

## $\epsilon$ -聚離胺酸分解酵素之生化研究 (二)

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，它的應用潛力廣，然而生合成作用機制還未明，調控機制則仍十分模糊。 $\epsilon$ -PL 分解酵素 (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 之生合成機制之一重要工具。我們曾篩選出一株具有能忍受  $\epsilon$ -PL 之菌株且具  $\epsilon$ -PL 合成與  $\epsilon$ -PL 分解能力之菌株 *S. albulus* PLT1，此菌株之  $\epsilon$ -PL 分解酵素為膜結合酵素。*S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素經分離純化，已知其分子量約為 39.5 kDa。本研究接續先前之研究，進行  $\epsilon$ -PL 分解酵素之特性鑑定及探討其生化活性； $\epsilon$ -PL 分解酵素的特性分析發現，其對  $\epsilon$ -PL 之作用型態為外切型酵素，以 L-lysyl-p-nitroanilide (Lys-PNA) 為基質時，最適反應溫度為 30°C，最適 pH 值為 7.0，在 20-40°C 保存時酵素活性穩定，在 50°C 以上保存時酵素活性迅速下降。最大反應速率  $V_{max}=0.068$  mmol/L/min，米氏常數  $K_m=0.127$  mmol/L。 $\epsilon$ -PL 分解酵素是一種金屬酶，EDTA 處理後酵素活性完全消失，加入  $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$  及  $Zn^{2+}$  可有效恢復酵素活性，分別為 94%、92%、85% 及 70%。 $Co^{2+}$  可恢復酵素活性 42%， $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  及  $Hg^{2+}$  則無法恢復酵素活性。

**關鍵詞：** $\epsilon$ -聚離胺酸，聚離胺酸分解酵素，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 $\epsilon$ -Polylysine Depolymerase: Part 2

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

Microbial fermentation produces  $\epsilon$ -polylysine ( $\epsilon$ -PL), which is a naturally occurring biomaterial. It has potential applications in various fields, such as in the food, medicine, pesticides, and electronic and chemical materials. Studies have reported promising results for  $\epsilon$ -PL biosynthesis; however, the biosynthetic mechanism has yet not been elucidated, and the biosynthetic enzymes have yet to be



isolated or characterized. We previously isolated an  $\epsilon$ -PL-tolerant strain (*Streptomyces albulus* PLT1) that showed both  $\epsilon$ -PL-producing and  $\epsilon$ -PL-degrading capacity. The  $\epsilon$ -PL-degrading enzyme (a cell membrane-associated protein) of *Streptomyces albulus* PLT1 was purified and analyzed using polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular mass was estimated to be approximately 39.5 kDa. In the present study, the enzyme was further characterized, and its biochemical properties were explored. The results showed that the enzyme catalyzed the exo-type degradation of  $\epsilon$ -PL. With L-lysyl-p-nitroanilide as a substrate, the enzyme was stable between pH 6.0 and 9.0 and showed maximum activity at pH 7.0. The optimal temperature was 30°C, and activity considerably decreased at temperatures exceeding 50 °C. The enzyme is a metalloenzyme that was completely deactivated by ethylenediaminetetraacetic acid treatment, but 94%, 92%, 85%, 70%, and 40% of its activity was restored through the addition of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Co}^{2+}$ , respectively. However, the addition of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  was unable to restore activity. The apparent  $K_m$  with L-lysyl-p-nitroanilide as the substrate was 0.127 mM, and the  $V_{max}$  was 0.068 mmol/L/min.

