

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：盧錫祺 博士
Advisor：Hsi-Chi Lu, Ph. D.

乳酸菌胞外多醣生產條件及
影響 FL83B 肝細胞葡萄糖帶入量與肝醣合成探討
Study on The Production of Exopolysaccharides of Lactic Acid
Bacteria and The Effects on Glucose Uptake and Glycogen Synthesis
in FL83B Hepatocytes

研究生：呂佳華 撰
Graduate Student：Chia-Hua Lu

中華民國一〇一年七月
July, 2012

謝誌

三年的研究生涯終於落幕，雖然論文並非完美，但這三年間學到了許多實驗及做人處世。承蒙恩師 盧錫祺博士願意收下我這不成材的學生，於研究上悉心指導並關懷我的生活及健康。在論文結束時，依舊叮嚀我未來該注意之事項，心中充滿感激及感謝。承蒙恩師 蔡政志博士總是默默關心且惦記著我，雖然不常跟您連絡，但心中由衷感謝您一路的關懷。師恩浩蕩，永誌不忘，對兩位恩師敬上最深的謝意。

論文口試期間，承蒙 蔡正宗博士、江文德博士及陳春榮博士，撥冗審閱論文及詳加修正，並提供寶貴意見，使本論文內容更為完善，在此深表萬分感謝。特別感謝莞玲師母、王姐、叔瑜助教、貞誼助教及怡君助教，謝謝您們用愛關懷我，總是鼓勵且替我打氣，不時提醒我照顧自己的健康，謝謝您們。感謝母校大仁科技大學恩師龔賢鳳老師及淑貞老師，謝謝您們當初的指導，並鼓勵我考取研究所，在我碩班生涯中，時常替我打氣加油，感謝您們一路的支持及信任。

在研究所期間，特別感謝本校畜產系 謝長奇老師慷慨借用儀器，對於實驗方法與技巧的協助及教導，總是給予加油與打氣，特至萬分感謝。感謝實驗室茹婕學姊、惠蘭學姊、汝翔學長、附偉學長、心語學姐及庭儒學長，謝謝您們一路走來支持與鼓勵我，在我感到最灰心時，總是獻上最暖的關懷；特別感謝青蓉學姊於實驗上的悉心指導及生活上的關心；感謝弘光蔡政志博士之實驗室佩佩學姐、姿儀學姊及冠蓉學姊於實驗上的教導及關心；感謝希奇，超超超感謝你，因為有你所以我沒有放棄，因為有你所以我更能誠實面對自己，因為有你所以人生更充滿著歡笑及勇氣，謝謝你總是比我自己還關心我自己，在人生的旅途上很感謝能遇到你，謝謝你的相知相惜；感謝鈺馨(可樂)總是無私分享著聖經裡的每一段話，每每看到妳的笑容，所有的烏雲終將散去；感謝芄萱(江Q)總是鼓勵著我，就算是離校了依舊不減對我的關懷，每次與你去 KTV 就是我最歡樂的時候；感謝菁羽與瑄閔一路的互相扶持與加油打氣；感謝建廷(歹人)總是提供好音樂以及笑話，讓實驗之餘增添幾分樂趣；感謝郭俊麟(郭 mei) 在最後時刻一起互相打氣；感謝冠閔總是不厭其煩的提供我實驗上最專業的資訊，並且解決我所的疑惑；感謝同屆所有的朋友們，一起共創許多回憶；感謝學妹鈺萍，在研究所生涯中能遇見你，真的很開心，謝謝你總是陪伴著我，與我一起分享所有的喜怒哀樂；感謝學妹彥蘋(大寶)，你總是願意在我需要的時候出手相救，關心我

的生活及健康，很開心最後一年的時間裡能更加的認識你；感謝鈺欣學妹在我碩一忙於帶實驗時，總是關懷並鼓勵我；感謝學妹欣怡（夜夜）總是默默關心與鼓勵我，能與你一起離校是我的榮幸唷；感謝學弟瑋翔（阿G）一路的加油打氣，也常常照顧我的胃，由衷感謝你；感謝學弟豐毓（碰碰）讓無後顧之憂在你們的實驗室撒野並且充數據，也感謝你的支持與信賴；感謝巧玲及昭玲學妹的體諒與關心，有你們的實驗室總是充滿歡笑聲；感謝學妹凱琳關懷我的胃及心靈，總是用非一般人的角度分析每一件事，謝謝你的貼心，與你相遇真是我八輩子修來的福氣；感謝學妹偉珊（小偉）在忙碌之餘不忘關懷我這老人家，擔憂我的飲食，提供最實質的幫助，很開心能認識你；感謝怡任學妹對我的信賴與支持，並且提供消遣訊息，使生活充滿少女般情懷；感謝學妹柏雅，難忘與你一起衝數據的日子，也謝謝你常常給我最有力的笑容及打氣，人生路上有你相伴我非常的開心；感謝所有學弟妹的體諒與扶持，使我備感溫馨；感謝大學及高中好友偵蓉（小古）、彥翔（便便）、修賢及宇秋，縱然不常聯絡，你們的默默關心或是久久一次的相聚，都是讓我走下去的動力，謝謝你們，有你們我真的很幸運；感謝好姊妹子芹（咩咩）謝謝你自始至終的信任我，總是替我加油打氣，關心我的一切，比我自己還愛我自己，謝謝你；感謝親戚舅舅、舅媽一家人，時常的鼓勵我，並給予我最大的支持與體諒。研究所期間得到太多貴人的相助，無法在此一一詳列，感謝每位貴人的扶持、打氣和一路相挺，因為有你們人生旅途上並不孤單。

最後，感謝我最愛的爸爸、媽媽、姐姐及弟弟，給我最大的關懷、包容及體諒，謝謝你們無怨無悔的付出，給予我最大的空間及信任，讓我無後顧之憂完成學業；感謝甜蜜蜜的忠實陪伴，讓我在研究所生涯中不至於孤單；也感謝家神石仙姑、金府千歲及媽祖，謝謝你們照顧家、保佑我們平安健康，順利渡過種種難關。將此論文獻給我最愛的家人與好友們，一同分享我的成長與喜悅。祝各位平安、順心、健康。

呂佳華 謹致於
東海大學食品科學研究所
中華民國一〇一年七月

目錄

摘要	1
英文摘要	2
壹、前言	3
貳、文獻回顧	5
一、乳酸菌之介紹	5
(一) 乳酸菌基本特性	5
(二) 乳酸菌分類	6
(三) 乳酸菌之醱酵	6
(四) 乳酸菌之應用	7
二、乳酸菌之胞外多醣	20
(一) 乳酸菌胞外多醣組成及結構	20
(二) 乳酸菌胞外多醣之生成	23
(三) 乳酸菌胞外多醣之應用	34
三、糖尿病	36
(一) 糖尿病流行病學	36
(二) 糖尿病簡介	38
(三) 糖尿病分類	38
(四) 糖尿病診斷標準	44
(五) 糖尿病的併發症	44

(六) 糖尿病的治療.....	45
四、胰島素.....	45
(一) 胰島素簡介.....	45
(二) 胰島素分泌.....	50
(三) 胰島素作用.....	50
(四) 胰島素細胞層面之傳訊路徑.....	53
(五) 胰島素與醣類代謝.....	57
五、胰島素阻抗.....	60
(一) 胰島素阻抗之定義及病因.....	60
(二) 誘發胰島素阻抗之肝臟細胞模式.....	62
六、研究動機與實驗架構.....	72
參、材料與方法.....	77
一、藥品及培養基.....	77
(一) 乳酸菌相關藥品.....	77
(二) 細胞相關藥品.....	78
(三) 主要儀器及設備.....	79
二、實驗方法.....	80
(一) 乳酸菌相關實驗方法.....	80
(二) 細胞培養相關實驗方法.....	85
(三) 統計分析.....	87

肆、結果與討論.....	92
一、高產量 EPS 之乳酸菌篩選.....	88
(一) 篩選高產量 EPS 之乳酸菌菌菌株.....	88
(二) 初步鑑定高產量 EPS 之乳酸菌菌菌株.....	88
二、探討不同菌株及生長條件對胞外多醣產量之影響.....	90
(一) 初始 pH 值之影響.....	90
(二) 培養溫度之影響.....	91
(三) 額外添加葡萄糖之影響.....	99
(四) 培養天數之影響.....	108
三、調節血糖恆定.....	129
(一) 分子量.....	124
(二) XTT 試驗探討其對細胞活性之影響.....	125
(三) 葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量.....	125
(四) 不同 EPS 濃度對 FL83B 肝醣合成量之影響.....	131
伍、結論.....	138
陸、參考文獻.....	139
柒、附錄.....	160
附錄一、KT 定序之序列.....	160
附錄二、鑑定 KT 藉由 API 套組.....	161
附錄三、多醣分子量之標準曲線.....	162

附錄四、DNS 法之標準曲線.....	162
附錄五、酚硫酸法之標準曲線.....	163
附錄六、蔥酮法之標準曲線.....	163

圖目錄

圖 1-1、人體內微生物之分佈圖.....	9
圖 1-2、益生菌之生理功效.....	18
圖 1-2、革蘭氏陰性及陽性菌所產置多醣之細胞分佈部位.....	21
圖 1-3、胞外多醣生合成之路徑.....	27
圖 1-4、Lactococcus lactis NIZO B40 之胞外多醣生合成之模式.....	28
圖 1-5、Lactococcus lactis NIZO B40 之基因群.....	28
圖 1-6、乳酸菌胞外多醣之生理功效.....	37
圖 1-7、不同階段之血糖失衡.....	42
圖 1-8、糖尿病主要併發症.....	47
圖 1-9、口服抗高血糖藥物之作用位置.....	49
圖 1-10、胰島素之結構.....	51
圖 1-11、胰島素之分泌機制.....	51
圖 1-12、胰島素之代謝調控.....	54
圖 1-13、胰島素訊息傳遞路徑.....	54
圖 1-14、胰島素刺激PKB 活化的路徑.....	56
圖 1-15、AMPK調節體內血糖平衡之角色.....	56
圖 1-16、胰島素作用於目標組織之功能.....	58
圖 1-17、肝臟細胞之葡萄糖代謝.....	58
圖 1-18、糖類與脂質之毒性及發炎反應所產生之胰島素抗性與內皮細胞之非正常之交互作用.....	63
圖 1-19、TNF- α 於脂肪細胞中誘導胰島素阻抗之機制.....	63
圖 1-20、攝取過量之產熱量營養物對由脂質引起的第二型糖尿病之病因.....	66
圖 1-21、在面對肥胖誘導胰島素阻抗及糖脂毒性作用下， β 細胞代償失敗之時期.....	67
圖 1-22、在 β 細胞中葡萄糖與脂質之關係.....	69
圖 1-23、高血糖產生之 ROS 透過氧化壓力造成 β -cell 功能異常.....	75
圖 1-24、實驗架構.....	76
圖 2-1、DNS 反應式.....	84
圖 2-2、XTT 試劑反應式.....	86

圖 4-1 乳酸菌胞外多醣之產量.....	89
圖4-2 乳酸菌菌液之殘糖量.....	89
圖4-3 EPS膠體通透層析圖譜.....	126
圖 4-4 不同菌株之 EPS 及多種濃度對於 FL83B 之存活性測定.....	128
圖4-5 高糖抑制小鼠肝臟FL83B細胞之2-NBDG攝入量分析.....	129
圖 4-6 高糖抑制小鼠肝臟 FL83B 細胞之肝醣合成量分析.....	129
圖 4-7 不同菌株之多種 EPS 濃度處理正常態 FL83B 的 2-NBDG 攝入量影 響.....	134
圖 4-8 不同菌株之多種 EPS 濃度處理阻抗態細胞的 2-NBDG 攝入量影響.....	135
圖 4-9 不同菌株之多種 EPS 濃度處理正常態細胞的肝醣合成量影響.....	136
圖 4-10 不同菌株之多種 EPS 濃度處理阻抗態細胞的肝醣合成量影響.....	137

