

利用可逆溶解型擔體於 *Bacillus* sp. 所生產幾丁質? 帛J白? 妝T定化研究

許智強、顏裕鴻、王三郎

E-mail: 9511322@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究以可逆溶解型擔體 - AS-L 為固定化材料，進行 *Bacillus cereus* TKU006 和 *B. subtilis* TKU007 所產酵素及鳳梨酵素和木瓜酵素之固定化。探討內容包括蛋白、及幾丁質在游離形式和固定化形式下，其最適反應溫度、熱安定性、最適反應 pH、pH 安定性及固定化酵素回收率之差異。並進一步探討固定化酵素之基質特異性。實驗結果顯示，針對游離形式和固定化形式下，最適反應溫度試驗僅於市售木瓜酵素之蛋白、活性及鳳梨酵素之幾丁質、活性具有較顯著的差異，最適反應 pH 試驗則僅於 *B. cereus* TKU006 之蛋白、部份有較顯著的差異，安定性試驗方面，一般皆具穩定活性，其中固定化酵素之活性更能表現出其對溫度及 pH 變化下的抗性。固定化酵素回收率試驗方面，在經過 7 次重複使用後，所有試驗酵素之活性皆具有約 60% 以上的回收率。基質特異性方面，除鳳梨酵素在水解白蛋白過程中，固定化酵素較游離酵素具有較高之水解活性外，其餘皆以游離酵素較高；鳳梨酵素亦於水解人工合成蛋白質基質試驗中，無論固定化態或游離態，皆具有較其他酵素為佳之水解活性。

關鍵詞：B.cereus、B.subtilis、AS-L、蛋白、幾丁質。

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.....	v	目錄.....	vi	圖目錄.....	vii
第一章、緒言.....	1	第二章、文獻回顧.....	3	2.1 幾丁質及幾丁寡醣.....	3
2.2 N-乙醯幾丁寡醣及幾丁寡醣.....	9	2.3 蛋白質及蛋白.....	11	2.4 酵素之固定化.....	16
2.5 固定化擔體之簡介.....	20	2.6 以可逆溶解型擔體 - AS-L 之固定化研究.....	21	第三章、材料與方法.....	26
3.1 菌株.....	26	3.2 儀器與藥品.....	26	3.3 實驗方法.....	27
第四章、結果與討論.....	33	4.1 酵素固定化之酵素基本研究.....	33	4.2 固定化酵素之最適化分析及比較.....	33
第五章、結論.....	68	參考文獻.....	70	圖目錄	
圖 2.1 幾丁質之化學構造	4	圖 2.2 幾丁質之晶格構造	5	圖 2.3 幾丁質之晶格構造	5
圖 2.4 酵素的各種固定化法	19	圖 2.5 AS-L 之化學結構式	22	圖 2.6 EDC 之化學結構	25
圖 2.7 EDC、AS-L 擔體和酵素間的化學反應	25	圖 4.1 <i>B. cereus</i> TKU006 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應溫度	36	圖 4.2 <i>B. subtilis</i> TKU007 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應溫度	37
圖 4.3 木瓜酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應溫度	38	圖 4.4 鳳梨酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應溫度	39	圖 4.5 <i>B. cereus</i> TKU006 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其熱安定性	41
圖 4.6 <i>B. subtilis</i> TKU007 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其熱安定性	42	圖 4.7 木瓜酵素之游離酵素和固定化酵素其熱安定性	43	圖 4.8 鳳梨酵素之游離酵素和固定化酵素其熱安定性	44
圖 4.9 <i>B. cereus</i> TKU006 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應 pH 值	46	圖 4.10 <i>B. subtilis</i> TKU007 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應 pH 值	47	圖 4.11 木瓜酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應 pH 值	48
圖 4.12 鳳梨酵素之游離酵素和固定化酵素其最適水解反應 pH 值	49	圖 4.13 <i>B. cereus</i> TKU006 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其 pH 安定性	51	圖 4.14 <i>B. subtilis</i> TKU007 所產酵素之游離酵素和固定化酵素其 pH 安定性	52
圖 4.15 木瓜酵素之游離酵素和固定化酵素其 pH 安定性	53	圖 4.16 鳳梨酵素之游離酵素和固定化酵素其 pH 安定性	54	圖 4.17 回收次數對 <i>B. cereus</i> TKU006 所產酵素之固定化酵素，其相對活性的影響	57
圖 4.18 回收次數對 <i>B. cereus</i> TKU007 所產酵素之固定化酵素，其相對活性的影響	58	圖 4.19 回收次數對木瓜酵素之固定化酵素，其相對活性的影響	59	圖 4.20 回收次數對鳳梨酵素之固定化酵素，其相對活性的影響	60
圖 4.21 回收次數對不同來源之固定化酵素，其蛋白? 蛇麩 " 坻獐 v 響	61	圖 4.22 回收次數對不同來源之固定化酵素，其幾丁質? 蛇麩 " 坻獐 v 響	62	表目錄	
表 2.1 AS-L 的性質說明	23	表 4.1 游離酵素及固定化酵素水解不同蛋白質基質之蛋白? 蛇麩 " ?	6	表 4.2 游離酵素及固定化酵素水解人工合成蛋白質基質之蛋白? 蛇麩 " ?	7

