

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 雙叉桿菌具轉半乳糖作用 -半乳半半半半半半用半半乳糖 寡半合成之研究(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-002-

執行期間：93年08月01日至94年10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

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告半發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 12 月 27 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

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

計畫編號：NSC93-2313-B-002-002

執行期限：91年8月1日至94年10月31日

報告日期：94年12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

本研究首先以三角錐瓶系統，比較雙叉桿菌包括 *Bifidobacterium longum* BCRC 15708、*B. longum* BCRC 14634、*B. longum* B6、*B. infantis* BCRC 14633、*B. breve* BCRC 11846、*B. bifidum* BCRC 14615、*B. adolescentis* BCRC 146087 菌株 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)之產生，而發現 *B. longum* BCRC 15708 所產生之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性及比活性最高，進一步探討不同碳源(lactose、glucose 及 galactose)及氮源(yeast extract、peptone、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、tryptone、gelatin、casein 及 beef extract)對 *B. longum* BCRC 15708 生產 $\beta$ -半乳糖苷酶之影響。結果顯示，乳糖及酵母抽出物分別為其最適之碳源及氮源，當以最適培養液組成(4% lactose、3.5% yeast extract、0.3%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和 0.03% L-cysteine)及最適培養條件(初始培養液 pH 值為 6.5 及培養溫度為  $37^\circ\text{C}$ ) 發酵培養 16 小時後，可得最高之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，約為 18.6 U/ml。

來自 *B. longum* BCRC 15708 之 $\beta$ -半乳糖苷酶經 Q Fast Flow 陰離子交換樹脂層析及 Superose 6 膠體過濾層析純化後，可得純化倍數 15.7 倍及酵素比活性 168.6 U/mg 之 $\beta$ -半乳糖苷酶，以 Native PAGE 分析發現其分子量為 357 kDa。當以 OPNG 作為反應基質時，酵素反應之最適作用溫度及 pH 值分別為  $50^\circ\text{C}$  及 7.0，最大反應速率( $V_{\max}$ )及反應速率常數( $K_m$ )則分別為 70.67 U/mg 及 0.85 mM。鈉離子及鉀離子可促進酵素之活性，當其添加濃度為 100 mM 時，相較於未添加者而言，約可分別提高 $\beta$ -半乳糖苷酶活性達 12 及 10

倍；1 mM 之鐵離子、鈷離子、銅離子、鋅離子等則會造成 $\beta$ -半乳糖苷酶活性被嚴重抑制之結果。半乳糖、乳糖及果糖等亦均會抑制 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，其中當以 OPNG 為反應基質時，乳糖之抑制作用可能為競爭型抑制之一種。

利用密閉 5 公升發酵槽培養 *B. longum* BCRC 15708 進行 $\beta$ -半乳糖苷酶之生產顯示，最適之初始乳糖及酵母抽出物添加濃度分別為 4 及 3.5%，而最適之初始接種菌量、培養溫度、培養液 pH 值及攪拌速率則分別為 20% (v/v)、 $37^\circ\text{C}$ 、6.5 及 100 rpm。並於最適培養條件下，發酵培養 10 小時後，可得最高 $\beta$ -半乳糖苷酶活性及轉半乳糖活性，分別為 36.7 及 0.49 U/ml。

最後，研究發現本試驗菌株於初始乳糖濃度為 40%，反應液 pH 值為 6.8 及反應溫度為  $45^\circ\text{C}$  下，當乳糖之轉化率為 57.8% 時，可產生最大之半乳寡糖量，相較於反應液中之總糖量而言為 30.1%，生成之半乳寡糖聚合度(DP)為 3 及 4，其中又以 3 糖為主要之半乳寡糖；隨著反應液中初始乳糖添加濃度之增加(5-40%)，愈有利於酵素進行半乳寡糖之生成； $\beta$ -半乳糖苷酶進行轉半乳糖反應之最適 pH 值及溫度分別為 6.8 及  $45^\circ\text{C}$ ，當降低或提高反應液之 pH 值(4.8；7.8-8.8)或溫度( $25$ - $35^\circ\text{C}$ ； $55$ - $65^\circ\text{C}$ )時，均不利於半乳寡糖之產生，其中溫度之影響較 pH 值之影響為顯著。此外，於反應液中額外添加葡萄糖或半乳糖，亦會抑制  $\beta$ -半乳糖苷酶之轉半乳糖反應。

**關鍵字：**  $\beta$ -半乳糖苷酶，雙叉桿菌，轉半乳糖作用，發酵槽

**Abstract**

Seven strains of bifidobacteria (*Bifidobacterium longum* BCRC 15708, *B. longum* BCRC 14634, *B. longum* B6, *B. infantis* BCRC 14633, *B. breve* BCRC 11846, *B. bifidum* BCRC 14615, and *B. adolescentis* BCRC 146087) were evaluated on  $\beta$ -galactosidase producing ability in a flask system with *B. longum* BCRC 15708 showing the highest production of  $\beta$ -galactosidase and the highest specific activity. Further study with *B. longum* BCRC 15708 revealed that lactose and yeast extract, respectively, were the best carbon source and nitrogen source for the  $\beta$ -galactosidase production. After 16 h of fermentation, a maximum  $\beta$ -galactosidase activity of 18.6 U/ml was found in medium containing 4% lactose, 3.5% yeast extract, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  and 0.03% L-cysteine at an initial pH of 6.5 and at 37°C.

