

## 黑殭菌微膠囊化之製備

劉清標\*、王亞慶\*\*、劉顯達\*\*\*

### 摘要

對於植物病蟲害防治而言，如何能克服微生物製劑在田間存活時間，發揮特有菌種活性，以達到有效防治植物病蟲害，微膠囊化技術扮演重要之角色。本研究選取具優異活性之菌株，黑殭菌(*Metarhizium anisopliae* MA126)，將真菌孢子微膠囊化。微膠囊的基材利用褐藻膠(alginate)、幾丁聚醣(chitosan)等，以研發能分解控制孢子釋放與抗紫外線功能之包覆材料。試驗結果，利用均質機及震盪攪拌方式，以 4% 褐藻酸鈉(sodium alginate)，添加 0.03% 之 hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) 等生物可分解聚合物，並加入植物油、橄欖油或葵花油等和 0.2% Tween 80 以增加乳化包覆保存性，在 10% 氯化鈣溶液中形成膠囊硬化，膠囊形成多一層包覆效果，可使性質更穩定，包覆率約 70%。由顯微鏡觀察粒徑分佈在 10~20  $\mu\text{m}$  之間，本研究以微膠囊化包覆方式開發生物殺蟲製劑，陸續探討膠囊化之理化性質，期能延長生物製劑之使用期限。

關鍵詞：蟲生真菌生物殺蟲製劑、黑殭菌、褐藻酸鈉、微膠囊化

---

\*美和技術學院生物科技系助理教授

\*\*美和技術學院生物科技系學生

\*\*\*美和技術學院生物科技系教授

## 壹、前言

台灣因地理環境及氣候關係，作物病蟲害種類繁多，對於植物病蟲害之防治，以往均使用化學農藥，造成對人畜之危害與環境污染，對生態平衡造成極大破壞。本省地窄人稠，若不能節制使用化學藥劑與有效的抑制病蟲害，其受害亦最深(羅，2004)。因此，積極尋求其他替代方式，成為各研究學者及專家努力之目標。而植物保護生物製劑，適時成為化學農藥之最佳替代品。目前國內之相關研究，在病蟲害之防治應用上，成果有目共睹，但是實際商品化之應用上，受限因素仍多，最主要在於如何克服微生物製劑在田間存活時間，且仍然保有菌種活性，以有效防治植物病蟲害之作用。

對於生物殺蟲劑在製備及推廣過程中，維持供試菌株之活性相當重要。不但要延長保存期限，保持活性，並且要方便使用，不會對土壤造成二次污染。林和劉(2004)從田間分離蟲體所得之四個菌株，結果得知其中兩株在蚜蟲殺死率之防治有效，分別為黑殭菌(*M. anisopliae* MA126)及蠟蚧輪枝菌(*V. lecanii* VL615)，利用蟲生真菌於溫室中防治桃蚜，經不同天數後桃蚜對高麗菜之危害指數 Infestation index(INFI)，在 25.5°C、98.2% R.H 之溫室條件，以蠟蚧輪枝菌 VL615 對桃蚜之防治效果較好，INFI 值為 1.0，其次為黑殭菌 MA126，INFI 值為 1.5；在 32°C、100% R.H 之生長箱條件，以黑殭菌 MA126 對桃蚜之防治效果較好，INFI 值為 1.67，而蠟蚧輪枝菌 VL615，INFI 值為 2.33；因為蟲生真菌在蚜蟲等之生物防治上，對於蚜蟲等致死率效果良好。其中蠟蚧輪枝菌，在台灣秋、冬低溫之季節，可施用此菌株來防治蚜蟲等病蟲害；春、夏較高溫之季節，可改用黑殭菌菌株來噴施。Hall(1976)之報告指出，於實驗室進行蟲生真菌對蚜蟲之生物檢測，其蚜蟲死亡率是隨著施用孢子濃度的增加而提高，此結論與林和劉(1994)之實驗報告室內生物檢測結果是一樣，所使用之供試菌株，其孢子濃度分別為  $1 \times 10^7$  conidia/ml、 $1 \times 10^8$  conidia/ml，其中每個菌株皆以  $1 \times 10^8$  conidia/ml 濃度對蚜蟲之死亡率為最高，但因為蚜蟲種類之不同，其感染死亡率也有差異，當孢子濃度為  $1 \times 10^8$  conidia/ml 感染 7 天觀察其死亡率，偽菜蚜、桃蚜及棉蚜皆以黑殭菌 MA126 菌株有最高之死亡率。一般真菌的特性，均需有高溼度環境，才能促使分生孢子發芽，Ferron(1978)報告指出 Deuteromycetes 的分生孢子在 92% R.H.以上才會發芽，而 Entomophthorales 則需在 100% R.H. 分生孢子才能發芽，因此，以蟲生真菌防治害蟲，在溫室內使用有其優點，可利用人為方式控制溫度及溼度，使其適合感染昆蟲，提高防治害蟲效果。對黑殭菌而言，至今並未普遍使用，也少有相關之商品生產、販售。回顧十年來的研究報告，歸納其原因有二項，其一乃為該菌包括大多數生物製劑，在田間受到自然界不良環境之影響，使施用效果不穩定，導致田間施用效果不如預期，其二則是該菌產品不易保存貯架壽命短，因此，影響到商品販賣及推廣。雖然

