



RRPD91080049 (9 .P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫 以不報口

產氣英膜桿菌幾丁質酶的純化與性質的研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91-2313-B-019-023

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣海洋大學食品科學系暨研究所

計畫主持人：陳幸臣

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 9 月 23 日

摘要

本研究係自人類糞便中分離出能水解幾丁質的 *Clostridium perfringens*，並試驗能使它產生幾丁質酶的最適培養基，再純化此酵素及探討其特性。此菌無需誘導，能在主要含蛋白胨及酵母萃之培養基中，於厭氧條件下在 35°C 培養至 25 小時後，產生活性最高的幾丁質酶。將粗酵素液先以硫酸銨 (~80%) 沉澱，再經透析、濃縮、DEAE 管柱及 HIC 管柱層析，獲得兩種幾丁質酶 (P-1 及 P-2)。此二幾丁質酶均能同時水解 4-methylumbelliferyl-diacetylchitobiose [4-MU-(NAG)₂] 及 4-MU-(NAG)₃。經 Sephacryl S-300、Native-與 SDS-PAGE 檢定，P-1 具有分子量 139.7 kDa，由兩個次單元 (87.3 及 52.4 kDa) 所構成；而 P-2 具有分子量 196.8 kDa，亦由兩個次單元 (97 及 49.9 kDa) 所構成。以 4-MU-(NAG)₂ 為受質時，P-1 及 P-2 之最適反應溫度均為 40°C，而最適反應 pH 則 P-1 為 6.0，P-2 為 5.0。以 4-MU-(NAG)₃ 為受質時，P-1 及 P-2 之最適反應溫度各為 40 及 50°C，而最適反應 pH 皆為 6.0。兩幾丁質酶均會受金屬離子 Cu²⁺、Fe³⁺ 及 Hg²⁺ 之抑制，但 P-2 尚受 Co²⁺ 之抑制。Ba²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 及 Na⁺ 均能活化兩種酵素，但 Co²⁺ 及 K⁺ 只能活化 P-1。以 4-MU-(NAG)₂ 為受質時，P-1 與 P-2 之 K_m 值分別為 212.5 及 60.0 μM，而 V_{max} 值各為 161.3 及 30.0 μmole/ml-min。由同一種細菌產生兩種分子量不同的幾丁質酶，但水解相同的受質的例子很少見。

關鍵詞：*Clostridium perfringens*、人體糞便、幾丁質酶

Abstract

This research was conducted to isolate chitinolytic *Clostridium perfringens* from human feces, to develop a medium that rendered the bacterium to produce higher chitinase activity and to purify and

characterize the chitinase(s) produced by the bacterium. A medium mainly containing peptone and yeast extract was employed to cultivate the bacterium for production of higher chitinase activity after cultivation for 25 h at anaerobic condition (35°C). When the proteins in crude enzyme solution of *C. perfringens* were precipitated by ammonium sulfate (~80% saturation) and then followed by dialysis, condensation and gel filtration using DEAE and hydrophobic interaction chromatography, two chitinases P-1 and P-2 were fractionated. Both of chitinases could hydrolyse 4-methylumbelliferyl-diacetylchitobiose [4-MU-(NAG)₂] and 4-MU-(NAG)₃. After the operations of Sephacryl S-300, Native-PAGE and SDS-PAGE, chitinase P-1 revealed the molecular weight (MW) of 139.7 kDa composed of two subunits (87.3 and 52.4 kDa); P-2 showed MW of 196.8 kDa constructed by two subunits (97 and 49.9 kDa). Using 4-MU-(NAG)₂ as a substrate, the optimum reaction temperatures of chitinase P-1 and P-2 were the same (40°C); while optimum reaction pHs for chitinase P-1 and P-2 were 6.0 and 5.0, respectively. Using 4-MU-(NAG)₃ as a substrate, the optimum reaction temperatures for chitinase P-1 and P-2 were 40 and 50°C, respectively; while the optimum pH was the same (6.0). The activities of chitinase P-1 and P-2 were inhibited by metal ions Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ and Hg²⁺, except P-2 was also inhibited by Co²⁺; while Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ and Na⁺ could activate both enzymes, except only P-1 could be activated by Co²⁺ and K⁺. When 4-MU-(NAG)₂ was used as a substrate, K_m values of chitinase P-1 and P-2 revealed 212.5 and 60.0 μM, respectively, and V_{max} values of chitinase P-1 and P-2 showed 161.3 and 30.3 μmole/ml-min, respectively. A bacterial strain can produce two chitinases with different molecular weights that can hydrolyse the same substrates is rarely demonstrated.

