

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

雙叉桿菌具轉半乳糖作用 -半乳糖苷酶及其應用於半乳糖寡糖合成之研究(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-075-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：周正俊

計畫參與人員：徐志安 李宜欣

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 26 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫執行進度報告

雙叉桿菌具轉半乳糖作用 β -半乳糖苷酶及其應用於半乳糖寡糖合成之研究(2/3)

計畫編號：NSC92-2313-B-002-075

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

報告日期：93年5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

本研究利用發酵槽(5L)培養 *B. longum* CCRC 15708 進行 β -galactosidase 之生產，探討培養溫度及培養液 pH 值對於菌體之生長及 β -galactosidase 產生之影響。並對 *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 進行純化，探討其一些之理化特性。初步結果顯示，培養溫度及培養液 pH 值均會影響所試菌種在發酵槽中 β -galactosidase 之產量。於 32°C 及培養液初始 pH 值為 6.5 下，培養 12 小時後，可得較高(12.1 U/mL)之 β -galactosidase 產量。以 Q sepharose fast flow 陰離子交換樹脂層析及 Superose 6 膠體過濾層析作 β -galactosidase 之部份純化後，經 native-PAGE 分析，顯示 *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 之分子量約為 323 kDa；同時，其酵素作用之最適反應溫度及 pH 值則分別為 50°C 及 7.0。

關鍵字：半乳糖苷酶,雙叉桿菌,轉半乳糖作用

二、緣由與目的

β -galactosidase 亦稱為 lactase (E. C. 3.2.1.23)，可水解一分子之乳糖並產生一分子之葡萄糖及半乳糖， β -galactosidase 轉化乳糖成為半乳糖寡糖之作用機制乃當此酵素與乳糖作用時，先將乳糖之 β -1,4 糖苷鍵切斷，並與半乳糖形成一酵素複合體，若有帶羥基之分子靠近此複合體時，即會發生鍵結轉移作用，故當靠近之分子為醣類，即會成為一新的醣苷鍵，而形成寡糖

(Prensil *et al.* 1987)；此外， β -galactosidase 之理化特性會隨不同之菌株來源而有所不同，Hung 及 Lee (2002)將來自 *B. infantis* HL96 之 β -galactosidase 進行純化後發現，其酵素分子量大小為 470 kDa，酵素作用最適反應溫度及 pH 值分別為 60°C 及 7.5；*Lactobacillus crispatus* 之 β -galactosidase 最適反應溫度及 pH 值分別為 45°C 及 6.5 (Kim and Rajagopal, 2000)；Nagy 等 (2001) 則指出 *Penicillium chrysogenum* 之 β -galactosidase 分子量大小為 270 kDa，酵素反應最適溫度為 27 至 37°C，且最適反應 pH 值為 4 至 5。

雙叉桿菌具有益生菌(probiotics)之生理功能，如可維持腸道內正常微生物族群、減少腸道內有害物質、預防大腸癌、降低血液中膽固醇及脂質含量等重要生理活性 (Berg 1998)。一些研究指出，此類菌株可產生 α - 及 β -galactosidase，其中 β -galactosidase 除可將乳糖分解成為葡萄糖及半乳糖外，亦可將半乳糖作為接受者，利用帶有之羥基與其他醣類結合，如乳糖，進行轉半乳糖作用，生成半乳糖寡糖之寡糖類物質(Prensil *et al.* 1987)。

吾人先前曾篩選比較不同雙叉桿菌 β -galactosidase 之產生而發現，在所試之菌株中以 *B. longum* CCRC 15708 產生之 β -galactosidase 最高，且針對其最適培養基組成進行探討。在本研究中乃以 *B. longum* CCRC 15708 為試驗菌株，進一步以 5L 發酵槽進行 β -galactosidase 之生產，探討培養溫度及培養液初始 pH 值等操作變數，對於菌株之生長以及 β -galactosidase 生產的影響

