

篩選幾丁質分解酶生產菌與其酵素之特性分析

馬玟鈞¹ 連德昇¹ 吳淑姿¹ 余世宗² 涂瑞澤¹

¹大葉大學生物產業科技學系

²大葉大學環境工程學系

515-91 彰化縣大村鄉山腳路 112 號

摘要

本研究自台北虎山溪之土壤中，篩選出具有生產幾丁質分解酶（chitinase）之菌株，此菌株為革蘭氏陰性桿菌，經食品工業研究所鑑定為 *Aeromonas hydrophila*，命名為 *Aeromonas hydrophila* DYU-Too10。此菌株於 CB（chitin broth）培養基中，振盪培養 120 h，幾丁質分解酶活性可達 316 U/L，其水解產物主要以 N-乙酰葡萄糖胺（N-acetylglucosamine）為主。分析粗酵素特性，發現此酵素於酸性環境中易喪失活性，對熱敏感，其最適反應溫度為 40 °C，最適反應之 pH 為 7.0。以不同碳源培養此菌株，得知以 2%（w/v）粉狀幾丁質作為碳源之酵素產量為最高，而利用其他醣類作為碳源時，菌株則無法大量分泌幾丁質分解酶，推測其所分泌之幾丁質分解酶是由幾丁質誘導產生的。將粗酵素液經硫酸銨沉澱、透析、DEAE-Sephadex CL-6B 及 Sephadex G-100 純化後，可獲得具有幾丁質分解酶活性之蛋白質。經活性電泳染色法證實，有三種幾丁質分解酶存在，其分子量分別為 40、50 及 55 kDa。

關鍵詞：幾丁質，幾丁質分解酶，N-乙酰葡萄糖胺

Screening of a Chitinase-Producing Strain and Characterization of Its Chitinases

WEN-CHUAN MA¹, TE-SHENG LIEN¹, SHWU-TZY WU¹, SHIH-TSUNG YU² and JUI-RZE TOO¹

¹Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

²Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 112, Shanjiao Rd., Dacun, Changhua, Taiwan 51591, R.O.C.

ABSTRACT

In this study, a chitinase-producing strain was isolated from soil in the Hu-Shan Creek in Taipei County, Taiwan. The Food Industry Research and Development Institute (Hsinchu, Taiwan) identified this strain as *Aeromonas hydrophila*, a gram-negative, rod-shaped bacterium (designated as *Aeromonas hydrophila* DYU-Too10). The activity of the chitinases produced by the strain was 316 U/L after 120 h when cultured in Medium CB (chitin broth). The main hydrolysate of chitin obtained with the aid of chitinases was N-acetylglucosamine. The crude enzyme reacted optimally at 40° C, being very sensitive to thermal heat. Having an optimal pH of 7.0, this enzyme's activity decreased rapidly in an acidic environment. Various carbon sources were used to cultivate this strain

in order to study the effect of a carbon source on the chitinase activity. The experimental results indicated that the chitinases produced by this strain were mainly induced by chitin and its derivatives. A protein having chitinase activity was purified by a series of procedures including ammonium sulfate precipitation, dialysis, anion exchange of DEAE-sepharose CL-6B and filtration of sephadex G-100. Three chitinases having molecular weights of 40, 50 and 55 *kDa*, respectively, were identified by a gel activity-staining method.

Key Words: chitin, chitinase, N-acetylglucosamine

一、前言

幾丁質是自然界含量僅次於纖維素之有機聚合物，每年來自於蝦、蟹殼等幾丁質類廢棄物數量十分龐大。因此，如何將這些幾丁質類廢棄物回收並開發成附加價值高的產品，是一個相當重要的課題。近年來，幾丁質及其衍生物在應用方面的研究，已擴展至：食品、醫藥、生化、農業和化妝品等領域 [1]。台灣四面環海，面對這項豐富天然資源的研發，更佔有先天上的優勢 [2]。

對幾丁質水解具有專一性的酵素稱為幾丁質分解酶，其廣泛存在於自然界中各種生物體，如動物、植物及微生物 [9]。幾丁質分解酶可避免幾丁質廢棄物的堆積，且可將其開發成附加價值高的產品，如此不僅解決了廢棄物所帶來的環保問題，並可轉變成具有經濟價值的資源。在許多研究中指出，微生物之幾丁質分解酶多為胞外酵素，可分解幾丁質作為菌體生長之能量來源 [25]。而幾丁質也是構成真菌細胞壁的成分之一，真菌於本身新陳代謝所需下，可分泌出多種幾丁質分解酶。此外，*Serratia marcescens* 所分泌出之幾丁質分解酶可水解幾丁質產生 NAG (N-acetyl-glucosamine)，此產物可作為酵母菌 *Pichia kudriavzevii* 培養基之碳源，生產單細胞蛋白質，充當動物飼料使用，以提高幾丁質的再利用 [7]。

植物病蟲害防治為確保糧食生產的有效方法，然而目前所使用之殺菌劑對環境具有相當的危害。幾丁質分解酶亦可用於原生質體 (protoplast) 的製備。例如：*Bacillus circulans* WL-12 的多種幾丁質分解酶可製備 *Phaffia rhodozyme* 的原生質體 [15]。某些微生物幾丁質分解酶已被證實可用來抵抗病原黴菌。植物體本身並不含幾丁質，但當受到侵害或感染，會分泌大量的幾丁質分解酶來防禦。目前已有數種微生物所分泌之幾丁質分解酶被用來作為以真菌為對象的生物控制劑 (biocontrol agent)，例如 *Serratia plymuthica* HRO-C48 所分泌之幾丁質分解酶可抑制植物真菌性病害 [10]。除了直接利用微生物所產的幾丁質分解酶，也有將選

