

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

佳作

040702

乳酸菌的逆襲－細菌素抗菌作用之探討

學校名稱：國立宜蘭高級中學

作者： 高二 呂怡萱 高二 林博元 高二 楊宗翰	指導老師： 黃國修
---	------------------

關鍵詞：乳酸菌、細菌素(bacteriocin)、抑菌能力

摘要

本研究從生活中常見的 20 種乳酸菌種，篩選出對大腸桿菌有較強抗菌力且在生活中常見的兩種乳酸菌：乳酸鏈球菌 (*Lactococcus lactis subsp. Lactis*, 簡稱 LL) 及嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*, 簡稱 LA)。經大量培養乳酸菌並進行蛋白質過濾與純化後，進行抗菌測試，結果顯示 LL 及 LA 之菌液均具抑菌能力，而後以蛋白質電泳確認介於 3-11kDa 間的蛋白質溶液具有良好抗菌能力，且抑菌力隨濃度增加而提升，故推測兩種細菌素的分子量均介於此區間。

將兩種細菌素進行基本特性分析後發現，兩種細菌素濃度均僅須大約 0.1mg/ml 以上就具有抗菌效果，且兩種細菌素溶液在 120°C 下加熱 30 分鐘都仍具抑菌能力；此兩種細菌素在酸性環境 (pH=2~4) 下有較佳的抑菌能力，且兩種細菌素憑藉其微量就具有抑菌能力，耐高溫、耐酸的特性未來將有應用於食品保存，製成天然防腐劑的潛力。

壹、 研究動機

在高二下應用生物中，我們了解到微生物在食品工業上的利用並進行相關實驗操作，在進行乳酸菌實驗後、清洗實驗容器時，發現有些錐形瓶中長出一些微生物，有些則沒有。因此便引發我們的思考：**是否有些乳酸菌在生長過程中分泌物質，抑制細菌或微生物的生長？**在查過資料後，我們推論可能是**細菌素 (bacteriocin)**的作用造成此一結果。細菌素是一種具抑菌能力的簡單蛋白質分子，現今最為人知的乳酸菌細菌素為乳酸鏈球菌(*Lactococcus lactis*)中提煉出來的 **nisin**。我們希望找尋其他同樣能產生細菌素的乳酸菌，並進一步探討其特性與應用。

為了延長保存期限，食品中常會添加防腐劑來延遲微生物生長或化學變化引起的腐敗。然而現今市面上的防腐劑大多是經由化學合成，長期食用對人體會產生影響。是否有能替代防腐劑且安全無虞的物質呢？細菌素為結構簡單的蛋白質，對人體沒有毒性，在身體中能被輕易分解，因此我們期待能將其用於食品保存等用途上，透過細菌素的各種優點，取代有種種疑慮的化學合成防腐劑。

我們希望運用抗菌實驗測試乳酸菌與其生產的物質對大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的抑菌能力，並純化細菌素，探討其特性，以探究其應用於食品保存等用途上的可能性。

貳、 研究目的

- 一、 藉由抗菌實驗，找出能抗大腸桿菌的乳酸菌菌種。
- 二、 利用自製蛋白質純化器材，製備細菌素，並探究細菌素的分子量區間。
- 三、 找出具較佳抑菌能力的細菌素濃度，並探討不同濃度對抗大腸桿菌能力的影響。
- 四、 不同 pH 值與溫度對乳酸菌細菌素抑菌能力之影響。

參、 研究設備與器材

表 1 實驗設備一覽表

實驗設備		
無菌操作台	滅菌釜	錯流式過濾濃縮卡茨
離心機	相機	迷你蛋白質垂直電泳槽
恆溫箱	冰箱	ELISA reader 光度計
電子天平	加熱器	

表 2 實驗器材一覽表

實驗器材			
酒精燈	打洞機	培養皿	保鮮膜
鑷子	濾紙	離心管	鋁箔紙
微量滴管	塑膠滴管	游標尺	蒸餾水
試管	量筒	玻璃棒	酒精
塗菌棒	封口膠膜 parafilm	96 孔盤	pH pen

➤ 乳酸菌 (Lactic acid bacteria)

乳酸菌為能利用碳水化合物進行發酵產生多量乳酸之細菌總稱。本研究所使用的菌種如下表所示，以 MRS 培養基培養，生長溫度為 37°C。

表 3 乳酸菌菌種一覽表

編號	代號	乳酸菌菌種之學名
1	LPL	<i>Lactobacillus plantarum</i> B18
2	LDB	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Orla-Jensen) Weiss et al.
3	LC	<i>Lactobacillus casei</i>
4	LL	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lister) Schleifer et al.
5	BB	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (Tissier) Orla-Jensen
6	ST	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> (Orla-Jensen) Farrow and Collins
7	LP	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Collins et al.
8	LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Hansen) Collins et al.
9	LJ	<i>Lactobacillus johnsonii</i> Fujisawa et al.
10	LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Moro) Hansen and Møcquot
11	BI	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> (Reuter) Mattarelli et al.
12	LG	<i>Lactobacillus gasseri</i> Lauer and Kandler
13	LRF	<i>Lactobacillus reuteri</i> Kandler et al.

14	BL	<i>Bifidobacterium longum</i> Reuter
15	LS	<i>Lactobacillus salivarius</i> Rogosa et al.
16	LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Hansen) Collins et al.
17	LP28	<i>Lactobacillus plantarum</i> (strain 28)
18	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
19	LRT	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TCELL-1
20	LCS	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota strain

經由初步實驗後，我們選擇了下列兩株菌為研究對象，其在菌種中心的資料如下：

BCRC Number:	14079
Organism:	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Moro) Hansen and Mocquot
Author:	(Moro) Hansen and Mocquot
History:	<< FIRDI, Y. K. Lo L9
Source:	commercial yoghurt
Growth Conditions:	37°C
Biosafety Level:	1

圖 1 LA 菌種資料 (資料來源:<http://www.bcrc.firdi.org.tw/>)

BCRC Number:	10791
Organism:	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lister) Schleifer et al.
Synonymy:	<i>Streptococcus lactis</i>
Author:	(Lister) Schleifer et al.
History:	<< ATCC << R. P. Tittsler strain Berridge X13 (<i>Streptococcus lactis</i>)
Other Collection No.:	ATCC 11454 ;DSM 20729 ;NCDO 496 ;NCIMB 8586
Characterization:	Production of nisin
Others:	used in Swiss cheese manufacture to suppress gas production by clostridia
Growth Conditions:	37°C
Biosafety Level:	1

圖 2 LL 菌種資料 (資料來源:<http://www.bcrc.firdi.org.tw/>)