響。此外，並對 β -galactosidase 進行純化，探討其相關之理化特性。

三、結果與討論

1. 培養溫度對於 *B. longum* CCRC 15708 生長及 β -galactosidase 活性之影響

以發酵槽(5L)在不同溫度下培養 *B. longum* CCRC 15708 經 12 小時後，試驗菌株之生長及 β -galactosidase 活性如圖一所示。培養溫度為 37°C 時，菌體之生長情形最好，其濁度(OD₅₄₀)達 6.58，其次是 32 及 42°C，而在 27°C 下培養則生長最差。然而， β -galactosidase 酵素活性則以在 32°C 為培養溫度時，活性最高(13.2 U/mL)，隨著培養溫度之增加， β -galactosidase 活性亦隨之降低，當培養溫度為 42 °C 時， β -galactosidase 之活性為 3.1 U/mL，約為以 32°C 培養時所得活性之 23.7%；而培養溫度降至 27°C 時， β -galactosidase 活性亦會隨之降低，酵素活性僅有 9.8 U/mL。

2. 培養液初始 pH 值對於 *B. longum* CCRC 15708 生長及 β -galactosidase 活性之影響

培養液初始 pH 值(4.5、5.5、6.5 和 7.5)，對於 *B. longum* CCRC 15708 生長及 β -galactosidase 活性之影響，如圖二所示。

培養液之 pH 值為 6.5 時，菌體之生長最佳，於培養 12 小時後，菌體濁度(OD₅₄₀)為 6.71。隨著培養液初始 pH 值增至 7.5 或降至 4.5，菌體濁度亦會隨之下降。同時，當培養液初始 pH 值為 6.5 時，則可獲得最佳之 β -galactosidase 酵素活性 (12.1 U/mL)，其次為 5.5，7.5 次之，4.5 最差。

3. *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 之純化

Nagy 等 (2001) 以 硫 銨 沉 澱、DEAE-Sephadex chromatography、affinity chromatography 及 chromatofocusing 純化 *P. chrysogenum* 之 β -galactosidase，結果發現其酵素分子量約為 270 kDa。

因此吾人利用不同之純化步驟，將 *B. longum* CCRC 15708 所產生之

β -galactosidase 進行純化。首先菌體用超音波破碎後離心，所得之粗酵素液進行 Q sepharose fast flow 陰離子交換樹脂層析，結果如圖三所示，具 β -galactosidase 活性部份(管號 12-20)於 NaCl 濃度為 0.25 M 時被沖洗出，收集 β -galactosidase 活性較高部份(管號 15-17)，分析發現其比活性由粗抽液的 10.8 U/mg 提高至 41.5 U/mg，倍數提高 3.9 倍(表一)。

利用 Q sepharose fast flow 陰離子交換樹脂層析所得之具活性部位以含 0.25 M NaCl 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH 6.5)進行透析 24 小時後進行 Superose 6 膠體過濾層析，結果如圖四所示。具 β -galactosidase 活性部份於管號 47-49 被沖洗出，收集所得之 β -galactosidase 比活性為 168.4 U/mg，純化倍數達 15.7 倍，而回收率為 29.3%。

為了瞭解各純化步驟的效果，實驗中利用 native-PAGE 電泳分析，結果如圖五所示，當以 Q sepharose fast flow 陰離子交換樹脂層析區分後，即可去除大部分之雜蛋白，再經過 Superose 6 膠體過濾層析後可以得到一個主要蛋白質片段，顯示這些純化步驟可以確定已達到部份純化的結果。同時與蛋白質標準品比較後，可推得由 *B. longum* CCRC 15708 所產生之 β -galactosidase 分子量約為 323 kDa。

4. *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 最適反應溫度

B. longum CCRC 15708 之 β -galactosidase 經前述部份純化後，其最適反應溫度之試驗結果如圖六所示。當反應溫度為 50°C 時， β -galactosidase 之相對活性最高，隨著反應溫度之上升(55-70°C)或下降(45-20°C)， β -galactosidase 之相對活性均會快速地降低，此顯示本試驗菌株所產生之 β -galactosidase 最適反應溫度為 50°C。

5. *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 最適反應 pH 值

圖七為在不同 pH 下， β -galactosidase 所呈現之活性。所測試之 pH 值中 (4.5-9.0)，*B. longum* CCRC 15708 之

