

## 題目：兼具免疫調節機能與抑制食因性病原菌之雙重功能的本土植物來源乳酸菌株之篩選

### 一、摘要

本計畫以分離自傳統醃漬蔬菜之植物源乳酸菌為對象，從 11 株經體外試驗證實具有免疫提升能力的植物源乳酸菌中，進一步篩選具有抑制食因性食品病原菌之乳酸菌株，針對其抑菌物質之特性進行探討，並對其增殖培養基組成及培養條件等進行了研究，最後委託國內廠商進行試量產，以探究其應用於人體保健與食品保存之可能性。

### 二、研究動機與研究問題

近年來經由食品病原菌污染所造成的疾病事件頻傳，如 2010 年 5 月美國生鮮雞蛋爆發沙門氏桿菌疫情，約 1,500 人遭受感染。2011 年日本發生消費者食用遭大腸桿菌 O111 型污染之生牛肉導致 4 人死亡案件。德國發生食用遭腸道出血性大腸桿菌 O104 型污染之芽菜(sprout)造成數十名個案死亡。美國發生哈密瓜遭單核球增多性李斯特菌污染造成 30 人死亡及 1 位孕婦流產。2012 年美國生鮮牛絞肉遭沙門氏桿菌污染，共 9 個州受到影響。台灣地區於 2010 年發生消費者透過網路購買三明治食品造成跨縣市沙門氏桿菌所引起之食品中毒、另發生肉毒桿菌中毒事件造成 1 人死亡。2012 年連鎖自助餐廳供應受污染的韓國進口生蠔造成消費者食品中毒等。無論已開發或開發中國家皆經常傳出重大食因性(foodborne)疾病案例，除了造成重大經濟損失之外，也引起消費者恐慌<sup>(1-3)</sup>。

乳酸菌(lactic acid bacteria)是革蘭氏陽性、厭氧或兼性厭氧、觸酶陰性反應、利用可發酵糖類並以乳酸作為主要代謝產物的一類微生物。長期以來，人們一直將乳酸菌用於發酵食品的生產中賦予食品特殊的風味、質地和營養特性。此外，還有增加乳糖的耐受力、增強免疫能力、降低發炎反應、降低膽固醇、改善過敏及預防癌症等保健功效<sup>(4)</sup>。國內通過認證之 40 種乳酸菌相關健康食品，其中有 35 種主要訴求功效為腸道功能改善，部分則是輔助調整過敏體質、調節血脂以及免疫調節功能或兼具雙重機能。乳酸菌除具有獨特的生理功能外，研究證實，

乳酸菌對腸道細菌如大腸桿菌、沙門氏菌等引起的疾病有治療和保健作用。這是因為乳酸菌在生長代謝過程中同時還產生許多拮抗物質，如有機酸、雙乙酰(diacetyl)、過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、reuterin、細菌素(bacteriocins)等<sup>(5)</sup>。這些抑菌物質不僅對食品的風味和組織狀態有很好的保持效果，還可以抑制食品腐敗菌和病原菌的生長，進而延長食品的保藏期。

乳酸菌因其益生菌(probiotics)用途，且可廣泛運用於食品加工，故而一向是食品界的研究主題之一，近年學者更紛紛提出乳酸菌對人體生理功效的各種研究報告，再加上保健食品在國內受到重視，因而更加引發大眾對乳酸菌的興趣。然而，目前有關保健機能的研究對象多以乳品、動物及人類來源之乳酸菌為主，而傳統發酵食品相關的植物性來源乳酸菌的研究卻少見於文獻<sup>(6,7)</sup>。

因此，如何運用具特色之本土微生物資源，結合資源篩選優勢及客製化研發服務概念，以產業應用為導向，開創多樣化微生物資源價值，即成為本研究重點。利用本實驗室分離的植物來源乳酸菌，以台灣常見之食品病原菌做為指示菌株，篩選可以有效抑制此類食品病原菌之乳酸菌株，並探討其發揮抑菌能力之物質及特性，以探究其應用於食品保存等用途上的可能性。

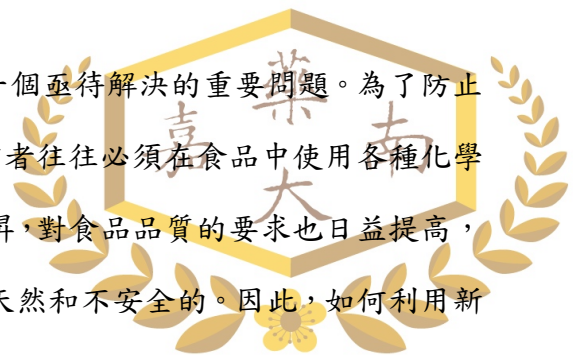
### 三、文獻回顧與探討

台灣及離島地區於2012~2014共計發生1416案食品中毒案件，中毒人數14,095人，無人死亡，每案平均約涉及10名患者。依病因物質統計，其中以「腸炎弧菌」引起的中毒案件數最多(3年共計135案，948人)，其次依序為「金黃色葡萄球菌」(100案，1360人)、「沙門氏桿菌」(69案，1023人)、「仙人掌桿菌」(57案，2369人)及「病原性大腸桿菌」(21案，444人)<sup>(8)</sup>。腸炎弧菌在沿海國家如台灣、日本、東南亞各國、英國、荷蘭及美國均為常見的食品中毒致病菌。在適當條件下，短時間內即可達到致病菌量，增殖迅速是造成食品中毒的一大原因。因此，腸炎弧菌一直是台灣發生率最高的食品中毒病原菌。金黃色葡萄球菌常存於人體的皮膚、毛髮、鼻腔及咽喉等黏膜及糞便中，尤其是化膿的傷口，因此極易經由人體而污染食品。食品從業人員衛生習慣不佳，工作場所衛生條件不良或

管理不當，常會造成金黃色葡萄球菌污染食品，進而引起食品中毒事件發生。造成仙人掌桿菌食品中毒的原因食品以中式食品及米飯製品最常發生，若烹調後未能儘速食用，且熱存溫度未達60°C，仙人掌桿菌孢子便有可能繁殖並產生毒素造成中毒。沙門氏桿菌被證實是引起食品中毒的病原菌已有百年以上的歷史，除了引起單純的腸炎外，還有傷寒及敗血症。沙門氏桿菌引起的食品中毒案件數，在美國是位居細菌性病因的第一位，在台灣則是第四位。食因性疾病是世界各國公共衛生管理的重點，經由食品污染所造成的疾病，可能是當今食品安全面臨最重要的問題，除了造成健康傷害外，更造成消費者恐慌及經濟上的損失<sup>(1-3)</sup>。

乳酸菌及其相關發酵產品已被認為是機能性食品(functional food)，主要是因此類產品無論是菌種本身或是其發酵產品，在臨床研究的報告均具有改善腸胃的蠕動及穩定正常菌叢、預防病原菌感染的效果，以及預防及治療細菌性及病毒相關性引起之腹瀉。乳酸菌能協助維持腸道的正常菌群生態，使腸道上皮細胞保持完整。一旦食因性致病菌或化學物質等有害物質入侵腸道，會侵犯到正常上皮細胞，影響腸道正常菌叢的數目。乳酸菌抑制病原菌的機制分為物理性及化學性兩種，物理性機制為乳酸菌與病原菌共同競爭生長所需養分以及體內腸壁細胞上的定位點(adhesion site)。當乳酸菌成為腸內優勢菌群時，會在腸壁細胞上形成一層生物膜(biofilm)，這樣有助於抑制其他病原菌及雜菌黏附在上面。化學性機制則包含了乳酸菌代謝過程中所產生的各種抑菌物質，例如有機酸、雙乙醯、過氧化氫、細菌素以及reuterin等<sup>(9)</sup>。研究顯示*Biofidobacteria*及 *Lactobacilli*等益生菌可以抑制*Salmonella typhimurium*、*Clostridium difficile*、*Campylobacterium jejuni*、*Escherichia coli*及*Shigella* sp.等腸道內致病菌的生長，來維持腸道內正常的菌相平衡<sup>(10)</sup>。

在食品工業中，食品的保鮮防腐始終是一個亟待解決的重要問題。為了防止食品腐敗同時提高食品感官特性，食品加工業者往往必須在食品中使用各種化學添加劑。然而，隨著消費者健康意識之日益提昇，對食品品質的要求也日益提高，有越來越多消費者認為使用食品添加劑是非天然和不安全的。因此，如何利用新



