

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

產細菌素乳酸菌株之篩選與鑑定

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：CN9626

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

計畫主持人：常振鎧

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：食品科技系

中華民國 97 年 2 月 28 日

## 摘要

本研究針對自行分離之乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*) 探討抑制金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的可能性。首先將自行分離之 159 株乳酸菌株以 API 50 CHL 套組進行菌種鑑定，發現所分離之菌株皆為乳酸菌。抑菌試驗結果發現 159 株乳酸菌株對指示菌株具有不同程度的抑制效果。為了排除其他干擾因素造成之影響，本研究進行乳酸、 $H_2O_2$  的排除試驗，篩選出 1 株具有較大抑菌活性之菌株，進一步以分子生物學方式鑑定菌種，鑑定結果為 *Lactobacillus plantarum*。

## 前言

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 (Joerger 2003)。

乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*, LAB) 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。乳酸菌除具有獨特的生理功能外，在生長代謝過程中乳酸菌同時還產生許多拮抗物質，如有機酸、雙乙醯、過氧化氫、羅伊氏素 (Reuterin)、細菌素 (Bacteriocins) 等。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，還可以抑制腐敗菌和病原菌的生長，進而延長食品的保藏期。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降解、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 (Cotter *et al.* 2005)。

細菌素 (Bacteriocins) 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。雖然迄今為止只有乳鏈菌肽 (Nisin) 已經成功商業化應用，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即具有重要意義。

本研究主要是篩選和鑑定具有較廣抑菌範圍之細菌素生產菌株。首先，從乳酸菌的自然生境 (如各種醃漬蔬菜、四川泡菜、東北酸白菜及台灣酸鹹菜、筍乾等) 中篩選乳酸菌。再以牛津杯定量擴散法，從中篩選出具有明顯抑菌活性代謝產物之菌株。在排除各項干擾因素後，篩選離心發酵液對指示菌仍有抑菌活性之菌株。繼而利用現代分析技術與經典分類法進行菌種鑑定。

## 材料與方法

### 一、儀器與材料

#### 1. 分離材料來源

具有良好風味之各種市售乳酸發酵蔬菜樣品，包括四川白菜、東北酸白菜、酸鹹菜、筍乾等乳酸發酵蔬菜。

#### 2. 使用菌株

##### 2.1 參考菌株

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (產 Nisin 之標準菌株)

##### 2.2 指示菌株

*Escherichia coli* ATCC 43886、*Salmonella typhi* BCRC 12948、*Staphylococcus aureus* FR 12653、*Bacillus cereus* ATCC 21778、*Listeria monocytogenes* BCRC 14845、*Saccharomyces cerevisiae* strain K。供作細菌素初步篩選之指示菌株，均來自於本實驗室菌種保存庫。

#### 3. 培養基

##### 3.1 乳酸菌培養基

MRS固體及液體培養基：用於乳酸菌之篩選分離（含0.5%  $\text{CaCO}_3$ ）及一般培養（不加 $\text{CaCO}_3$ ）。

PY及PYG培養基：用於乳酸菌生理生化測試。

##### 3.2 參考菌株培養基

Brain heart infusion agar。

##### 3.3 指示菌培養基

LB固體及液體培養基：用於各種病原菌、腐敗菌之培養。Potato dextrose broth：用於酵母菌之培養。

### 二、試驗方法

#### 1. 乳酸菌的分離、純化及保藏

在無菌條件下，按照10倍稀釋法，對不同種類的新鮮乳酸發酵蔬菜汁依次進行稀釋。吸取稀釋的菌懸液1 mL，預先注入經過滅菌的培養皿中，用滅菌後冷卻至45~50°C的MRS（含0.5%  $\text{CaCO}_3$ ）固體培養基傾倒平板，於30°C條件下培養2~3 d。挑取周圍有透明圈、形狀各異的單一菌落，在MRS平板上反復劃線純化直到得到單一菌落。將其分別轉移至MRS斜面培養基上，做好標記，於4°C條件下保藏。

#### 2. 乳酸菌的初步鑒定

對分離純化所得到菌落分別進行革蘭氏染色、鏡檢、觸酶試驗及乳酸定性試驗。挑選革蘭氏染色陽性、觸酶試驗陰性及乳酸定性試驗陽性的菌落繼續於4°C條件下保藏，棄去不合條件的菌株。

#### 3. 產抑菌活性物質乳酸菌株之初步篩選

(1)發酵上清液的製備：取經過活化的乳酸菌菌株3~5環接種於10 mL滅菌的MRS液體培養基中，30°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，30°C條件下培養48 h後，於4°C，10,000 rpm條件下離心10 min，即得到發酵上清液。

