

## $\epsilon$ -聚離胺酸分解酵素之生化研究 (一)

吳芳禎<sup>1</sup> 李建德<sup>2</sup> 施英隆<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學食品暨應用生物科技學系

<sup>2\*</sup>大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

\*ils@mail.dyu.edu.tw

### 摘要

$\epsilon$ -聚離胺酸 ( $\epsilon$ -Poly-lysine;  $\epsilon$ -PL) 是由微生物發酵生產的天然生物性材料。 $\epsilon$ -PL 之應用潛力廣，然而生成作用機制還未明，調控機制則仍十分模糊。 $\epsilon$ -PL 合成酵素 (PL synthetase; PLS) 與  $\epsilon$ -PL 降解酵素 (PL degrading enzyme; PLD) 與  $\epsilon$ -PL 之生產有密切關係，除可影響其分子量外亦為探討  $\epsilon$ -PL 之生成機制之一重要工具，本研究先行探討  $\epsilon$ -PL 降解酵素之分離純化。本研究已完成篩選一株具有能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株且具  $\epsilon$ -PL 合成與  $\epsilon$ -PL 降解能力之菌株 *Streptomyces albulus* PLT1。*S. albulus* PLT1 可使用葡萄糖或甘油為碳源並能生產  $\epsilon$ -PL，是為  $\epsilon$ -PL 之生產菌。在含葡萄糖之 M3G 培養基中經 72h 培養可得 0.561g/L 之  $\epsilon$ -PL，但在含甘油之 M3G 培養基中經 72h 培養可得 0.385g/L 之  $\epsilon$ -PL。*S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 之合成酵素活性以附著細胞膜部份最為顯著 (0.13±0.02 U/mg protein)，其他去菌之培養液，細胞質部份酵素活性相當低，因此應是膜結合蛋白。*S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 之分解酵素活性以附著細胞膜部份最為顯著 (0.066±0.002 U/mg protein)，其他去菌之培養液，細胞質部份酵素活性相當低，因此亦應是膜結合蛋白。在分解  $\epsilon$ -PL 實驗，經 30 分鐘反應後部份  $\epsilon$ -PL 已分解，新產物為 L-lys，而無其他多元之較小分子量之  $\epsilon$ -PL，因此 *S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素應是外切型酵素型態。 $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 之分離純化可經過 DEAE-Sepharose、Source 15Q 陰離子交換層析後得到純化之酵素，最後之純化倍數為 65.6，回收率為 25.5%，比活性達 40.0 U/mg。將純化的樣品進行 SDS-PAGE 電泳分析，樣品之電泳分析呈現一主帶，對照標準品分子量，計算得  $\epsilon$ -PL 分解酵素分子量約為 39.5 kDa。

**關鍵詞：** $\epsilon$ -聚離胺酸，聚離胺酸降解酵素，放線菌白色鏈球菌，酵素純化，離子交換層析，外切型酵素

## Biochemical Study of $\epsilon$ -Poly-lysine Depolymerase: Part 1

FANG-CHEN WU<sup>1\*</sup>, JEN-DER LEE<sup>2</sup> and ING-LUNG SHIH<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Applied Biotechnology, Da-Yeh University

<sup>2\*</sup>Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R. O. C.

\*ils@mail.dyu.edu.tw



## ABSTRACT

$\epsilon$ -Poly-lysine ( $\epsilon$ -PL) is a naturally occurring biomaterial produced through microbial fermentation.  $\epsilon$ -PL has potential applications in diverse areas, such as food, medicine, pesticides, and electronic and chemical material. Remarkable studies concerning  $\epsilon$ -PL biosynthesis have been reported; however, the biosynthetic mechanism of  $\epsilon$ -PL production has not yet been elucidated, and the enzymes involved in its biosynthesis are yet to be isolated and characterized. Therefore, this study involved the isolation and purification of an  $\epsilon$ -PL-degrading enzyme (Pld). An  $\epsilon$ -PL-tolerant strain (*Streptomyces albulus* PLT1) that demonstrated both  $\epsilon$ -PL-producing and  $\epsilon$ -PL-degrading capacities was isolated. *S. albulus* PLT1 synthesizes  $\epsilon$ -PL 0.561g/L or 0.385g/L  $\epsilon$ -PL in M3G medium containing glucose or glycerol, respectively.  $\epsilon$ -PL synthetase (Pls) and the Pld enzyme of this strain are both membrane-bound proteins. The crude preparation of the Pld enzyme catalyzes exo-type degradation of  $\epsilon$ -PL. The  $\epsilon$ -PL-degrading enzyme of *S. albulus* PLT1 was purified. Coarse enzyme extraction was subjected to DEAE-Sepharose and Source 15Q anion exchange chromatography. The final purification fold was 65.5 with recovery yield = 25.5% and specific activity = 40.0 U/mg. The purified sample was analyzed using SDS-PAGE, and the molecular mass of the enzyme was estimated to be approximately 39.5 kDa.

