植物來源乳酸菌移除膽固醇能力之探討 (一) [1]

黃建榕[2] 王妙鈴[2] 郭卿雲[2][3]

收件日期：96年12月3日；接受日期：97年4月18日

摘要

從植物性發酵產品如發酵鳳梨醬汁、蘿蔔醬汁、蘿蔔乾、梅子醬汁、小麥草、大白菜泡菜、雜交高粱種子、發酵牧草及綠肥大豆種子等進行乳酸菌之篩選，經純化及初步篩選獲數十株革蘭性陽性球菌、革蘭性陽性鏈球菌、革蘭性陽性桿菌及革蘭性陰性鏈球菌等，經以 RAPID ANA II method 進行純化菌株種類之鑑定，從高粱種子及綠肥大豆種子均鑑定出 *Lactobacillus jensenii*。以 API ZYM 套組來測定菌株酵素活性，除 α-glucosidase 外，二菌株皆具較弱活性之醣解酵素及蛋白質分解酵素，且均不具有 β-glucuronidase 活性。以 *o*-phthalaldehyde method 來探討此二菌株移除膽固醇能力之高低。初步結果得知：此二菌株均具移除膽固醇能力之特性，其中源自高粱種子之菌株 (A-3) 其移除膽固醇能力大於源自綠肥大豆種子之菌株 (B-2)，有關其他特性，目前正作進一步的探討。

關鍵詞：植物性來源乳酸菌、膽固醇移除能力、篩選。

緒言

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、酒粕等之植物性乳酸菌等三大類。而上述之乳酸菌生菌食品或製劑，目前大多採用動物性乳酸菌或腸內乳酸菌來研製。有關植物性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、菌種之不同，其所具有之機能性及胺基酵素之種類、活性會有所差異，因此植物性乳酸菌所具有之機能性是可以寄予期待。

由於心血管疾病是先進國家高死亡率的病因之一，且其發生與高膽固醇血症有重要關聯，因此，降低血清膽固醇已被視為防止心血管疾病發生的重要手段及方法。近年來，有些人體腸內微生物有降低血清膽固醇以及乳酸菌株具有吸附膽固醇能力之事實已廣為世人所熟知 (Gilliland *et al.,* 1985)。Gilliland and Walker (1990) 之研究報告顯示 *Lactobacillus acidophilus* 具有降低人體血清膽固

（1）行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1447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: cykuo@mail.tlri.gov.tw。

醇濃度之能力，Lee *et al.* (2005) 之研究也指出，從乳製品分離出 Lactococcus 屬乳酸菌 (LACC-N7 及 LACC-527) 在防止高膽固醇血症及脂肪肝的發生有顯著效能。在 Hughes and Hoover (1991) 之報告中得知，因具有降低血清膽固醇之效益，致使含有雙叉乳桿菌之發酵乳品銷售量大增。

鑑此，針對國人對健康訴求日益重視，尤其是有關膽固醇過高所引發的高血壓及心血管症狀等疾病，且為了擴大國人對鮮乳相關產品之消費量，本研究擬從所篩選之植物來源乳酸菌中探討其移除膽固醇能力之高低，並應用其來研製機能性酸酪乳製品，期能提供國內乳業界及食品業界之參考。

材料與方法

Ⅰ. 材料

高粱種子、綠肥大豆種子及發酵牧草由本所飼作組提供。小麥草購自台南新化有機食品商店。鳳梨醬汁、蘿蔔醬汁、梅子醬汁、大白菜泡菜、小黃瓜、泡菜及榨菜購自台南新化傳統市場。

Ⅱ. 篩選各種植物性來源之乳酸菌種

從Ⅰ. 之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，於非選擇性培養基 BL (HiMedia Laboratories Limited, India) 或選擇性培養基 BS (HiMedia Laboratories Limited, India) 上塗抹，並分別置於一般培養箱及厭氧培養箱內培養。將生長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 (Difco Laboratories, Detroit, USA) 中，於 37℃ 培養 48 hrs 後，保存於 4℃，每兩週活化一次，以供鑑定。

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 1 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 RAPID ANA Ⅱ 套組 (remel, Lenexa, Kansas, USA)，進行數十種不同醣類之發酵測試，於 37℃ 培養，並於 4 小時後判讀。

(ⅵ) 酵素活性測試：採用 API ZYM 套組 (Biomérieux, France)，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 小時，觀察其生長情況。

Ⅲ. 進行菌株對膽固醇移除能力之探討

參考 Liong and Shah (2005) 及 Rudel and Morris (1973) 之法，以含有膽固醇濃度 (70-100 μg/ml) 之滅菌 MRS-LC broth 來培養所篩選之植物來源乳酸菌，於 37℃ 下，培養 20 小時。培養終了，離心除去菌體，依 Rudel and Morris (1973) 之 *o*-phthalaldehyde method，測定 broth 中膽固醇之濃度。

