

# 篩選分解蒟蒻菌株與其發酵液之酵素活性探討

陳怡芳、張耀南

E-mail: 9417955@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究已初步篩選可分解蒟蒻效果較佳之兩株菌株(dyu-cs-3及dyu-cs-6)，並進行其培養條件與其發酵液對蒟蒻分解之酵素活性探討。實驗結果顯示，dyu-cs-3與dyu-cs-6兩株菌株在最適溫度37℃及最佳培養基酸鹼值為8.0，最適培養體積分別為50 mL/250 mL及75 mL/250 mL (含3%蒟蒻塊)，培養至48 hr時，蒟蒻被分解成還原糖之產量可達到最高值，分別為0.15 mg/mL及0.16 mg/mL。菌液在4℃下，經10000 × g離心10分鐘所得之發酵液，其最適反應溫度為40℃，最適反應酸鹼值在pH8.0，但相對酵素活性會隨反應溫度增加(>50℃)及pH值降低。

關鍵詞：蒟蒻；還原糖；酵素活性；分解菌株

## 目錄

|      |     |     |     |      |    |      |    |    |      |    |    |     |     |     |     |        |   |          |   |        |     |             |       |              |   |                |   |               |   |                  |    |                 |    |        |    |                |    |              |    |          |    |               |    |                 |    |               |    |           |    |          |    |          |    |             |    |            |    |                 |    |                |    |                |    |                       |    |                 |    |                     |    |                  |    |               |    |                |    |                |    |                 |    |                |    |              |    |                |    |               |    |               |    |           |    |          |    |             |    |                     |    |               |    |                   |    |                |    |             |    |              |    |               |    |              |    |            |    |              |    |             |    |             |    |        |    |      |    |     |             |   |               |   |                      |   |                  |    |                 |    |                      |    |                      |    |                      |    |  |    |   |    |                                 |    |  |    |                                 |    |                                       |    |   |    |                                     |    |                                     |    |                                      |    |  |    |                                       |    |  |    |                                    |    |                                    |    |                                     |    |                                     |    |                                   |    |                                   |    |  |    |  |    |     |                |   |                    |    |                     |    |                     |    |                                      |    |
