

# 利用 *Aeromonas hydrophila* Too11 生產N-乙醯葡萄糖胺之培養條件探討

張野廷、吳淑姿 余世宗

E-mail: 9511073@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

N-乙醯葡萄糖胺具有抵抗病菌、治療關節炎及防癌等功效，應用價值相當高，本實驗利用 *Aeromonas hydrophila* Too11 生產N-乙醯葡萄糖胺，探討不同培養條件對菌株Too11生產 N-乙醯葡萄糖胺的影響，並利用中心混成實驗設計，瞭解生成N-乙醯葡萄糖胺之最佳培養條件。將菌株Too11分別以不同碳源培養，發現其中以 -chitin為碳源較利於菌株生產N-乙醯葡萄糖胺，於培養72 h有13.4 g/L；不同氮源試驗中，以混合氮源(酵母抽出物與蛋白?) 生產N-乙醯葡萄糖胺 有最佳產量，於96 h有9.2 g/L；菌株Too11於不同濃度 -chitin powder中培養，在3%與4%之 -chitin生產N-乙醯葡萄糖胺最高，分別為13 g/L與13.7 g/L；不同磷源(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>與K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)濃度培養中，菌株在3.5 g/L的混合磷源中，N-乙醯葡萄糖胺 產量最高，為10.6 g/L。中心混成設計實驗中，採用磷源(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>與K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)總含量 3.5 g/L、氮源(酵母抽出物與蛋白?) 總含量1 g/L及 -chitin powder含量35 g/L為中心點設計，發現菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺最適條件為磷源(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>與K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 4.82 g/L、氮源(酵母抽出物與蛋白?) 0.80 g/L及 -chitin powder含量54.95 g/L，並預測N-乙醯葡萄糖胺產量為13.79 g/L，經確認後N-乙醯葡萄糖胺產量為13.88 g/L，符合預測值。

