

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開發

計畫編號：130100-CN10504

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 王淑珍

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。早期醫學對於感染 *H. pylori* 的病患大多施以抗生素治療，雖然治癒率高，但是長期服用抗生素對於患者還是會造成生理上的副作用，且近年來發現有部分 *H. pylori* 菌株具有抗藥性。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對造成胃癌之一的幽門桿菌之抑制作用，並探討培養條件及培養基配方，製成產品。

二、緒言

胃癌是台灣及全世界常見且死亡率高的疾病，除了飲食因子外，幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 是已知造成胃癌最重要的危險因子之一。透過許多流行病學及組織病理學的研究，目前發現感染此菌後造成胃炎及後續的萎縮性胃炎 (atrophic gastritis)、胃腸化生 (gastrointestinal metaplasia) 等胃癌前驅病徵⁽¹⁾。早期醫學對於感染 *H. pylori* 的病患大多施以抗生素治療，雖然治癒率高，但是長期服用抗生素對於患者還是會造成生理上的副作用，且近年來



發現有部分 *H. pylori* 菌株具有抗藥性。

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^(3,4)。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，三者在此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



之乳酸菌經由篩選對幽門桿菌具有良好抑菌效果的菌株，探討乳酸菌發酵液抑制幽門桿菌及其尿素酶活性，與其發酵液對幽門桿菌吸附 cell 表面能力的影響，製成抑制幽門桿菌的保健食品。

三、材料與方法

(一)實驗材料：

1. 試驗菌株

(1) *Helicobacter pylori* BCRC 17023。

(2) *H. pylori* BCRC 15415。

(3) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BCRC 10791。

以上均購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹，台灣）。

(4) 自行分離之 Lactic acid bacteria。

2. 培養基

培養基：MRS broth、Tryptic soy broth 含 sheep blood。

(二)實驗方法

1. 乳酸菌之培養

本研究所使用乳酸菌為自行分離之植生性乳酸菌株 B0001~B0159。



從-20°C 冰箱中取出菌株 50 μ l 接種至 10ml MRS 培養液中，再從培養液取出 100 μ l 至 10ml MRS 培養液進行二次菌種活化，以供實驗備用。

2. *H. pylori* 之生長曲線測定

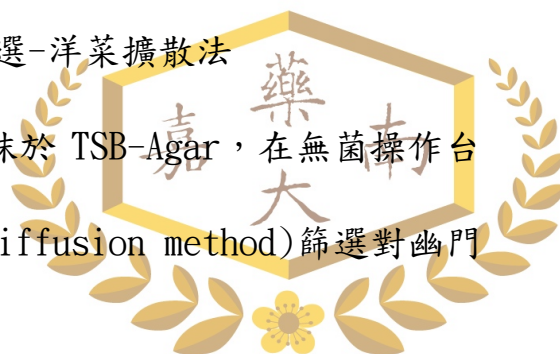
從-20°C 冷凍櫃中取出 1%幽門桿菌至 5ml TSB 培養液(含 5% Sheep Blood)，於 37°C、10%CO₂培養 48 小時，進行二次活化。再取 1% *H. pylori* 至 10ml TSB (含 5% Sheep Blood)，於 37°C、10% CO₂ 培養 72 小時，進行生長曲線測定，經由一系列稀釋後，取 0.1ml 塗抹於 TSA (含 5% Sheep Blood)，於 37°C、10% CO₂ 培養 72 小時，計算菌落數。

3. 乳酸菌發酵液製備

將活化後之乳酸菌以 MRS broth 培養於 37°C、20 小時，將培養後的乳酸菌發酵液(菌量 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml)以 10% HCl 調整其 pH 至 2.0，取發酵液置於離心管中，以 4°C 高速離心機 19000rpm 離心 10 分鐘，取上清液冷藏，以供實驗備用。

4. 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之篩選-洋菜擴散法

將活化後之幽門桿菌取 200 μ l 塗抹於 TSB-Agar，在無菌操作台中風乾 5 分鐘，以洋菜擴散法(Agar diffusion method)篩選對幽門