表目錄

表 1-1、常應用於食品業之乳酸菌菌株.....	8
表 1-2、乳酸菌主要各屬之比較.....	9
表 1-3、現今市售產品中常見之益生菌菌株.....	10
表 1-4、乳酸菌生成之同質多醣組成.....	25
表 1-5、乳酸菌生成之異質多醣組成.....	26
表1-6、代謝症候群診斷標準.....	40
表1-7、依病因分類之糖尿病.....	43
表 1-8、糖尿病臨床診斷標準.....	46
表 1-9、妊娠糖尿病臨床診斷標準.....	46
表 1-10、糖尿病高危險群之臨床診斷標準.....	46
表1-11. 口服降血糖藥物.....	48
表1-12、PKB 異構物在各組織中的表現情形.....	55
表1-13、Akt異構型之作用.....	55
表1-14、葡萄糖轉運蛋白種類.....	61
表4-1 不同pH對BCRC 12574於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	92
表4-2 不同pH對BCRC 14691於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	93
表4-3 不同pH對BCRC 14759於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	94
表4-4 不同pH對BCRC 16000於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	95
表4-5 不同pH對KT於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	96
表4-6 不同pH對LDB 4-2於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	97
表 4-7 總結:不同菌株於最佳 pH 值之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	98
表4-8 不同溫度對BCRC 12574於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	100

表4-9 不同溫度對BCRC 14691於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	101
表4-10 不同溫度對BCRC 14759於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	102
表4-11 不同溫度對BCRC 16000於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	103
表4-12 不同溫度對KT於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	104
表4-13 不同溫度對LDB 4-2於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	105
表4-14 總結:不同菌株於最佳溫度之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	106
表4-15 不同葡萄糖濃度對BCRC 12574於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	109
表4-16 不同葡萄糖濃度對BCRC 14691於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	110
表4-17 不同葡萄糖濃度對BCRC 14759於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	111
表4-18 不同葡萄糖濃度對BCRC 16000於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	112
表4-19 不同葡萄糖濃度對KT於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	113
表4-20 不同葡萄糖濃度對LDB 4-2於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	114
表 4-21 總結:不同菌株於最佳葡萄糖濃度之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	115
表4-22 不同培養時間對BCRC 12574於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	117
表4-23 不同培養時間對BCRC 14691於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	118
表4-24 不同培養時間對BCRC 14759於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生	

產之影響.....	119
表4-25 不同培養時間對BCRC 16000於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	120
表4-26 不同培養時間對KT於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	121
表4-27 不同培養時間對LDB 4-2於培養之菌數、pH值、殘糖量及胞外多醣生產之影響.....	122
表4-28 總結:不同菌株於最佳培養天數之菌數、殘糖量及胞外多醣生產.....	123

摘要

糖尿病為胰島素分泌不足或相關組織臟器產生胰島素阻抗所致。肝臟可調控葡萄糖帶入、儲存分解及代謝生合成，在血糖恆定上扮演重要角色。乳酸菌廣泛應用於保健食品上，已知有維持腸道菌相平衡、調節免疫及血糖等生理功效，並可能與其胞外多醣(EPS)之活性有關。本研究由 24 株乳酸菌篩選出六株胞外多醣高產者，分析不同葡萄糖濃度、培養溫度、培養時間及起始 pH 等條件，對胞外多醣生合成之影響。並探討所生成之胞外多醣調節 FL83B 肝細胞葡萄糖帶入及肝醣合成之功效。結果顯示，當額外添加葡萄糖時，KT、LDB 4-2、BCRC 12574、14759、16000 及 14691 EPS 之生成皆有增加。其中以 LDB 4-2 (1829 mg/L)有最佳產量。在 pH 為 4.5、5.5, 6.5 及 7.5 時，LDB 4-2 之 EPS 產量分別為 887、932、777 及 920 mg/L，均高於其他菌株。BCRC 12574 於 pH 7.5 時有最高 EPS 產量(876 mg/L)。KT 培養於 15~30°C 較低溫度時有最佳產量(865~944 mg/L)，且優於其他組別；而 LDB 4-2 則於 45°C 下較其他菌株產更多 EPS (918 mg/L)。不同培養時間下，此六株菌皆會因培養過久而使 EPS 產量變低，在第七天產量最低。綜合上述結果，其 EPS 會因為菌株及培養條件不同而有不同之產量。細胞模式中採單一發酵條件(37°C, 48 h)產製並萃取此六株菌之 EPS，並經膠體滲透層析法檢測發現此六株菌株 EPS 分子量介於 850 到 1200 kDa 之間。添加 50~800 ppm 各菌株 EPS 時，FL83B 細胞活性均未有降低，而正常態及阻抗態細胞攝入葡萄糖擬似物 2-NBDG 量及肝醣合成量均有明顯提升。初步判定，乳酸菌胞外多醣可能具有改善肝臟調節血糖能力之功效，未來可繼續探討傳訊路徑及相關蛋白表現。

Abstract

Diabetes is caused by deficiency in the secretion or action of insulin. Liver is one of the main insulin-responding organs and plays pivotal roles in maintaining glucose homeostasis via regulation of glucose uptake, deposition and metabolism. Lactic acid bacteria (LAB) have been widely applied in various functional foods, with known probiotic assets such as balancing microbial ecology in gut, fine-tune immune response and glycemia. These health-promoting properties may at least in part associate with the exopolysaccharides (EPS) of LAB. In this study, we screened high EPS-producing LABs from 24 strains, and studied the effects of various culturing conditions, including glucose supplementation, temperature, culturing time and initial pH, on EPS production. Extracted EPS were then used to test FL83B hepatocytes for glucose uptake and glycogen synthesis. Adding glucose led to significantly higher EPS production in all 6 high producing strains, i.e. KT, LDB 4-2, BCRC 12574, BCRC 14759, BCRC 16000 and BCRC 14691, with the highest (1.8g/L) in LDB 4-2. When culturing pH was adjusted to 4.5 and 5.5, 6.5 or 7.5, LDB 4-2 also showed highest EPS production (887, 932, 777 and 920 mg/L) among tested strains. BCRC 12574 produced more EPS (876 mg/L) at pH7.5. KT had best production at lower temperatures (865~944 mg/L at 15~25°C), while LDB 4-2 produced more (917.72 mg/L) EPS than others at 45°C. With prolonged culturing, EPS production of all LAB strains was gradually declined, and was the lowest at the end of test (day 7). Obviously all those culturing conditions affected EPS production of tested LAB. For testing with FL83B cells, EPS was extracted from LAB after growing at 37°C for 48hr. Gel permeation chromatography revealed that the molecular weights of extracted EPS ranged between 850~1200 kDa. Adding 50~800 ppm of EPS to the culture of FL83B cells did not reduce cell viability, and did significantly enhance the uptake of a glucose analogue, 2-NBDG, and glycogen content in normal or high-glucose induced insulin resistant FL83B cells. Preliminary results obtained in this study suggest EPS from LAB may possess hypoglycemic activity toward hepatocytes. Further investigations on signaling pathways and expressions of related proteins are welcomed.

壹、前言

隨著全球科技之發達，生活壓力劇增，人們藉由飲食紓解壓力，又因飲食的精緻化、攝取過多之高脂及高糖，且缺乏運動及生活作息不正常，導致文明病日益漸增，更有代謝症候群 (metabolic syndrome) 之一詞出現。糖尿病及其併發症也列為代謝症候群之中，並在國人十大死因中，名次高居不下，且糖尿病罹患之族群已逐漸年輕化，所以糖尿病備受重視，亦為重要研究方向之一。雖然糖尿病之藥物治療已相當多元，但仍有些許副作用，故現代人們希望可藉由其他天然食物或中草藥來改善胰島素阻抗。

在眾多保健食品中，乳酸菌自古以來常被應用於傳統發酵食品中，且被視為安全性物質 (GRAS ; generally regarded as safe)。乳酸菌現今研究相當多元，其在免疫調控層面為較多研究之方向，但亦有文獻表示糖尿病其與免疫反應具相關性，然而乳酸菌應用於調控血糖之能力，目前篩選平台多為動物試驗，而較少文獻探討細胞膜式，而在眾多文獻中，已證實乳酸菌可改善葡萄糖攝入量，進而達到血糖平衡 (Matsuzaki *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1999; Tabuchi *et al.*, 2003; Yamano *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2007; Abeer, 2009; Kim *et al.*, 2012; Moroti *et al.*, 2012)。

學者 Ruas-Madiedo 等 (2002) 提出乳酸菌能擁有多種生理功效，主要是 EPS 之影響。*Bifidobacterium* 分離之 EPS 具抗菌效果並有免疫調節之作用 (Wu *et al.*, 2010)。kefiran 為 *Lactobacillus* 屬分泌的其中一種 EPS，給予高膽固醇兔子 1% w/w 之 kefiran，可藉由抗發炎及抗氧化特性預防且延緩動脈硬化 (Liu *et al.*, 2011)。而由先前文獻論點指出，細胞激素、發炎反應及氧化能力皆與糖脂毒性有關，除此之外，中草藥及茶類中多醣已被確定其藉由調節血中葡萄糖，而改善胰島素阻抗 (胡, 2002; Xie and Du, 2011; Patel *et al.*, 2012)。

本實驗室先前研究，利用 FL83B 細胞透過高濃度葡萄糖產生胰島素抗性，並添加黃金銀耳之酸性多醣體觀察其是否具調控血糖平衡之效用，結果證實加入

黃金銀耳之酸性多醣體後，可增加細胞 2-NBDG 之帶入量及肝醣合成。故本研究細胞試驗將套用此模式，探討乳酸菌株之 EPS 是否可行同樣之模式進而達到調節血糖。而乳酸菌 EPS 之產率，會因為菌株或生長條件之不同而有異，所以本論文將探討乳酸菌於不同 pH 值、溫度、培養時間及葡萄糖添加之 EPS 產量，找出乳酸菌株最適生長 EPS 之條件，以增加 EPS 的生成量。

貳、文獻回顧

一、乳酸菌之介紹

自古以來，乳酸菌已被廣泛應用於食品上。約西元前五千年，美索不達米亞的蘇美人發現在炎熱天氣下裝於葫蘆內的羊奶形成了凝乳。而最早記載乳酸菌之文獻為舊約聖經創世紀篇，提及「亞柏拉罕以甜奶及酸奶款待三位天使」。而在兩千多年前，釋迦牟尼的教典中曾提及乳酸菌分泌物有關之經文，「大涅槃經猶如醍醐，最上最妙，若能服用，眾病悉除，一切諸藥悉入其中。」其意思是指若能服用醍醐則能消除百病。而製造醍醐的過程內容為「從牛出乳，從乳出酪，從酪出生酥，從生酥出熟酥，從熟酥出醍醐。醍醐最上。」此段經文是述說牛奶去除脂肪後便可得到乳酪，從乳酪中便可得到生菌，許多生菌生長並成熟後，便會產生醍醐，而醍醐便是乳酸菌。法國化學兼微生物學家巴斯德於 1857 年發現酸乳中存在微小物體，並將其定名為「levue lac tieu」，至此揭開乳酸菌發酵作用之神秘面紗 (廖, 1998)。而在 1907 年，科學家 Elie Metchnikoff 研究某些東歐地區長壽地區之飲食文化後所提出「長壽說」，其提及此些地區的飲食中會攝取大量的酸乳 (發酵乳)，而酸乳中的乳酸菌能夠維持腸胃道平衡以延緩老化發生，此理論成為乳酸菌為益生菌的基礎 (黃, 2006)。而現今乳酸菌不僅僅添加於醱酵食品或醱酵乳中，更能應用於保健食品上，維持體內腸胃道菌相平衡或調節免疫力。綜觀上述，從古至今乳酸菌已在食品工業或保健食品之應用上都扮演無可取代的角色。

