

探討 *Chitinibacter tainanensis* 醱酵條件及其 對植物病原菌之拮抗效果

陳志義、黃功銘

摘 要

本研究使用 *Chitinibacter tainanensis* 菌種進行發酵，生產幾丁質酵素與 N-乙醯葡萄糖胺酶，並評估對植物病原菌的拮抗作用。結果發現，當使用 yeast extract 為氮源時，添加碳酸鈣當做緩衝鹽類，菌量將達到 2.54 克/L。同時，利用幾丁質為碳源，產出幾丁質酵素 13.2mU/mL、N-乙醯葡萄糖胺酶 558.3mU/mL，分別在醱酵液之上清液可獲得。

由實驗結果知，醱酵液沉澱仍然保留幾丁質酵素和 N-乙醯葡萄糖胺酶的活性。因此，使用的 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4)，從沉澱細胞洗滌出殘餘酶的活性。結果顯示，在超音波震盪 10 分鐘後，幾丁質酵素 7.17 mU/ml 與 N-乙醯葡萄糖胺酶 558.3 mU/ml。收集醱酵液及緩衝洗滌液，進行測試對植物病原菌的拮抗作用影響；在各種微生物測試結果發現醱酵上清液對水稻秧苗立枯病有明顯之抑菌能力，但含酶緩衝洗滌液沒有拮抗作用。這結果證明，醱酵上清液的拮抗作用，是來自一些未知的化學品，非屬幾丁質酵素和 N-乙醯葡萄糖胺酶。它需進一步的研究，顯示了真正的化合物與醱酵液的拮抗作用機制。

關鍵詞：幾丁質酵素、N-乙醯葡萄糖胺酶、水稻秧苗立枯病、拮抗作用、病原菌。



Study on *Chitinibacter tainanensis* fermentation conditions and its antagonistic effect against plant pathogens

Chih-I Chen, Gong-Ming Huang

Abstract

In this study, the fermentation of *Chitinibacter tainanensis* was carried out to produce chitinase and N-acetyl-glucosaminidase and to evaluate their antagonistic effects against plant pathogens. It was found that when using yeast extract as the nitrogen sources and calcium carbonate as the buffer salt, the cell mass would reach 2.54 g/L. Meanwhile, by using chitin as the carbon source, the chitinase and N-acetyl-glucosaminidase would reach 13.2 mU/mL and 558.3 mU/mL respectively in the supernatant of the harvested broth.

It was observed that the cell precipitate of the broth still reserved chitinase and N-acetyl-glucosaminidase activities. Accordingly, 50 mM Tris buffer(pH7.4) was used to wash out the residual enzymes activities from the cells. The result showed that 7.17 mU/ml of chitinase and 558.3 mU/ml of N-acetyl-glucosaminidase can be obtained under a 10-min sonication. To test the effect of these collected solutions to the antagonistic effects against plant pathogens, various microorganisms were used in the tests. It was found that the supernatant displayed a significant inhibitive effect on *Sclerotium rolfsii*. Whereas, the washing-out buffer containing enzymes showed no antagonistic effect. This result proved that the antagonistic effect of the broth was due to some unknown chemicals and not from chitinase and N-acetyl-glucosaminidase. Further investigations should be performed to reveal the real compounds and mechanism about this antagonistic effect of the fermentation broth.

Keywords: chitinase, N-acetyl-glucosaminidase, *Chitinibacter tainanensis*, antagonism, *Sclerotium rolfsii*.



1. 前言

微生物、植物及其衍生物等研製的生物性植物保護製劑涵蓋有「微生物製劑」、「植物源農藥」及「生化農藥」等。生物性植物保護製劑對人畜較無毒害，不易危及非標的生物，對生態環境較友善，除可防治植物病害外，尚有助於作物生長[1]。農田與栽培介質中蘊藏有許多的微生物資源，其中包括細菌、真菌、放線菌及病毒等，除具有防治植物病原菌、線蟲及農業害蟲外，某些微生物尚具有提高作物吸收營養元素或促進作物生長的功效。

由於生物性植物保護製劑遠較傳統之化學藥劑危險性較少；專一性較高。對人、畜、野生動物，害蟲的天敵和有益昆蟲無害；使用少量即有效，分解快速，暴露風險低，無污染問題；無殘留量的問題，施用後可立即採收，因此不需訂定安全採收日期；可作為有害生物綜合管理（Integrated Pest Management, IPM）的一個方法和化學藥劑搭配使用，並可降低化學農藥之使用量，國內核准用於防治植物病害之生物性植物保護製劑僅有枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 及白鏈黴菌 (*Streptomyces candidus*)，這些拮抗菌株的拮抗能力通常來自其所分泌的代謝物質如可以抑制病原菌生長的抗生素或酵素（幾丁質酶）[2, 3]。隨著安全農業及農業永續經營之需求，開發新的植病防治資材

