

以果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之探討

吳芳禎¹ 盧碧蓮² 施英隆^{2*}

¹大葉大學食品暨應用生物科技學系

^{2*}大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*ils@mail.dyu.edu.tw

摘要

低聚乳果糖 (O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranoside; lactosucrose) 是一種功能性低聚糖, 已知具有一系列的生理功能, 體內外及動物實驗證實其具保健功效, 且安全無毒。此新型營養保健品對腸道保健及癌症預防有很大幫助。開發利用低聚乳果糖具極高之學術與工業價值, 在提高人們的健康水準具重要的意義。本研究探討以酵素催化合成系統探討低聚乳果糖之合成, 完成探討果聚糖蔗糖酶之製備、分離與純化, 並以游離型酵素與固定化酵素合成低聚乳果糖條件探討。果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase) 經沉澱、DEAE-Sepharose 及 Source 15Q 陰離子交換層析後可得到純化之酵素, 最後之純化倍數為 24.0, 回收率為 43.7%, 比活性達 300.1 U/mg。將純化的樣品進行 SDS-PAGE 電泳分析, 樣品之電泳分析呈現單一帶, 對照標準品分子量, 計算得分子量約為 32.5 kDa。以游離型酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖, 結果顯示低聚乳果糖之最佳生產條件為游離型酵素 (2.5U)、蔗糖/乳糖 (1:1) 濃度為 100 g/L、溫度 27°C、pH 6 的情況, 在 24h 可產出 35.8 g/L (生成率 35.8%; 1.49 g/L/h) 的低聚乳果糖。以固定化酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖, 結果顯示低聚乳果糖之最佳生產條件為固定化酵素 2 g (約含 150U)、蔗糖/乳糖 (1:1) 濃度為 100 g/L、溫度 27°C、pH 6 的情況下, 在 24h 可產出 36.9 g/L (生成率 36.9%; 1.54 g/L/h) 的低聚乳果糖。

關鍵詞: 果聚糖蔗糖酶, 低聚乳果糖, 游離型酵素, 固定化酵素

Lactosucrose Production using Levansucrase

FANG-CHEN WU¹, BI-LAN LU² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Food and Applied Biotechnology, Da-Yeh University

^{2*}Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R. O. C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Lactosucrose (O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranoside) has a series of physiological functions that are safe and nontoxic and have been proven to be health-promoting in vitro, in vivo, and in animal experiments. This new nutraceutical promotes intestinal health and aids cancer prevention. The development and use of this oligosaccharide has high academic and industrial value

and is of considerable significance in improving human health. This study involved the preparation, separation, and purification of levansucrase and its use in free and immobilized forms to synthesize lactosucrose. Precipitation, and DEAE-Sepharose and Source 15Q anion exchange chromatography were used to obtain the purified enzyme. The final purification ratio, recovery, and specific activity were 24.0, 43.7%, and 300.1 U/mg, respectively. The purified sample was subjected to SDS-PAGE analysis, and the estimated molecular weight of the enzyme was approximately 32.5 kDa. For the free enzyme, the optimal production conditions of lactosucrose were free enzyme = 2.5 U, sucrose:lactose (1:1) concentration = 100 g/L, temperature = 27°C, and pH = 6. With the free enzyme, 35.8 g/L of lactosucrose was produced in 24 h (production rate, 35.8%; 1.49 g/L/h). For the immobilized enzyme, the optimal production conditions of lactosucrose were immobilized enzyme = 2 g (approximately 150 U), sucrose:lactose (1:1) concentration = 100 g/L, temperature = 27°C, and pH = 6. With the immobilized enzyme, 36.9 g/L of lactosucrose was produced in 24 h (production rate, 36.9%; 1.54 g/L/h).

Key Words: Levansucrase, lactosucrose, free enzyme, immobilized enzyme

一、前言

低聚乳果糖 (O-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-fructofuranoside; lactosucrose) 是一種功能性低聚糖, 已知具有一系列的生理功能, 如低熱量、難消化、促進雙歧桿菌增殖、抑制致病菌產生、抗齲齒作用、調整腸道功能、降血脂、降膽固醇、促進礦物質吸收功能等。文獻上亦有一些體外 (in vitro) 與體內 (in vivo) 及動物實驗證實其保健功效之報導 [20, 23, 29, 31, 34-35]。毒理實驗證實了低聚乳果糖是安全無毒, 可作為健康食品的新甜味劑和健康食品原料與食品添加劑, 廣泛地應於乳製品、乳酸菌飲料、固體飲料、糖果、餅乾、果凍和冷飲等。另外, 低聚乳果糖是一種優於抗生素和益生素的新型飼料添加劑可用於寵物食品中。

自從Avigad發表利用果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase) 聚合蔗糖和乳糖而合成了低聚乳果糖以來 [1], 一些學者開始從事低聚乳果糖的生產研究。一般而言, 生產方法主要是以蔗糖和乳糖為原料, 並以能生產果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase; EC 2.4.1.10)、β-半乳糖苷酶 (β-galactosidase; EC 3.2.1.23) 或β-呋喃果糖苷酶 (β-fructofuranosidase; EC 3.2.1.26) 之菌株來進行發酵生產, 如生產β-半乳糖苷酶之節桿菌K1 (*Arthrobacter* sp. K1) [9, 21, 27]、生產果聚糖蔗糖酶之枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) [26]、多黏芽孢桿菌 (*Paenibacillus polymyxa*) [5]、及運動發酵單胞菌 (*Zymomonas mobilis*) [10]、生產β-呋喃果糖苷酶之環狀芽孢桿菌 (*Bacillus circulans*) [21]等。由於以全菌發酵生產低聚乳果糖, 產率有時不夠高, 又有副產物之污染, 及培養期間有抑制作用,

