

下培養三天)

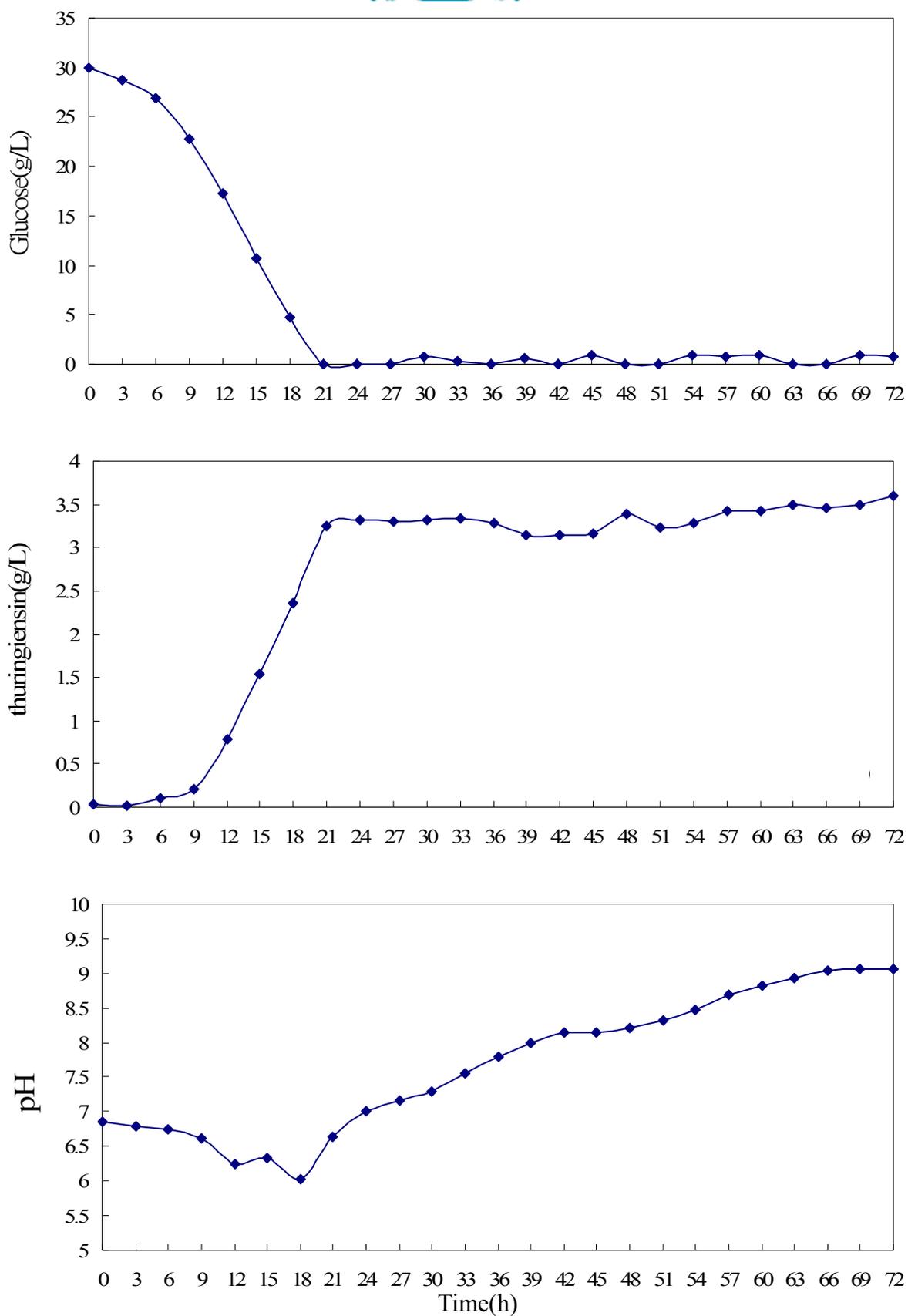


圖 4-9 30 L 攪拌式發酵槽殘糖、蘇力菌素產量及 pH 之趨勢圖

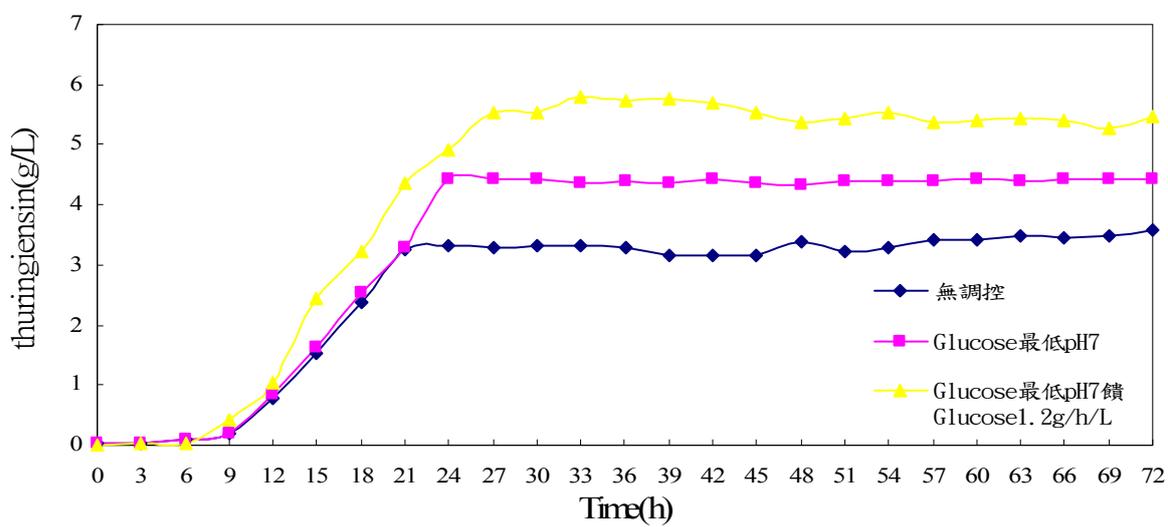


圖 4-10 30 L 攪拌式發酵槽在不同調控下蘇力菌素生成趨勢圖



表 4-7 30 L 攪拌式發酵槽中不同 Glucose 饋料量

對蘇力菌素產量之影響

調控條件	產量(g/L)
450rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7	4.42
450rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於殘糖最低前 3h 饋 Glucose $1.2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	5.46
450rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於殘糖最低前 3h 饋 Glucose $0.8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	4.73

(培養條件：培養基為主培培養基，於 30°C 、450 rpm、0.5

vvm 下培養三天)



表 4-8 30 L 攪拌式發酵槽中不同 Glucose 饋料時間

對蘇力菌素產量之影響

調控條件	產量(g/L)
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於殘糖最低前 3 h 饋 Glucose $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 饋料時間為培養 18~72 h	5.46
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於殘糖最低前 3 h 饋 Glucose $1.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 饋料時間為培養 18~36 h	5.55

(培養條件：培養基為主培培養基，於 30°C 、450 rpm、0.5 vvm

下培養三天)



表 4-9 30 L 攪拌式發酵槽發酵後期降轉速

對蘇力菌素產量之影響

調控條件	產量(g/L)
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 22 h 將轉速調降至 360 rpm	3.42
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 24 h 將轉速調降至 350 rpm	3.57
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 26h 將轉速調降至 350 rpm	3.71
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 30 h 將轉速調降至 350 rpm	6.04
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 36 h 將轉速調降至 350 rpm	4.27
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 38 h 將轉速調降至 350 rpm	3.25
450 rpm 殘糖最低點調控 pH 於 7 並於發酵後 40 h 將轉速調降至 350 rpm	4.61

(培養條件：培養基為主培培養基，於 30 °C、450 rpm、0.5

vvm 下培養三天)

