

# 益生菌之篩選

大同大學 生物工程系  
張效銘 蔡吉齡 顏聰榮

# 乳酸菌之篩選及菌種鑑定方法



# 益生菌篩選流程

## 乳酸菌之篩選及鑑定

耐膽鹽性分析

耐酸性分析

吸附性試驗

抑制腸道  
菌試驗

發酵寡糖分析



blank



Negative  
control



Positive  
control



Isolated  
strain

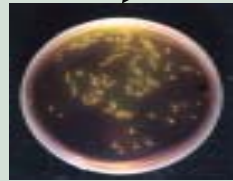
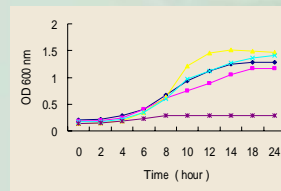
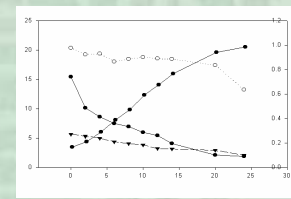


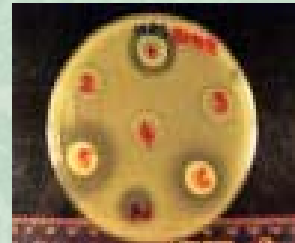
Plate 檢測



生長密度



HPLC 分析



抑制腸道  
害菌生長

# 表、醱酵蔬菜來源與乳酸菌量

Source	Maker	Total plate count (CFU/mL) *	Lactic acid bacterial count (CFU/mL) *
Chinese pickled vegetables	A * *	$3.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$
	B	$2.7 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$
	C	$7.7 \times 10^8$	$1.06 \times 10^8$
	D	$2.7 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
	E	$5.1 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$
Acidified bamboo shoot	I	$4.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$
Acidified vegetables	V	$2.3 \times 10^4$	$6 \times 10^3$

酸菜食品為每mL含有 $10^4$ 個乳酸菌；酸筍食品為每mL含有 $10^3$ 個乳酸菌。根據表三結果顯示泡菜中含乳酸菌量大於酸菜及酸筍食品所含乳酸菌量。

**Table Total plate counts and lactic acid bacterial counts of some animal excrement.**

<b>Source</b>	<b>Kinds</b>	<b>Lactobacilli count (CFU/ml)*</b>	<b>Total plate count (CFU/ml) *</b>
<b>Animal excrement</b>	<b>A</b>	$5.2 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$
	<b>B</b>	$2.6 \times 10^6$	$8.0 \times 10^8$
	<b>C</b>	$8.65 \times 10^5$	$1.12 \times 10^8$
	<b>D</b>	$2.0 \times 10^3$	$1.23 \times 10^9$

\* : Bacterial count of each sample was obtained by average of three test.