乳酸鏈球菌 (LL)，是已知可生產 nisin(又稱乳酸鏈球菌素)的乳酸菌，此種細菌素在國外已被廣泛使用，但國內的使用並不普遍。

➤ 大腸桿菌 *E.coli* DH5α

大腸桿菌常存於生物體腸道內，大部分為非致病性，為人體正常菌叢。因安全性考

量因此我們實驗不使用致病性的大腸桿菌。E.coli DH5α 此一品系常用於 DNA 轉殖，以 LB 培養基培養，生長溫度為 37°C。

➤ MRS 培養基

一種富含營養的培養基，常用於培養乳酸菌。

表 4 MRS 培養基配方

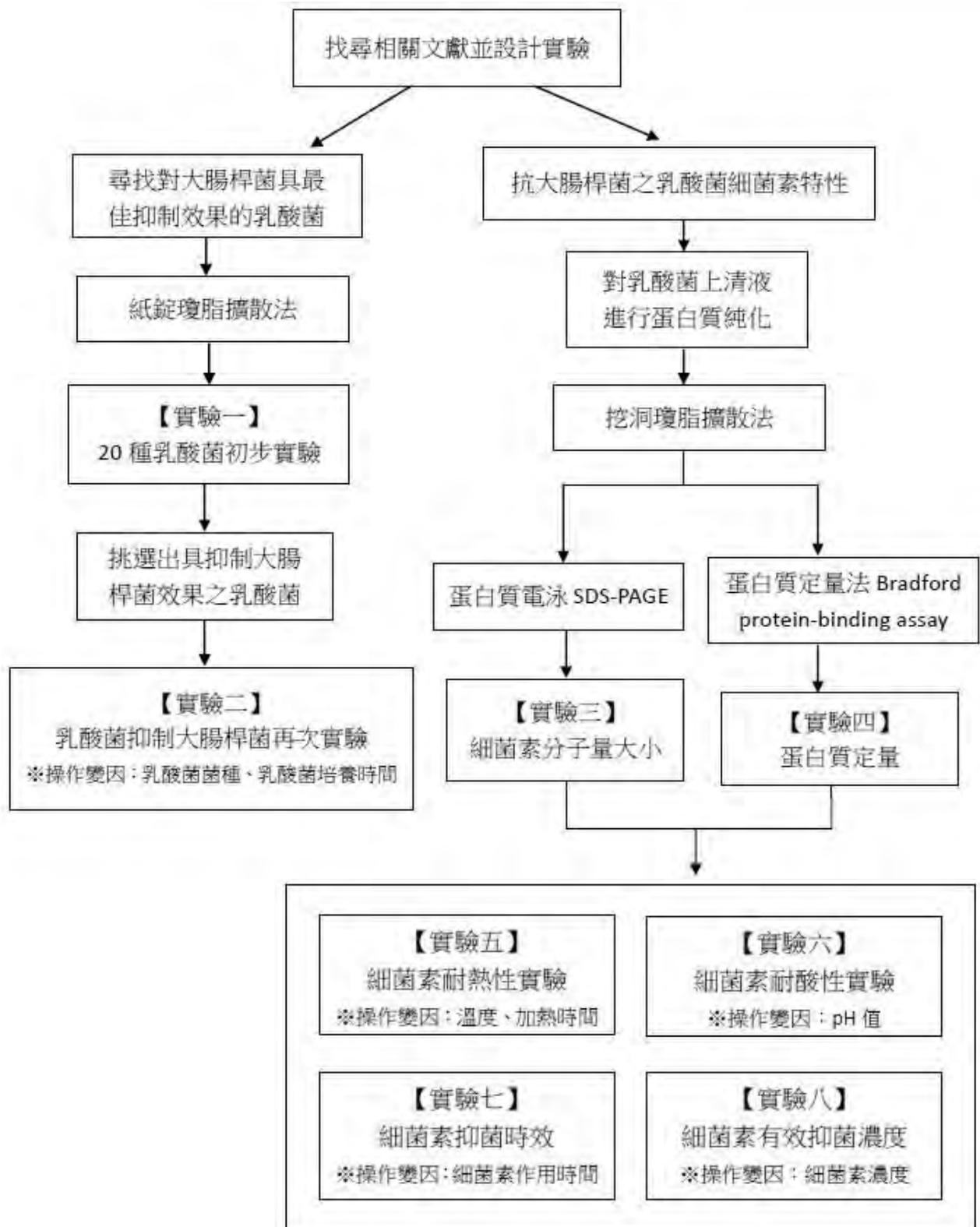
MRS培養基配方	
1.0% 蛋白胨	0.1% 聚山梨酯80 (吐溫80)
0.8% 肉類提取物	0.2% 磷酸氫二鉀
0.4% 酵母提取物	0.2% triammonium 檸檬酸
2.0% 葡萄糖	0.02% 七水硫酸鎂
0.5% 三水醋酸鈉	0.005% 硫酸錳水合物

◆ LB 培養基

常見的培養基，可用於培養大腸桿菌。

配方（一公升）：Tryptone 10g、Yeast extract 5g、NaCl 10g、Agar 1.5%

肆、 研究架構



伍、文獻回顧

一、 乳酸菌

乳酸菌為能利用碳水化合物進行發酵產生多量乳酸之細菌總稱。乳酸菌的營養需求較為複雜，除了碳水化合物外，乳酸菌需要各種各樣的胺基酸、維生素、礦物質等，以維持其生長。大部分乳酸菌為兼性厭氧菌，一般可於有氧環境下生長，但以無氧狀態生長較佳。乳酸菌與人體腸內菌相平衡有莫大的關聯性，近年來有研究指出乳酸菌具有排除致病菌、耐膽鹽、抗腫瘤、刺激活化免疫系統……等功用。

市面上有許多乳酸菌發酵製品與乳酸菌相關產品，例如養樂多（添加代田菌 *Lactobacillus casei Shirota*）、優酪乳（添加保加利亞乳桿菌 *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*、嗜熱鏈球菌 *Streptococcus thermophilus*）、添加乳酸菌的健康食品、菌粉等。就現況而言，國內較少使用乳酸菌細菌素，因此比較沒有相關的產品。

二、 細菌素

自然界中包括動、植物、昆蟲及細菌等，均可以產生天然的抗菌勝肽，其可用於人體、動物疾病、植物疾病或是食品中病菌的抗菌劑。而由細菌所產生的具抗菌能力的蛋白質（抗菌勝肽）通稱為細菌素（bacteriocin）。因為其為蛋白質，且對人體沒有毒性，在身體中能被輕易分解，可延長食物保存期，故具有被用作天然防腐劑的潛力。

細菌素是由細菌所產生的一種具抑菌能力、分子量較小的蛋白質。目前所發現的細菌素，其種類、特性多且複雜，現今大多依據 Tagg 在 1976 年所提出的細菌素定義：

- (1) 具生物活性之蛋白質
- (2) 抑菌範圍一般多限於與其本身血緣相近之菌屬或菌種
- (3) 產生細菌素之基因以及宿主細胞對細菌素之免疫基因皆位於質體上
- (4) 藉著可吸附到被抑制細胞的表面與細胞接受器結合而產生抑菌作用

乳酸菌所產生的細菌素一般能有效抑制格蘭氏陽性菌及陰性菌，但對酵母菌及黴菌較無抑制效果。乳酸菌所產生的細菌素能被人體腸道中的消化酵素分解，其**抑菌範圍比他種細菌所產生之細菌素還大**，因此在醫療保健、食品製程與保存上具發展潛力。一般產細菌素的乳酸菌均可於生長溫度下產生細菌素，而影響細菌素生成的因子包括培養溫度、培養時間、培養基的組成、起始 pH 值等許多因素。

乳酸菌細菌素的作用機制目前並未完全明瞭，僅知道一些乳酸菌細菌素可作用於細胞膜上，使細胞膜結構改變，最後導致菌體死亡。以 nisin（註 1）為例，nisin 可在細胞膜上形成

孔洞，使得胺基酸、鉀離子、氫離子、ADP、ATP 快速流失，最後導致菌體的死亡。另外也有一些細菌素與 nisin 的作用機制不相同，如 *Lactococcus lactis subsp cremoris* 346 所產生的 diplococcin 可使 DNA 與 RNA 的合成受阻，減少蛋白質的合成；*Lactobacillus helveticus* 27 所產生的 lactacin 27 可抑制細胞內蛋白質的合成，破壞細胞膜構造，但不影響 DNA、RNA 的合成等等。

註 1：乳酸鏈球菌 (*Lactococcus lactis*) 所產生、目前應用最廣的細菌素：nisin 是由 34 個胺基酸所組成，分子式是 $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ，分子量約為 3354 Da，通常以螺旋 (Screw-like) 結構存在，一般而言 nisin 常以二聚體 (Dimer) 及四聚體 (Tetramer) 形式存在。

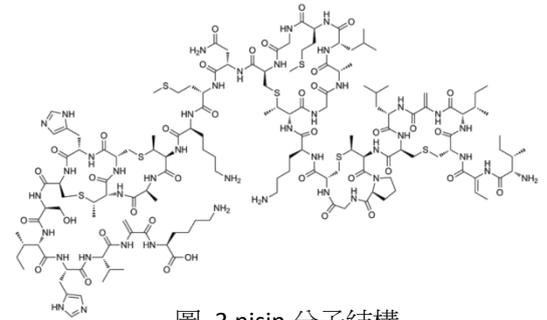


圖 3 nisin 分子結構

(圖片來源：<http://zh.wikipedia.org/>)

陸、研究過程或方法

◆ 研究方法

一、 乳酸菌培養

在適量 MRS 培養基中加入適當乳酸菌液，放入 37°C 培養箱培養，視實驗需要改變培養天數。將培養好的乳酸菌放入 4°C 冰箱冷藏保存，作為之後實驗菌種來源。

二、 抗菌實驗—紙錠瓊脂擴散法

1. 將大腸桿菌均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上
2. 放上以打孔機打好的直徑 6mm 圓形濾紙，滴上適量乳酸菌菌液（如右圖）
3. 置入 37°C 培養箱，培養後 24 小時後取出觀察抑菌圈大小

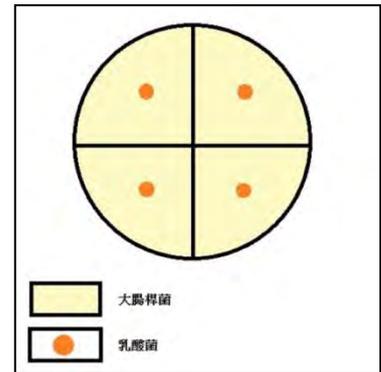


圖 4 抗菌實驗圖示

三、 抗菌實驗—挖洞瓊脂擴散法

1. 將大腸桿菌均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上
2. 用外徑 6mm 的玻璃棒在培養基上打洞後，滴入適量實驗樣本。
3. 置入 37°C 培養箱，培養後 24 小時後取出觀察抑菌圈大小

四、 蛋白質純化

【方法一】

1. 使用錯流式過濾濃縮卡茨（如下圖 5 裝置），將培養好的乳酸菌菌液通過 0.2 μ m 孔徑的濾心進行除菌。
2. 所得之濾液分別通過 30kDa、3kDa 的濾心，保留分子量介於 3~30kDa 之溶液。（從文獻得知細菌素分子量大於 3kDa、小於 30kDa）

