

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫中文名稱：利用雙叉桿菌生產半乳寡糖之研究
計畫英文名稱：Production of galacto-oligosaccharides
by bifidobacteria

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89-2313-B002-093

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：游若菽教授

計畫參與人員：于佳茜碩士班研究生

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中華民國八十九年十月三十一日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫中文名稱：利用雙叉桿菌生產半乳寡糖之研究

計畫英文名稱：Study on production of galacto-oligosaccharides by
bifidobacteria

計畫編號：NSC89-2313-B002-093

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：游若萩教授 國立臺灣大學食品科技研究所

電子信箱：yurc@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本研究利用萃取人體腸駐型益生菌 (probiotics) - 雙叉桿菌 (bifidobacteria) 之半乳糖，以乳糖為原料進行半乳寡糖的生產研究。結果顯示利用超音波破碎含 Triton X-100 的懸浮菌液 (50mg/ml)，可將所選用的五株腸駐型雙叉桿菌 *Bifidobacterium adolescentis* CCRC 14606、*B. bifidum* CCRC 14615、*B. infantis* CCRC 15416、*B. infantis* CCRC 14633、*B. longum* CCRC 14634 中之半乳糖萃取出來。利用萃取出的粗酵素液進行轉糖反應，結果以 CCRC 14634 之半乳糖表現最好，約可得到 5% 的半乳寡糖，主要產物為三糖。再以粗酵素液進行轉糖反應條件的探討，發現 CCRC 14634 之酵素在 pH 4-6 間活性都很穩定，最適轉糖反應 pH 值為 6.0；而溫度在 25-55 間酵素亦很穩定，最適轉糖反應溫度為 45；當反應 5 小時後可得最大寡糖產量，時間再延長寡糖將被水解。而在基質濃度試驗中，得知 CCRC 14634 之轉糖反應 K_m 值約為 1.3 M。在反應液中添加二價金屬離子並不能促進轉糖反應；添加 EDTA 及 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等會使酵素失活。以 CCRC 14634 之半乳糖於 pH 6.0 的磷酸緩衝液中，添加 1.0M 乳糖溶液，於 50 下反應 5 小時，進行半乳寡糖之大量製備，並將製備出的半乳寡糖進行菌體利用性試驗，發現自製之半乳寡糖可促進雙叉桿菌 (*B. longum* CCRC 14634) 生長；但對產氣莢膜桿菌 (*Clostridium perfringens* CCRC 10913) 之生長，也有促進作用。

關鍵詞：雙叉桿菌、半乳糖、水解反應、轉糖反應、半乳寡糖

Abstract

In order to produce galacto-oligosaccharides which is useful for probiotics, this study was conducted to study the characters of β -galactosidase from bifidobacteria and use lactose substrate to produce galacto-oligosaccharides. Beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* CCRC 14606、*B. bifidum* CCRC 14615、*B. infantis* CCRC 15416、*B. infantis* CCRC 14633、*B. longum* CCRC 14634 were extracted by ultrasonic treatment in the presence of Triton X-100. Crude enzyme of CCRC 14634 was found to be the most efficient producer of galacto-oligosaccharides. The yield was about 5% of total sugar and trioligo-saccharide was main product. Crude β -galactosidase was stable over pH 4-6, with maximal transgalactosylated activity at pH 6. The optimal temperature for transgalactosylation was 45. The maximum production was obtained after 5 hours of reaction. In the transgalactosylated reaction, the K_m value of crude enzyme of CCRC 14634 was 1.3 M for lactose. EDTA, copper, cobalt, magnesium, stannium and zinc could not improve transgalactosylation. Moreover, EDTA, copper, and zinc inhibited the enzyme activity. Finally, crude β -galactosidase of CCRC 14634 and suitable reaction conditions was used to prepare galacto-oligosaccharides. The prepared galacto-oligosaccharides was found to be the best carbon source for *Bifidobacterium longum* CCRC 14634 when compared to other

commercial galacto-oligosaccharides, lactose, and glucose. However, the prepared galacto-oligosaccharides also stimulated the growth of *Clostridium perfringens* CCRC 10913.