有其迫切性，因此，研發有益微生物作為植物保護製劑是實現生物防治的實際應用[4]。

生物防治中之微生物防治是利用一種或多種拮抗微生物，在自然或人為調控的環境下，降低病原的接種源密度 (inoculum density) 或致病能力，進而達到防治植物病害的目標[5]。拮抗微生物的拮抗作用、競爭作用或超寄生能力是拮抗菌在生物防治主要的防病機制[6]。水稻秧苗立枯病 (*Sclerotium rolfsii*) 主要在低溫期發生，初期造成秧苗生育不良呈萎凋狀，最後苗成淡褐色而枯死；被害秧莖有白色菌絲纏繞苗葉片枯黃，或害苗成白色枯死。利用對峙培養 (dual culture) 方式可以在實驗快速篩選具有拮抗能力的微生物[7]。幾丁質的分解是維持自然界生態系統平衡的一部分[8]。生物體結構中含有幾丁質的生物都具有幾丁醇素，主要用以維持細胞與外骨骼的型態；結構中缺乏幾丁質的生物所製造的幾丁醇素可能用以獲得碳源或氮源等營養[9]。一般而言，能夠生產幾丁質分解酵素的細菌[10]，可用其產生的幾丁醇素來分解植物病原真菌之細胞壁，發揮抑菌的作用則更能加強對真菌細胞壁的破壞，而提升抑菌能力[11]。

本實驗利用 *Chitinibacter tainanensis* 之菌株，探討培養基與醱酵天數，找尋幾



丁質酵素(Chitinase)和 N- 乙醯葡萄糖胺酶(NAGase)之醱酵產出最佳化條件，接續試驗拮抗病原菌效果。另外，使用另一株菌 *Paenibacillus taichungensis* 醱酵產出 chitinase 和 NAGase；利用 *C. tainanensis* 和 *P. taichungensis* 醱酵培養方式，調製各種不同含量之 chitinase 和 NAGase，探討各種製備醱酵液對多種病原菌之拮抗效果與其拮抗機制。進而將其導入農業生態體系中，作為生物防治用之菌種。

2. 材料與方法

2.1. 菌種培養

本實驗所使用 *C. tainanensis* (BCRC17254)，係中油嘉義煉製所提供，屬新種好氧菌，經醱酵易產出高活性 chitinase 與 NAGase。*P. taichungensis* 係中興大學劉永銓教授實驗室提供，菌體形態為內生孢子，具有生產 chitinase 能力。*Sclerotium rolfii*、*Glomerella cingula*、*Fusarium sp.*、*R. solanii* 等病原菌係農委會霧峰農業試驗所提供。

2.1.1. 菌種活化

取出冷凍保存之菌種，以固態培養基活化之，置於 30°C 的恆溫箱中培養 24 小時後，置於 4°C 下冷藏備用，一週內重新活化。固態培養基成份：chitin powder 10g/L、LB broth 25g/L (Tryptone 10g/L,

Yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L)、Agar 20g/L。

2.2.2. 液態培養

從菌種活化之菌體，取 2 個接種環至培養基中，置於往覆式震盪培養箱中，於 30°C、100 rpm 培養 8 小時，*C. tainanensis* 種菌液態培養基成份為 LB 2.5% 和 glucose 0.1%；*P. taichungensis* 種菌液態培養基成份為 Chitin 1%、Peptone 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.1%。

在 500ml 有溝錐形瓶中，配製接種主培養基 100 ml (*C. tainanensis* 培養基成分如表一；*P. taichungensis* 培養基成分：Chitin 5.54%、Peptone 0.18%、(NH₄)₂SO₄ 0.16%)。將上述接種培養 8 小時之 10ml 種菌液，加入 100ml 主培養基。於 30°C、100rpm 條件下，振盪培養 48 小時，進行醱酵主培養。

2.2 活性分析

2.2.1 Chitinase活性分析

以 0.4ml 醋酸鈉緩衝液 (pH5.5 0.1M)、0.2ml sample、0.2ml CM-CHITIN-RBV (Carboxymethyl Chitin Remazol Brilliant Violet 5R；Loewe Biochemica GmbH, 2mg/ml)，置於 37°C，反應 30min。再加入 0.2ml, 2N HCl，置於冰浴 10min。以 10000rpm 離心 5min，取上清液以波長 550nm，測其吸光值 OD₅₅₀。利用校正曲線，求出待量測之酵