**Key Words:**  $\epsilon$ -Poly-lysine,  $\epsilon$ -PL-degrading enzyme, *Streptomyces albulus*, enzyme purification, ion exchange chromatography, exo-type degradation

## 一、前言

$\epsilon$ -聚離胺酸 ( $\epsilon$ -Poly-lysine;  $\epsilon$ -PL) 為一結構特殊，且由微生物代謝合成而得之一天然聚合物，其係由離胺酸經由  $\alpha$ -羧基和  $\epsilon$ -胺基鏈結聚合而成之高分子聚合物[23-26]。 $\epsilon$ -PL 具有水溶、可食及生物可分解等特性且其本身或分解之產物對人體無害 [8, 18]，因此近年來已有相當多之研究著重於開發  $\epsilon$ -PL 及其衍生物於食品、醫藥及環保等領域之應用且有成果 [1-4, 6-7, 14, 21-22]。目前已知其可作為抗癌及基因藥物之載體 [3-4, 19-20]、食品防腐劑 [7]、殺菌消毒液、食品乳化劑 [10]、預防血脂過高與瘦身減肥保健品 [14, 28]，且可為強力吸水材料及薄膜材料 [17]。

過去幾年  $\epsilon$ -PL 研究主要著重於生產探討，但  $\epsilon$ -PL 的生產過程中合成和降解同時存在，例如 *Streptomyces albulus* 和它的突變體在酸鹼值 4.0 左右生產並且分泌  $\epsilon$ -PL 於培養基中，在酸鹼值 5.0-8.0， $\epsilon$ -PL 即被降解 [9, 12, 23]。已知降解係由  $\epsilon$ -PL 降解酶 ( $\epsilon$ -Poly-L-lysine-degrading enzyme, PLD 酶) 引起， $\epsilon$ -PL 降解酶 (PLD 酶) 的出現對於在工業上以 *S. albulus* 生產  $\epsilon$ -PL 是不利的。因此，研究 PLD 酶的性質對保證  $\epsilon$ -PL 的正常發酵和生產高產量  $\epsilon$ -PL 具有重要的意義。

在研究各種不同 *Streptomyces* 菌株的  $\epsilon$ -PL-降解酶的分佈中，發現在  $\epsilon$ -PL-降解和  $\epsilon$ -PL-產生活性之間有相關的

分佈 [16]。*Streptomyces virgimae* IF012827 和 *Streptomyces noursei* IF015452 展現了重要的  $\epsilon$ -PL 降解酶活性，他們也有能力生產  $\epsilon$ -PL。在其他展現低的  $\epsilon$ -PL 降解活性的菌株中，沒有發現  $\epsilon$ -PL 生產的活性。這個相互關係表示  $\epsilon$ -PL 生產者普遍擁有  $\epsilon$ -PL 降解酵素。 $\epsilon$ -PL 生產者的  $\epsilon$ -PL 降解酵素可能扮演自衛的角色。如何控制  $\epsilon$ -PL 降解除對  $\epsilon$ -PL 生產與  $\epsilon$ -PL 分子量有很大影響。分子量及多分散性 (polydispersity) 為一影響高分子化合物物性之重要因素，相對將影響其生理活性，例如研究發現分子量之大小影響  $\epsilon$ -PL 抑制胰臟脂肪酵素之作用與藥物載體之吸收性[14,19-20];另外已知  $\epsilon$ -PL 抑菌活性亦與分子量有關，分子量在 3600~4300 之間的  $\epsilon$ -PL 其抑菌活性最好，當聚合度低於十肽時，分子量低於 1300 時， $\epsilon$ -PL 失去抑菌活性;已知天然長鏈之  $\epsilon$ -PL 具有強烈之苦味，因此欲改善  $\epsilon$ -PL 之可食性，小分子量之控制是必要的。

雖然  $\epsilon$ -PL 已被商業生產作為食品的防腐劑，搖瓶與發酵槽之生產條件已有深入之探討，近年來在合成途徑之探討已有一些有趣之結果，然而生合成作用機制還是尚未被闡明，調控機制則仍十分模糊，因此探討  $\epsilon$ -PL 降解酵素 (PLD degrading enzyme) 之生化活性是非常必要的。本研究篩選具有  $\epsilon$ -PL 合成與降解能力之菌株，並探討菌株之  $\epsilon$ -PL 降解酵素之培養方法，同時探討此酵素在細胞之存在位置 (胞內或胞外酵素)， $\epsilon$ -PL 降解酵素對  $\epsilon$ -PL 之作用型態 (外切



型酵素或內切型酵素)，同時亦探討  $\epsilon$ -PL 降解酵素之分離純化。

## 二、材料與方法

### (一) 篩選具有能忍受 $\epsilon$ -PL 並有 $\epsilon$ -PL 合成與降解能力之菌株

#### 1. 具能忍受 $\epsilon$ -PL 之菌株篩選

以 5g 土壤樣本培養於篩菌用培養基 100ml (10-100 mg  $\epsilon$ -PL, 0.05 g yeast extract, 0.4 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 外加 0.1ml 金屬溶液 (pH 7.0) 於 28°C, 轉速 120 rpm 下, 振盪培養 24 h。上述金屬溶液為 1L 蒸餾水中含 0.4 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.04 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g KI, 0.2 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.4 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  及 0.01 ml 之 concentrated HCl [15]。能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株再以含 EC 培養基 (HIMEDIA EC Broth M127) 之洋菜膠篩選, 所得能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株再於 TM 培養基 (1L 含 5 g meat extract, 5 g polypeptone, 0.5 g yeast extract, 2 g NaCl) 及不等濃度之 0-100 mg/ml  $\epsilon$ -PL, pH 7.0) 再確認其  $\epsilon$ -PL 之忍受程度。

#### 2. $\epsilon$ -PL 生產菌之篩選

將上述能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株培養於分別添加 0.02% methylene blue (basic dye) 和 Remazol blue dye (acidic dye) 之 M3G 固態培養基 [1]。如果是  $\epsilon$ -polylysine 生產菌將會吸收 Remazol blue dye, 形成目視可見的同心圓區域, 菌落呈現藍色; 另外,  $\epsilon$ -polylysine 生產菌將會排斥鹼性染料亞甲基藍 methylene blue, 使菌落周圍呈現透明同心圓狀。用劃線法將上述分離出的菌株進行純化菌種於裝有 30 mL M3G 特別培養基 (每升含 50g glucose, 10g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g yeast extract, 1.36g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.03g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.04g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 6.8) 的 300 mL 三角瓶中, 於 30 °C、220 rpm 培養 4d 得到發酵液。發酵液於 8000 rpm 離心 10min, 將上清液適當稀釋, 用 Itzhaki 方法測定發酵液中  $\epsilon$ -PL 含量, 選取  $\epsilon$ -PL 產量較高的菌株, 對菌株進行形態學鑒定。

