

氧氣傳遞係數對木黴菌產生幾丁質酶的影響

陳淑德* 林世斌

國立宜蘭大學 食品科學系

(接受刊載日期: 中華民國九十二年九月十九日)

本研究的目的是探討木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 發酵過程培養基中的膠體幾丁質濃度和黏度的關係及搖瓶時的氧氣傳遞係數 (K_{La}) 值對木黴菌產生幾丁質酶和菌量產生的影響。結果顯示, 隨著膠體幾丁質濃度增加會使黏度增加, 且隨著發酵時間增長, 亦會使黏度增加。不同搖瓶操作條件明顯影響 K_{La} 值, 其中有擋板之錐形瓶、較小的操作體積及較大的轉速會得到較大的 K_{La} 值, 即氧氣傳遞效果較佳。利用 K_{La} 值在 4.51-44.82/h 的操作條件, 搖瓶培養木黴菌, 並於培養四天後以 K_{La} 值為 23.43/h 時所測得之幾丁質酶活性和菌量皆為最高。

關鍵字: 木黴菌, 幾丁質酶, 黏度, 氧氣傳遞係數。

Effect of Oxygen Transfer Coefficient on Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Fermentation

Su-Der Chen* and Shih-Bin Lin

Department of Food Science, National Ilan University, Ilan City, Taiwan

(Accepted for publication: September 19, 2003)

The objectives of this study were to determine the relationship between colloidal chitin concentration and viscosity of culture, and the effect of oxygen transfer coefficient (K_{La}) of Erlenmeyer flask on cell concentration and chitinase activity during *Trichoderma harzianum* fermentation. The results demonstrated that the viscosity of culture was related to the colloidal chitin concentration and increased with fermentation time. The shaking flask conditions significantly affected K_{La} value. The flask with baffle, smaller working volume and higher rotary speed obtained higher K_{La} value. When the *Trichoderma harzianum* cultivation conditions were operated at K_{La} values between 4.51 and 44.82/h, and the highest of chitinase activity and cell concentration of *Trichoderma harzianum* were operated at K_{La} value of 23.43/h.

Key words: *Trichoderma harzianum*, chitinase, viscosity, oxygen transfer coefficient.

前 言

幾丁質廣存於自然界中, 主要的來源為蝦、蟹、昆蟲等甲殼類動物外殼、軟體動物的器官及真菌類的細胞壁等。若利用強鹼處理幾丁質以進行不同程度的去乙酰反應所得的衍生物為幾丁聚醣, 一般以 70-80% 去乙酰程度最常見⁽¹⁾。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, 而若以幾丁酶、幾丁聚醣酶、纖維素酶及溶菌酶等酵素處理則較能產生五糖至七糖聚合度較高的寡糖且其可促進雙歧桿菌屬的生長, 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、抗菌等效果生理功能⁽²⁾。而利用酵素雖具專一性高、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酶以降低成本是重要課題⁽³⁾。

Ulhoa 與 Peberdy⁽⁴⁾ 利用 *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* 及 *Trichoderma* sp. 等三種菌株, 進行培養生產幾丁質酶, 結果以 *Trichoderma harzianum* 產生的活性最高, 故本試驗選擇以此菌種做為培養菌株。且大多數的微生物只在含有膠體幾丁質或其他幾丁質衍生物之培養基中生產時才會生長幾丁質酶, 因此, 幾丁質除

* Corresponding author.



了做為微生物生長的碳源外，可能也扮演誘導幾丁質酶生合成的角色⁽⁴⁻⁶⁾。除此之外，膠體幾丁質的濃度和發酵時間亦會影響木黴菌生成幾丁質酶的活性⁽⁶⁾。

在微生物生長之操作條件中，以氧氣傳遞係數和好氣菌體培養最為有關。在傳統規模放大培養時常以氧氣傳遞係數(K_La)為放大依據之變數，而錐形瓶是在生化系統中最常用來進行菌種篩選及培養基最適化之小型醱酵設備，但其本身不通氣，質傳效應全部依靠氣液接觸之表面進行，故錐形瓶之氧氣傳遞效會受錐形瓶構造、操作體積、操作液體黏度、轉速等因素的影響^(7,8)。

