

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

菊糖有孢子乳桿菌潛在益生功效的研究

**Studies on the Potential Probiotic Effects of
Sporolactobacillus inulinus BCRC 14647**

研究生：陳佩玉 撰

指導教授：曾政鴻 博士

中華民國九十五年六月

謝 誌

感謝指導教授曾政鴻博士兩年來於課業、研究等方面的悉心指導以及在待人處世上的諄諄教誨；撰寫論文期間恩師盡心指導論文寫作並詳加修正，使得本論文得以順利完成，師恩浩瀚，永銘於心。

文稿初成，承蒙大同大學顏聰榮教授、中山醫學大學王進崑教授、中興大學金安兒教授及本校鍾景光教授在百忙之中撥冗審閱，詳加斧正，並提供寶貴意見使論文得以更完善，僅此致上萬分謝忱。

在學研究期間歷經許多挫折、瓶頸，如今論文研究得以順利完成，在此特別感謝大同大學陳正祥學長於研究上給予的協助，以及食品工業發展研究所溫桂真與呂欣怡小姐在菌株分讓和細胞培養等諸多方面的幫忙。再者，要感謝研究室的學妹—馨儀、珮玲，以及同期研究所同學和好友們—麗淑、昭君、佳儀、賜明、世杰、靜宜，於艱辛研究過程中給予的諸多協助與鼓勵，在此致上我最誠摯的謝意。

最後由衷感謝家人們的全力支持，使我能致力於論文研究，謹此將本論文獻給所有關心我的師長及親友們，謝謝你們。

陳佩玉 謹致於

中國醫藥大學 營養學系

中華民國 九十五年 六月

中文摘要

本研究目的在探討產孢子性乳酸菌—菊糖有孢子乳桿菌 *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647 對模擬人體腸道中不良環境因子之抵抗性以及其在腸道中定殖與拮抗病原菌腸炎沙門氏菌 *Salmonella enteritidis* BCRC 10744 之能力，同時探討該菌株對人體腸道細胞之安全性，並與 *Lactobacillus acidophilus*、*L. bulgaricus*、*Bifidobacterium bifidum*、*B. longum* 等市售益生菌產品常添加之乳酸菌就上述試驗性質進行比較。酸與膽鹽耐受性，分別是以 pH 2~4 之酸液及 0.1~0.4% 之膽鹽溶液試驗之，而模擬腸道吸附性則是利用 Caco-2 cells 作為吸附試驗模式，另外抑菌試驗方面包含了乳酸菌培養基上清液抑制 *S. enteritidis* 生長之抑菌圈試驗以及上清液或其菌體拮抗 *S. enteritidis* 對模擬腸道細胞之吸附試驗。結果顯示在耐酸性方面，孢子形態的 *S. inulinus* 存活率顯著高於營養細胞形態的 *S. inulinus* 及 *Bifidobacterium* spp. ($p < 0.05$)，而其中以 *Lactobacillus* spp. 的存活率最佳 ($p < 0.05$)，此情形於耐膽鹽試驗中亦可看到類似的結果。而在模擬腸道細胞吸附試驗，則發現營養細胞形態的 *S. inulinus* (65.1%)、*L. bulgaricus* (78.7%) 和 *Bifidobacterium* spp. (74.9%, 52.7%) 皆具有良好的吸附性，其中以 *L. acidophilus* 對 Caco-2 cells 呈現出強力的吸附性 (92.3%)，而孢子形態的 *S. inulinus* 則是低吸附性的 (10.5%)。另外在抑菌圈之抑菌試驗

方面，發現 *S. inulinus* 的培養基上清液可顯著地抑制 *S. enteritidis* 的生長，且其營養細胞或上清液亦具有干擾 *S. enteritidis* 吸附於模擬腸道細胞的能力，同時預先以 *S. inulinus* 吸附於模擬腸道細胞亦可預防 *S. enteritidis* 的吸附。此外，侵入性試驗也顯示了 *S. inulinus* 具有高度的安全性。本研究顯示，營養細胞形態之 *S. inulinus* 因能夠吸附於模擬人類腸道細胞並拮抗病原菌 *S. enteritidis* 而具有潛在之益生功效。

關鍵字：產孢子性乳酸菌、菊糖有孢子乳桿菌、耐酸性、耐膽鹽、吸附性、拮抗能力

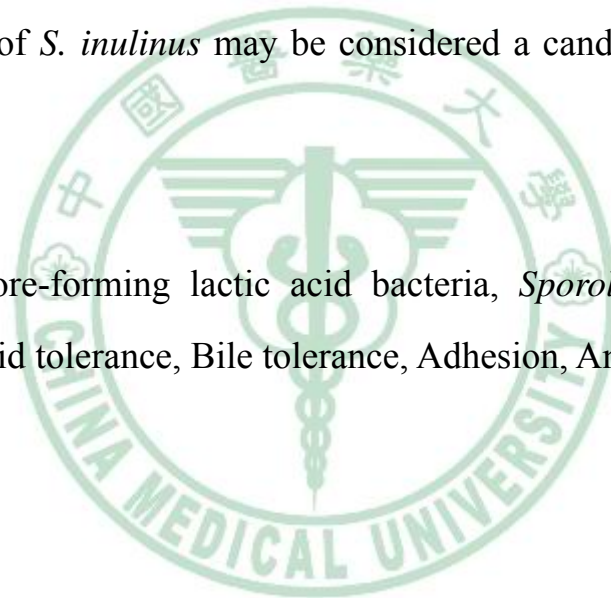


英文摘要

The basic characteristics of the spore-forming lactic acid bacterium (SFLAB), *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647, associated with its potential probiotic effects were evaluated *in vitro*. Assessments including acid and bile salt tolerance, adhesiveness, and antagonistic effects on pathogenic *Salmonella enteritidis* BCRC 10744, and an invasion assay were conducted using lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695, *L. bulgaricus* BCRC 14009) and *Bifidobacterium* spp. (*Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615, *B. longum* BCRC 11847) as a reference. For the acid and bile tolerance test, the samples were treated with pH 2~4 acid solutions and 0.1~0.4% oxgall bile solutions, respectively. The adhesion test was conducted using Caco-2 cells as the assay model. For the antagonistic activity of LAB toward pathogen *S. enteritidis*, the well diffusion assay method was used, the inhibition effect of LAB cells or their spent culture supernatants (SCS) on the binding of the pathogen to the Caco-2 cells was explored. In the results, *S. inulinus* spores presented significant higher survival rates than the vegetative cell form in acidic conditions as well as than the reference *Bifidobacterium* spp. However, *Lactobacillus* spp. showed the highest viability among all tested strains. Similar results were found in the bile tolerance test. Compared to the reference strains, the vegetative cell form of *S. inulinus* possessed a proper adhesive characteristic (65.1% for *S. inulinus*, 78.7% for *L. bulgaricus* and 74.9% and 52.7% for *B. bifidum* and *B. longum*, respectively). In the adhesion assay, the spore form of *S. inulinus* displayed weak adhesive

traits (10.5%). On the other hand, *L. acidophilus* showed a strong adhesive property (92.3%). The vegetative cells of *S. inulinus* and its SCS both dramatically reduced the adhesion of *S. enteritidis* to Caco-2 cells; meanwhile, the SCS of *S. inulinus* vegetative cells inhibited the growth of *S. enteritidis* in the inhibition zone test. From the results of the invasion assay, *S. inulinus* showed high safety properties. Based on the results of *in vitro* tests, *S. inulinus* shows the potential probiotic effects via the adherence to simulated human intestinal epithelial cells and the antagonistic activity against *S. enteritidis*. The vegetative cells of *S. inulinus* may be considered a candidate for the probiotic use.

Key words: Spore-forming lactic acid bacteria, *Sporolactobacillus inulinus*, Acid tolerance, Bile tolerance, Adhesion, Antagonistic activity



目 錄

第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	5
第一節 腸道微生物.....	5
1-1 人類腸道菌相之發展.....	5
1-2 人類腸道菌群的分佈.....	6
1-3 腸道微生物與宿主之關係.....	8
第二節 乳酸菌之介紹.....	10
2-1 乳酸菌的發現.....	10
2-2 乳酸菌的定義.....	10
2-3 乳酸菌的分類.....	11
第三節 乳酸菌為優質益生菌(probiotics).....	13
3-1 益生菌的定義.....	13
3-2 理想益生菌應具備之條件.....	14
3-3 益生菌之健康功效(health effects).....	14
3-4 已應用於產品之益生菌.....	22
3-5 產孢性乳酸菌(spore forming lactic acid bacteria)	24

3-6 嗜酸乳酸桿菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>).....	26
3-7 保加利亞乳桿菌(<i>Lactobacillus bulgaricus</i>).....	26
3-8 比菲德雙歧桿菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>).....	29
3-9 龍根雙歧桿菌(<i>Bifidobacterium longum</i>).....	29
第四節 乳酸菌對腸胃道耐受性之相關研究.....	31
4-1 乳酸菌之耐酸性研究.....	31
4-2 乳酸菌之膽鹽耐受性研究.....	33
4-3 乳酸菌吸附於腸道細胞之試驗模式.....	34
第五節 乳酸菌對腸炎沙門氏菌(<i>Salmonella enteritidis</i>)的抑制.....	36
5-1 腸炎沙門氏菌之簡介.....	36
5-2 沙門氏菌之致病機轉.....	37
第六節 乳酸菌之安全性評估.....	39
第七節 乳酸菌之貯藏安定性.....	41
第八節 研究動機.....	41
第九節 研究目的.....	42
第三章 材料與方法.....	43
第一節 研究設計架構.....	43
第二節 實驗材料.....	43

2-1 使用菌株.....	43
2-2 菌株活化之培養基.....	43
2-3 使用之細胞株.....	45
2-4 細胞株生長之新鮮培養基.....	45
2-5 細胞株保存之冷凍培養基.....	45
第三節 實驗菌株之前處理.....	46
3-1 菌株之活化與冷凍保存.....	46
3-2 菊糖有孢子乳桿菌之孢子誘導培養.....	46
第四節 細胞培養.....	47
4-1 冷凍細胞之活化.....	47
4-2 細胞繼代培養.....	47
4-3 細胞株冷凍保存.....	48
4-4 細胞染色與計數.....	48
4-5 細胞單層膜之培養.....	49
第五節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽與吸附性研究.....	49
5-1 耐酸性試驗.....	49
5-2 耐膽鹽試驗.....	50
5-3 模擬腸道吸附性試驗.....	50

第六節 乳酸菌培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌生長之試驗.....	51
6-1 培養基上清液 pH 值之測定.....	51
6-2 培養基上清液之乳酸產量測定.....	52
6-3 乳酸菌培養基上清液之抑菌圈試驗.....	52
第七節 乳酸菌培養基上清液之抑菌成份探討.....	53
7-1 培養基上清液中和試驗.....	53
7-2 培養基上清液之酵素處理.....	53
7-3 培養基上清液之熱穩定性試驗.....	54
7-4 培養基上清液之乳酸成份抑菌試驗.....	54
第八節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗.....	55
8-1 乳酸菌預防腸炎沙門氏菌侵襲腸道細胞之試驗 (prophylactic effect).....	55
8-2 乳酸菌及其培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌吸附於 腸道細胞之試驗(therapeutic effect)	57
第九節 細胞侵入性試驗.....	58
第十節 貯藏安定性試驗.....	60
第十一節 統計分析.....	60
第四章 結果與討論.....	62

第一節 菊糖有孢子乳桿菌之孢子誘導培養.....	62
第二節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽與模擬腸道吸附性.....	62
2-1 耐酸性試驗結果.....	62
2-2 耐膽鹽試驗結果.....	66
2-3 細胞單層膜完整性之觀察.....	68
2-4 吸附性試驗結果.....	70
第三節 乳酸菌培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌生長之試驗結果.....	75
3-1 乳酸菌培養基上清液之 pH 值變化.....	75
3-2 乳酸菌生長之乳酸產量變化.....	77
3-3 乳酸菌培養基上清液之抑菌圈試驗結果.....	77
3-4 乳酸菌培養基上清液之抑菌成份探討.....	79
3-4-1 培養基上清液經 NaOH 中和後之抑菌圈大小.....	79
3-4-2 培養基上清液經蛋白酶作用後之抑菌圈大小.....	84
3-4-3 培養基上清液經加熱處理後之抑菌圈大小.....	84

3-4-4 培養基上清液之乳酸成份抑菌試驗結果.....	84
第四節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗結果.....	91
4-1 乳酸菌預防腸炎沙門氏菌侵襲腸道細胞之潛在功效.....	91
4-2 乳酸菌及其培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌吸附於腸道細胞之結果.....	98
第五節 菌株安全性之初步評估結果.....	106
第六節 貯藏安定性試驗結果.....	108
第五章 結論.....	111
參考文獻.....	113



圖 目 錄

圖 2.1、人類腸胃道不同部位之菌群分佈.....	7
圖 2.2、腸道菌群與宿主健康關係.....	9
圖 2.3、益生菌的健康功效.....	16
圖 2.4、益生菌調節免疫反應之抗過敏機制.....	20
圖 2.5、 <i>S. inulinus</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	25
圖 2.6、 <i>L. acidophilus</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	27
圖 2.7、 <i>L. bulgaricus</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	28
圖 2.8、 <i>B. bifidum</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	30
圖 2.9、 <i>B. longum</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	32
圖 2.10、Caco-2 cells 生長分化過程之電子顯微鏡圖.....	35
圖 2.11、 <i>S. enteritidis</i> 之掃描式電子顯微鏡圖.....	38
圖 2.12、致病菌侵襲腸道上皮細胞過程.....	40
圖 3.1、實驗設計架構.....	44
圖 3.2、乳酸菌之侵入性試驗流程.....	59
圖 4.1、孢子染色 <i>S. inulinus</i> 之光學顯微照相圖.....	63
圖 4.2、Caco-2 cells 繼代培養後之生長形態.....	69
圖 4.3、各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 之吸附性.....	71

圖 4.4、各試驗乳酸菌株吸附於 Caco-2 cells 上之光學顯微照相圖.....	72
圖 4.5、 <i>L. acidophilus</i> BG2FO4 對人類腸道細胞之吸附模式.....	74
圖 4.6、各試驗乳酸菌株培養基上清液之 pH 值變化曲線圖.....	76
圖 4.7、各試驗乳酸菌株培養之乳酸產量變化曲線圖.....	78
圖 4.8、各試驗乳酸菌株 0~3 天之培養基上清液抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長之情形.....	81
圖 4.9、各試驗乳酸菌株 4~7 天之培養基上清液抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長之情形.....	82
圖 4.10、各試驗乳酸菌株之培養基上清液以蛋白酶作用後其抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長的抑菌圈大小.....	85
圖 4.11、各試驗乳酸菌株之培養基上清液經加熱處理後其抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長的抑菌圈大小.....	86
圖 4.12、各試驗乳酸菌株之培養基上清液經不同溫度條件處理後抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長之情形.....	87
圖 4.13、培養基上清液抑菌成份對 <i>S. enteritidis</i> 之抑菌效果.....	89
圖 4.14、預先吸附於 Caco-2 cells 上之乳酸菌預防螢光染色之 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附之試驗結果.....	92
圖 4.15、預先吸附於 Caco-2 cells 上的乳酸菌預防螢光染色 <i>S. enteritidis</i> 吸	

附之螢光顯微照相圖.....	93
圖 4.16、 <i>S. enteritidis</i> 對螢光染色乳酸菌吸附性的影響.....	94
圖 4.17、 <i>S. enteritidis</i> 對預先吸附於Caco-2 cells上之螢光染色乳酸菌吸附性 影響之螢光顯微照相圖.....	95
圖 4.18、乳酸菌培養基上清液對螢光染色之 <i>S. enteritidis</i> 吸附性的影 響.....	99
圖 4.19、乳酸菌菌體對螢光染色之 <i>S. enteritidis</i> 吸附性的影響.....	100
圖 4.20、 <i>S. inulinus</i> 及其培養基上清液降低 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附 性之螢光顯微照相圖.....	101
圖 4.21、 <i>L. acidophilus</i> 及其培養基上清液降低 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖.....	102
圖 4.22、 <i>L. bulgaricus</i> 及其培養基上清液降低 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖.....	103
圖 4.23、 <i>B. bifidum</i> 及其培養基上清液降低 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附 性之螢光顯微照相圖.....	104
圖 4.24、 <i>B. longum</i> 及其培養基上清液降低 <i>S. enteritidis</i> 對 Caco-2 cells 吸附 性之螢光顯微照相圖.....	105
圖 4.25、各試驗菌株於冷凍乾燥後 20 週之貯藏期間活菌數的變化.....	109

表 目 錄

表 2.1、益生菌篩選應考慮之條件.....	15
表 2.2、益生菌在微生物感染防治上之應用.....	18
表 2.3、應用於產品之益生菌株.....	23
表 4.1、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 和 3.0 hr 後之存活率.....	64
表 4.2、試驗乳酸菌株以 0.1, 0.2, 0.4%膽鹽濃度分別處理 1.5 和 3.0 hr 後之存活率.....	67
表 4.3、各試驗乳酸菌株於培養期間之培養基上清液抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長所形成的抑菌圈大小.....	80
表 4.4、各試驗乳酸菌之培養基上清液經 NaOH 中和後之抑制 <i>S. enteritidis</i> 生長所形成的抑菌圈大小.....	83
表 4.5、各試驗乳酸菌株侵入 Caco-2 cells 之百分比.....	107

第一章 前言

隨著經濟水準的提高與對身體保健的重視，益生菌(probiotics)的觀念和利用近來日趨重要(Marteau et al., 2001; Hammes and Hertel, 2002)。凡應用於人類或其他動物(Gatesoupe, 1999)，藉由改善腸內微生物相之平衡而有益於宿主的活菌，不論是單一或混合的菌株均可視之為益生菌(Sanders, 1998; Marteau and Boutron-Ruault, 2002)，其中應用於人體最普遍的便是乳酸菌(lactic acid bacteria; LAB) (Gomes and Xavier-Malcata, 1999; Shortt, 1999)。乳酸菌在自然界中分佈甚廣，生息於動物腸道內的乳酸菌和宿主健康關係密切(Shortt, 1999)，能阻止有害微生物的增殖(Bhatia et al., 1989; Ogawa et al., 2001a; Osset et al., 2001; Røssland et al., 2003)，在維持安定且健全的腸內菌叢上具不容忽視的重要性(Mattila-Sandholm et al., 1999; Restall, 2004)。近年來，乳酸菌之各種營養保健機能更陸續被發現與認知(Kaur et al., 2002)，使得乳酸菌的發酵產品受到廣大消費者的喜愛(Shortt, 1999)。目前有關乳酸菌在保健上的功能，大抵有其能夠抵抗消化道中的不利環境因子而成功地定殖於腸道中，並且吸附於腸道的上皮細胞以形成一道防禦，阻止病原菌的侵入感染(Reid, 2000; Resta-Lenert and Barrett, 2003; Rinkinen et al., 2003a; Servin and Coconnier, 2003)。除此之外，乳酸菌尚具有能生成抑菌物質(Cleveland et al., 2001)、產生乳酸(Samelis et al., 2005)、改善乳糖不

耐症(Mustapha et al., 1997)、降低膽固醇(Agerbck et al., 1995; Ahn et al., 2000; Ahn et al., 2003)、降血壓(Yamamoto et al., 1999)、抗腫瘤(Lee et al., 2004; You et al., 2004)、抗氧化(Holzapfel and Schillinger, 2002; Wang et al., 2006)、抗發炎(Ma et al., 2004)、刺激活化免疫系統(Hatakka et al., 2001), 產生維生素 B 群和胺基酸以增加營養價值(Breslaw and Kleyn, 1973; Deeth and Tamine, 1981)等功效。由於服用抗生素、腸胃消化不良以及不正常或不正確的飲食習慣等均會妨礙乳酸菌在腸內的定殖發育, 因此學者們即建議人們於飲食中補充攝取乳酸菌, 以維持並改善人體的腸胃道健康(Fooks et al., 1999)。至於有關乳酸菌在攝取後之安全性的評估, 之前雖有學者對於乳酸菌在人體體內之潛在致病性進行探討(Apostolou et al., 2001), 但是基本上乳酸菌仍可視為「公認安全(generally recognized as safe; GRAS)」之菌株(Mattila-Sandholm et al., 1999; Shu et al., 1999; Tasi et al., 2004)。

完善而有效的益生菌應具備以下條件, 包括(1)為人類來源; (2)能耐胃酸、耐膽鹽; (3)具有良好的腸道吸附性與定殖能力; (4)能拮抗病原菌的吸附; 以及(5)臨床試驗證實有效等(Sarrela et al., 2002)。因此, 對於益生菌基本性質的探討與了解, 以及其應用於人類保健效能之評估, 具有十分重要的意義。而對於上述益生菌基本特性之了解, 尤以對其在耐胃酸、耐膽鹽以及宿主腸道定殖等性質方面之評估, 更是重要的研究課題, 其中菌株對

腸道之吸附性，又較其對胃酸與膽鹽的耐性更為重要(Nielsen et al., 1994)。蓋由食糜所導致的胃酸與膽鹽之稀釋作用，可能會使少數不耐胃酸與膽鹽之菌株存活，並順利到達腸道，遂行其定殖作用。反之，若一菌株能克服胃酸與膽鹽之作用而到達腸道，如因無法吸附而直接經糞便排出，則其益生效果將大打折扣，故具有良好的腸道吸附能力乃是成為一株優良益生菌之首要必備條件。

產孢子性乳酸菌(spore-forming lactic acid bacteria; SFLAB)在遇到不利於生長的環境時會誘發菌體產生內孢子(endospore)，以幫助其抵抗不利環境因子的影響(Doores and Westhoff, 1983)。目前市面上有許多添加產孢子性乳酸菌的益生菌商品販售(#1, #2)，其產品大多標榜為能夠健胃整腸以及藉由此菌之產孢子能力而「可能」具有之耐胃酸、耐膽鹽的特性，以此宣稱能夠增加此菌之存活率來達到其保健功效，但是此種產孢子菌是否能有效地吸附於人類腸道細胞，則市售之產品並未能加以清楚說明。如前所述，益生菌除了要能抵抗胃酸及膽鹽的作用而存活之外，更重要的是當其順利到達腸道後能夠吸附並定殖下來，方能發揮其對人類之益生效果，故對於產孢子性益生菌之研究不應只侷限於對該屬菌株孢子在胃酸與膽鹽抗性方面的探討，更應對其在腸道之吸附性深入研究，而對該菌株拮抗病原菌之能力亦應加以探討，以了解其在益生保健方面的潛在效用。因此本研究目的為探討產

孢性乳酸菌－菊糖有孢子乳桿菌(*Sporolactobacillus inulinus*)對模擬人體腸道中不良環境因子之抵抗性以及其在腸道中定殖與拮抗病原菌腸炎沙門氏菌(*Salmonella enteritidis*)之能力，同時探討該菌株對人體腸道細胞之安全性，並與 *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* 等市售益生菌產品常添加之乳酸菌就上述試驗性質進行比較，進而評估菊糖有孢子乳桿菌在保健食品上應用的可行性。



第二章 文獻探討

第一節 腸道微生物

1-1 人類腸道菌相之發展

人類腸道中菌相種類繁多且複雜，其腸道菌相生態之變化相當活躍 (Macfarlane et al., 1998)。剛出生的嬰兒腸道內是處於無菌之環境，但出生後約 3~4 hr 就會有微生物進駐並定殖於腸道中，包括有乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、鏈球菌 (*Streptococcus*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 等菌群。以母乳哺餵之嬰兒，在出生後第 3 天雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 開始出現於腸道中，且在出生後 4~7 天以雙歧桿菌的生長最佔優勢，成為此時期腸道內的主要菌群，而其他菌群包括鏈球菌、產氣莢膜梭菌和大腸桿菌的數量則會逐漸減少 (Arunachalam, 1999)。

離乳後的幼兒，其腸內菌群轉變近似成人的腸道菌相，此時雙歧桿菌減少約 5~10%，菌群也由原先的 *B. infantis*, *B. breve* 轉變為 *B. longum*, *B. adolescentis* (Edwards, 1993)。成人時期的腸道菌相較為穩定，但進入老年期後，由於雙歧桿菌的大幅減少致使病原菌或腐敗菌如 *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. 等成為優勢之菌相 (Mallet and Rowland, 1987; Arunachalam, 1999; He et al., 2001b)，其代謝所產生的胺類或酚類有毒物質則會加速人體老化 (Mitsuoka, 1990)。

1-2 人類腸道菌群的分佈

人類腸道中的菌相分佈並不平均，為一複雜的微生物生態系統，而腸道內所分佈之菌相，至今尚未完全被分離鑑定出來，估計約由 300~400 多種(species)，數量高達 10^{14} CFU/ml 的細菌所組成，而此菌數超出人體其他器官菌數總和十倍之多，且厭氧菌比好氧菌佔優勢，約多出 10~1000 倍左右(Drasar and Hill, 1974; Tancrede, 1992; Tannock, 1995)。

胃(stomach)所分泌的胃酸造成低 pH 值的環境(約 pH 2.5~3.5)，而十二指腸(duodenum)也因存在膽鹽和胰臟分泌物，致使微生物不易存活，因此在胃及十二指腸內只有約 $10^1 \sim 10^3$ CFU/ml 少量菌數，其主要菌相為乳酸桿菌(Lactobacilli)、鏈球菌(Streptococci)及酵母菌(Yeasts)；在空腸(jejunum)與迴腸(ileum)片段，菌量及菌相都大量增加，主要存在的菌相為兼性厭氧的多種細菌，如乳酸桿菌、腸內細菌科(Enterobacteriaceae)、鏈球菌以及其他的絕對厭氧菌如雙歧桿菌(Bifidobacteria)、類桿菌(Bacteroides)等(Nielsen et al., 1994)；而大腸所含的菌相最為複雜，又以結腸(colon)所含之菌屬(genera)最多，其菌數高達 $10^{10} \sim 10^{12}$ CFU/ml，絕對厭氧菌是此區域的優勢菌種，如雙歧桿菌、類桿菌、產氣莢膜梭菌等，其他則由兼性厭氧菌如乳酸桿菌、腸內細菌科、鏈球菌、酵母菌等構成次要菌群(Holzapfel et al., 1998; Simmering and Blaut, 2001) (圖 2.1)。

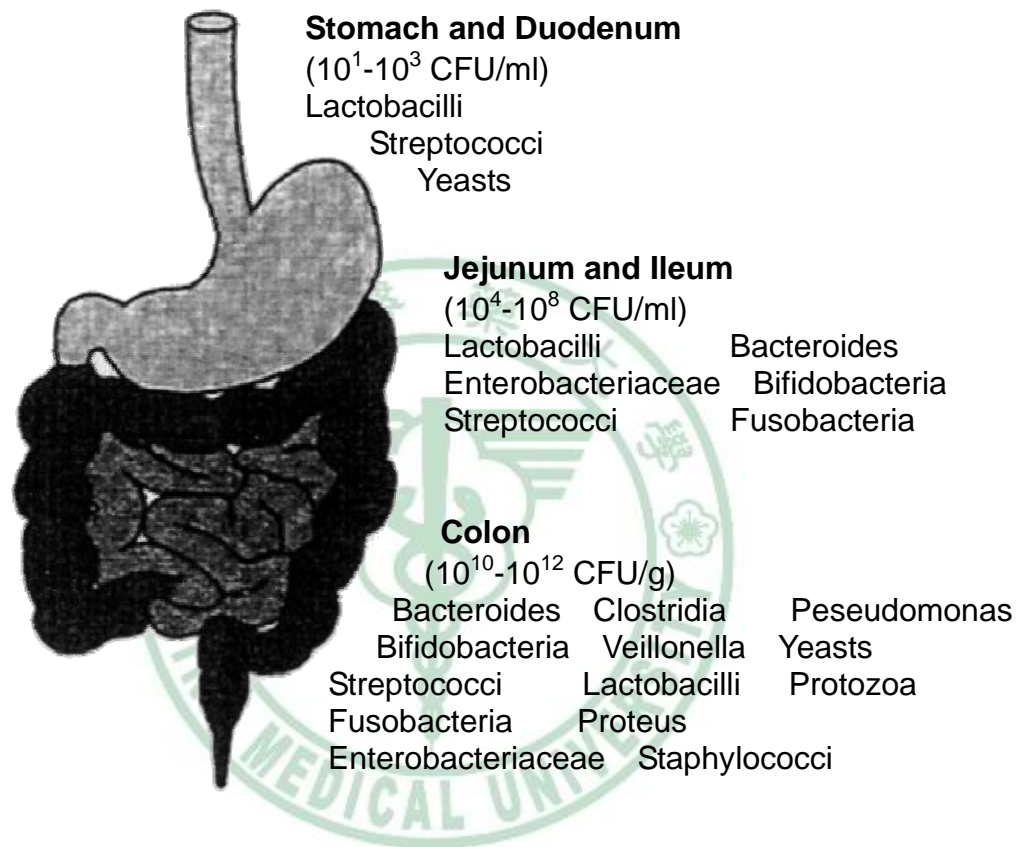


圖 2.1、人類腸胃道不同部位之菌群分佈

Fig. 2.1. Distribution of microbes in the human gastro-intestinal tract

(Holzapfel et al., 1998)

1-3 腸道微生物與宿主之關係

人類與腸內細菌的共生關係相當複雜，腸道細菌群的消長會影響人體的健康狀況，與宿主的健康或疾病有密切的關係。腸道中的正常菌群具有調節宿主健康之功能(Arunachalam, 1999)，如圖 2.2 所示，在正常情況之下，腸道微生物與人體內外環境保持著平衡的狀態，當腸道菌群與宿主的共生關係表現出有益菌呈優勢時，這些益生菌群的酸性代謝物不但能抑制病原菌的生長，更能刺激上皮細胞增生和促進腸道的蠕動，以達到淨化腸道並維持健康之效果；相反地，一旦腸道內菌相失調，即病原性及腐生性細菌群呈優勢時，則會代謝產生諸多含氮廢物及致癌相關物質，就會對人體健康造成危害。

腸道內的細菌對人體有益的功效大致包括有：(1)可以合成某些維生素，如維生素 B 群、維生素 K、維生素 C、生物素等，而其中的維生素 K 係由腸道中大腸桿菌所合成而無法從食物中獲取，另外某些菌群還能活化消化酵素，參與營養物質的代謝；(2)在腸黏膜表面形成生物屏障結構，抑制致病菌於黏膜上定殖所造成的感染；(3)產生細菌素等抗菌物質以殺死或抑制病原菌的生長；(4)刺激宿主免疫系統，使免疫細胞活化，提高人體免疫力(5)降低腸腔的酸鹼度，抑制致癌物的形成，或使某些致癌物轉化成非致癌物質等(徐，2005)。

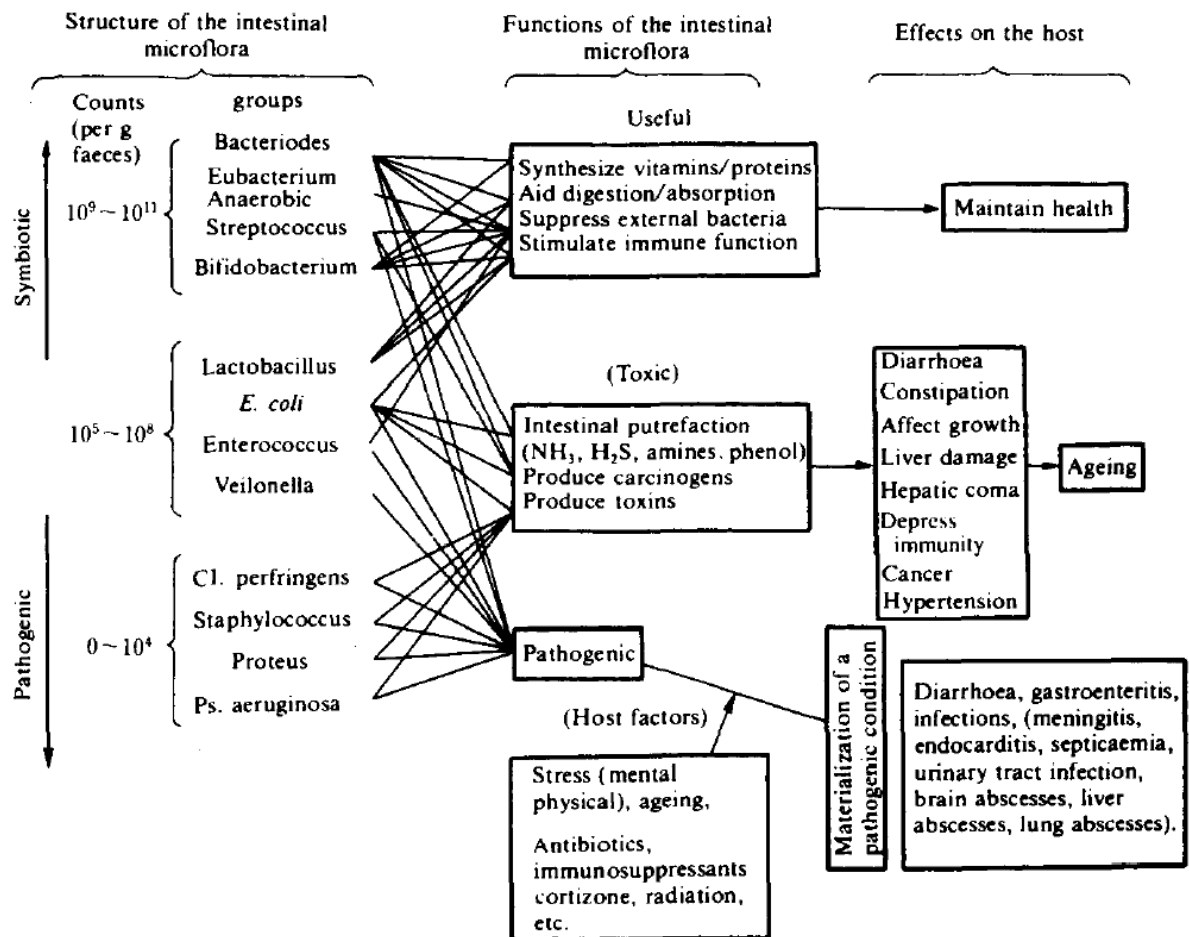


圖 2.2、腸道菌群與宿主健康關係

Fig. 2.2. Relationship between intestinal bacteria and host health

(Arunachalam, 1999)

第二節 乳酸菌之介紹

2-1 乳酸菌的發現

西元前五千年，美索布達米亞人發現葫蘆內之山羊奶於炎熱氣候下竟會凝固結塊，透露出其中乳酸菌參與發酵之作用。而中國幾千年來的醃漬物、地窖內的陳年老酒，更顯示乳酸菌於人們生活上扮演的重要角色。最先的科學證據是在西元 1857 年，由法國化學兼微生物學者巴斯德(Louis Pasteur, 1822-1895)發現酸乳(sour milk)中有微小生物體的存在，將其定名為「levue lactique」，首度揭露此發酵作用為乳酸菌所致之秘密。

素有「乳酸菌之父」之稱的俄國科學家梅契尼可夫(Elie Metchnikoff, 1845-1916)，於西元 1900 年提出經常飲用發酵乳對人體健康有助益並能延長壽命之說，梅契尼可夫認為發酵乳中的微生物能抑制腸道中腐敗菌的生長，減少有毒物質的產生，因此延緩老化的發生。自此之後，許多研究學者陸續投入此領域，便開始建立起乳酸菌的「益生」(probiotic)形象。

2-2 乳酸菌的定義

乳酸菌泛指能利用食物中的碳水化合物進行發酵，藉以獲得能量，同時可產生多量乳酸等有機酸之一群細菌的總稱。一般具有下列共通的特性 (Axelsson, 1998)：

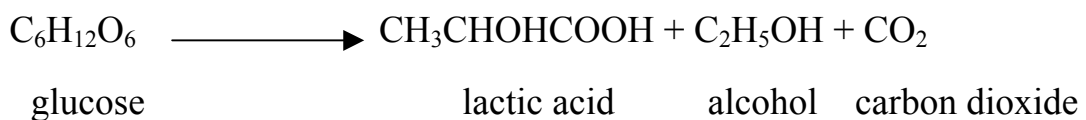
(1)為革蘭氏陽性菌；(2)無移動性；(3)營養需求複雜，需有醣類、胺基酸、核酸衍生物、維生素等多種養份方可生長，並且會分泌乳酸；(4)過氧化氫酶陰性，無細胞色素；(5)氣體需求為厭氧、微好氧、兼性厭氧或是耐氧厭氧性。一般可於有氧環境下生長，但以在無氧環境下生長較佳；(6)不產孢。

若依乳酸菌之代謝途徑及最終產物來區分，可將其分為同型發酵(homofermentative)及異型發酵(heterofermentative)乳酸菌。同型發酵菌約可生成 90~100%的乳酸，而異型發酵菌除了產生 45~50%乳酸之外，尚有醋酸、酒精、二氧化碳等副產物。其化學反應式如下：

同型發酵(homofermentative)



異型發酵(heterofermentative)