Key: *Clostridium perfringens*, human feces, chitinase

研究報告

一、前言

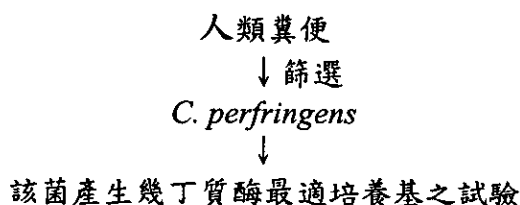
幾丁質是由 *N*-乙醯葡萄糖胺經 β -1,4 鍵結而成的直鏈狀高分子聚合物，在生物界中的含量僅次於纖維素，也是地球上蘊藏量最豐富之胺基醣形式之多醣之一 (Deshpande 等, 1986)。幾丁質會被 *N*-乙醯葡萄糖胺酶 (*N*-acetylglucosaminidase) 或幾丁質酶 (chitinase) 分別水解成單體 *N*-乙醯葡萄糖胺或 *N*-乙醯幾丁寡醣。在食品加工方面，低聚合度的 *N*-乙醯幾丁寡醣具有清爽的甜味，其甜味及吸濕性比單醣低，有助於調整食品的水活性，增進其保水性，同時亦具有調味及改良食品品質等功能。此類寡醣之研究及應用除了在食品方面外，更擴展至農業與醫學方面 (Shahidi 等, 2000; Yang 等, 2002)。

N-乙醯葡萄糖胺酶與幾丁質酶存在於多種的生物體中，包括動物、植物及微生物 (Jeuniaux 等, 1966)。在動物的消化道中所存在的微生物，其中部分具有代謝幾丁質的能力，會將其降解以供自身生長所需之碳源。本研究室在過去的研究 (Chen 等, 2002) 中發現，選取七株人體腸道菌，分別給予 *N*-乙醯幾丁一至六糖與葡萄糖，發現其中 *Clostridium perfringens* CCRC 10647 利用 *N*-乙醯幾丁二糖有較好之生長結果，推測該菌易利用 *N*-乙醯幾丁二糖作為生長時的能量來源。基於此背景，推測 *C. perfringens* 會產生幾丁質酶，能將大分子的幾丁質水解成小分子的寡醣甚至單醣，以供作碳源。

本研究擬自人類糞便中篩選出 *C. perfringens*，並進行該株菌之幾丁質酶的純化，並了解此水解酵素的特性，以瞭解此菌在人體內降解幾丁質的情形。

二、研究方法

1. 實驗設計



*BHI broth + colloidal chitin (CC)

PY medium + CC

*Salts medium + CC/ YE



幾丁質酶之純化

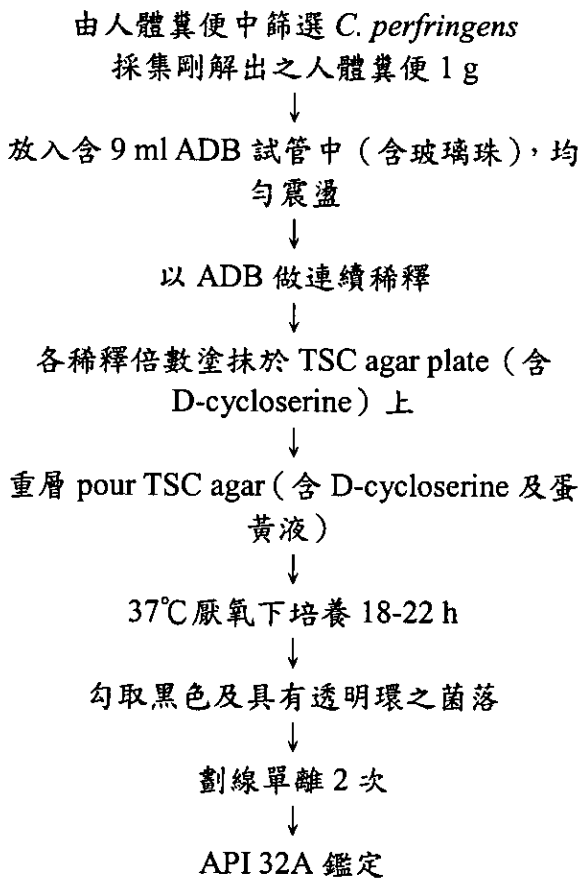


幾丁質酶性質試驗

*PY medium: 0.5g peptone, 0.5g tryptone, 1.0g yeast extract, 100.0 ml distilled water, 0.02 ml vitamin K₁, 0.05g cystein · H₂O.