$\beta$ -galactosidase from *B. longum* BCRC 15708 was first extracted by ultrasonication then purified by Q Fast-Flow chromatography and gel chromatography on a Superose 6 HR column. These steps resulted a purification of 15.7-fold, a yield of about 29.3% and a specific activity of 168.6 U mg<sup>-1</sup> protein. The molecular mass was estimated to be 357 kDa by Native-PAGE. The purified enzyme was stable at temperature up to 40°C and at pH values of 6.5-7.0.  $K_m$  and  $V_{max}$  for this purified enzyme were noted to be 0.85 mM and 70.67 U/mg, respectively.  $\beta$ -galactosidase was activated by Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> up to 10-fold and inhibited by Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Furthermore, although glucose, galactose, maltose, or raffinose exerted little or no effect on the  $\beta$ -galactosidase activity, lactose and fructose inhibited the enzyme activity. The effect of lactose on the enzyme activity for OPNG is probably a case of competitive inhibition.

*B. longum* BCRC 15708 grown in a 5-L jar fermenter showed that the inoculum size (1-30%), culture temperature (24-42°C), the pH of medium (4.5-7.5), the agitation speed (5-200 rpm), lactose content(1-10%) and yeast extract content (0.5-6.5%) would all affect the

$\beta$ -galactosidase production. In general, it was found that the growth and production of  $\beta$ -galactosidase increased as the inoculum size increased. With 20% inoculation of test organism in a medium containing 4% lactose and 3.5% yeast extract, a maximum  $\beta$ -galactosidase activity of 36.7 U/ml and a maximum transgalactosylation activity of 0.49 U/ml could be achieved in 10 h of fermentation if the pH value of culture medium, the agitation speed and the cultivation temperature were controlled at 6.5, 100 rpm, and 37 °C, respectively.

Galacto-oligosaccharides (GOS) were efficiently produced by  $\beta$ -galactosidase from *B. longum* BCRC 15708. GOS production increased with increasing lactose concentration. A maximum GOS production of 30.1% (w/w) of total sugars was achieved at 56.8% lactose conversion with 40% of initial lactose concentration at pH 6.8 and 45 °C. Tri-saccharides were the major types of GOS formed, accounting for more than 92% of the total GOS produced in the reactions. The presence of galactose and glucose at the concentrations encountered near maximum GOS greatly inhibited the reactions and reduced GOS yield by as much as 20% and 15% respectively.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase、Bifidobacteria、transgalactosylation、fermenter

## 二、緣由與目的

半乳糖寡糖是目前被公認的益菌助生質 (prebiotics)之一，為不被人類消化液分解利用，但可被宿主體內特定益生菌(如：雙叉桿菌等)代謝之物質；1995 年全球所生產之寡糖約為 85,000 噸，其中半乳寡糖即約占 15,000 噸，僅次於 lactulose (Sako *et al.* 1999)，更在經濟上深具價值。此類寡糖可用乳糖經由 $\beta$ -半乳糖苷酶進行轉半乳糖作用而生成 (Prensil *et al.* 1987)，其結構一般為 (Galactose)<sub>n</sub>-Galactose-Glucose，n=2 至 5，其中半乳糖大多以 $\beta$ -1,4 或 $\beta$ -1,6 的方式作鍵結 (Sako *et al.* 1999)，攝取半乳寡糖可有效地提升人類腸道內益生菌之數目 (Bouhnik *et al.*

1997; Ito *et al.* 1990; Ito *et al.* 1993)。

$\beta$ -半乳糖苷酶(lactase) (E. C. 3.2.1.23)，可水解乳糖並產生一分子之葡萄糖及半乳糖， $\beta$ -半乳糖苷酶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 $\beta$ -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，故當靠近之分子為糖類，即會成為一新的糖苷鍵，而形成寡糖，稱之為轉半乳糖作用(transgalactosylation) (Prenosil *et al.* 1987)；就反應動力學而言，一般在高乳糖含量及高溫下，由於半乳糖與酵素複合體之碰撞機率增加， $\beta$ -半乳糖苷酶之反應即會趨向轉半乳糖作用。