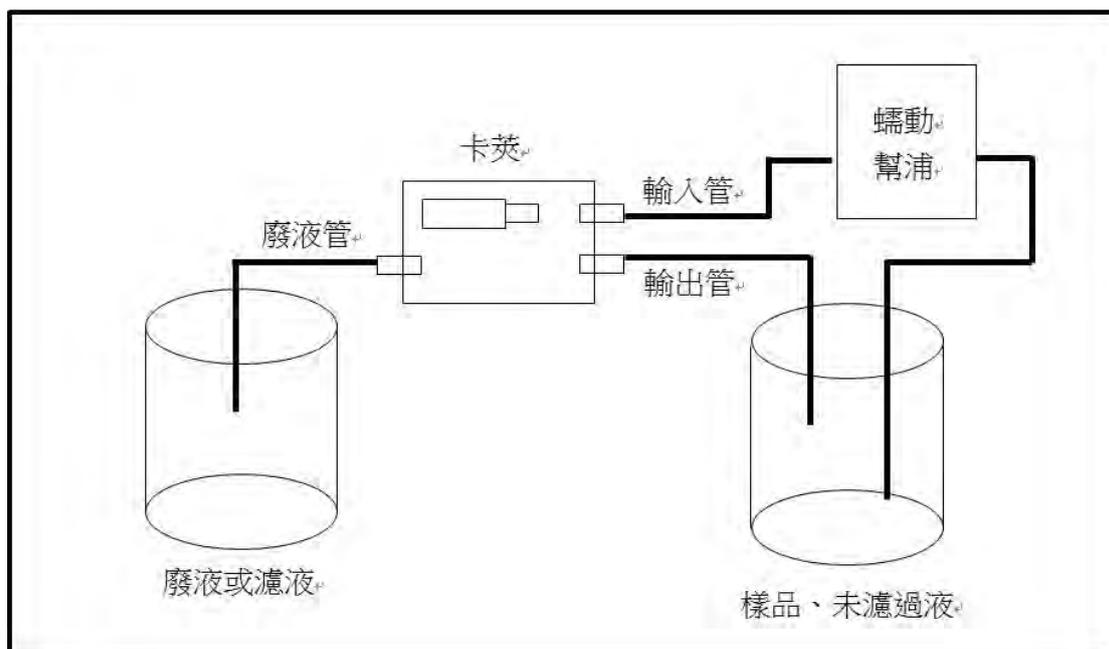


圖 5 蛋白質純化實驗裝置

【方法二】

1. 在除去乳酸菌的上清液中加入硫酸銨使蛋白質沉澱，利用高速離心的方式得到此一沉澱物，以蒸餾水將其溶解得到蛋白質溶液。
2. 以透析的方式除去蛋白質溶液中的鹽分。
3. 分別用 30kDa、5kDa 孔徑大小的濾膜以離心的方式進行超微薄膜過濾（註二）。
4. 分別保留分子量>30kDa 及介於 5kDa~30kDa 之蛋白質溶液

※註二：超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF) 為使用具有極小孔徑的薄膜，分離分子量不同的分子。薄膜上的小孔，只能讓某分子量以下的分子通過，可用於濃縮、脫鹽及無菌過濾。

五、 蛋白質定量—Bradford protein-binding assay

➤ 原理

利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CGB) 會與蛋白質結合的特性，在 CGB 與蛋白質結合後，CGB 的顏色會從茶色轉變成為藍色。此時在 595 nm 波長下會有較高的吸收，以便偵測。

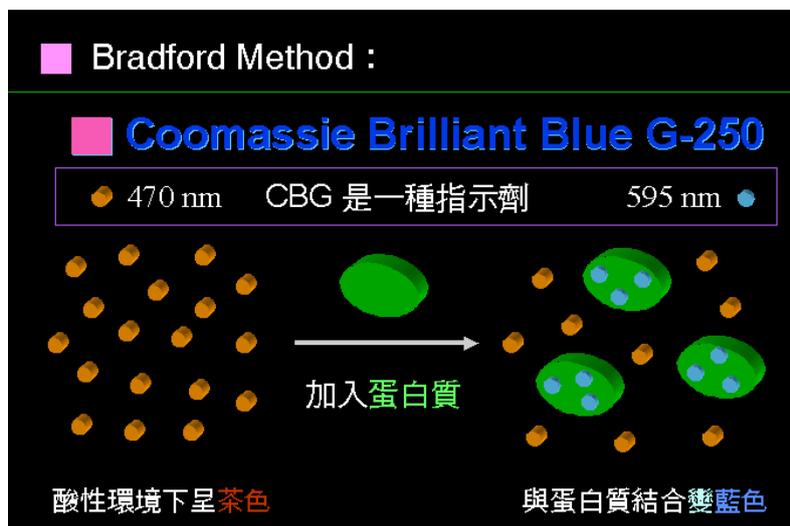


圖 6 CGB 會吸附到蛋白質分子上，並且變成藍色。

(圖片來源：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>)

CGB 類似指示劑，會在不同的酸鹼度下變色；在酸性下是茶色，在中性下為藍色。當 CGB 接到蛋白質上去的時候，因為蛋白質會提供 CGB 一個較為中性的環境，因此會變成藍色。當樣本中的蛋白質越多，吸到蛋白質上的 CGB 也多，藍色也會增強。因此，藍色的呈色強度，是與樣本中的蛋白質質量成正比。

➤ 步驟

1. 配置不同濃度的 BSA 標準溶液（如下表），並混合均勻。

試劑 (μl) \ 濃度 (mg/ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0
蛋白標準液 BSA(1mg/ml)	50	40	30	20	10	5	0
水	0	10	20	30	40	45	50

2. 將上述步驟所得之標準溶液 10μl 與 CGB 200ul 滴入 96 孔盤中（註：滴入 96 孔盤中之溶液皆各做三個降低誤差）
3. 另外將待測樣品（細菌素蛋白質溶液）10μl 與 CGB 200μl 滴入 96 孔盤中
4. 輕敲 96 孔盤邊緣使兩試劑混合均勻，並避免氣泡產生。
5. 於室溫下靜置 10 分鐘後，於 ELISA reader 光度計測 595 nm 吸光值

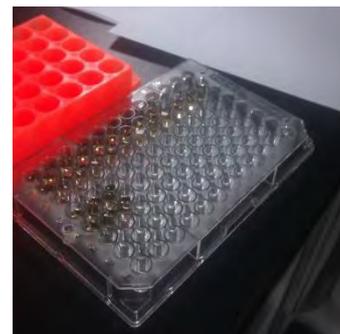


圖 7 96 孔盤

6. 紀錄 ELISA reader 光度計測得的 595 nm 吸光值。並依據 BSA 標準濃度及其吸光值繪製標準曲線圖。
7. 依據標準曲線圖估計樣品的蛋白質濃度。

六、 蛋白質電泳—SDS-PAGE

➤ 原理：

利用電場之牽引力，分離帶電物質。

PAGE（聚丙烯醯胺膠體電泳）是最普遍的蛋白質電泳方式。SDS（十二脂肪硫酸鈉）是界面活性劑，可使蛋白質變性，並在分子表面均勻佈上一層負電荷。因此在 SDS-PAGE 系統中，樣本分子的泳動率（mobility，帶電分子在電場中被電流移動的大小程度），僅取決於其分子量，故可用來測定蛋白質之分子量。

➤ 步驟：

1. 將樣本與 sample buffer 以 2:1 的比例混合，並在 100°C 下加熱五分鐘
2. 將電泳膠片放入電泳槽後，加入緩衝液
3. 依序在 well（電泳槽上加入樣本的凹槽）中加入 15 μ l 上述步驟所配的溶液
4. 打開電泳之電源，以 100V 進行電泳
5. 取出電泳膠並將其染色，最後利用去染溶液（醋酸+甲醇）將其去染，直到可清楚看到蛋白質標準品為止

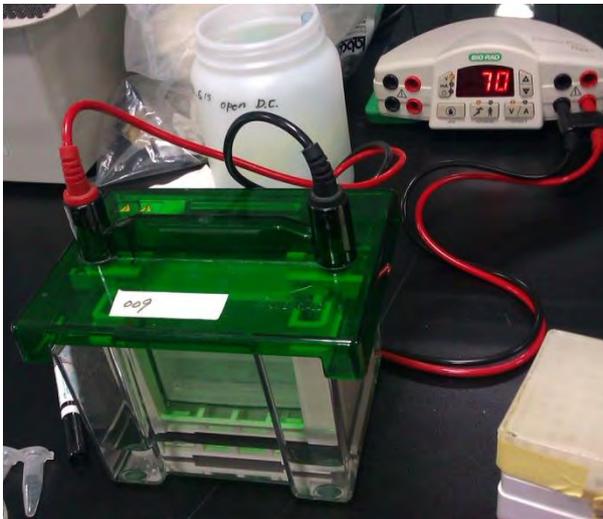


圖 9 電泳實驗裝置

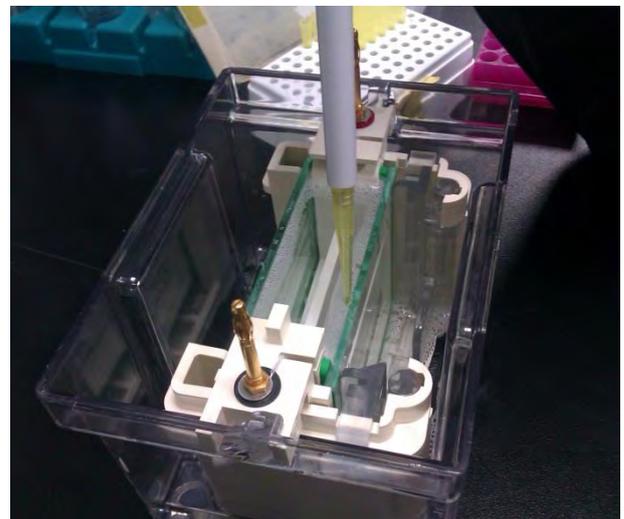


圖 8 清洗 well

◆ 研究過程

【實驗一】20 種乳酸菌初步實驗

➤ 以表三的乳酸菌作為實驗對象，使用紙錠瓊脂擴散法進行抗菌實驗：

1. 將大腸桿菌 60 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
2. 將培養一天的乳酸菌菌液以 5000rpm 離心得到上清液。
3. 放上圓形濾紙，分別滴上上清液與底部乳酸菌菌液 5 μ l。
4. 置入 37 $^{\circ}$ C 培養箱，培養 24 小時後取出觀察抑菌圈。

