

以微生物生產果聚醣及其應用

黃美瑩、黃詩涵、方佩琪、林金榮

水產試驗所水產養殖組

簡介

果聚醣 (levan) 是一種果糖的聚合物 (fructan)，果糖聚合物主要有 2 種，除了果糖之間的鍵結主要為 $\beta(2-6)$ 的果聚醣外，另一為菊糖 (inulin)，主要為 $\beta(2-1)$ 鍵結，二者均可能有支鏈，而前者的水溶性高於後者。許多植物組織中有小分子量的果聚醣及菊糖 (分子量通常 < 5000) 存在，此外，已知有多種微生物可以產生果聚醣，尤其是 *Bacillus* sp. 被研究的最多，這類微生物以蔗糖為基質，利用本身分泌的 levansucrase (sucrose 6-fructosyltransferase, EC 2. 4. 1. 10) 合成果聚醣，levansucrase 的作用是逐一的將來自蔗糖的單一果糖基，加到正在增長的果聚醣鏈上之非還原端果糖上面，而自蔗糖形成該聚合物的起始步驟之機制目前仍不清楚 (Han, 1990)。

以細菌生產果聚醣

雖然植物組織中有果聚醣存在，但其含量並不高，目前商業生產果聚醣的方法以細菌發酵蔗糖為主，因為其成本低且生產時間較短。以細菌生產果聚醣時，主要以蔗糖當基質進行發酵，依每種細菌不同其培養條件

有差異，發酵參數會影響果聚醣的產率及所生成果聚醣分子大小等，主要參數包括：溫度、蔗糖濃度、攪拌程度及 pH 等。視所使用之菌株不同，各菌株最適生長及生產果聚醣之溫度不一，例如 *Bacillus subtilis* 是以 30°C 左右培養及生產果聚醣為宜，而 *B. macerans* 則以 50°C 為最適生產果聚醣的溫度。一般而言，高蔗糖濃度會增加果聚醣產量，但會降低所產果聚醣之分子量，以 *B. polymyxa* 為例，培養在含有 15% 的蔗糖溶液中可產生最多果聚醣，於發酵的第 2 天蔗糖量下降，而果聚醣開始上升，在 10 天的發酵期間蔗糖逐漸減少，果聚醣累積至 $3.6\text{ g}/100\text{ mL}$ (第 10 天時)。而目前本所養殖組所分離出的 *B. licheniformis* FRI MY-55 在含有 40% 蔗糖的培養液中培養 24 小時 (40°C) 後就會產生 $13\text{ g}/100\text{ mL}$ 的高量果聚醣。攪拌程度也是 levansucrase 生物合成果聚醣很重要的因素，因此細菌培養時必須緩慢振盪，以 $150 - 200\text{ rpm}$ 為適當，不可太劇烈攪拌及打氣。以細菌發酵生產果聚醣時，因細菌代謝產物影響，很容易造成發酵液 pH 下降，而果聚醣生產過程中，pH 維持在 5.5 以上為宜，因 levansucrase 最適作用 pH 為 $5.5 - 7.0$ ，而且在低 pH 狀況下，果聚醣可能水解。此外，研究顯示，在蔗糖經過 levansucrase 作用形

成果聚醣的過程中，添加少量果聚醣可加速聚合反應，提升產率並增加大分子量果聚醣的產生。又，培養液中添加 2% 的酵母萃取物 (yeast extract) 會提高 levansucrase 的分泌量，所以也會增加果聚醣之產量 (Han, 1990)。

果聚醣之應用及保健功能

果聚醣在食物加工上可當乳化劑、成型劑、穩定劑、增稠劑及風味攜帶劑等，其低黏度而高水溶性之特性，也可取代阿拉伯膠使用在食物上。另外也可做為血漿填充劑 (分子量為 25 KDa-250 KDa 者)，因其打入血管後會自身體緩慢排出，因此無毒性。

此外，果聚醣也具有身體保健方面的功效，以下簡述之：

一、抗腫瘤之能力

Calazans et al. (1997) 將 4 株 *Zymomonas mobilis* 所產之果聚醣，每天分別注射 200 mg/kg (共 7 天) 於具有肉瘤細胞 (sarcoma 180) 與艾氏瘤 (Ehrlich carcinoma) 之瑞士白鼠 (Swiss albino mice)，觀察瑞士白鼠抵抗上述二種腫瘤之能力。結果顯示，4 株菌所產果聚醣均有抵抗肉瘤細胞及艾氏瘤之效果，其中 2 株 (ZAP 及 CP4) 所產果聚醣對於肉瘤細胞及艾氏瘤之抑制能力分別為 59% 與 63% 及 47% 與 74%。整體而言，注射果聚醣對艾氏瘤有較佳抑制力。而不同菌株所產果聚醣抑制腫瘤能力有差異，作者推測可能與果聚醣之分子量有關。Calazans et al. (2000) 進一步利用 4 株 *Z. mobilis* 菌株所產不同分子量大小 (3.53×10^5 - 1.07×10^6 Dalton) 之果聚醣，對具有肉瘤細胞的瑞士白鼠之腫瘤細