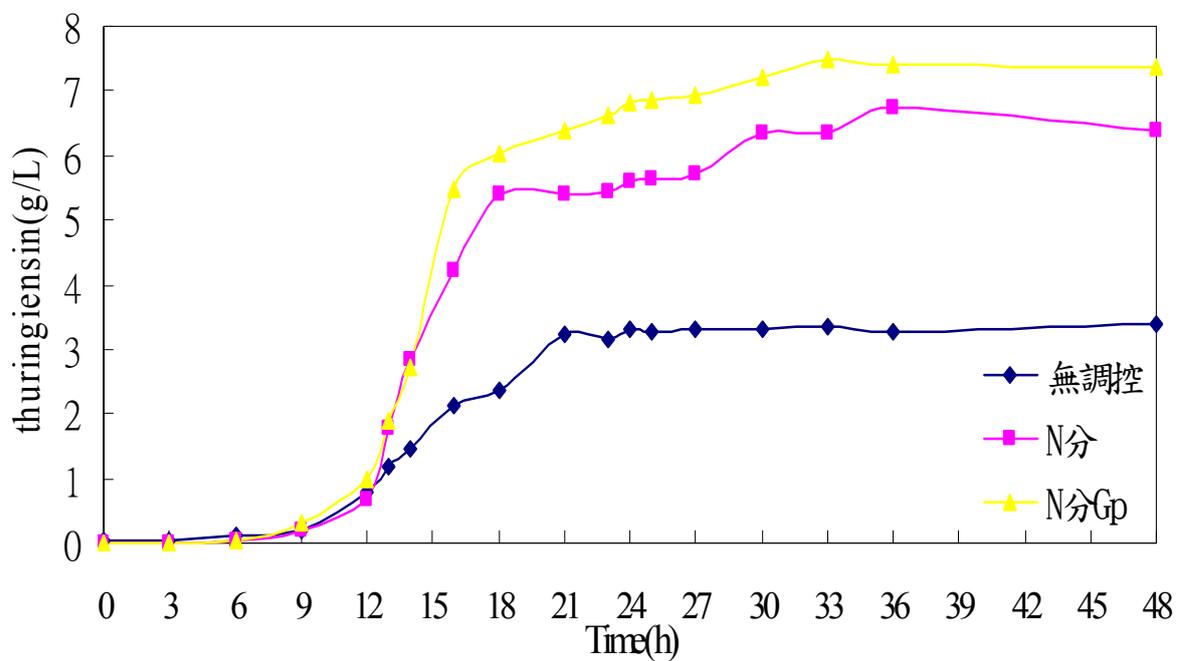


圖 4-11 30 L 攪拌式發酵槽在不同正相關因子調控下蘇力菌素生成趨勢圖

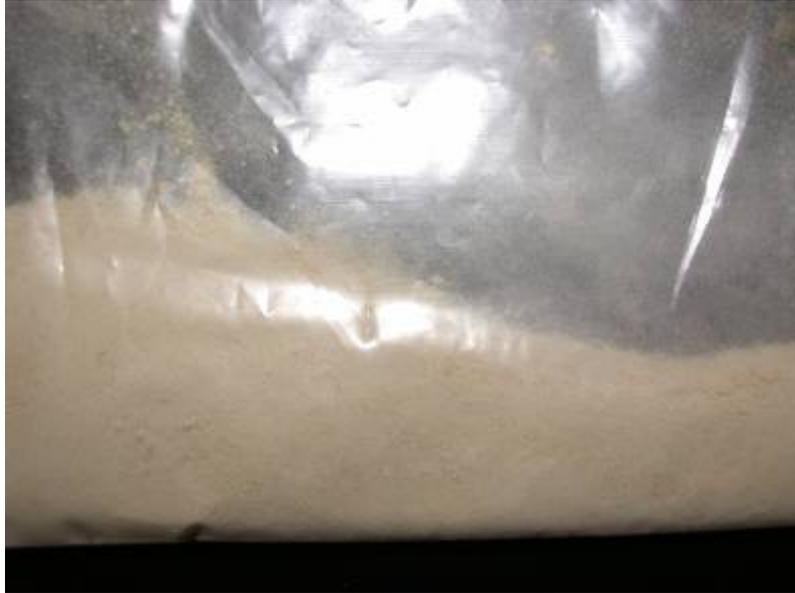


圖 4-12 蘇力菌素粉末 coating 到樹薯澱粉上之細末造粒成品。

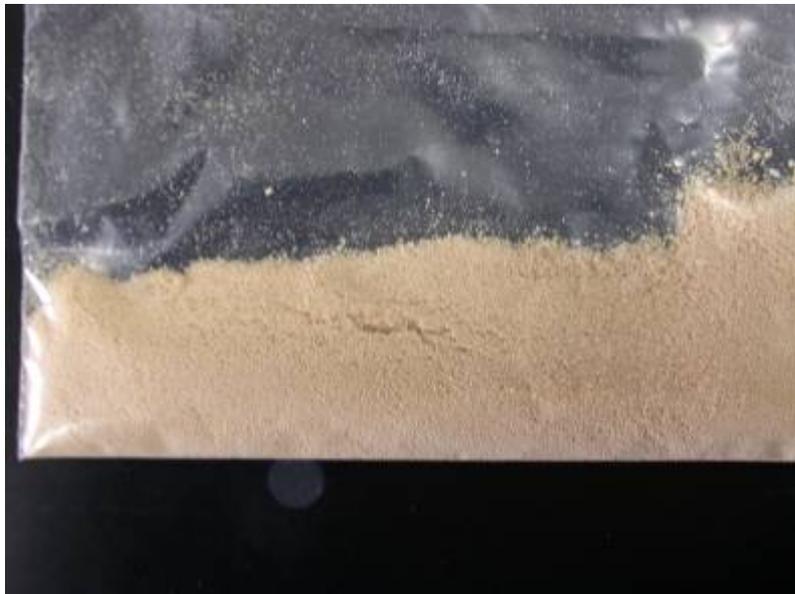


圖 4-13 蘇力菌素粉末 coating 到樹薯澱粉上之粗末造粒成品。



圖 4-14 A 養雞戶的雞舍內部蒼蠅數量減少實景。



圖 4-15 A 養雞戶的雞舍糞便堆蒼蠅數減少實景。



圖 4-16 B 戶雞舍蒼蠅肆虐情形已大獲改善實景。



圖 4-17 B 戶雞舍地面有大量死亡蒼蠅實景。



圖 4-18 C 戶機械自動化雞舍蒼蠅數減少實景。



圖 4-19 C 戶雞蛋上蒼蠅排洩物減少實景。



圖 4-20 實驗其間有大量的異變蒼蠅實景。



五、結論與未來展望

本研究以蘇力菌素之先導型試量產為主，劑型產品與實地應用測試為輔。蘇力菌素量產部份，已發現六種正相關因子，並經由單獨測試及合併測試，產量皆能有效提升，總產量由完全無任何調控的 3.59 g/L 至含有四項調控(硫酸銨、分散劑、饋 Glucose 及 pH 7)的 7.36 g/L，蘇力菌素產量提升 3.77 g/L，提升 105.01%。

後續可以目前研究為基礎發展後續實驗，包含對數生長期後將轉速降低，以降低剪應力使菌體得以將所獲之能量直接用於合成蘇力菌素上，而不會因為高剪應力使菌體受傷而使所獲之能量轉用於修復菌體上。此外，可嘗試將饋入 Glucose 含量增加，根據目前蘇力菌素生成趨勢圖(圖 4-11)，增加饋入量或許能使產量增加。