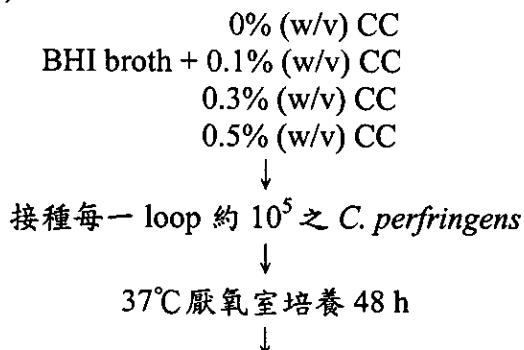
2. 實驗流程

a.



b. 生產 *C. perfringens* 幾丁質酶最適培養基之測試

(1)



測定生長期間中幾丁質酶活性之變化 (分別以 4-MU-(NAG)₁₋₃ 為受質)

(2)

0% (w/v) CC
0.1% (w/v) CC
PY medium + 0.3% (w/v) CC
0.5% (w/v) CC
↓
接種每一 loop 約 10⁵ 之 *C. perfringens*
↓
37°C 厭氧室培養 48 h

測定生長期間中幾丁質酶活性之變化 (分別以 4-MU-(NAG)₁₋₃ 為受質)

(3)

Salts medium + 0.1% (w/v) CC
0.3% (w/v) CC
0.5% (w/v) CC
(以上另添加 0.5 及 1% (w/v) YE)
↓
接種每一 loop 約 10⁵ 之 *C. perfringens*
↓
37°C 厭氧室培養 48 h

測定生長期間中幾丁質酶活性之變化 (分別以 4-MU-(NAG)₁₋₃ 為受質)

(以 salts medium 分別含有 0.5 及 1% YE 為對照組)

c. *C. perfringens* 幾丁質酶之純化
以 PY medium 培養 *C. perfringens* 1.2 L

↓
37°C 厭氧室培養 25 h
↓
4°C 下 14,000 rpm 離心 5min 去除菌體
↓
冰浴下緩慢加入硫酸銨至飽和濃度 80%
↓
慢速均質 30 min
↓
4°C 10,000 rpm 離心 30 min
↓
留取沉澱的蛋白質, 並以 PBS (20 mM pH 6.5) 復溶
↓
置入透析袋中, 於 4°C 下 40 倍體積的 dd

H₂O 透析 4 h

↓
再以 Tris-buffer (20 mM pH 8.0) 於 4°C 下透析 4 h (此步驟再重複一次)

↓
取出透析完後的 crude enzyme solution, 4°C 下慢速均質

↓
Amicon 濃縮 (M. W.=10,000 cut off)

↓
DEAE 管柱層析

↓
HIC 管柱層析

↓
Native-PAGE 活性染色及 SDS-PAGE 電泳膠片分析酵素 subunit 分子量 (分別以 4-MU-(NAG)₂₋₃ 為反應受質)

↓
GFC 管柱層析 (Sephacryl S-300) 檢測酵素分子量

↓
最適 pH、temp. 其穩定性對幾丁質酶活性之測定 (分別以 4-MU-(NAG)₂₋₃ 為受質)

↓
金屬離子對幾丁質酶活性之測定 (分別以 4-MU-(NAG)₂₋₃ 為受質)

↓
K_m 及 V_{max} 之測定

三、結果

1. 由糞便中篩出 *C. perfringens*

本研究先以傳統方法自人類糞便中分離出 *C. perfringens* 20 株, 再以 API 32A 鑑定。

2. *C. perfringens* 生產幾丁質酶最適培養基

為瞭解分離株水解幾丁質的能力, 試驗能使本菌產生最高幾丁質酶活性的培養基。在所試的三種培養基之中, 以含 peptone 及 yeast extract 為主的 PY medium 最能達到此效果, 無需添加膠體幾丁質誘導 (Fig. 1) 其他的培養基如 brain heart infusion broth 及 salts medium 加酵母萃後之效果均低於 PY medium。

