

104年度教育部推動技專校院與產業園區產學合作實施計畫成果報告

蘇力菌生物農藥與生物肥料生產製程最適化及田間試驗應用

計畫編號：

執行期間：105 年 06 月 01 日至 106 年 05 月 31 日

計畫主持人：鍾竺均

共同主持人：張晉峰

計畫參與人員：林思婷、何惘瑛、黃玉堂、林嘉慧

本成果報告包括以下應繳交之附件：

☐ 著作封面及目錄

☐ 專利證書影本

☒ 發表之論文封面及摘要或期刊封面及目錄

☐ 執行本計畫技轉合約書影本

執行單位：中華科技大學生物科技系

中 華 民 國 105 年 06 月 28 日

產業園區產學合作計畫結案摘要

計畫名稱	蘇力菌生物農藥與生物肥料生產製程最適化及田間試驗應用			
合作企業	漢寶工業有限公司		計畫主持人/ 學校/職稱	鍾竺均/中華科技大學/教授
參與計畫 學生數	博士後研究		碩士生	2
	博士生		大學生	2
計畫執行 概述	執行期程	民國 104 年 06 月 01 日起至 民國 105 年 05 月 31 日止	執行經費 教育部/學校/ 企業	36/10/50 萬元整
	產學合作解 決之問題或 開發之技術	協助企業開發具生物農藥與生物肥料功能之菌株，並建立生產與應用的相關試驗，輔導合作企業建立完整生產流程外，同時建立田間試驗模式進行產品確效與提供未來企業申請商品化過程的參考。		
計畫執行成效				
相關專利 申請說明	☐ 已獲得，專利類型/名稱：_____ ☒ 申請中 ☐ 未申請			
學生參與 計畫情形	☐ 考取相關證照（張數）：____； ☐ 完成相關專題製作（件數）：____ ☒ 完成相關技術報告/論文（篇數）： 1 ☐ 其他：_____			
企業滿意度 （請合作企業 說明）	☒ 非常滿意 ☐ 滿意 ☐ 大致滿意 ☐ 不滿意 ☐ 非常不滿意 相關說明： <u>要求團隊後續協助企業申請SBIR計畫</u>			
本案技術移轉 說明（含技轉 金額）	無			
其他成效說明	1.申請新型專利 1 件 2.參加台北國際發明展 3.協助廠商申請 SBIR 計畫(撰寫中) 4.國際 SCI 期刊投稿(撰寫中)			

中文摘要

計畫中，利用 5 公升發酵槽來評估蘇力菌在不同培養基與生產條件下，生產蘇力菌素與植物生長促進的潛力，並以液相層析儀來分析發酵過程中關鍵產物—蘇力菌素產量，並將所研發之多功能蘇力菌相關產品進行田間試驗，來測試生物肥料與生物農藥的效用。測試菌株 4M1, 4L1, 4k1, 4M2 與 4O1 在 7 天發酵的過程中，在第 5 天達到最高蘇力菌素生產量，其中又以 4M1 與 4L1 有最高生產量。測試菌株 4A1, 4M1, 4L1, 4k1, 4M2 與 4O1 皆表現出蛋白酶、澱粉酶、纖維素酶與溶磷活性，但缺乏脂解酶與溶鉀活性。4M1 相對於其他菌株有較佳的溶磷、蛋白酶、澱粉酶與纖維素酶的半定量比值 1.73 ± 0.08 , 1.77 ± 0.09 , 1.70 ± 0.24 與 1.45 ± 0.06 ，在溶磷定量分析結果顯示在第 7-14 天呈現最高溶磷量在 45.18 ± 0.18 - 48.80 ± 1.21 mg/mL。4M1 生產蘇力菌素的最佳培養條件為 25°C 溫度培養下，發酵槽轉速 400 rpm、曝氣量 2 vvm，添加 3% glucose 與 1% peptone 培養 120 小時有最高蘇力菌素 3048 ± 64 mg/mL 生產量。蘇力菌孢子與蘇力菌素田間應用結果顯示，可增加莧菜的生長率與產率，同時可以降低蟲害發生率。

關鍵詞：蘇力菌素、植物生長促進、生物農藥、生物肥料

英文摘要

In the present study, difference medium components and operating conditions were assessed for the production of thuringiensin and potential on promoting the plant growth by *B. thuringiensis* in 5L fermentation tank. A high-performance liquid chromatography was used to detect and quantify β -exotoxin production in *B. thuringiensis* culture supernatants. Finally, field conditions were used to confirm the performance of biopesticide and biofertilizer. Strains 4M1, 4L1, 4k1, 4M2 and 4O1 exhibited maximum Thu production at five day for 7 days incubation, among them, 4 M1 and 4L1 had the best performances. Strains 4A1, 4M1, 4L1, 4k1, 4M2 and 4O1 possessed protease, amylase, CMCase and calcium phosphate solubilization activities, but lacked lipase and kaolinite solubilization activity. 4M1 has the better P-solubilization, protease, amylase and CMCase semi-quantity activity ratio 1.73 ± 0.08 , 1.77 ± 0.09 , 1.70 ± 0.24 and 1.45 ± 0.06 and P-solubilization quantity activity 45.18 ± 0.18 - 48.80 ± 1.21 mg/mL at 7-14 days. The optimum conditions for the Thu production by 4M1 obtained from this experiment were 400 rpm rotating speed, 2 vvm aeration, 25°C incubation temperature, a growth period of 120 h, supplemented with 3% glucose and 1% peptone, 3048 ± 64 mg/mL Thu was obtained. *B. thuringiensis* spores and Thu field application increased the growth and yield and decrease insect pest of amaranth.