故本研究先測量不同濃度的膠體幾丁質發酵液的黏度，及其在木黴菌發酵生產幾丁質酶時的黏度變化，及測量搖瓶轉速、有擋板和無擋板的錐形瓶體積和發酵操作體積對氧氣傳遞係數(K_La)值的影響，以瞭解木黴菌發酵生產幾丁質酶的最適氧氣傳遞係數的條件，以期應用於發酵槽的發酵製程上。

材料與方法

一、膠體幾丁質之製備

取幾丁質粉末(應化企業有限公司，高雄，台灣) 40 g，加入 400 mL 鹽酸中浸泡約二小時，加入去離子水漂洗至洗出液之 pH 值接近 3.0 後，並利用氫氧化鈉調整 pH 值接近 5.0-6.0，以 10,000 rpm 離心 6 分鐘，再進行 121 °C，15 分鐘滅菌，得到膠體幾丁質備用，並利用 105 °C 烘箱烘乾決定固形物含量即膠體幾丁質的含量。

二、培養液的製備⁽⁶⁾

發酵培養液的製備分別有含 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%和 3%的膠體幾丁質，且含有 0.18% K_2HPO_4 、0.5%無機氮(0.25% KNO_3 、0.25% NH_4Cl)、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.0005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.00014% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.00016% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ ，以混合成不同操作體積(50、100、150 和 200 mL)的培養液，並置於 250 和 500 mL 兩種錐形瓶中，在 121 °C 下進行 20 分鐘的殺菌，之後冷卻備用。

三、木黴菌培養及幾丁質酶生產

將木黴菌(*Trichoderma harzianum* CCRC 30821)

培養於 potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 培養基中於 30 °C 培養約七天至直到產生綠色孢子，加入約 5 mL 無菌水將培養基上之孢子洗下收集(此步驟需二重複)，再以顯微鏡計算所得孢子懸浮液中之孢子數。接入孢子液至已經配製好 pH 值為 5.5 的不同體積及不同濃度的膠體幾丁質培養液中，使其剛開始的孢子濃度約為 10^6 個/mL，再置於 30 °C 下，分別以不同轉速(125、150 和 175 rpm)振盪培養四天，取發酵液作後續幾丁質酶活性和菌量的分析(二重複)。

四、黏度的測定

於室溫下使用微電腦數字型黏度計(Brookfield Viscometer DV-1 Brookfield Engineering, Lab. INC., Middleboro, MA, USA)，設定轉速為 100 rpm，挑選適合的探針，測量不同濃度 0.5%-3.0%的膠體幾丁質溶液和木黴菌發酵液的黏度(三重複)。

五、氧氣傳遞係數(K_La)的量測^(7,8)

亞硫酸鈉法是一種氧化還原滴定，主要是將未和氧作用之亞硫酸鈉，加入過量之已知濃度的碘液與其作用，殘餘之碘再與用已知濃度的硫代硫酸鈉溶液滴定之。取一定體積之 0.08 N 之亞硫酸鈉(Na_2SO_3)溶液，置於欲量測之 500 和 250 毫升的錐形瓶中，而錐形瓶的規格列於表一。然後將錐形瓶放於恆溫 30 °C 振盪培養箱中，每隔一段適當時間，從錐形瓶中取發酵液 1 mL，加至 9 mL 0.08 N 碘液中，並以 0.002 N 之硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3$)滴定之。將量測所得之 $Na_2S_2O_3$ 消耗速率與反應取樣時間做圖，並以最

表一 250 mL 和 500 mL 錐形瓶之尺寸規格
Table 1. The design of 250 mL and 500 mL Erlenmeyer flask.

Erlenmeyer flask capacity (mL)	Size (cm)	Baffle	
		With	Without
250	Bottom diameter	8.1	8.0
	Baffle height	1.7	-
	Flask height	13.3	13.4
500	Bottom diameter	9.9	9.9
	Baffle height	1.7	-
	Flask height	17.4	17.4

小平方誤差法進行線性迴歸，求出 Na_2SO_3 當量消耗速率 mol/h (sulfite consumption rate, SCR)，整理可得氧氣傳遞係數 $K_{La} = 4 \times \text{SCR} / (C_L \times V_L)$ ，其中 C_L 為液相中之溶氧飽和濃度即 8.43×10^{-3} (g/mL)， V_L 為操作體積 (L)。