3. 幾丁質酶之純化

以 Bradford's method (1976) 測定

蛋白質濃度。以 PY medium 培養 *C. perfringens* 1.2 L，於厭氧室 (37°C) 培養 25 h 後，以 14,000 rpm 離心 5 min 去除菌體後，上清液為粗酵素液。定容後於冰浴下添加硫酸銨至飽和濃度 80%，再經 10,000 rpm，30 min 離心沉澱蛋白質。以 100 ml，pH 6.5，20 mM 之磷酸鹽緩衝液復溶蛋白質。於 4°C 下透析 12 h 後，以 Amicon 濃縮，再進行 DEAE 之弱陰離子交換層析。發現幾丁質酶活性分別在 0.2 及 0.4 M 的 NaCl-20 mM Tris buffer (pH 7.5) 沖提下，各有一個吸光波峰 (peak)，前者稱為 P-1，後者為 P-2 (Fig. 2)。此二波峰均具有水解 4-MU-(GlcNAc)₂ 及 4-MU-(GlcNAc)₃ 的能力。在此步驟，幾丁質酶 P-1 和 P-2 的純化倍率以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時各為 0.74 及 3.25；而以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時各為 0.30 及 1.35 (Table 1)。

將具有幾丁質酶活性的部分分開收集，以 Amicon 濃縮 (M.W.=10,000 cut off)，再經 HIC 層析，幾丁質酶 P-1 及 P-2 均在無含硫酸銨的 Tris buffer (20 mM, pH 7.5) 下被沖提出來 (Fig. 3 和 Fig. 4)。在此步驟，幾丁質酶 P-1 和 P-2 的純化倍率以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時各為 14.85 及 2.90；而以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時各為 37.62 及 3.83 (Table 1)。

4. 活性染色與分子量測定

純化的幾丁質酶 P-1 與 P-2 以 8% Native-PAGE 分析，利用 Coomassie brilliant blue R-250 染色，於膠片上觀察蛋白帶；再分別以 50 μ m 之 4-MU-(GlcNAc)₂ 及 4-MU-(GlcNAc)₃ 為酵素基質，結果亦各出現一條具活性之螢光帶。以 12.5% SDS-PAGE 分析得知幾丁質酶 P-1 由二種次單元構成，分子量分別為 87.3 和 52.4 kDa (Fig. 5)；而幾丁質酶 P-2 亦由二種次單元構成，分子量分別為 96.8 和 49.9 kDa (Fig. 6)。幾丁質酶 P-1 經 Sephacryl S-300 膠過濾層析檢定分子量為 139.7 kDa (Fig. 7)；而幾丁質酶 P-2 檢定為 196.6 kDa (Fig. 8)。

5. *C. perfringens* 幾丁質酶之特性

C. perfringens 幾丁質酶 P-1 以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時，在 pH 6.5 之條件下，最適溫度為 40°C。若將其置於 pH 6.5，10-40°C，30 min，活性仍可維持 90% 以上，而在 50°C 以上，其活性急遽下降至 50% 以下。若改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時，在 pH 6.5 之條件下，最適溫度亦為 40°C。若將其置於 pH 6.5，10-40°C，30 min，活性可維持 90% 以上，而在 50°C 以上，其活性亦急遽下降至 50% 以下。

C. perfringens 幾丁質酶 P-2 以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時，在 pH 6.5 之條件下，最適溫度為 40°C。若將其置於 pH 6.5，10-50°C，30 min，活性可維持在 50% 以上，而在 60°C 以上時，其活性急遽下降至 10% 以下。改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時，在 pH 6.5 之條件下，最適溫度為 50°C。若將其置於 pH 6.5，10-40°C，30 min，活性可維持在 90% 以上，而在 50°C 以上時，活性便急遽下降至 30% 以下。

C. perfringens 幾丁質酶 P-1 以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時，最適 pH 為 6，而於 42.5°C 下，pH 6-7 放置 30 min，活性仍可保持 70% 以上。而在 pH 5 以下和 pH 8 以上，活性下降至 20% 以下。而改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時，最適 pH 亦為 6，而於 42.5°C 下，pH 6-7 放置 30 min，活性仍可保持 50% 以上。而在 pH 5 以下和 pH 8 以上，活性下降至 10% 以下。