|------|-----|-----|-----|------|----|------|----|----|------|----|----|-----|-----|-----|-----|--------|---|----------|---|--------|-----|-------------|-------|--------------|---|----------------|---|---------------|---|------------------|----|-----------------|----|--------|----|----------------|----|--------------|----|----------|----|---------------|----|-----------------|----|---------------|----|-----------|----|----------|----|----------|----|-------------|----|------------|----|-----------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------------|----|-----------------|----|---------------------|----|------------------|----|---------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|---------------|----|---------------|----|-----------|----|----------|----|-------------|----|---------------------|----|---------------|----|-------------------|----|----------------|----|-------------|----|--------------|----|---------------|----|--------------|----|------------|----|--------------|----|-------------|----|-------------|----|--------|----|------|----|-----|-------------|---|---------------|---|----------------------|---|------------------|----|-----------------|----|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|--|----|---|----|---------------------------------|----|--|----|---------------------------------|----|---------------------------------------|----|---|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|--|----|------------------------------------|----|------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-----------------------------------|----|-----------------------------------|----|--|----|--|----|-----|----------------|---|--------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|--------------------------------------|----|
| 封面內頁 | 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 | xii | 表目錄 | xiv | 第一章 前言 | 1 | 第二章 文獻回顧 | 2 | 2.1 蒟蒻 | 2.2 | 2.1.1 蒟蒻的簡介 | 2.2.1 | 2.1.2 蒟蒻粉的製備 | 5 | 2.1.3 蒟蒻粉的主要成分 | 7 | 2.1.4 蒟蒻的凝膠特性 | 9 | 2.1.5 葡甘露聚糖的生理機能 | 12 | 2.1.6 蒟蒻在食品上的應用 | 15 | 2.2 寡糖 | 19 | 2.2.1 寡糖之分類與製造 | 19 | 2.2.2 寡糖之機能性 | 22 | 2.3 甘露聚糖 | 23 | 2.3.1 甘露聚糖之生產 | 24 | 2.3.2 甘露聚糖之理化性質 | 28 | 2.3.3 甘露聚糖之應用 | 28 | 第三章 材料與方法 | 29 | 3.1 實驗材料 | 29 | 3.2 實驗方法 | 30 | 3.2.1 菌株之篩選 | 30 | 3.2.2 分析方法 | 30 | 3.2.2.1 生長曲線之探討 | 30 | 3.2.2.2 還原糖之測定 | 31 | 3.2.2.3 酵素活性測定 | 31 | 3.2.3 蒟蒻分解菌株之最適培養條件探討 | 32 | 3.2.3.1 培養溫度之影響 | 32 | 3.2.3.2 培養基起始酸鹼值之影響 | 32 | 3.2.3.3 培養基體積之影響 | 33 | 3.2.4 發酵液性質分析 | 33 | 3.2.4.1 發酵液之製備 | 33 | 3.2.4.2 最適反應溫度 | 33 | 3.2.4.3 最適反應酸鹼值 | 34 | 3.2.4.4 最適反應時間 | 34 | 3.2.4.5 熱穩定性 | 34 | 3.2.4.6 酸鹼值穩定性 | 34 | 3.2.4.7 儲存安定性 | 35 | 3.2.4.8 酵素動力學 | 35 | 第四章 結果與討論 | 36 | 4.1 菌株篩選 | 36 | 4.2 生長曲線之探討 | 36 | 4.3 蒟蒻分解菌株之最適培養條件探討 | 39 | 4.3.1 培養溫度之影響 | 39 | 4.3.2 培養基起始酸鹼值之影響 | 42 | 4.3.3 培養基體積之影響 | 42 | 4.4 發酵液性質分析 | 48 | 4.4.1 最適反應溫度 | 48 | 4.4.2 最適反應酸鹼值 | 52 | 4.4.3 最適反應時間 | 55 | 4.4.4 熱穩定性 | 55 | 4.4.5 酸鹼值穩定性 | 58 | 4.4.6 儲存安定性 | 58 | 4.4.7 酵素動力學 | 62 | 第五章 結論 | 68 | 參考文獻 | 69 | 圖目錄 | 圖2.1 蒟蒻的植物圖 | 4 | 圖2.2 蒟蒻粉的製造流程 | 6 | 圖2.3 Glucomannan分子結構 | 8 | 圖2.4 蒟蒻粉凝膠時之黏度變化 | 10 | 圖2.5 蒟蒻凝膠機制之流程圖 | 11 | 圖2.6 溫度和pH對蒟蒻粘度變化的影響 | 13 | 圖4.1 Dyu-cs-3菌株初步篩選圖 | 37 | 圖4.2 Dyu-cs-6菌株初步篩選圖 | 38 | 圖4.3 Dyu-cs-3及dyu-cs-6菌株於LB broth之生長曲線 | 40 | 圖4.4 不同培養溫度對dyu-cs-3及cs-6菌株降解蒟蒻生成還原糖之影響 | 41 | 圖4.5 不同培養基起始酸鹼值對dyu-cs-3生長曲線之影響 | 43 | 圖4.6 不同培養基起始酸鹼值對dyu-cs-3菌株降解蒟蒻生成還原糖之變化 | 44 | 圖4.7 不同培養基起始酸鹼值對dyu-cs-6生長曲線之影響 | 45 | 圖4.8 不同培養基起始酸鹼值對dyu-cs-6菌株降解蒟蒻成還原糖之變化 | 46 | 圖4.9 不同培養基起始酸鹼值對dyu-cs-3及cs-6菌株生成還原糖之影響 | 47 | 圖4.10 不同培養體積對dyu-cs-3菌株降解蒟蒻生成還原糖之影響 | 49 | 圖4.11 不同培養體積對dyu-cs-6菌株降解蒟蒻生成還原糖之影響 | 50 | 圖4.12 不同培養體積對dyu-cs-3及cs-6菌株生成還原糖之影響 | 51 | 圖4.13 不同反應溫度對dyu-cs-3及cs-6發酵上清液酵素活性之影響 | 53 | 圖4.14 不同酸鹼值對dyu-cs-3及cs-6發酵上清液酵素活性之影響 | 54 | 圖4.15 不同反應時間對dyu-cs-3及cs-6發酵上清液酵素活性之影響 | 56 | 圖4.16 不同靜置溫度對dyu-cs-3發酵上清液酵素安定性之影響 | 57 | 圖4.17 不同靜置溫度對dyu-cs-6發酵上清液酵素安定性之影響 | 59 | 圖4.18 不同靜置酸鹼值對dyu-cs-3發酵上清液酵素穩定性之影響 | 60 | 圖4.19 不同靜置酸鹼值對dyu-cs-6發酵上清液酵素穩定性之影響 | 61 | 圖4.20 不同儲存溫度對dyu-cs-3發酵上清液酵素活性之影響 | 63 | 圖4.21 不同儲存溫度對dyu-cs-6發酵上清液酵素活性之影響 | 64 | 圖4.22 Dyu-cs-3發酵液之動力學Lineweaver-Burk圖形 | 65 | 圖4.23 Dyu-cs-6發酵液之動力學Lineweaver-Burk圖形 | 66 | 表目錄 | 表2.1 魔芋的種類及其分佈 | 3 | 表2.2 細菌所產生之甘露聚糖的性質 | 25 | 表2.3 真菌類所產生之甘露聚糖的性質 | 26 | 表2.4 植物類所產生之甘露聚糖的性質 | 27 | 表4.1 Dyu-cs-3及dyu-cs-6發酵液分解蒟蒻塊之動力學參數 | 67 |
|------|-----|-----|-----|------|----|------|----|----|------|----|----|-----|-----|-----|-----|--------|---|----------|---|--------|-----|-------------|-------|--------------|---|----------------|---|---------------|---|------------------|----|-----------------|----|--------|----|----------------|----|--------------|----|----------|----|---------------|----|-----------------|----|---------------|----|-----------|----|----------|----|----------|----|-------------|----|------------|----|-----------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------------|----|-----------------|----|---------------------|----|------------------|----|---------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|---------------|----|---------------|----|-----------|----|----------|----|-------------|----|---------------------|----|---------------|----|-------------------|----|----------------|----|-------------|----|--------------|----|---------------|----|--------------|----|------------|----|--------------|----|-------------|----|-------------|----|--------|----|------|----|-----|-------------|---|---------------|---|----------------------|---|------------------|----|-----------------|----|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|--|----|---|----|---------------------------------|----|--|----|---------------------------------|----|---------------------------------------|----|---|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|---------------------------------------|----|--|----|------------------------------------|----|------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-----------------------------------|----|-----------------------------------|----|--|----|--|----|-----|----------------|---|--------------------|----|---------------------|----|---------------------|----|--------------------------------------|----|

