

行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

利用逆微胞自醱酵液中分離幾丁聚醣 及生產 幾丁寡醣(2/3)

計畫編號：NSC 90-2214-E-002-043

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：蔣丙煌 教授

台灣大學食品科技研究所

計畫參與人員：蕭伊茜、林育蔚 台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

本研究乃探討如何利用逆微胞系統之特性，調整微胞內酵素、受質及水之含量比，來促進酵素之逆合成反應而能生產較具有生理功能之高聚合度幾丁聚醣。同時，本研究亦探討如何利用膜反應器之操作特性，將初水解成寡醣之產物以超過濾膜分離出反應器，而能避免其被進一步水解成低分子量寡糖使產品含較多之高聚合度寡糖。在逆微胞反應器實驗方面，本研究發現粗酵素在逆微胞中有合成四、五、六醣現象，但由於水解反應和逆合成反應會相互競爭，以致於難以解釋所觀察到之現象。進一步將粗酵素分離成三個純化酵素，分別命名為 CBC I、CBC II、CBC III，探討其於逆微胞中之反應，結果雖然觀察到轉糖反應，但是目前仍然無法完全掌控反應之進行。在膜反應器之研究方面，已經初步了解 E/S 比與產物中高聚合度寡糖含量之關係，將進一步研究其他加工條件，以生產出較多的高聚合度寡糖。

關鍵詞：

逆微胞、幾丁聚醣酶、幾丁寡醣、酵素逆合成反應

二、英文摘要

This study was to use reverse micelle (RM) system to enhance the enzymatic reverse synthesis reaction of chitosanase in order to produce highly polymerized chitooligosaccharides (COS) by adjusting enzyme, substrate and water ratio inside the RM. Meanwhile, ultrafiltration membrane reactor was also studied for the same purpose. The membrane separated chitosan hydrolysate continuously to avoid the high molecular weight product being further hydrolyzed to low molecular weight COS. In the RM system, it was found that crude enzyme could synthesize tetra-COS, penta-COS and hexa-COS. However, the hydrolysis and the reverse synthesis reactions occurred simultaneously in the RM, and it was difficult to explain the observed phenomenon, therefore, crude enzyme was further separated to three fractions, and the purified enzymes were applied to RM system.

Although it was found that the transglycosylation reaction did occurred in the RM system, the reactions still could not be fully controlled. In the membrane reactor system, the relationship between E/S ratio and high DP COS was established. Further study will focus on other processing factors for increasing the content of high DP COS in the product.

三、緣由與目的

幾丁聚醣酶為極具應用性之酵素，它可水解幾丁聚醣而生產具生理活性之幾丁寡醣。然而，一般之幾丁聚醣酶水解幾丁聚醣所獲得之產物多為生理活性較低的低聚合度寡糖（二至五醣）。因此如何利用適當的酵素反應方法與條件生產具較高生理活性之寡糖（六至八醣）為本研究之主要目的。

由於在逆微胞系統中可藉由控制微胞中心之水分含量而使酵素水解反應朝逆方向（合成方向）進行，所以本研究乃探討如何將逆微胞視為一酵素反應器，利用其生產高聚合度之幾丁寡醣，同時探討此一酵素反應之機制。據此，本研究於第一年已經成功的找出利用逆微胞自醱酵液中分離出幾丁聚醣酶之操作條件。第二年研究之工作項目包括：

（一）以幾丁聚醣酶為生物催化劑，以低分子量幾丁寡醣（三醣或四醣）當受質，利用逆微胞系統之特性調整微胞內酵素及受質濃度及水含量比（Wo）來促使酵素朝水解逆反應方向進行，生產較具有生理活性功能的高分子量幾丁聚醣（六醣至八醣），同時探討反應機制。（二）利用膜反應器為工具進行水解反應，由於膜反應器可以將初水解成寡糖之產物經膜分離系統帶出反應器，避免其被進一步水解成低分子量寡糖，因此能夠生產出較多的高聚合度寡糖。分別探討逆微胞酵素反應器膜反應器之表現後，則進行比較。以下為初步之研究結果與討論。

