

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

Aeromonas caviae No. 2 所生產

幾丁質分解酵素之研究

Studies on chitinolytic enzymes from

Aeromonas caviae No. 2

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central bell (the symbol of the university) surrounded by a wreath. The outer ring contains the university's name in Chinese characters: '國立臺灣大學' at the top and '愛·學勵品敬' at the bottom.

吳立森

Li-Sen Wu

指導教授：陳俊任 博士

Advisor: Chun-Jen Chen, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

謝誌

2008 年 4 月，我第一次走進 CJC 實驗室，開始了我的研究所生涯。從一開始幾乎什麼都得重新學，比如會拿 1000 P 去插 200 的 tip；打破數不清的燒杯；第一次壓力很大的個別 meeting；第一次的進度報告作了五六十頁的 powerpoint，卻沒講到重點；第一次報 PAPER 被慘電；第一次戰戰兢兢冷汗直流使用 HPLC；第一次發抖著處理毒化物；第一次作 gel filtration 做到頭痛；第一次作實驗做到半夜一點……等，這些看似痛苦的回憶現在回想起來卻是那麼甘甜。首先很感謝陳俊任老師在這兩年中對我的包容與指導，不管 DATA 再怎麼爛，膠跑得再怎麼醜，老師總是有耐心，仔細的去發掘實驗失敗的原因，甚至去探究可能可以觀察到的現象，而並非責怪。感謝張世宗老師對於蛋白質純化方面的指導與加油鼓勵，讓我對實驗有很多信心；感謝李昆達老師像朋友般的關心我的實驗情況與現實生活，讓我能紓解許多壓力。另外也感謝謝陸盛學長在 FPLC 上的教學與建議，讓我能事半功倍的很快上手。另外，也非常感謝一開始帶我的小畢學姐，讓我認識實驗室的環境，另外念杰學姐也是我排解壓力與談天的對象；感謝和我同一屆，陪我一起聊天打屁與運動游泳的戰友大仔、高國、胖丁、榮顥、耀萱，讓我能保持身心健康狀況；也感謝實驗室中幫我很多忙與製造許多笑料的學弟妹楚喬、宗凱、小祺、秋瑩、耕耘、瀚壬、惠儀、鏡介，讓我總是有很多題材可以寫小說，精神生活充盈；另外也感謝幫我修改論文，修改圖說的思穎與蘋果派，讓我的論文免去被老師慘電的命運。要特別感謝佩玉阿姨一家人在我碩二時期的精神支持，與提供許多精神食糧讓我排解煩悶；感謝孟修學弟和我並肩一起作實驗，度過難關；感謝林泉亨先生至台南快樂釣蝦場協助取樣。感謝大學同學存瑄，在論文編排上的幫忙與建議。感謝一個已經不再的人，在碩一的時候給我的支持與磨鍊。

最後，要感謝我的父母與家人一直以來在學業上的支持與生活上照顧，讓我能無後顧之憂的完成學業。本論文僅獻給愛護我的家人，好友與師長，謝謝你們！

中文摘要

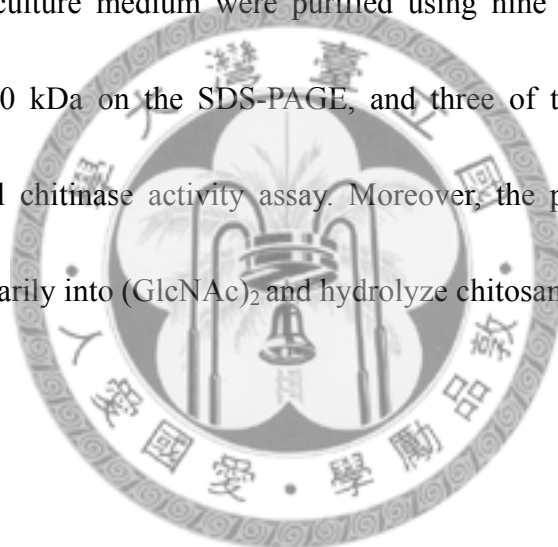
過去研究指出聚合度 4-7 的 N-乙醯幾丁寡糖 (*N*-acetylchitooligosaccharides) (GlcNAc)₄₋₇ 具有抗腫瘤、提高小鼠免疫能力的生物活性。本研究由富含幾丁質環境中篩選出具有可分解幾丁質產生較高聚合度的 *N*-乙醯幾丁寡糖的菌株。初期篩選中，先以幾丁質作為培養基主要碳源，篩選可利用幾丁質之微生物，再以粗酵素液水解膠態幾丁質，以 HPLC 與 TLC 鑑定其產物是否具有 (GlcNAc)₄₋₇。經由此篩選程序，選獲一菌株可水解幾丁質產生 (GlcNAc)₄₋₅，水解幾丁聚醣產生 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆。此菌株經 16S rDNA 分析，被分類與 *Aeromonas caviae* 之親緣關係最為接近，本研究中命名為 *Aeromonas caviae* No. 2。探討此菌株的最佳培養條件，以增加幾丁質酶之生產方面，首先以不同之培養酸鹼值與溫度測試，獲得最佳培養酸鹼值為 pH 6，溫度為 25°C。另以反應曲面法 (response surface methology, RSM) 之中心混成設計 (central composite design, CCD) 得到最佳酵素生產培養基條件之碳源與氮源濃度為 colloidal chitin 1.098%，soybean flour 0.735% 和 yeast extract 0.74%。以複選培養基培養之粗酵素液以一系列純化方法包括：硫酸銨分劃 (40-70%)，專一性吸附水解法及 Sephacryl 200 膠體過濾進行純化。純化後在 SDS-PAGE 於 55 至 100 kDa 之間得到四個可能和分解幾丁質相關的蛋白質，其中有兩個於 55-70 kDa 間於幾丁質活性染色膠體電泳中具有活性訊號。但是若以最佳化培養基培養之粗酵素液純化過後之蛋白質在 SDS-PAGE 上於 40 至 100 kDa 之間分佈 9 個蛋白質訊號，活性染色上則可測得三種幾丁質酶，其中兩種於 55 至 70 kDa 附近，而在 40 kDa 附近也有一條活性訊號。另在純化後之蛋白質水解產物方面，其水解幾丁質產生大量之 (GlcNAc)₂ 與少量 GlcNAc 和 (GlcNAc)₃，另水解幾丁聚醣之產物亦出現 (GlcNAc)₄₋₆ 以及可能為更高聚合度之寡糖。

關鍵字：*N*-乙醯幾丁寡糖，幾丁質酶，16S rDNA，反應曲面法，中心混成設計

Abstract

It was reported that *N*-acetylchitooligosaccharides (degree of polymerization 4-7) (GlcNAc)₄₋₇ have specific biological activities such as antitumor activity and immuno-stimulating effects. In this study, we aimed to screen microorganisms from a chitin-rich environment and isolate the ones that can produce enzymes to hydrolyze chitin into *N*-acetylchitooligosaccharides. At the initial stage, we used the selection medium with colloidal chitin as the sole carbon source to select for microorganisms which could utilize chitin for growth. The microbial isolates were further screened by incubating the culture broth with colloidal chitin and analyzing the products by HPLC and TLC. Using this screening strategy, we obtained one bacterial isolate that could produce enzymes to hydrolyze chitin into (GlcNAc)₄₋₅ and hydrolyze chitosan into (GlcN/GlcNAc)₄₋₆. The bacterial strain was identified by 16S rDNA sequencing and phylogenetic classification to belong to *Aeromonas caviae* and was named *Aeromonas caviae* No. 2. To optimize the culture condition for producing higher amounts of chitinase, we first tested various culture pHs and temperatures and found that the highest chitinase activity was produced at pH 6 and 25°C. Using the central composite design (CCD) of response surface methodology (RSM), we further obtained the optimal concentrations of chitin and nitrogen sources in the culture medium to be colloidal

chitin: 1.098%, soybean flour: 0.735% and yeast extract: 0.74%. The crude enzyme produced in selection medium went through successive steps of purification including ammonium sulfate precipitation (40-70%), chitin affinity-hydrolysis method and gel filtration chromatography (Sephacryl 200). After purification, four major proteins were found range from 55 to 100 kDa on the SDS-PAGE, and two of them showed chitinase activity range from 55 to 70 kDa on the in-gel chitinase activity assay. When proteins from the optimized culture medium were purified using nine major bands appeared range from 40 to 100 kDa on the SDS-PAGE, and three of them showed chitinase activity on the in-gel chitinase activity assay. Moreover, the purified proteins could hydrolyze chitin primarily into (GlcNAc)₂ and hydrolyze chitosan into (GlcN/GlcNAc)₄₋₆.



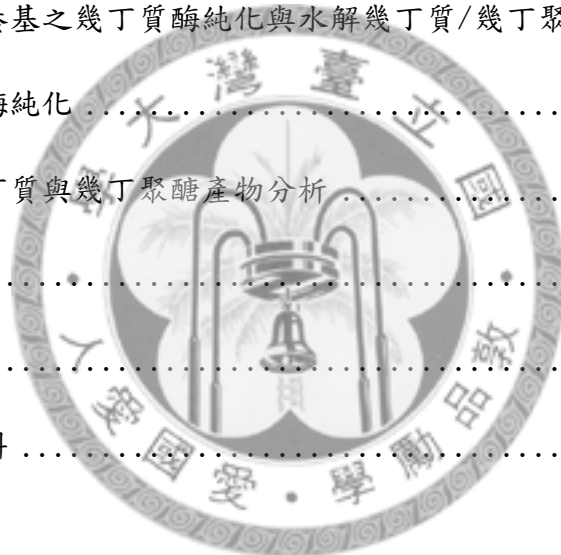
Key words: *N*-acetylchitooligosaccharides, chitin, chitinase, response surface methology (RSM), central composite design (CCD)

目錄

謝誌	I
中文摘要	II
Abstract	III
圖目錄	VIII
表目錄	X
第 1 章 文獻探討	1
1.1. 幾丁質 (chitin) 和幾丁聚醣 (chitosan)	1
1.1.1. 分佈與化學結構	1
1.1.2. 幾丁質與幾丁聚醣的製備	1
1.1.3. 幾丁質與幾丁聚醣的應用	4
1.2. <i>N</i> -乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖	4
1.2.1. <i>N</i> -乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖的結構與製備	4
1.2.2. <i>N</i> -乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖的應用	5
1.3. 幾丁質酶 (chitinase)	6
1.3.1. 幾丁質酶的分類	6
1.3.2. 幾丁質酶的來源與功能	6
1.3.3. 幾丁質酶的應用	7
1.4. 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)	8
1.5. <i>Aeromonas caviae</i>	10
1.6. 研究目的與內容大綱	10

1.7.	實驗流程圖	11
第 2 章	材料與方法	12
2.1.	實驗材料	12
2.1.1.	實驗藥品	12
2.1.2.	實驗器材	12
2.2.	實驗方法	13
2.2.1.	培養基組成	13
2.2.2.	幾丁質分解酵素生產菌株之分離與篩選	14
2.2.3.	酵素活性之測定	15
2.2.4.	蛋白質電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)	16
2.2.5.	水解寡糖產物分析	19
2.2.6.	最佳化培養條件探討	21
2.2.7.	酵素純化方法	23
第 3 章	實驗結果	24
3.1.	幾丁質分解酵素生產菌株之篩選	24
3.1.1.	酵素生產菌株之初選	24
3.1.2.	菌株幾丁質酶產物之分析	24
3.2.	幾丁質分解酵素生產菌株之鑑定	29
3.3.	最適培養組成之探討	29
3.3.1.	菌體生長與酵素生產之過程	29
3.3.2.	起始 pH 值與溫度對酵素生產之影響	32

3.3.3.	氮源種類對酵素生產之影響	32
3.3.4.	利用 RSM 探討最適培養基之組成	32
3.4.	幾丁質酶之純化	52
3.4.1.	硫酸銨分劃	52
3.4.2.	幾丁質親和性吸附	52
3.4.3.	膠體過濾法	53
3.5.	以複選培養基純化之幾丁質酶水解幾丁聚醣 (chitosan)	61
3.6.	最佳化培養基之幾丁質酶純化與水解幾丁質/幾丁聚醣產物分析	64
3.6.1.	幾丁質酶純化	64
3.6.2.	水解幾丁質與幾丁聚醣產物分析	64
第 4 章	討論	72
第 5 章	結論	77
第 6 章	參考資料	79



圖目錄

圖 1-1 幾丁質與幾丁聚醣之構造.....	2
圖 1-2 幾丁質之分子結構.....	3
圖 1-3 RSM 實驗設計流程圖.....	9
圖 2-1 甲醇丙酮純化流程圖.....	20
圖 2-2 中心混成設計圖.....	22
圖 3-1 聚積培養基培養 14 天後之外觀.....	25
圖 3-2 聚積培養基之培養液序列稀釋後塗抹於複選培養基培養之外觀.....	26
圖 3-3 以 HPLC 分析水解膠態幾丁質產物.....	27
圖 3-4 以 TLC 分析水解膠態幾丁質產物.....	28
圖 3-5 16S rDNA 親緣樹狀圖.....	30
圖 3-6 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 之菌體生長與酵素生產曲線.....	31
圖 3-7 不同起始 pH 值培養基對 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 生產幾丁質酶之影響.....	33
圖 3-8 不同培養溫度對 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 生產幾丁質酶之影響.....	34
圖 3-9 氮源種類對 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 生產幾丁質酶之影響.....	35
圖 3-10 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 培養於 Two-level 實驗設計培養基之幾丁質酶活性.....	38
圖 3-11 <i>Aeromonas caviae</i> No. 2 培養於陡升路徑法設計培養基之幾丁質酶活性圖.....	42
圖 3-12 Colloidal chitin 與 soybean flour 對幾丁質酶產量之反應曲面圖.....	47
圖 3-13 Soybean flour 與 yeast extract 對幾丁質酶產量之反應曲面圖.....	48
圖 3-14 Colloidal chitin 與 yeast extract 對幾丁質酶產量之反應曲面圖.....	49
圖 3-15 不同飽和百分率之硫酸銨分劃之幾丁質酶與 NAGase 活性分佈.....	54
圖 3-16 不同飽和百分率之硫酸銨分劃沈澱之蛋白質之活性染色.....	55
圖 3-17 幾丁質對幾丁質酶吸附關係.....	56

圖 3-18 不同純化階段所得之幾丁質酶 SDS-PAGE 及活性染色圖.....	57
圖 3-19 膠體過濾 (Sephacryl 200) 純化幾丁質酶層析圖.....	58
圖 3-20 膠體過濾之 fractions 濃縮分析.....	59
圖 3-21 推測以幾丁質酶水解幾丁聚糖之模式圖.....	62
圖 3-22 幾丁質酶水解幾丁聚糖產物之 HPLC 與 TLC 分析圖.....	63
圖 3-23 不同純化階段所得之幾丁質酶 SDS-PAGE 及活性染色圖	66
圖 3-24 幾丁質酶水解幾丁質產物之 HPLC 分析圖.....	68
圖 3-25 幾丁質酶水解幾丁聚糖產物之 HPLC 分析圖.....	69
圖 3-26 幾丁質酶水解幾丁質產物之 HPLC 分析圖.....	70
圖 3-27 幾丁質酶水解幾丁聚糖產物之 HPLC 分析圖.....	71



表目錄

表 3-1	Two-level 實驗設計表.....	37
表 3-2	Two-level 實驗結果之 ANOVA 分析.....	39
表 3-3	Two-level 實驗設計結果之變數最大值預測表.....	40
表 3-4	陡升路徑法之實驗設計表.....	41
表 3-5	RSM 之實驗設計表.....	44
表 3-6	RSM 之中心混成設計設定參數.....	45
表 3-7	RSM 實驗設計之 ANOVA 迴歸分析表.....	46
表 3-8	RSM 設計之變數最大值預測表.....	50
表 3-9	幾丁質酶活性比較表.....	51
表 3-10	<i>Aeromonas caviae</i> No. 2 所生產之幾丁質酶純化表 (1).....	60
表 3-11	<i>Aeromonas caviae</i> No. 2 所生產之幾丁質酶純化表 (2).....	67



第 1 章 文獻探討

1.1. 幾丁質 (chitin) 和幾丁聚醣 (chitosan)

1.1.1. 分佈與化學結構

幾丁質是 N-乙醯葡萄糖胺 (*N*-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 以 β -1,4 鍵結組成的長鏈聚合物 (圖 1) [1], MW (1×10^6 - 2.5×10^6), 是一種廣泛分布於自然界的長鏈聚合物, 含量僅次於纖維素。其經常被發現於甲殼類外殼, 昆蟲外骨骼以及真菌之細胞壁中, 扮演支撐並保護個體免於外界惡劣環境與病原體侵害的重要角色 [2]。

幾丁聚醣 (chitosan) 是幾丁質去乙醯化後的化合物總稱 (圖 1), 可溶解於酸性環境中 [1]。通常將去乙醯化 50% 以上定義為幾丁聚醣, 存在於某些真菌及藻類的細胞壁中 [3]。

幾丁質存在於大自然界中主要有三種構型: α 、 β 和 γ 。最近研究指出 γ 構型是 α 構型家族中的一種 [4]。 α 構型是自然界中最主要且常見的結構, 在真菌細胞壁、昆蟲外骨骼及甲殼類外殼中之幾丁質結構多屬此類。其醣鏈以 antiparallel 的方式排列, 長鏈之間有氫鍵連結, 形成穩定且不易形變的結構 (圖 2-a)。

β 構型則以平行方式排列, 因為沒有如 α 構型中的 C-O-NH 的強氫鍵連結, 故結構上較不穩定。烏賊軟骨中的幾丁質構型屬此類 (圖 2-b) [2, 5]。

1.1.2. 幾丁質與幾丁聚醣的製備

幾丁質大量存在於海洋甲殼類生物中, 在製備上尤以漁業的漁獲廢棄物為主的幾丁質原料為更經濟、方便的選擇。通常這些漁獲甲殼類廢棄物含有

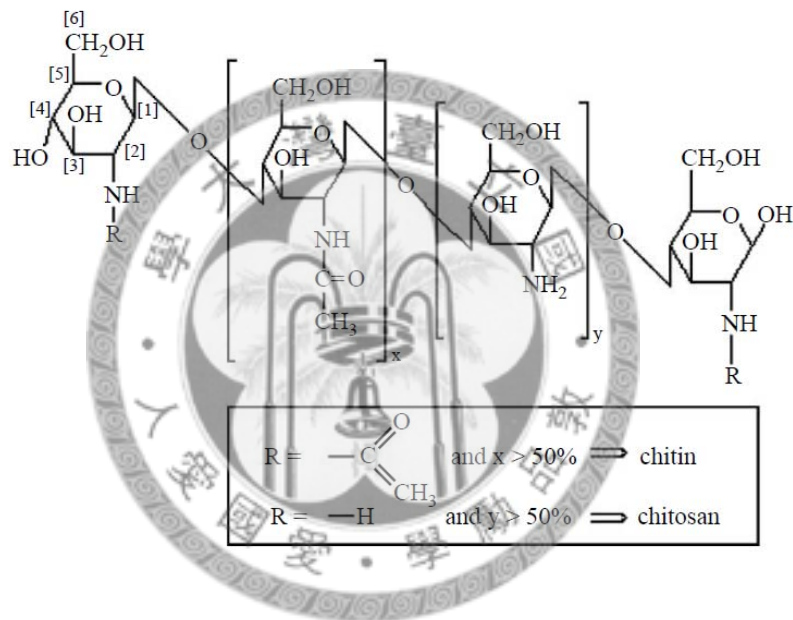


圖 1-1 幾丁質與幾丁聚糖之構造 [1]