殖自微生物之幾丁質分解酶基因導入栽培作物染色體，而育種出具有分泌幾丁質分解酶能力之作物，如煙草等，來增加植物抵抗病原性真菌之感染 [21]。

由不同微生物所生產之幾丁質分解酶對基質之反應性也有差異，其最適反應 pH 大約在 4.0~7.0 [16]，最適反應溫度在 40~60 °C [17]。大部份的幾丁質分解酶活性會受 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 及 Cu^{2+} 抑制 [17]，而在一些文獻中發現 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 則會促進酵素活性 [19, 20]。

本研究為自台灣本土土壤中篩選可生產幾丁質分解酶之菌株，並探討培養基成分對菌體生長與幾丁質分解酶之關係，進一步純化幾丁質分解酶以了解其特性。

二、材料與方法

(一) 培養基配製

菌種繼代培養基 Luria-Bertani (LB) 培養基 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 用於菌株繼代保存、菌株活化及預培養時使用。幾丁質培養基 (chitin broth, CB) 組成 (w/v %) 為： KH_2PO_4 (0.03%)、 K_2HPO_4 (0.07%)、 MgSO_4 (0.05%)、peptone (0.03%)、yeast extract (0.03%) 及 chitin powder (2%)，為幾丁質分解酶之誘導培養基。膠態幾丁質平板 (colloidal chitin plate, CCP) 培養基用於篩菌，其配方為上述之 CB 培養基中的粉狀幾丁質 (2%) 改為膠態幾丁質 (0.4%) 與洋菜 (0.8%)。

(二) 膠態幾丁質 (colloidal chitin) 之製備

膠態幾丁質之製備是參照 Hsu and Lockwood [13] 之方法略加修改。將 5 g 粉狀幾丁質 (購自誠麗股份有限公司) 以濃鹽酸 50 mL 處理 1 h 後，將其倒入 1250 mL 蒸餾水 (5-10 °C) 中，經離心與水洗至中性後，測定其水分含量，並儲存於 4 °C 備用。

(三) 幾丁質分解酶生產菌株之篩選、分離及鑑定

篩選幾丁質分解酶生產菌株主要參照 Hsu 與 Lockwood [13] 之方法並略加修改。菌株篩選之土壤樣本分別採自台

北虎山溪、新竹西濱海岸、雲林自強大橋下及高雄澄清湖等地。取 1-2 g 土壤，加入 50 mL 無菌水，振盪活化 2 h 後，靜置 1 h，取上層土壤懸浮液，以無菌水適當倍率稀釋，並塗抹於 CCP 培養基，經培養後挑選具有透明環之菌落，接種於 LB 培養基中，於 30 °C、150 rpm 下振盪培養後，再接種於 CCP 中，確認是否仍有透明環產生，並利用四區劃線方式進行菌株純化，將純化後菌株分別以 Luria-Bertani agar 保存於 4 °C 或以 15% 甘油保存於 -80 °C 中。

(四) 幾丁質分解酶活性分析

1. 還原醣測定法 [14]

取 0.2 mL 酵素液與含 1% 膠態幾丁質之 McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 混合，於 40 °C 下反應 30 min，利用呈色劑於 420 nm 下測其吸光值。呈色劑之配製為 1 L 之 0.5 M 的 Na₂CO₃ 溶有 0.5 g 的 K₃Fe(CN)₆。標準曲線測定溶液為 N-乙醯葡萄糖胺 (0~100 µg/mL)。酵素活性定義為：於 40 °C 下反應，每分鐘可水解膠態幾丁質產生 1 µmol 還原醣之酵素量為 1 個酵素活性單位。

2. CC-RBB 測定法 [11]

CC-RBB (colloidal Chitin-Remazol brilliant blue R) 之配製：將 25 g 膠態幾丁質加入 100 mL 之 Remazol Brilliant Blue R (0.84% w/v) 水溶液內，於沸水浴中攪拌 60 min，離心去除上清液，沉澱物添加 25 mL 內含 1.5% (w/v) 重酪氨酸與 1.5% (w/v) 酒石酸鉀鈉之溶液，於沸水浴中攪拌 10 min，利用離心方式清洗至濾液無色為止。於 0.2 M 之磷酸鈉緩衝液中 (pH 7.0) 添加 CC-RBB 配製成 10% (w/v) 之受質緩衝液，貯存於 4 °C 備用。

取 0.5 mL 酵素液加入 0.5 mL CC-RBB 溶液，於 40 °C 下反應 30 min 後，於沸水浴中加熱 5 min，停止酵素反應，離心收集上清液，於 595 nm 下測其吸光值。酵素活性定義為：於 40 °C 下反應，使吸光值上升 0.01 之酵素量為一個活性單位。

(五) 幾丁質分解酶特性分析

將菌株以 LB 培養基進行預培養後，再接種於 CB 培養基中進行主培養。經 120 h 後所得之發酵液，經由離心所得之上層液為粗酵素液。

1. 粗酵素液之最適基質濃度

取粗酵素液 0.2 mL 與含不同基質濃度 (0.1%、0.5%、1.0%、1.5% 及 2% 的膠態幾丁質) 之 McIlvaine buffer (pH 7) 1 mL，於 40 °C 下反應 30 min 後，測定其幾丁質分解酶活性。

2. pH 對粗酵素活性與穩定性之影響

- (1) 最適反應 pH 值：首先配製 pH 3-8 之 McIlvaine buffer 與 pH 8-11 Tris-HCl buffer (皆含 1% colloidal chitin)。將酵素液分別置於上述之不同 pH 值之緩衝液中，於 40 °C 下反應 30 min 後，以測定其幾丁質分解酶之活性。
- (2) pH 穩定性：將粗酵素液分別置於不同 pH 值 (3-10) 之緩衝液中，於 40 °C 放置 1 h，然後加入 pH 7 之 McIlvaine buffer (含 1% colloidal chitin)，於最適反應溫度下反應 30 min 後，測定殘留幾丁質分解酶活性。