四、結果與討論

（一）利用逆微胞分離 chitosanase 的效果

由於本實驗採用之逆微胞系統是以 Direct Injection 方式進行，與前一年的 phase transfer 方式不同，故針對直接注入法對於 chitosanase 的分離效果再做進一步的探討，結果如表一所示。

表一 使用 Reverse micelle 將 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 幾丁聚糖 純化之效果

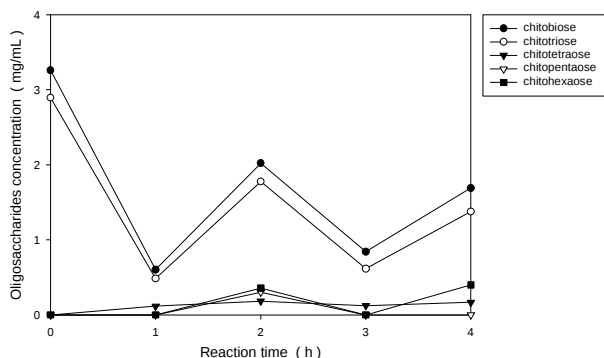
Enzyme	Total Activity (units)	Total Protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	25.87	3.29	7.86	1	100
Purified enzyme	19.01	1.175	16.18	2.06	73.5

結果發現利用 Direct injection 的方式可將粗酵素純化，純化倍數為 2 倍；而第一年所採用的 Phase Transfer 法則可將比活性提高至 2.63 倍。但是若要以逆微胞當作寡糖反應之微小反應器，則以採用 Direct Injection 法形成逆微胞較易控制反應之進行。

(二) 幾丁聚糖於逆微胞中反應

採用受質為幾丁二糖與幾丁三糖之標準品，等比例混合配製成受質溶液，以適當活性之酵素液控制 E/S ratio = 0.03 units/mg substrate，在 40°C 下反應四小時。

圖一顯示，粗酵素在逆微胞中有合成四、五、六糖現象，但由於水解反應和逆合成反應會相互競爭，以致於難以解釋所觀察到之現象。因此，將粗酵素進行純化，再執行酵素反應實驗。



圖一 逆微胞中粗酵素與幾丁二糖及三糖於 40

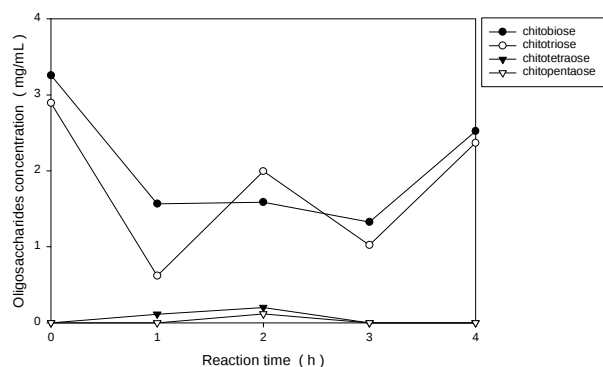
°C 時之反應結果

(三) 粗酵素之純化

參考陳 (1995) 利用陽離子交換樹脂，將粗酵素進行純化，依照鹽梯度溶離出之先後順序將其命名為 chitosanase I, II, III (CBC I、CBC II、CBC III)。經過濃縮之後，以 SDS-PAGE 檢定其蛋白質組成及分子量，可以得知 chitosanase I 主要的蛋白質分子量約為 41 kDa；chitosanase II 所包含之蛋白質種類較為繁雜，但仍可得到分子量為 54 kDa 之主要蛋白質；chitosanase III 約含四種蛋白質，其主要蛋白質之分子量約為 46 kDa。另外，研究發現 CBC I 為外切型酵素，產物為幾丁二糖，而 CBC II 和 CBC III 可能混有內切及外切型酵素。