Keywords: thuringiensin, plant growth promote, biopesticide, biofertilizer

目錄

產業園區產學合作計畫結案摘要	I
中英文摘要	II
目錄	III
前言	1
計畫目的	3
合作方式	3
結果與討論	4
結論	7
參考文獻	9
附錄1：計畫成果自評表（如附表3）	11
附錄2：執行成效表格（如附表4）	12

前言

環境保護與食品安全的意識逐漸受到重視之下，減少化學性農藥與增加生物性農藥的使用，有越來越增加的趨勢。生物農藥相較於傳統化學農藥有危險性低、專一性高、對非目標生物傷害小與在環境中分解快速與無殘留量的問題。根據行政院農業委員會之定義，生物性農藥（生物製劑）係指天然物質如動物、植物、微生物及其所衍生之產品，包括「天然素材農藥」、「微生物農藥」、「生化農藥」及基因工程技術產製之微生物農藥。其中微生物製劑定義為，用於作物病原、害蟲、雜草防治或誘發作物抗性之微生物或其有效成分經由配方所製成之產品，其微生物來源可包括：細菌、真菌、病毒和原生動物等，一般由自然界分離所得，惟也可再經人工品系改良，如人為誘變、汰選或遺傳基因改造(農委會動植物防疫檢疫局與農藥資訊服務網)。天然環境中微生物種類繁多，且其產生之代謝產物更是多樣化，可能具有抗病、抗蟲、抑菌、除草、拮抗、誘導植物抗性與生長調節，甚至可增加產量等功效，然而，目前發展為農藥的種類仍然有限，因此，龐大的微生物資源便成為各界開發探索的目標。雖然目前生物農藥之銷售量僅佔全球農藥銷售量之 5.5%，然而生物農藥正以 15%之年成長率持續擴大市場佔有率，預計在 2050 年銷售額將激增為目前之 3 倍(Marrone, 2014)。綜觀目前生物製劑之商業化產品，以蘇力菌的研究與應用最完整，因此，發展蘇力菌相關之產品最具市場利基。然而，目前台灣生物農藥產值僅佔整體農藥產值之 0.3% 左右，遠低於國際的比重(5.5%)，顯示發展蘇力菌為主之產品，無論往國際或台灣生物農藥市場發展，皆具有相當大的空間並值得鼓勵投入(許等，2014)。

蘇力菌目前是全球生物農藥市場被使用最久且種類最多之商品(高，2010)，自 1938 年在法國出現第一個蘇力菌產品，至今全世界蘇力菌產品已超過 100 種以上。由於蘇力菌的專一性及其作用機制，目前被認為是蟲害防治的一種安全的選擇，也一直是有害生物綜合管理較佳的防治法。蘇力菌最早為日本學者Ishiwata於 1903 年由染病的家蠶*Bombyx mori*體內分離出來的。到了 1915 年學者Berliner將一批染病的地中海粉螟體內所分離的致病桿菌的型態、培養特徵和致病性作了描述後，才正式命名為*Bacillus thuringiensis* (蘇力菌)。蘇力菌屬於革蘭氏陽性(Gram positive)之好氣性產孢桿菌，常呈現長鏈鎖狀，廣泛地存在於土壤、養蠶業、田間、植物葉表、死亡昆蟲與廢水等自然環境中(DeLucca等，1981; DeLucca與Ciegler，1982; Ohba等，1984; Smith與Couche，1991; Kuo與Chak，1996; Mohammadi等，2006)。

目前已知蘇力菌會產生的殺蟲毒素，以胞外毒素為主，包括： α -外毒素(α -exotoxin)、蘇力菌素(thuringiensin)或稱為 β -外毒素(β -exotoxin)、 γ -外毒素(γ -exotoxin)、 δ -內毒素(δ -endotoxin)、不穩定外毒素(labile exotoxin)、水溶性外毒素(water-soluble exotoxin)及鼠因外毒素(mouse-factor exotoxin)，與毒素相關者則尚包括孢子(spores)及 Vips (vegetative insecticidal proteuns)等，總計九種物質(Rodriguezpadilla等，1990；Rowe 與 Margaritis，1987)。其中以 δ -內毒素與蘇力菌素，最常被使用在農業害蟲之防治上。 δ -內毒素，又稱殺蟲結晶蛋白。當昆蟲幼蟲食入殺蟲結晶蛋白時，在其腸道鹼性環境下將溶解，再藉由蛋白酶的作用，使其活性片段和構造片段的前毒素(pro-toxin)，活化成 60-70 kDa 的毒素(toxin)，進而與腸道上皮細胞結合，使昆蟲幼蟲腸道穿孔而死亡。由於，此類毒蛋白僅針對特定昆蟲(Feitelson 等，1992)，雖然專一性很高，但殺蟲害範圍較小。

蘇力菌素最早於 1959 年由McConnell 和Richard 由蘇力菌變種中所發現，又稱為蘇力菌 β -外毒素或蠅素，屬於核苷酸類物質(圖一)，此種毒素產生於蘇力菌的生長階段，具熱穩定性與水溶性對昆蟲有特定之毒殺作用。研究顯示，其具有相當廣泛之殺蟲效果，對於鱗翅目(Lepidoptera)、雙翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、膜翅目

(Hymenoptera)、等翅目(Isoptera)、直翅目(Orthoptera)、脈翅目(Neuroptera)、半翅目(Hemiptera)和異翅目(Heteroptera)等昆蟲均具有一定之致病性(Palma等, 2014)。蘇力菌素毒性作用的機制主要是由於其官能基之磷基(H_2PO_4^-)結構部分會與ATP相互競爭，進而抑制核糖核酸聚合酵素(RNA polymerase)之生化合成，而造成毒害效果(Sebesta等, 1981)，因此，蘇力菌素具有廣效性殺蟲作用，再加上其熱穩定性，以商業生產與應用的角度來看，其相較於 δ -內毒素具有較高的商業應用價值。