六、幾丁質酶活性測定⁽⁹⁾

吸取 10 μL 經轉速 13 rpm 處理五分鐘過的發酵液，加入 100 μL ChR 緩衝液 (50 mM sodium acetate, 10 mM 及 15 mg phenylmethyl sulfonyl fluoride) 及 2 μL 4-methylumbelliferyl- β -D-N, N', N''-triacylchitotriose (MUCHT) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 放入 40 $^{\circ}\text{C}$ 熱水浴，計時五分鐘取出後立刻加入 1.9 mL 0.2 M Na_2CO_3 ，搖動使其停止反應，並置於冰浴中，利用螢光分光光譜儀 (Model: F-2500, Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan) 於激發光波長 360 nm 下，測定 470 nm 之螢光值，再計算發酵液中的幾丁質酶活性 (U/mL)，其中 4-methylumbelliferone (MU) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 濃度和螢光值的線性關係為 $\text{MU} (\text{ng/mL}) = 0.0464 \times \text{螢光值}$ 。一個單位的幾丁質酶活性定義為每分鐘可產生 1 μmol methylumbelliferone (MU)。

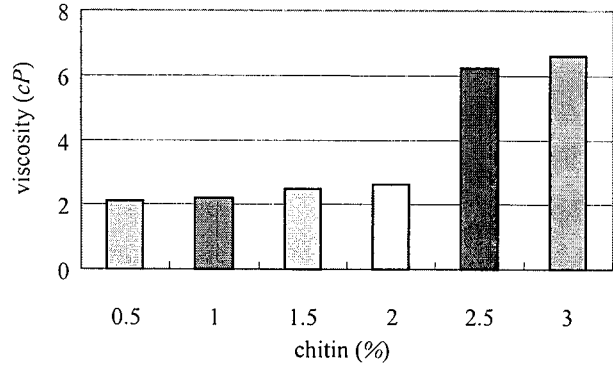
七、菌量的測定⁽⁸⁾

取發酵液 5 mL，以 4,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 7.5 mL 之 40% 硫酸，以振盪器混合均勻後再加入 12.5 mL 的蒸餾水，再以 4,000 rpm 離心十分鐘，倒掉上清液加入 12.5 mL 的逆滲透水混合均勻洗滌 (重複二次)，然後以 4,000 rpm 離心十分鐘，再重複上步驟一次，倒掉上清液，在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘乾至恒重，精秤其重量，便可得到菌體乾重 (二重複)。

結果與討論

一、幾丁質發酵液的黏度變化

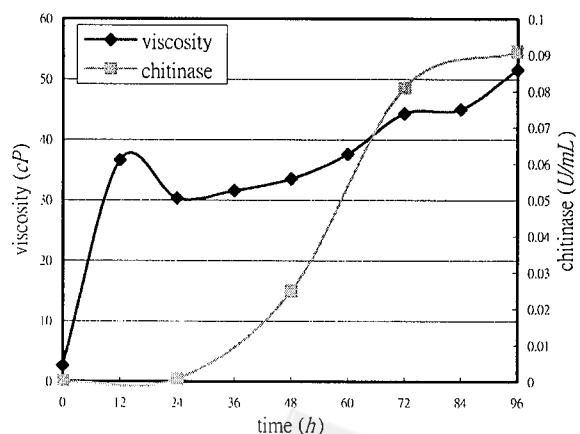
利用微電腦數字型黏度計初步測定在不同攪拌速度下，膠體幾丁質之黏度變化不大，均為牛頓流體，故選擇轉速在 100 rpm 下，測定不同濃度 (0.5%、1%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%) 的膠體幾丁質黏度。由圖一所示，黏度從 3% 的 6.6 cP，下降至 0.5% 的 2.1 cP，而其餘 2.5%、2.0%、1.5%、1.0% 的膠體幾丁質，其黏度分別為 6.24 cP、2.63 cP、2.48 cP、2.18 cP，故膠體



圖一 不同濃度膠體幾丁質對培養液的黏度影響
Fig. 1. The effect of different colloidal chitin concentrations on viscosity of culture.