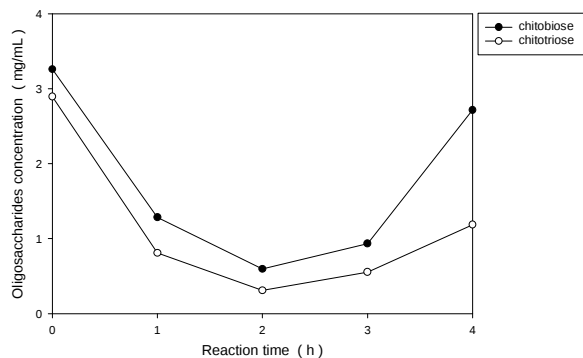
(四) 純化酵素於逆微胞中與幾丁二糖及三糖之反應

從圖二可以得知，CBC I 於逆微胞中對於三糖之反應趨勢與粗酵素液相似。而對於其水解產物二糖而言，從開始反應至 3 h 可發現二糖的量有下降並維持一段時間為低濃度的情形，推測在 0 到 1 h 之間，因所供給之二糖濃度極高，造成水解之逆反應速率增加，CBC I 將二糖聚合成為四糖之也可能將二糖與三糖合成為五糖。



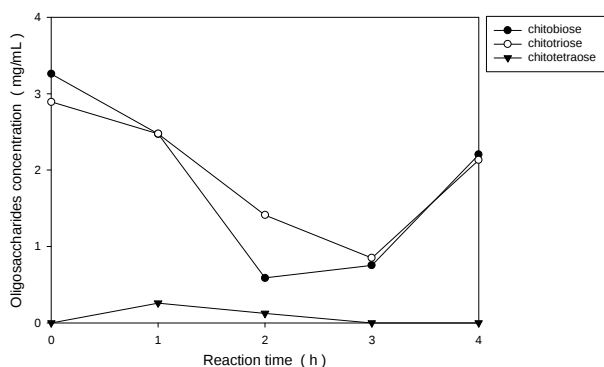
圖二 逆微胞中 CBC I 與幾丁二糖及三糖於 40°C 時之反應結果

CBC II 作用於幾丁二糖、三糖之變化量是呈現先減少後增加的趨勢 (圖三)，反應開始便造成二糖及三糖濃度大幅降低，同樣可能有合成反應發生於 0 到 3 h 之間。但至 4 h 時濃度又有部分增加，或許是合成出來的產物又被 CBC II 再度水解所致。



圖三 逆微胞中 CBC II 與幾丁二糖及三糖於 40 °C 時之反應結果

CBC III 能於逆微胞中快速降低幾丁二糖及三糖的濃度，三糖降低幅度更大於二糖（圖四）。於反應 2 h 時二糖及三糖的量皆為最低，約為原先反應之濃度的 18 % 及 11 %。依據質量平衡定律，降低之二、三糖應該仍存在於此系統中，故推測應為合成出高聚合度之寡糖，遺憾的是無法從使用之分析方法看出其合成之直接證據，有待後續研究之探討。



圖四 逆微胞中 CBC III 與幾丁二糖及三糖於 40 °C 時之反應結果。

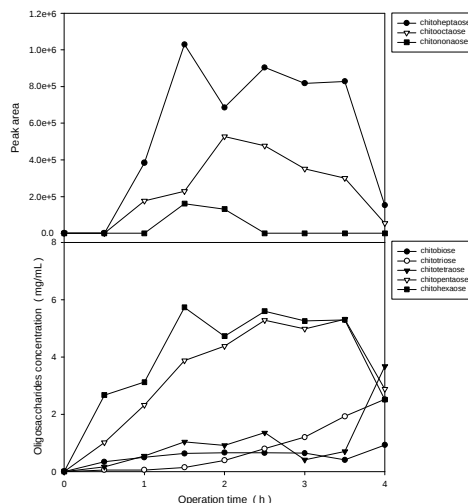
(五)、利用連續式膜反應器生產幾丁寡糖

本研究使用的中空纖維型分離膜（A/G Technology Polysulfone Membrane；UFP-3-c-4MA），分子篩為 3000 Daltons，纖維管徑 0.5 mm，膜表面積為 0.065 m²，於 25-50 °C 下操作時進口壓力上限為 45 psi，pH 適用範圍為 2-13。使用之受質為去乙醯度 95% 之幾丁寡糖溶於 0.2M, pH=5 醋酸緩衝液中。

