

幾丁質分解菌的分離與幾丁質酵素的研究

食品科學系 林世斌



幾丁質，與纖維素同為地球上豐富但尚未充分利用的物藏之一，而其蘊藏量僅次於纖維素。纖維素乃葡萄糖分子所組成的聚合物，可藉由微生物的纖維素酵素分解產生葡萄糖分子，進而利用微生物發酵產生可利用食品及化學工業的有機代謝物，如酒精，醋酸，丙酮等。類似纖維素，幾丁質乃以 1000-3000 個 N-D-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine) 單元組成之直鏈狀聚合物。其分布十分廣泛，諸如水生甲殼類動物（蝦，蟹殼），昆蟲，乃至於真菌的細胞壁，皆有豐富的

含量。幾丁質相關物質具組織相容性 (histocompatibility)，毒性低，且具生物活性等特性，已被廣泛地運用到食品加工（香味，防腐，黏稠劑），保健食品（增強免疫能力，防止老化，降低膽固醇），醫學（抗癌，人工皮膚，外科手術縫合線，抗凝血劑），生化工業（化妝品，洗髮劑，保濕劑，人造纖維），環境處理（淨水劑），農業（生物性農藥，飼料）等不同的領域，且多已證實有極佳的效果。

圖一、篩菌樣本採樣處：枯葉（左上）、腐木（左下）、苗圃表土（右上）、池水（右下）

幾丁質相關製品中以幾丁寡糖及幾丁聚寡糖最具保健食品及醫藥上的價值。而其中以六醣到八醣，最具機能性，因而最為重要。幾丁六醣在促進免疫功能及抗腫瘤上的效果上最為顯著。N-乙醯幾丁寡糖及幾丁寡糖的製備概由以下兩種方法製得(1)化學法製備(2)酵素法製備。目前則多以前者為主。化學法製備的方法多以濃鹽酸在適度的溫度下將幾丁質或幾丁聚醣，利用批次反應槽(batch tank reaction)解離成單至七醣之寡糖，再經適當的管柱，利用分子大小的差異分離，以取得適當的產物。酵素法則利用幾丁質酵素(chitinase)及幾丁聚醣酵素(chitosanase)分別水解幾丁質及幾丁聚醣而生成幾丁寡糖及幾丁聚寡糖。酵素有高度專一性，操作簡便，低污染，且製成品質穩定等優點；而化學法則不容易控制產品的品質及一貫性或再現性，尤其為人所詬病的是可能會產生有毒副產物。此外，酵素更可靈活地配合過濾膜(例如超過濾膜)的使用，分離適當產物，並設計成連續反應槽(continuous stir tank reaction)，進一步減少酵素，人力，時間等的浪費。然而酵素法在工業上的使用則經常面臨酵素價格昂貴而導致成本過高的缺點。因此，如何降低酵素成本，乃是以酵素法製備幾丁寡糖及幾丁聚寡糖所面臨的重要問題。幾丁質酵素除了可以產生幾丁質寡糖外，也被證實可用於植物黴菌病害的防治，更可以運用於廢棄物處理。畢竟幾丁質相關廢棄物佔全球垃圾總量乃僅次於纖維素。因此，在環保的觀點上，幾丁質酵素亦頗具潛力。目前已有多種能產生幾丁質酵素的細菌被篩選出來，如 *Serratia marcescens*, *Streptomyces sp.*, *Aeromonas sp.*, *Cellulomonas flavigena NTOU 1*, *Vibrio harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa K-187*，且也有多種細菌性幾丁質酵素被純化出來。但是到目前為止，具有產生生理機能的幾丁質寡糖(介

於6到10個乙醯葡萄糖胺分子)專一性的幾丁質相關酵素尚未被發現。除此之外，具高活性及穩定性的幾丁質酵素亦極具開發的價值。微生物的多樣性及分解聚合物的能力，提供了食品及化學工業無限的商機，更成為生物科技極重要的磐石。微生物在先進國家中已被視為國寶，許多國家甚至立法保護本國的微生物，以避免本土微生物流出境外，成為他國的生財工具。台灣氣候極具多樣性，因此孕育了極具多樣性的微生物，而宜蘭地處溫和多溼，極適合微生物生長，因此本實驗室亦嘗試篩選幾丁質分解菌，希望能從中得到較具商業潛力的幾丁質酵素。

幾丁質分解菌的篩選

在宜蘭技術學院4種不同環境下採樣(枯葉、腐木、苗圃表土、池水)(圖一)，取樣本2g，利用聚積培養，加入50 mL含0.5%的膠體幾丁質溶液，在室溫下震盪培養5天。取0.1 mL懸浮液做連續稀釋平板塗抹於幾丁質培養平板。經37°C培養72小時，幾丁質分解菌可在平板上形成清晰透明環帶(圖二)。將較具分解力(形成較大透明環帶者)之菌單離培養於幾丁質酵素誘發培養液，觀察目標菌分解幾丁質的行為(圖三)，做進一步的篩選、單離及純種培養(圖四)。篩得之菌株經革蘭氏染色，利用光學顯微鏡做初步菌形的觀察(圖五)。