的方法來延長食品的貨架期、提高食品的安全性，同時並滿足消費者日益增長的健康需求，是食品相關業者和政府決策人員迫切關注的問題。因此，為了符合時代潮流與消費者需求，尋找安全性高的天然抗菌物質即成為研究重點<sup>(11)</sup>。

長期以來人們應用乳酸菌來抑制乳品、蔬菜及肉製品的腐敗現象，這是由於乳酸菌在生長代謝過程中除產生乳酸、醋酸、雙乙醯和過氧化氫外，還能產生具有抑菌或殺菌活性的細菌素，其在抑制各種病原菌和食物腐敗中具有重要的作用。乳酸菌產生的細菌素以其對動物無毒性、易被人體消化道中的蛋白酶分解、不會在體內蓄積引起不良反應等特性，被認為是一種具有廣闊應用前景的天然食品防腐劑和飼料添加劑<sup>(5)</sup>。細菌素是由細菌代謝產生的具有抑菌、殺菌作用的蛋白或多肽。乳酸菌細菌素以其安全、高效、無毒副作用和無抗藥性等優點，已經成為國內外食品加工、飼料添加劑以及醫藥等開發人員研究的重點。作為安全、天然的抗菌物質，細菌素在食品保藏中具有廣闊的應用前景。目前廣泛應用於食品保鮮的乳酸菌素主要有乳酸鏈球菌素(nisin)和乳酸片球菌素(pediocin)，但為了拓展乳酸菌細菌素此一天然生物防腐劑之應用範圍，研究與開發新型式的乳酸菌細菌素物質具有重要意義。

本研究主要是從具有特殊生理活性(如調節免疫、降膽固醇及調節血壓等)之乳酸菌株中，篩選對於食因性致病菌具有較廣抑菌範圍之菌株，並探討其發揮抑菌能力之物質及基本特性，以探究其應用於食品保存等用途上的可能性。首先，由這些具有特殊生理活性之乳酸菌株中，以agar well定量擴散法，從中篩選出具有明顯抑菌活性代謝產物之菌株。接著，在排除各項干擾因素後，篩選發酵上清液對指示菌仍有抑菌活性之乳酸菌株。繼而探討各項發酵生產條件，最後進行發酵試量產。

#### 四、研究方法與步驟

##### (一) 使用菌株

##### 1. 測試菌株

11 株經體外(in vitro)試驗研究證實具有免疫調節機能之乳酸菌，菌株編號分



別為：B0018、B0019、B0040、B0042、B0044、B0046、B0052、B0088、B0091、B0110及B0145。本研究所使用之植物來源乳酸菌株，均分離自具有良好風味之各種乳酸發酵蔬菜樣品，並保存於本研究室菌種庫。

## 2. 指示菌株(食因性病原菌)

*Bacillus cereus* ATCC 21778、*Escherichia coli* BCRC 10675、*Salmonella enteritidis* BCRC 10744、*Staphylococcus aureus* BCRC 13829、*Vibrio parahaemolyticus* BCRC 10806。

## 3. 培養基

### 3.1 乳酸菌株培養基

MRS固體及液體培養基。

### 3.2 指示菌株培養基

用於各種病原菌之培養，*B. cereus*、*E. coli*及*Sal. Enteritidis*培養於Nutrient broth (NB)及agar (NA)培養基；*Sta. aureus*及*Vibrio parahaemolyticus*培養於trypticase soy broth (TSB)及agar (TSA)培養基等。

## (二) 試驗方法

### 1. 產抑菌活性物質乳酸菌株之初步篩選

#### 1.1 培養上清液的製備

取經過活化的乳酸菌菌液0.1 mL接種於10 mL滅菌的MRS液體培養基中，37°C條件下培養24 h，取此培養液0.5 mL接入50 mL已滅菌的MRS液體培養基中，37°C條件下培養24 h後，於4°C以13,000 rpm離心10分鐘，離心上清液以0.22 µm無菌濾膜過濾，過濾上清液備用。以新鮮MRS broth作為對照組。

#### 1.2 抑菌試驗

採用agar well定量擴散法<sup>(12)</sup>。將二次活化之病原菌菌液，以1%之比例接種至nutrient broth (*B. cereus*, *E. coli* and *Sal. Enteritidis*)或trypticase soy broth (*Sta. aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*)，37°C震盪(100 rpm)培養24小時。調整菌體懸浮液濃度至10<sup>7</sup> CFU/ mL，塗抹至定量20 mL之nutrient agar plate或trypticase soy

agar plate。再用高壓滅菌後的1 mL tip (內徑8 mm)尾端在agar plate上挖洞備用。取200  $\mu$ L之乳酸菌培養濾液(步驟1.1)加至上述已塗抹病原菌之agar well裡，置於37°C恆溫培養箱中培養至少14小時後測量抑菌圈的大小。挑選對上述指示菌株具有較大抑菌圈的相對應的菌株作為待試菌株。所有實驗皆進行三重覆。

## 2. 以單因素試驗法探討發酵培養條件對乳酸菌株生長及抑菌物質生產的影響

### 2.1 乳酸菌株之培養

乳酸菌株保存在含15%甘油的MRS培養基中(-70°C)。試驗前，把乳酸菌接種於MRS瓊脂培養基活化，然後挑菌落接種於MRS液體培養基隔夜培養(37°C)，再按1%接種於MRS液體培養基或實驗室自行開發之乳酸菌培養基，37°C深層培養20 h。

### 2.2 生長動力學

將1%新鮮菌液接種至MRS broth中，37°C培養24小時，每隔一定培養時間取出培養液，分別測量OD<sub>600</sub>吸光值、pH值、有機酸與抑菌測試。抑菌測試參照試驗方法1.2之方法實施。

## 3. 培養基組成測試

依本實驗室所使用之乳酸菌發酵培養基(Original, 原始培養基)以逐步試驗法，逐一調整碳源、氮源及無機鹽類用量。將活化後之菌液以1%接種量，接種於欲測試之培養基組成分，37°C培養24小時，取1 mL菌液以無菌水進行序列稀釋，以MRS瓊脂平板傾注培養，37°C培養48小時後計算菌數。

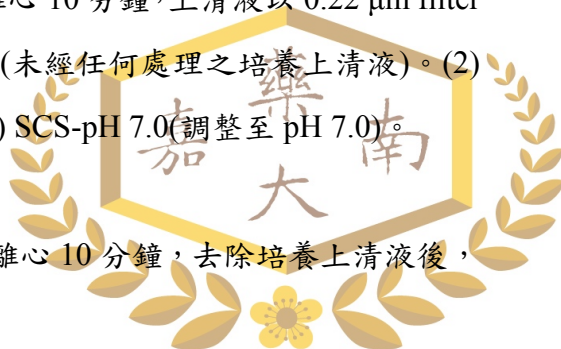
## 4. 抑菌曲線試驗

### 4.1 培養上清液的前處理

乳酸菌經活化培養24小時，12,000 rpm離心10分鐘，上清液以0.22  $\mu$ m filter過濾，濾液以不同方式處理，分為：(1) SCS(未經任何處理之培養上清液)。(2) SCS-heated(濾液經100°C加熱處15分鐘)。(3) SCS-pH 7.0(調整至pH 7.0)。

### 4.2 抑菌曲線試驗<sup>(13)</sup>

病原菌經活化培養24小時，12,000 rpm離心10分鐘，去除培養上清液後，



以 PBS 清洗菌體，離心。菌體沉澱以 PBS 回溶至  $10^8$  備用。將前述經不同方式處理之乳酸菌培養上清液與病原菌以 1:1 比例，混合培養四小時，每隔 1 小時取出測定菌數。對照組為 MRS broth。

## 5. 發酵試量產

綜合以上實驗結果，先於實驗室進行 10 L 發酵槽生產測試，確認實驗結果無誤，再以委外方式進行較大規模(至少 50~100 L)之量產測試。

## 6. 統計分析

各檢測分析均進行三重複，實驗結果以平均值與標準偏差表示(Means  $\pm$  SD)，採用 SPSS 軟體進行統計分析，進行 one-way ANOVA 分析，並以 Dunnett's test 比較各試驗組與對照組之間的差異性，若  $p < 0.05$  代表有顯著差異。