胞的抑制能力測試。先施打肉瘤細胞入老鼠體內 24 小時後，每天注射 200 mg/kg (體重) 果聚醣入老鼠體內，連續 7 天。結果顯示，以分子量為 4.569×10^5 之果聚醣組對抑制腫瘤之能力最佳 (72%)，其它依次為 7.202×10^5 (53%)、 7.695×10^5 (43%)、 1.0735×10^6 (43%)、 3.535×10^5 (27%)。作者認為果聚醣之分子量會大大影響老鼠的抗腫瘤能力。

Yoo et al. (2004) 以生產自 4 種不同細菌之果聚醣，*Gluconoacetobacter xylinus* (G, 分子量為 4.0×10^4)、*Microbacterium laevaniformans* (M, 分子量為 7.1×10^5)、*Rahnella aquatilis* (R, 分子量為 3.8×10^5) 及 *Z. mobilis* (Z, 分子量為 5.7×10^5) 進行體外抵抗 8 種不同腫瘤細胞株之測試，包括 Hep G2 (Hepatocellular carcinoma, human, KCLB 58065)、P388D1 (Lymphoid neoplasm, mouse, KCLB 10046)、SNU-1 (Stomach carcinoma, human, KCLB 00001)、HeLa (Cervix adenocarcinoma, human, KCLB 10002)、HCT116 (Colorectal carcinoma, human, KCLB 10247)、MCF-7 (Breast adenocarcinoma, human, KCLB 30022)、A549 (Lung carcinoma, human, ATCC 10801) 及 OVCAR3 (Ovarian carcinoma, human)。結果顯示，M-levan 及 R-levan 對 SNU-1 具有最強的抵抗力 (52.5—62.1% 及 52.2—58.6%)，而 M-levan 對 Hep G2 有較強的抑制能力 (49.9—61.3%)。體內試驗方面，餵食 0.02% 之果聚醣予具有肉瘤細胞之老鼠 7 天後，發現投餵 M、R 及 Z-levan 組均具有平均 60% 的抵抗肉瘤細胞生長之能力，而 G-levan 之效果則較差 (42%)。因不同菌株所產之果聚醣大小不同，所以作者推

測果聚糖之分子量影響抗腫瘤活性。

除了果聚糖之分子量大小左右其抗腫瘤活性外，有學者探討其支鏈之影響。Yoon et al. (2004) 以 inulinase 修飾 *M. laevaniformans* KCTC 9732 所產之果聚糖 (M-levan) 之支鏈，並評估產物之抗腫瘤活性，當 M-levan 支鏈自原來的 12.3% 減少為 11.6—4.0% 時，其抗 SNU-1 之活性呈直線下降，在支鏈為 9.3% 時，對抗 Hep G2 之能力亦急速下降。因此作者推測果聚糖之化學結構對於抗腫瘤活性扮演著很重要的角色。

有研究顯示，特殊聚糖類可誘發人類膀胱癌細胞 (human bladder tumor cells 5637) 凋亡程序 (apoptosis)，學者指出特殊聚糖可能會與癌細胞膜結合，導致 caspase-3 活化及 DNA 斷裂所致。Caspase-3 蛋白酶是一種細胞凋亡蛋白，它會裂解許多與細胞黏附、DNA 修補及結構相關的蛋白，因此造成細胞的不穩定而使細胞走向死亡 (Hasegawa et al., 2001)。此外，特殊聚糖類能誘發毒殺性 T 細胞之分化，而有更好的細胞毒殺效果，因而具抗癌特性 (Tokoro et al., 1988)。

聚糖除了上述作用外，果聚糖經由益菌的消化產生一些短鏈脂肪酸，從 1982 年起，許多研究都發現其中的丁酸可以抑制腸癌細胞的增殖，刺激癌細胞分化及誘導腸癌細胞凋亡 (楊與林，2007)。

二、降低膽固醇

Yamamoto et al. (1999) 將微生物所產的果聚糖 (分子量為 2.0×10^6) 分別以 1% 及 5% 添加於飼料中，餵食老鼠 4 週後，發現其體重、內臟器官、腸道型態、血清中之三酸甘油酯及葡萄糖量均無明顯改變，而膽固醇