β -galactosidase 最適反應 pH 值為 7.0，當 pH 值降低至 6.0 以下時， β -galactosidase 之活性會急劇地降低，pH 值為 4.5 時，酵素之相對活性降至為 0%，反之，當反應 pH 值提高至 7.5 以上時，亦會有相似之情形。

四、初步結論

在以 5L 發酵槽培養 *B. longum* CCRC 15708 產生之 β -galactosidase 時，32°C 及 6.5 分別為此菌株產生 β -galactosidase 之最佳培養溫度及 pH 值。經 Q sepharose fast flow 陰離子交換樹脂層析及 Superose 6 膠體過濾層析後，可得純化倍數為 15.7 倍之 β -galactosidase，並經由 native-PAGE 分析後，可知 *B. longum* CCRC 15708 之 β -galactosidase 之分子量約為 323 kDa；同時，其最適反應溫度及 pH 值則分別為 50 °C 及 7.0。

四、參考文獻

1. Berg RD. 1998. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? Trends Microbiol 6:89-92.
2. Kim JW, Rajagopal SN. 2000. Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. Folia Microbiol 45:29-34.
3. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biro S. 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. Protein Expr Purif 21:24-29.
4. Prenosil JE, Stuker E, Bourne JR. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. Biotechnol Bioeng 30:1019-1025.
5. Hung MN, Lee BH. 2002. Purification and characterization of β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. Appl Microbiol Biotechnol 58:439-445.

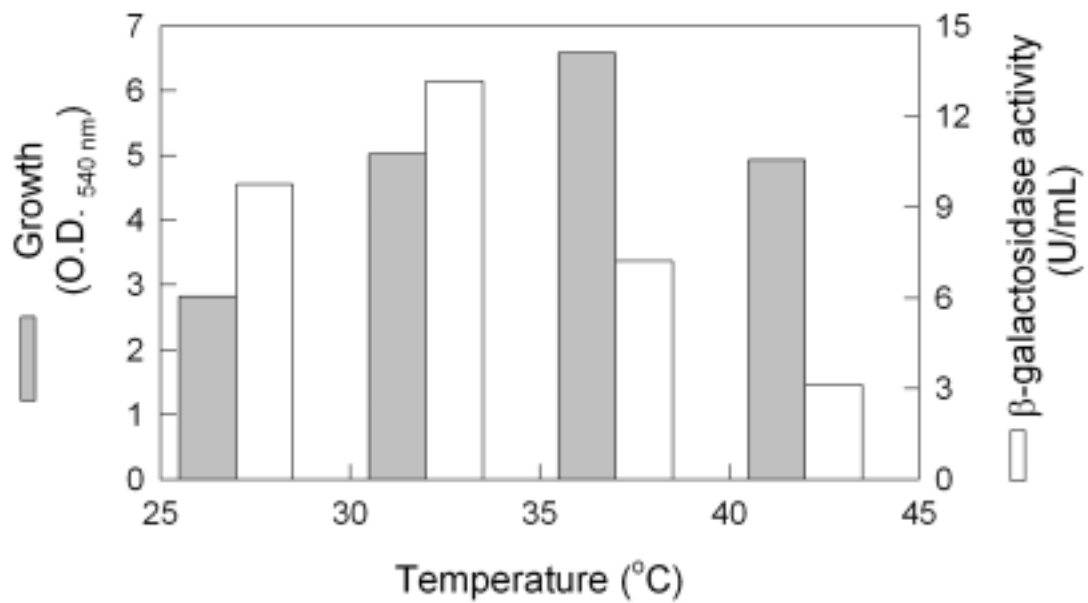


Figure 1. Effect of cultivation temperature on the growth and production of β -galactosidase by *B. longum* CCRC 15708. Operation conditions: agitation speed, 50 rpm; pH 6.5.