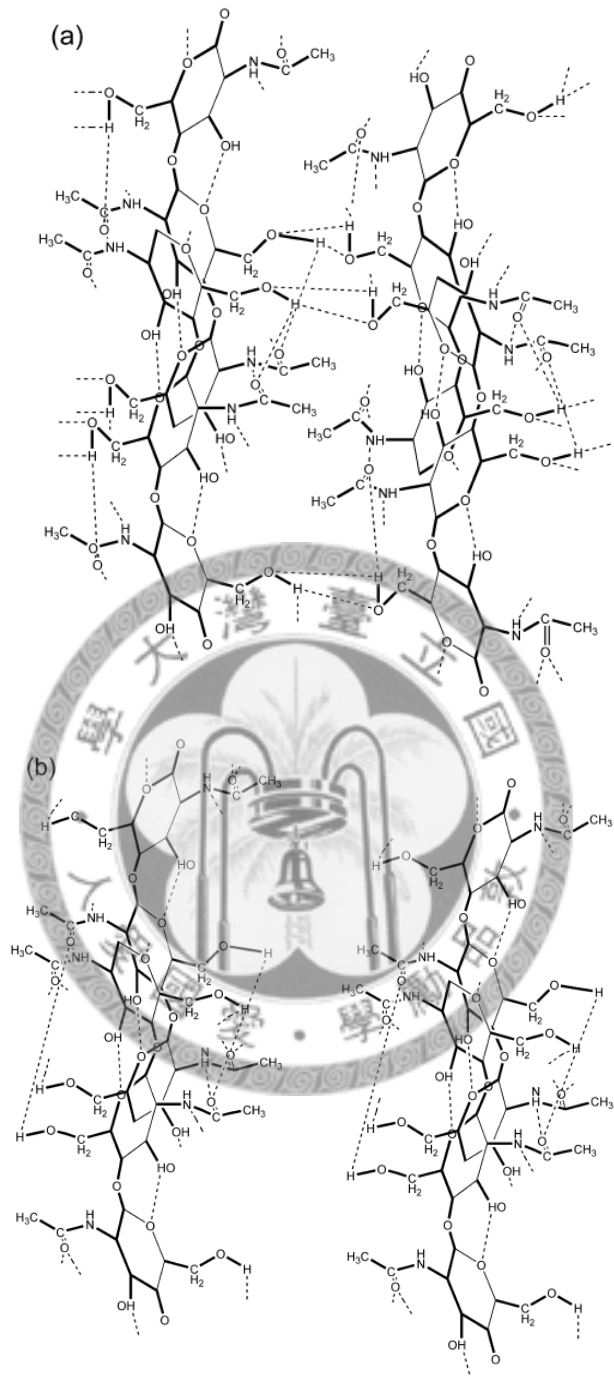


圖 1-2 幾丁質之分子結構 [5]

(a) α -幾丁質之晶格構造 (b) β -幾丁質之晶格構造

15-40% 的幾丁質，20-40% 的蛋白質，與 20-50% 的碳酸鈣鹽類 [6]。在分離純化幾丁質時，首要是分離與幾丁質緊密結合的如蛋白質與鹽類等雜質。一般的方法是先以稀鹽酸洗去碳酸鈣等金屬鹽類，再於氫氧化鈉中加熱到約 100°C 去除蛋白質與色素 [7-8]。幾丁聚醣則是將幾丁質以 40-50% 的鹼溶液去乙醯化而成 [9]。

1.1.3. 幾丁質與幾丁聚醣的應用

因為幾丁質與幾丁聚醣無毒性，結構具有纖維特性，可吸收金屬離子，同時又具有顯著的生物活性，因此在生物材料、醫療上有許多應用 [6]。又如其無毒、生物可分解等特性，應用在外科手術縫合線，人工皮膚與隱形眼鏡的材料 [1, 10]。此外，幾丁質與幾丁聚醣在 1980 年代末期被發現具有可刺激巨噬細胞與 N.K. cell 之免疫活性 [11]，因而被用來添加在免疫佐劑中，以增強疫苗效果 [12-13]。此外，幾丁質也可用來製作管柱以吸收金屬離子，或純化 lectin [14]。

1.2. *N*-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖

1.2.1. *N*-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖的結構與製備

N-乙醯幾丁寡糖 (*N*-acetylchitooligosaccharides) 與幾丁寡糖 (chitooligosaccharides) 分別指由 2-10 個 *N*-乙醯葡萄糖胺與葡萄糖胺 (glucosamine, GlcN) 以 β -1,4 鍵結組成的低聚合度醣類 [15-16]，將幾丁質或幾丁聚醣水解切開醣苷鍵 (glycosidic linkage) 可得。一般可利用酸水解的方法製得，水解後的醣類再以膠體過濾或親和性管柱來加以分離純化 [17-18]。但此方法的酸廢液容易造成環境污染，並且無法專一性的產生特定長度的寡

糖，所以利用酵素來水解幾丁質和幾丁聚醣產生 N-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖是一個具有研究價值之課題。

幾丁質酶是一種存在於可分解幾丁質之微生物中的酵素，其可幫助微生物分解幾丁質，產生寡醣如 (GlcNAc)₂ 以便利用。但是絕大多數幾丁質酶水解幾丁質之產物皆為 (GlcNAc)₂，若要產生其他較長長度之寡糖，則需篩選具有特殊活性的幾丁質酶之微生物。

特定種類的幾丁質酶與溶菌酶 (lysozyme) 具有轉醣作用 (transglycosylation) 活性，可將短鏈寡糖接合成較長鏈的寡糖 [19]。1980 年代後期，Usui 和 Nanjo 發現從 *Nocardia orientalis* 純化所得的幾丁質酶可進行轉醣作用 (transglycosylation)，將 (GlcNAc)₄ 轉換成 (GlcNAc)₆ 和 (GlcNAc)₂，並將 (GlcNAc)₅ 轉換成 (GlcNAc)₇ 和 (GlcNAc)₂ [20]。在後續的研究中，許多具有轉醣酶活性的幾丁質酶都被發現並純化出來，如 *Serratia marcescens* [21], *Coccidioides immitis* [22] 和 *Vibrio harveyi* 的 chitinase A [23], *Bacillus circulans* 的 chitinase A1 [24] 等。利用具有轉醣作用活性的幾丁質酶來生產長鏈寡糖是一種深富潛力的方法。

1.2.2. N-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖的應用

先前的研究中指出不同長度的 N-乙醯幾丁寡糖具有多樣的生理活性。如 N-乙醯幾丁六醣與 N-乙醯幾丁七醣具有抗腫瘤的活性 [25-27]，而 N-乙醯幾丁四醣至六醣具有活化免疫細胞的能力，其中又以 N-乙醯幾丁六醣之活性最高，可保護小鼠不被病原菌感染 [26-27]。因此 N-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖在醫療上研究的應用與潛力極富潛力。此外，N-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖的單體 N-乙醯葡萄糖胺與葡萄糖胺也發現對於骨關節炎 (osteoarthritis) 具有治療效果，可延緩軟骨的損耗 [28-29]。

1.3. 幾丁質酶 (chitinase)

1.3.1. 幾丁質酶的分類

幾丁質酶 (EC 3.2.1.14) 是一種廣泛存在於微生物與動物，可用以切斷幾丁質上的糖苷鍵，水解幾丁質的酵素。幾丁質酶以水解幾丁質之方式可分為兩種：內切型 (Endochitinase) 和外切型 (Exochitinase) [30-31]。內切型幾丁質酶 (EC 3.2.1.14) 可隨機的水解幾丁質，使其成為不同長度的寡糖 [32]；而外切型幾丁質酶可再分為兩類： chitobiosidase (EC 3.2.1.29) 與 *N*-acetyl glucosaminidase (EC 3.2.1.30)。前者可將幾丁質的非還原端水解為 *N*-乙醯幾丁二糖，大多數細菌之幾丁質酶屬於此類。而後者可水解 *N*-乙醯幾丁二糖與其他長度寡糖為 *N*-乙醯葡萄糖胺[31]。而經序列、結構與作用機制分析，幾丁質酶可被歸類於水解碳水化合物之蛋白質的兩大家族：第 18 家族及第 19 家族 [33-34]。第 18 家族的幾丁質酶廣泛存在於細菌，真菌，昆蟲，植物及哺乳類等物種中，具有 $(\alpha\beta)_8$ -barrel domain，含有 8 個 α -helix 與 8 個 β -sheet 二級結構 [35]。第 19 家族的幾丁質酶只在少數的植物與 *Streptomyces* 屬的菌株中，此家族的結構和雞蛋中的溶菌酶相同，大多富含 α -helix 的二級結構 [24]。

1.3.2. 幾丁質酶的來源與功能

幾丁質酶可由許多來源純化而來，包括：植物、真菌、酵母菌、細菌及昆蟲等，並扮演著許多不同的角色。如在細菌中的幾丁質酶通常被運用來水解幾丁質成 *N*-乙醯葡萄糖胺，作為碳源吸收。因此通常在分解幾丁質作為碳源的微生物可分泌不只一種幾丁質酶，可能包含外切型與內切型等，可增加水解幾丁質為寡糖之效率，再由 *N*-acetyl glucosaminidase 進一步水解為 *N*-乙醯葡萄糖胺供菌體使用；另在植物方面，植物之幾丁質酶多作為防禦之功能，可防禦

病原菌與真菌之侵襲；真菌方面幾丁質酶的功能主要是幫助水解幾丁質之基質以寄生或作為碳源使用；酵母菌方面，則幾丁質酶主要與細胞分裂有關[36]。

1.3.3. 幾丁質酶的應用

常見的幾丁質酶應用如下：

a. 真菌原生質體 (fungal protoplast) 的分離

真菌的原生質體可用來研究細胞壁形成，酵素分泌和固醇類的運送等 [31]。因為幾丁質為真菌細胞壁的主要成分，所以幾丁質酶與其他可分解細胞壁的酵素可幫助原生質體的分離。先前研究指出 *Enterobacter* sp. NRG4 純化出的幾丁質酶可以有效率的分離 *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida* 和 *Agaricus bisporus* 等真菌的原生質體 [37]。

b. 製備 *N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁寡糖

隨著 *N*-乙醯葡萄糖胺、葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁寡糖等在生理活性研究與重要性增加，如何製備特定長度的寡糖也成為值得研究的課題。利用酸水解製備 *N*-乙醯幾丁五糖、*N*-乙醯幾丁六糖等醣類產量極低，而使用酵素製備時，聚合度較高的寡糖通常為中間產物。因此尋找具有特殊專一性可生產高聚合度寡糖的酵素變得相當重要。自 *Nocardia orientalis* 純化所得

的幾丁質酶可進行轉醣作用 (transglycosylation)，可生產 (GlcNAc)₆ 及 (GlcNAc)₇ [38]；而自 *Vibrio alginolyticus* 純化出的 chitinase 可水解 chitin 產生 (GlcNAc)₃ - (GlcNAc)₅。另有從 *Bacillus* sp. 純化出的 chitosanase 可水解 chitosan 生成 (GlcN)₂ - (GlcN)₅ [39]。

c. 生物控制藥劑

幾丁質的堅固結構在昆蟲外骨骼與真菌細胞壁上扮演保護與隔離的重要角色。幾丁質酶因為可以破壞幾丁質結構，因此常被用以作為生物控制的藥劑或添加物 [30-31]。例如從 *Serratia marcescens* 純化的幾丁質酶可用來

噴灑於農田中，用以控制 *Pyricularia oryzae* 所引起的水稻白葉枯病 (rice blight) [40]; 此外也可用來有效的控制 *Sclerotium rolfsii* 感染的豆類作物的災情 [41]。在蚊蚋控制上，*Myrothecium verrucaria* 純化出的幾丁質酶可在 48 小時內撲殺登革熱 (yellow fever and dengue) 的病媒蚊埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) [42]。

1.4. 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

多因子系統的最適化，通常以一次測試一個因子 (one-factor at a time) 的方法尋找最適點。然而這種方法並沒有探討各因子之間的交互作用關係 (interactive effect)，倘若將之列入考慮，所需的實驗次數也會大幅增加，且往往無法得到合適的最適化值。反應曲面法 (response surface methodology, RSM) 是 1950 年代由 Box 和 Wilson 等學者所發展，結合統計實驗方法與數據契合技巧 (data-fitting technique)，根據實驗數據，建立之數學模式，其可用以描述受測試因子與目標函數之間的相互關係，進而推測極值點所在的可能區域。最適化步驟如圖 1-3 所示，主要包括依據先前研究與參考資料找出所要選擇的測試因子，並測試推斷其有效的影響範圍。再利用二水準因子設計 (Two-level factorial design) 與陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent) 來尋找極值點所在的可能區域。最後以中心混成設計 (Central composite design) 進行實驗，並將實驗所得之數據以多重迴歸分析，畫成曲面圖，確定極值所在之範圍與可能位置。



圖 1-3 RSM 實驗設計流程圖

1.5. *Aeromonas caviae*

Aeromonas caviae 為一常見於淡水中之革藍氏陰性菌，可感染魚類引發表皮潰瘍，對人類而言多是腹瀉之案例。在菌落外觀上為邊緣整齊之圓形，中央凸起，表面光滑，顏色為淡黃色。自 1980 年代 *Aeromonas caviae* 在前人之研究中發現具有幾丁質酶活性以降，迄今發現其可生產四種幾丁質酶，分子量分別為 92，82，70 及 55 kDa，其中 92 kDa 者被命名為 Chi1，其基因與蛋白質結構皆被作了進一步之探討，並具有 exochitinase 之活性，可水解幾丁質產生 (GlcNAc)₂₋₃[43-44]。其中其他分子量之幾丁質酶之功能與結構需再做進一步之探究。

在 *Aeromonas* 此屬中，也有其他許多菌株具幾丁質酶之分泌的相關研究。如 *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9 之幾丁質酶 (分子量為 91.6 kDa) chiA 基因被定序，並轉殖到 *Escherichia coli* 中，藉由表現來探討其幾丁質酶之活性。研究結果發現，此種幾丁質酶可水解長鏈寡糖如 (GlcNAc)₃₋₅ 為 GlcNAc 或 (GlcNAc)₂ [45]；另外，如 *Aeromonas sp.* no. 10S-24 之培養液體中可分離純化出六種幾丁質酶，分子量主要分布於 89-120 kDa，並探討蛋白質之生化特性等[46-47]。

1.6. 研究目的與內容大綱

1. 依據前人研究指出，長鏈寡糖 (GlcNAc)₄₋₆ 具有特殊生理活性，極富研究之價值。而一般自然界能分解幾丁質之微生物大部分皆可將幾丁質或長鏈寡糖水解產生單糖 *N*-乙醯葡萄糖胺或葡萄糖胺，此二者對於骨關節炎 (osteoarthritis) 具有治療效果，可調節發炎相關激素延緩軟骨的損耗。因此本研究擬自如釣蝦場之富含幾丁質之環境中分離並篩選微生物，其幾丁質

酶具有水解幾丁質或幾丁聚醣為長鏈寡糖 (GlcNAc/GlcN)₄₋₆ 活性，本研究也希望此微生物在水解之最終產物單醣方面也具有較高活性。

2. 將分離篩選到之微生物生產幾丁質酶之條件進行最適化，以期能提昇幾丁質酶之產量。
3. 自培養液中分離純化幾丁質酶，以期藉由去除能水解長鏈寡醣與雙醣之 *N*-acetylglucosaminidase (NAGase)，提昇長鏈寡醣之產量，並探討幾丁質酶之生化特性。

1.7. 實驗流程圖



第 2 章 材料與方法

2.1. 實驗材料

2.1.1. 實驗藥品

一般化學藥品購自 Sigma (USA)、J.T. Baker (USA)、MP (USA)、SHOWA (Japan) 等公司。蛋白質分析試劑購自 Thermo (USA) 公司。甲醇、丙酮等有機溶劑購自 Mallinckrodt (USA)，acetonitrile 購自 MERCK (USA)。

2.1.2. 實驗器材

1. 桌上型冷凍離心機
(Allegra X-15R Centrifuge, Beckman, USA)
2. 落地型冷凍離心機
(high speed refrigerate centrifuge, CR20B2, Hitachi, Japan)
3. 真空冷凍乾燥機
(freeze dry system, FreeZone 4.5 Model 77500, Labconco, USA)
4. 雙光束分光光度計
(double-beam spectrophotometer, model U-2001, Hitachi, Japan)
5. 蛋白質電泳槽
(SE-250 Mighty II vertical slab electrophoresis unit, GE health care, USA)
6. 水平式 DNA 電泳槽
(Mupid-2-Plus, Cosmos)
7. HPLC (High-performance liquid chromatography)
(LC-10AT, SHIMADZU, Japan)
8. ELISA Reader
(MRX II, Dynex, USA)
9. 震盪培養箱
(Shaker incubator 723, Hotech, Taiwan)
10. PCR 反應器
(P×2 Thermalcycler, Thermo, USA)
11. 微量離心機
(Centrifuge 5418, eppendorf, USA)

2.2. 實驗方法

2.2.1. 培養基組成

a. 製備膠狀幾丁質與與膠狀幾丁聚醣

購自 Sigma 的幾丁質以粉碎機粉碎，並以 60 mesh 的篩網篩選。將 10 g 篩選過後的粉末加入 4°C 之冰冷濃鹽酸中，緩慢攪拌 20 分鐘，使粉末均勻散佈於溶液中，並緩慢使溫度上升至 37°C。加入 4 L, 4°C 的 ddH₂O 稀釋此溶液，此時溶液成雲霧狀。離心 (10000 × g, 20 min) 後取沈澱物，並以 ddH₂O 清洗數次。最後將膠狀幾丁質懸浮液以氫氧化鈉調整 pH 值至 7，並利用冷凍乾燥法測幾丁質乾重定量。

購自誠麗公司的幾丁聚醣 (去乙醯化 80%) 以 30 mesh 的篩網篩選後，取 1 g 懸浮於 200 mL 之 0.1 M 醋酸溶液中，於室溫下攪拌兩小時後移至 4°C 下攪拌過夜。離心 (5000 × g, 15 min) 去除不溶物質後，將上清液稀釋為 600 mL，在快速攪拌下，以氫氧化鈉調整 pH 至 7，離心 (10000 × g, 15 min) 後所得的沈澱以 ddH₂O 充分洗滌後，配成約 100 mL 懸浮液，並利用冷凍乾燥法測幾丁聚醣乾重定量。

b. 複選培養基

Colloidal chitin	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3 g
Yeast extract	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Distilled water	1 L
Agar	18 g
pH	7.0

