

# 培養基對木黴菌(*Trichoderma harzianum*) 發酵生產幾丁質酵素的影響

陳淑德<sup>1</sup>、蕭玉玲<sup>2</sup>、林世斌<sup>3</sup>

國立宜蘭技術學院食品科學系副教授  
國立宜蘭技術學院食品科學系研究助理  
國立宜蘭技術學院食品科學系助理教授

## 摘 要

幾丁質酵素可將幾丁質水解成具保健功能的幾丁質寡糖或幾丁聚寡糖。本研究針對各種不同種類和濃度的碳源及氮源等培養基，瞭解其對木黴菌(*Trichoderma harzianum*)生產幾丁質酵素的影響。利用螢光光譜分析儀快速分析搖瓶發酵四天後木黴菌發酵液中的幾丁質酵素活性。結果顯示，膠體幾丁質可誘導木黴菌發酵生產幾丁質酵素，而葡萄糖和幾丁聚醣則無法使木黴菌生產幾丁質酵素；在不同濃度 0.5%、1%、2%和 3%的膠體幾丁質培養基中，則以 2%者生產幾丁質酵素的活性最高，其他相差不大。利用三種不同的氮源：酵母抽出物、麥芽抽出物、硝酸鉀和氯化銨無機氮的研究中發現以酵母抽出物和無機氮培養木黴菌生產的幾丁質酵素活性較麥芽抽出物為高，而 2%氮源濃度則呈現較高的幾丁質酵素活性，但幾丁質酵素活性並不與碳源和氮源的濃度成比例的關係。

關鍵字：幾丁質酵素、幾丁質、木黴菌

# Effect of Culture Media on Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Fermentation

Su-Der Chen Yu-Lin Hsiao Shih-Bin Lin

Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology, Associate  
Professor

Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology, Research  
Assistant

Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology, Assistant  
Professor

## Abstract

Chitinase can degrade colloidal chitin to produce biofunctional oligosaccharides. This study was to observe the influences of carbon and nitrogen sources on the production of chitinase by *Trichoderma harzianum*. The chitinase activities were analyzed by a fluorescence meter after a four-day cultivation. The results demonstrated that colloidal chitin could induce the production of chitinase, but glucose and chitosan couldn't during the *Trichoderma harzianum* fermentation. Different concentrations (0.5%, 1.0%, 1.5% and 2%) of colloidal chitin applied in the culture media were used to compare their ability in the chitinase induction; the results reveal that the 2% chitin induced the highest chitinase activity, but there were no appreciable difference for the other factors. Comparison among the three different nitrogen sources: yeast extract, malt extract and potassium nitrate/ ammonium chloride, demonstrated that the yeast extract and inorganic nitrogen compounds induced higher chitinase activities than that of the malt extract. The chitinase produced in the media with 2% nitrogen sources showed higher chitinase activity; however, the activities of chitinase

were not proportional neither to the carbon concentrations nor to the nitrogen concentrations in the culture media.

Keywords: chitinase, chitin, *Trichoderma harzianum*

# 一、前言

幾丁質在自然界中的含量僅次於纖維素，是由 1000~3000 個 N-乙醯葡萄糖胺以  $\beta$ -1,4 鍵結所組成直鏈狀聚合物，它廣泛存在於蝦、蟹甲殼類的外骨骼，昆蟲外皮，真菌的細胞壁等[1]。而幾丁質先利用強鹼進行不同程度的去乙醯反應所得之衍生物即為幾丁聚醣，一般以 70~80% 去乙醯程度最常見[1,2]。因幾丁質與幾丁聚醣二者皆來自天然的生物體、無毒，生物可分解性及良好的生物反應性，且具有強吸濕性，保溼效果亦相當好，並具有吸附重金屬離子的功能，分子在自然狀態下不易斷裂，也不易變性，故可開發用於食品、醫療材料、化妝品保溼、農業土壤覆育、可食用膜、純化水、食品加工廢棄物處理等用途。

將幾丁質和幾丁聚醣經酸或酵素水解作用會產生幾丁寡醣，其中以無機酸水解會產生單糖至三糖的低聚合度寡醣，而若以幾丁酵素、幾丁聚醣酵素、纖維酵素及溶菌酵素等酵素處理則較能產生五糖至七糖聚合度較高的寡醣且較具生理功能[3]。幾丁寡醣被認為具有促進人體有益菌屬雙歧桿菌屬的生長，降低血漿膽固醇含量，加速瘡傷癒合，刺激免疫系統及抗腫瘤、抗菌等效果[1,4]。