2-3 乳酸菌的分類

乳酸菌廣泛分佈於自然界中，依分類鑑定屬性，其界定仍有許多爭議存在。乳酸菌的分類，大抵可歸納為下列十一屬(Axelsson, 1998)：

(1)鏈球菌屬(*Streptococcus*)；(2)腸球菌屬(*Enterococcus*)；(3)乳酸球菌屬(*Lactococcus*)；(4)四體球菌屬(*Tetragenococcus*)；(5)肉品桿菌屬(*Carnobacterium*)；(6)徘徊球菌屬(*Vagococcus*)；(7)足球菌屬(*Pediococcus*)；(8)明串球菌屬(*Leuconostocs*)；(9)乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)；(10)雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)；(11)有孢子乳桿菌屬(*Sporolactobacillus*)。

其中乳酸桿菌屬及有孢子乳桿菌屬是屬於乳酸桿菌科(Lactobacillaceae)(Kitahara and Suzuki, 1963)，而雙歧桿菌屬則是屬於放線菌目(Actinomycetales)之放線菌科(Actinomycetaceae)。如依乳酸菌之共通特性中「不產孢、不具移動性」之定義，有孢子乳桿菌屬因會產生孢子及具移動性等特性，其應被排除於乳酸菌之分類體系之外，但因其形狀為類似乳酸桿菌屬之桿狀，並可進行典型之同型乳酸發酵(homofermentative lactic acid fermentation)，且有些菌株具有可產生拮抗 *Bacillus cereus*、*B. subtilis* 等害菌之抑菌素(bacteriocin)的益生功效(Yanagiad et al.,1997)，故現已將其納入為乳酸菌廣義性分類之一屬。另外，雙歧桿菌屬則因屬於放線菌科，故其於基因型(genotype)方面之遺傳形態與典型之乳酸菌差異甚多，但是其表現型(phenotype)則具有(1)可定殖於人類腸道，為人類腸道之正常菌群；(2)可產生多量乳酸；(3)其益生功效類似多種乳酸菌等特性，故多數學者仍將之歸類為乳酸菌(Chaia and Oliver, 2003)。

第三節 乳酸菌為優質益生菌(probiotics)

3-1 益生菌的定義

益生菌 probiotic 一字，係源自希臘文「for live」之意。從很早以前，就陸續有多位學者嘗試對益生菌種提出合適的定義，在 1974 年 Parker 提出，只要是能夠促進宿主腸道菌相平衡的微生物或是物質，都可稱之為益生菌(probiotics) (Parker, 1974)，但是後來 Fuller (1989)則認為此定義可能包含抗生素等物質，並不適用作為 probiotics 的定義，因此重新將 probiotics 定義為活的微生物補充物，藉以改善宿主腸道菌相之平衡及促進宿主的健康(Fuller, 1989)。另也有文獻指出，probiotics 泛指可改善宿主體內內生性微生物相平衡，而有益於宿主的單一或複數種微生物(活菌)，其宿主包括人類或動物(Huis in't Veld and Havenaar, 1991)，此定義廣泛為國際上所接受和採用(O'Sullivan et al., 1992)。近年 Naidu et al. (1999)認為 probiotics 應包括可以改善宿主腸道菌相平衡之活的微生物或具有益生效用之胞外代謝物(probiotic active substance) (Naidu et al., 1999)。而 Salminen et al. (1999)定義 probiotics 為一種不一定是活的微生物或其微生物所衍生之某些活性物質，其對宿主具有健康之助益者。Kaur et al. (2002)也指出，probiotics 是數種微生物，可藉由促進宿主腸胃道之菌相平衡，進而增進宿主的健康。因此，現今益生菌的新觀念是包括活菌體、死菌體、菌體萃取物，甚至是微生物

代謝產物等都可歸屬於益生菌(probiotics)的範疇。

3-2 理想益生菌應具備之條件

完善而有效的益生菌應具備下列所述之條件，包括(1)為人類來源；(2)能耐胃酸、耐膽鹽；(3)具有良好的腸道吸附性與定殖能力；(4)能對宿主健康提供有益的功能，如優異的競爭性，能夠有效排除並抑制病原菌生長，增進宿主免疫調節能力；(5)具有良好的加工特性，在儲存運銷期間菌株活性能夠維持，如菌株穩定性、菌株之氧氣耐受性、大規模生產的適合性；(6)顧客的接受性；以及(6)臨床試驗證實有效等，如表 2.1 所示(Sarrela et al., 2002)。

3-3 益生菌之健康功效(health effects)

益生菌對人體健康之功效主要分為三大部份，如圖 2.3 所示：

(1) 維持正常腸道菌相：

益生菌能維持腸道正常的菌相，除了有預防的功能外，尚能將其應用在腸胃疾病的治療(Clements et al., 1983; Biller et al., 1995; Spanhaak et al., 1998)。目前已證實將益生菌應用於抗生素誘發型腹瀉(antibiotic-associate diarrhea; AAD) (Siitonen et al., 1990)、旅行者型腹瀉(travelers' diarrhea)、嬰兒型腹瀉(infantile diarrhea)、再發性結腸炎(relapsing *C. difficile* colitis)以及

表 2.1、益生菌篩選應考慮之條件

Table 2.1. Properties of probiotics to be assessed in the screening of new probiotic strains and development new probiotic foods

Property	Target and method
Strain specificity	Source or origin to be assessed.
Resistance to pH	Model systems for gastric and bile effects.
Adhesion and colonization	Several model systems to be used for adhesion (e.g. cell culture, mucus, intestinal segments).
Competitive exclusion	Adhesion and competitive exclusion of pathogens in vitro and in vivo model systems.
Immune regulation	In vitro and human studies.
Safety	Pre-market clearance and post-market surveillance.
Technological properties	Various systems for stability and activity throughout the processes.
Sensory assessment	Sensory testing of model and final products.
Consumer acceptance	Consumer studies on product formulations.
Efficacy assessment	Human clinical intervention studies with final product formulations; at least two independent studies to show efficacy in target populations and safety in all consumer groups.

(Sarrela et al., 2002)

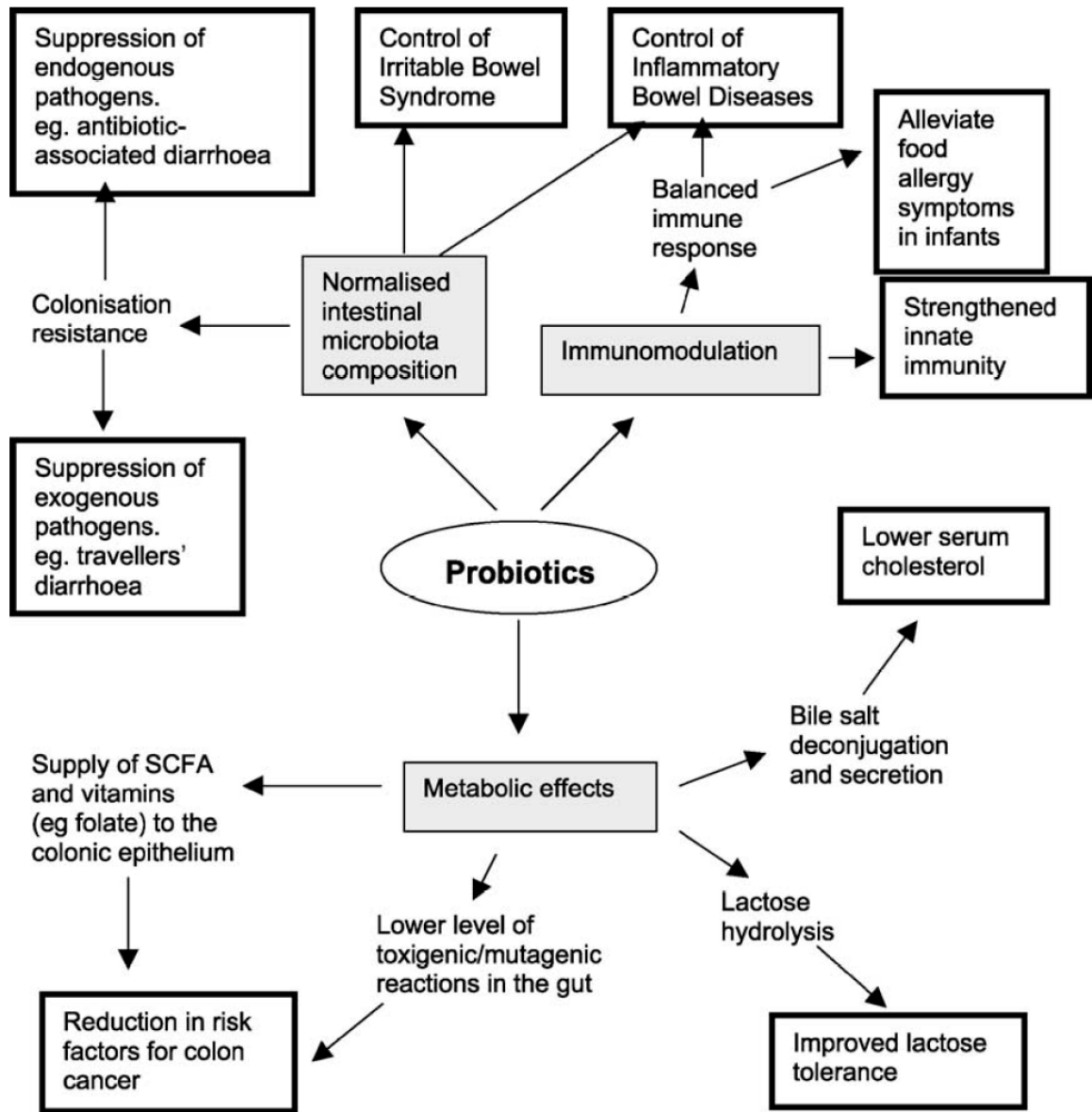


圖 2.3、益生菌的健康功效

Fig. 2.3. Proposed health effects of probiotics

(Sarrela et al., 2002)

由食物病原菌所引起的腹瀉(foodborne pathogenic diarrhea)等具有良好的成效。而益生菌在其他腸胃道疾病或感染方面亦頗具潛力，臨床試驗證實其具有不錯的預防效果，包括有預防大腸急躁症候群(irritable bowel syndrome; IBS)、發炎性腸道疾病(inflammatory bowel disease; IBD) (Shanahan, 2004)、由幽門螺旋桿菌所引起的胃炎(*Helicobacter pylori* gastroenteritis) (Wang et al., 2004)以及泌尿道感染(urinary tract infections) (Hoesl and Altwein, 2005)等。表2.2為目前益生菌在微生物感染防治上應用(Fooks and Gibson, 2002)。

(2) 免疫調節作用：

益生菌能藉由活化巨噬細胞刺激免疫系統，以增強非特異性之先天免疫力(innate immunity)。亦能激活淋巴細胞，使 IgA 的濃度增加，並產生 γ -干擾素(γ -interferon)，利用激活免疫系統來抑制腫瘤的形成。許多過敏性疾病是由於 Th1 (T helper 1 cell)與 Th2 免疫反應不平衡，且對過敏原的反應較偏向 Th2 的免疫反應所引起的。Th2 因分泌 IL-4 (interleukin-4)、IL-5 及 IL-13 而吸引嗜伊性紅血球(eosinophils)、嗜鹼性細胞(basophils)與肥大細胞(mast cell)移至發炎位置，這些細胞可單獨與 IgE 共同作用而引起過敏反應。另外，IL-4 和 IL-13 可促進 B 細胞進行抗體的 isotype switch，製造出 IgE 抗體，並增加血液循環中 IgE 的量(Schultz-Larsen and Hanifin, 1992)。在 T 細胞分化的早期，藉由細胞激素的調控可抑制 Th2 的免疫反應，IFN- γ

表 2.2、益生菌在微生物感染防治上之應用

Table 2.2. Application of probiotics in the prevention of microbial infection

Disorder	Subject	Probiotics	Effect
Infantile diarrhoea	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Reduced duration of diarrhoea
Antibiotic-associated diarrhoea	Human	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Reduced duration of diarrhoea
	Human	<i>B. bifidum</i> + <i>S. thermophilus</i>	Prevented rotavirus diarrhoea
	Human	<i>B. breve</i>	Prevented diarrhoea
	Human	<i>B. longum</i>	Decreased course of erythromycin-induced diarrhoea
	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Decreased course of erythromycin-induced diarrhoea, and other side-effects of erythromycin
Relapsing <i>C. difficile</i> colitis	Human	<i>Streptococcus faecium</i>	Decreased diarrhoea associated with antitubercular drugs administered for pulmonary TB
	Human	<i>S. boulardii</i>	Reduced incidence of diarrhoea
	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Improves/terminates colitis
Travellers' diarrhoea	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Eradicated associated diarrhoea
	Human	<i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i>	Decreased frequency, not duration of diarrhoea
Foodborne pathogen exclusion	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Decreased incidence of diarrhoea
	Male BALB/c mice	<i>L. casei</i> Shirota	Increased resistance to lethal infection with <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> and <i>L. monocytogenes</i>
	Male rat	Yoghurt bacteria	Increased resistance to salmonellosis infection
	<i>In vitro</i>	<i>L. acidophilus</i> + <i>Lactobacillus</i> GG	Inhibited growth of <i>Salmonella</i>
	Human	<i>Lactobacillus</i> GG	Decreased shigellosis-associated diarrhoea

(Fooks and Gibson, 2002)

(Interferon- γ)可減少 IL-4 的表現量，並抑制 B 細胞進行抗體的 isotype switch；IFN- α 可增加 IFN- γ 的產生，促進 Th1 的免疫反應，降低 IgE 的產生；而益生菌則可增加 IFN- α 與 IFN- γ 的表現量，誘發 Th1 的免疫反應，以減少過敏的反應，如圖 2.4 所示(Cross et al., 2001)。此外，益生菌也具有水解食物過敏原的能力(Bertrand-Hard et al., 2003)，以降低對過敏原的吸收，因此近年來益生菌也常應用於過敏性疾病的處理與預防(Perdigon et al., 1995; Majamaa and Isolauri, 1997; He et al., 2001a)。

(3) 代謝作用：

益生菌代謝過程中會產生短鏈脂肪酸(short chain fatty acid)、抑癌物質及乳糖分解酵素等，可發揮以下功效：

(i) 降低結腸癌發生率

益生菌可有效降低糞便中致癌酵素的濃度(如 β -glucuronidase、azoreductase、nitroreductase、glycocholic acid reductase 及 urease 等)(Goldin and Gorbach, 1977; McConnell and Tannock, 1991; Fujisawa and Mori, 1997)、抑制公認致癌物質的產生及抑制能分泌致誘變物質微生物的生長，因而減少罹患癌症的機會(Bogdanov et al., 1975; Rowland and Grasso, 1975; Mizutani and Mitsuoka, 1980; Bodana and Rao, 1990; Ebina et al., 1995; Lo et al., 2002)。此外，益生菌代謝所產生的短鏈脂肪酸，可作為上皮細胞的能

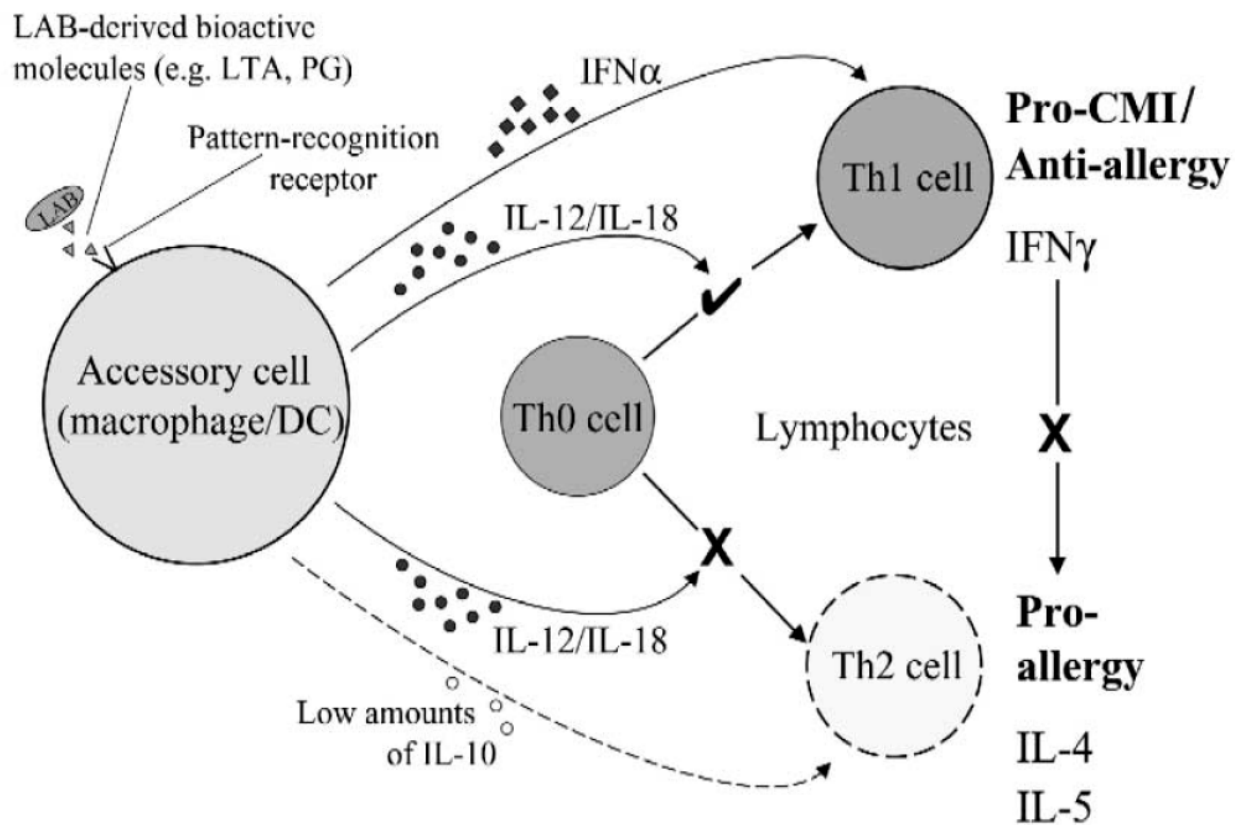


圖 2.4、益生菌調節免疫反應之抗過敏機制

Fig. 2.4. Theoretical anti-allergy mechanism for immunoregulation of probiotics

(Cross et al., 2001)

量來源(Sakata, 1987; Ichikawa et al., 1999)，經結腸上皮細胞吸收後，還能進一步降低結腸癌的發生率(You et al., 2004)。

(ii) 降低膽固醇

某些益生菌能將膽鹽去結合化，具有降低膽固醇的功效(Ahn et al., 2003)。Tahri et al. (1996)指出在膽鹽存在之下，雙歧桿菌可藉由將膽固醇與膽酸共沈澱及同化作用，而將膽固醇從培養基中去除。膽鹽為肝臟中膽固醇經氫氧化所產生，是一種具有極性之衍生物，其中膽酸(bile acid)含量佔總量的 50%，由 chenodeoxycholic acid、cholic acid 及 deoxy cholic acid 所組成，大部份膽酸會與牛磺酸(taurine)及甘胺酸(glycine)結合形成結合型膽鹽(conjugated bile salts) (Hofmann and Mysels, 1992)，而未與牛磺酸及甘胺酸結合者則稱為去結合型膽鹽(deconjugated bile salts)，去結合型膽鹽於 pH 5.5 以下溶解度會下降(Hofmann and Mysels, 1992; Klaver and Van der Meer, 1993; Tannock, 1995)，並與膽固醇共沈澱而排出，不僅有助於膽固醇免被吸收，更可因膽鹽減少而加速膽固醇形成膽鹽的速率，進而降低血清膽固醇的含量(Reynier et al., 1981; De Smet et al., 1994; De Rodas et al., 1996)。

(iii) 緩和乳糖不耐症

人體發生乳糖不耐症的情形，約有 90~95%是由於小腸粘膜上的乳糖酶(lactase)活力較低所致，且隨著年齡的增長，成年人體內乳糖酶活力下

降，乳糖不耐症更加明顯，當攝入含有未經水解的乳糖後，由於只能消化少部分乳糖，其餘尚未被分解的乳糖仍留在腸內，則會被腸內的微生物發酵利用分解產生氫氣、二氧化碳、乳酸以及其他短鏈脂肪酸等，進而刺激腸道，而這些代謝產物會使腸內的滲透壓升高，造成水份滲透到腸管，使腸腔脹大，因此患者會有反胃、脹氣、腹瀉、腹痛等不適症狀產生。

預先以益生菌發酵乳品中的乳糖，可將乳糖分解成葡萄糖與半乳糖，供身體吸收利用，而益生菌株所含的 β -galactosidase 並不會由菌體釋出，而是藉由膽鹽使細胞膜的通透性增加，讓乳糖等受質易於進入細胞內分解 (Pathmakanthan et al., 2000)，故能夠改善患有先天性腸黏膜 β -galactosidase 缺乏症所引起的乳糖代謝障礙，或是增進因腸胃炎等腸疾而導致的乳糖酶活性不足者對乳品的食用性 (Kilara and Shahani, 1976a; Mustapha et al., 1997)。

3-4 已應用於產品之益生菌

目前已應用於產品的益生菌包含了細菌、酵母菌還有黴菌，其菌種詳列於表 2.3，而當中較常使用的菌株以 *Lactobacillus* 與 *Bifidobacterium* 二屬居多，例如 *L. acidophilus*、*L. casei*、*L. reuteri*、*L. rhamnosus*、*B. bifidum*、*B. longum*、*B. lactis* 等，還有一些其他屬的乳酸菌如 *S. inulinus*、*Enterococcus*

表 2.3、應用於產品之益生菌株

Table 2.3. Probiotics applied in probiotic products

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Other LAB	Non-lactics
species	species		
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> (toyoi)
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> (Nissle 1917)
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactoc. lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii)
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Ped. acidilactici</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Strep. thermophilus</i>	
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

(Holzapfel et al., 1998)

faecalis 等(Holzapfel et al., 1998)。此外，也有一些非乳酸菌類(non-lactics)的菌株如 *Bacillus cereus*、*Saccharomyces* 等，但非乳酸菌菌株較少用於乳品或食品中，而大多是用於生技製藥方面，以凍乾或微膠囊的方式生產製造(吳等，2004)。

3-5 產孢子性乳酸菌(spore-forming lactic acid bacteria; SFLAB)

產孢子性乳酸菌是一群革蘭氏陽性菌，其特性兼具 *Lactobacillus* 屬的微生物好氧性、發酵醣類產生乳酸，及 *Bacillus* 屬的產孢子性及移動性(motile) (Kitahara and Suzuki, 1963; Doores, 1983; Kandler and Weiss, 1984; Suzuki and Yamasato, 1994; Murinda et al., 1995)等性質。

有部份研究將產孢子性乳酸菌作為益生菌使用(Hyronimus et al., 2000)，包括有孢子乳桿菌屬的 *Sporolactobacillus inulinus* (如圖 2.5 所示)、*S. laevis*、*S. racemicus* 及芽孢桿菌屬的 *Bacillus coagulans*、*B. laevolacticus*、*B. racemilacticus* (Hammer, 1915; Nakayama and Yanoshi, 1967a,b; Holzapfel and Botha, 1988)。

在國內產孢子性乳酸菌—*S. inulinus* 被列為食用級微生物，生物安全等級為 1，目前已於保健或健康食品中做為益生性之乳酸菌株使用(吳等，2004)，具產孢子特性之 *S. inulinus* 在不利於生長的環境下菌體可被誘發形成內孢子，以休眠的方式增進其抵抗不利環境因子的影響。

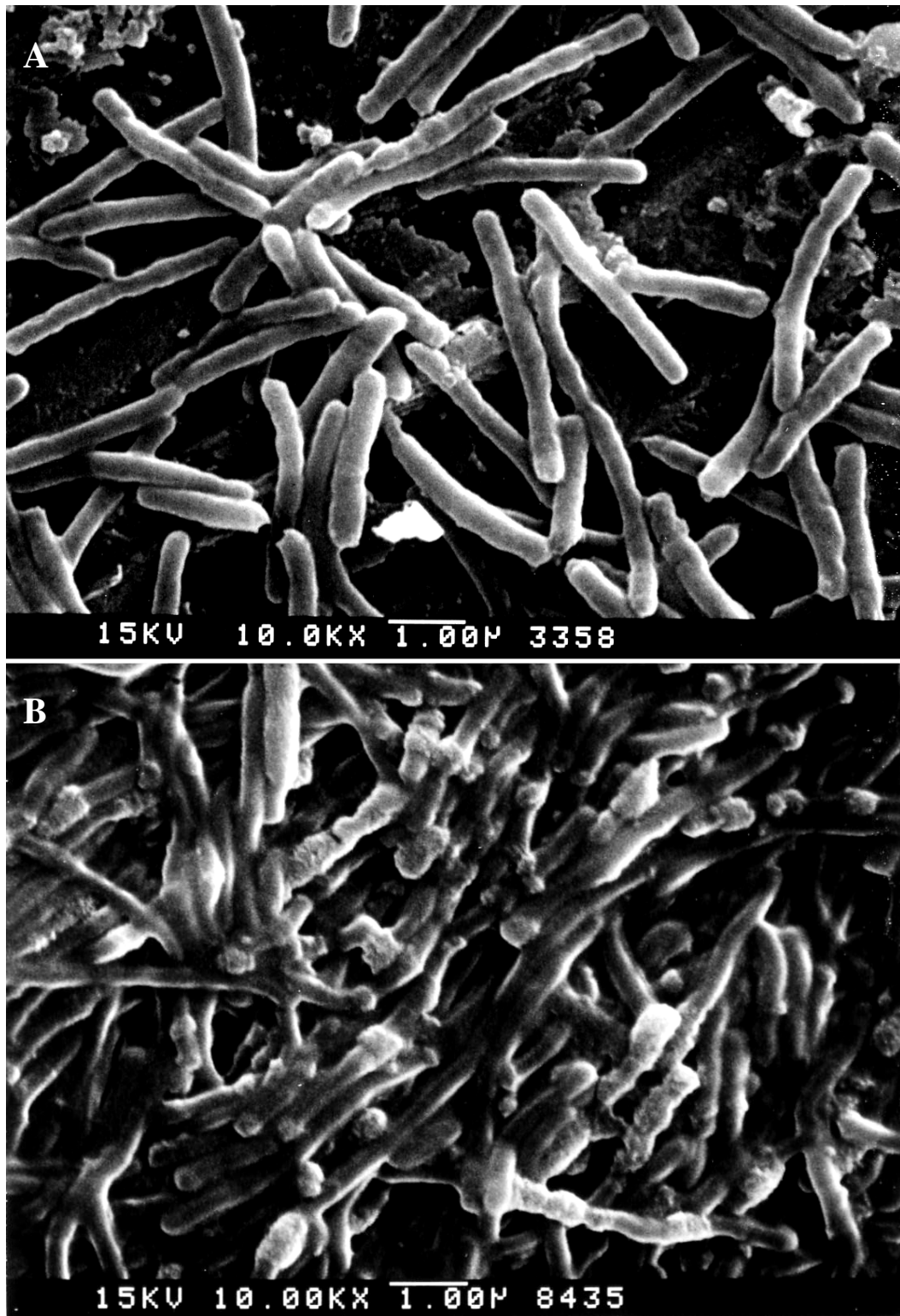


圖 2.5、*S. inulinus* 之掃描式電子顯微鏡圖(A)營養細胞形態；(B)孢子形態(放大倍率 10,000×)

Fig. 2.5. Scanning electron micrograph of *S. inulinus* (A) vegetative cell form; (B) spore form (magnification 10,000×)

3-6 嗜酸乳酸桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)

嗜酸乳酸桿菌為一典型益生菌株，如圖 2.6 所示，常被添加於膳食補充品中(diet supplement) (Prasad et al., 1998; Vinderola and Reinheimer, 2003; Kasimoglu et al., 2004)，具有諸多有益於人體健康之功效(Tejada-Simon et al., 1999; Michetti et al., 1999; Lin and Chen, 2000; Ogawa et al., 2001b)。該菌株為非產孢性的革蘭氏陽性菌，形態為兩端圓形之桿狀，常以單細胞、兩個成對或短鏈狀形態存在、不具運動性，屬於兼性厭氧菌，在 15°C 以下不會生長，最適生長溫度介於 35~38°C 之間，可生長於低 pH 值和膽鹽的環境中(Gupta et al., 1996)。

3-7 保加利亞乳桿菌(*Lactobacillus bulgaricus*)

保加利亞乳桿菌是屬於 *Lactobacillus delbrueckii* 下的亞種 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*，本論文以 *Lactobacillus bulgaricus* 或 *L. bulgaricus* 來表示。保加利亞乳桿菌為革蘭氏陽性菌，如圖 2.7 所示，形態為兩端圓形之桿狀，常以單細胞或短鏈狀形態存在、不產孢、無運動性、耐酸性強，在 pH 5 或更低的情況下仍可生長(Delley and Germond, 2002)。在優格(yogurt)乳製品發酵上，常將此菌株作為乳品菌醃(starter)使用，故其在乳品工業上扮演一重要角色(Kitazawa et al., 2003; Ravin and

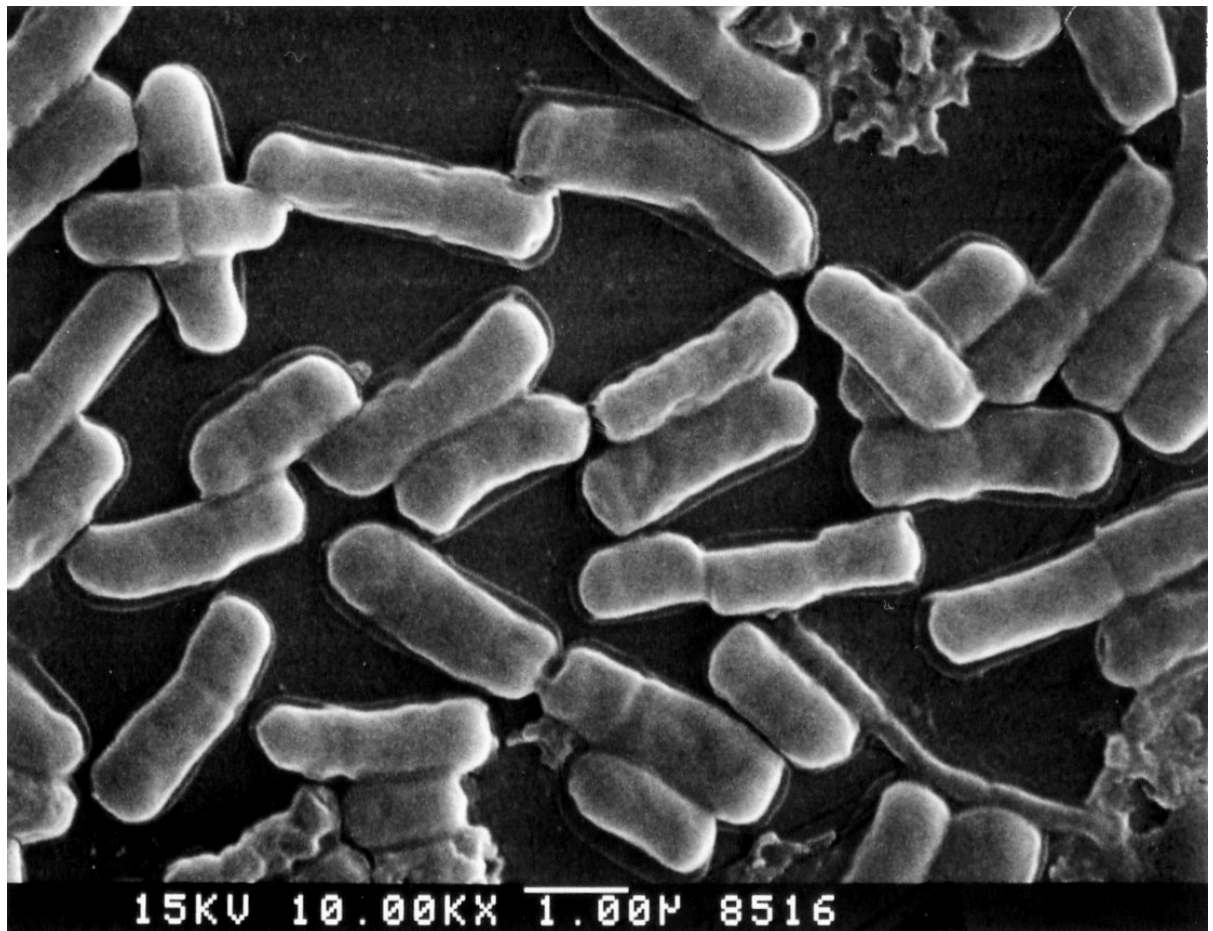


圖 2.6、*L. acidophilus* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 10,000×)

Fig. 2.6. Scanning electron micrograph of *L. acidophilus* (magnification 10,000×)

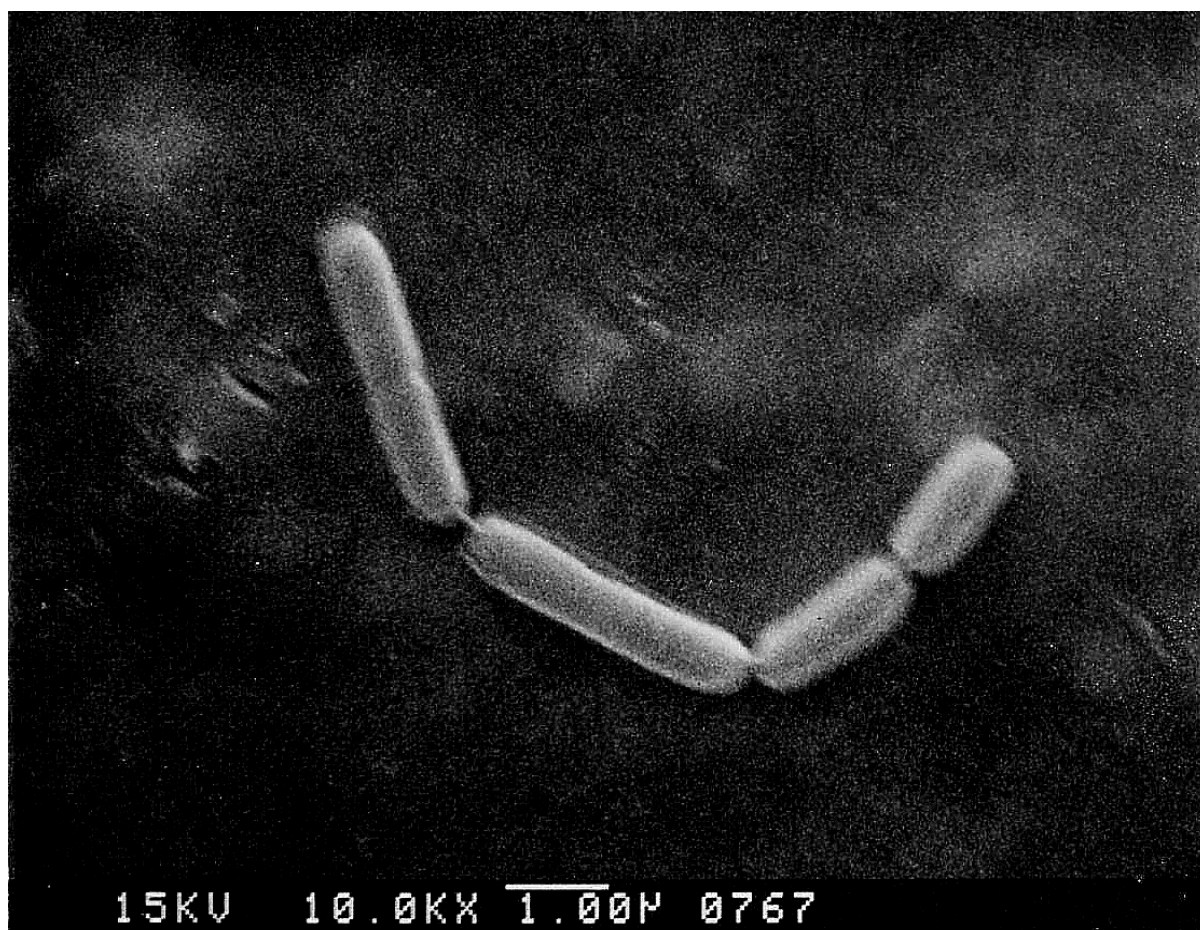


圖 2.7、*L. bulgaricus* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 10,000×)

Fig. 2.7. Scanning electron micrograph of *L. bulgaricus* (magnification 10,000×)

Alatossava, 2003; Serror et al., 2003)，目前已有多篇文獻將此菌株列為益生菌使用(Bezkorovainy et al., 1997; Naidu et al., 1999; Streekumar and Hosono, 2000; Vinderola and Reinheimer, 2003)。

3-8 比菲德雙歧桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)