幾丁質粗酵素最適 pH 之測定

最適 pH 之測定乃利用幾丁質酵素擴散測試方法測定之。試驗中利用不同 pH 值之 50 mM phosphate buffer (pH3,4,5,6,...,10)調配1%膠體幾丁質平板，製成厚度相同但 pH 不同之數個平板。在平板上挖出孔徑為 3mm 的均勻小孔，分別滴入 20 μ l 不同菌株之誘發粗酵素液樣本(72小時)，在 37°C 下反應3天後，測量透明環之大小，決定測酵素活性之最適 pH (圖六)。

圖二、幾丁質分解菌在幾丁質培養基上形成之透明環

圖三、不同的幾丁質分解菌在幾丁質液體培養基中分解的狀態

後記

在篩菌的過程中，發現本校土壤幾丁質分解

菌除種類繁多外，分解力亦極為可觀。相信除了幾丁質分解菌以外，本縣還有難以數計的土生菌種可供篩選，包括蛋白質酵素，纖維素酵素，脂類分解酵素等聚合物酵素的生成菌。這些菌除了可用在食品及化學工業外，更具環保上的價值，如廚餘的分解除臭即為一例。但實驗過程繁雜耗時，亟須投入人力，希望未來能有更多的有心之士能加入這個行列。

圖五、革蘭氏染色及顯微鏡鏡檢

圖四、幾丁質分解菌的純種培養

圖六、幾丁質酵素液在幾丁質平板上形成之透明環

動物細胞培養應用 ~ 從牛乳蛋白單株抗體製備研發羊乳摻假之檢驗試劑

 應用動物系 曹博宏

一、前言

近年來動物細胞工業發展，可謂一日千里，進展快速。由早期之病毒疫苗生產，逐漸擴展至利用單株抗體製備檢驗試劑，此乃為目前主要發展方向之一。今日擬就利用融合瘤技術製造單源抗體為例，介紹本研究室近日所製備之牛乳蛋白單源抗體及其未來應用發展方向。

羊乳在台灣被視為是養生食品，而其售價遠比牛乳貴很多，許多不肖商人為了圖利，可能以牛乳摻於羊乳中販賣，而少數生產兼經營

的個體養羊戶，當產量波動不足以供應訂戶時，也有可能添加牛乳應急。因此，如何確保市售羊乳之品質實值得留意。

二、羊乳中添加牛乳之檢出

日前衛生署全面清查市售各類羊乳製品，結果檢出其中有相當高比例含有牛乳成分。衛生署所採用之檢驗方法為 CNS 14117 N6304 之乳品檢驗法。該法乃利用尿素電泳法檢測，其中之操作過程需分離酪蛋白，步驟繁瑣、耗時且檢驗成本較高。因此，本研究室著手研發較簡易之改良法，利用迷你 SDS-凝膠電

泳來檢測羊乳中攙入牛乳之含量，以期簡化檢測品管之流程。本法不僅將前處理過程大為縮減，且亦將 CNS 中原用之電泳部分予以改良，可快速準確檢測出羊乳中牛乳之添加量，其中若以 coomassie blue 染色法可檢出 2% 牛乳含量，而以銀染色法則靈敏度更可達 1% (如圖 1)。

三、以融合瘤技術製備牛乳蛋白單株抗體

目前本系師生更利用融合瘤技術製備出一種牛乳蛋白單株抗體(如圖 2)。利用此一細胞株所產生之抗體，可開發出更簡易、快速且準確之改良檢測法。根據我們檢測的結果証實，利用此單源抗體以 ELISA 檢測羊乳中含牛乳的量，可有效偵測到 0.2% 以上之牛乳摻假量(如圖 3)。

圖 1. 脫脂羊乳依比例分別攙入 0.5, 1, 2, 5, 10, 20% 脫脂牛乳之凝膠電泳染色。

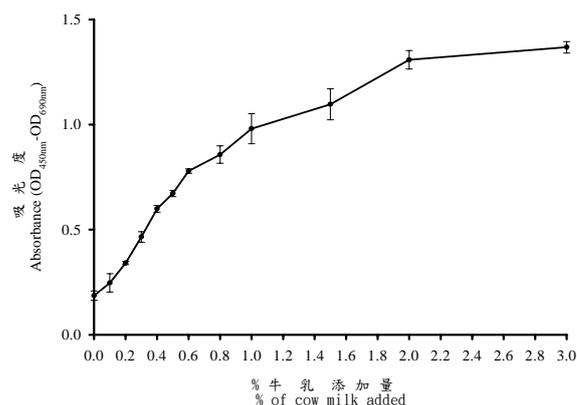


圖 2. 牛、羊乳蛋白凝膠電泳轉漬後以 16A5 單源抗體免疫呈色。

圖 3. 羊乳中含牛乳之酵素免疫分析檢測。

