

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 台灣本土性被包毛黴幾丁質分解酵素之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-041-004-

執行期間：93年08月01日至95年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：邱淑媛

計畫參與人員：江建民 陳金村

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台灣本土性被包毛黴幾丁質分解酵素之研究

Studies on chitinases of *Mortierella* sp. isolated in Taiwan

計畫編號：NSC93-2313-B-041-004

執行期限：92年08月01日至94年07月31日

主持人：邱淑媛 執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

## 一、中英文摘要

本研究選擇具有分解幾丁質能力的被包毛黴 (*Mortierella*) 為材料，探討幾丁質分解酵素分泌與培養時間的關係及幾丁質分解酶的性質，包括酵素的受質專一性、產物種類、酵素熱安定性，分子大小、pI 值等生化特性，建立 *Mortierella* 幾丁質酶的基本資料。結果顯示 *Mortierella* 之細胞外幾丁質酶必須於培養後期膠態幾丁質基質無殘存時才可釋放於培養液中。濃度極低，培養液需經 400 倍以上的濃縮才可測得活性。無法用硫酸銨沉澱有效劃分。酵素之 pI 值介於 8.15~9.30 之間，酵素最適反應 pH 值介於 3~5 之間，與菌體生長 pH 值符合。酵素之耐熱性大於菌體可生長之溫度，可分解幾丁質但無法分解幾丁聚醣(chitosan)。分解幾丁質產生 DP 1~4 之寡糖但以 DP 1~3 為主。研究結果顯示 *Mortierella* sp. L9-22 菌株於膠態幾丁質平板上產生邊界不明顯的透明環，是因為其幾丁質酶活性弱，而非因為其酵素為內切酶。

## Abstract

The main purpose of this study was to investigate the properties of chitinases generated by *Mortierella* sp. L9-22 and the parameters associated with its cultivation. The results indicated that extracellular

chitinase was released into the culture broth only after the colloidal chitin was completely degraded. The culture supernatant was concentrated 400x with semi-permeable membrane to form clear zone on colloidal chitin plate. Two protein bands with chitinase activity were observed on IEF gel, with pI ranged from 8.15 to 9.30. The optimal pH of the chitinases ranged from 3 to 5. The enzyme was thermal stable (95% of the activity remained after incubation at 45°C for 12h). The enzymes were unable to react with chitosan. The main product of the chitin hydrolysis catalyzed by the enzyme was chito-oligosaccharides with degrees of polymerization from 1 to 4.

**Keywords:** *Mortierella*, chitinase

## 二、緣由與目的

幾丁質是地球上豐富性僅次於纖維素的生物分子，廣泛存在於蝦、蟹、昆蟲外殼；水族類如魷魚的內骨骼與真菌的細胞壁中。幾丁質的用途廣泛，例如：醫藥敷材、人工皮膚、手術縫線、酵素固定化擔體等。幾丁寡醣是極具發展潛力的幾丁質產品，尤以六醣具有抗菌活性，動物試驗中可提高動物的抵抗力、並具有增強免疫活性抑制腫瘤的功用。

目前的文獻指出利用微生物（細菌）幾丁質酶分解幾丁質，所生成的幾丁寡糖大多是分子量小的單糖至三糖。由於微生物幾丁質酶生產菌種的篩選大多以透明環直徑為指標，致使獲得菌株均以細胞生長為目的製造幾丁質酶，產生小分子糖類是合理的結果。

目前並未發現有產生六糖的幾丁質外切酶，因此較高碳數的幾丁寡糖產物是內切酶作用的結果。在幾丁質酶是構成性酵素（而非基質利用性酵素）的微生物中，外切酶與內切酶的比值可能較高。

絲狀真菌被包毛黴 (*Mortierella* sp.) 與以研究很多的 *Mucor* 同屬於接合菌綱，本菌屬諸多菌株確定具有分解幾丁質的能力，幾丁質酶的量又與培養條件有關，加上適合於以液態深層方式大量培養，因此擬以 *Mortierella* 為對象，探討幾丁質分解酵素的特性。