結果與討論

本研究從數批發酵牧草、高粱種子、綠肥大豆種子、鳳梨醬汁、泡菜、榨菜及小麥草等中，進行植物性來源乳酸菌之篩選作業，並以 RAPID ANA Ⅱ 套組進行菌種之鑑定。由表 1 得知從各種植物性發酵物所篩選出的菌種大多屬於梭菌屬菌種 (*Clostridium* spp.)，一部分屬放線菌屬 (*Actinomyces*) 及真菌屬 (*Eubacterium*) 菌種，唯有從編號 A-3 之高粱種子及編號 B-2 之綠肥大豆種子均各篩選出一株 *Lactobacillus jensenii*。再者，此二菌株對於 *p-Nitrophenyl-n-acetyl-β-D-glucosaminide* 均具有利用性，荒等 (2002) 之研究指出源自植物產品的乳酸菌可能具有 masking 之功能，對於產品之呈味性，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。

表 1. 從植物性發酵物所篩選的微生物菌種

Table 1. The species of microorganisms screened from plant fermented substances

No.	Species	Plant fermented substances
A-1	*Actinomyces meyeri*	Seed of Kaoliang
A-2	*Clostridium botulinum*	Seed of Kaoliang
A-3	*Lactobacillus jensenii*	Seed of Kaoliang
B-2	*Actinomyces odontolyticus*	Seed of soybeans
B-2	*Lactobacillus jensenii*	Seed of soybeans
B-3	*Clostridium hastiforme*	Seed of soybeans
1-1	*Clostridium hastiforme*	Sauce of pineapple
1-2	*Clostridium hastiforme*	Sauce of pineapple
1-5	*Clostridium hastiforme*	Sauce of pineapple
6-2	*Eubacterium aerofaciens*	Wheat grass
6-3	*Clostridium difficle*	Wheat grass
7-1	*Actinomyces meyeri*	Chinese cabbage pickle
a-1	*Clostridium innocuum*	Cucumbers
a-2	*Clostridium innocuum*	Cucumbers
a-5	*Clostridium innocuum*	Cucumbers
b-4	*Clostridium innocuum*	Pickles
c-1	*Eubacterium limosum*	Mustard tuber
c-2	*Eubacterium limosum*	Mustard tuber
c-3	*Clostridium innocuum*	Mustard tuber
c-4	*Clostridium innocuum*	Mustard tuber
c-5	*Clostridium innocuum*	Mustard tuber
5X-1	*Clostridium hastiforme*	Fermented pasture
5X-4	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
10X-1	*Clostridium hastiforme*	Fermented pasture
10X-2	*Clostridium innocuum*	Fermented pasture
10X-3	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
10X-4	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
10X-5	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
10X-6	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
1	*Clostridium difficle*	Fermented pasture
2	*Clostridium botulinum*	Fermented pasture
3	*Clostridium difficle*	Fermented pasture

圖 1 及圖 2 分別為源自高粱種子 (A-3) 及綠肥大豆種子 (B-2) 之微生物使用 RAPID ANA II 系統之鑑定結果。由圖顯示，此二菌株無法有效地利用具有 β-D-galactoside 構造之物質，也就是說對於乳糖之利用性可能不如源自動物性來源或腸道菌叢之乳酸菌株，這可能與其源自植物發酵產品有關。

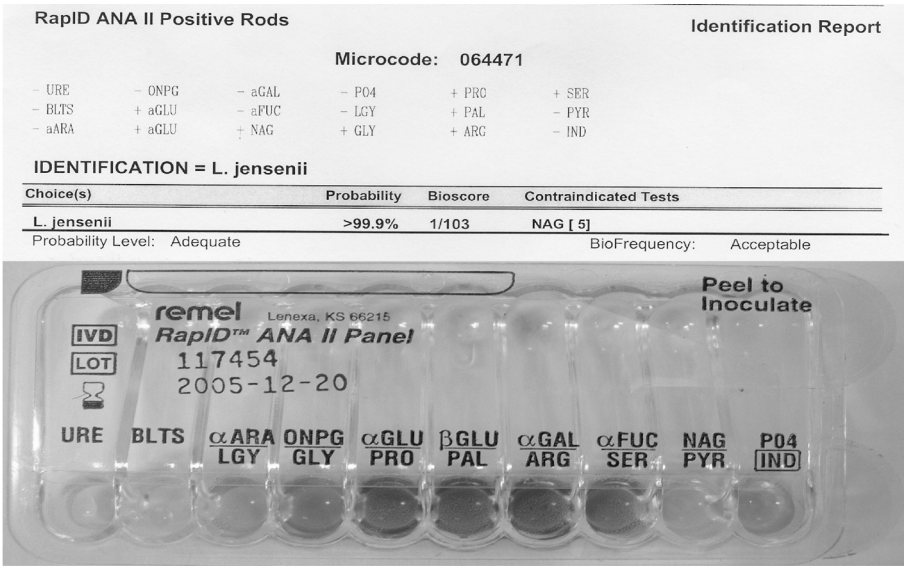

圖 1. 源自高粱種子之乳酸菌株 (A-3) RAPID ANA Ⅱ 之鑑定結果。

Fig. 1. Utilization of carbon source of lactic acid bacterium （A-3）screened from seed of kaoliang by RAPID ANA Ⅱ test.