雖然利用酵素法水解幾丁質和幾丁聚醣以生產幾丁寡糖和 N-乙醯幾丁寡糖，具專一性高、操作簡便、低污染等優點，但酵素價格昂貴而導致成本過高是缺點，故利用微生物發酵大量生產幾丁質酵素以降低成本是重要課題[5]。

在利用微生物發酵生產幾丁質酵素時，不同的菌種會影響幾丁質酵素的活性，像 Ulhoa 等[6]以 *Trichoderma viride*、*Trichoderma harzianum* 及 *Trichoderma sp.* 等三種菌屬發酵產生幾丁質酵素的活性，其中以 *Trichoderma harzianum* 產生的幾丁質酵素活性最高。而各種不同碳源、氮源等培養基組成對微生物生產幾丁質酵素的產量會有影響，通常大多數的微生物只在含有幾丁質之培養基中生長時才會生產幾丁質酵素，因此幾丁質除了做為微生物生長的碳源外，可能也扮演了誘導幾丁質酵素生合成的角色[6]，另一方面，添加不同氮

源，例如麥芽抽出物除提供氮源外，亦含其它營養素，故可促進 *Listonella damseila* NTU-FC-6 菌生產幾丁質酵素[7]。另外添加不同鹽類對幾丁質酵素生產亦有影響，像培養基中經常會添加適當的磷酸鹽類作為緩衝劑並提供磷源，可提高幾丁質酵素的產量，但若濃度過高則有嚴重抑制的現象，但有時培養基中額外添加鹽類時，幾丁質酵素的產量皆無顯著變化甚至還微幅下降，故若考慮成本則採用原來培養基組成，不再額外添加鹽類[7]。

本研究之目的為利用木黴菌 *Trichoderma harzianum* 作為發酵生產幾丁質酶的菌種以(1)探討培養時間對木黴菌發酵產生幾丁質酵素活性的影響(2)研究不同種類和濃度的氮源及碳源對木黴菌發酵產生幾丁質酵素活性的影響和(3)比較不同幾丁質來源對木黴菌發酵產生幾丁質酵素活性的影響。

## 二、材料與方法

### (一)木黴菌生產幾丁質酵素之培養

將木黴菌(*Trichoderma harzianum* CCRC 30821)於 PDA 培養基中塗抹培養，30°C 培養約 7 天至直到產生綠色孢子，加入約 5ml 無菌水將培養基上之孢子洗下收集(此步驟需二重覆)，再以顯微鏡計算所得孢子液中之孢子數。

取一定量孢子數( $10^6$  個/ml)的孢子液，接入已經配製各種不同成分 pH 值為 5、總體積為 150ml 的培養液中，再置於 30°C 下以 150rpm 的振盪轉速培養 4 天或至 10 天(二重覆)，然後將菌液離心，取上清發酵液，測幾丁質酵素活性(二重覆)。

### (二)培養基

#### 1. 膠體幾丁質之製備方法

將幾丁質粉末或猴頭菇，利用乾風乾燥，再磨成粉末，精稱 40 克，

加入 400ml 鹽酸中浸泡約 2 小時後，並加入去離子水混勻，至洗出液之 pH 值接近 3.0，酸化後的膠體幾丁質可作為發酵液中的碳源。利用抽氣過濾，將幾丁質用 4°C 的去離子水清洗，最後再利用氫氧化鈉調整 pH 值接近 6.0~6.5，裝瓶，進行 121°C，15 分鐘滅菌。並精稱此膠體幾丁質溶液於 105°C 烘乾至恒重，由固形物量以決定其膠體幾丁質的濃度。

## 2. 培養基之製備

本研究培養基的碳源分別為葡萄糖、膠體幾丁質、猴頭菇膠體幾丁質及幾丁聚糖，而培養基的氮源則分別有(1)硝酸鉀和氯化銨的混合無機氮鹽、(2)酵母抽出物及(3)麥芽抽出物的有機氮鹽三種。除上述碳源和氮源外 1 升的培養基中尚含 0.2%的  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.18%的  $K_2HPO_4$ 、0.001%的  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.001%的  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  和 0.001%的  $MnSO_4$  所配製的混合溶液，且各液體於配製完成後，均需個別滅菌以避免導致沉澱。