桿菌菌株具有抑制作用之乳酸菌。

5. 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之生長試驗⁽¹²⁾

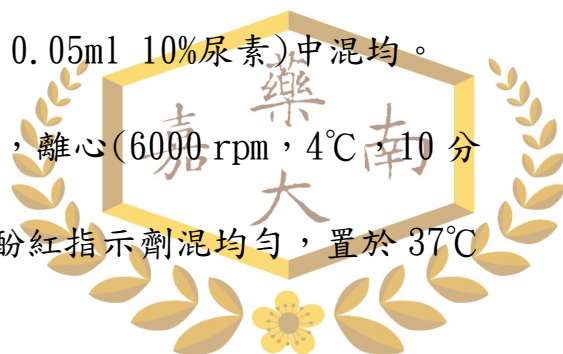
取以 NaOH 調整 pH 至 4.0 的乳酸菌發酵液與以培養 48hr 的 *H. pylori* 加入 TSB 培養液混合(1:1:2)培養於 37°C，在培養至 0hr、4hr 與 8hr 時，分別取出培養液進行菌落數與菌體濃度(0. D595 nm)測定，並推算其抑制率。

Inhibition rate(%):(1-LAB-SCS 0. D595/MRS OD595)×100

6 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之尿素酶試驗

H. pylori 所產生之尿素酶可代謝尿素產生氨，並利用氨中和胃酸，藉以幫助幽門桿菌在酸性環境的胃中仍能形成菌落。本試驗參照 Nankamura 等學者⁽¹³⁾ 的方法，測定尿素酶利用其代謝尿素產生氨的特性，偵測所生成氨的含量，推知尿素酶的活性，測量之方法是採用 Berthelot method⁽¹⁴⁾ 偵測氨的含量。

- a. 在 5 ml TSB 培養液(含 10% FBS)加入 0.05ml 10%尿素。
- b. 將乳酸菌發酵液以 NaOH 調整 pH 至 4.0，取培養 48hr 之 *H. pylori* (10^6-10^7 CFU/mL)與乳酸菌發酵液(最終濃度達 6%、12.5%、25%)加入 5ml TSB 培養液(含 10% FBS、0.05ml 10%尿素)中混均。
- c. 置於 37°C 分別培養 0、24、48 小時，離心(6000 rpm，4°C，10 分鐘)，取上清液，加入 0.1 ml 0.85%酚紅指示劑混均勻，置於 37°C



反應 10 分鐘，測 O.D 540 nm。

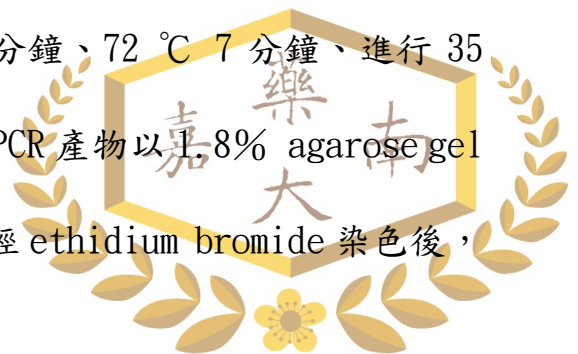
7. 乳酸菌酸耐受性試驗⁽¹⁵⁾

取 1ml 二次活化後的乳酸菌液加入 1.5ml 離心小管 11,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 1ml pH 7.4 PBS buffer 緩衝溶液清洗，接著抽取 100 μ l 到 9ml 之 pH 3.0 或 2.5 的 MRS-HCl 中，於 37°C 下進行酸耐受性反應 3 小時。反應後取出 1ml 以 11,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 1ml pH 7.4 PBS buffer 緩衝溶液清洗，再以 11,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，在以乾淨的 MRS 回溶，馬上進行平板塗抹，培養 48 小時計數。

