

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

研究題目：具功能性乳酸菌飲品之之開發

計畫編號：130100-CN10506

執行期限：105 年 01 月 01 日至 105 年 12 月 31 日

主持人：食品科技系 邱致廣

中華民國 105 年 11 月 14 日

## 一、摘要

乳酸菌因其益生菌 (probiotics) 特性，且應用廣泛，早已是食品界的研究主題，加上保健食品在國內日益受到重視，因而更加引發大眾對乳酸菌的興趣。長期服用抗生素用來對抗病原菌，對於患者還是會造成生理上的副作用，且近年來發現許多菌株皆具有抗藥性。本系微生物團隊多年收集很多乳酸菌種，同時也從事乳酸菌研究及功能開發，瞭解乳酸菌對人類健康的功能。因此，擬將一些對人體有益之乳酸菌研究其改善腸胃道及對造成胃癌之一的幽門桿菌之抑制作用，製成乳酸菌抑菌產品。

## 二、緒言

乳酸菌 (LAB) 廣泛存在於大自然中，在發酵食品中扮演重要的角色，可做為製程中產酸及風味的來源，以及防腐與保存食品之用。乳酸菌在發酵過程中會分泌乳酸、醋酸、過氧化氫、雙乙酰 (diacetyl)、洛德因 (reuterin) 及細菌素 (bacteriocins) 等產物，可以抑制一些污染菌或是病原菌的生長。其中又以雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*) 及乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 等的益生菌最受重視。

腸道是食物消化最主要的器官，同時也主宰了營養、廢物毒物的吸收、分解與排泄，身體健康的人其腸道功能必然是健全的。益生菌



在腸道中扮演著重要的角色，腸道內菌種的種類相當多，有益生菌、有害菌及中間菌，三者 在腸道內互相競爭養分及空間。若是腸道內的益生菌數量足夠且菌態活躍，自然就能抑制腸道內壞菌的數量與繁殖速度。隨著年齡的增長，腸道中的有益菌會減少，而有害菌則可能會不斷地增加，隨之而來的就是老化、功能不健全的腸道。因此，現代人養生保健之道，無非是時時保持腸內有益菌的數量，控制有害菌在體內的活動範疇。

本系微生物團隊多年收集很多乳酸菌種，同時也從事乳酸菌研究及功能開發，瞭解乳酸菌對人類健康的功能。因此，擬將一些對人體有益之乳酸菌經由篩選技術，製成具有功能性之保健食品。

### 三、材料與方法

#### (一)實驗材料:

##### 1. 發酵培養基建立

###### (1) 菌種活化培養

將存放於 $-20^{\circ}\text{C}$  乳酸菌取出以1%接種於MRS (de Man, Rogosa, Sharpe medium, Himedia) Broth中，以 $37^{\circ}\text{C}$ 培養20小時活化後，再次活化於新鮮備製的MRS Broth ( $37^{\circ}\text{C}$ , 20小時)即可使用。

###### (2) 碳源培養基測試



碳源試驗:包括葡萄糖、紅糖及砂糖。

將活化後之乳酸菌液以 1%比例接種於欲測試之培養基，以37°C 培養20小時，以9mL 無菌水進行10倍序列稀釋，稀釋至 $10^8$ 後各取1mL 傾注於MRS agar 培養基，37°C培養48小時後計數，計算生長於MRS agar之菌落數並以25至250間之菌落數進行計數。

### (3)氮源培養基測試

氮源:包括豆類蛋白質、芝麻粕蛋白質、黃豆蛋白質。

先以MRS Broth將活化後之菌液取出 1%接種於欲測試之氮源培養基，進行37°C培養24小時，以9 mL 無菌水進行10倍序列稀釋，稀釋至 $10^8$ 後各取1mL進行傾注37°C培養。

## 2. 小量測試

菌體最適賦型劑試驗，菌株在進行冷凍乾燥前所添加之賦型劑進行試驗。找出冷凍乾燥後菌數最多之配方。

(1) 所得沈澱菌體以新鮮培養基進行以8000rpm/20min 離心濃縮，去除上清液，秤取沉澱物濕重後，並與賦型劑水溶液以1(沉澱物):1(保護劑)震盪器震盪使菌體和培養基混合均勻。

(2) 置於-80°C 冷凍20 hr。冷凍後之樣品上機進行冷凍乾燥，乾燥完畢後測定乾物重及菌數含量。

## 3. 100升擴大生產



醱酵模式採用批式醱酵 (batch culture)，將種菌接種於修飾培養基，進行100升培養條件探討及生產。

#### 四、結果與討論

##### 1. 碳源培養基測試

碳源試驗:包括葡萄糖、紅糖及砂糖。

將活化後之乳酸菌液以 1%比例接種於欲測試之培養基，以37°C培養20小時，結果顯示三種糖皆可達到9 logCFU/mL，其中葡萄糖的菌數為9.74 log CFU/mL，紅糖菌數為9.43 log CFU/mL，砂糖菌數為9.57 log CFU/mL。顯示葡萄糖具有較好的菌數。