因此利用酵素催化合成系統來大量合成低聚乳果糖有其優點, 再加上影響合成之因數如pH、溫度、酵素量及基質濃度可容易調節, 因此漸受重視, 例如從節桿菌K1 (*Arthrobacter* sp. K1) 分離純化β-呋喃果糖苷酶 (β-fructofuranosidase) [9] 及以芽孢桿菌417 (*Bacillus* sp. no 417) 所產生之β-呋喃果糖苷酶 [14]來催化生產低聚乳果糖已有文獻之報導。以納豆桿菌 (*Bacillus subtilis natto*)、*Pseudomonas aurantiaca* (假單胞菌) [11, 30]、*P. polymyxa* (多黏芽孢桿菌)[5]及*Bacillus methylotrophicus* (甲基營養型芽孢桿菌) [32]所產生之果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase) 粗酵素來催化生產低聚乳果糖亦已有文獻報導。

功能食品已成為目前世界食品工業發展的新主流, 低聚乳果糖是一種功能性低聚糖, 具有一系列的生理功能。在台灣低聚乳果糖的研究很少, 工業生產更未見報導。隨著人們保健意識的日益增強和食品工業的發展, 各種新型功能性食品添加劑的市場越來越大, 低聚乳果糖需求也越來越大, 發展潛力極高。因此本研究探討以酵素合成法合成低聚乳果糖, 期能研究開發低聚乳果糖之較有效之製備方法, 除可滿足人們日常生活的需要, 在提高人們的健康水準具重要的意義。因此, 開發利用低聚乳果糖具極高之學術與工業價值。

二、研究方法及步驟

(一) 菌種

本研究所使用於生產低聚乳果糖之菌株為納豆菌 (*B. subtilis natto*), 此菌株係自日本高橋祐藏研所 (Takahashi

Yuzo research facility in Japan) 購得。

(二) 果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase) 之生產及製備

Levansucrase 之製備、分離純化將參考文獻 [2, 6, 7] 與我們實驗室之前開發之方法 [4] 並加以改良, 詳細實驗方法與步驟敘述如下:

1. 培養基與培養方法

將上述會生產 Levansucrase 之菌株先培養在 pH 7.4, 37°C 含有牛肉萃取液 (beef extract, 3g/L), 蛋白朊 (peptone, 5g/L) 及洋菜 (Agar, 15g/L) 之固態培養基 (Nutrient agar) 中。在不含洋菜之液態培養基 (Nutrient Broth: beef extract 3g/L, peptone, 5g/L, NaCl 5 g/L) 中, 並於 pH 7.4, 37°C 之培養箱中, 150rpm 振盪作前培養 48 小時。將上述 10% (v/v) 培養液接種於含有 150 mL NB 培養基之 250 mL 三角錐形瓶中進行第二次的活化, 即於 37 °C、150 rpm 的轉速培養 24 小時。再以 10% (v/v) 前培養液置於基礎培養基 (1L) -- 蔗糖 (sucrose, 60g/L)、硫酸銨 ((NH₄)₂SO₄, 20g/L)、硫酸鎂 (MgSO₄ 7 H₂O, 0.5g/L)、磷酸鹽 (Na₂HPO₄·12H₂O, 3g/L; NaH₂PO₄·2H₂O, 3 g/L) 中, 並於 pH 7.0, 37°C 之培養箱中, 以 150rpm 振盪培養, 分別培養 (0、12、24、36、48、60、72 h), 停止培養並以離心, 9000 rpm 離心去除菌體後, 保存於 4 °C, 此即粗酵素液, 可進行後續酵素活性分析。

2. 酵素活性分析

Levansucrase 之活性分析將依照文獻 [24] 之方法進行分析; Levansucrase 酵素所催化的水解與聚合反應是同時進行的。在合成時, 首先酵素的親核基團進攻蔗糖形成共價的果糖-酵素中間體, 而釋放葡萄糖, 果糖則被移轉至正在延長之果聚糖鍊上, 但果糖-酶中間體遇受體為水時發生水解反應而釋放果糖, 因此總裂解蔗糖量可以釋放葡萄糖量代表, 而果糖量則代表酵素水解活性, 因此酵素之轉果糖活性可以葡萄糖量減果糖量代表。0.5ml 酵素溶液 (酵素溶於 0.05M 磷酸緩衝液, pH6) 加入 0.5ml 蔗糖溶液 (20% 蔗糖溶於 0.05M 磷酸緩衝液, pH6), 在 37°C 共同培養 20 分鐘後稀釋, 所釋放之葡萄糖、果糖可以下述之 HPLC 方法分析。每單位之酵素活性 (蔗糖裂解活性、水解活性與轉果糖活性) 分別定義為每分鐘所釋放之 1.0 μmol 葡萄糖所須之酵素量 (蔗糖裂解活性), 每分鐘所釋放之 1.0 μmol 果糖所須之酵素量 (水解活性), 每分鐘所釋放之 1.0 μmol (葡萄糖減果糖) 所須之酵素量 (轉果糖活性)。

3. 酵素沉澱分離

上述離心後之上清液以不同分子量之截斷過濾膜過濾後, 進行透析, 於調節 pH 後以乙醇沉澱並置於低溫過夜後, 離心後之沉澱物溶入 0.05M, pH6 之磷酸緩衝液, 再以硫酸銨沉澱, 離心後之沉澱物再溶入少量 0.05M, pH6 之磷酸緩衝液並對同緩衝液以纖維素透析膜 (220 nm) 透析之。

4. 酵素純化

先依上述方法製備粗酵素, 粗酵素則將以 DEAE-Sephrose (16 mm×350 mm) 陰離子交換層析, 粗酵素液載入管柱後, 先以緩衝液 A (20 mM 磷酸鉀, pH 6.5) 洗滌平衡, 再以緩衝液 B (緩衝液 A+0.5 M NaCl) 以 0-100% 作線性梯度沖提, 分液收集洗脫液並以上述方法檢測酵素活性; 將 DEAE-Sephrose 陰離子交換層析得到的含有酵素活性的收集洗脫液透析、濃縮, 進行 Source 15Q (HR10/10, 8mL) 陰離子交換層析, 將粗酵素液填入管柱後, 先以緩衝液 C (0.025 M 磷酸鉀, pH 7.6) 緩衝液洗滌平衡, 再以緩衝液 D (緩衝液 C+0.5 M NaCl) 以 35-60% 作線性梯度沖提, 分液收集洗脫液並檢測酵素活性, 收集活性峰; 將 Source 15Q 陰離子交換層析得到的活性峰透析、濃縮。純化酵素則以 SDS-PAGE 確定其純度並以 Sephacryl-S300 之管柱估計其分子量。酵素或蛋白質定量分析係採 Bradford 之定量分析法 [3]。