(1)、酵素/受質比為 0.05 時之反應

如圖五所示，發現於操作 1 h 之後便可觀察到有七、八、九糖的產生，九糖出現於 1.5 h 及 2 h，

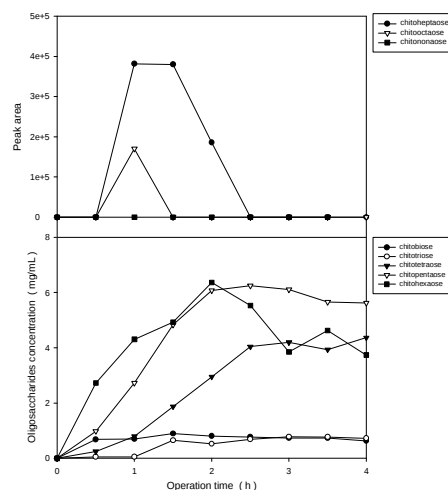
七、八糖之產量於 3.5 h 後急劇減少。六糖的濃度在 1.5 h 達到 5.6 mg/mL 最高，之後微幅降低。幾丁三糖的量則隨反應時間延長而有增加的趨勢。



圖五 在 E/S ratio 為 0.05 的條件下幾丁聚糖膜反應器中生產幾丁寡糖之組成變化

(2)、酵素/受質比為 0.075 時之反應

圖六顯示在 E/S ratio 為 0.075 的條件下，反應並無九糖生成，即使是八糖也只出現在反應 1 h 的時間點。值得注意的是，當八糖的波峰於 1.5 h 時消失，幾丁三糖及五糖的濃度反而急速增加，故推測幾丁聚糖可將幾丁八糖再水解

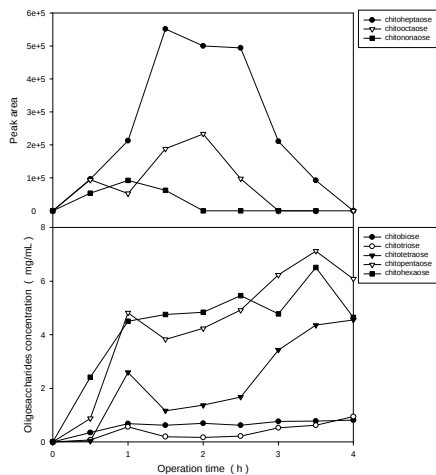


圖六 在 E/S ratio 為 0.075 的條件下，幾丁聚糖於膜反應器中生產幾

(3)、酵素/受質比為 0.1 時之反應

圖七顯示在 E/S ratio 為 0.1 膜反應器之結果，在 1 h 到 1.5 h 時，三糖、四糖、五糖的濃度皆有明顯的下降趨勢，七糖及八糖的濃度則有顯著的增加，此

現象之發生，初步推測可能是因為低聚合度之寡醣間進行轉醣反應或是九醣被水解而造成七醣、八醣的濃度增加。操作 2 h 之後，七醣、八醣之濃度下降，表示又再度被水解，此時四、五、六醣之濃度增加。操作 4 h 可以觀察到高於六醣之寡醣波峰已消失不見，而四醣、五醣及六醣的濃度有顯著增加。表示較高聚合度之寡醣在反應器中之濃度增加後，即變成主要的受質而被再進行第二次水解。