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 $\alpha$ -及 $\beta$ -半乳糖苷酶，其中 $\beta$ -半乳糖苷酶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，進行轉半乳糖作用，生成半乳糖寡糖之寡糖類物質(Prenosil *et al.* 1987)。許多微生物可產生 $\beta$ -半乳糖苷酶，但屬 GRAS (generally recognized as safe)級且可用於食品系統的菌種卻很少(Gekas V and López-Leiva 1985; Kim and Rajagopal 2000)，且目前用以生產此酵素之微生物大多為黴菌或酵母菌。Albayrak 及 Yang (2002)亦指出，雖已有許多微生物可以產生具轉半乳糖作用之 $\beta$ -半乳糖苷酶，但這些研究多半為探討如何提高此類寡糖之產量，且這些酵素也多半不是應用於食品者。乳酸菌及雙叉桿菌自古以來即被應用於食品當中，所以若來自此類菌株之 $\beta$ -半乳糖苷酶則可安全地應用於食品工業上(Matsumoto 1990)。

微生物生產酵素會受到碳源、氮源、培養液 pH 值及培養溫度等因子之影響。碳水化合物一般是提供微生物菌體生物質量(biomass)及生長所需之能量，而氮源一般是作為細胞體中合成蛋白質、酵素分子、DNA、RNA 和 ATP 等之基本元素之來源，碳源及氮源之種類會影響酵素之合成速率。Nagy (2001a)等人之研究中指出，當以乳糖作為碳

源時，*Penicillium chrysogenum* 可產生最高之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性；*Rhodococcus equi* No. 23 生產膽固醇氧化酵素時，不同之碳源及氮源，亦會影響微生物產生酵素活性之高低(Kreit *et al.* 1992; Lee *et al.* 1997; Liu *et al.* 1987)。

基於雙叉桿菌具有 probiotic 功能，屬 GRAS 菌株，及其產生之 $\beta$ -半乳糖苷酶在保健、經濟及學術價值上之考慮，在此研究中，吾人乃進行一系列之試驗，比較不同雙叉桿菌菌株 $\beta$ -半乳糖苷酶活性之表現，並以三角錐瓶培養探討不同培養液組成，尋求可獲得最高之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性之最適組合；其後，進一步以密閉 5 公升發酵槽進行 $\beta$ -半乳糖苷酶之生產，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 $\beta$ -半乳糖苷酶生產的影響。此外，並對 $\beta$ -半乳糖苷酶進行純化，探討其相關之理化特性。最後，在本研究中探討初始乳糖添加濃度、pH 值、反應溫度及葡萄糖與半乳糖等對於由雙叉桿菌所產生之 $\beta$ -半乳糖苷酶進行轉半乳糖反應之影響。

### 三、結果與討論

以 250 ml 錐瓶，於 37°C 培養不同雙叉桿菌菌株 12 小時後，顯示不同雙叉桿菌菌株最終菌數為 7.7 至 8.2 log CFU/ml 之間，並於所測試的菌株中，只有 *B. longum* B6、BCRC 15708 及 *B. infantis* BCRC 14633 可測得 $\beta$ -半乳糖苷酶活性；其中又以 *B. longum* BCRC 15708 所產生之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性及比活性為最高(4.96 U/ml; 7.15 U/mg protein)，故在其後之實驗均以此菌株作為試驗菌株。

不論以乳糖或葡萄糖作為碳源，*B. longum* BCRC 15708 之最終菌數均較高，但以乳糖作為碳源時，可獲得最高之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性(5.44 U/ml)，其次為以半乳糖作為碳源者，而以葡萄糖作為培養之碳源時，所測得之 $\beta$ -半乳糖苷酶活性最低。此結果與 Fiedurek 及 Szczodrak (1994)和 Shaikh 等人(1997)所得之結果相符，他們分別指出乳糖為誘導 *Kluyveromyces fragilis* 和 *Rhizomucor* sp 產生 $\beta$ -半乳糖苷酶時之最佳碳源，而葡萄糖則為較差之誘導物。

在含有 0.5-10.0% 乳糖之培養液中，本試驗菌株之最終菌數為 8.1 至 8.4 之間， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性會隨培養液中添加乳糖濃度之提升而增加。當乳糖添加濃度為 4.0% 時，可獲得最高之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性，若再增加乳糖之添加濃度，則會抑制本試驗菌株對於  $\beta$ -半乳糖苷酶之產生。此結果與 Fiedurek 及 Szczodrak (1994) 以 *K. fragilis* 生合成  $\beta$ -半乳糖苷酶之報告相類似。而由本試驗結果中顯示 4% 之乳糖已足夠誘導本試驗菌株產生最高活性之  $\beta$ -半乳糖苷酶。

進行不同氮源影響  $\beta$ -半乳糖苷酶之產生顯示酵母抽出物為 *B. longum* BCRC 15708 產生  $\beta$ -半乳糖苷酶之最佳氮源，推測酵母抽出物，除可作為菌株生長所需之氮源外，亦可提供其他對菌體有利之生長因子如維生素等所致(Bridson and Brecker 1970)。