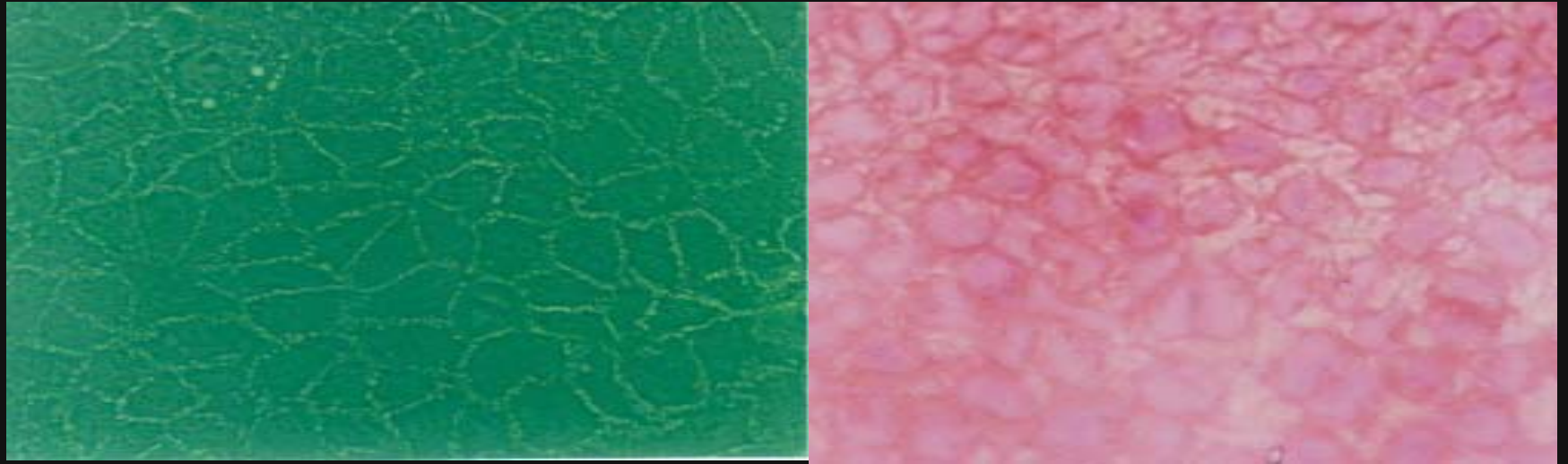
# 吸附性試驗

將培養3週之Caco2-cell細胞以PBS緩衝液清洗，加入DMEM培養30分鐘後，接種測試菌株，於37°C培養1小時，再以PBS緩衝液清洗，加入methanol固定細胞，後以Gram染色，在顯微鏡下觀察。吸附菌量之計算如下：在20個random fields中，若細菌量低於15時，表示非吸附。在20個random fields中，若細菌量介於15-100間，表示有吸附。在20個random fields中，若細菌量大於100時，表示強烈吸附。

