

# Aeromonas sp. DYU-Too7與本土菌株JR1之幾丁質分解?純化與特性分析

張瓊璋、& #20931 ; 瑞澤 ; 余世宗

E-mail: 9318438@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本實驗自新竹南寮漁港之土壤中分離具幾丁質分解能力之菌株，經鑑定後並命名為Aeromonas sp. DYU-Too 7。此菌株於30 下以CB (chitin broth)培養120 h之發酵液，經離心後取其上層液，經飽和硫酸銨沉澱、DEAE Sepharose CL-6B、Sephadex G-100及SDS-PAGE蛋白質純化程序後，可獲得分子量為35 kDa與60 kDa之幾丁質分解?(chitinase)。35 kDa幾丁質分解?回收率與純化倍率分別為5.07%與3.66 ; 60 kDa幾丁質分解?回收率與純化倍率分別為6.76%與2.25。經酵素特性分析，發現35 kDa與60 kDa幾丁質分解?最適反應pH值分別為pH 5與pH 4，最適反應溫度分別為70 與60 ; 酵素之pH與溫度穩定性實驗結果：35 kDa幾丁質分解?在pH 5-8與10-60 時皆可維持原本活性之60%以上；60 kDa幾丁質分解?在pH 4-8下可維持原本活性之80%以上，於10-50 時則可維持原本活性之60%以上；金屬離子對酵素活性之影響：35 kDa與60 kDa幾丁質分解?與10 mM Ba<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>及Ag<sup>+</sup>作用1 h後，皆可維持原本活性之50%以上；酵素水解產物：35 kDa與60 kDa幾丁質分解?與膠態幾丁質作用24 h，分別得到N-乙醯幾丁二糖2.21 g/L與2.3 g/L；酵素動力學結果：35 kDa幾丁質分解?V<sub>max</sub>與K<sub>m</sub>分別為2,000 U/L與8.0 g/L；60 kDa幾丁質分解?V<sub>max</sub>與K<sub>m</sub>分別為1,428.6 U/L與4.3 g/L。本實驗自臺北後山埤土壤取樣，以含0.5%膠態幾丁質之培養基篩菌，分離出一具幾丁質分解能力菌株JR1。此菌株以LB (Lu- ria-Bertani)培養基培養2 h達對數增殖期(log phase or exponential phase)，培養12 h達定常期(stationary phase)。於30 下，以含2%幾丁質粉末之CB培養120 h，其幾丁質分解?活性可達366 U/L，發酵液離心後取其上層液，經飽和硫酸銨沉澱、DEAE Sepharose CL-6B、Sephadex G-100及活性電泳染色法蛋白質純化程序後，可獲得分子量為75 kDa之幾丁質分解?。經酵素特性分析，發現粗酵素液之最適基質濃度為15 g/L，粗酵素液與75 kDa幾丁質分解?最適反應pH值分別為pH 6與pH 7；最適反應溫度皆為40 。以CB培養24 h之酵素水解產物為N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)，4.79 g/L。

關鍵詞：幾丁質；幾丁質分解& #37238 ; Aeromonas sp. DYU-Too 7 ; JR1 ; N-乙醯葡萄糖胺

## 目錄

目錄封面內頁 頁次 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
誌謝.....	viii
目錄.....	ix
圖目錄.....	xiii
表目錄.....	xvi
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2-1 幾丁質.....	7
2-2 幾丁質分解?.....	7
2-2.1 幾丁質分解?分類.....	7
2-2.2 幾丁質分解?的天然分佈.....	10
2-2.3 幾丁質分解?的命名與特性.....	10
2-2.4 幾丁質分解?對幾丁質的水解.....	11
2-2.5 幾丁質分解?的應用.....	11
2-2.6 N-乙醯幾丁寡醣的特性與應用.....	12
2.3 酵素純化.....	12
2.3.1 硫酸銨沉澱.....	13
2.3.2 離子交換層析.....	15
2.3.3 膠體過濾層析.....	15
2.4 幾丁質分解?純化與特性分析.....	16
第三章 材料與方法.....	25
3.1 實驗菌株.....	25
3.2 實驗材料.....	25
3.3 實驗器材.....	28
3.4 實驗方法.....	29
3.4.1 培養基配置.....	29
3.4.2 製備膠態幾丁質.....	29
3.4.3 幾丁質分解?之活性測定.....	29
3.4.4 幾丁質分解?之純化分離.....	31
第四章 結果與討論.....	39
4.1 菌株型態.....	39
4.2 幾丁質粉末粒徑大小之測定.....	39
4.3 Aeromonas sp. DYU-Too 7幾丁質分解?純化.....	39
4.3.1 硫酸銨沈澱.....	39
4.3.2 離子交換層析.....	43
4.3.3 膠體過濾層析.....	45
4.3.4 幾丁質分解?分子量之測定.....	45
4.3.5 純化總表.....	45
4.4 幾丁質分解?之特性分析.....	49
4.4.1 最適反應pH值之測定.....	49
4.4.2 最適反應溫度之測定.....	52
4.4.3 pH穩定性之測定.....	52
4.4.4 溫度穩定性之測定.....	55
4.4.5 金屬離子對酵素活性之影響.....	55
4.4.6 酵素水解產物分析.....	58
4.4.7 酵素動力學.....	61

