

# 乳酸菌之篩選及固定化研究

魏欣儀、王三郎；顏裕鴻

E-mail: 9125199@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以篩選出具特殊功能及安全性之乳酸菌為目的，另外將乳酸菌細胞固定化在擔體上，以增加其利用性。分別由土壤、各種乳酸菌產品以及幼兒唾液中篩選，最後挑選由幼兒唾液中分離出之乳酸菌YQ-101作為研究菌株。由幼兒唾液中篩選出之乳酸菌菌株YQ-101，經食品工業發展研究所菌種保存中心鑑定後確定為*Lactobacillus rhamnosus*；為革蘭氏陽性桿菌，不具運動性，觸反應為陰性，好氧及厭氧環境下均會生長，不產生內孢子。乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus* YQ-101生長之誘導期（Induction Period）約為0~2小時，對數期（Lag Phase）為3~10小時；培養溫度37℃，起始培養基之pH值在7時生長狀況最好。乳酸菌固定化細胞粒子經培養後，固定在幾丁聚醣上之乳酸菌並無生長狀況；固定於海藻酸鈉上之乳酸菌經培養後有生長的狀況，且製作二星期後之固定化菌體，仍然具有生長能力。

關鍵詞：乳酸菌；抗菌；固定化

## 目錄

目錄封面內頁簽名頁授權書 iii	中文摘要 iv	英文摘要 v	誌謝 vi	目錄 vii	圖目錄 xi	表目錄 xiii																																																																											
第一章 緒論 1	第二章 文獻回顧 2	2.1 乳酸菌簡介 2	2.1.1 乳酸菌概論 2	2.1.2 乳酸菌分類 3	2.2 乳酸菌的代謝 5	2.3 乳酸菌之應用 8	2.3.1 於傳統食品上之利用 8	2.3.2 乳酸菌於抗菌上之應用 8	2.4 乳酸菌與人體健康之關係 13	2.5 酵素固定化 14	2.5.1 固定化的方法 16	2.5.1.1 擔體結合法 16	2.5.1.2 架橋聚合法 16	2.5.1.3 膠體包容法 16	2.6 固定化酵素之擔體 19	2.6.1 非可溶解型擔體 19	2.6.2 可逆溶解型擔體 19	2.7 海藻酸鈉 20	2.7.1 背景資料 20	2.7.2 一般特性 20	2.8 高血壓 21	2.8.1 血管張力素轉化抑制劑 21	2.8.2 鈣離子徑路阻斷劑 22	2.8.3 交感神經乙型接受體阻斷劑 22	2.8.4 利尿劑 23	第三章 研究材料與方法 25	3.1 研究設備 25	3.2 研究材料 26	3.3 研究方法 28	3.3.1 篩菌 28	3.3.2 篩選菌株之挑選 28	3.3.3 菌種鑑定 29	3.3.4 菌種性質測定 29	3.3.4.1 生長曲線 29	3.3.4.2 菌體生長酸鹼度試驗 29	3.3.4.3 蛋白質測定 30	3.3.4.4 蛋白質測定 30	3.3.4.5 幾丁質活性之測定 30	3.3.4.6 ACEI活性的測定 31	3.3.5 抗菌試驗 31	3.3.6 細胞固定化 32	3.3.6.1 細胞前處理 32	3.3.6.2 以幾丁聚醣固定化細胞 32	3.3.6.3 以海藻酸鈉固定化細胞 32	3.3.6.4 固定化細胞培養 32	第四章 實驗結果 35	4.1 篩選菌株之活性 35	4.2 鑑定結果 35	4.3 生長曲線 35	4.4 菌體生長酸鹼度試驗 39	4.5 蛋白質測定 39	4.6 酵素活性測定 40	4.7 抗菌測試 40	4.8 固定化 41	第五章 結論 56	參考文獻 58	圖目錄 圖2.1 各種微生物之葡萄糖代謝途徑 7	圖2.2 有機酸抑菌之作用機制 11	圖2.3 乳酸菌產生過氧化氫之機制 12	圖2.4 酵素的各種固定化法 18	圖2.5 高血壓治療藥物之作用位置 24	圖3.1 protein 200 assay kit 34	圖4.1 乳酸菌之生長濃度 36	圖4.2 篩選出乳酸菌之生長曲線 37	圖4.3 乳酸菌YQ-101之生長曲線 38	圖4.4 乳酸菌於不同pH下培養之結果 42	圖4.5 不同pH值起始培養基下pH值之變化 43	圖4.6 以protein 200 assay kit模擬分析之SDS page 44	圖4.7 以SDS page分析之蛋白質圖 45	圖4.8 以protein 200 assay kit分析之蛋白質圖譜A 46	圖4.9 以protein 200 assay kit分析之蛋白質圖譜B 47	圖4.10 以不同pH處理之乳酸菌蛋白質 48	圖4.11 乳酸菌發酵產物之抗菌效果 49	圖4.12 海藻酸鈉固定化顆粒 50	圖4.13 幾丁聚醣冷凍乾燥固定化顆粒 51	圖4.14 海藻酸鈉冷凍乾燥固定化顆粒 52	圖4.15 顯微鏡下海藻酸鈉固定化顆粒 53	圖4.16 顯微鏡下海藻酸鈉冷凍乾燥固定化顆粒 54	表目錄 表2.1 各種發酵食品 10	表2.2 數株原生保健菌種之臨床效益研究 15	表4.1 固定化顆粒培養狀況 55