聚基培養基組成成分除 Colloidal chitin 為 15 g 外，其餘皆與複選培養基相同。

2.2.2. 幾丁質分解酵素生產菌株之分離與篩選

a. 菌株之分離與初步篩選

取樣自台南快樂釣蝦場釣蝦場之池水，將適當量之樣品培養於積聚培養基中，以 30°C，130 rpm 之條件培養 14 天。待培養液中幾丁質減少較為澄清時，將培養液以 1-10⁻⁷ 倍之序列稀釋塗抹於複選培養基上，於 30°C 中培養數天，挑出菌落周圍產生較大透明環 (clear zone) 者。

b. 具有幾丁質分解能力菌株之產物鑑定

將初步篩選中可產生較大透明環的菌株接種於複選培養基中 24 小時，測量活性後取 0.004 U 之培養液，加入溶於 20 mM acetate buffer, pH 4 之 0.5% 幾丁質 180 µl，作用 24 小時後以 HPLC 與 TLC 確認水解產物。

c. 16S rDNA 定序

16S rDNA 序列是一個細菌核糖體中具有高保守性的序列，因此分析此序列並比對分析，可了解自環境中分離的未知菌種的分類。菌體 DNA (Genomic DNA) 首先以 DNA extraction kit (GeneMark) 萃取。PCR 反應液 (20 µl) 包括：2 µl 10× Taq buffer, 4 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10 µM forward primer, 1 µl 10 µM reverse primer, 1 µl Taq (Geneteks), 9 µl ddH₂O, 2 µl genomic DNA。使用 Forward universal bacterial primer 530F (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC) and reverse universal bacterial primer 1525R (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG)。PCR 產物跑膠確定大小 (~995 bp) 後，切膠以 Gel Fragment Extract Kit (Genenaid) 純化後送交明欣生物科技公司定序，並將序列輸入 NCBI 之 BLAST 功能，並製作樹狀圖比對親緣關係。

PCR 條件如下：

Step	Temp	Time	cycle
Initial denaturation	94°C	2 mins	1
Denaturation	94°C	1 min	35
Annealing	55°C	1 min	
Extension	72°C	3 mins	
Final extension	72°C	10 mins	1

2.2.3. 酵素活性之測定

a. 幾丁質酶活性之測定 [48]

幾丁質酶活性測定方式在本篇實驗中為還原力測定法。原理主要為測定幾丁質酶水解幾丁質所產生還原端的多寡。取 20 μl 待測定之樣品與 180 μl 0.5 % 膠態幾丁質於 50 mM phosphate buffer (pH 7) , 30°C 條件下混和作用 20 分鐘。離心 (10000 \times g, 3 min) 後取 50 μl 之上清液加入 100 μl 鐵氰酸鉀試劑 (0.5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (SHOWA) 溶於 1 L 之 0.5 M Na_2CO_3 (J.T. Baker)) , 加熱至 100°C 反應 10 分鐘, 並測試 OD_{405} 。標準曲線以 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 *N*-乙醯葡萄糖胺作為標準溶液, 測試 ΔOD_{405} ($\text{OD}_{405 \text{ blank}} - \text{OD}_{405 \text{ sample}}$)。一個酵素活性單位指在上述條件下, 每分鐘水解膠態幾丁質產生 1 μmol 還原醣。

b. *N*-acetylglucosaminidase (NAGase) 活性之測定

反應液組成：

10 mM <i>p</i> -nitrophenyl- β -D- <i>N</i> -acetylglucosaminide (<i>p</i> NPGlcNAc) (Sigma)	0.1 mL
50 mM phosphate buffer (pH 6.0)	0.8 mL
酵素液 (待測樣品)	0.1 mL
<hr/>	
總體積	1.0 mL

反應液於 40°C 下反應 5 分鐘後，添加 2 mL 之 0.25 M Na₂CO₃ 停止反應，並以事先添加 0.25 M Na₂CO₃ 之反應液為空白試樣。標準曲線以 0-100 μ g/mL 之 *p*-nitrophenol 製成。一個酵素活性單位為在上述條件下，每分鐘水解 *p*NPGlcNAc 產生 1 μ mol *p*-nitrophenol 之酵素量。



2.2.4. 蛋白質電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)

a. 蛋白質電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)

試劑：

A 液 30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1 (C 2.6%) (Bio-Rad)

B 液

Tris (Bio basic Inc.)	18.2 g
TEMED (GE Health care)	0.36 mL

以 60 mL 水溶液後，以 HCl 調整 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，貯存於 4°C

C 液

Tris (Bio basic Inc.)	0.6 g
TEMED (GE Health care)	40 μ l

以 8 mL 水溶液後，以 HCl 調整 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，貯存於 4°C

SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	12.5% 分離膠體溶液	4% 焦集膠體溶液
A	4.15	0.66
B	2.5	
C		12.4
10% SDS	0.1	0.05
H ₂ O	3.2	2.95
APS	0.05	0.1
總體積	10	5.0

通用電泳溶液 (5×)

Tris (Bio basic Inc.)	54.5 g
Glycine (Sigma)	4.7 g
SDS (Sigma)	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。
使用前要以蒸餾水稀釋五倍。

SDS-PAGE sample buffer (1×)

Tris (Bio basic Inc.)	125 mM
Glycerol (Sigma)	5% (W/V)
Bromphenol blue (Sigma)	0.002% (W/V)
SDS (Sigma)	2% (W/V)
β-mercaptoethanol (Sigma)	1% (V/V)

調整 pH 值至 6.8 後，貯存於 -20°C 備用。

CBR 染色液：

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 0.75 g

用 250 mL 甲醇溶解後，再加入 250 mL 二次水及 50 mL 醋酸。

CBR 脫色液：

10% 醋酸與 20% 甲醇的水溶液。

方法：

本研究主要以 12.5% (W/V)，含 0.1% SDS 之聚丙烯醯胺分離膠體與含 4% (W/V) 聚丙烯醯胺集膠膠體進行蛋白質樣品之電泳分析。樣品先加入 sample buffer 煮沸至 100°C，5 分鐘後置於冰上進行電泳。先以電壓 100 V 進行電泳，待追蹤染料進入分離膠體後，以 120 V 跑至追蹤染料跑出膠體。膠體利用 CBR 染色 30 分鐘，並以脫色液脫色 1 h 小時左右以偵測蛋白質。

b. 活性染色法 [49]

(1) 製備 glycol chitin [50-51]

Glycol chitin 的製備為乙醯化 glycol chitosan。將 5 g 之 glycol chitosan (Sigma) 溶解於 100 mL 之 10% 醋酸 (Scharlau) 中，並將溶液於 22°C 放置隔夜。緩緩加入 450 mL 之甲醇，並以 Whatman No.4 濾紙過濾，濾液加入 7.5 mL 之 acetic anhydride (Echo) 混和均勻，於室溫下作用約半小時至產生膠體。去除膠體上之液體，並將膠體切成小塊。加入等體積之甲醇充分攪拌均勻，並以離心 (10000 × g, 10 min)，移除上層之甲醇。重複此清洗膠體之步驟數次。將膠體回溶於含 0.02% (W/V) 之二次水 500 mL 中，即為 1% (W/V) 之 glycol chitin。

(2) 膠體活性染色法 (In-gel activity staining assay)

將 12.5% SDS-PAGE 之膠體加入 0.1% glycol chitin，依照前述 SDS-PAGE 之電泳條件電泳後將膠體浸於含 1% (V/V) Triton X-100 (Sigma) 之 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)，於 37°C 中至少浸泡兩小時去除 SDS 使蛋白質恢復活性，再將膠體浸於現配合 0.01% (W/V) Calcofluor white M2R (MP) 之 500 mM Tris-HCl (pH 8.9) 緩衝液中 5 分鐘，再將膠體於二次水中退染一小時，以紫外光照射並觀察。若膠體中的 glycol chitin 被幾丁質酶分解，則螢光染劑則無法吸附於該區域，而在紫外光照射下呈現一暗帶。



2.2.5. 水解寡糖產物分析

a. 甲醇丙酮純化 [52]

甲醇丙酮純化可用以分離去除聚合度過大或者過小的寡糖，並對醣類樣品進行濃縮。樣品加入 2-3 × vol. 之甲醇，混和均勻後離心 (10000 × g, 30 min)，此時沈澱為聚合度 8-10 以上醣類，而上清液為聚合度 8 以下之寡糖。取上清液加入 2-3 × vol. 之丙酮，混和均勻後離心 (10000 × g, 30 min)，此時上清液體多為單糖或雙糖，沈澱則為聚合度 3-7 之寡糖。將沈澱之丙酮蒸乾後以二次水回溶，進行分析。實驗流程圖如圖 2-1。



圖 2-1 甲醇丙酮純化流程圖

b. 水解幾丁聚醣產物之乙醯化

水解幾丁聚醣產物需經過乙醯化之後方能和標準品寡醣比對分析。步驟基本上與與前述乙醯化 glycol chitosan 相同，惟在加入無水醋酸後之步驟有所更改：將 1 mL 之水解幾丁聚醣之寡醣液體加入醋酸至 10% 於室溫下過夜，加入 4.5 mL 之甲醇後，再加入無水醋酸 75 μ l，反應 30 分鐘後離心 (10000 \times g，20 min)，取甲醇上清液，除去沈澱。因為依據甲醇丙酮純化之原理，聚合度小於 8-10 之寡糖會溶於甲醇上清液中。此甲醇上清液體直接加入 2-3 \times vol. 之丙酮以甲醇丙酮純化處理，得到濃縮純化後的寡醣樣品。

c. 高效液相層析 (High-performance liquid chromatography, HPLC)

本實驗使用 HPLC 作為檢測寡糖產物的主要方式，系統為 SHIMADZU LC-10AT。樣品以 0.22 μm 孔徑之過濾膜過濾，使用 Thermo APS2 NH_2 與 Phenomenex NH_2 管柱，流動相 Acetonitrile: H_2O = 73:27，流速為 1.0 min/mL，並以 UV 210 nm 偵測 $(\text{GlcNAc})_n$ 訊號。

d. 薄層層析 (Thin layer chromatography, TLC)

本實驗亦採用 TLC 作為檢測寡糖產物的方式。將樣品點在 silica gel 60 plate (Merk)，以流動相為 1-propanol/water/ammonia (70 : 30 : 0.1) 展開數小時。展開完畢後，以熱風吹乾，接著浸泡於硝酸銀之飽和丙酮溶液中並立即取出，風乾後噴灑 0.5 N 氫氧化鈉乙醇溶液，再置入烘箱 (80°C) 中加熱 20 分鐘使其變色。

2.2.6. 最佳化培養條件探討

a. 種菌培養

取一接種環量之新鮮菌體，接入含有 2 mL 之複選培養基之試管中，以 30°C ，130 rpm 下培養 12 小時，作為種菌培養液。

b. 酵素生產用最佳化培養基之探討

以複選培養基為基礎，探討 pH、培養溫度及最佳氮源等不同變數，並以逐步固定變數探討其最佳化培養條件。以百分之一的接種量，於 30°C ，130 rpm 下培養 24 小時，取樣測定酵素產量。

c. RSM

選取 colloidal chitin (X_1)、soybean flour (X_2) 和 yeast extract (X_3) 作為變數，探討其對幾丁質酶活性 (Y) 之影響。統計分析、繪圖軟體使用 Statistics Analysis System (SAS)。分析流程如圖 1-3。先利用二因子設計 (Two level factorial design) 確定各因子對幾丁質活性之影響有顯著差異後，再利用陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent) 尋找最佳點所在的可能位置。最後利用中心混成設計 (Central composite design)，以二階方程式描述回應曲面的立體變化。本實驗使用 Box 等提出的中心混成實驗圖 [53] (圖 2-2)，設計點與原點的適當距離，即原點與立方體各頂點之距離 (單位為 1)，另補充 6 個星點，因子設計與星點之實驗點都在以原點為中心的球形表面上。將各組求得的活性數值利用 SAS 軟體之 RSM 功能分析，並做出反應曲面圖，判讀極值所在之可能位置。

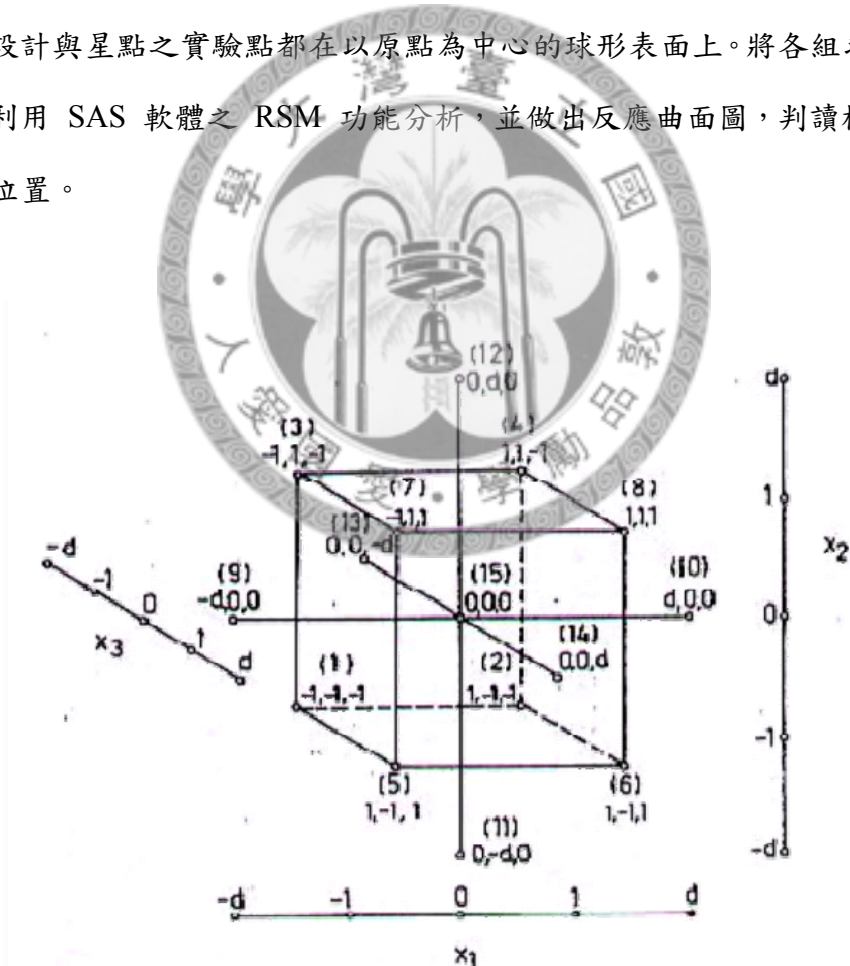


圖 2-2 中心混成設計圖

2.2.7. 酵素純化方法

a. 硫酸銨分劃

將培養 24 小時之培養液，離心 ($10000 \times g$, 20 分鐘) 去除菌體，於冰浴一面攪拌並緩慢加入預先磨細並烘乾之硫酸銨粉末至指定濃度，完畢後於 4°C 下攪拌 1 小時左右，離心 ($10000 \times g$, 20 分鐘) 分離上清液與沈澱後進行下一步驟。硫酸銨之沈澱進行下一純化步驟時需以 50 mM phosphate buffer (pH 7) 透析，使硫酸銨沈澱完全溶於溶液中，並離心去除不溶雜質。

b. 膠態幾丁質吸附-水解法

取硫酸銨分劃後之粗酵素液，測定活性之後以 0.025 U/mL 與 0.8% 之膠態幾丁質的比例混和，於 4°C 下震盪 1 小時進行吸附後，離心 ($8000 \times g$, 10 分鐘) 去除上清液，沈澱部分以 5-10 倍之 50 mM phosphate buffer (pH 7) 清洗 1-2 次之後，加入少量之相同緩衝液，於 30°C 下震盪反應進行膠態幾丁質之水解，至膠態幾丁質澄清。將反應液體於相同緩衝液下進行透析，離心去除沈澱後，進行下一步之純化。

c. 膠體過濾法 Gel filtration

本實驗採用 Sephacryl 200 (GE health care) 作為過濾用膠體。取適當量之樣品注入管柱層析，設定流速為 0.5 mL/min，收集 1.5 倍管柱體積，於 50 mM phosphate buffer, pH 7 (含 0.15 M NaCl) 條件下進行。收集完畢後，測試每管之蛋白質含量，並將波峰以 Ultra filtration 10 kDa (Amicon) 濃縮進行分析工作。

d. 蛋白質之定量

本實驗之蛋白質定量使用 BCA Protein Assay (Thermo)，標準曲線由 0-1 mg/mL 之 BSA 測定而成。

第 3 章 實驗結果

3.1. 幾丁質分解酵素生產菌株之篩選

3.1.1. 酵素生產菌株之初選

釣蝦場之池水經過聚積培養 14 天後 (圖 3-1)，可發現培養液中的膠狀幾丁質幾乎被分解殆盡。取培養液稀釋塗抹於複選用平板培養基上，依菌落外型差異可發現在培養基上約有五種菌株，其中可利用培養基中之幾丁質，產生透明環之菌株外觀上都很類似。推測可能是釣蝦場之池水內有投藥控制池水中菌相之生長，故以池水篩選到之菌株為可適應池水環境之優勢菌種。因為本研究除了希望生產長鏈寡糖外，另也希望所篩選之微生物生產單醣之活性亦佳，又能將幾丁質分解成單醣之效果較佳者其菌落外圍應有較大之透明環，故本實驗選用具有較大透明環的菌落作為研究 (圖 3-2)。

3.1.2. 菌株幾丁質酶產物之分析

一般而言，大部分可分解幾丁質的微生物都是將幾丁質分解為 GlcNAc 或 $(\text{GlcNAc})_2$ 以便進一步利用。將先前挑出的菌落接種於複選培養基中，培養 2 天後取培養液與 0.5% 之膠態幾丁質於 20 mM acetate buffer (pH 4) 中作用 24 小時，以 HPLC (圖 3-3) 與 TLC (圖 3-4) 檢測水解產物。結果顯示本實驗篩選到一具有將膠態幾丁質水解產生 $(\text{GlcNAc})_{4-5}$ 能力的菌株。



圖 3-1 聚積培養基培養 14 天後之外觀

Fig. 3-1 Appearance of enrichment medium after 14 days incubation

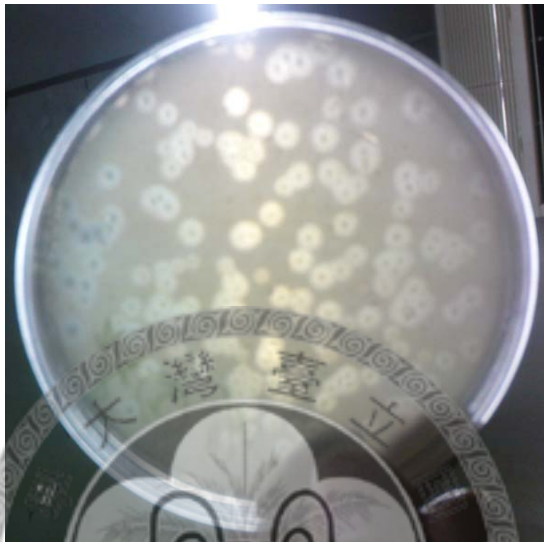


圖 3-2 聚積培養基之培養液序列稀釋後塗抹於複選培養基培養之外觀

Fig. 3-2 Colony appearances of chitinase-producing microorganisms on the selection medium plate

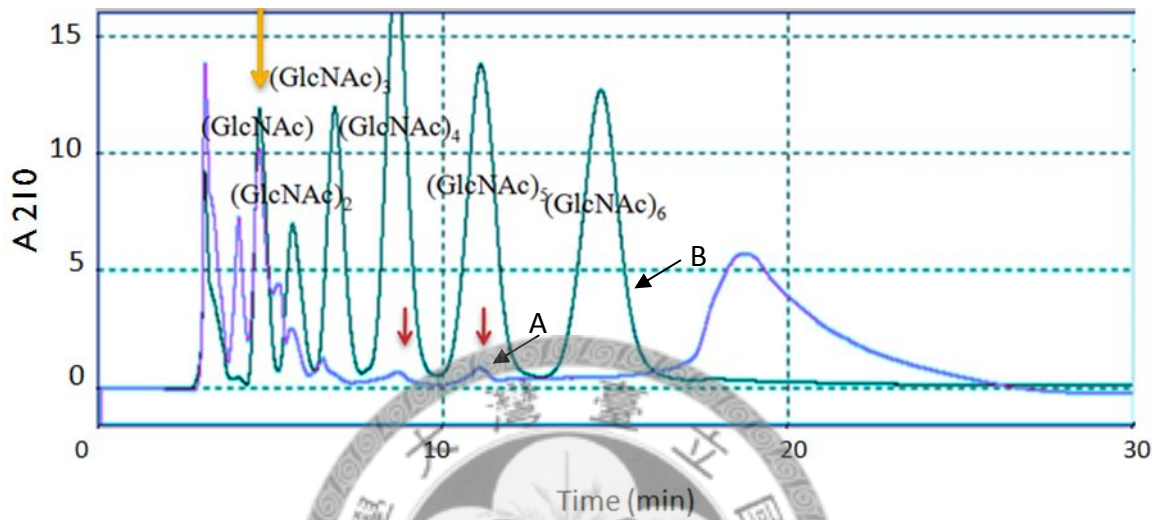


圖 3-3 以 HPLC 分析水解膠態幾丁質產物

Fig. 3-3 HPLC chromatogram of hydrolysis products of colloidal chitin

A: Colloidal chitin (0.5%) 180 μ l was incubated with crude enzyme (culture medium, 0.004 U) of the isolated bacterial strain in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 24 h.