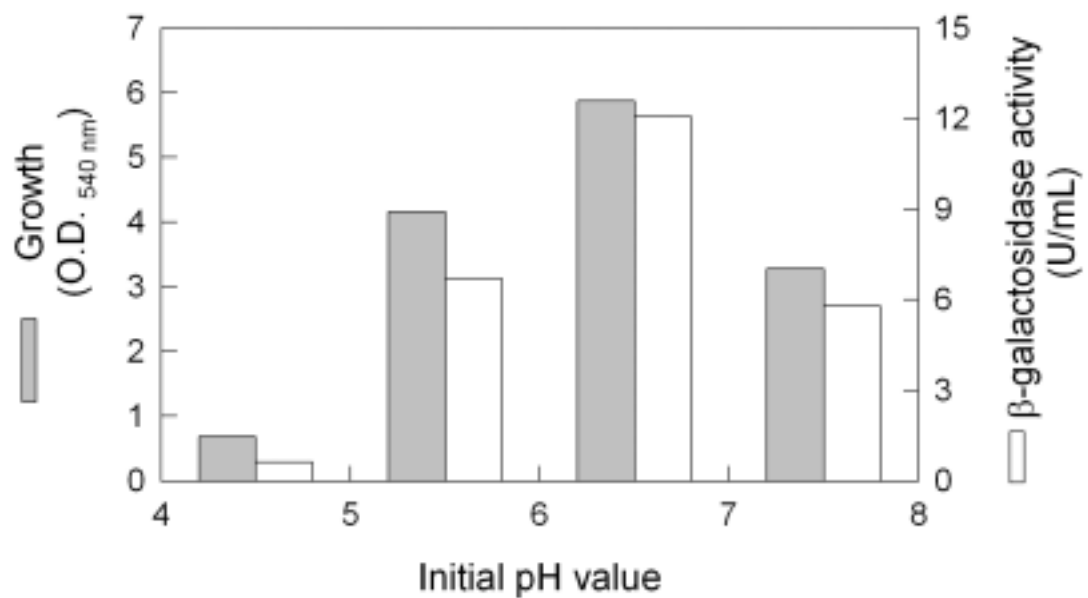


Figure 2. Effect of initial pH value on the growth and production of β -galactosidase by *B. longum* CCRC 15708. Operation conditions: agitation speed, 50 rpm; temperature, 32°C.

