

# 發孝培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 生產 N-乙醯幾丁寡醣之培養條件探討 = Study on the cultivation conditions of aeromonas ..

顧振旗、吳淑姿；余世宗

E-mail: 9708280@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

研究探討不同培養條件(碳源、氮源、 $\alpha$ -幾丁質粉末濃度及 $\beta$ -幾丁質粉末濃度)對菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12 生產 N-乙醯幾丁寡醣的影響。菌株培養於 $\alpha$ -幾丁質粉末與膠態幾丁質之基礎培養基，水解產物以 N-乙醯幾丁三醣為主，培養於第 72 h，N-乙醯幾丁三醣分別可達 0.48 與 0.47 g/L，而培養於 $\beta$ -幾丁質粉末之基礎培養基於第 24 h，N-乙醯幾丁三醣可達 0.3 g/L，培養於第 96 h，N-乙醯葡萄糖胺可達 0.45 g/L。菌株培養於含 5% $\alpha$ -幾丁質粉末之基礎培養基中，水解產物以 N-乙醯葡萄糖胺與 N-乙醯幾丁三醣為主，培養於第 144 h，N-乙醯葡萄糖胺產量為 2.85 g/L，N-乙醯幾丁三醣產量為 2.42 g/L。於高溶氧的批次發酵培養 96 h，N-乙醯幾丁三醣產量為 0.64 g/L；於低溶氧的批次發酵培養 72 h，N-乙醯葡萄糖胺與 N-乙醯幾丁三醣，分別有 1.26 與 1.1 g/L；不通氣的批次發酵培養 96 h，N-乙醯葡萄糖胺為 2.55 g/L。於發酵槽中以低溶氧量培養菌株，其粗酵素液，經硫酸銨沉澱、透析、DEAE-Sepharose CL-6B 及 Sephacryl S-100 純化步驟後，收集具活性之波峰，酵素之比活性為 9.62，回收率為 5.34%，純化倍率為 3.14。最適反應溫度與 pH 值為 40 與 6.0。Hg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 及 Mn<sup>2+</sup> 金屬離子對幾丁質分解? 活性抑制較大，EDTA 對幾丁質分解? 之活性有較大促進作用。

關鍵詞：N-乙醯幾丁寡醣；N-乙醯幾丁三醣；幾丁質分解?