參考文獻

中文部份 1. 王三郎。1991。生物工學入門。高立圖書出版社。台北，台灣。 2. 王三郎。1996。水產資源利用學。高立圖書出版社。台北，台灣。 3. 王三郎。1999。海洋未利用生物資源之回收再利用-幾丁質及幾丁聚醣。生物資源生物技術1(1):1-8。 4. 王三郎。2005

。應用微生物學。高立圖書出版社。台北，台灣。5. 王中和，陸順娟，胡海生等。1997。低分子殼多糖對癌症放療患者免疫功能的影響。首都醫科大學學報18(1):80。6. 王啟浩。1999。利用細菌發酵農水產廢棄物生產生物製劑之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化。7. 江晃榮，林玉媛。1998。生物科技的奇蹟-甲殼素的強效。世茂出版社。台北。8. 邱少華。1997。利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁質之應用及量產條件之研究。大葉工學院食品工程研究所碩士論文。彰化。9. 杜昱光，白雪芳，虞星炬等。1997。寡聚糖類物質生理活性的研究。中國生化藥物雜誌18(5):268。10. 松尾高明。1997。Biological function of soybean peptides and its application。食品與開發26(2):3-7。11. 林咨吟。2003。Bacillus subtilis W-118所生產幾丁質之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化。12. 章瑩。1996。幾丁質應用於腫瘤治療的研究現狀。國外醫學 腫瘤分冊23(6):346。13. 陳秀蓮。1993。常用調味料中的蛋白質水解液。食品工業25(6):33-43。14. 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。15. 陳泰州。2000。嗜水性產氣單胞桿菌Aeromonas hydrophila臨床株CKH-29溶血素之純化與分析。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文。台北。16. 陳國誠。1989。微生物酵素工程學。藝軒圖書出版社。台北，台灣。17. 鄭靜桂。1997。蛋白質之水解與水解液之利用。食品工業29(5):10-17。18. 蔡國珍，吳冠政，詹淑玲。2002。幾丁寡醣之抗菌及免疫活性。幾丁質幾丁聚醣研討會論文集:43-45。中華幾丁質幾丁聚醣學會。2002.5.24。基隆。19. 蕭瑞昌。1997。利用水溶性幾丁聚醣以薄膜超過濾法去除微量之金屬離子。元智工學院化學工程研究所碩士論文。桃園。英文部份 1. Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers, Bagsvaerd, Denmark. 2. An-Lac, N. and Luong, L. H. 1986. Diffusion in -carrageenan gel beads. Biotech. Bioeng. 28 : 1261-1267. 3. Castillo, E., Casas, R. L., Quintero, R. and Lopez-Munguia, A. 1991. Design of two immobilized cell catalysts by Entrapment on gelatin : internal Diffusion Aspects. Enzyme Microb. Technol. 13:127-133. 4. Chen, J. P. and Chen, Y. C. 1997. Preparations of immobilized lysozyme with reversibly soluble polymer for hydrolysis of microbial cells. Biores Technol 60: 231-237. 5. Dalvie, S. K. and Baltus, R. E. 1992. Distribution of immobilized enzymes on porous membranes. Biotech. and Bioeng. 40 : 1173-1180. 6. Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitin & its biological application. J. Sci. Ind. Res. 45:273-277. 7. Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein Supplementation. Food Technol. 48:86-88. 8. Fujii, M. and Tsniguchi, M. 1991. TIBTECHJUNE. 9 : 191-196. 9. Hasegawa, M., Isogi, A. and Onabe, F. 1993. Preparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid. Carbohydr. Polym. 20:279-283. 10. Jeuniaux, c. 1966. Chitinases. Methods Enzymol. 8:644-650. 11. Kang, C. D., Do, I. R., Kim, K. W., Ahn, B. K., Kim, S. H., Chung, B. S., Jhun, B. H. and Yoo, M. A. 1999. Role of Ras/ERK-dependent pathway in the erythroid differentiation of K562 cells. Exp. Mol. Med. 31:76-82. 12. Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to Fusarium soloni and elicits pisatin formation in Pisum sativum. Exp. Mycol. 8:276-281. 13. Koga D., Sueshige, N., Orkono, K., Utsumi, T., Tanaka, S., Yamada, Y. and Ide, A. 1988. Efficiency of chitinolytic enzyme in the formation of trichoderma matsutake protoplasts. Agric. Biol. Chem. 52:2091-2094. 