##### (3)氮源培養基測試

氮源:包括豆奶粉、脫脂奶粉及乳清蛋白進行氮源測試。

先以MRS Broth將活化後之菌液取出 1%接種於欲測試之氮源培養基，進行37°C培養20小時，結果顯示三種氮源皆可達到9 logCFU/mL，其中豆奶粉的菌數為9.74 log CFU/mL，脫脂奶粉菌數為9.43 log CFU/mL，乳清蛋白菌數為9.57 log CFU/mL。顯示葡萄糖具有較好的菌數。

##### 2. 小量測試

菌體最適賦型劑試驗，菌株在進行冷凍乾燥前所添加之賦型劑進行



試驗。找出冷凍乾燥後菌數最多之配方。由表 1 的結果可以看出，所選單一賦形劑包括乳糖、果寡糖、海藻糖、甘露糖醇、山梨醇及脫脂乳粉等，對乳酸菌均有一定的保護效果。由於單一的賦形劑在測試結果並無法達到預期每克菌數  $10^{11}$  CFU/g，故採用複合配方。進一步對乳酸菌株 B0007 進行複合賦形劑配方篩選（表 2）。結果發現配方一（15%脫脂乳粉+15%海藻糖+15%乳糖）及配方二（20%脫脂乳粉+20%果寡糖）其菌落數分別可達到  $2.65(\pm 0.2)\times 10^{11}$  及  $4.2(\pm 0.17)\times 10^{11}$  保護效果較佳。

### 3. 100升擴大生產

擴大 100 公升培養並進行凍乾，採用上述賦形劑進行試驗發現同樣條件下進行 B0007 及 B0091 凍乾並無法達到相同菌落數，B0007 在配方一及配方二條件下進行序列稀釋，其菌落數分別為  $6.45\times 10^{10}$  及  $8.2\times 10^{10}$  CFU/mL；B00912 凍乾後其菌落在配方一及配方二菌數分別為  $4.3\times 10^{10}$  及  $8.3\times 10^{10}$  CFU/mL（表 3）。此可能由於量多，凍乾機無法在時間內凍乾，導致菌數下降。發現配方 2 之菌數皆為  $8.2-8.3\times 10^{10}$  CFU/mL，非常接近  $10^{11}$  CFU/mL，將來量產時擬採用此配方進行量產。





表 1、單因子凍乾賦形劑保護 B0007 菌株篩選結果

Table 1. Single factor freeze protection agents screening results

| <b>excipient</b>     | <b>before drying<br/>(CFU/mL)</b> | <b>after freeze<br/>drying<br/>(CFU/g)</b> |
|----------------------|-----------------------------------|--|
| Unprotected          | $2.8 \times 10^9$                 | $< 10^{10}$                                |
| 20% Corn starch      | $2.8 \times 10^9$                 | $< 10^{10}$                                |
| 20% Dextrin          | $3 \times 10^9$                   | $< 10^{10}$                                |
| 20% Lactose          | $2.4 \times 10^9$                 | $2 \times 10^{10}$                         |
| 20% Oligosaccharides | $2.4 \times 10^9$                 | $2.45 \times 10^{10}$                      |
| 20% Trehalose        | $3 \times 10^9$                   | $2.1 \times 10^{10}$                       |
| 20% Skim milk        | $2.4 \times 10^9$                 | $2.6 \times 10^{10}$                       |



表 2、複合凍乾賦形劑保護 B0007 菌株篩選結果

Table 2. The results of freeze-dried preservative compound screening

| <b>excipient</b>     | <b>before drying<br/>(CFU/mL)</b> | <b>after drying<br/>(CFU/g)</b> | <b>Recovery(%)</b> |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| 15% Skim milk        |                                   |                                 |                    |
| 15% Trehalose        | $2 \times 10^9$                   | $6.45 \times 10^{10}$           | 1.4                |
| 10% Lactose          |                                   |                                 |                    |
| 15% Skim milk        |                                   |                                 |                    |
| 15% Trehalose        | $2 \times 10^9$                   | $2.3 \times 10^{11}$            | 1.51               |
| 15% Lactose          |                                   |                                 |                    |
| 15% Skim milk        |                                   |                                 |                    |
| 15% Trehalose        | $2 \times 10^9$                   | $4.3 \times 10^{10}$            | 1.47               |
| 20% Lactose          |                                   |                                 |                    |
| 20% Skim milk        |                                   |                                 |                    |
| 20% Oligosaccharides | $2.8 \times 10^9$                 | $4.6 \times 10^{11}$            | 1.45               |



表 10、複合凍乾賦形劑擴大培養測試結果 B0007、B0091

Table 10. Composite freeze-dried excipient expanding culture of lactic acid bacteria B0007.B0091

| <b>excipient</b>                 | <b>B0007</b>          | <b>B0091</b>         |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>Formula 1</b>                 |                       |                      |
| <b>before drying</b><br>(CFU/ml) | $4.25 \times 10^9$    | $2.5 \times 10^9$    |
| <b>Formula 1</b>                 |                       |                      |
| <b>after drying</b><br>(CFU/ml)  | $6.45 \times 10^{10}$ | $4.6 \times 10^{10}$ |
| <b>Formula 2</b>                 |                       |                      |
| <b>before drying</b><br>(CFU/g)  | $4.25 \times 10^9$    | $2.5 \times 10^9$    |
| <b>Formula 2</b>                 |                       |                      |
| <b>after drying</b><br>(CFU/g)   | $8.2 \times 10^{10}$  | $8.3 \times 10^{10}$ |