黑殭菌有此缺點，但在殺蟲能力及安全性方面卻不容忽視。

微膠囊化選擇包覆的材料，意指應避免有害溶劑，熱或高剪切力參與之包材。使用成膠性的蛋白質或多醣類等天然聚合物，如洋菜膠、鹿角菜膠、褐藻膠等，為較溫和且生物相容性高的膠囊化材質，但前兩者的製備，需要高溫加熱溶解膠體，再藉由降溫達到凝膠目的，不利於對溫度敏感性高物質之包覆。而褐藻酸鈉是最廣被使用的固定化工具，相關之研究報導也很多(Chan 等，2000；Strand 等，2002；Lee 等，2003；Rosenberg 等，2004；Zhang 等，2005；Catarina 等，2006)。褐藻酸鈉是由 D-甘露糖醛酸 (D-mannuronic acid)以  $\beta$ -(1,4) 鍵結，及 L-古洛糖醛酸(L-guluronic acid)以  $\alpha$ -(1,4) 鍵結，上述兩種單體所組合而成之線性高分子多醣類聚合物。利用褐藻酸鈉其優點為 1. 成本低。2. 生物相容性高。3. 無毒性。4. 操作條件溫和且簡易。因此，採用為本實驗之主要材質。利用微膠囊化包覆微生物，延長生物製劑之使用期限，發揮特有菌種活性，且能達到定時釋放效果，以有效防治植物病蟲害之作用，為本研究之目的。

## 貳、材料與方法

選取具優異殺蟲效果之黑殭菌 *Metarhizium anisopliae* MA126 菌株為主，由劉顯達教授提供。利用微膠囊方式進行各項試驗，希望能開發生物微膠囊殺蟲製劑，以延長使用壽命，為本研究主要工作。

### 1. 供試菌株培養

從供試菌株，黑殭菌 *M. anisopliae* MA126，以 Sabouraud dextrose agar (peptone from meat 5 g ; peptone from casein 5 g ; D(+)-glucose 40 g ; agar 15 g/L ; 以下簡稱 SDA)作為培養基，放置於 28°C、8 hr 光照 16 hr 黑暗處理(8 L : 16D)之培養室，待其一週後長出菌絲及孢子，再重複進行繼代培養，菌種孢子來源，則利用白米為材料，以太空包固態培養方式，於室溫培養 14 天，再置於 40°C 烘乾過夜，過篩可收集大量孢子；或利用培養皿方式，用 0.1% Tween 80 或利用無菌水(10%甘油及 90%去離子水)將孢子洗下回收(鄒，2005)置冰箱保存，以進行各階段之實驗。

### 2. 菌株生理性質測定:

- (1) 形態觀察: 以光學及電子顯微鏡，觀察菌株外型。
- (2) 生理性質: 染色及生化性質測定，了解各菌株的基本性質。
- (3) 生長速率: 在液態培養中菌落生長的速率，測其 600 nm吸光值，了解生長曲線。
- (4) 最適生長溫度: 分別在 20、25、28、30、35°C 下培養，測其最適生長溫度。

### 3. 微膠囊製備法 (Lee等, 2003) :

研究採用 Lee 等人之方法, 作修飾改進而以褐藻酸鈉為材料, 為避免包覆之菌劑快速釋放, 褐藻膠與聚合物以塗佈(coating)和混合(blending)方式進行研究。A. 褐藻膠塗佈聚合物: 首先以 4% 褐藻膠溶液與 HPMC 攪拌均勻與實驗菌劑, 在植物油與 Tween 80 表面乳化劑作用下, 在 8,000 rpm 轉速下均質十分鐘, 兩者之比率褐藻酸鈉與菌劑是以 4:1 比率進行, 再慢慢注入 10% CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 樣品最後經過水洗、過濾、乾燥後回收待試驗。B. 褐藻膠混合聚合物: 以 4% 褐藻膠溶液加上 0.5% Chitosan (溶於 0.5% acetic acid 中), 充分攪拌可增進聚合物之流動性與塑性。聚合物與菌劑在植物油與 Tween 80 作用下, 在 8,000 rpm 均質十分鐘, 再注入於 10% CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 形成 alginate microspheres, 浸製 microspheres 於聚合物中, 攪拌廿分鐘, 樣品最後經過充分水洗、過濾、乾燥後回收於 4°C 保存待分析。

### 4. 利用各種植物油進行微膠囊化

上述實驗步驟, 分別利用六種不同植物油如橄欖油、葵花油、花生油、沙拉油、酥烤油、精緻橄欖油等, 探討其對微膠囊化形態生成之影響。

### 5. 微膠囊之性質測定

- (1) 微膠囊化之穩定性: 分析方法可用活菌數測定方式, 以了解菌體在微膠囊化後之穩定性。
- (2) 微膠囊化釋放率: 對於釋放率之分析, 在 pH 7.4 之 PBS 生理食鹽水, 於 0、1、5、10、30 min 及 1 hr 和 2 hr 定時取樣, 於光學顯微鏡觀察其孢子及菌絲等釋放情形。
- (3) 表面觀察: 在光學顯微鏡下觀察微膠囊形態, 以掃描式電子顯微鏡觀察樣品表面超微結構。
- (4) 低溫噴霧乾燥: 建立低溫噴霧乾燥黑殭菌微膠囊之技術, 確定製劑活性與保存期限, 操作條件入風口溫度: 50°C、出風口溫度: 28°C、流速: 0.14 L/h、壓力: 8 kg/cm<sup>2</sup>。