(一) 乳酸菌基本特性

乳酸菌是一群可利用醣類醱酵而產生乳酸代謝物的細菌總稱，此為一般習慣用語，並非學術分類上正式名稱。乳酸菌可廣泛分布在自然界中，且在多數動物消化道中為優勢菌種，少數具有芽孢及莢膜，不具活動性，可在 15°C~45°C 度中生長，一般最適宜生長溫度為 37°C。其基本特性為：1、革蘭氏陽性菌 (gram positive bacteria)。2、型態為球菌或桿菌。3、無運動性 (non-motile)。4、微好氧 (microaerophilic) 至 (厭氧性 anaerobic)。5、觸酶 (過氧化氫酶) 反應呈陰性 (catalase negative)。6、通常缺乏細胞色素 (cytochrome)。7、除了 *Sporolactobacillus* 外，皆不產內生孢子 (non-endosporing)。8、營養需求複雜 (nutritional requirements complex)，須有醣類、胺基酸和酸衍生物為生物及多種生長素才能生長。9、含數種蛋白酶 (protease) 及脂解酶 (lipase)，但活性低，可使蛋白質被分解而不產生腐

敗物。10、代謝葡萄糖後可產生 40~50% 以上乳酸，除了 *bifidobacterium* (Sneath *et al.*, 1986; 陳和林, 2004)。

(二) 乳酸菌分類

近年來因為科技不斷發展，依日本株式會社 農 (Minori.Inc) 資料顯示，目前普遍認為的乳酸菌已由早期的四個屬 (genus) 再細分及擴充為 28 個屬，其中常見的乳酸菌屬有：乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)、乳酸球菌屬 (*Lactococcus*)、雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*)、明串球菌屬 (*Leuconostoc*)、足球菌屬 (*Pediococcus*) 及鏈球菌屬 (*Sterptococcus*)。比較少見為：*Melissococcus* 屬、*Enterococcus* 屬、*Trichococcus* 屬、*Carnobacterium* 屬、*Vagococcus* 屬、*Tetragenococcus* 屬、*Atopobium* 屬、*Weissella* 屬、*Oenococcus* 屬、*Abiotrophia* 屬、*Desemzia* 屬、*Paralactobacillus* 屬、*Granulicatella* 屬、*Alkalibacterium* 屬、*Olsenella* 屬、*Isobaculum* 屬、*Marinilactibacillus* 屬、*Atopostipes* 屬、*Lactovum* 屬、*Pilibacter* 屬、*Fructobacillus* 屬、*Lacticigenium* 屬及 *Bavariococcus* 屬 (李, 2000)。而常使用於食品業上之乳酸菌株如表 1-1 (李, 1989; 黃, 1991; 佐佐木隆, 1998; 蔡, 1998; 林, 2006; 陳, 2008)

(三) 乳酸菌之醱酵

乳酸菌代謝途徑及醱酵最終產物的種類不同，而可分為下列兩種 (1) 同型醱酵 (Homofermentation)：其所產生之能量為異型發酵的兩倍，主要是由糖解作用將醣類分解為丙酮酸後，直接還原成約 90~100% 的乳酸代謝產物，如 *Lactococcus* spp. *Streptococcus* spp. 等；但若環境中有五碳糖 (pentose) 存在時或生長環境有改變時，其終產物不僅有乳酸甚至會有醋酸之產生 (Landon, 1976; Brown and Collin, 1997)。(2) 異型醱酵 (Heterofermentation)：除了可藉由糖解作用使每莫耳葡萄糖產生一莫耳 ATP 與乳酸 (約 45~50 % 的理論值)，其也可經由酵素 (Phosphoketolase) 作用，產生如二氧化碳、乙醇等其他產物 (Sneath *et al.*, 1986)，且其比同型醱酵可產較多乙烯乙醛 (acetylaldehyde) 及雙乙烯 (diacetyl) 等香氣成分 (Collins, 1972)，如 *Leuconostoc* spp. 等。主要常用乳酸菌屬之發酵型態比較為表 1-2。乳酸菌產生之乳酸主要分為兩種：L (+) 乳酸及 D (-) 乳酸。可產生兩種乳酸：嗜酸乳桿菌 (*L. acidophilus*)、*L. helveticus* 等。僅能產生 D (-) 乳酸：乳酸桿菌 (*L. lactis*)、*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*。僅產生 L (+) 乳酸：雙歧桿菌、鏈球菌屬、酪酸乳桿菌 (*L. casei*) 等。

(四) 乳酸菌之應用

乳酸菌應用型式不只是菌體本身，其發酵代謝物也常被應用於食品中。目前市售乳酸菌產品型式可分為六種：1、發酵乳品及飲料類。2、奶粉類。3、錠片粉末膠囊類。4、休閒食品 如口香糖。5、醃製蔬菜。6、固態乳製品 (陳等, 2007)。又因其應用功能大致可分為兩大類：

1、食品工業層面 (廖, 1998; 陳, 2007)

(1) 產生特殊香氣

乳製品中的乳酸菌可代謝檸檬酸，產生香味成分雙乙醯 (diacetyl)、3-羥基丁酮 (acetoin)、乙醯乙醇 (acetoethyl alcohol)、乙醯乙醛 (acetoacetaldehyde)、乳酸及裂解脂類、蛋白質的小分子。

(2) 去除異味

其作用機制尚未明瞭，但已有其應用實例，如：改善畜魚肉味臭氣、蛋製品臭氣、牛乳乳味、蔬菜類青臭類或大豆豆乳異味之去除 (將 carbonyl compound 轉成有機酸)。

(3) 淡化食品顏色

乳酸菌在有氧存在下，透過 flaoprotein oxidase 或 NADH peroxidase 將養分子轉變成過氧化氫，乳酸菌因其本身缺乏 catalase 故過氧化氫會蓄積在食物中。過氧化氫除了可抑菌，也可改善肉品某些不良顏色 (陳, 1991)。同時亦有文獻提及，醬油經乳酸菌作用後可產生淡化現象 (李, 1989)。

(4) 代謝物之利用

利用乳酸菌發酵後之代謝產物，如酵素、寡糖、聚葡萄糖等。不同菌種之 *Bifidobacterium*，可利用本身酵素系統而產生多種寡糖，例如果寡糖及大豆寡糖。*S.thermophilus* 可經乳糖分解酶合成乳寡糖。*Leuconostoc mesenteroides* 之聚葡萄糖可被用於製造代用血漿 (廖, 1998)。

表 1-1、常應用於食品業之乳酸菌菌株

Table 1-1. Major lactic acid bacteria used in food.

利用領域	實例	常用菌株
乳製品	乳酪	<i>Stc. thermophilus</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Leuc. cemoris</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i>
	發酵乳	<i>Lb. bulgaricus subsp. bulgaricus</i> , <i>Stc. thermophilus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lc. Lactis subsp. lactis</i> , <i>Lc. Lactis subsp.</i> <i>cremoris</i> , <i>Leuc. citrovorum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>L. jugurti</i> , <i>L. kefir</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i>
	其他：Kephir、 發酵奶油	<i>Stc diaceilactis</i> , <i>Lc Lactis subsp. lactis</i> , <i>Lc Lactis subsp.</i> <i>cremoris</i>
肉魚製品	香腸	<i>Lactobacillus spp</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricu</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. Saek</i> , <i>Lb. carvatus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Ped. cerevisae</i> , <i>Stc. lactis</i> , <i>Stc. diacetilactis</i> , <i>Leuc. Cemoris</i> , <i>Leuc. Citrovorum</i> , <i>Lc. Lactis subsp. lactis</i> ,
蔬果製品	葡萄酒、泡菜	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Leuc. mesenterodies</i> , <i>Leuc. Oenos</i> , <i>Leuc.</i> <i>gracile</i> , <i>Ped. cerevisae</i> , <i>Ec. Faecalis</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb.</i> <i>hilgardii</i>
穀物製品	味噌、醬油、發 酵豆乳、發酵麵 糰、臭豆腐	<i>Leuc. mesenterodies</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc.</i> <i>Lactis subsp. lactis</i> , <i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Stc. thermophilus</i> , <i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> , <i>Lactobacillus spp</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. hilgardii</i> ,
有機物製造	乳酸、葡萄糖、 葡聚糖、乳酸鏈 球菌素	
保健相關	整腸劑、乳酸菌 製劑	

Ec.: *Enterococcus*, *Lb.*: *Lactobacillus*, *Lc.*: *Lactococcus*,

Leuc.: *Leuconostoc*, *Ped.*: *Pediococcus*, *Stc.*: *Streptococcus*

(修改佐佐木隆, 1998; 蔡, 1998)

表1-2、乳酸菌主要各屬之比較

Table 1-2. The different of lactic acid bacteria

屬名	型態	醱酵形式	好或厭氧性
乳酸桿菌屬	桿菌	同型、異型醱酵	兼性厭氧
鏈球菌屬	雙鏈球菌	同型醱酵	兼性厭氧
足球菌屬	四鏈球菌	同型醱酵	兼性厭氧
明串菌屬	雙鏈球菌	異型醱酵	兼性厭氧
雙歧桿菌屬	桿菌	異型醱酵	絕對厭氧

(蔡, 1998; 黃, 2006)

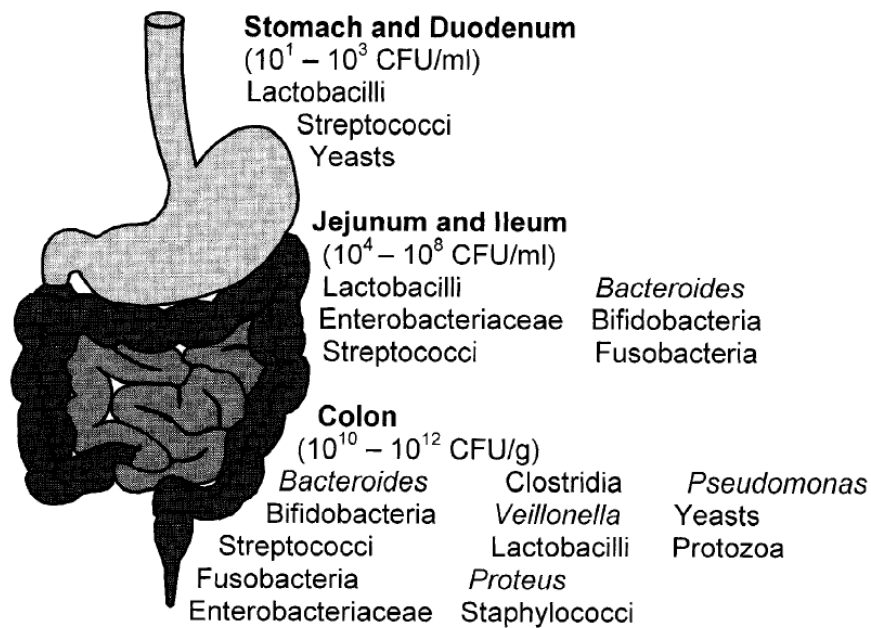


圖 1-1、人體內微生物之分佈圖

Fig. 1-1. Microbial colonization of the human gastro-intestinal tract.