8. 乳酸菌菌種鑑定

(1) PCR 增幅反應

將所萃取的乳酸菌菌株之 DNA 進行 16S rDNA 的增幅反應。分別加入 5 μ l 的 DNA、2.5 mM dNTP 2.5 μ l、10 \times PCR buffer 5 μ l、primer 1 (27F)、primer 2 (1492R) (30 pmole/ μ l) 1.6 μ l 及 5 U 的 ExSe1 high DNA polymerase 0.04 μ l，補充無菌水至總量 50 μ l，進行 PCR 反應 (GeneAmp PCR system 2400)。反應條件開始以 94 $^{\circ}$ C 10 分鐘以及 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、45 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 7 分鐘、進行 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 維持 1 分鐘。將 PCR 產物以 1.8% agarose gel 於 1 \times TBE buffer 中進行電泳分離，經 ethidium bromide 染色後，



置於 UV Box 下觀察。

四、結果與討論

1. *H. pylori* 之生長曲線

結果顯示在 0-24 小時兩菌菌量由 4.0 log CFU/ml 上升至 6.0 log CFU/ml，至 48 小時菌數則明顯趨緩，至 72 小時兩菌菌量則達到 8.1 log CFU/ml 以上（圖 1）。

2. 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之篩選-洋菜擴散法

研究結果顯示，B0003、B0055、B0078、B0136、B0155 乳酸菌對 2 株幽門桿菌皆具有良好的抑制活性（表 1）。

3. 乳酸菌發酵液對 *H. pylori* 之生長影響

乳酸菌 B0055 對 *H. pylori* BCRC 17023 及 *H. pylori* BCRC 15415 抑制效果優（表 2）。

4. 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之尿素酶活性之影響

由結果顯示，幽門桿菌之尿素酶活性在樣品的濃度增加下，抑制的能力會隨著增加，然且隨著作用的時間增加抑制能力則會隨著降低。對

H. pylori 之生長有明顯抑制效果的各別乳酸菌株以 12.5% 的濃度進行試驗。結果顯示 B0003、B0055 及 B0155 對 *H. pylori* BCRC 17023 及 *H. pylori* BCRC 15415 抑制效果優（表 4）。



5. 乳酸菌對酸的耐受性試驗

將 B003、B0055 及 B0155 菌株進行對酸耐受性試驗(表 5)，結果顯示，在 pH 2.5 的環境下所有乳酸菌株可達到 10^4 CFU/mL。

6. 乳酸菌菌種鑑定

將所分析之 16S rDNA 序列與 NCBI 資料庫中已發表之核酸序列進行比對，B0003 分離株與 AL935263 *L. plantarum* 有 99% 的核酸序列相似性、B0055 分離株與 HM058986 *L. plantarum* 有 100% 的核酸相似性，B0155 分離株與 CP001617 *L. plantarum* 有 99% 的核酸序列相似性，是屬於植物性來源的乳酸菌。



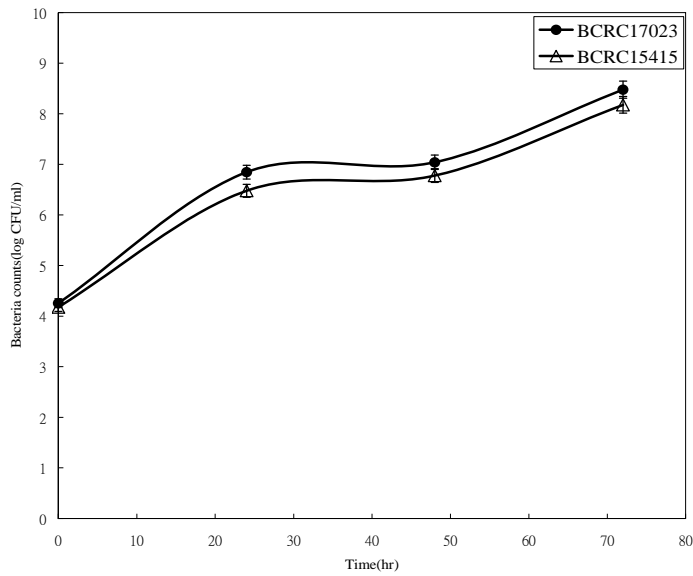


圖 1、*H. pylori* 於 37°C 微好氧培養 72 小時之生長曲線

Fig 1. The growth curve of *H. pylori* incubated microaerobically at 37°C in Tryptic soy broth containing 5% Sheep Blood for 72 hr