電顯樣品製備方式如下(Liu等, 2001; 2005) :

掃描式電子顯微鏡之觀察:

微膠囊或菌體充份以 pH 7.4 之二甲砷酸鈉水洗 3 次, 以 3,000 x g 離心 10 分鐘並去水層, 進行前固定步驟; 加入 2.5% 戊二醛在 4°C 下持續攪拌 2 小時, 菌體再以 buffer 水洗 3 次, 3,000 x g 離心 10 分鐘去水層, 接著進行後固定步驟; 樣品經前、後固定、系列脫水過程, 同穿透式樣品處理步驟, 進行樣品乾燥, 用 CO<sub>2</sub> 臨界點乾燥裝置, 加溫至 31°C, 壓力為 1,070 psi 保持 8 分鐘, 取出乾燥樣品, 平貼於有雙面膠之鋁檯上。移至離子鍍膜機上於真空下鍍金 3 分鐘, 最後利用掃描式電子顯微鏡 (JEOL JSM-6300) 於 15~20 KV 加

速電壓，工作距離為 30 cm 下，進行微膠囊或菌體表面形態觀察。

### 6. 儀器與材料

微膠囊乳化聚合製備方法採用 VORTEX-GENIE 2 振盪機，Spire Mixer 5100 及 IKA T18 高速均質機進行微膠囊化。低溫噴霧乾燥機 YK-100(主典)，氯化鈣(林純藥工業株式會社)，polyoxyethylene sorbitan monolate，acetic acid (Nacalai tesque)，chitosan，hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)，褐藻酸鈉 (alginate sodium salt from brown algae)(Sigma, USA)，SDA (Sabouraud dextrose agar) (Difco, Sparks, USA)。

## 參、結果與討論

黑殭菌 *M. anisopliae* MA126，對於不同生長溫度比較，結果以 25~28°C 生長佳，35°C 即生長遲緩，其中以生長條件在 28°C 下，無論照光與否在固態或液體培養基中，均生長良好，測其 600 nm 生長曲線，在第七天可達靜止期。對於菌種孢子來源，則利用太空包固態培養方式白米為材料，接入黑殭菌後，於室溫培養 14 天，再置於 40°C 烘乾過夜，過篩可收集大量孢子，以進行各階段之實驗。培養階段黑殭菌孢子呈現墨綠色，菌絲較細長，黑殭菌經平板培養生長 7 天後，外型似蕈狀，生長至 14 天後，再置久顏色變灰黑色，經平板培養之分生孢子，孢子大小為 7.5~10  $\mu\text{m}$ 。探討微膠囊最適包覆條件，利用不同植物油、Tween 80 濃度、HPMC、不同 pH 之氯化鈣濃度及攪拌速率，探討對微膠囊大小之影響。以各種植物油而言，不同植物油對微膠囊形態之影響，結果如表 1 所示，以葵花油、橄欖油及沙拉油在包覆效果上比其他種油品穩定，實驗後來均利用葵花油，作後續實驗，因該油乳化性較穩定，因每種油品 pH 質差異很大，粘稠及乳化均勻度，也是影響包覆效果之因素。表 2 為不同 Tween 80 濃度對微膠囊形態之影響，結果顯示當乳化劑濃度在 0.2% 乳化情形較好。表 3 為不同 HPMC 濃度對微膠囊形態之影響，添加 0.03% 之 HPMC 聚合物，對包覆效果佳。表 4 為不同 pH 之氯化鈣對微膠囊形態之影響，在 pH 5~6 時氯化鈣對於微膠囊顆粒形態成形較理想，表 5 與表 6 顯示攪拌速度與氯化鈣濃度對微膠囊形態之影響，對於粒子大小及混合均勻度有極大影響。如果攪拌速度不夠，樣品將凝聚成一團，無法形成大小適中之顆粒，其中又以均質機因轉速高攪拌效果較震盪方式好，不會有結塊情形，且顆粒分佈較小。

微膠囊化之製備，研究發現以 4% 褐藻膠，添加 HPMC 等生物可分解聚合物，並加入植物油增加包覆保存性，在 10% 氯化鈣溶液中形成膠囊硬化，形成多一層包覆效果，可使微膠囊性質更穩定，條件、試劑濃度控制好，褐藻膠形成之微膠囊電顯圖，其大小分佈在 10~40  $\mu\text{m}$  之間 (如圖 1)。因此，褐藻膠作為主要包覆材質。利用均質設備，將微膠囊顆粒大小最小化，安定性更好，使