素活性。酵素活性(1 unit)定義為每分鐘生成 1 mg chitin-RBV。

2.2.2 NAGase活性分析

在 eppendorf 中加入 150 μ L buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 7.0)與 150 μ L 基質(0.36 mM PNP-GluNAc)均勻震盪。加入 30 μ L 酵素液，置於 30°C 下反應 30min。加入 30 μ L, 1M NaOH，置於冰浴 5min。以 10000rpm 離心 5min，在 405nm 下其吸光值。利用校正曲線，求出待測 NAGase 之活性。定義 1 unit 酵素活性為每分鐘生成 1 μ mole NAG。

2.3 菌數測定

使用最為廣泛的標準平板測定法(CFU/ml)，菌液依照等比稀釋後，取 100 μ L 均勻分散於固態培養基上，兩天後計算形成之菌落數，來判斷培養過程中活菌的數量。

2.4 拮抗試驗

2.4.1 製備各種酵素液

將上述振盪培養 48 小時後，主培養液以 10000rpm、5 分鐘離心，取上清酵素液(supernatant enzyme solution, SES)。接著，沉澱物加入適量 buffer(0.01M, pH 7.4 Tris-HCl)震盪 10 分鐘，再以 10000rpm、5 分鐘離心後，取上清酵素液稱為沈澱酵素液(precipitation enzyme solution, PES)；使用等體積

buffer，震盪均勻，此部份稱為菌體沈澱液(cell precipitation solution, Cell)。經此連續步驟，取到 SES、PES、Cell 共三部分酵素液。

2.4.2 對峙培養

C. tainanensis 培養 2 天後，依上述 2.4.1 步驟製備 SES、PES、Cell 等 3 種酵素液。將上述三種酵素液之一種，上塗於固態培養基左邊，接著 *C. tainanensis* 菌的 agar 取一小圓片貼於此區域內，形成 *C. tainanensis* 菌與酵素液共存一個區域；病原菌塗於右邊。當病原菌菌絲生長擴散後，觀察是否通過 *C. tainanensis* 菌體區及酵素液區，藉此方法快速篩選 *C. tainanensis* 菌及酵素液對各種病原菌之抑制能力。

2.4.3 抑菌率

在約 50°C 下，將待測試之溶液與 potato dextrose agar (PDA)以 1:1 比例混合，此培養基稱為 PDA X；X: 待測試之溶液(如 SES、PES、Cell)。將病原菌的 agar 取一小圓片貼於 PDA X 上，對照組為 PDA。培養 5 天，第三天觀察並比較病原菌之菌絲的生長情形，計算抑菌率。

$$\text{抑菌率(\%)} = (C_1 - C_2) / C_1 * 100\%$$

C₁: 對照組菌落直徑

C₂: 待測組菌落直徑



2.5 菌體乾重測定

將醱酵液與去離子水稀釋成各種濃度，用 UV-VIS 於波長 600nm 測得 OD₆₀₀ 值。另外，將此濃度之醱酵液置於 50°C，24h 下烘乾，測得菌體乾重(Dry cell weight; DCW)。將菌體乾重(g/L) 與 OD₆₀₀ 值關係作圖，得檢量線。利用檢量線，求出待測菌體乾重值(DCW)。

3. 結果與討論

3.1 培養基效應

首先探討培養基效應，嘗試提升 *C. tainanensis* 菌體量，期望得到高酵素之 Chitinase 與 NAGase 量。將在 *C. tainanensis* 種菌液態培養基添加易溶解的葡萄糖 0.1%及 1%，結果如圖一。由圖一 (▲)LB broth+1% Glucose 之曲線，過量的葡萄糖，會導致培養液趨於酸性(pH=4.5)；培養 4 小時後，菌量濃度為 0.4 g/L，不利 *C. tainanensis* 菌生成。由中圖(●) LB broth+0.1% Glucose 之曲線看到，培養時間為 0 – 4h 時，培養液趨於酸性(pH=6.8 降至 5.5)。培養 4 小時後，葡萄糖消耗完，菌量濃度達最高(約 1.1 g/L)。因此在下面實驗中，以培養 6-8 小時之培養液，作為種菌液。取 10%種菌液至主醱酵液培養。此操作基本上，不影響主醱酵液內碳源與 pH 值。

添加 1% 各種氮源，測試對 *C. tainanensis* 菌生長影響，結果如圖二。由圖二發現，使用 yeast extract 作為氮源，*C. tainanensis* 菌之 DCW 為 2.0g/L、pH=4.78 為最佳。另外，針對培養過程中，pH 趨於酸性之問題，依照陳等人[12]所述，添加 CaCO₃有利於 *C. tainanensis* 醱酵產出 NAGase。因此，嘗試添加 CaCO₃ 於培養基，測試對 *C. tainanensis* 菌生長影響，結果如圖三。由圖三可知，CaCO₃ 之添加，可將 pH 值維持在 5.0 - 5.5 間。在添加 4 g/L CaCO₃ 下，*C. tainanensis* 培養液之 pH 值為 5.2，DCW 達到最高量 2.45 g/L。故主培養基添加 1% yeast extract 與 4 g/L CaCO₃。

