

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

乳酸菌經模擬胃腸道條件之酸與膽鹽作用後的

基礎益生特性探討

**Basic Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria after
Being Treated with Simulate Gastrointestinal
Conditions of Acid and Bile Salt**

研究生：謝馨儀 撰

指導教授：曾政鴻 博士

中華民國九十六年六月

謝 誌

感謝指導教授曾政鴻博士兩年來於學業、研究等方面的悉心指導及待人處事上的諄諄教誨，使本論文得以順利完成。師恩浩瀚，永銘於心，謹誌卷首，以表誠摯之謝忱。

文稿初成，承蒙陽明大學蔡英傑教授、中興大學陳錦樹教授、屏東科技大學謝寶全教授及中興大學金安兒教授於百忙之中撥冗審閱，詳加斧正，並提供寶貴意見使論文內容得以更加完善，謹此致上萬分謝意。

在學期間，多蒙本系所師長及學姐佩玉於課業及實驗上的指導；同窗好友珮玲、苓卉、杏純、珊瑩、昇輝及同期研究所同學於實驗與生活上的幫助與支持；實驗室之學妹宜儒、雯淳的協助與幫忙；再者，要感謝好友們劫展、淑珍、詠薇、容秀、薇頻、玉玲、芳君，於艱辛研究過程中給予諸多的協助與鼓勵，在此致上最誠摯的謝意。

最後由衷感謝家人們的關懷與支持，使我能安心無慮的完成學業。謹此將本論文獻給所有關心及曾經幫助我的人，謝謝你們。

謝馨儀 謹致於

中國醫藥大學 營養學系

中華民國 九十六年六月

中文摘要

本研究目的欲探討乳酸菌在經模擬胃腸道條件之酸及膽鹽作用後其益生功效之改變，以 *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695, *Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615, *L. paracasei* BCRC 14023 作為益生菌株，*Clostridium perfringens* BCRC 13019 作為拮抗能力試驗之病原菌株，試驗項目包括乳酸菌之酸及膽鹽耐受性、酸及膽鹽作用前後其吸附能力、拮抗病原菌能力、 β -半乳糖苷酶活性(β -galactosidase activity)及其安全性試驗等。酸與膽鹽耐受性是分別及連續以 pH 2, 3, 4 之酸液及 0.1, 0.2, 0.3% 膽鹽溶液進行試驗。模擬腸道吸附試驗則以乳酸菌對模擬腸道細胞 Caco-2 cell 之吸附能力為試驗模式，病原菌拮抗能力則以乳酸菌對產氣莢膜梭菌在模擬腸道細胞之吸附抑制與取代試驗來進行。結果顯示 *L. acidophilus* 具最佳酸耐受性($p < 0.05$)、*L. paracasei* 具最佳膽鹽耐受性($p < 0.05$)，在不同 pH 值酸液及不同濃度膽鹽連續作用後，各試驗乳酸菌株於 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽作用後具較高存活菌數及存活率。在模擬腸道吸附性試驗方面，*L. acidophilus* 具最佳吸附能力($p < 0.05$)，而在酸(pH 4)及膽鹽(0.1%)連續作用後之吸附能力則是 *L. paracasei* (80.6%) > *L. acidophilus* (9.71%) > *B. bifidum* (5.20%)。拮抗能力的試驗結果則顯示，乳酸菌經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽作用後，各試驗菌株仍保有拮抗 *C. perfringens* 之能力。 β -半乳糖苷酶活性試驗中發現在經相同 pH 值之酸

液作用後，接著隨膽鹽作用濃度增加，其 β -半乳糖苷酶的活性也隨之增加，顯示菌體細胞膜因受上述條件作用後之傷害程度也增加。此外，安全性分析試驗也顯示本研究所使用試驗菌株具有安全性。本研究發現低 pH 值酸液及高濃度膽鹽致使乳酸菌株無法存活，而喪失其吸附能力，但於 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後存活之菌株，仍具有吸附力並能有效拮抗病原菌吸附。

關鍵字：乳酸菌、模擬胃腸道條件、益生性、酸耐受性、膽鹽耐受性、
吸附能力、病原菌拮抗能力、安全性、產氣莢膜梭菌



英文摘要

This study investigated the changes in probiotic properties of lactic acid bacteria (LAB) after being treated with simulate gastrointestinal condition of acid and bile salts. *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695, *Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615, *L. paracasei* BCRC 14023 were used as probiotics, and *Clostridium perfringens* BCRC 13019 was studied in the antagonistic activity for the selected LAB. Tested items included acid and bile tolerance, adherence, antagonistic activity, β -galactosidase activity, and safety aspect of the LAB after acid and bile treatment. For the acid and bile tolerance tests, the LAB were treated with pH 2, 3, 4 acid solution and 0.1, 0.2, 0.3% oxgall bile solution, respectively or continually. The adhesion assay determined the adherence rate of LAB adhered to the simulate intestinal Caco-2 cell as the tested model. Both adherence inhibition and displacement test were used for the study of LAB antagonistic activity against *C. perfringens*. Results showed that *L. acidophilus* exhibited the best acid tolerance ($p < 0.05$), and *L. paracasei* had better bile resistance than the other two tested probiotics ($p < 0.05$). All tested LAB had better viable count and survival rate after being treated with pH 4 acid solution and then 0.1% bile solution. Adhesive ability of LAB after exposure to acid (pH 4) and bile (0.1%), shown in adherence rate in descending order, were *L. paracasei* (80.6%) $>$ *L. acidophilus* (9.71%) $>$ *B. bifidum* (5.20%). LAB pretreated with pH 4 acid solution and 0.1% bile solution retained the ability of diminishing the adhesion of *C. perfringens* ($p < 0.05$). After exposure to the same pH acid solution, the injury of LAB cell membrane raised with the increased bile salt content, leading to higher

β -galactosidase values. The result of invasion test for safety aspect revealed that LAB possessed a safety property. Some of the tested LAB after the treatments of acid solution with low pH value plus bile solution of high concentration would lead to death. The tested LAB surviving the treatment of pH 4 acid and 0.1% bile solution still remained the characteristics of adhesiveness and antagonistic activity toward the pathogen.

Key words: lactic acid bacteria, simulate gastrointestinal conditions, probiotic property, acid tolerance, bile tolerance, adhesion, antagonistic activity, safety property, *C. perfringens*



目錄

第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 腸道菌群組成	3
1-1 腸道菌相組成及分佈	3
1-2 影響腸道菌相之因子	4
1-3 腸胃道微生物與宿主之關係	6
第二節 乳酸菌介紹	6
2-1 乳酸菌定義	6
2-2 乳酸菌的分類	9
2-3 乳酸菌的應用	11
第三節 益生菌介紹	11
3-1 益生菌定義	11
3-2 益生菌應具備之條件	12
3-3 益生菌之保健功效	12
3-4 乳酸菌作為益生菌之特性	18
3-5 益生菌之應用	19
3-6 嗜酸乳酸桿菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	20
3-7 比菲德雙歧桿菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>)	20
3-8 副乾酪乳酸桿菌(<i>Lactobacillus paracasei</i>)	23
第四節 乳酸菌腸胃道耐受性研究	23
4-1 乳酸菌之耐酸性研究	23
4-2 乳酸菌之膽鹽耐受性研究	26
4-3 乳酸菌吸附於腸道細胞之試驗模式	27

第五節 乳酸菌對產氣莢膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>)之競爭排除作用.....	27
5-1 產氣莢膜梭菌之介紹.....	27
5-2 產氣莢膜梭菌之致病機轉.....	29
5-3 乳酸菌之競爭排除作用.....	30
第六節 乳酸菌之 β -半乳糖苷酶活性.....	31
第七節 乳酸菌之安全性評估.....	31
第八節 研究動機.....	34
第九節 研究目的.....	34
第三章 材料與方法.....	36
第一節 研究設計架構.....	36
第二節 實驗材料.....	36
2-1 使用菌株.....	36
2-2 菌株活化之培養基.....	36
2-3 使用細胞株.....	38
2-4 細胞株生長之培養基.....	38
2-5 細胞株保存之冷凍培養基.....	38
第三節 實驗菌株之前處理.....	38
第四節 細胞培養.....	39
4-1 冷凍細胞活化.....	39
4-2 細胞繼代培養.....	39
4-3 細胞株冷凍保存.....	39

4-4 細胞染色與計數.....	40
4-5 細胞單層膜之培養.....	40
第五節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽研究.....	41
5-1 耐酸性試驗.....	41
5-2 耐膽鹽試驗.....	41
5-3 連續耐酸、耐膽鹽試驗.....	42
第六節 乳酸菌吸附性研究.....	42
6-1 模擬腸道吸附性試驗.....	42
6-2 連續耐酸、耐膽鹽後模擬腸道吸附性試驗.....	44
第七節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗.....	44
7-1-1 乳酸菌預防 <i>C. perfringens</i> 侵襲模擬腸道細胞之試驗 (prophylactic effect of adherence inhibition)-控制組.....	44
7-1-2 乳酸菌預防 <i>C. perfringens</i> 侵襲模擬腸道細胞之試驗 (<i>C. perfringens</i> 預先以酸及膽鹽連續處理)-試驗組.....	45
7-2-1 乳酸菌取代 <i>C. perfringens</i> 吸附於模擬腸道細胞之試 驗(therapeutic effect of displacement test)-控制組.....	46
7-2-2 乳酸菌取代 <i>C. perfringens</i> 吸附於模擬腸道細胞之試 驗(乳酸菌預先以酸及膽鹽連續處理)-試驗組.....	47
第八節 β -半乳糖苷酶活性.....	48
第九節 細胞侵入性試驗.....	48
第十節 統計分析.....	52
第四章 結果與討論.....	53
第一節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽.....	53
1-1 耐酸性試驗結果.....	53
1-2 耐膽鹽試驗結果.....	55

1-3 耐酸耐膽鹽連續試驗結果.....	55
第二節 乳酸菌模擬腸道之吸附性.....	59
2-1 細胞單層膜觀察.....	59
2-2 吸附性試驗結果.....	60
2-3 乳酸菌耐酸耐膽鹽後之腸道吸附性.....	64
第三節 乳酸菌拮抗病原菌吸附之益生特性.....	68
3-1 乳酸菌預防 <i>C. perfringens</i> 侵襲模擬腸道細胞之吸附性 抑制功效(adherence inhibition effect).....	68
3-2 乳酸菌取代 <i>C. perfringens</i> 吸附於模擬腸道細胞之功效 (displacement effect).....	73
第四節 β -半乳糖苷酶活性.....	78
第五節 菌株安全性評估.....	80
第五章 結論.....	83
參考文獻.....	85

表目錄

表 2.1、影響腸胃道微生物菌相之因子.....	7
表 2.2、應用於益生菌產品之菌株.....	21
表 4.1、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 及 3.0 hr 後之 存活菌數(log CFU ml ⁻¹)及存活率(%).....	54
表 4.2、試驗乳酸菌株以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽濃度分別處理 1.5 及 3.0 hr 後之存活菌數(log CFU ml ⁻¹)及存活率(%).....	56
表 4.3、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽分別處理 3 hr 後之存活菌數(log CFU ml ⁻¹)及 存活率(%).....	57
表 4.4、各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 之吸附率(%).....	62
表 4.5、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽分別處理 3 hr 後之存活菌數(log CFU ml ⁻¹)、 吸附菌數(log CFU ml ⁻¹)及吸附率(%).....	66
表 4.6、各試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽分別處理 3 hr 後之 β-半乳糖苷酶活性(μmol/ml)	79
表 4.7、各試驗乳酸菌株侵入 Caco-2 cells 之百分比.....	81
表 4.8、各試驗乳酸菌株經 pH 4 酸液作用 3 hr 後再以 0.1%膽鹽連 續處理 3 hr 後侵入 Caco-2 cells 之百分比.....	82

圖目錄

圖 2.1、人類腸胃道菌相分佈	5
圖 2.2、腸道菌相與宿主健康之關係	8
圖 2.3、益生菌的健康功效	13
圖 2.4、益生菌調節免疫反應之抗過敏機制	16
圖 2.5、 <i>L. acidophilus</i> 之掃描式電子顯微鏡圖	22
圖 2.6、 <i>B. bifidum</i> 之掃描式電子顯微鏡圖	24
圖 2.7、 <i>L. paracasei</i> 之掃描式電子顯微鏡圖	25
圖 2.8、 <i>C. perfringens</i> 之掃描式電子顯微鏡圖	28
圖 2.9、 β -galactosidase 對乳糖及 ONPG 作用情形	32
圖 2.10、致病菌侵襲腸道上皮細胞過程	33
圖 3.1、實驗設計架構	37
圖 3.2、 β -半乳糖苷酶活性之標準曲線	49
圖 3.3、乳酸菌之侵入性試驗流程	51
圖 4.1、Caco-2 cells 繼代培養後之生長型態	61
圖 4.2、各試驗乳酸菌株吸附於 Caco-2 cells 上之光學顯微鏡照像圖	63
圖 4.3、 <i>L. acidophilus</i> BG2FO4 對人類腸道細胞之吸附模式	65
圖 4.4、各試驗乳酸菌株經 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽連續處理後吸附於	

Caco-2 cells 上之光學顯微鏡照像圖	67
圖 4.5、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌對螢光染色之 <i>C. perfringens</i> (未處理及連續以 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽溶液 處理)的吸附性抑制之試驗結果	69
圖 4.6、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌預防螢光染色 <i>C. perfringens</i> 吸附之螢光顯微鏡照相圖	71
圖 4.7、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌預防先以 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽溶液處理之螢光染色 <i>C. perfringens</i> 吸附之螢光顯 微鏡照相圖	72
圖 4.8、乳酸菌(未處理及連續以 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽溶液處理)取 代螢光染色之 <i>C. perfringens</i> 對 Caco-2 cell 吸附之試驗結果 ..	74
圖 4.9、乳酸菌取代螢光染色 <i>C. perfringens</i> 吸附之螢光顯微鏡照相 圖	76
圖 4.10、預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液處理之乳酸菌取代螢光 染色 <i>C. perfringens</i> 吸附之螢光顯微鏡照相圖	77

第一章 前言

近年來國人健康意識的提升，對食品的選擇更要求能調節生理機能。乳酸菌廣泛分布於自然界中，動物腸道內乳酸菌與宿主健康關係密切，許多文獻證實有益人體之乳酸菌為一優質益生菌(Fuller and Brooker, 1974; Bernet *et al.*, 1993; Berent-Camard *et al.*, 1997)，且其發酵產品受消費者喜愛。人類的消化道中有高達 10^{12} - 10^{14} 個以上的細菌存在，其中包含益生菌及有害菌的存在，其相互間的拮抗會直接或間接影響腸道菌相的平衡(Cummings and Macfarlane, 1991)。許多文獻指出攝取益生菌具有平衡腸道菌相(Ziemer and Gibson, 1998)、改善乳糖不耐症(Salminen *et al.*, 1998; de Vrese *et al.*, 2001)、降低膽固醇(Pereira and Gibson, 2002; Lim *et al.*, 2004)、產生抑菌物質(Coconnier *et al.*, 1997; Wollowski *et al.*, 2001)、抗腫瘤(Steer *et al.*, 2000; You *et al.*, 2004)、抗發炎(Ma *et al.*, 2004)、抗氧化(Kullisaar *et al.*, 2003)、降血壓(Tuomilehto *et al.*, 2004)、活化免疫系統(Ziemer and Gibson, 1998)，產生維生素 B 群及胺基酸以增加營養價值(Elmadfa *et al.*, 2001)等功效。

完善的益生菌應具備之特點包括，(1)為人類來源；(2)必須為一般公認安全(generally recognized as safe, GRAS)菌株；(3)具有良好的酸及膽鹽耐受性；(4)於腸道中有良好的吸附性及定殖能力；(5)能有效排除並抑制病原菌生長，並增強免疫能力，及臨床證實具有健康功效等(Sarrela *et al.*,

2002)。上述條件對益生菌基本性質具十分重要之意義，並藉以應用於臨床功效之評估，但大多數關於乳酸菌之生體外(in vitro)耐酸性、耐膽鹽、腸道細胞吸附性及拮抗病原菌試驗等都是以模擬胃腸道中單獨、不連續之條件或是直接以未經酸與膽鹽作用之菌體來進行探討(Chou and Weimer, 1999; Dunne *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2003)，而胃腸道消化過程為一連續情況，目前少有文獻研究於生體外試驗模式下乳酸菌若經模擬胃酸及膽鹽之連續作用後，是否仍保有吸附於腸道細胞之能力或其他基礎益生性質。本研究在探討益生菌經酸及膽鹽作用後其耐受性、吸附力及拮抗病原菌等基礎益生性質是否有所改變，研究菌株於模擬腸胃道不良環境因子條件作用後對菌體細胞膜之影響，及菌株對模擬人體腸道細胞之安全性。

第二章 文獻探討

第一節 腸道菌群組成

1-1 腸道菌相組成及分佈

人體腸道中存在的菌種種類多且複雜，並有著各種不同且複雜的生態系統(Macfarlane *et al.*, 1998)。在人類消化道中有高達 10^{12} - 10^{14} 個以上的細菌存在，約有 400-500 種以上從人類消化道檢測出來，其中以厭氧菌為優勢菌群，其數量約為好氧菌的 10-1000 倍左右(Tancrede, 1992; Tannock, 1995)。初生嬰兒腸道原屬於無菌狀態，在出生 3、4 個小時，經由母體產道感染細菌逐漸入侵至腸道內棲息，且在出生後 4-7 天後達成均衡菌相，此時雙歧桿菌為最優勢菌群，其他菌群包括乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、鏈球菌 (*Streptococcus*) 僅微量存在(Steer *et al.*, 2000)。成年人腸道菌相較為穩定，隨著年紀增長雙歧桿菌數量明顯降低，使病原菌如 *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. 等成為優勢菌群(Mallet and Rowland, 1987; Holzapfel *et al.*, 1998; Arunachalam, 1999)，其代謝所產生之胺類或酚類等有毒物質會加速人體老化(Mitsuoka, 1990)。

成人口腔內菌數約為 10^7 CFU/ml，菌數隨著食道進入胃腸道而急遽下降，在胃部(stomach)及十二指腸(duodenum)內約只有 10^1 - 10^3

CFU/ml，以革蘭氏陽性菌為優勢菌群，其主要菌相為乳酸桿菌 (Lactobacilli)、鏈球菌(Streptococci)及酵母菌(Yeasts)。此區域菌數大量減少的原因有二，一是胃所分泌之胃酸造成低 pH 值的環境，pH 值約在 2.5-3.5 左右；另一原因是十二指腸中存在的膽鹽和胰液，使微生物不易存活，因而造成此區域活菌菌數明顯下降。在空腸(jejunum)及迴腸(ileum)，其菌數會顯著增加，約為 10^4 - 10^8 CFU/ml，主要菌相為乳酸桿菌、腸內細菌科(Enterobacteriaceae)、鏈球菌等兼性厭氧菌以及其他的絕對厭氧菌如類桿菌(Bacteroides)、雙歧桿菌(Bifidobacteria)、Fusobacteria 等(Nielsen *et al.*, 1994)。大腸中所含的菌相最為複雜，以結腸(colon)菌屬(genera)最多，至少有 50 種以上，主要菌數的菌數約為 10^{10} - 10^{12} CFU/ml，絕對厭氧菌是此區之優勢菌種，如類桿菌、雙歧桿菌、產氣莢膜梭菌等，其它則由兼性厭氧菌如酵母菌、鏈球菌、腸內細菌科、乳酸桿菌等構成次要菌群(Holzapfel *et al.*, 1998) (圖 2.1)。

1-2 影響腸道菌相之因子

腸內菌叢受到宿主的生理狀態、飲食習慣、年齡等因素影響(Collins and Gibson, 1999)，Holzapfel 等(1998)將其歸納為四大類，包括(1)受宿主本身生理狀況所影響，如老化、壓力、健康情況以及種族差異等，或是腸道內環境與消化情況，如胃腸道內的 pH 值、營養物質的利用性、

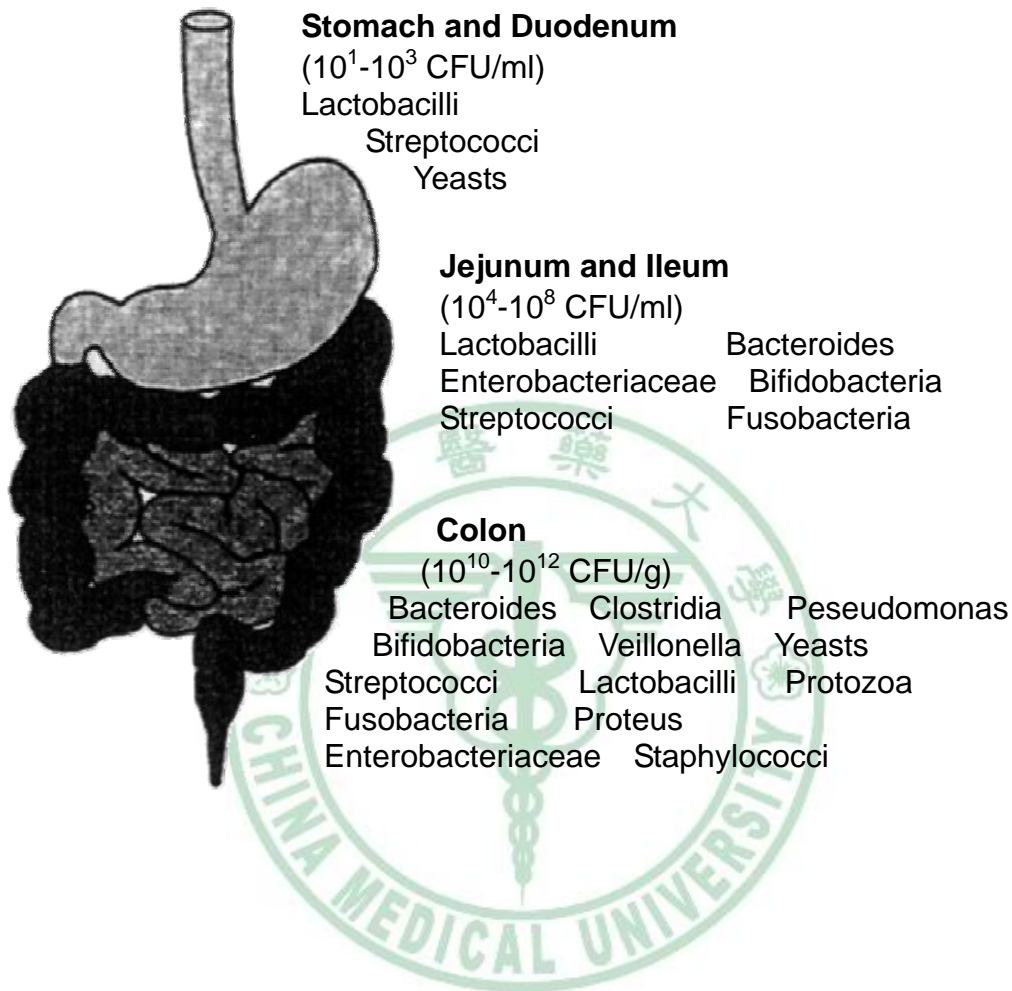


圖 2.1、人類腸胃道菌相分佈

Fig. 2.1. Microbial colonization of the human gastrointestinal tract

(Holzapfel *et al.*, 1998)

氧化還原電位、食物通過腸胃道的時間、腸液流動性及抗體 IgA 分泌等；(2)與腸道微生物本身特性有關的因素，如吸附性、運動性、營養適應性或世代時間等；(3)受到微生物間交互作用影響，包括微生物間協同作用(synergy)，拮抗、刺激作用(antagonism/stimulation)；(4)飲食因素，如飲食習慣、藥物等，如表 2.1 所示。

1-3 腸胃道微生物與宿主之關係

人類腸道微生物與宿主的健康或疾病有密切的關係，腸道中正常的菌群具有調節宿主健康的功能(Arunachalam, 1999)，如圖 2.2 所示，當腸道內菌相失衡時則會對人體健康產生危害。腸道內細菌對人體有益的功能包括：(1)分解某些食物成分；(2)可合成某些維生素，如維生素 B 群、維生素 K、維生素 C、生物素等；(3)刺激宿主免疫系統；(4)活化消化酵素及保護人體之酵素；(5)在腸黏膜形成生物屏障，抑制病原菌定殖於腸道；(6)降低腸道酸鹼值，抑制致癌物質生成等(Holzapfel *et al.*, 1998; Collins and Gibson, 1999; Isolauri *et al.*, 2002)。

第二節 乳酸菌介紹

2-1 乳酸菌定義

乳酸菌為相當複雜之菌群，其通常定義為能利用碳水化合物以進行發酵產生乳酸等有機酸之細菌的總稱，通常具有下列共同特性(Axelsson,

表 2.1、影響腸胃道微生物菌相之因子

Table 2.1. Factors affecting the microflora of the gastro-intestinal tract

1. *Host mediated factors*

pH, secretions such as immunoglobulins, bile, salts, enzymes
Motility, e.g. speed, peristalsis
Physiology, e.g. compartmentalization
Exfoliated cells, mucins, tissue exudates

2. *Microbial factors*

Adhesion
Motility
Nutritional flexibility
Spores, capsules, enzymes, antimicrobial components
Generation time

3. *Microbial interactions*

Synergy
Metabolic cooperation
Growth factors and vitamin excretion
Changes to E_h , pH, O_2 tension
Antagonism/stimulation
Short-chain fatty acids, amines
Changes to E_h , pH, O_2 tension
Antimicrobial components, siderophores
Nutritional requirements, etc.