### 三、結果與討論

#### (1) 選用細胞外酵素為實驗對象

將搖瓶培養 28 天或醱酵槽培養 16 天之培養液以分子量 10,000 之半透膜進行限外過濾，濃縮 400 倍後，點於適當 pH 值之膠態幾丁質平板上，於 25°C 培養 3 天，肉眼可見透明環逐漸生成。菌體添加 0.02 M citrate buffer (pH 4.0) 緩衝溶液研磨，離心去除細胞並通過 0.22 $\mu$ m 濾膜之濾液（代表細胞內酵素），以限外過濾濃縮至菌體重量 5%（10 g 濕重菌體濃縮至 0.2 mL）之細胞內酵素，亦可於膠態幾丁質平板上生成透明環，惟電泳分析顯示蛋白質圖譜非常複雜，故本研究選用細胞外酵素為實驗的對象。

#### (2) L9-22 菌株細胞外酵素之分泌時間與培養參數 pH 值及溶氧值之關係

本研究使用 *Mortierella* sp. 分離株 L9-22，因其於膠態幾丁質平板上生成之透明環邊界不清楚，不確定是否因為其外切酶活性較弱之故。L9-22 菌株培養於含 0.3% 膠態幾丁質為唯一碳源之 HD 培養基中，於 25°C 培養。培養若於搖瓶中進行，需時約 21~28 日，因此改於生物反應器中進行。培養過程中 pH 值及溶氧值之變化示如圖一。由培養外觀判定，膠態幾丁質於第 8 天分解完。培養之第 2, 4, 5, 7, 9, 12 日分別取出培養液（不含菌體）進行濃縮，測定幾丁質分解酵素活性，結果顯示只有第 12 天取出之培養液具有幾丁質酶活性。培養液之溶氧值於第 12 天達到 100%，培養基之 pH 值亦於第 12 天起顯著提高。由溶氧值達飽和可判斷菌體已停止生長，其 pH 值不斷提高則可能意謂 L9-22 菌體進行自分解，或幾丁質基質中的 N-乙醯基葡萄糖胺單體進入脫胺基（deamination）反應，造成 pH 值顯著提升。pH 值提升的同時併有幾丁質酶的脫附作用，因此於培養液中得以測出幾丁質酶活性。

#### (3) L9-22 細胞外幾丁質酶之最適反應 pH 值

以 pH 3~9 之緩衝溶液配製膠態幾丁質平板，測定 L9-22 幾丁質酶的最適反應 pH 值，結果顯示 pH 3~5 為透明環生成最快之 pH 值，且三個 pH 值下透明環直徑相當。pH 6 時透明環生成明顯較慢，pH 7 以上，在平板污染前無法觀察到透明環生成。

#### (4) L9-22 細胞外幾丁質酶因 SDS 處理而喪失活性

L9-22 幾丁質分解酵素以膠體濃度高達 15% 之 SDS-PAGE 進行電泳，除在泳動前緣之外，無特定分子量之顯著色帶出

現，但在分子量 16 kDa 附近有一類似拖尾之染色區域（圖二），由於無固定分子量，推測為未分解完之幾丁聚糖，但其中可能亦混有幾丁質酶。雖經尿素去除 SDS 的處理，在活性染色中不論以 Caucoflour 染色或以 ethylene glycol chitin 混入膠片中配合 Trypan blue 染色，或直接將尿素處理過的膠片貼附於膠態幾丁質平板上，均無法辨認酵素所在位置。取酵素直接與 SDS 混和，點於膠態幾丁質平板進行活性測定，得知 L9-22 幾丁質酶在 SDS 處理之後完全喪失活性。