### (三)幾丁質酵素活性測定

根據 Carolina 等(8)利用螢光法分析發酵液的幾丁質酵素活性，取離心後之上清發酵液 10  $\mu L$ ，加入 100  $\mu L$  ChR 緩衝溶液(此 100 毫升 ChR 緩衝溶液含 0.6804 克的醋酸鈉 0.3722 克的 EDTA 和 0.015 克的 phenylmethyl sulfonyl fluoride)，再加入 2  $\mu L$  4-methylbelliferyl- $\beta$ -D-N,N',N'' triacetylchitotriose (MUChT)作為基質，放入 40°C 熱水浴，計時 5 分鐘，取出後立刻加入 1.9mL 0.2M  $Na_2CO_3$ ，並均勻搖動使其停止反應，並置於冰浴中，利用螢光分光光譜儀 (Hitachi F2500) 於激發光波長 360nm 下產生放射光波長 470nm 的螢光值，並由標準曲線換算得知幾丁質酵素活性(U/mL 發酵液)。標準曲線的作法為精稱 0.05 克的 4-methylumbelliferone(MU)溶於 0.2M 碳酸鈉溶液中並定量至 500 毫升，再用 0.2M 碳酸鈉溶液進一步的稀釋成 25、50、100、200 和 500 奈克(MU)/毫升，並用螢光分光光譜儀，於激發光波長 360nm

下產生放射光波長 470nm 的螢光值，其 MU 濃度和螢光值的線性關係為  $y=21.38x+32.35$  ( $r=0.999$ )。一個幾丁質酵素活性單位(U)則定義為在 40 °C 下，每分鐘可水解產生  $1\mu\text{mol}$  的 methylumbelliferone (MU)。

### 三、結果與討論

首先要先決定木黴菌生產幾丁質酵素活性之變化情形，本研究在基本培養基中添加 2%膠體幾丁質及 0.1%的硝酸鉀和氯化銨無機氮源培養木黴菌至 10 天，並利用螢光分光光譜儀測定幾丁質酵素之活性，其結果如圖 1 所示，培養至二天前其幾丁質酵素之活性很低，而以培養第二天到第四天時的幾丁質酵素活性產生的速率最快為 0.026U/天，且已達最佳狀況，隨著培養時間之增長，雖然在第八天到第十天有上升的情形，但是幾丁質酵素活性產生速率已趨平緩。而此與 Ulhoa 和 Peberdy [6]提到利用木黴菌在 28°C，pH6.0 下培養 48 小時，即可得最高幾丁質酵素活性有所不同。今根據時間和經濟考慮下，所以決定以四天作為發酵終止時間，故本次幾丁質酵素生產研究的培養時間均以四天為主。

在基本培養基中添加 2%膠體幾丁質，再分別比較三種不同濃度和種類的氮源:酵母抽出物、麥芽抽出物、硝酸鉀和氯化銨混合的無機氮源對木黴菌產生幾丁質酵素活性的影響，由表 1 的結果得知以無機氮源培養與酵母抽出物及麥芽抽出物的有機氮源培養所得之幾丁質酵素活性差異並不大，這與蘇和李[7]利用 *Listonella damsela* NTU-FC-6 菌生產幾丁質酵素較不同，因為文中提到培養基中麥芽抽出物濃度之增加可顯著提高發酵液中幾丁質酵素活性，故基於經濟的考量下，決定以硝酸鉀和氯化銨二種混合的無機氮源作為培養基的氮源。在三種不同的氮源濃度對木黴菌產生幾丁質酵素活性的影響方面，其中 0.5%、2%和 3%酵母抽出物對木黴菌生產幾丁質酵素活性分別為 0.041U/mL、0.047 U/mL 和 0.038U/mL，而 0.5%、2%和 3%麥芽抽出物對木黴菌生產幾丁質酵素活性分別為 0.028U/mL、0.038U/mL 和 0.029U/mL，至於 0.5%、2%、3%的硝酸鉀和氯化銨混合的無機氮源對木黴菌生產幾丁質酵素活性則分別為 0.042U/mL、0.049U/mL 和 0.037U/mL，發現氮源濃度也會影響其生產幾丁質酵素，但過高的氮源濃度並不

