

# 利用 *Aeromonas caviae* DYU-BT4 之幾丁質分解酵素水解幾丁質生產 N-乙醯幾丁寡醣

李宜玲、涂瑞澤；余世宗

E-mail: 9318391@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究目的為篩選土壤中具有分解幾丁質能力之菌株，利用 HPLC 分析幾丁質水解產物，藉由發酵槽大量培養，探討不同碳源濃度下，生質量、還原醣量、幾丁質分解酵素活性及 N-乙醯葡萄糖胺之產量，以 DEAE-Sepharose CL-6B 離子交換層析管柱與 Sephadex G-100 膠體過濾層析管柱純化不同培養時間之幾丁質分解酵素，並利用 SDS-PAGE 分析幾丁質分解酵素之蛋白質的分子量與酵素之特性。從雲林縣濁水溪河畔之土壤，篩選出具有分解幾丁質能力之菌株，此菌株經新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心鑑定為 *Aeromonas caviae*，故命名為 *Aeromonas caviae* DYU-BT4。此菌株於蝦殼粉、烏賊軟骨、幾丁質粉末及膠態幾丁質為碳源之培養基中，其幾丁質水解產物是以 N-乙醯葡萄糖胺為主，其中以膠態幾丁質為碳源時所得之 N-乙醯葡萄糖胺產量最高，約為 39% (w/w)。以發酵槽批次培養菌株 BT4 可以縮短 N-乙醯葡萄糖胺之生產時間，提高培養基碳源濃度則可增加 N-乙醯葡萄糖胺產量。*Aeromonas caviae* DYU-BT4 之發酵液經純化後，以 SDS-PAGE 分析，在分離膠體中添加 0.1% 乙二醇幾丁質，可直接從膠片上得知具有幾丁質分解酵素活性之蛋白質分子量為 75 kDa。此酵素之最適反應溫度為 40 °C；最適反應 pH 為 7；由酵素動力反應中，Km 值為 1.87 g/L，Vmax 值為 213 U/L；Co<sub>2</sub>+ 可提高酵素活性，而 Ag<sup>+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup> 及 Zn<sup>2+</sup> 等金屬離子會對酵素活性有抑制作用。