#### 3. Itzhaki 方法快速分析聚離胺酸

Itzhaki 比色法具有較高的靈敏度, 而且簡單快速 [11], 其原理是過量甲基橙與  $\epsilon$ -PL 反應生成沉澱, 經離心後測定上清剩餘甲基橙的吸光度, 從而得出參與反應的  $\epsilon$ -PL 濃度。簡述如下: 取 2 mL 待測液與 2 mL 甲基橙溶液 (1 mmol/L)

混合, 在 30°C 振盪反應 30 min 後, 以 4000 rpm 離心 15 min。用磷酸鉀緩衝液 (1mmol/L, pH 6.9) 將上清稀釋 10 倍, 以磷酸鉀緩衝液與甲基橙反應為空白對照, 再以分光光度計測定 465nm 的吸光值。

#### 4. $\epsilon$ -PL 降解菌株之篩選

將上述能忍受  $\epsilon$ -PL 及具  $\epsilon$ -PL 生產之菌株再以 M3G 特別培養基於 30°C, 轉速 150 rpm 下, 振盪培養 72h 後離心, 菌絲以 100 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 (pH 6.0) 洗滌 2 次後置入含 0.1 mg/ml  $\epsilon$ -PL 之緩衝液, 經培養 3h 後離心, 再以下述 HPLC 法進行  $\epsilon$ -PL 之定量分析。HPLC 系統包含 Hitachi L6200 層析裝置並配 Tsk gel ODS-120T column (4.6×250; Tosho Co. Ltd., Tokyo) 分析管柱, 使用 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  作為沖提液, 流速 0.4 mL/min, 以 UV 215 nm 波長偵測。將所篩選出之  $\epsilon$ -PL 降解菌株進行鑑定, 再進行 16S-rDNA 序列分析, 所得到的序列分析與 NCBI 之基因之料庫比對, 可得知此菌株與 *Streptomyces albulus* 最相近。

### (二) $\epsilon$ -PL 合成酵素與分解酵素在細胞之存在位置 (胞內或胞外酵素)

#### 1. $\epsilon$ -PL 合成酵素之存在位置鑑定

將上述篩選得到之具有  $\epsilon$ -PL 合成能力之菌株依上述方法培養, 並監控細菌生長 (OD660nm), 當菌之生長曲線對數成長期 (Logarithmic phase) 之末及靜止期 (stationary phase) 之初, 停止培養並離心 (12,000g, 4°C)。保留上清液, 沉澱之細胞則懸浮於緩衝液 A (含 40% glycerol, 200mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 10mM dithiothreitol, 2mM EDTA) 再以超音波打破, 經高速離心 (12,000g) 後, 上清液再以超高速離心 (56,000g) 分成細胞質部份 (上清液) 及附著細胞膜部份 (沉澱部份), 細胞膜部份置於緩衝液 A 溶液中 (含 1% (w/v) Brij 58) (25°C, 2h) 後高速離心。將上述三個部份之酵素之製備液 (去菌之培養液, 細胞質部份及附著細胞膜部份) 以下述方法用於離胺酸之聚合以確定  $\epsilon$ -PL 合成酵素之存在位置。

#### 2. 以 $\epsilon$ -PL 合成酵素聚合 L-Lysine

本實驗依 Kawai [13] 之方法進行以  $\epsilon$ -PL 合成酵素催化聚合離胺酸: 將反應混合液 100  $\mu$ l (含 10  $\mu$  mol Tris/HCl, 5  $\mu$  mol L-Lysine, 5  $\mu$  mol ATP, 0.5  $\mu$  mol  $\text{MgCl}_2$ , 20  $\mu$  mol KCl, 0.1  $\mu$  mol dithiothreitol, 與 40  $\mu$  g  $\epsilon$ -PL 合成酵素之製備液) 在 pH 8.0, 30°C 之培養箱中培養 24 小時。加入 Chaps (最



終濃度 0.1M)並在 25°C 培養過夜。將培養液以水稀釋至 1ml, 以 HPLC 分析  $\epsilon$ -PL, 1 單位活性定義為在 30°C, 每分鐘將 1pmol 的 L-Lysine 轉化為  $\epsilon$ -PL 之酵素量。

### 3. $\epsilon$ -PL 降解酵素之存在位置鑒定 (胞內或胞外酵素)

將上述篩選得到之具有  $\epsilon$ -PL 降解能力之菌株依上述方法培養, 並監控細菌生長 (OD660nm), 當菌之生長曲線在靜止期 (stationary phase) 之末, 停止培養並以離心 (12,000g, 4°C)。保留上清液, 沉澱之細胞則懸浮於緩衝液 A (含 40% glycerol, 200mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 10mM dithiothreitol, 2mM EDTA) 再以超音波打破, 經高速離心 (12,000g) 後, 上清液再以超高速離心 (56,000g) 分成細胞質部份 (上清液) 及附著細胞膜部份 (沉澱部份)。細胞膜部份置於緩衝液 A 溶液中 (含 1% (w/v) Brij 58) (25°C, 2h) 後高速離心。將上述三個部份之酵素之製備液 (去菌之培養液, 細胞質部份及附著細胞膜部份) 以下述 L-lysyl-p-nitroanilide (Sigma 產品) 為基質之  $\epsilon$ -PL 降解酵素之活性分析方法加以分析。