4. *Diet*

Composition, non-digestible fibers, drugs, etc.

(Holzapfel *et al.*, 1998)

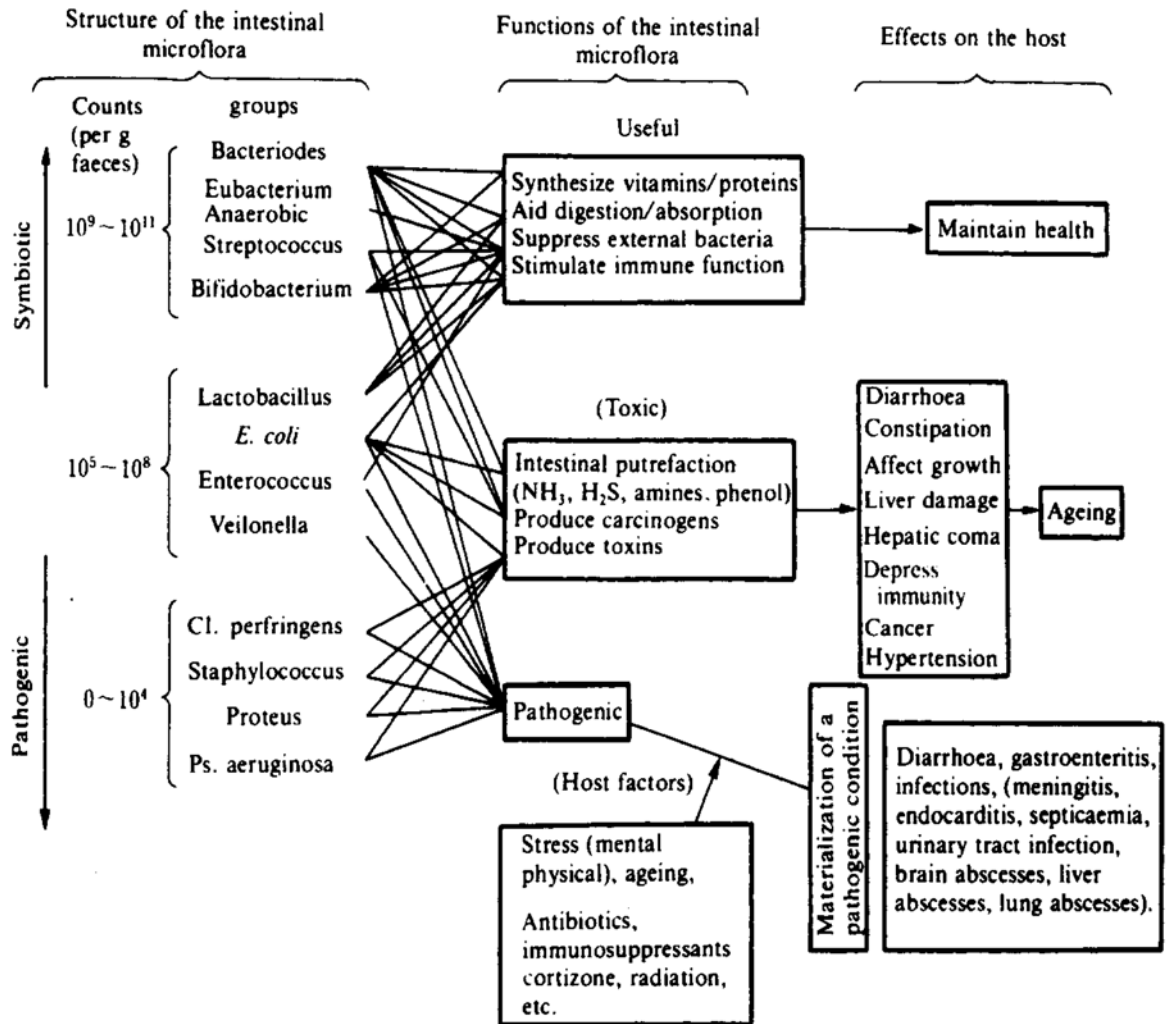


圖 2.2、腸道菌相與宿主健康之關係

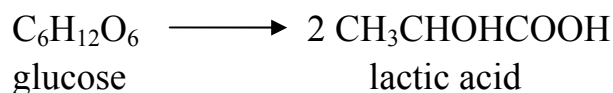
Fig. 2.2. Relationship between intestinal bacteria and host health

(Arunachalam, 1999)

1998): (1)為革蘭氏陽性菌(Gram positive); (2)桿菌或球菌; (3)不產孢(nonsporing); (4)無運動性(nonmobile); (5)營養需求複雜, 需有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素等多種生長素等養份才可生長, 並且會代謝產生乳酸; (6)氣體需求為厭氧、微好氧、耐氧厭氧、兼性厭氧性, 一般可於有氧環境生長, 但以無氧狀態生長較佳; (7)過氧化氫酶陰性, 缺乏細胞色素。

如依乳酸菌代謝途徑及最終產物的不同, 可將其分為同型發酵(homofermentative)及異型發酵(heterofermentative)乳酸菌。同型發酵菌經糖解作用使碳水化合物分解成乳酸, 其乳酸產量達 90-100%, 行此種發酵有 *Streptococcus*、*Pediococcus*、及一部份的 *Lactobacillus* 等菌屬, 而異型發酵菌除了產生 45-50% 乳酸之外, 亦可經 Phosphoketolase 作用, 產生醋酸、酒精、二氧化碳等其他產物, 而 *Leuconostoc*、*Bifidobacterium* 及部分 *Lactobacillus* 等菌屬異型發酵。其化學反應式如下:

A. 同型發酵(homofermentative)



B. 異型發酵(heterofermentative)



2-2 乳酸菌的分類

乳酸菌廣泛分佈於自然界中，也為人類腸道內主要的菌群之一，大致可歸納為下列十八屬(Axelsson, 1998; 李,2000)：(1)鏈球菌屬(*Streptococcus*)；(2)腸球菌屬(*Enterococcus*)；(3)乳酸球菌屬(*Lactococcus*)；(4)徘徊球菌屬(*Vagococcus*)；(5)乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)；(6)肉品桿菌屬(*Carnobacterium*)；(7)有孢子桿菌屬(*Sporolactobacillus*)；(8)明串球菌屬(*Leuconostocs*)；(9)足球菌屬(*Pediococcus*)；(10)四體球菌屬(*Tetragenococcus*)；(11)雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)；(12)奇異菌屬(*Atopobium*)；(13)*Weissella*；(14)*Abiotrophia*；(15)*Lactosphaera*；(16)*Oenococcus*；(17)*Granulicatella*；(18)*Paralactobacillus*。

由於分離鑑定與 DNA 類源比對技術發展，傳統以形狀、生理特性等作為分類根據的方式已不適用，某些類源性相近如乳酸桿菌屬及有孢子桿菌屬是屬於乳酸桿菌科(Lactobacillaceae)，有孢子乳酸桿菌屬會產生孢子且具移動性，如根據乳酸菌「不產孢、不具移動性」之特性，應被排除於乳酸菌之外，但因其形狀類似乳酸桿菌屬之桿狀，且可進行同型發酵，有些菌株具有拮抗 *Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis* 等有害菌之益生功效(Yanagiad *et al.*, 1997)，故已被納入乳酸菌菌屬之一。*Weissella* 屬則可同時存在球菌與桿菌的形態。因此 DNA 類源比對技術將成為乳酸菌分類之重要依據。

2-3 乳酸菌的應用

人類生活的環境周圍存有許多的乳酸菌，其應用的範圍亦非常廣泛，許多發酵食品生產過程中都有乳酸菌的參與，乳酸菌代謝過程中所產生的物質如乳酸及可分解蛋白質及脂肪之酵素，可賦予食物特殊風味，其它包括有機酸、過氧化氫、二氧化碳、雙乙酰(diacetyl)、細菌素(bacteriocin)等具有抑菌作用，添加有抑菌作用之乳酸菌或發酵產物則可達到保存食物之目的(Hose and Sozzi, 1991; 廖, 1998)。乳酸菌具有穩定腸道菌相、拮抗病原菌、合成食物所缺乏之維生素等益生功效，近年來更廣泛被應用於機能性食品。

第三節 益生菌介紹

3-1 益生菌定義

益生菌(probiotics)一詞係由希臘文”for life”之意而來，最早由 Lilly and Stillwell (1965)提出，表示由某一原生動物所產生可促使另一原生動物生長之物質，即稱為益生菌。Parker (1974)則認為凡是藉由改善腸道微生物平衡而使宿主產生有效益處的補給物，不論菌體及物質均可稱之，但因物質包含抗生素，故此說法並不被普遍接受。Fuller (1989)將其重新定義為可經由改善宿主腸內菌相平衡，而對宿主有益之活菌補充物。目前最為國際上所接受的定義為 Huis in't Veld and Havenaar (1991)及 O'Sullivan *et al.* (1992)所提出：凡應用於人類或其他動物的單一或混

合菌株，藉由改善宿主內生性微生物相平衡，而有益於宿主的活菌均可視為益生菌。Naidu *et al.* (1999)則認為 probiotics 應包括可改善宿主腸道菌相平衡之活的微生物及其胞外代謝物，而 Salminen *et al.* (1999)則定義不論是活的或死的微生物，對宿主健康有益者皆可稱之益生菌。

3-2 益生菌應具備之條件

完善的益生菌應具備之特點包括，(1)為人類來源；(2)必須為一般公認安全(generally recognized as safe, GRAS)菌株；(3)具有良好的酸及膽鹽耐受性；(4)於腸道中有良好的吸附性及定殖能力；(5)對宿主健康提供有益功效，如優異競爭性、能有效排除並抑制病原菌生長、並增強免疫能力及臨床證實具有健康功效；(6)具穩定性及良好加工特性；(7)顧客接受性等(Saarela *et al.*, 2002)。

3-3 益生菌之保健功效

益生菌對人體主要健康功效，如圖 2.3 所示：

(1)維持正常腸道菌相

益生菌在腸道中具有平衡腸道菌叢的能力，益生菌能與病原菌在腸道中競爭營養源、吸附位置，且其代謝過程可產生過氧化氫(hydrogen peroxide)、抑菌素(bacteriocin)、聯乙醯(diacetyl)、有機酸(如乳酸、醋酸、

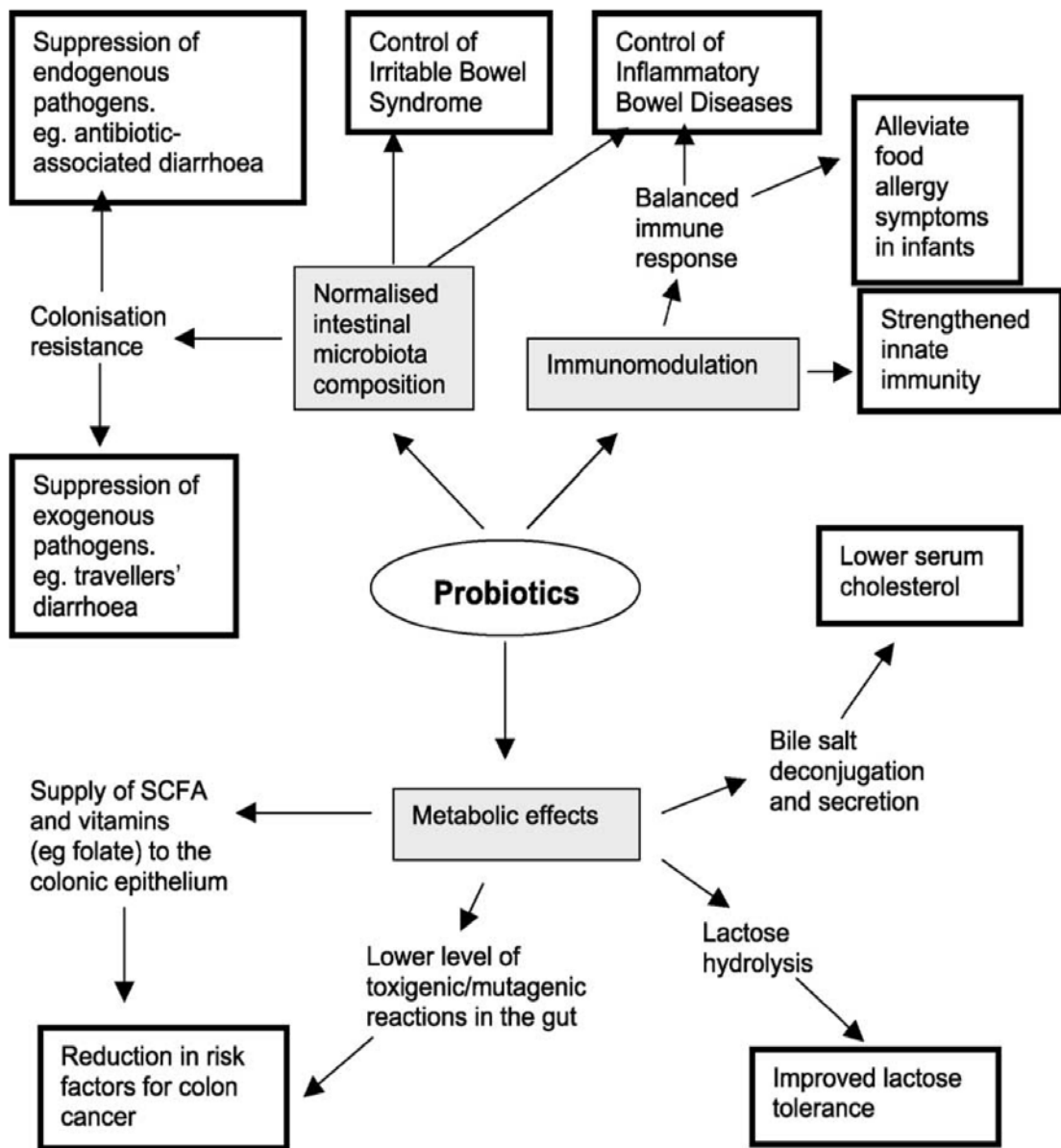


圖 2.3、益生菌的健康功效

Fig. 2.3 Proposed health effects of probiotics

(Saarela *et al.*, 2002)

丙酸)等以抑制病原菌，達到平衡腸道菌叢的功效(Bearson *et al.*, 1997; Ziemer and Gibson, 1998; Steer *et al.*, 2000)。已有許多臨床研究證實，服用益生菌作為補充品，能夠有效預防腸胃疾病感染及提高腸胃功能(de Vrese and Schrezenmeir, 2002; Olivares *et al.*, 2006; Yamano *et al.*, 2006)，另外也能將其運用於腸胃疾病之治療(Biller *et al.*, 1995; Majamaa *et al.*, 1995; Isolauri *et al.*, 2002)。目前已證實可有效運用於嬰兒型腹瀉(infantile diarrhea)、抗生素誘發型腹瀉(antibiotic-associate diarrhea)、旅行者型腹瀉(travelers' diarrhea)、*C. difficile* 引起之再發性結腸炎(relapsing *C. difficile* colitis)及由食物媒介型病原菌所引起的腹瀉(foodborne pathogenic diarrhea)等(Fooks and Gibson, 2002)。另外益生菌對幽門螺旋桿菌所引起的胃炎(*Helicobacter pylori* gastroenteritis) (Felley and Michetti, 2003)、大腸急躁症候群(irritable bowel syndrome, IBS)、發炎性腸道疾病(inflammatory bowel disease, IBD) (Marteau *et al.*, 2001)、念珠球菌陰道炎(*Candida vaginitis*) (Reid, 2001)及泌尿道感染(urinary tract infections) (Reid and Bruce, 2006)等皆有不錯的預防效果。

(2) 免疫調節作用

益生菌可活化腸道部分的巨噬細胞及淋巴細胞，使 IgA 濃度增加，並產生 γ -干擾素(γ -interferon)，以刺激免疫系統來抑制腫瘤的形成(Zierner and Gibson, 1998; Steer *et al.*, 2000)。近年來遺傳性過敏疾病有增

加之趨勢，使得免疫反應逐漸趨向 Th2 免疫反應，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 細胞進行抗體的同種型轉換(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 (Interferon- γ)可減少 IL-4 的表現量，並抑制 B 細胞進行抗體的同種型轉換；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)。Majamaa and Isolauri (1997) 發現對乳品過敏的成人食用 *L. rhamnosus* GG 後，能夠適當調節其對乳品中抗原的免疫反應，並減緩此類乳品造成的過敏現象。

(3)代謝作用

1.抑制有毒物質或致癌代謝物之生成

人體腸道中約有四百多種微生物，這些腸道菌落具有不同的酵素代謝活性，當腸道內類桿菌、產氣莢膜梭菌等病原菌群增加時會使腸道中 β -glucuronidase、nitroreductase、azoreductase、urease、及 glycocholic acid reductase 等酵素濃度增加而促進致癌物的生成，增加罹患結腸癌的機

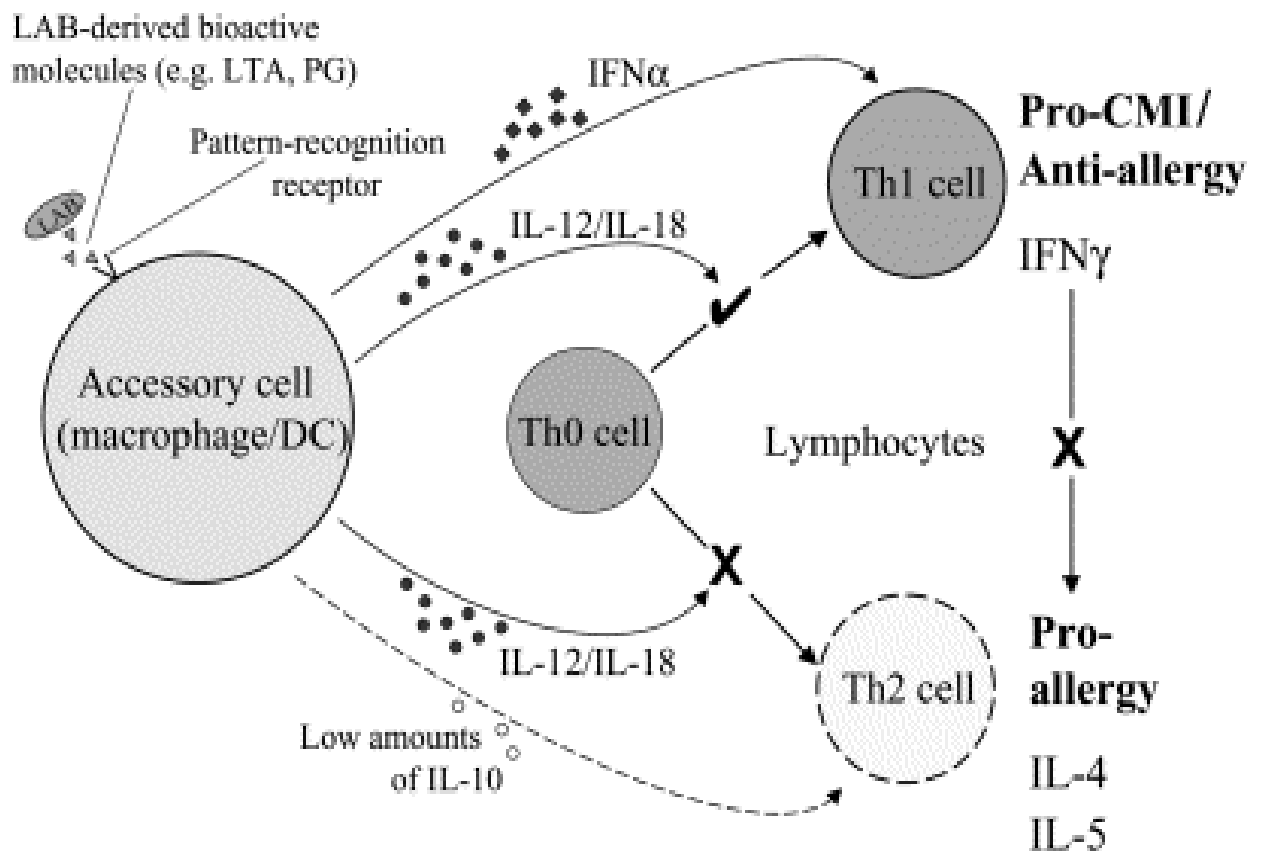


圖 2.4、益生菌調節免疫反應之抗過敏機制

Fig. 2.4. Theoretical model for anti-allergy mechanisms for immunoregulating of probiotics

(Cross *et al.*, 2001)

率，透過益生菌的作用能夠有效降低上述致癌酵素在糞便中的濃度，而減少致癌的機會(Bodana and Rao, 1990; Ling *et al.*, 1994; Spanhaak *et al.*, 1998; Wollowski *et al.*, 2001)。另外醣類經益生菌代謝後所產生的短鏈脂肪酸，經結腸上皮細胞吸收後，可作為上皮細胞之能量來源，且短鏈脂肪酸可降低腸道中之 pH 值，因而降低結腸癌發生的機率(You *et al.*, 2004)。近年來發現乳酸菌具有結合致突變物之能力，許多體外試驗證實乳酸菌可吸附 Trp-p-1、Trp-p-2、MeIQ、IQ、PhIP 等物質而降低其相對突變性(Morotomi and Mutai, 1986; Zhang and Ohta, 1993)，其結合能力與菌體濃度、致突變物濃度、pH 值及作用時間有關(Sreekumar and Hosono, 1998)。

2.降低膽固醇

研究證實，發酵乳品中存在的有機酸，如 uric acid、orotic acid 及 hydroxymethylglutaric acid 會降低腸內 pH 值，當 pH 值小於 6 時，膽固醇會與去結合型膽鹽(deconjugated bile salts)共同沉澱並隨糞便一起排出，減少膽鹽藉由腸肝循環(enterohepatic circulation)之再利用，進而促進血液與肝中膽固醇再行分解與製造膽鹽，使血液中膽固醇含量下降(Klaver and Van Der Meer, 1993; Jin *et al.*, 1998)。

3.緩和乳糖不耐症

乳糖不耐症(lactose intolerance)是指體內缺乏或僅有少量的乳糖酶

(lactase)，以致無法分解乳糖，未被吸收之乳糖進入大腸後會被微生物所利用而產生乳酸、二氧化碳、氫氣及短鏈脂肪酸，進而造成腹痛、脹氣、腹瀉等現象。益生菌所含之 β -半乳糖苷酶可將乳製品之乳糖分解，或維持 β -半乳糖苷酶活性到達腸道發揮分解乳糖之特性，故可改善乳糖不耐症(Salminen *et al.*, 1998; de Vrese *et al.*, 2001)。

3-4 乳酸菌作為益生菌之特性

(1) 乳酸菌為正常腸內菌群

腸內菌群的組成包括有益菌及病原菌，腸內菌共分可分三大菌群(a) 游離菌群：此族群停留於體內時間很短；(b)與腸內物顆粒結合菌群：此族群菌體含有酵素，藉由消化結合之顆粒，使宿主獲利；(c)與腸壁組織結合菌群：此族群菌體可抑制外來微生物於腸內增殖之能力，其菌數會因宿主發生疾病或攝取抗生素而降低，此類微生物主要為乳酸菌及酵母菌(Fuller and Brooker, 1974)。

(2) 能產生抗菌物質，抑制其他菌生長

Coconnier *et al.* (1997)指出部份乳酸菌能分泌抗菌物質，對革蘭氏陽性菌或陰性菌皆有抑制效果，乳酸菌所產生之抑菌物質包括有機酸、過氧化氫、聯乙醯、抑菌素、reuterin 等。

(3) 耐胃酸及耐膽鹽能力

大部分微生物在酸性環境中均無耐受性，乳酸菌本身雖為產酸菌，

但其生長環境 pH 值僅能達 3.2-4.5，因此在胃中之低 pH 值(2.0-3.2)是影響其存活主要因素之一，Toit *et al.* (1998)即以不同低 pH 值之 MRS broth 篩選耐酸性乳酸菌株。Gilliland (1979)指出 *Lactobacillus* 對膽鹽之抵抗力與其腸內定殖能力有關。