3.2 培養基之比較

一般培養基的不同，菌體的代謝與適應也會受影響。BHSI broth (BHSI)為食品工業研究所提供成分；chitin broth (CB) 為本研究依上述實驗，擬出之修飾培養基(如表一)。接著，使用 *C. tainanensis* 進行 96h 培養，再依步驟 2.4.1 製備 SES、PES 酵素液，探討使用兩種培養基(BHSI 與 CB)；分別以 (■) BHSI- SES、(●) BHSI-PES、(▲) CB-SES、(▼) CB-PES，再依步驟 2.2 活性分析，表示各種酵素液之 chitinase 和 NAGase 量之變化。依步驟 2.3 菌數測定以(■) BHSI、(▲) CB 測試 pH 值和 *C. tainanensis* 菌數變化，結果如



圖四(a)chitinase 量變化、(b) NAGase 量變化、(c)pH 值變化、(d) CFU/mL 量變化等圖。由圖四(a)CB(▲)培養基，培養 *C. tainanensis* 96h 後，得到約 6-8 mU/ml chitinase 酵素及微量 NAGase。接續，進行測試拮抗病原菌時，可易於比較 chitinase 活性對拮抗病原菌之效果試驗。圖四(b)中，CB 之 SES，隨培養時間(0-96h)增加，NAGase 量都沒生成。在圖四(c)中，以 CB 培養(0-96h)過程，pH 值隨培養時間增加，pH 值下降，當 t=40h 後，pH 值穩定在 5.5。在圖四(d)中，比較活菌 CFU 數量的變化，以 CB(▲)培養時，培養(0-96h)過程，剛開始 CFU 值隨培養時間增加，當 t=10h 後，CFU 有最大量出現活菌 CFU 數約 10^{11} ，當 t=40h 後降至為 0。同樣情形，以 BHSI 培養時，活菌數有類似變化，當 t=10h 後，CFU 有最大量出現活菌 CFU 數約 10^{10} ，當 t=30h 後降至為 0。由此可知，BHSI 較不利於菌體的生長。因此選用 CB 培養基，減少 pH 值對測試病原菌之拮抗效果困擾。

3.3 植物病原菌之拮抗能力試驗

3.3.1 三明治法之抑菌測試

Glomerella cingula 為蓮霧炭疽病之病原菌；FO428 為蕃茄镰胞菌之病原菌、FOL04 為番茄萎凋病之病原菌，屬於 *Fusarium solani* 病原菌、FO50 為國蘭軟腐病之病原菌和 FO51 為國蘭根腐病之病

原菌，屬於 *Fusarium sp.* 病原菌；RST04 為水稻紋枯病之病原菌、RS0507 為水稻紋枯病之病原菌，屬 *Rhizoctonia solanii* 病原菌，SR0414 為水稻秧苗立枯病之 *S. rolfisii* 病原菌，係農委會霧峰農業試驗所提供。

C. tainanensis 在培養兩天後，依步驟 2.4.1 製備 ESE、PES、cell 等酵素液。接著，依 2.4.2 對峙培養之步驟，進行三明治法之抑菌測試，結果如表二。由表二知，抑菌能力方面，以 SES 部份較強，其中 SES 對 RS0507 水稻紋枯病 (*Rhizoctonia solani*)病原菌有 100%之抑制率；對 SR0414 水稻秧苗立枯病 (*Sclerotium rolfisii*) 病原菌有 77.95%抑制率效果。

Mahadevan 等人 [13] 發現 *S. lydicus* WYEC108 (Actinovate[®]) 菌株會高度分泌 chitinase，其具有拮抗病原真菌的能力。研究發現它除了可阻擾 *P. ultimum* 的卵孢子發芽外，亦可破壞其菌絲的細胞壁，使豌豆種子免於遭受腐霉菌 (*Pythium ultimum*) 的危害，保護率達 60% 以上。一般在文獻中，較少提到使用 Chitinase 與 NAGase 應用於 *S. rolfisii* 之生物防治功用，但由表二，發現 SES 抑制 *S. rolfisii* 明顯效果。因為 SES 內含 32.34 mU/ml Chitinase 與 10.86 mU/ml NAGase，因此需再進一步確認兩酵素何