## 目錄

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	vii	目錄	viii	圖目錄	xii	表目錄	xvi	1. 緒論	1	2. 文獻回顧	2	2.1 幾丁質	2	2.2 幾丁質之結晶結構	5	2.3 幾丁質水解模式	5	2.4 幾丁質分解酵素之分類	7	2.4.1 幾丁質?	7	2.4.2 N-乙醯葡萄糖胺?	10	2.4.3 幾丁二醣?	10	2.4.4 幾丁質去乙醯?	10	2.4.5 幾丁聚醣?	10	2.5 幾丁質酵素命名	11	2.6 幾丁質分解酵素的活性測定	11	2.6.1 還原醣測定法	12	2.6.2 混濁度測定法	12	2.6.3 黏度計測定法	12	2.6.4 N-乙醯葡萄糖胺生成量測定法	12	2.6.5 放射線測定法	13	2.6.6 染料結合測定法	13	2.7 N-乙醯幾丁寡醣之製備	13	2.7.1 化學法	14	2.7.2 微生物法	14	2.8 N-乙醯幾丁寡醣之分離	15	2.8.1 離子交換法	15	2.8.2 膠體過濾法	15	2.8.3 液相層析法	16	2.9 N-乙醯幾丁寡醣之應用	16	3. 材料與方法	20	3.1 實驗架構	20	3.2 實驗藥品	20	3.3 實驗器材	21	3.4 實驗方法	22	3.4.1 培養基組成	22	3.4.2 膠態幾丁質之製備	22	3.4.3 批次發酵槽培養	24	3.4.4 呈色劑之配製	25	3.4.5 還原醣含量之測定	25	3.4.6 生質量	25	3.4.7 酵素活性分析	26	3.3.8 蛋白質濃度測定	26	3.4.9 幾丁質水解產物分析	26	3.4.10 幾丁質? 之分離純化	28	3.4.11 純化酵素特性分析	28	3.4.12 聚丙烯醯胺膠體電泳分析	30	4. 結果與討論	32	4.1 菌株 DYU-Too12 之鑑定	32	4.2 以不同碳源培養 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too1232	4.2.1 幾丁質分解? 之活性分析	32	4.2.2 還原醣量與 pH 值變化	34	4.2.3 幾丁質水解產物分析	38	4.3 以不同氮源培養 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too1240	4.3.1 幾丁質分解? 之活性分析	40	4.3.2 還原醣生成量與 pH 值變化	40	4.3.3 幾丁質水解產物分析	44	4.4 以不同濃度之 $\alpha$ -幾丁質粉末培養 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too1244	4.4.1 幾丁質分解? 之活性分析	46	4.4.2 還原醣、蛋白質及 pH 值變化	46	4.4.3 幾丁質水解產物分析	49	4.5 以不同濃度 $\beta$ -幾丁質粉末培養 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too1254	4.5.1 幾丁質分解? 之活性分析	58	4.5.2 還原醣、蛋白質及 pH 值變化	58	4.5.3 幾丁質水解產物分析	61	4.6 批次發酵培養	65	4.6.1 幾丁質分解? 之活性分析	69	4.6.2 還原醣、pH 值及蛋白質變化	71	4.6.3 生質量與幾丁質殘留量變化	71	4.6.4 幾丁質水解產物分析	76	4.7 幾丁質分解? 之分離純化	81	4.7.1 培養於低溶氧量之幾丁質分解? 的純化	81	4.7.2 幾丁質分解? 之特性分析	87	5. 結論	94	5.1 結論	94	5.2 未來展望	95	參考文獻	96	附錄	101	圖目錄	圖 2.1 纖維素、幾丁質和幾丁聚醣的結構	3	圖 2.2 $\alpha$ -幾丁質(左圖)及 $\beta$ -幾丁質(右圖)的分子鏈排列情形	6	圖 2.3 幾丁質水解酵素水解途徑	8	圖 2.4 幾丁質的水解產物	9	圖 4.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 革蘭氏染色顯微照片	33	圖 4.2 不同碳源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中幾丁質分解酵素活性的影響	35	圖 4.3 不同碳源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中還原醣的影響	36	圖 4.4 不同碳源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液 pH 值的影響	37	圖 4.5 不同碳源培養菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之 N-乙醯幾丁寡醣種類與含量	39	圖 4.6 不同氮源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中幾丁質分解酵素活性的影響	41	圖 4.7 不同氮源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中還原醣的影響	42	圖 4.8 不同氮源對菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液 pH 值的影響	43	圖 4.9 不同氮源培養菌株 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 於 72 h 之 N-乙醯幾丁寡醣種類與含量	45	圖 4.10 不同濃度 $\alpha$ -幾丁質粉末對 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中幾丁質分解酵素活性的影響	47	圖 4.11 不同濃度 $\beta$ -幾丁質粉末對 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中還原醣的影響	48	圖 4.12 不同濃度 $\alpha$ -幾丁質粉末對 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中蛋白質的影響	50	圖 4.13 不同濃度 $\beta$ -幾丁質粉末對 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 之發酵液中的 pH 值影響	51	圖 4.14 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 生產之 N-乙醯幾丁三醣的高效能液相層析圖	52	圖 4.15 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 培養於不同濃度 $\alpha$ -幾丁質粉末於 96 h 之幾丁寡醣種類與含量	53	圖 4.16 <i>Aeromonas hydrophila</i> Too12 培養於	
--------	-----	-----	-----	------	----	------	---	----	-----	----	------	-----	-----	-----	-----	-------	---	---------	---	---------	---	--------------	---	-------------	---	----------------	---	------------	---	-----------------	----	-------------	----	---------------	----	-------------	----	-------------	----	------------------	----	--------------	----	--------------	----	--------------	----	----------------------	----	--------------	----	---------------	----	-----------------	----	-----------	----	------------	----	-----------------	----	-------------	----	-------------	----	-------------	----	-----------------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	----------	----	-------------	----	----------------	----	---------------	----	--------------	----	----------------	----	-----------	----	--------------	----	---------------	----	-----------------	----	-------------------	----	-----------------	----	--------------------	----	----------	----	----------------------	----	---	--------------------	----	--------------------	----	-----------------	----	---	--------------------	----	----------------------	----	-----------------	----	--	--------------------	----	-----------------------	----	-----------------	----	--	--------------------	----	-----------------------	----	-----------------	----	------------	----	--------------------	----	----------------------	----	--------------------	----	-----------------	----	------------------	----	--------------------------	----	--------------------	----	-------	----	--------	----	----------	----	------	----	----	-----	-----	-----------------------	---	---	---	-------------------	---	----------------	---	---	----	---	----	---	----	--	----	--	----	---	----	---	----	--	----	---	----	--	----	---	----	--	----	---	----	--	----	---	----	--	--