## 參考文獻

- 于紅、盧雪梅、秦夢華、曲音波、高培基。2002。?法漂白的現狀和機理研究進展。中國造紙學報17(2):112-115。
- 王小泉、宋雪峰。2003。魔芋葡甘聚糖弱凝膠研製。油田化學20(3):258-260。
- 李勇。1997。低聚糖生理功效的研究進展。中國食物與營養4:23-25。
- 吳景陽。1994。蒟蒻。食品工業26(2):12-19。
- 吳擁軍、王嘉福、蔡金藤、羅敏。2002。魔芋葡萄甘露低聚糖的提取及其產物對耐氧雙歧桿菌的促生長作用。食品科學23(6):41-44。
- 吳襟、何秉旺。1999。微生物-甘露聚糖?。微生物學通報26(2):134-136。
- 周映湘。1994。日本寡糖市場概況。生物技術醫藥產業報導3(2):50-56。
- 林子傑。2000。嗜水性產氣單胞桿菌 *Aeromonas hydrophila* 絲氨酸蛋

白?之特性及基因分析:89. 台灣大學碩士論文。台北。 9.林鴻崇。2001。蒟蒻粉與蒟蒻凍添加量對蒟蒻油麵性質之影響:44-61。大葉大學碩士論文。彰化。 10.香紅星、董仲華、劉亞力。2001。功能性寡糖的研究應用進展(上)。飼料研究7:9-11。 11.段國仁。1994。機能性寡糖的開發與應用。生化工程專刊(一) 41(2):11-21。 12.夏慧芬。1999。精製蒟蒻(Glucomannan葡甘露聚糖)在食品應用的新發展—與日本技術同步流行。食品資訊157:42-45。 13.郭文怡。1997。一種可廣泛應用於食品中的健康食品素材。烘焙工業144:59-61。 14.清水壽夫,夏慧芬譯。2000。葡甘露聚糖(Glucomannan)在休閒飲料的開發應用。食品資訊179:38-44。 15.張信彰。2001。蒟蒻塊製備及殺菌條件對其物性之影響。大葉大學碩士論文。彰化。 16.鄔敏辰。2001。-甘露聚糖?及其水解產物的應用研究。專家論壇69:5-7,9。 17.楊文博、沈慶、佟樹敏。1995。產-甘露聚糖?地衣芽孢桿菌的分離篩選及發酵條件。微生物學通報22(3):154-157。 18.楊季清、張政偉、羅麗珠。1997。蒟蒻素食火腿製作之最適化。食品科學24(2):230-241。 19.劉錦芳。2003。細菌LCF007所生產蛋白?之純化及其性質之研究:66。大葉大學碩士論文。彰化。 20.賴鳴鳳、廖樹杰、呂政義。1999。水溶性蒟蒻膠萃取與分子性質之探討。食品科學26(5):456-467。 21.龍健兒、陳一平。1998。-甘露聚糖?的研究現狀。微生物學雜誌18(3):44-57。 22.譚靜芬。1999。機能性寡糖之介紹。食品工業月刊31(7):1-8。 23.Akino, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1987. Production of -Mannosidase and -Mannanase by an alkalophilic Bacillus sp.. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:323-327. 24.Akino, T., Nakamura, N. and Horikoshi, K. 1988. Characterization of three -Mannanase of an alkalophilic Bacillus sp.. Agric. Biol. Chem. 52(3):773-779. 25.Araujo, A. and Ward, O.W. 1990. Purification and some properties of the mannanases from Thielavia terrestris. J. Ind. Microbiol. 6:269-274. 26.Araujo, A. and Ward, O. W. 1991. Studies on the galactomannan-degrading enzymes produced by Sporotrichem cellulophilum. J. Ind. Microbiol. 8:229-236. 27.Arisan-Atac, I., Hodits, R., Kristufek, D. and Kubicek, C. P. 1993. Purification and characterization of a -Mannanase of Trichoderma reesei C-30. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:58-62. 28.Arville, A. and Bodin, L. 1995. Effect of short-term ingestion of konjac glucomannan on serum cholesterol in healthy men. Am. J. Clin. Nutr. 61(3):585-589. 29.Gubitz, G. M., Haltrich, D., Latal, B. and Steiner, W. 1997a. Mode of depolymerization of hemicellulose by various mannanase and xylanases in relation to their ability to bleach soft wood pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:658-662. 30.Gubitz, G. M., Lischnig, T., Stebbing, D. and Saddler, J. N. 1997b. Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. Biotechnol. Lett. 19:491-495. 31.Hannigan, k. 1980. The food helps control weight. Food Eng. Int. 5(12):21,23,25. 32.Hossain, M. Z., Abe, J. J. and Hizukuri, S. 1996. Multiple forms of -Mannanase from Bacillus sp. KK01. Enzyme Microb. Technol. 18:95-98. 33.Jantarat, J., Jarunatewilas, E. and Noisuwan, S. 1998. Reduction of fat in cake and cookie products made with konjac flour. Food 28(2):111-124. 34.Kato, K. and Matsuda, K. 1973. Isolation of oligosaccharides corresponding to the branching point of konjac mannan. Agric. Biol. Chem. 37(9):2045-2051. 35.Katsuraya, K., Okuyama, K., Hatanaka, K., Oshima, K., Sato, T. and Matsuzaki, K. 2003. Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. Carbohydr. Polymers, 53, 183 – 189. 36.Khanongnuch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S. and Lumyong, S. 1998. -Mannanase and xylanase of Bacillus subtilis 5H active for bleaching of crude pulp. J. Ferment. Bioen. 86(5):461-466. 37.Kojima, M., Tachikake, N., Kyotani, Y., Konno, K., Maruo, S., Yamamoto, M. and Ezure, Y. 1995. Effect of dissolved oxygen and pH on Moranoline (1-deoxynojirimycin) fermentation by Streptomyces lavendulae. J. Ferment. Bioen. 