

# N-乙醯幾丁寡醣生產菌之篩選與幾丁質? S性分析 = Isolation of a microbe to produce N-acetylchitooligosaccharides and ...

江佩軒、吳淑姿 ; ?瑞澤

E-mail: 9708285@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究自彰化縣花壇鄉篩選出幾丁質分解酵素之菌株，DYU-T0013，以此為試驗菌株，進行寡醣生成之培養條件探討。結果顯示，以 幾丁質粉末為碳源之培養，於培養120 h具最高N-乙醯幾丁三醣，為1.02 g/L。以不同氮源培養時，以蛋白?為氮源培養時，於培養96 h N-乙醯幾丁三醣生成量達到最高，為1.62 g/L。以不同濃度之 幾丁質粉末(1%~6%)培養，以6%培養條件下，於96 h，生成物以N-乙醯幾丁三醣為主，其生成量為2.72 g/L。以不同含量之蛋白?為氮源培養時，於培養至72與96 h時，蛋白?含量為0.09 g生成N-乙醯幾丁三醣量為最高(1.90 g/L)。以不同含量之氯化銨為氮源，可得N-乙醯幾丁五醣，其中以氯化銨含量為0.06 g生成之N-乙醯幾丁五醣含量最高，於培養至96 h，達0.246 g/L。以不同溫度培養菌株DYU-T0013，探討其對N-乙醯幾丁寡醣的種類與生成量之影響。於30或35 下培養，至96 h，均生成N-乙醯幾丁三醣，其生成量分別為1.16 g/L與1.36 g/L；於40 下培養，N-乙醯幾丁單醣為2.07 g/L，N-乙醯幾丁三醣為0.327 g/L及N-乙醯幾丁四醣為0.74 g/L。粗酵素液之最適反應溫度為50 ，最適反應pH值為6；最穩定之反應溫度為10~30 ，最穩定之反應pH值為8。