者有直接影響，故嘗試使用 BHSI 與 CB 培養基，以 *C. tainanensis* 培養 72h，再依步驟 2.4.1 製備 ESE、PES、cell、mixture (SES:PES=1:1) 等酵素液，使用這些酵素液針對 *S. rolfisii* 進行抑菌測試，結果如表三。由表三知，CB broth 之 SES 具有良好的抑菌率效果 (77.06%)。而將 SES 與 PES, mixture 以 1:1 方式混合後，其抑菌能力則降為 36.47%，抑菌能力為 SES 之 1/2。以 BHSI broth 之 mixture，抑菌率由 44.71% 降至 7.06%，抑菌能力差。整體上 CB broth 之 SES，有較好的抑制效果。圖五與圖六為抑菌能力之實驗結果。由圖六(d) BHSI 之 mixture，看出 PES 與 Cell 對病原菌毫無抑制效果。尤其，當第五天時，病原菌部分仍然長滿 plate；表示 SES 雖可抑制 *S. rolfisii*，但培養時間延長後，抑制 *S. rolfisii* 效果變差。

3.3.2. *C. tainanensis* 與 *P. taichungensis* 培養液之抑菌效果

Chamberlain 等人 [14] 發現 *Streptomyces violaceusniger* YCED9 菌株可以產生 nigericin、geldanamycin、Guanidylfungin A、chitinase、NAGase 及 β -1,3 glucanase。施用 *S. violaceusniger* YCED9 孢子至草皮可以防治 *R. solani* 引起的苗床病害及 *S. homeocarpa* 引起的 crown-foliar 病害。由圖四知 CB(▲) 內主含量為 chitinase (約 6-8 mU/ml)；表

三與圖五結果得知，CB broth 之 SES，具有良好的抑菌率效果，推測抑菌效果係來自 Chitinase。

El-Tarabily 等人 [15] 採用數種放線菌防治 *P. coloratum* 引起胡蘿蔔之孔斑病 (cavity-spot)，醱酵液成份對病原菌的菌絲及卵孢子超寄生，隨後卵孢子的細胞質出現崩解，因而死亡。因此接續，嘗試在培養過程中，加 *P. taichungensis*，以兩菌株分別醱酵培養的形式，增加酵素液中 chitinase 含量；再以此酵素液之 SES 與 PES 進行抑菌試驗，實驗結果如表四所示。由表四知 *P. taichungensis* 在單一培養下，broth 之 SES 含 chitinase 為 11.71 mU/ml，對 *S. rolfisii* 之抑制率僅 23.53%；培養液之 SES 依然具有抑菌率的能力 (44.12%)。由此可知 *C. tainanensis* 與 *P. taichungensis* 共培養液，仍具有相當的抑菌能力；但主要抑菌能力，係來自於 *C. tainanensis* 培養液之 SES 部份。

接續，嘗試 *C. tainanensis* 與 *P. taichungensis* 分別醱酵培養或共培養 (co-culture)，製備各種 SES、PES 之酵素液，觀察酵素液內 chitinase 與 NAGase 濃度對 *S. rolfisii* 之抑制效果測試、菌絲體的型態變化，結果如圖七與表四。由圖七發現 *C. tainanensis* 之 SES 有 8.01 mU/ml chitinase 與 68.24% 抑菌之功效；另外，co-culture 之 SES 有 8.53 mU/ml chitinase



與 65.29% 抑菌之功效。而 *P. taichungensis* 之 SES 有 11.71 mU/ml chitinase 與 23.53% 抑菌之功效；*C. tainanensis* 與 *P. taichungensis* 之 SES 有 9.86 mU/ml chitinase 與 44.12% 抑菌之功效，顯示 Chitinase 非主要抑菌因素。另外，co-culture 之 SES 部份菌絲體上產生菌核，表示係環境不適合病原菌生長；當培養第 5 天時，病原菌快速生長，佔滿培養皿。此結果表示 SES 內有某些抑菌成份，當此量越多，抑菌效果越明顯；反之，當此量降低，病原菌即快速生長。

進一步將 *C. tainanensis* 之 SES 收集，另外使用 0.2 μm pore size 之 filter，收集透析後醱酵液(pre-SES)。將兩者經 100°C x 15min 處理後，測試抑菌效果：SES 為 78.8%，pre-SES 為 79.2%；兩者結果均較未高溫處理之 SES 高(68.24%)。Chitinase 與 NAGase 經高溫處理後均會失活，表 SES 內含一些直徑 < 0.2 μm 之小分子且水溶性的拮抗物質，詳細成份與拮抗機制，需再進一步分離純化與探討。

4. 結論

病原菌之細胞壁，主要組成幾丁質，拮抗微生物利用微寄生作用，寄生於病原上，菌絲上分泌 chitinase 分解寄主病原菌之細胞壁，使其菌絲或生殖構造被破壞甚至死亡。*P. taichungensis* 之 SES 可

