

以微生物發酵烏賊軟骨生產化妝品生物活性物質之研究

Production of bioactive materials for cosmetic utilizations by submerged fermentation from squid pen

王全祿(Chuan-Lu Wang)

261 宜蘭縣頭城鎮復興路 79 號

E-mail:chuanlu@mail.fit.edu.tw

摘要

隨著生活品質的提昇，也伴隨著資源的大量使用以及廢棄物的產生，更造成廢棄物的處理問題。如何減少廢棄物的產生與廢棄物的資源再利用為一重要的課題。

臺灣漁業資源豐富，水產廢棄物除了部分有被用來加工成魚粉或蝦蟹殼粉等廉價肥飼料之外，其餘水產廢棄物並未被有效再利用。蝦蟹加工所衍生的固體廢棄物量高達蝦蟹活體重的 50%，因其含有豐富的可溶性碳水化合物及蛋白質，係為極具回收再利用之生物資源。若能配合微生物機能進行研發，不但解決了廢棄物的問題，亦可開發出高附加價值產品。

本研究利用微生物發酵水產廢棄物烏賊軟骨，進行生產化妝品生物活性物質之相關研究。利用能以烏賊軟骨為唯一碳源之 *Serratia marcescens* TKU011 菌株，進行生產生物活性物質相關試驗，並將所生產之生物活性物質應用於化妝保養品之研發為本研究之主要目的。

關鍵字：烏賊軟骨、微生物、生物活性物質

ABSTRACT

Recently, much attention has been focused on the utilization of various natural biomaterials, such as chitin, chitosan, and collagen. Because they are derived from materials synthesized by living things, they may show some affinities for human beings and animals and thus will be available for medical and cosmetic materials. In addition, the natural biomaterials can be obtained as low-priced wastes generated especially in the field of food industry.

Chitin bioconversion has been proposed as a waste treatment alternative to the disposal of shellfish waste. Some pretreated chitin is used as substrate for microbial chitinase production. To further enhance the utilization of chitin-containing marine crustacean waste, we have recently investigated the bioconversion of shrimp and crabshell powder for bioactive ingredients production.

A squid pen -assimilating strain *Serratia marcescens* TKU011 was cultivated by using squid pen as the sole carbon/nitrogen source. This is a study of the utilization of squid pen wastes by *Serratia marcescens* TKU011 strain to produce bioactive materials, isolation and purification of bioactive materials from methanol extract and structural identification and cosmetic efficiency and safety investigation of isolate compounds are perform.

Key Word : Squid pen、Microorganism、Bioactive ingredients



壹、前言

宜蘭縣農漁產業發達，於漁業方面擁有全台三大漁港之一的南方澳漁港、烏石港及大溪漁港，另蘇澳鎮龍德工業區為主要水產加工區，水產資源豐富。水產廢棄物除了部分有被用來加工成魚粉或蝦蟹殼粉等廉價肥飼料之外，其餘水產廢棄物並未被有效再利用。蝦蟹加工所衍生的固體廢棄物量高達蝦蟹活體重的50%，因其含有豐富的可溶性碳水化合物及蛋白質，極具回收再利用之生物資源。若能配合微生物機能進行研發，不但解決了廢棄物的問題，亦可開發出高附加價值產品。

幾丁質為一不溶於水且由*N*-乙酰葡萄糖胺(*N*-acetylglucosamine)以 β -1,4鍵結而成之直鏈聚合物，廣泛存在於海洋無脊椎動物。幾丁質屬生物性高分子，與生物體細胞有良好的生物相容性、不具毒性、可被生物體分解及具有生物活性，因此可應用的領域非常廣泛(Table 1)，包括機能保健食品、醫藥用品、食品加工、化妝品、紡織、環保、農業、化學工業等領域⁽¹⁻¹⁶⁾。近年來，健康觀念及環保意識的提高，以天然且安全之有效物質添加於化妝保養品內，已成為消費者購買之主流產品。故本研究擬利用烏賊軟骨(Fig.1)，進行生產化妝品生物活性物質為本研究之主要動機。