活性電泳染色法.....	65	4.5篩選幾丁質分解?生產菌株.....	65	4.6篩選
菌株之特性分析.....	67	4.7 JR1菌株粗酵素液之特性分析.....	71	4.7.1粗
酵素液之最適基質濃度.....	74	4.7.2粗酵素液之最適反應pH值.....	74	4.7.3粗酵素
液之最適反應溫度.....	74	4.8 JR1菌株幾丁質分解?純化.....	77	4.8.1硫酸銨沈
澱.....	77	4.8.2離子交換層析.....	77	4.8.3膠體過濾層
析.....	79	4.8.4幾丁質分解?分子量之測定(活染法).....	79	4.9幾丁質分解?之特
性分析.....	84	4.9.1最適反應pH值.....	84	4.9.2最適反應溫度.....
.....	84	4.9.3 pH穩定性之測定.....	84	4.9.4溫度穩定性之測定...
.....	87	4.9.5金屬離子對酵素活性之影響.....	87	4.9.6酵素動力學.....
.....	91	4.9.7幾丁質分解?分子量之測定(SDS-PAGE).....	91	第五章 結論.....
.....	96	參考文獻.....	97	圖 目 錄
圖2.1 幾丁質、		幾丁聚醣、纖維素之化學構造	3	圖2.2 幾丁質、幾丁聚醣之製備 ...5
圖2.3 幾丁質的水解物	8	圖4.1 Aeromonas sp. DYU-Too	7	7之革蘭氏染色顯微照片.....
40		圖4.2 以位相差顯微鏡測定幾丁質粉末之粒徑大小.....	41	圖4.3 Aeromonas sp.
DYU-Too 7以CB培養所得		粗酵素液之幾丁質分解?活性與還原醣含		量變化.....
42		圖4.4 Aeromonas sp. DYU-Too 7培養120 h之酵		素液經DEAE Sepharose CL-6B分離之結果.....
44		圖4.5 活性波峰D1		以Sephadex G-100分離之結果.....
46		圖4.6 活性波峰D2以Sephadex G-100分離之結果.....	47	圖4.7
以SDS-PAGE測定Aeromonas sp.DYU-Too 7		純化過程中具活性波峰酵素液之分子量.....	48	圖4.8 pH值對35 kDa
與60 kDa幾丁質分解? 反應活性之影響.....	51	圖4.9 溫度對35 kDa與60 kDa幾丁質分解? 反		應活性之影響.....
53		圖4.10 幾丁質分解?(35 kDa與60 kDa)之pH穩定性.....	54	圖4.11
幾丁質分解?(35 kDa與60 kDa)之溫度穩定性.....	56	圖4.12 幾丁質分解?(35 kDa)對不同基質作用 所得之N-乙醯幾丁二糖		.....
59		圖4.13 幾丁質分解?(60 kDa)對不同基質作用 所得之N-乙醯幾丁二糖.....	60	圖4.14 不同基質濃度對35 kDa與60 kDa幾丁質
分解?活性之影響.....	62	圖4.15 幾丁		質分解?(35 kDa) Lineweaver-Burk 雙倒數作圖之Km與Vmax.....
63		圖4.16 幾丁質分解?(60 kDa)		Lineweaver-Burk 雙倒數作圖之Km與Vmax.....
64		圖4.17 以活性電泳染色法檢定純化過程中具活性		波峰酵素液之幾丁質分解?.....
66		圖4.18 篩選菌株JR1與JR2以CB培養所得粗酵素		液之幾丁質分解?活
性.....	68	圖4.19 篩選菌株JR1與JR2以CB培養所得之 N-乙醯葡萄糖胺.....	69	圖4.20 篩選菌株JR1與JR2以LB培養之生長曲線.....
70		圖4.21 JR1菌株於膠態幾丁質培養基產生透明		環之型態.....
72		圖4.22 JR1菌株以CB培養所得粗酵素液之幾丁質		分解酵素活性、還原醣及蛋白質含量關係圖.....
73		圖4.23 基質濃度對JR1菌株幾丁質粗酵素液反應		活性之影響.....
75		圖4.24 pH值		對JR1菌株幾丁質粗酵素液反應活性 之影響.....
76		圖4.25 溫度對JR1菌株幾丁質		粗酵素液反應活性之影響.....
78		圖4.26 JR1菌株培養120 h之酵素液經DEAE Sepharose CL-6B分離之結果.....	80	圖4.27 活性波峰A1以Sephadex G-100分離之結果.....
81		圖4.28 以活性電泳染色法測定JR1菌株粗酵素液		純化過程中具活性波峰酵素液之分子量.....
82		圖4.29 pH值對75 kDa幾丁質分解?反應活性之影響.....	85	圖4.30 溫度對75 kDa幾丁質分解?反應活性之影響.....
86		圖4.31 幾丁質分解?(75 kDa)之pH穩定性.....	88	圖4.32 幾丁質分解?(75 kDa)之溫度穩定性.....
89		圖4.33 不同基質濃度對75 kDa幾丁質分解?活性之影		響.....
92		圖4.34 幾丁質分解?(75 kDa) Lineweaver-Burk 雙倒數作圖之Km與Vmax.....	93	圖4.35
以SDS-PAGE測定JR1菌株純化過程中		具活性波峰酵素液之分子量.....	95	表 目 錄
表2.1 幾丁質和幾		丁聚醣的應用.....	6	表2.2 依照不同蛋白質性質所使用之分離方法.....
14		表2.3 微生物		幾丁質分解?特性之比較.....
22		表2.3 微生物幾丁質分解?特性之比較(續).....	23	表2.3 微生物
幾丁質分解?特性之比較(續).....	24	表3.1 Aeromonas sp. DYU-Too 7之簡單鑑定試驗.....	26	表3.2 培養
基組成.....	30	表3.3 分離膠組成.....	37	表3.4
堆積膠組成.....	38	表4.1 Aeromonas sp. DYU-Too 7 chitinases之純化總表.....	50	表4.2
金屬離子對35 kDa與60 kDa幾丁質		分解酵素活性之影響.....	57	表4.3 金屬離子對75 kDa幾丁
質分解?活性之影響.....	90			