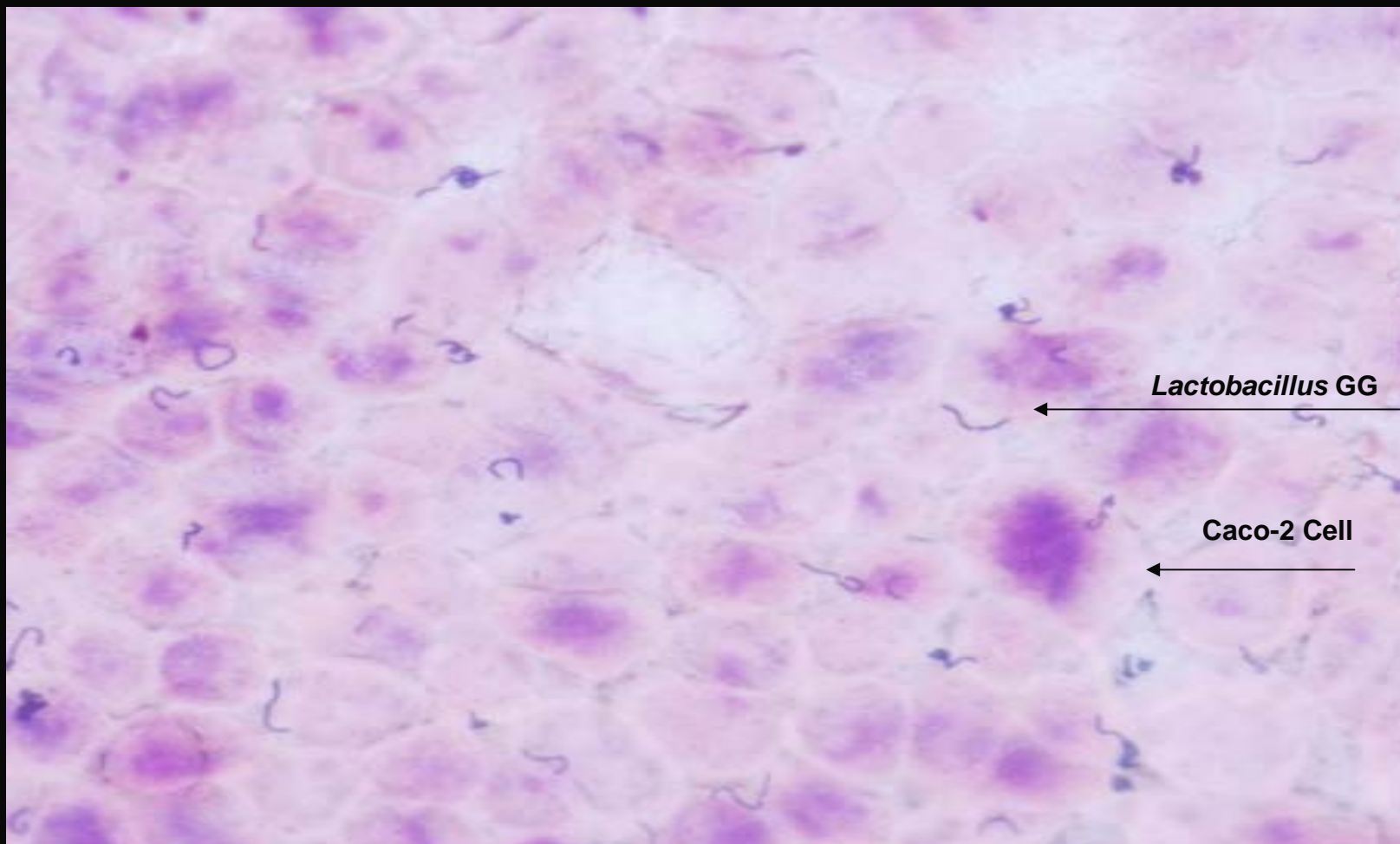


A

B

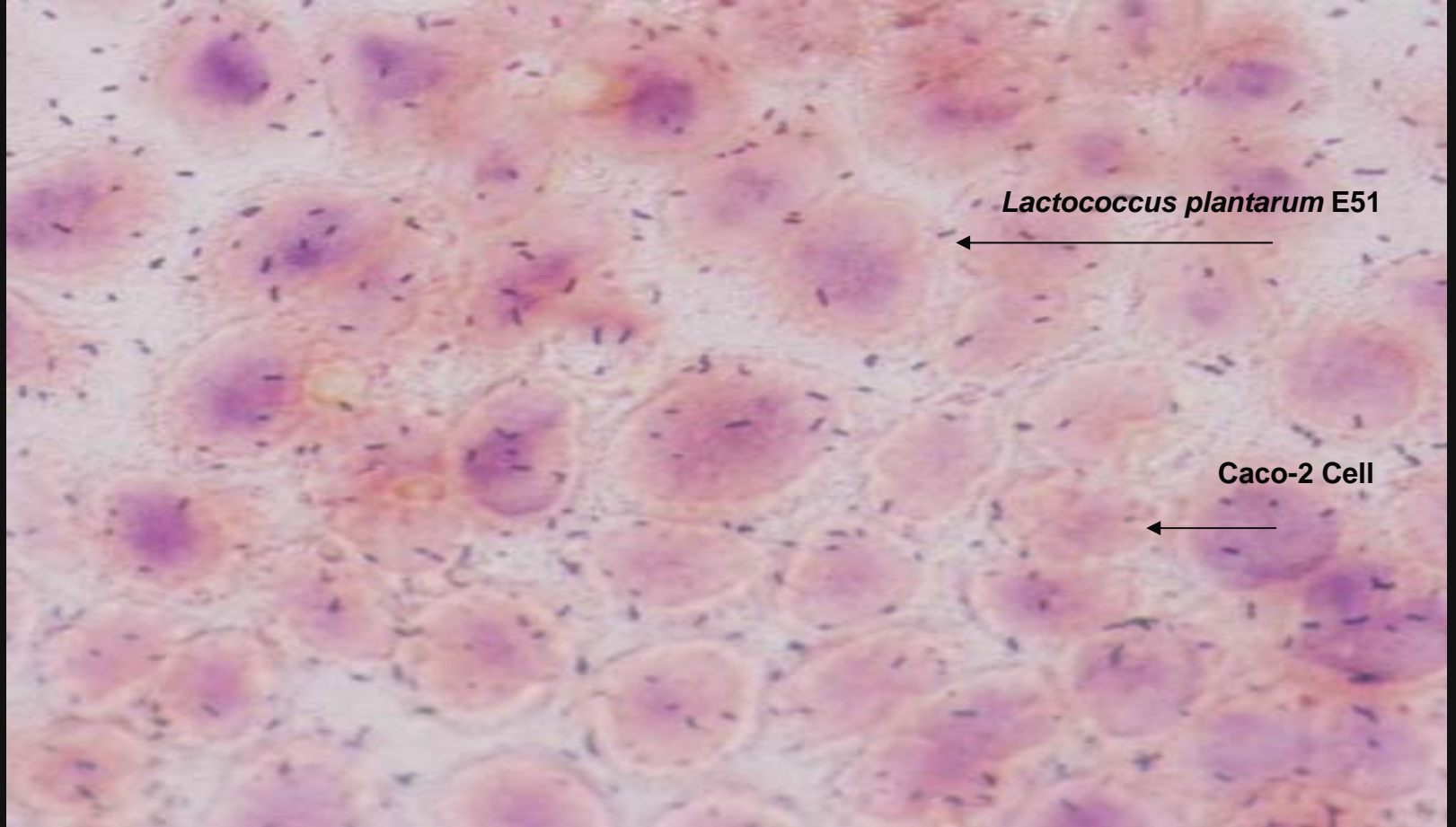


- 圖四、Caco-2細胞株生長型態（A 第七天，B不添加乳酸菌之Caco-2細胞株，以400x倒立顯微鏡觀察）。



■ 圖六、*Lactobacillus* GG附著於Caco-2 細胞株(400x)。





- 圖七、*Lactococcus plantarum* E51附著於Caco-2 細胞株 (400x)。