抑制 *S. rolfii*，但無法完全殺死病原菌；雖然，在 *C. tainanensis* 培養液之 PES 內含高濃度 NAGase；*P. taichungensis* 培養液之 SES 內含高濃度 Chitinase，但兩者在拮抗上並沒有明顯的抑菌效果。相對的，以 *C. tainanensis* 培養液之 SES，對病原菌 *S. rolfii* 有抑制作用。由以上實驗發現，*C. tainanensis* 或 *P. taichungensis* 產生之 Chitinase 與 NAGase，非抑制病原菌生長之因素；而 *C. tainanensis* 培養液之 SES 具抑菌效果，可能來自 SES 所含小分子抗生物質，需再進一步分離純化，探討實際成份與拮抗機制。

5. 誌謝

感謝中興大學化工系劉永銓教授與實驗室同學之協助，使得本實驗得以順利進行，其中黃功銘學弟在文獻資料上之蒐尋及菌種保存上之幫助，在此一併感謝。

參考文獻：

- [1] 林漢釗, 黃文的, 楊尚書與曾德賜, 枯草桿菌 *Bacillus subtilis* WG6-14 對水稻秧苗之生長促進及對 *Sclerotium rolfii* 所造成水稻秧苗立枯病之防治效果. *Plant Pathology Bulletin* 2008. 17: p. 53-64.
- [2] Dickinson, J.M., J.R. Hanson, and A. Trunch, Metabolites of some



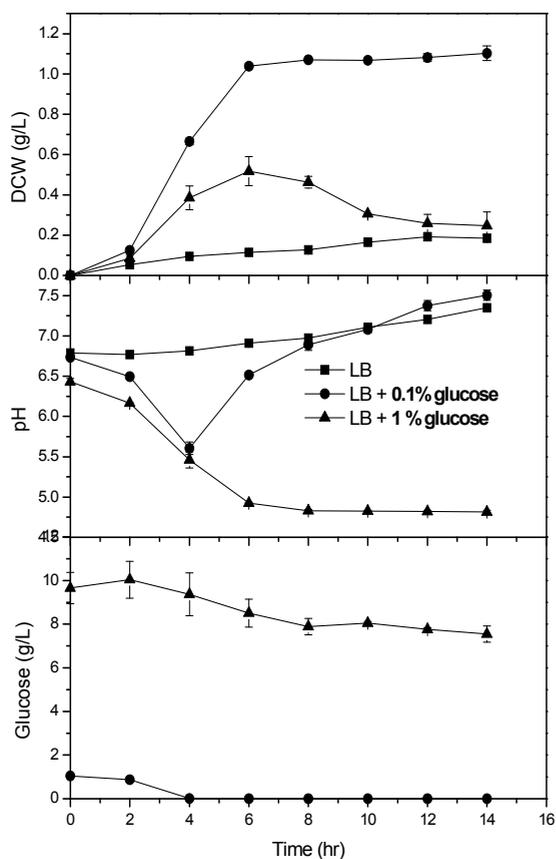
- biological control agents. *Pesticide science*, 1995(44): p. 389-393.
- [3] Fravel, D.R., Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 1988. **26**: p. 75-91.
- [4] 石信德, 黃振文與謝廷芳, 台灣生物植物保護製劑防治作物病害的研發與應用. *農業試驗所特刊*, 2006: p. 157-169.
- [5] Baker, R., Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1968. **6**: p. 263-294.
- [6] Cook, R.J., Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1993. **31**: p. 53-80.
- [7] Johnson, L.F. and E.A. Curl, Methods for Research on the ecology of soilborne plant pathogens. 1972, Minnesota, USA: Burgess Publishing Company.
- [8] Boyer, J.N., Aerobic and anaerobic degradation and mineralization of ¹⁴C-chitin by water column and sediment inocula of the York River estuary. *Applied and environmental microbiology*, 1994. **60**: p. 174-179.
- [9] Cohen-Kupiec, R. and I. Chet, The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998. **9**: p. 270-277.
- [10] 黃建瑞, 陳昭瑩, 植物的醫病良方-幾丁質分解性拮抗細菌. *科學發展*, 2005. **391**: p. 28-33.
- [11] 陳錦坤、陳盈臻、方炳勳、黃冬梨、李政誠與沈宏俊, *Chitinibacter tainanensis* N - 乙醯葡萄糖胺酶之研究. 幾丁質幾丁聚醣研討會論文專輯, 2007b: p. 263-266.
- [12] 陳錦坤、陳盈臻、方炳勳、黃冬梨、李政誠與沈宏俊, 碳酸鈣對 *Chitinibacter tainanensis* 生產 N - 乙醯葡萄糖胺之影響. 幾丁質幾丁聚醣研討會論文專輯, 2007: p. 259-262.
- [13] Mahadevan, B., and Crawford, D. L., Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microbial Technol.* 1997. **20**: p. 489-493.
- [14] Chamberlain, K. and Crawford, D. L., In vitro and vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Indu. Micro. Biotech.* 1999, **23**: p. 641-646.
- [15] El-Shanshoury, A. R., El-sououd, S. A., Awadalla, O. A. and El-Bandy, N. B., Effects of *Streptomyces corchorusii*, *Streptomyces mutabilis*,