**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) 是為一結構極為特殊，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]。 $\epsilon$ -聚離胺酸具有水溶、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  $\epsilon$ -聚離胺酸及其衍生物於食品、醫藥及環保等領域之應用且有極多成果 [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, 8]、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分解同時存在，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 左右的時候， $\epsilon$ -PL 立刻被分解 [9, 12-13, 23]。已知分解係由  $\epsilon$ -聚離胺酸分解酶 ( $\epsilon$ -Poly-L-lysine-degrading enzyme, PLD) 引起， $\epsilon$ -PL 分解酶 (PLD) 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 的性質對保證  $\epsilon$ -PL 的正常發酵和生產高產量  $\epsilon$ -PL 具有十分重要的意義。

在研究各種不同 *Streptomyces* 菌株的  $\epsilon$ -PL-分解酶的分佈中，發現在  $\epsilon$ -PL-分解和  $\epsilon$ -PL-產生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 分解酶活性，他們也有能力生產  $\epsilon$ -PL。在其他展現低的  $\epsilon$ -PL 分解活性的菌株中，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 分解酵素。 $\epsilon$ -PL 生產者的  $\epsilon$ -PL 分解酵素可能扮演自衛的角色。如何控制  $\epsilon$ -PL 分解除對  $\epsilon$ -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，分子量低於 1300 時， $\epsilon$ -PL 失去抑菌活性；已知天然長鏈之  $\epsilon$ -PL 具有強烈的苦味，因此欲改善  $\epsilon$ -PL 之可食性，小分子量之控制是必要的 [5, 7-8]。

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 分解酵素 ( $\epsilon$ -PL degrading enzyme) 之生化活性是非常必要的。我們先前研究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 分解能力之菌株 *S. albulus* PLT1，此菌株之  $\epsilon$ -PL 分解酵素為膜結合酵素。*S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素經分離純化，其分子量約為 39.5 kDa [29]。本研究將接續先前之研究，進行  $\epsilon$ -PL 分解酵素之特性鑑定 (包括其對  $\epsilon$ -PL 之作



用型態、動力參數  $K_m$ 、 $V_{max}$  及探討其生化活性（最適溫度及 pH、穩定度、活化及抑制因子、基質之選擇性等）。

## 二、材料與方法

### （一） $\epsilon$ -PL 分解酵素之製備、分離純化及分子量分析

$\epsilon$ -PL 分解酵素之製備、分離純化及分子量分析係依先前之方法 [15-16, 29]。將  $\epsilon$ -PL 分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， $\epsilon$ -PL 濃度以 Itzhaki 方法快速分析監控 [11]，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，進行  $\epsilon$ -PL 分解酵素之活性分析： $\epsilon$ -PL 分解酵素之活性係以 L-lysyl-p-nitroanilide (Lys-PNA) 為基質，反應液含 5 $\mu$ mol L-lysyl-p-nitroanilide，100 $\mu$ mol 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，過濾後溶液以磷酸鉀調整 pH，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 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (pH 7.0) 計算，1 單位活性定義為在 30°C，每分鐘形成 1 $\mu$ mol p-nitroaniline 之酵素量。以上述 L-lysyl-p-nitroanilide 為基質之  $\epsilon$ -PL 分解酵素之活性分析方法加以分析後，具酵素活性之部份，再經管柱層析純化 [29]。管柱層析係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。沉澱物以 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 24h 後，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，

經透析後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，再進行 Source 15Q（HR10/10, 8mL）陰離子交換層析（Amersham Bioscience 產品），將粗酶液填入管柱後，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，經透析後並檢測酵素活性，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。PLD 樣品純度分析和分子量測定係利用 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。

### （二） $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 性質探討

#### 1. 最適溫度及熱穩定性

最適溫度分析實驗係將上述 100 mM potassium phosphate (pH 7.0) 含 L-lysyl-p-nitroanilide 為基質之溶液與  $\epsilon$ -PL 分解酵素在 0-60°C 溫度範圍（0、10、20、30、40、50、60°C），分別共同反應 3 min 後，以所形成之 p-nitroaniline 分析 PLD 酵素之活性，將 PLD 酵素的最高活性定義為 100% 以計算相對活性，酵素活性最大時的溫度即為最適溫度。熱穩定性分析則將酵素液分別在 30, 40, 50, 60, 70°C 水浴下分別保存 10、20、30、40、50、60 min，再以上述酵素活性分析方法加以分析，即將酵素製備液與含 Lys-pNA 緩衝液共同反應，在 30°C 反應 3 min 後分析酵素之活性，將溫度處理前 PLD 的活性定義為 100%，相對酵素活性 (%) = 處理後酵素液剩餘活性 / 未處理酵素液活性。