B: Standards (GlcNAc)₁₋₆

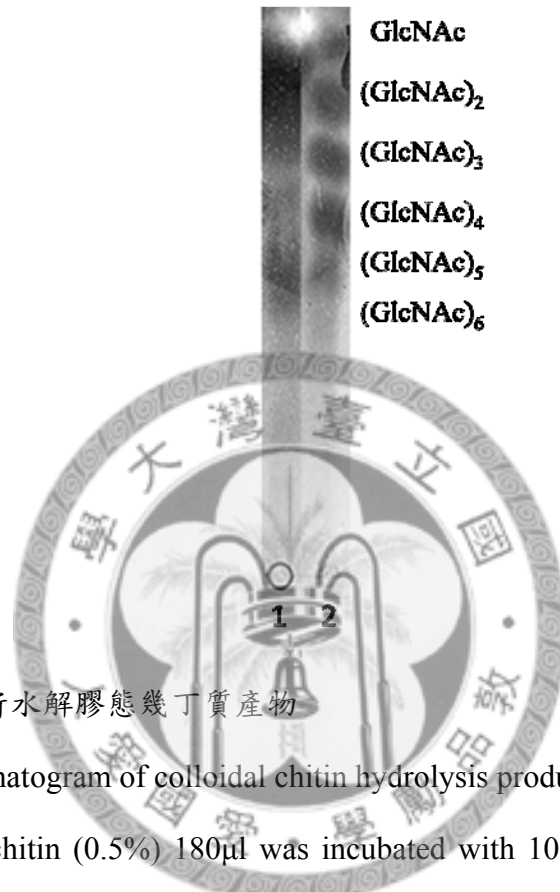


圖 3-4 以 TLC 分析水解膠態幾丁質產物

Fig. 3-4 TLC chromatogram of colloidal chitin hydrolysis products

Lane 1: Colloidal chitin (0.5%) 180 μ l was incubated with 100% ammonium sulfate precipitation enzyme (0.012 U) for 24 h in 20 mM acetate buffer, pH 5.

Lane 2: Standards (GlcNAc)₁₋₆

3.2. 幾丁質分解酵素生產菌株之鑑定

本實驗中使用之鑑定菌株方法為檢測其 16S rDNA 序列，並利用 NCBI 之 BLAST 系統作為比對方式。16S rDNA 是一存在於核糖體中長約 1500 個核苷酸的核酸序列，在基因演化過程中具有相對穩定、高度保留的特點，能用來檢測物種間之親緣遠近關係，故常用以做為菌種鑑定與親緣關係判定的工具。本實驗使用之 universal primer 為 forward primer 530 與 reverse primer 1525，進行 PCR 放大所需之 16S rDNA 片段，預估產物長度為 995 bp。以瓊脂糖膠體電泳確定產物後，切下該片段所在位置，進行 gel extraction 並定序。將定序結果利用 NCBI 之 BLAST 系統序列資料庫進行比對，發現此序列和數個 *Aeromonas* 屬菌種的 16S rDNA 有較高的相似度，alignment score 和 identities 分別為 1779 與 99%，比對親緣樹狀圖，發現在樹狀圖上此篩選到的菌株被歸類與 *Aeromonas caviae* 有較接近的親緣關係 (圖 3-5)，故本研究中暫定此菌株之命名為 *Aeromonas caviae* No. 2。

3.3. 最適培養組成之探討

3.3.1. 菌體生長與酵素生產之過程

以複選培養基進行培養，每 4 小時測定菌體生長、酵素活性之變化情形。由圖 3-6 可知幾丁質酶之活性在菌體成長至恆定期 (stationary phase) (約 16 小時) 後才開始大量增加。培養 24 小時後，酵素之產量變化不大，維持在 0.08-0.09 U/mL，故以下探討培養基組成之培養時間以 24 小時為主。

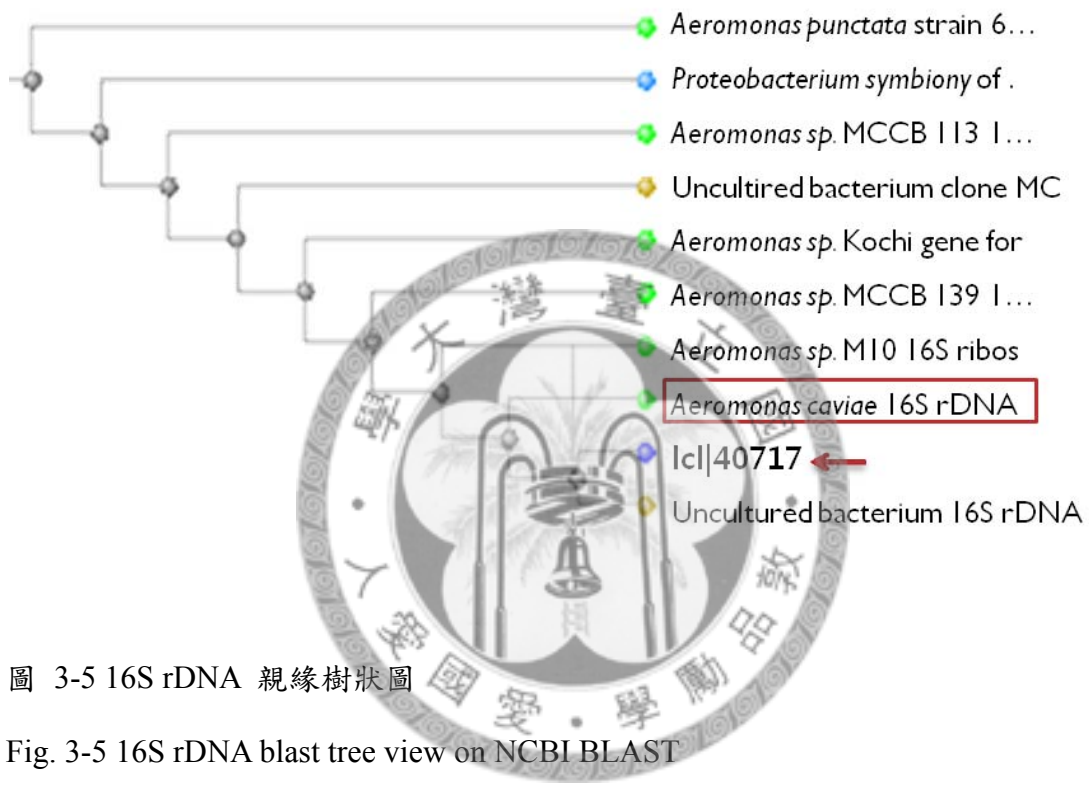


圖 3-5 16S rDNA 親緣樹狀圖

Fig. 3-5 16S rDNA blast tree view on NCBI BLAST

lcl|40717: 16S rDNA sequence of the chosen bacteria

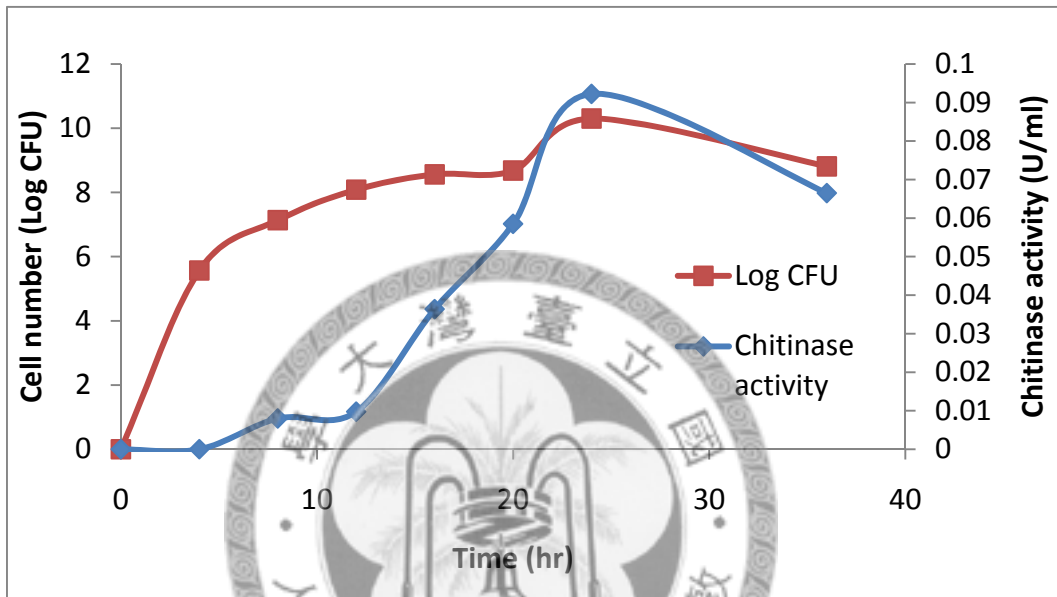


圖 3-6 *Aeromonas caviae* No. 2 之菌體生長與酵素生產曲線

Fig. 3-6 Growth and enzyme production curve of *Aeromonas caviae* No. 2

Aeromonas caviae No. 2 was cultured in the selection medium, and the cell number and chitinase activity were measured every 4 h.

3.3.2. 起始 pH 值與溫度對酵素生產之影響

以複選培養基為基底，分別調整不同 pH 值 (pH 5、6、7、8、9、10) 與生長溫度(25、30、37°C)，培養 24 h 後測量幾丁質酶活性。實驗結果 (圖 3-7, 3-8) 發現，此菌種於 pH 值為 6，及溫度為 25°C 的條件下生長可產生最多幾丁質酶，所以以下培養基皆在 pH 6 與 25°C 的條件下進行

3.3.3. 氮源種類對酵素生產之影響

將複選培養基之氮源硫酸銨，改以各種常見之有機及無機氮源取代，並將濃度提高至 1% (w/v) 進行探討。實驗結果顯示，以有機氮源培養幾丁質酶之產量較高 (圖 3-9)，雖然 casein 與 peptone 兩者為氮源時的幾丁質酶活性最高，但考量未來大量生產之成本，決定以成本較低且幾丁質酶活性亦佳的 soybean flour 與 yeast extract 做為氮源。其中 yeast extract 除了可以提供氮源外，亦含有豐富的維生素 B 群，可促進菌體生長。在先前研究中，Monreal 等人利用 *Serratia marcescens* 生產幾丁質酶 [54] 及 Neugebauer 等利用 *Streptomyces lividans* [55] 進行幾丁質酶之研究時，皆發現添加 yeast extract 可增加培養基中之酵素產量，故本實驗在 RSM 探討培養基之最佳組成時，使用 soybean flour 與 yeast extract 做為探討因子，期望能找出 soybean flour 與 yeast extract 之最佳濃度。

3.3.4. 利用 RSM 探討最適培養基之組成

本研究中所選定以 RSM 方法來探討最適化的三個因子為：colloidal chitin (X_1)、soybean flour (X_2)及 yeast extract (X_3)。其中 colloidal chitin 是誘導幾丁質酶分泌的誘導物，又可作為主要碳源。而 soybean flour 及 yeast extract 兩者則做為主要氮源。

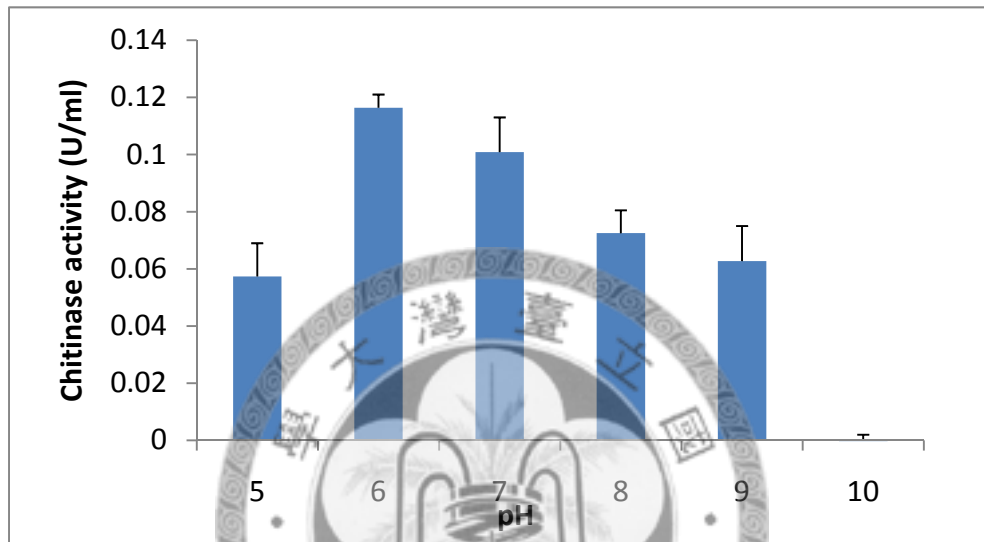


圖 3-7 不同起始 pH 值培養基對 *Aeromonas caviae* No. 2 生產幾丁質酶之影響

Fig. 3-7 Effect of initial pH on the chitinase production by *Aeromonas caviae* No. 2

Aeromonas caviae No. 2 was cultured in the selection medium of different initial pH for 24 h. Chitinase activity was shown as means \pm S.E.M (n = 2). The data shown are representative of three independent experiments.

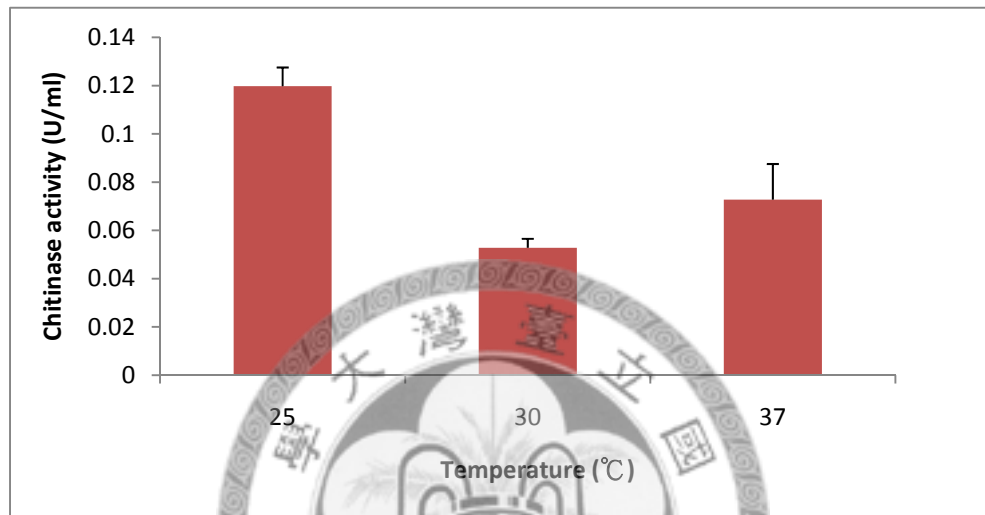


圖 3-8 不同培養溫度對 *Aeromonas caviae* No. 2 生產幾丁質酶之影響

Fig. 3-8 Effect of temperature on the chitinase production by *Aeromonas caviae* No. 2

Aeromonas caviae No. 2 was cultured in the selection medium at different temperature for 24 h. Chitinase activity was shown as means \pm S.E.M (n = 2). The data shown are representative of two independent experiments.

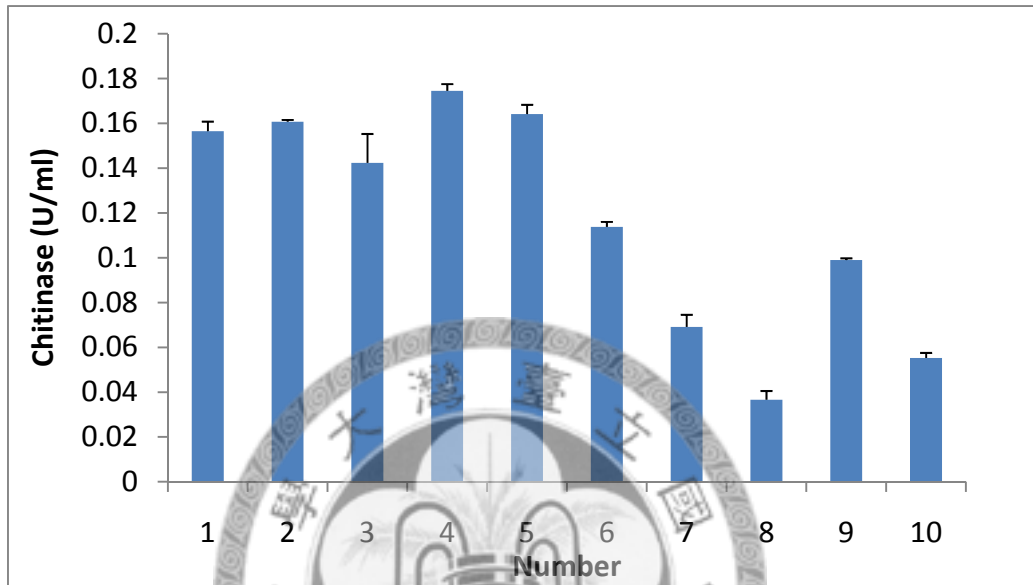


圖 3-9 氮源種類對 *Aeromonas caviae* No. 2 生產幾丁質酶之影響

Fig. 3-9 Effect of different nitrogen sources on the production of chitinase by *Aeromonas caviae* No. 2

Aeromonas caviae No. 2 was cultured with different nitrogen sources on the base of selection medium for 24 h. Chitinase activity was shown as means \pm S.E.M (n = 2). The data shown are representative of two independent experiments.