### 4. $\epsilon$ -PL 降解酵素之活性分析

$\epsilon$ -PL 降解酵素之活性係以 L-lysyl-p-nitroanilide (Lys-PNA) 為基質, 反應液含 5 mM L-lysyl-p-nitroanilide, 100 mM potassium phosphate (pH 7.0), 及酵素溶液, 總體積共 1 ml, 在 30°C 反應 3 min 後, 加入 0.1 ml 之 2 N HCl 以停止反應, 所形成之 p-nitroaniline 以分光光度計在 410 nm 分析, 酵素活性以 p-nitroaniline 在 410 nm 之吸光係數  $6525 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (pH 7.0) 計算, 1 單位活性定義為在 30°C, 每分鐘形成  $1 \mu \text{ mol p-nitroaniline}$  之酵素量。

### 5. 降解酵素對 $\epsilon$ -PL 降解實驗

將反應溶液 4ml (含 4U 酵素, 4 mg  $\epsilon$ -PL 及 100mM 之 potassium phosphate (pH 7.0) 在 30°C 反應, 反應產物再以下述 GPC (Gel Permeation chromatography) 分析  $\epsilon$ -PL 之分子量以決定分子量隨時間之變化關係, 同時  $\epsilon$ -PL 之定量係以下述 HPLC 方法分析。

### 6. $\epsilon$ -PL 之定量 (HPLC 分析)

培養基中  $\epsilon$ -PL 濃度之定量係於不定時間取少許培養液並以 HPLC 分析, 並將  $\epsilon$ -PL 之波峰面積與由純  $\epsilon$ -PL 標準品 (本實驗室過去生產及純化之產品) 所建立之檢量線相對照而得 [1]。HPLC 系統包含 Hitachi L6200 層析裝置並配 Tsk gel ODS-120T column (4.6×250; Tosho Co. Ltd., Tokyo) 分析管柱, 使用 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  作為沖提液, 流速 0.4 mL/min,

以 UV 215 nm 波長偵測。

### 7. $\epsilon$ -PL 之分子量分析

$\epsilon$ -PL 之分子量將以 GPC (Gel Permeation chromatography) 分析。GPC 系統包含 Hitachi L6200 層析裝置並配置 Sephadex G-100 管柱、UV 偵測器、Waters 之數據處理器, 並以 Cytochrome c (NW 12,384)、myoglobin (17,800)、 $\alpha$ -chymotrypsinogen A (25,000)、bovine albumin (67,000) 建立分子量之檢量線, 層析之移動相為 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 流速  $0.2 \text{ ml min}^{-1}$ 。

### (三) $\epsilon$ -PL 降解酵素之製備

將  $\epsilon$ -PL 降解酵素之生產菌以接種量 10% 接種於含 3 L 之 M3G 特別培養基之 5L 自動控制發酵槽中進行, 發酵體積 3 L, 發酵溫度 28°C, 轉速 400 r/min, 通氣量 2.0 L/min, 並自動加氨水 (10%) 以控制 pH 在 4.0, 經培養 72 h 後發酵液冷凍離心 (4°C, 12000g) 30 min, 保留上清液並收穫菌體, 沉澱之細胞則懸浮於緩衝液 A (含 40% glycerol, 200mM Tris-HCl buffer (pH8.0), 10mM dithiothreitol, 2mM EDTA) 再以超音波打破, 經高速離心 (12,000g) 後, 上清液再以超高速離心 (56,000g) 分成細胞質部份 (上清液) 及附著細胞膜部份 (沉澱部份)。細胞膜部份置於緩衝液 A 溶液中 (含 1% (w/v) Brij 58) (25°C, 2h) 後高速離心後保留上清液, 所得之粗酵素, 以前述 L-lysyl-p-nitroanilide 為基質之  $\epsilon$ -PL 降解酵素之活性分析方法加以分析後, 具酵素活性之部份, 再經下述之管柱層析。

### (四) $\epsilon$ -PL 降解酵素 (PLD) 的分離純化

#### 1. 管柱層析

將上述細胞膜部份置於緩衝液 A 溶液中 (含 1% (w/v) Brij 58) (25°C, 2h) 後高速離心後保留上清液, 所得之粗酵素, 加入 1.5 倍冷乙醇沉澱, 並於 4°C 下靜置 1h, 再以 8000 rpm 離心 10 min, 收集沉澱物, 再以 100 mM 磷酸緩衝液溶解, 再以含 20% (v/v) 甘油之 100 mM 磷酸緩衝液透析 24 h, 進行以 DEAE-Sepharose (16 mm×350 mm) 陰離子交換層析 (Amersham Bioscience 產品), 粗酵素液載入管柱後, 先以緩衝液 A (0.025 mol/L 磷酸鉀, pH=8.0) 洗滌平衡, 再以緩衝液 B (緩衝液 A+0.5 mol/L NaCl) 以 0-100% 作線性梯度沖提, 分液收集洗脫液並以上述方法檢測酵素活性; 將 DEAE-Sepharose 陰離子交換層析得到的含有酵素活性的收集洗脫液透析、濃縮, 進行 Source 15Q (HR10/10, 8mL) 陰離子交換層析 (Amersham Bioscience 產品), 將經 DEAE-





Sepharose 之後濃縮之酵素液填入管柱後，先以緩衝液 C (0.025 mol/L 磷酸鉀, pH=7.6) 緩衝液洗滌平衡，再以緩衝液 D(緩衝液 C+0.5mol/L NaCl)以 35-60%作線性梯度沖提，分液收集洗脫液並檢測酵素活性，收集活性峰；將 Source 15Q 陰離子交換層析得到的活性峰透析、濃縮。