14. Koga D., Sueshige, N., Utsumi, T. and Ide, A. 1989. Kinetics of chitinase fromyam, Dioscorea opposita thumb. Agric. Biol. Chem. 53:3121-3127. 15. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymer in food. Food Technol. 1:85-89. 16. Lahl, W. J. and S. D. Braun 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. Food Technol. 48:68-71. 17. Loffler, A. 1986. Proteolytic enzymes:sources and applications. Food Technol. 40:63-70. 18. Mink, R. and Blackwell, J. 1978. The structure of -chitin. J. Mol. Biol. 120:167-170. 19. Muzzarelli, R. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. In Chitin. Pregamon Press, New York, USA. 20. Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F. and Emanuelli, M. 1984. Chelating derivatives of chitosan obtained by reaction with ascorbic acid. Carbohydr. Polym. 4:137-151. 21. Nielsen, P. M. 1994. Enzyme technology for production of protein based flavours. Food Ingredients Europe Conference. 22. Ohtakara, A., Matsunaga, H. and Mitsutomi, M. 1990. Action pattern of Streptomyces griseus chitinase on partially N-acetylated chitosan. Agric. Biol. Chem. 54:3191-3199. 23. Richard F. Taylor. 1991. Protein immobilization fundamental and application. p. 3-4,15-29,105-133. Marcel Dekker, INC. Hong Kong. 24. Robert, W. K. and Selitrennidkoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. J. Biol. Chem. 134:169-171. 25. Suzuki, K., Mikami, T. and Okawa, Y., 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. Carbohydrate Research 151: 403-408. 26. Suzuki, S., Okawa, Y. and Suzuki, K. 1987. Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of seine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect. Microbiol Immunol. 31:375-383. 27. Suzuki, K., Okawa, Y. and Suzuki, S. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. Microbiol Immunol. 28:903-912. 28. Suzuki, K., Tokoro, A. and Okawa, Y. 1985. Enhancing effects of N-acetyl-chito-oligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. Chem. Pharm. Bull. 33:886-888. 29. Suzuki, K. Tokoro, A., Okawa, Y. 1986. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. Microbiol Immunol. 30:777-787. 30. Tanaka, H., Matsumura, M. and Veliky, I. A. 1984. Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads. Biotech. and Bioeng. 26:53-58. 31. Thomas, L. and Loffler, F. 1994. Improved protein functionalities by enzymatic treatment. Food Marketing Technol. 4-6. 32. Tokoro, A., Kobayashi, M. and Tatewaki, N. 1989. Protective effect of N-acetyl chitohexaose on Listeria monocytogenes infection in mice. Microbiol Immunol. 33(4):357-368. 33. Tsutomu, T., Kasumi, A., Yasuyaki, T. and Venzo, S. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from Bacillus licheniformis. Biophys. Acta. 1078:404-411. 34. Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. 1987. Transglycoylation reaction of chitinase purified from Nocardio orientalis. Biochim. Biophys. Acta. 9923:302-309. 35. Wang, S.L., Chio, S.H. 1998. Reversible Immobilization of Chitinase via Coupling to Reversibly Soluble Polymer. Enzyme Microb Technol. 22: 634-640.