圖 1、蘇力菌素之化學結構式

去研究顯示許多 *B. cereus* 菌株或蘇力菌都具有植物生長促進的能力，例如：溶磷作用、產生吡啶-3-乙酸或茁長素、產生 1-胺基環丙烷-羧酸脫胺酶或產生載鐵物質(siderophore)來促進植物生長(de la Fuente-Salcido 等，2013)，而 *Bacillus* 屬的細菌由於具有產生孢子之能力，可抵抗不良生長環境條件，相較於其他屬細菌具有較佳的利用(環境適應)優勢。透過蘇力菌的植物生長促進機制，將可能固定大氣中的氮轉化為氮源供植物利用、溶解/釋放土壤中的礦物質(例如：磷或鉀)使植物有效吸收、提供植物適當之鐵質或是合成植物激素來幫助植物生長(Sivasankari 與 Anandharaj，2014)。此外，藉由此類生物性肥料之施用，進而減少化學性肥料的使用，發揮蘇力菌做為生物農藥與生物肥料之雙項功效。

計畫目的

生物農藥相較於化學農藥具有許多優勢，然而，由於較高的生產技術與價格以及田間施用的效率不佳而影響其推廣。蘇力菌生物農藥生產的效力，特別是有效成分的產生，與培養基的組成份與發酵的條件有關，加上生產過程使用原料的價格經常受原物料波動的影響有 35-59%的變動(Lachhab 等，2001)。因此，利用便宜及容易取得的原物料進行最佳生產條件的試驗工作，以利後續廠商進行量產與推廣，便成為很重要的首要目標。在本計畫中，利用傳統與非傳統的碳源與氮源來進行蘇力菌生產過程中重要的生物量、蘇力菌素生產與孢子形成的最佳化測試，同時評估這些原料在生產成本上的影響。本計畫在生產蘇力菌素的過程中，同時也評估菌株相關植物生長促進的功能，在利用發酵液製成蘇力菌素農藥商品過程中，菌體也可以進一步評估製作生物肥料。因此，具有開發成 2 種商品的應用潛力，具有極高的商業開發效益。本計畫主要需突破之技術瓶頸為：1)須篩選出具有蘇力菌素生產能力與具有植物生長促進能力的菌株；2)發酵過程中需測試出蘇力菌生產與菌株生物量產生的最佳條件；3)針對蘇力菌素對抗蟲害部分需建立實驗室毒力分析方法外，實際田間測試條件與方法也需確認。雖然有上述需要突破的技術瓶頸，但是這些條件的設立以及未來發展的生產與操作技術，確實也成為生物農藥市場與植物生長促進試劑市場部分提供良好的利基。

合作方式

台灣目前在蘇力菌生物農藥商品部分，主要還是仰賴進口，於農委會登記在案具有許可證的廠家中，大多數還是以進口為主，僅有少數廠家，例如：興農、福壽與嘉農可於國內自行生產。本計畫擬與「漢寶工業有限公司」進行合作，漢寶工業有限公司主要從事農藥原體、農藥、肥料成品與農業資材之研發與銷售，看好生物農藥在國際市場的商機與擬使公司的農藥產品更多元化，因此，近年投入生物農藥之研發，然而受限於公司本身之研發能量與資源，故於去年由本人透過「學界協助中小企業科技關懷計畫」(經費 7.2 萬)，協助該公司初步建立蘇力菌之發酵製程。本計畫則擬透過較完整之產學合作模式，使該公司研發人員及本校學生共同參與，在良好之研究互動下，共同建立符合經濟量產規模的商業化量產技術，包括：菌株培養、發酵、蘇力菌素萃取、純化等製程的標準化流程，並評估與測試與菌株相關植物促進之功能。同時利用本校雲林校區已建立之農場進行生物製劑的田間試驗。本計畫之執行，1)可協助該廠商建立菌株本身及其代謝物之種類與有效成分；2)建立包括量產技術的標準化製程；3)建立生產過程有效成分的之檢驗分析方法，以作為安全管理之技術依據；4)評估與測試相關植物促進功能性，提升未來產品的附加價值與 5)田間試驗結果則能提供商品配方與規格及建立正確使用方法，對於後續生物農藥登記申請也能提供測試方法標準化的參考依據。此研究之執行，該公司允諾將全力配合，因為計畫之成果將有助於公司之轉型(由原有之銷售農藥與肥料為主轉型為生產有機農業資材為主)，並成為

產學合作之典範企業。

結果與討論

菌種保存

為維持菌種的特性以應用在後續商業的生產上，保存上採取1)長期保存:菌株以30%的甘油當作抗凍劑存放於-80°C的條件下保存。2)短期保存:斜面培養後，存放於4°C的條件下保存。

溶磷鉀半定量活性測試

6株不同品系的蘇力菌(4A3、4K1、4L1、4M1、4M2、4O1)利用平板測試不同溶磷鉀活性的結果如表1所示。溶磷活性部分，測試菌株中4M1、4M2與4L1在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 為磷源的溶磷平板上25°C 5天培養條件下，相較於其他分離株顯示出較高的溶磷活性比值。25°C第5天時，這3株菌顯示 1.45 ± 0.06 、 1.22 ± 0.08 、 1.20 ± 0.04 的透明環比值，其中以4M1為最高。整體而言以4M1有最高比值，4M2次之，4A3的溶磷比值最低。在以Kaolinite為鉀源的溶鉀平板上皆無觀察到溶鉀透明環的現象，因此比值皆為1。