不同濃度 -幾丁質粉末於120 h之幾丁寡醣種類與含量55 圖4.17 *Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末於144 h之幾丁寡醣種類與含量56 圖4.18 不同濃度 -幾丁質粉末濃度對*Aeromonas hydrophila* Too12之發酵液中幾丁質分解酵素活性的影響59 圖4.19 不同濃度 -幾丁質粉末濃度對*Aeromonas hydrophila* Too12之發酵液中還原醣的影響60 圖4.20 不同濃度 -幾丁質粉末對*Aeromonas hydrophila* Too12之發酵液中蛋白質量的影響62 圖4.21 不同濃度 -幾丁質粉末對*Aeromonas hydrophila* Too12之發酵液中的pH值影響63 圖4.22 *Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末於48 h之幾丁寡醣種類與含量64 圖4.23 *Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末於72 h之幾丁寡醣種類與含量66 圖4.24 *Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末於96 h之幾丁寡醣種類與含量67 圖4.25 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之幾丁質分解?活性變化70 圖4.26 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之還原醣生成量變化72 圖4.27 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之pH值變化73 圖4.28 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之蛋白質生成量變化74 圖4.29 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之生質量變化75 圖4.30 以不同溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之殘留幾丁質變化77 圖4.31 以高溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之幾丁寡醣種類與含量78 圖4.32 以低溶氧量培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之幾丁寡醣種類與含量79 圖4.33 以不通氣培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之N-乙醯葡萄糖胺生成量80 圖4.34 以低溶氧量於5 L發酵槽培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之粗酵素液的DEAE-Sepharose CL-6B管柱層析圖83 圖4.35 活性波峰D1(圖4.33所示之第47-51管)以Sephacryl S-100管柱純化之膠體過濾層析圖84 圖4.36 以SDS-PAGE活性染色分析波峰D1(圖4.33所示之第47-51管)經Sephacryl S-100HR純化收集之第35~43管85 圖4.37 溫度對菌株*Aeromonas hydrophila* Too12於低溶氧量培養之幾丁質分解?反應活性與穩定性的影響88 圖4.38 pH值對菌株*Aeromonas hydrophila* Too12於低溶氧量培養之幾丁質分解?反應活性與穩定性的影響。( ) : McIlvaine buffer (pH 3-8) ; ( ) : Tris-HCl buffer (pH 7-10)89 圖4.39 *Aeromonas hydrophila* Too12於低溶氧量培養之幾丁質分解?的Km與Vmax91表目錄 表2.1 甲殼類、昆蟲、軟體動物及真菌類之幾丁質含量4 表2.2 不同微生物生產N-乙醯幾丁寡醣種類與含量之比較17 表3.1 培養基組成23 表3.2 cMcIlvaine緩衝溶液27 表3.3 分離膠組成31 表3.4 堆積膠組成31 表4.1 c*Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末之N-乙醯幾丁寡醣的種類及含量57 表4.2 c*Aeromonas hydrophila* Too12培養於不同濃度 -幾丁質粉末之N-乙醯幾丁寡醣的種類及含量68 表4.3 以低溶氧量於5 L發酵槽培養菌株*Aeromonas hydrophila* Too12之幾丁質分解?純化總表86 表4.4 金屬離子或EDTA對菌株*Aeromonas hydrophila* Too12於低溶氧量培養之幾丁質分解?活性之影響92