最終，於發酵過程中加入純氧，需再經多方測試，觀察其是否能由 5 L 放大化至 30 L 甚至更大產程。

綜合以上結果，其目的皆為使蘇力菌素產量提高有利後續應用，並減低單位產量生成所需之成本。除了著力於蘇力菌素生成量提升外，後續也應於劑型產品上的製程有所突破，因為，唯有環環相扣才能使此一連貫製程達到最大效果。如此實地應用將更顯成效。



1. 王培銘 (2001) 具方形網狀導流管氣泡塔式發酵槽之設計及其在液態培養紅麴菌之應用，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
2. 吳俊毅 (1992) 網狀內管氣舉式反應器在發酵上之應用，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
3. 吳美貌 (1992) 蘇力菌素的醱酵產製、分離純化與生物檢定，大葉大學食品工程研究所碩士論文，彰化大村。
4. 林銘璋 (2006) 蘇力菌素防治水稻田福壽螺之探討，朝陽科技大學應用化學所碩士論文，台中霧峰。
5. 姚良龍 (2001) 蘇力菌培養及蘇力菌素之生產的系統分析，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
6. 柯銀府 (2000) 蘇力菌發酵系統之動態分析，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
7. 徐銘豐、鄧力瑋、李怡臻、曾耀銘 (2005) 蘇力菌在氣舉式與攪拌式發酵槽的開發與研究，第十屆生化工程研討會，台灣大學，台北市。
8. 張伯熙 (1997) 台灣缺蠓之殺蟲劑篩選及其誘集研究，中興大學昆蟲學系碩士論文，台中市。
9. 陳建孝 (2002) 蘇力菌之培養及其影像分析之應用，清華大學化學工程