含量則明顯下降。餵食 1% 及 5% 之果聚糖組其膽固醇分別下降 83% 及 59%，且伴隨著糞便中排出的固醇類及脂肪明顯上升。以人工消化液模擬體外消化道水解果聚糖之試驗顯示，高分子量的果聚糖 (分子量為 2.0×10^6) 無法被唾液的澱粉酶 (amylase) 分解，而可以被人工胃液水解，變成低分子量果聚糖 (大約為 4.0×10^3) 及少量果糖，但無寡糖產生；而低分子量 (約 6.0×10^3) 者並不會被胰液及小腸分泌的酵素水解，因此作者推測，於體內自大分子量衍生出來的小分子量果聚糖並不會再被消化，而是直接到達大腸，而低分子量果聚糖 (約 6.0×10^3) 則不會被 bifidobacteria 發酵，因此作者認為果聚糖降低膽固醇的原因可能是類似膳食纖維，係結合或抓著膽固醇，防止腸道吸收固醇類，而不是果聚糖發酵產物的作用；但，以往認為分子量為 6.0×10^3 之果聚糖並不會被 bifidobacteria 發酵之觀點可能不完全正確。

Kang et al. (2004) 餵食含 0.1、5 及 10% 之高分子量果聚糖 (分子量為 6×10^6) 搭配高脂飼料給 4 週大的 Sprague-Dawley 大鼠吃 4 週。結果顯示，飼料中添加果聚糖不會造成高脂質飼料導致的體重增加、白色脂肪 (如：附睪、內臟及腹膜之脂質) 增加、脂肪細胞肥大及高血脂等現象，且這些減緩現象與果聚糖添加之劑量呈正相關。又，血清中三酸甘油酯及游離脂肪酸也由於飼料中添加果聚糖而明顯的下降，血清中總膽固醇減少，HDL 膽固醇則增加。

No et al. (2007) 探討飼料中添加果聚糖對於大鼠血脂及鈣質吸收率之影響。分別餵食含有低鈣 (0.1%) 飼料中添加 2.5% 及 5%

果聚糖予大鼠 8 週後，測定血脂、觀察鈣吸收程度。結果顯示，餵食含 5%果聚糖組的大鼠之體重低於控制組，而且血漿中三酸甘油酯及 LDL-膽固醇含量亦較控制組為低，而該組大鼠對鈣的吸收則較控制組高；所以作者認為飼料中添加 5%果聚糖有助於攝食低鈣飼料的大鼠吸收鈣質，並提升其脂質組成。

雖然大部分的膳食纖維會因為纖維與礦物質的結合和遮蔽效應，使得礦物質在腸道的吸收降低。但是，果聚糖卻恰恰相反，這主要是果聚糖的發酵產物-短鏈脂肪酸的效用。學者們推論果聚糖在進入大腸後發酵成短鏈脂肪酸，這些短鏈脂肪酸可以降低腸道的酸鹼度，增加可溶鈣的濃度，刺激腸道黏膜細胞的增長，使得鈣的吸收速率增加。同時，短鏈脂肪酸也可以使食物中的不溶鈣轉變成爲稍微可溶性的鹽類，因而增加鈣的溶解度。當鈣的溶解度變好、濃度增加時，腸壁對鈣的通透吸收能力也會相對提升，也就是果聚糖的發酵產物可以使腸道變成有利於鈣質吸收的環境（楊與林，2007）。

Kang et al. (2006) 以含有 0、1%、5%及 10% 果聚糖之飼料分別餵飼 4 週大的 Sprague-Dawley 大鼠共 4 週，該批大鼠已吃了 6 週高脂飼料（40%的能量來自脂肪）。結果顯示，血清中胰島素會隨著果聚糖的添加而下降，且與添加的比例成正相關。肝脂肪酸合成酵素 (hepatic fatty acid synthase) 及乙醯輔酶 A 羧基酶 (acetyl CoA carboxylase) 的 mRNA 表現也受到果聚糖之調節而下降，前述 2 種酵素為脂肪酸合成之重要酵素。作者認為膳食果聚糖在體內之降脂作用包括抗肥胖及降低脂肪，可能是抑制脂肪形成並刺激

脂肪水解，且伴隨著調節肝臟脂肪形成的酵素。

人體試驗方面，Kang et al. (2003, 2005) 以 29 位韓國婦女研究攝食果聚糖對體脂及血清中脂質組成之影響，其中 16 位每天攝食 12 g 的果聚糖共 12 週，13 位為控制組。結果顯示，試驗組的體重及體脂肪明顯下降，體脂肪自 37.8 下降到 35.0 (第 4 週) 及 34.2 (第 12 週)。在第 4 週時，腰臀比自 0.88 下降為 0.82，而血清中三酸甘油酯自 121 mg/dL 下降為 103 mg/dL，LDL-膽固醇亦下降。作者認為飲食中添加果聚糖可有效控制體重、體脂肪、LDL-膽固醇及三酸甘油酯。