會誘導更高的幾丁質酵素活性，未來可考慮低氮源濃度並配合饋料培養木黴菌以獲得較高幾丁質酵素產量。

在基本培養基中添加固定濃度的 0.3% 的硝酸鉀和氯化銨的無機氮源，再比較不同濃度 0.5%、1%、2% 和 3% 的膠體幾丁質對木黴菌產生幾丁質酵素活性的影響，由圖 2 結果得知，以 2% 膠體幾丁質培養木黴菌所生產的幾丁質酵素的活性最高為 0.070U/mL，1% 和 3% 者次之約為 0.048U/mL、0.044U/mL，0.5% 者為 0.042U/mL，但 0.5%、1% 和 3% 的膠體幾丁質培養木黴菌所生產的幾丁質酵素活性差異並不大，並未依所給予的培養基中膠體幾丁質含量比例而使得幾丁質酵素活性成倍數增加，故基於經濟效率考量似乎未來可使用 0.5% 膠體幾丁質培養，或可配合饋料培養以使得木黴菌發酵所產生的幾丁質酵素量較高。另一方面，以葡萄糖和幾丁聚醣培養木黴菌則完全無法產生幾丁質酵素，此與 Ulhoa 等[6]提到的結果相同，因為幾丁質除了做為微生物生長碳源外，亦扮演了誘導幾丁質酵素生合成的角色。且以葡萄糖作為碳源培養時，發酵液的顏色呈透明狀，以幾丁聚醣作為碳源培養時，發酵液的顏色為棕色且呈現具氣泡的極黏稠膠體，此二者和以膠體幾丁質作為碳源培養時，發酵液的顏色呈棕黑色，並產生大量氣泡截然不同。

在表 2 中，比較猴頭菇膠體幾丁質對木黴菌發酵產生幾丁質酵素活性的影響，其中培養基中的 1% 膠體幾丁質來源分別來自幾丁質粉末、乾猴頭菇、經水煮並乾燥後的猴頭菇及萃取後猴頭菇廢棄物，在木黴菌培養四天後，發酵液中的幾丁質酵素活性分別達 0.048U/mL、0.027U/mL、0.027U/mL 及 0.028U/mL，仍以商業的幾丁質粉末所發酵生產的幾丁質酵素活性較高，而經過不同處理之猴頭菇類，其膠體幾丁質所發酵生產的幾丁質酵素活性差別不大，故此可解決蕈類萃取後的廢棄物問題，並降低生產幾丁質酵素的成本。

## 四、結 論

本研究得知木黴菌發酵四天後，所產生的單位體積之幾丁質酵素活性達至高峰，而培養基需有膠體幾丁質作為碳源以生產幾丁質酵素，而培養基中的氮源種類，稍會影響幾丁質酵素活性，故基於成本考量以硝酸鉀和氯化銨無機氮源即可，至於氮源和膠體幾丁質濃度雖會影響木黴菌產生幾丁質酵素活性，但



並不與濃度成比例的關係，未來可考慮饋料培養以提高木黴菌發酵產生幾丁質酵素的產量。

## 五、參考文獻

1. 劉瓊淑 (1994), 「幾丁質、幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用」, 食品工業, 第二十六卷, 第一期, 第 26-35 頁。
2. 江晃榮 (1998), 「生體高分子(幾丁質膠原蛋白)在食品工業上的應用」, 食品資訊, 第一百五十期, 第 19-25 頁。
3. 陳坤上、黃珮芬、陳聰松、陳幸臣 (1996), 「幾丁寡醣製備條件之探討」, 食品科學, 第二十三卷, 第六期, 第 874-883 頁。
4. 賴進此 (2000), 「幾丁類物質在生物技術上之應用」, 食品工業, 第三十二卷, 第一期, 第 31-39 頁。
5. Felse, P.A. and T. Panda (1999), "Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode." Process Biochem., Vol 34, pp.563-566.
6. Ulhoa, Cirano J., and John F. Peberdy (1991), Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology, Vol.137, pp.2163-2169.
7. 蘇南維、李敏雄 (1998), 「*Listonella damsela* NTU-FC-6 幾丁質酶之生產與基本性質之探討」, 中國農業化學會誌, 第三十六卷, 第一期, 第 65-76 頁。
8. Carsolio, Carolina; Ana Gutierrez; Beatriz Jimenez and Marc Van Montagu (1994), "Characterization of each-42, a *Trichoderma harzianum*, endochitinase gene expressed during mycoparasitism." Proc. Natl. Acad. Sci. USA" Vol. 91, pp.10903-10907.