# 醱酵寡糖特性分析

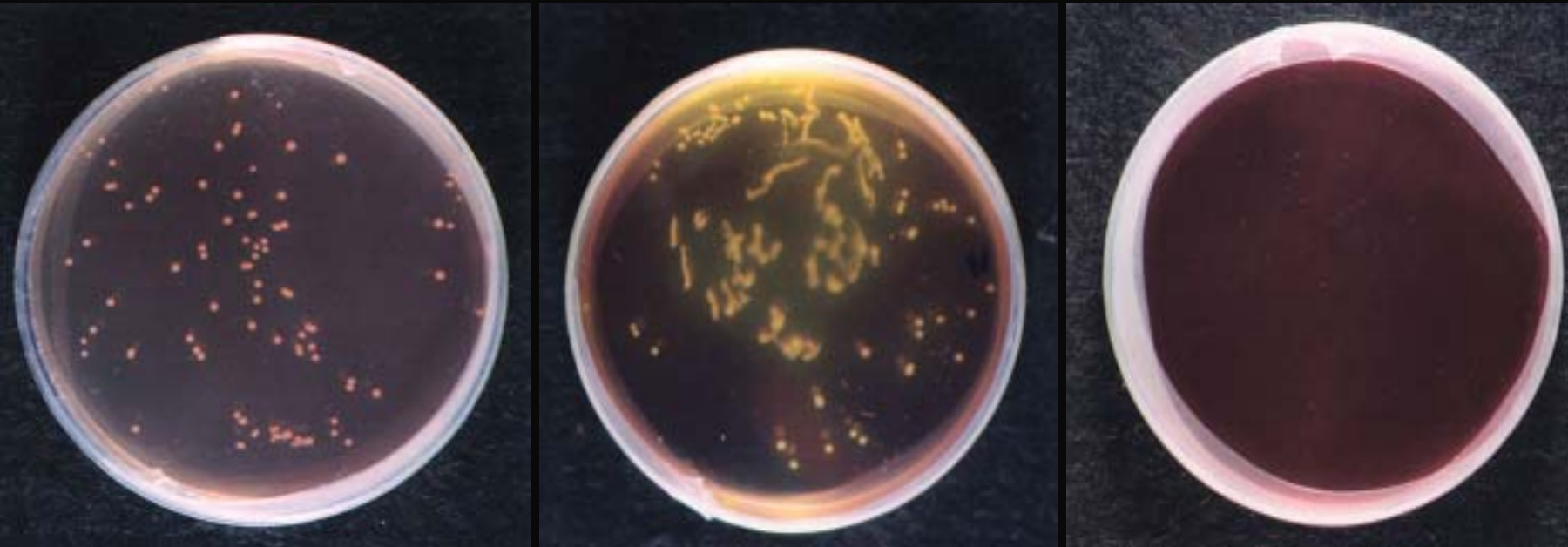
Prebiotics特性之一就是能被腸道菌株所醱酵，寡糖是常見及具功效的prebiotics物質。在此選用果寡糖、異麥芽寡糖、龍膽寡糖等纖維寡糖當作測試的prebiotics物質，探討兼具耐酸性及膽鹽耐受性的33株乳酸菌分離株是否能醱酵寡糖。利用添加寡糖至MRS培養基進行乳酸菌醱酵寡糖試驗。



(A)

(B)

(C)