表 1. 利用半定量方法測定蘇力菌株的溶磷鉀活性

Strains	Halo size (cm) / colony size (cm)	
	P-solubilizing agar	K-solubilizing agar
4A3	1.10 ± 0.04	1 ± 0.00
4K1	1.13 ± 0.05	1 ± 0.00
4L1	1.20 ± 0.04	1 ± 0.00
4M1	1.45 ± 0.06	1 ± 0.00
4M2	1.22 ± 0.08	1 ± 0.00
4O1	1.17 ± 0.03	1 ± 0.00

脂肪、澱粉質、纖維素及蛋白質分解酵素半定量活性測試

利用平板測試不同酵素活性的結果如表2所示。在skim milk agar測試蛋白酶產生能力部分，25°C培養5天時測試菌株分別表現 1.39 ± 0.04 、 1.30 ± 0.05 、 1.35 ± 0.09 、 1.73 ± 0.08 、 1.38 ± 0.05 與 1.43 ± 0.01 的透明環比值，其中以4M1有最高蛋白酶活性比值，4O1次之，4K1的活性比值最低。在Tributylin agar上皆無觀察到脂解透明環的現象，因此活性比值皆為1。在cellulytic agar測試纖維素酶產生能力部分，25°C培養5天時測試菌株分別表現 1.39 ± 0.08 、 1.44 ± 0.12 、 1.33 ± 0.04 、 1.70 ± 0.24 、 1.62 ± 0.30 與 1.23 ± 0.09 的透明環比值，其中以4M1有最高纖維素酶活性比值，4M2次之，4O1的活性比值最低。在starch agar上測試澱粉酶產生能力部分，25°C培養5天時測試菌株分別表現 1.74 ± 0.05 、 1.11 ± 0.05 、 1.52 ± 0.03 、 1.77 ± 0.09 、 1.30 ± 0.02 與 1.15 ± 0.15 的透明環比值，其中以4M1有最高澱粉酶活性比值，4A3次之，4K1的活性比值最低。

溶磷活性定量結果

測試菌株利用不溶性磷酸鈣為磷源，測試在25°C時的溶磷能力。利用磷酸二氫鉀為標準品定量分析在420 nm波長下與鉬黃試劑反應後的吸光值進行定量分析，結果顯

示於圖 2 中。由磷酸鈣溶磷半定量分析結果中挑選 4M1 菌株進行溶磷定量分析。結果顯示，4M1 菌株在 25°C 溫度下培養時，溶磷效果持續上升至第 7-14 天到達最高溶磷量(45.18 ± 0.18-48.80 ± 1.21 mg/mL)後呈現下降趨勢，培養到 35 天時溶磷量呈現偏低的表現。本研究所測試的 4M1 菌株最高溶磷量 48.8 mg/l 與過去研究如 *Bacillus licheniformis* A3 於第 10 天時溶磷量 58.4mg/l (Chang 與 Yang, 2009)、*Paenibacillus kribensis* CX-7 於第 3 天時溶磷量 71.60 mg/l 與 *Arthrobacter* sp. 60.1 mg/l (Zhang 等, 2013) 的比較呈現相似的表現能力。本菌株也同時具有生產蛋白酶、纖維素酶、澱粉酶與蘇力菌素的能力，具有多功能性應用於有機農業對於肥料與蟲害防治方面。

表 2. 利用半定量方法測定蘇力菌株的各種酵素活性

Strains	Halo size (cm) / colony size (cm)			
	skim milk agar	tributyryn agar	Cellulytic agar	Starch agar
4A3	1.39 ± 0.04	1 ± 0.00	1.39 ± 0.08	1.74 ± 0.05
4K1	1.30 ± 0.05	1 ± 0.00	1.44 ± 0.12	1.11 ± 0.05
4L1	1.35 ± 0.09	1 ± 0.00	1.33 ± 0.04	1.52 ± 0.03
4M1	1.73 ± 0.08	1 ± 0.00	1.70 ± 0.24	1.77 ± 0.09
4M2	1.38 ± 0.05	1 ± 0.00	1.62 ± 0.30	1.30 ± 0.02
4O1	1.43 ± 0.01	1 ± 0.00	1.23 ± 0.09	1.15 ± 0.15