(4)具吸附上皮細胞的特性

微生物須具有附著於腸道上皮細胞能力方能於腸道中定殖，並發揮其益生作用(Annika *et al.*, 1983; Fuller, 1989)。許多生體外及生體內試驗的結果可觀察到乳酸菌在腸道上皮細胞之吸附(Bernet *et al.*, 1993; Berent-Camard *et al.*, 1997; Tuomola and Salminen, 1998; Liévin *et al.*, 2000)。

(5)快速增殖

Savage (1983) 指出 *Lactobacillus* spp. 能分泌酵素，分解腸道黏膜外層的黏液蛋白(mucous glycoproteins)，並利用其作為能量來源，進行快速增殖而存活於腸道中。

3-5 益生菌之應用

益生菌應用於食品中可以一種或多種菌株混合使用，其中以 *Lactobacillus* 與 *Bifidobacterium* 二屬居多。益生菌大部分應用於乳製品中，如優酪乳、乳酸菌飲料、乾酪、乳酪、冰淇淋等(Krasaekoopt *et al.*, 2003)，另有使用在發酵豆奶、蔬果汁、糖果、糕餅上，其他亦有以錠

片、膠囊、顆粒狀包裝的乾燥菌體型態銷售物產品(Mattila-Sandholm *et al.*, 2002)。此外也有非乳酸菌類之益生菌株如 *Bacillus cereus* (toyoi) (Homma and Shinohara, 2004)、*Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 1998) 等，大多應用於生技製藥方面，以凍乾或微膠囊的方式製造生產。表 2.2 為已應用於益生菌產品之菌株。

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

嗜酸乳酸桿菌為非產孢革蘭氏陽性菌，不具運動性，屬兼性厭氧菌，形態為兩端圓形之桿狀，常以單細胞、兩個成對或短鏈型態存在(如圖 2.5 所示)，於 15°C 下不會生長，最適生長溫度為 35-38°C 之間，可生長於低 pH 值及膽鹽環境中(Gupta *et al.*, 1996)。此菌株具有多種有益人體之功效，因此經常使用添加於膳食補充品中(Hekmat and McMahon, 1992; Prasad *et al.*, 1998; Anderson and Gilliland, 1999; Ishida *et al.*, 2005)。

3-7 比菲德雙歧桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)

雙歧桿菌為腸道中正常菌屬(Holzapfel *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999)，經常使用於益生菌產品中(Prasad *et al.*, 1998; Acharya and Shah, 2002)，為不產孢、不具運動性之革蘭氏陽性菌，最適生長溫度 37-43°C 間。比菲德雙歧桿菌菌體型態呈多形性，為短桿狀、球桿狀、彎曲形或是分叉為 Y 字形或 V 字型外含有大小不等的出芽狀片段和具凹縫多分

表 2.2、應用於益生菌產品之菌株

Table 2.2. Microorganisms applied in probiotic products

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species	Other LAB	Non-lactics
<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)

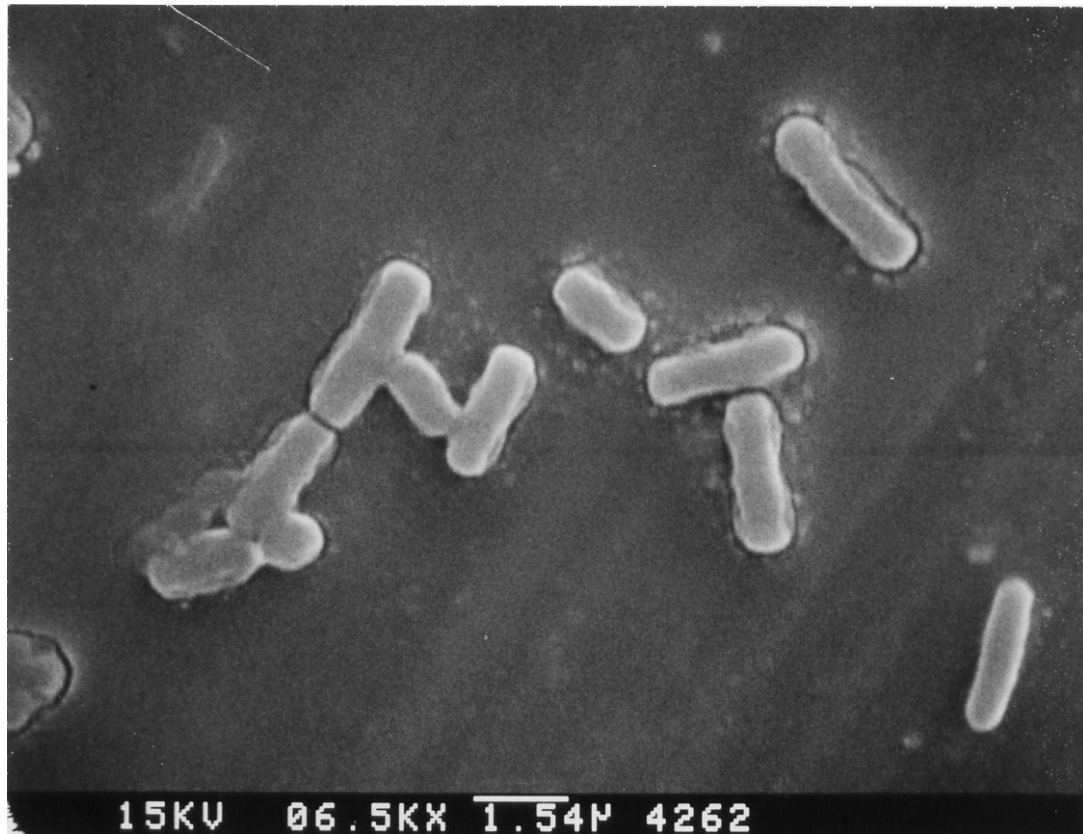


圖 2.5、*L. acidophilus* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 6500×)

Fig. 2.5. Scanning electron micrograph of *L. acidophilus* (magnification 6500×)

隔桿狀(Laroia and Martin, 1990) (如圖 2.6 所示)。

3-8 副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)

副乾酪乳酸桿菌存於發酵牛乳及動物產品中，為非產孢、不具運動性之革蘭氏陽性菌，菌體外觀為細長桿菌，微嗜氧性(如圖 2.7 所示)。

以同型發酵方式將醣類、多醇類發酵為乳酸；以異型發酵方式產生醋酸、酒精及二氧化碳，亦經常添用於益生菌產品中(Juntunen *et al.*, 2001;

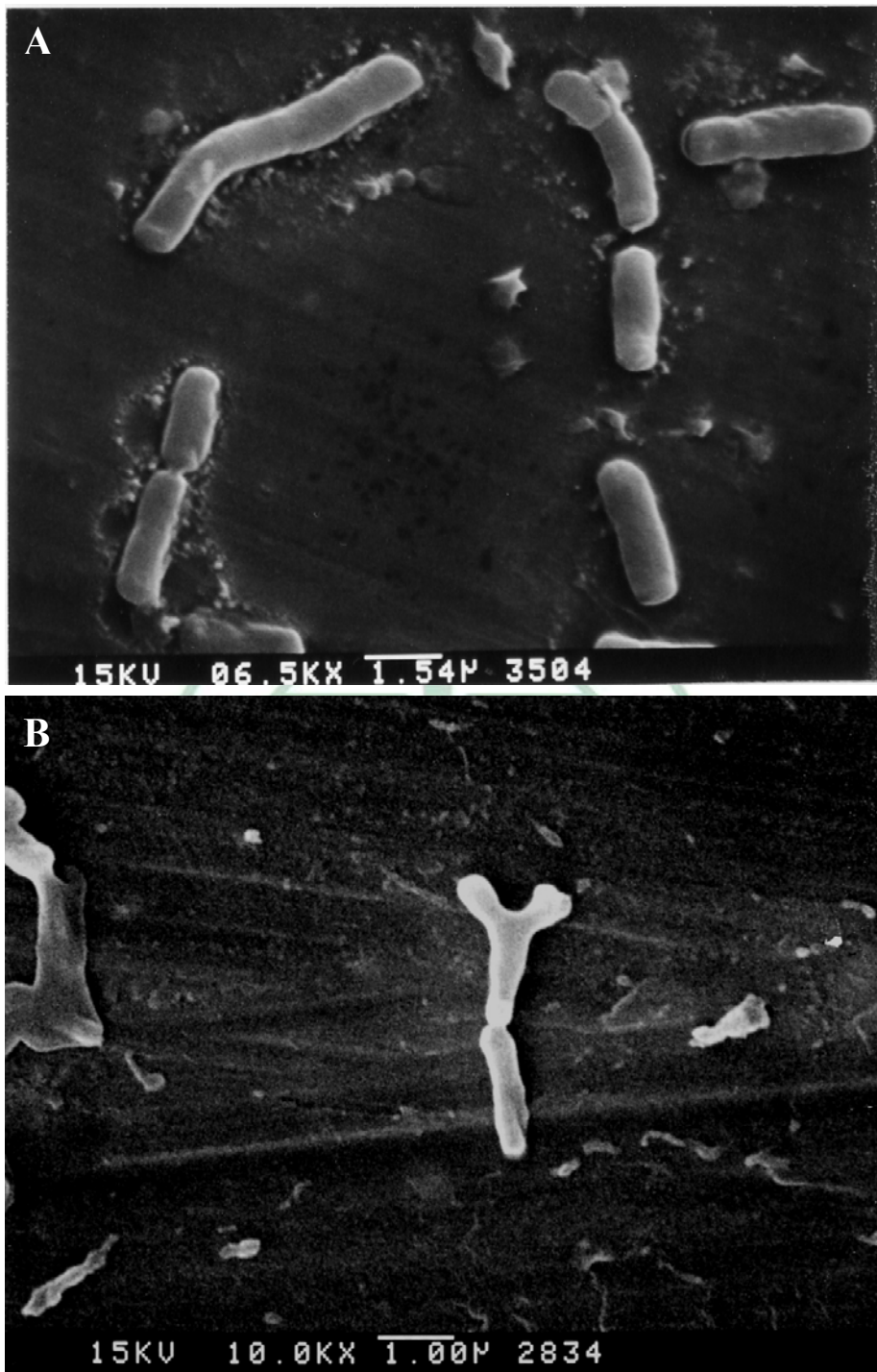
Peng and Hsu, 2005; Marzotto, *et al.*, 2006)。

第四節 乳酸菌腸胃道耐受性研究

4-1 乳酸菌之耐酸性研究

乳酸菌之耐酸性研究目前大多著重於對其在低 pH 值條件下之耐受性試驗，以生體外試驗模擬胃酸(pH 2)的環境條件來進行探討。臨床分析顯示胃酸 pH 值會隨進入胃中之食物種類和進入時間而改變，變化範圍一般在 pH 1.5-4.58 之間，而食物停留時間也會因食物種類及數量之不同而異，一般之停留時間平均約 2-3 小時(Insel *et al.*, 2001)。胃酸之性質與鹽酸類似，因此模擬胃酸多以鹽酸製備之。de Man *et al.* (1960)使用鹽酸將 MRS broth 調整其 pH 為 2.0-3.4 以之探討受試菌株之存活率；

Berrada *et al.* (1991)以發酵乳品提供禁食隔夜的健康成人食用，測定不同時間胃內容物及活菌數變化；而 Toit *et al.* (1998) 以鹽酸調整不同 pH 值



(陳，2006)

圖 2.6、*B. bifidum* 之掃描式電子顯微鏡圖(A)短桿狀形態(放大倍率 6500×); (B)Y 字形形態(放大倍率 10000×)

Fig. 2.6. Scanning electron micrograph of *B. bifidum* (A) rod shape (magnification 6500×); (B) Y shape (magnification 10000×)

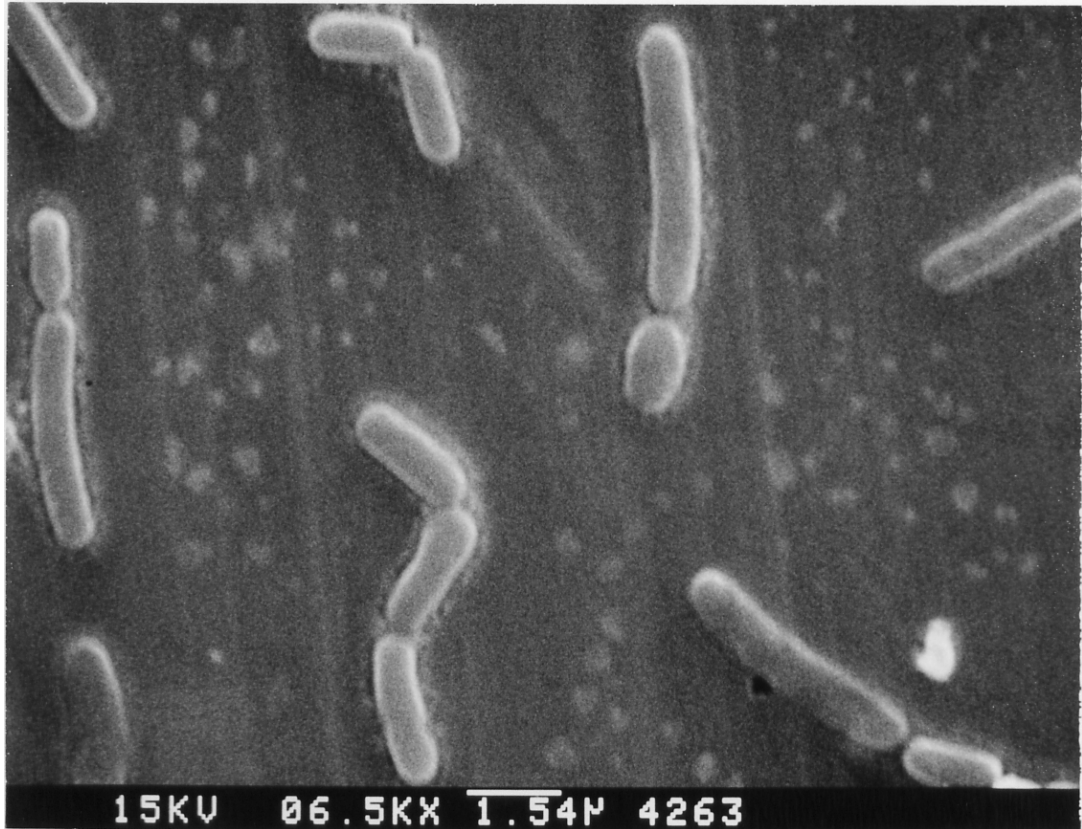


圖 2.7、*L. paracasei* 之掃描式電子顯微鏡圖(放大倍率 6500×)

Fig. 2.7. Scanning electron micrograph of *L. paracasei* (magnification 6500×)

的 MRS broth 以進行耐酸性菌株之篩選。菌株本身之耐酸性對於增加所攝入菌株在腸道中之存活具有十分重要的意義。

4-2 乳酸菌之膽鹽耐受性研究

腸內膽鹽對微生物是一種抑制因子，膽鹽於阻止活菌進入下段腸道中扮演著重要角色，Gilliland (1979)指出 *Lactobacillus* 對膽鹽之抵抗力與棲息於腸道之能力有關。生體外試驗模擬膽鹽耐性之困難在於人體腸道中膽汁濃度尚未有完整數據(Gilliland, 1989; Lankaputhra and Shah, 1995)，食物停留在腸道時間的長短也是影響菌體存活的一大變因。直接利用人體膽汁進行試驗研究甚少，通常以牛膽汁(oxgall)模擬人體膽汁(Klaver and Van Der Meer, 1993)，其成份包含 cholate, deoxycholate, dehydrocholate, cheno- deoxycholate, glycocholate, glycochenodeoxycholate, glycodeoxycholate, taurocholate, taurochenodeoxycholate, taurodeoxycholate 等。篩選具膽鹽耐受性之菌株所使用的膽鹽濃度不一，其濃度範圍約為 0.05% - 4% (Mayara-Makinen *et al.*, 1983; Suskovic *et al.*, 1997; Garriga *et al.*, 1998; Kimoto *et al.*, 1999; Noriega *et al.*, 2004)。雖然腸道中膽鹽濃度多變，但其平均值約為 0.3% (Sjovall, 1959; Gilliland *et al.*, 1984)；因此目前研究多以 0.3% 模擬腸道中膽鹽的濃度進行相關試驗(Gilliland and Walker, 1990; Noh and Gilliland, 1993; Chateau *et al.*, 1994; Hyronimus *et al.*, 2000; Mainville *et al.*, 2005)。

4-3 乳酸菌吸附於腸道細胞之試驗模式

許多生體外試驗利用腸道細胞株進行乳酸菌吸附性試驗，如人類腸上皮細胞株 Int-407，人類結腸腺癌細胞株 Caco-2, HT-29 (Tuomola and Salminen, 1998; Bibiloni *et al.*, 1999; Gopal *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004)。

Caco-2 cell line 被廣泛使用在對人體腸道細胞的組織和功能研究上 (Zweibaum *et al.*, 1991)，是一株由人類結腸腺癌所分離出來之細胞株，其優點在於可以表現出體外型態及功能上的分化，並表現成熟腸道的特性，包括極化(polarization)、具功能性的刷狀緣微絨毛及腸道上層的水解酵素等(Pinto *et al.*, 1983; Hauri *et al.*, 1985; Peterson and Mooseker, 1992)，因此 Caco-2 cell 被認為是很方便的腸道細胞模式，且是研究細菌對細胞的吸附和侵入之生化過程的極佳模式(Chauviere *et al.*, 1992a; 1992b; Gopal *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Matijašic *et al.*, 2006)。

第五節 乳酸菌對產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)之競爭排除作用

5-1 產氣莢膜梭菌之介紹

產氣莢膜梭菌之前稱為魏氏梭菌(*Clostridium welchii*)，為產孢、不具運動性之革蘭氏厭氧陽性桿菌，其型態如圖 2.8 所示，可於 20-50°C 生長。根據主要產生的致命毒素可分為 5 類(A、B、C、D、E)，廣泛分布

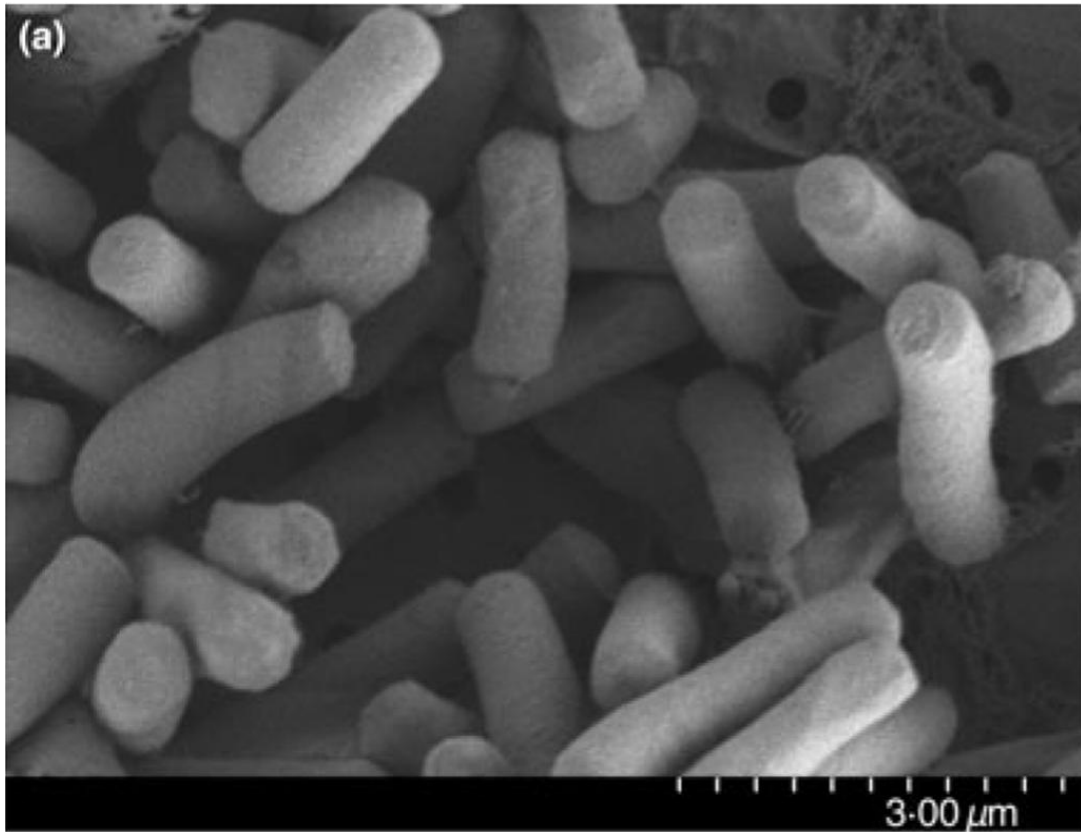


圖 2.8、*C. perfringens* 之掃描式電子顯微鏡圖

Fig. 2.8. Scanning electron micrograph of *C. perfringens*

(Zhang *et al.*, 2006)

於自然界的土壤、水、動物腸道中，其營養細胞是人體胃腸道與陰道中的正常菌叢，可利用碳水化合物作為營養源。菌體耐膽鹽，不會被 20% 膽汁所抑制，當 pH 值於 5.5-8.0 之間、2% NaCl 時並不會抑制其生長，當 NaCl 濃度達 6.5% 時，則會明顯抑制其生長(Krieg and Holt, 1989)。

產氣莢膜梭菌為學者公認腸道中最常見的厭氧壞菌(Pyrtek and Bartus, 1962; Shimada *et al.*, 1977)，其在腸道中對人體健康產生之不良影響包括產生腐敗物質、致癌的促進物質等(顏，1990)，同時也是食品中毒的原因菌之一，可藉由屠宰場之禽畜糞便污染屠體。感染後的潛伏期約 6-24 小時，發病時會有噁心、腹瀉及嚴重的腹痛等症狀。肉類、雞肉、魚肉與其加工品是最常見之傳染原，食物中毒的原因通常是因為烹煮過程沒有將孢子去活化，而將食物置於可讓孢子萌發的環境中。

5-2 產氣莢膜梭菌之致病機轉

(1) 產生毒素

產氣莢膜梭菌的腸毒素是對熱敏感蛋白質，作用於後段小腸，其與上皮細胞表面接受器結合後會改變細胞膜，導致體液與細胞內蛋白的流失，分泌腸毒素的菌株通常具耐熱性，孢子在 100°C 加熱 1 小時後仍可存活，因此更加強此菌於腸道之感染與致病率(蕭等，2004)。

(2) 侵入性(invasion)

產氣莢膜梭菌會分泌許多致病性的外毒素與水解酵素，分泌 α -toxin 與腸毒素的 A 型菌株是人類感染最常見的致病菌(Brynstad and Granum, 2002)。 α -toxin 是一種可分解哺乳動物細胞膜上卵磷脂成分的磷脂酶 (phospholipase C)，因此可溶解上皮細胞、紅血球、白血球及血小板，造成侵入性。此病原菌是新陳代謝快之細菌，可製造蛋白酶、去氧核糖核酸酶、玻尿酸酶與膠原蛋白酶等水解酵素，這些酵素會液化組織，促使感染範圍擴大(蕭等，2004)。

5-3 乳酸菌之競爭排除作用

病原菌吸附至腸黏膜表面被認為是感染腸道的首要步驟(Beachey, 1981; Finlay and Falkow, 1997; Scaletsky *et al.*, 2002)，因此抑制病原菌之吸附可預防其感染及定殖於腸道(Tuomola *et al.*, 1999)，已有許多生體外試驗中證實乳酸菌可抑制病原菌吸附及侵入腸道細胞(Coconnier *et al.*, 1993; Bernet *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001; Gagnon *et al.*, 2004)。病原菌上之吸附因子可辨認腸黏膜上特定受體，因此益生菌藉由與病菌菌競爭吸附位置或利用空間妨礙(steric hindrance)來抑制其吸附(Coconnier *et al.*, Tuomola *et al.*, 1999; Fujiwara *et al.*, 2001, Lee and Puong, 2002)。