(三) 游離型酵素合成低聚乳果糖之條件探討

以批次反應合成 Levan 果聚糖之條件探討時係在反應體積 50 ml 之 50 mM 磷酸緩衝液, pH6, 含自由酵素 (2.5U) 中加入 10% 含不同濃度乳糖與蔗糖 (100-400 g/L; 比例 1:1-3:1) 之生產培養基, 反應在 40°C 進行 5-70 小時, 反應期間採樣分析, 樣品加入同體積 20 mM NaOH 溶液去除酵素活性並離心 (10,000 x g, 10 min), 上層液以下述 HPLC 定量方法定量低聚乳果糖產量。依上述方法變化蔗糖溶液濃度 (100-400 g/L)、溫度 (0-50°C)、pH (3-8)、酵素劑量 (1-10 U) 以探討蔗糖溶液濃度、溫度、pH、酵素劑量之影響。

(四) 海藻酸鈉固定 Levansucrase 的製備

將上述菌發酵培養液, 離心收集上清液, 70% 飽和度硫酸銨鹽析, 沉澱後溶於 pH6.0 的 20 mM 的緩衝液中即是粗酵素液。將 4% 褐藻膠 (Sodium Alginate) 20 mL 溶液之 100 mL 燒杯中經過高溫滅菌及冷卻至室溫後, 與 20 mL 粗酵素液混勻後, 再以 10 mL 注射針筒吸取含酵素之褐藻膠溶液並慢慢滴入含 2% 氯化鈣 100 mL 溶液之 250 mL 燒杯中, 反應 2 小時, 製備成顆粒, 再以無菌水清洗菌體顆粒後, 然後

過濾洗滌，加入 0.2% 戊二醛溶液交聯，再洗滌，測定酵素活性。

1. 固定化酵素活性分析:

取 2g 濕的固定化的酵素和 10 mL 蔗糖溶液 (20% 蔗糖溶於 0.05M 磷酸緩衝液, pH6), 在 37°C 共同培養 20 分鐘後稀釋, 所釋放之葡萄糖、果糖可以 HPLC 方法分析。執行所有後續程序以與上述相同的方式。酵素活性以轉果糖活性表達, 即每分鐘所釋放之 1.0 μmol (葡萄糖減果糖) 所須之酵素量 (轉果糖活性)。一個單位酵素活性的定義為以 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 轉移果糖所需的酵素量。

2. 固定化酵素合成低聚果糖之條件探討:

取 2g 固定化酵素 (約含 150U) 在反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液, pH6, 含加入蔗糖、乳糖 (1:1) 之溶液, 反應在適當 pH 及適溫度下進行 6-48 小時。

(五) 糖類分析

本實驗採用高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分析法。先將試樣以 0.45 μm 過濾膜過濾後, 注入 HPLC 分析, HPLC 分析裝置使用之管柱為 SUGAR KS-802 column (L=300 mm, ID=8.0 mm, particle size=5 μm), 偵測器為 RI Detector (Bischoff 8020, Germany), 幫浦使用 HITACHI L-2130, 每次試樣的注射量 (Injection volume) 為 20 μl , 以去離子水做為沖提液 (mobile phase), 在流速 (Flow rate) 0.5 ml/min、溫度 (Temperature) 50°C 下分析果聚糖、蔗糖、葡萄糖、果糖的變化。實驗數據為二重複之平均值。

三、結果與討論

(一) 逐步添加硫酸銨產生沉澱物之酵素活性及蛋白質含量

將上述發酵後之含酵素粗液經由超濃縮過濾系統 (5 kDa 管柱) 之分離, 可得濃縮液 (含 5 kDa 以上之 Levan 和 Levansucrase) 及過濾液 (含 5 kDa 以下之蔗糖、葡萄糖、果糖和其他金屬離子)。將濃縮液逐步添加硫酸銨並攪拌, 當硫酸銨濃度達 10%, 該區分再經由 10,000 rpm 離心 30 分鐘, 將沉澱物與上清液分離, 以磷酸緩衝液 (pH 7.0) 溶解沉澱物, 即為初酵素液, 將初酵素液分析其蛋白質含量 [3] 及酵素活性 (levan 之形成活性) [24]。上清液則再逐步添加硫酸銨, 當硫酸銨濃度每增加 10% (至 20%、30%、40%、50%、60%、70% 及 80%) 時之該區分則重複如上述沉澱物