## 參考文獻

- 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。大葉大學生物產業科技系研究所碩士論文，彰化。
- 2.林玲慧。2005。生產N-乙醯幾丁寡醣菌株之篩選與幾丁質?之分離純化。大葉大學生物產業學系研究所論文，彰化。
- 3.張鄧廷。2006。利用*Aeromonas hydrophila* Too11生產N-乙醯葡萄糖胺之培養條件探討。大葉大學生物產業學系研究所論文，彰化。
- 4.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。
- 5.連德昇。2007。幾丁質分解酵素之生產與其基因選殖。大葉大學食品工程研究所博士論文，彰化。
- 6.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:第34-41頁。基隆。
- 7.陳錦坤、許清輝、李錦榆、林忠亮、方炳?、黃冬梨、吳奇生。2001。在電泳片上直接分析chitinase活性的新方法。90學年度技術與教學研討會論文專輯:21-23。明志技術學院。台北。
- 8.曾士維。2006。以Chitinibacter tainanensis生產N-乙醯葡萄糖胺之研究。大葉大學生物產業科技學系研究所碩士論文，彰化。
- 9.黃安德。1998。利用部份純化之Amycolatopsis orientalis 細胞外N-乙醯葡萄糖胺製備N-乙醯幾丁寡醣。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 10.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研究所碩士論文，基隆。
- 11.蕭瑞昌。1997。利用水溶液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。
- 12.龜山猶一。1981。化學分析試藥配製法。正文書局。台北。
- 13.謝伊金。2007。N-乙醯幾丁寡醣生產菌之篩選與幾丁質分解?-特性分析。大葉大學生物產業學系研究所論文，彰化。
- 14.Aiba, S. and Muraki, E. 1998. Preparation of higher N-acetylchitooligosaccharides in high yields. *Advances in Chitin Sci.* 3: 89-96.
- 15.Austin, P.R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P. 1981. Chitin: New facets of research. *Sci.* 212(5): 749.
- 16.Boller, T. and Mauch, F. 1988. Colorimetric assay for chitinase. In *Method in Enzymology.* 161: 424-426, Academic Press, New York.
- 17.Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 18.Chen, S. W. and Chen, H. C. 1999. Effect of oral administration of *Cellulomonas flavigena* NTOU 1-degraded chitin hydrolysate on physiological changes in rats. *Food Sci. Agric. Chem.* 1: 186-189.
- 19.Cody, R. M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. *Current Microbiol.* 19: 201-205.
- 20.Davis, B. and Eveleigh, D. E. 1984. Chitosanases: Occurrence, Production and Immobilization. In *Chitin, Chitosan and Related Enzymes* Zikakis, J. P. (Ed.), p.161-179. Academic Press, Orlando, FL.
- 21.Davis, D. H. and Hayes, E. R. 1988. Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Method in Enzymology.* 161: 442-446.
- 22.Domard, A. and Cartier, N. 1989. Glucosamine oligomers preparation and characterization. *Int. Biol. Macromol.* 11: 297-302.
- 23.Flach, J., Pilet, P.E. and Jolles, P. 1992. What ' s new in chitinase research? *Experientia.* 48: 701-716.
- 24.Gooday, G.W. 1997. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation.* 1: 177-190.
- 25.Hackman, R. H. 1960. Studies on chitin. IV. The nature of - and -chitin. *J. Biol. Sci.* 18: 935.
- 26.Imoto, T. and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1154-1156.
- 27.Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H. and Ohtakara, A. 1992. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from