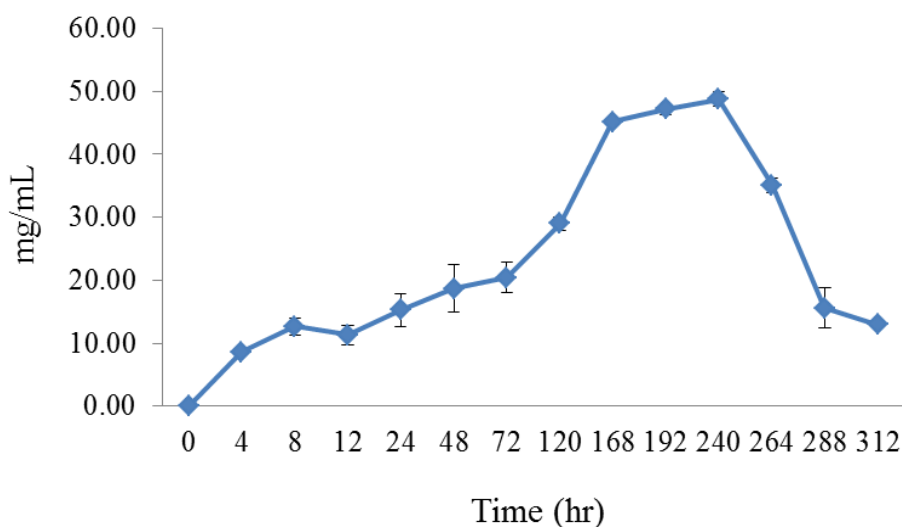


圖 2. 菌株 4M1 溶磷能力定量分析結果

蘇力菌素生產

純化後蘇力菌素標準品經 HPLC 分析後，在滯留時間 22.2 分鐘出現一明顯波峰。以 glucose 為碳源、peptone 為氮源，分析不同菌株發酵期間於不同階段蘇力菌素產生情形的結果如圖 2 顯示，受測的 6 株菌株中，除了 4A3 未偵測到蘇力菌素的產生外，菌株 4M1、4L1、4k1、4M2 與 4O1 的產量皆在第 5 天達到最高峰後呈現下降的趨勢。其中已以 4M1 與 4L1 有最高的蘇力菌生產量。由於 4M1 菌株在蘇力菌素的生產與植物生長促進能力相較於其他菌株有較佳的整體表現，因此後續最適化蘇力菌素發酵條件的測試以 4M1 為測試菌株進行試驗。

蘇力菌素發酵條件最適化分析

1. 不同碳源添加對菌株生產蘇力菌素的影響

分別添加1%葡萄糖、1%蔗糖與1%澱粉當作碳源的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(A)所示。添加葡萄糖、蔗糖與澱粉當作碳源時，在第5天時蘇力菌素生產量分別為 924 ± 30 mg/mL、 841 ± 46 mg/mL與 608 ± 36 mg/mL。其中以添加 1%葡萄糖當作碳源時蘇力菌素的表現量較高，因此以1%葡萄糖為最佳碳源添加量進行後續試驗。

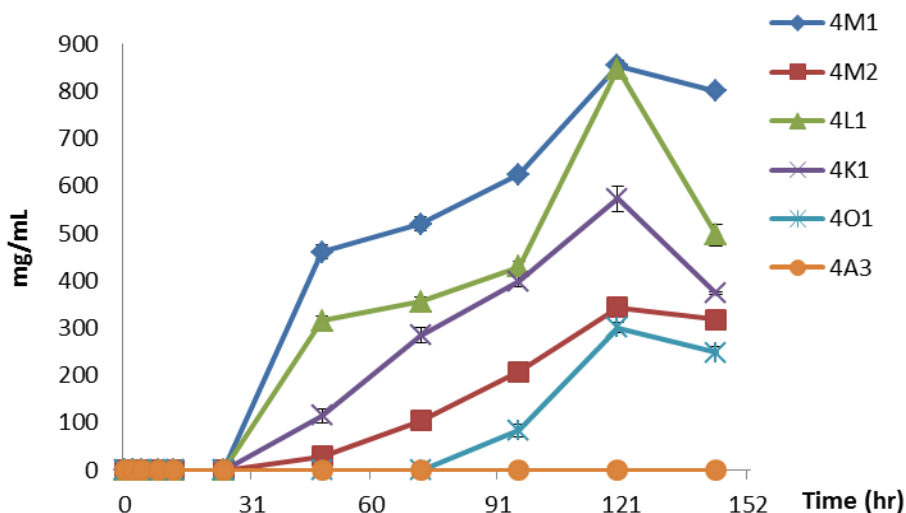


圖 3. 不同蘇力菌菌株在發酵培養過程中蘇力菌素產生情形

2. 添加不同比例葡萄糖對菌株生產蘇力菌素的影響

分別添加1%葡萄糖、2%葡萄糖與3%葡萄糖當作碳源的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(B)所示。添加1%葡萄糖、2%葡萄糖與3%葡萄糖時，在第5天時蘇力菌素生產量分別為 948 ± 25 mg/mL、 1430 ± 38 mg/mL與 1572 ± 53 mg/mL。其中以添加3%葡萄糖當作碳源時蘇力菌素的表現量較高，因此以3%葡萄糖為最佳碳源添加比例進行後續試驗。

3. 添加不同氮源對菌株生產蘇力菌素的影響

以3%葡萄糖為最佳碳源，並分別添加0.5%peptone、0.5% malt extract與0.5% NH_4SO_4 當作氮源的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(B)所示。添加0.5%peptone、0.5% malt extract與0.5% NH_4SO_4 不同氮源時，在第5天時蘇力菌素生產量分別為 1549 ± 75 mg/mL、 995 ± 125 mg/mL與 978 ± 93 mg/mL。其中以添加0.5%peptone當作氮源時蘇力菌素的表現量較高，因此以0.5%peptone為最佳氮源添加比例進行後續試驗。

4. 添加不同比例peptone對菌株生產蘇力菌素的影響

以3%葡萄糖為最佳碳源，並分別添加0.5%peptone、1%peptone與2%peptone當作氮源的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(C)所示。添加0.5%peptone、0.1%peptone與2%peptone不同氮源比例時，第5天時蘇力菌素生產量分別為 1624 ± 25 mg/mL、 2290 ± 3 mg/mL與 2044 ± 130 mg/mL。其中以添加1%peptone當作

氮源時蘇力菌素的表現量較高，因此以2%peptone為最佳氮源添加比例進行後續試驗。

5. 發酵槽不同轉速對菌株生產蘇力菌素的影響

以3%葡萄糖為碳源、1%peptone為氮源，並在發酵槽轉速分別為200 rpm、300 rpm與400 rpm的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(D)所示。發酵槽轉速分別為200 rpm、300 rpm與400 rpm的條件下，第5天時蘇力菌素生產量分別為 2290 ± 3 mg/mL、 2644 ± 123 與 2747 ± 134 mg/mL。其中以轉速為400 rpm時蘇力菌素的表現量較高，因此以400 rpm為最佳發酵槽轉速進行後續試驗。