雙歧桿菌常於膳食補充品中作為益生菌使用(Prasad et al., 1998; Bielecka et al., 2002; Vinderola and Reinheimer, 2003)，其為人體腸道中之正常菌屬(He et al., 2001a,b)，不產孢、不具運動性之革蘭氏陽性菌，最適生長溫度介於 37~43°C 之間。比菲德雙歧桿菌之菌體形態呈多形性為不規則桿狀、球菌狀、彎曲形、Y 字型、桿形兩端膨大增厚呈球桿狀，或是桿形及 Y 字型外含有大小不等的出芽狀片段和具凹縫多分隔桿狀(如圖 2.8 所示)。

雙歧桿菌屬與一般同型或異型發酵乳酸菌之主要差異為代謝途徑的不同，其缺乏 aldolase 及 glucose-6-phosphate dehydrogenase，故主要利用 fructose-6-phosphate phosphoketolase 將二分子葡萄糖代謝為二分子乳酸及三分子醋酸(Scardovi and Trovatelli, 1965; Chick et al., 2001)。

3-9 龍根雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)

棲息於人類及恆溫動物腸道中之有益菌—龍根雙歧桿菌，與比菲德



圖 2.8、*B. bifidum* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 10,000×)

Fig. 2.8. Scanning electron micrograph of *B. bifidum* (magnification 10,000×)

雙歧桿菌同屬於雙歧桿菌屬，活躍於宿主的大腸部位。其為革蘭氏陽性菌、厭氧、不具運動性、不形成孢子、菌體形態具有特徵之不規則分枝，培養時只有少數會成對出現，但不會形成鏈狀(如圖 2.9 所示)，其最適生長溫度為 36~38°C，雙歧桿菌屬藉由 fructose-6-phosphate shunt 分解葡萄糖，此屬最大的特色是會產生 fructose-6-phosphate phosphoketolase，此為 bifidobacteria 代謝六碳糖的關鍵酵素，也是鑑別 bifidobacteria 最直接的方法(Scardovi and Trovattelli, 1965; Chick et al., 2001)；另外此菌株可利用銨鹽當作唯一氮源而產生胺基酸，亦能製造維生素 B 群以及產生許多可幫助消化的酵素，例如酪蛋白分解酵素等，而糖分解主要是產生乳酸及醋酸，但不會產生二氧化碳(Arunachalam, 1999)。

第四節 乳酸菌對腸胃道耐受性之相關研究

4-1 乳酸菌之耐酸性研究

乳酸菌之耐酸性研究，目前多著重於對低 pH 值胃酸的耐受性試驗。臨床分析顯示，胃酸之 pH 值會隨胃內食物進入的時間和種類而變化，一般變化幅度約在 pH 1.5~4.58 之間，而食物停留在胃部的時間平均為 2~3 hr，亦會因食物種類及數量不同而有所差異，停留在胃部的時間以脂質停留的時間最長，其次是蛋白質類，停留時間最短者為醣類，一般而言，食

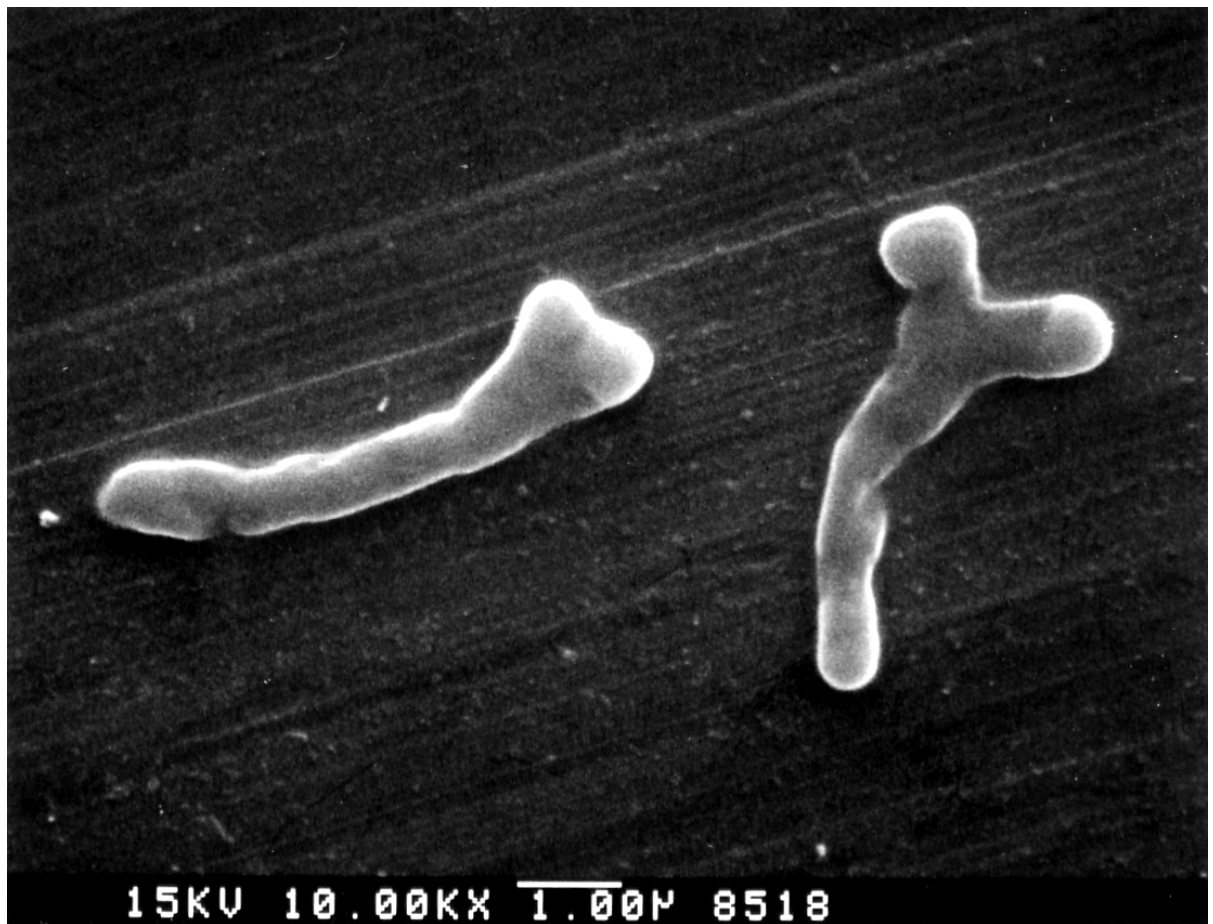


圖 2.9、*B. longum* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 10,000×)

Fig. 2.9. Scanning electron micrograph of *B. longum* (magnification 10,000×)

物中的脂質含量越高，停留於胃部的時間越長(Insel et al., 2001)。Berrada et al. (1991)研究發現，在空腹情況下，攝食發酵乳製品之胃排空期因攝食量而異，攝食量越大，胃排空速率愈慢，80%胃含量之食物的排空期平均為90 min，同時胃排空期也會因個人而異。

胃酸之酸性性質與鹽酸相似，因此實驗室在模擬胃液之酸性多以鹽酸進行 pH 值的調整(Prasad et al., 1998)，如 Toit et al. (1998)以鹽酸調整不同 pH 值的 MRS broth 進行耐酸性菌株的篩選，以期能夠篩選到具有耐酸能力之乳酸菌菌株；Berrada et al. (1991)則以 1.25 N HCl 將試驗之乳品調成 pH 3 以進行生體外(*in vitro*)試驗，而生體內(*in vivo*)試驗則是提供發酵乳予禁食隔夜的健康成人，再以胃管取食用發酵乳已經過 0、30、60、90 min 之胃內容物，並測其存活菌數；而 Holcomb et al. (1991)則是以 0.01 N HCl，37°C 培養乳酸菌 2 hr 測試其菌株之耐酸性。

4-2 乳酸菌之膽鹽耐受性研究

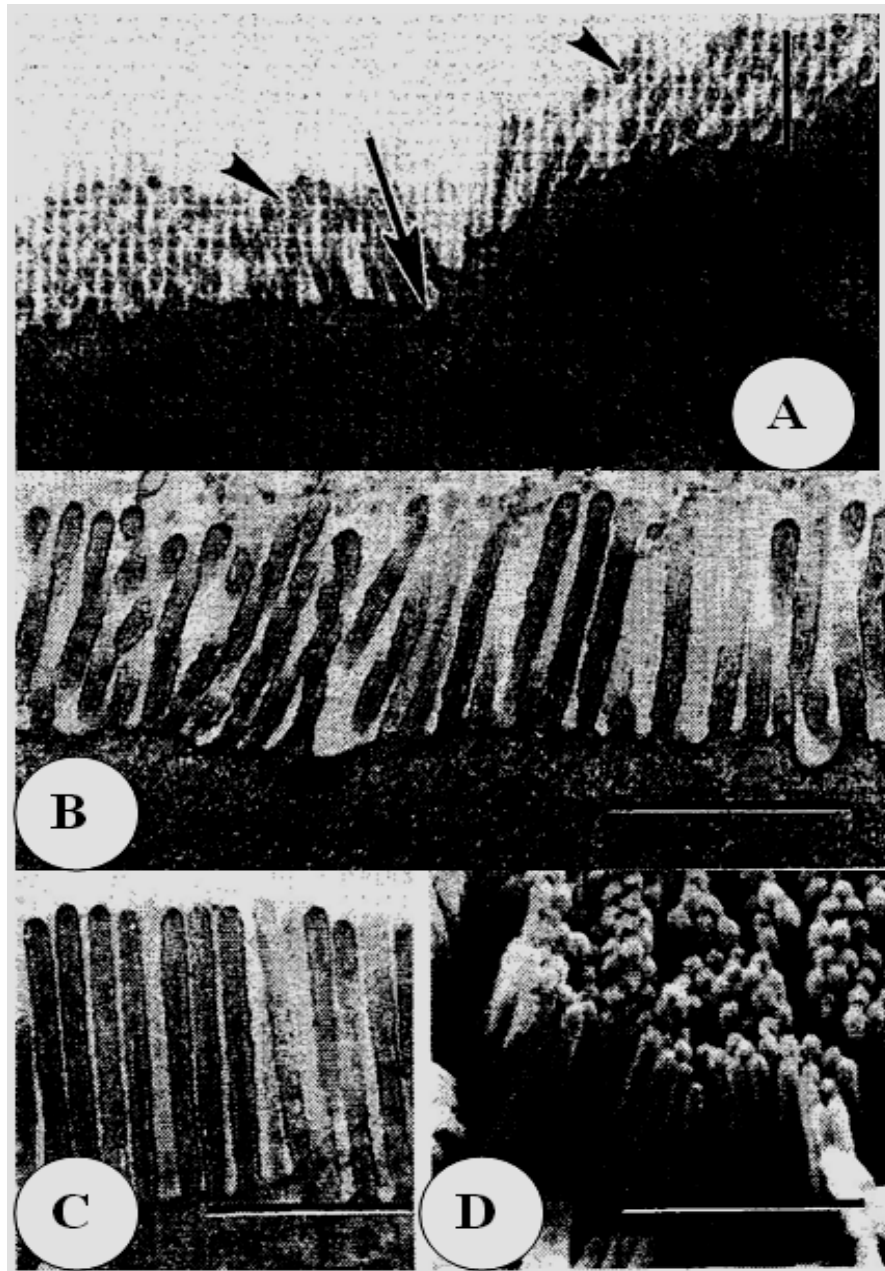
腸道內存在的膽鹽是一種由肝臟所產生的界面活性物質，對微生物而言是一種抑制因子。Gilliland (1979)曾指出 *Lactobacillus* spp.對膽鹽之抵抗力與棲息於腸道之能力有關。人體內腸道中膽汁的實際正確濃度，目前尚未有完整的數據(Gilliland, 1989)，直接由人體取得膽汁進行試驗的研究極

少，通常都是以牛膽汁(oxgall)作為模擬人體之膽汁，其成份包含 cholate, deoxycholate, dehydrocholate, chenodeoxycholate, glycocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, taurochenodeoxycholate, taurodeoxycholate, glycodeoxycholate 等。

4-3 乳酸菌吸附於腸道細胞之試驗模式

就目前的研究，欲探討生體內之菌株吸附於腸道細胞之試驗，實有其一定的困難度，因此許多相關研究都利用已建立之腸道細胞株來進行吸附性試驗探討，如人類結腸腺癌細胞株 Caco-2 cell 及人類腸上皮細胞株 Int-407 等 (Pinto et al., 1983; Sarem et al., 1996; Briske-Anderson et al., 1997; Tuomola and Salminen, 1997; Kirjavainen et al., 1998; Tuomola and Salminen, 1998; Jacobsen et al., 1999; Ouwehand et al., 1999a; Tsai et al., 2004)。

Caco-2 cell line 為源自於人體結腸特化之腺性瘤(adenocarcinoma)細胞株，能於生體外培養基中以貼附表面的方式進行極化性(polarized)的生長，其於體外生長分化完成(約 21 天)的模式，如圖 2.10 所示 (Briske-Anderson et al., 1997)；分化完成之此細胞株的生理特性為具有功能性的刷狀緣微絨毛及腸道上緣的水解酵素等成熟腸道之特性(Pinto et al., 1983; Hauri et al., 1985; Neutra and Louvard, 1989; Rodriguez-Boulan et al., 1989; Laburthe and



(Briske-Anderson et al., 1997)

圖 2.10、Caco-2 cells 生長分化過程之電子顯微鏡圖。(A)~(C)為 Caco-2 cells 生長分化過程中之穿透式電子顯微鏡圖，(A)和(B)為第 15 天，(C)第 21 天；(D)第 21 天之掃描式電子顯微鏡圖

Fig. 2.10. Electron micrographs of the growth and Development of Caco-2 cells. (A-C) Transmission electron microscopy (TEM) of the progression of differentiation of Caco-2 cells on day 15 (A-B) and day 21 (C). (D) A surface view of brush border on day 21 by scanning electron microscopy (SEM)

Amiranoff, 1990; Peterson and Mooseker, 1992; Costa de Beauregard et al., 1995)。由於其具備：(1) 構造簡單，易於操作；(2) 極少之遺傳變異性；以及 (3) 可免除類似其他細胞株層層相疊之生長現象等諸多優點，故目前已廣泛使用於生體外之模擬腸道的藥物通透以及益生菌、致病菌等方面之吸附試驗模式(Coconnier et al., 1992; Bernet et al., 1993; Coconnier et al., 1993a, b; Bernet et al., 1994; Greene and Klaenhammer, 1994; Giannasca et al., 1996; Lehto and Salminen, 1997; Gopal et al., 2001; Fernández et al., 2003; Lee et al., 2003; Resta-Lenert and Barrett, 2003; Matijašic et al., 2006)。

第五節 乳酸菌對腸炎沙門氏菌(*Salmonella enteritidis*)的抑制

5-1 腸炎沙門氏菌之簡介

依據世界衛生組織(World Health Organization; WHO)的分類，沙門氏菌分為兩種，分別是 *S. enterica* 及 *S. bongori*，而腸炎沙門氏菌即屬於 *S. enterica* 六個亞種下的 *S. enterica* subsp. *enterica* (Le Minor and Popoff, 1987; Popoff and Le Minor, 1997; Popoff et al., 2000)，因此本論文之腸炎沙門氏菌菌全名應為 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis*，簡寫為 *Salmonella enteritidis* 或 *S. enteritidis*。

沙門氏菌屬於腸內桿菌科，為革蘭氏陰性桿狀菌，氣體需求為好氧及

兼性厭氧，不會形成孢子，是人畜共通的病原菌，與其他腸內菌如 *E.coli*, *Citrobacter* 等血源相近。除了 *S. pullorum* 及 *S. gallinarum* 外，通常具有周鞭毛(peritrichous flagella)，具運動性(Parker and Guard-Petter, 2001)，如圖 2.11 所示。此菌可生長在 5~47°C 之間，最佳生長溫度是 37°C，最適生長之 pH 值在中性(6.6~8.2)，pH 大於 9.0 及低於 4.0 均有殺菌作用。沙門氏菌對溫度敏感，在巴斯德消毒法的溫度(63~65°C, 30 min)下即可被殺死。腸炎沙門氏菌感染之潛伏期約數小時至 72 小時，初始症狀會有水便、黏便、腹痛、噁心、嘔吐、發燒(70%以上病人會有)等症狀產生，極少數感染的病人會引起潛在的併發症，如敗血症及神經系統損害等(Baird-Parker, 1990)。五歲以下兒童，特別是一歲以下的嬰幼兒及老人家，體力、抵抗力差者，或因消化性潰瘍而長期吃大量制酸劑的人，都是罹病的高危險群。而該病菌之傳染途徑為經口傳入，主要是吃到受污染的水或食物，如未消毒的牛奶或乳製品、未煮開的水、未煮熟的肉類或蛋等。其他如糞便污染、使用被污染的器具、接觸已污染的貓、狗、家禽等。

5-2 沙門氏菌之致病機轉

(1) 產生毒素

根據許多動物實驗及生體外試驗結果，認為沙門氏菌可能是由

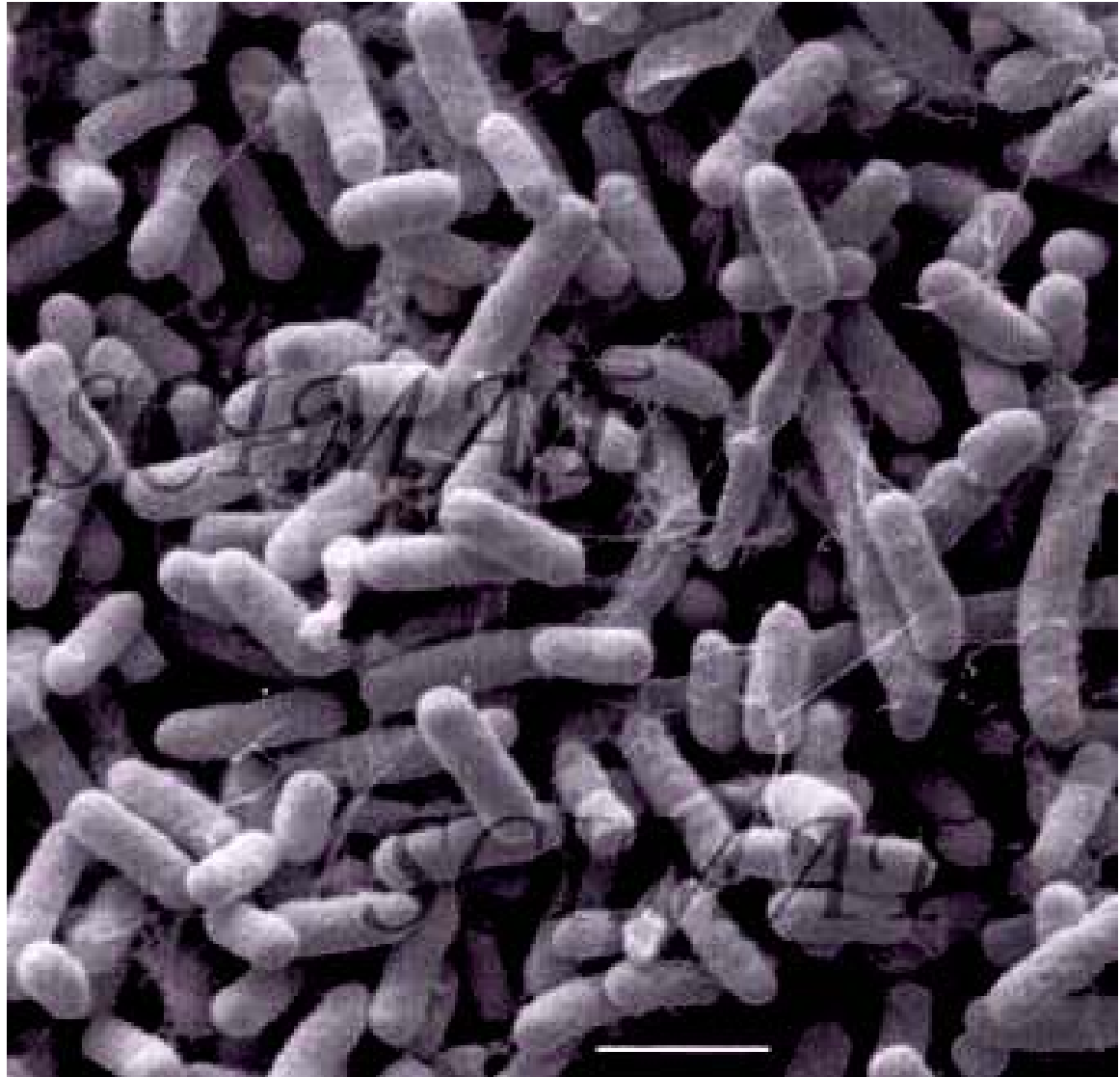


圖 2.11、*S. enteritidis* 之掃描式電子顯微鏡圖

Fig. 2.11. Scanning electron micrograph of *S. enteritidis*

(#3. <http://anka.livstek.lth.se:2080/salmonella.htm>)

於產生腸毒素(enterotoxin)及細胞毒素(cytotoxin)而造成致病性。Koo 及 Peterson (1983)發現沙門氏菌之萃取液會抑制兔子腸道表皮細胞及 Vero 細胞之蛋白質合成，進而顯示感染沙門氏菌之所以會造成腸黏膜損傷而引發全身性的感染，可能是其所產生之細胞毒素所導致(Koo et al., 1984)。

(2) 侵入性(invasion)

沙門氏菌與耶爾辛氏菌(yersinia)、志賀氏菌及某些大腸桿菌，都會侵入原核細胞內並繁殖。而線毛可能與沙門氏菌被細胞攝入有關，這是因為當使用抑制線毛形成之試劑—cytochalasin 時，則菌體侵入細胞的能力會下降；而另一種可能是因為線毛會誘導沙門氏菌附著及攝入細胞所需之蛋白質的合成(蔡，2004)。

第六節 乳酸菌之安全性評估

欲成為益生菌最重要的條件就是必須具有吸附於人類腸道細胞之能力，但不能具有侵入性(invasion)，因為菌株若有侵入性可能就同時擁有相當程度的病原性與感染性(Ford et al., 1996; Urao et al., 1996)，具侵襲力(invasiveness)的致病菌能突破宿主黏膜屏障，之後侵入體內定殖進而造成致病性(圖 2.12)。因此研究細菌是否具有侵入性可以生體外之細胞模式進行評估。其方法大致為：首先將試驗菌株與細胞共同培養一段時間，使細

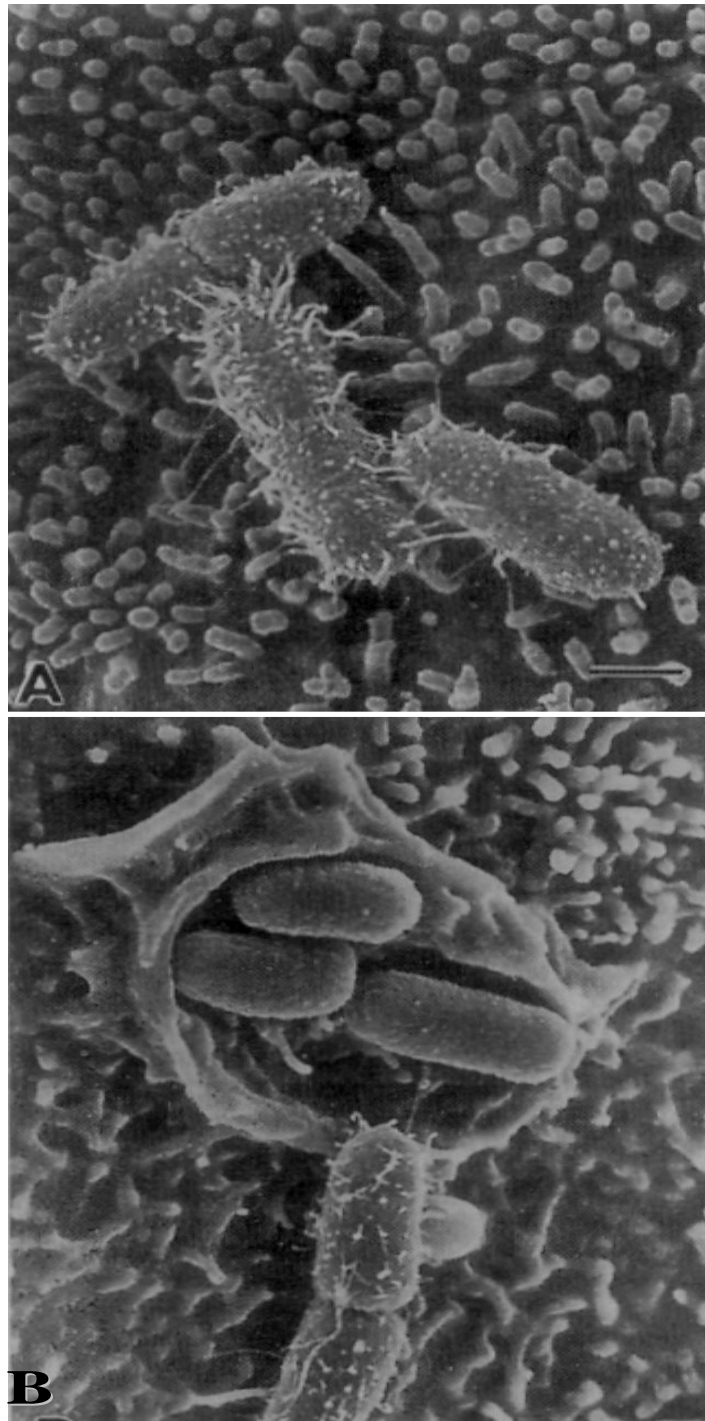


圖 2.12、致病菌侵襲腸道上皮細胞過程。(A)致病菌先行吸附於腸道上皮細胞上，進而侵襲腸道細胞(B)

Fig. 2.12. The invasion process of pathogens invading intestinal epithelial cells composed of (A) adherence of pathogens to the intestinal epithelial cell surface, and (B) invade the intestinal cells

(#4. <http://basic.shsmu.edu.cn/passw/micro2/jxnr/cn/6.ppt>)

菌有機會附著於細胞上，若該菌株具有侵入性則會侵入細胞內，之後再加入抗生素以殺死只附著在細胞表面之試驗菌株，接著打破細胞並計數侵入細胞內之菌數(Tang et al., 1993)。另外也可以實驗動物評估活體內之菌體侵入性，主要是先餵食實驗動物該試驗菌株，之後取其血液及肝、脾等器官計數其侵入菌數(Seppa, 1989)。

第七節 乳酸菌之貯藏安定性

為了使菌株在貯藏保存期間能夠維持較佳的存活菌數及穩定性，故將菌株進行冷凍乾燥處理。冷凍乾燥法乃是使樣品在凍結狀態之下，將其所含的水份直接昇華成水蒸氣的乾燥方式(Ratti, 2001)，由於冷凍乾燥過程相當耗能及費時，常造成操作成本昂貴，故冷凍乾燥適用於高價值、高品質的乾燥產品，目前常被應用於微生物、醫學、藥學等方面。一穩定的乾燥菌體，除了於冷凍乾燥後要有高度的存活率之外，其保存期限也是必須考量的，乾燥菌體貯存於-20°C可維持至少一年的活性，但若於 22°C下以真空保存則能維持三個月的活性(Speckman et al., 1973)。

第八節 研究動機

產孢性乳酸菌能夠產生菌體內孢子，以抵抗周圍不利環境因子的影響(Doores and Westhoff, 1983)，目前市面上有為數不少之添加產孢性乳酸菌的

益生菌商品販售(#1, 2.)，其產品大多標榜為能夠健胃整腸以及藉由此菌之產孢能力而「可能」具有之耐胃酸、耐膽鹽的特性，以此宣稱能夠增加此菌之存活率來達到其保健功效，但是此種產孢菌是否能有效地吸附於人類腸道細胞，則市售之產品並未能加以清楚說明。故對於產孢性乳酸菌之研究，除須探討該屬菌株孢子對胃酸與膽鹽的耐受性之外，更應對其腸道吸附性加以了解，以評估其潛在益生功效，而此種吸附能力之研究應包含營養細胞和孢子二者，以了解不同細胞形態在腸胃道吸附特性之表現。

第九節 研究目的

本研究欲探討孢子形態和營養細胞形態之產孢性乳酸菌—菊糖有孢子乳桿菌對模擬人體腸道中不良環境因子之抵抗性以及其在腸道中定殖與拮抗病原菌腸炎沙門氏菌之能力，同時探討該菌株對人體腸道細胞之安全性，並與 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *B. longum* 等市售益生菌產品常添加之乳酸菌就上述試驗性質進行比較，比較各試驗菌株在上述諸多性質方面的差異或相似性，進而評估菊糖有孢子乳桿菌在保健食品上應用的可行性。

第三章 材料與方法

第一節 研究設計架構

本研究之實驗設計架構如圖 3.1 所示，實驗材料與方法則於下列各節詳述。

第二節 實驗材料

2-1 使用菌株

- (1) *Sporolactobacillus inulinus* BCRC 14647
- (2) *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695
- (3) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BCRC 14009
- (4) *Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615
- (5) *Bifidobacterium longum* BCRC 11847
- (6) *Salmonella enteritidis* BCRC 10744

以上菌株皆購自新竹市食品工業發展研究所。

2-2 菌株活化之培養基

- (1) de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)。
- (2) MRS broth 另外添加 0.05% (w/v) L-cysteine-HCl (AppliChem, Darmstadt, Germany) (MRS-C)。



圖 3.1、實驗設計架構

Fig. 3.1. Design of the research

(3) reinforced clostridial medium (RCM; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)。

(4) Nutrient broth (NB; Difco Laboratories)。

液態培養基另外添加 1.5% agar (Difco Laboratories)，經高壓滅菌(121°C, 15 min)冷卻後即可製成固態培養基。

2-3 使用之細胞株

C2BBel BCRC 60182 (human colon adenocarcinoma, clone of Caco-2)
購自新竹市食品工業發展研究所。

2-4 細胞株生長之新鮮培養基

90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Germany)、10%胎牛血清(fetal bovine serum; FBS, Biological, Kibbutz Beit Haemek, Israel)、1%抗生素(penicillin/streptomycin, BioSource, Camarillo, CA, USA)、1% L-glutamine (Biological)。

2-5 細胞株保存之冷凍培養基

80% DMEM、20%胎牛血清、1%抗生素、1% L-glutamine、7%冷凍保護劑 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA)。

第三節 實驗菌株之前處理

3-1 菌株之活化與冷凍保存

取由食品工業發展研究所生物資源保存中心購得之菌株，分別以 MRS broth (*S. inulinus* 及 *Lactobacillus* spp. 培養基)、MRS-C broth (*B. bifidum* 培養基)、RCM broth (*B. longum* 培養基)或 Nutrient broth (*S. enteritidis* 培養基)活化二次。所有菌株皆以 37°C 活化培養，而氣體需求條件 *S. inulinus* 和 bifidoabcteria 為厭氣培養(gas-generating kit, Oxoid)，lactobacilli 為微好氣培養，*S. enteritidis* 則為好氣培養。

將活化之菌液離心(8000 xg, 4°C, 15 min)後，重新懸浮於培養基中，再以 1:1 的比例與已滅菌之 20% glycerol 溶液混合，分裝成 1 ml 懸浮液貯存於-80°C 下備用。實驗前將其取出解凍，取 1%之接種量，接種於液態培養基中，以 37°C 活化 48 hr。

3-2 菊糖有孢子乳桿菌之孢子誘導培養

將已活化之 *S. inulinus* 菌液進行離心(8000 xg, 15 min, 4°C)，再以無菌之磷酸緩衝生理食鹽水(phosphate-buffered saline; PBS, Hyclone, Logan, UT, USA)沖洗菌體沈澱物(pellet)二次，即可得到營養細胞形態之菌體。將此營養細胞塗抹於產孢培養基瓊脂平板上。產孢培養基之組成如下: yeast extract

(Difco), 0.5%; peptone (Difco), 0.5%; methyl- α -D-glucopyranoside (Sigma), 1.0~2.0%; CaCO₃ (Wako, Tokyo, Japan), 3.0%; agar (Difco), 1.5%。以 37°C 厭氧培養 14~21 天，直到產生孢子(以孢子染色法觀察驗證)。實驗前以 PBS buffer 將培養基上的孢子沖洗下來，之後離心再以 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，即可得到孢子形態之菌體。

第四節 細胞培養

4-1 冷凍細胞之活化

Caco-2 細胞株於 37°C 下快速解凍，接著加入新鮮細胞培養基，混合均勻之後移入 CO₂ 培養箱(NUAIRE, NU-5500, USA)以 37°C, 5% CO₂ 培養。次日將舊培養基吸除以移除冷凍保護劑，並且加入新鮮培養基，隨後繼續以 37°C, 5% CO₂ 培養，每隔兩天更換細胞培養基。

4-2 細胞繼代培養

待細胞生長至高密度時，即須分殖至新的培養瓶中。首先吸除舊培養基，以 PBS buffer 潤洗細胞 1~2 次，接著加入 0.05% trypsin-EDTA 溶液 (Biochrom AG)，於 37°C 下作用數分鐘，之後輕拍培養瓶使細胞自瓶壁上脫落，再加入適量之新鮮培養基，以吸取器吸放數次以打散細胞團塊，混合均勻後依比例稀釋移至新的培養瓶中，依正常培養條件培養。

4-3 細胞株冷凍保存

細胞株之冷凍保存應在生長良好之對數期(log phase)、約 80~90%緻密度且存活率高的狀態下進行。首先依照細胞繼代培養的步驟，將細胞打散並收集細胞，一方面取少量的細胞懸浮液計數細胞濃度，另一方面將細胞懸浮液離心(1000 rpm, 10 min)，去除上清液，接著加入適量之細胞冷凍培養基，混合均勻後，分裝於已標示完全之冷凍保存管中(細胞濃度至少為 10^6 cells/ml)，即可進行低溫冷凍保存。細胞低溫冷凍保存步驟為：先將冷凍保存管置於 4°C , 10 min \rightarrow -20°C , 30 min \rightarrow -80°C , overnight \rightarrow 液態氮桶長期貯存。

4-4 細胞染色與計數

取 20 μl 細胞懸浮液與 20 μl trypan blue (Biochrom AG)等體積混合。取少許混合液注入血球計數盤 chamber 上方之凹槽內，以 100 倍倒立式顯微鏡(Olympus, IX71, Japan)觀察並計數，活細胞由於細胞膜完整故不會被染色，死細胞則會被染為藍色。計數四大方格中的細胞總數，再除以 4，乘以稀釋倍數(至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合)，最後乘以 10^4 ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。

$$(\text{四大方格細胞總數} \div 4) \times 2 \times 10^4 = \text{細胞數/ml}$$

活細胞數÷(死細胞數+活細胞數)×100%=存活率

4-5 細胞單層膜之培養

本實驗參考 Coconnier et al. (1992)所述之方法。將繼代培養之細胞，加入細胞培養皿(cell culture dish)中，使每個 well 的細胞濃度為 $3\times 10^4\sim 3\times 10^5$ /ml。然後以 37°C, 5% CO₂ 培養，且每天更換新鮮之培養基，直至細胞株形成分化完全之單層膜，並以倒立式顯微鏡拍照觀察。

第五節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽與吸附性研究

5-1 耐酸性試驗

此試驗乃參考 Fernández et al. (2003)所述之方法來進行。將前述含活化菌株之菌液(含營養細胞菌體)或孢子懸浮液以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌之 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，然後再重新懸浮於 PBS buffer 中。將 1 ml (約 $N\times 10^9$ CFU/ml)此菌液分別加入 10 ml pH 2.0, 3.0, 4.0 之酸液中，酸液為 0.1% peptone water 分別以 3.0 M HCl 調整為 pH 2.0, 3.0, 4.0，將含有菌體之酸液移入迴轉式振盪培養箱(LIAN SHEN, LUS-480, Taiwan)中以 37°C 振盪培養(150 rev/min) 0, 1.5, 3.0 hr。培養作用後之樣品，以標準平板計數法求得各個作用時間之存活菌數並計算其存活率；每一樣品進行三重複試驗。

$$\text{存活率} = \frac{\text{各作用時間之存活菌數}(\log \text{CFU/ml})}{\text{初始菌數}(\log \text{CFU/ml})} \times 100\%$$

5-2 耐膽鹽試驗

將上述活化菌液(含營養細胞菌體)或孢子懸浮液，以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌之 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，接著再重新懸浮於 PBS buffer 中。將此懸浮液分別加入含有 0.1% , 0.2%及 0.4% oxgall bile (Sigma) 之 peptone water 中，以 37°C 振盪培養(150 rev/min) 0, 1.5, 3.0 hr。培養作用後之樣品，以標準平板計數法求得各個作用時間之存活菌數並計算其存活率；每一樣品進行三重複試驗。

$$\text{存活率} = \frac{\text{各作用時間之存活菌數}(\log \text{CFU/ml})}{\text{初始菌數}(\log \text{CFU/ml})} \times 100\%$$

