

本土乳製品之優良乳酸菌篩選及其胞外多醣 體產量比較⁽¹⁾

李純慧⁽²⁾ 郭卿雲⁽³⁾⁽⁴⁾ 李寶珠⁽²⁾

收件日期：94 年 11 月 15 日；接受日期：95 年 2 月 22 日

摘要

從台灣的乳製品中篩選得五株高產量胞外多醣 (Exopolysaccharide, EPS) 乳酸菌，分別鑑定為 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Leuconostoc* spp.、*Lb. rhamnosus*、*Lb. delb. lactis* 和 *Lb. paracasei*。其中以 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* EPS 產量最高，而 *Lb. paracasei* 是首次由台灣乳製品中分離純化之高產量 EPS 乳酸菌，頗具研究及應用價值。5 株菌在 MEPS-2 培養基中生長良好，生菌數及 EPS 產量較高。以試驗配方先以菌粉於 37℃ 發酵 24 小時後，再加入篩選的乳酸菌移置於 10℃ 培養 48 小時，所得 EPS 產量，較培養基同時放入篩選的菌株與菌粉於 37℃ 培養 24 小時，再移置於 10℃ 培養 48 小時者為佳。

關鍵詞：胞外多醣、乳酸菌、發酵乳。

緒言

乳酸菌所產生之胞外多醣 (exopolysaccharide, EPS) 在食品工業的應用近來極受重視，主要原因為乳酸菌屬於公認食品級之安全物質 (generally recognized as safe, GRAS)，且已廣泛地利用在食品工業中做為發酵種菌 (詹，2001)。EPS 可應用於許多不同產品中提供增黏 (viscositying)、穩定 (stabilizing)、乳化 (emulsifying) 及膠化 (gelling) 等特性，並可避免產品出現離水現象 (syneresis) (Grobbe *et al.*, 2000 ; de Vuyst and Degeest, 1999)。消費者喜好的發酵乳應具有好的外觀，如結構完整，緊密、潔白及細緻綿滑的口感，而產品的質地及安定性受原料乳、菌元、添加劑及製造過程等條件影響。一般而言，增進發酵乳品質之方法為增加乳固形物，如脂肪、蛋白質及糖類，或添加膠類、澱粉等以增進其安定性及黏稠度 (盛，2002)。然而隨著現代消費者健康意識抬頭，低脂、低糖及低添加物之天然食品漸受重視。根據研究指出 EPS 可改善傳統發酵乳普遍存在之問題，如低黏度、凝乳易破碎、高乳清析出等 (簡，2000 ; Bouzar *et al.*, 1997 ; Hesan *et al.*, 1996a;

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1312 號。

(2) 國立台南大學自然科學教育研究所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(4) 通訊作者，E-mail: cykuo@mail.tlri.gov.tw。

1996b ; Hugenholtz and Zoon, 2002 ; Toba *et al.*, 1990 ; Wachter-Rodarte *et al.*, 1993), 並可取代發酵乳中使用的人工添加劑 (Hugenholtz and Zoon, 2002 ; Teggtatz and Morris, 1990)。

乳酸菌所生成的胞外多醣除了提供乳製品在加工方面的益處外, 近年來更有研究指出其對人體生理機能也有所助益, 如以產 EPS 乳酸菌所生產的發酵乳, 因其黏度高可延長菌體在腸道內滯留的時間, 因此有助於此類乳酸菌在腸道內的增殖 (Duboc and Mollet, 2001)。此外, 部分黏質乳酸菌被證實具有抑制腫瘤細胞生長的效果 (Gilliland, 1990), 並有活化免疫系統之功能 (郭, 2000 ; Hugenholtz and Zoon, 2002)。

綜觀以上文獻發現, 產 EPS 乳酸菌具有改善乳製品品質、減少人工添加劑量、節省成本及活化免疫力之功效。在國外, 普遍將產黏乳酸菌應用於發酵乳的製造, 且生產技術已臻成熟, 而台灣本土發酵乳市場近年來蓬勃發展, 上市產品除了重視美味外, 還添加多種益生菌以強調其機能性, 目前尚未有強調使用產黏乳酸菌所製造的產品出現, 故本試驗針對此主題詳加研究, 篩選適合台灣本土環境的產黏乳酸菌株, 並以行政院農業委員會畜產試驗所產學合作公司之發酵乳配方, 探討最適發酵條件, 期能找出高產 EPS 的乳酸菌, 未來可應用在發酵乳製造, 開創台灣高 EPS 含量之新式乳製品, 讓消費者也能享受到 EPS 的健康性及機能性。