幾丁質濃度在 2% 以下，屬低黏度流體，且黏度在 2 cP 附近，變化不大，此有利發酵製程操作和氧氣的傳遞。

另一方面，測定在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、振盪速度為 150 rpm，以含 2% 的膠體幾丁質培養液培養木黴菌四天發酵過程中發酵液的黏度。由圖二得知，發酵後之黏度從未發酵的 2.68 cP 經 12 小時的培養後迅速上升到 36.63 cP，然後發酵 24 小時則稍下降到 30.3 cP，此可能和微生物開始產生幾丁質酶可分解膠體幾丁質有關，然後微生物可以利用膠體幾丁質的碳源而大量生長，造成在發酵 36 小時至 96 小時的發酵液黏度從 31.57 cP 緩慢上升到 51.6 cP。由於整個發酵過程，發酵液的黏度還不致於升高太多，應不會造成氧氣傳遞的困難。而幾丁質酶的活性在發酵第一天起大量增加且呈線性的增加至第三天已達 0.08 U/mL，而後趨緩上升至第四天的 0.09 U/mL，此可知木黴菌生產幾丁質酶的發酵天數



圖二 2% 膠體幾丁質培養液在木黴菌發酵過程時的黏度和幾丁質酶活性變化
Fig. 2. The change of viscosity and chitinase activity at 2% colloidal chitin culture during *Trichoderma harzianum* fermentation.

以四天即可收槽。

二、搖瓶條件對錐形瓶氧氣傳遞係數的影響

表二是在固定振盪轉速 150 rpm 下，不同搖瓶體積 250 mL 及 500 mL 錐形瓶的氧氣傳遞係數 K_{La} 值。結果顯示，500 mL 有擋板和無擋板的錐形瓶中加入不同操作體積 200 mL、150 mL 和 100 mL，所測得的 K_{La} 值分佈在 4.51 和 44.28/h 之間，而 250 mL 有擋板和無擋板的錐形瓶中加入不同 50 mL 和 100 mL 操作體積，所測得的 K_{La} 值則分佈在 2.99 和 134.83/h 之間，且不論錐形瓶體積大小為何，皆以有擋板所測得之 K_{La} 值明顯大於無擋板者，故可知擋板能有效促進發酵液的擾動以增加錐形瓶中的液氣接

觸機會。至於發酵液的操作體積會影響發酵液在錐形瓶中和空氣接觸表面積的大小，使得發酵液操作體積較小者，其空氣接觸表面積較大，故所測得的 K_{La} 值明顯較大。劉和陳⁽⁷⁾曾指出無擋板錐形瓶的 K_{La} 值受操作體積影響較大，且在操作體積和錐形瓶體積比例相同時，所測得之 K_{La} 值則以 250 mL 錐形瓶大於 500 mL 錐形瓶。

表三則則是在不同的振盪轉速 (125、150 和 175 rpm) 和操作體積 (100、150 和 200 mL) 下，500 mL 有擋板錐形瓶的氧氣傳遞係數 K_{La} 值，隨著振盪轉速的增加會增加液氣接觸機會，使得 K_{La} 值增大。另一方面，可透過控制操作體積和振盪轉速一起調控 K_{La} 值，例如以 100 mL 和 150 rpm 操作下的 K_{La} 值為 44.28/h 和以 150 mL

表二 在固定轉速 150 rpm 下不同錐形瓶體積和操作體積之 K_{La} 值

Table 2. The effects of flask volume and working volume on oxygen transfer coefficient (K_{La}) at a constant rotary speed of 150 rpm

Flask volume (mL)	Baffle	Working volume (mL)	K_{La} (/h)	r^2
500	w	100	44.28	0.992
		150	34.9	0.994
		200	23.4	0.999
	w/o	100	14.4	0.998
		150	5.65	0.999
		200	4.51	0.997
250	w	50	134.83	0.999
		100	56.5	0.999
	w/o	50	56.5	0.994
		100	2.99	0.994

表三 有擋板 500 mL 的錐形瓶，以不同振盪速度、操作體積下之 K_{La} 值

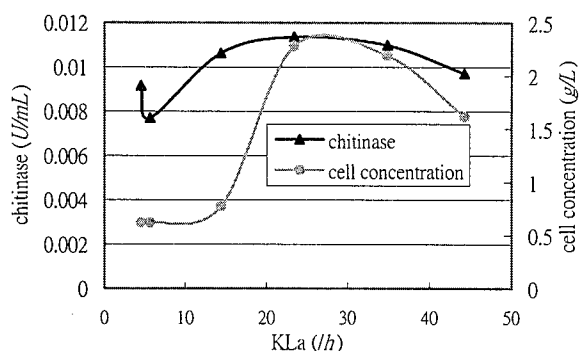
Table 3. The effects of rotary speed and working volume on oxygen transfer coefficient (K_{La}) in the 500 mL flask with baffle

