



利用固定化 *Rhodococcus equi* No. 23 細胞  
生產膽固醇氧化酶

Production of cholesterol oxidase with  
immobilized cells of *Rhodococcus equi* No. 23

計畫編號：NSC89-2313-B-002-081

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

*Rhodococcus equi* No. 23 能產生膽固醇氧化酶 (Cholesterol Oxidase, CO)，可應用於食品與血液中膽固醇含量之測定，亦可分解膳食中之膽固醇以製造低膽固醇含量之食品。本研究乃在探討利用海藻酸鈣固定化 *R. equi* No. 23 以生產 CO。結果顯示，固定化過程中對菌體並不會造成傷害。接種菌量、培養液起始 pH 值、培養溫度及振盪速率均會影響固定化 *R. equi* No. 23 之生長及 CO 之產生。固定化菌體產生 CO 之最適培養液起始 pH 值、培養溫度及震盪速率分別為 7.0、30°C 及 250 rpm。在最適條件下，接種 14.0 g/100 mL 之固定化膠粒於培養液中，經 48 小時之培養後，CO 活性達 0.93 unit/mL。以固定化 *R. equi* No. 23 進行每批次 48 小時之重複批式發酵，經四批次後，CO 產生之活性仍達 0.76 unit/mL，約為第一批次產量之 87 %。

關鍵字：*Rhodococcus equi* No. 23，膽固醇氧化酶，固定化，海藻酸鈣

Abstract

Cholesterol oxidase (CO) was produced by *Rhodococcus equi* No. 23, it has been used for the determination of cholesterol in food and blood serum. In addition, CO can also be employed to degrade dietary cholesterol to

produce low-cholesterol food. This study was conducted to investigate the production of CO by immobilized cells of *R. equi* No. 23. No detrimental effect was found on *R. equi* No. 23 during the immobilization procedures using sodium alginate. Inoculum size, initial pH of medium, cultivation temperature, and shaking speed affected the growth and CO production by immobilized *R. equi* No. 23. The optimal initial pH of culture medium, incubation temperature and shaking speed for the production of CO by the immobilized cell were found to be at pH 7.0, 30°C and 250 rpm, respectively. After 48 h of cultivation under the optimal conditions, a CO activity of 0.93 unit/mL was noted in the medium, which was inoculated with 14.0 g/100 mL cell-containing gel beads. Reuse of cell-containing gel beads for repeated batch fermentation at 48-hour intervals revealed that CO production in the 4<sup>th</sup> cycle was 0.76 unit/mL, about 87 % of that in the first cycle.

Keywords : *Rhodococcus equi* No. 23, cholesterol oxidase, immobilization, sodium alginate

二、緣由與目的

膽固醇氧化酶 (cholesterol oxidase, CO) 可催化膽固醇之氧化形成 4-cholesten-3-one，同時將 O<sub>2</sub> 還原產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。CO 成為

大眾所關注之酵素之一，乃因其可被應用食品與血液中膽固醇含量之測定 (Srivith and Brooks, 1976)，且它也是一些藥用類固醇 (steroid) 化學合成過程中之先驅物質 (Watanabe *et al.*, 1986)。此外，它亦被認為可用以分解膳食中的膽固醇 (Aihara *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1989a) 而降低心血管疾病之發生，以促進人體之健康。

*R. equi* No. 23 為 Watanabe *et al.* (1986) 首先從乳酪中分離能產生 CO 且具有工業開發潛力之菌株，Aihara *et al.* (1988) 及巫 (1994) 曾用此菌株產生之 CO 分別分解蛋黃及蛋粉之膽固醇含量。

固定化細胞可將細胞侷限於包埋材質內達到高細胞密度 (Lacroix *et al.*, 1990)，以及可重複使用 (El-Aassar *et al.*, 1990)、較寬廣的 pH 值適應性 (Bajpai and Margaritis, 1987)、最適溫度的提高 (Bajpai and Margaritis, 1987) 及為菌體提供屏障之效果 (Ohta *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998)。利用固定化技術以固定化細胞或酵素，對產物之轉化及合成提供更佳之操作性及使用效率。其應用範圍很廣，如醫藥用品、食品、環境工程等都很常見。故本研究即企圖利用固定化 *R. equi* No. 23 生產 CO，並瞭解各操作條件對固定化菌體生長及 CO 生產之影響。