5-3 模擬腸道吸附性試驗

本試驗乃參考 Matijašic et al. (2006)、Bibiloni et al. (1999)及 Gopal et al. (2001)之方法行之。在試驗進行前 1.5 hr，預先以 0.25% (v/v) glutaraldehyde (Sigma)將 Caco-2 cell monolayer 固定 15 min，之後再以 PBS buffer 潤洗 cell monolayer 二次，再添加不含抗生素之 DMEM 培養基，作為模擬腸道吸附試驗使用。將試驗之乳酸菌株，以 8000 xg 離心 15 min 後，使用 PBS buffer

清洗二次，再懸浮於不含抗生素之 DMEM 中。接著在每個欲進行吸附作用之 well 內加入 1 ml 之吸附試驗菌株(約 10^8 CFU/ml)，在 37°C ，5% CO_2 下培養 2 hr。然後以無菌之 PBS buffer 清洗 well 五次，將未吸附於 cell monolayer 上之菌株洗掉，再以 1% Triton X-100 (Sigma) 溶液分解 Caco-2 cell monolayer，之後將 well 中的溶液以連續稀釋法在適合個別試驗菌株生長的培養基上進行標準平板計數，每一樣品進行三重複試驗，之後計算其吸附率，其計算公式如下：

$$\text{吸附率} = \frac{\text{吸附至細胞單層膜上的菌數 (log CFU/ml)}}{\text{添加至細胞單層膜上的菌數 (log CFU/ml)}} \times 100\%$$

另將完成吸附試驗後的 cell monolayer，以 95% methanol (TEDIA, Fairfield, Ohio, USA) 將吸附於膜上之菌株加以固定(作用時間 30 min)，之後吸除 methanol，再以 PBS buffer 清洗 cell monolayer 並於無菌操作台中風乾，之後進行革蘭氏染色，再以正立式顯微鏡觀察(Olympus, CX41, Japan)。

第六節 乳酸菌培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌生長之試驗

6-1 培養基上清液 pH 值之測定

將 1% 之試驗菌株接種於液態培養基中，以 37°C 培養 7 天。每天取出 5

ml 培養之菌液進行離心(8000 xg, 15 min)，並收集其培養基上清液(spent culture supernatant; SCS)，之後直接以 pH meter (SUNTEX, sp-701, Taiwan) 測定之。

6-2 培養基上清液之乳酸產量測定

取 5 ml 乳酸菌培養基上清液，以蒸餾水定量至 100 ml，再取其定量後之 25 ml 稀釋液，加入 0.5 ml 酚酞指示劑，以 0.1 N NaOH 標準溶液(Aldrich, St. Louis, MO, USA) 滴定至樣品呈現微紅色，且維持 30 秒內不變，即為滴定終點(pH 7.0)。記錄滴定所耗用的 NaOH 溶液體積，以下列公式計算(樣品中有機酸量以乳酸表示之)(李及賴，1992)。

0.1 N NaOH 溶液 1 ml 相當於 0.009 g 乳酸

$$\text{乳酸(\%)} = 0.1 \text{ N NaOH 滴定量(ml)} \times 0.009 \times (100/25) \times (1/5) \times 100$$

6-3 乳酸菌培養基上清液之抑菌圈試驗

本試驗參考 well diffusion assay 方法(Schilinger and Lucke, 1989; Fernández et al., 2003)來進行。將已活化之包含 *S. inulinus* 在內之各試驗菌株，以液態培養基培養 7 天之後，離心(8000 xg, 15min)並收集上清液，用以進行抑菌試驗分析。將培養 24 hr 的 *S. enteritidis* 菌液離心，以 PBS 沖洗二次，接著再重新懸浮於 PBS buffer 中，作為抑菌試驗之病原菌。將 200 μ l

S. enteritidis 菌液塗抹於 Nutrient agar 上，在無菌操作台中風乾 30 min，再以無菌 tip 較寬的一端於洋菜平板上壓出 9 mm 直徑的孔洞。接著於每個孔洞中分別注入 100 μ l 各試驗菌株之培養基上清液，靜置 30 min 後，在 37°C 下正面放置培養皿使培養基上清液作用 48 hr 後，觀察各試驗菌株之培養基上清液是否有抑菌圈產生，並測量其所形成之抑菌圈之直徑大小。

第七節 乳酸菌培養基上清液之抑菌成份探討

為了探討試驗乳酸菌培養基上清液中的抑菌成份為何，故針對有機酸 (organic acid) 以及抑菌素 (bacteriocins) 二者進行培養基上清液之中和試驗和酵素作用試驗。

7-1 培養基上清液中和試驗

本試驗參考 Jin et al. (2000)、Mante et al. (2003) 和 de Carvalho et al. (2006) 所述之方法。首先收集培養 5 天的乳酸菌液，經 4°C，8000 xg 離心 15 min 後，即可分離得到不含乳酸菌菌體的培養基上清液。以 1 M NaOH 中和各培養基上清液中之有機酸，並將 pH 值調整至中性 (pH 約為 7.0)，再以 0.22 μ m 之濾膜過濾此上清液，利用 well diffusion assay 的方法測定其抑菌能力，並與未經 NaOH 中和的乳酸菌培養基上清液做對照。

7-2 培養基上清液之酵素處理

將培養 5 天的乳酸菌培養基上清液分別加入 proteinase K、 α -chymotrypsin、trypsin、pepsin，上述酵素皆為 Sigma 廠牌，使其最終濃度為 1 mg/ml，以 37°C 水浴作用 2 hr，而後以 100°C 加熱 5 min 終止其反應，再進行 well diffusion assay 之抑菌試驗，並與未經任何處理的乳酸菌培養基上清液做為比較(Gopal et al., 2001；吳，2005)。

7-3 培養基上清液之熱穩定性試驗

為了進一步測試培養基上清液中抑菌成份對熱的敏感性，故將培養 5 天的培養基上清液分別以 70°C, 15 min、70°C, 30 min、100°C, 15 min、100°C, 30 min 及 121°C, 15 min 加熱處理之後，以 well diffusion assay 測定其抑菌能力，並以未經加熱處理的乳酸菌培養基上清液做為對照(吳，2005)。

7-4 培養基上清液之乳酸成份抑菌試驗

實驗設計原理為將病原菌 *S. enteritidis* 加入(1) *S. inulinus* 之培養基上清液 (乳酸濃度為 0.192 mmole/ml，pH 約為 3.69)；(2)添加 D-(-)或 L-(+)乳酸之 MRS broth (濃度為 0.192 mmole/ml，pH 約為 3.69)；以及(3)以 HCl 調酸之 MRS broth (pH 3.69)中，並以 MRS broth (pH 6.8)作為控制組，以探討 *S. inulinus* 上清液對 *S. enteritidis* 的抑菌效果是否為 pH 值的降低亦或是乳酸菌分泌之乳酸而引起的。

首先將培養 5 天之 *S. inulinus* 上清液，以 0.1 N NaOH 標準溶液滴定中和並測定其有機酸之含量，再由 NaOH 標準液滴定量換算培養基上清液中所含之乳酸含量為 0.192 mmole/ml (pH 3.69)，因此在 MRS broth 中添加 0.192 mmole/ml (pH 3.69) 乳酸，使之與 *S. inulinus* 培養基上清液中所含的乳酸含量相同。實驗方法為將已活化培養之 *S. enteritidis* 菌液離心(8000 xg, 15 min, 4°C)，並以 PBS buffer 清洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中，之後取 1 ml 菌液分別加入 9 ml 下述之試驗溶液中(1)為 *S. inulinus* 培養基上清液，pH 3.69；(2)添加 0.192 mmol/ml D-(-)或 L-(+)乳酸之 MRS broth，pH 3.69；(3)以 3.0 M HCl 調整 pH 值為 3.69 之 MRS broth 及(4)控制組 MRS broth，pH 6.8。以 37°C 振盪培養(150 rev/min) 0~4 hr，接著每隔 1 hr，將含有菌體之試驗溶液離行離心，以 PBS buffer 清洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中，之後連續稀釋以 Nutrient agar 製成平板，於 37°C 培養 48 hr，計數 *S. enteritidis* 之存活菌數。

第八節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗

8-1 乳酸菌預防腸炎沙門氏菌侵襲腸道細胞之試驗(prophylactic effect)

此試驗乃參考 Wadström 等(1997)之方法來進行。將試驗之乳酸菌株預先吸附於 Caco-2 cells 上，試驗其阻止 *S. enteritidis* 侵襲感染腸黏膜之能力。

先將 Caco-2 cell monolayer 以 0.25% (v/v) glutaraldehyde 固定 15 min 之後，再以 PBS buffer 清洗二次，接著添加不含抗生素的 DMEM，經 1.5 hr 培養後作為試驗之用。將試驗之乳酸菌液離心後，以 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於不含抗生素的 DMEM 中。另外將 *S. enteritidis* 菌液混合等體積的 fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma) 螢光染劑(2 mg/ml)，於室溫下作用 20 min，然後離心去除過量的 FITC，菌體沈澱物再以 PBS buffer 沖洗三次，並重新懸浮於不含抗生素的 DMEM 中。將 1 ml 的各乳酸菌液(約 10^8 CFU/ml)加入含有 Caco-2 cell monolayer 之 well 中，以 37°C, 5% CO₂ 培養 2 hr 後，吸除 DMEM 培養液並以 PBS buffer 清洗 well 五次，以移除未吸附於 cell monolayer 上之菌株，接著加入 1 ml FITC-labeled *S. enteritidis* (10^8 CFU/ml)，在 37°C, 5% CO₂ 下培養 2 hr 後，吸除培養液並以 PBS buffer 清洗五次，以移除未附著之菌體。然後使用螢光檢測器(Bio-Tek, FLX-800, USA)以 485 nm 激發波長和 528 nm 散發波長偵測其樣品的螢光強度(fluorescence density)，並且以螢光顯微鏡拍照觀察。同時以未預先用試驗乳酸菌株處理的樣品作為控制組，計算試驗組和控制組的螢光強度比值，計算方式為試驗組之螢光強度值除以控制組之螢光強度值，再乘以 100，接著將控制組之螢光強度值定為 100%，若螢光強度比值減弱，則表示預先以試驗乳酸菌株吸附於 Caco-2 cells 上，可有效降低 *S. enteritidis* 對

Caco-2 cells 的侵襲。

另外也將各試驗乳酸菌株進行 FITC 螢光染色，之後吸附於 Caco-2 cells 上，接著於 well 中加入濃度為 10^8 CFU/ml 的 *S. enteritidis* 菌液 1 ml，以 37°C ，5% CO_2 培養 2 hr，觀察 *S. enteritidis* 加入前後 Caco-2 cells 上各試驗菌株螢光強度之變化。若螢光強度不變，則表示各試驗乳酸菌株不會受到 *S. enteritidis* 的影響而降低對 Caco-2 cells 的吸附與定殖，所得結果與其控制組(未以 *S. enteritidis* 處理者)進行比較。

8-2 乳酸菌及其培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌吸附於腸道細胞之試驗 (therapeutic effect)

本試驗以 Caco-2 cells 模擬腸道上層黏膜細胞。參照前述 8-1 之方法，將 FITC-labeled *S. enteritidis* 吸附於 Caco-2 cells 上，接著於 well 中加入 1 ml 濃度為 10^8 CFU/ml 之各試驗乳酸菌株或其培養基上清液，以 37°C ，5% CO_2 培養 2 hr 之後，偵測樣品螢光強度並以螢光顯微鏡拍照觀察。同時以未加入試驗菌株或其培養基上清液之樣品作為控制組，計算試驗組和控制組的螢光強度比值，計算方式為試驗組之螢光強度值除以控制組之螢光強度值，再乘以 100，接著將控制組之螢光強度值定為 100%，若螢光強度比值減弱，則代表乳酸菌菌體或其培養基上清液能有效抑制 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 之吸附。

第九節 細胞侵入性試驗

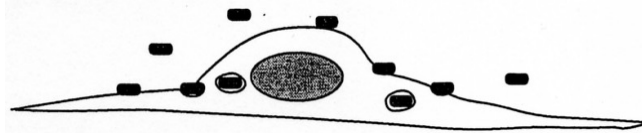
各試驗乳酸菌株對人類腸道細胞之安全性評估，乃以生體外模式之侵入性試驗為之(Tang et al., 1993)，試驗流程如圖 3.2 所示。先以 0.25% (v/v) glutaraldehyde 固定 Caco-2 cell monolayer 之後，再以 PBS buffer 清洗二次，接著添加不含抗生素的 DMEM 培養 1.5 hr。各試驗菌株則先接種於液體培養基，以 37°C 培養 48 hr，之後離心並以 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再將其重新懸浮於不含抗生素的 DMEM 中。添加已知菌數之試驗菌株($10^3 \sim 10^9$ CFU/ml)於含有 Caco-2 cell monolayer 之 well 中，培養 2 hr，接著吸除 well 中之培養液，以 PBS buffer 清洗五次，去除未附著之菌株，然後於 well 中加入含有抗生素(100 μ g/ml tetracycline, MDBio, Frederick, MD, USA)的 DMEM，於 37°C，5% CO₂ 下作用 2 hr，以殺死吸附於 Caco-2 cells 表面之試驗菌株，之後以 PBS buffer 洗除 tetracycline 及溶液中死亡的菌體。接著使用 1% Triton X-100 溶液分解 Caco-2 cell monolayer，釋出可能侵入 Caco-2 cells 內部之試驗菌株。將 well 中之溶液以連續稀釋法進行標準平板計數，計算侵入百分比，其計算公式如下：

$$\text{侵入百分比(\%)} = \frac{\text{經抗生素處理後存活之菌數}}{\text{添加於含細胞單層膜之 well 中的菌數}} \times 100\%$$

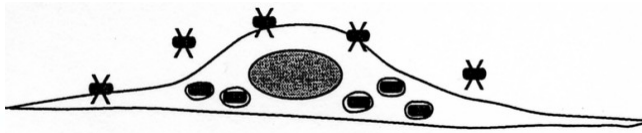
1. Infect Caco-2 cells with bacteria (10^3 to 10^9 CFU/ml).



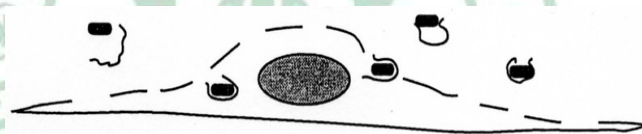
2. Incubate at 37°C , 5% CO_2 for 2 hr.



3. Add $100\ \mu\text{g/ml}$ tetracycline for 2 hr to kill extracellular bacteria.



4. Wash and add 1% Triton X-100 to release internalized bacteria.



5. Perform plate count of intracellular bacteria.



$$\% \text{ INVASION} = \frac{\# \text{ bacteria surviving tetracycline treatment}}{\# \text{ bacteria added to cell monolayer}} \times 100\%$$

圖 3.2、乳酸菌之侵入性試驗流程

Fig. 3.2. Flow chart of LAB invasion assay

(Tang et al., 1993)

侵入百分比越低，表示試驗之乳酸菌株使用於人體的安全性越高。若其不具侵入性，則當其作為益生菌使用時，不會有侵襲人體腸道細胞之危險。

第十節 貯藏安定性試驗

將含有活化菌株之菌液及孢子懸浮液以 8000 xg 離心 15 min 之後，去除上清液並以 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於無菌的 11% 脫脂牛乳(Anchor, Wellington, New Zealand)中，將上述脫脂乳菌液分裝至冷凍乾燥瓶中，每瓶分裝 5 ml，再以冷凍乾燥機(EYELA, FDU-2000, Japan)乾燥之。完成乾燥後的樣品移置恆溫恆濕箱(YOUNG CHENN, HG-40, Taiwan)中進行貯藏試驗，貯藏條件為 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $60 \pm 5\% \text{RH}$ 。分別計數冷凍乾燥前及冷凍乾燥後貯藏第 0, 4, 8, 12, 16, 20 週回溶為液態樣品時的活菌數(以 log CFU/ml 表示)。

第十一節 統計分析

本實驗利用 Microsoft Excel 軟體(Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, 2003, USA)計算試驗三重複數據之平均值與標準差(standard deviation)，並以 SigmaPlot 繪圖軟體(SigmaPlot 2000 for Windows, ver 6.00, USA)繪製柱狀圖與曲線圖。另外也採用 SAS 軟體(Statistical Analysis System,

Version 6.12, 1996), 利用 GLM 程序之 Duncan's new multiple range test 及 Dunnett's test 進行數據之間的差異顯著性比較。



第四章 結果與討論

第一節 菊糖有孢子乳桿菌之孢子誘導培養

將營養細胞形態之 *S. inulinus* 塗抹於產孢培養基上，其產孢培養基組成為 1.0 ~ 2.0% methyl- α -D-glucopyranoside; 0.5% yeast extract; 0.5% peptone; 3.0% CaCO₃; 1.5% agar，以 37°C 厭氧培養 14~21 天，使其形成孢子形態之 *S. inulinus*。由於 *S. inulinus* 在營養充裕的狀態下不易形成孢子，故在產孢培養基中添加 methyl- α -D-glucopyranoside 取代 glucose 作為菌株生長之碳源，藉此增強菌株孢子的形成(Doores and Westhoff, 1981; 1983)。圖 4.1 為 *S. inulinus* 的營養細胞(A)及其孢子形態(B)，由 B 圖可觀察到孢子形態的 *S. inulinus* 其桿狀菌體的末端有黑色圓點出現，當中亦可看到有單獨分離出來的黑色圓點，其為菌株所形成的孢子，此兩種形態的 *S. inulinus* 皆為光學顯微鏡下觀察之結果。

第二節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽與模擬腸道吸附性

2-1 耐酸性試驗結果

試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 和 3.0 hr 之菌株存活率如表 4.1 所示。由表 4.1 中可看到在相同處理條件之下，孢子形態之 *S. inulinus* 比營養細胞形態的 *S. inulinus*、*B. bifidum* 及 *B. longum* 具有較高的存活率(*p*

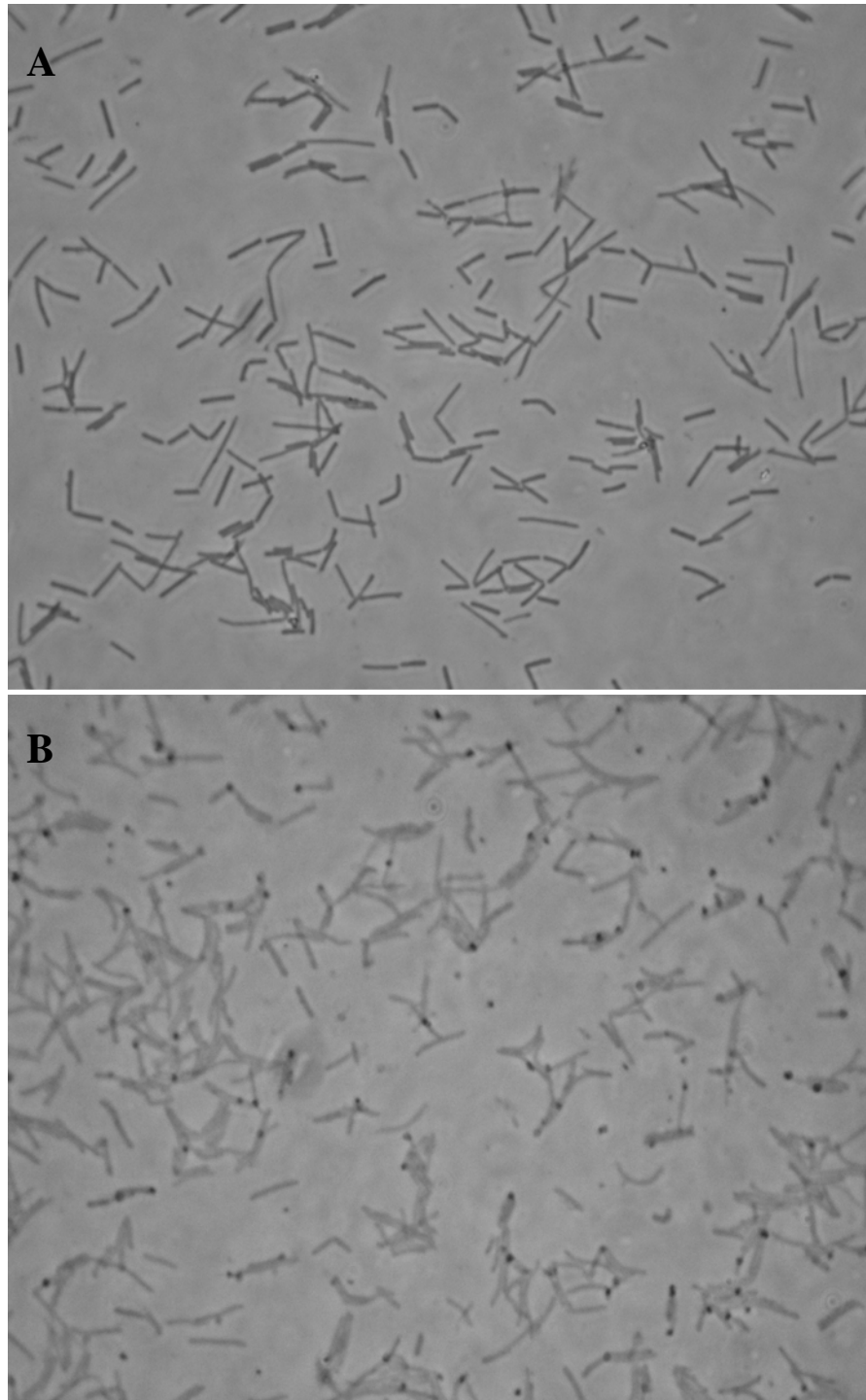


圖 4.1、孢子染色 *S. inulinus* 之光學顯微照相圖。(A)營養細胞形態；(B)孢子形態(放大倍率 2,000×)

Fig. 4.1. Vegetative cells (A) and spores (B) of *S. inulinus*. The former (A) were Gram stained and the spores (B) were stained by spore-staining. Both were observed under a light microscope (magnification 2,000×)

表 4.1、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 和 3.0 hr 後之存活率

Table 4.1. Survival rates (%) of tested strains treated with acid in different incubation times (1.5, 3.0 hr) at the same pH values of pH 2, pH 3 and pH 4, respectively

Strain	pH 2		pH 3		pH 4	
	1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr
<i>S. inulinus</i> (S)*	64.5 ± 2.0 ^{cx**}	44.8 ± 0.2 ^{cy}	88.3 ± 1.0 ^{bx}	78.9 ± 0.8 ^{cy}	94.2 ± 0.6 ^{bx}	91.7 ± 1.3 ^{by}
<i>S. inulinus</i> (V)	15.4 ± 1.0 ^{fx}	0.0 ± 0.0 ^{ey}	27.6 ± 0.3 ^{ex}	19.5 ± 1.6 ^{ey}	71.2 ± 1.3 ^{cx}	55.0 ± 1.3 ^{ey}
<i>L. acidophilus</i>	90.3 ± 1.5 ^{ax}	68.8 ± 1.0 ^{ay}	98.1 ± 1.0 ^{ax}	95.6 ± 0.9 ^{ay}	98.2 ± 1.3 ^{ax}	97.0 ± 0.3 ^{ax}
<i>L. bulgaricus</i>	78.3 ± 3.4 ^{bx}	52.1 ± 1.4 ^{by}	88.7 ± 2.3 ^{bx}	83.9 ± 1.1 ^{by}	95.2 ± 2.9 ^{abx}	90.0 ± 1.4 ^{bx}
<i>B. bifidum</i>	42.5 ± 4.9 ^{ex}	0.0 ± 0.0 ^{ey}	65.9 ± 1.5 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{fy}	74.5 ± 1.6 ^{cx}	58.1 ± 1.3 ^{dy}
<i>B. longum</i>	49.7 ± 1.9 ^{dx}	29.0 ± 2.6 ^{dy}	62.6 ± 1.7 ^{dx}	32.5 ± 0.8 ^{dy}	94.6 ± 3.9 ^{abx}	74.2 ± 3.2 ^{ey}

S: Spore form, V: Vegetative cell form.

** ^{a-f} Different letters within a column significantly differ at 5% level, $n = 3$.

** ^{x-y} Different letters within a row of the same pH value significantly differ at 5% level, $n = 3$.

< 0.05)，然而在所有試驗菌株中，以 *L. acidophilus* 和 *L. bulgaricus* 呈現高度的耐酸性。在同一 pH 值之下，較長的作用時間(3.0 hr)均會使各試驗菌株的存活率明顯降低($p < 0.05$)，而在 pH 4 的酸液中無論作用 1.5 或 3.0 hr，*L. acidophilus* (98.2% vs 97.0%)和 *L. bulgaricus* (95.2% vs 90.0%)的存活率並無明顯變化，由此可知本研究所使用之 *Lactobacillus* spp.的耐酸性比其他試驗菌株佳。

在 Hyronimus et al. (2000)的研究曾探討多種產孢子性乳酸菌—*S. inulinus* CIP103279, NCFB1839, DSM30348 等對酸液的耐受性，其結果與本研究所使用的營養細胞形態之 *S. inulinus* 的耐酸性試驗結果相似。多篇文獻證實 *L. acidophilus* 對酸具有抵抗性(Gupta et al., 1996; Prasad et al., 1998; Fernández et al., 2003)。在 Laroia and Martin (1991)的研究中也指出 *L. acidophilus* 確實可生長於較低的 pH 值下(3.9~4.6)，而 *B. bifidum* 則無法在低 pH 值的環境中存活；Dunne et al. (1999)也發現 bifidobacteria 菌株對酸的耐受性明顯比 *L. acidophilus* 差，而在本研究中的耐酸性試驗結果與上述作者之試驗結果相似。另一方面，有文獻指出 *L. bulgaricus* 的耐酸性不佳(Lindwall and Fondén, 1984; Conway et al., 1987)，但在本研究中卻發現該菌株具有極佳的胃酸耐受性，甚至比 bifidobacteria 菌株的存活率高，不同試驗結果之間的差異性可能與菌株的不同有關，不同的菌株來源會造成相異

的試驗結果(Charteris et al., 1998; Xanthopoulos et al., 2000; Zárate et al., 2000)。

2-2 耐膽鹽試驗結果

各試驗乳酸菌株對於膽鹽耐受性之試驗結果如表 4.2 所示。由表中可知菌株的存活情形相似於耐酸性試驗，孢子形態的 *S. inulinus* 比營養細胞形態的 *S. inulinus*、*B. bifidum*、*B. longum* 及 *L. bulgaricus* 具有較高的存活率($p < 0.05$)，而在所有試驗菌株中，*L. acidophilus* 具有良好的膽鹽耐受性。此外，在相同膽鹽濃度之下，較長的作用時間(3.0 hr)，其各試驗菌株的存活率也都明顯的降低($p < 0.05$)。

在 Hyronimus et al. (2000)的研究曾提出產孢子性乳酸菌—*S. inulinus* CIP103279, NCFB1839, DSM30348 對膽鹽的耐受性極低，其結果亦與本研究所使用的營養細胞形態之 *S. inulinus* 的耐膽鹽試驗結果相似。具膽鹽耐受能力是 *L. acidophilus* 的一項重要特質(Walker and Gilliland, 1993)，在許多文獻中均證實該菌株具有極佳的膽鹽耐受性(Walker and Gilliland, 1993; Gupta et al., 1996; Jin et al., 1998; Fernández et al., 2003)，本研究結果亦發現 *L. acidophilus* 確實具有良好的膽鹽耐受能力；而在 Krasaekoopt et al. (2003)的研究則發現 *L. bulgaricus* 對膽鹽的耐受性很差，並推論該菌株無法存活與生長於腸道中，本研究結果也與其相同。

表 4.2、試驗乳酸菌株以 0.1, 0.2, 0.4%膽鹽濃度分別處理 1.5 和 3.0 hr 後之存活率

Table 4.2. Survival rates (%) of tested strains treated with oxgall bile salt in different incubation times (1.5, 3.0 hr) at the same bile salt concentrations of 0.1%, 0.2%, and 0.4%, respectively

Strain	oxgall bile salt					
	0.1%		0.2%		0.4%	
	1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr
<i>S. inulinus</i> (S)*	61.1 ± 0.6 ^{bx**}	36.8 ± 2.3 ^{by}	57.4 ± 1.7 ^{ax}	33.5 ± 0.8 ^{by}	36.5 ± 1.6 ^{bx}	14.0 ± 2.1 ^{by}
<i>S. inulinus</i> (V)	43.1 ± 0.7 ^{dx}	19.3 ± 1.0 ^{dy}	30.0 ± 1.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cy}	0.0 ± 0.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cx}
<i>L. acidophilus</i>	71.2 ± 2.0 ^{ax}	42.1 ± 2.1 ^{ay}	48.7 ± 2.0 ^{bx}	38.8 ± 0.4 ^{ay}	47.6 ± 3.0 ^{ax}	32.6 ± 3.7 ^{ay}
<i>L. bulgaricus</i>	42.9 ± 2.1 ^{dx}	24.1 ± 2.3 ^{cy}	0.0 ± 0.0 ^{ex}	0.0 ± 0.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cx}
<i>B. bifidum</i>	53.6 ± 6.3 ^{cx}	13.8 ± 3.2 ^{ey}	18.0 ± 1.4 ^{dx}	0.0 ± 0.0 ^{cy}	0.0 ± 0.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cx}
<i>B. longum</i>	69.2 ± 0.9 ^{ax}	35.9 ± 2.7 ^{by}	28.1 ± 1.4 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cy}	0.0 ± 0.0 ^{cx}	0.0 ± 0.0 ^{cx}

S: Spore form, V: Vegetative cell form.

**^{a-c} Different letters within a column significantly differ at 5% level, $n = 3$.

**^{x-y} Different letters within a row at the same oxgall concentration significantly differ at 5% level, $n = 3$.

益生菌必須能存活於不適宜生長的腸胃道中，方能表現益生菌對宿主的健康功效(Gilliland, 1989; Prasad et al., 1998)，而探討菌體對胃酸與膽鹽的耐受性可用來評估益生菌株是否能存活並通過胃腸道(Prasad et al., 1998; Hyronimus et al., 2000; Park et al., 2002; Michida et al., 2006)。在胃中含有低 pH 值的胃液，這是因為所分泌的胃酸中含有高濃度的鹽酸所致(Holzapfel et al., 1998)，而如此低的 pH 值易造成大多數的微生物死亡(Kimoto et al., 2000)；在腸道中存有膽鹽，高濃度的膽鹽會快速溶解菌體細胞膜的脂質，這些對微生物而言亦是一生長抑制因子(Keele and Neil, 1965; Floch et al., 1972; Le Vay, 1988)，故胃酸與膽鹽是決定各種益生菌在腸胃道中存活與定殖的關鍵性影響要素(Walker and Gilliland, 1993; Jin et al., 1998; Succi et al., 2005)。

2-3 細胞單層膜完整性之觀察

為了觀察 Caco-2 cell monolayer 的完整性，從 Caco-2 cells 繼代培養開始，即以倒立式顯微鏡觀察細胞培養皿中的細胞生長狀況。結果發現在第 0 天(如圖 4.2-A)剛繼代培養後的細胞是呈現完整的圓點形狀，此時尚未貼附於細胞培養皿上，到了第四天(如圖 4.2-B)時就可以觀察到大多數的細胞都已貼附於細胞培養皿的壁上，此時細胞呈現扁平狀且有增多的現象，而

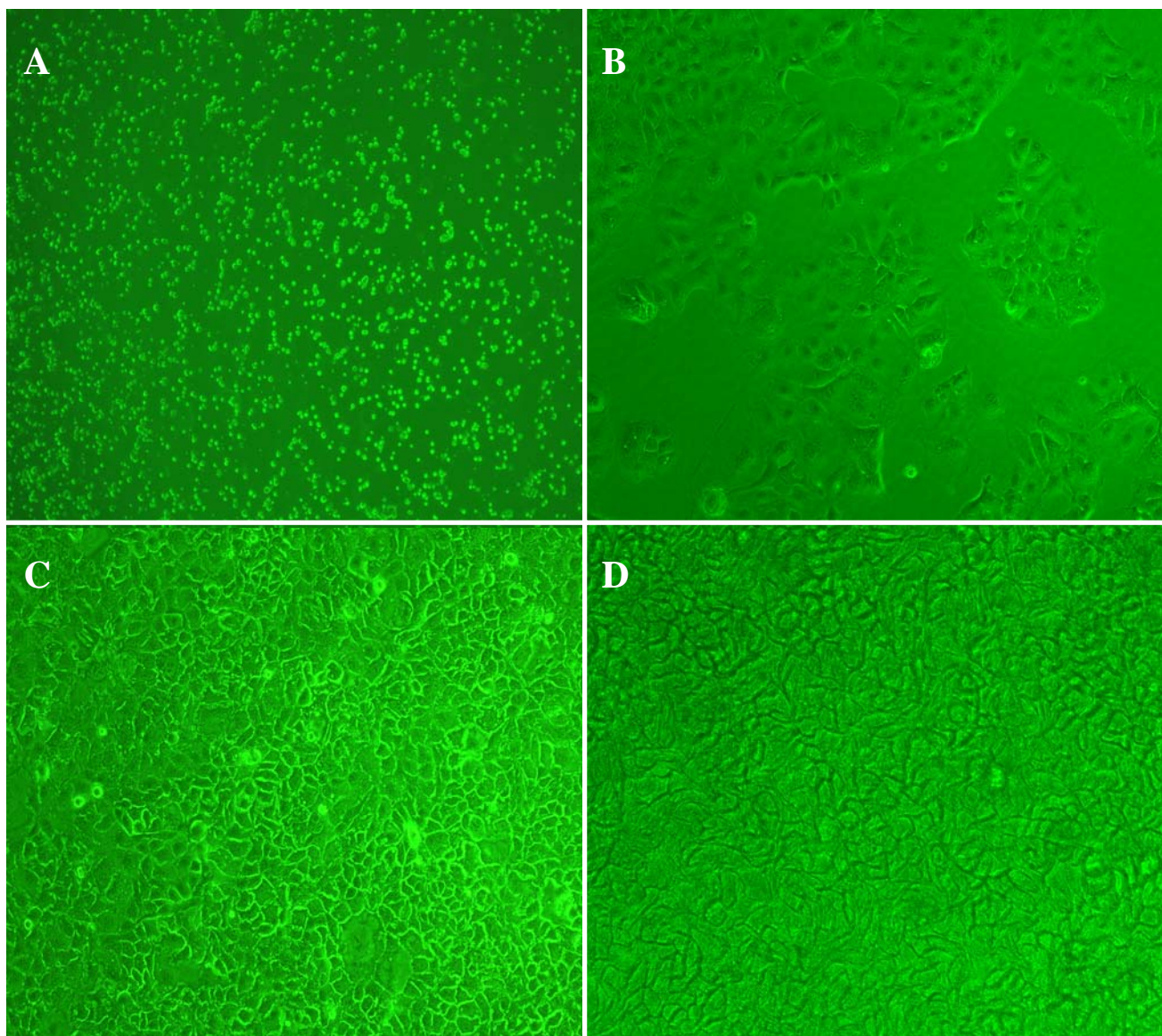


圖 4.2、Caco-2 cells 繼代培養後之生長形態(A)繼代培養後第 0 天；(B)第 4 天；(C)第 8 天；(D)第 15 天 (放大倍率 100×)

Fig.4.2. Changes in shape of Caco-2 cells (A) 0 day; (B) 4 days; (C) 8 days; (D) 15 days at after subculture (magnification 100×)

在第八天(如圖 4.2-C)時細胞已長滿整個細胞培養皿且開始分化，到了第十五天之後細胞分化完成(如圖 4.2-D)，因此在本研究中的吸附試驗所使用的 cell monolayer，皆為 Caco-2 cells 繼代後培養十五天之 cell monolayer。

2-4 吸附性試驗結果

圖 4.3 顯示各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 的吸附能力，而吸附性由強至弱之排序為：*L. acidophilus* (92.3%，圖 4.4-B) > *L. bulgaricus* (78.7%，圖 4.4-C) > *B. bifidum* (74.9%，圖 4.4-D) > *S. inulinus* (營養細胞，65.1%，圖 4.4-A) > *B. longum* (52.7%，圖 4.4-E) > *S. inulinus* (孢子形態，10.5%)。其中 *L. acidophilus* 呈現強力的吸附性(strong adhesion)，具有吸附性(adhesion)的包括有營養細胞形態之 *S. inulinus*、*L. bulgaricus*、*B. bifidum* 及 *B. longum*，而孢子形態的 *S. inulinus* 則是呈現低度的吸附性(weak adhesion)。

腸黏膜(intestinal mucus)是菌株吸附與定殖的重要部位(Mikelsaar et al., 1998)，因此在生體外試驗常使用 Caco-2 cell 作為模擬腸道細胞以探討益生菌之吸附能力。而菌株若要能定殖在腸道中，前提是須具有吸附於腸道細胞之能力(Beachey, 1981)，所以欲成為益生菌，首要條件即為菌株應具腸黏膜吸附性(Ouwehand et al., 1999c)，以延長益生菌持續停留在腸道中，發揮其有益人體健康之功效(Morelli et al., 1997)。然而有文獻指出，益生菌似乎無法長久定殖於宿主腸道內，在許多研究中發現當給予益生菌後可在糞便

