

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

研究題目：乳酸菌抑菌功能之評估及發酵生產

計畫編號：CN9606

執行期限：96年01月01日至96年12月31日



主持人：食品科技系 陳佳慧

中華民國 97 年 2 月 18 日

一、摘要

本研究針對自行分離之乳酸菌 (Lactic acid bacteria) 探討抑制蛀牙菌的可能性。自行分離之 224 株乳酸菌株以 API 50 CHL 套組進行菌種鑑定，發現所分離之菌株皆為乳酸菌。研究結果初步發現 224 株乳酸菌株對造成齲齒的 *Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sobrinus* 菌株具有不同程度抑制效果。為了排除其他因素造成之抑制，本研究進行乳酸、H₂O₂ 的排除試驗，分別篩選出抑制 *S. mutans* 及 *S. sobrinus* 活性較高之菌株各 1 株。本研究以不同糖質進行乳酸菌株之培養與細菌素活性探討。此外，將糖質培養基中具良好抑菌活性之乳酸菌菌株進行 16S rDNA gene 序列分析。

二、前言

蛀牙菌乃是一種稱為鏈球乳酸菌 (*Streptococcus sobrius*、*Streptococcus mutans*) 的細菌。當我們吃一些糖類食物時，就會在口中形成一種不溶於水的葡聚糖 (Dextran)。此葡聚糖屬於多醣類，呈糊狀，將會促使鏈球菌附著於牙齒表面。當鏈球菌附著於牙齒表面時，將會降低牙齒的抵抗力，不僅如此，還會消化分解牙齒中的有機質，因而造成蛀牙。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 提供食品特殊風味之外，在發酵過程中會分泌乳酸、醋酸二氧化碳、過氧化氫、diacetyl 及細菌素 (bacteriocins) 等，可抑制腐敗菌及許多病原菌之生長。本研究擬對分離之 224 株乳酸菌對造成齲齒的 *Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sobrinus* 菌株之抑制效果進行探討，並進行細菌素之分離。

三、實驗方法

(一) 干擾因素之排除

1. 抑菌試驗及有機酸排除試驗
2. H₂O₂ 排除試驗
3. pepsin 之影響試驗

(二) 菌種鑑定

本研究利用 16S rDNA gene' s primers，進行 16S rDNA 序列分析。

(三) 粗細菌素之純化

以菌體吸附釋放法進行粗細菌素之純化。

(四) 測定不同糖質培養基組成發酵乳酸菌液之抑菌效果

(五) 蛋白質電泳分析

四、結果與討論

1. 抑菌試驗及有機酸排除試驗

將 224 株乳酸菌菌液以 NaOH 調整 pH 至 2.0，此部分可篩選出不同抑菌活性大小，選取抑菌圈大於 1.25cm 之菌株。結果顯示，菌株編號 B0053、B0074、B0091 對 *Streptococcus sobrinus* 之抑菌圈皆大於 1.25cm 之菌株，具有較佳的抑菌效果；B0104、B0105、Lact45 對 *Streptococcus mutans* 抑菌圈皆大於 1.25cm，顯示具有較佳抑菌效果。

2. 過氧化氫排除結果

將上述菌株進行排除過氧化氫試驗，選取抑菌圈大於 1.20cm 之菌株。結果顯示，編號 B0074 對 *Streptococcus sobrinus* 有較佳抑菌活性，對 *Streptococcus mutans* 抑制作用，編號 B0105 具有較佳的抑菌活性。

3. pepsin 作用之結果

將上述菌株 B0074 及 B0105 進行 pepsin 影響試驗，選取抑菌圈大於 1.00cm 之菌株。結果顯示，編號 B0074 對 *Streptococcus sobrinus* 有較佳抑菌活性，其抑菌圈大於 1.00cm；對 *Streptococcus mutans* 抑制作用，編號 B0105 具有較佳的抑菌活性，其抑菌圈大於 1.00cm。

4. 菌種鑑定結果

將編號 B0074、B0105 菌株以 primer 27F、1492R 進行 16S rDNA 序列分析。經 16S rDNA 序列分析，結果顯示(Table 5)，B0074 與 *Pediococcus pentosaceus* 與 16S rDNA 具有 99%核酸相似性，而 B0105 與 *Lactobacillus plantarum* 具有 100 %核酸相似性。