其更能有效利用。黑殭菌之包覆利用 4%褐藻膠，添加 0.03% HPMC 等聚合物與 10%氯化鈣溶液中形成膠囊化，可形成良好包覆效果，包覆率可達 70%以上，而且在各種蔬菜油質中，以橄欖油和葵花油與 0.2% Tween 80 包覆效果最好。在微膠囊研究中，黑殭菌孢子，從光學顯微鏡觀察，可見其包覆情形(如圖 2~圖 3 所示) 以震盪方式包覆黑殭菌孢子，形態大小在 10 ~ 30  $\mu\text{m}$  之間，以均質機方式加入 HPMC 包覆黑殭菌孢子，形態大小 7.5 ~ 15  $\mu\text{m}$  之間。其中以均質機因轉速高，攪拌效果較震盪方式好，不會有結塊情形，且顆粒分佈較小。在孢子存活率之探討，去年 8 月包覆之微膠囊樣品，在 SDA 培養基中仍能生長出菌落，存活率可達 80%以上。因本菌株屬較耐 UV 之菌種，因此在照射 UV-B 312 nm 波長下，在數分鐘至兩小時仍可生長，實驗亦探討其他性質，包括添加 skimmed milk 等，作為微膠囊之 UV 保護劑，另以磷酸緩衝液，可控制其緩釋之效果。

探討微膠囊釋放率，以乾燥後之微膠囊顆粒，利用磷酸緩衝液(PBS) pH=7.4，分別在不同時間，利用光學顯微鏡，觀察孢子、菌絲等釋放情形，結果顯示在加入 PBS 後，其中在加入 5~10 分鐘後，菌絲體等釋放情形最明顯，顯然釋放快慢與褐藻膠與 HPMC 濃度有關。利用此方法以利供噴灑於植株上，相對在弱酸性及室溫下仍能保存其使用期限，是本研究之目的。圖 4 嘗試利用低溫噴霧乾燥機方式，加入 HPMC 包覆黑殭菌孢子，結果形成之顆粒大小在 20 ~ 60  $\mu\text{m}$  之間，因低溫噴霧乾燥機有 3 個收集筒，其中又以第 3 筒所收集之顆粒最小，3 個回收筒所得之粉末粒徑分佈，分別為 3.91, 3.55 與 2.95  $\mu\text{m}$  平均約 2 ~ 5  $\mu\text{m}$  之間，平均之回收率約在 6 成以上。研究並利用均質機與震盪方式，探討比較不同聚合物對微膠囊之包覆效果，三種樣品包括 HPMC、1/2HPMC+1/2Chitosan、Chitosan 粒徑分佈結果如圖 5A, B, C 顯示，粒徑分佈分別在 5~25, 5~30, 10~35  $\mu\text{m}$  之間；利用 HPMC 包覆兩者均有不錯效果，Chitosan 因本身較難溶解，且因溶在 5%醋酸，pH 值較低會影響微膠囊包覆效果，利用 1/2HPMC+1/2Chitosan 混合方式可增加壁厚功能，添加 HPMC 組形成之顆粒較均勻，而 Chitosan 組形成之膠囊顆粒較不規則如表 7，陸續將探討兩種組成在保存孢子期限及維持活性之差別。整體而言，因攪拌速度之快慢差別，形成膠囊顆粒，以均質機較震盪方式均勻，形成之顆粒包覆效果較佳。

#### 肆、結論

研究利用均質機及震盪混合等方式進行蟲生真菌之微膠囊化實驗，最適微膠囊化條件為以 4%褐藻膠，添加 0.03%之 HPMC 及 Chitosan 等生物可分解聚合物，並加入植物油；橄欖油或葵花油等和 0.2% Tween 80 以增加包覆保存性，在 10%氯化鈣溶液中激烈攪拌形成膠囊硬化，形成多一層之包覆效果，可使微膠囊性質更穩定，由顯微鏡觀察形成顆粒均勻分佈，大小可達 10~20  $\mu\text{m}$  之間，

期間也對膠囊之釋放率、保存活性等作探討。整體而言，因攪拌速度之快慢差別，形成之膠囊顆粒，以均質機攪拌較震盪方式均勻，形成之顆粒包覆效果較佳，在孢子存活率之探討，去年 8 月微膠囊樣品，在 SDA 培養基中仍能生長出菌落，存活率可達 80% 以上。因此，以微膠囊化方式包覆蟲生真菌有其可行性；研究將持續探討低溫噴霧乾燥法，因所形成之微膠囊顆粒大小較均勻，包覆效果好，且適於量產化，低溫噴霧乾燥有利於對熱較敏感之酵素及微生物等之活性維持與保存；利用生物殺蟲製劑，一方面減少化學農藥之使用量，另一方面無毒之微膠囊可分解材料不會造成環境污染。因而，微膠囊化生物製劑將成爲發展生物殺蟲劑的新策略之一。

### 參考文獻

- 林秀芬、劉顯達 (2004)。四種蟲生真菌感染溫室內蚜蟲及其產生酵素之探討。  
**植物保護學會會刊**，**46**, 143-154。
- 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), 1-12。
- 鄒嘉恆 (2005)。黑殭菌素 E 之製備與回收純化。**朝陽科技大學碩士論文**。p. 36。
- 羅朝村 (2004)。微生物製劑在作物病蟲害防治上的應用。**生物多樣性在農業生技產業發展之國際學術研討會**。屏東，臺灣。pp. 75。
- Catarina, P. R., Ronald, J. N., Sandra, V., Antonio, J. & Francisco, V. (2006). Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal Microencapsulation*, 23(3), 245-257.
- Chan, L. W., Lim, L. T. & Heng, P. W. S. (2000). Microencapsulation of oils using sodium alginate. *Journal Microencapsulation*, 27(6), 757-766.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review Entomology*, 23, 409-442.
- Hall, R. A. (1976). A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal Invertebrate Pathology*, 27, 41-48.
- Huang, Y. C., Chiang, C. H. & Yeh, M. K. (2003). Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal Microencapsulation*, 20(2), 247-260.
- Kiyoyama, S., Shiomori, K., Kawano, Y. & Hatate, Y. (2003). Preparation of microcapsules and control of their morphology. *Journal Microencapsulation*, 20(4), 497-508.
- Lee, K. E., Cho, S. H., Lee, H. B., Jeong, S. Y. and Yuk, S. H. (2003). Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug. *Journal*