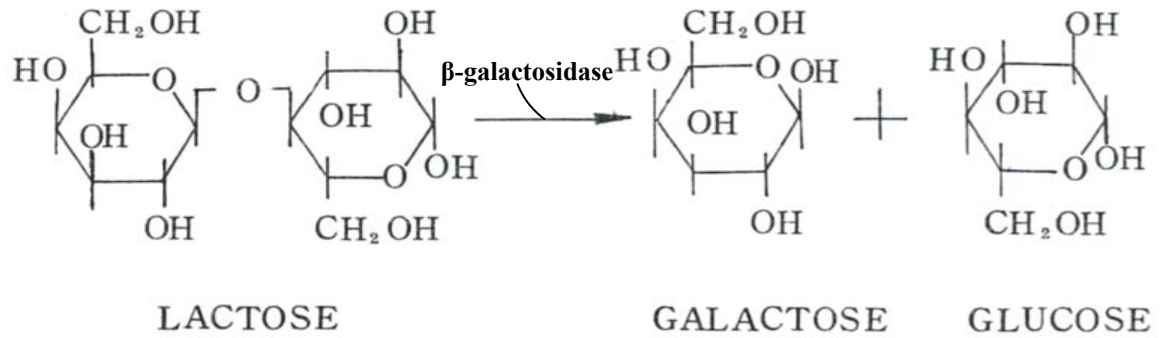
第六節 乳酸菌之 β -半乳糖苷酶活性

β -半乳糖苷酶可將乳糖(lactose)分解成葡萄糖(glucose)和半乳糖(galactose)，如圖 2.9-A，乳糖及其類似物可當作 β -半乳糖苷酶的誘導物，*o*-nitrophenyl- β -D-galactosidase (ONPG)是乳糖的類似構造物，可被 β -半乳糖苷酶分解成半乳糖和 *o*-nitrophenol，如圖 2.9-B。*o*-nitrophenol 為無色，但 *o*-nitrophenol 在鹼性情況下呈黃色，因此測定黃色形成之速率，即相當於測定細胞中 β -半乳糖苷酶的量(王，1999)。Taranto *et al.* (2006)利用測定 β -半乳糖苷酶活性來判斷不同濃度之膽鹽對乳酸菌細胞膜滲透性改變之影響。

第七節 乳酸菌之安全性評估

益生菌一般被定義為活的微生物，且對宿主健康有益，其最重要的條件必須具有吸附於人類腸道細胞的特性及不具侵入性，若具侵入性表示其可能具病源性及感染性(Urao *et al.*, 1996)。細菌侵入細胞需經兩個步驟，首先細菌附著於宿主細胞，菌體需有適合的 receptor，才可順利吸附至細胞上，如圖 2.10-A，接著以各種機制進入細胞內，大多是菌體放出訊息使細胞的 cytoskeletal 發生重排，讓菌體進入細胞中(Tang *et al.*, 1993) (圖 2.10-B)。細菌是否對宿主具侵入性之關係可以利用生體外試驗以細胞株培養來研究，其方法為：將試驗菌株和細胞共同培養一段時間，使細菌有時間附著並侵入細胞，接著加入抗生素將附著於細胞表面

(A)



(B)

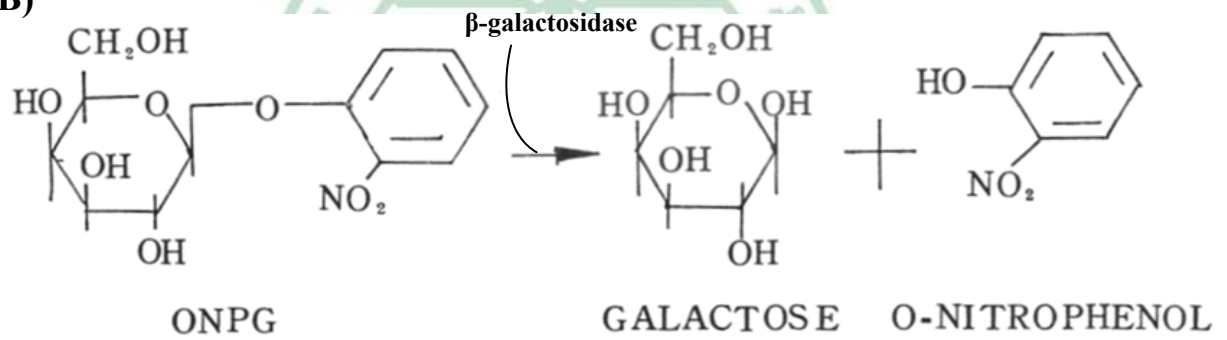


圖 2.9、 β -galactosidase 對乳糖及 ONPG 作用情形。(A)乳糖水解，
(B) ONPG 水解

Fig. 2.9. Lactose and ONPG hydrolysis by β -galactosidase. (A) lactose hydrolysis; (B) ONPG hydrolysis

(王，1999)

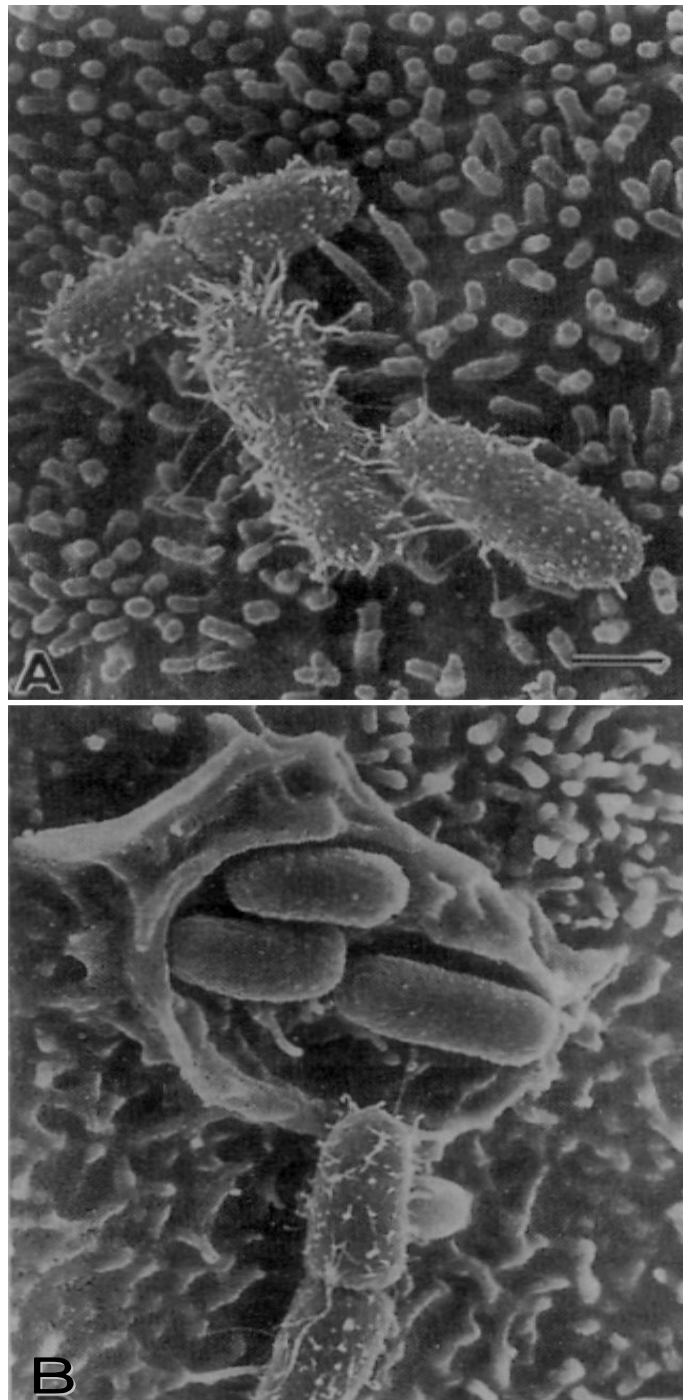


圖 2.10、致病菌侵襲腸道上皮細胞過程。(A)致病菌先行吸附於腸道上皮細胞上，進而侵襲腸道細胞(B)

Fig. 2.10. 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

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

的菌株殺死，最後將細胞打破並計數侵入細胞內之菌數(Tang *et al.*, 1993)。另外也可利用動物試驗評估生體內菌體之侵入性，將欲評估之菌株餵食動物後，取其血液、肝、脾等器官計數菌數(Seppa, 1989)。

第八節 研究動機

大部分生體外試驗利用個別之耐胃酸、耐膽鹽、及對模擬腸道細胞之吸附性等試驗來篩選具益生特性之乳酸菌(Prasad *et al.*, 1998; Chou and Weimer, 1999; Fernández *et al.*, 2003)，再進一步評估其是否具保健功效，但腸胃道之消化作用為一連續過程，如欲以生體外試驗模擬胃腸道中不利益生菌生存之胃酸與膽鹽作用模式，仍應以益生菌先經酸然後膽鹽之連續作用後的性質評估，較接近益生菌在人體胃腸道中所遭遇之真實環境條件。乳酸菌經存在於胃腸道中之不利因子作用後，是否仍具有吸附於腸道細胞之能力或其他益生性質，目前仍少有相關文獻之探討。故上述生體外試驗模式之建立，實為一值得開發與研究之課題。

第九節 研究目的

本研究利用市售益生菌產品常添加之菌株 *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. paracasei* 等，探討益生菌經酸及膽鹽連續作用後其耐受性、吸附力及拮抗病原菌等基礎益生性質是否有所改變，並探討於模擬腸胃道不良環

境因子條件作用後對菌體細胞膜之影響，及菌株對人體腸道細胞安全性，與未經酸與膽鹽作用之菌株特性相互比較，以評估二者基礎益生性質之異同。



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。

第二節 實驗材料

2-1 使用菌株

- (1) *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695
- (2) *Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615
- (3) *Lactobacillus paracasei* BCRC 14023
- (4) *Clostridium perfringens* BCRC 13019

以上菌株皆購自食品工業發展研究所，新竹市。

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 (MRSC; AppliChem, Darmstadt, Germany)。
- (3) GAM broth (Nissui Phamaceuttical CO., LTD, Japan)
液態培養基另外添加 1.5% agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)，高壓滅菌(121°C, 15 min) 冷卻後即製成固態培養基。

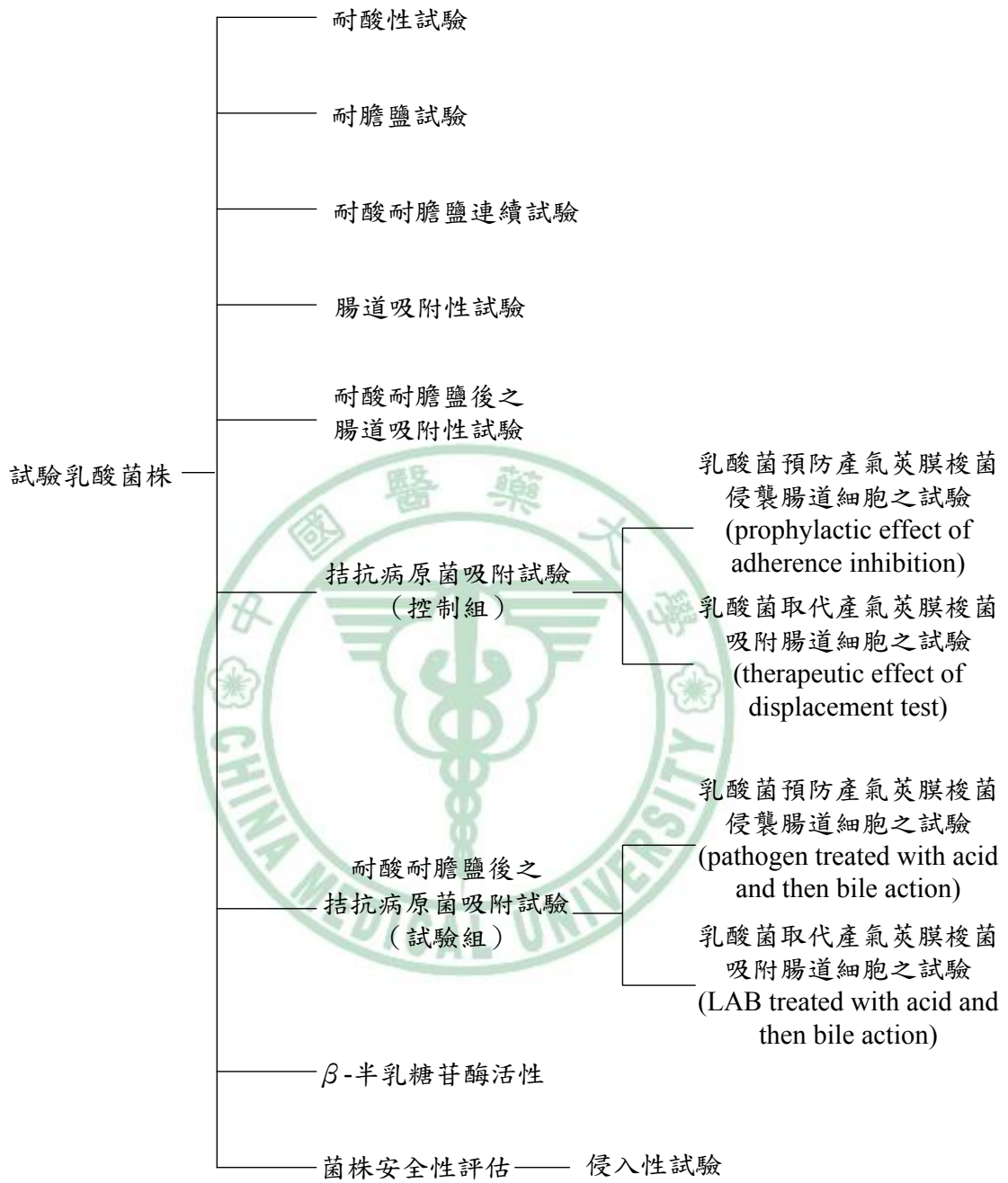


圖 3.1、實驗設計架構

Fig. 3.1. Design of the research

2-3 使用細胞株

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

2-4 細胞株生長之培養基

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

由食品工業發展研究所所購得之菌株，分別以 MRS broth (*Lactobacillus* spp. 培養基)、MRS-C broth (*B. bifidum* 培養基)及 GAM broth (*C. perfringens* 培養基)活化二次。*Lactobacillus* 為微好氣培養，*B. bifidum* 和 *C. perfringens* 使用厭氣培養缸厭氣培養(gas-generating kit, Oxoid)，所有菌株皆於 37°C 下活化培養。將活化之菌液離心(8000 xg, 4°C, 15 min)後，重新懸浮於培養基中，以 1:1 比例與無菌之 20% glycerol 溶

液混合，分裝成每管 1 ml 懸浮液貯存於-80°C 下備用。實驗前將其取出解凍，取 1% 接種量接種於液態培養基中，於 37°C 活化 16-24 hr。

第四節 細胞培養

4-1 冷凍細胞活化

Caco-2 細胞株於 37°C 下快速解凍，加入新鮮培養基，混合均勻後移入 CO₂ 培養箱(NUAIRE, NU-5500, USA)，以 37°C, 5% CO₂ 培養。隔日將舊培養基吸除以移除 DMSO 冷凍保護劑，並加入新鮮培養基，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(約八分滿)時，需將其分殖至新的培養瓶中。其方法為將舊培養液吸除，以 PBS buffer (phosphate buffered saline)潤洗細胞 2 次，加入 0.05% trypsin-EDTA 溶液(Biochrom AG)於 37°C 作用數分鐘，之後輕拍瓶壁使細胞自瓶壁上脫落，將細胞離心並移除上清液，再加入適量之新鮮培養基，以吸取器吸放數次打散細胞團塊，混合均勻後依比例稀釋至新的培養瓶中，依一般培養條件培養之。

4-3 細胞株冷凍保存

細胞株之冷凍保存應在其生長對數期(log phase)、約 80-90% 緻密

度且高存活率狀態下進行。首先依細胞繼代培養之步驟，將細胞打散並收集細胞，一方面取少量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，加入適量細胞冷凍培養基(細胞濃度至少為 10^6 cells/ml)，混合均勻後，分裝於冷凍保存管中進行冷凍保存。細胞冷凍保存步驟為：冷凍保存管置於 4°C , 10 min \rightarrow -20°C , 30 min \rightarrow -80°C , 隔夜 \rightarrow 液態氮桶長期貯存。

4-4 細胞染色與計數

將 20 μl 細胞懸浮液與 20 μl trypan blue (Biochrom AG) 等體積混合，取 20 μl 混合液注入血球計數盤凹槽內，於 100 倍倒立式顯微鏡(Olympus, IX71, Japan)下觀察計數。活細胞不被染色，死細胞則為藍色。計數四大方格中細胞總數，除以四，乘以稀釋倍數，最後乘以 10^4 (血球計數盤每一大格體積為 10^{-1} mm^3)，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。

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

$$\text{活細胞數} \div (\text{活細胞數} + \text{死細胞數}) \times 100\% = \text{存活率}$$

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，加入細胞培養皿中，每個培養皿中細胞濃度為 $3 \times 10^4 - 3 \times 10^5/\text{ml}$ 。於 37°C , 5% CO_2 培養箱中培養，每隔兩天更換新鮮培養基，直至細胞形成

分化完全之單層膜，將其生長型態以倒立式顯微鏡觀察並拍照。

第五節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽研究

5-1 耐酸性試驗

本試驗參考 Hyronimus *et al.* (2000)所述之方法進行。將前述含活化菌株之菌液以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中。將 0.1% peptone water 以 3.0 M HCl 分別調整為 pH 2.0, 3.0, 4.0 之酸液後，分別加入 1 ml (約 $N \times 10^9$ CFU/ml) 懸浮菌液於 10 ml pH 2.0, 3.0, 4.0 之酸液中，然後移置迴轉式震盪培養箱 (LIAN SHEN, LUS-480, Taiwan) 以 37°C, 150 rev/min 震盪培養 0, 1.5, 3.0 hr。另將 1 ml 懸浮菌液加入未調整 pH 值之 0.1% peptone water 中於相同條件下培養，作為控制組(control)。作用後之樣品，以標準平板計數法求得各酸液於各個作用時間之存活菌數並計算其存活率；每一樣品進行三重覆試驗。

5-2 耐膽鹽試驗

將前述含活化菌株之菌液以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中。將 1 ml (約 $N \times 10^9$ CFU/ml) 懸浮菌液分別加入 0.1%, 0.2%, 0.3% 之 oxgall bile (Sigma) 溶液(pH 7.5) 中，以 37°C, 150 rev/min 震盪培養 0, 1.5, 3.0 hr。另將 1 ml

懸浮菌液加入不含膽鹽之 0.1% peptone water 中於相同條件下培養，作為控制組。作用後之樣品，以標準平板計數法計數各作用時間之存活菌數並計算其存活率；每一樣品均進行三重覆試驗。

5-3 連續耐酸、耐膽鹽試驗

將上述含活化菌株之菌液以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中。將 1 ml 懸浮液分別加入 pH 2.0, 3.0, 4.0 之酸液中，以 37°C, 150 rev/min 震盪培養 3.0 hr，另將 1 ml 懸浮菌液加入未調整 pH 值之 0.1% peptone water 中作為控制組，作用後之樣品於 8000 xg 離心 15 min，並將菌體重新懸浮於 PBS buffer 中。經各酸液作用後之懸浮菌液再分別加入 0.1%, 0.2%, 0.3% 之 oxgall bile (Sigma) 溶液中，以上述相同條件震盪培養 3.0 hr，另將 1 ml 懸浮菌液加入不含膽鹽之 0.1% peptone water 中作為控制組，作用後之樣品，以標準平板計數法求得各作用時間之存活菌數並計算其存活率；每一樣品均進行三重覆試驗。

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

第六節 乳酸菌吸附性研究

6-1 模擬腸道吸附性試驗

本試驗參考 Matijašic *et al.* (2006)、Lee *et al.* (2003)及 Gopal *et al.* (2001)之方法。將 Caco-2 cell monolayer 預先以 0.25% (v/v) glutaraldehyde (Sigma)固定 15 min，之後再以 PBS buffer 潤洗 cell monolayer 二次，接著添加不含抗生素之 DMEM 培養基培養 1.5 hr，作為模擬腸道吸附性試驗使用。將試驗之乳酸菌株，以 8000 xg 離心 15 min 後，以 PBS buffer 清洗兩次，再重新懸浮於不含抗生素之 DMEM 中。在每個含有經 glutaraldehyde 固定之 Caco-2 cell monolayer 的 well 中加入 1 ml 之乳酸菌株(約 10^8 CFU/ml)，於 37°C, 5% CO₂ 下培養 2 hr，然後以 PBS buffer 清洗 cell monolayer 五次，將未吸附於 monolayer 上之菌體洗除，再以 1% Triton X-100 (Sigma)溶液分解 Caco-2 cell monolayer，將 well 中之溶液以標準平板計數法計數，每一樣品進行三重覆試驗，並計算其吸附率，其計算公式如下：

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

另將完成吸附試驗後的 cell monolayer，以 95% methanol (TEDIA, Fairfield, Ohio, USA)將吸附於 monolayer 上之菌株固定(作用 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，然後進行革蘭氏染色，樣品風乾後以光學顯微鏡(Olympus,

CX41, Japan)觀察菌體吸附情形。

6-2 連續耐酸、耐膽鹽後模擬腸道吸附性試驗

如上述 5-3 之方法將乳酸菌株經酸及膽鹽連續作用後，將含乳酸菌株之不同濃度之膽鹽溶液以 8000 xg 離心 15 min，去除上清液後，以不含抗生素之 DMEM 重新懸浮菌體，依 6-1 方法進行模擬腸道吸附性試驗；另取 DMEM 之懸浮菌液計數經酸及膽鹽連續作用後之存活菌數，每一樣品均進行三重覆試驗。其吸附率計算公式如下：

$$\text{吸附率} = \frac{\text{經酸及膽鹽連續作用後吸附至細胞單層膜上的菌數(CFU/ml)}}{\text{經酸及膽鹽連續作用後添加至細胞單層膜上的存活菌數(CFU/ml)}} \times 100\%$$

第七節 乳酸菌拮抗病原菌之吸附試驗

7-1-1 乳酸菌預防 *C. perfringens* 侵襲模擬腸道細胞之試驗(prophylactic effect of adherence inhibition) – 控制組

此試驗乃參考 Wadström 等(1997)之方法來進行。將試驗乳酸菌株預先吸附於 Caco-2 cell，試驗其防止 *C. perfringens* 侵襲腸細胞之能力。先將 Caco-2 cell 以 0.25% (v/v) glutaraldehyde 固定 15 min，再以 PBS buffer 潤洗 cell monolayer 二次，接著添加不含抗生素之 DMEM 培養基培養 1.5 hr。將試驗乳酸菌株離心後，以 PBS buffer 沖洗菌體沉澱二次，再以不

含抗生素之 DMEM 將菌體重新懸浮。另外將 *C. perfringens* 菌液與 fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma) 螢光染劑(2 mg/ml) 等體積混合，並作用 20 min，接著離心以去除過量 FITC，再以 PBS buffer 清洗菌體沉澱 3 次，將其重新懸浮於不含抗生素之 DMEM 中。將 1 ml (約 10^8 CFU/ml) 乳酸菌液加入含有 Caco-2 cell monolayer 之 well 中，以 37°C, 5% CO₂ 培養 2 hr，吸除培養液並以 PBS buffer 潤洗 well 五次，以移除未吸附於 cell monolayer 上之菌體，然後加入 1 ml FITC 染色之 *C. perfringens* 菌液(約 10^8 CFU/ml)，於 37°C, 5% CO₂ 培養 2 hr，吸除培養液並以 PBS buffer 潤洗 well 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) 以激發波長 485 nm 和散發波長 528 nm 偵測樣品之螢光強度 (fluorescence density)，並以螢光顯微鏡拍照觀察，另外製備未預先吸附乳酸菌，但加入 FITC 染色之 *C. perfringens* 的樣品 (LAB-free)，同時測定其螢光強度。螢光強度比值的計算方式是以含乳酸菌樣品之螢光強度值除以未含者之螢光強度值，再乘以 100，並將未含乳酸菌樣品之螢光強度值定為 100%，若螢光強度比值降低，則表示預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌株能有效降低 *C. perfringens* 對 Caco-2 cell 之侵襲。

7-1-2 乳酸菌預防 *C. perfringens* 侵襲模擬腸道細胞之試驗 (*C.*

perfringens 預先以酸及膽鹽連續處理) – 試驗組

本試驗乃參考 Lee *et al.* (2003) 所述之方法來進行。本試驗模擬體內腸道之情況，假設乳酸菌已可良好定殖於腸道細胞上，當外來大量之病原菌攝入體內時，必須通過胃腸道中胃酸與膽鹽之作用，因此於此體外試驗先將各試驗乳酸菌株之懸浮菌液(約 10^8 CFU/ml)於 37°C , 5% CO_2 培養 2 hr。另一方面則預先將 *C. perfringens* (約 10^8 CFU/ml)於 pH 4 酸液中作用 3 hr，接著於 0.1% bile solution 中作用 3 hr，作用後離心收集菌體沈澱，並以不含抗生素之 DMEM 重新懸浮，依實驗 7-1-1 所述之方法將 *C. perfringens* 螢光染色，並加入已預先吸附乳酸菌株之 Caco-2 cell monolayer 之 well 中，於 37°C , 5% CO_2 培養 2 hr，以螢光偵測器偵測其螢光強度，並以螢光顯微鏡拍照觀察，另外製備未預先吸附乳酸菌，但加入 FITC 染色之 *C. perfringens* 的樣品，同時測定其螢光強度。螢光強度比值計算方法為含乳酸菌樣品之螢光強度值除以未含者之螢光強度，再乘以 100，將未含乳酸菌樣品之螢光強度定為 100%，若螢光強度比值降低，則代表乳酸菌菌體能有效預防經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後之 *C. perfringens* 吸附於 Caco-2 cell。