5. 不同濃度糖質培養基組成發酵乳酸菌液之抑菌結果

將編號 B0074 與 B0105 菌株以不同濃度的糖蜜做為培養基，結果顯示(Table1)，B0074 與 B0105 在 2%糖蜜培養基均具有較佳抑菌活性。

6. 蛋白質電泳分析結果

B0074 菌株以 MRS broth 或 2%糖蜜 +0.4%yeast extract 作為培養基進行培養，並以吸附法進行純化細菌素，經由 SDS-PAGE 電泳分析後，結果顯示以 MRS broth 或 2%糖蜜 +0.4%yeast extract 作為培養基縮生長之細菌素經純化後，分子量同樣為 1300kD 左右 (Fig. 2)；B0105 菌株亦具有相同的結果 (Fig. 3)。

7. 蛋白質電泳膠片抑菌試驗

B0074 菌株以 2%糖蜜+0.4%yeast extract 培養，經由 SDS-PAGE 純化之細菌素對 *Streptococcus sobrinus* 具有抑制作用(Fig. 4)；B0105 菌株以 2%糖蜜+0.4%yeast extract 培養，經由 SDS-PAGE 純化之細菌素對 *Streptococcus*

mutans 具有抑制作用 (Fig. 5)。

Table 1 Different concentration of molasses showing the zone of growth inhibition of *Streptococcus* spp. by isolated B0074 and B0105 strains

Strains	Media ^a	Inhibition zone (cm)
B0074	2% molasses	1.4
B0074	10% molasses	1.3
B0105	2% molasses	1.35
B0105	10% molasses	1.3

a: Medium containing 0.4% yeast extract

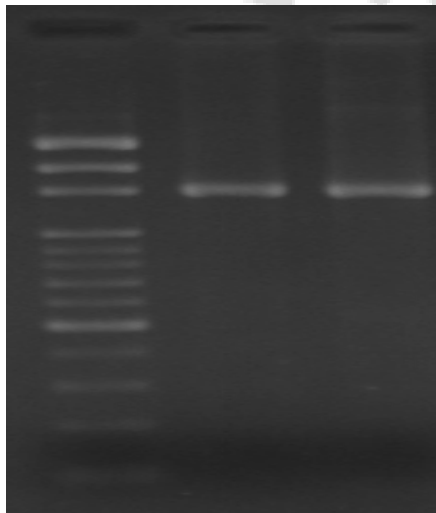


Fig.1 Size of the 16S rDNA sequences from isolated B0074 and B0105 strains
Lane a: 100bp DNA ladder MW
Lane b: B0074 ; Lane C: B0105 。

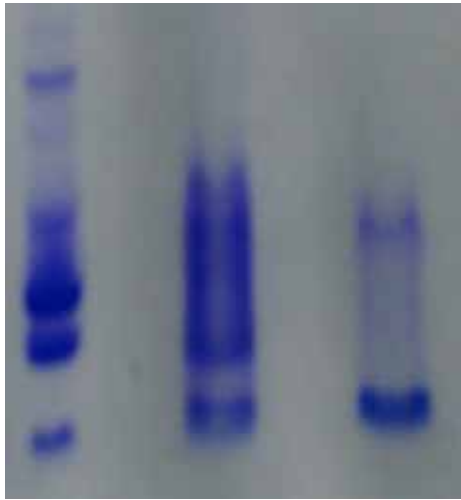


Fig.2 A profile of SDS-PAGE of isolated B0074 strains in different media Lane a: Ultra-low Range Molecular Weight Marker ; Lane b : B0074 (MRS broth); Lane C : B0074(50% molasses)。

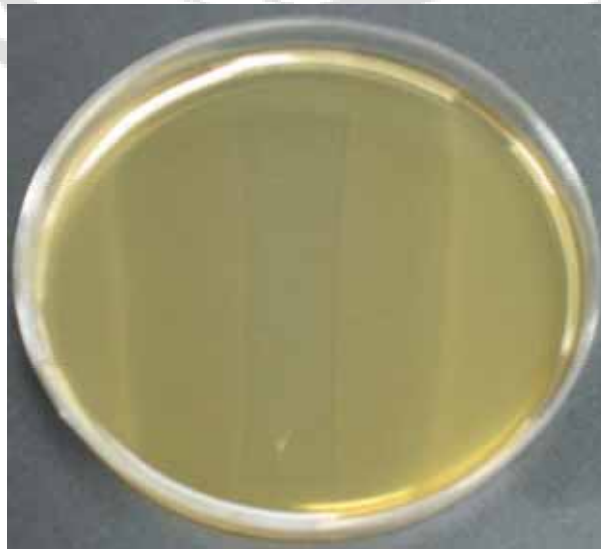


Fig.4 SDS –PAGE gel half, showing the zone of growth inhibition of *Streptococcus sobrinus* by isolated B0074 strains