研究所碩士論文，新竹市。

10. 陳舜榮 (1995) 基質的影響在氣舉式反應器生產蘇力菌素之研究，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
11. 喻子牛 (1990) 蘇芸金桿菌，科學出版社，中國大陸武漢市。
12. 楊心怡 (2000) 影像分析在蘇力菌運動性之研究，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
13. 詹効松 (1999) 網狀內管氣舉式發酵程序生產蘇力菌 δ -內毒素之探討，東華大學生物技術研究所碩士論文，花蓮壽豐。
14. 鄒雯漪 (2003) 利用蘇力菌素防治福壽螺之病理探討，朝陽科技大學應用化學所碩士論文，台中霧峰。
15. 鄒嘉恒 (2005) 黑殭菌素 E 之發酵製備與回收純化，朝陽科技大學應用化學所碩士論文，台中霧峰。
16. 熊定宇 (1995) 具網狀導流管氣舉式反應器之設計及其在蘇力菌發酵上之應用，清華大學化學工程研究所碩士論文，新竹市。
17. 蔡三福、廖俊旺、王順成 (1998) 蘇力菌素對大鼠口服及肺毒性之評估，中華獸醫誌，24, 203-211。
18. 蔡三福、林佳蓉、廖俊旺、王順成 (1998) 以沙門氏桿菌及枯草桿菌偵測蘇力菌素之遺傳毒性，中華獸醫誌，25, 43-49。
19. 蔡啟良、劉子鋒、喻子牛 (2003) 蘇芸金芽孢桿菌生物活性成分研究進



展，華中農業大學應用與環境生物學報，9, 207-212。

20. 鍾建中 (1994) 網狀內管氣舉式反應器在蘇力菌素生產之應用，清華大學化學工程研究所博士論文，新竹市。
21. Arcas, J., Yantorno, O., Arraras, E. and Ertola, R., (1984) A new medium for growth and δ -endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *Biotechnology Letters*, 6, 495–500.
22. Brara, S. K., Verma A. M., Tyagia, R. D., Tyagia, J. R. and Valeroc, R.Y., (2005) Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts. *Water Research*, 39, 3001–3011.
23. Cantwell, G. E., Dougherty, E. and Cantelo, W. W., (1983) Activity of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* against the Colorado potato beetle and the ames test. *Environmental Entomology*, 12(5), 1424–1427.
24. Carlberg, G. and Lindstrom, R., (1987) Testing fly resistance to thuringiensin produced by *Bacillus thuringiensis*, serotype H-1. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 194–197.
25. De Barjac, H. and Frachon, E., (1990) Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, 35, 233–240.
26. Dulmage, H. T. (1971) Production of pathogen in artificial media. *Microbial Control of Insects and Mites*, 507–540.
27. Dunn, P. H., (1960) Control of house flies in bovine feses by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *Journal of Insect Pathology*, 2, 13–16.
28. Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D. and Sanchis, V., (2005) An ABC



- transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β -exotoxin I production. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 5848–5854.
29. Gardner, W. A., Pendley, A. F. and Storey, G. K., (1986) Interactions between *Bacillus thuringiensis* and its β -exotoxin against fall armyworm (Lipidoptera : noctuidae) neonate larvae. *Florida Entomologist*, 69, 531–536.
 30. Glazer, A. N. and Nikaido, H., (1995) *Microbial biotechnology-fundamentals of applied microbiology*. Freeman, W. H. & Company. New York.
 31. Heimpel, A. M., (1967) A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology*, 12, 287–322.
 32. Holmberg, A., Sievanen, R. and Garlberg, G., (1980) Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production : process analysis study. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1707–1724.
 33. Huang, T. K., Wang, P. M. and Wu, W.T., (2001) Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tube. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 35–39.
 34. Krieg, A., (1968) Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* exotoxin on *Tetranychus telarius*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12, 478–480.
 35. Liu, C. M. and Tzeng, Y. M., (1998) Quantitative analysis of thuringiensin by high-performance liquid chromatography using adenosine monophosphate as an internal standard. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 340–344.
 36. Luong, J. H., Male, K. B., Mazza, A., Masson, L. and Brousseau, R., (2004) Analysis of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and recombinant *Escherichia coli* by capillary electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*