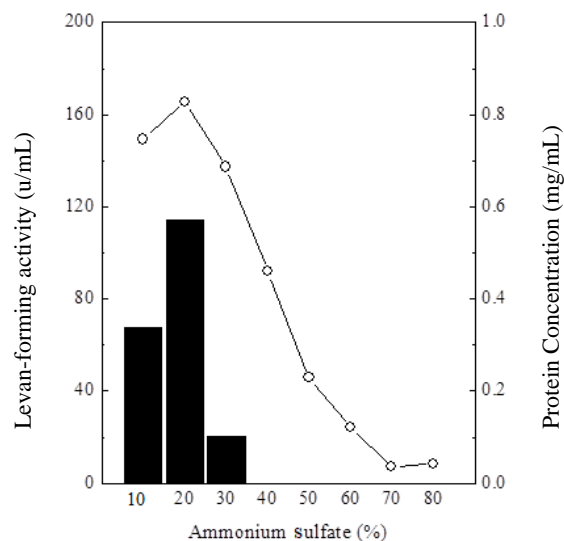


圖1. 逐步添加硫酸銨後每區分沉澱物之酵素活性及蛋白質含量

(■) Levan-forming activity; (-○-) Protein concentration

之蛋白質含量及酵素活性 (levan 之形成活性) 分析。由圖 1 顯示, 逐步添加硫酸銨濃度至 10%、20%、30%, 每區分所產生之沉澱物具有酵素活性, 其形成活性在添加硫酸銨濃度至 10%、20%、30% 時分別為 67.59、114.16 及 20.21 U/mL, 而添加硫酸銨濃度至 40% 以上時之區分所得之沉澱物已無活性存在。蛋白質定量分析 (圖 1) 顯示, 在逐步添加硫酸銨濃度至 20% 時之區分, 蛋白質含量最高, 其值為 0.82 mg/mL, 當逐步添加硫酸銨濃度至 70% 時之區分, 沉澱物之蛋白質含量值僅為 0.12 mg/mL, 因此最適添加硫酸銨濃度為 40%, 此時所有酵素活性已被沉澱出來。

(二) 酵素的純化

先依上述方法製備粗酵素, 粗酵素則以 DEAE-Sepharose (16 mm×350 mm) 陰離子交換層析, 粗酵素液載入管柱後, 先以緩衝液 A (20 mM 磷酸鉀, pH 6.5) 洗滌平衡, 再以緩衝液 B (緩衝液 A+0.5 M NaCl) 以 0-100% 作線性梯度沖提, 分液收集洗脫液並以上述方法檢測酵素活性; 將 DEAE-Sepharose 陰離子交換層析得到的含有酵素活性的收集洗脫液透析、濃縮, 進行 Source 15Q (HR10/10, 8mL) 陰離子交換層析, 將粗酶液填入管柱後, 先以緩衝液 C (0.025 M 磷酸鉀, pH 7.6) 緩衝液洗滌平衡, 再以緩衝液 D (緩衝液 C+0.5M NaCl) 以 35-60% 作線性梯度沖提, 分液收集洗脫液並檢測酵素活性, 收集活性峰; 將 Source 15Q 陰離子交換層析得到的活性峰透析、濃縮, 純化酵素則以 SDS-

PAGE 確定其純度並估計其分子量。各個純化步驟之活性與回收率之結果示於表 1，最後之純化倍數為 24.0，回收率為 43.7%，比活性達 300.1 U/mg。將純化的樣品進行 SDS-PAGE 電泳分析，由圖 2 可知經陰離子交換層析後樣品之電泳分析呈現單一帶，以標準蛋白之相對滯留時間對相應蛋白分子量對數 ($\log M_r - R_f$) 作圖，可得分子量分布標準曲線，對照 Marker 分子量，計算得分子量約為 32.5 kDa。已知 *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola 與 *Rahnella aquatilis* JMC-1683 的 Levansucrase 分子量分別約為 45.0 kDa [13] 及 120 kDa [25]。 *Bacillus* sp. TH4-2 之 Levansucrase 之分子量約為 56.0 kDa [2]，此與 *Z. mobilis* [28, 33]，*Acetobacter diazotrophicus* [12] 之 Levansucrase 的分子量相近，而 *Erwinia amylovora*，*Erwinia herbicola* 的 Levansucrase 之分子量約為 47.0 kDa [13]。

(三) 以游離型酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖之探討

1. 不同溫度之影響

以批次反應合成低聚乳果糖之條件探討時係在反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液，pH6，含自由酵素 (2.5U) 中加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L 溶液，反應在溫度 27°C-42°C，進行 6-48 小時。結果如表 2 所示，由表 2 可知隨溫度上升低聚乳果糖之產量呈現緩步下降趨勢，在相同溫度下，反應 24h 通常已可達高產量，再增加反應時間對提升產量已無幫助。因此低聚乳果糖形成的最佳溫度是 27°C，在溫度 27°C 時反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 10.6 g/L (生成率 10.6%)、35.6 g/L (生成率 35.6%) 及 36.5 g/L (生成率 36.5%)，因此選擇溫度 27°C 進行後續優

化實驗。雖然本實驗低聚乳果糖形成的最佳溫度是 27°C，其他菌之 levansucrases 合成低聚乳果糖之最佳溫度大多相對較高。例如來自枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*)，嗜熱脂肪土芽孢桿菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 和多粘芽孢桿菌 (*P. polymyxa*) 的 levansucrases 為 55°C，而對於來自假單胞菌 (*P. syringae*) 和水生拉恩菌 (*R. aquatilis*) 的 levansucrases 是 40°C [26]。另外來自運動發酵單胞菌 (*Z. mobilis*) 的 levansucrases 熱穩定性較差，故選擇 23°C 的溫度用於低聚乳果糖的合成溫度 [15-16]。

2. 不同 pH 之影響

承續上節最佳溫度之結果，本實驗之反應條件設計如上

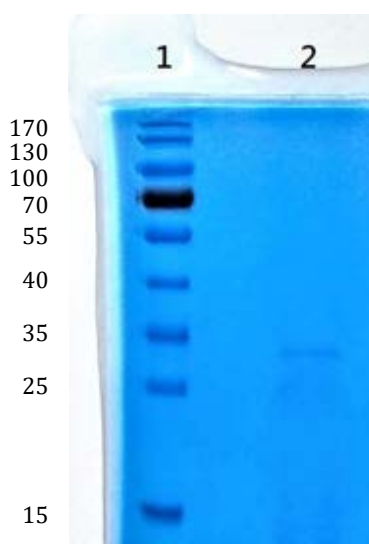


圖2. 純化果聚糖蔗糖酶之SDS-PAGE 電泳圖
電泳帶 (單位kDa) 1：分子量標準品電泳帶、
2：純化之果聚糖蔗糖酶

表1. Levansucrase的純化過程和回收率

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Supernatant	52.1	652.3	12.5	100.0	1.0
DEAE-Sepharose	52.1	400.5	148.3	61.4	11.9
Source 15Q	52.1	285.0	300.1	43.7	24.0

