

植物性來源乳酸菌之篩選、特性及應用於乳製品方面之研究 (I) 植物性來源乳酸菌之篩選及一般特性之探討⁽¹⁾

黃建榕^{(2) (3)} 涂榮珍⁽²⁾

收件日期：93 年 11 月 11 日；接受日期：94 年 4 月 25 日

摘 要

本研究之目的在於從本土植物性發酵產品中篩選具有優良特性的植物性來源乳酸菌，以期未來提供產業界參考利用。本研究從發酵小麥草及牧草中，進行植物性來源乳酸菌之篩選作業，以 API 50 CHL 套組來鑑定菌株種類，目前已確認二株為 *Lactobacillus brevis* (L-1) 及 *Lactobacillus pentosus* (L-2)。一般特性試驗證實二株皆為革蘭氏陽性桿菌，其最適生長溫度分別為 30 及 37℃，菌株皆能在含 6.5%NaCl 之培養液中生長，耐鹽性方面，L-2 株優於 L-1 株。以 API ZYM 套組來測定菌株酵素活性，二株皆具較弱活性之糖解酵素及蛋白質水解酵素，但均不具有 β - glucuronidase 活性。

關鍵詞：植物性來源乳酸菌、篩選、應用、特性。

緒 言

近年，因能改善腸內菌叢，對於人體健康有顯著幫助之乳酸菌生菌食品或製劑被視為生物技術中之原生保健性菌種與益菌助生質之一環而倍受重視（光岡，1984）。一般此類食品之主要機能為改善腸內菌叢平衡、防止下痢及改善便秘、降低血液膽固醇含量以及提高、活化人體免疫系統等（Fuller, 1995）。目前，乳酸菌因其棲息環境之不同而可分為（1）使用於酸酪乳、乳酸菌飲料及乾酪等畜產加工品之動物性來源乳酸菌（2）生長於人及動物腸內之腸內乳酸菌及（3）使用於植物性加工品如豆乳、酒粕等之植物性來源乳酸菌等三大類（熊谷等，2000；2001）。而上述之乳酸菌生菌食品或製劑目前大多採用動物性來源乳酸菌或腸內乳酸菌來研製（廣田，1990；光岡，1984）。有關植物性來源乳酸菌的特性及其機能性的研究到目前為止仍屬少數。由於乳酸菌會因菌株、菌種及來源之不同，其所具有之機能性及胺基酸酶之種類、活性會有所差異（上野川，1981），因此植物性來

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1282 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(3) 通訊作者，E-mail: cjhuang@mail.tlri.gov.tw

源乳酸菌所具有之機能性及其應用於畜產品、食品方面之附加價值是可以寄予莫大之期待。目前對於植物性來源乳酸菌之探討的範圍大致僅限於植物性來源乳酸菌之抗變異特性、對排便次數之影響以及對胃液、腸液之耐性等（熊谷等，2000；2001；瀨野等，2000），對於其他應用（如機能性食品之研製等）及機能特性之探討則尚付闕如。鑑此，為了研發多樣化機能性乳製品，本研究於第一年度擬從本土植物性發酵食品如酸醃菜、醃漬蔬菜或發酵豆類、牧草中篩選出具有優良特性的植物性來源乳酸菌，並在第二年度進行各項機能特性（如抑菌性、耐酸、耐膽鹽性等）之探討以及在第三年度進行產品之研製、應用及其機能成分之萃取、精製，期能提供國內乳業界及食品界未來應用於多樣化機能性食品研製時之參考。

材料與方法

I. 乳酸菌之分離

從植物性發酵產品如發酵牧草及小麥草等秤取 10 g 攪碎均質後，在有氧及厭氧的條件下稀釋成適當之倍數後（結城等，1999），於非選擇性培養基 BL 或選擇性培養基 BS 上塗抹（光岡，1990），並分別置於一般培養箱（IC 43；Yamato，日本）及厭氧培養箱（F 1025 型；Forma，美國）內培養。將生育於培養基上的菌落分離後，再作進一步的連續培養及純化。再將純化後之菌株移至 MRS 培養液中，於 37℃ 培養 48 h 後，保存於 4℃，每兩週活化一次，以供鑑定。