#### (5) L9-22 細胞外幾丁質酶之原態電泳

由於以常用的 pH 6.8 及 8.3 之 Tris-glycine 系統進行原態電泳，不論電泳進行的方向是正常（負極到正極）或相反（正極到負極），雖有蛋白質色帶出現，但均無法偵測到任何活性帶與蛋白質帶相符合，可能意謂幾丁質酶位於電場中泳動率極低。改以 pH 4.0 之緩衝溶液進行電泳，膠體濃度為 5%，在正常電流方向下可得較多蛋白質色帶，但均無幾丁質酶活性。相對地，在電流方向相反時僅有二個蛋白質色帶出現，在活性染色上則顯示該二色帶均具幾丁質酶活性（圖三）。由於使用膠體濃度為 5%，加上電泳操作時間 2 小時，活性帶出現於 pH 4.0 之電場方向相反時，且移動位置極小，而活性帶卻不出現在 pH 8.3 之電泳系統中，顯示幾丁質酶 pI 值應接近 8.3。其 pI 值與其他主要細胞外蛋白質相較偏高（泳動率最高）。

#### (6) L9-22 細胞外幾丁質酶之等電聚焦電泳 (Isoelectrofocusing, IEF)

IEF 結果與原態電泳分析結果相符，幾丁質分解酵素在 IEF 中活性帶出現於 2 個 pI 值，介於 pH 8.15~9.30 之間（圖四），

幾丁質酶之著色帶顏色很淺，並不是細胞外之主要蛋白質。

#### (7) L9-22 細胞外幾丁質酶之硫酸銨劃分

L9-22 酵素活性在硫酸銨飽和度高達 100% 時，只能收集到 42.5% 的酵素活性。至於在可沉澱的部分，則以 20~80% 區間可收集到大部分的活性（表一）。

#### (8) L9-22 細胞外幾丁質酶之產物分析

L9-22 細胞外酵素無法分解幾丁聚糖，但可分解幾丁質。以膠態幾丁質為受質，產物 DP 為 1~4 且以 1~3 佔大部分（圖五），計算其產物比例，DP 1 = 43.8%，DP 2 = 18.7%，DP 3 = 25.0%，DP 4 = 12.5%。

#### (9) L9-22 細胞外幾丁質酶之熱安定性

雖然該菌株之培養溫度為 20~24°C，且高於 33°C 菌株停止生長，但幾丁質分解酵素於 37°C 及 45°C 作用 12 小時仍保留活性，於膠態幾丁質平板上形成透明環（圖六）。以 4-methylumbelliferyl-N,N'-diacetylchitobioside 及 4-methylumbelliferyl-N,N',N''-triacetylchitotrioside 為基質計算其活性，酵素在 45°C 處理 12 小時後活性保留 95.7%。

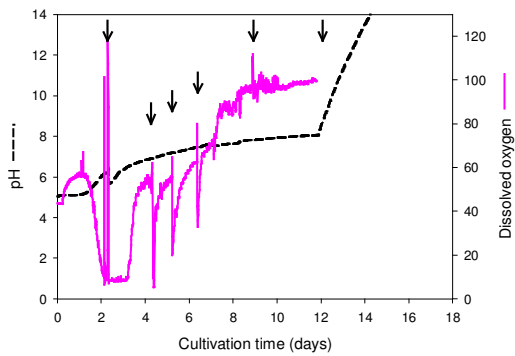
## 四、計劃成果自評

本研究之對象 *Mortierella* 菌屬在含有幾丁質為唯一碳源之液態培養基中培養，有細胞外幾丁質酶分泌，但酵素濃度極低。酵素雖對熱安定，但對介面活性劑 SDS 並不安定。較特別的是其高 pI 值。雖然在本研究中限於其培養緩慢且酵素濃度低，未及取得足夠酵素進行最適純化程序之探討，然本研究亦確定其產物並不含有經濟價值較高之 DP 5 以上之寡糖，不具經濟潛力。惟後人如有意於深入進行酵素