表2. 不同溫度對以游離型果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Temperature (°C)			
	27	32	37	42
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	10.6	10.5	5.7	6.1
24	35.6	35.5	28.4	27.5
48	36.5	29.6	16.1	10.1

反應條件：反應體積50ml 之50 mM磷酸緩衝液，含自由酵素 (2.5U) 中加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L 溶液，反應在 pH 6、溫度 27°C-42°C。

節所述，但溫度固定在 27°C，pH 之變化為 4-7。結果如表 3 所示。由表 3 可知 pH 升高，低聚乳果糖之產量隨之上升，在 pH 6 時達到最高，超過 pH 6 時產量呈現下降趨勢。在相同 pH 下，反應 24h 通常已可達高產量，再增加反應時間對提升產量已無顯著幫助。在 pH 6 時反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 10.5g/L (生成率 10.5%)、35.5 g/L (生成率 35.5%) 及 36.0g/L (生成率 36.0%)。pH 的差異導致低聚乳果糖產生有顯著差異，低聚乳果糖形成的最佳 pH 為 6。文獻亦記載以枯草芽孢桿菌 (*B. subtilis*)，嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*G. stearothermophilus*)，多粘芽孢桿菌 (*P. polymyxa*)，丁香假單胞菌 (*P. syringae*)，水生拉恩菌 (*R. aquatilis*)，*Sterigmatomyces elviae* 和微桿菌 (*Microbacterium laevaniformans*) 的 levansucrases 催化生產低聚乳果糖之最佳 pH 值亦為 6.0 [18, 19, 26]，與本研究相似。由於 levansucrases 在鹼性 pH 下高度不穩定 [16]，因此選擇 pH 6.0 進行後續之實驗。

3. 不同的糖濃度之影響

承續上述最佳溫度與 pH 之結果，本實驗之反應條件如

上節所述，但溫度固定在 27°C，pH 固定在 6，蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度變化為 50g/L、100g/L、150g/L、200g/L。結果如表 4 所示。由表 4 可知在相同蔗糖、乳糖濃度下，反應 24h 低聚乳果糖通常已可達高產量，再增加反應時間時，低聚乳果糖之產量提升已顯著趨緩。在反應 24h 後，當蔗糖、乳糖濃度分別為 50g/L、100g/L、150g/L 及 200g/L 時，低聚乳果糖之產量分別為 7.6 g/L、35.0 g/L、40.5 g/L 及 50.2 g/L，但若換算成生成率則分別為 15.2%、35.0%、27.0% 及 25.1%，由此可知蔗糖、乳糖 100g/L 為最佳生產低聚乳果糖之糖濃度。蔗糖、乳糖濃度為 150g/L 和 200g/L 時低聚乳果糖之生產濃度雖較蔗糖、乳糖濃度為 100g/L 時高，但生成率則較低。而蔗糖、乳糖濃度為 50g/L 時低聚乳果糖之生產速率較 100g/L 時慢，且在產量及生成率亦較低。

4. 酵素用量對低聚乳果糖產量的影響

本實驗之反應條件如上節所述，但溫度固定在 27°C，pH 固定在 6，蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L，僅變化游離型酵素之使用量 (0.5, 1.0, 2.5, 5.0U)。結果如表 5 所示。由表 5 可知隨著酵素 (酶) 用量由 0.5 增加至 2.5U 時，低

表 3. 不同 pH 對以游離型果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	pH			
	4	5	6	7
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	5.1	8.1	10.5	5.0
24	10.6	27.5	35.5	10.2
48	13.5	25.1	36.0	13.1

反應條件：反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液，含自由酵素 (2.5U) 中加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L、溫度 27°C、pH 4-7。

表 4. 不同糖濃度對以游離型果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Substrate concentrations (g/L)			
	50	100	150	200
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	5.1	10.6	10.5	15.0
24	7.6	35.0	40.5	50.2
48	11.5	36.6	50.6	40.1

反應條件：反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液，含自由酵素 (2.5U) 中加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 50-200 g/L、溫度 27°C、pH 6。

表 5. 不同酵素用量對以游離型果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Enzyme content (U)			
	0.5	1.0	2.5	5.0
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	2.1	5.6	10.8	10.0
24	2.6	12.7	35.6	22.2
48	7.5	24.6	36.3	15.1

反應條件：反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液，含自由酵素 (0.5, 1.0, 2.5, 5U) 中加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100 g/L、溫度 27°C、pH 6。

聚乳果糖之產量皆隨時間增加而上升，且酵素（酶）用量越高產量越高，然而，當酵素用量為 5.0U 時，則低聚乳果糖之產量呈現下降。由此可知酵素用量為 2.5U 時，為最佳生產低聚乳果糖之酵素用量。酵素用量為 2.5U 時，反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 10.8 g/L（生成率 10.8%）、35.8 g/L（生成率 35.8%）及 36.3g/L（生成率 36.3%）。該結果可能是由於 Levansucrase（果聚糖蔗糖酶）的乳糖及蔗糖水解活性所致。Levansucrase 將蔗糖的果糖基部分轉移到乳糖中，然後形成 lactosucrose（低聚乳果糖）[17]。然而，Levansucrase 不僅催化果糖轉移反應，而且還催化水解蔗糖與 lactosucrose，蔗糖水解為果糖和葡萄糖，lactosucrose 水解為果糖和乳糖 [9, 17]。因此，為求高 lactosucrose 之產量，應降低水解反應。