1: tryptone; 2: soybean flour; 3: yeast extract; 4: casein; 5: peptone; 6: casamino acid; 7: sodium nitrate; 8: Urea; 9: ammonium sulfate; 10: none

a. 二水準因子設計 (Two-level factorial design)

利用二水準因子設計，檢測所選之因子是否對於幾丁質活性 (Y) 有顯著影響。設計之 coded level 如表 3-1 所示。測定各組活性之後 (圖 3-10)，利用 SAS 軟體以 ANOVA 分析，顯示 colloidal chitin (X_1)、soybean flour (X_2) 及 yeast extract (X_3) 對幾丁質酶活性 (Y) 皆有顯著差異的影響 (表 3-2)，故利用各因子之估計值得到一階回歸方程式如下：

$$Y = -0.1164 + 0.6334X_1 + 0.5259X_2 + 0.5786X_3$$

由檢定係數 $R^2 = 0.84$ 來看，此迴歸方程式能描述本實驗之數據。此外，利用 SAS 軟體預測活性最大值落在 colloidal chitin = 0.88%，soybean flour = 0.515% 及 yeast extract = 0.823% 上 (表 3-3)。因此，後續實驗將進一步利用陡升路徑法找出其接近極值點之位置，並將範圍縮小至極值點附近。

b. 陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent)

利用二水準因子設計了解 colloidal chitin (X_1)、soybean flour (X_2) 及 yeast extract (X_3) 對於幾丁質酶產量有明顯的影響，為了確定其極值所在位置，本實驗以陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent) 加以探討。最適化的過程中，陡升路徑法為一可有條理、有系統的逼近極值點所在區域的方法。以前述實驗之極值點 colloidal chitin = 0.88%，soybean flour = 0.515% 及 yeast extract = 0.823% 為中心點，以固定距離向前或向後延伸，逼近最適值所在的區域。本實驗中所使用的距離變化幅度為利用二因子設計所得之公式，設計每因子變化與其斜率變化成下列比例關係：

$$\Delta X_1 = \Delta X_2 * 0.633 / 0.526 = \Delta X_3 * 0.633 / 0.579$$

所得陡升路徑法之實驗設計表如表 3-4。由圖 3-11 之實驗結果可知，幾丁質酶活性從 coded level 為 -2、-1 漸漸升高，且其活性於原始設定之零點最高，在 coded level 為 1 與 2 時有下降的趨勢，因此推測最佳化的極值點應在 coded level 為 0 的附近。接下來以反應曲面法來找出極值點所在的位置。

表 3-1 Two-level 實驗設計表

Table 3-1 Two-level factorial design table

number	colloidal chitin (X ₁)	soybean flour (X ₂)	yeast extract (X ₃)
1	0.01%	0.01%	0.01%
2	0.01%	0.01%	1.00%
3	1.00%	0.01%	0.01%
4	1.00%	0.01%	1.00%
5	0.01%	1.00%	0.01%
6	0.01%	1.00%	1.00%
7	1.00%	1.00%	0.01%
8	1.00%	1.00%	1.00%

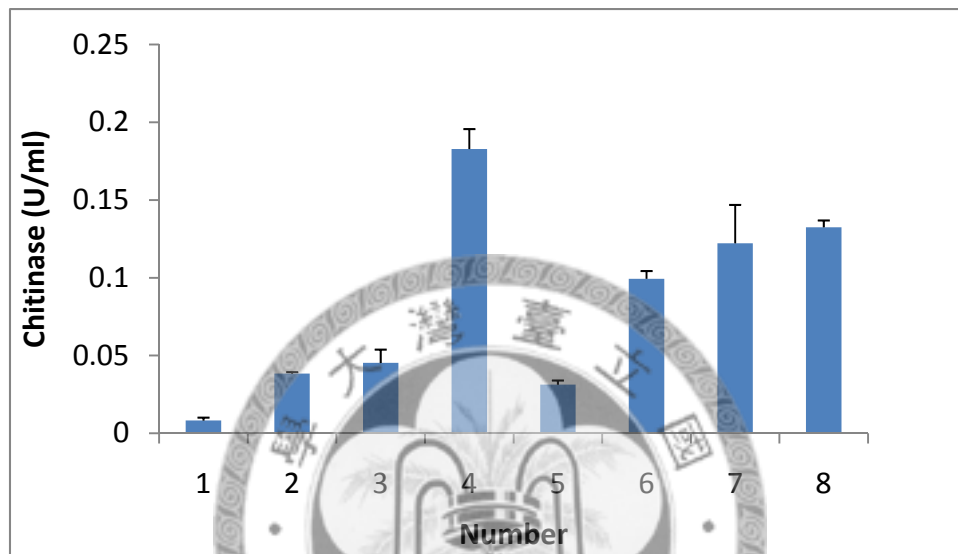


圖 3-10 *Aeromonas caviae* No. 2 培養於 Two-level 實驗設計培養基之幾丁質酶活性

Fig. 3-10 Chitinase activity of *Aeromonas caviae* No. 2 cultured in two-level factorial design medium

Aeromonas caviae No. 2 was cultured in medium designed by two-level factorial, and the chitinase activity was measured at 24 h. Chitinase activity was shown as means \pm S.E.M (n = 2). The data shown are representative of two independent experiments.

表 3-2 Two-level 實驗結果之 ANOVA 分析

Table 3-2 ANOVA analysis of two-level factorial design experiment

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	-0.116465	0.168082	-0.69	0.5059	0.660125
Collidial	1	0.633402	0.219535	2.89	0.0180	0.305500
Soybean	1	0.525939	0.219535	2.40	0.0402	0.110625
Yeast	1	0.578637	0.219535	2.64	0.0271	0.246000
Collidial*Collidial	0	0	.	.	.	0
Soybean*Collidial	1	-0.234670	0.252643	-0.93	0.3772	-0.057500
Soybean*Soybean	0	0	.	.	.	0
Yeast*Collidial	1	0.202530	0.252643	0.80	0.4434	0.049625
Yeast*Soybean	1	-0.364249	0.252643	-1.44	0.1832	-0.089250
Yeast*Yeast	0	0	.	.	.	0

表 3-3 Two-level 實驗設計結果之變數最大值預測表

Table 3-3 Estimated ridge of maximum response from two-level factorial design

Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor Values		
			Collidial	Soybean	Yeast
0.0	0.660125	0.061904	0.505000	0.505000	0.505000
0.1	0.700852	0.062214	0.542338	0.517263	0.535096
0.2	0.741575	0.063143	0.580077	0.527103	0.565629
0.3	0.782373	0.064692	0.618122	0.534426	0.596596
0.4	0.823325	0.066859	0.656364	0.539177	0.627984
0.5	0.864513	0.069643	0.694693	0.541338	0.659766
0.6	0.906019	0.073039	0.732999	0.540931	0.691907
0.7	0.947925	0.077044	0.771179	0.538023	0.724364
0.8	0.990309	0.081655	0.809139	0.532710	0.757087
0.9	1.033247	0.086874	0.846797	0.525122	0.790027
1.0	1.076809	0.092705	0.884088	0.515407	0.823133

表 3-4 陡升路徑法之實驗設計表

Table 3-4 Experimental design of method of path of steepest ascent expressed in coded and natural units.

Factor	Unit	-2	-1	0	1	2
Colloidal chitin (X_1)	%	0.278	0.579	0.88	1.181	1.482
Soybean flour (X_2)	%	0.015	0.265	0.515	0.765	1.015
Yeast extract (X_3)	%	0.273	0.548	0.823	1.098	1.373

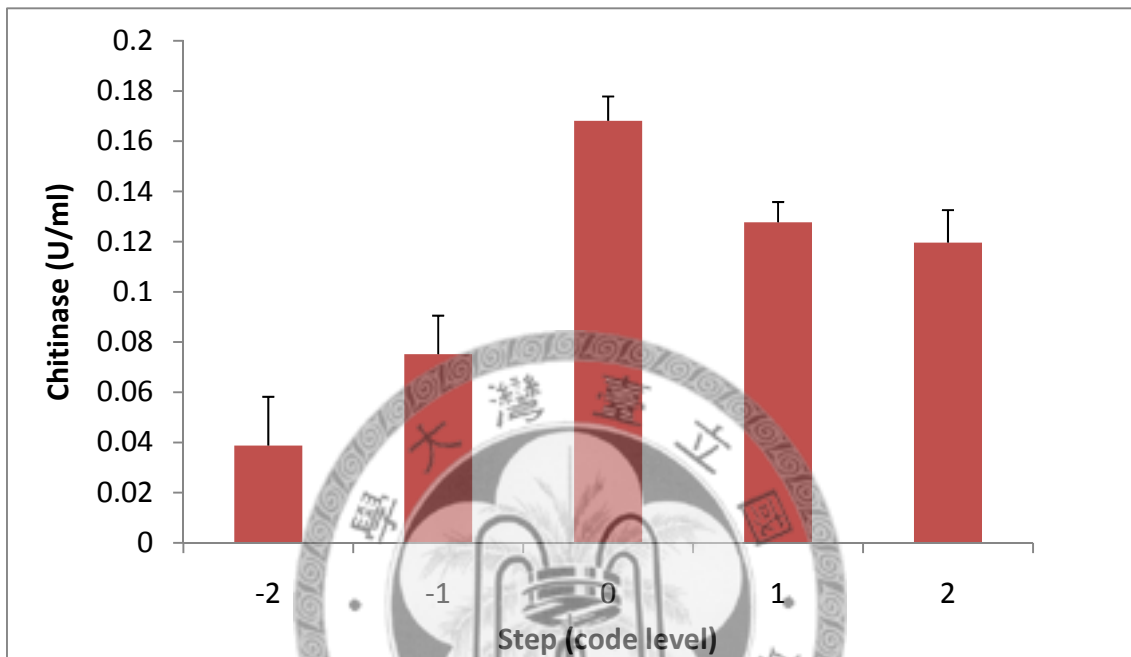


圖 3-11 *Aeromonas caviae* No. 2 培養於陡升路徑法設計培養基之幾丁質酶活性圖

Fig. 3-11 Chitinase activity of *Aeromonas caviae* No. 2 cultured by method of path of steepest ascent design medium

Aeromonas caviae No. 2 was incubated in the medium designed by method of path of steepest ascent and the chitinase activities were measured at 24 h. Chitinase activities were shown as means \pm S.E.M (n=2). The data shown are representative of two independent experiments

c. 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

由陡升路徑法得知極值點所在的可能位置後，便由先前設計的 code level=0 的位置開始探討。本實驗依據 Box 等人提出的中心混成實驗圖 (圖 2-2) 設計實驗，並以二階方程式描述反應曲面的立體變化。首先設計點與原點的適當距離，即原點與立方體各頂點之距離，另補充星點，即沿中心軸向外延伸之實驗點。因子設計與星點之實驗點都在以原點為中心的球形表面上，彼此對稱且等值加權。實驗設計如表 3-5、3-6 所示。

各組測定活性之後，將參數與結果以 SAS 軟體分析，利用迴歸分析得到之數值 (表 3-7) 代入 RSM 二階迴歸方程式如下：

$$Y=1.350928+X_1*(0.059268)+X_2*(0.060911)+X_3*(-0.033362)+X_1*X_1*(-0.108095)+X_1*X_2*(0.102382)+X_2*X_2*(-0.073729)+X_3*X_1*(-0.032331)+X_3*X_2*(0.021554)+X_3*X_3*(-0.062274)$$

Y: chitinase activity, X_1 : colloidal chitin, X_2 : soybean flour, X_3 : yeast extract

利用此二階迴歸方程式繪製出反應區面圖，探討各因子間的關係與極值所在位置 (圖 3-12、3-13、3-14)。由反應區面圖 3-12 與 3-14 可知，colloidal chitin 分別與 soybean flour 及 yeast extract 的關係圖可於曲面上找到極值，而在圖 3-13 中 soybean flour 與 yeast extract 的關係並不能確定極值位置。由反應曲面圖 3-12 與 3-14 兩者相互比對配合方程式所預測的最大值 (表 3-8) 的結果可推測出最佳化濃度為 colloidal chitin 1.10%，soybean flour 0.73% 與 yeast extract 0.74%。利用此最適化之培養基產生之幾丁質酶活性與複選培養基相較，可增加約 4 倍 (表 3-9)。

表 3-5 RSM 之實驗設計表

Table 3-5 Experimental design of RSM expressed in coded and natural units.

Factor	Unit	-1.68	-1	0	1	1.68
Colloidal chitin (X_1)	%	0.375	0.579	0.88	1.181	1.386
Soybean flour (X_2)	%	0.095	0.265	0.515	0.765	0.935
Yeast extract (X_3)	%	0.361	0.548	0.823	1.098	1.285

表 3-6 RSM 之中心混成設計設定參數

Table 3-6 Central composite design of RSM

Number	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

表 3-7 RSM 實驗設計之 ANOVA 迴歸分析表

Table 3-7 ANOVA analysis of central composite design experiment

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	1.350928	0.097780	13.82	<.0001	1.350928
Collidial	1	0.059268	0.064908	0.91	0.3827	0.099571
Soybean	1	0.060911	0.064908	0.94	0.3701	0.102331
Yeast	1	-0.033362	0.064908	-0.51	0.6184	-0.056049
Collidial*Collidial	1	-0.108095	0.063259	-1.71	0.1183	-0.305086
Soybean*Collidial	1	0.102382	0.084769	1.21	0.2549	0.288962
Soybean*Soybean	1	-0.073729	0.063259	-1.17	0.2709	-0.208093
Yeast*Collidial	1	-0.032331	0.084769	-0.38	0.7109	-0.091251
Yeast*Soybean	1	0.021554	0.084769	0.25	0.8044	0.060834
Yeast*Yeast	1	-0.062274	0.063259	-0.98	0.3481	-0.175762



圖 3-12 Colloidal chitin 與 soybean flour 對幾丁質酶產量之反應曲面圖

Fig. 3-12 Response surface diagram of the effect of colloidal chitin and soybean flour on chitinase production

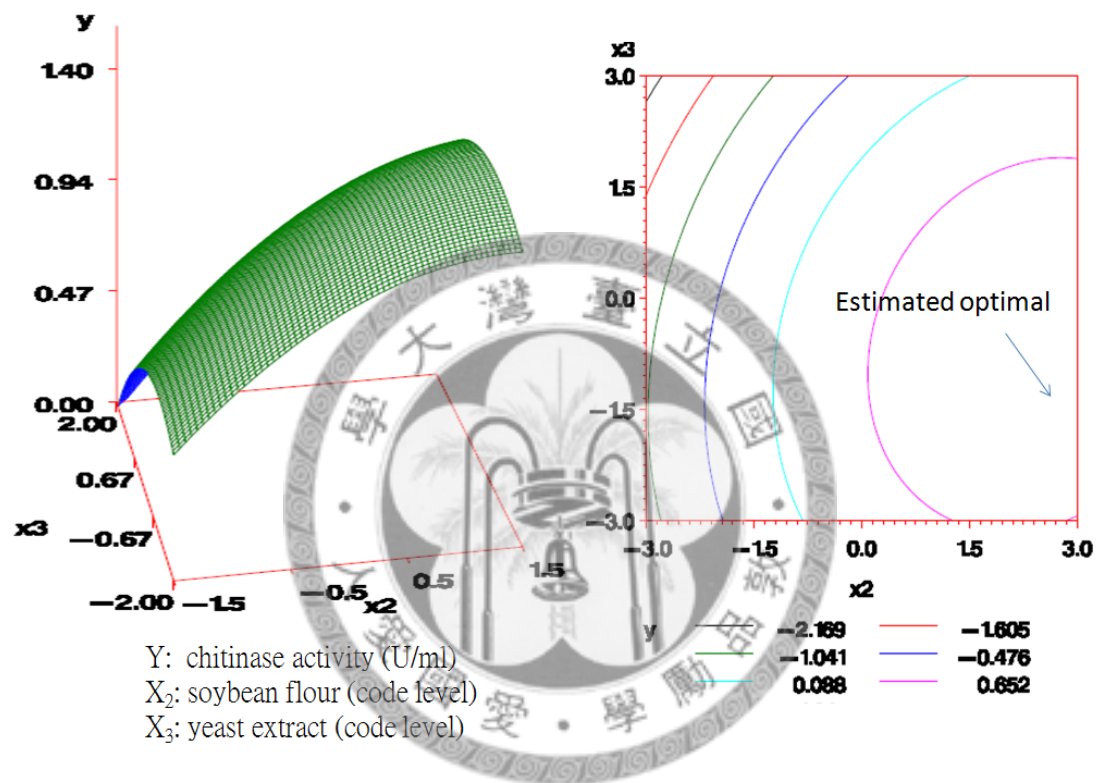


圖 3-13 Soybean flour 與 yeast extract 對幾丁質酶產量之反應曲面圖

Fig. 3-13 Response surface diagram of the effect of soybean flour and yeast extract on chitinase production



圖 3-14 Colloidal chitin 與 yeast extract 對幾丁質酶產量之反應曲面圖

Fig. 3-14 Response surface diagram of the effect of colloidal chitin and yeast extract on chitinase production

表 3-8 RSM 設計之變數最大值預測表

Table 3-8 Estimated ridge of maximum response from RSM

Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor Values		
			Collidial	Soybean	Yeast
0.0	1.350928	0.097780	0	0	0
0.1	1.365147	0.097461	0.107223	0.115443	-0.058311
0.2	1.377152	0.096695	0.212437	0.235646	-0.110624
0.3	1.386967	0.096068	0.316719	0.358999	-0.157559
0.4	1.394613	0.096577	0.420445	0.484643	-0.199829
0.5	1.400103	0.099556	0.523771	0.612029	-0.238085
0.6	1.403450	0.106421	0.626772	0.740776	-0.272895
0.7	1.404662	0.118275	0.729493	0.870604	-0.304737
0.8	1.403748	0.135641	0.831964	1.001303	-0.334014
0.9	1.400713	0.158515	0.934206	1.132711	-0.361066
1.0	1.395563	0.186609	1.036240	1.264703	-0.386179

表 3-9 幾丁質酶活性比較表

Table 3-9 Comparison table of chitinase activity of selection medium and optimized medium



	幾丁質酶活性
複選培養基	0.09±0.01
最佳化培養基	0.38±0.02

Chitinase activity shown as means ± S.E.M (n=3).