### 三、結果與討論

本研究中首先測試 *R. equi* No. 23 菌體之生長曲線並選擇不同培養時間 (12、20、36 小時) 即相當於菌體生長之對數期、對數期末期靜止期初期及靜止期之 *R. equi* No. 23 菌體，以菌液與海藻酸鈉溶液依體積比 1:6 進行固定化。結果顯示，以預培養 20 小時之 *R. equi* No. 23 菌體固定化後，再培養所得之 CO 活性顯著最高。

固定化過程可能會影響菌體之存活、固定化菌體之活性及代謝物之產生 (Groboillot *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998)。為瞭解以海藻酸鈉進行 *R. equi* No. 23 之固定化時所造成之影響，吾人乃測試在固定化過程不同階段 *R. equi* No. 23 活菌變化之情形。此結果顯示，利用海藻酸鈣進行 *R. equi*

No. 23 之固定化並不會造成菌體之傷害。

El-Aassar *et al.* (1990) 指出 *Penicillium chrygenum* 海藻酸鈣固定化膠粒之接種量會影響 fibrinolytic 和蛋白質分解酵素之產生。吾人分別接種 3.5、7.0、14.0 及 21.0 g 之固定化膠粒進行培養，以 14.0 g/100 mL 者之 CO 生產最佳，經 48 小時培養後酵素活性可達 0.18 unit/mL。

培養液之起始 pH 曾被報告會影響微生物發酵時代謝物之產生 (Bajpai and Margaritis, 1987; Buzás *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1999)。在本實驗中，分別接種 2.0 mL 種菌或 14.0 g 固定化菌體至未調整 pH 值 (pH 6.2) 及調整 pH 值為 5.0~9.0 之培養液中。經 48 小時培養後，固定化 *R. equi* No. 23 菌體於起始 pH 值 7.0 之培養液中，可得較高之 CO 活性，與未固定化菌體相較，前者擁有較寬廣之最適作用 pH 值範圍。

探討不同培養溫度 (25~45°C) 對固定化及游離 *R. equi* No. 23 生長及 CO 生產之影響，比較固定化及未固定化菌體培養時 CO 之產生顯示 *R. equi* No. 23 菌體經由固定化處理後，CO 之最適生產溫度提高，由 25°C 延展至 30°C。此趨勢與 Tan and Day (1998) 及 Bajpai and Margaritis (1987) 之報告相一致。

巫 (1994) 指出 *R. equi* No. 23 為一好氣菌，生長時須供給氧氣才能生長，若將菌體靜置培養，則菌數及 CO 活性遠不如振盪組。吾人以靜置或不同振盪速率 (100~250 rpm) 分別培養游離或固定化 *R. equi* No. 23 菌體，培養 48 小時後測定培養液中之 CO 活性。於振盪速率 250 rpm 下，固定化菌體達到最高之 CO 活性 0.94 unit/mL，證明氧對 *R. equi* No. 23 CO 之生產影響甚巨，且高振盪速率克服了固定化包材對氧通透的限制性。

連續培養游離及固定化 *R. equi* No. 23 菌體，觀察培養過程中菌體生長及 CO 活性之變化。結果顯示，連續培養固定化 *R. equi* No. 23 48 小時後 CO 活性為 0.93 unit/mL，此時 CO 之生產已進入穩定態，並可持續至 72 小時，使活性達 0.95 unit/mL；與未固定化者相較，固定化菌體能在培養時間縮短一半的情況下即達到前者之最高酵素活性之

82~83 %。

為探究海藻酸鈣包埋 *R. equi* No. 23 膠粒於長期使用下之安定性及 CO 之生產情形，乃採用重複批式之方法以每 48 小時為一批次，並更換新的培養液。固定化 *R. equi* No. 23 菌體經四批次培養後，CO 所產生之活性仍達 0.76 unit/mL，約為第一批次產量之 87 %。

#### 四、計畫成果自評

本研究以預培養 20 小時之 *R. equi* No. 23 菌體固定化後，再培養所得之 CO 活性最高，且以海藻酸鈉進行固定化之過程中對 *R. equi* No. 23 菌體並不會造成傷害。

固定化膠粒接種量 14.0 g/100 mL 時 CO 之生產最佳，經 48 小時培養後酵素活性可達 0.18 unit/mL。

固定化 *R. equi* No. 23 菌體於起始 pH 值為 7.0 之培養液中培養可得較高之 CO 活性，與未固定化菌體比較，固定化菌體擁有較寬廣之培養液最適作用 pH 值範圍，而且 CO 產生之最適培養溫度亦由 25°C 提升至 30°C。於振盪速率 250 rpm 下，固定化菌體達到最高之 CO 活性 0.94 unit/mL，證明氧對 *R. equi* No. 23 CO 之生產影響甚巨，且高振盪速率克服了固定化包材對氧通透的限制性。