當進一步探討不同酵母抽出物添加濃度(0-16%)之影響發現，在含有 0.0-16.0% 酵母抽出物之培養液中，本試驗菌株之最終菌數為 6.9 至 8.6 之間，隨著添加於培養液中酵母抽出物濃度之提升， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性也隨之增加，當酵母抽出物添加濃度為 10% 時，於 37°C 培養 12 小時後，可獲得最大活性，約為 18.8 U/ml；然而，當酵母抽出物添加濃度再提升至 12-16% 時，反而不利於 *B. longum* BCRC 15708 對  $\beta$ -半乳糖苷酶之產生。

當培養液初始 pH 值為 5.0-6.5 時，於 37°C 下培養 12 小時後，本試驗菌株可得最佳之生長結果，約為 8.5-8.7 log CFU/ml，而以初始培養液 pH 值為 7.0 或 7.5 時，所得之結果為最差；此外，隨著培養液初始 pH 值之增加， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性亦會隨之提高，當初始培養液 pH 值為 6.5 時，本試驗菌株可產生最高之酵素活性，約為 15.87 U/ml，但若再提高培養液之初始 pH 值時， $\beta$ -半乳糖苷酶活性則會急劇地降低。

雖然於培養溫度為 27-42°C 間，對於本試驗菌株之生長沒有顯著的差異，但隨著培養溫度之增加，本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性亦會隨之提高，當培養溫度為 37°C 時， $\beta$ -半乳糖苷酶活性會顯著高於其他所測試之溫度，若再提高培養溫度，則會造成  $\beta$ -半乳糖苷酶活性產生之減少。此結果與 Fiedurek 及 Szczodrak (1994) 和 Shaikh (1997)

等人之研究結果相似。

在最適培養液組成及培養條件下，隨著培養時間之延長，菌體之生長會隨之增加且培養液之 pH 值會隨之降低，當培養時間為 10 小時時，菌體之生長可達最高值，約為 8.3 log CFU/ml，並當培養時間為 16 小時時，培養液之 pH 值會降至最低點，約為 3.8。此外，隨著培養時間之延長， $\beta$ -半乳糖苷酶活性亦會隨之增加，當培養時間為 16 小時時，可得最大之生  $\beta$ -半乳糖苷酶活性，約為 18.6 U/ml，同時，隨著  $\beta$ -半乳糖苷酶活性之增加，酵素之轉半乳糖活性亦會隨之提高，並於培養時間為 12-16 小時間，可達最大值。

嘗試利用不同之純化步驟，將 *B. longum* BCRC 15708 所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶進行純化。首先菌體用超音波破碎後離心，所得之粗酵素液進行 Q Fast Flow 陰離子交換樹脂層析並收集  $\beta$ -半乳糖苷酶活性較高部份，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，之後以含 0.25 M NaCl 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH 6.5)透析 24 小時後進行 Superose 6 膠體過濾層析，收集所得之  $\beta$ -半乳糖苷酶比活性為 168.6 U/mg，純化倍數達 15.7 倍，而回收率則為 29.3%。

實驗中並利用 Native-PAGE 電泳分析以了解各純化步驟的效果，當以 Q 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(66-669 kDa)比較後，可推得由 *B. longum* BCRC 15708 所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶分子量約為 357 kDa。

由 *B. longum* BCRC 15708 所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶最適反應溫度則為 50°C，隨著反應溫度增加(60-70°C)，酵素活性會急劇地下降，當反應溫度為 70°C 時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性約為反應溫度為 50°C 時，酵素活性之 20%；同時，隨著反應溫度下降(20-45°C)，酵素活性亦會隨之降低，當反應溫度為 20°C 時，相對於最高反應活性，約為 10%。當酵素分別靜置於 30 或 40°C 下 40 分鐘後，本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶仍能保留 85% 以上之酵素活性，但當酵素靜置於 50°C 下 10 分鐘後，酵素之殘存活性約只剩下原活性之

50%，當酵素靜置於 60°C 下時，酵素活性則會急速地降低，並於靜置 10 分鐘後，酵素即完全失去活性。這些結果顯示 *B. longum* BCRC 15708 所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶於 30 至 40°C 下是穩定的，而於 50°C 以上時，酵素活性則不穩定。

當以 OPNG 為反應基質時，*B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 及反應速率常數 ( $K_m$ ) 分別為 70.67 U/mg 及 0.85 mM，其最大反應速率相較於 *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 (4.64 U/mg) 及 *P. chrysogenum* (40 U/mg) 為高 (Itoh *et al.* 1992; Nagy *et al.* 2001b)，較 *B. infantis* HL96 (262 U/mg) 為低 (Hung and Lee 2002)，而反應速率常數相較於 *B. infantis* HL96 (2.6 mM) 及 *L. kefiranofaciens* K-1 (4.92 mM) 為低，代表由本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶對於基質 (OPNG) 之親和力較其他菌株所產生  $\beta$ -半乳糖苷酶之親合力為佳。