6. 發酵槽不同曝氣量對菌株生產蘇力菌素的影響

以3%葡萄糖為碳源、1%peptone為氮源、發酵槽轉速400 rpm，並在空氣曝氣量分別為0.5、1.0與2.0 vvm的條件下，培養5天後4M1菌株產生蘇力菌素的結果如圖3(E)所示。發酵槽空氣曝氣量分別為0.5、1.0與2.0 vvm的條件下，第5天時蘇力菌素生產量分別為 2747 ± 134 mg/mL、 2934 ± 24 與 3048 ± 64 mg/mL。其中以曝氣量為2.0 vvm時蘇力菌素的表現量較高，因此以2.0 vvm為最佳發酵槽空氣曝氣量為最佳條件。

綜合上述結果顯示，利用3% glucose與1% peptone為培養基中的最佳碳源與氮源比例，接種4M1菌株，在溫度25°C，發酵槽轉速400 rpm與空氣曝氣量為2 vvm的條件下，有 3048 ± 64 mg/mL最佳蘇力菌素生產表現。

田間試驗結果

植物主要挑選葉菜類植物莧菜進行測試。葉菜類一般較不具耐熱性，莧菜的耐熱性佳，夏季高於40°C的環境下商業生產的葉菜類，只有莧菜一種，而且可以連續生產，較少土地連作的問題，由於有耐熱及適應性廣泛等優點，所以成為夏季主要葉菜類之一。莧菜之蟲害並不嚴重，主要為雜食性的斜紋夜盜蟲，由於莧菜對藥劑較敏感，容易產生藥害，因此蟲害防治較為困難。肥料施用時需注意若太早施用，或濃度太高，對植株生育會受到影響，因此，選用本計畫蘇力菌素與蘇力菌孢子當作生物農藥與生物肥料來進行測試對現菜生長過程的影響是否能降低蟲害與增加植物生長，結果顯示如表4;圖4。生物肥料效力結果顯示，噴灑蘇力菌發酵液含孢子的植株生長情況與控制組相較有較佳的生長表現，而與添加化學肥料的組別相較則顯示相似的結果，因此表示利用該發酵液具有取代化學肥料的潛力。在生物農藥效力結果顯示，噴灑蘇力菌發酵液含蘇力菌素的植株生長情況與控制組相較少的蟲害表現，因此表示利用該發酵液具有取代一般農藥的潛力。

結論

本計畫篩選出具有較佳蘇力菌生產能力與植物生長促進能力的4M1菌株，同時也定量分析該菌株對鈣磷的溶磷效果與5L發酵槽蘇力菌素生產最佳化條件的測試。應用發酵產物蘇力菌素與蘇力菌孢子對於植物生長與蟲害防治的田間試驗部分也顯示出良好的成效，具高度潛力進行具生物農藥與生物肥料雙重效力商品的開發，此為文獻中與市場首見。