7-2-1 乳酸菌取代 *C. perfringens* 吸附於模擬腸道細胞之試驗

(therapeutic effect of displacement test) – 控制組

本試驗參考上述 7-1-1 之方法，將 FITC 染色之 *C. perfringens* 預先吸附於 Caco-2 cell monolayer 上，於 37°C 作用 2 hr 後，接著於 well 中加

入各試驗乳酸菌株之懸浮菌液(約 10^8 CFU/ml)，於 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培養 2 hr，接著偵測樣品螢光強度，並以螢光顯微鏡拍照觀察。另外製備預先吸附 FITC 染色之 *C. perfringens*，但是未加入試驗乳酸菌之樣品，同時測定其螢光強度。螢光強度比值之計算方式為含乳酸菌樣品之螢光強度值除以未含者之螢光強度，再乘以 100，將未含乳酸菌樣品之螢光強度定為 100%，若螢光強度比值降低，則代表乳酸菌菌體能有效取代 *C. perfringens* 吸附於 Caco-2 cell。

7-2-2 乳酸菌取代 *C. perfringens* 吸附於模擬腸道細胞之試驗 (乳酸菌預

先以酸及膽鹽連續處理) – 試驗組

本試驗參考前述 7-2-1 之方法，本試驗假設 *C. perfringens* 已侵襲腸道細胞，當外來乳酸菌攝入體內時，必須通過胃腸道中胃酸與膽鹽之作用，因此先將 FITC 染色之 *C. perfringens* 懸浮菌液(約 10^8 CFU/ml)於 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培養 2 hr 使之吸附於 Caco-2 cell 上，另一方面則將各試驗乳酸菌株(約 10^8 CFU/ml) 預先於 pH 4 酸液中作用 3 hr，接著於 0.1% 膽鹽中作用 3 hr，作用後離心收集菌體沈澱，並以不含抗生素之 DMEM 重新懸浮，於 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培養 2 hr，偵測其螢光強度，並以螢光顯微鏡拍照觀察。另外製備預先吸附經 FITC 染色之 *C. perfringens*，但是未加入試驗乳酸菌之樣品，同時測定其螢光強度。螢光強度比值計算方法為含乳酸菌樣品之螢光強度值除以未含者之螢光強度，再乘以 100，將未含

乳酸菌樣品之螢光強度定為 100%，若螢光強度比值降低，則代表經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後乳酸菌菌體能有效取代 *C. perfringens* 吸附於 Caco-2 cell。

第八節 β -半乳糖苷酶活性

本試驗參考 Noh and Gilloiland (1993) 及 Wang and Sakakibara (1997) 所述之方法來進行。將活化之乳酸菌株以 8000 xg 離心 15 min，使用無菌 PBS buffer 沖洗菌體沈澱物二次，再重新懸浮於 PBS buffer 中。將各菌株依 5-3 節連續耐酸、耐膽鹽之試驗方法先後以不同 pH 值之酸液及不同濃度之膽鹽作用後，接著將溶液離心以取得菌體沉澱，將菌體沉澱重新懸浮於 1 ml phosphate buffer 中並加入 4 ml 0.005 M *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG; Sigma)，於 37°C 水浴反應 10 min，然後加入 2 ml 0.1 M Na₂CO₃ (Wako, Japan) 終止其反應，於 1°C 下以 8000 xg 離心 10 min，取上清液以分光光度計 (Hitachi, U-2000, Japan) 於 420 nm 波長下測其吸光值。另外測定不同濃度 *o*-nitrophenol (ONP; Sigma) 之吸光值作出此試驗之檢量線如圖 3.2 所示， β -半乳糖苷酶活性是以反應時間 10 min 內，在 1 ml 懸浮菌液中由 ONPG 解離之 ONP μ mol 數來表示，其單位為 μ mol/10 min·ml。

第九節 細胞侵入性試驗

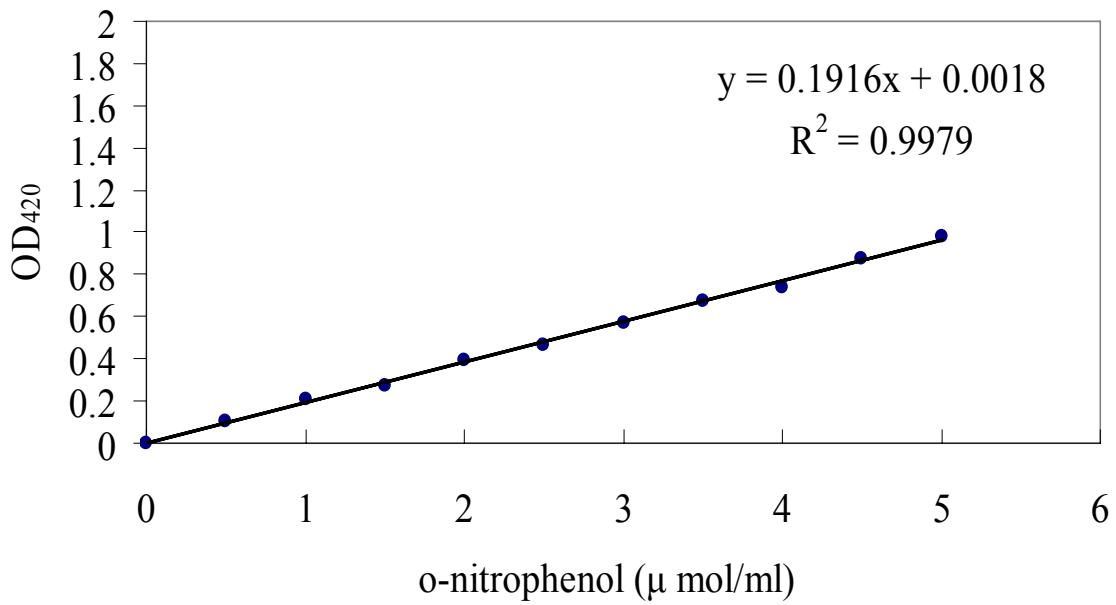
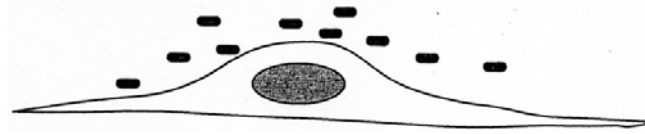


圖 3.2、β-半乳糖苷酶活性之標準曲線

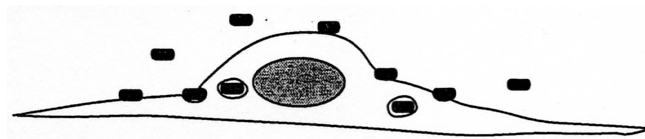
Fig. 3.2. The standard curve of β - galactosidase activity.

各試驗菌株之安全性評估是根據 Tang *et al.* (1993)之方法來進行，試驗流程如圖 3.3 所示。先以 0.25% (v/v) glutaraldehyde 固定 Caco-2 cell monolayer 15 min，再以 PBS buffer 清洗二次，並添加不含抗生素之 DMEM 培養 1.5 hr，以供菌株侵入性試驗使用。各試驗菌株於液體培養基活化後，將其離心並以 PBS buffer 沖洗菌體沉澱二次，將其重新懸浮於不含抗生素的 DMEM 中。接著添加 1 ml 已知菌數之試驗菌株(10^3 - 10^9 CFU/ml)於含有 Caco-2 cell monolayer 之 well 中培養 2 hr 後，吸除 well 中之培養液，以 PBS buffer 沖洗五次以去除未附著於 monolayer 上之菌株。然後加入含抗生素(100 μ g/ml tetracycline, MDBio, Frederick, MD, USA)之 DMEM，於 37°C, 5% CO₂ 下作用 2 hr 以殺死吸附於 Caco-2 cell monolayer 表面上之乳酸菌株，以 PBS buffer 沖洗五次以洗除 tetracycline 及死亡之菌體。接著加入 1% Triton X-100 溶液分解 Caco-2 cell monolayer，釋出可能侵入細胞內之菌株。將 well 中溶液以標準平板計數法計數以計算侵入百分比。另將試驗乳酸菌株以 pH 4.0 之酸液作用 3.0 hr，將其離心後重新懸浮於 PBS buffer 後移置 0.1%膽鹽溶液中作用 3.0 hr，將作用完之溶液離心，重新懸浮菌體於不含抗生素之 DMEM 中，依上述步驟進行安全性評估試驗，並計算其侵入百分比，其計算公式如下：

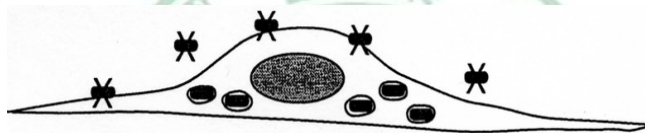
1. Infect Caco-2 cells with bacteria treated with or without acid and then bile solution (10^3 to 10^9 CFU/ml).



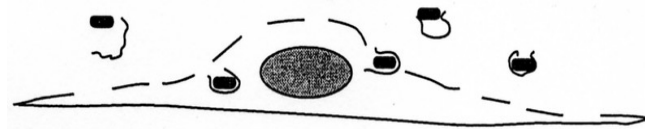
2. Incubate at 37°C , 5% CO_2 for 2 hr.



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.



$$\text{Invasion rate (\%)} = \frac{\# \text{ bacteria surviving tetracycline treatment}}{\# \text{ bacteria added to cell monolayer}} \times 100\%$$

圖 3.3、乳酸菌之侵入性試驗流程

Fig. 3.3. Flow chart of LAB invasion assay

(Tang *et al.*, 1993)

$$\text{侵入百分比} = \frac{\text{經抗生素處理後存活之菌數(CFU/ml)}}{\text{添加至細胞單層膜上的菌數(CFU/ml)}} \times 100\%$$

第十節 統計分析

本研究使用 Microsoft Excel 軟體(Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, 2003, USA) 計算試驗三重覆數據之平均值與標準差，並以 SigmaPlot 繪圖軟體(SigmaPlot 2000 for Windows, ver 6.00, USA)繪製柱狀圖。並利用 SAS 軟體(Statistical Analysis System, Version 8.2, 2001)以 Student's t-test 及 GLM 程序之 Duncan's new multiple range test 及 Dunnett's test 進行數據間之差異顯著性比較。

第四章 結果與討論

第一節 乳酸菌耐酸、耐膽鹽

1-1 耐酸性試驗結果

將所用乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 和 3.0 hr 之存活菌數及存活率如表 4.1 所示。在相同處理條件下，*L. acidophilus* 具較佳耐酸性(5.72-8.26 log CFU ml⁻¹, 0.26-91.17%)，*L. paracasei* 次之(4.18-8.10 log CFU ml⁻¹, 0.00933-77.59%)，*B. bifidum* 其耐酸性則較差(0-6.07 log CFU ml⁻¹, 0-0.787%)。在同一 pH 值作用條件下，隨著作用時間增長各試驗菌株存活率均明顯下降($p < 0.05$)。

許多文獻證實 *L. acidophilus* 具有良好酸耐受性(Gupta *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1998; Chou and Weimer, 1999)；而 Bifidobacteria 對酸的耐受性明顯較 *L. acidophilus* 差(Charteris *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2004)。Wang *et al.* (1999) 及 Fávaro-Trindade and Grosso (2002) 皆指出益生菌在不同 pH 值環境下之存活菌數，隨著 pH 值下降與時間的增加而遞減；在本研究中耐酸性試驗結果與上述作者之試驗結果相似。微生物在胃中主要之傷害為胃酸含有高濃度鹽酸所導致，其傷害程度與氫離子濃度及 pH 值有關(Suskovic *et al.*, 1997; Holzapfel *et al.*, 1998)。Conway *et al.* (1987) 指出乳酸菌於胃內之存活率會因食物存在而提高，且胃液中胃蛋白酶與食糜對菌體具有保護作用。

表 4.1、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 酸液分別處理 1.5 及 3.0 hr 後之存活菌數 (log CFU ml⁻¹)及存活率(%)

Table 4.1. Viable count (log CFU ml⁻¹) and survival rate (%) of the tested LAB strains treated with acid in pH 2, 3, and 4 for 1.5 and 3.0 hr respectively

Strain	initial	control*	pH value					
			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>L. acidophilus</i>	8.30 ^a (100)**	8.29±0.03 ^a (96.8)	7.52±0.07 ^{ax} (16.88)	5.72±0.07 ^{ay} (0.26)	8.24±0.03 ^{ax} (87.81)	7.93±0.06 ^{ay} (42.39)	8.26±0.04 ^{ax} (91.17)	8.07±0.04 ^{ay} (58.53)
<i>B. bifidum</i>	8.17 ^a (100)	8.15±0.06 ^a (95.6)	3.79±0.08 ^{cx} (0.0042)	0 ^{cy} (0)	5.49±0.07 ^{cx} (0.213)	0 ^{cy} (0)	6.07±0.05 ^{cx} (0.787)	4.73±0.04 ^{cy} (0.0363)
<i>L. paracasei</i>	8.23 ^a (100)	8.23±0.04 ^a (100)	6.03±0.09 ^{bx} (0.687)	4.18±0.02 ^{by} (0.00933)	8.08±0.05 ^{bx} (74.88)	7.63±0.15 ^{by} (28.37)	8.10±0.04 ^{bx} (77.59)	7.98±0.06 ^{by} (57.78)

^{a-c} Different letters in the same column significantly differ at the 5% level, n=3.

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

* All of the viable counts of control do not significantly differ from the initial.

** Survival rate (%).

1-2 耐膽鹽試驗結果

各試驗乳酸菌對不同濃度膽鹽耐受性之存活菌數及存活率如表 4.2 所示。由表中可知 *L. paracasei* 具有較高存活率($p < 0.05$)及膽鹽耐受性，*L. acidophilus* 次之，而 *B. bifidum* 之膽鹽耐受性最差。在相同膽鹽濃度下，隨著作用時間增加，各試驗菌株的存活率都顯著降低($p < 0.05$)。

具膽鹽耐受能力是 *Lactobacillus* 存活與生長於腸道中的一項重要特質(Jin *et al.*, 1998)，且膽鹽對 *Bifidobacterium* 存活率具很大影響(Marteau *et al.*, 1997)，*lactobacilli* 和 *bifidobacteria* 之膽鹽耐受性會因菌種之不同而有所差異(Charteris *et al.*, 1998b; Xanthopoulos *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2000)。許多文獻中證實 *L. acidophilus* 及 *L. paracasei* 皆具有良好的膽鹽耐受性(Walker and Gilliland, 1993; Gupta *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1998; Vinderola and Reinheimer, 2003)，Chung *et al.* (1999) 生體外試驗中發現，膽鹽會造成 *Bifidobacterium* 存活菌數明顯下降，而在本研究中耐膽鹽試驗結果與上述作者之試驗結果相似。

1-3 耐酸耐膽鹽連續試驗結果

各試驗乳酸菌以 pH 2, 3, 4 酸液及 0.1, 0.2, 0.3% 膽鹽連續作用後之存活菌數及存活率如表 4.3 所示。在 pH 4 酸液作用後以不同濃度

表 4.2、試驗乳酸菌株以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽濃度分別處理 1.5 及 3.0 hr 後之存活菌數 (log CFU ml⁻¹)及存活率(%)

Table 4.2. Viable count (log CFU ml⁻¹) and survival rate (%) of the tested LAB strains treated with oxgall bile salt in 0.1, 0.2, and 0.3% of concentration for 1.5 and 3.0 hr respectively

Strain	initial	control*	Oxgall bile salt concentration					
			0.1%		0.2%		0.3%	
			1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr	1.5 hr	3.0 hr
<i>L. acidophilus</i>	8.27 ^a (100)**	8.26±0.04 ^a (98.7)	5.86±0.13 ^{bx} (0.403)	3.56±0.1 ^{by} (0.00202)	4.23±0.07 ^{bx} (0.00932)	3.23±0.04 ^{by} (0.000931)	4.00±0.06 ^{bx} (0.00548)	2.79±0.1 ^{by} (0.000347)
<i>B. bifidum</i>	8.28 ^a (100)	8.27±0.02 ^a (97.6)	4.9±0.07 ^{bx} (0.0415)	2.57±0.18 ^{by} (0.000211)	2.57±0.17 ^{cx} (0.000203)	0 ^{cy} (0)	1.65±0.06 ^{cx} (0.0000237)	0 ^{cy} (0)
<i>L. paracasei</i>	8.21 ^a (100)	8.20±0.06 ^a (99.2)	7.11±0.03 ^{ax} (7.99)	6.06±0.07 ^{ay} (0.708)	6.84±0.12 ^{ax} (4.42)	6.12±0.04 ^{ay} (0.817)	6.59±0.11 ^{ax} (2.56)	5.94±0.06 ^{ay} (0.537)

^{a-c} Different letters in the same column significantly differ at the 5% level, n=3.

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

* All of the viable counts of control do not significantly differ from the initial.

** Survival rate (%).

表 4.3、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3% 膽鹽分別處理 3 hr 後之存活菌數(log CFU ml⁻¹)及存活率(%)

Table 4.3. Viable count (log CFU ml⁻¹) and survival rate (%) of the tested LAB strains treated with acid of pH 2, 3, 4 for 3 hr and then bile salt with 0.1, 0.2, 0.3% concentration for 3 hr respectively

Strain	initial	control*	pH 2			pH 3			pH 4		
			0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%
<i>L. acidophilus</i>	8.25 ^a	8.23±0.07 ^a	0 ^{ax}	0 ^{ax}	0 ^{ax}	2.67±0.12 ^{ax}	0 ^{ay}	0 ^{ay}	4.33±0.08 ^{ax}	4.23±0.12 ^{ax}	2.24±0.04 ^{ay}
	(100) ^{**}	(97.5)	(0)	(0)	(0)	(0.000281)	(0)	(0)	(0.0125)	(0.00966)	(0.0001)
<i>B. bifidum</i>	8.28 ^a	8.26±0.05 ^a	0 ^{ax}	0 ^{ax}	0 ^{ax}	0 ^{cx}	0 ^{ax}	0 ^{ax}	3.72±0.06 ^{cx}	0 ^{cy}	0 ^{by}
	(100)	(96.8)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.00288)	(0)	(0)
<i>L. paracasei</i>	8.10 ^a	8.10±0.04 ^a	0 ^{ax}	0 ^{ax}	0 ^{ax}	2.26±0.14 ^{bx}	0 ^{ay}	0 ^{ay}	4.20±0.04 ^{bx}	3.61±0.17 ^{by}	2.21±0.12 ^{az}
	(100)	(100)	(0)	(0)	(0)	(0.000151)	(0)	(0)	(0.0126)	(0.0032)	(0.00013)

^{a-c} Different letters in the same column significantly differ at the 5% level, n=3.

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

* All of the viable counts of control do not significantly differ from the initial.

** Survival rate (%).

之膽鹽連續處理後各試驗乳酸菌株之存活菌數及存活率依序為：*L. acidophilus* (2.24-4.33 log CFU ml⁻¹, 0.0001-0.0125%) > *L. paracasei* (2.21-4.20 log CFU ml⁻¹, 0.00013-0.0126%) > *B. bifidum* (0-3.72 log CFU ml⁻¹, 0-0.00288%)。於 pH 3 酸液作用後，再以不同濃度膽鹽連續處理，只有 *L. acidophilus* (2.67 log CFU ml⁻¹, 0.000281%) 及 *L. paracasei* (2.26 log CFU ml⁻¹, 0.000151%) 可於 pH 3 酸液及 0.1% 膽鹽連續處理後存活，其餘試驗條件菌株均無存活。另外，預先以 pH 2 酸液作用後再分別以不同濃度膽鹽處理，所有菌株皆無法存活。各試驗菌株連續以酸液及膽鹽處理後其存活率(表 4.3)幾乎都低於單獨以酸液(表 4.1)或膽鹽(表 4.2)單獨作用後之存活率，顯示結合酸與膽鹽二者所進行之模擬胃腸道消化試驗結果，益生菌所受之傷害高於單一耐酸或耐膽鹽試驗者。*B. bifidum* 為一厭氧菌，在耐酸及耐膽鹽試驗中震盪培養過程，以不含酸及膽鹽之 0.1% peptone water 作為控制組，發現此 *B. bifidum* 於震盪培養過程並不影響其存活。

攝食益生菌時，菌體必須連續通過胃腸道，因此利用接近人體生理環境模擬消化過程中受胃酸及腸道中高濃度膽鹽環境，來探討對益生菌存活之影響。Marteau *et al.* (1997) 利用動力模式(dynamic model)之生體外試驗模擬人體消化道環境來探討模擬胃腸道環境對乳酸菌存活的影響，其結果顯示，*L. acidophilus* 和 *B. bifidum* 存活率較高。在林(2001)

研究中將乳酸菌於 pH 3.2 及 0.3%膽鹽溶液中連續作用，結果發現 *B. adolescentis* 及 *B. bifidum* 之存活率最高，其次為 *L. acidophilus*、*L. bulgaricus* 及 *L. rhamnosus*。在本研究中結果則是 *L. acidophilus* 及 *L. paracasei* 之存活率較 *B. bifidum* 高。

許多研究利用不連續之酸及膽鹽耐受性試驗來篩選具潛在益生性質之菌株(Charteris *et al.*, 1998; Huang and Adams, 2004; Noriega *et al.*, 2004)，但乳酸菌於人體內消化過程必須先通過胃酸之作用再經過小腸之連續緊迫(Bouhnik *et al.*, 1992; Pouchart *et al.*, 1992; Mainville *et al.*, 2005)，因此生體外試驗以連續酸及膽鹽耐受性試驗會與體內胃腸道實際情況接近。此外，胃腸道環境會隨著攝取食物的種類及消化等情況而改變(McLauchlan *et al.*, 1989; Morelli, 2000)，菌體通過腸胃道會遭遇不同 pH 值胃酸及不同濃度膽鹽之作用(Berrada *et al.*, 1991; Mainville *et al.*, 2005)。本研究發現以 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽溶液連續作用的試驗條件下，所有試驗菌株皆有較高存活率。Goldin *et al.* (1992)指出益生菌若能順利通過胃腸道便可以短暫定殖於胃腸道中，並發揮其益生功效。

第二節 乳酸菌模擬腸道之吸附性

2-1 細胞單層膜觀察

Caco-2 cell 於繼代培養後，以倒立式顯微鏡觀察細胞培養皿中細胞

生長情況及 Caco-2 cell monolayer 之完整性。結果發現於繼代培養後第 0 天(如圖 4.1-A)，細胞呈現完整圓點形狀，且尚未貼附至細胞培養皿上，至第四天(如圖 4.1-B)可觀察到大多數細胞已貼附於細胞培養皿壁上，呈扁平狀且細胞數增多，至第七天(如圖 4.1-C)時細胞已長滿培養皿並開始分化，至第十五天(如圖 4.1-D)後細胞分化完成，本研究吸附試驗所使用之 cell monolayer 皆為 Caco-2 cell 繼代培養十五天後之樣品。

2-2 吸附性試驗結果

表 4.4 為各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cell 之吸附率，亦即各菌株對腸道細胞吸附能力的指標，其吸附能力依序為 *L. acidophilus* (8.28%，圖 4.2-A) > *B. bifidum* (0.97%，圖 4.2-B) > *L. paracasei* (0.012%，圖 4.2-C)，*L. acidophilus* 在此試驗中呈現最佳吸附性($p < 0.05$)。 *Lactobacillus* 及 *Bifidobacterium* 吸附於腸道細胞之能力因菌種間之差異而有所不同 (Bernet *et al.*, 1993; Coconnier *et al.*, 1992; Gopal *et al.*, 2001)。

益生菌欲定殖於腸道必須預先吸附於腸道，因此欲成為益生菌必須具有吸附於腸道細胞之能力，並發揮其有益人體健康之功效(Havenaar *et al.*, 1992; Morelli *et al.*, 1997; Ouwehand *et al.*, 1999c)。另外，許多文獻指出具吸附性之益生菌並不能長久定殖於腸道，許多研究中發現當給予具吸附性之益生菌時可在糞便中測得益生菌，但停止給予後發現糞便中益生菌菌數便逐漸減少，因此推測益生菌只能短暫定殖於腸道中(Saxelin,