II. 乳酸菌之鑑定及特性

純化後之乳酸菌株，依據光岡（1990）、Hardie（1986）及 Kandler and Weiss（1986）所述之分類標準進行鑑定。

檢驗項目包括：

- (i) 菌體形態之觀察，以革蘭氏染色法將菌株染色後，以電子顯微鏡（Type 108；Nikon，日本）觀察並照相做為篩選依據。
- (ii) 發酵型式：於 MRS 培養液中培養，觀察是否有氣體產生來判斷為同質或異質發酵。
- (iii) 生長適溫：將菌液培養於 10℃ 或 45℃，視其是否生長。
- (iv) 觸酶反應：取一白金耳菌塗抹於載玻片上，加 3% 過氧化氫 1-2 滴於菌體上，迅速冒泡者，為陽性反應。
- (v) 醣發酵性狀測試：採用 API 50 CHL 套組，進行 49 種不同醣類之發酵測試，於 37℃ 培養，並分別於 24 及 48 小時判讀。
- (vi) 酵素活性測試：採用 API ZYM 套組，測試菌株 19 種酵素活性，並依其呈色深淺分為五級，顏色越深則其酵素活性越高。
- (vii) 耐鹽性：將菌株培養於 MRS 培養基（內含 6.5% NaCl）中，於 37℃ 培養 48 h，觀察其生長情況。

結果與討論

本研究從數批發酵牧草及小麥草中，進行乳酸菌株之篩選作業。秤取一定量之材料，以攪碎機攪碎均質後，先移至 BL 或 BS 培養基上培養，再將分離後之菌落移至 MRS 培養基培養後，以 API 50 CHL 微生物鑑定套組進行菌株 49 種不同醣類之發酵測試。前幾批材料所篩選之微生物經 API 細

Fig. 1. API 50 CHL pattern of L-1 (left) and L-2 (right) strains.

表1顯示L-1株能利用glucose、galactose、fructose及mannose等單醣類及蔗糖，但卻無法利用lactose，這可能與其源自植物性發酵產品之特性有關，對於醣醇類如inositol、sorbitol及mannitol等也無法有效加以利用。L-2株（表2）同樣也能有效地利用galactose、glucose等單醣類及蔗糖，而其與L-1株不同之處在於其能有效利用lactose及部份醣醇類如mannitol及sorbitol，且能利用raffinose，這個特性可應用於發酵豆乳產品之製造上（荒等，2002）。而此二株菌均能利用胺基醣—N-acetylglucosamine。荒等（2002）之研究報告顯示，源自於植物性產品的乳酸菌可能具有masking（隱蔽的）功能，對於產品的呈味性，具有改善之效果，而其機能性主成分可能與其反應中生合成之新型醣分子有關。

Table 1. Utilization of carbon source of L-1 strain in API 50 CHL test

[illegible]

表 2. L-2 菌株於 API 50 CHL 鑑定試驗中之碳源利用情形

Table 2. Utilization of carbon source of L-2 strain in API 50 CHL test profile :

0	-	GLY	-	ERY	-	DARA	-	LARA	+	RIB	+	DXYL	+	LXYL	-	ADO	-	MDX	-	GAL	+
GLU	+	FRU	+	MNE	+	SBE	-	RHA	-	DUL	-	INO	-	MAN	+	SOR	+	MDM	-	MDG	-
NAG	+	AMY	+	ARB	+	ESC	+	SAL	+	CEL	+	MAL	+	LAC	+	MEL	+	SAC	+	TRE	+
INU	-	MLZ	+	RAF	+	AMD	-	GLYG	-	XLT	-	GEN	+	TUR	+	LYX	-	TAG	-	DFUC	-
LFUC	-	DARL	-	LARL	-	GNT	-	2KG	-	SKG	-										