材料與方法

I. 菌株分離及純化

參照 Simova *et al.* (2002) 方法修飾之。

(i) 乳酸菌

將市面上購得 9 種優酪乳、2 種乳酸菌粉和克弗爾 (kefir) 與 villi 發酵乳 (行政院農業委員會畜產試驗所加工組提供), 以無菌水稀釋至適當倍數, 分別塗布於 MRS 培養基 (Difco Laboratories, Detroit, USA) 及 M17 培養基 (HiMedia Laboratories Limited, India), 置於 37°C 培養 48 小時, 篩選乳酸桿菌及乳酸球菌。

(ii) 酵母菌

將克弗爾與 villi 發酵乳之適當稀釋菌液, 塗布於馬鈴薯葡萄糖培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA, Difco Laboratories, Detroit, USA), 置於 37°C 培養 48 小時, 篩選酵母菌。

(iii) 乳酸菌及酵母菌之純化

挑選不同形態菌落分別培養於 MRS 液態培養基、M17 液態培養基 (HiMedia Laboratories Limited, India) 和馬鈴薯葡萄糖液態培養基 (Potato Dextrose Broth, PDB, HiMedia Laboratories Limited, India), 置於 37°C 培養 24 小時, 重複上述步驟四 ~ 五次, 達純化。

II. 產 EPS 乳酸菌之初篩

參照 Garcia-Caribay and Marshall (1991) 方法修飾之。將經 I. 篩選純化之乳酸菌株, 以及由產學合作公司與屏東科技大學畜產系提供之乳酸菌株, 分別以 MEPS-2 (蒸餾水每 100 ml 中含脫脂乳粉 9 g, Yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0.35 g, Peptone (Difco Laboratories, Detroit, USA) 0.35 g 和 Lactose (NACALAI TESQUE, INC. KYOTO, JAPAN) 5 g) 及 pH 4.6 或 pH 6.2 去蛋白乳清培養基 (以下簡稱 WHEY; 將生乳離心去除脂肪, 以 1N HCl 溶液將 pH 值調至 4.6, 經離心回收上清液即乳清, 使用 1N NaOH 溶液將乳清 pH 值分別調至 6.2 與 4.6, 於 100°C 加熱 30 分鐘, 再次離心去除乳清蛋白沉澱物, 取其上清液即得去蛋白乳清, 加 0.5% peptone 和 0.3% 酵母萃 (Yeast extract), 經高溫高壓殺菌後即得去蛋白乳清培養基。) 將純化之乳酸菌以 25 或 37°C 培養

24 小時，以目測方式觀察培養基質的凝乳狀態並觀察其基質黏絲性，將培養基搖晃而組織易碎者淘汰，挑選出組織基質延展性佳不易破碎，即凝乳狀態及黏絲性較佳之初篩菌株進行接續試驗。

III. EPS 高產量菌株之再篩

參照 Garcia-Caribay and Marshall (1991) 方法修飾之。分別取初篩乳酸菌液 1 ml 接種於 MEPS-2 及 pH4.6 和 pH6.2 去蛋白乳清等三種培養基各 20 ml，置於 15 或 30℃ 培養 24 小時，得待測試樣，進行 EPS 含量檢測，以篩選出高產粘菌株。

取待測試樣，加入三氯醋酸 (TCA)，比例 83:17 (v/v)，於 4℃ 以 $16000 \times g$ ，30 分鐘離心（超高速離心機；日立牌 CR-20B2 型），取上清液濃縮 5 倍（真空迴旋濃縮器；YAMATO RE 47 型），加入 3 倍體積純乙醇 (99.98% ethanol) 置於 4℃ 儲存，隔夜再以 0℃， $12000 \times g$ ，20 分鐘離心，取沉澱物並以蒸餾水溶解之，以蒸餾水為透析外液，於 4℃ 透析 24 小時（透析膜 Spectrum MWCO 3,500）後凍乾（凍乾機；FTS systems），即得 EPS。選擇 EPS 高產量之菌株，即為再篩高產 EPS 乳酸菌。

IV. 高產 EPS 乳酸菌株應用於發酵乳之生產

將再篩乳酸菌應用於發酵乳之生產，分成前段與後段發酵兩種培養方式，以測試發酵終了之 EPS 產量與生菌數差異性。第一組為前段發酵 (Pre-fermented treatment)：將再篩得之單株菌 (2.0×10^8 cfu/ml) 和產學合作公司菌粉（菌粉含菌數為 1.10×10^{10} cfu/ml）同時置於發酵乳培養基（產學合作公司之配方）37℃ 培養 24 小時後，加入蛋白質分解酵素 (SynbioTech proteinase，產學合作公司提供) 和 30% 砂糖（蔗糖）均勻攪拌，轉置於 10℃ 培養 48 小時，測其 EPS 產量與生菌數。第二組為後段發酵 (Post-fermented treatment)：將菌粉加入發酵乳培養基，以 37℃ 培養 24 小時後，加入蛋白質分解酵素和 30% 砂糖均勻攪拌後，將再篩得之單株菌分別加入，再以 10℃ 培養 48 小時，測其 EPS 產量與生菌數。比較二種發酵方式之結果，使用統計軟體分析其顯著差異。