關鍵詞：DYU-T0013；幾丁質分解?；N-乙醯幾丁三醣

## 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vi 目錄vii 圖目錄xii 表目錄xvi 1. 緒論1 2. 文獻回顧2 2.1 幾丁質2 2.1.1 幾丁質之分子結構與特性2 2.1.2 幾丁質的功能與應用4 2.1.3 幾丁質的製備4 2.2 幾丁質分解? 7 2.2.1 幾丁質分解?之分類9 2.2.2 幾丁質?作用形機制10 2.2.3 幾丁質分解?之應用13 2.2.4 幾丁質分解?之活性分析14 2.3 N-乙醯幾丁寡醣15 2.3.1 N-乙醯幾丁寡醣之製備15 2.3.2 N-乙醯幾丁寡醣之應用16 3. 材料與方法19 3.1 實驗架構19 3.2 實驗儀器19 3.3 實驗藥品21 3.4 培養基與試劑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 sMcIlvaine buffer之配製24 3.4.4 還原醣呈色劑之配製24 3.5 實驗方法24 3.5.1 菌株篩選、保存及鑑定24 3.5.2 菌株生長曲線測定26 3.5.3 還原醣測定26 3.5.4 幾丁質分解?活性測定26 3.5.5 蛋白質濃度測定27 3.5.6 幾丁質水解產物分析27 3.5.7 酵素之特性分析27 4. 結果與討論29 4.1 幾丁質分解菌之篩選29 4.1.1 幾丁質?活性與還原醣量之分析29 4.1.2 幾丁質?之水解產物之分析31 4.1.3 菌株DYU-T0013之初步鑑定31 4.2 以不同碳源培養DYU-T0013 36 4.2.1 不同碳源培養DYU-T0013之還原醣量影響36 4.2.2 不同碳源培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響38 4.2.3 不同碳源培養DYU-T0013之蛋白質含量的影響38 4.2.4 不同碳源培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響40 4.3 以不同氮源培養DYU-T0013 ( 幾丁質粉末為碳源)45 4.3.1 不同氮源培養DYU-T0013之還原醣量影響45 4.3.2 不同氮源培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響47 4.3.3 不同氮源培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響49 4.4 以不同氮源培養DYU-T0013 ( 幾丁質粉末為碳源)50 4.4.1 不同氮源培養DYU-T0013之還原醣量影響53 4.4.2 不同氮源培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響55 4.4.3 不同氮源培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響57 4.5 以不同濃度之 幾丁質粉末培養DYU-T0013 63 4.5.1 不同濃度 幾丁質粉末之培養DYU-T0013之還原醣量的影響63 4.5.2 不同濃度 幾丁質粉末培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響65 4.5.3 不同濃度 幾丁質粉末培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響68 4.6 以不同濃度之蛋白?培養DYU-T0013 71 4.6.1 不同濃度之蛋白?培養DYU-T0013之還原醣量的影響72 4.6.2 不同濃度之蛋白?培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響74 4.6.3 不同濃度之蛋白?培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響76 4.7 不同濃度之氯化銨培養DYU-T0013 79 4.7.1 不同濃度之氯化銨培養DYU-T0013之還原醣量的影響79 4.7.2 不同濃度之氯化銨培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響81 4.7.3 不同濃度之氯化銨培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響83 4.8 不同溫度培養DYU-T0013 86 4.8.1 不同溫度培養DYU-T0013之還原醣量影響87 4.8.2 不同溫度培養DYU-T0013之幾丁質分解?活性的影響87 4.8.3 不同溫度培養DYU-T0013之N-乙醯幾丁寡醣種類與生成量的影響90 4.9 粗酵素之特性分析93 4.9.1 最適反應溫度之測定93 4.9.2 最適反應pH值之測定95 4.9.3 溫度穩定性之測定95 4.9.4 spH值穩定性之測定95 5. 結論100 參考文獻102 圖目錄 圖2.1 幾丁質之製備8 圖2.2 幾丁質分解酵素之作用機制11 圖2.3 醣類水解酵素之水解機制可分為保留與反轉兩類12 圖3.1 實驗架構流程圖20 圖4.1 以CB培養基培養菌株P1~P4之還原醣之變化32 圖4.2 以CB培養基培養菌株P1~P4之幾丁質?活性變化33 圖4.3 菌株DYU-T0013於膠態幾丁質培養基產生透明環之型態34 圖4.4 菌株DYU-T0013之位相差顯微照相圖 ( 1000X)35 圖4.5 不同碳源對菌株DYU-T0013之還原醣量影響37 圖4.6 不同碳源對菌株DYU-T0013之幾丁質?活性影響39 圖4.7 不同碳源對菌株DYU-T0013之蛋白質含量的影響41 圖4.8 以 幾丁質粉末對菌株DYU-T0013之生合成N-乙醯幾丁寡醣的種類與生成量