## 2. PLD 樣品純度分析和分子量測定

利用 SDS-PAGE 電泳 (Tris-HCl 緩衝系統並採用 12% 的分離膠) 對各分離純化步驟進行純度分析並分析 PLD 分子量，SDS-PAGE 電泳分析採用以標準蛋白為分子量比對標誌。

## 三、結果與討論

### (一) 篩選具有能忍受 $\epsilon$ -PL 並有 $\epsilon$ -PL 合成與降解能力之菌株

由土壤樣品篩選具有  $\epsilon$ -PL 忍受能力之菌株，發現有 7 株菌株具有  $\epsilon$ -PL 忍受能力，這 7 株菌株  $\epsilon$ -PL 忍受能力介於 0-50 mg/ml，其中一株具有  $\epsilon$ -PL 合成能力與分解能力。此菌株經形態學鑒定屬於 *Streptomyces albulus*，此菌株暫命名為，*S. albulus* PLT1。*S. albulus* PLT1 對  $\epsilon$ -PL 之忍受能力介於 0-5mg/L (如圖 1 所示)， $\epsilon$ -PL 濃度超過 10mg/ml 則 *S. albulus* PLT1 生長幾乎被抑制。與其他菌株比較 *S. albulus* PLT1 具有極高之  $\epsilon$ -PL 忍受能力，一般細菌之最低抑制濃度為 1-8 ug/ml，而真菌之最低抑制濃度為 120-250 ug/ml。將此菌培養於以 M3G 固態培養基分別添加 0.02% methylene blue (basic dye) 和 Remazol blue dye (acidic dye) ;結果發現會吸收酸性染料 Remazol blue dye，形成目視可見的同心圓區域，菌落呈現藍色 (圖 2 (A)); 另外， $\epsilon$ -polylysine 生產菌將會排斥鹼性染料亞甲基藍 methylene blue，使菌落周圍呈現透明同心圓狀 (圖 2 (B)); 因此 *S. albulus* PLT1 極可能生產  $\epsilon$ -PL。

將上述篩選之 *S. albulus* PLT1 置入 M3G 特別培養基中培養，M3G 培養基中之碳源分別為葡萄糖 (glucose) 與甘油 (glycerol)，以探討篩選菌是否生產  $\epsilon$ -PL 與其探是否使用葡萄糖或甘油，結果 (如圖 3 所示) 發現 *S. albulus* PLT1 可使用葡萄糖或甘油為碳源並能生產  $\epsilon$ -PL，即為  $\epsilon$ -PL 之生產菌。在含葡萄糖之 M3G 培養基中經 72h 培養可得 0.561g/L 之  $\epsilon$ -PL，但在含甘油之 M3G 培養基中經 72h 培養可得 0.385g/L 之  $\epsilon$ -PL。由圖 3 亦可看出在 72h 時  $\epsilon$ -PL 之產量最高，之後  $\epsilon$ -PL 之產量下降，可能是  $\epsilon$ -PL 被分解之故，因此

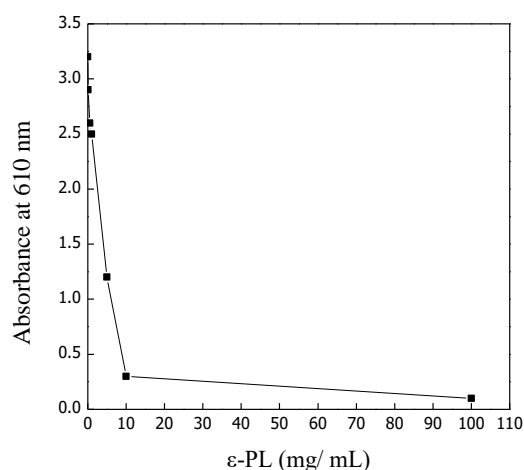


圖 1. 篩選菌 *Streptomyces albulus* PLT1 對  $\epsilon$ -PL 之忍受度



圖 2(A). *S. albulus* PLT1 培養於添加 Remazol blue 之 M3G 固態培養基



圖 2(B). *S. albulus* PLT1 培養於添加鹼性染料亞甲基藍 methylene blue 之 M3G 固態培養基

此株菌應有  $\epsilon$ -PL 降解能力。將 *S. albulus* PLT1 置入 M3G 培養基中振盪培養 72 h 後將菌絲以 100 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液 (pH 6.0) 洗滌 2 次後置入含 0.1 mg/ml  $\epsilon$ -PL 之緩衝液，經培養 3h 後離心，再以 HPLC 分析，發現 *S. albulus* PLT1 具有  $\epsilon$ -PL 降解能力 (data not shown)。由上述數據已證明 *S. albulus* PLT1 具有



能忍受  $\epsilon$ -PL 並有  $\epsilon$ -PL 合成與降解能力之菌株。

## (二) $\epsilon$ -PL 之合成酵素及 $\epsilon$ -PL 降解酵素在細胞之存在位置 (胞內或胞外酵素)

將 *S. albulus* PLT1 培養後依上述之實驗方法，製備三個部份之酵素製備液 (去菌之培養液，細胞質部份及附著細胞膜部份)。

### 1. $\epsilon$ -PL 之合成酵素之存在位置

將此三個部份酵素之製備液依 Kawai [13] 之方法進行以聚合酵素催化聚合離氨酸，結果 (圖 4) 顯示，酵素活性以附著細胞膜部份最為顯著 ( $0.13 \pm 0.02$  U/mg protein)，其他去菌之培養液，細胞質部份酵素活性相當低，因此 *S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 之合成酵素應是膜結合蛋白 (membrane bound protein)。