V. 菌種鑑定方法

參照 Maissin *et al.* (1987)，黃及涂 (2005) 方法行之。所獲得之菌株採用生物梅里埃 (BIOMÉRIEUX) 之 API 20 STREP 與 API 50 CHL 菌種鑑定組合來鑑定經再篩所選出之菌株。

VI. 統計分析

本研究分析之項目皆以二次重複所得之實驗數據使用 ANOVA 進行分析，並以鄧肯多變域顯著性測驗 (Duncan's multiple range significant test) 比較各組間平均値之差異。

結果與討論

I. 菌株分離與純化

市售購得之發酵乳、菌粉及畜產試驗所提供之 kefir 及 villi 發酵乳，經 MRS、M17 及馬鈴薯液態培養基進行菌株之分離及純化步驟，初步篩得 61 株乳酸菌，另由產學合作公司與屏東科技大學提供菌株供本試驗進行研究，共計 91 株，作為後續篩選產 EPS 菌株之用。

II. 產 EPS 乳酸菌株初篩

Grobben *et al.* (2000) 提出乳酸菌可產出 EPS 較多者，於培養後之基質具凝聚性且粘絲性較強，本試驗之 91 株菌株，分別以 MEPS-2、pH4.6-WHEY 及 pH6.2-WHEY 等培養基培養進行初步篩選，得凝聚性及粘絲性較強之乳酸菌共 30 株，分別編號為 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13、S15、S18、S21、S23、S25、S28、S30、Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8 及 Y9，作為進一步篩選優良產 EPS 菌株之用。

III. EPS 高產量乳酸菌株之再篩

經過初篩之 30 株乳酸菌，分別以 MEPS-2、pH 4.6-WHEY 及 pH 6.2-WHEY 等培養基，於 15 或 37℃ 培養，結果如表 1 所示，菌株於 MEPS-2 及 pH 6.2-WHEY 培養基中以 15℃ 培養者，所得 EPS 平均產量較 37℃ 者為高。菌株在 MEPS-2 培養基中 15℃ 培養所得之 EPS 平均產量為 38.40 mg/ml，37℃ 培養者為 16.72 mg/ml。在 pH6.2-WHEY 中 15℃ 培養所得 EPS 平均產量為 28.77 mg/ml，37℃ 培養者為 24.94 mg/ml，與前人研究所提出當培養溫度略低時，乳酸菌細胞壁合成慢，生長速率較慢，因此有較多的代謝物如磷酸異戊二醇 (isoprenoid phosphate) 等供 EPS 的合成，有增加 EPS 生產量之情形；當培養溫度略高時，如 37℃，菌體生長快速，大部分能量與物質被用於菌體的增殖，相對地 EPS 產量較低 (Cerning *et al.*, 1986 ; Gancel and Novel, 1994 ; Grobben *et al.*, 1995)。

比較培養基 pH 值對 EPS 產量之影響時發現，於 pH 4.6-WHEY 中 15℃ 培養時，菌株之 EPS 產量為 19.55 mg/ml，較 37℃ 培養之 25.56 mg/ml 低 (如表 1)，此可能與 EPS 水解酵素最適作用 pH 值為 4.6-5.0，因此 pH 4.6-WHEY 中 EPS 易被分解 (Mozzi *et al.*, 1996)。比較兩種 pH 值之 WHEY 培養基，菌株在 pH 4.6 的 EPS 產量較 pH 6.2 的產量低，主要原因除了 EPS 分解酵素的因素以外，pH6.2 是糖類轉變為 EPS 及生物質量的最佳酸鹼度亦為相關因素之一 (van den Berg *et al.*, 1995)。

比較 3 種培養基—MEPS-2、pH 4.6-WHEY 及 pH 6.2-WHEY 等對菌株 EPS 產量的影響，結果顯示平均產量以 MEPS-2 培養基最佳，pH 6.2-WHEY 次之，而 pH 4.6-WHEY 最差，15℃ 時分別為 38.40 mg/ml，28.77 mg/ml，19.55 mg/ml (如表 2)，推測其原因是培養基所含碳源與氮源不同所致，MEPS-2 培養基中含有乳糖及蛋白質 (配方如材料與方法所示) (Gammar *et al.*, 1997)。

由表 1 可知各菌株之間，可以生產 EPS 的量各相異，與文獻相同 (郭，2000 ; Cerning *et al.*, 1992)。本試驗的各株乳酸菌以 MEPS-2 培養基於 15℃ 培養所得 EPS 產量超過 40.00 mg/ml 者有 15 株，分別為 S2、S6、S7、S8、S9、S15、S18、S20、S21、S23、S30、Y3、Y5、Y6 和 Y8 (如表 1)。表 1 顯示，產黏菌種在 MEPS-2 培養基、低溫、pH 6.2 條件下培養，較有利於 EPS 產量。