- Microencapsulation*, 20(4), 489-496.
- Lee, H. Y., Chan, L. W. & Heng, P. W. S. (2005). Influence of partially cross-linked alginate used in the production of alginate microspheres by emulsification. *Journal Microencapsulation*, 22(3), 275-280.
- Liu, C. P. & Lin, L. P. (2001). Ultrastructural Study and Lipid Formation of *Isochrysis* sp. CCMP 1324. *Botany Bulletin Academia Sinica*, 42(3), 207-214.
- Liu, C. P. & Lin, L. P. (2005). Morphology and eicosapentaenoic acid production by *Monodus subterraneus* UTEX 151. *Micron*, 36(6), 545-550.
- Liu, S. D. (1994). The application of fungicide resistant entomopathogenic green muscardine fungus in Taiwan, Biological control of coconut leaf beetle (*Bronstispa longissima*) and diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Technical Bulletin*, 138, 1-10.
- Rosenberg, M. & Lee, S. J. (2004). Calcium-alginate coated whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. *Journal Microencapsulation*, 21(3): 263-281.
- Strand, B. L., Gaserod, O., Kulseng, B., Espevik, T. & Skjak-Break, G. (2002). Iginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. *Journal Microencapsulation*, 19(5), 615-630.
- Strasser, H., Vey, A., and Butt, T. M. (2000). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science Technology*, 10, 717-735.
- Tsuji, K. (2001). Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety. *Journal Microencapsulation*, 18(2), 137-147.
- Zhang, J. X., Chen, D., Wang, S. J. & Ahu, K. J. (2005). Optimizing double emulsion process to decrease the burst release of protein from biodegradable polymer microspheres. *Journal Microencapsulation*, 22(4), 413-422.

黑殭菌微膠囊化之製備

表1 各種植物油對微膠囊形態之影響

Test oil	Color	Tween 80(%)	Na-Alginate 4% (mL)	Morphology
橄欖油(I)	淺黃	0.2	4.0	Better homogeneity
葵花油	淺黃	0.2	4.0	Better homogeneity
花生油	土黃	0.2	4.0	Homogeneous
酥烤油	淺黃	0.2	4.0	Homogeneous
沙拉油	淺黃	0.2	4.0	Better homogeneous
橄欖油(II)	淺黃	0.2	4.0	Better homogeneity

橄欖油(I) (II) 為不同品牌，植物油各加 6 mL

表2 Tween 80 濃度對微膠囊形態之影響

Test tube No.	Tween 80(%)	Na-Alginate 4% (mL)	HPMC(%)	Morphology
1	0.02	4.0	0.03	Homogeneous
2	0.06	4.0	0.03	Homogeneous
3	0.12	4.0	0.03	Homogeneous
4	0.18	4.0	0.03	Homogeneous
5	0.20	4.0	0.03	Better homogeneity
6	0.30	4.0	0.03	Heterogeneous

植物油各加 6 mL

表3 HPMC對微膠囊形態之影響

Test tube No.	Tween 80(%)	Na-Alginate 4%(mL)	HPMC(%)	Morphology
1	0.2	4.0	0.01	Homogeneous
2	0.2	4.0	0.03	More homogeneous
3	0.2	4.0	0.06	Homogeneous
4	0.2	4.0	0.12	Heterogeneous
5	0.2	4.0	0.18	Homogeneous
6	0.2	4.0	0.24	Smaller

植物油各加 6 mL

表 4 不同 pH 之氯化鈣對對微膠囊形態之影響

Test tube No.	Na-Alginate 4% (mL)	HPMC(%)	CaCl <sub>2</sub> pH	Morphology
1	4.0	0.03	4.0	Spherical ellipsoid
2	4.0	0.03	5.0	More spherical
3	4.0	0.03	6.0	More spherical
4	4.0	0.03	7.0	Clusters
5	4.0	0.03	8.0	Clusters
6	4.0	0.03	9.0	Small clusters

植物油各加 6 mL，加入 0.5 mL 0.2% Tween 80

表 5 攪拌速率對微膠囊大小之影響

Test tube No.	Na-Alginate 4%(mL)	HPMC(%)	RPM of vortex	Size range (μm )
1	4.0	0.03	1,000	20-80
2	4.0	0.03	2,000	20-80
3	4.0	0.03	3,000	20-80
4	4.0	0.03	5,000	15-80
5	4.0	0.03	6,000	15-80
6	4.0	0.03	8,000	15-80

植物油各加 6 mL，加入 0.5 mL 0.2% Tween 80

表 6 氯化鈣濃度對微膠囊形態之影響

Test tube No.	Na-Alginate 4% (mL)	HPMC(%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Morphology
1	4.0	0.03	5	Heterogeneous
2	4.0	0.03	10	Better Homogeneity
3	4.0	0.03	15	Heterogeneous
4	4.0	0.03	20	No proper reaction
5	4.0	0.03	25	No proper reaction