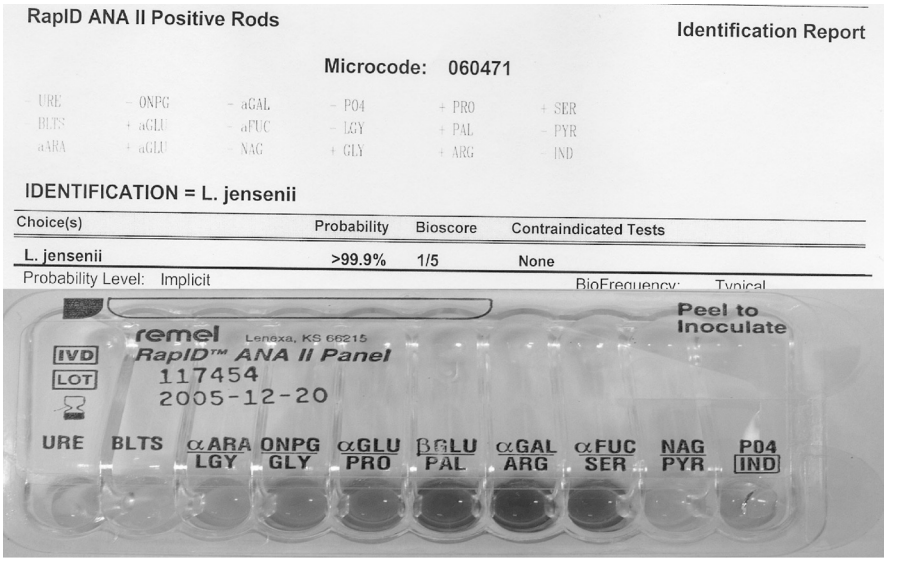

圖 2. 源自綠肥大豆種子之乳酸菌株 (B-2) RAPID ANA Ⅱ 之鑑定結果。

Fig. 2. Utilization of carbon source of lactic acid bacterium （B-2）screened from seed of soybeans by RAPID ANA Ⅱ test.

為了更明瞭此二篩選菌株之酵素活性，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，依反應顏色之深淺從 0-5 可分為 6 個等級，0 相等於負反應，5 則為最大強度之正反應 (Hofstad, 1980)，其結果如表 2 所示。此二菌株均具有較高酵素活性之 Acid phosphatase、N-acetyl-β-glucosaminidase，而在醣解酵素方面，除 α-glucosidase 外，其餘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 α-glucosidase 對於諸如大豆、大麥及馬鈴薯等含有 α-1,4 glucoside 構造的物質則具有水解及生合成機能性寡醣類之功能 (細谷及福場，1984)，對於未來應用於類似豆乳等發酵性產品時，可寄予期待。而此二菌株也皆僅具微弱之 leucine arylamidase 及 cystine arylamidase 等蛋白質水解酵素活性，故可能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，所以其在牛乳中之生長性可能不佳 (Cheng and Nagasawa, 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)。此外，此二菌株皆不具有 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關。

表 2. A-3與B-2菌株於API ZYM試驗之酵素活性

Table 2. API ZYM test enzymes activity of A-3 and B-2 strains

No.	Enzyme	A-3	B-2
1	Control	—	—
2	Alkaline phosphatase	1	—
3	Esterase	—	—
4	Esterase, Lipase	2	—
5	Lipase	—	4
6	Leucine arylamidase	1	2
7	Valine arylamidase	1	—
8	Cystine arylamidase	1	1
9	Trypsin	—	—
10	α-chymotrypsin	—	—
11	Acid phosphatase	4	3
12	Naphthol-As-Bl-phosphohydrolase	2	2
13	α-galactosidase	1	—
14	β-galactosidase	—	—
15	β-glucuronidase	—	—
16	α-glucosidase	2	2
17	β-glucosidase	1	1
18	N-acetyl-β-glucosaminidase	3	2
19	α-mannosidase	—	—
20	α-fucosidase	—	1
A-3	*Lactobacillus jensenii*		
B-2	*Actinomyces odontolyticus*		