3. 溫度對酵素活性與穩定性之影響

- (1) 最適反應溫度：於不同溫度下進行酵素反應，以求得酵素液之最適反應溫度，將酵素液置於含 1% 膠態幾丁質之 McIlvaine buffer (pH 7.0) 中，分別於 20-70 °C 下反應 30 min 後，以還原醣法測定幾丁質分解酶之活性。
- (2) 溫度穩定性：將酵素液分別置於 20-70 °C 下反應 1 h，然後加入最適反應 pH 值之緩衝液 (含 1% colloidal chitin)，於 40 °C 下反應 30 min 後，測定殘留幾丁質分解酶活性。

(六) 蛋白質濃度測定

蛋白質濃度之測定係參考 Bradford [6] 方法，將 0.3 mL 的酵素液加入 1.2 mL 的 coomassie blue dye，靜置 10 min 後，以波長 595 nm 測其吸光值，對照牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 製成的檢量線 (0 - 100 µg/mL)，求得蛋白質濃度。

(七) 菌體生質量之測定

菌體生質量 (biomass) 是以稱重法來測定。利用 5 µm Advantec 濾紙 (No. 2, Advantec, Tokyo, Japan) 以抽氣過濾的方式將發酵液中菌體與殘餘之幾丁質分離，所得之濾液以 2,280 x g 離心 10 min，所得菌體以少量蒸餾水洗入鋁盤中，並置入 90 °C 烘箱中烘乾稱重。

(八) 探討酵素生產之最適碳源與其最適濃度

將菌株分別培養於膠態幾丁質、N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine)、幾丁聚醣 (chitosan)、葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose) 及蔗糖 (sucrose) 為主要碳源之培養基 (取代前述 CB 培養基中之粉狀幾丁質)，每隔 24 h 取樣，測定發酵液中 pH、生質量、幾丁質分解酶活性及蛋白質含量變化。所得之最適碳源種類後，再針對其不同濃度作進一步探討。

(九) 幾丁質水解產物分析

將菌株培養於 CB 中，每隔 24 h 取樣，發酵液離心後，取 5 mL 上清液進行冷凍乾燥，將凍乾之寡醣以 0.5 mL 之去離子水復溶，加入 acetonitrile 稀釋液 0.5 mL，離心去除殘餘蛋白質和雜質，取上清液，以 0.22 μ m 過濾膜過濾，濾液以高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC, Hitachi, L-7100, Tokyo, Japan) 分析水解產物之寡醣分布。分離管柱為 LiCrospher NH₂-100 (5 μ m, 4 \times 250 mm, Merck)。分離所用之移動相為乙腈：H₂O = 70：30 (v/v)，流率為 1 mL/min，樣品注入量為 20 μ L，UV 檢測器之波長為 205 nm。使用 1 糖至 6 糖的標準品 (購自 Sigma 公司)，並做檢量線以計算各寡醣濃度。

(十) 幾丁質分解酶之分離純化

將菌株以 LB 培養基進行預培養後，再接種於 CB 培養基中進行主培養。經培養 120 h 後收集所有發酵液約 600 mL，依序進行下列試驗。

1. 粗酵素液製備

菌體發酵液經離心 (6,000 rpm, 20 min) 去除菌體與殘留之粉狀幾丁質後，所得之上清液約為 500 mL，以飽和度 0-80% 之硫酸銨溶液進行蛋白質沉澱，於 4 $^{\circ}$ C 下靜置 24 h 後，離心 (9,000 rpm, 20 min) 收集沉澱物，並復溶於 50 mM 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 中，再以相同緩衝液重複進行透析。

2. 離子交換層析

將 DEAE-Sepharose CL-6B 充填至分離管中 (1.6 cm \times 20 cm)，以 50 mM 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 平衡後，注入透析後之酵素液，先以 50 mM 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 沖提後，流率為 0.5 mL/min，每管收集 3 mL，而吸附於膠體的蛋白質再以含 0-0.3 M 的 NaCl 之相同緩衝液沖提使蛋白質溶離，收集各階段之溶液，於波長 280 nm 下測其吸光值以定量蛋白質濃度，並分析幾丁質分解酶活性，收集具有酵素活性之蛋白質樣品。

3. 膠體過濾層析

將 Sephadex G-100 充填至分離管 (1 cm \times 100.0 cm) 中，以 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 達平衡之，將上述含有幾丁質分解酶活性之溶液經冷凍乾燥濃縮後，復溶於 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8)，將此酵素液注入 Sephadex G-100 中，以相同緩衝液沖提，流率為 0.1 mL/min，每管收集 3 mL，收集各階段之溶液，於波長 280 nm 下測其吸光值

以定量蛋白質濃度，並分析幾丁質分解酶活性，收集具有酵素活性之蛋白質樣品。

4. 活性電泳染色法 (zymogram)

參照 Guo 等人 [12] 之活性電泳染色法，可直接於電泳膠片上觀察幾丁質分解酶活性。實驗方法與 SDS 膠體電泳類似，膠片改用含 0.1% 乙二醇幾丁質之聚丙烯醯胺膠體。待電泳完畢後，以 1% Triton X-100 之醋酸鈉緩衝液 (0.1 M, pH 5.0) 於室溫振盪 2 h 復性後，進行染色與脫色。

三、結果與討論

(一) 幾丁質分解酶生產菌之篩選與初步鑑定

本實驗篩菌用之土壤樣品分別採自台北虎山溪、新竹西濱海岸、雲林自強大橋及高雄澄清湖等地，菌株分別以 T₁-T₄ 表示之。將土壤樣品稀釋塗抹於篩菌培養基 (CCP) 上，經 2-3 天培養後，挑出具有透明環菌株，並以三區劃線法分離單一菌株，比較其酵素活性，分別為 327、62、145 及 23 U/L，即 T₁ 菌株 (由台北虎山溪所篩選) 產生之幾丁質分解酶活性為最高，因此以 T₁ 作為實驗之菌株。經食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (新竹市) 綜合 16S rDNA 部分序列分析、醣類利用性 (BIOLOG 鑑定套組) 分析及生理生化反應試驗之結果，鑑定為 *Aeromonas hydrophila*，命名為 *Aeromonas hydrophila* DYU-Too10。此菌株為革蘭氏陰性桿菌，具觸酶活性、氧化酶活性及運動性，於好氧或厭氧環境下都可生長，培養期間不會產生內生孢子。