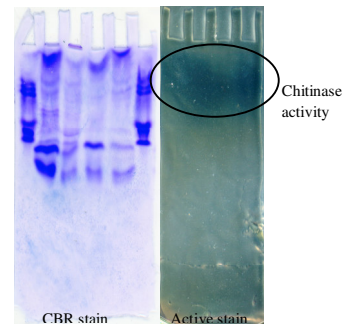
之純化，應可直接利用其高 pI 值的特性嘗試以蛋白質沉澱的方式提高純化的效率。

## 五、參考文獻

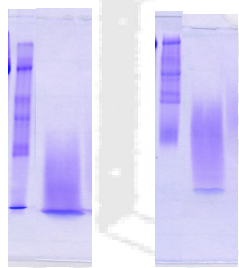
- Chang, K L. B., J. Lee and W. R. Fu. (2000). HPLC analysis of N-acetyl-chitooligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *J. Food Drug Anal.*, **8**: 75-83.
- Howard, M. B., N. A. Ekborg, R. M. Weiner and S. W. Hutcheson. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol.*, **30**: 627-635.
- Huang, J. H., C. J. Chen and Y. C. Su. (1996). Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. *J. Ind. Microbiol.*, **17**: 89-95.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for detection of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**: 426-428.
- No, H. K. and S. P. Meyers. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **4**(2): 27-52.
- Rast, D. M., D. Baumgartner, C. Mayer and G. O. Hollenstein. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*, **64**: 339-366.
- Shimahara, K. and Y. Takiguchi. (1988). Preparation of crustacean chitin. In: *Methods in Enzymology*, Vol 161, pp.417-423, Academic Press, New York.
- Wang, S. Y., A. L. Moyne, G. Thottappilly, S. J. Wu, R. D. Locy and N. K. Singh. (2001). Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**: 492-498.



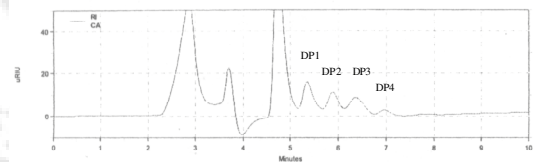
圖一 於生物反應器中 L9-22 菌株之培養時間與培養參數 pH, 溶氧值之關係



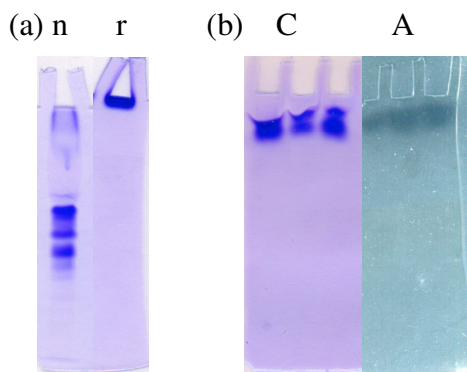
圖四 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之等電聚焦電泳檢測及活性測定



圖二 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之 SDS 電泳檢測

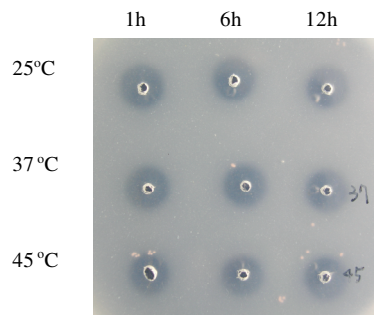


圖五 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之幾丁質及幾丁聚醣分解產物之鑑定



圖三 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之原態電泳檢測及活性測定(pH 4.0)

(a) 電流方向負極到正極(n)及電流正極到負極(r). (b) 蛋白質染色(C)與活性染色(A)



圖六 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之熱安定性

表一 L9-22 菌株濃縮細胞外酵素之硫酸銨  
劃分

Conc. of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Enzyme units in ppt	Percentage of Activity
Initial	(235.2)	-
20%	3.2	3.2%
40%	34.2	34.2%
60%	19.8	19.8%
80%	26.6	26.6%
100%	16.2	16.2%