【實驗二】乳酸菌抑制大腸桿菌再次實驗

※操作變因：乳酸菌菌種、乳酸菌培養時間

➤ 從【實驗一】中挑選抗菌能力較好的菌株作為實驗對象，並使用紙錠瓊脂擴散法進行抗菌實驗。

1. 分別培養乳酸菌 48 小時、72 小時。
2. 將大腸桿菌 60 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
3. 將乳酸菌菌液以 6000rpm 離心得到上清液。
4. 放上圓形濾紙，分別滴上上清液與底部乳酸菌菌液 5 μ l。
5. 置入 37 $^{\circ}$ C 培養箱，在培養 24 小時後取出觀察抑菌圈。

【實驗三】蛋白質電泳—SDS-PAGE

➤ 使用迷你蛋白質垂直電泳槽進行電泳。(見研究方法一六、蛋白質電泳—SDS-PAGE)

【實驗四】蛋白質定量

➤ 使用蛋白質定量法 Bradford protein-binding assay 來估計 LA、LL 細菌素溶液的蛋白質濃度。(見研究方法一五、蛋白質定量)

【實驗五】細菌素耐熱性實驗

※操作變因：溫度、加熱時間

➤ 以純化過的 LA、LL 細菌素溶液為實驗對象，使用挖洞瓊脂擴散法進行抗菌實驗：

1. 將細菌素溶液 (LL、LA) 以 40 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C、120 $^{\circ}$ C、140 $^{\circ}$ C、160 $^{\circ}$ C 分別利用隔水及隔油加熱 10 分鐘、30 分鐘。
2. 將大腸桿菌 40 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
3. 在培養基上挖洞，分別滴進加熱過的細菌素溶液 30 μ l；並另外滴進未經任何加熱處理之細菌素溶液作為對照組。
4. 置入 37 $^{\circ}$ C 培養箱，在培養 24 小時後取出觀察抑菌圈大小並記錄。

【實驗六】細菌素耐酸性實驗

※操作變因：pH 值

- 以純化過的 LA、LL 細菌素為實驗對象，使用挖洞瓊脂擴散法進行抗菌實驗。
- 1. 分別使用 HCl、NaOH，將 LA、LL 的細菌素溶液的 pH 值調整至 2~8。
- 2. 以蒸餾水稀釋細菌素溶液，使其細菌素濃度與前項步驟調整出的溶液濃度相等。
- 3. 將大腸桿菌 40 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
- 4. 在培養基上挖洞，分別滴進調整 pH 值過的細菌素溶液及稀釋過之同樣濃度的細菌素溶液 50 μ l。
- 5. 置入 37⁰C 培養箱，在培養 24 小時後取出觀察抑菌圈大小。

【實驗七】細菌素抑菌時效

※操作變因：細菌素作用時間

- 以純化過的 LA、LL 為實驗對象，使用挖洞瓊脂擴散法進行抗菌實驗：
- 1. 將大腸桿菌 40 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
- 2. 在培養基上挖洞，滴進細菌素溶液 30 μ l。
- 3. 置入 37⁰C 培養箱，在培養 24、48、72、96、120 小時的時候取出觀察抑菌圈大小並記錄。

【實驗八】細菌素有效抑菌濃度

※操作變因：細菌素濃度

- 以純化過的 LA、LL 為實驗對象，使用挖洞瓊脂擴散法進行抗菌實驗：
- 1. 從【實驗四】蛋白質定量中已得知蛋白質的濃度，用蒸餾水將 LA、LL 細菌素溶液稀釋成不同倍率的溶液。
- 2. 將大腸桿菌 40 μ l 均勻塗在 LB 固態培養基的平盤上。
- 3. 在培養基上挖洞，分別滴進上述細菌素溶液各 30 μ l。
- 4. 置入 37⁰C 培養箱，在培養 24 小時後取出觀察抑菌圈大小並記錄。

柒、研究結果

【實驗一】20種乳酸菌初步實驗

從結果可看到有些紙錠外有一圈大腸桿菌無法生長的區域(抑菌圈)，而不同乳酸菌的抑菌圈大小不盡相同。

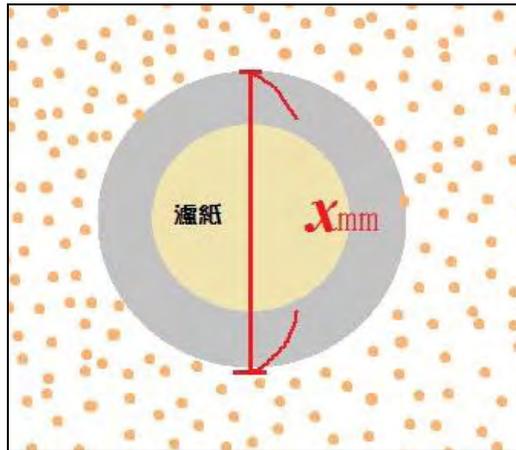


圖 10 以游標尺量取抑菌圈直徑

以上圖 8 計算方法，將每一組的數據 (X mm) 取平均後，製成下表。未出現抑菌圈或抑菌圈不明顯以「-」表示。編號 11 (BI) 菌種受到污染，以「x」表示。

表 5 【實驗一】結果數據表

編號 ^o	菌種 ^o	抑菌圈大小：菌 ^o	抑菌圈大小：上清液 ^o	編號 ^o	菌種 ^o	抑菌圈大小：菌 ^o	抑菌圈大小：上清液 ^o
1 ^o	LPL ^o	12.5 ^o	12 ^o	11 ^o	BI ^o	x ^o	x ^o
2 ^o	LDB ^o	9 ^o	- ^o	12 ^o	LG ^o	8 ^o	- ^o
3 ^o	LC ^o	8 ^o	- ^o	13 ^o	LRF ^o	10.5 ^o	10.5 ^o
4 ^o	LL ^o	14 ^o	- ^o	14 ^o	BL ^o	8 ^o	- ^o
5 ^o	BB ^o	11.5 ^o	- ^o	15 ^o	LS ^o	- ^o	- ^o
6 ^o	ST ^o	- ^o	- ^o	16 ^o	LGG ^o	6.75 ^o	6 ^o
7 ^o	LP ^o	- ^o	- ^o	17 ^o	LP28 ^o	10 ^o	- ^o
8 ^o	LR ^o	8 ^o	- ^o	18 ^o	EF ^o	11.5 ^o	9.5 ^o
9 ^o	LJ ^o	7.5 ^o	- ^o	19 ^o	LRT ^o	12 ^o	6 ^o
10 ^o	LA ^o	12.5 ^o	- ^o	20 ^o	LCS ^o	12 ^o	- ^o

從上表挑選出抗菌能力較好的九株菌種：LPL(編號 1)、LL(編號 4)(註：Production of nisin)、BB(編號 5)、LA(編號 10)、LRF(編號 13)、LGG(編號 16)、EF(編號 18)、LRT(編號 19)、LCS(編號 20)作為實驗二之對象。

【實驗二】乳酸菌抑制大腸桿菌再次實驗

以圖四計算方法，將每一組的兩個數據（X mm）取平均後，製成下表。

表 6 【實驗二】結果數據表

編號	菌種	48 小時		72 小時	
		抑菌圈大小：菌液	抑菌圈大小：上清液	抑菌圈大小：菌液	抑菌圈大小：上清液
1	LPL	7	-	7	-
4	LL	10	-	6.5	-
5	BB	11	-	6.5	-
10	LA	11	-	6.5	-
13	LRF	13.5	-	-	-
16	LGG	10.75	-	6.5	-
18	EF	9	-	11	-
19	LRT	-	-	6.5	-
20	LCS	9.5	-	10.5	-

綜合【實驗一】與【實驗二】的結果，我們選擇抗菌能力較佳且生活中相當常見的兩種菌株-乳酸鏈球菌〈*Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lister) Schleifer et al.，LL) 以及嗜酸乳桿菌〈*Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocoquot，LA) 作為之後實驗對象，進行蛋白質純化得到細菌素溶液。