#### 2. 最適 pH 值

為了瞭解不同反應 pH 值對聚離胺酸分解酵素之活性是否造成影響，本實驗將純化的聚離胺酸分解酵素於不同 pH（4~9），30°C 下進行酵素活性分析；配製不同 pH 值的緩衝液（濃度均為 0.1 mol/L；dihydrogen phosphate-citric acid buffer pH4-6；potassium phosphate pH 6-8；Tris-HCl buffer pH 8-9），改變反應中緩衝液的 pH 值，測定酵素活性，PLD 酵素活性最高時的 pH 即為最適 pH 值。

#### 3. 動力參數之米氏常數 ( $K_m$ ) 和最大反應速率 ( $V_{max}$ )

用緩衝液（100 mM potassium phosphate, pH 7.0）分別配製 10、20、30、40、50  $\mu$ mol/L 五種不同濃度的 Lys-PNA 為基質，將酵素製備液 250 $\mu$ l 與 250 $\mu$ l 之含 Lys-PNA 緩衝液在 30°C 共同反應，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。同時測定反應速率  $V_G$  (initial rate of p-nitroaniline，每分鐘 p-nitroaniline 釋出之莫耳濃度)，並採用 Michaelis-Menten 方程式，由  $1/V_G$  與 Lys-PNA 濃度之 double reciprocal plot 即可同時計算動力參數；米氏常數  $K_m$  和最大反應速率  $V_{max}$ 。

#### 4. $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 之活化及抑制因子之探討

將酵素液加入 1 mmol/L EDTA 在 4°C 處理 24 h，透析，分析相對分解酵素之活性，以確定 PLD 是否為金屬酶。將處理後的酵素液透析，分別加入 1 mmol/L 不同金屬離子  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  等物質再分析其活性。

#### 5. 分解酵素對 $\epsilon$ -PL 分解實驗

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 GPC (Gel Permeation chromatography) 分析，並由層析圖形變化以了解聚離氨酸分解之型式為外切或內切型式。所使用之  $\epsilon$ -PL 為本實驗室過去生產及純化之產品 [1, 21, 29]，其相對分子大小 (relative molecular size) 約為 4,000 Da，在本實驗 GPC 分析條件下其 Retention Time 為 15.0 min (RT=15.0 min)，而最終產物為 L-lys (RT=17.5 min)。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 Bradykinin (MW 1,060)、Cytochrome c (NW 12,384)、myoglobin (17,800)、 $\alpha$ -chymotrypsinogen A (25,000) 建立分子量之檢量線。層析之移動相含 0.1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ，流速  $0.2 \text{ ml min}^{-1}$ 。

#### 6. 基質之特異性分析 (Substrate specificity)

為決定純化酵素分解基質之特異性，純化酵素用於分解幾種短肽 (oligopeptides)，如 Lys-PNA, Glu-PNA、Lys-Lys、Lys-Lys-Lys、Lys-Als, Als-Lys、Lys-Glu, Glu-Lys、Lys-Asp, Asp-Lys、Arg-Lys-Asp-Val-Tyr、casein 等，以 Lys-PNA 之分解為相對之標準。分解反應實驗依上節所述  $\epsilon$ -PL 降解實驗之程序，反應溶液包含 4 U PLD，100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 並將  $\epsilon$ -PL 以各基質取代，最終體積為 4 ml。將實驗在 30°C 下反應 15 分鐘後再分析 L-離氨酸濃度並確定相對活性，L-離氨酸濃度係依據已知之 L-lysine-K-oxidase 酵素法分析 [15-16]。

#### 7. Itzhaki 方法快速分析聚離氨酸

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 (1 mmol/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。