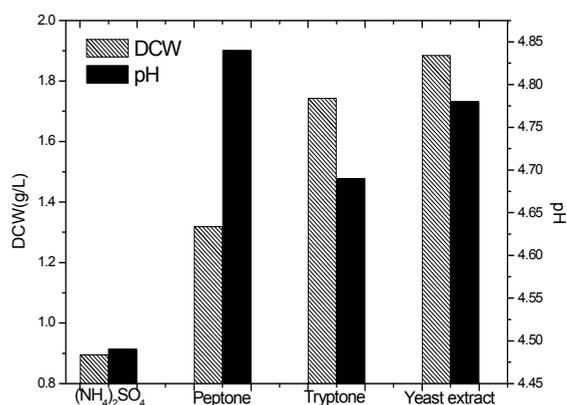
pendimethalin, and metribuzin on the control of bacterial and Fusarium wilt of tomato . Can. J. Bot. 1996, 74:p. 1016-1022.

表一、BHSI 與 CB 培養基成份

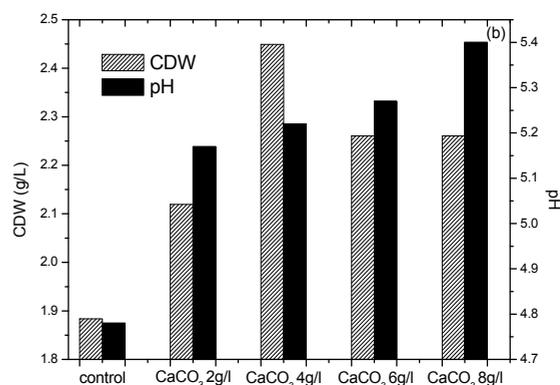
BHSI		Chitin Broth	
β -chitin powder	20g/L	β -chitin powder	20g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4g/L	Yeast extract	10g/L
KH ₂ PO ₄	1g/L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1g/L	KH ₂ PO ₄	2g/L
KNO ₃	1g/L	NaCl	2.5g/L
		CaCO ₃	4g/L



圖一、不同量葡萄糖培養 *C. tainanensis* 菌種之影響



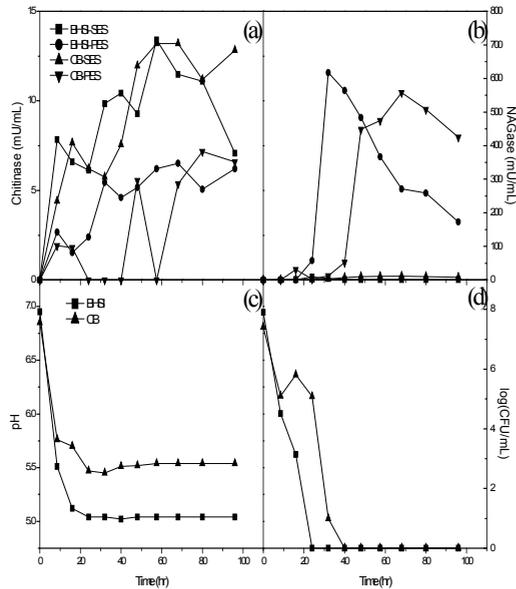
圖二、不同氮源對 *C. tainanensis* 菌體生長之影響



圖三、不同碳酸鈣量對 *C. tainanensis* 菌體生長之影響



表二、三明治法之抑菌效果



圖四、*Chitinibacter tainanensis* 生長曲線 (chitinase, NAGase, pH 和 CFU/mL) 變化。(a) chitinase 量變化; (b) NAGase 量變化; (c) pH 變化; (d) CFU/mL 量變化

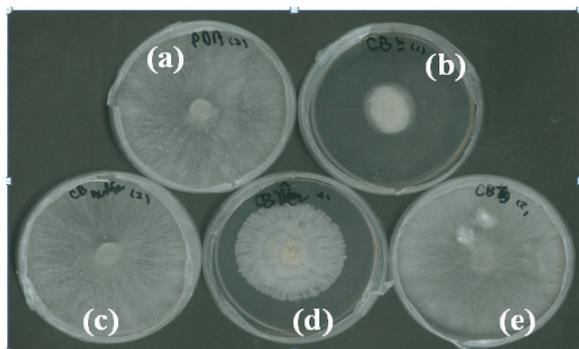
病原菌編號	酵素液種類		
	PES	SES	Cell
	抑菌率(%)		
<i>G. cingula</i>	15.93	24.33	10.85
FO428	0.00	0.00	7.46
FOL04	0.00	4.20	0.00
RST04	8.75	39.04	0.00
RS0507	25.51	100.00	35.02
SR0414	19.18	77.95	36.07
FO50	16.42	26.34	20.92
FO51	0.00	0.00	0.00
	活性量 (mU/ml)		
Chitinase	25.64	32.34	5.43
NAGase	1331.25	10.86	584.57