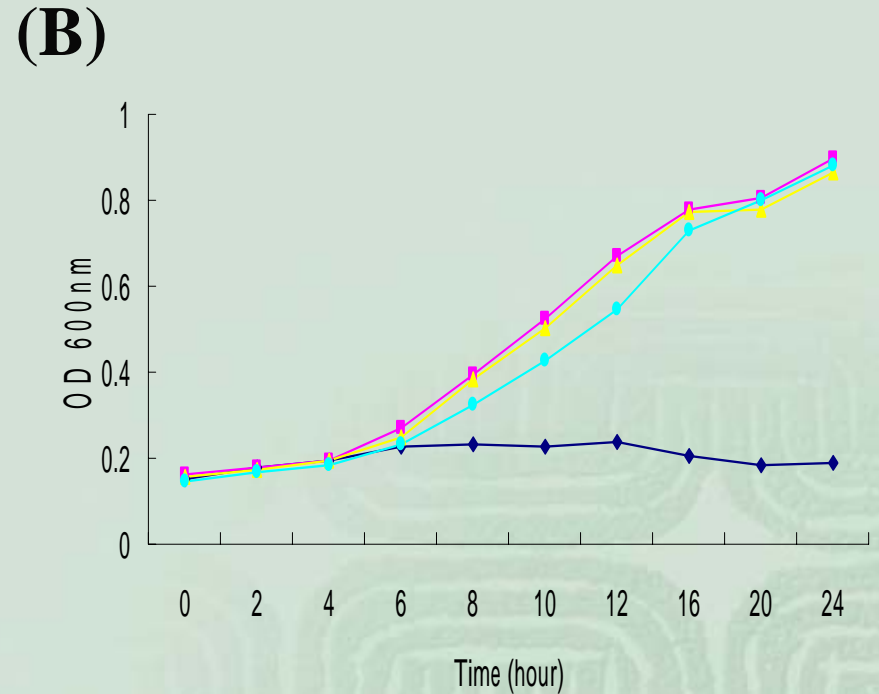
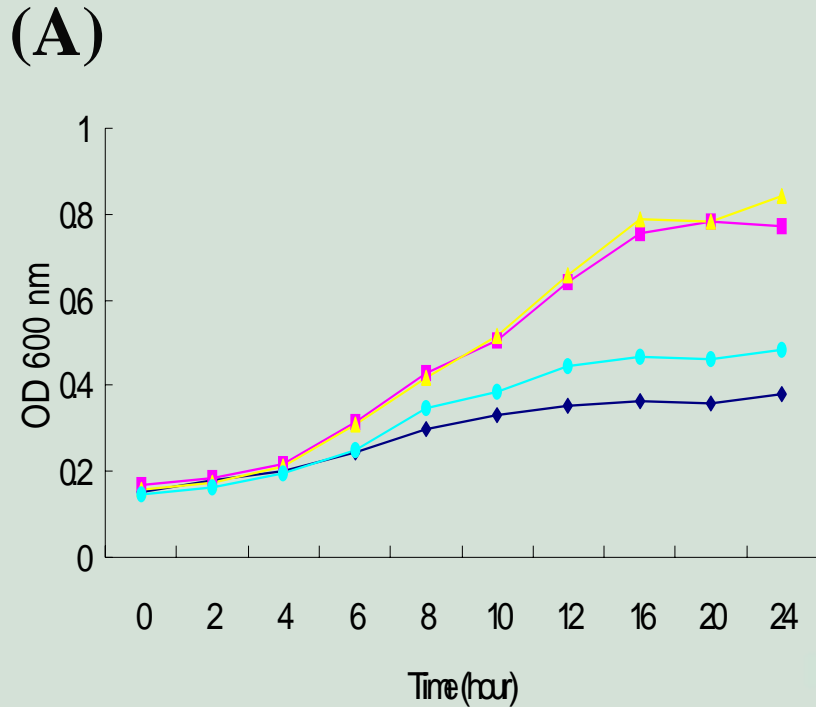


圖八、以含有寡糖之MRS plate進行醱酵寡糖特性分析模式圖。(A) 乳酸菌不醱酵prebiotics物質之負對照組，其在菌落周圍不產生黃色區帶，(B) 乳酸菌可醱酵prebiotics物質之正對組，其在菌落周圍產生黃色區帶，(C) 不添加乳酸菌之prebiotics-MRS plate背景顏色。