## 五、結果與討論

### 1. 病原菌抑制能力

研究表明，乳酸菌對腸道細菌如大腸桿菌、沙門氏菌等引起的疾病有治療和保健作用。乳酸菌生長繁殖過程產生乳酸、乙酸等有機酸和抑菌素等，降低腸道的 pH 值，改善腸道內部微環境，抑制有害菌的生長，其代謝產物對人體本身也具有保健作用。

Probiotics 的作用之一為抑制致病性及有害的微生物，同時不會影響腸道正常菌叢生長。本試驗所使用之指示菌株(indicator strain)，包括革蘭氏陽性菌 *Staphylococcus aureus* BCRC 13829 和革蘭氏陰性菌 *Escherichia coli* BCRC 10675 及 *Salmonella enteritidis* SE07 ATCC 13880。供試驗的 11 株具免疫機能之植物源乳酸菌經培養後，可發現在受測菌株周圍會形成大小不一之透明圈(圖 1)。透明圈越大即表示抑菌活性越強。乳酸菌培養物離心上清液對病原菌的抑制試驗結果見表 1。結果顯示，所有的乳酸菌培養上清液同時能抑制革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌生長。由表 1 可以發現，B0088、B0091 及 B0145 對 *E. coli* BCRC 10675 的抑菌能力優於參考菌株 *L. casei* Shirota，B0019、B0044 及 B0052 則與 *L. casei* Shirota 無顯著差異。乳酸菌培養上清液對 *Staphylococcus aureus* BCRC 13829 的

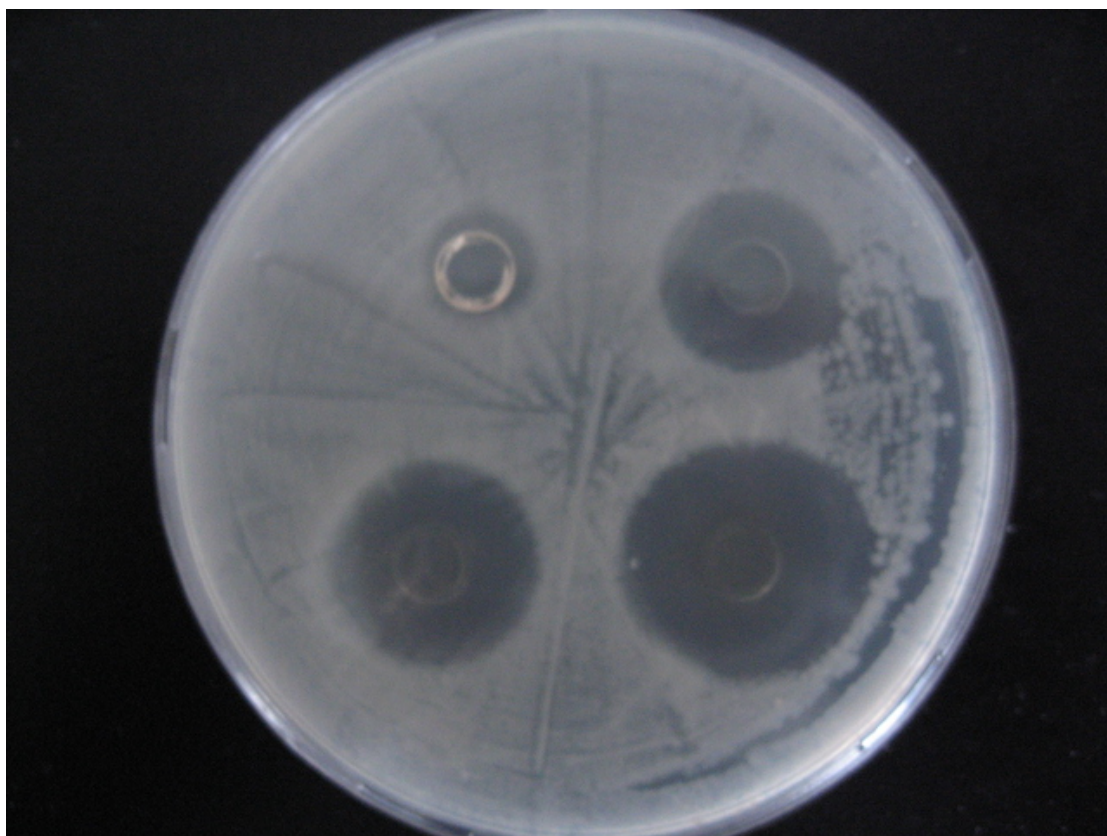


圖 1 不同乳酸菌株之培養上清液抑菌活性測試

Figure 1 Inhibitory activity of cell-free LAB-SCS of various lactic acid bacteria.



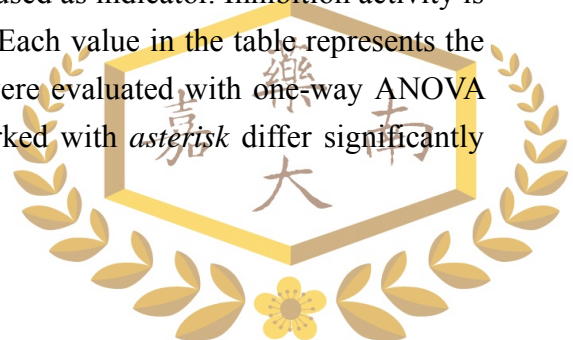


表 1 不同乳酸菌株培養上清液對病原菌之抑菌試驗結果

Table 1 Inhibition of pathogenic bacteria by cell-free LAB-SCS of various lactic acid bacteria.

Strains	Inhibition zone (mm)		
	<i>E. coli</i> BCRC 10675	<i>Staphylococcus aureus</i> BCRC 13829	<i>Salmonella enteritidis</i> SE07 ATCC 13880
B0018	11.9 ± 0.3	10.3 ± 0.2	14.3 ± 0.4
B0019	13.2 ± 0.3	11.9 ± 0.2	13.6 ± 0.5
B0040	10.8 ± 0.3	10.7 ± 0.3	13.6 ± 0.3
B0042	12.2 ± 0.6	11.6 ± 0.2	12.3 ± 0.4
B0044	13.2 ± 0.3	11.6 ± 0.2	12.3 ± 0.3
B0046	11.5 ± 0.63	10.0 ± 0.0	12.5 ± 0.4
B0052	13.2 ± 0.4	12.6 ± 0.3	14.2 ± 0.3
B0088	15.1 ± 0.4	12.9 ± 0.4	14.2 ± 0.3
B0091	14.7 ± 0.6	12.6 ± 0.2	13.9 ± 0.4
B0110	12.1 ± 0.5	10.7 ± 0.3	14.0 ± 0.3
B0145	14.6 ± 0.3	13.1 ± 0.3	14.6 ± 0.4
<i>L. casei</i> Shirota	13.5 ± 0.6	13.1 ± 0.3	13.6 ± 0.4
MRS	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0

Inhibition activity on pathogenic bacteria for LAB strain was performed by an agar well diffusion assay. *E. coli* BCRC10675, *Staphylococcus aureus* BCRC 13829, and *Salmonella enteritidis* SE07 ATCC 13880 were used as indicator. Inhibition activity is presented as diameter (mm) of inhibition zone. Each value in the table represents the mean value ± SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).