人體吸入氧氣後，在進行一連串新陳代謝運作時，不斷產生帶著單數、不成對電子的自由基。這些帶有成對電子的自由基，十分不穩定，到處搶奪其他帶著成對電子、正常穩定的分子物質，讓被搶奪的分子物質也變得受損、不穩定，造成身體機能的損傷，長期下來這樣的連鎖反應，就會讓身體器官與身體運作機能衰退、老化。故減少不穩定自由基的產生-「抗氧化」，不僅能讓我們皮膚減緩老化，也能讓我們身體機能保持健康，充滿活力。

到目前為止極少有利用微生物分解烏賊軟骨生產化妝品生物活性原料報告被發表，故利用微生物進行烏賊軟骨分解，生產抗氧化化妝品生物活性原料，並應用於化妝品相關產品之研發為本研究之主要目的。

Table 1 幾丁質與幾丁聚糖的應用

領域	應用	參考文獻
保健	改善消化吸收的機能、減少脂肪及膽固醇的攝取、降低高血壓、強化免疫力	(1)
食品	提高液體產品品質或提高固體產品回收率、處理廢水、回收蛋白做為動物飼料使用、食品填充劑、增稠劑、穩定劑、脫色劑、香味增濃劑、食品包裝材料	(2)
		(3)
	水果保鮮劑	(4)
醫藥	手術縫合線、止血和傷口被覆材料、藥物運送的載體、隱形眼鏡、血液透析膜、抑制胃酸、腫瘤細胞的作用	(5~10)
美妝	具有良好的保濕性、增黏性、成膜性、預防蛀牙、防止牙周潰爛、除去或減輕口臭	(11~12)
紡織	具有抗菌及防臭的特性、醫用纖維—具促進傷口癒合的功效、用於敏感性皮膚的紡織品、吸附重金屬及減緩藥劑釋放的纖維	(7、13)
環保	當做生物可分解塑膠的原料、具吸附及螯合性	(10、13)
農業	生物農藥、植物生長調節劑、病蟲害防除劑及肥料、殺蟲、除草劑等的控制釋放劑、餵飼魚類的補充飼料	(14)
化學工業	超過濾膜、逆滲透膜、催化功能膜、氣體滲透膜、對織物、皮革、紙、玻璃纖維均有良好的親和性、增加塗覆的面積、降低油漆的消耗	(15~16)



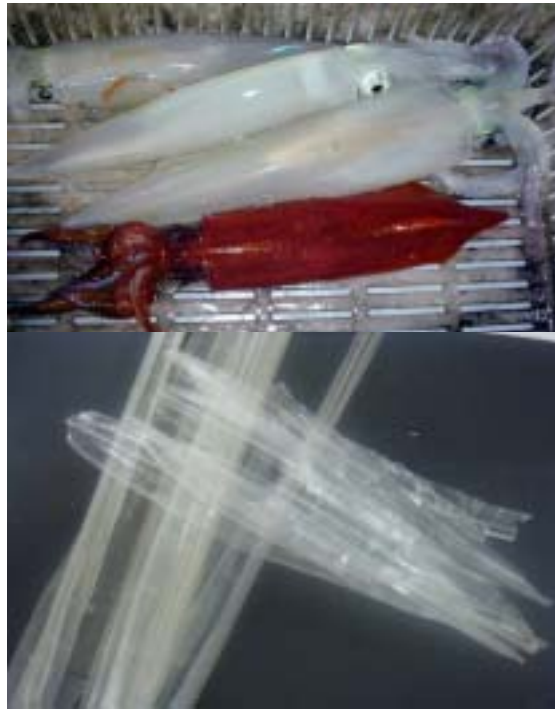


Fig.1 烏賊與烏賊軟骨

貳、實驗材料與方法

一、菌株

(一) *Serratia marcescens* TKU011 菌株

係由淡江大學生命科學研究所王三郎教授所提供。*Serratia marcescens* TKU011 菌係篩選自台灣中部農地土壤之蛋白酶及幾丁聚醣酶生產菌。

二、實驗材料

(一) 烏賊軟骨(squid pen, SP)

購自宜蘭縣新馬冷凍食品公司。

三、培養基組成

(一) *Serratia marcescens* TKU011 菌株(100 ml)

1%烏賊軟骨粉末、0.1% K_2HPO_4 及 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。培養液之最終酸鹼值為 pH 7.0。