IV. 高 EPS 乳酸菌株應用於發酵乳之生產

將 15 株再篩菌株，分別進行前段發酵與後段發酵處理，比較其 EPS 產量 (如表 3)，結果顯示，再篩菌株進行前段發酵處理所得 EPS 平均產量 1.54 mg/ml 較後段發酵處理者 1.75 mg/ml 低，兩者間達顯著差異 ($P < 0.05$) (如表 4)，即發酵乳培養基先以菌粉發酵 24 小時後，再接種本試驗再篩所得之產黏菌株並移置於 10℃ 培養 48 小時，終產品中之 EPS 含量，較直接將產黏菌株接種於發酵乳培養基與菌粉共同進行發酵 72 小時者高。推測菌株於發酵乳中培養 72 小時，已過了菌株的生長穩定期 (stationary phase) 並進入死滅期 (autolysis phase)，致使菌株的 EPS 總產量減少；此外，乳酸菌除了可合成 EPS 外，亦可合成 EPS 的水解酵素，故在生長後期 EPS 生產漸緩時，EPS 的水解酵素的作用趨於明顯 (Marshall and Rawson, 1995)，因而導致發酵乳中之 EPS 含量急遽減少。Mozzi and Rawson (1995) 提出 *Lactococcus bulgaricus* 與 *Streptococcus thermophilus* 於脫脂乳中培養 24 小時所得之 EPS 量較 72 小時者為高，與本試驗結果吻合。

表 1. 30 株乳酸菌各於三種培養基 15 及 37°C 培養之 EPS 產量*

Table 1. The EPS production of 30 strains lactic acid bacteria in three kinds of media at 15°C and 37°C