抑菌能力，除 B0052、B0088、B0091 及 B0145 之抑菌能力與 *L. casei* Shirota 無顯著差異之外，其餘菌株皆遜於 *L. casei* Shirota。除 B0020、B0042、B0044 及 B0046 對 *Salmonella enteritidis* SE07 ATCC 13880 的抑菌能力略遜於 *L. casei* Shirota 之外，其餘菌株之表現均優於或與參考菌株 *L. casei* Shirota 無顯著差異。

試驗中加入 MRS 培養基的對照孔均未出現抑菌環，這表明 MRS 培養液對三種病原菌並無抑制作用，說明對病原菌的抑制作用是乳酸菌在培養過程中產生的代謝產物所致。推測其可能原因是乳酸菌可產生有機酸及一些抗菌物質，如乳酸、二乙醯(diacetyl)及細菌素(bacteriocin)等。乳酸可降低環境的 pH 值及抑制細菌生長。二乙醯為乳酸菌代謝丙酮酸的產物之一，會妨礙革蘭氏陰性菌對精胺酸的利用。細菌素為小型陽離子蛋白質，由 30~60 個胺基酸所組成，細菌素類物質對革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌均能抑制。至於培養上清液中詳細的抑菌物質及機制，仍有待進一步研究才能得知。

## 2. 生長動力學

將 1%新鮮菌液接種至 MRS broth 中，37°C 培養 24 小時，每隔一定培養時間取出培養液，分別測量 OD<sub>600</sub> 吸光值、pH 值及有機酸之變化情形與進行抑菌測試(數據未呈現)。測量 OD<sub>600</sub> 之吸光值，發現 20 小時內乳酸菌呈對數成長，20 小時後生長曲線趨於平緩。經過 12 小時培養後可以發現抑菌能力快速增加，但 20 小時後隨著培養時間增加而逐漸減少。pH 值隨著培養時間增加而逐漸下降，至 24 小時後趨於平緩。有機酸則隨著培養時間而增加，至 18 小時後就趨於平緩。

## 3. 最適培養基組成

一般而言，在培養基的配方設計上並無通則可循，必須針對個別細胞之生長特性及代謝需求，調整培養基組成和培養條件，使生長和代謝均能在最適合之條件下進行。在開始進行培養基最適化之前必須先篩選基礎培養基之種類，本研究以本校食品系王淑珍教授之研究團隊開發出一極適合乳酸菌生長之工業化培養基為基礎(表2)，以逐步推定法進行乳酸菌最適培養基成分探討，同時結合具有

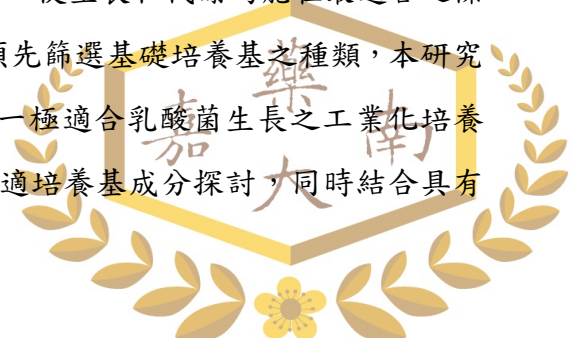


表 2 原始培養基配方(郭炯陽、王淑珍)

Table 2 Composition of Original medium.

Component	Concentration (g/L)
Soy milk powder	10
Glucose	30
Soy peptone	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.2
MnSO <sub>4</sub>	0.4
Sodium citrate	1.0



康意識的在地特色農產品，因此以豆漿作為主要培養基質，逐步探討不同碳源用量、不同氮源用量以及不同微量金屬元素之用量等，主要目的在建立適合於工業生產之低成本培養基<sup>(14)</sup>。

本研究採用前期計畫所開發之培養基為基礎，探討益生性乳酸菌株 B0091 之最適培養基組成。因為計畫重點之一強調在地農產素材之加值利用，而台灣每年人均黃豆食用率高居全球前三名，且大豆是優質的植物蛋白質來源，同時含有多種不飽和脂肪酸及生物活性成分，有益人體健康。因此以豆漿作為乳酸菌的主要培養基質，但考慮到市售豆漿這類天然產品成分常受原料來源、製程等因素影響而品質不一，同時本研究之主要目的之一在開發一符合工業生產成本且配製程序簡便之培養基組成，因此後續即採用振芳公司(台北市)生產之豆漿粉作為培養基質，品質較容易控制，並進一步探討其使用濃度。

在探討豆漿粉使用量時，其他成分之用量均控制不變，結果如圖 2 顯示，當豆漿粉使用濃度為 1.5% 時，菌數顯著提高可達  $2.4 \times 10^9$  cfu/mL。接著探討葡萄糖之使用量，此時除豆漿粉用量為 1.5%，其他成分用量均不改變，發現葡萄糖用量以 1% 為最佳(圖 3)。圖 4 為探討 soy peptone 之使用濃度，控制豆漿粉用量 1.5%、葡萄糖為 1.0%，發現 soy peptone 之使用濃度 1.5% 與 2.0% 之結果差異不大，故採用 1.5% soy peptone 作為後續使用濃度。無機鹽類由磷酸二氫鈉 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )、硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ )、硫酸錳 ( $\text{MnSO}_4$ ) 及檸檬酸鈉 (sodium citrate) 四者所組成，其最適使用濃度為原始培養基之 2 倍(圖 5)。最後得到一最適合乳酸菌株 B0091 之工業化生產培養基配方如表 3。最佳發酵培養基組成為：豆漿粉 1.5%、葡萄糖 1.0%、soy peptone 1.5%、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.02%、 $\text{MgSO}_4$  0.04%、 $\text{MnSO}_4$  0.08% 及檸檬酸鈉 0.2%。並確定了乳酸菌的培養條件：接種量 1%，發酵培養最適溫度 37°C，起始 pH 值 6.5，發酵槽轉速 50 rpm，培養時間 20~24 小時。並以此培養基配方(Modified)與 MRS broth 及前期培養基配方(Original)進行比較試驗，確認修改後之培養基配方(Modified)確實較適合於 B0091 菌株之培養，結果如圖 6。此配方配製程序簡便且成本低廉(\$10/L 左右)適合工業生產使用，並於本實驗室中以 10 L 發酵槽(裝液量 7 L)進行預備試驗，發酵過程之 pH 值及菌數變化結果如圖 7 所示，37°C 培養 24 小時後，菌數可達到  $2.93 \times 10^9$  cfu/mL，離心後之菌泥與凍乾保護劑配方 A 以 1:1 比例混合均勻，經凍乾之後，初菌數可達  $3.3 \times 10^{11}$

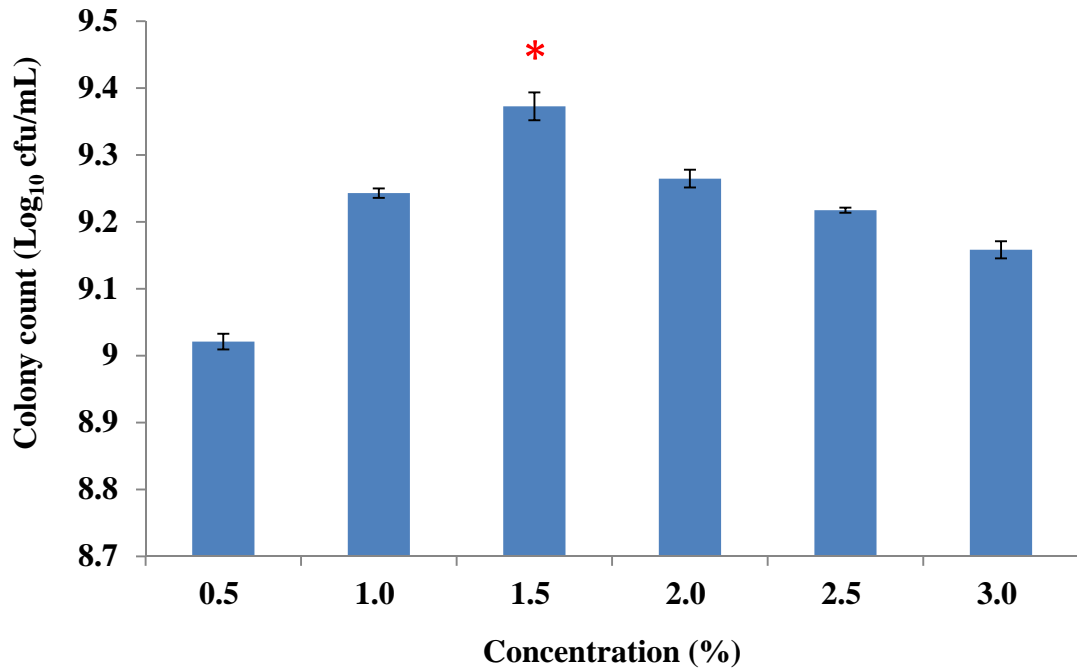


圖 2 豆漿粉濃度對乳酸菌 *L. plantarum* B0091 生長之影響

Figure 2 Effect of initial soy milk powder concentration on viability of *L. plantarum* B0091.

Each value in the table represents the mean value  $\pm$  SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).