植物油各加 6 mL，加入 0.5 mL 0.2% Tween 80

表 7 不同之包覆材料對微膠囊形態之影響

Sample	pH	Na-Alginate 4% (mL)	Entrapment efficiency (%)	Size range (μm )	Morphology
HPMC	4.35	4.0	65	15-40	Better Homogeneity
Chitosan	3.87	4.0	55	20-40	Heterogeneous
(HPMC+ Chitosan)	3.90	4.0	75	20-40	Better Homogeneity
BK	4.46	4.0	45	15-50	Heterogeneous

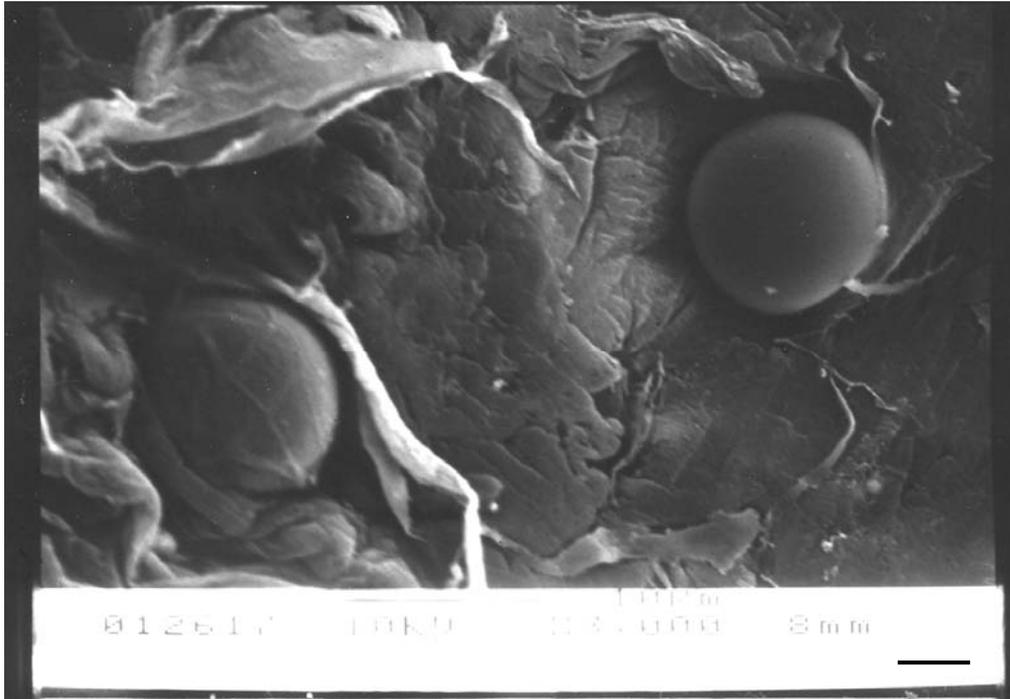