以游離型酵素（free enzyme）合成低聚乳果糖之探討，已有一些前例。Avigad (1957) 曾利用從氣桿菌 (*Aerobacter Levanicum*) 所產生之果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase) 粗酵素在 pH 5.4，乳糖 (lactose) 292 g/L 及蔗糖 (sucrose) 100 g/L，30°C 生產 lactosucrose，並以填入 Darco G-60 及 Celite 535 (1:1) 之管柱層析加以純化，但無轉化效率與產率之報導。Takahama [30] 報導以純化之納豆桿菌 (*B. natto*) 所產生之 Levansucrase 在 pH 6.2，等濃度 (85.5g/L) 之乳糖 (lactose) 及蔗糖 (sucrose)，35°C，反應 2 小時可生產 lactosucrose 53 g/L，轉化效率 26.5 g/L/h。Ikegaki 及 Park [14] 則報導以純化之芽孢桿菌 417 (*Bacillus* sp. no 417) 所產生之 β -fructofuranosidase 在 pH 5.6，等濃度 100 g/L (1:1) 之乳糖 (lactose) 及蔗糖 (sucrose)，45°C，反應 8 小時可生產 lactosucrose 54 g/L，轉化效率 6.8 g/L/h。Choi 等[5]則報導以 *P. polymyxa* (多黏芽孢桿菌) 所產生之 Levansucrase 粗酵素在 pH 6.0，等濃度 (1:1) 225 g/L 之乳糖 (lactose) 及蔗糖 (sucrose)，40°C，反應 40 分鐘可生產 lactosucrose 140g/L，轉化效率 210 g/L/h。Han 等[11]報導以 *P. aurantiaca* (假

單胞菌) 所產生之 Levansucrase 粗酵素在 pH 4.0，360 g/L 之乳糖 (lactose) 及 510 g/L 蔗糖 (sucrose)，45°C，反應 2 小時可生產 lactosucrose 285g/L，轉化效率 142.5 g/L/h。最近 Wu 等[32]報導以 *B. methylotrophicus* (甲基營養型芽孢桿菌) 所產生之 Levansucrase 粗酵素在 pH 6.5，200 g/L 之乳糖 (lactose) 及 200 g/L 蔗糖 (sucrose)，37°C，反應 20 小時可生產 lactosucrose 143g/L，轉化效率 7.2 g/L/h。

(四) 以固定化酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖之探討

1. pH 對固定化酵素合成低聚乳果糖的影響

取 2g 固定化酵素 (約含 150U) 在反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液, pH6, 含加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L 溶液，溫度 27°C，pH 4-7，進行 24 小，結果如表 6 所示。由表 6 可知 pH 升高，低聚乳果糖之產量隨之上升，在 pH 6 時達到最高，超過 pH 6 時產量呈現下降趨勢，但低聚乳果糖之產量在 pH6 及 pH7 時則無太大差異。相對的，在使用游離型酵素時，低聚乳果糖之產量在 pH6 及 pH7 時則有很大差異。在相同 pH 下，反應 24h 通常已可達高產量，再增加反應時間對提升產量已無顯著幫助。與使用游離型酵素之結果相比較，固定化酵素合成低聚乳果糖之生成開始時較緩慢，但反應至 24 小時則無大差異。pH 6 時反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 8.5g/L (生成率 8.5%)、35.5 g/L (生成率 35.5%) 及 34.0g/L (生成率 34.0%)，與使用游離型酵素時之結果相似，因此仍選擇 pH 6.0 進行後續之實驗。

2. 溫度對固定化酵素合成低聚糖的影響

根據上述 pH 條件探討之結果，本實驗之反應條件如上節所述，但 pH 固定在 6，而溫度變化為 27、32、37、及 42°C 結果如表 7 所示。由表 7 可知低聚乳果糖之生成開始時隨溫度上升而增加，此時可能因 Levansucrase 的轉果糖基活性占優勢，但反應至 24 小時則低聚乳果糖之生成隨溫度上升而

表 6. 不同 pH 對以固定化果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	pH			
	4	5	6	7
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	2.1	8.1	8.5	3.0
24	16.6	33.5	35.5	14.9
48	12.5	30.1	34.0	11.1

反應條件：2g 固定化酵素 (約含 150U) 在反應體積 50ml 之 50 mM 磷酸緩衝液，pH 4-7，含加入蔗糖、乳糖 (1:1) 濃度為 100g/L 溶液，溫度 27°C，進行 6-48 小時。

表 7. 不同溫度對以固定化果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Temperature (°C)			
	27	32	37	42
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	6.6	7.5	8.7	9.1
24	30.6	30.5	25.4	20.5
48	37.5	25.6	20.1	11.1

反應條件：2g固定化酵素（約含150U）在反應體積50ml 之50 mM磷酸緩衝液，pH6，含加入蔗糖、乳糖（1:1）濃度為100g/L溶液，溫度27, 32, 37, 42°C，進行6-48小時。

表 8. 不同糖濃度對以固定化果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Substrate concentrations (g/L)			
	50	100	150	200
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	5.1	6.6	6.5	6.7
24	13.6	30.5	30.7	30.2
48	16.5	37.6	36.6	37.1

反應條件：2g固定化酵素（約含150U）在反應體積50ml 之50 mM磷酸緩衝液，pH6，含加入蔗糖、乳糖（1:1）濃度為50-200g/L溶液，溫度27°C，進行6-48小時。

表 9. 不同酵素用量對以固定化果聚糖蔗糖酶催化生產低聚乳果糖之影響

Cultivation time (h)	Enzyme content			
	1g	2g	3g	4g
	Lactosucrose concentration (g/L)			
6	3.1	6.7	10.5	18.7
24	14.2	30.2	24.5	26.4
48	17.7	36.9	20.6	22.1

反應條件：1-4g固定化酵素（約含150 U/2g）在反應體積50ml 之50 mM磷酸緩衝液，pH6，含加入蔗糖、乳糖（1:1）濃度為100g/L溶液，溫度27，進行6-48小時。

下降，此時可能是由於 Levansucrase 的乳糖及蔗糖水解反應占優勢。在相同溫度下，反應 24h 通常已可達高產量，除了在 27°C 時，再增加反應時間對提升產量已無幫助。因此低聚乳果糖形成的最佳溫度是 27°C，在溫度 27°C 時反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 6.6 g/L（生成率 6.6%）、30.6 g/L（生成率 30.6%）及 37.5 g/L（生成率 37.5%），因此選擇溫度 27°C 進行後續優化實驗。