Keywords: bifidobacteria, α -galactosidase, hydrolysis, transgalactosylation, galacto-oligosaccharides.

二、緣由與目的

半乳寡糖是存在於母乳中的天然益菌助生質，可以促進人體腸道內有益菌如雙叉桿菌、乳酸桿菌的生長，而增進人體對環境有害因子的抵抗力，維持正常生理功能的運作。同時具有類似膳食纖維的效果與改善液體食物流變性質，現已被視為重要之保健性食品與加工適性兼備的食品添加物。

目前半乳寡糖的生產，都是利用微生物所產生之半乳糖苷酶 (α -galactosidase) 進行酵素性的合成反應，同時藉由適當反應條件的控制，可以增加半乳寡糖之產量。在 O'Brien 和 Mitsuoka [1]、Roy 等 [2] 的研究中指出腸內益生菌雙叉桿菌亦具有半乳糖苷酶的活性，可以進行半乳寡糖基之轉移反應。研究指出雙叉桿菌對於半乳寡糖利用性是以三糖為最高，其中又以含有乳糖結構的三糖較易被雙叉桿菌利用，亦即 α -4'-galactosyllactose [3-4]。

本研究期望自人體內所分離出的腸駐型雙叉桿菌中找到適合生產半乳寡糖的菌株，探討其 α -galactosidase 的特性；並用以合成半乳寡糖，供人體內益生菌利用，促進身體健康。

三、結果與討論

一. 不同雙叉桿菌菌株之半乳糖苷酶進行水解與轉糖反應之探討

半乳糖苷酶可以將乳糖合成半乳寡糖最早是由 Wallenfels [5] 證實。經研究發現其可同時進行轉糖與水解反應活性，當控制反應條件於高乳糖及高溫下會趨向轉糖反應的發生 [6]。而在 O'Brien 及 Mitsuoka [1] 和 Smart 等 [7] 的報告指出雙叉桿菌中多具有半乳糖苷酶的酵素活性。本實驗中選用 *Bifidobacterium adolescentis* CCRC 14606、*B. bifidum* CCRC 14615、*B. infantis*

CCRC 15416、*B. infantis* CCRC 14633、*B. longum* CCRC 14634 等五株雙叉桿菌，進行半乳糖苷酶的篩選。

1. 半乳糖苷酶之製備

取培養達靜止期初期的菌液，菌數在 $2-5 \times 10^{11}$ CFU / ml，利用超音波破碎，實驗組為添加有 0.2% 的 Triton X-100 的磷酸鹽緩衝液，以弱化細胞壁，利用超音波破碎細胞壁 5 分鐘；而對照組則為僅使用含 0.2% 的 Triton X-100 的磷酸鹽緩衝液來弱化細胞壁。處理完後，利用離心方式去除細胞或殘骸得到粗萃取液，以 α -NPG 進行活性分析。所得結果顯示破碎 5 分鐘者 α -NPG 水解活性最高，約高於對照組 2.5 倍。

2. 半乳糖苷酶對 α -NPG 及乳糖基質活性之探討

Dumortier 等 [8] 指出，*B. bifidum* 之半乳糖苷酶在 pH 4.5 時轉糖反應活性最高，而 pH 6.5 時水解反應活性最高。為了降低水解活性、提高轉糖活性，建議使用 pH 4.3 及 4.5 進行寡糖之合成。本實驗中同時以另一種乳糖衍生物 α -NPG 來進行快速的水解活性分析， α -NPG 可被半乳糖苷酶水解而形成黃色之 α -nitrophenol，可於 405nm 吸光下測定。在水解活性分析上，若以 α -NPG 基質呈色法測知，所得酵素活性定義為在 37 °C、pH 6.5 反應條件下每分鐘分解 1 m mol α -NPG 所需之酵素量。結果以 CCRC 14606 在水解 α -NPG 是明顯最高者。而在乳糖基質之反應，包括寡糖合成及水解方面，轉糖與水解活性的定義為 45 °C、pH 4.3 下每小時合成 1 μ mol 寡糖或水解 1 μ mol 乳糖所需之酵素量。結果顯示兩者的表現上都以 CCRC 14634 最高。