圖 1 褐藻膠微膠囊 SEM 圖，顆粒大小在 10 ~ 40  $\mu\text{m}$  之間，scale bar = 15  $\mu\text{m}$

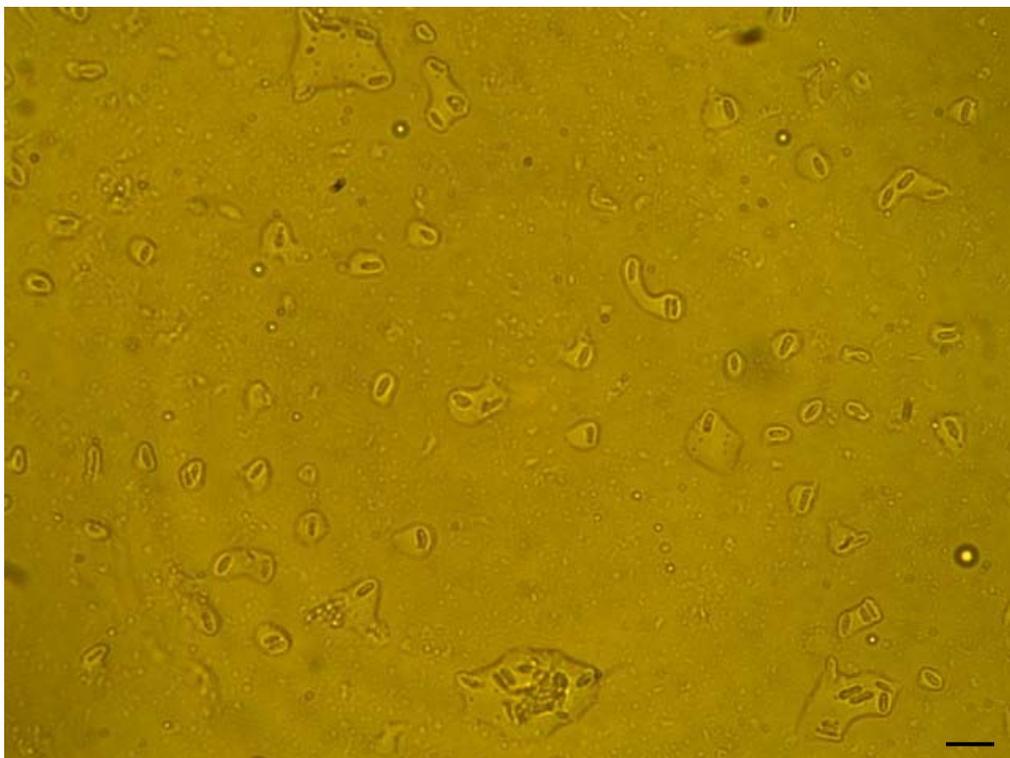


圖 2 以震盪方式包覆黑殭菌孢子，粒徑分佈在 10 ~ 30  $\mu\text{m}$  之間，scale bar = 15  $\mu\text{m}$

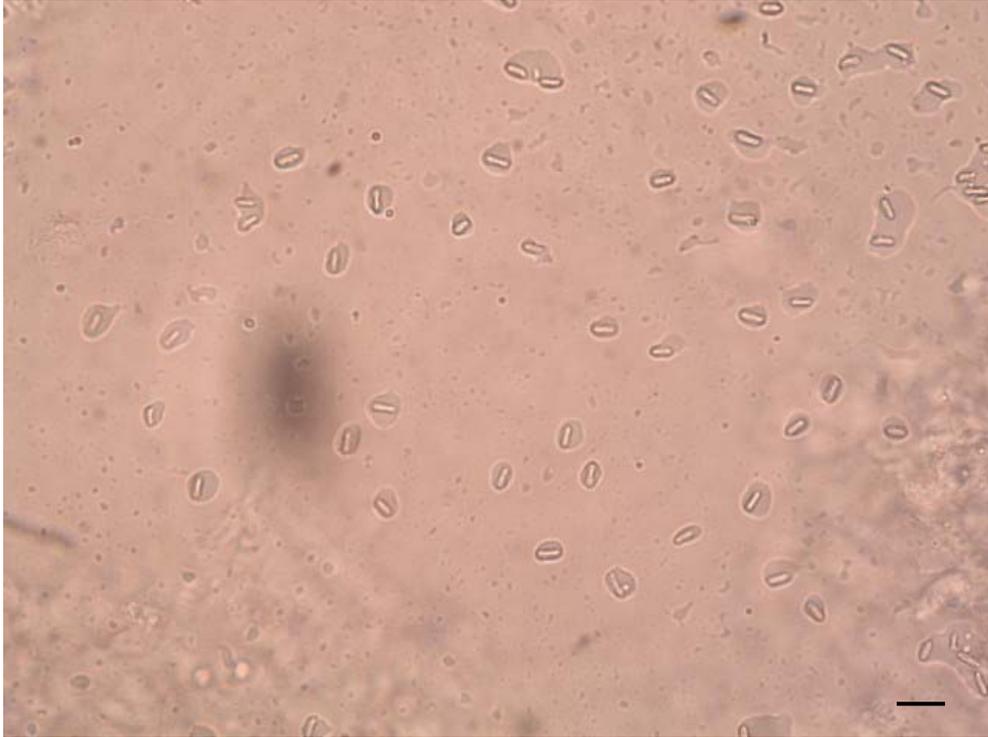


圖 3 以均質機方式加入 HPMC 包覆黑殭菌孢子，粒徑分佈在  $7.5 \sim 15 \mu\text{m}$  之間，scale bar =  $15 \mu\text{m}$