### 三、結果與討論

#### (一) $\epsilon$ -PL 分解酵素之製備分離純化及分子量分析

$\epsilon$ -PL 分解酵素之製備、分離純化及分子量分析已於先前之研究探討並發表過 [29]。已知菌株 *S. albulus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素為膜結合酵素。 $\epsilon$ -PL 分解酵素 (PLD) 之分離純化可經過 DEAE-Sephrose、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 [29]。本研究續進行此酵素之特性鑑定。

#### (二) $\epsilon$ -PL 分解酵素的特性分析

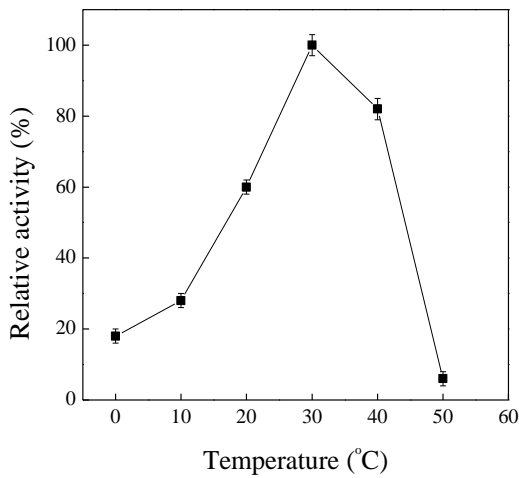
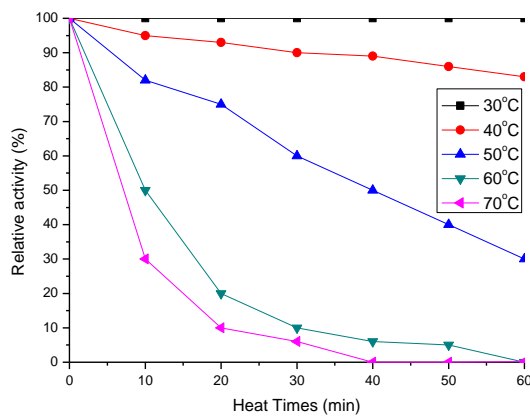
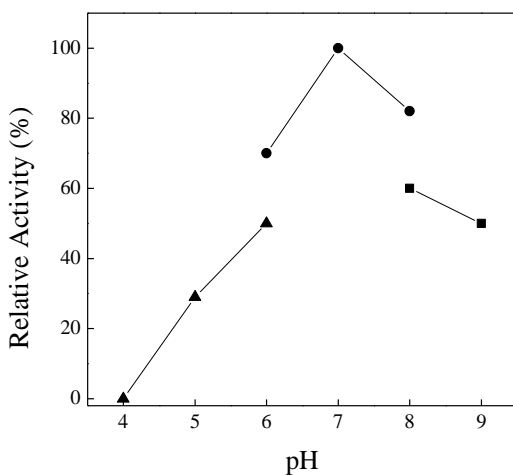
##### 1. 最適溫度及熱穩定性

圖1所示為反應溫度對  $\epsilon$ -PL 分解酵素的影響，在 0-60°C 之測試範圍，結果發現  $\epsilon$ -PL 分解酵素在 30°C 時活性最高，即最適反應溫度為 30°C。圖2所示為  $\epsilon$ -PL 分解酵素的熱穩定性，結果發現溫度對  $\epsilon$ -PL 分解酵素的熱穩定性影響很大，在 30°C 下保持 1 小時酵素活性幾乎沒有損失，在 40°C 下保持 1 小時酵素活性仍有 80%，50-70°C 時很不穩定，在 60°C 以上保持 1 小時酵素活性幾已完全喪失。此結果與 *Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 [5] 及 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 之 PLD 性質相近 [27]。另 Kito 等 [16] 報導 *Streptomyces albulus* 之 PLD 在 50°C 下觀察到最高活性，當該酵素在高達 45°C 的溫度下反應 30 分鐘時，未觀察到活性損失。