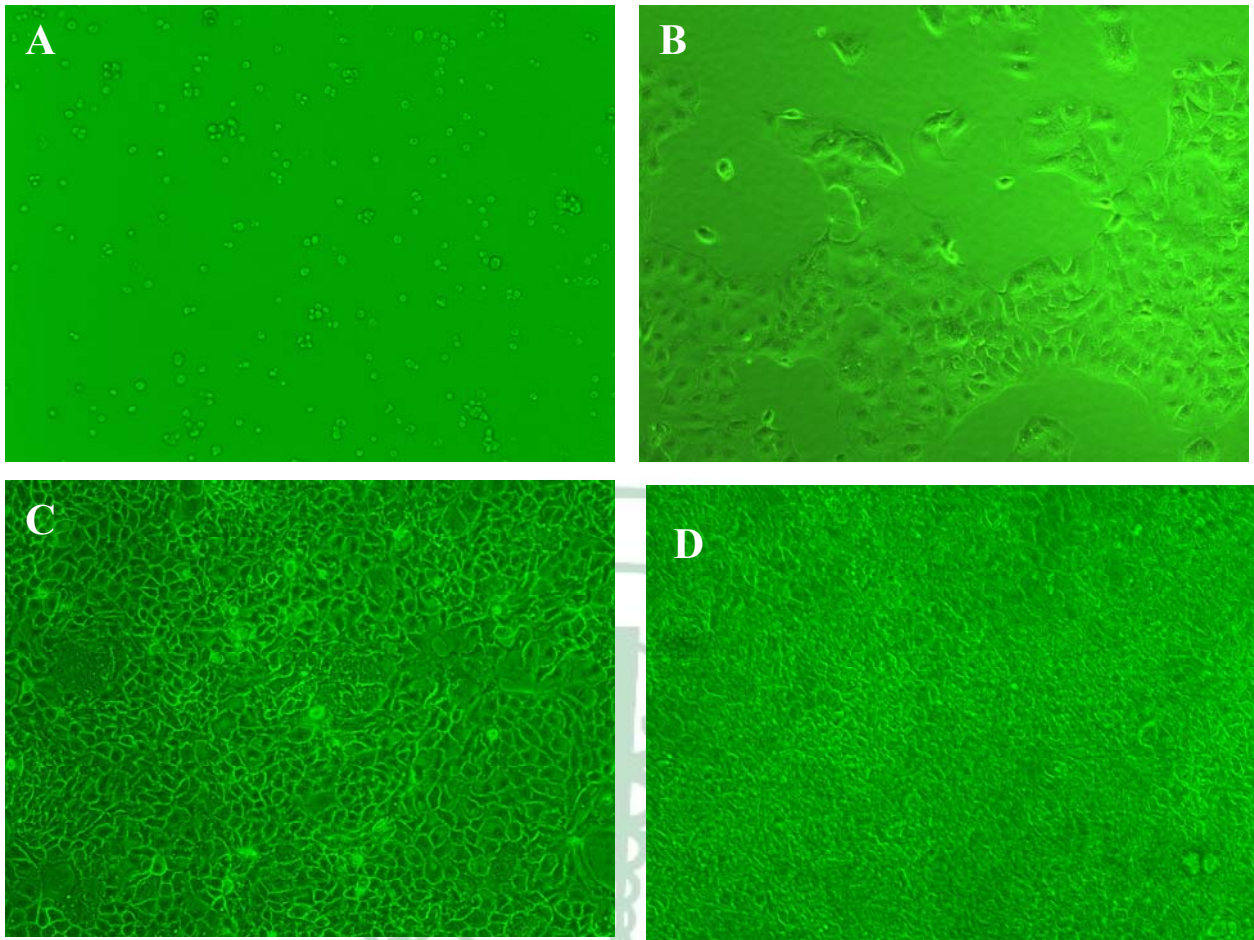


圖 4.1、Caco-2 cells 繼代培養後之生長型態(A)繼代培養後第 0 天； (B) 第 4 天；(C)第 7 天；(D)第 15 天 (放大倍率 100×)

Fig. 4.1. Changes in shape of Caco-2 cells at after subculture (A) 0 day; (B) 4 days; (C) 7 days; (D) 15 days (magnification 100×)

表 4.4、各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cells 之吸附率(%)

Table 4.4. Adherence rate (%) of the tested LAB to Caco-2 cells

	Strain		
	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. paracasei</i>
Adherence (%)	8.28 ^a	0.97 ^b	0.012 ^c

^{a-c} Values with different superscript letters significantly differ at the 5% level, n=3.



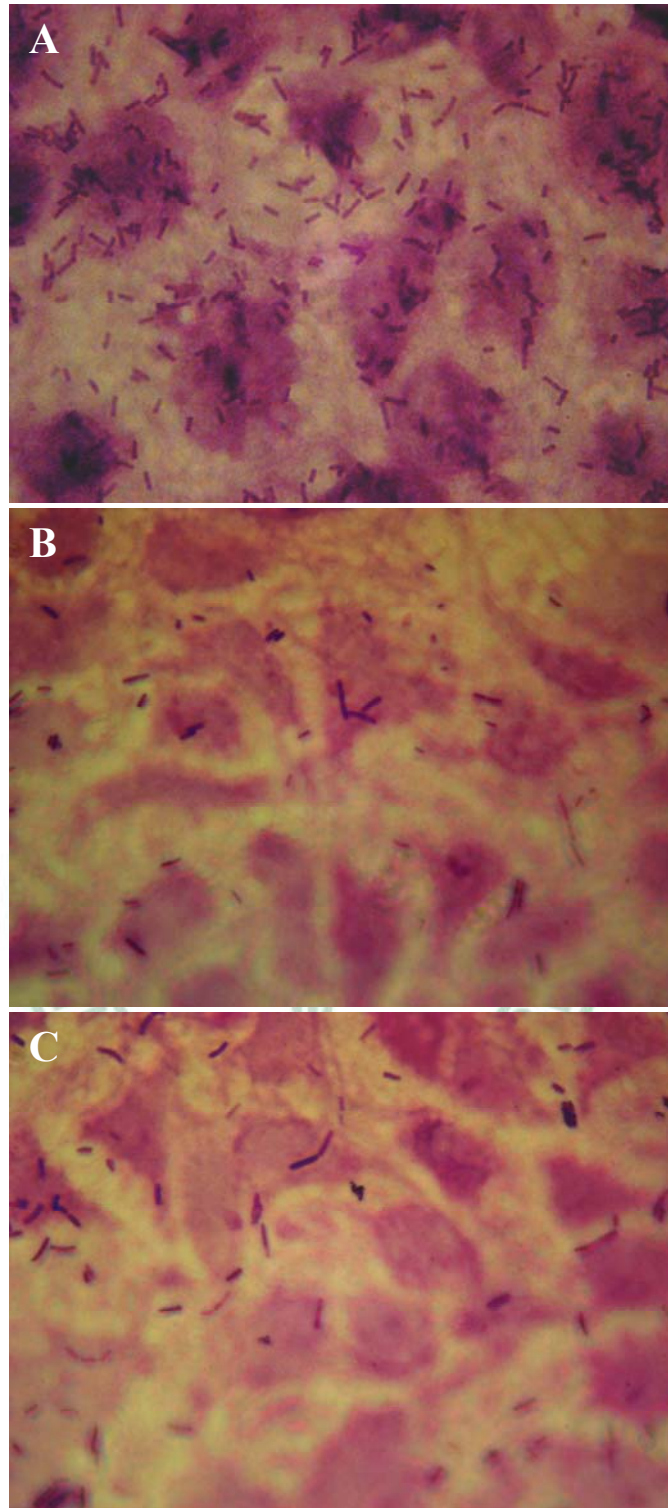


圖 4.2、各試驗乳酸菌株吸附於 Caco-2 cells 上之光學顯微鏡照像圖
(A) *L. acidophilus*; (B) *B. bifidum*; (C) *L. paracasei* (放大 2, 000×)
Fig. 4.2. Photograph of the tested LAB adhered to Caco-2 cells in a light
microscope (A) *L. acidophilus*; (B) *B. bifidum*; (C) *L. paracasei*
(magnification 2, 000×)

1997; Spanhaak *et al.*, 1998)。

L. acidophilus 為一種典型益生菌，具耐酸、耐膽鹽及可吸附於腸道細胞之能力，且具有多種有益於人體健康之功效(Tuomola and Salminen, 1998; Tejada-Simon *et al.*, 1999; Lin and Chen, 2000; Gopal *et al.*, 2001; Hütt *et al.*, 2006)。Coconnier *et al.* (1992)探討 *L. acidophilus* BG2FO4 之腸道吸附模式，提出胞外蛋白質雙價橋理論，如圖 4.3 所示，*L. acidophilus* 藉由此種胞外蛋白質連結至人體的腸道細胞受體，達到吸附與定殖的效果。Bifidobacteria 也為源自人類腸道之益生菌，已有許多文獻證實其多項益生效果(Tejada-Simon *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2004)。曾有學者以花生凝集素(peanut agglutinin; PNA)做為研究素材來探討 *B. bifidum* EB102 之吸附機制，結果發現此菌株是以細胞蛋白表面之蛋白質成分 (proteinaceous components)結合至模擬腸道細胞株 Caco-2 cell 之醣脂質 (glycolipid)的醣部分(carbohydrate moieties) (Mukai *et al.*, 2004)。

2-3 乳酸菌耐酸耐膽鹽後之腸道吸附性

各試驗乳酸菌株經 pH 2, 3, 4 及 0.1, 0.2, 0.3%連續作用後之存活與吸附菌數(log CFU ml⁻¹)及吸附率(%)如表 4.5 所示。結果顯示只有經 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽連續作用後之乳酸菌株仍具有吸附能力，其吸附率依序為：*L. paracasei* (80.68%，圖 4.4-C) > *L. acidophilus* (9.71%，圖 4.4-A)

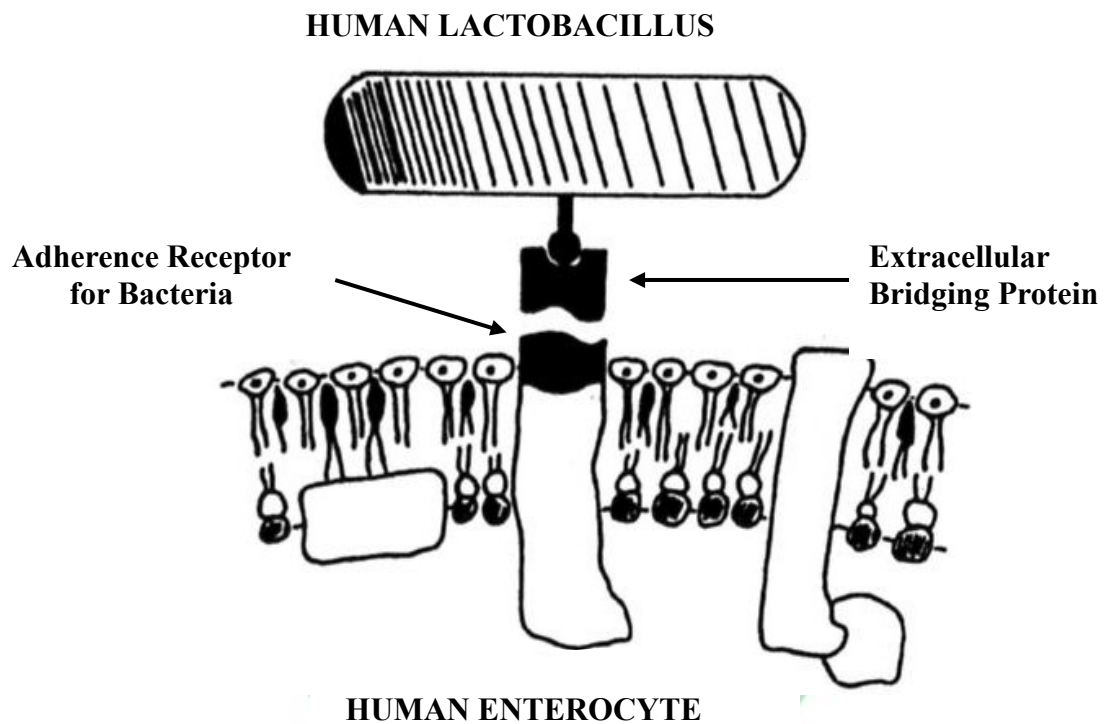


圖 4.3、*L. acidophilus* BG2FO4 對人類腸道細胞之吸附模式

Fig. 4.3. The model of adherence of *L. acidophilus* BG2FO4 to human intestinal cell

(Coconnier *et al.*, 1992)

表 4.5、試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3% 膽鹽分別處理 3 hr 後之存活菌數(log CFU ml⁻¹)、吸附菌數(log CFU ml⁻¹)及吸附率(%)

Table 4.5. The viable count of survival (log CFU ml⁻¹), adherence (log CFU ml⁻¹) and adherence rate (%) of the tested LAB treated with pH 2, pH 3, and pH 4 acid solutions for 3 hr and then 0.1, 0.2, 0.3% oxgall bile salt solutions for 3 hr respectively

Strain	pH 2						pH 3						pH 4					
	0.1%		0.2%		0.3%		0.1%		0.2%		0.3%		0.1%		0.2%		0.3%	
	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence	survival	adherence
<i>L. acidophilus</i>	0 ^a	0	0	0	0	0	2.64	0	0	0	0	0	4.27	3.19	4.21	0	2.29	0
	(0) ^b	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(9.71) ^y	(100)	(0)	(100)	(0)
<i>B. bifidum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.69	2.34	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(5.20) ^y	(0)	(0)	(0)	(0)
<i>L. paracasei</i>	0	0	0	0	0	0	2.16	0	0	0	0	0	4.08	3.98	3.64	0	2.40	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(100)	(80.68) ^x	(100)	(0)	(100)	(0)

^{x-y} Different letters in the same column significantly differ at the 5% level, n=3

^a Viable counts after the treatment of acid and continued action by bile salt; the initial inoculum is N×10⁸ CFU ml⁻¹

^b Adherence rate (%)

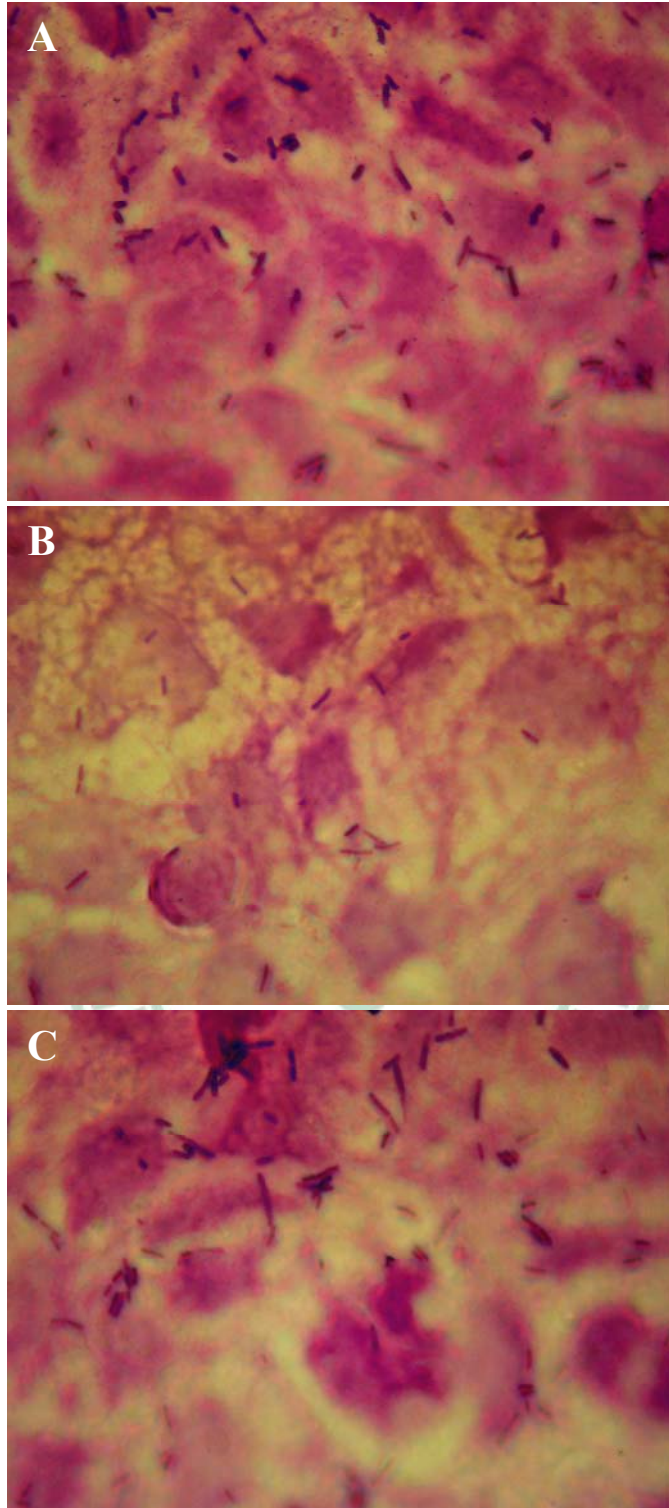


圖 4.4、各試驗乳酸菌株經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續處理後吸附於 Caco-2 cells 上之光學顯微鏡照像圖(A) *L. acidophilus*; (B) *B. bifidum*; (C) *L. paracasei* (放大 2, 000x)

Fig. 4.4. Photograph of the tested LAB after being treated with pH 4 acid solution and 0.1% bile continually adhered to Caco-2 cells in a light microscope (A) *L. acidophilus*; (B) *B. bifidum*; (C) *L. paracasei* (magnification 2, 000x)

> *B. bifidum* (5.20%，圖 4.4-B)，其中 *L. paracasei* 具最高吸附率($p < 0.05$)。所有試驗乳酸菌株於 pH 2 或 pH 3 酸液作用後再分別以 0.1, 0.2, 0.3% 膽鹽處理後，皆喪失其吸附能力。另外，與未經酸及膽鹽溶液連續作用前之吸附率(表 4.4)比較，經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液連續作用後存活之乳酸菌表現較高的吸附率(表 4.5)。經 pH 3 酸液及 0.1% 膽鹽、pH 4 酸液再分別以 0.2, 0.3% 膽鹽連續作用後存活之乳酸菌皆喪失其吸附能力，推測此結果可能因菌體表面蛋白質成分之吸附因子於酸液及膽鹽作用後受到損害所導致。

第三節 乳酸菌拮抗病原菌吸附之益生特性

3-1 乳酸菌預防 *C. perfringens* 侵襲模擬腸道細胞之吸附性抑制功效 (adherence inhibition effect)

乳酸菌預先吸附於 Caco-2 cell 上，再分別加入(1)不經酸及膽鹽作用之螢光染色 *C. perfringens*，以及(2)經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後螢光染色之 *C. perfringens*，所得之乳酸菌預防 *C. perfringens* 吸附之結果如圖 4.5 所示。*C. perfringens* 未經酸及膽鹽作用前吸附於 Caco-2 cell 上之菌數為 $5.94 \log \text{CFU ml}^{-1}$ ，預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液連續作用後，其吸附於 Caco-2 cell 上之菌數為 $4.87 \log \text{CFU ml}^{-1}$ ，並以此數據作為圖 4.5 上未吸附乳酸菌組 (LAB-free) 100% 之吸附率。結果顯示各試驗乳酸菌株皆可顯著預防 *C. perfringens* 吸

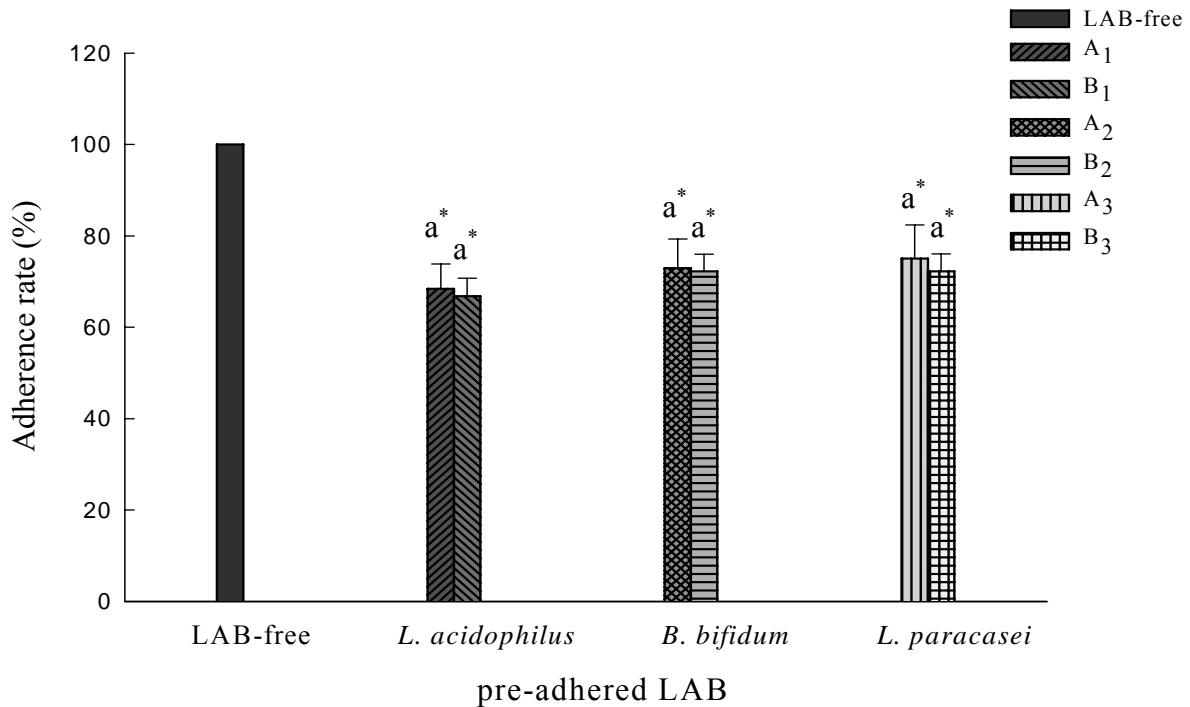


圖 4.5、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌對螢光染色之 *C. perfringens* (未處理及連續以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液處理) 的吸附性抑制之試驗結果。* 含乳酸菌組與 LAB-free 組(未預先吸附乳酸菌)比較後達統計上顯著性差異($p < 0.05$)；含相同乳酸菌組標示之字母 a，表示彼此間不具顯著性差異($p > 0.05$)。A₁, A₂, A₃：未以酸液及膽鹽溶液處理之螢光染色 *C. perfringens* (控制組)；B₁, B₂, B₃：預先以酸液及膽鹽溶液處理之螢光染色 *C. perfringens* (試驗組)

Fig. 4.5. Adherence inhibition effect of the tested LAB pre-adhered to Caco-2 cells upon the adhesion of FITC-labeled *C. perfringens* (with and without pretreatment of acid (pH 4) and bile (0.1%)).
 *Significantly different from the LAB-free group ($p < 0.05$).
^a Values of the identical LAB do not differ significantly ($p > 0.05$). A₁, A₂, A₃: FITC-labeled *C. perfringens* without the treatment of acid and bile. B₁, B₂, B₃: FITC-labeled *C. perfringens* pretreated with acid and bile

附於 Caco-2 cell ($p < 0.05$)。此外，同一乳酸菌株預防不經酸及膽鹽作用之 *C. perfringens* 及經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後之 *C. perfringens*，雖然各乳酸菌株預防經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用後之 *C. perfringens* 結果較佳，但兩者間並未達到顯著差異 ($p > 0.05$)。由上可知，不論 *C. perfringens* 是否經酸與膽鹽作用，乳酸菌株均能有效預防 *C. perfringens* 對腸道細胞之侵襲，圖 4.6(病原菌未經酸、膽鹽作用)及圖 4.7(病原菌先經酸、膽鹽作用)為其螢光顯微照相圖，由圖中可知預先以乳酸菌定殖之樣品，*C. perfringens* 螢光強度皆有減弱的現象。

病原菌吸附至腸黏膜表面被認為是感染腸道細胞之首要步驟 (Beachey, 1981; Finlay and Falkow, 1997)，因此抑制病原菌之吸附可預防其定殖及感染腸道 (Tuomola *et al.*, 1999)。已有許多研究證實乳酸菌具有抑制病原菌吸附及侵入腸道細胞之功效 (Bernet *et al.*, 1993; Coconnier *et al.*, 1993; Hudault *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2003; Asahara *et al.*, 2004)，目前也已廣泛應用於人體及動物治療腸胃道疾病 (Rolfe, 2000)。

大多生體外拮抗病原菌能力之試驗 (Coconnier *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2003; Gagnon *et al.*, 2004) 其乳酸菌株或病原菌株並未經酸及膽鹽連續作用後，再進行試驗。本研究中拮抗病原菌之生體外試驗，欲更