圖七 在 E/S ratio 為 0.1 的條件下，幾丁聚醣於膜反應器中生產幾丁寡醣之組成變化

幾丁聚醣在膜反應系統寡醣，並且使小分子醣類可隨時透出膜，能觀察到中間產物的組成變化情形。本研究發現高酵素濃度時 (E/S ratio 為 0.1)，有類似轉醣反應的現象。此轉醣現象在 E/S ratio 為 0.075 及 0.05 時並沒有發生。

(六)、結論

根據逆微胞之實驗結果可知雖有轉醣反應之發生，但由於影響酵素於逆微胞中反應之因素很多，且實驗時酵素與受質之用量皆很低，導致實驗結果之再現性不佳。且較高聚合度之寡醣在分析上較為困難，無法以質量平衡計算寡醣間之轉化量，不易討論其轉醣之可能機制。另外，由於逆微胞對酵素分子之影響機制未明，在核心水相的反應更是難以預期，僅能以控制反應之條件來進一步觀察酵素反應之情形，例如：調整逆微胞中不同之水分含量、改變反應之 pH 值、改變寡醣受質之聚合度及組合等。後續研究應以改變上述條件來探討幾丁聚醣與幾丁寡醣間之作用機發生之最佳條件。

利用幾丁聚醣於膜反應器中水解幾丁聚醣，不但具有反應條件易控制，反應體積大，產物

量多等優點之外，於實驗中已證實只需降低酵素用量即可產生高聚合度寡醣（七、八、九醣）。然而，今後仍需針對各操作條件作進一步之研究，以期能以膜反應器生產更高量具生理活性的寡醣。

五、參考文獻

- 洪啟章。1994。 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 菌株之幾丁聚醣研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 陳美菁。1995。 *Bacillus cereus* NTU-FC-4 幾丁聚醣研究。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- 葉智偉。1997。逆微胞中寡醣合成與動力學模式分析。大同工學院化學工程研究所碩士論文。
- Aiba, S. I. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans. Carbohydrate Research. 261:297-306.
- Cheryan, M. and Mehaia, M. 1984. Ethanol production in a membrane recycle bioreactor conversion of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. Dec:204.
- Deeslie, W. D. and Cheryan, M. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in ultrafiltration reactor. J. Food Sci. 46:1035.
- Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M., and Ohtakara, A. 1992. Action pattern of *Bacillus sp.* 7-M chitinase on partially N-acetylated chitosan. Biosci. Biotech. Biochem. 56:448.
- Monsan P, Paul F. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol. Rev. 16 : 187-192.
- Muraki, E., Yaku, F. and Kojima, H. 1993. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. Carbohydrate Research. 239:227-237.
- Seino, H., Tsukuda, K. and Shimasue, Y. 1991. Properties and action pattern of a chitinase from *Bacillus* sp. PI-7S. Agric. Biol. Chem. 55: 2424-2423
- Sim, K. A. and Cheryan, M. 1992. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. Biotechnol. bioeng. 39: 960-967.
- Singh S, Packwood J, Samuel CJ, Critchley P, Crout DHG. 1995. Glycosidase -catalysed oligosaccharide synthesis: preparation of N-acetylchitooligosaccharides using the β -N-acetylhexaminidase of *Aspergillus oryzae*. Carbohydr. Res. 279 : 293-305.
- Tokuyasu K, Ono H, Hayashi K, Mori Y. 1999. Reverse hydrolysis reaction of chitin deacetylase and enzymatic synthesis of β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc from chitin. Carbohydr. Res. 322 : 26-31.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期中報告

利用逆微胞自醱酵液中分離幾丁聚醣 及 幾丁寡醣(2/3)

Separation of chitosanase from fermentation broth and production of chito-oligosaccharides using reverse micelles (2/3)

計畫類別： ☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 90 - 2214 - E - 002 -0043

執行期間： 90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔣丙煌 教授

計畫參與人員：蕭伊茜、林育蔚

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學食品科技研究所

中 華 民 國 91 年 05 月 29 日