Rotary speed (rpm)	Working volume (mL)	K_{La} (/h)	r^2
125	100	20.13	0.995
	150	11.90	0.999
	200	-	-
150	100	44.28	0.999
	150	34.90	0.994
	200	23.40	0.999
175	100	128.76	0.999
	150	43.73	0.973
	200	11.52	0.996

和 175 rpm 操作下的 K_{La} 值為 43.73/h 相近，這點為微生物在搖瓶培養上極需考慮的因素，因為振盪轉速太快，雖可有效地提高 K_{La} 值，但不一定有利於微生物的生長，故搖瓶時，只要配合適合操作體積和振盪轉速亦可達到適當的氧氣傳遞量。

三、不同氧氣傳遞係數對木黴菌發酵生產幾丁質酶之影響

為研究氧氣傳遞係數 K_{La} 值對木黴菌發酵生產幾丁質酶之影響，故選擇在 150 rpm 振盪轉速下，500 mL 有擋板和無擋板的錐形瓶中分別加入三種操作體積 200 mL、150 mL 和 100 mL 的 0.5% 膠體幾丁質培養液，進行木黴菌發酵。此六種操作條件的 K_{La} 值則分佈在 4.51 和 44.28 /h 之間(表二)。木黴菌發酵四天後其所產生幾丁質酶的活性和菌量的結果分別顯示於圖三中。由結果得知幾丁質酶活性在 150 rpm 下，500 mL 有擋板的錐形瓶之 K_{La} 值為 23.4/h 時最高為 0.0113 U/mL，且菌量也最多，之後趨於平緩。太低的 K_{La} 值，由於氧氣傳遞速度差並不有利於木黴菌生產幾丁質酶，故在發酵培養過程以 150 rpm 下，500 mL 錐形瓶控制 K_{La} 值在 14.4-23.4/h 之間來進行木黴菌發酵生產幾丁質酶為佳。



圖三 K_{La} 值對木黴菌發酵產生幾丁質酶活性和菌量的影響

Fig. 3. The effect of oxygen transfer coefficient (K_{La}) on chitinase production and cell concentration of *Trichoderma harzianum* fermentation.

結 論

本研究說明膠體幾丁質濃度會增加發酵液的黏度，在木黴菌發酵後，發酵液的黏度會增加。振盪錐形瓶的氧氣傳遞係數 K_{La} 值，則以有擋板者大於無擋板，轉速越快則 K_{La} 值越高，液氣接觸面積和培養液的操作體積比值越小，則 K_{La} 值越低，且在木黴菌搖瓶培養生產幾丁質酶時，以 K_{La} 值控制在 20-30/h 時幾丁質酶活性為佳。

謝 誌

本研究部分內容承蒙專題研究學生陳湘沂、張苑玲、謝仁琪和陳語潔同學的協助才得以順利完成，特此誌謝。

參 考 文 獻

- (1) 劉瓊淑：幾丁質、幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。《食品工業》，26: 26-35 (1994)。
- (2) 陳坤上、黃珮芬、陳聰松、陳幸臣：幾丁寡醣製備條件之探討。《食品科學》，23: 874-883 (1996)。
- (3) P. A. Felse and T. Panda: Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Proc. Biochem.*, 34: 563-566 (1999).
- (4) C. J. Ulhoa and J. F. Peberdy: Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2163-2169 (1999).
- (5) 蘇南維、李敏雄：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》，36: 65-76 (1998)。
- (6) 陳淑德、蕭玉玲、林世斌：培養基對木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 發酵生產幾丁質酶的影響。《宜蘭技術學報》，9: 9-14 (2002)。
- (7) 劉永銓、陳光宇：錐形瓶中氣液質傳係數及好氣培養菌體濃度之估算方法。《興大工程學刊》，10: 9-14 (1999)。
- (8) 張鴻達：鏈黴菌生產幾丁質酶條件探討，中興大學化學工程研究所碩士論文，台中，台灣 (2000)。
- (9) C. Carsolio, A. Gutierrez, B. Jimenez, M. V. Montagu and A. Herrea-Estrella: Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10903-10907 (1994).