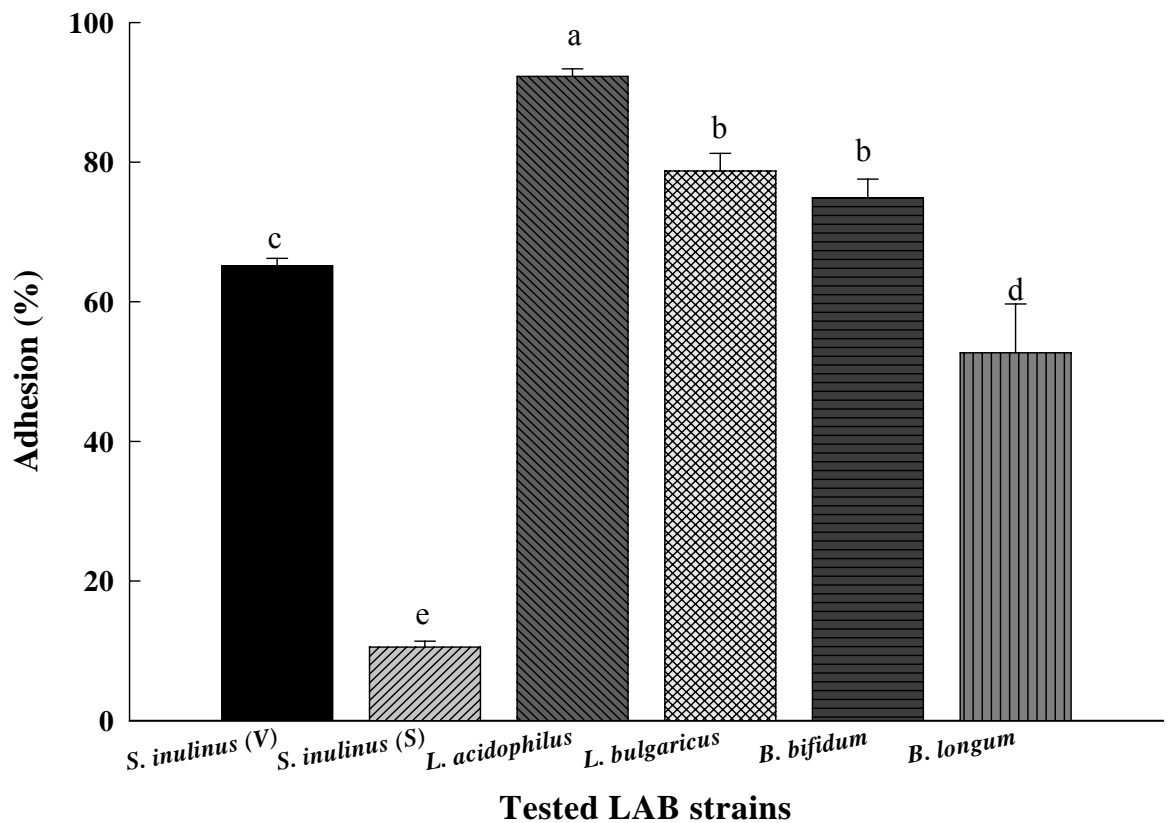


圖 4.3、各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 之吸附性。*S. inulinus* (V)：營養細胞形態；*S. inulinus* (S)：孢子形態。^{a-c} 為各菌株之間相互比較，所標示的字母不同表示有顯著性差異 ($p < 0.05$)

Fig. 4.3. Adhesion of the tested LAB to Caco-2 cells. *S. inulinus* (V): vegetative cell form; (S): spore form. ^{a-c} Groups with different letters differ significantly ($p < 0.05$)

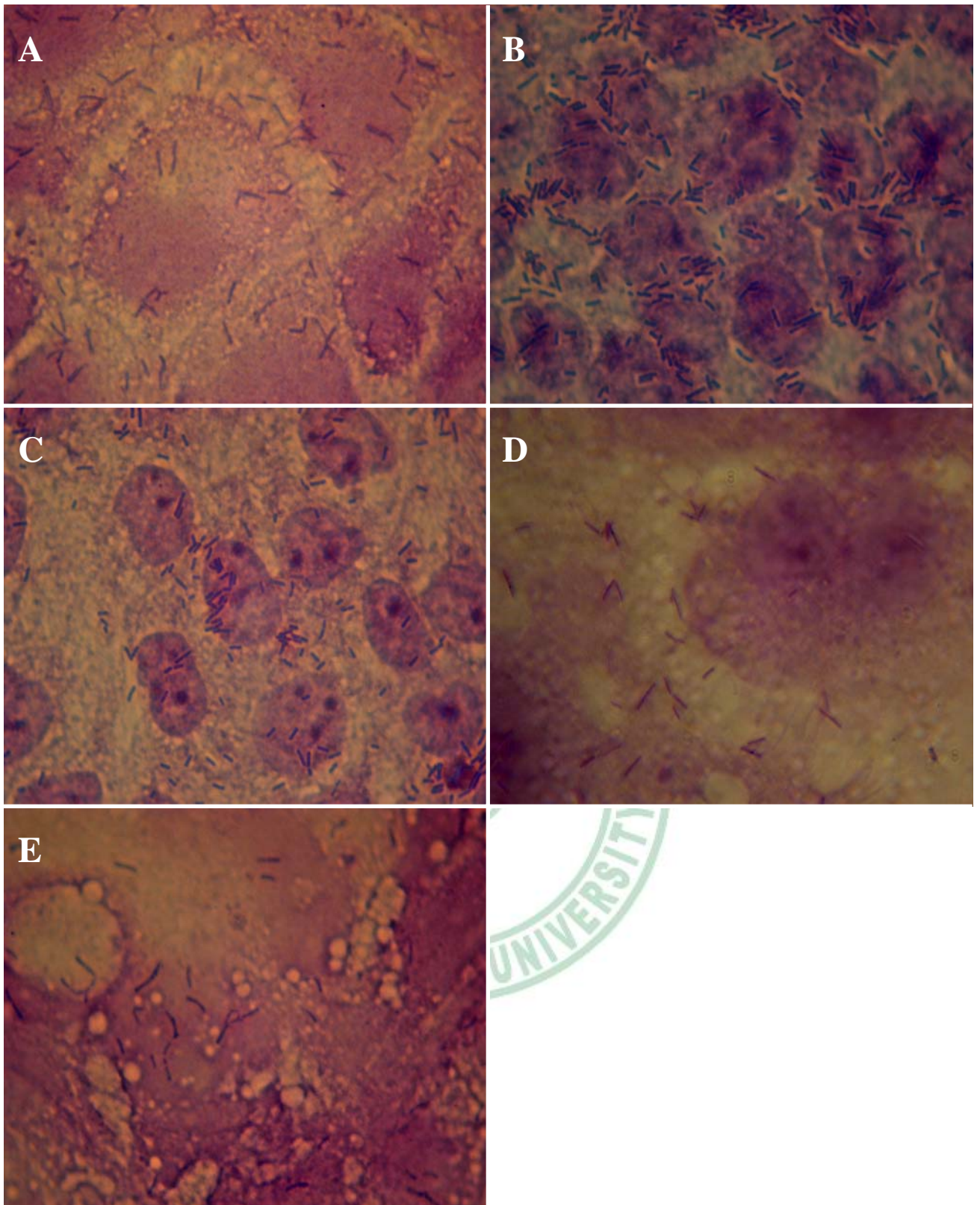


圖 4.4、各試驗乳酸菌株吸附於 Caco-2 cells 上之光學顯微照相圖(A) *S. inulinus* ; (B) *L. acidophilus* ; (C) *L. bulgaricus* ; (D) *B. bifidum* ; (E) *B. longum* (放大倍率 2, 000×)

Fig. 4.4. Schemes of the tested LAB adhesion to Caco-2 cells in a light microscope (A) *S. inulinus* ; (B) *L. acidophilus* ; (C) *L. bulgaricus* ; (D) *B. bifidum* ; (E) *B. longum* (magnification 2, 000×)

中測得其益生菌數，但一旦停止給予後，其糞便中的菌數即逐漸減少，因此推論益生菌吸附於腸道中只是短暫的定殖而已(Johansson et al., 1993; Link-Amster et al., 1994; Saxelin, 1997; Spanhaak et al., 1998)。

此外，前人的研究均曾提到，乳酸菌的腸道吸附具有宿主專一性(host specificity)，亦即人類來源的乳酸菌才會吸附在人類腸道細胞上(Walker and Duffy, 1998; Ouwehand et al., 1999a; Ouwehand et al., 1999c)，而且將其作為選擇益生菌所依據的標準之一。但是 Rinkinen et al. (2003b)的研究發現，來自於某一宿主的益生菌，亦可能有效地吸附於其他宿主之腸道黏膜，而此種吸附性主要是奠基於益生菌本身的菌株特性，而非僅取決於其是否為人類來源之益生菌。

L. acidophilus 為一種典型的益生菌，具有多種能夠助益人體健康的保健功效(Tejada-Simon et al., 1999; Michetti et al., 1999; Lin and Chen, 2000; Ogawa et al., 2001b)，之前曾有研究指出，*L. acidophilus* 具有耐胃酸、耐膽鹽及可吸附於模擬腸道細胞之能力(Tuomola and Salminen, 1998; Gopal et al., 2001; Fernández et al., 2003)。Kos et al. (2003)也發現 *L. acidophilus* 具有吸附於腸道上皮細胞以及預防病原菌定殖之共凝集(coaggregation)的能力。

Coconnier et al. (1992)曾探討 *L. acidophilus* BG2FO4 的腸道吸附模式，並提出所謂的胞外蛋白質雙架橋理論，如圖 4.5 所示，*L. acidophilus* 即藉

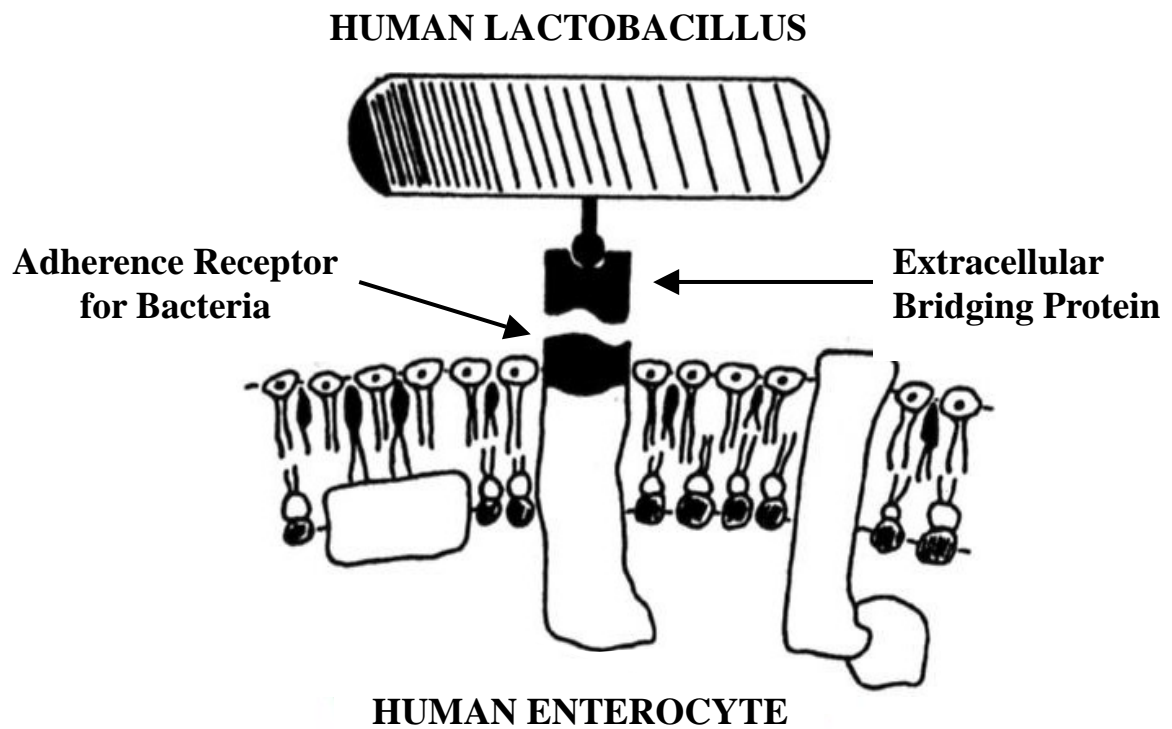


圖 4.5、*L. acidophilus* BG2FO4 對人類腸道細胞之吸附模式

Fig. 4.5. The model of adherence of *L. acidophilus* BG2FO4 to human intestinal cell

(Coconnier et al., 1992)

由此種胞外蛋白連結至人體的腸道細胞受體，達到吸附與定殖的效果。此外，bifidobacteria 亦為源自人類腸道的另一種益生菌，其對於人體的益生效果，亦有多篇文獻報告之佐證(Tejada-Simon et al., 1999; Asahara et al., 2004; Lee et al., 2004)。在其吸附模式之探討方面，曾有學者以花生凝集素(peanut agglutinin; PNA)做為研究素材，探討 *B. bifidum* EB102 之腸道吸附機制，結果發現此菌株是以細胞表面之蛋白質成份(proteinaceous components)結合至模擬腸道細胞株 Caco-2 cells 之醣脂質(glycolipid)的醣部份(carbohydrate moieties) (Mukai et al., 2004)。

Jacobsen et al. (1999)的研究指出 *L. bulgaricus* CHCC759, CHCC2164 不具腸道吸附性，而 Gopal et al. (2001)的研究也將 *L. bulgaricus* LB1 做為吸附試驗的負控制組，然而在本研究中卻發現 *L. bulgaricus* BCRC 14009 具有良好腸道吸附性(78.7%)，其結果與上述作者之研究論述有差異，在 Ouwehand et al. (1999b)的研究也指出，常被認為是非腸道定殖菌株的 *L. bulgaricus* 可良好的吸附於腸道黏膜上，因此推測試驗結果不同可能是因為菌株上的差異所致。

第三節 乳酸菌培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌生長之試驗結果

3-1 乳酸菌培養基上清液之 pH 值變化

各試驗乳酸菌株於培養期間之 pH 值變化如圖 4.6 所示。在圖 4.6 顯示

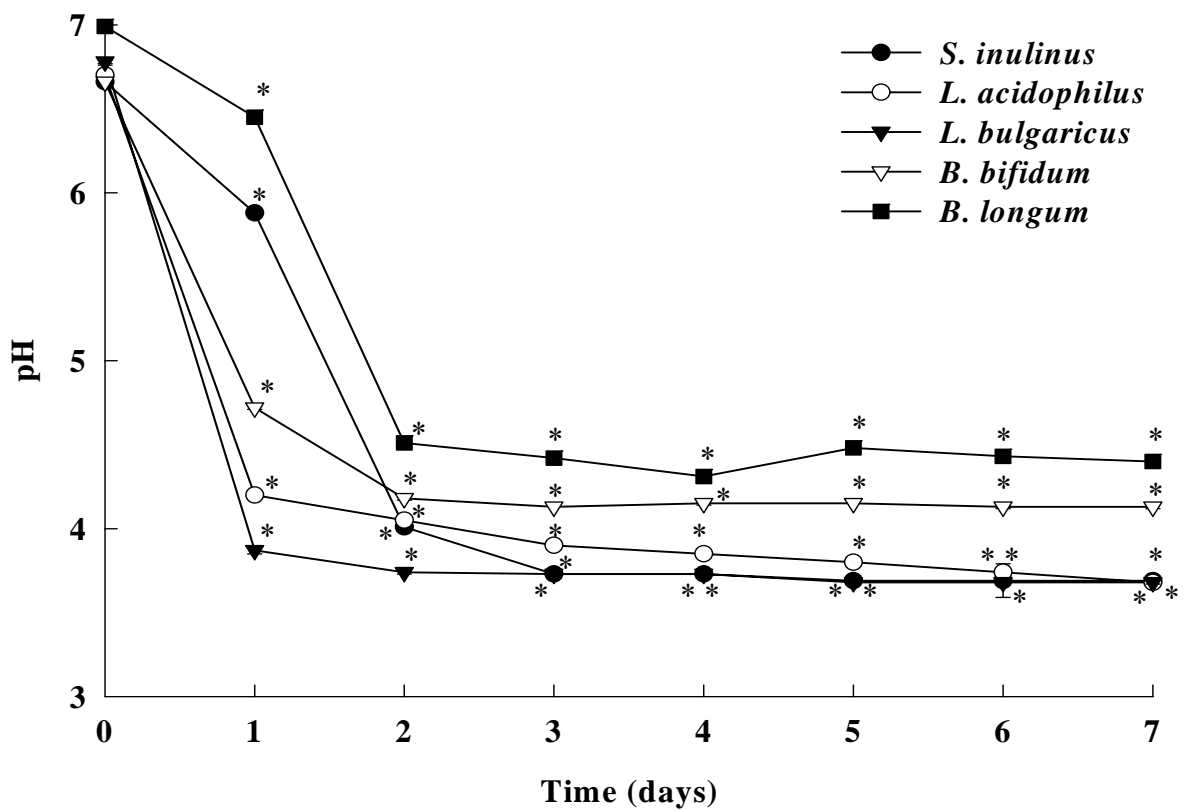


圖 4.6、各試驗乳酸菌株培養基上清液之 pH 值變化曲線圖。*為各試驗天數之 pH 值與第 0 天之 pH 值相比後達到統計上之顯著性差異 ($p < 0.05$)

Fig. 4.6. pH change curves of the tested LAB-SCS during one weeks' cultivation. * Significantly different from day 0 ($p < 0.05$)

菌株在培養後的第 1 天，其 pH 值即顯著下降($p < 0.05$)，其中以 *L. bulgaricus*、*L. acidophilus*、*B. bifidum* 下降較快，而到了第 3 天後，各試驗菌株的 pH 值都已完全下降且趨於穩定。另外亦可發現在 *S. inulinus*、*L. bulgaricus* 及 *L. acidophilus* 的生長培養基所測得的 pH 值是最底的，且 *S. inulinus* 生長培養基測得的 pH 值與 *Lactobacillus* spp. 最為接近。

3-2 乳酸菌生長之乳酸產量變化

乳酸菌生長時會分泌有機酸，其中以乳酸的含量最多，將不同培養天數之乳酸菌培養基上清液以 0.1 N NaOH 標準溶液滴定，並計算所得之有機酸量(%)，以乳酸表示之，其結果如圖 4.7 所示。由圖 4.7 可知大部份的試驗菌株在培養後第 2~3 天其乳酸產量即達最高峯，之後便趨於穩定，而 *L. acidophilus* 則是在培養後第 4 天其乳酸量才達最高。另外也發現 *S. inulinus*、*L. bulgaricus* 和 *L. acidophilus* 有最高的乳酸產量，且 *S. inulinus* 的乳酸產量與 *Lactobacillus* spp. 最接近。*L. bulgaricus* 在培養後第 1 天即有高量的乳酸產生，故該菌常於乳品工業發酵中作為菌醃使用(Kitazawa et al., 2003; Ravin and Alatosava, 2003; Serror et al., 2003)。

3-3 乳酸菌培養基上清液之抑菌圈試驗結果

收集各試驗乳酸菌株於生長培養期間的培養基上清液，之後進行 well

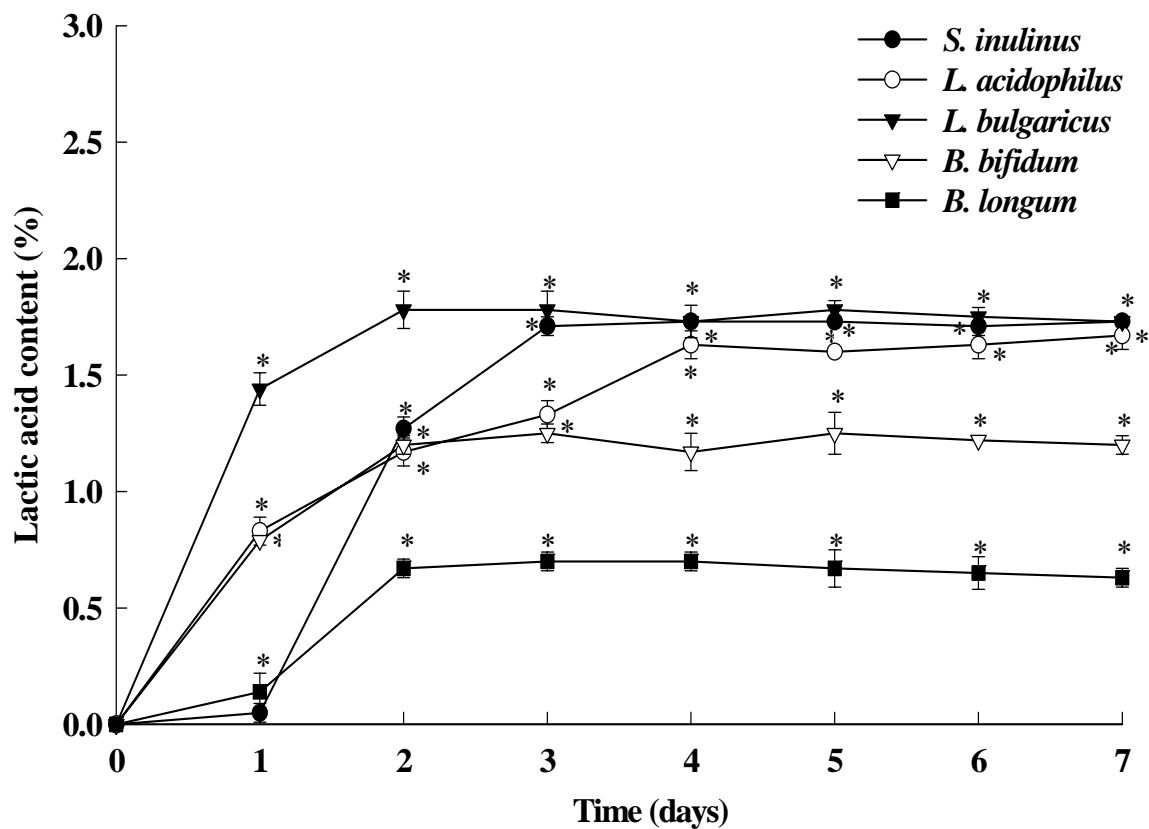


圖 4.7、各試驗乳酸菌株培養之乳酸產量變化曲線圖。*為各試驗天數之乳酸產量與第 0 天相比後達到統計上之顯著性差異($p < 0.05$)

Fig. 4.7. Changes in lactic acid production of the tested LAB during one weeks' cultivation. * Significantly different from day 0 ($p < 0.05$)

diffusion assay，觀察其抑制 *S. enteritidis* 生長所形成的抑菌圈大小(mm)，結果如表 4.3 和圖 4.8、4.9 所示。由結果可看到 *L. acidophilus*、*L. bulgaricus* 及 *Bifidum* 在培養後第 1 天所收集的上清液即有抑菌圈產生，*S. inulinus* 和 *B. longum* 則是在第 2 天所收集的上清液才開始有抑菌圈的形成，然而由表 4.3 可發現所有試驗之乳酸菌株培養第 4~5 天所收集的上清液，其所形成的抑菌圈即開始維持固定的最大值，故在之後的抑菌實驗中，皆使用培養 5 天後的上清液；另外本試驗也發現 *S. inulinus*、*L. bulgaricus*、*L. acidophilus* 所收集的培養基上清液具有較佳的抑菌效果。

3-4 乳酸菌培養基上清液之抑菌成份探討

為了瞭解各試驗乳酸菌的培養基上清液之抑菌成份，是菌株所分泌之乳酸的作用亦或者是所分泌抑菌素(bacteriocins)的影響，故分別進行上清液中和試驗、酵素作用及加熱處理試驗。

3-4-1 培養基上清液經 NaOH 中和後之抑菌圈大小

將收集的培養基上清液，以 NaOH 中和之後，其抑菌圈的大小(mm)顯示在表 4.4。由結果可發現在經 NaOH 中和後的培養基上清液皆失去抑制 *S. enteritidis* 生長的效果，因此推測影響培養基上清液抑菌效果的因素，即有可能是培養基上清液中所含的乳酸或是其 pH 值的降低所造成的抑菌效

表 4.3、各試驗乳酸菌株於培養期間之培養基上清液抑制 *S. enteritidis* 生長所形成的抑菌圈大小

Table 4.3. Diameter of inhibition zone of tested LAB-SCS revealing the inhibition activity toward the growth of *S. enteritidis* during 7 days' cultivation

Strain	Time (day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
<i>S. inulinus</i>	9.0 ^{a*}	9.0 ^d	14.4 ^b	16.1 ^a	16.4 ^a	16.5 ^a	16.4 ^a	16.4 ^a
<i>L. acidophilus</i>	9.0 ^a	13.4 ^b	14.3 ^b	15.1 ^b	15.1 ^b	15.1 ^b	15.0 ^b	15.0 ^b
<i>L. bulgaricus</i>	9.0 ^a	15.2 ^a	16.4 ^a	16.4 ^a	16.4 ^a	16.4 ^a	16.4 ^a	16.3 ^a
<i>B. bifidum</i>	9.0 ^a	12.9 ^c	13.0 ^c	12.9 ^c	12.9 ^c	12.9 ^c	12.8 ^c	12.9 ^c
<i>B. longum</i>	9.0 ^a	9.0 ^d	12.8 ^d	12.8 ^c	12.8 ^c	13.0 ^c	12.8 ^c	13.0 ^c

* Inhibition zone (mm) (9 mm: the diameter of the punctured hole).

^{a-d} Different letters within a column significantly differ at 5% level, $n = 3$.

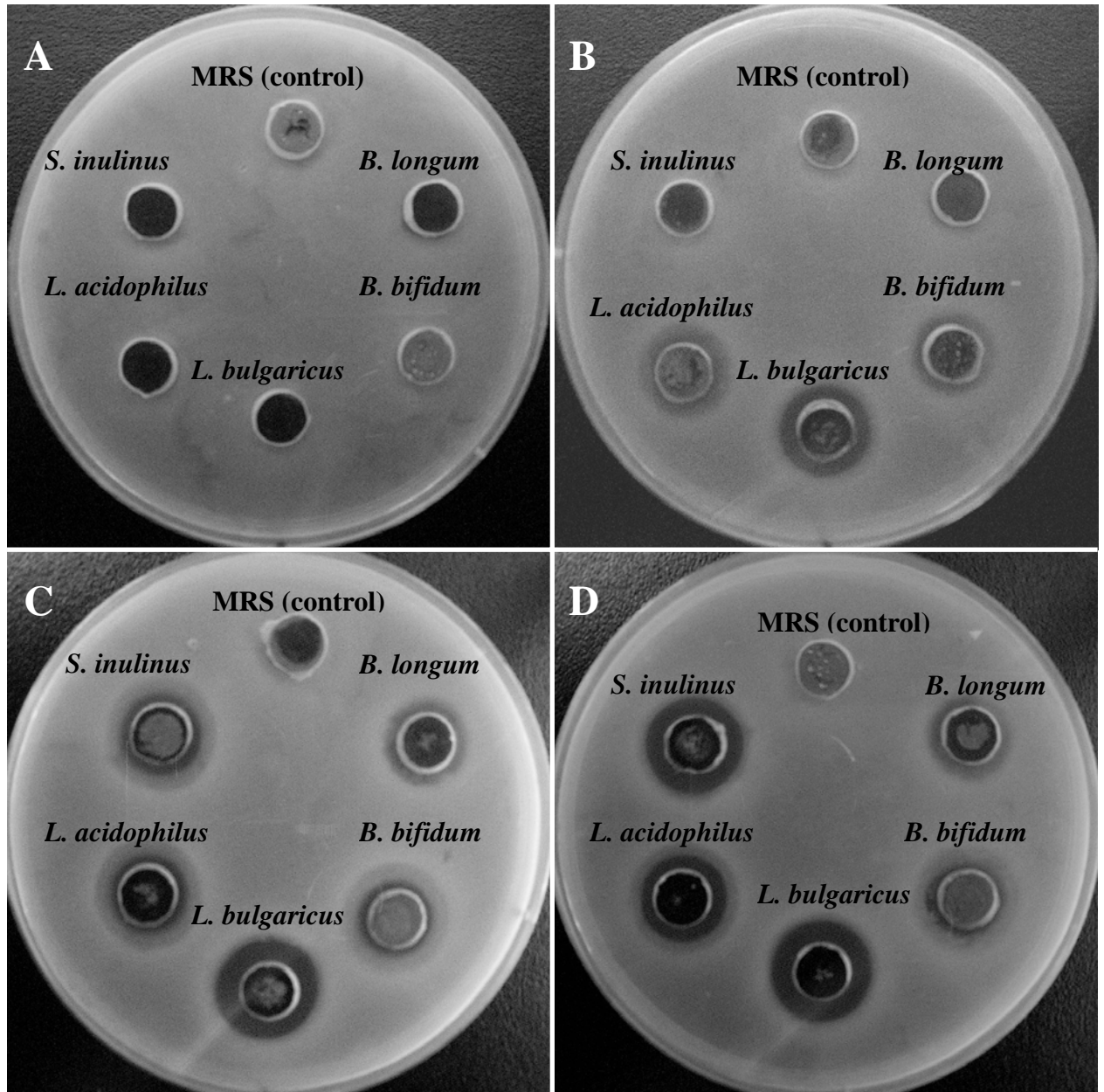


圖 4.8、各試驗乳酸菌株 0~3 天之培養基上清液抑制 *S. enteritidis* 生長之情形(A)第 0 天；(B)第 1 天；(C)第 2 天；(D)第 3 天之培養基上清液。透明區域為上清液所形成之抑菌圈

Fig. 4.8. Inhibition zones (clear areas) of the tested LAB-SCS revealing the inhibition activity toward the growth of *S. enteritidis* during 3 days' cultivation. A-D indicates the SCS obtained at (A) day 0; (B) day 1; (C) day 2; (D) day 3

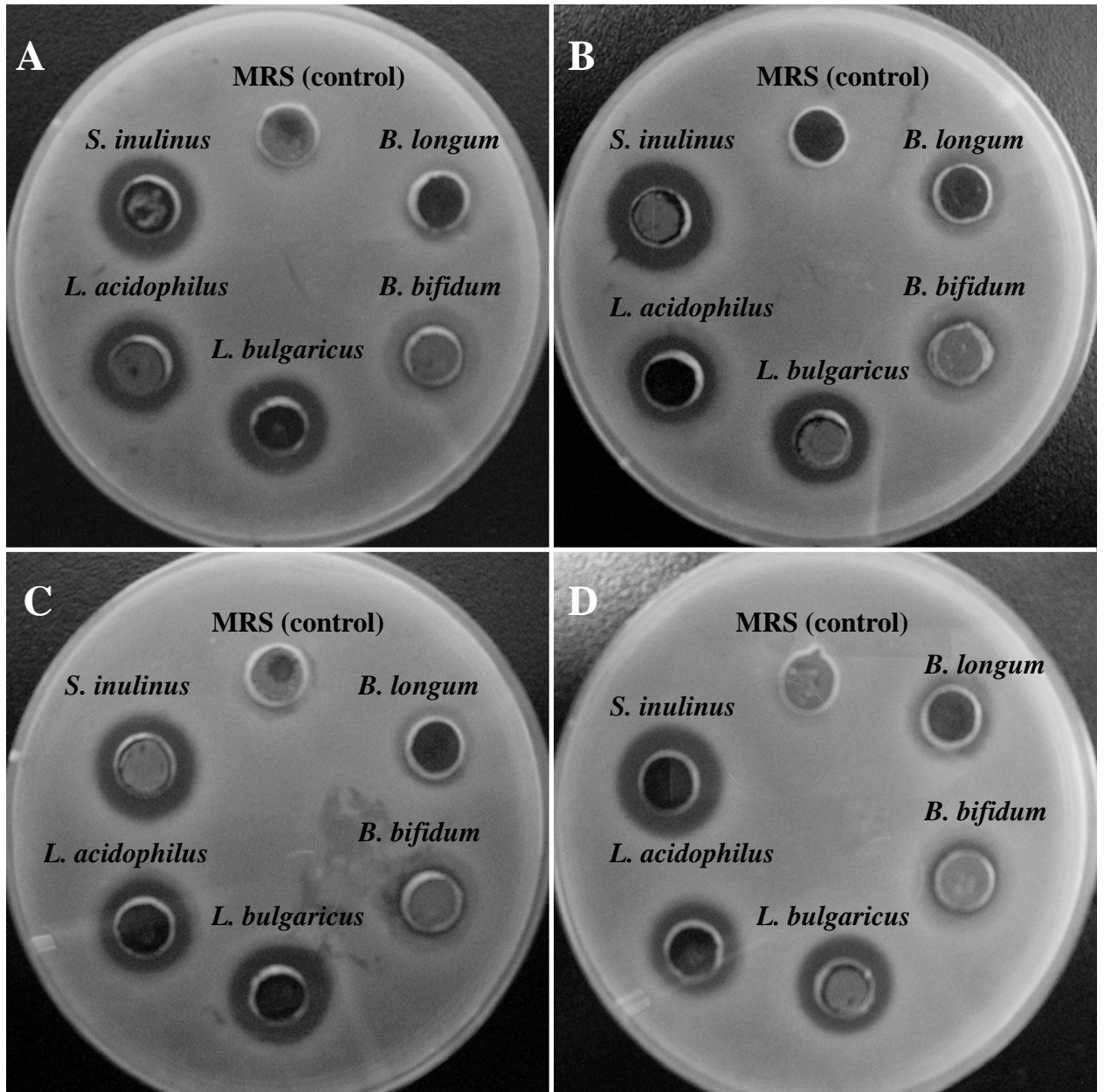


圖 4.9、各試驗乳酸菌株 4~7 天之培養基上清液抑制 *S. enteritidis* 生長之情形(A)第 4 天；(B)第 5 天；(C)第 6 天；(D)第 7 天之培養基上清液。透明區域為上清液所形成之抑菌圈

Fig. 4.9. Inhibition zones (clear areas) of the tested LAB-SCS revealing the inhibition activity toward the growth of *S. enteritidis* during 3 days' cultivation. A-D indicates the SCS obtained at (A) day 4; (B) day 5; (C) day 6; (D) day 7

表 4.4、各試驗乳酸菌株之培養基上清液經 NaOH 中和後之抑制 *S. enteritidis* 生長所形成的抑菌圈大小

Table 4.4. Diameter of inhibition zone of the 5 days' cultivated LAB-SCS revealing the inhibition activity toward the growth of *S. enteritidis* before and after neutralized by the NaOH solution

Strain	Inhibition zone (mm)	
	SCS before neutralization	Neutralized SCS
<i>S. inulinus</i>	16.5	9 *
<i>L. acidophilus</i>	15.1	9
<i>L. bulgaricus</i>	16.4	9
<i>B. bifidum</i>	12.9	9
<i>B. longum</i>	13.0	9

* 9 mm: the diameter of the punctured hole. No clear area of inhibition zone was found.