四、實驗方法

(一) 蛋白酶之活性測定

取 0.2 mL 之酵素液，加入 1.25 mL 之酪蛋白(1.25%)基質(溶於 50 mM 之 NPB(pH 7))，於 37°C 下水浴反應 30 分鐘後，加入 2.5 mL 之 TCA 溶液(0.11 M 三氯醋酸、0.22 M 醋酸鈉、0.33 M 醋酸)中止反應；離心(1,860×g) 15 分鐘後，取 0.625 mL 上清液，加入 1.25 mL 之 0.28 N 氫氧化鈉和 0.4 mL phenol reagent (Folin-Ciocalteu' s Reagent : ddH₂O=1 : 2)，於室溫下呈色 15 分鐘，測其於波長 578 nm 下之吸光值。酵素活性以每分鐘產生 1 μ mole 之 tyrosine 所需酵素量定義為 1 U。而標準曲線係以 0~30 μ g/mL 之 tyrosine 製得。



(二) 幾丁聚醣酶之活性測定

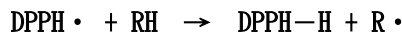
取 0.2 mL 之酵素液，加入 0.3 mL 之 50 mM NPB (pH 7) 與 1 mL 0.3% (w/v) 水溶性幾丁聚醣基質 (溶於 50 mM NPB (pH 7))，於 37°C 下水浴反應 30 分鐘後，加入 2 mL 之呈色劑 (0.5 g $K_3Fe(CN)_6$ 溶於 1 L 之 0.5 M Na_2CO_3)；置於 100°C 下乾浴反應 15 分鐘使其呈色，待冷卻至室溫後，離心 (1860 $\times g$) 15 分鐘，取其上清液測定於波長 420 nm 下之吸光值 (還原糖測定法) (Imoto and Yagishita, 1971)。酵素活性以每分鐘產生 1 μ mole 之還原糖所需酵素量定義為 1 U。而標準曲線係以 0-80 μ g/mL 之 *N*-acetylglucosamine 所製得。

(三) 幾丁質酶之活性測定

取 0.2 mL 之酵素液，加入 0.3 mL 之 50 mM NPB (pH 7) 和 1 mL 之懸浮態幾丁質基質，於 37°C 下水浴反應 60 分鐘後，加入 2 mL 呈色劑 (0.5 g $K_3Fe(CN)_6$ 溶於 1 L 之 0.5 M Na_2CO_3)；置於 100°C 下乾浴反應 15 分鐘後，待冷卻至室溫後，離心 (1860 $\times g$) 15 分鐘後，取其上清液測定於波長 420 nm 下之吸光值。酵素活性以每分鐘水解產生 1 μ mole *N*-acetylglucosamine 所需之酵素量定義為 1 U。而標準曲線係以 0-80 μ g/mL 之 *N*-acetylglucosamine 所製得。

(四) 抗氧化特性分析- DPPH 自由基清除能力之測定

DPPH 含有一穩定自由基，在波長 517 nm 下具有強烈吸光值。當 DPPH 自由基與抗氧化物或自由基進行反應，失去自由基後將會使吸光值降低，以此判斷樣品清除 DPPH 自由基之能力。



實驗前須先以 0.2 mL 之 0.75 mM DPPH 溶液 (DPPH 溶於 methanol，振盪攪拌 20-30 分鐘使其完全溶解，置於 4°C 保存，欲使用前須振盪使其均勻混合) 加入適量 methanol 作為控制組，混合均勻後避光靜置 30 分鐘，測其於波長 517 nm 之吸光值 (須控制在最接近 1.00 左右)。而所使用之 methanol 清除率 (%) = $\left[1 - \left(\frac{\text{實驗組} - \text{對照組}}{\text{控制組}} \right) \right] \times 100$ 含量，即為屆時樣品取適量之發酵上清液 (依前述控制組測試所得之添加量)，加入 0.2 mL 之 DPPH 溶液，混合均勻後避光靜置 30 分鐘，測其於波長 517 nm 之吸光值；若樣品本身有顏色則需做對照組 (取與實驗組相同體積之上清液並加入 0.2 mL 之 methanol，混合均勻後避光靜置 30 分鐘，其於波長 517 nm 之吸光值)，以減少誤差。而吸光值越低表示清除能力越強。其 DPPH 自由基清除能力之計算方式如下：