表 3. L-1 與 L-2 菌株之特性

Table 3. Characteristics of L-1 and L-2 strains

Strain	Form	Fermentation type	Temperature of growth (°C)	Reaction of catalase	Gram's stain	Tolerance of 6.5% NaCl
L-1	Rod	Homo	15-45	-	+	±
L-2	Short rod	Homo	15-45	-	+	+

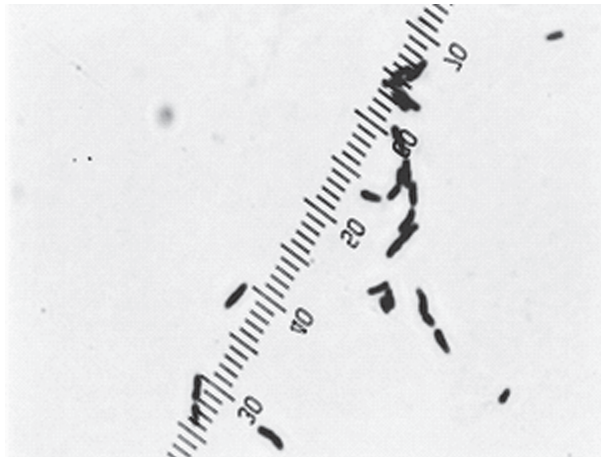


圖 2. L-1 菌株於格蘭氏染色下之電子顯微照片 (× 400)。

Fig. 2. Electronic morphology of L-1 strain by Gram's stain (× 400).

為了更明瞭此二篩選菌株之一般特性，將 L-1 及 L-2 進行菌體形態、格蘭氏染色、發酵型式、觸酶反應及耐鹽性等特性之觀察，所得結果如表 3 所示，L-1 (圖 2) 及 L-2 均為革蘭氏陽性桿菌，發酵型式均為同質型發酵，皆能在含 6.5%NaCl 之培養液中生長，而在耐鹽性方面，L-2 株則優於 L-1 株，生長適溫範圍在 15 ~ 45°C 之間。

為了探討篩選菌株之最適生長溫度，將接種於 MRS 培養液之 L-1 及 L-2 株分別培養於 15、20、25、30、37、42、45 及 50°C 等幾個溫度環境下，經 48 小時後測定波長 660 nm 之吸光度，結果顯示，兩株於 15°C 以下或 45°C 以上皆呈幾近不生長狀態 (圖 3)，而 L-1 株於 30°C 左右生長狀況最佳，而 L-2 株則於 37°C 時生長狀況較佳。

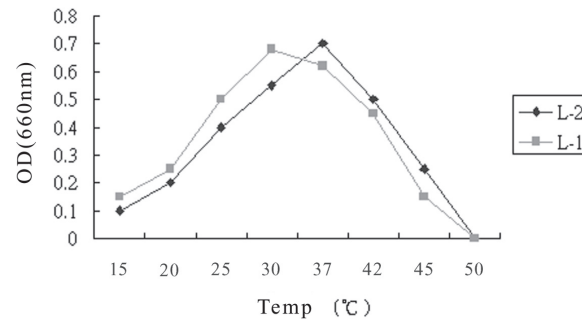


圖 3. L-1 與 L-2 兩菌株以不同培養溫度下於 MRS 液態培養基中之生長情形。

Fig. 3. Growth condition of L-1 and L-2 strains in different temperature of MRS broth.