(Holzapfel *et al.*, 1998)

(5) 提高產品營養價值 (生物轉換力)

部分乳酸菌具有特殊轉換作用，如 *Lactobacillus* 菌種可將甘油轉變成丙烯醛；及將木糖轉變成異木糖。乳酸菌液亦可產生共軛脂肪酸，藉此生產高附加價值產物，使其發展潛力 (吳, 2008)。

(6) 提升食品保存性

乳酸菌在發酵過程中會產生多種抑菌之代謝物，如醋酸、乳酸、過氧化氫、二氧化碳及雙乙醯等，其主要是因 pH 隨之下降，使有害菌無法在低 pH 環境中生長 (陳, 1991)。另外有些菌種可分泌抑菌物質如較為常見之 *Streptococcus faecalis* 及 *S. lactis* 所分泌的抗生素 nisin、抗菌物質 reuterin 及產生多胜肽類蛋白質型或含 lantibiotics 型 (李, 1989)。故乳酸菌可提升食品的保存及安全性。

表 1-3、現今市售產品中常見之益生菌菌株

Table 1-3. The most commonly used species of lactic acid bacteria in probiotic preparations

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. (<i>bulgaricus</i>)	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

(Parvez *et al.*, 2006)

2、食品保健層面

人體腸胃道中含多種微生物 (圖 1-1)，而乳酸菌為最重要之腸內菌群 (顏, 1991)。乳酸菌因附著於腸腔及與淋巴組織接觸，進而刺激腸道相關淋巴組織非特異性及特異性之免疫反應，因此常被用於一些腸道疾病的預防與治療

(Fooks and Gibson, 2002; Matsuzali and chin, 2000; 陳等, 2007)。近年來，乳酸菌被稱為益生菌之一。

(1) 益生菌 (probiotics) 之定義

益生菌 (probiotics) 其名源自於希臘語，意指 for life，對生命有益之意。1974 年學者 Parker 定義益生菌為能夠促進宿主腸道菌相平衡的微生物或物質。學者 Salminen (1996) 認為對宿主健康有益之微生物及其細胞組成份即為 probiotics，且其不一定是為活菌。

(2) 符合益生菌之條件 (Havenaar *et al.*, 1992; Sarrela *et al.*, 2002)

益生菌必須符合下列條件：

- A、菌株本身特質，為 GRAS 菌株 (安全菌株)。
- B、可耐胃腸的 pH (胃酸) 與膽鹽。
- C、對腸壁具有吸附性並能生長 (對宿主的上皮細胞具有吸附性)。
- D、具免疫調節功效。
- E、有良好的穩定性與加工特性。
- F、可廣泛的被接受。
- G、保持良好的儲藏活性。
- H、加工製程中具穩定性。
- I、對抗生素具有耐受性。
- J、對其他微生物具有抑制性。

而目前市售產品中常見之益生菌菌株為表 1-3 (Parvez *et al.*, 2006)。

(3) 益生菌之作用機制

益生菌保護與治療的主要機制，至今尚未清楚。但有多個假設，可分為下列數種機轉功用 (Fuller, 1992; 陳等, 2007)：

A、維持正常腸道內菌相，競爭及排除有害病原菌。

B、分泌抑菌物質，以增加宿主的免疫力。

C、降低腸道酸鹼值。

D、刺激相關之解毒(detoxification)酵素反應的發生。

E、促進維生素之合成 (vitB 群 K)。

(4) 益生菌之生理功效

益生菌常見生理功效主要可分為三大種類來探討之

A、抑制致病菌，維持腸道菌相之平衡

腸道內的益生菌藉由吸附於上皮細胞絨毛刷狀邊緣上，進而與外來致病菌競爭其位置及營養物質而使病原菌減少。抑或益生菌於腸道中產生有機酸或是具抑菌功效之高分子蛋白質，如：抑菌素等，而達到抑制病原菌生長 (陳, 2007; Arunachalam, 1999)。已有許多研究文獻證實若適當添加益生菌於日常生活中，作為膳食補充品 (dietary supplement)，可以減緩腸胃疾病的感染。

a、預防食物病原菌引起之腹瀉

當 *Staphylococcus*、*Salmonella*、*Clostridium*、*E. coli*、*L. monocytogenes* 等細菌於食品中繁殖，且人體食入後會產生腹瀉等中毒現象。然而益生菌可抑制這些病原菌於腸道中繁殖。文獻指出益生菌可附著於 Hs0074 和 CaCO₂ 腸道細胞上，進而抑制大腸桿菌的附著能力 (Ouweland and Salminen, 1998)。2002 年學者 Fook and Gibson 將 *L. plantarum* 0407 及 *B. bifidum* Bb12 培養且離心後取其上清液，發現其可抑制 *E. coli* 9517 及 *Salmonella enteritidis* 4444 生長。研究證實單獨食用 *L. rhamnosus* GG 能降低桿菌性痢疾的發生。於體外試驗中，併用 *L. rhamnosus* GG 與 *L. acidophilus* 時，可有效抑制沙門氏菌於腸道中繁殖。*L. casei* Shirota 經老鼠試驗證實其可提升上皮細胞對抗沙門氏菌、大腸桿菌及李斯特菌之能力 (陳, 2007; 黃, 2004)。

b、預防旅行者腹瀉

旅行者腹瀉大多是經由食物傳染。較常發生於在開發中熱帶國家，因其

環境衛生不佳的情況，如未適當清洗食物、食物保存不良等，都會提生旅行者腹瀉的機會。旅行者腹瀉大部分由細菌感染引起，如大腸桿菌、沙門氏菌、志賀氏菌等。較少由病毒引起，如輪狀病毒 (rotavirus)、諾羅病毒 (norovirus) 等。學者 Oksanen 等人 (1990) 投予 *L. casei* 於往返土耳其旅行者，結果顯示可減少腹瀉發生率。經人體試驗證實，同時服用 *L. acidophilus* 與 *B. bifidum* 可減少腹瀉的發生，而單獨食用 *L. rhamnosus* GG 也具同效果 (黃, 2004)。

c、預防嬰兒型腹瀉且緩解其症狀

輪狀病毒是引起嬰兒型腹瀉 (infantile diarrhea) 的主因，好發於幼兒或新生兒 (Bae *et al.*, 2002)。當病毒侵入腸道後並於小腸上皮細胞繁殖，進而破壞腸壁的絨毛組織，使腸道通透性提高而造成腹瀉 (Jalonen *et al.*, 1991)。益生菌能產生對輪狀病毒具有特異性之 IgA 抗體，並減少腸道通透性，且調整腸道菌相，進而延緩腹瀉 (Saavedra *et al.*, 1994)。學者 Saavedra (1994) 指出孩童併用 *S.thermophilus* 與 *B. bifidum* 後可預防輪狀病毒之急性腹瀉及再現症狀(episodes)。研究證實投予 *L. casei* GG 於孩童中可改善其腹瀉情形並可增加抗感染之免疫反應 (Majamaa, 1995)。在臨床試驗中，*L. casei* Shirota、*L. rhamnosus* GG、*L. reuteri* 及 *B. lactic* Bb12 皆能有效縮短腹瀉時間 (Shornikova *et al.*, 1997)。此外單獨食用 *S.thermophilus*、*B. bifidum* 或 *B. breve* 亦可預防由輪狀病毒引起之嬰兒型腹瀉 (Ouweland *et al.*, 2002; 陳, 2007)。

d、預防抗生素誘發型腹瀉

抗生素誘發型腹瀉 (antibiotic associated diarrhea, 簡稱 AAD) 是指應用抗生素後繼發腹瀉，為較常見的藥物不良反應，其發生率視不同抗生素而異。主要是因為抗生素會影響腸道菌生長力，進而破壞腸道菌相所引起。當 *Clostridium difficile* 與 *Candida* 等腐敗菌開始大量繁殖並產毒而引發腹瀉。*B. longum*、*L. rhamnosus* GG、*S. faecium* 經實驗證實可有效減緩抗生素誘發型腹瀉的發生 (Siitonen *et al.*, 1990; Beaugerie and Petit, 2004; Plummer *et al.*, 2004)。*Ent. Faecium* 也具同樣效果，且 *L. rhamnosus* GG 亦能減緩紅黴素之副作用。*S. cerevisiae* (原名為 *Saccharomyces boulardii*) 除了能降低發生率外，還可抑制白色念珠菌於腸道內定殖 (陳, 2007)。

e、預防潰瘍性結腸炎

潰瘍性結腸炎 (Ulcerative Colitis, 又名潰爛性大腸炎) 是一種大腸 (結腸和直腸) 組織的炎症, 症狀包括腹瀉、腹部痙攣、直腸出血、體重喪失和發燒, 且增加大腸癌罹患率。臨床實驗中, 針對接受過迴腸小囊肛門吻合手術 (ileal pouch-anal anastomosis) 的患者, 投予高濃度的益生菌調劑配方 VSL-3 其結果顯示 VSL-3 能夠有效預防急性囊炎的發生, 並且改善病人的生活品質 (Gionchetti *et al.*, 2003; 陳, 2005; 陳, 2007)。

f、預防再發性結腸炎

人體試驗證實, 服用 *L. rhamnosus* GG 可改善結腸炎症狀 (Biller *et al.*, 1995)。

g、改善大腸急躁症候群之臨床症狀

大腸急躁症 (Irritable Bowel Syndrome, IBS), 也稱為「腸道敏感症」或「刺激性腸症候群」, 為臨床常見的腸胃道疾病, 盛行率約為 10~15%。主要是因為腸道對痛覺過度敏感、腦部和腸道間的調節失衡、腸道活動力改變、腸道本身的因素 (如食物、細菌、發炎等) 或環境的刺激 (如情緒壓力)。症狀主要是慢性反覆性腹痛 (以左下腹較常見) 和排便習慣的改變 (分為以便秘為主、以腹瀉為主或兩者交替出現), 其他少見症狀為噁心、排氣過多、上腹痛或非典型胸痛等, 亦或與腸胃道無關的症狀如經痛、頻尿、性功能障礙或筋膜炎。在臨床實驗中, 針對患有大腸急躁症候群或功能性腹瀉的病人進行研究, 病人服用 VSL-3 益生菌調劑配方後, 糞便中的菌相和生化特性均有明顯的改變, 且有改善臨床症狀之效果 (陳, 2007)。Dunne 等學者 (1999) 提出服用 *Lactobacillus* GG 或以 *L. salivarius* subsp. *Salivarius* UCC118 搭配 *Bifidobacterium longum infantis* UC-C35624 可降低抗原刺激腸道而減緩 Crohn's disease。也有文獻指出可補充 *L. plantarum* 來減緩 IBS 所引起的不適 (丁, 2000)。

h、抑制幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 的生長

幽門螺旋桿菌為革蘭氏陰性的螺旋狀桿菌, 因為它具有特殊的螺旋結構及鞭毛, 所以可以鑽入胃黏液而到達胃黏膜上, 同時分泌一種酵素, 將尿素

轉化成鹼性的氨，在菌體外形成一層防護層，以防胃酸的侵蝕，故能生存於強酸的環境中，此外它還可分泌不同的消化酵素，破壞胃粘膜之表皮細胞，造成胃發炎、消化性潰瘍及胃癌等疾病。益生菌因產有機酸使 pH 下降，以減少幽門螺旋桿菌的滋生；同時益生菌會分泌抑菌素 (bacteriocin) 減少致病菌之活性；再者，益生菌可增加腸道黏膜對外來微生物之防禦力 (施,2009)。國內於人體試驗中發現，益生菌可抑制胃幽門螺旋桿菌生長，進而提升除菌成功率。其可能的機制是，益生菌在腸道中釋放免疫調控物質至胃部，而抑制了胃幽門螺旋桿菌的生長；另外有研究認為仍有少量的益生菌存活於胃中，也許扮演了輔助抑制胃幽門螺旋桿菌生長的角色 (郭, 2010)。Kabir 等學者 (1997) 指出 *L. salivarius* 於體外及動物試驗中皆有結抗幽門桿菌之作用。*L. johnsonii* La1 (LC-1) 發酵液具有殺菌能力，對幽門螺旋桿菌也有部份抑制作用，但其抑菌效用與產生之酸並無直接關聯，反而是一種未知抗生物質的效果 (Bernet-Camard *et al.*, 1997; Miche-tti *et al.*, 1999; Felley *et al.*, 2001)。

B、免疫調節作用

益生菌須於腸道中存活且定殖於腸壁細胞常可以發揮其調節宿主之免疫反應 (王, 2000)。益生菌在免疫調節功能中扮演雙重角色，一能透過 Th1 細胞促使體液性免疫反應增加 IgA 分泌，二來也可藉由 Th2 細胞調控毒殺性 T 細胞(cytotoxic T cells)，促進細胞性免疫反應 (cell-mediated immunity) (丁, 2000; Bengmark, 2000; 林, 2004)。乳酸菌為革蘭氏陽性菌，而革蘭氏陽性菌誘發的細胞激素為 IL-12 與 TNF- α ，較偏向 Th1 的免疫反應，且其產量較革蘭氏陰性菌多；而革蘭氏陰性菌所誘發的細胞激素則為 IL-10 (黃, 2006)。

a、強化免疫系統

乳酸菌可能誘導淋巴細胞分化與增生，促進生成 IgA 抗體及其他細胞激素，如 interleukin- α (IL- α)、interleukin- β (IL- β)、interleukin- γ (IL- γ)、interferon- α (INF- α)、interferon- γ (INF- γ) 等，以刺激免疫系統而抑制腫瘤的生成 (Naidu *et al.*, 1999; Pastka *et al.*, 2001; 黃, 2004)。也可提升巨噬細胞之活性而達到強化人體非特異性先天免疫力 (innate immunity) (林, 2004)。Gill 等學者 (2000) 發現 *L. rhamnosus*、*L. acidophilus* 或 *B. lactis* 餵食於老鼠後可提高自然殺手細胞之能力、使淋巴細胞增生及增加周邊血液淋巴細胞與巨噬細胞之