參、結果與討論

S. marcescens TKU011 菌係篩選自台灣中部農地土壤之蛋白酶及幾丁聚醣酶生產菌。*S. marcescens* TKU011 以烏賊軟骨粉末 (SPP) 作為碳氮源，其培養條件為 1% SPP、0.1% K_2HPO_4 及 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，在 25°C、pH 7 之 100 mL 液態培養基搖瓶 (150 rpm) 培養。培養 1-4 天所生產的蛋白酶、幾丁聚醣酶活性及清除 DPPH 自由基能力結果如 Fig. 2 所示。

幾丁聚醣酶活性培養到第 4 天其活性達到 0.1 U/mL；而蛋白酶亦於第 4 天 (SPP, 0.17 U/mL)



達到最高活性；於 DPPH 清除能力方面，所得發酵上清液隨著培養時間增加而增加，並於第 4 天 DPPH 清除能力可達 70% 清除率。

此結果與 *S. marcescens* TKU011 以蝦頭粉(SHP)作為碳氮源，其培養條件為 2% SHP、0.1% K_2HPO_4 及 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，在 25°C、pH 7 之 50 mL 液態培養基搖瓶(150 rpm)培養條件相比較⁽¹⁷⁾，發現以 SPP 作為碳氮源所生產之幾丁聚醣酶活性較高，培養到第四天其活性達到 0.1 U/mL；而蛋白酶則是兩者分別在第 2 天(SHP, 0.14 U/mL)及第 4 天(SPP, 0.17 U/mL)達到最高活性；於 DPPH 清除能力方面，則是利用 SPP 為碳氮源，所得發酵上清液在第四天可達 70% 清除率。可能係因 SPP 較 SHP 易被 TKU011 之酵素水解，進而獲得更多抗氧化物質。

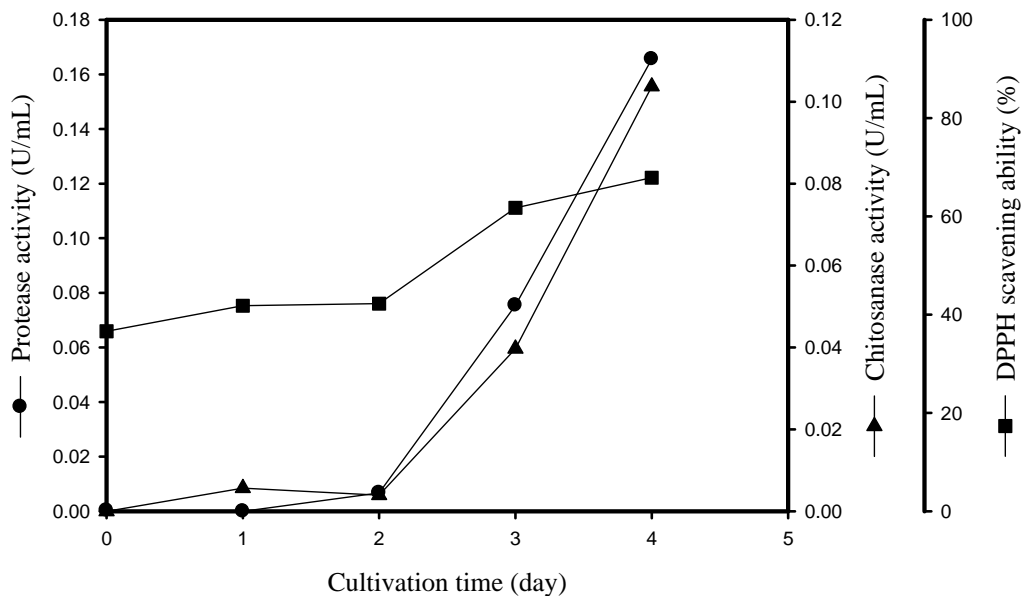


Fig. 2 TKU011 培養於 SPP 培養基所生產蛋白酶、幾丁聚醣酶及 DPPH 自由基清除能力之變化情形。

肆、結論

隨著經濟發展及科技的進步，化妝品的需求量日益增加且多元化。近年來，隨社會環境的變遷及環保意識高漲下，消費者轉向崇尚自然產品之趨勢。因此，目前化妝品多傾向於使用天然物質做為原料或添加劑，並在化妝品市場的迅速發展下，將帶來無限商機。