### 2. $\epsilon$ -PL 之分解酵素之存在位置

將此三個部份酵素之製備液依 Kito [14-15] 之方法進行以分解酵素催化分解  $\epsilon$ -PL，結果 (圖 5) 顯示酵素活性以附著細胞膜部份最為顯著 ( $0.066 \pm 0.002$  U/mg protein)，其他去菌之培養液，細胞質部份酵素活性相當低，因此 *S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 之分解酵素應是膜結合蛋白 (membrane bound protein)。

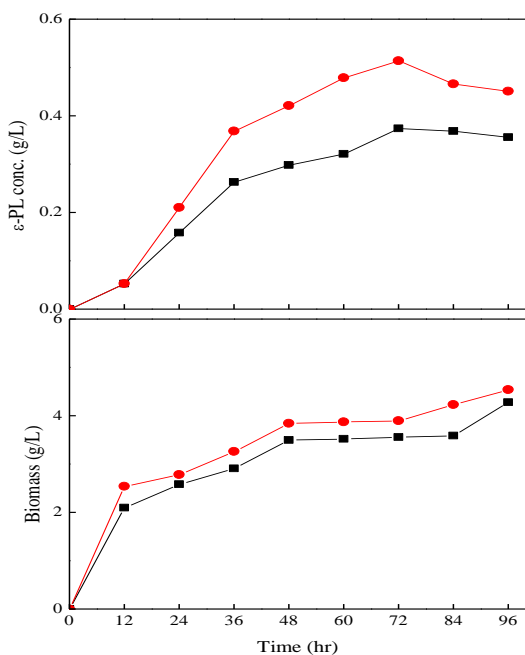


圖 3. *S. albulus* PLT1 培養於 M3G (含葡萄糖或甘油) 培養基，Symbol：(■) Glycerol；(●) Glucose

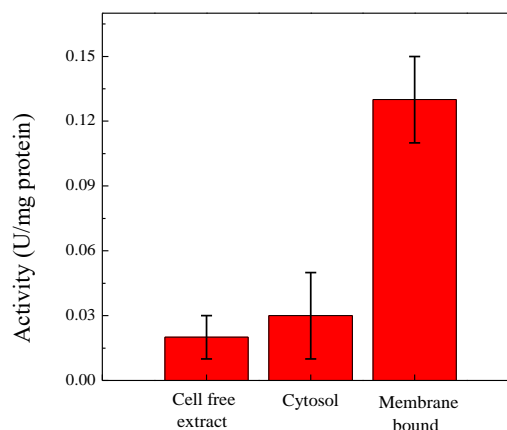


圖 4. 粗酵素製備之  $\epsilon$ -PL 之合成活性

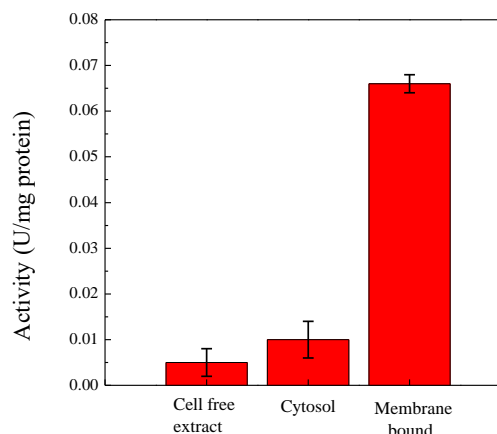


圖 5. 粗酵素製備之  $\epsilon$ -PL 之分解活性

## (三) $\epsilon$ -PL 降解酵素對 $\epsilon$ -PL 之作用型態 (外切型酵素或內切型酵素)

將粗酵素製備液  $\epsilon$ -PL 在 100mM 之 potassium phosphate (pH 7.0) 緩衝液中，在 30°C 反應，反應物再以上述 HPLC 方法分析，結果如圖 6 所示，經 30 分鐘反應後部份  $\epsilon$ -PL 已分解，新產物為 L-lys (RT=13.5 min)，因此 *S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素應是外切型酵素型態，*S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素應可應用於不同分子量之  $\epsilon$ -PL 的製備，以利各種不同功能之應用。

## (四) $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 的分離純化

將粗酵素液進行進行以 DEAE-Sepharose (16 mm×350 mm) 陰離子交換層析，以緩衝液作線性梯度沖提，分液收集，層析圖如圖 7 所示，此純化過程出現多個蛋白質之吸收峰，將具有分解酵素活性之洗脫液合併收集，透析、濃縮。再將此含有酵素活性的收集液進行 Source 15Q (HR10/10, 8mL) 陰離子交換層析，層析圖如圖 8 所示，收集活性峰，



透析、濃縮。各個純化步驟之活性與回收率之結果示於表 1，最後之純化倍數為 65.6，回收率為 25.5%，比活性達 40.0 U/mg。將純化的樣品進行 SDS-PAGE 電泳分析，由圖 9 可知經陰離子交換層析後樣品之電泳分析呈現一主帶，其他非常微量，呈現主帶以標準蛋白之相對滯留時間對相應蛋白分子量對數 ( $\log M_r - R_f$ ) 作圖，可得分子量分布標準曲線，對照 Marker 分子量，計算得  $\epsilon$ -PL 分解酵素分子量約為 39.5 kDa，已知 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 的  $\epsilon$ -PL 分解酵素之分子量約為 54.7 kDa。[27]，*Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 中的  $\epsilon$ -PL 分解酵素之分子量約為 43.6 kDa [5]。Kito 等 [16]雖然曾從 *Streptomyces albulus* 分離純化  $\epsilon$ -PL 分解酵素，但其檢測出的酵素分子量為 54 kDa，與本文所得  $\epsilon$ -PL 分解酵素之分子量不同。