(二) 幾丁質分解酶之特性分析

將篩選之菌株 *Aeromonas hydrophila* DYU-Too10 置於含 CB 培養基之搖瓶中，收集 120 h 之培養液，進行酵素特性分析。

1. 粗酵素之最適反應溫度與溫度穩定性

將粗酵素液與膠態幾丁質溶液混合後，置於不同溫度 (10-80 $^{\circ}$ C) 下反應，測定酵素活性，以瞭解溫度對粗酵素活性之影響，結果如圖 1 所示。粗酵素之最適反應溫度為 40 $^{\circ}$ C，溫度超過 40 $^{\circ}$ C，酵素活性遞減，溫度提高至 60 $^{\circ}$ C 以上，相對活性只剩最高值的 20% 左右。將粗酵素液置於不同溫度 (10-80 $^{\circ}$ C) 下 1 h，再與受質反應，測其活性，結果如圖 1 所示。30 $^{\circ}$ C 以下之環境，粗酵素很穩定；但若保存於 40 $^{\circ}$ C 下 1 h，其活性只有最高值的 70% 左右；當溫度超過 40 $^{\circ}$ C，此酵素幾乎完全失活。由此可知，*Aeromonas hydrophila* DYU-Too10 所分泌之幾丁質分解酶 (粗酵素) 的

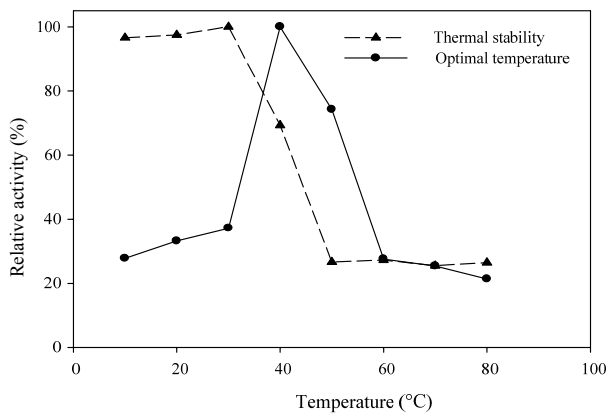


圖 1. 溫度對幾丁質粗酵素反應活性之影響

熱穩定性在 40 °C 以上不佳，為一常溫型之酵素。

2. 粗酵素之最適反應 pH 與 pH 穩定性

為了探討 pH 對酵素活性之影響，將粗酵素液於不同 pH (3-10) 之膠態幾丁質溶液下反應，測定酵素活性，結果如圖 2 所示。粗酵素之最適反應 pH 值為 7.0，當 pH 值介於 8.0-10.0 時，相對活性約為最高值的 80%，而酵素活性隨 pH 值之降低而遞減，於 pH 3.0 時，酵素幾乎完全失活。將粗酵素液於不同 pH (3-10) 下 1 h，再與受質反應後，測酵素活性，結果如圖 2 所示。粗酵素可以很穩定的保存在 pH 5-8 之間；若保存於 pH 5 以下，此酵素亦快速喪失活性。由此可知，*Aeromonas hydrophila* DYU-Too10 所分泌之幾丁質分解酶（粗酵素）並不耐酸。若置於 pH 10 之環境下 1 h，其活性只有最高值的 70% 左右。

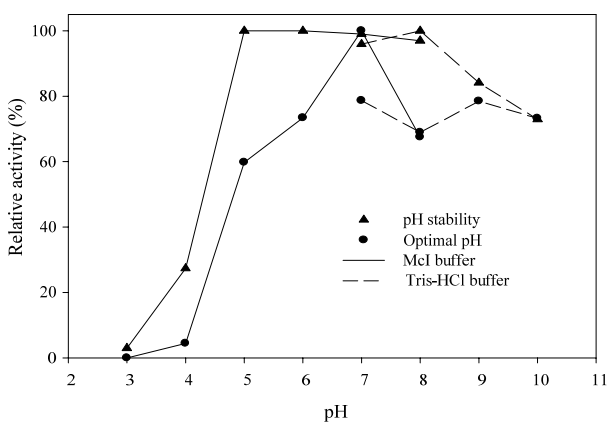


圖 2. pH 值對幾丁質粗酵素反應活性之影響

3. 幾丁質酶之水解產物分析

粗酵素之水解產物分析是利用高效能液相層析法 (HPLC) 來測定。*A. hydrophila* DYU-Too10 於發酵培養基中連續培養 144 h，每隔 24 h 取樣一次，分析發酵液中幾丁質分解酶水解粉狀幾丁質所產生之寡醣分布情形。經由分析後得知，寡醣含量隨著培養時間的增加而提高。於培養至第 144 h 之酵素水解產物分析結果顯示，主要產物為一醣，約為 2 g/L。

(三) 誘導酵素生產之最適碳源

1. 菌株之生長趨勢

以 CB 培養基振盪培養 *A. hydrophila* DYU-Too10，測定發酵液中 pH、乾菌重及酵素活性，作為往後擬定酵素生產用培養基之參考，實驗結果如圖 3 所示。酵素活性、菌體乾重及 pH 皆隨著培養時間增加而上升。當培養至 120 h 酵素活性達到高峰，而菌體生長於 96 h 後趨於平穩，由此可知，菌體量高則酵素活性大，因為菌體分泌幾丁質分解酶之目的為分解幾丁質用以產生小分子醣類，其可作為菌體生長所需，因此菌體量與幾丁質分解酶活性為正相關。為了觀察酵素生產趨勢，仍持續培養直到 168 h 才終止發酵。於不同碳源試驗中因添加醣類，為了排除發酵液中還原醣之干擾，以下測定酵素活性採用 CC-RBB 法，於 OD₅₉₅ 測吸光值。