以 *o* -phthalalhyde method 來探討植物來源乳酸菌移除膽固醇能力之高低，結果如圖 3 所示，各菌株間膽固醇移除能力有明顯差異，A-3 及 B-2 二株源於植物來源之乳酸菌其移除能力高於 *Streptococcus thermophilus* CCRC 14807 ，且 A-3 高於 B-2。Liong and Shah (2005) 之研究報告指出菌株間膽固醇移除能力之高低，可能與其耐膽鹽性之高低及生菌數目有所關聯。有關其關聯特性，目前正作進一步之探討。

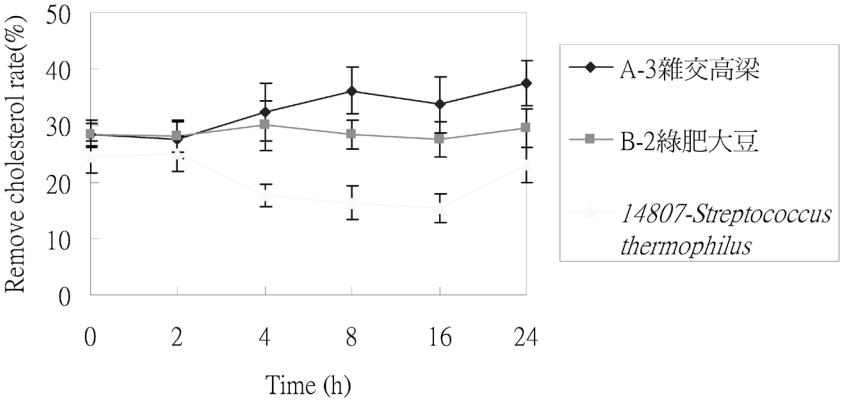

圖 3. 植物來源乳酸菌之膽固醇移除能力。

Fig. 3. The efficiency of cholesterol removal ability by plant origin lactic acid bacteria.

結果與建議

由於市售之植物性發酵產品包裝後大都經過二次殺菌，導致不易自市售產品中篩選到乳酸菌株，往後計劃自製植物性發酵產品 (如泡菜等)，從中篩選符合目的及特性的乳酸菌株，以利實驗作業之進行。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會九十五年度農業科技計畫 (95 農科 -10.1.4- 畜 -L1(5)) 經費補助及本所飼料作物組許福星組長、成游貴博士及許進德提供試樣品，特此致謝。

參考文獻

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。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。日本食品工學會誌 49(6):377-387。

細谷憲政、福場博保。1984。轉移糖と榮養，pp. 32-43，第一出版社，東京，日本。

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.

Hofstad, T. 1980. Evaluation of API ZYM system for indentification of bacteroides and Fusobacterium species. Med. Microbiol. Immunol. 168:173-177.

Gilliland, S. E., C. R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus.* Appl. Environ. Microbiol. 49:377-381.

Gilliland, S. E. and D. K. Walker. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73:905-911.

Hardie, J. M. 1986. Genus Streptococcus. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp.1043-1071.

Hughes, D. B. and D. G. Hoover. 1991. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. Food Technol. 45:74-80.

Kandler, O. N. and D. Weiss. 1986. Genus Lactobacillus. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, pp.1209-1234.

Lee, W. K., H. J. Lim, S. Y. Kim, H. Kimoto, S. Ohmomo, Y. Tashiro and H. Takebe. 2005. Hypocholesterolemic effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527 Strains in SD rats. Biosci. Flora. 24(1):11-16.

Liong, M. T. and N. P. Shah. 2005. Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. Biosci. Flora. 24(1):1-10.

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.

Rudel, L. L. and M. D. Morris. 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. J. Lipid Res. 14:364-366.

Studies on the cholesterol removal ability of plant origin lactic acid bacteria [1]

Chien-Jung Huang[2], Miao-Ling Wang[2] and Ching-Yun Kuo[2][3]

Received : Dec. 3, 2007 ; Accepted : Apr. 18, 2008

Abstract

The aims of this study was to screen plant origin lactic acid bacteria which had the cholesterol removal ability for the future application of yoghurt products to dairy and food industries. Two strains of bacteria isolated from seeds of kaoliang and soybeans were screened and identified to be *Lactobacillus jensenii* by RAPID ANA Ⅱ method. The enzyme activity evaluated by the API ZYM kit indicated that both of the isolated bacteria had lower activity of glycosidase and proteinase except α - glucosidase, but no activity of β - glucuronidase.

Cholesterol assimilation was determined by a difference in cholesterol content in the medium before and after the incubation period by *o*-phthalaldehyde method. The result showed the two strains had the cholesterol removal ability, and the strain of A-3 was higher than that of B-2.

Key words : Plant origin lactic acid bacteria, Cholesterol removal ability, Screening.

（1）Contribution No. 1447 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: cykuo@mail.tlri.gov.tw