表 4. L-1 與 L-2 兩菌株於 API ZYM 試驗之酵素活性

Table 4. API ZYM test enzymes activity of L-1 and L-2 strains

No.	Enzyme species	L-1	L-2
1	Control	—	—
2	Alkaline phosphatase	2	—
3	Alkaline phosphatase	—	—
4	Esterase Lipase (C4)	—	4
5	Lipase (C14)	—	5
6	Leucine arylamidase	1	1
7	Valine arylamidase	1	—
8	Cystine arylamidase	1	1
9	Trypsin	—	—
10	α -chymotrypsin	—	—
11	Acid phosphatase	5	2
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3	3
13	α -galactosidase	1	1
14	β -galactosidase	—	4
15	β -glucuronidase	—	—
16	α -glucosidase	1	1
17	β -glucosidase	1	3
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	1	—
19	α -mannosidase	—	1
20	α -fucosidase	1	—

將此二篩選菌株以 API ZYM 套組測其 19 種酵素活性，依反應顏色之深淺，來顯示反應之進行與否。記錄反應結果之讀值，依反應之顏色深淺從 0 - 5 可分為 6 個等級，0 相當於負反應，5 則為最大強度之正反應（Hofstad, 1980）。其結果如表 4 所示。

L-1 株具有較高酵素活性之 acid phosphatase，naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 及 alkaline phosphatase，而在糖解酵素方面，則僅具微弱活性或不具任何活性，這可能與其生活環境有關。而 L-2 株則對 esterase (C4)、esterase lipase (C8) 及某些糖解酵素如 β -galactosidase 及 β -glucosidase 等具有較高之酵素活性。而 L-1 及 L-2 株也皆僅具微弱之 leucine arylamidase 及 cystine arylamidase 等蛋白質水解酵素活性，無法有效地將蛋白質分子完全分解為低分子胜肽類或胺基酸，故其在牛乳中之生長性狀可能不佳（Cheng and Nagasula, 1984），須配合動物性來源乳酸菌組成混合菌元，互補長短（石川等，2003），久米村等（2001）之研究顯示飲用含有植物性來源乳酸菌之發酵乳製品，能有效地增加人體腸內 *Bifidoabcterium* 及 *Lactobacillus* 之菌數，改善腸內菌叢之平衡。而一般源自動物之乳酸桿菌屬，則大多具有較高活性之 Leucine arylamidase，cystine arylamidase 及 β -galactosidase，可將牛乳中之蛋白質及乳糖分子分解成低分子胜肽類、胺基酸、葡萄糖或生合成機能性寡醣類，以供菌株之生長利用，不過類似此種特性會因菌株、菌種的不同而會有所差異（上野川，1981）。另外，L-1 及 L-2 株皆不具有 β -glucuronidase 活性，Nanno *et al.* (1986) 指出此酵素有可能與致癌物質之產生有所關聯。

結論與建議

本研究已初步篩選二株源自植物之乳酸菌株 — *Lactobacillus brevis* 及 *Lactobacillus pentosus*，未來將繼續推行有關其機能特性之探討。此外，在本研究進行期間，有些篩選之菌株以 API 50 CHL 套組鑑定結果，其鑑定百分比 (ID%) 及典型指數 (Tindex) 均達高標準，而判讀結果卻為 Doubtful profile (可疑的樣式)，亦即不典型的鑑定結果，其原因可能緣於所篩選之菌株屬於少見的生化型或 API 菌種資料庫未登錄之菌種，往後可能需配合傳統生化測試，才能確認結果。

致 謝

本研究承蒙行政院農業委員會九十二年度農業科技計畫 (92 農科-3.1.3-畜-L1 (16)) 經費補助及本所飼料作物組許福星組長及成游貴博士提供供試樣品，特此致謝。

參考文獻

- 王進琦。2000。食品微生物學，pp.599-617，藝軒圖書出版社，台北，台灣。
- 上野川 修一。1981。蛋白分解酵素によるカゼイソ分解の機構。日畜會報 52 (9)：627-638。
- 久米村 惠、戸羽正道、曾川芳郎、清水精一、川口信三。2001。*Lactobacillus plantarum* を用いて調製した發酵乳の生理機能 I. *Lactobacillus plantarum* の大腸到達性および健康成人の糞便細菌叢に及ぼす影響。腸内細菌學雜誌 15：15-20。
- 石川健一、加藤丈雄、小宮孝志。2003。混合乳酸菌スターターカルチャーを利用した發酵漬物の開發。日本食品工學會誌 50 (9)：411-418。
- 光岡知足。1984。乳酸菌の效用と新しい利用分野。日本食工學會誌 31 (4)：285-296。