果。

3-4-2 培養基上清液經蛋白酶作用後之抑菌圈大小

圖 4.10 為各試驗乳酸菌株的培養基上清液經各種蛋白酶作用後之抑制 *S. enteritidis* 生長的抑菌圈大小，結果發現各培養基上清液經酵素作用後其抑制效果與控制組(未以蛋白酶處理者)比並無明顯改變，因此推測其培養基上清液的抑菌成份可能是非肽類的抑菌素(bacteriocins)或是其他非肽類的抑菌物質。

3-4-3 培養基上清液經加熱處理後之抑菌圈大小

各試驗乳酸菌之培養基上清液經加熱處理後其抑制 *S. enteritidis* 生長的抑菌圈大小變化顯示在圖 4.11、4.12。由結果可知各乳酸菌之培養基上清液經各種不同溫度條件加熱處理後，其上清液的抑菌效果仍然存在，且與未經加熱處理的控制組相較，其抑菌圈大小並無顯著性差異存在，因此推測培養基上清液中所含的抑菌成份應為熱安定性物質(heat-stable substance)。

3-4-4 培養基上清液之乳酸成份抑菌試驗結果

由結果 3-4-1, 3-4-2, 3-4-3 可知乳酸菌培養基上清液經 NaOH 中和後其抑菌效果即消失，而當以蛋白酶或是加熱處理之後，其培養基上清液的抑

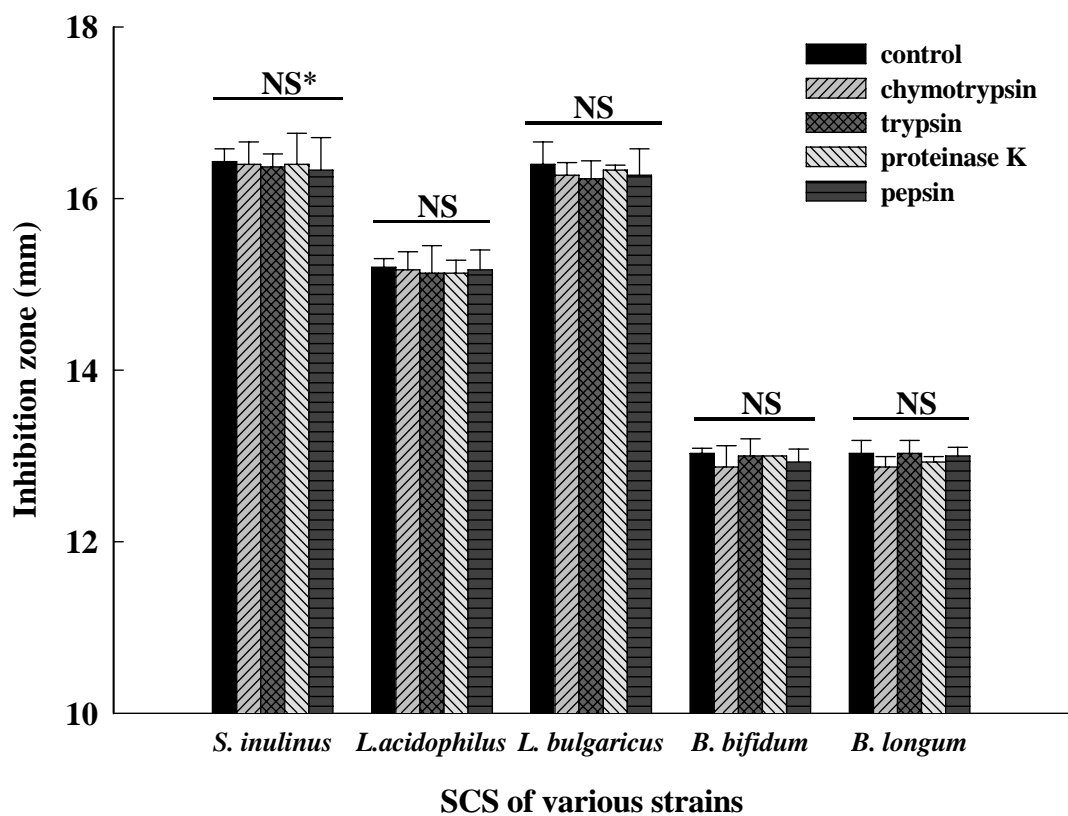


圖 4.10、各試驗乳酸菌株之培養基上清液以蛋白酶作用後其抑制 *S. enteritidis* 生長的抑菌圈大小。* NS 為試驗組與控制組之間無顯著性差異

Fig. 4.10. Diameter of inhibition zone of the LAB-SCS after the protease treatment. * NS: not significantly different from the control

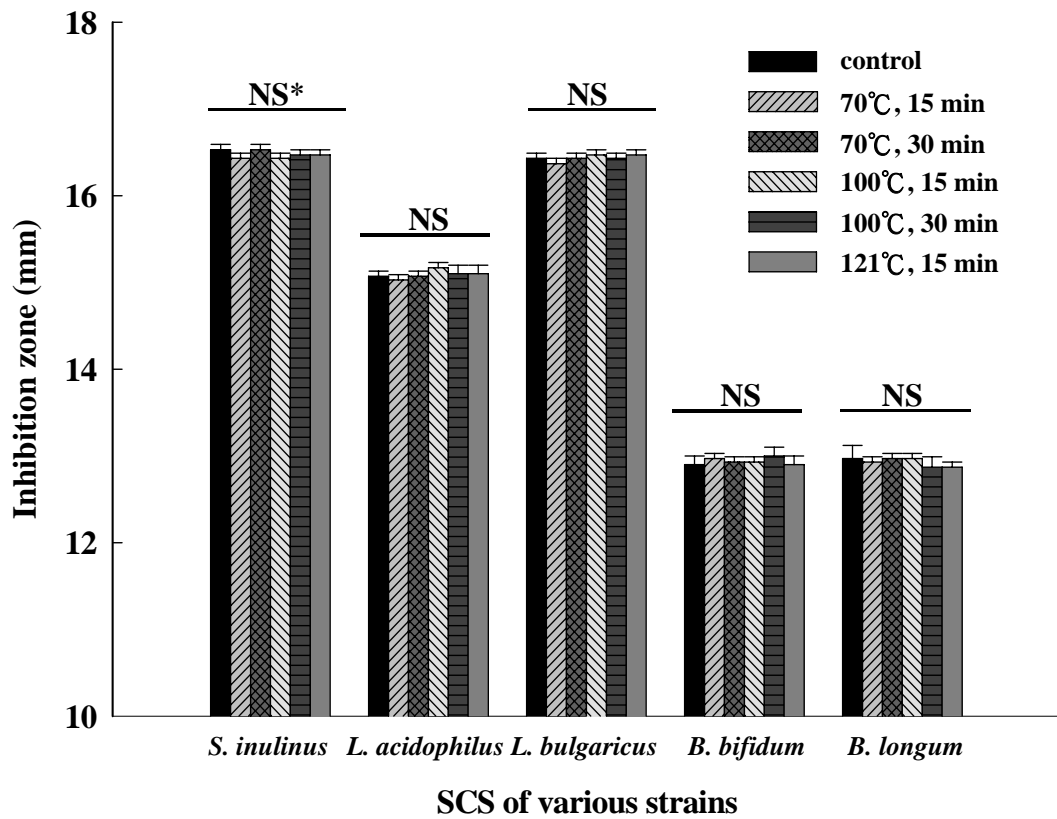


圖 4.11、各試驗乳酸菌株之培養基上清液經加熱處理後其抑制 *S. enteritidis* 生長的抑菌圈大小。NS 為試驗組與控制組之間無顯著性差異

Fig. 4.11. Diameter of inhibition zone of the LAB-SCS after the heat treatment.
* NS: not significantly different from the control

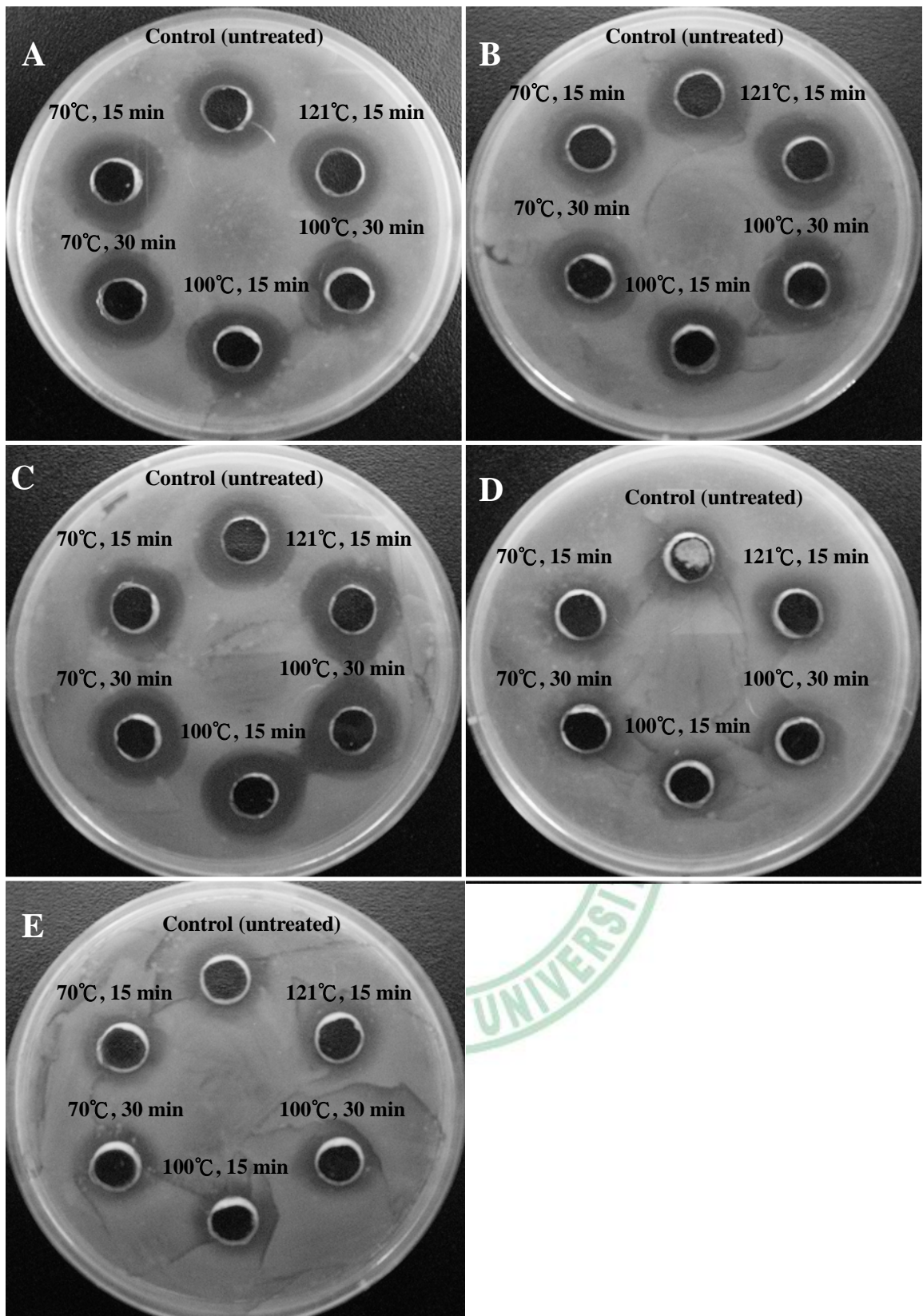


圖 4.12、各試驗乳酸菌株之培養基上清液經不同溫度條件處理後抑制 *S. enteritidis* 生長之情形(A) *S. inulinus*; (B) *L. acidophilus*; (C) *L. bulgaricus*; (D) *B. bifidum*; (E) *B. longum*

Fig. 4.12. Inhibition zones (clear areas) of the tested LAB-SCS revealing the inhibition activity toward *S. enteritidis* (A) *S. inulinus*; (B) *L. acidophilus*; (C) *L. bulgaricus*; (D) *B. bifidum*; (E) *B. longum*

菌效果卻不受影響，故由以上的實驗證據顯示各試驗乳酸菌株之培養基上清液中的抑菌成份可能為乳酸或是 pH 值的降低所致。為了進一步探討抑菌效果是乳酸亦或是 pH 值(H^+)的作用，故比較(1)培養基上清液(pH 3.69)與(2)單獨添加乳酸於培養基(其添加量等於控制組培養基上清液中的乳酸含量，pH 3.69)以及(3)使用 HCl 調酸至 pH 3.69 的培養基(相當於培養基上清液中的 pH 值)，試驗其抑制 *S. enteritidis* 生長的效果，並以 pH 6.8 的 MRS broth 作為控制組，其結果如圖 4.13 所示。

由圖 4.13 發現控制組(MRS broth, pH 6.8)完全無法抑制 *S. enteritidis* 的生長，而不論是培養基上清液(SCS, 0.192 mmole lactate/ml, pH 3.69)或是單獨添加乳酸的培養基(0.192 mmole L(+)或 D (-)-lactate/ml, pH 3.69)都可以在培養 1 hr 之後完全抑制 *S. enteritidis* 的生長，而以 HCl 調酸的培養基(pH 3.69)雖然也可抑制 *S. enteritidis* 的生長，但其抑制效果並不如培養基上清液或是單獨添加乳酸的培養基來得好，因此推測影響培養基上清液的抑菌成份不單純只是 pH 值的降低(H^+ 的作用)而已，而可能是該菌株所分泌的乳酸發揮其抑菌效果；另外，本試驗亦推論有機酸(如乳酸)的抑菌效果比鹽酸等無機酸來得好。

乳酸菌在腸胃道中可抑制有害微生物或是食物中毒菌(如沙門氏菌、李斯特菌)的生長(Huges and Hoover, 1991; Lim et al., 1993; Hudault et al., 1997

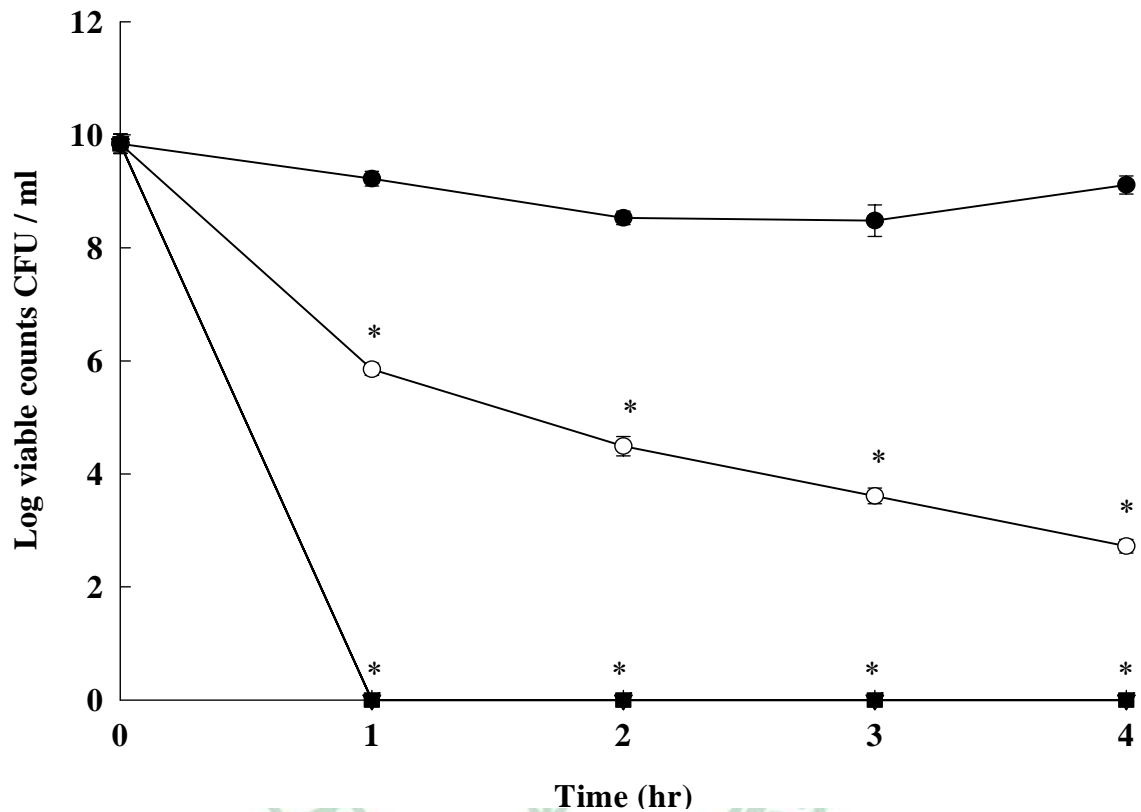


圖 4.13、培養基上清液抑菌成份對 *S. enteritidis* 之抑菌效果。●：MRS broth (control, pH 6.8)；○：MRS broth (pH 3.69)；▼：MRS broth [0.192 mmole L (+)-lactate/ml, pH 3.69]；▽：MRS broth [0.192 mmole D (-)-lactate/ml, pH 3.69]；■：*S. inulinus* 之培養基上清液(SCS) (0.192 mmole/ml lactate, pH 3.69)。*表 *S. enteritidis* 之存活菌數與啟始(0 hr)菌數比較時達顯著性差異($p < 0.01$)

Fig. 4.13. LAB-SCS factors affecting the growth of *S. enteritidis*. ●: MRS broth (control, pH 6.8); ○: MRS broth (pH 3.69); ▼: MRS broth [0.192 mmole L (+)-lactate/ml, pH 3.69] ; ▽: MRS broth [0.192 mmole D (-)-lactate/ml, pH 3.69] ; ■: *S. inulinus*-SCS) (0.192 mmole lactate/ml, pH 3.69). * Differ significantly compared with the initial (0 hr) viable count ($p < 0.01$)

; Tsai et al., 2005; de Carvalho et al., 2006)，此種功效乃歸因於菌株代謝所產生的酸(Midolo et al., 1995; Røssland et al., 2005)、抑菌素(bacteriocins) (Tagg et al., 1976; Cleveland et al., 2001; Forestier et al., 2001)或是乳酸菌與病原菌競爭生長(Gurr, 1987; Chauviere et al., 1992)及增強宿主免疫力(Fuller, 1992)等的作用。

乳酸菌代謝產生乳酸、醋酸等有機酸，有文獻指出有機酸比無機酸具有更強的殺菌能力(Asahara et al., 2004)，其原因為這些有機酸的蓄積會導致 pH 值的下降，如此可降低腸道微生物的活性(Rasic and Kurmann, 1983; Gilliland, 1989; Vandenberg et al., 1993)，但是 pH 值的下降並非抑菌的主要因素，其最主要抑菌機制乃是因為屬於弱酸有機酸只有部份解離，在細菌細胞外之未解離酸因不帶電荷，故可穿透過細胞膜進入細胞中，當在進入 pH 值較高的細胞質中即進行解離作用，釋出大量的質子(proton)，使細菌細胞質酸化，進而達到抑菌作用(Ogawa et al., 2001b; Asahara et al., 2004)。另有文獻指出解離態有機酸陰離子(anion)的蓄積也可能對菌體造成毒性，導致有害微生物的死滅(Russell, 1991)，而未解離有機酸其抑菌效力是解離有機酸的 10~600 倍，因此未解離的乳酸、醋酸具有高度的抗菌能力(Eklund, 1983; Brocklehurst and Lund, 1990; Helander et al., 1997)。

第四節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗結果

4-1 乳酸菌預防腸炎沙門氏菌侵襲腸道細胞之潛在功效

將乳酸菌預先吸附於 Caco-2 cells 上，再加入螢光染色之 *S. enteritidis*，所得乳酸菌預防 *S. enteritidis* 吸附之結果如圖 4.14 所示。由結果得知 *S. inulinus* 及其各試驗菌株皆可顯著地預防 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 的吸附，因此可推論 *S. inulinus* 和各試驗菌株應能有效預防 *S. enteritidis* 對腸道細胞之侵襲，圖 4.15 為其螢光染色之觀察圖，可看到預先以乳酸菌定殖者其 *S. enteritidis* 螢光強度皆減弱。

此外，另將螢光染色之試驗乳酸菌株先行吸附於 Caco-2 cells 上，之後再加入病原菌 *S. enteritidis*，以探討 *S. enteritidis* 對乳酸菌吸附性之影響，其結果如圖 4.16 所示。由圖中可看到已吸附於 Caco-2 cells 的試驗乳酸菌株，*S. inulinus*、*L. acidophilus* 及 *B. bifidum* 並不會因為 *S. enteritidis* 的加入而影響其吸附性，而 *L. bulgaricus*、*B. longum* 則因加入 *S. enteritidis* 而使其吸附性與控制組(未加入 *S. enteritidis* 者)相較有顯著性的降低，在所有試驗乳酸菌株中又以 *L. bulgaricus* 的吸附性降低最為顯著，由此可知 *S. inulinus*、*L. acidophilus* 及 *B. bifidum* 不會受到病原菌 *S. enteritidis* 的影響而降低其對腸道細胞的定殖。另外，在圖 4.17 亦可觀察到 *S. inulinus*、*L. acidophilus* 及 *B. bifidum* 在加入 *S. enteritidis* 前後之螢光強度並無變化。

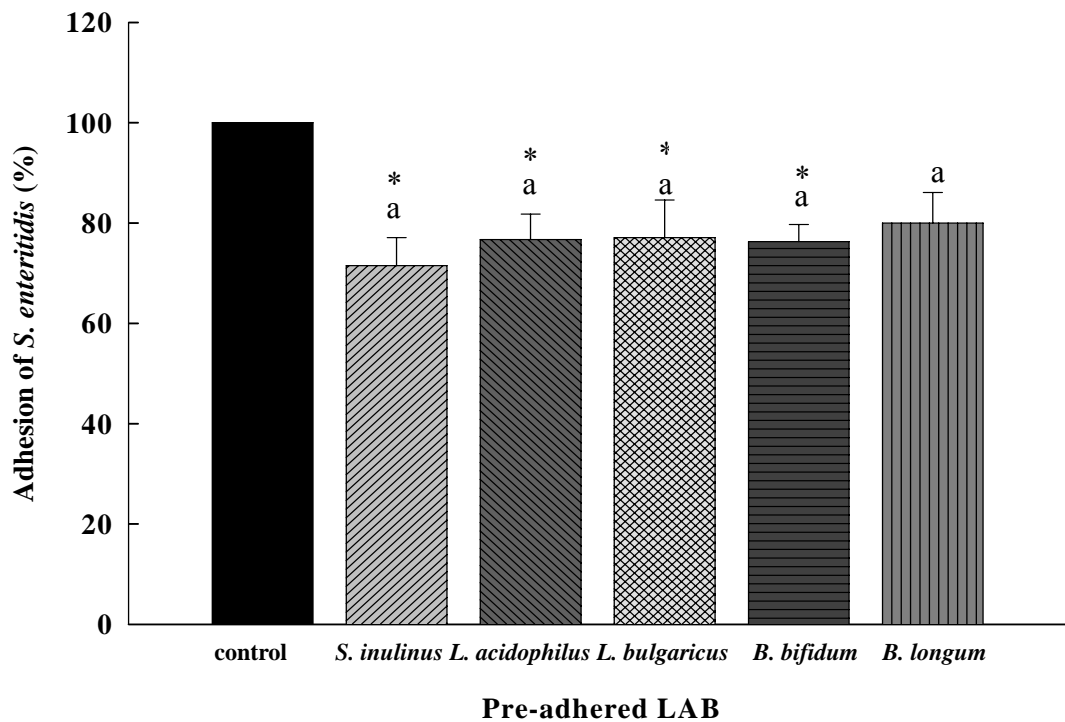


圖 4.14、預先吸附於 Caco-2 cells 上之乳酸菌預防螢光染色之 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附之試驗結果。*為各試驗組與控制組(未預先吸附乳酸菌者)相比後達到統計上之顯著性差異($p < 0.05$)；各試驗組標示之字母 a，表示彼此之間不具顯著性差異 ($p > 0.05$)

Fig. 4.14. Preventive effects of the tested LAB pre-adhered to Caco-2 cells upon the FITC-labeled *S. enteritidis* adhesion. * Significantly different from the control (not pretreated with LAB) ($p < 0.05$). All tested LAB do not differ significantly with each other and are all marked with the letter of "a" ($p > 0.05$)

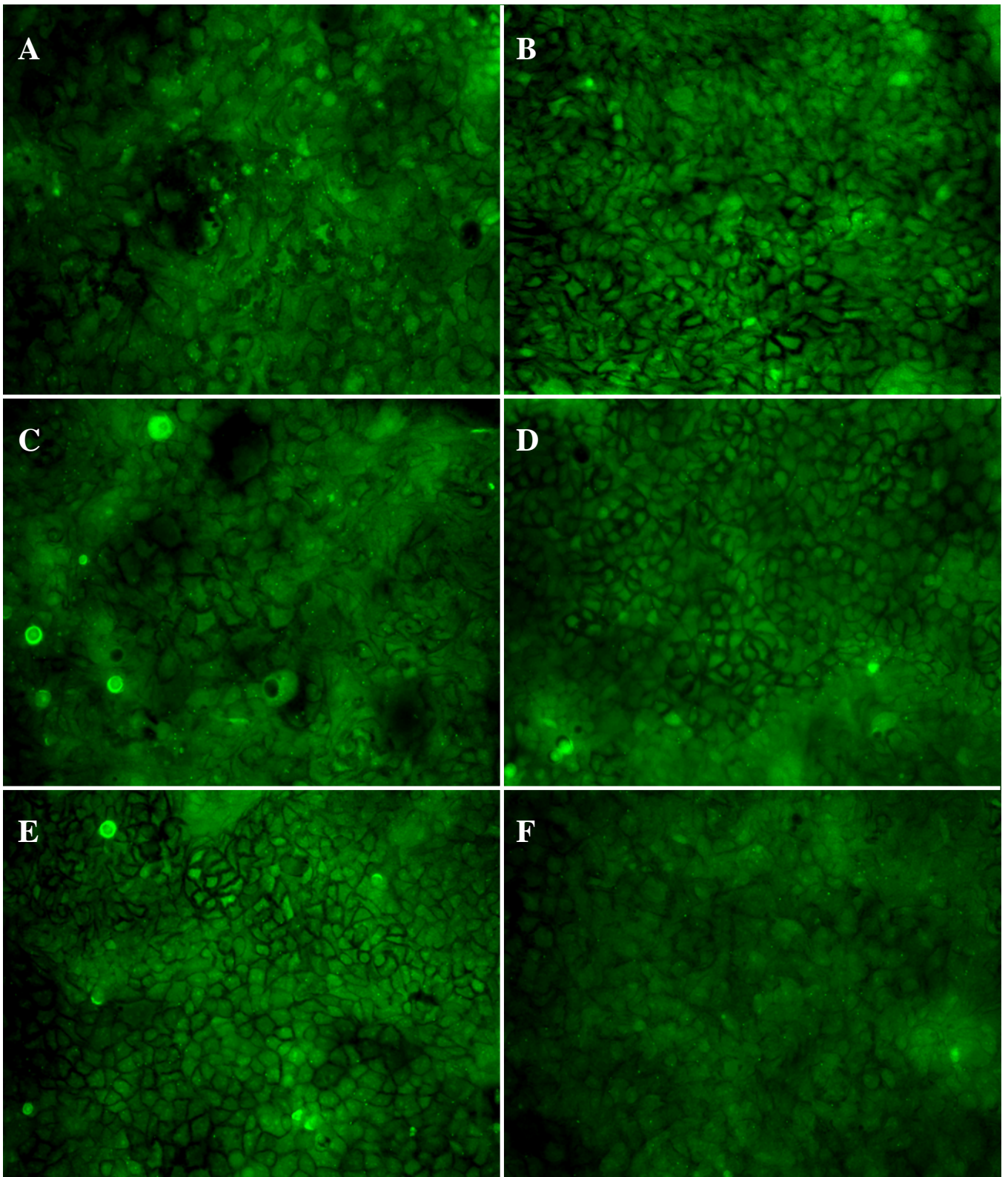


圖 4.15、預先吸附於 Caco-2 cells 上的乳酸菌預防螢光染色 *S. enteritidis* 吸附之螢光顯微照像圖。
 (A)為控制組，未預先以乳酸菌處理；(B)預先以 *S. inulinus* 處理；(C)預先以 *L. acidophilus* 處理；(D)預先以 *L. bulgaricus* 處理；(E)預先以 *B. bifidum* 處理；(F)預先以 *B. longum* 處理

Fig. 4.15. Fluorescent microscopic schemes representing the preventive effects of the tested LAB pre-adhered to Caco-2 cells upon the *S. enteritidis* adhesion. (A) control, not pretreated with LAB; and LAB pre-adhered to Caco-2 cells with (B) *S. inulinus*; (C) *L. acidophilus*; (D) *L. bulgaricus*; (E) *B. bifidum*; (E) *B. longum*, respectively

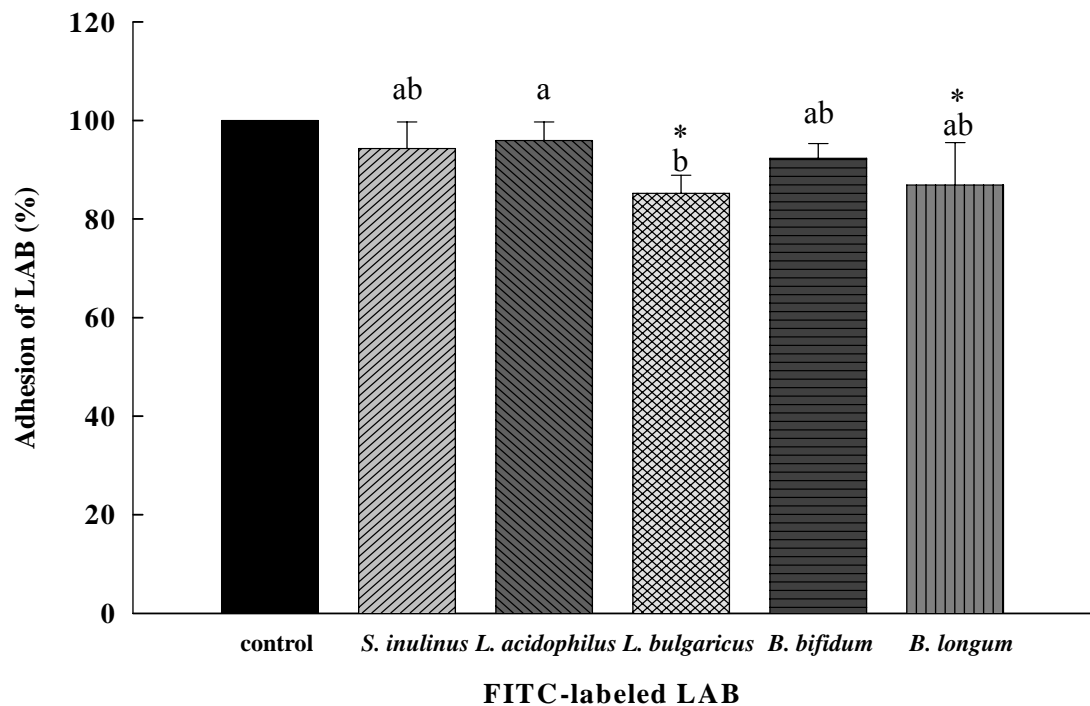


圖 4.16、*S. enteritidis* 對螢光染色乳酸菌吸附性的影響。*為各試驗組與控制組相比後達到統計上之顯著性差異($p < 0.05$)；試驗組標示字母不同者表示彼此間有顯著性差異($p < 0.05$)

Fig. 4.16. Influence of *S. enteritidis* on the adhesion of FITC-labeled LAB. Tested LAB not marked with the same letter differ significantly with each other ($p < 0.05$). * Significantly different from the control (not treated with *S. enteritidis*) ($p < 0.05$)

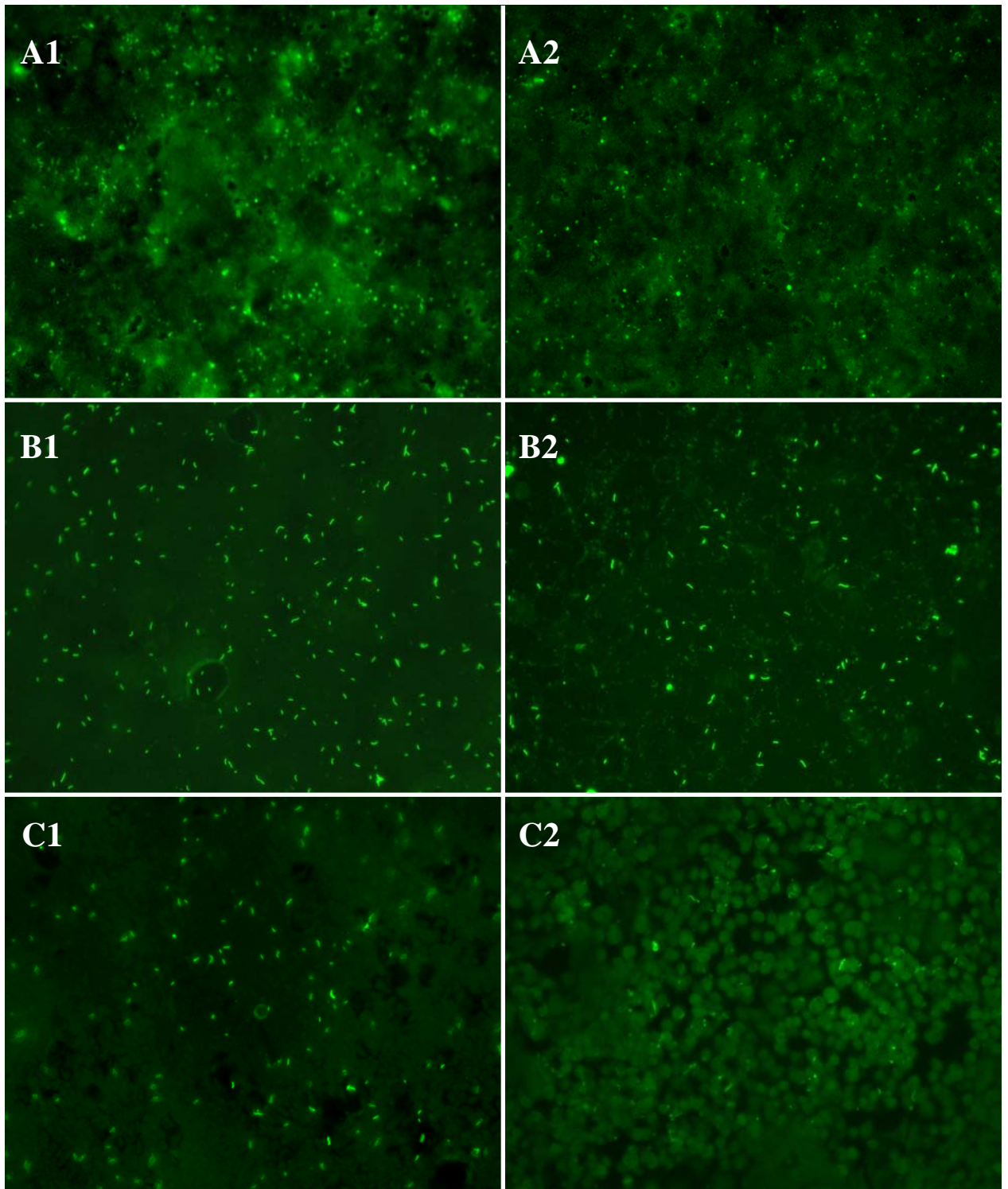
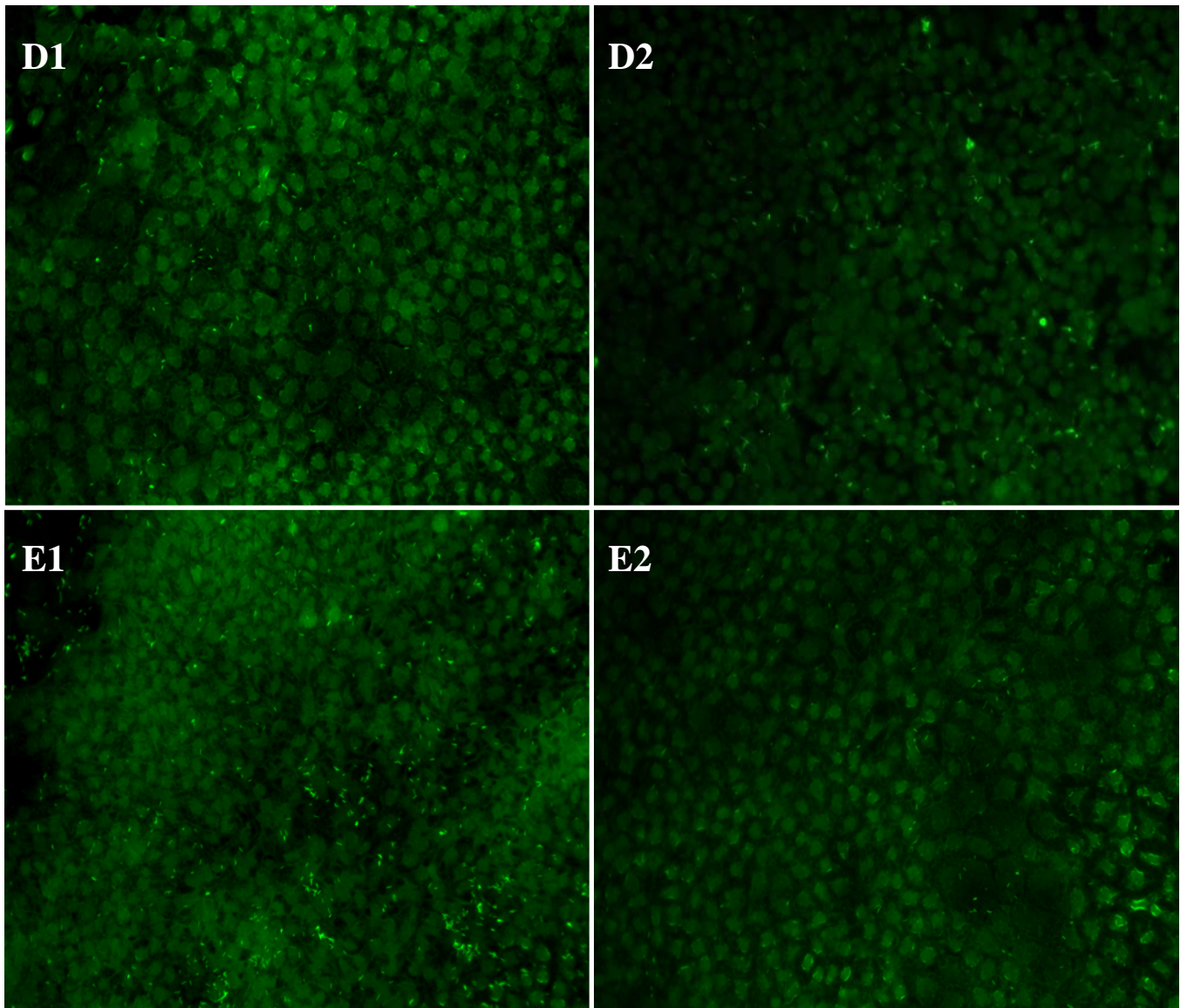