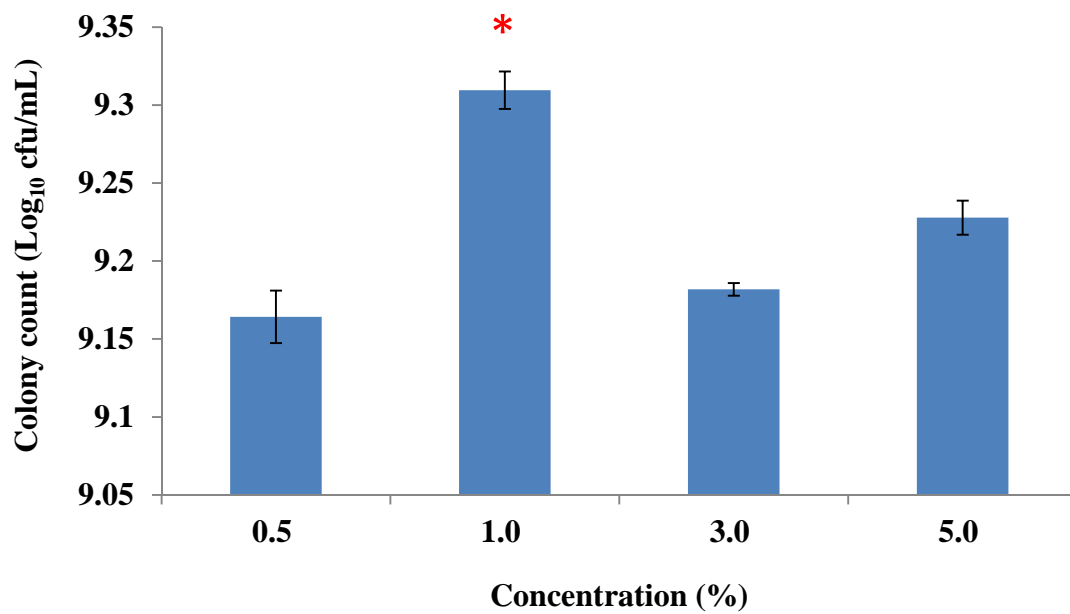


圖 3 葡萄糖濃度對乳酸菌 *L. plantarum* B0091 生長之影響

Figure 3 Effect of glucose concentration on viability of *L. plantarum* B0091.

Each value in the table represents the mean value  $\pm$  SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).



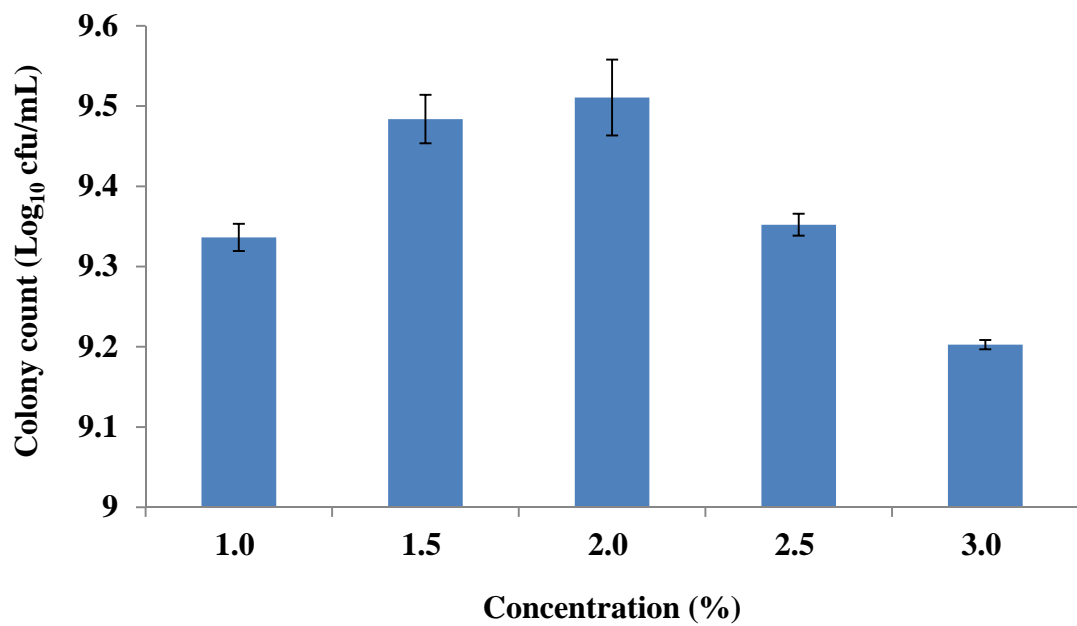


圖 4 Soy peptone 濃度對乳酸菌 *L. plantarum* B0091 生長之影響

Figure 4 Effect of soy peptone concentration on viability of *L. plantarum* B0091.

Each value in the table represents the mean value  $\pm$  SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).



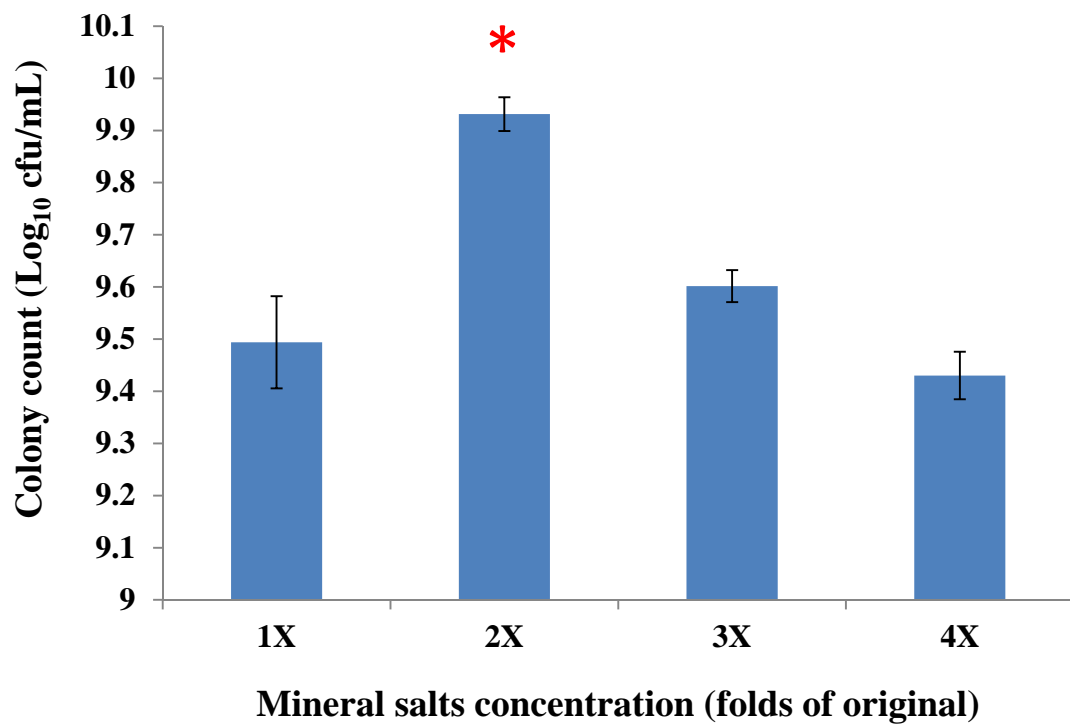


圖 5 無機鹽類濃度對乳酸菌 *L. plantarum* B0091 生長之影響

Figure 5 Effect of initial mineral salts concentration on viability of *L. plantarum* B0091.

Each value in the table represents the mean value  $\pm$  SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).





表 3 乳酸菌 *L. plantarum* B0091 之最適培養基組成

Table 3 Compositions of modified medium for *L. plantarum* B0091.