Strains	MEPS-2		pH 4.6-Whey		pH 6.2-Whey	
	15°C	37°C	15°C	37°C	15°C	37°C
	mg/ml					
S1	30.75± 0.82 ^{l**}	20.11± 1.34 ^f	29.52± 0.21 ^{cd}	27.26± 0.33 ^f	41.87± 0.17 ^a	29.70± 1.66 ^e
S2	46.07± 0.23^{ab}	24.89± 1.01 ^{bc}	17.68± 0.34 ^{gh}	24.64± 0.81 ^{ghi}	37.10± 1.09 ^b	24.40± 1.48 ^h
S3	34.44± 0.40 ⁱ	17.63± 0.84 ^g	0.37± 0.00 ^o	19.37± 0.48 ^{lm}	37.51± 0.33 ^b	38.26± 1.51 ^b
S4	32.11± 0.69 ^j	22.93± 0.22 ^c	26.77± 0.15 ^{de}	17.26± 0.94 ^m	28.84± 0.95 ^e	12.80± 0.32 ^k
S5	36.53± 0.30 ^{gh}	7.05± 0.01 ^l	10.16± 0.99 ⁱ	20.63± 0.13 ^{lm}	24.85± 0.32 ^g	21.90± 0.75 ⁱ
S6	41.56± 0.14^{ef}	19.74± 0.52 ^f	20.09± 0.72 ^{fg}	21.73± 0.13 ^{kl}	33.15± 0.00 ^c	12.97± 0.13 ^k
S7	45.20± 0.89^{bc}	14.45± 0.12 ⁱ	29.24± 0.95 ^{cd}	20.80± 0.16 ^{klm}	21.65± 0.17 ^h	23.61± 0.37 ^h
S8	41.13± 0.14^f	22.49± 0.01 ^{cd}	40.93± 1.36 ^b	18.18± 0.19 ^{lm}	31.69± 0.13 ^d	27.58± 0.15 ^f
S9	45.67± 0.37^{abc}	21.28± 0.12 ^c	19.59± 0.21 ^{fg}	23.56± 0.28 ^{ij}	37.52± 0.69 ^b	36.86± 0.10 ^c
S10	37.29± 0.18 ^g	15.99± 0.19 ^{hi}	15.17± 0.16 ^h	22.39± 0.20 ^{jk}	25.68± 0.03 ^{fg}	37.50± 0.32 ^{bc}
S11	22.89± 0.80 ^{jk}	11.88± 0.08 ^j	26.21± 0.20 ^{de}	27.47± 0.20 ^f	20.22± 0.33 ⁱ	41.14± 0.28 ^a
S12	34.71± 0.00 ⁱ	21.54± 0.16 ^{de}	23.83± 0.41 ^{ef}	24.17± 0.13 ^{hi}	36.51± 0.33 ^b	37.36± 0.14 ^{bc}
S13	35.61± 0.00 ^{hi}	8.68± 0.06 ^k	42.93± 0.28 ^b	25.48± 0.14 ^{gh}	19.50± 0.10 ^j	32.26± 0.35 ^{de}
S15	44.17± 1.11^{cd}	10.50± 0.24 ^k	8.84± 0.25 ^{ij}	51.13± 0.35 ^a	28.72± 0.20 ^e	29.77± 0.13 ^e
S18	40.45± 0.72^f	2.70± 0.05 ^m	27.99± 1.27 ^{cd}	33.90± 2.67 ^d	25.68± 0.14 ^{fg}	33.22± 0.00 ^d
S20	41.90± 0.34^{ef}	3.60± 0.00 ^m	31.62± 0.30 ^c	26.01± 0.44 ^{fg}	26.66± 0.16 ^f	30.01± 0.16 ^e
S21	42.93± 1.19^{de}	20.50± 0.23 ^{ef}	48.55± 0.18 ^a	30.43± 0.33 ^e	21.65± 0.15 ^h	26.73± 0.22 ^g
S23	47.11± 0.31^{ab}	18.60± 0.10 ^g	18.87± 1.10 ^g	25.36± 0.00 ^{gh}	18.96± 0.13 ⁱ	10.95± 0.16 ^l
S25	25.65± 0.75 ^{jk}	25.20± 0.18 ^b	28.25± 0.16 ^{def}	44.01± 1.27 ^b	16.05± 0.23 ^j	11.69± 0.12 ^l
S28	39.04± 0.21 ^{fg}	29.20± 0.16 ^a	7.03± 0.15 ⁱ	39.01± 1.03 ^c	19.98± 0.12 ⁱ	18.92± 0.36 ^j
S30	41.55± 0.61^{bc}	9.30± 0.29 ^{lm}	26.53± 0.28 ^c	42.67± 0.26 ^{bc}	24.34± 0.44 ^g	23.50± 0.12 ^h
Y1	36.00± 0.00 ^{gh}	7.35± 0.03 ^l	15.97± 0.15 ^h	9.95± 0.62 ⁿ	21.55± 0.31 ^{gh}	13.81± 0.14 ^k
Y2	38.43± 0.31 ^{fg}	14.13± 0.19 ⁱ	13.49± 0.12 ^j	9.04± 0.41 ⁿ	41.18± 0.00 ^{ab}	25.04± 0.58 ^g
Y3	45.55± 0.31^{abc}	19.78± 0.12 ^f	15.93± 0.20 ^h	27.43± 0.16 ^{ef}	39.32± 0.18 ^{ab}	31.09± 0.24 ^{cd}
Y4	24.05± 0.00 ^k	23.72± 0.17 ^c	1.87± 0.33 ⁿ	32.31± 0.18 ^d	34.73± 0.11 ^{bc}	21.08± 0.00 ⁱ
Y5	50.40± 0.34^a	20.71± 0.11 ^e	9.79± 0.28 ^{jk}	22.62± 0.34 ^{ij}	30.01± 0.21 ^{ef}	9.67± 0.79 ^l
Y6	45.43± 0.00^{abc}	11.63± 0.16 ^j	4.26± 0.30 ^m	14.53± 0.62 ^{lm}	22.01± 1.17 ^{gh}	5.79± 0.19 ^{lm}
Y7	34.29± 0.00 ^{ij}	11.78± 0.00 ^{ij}	10.63± 0.11 ^j	23.39± 0.30 ^{ij}	40.67± 0.26 ^{ab}	16.65± 0.45 ^{jk}
Y8	51.00± 0.18^a	17.99± 0.12 ^h	8.61± 0.36 ^k	27.69± 0.33 ^{ef}	22.99± 0.13 ^{gh}	41.28± 0.40 ^a
Y9	20.01± 1.07 ^{kl}	20.34± 0.32 ^e	5.74± 0.06 ^l	14.45± 0.32 ^{lm}	32.68± 0.12 ^{cd}	22.75± 0.34 ^h
Mean	38.40± 0.41	16.72± 0.24	19.55± 0.39	25.56± 0.38	28.77± 0.29	24.94± 0.40

* The EPS production of lactic acid bacteria without dialysis treatment.

**a—o Means in the same column with the different superscript differ significantly (P<0.05).

表 2. 30 株乳酸菌各於三種培養基 15 及 37°C 培養之 EPS 平均產量*

Table 2. The EPS average product of 30 kind of lactic acid bacteria cultured in three kinds of media at 15°C and 37°C

Medium	Temperature(°C)	EPS average product (mg/ml)
MEPS-2	15	38.40± 0.41 ^{a**}
	37	16.72± 0.24 ^e
pH 4.6-Whey	15	19.55± 0.39 ^d
	37	25.56± 0.38 ^c
pH 6.2-Whey	15	28.77± 0.29 ^b
	37	24.94± 0.14 ^c

* The EPS production of lactic acid bacteria without dialysis treatment.