#### 四、結論

本研究已建立篩選具有能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株， $\epsilon$ -PL 合成菌株與  $\epsilon$ -PL 降解能力菌株之方法。已篩選出一株具有能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株且具  $\epsilon$ -PL 合成與  $\epsilon$ -PL 降解能力之菌株 *S. albulus* PLT1，此菌株之  $\epsilon$ -PL 合成酵素及  $\epsilon$ -PL 分解酵素兩者皆為膜結合酵素，而  $\epsilon$ -PL 降解酵素對  $\epsilon$ -PL 之作用型態之探討證明其為外切型酵素。 $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 之分離純化可經過 DEAE-Sepharose、Source 15Q 陰離子交換層

析後得到純化之酵素，其分子量約為 39.5 kDa。後續將進行  $\epsilon$ -PL 分解酵素之特性鑑定及  $\epsilon$ -PL 分解酵素生化活性之探討。 $\epsilon$ -PL 降解酵素與  $\epsilon$ -PL 之生產有密切關係，本研究結果將對控制  $\epsilon$ -PL 之生產有顯著的貢獻。

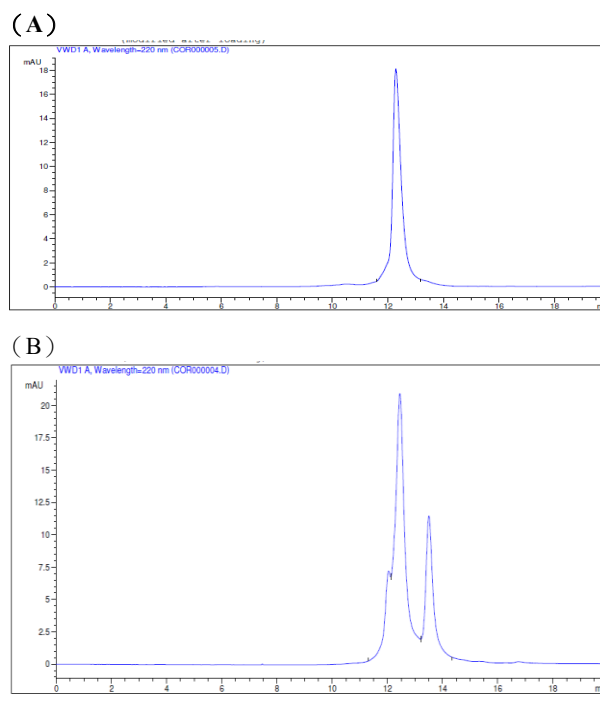


圖 6.  $\epsilon$ -PL 降解酵素對  $\epsilon$ -PL 之作用  
(A) 0 分鐘、(B) 30 分鐘

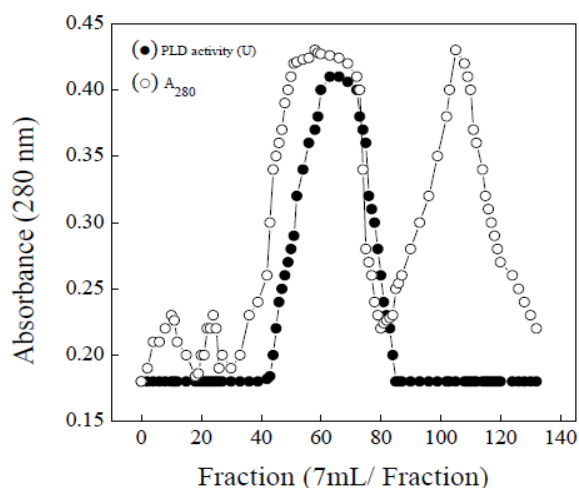


圖 7. DEAE-Sepharose 弱陰離子交換層析圖

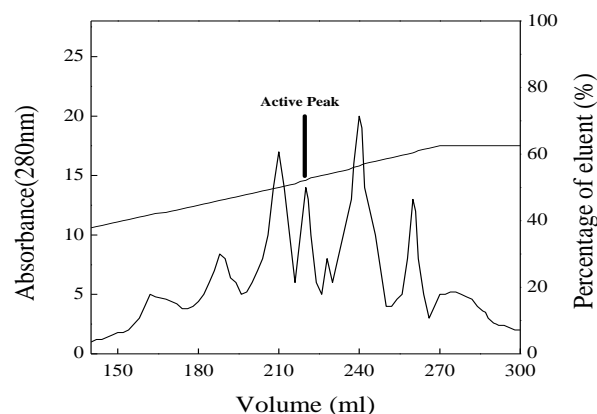


圖 8. Source 15Q 陰離子交換層析

表 1.  $\epsilon$ -PL 分解酵素的純化過程和回收率

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Broken Cell Extract	2223.1	1349.0	0.61	100.0	1.00
Cell Membrane Extrac	1556.2	1214.1	0.78	90.0	1.28
DEAE-Sepharose	72.7	705.5	9.70	52.3	15.9
Source 15Q	8.6	344.0	40.0	25.5	65.6