Component	Concentration (g/L)
Soy milk powder	15
Glucose	10
Soy peptone	15
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub>	0.4
MnSO <sub>4</sub>	0.8
Sodium citrate	2.0



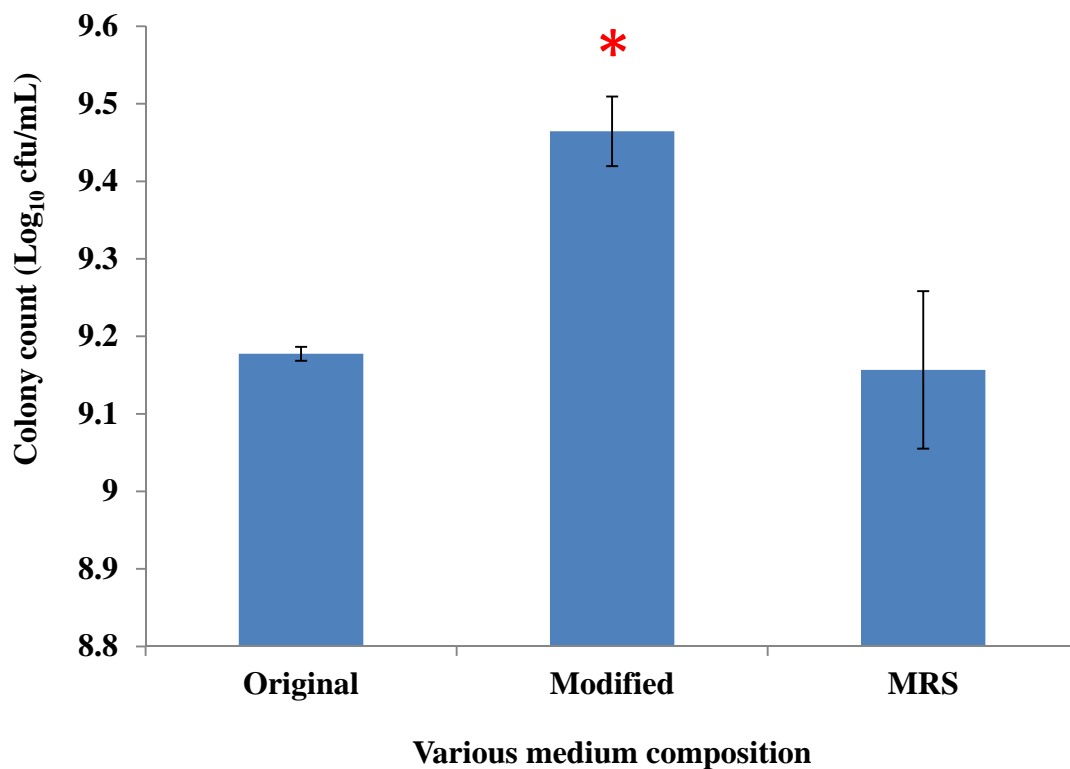


圖 6 不同培養基組成對乳酸菌 *L. plantarum* B0091 生長之影響

Figure 6 Effect of different medium composition on viability of *L. plantarum* B0091.

Each value in the table represents the mean value  $\pm$  SD from at least 3 trials. Data were evaluated with one-way ANOVA and compared using Dunnett's test. Values marked with *asterisk* differ significantly from *L. casei* Shirota values ( $p < 0.05$ ).



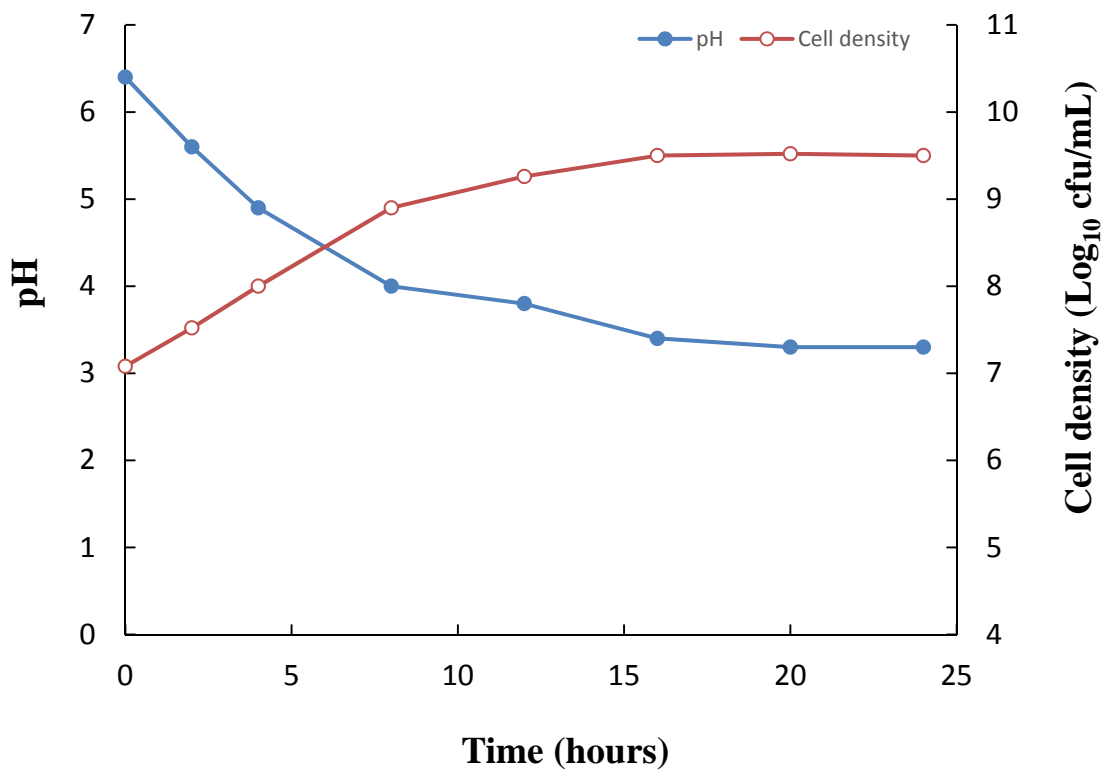


圖 7 十公升發酵槽培養 *L. plantarum* B0091 發酵過程中之 pH 值及菌數變化情形

Figure 7 Kinetics of the *L. plantarum* B0091 in the 10 L fermentor.



cfu/g，分別儲存於室溫及 4°C，每隔一定時間取出測定活菌數。後續即以此培養基配方提供廠商進行 50 L 發酵槽試量產。

#### 4. 抑菌曲線試驗

將具開發潛力之乳酸菌株 B0091 經活化培養 24 小時，培養上清濾液以不同方式處理，將前述經不同方式處理之乳酸菌培養上清液與病原菌以 1:1 比例，混合培養四小時，每隔 1 小時取出測定菌數。對照組為 MRS broth。由結果(圖 8)可以發現，B0091 菌株未經任何處理之培養上清液(SCS)以及濾液經 100°C 加熱處 15 分鐘(SCS-heated)，兩者對 *E. coli* BCRC 10675 均有顯著抑制作用，而培養上清液調整至 pH 7.0 (SCS-pH 7.0)則與 MRS broth 對照組相同，對 *E. coli* BCRC 10675 並無抑制能力。在 *Staphylococcus aureus* BCRC 13829 之抑菌試驗上亦可觀察到類似的結果(圖 9)。然而，B0091 菌株未經任何處理之培養上清液(SCS)以及濾液經 100°C 加熱處 15 分鐘(SCS-heated)，對革蘭氏陽性菌 *Staphylococcus aureus* BCRC 13829 之抑菌效果則較不顯著。此結果與表 1 抑菌圈試驗結果存在一致性。

#### 5. 50 L 發酵槽之試量產

依計畫要求須進行 50 L 發酵槽之試量產，依照實驗室所得之各項數據經整理後，委託國內廠商金穎生物科技股份有限公司代工生產。由圖 10 及 11 可發現乳酸菌株 B0091 之生長速率在 20 小時即達穩定，產酸正常，這與實驗室觀察結果相符，以凍乾保護劑配方 A 凍乾後之乳酸菌菌粉，其活菌數可達  $1.5 \times 10^{11}$  cfu/g，與實驗室數據  $3.3 \times 10^{11}$  cfu/g 亦相去不遠，相關數據整理如表 4。有趣的是，因為培養基採用豆漿粉為基質，配製後呈乳白色液狀，因此在發酵終點判定上一般採用 pH 或酸度較為快速，較少使用 OD<sub>600</sub> 吸光值(太混濁)或測定菌數(耗時)，但金穎公司仍試探性採用 OD<sub>600</sub> 吸光值作為輔助，發現在發酵終點判定上仍有一定參考價值。