** a—d Means with the different superscript differ significantly (P<0.05).

表 3. 15 株乳酸菌以前段發酵處理與後段發酵處理之 EPS 產量

Table 3. The amount of EPS produced by 15 lactic acid bacteria strains under pre-fermented and post-fermented treatment

Lactic acid bacteria		Treatment	
		The EPS production of Pre-fermented	The EPS production of post-fermented
Strain No.		mg/ml	mg/ml
1	S2	1.71± 0.14 ^{bc*}	1.54± 0.13 ^e
2	S6	2.00± 0.30 ^{ab}	2.83± 0.26^a
3	S7	1.67± 0.00 ^{bcd}	1.05± 0.14 ^j
4	S8	1.81± 0.14 ^{abc}	2.06± 0.17 ^{cd}
5	S9	1.53± 0.14 ^{cde}	2.41± 0.11^{ab}
6	S15	1.69± 0.40 ^{bc}	2.28± 0.11^b
7	S18	1.69± 0.00 ^{bc}	1.99± 0.17 ^d
8	S20	2.23± 0.00 ^a	2.13± 0.02 ^c
9	S21	1.17± 0.12 ^c	1.01± 0.00 ^f
10	S23	1.85± 0.13 ^{abc}	2.52± 0.12^{ab}
11	S30	1.23± 0.19 ^{de}	1.20± 0.34 ^{ef}
12	Y3	0.71± 0.13 ^f	1.23± 0.17 ^{ef}
13	Y5	1.49± 0.23 ^{cde}	0.93± 0.13 ^f
14	Y6	1.15± 0.00 ^e	1.25± 0.18 ^{ef}
15	Y8	1.52± 0.16 ^{cde}	2.36± 0.12^b
16	Control	1.20± 0.13 ^{cde}	1.19± 0.16 ^{ef}
Average		1.54± 0.13	1.75± 0.15

*a—f Means in the same column with the different superscript differ significantly (P<0.05).

表 4. 前段發酵與後段發酵處理方法對乳酸菌生產 EPS 平均產量比較

Table 4. Comparison the amount of EPS produced by lactic acid bacteria between pre-fermented and post-fermented treatment

Treatment	EPS average product (mg/ml)	Lactic acid bacteria counts (log CFU/ml)
Pre-fermented	1.54± 0.13 ^{b*}	14.08± 0.15 ^a
Post-fermented	1.75± 0.05 ^a	14.39± 0.16 ^a
Control	1.19± 0.16 ^c	12.37± 0.25 ^b

* a—c Means in the same column with the different superscript differ significantly (P<0.05).

15 株菌株在發酵乳培養基所產出的 EPS 量各有差異（如表 3），經由後段發酵處理篩選出產量最佳的菌株 S6（2.83 mg/ml）、S9（2.41 mg/ml）、S15（2.28 mg/ml）、S23（2.52 mg/ml）及 Y8（2.36 mg/ml）等 5 株。早期 La Riviere *et al.*（1967）由 kefir 分離得之產黏菌株 *Lb. brevis* 其 EPS 產量為 0.4 mg/ml；Yokoi *et al.*（1990）以乳清培養基為基質，*Lb. kefiranofaciens* 所產生之 EPS 產量為 0.27-0.41 mg/ml；三枝等人（1988）進一步將 *Lb. kefiranofaciens* 以 UV 照射以產生變異株，於改良的 MRS 培養液中，可獲得高達 2.5 mg/ml 的 EPS 產量。而本試驗將產黏乳酸菌的 EPS 產量提升至 2.28 - 2.83 mg/ml，已屬乳酸菌之高產 EPS 菌株。其中 Y8 是由本土乳製品中篩選純化，尚未被用作增加乳製品 EPS 含量的材料菌種，預測具有相當的應用潛力。