## 參考文獻

- 參考文獻 1. 王三郎(1999)應用微生物學, 高立圖書有限公司, 台北。 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, 150: 19-25. 3. 李建武、蕭能庚、余瑞元、陳麗蓉、陳雅蕙、陳來同、袁明秀(1999)生物化學實驗原理和方法, 藝軒圖書出版社, 台北。 4. 吳豐智、曾如玲(1997)神奇的物質-幾丁質和幾丁聚醣, 化工技術, 5(7): 196-201. 5. 林宣因(2002)蠟蚱輪枝菌發酵生產幾丁質?之研究探討, 國立東華大學生物技術研究所碩士論文, 花蓮。 6. 周婉萍(1993) Bacillus coagulans NTU-FC-1幾丁質?之研究, 國立台灣大學農業化學研究所碩士論文, 台北。 7. 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, 34-41. 8. 陳國誠(1999)微生物酵素工程學, 藝軒圖書出版社, 台北。 9. 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。 10. 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。 11. 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。 12. 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專輯, C-138-142。 13. 康建智(2001)細菌幾丁質?基因的誘導表現及生產N-乙醯幾丁寡醣最適化條件的研究, 國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文, 基隆。 14. 黃安德(1998)利用部分純化之Amycolatopsis orientalis細胞外N-乙醯葡萄糖胺酵素製備N-乙醯幾丁寡醣, 國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士學位論文, 基隆。 15. 黃昭仁(1998)微生物生產幾丁質酵素之研究, 大葉大學食品工程研究所碩士論文, 彰化。 16. 蔣馥蕾(2000)產黃纖維單胞桿菌幾丁質?基因的選殖與酵素的快速純化, 國立台灣海洋大學食品科學系碩士學位論文, 基隆。 17. 劉瓊淑(1994)幾丁質、幾丁聚醣及其相關酵素之特性與用, 食品工業, 26(1): 26-36。 18. 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。 19. A/Banat, B. M., Y. Kameyama, T. Yoshioka and D. Koga (1999) Purification and characterization of a 54 kDa chitinase from *Bombyx mori*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 537-547。 20. Brine, C. J., and P. R. Austin (1981) Chitin variability with species and method of preparation, *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 283-286。 21. Bhushan, B. (2000) Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 800-808。 22. Collinge, D. B., K. M. Kragh, J. D. Mikkslesen, K. K. Nielsen, U. Rasmussen and K. vad (1993) Plant chitinase, *J. Plant*, 3: 31-40。 23. Cruz, M. A. L., V. M. Gomes, K. V. S. Fernandes, O. L. T. Machado and J. Xavier-Filho (2002) Identification and partial characterization of a chitinase and a  $\alpha$ -1,3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax, *Plant Physiol. Bioch.*, 40: 11-16。 24. Curling, J. M. (1978) In: *Chromatography of Synthetic and Biological Polymers*, Ed. by E. Epton, Ellis Horwood, UK, Vol. 2, pp. 75-87。 25. Dunnill, P. (1973) In: *Enzyme Engineering*, Ed. by E. K. Pye and L. B. Wingard, Plenum Press, New York and London, Vol. 3, pp.207-216。 26. Dunnill, P. and M. D. Lilly (1972) In: *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 3, Enzyme Engineering*, Ed. by L. B. Wingard, Interscience Publishers, New York, pp. 97-113。 27. Jeuniaux, C. (1996) Chitinases, *Method Enzymol.*, 8: 644-650。 28. Kafetzopoulos, D., A. Martinou and V. Bouriotis (1993) Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 2564-2568。 29. Kawachi, I., T. Fujieda, M. Ujita, Y. Ishii, K. Yamagishi, H. Sato, T. Funaguma and A. Hara (2001) Purification and properties of extracellular chitinases from the parasitic fungus *Isaria japonica*, *J. Ferment. Technol.*, 92(6): 544-549。 30. Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymer in food, *Food Technol.