*B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性會被 1 mM 之重金屬離子 (鐵離子、鈷離子、銅離子、鋅離子) 嚴重抑制，但其活性可被鈉離子及鉀離子等促進，且其促進之效果會隨鈉離子或鉀離子添加濃度之提高而增加，當鈉離子或鉀離子添加濃度為 100 mM 時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性分別約為不添加時之 12 及 10 倍。本試驗結果相似於 Hung 及 Lee (2002) 之研究結果，作者發現低濃度 (1 mM) 之重金屬離子 (錳離子、鈣離子、鈷離子、鋅離子、汞離子、銅離子) 會嚴重抑制 *B. infantis* HL96 之活性，但鈉離子及鉀離子則有促進的效應。

當以 OPNG 為反應基質時，半乳糖、乳糖及果糖均會造成 *B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性降低，其中以乳糖之抑制情形最為顯著，當乳糖添加濃度為 10 mM 時， $\beta$ -半乳糖苷酶活性約為不添加時活性之 68.6%，而添加 10 mM 之半乳糖或果糖時， $\beta$ -半乳糖苷酶活性則分別約為不添加時活性之 95.4% 及 85.6%。此與文獻指出，半乳糖為  $\beta$ -半乳糖苷酶水解 OPNG 時之競爭型抑制劑之報告相符合 (Smart and Richardson 1987; Greenberg and Mahoney 1982)。更進一步探討添加不同濃度乳糖 (10 及 20 mM) 對於  $\beta$ -半乳糖苷酶反應速率常數 ( $K_m$ ) 之影響，當添加 20 mM 之乳糖於反應基質中時， $\beta$ -半乳糖苷

酶之最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 不變，但反應速率常數較乳糖添加濃度為 10 mM 時大，代表存在較高濃度之乳糖時，會降低酵素對基質 (OPNG) 之親和力，因此推測乳糖可能為此酵素之競爭型抑制劑。

在更進一步以發酵槽規模來大量生產此酵素發現，當接種菌量為 30% (v/v) 時，在培養時間為 10 小時之後，其生長濁度即可達最大值，約為 11.1，當接種菌量為 20% (v/v) 時，則於培養時間為 12 小時時，菌體濁度方可達最高點，其值約為 10.4。此外，當初始接種菌量為 30 或 20% (v/v) 時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性於培養過程中可快速地增加，前者於培養時間為 10 小時時，酵素活性可達最大值，約為 41.0 U/ml，其後會有下降之趨勢，並於發酵終點 12 小時時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性約為 36.8 U/ml，後者則於培養時間為 12 小時時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性方達最大值，約為 38.5 U/ml；反之，若當初始接菌量分別為 1、5 或 10% (v/v) 時，則於培養 12 小時後，其  $\beta$ -半乳糖苷酶活性分別只有 0.9、10.9 及 13.0 U/ml，顯著低於初始接菌量為 20 或 30% (v/v) 時所產生之酵素活性 ( $p < 0.05$ )。考量經濟之效益及培養時間之長短後，將定 20% (v/v) 為最適之初始接種菌量，並進行之後本試驗菌株於發酵槽規模生產  $\beta$ -半乳糖苷酶影響因子之探討。

探討 27、32、37 和 42°C 對於以發酵槽規模培養 *B. longum* BCRC 15708 時，菌體生長以及  $\beta$ -半乳糖苷酶活性產生之影響發現，在整個發酵培養過程中，以 37°C 時之菌體生長為最佳，其次為 32°C，而當培養溫度為 27 或 42°C 時，菌體之生長較差，但彼此之間則無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；另外，在整個發酵過程中，分別在 27、32 和 37°C 下培養時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性均會持續地上升，當培養時間為 12 小時時，其酵素活性分別約為 16.0、21.9 及 35.9 U/ml；然而，當培養溫度定為 42°C 時，於發酵時間為 2 小時之後， $\beta$ -半乳糖苷酶活即不再增加，並於發酵終點 12 小時時，其酵素活性約只有 2.2 U/ml，為培養溫度 37°C 時酵素活性之 6.5%，這些結果顯示以發酵槽培養 *B. longum* BCRC 15708 生產  $\beta$ -半乳糖苷酶時之最適培養溫度為 37°C。