3. 不同的糖濃度對固定化酵素合成低聚糖的影響

根據上述溫度與 pH 條件探討之結果，因此本實驗之反應條件如上節所述，但 pH 固定在 6，溫度固定在 27°C，蔗糖、乳糖（1:1）濃度變化為 50-100g/L。結果如表 8 所示。由表 8 可知在相同蔗糖、乳糖濃度下，反應 24h 低聚乳果糖通常已可達高產量，再增加反應時間時，低聚乳果糖之產量提升已顯著趨緩，此現象與使用游離型酵素時之結果相似。在反應 24h 後，當蔗糖、乳糖濃度分別為 50g/L、100g/L、150g/L 及 200g/L 時，低聚乳果糖之產量分別為 13.6 g/L、30.5 g/L、30.7 g/L 及 30.2 g/L，但若換算成生成率則分別為 27.2 %、30.5%、20.4 % 及 15.1 %，由此可知蔗糖、乳糖 100g/L 為最佳生產低聚乳果糖之糖濃度。蔗糖、乳糖濃度為

150g/L 和 200g/L 時低聚乳果糖之生產濃度雖與蔗糖、乳糖濃度為 100g/L 時相當，但生成率則相對較低。因此提高糖濃度無助於生產低聚乳果糖，況且當糖濃度過高，粘度會變大，使質傳困難。而蔗糖、乳糖濃度為 50g/L 時低聚乳果糖之生產速率較 100g/L 時慢，且在產量及生成率亦較低。

4. 酵素用量對固定化酵素合成低聚糖的影響

本實驗之反應條件如上節所述，但 pH 固定在 6，溫度固定在 27°C，蔗糖、乳糖（1:1）濃度為 100g/L。變化固定化酵素之使用量為 1-4g，結果如表 9 所示。由表 9 可知隨著酵素（酶）用量由 1g 增加至 4g 時，反應在 6 小時內，低聚乳果糖之產量接隨酵素（酶）用量增加而增加，且酵素（酶）用量越高產量越高。但當酵素用量大於 2g 時，低聚乳果糖之產量隨時間增加而降低。該結果可能是由於 Levansucrase 的乳糖及蔗糖水解活性所致。當酵素用量低於 2g 時，低聚乳果糖之生成則較緩慢。由此可知酵素用量為 2g 時，為最佳生產低聚乳果糖之酵素用量，在此條件下，反應 6、24 及 48 小時，低聚乳果糖之產量分別為 6.7 g/L（生成率 6.7%）、30.2 g/L（生成率 30.2%）及 36.9 g/L（生成率 36.9%）。已知以酵素（Levansucrase）催化生產低聚乳果糖之合成是個複

雜的體系，Levansucrase 的轉果糖基反應與水解反應同時進行，產物單糖（葡萄糖和半乳糖）都會抑制水解，葡萄糖還會抑制低聚乳果糖之形成 [8]。據我們所知，以固定化酵素（酶）生產低聚乳果糖的研究不多，Mikuni 等人 [22] 使用固定化 β -呋喃果糖苷酶（來自糖加工公司獲得之 *Arthrobacter* sp 菌株），將固定在載體樹脂上（FE4611）之酵素（酶）在柱式反應器中進行中規模的連續生產。反應器成功運行 35 天，提供約 120g / L 的低聚乳果糖。這些結果表明低聚乳果糖工業規模生產的可能性。

四、結論

本研究完成製備、分離純化果聚糖蔗糖酶（Levansucrase），同時建立以果聚糖蔗糖酶（游離型酵素與固定化酵素）合成 Lactosucrose 之條件探討，同時對最適 pH、溫度、糖濃度及酵素量之影響進行了探究。低聚乳果糖是一種功能性低聚糖，具有一系列的生理功能。在台灣低聚乳果糖的研究很少，工業生產更未見報導，本研究已開發低聚乳果糖之有效之製備方法，結果顯示以游離型酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖，在生產條件為自由酵素（2.5U）、蔗糖/乳糖（1:1）濃度為 100 g/L、溫度 27°C、pH 6 的情況，在 24h 可產出 35.8g/L（生成率 35.8%；1.49 g/L/h）的低聚乳果糖。以固定化酵素-Levansucrase 催化生產低聚乳果糖，在生產條件為固定化酵素 2 g（約含 150U）、蔗糖/乳糖（1:1）濃度為 100 g/L、溫度 27°C、pH 6 的情況下，在 24h 可產出 36.9 g/L（生成率 36.9%；1.54 g/L/h）的低聚乳果糖。本研究結果對未來低聚乳果糖之生產、功能測試有很大幫助。低聚乳果糖應用領域大，市場前景好，此新型營養保健品對腸道保健及癌症預防有很大幫助，開發此產品在提高人們的健康水準具重要的意義。

參考文獻

1. Avigad, G. (1957) Enzymatic synthesis and characterization of a new trisaccharide, α -lactosyl- β -fructofuranoside. *The Journal of Biological Chemistry*, 229, 121-129.
2. Ben Ammar, Y., T. Matsubara, K. Ito, M. Iizuka, T. Limpaseni, P. Pongsawasdi and N. Minamiura (2002) Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 99(2), 111-119.
3. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
4. Chen, L. D. (2009) Production of levan using immobilized Techniques. Master thesis, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.
5. Choi, H. J., C. S. Kim, P. Kim, H. C. Jung and D. K. Oh (2004). Lactosucrose bioconversion from lactose and sucrose by whole cells of *Paenibacillus polymyxa* harboring levansucrase activity. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1876-1879.
6. Dahech I., K. S. Belghith, H. Belghith and H. Meidoub (2012) Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(3), 329-335.
7. Euzenat, O., A. Guibert and D. Combes (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*. 32(3), 237-243.
8. Flaschel, E., E. Raetz and A. Renken (1982) The kinetics of lactose hydrolysis for the β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 24(11), 2499-2518.
9. Fujita, K., K. Hara, H. Hashimoto and S. Kitahara (1990) Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(10), 2655-2661.
10. Han, W., S. Byun, M. Kim, E. Sohn, J. Lim, B. Um, C. Kim, S. Kang and K. Jang (2009) Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(10), 1153-1160.
11. Han, W., S. Byun, J. Lee, M. Kim, S. Kang, C. Kim, E. Son and K. Jang (2007) Synthesis of lactosucrose formed by levansucrase from *Pseudomonas aurantiaca*. *Journal of Biotechnology*, 131(2), S113.
12. Hernandez, L., J. Arrieta, C. Menendez, R. Vazquez, A. Coego, V. Suarez, G. Selmán, M. F. Petit-Glatron and R. Chambert (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical journal*, 309 (Pt 1), 113-118.