圖4.17、*S. enteritidis*對預先吸附於Caco-2 cells上之螢光染色乳酸菌吸附性影響之螢光顯微照相圖。(A1), (A2)：FITC-labeled *S. inulinus*；(B1), (B2)：FITC-labeled *L. acidophilus*；(C1), (C2)：FITC-labeled *L. bulgaricus*；左圖：(A1)~(C1)為未加入*S. enteritidis*之控制組，右圖(A2)~(C2)為加入*S. enteritidis*處理之試驗組

Fig. 4.17. Fluorescent microscopic schemes representing the influence of *S. enteritidis* on the adhesion of the pre-adhered LAB to Caco-2 cells. (A1), (A2): FITC-labeled *S. inulinus*; (B1), (B2): FITC-labeled *L. acidophilus*; (C1), (C2): FITC-labeled *L. bulgaricus*. Schemes on the left side of (A1)~(C1): the control (not added in *S. enteritidis*); schemes on the right side of (A2)~(C2): the treatment group (added in *S. enteritidis*)



續圖4.17、*S. ent* 先吸附於Caco-2 cells上之螢光染色乳酸菌吸附性影響之螢光顯微照相圖。(D1), (D2) : FITC-labeled *B. bifidum* ; (E1), (E2) : FITC-labeled *B. longum* ; 左圖 : (D1), (E1)為未加入*S. enteritidis*之控制組，右圖(D2), (E2)為加入*S. enteritidis*處理之試驗組

Continued Fig. 4.17. Fluorescent microscopic schemes representing the influence of *S. enteritidis* on the adhesion of the pre-adhered LAB to Caco-2 cells. (D1), (D2) : FITC-labeled *B. bifidum*; (E1), (E2) : FITC-labeled *B. longum*. Schemes on the left side of (D1), (E1): the control (not added in *S. enteritidis*); schemes on the right side of (D2), (E2): the treatment group (added in *S. enteritidis*)

病原菌沙門氏菌會吸附並侵入腸道細胞(Finlay and Falkow, 1990; Gahring et al., 1990; Giannasca et al., 1996)，而該菌株在侵襲腸道細胞之前，會先吸附於腸道細胞上再侵入其中進而造成致病性(Beachey, 1981; Finlay and Falkow, 1997)，因此若是能抑制沙門氏菌的吸附，當能有效預防沙門氏菌感染 (Lehto and Salminen, 1997)。在本研究中發現事先定殖 *S. inulinus* 及其他所試驗之乳酸菌於 Caco-2 cells 上皆能有效預防 *S. enteritidis* 對模擬腸道細胞之侵襲。

乳酸菌因可以抑制許多腸病原菌的生長，目前已廣泛應用於人體及動物用以治療胃腸道的疾病(Rolfe, 2000)。在生體外試驗，Coconnier et al. (1992) 觀察到 lactobacilli 會排斥腸毒素型大腸桿菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*) 對 Caco-2 cells 的吸附; Fernández et al. (2003) 和 Matijašić et al. (2006) 的研究中預先將 *L. gasseri* 吸附於 Caco-2 cells 上，也能大幅的降低 *E. coli* 對 Caco-2 cells 的吸附; 而在生體內試驗方面，Asahara et al. (2005) 預先給予無特定病原菌的小鼠口服 *B. breve* strain Yakult ($1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ CFU/day)，之後再以腸毒素型 *E. coli* O157: H7 處理，結果發現預先以 *B. breve* 菌株定殖的小鼠，其存活率良好且腸道毒素產量與未預先以 *B. breve* 定殖的控制組相比也都有顯著性的降低，這些證據皆顯示乳酸菌的預先定殖可減少病原菌的感染機會，對宿主腸道具有防禦之功能。

4-2 乳酸菌及其培養基上清液抑制腸炎沙門氏菌吸附於腸道細胞之結果

先將螢光染色之病原菌 *S. enteritidis* 預先吸附於 Caco-2 cells 上，再加入各試驗乳酸菌的培養基上清液或其菌體，探討上述二者對 *S. enteritidis* 吸附性的影響，結果如 4.18、4.19 所示。圖 4.18 為以培養基上清液處理者，而圖 4.19 則是以乳酸菌之菌體處理者，結果可發現不論是各試驗之乳酸菌培養基上清液或其菌體處理，皆可顯著降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 的吸附。在圖 4.19 更發現到 *S. inulinus* 比其他試驗乳酸菌株更能有效地抑制 *S. enteritidis* 吸附於 Caco-2 cells 上，而 *L. acidophilus*、*B. bifidum*、*B. longum* 等菌株也都有不錯的抑制吸附能力，其中 *L. bulgaricus* 雖然也能有效抑制 *S. enteritidis* 的吸附，但其效果不如其他試驗菌株來得好，由圖 4.18、4.19 亦發現 *L. bulgaricus* 之培養基上清液抑制 *S. enteritidis* 吸附於 Caco-2 cells 之能力比其菌體的作用效果為佳($p < 0.05$)。圖 4.20~4.24 則是各試驗乳酸菌的培養基上清液或其菌體干擾 *S. enteritidis* 吸附性結果之螢光顯微照相圖，各圖的結果均顯示不論是乳酸菌培養基上清液(B)或菌體處理組(C)，都可使螢光染色的 *S. enteritidis* (A) 螢光強度減弱。

當感染沙門氏菌時，該菌會先吸附而後侵入腸道細胞中(Finlay and Falkow, 1990; Gahring et al., 1990; Giannasca et al., 1996)，因此益生菌若是能干擾沙門氏菌的吸附，可能就能用以治療因沙門氏菌所造成的感染。而

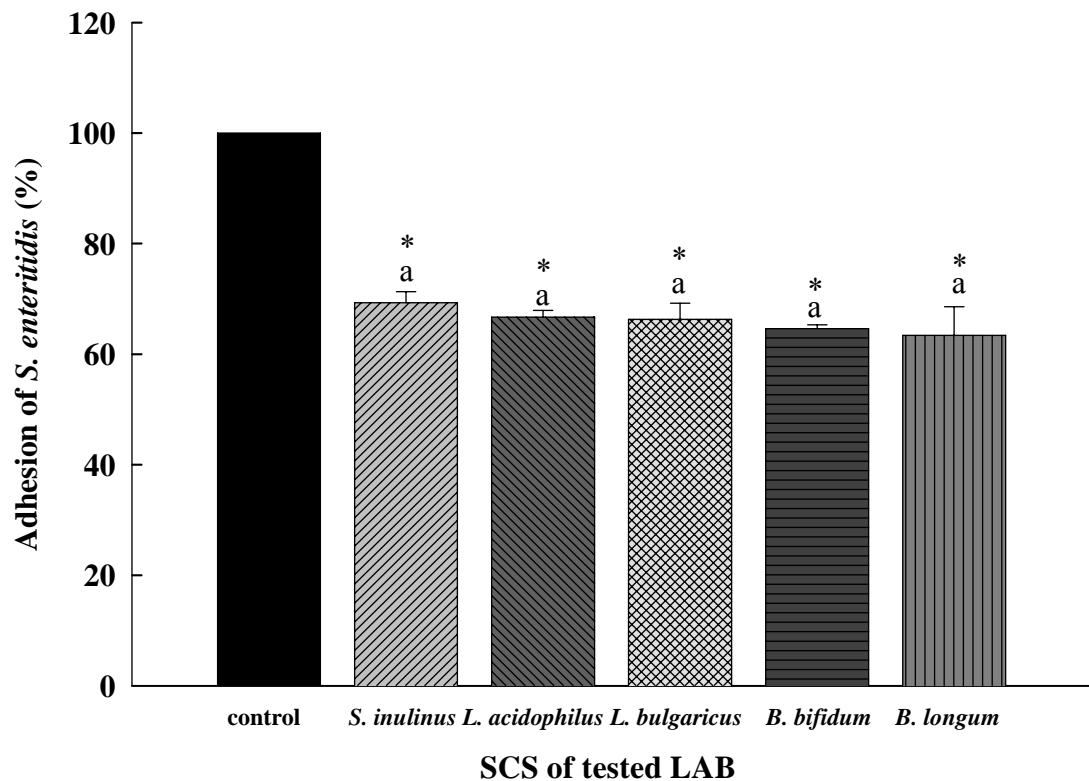


圖 4.18、乳酸菌培養基上清液對螢光染色之 *S. enteritidis* 吸附性的影響。* 為各試驗組與控制組相比後達到統計上之顯著性差異 ($p < 0.05$)；各試驗組標示之字母 a，表示彼此之間不具顯著性差異 ($p > 0.05$)

Fig. 4.18. Effects of the tested LAB-SCS on the adhesion of pre-adhered FITC-labeled *S. enteritidis*. * Significantly different from the control (not treated with the LAB-SCS) ($p < 0.05$). All tested LAB do not differ significantly with each other and are all marked with the letter of "a" ($p > 0.05$)

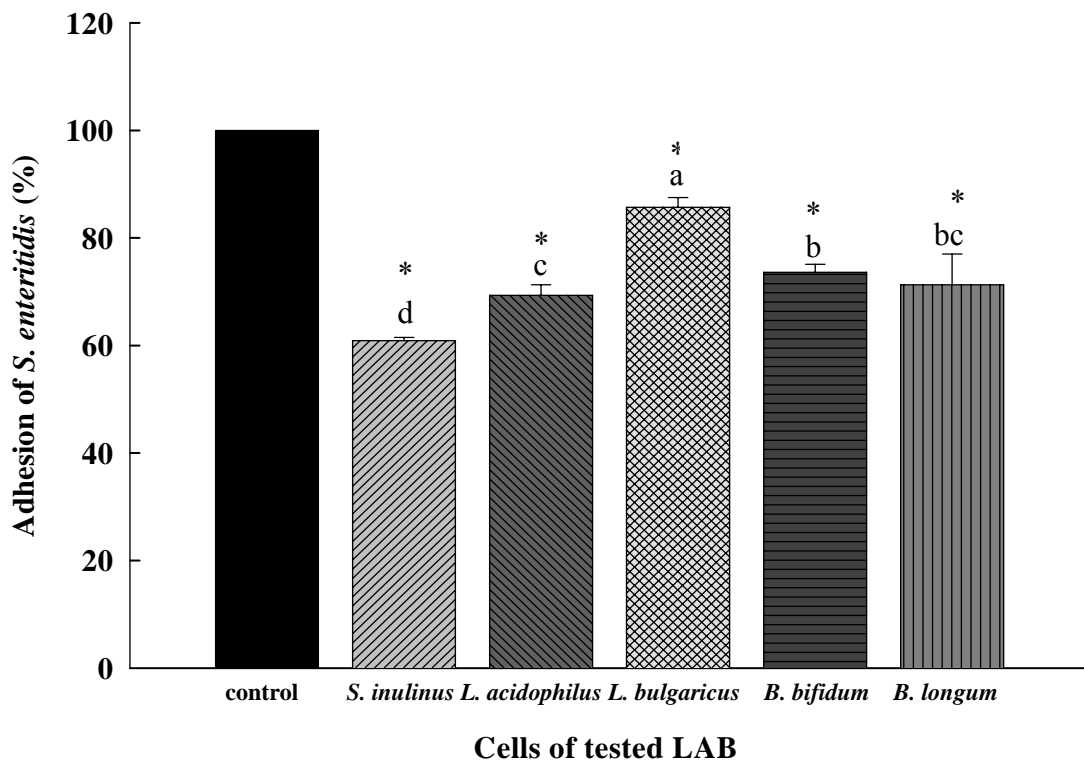


圖 4.19、乳酸菌菌體對螢光染色之 *S. enteritidis* 吸附性的影響。*為各試驗組與控制組相比後達到統計上之顯著性差異($p < 0.05$)；試驗組標示字母不同者表示彼此間有顯著性差異($p < 0.05$)

Fig. 4.19. Effects of cells of the tested LAB on the adhesion of pre-adhered FITC-labeled *S. enteritidis*. * Significantly different from the control (not treated with the LAB-cells) ($p < 0.05$). Tested LAB not marked with the same letter differ significantly with each other ($p < 0.05$)

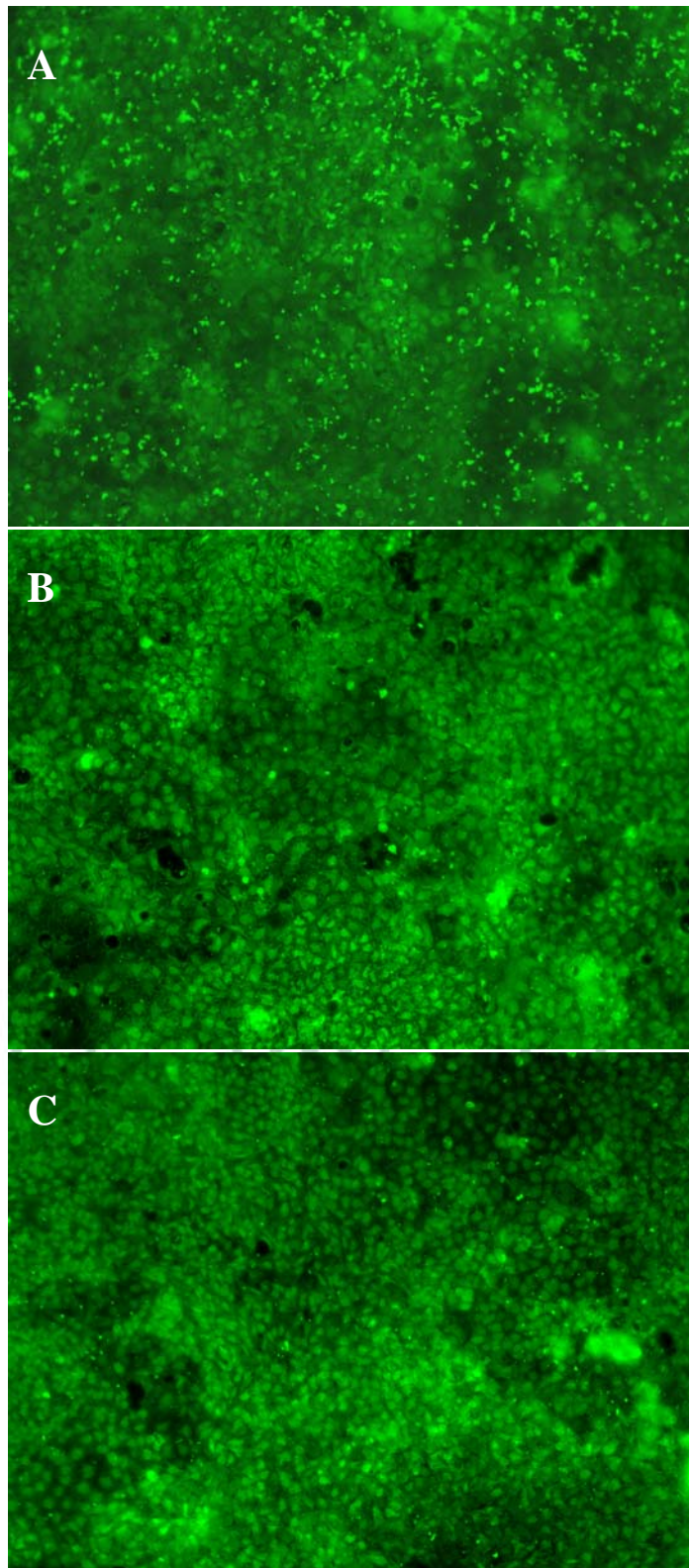


圖 4.20、*S. inulinus* 及其培養基上清液降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖。(A) 為 *S. enteritidis* (未添加 *S. inulinus*-SCS 或其菌體)；(B) 添加 *S. inulinus*-SCS；(C) 添加 *S. inulinus* 菌體

Fig. 4.20. Fluorescent microscopic schemes representing the inhibition effects of the SCS and cells of *S. inulinus* on the adhesion of *S. enteritidis*. (A) FITC-labeled *S. enteritidis* (control), (B) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with *S. inulinus*-SCS, and (C) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with cells of *S. inulinus*

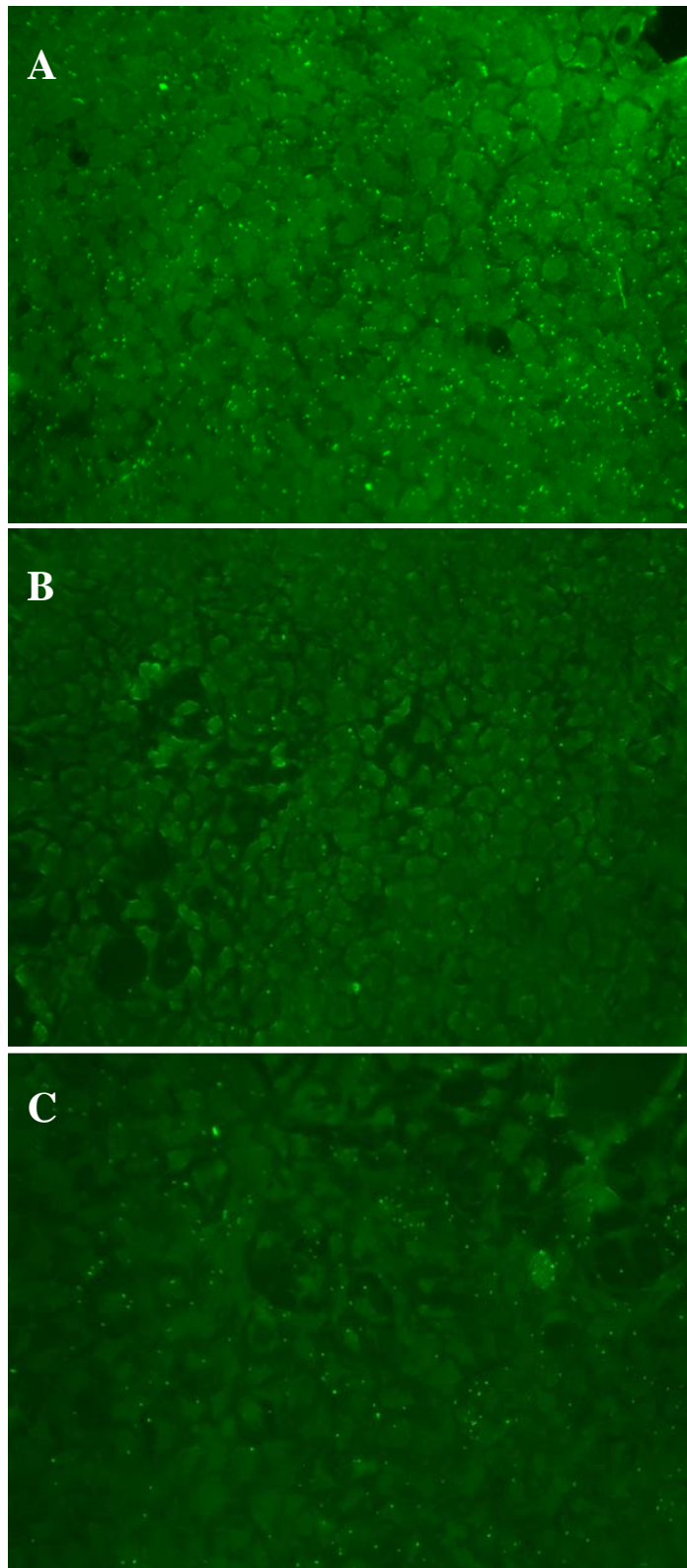


圖 4.21、*L. acidophilus* 及其培養基上清液降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖。(A)為 *S. enteritidis* (未添加 *L. acidophilus*-SCS 或其菌體)；(B)添加 *L. acidophilus*-SCS；(C)添加 *L. acidophilus* 菌體

Fig. 4.21. Fluorescent microscopic schemes representing the inhibition effects of the SCS and cells of *L. acidophilus* on the adhesion of *S. enteritidis*. (A) FITC-labeled *S. enteritidis* (control), (B) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with *L. acidophilus*-SCS, and (C) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with cells of *L. acidophilus*

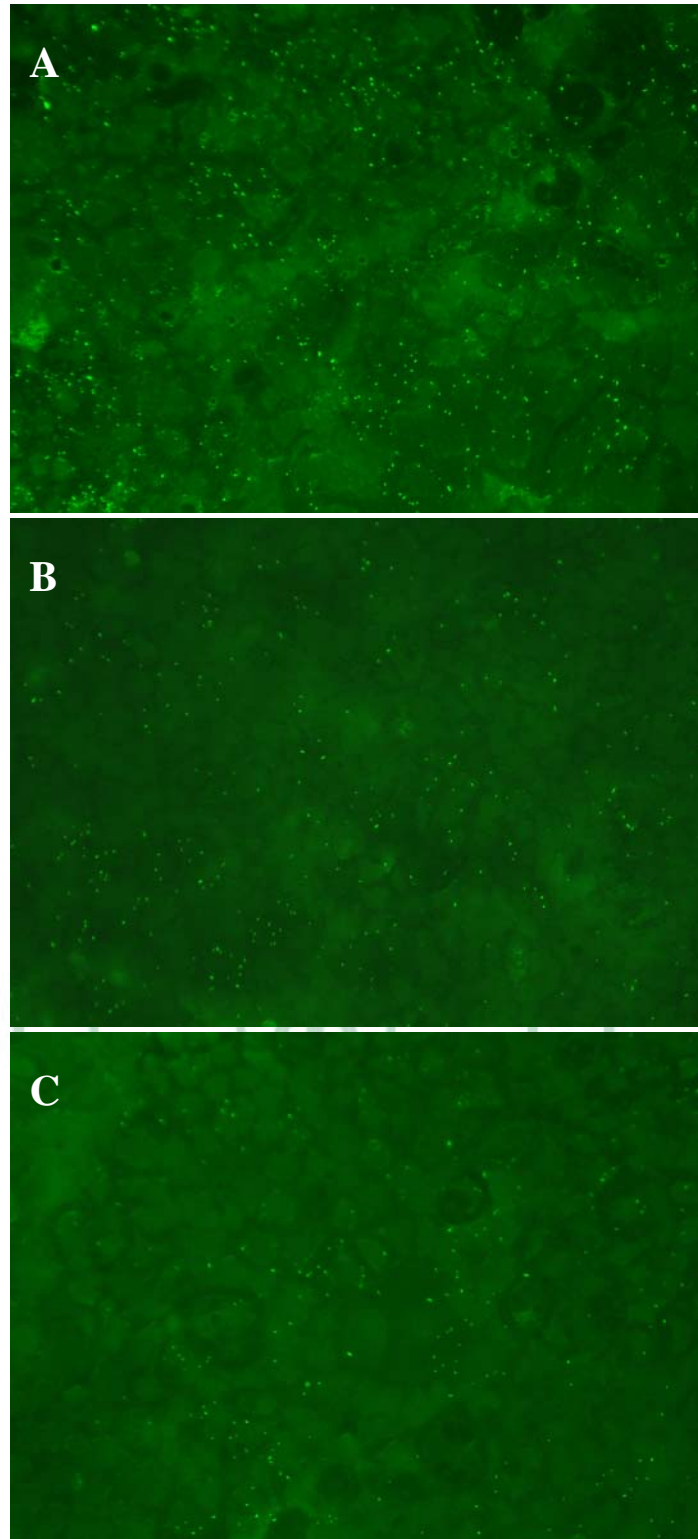


圖 4.22、*L. bulgaricus* 及其培養基上清液降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖。(A)為 *S. enteritidis* (未添加 *L. bulgaricus*-SCS 或其菌體)；(B)添加 *L. bulgaricus*-SCS；(C)添加 *L. bulgaricus* 菌體

Fig. 4.22. Fluorescent microscopic schemes representing the inhibition effects of the SCS and cells of *L. bulgaricus* on the adhesion of *S. enteritidis*. (A) FITC-labeled *S. enteritidis* (control), (B) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with *L. bulgaricus*-SCS, and (C) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with cells of *L. bulgaricus*

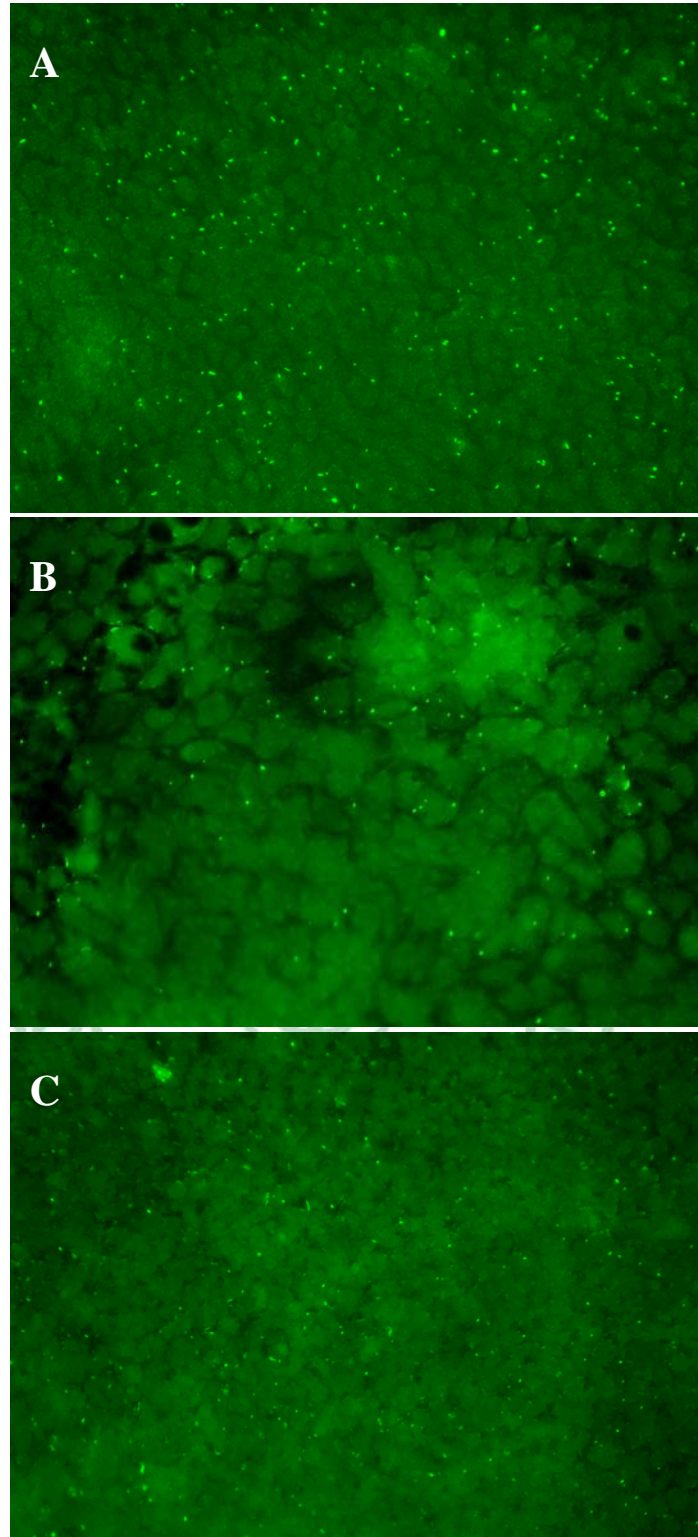


圖 4.23、*B. bifidum* 及其培養基上清液降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖。(A)為 *S. enteritidis* (未添加 *B. bifidum*-SCS 或其菌體)；(B)添加 *B. bifidum*-SCS；(C)添加 *B. bifidum* 菌體

Fig. 4.23. Fluorescent microscopic schemes representing the inhibition effects of the SCS and cells of *B. bifidum* on the adhesion of *S. enteritidis*. (A) FITC-labeled *S. enteritidis* (control), (B) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with *B. bifidum*-SCS, and (C) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with cells of *B. bifidum*

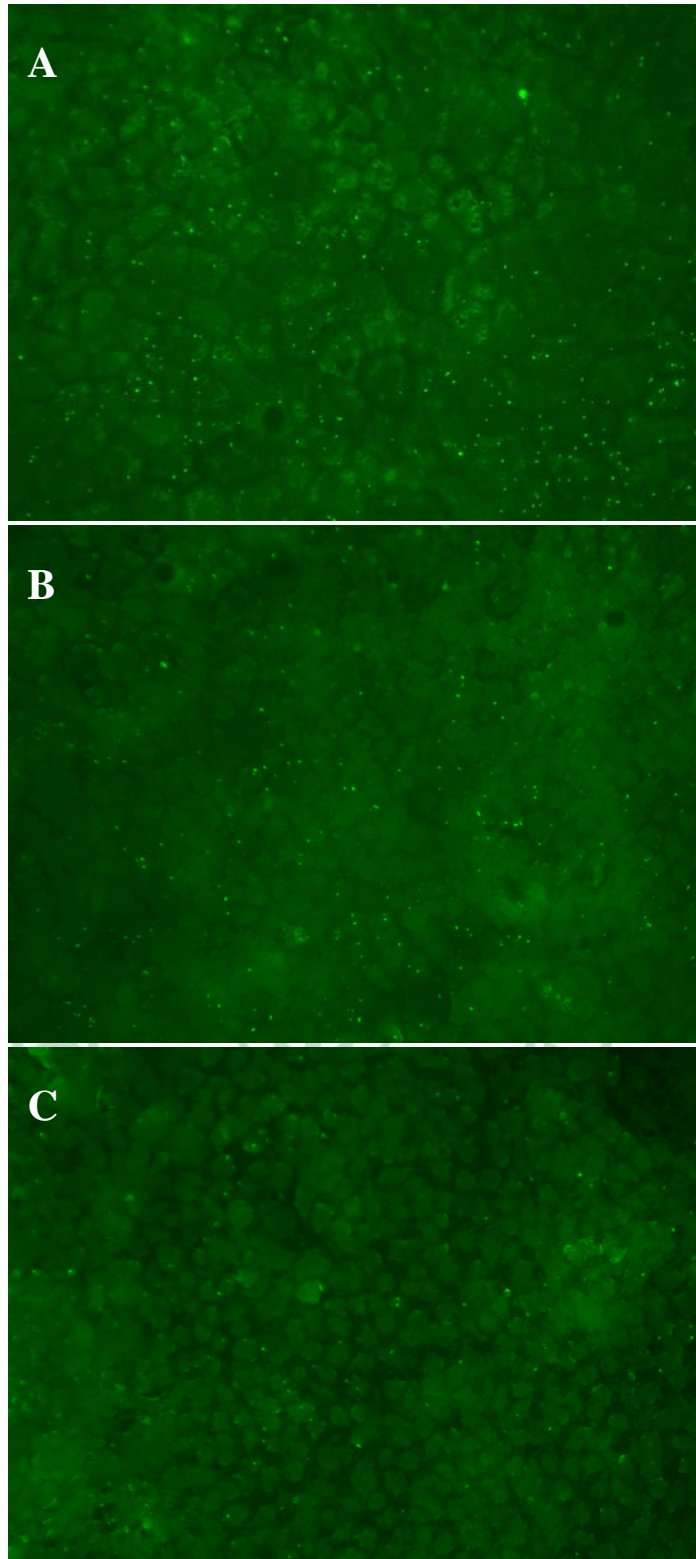


圖 4.24、*B. longum* 及其培養基上清液降低 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 吸附性之螢光顯微照相圖。(A) 為 *S. enteritidis* (未添加 *B. bifidum*-SCS 或其菌體)；(B) 添加 *B. longum*-SCS；(C) 添加 *B. longum* 菌體

Fig. 4.24. Fluorescent microscopic schemes representing the inhibition effects of the SCS and cells of *B. longum* on the adhesion of *S. enteritidis*. (A) FITC-labeled *S. enteritidis* (control), (B) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with *B. longum*-SCS, and (C) FITC-labeled *S. enteritidis* treated with cells of *B. longum*

在本研究中發現 *S. inulinus* 及其所有試驗乳酸菌株不論是培養基上清液抑或是菌體本身都能顯著地抑制 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 的吸附，因此於臨床應用具有治療 *S. enteritidis* 感染的潛力。

許多文獻指出乳酸菌或其培養基上清液具有抑制病原菌吸附及防止其侵襲腸道上皮細胞的能力(Blomberg et al., 1993; Bernet et al., 1994; Spencer and Chesson, 1994; Ouwehand and Conway, 1996; Tuomola et al., 1999; Fujiwara et al., 2001)。在生體外試驗中，Tasi et al. (2004)提出 *E. faecium* TM39 不論是菌體本身或是其培養基上清液皆可有效抑制 *Helicobacter pylori* (BCRC 17021, OUI 141)對胃腺癌細胞(TSGH 9201)的吸附，而 Gopal et al. (2001)則是以 *L. acidophilus* HN017、*L. rhamnosus* DR20、*B. lactis* DR10 之培養基上清液處理吸附於模擬腸道黏膜細胞(HT-29, Caco-2, HT29-MTX)上的 *E. coli* O157: H7，結果亦發現上述上清液皆能有效降低該病原菌對細胞的吸附與侵入性，另外 Sgouras et al. (2004)從生體內試驗亦發現口服益生菌 *L. casei* strain Shirota 可有效降低定殖於胃黏膜上 *H. pylori* SS1 的量。由本研究以及前人的文獻可知，乳酸菌如應用於臨床上應可藉由改善腸胃道菌相而有助於疾病的緩解與治療。

第五節 菌株安全性之初步評估結果

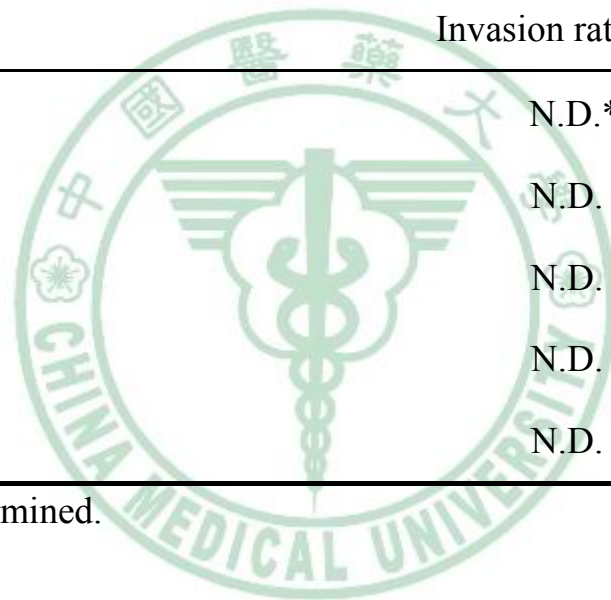
各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 之侵入百分比如表 4.5 所示。由結果可

表 4.5、各試驗乳酸菌株侵入 Caco-2 cells 之百分比

Table 4.5. Invasion rate of the tested LAB

Strain	Invasion rate (%)
<i>S. inulinus</i>	N.D.*
<i>L. acidophilus</i>	N.D.
<i>L. bulgaricus</i>	N.D.
<i>B. bifidum</i>	N.D.
<i>B. longum</i>	N.D.

* N.D.: not determined.