*, 1: 85-89。 31. Koga, K., Y. Iwamoto, H. Sakamoto and K. Hatano (1991) Purification and characterization of  $\alpha$ -N-acetylhexosaminidase from *Trichoderma harzianum*, *Agric. Biol. Chem.*, 55(11): 2817-2823。 32. Koga, D., Y. Sasaki, Y. Uchiumi, N. Hirai and Y. Arakane (1997) Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinases, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(8/9): 757-767。 33. Krishnaveni, S., G. H. Liang, S. Muthukrishnan and A. Manickam, (1999) Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds, *Plant Sci.*, 144: 1-7。 34. Mitsutomi, M., T. Hata and T. Kuwahara (1995) Purification and characterization of novel chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037, *J. Ferment. Technol.*, 80(2): 153-158。 35. Ohishi, K., M. Yamagishi, T. Ohta, M. Suzuki, H. Izumida, H. Sano, M. Nishijima and T. Miwa (1996) Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginilyticus* H-8, *J. Ferment. Technol.*, 82(6): 598-600。 36. Overdijk, B. and G. J. V. Steijn (1994) Human serum contains a chitinase: identification of an enzyme, formerly described as 4- methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside hydrolase (MU-TACT hydrolase), *Glycobiology*, 4(6): 797-803。 37. Pemberton, J. M., Kidd. S. P. and Schmidt R (1997) Secreted enzymes of *Aeromonas*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 152: 1-10。 38. Robbins, P. W., C. Albright and B. Benfield (1988) Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 263: 443-447。 39. Sakurada, M., D. P. Morgavi, K. Komatani, Y. Tomita and R. Onodera(1997) Purification and characteristics of an autolytic chitinase of *Piromyces communis* OTS1 from culture medium, *Curr. Microbiol.*, 35: 48-51。 40. Souza, R. F., R. C. Gomes, R. R. R. Coelho, C. S. Alviano and R. M. A. Soares (2003) Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 222: 45-50。 41. Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatewaki, K. Suzuki, Y. Okawa, T. Mikami, S. Suzuki and M. Suzuki (1989) Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice, *Microbiol. Immunol.*, 33: 357-367。 42. Tsigos, I., N. Zydowicz, A. Martinou, A. Domard and V. Bouriotis (1999) Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides, *Eur. J. Biochem.*, 261: 698-705。 43. Ueno, H., K. Miyashita, Y. Sawada and Y. Oba (1990) Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* sp. S-84, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36: 377-392。 44. Wang, S. Y., A. L. Moyne, G. Thottappilly, S. J. Wu, R. D. Locy and N. K. Singh (2001) Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase, *Enzyme Microb. Tech.*, 28: 492-498。 45. Wiwat, C., P. Siwayaprahm and A. Bhumiratana (1999) Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1, *Curr. Microbiol.*, 39: 134-140。 46. Yamamoto, Y., Y. Fukunaga, H. Aoyagi and H. Tanaka (1995) Purification and characteristics of chitinase secreted by cultured *Wasabia japonica* cells, *J. Ferment. Technol.*, 80(2): 148-152。