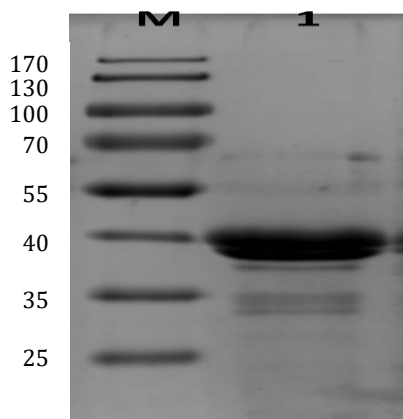


圖 9. 純化  $\epsilon$ -PL 分解酵素之 SDS-PAGE 電泳圖

電泳帶 M：分子量標準品

電泳帶 1：純化之  $\epsilon$ -PL 分解酵素

### 誌謝

本研究誠摯感謝科技部計畫提供相關經費支援(計畫編號：NSC 101-2313-B-212 -003 -MY3)，使得本研究得以順利進行，謹此致謝。

### 參考文獻

1. 施英隆、沈名豪(民 92)，以微生物生產聚離氨酸及其應用，生物資源生物技術，5(1)，4-11。
2. 施英隆(民 95)，微生物生產生物高分子及其應用，化學，64(1)，105-118。
3. Choi, J. S, D. K. Joo, C. H. Kim, K. Kim and J. S. Park (2000) Synthesis of barbell-like tri-block copolymers, poly(L-lysine)dendrimer-block-poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) dendrimers and its self-assembly with plasmid DNA. *Journal of American Chemical Society*, 122(3), 474-480.
4. Choi, J. S, E. J. Lee, Y. H. Choi, Y. J. Jeong and J. S. Park (1999) Poly (ethylene glycol)-block-poly (L-lysine) dendrimer: novel linear polymer/dendrimer block copolymer forming a spherical water-soluble polyionic complex with DNA. *Bioconjugate chemistry*, 10(1), 62-65.
5. Feng, X. H., H. Xu, X. Y. Xu, J. Yao and Z. Yao (2008) Purification and some properties of  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme from *Kitasatospora* sp. CCTCC M205012. *Process Biochemistry*, 43(6), 667-672.
6. Hiraki, J. (1995) Basic and applied studies on  $\epsilon$ -polylysine. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 23, 349-354.
7. Hiraki, J. (2000)  $\epsilon$ -polylysine, its development and utilization. *Fine chemicals*, 29(1), 28-25.
8. Hiraki, J., T. Ichikawa, S. I. Ninomiya, H. Seki, K. Uohama, H. Seki, S. Kimura, Y. Yanagimoto and J. W. Barnett (2003) Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328-340.
9. Hiraki, J., H. Masakazu, M. Hiroshi and I. Yoshikazu (1998) Improved poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistane mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsukogaku*, 76, 487-493.
10. Ho, Y.T., S. Ishizaki and M. Tanaka (2000) Improving emulsifying activity of  $\epsilon$ -polylysine by conjugation with dextran through the Maillard reaction. *Food Chemistry*. 68(4), 449-455.
11. Itzhaki, F. R. (1972) Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50(2), 569-574.
12. Kahar P., T. Iwata, J. Hiraki, Y. E. Park and M. Okabe (2001) Enhancement  $\epsilon$ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 190-194.
13. Kawai, T., T. Kubota, J. Hiraki and Y. Izumi (2003) Biosynthesis of  $\epsilon$ -L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(3), 635-640.
14. Kido, Y., S. Hiramoto, M. Murao, Y. Horio, T. Miyazaki, T. Kodama and Y. Nakabou (2003)  $\epsilon$ -Polylysine inhibits pancreatic lipase activity and suppresses postprandial hypertriacylglyceridemia in rats. *The Journal of Nutrition*. 133(6), 1887-1891.
15. Kito, M., Y. Onji, T. Yoshida and T. Nagasawa (2002). Occurrence of  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme in  $\epsilon$ -poly-L-lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 207(2), 147-151.
16. Kito, M., R. Takimoto, T. Yoshida and T. Nagasawa





- (2002). Purification and characterization of an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme from an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing strain of *Streptomyces albulus*. *Archives Microbiology*, 178(5), 325-330.
17. Kunioka, M. and H. J. Choi (1995) Properties of biodegradable hydrogels prepared by  $\gamma$ -irradiation of microbial ( $\epsilon$ -Lysine) aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 58(4), 801-806.
  18. Neda, K., T. Sakurai, M. Stakahashi, M. Shiychi and M. Ohgushi (1999) Two-generation reproduction study with teratology test of  $\epsilon$ -poly-L-lysine by dietary administration in rats. *Japanese Pharmacology and Therapy*. 27(7), 1139-1159.
  19. Shen, W. C. and H. J. P. Ryser (1978) Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75(4), 1876-1978.
  20. Shen, W. C. and H. J. P. Ryser (1981) Poly(L-lysine) has different membrane transport and drug-carrier properties when complexed with heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78(12), 7580-7593.
  21. Shih, I. L., M. H. Shen and Y. T. Van, (2006) Microbial synthesis of poly( $\epsilon$ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 97(9), 1148-1159.
  22. Shih, I. L., Y. T. Van and M. H. Shen (2004) Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine). *Mini Review in Medicinal Chemistry*, 4(2),179-188.
  23. Shima S., S. Oshima and H. Sakai (1983) Biosynthesis of  $\epsilon$ -poly-L-lysine by washed mycelium of *Streptomyces albulus* No-346. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 57, 221-226 (in Japanese).
  24. Shima, S and H. Sakai (1977) Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(9), 1807-1809.
  25. Shima, S and H. Sakai (1981) Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2497-2502.
  26. Shima, S and H. Sakai (1981). Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2503-2508.
  27. Tan, Z. L., S. R. Jia, Y. Zhao, G. D. Yuan and W. F. Cao (2009) Purification and characterization of an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme isolated from *streptomyces diastatochromogenes* TUST2. *Chemical Journal of Chinese Universities -Chinese Edition*, 30(12), 2404-2408.
  28. Tsujita, T., H. Takaichi, T. Takaku, S. Aoyama and J. Hiraki (2006). Antiobesity action of  $\epsilon$ -polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. *Journal of Lipid Research*. 47(8), 1852-1858.

收件：108.10.07 修正：108.11.25 接受：109.01.14