3.4. 幾丁質酶之純化

確認 *Aeromonas caviae* No. 2 具有分解幾丁質為 (GlcNAc)₄₋₅ 之活性後，本研究接著以複選培養基培養 *Aeromonas caviae* No. 2，進行純化幾丁質酶之純化，並分離可分解長鏈寡糖或 (GlcNAc)₂ 為 *N*-乙醯葡萄糖胺之 *N*-Acetylglucosaminidase (NAGase)，以利生產聚合度較高之寡糖。幾丁質酶之純化流程如下：

3.4.1. 硫酸銨分劃

本研究中，純化幾丁質酶先以每 10% 飽和度之硫酸銨為單位，測試其中幾丁質酶、NAGase 活性與蛋白質濃度。實驗結果可知 NAGase 活性於硫酸銨分劃 0-20% 最高，而幾丁質酶則是主要沈澱於硫酸銨飽和濃度 40-70% (圖 3-15)。故此方法可以有效分離 NAGase 與幾丁質酶，並可減少長鏈寡糖被 NAGase 水解的機率，提昇長鏈寡糖的產量。另以活性染色圖確認，發現 *Aeromonas caviae* No. 2 產生的幾丁質酶可能有兩種，分別約位於 60 kDa 與 80 kDa 附近，主要於硫酸銨飽和濃度 40-70% 附近被分離出來 (圖 3-16)。因此，本方法可有效分離 NAGase 與幾丁質酶。經硫酸銨分劃沈澱過後之產物，利用透析去除鹽類後，再進一步純化幾丁質酶。

3.4.2. 幾丁質親和性吸附

為了有效的分離幾丁質酶，本研究利用幾丁質酶進行水解時需與幾丁質專一性結合之特性，先將酵素與基質做專一性之結合，再進行水解反應將吸附之幾丁質酶釋出之幾丁質專一性吸附-分解法進行純化。本實驗首先測試較佳之幾丁質酶與幾丁質之比例，發現於 0.025 U 之幾丁質酶添加 0.8% 膠態幾丁質在總體積為 100 μ l 的情況下，幾丁質酶可吸附達八成以上 (圖 3-17)。接著

以幾丁質酶與幾丁質吸附進行水解反應之特性，先加入基質，充分混和均勻 1 h 後，離心分離幾丁質，並用緩衝液 (50mM phosphate buffer, pH 7) 清洗數次。本方法可將與幾丁質分解相關之蛋白質吸附純化，本研究發現於 SDS-PAGE 上於 100 至 70 kDa 間，與 70 至 55 kDa 間各有兩條蛋白質訊號，而在活性染色上於 70-55 kDa 附近可看到兩條活性訊號。(圖 3-18)。

3.4.3. 膠體過濾法

以幾丁質親和性吸附法後，雖可除去大部分 35 kDa 附近之雜蛋白質，但卻無法完全去除。因為其分子量與幾丁質酶相關蛋白質分子量相差較多，故選擇以膠體過濾法進行進一步純化，希望能將此蛋白去除，提高純化效果。選用 Sephacryl 200 做為分離膠體，分離過後如圖 3-19，可發現有三個主要波峰。濃縮後以 SDS-PAGE 與活性染色檢測 (圖 3-20)，可發現 35 kDa 之蛋白質幾乎被去除，有良好的分離效果。

蛋白質純化表如表 3-10，可發現蛋白質純化最後膠體過濾之比活性為最初粗酵素液之 51.29 倍，而膠體過濾之純化倍率為粗酵素液之 51.59 倍，兩者有明顯的提昇，惟回收率部分，主要損失在硫酸銨分劃，回收率為 20% 左右。

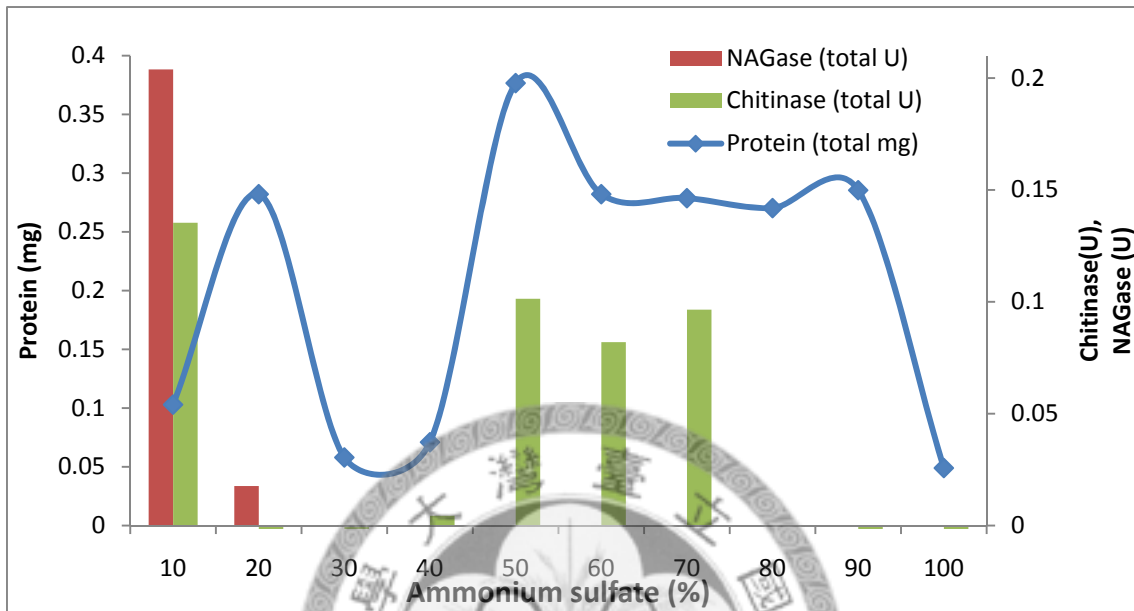
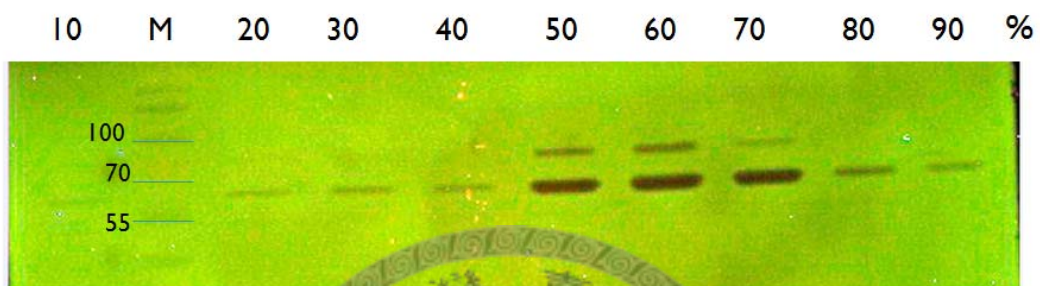


圖 3-15 不同飽和百分率之硫酸銨分劃之幾丁質酶與 NAGase 活性分佈。

Fig 3-15 Ammonium sulfate fractionation profile of chitinase and NAGase activity

Total protein in culture medium of *Aeromonas caviae* No. 2 was precipitated by successive 10% ammonium sulfate fractionation, and the activity of chitinase and NAGase were measured. The data shown are representative of two independent experiments.



(M=Marker)

圖 3-16 不同飽和百分率之硫酸銨分劃沈澱之蛋白質之活性染色

Fig 3-16 Chitinase activity staining assay of ammonium sulfate fractionation

Total protein in culture medium of *Aeromonas caviae* No. 2 was precipitated by successive 10% ammonium sulfate fractionation and the precipitated proteins were detected by chitinase activity staining assay described as materials and methods.

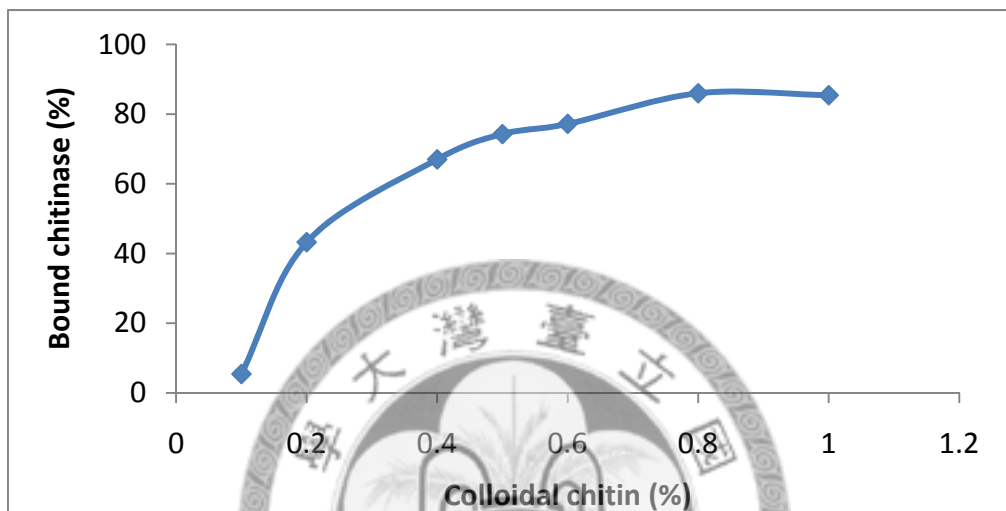


圖 3-17 幾丁質對幾丁質酶吸附關係

Fig 3-17 Effect of different chitin concentrations on chitin-affinity hydrolysis assay

The 40-70% ammonium sulfate fractionation (0.025 U) was incubated with different percent (0.1-1%) of colloidal chitin for 1 h, and the total volume was 100 μ l. The percentage of bound chitinase was determined by chitinase activity analysis of the supernatant isolated by centrifugation (10000 \times g). The data shown are representative of three independent experiments.

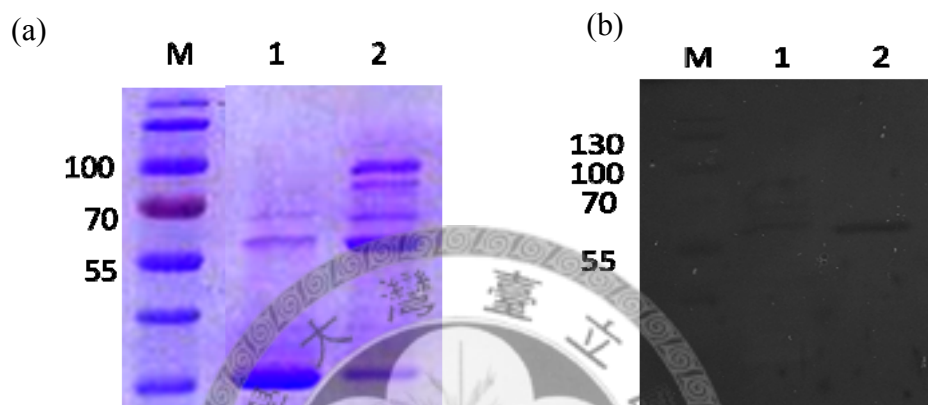


圖 3-18 不同純化階段所得之幾丁質酶 SDS-PAGE (a) 及活性染色圖 (b)

Fig. 3-18 PAGE analysis of chitinase.

Protein samples from ammonium sulfate fractionation (40-70%) (lane 1) and chitin-affinity hydrolysis purification (lane 2) were separated by SDS-PAGE and subjected to CBR stain (a) and chitinase activity staining assay (b). M, Marker.

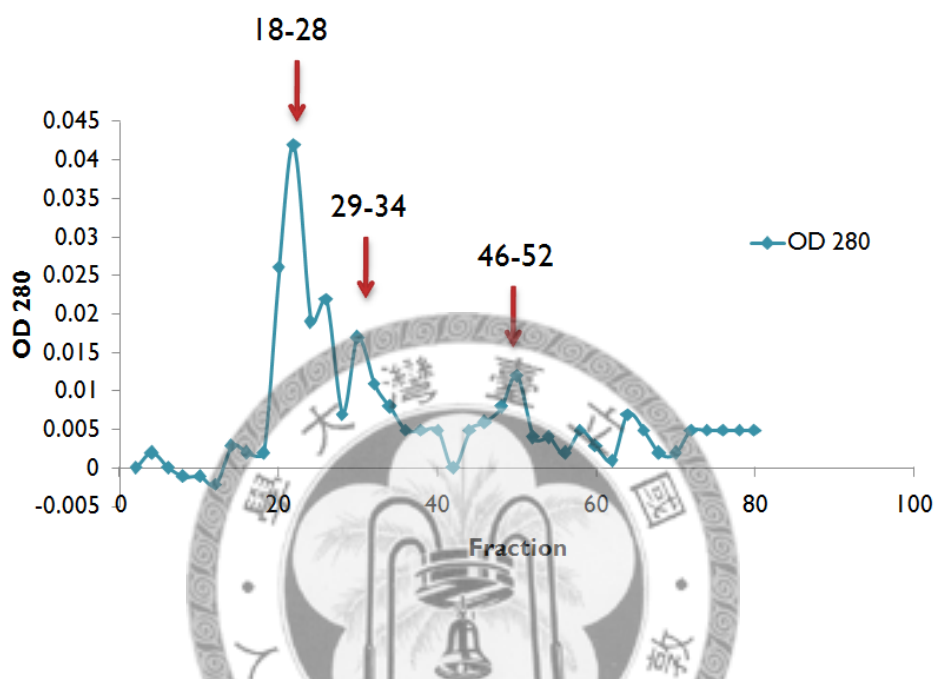


圖 3-19 膠體過濾 (Sephacryl 200) 純化幾丁質酶層析圖

Fig. 3-19 Gel filtration chromatograms of purification of chitinase

Protein samples from chitin-affinity hydrolysis assay were purified by gel filtration (Sephacryl 200).

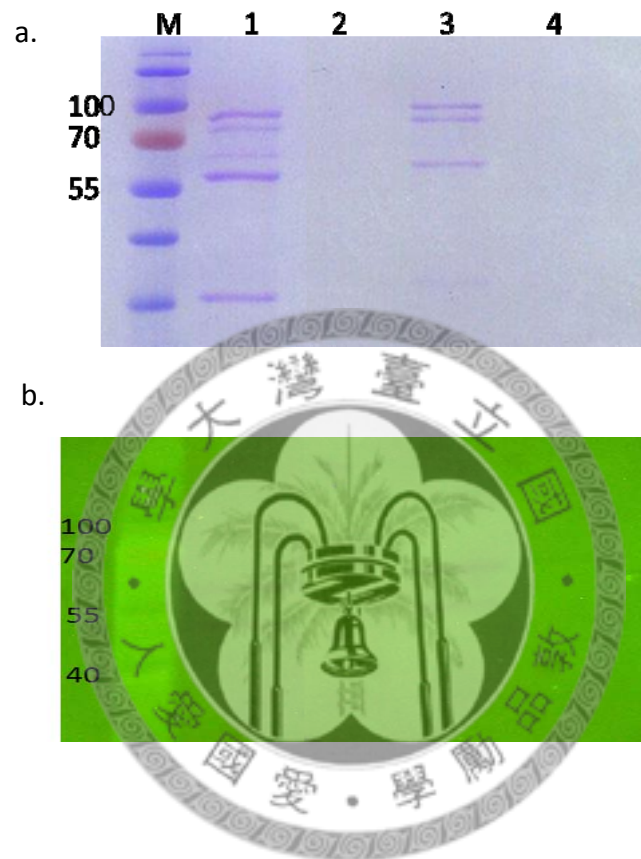


圖 3-20 膠體過濾之 fractions 濃縮分析

Fig. 3-20 PAGE analysis of chitinase, (a) CBR stain (b) Activity stain

M. Marker; lane 1. Protein purified by chitin-affinity hydrolysis assay; lane 2. S-200 18-28; lane 3. S-200 29-34; lane 4. S-200 46-52

表 3-10 *Aeromonas caviae* No. 2 所生產之幾丁質酶純化表 (1)

Table 3-10 Purification table 1 of chitinase from *Aeromonas caviae* No. 2

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Fold	Recovery (%)
Crude enzyme	21962.5	13.58	0.00062	1	100
AS (40~70%)	1703.5	2.6124	0.0015	2.48	19.24
Affinity digest	200.1	1.3489	0.0067	10.90	9.9
S-200	31.07	0.99	0.0318	51.59	7.3

* One unit of chitinase activity was defined as the amount of the enzyme that produces 1 μmol of reducing sugar per min.

3.5. 以複選培養基純化之幾丁質酶水解幾丁聚醣 (chitosan)

幾丁聚醣是部分去乙醯化的幾丁質之總稱，本研究中利用幾丁質酶水解幾丁聚醣，期望得到聚合度較高之寡醣。由於幾丁聚醣上可供幾丁質酶辨識之 *N*-乙醯葡萄糖胺間隔不等長度出現，經酵素水解後，有機會得到聚合度較長之寡醣 (圖 5-1)。前人研究中，Audun 等人利用 *Serratia marcescens* 之 chitinase B 水解 chitosan 產生若干不同聚合度之寡醣，長度可達 (GlcN/GlcNAc)₈ 以上。本實驗以培養自複選培養基利用硫酸銨分劃 (40-70%) 之幾丁質酶水解幾丁聚醣後，其產物寡糖為 *N*-乙醯葡萄糖胺 (GlcNAc) 與葡萄糖胺 (GlcN) 之單體組合之聚合體，故配合乙醯化之步驟，使寡醣之單體轉化為 *N*-乙醯葡萄糖胺，以便與標準品 (GlcNAc)_n 比對寡醣之聚合度。本研究中參照 Shigehiro 等學者於 1976 年發表之方法，利用無水醋酸做為醯化試劑進行反應，製備乙醯化之幾丁聚醣。而本篇實驗研究之寡醣，在乙醯化步驟完成後，依據甲醇丙酮純化之原理，寡醣應存在於甲醇上清液中，而沈澱之膠體為聚合度 10 以上之醣類。接著將甲醇上清液加入丙酮，利用極性之差異，離心取得沈澱後，蒸乾丙酮加入二次水，以 HPLC 與 TLC 分析其產物 (圖 5-2)。實驗結果發現，本研究所篩選之微生物之幾丁質酶可水解幾丁聚醣產生 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆。

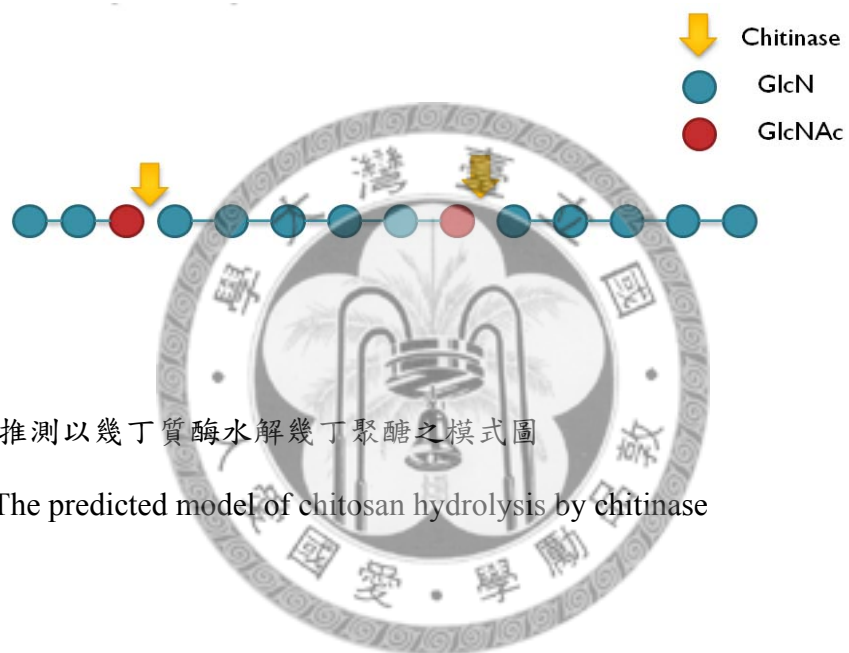


圖 3-21 推測以幾丁質酶水解幾丁聚醣之模式圖

Fig. 3-21 The predicted model of chitosan hydrolysis by chitinase

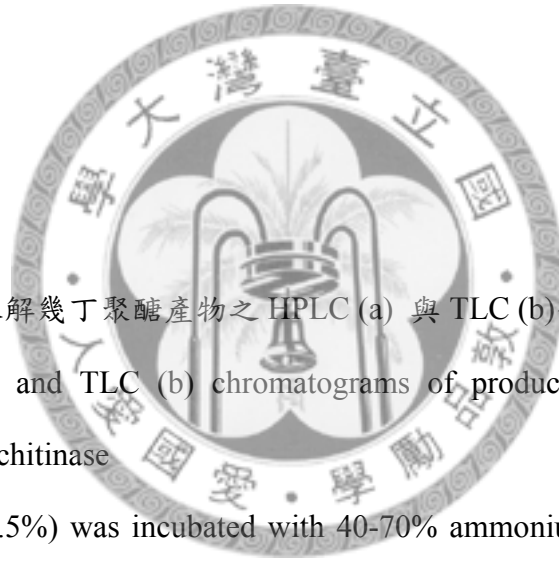


圖 3-22 幾丁質酶水解幾丁聚醣產物之 HPLC (a) 與 TLC (b) 分析圖

Fig. 3-22 HPLC (a) and TLC (b) chromatograms of products from hydrolysis of colloidal chitosan by chitinase

Colloidal chitosan (0.5%) was incubated with 40-70% ammonium sulfate precipitated chitinase (0.012 U) from selection medium in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 24 h, and the hydrolysis product went through acetylation and methanol-acetone precipitation .

a. Green line stands for standard (GlcNAc)₁₋₆ and blue line stands for hydrolysis sample.

