

Study on Cultivation Conditions of *Aeromonas hydrophila* Too11 to Produce N-acetylglucosamine

張鄴廷、吳淑姿 余世宗

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

ABSTRACT

N-acetylglucosamine has anti-tumor and immuno-stimulating capabilities and functions to cure arthritis, and therefore, has been widely used in many fields. The aim of this study is to optimize the N-acetylglucosamine production by *Aeromonas hydrophila* Too11. A central composite design was used to search an optimal operation condition for N-acetylglucosamine production. The strain Too11 can be cultivated using various carbon sources. Especially, in α -chitin (obtained from squid pens), the N-acetylglucosamine production was maximized to be 13.4 g/L at 72 h. Similarly, the strain Too11 can be cultivated using various nitrogen sources. Especially with a mixed nitrogen (yeast extract and peptone) source, the N-acetylglucosamine production was maximized to be 9.2 g/L at 96 h. To investigate the effect of α -chitin concentration on the production, the strain Too11 was cultivated in media with various chitin concentrations. The highest N-acetylglucosamine production was 13.7 g/L if the medium contained 4% α -chitin. The strain Too11 was cultivated in media with various phosphorus (KH_2PO_4 and K_2HPO_4) concentrations. The highest N-acetylglucosamine production was obtained to be 10.6 g/L when the strain was cultivated in a medium containing 3.5 g/L phosphorus. The concentrations of mixed phosphorus (KH_2PO_4 and K_2HPO_4) source 3.5 g/L, mixed nitrogen (yeast extract and peptone) source 1 g/L and α -chitin powder 35 g/L were used to initiate a central composite design. After the analysis, an optimal cultivating condition for N-acetylglucosamine production was obtained to have mixed phosphorus (KH_2PO_4 and K_2HPO_4) source 4.82 g/L, mixed nitrogen (yeast extract and peptone) source 0.8 g/L and α -chitin powder 54.95 g/L in the medium. When the strain Too11 was cultivated in the optimal condition, the N-acetylglucosamine production reached 13.88 g/L, which is close to the predicted value (13.79 g/L) from the regression model.

Keywords : N-acetylglucosamine ; *Aeromonas hydrophila* ; central composite design

Table of Contents

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 幾丁質之應用	9
2.2.1 幾丁質之水解模式及其分類	15
2.2.2 N-乙醯葡萄糖胺	16
2.2.3 N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯幾丁寡醣	19
2.2.4 幾丁質之活性分析	16
2.3 N-乙醯葡萄糖胺與N-乙醯幾丁寡醣之製備	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 α -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-乙醯葡萄糖胺之活性測定	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 α -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 α -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
2.2 幾丁質及幾丁聚醣之製備	5
2.3 幾丁質的水解產物	17
2.4 實驗設計之主要流程圖	22
3.1 實驗流程大綱圖	25
4.1 粗酵素液最適反應pH值之測定	41
4.2 粗酵素液最適反應溫度之測定	42
4.3 培養溫度對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	44
4.4 培養溫度對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	45
4.5 培養溫度對菌株Too11還原醣產量之影響	46
4.6 培養溫度對菌株Too11的發酵液pH值之影響	47
4.7 碳源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	50
4.8 碳源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	51
4.9 碳源對菌株Too11還原醣產量之影響	52
4.10 碳源對菌株Too11的發酵液pH值之影響	53
4.11 氮源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	55
4.12 氮源對菌株Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之影響	56
4.13 氮源對菌株Too11生產還原醣之影響	57
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 表 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-乙醯葡萄糖胺生合成量之變異數分析 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-乙醯葡萄糖胺生合成量之變異數分析 82 表 4.11 中心混成實驗設計(二)N-乙醯葡萄糖胺生合成量二階模式之統計迴歸分析結果 83

REFERENCES

- 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? ; 妞膿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? ; 坐擢矚瞻 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? ; 妞膿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? ; 艾尤靛尿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.張瓊璋。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? ; 妞膿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 懷酋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? ; 妞膿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 strain 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 Stereptomycetes 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 broth 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 six 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., Shemyakina, 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. Transglycoylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia Orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 9923:302-309.