表 1、乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 之抑制活性

Table 1. The inhibition activity of the lactic acid bacteria against *H. pylori*

Strains	Inhibition zone(cm)	
	BCRC17023	BCRC15415
MRS(pH2.0)	1.0	1.1
BCRC17394	1.5	1.6
BCRC10791	1.4	1.5
B0003	1.5	1.7
B0055	1.5	1.5
B0078	1.6	1.6
B0136	1.5	1.5
B0155	1.5	1.5



表 2、乳酸菌發酵液對 *H. pylori* 之生長抑制之結果

Table 2. The inhibition activity of lactic acid bacteria fermented liquor with *H. pylori*

Strains	<i>H. pylori</i> BCRC 17023			<i>H. pylori</i> BCRC15415		
	0hr logCFU/ml	4hr logCFU/ml	8hr logCFU/ml	0 hr logCFU/ml	4 hr logCFU/ml	8 hr logCFU/ml
MRS broth	6.95	7.91 ±0.00	8.09 ±0.01	6.42	6.75 ±0.00	7.698 ±0.01
BCRC17394	6.97	7.28 ±0.01**	7.41 ±0.00*	6.41	6.48 ±0.00**	6.71 ±0.01**
BCRC10791	6.97	7.51 ±0.00*	7.53 ±0.00*	6.41	6.66 ±0.02*	7.02 ±0.01
B0003	7.05	7.27 ±0.00**	7.35 ±0.00**	6.41	6.62 ±0.01*	6.89 ±0.01*
B0055	7.05	7.29 ±0.01**	7.36 ±0.00**	6.41	6.55 ±0.01**	6.80 ±0.01**
B0078	7.05	7.38 ±0.00*	7.44 ±0.00*	6.41	6.67 ±0.04	6.96 ±0.01
B0136	7.05	7.38 ±0.01*	7.38 ±0.00**	6.41	6.69 ±0.04	6.92 ±0.04
B0155	7.05	7.29 ±0.00**	7.30 ±0.00**	6.41	6.68 ±0.03	6.95 ±0.01



表 4、12.5% 乳酸菌發酵液抑制 *H. pylori* 尿素酶活性之結果

Table 4. The inhibition urease activity of 12.5% lactic acid bacteria fermented liquor with *H. pylori*

Strains	<i>H. pylori</i> BCRC17023			<i>H. pylori</i> BCRC15415		
	O.D 540			O.D 540		
	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr
Blank	0.445	0.797	0.836	0.465	0.775	0.910
BCRC17394	0.009**	0.095**	0.185**	0.003**	0.008**	0.083**
BCRC10791	0.308*	0.566*	0.843	0.307*	0.698*	0.822*
B0003	0.259**	0.48**	0.692*		N.D	
B0055	0.256**	0.522**	0.696*	0.354*	0.702*	0.763**
B0155	0.297*	0.306**	0.323**		N.D	

N.D : non detected

* 乳酸菌發酵液在對幽門桿菌之尿素酶活性抑制具有顯著差異(p<0.05)

** 乳酸菌發酵液在對幽門桿菌之尿素酶活性抑制結果高於 BCRC10791 (p<0.05)

表 5、乳酸菌對酸耐受性試驗(pH 2.5 and 3)

Table 5. Analysis of acid tolerance (pH 2.5 and 3) for lactic acid bacteria strains

Strain	CFU/mL	pH3,3hr	pH2.5,3hr
		CFU/mL	CFU/mL
BCRC10791	9.53 ±0.04	8.78 ±0.08	4.51 ±0.06
BCRC17394	9.62 ±0.06	9.51 ±0.08	8.53 ±0.03
B0003	9.54 ±0.01	7.60 ±0.06	4.48 ±0.05
B0055	9.46 ±0.09	8.81 ±0.09	4.26 ±0.06
B0155	8.91 ±0.71	8.88 ±0.11	4.04 ±0.14