Mobile phase: Acetonitrile : H₂O = 73 : 27; flow rate = 0.8 ml/min; column: phenomenex NH₂.

b. 1, hydrolysis product; 2, standard.

3.6. 最佳化培養基之幾丁質酶純化與水解幾丁質/幾丁聚醣產物分析

前述實驗找到最佳化培養基條件後，本實驗擬由最佳化培養基中純化幾丁質酶，並測試其粗酵素液與純化過後之蛋白質水解幾丁質與幾丁聚醣之產物，確認 *Aeromonas caviae* No. 2 培養於最佳化後之培養基生產之幾丁質酶亦能水解幾丁質與幾丁聚醣產生目標產物單醣與長鏈寡糖。

3.6.1. 幾丁質酶純化

以最佳化培養基培養 *Aeromonas caviae* No. 2 後，依照前述以複選培養基之培養液所建立之純化流程，經由硫酸銨分劃、專一性吸附水解法及膠體過濾後，利用 SDS-PAGE 與 活性染色確認其產物 (圖 6-1)，並計算回收率 (表 6-1)。

實驗結果發現，*Aeromonas caviae* No. 2 經最佳化培養基培養後，培養液內之幾丁質酶之組成與比例發生改變，純化後在 SDS-PAGE 上於 100 至 40 kDa 之間分佈 9 個蛋白質訊號，在活性染色上於 70-55 kDa 附近可看到兩條幾丁質酶之活性，而在 40 kDa 附近也有一條活性訊號。回收率的部份，幾丁質酶之回收率主要損失於硫酸銨分劃之步驟，回收率約 20%，且純化倍率下降五成。然經過此步驟後，幾丁質酶之活性幾乎可完全回收，且純化倍率也確實上升。

3.6.2. 水解幾丁質與幾丁聚醣產物分析

因利用最佳化之培養基培養 *Aeromonas caviae* No. 2 之培養液與經由前述純化步驟純化後之酵素其蛋白質組成與成分上有所改變，因此需分別水解幾丁質與幾丁聚醣以 HPLC 確認其產物，以確認其中蛋白質之改變依然可產生本實驗之目標產物。實驗結果發現，培養液水解幾丁質後，在 HPLC 圖譜上於 (GlcNAc) 與 (GlcNAc)₂ 之標準品間出現一隨時間增加之訊號 (圖 6-2)，而水解幾丁聚醣部分，水解產物經由乙醯化、甲醇丙酮純化後，發現產物具有 (GlcNAc)₄₋₆，甚至更高聚合度之寡糖 (圖 6-3)。另在純化後之蛋白質水解產物方面，利用純化後之蛋白質

水解幾丁質產生大量之 $(\text{GlcNAc})_2$ 與少量 GlcNAc 和 $(\text{GlcNAc})_3$ (圖 6-4)，另水解幾丁聚醣之產物亦出現 $(\text{GlcNAc})_{4-6}$ 以及可能為更高聚合度之寡醣 (圖 6-5)。



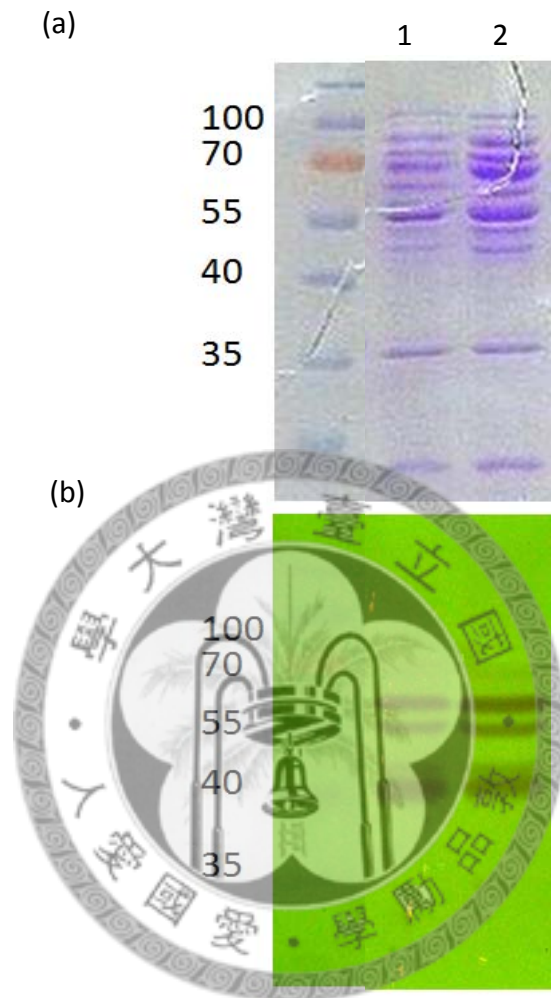


圖 3-23 利用最佳化培養基培養 *Aeromonas caviae* No.2 經不同純化階段所得之幾丁質酶 SDS-PAGE (a) 及活性染色圖 (b)

Fig. 3-23 PAGE analysis of chitinase purified from optimized culture broth.

Protein samples from chitin-affinity hydrolysis purification (lane 1) and gel filtration (S100) (lane 2) were separated by SDS-PAGE and subjected to CBR stain (a) and chitinase activity staining assay (b). M, Marker.

表 3-11 *Aeromonas caviae* No. 2 所生產之幾丁質酶純化表 (2)

Table 3-11 Purification table 2 of chitinase from *Aeromonas caviae* No. 2

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Fold	Recovery (%)
Crude enzyme	396375	115.20	0.0003	1	100
AS	164887.5	26.12	0.00016	0.55	22.67
AF	40818.75	14.54	0.00036	1.23	12.62
S100	29943.65	13.17	0.00044	1.51	11.46

* One unit of chitinase activity was defined as the amount of the enzyme that produces 1 μmol of reducing sugar per min.

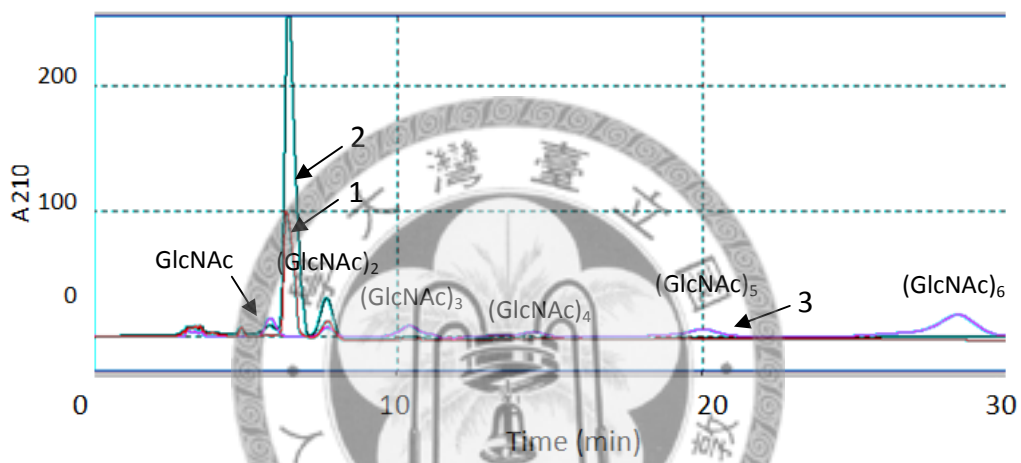


圖 3-24 幾丁質酶水解幾丁質產物之 HPLC 分析圖

Fig. 3-24 HPLC chromatograms of products from hydrolysis of colloidal chitin by chitinase

Colloidal chitin (0.5%) was incubated with culture broth (0.015 U) in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 1 and 18 h.

1, 1 h; 2, 18 h; 3, standard.

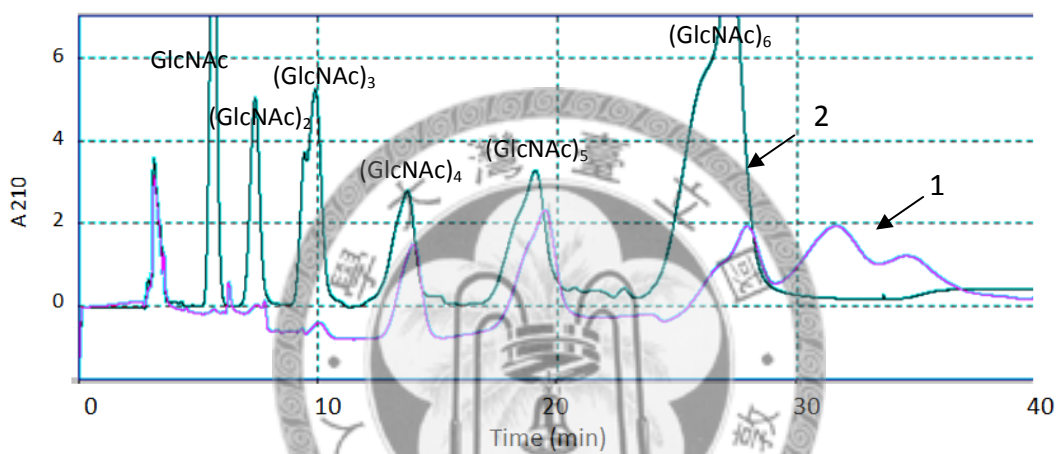


圖 3-25 幾丁質酶水解幾丁聚醣產物之 HPLC 分析圖

Fig. 3-25 HPLC chromatograms of product from hydrolysis of colloidal chitosan by chitinase

Colloidal chitosan (0.5%) was incubated with culture broth (0.015 U) in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 18 h, and the hydrolysis product went through acetylation and methanol-acetone precipitation.

1, hydrolysis product; 2, standard.

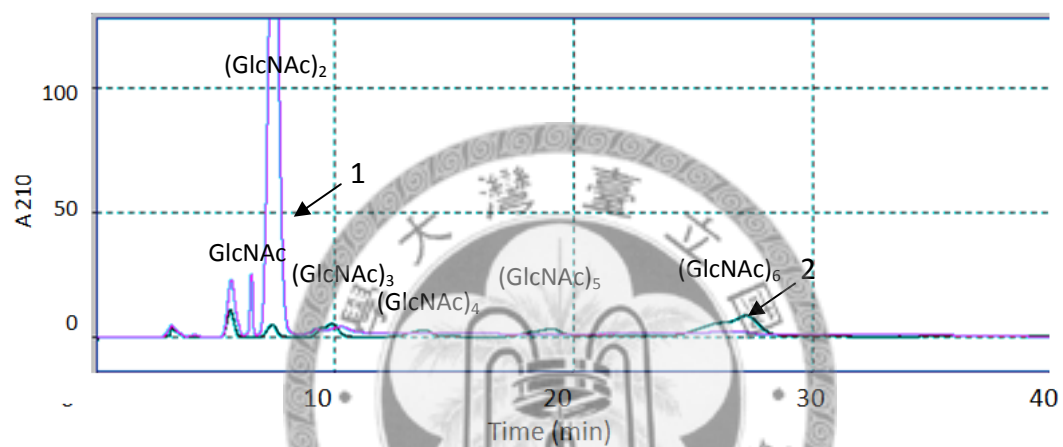


圖 3-26 幾丁質酶水解幾丁質產物之 HPLC 分析圖

Fig. 3-26 HPLC chromatograms of product from hydrolysis of colloidal chitin by chitinase

Colloidal chitin (0.5%) was incubated with purified chitinase (0.0865 U) in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 18 h.

1, hydrolysis product; 2, standard.

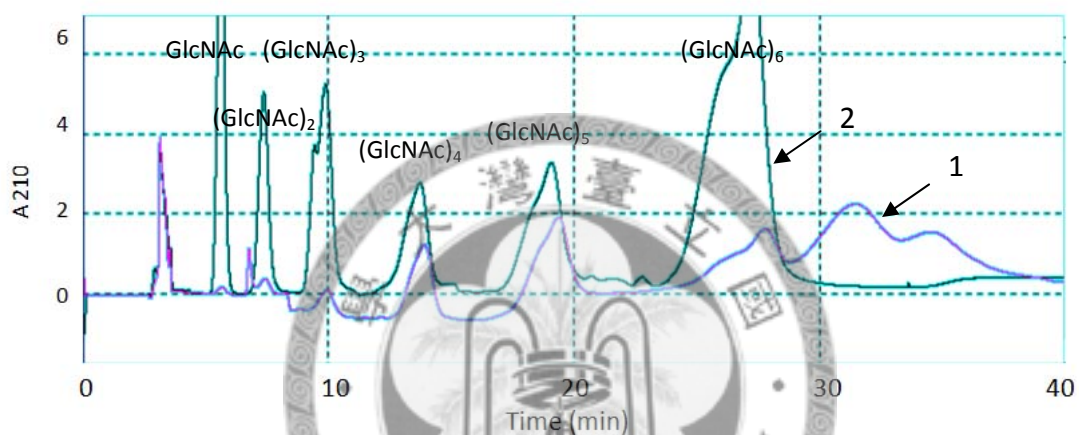


圖 3-27 幾丁質酶水解幾丁聚醣產物之 HPLC 分析圖

Fig. 3-27 HPLC chromatograms of product from hydrolysis of colloidal chitosan by chitinase

Colloidal chitosan (0.5%) was incubated with purified chitinase (0.086 U) in the acetate buffer (20 mM, pH 5) for 18 h, and the hydrolysis product went through acetylation and methanol-acetone precipitation.

1, hydrolysis product; 2, standard.

第 4 章 討論

本實驗可就幾個方面進行討論：

1. 菌株篩選方面

本實驗所篩選到的菌株經由 16S rDNA 之 BLAST 親緣樹狀圖比對後發現與之親緣最為接近。*Aeromonas caviae* 為一常見於淡水中之革藍氏陰性菌，可感染魚類引發表皮潰瘍，對人類而言多是腹瀉之案例。在菌落外觀上為邊緣整齊之圓形，中央凸起，表面光滑，顏色為淡黃色，和已知菌落外觀相似。自 1980 年代 *Aeromonas caviae* 在前人之研究中發現具有幾丁質酶活性以降，迄今發現其可生產四種幾丁質酶，分子量分別為 92, 82, 70 及 55 kDa，其中 92 kDa 者被命名為 Chi1，其基因與蛋白質結構皆被作了進一步之探討，並具有 exochitinase 之活性，可水解幾丁質產生 $(\text{GlcNAc})_{2-3}$ [43-44]。在鑑定菌株方面，除 16S rDNA 之外，可增加其他傳統菌種鑑定方法加以輔助，增加鑑定結果之可靠度。

2. 培養基探討方面

最佳化培養基之過程中，本實驗在培養基探討時利用幾丁質酶活性作為最佳化之依據，但在判讀 RSM 圖型選擇極值範圍時，發現 colloidal chitin 分別與 soybean flour 及 yeast extract 作圖時，其極值區域落在判讀範圍之內，而 soybean flour 及 yeast extract 之圖型之極值範圍則無法判讀。可能是因為 soybean flour 及 yeast extract 對本實驗之菌株皆為氮源，故在判斷此二因子之交互作用時其關係並不明顯。所以在選擇極值時主要參考 colloidal chitin 分別與 soybean flour 及 yeast extract 之圖型，並配合 SAS 軟體之預測表決定極值位置。

3. 幾丁質酶產物方面

本實驗在探討培養基之最佳化時，同時亦進行以複選培養基培養 *Aeromonas*

caviae No.2 之幾丁質酶純化之步驟。培養液在一系列步驟純化後，檢討活性表發現幾丁質酶回收主要損失於硫酸銨沈澱的步驟，約只回收 20% 左右，且重複許多次實驗皆是如此。推測可能是因為純化過程中去除了 *N*-Acetylglucosaminidase，此蛋白質在利用還原糖法測定幾丁質酶活性時，也會水解寡糖產生還原糖端，進而造成整體活性的增加，因此去除 *N*-Acetylglucosaminidase 可能是造成回收率大幅下降之原因。

複選培養基之培養液經蛋白質純化後發現 SDS-PAGE 上於 100 至 70 kDa 間，與 70 至 55 kDa 間各有兩條蛋白質訊號，而在活性染色上於 70 至 55 kDa 附近可看到兩條活性訊號。在已發表之 *Aeromonas caviae* 所分泌之幾丁質酶相關研究中，目前發現主要有四條（分子量分別為 92，82，70 及 55 kDa）幾丁質酶可在培養液體中被發現。對照本實驗所得到之初步結果，實在不能斷定本實驗純化得到之蛋白質之可能在已發表論文中之身分。

另外，在利用最佳化培養基培養 *Aeromonas caviae* No. 2 後，發現純化過後之蛋白質之組成和複選培養基有極大不同。純化過後之蛋白質在 SDS-PAGE 上於 40 至 100 kDa 之間分佈 9 個蛋白質訊號，但在活性染色上於 55-70 kDa 附近可看到兩條幾丁質酶之活性，而在 40 kDa 附近也有一條活性訊號。此可能代表著培養基之不同使此菌株生產之幾丁質酶比例上產生改變。而在活性染色上，複選培養基與最佳化培養基具有幾丁質酶活性之主要訊號皆出現在 55-70 kDa 附近。為避免因不同次實驗或者活性染色之 marker 不清楚所造成之誤判，未來實驗會將複選培養基與最佳化培養基純化之蛋白質放在同一張 SDS-PAGE 與活性染色上作對照，以判別蛋白質之組成之確實變化。

在蛋白質純化之過程中，另有一複選培養基與最佳化培養基之間之差別。兩者培養基在培養過後，都有一位於 35 kDa 附近之主要雜蛋白質，利用專一性純化之步驟可去除大部分。而在複選培養基之蛋白質純化中，再利用 S200 之膠體過濾可進一步去除之。但在最佳化培養基之純化方面，利用專一性純化步驟雖可再進