關鍵詞：N-乙醯葡萄糖胺；*Aeromonas hydrophila*；中心混成設計

## 目錄

授權書 iii	中文摘要 iv	英文摘要 v	誌謝 vii	目錄 viii	圖目錄 xii	表目錄 xiv	第一章 緒論 1	第二章 文獻回顧 2	2.1 幾丁質 2	2.1.1 幾丁質類之分子結構 2	2.1.2 幾丁質之製備 4	2.1.3 幾丁質類之應用 6	2.2 幾丁質? 6	2.2.1 幾丁質?之應用 9	2.2.2 幾丁質?之水解模式及其分類 15	2.2.3 N-乙醯葡萄糖胺? 16	2.2.4 幾丁質?之活性分析 16	2.3 N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯幾丁寡醣 19	2.3.1 N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯幾丁寡醣之製備 19	2.3.2 N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯幾丁寡醣之功能 19	2.4 SDS-PAGE 20	2.5 實驗設計 21	2.5.1 一次一因子 21	2.5.2 回應曲面法 21	2.6 <i>Aeromonas hydrophila</i> 簡介 23	2.6.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> 幾丁質?之相關研究 23	第三章 材料與方法 24	3.1 實驗材料 24	3.1.1 實驗藥品 24	3.1.2 儀器設備 24	3.2 培養基與試劑 26	3.2.1 培養基 26	3.2.2 蝦殼粉之製備 28	3.2.3 -chitin之製備 28	3.2.4 膠態幾丁質之製備 28	3.2.5 呈色劑之配製 28	3.2.6 樣品緩衝液之配製 28	3.2.7 CBR染液之配製 29	3.2.8 脫色液之配製 29	3.2.9 電泳緩衝液之配製 29	3.3 分析方法 29	3.3.1 實驗菌株 29	3.3.2 N-乙醯葡萄糖胺?活性測定 29	3.3.3 還原醣含量之測定 30	3.3.4 水解產物之分析 30	3.4 最適反應條件 30	3.4.1 最適反應pH值 30	3.4.2 最適反應溫度 31	3.5 最適培養溫度 31	3.6 一次一因子探討 31	3.6.1 碳源 31	3.6.2 氮源 31	3.6.3 -chitin powder濃度 32	3.6.4 氮源濃度 32	3.6.5 磷源濃度 32	3.7 中心混成實驗設計 33	3.7.1 中心混成實驗初步設計 33	3.7.2 中心混成實驗設計 33	3.8 電泳分析 33	第四章 結果與討論 40	4.1 粗酵素液最適反應條件之探討 40	4.1.1 最適反應pH值之測定 40	4.1.2 最適反應溫度之測定 40	4.2 菌體最適培養溫度之探討 40	4.3 一次一因子 48	4.3.1 不同碳源對N-乙醯葡萄糖胺產量之影響 48	4.3.2 不同氮源對N-乙醯葡萄糖胺產量之影響 49	4.3.3 不同 -chitin powder濃度對N-乙醯葡萄糖胺產量之影響 59	4.3.4 不同混合氮源濃度對N-乙醯葡萄糖胺產量之影響 61	4.4 中心混成實驗設計 64	4.4.1 中心混成初步試驗 64	4.4.2 磷源濃度對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響 67	4.4.3 中心混成實驗設計 74	4.5 SDS-PAGE 84	第五章 結論 87	參考文獻 89	附錄 95	圖目 錄 圖	2.1 纖維素、幾丁質及幾丁聚醣之結構 3	圖 2.2 幾丁質及幾丁聚醣之製備 5	圖 2.3 幾丁質的水解產物 17	圖 2.4 實驗設計之主要流程圖 22	圖 3.1 實驗流程大綱圖 25	圖 4.1 粗酵素液最適反應pH值之測定 41	圖 4.2 粗酵素液最適反應溫度之測定 42	圖 4.3 培養溫度對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響 44	圖 4.4 培養溫度對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺?之影響 45	圖 4.5 培養溫度對菌株Too11還原醣產量之影響 46	圖 4.6 培養溫度對菌株Too11的發酵液pH值之影響 47	圖 4.7 碳源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響 50	圖 4.8 碳源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺?之影響 51	圖 4.9 碳源對菌株Too11還原醣產量之影響 52	圖 4.10 碳源對菌株Too11的發酵液pH 值之影響 53	圖 4.11 氮源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響 55	圖 4.12 氮源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺?之影響 56	圖 4.13 氮源對菌株Too11生產還原醣之影響 57	圖 4.14 氮源對菌株Too11的發酵液pH值之影響 58	圖 4.15 以1%~4% -chitin powder培養基培養菌株Too11 之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺?、還原醣及pH值的變化 60	圖 4.16 不同濃度蛋白?對菌株Too11之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺?、還原醣及pH值之影響 62	圖 4.17 不同濃度酵母抽出物對菌株Too11之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺?、還原醣及pH值之影響 63	圖 4.18 中心混成實驗設計(一)對N-乙醯葡萄糖胺產量影響之回應曲 面圖 68	圖 4.19 磷源濃度對菌株Too11之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺? 活性、還原醣及pH值的影響 73	圖 4.20 中心混成實驗設計(二)對N-乙醯葡萄糖胺產量影響之回 應曲 面圖 77	圖 4.21 碳源培養菌株Too11粗酵素液之SDS-PAGE分析 85	圖 4.22 碳源培養菌株Too11粗酵素液之活性染色分 析 86	表目 錄 表 2.1 幾丁質及幾丁聚醣的應用 7	表 2.2 不同微生物分泌之幾丁質?特性之比較 10	表 3.1 培養基之組成 27
---------	---------	--------	--------	---------	---------	---------	----------	------------	-----------	-------------------	----------------	-----------------	------------	-----------------	------------------------	--------------------	--------------------	--------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-----------------	-------------	----------------	----------------	---------------------------------------	--	--------------	-------------	---------------	---------------	---------------	--------------	-----------------	---------------------	-------------------	-----------------	-------------------	-------------------	-----------------	-------------------	-------------	---------------	------------------------	-------------------	------------------	---------------	------------------	-----------------	---------------	----------------	-------------	-------------	---------------------------	---------------	---------------	-----------------	---------------------	-------------------	-------------	--------------	----------------------	---------------------	--------------------	--------------------	--------------	-----------------------------	-----------------------------	--	---------------------------------	-----------------	-------------------	------------------------------------	-------------------	-----------------	-----------	---------	-------	--------	-----------------------	---------------------	-------------------	---------------------	------------------	-------------------------	------------------------	------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	------------------------------	--------------------------------	--	---	---	---	---	--	--------------------------------------	-----------------------------------	--------------------------	----------------------------	-----------------