## 參考文獻

1. 方繼、李根永、李清福、林建谷、林順富、范晉嘉、陳惠英、虞積凱、蔡國珍（1999），現代食品微生物學，偉明圖書有限公司。
2. 王三郎（1991）生物工學入門，藝軒圖書出版社。
3. 王三郎（1997）應用微生物學，高立圖書出版社。
4. 台灣醫學會 <http://formosan.mc.ntu.edu.tw>
5. 李福臨（2000），食品工業，Vol.32 No.8。
6. 乳酸菌 <http://www.ch.com.tw/doc-16B.htm>
7. 高血壓之藥物療法
8. 高血壓的治療 <http://www.csmu.edu.tw/leader/c6.htm>
9. 張坤煌(1993)，食品資訊，1993/2
10. 陳勁初（1991），食品工業，Vol.23 No.9。
11. 陳國群（1966）血管張力轉化抑制劑，合記出版社。
12. 楊媛綸（1998），食品工業，Vol.30 NO.2
13. 廖貞如、江善宗、潘崇良（1999），利用乳酸菌發酵改善魚肉特性，國立海洋大學食品科學系碩士班論文。
14. 廖啟成（1998），食品工業，Vol.30 No.2。
15. 蔡英傑（1998），生物產業，Vol.9 No. 2。
16. 賴永裕（2000），食品資訊，No 178 49-52。
17. An-Lac, N. and Luong, J. H. (1986) Diffusion in k-carrageenan gel beads. *Biotech. Bioeng.*, 28:1261-1267.
18. Axen, R., Heilbronn, E. and Weetall, H. H. (1969) Preparation and properties of cholinesterase covalently bound to Seoharous. *Biochem. Biophys. Acta.*, 191:478-481.
19. Baird-Parker, A. C.(1980). Organic acids. In: *Microbial Ecology of Food* (silliker, J. H., Ed) 126-135 Accademic Press, New York.
20. Castillo, E., Casas, R. L., Quintero, R. and Lopez-Munguia, A. (1991) Design of two immobilized cell catalysts by Entrap-ment on gelatin:internal Diffusion Aspects.

Enzyme Microb. Technol. , 13:127-133. 21. Christiane, F., Christophe D. C., Catherine V., Bernard J. ( 2001 ) Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res. Microbiol. 167—173 22. Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams , 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. , Nov. J. Appl. Bacteriol. 67:453-460. 23. Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70:1-12. 24. Dalvie, S. K. and Baltus, R. E. ( 1992 ) Distribution of immobilized enzymes on porous membranes. Biotech. Bioeng. , 40:1173-1180. 25. Elizabeth Caplice, G. F. Fitzgerald ( 1999 ) , Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation , International Journal of Food Microbiology , Vol. 50 131-149. 26. Fujii, M. and Tsiguchi, M. ( 1991 ) TIBTECHJUNE , 9:191-196 27. Hood, S. K. and E. A. Zottola. 1987. Electron microscopic study of the adherence properties of *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci. 52: 791-794. 28. Kandler, O., Stetter, K. O., and Kohl, R. (1980). *Lactobacillus reuteri* sp. nov. a new species of heterofermentative lactobacilli. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. 1. Abt. Orig. C1, 264-269 29. Lee, Y. K. and Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends in food Sci. Technol. 6(7):241-245. 30. Lilly, M. D. ( 1971 ) Stability of immobilized -galactosidase on prolonged storage. Biotech. and Bioeng. , 13:589-592. 31. Masa-Aki, S. , Yoshihide, K. and Tsuneo, Y. ( 1992 ) Immobilization of yeast cells with cross-linked chitosan beads. J. Ferment. Bioeng. , 74 ( 2 ) :90-94. 32. Stanley, W. L. , Watters, G. G. , Chan, B. G. and Kelly, S. H. ( 1976 ) Immobilization of glucose isomerase on chitin with glutaraldehyde and by simple adsorption. Biotech. and Bioeng. , 18:439-442. 33. Synowiecki, J. , Sihorski, Z. E. and Naczek, M. ( 1981 ) Immobilization of Invertase on krill chitin. Biotech. Bioeng. , 23:231. 34. Tanaka, H. , Matsumura, M. and Veliky, I. A. ( 1984 ) Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads. Biotech. Bioeng. , 26:53-58. 35. Taylor, R. F. ( 1991 ) Protein immobilization fundamental and applications. Marcel Dekker, INC. Hong Kong, :105-133. 36. Tsyn, H. Y. and Tasi, S. Y. ( 1988 ) Comparison of kinetic and factors affecting the stability of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources. J. Ferment Technol. , 66:193.