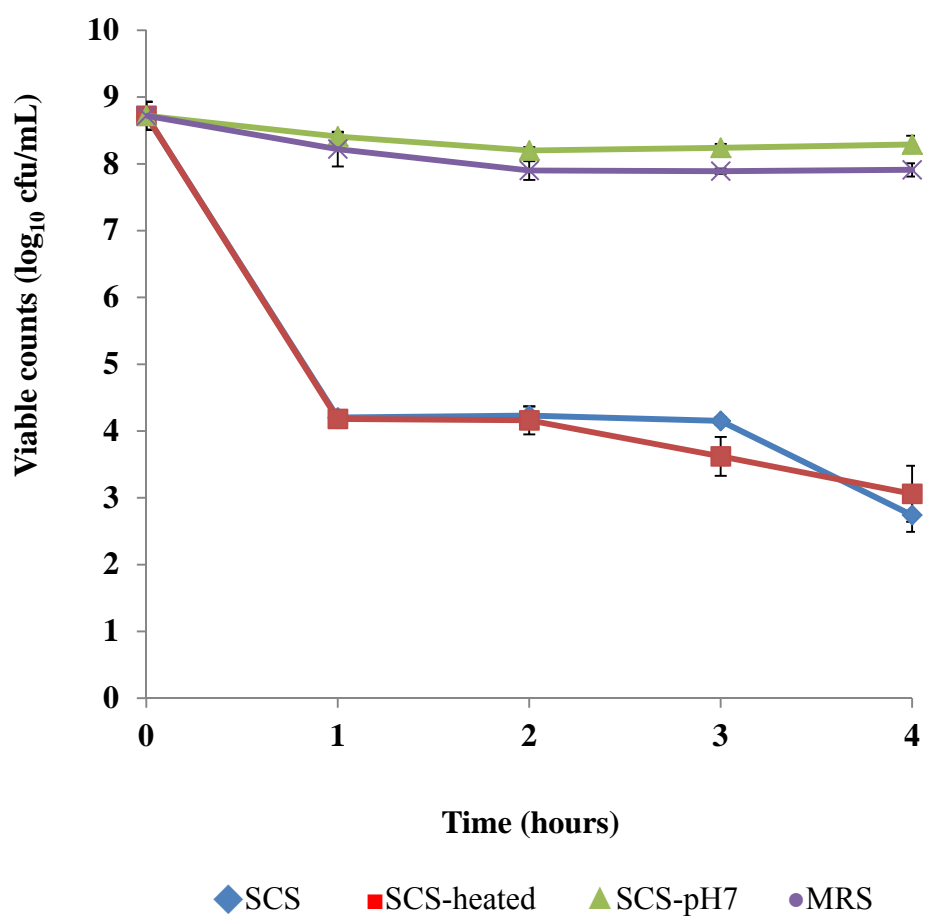


圖8 不同處理方式之*L. plantarum* B0091培養上清液對大腸桿菌*E. coli* BCRC10675之抑制變化情形

Figure 8 Inhibition on the growth of *E. coli* BCRC10675 by various bacterial stimulants of *L. plantarum* B0091. Experimental conditions are described in the text.



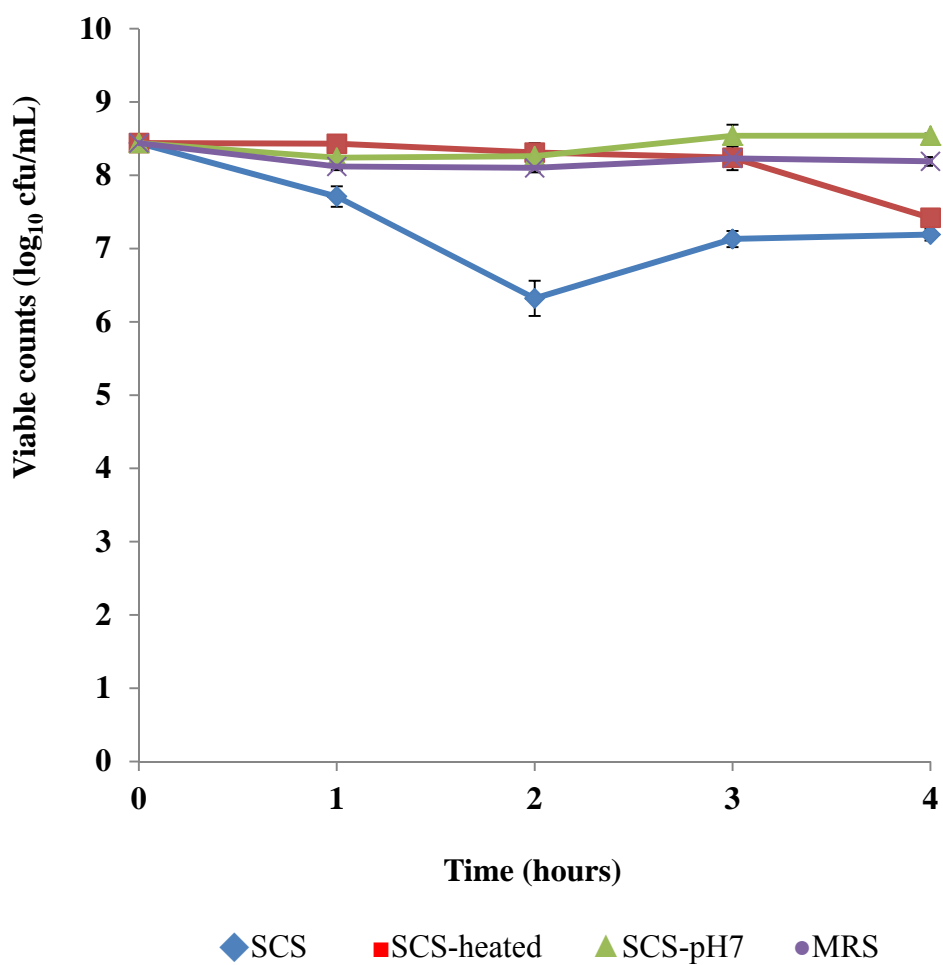


圖9 不同處理方式之*L. plantarum* B0091培養上清液對金黃色葡萄球菌  
*Staphylococcus aureus* BCRC 13829之抑制變化情形

Figure 9 Inhibition on the growth of *Staphylococcus aureus* BCRC 13829 by various bacterial stimulants of *L. plantarum* B0091. Experimental conditions are described in the text.



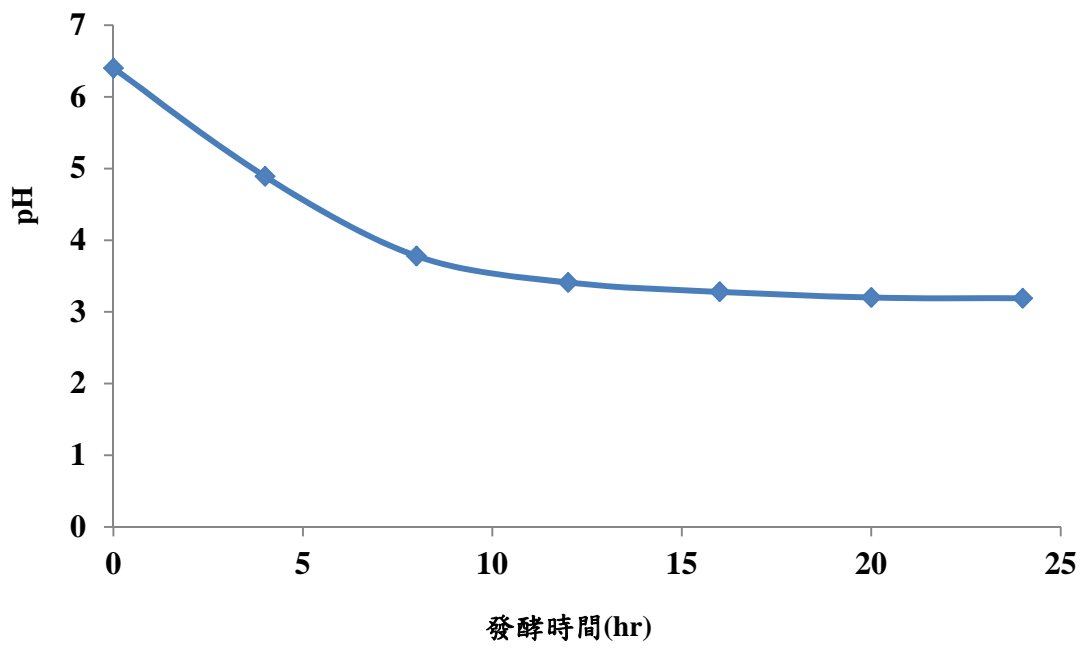


圖 10 五十公升發酵槽培養 *L. plantarum* B0091 發酵過程中 pH 值變化情形

Figure 10 Change of pH in a 50 L fermentor during *L. plantarum* B0091 fermentation.