之影響42 圖4.9 以 -幾丁質粉末對菌株DYU-Too13之生合成N-乙醯幾丁寡醣的種類與生成量之影響43 圖4.10 以膠態幾丁質對菌株DYU-Too13之生合成N-乙醯幾丁寡醣的種類與生成量之影響44 圖4.11 不同氮源對菌株DYU-Too13之還原醣的影響(以 -幾丁質粉末為碳源)46 圖4.12 不同氮源對菌株DYU-Too13之幾丁質?活性的影響(以 -幾丁質粉末為碳源)48 圖4.13 不同氮源培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量(以 -幾丁質粉末為碳源)51 圖4.14 不同氮源培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量(以 -幾丁質粉末為碳源)52 圖4.15 不同氮源對菌株DYU-Too13之還原醣的影響(以 -幾丁質粉末為碳源)54 圖4.16 不同氮源對菌株DYU-Too13之幾丁質?活性的影響(以 -幾丁質粉末為碳源)56 圖4.17 不同氮源培養菌株DYU-Too13於48 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量(以 -幾丁質粉末為碳源)58 圖4.18 不同氮源培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量(以 -幾丁質粉末為碳源)59 圖4.19 不同氮源培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量(以 -幾丁質粉末為碳源)60 圖4.20 以1%~6%之 -幾丁質粉末對菌株DYU-Too13還原醣量之影響64 圖4.21 以1%~6%之 -幾丁質粉末對菌株DYU-Too13幾丁質分解?活性的影響66 圖4.22 以1%~6%之 -幾丁質粉末培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量69 圖4.23 以1%~6%之 -幾丁質粉末培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量70 圖4.24 以不同含量之蛋白?培養對菌株DYU-Too13還原醣量之影響73 圖4.25 以不同含量之蛋白?培養對菌株DYU-Too13幾丁質分解?之影響75 圖4.26 不同含量之蛋白?培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量77 圖4.27 不同含量之蛋白?培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量78 圖4.28 以不同含量氯化銨培養對菌株DYU-Too13還原醣量之影響80 圖4.29 以不同含量之氯化銨培養對菌株DYU-Too13幾丁質分解?之影響83 圖4.30 不同含量之氯化銨培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量84 圖4.31 不同含量之氯化銨培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量85 圖4.32 以不同溫度培養對菌株DYU-Too13還原醣量之影響88 圖4.33 以不同溫度培養對菌株DYU-Too13幾丁質分解?之影響89 圖4.34 不同溫度培養菌株DYU-Too13於72 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量91 圖4.35 不同溫度培養菌株DYU-Too13於96 h之N-乙醯幾丁寡醣的種類與含量93 圖4.36 溫度對菌株DYU-Too13之粗酵素液反應活性之影響94 圖4.37 pH值對菌株DYU-Too13之粗酵素液反應活性之影響96 圖4.38 溫度對菌株DYU-Too13之幾丁質分解?之穩定性影響97 圖4.39 pH值對菌株DYU-Too13之粗酵素液穩定性影響98 表目錄 表2.1 幾丁質與幾丁聚醣之應用4 表3.1 培養基之組成23 表3.2 McIlvaine 緩衝溶液25 表4.1 幾丁質分解菌株之來源與代號30 表4.2 以CB培養基培養菌株P1~P4之N-乙醯幾丁寡醣之種類與含量30

## 參考文獻

- 1.江晃榮。1998。生體高分子(幾丁質、膠原蛋白)在食品工業上的應用。食品資訊, 150: 19-25。
- 2.吳豐智、曾如玲。1997。神奇物質-幾丁質和幾丁聚醣。化工技術, 5 (7): 196-201。
- 3.李宜玲。2004。利用Aeromonas caviae DYU-BT4之幾丁質水解酵素水解幾丁質生產N-乙醯幾丁寡醣。大葉大學生物產業學系研究所論文, 彰化。
- 4.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。
- 5.袁國芳。1999。幾丁質與幾丁聚醣在食品工業上之應用。食品工業, 31(10): 19-23。
- 6.梁舜欣。1990。N-乙醯幾丁寡醣製備。台灣大學農業化學研究所碩士論文, 台北。
- 7.連德昇。2007。幾丁質分解酵素之生產與其基因選殖。大葉大學生物產業科技學系博士論文, 彰化。
- 8.陳坤上、黃佩芬、陳聰松、陳幸臣。1996。幾丁寡醣製備條件之探討。食品科學, 23(6): 874-883。
- 9.陳榮輝。2001。幾丁質、幾丁聚醣的生產製造、檢測與應用。第777-787頁。科學發展月刊。
- 10.龜山猶一。1981。化學分析試藥配製法。正文書局, 台北。
- 11.鍾竺均、陳偉。2003。生物技術概論。新文京開發出版, 台北。
- 12.Aiba, S. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans. Carbohydr. Res., 261: 297-306.
- 13.Allan, C. R. and Hadwiger, L. A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition, Experimental Mycology., 3: 285-287.
- 14.Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. Planta., 157: 22-31.
- 15.Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. 1990. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. Planta., 157: 22-31.
- 16.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.
- 17.Brameld, K. A. and Goddard III, W. A. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinase. Proc. Natl. Acad. Sci., 95:4276-4281.
- 18.Brine, C. J. and Austin, P. R. 1981. Chitin variability with species and method of preparation. Comp. Biochem. Physiol., 69 B: 283-286.
- 19.Davis, G. and Herrissant, B. 1995. Structure and mechanisms of glycosyl hydrolase. Struct., 3: 853-859.
- 20.Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of Serratia plymuthica HRO-C48. Arch. Microbiol., 176: 421-426.
- 21.Gomez Ramirez, M., Rojas Avelizapa, L. I., Rojas Avelizapa, N. G. and Cruz Camarillo, R. 2004. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinase. J. Microbiol. Meth., 56(2): 213-219.
- 22.Hicks, K. B. 1988. Isolation of oligomeric fragments by preparative high-performance liquid chromatography. Method Enzymol., 161: 410-416.
- 23.Imoto, T. and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. Agric. Biol. Chem., 35(7): 1154-1156.
- 24.Jeon, J. Y. and Kim, K. S. 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. Carbohydrate Polymers, 41: 133-141.
- 25.Jeuniaux, C. 1966. In Method in Enzymology. Academic Press, New York, 8: 644-654.
- 26.Kendera, D. F. and Hadwiger, L. A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to fusarium solani and elicits pisatin formation in pisum sativum. Experimental Mycology, 8: 276.
- 27.Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymer in food. Food Technol., 1: 85-88.
- 28.Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1990. Effect of N-acetyl-chitohexase against Candida albicans infection of