【實驗三】細菌素分子量大小

【實驗 3-1】

對使用【方法一】純化出的含細菌素溶液進行蛋白質電泳分析。

細菌素的分子較小，參考文獻後，我們鎖定收集分子量 30KDa 以下的蛋白質進行分析。從電泳結果看出純化出的細菌素溶液在 11KDa 以下有蛋白質存在，經抗菌實驗得知此細菌素溶液具抑菌效果，故推測此 11KDa 以下的蛋白質（細菌素）具有良好抗菌能力，綜合進行蛋

白質純化時使用的濾膜大小 (3kDa)，兩種細菌素的分子量均介於 3-11kDa。如下圖，由左至右為純化後的細菌素溶液，用蒸餾水稀釋使得濃度由低至高，M 為蛋白質標準品。

表 7 LA 細菌素溶液電泳各個 well 添加之溶液

	lane 1	lane 2	lane 3	lane 4	lane 5	lane 6	lane 7	lane 8
SDS(μl)	5	5	5	5	5	5	5	5
LA 細菌素溶液濃度 (加入 10μl)	1/20 倍原液	1/10 倍原液	1/5 倍原液	1/4 倍原液	2/5 倍原液	1/2 倍原液	3/4 倍原液	原液

※上圖 Lane M 為蛋白質標準品

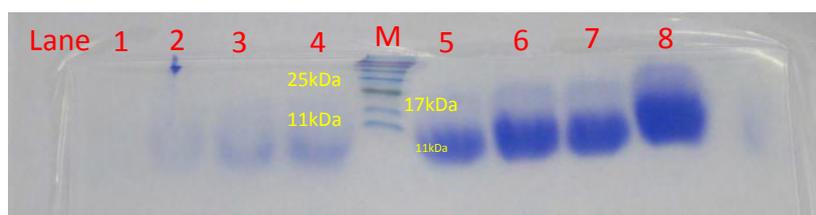


圖 11 LA 細菌素電泳結果，由圖可見其分子量在 11kDa 以下

表 8 LL 細菌素溶液電泳各個 well 添加之溶液

	lane 1	lane 2	lane 3	lane 4	lane 5	lane 6	lane 7	lane 8
SDS(μl)	5	5	5	5	5	5	5	5
LL 細菌素溶液濃度 (加入 10μl)	1/20 倍原液	1/10 倍原液	1/5 倍原液	1/4 倍原液	2/5 倍原液	1/2 倍原液	3/4 倍原液	原液

※上圖 Lane M 為蛋白質標準品

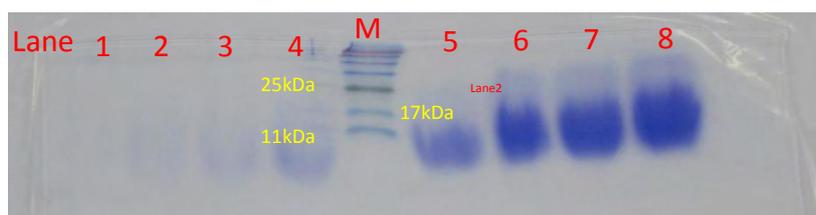


圖 12 LL 細菌素電泳結果，圖上顯示其分子量在 11kDa 以下

[實驗 3-2]

下圖為使用【方法二】純化處理 LA 細菌素後，經蛋白質電泳的結果圖。

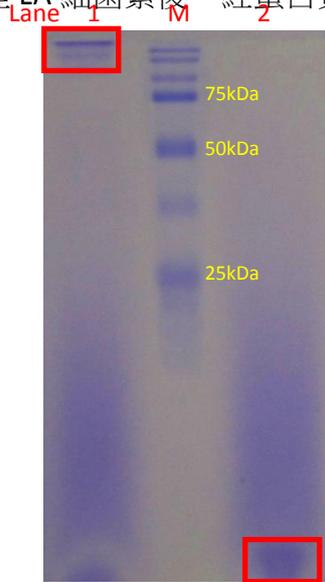


圖 13 LA 細菌素電泳

Lane1 為未通過 30kDa 薄膜（即分子量>30kDa）之蛋白質溶液，而 lane2 則為通過 30kDa 薄膜但未通過 5kDa 薄膜（即分子量 5kDa~30kDa）之蛋白質溶液，可看見 lane2 相較於 lane1 在分子量較低之處有一明顯色帶（下圖右下紅框處）。配合【方法一】與後續抗菌實驗結果，推論 LA 所產之細菌素分子量大小大約介於 5kDa-11kDa 之間。

【實驗四】蛋白質定量

將 LA、LL 細菌素溶液以蛋白質定量法 Bradford protein-binding assay 方法進行定量分析如下，先利用蛋白質標準品得出蛋白質濃度與吸光值的關係，拉出一條標準曲線圖。

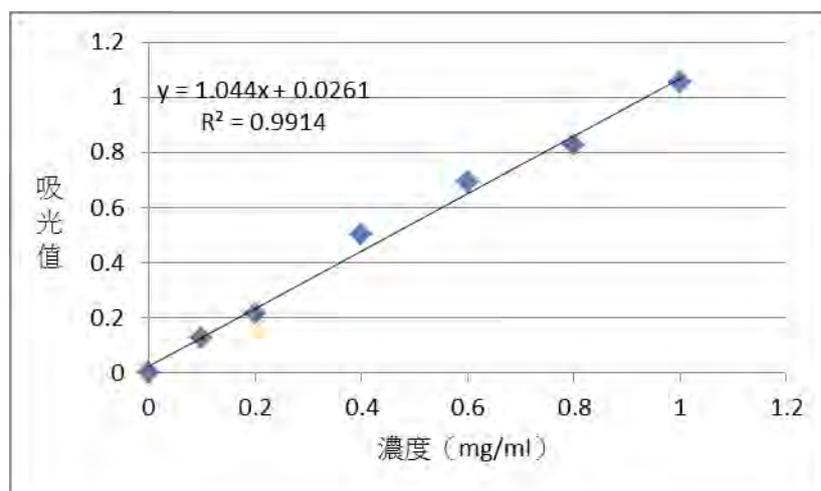


圖 14 蛋白質濃度標準曲線圖

得出濃度(x)與吸光值(y)的關係方程式：

$$y = 1.044x + 0.0261$$

LL 的平均吸光值為 0.195333333，代入上述方程式得濃度為 0.162100894 mg/ml；LA 的平均吸光值為 0.224666667，代入得濃度為 0.190197957 mg/ml。

【實驗五】細菌素耐熱性實驗

量取抑菌圈的直徑，將每一組的兩個數據（單位：mm）取平均後，製成下表。

表 9 細菌素耐熱性實驗結果之 40°C~100°C

		40°C	60°C	80°C	100°C	對照組
LA	10 分鐘	8.525	7.9625	8.583333	8.4125	8.25
	30 分鐘	8.65	8.375	10.3	8.5625	
LL	10 分鐘	9.45	8.4	7.366667	10.425	9.05
	30 分鐘	9.1875	8.75	8.1625	10.36667	