3.2 23因子設計之控制因子與水準(一) 34 表 3.3 中心混成設計補充實驗之控因(一) 34 表 3.4 中心混成實驗設計表(一) 35 表  
3.5 23因子設計之控制因子與水準(二) 36 表 3.6 中心混成設計補充實驗之控因(二) 36 表 3.7 中心混成實驗設計表(二) 37 表  
3.8 12%分離膠組成 39 表 3.9 4%堆積膠組成 39 表 4.1 N-乙醯葡萄糖胺中心混成設計(一)實驗結果 65 表 4.2 以中心混成實驗  
設計(一)培養菌株Too11之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺?活性、還原醣及pH值實驗結果 66 表 4.3 中心混成設計(一)N-  
乙醯葡萄糖胺之誤差變異數分析表 70 表 4.4 中心混成設計(一)N-乙醯葡萄糖胺生成量之變異數分析 71 表 4.5 中心混成實  
驗設計(一)N-乙醯葡萄糖胺正則分析結果 72 表 4.6 N-乙醯葡萄糖胺中心混成設計(二)實驗結果 75 表 4.7 以中心混成實驗設  
計(二)培養菌株Too11之N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯葡萄糖胺?活性、還原醣及pH值實驗結果 76 表 4.8 中心混成設計(二)N-乙  
醯葡萄糖胺之誤差變異數分析表 79 表 4.9 中心混成實驗設計(二)之N-乙醯葡萄糖胺正則分析結果 80 表 4.10 中心混成設計  
(二)N-乙醯葡萄糖胺生成量之變異數分析 82 表 4.11 中心混成實驗設計(二)N-乙醯葡萄糖胺生成量二階模式之統計迴歸  
分析結果 83

## 參考文獻

- 中文部份 1.李宜玲。2004。利用*Aeromonas acviae* DYU-BT4之幾丁質分解酵素水解幾丁質生產N-乙醯幾丁寡醣。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 2.呂明洲。1994。Pseudomonas aeruginosa K-181所產幾丁質分解酵素之探討。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 3.周婉萍。1993。Bacillus coagulans NTU-FC-I幾丁質?； 妞臚s。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文，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.林玲慧。2005。生產N-乙醯幾丁寡醣菌株之篩選與幾丁質?； 坐擢黝瞻 C大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 6.林姿吟。2003。Bacillus subtilis K-181所產幾丁質?； 妞臚s。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 7.洪哲穎、陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上的應用。化工39(2):3-18。 8.馬玟釧。2004。幾丁質分解?； 艾尤脛尿z選及?； 妖瞻 P特性分析。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 9.張文智。1996。蝦蟹殼加工廢棄物回收與再利用。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 10.張瓊瑋。2004。Aeromonas sp. DYU-Too7與本土菌株之幾丁質分解?； 瞻 P特性分析。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 11.黃昭仁。1998。微生物所生產幾丁質分解?； 妞臚s。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 12.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。 13.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。 14.陳坤上、黃佩芬、陳聰松、陳幸臣。1996。幾丁寡醣製備條件之探討。23:874-883。 15.陳彥旭。2004。Aspergillus fumigatus TKU 003所生產蛋白?； P幾丁質?； 瞻 慎酋w性之研究。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 16.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。 17.蕭惟仁。2001。以紅麴發酵蝦蟹殼糖生產抗菌幾丁質?； 妞臚s。大葉大學生物科技系研究所碩士論文，彰化。 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。 英文部分 1.Aiba, S. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitoasns. Carbohydr. Res., 261:297-306. 2.Allan, G. G. and Peyron, M. 1995a. Molecular weight manipulation of chitosan I:kinetic of depolymerization by nitrous acid. Carbohydr. Res., 277:257-272. 3.Allan, G. G. and Peyron, M.1995b. Molecular weight manipulation of chitosan II:prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid. Carbohydr. Res., 277:273-282. 4.Beryer, L. R. and Reynold, D. M. 1958. The chitinase system of a straim of Streptomyces griseus. Biochimca Et Biophy. Acta., 29:105. 5.Chang, J. J. and Hash, J. H. 1979. The use of an amino acid analyzer for the rapid identification and quantitative determination of chitosan oligosaccharides. Anal. Biochem., 95:563-567. 6.Charpentier, M. and Percheron, F. 1983. The Chitin degrading enzyme system of a Streptomyces species. Int. J. Biochem. 15:298. 7.Chen, H. C., Hsu, M. F. and Jiang, S. T. 1997. Purification characterization of an exo-N,N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from Celloulomonas flavigena NTOU 1. Enzyme Microb. Technol., 20:190-197. 8.Cody, R. M. 1989. Distribution of Chitinase and Chitobiase in Bacillus. Current microbiology. 19(4):201. 9.Collinge, D. B., Kargh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K. 1993. Plant chitinase. Plant J., 3:31-40. 10.Dickinson, K., Keer, V., Hitchcock, C. A. and Asams, D. J. 1989. Chitinase activity from Candida alabicans its inhibition by allosamidin. J. Gen. Microbiol., 135:1417-1421. 11.Flach, J., Pilet, P. E. and Jolles, P. 1992. What ' s new in chitinase research ? Ezperientia, 48:701-716. 12.Hara, S., Yamamura, Y. Y., Fujii, Y. and Lkenaka, Y. 1982. Purification and characterization of chitinase produced by Stereptomyces erythraeus. J. Biochem., 105:484-489. 13.Harpater, M. H. and Dunsmuir, P. 1989. Nucleotide sequence of the chitinase B gene of Serratia marcescens QMB1466. Nucleic acids research. 17(13):5395. 14.Hasegawa, M. Isogi, A. and Onabe, F. 1993. Preparation of low-molecular weight chitosan using phosphoric acid. Carbahydr. Polym., 20:279-283. 15.Hicks, K. B. 1988. Isolation of oligomeric fragments by preparative high- performance liquid chromatography. Method Enzymol., 161:410-416. 16.Hiraga, K., Shou, L., Kitazawa, M., Takahashi, Shimada, M., Sato, R. and Oda, K. 1997. Isolation and characterization of chitinase from a Flake-chitin degrading marine bacterium, Aeromonas hydrophila H-2330. Biosci. Biochem., 61(1):174-176. 17.Hiroshi, T., Katsuhiko, M., Katsushiro. M., Hiroshi, E., Masafumi, M. and Yoshihiko. I. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from Sterptomyces thermoviolaceus OPC-520. Appl. Environ. Microbiol., 59(2): 620-623. 18.Huang, J. H., Chen, C. J. and Su, Y. C. 1996. Production of chitinolytic enzyme from a novel species of Aeromonas. Journal of Industrial Microbiology. 17(2):89-95. 19.Jeuniaux, C. 1996. Chitinases, Method Enzymol., 8:644-650. 20.Katsuchiro, O., Fumitomo, K., Norihiko, W., Setsuko, Y., Yoshihiro, M., and Shigeru, H. 1995. Purification and properties of chitinase from Streptomyces sp. J-13-3. Biosci. Biotech. Biochem. 59:1586. 21.Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food – A challenge for food research and development, Food Technol., 38:85-97. 22.Kumar, S. L., Olafson, B. D. and Goddard III, W. A. 1990. DREIDING: a generic force field for