##### 2. 最適 pH 值

pH 值是  $\epsilon$ -PL 發酵生產過程中最重要的影響因素之一，發酵過程中控制發酵液的 pH 對  $\epsilon$ -PL 之生產有極大之影響，目前已知 pH 為酸性 4.0 時有利於  $\epsilon$ -PL 的累積，且不會影響菌的正常生長和代謝，當 pH 為在 5 以上時  $\epsilon$ -PL 則立刻分解，對  $\epsilon$ -PL 生產極為不利 [12]。如圖 3 所示，當 pH 為 4.0 時  $\epsilon$ -PL 分解酵素的相對酶活性幾乎為 0，pH 上升為 5.0 時， $\epsilon$ -PL 分解酵素的相對酶活性為 25.0%，當 pH 為 7.0



圖1. 反應溫度對  $\epsilon$ -PL分解酵素的影響。圖2.  $\epsilon$ -PL分解酵素的熱穩定性圖3. pH對  $\epsilon$ -PL分解酵素的影響

Buffers used (100 mM) : (▲) disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer (pH 4.0-6.0); (●) potassium phosphate buffer (pH 6.0-8.0); (■) Tris-HCl buffer (pH 8.0-9.0).

時  $\epsilon$ -PL 分解酵素的相對酶活性達到 100%，從這一結果可知 pH 值對此菌中  $\epsilon$ -PL 分解酵素的活性影響很大，此結果與 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 [27]、*Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 [5] 及 *Streptomyces albulus* [16]之 PLD 性質相近。

### 3. 金屬離子對 $\epsilon$ -PL 分解酵素的影響

由表 1 之結果得知  $\epsilon$ -PL 分解酵素經 EDTA 處理後活性完全喪失，因此推測  $\epsilon$ -PL 分解酵素是一種金屬酶。為了解金屬離子之影響，經 EDTA 處理後之酵素加入 1 mM 之各種金屬離子，以未經 EDTA 處理的酵素液的相對酶活性為對照，金屬離子對  $\epsilon$ -PL 分解酵素活性的影響結果列於表 1，可見加入  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  及  $\text{Zn}^{2+}$  可有效恢復  $\epsilon$ -PL 分解酵素活性分別為 94%、92%、85% 及 70%， $\text{Co}^{2+}$  可恢復  $\epsilon$ -PL 分解酵素活性 42%， $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  及  $\text{Hg}^{2+}$  則無法恢復  $\epsilon$ -PL 分解酵素活性。先前已報導 *Streptomyces diastatochromogenes* TUST2 [27]、*Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 [5] 及 *Streptomyces albulus* [16] 之 PLD 皆為金屬酶，但金屬離子對 PLD 活性之影響則稍有差異。

### 4. 動力參數之米氏常數 ( $K_m$ ) 和最大反應速率 ( $V_{max}$ )

以 Lys-PNA 為基質分別測定 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{mol/L}$  五種不同濃度下  $\epsilon$ -PL 分解酵素之反應速率  $V_G$  (initial rate of p-nitroaniline)，並採用 Michaelis-Menten 方程式，由  $1/V_G$  與 Lys-PNA 濃度之 double reciprocal plot 即可得米氏常數  $K_m=0.127 \text{ mmol/L}$ ，最大反應速率  $V_{max}=0.068 \text{ mmol/L/min}$ 。文獻上目前報導  $\epsilon$ -PL 分解酵素之動力參數並不多見，*Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素對 Lys-PNA 為基質之  $K_m=0.216 \text{ mmol/L}$ ，最大反應速率  $V_{max}=$

表 1. 金屬離子對  $\epsilon$ -PL 分解酵素的影響

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
EDTA	0
$\text{Ca}^{2+}$	94
$\text{Fe}^{3+}$	92
$\text{Zn}^{2+}$	85
$\text{Mg}^{2+}$	70
$\text{Co}^{2+}$	42
$\text{Fe}^{2+}$	0
$\text{Cu}^{2+}$	0
$\text{Mn}^{2+}$	0
$\text{Ni}^{2+}$	0
$\text{Hg}^{2+}$	0