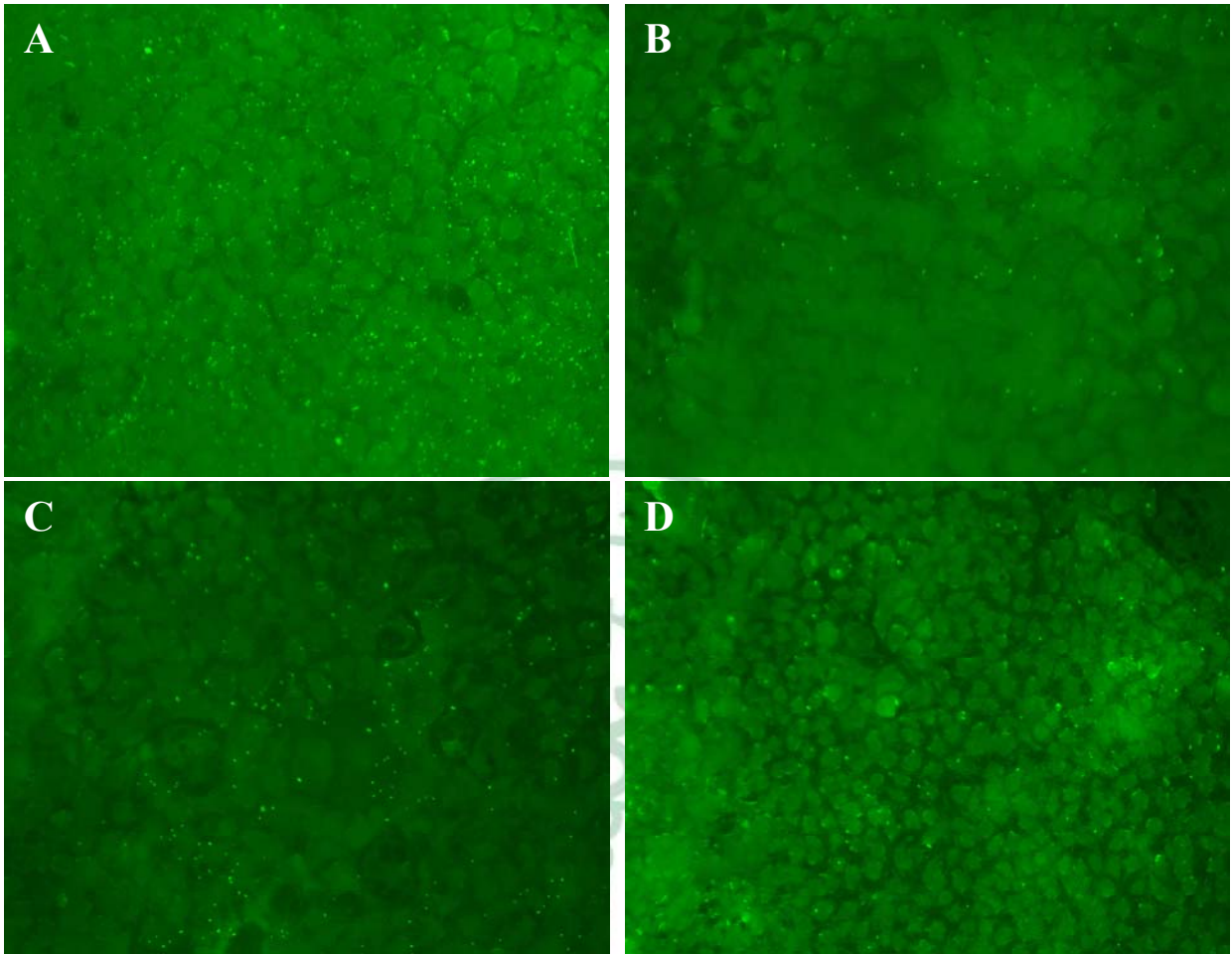


圖 4.6、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌預防螢光染色 *C. perfringens* 吸附之螢光顯微鏡照相圖。(A)LAB-free 組，未預先吸附乳酸菌；(B)預先吸附 *L. acidophilus*；(C)預先吸附 *B. bifidum*；(D)預先吸附 *L. paracasei*

Fig. 4.6. Fluorescent microscopic photographs representing the preventive effects of the tested LAB pre-adhered to Caco-2 cells upon the adhesion of FITC-labeled *C. perfringens*. (A) LAB-free group (not treated with LAB), and LAB pre-adhered to Caco-2 cells with (B) *L. acidophilus*; (C) *B. bifidum*; (D) *L. paracasei*, respectively

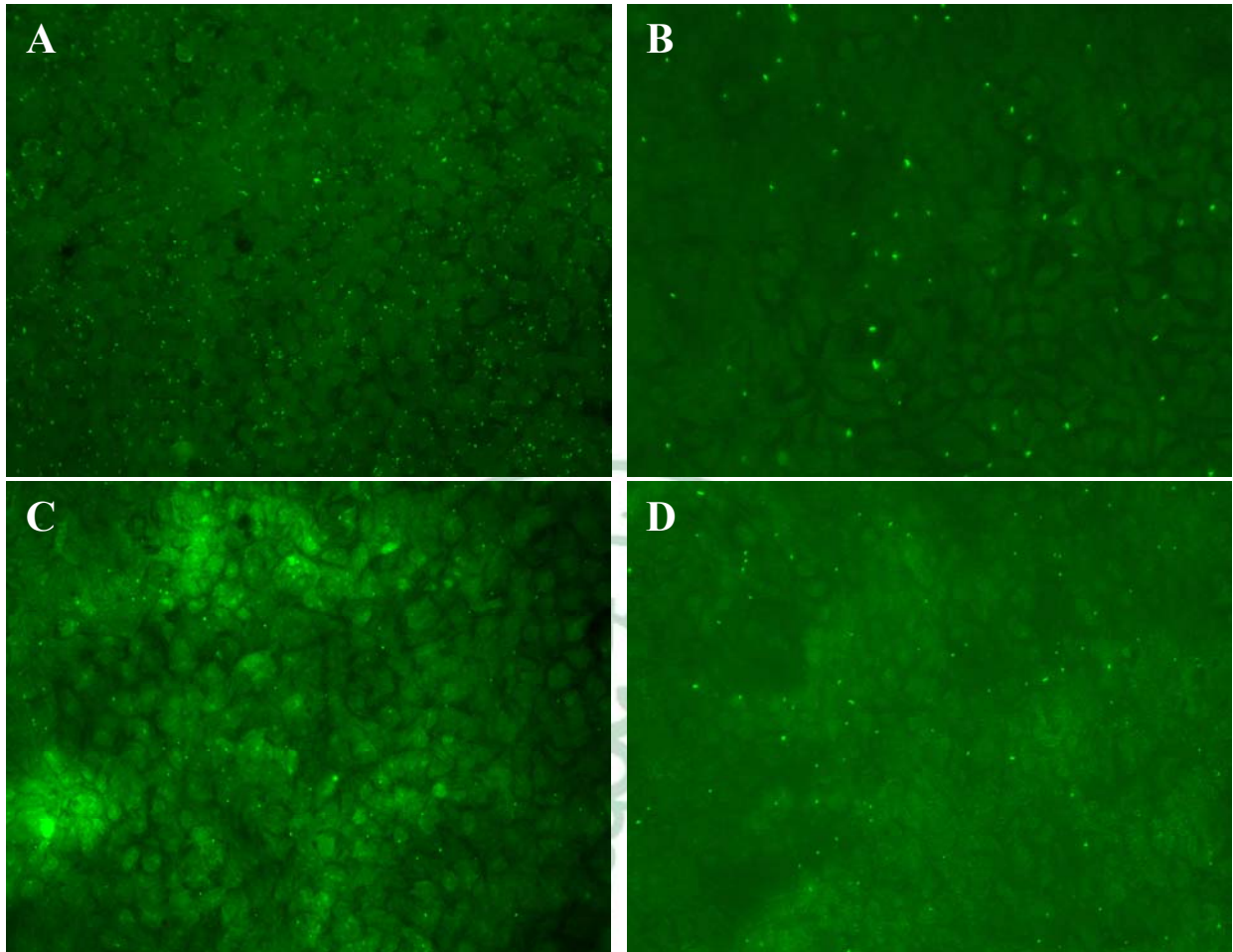


圖 4.7、預先吸附於 Caco-2 cell 上之乳酸菌預防先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液處理之螢光染色 *C. perfringens* 吸附之螢光顯微鏡照相圖。(A)LAB-free 組，未預先吸附乳酸菌；(B)預先吸附 *L. acidophilus*；(C)預先吸附 *B. bifidum*；(D)預先吸附 *L. paracasei*

Fig. 4.7. Fluorescent microscopic photographs representing the preventive effects of the tested LAB pre-adhered to Caco-2 cells upon the FITC-labeled *C. perfringens* (pretreated with pH 4 acid solution and 0.1% bile solution) adhesion (A) LAB-free group (not treated with LAB), and LAB pre-adhered to Caco-2 cells with (B) *L. acidophilus*; (C) *B. bifidum*; (D) *L. paracasei*, respectively

接近實際生體內之情況，因此於乳酸菌預防 *C. perfringens* 侵襲腸道細胞試驗中，假設乳酸菌株已吸附並定殖於腸道上，以驗證定殖於腸道之乳酸菌對於經酸、膽鹽作用後之病原菌是否有較佳之吸附性抑制 (adherence inhibition) 效果。若攝入病原菌，則病原菌必須先經胃腸道之作用，再與乳酸菌株競爭吸附，結果發現乳酸菌可顯著降低 *C. perfringens* 之吸附，且效果較佳，雖然與未經酸及膽鹽作用之 *C. perfringens* 拮抗能力比較並未達到顯著差異。另外，乳酸菌經酸及膽鹽作用後之吸附能力之結果中發現，只有經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽預先作用乳酸菌仍具有吸附能力(表 4.5)，因此以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽作為模擬胃腸道及 *C. perfringens* 所受酸、膽鹽之作用條件。

3-2 乳酸菌取代 *C. perfringens* 吸附於模擬腸道細胞之功效 (displacement effect)

將螢光染色之 *C. perfringens* 預先吸附於 Caco-2 cell 上，再加入未經酸液及膽鹽作用之乳酸菌株及經 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用之乳酸菌株，探討上述兩種不同情況下乳酸菌對 *C. perfringens* 吸附性之影響，結果如圖 4.8 所示。由圖可知乳酸菌株無論是否先經酸液及膽鹽預先作用，皆可顯著降低 *C. perfringens* 對 Caco-2 cell 的吸附。另外，同一乳酸菌株，經酸液及膽鹽預先作用後，其抑制 *C. perfringens*

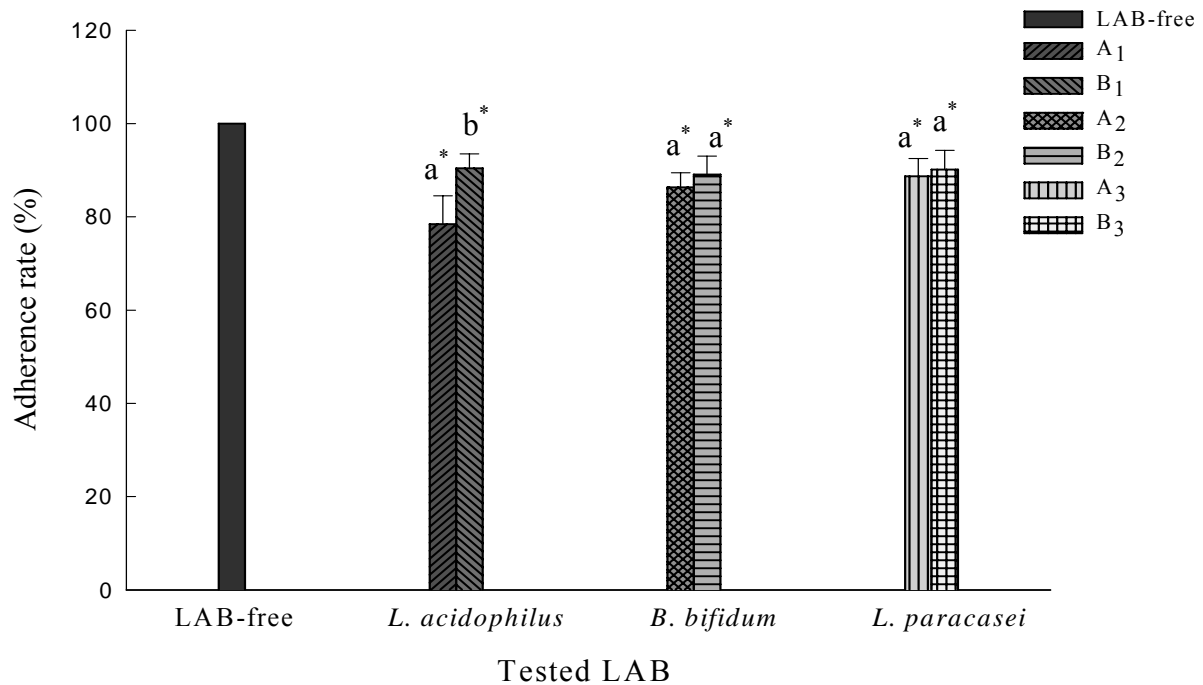


圖 4.8、乳酸菌(未處理及連續以 pH 4 酸液及 0.1%膽鹽溶液處理)取代螢光染色之 *C. perfringens* 對 Caco-2 cell 吸附之試驗結果。*含乳酸菌組與 LAB-free 組(未吸附乳酸菌)比較後達統計上顯著性差異($p < 0.05$)；含相同乳酸菌組標示字母不同者，表示彼此間具顯著性差異($p < 0.05$)。A₁, A₂, A₃：未以酸液及膽鹽溶液處理之乳酸菌(控制組)；B₁, B₂, B₃：預先以酸液及膽鹽溶液處理之乳酸菌(試驗組)

Fig. 4.8. Displacement effect of the tested LAB with and without the pretreatment of acid (pH 4) and bile (0.1%) on the adhesion of pre-adhered FITC-labeled *C. perfringens*. * Significantly different from LAB-free group ($p < 0.05$). ^{a-b} Values of the identical LAB with different letters differ significantly ($p < 0.05$). A₁, A₂, A₃: the three LAB without the pretreatment of acid and bile. B₁, B₂, B₃: the three LAB with the pretreatment of acid and bile

吸附之作用下降，三株菌中又以 *L. acidophilus* 之取代吸附能力降低程度達到顯著差異($p < 0.05$)，因此可推論乳酸菌株以酸液及膽鹽預先作用會對其造成傷害，雖然 *B. bifidum* 及 *L. paracasei* 也顯示相同之結果，但並未達顯著差異($p > 0.05$)。圖 4.9(乳酸菌未經酸、膽鹽作用者)及圖 4.10(乳酸菌先經酸、膽鹽作用者)為各試驗乳酸菌株取代 *C. perfringens* 吸附程度之螢光顯微照相圖，結果顯示螢光染色 *C. perfringens* 之螢光強度皆減弱。

許多文獻指出乳酸菌具有抑制病原菌吸附及侵襲腸道細胞之能力(Bernet *et al.*, 1994; Tuomola *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2004)。本研究中試驗之乳酸菌株無論是否預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽作用，皆可有效取代 *C. perfringens* 吸附於腸道細胞。由先前許多學者及本研究中之結果可知，如將乳酸菌應用於臨床上應可改善腸胃道菌相有助於腸胃道疾病之治療與緩解。

本研究中，*L. acidophilus* 在未經酸及膽鹽連續作用前，擁有最佳的吸附能力，但在拮抗病原菌試驗中與 *B. bifidum*、*L. paracasei* 比較後，並未表現出最佳拮抗能力。Tuomola *et al.* (1999)指出拮抗病原菌吸附之能力與益生菌本身之吸附能力並無相關性。其拮抗能力與益生菌及病原菌競爭腸道上之特定吸附因子之接受器(Lee and Puong, 2002)，及乳酸菌與病原菌之間共凝集作用有關(Reid *et al.*, 1988;

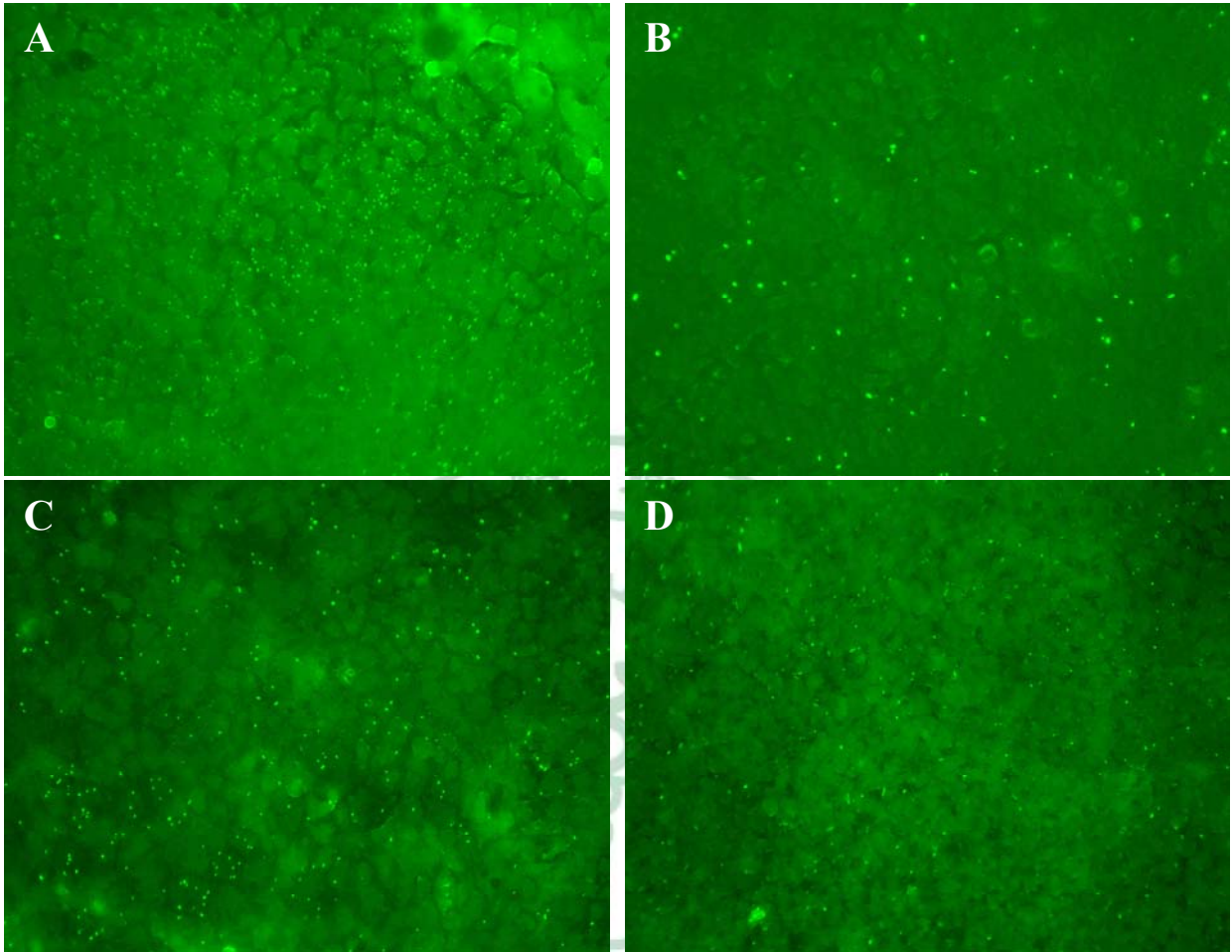


圖 4.9、乳酸菌取代螢光染色 *C. perfringens* 吸附之螢光顯微鏡照相圖。(A)LAB-free 組，螢光染色 *C. perfringens*；(B)添加 *L. acidophilus*；(C)添加 *B. bifidum*；(D)添加 *L. paracasei*

Fig. 4.9. Fluorescent microscopic photographs representing the displacement effect of the tested LAB on the adhesion of pre-adhered FITC-labeled *C. perfringens*. (A) FITC-labeled *C. perfringens* (LAB-free group), FITC-labeled *C. perfringens* treated with (B) *L. acidophilus*; (C) *B. bifidum*; (D) *L. paracasei*, respectively

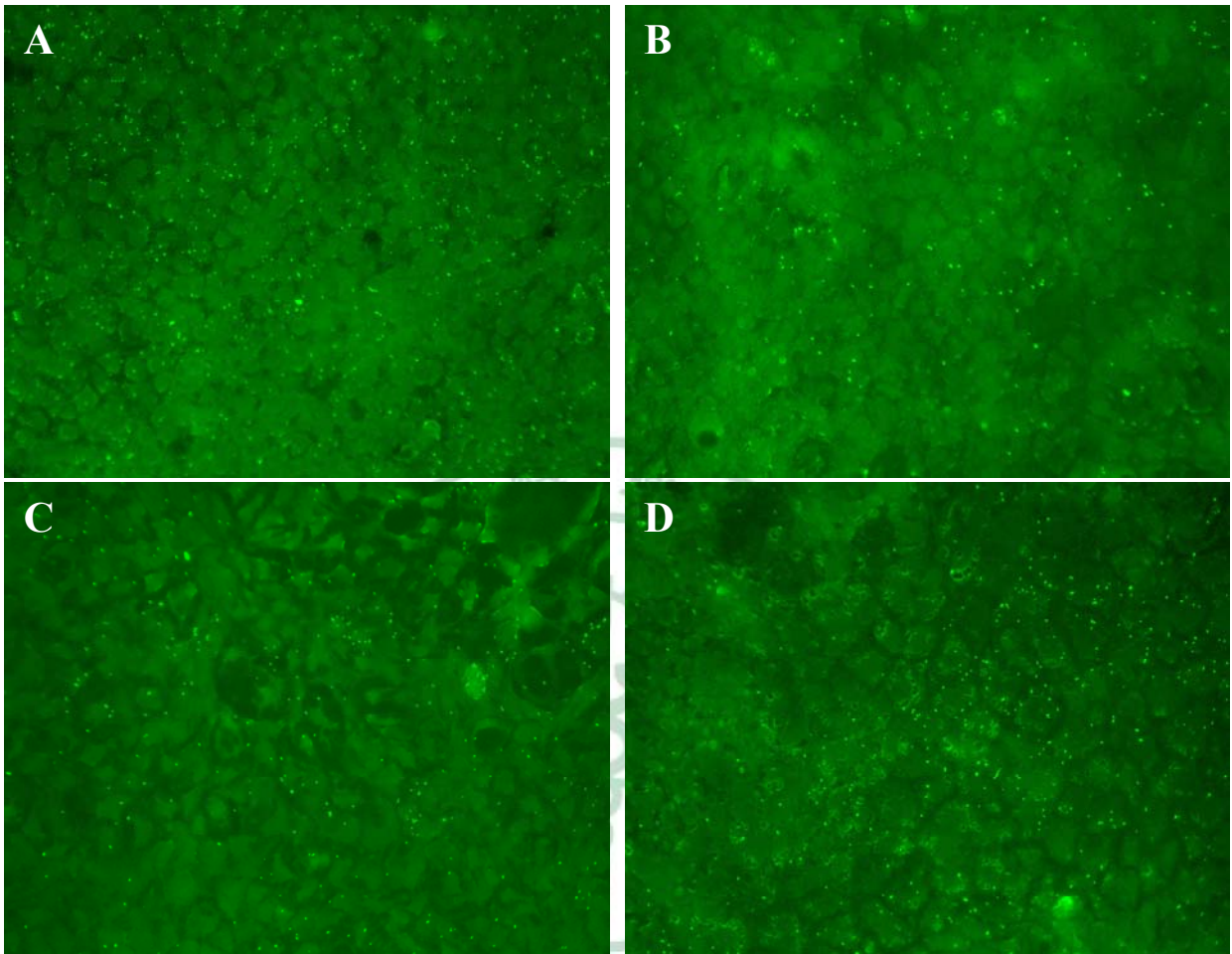


圖 4.10、預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液處理之乳酸菌取代螢光染色 *C. perfringens* 吸附之螢光顯微鏡照相圖。(A)LAB-free 組，螢光染色 *C. perfringens*；添加酸、膽鹽連續處理之(B) *L. acidophilus*；(C)添加 *B. bifidum*；(D)添加 *L. paracasei*

Fig. 4.10. Fluorescent microscopic photographs representing the displacement effect of the tested LAB (pretreated with pH 4 acid solution and then 0.1% bile) on the adhesion of pre-adhered FITC-labeled *C. perfringens*. (A) FITC-labeled *C. perfringens* (LAB-free group), FITC-labeled *C. perfringens* treated with (B) *L. acidophilus*; (C) *B. bifidum*; (D) *L. paracasei*, respectively

Gueimonde *et al.*, 2006)。Lee *et al.* (2003)研究中發現，益生菌取代病原菌株之作用(displacement effect)與其本身競爭及預防吸附(adherence inhibition)之能力是有差異的，且通常在與病原菌競爭排除試驗上，取代病原菌吸附之效果通常比預防其吸附之效果來的低，本研究也發現了相似的結果(圖 4.5，圖 4.8)。

第四節 β -半乳糖苷酶活性

各試驗乳酸菌株分別經 pH 2, 3, 4 酸液及 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽連續作用後之 β -半乳糖苷酶活性如表 4.6 所示。由結果得知各試驗菌株在相同 pH 值作用條件下，其 β -半乳糖苷酶活性隨著膽鹽濃度增加也增加。

許多文獻指出膽鹽會破壞菌體細胞膜上雙層脂質結構，使細胞膜受到傷害(Adamowicz *et al.*, 1991; Flahaut *et al.*, 1996)，造成細胞膜通透性增加(Noh and Gilliland, 1993; de Valdez *et al.*, 1997)，致使測得之 β -半乳糖苷酶活性也增加，因此可藉由測定 β -半乳糖苷酶活性來判斷細胞膜受破壞之程度。Taranto *et al.* (2006)探討不同濃度膽鹽對 *L. reuteri* CRL 1098 細胞膜通透性之影響，結果發現其 β -半乳糖苷酶活性隨著膽鹽濃度之提高而增加，而本研究也發現類似之結果。

此外，隨作用酸液 pH 值降低 β -半乳糖苷酶活性也下降，推測可

表 4.6、各試驗乳酸菌株以 pH 2, 3, 4 分別處理 3 hr 後再連續以 0.1, 0.2, 0.3%膽鹽分別處理 3 hr 後之 β -半乳糖苷酶活性($\mu\text{mol/ml}$)

Table 4.6. β - galactosidase activity ($\mu\text{mol/ml}$) of the tested strains after the treatment of acid (pH 2, pH 3, pH 4) and then bile salt (0.1, 0.2, 0.3%), respectively.