另外，在 HPLC 結果中也可以看出，所得到的寡糖幾乎都是三糖，僅在酵素活性較高的 CCRC 14634 中偶有極微量的四糖產生。Dumortier 等 [8] 以 *B. bifidum* 所進行之實驗中可以產生三糖-五糖的寡糖，因此推測本實驗中此種情形有可能是因為酵素活性過低所致，使得三糖濃度不高，故其再和酵素複合體發生有效碰撞的機會極低，因此不易產生四糖。

二. 影響半乳糖苷酶進行轉糖反應之因素

1.反應時間

依照 Dumortier 等〔8〕的反應條件，以 pH 4.3、4.5、0.5 M 乳糖溶液進行反應並定時取樣。結果顯示 CCRC 14606 及 CCRC 14634 之半乳糖在反應 4 小時內會有最大量的寡糖生成，可產生三糖以上寡糖約 5% 左右。而 CCRC 15416、CCRC 14633 則在反應的 6 小時有最大量寡糖生成，佔總糖量的 4% 左右。CCRC 14615 約反應 10 小時才得到最大寡糖生成量 4%。以寡糖生成後的穩定性來說，CCRC 14634 最差，大約 15 小時時即幾乎測不到寡糖含量的；而 14606 在 30 小時後測不到寡糖存在。

各試驗菌株反應液中單糖、乳糖、寡糖的生成情形，在 CCRC 14606 及 CCRC 14634 有較相似的情形，乳糖快速被反應，大約 10 小時時分別只剩下 20% 及 10% 左右；在此同時單糖會不斷累積，而 CCRC 14634 又比 CCRC 14606 分解速度更快。

Cruz 等〔9〕利用 *Penicillium simplicissimum* 之半乳糖試驗也有相同的現象，可能是因酵素會同時進行寡糖的合成與雙糖的水解，當水解量達到某一個程度時，過多的單糖累積，會刺激寡糖分子開始被水解，直到均為單糖分子，且此種水解會由高分子往低分子進行，也就是說三糖會比乳糖水解更快。

2.反應 pH 值

本試驗探討 β -galactosidase 在 pH3-8 之活性，結果顯示五株菌在 pH 3 以下或 pH 8 以上都不具任何活性；主要活性在 pH 4-6 之間。CCRC 14606 及 CCRC 15416 之 β -galactosidase，在 pH 4-6 間之活性差異不大。CCRC 14615 及 CCRC 14633 之 β -galactosidase 不論在轉糖活性或水解活性的表現上，都是在 pH 6 時最大。CCRC 14634 的轉糖活性在 pH 4-6 間差不多，但水解反應活性卻在 pH 6 時明顯較高。而 CCRC 14634 在寡糖合成活性上，不論反應液中 pH 值為何，只要在酵素活性表現範圍內皆優於其它菌株。

3.反應溫度

五株菌之 β -galactosidase 轉糖反應活性，皆約在 45 時有最高的活性。而以 37

時轉糖活性表現最低，這種現象和之前文獻中所推測的寡糖產生機制，有可能是菌體為了避免環境所帶來的衝擊才產生的可互相映證，像合成寡糖可以降低高乳糖所造成之高滲透壓的作用或者可以在高溫下有保護菌體的效果〔10〕，所以菌體才會在生長最適溫度時轉糖活性最低。

4.基質濃度

利用不同的乳糖濃度進行試驗，可以發現當乳糖濃度過低時，約 0.2M 以下，在五株試驗菌株酵素活性的表現上都只有水解反應的發生。而當乳糖濃度高於 0.2M 後，轉糖反應活性開始快速增加，CCRC 14606、CCRC 14615、CCRC 15416 及 CCRC 14633 在 0.4M 乳糖濃度以上後轉糖反應增加趨勢漸趨緩和；而 CCRC 14634 在轉糖活性表現上則明顯較佳，雖然 0.4M 以上活性不再呈直線上升，但仍有明顯增加的趨勢直到 1.0M 以後才漸趨穩定。