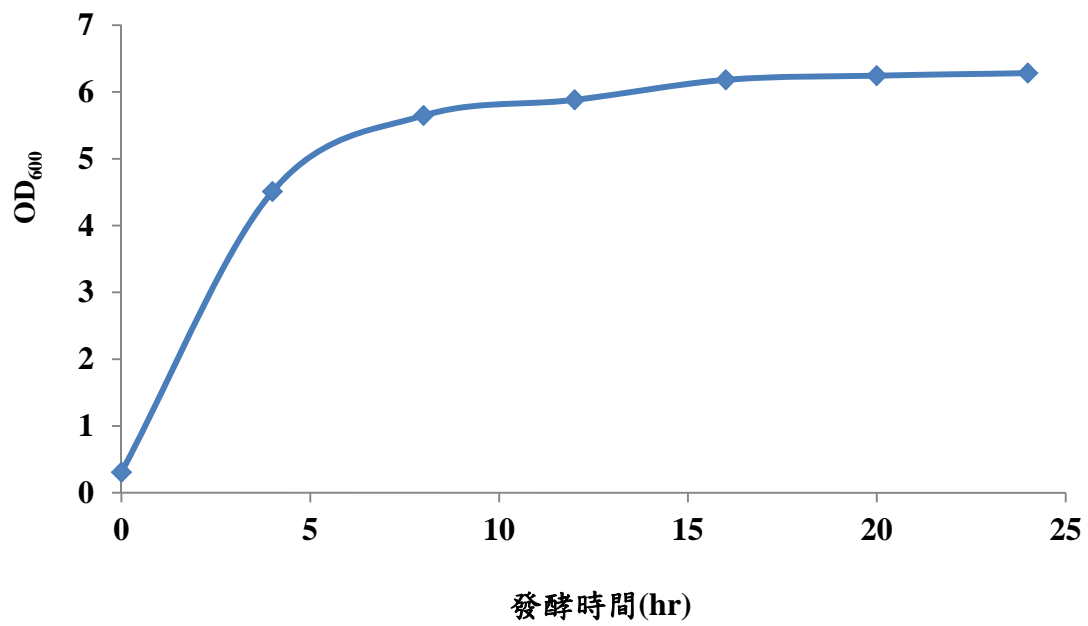


圖 11 五十公升發酵槽培養 *L. plantarum* B0091 發酵過程中 OD<sub>600</sub> 吸光值變化情形

Figure 11 Change of pH in a 50 L fermentor during *L. plantarum* B0091 fermentation.





表 4 五十公升發酵槽培養 *L. plantarum* B0091 發酵過程中各項數值分析結果

Table 4 Summary of the *L. plantarum* B0091 cultured in the 50 L fermentor.

樣品分析	pH	OD <sub>600</sub>	菌數
接菌點	6.40	0.307	1.0 x10 <sup>8</sup> cfu/mL
發酵 4 小時	4.89	4.510	-
發酵 8 小時	3.78	5.647	-
發酵 12 小時	3.41	5.882	-
發酵 16 小時	3.28	6.182	2.2 x10 <sup>9</sup> cfu/mL
發酵 20 小時	3.20	6.245	2.3 x10 <sup>9</sup> cfu/mL
發酵 24 小時(收槽點)	3.19	6.282	2.2 x10 <sup>9</sup> cfu/mL
離心菌泥	-	-	1.1 x10 <sup>11</sup> cfu/mL
乳酸菌發酵粉	-	-	1.5 x10 <sup>11</sup> cfu/g



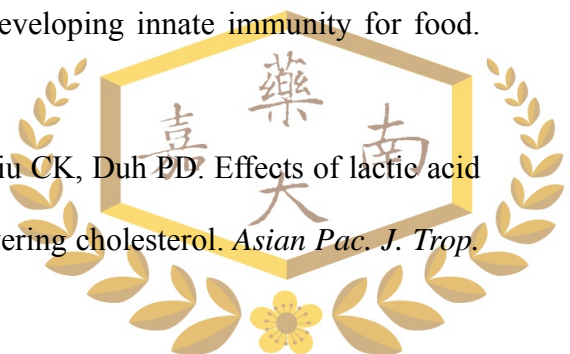
## 六、結論

1. 綜合研究結果顯示，具免疫調節機能之植物源乳酸菌 B0091 菌株在病原菌抑制能力試驗方面具有良好的表現，抑菌能力均優於參考菌株 *L. casei* Shirota。且經過完整菌種鑑定程序，確保安全性。為自然、安全之本土性菌株，更適合國人體質，未來具有廣闊的產業應用前景。。

2. 本計畫針對增殖培養基組成、培養條件的篩選等進行了研究，並委託國內廠商進行了試量產。結果如下：首先針對發酵培養基進行最適化，得到乳酸菌株 B0091 之最佳發酵培養基組成為：豆漿粉 1.5%、葡萄糖 1.0%、soy peptone 1.5%、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.02%、 $\text{MgSO}_4$  0.04%、 $\text{MnSO}_4$  0.08%及檸檬酸鈉 0.2%，並確定了乳酸菌的培養條件：接種量 1%，發酵培養最適溫度 37°C，起始 pH 值 6.5，培養時間 20~24 小時，發酵槽轉速 50 rpm。依上述條件，在實驗室經 24 小時培養得到的 B0091 乳酸菌活菌數為  $2.93 \times 10^9$  cfu/mL。經委託國內廠商金穎生技公司進行 50 L 發酵槽代工生產，發酵終點之菌數為  $2.2 \times 10^9$  cfu/mL，二者之間無明顯差異。

## 七、參考文獻

1. 戚祖沅、宋承歡、鄭維智、許朝凱、馮潤蘭、蔡淑貞。九十九年台灣地區食品中毒案件分析食品藥物研究年報。2011。2：83-89。
2. 戚祖沅、郭家維、鄭維智。100 年度台灣地區食品中毒案件分析食品藥物研究年報。2012。3：138-144。
3. 戚祖沅、張芳瑜、陳清美、鄭維智。101 年度台灣地區食品中毒案件分析食品藥物研究年報。2013。4：16-22。
4. 廖啓成。乳酸菌之分類及應用。乳酸菌專輯：廖啓成、朱文深、楊媛絢編。新竹市：財團法人食品工業發展研究所。2000。pp 3-21。
5. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3:777-788.
6. Wang SC, Chang CK, Chan SC, Shieh JS, Chiu CK, Duh PD. Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol. *Asian Pac. J. Trop.*



*Biomed.* 2014; 4: 523-528.

7. Chang CK, Wang SC, Chiu CK, Chen SY, Chen ZT, Duh PD. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015; 5: 281-286.

8. 行政院衛生福利部食品藥物管理署。台灣地區歷年食品中毒資料。

<http://www.fda.gov.tw/TC/site.aspx?sid=1816> (歷年食品中毒資料)。

9. 楊媛綸。*Lactobacillus acidophilus*之降膽固醇及抗癌性。乳酸菌專輯：廖啓成、朱文深、楊媛綸編。新竹市：財團法人食品工業發展研究所。2000。pp 67-75。

10. Hose H, Sozzi T. Probiotics, fact or fiction. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1991;51:540-544.

11. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 2003;82:640-647.

12. Chiu HH, Tsai CC, Hsieh HY, Tsen HY. Screening from pickled vegetables the potential probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. *J. Appl. Microbiol.* 2008;104: 605-612.

13. Lin CK, Tsai HC, Lin PP, Tsen HY, Tsai CC. *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe* 2008; 14(5): 251-255.

14. Hayek SA, Ibrahim SA. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences* 2013; 4: 73-87.

#### 捌、附錄(前補助案之論文或專利成果報告)

Chang CK, Wang SC, Chiu CK, Chen SY, Chen ZT, Duh PD. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2015; 5: 281-286.

*J. Trop. Biomed.* 2015; 5: 281-286.