吞噬能力。而 *B. longum* Bb12 或 *L. acidophilus* La1 皆能提升白血球之吞噬力 (Hatcher and Lambrecht, 1993; Schiffrin *et al.*, 1995)。文獻指出優酪乳較牛奶更能促使淋巴細胞增生且產大量的 INF- γ (Aattouri, 2002)。將 *L. casei* Shirota 經老鼠試驗發現其可促使 INF- γ 及 IL-2 之分泌，且其可增加自然殺手細胞之活性 (Matsuzaki *et al.*, 1998; Nagao *et al.*, 2000)。

b、減緩過敏現象

Th1 與 Th2 免疫反應失衡時則會導致過敏性疾病的產生，且過敏原較偏向於 Th2 之反應引起。乳酸菌可增加 TNF- α 之量進而促使 INF- γ 也隨之產生，走向 Th1 反應，減少 IgE 之生成，以減緩過敏反應。然而乳酸菌具有水解食物過敏原之能力，可維持腸道黏膜屏障，將低過敏原的吸收 (林, 2004)。多個研究指出 *L. rhamnosus* GG 可改善嬰兒過敏症或其他過敏 (Majamaa and Isolauri, 1997; Isolauri *et al.*, 2000; Betsi *et al.*, 2008; 施, 2009)。 *B. lactis* Bb-12 經人體試驗後證實其可助於改善腸道菌相且緩和過敏發炎反應 (Kirjavainen *et al.*, 2002)。

C、代謝作用

益生菌的代謝產物，如短鏈脂肪酸、抑癌物質、乳糖分解酵素或其他成分等，具有以下之效用：

a、降低結腸癌發生的機率

因飲食習慣及環境之改變，現代人多為外食族，長期缺乏攝取足夠之蔬果，因而使雙歧桿菌數量減少、腸道內產氣莢膜梭菌等有害菌菌數增加，並導致腸道及糞便內的 β -glucuronidase、azooreductase、urease、nitroreductase 及 glycocholic acid reductase 等致癌酵素濃度增加，促使致癌物的產生，提升罹患結腸癌率 (黃, 2004)。益生菌代謝可產生短鏈脂肪酸與維生素，其中短鏈脂肪酸可刺激大腸與小腸腸壁上皮細胞之增殖與分化，且丁酸也有抑制腸道內腫瘤增生與分化之效 (黃, 2004; Goldin and Gorbach, 1984)。額外補充益生菌能減少致癌酵素的濃度，進而降低罹癌率 (Benno *et al.*, 1991; Hirayama and Rafter, 2000)。再者益生菌可藉由活化巨噬細胞及淋巴細胞，而增強體內非特異性之先天免疫、增加 IgA 濃度，並產生 γ -干擾素，以抑制腫瘤形成。但有研究顯示，在防治腫瘤功效上具有菌株特異性，而且不同菌株亦可能有

不同的抗癌作用機制 (Ziemer and Gibson, 1998; Steer *et al.*, 2000; Bielecka *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003)。Kampman 等學者 (1994) 提出由流行病學中發現發酵乳攝取量與大腸癌罹患率成負相關。例如益生菌 *B. bifidum* 已有許多文獻指出其可減少減少致癌酵素 (Marteau *et al.*, 1990)，抑制致癌物產生 (Ling *et al.*, 1994; Farnades *et al.*, 1990)。

b、改善乳糖不耐症

小腸中 β 半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 的活性會因年齡增長而降低，當乳糖為被完全消化而進入腸道後，因微生物發酵而產生氣體、乙酸與丁酸等短鏈脂肪酸，使腸道滲透壓增加，而造成腸道不適如脹氣、腹痛或腹瀉等症狀，通稱為「乳糖不耐症」(王, 2000)。而文獻指出，益生菌可對乳品中的乳糖進行預先發酵，產生乳糖分解酶 (lactase)，且可維持其活性到達腸內作用，故能夠有效改善患有先天性腸黏膜 β -galactosidase 缺乏症所引起的乳糖代謝障礙，或是增進因胃腸炎等腸道疾病所導致的乳糖酶活性不足者對乳品的食用性 (Montes *et al.*, 1995; Jia-ng *et al.*, 1996; Mustapha *et al.*, 1997; Naidu *et al.*, 1999)。益生菌的蛋白水解酶能適度的消化降解牛乳蛋白，也可增加乳製品的消化與吸收 (Ziemer *et al.*, 1998; Bi-elecka *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2003)。研究證實 *L. acidophilus* 存在有膽汁之環境中，其細胞膜通透性 (permeability) 增加，且膽汁也可增加基質中 β -galactosidase 的活性 (Noh and Gilliland, 1993)。Jiang 等學者 (1996) 研究發現 *B.longum* B6 之乳糖通透性及 β -galactosidase 的活性最高。

c、具降低膽固醇的功效

膽固醇為細胞質脂蛋白及細胞膜之重要成分，也為膽鹽、膽酸及各種固醇類荷爾蒙之前驅物。益生菌具有增加膽固醇排出量、干擾腸道膽固醇之吸收及影響血之代謝系統 (Nelson *et al.*, 1985)。乳酸菌降膽固醇有多種可能的機制，一為乳酸菌具有的膽鹽水解酵素 (bile salt hydrolase)，可進行去結合作用 (deconjugation) 而產生去結合型態的膽鹽 (deconjugated bile salt)，使膽固醇與去結合型膽鹽產生共沉澱作用，從而達到降低膽固醇的效果 (Klaver *et al.*, 1993; Lourens-Hattingh *et al.*, 2001; 黃, 2004)。但若菌株不具去結合能力，則不會發生此類共沉澱機制(楊,1997)。有文獻表示，pH<6 時去結合型膽鹽之溶解度下降並沉澱，而膽鹽溶解度與膽固醇溶解度具關聯性，膽固醇與膽

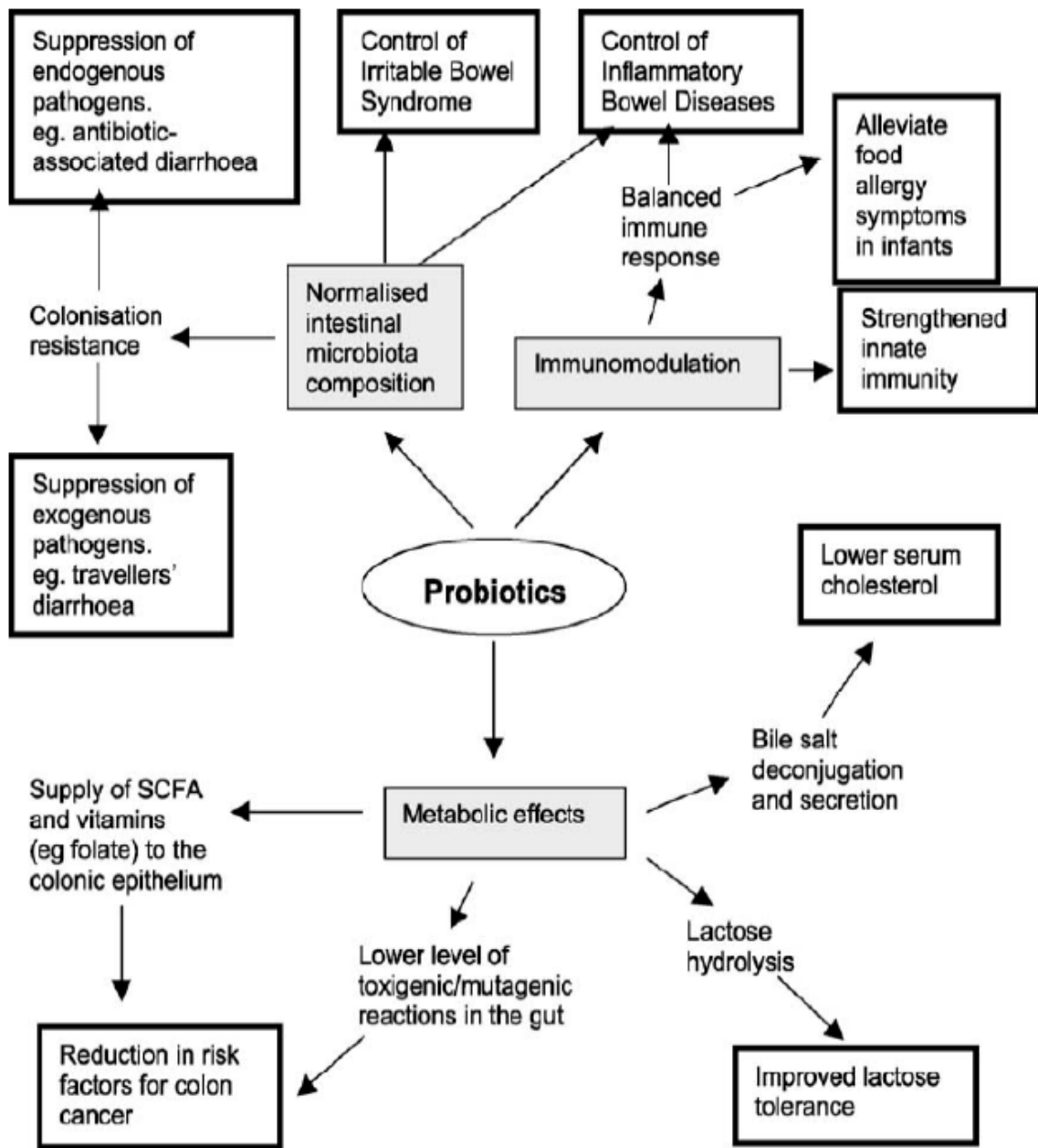


圖 1-2、益生菌之生理功效

Fig. 1-2. Proposed health benefits stemming from probiotic consumption

(Saarela *et al.*, 2002)

鹽會產生共沉澱而隨糞便被排掉 (Brashears *et al.*, 1998; StOnge *et al.*, 2000)。二為乳酸菌細胞膜可鍵結膽固醇，甚至可將吸附的膽固醇進行同化作用 (assimilation)，而代謝成細胞所需物質，其中以乳酸桿菌的降膽固醇的能力較佳 (Grill *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2003)。三為益生菌於代謝過程中產生有機酸 (如乳酸或醋酸)，其可抑制 Hydroxymethylglu-taric-CoA reductase 的活性，進而抑制膽固醇之合成 (Homma, 1998)。動物試驗中，高膽固醇飲食之兔子可藉由優酪乳而降低其血清膽固醇濃度 (Thakur *et al.*, 1981)。而於老鼠實驗可發現 *S. thermophilus* 可使四週大之 SD 大鼠的血中膽固醇減低 (Zommara *et al.*, 1996)。Beena 等學者 (1997) 以 *L. bulgaricus* 與 *S. thermophilus* 或 *B. bifidum* 發酵乳經動物試驗，發現血中 TG、LDL 及總膽固醇皆有下降之趨勢。人體試驗中，每日給予男性優酪乳 125mL 後，可降低血清 LDL 及血中膽固醇 (Schaafsma *et al.*, 1998)。Usman 及 Hosono (1999) 指出小腸中 *L. gasseri* (為 *L. acidophilus* 的亞群 B1) 可將膽固醇結合在細胞膜上，以減少膽固醇之吸收，其機制主要與細胞壁上肽聚糖成分相關。*L. acidophilus* 可同化膽固醇某些成分且降低腸道 pH，於 pH<6 時可與膽固醇產生共沉澱作用，以達到減少血中膽固醇之濃度 (Sanders *et al.*, 1999)。

d、具降低血壓的功效

乳酸菌降血壓機制組要是其產物中含有可抑制 angiotensin I-converting enzyme (ACE) 之成分，其在腎素-血管升壓素-皮質醛酮系統 (rennin-angiotensin-aldosterone system) 中是調控血壓的主要機轉 (劉, 2004; 黃, 2006)。*L. helveticus* 發酵乳餵食 SHR 老鼠發現其可降低 ACE 活性；分析 *L. helveticus* 與 *S. cerevisiae* 之發酵乳發現其有兩個主要胜肽 VPP (Val-Pro-Pro) 與 IPP (Ile-Pro-Pro)，為目前發酵乳中最具抑制 ACE 活性之胜肽，推測其直接進入內皮組織而發揮作用 (Nakamura *et al.*, 1995; 中村, 2001; Leene *et al.*, 2003; Lye *et al.*, 2009)。*L. helveticus* CPN4 中發現胜肽 Try-Pro，且其可降低血壓 (Yamamoto *et al.*, 1999)。給予高血壓病患 *L. helveticus* LBK-16H 發酵乳於 21 周後，結果顯示血壓明顯下降並且無副作用 (Seppo *et al.*, 2003)。混合 *L. casei*、*L. acidophilus*、*S. thermophilus*、*L. bulgarius* 及 *B. longum* 於市售牛乳發酵 30 小時，餵食 SHR 老鼠 8 週後，其可提升抑制 ACE 之能力 (陳, 2001)。