關鍵詞：幾丁質分解酵素；*Aeromonas caviae*

## 目錄

目錄封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	v
誌謝.....	vii	目錄.....	viii	圖目錄.....	xiii
第一章 緒論.....	1	第二章 文獻回顧.....	3	2.1 幾丁質.....	3
2.1.1 幾丁質之結晶結構.....	3	2.1.2 幾丁質之製備.....	5	2.2 幾丁質分解酵素.....	5
2.2.1 幾丁質分解酵素的分布.....	5	2.2.2 幾丁質分解酵素之分類.....	6	2.2.3 幾丁質分解酵素的活性測定.....	8
2.3 N-乙醯幾丁寡醣.....	10	2.3.1 N-乙醯幾丁寡醣之製備.....	10	2.3.2 N-乙醯幾丁寡醣之分離.....	11
2.3.3 N-乙醯幾丁寡醣之應用.....	12	2.4 酵素分離與純化.....	12	2.4.1 硫酸銨沉澱.....	13
2.4.2 離子交換層析法.....	13	2.4.3 膠體過濾層析法.....	13	2.5 SDS-PAGE 之原理.....	16
2.5.1 聚丙烯醯胺凝膠的形成和結構.....	16	2.5.2 起始劑、增速劑和聚合.....	17	2.5.3 聚丙烯醯胺凝膠之分離機制.....	17
2.5.4 聚丙烯醯胺凝膠染色.....	20	2.6 微生物 <i>Aeromonas caviae</i> 之簡介.....	22	2.6.1 微生物 <i>Aeromonas caviae</i> 之特性.....	22
2.6.2 微生物 <i>Aeromonas caviae</i> 之相關研究.....	22	第三章 材料與方法.....	25	3.1 藥品.....	25
3.2 儀器設備.....	26	3.3 培養基與試劑的配製.....	27	3.3.1 培養基之組成.....	27
3.3.2 膠態幾丁質之製備.....	28	3.3.3 蝦殼粉之製備.....	29	3.3.4 烏賊軟骨之製備.....	29
3.3.5 McIlvaine buffer 之配製.....	29	3.3.6 呈色劑之配製.....	29	3.3.7 樣品緩衝液之配製.....	29
3.3.8 CBR 染液之配製.....	30	3.3.9 脫色液之配製.....	30	3.3.10 電泳緩衝液之配製.....	30
3.4 幾丁質分解菌之篩選.....	32	3.4.1 採樣地點.....	32	3.4.2 篩選菌株.....	32
3.4.3 菌種保存.....	32	3.5 批次發酵槽之發酵試驗.....	33	3.5.1 批次發酵培養條件.....	33
3.5.2 操作步驟.....	33	3.6 分析方法.....	34	3.6.1 幾丁質分解酵素活性測定.....	34
3.6.2 還原醣含量.....	34	3.6.3 生質量與幾丁質殘餘量之測定.....	35	3.7 幾丁質分解酵素之特性分析.....	35
3.7.1 粗酵素液之最適基質濃度.....	35	3.7.2 粗酵素液之最適反應 pH 值.....	35	3.7.3 粗酵素液之最適反應溫度.....	36
3.8 N-乙醯幾丁寡醣之測定.....	36	3.8.1 水解產物前處理.....	36	3.8.2 高效能液相層析儀分析.....	37
3.9 N-乙醯幾丁質分解酵素純化.....	37	3.9.1 硫酸銨沉澱.....	37	3.9.2 離子交換層析.....	37
3.9.3 膠體過濾層析.....	37	3.10 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析.....	39	3.10.1 樣品前處理.....	39
3.10.2 製備 SDS-聚丙烯醯胺膠片.....	39	3.10.3 分子量之分離.....	39	3.10.4 膠片染色與脫色.....	41
3.10.5 在電泳膠片上分析幾丁質分解酵素活性.....	41	3.11 純化酵素之特性分析.....	41	3.11.1 酵素液之最適反應 pH 值與 pH 值穩定性.....	41
3.11.2 酵素液之最適反應溫度與溫度穩定.....	41				

性.....	42	3.11.3 酵素液之最適基質濃度.....	42	3.11.4 金屬離子對酵素活性之影響.....	43	第四章 結果與討論.....	44
4.1 幾丁質分解菌之篩選.....	44	4.1.1 各菌株之生長曲線.....	44	4.1.2 各菌株之幾丁質分解酵素活性比較.....	44	4.1.3 篩選菌株之水解產物分析.....	47
4.1.4 菌株BT4之鑑定.....	47	4.2 幾丁質粗酵素液之特性分析.....	51	4.2.1 最適反應基質濃度.....	51	4.2.2 最適反應pH值.....	51
4.2.3 最適反應溫度.....	54	4.3 不同碳源之水解產物分布.....	56	4.4 批次發酵培養.....	61	4.4.1 生質量.....	61
4.4.2 還原醣量.....	61	4.4.3 幾丁質分解酵素活性.....	62	4.4.4 N-乙醯葡萄糖胺產量.....	62	4.5 N-乙醯幾丁質分解酵素純化.....	68
4.5.1 於1%幾丁質培養基之批次發酵培養.....	68	4.5.2 於2%幾丁質為碳源之批次發酵培養.....	71	4.6 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析.....	81	4.7 純化酵素之特性分析.....	91
4.7.1 最適反應pH值與pH值穩定性.....	91	4.7.2 最適反應溫度與溫度穩定性.....	91	4.7.3 最適基質濃度.....	94	4.7.4 金屬離子對酵素活性之影響.....	99
4.7.5 最適基質濃度.....	94	第五章 結論.....	101	參考文獻.....	102		