Strain	control*	pH 2			pH 3			pH 4		
		0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%	0.3%
<i>L. acidophilus</i>	0.085 ^{aw}	0.142 ^{ax}	0.319 ^{ay}	0.346 ^{by}	0.366 ^{ax}	0.685 ^{ay}	0.763 ^{ay}	0.680 ^{ax}	0.941 ^{ay}	1.024 ^{ay}
<i>B. bifidum</i>	0.074 ^{aw}	0.272 ^{ax}	0.293 ^{ax}	0.424 ^{ay}	0.325 ^{ax}	0.403 ^{ay}	0.533 ^{ay}	0.398 ^{bx}	0.810 ^{ay}	1.066 ^{az}
<i>L. paracasei</i>	0.058 ^{aw}	0.095 ^{ax}	0.236 ^{ay}	0.319 ^{az}	0.116 ^{bx}	0.335 ^{by}	0.450 ^{by}	0.178 ^{bx}	0.429 ^{by}	0.439 ^{by}

*Control: β - galactosidase activity without the action of acid and then bile salt.

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

^{w-z} Different letters within a row are significantly different from the control at the same pH value ($p < 0.05$).

能原因為不同 pH 值酸液導致菌體死亡程度不一，並使 β -半乳糖苷酶失去活性所造成之結果；較低 pH 值酸液之乳酸菌存活菌數較低，而已死亡之菌體無法表現其受損細胞膜之 β -半乳糖苷酶活性，因而所測得 β -半乳糖苷酶活性較低。

第五節 菌株安全性評估

各試驗乳酸菌株對 Caco-2 cell 之侵入百分比如表 4.7 所示，由結果可知本研究中所試驗之乳酸菌株均對 Caco-2 cell 不具侵入性。另外，將試驗菌株以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽溶液連續作用後，各試驗菌株對 Caco-2 cell 之侵入百分比如表 4.8 所示，由結果發現將乳酸菌以模擬胃腸道條件作用後之乳酸菌仍對 Caco-2 cell 不具侵入性，因此可進一步推論本試驗所使用之菌株對人體具安全性，不具侵襲人體腸道細胞之危險性。

行政院衛生署公告可做為食品原料或食品加工使用之微生物包括本研究中所使用的三種乳酸菌—*L. acidophilus*、*B. bifidum*、*L. paracasei* (# 2.)。具侵襲力的致病菌能突破宿主黏膜屏障，侵入體內定殖造成腸道疾病，因此成為益生菌之條件必須具有吸附人類腸道細胞之能力，但不能具有腸道細胞侵入性，若菌株具侵入性可能同時擁有相當程度之病原性與感染性(Ford *et al.*, 1996; Urao *et al.*, 1996)。

表 4.7、各試驗乳酸菌株侵入 Caco-2 cells 之百分比

Table 4.7. Invasion rate of the tested LAB

Strain	Invasion rate (%)
<i>L. acidophilus</i>	N.D.*
<i>B. bifidum</i>	N.D.
<i>L. paracasei</i>	N.D.

*N.D.: not detected.

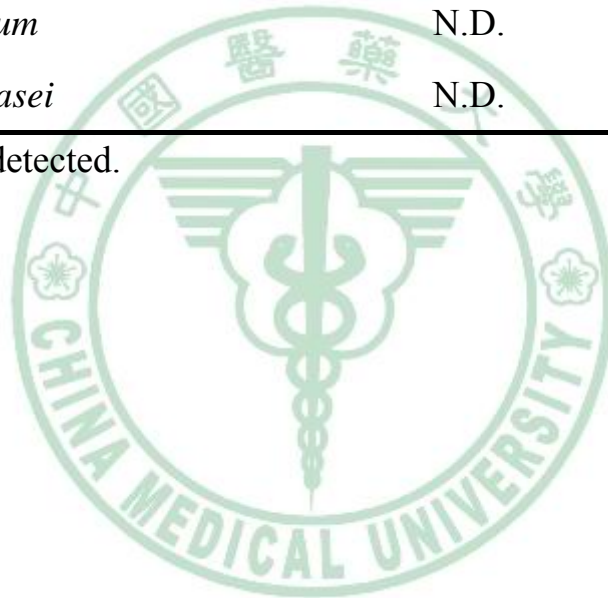
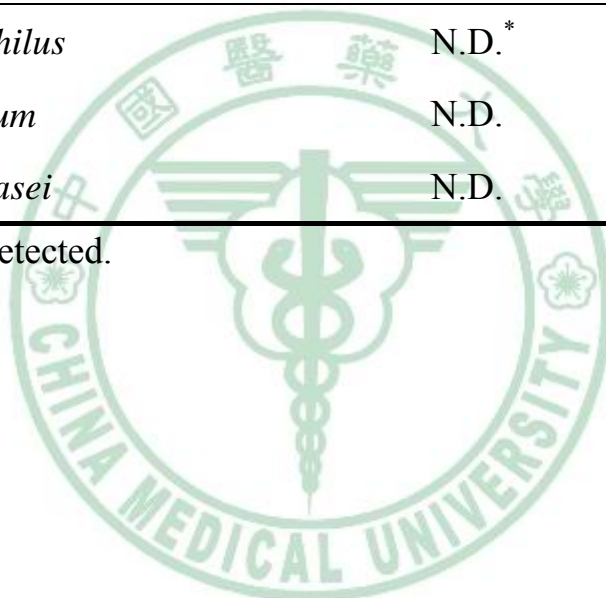


表 4.8、各試驗乳酸菌株經 pH 4 酸液作用 3 hr 後再以 0.1% 膽鹽
連續處理 3 hr 後侵入 Caco-2 cells 之百分比

Table 4.8. Invasion rate of the tested LAB after being treated with pH 4
acid solution for 3 hr and then 0.1% bile for 3 hr continually

Strain	Invasion rate (%)
<i>L. acidophilus</i>	N.D.*
<i>B. bifidum</i>	N.D.
<i>L. paracasei</i>	N.D.

*N.D.: not detected.



第五章 結論

本研究利用 *L. acidophilus* BCRC 10695, *B. bifidum* BCRC 14615, *L. paracasei* BCRC 14023 作為試驗菌株，探討益生菌經酸及膽鹽作用後其耐受性、模擬腸道吸附性、拮抗 *C. perfringens* BCRC 13019 之能力及菌株安全性等基礎益生性質，及菌株受模擬腸胃道不良環境因子條件作用後對其細胞膜完整性之影響，總結試驗結果如下：

- (1)所有試驗乳酸菌株於酸及膽鹽之個別試驗中，*L. acidophilus* 表現最佳耐酸性，*L. paracasei* 表現最佳膽鹽耐受性；而結合酸與膽鹽之連續性試驗結果，所有試驗菌株於 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽之連續作用下，具有最高之存活率。
- (2)未經酸及膽鹽作用之 *L. acidophilus* 擁有最佳吸附能力(8.28%)；經不同濃度之酸及膽鹽溶液作用後，所有試驗菌株僅於 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽條件作用後存活之乳酸菌仍保有吸附能力，且其吸附能力大於未經酸及膽鹽作用者；其中又以 *L. paracasei* 擁有最佳之吸附能力(80.68%)。
- (3)本研究結果推論，低 pH 值與高濃度膽鹽會導致乳酸菌株存活率下降，且其造成之傷害會使菌株喪失其吸附能力。
- (4)預防 *C. perfringens* 侵襲腸道之吸附抑制試驗，不論 *C. perfringens* 是否預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用，試驗乳酸菌株皆可有效預

防 *C. perfringens* 侵襲腸道細胞，且乳酸菌對預先以酸及膽鹽處理之病原菌具有較佳但未達顯著性之拮抗能力。

(5) 取代 *C. perfringens* 吸附於腸道細胞之試驗結果顯示，不論乳酸菌是否預先以 pH 4 酸液及 0.1% 膽鹽連續作用，試驗菌株皆可有效降低預先吸附於 Caco-2 cell 上 *C. perfringens* 之吸附率，因此達到取代 *C. perfringens* 吸附於腸道細胞之效果；但經模擬胃腸道條件作用後之乳酸菌其拮抗能力略低於未經作用之乳酸菌。

(6) β -半乳糖苷酶活性試驗結果得知，隨著膽鹽濃度之提高 β -半乳糖苷酶活性也增加，顯示菌體細胞膜可能遭受之破壞程度隨膽鹽濃度提高而增加。

(7) 生體外試驗得知不論是否經酸與膽鹽作用，*L. acidophilus*、*B. bifidum*、*L. paracasei* 皆不具細胞侵入性，因此初步推論其對人體腸道不具侵襲性。

(8) 本研究結果顯示，以酸及膽鹽作為模擬胃腸道之環境條件用以探討乳酸菌經上述條件作用後之益生性質表現，應為一適當可行之生體外試驗評估模式。

參考文獻

- 李福臨 (2000) 乳酸菌分類之研究近況。食品工業 32(8): 36-42。
- 廖啟成 (1998) 乳酸菌之分類及應用。食品工業 30(2): 1-10。
- 顏文俊 (1991) 腸內菌群與人體健康。食品工業 23: 1-4。
- 陳佩玉 (2006) 菊糖有孢子乳桿菌潛在益生功效的研究。中國醫藥大學營養學系碩士論文，台中。
- 蕭孟芳 (2004) 圖解微生物學，pp. 210-213。合記圖書出版社，台北。
- 王孟群 (1999) 實用微生物學實驗，pp. 130-134。九州圖書，台北。
- 林文郁 (2001) 乳酸菌和雙叉乳桿菌益生特性之探討。中興大學畜產學系碩士論文，台中。
- Acharya, M. R. and Shah, R. K. (2002) Selection of human isolates of Bifidobacteria for their use as probiotics. Applied Biochemistry and Biotechnology 102: 81-98.
- Adamowicz, M., Kelley, P., and Nickerson, K. (1991) Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 173: 229-233.
- Anderson, J. W. and Gilliland, S. E. (1999) Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. Journal of the American College of Nutrition 18: 43-50.
- Annika, M. M., Manninen, M. and Gylienbery, H. (1983) The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. Journal of Applied Bacteriology 55: 241-245.
- 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.
- Beachy, E. H. (1981) Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases* 143: 325-345.
- Bearson, S., Bearson, B., and Foster, J. W. (1997) Acid stress responses in Enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 147: 173-180.
- Berent-Camard, M. F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L., and Hudault, S. (1997) The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2747-2753.
- 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.
- 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.

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.

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.

Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., and Rambaud, J. C. (1992) Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102: 875-878.

Brynstad, S. and Granum, P. E. (2002) *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74: 195-202.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84: 759-768.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., and Collins, J. K. (1998b) Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology* 51(4): 123-136.

Chateau, N., Deschamps, A. M., and HadjSassi, A. (1994) Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology* 18: 42-44.

Chauviere, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B., and Servin, A. L. (1992a) Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (EHEC) from enterocyte-like Caco-2 cells in culture. *FEMS Microbiology Letter* 91: 213-218.

Chauviere, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Fourniat, J., and Servin, L.

- (1992b) Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology* 138: 1689-1696.
- Chou, L. S. and Weimer, B. (1999) Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 82: 23-31.
- Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L., and Ji, G. E. (1999) Screening and selection of acid and bile resistant Bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 47: 25-32.
- Coconnier, M. H., Bernet, M. F., Kernéis, S., Chauvière, G., Fourniat, J., and Servin, A. L. (1993) 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.
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Camard, M. F. B., Hudalt, S., and Servin, A. L. (1997) Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5: 1046-1052.
- Collins, M. D. and Gibson, G. R. (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition* 69 (suppl): 1052s-1057s.
- 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.
- Cross, M. L., Stevenson, L. M., and Gill, H. S. (2001) Anti-allergy

properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *International Immunopharmacology* 1: 891-901.

Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 443-459.

de Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. T. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.

de Valdez, G. F., Martos, G., Taranto, M. P., Lorca, G. L., Oliver, G., and de Ruiz Holgado, A. P. (1997) Influence of bile on β -galactosidase activity and cell viability of *Lactobacillus reuteri* when subjected to freeze-drying. *Journal of Dairy Science* 80: 1955-1958.

de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. (2001) Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (suppl): 421S-429S.

de Vrese, M. and Schrezenmeir, J. (2002) Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *British Journal of Nutrition* 88 (suppl): 59s-66s.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., and Collins, J. K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 386S-392S.

Elmadfa, I., Heinzle, C., Majchrzak, D., and Foissy, H. (2001) Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamins B(1), B(2) and B(6) in the healthy adult human. *Annals of Nutrition & Metabolism* 45: 13-18.

Fávaro-Trindade, C. S. and Grosso, C. R. F. (2002) Microencapsulation of *L. acidophilus* La-05 and *B. lactis* Bb-12 and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation* 19 (4): 485-494.

- Felley, C. and Michetti, P. (2003) Probiotics and *Helicobacter pylori*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 17: 785-791.
- 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. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 136-169.
- Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996) Comparison of the bile salts and sodium dodecylsulfate stress response in *Enterococcus faecalis*. Applied and Environmental Microbiology 62: 2416-2420.
- Fooks, L. J. and Gibson, G. R. (2002) Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition 88: 39s-49s.
- 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.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T., 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. and Brooker, B. E. (1974) Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. American Journal of clinical Nutrition 27: 1305-1312.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in men and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Blay, G. L., Fliss, I. (2004) In vitro inhibition of

Escherichia coli O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. International Journal of Food Microbiology 92: 69-78.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J. M., and Hugas, M. (1998) Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. Journal of Applied Microbiology 84: 125-132.

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.

Gilliland, S. E., Staley, T. E., and Bush, L. J. (1984) Importance of bile tolerance of *Lb. acidophilus* used as a dietary adjunct. Journal of Dairy Science 67: 3045-3051.

Gilliland, S. E. and Walker, D. K. (1990) Factors to consider when selecting a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. Journal of Dairy Science 73: 905-911.

Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., and Salminen, S. (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. Digestive Diseases and Sciences 37: 121-128.

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 enterotoxigenic *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology 67: 207-216.

Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M., and Salminen, S. (2006) Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. Food Research International 39: 467-471.

- 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.
- 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. *Journal of Cell Biology* 101: 838-851.
- Havenaar, R., Brink, N. G., and Huis In't Ved, J. H. J. (1992) Selection of strains for probiotics use. In *Probiotics, The Scientific Basis* ed. Fuller, R. pp. 210-224. London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall.
- Hekmat, S. and McMahon, D. J. (1992) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science* 75: 1415-1422.
- Holzappel, W. H., Haberer, H., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J. H. J. (1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101.
- Homma, H. and Shinohara, T. (2004) Effects of probiotic *Bacillus cereus toyoi* on abdominal fat accumulation in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Science Journal* 75: 37-41.
- Hose, H. and Sozzi, T. (1991) Probiotics, fact or fiction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 51: 540-544.
- Huang, Y. and Adams, M. C. (2004) In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology* 91: 253-260.
- Hudault, S., Liévin, 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.

- 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.
- Hütt, P., Shchepetova, J., Lõivukene, K., Kullisaar, T., and Mikeleaar, M. (2006) Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1324-1332.
- Hyronimus, B., Marrec, C. L., Sassi, A. H., and Deschamps, A. (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 31: 193-197.
- Insel, P., Turner, R. E., and Ross, D. (2001) Nutrition. In digestion and absorption. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA, pp. 64-97.
- Ishida, Y., Nakamura, F., Kanzato, H., Sawada, D., Yamamoto, N., Kagata, H., Oh-Ida, M., Takeuchi, H., and Fujiwara, S. (2005) Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: a randomized placebo-controlled trial. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 1652-1660.
- Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., and Salminen, S. (2002) Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50 (suppl): 54-59.
- 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., Ho, Y. W., Abdullah, N., and Jalaludin, S. (1998) Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science* 77: 1259-1265.
- Juntunen, M., Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., and Isolauri, E. (2001) Adherence of probiotic bacteria to human intestinal

mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 293-296.

Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N. M., Ohmomo, S., and Okamoto, T. (1999) Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology* 29: 313-316.

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.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *International Dairy Journal* 13: 3-13.

Krieg, N. R. and Holt, J. G. (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 2: 1179-1182.

Kullisaar, T., Songisepp, E., Mikelsaar, M., Zilmer, K., Vihalemm, T., and Zilmer, M. (2003) Antioxidative probiotic fermented goat's milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition* 90: 449-456.

Lankaputhra, W. E. A. and Shah, N. P. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal* 30: 2-7.

Laroia, S. and Martin, J. H. (1990) Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products- a review. *Cultured Dairy Products Journal* 25: 18-22.

Lee, Y. K., Lim, C. Y., Teng, W. L., Ouwehand A. C., Tuomola, E. M., and Salminen, S. (2000) Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3692-3697.

- Lee, Y. K., and Puong, K. Y. (2002) Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition* 88: S101-S108.
- 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., Puong, K. Y., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003) Displacement of bacterial pathogen from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 52: 925-930.
- Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J-R, and Servin, A. L. (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47: 646-652.
- Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lim, H. J., Kim, S. Y., and Lee, W. K. (2004) Isolation of Cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of Veterinary Science* 5: 391-395.
- 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.
- Ling, W. H., Korpela, R., Mykkänen, H., Salminen, S., and Hänninen, O. (1994) *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *Journal of Nutrition* 124: 18-23.
- 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.
- Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E. R. (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 99: 287-296.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., and Vesikari, T. (1995) Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 20: 333-338.
- 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.
- Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., and Schrezenmeir, J. (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 430s-436s.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis In't veld, J. H. J. (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effect of bile. *Journal of Dairy Science* 80: 1031-1037.
- Marzotto, M., Maffeis, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzotti, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F., and Torriani, S. (2006) *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Research in Microbiology* 157: 857-866.
- Matijašić, B. B., Narat, M., Peternel, M. Z., and Rogelj, I. (2006) Ability of *Lactobacillus gasseri* 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., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., and Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12: 173-182.

Mayara-Makinen, A., Manninen, M., and Gyllenberg, H. (1983) The adhesion of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pig and calves. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 241-245.

McLauchlan, G., Fullarton, G. M., Crean, G. P., and McColl, K. E. L. (1989) Comparison of the gastric body and antral pH: a 24 hour ambulatory study in healthy volunteers. *Gut* 30: 573-578.

Mitsuoka, T. (1990) Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology* 6: 263-268.

Morelli, L. (2000) In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issue in Intestinal Microbiology* 1: 59-67.

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.

Morotomi, M. and Mutai, M. (1986) In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *Journal of National Cancer Institute* 77: 195-201.

Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., and Otori, 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.

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.

- Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 59: 338-356.
- 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. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 467-474.
- Noh, D. O. and Gilliland, S. E. (1993) Influence of bile on cellular integrity and β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76: 1253-1259.
- Noriega, L., Gueimoede, M., Sanchez, B., Margolles, A., and de los Reyes-Gavilan, C. G. (2004) Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross resistance to bile salt in *Bifidobacterium*. *International of Food Microbiology* 94: 79-86.
- Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., Martín, R., López-Huertas, E., Rodríguez, J. M., and Xaus, J. (2006) Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* 107: 104-111.
- O'Sullivan, M. G., Thornton, G., O'Sullivan, G. C., and Collins, J.K. (1992) Proiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology* 3: 309-314.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., and Salminen, S. (1999c) Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9: 43-52.
- Parker, R. B. (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health* 29: 4-8.
- Peng, G. C. and Hsu, C. H. (2005) The efficacy and safety of heat-killed

Lactobacillus paracasei for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatric Allergy and Immunology* 16: 433-438.

Pereira, D. I. and Gibson, G. R. (2002) Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4689-4693.

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., Kedinger, M. D., Triadou, M., Dussaulx, N., Lacroix, E., Simon-Assmann, B., Haffen, P., 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.

Pouchart, P., Marteau, P., Bouhnik, Y., Goderel, I., Bourlioux, P., and Rambaud, C-C. (1992) Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition* 55: 78-80.

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.

Pyrttek, L. J. and Bartus, S. H. (1962) *Clostridium welchii* infection complicating biliary-tract surgery. *New England Journal of Medicine* 266: 689-693.

Reid, G. (2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 437s-443s.

Reid, G. and Bruce, A. W. (2006) Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World Journal of Urology* 24: 28-32.

- Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, R. and Cook, R. L. (1988) *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 344-351.
- Rolfe, D. R. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* 130: 396S-402S.
- Saarela, 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.
- Salminen, S., Ouwehand, A. C., and Isolauri, E. (1998) Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 8: 563-572.
- 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.
- Savage, D. C. (1983) Mechanisms by which indigenous micro-organisms colonize gastrointestinal epithelial surfaces. *Progress in Food & Nutrition Science* 7: 65-75.
- Saxelin, M. (1997) *Lactobacillus* GG- a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International* 13: 293-313.
- Schultz-Larsen, F. S. and Hanifin, J. M. (1992) Secular change in the occurrence of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* 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.

Shimada, K., Takashi, I., and Yamashiro, M. (1977) Anaerobic bacteria in biliary disease in elderly patients. *Journal of Infectious Diseases* 135: 850-854.

Sjovall, J. (1959) On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption bile acids and steroids 74. *Acta physiologia Scandinavia* 46: 339-345.

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.

Sreekumar, O. and Hosono, A. (1998) Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *Journal of Dairy Science* 81: 1508-1516.

Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K., and Gibson, G. R. (2000) Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 13: 229-254.

Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S., and Maric, V. (1997) *L. acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft* 52: 430-435.

Takahashi, N., Xiao, J. Z., Miyaji, K., Yaeshiima, T., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S., and Hosono, A. (2004) Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research* 71: 340-345.

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.

- Tannock, G. W. (1995) Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5: 1059-1070.
- Taranto, M. P., Perez-Martinez, G., and de Valdez, G. F. (2006) Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology* 157: 720-725.
- 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.
- Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., and Holzapfel, 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., 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.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Hyyrynen, J., Korpela, R., Karhunen, M. L., Mikkola, L., Jauhiainen, T., Seppo, L., and Nissinen, A. (2004) Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension* 18: 795-802.
- 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.
- 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.

- 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.
- Vinderola, C. 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.
- Wadsröm, T., Hirno, S., Novak, H., Guzman, A., Ringnér-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.
- Wang, D. and Sakakibara, M. (1997) Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry* 4: 255-261.
- Wang, X., Brown, I. L., Evans, A. J., and Conway, P. L. (1999) The protective effects of high amylose maize (amylomalize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 87: 631-639.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G. and Pool-Zobel, B. L. (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 451s-455s.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. (2000) Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology* 17: 205-215.
- Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F., and Fukushima, Y. (2006) Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the

probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. British Journal of Nutrition 95: 303-312.

Yanagiad, F., Suzuki, K.-I., Kozaki, M., and Komagata, K. (1997) Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* supsp. *nakayamae* sp. nov., supsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* supsp. *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(9): 1214-1221.

Ziemer, C. J. and Gibson, G. R. (1998) An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. International Dairy Journal 8: 473-479.

Zhang, X. B. and Ohta, Y. (1993) Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole. Canadian Journal of Microbiology 39: 841-845.

Zhang, G., Darius, S., Smith, S. R., and Ritchie, S. J. (2006) In vitro inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α -toxin production. Letters in Applied Microbiology 42: 138-143.

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, Vol. IV: 223-255.

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

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