二、乳酸菌之胞外多醣

乳酸菌及多種微生物皆可合成不同的多醣體，而依其與細胞的相對位置則有不同之定義及名稱，大致上可分為三類（圖 1-2）：第一類為胞內多醣（intracellular polysaccharides），主要分佈在細胞質中，提供碳源給菌體利用，如肝醣。第二類為結構多醣（structural polysaccharides），其為構成細胞壁之成分，如革蘭氏陰性菌 G (-) 的脂多醣固定在細胞膜外，革蘭氏陽性菌 G (+) 的脂胞壁酸（lipoteichoic acids）與肽聚醣（peptidoglycan）。第三類為存在細胞壁外之多醣體，又可分成兩種，但一般統稱其為胞外多醣。一為莢膜或莢膜多醣（capsular polysaccharides）以共價鍵結附著於細胞壁上；另一為黏稠多醣（slime polysaccharides）以黏液形式疏鬆結合於細胞表面。

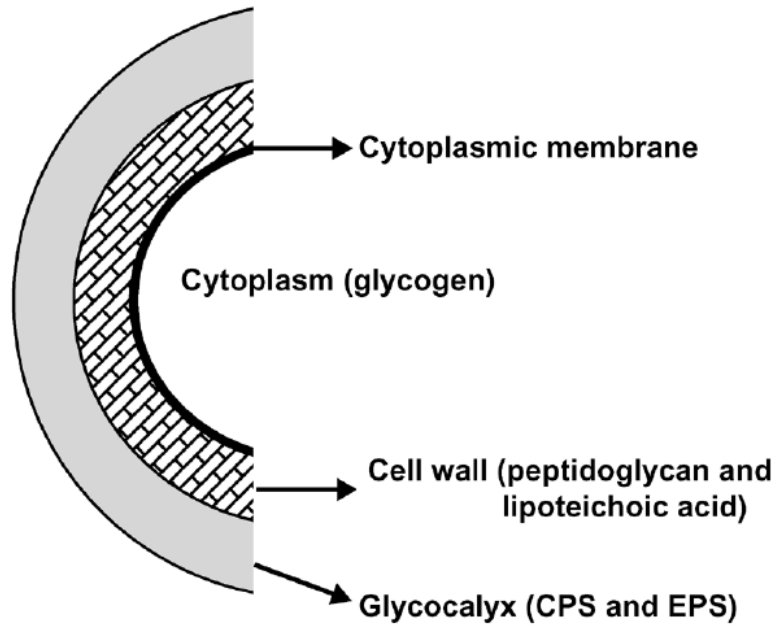
乳酸菌中有多個菌屬具生產胞外多醣（exopolysaccharides, EPS）的能力。胞外多醣是由乳酸菌利用醣類進行發酵後分泌產生而分布於菌體外之高分子多醣類。當菌體受到外在刺激時，菌體會分泌產生高分子多醣類來保護微生物體（楊, 2009）。乳酸菌被認為安全性物質（GRAS : generally regarded as safe），且其不具致病性，較不會引發吞噬作用（Cerning, 1990），故其胞外多醣也被應用在食品工業上，如可做為增稠劑、成膠劑、降低凝析現象等特性（Pham *et al.*, 2000）。而有學者認為乳酸菌促進人體健康效應與其胞外多醣的生理活性有關（Ruas-Madiedo *et al.*, 2002），如抗腫瘤、調節免疫活性降低血中膽固醇等功能（楊, 2009）。綜觀而言，近年來乳酸菌胞外多醣之相關研究備受重視。

（一）乳酸菌胞外多醣組成及結構

有些乳酸菌菌株可藉由發酵醣類而合成胞外多醣（exopolysaccharides, EPS）。而大部分胞外多醣生產菌株並不會分解自身產的胞外多醣（Cerning, 1990）。其生產之胞外多醣其組成、結構及分子量皆不盡相同。大致上可分為兩大類，同質多醣（Homopolysaccharides, HoPS）及異質多醣（Heteropolysaccharides, HePS）。HoPS 僅含一種單醣分子，主要組成為葡萄糖或果糖，又可分為四大群（表 1-4）（Monsan *et al.*, 2001; de Vuyst and Degeest, 1999）：

1、 α -D-葡聚醣（ α -D-glucan）：其又分為三種：（1）Dextran 為葡萄糖以 α -1,6 鍵結之，代表菌株為 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* 及

Gram-positive



Gram-negative

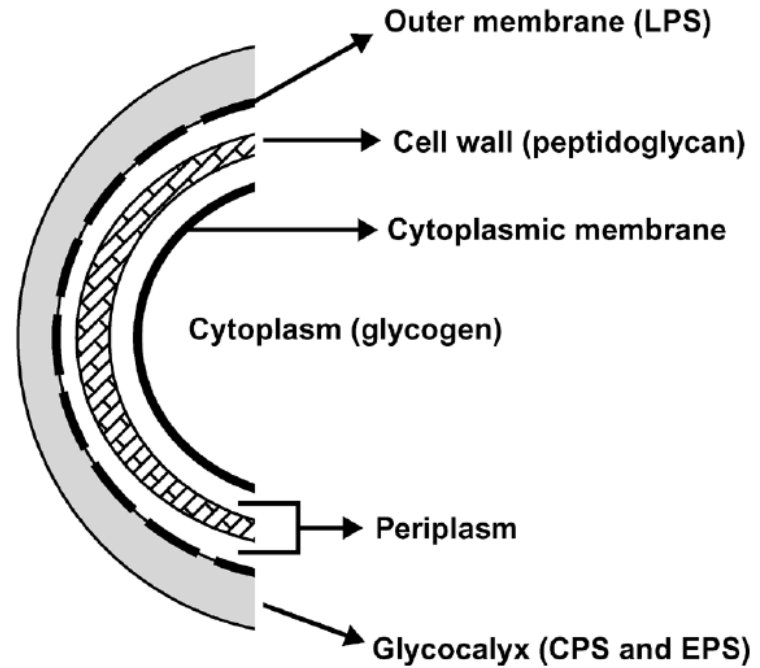


圖 1-2、革蘭氏陰性及陽性菌所產置多醣之細胞分佈部位

Fig.1-2. Cell location of polysaccharides produced by gram-positive and gram-negative bacteria

CPS = Capsular polysaccharides (capsule), EPS = exopolysaccharides (slime layer).

(Ruas *et al.*, 2005)

Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum。(2) *Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sobrinus* 所產生由 α -1,3 鍵結葡萄糖之 mutan。(3) Alternan 為 *Leuconostoc mesenteroides* 以 α -1,6 及 α -1,3 鍵結葡萄糖所產生。分子量一般約為 $6.2\sim 7.1\times 10^6\text{Da}$ 。

2、 β -D-葡聚糖 (β -D-glucan)：為 β -1,3 鍵結葡萄糖而產生，代表菌株為 *Pe-diococcus spp.* 及 *Streptococcus spp.*。

3、聚果糖 (fructans)：又分為二，一為 *Streptococcus salivarius* 所產生之 Levans，主要由 β -2,6 鍵結聚果糖。另一則為 *Streptococcus mutans* 所產生的由 β -2,1 鍵結之 Inulin-like。分子量一般約為 $2.7\sim 21.6\times 10^6\text{Da}$ 。

4、聚半乳糖 (polygalactan) 是 *L. lactis subsp. lactis* H414 所生成，主要為 α -D-半乳糖及 β -D-半乳糖組合而成。

另一則為 HePS，由 2 到 8 種單糖分子或其衍生物組成之不同單糖鍵結的重覆單位構成 (表 1-5)，大部分單糖分子為 D-葡萄糖 (D-glucose)、D-半乳糖 (D-galactose)、L-鼠李糖 (L-rhamnose)、N-乙醯半乳糖胺 (N-acetylglucosamine) 或葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 等。其分子量一般約為 $4\times 10^4\text{Da}\sim 6\times 10^6\text{Da}$ 。大部分高溫乳酸菌所產之胞外多醣為此，產量較低、組成變化較大。而此類型在發酵乳飲料的質地、口感及物性上擔任重要之角色。然而受到培養基成分與培養條件不同之影響，同一乳酸菌也能生產出不同單糖聚合而成之 HePS (Degeest *et al.*, 2001; Ariga *et al.*, 1992; Marshall *et al.*, 1995; Looijesteijn *et al.*, 2000; Grobber *et al.*, 2000)。

在溶液中乳酸菌胞外多醣的物性及流變性質會受到分子量、三度空間結構、分子構形及分子內聚力所影響。胞外多醣的二級與三級結構主要取決於其一級結構，然而組成胞外多醣重覆單元之結構可藉由酵素水解、水解、甲醇降解 (methanolysis)、乙酸解作用 (acetolysis)、Smith 降解作用、過碘酸鹽氧化作用、甲基化分析、1D 及 2D $^1\text{H-NMR}$ 光譜儀分析等方法以確立 (Lemoine *et al.*, 1997; van Casteren *et al.*, 1998; Cerning *et al.*, 1994; Doco *et al.*, 1990; Faber *et al.*, 1998; Navarini *et al.*, 2001; Robijn *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000)。

乳酸菌胞外多醣為高重覆單位之高分子聚合物，大多分子量介於 $40\sim 6\times 10^3$ kDa (de Vuyst and Degeest, 1999)。而不同菌株其胞外多醣分子量也會不同 (Gro-bbrn *et al.*, 1998)。同一菌株於不同培養條件下，其胞外多醣之組成及分子量也會有差異，如 *Antrodia camphorate* CCRC 35396 分子量範圍位在 $91.5\sim 7.98\times 10^2$ kDa (Shu and Lung, 2004)。除此之外，分子量與黏度也有相當的關聯性，一般而言分子量較大者可助於黏度之提升 (Petry *et al.*, 2003)。在生理功效方面，胞外多醣之分子量對免疫特性之影響力不亞於結構或鏈長，一般平均分子量大於 90 kDa 的葡聚醣具有極佳的免疫抗原性 (Kabat and Bezer, 1958)。

(二) 乳酸菌胞外多醣之生成

1、合成路徑

菌體細胞壁上的肽聚糖 (peptidoglycan) 和脂多醣類 (lipopolysaccharide) 與胞外多醣生合成有相關性。細胞外合成路徑 (extracellular synthesis) 可生成同質多醣，須特定糖基供體及受體，而供體的糖基基團可經由葡萄糖基轉移酶 (glucosyl transferase; GTFs) 轉移致受體主鏈上聚合而得之；細胞內合成途徑 (intracellular synthesis) 可生成異質多醣，其於細胞內合成是藉由多種酵素進行一系列複雜的代謝作用而產生之 (楊, 2009)。乳酸菌由胞外攝取乳糖及半乳糖至胞內後經酵素作用而產 EPS (圖 1-3)；其相關酵素因分佈於細胞不同區域而分成四類 (Kumar *et al.*, 2007)：細胞內存在第一及第二類酵素，葡萄糖 (glucose; Glc) 經六碳糖激酶 (hexokinase) 轉換成葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate; Glc-6-P)，Glc-6-P 再藉由磷酸葡萄糖轉位酶 (phosphoglucumutase) 轉化成葡萄糖-1-磷酸 (glucose-1-phosphate; Glc-1-P)，尿苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶 (urine diphosphate glucose pyrophosphorylase; UGPase) 將 Glc-1-P 轉換成尿苷二磷酸-葡萄糖 (urine diphosphate glucose; UDP-Glc)，UDP-Glc 為產生胞外多醣之最關鍵物質，其可經由尿苷二磷酸-半乳糖-4-表異構化酶 (urine diphosphate-galactose-4-epimerase; UDP-Gal-4-epimerase) 催化轉換成尿苷二磷酸-半乳糖 (urine diphosphate-galactose; UDP-Gal)。第三類酵素為存在於細胞膜和細胞壁間質 (periplasmic) 之 GTF，此酵素利用脂質載體 C55-isoprenoid lipid carrier 作為骨