根據 Michaelis-Menten 之酵素動力學顯示， K_m 值是為達到一半最高催化速率時所需之基質濃度，故 K_m 可視為使用酵素基質的大約濃度。在各試驗菌株中 CCRC 14606 之 K_m 為 570 mM，CCRC 15416 為 480 mM，CCRC 14633 為 440 mM，CCRC 14634 為 1360 mM，此和文獻中記錄相近〔8〕。另外所得之 V_{max} 也顯示了 CCRC 14634 之最大反應速率最高。

5.金屬離子及 EDTA

金屬離子的存在會對酵素水解與轉糖活性的表現有所影響的。本實驗中選用 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Zn^{2+} 等不同氯化鹽及 EDTA，各 2.5 mM 添加於反應液中，結果顯示在添加 $CuCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、EDTA 等三組，對五株試驗菌株的兩種酵素活性都呈現完全之抑制。 Ca 離子的添加對 CCRC 14615 的兩種活性表現均為抑制作用；對 CCRC 14606 及 CCRC 14633 的水解活性略增，但對於轉糖反應活性則略降；對 CCRC 14634 則相反。添加 $CoCl_2$ 的效果，在五株試驗菌的轉糖活性上都是呈現抑制的效果；但對於水解活性上則 CCRC 14606、CCRC 14615、CCRC 15416 呈現小幅下降，但 CCRC 14633、CCRC 14634 則小幅增加，幾乎可視作沒有影響。添加 $MgCl_2$ 時，對於 CCRC

14606、CCRC 15416、CCRC 14633等的轉醣活性是抑制作用，但對於CCRC 14615、CCRC 14634則不影響；分析水解活性，對CCRC 14606、CCRC 14615、CCRC 1434影響不大，對CCRC 15416有明顯抑制作用，對於CCRC 14633則有促進效果。而添加SnCl₂則對試驗菌的兩種酵素活性都是抑制的效果，可達50%以上，僅在CCRC 14634菌株之轉醣活性是維持略增的。因此，對CCRC 14606、14615、15416、14633等菌來說添加實驗中所使用的金屬離子，效果均不顯著，因此不建議在反應液中添加額外的二價金屬離子，而僅以含鈉的緩衝液進行反應。實驗中加入EDTA將反應液中之金屬離子去除，會使酵素失活，推測此酵素反應是需要有金屬離子作cofactor才能作用，且以添加鈉離子較佳，其它二價離子的作用則在不同菌株有不同表現。Becker及Evans〔11〕認為半乳糖作用需要單價陽離子乃因其可誘導酵素結構上構形的改變，而可是酵素作用，且鈉離子因為分子直徑小更能與酵素緊密結合而優於K⁺。

三.半乳糖對於雙叉桿菌與產氣莢膜桿菌的影響

本實驗以 *B. longum* CCRC 14634 的半乳糖 酵素粗萃液，於 1.0M 乳糖溶液中進行大量製備的反應，反應條件為 pH6.0、50 之磷酸緩衝液進行之。所產生之半乳糖稀釋成 5% 的半乳糖液後添加於 modified Reinforced Clostridial medium 中，和商品化半乳糖、葡萄糖等一起觀察對雙叉桿菌、產氣莢膜桿菌生長促進的作用。

結果發現雙叉桿菌在添加半乳糖的培養基中生長確實較添加其他碳源者為快，大約 12 小時即可獲最大之菌數。在葡萄糖培養基中則要 15 小時，乳糖更慢，則要 18 小時。

產氣莢膜桿菌在乳糖之培養基生長最好，自製半乳糖次之，較差的則是商品化半乳糖及葡萄糖。在添加有乳糖的培養基中大約 6 小時就達到穩定期；而在添加商品化半乳糖與葡萄糖的培養基中都是在 9 小時達到穩定期。推測可能是自製半乳糖內所含乳糖量較商品化寡糖高，而能讓產氣莢膜桿菌利用，故在促生效果上才會和乳糖組