在發酵培養過程中，一共探討不控制培

養液 pH 值及四種固定 pH 值(4.5、5.5、6.5 和 7.5)對於 *B. longum* BCRC 15708 生長以及  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影響。當培養液初始 pH 值定為 6.5，並於培養過程中不控制 pH 值時，隨著發酵時間之延長，菌體之生長亦會隨之增加，但於培養時間為 8 小時後，菌體之濁度即不再提高；相較將培養液 pH 值控制於 4.5-6.5 而言，菌體之生長(OD<sub>540</sub>)均能隨著培養時間之延長而增加，並於發酵培養時間為 12 小時時達到最高值，其濁度約為 10.2，但當培養液 pH 值控制於 7.5 時，菌體之生長較則明顯較其他三者(4.5、5.5 及 6.5)為差。此外，在培養過程中，酵素活性均會隨著培養時間之延長而增加，唯增加之幅度以將 pH 值調控於 6.5 時最高，而以 pH 7.5 時最為緩慢，並於培養時間為 12 小時時，酵素活性依序分別約為 23.4、30.4、37.3 和 8.5 U/ml。若於培養過程中不控制培養液之 pH 值，此酵素活性於發酵終點時約只有 4.3 U/ml，為控制 pH 值於 6.5 時酵素活性之 11.5%。

攪拌速率影響之試驗結果顯示，無論培養過程中攪拌速率為何(5-200 rpm)，隨著培養間時間之延長，菌體之生長亦會隨之增加，唯較高攪拌速率者(100、150 或 200 rpm)，菌體之生長較快，於培養時間為 10 小時時，其菌體濁度(OD<sub>540</sub>)即可達最高值，依序約為 11.2、11.1 和 11.9。在較高攪拌速率下，除可促進培養液中巨分子之擴散(Buckland *et al.* 1976)之外，亦可降低含有較高量巨分子培養液之黏度(Umasankar *et al.* 1996)以提高微生物對於擴散性較差基質之利用(Confer and Logan 1991)；故推測此為在較高攪拌速率下，使得菌體之生長可以被促進之主要原因。此外，隨著培養時間之延長，*B. longum* BCRC15708 所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性均會隨之增加，唯在較高之攪拌速率(100、150、200 rpm)下，於培養時間為 10 小時時，酵素活性即可達到最大值，分別約為 37.2、35.5 和 36.9 U/ml，而在較低攪拌速率(5 和 50 rpm)下，則需於發酵時間為 12 小時時，方能達到最大值，分別約為 35.0 和 36.1 U/ml。

在碳源及氮源濃度之影響試驗中發現，無論培養液中初始乳糖濃度(1-10%)為何，在

發酵培養之初期(約 6 小時前)， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性均能快速產生，但當乳糖濃度為 1% 時，於培養時間為 6 小時之後，酵素活性即不再增加，約為 20.9 U/ml，且當乳糖濃度提高至 10% 時，在培養時間為 6 小時之後，酵素活性會有下降之趨勢，並於發酵終點 12 小時時，其酵素活性約只剩 7.1 U/ml；若培養液中乳糖添加濃度為 2、3 或 4% 時，酵素活性於發酵時間為 6 小時之後，除仍能持續地增加之外，並於發酵時間為 10 小時時，可獲得最高之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性，分別約為 28.6、32.7 及 35.5 U/ml。

此外，隨著培養液中酵母抽出物添加濃度之增加， $\beta$ -半乳糖苷酶活性亦愈大，當酵母抽出物添加濃度為 3.5% 時，於培養時間為 10 小時後，酵素活性即可達最大值，約為 35.5 U/ml；然而，若酵母抽出物添加濃度再提高至 6.5%，整體而言，對於酵素活性的產生則沒有顯著性的影響( $p>0.05$ )，且於發酵終點 12 小時時， $\beta$ -半乳糖苷酶之活性略低於酵母抽出物添加濃度為 3.5% 時所產生的酵素活性。

於最佳發酵培養條件(初始接種菌量 20% (v/v)、初始乳糖及酵母抽出物添加濃度分別為 4 及 3.5%、攪拌速率為 100 rpm、培養溫度及培養液 pH 值分別控制於 37°C 及 6.5)下，以密閉不通氣 5 公升發酵槽培養 *B. longum* BCRC 15708 時，當培養時間為 10 小時時，其生長濁度達最大值，約為 11.6，此時，培養液中之乳糖即會被全部利用殆盡。此外，隨著培養時間之延長，酵素活性亦會隨之提高，並於培養時間為 10 小時時， $\beta$ -半乳糖苷酶及轉半乳糖活性均可達最大值，分別約為 36.7 及 0.49 U/ml；相較於先前吾人以三角錐瓶及最佳培養條件所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶活性(18.6 U/ml)及轉半乳糖活性(0.04 U/ml)而言，分別高達 2.0 及 12.3 倍之多，並大幅縮短生產此酵素所需之時間。

自 *B. longum* BCRC 15708 中萃取  $\beta$ -半乳糖苷酶之粗酵素液後，於初始乳糖濃度為 40%、反應溫度為 45°C 及 pH 值為 6.8 下進行轉半乳糖反應，反應 10 小時後所產生之半乳糖寡糖共有 2 種，其聚合度(degree of polymerization)分別為 3 及 4，其中 3 糖及 4 糖之產量分別為 12.6% 及 1.6%，以 3 糖為主