架，將 UDP-Glc 或 UDP-Gal 等前驅物質結合之並形成多醣的重複單位 (圖 1-4)。第四類酵素位於細胞膜外，其負責將多醣的重覆單位與載體 (lipid carrier) 分離並分泌至細胞表面，再者將重覆單位聚合成多醣以莢膜多醣型式附著於細胞表面，或分泌黏質多醣於細胞質中 (Welham *et al.*, 2003)。

2、胞外多醣之基因體

乳酸菌生產的 EPS 重複單位鍵結形式皆有差異，其意味有數種醣基轉移酶參與 EPS 的合成，因此可推測乳酸菌基因體中，包含了具有調控、醣基轉移、聚合、釋出及鏈長決定等功能之蛋白質合成基因，此些基因與合成 EPS 相關 (陳,2007)。第一個鑑定菌株其 EPS 之基因為 *S. thermophilus* Sfi6，Stingle 等學者 (1996)發現基因大小為 15.25 kb 共有 15 個的開放讀架 (ORFs)，其中有 13 個區域 (14.5 kb) 可藉由轉錄得到合成 EPS 的基因，定為 epsA 到 epsM (圖 1-5)。van Kranenburg 等 (1999)利用 *Lc. lactis* NIZO B40 發現其 EPS 基因群為 epsRXABCDEFGHIJKL 共 14 種，其中 epsDEFG 可表現出 glycosyltransferase 的作用。經由比對後推論，蛋白質 EpsA 由 epsA 基因轉譯且與基因調控有關；epsE、F、G、H 和 I 基因則可轉譯出醣基轉移酶 EpsE、F、G、H 和 I，進而決定重覆單位之單醣順序與骨架結構；而 EPS 鏈長決定、聚合與釋出，則是與基因 epsC、D 及 epsJ、K 轉譯之蛋白質較有關聯；epsB、L 和 M 尚未找到同源性基因，但實驗證實若經突變破壞後，仍會影響 EPS 的合成 (陳, 2007)。

3、EPS 生成之影響因子

乳酸菌胞外多醣生成率會因菌株本身之遺傳特性、生長條件 (如 pH、培養時間或培養溫度) 及培養基成分 (如碳源、氮源或其他營養物質) 而有所不同 (Looi jesteijn *et al.*, 2000; Torino *et al.*, 2000; Grobber *et al.*, 2000; 林, 2005; 楊, 2009)。當菌株生長環境非為適當生存情況時，會較利於生成胞外多醣，其或許是因為胞外多醣扮演了保護菌體之角色。一般而言，乳酸菌胞外多醣產量偏低且品質特性多變 (Hallemeersh *et al.*, 2002)。胞外多醣組成分、構型及生化特性也十分多變，大部分菌株之胞外多醣產量約為 200mg/L 或更低 (邱, 2008)。

表 1-4、乳酸菌生成之同質多醣組成

Table 1-4. The component of homopolysaccharides produced by lactic acid bacteria

EPS	Strain	Linkage ^a
α -D-glucans		
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	α -D-Glcp ^b (1→6)
Mutan	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sobrinus</i>	α -D-Glcp ^b (1→3)
Alternan	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -D-Glcp (1→3)/(1→6)
β -D-glucans	<i>Pediococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	β -D-Glcp (1→3)
Fructans		
Levans	<i>Streptococcus salivarius</i>	β -D-Frup (2→6)
Inulin-like	<i>Streptococcus mutans</i>	β -D-Frup (2→1)
Polygalactan	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> H414	α -D-Galp/ β -D-Galp ^c

^aGlc: glucose; Gal: galactose; Fru: fructose.

^bAt least 50% of the respective linkage.

^cHomopolysaccharide containing a pentameric repeating unit of galactose.

(Ruas-Madiedo *et al.*, 2002)

表 1-5、乳酸菌生成之異質多醣組成

Table 1-5. The component of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria

	Repeating units	References
Lactobacillus		
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 291		Faber, Kamerling, and Vliegthart (2001)
<i>Lb. helveticus</i> Lb161		StAAF et al. (2000)
<i>Lb. helveticus</i> K16		Yang et al. (2000)
<i>Lb. rhamnosus</i> C83		Vanhaverbeke et al. (1998)
Streptococcus		
<i>S. macedonius</i> Sc136		Vincent et al. (2001)
<i>S. thermophilus</i> SF1 20		Navarini et al. (2001)
<i>S. thermophilus</i> Rs <i>S. thermophilus</i> Sts		Faber et al. (1998)
<i>S. thermophilus</i> MR-1C		Low et al. (1998)
<i>S. thermophilus</i> S3		Faber, van den Haak, Kamerling, and Vliegthart (2001)
<i>S. thermophilus</i> 8S ^b		Faber (2000)
<i>S. thermophilus</i> EU20		Marshall et al. (2001)
Lactococcus		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B39		van Casteren, Dijkema, Schols, Beldman, and Voragen (2000)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B891		van Casteren, de Waard, Dijkema, Schols, and Voragen (2000)

^aThis table does not contain structures already summarised in previous reviews (De Vuys & Degeest, 1999; Ricciardi & Clementi, 2000; Sikkema & Oba, 1998). (■) β-D-glucose; (□) α-D-glucose; (●) β-D-galactose; (○) α-D-galactose; (◆) β-L-rhamnose; (◇) α-L-rhamnose; (Rib) D-ribose; (Fuc) fucose; (Nac) N-acetyl, (Ac) acetyl; (G) glycerol.

^bSug is 6-O-(3',9'-dideoxy-D-threo-D-altro-nononic acid-2'-yl)-α-D-glucopyranose.

(Ruas-Madiedo *et al.*, 2002)

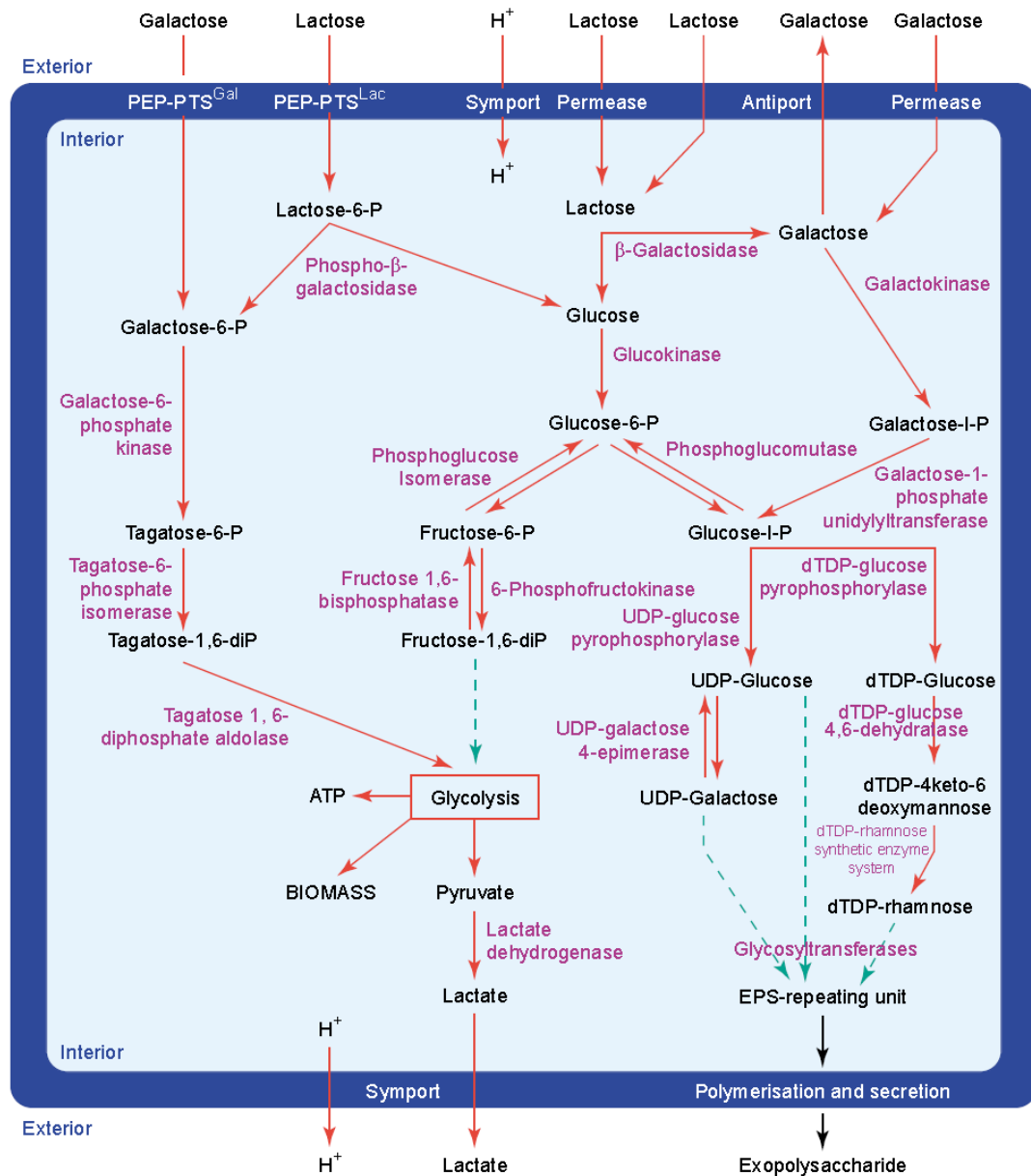


圖 1-3、胞外多醣生合成之路徑

Fig. 1-3. The pathway of EPS biosynthesis

(Welmam *et al.*, 2003)

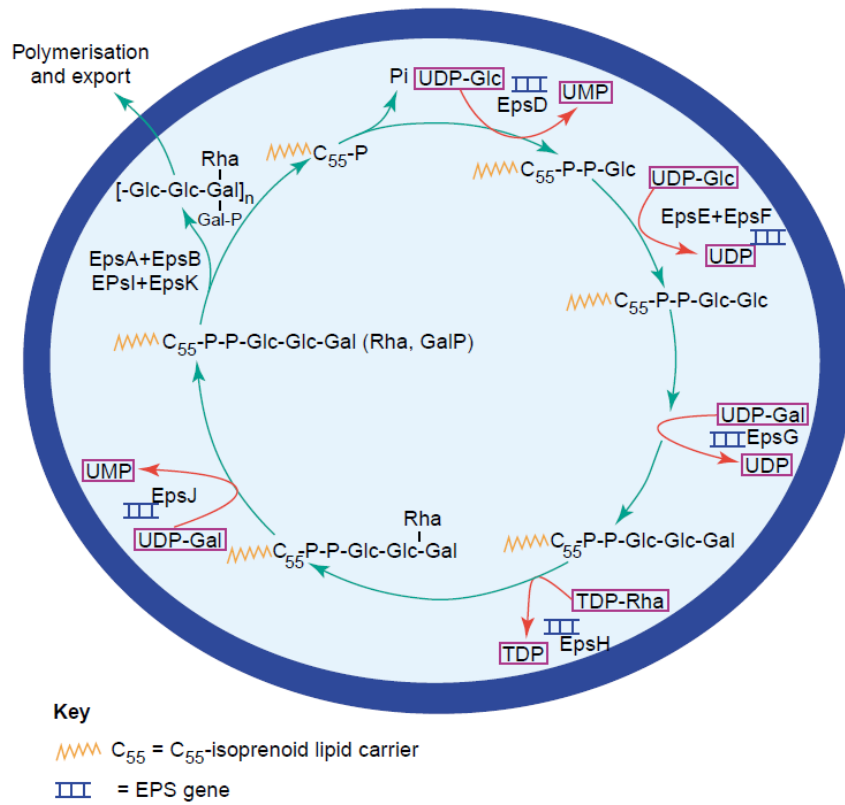


圖 1-4、*Lactococcus lactis* NIZO B40 之胞外多醣合成之模式

Fig. 1-4. Model of EPS biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40

(Welmam *et al.*, 2003)