本實驗利用微生物發酵水產廢棄物烏賊軟骨，進行生產抗氧化化妝品生物活性物質之研究。於 Fig. 2 結果所示，*S. marcescens* TKU011 菌株能以烏賊軟骨粉末(SPP)為主要碳/氮源，所得之上清液具有 DPPH 清除能力效果，其清除率可達 70%，獲得良好結果。由上述結果得知，本菌株能分解烏賊軟骨，並生產具 DPPH 清除能力之抗氧化化妝品生物活性原料，另烏賊軟骨為天然物質且不具毒性，其分解產物添加於化妝品相關產品中，將可提高其對於皮膚之安全性，極具研究價值。今後將進一步探討應用於化妝品相關產品研發之相關研究。



五、参考文献

1. Wadstein, J., Thom, E., Heldman, E., Gudmunsson, S., Lilja, B., 2000. Biopolymer L 112, a chitosan with fat binding properties and potential as a weight reducing agent: a review of *in vitro* and *in vivo* experiments, in: R.A.A. Muzzarelli (Ed.), Chitosan Per os: From Dietary Supplement To Drug Carrier, Grottammare, Italy.
2. Knorr, D., 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technol 45,114-23.
3. Austin, P.R., Zikakis, J.P., Saylor, W.W., 1982. Chitin and Chitosan. The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori, 233.
4. Zikakis, J.P., Spreen, K.A., Austin, P.R., 1984. Chitin, Chitosan and Related Enzymes. Academic Press 57.
5. Le, Y., Anand, S.C., Horrocks, A.R., 1996. Development of anti- bacterial polysaccharide fibers and their performance. European Conference on Advances in Wound Management .
6. Stinnes, A., Sandford, D.A., 1991. Biomedical Applications of High Purity Chitosan — Physical. Chemical and Bioactive Properties. ACS Symposium Series 467, 430-5.
7. Szosland, B., East, G.C., 1995. The dry spinning of dibutrylchitin fibres. J Appl Polym Sci 58, 2459-66.
8. Bergamini, M.V.W., Markey, M.L., Bowman, M.L., 1989. Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science 713.
9. Sakiyama, T., Chu, C.H., Fuji, T., Yano, T., 1993. Preparation of polyelectrolyte complex gel from chitosan and *k*-carrageenan and its pH sensitivity swelling. J Appl Polym Sci 50, 2021-5.
10. Hirano, S., 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. Polym Int 48, 732-4.
11. Rathke, T.D., Hodson, S.M., 1994. Review of chitin and chitosan as fibre and film formers. Poly Rev 34, 375-437.
12. Kim, S.Y., Lee, Y.M., Lee, S.I., 1997. Preparation and evaluation of in vitro stability of lipid nanospheres containing vitamins A or E for cosmetic application, in: 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Stockholm, Sweden, June 15–19.
13. Kang, D.W., Choi, H.K., Kweon, D.K., 1996. Polymer (Korea) 20, 989-95.
14. Li, Y.C., Sun, X.J., Bi, Y., Ge, Y.H., Wang, Y., 2009. Antifungal activity of chitosan on *Fusarium sulphureum* in relation to dry rot of potato tuber. Agric Sci in China 8, 597-604.
15. Muzzarelli, R.A.A., 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutical administration of chitin derivatives. Cell Mol Biol Life Sci 53, 131-40.
16. Lee, Y.M., Kim, S.S., Cho, C.S., 1996. Wound covering materials of semi-interpenetrating polymer networks hydrogels composed of poly(ethylene glycol) diacrylate macromers and β -chitin and their release of silver sulfadiazine, in: 36th IUPAC International Symposium on Macromolecules, Seoul, Korea, 4–9.
17. Wang, S.L., Peng, J.H., Liang, T.W., Liu, K.C., 2008a. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. Carbohydr Res 343, 1316–1323.