(2) 抑菌試驗：採用牛津杯定量擴散法。從菌種庫將保存之指示菌株 (*Staphylococcus aureus*) 取出活化，接種於50 mL牛肉膏蛋白胨液體培養基內，37°C、120 rpm震盪培養隔夜。取經滅菌的2%瓊脂抑菌活性檢測用培養基加熱融化後，冷卻至45~50°C左右，傾倒入培養皿製成平板。將指示菌培養到指數期，經無菌水系列稀釋至 $10^8$  CFU/mL，製成指示菌懸浮液。取指示菌懸浮液0.1 mL，塗抹於上述平板上，備用。

(3) 抑菌活性測試：將上述平板放置於水平桌面上，在其上間隔放置經滅菌的牛津杯 (6 mm x 10 mm)。分別向各個牛津杯小心滴加200  $\mu$ L的乳酸菌發酵上清液，同時以滴加pH值4.5的乳酸溶液的牛津杯作為對照。蓋上培養皿蓋，平板置室溫下擴散3 h。30°C條件下培養16 h後，取出平板，測量各抑菌圈直徑的大小。觀察抑菌圈大小，同時以參考菌株作為對照，挑選對上述指示菌有較大抑菌圈的相對應的菌落轉接到MRS斜面培養基培養24 h，作為待試菌株。

#### 4. 乳酸菌產抑菌活性物質的確定

採用逐步排除干擾因素的方法：包括中和法排除有機酸、觸酶法排除過氧化氫、胃蛋白酶處理透析液檢測抑菌物質。

(1) 有機酸排除試驗：將乳酸菌液pH調整至2.0，離心取上清液至牛津杯，觀察抑菌活性。

(2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>排除試驗：將乳酸菌液pH調整至2.0，離心取上清液，再調整pH至5.0，加入catalase反應，取200 $\mu$ l至牛津杯，觀察抑菌活性。

(3) pepsin之影響試驗：將乳酸菌液pH調整至2.0，離心取上清液，加入pepsin反應，取200 $\mu$ l至牛津杯，觀察抑菌活性。

#### 5. 乳酸菌的鑒定

##### 5.1 乳酸菌生理生化特性鑒定

利用BioMerieux公司生產的乳酸菌快速鑒定試劑盒API 50鑒定系統，對所篩選的乳酸菌進行鑒定。採用APILAB Plus自動判讀系統 (BioMerieux, S.A., Marcy l'Etoile, France) 對菌株進行鑒定。

##### 5.2 分子生物學鑒定

本研究利用Lane (1991) 發表之16S rDNA primers 27F/1492R進行16S rDNA序列分析。

#### 6. 粗細菌素之純化

本研究依據 Yang *et al.* (1992) 發表之菌體吸附釋放法進行粗細菌素之純化。接種 *Lactobacillus plantarum* 於 MRS broth 中，37°C 培養 18 小時後，經 80°C 加熱 30 分鐘處理。以 1N NOH 調整至 pH 6.0，經 4°C 下緩慢攪拌 4 小時。9,000 rpm、4°C 離心 20 分鐘，沉澱菌體部分，用 0.15 倍體積 0.005 M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) 清洗二次，菌體再以適當的體積 0.1 M NaCl 溶液回溶，並以 1N HCl 調整至 pH 2.0。4°C 下緩慢攪拌隔夜，使菌體表面上之細菌素完全釋放，離心後收集上清液

置於 4°C 下儲存。

## 7. 蛋白質電泳分析

細菌素加入 SDS 緩衝液 (含 0.1% SDS、bromophenol blue 與 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 6.8), 加熱 100°C、5 分鐘, 冷卻後取 10 µL 樣本液以 12.5 % 進行 SDS-PAGE 電泳分析。

## 結果與討論

### 1. 乳酸菌之篩選及鑑定

利用乳酸發酵之蔬菜汁進行乳酸菌的篩選, 以添加 0.5% 的 CaCO<sub>3</sub> 的 MRS 培養基來篩選具有透明圈的菌株。因會產酸的菌株會使 CaCO<sub>3</sub> 溶解而形成透明圈。取周圍有透明圈、形狀各異的單一菌落。利用 API 50CHL 鑑定系統進行上述得到的單一菌落進行生物學特性鑑定, 經由每個試劑不同顏色的變化與檢測菌株對 49 種碳水化合物的利用情況。採用 APILAB Plus 自動判讀系統 (BioMerieux, S.A., Marcy l'Etoile, France) 對菌株進行鑑定。因此共得到 159 株乳酸菌菌株, 將 159 株乳酸菌菌株進一步的細菌素之初步篩選。