C. perfringens 幾丁質酶 P-2 以 4-MU-(GlcNAc)₂ 為受質時，最適 pH 為 5，而於 42.5°C 下，pH 5-7 放置 30 min，活性仍可保持 70% 以上。而在 pH 4 以下和 pH 8 以上，活性下降至 10% 以下。若改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為受質時，最適 pH 亦為 6，而於 42.5°C 下，pH 5-7 放置 30 min，活性可維持 60% 以上，而在 pH 4 以下及 pH 8 以上，活性均降至 10% 以下。

在 12 種氯化鹽類中，Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 及 Hg²⁺ 對幾丁質酶 P-1 水解 4-MU-(GlcNAc)₂ 有很強地抑制活性作用，NH₄⁺ 亦有抑制效果。而 Ba²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、K⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 及 Na⁺ 具有促進活性的作用，其中又以 Ca²⁺ 及 Mn²⁺ 有很強的

致活作用。改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為幾丁質酶 P-1 的受質時，Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 及 Hg²⁺ 具有很強地抑制活性作用，Na⁺ 具些微地抑制作用。而 Ba²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、K⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 及 NH₄⁺ 則具有很強地致活作用，其中以 Mn²⁺ 的致活作用最強。

幾丁質酶 P-2 水解 4-MU-(GlcNAc)₂ 時，Cu²⁺、Co²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 及 Hg²⁺ 有很強地抑制作用，NH₄⁺ 具些微抑制作用，而 Ba²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺ 及 Na⁺ 則具有很強的致活作用。改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為幾丁質酶 P-2 的受質時，Cu²⁺、Co²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ 及 Hg²⁺ 具很強地抑制作用，Mn²⁺ 及 Mg²⁺ 具些微地抑制作用，而 Ca²⁺、K⁺、Na⁺ 及 NH₄⁺ 使其酵素活性降低 50%。

利用 4-MU-(GlcNAc)₂ 為幾丁質酶 P-1 水解之受質時，其 V_{max} 為 161.29 (μmole/ml-min)，K_m 為 212.47 (μM)；改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為幾丁質酶 P-1 的受質時，V_{max} 為 13.70 (μmole/ml-min)，K_m 為 33.13 (μM)。利用 4-MU-(GlcNAc)₂ 為幾丁質酶 P-2 水解之受質時，其 V_{max} 為 30.30 (μmole/ml-min)，K_m 為 59.94 (μM)；而改以 4-MU-(GlcNAc)₃ 為幾丁質酶 P-2 的受質時，V_{max} 為 9.78 (μmole/ml-min)，K_m 為 36.20 (μM)。

四、討論

培養基的種類與組成對產生細菌幾丁質酶非常重要，由於在生產幾丁質酶培養基中，多見加入 yeast extract，如 Chen (1997) 於 medium A 中添加 1% (w/v) shrimp shell power 及 0.5% (w/v) yeast extract 培養 *Cellulomonas flavigena* NTOU 1 可得到較高的幾丁質酶活性；Suginta (2000) 於產生幾丁質酶的 *Vibrio complex* medium 添加 0.5% (w/v) bacteriological peptone、0.5% (w/v) yeast extract 及 3% (w/v) NaCl 培養 *V. aestuarianus* LMG7909 等菌；而 Shimahara 等 (1992) 則在 MS medium 中添加 1.5% (w/v) colloidal chitin 和 0.05% (w/v) yeast extract，以生產 *Bacillus licheniformis* 之幾丁質酶，且發現培養基中若不加入 yeast extract，會使得

酵素活性降低。本試驗也發現添加 yeast extract 的三種培養基使 *C. perfringens* 產生 chitinase 的活性增高，其中以 PY medium 最佳。