- 光岡知足。1990。腸道フロ - ラと健康。New Food Industry 32 (10) : 1-8。
- 荒 勝俊、吉松正、小島みゆき、川合修次、大久保一良。2002。新規乳酸菌を用いた豆乳發酵食品の呈味改善。日本食工學會誌 49 (6) : 377-387。
- 結城功勝、松本一政、高山博夫、諸富正己、田中隆一郎。1999。實驗動物ラット糞便から *Bifidobacterium* の分離同定。腸内細菌學雜誌 12 : 97-102。
- 熊谷武久、瀨野公子、渡邊紀之、岡田早苗。2000。米及び米加工品より分離した植物性乳酸菌の抗變異原性。日本食工學會誌 47 (7) : 551-554。
- 熊谷武久、瀨野公子、川村博幸、渡邊紀之、岡田早苗。2001。植物性乳酸菌の食品發酵と食餌モデル培地における生育。日本食工學會誌 48 (9) : 677-683。
- 廣田哲二。1990。乳業用乳酸菌に期待される保健效果。New Food Industry 32 (10) : 9-17。
- 瀨野公子、熊谷武久、渡邊紀之、岡田早苗。2000。植物性乳酸菌と含む發酵乳の便通に及ぼす影響。日本食工學會誌 47 (7) : 555-559。
- Cheng, c. c. and T. Nagasawa. 1984. Effect of peptides and amino acids produced by *Lactobacillus casei* in milk on the acid production of *bifidobacteria*. Jpn. J. Zootech. Sci. 55 (5) : 339-349.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66 : 365-378.
- Hardie, J. M. 1986. Genus *Streptococcus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2:1043-1071.
- Hofstad, T. 1980. Evaluation of the API ZYM System for identification of *bacteroides* and *Fusobacterium* species. Med. Microbiol. Immunol. 168 : 173-177.
- Kandler, O. N. and D. Weis, 1986. Genus *Lactobacillus*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2: 1209-1234.
- Nanno, M., M. Morotomi, H. Takayama, T. Kuroshima, R. Tanaka and M. Mutai. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo (a) pyrene by β -glucuronidase - positive bacteria in human in faeces. J. Med. Microbiol. 22 : 351-355.

Studies on the screening, characteristics and application of dairy products with plant origin lactic acid bacteria. (I) The screening and characteristics of plant origin lactic acid bacteria⁽¹⁾

Chien-Jung Huang^{(2) (3)} and Rung-Jen Tu⁽²⁾

Received : Nov. 11, 2004 ; Accepted : April 25, 2005

Abstract

The objectives of this study were to screen the lactic acid bacteria from the domestic plant origin fermented foods for the future application to dairy and food industries. Two strains of the bacteria isolated from fermented wheat grass and herbage were screened and identified to be *Lactobacillus brevis* (L-1) and *Lactobacillus pentosus* (L-2) by API 50 CHL kit. General characteristic test revealed that both of the isolated bacteria belonged to Gram positive rods and the optimum growth temperatures were 30 and 37°C, respectively. Both of the isolated bacteria could grow in culture medium which contained 6.5% NaCl, and L-2 strain was superior to L-1 strain in bile-tolerance. The enzyme activity evaluated by the API ZYM kit indicated that both of the isolated bacteria had lower activity of glycosidase and proteinase, but no activity of β -glucuronidase.

Key words: Plant origin lactic acid bacteria, Screening, Application, Characteristic.

(1) Contribution No.1282 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Products Processing Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: cjhuang@mail.tlri.gov.tw