要之半乳寡糖；於反應之初期(5 小時)，*B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶會快速轉化利用反應液中之乳糖，使得半乳寡糖及葡萄糖之產量快速地累積，唯半乳糖產量之累積則較為緩慢，當反應時間為 10 小時時，半乳寡糖之產量可達最高值，約佔反應液中總糖量之 30.1%；但當反應時間為 10 小時後，酵素利用乳糖之速率趨於緩慢，同時，半乳寡糖之產量不再增加，並有下降之趨勢，唯葡萄糖及半乳糖之產量仍會持續地累積。此外由實驗結果亦發現，隨著乳糖轉化率之提高，半乳寡糖之產量亦會快速地累積，當乳糖之轉化率為 56.8% 時，可得最高之半乳寡糖產量，然而當乳糖之轉化率再提高時，反應液中半乳寡糖之產量則會急劇地降低，同時，葡萄糖及半乳糖之產量則會快速地增加。

當初始乳糖濃度為 5% 時，由本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶合成之半乳寡糖之總產量約為初始乳糖添加量(5%)之 0.9%，且葡萄糖及半乳糖產量相對於初始乳糖添加量(5%)則分別約為 43.7% 及 48.0%，所產之半乳寡糖中，只有 3 糖；隨著反應液中初始乳糖添加濃度之增加(10-40%)，所產生之半乳寡糖種類共有 3 及 4 糖，唯其中亦以 3 糖為主要之半乳寡糖，此外，半乳寡糖產生之總量相對於初始乳糖含量(10-40%)之比例而言有上升之趨勢，但葡萄糖及半乳糖產量相對於初始乳糖含量(10-40%)之比例則為下降之情形，當初始乳糖濃度為 40%，於反應 10 小時後，半乳寡糖總產量相對於初始乳糖含量為 34.7%，葡萄糖及半乳糖之產量相對於初始乳糖濃度而言，則分別約為 21.9% 及 9.5%，若再提高初始乳糖添加含量至 50%，則反而不利於半乳寡糖之合成。

*B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶於初始乳糖濃度為 40% 及反應溫度為 45°C 下，當反應液之 pH 值為 6.8 時，於反應 10 小時後，可得最佳之半乳寡糖總產量，相對於初始乳糖添加含量(40%)約為 33.7%，其中亦以 3 糖為主要之半乳寡糖，當反應液 pH 值降至 5.8 時，對於酵素進行轉半乳糖反應並無顯著之影響，但當反應液 pH 值再降至 4.8 或提高至 6.8 以上時，半乳寡糖之總生成量則有下降之趨勢，於反應液 pH 值為 8.8 時，反應 10 小時後，半乳寡糖之生成量相對

於初始乳糖添加量而言，約為 20.3%，代表由本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶之最適轉半乳糖反應 pH 值為 6.8。

於反應初始乳糖濃度為 40% 及反應液 pH 值為 6.5 下，*B. longum* BCRC 15708 之  $\beta$ -半乳糖苷酶隨著反應溫度之增加(25-45°C)，於反應 10 小時後，半乳寡糖之產量亦會顯著地提高( $p < 0.05$ )，所產生半乳寡糖之總量相對於初始乳糖添加量(40%)而言，可由 13.0% 提高至 32.0%，且所產生之半乳寡糖中亦以 3 糖為主，然而，當反應溫度再提高至 55 或 65°C 時，半乳寡糖之產量則會顯著地降低( $p < 0.05$ )，半乳寡糖產生之總量相對於初始乳糖添加量(40%)而言，則分別下降至 9.2 及 1.0%，這可能是因為由本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶在反應溫度為 50°C 以上時，酵素活性不穩定，而導致其活性快速失活所致。

隨著反應液中葡萄糖添加濃度(5-20%)之增加，由本試驗菌株所產生  $\beta$ -半乳糖苷酶於最適反應條件(反應液 pH 值為 6.5、反應溫度為 45°C 及初始乳糖添加濃度為 40%)下，半乳寡糖之產量會隨之降低，當葡萄糖之添加量為 0-10% 時，對於半乳寡糖之產生無顯著的影響( $p > 0.05$ )，但當葡萄糖之添加濃度再提高至 15 或 20% 以上時，則會顯著地阻礙  $\beta$ -半乳糖苷酶轉化乳糖產生半乳寡糖( $p < 0.05$ )，並於反應終止 10 小時時，半乳寡糖之產量分別降至 6.9 及 6.6% (w/v)，抑制幅度達 38.9% 以上；相對於葡萄糖對於半乳寡糖產生之抑制而言，低濃度(0-10%)半乳糖對於由本試驗菌株所產生之  $\beta$ -半乳糖苷酶轉化產生半乳寡糖亦無顯著地影響( $p > 0.05$ )，但當半乳糖之添加濃度提高至 15% 以上時，則會對於半乳寡糖之產生有抑制之效應，於反應終止 10 小時時，半乳寡糖之產量由 11.3% 降低至 8.8%，但其抑制幅度較葡萄糖之抑制為小。