表三、不同培養基之 *C. tainanensis* 酵素液拮抗 *S. rolfsii* 菌能力比較

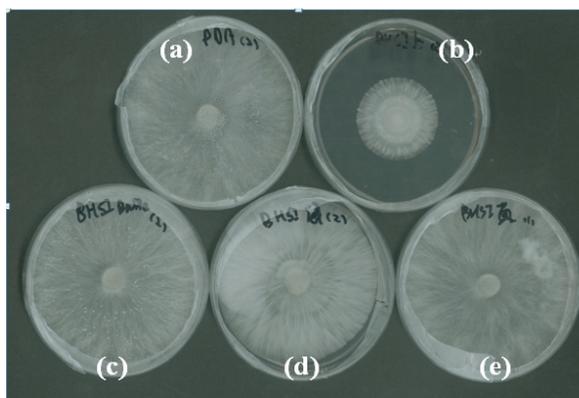
	菌絲生長直徑 (mm)	抑菌率(%)	Chitinase (mU/mL)	NAGase (mU/mL)
control	85±0	0.00	-	-
CB	20±12.0	77.06	6.89	8.36
PES	85±0	0.00	2.96	485.04
mixture ^a	54±0	36.47	4.92	246.70
cell	85±0	0.00	0.00	238.99
BHSI	47±9.9	44.71	4.33	4.28
PES	85±0	0.00	2.74	592.50
mixture ^a	79±0	7.06	3.54	298.39
cell	85±0	0.00	0.00	451.69

^a SES 與 PES 等比例混合





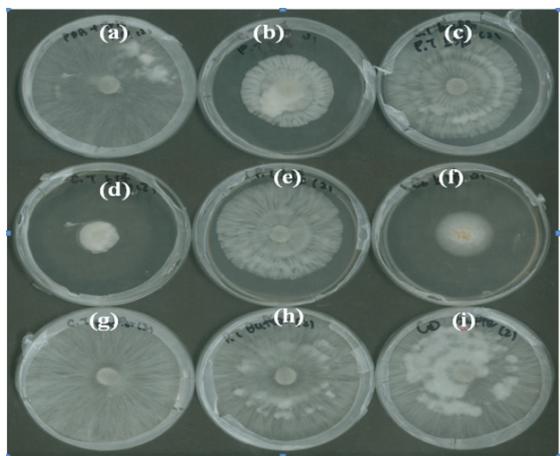
圖五、*C. tainanensis* 以 CB 培養添加各種製備酵素液之生長情形 (a)control,(b)SES,(c)PES,(d)Mixture,(e)Cell



圖六、*C. tainanensis* 以 BHSI 培養添加各種製備酵素液之生長情形 (a)control,(b)SES,(c)PES,(d)Mixture,(e)Cell

表四、*C. tainanensis* 與 *P. taichungensis* 培養，製備各種酵素液之抑制 *S. rolfsii* 菌能力

	菌絲生長直徑 (mm)	抑菌率(%)	Chitinase (mU/mL)	NAGase (mU/mL)
control	85±0	0.00	.	.
<i>C. tainanensis</i> SES	27±5.7	68.24	20.52	15.23
<i>C. tainanensis</i> PES	85±0	0.00	10.09	299.94
<i>P. taichungensis</i> SES	65±0	23.53	27.22	0.37
<i>P. taichungensis</i> PES	85±0	0.00	15.93	0.26
Co-culture SES	29.5±2.1	65.29	21.48	18.27
Co-culture PES	85±0	0.00	14.30	505.98
<i>C.sp</i> and <i>P.sp</i> SES mixture	47.5±0.7	44.12	23.87	7.80
<i>C.sp</i> PES and <i>P.sp</i> SES mixture	70±0	17.65	18.66	150.16



圖七、*C.tainanensis* 與 *P. taichungensis* 培養，製備各種酵素液對 *S. rolfsii* 病原菌之拮抗作用(a)control, (b) SES mixture by *C.tainanensis* and *P. Taichungensis*, mixture ratio=1:1, (c) mixture by PES of *C.tainanensis* and SES of *P. Taichungensis*, mixture ratio=1:1, (d) SES of *C. Tainanensis*, (e) SES of *P. Taichungensis*, (f) SES of co-culture, (g) PES of *C. Tainanensis*, (h) PES of *P. Taichungensis*, (i) PES of co-culture.