molecular simulations. *J. Phys. Chem.* 94: 8897-8909. 23. Majeti, N. V., and R. Kumar 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*. 46:1-27. 24. Martin, M. N. 1991. The latex of *Hevea brasiliensis* contain high levels of chitinase and chitinase/lysozymes. *Plant Physiol.*, 95:469-476. 25. Mitsuhiro, U., Ayako, F., Takashi, K. and Motoo, M. 1995. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci. Biotech.*, 59:2162. 26. Mitsuhiro, U. and Motoo, M. 1995. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci. Biotech.*, 56:529. 27. Mitsutomi, M., Ohtakara, A. Fukamizo T. and Goto, S. 1990. Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric Biol Chem.*, 54(4):871-877. 28. Mori, T., Okumura, M., Matura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Minami, S. and Fujinaga, T. 1997. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 18, 947-951. 29. Ohtakara, A., Yoshida, M., Murakami, M., and Izumi, T. 1981. Purification and characterization of N-acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agric. Biol. Chem.* 45:239. 30. Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avallone, B. and Balsamo, G. 1994. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* 15:1215-1220. 31. Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1994. Purification and characterization of thermostable N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(2):2911-2915. 32. Sawao, M., Teruhiko, K., Homare, I., Hiroshi, O., and Takashi S. 1992. Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. *Biosci. Biochem.* 56:368. 33. Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda, K. and Aiba, S. I. 2002. Production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydr. Res.* 337:761-763. 34. Shahidi, F., Vidana Arachchi, J. K., and Jeon, Y. J. 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Sci. & Technol.* 10:37-51. 35. Trachuk, L. A., Revina, L. P., Shemyakima, T. M., Chestukhina, G. G. and Stepanov, V. M., 1996. Chitinase of *Bacillus licheniformis* B-6839: Isolation and properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(4):307-315. 36. Tsutomu, T., Kasumi, A., Yasuyaki, T. and Venzo, S. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1078:404-411. 37. Tsukamoto, T., Koga, D., Ide, A., Ishibashi, T., Horino-Matsushige, M., Yagishita, K. and Imoto, T. 1984. Purification and some properties of chitinase from yam, *Dioscorea opposita* thumb. *Agric. Biol. Chem.*, 48:931-939. 38. Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. 1976. Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse cellwall. *Agric. Biol. Chem.* 40:2325. 39. Wang, S. Y., Moyne, A. L., Thottappilly, G., Wu, S. J., Locy, R. D. and Singh, N. K. 2001. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme and Microbial Technology* 28:492-498. 40. Ulhoa, C. J. and Peberdy, J. F. 1992. Purification and some properties of extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 14(3):236-240. 41. Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 9923:302-309.