以上表資料製成以下折線圖。縱軸為抑菌圈直徑大小，以毫米（mm）為單位。

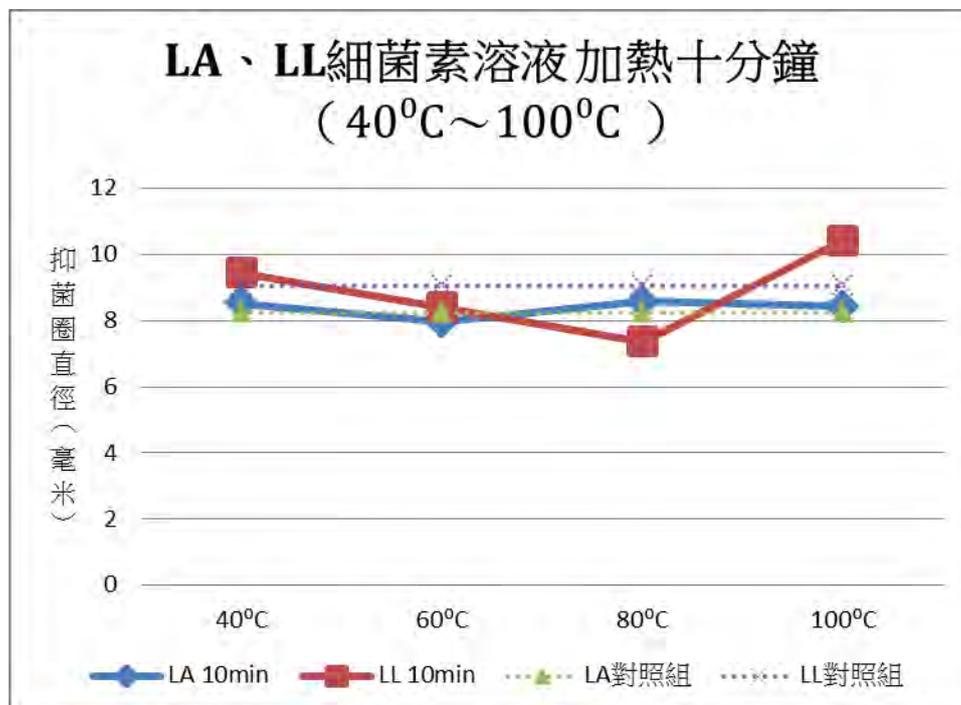


圖 15 細菌素耐熱性實驗 40°C~100°C 加熱十分鐘

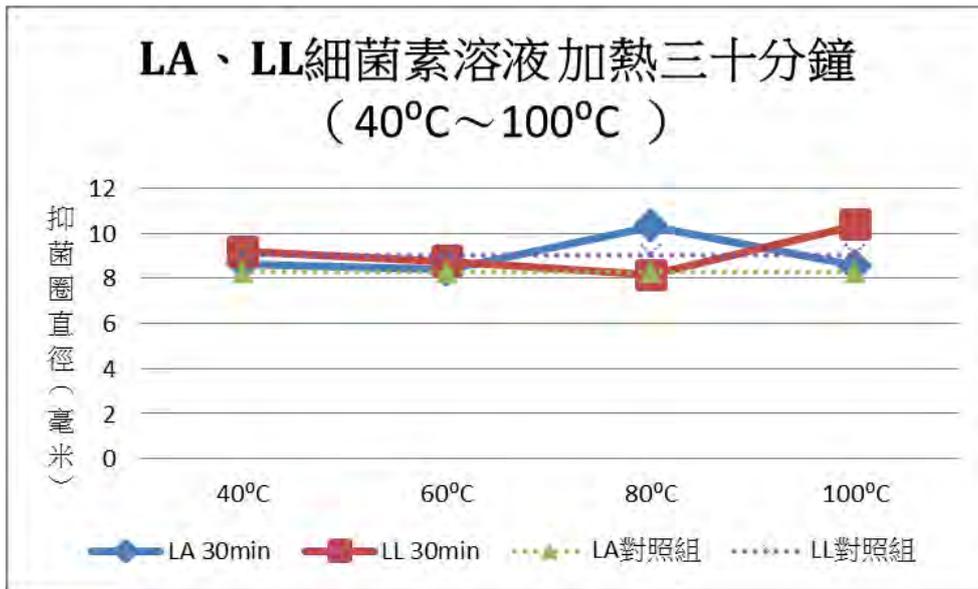


圖 16 細菌素耐熱性實驗 40°C~100°C 加熱三十分鐘

可看見所有樣本皆具抑菌圈，且抑菌圈大小變化不大，從上方實驗結果看出細菌素在 100°C 下加熱仍具抑菌能力。為了瞭解細菌素的耐熱極限，我們接著利用隔油加熱的方式，將加熱溫度調高至 160°C，實驗結果如下：

表 10 細菌素耐熱性實驗結果之 100°C~160°C

		100°C	120°C	140°C	160°C	對照組
LA	10 分鐘	13.7875	14.4125	17.9375	15.9375	14.1
	30 分鐘	13.675	14.6	8.5625	8.0875	
LL	10 分鐘	13.4125	16.1875	14.175	17.5125	15.25
	30 分鐘	13.8875	18.95	16.625	7.6	

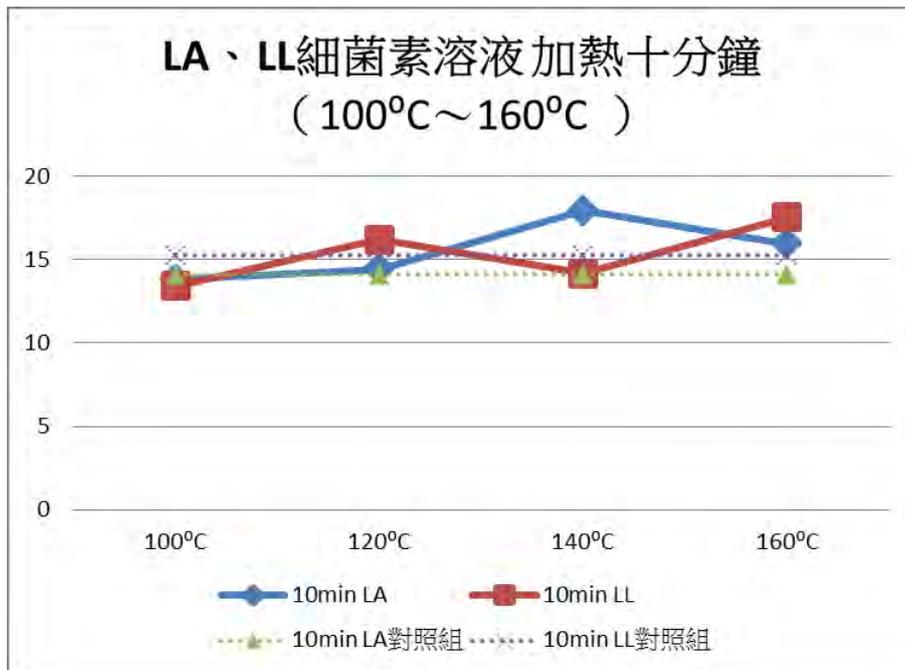


圖 17 細菌素耐熱性實驗 100°C~160°C 加熱十分鐘

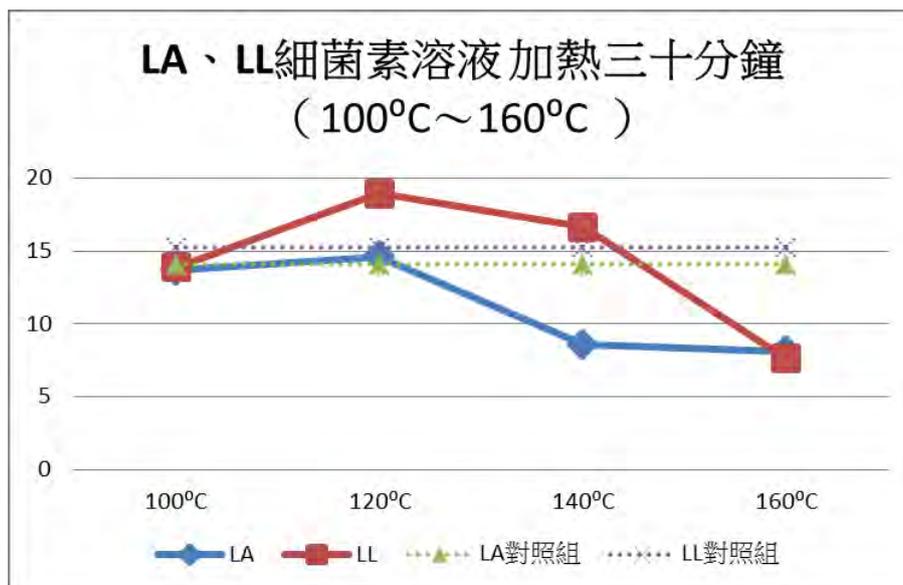


圖 18 細菌素耐熱性實驗 100°C~160°C 加熱三十分鐘

從結果中可看見 LA 在 140°C 加熱三十分鐘後，抑菌能力明顯降低；LL 在 160°C 加熱三十分鐘，抑菌能力明顯降低。在加熱十分鐘部分，兩者之抑菌能力無明顯之變化。

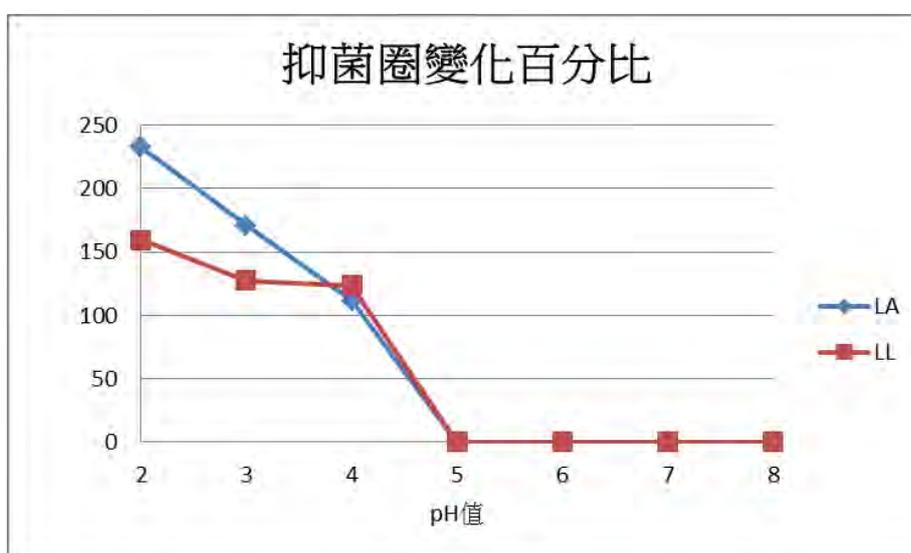
【實驗六】細菌素耐酸性實驗

以 NaOH 與 HCl 調整細菌素溶液的 pH 值至 pH=2~pH=8，進行抑菌實驗。量取抑菌圈的直徑，將數據（單位：mm）取平均後，得到抑菌圈隨 pH 值變化的關係（計算方式如下之式子），並製成下表。

$$\text{抑菌圈變化百分率} = \frac{\text{調整 pH 值後抑菌圈大小}}{\text{未調整 pH 值之抑菌圈大小}} \times 100\%$$