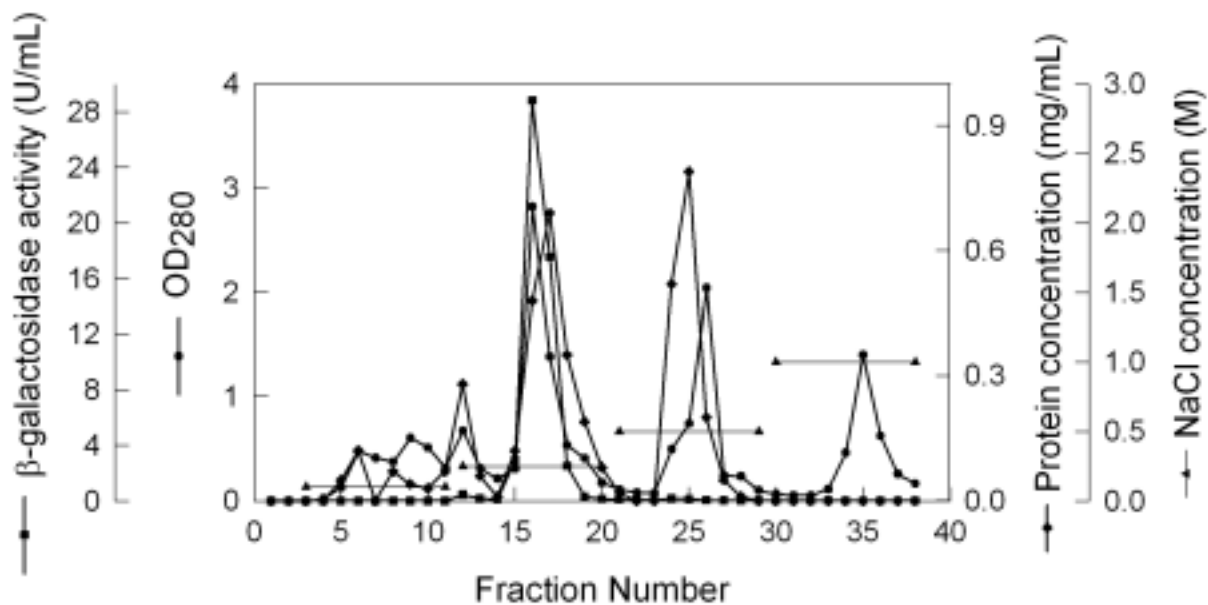


Figure 3. The elution profile of Q fast flow chromatography of β -galactosidase from *B. longum* CCRC 15708. (\blacksquare), β -galactosidase activity; (\bullet), OD₂₈₀; (\blacklozenge), protein concentration; (\blacktriangle), NaCl concentration.

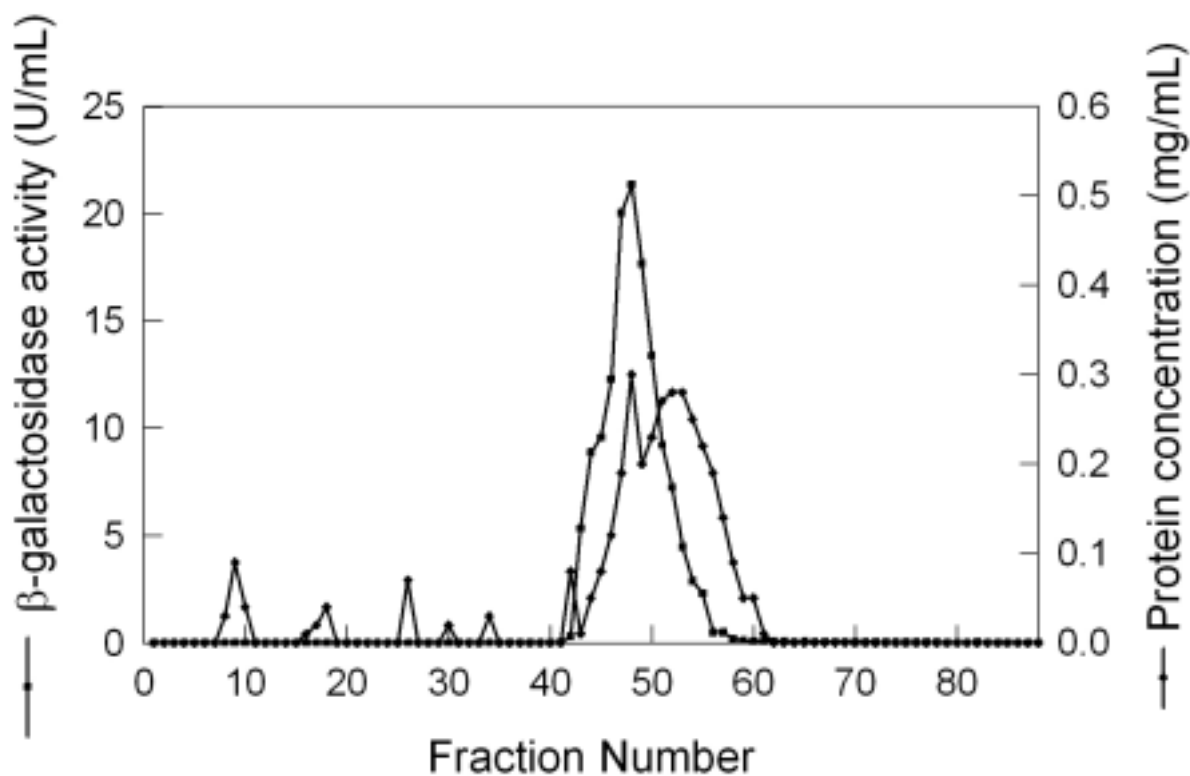


Figure 4. The elution profile of Superose 6 gel filtration of β -galactosidase from *B. longum* CCRC 15708. (\blacksquare), β -galactosidase activity; (\blacklozenge), protein concentration.