V. 乳酸菌鑑定之結果

經使用生物梅里埃（BIOMÉRIEUX）之 API 20 STREP 與 API 50 CHL 菌種鑑定組合技術鑑定本試驗所篩選出之乳酸菌，五株高產量 EPS 乳酸菌鑑定結果如下：S23 為 *Lactobacillus delb. lactis*，細胞呈長桿形，無運動性，革蘭氏陽性（如圖 1A），產生左旋性乳酸，生長適溫為 40℃。Y8 為 *Lactobacillus paracasei*，細胞呈桿形，無運動性，革蘭氏陽性（如圖 1B），產生右旋性乳酸及少量左旋性乳酸，為好氣性，生長適溫為 30℃。S6 為 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*，細胞呈桿形，兩端圓形，細胞長可至 10 μm 或呈螺旋狀，無運動性，為革蘭氏陽性菌（如圖 1C），生長適溫為 38-41℃，發育溫度最高可達 53℃，20℃ 以下無法發育，為高生酸菌，能生成大量乳酸，Hess *et al.*（1997）指出，以 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 菌株醱酵的牛乳，因菌株產出的 EPS 可將牛乳蛋白質網狀組織緊密結合，使凝乳質地更加堅固而可減少乳清析出現象。Duboc and Mollet（2001）指出 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 在牛乳中發酵可得之 EPS 產量最高為 2.14 mg/ml，而本試驗中 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 之 EPS 產量可提升至 2.84 mg/ml。S9 為 *Leuconostoc* spp.，細胞呈球形，為革蘭氏陽性菌（如圖 1D），生長適溫為 20-25℃，可將牛乳中檸檬酸代謝生成聯乙醯（diacetyl）及乙醯乙醇（acetoin）等香氣物質。S15 為 *Lactobacillus rhamnosus*，細胞呈桿形，革蘭氏陽性菌（如圖 1E），生長適溫為 37℃，Ruas-Madiedo *et al.*（2002）指出 *L. rhamnosus* RW-9595M 菌株在含有礦物鹽和維生素的培養基中生長可有最高的 EPS 產量。Xanthopoulos *et al.*（2000）指出 *Lb. paracasei* 與 *Lb. rhamnosus* 菌株在低 pH 值的胃液環境下仍有極高的存活率，故將此菌株應用在發酵乳產品中，消費者食用後，菌株可順利通過胃到達腸道作用（林，1997；張，1989；Gamar *et al.*, 1997）。

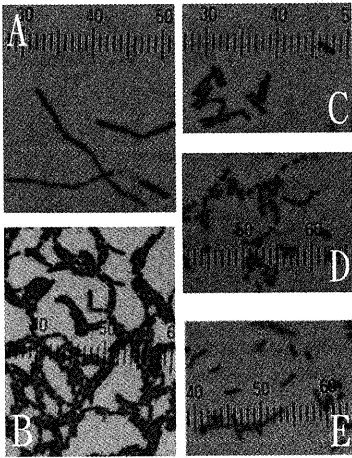


圖 1. 5 株乳酸菌之顯微照相圖 (LM 1000X，刻度一格為 1mm)。

Fig.1. The microphotographs of 5 strains lactic acid bacteria.

註：A、B、C、D 及 E 分別為 *Lactobacillus delb. Lactis* (S23) 為革蘭氏陽性菌，細胞呈長桿形、*Lactobacillus paracasei* (Y8) 為革蘭氏陽性，細胞呈桿形、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (S6) 為革蘭氏陽性菌，細胞呈長或螺旋狀、*Leuconostoc* spp.(S9) 為革蘭氏陽性菌，細胞呈球形及 *Lactobacillus rhamnosus* (S15) 為革蘭氏陽性菌，細胞桿形。

結論

本研究篩選本土性高產量 EPS 乳酸菌株並探討其適當生長條件，以期能增進本土乳製品的品質與其機能性，使產品更具市場競爭力。由收集而得之多種發酵乳製品初篩得 91 株乳酸菌，經由 EPS 生成表現選出 15 株產量較高的菌株應用於產學合作公司發酵乳的製作上，結果發現 EPS 高產量菌株確實可以提升終產品中 EPS 含量，共篩選出 5 株菌分別為 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Leuconostoc* spp.、*Lb. rhamnosus*、*Lb. delb. lactis* 及 *Lb. paracasei*，在後段發酵接種培養可明顯提升產品中 EPS 產量。其中 *Lb. paracasei* 是首次在本土乳製品篩選之高產量 EPS 乳酸菌株，後續值得繼續探討其特性，以應用在發酵乳製品生產上。

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 -L7) 經費補助、產學合作公司生合科技公司提供菌株及發酵乳培養基配方及屏東科技大學畜產系提供菌株，特此致謝。

參考文獻

- 林耕年。1997。食品微生物學附實習法。復文書局，台南市。
- 郭卿雲。2000。克弗爾菌元生長與克弗爾蘭生成之研究。國立台灣大學畜產學研究所博士論文，台北。
- 盛兆盈。2001。產胞外多醣體之乳酸菌對羊乳酸酪乳品質之影響。東海大學畜產系研究所碩士論文，台中。
- 黃建榕、涂榮珍。2005。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。畜產研究 38(2)：145-152。