2. 碳源種類對酵素產量之影響

根據文獻指出，幾丁質分解酶之生成可分為誘導型 (inducible) 與構成型 (constitutive) 兩種。為了探討 *A. hydrophila* DYU-Too10 所生產之幾丁質分解酶型式，本試驗於液態培養基中添加不同碳源，分別以膠態幾丁質、幾丁聚

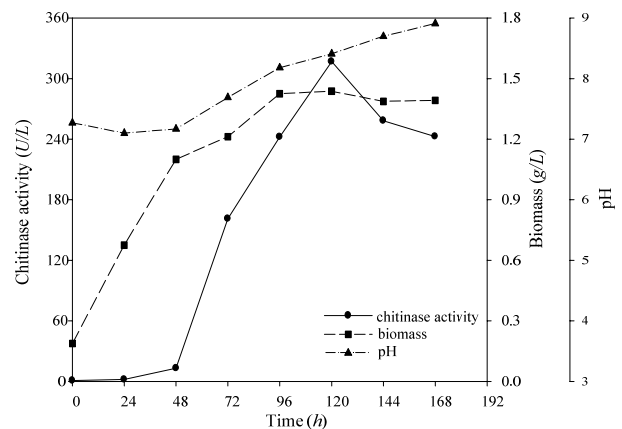


圖 3. *A. hydrophila* DYU-Too10 之生長曲線、酵素活性及 pH 值之變化

醣、N-乙醯葡萄糖胺、葡萄糖、果糖及蔗糖取代基礎培養基中之粉狀幾丁質，並探討碳源種類對發酵液中之幾丁質分解酶活性與菌體量 (biomass) 之影響。如圖 4 所示，*A. hydrophila* DYU-Too10 株利用粉狀幾丁質作為碳源時，可得到最高之酵素活性，以膠態幾丁質作為碳源，活性約為粉狀幾丁質之最高值的 90%，若改用其他碳源包含幾丁聚醣、N-乙醯葡萄糖胺、葡萄糖、果糖及蔗糖來培養菌株時，所測得幾丁質分解酶活性皆不及粉狀幾丁質之 40%。因此可推測此酵素是受到粉狀幾丁質所誘導產生的。此與 Ulhoa 與 Peberdy [24] 的結果相同，因幾丁質除了做為微生物生長碳源外，亦扮演了誘導幾丁質分解酶之合成的角色。

欲探討發酵液中碳源種類對菌體生長之影響，如圖 5 所示，培養 48 h 前以粉狀幾丁質作為碳源時，菌株於之生長速率比以膠態幾丁質作為碳源時為慢，但 48 h 後，以幾丁質為碳源之菌株的生長速率急速上升。

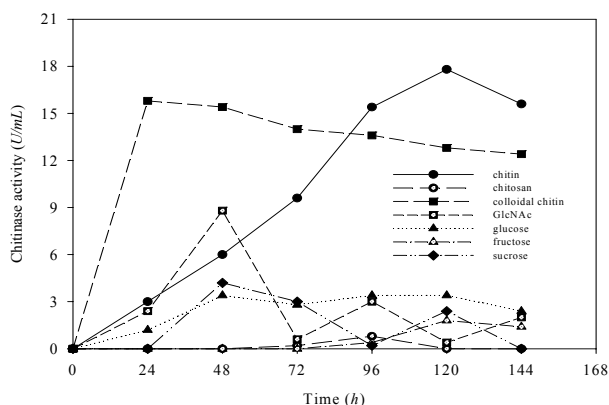


圖 4. 培養基中碳源種類對幾丁質酶活性之影響

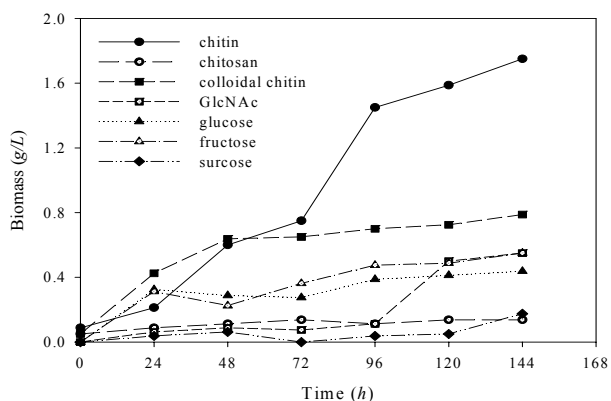


圖 5. 培養基中碳源種類對 *A. hydrophila* DYU-Too10 生長之影響

A. hydrophila DYU-Too10 之生長情形可由篩菌培養基與液態培養基中觀察到。以粉狀幾丁質、幾丁聚醣及膠態幾丁質作為碳源培養時，發酵液之顏色呈黃棕色帶黏稠狀，將其塗抹於篩菌培養基上培養約 1 天後會產生透明環。當以其它醣類作為碳源時，發酵液之顏色呈微混濁狀，其酵素活性亦低，表示此菌株生長慢且分泌幾丁質分解酶少，將發酵液塗抹於篩菌培養基，培養數天後才有透明環產生。由此推測此菌株在含醣類碳源之培養基中，菌體可能因發酵液中 pH 降低，而使細胞受損，再轉殖於篩菌培養基後需要時間修復，以致潛伏期較長才能分泌出幾丁質分解酶。

陳淑德 [4] 以木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 發酵生產幾丁質分解酶，所用的碳源包括：幾丁聚醣、膠態幾丁質及葡萄糖，結果發現，膠態幾丁質可誘導木黴菌生產幾丁質分解酶，但幾丁聚醣或葡萄糖則無法誘導出幾丁質分解酶，而文中亦提到幾丁質分解酶活性與碳源添加濃度並無比例關係。陳幸臣 [3] 在探討醣類對 *Aeromonas caviae* 的水解蝦、蟹殼能力提到以醣類作為碳源培養時，因醣類發酵產物的累積，使發酵液中 pH 值降低而抑制細菌的生長，導致菌體失去分泌幾丁質分解酶的能力。此實驗是以纖維二糖、果糖、葡萄糖、麥芽糖、乳糖、半乳糖及蔗糖作為碳源，發現以乳糖、半乳糖及葡萄糖做為碳源時卻可誘導 *Aeromonas caviae* 生產幾丁質分解酶，因而判定此酵素為構成型。而本研究之幾丁質分解酶為誘導型，與 *Aeromonas caviae* 之幾丁質分解酶型式不同。