表 11 不同 pH 值下之抑菌圈變化

單位：%	pH	2	3	4	5	6	7	8
	LA	232.613	170.8042	111.5132	0	0	0	0
	LL	159.7015	127.3504	123.46	0	0	0	0



從實驗結果可以看出細菌素溶液抑菌圈大小隨 pH 值下降而增加，pH=2~pH=4 時具抑菌能力，而當 pH 值大於 5 時則失去抑菌能力。

【實驗七】細菌素抑菌時效

此實驗試著討論細菌素抑菌效果隨時間下降的幅度，將純化出的細菌素溶液原液（10X）和濃縮成原液兩倍的溶液（20X）分別滴進打出的孔中，並接連記錄五天的抑菌圈直徑，實驗結果如下圖表。

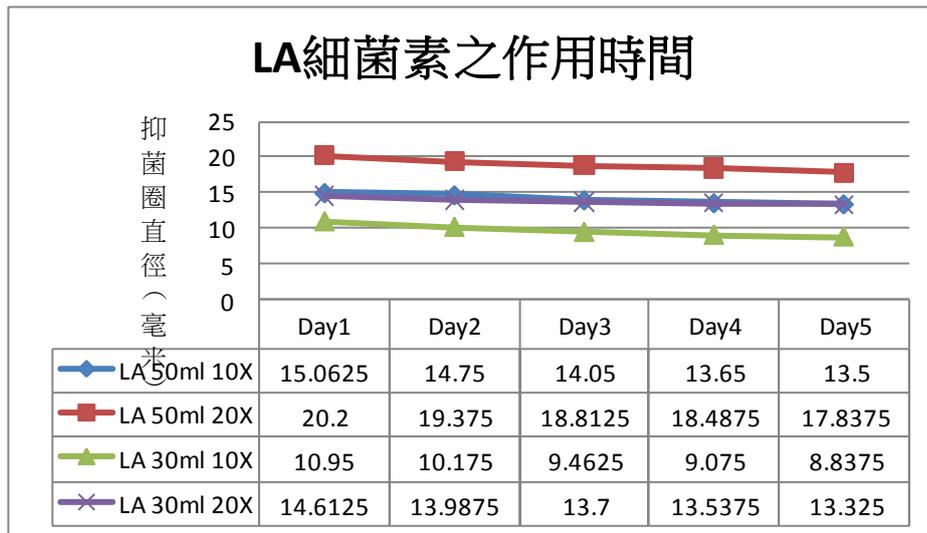


圖 19 LA 細菌素抑菌時效

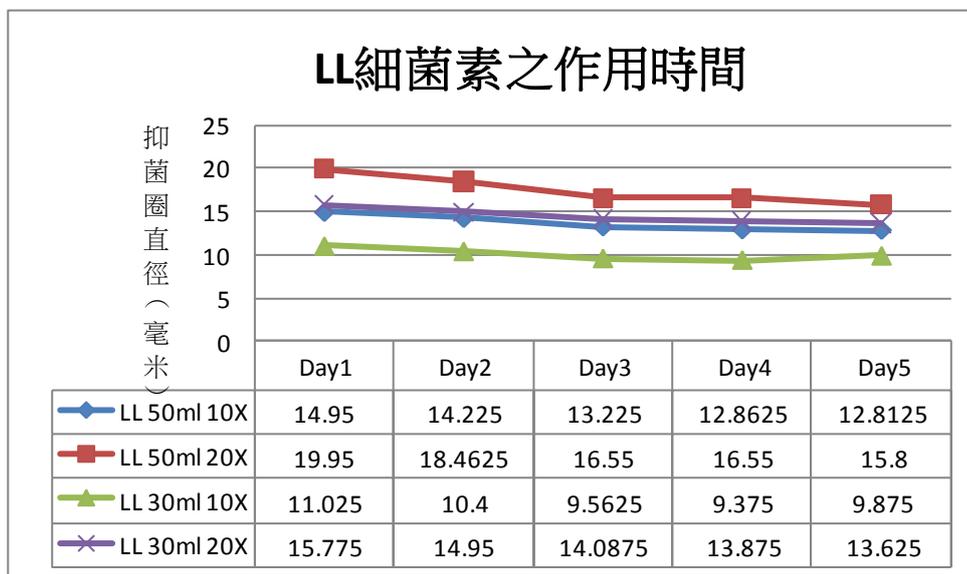


圖 20 LL 細菌素抑菌時效

在密閉的培養基平盤下，抑菌圈直徑下降的幅度非常小，LL 平均每天抑菌圈直徑下降比率為 3.7%、LA 每天抑菌圈直徑下降比率為 3.4%。從實驗結果看出，細菌素作用五天的抑菌圈下降比率，LA 細菌素抑菌圈大小為原本的 87.45%，LL 細菌素抑菌圈大小為原本的 85.225%。

$$\text{平均每天抑菌圈直徑下降量} = \frac{\text{第五天抑菌圈大小} - \text{第一天抑菌圈大小}}{4 \times \text{第一天抑菌圈大小}}$$

【實驗八】細菌素有效抑菌濃度

表 12 細菌素有效抑菌濃度實驗結果

不同濃度細菌素抑菌圈大小（單位：mm）					
濃度	1/10 倍原液 (1X)	1/2 倍原液(5X)	原液 (10X)	原液濃縮 1.5 倍(15X)	原液濃縮 2 倍(20X)
LA	6	6.0875	9.5	11.61667	14.2875
LL	6	6.3	10.075	13.1	12.55

※若無抑菌圈以玻璃棒外徑 6mm 作為觀察數據

將數據製成折線圖如下，橫軸為細菌素濃度。

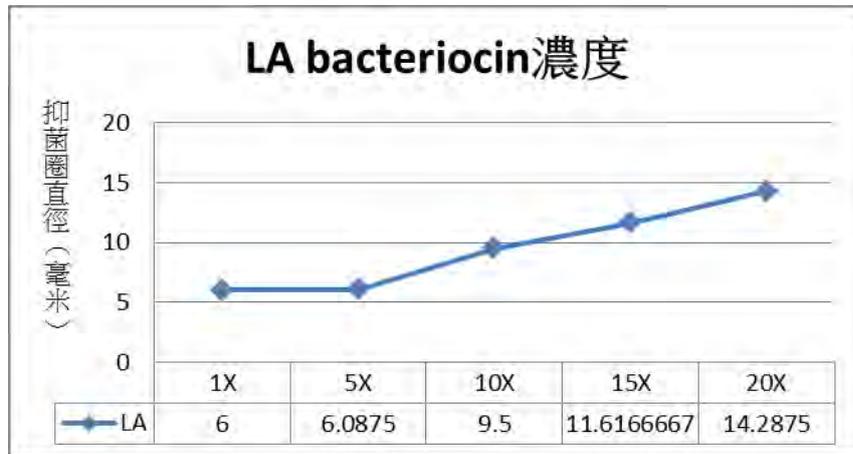


圖 21 LA 細菌素不同濃度之抑菌圈大小

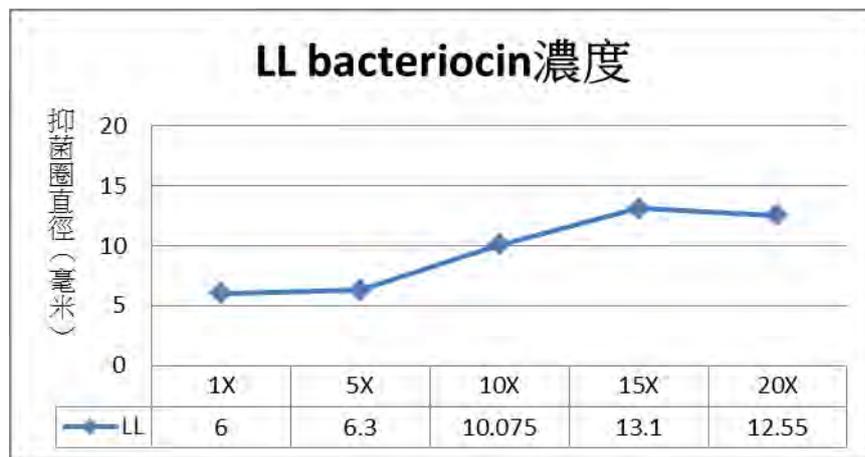


圖 22 LL 細菌素不同濃度之抑菌圈大小

綜合【實驗三】蛋白質定量的結果，得到上述實驗樣本之蛋白質濃度。無論是 LA 或是 LL，在 1/10 倍原液和 1/2 倍原液濃度的細菌素下，並無產生明顯的抑菌圈，在原液及原液濃縮 2 倍下則有明顯的抑菌圈，隨著濃度的增加，抑菌效果也逐漸上升。經由換算得出：LA 具較佳抑菌能力的細菌素濃度約為 0.0951~ 0.1902 mg/ml 以上，LL 則為 0.08105~ 0.1621 mg/ml 以上。