enzymatic hydrolyzates of chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1327-1328. 28. Jeuniaux, C. 1966. Chitinases. *Methods Enzymol.* 8: 644-650.

29. Kang, C. S., Park, S. and Lee, G. D. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus. *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 276-281. 30. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food-A challenge for food research and development. *Food Technology*. January: 85-97. 31. Koga, D., Jilka, J. and Kramer, K.J. 1983. Insect endochitinases: glycoproteins from moulting fluid, integument and pupal haemolymph of *Manduca sexta*. *L. Insect Biochem.* 13: 295-305. 32. Mitsutomi, M., Hata, T. and Kuwahara, T. 1995. Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Ferm. Bioengng.* 80(2):153-158. 33. Molano, J., Puran, A. and Cabib, E. 1977. A rapid and sensitive assay of chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* 83: 648. 34. Muraki, E., Yaku, F. and Kojima, H. 1993. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp. 6-8. *Carbohydr. Res.* 239: 227-237. 35. Muzzarelli, R. A. A. 1977. Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Ferment. Bioengng.* 77: 617-620. 36. Ohtakara, A. 1961. Studies on the chitinolytic enzymes of black-kogi mold. Part I. Viscometric determination of chitinase activity by application of glycol chitin as a new substrate. *Agric. Biol Chem.* 25(1): 50-54. 37. Pal, W. R., Epping, E. and Gottschal, J. C. 1990. Comparison of the chitinolytic properties of *Clostridium* sp. strain 9.1 and -chitin-degrading bacterium from the intestinal tract of the plaice. *Pleuronectes platessa* (L.). *J. Gen. Microbiol.* 136:695-704. 38. Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217: 959-966. 39. Righetti, P. G., Gianazza, E., Gelfi, C. and Chiari, M. 1990. In: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Hames, B. D. and Richwood, D. (Eds.). p.149-216. Oxford University Press, New York. 40. Robert, W. K. and Selitrennidkoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 134:169-171. 41. Roberts, G. 1992. *Chitin Chemistry*. The MacMillan Press. London. 42. Sampson, M. N. and Gooday, G. W. 1996. A novel chitinase assay using the fluorescent brightener Calcofluor White M2R. In *chitin Enzymology*. 2: 227-234. 43. Scheel, O. and Thiem, J. 1997. Cleavage of Chitin by Means of Aqueous Hydrochloric Acid and Isolation of Chito-oligosaccharides. In: *Chitin Handbook*. Muzzarelli, R. A. A. and M. G. Peter. (Eds), p.165-170. Atec Grottammare, Italy. 44. Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1989. Protective effect of N-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 33: 357-367. 45. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1988. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 784-790. 46. Tsukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., Tokoro, A., Naruse, R., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1990. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *J. Cancer Res.* 81: 259-265. 47. Tsutomu, T., Kasumi, A., Yasuyaki, T. and Venzo, S. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis*. *Biophys. Acta.* 1078: 404-411. 48. Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 923: 302-309. 49. Wang, S. Y., Moyne, A. L., Wu, T. G., Locy, S. J. and Singh, N. K. 2001. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme and Microbial Technology.* 28: 492-498. 50. Young, M. E. and Carroad, P. A. 1981. Dependence of extracellular chitinase activity of *Serratia marcescens* QMB1466 on continuous culture dilution rate. *Can. J. Microbiol.* 27(1):142-144.