- 25, 3292–3299.
37. McConnell, E. and Richards, A. G., (1959) The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat stable substance toxic for insects. Canadian Journal of Microbiology, 5, 161–168.
 38. Meretoja, T. and Garlberg, G., (1977) The effect of *Bacillus thuringiensis* and of cell-free supernatants of some other bacteria on the mitotic activity of human lymphocytes. FEMS Microbiology Letters, 2, 109–111.
 39. Michel, G. and Stephane, P., (2001) Sample preparation for β -exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, 298, 112–117.
 40. Paige, M. R. and Cooper, R. D., (1990) Scale-up of β -exotoxin production in fed-batch *Bacillus thuringiensis* fermentation. Proceeding of 5th Euro Congress Biotechnology, Vol II, Munksgaard International Publisher, Copenhagen, July 8–13, pp 146–159.
 41. Rodriguezpadilla, C., Galanwong, L., De Barjac, H., Romancalderon, E., Tamezguerra, R. and Dulmage, H., (1990) *Bacillus thuringiensis* neoleonensis serotype H-24, a new subsp. Which produces a triangular crystal. Journal of Invertebrate Pathology, 56, 280–282.
 42. Rowe, G. E. and Margaritis, A., (1987) Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 6, 87–127.
 43. Steinhaus, E. A., (1951) Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the α -caterpillar. Hilgardia, 20, 359–381.
 44. Sebesta, K., Horska, K. and Vankova, J., (1969) Inhibition of de novo RNA



- synthesis by the insecticidal exo toxin of *Bacillus thuringiensis* var. *elechia*.
Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 34, 1786–1791.
45. Sebesta, K., Farkas, J. and Horska, K., (1981) Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In Microbial control of pests and plants diseases, 1970–1980, (Burgess, H. D., ED), pp. 249-281, Marcel Dekker Inc. New York.
46. Tanigoshi, L. K., Mayer, D. F., Babcock, J. M. and Lunden, J. D., (1990) Efficacy of the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Lygus Hesperus* (Heteroptera : Miridae): Laboratory and field responses. Environmental Entomology, 83, 2200–2206.
47. Vargas, R., Chapman, B. and Penman, D. R., (2002) Effect of thuringiensin on cuticle development of immature stages of *Tetranychus urticae* Koch. Agricultura Technica (Chile), 62(2), 201–211.
48. Zhou, J. W., Chang, Y. F., Xu, Z. H. and Yu, Z. N., (2007) Production of thuringiensin by fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadensis* 032 with an improved pH-control glucose feeding strategy. Process Biochemistry, 42, 52–56.



A. 系統周邊設備

系統	儀器名稱	規格	品牌	型號
氣體供應系統	空氣壓縮機	10 Kg/cm ²	SWAN	DT-175-2C
	壓力調節器	0-60 psi		
	氣體流量控制 制器	0-100L/min	Brooks	5851E
	空氣過濾器	0-10 Kg/cm ²		
氣體分析系統	氣體乾燥機		Bio-Top	
	抽氣幫浦		Bio-Top	
	氣體流量控 制器	0-10 L/min	Dwyer	
	氧氣分析儀		Teledyne	
	二氧化碳分 析儀		Edinburgh	Guardian II
偵測及監控系 統	溶氧電極	PPM	Ingold	322756800
	酸鹼電極	pH 0-14	Broadley-J	F-635
	消泡電擊		Bio-Top	
	蠕動幫浦		Bio-Top	
資料擷取處理 系統	軟水機		Bio-Top	
	蒸汽鍋爐		Yiu-Lih	
	低溫循環水 槽		Firstek	
	加熱棒		Bio-Top	B403
	個人電腦	32 bit		586
	訊號轉換器			PCL-818L
	應用軟體			Genie 2.0



B. 蘇力菌素應用防制對象評估文獻報告

作者	防治對象	內容
Bond et al,1971	鱗翅目 (<i>Lepidoptera</i>) 雙翅目 (<i>Diptera</i>) 鞘翅目 (<i>Coleoptera</i>) 膜翅目 (<i>Hymenoptera</i>) 等翅目 (<i>Isoptera</i>) 直翅目 (<i>Orthoptera</i>)	防治能力研究
Cantwell et al,1983	馬鈴薯甲蟲	防治能力研究
Carlberg,1986	-	殺蟲作用機制研究
Carberg & Lindstrom,1987	蠅幼蟲	長時間抑制蠅幼蟲滋生
Ciordia & Bizzel,1961	線蟲	防治能力研究
Dubois,1986	吉普賽娥幼蟲	防治能力具有加成作用
Hoy & Quyang,1987	紅葉蟎	防治能力研究
Gardner,1988 Gardner et al,1986 Muller & Harper,1987	草地黏蟲幼蟲	蘇力菌內外毒素 不同混和比例之 交互作用之研究
Herbert & Harper,1985,1986	美洲棉鈴蟲	將低存活率達 93.3%
Herbert & Harper,1986	半翅目 (<i>Hemiptera</i>)	防治能力研究
Jaques et al,1989	鞘翅目幼蟲	防治能力研究