Table 1 Purification of β -galactosidase from *B. longum* CCRC 15708

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification	Recovery factor (%)
Crude extract	66.2	712.4	10.8	1.0	100.0
Q fast flow	12.2	506.0	41.5	3.9	71.0
Superose 6 gel filtration	1.2	209.1	168.4	15.7	29.3

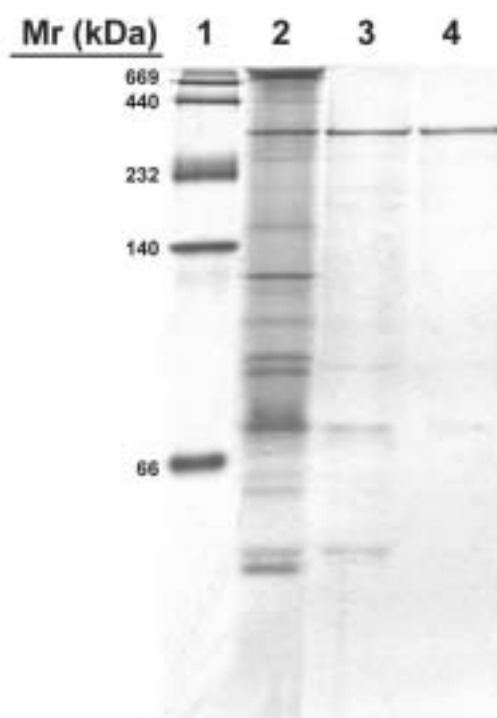


Figure 5. The native-PAGE of β -galactosidase from *B. longum* CCRC 15708. Lane 1, marker proteins; lane 2, crude extract; lane 3, Q fast flow chromatography; lane 4, Superose 6.

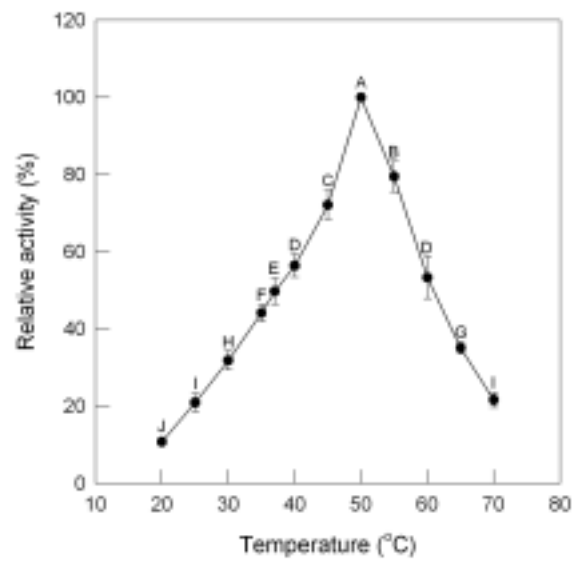


Figure 6. Optimal temperature of the purified β -galactosidase using OPNG as substrate.

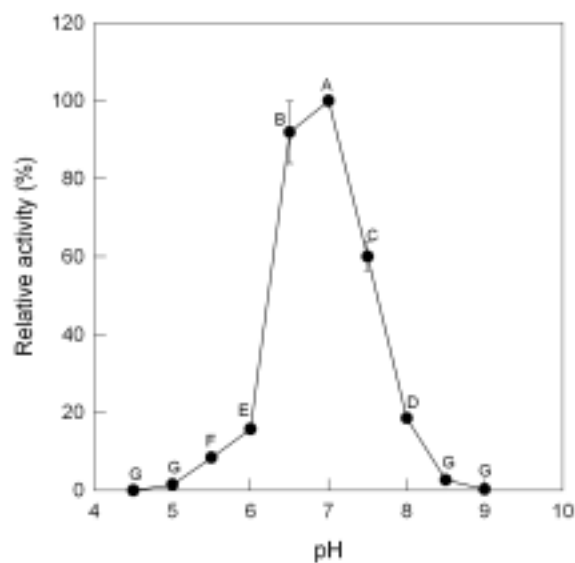


Figure 7. Optimal pH of the purified β -galactosidase using OPNG as substrate. The buffers used are citrate buffer (pH 4.5-6.0), Na-phosphate buffer (pH 6.5-8.0), and boric acid buffer (pH 9.0-9.5).