以 PY medium 於厭氧室中培養 *C. perfringens* 25 小時後，發現可產生活性較高之乙醯幾丁二糖酶與乙醯幾丁三糖酶，因此推測該菌能產生此兩種不同的外切型幾丁質酶 (exo-chitinase)。在經過數次的測試後，發現利用 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) 經離子交換樹脂管柱層析 (DEAE fast flow) 及疏水交互作用管柱層析後 (HIC) 可純化出兩種 *C. perfringens* 幾丁質酶，但並非屬於專一性高的乙醯幾丁二糖酶與乙醯幾丁三糖酶。因在收集 Amicon 濃縮的粗酵素液後，經 DEAE 以 Tris-buffer (20 mM, pH 8.0) 分別在含有 0.2 及 0.4 M 之 NaCl 沖提下，可得到兩個具幾丁質酶活性之波峰 (P-1 與 P-2)。此 P-1 與 P-2 均能水解 4-MU-(NAG)₂ 及 4-MU-(NAG)₃，且以水解 4-MU-(NAG)₂ 較佳。該現象與 Nawani 等 (2001) 自 *Serratia marcescens* NK1 的 exo-chitinase 情形相同，該幾丁質酶同時具有水解 PNP-(NAG)₂ 及 PNP-(NAG)₃ 之能力，且以水解 PNP-(NAG)₂ 能力較佳。

依試驗結果幾丁質酶 P-1 及 P-2 均為 dimer，然而幾丁質酶 P-2 在 Native-PAGE 有 2 條蛋白帶，且分別經 4-MU-(NAG)₂ 或 4-MU-(NAG)₃ 活性染色後均可產生螢光性，顯示此二條蛋白帶都具有幾丁質酶的活性，此現象與 Chen 等 (1997) 自 *C. flavigena* NTOU 1 純化之乙醯幾丁二糖酶相似，因此推測幾丁質酶 P-2 經 Native-PAGE 電泳泳動時，發生 degradation 或 polymerization 或酵素具 iso-form。

五、結論

1. *C. perfringens* 產生幾丁質酶最適培養基為含 peptone 及酵母萃之 PY medium，且不需經膠體幾丁質誘導。
2. 本菌產生兩種分子量不同，但水解受質相同的幾丁質酶；均由兩個次單元所構成，相當少見。

3. 此二幾丁質酶的特性頗類似。

六、針對目前的研究成果，提出以下幾點建議：

1. 以若干化學藥劑對幾丁質酶 P-1 及 P-2 活性之影響，以進一步了解參與活性之重要胺基酸。
2. 分析此二酵素對不同型態之幾丁質或對其他醣類水解能力作受質特異性的探討，且分析幾丁質酶 P-1 與 P-2 水解幾丁質的產物，以推測可能之水解模式及在人體內水解幾丁質的情形。
3. 以蛋白質工程等方法進行幾丁質酶 P-1 與 P-2 轉殖至 *E. coli* 中，以期快速純化出幾丁質酶，以便對此類酵素做更深入的研究。

參考文獻

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein using principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chen, H. C., C. C. Chang, W. J. Mau, and L. S. Yen. 2002. Evaluation of *N*-acetylchitooligosaccharides as the main carbon sources of the growth of intestinal bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 53-56.
- Chen, H. C., M. F. Hsu, and S. T. Jiang. 1997. Purification and characterization of an exo-N, N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. *Enzyme Microbial Tech.* 20: 191-197.
- Deshpande, M. V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *J. Scientific Industrial Res.* 45: 273-281.
- Jenuiaux, C. 1966. Chitinase. *Methods Enzymol.* 8: 644-650.
- Nawani, N. N. and B. P. Kapadnis. 2001. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1 a soil isolate. 90: 803-808.
- Shahidi, F., J. K. V. Arachchi, and Y. J. Jeon. 2000. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Tech.* 10(2): 37-51.
- Suginta, W., P. A. W. Robertson, B. Austin, S. C. Fry, and L. A. Fothergill-Gilmore. 2000. Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89: 76-84.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., and Nagano, Y. 1992. Degradation pathway of chitin by a thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* X-7u. *Advances in chitin and chitosan. Processing of the 5th International Conference on Chitin and Chitosan.* Brine, C. J., Sanford, P. A. and Zikakis, J. P. eds. October 17-20. Princeton, New Jersey, USA. 364-371.
- Yang, Q. and Z. Z. Gong. 2002. Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). *Protein Expre. Purification.* 24(1): 76-82.