Kiselek,1975	脈翅目(<i>Neuroiptera</i>)	防治能力研究
Marjorie & Ouyang,1987	蟎類	防治能力研究
Mohd-Salleh & Lewis,1982	歐洲玉米螟 小地老虎 草地黏蟲 家蠅	殺蟲效果敏感性研究
Moiseenko & Barybkina,1977	初齡幼蟲	3日內殺蟲率 100%
Sebesta,1981	蠅類	施用後蠅類不能正常 發育導致化蛹不正常
Sebesta et al,1981	亞熱帶黏蟲	抑制黏蟲繁殖
Tangoshi et al,1990	盲椿若蟲	防治率 86-98%
Vankova,1978	-	殺蟲作用機制研究
Wilson et al,1984	苜蓿象鼻蟲	防治能力研究



C. 蘇力菌素對昆蟲毒性評估文獻報告

作者	高等,2000	Barjac、 Dedondor	Beebee、 Bond, 1973	Bond <i>et al</i> , 1969	Kim <i>et al</i> , 1973	Norris,1969	Sebesta <i>et</i> <i>al</i> , 1969	Toledo <i>et</i> <i>al</i> , 1999
試驗昆蟲	家蠅 (<i>Musca domestica</i>)	蠅類	蠅類	蠅類	蠅類	蠅類	大蠟螟	果蠅 (<i>ludense</i>) ¹ (<i>oblique</i>) ² (<i>serpentine</i>) ³
投予方式	餵飼 (10 天)	餵飼	注射	餵飼	餵飼	餵飼	餵飼	呼吸毒
結果 (LD ₅₀ 值)	2.39±0.19 ~ 7.83±0.17 (ppm)	2.42 (μg/g)	0.1~0.5 (μg/g)	3 (μg/g)	0.25~0.5 (μg/g)	0.5 (μg/g)	0.5 (μg/g)	0.641±0.064 _a 0.512±0.033 _{ab} 0.408±0.0019 _b (mg/cm ²)



D. 蘇力菌素對哺乳動物毒性評估文獻報告

作者	Beebee、Bond, 1973	Norris, 1969	Barjac, 未發表	Sebesta <i>et al</i> , 1969	蔡等, 1998	蔡等, 2003
試驗動物	大鼠	大鼠	大鼠	小鼠	大鼠	大鼠
有效成分	-	-	-	-	5.87%(CPC 萃取) ^a 7.20%(澱粉萃取) ^{b&c}	81 mg/kg
投予方式	注射	餵飼	餵飼	餵飼	胃管 ^{1&2} 呼吸毒 ³	呼吸毒
結果 (LD ₅₀ 值)	18 (μ g/g)	400~800 (μ g/g)	930 (μ g/g)	18 (μ g/g)	53.9 ^a 無任何中毒情形 ^b 71.8 ^c (mg/kg)	4.4 (mg/kg)



姓名：陳志榮

學歷：東海大學應用生命科學系(所) 學士 (2005)

朝陽科技大學生物技術研究所 碩士 (2007)

研究發表：

- (1) 陳志榮、楊晴淇、楊智添、曾耀銘 (2006) 「蘇力菌素(thuringiensin) 發酵生產之研究探討」，第十一屆生化工程研討會論文集，第 P7-007 頁，清華大學，新竹市。
- (2) 陳志榮、朱汶欣、楊晴淇、楊智添、曾耀銘 (2007) 「蘇力菌素 (thuringiensin) 發酵生產之研究探討」，第十二屆生化工程研討會論文集，第 178 頁，長庚大學，台北林口。
- (3) 徐銘豐、陳志榮、朱汶欣、曾耀銘 (2007) 「蘇力菌素先導型試量產應用之研究與探討」，第四十五屆農業化學研討會，台灣大學，台北市。