相類似。

根據 Mlobeli 等〔12〕利用葡萄糖、乳糖、水蘇糖、纖維雙糖等進行雙叉桿菌生長速率探討，*B. bifidum* 在添加葡萄糖的培養基中生長速率是最快的，相對的菌體量、代謝速率等也隨之增快；而實驗中也證實了，乳糖對於雙叉桿菌不是一個很好的基質。另外 Hopkins 等〔13〕也提及了雙叉桿菌不同菌種間對於不同碳源的利用情形會有所差異，甚至不同菌株間也會有此種現象發生。不過可以看出在其選用的雙叉桿菌中對於半乳糖、低聚合度的寡糖等多有良好的利用情形；而普遍對於木寡糖的利用情形較不佳。在體內實驗的結果中，也證實當食用半乳糖後，體內的雙叉桿菌及乳酸菌菌數會增加，類桿菌屬（bacteroidaceae）菌數則減少，且短鏈有機酸會增加〔14〕。這些作用可有效刺激腸道蠕動，減少大腸直腸癌的發生並延緩老化的現象。

四、計畫成果自評

1. 本研究計畫成果報告內容與原申請研究計畫書內容相符，並達成預期目標。
2. 研究成果具學術及應用價值，適合在學術期刊發表。

五、參考文獻

- 1.O'Brien, M. and Mitsuoka, T. 1991. Quantitative fluorometric assay for rapid enzymatic characterization of *Bifidobacterium longum* and related bifidobacteria. *Microbiol Immunol.* 35: 1041-1047.
- 2.Roy, D., Berger, J. L. and Reuter, G. 1994. Characterization of dairy-related *Bifidobacterium* spp. based on their -D-galactosidase electrophoretic patterns. *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 55-70.
- 3.Ozawa, O., Ohtsuka, K., and Uchida, R. 1989. Production of 4'-galactosyllactose by mixed cells of *Cryptococcus laurentii* and baker's yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 36: 898-902.
- 4.Yanahira, S., Morita, M., Aoe, S., Suguri, T., Nakajima, I., and Deya, E. 1995. Effects of lactitol-oligosaccharides on the intes-

- tinal microflora In rats. J. Nutri. Sci. Vitaminol. 41: 83-94.
5. Wallenfels, K. 1951. Enzymatische synthese von oligosacchariden auf disacchariden. Naturwissenschaften. 38: 306-307.
 6. Z'arate, S. and Lopez-Leiva, M. H. 1990. Oligosaccharide formation during enzymatic lactose hydrolysis: A literature review. J. Food Protect., 53: 262-268.
 7. Smart, J. B., Pillidge, C. J., and Garman, J. H. 1993. Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of β -galactosidase and phospho- β -galactosidase. J. Dairy Res. 60: 557-568.
 8. Dumortier, V., Brassart, C. and Bouquelet, S. 1994. Purification and properties of a β -D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. Biotechnol. Appl. Biochem., 19: 341-354.
 9. Cruz, R., Cruz, V. D., Belote, J. G., Khenayfes, M. de O., Dorta, C., Oliveira, L. H. dos S., Ardiles, E., and Galli, A. 1999. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissium*. Bioresource Technol. 70: 165-171.
 10. Messer, M., Trifonoff, E., Stern, W., Collins, J. G., and Bradbury, J. H. 1980. Carbohydr. Res. 83: 327-334.
 11. Becker, V.E. and Evans, H. J. 1969. The influence of monovalent cations and hydrostatic pressure on β -galactosidase activity. Biochim Biophys Acta. 191: 95-104.
 12. Mlobeli, N. T., Gutierrez, N. A., and Maddox, I. S. 1998. Physiology and kinetics of *Bifidobacterium bifidum* during growth on different sugars. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 125-128.
 13. Hopkins, M. J., Cummings, J. H., and Macfarlane, G. T. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate source. J. of Appl. Microbiol. 85: 381-386.
 14. Ito, M., Deguchi, Y., Matsumoto, K., Kimura, M., Onodera, N., and Yajima. 1993. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 39: 635-640.