79(4):391-394. 38.Lin, K. W. and Huang, H. Y. 2003. Konjac / gellan gum mixed gels improve the quality of reduced-fat frankfurters. Meat Sci. 65(2):749-755. 39.Lin, T. C. and Chen, C. 2004. Enhanced mannanase production by submerged culture of Aspergillus niger NCH-189 using defatted copra based media. Process Biochem. 39:1103-1109. 40.Maeda, M., Shimahara, H. and Sugiyama, N. 1980. Detailed examination of the branched structure of konjac glucomannan. Agric. Biol. Chem. 44(2): 245-252. 41.Maekaji, K. 1973. Peptization of the gel of konjac mannan. Agric. Biol. Chem. 37(10):2433-2434. 42.Maekaji, K. 1974. The mechanism of gelation of konjac mannan. Agric. Biol. Chem. 38(2):315-321. 43.Oda, Y., Komaki, T. and Tonomura, K. 1993a. Production of -mannanase and -mannosidase by Enterococcus casseliflavus FL2121 isolated from decayed konjac. Food Microbiol. 10:353-358. 44.Oda, Y., Komaki, T. and Tonomura, K. 1993b. Purification and properties of extracellular -mannanase produced by Enterococcus casseliflavus FL2121 isolated from decayed konjac. J. Ferment. Bioen. 76(1):14-18. 45.Onishi, N., Kawamoto, S., Nishimura, M., Nakano, T., Aki, T., Shigeta, S., Shimizu, H., Hashimoto, K. and Ono, K. 2005. A new immunomodulatory function of low-viscous konjac glucomannan with a small particle size: its oral intake suppresses spontaneously occurring dermatitis in NC/Nga mice. Int. Arch. Allergy Immunol. 136(3):258-265. 46.Park, J. W. 1996. Temperature-tolerant fish protein gels using konjac flour. J. Muscle Foods. 7(2):165-174. 47.Rademacher, T. W., Parekh, R. B. and Dwek, R. A. 1988. Glycobiology. Annu. Rev. Biochem. 57:785-838. 48.Ratto, M., Siika-aho, M., Buchert, J., Valkeajarvi, A. and Viikari, L. 1993. Enzymatic hydrolysis of isolated and fibre-bound galactoglucomannans from pine-wood and pine kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:449-454. 49.Sachslehner, A. and Haltrich, D. 1999. Purification and some properties of a thermostable acidic endo- -1,4-D-Mannanase from Sclerotium (Athelia) rolfsii. FEMS Microbiol. Lett. 177:47-55. 50.Shallom, D. and Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Curr. Opin. Cell Biol. 6:219-228. 51.Shimahara, H., Suzuki, H., Sugiyama, N., and Nisizawa, K. 1975. Isolation and characterization of oligosaccharides from an enzymatic hydrolysate of konjac glucomannan. Agric. Biol. Chem. 39(2):293-299. 52.Stalbrand, H., Siika-aho, M., Tenkanen, M. and Viikari, L. 1993. Purification and characterization of two -Mannanase from Trichoderma reesei. J. Biotechnol. 29:229-242. 53.Takigami, S. 2000. konjac mannan. In Phillips, G. O. and Williams, P. A. (Eds.). Handbook of hydrocolloids. p.413-424. Woodhead, Cambridge. 54.Takigami, S., Takiguchi, T. and Phillips, G. O. 1997. Microscopical studies of the tissue structure of konjac tubers. Food Hydrocoll. 11(4):479-484. 55.Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. Food Technol. 10:61-65. 56.Tye, R. J. 1991. Konjac flour properties and application. Food Technol. 45:82-85. 57.Vuksan, V., Sievenpiper, J. L., Owen, R., Swilley, J. A., Spadafora, P., Jenkins, D. J., Vidgen, E., Brighenti, F., Josse, R. G., Leiter, L. A., Xu, A. and Novokmet, R. 2000. Beneficial effects of viscous dietary fiber from konjac-mannan in subjects with the insulin resistance syndrome. Diabetes Care 23(1):9-14. 58.Williams, MAK, Foster, T. J., Mathin, D. R. and Norton, I. T. 2000. A molecular description of the gelation mechanism of konjac mannan. Biomacromol.

1(3):440-450. 59. 前?健治。1978。????????????化?開始?脫????化率??關係。農化52(11):513-517。