## 參考文獻

- 參考文獻 1.王三郎(1997)蝦蟹加工廢棄物之利用。水產資源利用學，高立圖書公司，台北，75-80。 2.朱元珍、陳幸臣(2004)人體糞便中產氣莢膜桿菌幾丁質酶的純化與性質之研究。台灣幾丁質幾丁聚醣學會年會暨幾丁質類生物高分子研討會論文集，11-16。 3.李美葉(2000)幾丁質類物質在膳食與醫療之助益及潛在問題。生物資源生物技術，2(2): 29-33。 4.林仲聖、薛夢娟、廖桂晴(2001)蝦殼廢棄物中幾丁質?生產菌的篩選及最適生長條件的探討。元培學報，8: 21-35。 5.火田野功太(1992)幾丁質、脫乙醯幾丁質與幾丁質水解?在日本之研究發展現況。生物產業，3: 157-167。 6.陳錦坤、許清輝、李錦榆、林忠亮、方炳勳、黃冬梨、吳奇生(2001)在電泳片上直接分析chitinase活性的新方法。明志技術學院90學年度技術與教學研討會論文專輯，21-23。 7.陳坤上、李國誥、陳幸臣(1994)醣類對Aeromonas caviae的生長及水解蝦殼能力之影響。食品科學，21(2): 96-106。 8.陳坤上、黃佩芬、陳聰松、陳幸臣(1996)幾丁寡醣製備條件之探討。食品科學，23(6): 874-883。 9.陳澄河(2003)蝦蟹殼傳奇。科學發展，369: 62-67。 10.陳思豪(2003)利用溶菌酵素水解幾丁質生產N-乙醯幾丁寡醣之分析應用及量產條件之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文，彰化。 11.陳榮輝、金曉珍(1995)水產甲殼類廢棄物開發高經濟價值之幾丁質、幾丁聚醣、幾丁寡醣研究之規劃報導。科學發展月刊，23(6): 550-562。 12.陳幸臣(2000)幾丁質酵素生產與應用。食品生物技術研討會專輯，基隆，34-41。 13.陳淑德、蕭玉玲、林世斌(2002)培養基對木黴菌(Trichoderma harzianum)發酵生產幾丁質酵素的影響。宜蘭技術學報，9: 9-14。 14.莊榮輝(2000)酵素純化方法。酵素化學與分析-酵素化學實驗，國立台灣大學農業化學系生物化學實驗室，台北。 15.連德昇(2002)以本土菌株分解幾丁質生產N-乙醯幾丁寡醣之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文，彰化。 16.郭?君(1999)凝??泳的支持介?。蛋白??泳??技?，科?出版社，北京，14-35。 17.郭尚鑫、陳錦坤、李文乾(2004) Aeromonas schubertii的胞外幾丁質水解酵素雙聚物之研究分析。台灣幾丁質幾丁聚醣學會年會暨幾丁質類生物高分子研討會論文集，138-142。 18.張瓊璋、連德昇、?瑞澤、余世宗(2004) Aeromonas sp. DYU-Too7幾丁質分解酵素之純化與特性分析。台灣幾丁質幾丁聚醣學會年會暨幾丁質類生物高分子研討會論文集，124-127。 19.蘇南維、李敏雄(1998) Listonella damsela NTU-FC-6 幾丁質酵素之生產與基本性質之探討。中國農業化學會誌，36(1): 65-76。 20.梁舜欣(1990)N-乙醯幾丁寡醣製備。台灣大學農業化學研究所碩士論文，台北。 21.薛家倩(2004) SDS-PAGE 蛋白質電泳分離技術。化工資訊與商情，7: 73-79。 22.龜山猶一(1981)化學分析試藥配製法。正文書局，台北。 23.Chen, H. C. (1994) Purification and characterization of chitinase produced from Aeromonas caviae. The 3th International Marine Biotechnology Conference, Tromso, Norway. 24.Chen, H. C. and K. S. Chen (1991) Isolation of chitinolytic bacteria and their hydrolytic activity on shrimp shells. Proceeding of the National Science Council, ROC. Part: B, Life Science, 15: 233-239. 25.Davis, B. and D. E. Eveleigh (1984) Chitosanases: occurrence, production and immobilization. In ' ' Chitin, Chitosan and Related Enzymes ' ' J. P. Zikakis, eds., Academic Press, Orlando, 161-179. 26.Dawson, R.M.C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones, (1969) Data for Biochemical Research, 2nd Ed., Oxford Univ. Press. New York. 27.Ekenler, M. and M. A. Tabatabai (2002) Effects of trace elements on -glucosaminidase activity in soils. Soil Biol. Biochem., 34: 1829-1832. 28.Guo Y. J. and R. J. Bishop (1982) Chromatography, 234: 459-462. 29.Gooday, G. W. (1990) The ecology of chitin degradation. Adv. Microb. Ecol., 11: 387-430. 30.Havukkala, I., C. Mitamura, S. Hara, K. Hirayae, Y. Nishizawa and T. Hibi (1993) Induction and purification of Beauveria bassiana chitinolytic enzymes. J. Intervent. Radiol., 61: 97-102. 