#### 四、計劃成果自評

本研究所得有關培養 *B. longum* BCRC 15708 生產具轉半乳糖活性之  $\beta$ -半乳糖苷酶之最適培養液組成(碳源及其添加濃度、氮源及其添加濃度)與最適培養條件(培養液 pH 值、培養溫度、攪拌轉速及接種菌體濃度)及酵素之理化特性(分子量大小、最大反應速率、反應速率常數、最適作用 pH 值、最適作

用溫度及不同金屬離子及其濃度之影響)，和利用此酵素在不同乳糖濃度(5-50%)、pH值(4.8-8.8)、溫度(25-65°C)下，對於生產半乳寡糖之探討，除具學術意義外，本研究所得之方法與條件更可作為利用雙叉桿菌大量生產此酵素或半乳寡糖時之參考。

## 五、參考文獻

1. Albayrak NA, Yang ST. 2002. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol Bioeng* 77:8-19.
2. Berg RD. 1998. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? *Trends Microbiol* 6:89-92.
3. Bouhnik Y, Flourie B, D'Agay-Abensour L, Pochart P, Gramet G, Durand M, Rambaud JC. 1997. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* 127:444-448.
4. Bridson EY, Brecker A. 1970. Design and formulation of microbial culture media. In: Norris JR, Ribbons DW. (Eds). *Methods in microbiology*, vol. 3A. Cambridge University Press. London. pp. 229-295.
5. Buckland BC, Lilly MD, Dunnill P. 1976. The kinetics of cholesterol oxidase synthesis by *Nocardia rhodochrous*. *Biotech Bioeng* 18:601-621.
6. Confer DR, Logan BE. 1991. Increased bacterial uptake of macromolecular substrates with fluid shear. *Appl Environ Microbiol* 67:3093-3100.
7. Fiedurek J, Szczodrak J. 1994. Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Microbiol Polonica* 43:57-65.
8. Gekas V, López-Leiva M. 1985. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem* 20:2-12.
9. Greenberg NA, Mahoney RR. 1982. Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J Food Sci* 37:248-254.
10. Hung MN, Lee BH. 2002. Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:439-445.
11. Ito M, Deguchi Y, Miyamori A, Matsumoto K, Kimkuchi H, Matsumoto K, Kobayashi Y, Yajima T, Kan T. 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microbial Ecol Health Disease* 3:285-292.
12. Ito M, Matsumoto K, Kimura M, Onodera N, Yajima T. 1993. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. *J Nutr Sci Vitaminol* 39:635-640.
13. Itoh K, Toba T, Itoh T, Adachi S. 1992. Properties of  $\beta$ -galactosidase of *Lactobacillus kefirifaciens* K-1 isolated from kefir grains. *Letters Appl Microbiol* 15:232-234.
14. Kim JW, Rajagopal SN. 2000. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol* 45:29-34.
15. Kreit J, Germain P, Lefebvre G. 1992. Extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. cells. *J Biotechnol* 24:177-188.
16. Lee MT, Chen WC, Chou CC. 1997. Nutritional factors that affect the production of cholesterol oxidase by *Rhodococcus equi* no. 23. *Biotechnol Appl Biochem* 26:159-162.
17. Liu WH, Meng MH, Huang CF. 1987. Production of cholesterol oxidase by streptomycin-resistant and constitutive mutant of *Arthrobacter simplex*. *J Chin Agri Chem Society* 25:23-30.
18. Matsumoto K. 1990. Characterization and utilization of  $\beta$ -galactosidase from lactobacilli and bifidobacteria. *Jap J Dairy Food Sci* 39:A239-248.
19. Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biro S. 2001a. Carbon source regulation of

- $\beta$ -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J Basic Microbiol 41:351-362.
20. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biro S. 2001b.  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. Protein Expr Purif 21:24-29.
  21. Prenosil JE, Stuker E, Bourne JR. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. Biotechnol Bioeng 30:1019-1025.
  22. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. Int Dairy J 9:69-80.
  23. Shaikh SA, Khire JM, Khan MI. 1997. Production of  $\beta$ -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor* sp. J Ind Microbiol Biotechnol 19:239-245.
  24. Smart J, Richardson B. 1987. Molecular properties and sensitivity to cations of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* with four enzyme substrates. Appl Microbiol Biotechnol 26:177-185.
  25. Umasankar U, Annadurai G, Chellapandian M, Krishnan MRV. 1996. Xanthan production- effect of agitation. Biopro Eng 15:35-37.