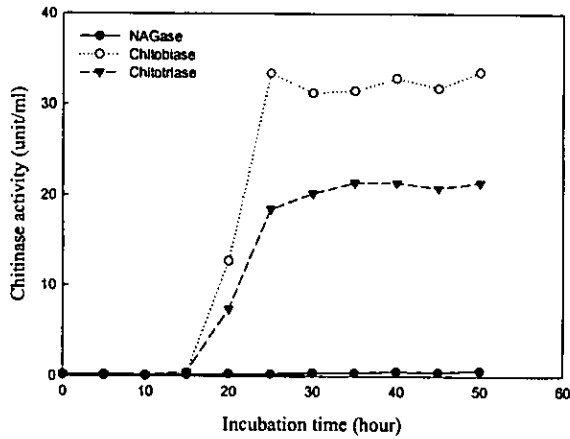


Fig. 1 Chitinases activities [using 4-MU-GlcNAc, 4-MU-(GlcNAc)₂ or 4-MU-(GlcNAc)₃ as the substrate] of *C. perfringens* cultivated in PY medium.

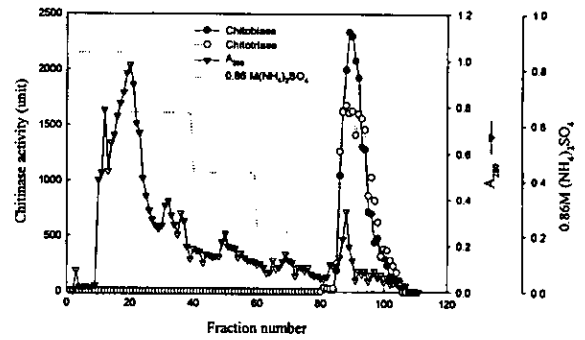


Fig. 3 Hydrophobic interaction chromatography of chitinase P-1 from *C. perfringens* using 4-MU-(GlcNAc)₂ or 4-MU-(GlcNAc)₃ as the substrate.

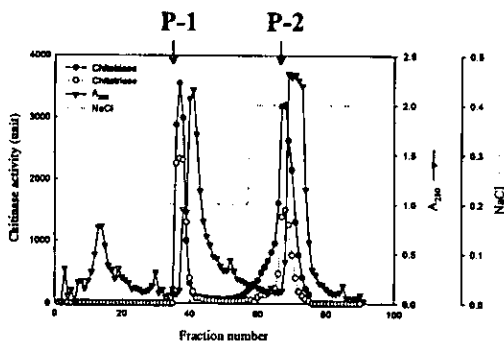


Fig. 2 Ion exchange chromatography (DEAE) of crude enzyme solution from *C. perfringens* using 4-MU-(GlcNAc)₂ or 4-MU-(GlcNAc)₃ as the substrate.

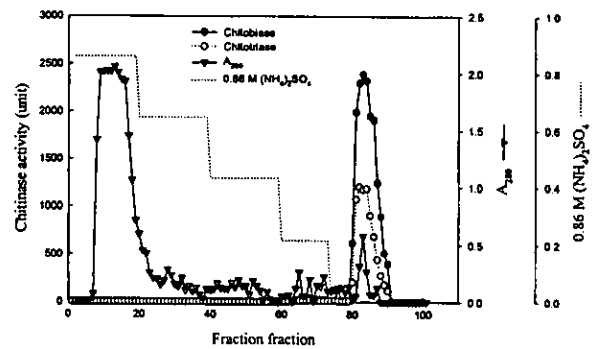


Fig. 4 Hydrophobic interaction chromatography of chitinase P-2 from *C. perfringens* using 4-MU-(GlcNAc)₂ or 4-MU-(GlcNAc)₃ as the substrate.

Table 1 Summary of purification of *C. perfringens* chitinases.

Procedure	Chitobiose as the substrate				Chitotriose as the substrate					
	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Cultrate filtrate	1160	22.04	107525	4878	1.00	100	88090	3996	1.00	100
DEAE Fast Flow										
Peak 1	77	5.36	19408	3620	0.74	18.05	16441	1201	0.30	18.66
Peak 2	245	2.03	32153	15839	3.25	29.90	10958	5398	1.35	12.44
HIC ^a										
Peak 1	100	0.36	19361	53781	11.03	18.0	16275	45208	11.31	18.4
Peak 2	121	0.36	16516	45879	9.41	15.3	7446	20685	5.17	0.08

^a Hydrophobic interaction chromatography.