tumor-bearing mice. *Microbiol. Immunol.*, 34: 413-426. 29.Koga, D., Tuskamoto, T., Sueshige, N., Usumi, T. and Ide, A. 1989. Kinetics of chitinase from yam, *Diocorea oppositifolia*. *Agric. Biol. Chem.*, 3(12): 3121-3126. 30.Kumar, R. and Majeti, N. V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymer*, 46: 1-27. 31.Kurita, K. 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *J. Mol. Biol.*, 120: 167-181. 32.Mayo, 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. 33.Minke, R. and Blackwell, J. 1978. The structure of  $\beta$ -chitin. *J. Mol. Biol.*, 120: 167-181. 34.Molano, J., Duran, A. and Cabib, E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.*, 83(2): 648-656. 35.Nampoothiri, M. K., Baiju, T. V., Sandhya, C. and Sabu, A. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem.*, 39: 1583-1590. 36.Otakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.*, 57(3): 169-177. 37.Overdijk, B. and Steijn, G. J. V. 1994. Human serum contains a chitinase: identification of an enzyme, formerly described as 4-methylumbelliferyl-tetra- N-acetylchitotetraoside hydrolase (MU-TACT hydrolase). *Glycobiology*, 4(6): 797-803. 38.Patil, R. S., Ghormade, V. and Deshpand, M. V. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme. Microb. Technol.*, 26(7): 473-483. 39.Robbins, P. W., Albright, C. and Benfield, B. 1988. Cloning and expression of a streptomyces plicatus chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 263(1): 443-447. 40.Roberts, G. A. F. 1982. *Chitin Chemistry*. The MacMillan Press, London. 41.Suzuki, K., Midami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151: 403-408. 42.Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.*, 28: 903-912. 43.Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1986. Effect on N-acetylchitooligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, 30: 777-787. 44.Suzuki, K., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1985. Enhancing effects of N-acetylchitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.*, 33: 886-888. 45.Takayanagi, T., Ajisaka, K., Takiguchi, Y. and Shimahara, K. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochim Biophys Acta*, 1078(3): 404-410. 46.Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. 1989. Protective effect of N-acetyl-chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, 33: 357-367. 47.Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. 1987. Trans-glycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim Biophys Acta*, 923(2): 302-309. 48.Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 405-409.