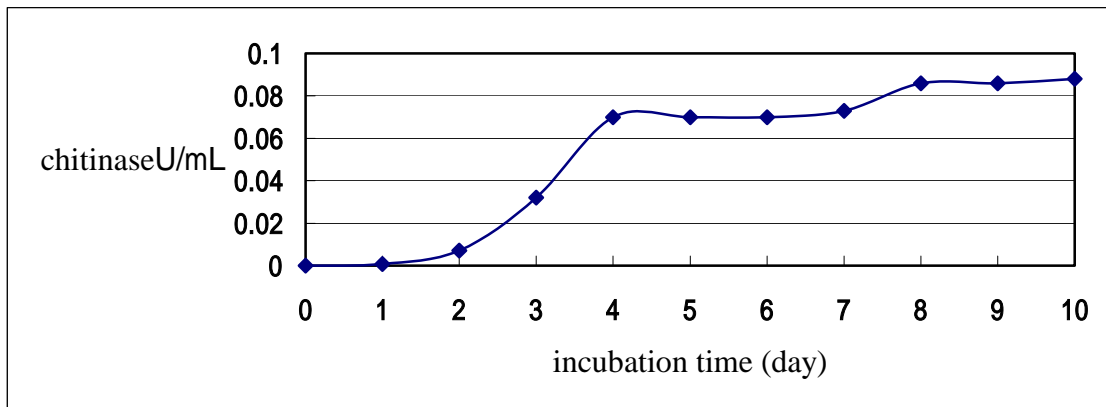


圖 1 2%膠體幾丁質培養木黴菌生產幾丁質酵素活性之變化情形

Figure 1 The chitinase production during fermentation period by *Trichoderma harzianum*.

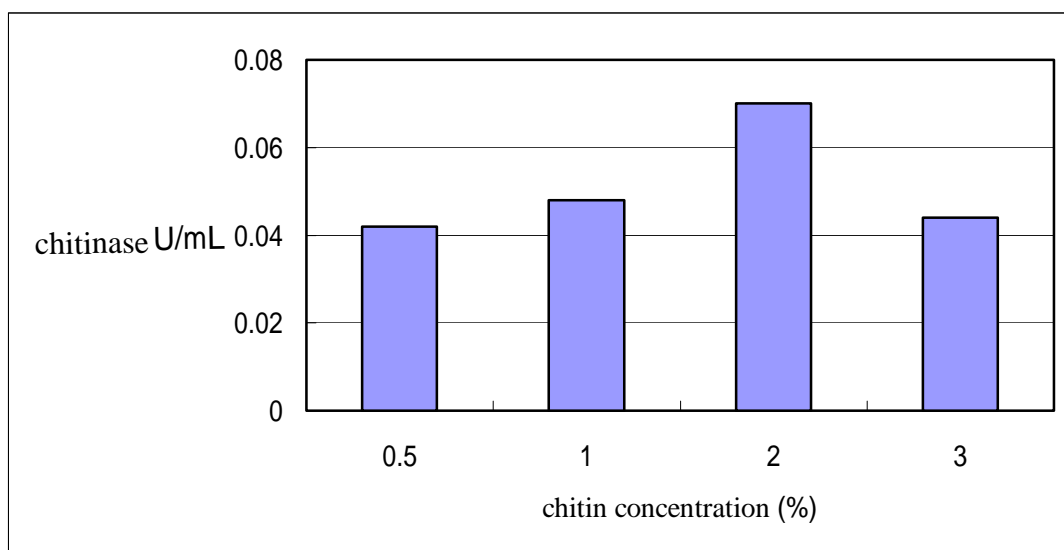


圖 2 不同濃度膠體幾丁質對木黴菌產生幾丁質酵素活性的影響

Figure 2 Effect of different colloidal chitin concentrations on the production of chitinase by *Trichoderma harzianum*.

表 1 不同濃度和不同成分之氮源對木黴菌產生幾丁質酵素活性的影響  
 Table 1 Effect of different nitrogen sources and concentrations on chitinase production by *Trichoderma harzianum*.

濃度 成分	0.5%	2.0%	3.0%
酵母抽出物	0.042 U/mL	0.048 U/mL	0.038 U/mL
麥芽抽出物	0.028 U/mL	0.038 U/mL	0.029 U/mL
硝酸鉀和氯化銨	0.043 U/mL	0.070 U/mL	0.037 U/mL

表 2 不同膠體幾丁質對木黴菌發酵產生幾丁質酵素活性的影響

Table 2 Effect of different colloidal chitin on the production of chitinase by *Trichoderma harzianum*.

1% 膠體幾丁質來源	幾丁質酵素活性(U/mL)
幾丁質粉末	0.048
乾猴頭菇	0.027
水煮並乾燥的猴頭菇	0.027
猴頭菇廢棄物	0.028