0.112 mmol/L/min [5], *Streptomyces albus* ZC7之 $\epsilon$ -PL分解酵素對 $\epsilon$ -PL為基質之 $K_m=0.226$ mmol/L, 最大反應速率 $V_{max}=0.402 \times 10^{-3}$  mmol/(L·S) [30], *Sphingobacterium multivorum* OJ10之 $\epsilon$ -PL分解酵素對Lys-PNA 為基質與 $\epsilon$ -PL為基質之 $K_m$ 分別為2.08 mM及186  $\mu$ M [15]。

### (三) 分解酵素分解 $\epsilon$ -PL的分析

#### 1. 分解酵素分解 $\epsilon$ -PL的 GPC 圖

圖4所示為純化之 $\epsilon$ -PL分解酵素對 $\epsilon$ -PL為基質之分解實驗之GPC圖, 由圖可知, 經95分鐘反應後 $\epsilon$ -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. albus* PLT1之 $\epsilon$ -PL分解酵素應是外切型酵素型態。已知*Kitasatospora sp.* CCTCC\_M205012 [5]、*Sphingobacterium multivorum* OJ10 [15]、*Streptomyces albus* [16]及*Streptomyces albus* ZC7 [30]之 $\epsilon$ -PL分解酵素亦皆是外切型酵素型態。*S. albus* 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 [5, 7-8, 14]。

#### 2. $\epsilon$ -PL 分解酵素之基質特異性分析

表 2 所示為  $\epsilon$ -PL 分解酵素之基質特異性結果, 顯示  $\epsilon$ -PL 分解酵素對 Lys-Lys 與 Lys-Lys-Lys 之相對活性相當高, 此結果與 *Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素相似 [5], 但與 *Sphingobacterium multivorum* OJ10 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素較不同 [15], 因此 *S. albus* PLT1 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素應與 *Kitasatospora sp.* CCTCC M205012 之  $\epsilon$ -PL 分解酵素一樣是外切型酵素型態。此與上述分析之結果一致。

## 四、結論

本研究接續先前之研究, 進行並完成  $\epsilon$ -PL 分解酵素之特性鑑定(包括其對  $\epsilon$ -PL 之作用型態、動力參數  $K_m$ 、 $V_{max}$ )及探討其生化活性(最適溫度及 pH、穩定度、活化及抑制因子、基質之選擇性等)之探討。 $\epsilon$ -PL 分解酵素是一種金屬酶, 其對  $\epsilon$ -PL 之作用型態為外切型酵素, 以 Lys-PNA 為基質時, 最適反應溫度為 30°C, 最適 pH 值為 7.0。在 20-40°C 保存時酵素活性穩定, 在 50°C 以上保存時酵素活性迅速下降, 最大反應速率  $V_{max}=0.068$  mmol/L/min, 米氏常數  $K_m=0.127$  mmol/L。 $\epsilon$ -PL 合成酵素與  $\epsilon$ -PL 分解酵素與  $\epsilon$ -PL 之生產有密切關係, 除可影響其分子量外亦為探討  $\epsilon$ -PL 之生產合成調控機制之重要工具。目前國際上此方面研究仍相當少, 完成  $\epsilon$ -PL 分解酵素分解  $\epsilon$ -PL 之機制探討分析具有極高之