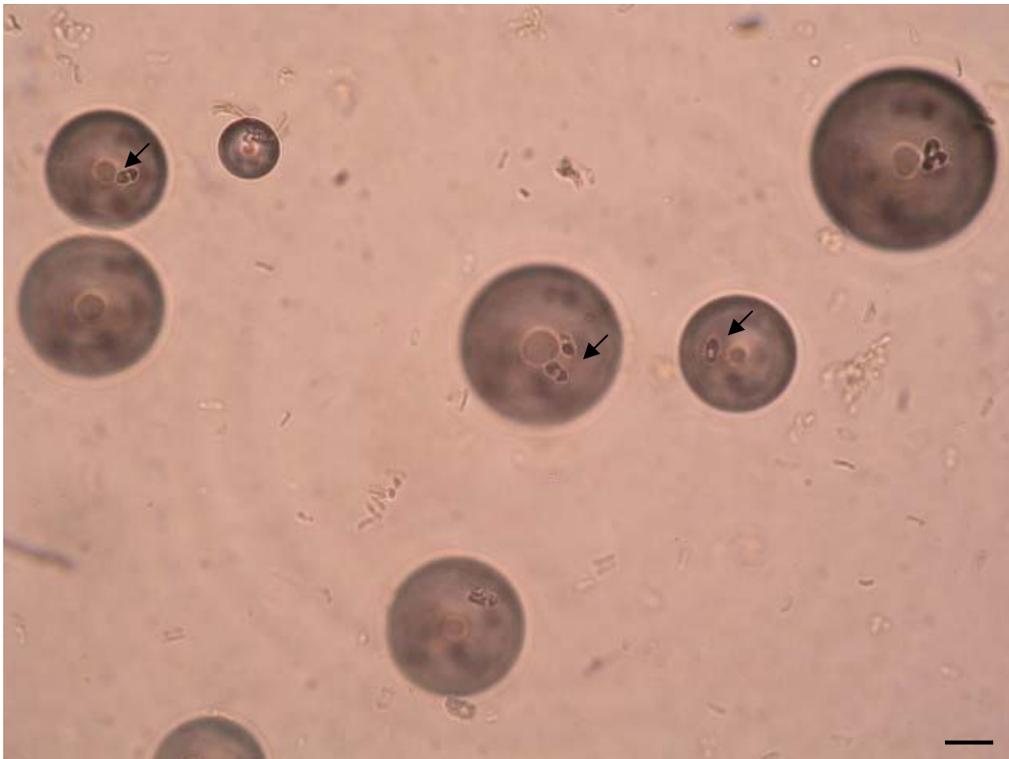


圖 4 以低溫噴霧乾燥方式加入 HPMC 與糊精包覆黑殭菌孢子(箭頭所指)，顆粒大小在  $20 \sim 60 \mu\text{m}$  之間，scale bar =  $10 \mu\text{m}$

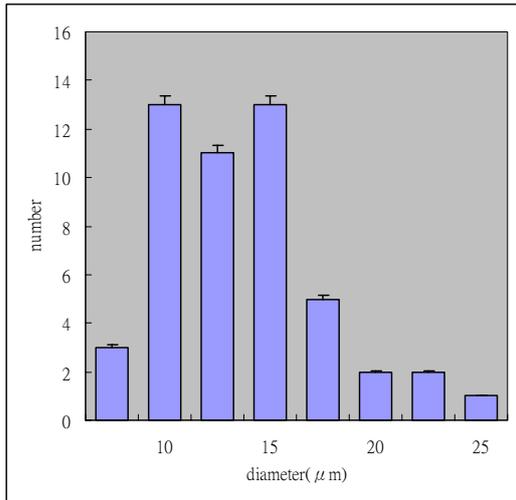


圖 5A、Ma+HPMC 粒徑分佈，粒徑在 5~25 μm 之間

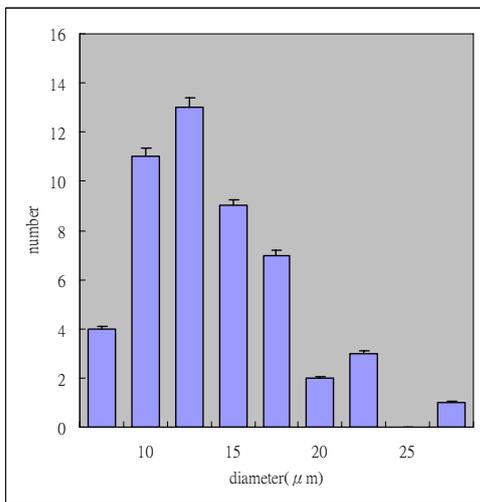


圖 5B、Ma+Chitosan 粒徑分佈，粒徑在 5~30 μm 之間

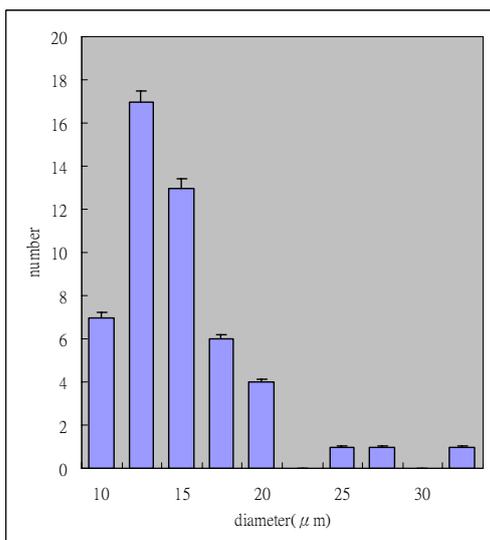


圖 5C、Ma+HPMC+ Chitosan 粒徑分佈，粒徑在 10~35 μm 之間

## Formulations for Microencapsulating of *Metarhizium*

### *anisopliae* MA126

Ching-Piao Liu\*, Ya-Chin Wang\*\*, Shan-Da Liu\*\*\*

#### Abstract

For ecological, environmental and healthy purposes pesticides coming from natural sources, such as *Metarhizium anisopliae*, have been used widely in plant disease control. To meet the strong demand for long lasting, more efficient and labor saving bioinsecticides, a preliminary study in microencapsulating *Metarhizium anisopliae* MA126, which is capable of controlling asphids more efficiently than other fungi due to high protease activities, was carried out in the present investigation. The conidia of *M. anisopliae* MA126 was mixed with different combinations and concentrations of basal coating, emulsion and hardening materials. The combination of sodium alginate 4% and hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) 0.03%, serving as UV-resistant and biodegradable wall materials, plant-based oils with 0.2% Tween 80 as emulsion materials and 10% calcium chloride for hardening is around 70% with capsule diameters ranging from 10 ~ 20  $\mu\text{m}$ . The physical and chemical properties for long lasting field and efficacy in asphids control are under investigation.

Keywords: Entomopathogenic Fungus Bioinsecticides, *Metarhizium anisopliae*, Sodium alginate, Microencapsulation

---

\* Assistant Professor, Department of Biological Science and Technology, Meiho Institute of Technology

\*\* Student, Department of Biological Science and Technology, Meiho Institute of Technology

\*\*\* Professor, Department of Biological Science and Technology, Meiho Institute of Technology