3. 最適碳源濃度對酵素產量之影響

經由上述實驗得知：培養基中之最適碳源為粉狀幾丁質，為了進一步探討粉狀幾丁質對誘導酵素產量之影響，於液態培養基中添加 1% - 10% (w/v) 之不同濃度粉狀幾丁質，並分析其對發酵液中之幾丁質分解酶活性與菌體乾重之影響。如圖 6 所示，以添加 2% 之粉狀幾丁質能誘導出最高酵素活性，相較之下，添加 4% 之粉狀幾丁質所誘導出幾丁質分解酶較 2% 者為慢，而添加 1% 者雖可很快誘導出酵素，但酵素活性卻比 2% 者為低；若添加濃度提高至 6% 以上，則酵素生產速率趨於緩慢。比較其相對活性，添加 2% 之粉狀幾丁質誘導出酵素活性為最高，而在特定培養時間內酵素活性隨著粉狀幾丁質濃度增加而降低。

由圖 7 顯示，培養基中幾丁質濃度對菌體生長之影響，是以添加 2% 之粉狀幾丁質對於菌體生長情形最佳，當添加量為 1% 時，菌體量較少，可能是碳源不足所致。當添加量

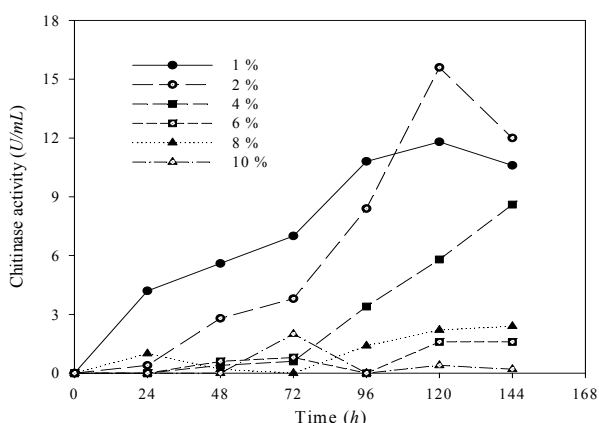


圖 6. 培養基中粉狀幾丁質添加濃度對酵素產量之影響

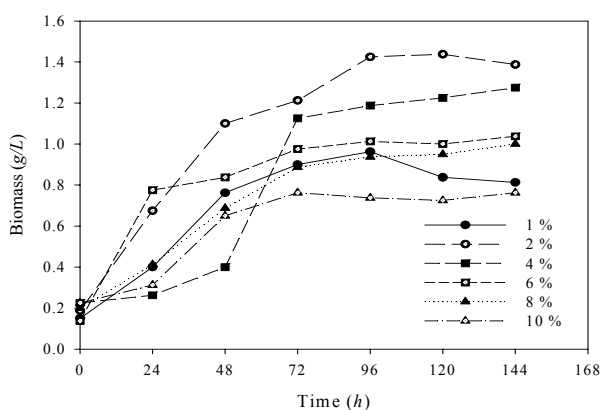


圖 7. 培養基中粉狀幾丁質添加濃度對菌體生長之影響

為 4% 時，菌體生長與幾丁質的利用趨於緩慢；添加量為 6% 以上時，菌體生長情形皆比添加量為 1% - 4% 者為差。

於碳源濃度探討中，以塗抹法來觀察菌株之酵素活性。將不同濃度粉狀幾丁質培養 48 h 之發酵液塗抹於篩菌培養基上，培養 48 h 後產生透明環。當培養終止 (144 h) 後，取出發酵液塗抹於篩菌培養基，發現：添加濃度為 6% 以上時，培養約 72 h 才會產生透明環，可見生長情形較慢且菌落較小。

綜合上述得知，幾丁質濃度太高時會抑制菌體生合成幾丁質分解酶的能力，因此於限制培養基下，菌體無法利用幾丁質分解酶分解幾丁質獲得生長所需之碳源，導致菌體無法生長，所以菌體量低，此結果與 Mejia-Saules 等人 [18] 與 El-Katatny 等人 [8] 相同。酵素生產之培養基最適碳源濃度為 2% 粉狀幾丁質。將培養終止 (144 h) 之不同添加濃度發酵液收集之，測定殘餘之幾丁質含量與菌株對不同粉狀幾

丁質濃度之利用率。結果如表 1 所示，隨著幾丁質添加濃度的增加，其利用率改變，以添加 2% 之幾丁質利用率最高，達 84.6%，其次為 4%，而 10% 最差。

(四) 幾丁質酶之分離純化

1. 酵素之純化

將硫酸銨所沉澱之蛋白質經由 DEAE-Sepharose CL-6B 陰離子交換層析管柱加以區分，以含 0-0.3 M NaCl 之 50 mM Tris-HCl buffer 沖提之。其純化結果如圖 8 所示，顯示有 2 個波峰出現，標示為 P₁ (Fractions 9-15) 和 P₂ (Fractions 40-51)，而 P₁ 雖有較高的蛋白質，但卻不具幾丁質分解酶活性，因而收集具幾丁質分解酶活性波峰 (P₂) 之蛋白質區間，進行電泳分析。

為使酵素分離更加完全以提高蛋白質純度，需進一步以 Sephadex G-100 膠體過濾層析純化。其結果如圖 9 所示，有 2 個波峰出現，標示為 P₃ (Fractions 11-14) 和 P₄ (Fractions 16-19)，但進行膠體過濾層析之酵素液，雖可得到明顯波峰，但具幾丁質分解酶活性波峰 (P₄) 卻與蛋白質波峰 (P₃) 有所分歧。此時所得之酵素活性已較先前驟減，其相對的蛋白質量也非常低，可能原因為經陰離子交換層析後所得之酵