13. Hettwer, U., M. Gross and K. Rudolph (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*, 177(10), 2834-2839.
14. Ikegaki, M. and Y.K. Park (1997) Lactosucrose production by β -fructofuranosidase from *Bacillus* sp. No 417 using lactose and sucrose mixture. *Food Science and Technology*, 17(2), 188- 191.
15. Jang, K. H., J. W. Seo, K. B. Song, C. H. Kim and S. K. Rhee (1999) Extracellular secretion of levansucrase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*, 21(5), 453-458.
16. Jang, K. H., K. B. Song, C. H. Kim, B. H. Chung, S. A. Kang, U. H. Chun, R. W. Choue and S. K. Rhee (2001) Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 23(5), 339-344.
17. Kawase, M., A. Pilgrim, T. Araki and K. Hashimoto (2001) Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor. *Chemical Engineering Science*, 56(2), 453-458.
18. Kim, M. J., H. E. Park, H. K. Sung, T. H. Park and J. H. Cha (2005) Action mechanism of transfructosylation catalyzed by *Microbacterium laevaniformans* levansucrase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 99-104.
19. Lee, J. H., J. S. Lim, C. H. Park, S. W. Kang, H. Y. Shin, S. W. Park, and S. W. Kim (2007) Continuous production of lactosucrose by immobilized *Sterigmatomyces elviae* mutant. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 1533-1537.
20. Li, W., K. Wang, Y. Sun, H. Ye, B. Hu and X. Zeng (2015) Lactosucrose and its analogues derived from lactose and sucrose: Influence of structure on human intestinal microbiota *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 17, 73-84.
21. Li, W., X. Xiang, S. Tang, B. Hu, L. Tian, Y. Sun, H. Ye and X. Zeng (2009) Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by beta-D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3927-3933.
22. Mikuni, K., W. Qiong, K. Fujita, K. Hara, S. Yoshida and H. Hashimoto (2000) Continuous production of 4^G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) using immobilized β -fructofuranosidase. *Journal of Applied Glycoscience*, 47(3), 281- 285.
23. Mizote, A., Y. Taniguchi, Y. Takei, S. Koya-Miyata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Kurose, K. Oku, H. Chaen and S. S. S. Fukuda (2009) Lactosucrose inhibits body fat accumulation in rats by decreasing intestinal lipid absorption. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73(3), 582-587.
24. Nakapong, S., R. Pichyangkura, K. Ito, M. Iizuka and P. Pongsawasdi (2013) High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 30-36.
25. Ohtsuka, K., S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematu, and T. Uchida (1992) Characterization of levansucrase from *Rhanella aquatilis* JCM1683. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56(9), 1373-1377.
26. Park, N. H., H. J. Choi and D.K. Oh (2005) Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity. *Biotechnology Letters*, 27(7), 495-497.
27. Pilgrim, A., M. Kawase, M. Ohashi, K. Fujita, K. Murakami and K. Hashimoto (2001) Reaction kinetics and modeling of the enzyme-catalyzed production of lactosucrose using β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. K-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(4), 758-765.
28. Sangilyandi, G. and P. Gunasekaran (1998) A simple method for purification of thermostable levansucrase of *Zymomonas mobilis* from a recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 33(2), 153-156.
29. Silvério S. C., E. A. Macedo, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues (2015) Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. *Journal of Functional Foods*, 19, 74-90.
30. Takahama, A., J. Kuze, S. Okano, K. Akiyama, T. Nakane, H. Takahashi and T. Kobayashi (1991) Production of lactosucrose by *Bacillus natto* levansucrase and some properties of the enzyme. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38(9), 789-796.
31. Teramoto, F., K. Rokutan, Y. Sugano, K. Oku, E. Kishino, K. Fujita, K. Hara, K. Kishi, M. Fukunaga and T. Morita (2006) Longterm administration of 4^G- β -D-galactosylsucrose (lactosucrose) enhances intestinal calcium absorption in young women: A randomized, placebo-controlled 96-wk study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 337-346.
32. Wu, C., T. Zhang, W. Mu, M. Miao and B. Jiang (2015)

-
- Biosynthesis of lactosyl fructosidase by an intracellular levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydrate Research*, 401, 122-126.
33. Yanase, H., M. Iwata, R. Nakahigashi, K. Kita, N. Kato and K. Tonomura (1992) Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56(8), 1335-1337.
34. Zhou, X. L., Z. Ruan, X. L. Huang, Y. Zhou, S. Q. Liu, and Y. L. Yin (2014) The prebiotic lactosucrose modulates gut metabolites and microbiota in intestinal inflammatory rats. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 157-163.
35. Zhou, Y., Z. Ruan, X. Zhou, X. Huang, H. Li, L. Wang, C. Zhang, Z. Deng, G. Wu and Y. Yin (2015) Lactosucrose attenuates intestinal inflammation by promoting Th2 cytokine production and enhancing CD86 expression in colitic rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 79(4), 643-651.
- 收件：108.08.13 修正：108.10.23 接受：108.12.13