知 *S. inulinus* 及其他乳酸菌均對 Caco-2 cells 不具侵入性，因此可進一步推斷該菌株對人體具有安全性，而當作為益生菌使用時，不會有侵襲人體腸道細胞之危險。在行政院衛生署公告的可作為食品原料或食品加工使用的微生物包括本研究所使用的五種乳酸菌—*S. inulinus*、*L. acidophilus*、*L. bulgaricus*、*B. bifidum* 及 *B. longum* (# 5.)。欲成為益生菌最重要的條件就是必須具有吸附於人類腸道細胞之能力，但不能具有腸道細胞侵入性；因為菌株若具有侵入性可能就同時擁有相當程度的病原性與感染性(Ford et al., 1996; Urao et al., 1996)，具侵襲力的致病菌能突破宿主黏膜屏障，之後侵入體內定殖進而造成腸道疾病。

第六節 貯藏安定性試驗結果

良好的益生菌產品其所含的菌數至少應為 $10^6 \sim 10^8$ CFU/ml (Schuller-Malyoth et al., 1968; Kasimoglu et al., 2004)。本實驗乃是將試驗菌株懸浮於脫脂牛乳中，經冷凍乾燥後進行 20 週的貯藏試驗，並以回溶後的樣品進行菌數分析，所得貯藏期間活菌數的變化如圖 4.25 所示。在冷凍乾燥前(第-1 週)與冷凍乾燥後(第 0 週)，各菌株之活菌數彼此之間均未達顯著差異($p > 0.05$)。而後隨著貯藏週數的延長菌株的存活情形亦隨之降低，其中可發現在貯藏至第 20 週時，以 *L. bulgaricus* (log 9.8 CFU/ml) 具有最高的貯藏活菌數($p < 0.05$)，而 *L. acidophilus* (log 8.91 CFU/ml)、孢子形態的 *S.*

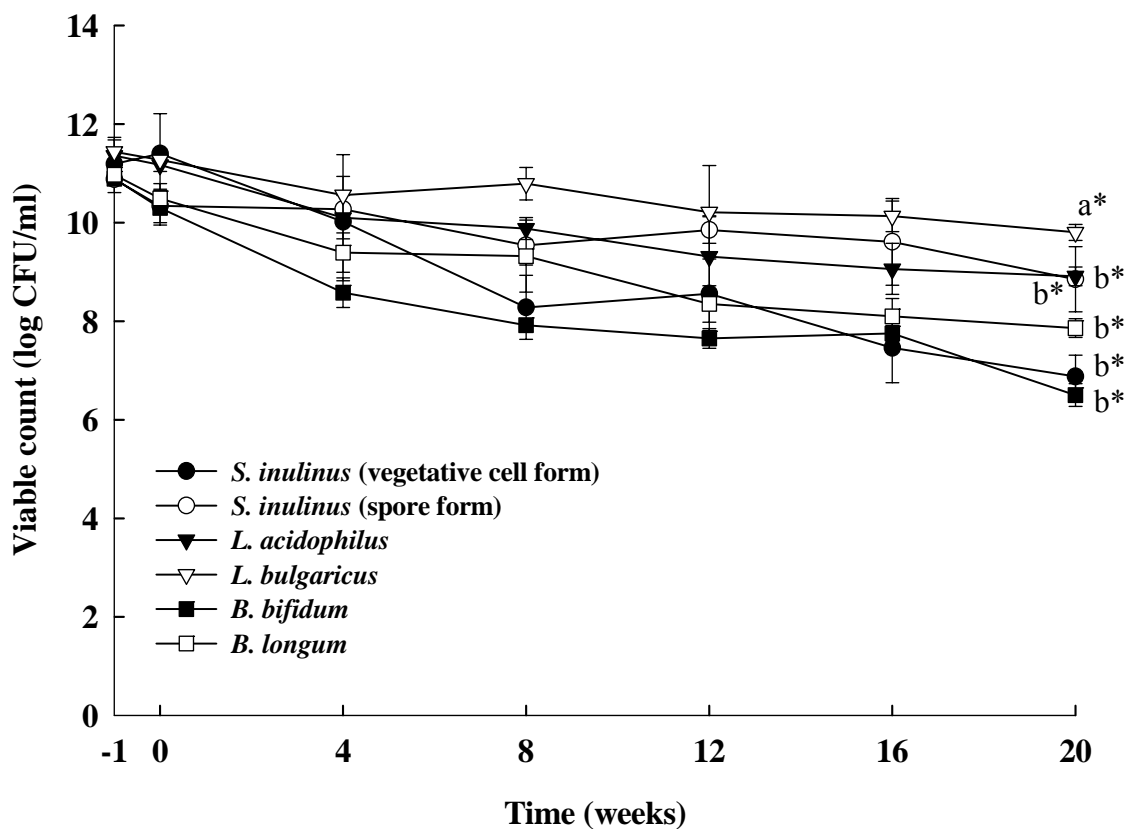


圖 4.25、各試驗菌株於冷凍乾燥後 20 週之貯藏期間活菌數的變化。*為菌株與起始菌數(第 0 週)比較後達到統計上之顯著性差異($p < 0.05$)。^{a-b} 各菌株標示字母不同者表示彼此間有顯著性差異($p < 0.05$)

Fig. 4.25. Changes in viable counts of tested LAB during 20 week's storage after freeze-drying. * Significantly different from the initial viable count ($p < 0.05$). ^{a-b} Strains marked with different letters differ significantly ($p < 0.05$)

inulinus (log 8.85 CFU/ml)、*B. longum* (log 7.86 CFU/ml)、營養細胞形態的 *S. inulinus* (log 6.88 CFU/ml)及 *B. bifidum* (log 6.50 CFU/ml)亦有高於 10^6 CFU/ml 的活菌數。另外也發現到雖然孢子形態的 *S. inulinus* 其貯藏活菌數高於營養細胞形態的 *S. inulinus*，但兩者之間並無顯著性差異($p > 0.05$)。

冷凍乾燥可使菌株於貯藏時維持較佳的穩定性，是目前公認最有效的菌種保存方法(Lawrence et al., 1976)，而此方法乃是將菌體凍結之後，經減壓昇華方式去除細胞內的水份，使菌體內的代謝反應停止，而達到長久保存的目的。Speckman et al. (1973)指出經冷凍乾燥處理的菌株，有些甚至可以維持一年的活性。另外本研究使用脫脂牛乳作為冷凍乾燥之保護劑，因為脫脂牛乳具有容易乾燥之特性，且其成本低廉並取得容易，故常作為冷凍乾燥時之菌體保護劑(Kilara et al., 1976b)。

在 Kilara et al. (1976b)的研究中提出，懸浮液中的初始菌數濃度可能會影響冷凍乾燥後的菌體存活率，當菌數濃度過高時($> 10^{12}$ CFU/ml)，則會在冷凍過程中形成高滲透壓的環境，反而不利於菌體的生存，而在本實驗所測得的懸浮液初始菌數濃度約為 $N \times 10^{10} \sim N \times 10^{11}$ CFU/ml，因此可排除此影響。

第五章 結論

本研究以產孢性乳酸菌 *S. inulinus* BCRC 14647 作為試驗菌株，對其在耐酸性、耐膽鹽、模擬腸道吸附性、對 *S. enteritidis* BCRC 10744 的拮抗性以及菌株安全性等表現其潛在益生功效之基本特性進行探討，並與四種常用之益生菌就上述試驗性質做比較，總結試驗之結果如下：

(1)於所有試驗之乳酸菌株中，孢子形態的 *S. inulinus* BCRC 14647 表現出僅次於 *L. acidophilus* BCRC 10695 及 *L. bulgaricus* BCRC 14009 之耐酸性，而膽鹽耐性則是僅次於 *L. acidophilus* BCRC 10695。

(2)具酸與膽鹽耐受性的孢子形態 *S. inulinus* 對 Caco-2 cells 的吸附性極低(10.5%)，而其營養細胞則有中等程度的吸附性(65.1%)。

(3) *S. inulinus* 可產生高量的乳酸，能有效抑制 *S. enteritidis* 的生長，其培養基上清液或菌體本身亦能有效抑制 *S. enteritidis* 對 Caco-2 cells 的吸附。

(4)預先以 *S. inulinus* 吸附於 Caco-2 cells 上可減少 *S. enteritidis* 對模擬腸道細胞的吸附。

(5)由本研究的結果推斷，*S. inulinus* 預先定殖於腸道(prophylactic effect)或是用於 *S. enteritidis* 之感染治療上(therapeutic effect)，*S. inulinus* 均具有潛在之益生功效。

(6)於生體外試驗得知 *S. inulinus* 並不具細胞侵入性，因此初步推論其對人體不具腸道侵襲性。

(7)雖然營養細胞形態的 *S. inulinus* 其酸與膽鹽性耐受性不如孢子形態的 *S. inulinus*，但由於營養細胞形態的 *S. inulinus* 能夠吸附於模擬人類腸道細胞並拮抗腸炎沙門氏菌，諸多基本特性與其他試驗之益生菌類似，因此具有潛在之益生功效。



參考文獻

- 李秀、賴滋漢 (1992) 食品中有機酸的定量。食品分析與檢驗，pp. 64-65。富林出版社，台中。
- 吳俊德、張靜文、陳振文、于台珊、洪其璧 (2004) 微生物產業生物危害調查。勞工安全衛生研究季刊 12: 275-290。
- 吳惠芬、毛勝勇、姚文、朱偉云 (2005) 豬源乳酸菌產乳酸及其抑菌特性研究。微生物學通報 32: 79-84。
- 徐志毅 (2005) 腸道正常菌群與人體的關係。微生物學通報 32: 117-120。
- 蔡政志 (2004) 乳酸菌之分子鑑定及其特性與機能性評估。國立中興大學食品科學系博士論文，台中。
- Agerbck, M., Gerdes, L. U., and Richelsen, B. (1995) Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European Journal of Clinical Nutrition* 49: 223-234.
- Ahn, Y. T., Kim, B. H., and Kim, H. U. (2000) Effect of the intake of acidophilus milk on the serum cholesterol level of Korean adult. *Korean Journal of Animal Science and Technology* 42: 223-234.
- Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J., and Kim, H. U. (2003) Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal* 13: 303-311.
- Apostolou, E., Kirjavainen, P. V., Saxelin, M., Rautelin, H., Valtonen, V., Salminen, S. J., and Ouwehand, A. C. (2001) Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *Immunology and Medical Microbiology* 31: 35-39.
- Arunachalam, K. D. (1999) Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research* 19: 1559-1597.
- Asahara, T., Shimizu, K., Nomoto, K., Hamabata, T., Ozawa, A., and Takeda, Y. (2004) Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Immunity 72: 2240-2247.

Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In "Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects (Salminen, S., Ed.)" pp. 1-72. Marcel Dekker, Inc., New York.

Baird-Parker, A. C. (1990) Foodborne salmonellosis. Lancet 336: 1231-1235.

Beachey, E. H. (1981) Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. Journal of Infectious Diseases 143: 325-345.

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., and Servin, A. L. (1993) Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Applied and Environmental Microbiology 59: 4121-4128.

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., and Servin, A. L. (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut 35: 483-489.

Berrada, N., Lemekand, J. F., Laroche, G., Thouvenot, P., and Piaia, M. (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. Journal of Dairy Science 74: 409-413.

Bertrand-Harb, C., Ivanova, I. V., Dalgalarondo, M., and Haertlé, T. (2003) Evolution of β -lactoglobulin and α -lactalbumin content during yoghurt fermentation. International Dairy Journal 13: 39-45.

Bezkorovainy, A., Miller-Catchpole, R., and Kot, E. (1997) Health benefits of bifidobacteria. Tecnologia Láctea Latinoamericana 10: 34-41.

Bhatia, S. J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N. G., and Mehta, A. P. (1989) *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. Journal of Clinical Microbiology 27: 2328-2330.

Bibiloni, R., Pérez, P. F., and De Antoni, G. L. (1999) Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? Anaerobe 5: 519-524.

- Bielecka, M., Biedrzycka, E., and Majkowska (2002) Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International* 35: 125-131.
- Biller, J. A., Katz, A. J., Flores, A. F., Buie, T. M., and Gorbach, S. L. (1995) Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 21: 224-226.
- Blomberg, L., Henriksson, A., and Conway, P. L. (1993) Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 34-39.
- Bodana, A. R. and Rao, D. R. (1990) Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* 73: 3379-3384.
- Bogdanov, I. G., Dalev, P. G., Gurevich, A. I., Kolosov, M. N., Malekova, V. P., Plemyannnikova, L. A., and Sorokina, I. B. (1975) Antitumour glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters* 57: 259-261.
- Breslaw, E. S. and Kleyn, D. H. (1973) In vitro digestibility of protein in yoghurt at various stages of processing. *Journal of Food Science* 38: 1016-1021.
- Briske-Anderson, M. J., Finley, J. Q., and Newman, S. M. (1997) The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cell. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 214: 248-257.
- Brocklehurst, T. F. and Lund, B. M. (1990) The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. *The Journal of Applied Bacteriology* 69: 390-397.
- Chaia, A. P. and Oliver, G. (2003) Intestinal microflora and metabolic activity. In "Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health (Fuller, R. and Perdigon, G., Eds.)" pp. 77-98. Blackwell Publishing, Ltd., Malden, MA, USA.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998) Ingredient

selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology* 51: 123-136.

- Chauviere, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B., and Servin, A. L. (1992) Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (EHEC) from enterocyte-like Caco-2 cells in culture. *FEMS Microbiology Letters* 91: 213-218.
- Chick, H., Shin, H. S., and Ustunol, Z. (2001) Growth and acid production by lactic acid bacteria and Bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *Journal of Food Science* 66: 478-481.
- Clements, M. L., Levine, M. M., Rimstaino, P. A., Daya, V. E., and Hughes, T. P. (1983) Exogenous lactobacilli fed to man-their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Progress in Food and Nutrition*. 7: 29-37.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- Coconnier, M. H., Bernet, M. F., Chauvière, G., and Servin, A. L. (1993b) Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 11: 235-242.
- Coconnier, M. H., Bernet, M. F., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J., and Servin, A. L. (1993a) Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters* 110: 299-306.
- Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kernéis, S., Bernet, M. F., and Servin, A. L. (1992) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2034-2039.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70: 1-12.
- Costa de Beauregard, M. A., Pringault, E., Robine, S., and Louvard, D. (1995)

- Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells. *The EMBO Journal* 14: 409-421.
- Deeth, H. C. and Tamime, A. Y. (1981) Yoghurt: nutritive and therapeutic aspects. *Journal of Food protection* 44: 78-86.
- Delley, M. and Germond, J. E. (2002) Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, subsp *lactis* and subsp *delbrueckii* using physiological and genetic tools and reclassification of some strains from the ATCC collection. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 228-231.
- de Carvalho, A. A. T., de Paula, R. A., Mantovani, H. C., and de Moraes, C. A. (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology* 23: 213-219.
- De Rodas, B. Z., Gilliland, S. E., and Maxwell, C. V. (1996) Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *Journal of Dairy Science* 79: 2121-2128.
- De Smet, I., Van Hoorde, L., De Saeyer, N., Vande Woestyne, M., and Verstraete, W. (1994) In vitro study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. *Microbial Ecology in Health and Disease* 7: 315-329.
- Doores, S. (1983) Bacterial spore resistance- species of emerging importance. *Food Technology* 37: 127-134.
- Doores, S. and Westhoff, D. C. (1981) Heat resistance of *Sporolactobacillus inulinus*. *Journal of Food Science* 46: 810-812.
- Doores, S. and Westhoff, D. C. (1983) Selective method for the isolation of *Sporolactobacillus* from food and environmental sources. *Journal of Applied Bacteriology* 54: 273-280.
- Drasar, B. S. and Hill, M. J. (1974) Human intestinal flora. Academic Press Inc. New York.

- Dunne, C., Murphy, L., Flyin, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thorton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G. G., Shanahan, F., and Collins, K. (1999) Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anotnie Van Leeuwenhoek* 76: 279-292.
- Ebina, T., Ogama, N., and Murata, K. (1995) Antitumor effect of *Lactobacillus bulgaricus* 878R. *Biotherapy* 9: 65-70.
- Edwards, C. (1993) Interactions between nutrition and intestinal microflora. *The Proceedings of the Nutrition Society* 52: 375-382.
- Eklund, T. (1983) The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *The Journal of Applied Bacteriology* 54: 383-389.
- Fernández, M. F., Boris, S., and Barbés, C. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94: 449-455.
- Finlay, B. B. and Falkow, S. (1990) *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 162: 1096-1106.
- Finlay, B. B. and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 136-169.
- Floch, M. H., Binder, H. J., Filburn, B., and Gershengoren., W. (1972) The effect of bile acids on intestinal microflora. *The American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1418-1426.
- Fooks, L. J. and Gibson, G. R. (2002) Probiotics as modulators of the gut flora. *The British Journal of Nutrition* 88: 39s-49s.
- Fooks, L. J., Fuller, R., and Gibson, G. R. (1999) Prebiotics, probiotics and

human gut microbiology. *International Dairy Journal* 9: 53-61.

Ford, H. R., Avanoglu, A., Boechat, P. R., Melgoza, R., Lum-Cheong, R. S., Boyle, P., Garrett, M., and Rowe, M. I. (1996) The microenvironment influences the pattern of bacterial translocation in formula-fed neonates. *Journal of Pediatric Surgery* 31: 486-489.

Forestier, C., Champs, C. D., Vatoux, C., and Joly, B. (2001) Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology* 152: 167-173.

Fujisawa, T. and Mori, M. (1997) Influence of various bile salts on β -glucuronidase activity of intestinal bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 25: 95-97.

Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., and Forstner, J. F. (2001) Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside GM1 on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology* 67: 97-106.

Fuller, R. (1989) Probiotics in men and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.

Fuller, R. (1992) *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman & Hall.

Gahring, L. C., Heffron, F., Finlay, B. B., and Falkow, S. (1990) Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infection and Immunity* 58: 443-448.

Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.

Giannasca, K. T., Giannasca, P. J., and Neutra, M. R. (1996) Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: Identification of a glycoconjugatic receptor. *Infection and Immunity* 64: 135-145.

Gilliland, S. E. (1979) Beneficial interrelationships between certain

microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Protection* 42: 164-167.

Gilliland, S. E. (1989) *Acidophilus* milk product: A review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science* 72: 2483-2494.

Goldin, B. and Gorbach, S. L. (1977) Alterations in faecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements and dimethylhydrazine. *Cancer* 40: 2421-2426.

Gomes, A. M. P. and Xavier-Malcata, F. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10: 139-157.

Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S. (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 67: 207-216.

Greene, J. D. and Klaenhammer, T. R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4487-4494.

Gupta, P. K., Mital, B. K., and Garg, S. K. (1996) Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *International Journal of Food Microbiology* 269: 105-109.

Gurr, M. I. (1987) Nutritional aspects of fermented milk products. Milk: The vital force proceedings of the XXII international dairy congress, Dordrecht, Netherlands, September 29-October 3, 1986.

Hammer, B. W. (1915) Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin* 19: 119-131.

Hammes, W. P. and Hertel, C. (2002) Research approaches of pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Research International* 35: 165-170.

- Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M., and Korpela, R. (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomized trial. *British Medical Journal* 322: 1-5.
- Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A. M., and Marxer, A. (1985) Expression and intracellular transport to microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 101: 838-851.
- He, F., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Hashimoto, H., Benno, Y., and Salminen, S. (2001a) Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 30: 43-47.
- He, F., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., and Salminen, S. (2001b) Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and health seniors. *Current Microbiology* 43: 351-354.
- Helander, I. M., von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T. M. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 8: 146-150.
- Hoesl, C. E. and Altwein, J. E. (2005) The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *European Urology* 47: 288-296.
- Hofmann, A. F. and Mysels, K. J. (1992) Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: The role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *Journal of Lipid Research* 33: 617-626.
- Holcomb, J. E., Frank, J. F., and Mc Gregor, J. U. (1991) Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in soft-serve frozen yogurt. *Cultured Dairy Products Journal* 26: 4-5.
- Holzappel, W. H. and Botha, S. J. (1988) Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of in vitro antagonism against *Bacillus* sp. *International Journal of Food*

Microbiology 7: 161-168.

Holzappel, W. H. and Schillinger, U. (2002) Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International* 35: 109-116.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis, H. J. (1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101.

Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.-F., and Servin, A. L. (1997) Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 513-518.

Huges, D. B. and Hoover, D. G. (1991) Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technology* 45: 74-83.

Huis in't Veld, J. H. J. and Havenaar, R. (1991) Probiotics and health in man and animal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 51: 562-567.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., and Deschamps, A. (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 61: 193-197.

Ichikawa, H., Kuroiwa, T., Inagaki, A., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S., and Sakata, T. (1999) Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 2119-2123.

Insel, P., Turner, R. E., and Ross, D. (2001) Nutrition. In *Digestion and absorption*. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA, pp. 64-97.

Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4949-4956.

- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., and Jalaludin, S. (1998) Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology* 27: 183-185.
- Jin, L. Z., Marquardt, R. R., and Baidoo, S. K. (2000) Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 619-624.
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppson, B., Nobaek, S., Ahrné, S., and Bengmark, S. (1993) Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 15-20.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1984) Genus *Sporolactobacillus*. In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, P. H. A., Ed)” pp. 1139-1141. Williams and Wilkins, Los Angeles.
- Kasimoglu, A., Göncüoğlu, M., and Akgün, S. (2004) Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal* 14: 1067-1073.
- Kaur, I. P., Chopra, K., and Saini, A. (2002) Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15: 1-9.
- Keele, C. A. and Neil, E. (1965) Secretion of digestive juices. In “Samson Wright’s Applied Physiology” pp. 1353-1363. Oxford University Press, London.
- Kilara, A. and Shahani, K. M. (1976a) Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *Journal of Dairy Science* 59: 2031-2035.
- Kilara, A., Shahani, K. M., and Das, N. K. (1976b) Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage on lactic cultures. *Culture of Dairy Production Journal* 11: 8-11.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., and Okamoto, T. (2000) In vitro studies on probiotic properties of lactococci. *Milchwissenschaft* 55: 245-249.

- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., and Salminen, S. (1998) The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* 167: 185-189.
- Kitahara, K. and Suzuki, J. (1963) *Sporolactobacillus* nov. subgen. *Journal of General and Applied Microbiology* 9: 59-71.
- Kitazawa, H., Watanabe, H., Shimosato, T., Kawai, Y., Itoh, T., and Saito, T. (2003) Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *International Journal of Food Microbiology* 85: 11-21.
- Klaver, F. A. M. and Van der Meer, R. (1993) The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1120-1124.
- Koo, F. C. W. and Peterson, J. W. (1983) Cell-free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells. *Toxicon* 21: 309-320.
- Koo, F. C. W., Peterson, J. W., Houston, C. W., and Molina, N. C. (1984) Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infection and Immunity* 43: 93-100.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., and Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94: 981-987.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13: 3-13.
- Laburthe, M. and Amiranoff, B. (1990) Peptide receptors in intestinal epithelium. In "Handbook of Physiology: Neutral and Endocrine Biology (Makhlouf, G. M. and Schultz, S. G., Eds.), pp. 215-243. Oxford University Press, Oxford,
- Laroia, S. and Martin, J. H. (1991) Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal* 26: 13-21.

- Lawrence, R. C., Thomas, T. D., and Terzaghi, B. E. (1976) Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. *Journal of Dairy Research* 43: 141-193.
- Le Minor, L. and Popoff, M. Y. (1987) Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 465-468.
- Le Vay, D. (1988) Digestion. In "Human Anatomy Physiology, 3rd ed" pp. 231-233. Hodder & Stoughton, Sevenoaks, Kent.
- Lee, J. W., Shin, J. G., Kim, E. H., Kang, H. E., Yim, I. B., Kim, J. Y., Joo, H. G., and Woo, H. J. (2004) Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Science* 5: 41-48.
- Lee, Y. K. and Salminen, S. (1995) The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 6: 241-245.
- Lee, Y. K., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003) Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 52: 925-930.
- Lehto, E. M. and Salminen, S. J. (1997) Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernatant: only a pH effect? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18: 125-132.
- Lim, K., Huh, C. S., and Baek, Y. J. (1993) Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 76: 2168-2174.
- Lin, M. Y. and Chen T. W. (2000) Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. *Journal of Food and Drug Analysis* 8: 97-102.
- Lindwall, S. and Fondén, R. (1984) Passage and survival of *L. acidophilus* in the human gastrointestinal tract. *IDF Bulletin* 179: 21.
- Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O., and Aeschlimann, J. M. (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in

intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 10: 55-64.

Lo, P. R., Yu, R. C., Chou, C. C., and Tsai, Y. H. (2002) Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacterium against benzo[a]pyrene. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94: 148-153.

Ma, D., Forsythe, P., and Bienenstock, J. (2004) Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity* 72: 5308-5314.

Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., and Gibson, G. R. (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology* 35: 180-187.

Majamaa, H. and Isolauri, E. (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99: 179-185.

Mallet, A. K and Rowland, J. R (1987) Dietary modification of intestinal bacterial enzyme activities- potential formation of toxic agents in the gut. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 22 (suppl): 251-257.

Mante, E. S., Sakyi-Dawson, E., and Amoa-Awua, W. K. (2003) Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 89: 41-50.

Marteau, P. and Boutron-Ruault, M. C. (2002) Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *British Journal of Nutrition* 87 (Suppl. 2): s153-s157.

Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., and Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The*

American Journal of Clinical Nutrition 73 (Suppl): s430-s436.

- Matijašić, B. B., Narat, M., Peternel, M. Z., and Rogelj, I. (2006) Ability of *Lactobacillus gasserii* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology* 107: 92-96.
- Mattila-Sandholm, T., Mättö, J., and Saarela, M. (1999) Lactic acid bacteria with health claims- interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal* 9: 25-35.
- McConnell, M. A. and Tannock, G. W. (1991) Lactobacilli and azoreductase activity in the murine cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3664-3665.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L., and Corthésy-Theulaz, I. (1999) Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*johnsonii*) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 60: 203-209.
- Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2006) Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal* 28: 73-78.
- Midolo, P. D., Lambert, J. R., and Hull, R. (1995) In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology* 79: 475-479.
- Mikelsaar, M., Mänder, R., and Sepp, E. (1998) Lactic acid microflora in the human microbial ecosystem and its development. In "Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edn. (Salminen, S. and von Wright, Eds)", pp. 279-342. Marcel Dekker, New York.
- Mitsuoka, T. (1990) Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* 6: 263-268.

- Mizutani, T. and Mitsuoka, T. (1980) Inhibitory effect of some intestinal bacteria on tumorigensis in gnotobiotic C 3H/He male mice. *Cancer Letters* 11: 89.
- Morelli, L., Cesena, C., Lucchini, F., and Callegari, M. L. (1997) Role of cell aggregation protein in adhesion in vitro and in vivo. In “Novel Methods for Probiotic Research, 2nd Workshop FAIR CT96-1028, PROBDEMO” pp. 63. Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., and Ohori, H. (2004) Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International Journal of Food Microbiology* 90: 357-362.
- Murinda, S. E., Roberts, R. F., and Doores, S. (1995) Evaluation of lactic acid -producing *Bacillus* and *Sporolactobacillus* for antilisterial activity. *Journal of Food Protection* 58: 570-572.
- Mustapha, A., Jiang, T., and Savaiano, A. (1997) Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport and acid tolerance of *Lb. acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 810: 1537-1545.
- Nakayama, O., Yanoshi, M. (1967a) Spore bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. I. Taxonomic studies on *Bacillus laevolacticus* nov. sp. and *Bacillus racemilacticus* nov. sp. *The Journal of General and Applied Microbiology* 13: 139-153.
- Nakayama, O., Ynoshi, M. (1967b) Spore bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. II. Taxonomic studies on the catalase negative strains. *The Journal of General and Applied Microbiology* 13: 155-165.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., and Clemens, R. A. (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LB). *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition* 38: 13-126.
- Neutra, M. and Louvard, D. (1989) Differentiation of intestinal cells in vitro. In “Functional Epithelial Cells In Culture. (Matlin, K. S. and Valentich, J. D., Eds.)”, pp. 363-398. Alan Liss, New York.

- Nielsen, O. H., Jorgensen, S., Pedersen, K., and Justesen, T. (1994) Microbial evaluation of jejunal aspirates and fecal samples after oral administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *The Journal of Applied Bacteriology* 76: 467-474.
- O'Sullivan, M. G., Thornton, G., O'Sullivan, G. C., and Collins, J. K. (1992) Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology* 3: 309-314.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S., and Takeda, Y. (2001a) Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *American Society for Microbiology* 69: 1101-1108.
- Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T., and Takeda, Y. (2001b) Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology* 68: 135-140.
- Osset, J., Bartolomé, R. M., García, E., and Andreu, A. (2001) Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *The Journal of Infectious Disease* 183: 485-491.
- Ouwehand, A. C. and Conway, P. L. (1996) Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus* spp. to inhibit adhesion of enteropathogenic fimbriated *Escherichia coli* cells. *Microbial Ecology in Health and Disease* 9: 239-246.
- Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., and Salminen, S. (1999a) Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiology Letters* 172: 61-64.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Grönlund, M. M., Isolauri, E., and Salminen, S. J. (1999b) Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* 9: 623-630.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., and Salminen, S. (1999c) Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy*

Journal 9: 43-52.

- Park, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. S., and Shin, D. H. (2002) Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2531-2536.
- Parker, C. T. and Guard-Petter, J. (2001) Contribution of flagella and invasion proteins to pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in chicks. *FEMS Microbiology Letters* 204: 287-291.
- Parker, R. B. (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health* 29: 4-8.
- Pathmakanthan, S., Meance, S., and Edwards, C. A. (2000) Probiotics: a review of human studies to date and methodological approaches. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12 (suppl. 2): 10-30.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., and Gobbato, N. (1995) Immune system stimulation by probiotics. *Journal of Dairy Science* 78: 1597-1606.
- Peterson, M. D. and Mooseker, M. S. (1992) Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the Caco-2_{BBE} clones of the human intestinal cell line Caco-2. *Journal of Cell Science* 102: 581-600.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., and Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 47: 323-333.
- Popoff, M. Y. and Le Minor, L. (1997) Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. In “WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*” 7th revision, Institute Pasteur, Paris.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., and Brenner, J. W. (2000) Supplement 1999 (no 43) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 151: 893-896.
- Prasad, J., Harsharanjit, G., Smart, J., and Gopal, P. K. (1998) Selection and

characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8: 993-1002.

Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. (1983) Bifidobacteria and their role. microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia Supplementum* 39: 1-295.

Ratti, C. (2000) Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering* 49: 311.

Ravin, V. and Alatossava, T. (2003) Three new insertion sequence elements ISLD12, ISLd13, and ISLd14 in *Lactobacillus delbrueckii*: isolation, molecular characterization, and potential use for strain identification. *Plasmid* 49: 253-268.

Reid, G. (2000) In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal* 10: 415-419.

Resta-Lenert, S. and Barrett, K. E. (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52: 988-997.

Restall, R. A. (2004) Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *The Journal of Nutrition* 134 (Suppl. 8): s2022-s2026.

Reynier, M. O., Montet, J. C., Gerolami, A., Marteau, C., Crotte, C., Montet, A. M., and Mathieu, S. (1981) Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic, and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol. *Journal of Lipid Research* 22: 467-473.

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A. C. (2003a) Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Veterinary Microbiology* 92: 111-119.

Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A. C. (2003b) Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Veterinary Microbiology* 97: 55-61.

- Rodriguez-Boulan, E., Salas, P. J., Sargiacomo, M., Lisanti, M., Lebivic, A., Sambuy, Y., Vega-Salas, D., and Graeve, L. (1989) Methods to estimate the polarized distribution of surface antigens in cultured epithelial cells. *Methods in Cell Biology* 32: 37-56.
- Rolfe, D. R. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* 130: 396S-402S.
- Røssland, E., Andersen-Borge, G. I., Langsrud, T., and Sørhaug, T. (2003) Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 89: 205-212.
- Røssland, E., Langsrud, T., Granum, P. E., and Sørhaug, T. (2005) Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 98: 193-200.
- Rowland, I. R. and Grasso, P. (1975) Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Applied Microbiology* 29: 7-12.
- Russell, J. B. (1991) Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 255-259.
- Sakata, T. (1987) Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: A possible explanation for trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic factors. *The British Journal of Nutrition* 58: 96-103.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., and Lee, Y. K. (1999) Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science and Technology* 10: 107-110.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., and Smith, G. C. (2005) Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 38: 21-28.
- Sanders, M. E. (1998) Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 8: 341-347.

- Sarem, F., Darem-Damerdji, L. O., and Nicolas, J. P. (1996) Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Applied Microbiology* 22: 439-442.
- Sarrela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., and Mattila-Sandholm, T. (2002) Gut bacteria and health foods- the European perspective. *International Journal of Food Microbiology* 78: 99-117.
- Saxelin, M. (1997) *Lactobacillus* GG- a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International* 13: 293-313.
- Scardovi, V. and Trovatelli, L. D. (1965) The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 15: 19-27.
- Schilinger, U. and Lucke, F. K. (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
- Schuller-Malyoth, R., Ruppert, A., and Müller, F. (1968). The microorganisms of the bifidus group (*Lactobacillus bifidus*). I. Historical review, nutritional, physiological and therapeutic aspects, morphology, culture procedures and taxonomy. *Milchwissenschaft* 23: 356-360.
- Schultz-Larsen, F. S. and Hanifin, J. M. (1992) Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. (Stockh.) 176: 7-12.
- Seppa, L., Luoma, H., Forss, H., Spets-Happonen, S., Markkanen, S., and Pelkonen, K. (1989) Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. *Clinical Infectious Diseases* 23: 371-374.
- Serror, P., Dervyn, R., Ehrlich, S. D., and Maguin, E. (2003) *Csp*-like genes of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and their response to cold shock. *FEMS Microbiology Letters* 226: 323-330.

- Servin, A. L. and Coconnier, M. H. (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17: 741-754.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Mentis, A. (2004) In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 518-526.
- Shanahan, F. (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease- therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 809-818
- Shortt, C. (1999) The probiotics century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science and Technology* 10: 411-417.
- Shu, Q., Zhou, J. S., Rutherford, K. J., Birtles, M. J., Prasad, J., Gopal, P. K., and Gill, H. S. (1999) Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. *International Dairy Journal* 9: 831-836.
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A., Saxelin, M., Wikberg, R., and Kirkkola, A. L. (1990) Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhea. *Annals of Medicine* 22: 57-59.
- Simmering, R. and Blaut, M. (2001) Pro- and prebiotics - the tasty guardian angels? *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 19-28.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 52: 899-907.
- Speckman, C. A., Sandine, W. E. and Elliker, P. R. (1973) Lyophilized lactic acid starter culture concentrates: preparation and inoculation of vat milk for cheddar and cottage cheese. *Journal of Dairy Science* 57: 165-173.
- Spencer, R. J. and Chesson, A. (1994) The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine

enterocytes. *The Journal of Applied Bacteriology* 77: 215-220.

Sreekumar, O. and Hosono, A. (2000) Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* in coculture. *Journal of Dairy Science* 83: 931-939.

Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., and Coppola, R. (2005) Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters* 244: 129-137.

Suzuki, T. and Yamasato, K. (1994) Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiology Letters* 115: 13-18.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-negative bacteria. *Bacteriological Review* 40: 722-756.

Tahri, K., Grill, J. P., and Schneider, F. (1996) Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiology* 33: 187-193.

Tancrede, C. (1992) Role of human microflora in health and disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 11: 1012-1015.

Tang, P., Foubister, V., Pucciarelli, M. G., and Finlay, B. B. (1993) Methods to study bacterial invasion. *Journal of Microbiological Methods* 18: 227-240.

Tejada-Simon, M. V., Lee, J. H., Ustunol, Z., and Pestka, J. J. (1999) Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *Journal of Dairy Science* 82: 649-660.

Tannock, G. W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5: 1059-1070.

Tasi, C. C., Huang, L. F., Lin, C. C., and Tsen, H. Y. (2004) Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. *International Journal of Food Microbiology* 96: 1-12.

- Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., and Holzafel, W. H. (1998) Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology* 40: 93-104.
- Tsai, C. C., Hsieh, H. Y., Chiu, H. H., Lai, Y. Y., Liu, J. H., Yu, B., and Tsen, H. Y. (2005) Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from Swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology* 102: 185-194.
- Tuomola, E. M. and Salminen, S. J. (1997) Adhesion of two *Lactobacillus* strains, one *Lactococcus* and one *Propionibacterium* strain to cultured human intestinal Caco-2 cell line. *Bioscience and Microflora* 16: 13-17.
- Tuomola, E. M. and Salminen, S. J. (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41: 45-51.
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. J. (1999) The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26: 137-142.
- Urao, M., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., and Coran, A. G. (1996) The association of gut-associated lymphoid tissue and bacterial translocation in the newborn rabbit. *Journal of Pediatric Surgery* 31: 1482-1487.
- Vandenbergh, P. A. (1993) Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 221-238.
- Vinderola, G. G. and Reinheimer, J. A. (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Wadström, T., Hirno, S., Novak, H., Guzman, A., Ringner-Pantzar, M., Utt, M., and Aleljung, P. (1997) Sulfatides inhibit binding of *Helicobacter pylori* to the gastric cancer Kato III cell line. *Current Microbiology* 34: 267-272.
- Walker, D. K. and Gilliland, S. E. (1993) Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus*

- acidophilus*. Journal of Dairy Science 76: 956-961.
- Walker, W. A. and Duffy, L. C. (1998) Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. Journal of Nutritional Biochemistry 9: 668-675.
- Wang, K. Y., Li, S. N., Liu, C. S., Perng, D. S., Su, Y. C., Wu, D. C., Jan, C. M., Lai, C. H., Wang, T. N., and Wang, W. M. (2004) Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. American Society for Clinical Nutrition 80: 737-741.
- Wang, Y. C., Yu, R. C., and Chou C. C. (2006) Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology 23: 128-135.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. (2000) Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiology 17: 205-215.
- Yamamoto, N., Maeno, M., and Takano, T. (1999) Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. Journal of Dairy Science 82: 1388-1393.
- Yanagiad, F., Suzuki, K.-I., Kozaki, M., and Komagata, K. (1997) Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 499-504.
- You, H. J., Oh, D. K., and Ji, G. E. (2004) Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. FEMS Microbiology Letters 240: 131-136.
- Zárate, G., Pérez Chaia, A., González, S., and Oliver, G. (2000) Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. Journal of Food Protection 63: 1214-1221.
- Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., and Louvard, D. (1991) Use of

cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In "Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System. Intestinal Absorption and Secretion vol. IV. (Shultz, S. J., Field, M., and Frizell, R. A. (Eds))" pp. 223-255. American Physiology Society, Bethesda, MD.

1. <http://www.apog.com.tw/>

2. <http://www.pro-partner.com.tw/>

3. <http://anka.livstek.lth.se:2080/salmonella.htm>

4. <http://basic.shsmu.edu.cn/passw/micro2/jxnr/cn/6.ppt>

5. <http://food.doh.gov.tw/chinese/info/可供食品使用原料彙整一覽表.xls>