- 黃建榕、張宇恆、張勝善。2003。高黏質性乳酸菌應用於酸乳酪之研究。畜產研究 36(3)：263-270。
- 張勝善。1989。牛乳與乳製品。長河出版社，台北市，pp. 178-233。
- 詹淑雲。2001。乳酸菌生產胞外黏性物質以及於與魚肉漿乳酸菌發酵食品之探討。國立海洋大學食品科學系碩士論文，台北。
- 簡君祐。2000。篩選產黏乳酸菌以改善酸酪乳品質。東海大學畜產學系碩士論文，台中。
- 三枝隆裕、立花國治、原敏夫、藤尾雄策。1998。ケフィラン產生乳酸菌の分離とケフィランの生産性の向上。生物工學會誌 76(11)：447-450。
- Bouzar, F., J. Cerning and M. Desmazeaud. 1997. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. J. Dairy Sci. 80: 2310-2317.
- Cerning, J., C. Bouillanne, J. M. Desmazeud and M. Landon. 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Lett. 8: 625-260.
- Cerning, J., C. Bouillanne, M. Landon and M. Desmazeud. 1992. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 75: 629-699.
- De Vuyst, L. and B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23: 153-177.
- Duboc, P. and B. Mollet. 2001. Application of exopolysaccharides in the dairy industry. Int. Dairy J. 11: 759-768.
- Garcia-Caribay, M. and V. Marshall. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Appl. Bacteriol. 70: 325-328.
- Gamar, L., K. Blondeau and J. M. Simonet. 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 83: 281-287.
- Gancel, F. and G. Novel. 1994a. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. J. Dairy Sci. 77: 685-688.
- Gancel, F. and G. Novel. 1994b. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. J. Dairy Sci. 77: 689-695.
- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Rev. 87: 175.
- Grobben, G. J., I. C. Boels, J. Sikkema, M. R. Smith and J. A. M. Bont. 2000. Influence of ions on growth and production of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. J. Dairy Res. 67: 131-135.
- Grobben, G. J., J. Sikkema, M. R. Smith and J. A. M. de Bont. 1995. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. J. Appl. Bacteriol. 79: 103-107.
- Hassan, A. N. J., F. Frank, K. A. Schmidt and S. I. Shalabi. 1996a. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. J. Dairy Sci. 79: 2091-2097.
- Hassan, A. N. J., F. Frank, M. A. Farmer, K. A. Schmidt and S. I. Shalabi. 1996b. Formation of yogurt microstructure and three dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. J. Dairy Sci. 78: 2629-2632.
- Hess, S. J., R. F. Roberts and G. R. Ziegler. 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. J. Dairy Sci. 80: 252-263.

- La Rivère, J. W. E., P. Kooiman and K. Schmidt. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. Arch. Microbiol. 59: 269-278.
- Maissin, R., A. Bernard, V. Duquenne, S. Baeten, C. Gerard and J. Decallonne. 1987. Characteristics of a computer-aided procedure for the identification of *Lactobacilli*. Belgian J. Food Chem. Biotechnol. 42: 176-183.
- Marshall, V. M. and H. L. Rawson. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. J. Dairy Res. 62: 621-628.
- Mozzi, F., G. S. De Giori, G. Oliver and G. F. De Valdez. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. Milchwissenschaft 51: 670-673.
- Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholtz and P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 12: 163-171.
- Ruas-Madiedo, P. and P. Zoon. 2003. Effect of exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* strains and temperature on the permeability of skim milk gels. Eng. Aspects. 213: 245-253.
- Simova, E., D. Beshkova, A. Angelov, Ts. Hristozova, G. Frengova and Z. Spasov. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 1-6.
- Teggatz, J. A. and H. A. Morris. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yougurt during shearing. Food Struct. 9: 133-138.
- Toba, T., H. Nakajima, A. Tobitani and S. Adachi. 1990. Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nodic ropy sour milk. Int. J. Food Microbiol. 11: 313-320.
- van den Berg, D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, A. M. Ledebor and C. T. Verrips. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.
- Wacher-Rodarte, C., M. V. Galvan, A. Farres, F. Gallardo, V. M. E. Marshall and M. Garcia-garibay. 1993. Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. J. Dairy Res. 60: 247-254.
- Xanthopoulos, V., L. E. Itopoulou-Tzanetaki and N. Tzanetakis. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiol. 17: 205-215.
- Yokoi, H., T. Watanabe, Y. Fujii, T. Toba and S. Adachi. 1990. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. J. Dairy Sci. 73(7): 1684-1689.

Isolation and culture of high exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from native fermented milk ⁽¹⁾

Chun-Huei Lee ⁽²⁾, Ching-Yun Kuo ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ and Pau-Ju Lee ⁽²⁾

Received : Nov. 15, 2005 ; Accepted : Feb. 22, 2006

Abstract

Five species of high exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria were isolated from local fermented milk and identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Leuconostoc* spp., *L. rhamnosus*, *L. delb. lactis* and *L. paracasei*. The *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* had the highest EPS production assay among the five species bacteria. Above all, *L. paracasei* was the first one isolated from Taiwan milk products. The cultural studies showed that the better microbial counts and EPS products for five species of lactic acid bacteria were obtained from MEPS-2 medium at 15°C. Post-fermented milk culture medium at 37°C for 24 hours followed by one at 10°C for 48 hours and single-strain starter culture had maximum EPS production.

Key words: Exopolysaccharide, Lactic acid bacteria, Fermented milk.

(1) Contribution No.1312 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Graduate Institute of Natural Science Education, National Tainan University.

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

(4) Corresponding author, E-mail: cykuo@mail.tlri.gov.tw