捌、討論

1. **菌液抗菌能力優於上清液：** 20 種乳酸菌實驗結果顯示，包括現有已知會分泌 nisin 的乳酸菌 (LL)，所有乳酸菌之上清液皆無抑菌效果。與老師討論和查閱文獻後得知，在培養乳酸菌時，剛開始在沒外力刺激下，乳酸菌多將其能量用於繁殖，直到繁殖接近飽和後才大量製作細菌素。細菌素為細菌之代謝產物，可於菌株之生長指數期或穩定期分泌出來，且細菌素的生產受許多因素影響。
2. **選擇乳酸鏈球菌 (LL) 與嗜酸乳桿菌 (LA) 進行之後實驗：**綜合實驗一、二，我們選擇抗菌能力較佳且生活中相當常見的兩種菌株：乳酸鏈球菌 (*Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lister) Schleifer et al., LL) 以及嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocoquo, tLA) 作為之後實驗對象，並利用自製器材進行蛋白質純化得到細菌素溶液。
3. **LL、LA 細菌素大小約在 3kDa 至 11kDa 之間：**從實驗三之電泳結果看出純化出的細菌素溶液僅在 11kDa 以下有蛋白質存在，經抗菌實驗得知此細菌素溶液具抑菌效果，故推測此 11kDa 以下的蛋白質 (細菌素) 具有良好抗菌能力，綜合進行蛋白質純化時使用的濾膜大小 (3kDa)，LA 和 LL 的蛋白質區間均介於 3kDa 至 11kDa 之間，屬於較小的蛋白質。
4. **細菌素相較於其他蛋白質有穩定之化學特性：**經查閱文獻後得知 nisin 分子量大小為 3354Da，而此種較小的蛋白質相對於其他一般蛋白質也有較穩定的化學特性，在之後的實驗獲得證實。可能的原因為細菌素為一種鍵結能力較強之簡單蛋白質，只具有一、二級蛋白質結構，無立體的三級空間構形或是結構中具有特殊之疏水性胺基酸等，需較大的外力才可將其結構破壞，使之失去活性。
5. **LL 與 LA 所產的細菌素於 120°C 下加熱 30 分鐘仍具抑菌能力：**在細菌素耐熱性實驗中，以 40°C~160°C 加熱 LA 及 LL 細菌素溶液 10 分鐘及 30 分鐘，而後進行抗菌實驗測試。40°C~120°C 的實驗組皆有抑菌圈且抑菌圈的大小無多大差異，而 140°C 及 160°C 加熱三十分鐘之細菌素溶液抑菌圈大小皆明顯下降，140°C 及 160°C 加熱十分鐘之抑菌圈則無明顯變化。上述兩種細菌素溶液皆具有很好的耐熱性，從實驗結果看來，LA 所產之細菌素溶液於 140°C 以下加熱三十分鐘仍具抗菌效力，而 LL 所產之細菌素溶液於 120°C 以下加熱三十分鐘也具抗菌效力。綜合兩者耐熱極限，則約為 120°C，具耐熱性。
6. **環境 pH=2~4 時利於 LA、LL 生產的細菌素作用：**從細菌素耐酸性實驗結果中，可以看出細菌素溶液抑菌圈大小隨 pH 值下降而增加，在 pH=2 時抑菌圈達到最大，而當 pH 值大於 5 時則失去抑菌能力。推測細菌素 pH 值大於 5 時，結構會遭到破壞，失去其活性 (抑菌能力)。

7. **兩種細菌素作用五天的抑菌圈大小皆在原本的 85%以上**：我們發現在密閉的培養基平盤下，抑菌圈直徑下降的幅度非常小，LL 平均每天抑菌圈直徑下降量為 3.7%、LA 每天抑菌圈直徑下降量為 3.4%。從實驗結果看出，細菌素作用五天的抑菌圈下降比率，LA 細菌素抑菌圈大小為原本的 87.45%，LL 細菌素抑菌圈大小為原本的 85.225%。
8. **兩種細菌素在濃度大約 0.1mg/ml 以上就具有抗菌效果**：發現無論是 LA 或是 LL，在 1/10 倍原液和 1/2 倍原液濃度的細菌素下，並無產生明顯的抑菌圈，在原液及原液濃縮 2 倍下則有明顯的抑菌圈，隨著濃度的增加，抑菌效果也逐漸上升。綜合蛋白質定量的結果，經由換算得出：LA 具較佳抑菌能力的細菌素濃度約為 0.0951~ 0.1902 mg/ml 以上，LL 則為 0.08105~ 0.1621 mg/ml 以上。
9. **許多抑菌機制交互作用**：經由實驗我們得知乳酸菌在培養的過程中確實會產生細菌素，然而乳酸菌的抑菌機制有 pH 值、有機酸、二氧化碳、過氧化氫、細菌素、Reuterin System……等，許多機制交互作用抑制其他微生物的生長。以一般方式培養的乳酸菌菌液其內含細菌素的濃度不夠高，工業上可經由化學合成 nisin，但其他種類的細菌素尚未有廣泛應用。
10. **乳酸菌細菌素用於食品保存**：若要將乳酸菌細菌素用於食品保存上，可將純化後的細菌素加入食品，抑制微生物生長；也可直接使用會產生細菌素的乳酸菌進行發酵，在發酵的過程中乳酸菌會持續分泌細菌素並抑制其他雜菌的污染，在自然狀態下達到抑菌效果。LA、LL 兩種乳酸菌所生產的細菌素憑藉其微量就具有抑菌能力，耐高溫、耐酸的特性未來將有應用於食品保存，製成天然防腐劑的潛力。

玖、結論

1. 在二十種乳酸菌中選出抗菌能力較佳的 *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lister) Schleifer et al.(LL, 乳酸鏈球菌, 產 nisin)及 *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocquot (LA, 嗜酸乳桿菌) 作為主要研究對象, 而經實驗證實兩者都具有分泌細菌素的能力。
2. LL 及 LA 所生產的細菌素大小約在 3kDa 至 11kDa 之間, 屬於較簡單的蛋白質, 相對於其他蛋白質有較穩定的化學特性。
3. LL 及 LA 所產之細菌素有極佳的耐熱性, 在 120°C 以下處理 30 分鐘後之細菌素的抑菌能力與未經加熱處理的細菌素溶液差異極小。
4. 若要應用於食品保存, 產生明顯的抑菌效果, LL 所需的最低濃度約為 0.081mg/ml, LA 則為 0.095mg/ml。兩者在室溫下作用五天的抑菌圈大小皆在原本的 85%以上。
5. LA、LL 兩種乳酸菌所生產的細菌素憑藉其微量就具有抑菌能力, 耐高溫、耐酸的特性未來將有應用於食品保存, 製成天然防腐劑的潛力。

拾、未來展望

Lactobacillus acidophilus 是人體腸道中常見的菌種, 也被添加在優酪乳、健康食品 and 優格中。我們希望接下來能更進一步確定其所生產之蛋白質種類, 知道其能抑菌的對象及範圍, 並了解其在食品中所扮演的角色 (是否在某些已添加 *Lactobacillus acidophilus* 的食品中等等)。如果能使食品保持其生長所需的養分和給予適當的溫度, 使其釋放細菌素, 也許能不添加防腐劑而有一定的保存期限。

除了繼續探討其所產生抑菌素的條件, 如: 生產時間、所需養分.....外, 我們也想進一步比較 *Lactobacillus acidophilus* 所生產的細菌素和被運用已久的 nisin 在特性上的差異, 也許在某些特定的食品中, 其所產生的細菌素能發揮更好的效果。

拾壹、參考資料

1. 廖啟成、朱文深、楊媛絢 (1997)。乳酸菌專輯。財團法人食品工業發展研究所。
2. 龍湘美 (2004)。乳酸菌細菌素抗菌作用及其在食品上應用之回顧。國立台灣海洋大學食品科學系。
3. 蔡宛玲 (1998)。乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* S, *Piococcus pentosaceus* L 與 *Lactobacillus acidophilus* 生長與抑菌物質生產及特性之探討。國立臺灣海洋大學。
4. 莊榮輝 (2009)。酵素純化分析。取自：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>
5. Susan F. Barefoot & Todd R. Klaenhammer (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Department of Food Science, North Carolina State University.
6. José Luis Parada & Carolina Ricoy Caron & Adriane Bianchi P. Medeiros & Carlos Ricardo Socol(2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Braz. arch. biol. technol. vol.50 no.3 Curitiba May 2007.
7. Mehwish Aslam & Muhammad Shahid & Fayyaz ur Rehman & Mian Anjum Murtaza & Sumaira & Sharif & Asia Ata & Saba Noor (2012). Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. Department of Chemistry and Biochemistry, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. Department of Chemistry, University of Sargodha, Sargodha, Pakistan.

【評語】 040702

由常見乳酸菌株篩選出二株(LL 及 LA)具抑菌效果，透過蛋白質分離而發現 3-11kDa 蛋白質成分為細菌素，有別於小分子成份，具有創新性。後續應以確定分子量及胺基酸定序，以研究其抑菌或殺菌之作用及功效應用。