### 2. 細菌素產生菌之初步篩選

將 159 株乳酸菌進行細菌素產生菌的初步篩選, 以金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* FR 12653) 作為指示菌株, 可發現在受測菌株周圍會形成大小不一之透明圈 (圖一)。以 *Lactobacillus lactis* BCRC 10791 (Nisin 生產菌) 為標準菌株做對照組。挑選透明圈大者進行干擾因素排除試驗。

經初步篩選後, 菌株編號 13、39、55、126、134 等 5 株五株乳酸菌菌株具有較佳的抑菌效果。因乳酸菌代謝產物中包括有機酸、過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 與細菌素 (bacteriocins) 等均可抑制病原菌的生長。因此必須將有機酸、過氧化氫與 pepsin 酵素等干擾因素排除。最後確認菌株編號 13 號之乳酸菌菌株對指示菌株具有較佳之抑制能力。

### 3. 菌種鑑定結果

將編號 13 號菌株以 API 50 菌種鑑定套組進行菌種鑑定, 初步判定為 *Lactobacillus plantarum*。繼續再以 primer 27F/1492R 進行 16S rDNA 序列分析。經 16S rDNA 序列分析, 結果顯示 13 號菌株與 *Lactobacillus plantarum* 具有 99 % 的核酸相似性 (圖二)。

### 4. 細菌素之純化

因為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。因此, 早期的研究多使用一般蛋白質純化方法, 即硫酸銨分劃法、離子交換層析法、疏水性層析法與逆向高效能液相層析法來進行純化, 但實驗過程耗時且須經多次透析與濃縮, 造成抑菌活性嚴重降低, 因此需選擇新的純化法來純化乳酸菌細菌素。如以酒精、氯仿、雙水相系統、菌體吸附釋放或丙酮沉澱來萃取細菌素並可得到較高產率的產物。

本研究最初亦採行硫酸銨分劃法及離子交換層析法來進行細菌素之純化工

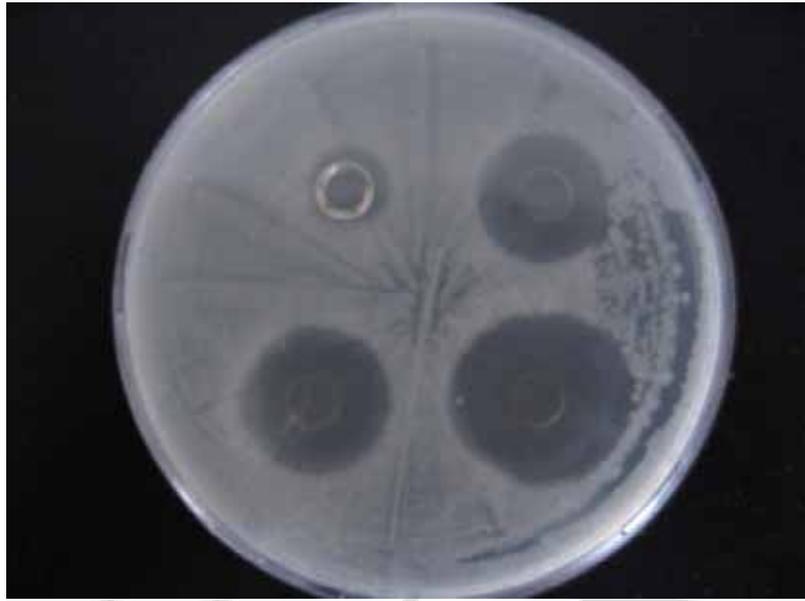
作，但最終之結果頗令人失望，在反覆之透析與濃縮過程之後，幾乎測不到任何抑菌活性。因此後來改採菌體吸附釋放法來進行細菌素之純化工作（表一），雖然本研究細菌素之回收率並不如其他同樣採行吸附釋放法純化之細菌素如 pediocin AcH 等（Carolissen-Mackay *et al.* 1997）。但 SDS-PAGE 的結果顯示，菌體吸附釋放法在純化細菌素方面仍是一簡單有效的方法，可以在短時間內獲得大量之細菌素，且不受多次透析濃縮造成活性嚴重降低之影響。

#### 5. 蛋白質電泳分析結果

將初步純化後之細菌素進行 SDS-PAGE 電泳分析（圖三）。同時，將另一片電泳膠片上細菌素之相對位置切下進行抑菌活性測試，發現 SDS-PAGE 與抑菌活性位置皆在同一位置（圖四），可見有明顯之抑菌圈出現。