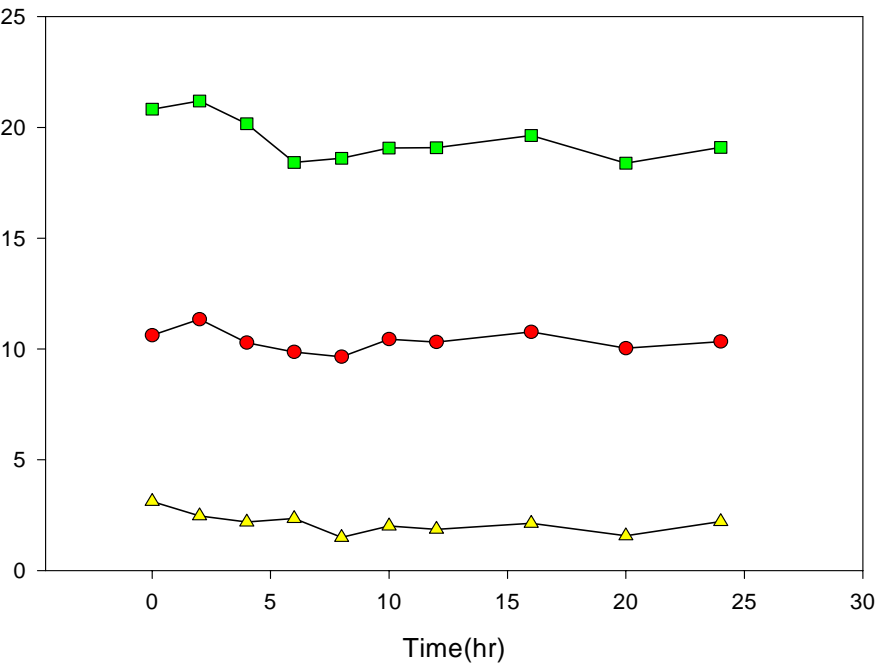
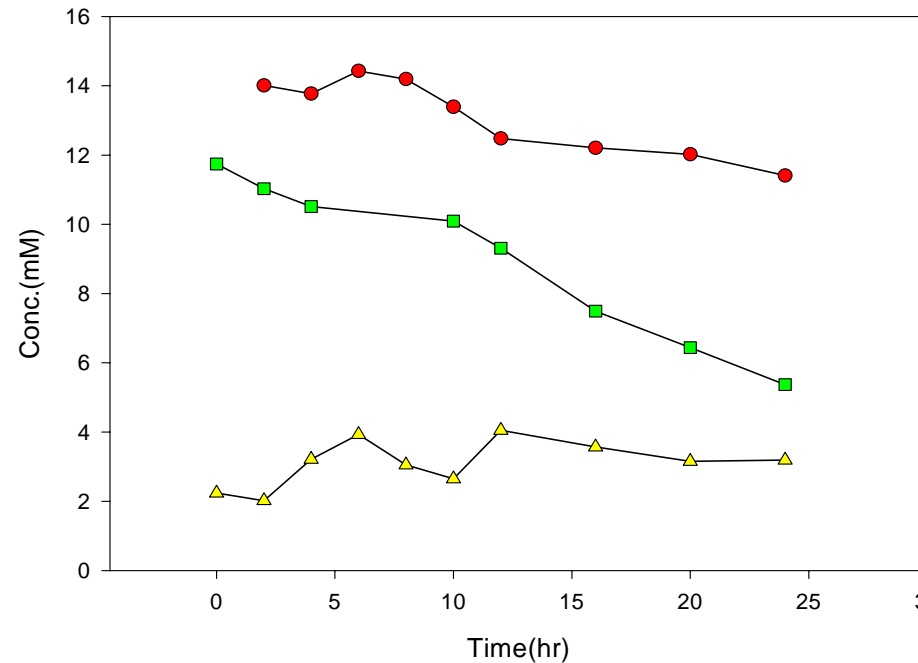
# 表、乳酸菌分離株之醱酵一些寡糖之分析

Strain No.	Oligosaccharides		
	FOS	IMOS	GOS
E55	+	+	+
E47	-	+	+
V12	-	+	+
E53	-	+	+
E30	+	+	+
E51	-	+	+
E38	-	+	+

- 33株乳酸菌分離株在醱酵果寡糖能力上較低，只有9個乳酸菌菌落可醱酵果寡糖，另24個乳酸菌無法醱酵果寡糖。在醱酵異麥芽寡糖及龍膽寡糖能力上較佳，33株乳酸菌分離株均能醱酵