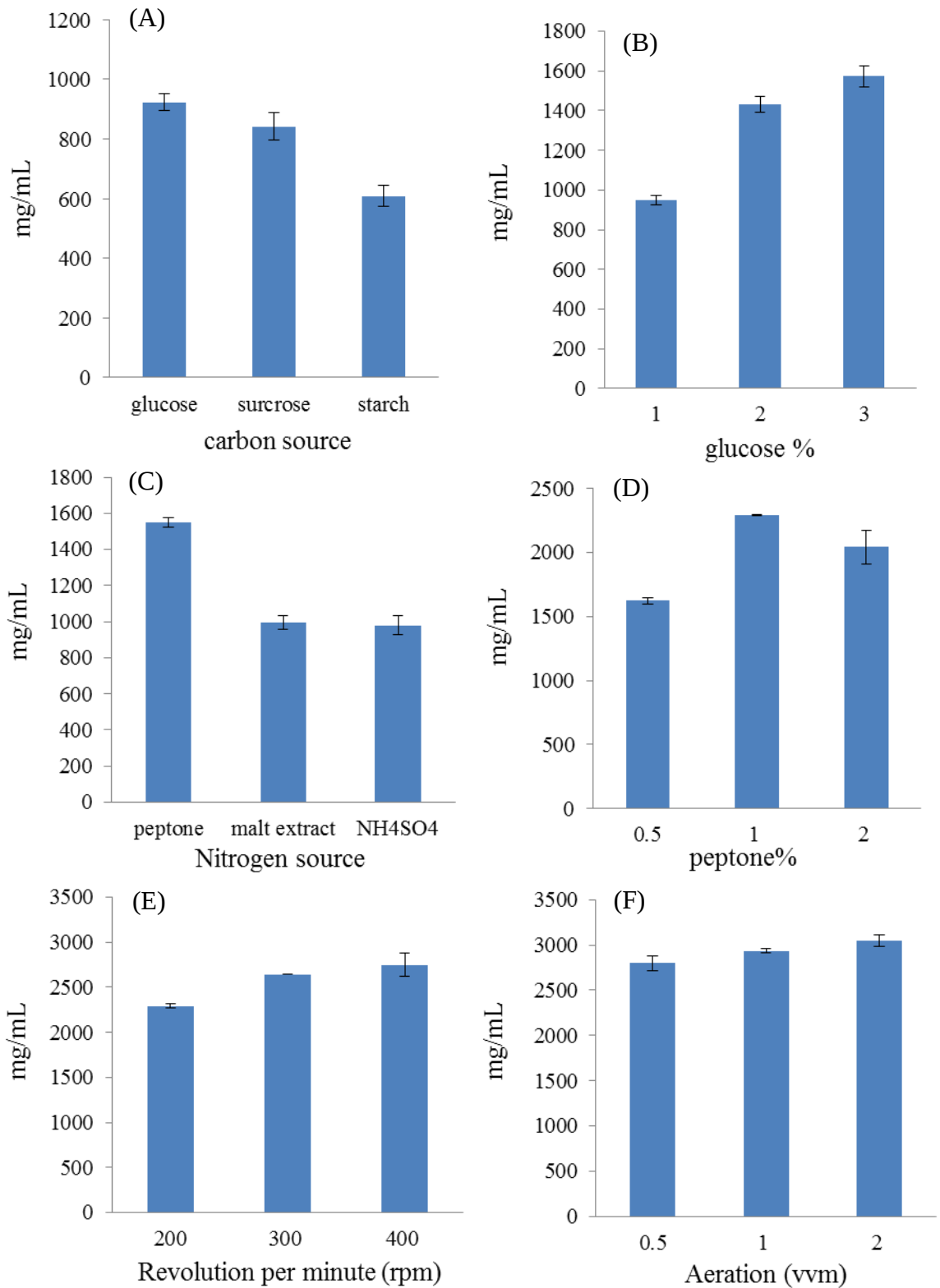


圖 4.接種 4M1 菌株在 25°C 培養下，蘇力菌素最佳發酵條件測試(A)不同碳源測試; (B)不同濃度 glucose 測試; (C)不同氮源測試; (D)不同濃度 peptone 測試; (E)不同轉速測試; (F)不同曝氣量測試

表 4. 蘇力菌素(300 mg/mL)與蘇力菌孢子(10^8 CFU/ml)對於植物生長過程的影響

Treatment	Height (cm)	No. of leaves	Yield (g/m ²)	No. of galls/plant	No. of worms/m ²
Control	16.2± 0.5	8.2±0.7	30.25±0.51	10±2	8±3
Chemical fertilizer	22.9± 0.9	9.0±0.3	61.31±0.70	11±3	8±3
Broth	23.6 ± 0.8	9.3±0.3	63.23± 0.34	3±1	2±1



圖 4. 莧菜田間試驗狀況(a)種植初期(b)噴灑發酵液 3 周後

參考文獻

- 許華芳、王堂凱、張瑞璋。2014。生物農藥管理現況與展望。臺中區農業改良場特刊。121:1-12。
- 高穗生。2010。微生物農藥研發進展與產業潛力。農業生技產業季刊。24:28-37。
- 陳志榮。2006。蘇力菌素(thuringiensin)先導型試量產與應用之研究探討。朝陽科技大學生物科技研究所碩士論文。
- 曾耀銘、吳文騰、高穗生、王順成。2000。生物農藥—蘇力菌素的研究開發。科學發展月刊。28(5):350-353。
- 農委會動植物防疫檢疫局與農藥資訊服務網，
<http://pesticide.baphiq.gov.tw/web/briefDetailView.aspx?sn=26>
- Alves, L.F.A., S.B. Alves, R.M. Pereira and D.M.F. Capalbo. (1997) Production of *Bacillus thuringiensis* berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Sci Technol* 7:377-383.
- Ankolekar, C., T. Rahmati, and R.G. Labbé. (2009) Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol.* 128(3):460-466
- Arcas, J., O. yantorno, E. Arraraãs and R. Ertola. (1984) A new medium for growth and δ -endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol Lett* 6: 495-500.
- Asano, S.I., Y. Nukumizu, H. Bando, T. Iizuka and T. Yamamoto. (1997) Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 63(3):1054-1057.
- Baumann, L., K. Okamoto, B.M. Unterman, M.J. Lynch, and P. Bauman. (1984) Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J Invertebr Pathol* 44:329-341.
- Carlson, C.R. and A.B. Kolstø. (1993) A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J Bacteriol* 175:1053-1060.
- Carlson, C.R., D.A. Caugant and A.B. Kolstø. (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol.* 60:1719-1725.
- Couch, T.L. and D.A. Ross. (1980) Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*.

- Biotechnol Bioeng 22:1297–1304.
- de la Fuente-Salcido, N.M., L.E. Casados-Vázquez, and J.E. Barboza-Corona. (2013) Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can J Microbiol*. 59(8):515-522.
- DeLucca, I.A.J. and A. Ciegler. (1982) *Bacillus thuringiensis* in grains elevator dust. *Can J Microbiol* 28(4):452–456.
- DeLucca, I.A.J., J.G. Simonson and A.D. Larson. (1981) *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can J Microbiol* 27(9):865–870.
- Devidas, P.C., B.H. Pandit, and P.S. Vitthalrao. (2014) Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/273030.
- Feitelson, J.S., J. Payne and L. Kim. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnol* 10:271–275.
- Kuo, W.S. and K.F. Chak. (1996) Identification of a novel Cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl Environ Microbiol* 62:1369–1377.
- Lachhab, K., R.D. Tyagi, J.R. Valéro. (2001) Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochem* 37:197–208.
- Marrone, P. G., (2014) The Market and Potential for Biopesticides-*Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, pp 245–258.
- Mohammedi, S., S.B. Subramanian, S. Yan, R.D. Tyagi and J.R. Valéro. (2006) Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. *Process Biochem* 41:829–835.
- Ohba, M., K. Aizawai, S. Sudo. (1984) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Fukuoka prefecture Japan. *Proc Assoc Plant Prot Kyushu* 30:152–5.
- Poopathi S., and B. B. Archana. (2012) Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Indian J Exp Biol*. 50(1):65-71.
- Poopathi S., C. Mani, G. Rajeswari. (2013) Potential of sugarcane bagasse (agro-industrial waste) for the production of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Trop Biomed*. 30(3):504-515.
- Rodriguezpadilla, C., L. Galanwong, H.D. Barjac, E. Romancalderon, R. Tamezguerra and H. Dulmage. (1990) *Bacillus thuringiensis* subspecies *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *J Invertebr Patholo* 56:280–282.
- Rowe, G.E. and A. Margaritis (1987) Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Crit Rev Biotechnol* 6:87–127.
- Salama, H.S., M.S. foda, M.H. Selim and A. Elsharaby (1983) Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Zbl Mikrobiol* 83:553–563.
- Sebesta, K., J. Farkas and K. Horska. (1981) Thuringiensin, the β -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In *Microbial control of pests and plants diseases, 1970–1980*, (Burges, H. D., ED), pp. 249-281, Marcel Dekker Inc. New York.
- Sivasankari, B. and M. Anandharaj. (2014) Isolation and molecular characterization of potential plant growth promoting *Bacillus cereus* GGBSTD1 and *Pseudomonas* spp. GGBSTD3 from vermisources. *Adv Agri* 2014:1-13.
- Smith, R. and G.A. Couche. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 57:311–315.