31.Imoto, T., and K. Yagishita. (1971) A simple activity measurement of lysozyme. Agric. Biol. Chem., 35: 1154-1156. 32.Jeuniaux, C. (1966) Chitinases, In: Methods in Enzymology, pp. 644- 650, E. F. Neufeld and V. Ginsburg, Academic Press, New York. 33.Kafetzopoulos, D., A. Martinou, and V. Bouriotis (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chi- tin deacetylase from Mucor rouxii. Proc Natl Acad Sci USA 90: 2564-2568. 34.Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymer in food, Food Technol., 1: 85-89. 35.Krieg, N. R. (1984) Facultatively anaerobic gramnegatie rods., In: Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology, pp. 545-548, Science Press, Beijing. 36.Kurita, K. (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitn, Prog. Polym. Sic., 26: 1921-1971. 37.Leah, R., H. Tommerup, I. Svendsen and J. Mundy (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J. Biol. Chem., 19: 196-201. 38.Minke, R. and J. Blackwell (1978) The structure of -chitin. J. Mol. Biol., 120: 167-181. 39.Mitsutomi, M., A. Ohtakara, T. Fukamizo and S. Goto (1990) Action pattern of Aeromonas hydrophila chitinase on partially N-acetylated chitosan. Agric Biol Chem., 54(4): 871-877. 40.Molano, J., A. Puran and E. Cabib (1975) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. Anal. Biochem., 83: 648-656. 41.Muzzarelli, R. A. A. (1977) Chitin, Appl. Environ. Microbiol., 53: 1717-1724. 42.Oh, Y. S.,

I. L. Shih, Y. M. Tzeng and S. L. Wang (2000) Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme Microb. Tech.*, 27: 3-10.

43. Otakara, A., M. Mitsutomi and Y. Uchida (1979) Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.*, 57(3): 169-177.

44. Parham, J. A. and S. P. Deng (2000) Detection, quantification and characterization of  $\alpha$ -glucosaminidase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1183-1190.

45. Righetti, P. G., E. Gianazza, C. Gelfi and M. Chiari (1990) In: *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach*, pp. 149-216, B. D. Hames and D. Richwood eds., 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford, New York.

46. Roberts, G. A. F. (1982) *Chitin Chemistry*. The MacMillan Press, London.

47. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki and M. Suzuki (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Res.*, 151: 403-412.

48. Usui, T., Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai and Y. Ishido (1987) Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 923: 302-309.

49. Ulhoa, C. J. and J. F. Peberdy (1991) Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2163-2169.