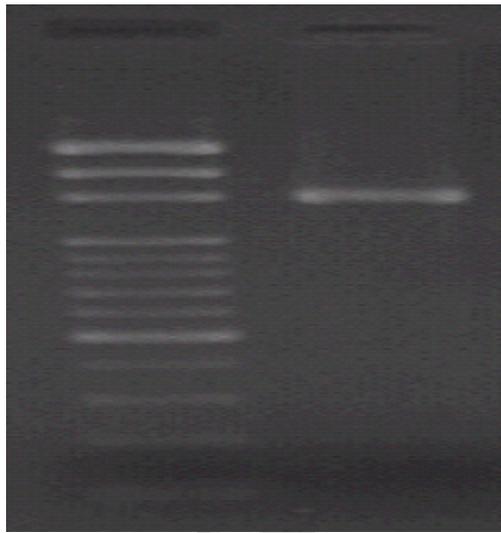
#### 參考文獻

- Carolissen-Mackay V, Arendse G, Hastings JW (1997) Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria : Problema and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 1-16.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.
- Joerger RD (2003) Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 82:640-647.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
- Yang R, Johnson MC, Ray B (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355- 3359.



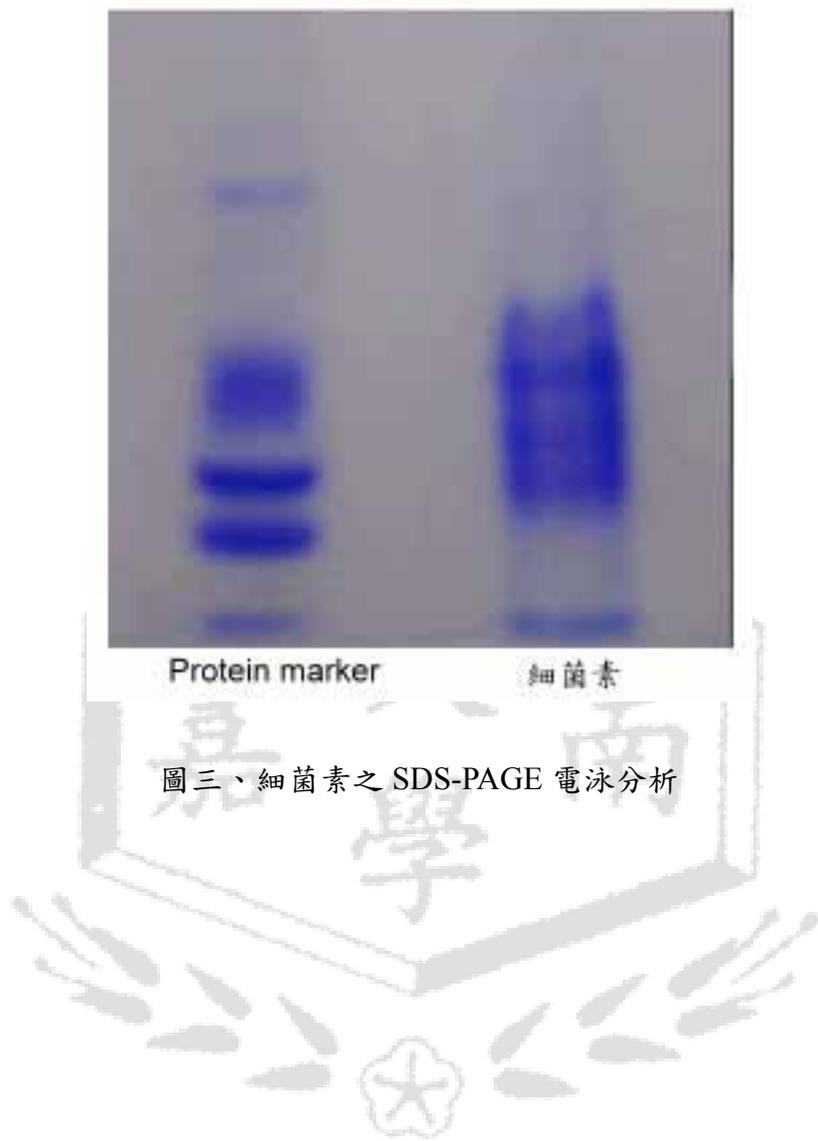
圖一、抑菌活性測試結果





圖二、16S rDNA 電泳分析結果





圖三、細菌素之 SDS-PAGE 電泳分析



圖四、電泳膠片抑菌活性分析



表一、菌體吸附釋放法純化表

	Total protein (mg)	Total activity (AU)	Specific activity (AU/mg)	Recovery (%)
純化前	3324	512000	154	100
純化後	29.9	7680	256.9	1.5