表 1. *A. hydrophila* DYU-Too10 對不同幾丁質濃度之利用率

Initial chitin content (%, w/v)	Residual chitin (g/100 mL)	Chitin utilization (%)
1.0	0.20	80
2.0	0.30	85
4.0	0.79	80
6.0	1.85	69
8.0	4.28	47
10.0	5.44	46

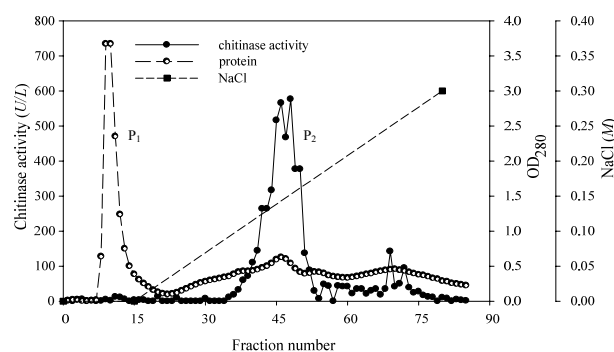


圖 8. *A. hydrophila* DYU-Too10 之粗酵素液經 DEAE-Sepharose CL-6B 分離之結果

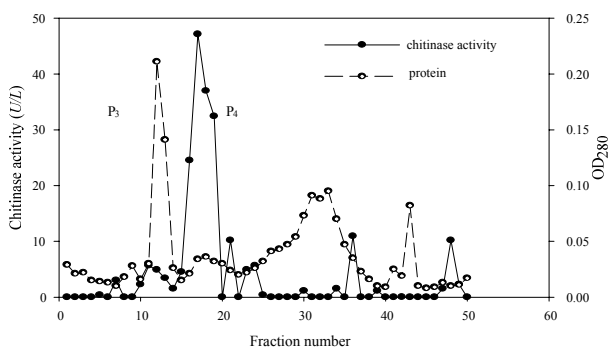


圖 9. 活性波峰 P2 (圖 8) 以 Sephadex G-100 分離之結果

素液具有色澤，但是再以膠體過濾層析後之酵素液卻呈現透明，因此，色素與幾丁質分解酶之間是否有其相關性，仍須進一步探討，此結果與黃安德 [5] 相似，因而只能以電泳分析其特性。

收集 *A. hydrophila* DYU-Too10 之幾丁質分解酶於純化過程中各步驟的酵素活性部分，測其幾丁質分解酶活性與蛋白質含量，其結果如表 2 所示。此酵素之活性回收率為 7.87%，純化倍數為 4.87，比活性為 1.87 U/mg protein，比活性與純化倍數都比未經純化之原發酵液高，但活性回收率顯著偏低。而於膠體過濾層析純化步驟，因其活性與蛋白質量太低，無法再進一步純化比較。

2. 電泳分析

將上述每一步驟純化之酵素液收集，以活性染色電泳進行分子量測定。其結果如圖 10 所示，Lane M 為蛋白質標準品，Lane 1 為未經純化之原發酵液，因其未經凍乾處理，蛋白質濃度較低也較複雜，隱約可見一條色帶出現。Lane 2 為粗酵素液經硫酸銨所沉澱之蛋白質，大約在 35-50 與 50-75 kDa 之間分別有色帶較深的蛋白質，但目標蛋白質菌株 *A. hydrophila* DYU-Too10 約有 3 種幾丁質分解酶被分

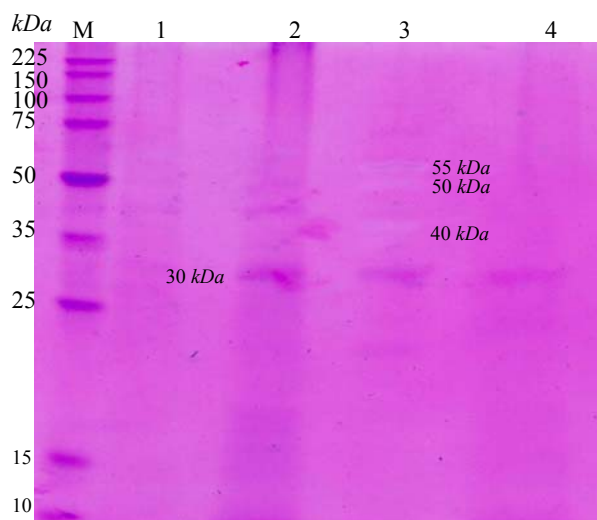


圖 10. 純化酵素之 SDS-PAGE 活性染色

(chitinase) 尚未顯現，使膠片上無透明環色帶顯現。Lane 3 為粗酵素液經陰離子交換層析後之蛋白質，經此純化步驟，離出來，分子量分別為 40、50 及 55 kDa，膠片上明顯可見透明環色帶產生，其中以 55 kDa 之蛋白質色帶較為明顯，但於膠片上之蛋白質濃度還是很低。Lane 4 為粗酵素液經膠體過濾層析後之蛋白質，於此純化步驟之酵素液已由陰離子交換層析分割收集，再進一步純化後，又造成酵素活性的稀釋，從膠片中並無看出活性與蛋白質，而 30 kDa 左右有一個蛋白質色帶，此色帶於每步驟皆會出現，蛋白質濃度雖然較高，但並非目標蛋白質，因為此酵素以膠體過濾層析純化效果並不佳。

Ueda 等人 [23] 於 *Aeromonas* sp. no. 10S-24 中純化其幾丁質分解酶，共獲得 6 種幾丁質分解酶，分子量介於 89-120 kDa，其中 β -N-acetylglucosaminidase 的分子量為 90 kDa [22]。但是於本實驗中並無發現 90 kDa 的幾丁質分解