學術與工業生產  $\epsilon$ -PL 之價值。

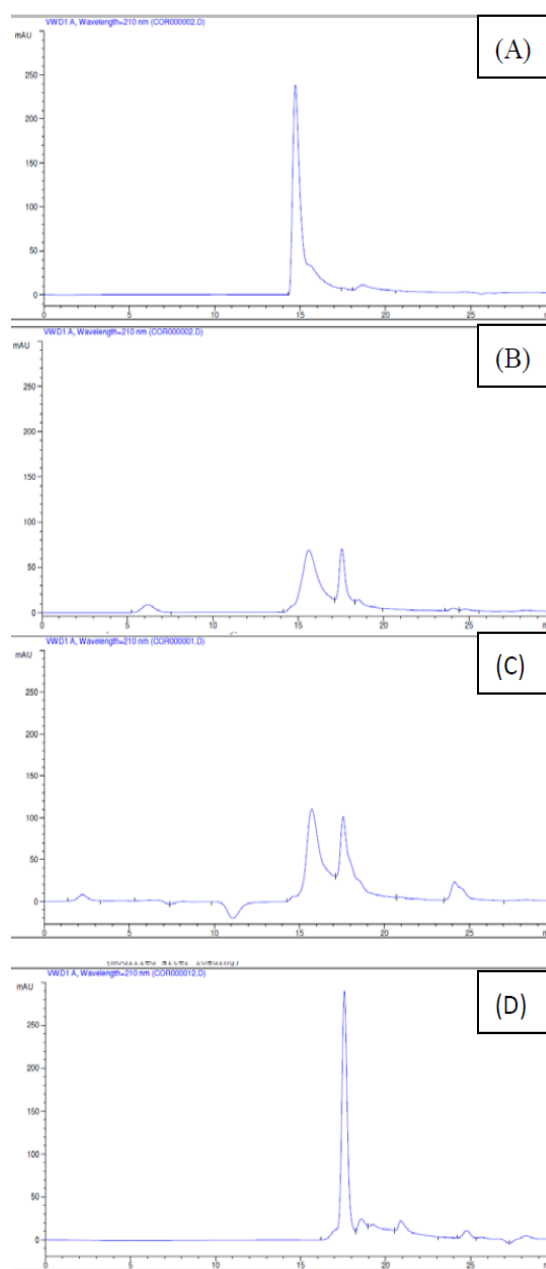


圖4.  $\epsilon$ -PL降解酵素對 $\epsilon$ -PL之分解GPC圖

(A) 0分鐘; (B) 30分鐘; (C) 45分鐘; (D) 95分鐘  
Product characteristics: (A) 0 min ( $\epsilon$ -PL: MW 4,000 Da, RT=15.0 min); (B) 30 min ( $\epsilon$ -PL fragment: MW 2600 Da, RT=15.5 min; L-lys: MW 145 Da, RT=17.5 min); (C) 45 min ( $\epsilon$ -PL fragment: MW 2000 Da, RT=16.0 min; L-lys: MW 145 Da, RT=17.5 min); (D) 95 min (L-lys: MW 145 Da, RT=17.5 min)



表 2.  $\epsilon$ -PL 分解酵素之基質特異性

Substrate	Relative activity (%)
Lys-pNA	100.0
Glu-pNA	12.5
Arg-pNA	13.4
$\epsilon$ -PL	2.2
Lys-Lys	23.5
Lys-Lys-Lys	31.2
Lys-Ala	6.9
Lys-Glu	8.7
Glu-Lys	3.5
Lys-Asp	7.1
Lys-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr	2.8
Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-Lys	0
Casein	0

### 參考文獻

- 施英隆、沈名豪（民 92），以微生物生產聚離胺酸及其應用，生物資源生物技術，5(1)，4-11。
- 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。
- 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.
- 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.
- 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
- Hiraki, J. (1995) Basic and applied studies on  $\epsilon$ -polylysine. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 23, 349-354.
- Hiraki, J. (2000)  $\epsilon$ -Polylysine, its development and utilization. *Fine chemicals*, 29(1), 28-25.
- 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.
- Hiraki, J., H. Masakazu, M. Hiroshi and I. Yoshikazu (1998) Improved poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsukogaku*, 76, 487-493.
- 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.
- Itzhaki, F. R. (1972) Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50(2), 569-574.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
29. Wu, F. C., J. D. Lee and I. L. Shih (2015) Purification and characterization of  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme isolated from *Streptomyces albulus* PLT1. BIT's 8th World Congress of Industrial Biotechnology, Nanjing, China.
30. Zhang, C., X. S. Luan, Y. H. Liu and J. X. Wang (2011) Study on the properties of  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme by *Streptomyces albulus* ZC7. *China Food Additives*, 2, 66-70 (in Chinese).

收件：109.02.17 修正：109.05.04 接受：109.07.01