(附表 3)計畫成果自評表

量化成效指標		成效（數量）
1.發表論文數	1-1 國際期刊論文（篇）	0
	1-2 國內期刊論文（篇）	0
	1-3 國際研討會論文（篇）	0
	1-4 國內研討會論文（篇）	1
2.專利已申請件數	2-1 發明專利數（件）	0
	2-2 新型專利數（件）	1
	2-3 設計專利數（件）	0
3.專利核發件數	3-1 發明專利數（件）	0
	3-2 新型專利數（件）	0
	3-3 設計專利數（件）	0
4.技術移轉件數與金額	4-1 技術移轉件數（件）	0
	4-2 技術移轉合計金額（元）	0
5.產學合作件數與金額	5-1 產學合作件數（件）	1
	5-2 產學合作合計金額（元）	50 萬
6.人才培訓成效	6-1 指導碩博士論文數（篇）	0
	6-2 指導學生實務專題數（件）	0
	6-3 學生參與計畫人數（人）	4
7.反饋教學成效	7-1 教材開發數量（件）	1

說明：1.計畫成效調查需與當年度執行教育部產業園區產學合作計畫直接產出相關，始可填入。

2.計畫主持人需提供成效佐證資料（含結案報告封面所示應繳交附件及附表 4，無成效頁面不需檢附）。

(附表 4)執行成效表格

一、發表論文數

(一) 國際期刊論文

項次	作者	論文名稱	期刊名稱	期卷數(含頁碼)	日期(例: yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(二) 國內期刊論文

項次	作者	論文名稱	期刊名稱	期卷數(含頁碼)	日期(例: yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(三) 國際研討會論文

項次	作者	論文名稱	參與研討會名稱	講義(含頁碼)與活動地點	日期(例: yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(四) 國內研討會論文

項次	作者	論文名稱	參與研討會名稱	講義(含頁碼)與活動地點	日期(例: yyyy/mm/dd)
1.	張晉峰、何惘瑛、林思婷、鍾竺均	蘇力菌素生產菌株的篩選與植物生長促進能力分析	第七屆健康科技發展教學研討會	p.57-68/台北	2016 年 05 月 13 日
2.					

二、 專利申請數

(一) 發明專利

項次	專利名稱	發明人	申請國別	申請編號	申請日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(二) 新型專利

項次	專利名稱	發明人	申請國別	申請編號	申請日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.	結合蘇力菌素生物農藥 與植物生長促進生物肥 料功能之結構	張晉峰、鄧啓銘、鍾竺 均、林思婷、何幗瑛	台灣	P580140	2016/06/02
2.					

(三) 設計專利

項次	專利名稱	發明人	申請國別	申請編號	申請日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

三、 專利核發件數

(一) 發明專利

項次	專利名稱	發明人	獲准國別	專利編號	獲准日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(二) 新型專利

項次	專利名稱	發明人	獲准國別	專利編號	獲准日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

(三) 設計專利

項次	專利名稱	發明人	獲准國別	專利編號	獲准日期 (例：yyyy/mm/dd)
1.					
2.					

四、 技術移轉件數與金額

項次	技術名稱	合作廠商	技轉金額(單位：元)	簽約日期(例：yyyy/mm/dd)
1.				
2.				

五、產學合作件數與金額

項次	計畫名稱	合作廠商	合作金額(單位：元)	簽約日期(例：yyyy/mm/dd)
1.				

六、人才培訓

(一) 指導碩博士論文數

項次	指導老師(含共同指導)	論文名稱	學生姓名	指導學年度(例：104 學年度)
1.				
2.				

(二) 指導學生實務專題數

項次	指導老師(含共同指導)	專題名稱	學生姓名	指導學年度(例：104 學年度)
1.				
2.				

(三) 學生參與計畫人數

項次	學生名字	系所	協助項目
1.	何憫瑛	生物科技系	菌株篩選、蘇力菌蘇生產條件測試、植物生長能力分析
2.	林思婷	生物科技系	菌株篩選、蘇力菌蘇生產條件測試、植物生長能力分析
3.	黃玉堂	生物科技系健康科技碩士班	協助生物肥料與生物農藥實場測試
4.	林嘉慧	生物科技系健康科技碩士班	協助生物肥料與生物農藥實場測試

七、教材開發數量

項次	教材名稱	授課系所
1.	生物農藥與生物肥料的應用	生物科技系