連續培養固定化 *R. equi* No. 23 144 小時，經 48 小時後 CO 活性為 0.93 unit/mL，此時 CO 之生產已進入穩定態，並可持續至 72 小時，使活性達 0.95 unit/mL；與未固定化者相較，固定化菌體能在培養時間縮短一半的情況下即達到前者之最高酵素活性之 82~83 %。

以固定化菌體進行每批次 48 小時之重複批式發酵，經四批次培養後，CO 所產生之活性仍達 0.76 unit/mL，約為第一批次產量之 87 %。

綜合以上結果，固定化 *R. equi* No. 23 菌體不但能在較短時間中達成高 CO 產率，同時因其具有操作穩定，產物易於分離純化，膠粒可長期儲存並能重覆使用之優點，固定化細胞系統似乎有其優越之處。

#### 五、參考文獻

1. 巫峻陽。1994。利用 *Rhodococcus equi* No. 23 酵素製造低膽固醇蛋黃粉之研究。台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
2. 李明聰。1997。利用 *Rhodococcus equi* No. 23 生產膽固醇氧化酶。台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。
3. 鄭昕怡。1996。利用固定化 *Sporidiobolus salmonicolor* 細胞生產  $\gamma$ -decalactone。國立台灣大學食品科技所碩士論文。台北。
4. Aihara, H., Watanabe, K., and Nakamura, R. 1986. Characterization of production of cholesterol oxidase in three *Rhodococcus* strain. *J. Appl. Bacteriol.* 61 : 269-274.
5. Aihara, H., Watanabe, K., and Nakamura, R. 1988. Degradation of cholesterol in egg yolk by *Rhodococcus equi* No. 23. *J. Food Sci.* 53 : 659-660.
6. Bajpai, P. and Margaritis, A. 1987. The effect of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. *Biotechnol. Bioeng.* 30 : 306-313.
7. Buzás, Zs., Dallmann, K., and Szajáni, B. 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 34 : 882-884.
8. El-Aassar, S. A., El-Badry, H. M., and Abdel-Fattah, A. F. 1990. The biosynthesis of protease with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 : 26-30.
9. Groboillot, A., Boadi, D. K., Poncelet, D., and Neufeld, R. J. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14 : 75-107.
10. Lacroix, C., Paquin, C., and Arnaud, J. P. 1990. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*.

- Appl. Microbiol. Biotechnol. 32 : 403-408.
11. Lee, S. L., Cheng, H. Y., Chen, W. C., and Chou, C. C. 1998. Production of  $\gamma$ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Proc. Biochem. 33 : 453-459.
  12. Lee, S. L., Cheng, H. Y., Chen, W. C., and Chou, C. C. 1999. Effect of physical factors on the production of  $\gamma$ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. Proc. Biochem. 34 : 845-850.
  13. Ohta, T., Ogbonna, J. C., Tanaka, H., and Yajima, M. 1994. Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 : 246-250.
  14. Smith, A. G. and Brooks, C. J. W. 1976. Cholesterol oxidase : properties and applications. J. Steroid Biochem. 7 : 705-713.
  15. Tan, Q. and Day, D. F. 1998. Bioconversion of limonene to  $\alpha$ -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 : 96-101.
  16. Watanabe, K., Aihara, H., and Nakamura, R. 1989a. Degradation of cholesterol in lard by the extracellular and cell-bound enzymes from *Rhodococcus equi* No. 23. Lebensm. -Wiss. u. -Technol. 22 : 98-99.
  17. Watanabe, K., Aihara, H., Nakagawa, Y., Nakamura, R., and Sasaki, T. 1989b. Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus equi* No. 23. J. Agric. Food Chem. 37 : 1178-1182.
  18. Watanabe, K., Aihara, H., Tachi, N., and Nakamura, R. 1987. Degradation of 4-cholesten-3-one and 1,4-androstadiene-3,17-dione by cholesterol-degrading bacteria. J. Appl. Bacteriol. 62 : 151-155.
  19. Watanabe, K., Shimizu, H., Aihara, H., Nakamura, R., and Suzuki, K. I. 1986. Isolation and identification of cholesterol-degrading *Rhodococcus* strains from food

of animal origin and their cholesterol oxidase activity. J. Gen. Appl. Microbiol. 32 : 137-147.