一步去除其他雜蛋白質，但再利用 S200 之膠體過濾後，卻無法去除位於 35 kDa 之蛋白質。且換成解析度更高之 S100 之後亦無明顯效果。利用膠體過濾之分子定量後，發現所選取之膠體過濾波峰約在 90 kDa 左右，但濃縮後跑膠卻出現分子量 35 kDa 之蛋白質，故推斷此蛋白質可能和其他部分在活性染色沒有出現訊號之蛋白質都具有和幾丁質酶結合，幫助幾丁質酶水解幾丁質，形成類似 cellulosome [56] 之結構。此外在前人之研究中，如 Kazushi 等人在 *Serratia marcescens* 2170 之培養液中發現有 chitin binding protein (21 kDa) 之存在，另在 Gustav 等人進一步研究中指出此蛋白質可藉由與幾丁質結合改變幾丁質之構形而增加幾丁質酶水解之效率，並且提出在其他可分解幾丁質之微生物中，此蛋白質基因之 homologues 也具有可與幾丁質結合之功能[57]。在對於 *Aeromonas caviae* 之 chitin binding protein 之相關功能與結構方面研究，不失為一研究之方向。

此外，因為本實驗在培養基探討時利用幾丁質酶活性作為最佳化之依據，但最佳化後之結果，SDS-PAGE 上發現蛋白質之訊號與複選培養基之蛋白質相比有比例上的不同，甚者出現許多原本並不存在蛋白質訊號，因此在最佳化之過程中並不能確定是對能生產長鏈寡醣之酵素作最佳化，且在利用最佳化後之培養基純化蛋白質之後，發現純化過程中之純化倍率由原先複選培養基之 51.59 變為 1.51，表示純化到的幾丁質酶變得比較不純，推測可能是因為最佳化後除了幾丁質酶之活性增加外，外另有許多蛋白質之產量也增加，此外在純化過程中也可以被本研究之純化步驟所純化。

4. 幾丁質酶水解產物方面

a. 水解幾丁質

本實驗一開始利用複選培養基培養 *Aeromonas caviae* No. 2 後，使用其培養液水解幾丁質之產物進行篩選，挑選可產生單醣以及 (GlcNAc)₄₋₅ 者做進一步之研究。在挑選水解之條件方面，本研究所選用之水解幾丁質之條件為酸性，在 pH 4

或 pH 5 之情況下反應。因在前人研究中，在酸性條件下幾丁質酶具有較高之轉糖活性[58][54]，在一開始不確定此蛋白菌株生產之幾丁質酶是透過何機制水解幾丁質生產長鏈寡糖的情況下，多方嘗試選擇可能產生長鏈寡糖之反應條件是必要的。

但在使用最佳化培養基培養之後，發現當中之蛋白質組成發生改變，因此便先確認此改變是否會讓其水解之產物也發生改變。實驗結果發現，粗酵素液之水解幾丁質之產物在 HPLC 上主要在 GlcNAc 與 (GlcNAc)₂ 之間，和複選培養基培養之粗酵素液之水解幾丁質產物有所不同，同時和預測之 GlcNAc 產物有所出入。因為在粗酵素液體中，含有 *N*-Acetyl glucosaminidase，此酵素可將長鏈寡糖或雙糖自非還原端水解為 GlcNAc[59]。而在 HPLC 之圖譜上卻無法和標準品 GlcNAc 對應，另外，也可確定不是 (GlcNAc)₂，因產物中另有波峰可和其標準品 (GlcNAc)₂ 對應，此水解產物是否有被作其他修飾而導致此實驗結果，需要做進一步之確認，如利用 TLC。而利用最佳化培養基之水解幾丁質於 HPLC 圖譜上沒有發現 (GlcNAc)₄₋₅ 之訊號，推測可能因為培養基中蛋白質之組成改變而造成水解產物比例的變化。

b. 水解幾丁聚糖

在 1980 年代後期，Masato 等人發現利用 *Bacillus* sp. No. 7-M 生產之 chitosanase 水解幾丁聚糖產生長鏈寡糖 (GlcN)₂₋₆ 之可行性[60]。Chitosanase (EC 3.2.1.99) 是一種可在微生物或植物中發現，可專一性的水解 chitosan，屬內切型 (endo-acting) 之酵素[61]。除利用 chitosanase 專一性水解 chitosan 外，利用 chitinase 水解 chitosan 產生長鏈寡糖也是研究方向之一。近期研究中，Audun 等人利用 *Serriatia marcescens* 之 chitinase B 水解 chitosan，發現可產生 (GlcN/GlcNAc)₂₋₂₀ 之產物，並進一步發現 chitosan 之乙醯化程度對產物組成之影響[62-63]。本研究所篩選到之菌株，利用複選培養基培養之 40-70% 硫酸銨分劃

之沈澱水解幾丁聚醣可得到 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆，而利用最佳化培養基培養後之培養液與純化後之蛋白質水解幾丁聚醣皆可得到 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆，甚至聚合度更高之產物。在產物之分析上，本實驗選用之 HPLC 分析管柱為親水性之 NH₂ 管柱，若要分析更高聚合度之寡醣者可以使用 size exclusion chromatography (如 Superdex 30) 配合分析系統進行分析，一方面可減少整體實驗之時間，另一方面甚而進一步做寡醣之純化[63]。

c. 幾丁質酶之水解機制

幾丁質酶水解幾丁質產生長鏈寡醣推測可能透過兩種機制，一是本身即為內切型之幾丁質酶，另一種可能為轉醣酶活性 (transglycosylation) 之存在。本篇研究分離之幾丁質酶是透過何種途徑水解幾丁質生成長鏈寡醣，則需要經過進一步確認。而在水解幾丁聚醣方面，本篇研究之幾丁質酶可水解幾丁聚醣產生 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆，其水解機制在最近之研究中發現和幾丁聚醣之未被去乙酰化之乙酰基有一定之關係[62]，本研究未來也可做進一步之探討。

本研究另也使用過 stirred cell 裝置，讓幾丁質酶水解幾丁質或幾丁聚醣之反應於裝置中進行，搭配 10 kDa 之濾膜期望能將尚未被切成更小分子之寡糖分離出來，惟效果不彰。本研究所建立之生產 GlcNAc 與 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆ 之條件與方法，可做進一步最適化反應條件、生產量之探討，另發展分離各聚合度寡醣之方法，期望此醣類產物能更進一步應用。

第 5 章 結論

1. 自釣蝦場利用複選培養基，篩選能在平板複選培養基上水解幾丁質形成透明環之菌株，並進一步培養，利用其培養液水解幾丁質後分析產物，發現一菌株之水解產物有除了常見之 GlcNAc 外，亦發現有 (GlcNAc)₄₋₅。經由 16S rDNA 之鑑定後，此菌株與 *Aeromonas caviae* 之親緣關係最為接近，故暫時命名為 *Aeromonas caviae* No. 2。
2. 探討此菌株的最佳培養條件，以複選培養基為基底，調整不同之 pH 值與溫度，獲得最佳培養 pH 為 6，溫度為 25°C。碳源與氮源方面，先測試最佳氮源發現此菌株利用有機氮源之效果較佳，考量成本與功能後選擇 soybean flour 與 yeast extract 作為考慮之因子，加上 colloidal chitin，以反應曲面法 (response surface methology, RSM) 之中心混成設計 (central composite design, CCD) 得到最佳酵素生產之培養基成分為 colloidal chitin 1.098%, soybean flour 0.735% 和 yeast extract 0.74%。
3. 以複選培養基培養之粗酵素液以硫酸銨分劃 (40-70%) 可分離幾丁質酶與 NAGase，再以幾丁質專一性吸附水解法分離幾丁質酶，最後以 Sephacryl 200 膠體過濾進一步純化，得到之樣品在 SDS-PAGE 上得到 4 個可能和分解幾丁質相關的蛋白質，其中 2 個在幾丁質活性染色膠體電泳中具有幾丁質酶活性。
4. 以最佳化培養基培養之粗酵素液純化過後之蛋白質在 SDS-PAGE 上於 100 至 40 kDa 之間分佈 9 個蛋白質訊號，但在活性染色上於 70-55 kDa 附近可看到兩條幾丁質酶之活性，而在 40 kDa 附近也有一條活性訊號。
5. 利用複選培養基培養並純化過後之幾丁質酶可水解幾丁聚醣並產生 (GlcN/GlcNAc)₄₋₆，而利用最佳化培養基之培養液水解幾丁質後，在 HPLC 圖譜上於 (GlcNAc) 與 (GlcNAc)₂ 之標準品間出現一隨時間增加之訊號，而水解幾丁聚醣部分，發現產物具有 (GlcNAc)₄₋₆，甚至更高聚合度之寡醣。另在純化後之蛋白質水解產物方面，利用純化後之蛋白質水解幾丁質產生大量之 (GlcNAc)₂ 與少

量 GlcNAc 和 $(\text{GlcNAc})_3$ ，另水解幾丁聚醣之產物亦出現 $(\text{GlcNAc})_{4-6}$ 以及可能為更高聚合度之寡醣。



第 6 章 參考資料

1. Khor, E. and L.Y. Lim, *Implantable applications of chitin and chitosan*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2339-49.
2. C.K.S. Pillala, W.P.a.C.P.S., *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation* Progress in Polymer Science, 2009. **34**(7): p. 641-678.
3. Yabuki, M., Uchiyama, A, Suzuki, K, Ando, A, Fujii, T, *Purification and properties of chitosanase from Bacillus circulans MH-K1*. J Gen Appl Microbiol, 1988. **34**: p. 255-270.
4. Minke, R. and J. Blackwell, *The structure of alpha-chitin*. J Mol Biol, 1978. **120**(2): p. 167-81.
5. Khor, E., *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*. Elsevier Science, 2001.
6. Kurita, K., *Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans*. Mar Biotechnol (NY), 2006. **8**(3): p. 203-26.
7. Blackwell, J., Gardner, KH, Kolpak, FJ, Minke, R, Classey, WB, *Refinement of cellulose and chitin structures*. ACS Symp Ser, 1980. **141**: p. 315-334.
8. Nagao, S.H.a.N., *An improved method for the preparation of colloidal chitin by using methanesulfonic acid*. Agric. Biol. Chem. , 1988. **52**(8): p. 2111-2112.
9. Domard, A., Rinaudo, M, *Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan*. Int J Biol Macromol, 1983. **5**: p. 49-52.
10. RA., M., *Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives*. Cell Mol Life Sci., 1997. **53**: p. 131-140.
11. Nishimura, K., et al., *Immunological activity of chitin and its derivatives*. Vaccine, 1984. **2**(1): p. 93-9.
12. Gupta RK, S.G., *Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects*. Vaccine, 1995. **13**(14): p. 1263-76.
13. Nishimura S, N.N., Tokura S, Nishimura K, Azuma I., *Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl)chitins*. Carbohydr Res., 1986. **146**(2): p. 251-8.
14. Datta, P.K., P.S. Basu, and T.K. Datta, *Isolation and characterization of Vicia faba lectin affinity purified on chitin column*. Prep Biochem, 1984. **14**(4): p. 373-87.
15. Hirano, S., Kondo, Y, Fujii, K, *Preparation of acetylation derivatives of modified chito-oligosaccharides by the depolymerisation of partially N-acetylated chitosan with nitrous acid*. Carbohydr Res, 1985. **144**: p. 338-341.
16. Sashiwa, H., Saimoto, H, Shigemasa, Y, Tokura, S, *N-Acetyl group distribution in partially deacetylated chitins prepared under homogeneous conditions*. Carbohydr Res 1993. **242**: p. 167-172.
17. S.A. Barker, A.B.F., M. Stacey and J.M. Webber, *Amino-sugars and related*

- compounds. Part IV. Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin. *Journal of the Chemical Society*, 1958. **1958**: p. 2218-2227.
18. Cartier, A.D.a.N., *Glucosamine oligomers: 1. Preparation and characterization*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1989. **11**(5): p. 297-302.
 19. Cishan Li, W.H., and Lai-Xi Wang, *Chemo-enzymatic synthesis of N-linked neoglycoproteins through a chitinase-catalyzed transglycosylation*. *Bioorg Med Chem.*, 2008. **16**(18): p. 8366-8372.
 20. Usui, T., et al., *Transglycosylation reaction of a chitinase purified from Nocardia orientalis*. *Biochim Biophys Acta*, 1987. **923**(2): p. 302-9.
 21. Aronson, N.N., Jr., et al., *Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of Serratia marcescens chitinase A enhances transglycosylation*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006. **70**(1): p. 243-51.
 22. Fukamizo, T., et al., *Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen Coccidioides immitis*. *Biochemistry*, 2001. **40**(8): p. 2448-54.
 23. Suginta W, V.A., Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H., *Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from Vibrio carchariae, as revealed by HPLC-MS*. *FEBS J.*, 2005. **272**(13): p. 3376-86.
 24. Sasaki, C., et al., *Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes*. *J Biochem*, 2002. **131**(4): p. 557-64.
 25. Suzuki, K., et al., *Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose*. *Carbohydr Res*, 1986. **151**: p. 403-8.
 26. Kobayashi, M., et al., *Effect of N-acetylchitohexaose against Candida albicans infection of tumor-bearing mice*. *Microbiol Immunol*, 1990. **34**(5): p. 413-26.
 27. Tokoro, A., et al., *Protective effect of N-acetyl chitohexaose on Listeria monocytogenes infection in mice*. *Microbiol Immunol*, 1989. **33**(4): p. 357-67.
 28. Shikhman, A.R., et al., *Differential metabolic effects of glucosamine and N-acetylglucosamine in human articular chondrocytes*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009. **17**(8): p. 1022-8.
 29. Shikhman, A.R., et al., *Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(1): p. 89-94.
 30. Deshpande, S.A.S.a.M.V., *Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research* *World J Microbiol. Biotechnol*, 1993. **9**(4): p. 468-475.
 31. Neetu Dahiya , R.T.a.G.S.H., *Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review*. *Appl Microbiol. Biotechnol* 2006. **71**: p. 773-782.
 32. Roberts, W.K.S., C.P., *Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity.* *Journal of General Microbiology*, 1988. **134**: p. 169-176.
 33. Henrissat, B. and A. Bairoch, *New families in the classification of glycosyl*

- hydrolases based on amino acid sequence similarities*. Biochem J, 1993. **293 (Pt 3)**: p. 781-8.
34. Henrissat, B. and G.J. Davies, *Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics*. Plant Physiol, 2000. **124(4)**: p. 1515-9.
 35. Aronson N N Jr., et al., *Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of Serratia marcescens chitinase A*. Biochem J, 2003. **376(Pt 1)**: p. 87-95.
 36. Bhattacharya, D., A. Nagpure, and R.K. Gupta, *Bacterial chitinases: properties and potential*. Crit Rev Biotechnol, 2007. **27(1)**: p. 21-8.
 37. N. Dahiya, R.T., R. P. Tiwari and G. S. Hoondal *Production of an Antifungal Chitinase from Enterobacter sp. NRG4 and its Application in Protoplast Production*. World J Microbiol Biotechnol, 2005. **21**: p. 1611–1616.
 38. Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., & Shin, T. , *Purification and Characterization of a Novel Type of Chitinase from Vibrio alginolyticus TK-22*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992. **56**: p. 368-369.
 39. Usui T, H.Y., Nanjo F, Sakai K, Ishido Y., *Transglycosylation reaction of a chitinase purified from Nocardia orientalis*. Biochim Biophys Acta., 1987. **923(2)**: p. 302-9.
 40. Tanaka, H., Ogasawara, N., Nakajima, T. & Tamari, K., *Cell walls of Piricularia oryzae. I. Selective enzymolysis of Piricularia oryzae walls by wall-lytic enzymes of Bacillus circulans WL 12*. Journal of General and Applied Microbiology, 1970. **16**: p. 39-60.
 41. Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I., *The Role of Chitinase of Serratia marcescens in Biocontrol of Sclerotium rolfisii*. Phytopathology, 1988. **78**: p. 84-88.
 42. E. S. Mendonsa, P. H. Vartak, J. U. Rao and M. V. Deshpande, *An enzyme from Myrothecium verrucaria that degrades insect cuticles for biocontrol of Aedes aegypti mosquito*. Biotechnol Lett, 1996. **18**: p. 373-376.
 43. Li, Q., X. Xiao, and F. Wang, *Screening of genes involved in chitinase production in Aeromonas caviae CB101 via transposon mutagenesis*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **102(3)**: p. 640-649.
 44. Wang, F.P., et al., *The C-terminal module of Chi1 from Aeromonas caviae CB101 has a function in substrate binding and hydrolysis*. Proteins: Structure, Function, and Genetics, 2003. **53(4)**: p. 908-916.
 45. Lan, X., et al., *Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium Aeromonas hydrophila strain SUWA-9*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70(10)**: p. 2437-42.
 46. Ueda M, F.A., Kawaguchi T, Arai M., *Purification and some properties of six chitinases from Aeromonas sp. no. 10S-24*. Biosci Biotechnol Biochem, 1995.

- 59(11):** p. 2162-4.
47. Sutrisno, A., et al., *Expression of a gene encoding chitinase (pCA 8 ORF) from Aeromonas sp. no. 10S-24 in Escherichia coli and enzyme characterization.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91(6):** p. 599-602.
 48. Taiji Imoto and Kazuyoshi Yagishita, *A Simple activity measurement of lysozyme.* Agr. Biol. Chem., 1988. **35:** p. 1154-1156.
 49. Trudel, J. and A. Asselin, *Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis.* Anal Biochem, 1989. **178(2):** p. 362-6.
 50. Molano, J., et al., *An endochitinase from wheat germ. Activity on nascent and preformed chitin.* J Biol Chem, 1979. **254(11):** p. 4901-7.
 51. S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Selective N-acylation of chitosan.* Carbohydrate Research, 1976. **47:** p. 315-320.
 52. Muraki E, Yaku F., Kojima H., *Preparation and crystallization of d-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8.* Carbohydr Res., 1993. **239(227-237).**
 53. Box G.E., Hunter W., Hunter J.S., *Statistics for experimenters.* John Wiley and Sons, 1978.
 54. Monreal, J. and E.T. Reese, *The chitinase of Serratia marcescens.* Can J Microbiol, 1969. **15(7):** p. 689-96.
 55. Neugebauer, E., Gamache, B., Dery, C. V. and Brzezinski, R., *Chitinolytic properties of Streptomyces lividans.* Arch Microbiol., 1991. **156:** p. 192-197.
 56. Fontes, C.M. and H.J. Gilbert, *Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates.* Annu Rev Biochem, 2010. **79:** p. 655-81.
 57. Vaaje-Kolstad, G., et al., *The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from Serratia marcescens is essential for chitin degradation.* J Biol Chem, 2005. **280(31):** p. 28492-7.
 58. Usui, T., H. Matsui, and K. Isobe, *Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate.* Carbohydr Res, 1990. **203(1):** p. 65-77.
 59. Cohen-Kupiec, R. and I. Chet, *The molecular biology of chitin digestion.* Current Opinion in Biotechnology, 1998. **9(3):** p. 270-277.
 60. Izume M., Ohtakara A., *Preparation of D-Glucosamine Oligosaccharides by the Enzymatic Hydrolysis of Chitosan.* Agricultural and Biological Chemistry, 1987. **51:** p. 1189-1911.
 61. Ohtakara, A. and M. Mitsutomi, *Analysis of chitoooligosaccharides and reduced chitoooligosaccharides by high-performance liquid chromatography,* in *Methods in Enzymology*, S.T.K. Willis A. Wood, Editor. 1988, Academic Press. p. 453-457.
 62. Sorbotten, A., et al., *Degradation of chitosans with chitinase B from Serratia*

marcescens. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. FEBS J, 2005. **272**(2): p. 538-49.

63. Sikorski, P., et al., *Development and application of a model for chitosan hydrolysis by a family 18 chitinase*. Biopolymers, 2005. **77**(5): p. 273-85.