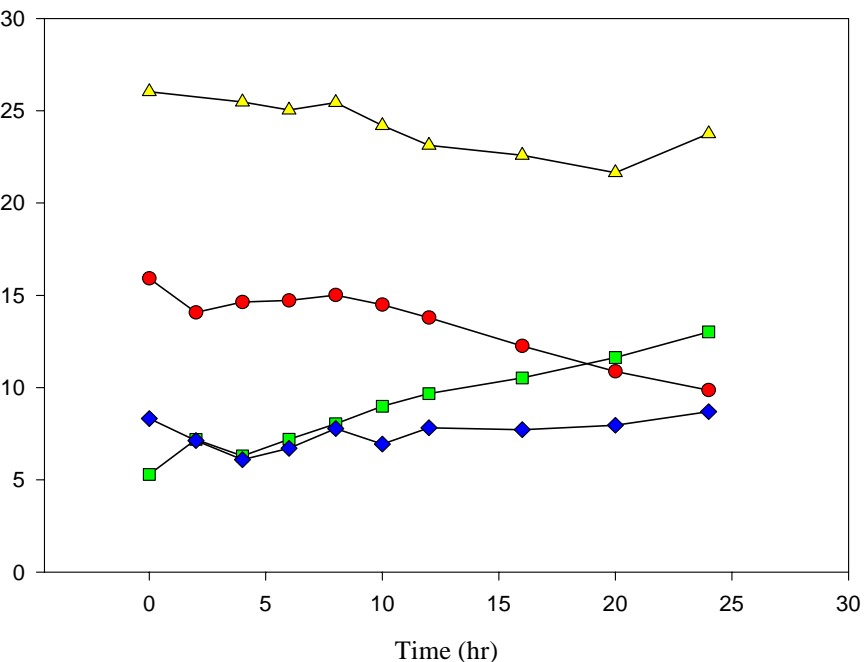


- 圖九、乳酸菌分離株在含寡糖培養基之生長曲線分析。A是*Lactococcus plantarum* strain E51，B是*Lactobacillus casei* strain E30。培養基不含糖以  $\square$  表示，含2% GOS以  $\triangle$  表示，含2% IMOS以  $\circ$  表示，含2% FOS以  $\diamond$  表示。

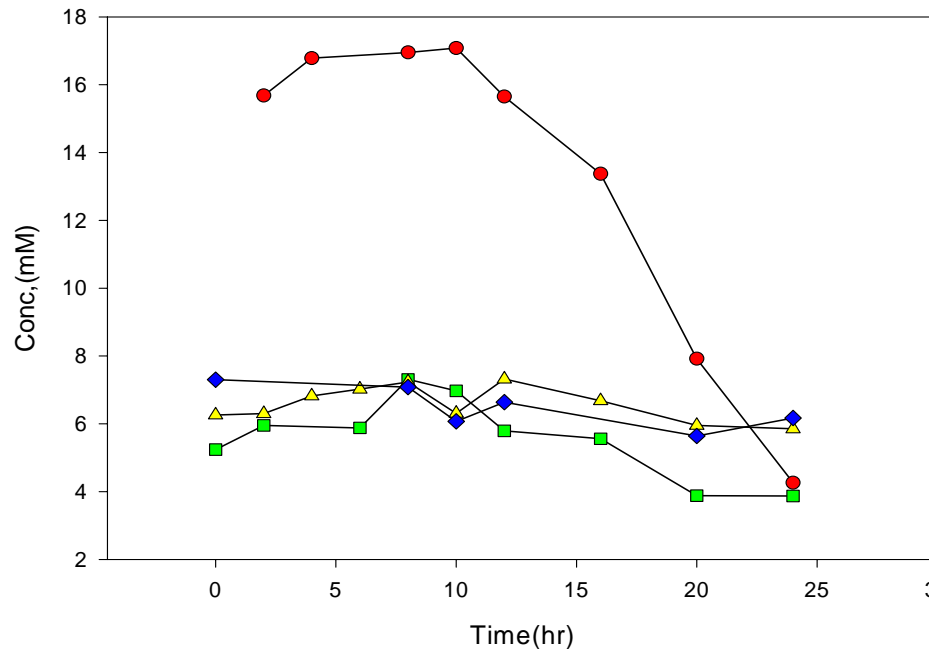
**(A)*****Lactococcus plantarum* E51****(B)*****Lactobacillus casei* E30**

- 圖十三、以HPLC分析乳酸菌分離株利用果寡糖結果。A是 *Lactococcus plantarum* E51, B是 *Lactobacillus casei* E30。果寡糖-MRS 培養基包含6.87 mM蔗糖二糖( )、10.68 mM蔗糖三糖( )及 1.89 mM蔗糖四糖( )。

A)