表 2. *A. hydrophila* DYU-Too10 之幾丁質酶純化總表

Steps of purification	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	60	145.6	0.4	100	1
Ammonium sulfate precipitation	10.7	45.6	0.2	19	0.6
DEAE-Sepharose CL-6B (P ₂)	4.4	2.4	1.9	7.9	4.9
Sephadex G-100 (P ₄)	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected

酶，且分子量皆低於 60 kDa，此結果亦不同於 *Aeromonas* sp. no. 10S-24。

四、結論

本研究於台北虎山溪之土壤中，篩選出一株具有幾丁質分解酶 (chitinase) 活性之菌株，此菌株經初步鑑定為革蘭氏陰性桿菌，具觸酶反應與幾丁質分解酶活性，經進一步鑑定為 *Aeromonas hydrophila*。此菌株於 CB 培養基中，振盪培養 120 h 後，幾丁質分解酶活性最高可達 316 U/L，其水解產物以 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 為主。幾丁質粗酵素特性分析結果得知，此酵素不耐酸亦不耐熱，於低溫下保存可維持其活性，最適反應溫度為 40 °C，最適反應 pH 為 7.0，作用基質濃度為膠態幾丁質 1% (w/v) 以上。以不同碳源 (粉狀幾丁質、膠態幾丁質、N-乙酰葡萄糖胺、幾丁聚醣、葡萄糖、果糖及蔗糖) 培養此菌株時，其中以 2% (w/v) 粉狀幾丁質之酵素產量最高，而利用其它醣類作為碳源時，菌株則無法分泌幾丁質分解酶，依此推測此菌株所分泌之幾丁質分解酶為誘導型，而非構成型。此外，以醣類為碳源時，於培養過程中會產生大量的有機酸而使 pH 值急速下降，造成菌體細胞壁破裂而無法生長。將粗酵素液經 20-80% 飽和硫酸銨沉澱、透析及 DEAE-Sepharose CL-6B 離子交換層析純化後，可獲得一具幾丁質酶活性波峰之蛋白質區間 (P₂)。再以 Sephadex G-100 膠體將 P₂ 過濾層析進一步區分後，收集幾丁質分解酶活性區間，經活性電泳染色法測定具有三種幾丁質分解酶存在，分子量分別為 40、50 及 55 kDa。

參考文獻

- 林欣榜 (民 88)，幾丁類物質在食品加工上之應用，食品工業，31(10)，26-37。
- 吳豐智、曾如玲 (民 86)，神奇的物質—幾丁質和幾丁聚醣，化工技術，5(7)，196-201。
- 陳幸臣 (民 93)，醣類對 *Aeromonas caviae* 的水解蝦蟹能力之影響，食品科學，21(2)，96-106。
- 陳淑德 (民 91)，培養基對木黴菌 (*Trichoderma harzianum*) 發酵生產幾丁質酵素之影響，宜蘭技術學報，9，9-14。
- 黃安德 (民 87)，利用部分純化之 *Amycolatopsis orientalis* 細胞外 N-乙酰葡萄糖胺酵素製備 N-乙酰幾丁寡醣，國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士學位論文，基隆。
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cosio, I. G., R. A. Fisher and P. A. Carroad (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *Journal of Food Science*, 47, 901-905.
- El-Katatny, M. H., W. Somitsch, K. H. Robra, M. S. El-Katatny and G. M. Gubitza (2000) Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology*, 38(3), 173-180.
- Flach, J., P. E. Pilet and P. Jolles (1992) Chitin and chitinases research. *Experientia*, 48, 701-716.
- Frankowski, J., M. Lorito, F. Scala, R. Schmid, G. Berg and H. Bahl (2002) Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia* HRO-C48. *Archives of Microbiology*, 176, 421-426.
- Gómez Ramírez, M., L. I. Rojas Avelizapa, N. G. Rojas Avelizapa and R. Cruz Camarillo (2004) Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinase. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 213-219.
- Guo, S. H., J. K. Chen and W. C. Lee (2004) Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 550-556.
- Hsu, C. S. and J. L. Lockwood (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, 29, 422-426.
- Imoto, T. and K. Yagishita (1971) A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(7), 1154-1156.
- Johson, E. A., T. G. Villa, M. J. Lewis and H. J. Phaff (1979) Lysis of the cell wall of yeast *Phaffia rhodozyme* by lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12. *Journal of Applied Biochemistry*, 1, 273-282.
- Lan, X., N. Ozawa, N. Nishiwaki, R. Kodaira, M. Okazaki and M. Shimosaka (2004) Purification, cloning, and

- sequence analysis of beta-N-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(5), 1082-1090.
17. Lin, C. S., H. C. Chen and F. P. Lin (1997) Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 472-478.
 18. Mejia-Saules, J. E., K. N. Waliszewski, M. A. Garcia and R. Cruz-Camarillo (2006) The use of crude shrimp shell powder for chitinase production by *Serratia marcescens* WF. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 95-100.
 19. Nawani, N. N., B. P. Kapadnis, A. D. Das, A. S. Rao, and S. K. Mahajan (2002) Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 965-975.
 20. Ohishi, K., M. Yamagishi, T. Ohta, M. Suzuki, H. Izumida, H. Sano, M. Nishijima and T. Miwa (1996) Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Fermentation Technology*, 82(6), 598-600.
 21. Terakawa, T., N. Takaya, H. Horiuchi, M. Koike and M. Takagi (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 16, 439-443.
 22. Ueda, M. and M. Arai (1992) Purification and some properties of β -GlcNAcase from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 1204-1207.
 23. Ueda, M., A. Fujiwara, T. Kawaguchi and M. Arai (1995) Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(11), 2162-2164.
 24. Ulhoa, C. J. and J. F. Peberdy (1991) Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *The Journal of General Microbiology*, 137, 2163-2169.
 25. Wiwat, C., P. Siwayaprahm and A. Bhumiratana (1999) Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Current Microbiology*, 39, 134-140.

收件：95.04.24 修正：95.09.18 接受 95.12.26