在人體與動物的試驗中，發現果聚糖能降低血中的三酸甘油酯與膽固醇濃度，學者推測其可能的機制包括四種，其中第一種為類似膳食纖維之效果，其他三種主要為果聚糖是益生物質，可促進乳酸菌生長，而乳酸菌本身及其代謝果聚糖之產物具有降低膽固醇的特性，茲說明如下：第一種為果聚糖調節血脂的機制與膳食纖維類似，可以和膽酸及膽鹽結合，把它們排出體外，防止它們的再吸收。因此，人體內就會促進膽固醇在肝臟進行氧化作用，產生更多的膽酸，因而降低血膽固醇的濃度。第二是可以經由細菌發酵後的變身-短鏈脂肪酸來發揮效用。研究指出在這些短鏈脂肪酸中，丙酸最具抑制肝臟膽固醇及三酸甘油酯生成的效果（楊與林，2007）。第三個機制是乳酸菌本身具有的膽鹽水解酵素活性，使膽固醇在代謝過程中產生去結合型態的膽鹽，使膽固醇與去結合型的膽鹽產生共同沉澱效果，更多的膽固醇量被沉澱下來，達到降低膽固醇的效果。第四種

為乳酸菌細胞膜可鍵結膽固醇，甚至可以將吸附的膽固醇進行同化作用，代謝成細胞所需物質，直接降低膽固醇含量 (陳等, 2007)。

三、具益菌質 (prebiotic) 之功效

研究顯示，果聚糖具有當作益菌質的特性，所謂益菌質是人體無法消化的食物成分，它們在大腸中選擇性的刺激益菌生長，當這類益菌生長同時，所產代謝物會抑制害菌，可以調整腸道菌叢生態，進而增進宿主的健康。添加人類糞便於培養液的體外試驗研究發現，加入 *Lactobacillus sanfranciscensis* 所產的果聚糖 (分子量 $> 2 \times 10^6$)，可以增加糞便中 2 個對數值的 *Bifidobacterium* spp. 菌數，而添加 *Erwinia herbicola* 所產的果聚糖也會增加 1 個對數值的 *Bifidobacterium* spp. 數量 (Bello et al., 2001; Korakli et al., 2002)。在發酵乳中添加 2% 的果聚糖 (分子量為 2×10^6) 促使發酵乳中的乳酸菌益菌 (*B. lactic*、*L. acidophilus* 及 *Streptococcus thermophilus*) 之菌體重量較控制組增加了 20 – 34%，而且在培養液中也有檢測到 β -fructanhydrolase，推測該酵素有助於益菌代謝果聚糖 (Semjonovs and Zikmanis, 2007)。

益生菌能夠藉由活化巨噬細胞，而強化動物體內非特異性之先天免疫力。它也具有激活淋巴細胞的能力，使得 IgA 的濃度增加，並產生 γ -干擾素，以刺激免疫系統 (陳等, 2007)。而近年來，益生菌中的乳酸菌使用在水產養殖的研究也顯示，乳酸菌可提升比目魚仔魚的活存率 (Gatesoupe, 1991)、增進比目魚及虹鱒的免疫能力 (Lara-Flores et al., 2003; Villamil et al., 2003)、抑制魚類腸道中的病原菌：*Aeromonas hydrophila*、*A.*

salmonicida 及 *Vibrio anguillarum* 等 (Bergh, 1995; Santos et al., 1996)。Rairakhwada 等 (2007) 研究，果聚糖對於鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 稚魚免疫調節的效果，試驗分五組，分別為飼料中添加 0.1%、0.2%、0.5% 與 1.0% 等不同含量的果聚糖及對照組 (未添加)，進行 75 天的餵養試驗。結果顯示，添加果聚糖可提升鯉魚血液中之總紅血球及血紅素含量、增加血清蛋白質及球蛋白含量、提高呼吸爆裂活性及增強溶菌素活性等免疫指數，進而提升對 *A. hydrophila* 病原菌之抵抗能力，其中又以添加 0.5% 果聚糖組的效果最好，因此作者建議於飼料中添加 0.5% 的果聚糖作為鯉魚稚魚免疫刺激劑。因為果聚糖可促進乳酸菌等在動物腸道繁殖，進而抑制有害細菌，因此，推測果聚糖也可用在調整魚類腸道之菌相、增加菌叢生態平衡、降低不良細菌數量並增強免疫能力等，進而提升魚類養殖成效。

結語

果聚糖是由葡萄糖分子與多個果糖分子結合而成，目前商業生產大都以具有 levansucrase 的微生物自蔗糖合成果聚糖。這是一種低熱量的天然水溶性纖維，由於其水溶性佳及低黏度等特性，可以廣泛應用於各種食品，且具有抗腫瘤、降低膽固醇及當作益菌質等保健功能，頗具開發為保健食品的潛力，在水產養殖上可當作免疫刺激劑；有關果聚糖是否可用來調整魚類腸道之菌相及增加菌叢生態平衡，進而提升魚類養殖成效，是另一項值得我們探討的議題。