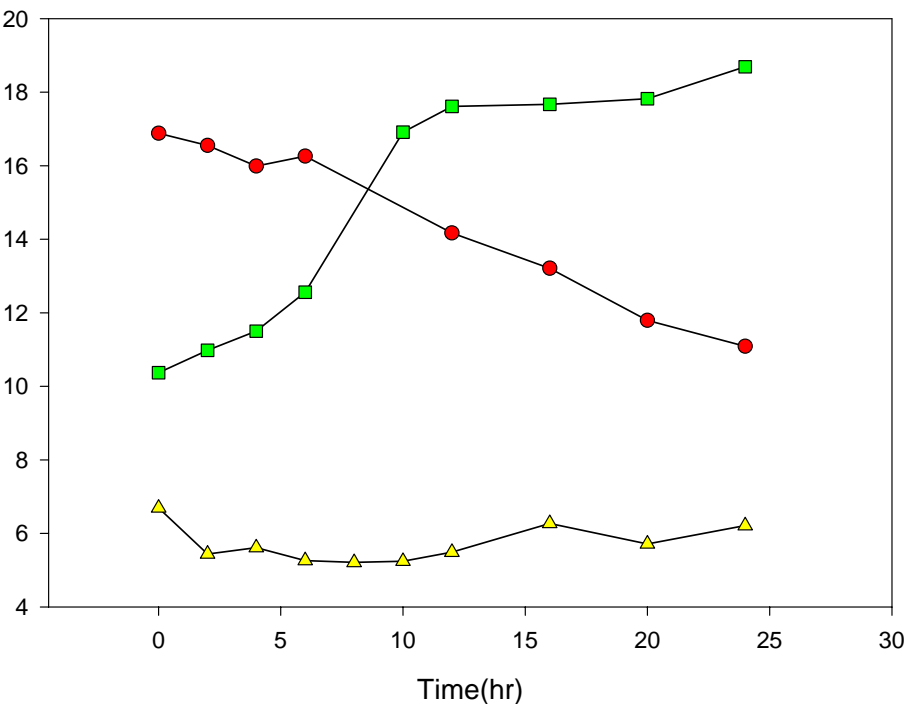


(B)

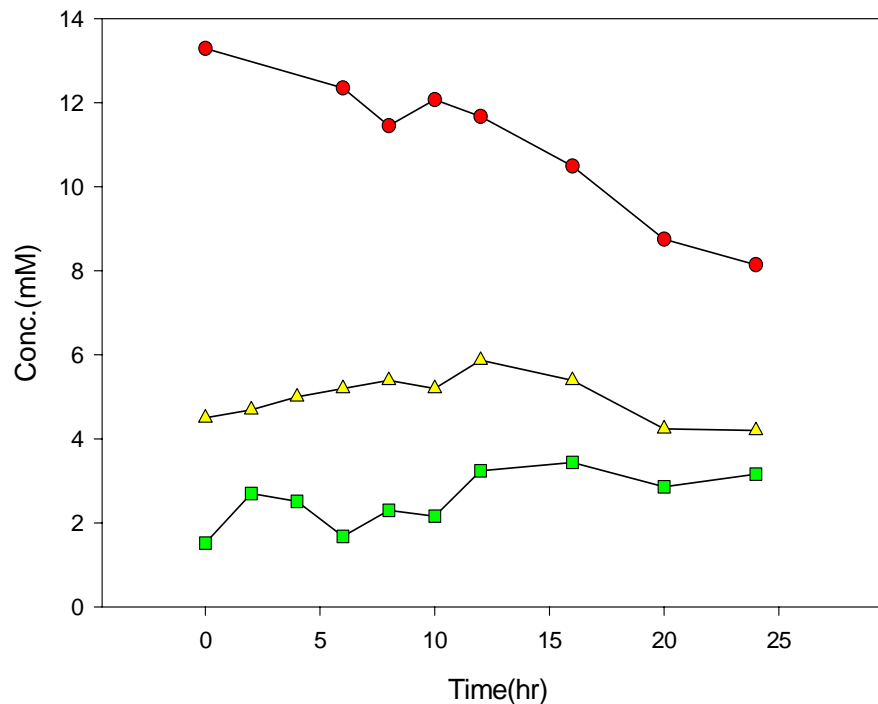


- 圖十四、以HPLC分析乳酸菌分離株利用異麥芽寡糖結果。A是 *Lactococcus plantarum* E51, B是 *Lactobacillus casei* E30。異麥芽寡糖-MRS 培養基包含9.42 mM isomaltose( )、0.09 mM tyrosine( )及 1.85 mM Panose( )、4.72 mM tetraose( )。

A)



(B)



- 圖十五、以HPLC分析乳酸菌分離株利用龍膽寡糖結果。A是 *Lactococcus plantarum* E51, B是 *Lactobacillus casei* E30。龍膽寡糖-MRS 培養基包含11.39 mM龍膽二糖( )、1.24 mM龍膽三糖( )及 3.44 mM龍膽四糖( )。



# Probiotics properties of the isolated lactic acid bacteria

Isolated colony	*Acid treatment	** Bile salt treatment	Adsorption ***	Prebiotics digestion* **
	pH 3.0	0.3% 之 OD 600 nm		
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	$7.3 \times 10^4$	2.059	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B6	$2.2 \times 10^4$	2.120	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B7	$4.3 \times 10^4$	2.093	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B8	$3.3 \times 10^4$	2.154	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B12	$7.8 \times 10^4$	2.201	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B14	$5.5 \times 10^5$	2.209	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. B14	$1.1 \times 10^4$	2.109	+ +	+
<i>Lactobacillus</i> sp. D15	$3.5 \times 10^5$	2.307	+ +	+