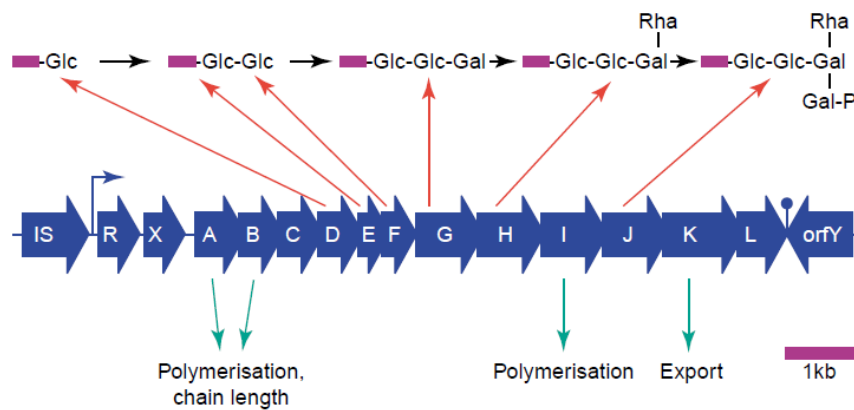


圖 1-5、*Lactococcus lactis* NIZO B40 之基因群

Fig. 1-5. Organization of the eps gene cluster in *Lactococcus lactis* NIZO B40

(Welmam *et al.*, 2003)

(1) 遺傳特性

菌體本身之遺傳特性會影響胞外多醣產量之穩定性，當菌株經過多次世代培養，其 DNA 突變率變高，進而使菌體喪失產生胞外多醣之能力，亦或是其黏性有逐漸消失 (Cerning, 1990; Cerning, 1992; Macura and Townsley, 1984; 楊, 2000)。其主要是因為與生產 EPS 之相關基因在質體中消失，而 generalized genomic instability 或 mobile genetic elements，包括 rearrangements 及 deletions 則將使此基因的不穩定 (Germond *et al.*, 1995; Guedon *et al.*, 1995; Bouzar *et al.*, 1997; Knoshaug *et al.*, 2000)。中溫乳酸菌如 *Lactococcus* 其可能是因生產胞外多醣基因所在之質體遺失而產黏特性隨之消失；而 *Streptococcus* 及 *Lactobacillus* 等高溫乳酸菌中，其染色體上有生產胞外多醣之基因，故其會隨著基因缺失或重組等遺傳上不穩定性而導致生產胞外多醣能力喪失 (Kojic *et al.*, 1992; Law *et al.*, 2001; Cerning, 1995; de Vuyst and Degeest, 1999)。

(2) pH 值

若控制起始培養基及培養過程中 pH 值，則利於胞外多醣之生成 (Petry *et al.*, 2000)，且其效應比額外添加營養物質還要佳 (Sebastiani and Zelger, 1998; Gassem *et al.*, 1997)。許多研究指出 pH 值於中性偏酸時，有較多之胞外多醣合成量。Gassem 等學者 (1997) 研究指出，糖類最適轉變為胞外多醣之 pH 值為 5.8，但轉變為生物質量的最適 pH 值則為 6.2 (van den Berg *et al.*, 1995)。 *L. casei* 培養於 pH 4、5、6 培養，結果為 pH 為 6.0 時其菌數及胞外多醣產量均較高於 pH 5.0 及 pH 4.0；但若以每個細胞之產量來比較時，則以 pH 4 有較佳產量 (Mozz *et al.*, 1994)；而在 pH 5，胞外多醣產量最低，且於培養末期有減少之趨勢。推測 pH 5 可能是 EPS 水解酵素的最適作用 pH 值 (Mozzi *et al.*, 1996)。但學者 Shu 和 Lung (2004) 提出 *Antodia camphorate* 培養於 pH 5 時其產量較高於 pH 3、4 及 6，而 pH 4 有較多菌數，且高 pH 值分子量會少於低 pH 值。 *S. thermophilus* LY03 培養於 pH 值分別為 4.9、5.5、6.2、6.9 之牛奶培養基中，發現在 pH 6.2 時有較佳胞外多醣產量。維持中性偏酸的 pH 值因為延長了菌株生長對數的時間，且其也可能造成較長的生長平穩期，而降低的肽聚糖 (peptidoglycan) 及胞壁酸 (teichoic acids) 之合成，進而使胞外多醣產量增加 (de Vuyst *et al.*, 1998)。在 pH 5~8 之培養基中培養 *Aureobasidium pullulans*，發現其於第 10 天且 pH 為 7 時有較高產量，並培養液之黏度有 non-Newtonon 現象 (Toda *et al.*, 2000)。國內研究者將 *L. bulgaricus* BCRC

10696, *L. plantarum* BCRC10069, *L. mesenteroides* BCRC 12273, *L. rhamnosus* GG BCRC 16000、*S. thermophilus* BCRC 14085及*L. acidophilus* BCRC 14079培養於pH6.5時有較高之產量比起 pH 5.5，且*S. thermophilus* BCRC 14085及*L. acidophilus* BCRC 14079 較有明顯差異(陳, 2004)。再者，*L. helveticus* BCRC14030 培養於 pH 5、6及7之培養液中，發現當發酵 48小時，pH 7胞外多醣之產量優於其他 pH值；而經 72、96及 108小時後，pH 6會比其他兩個佳(楊, 2004)。若將 *L. helveticus* ATCC 15807 培養於pH 4.5、5.0及6.2脫脂奶，經 36小時後 pH4.5有較高胞外多醣產量約為 0.549 g/L (Torino *et al.*, 2001)。學者Gancel和Novel (1994) 發現*S. thermophilus* S22於不同碳源環境下，最適胞外多醣生產量也有差異，如蔗糖為 pH 5.5、乳糖則為 pH 7。若以乳清培養*L. delbreuckii subsp. Bulgaricus*進行批式發酵最適生產胞外多醣pH為 5.8，而連續式發酵則為 pH 6.5 (van den Berg *et al.*, 1995)。 *S. macedonicus* Sc136 培養 24 h，胞外多醣結構組成上含有 N-acetyl-glucosamine (Vincent *et al.*, 2001)。

(3) 培養溫度

培養溫度對於胞外多醣生成量之影響其結果相當分歧。主要分為三派理論：

A、乳酸菌在較低最適溫度之下有較高的胞外多醣產量(Cerning *et al.*, 1992; Gasse *et al.*, 1997; Kontusaari and Forsen, 1988)。文獻指出 Kandler and Weiss(1986) 將*L. delbreuckii ssp. bulgaricus* 培養於低於37 °C，發現有較高胞外多醣之生成量。當*S. thermophilus*於30 °C培養時其產量比37、42、45 °C高(Gancel and Novel, 1994)。Gamar等學者發現*L. rhamnosus* C83 於20 與25 °C下培養，可增加胞外多醣產量，但需額外添加胺基酸與鹽類；若在其對數生長期將培養溫度由37 °C降為25 °C時，胞外多醣產量有顯著的上升(Gamar-Nourani *et al.*, 1997; Gamar-Nourani *et al.*, 1998)。國內學者黃(2002)於研究中，發現*L. delbreuckii ssp. bulgaricus* CCRC 14007 多醣產量較高於*Bifidobacterium infantis* CCRC 14661，且多醣生成量會隨培養溫度上升而下降。不同培養溫度下，含葡萄糖之CDM (chemically defined medium) 接種*L. plantarum*，25、30及37 °C胞外多醣產量較低於18 °C (Tallon *et al.*, 2003)。 *L. bulgaricus* BCRC 10696, *L. plantarum* BCRC 10069, *L. mesenteroides* BCRC 12273, *L. rhamnosus* GG BCRC 16000及*S. thermophilus* BCRC 14085皆於25 °C培養時EPS的產量高於 37 °C培養。而*L. acidophilus* BCRC 14079則於37 °C培養時有較多之產量(陳, 2004)。 *L. helveticus* BCRC 14030在25 °C培養所產之EPS多於比在37及50 °C培養時(楊, 2005)。研究

指出Chr. Hansen- Peyma, Istanbul, Turkey 產黏菌醃B- 3於35 °C下培養，比45 °C更可增加優酪之濃度及黏度，以增進優酪的品質(Zeynep *et al.*, 2005)。 *Pediococcus damnosus* 2.6於25 °C下培養，胞外多醣產量高於12 °C，並隨著添加glucose及Bacto casamino acid與培養時間延長而產量隨之提升，但於96小時後黏度減低(Duenas *et al.*, 2003)。

B、亦有研究表示，某些乳酸菌於最適生長溫度時，有最佳胞外多醣產量(de Vuyst *et al.*, 1998)。*L. acidophilus*在37 °C培養EPS產量較高於30 °C培養者(Mozzi *et al.*, 1995)。國內學者林等(2005) 研究發現商用酸酪菌醃其胞外多醣量於37 °C時有最大產量。

C、高於最適生長溫度時，有較高胞外多醣產量。Grobben等(1995) 在34-48 °C下培養*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772，發現於40 °C時，可獲得最高的胞外多醣產量。*S. thermophilu* LY03在42 °C培養時，較於30、37及50 °C培養生成較多的胞外多醣(de Vuyst *et al.*, 1998)。Kimmel等學者(1998)指出*L. bulgaricus* RR胞外多醣產量在40 °C下優於30 °C，且其EPS生成速率比在30 °C快。而在高溫時(高於45 °C)乳酸菌會因菌體發生突變，而失去製造slime及胞外多醣能力(Gancel and Novel, 1994; Mozzi *et al.*, 1995)。

ven den Berg等(1995) 認為因乳酸菌於次適生長溫度(suboptimal temperature)時生長速率較緩慢，而有較多之isoprenoid lipid carrier 供胞外多醣之合成；但若於生長適溫時，菌體之代謝速率高，大部分合成物質及產生能量均用於菌體之生長繁殖上，故胞外多醣合成較少。

(4) 培養時間

乳酸菌繁殖過程中，胞外多醣已持續合成，但胞外多醣最高產量則是在菌體於增殖穩定期及死滅期時，乃因菌體生長減緩後，才有較多能量提供給胞外多醣之合成。而培養時間太久，胞外多醣總產量亦有減少的趨勢，此是因乳酸菌除了有合成胞外多醣能力外，亦會產生此等胞外多醣之水解酵素，因而在生長後期多醣產生漸緩和時，此類酵素的作用趨於明顯(Marshall *et al.*, 1995)。*L. helveticus* BCRC 14030 於25 °C培養48、72、96、108小時，於96小時下所生成之EPS產量及黏絲性為最佳(楊, 2005)。培養菌株32、36、48、60、72及84小時後，發現*L. helveticus* BCRC 14030及*L. helveticus* BCRC 14076 於60小時有最大胞外多醣生成量，而*Strep. Thermophilus* BCRC 14085 則在60及72小時有較高產量(Lin, 2007)。Mozzi 等(1995)之報告指出，*L. bulgaricus*與*S. thermophilus*於脫脂乳中培

養24 小時後，其胞外多醣產量優於培養72 小時者，或許是因為培養後期胞外多醣水解酵素之作用大於菌體之生產所導致。除此之外，隨著培養時間的變化，乳酸菌胞外多醣的產量會受影響外，亦影響其的組成。大多由葡萄糖與半乳糖組成胞外多醣，隨培養時間增長，葡萄糖佔有的比例逐漸增加。此因菌體對葡萄糖的利用率較半乳糖佳，因此培養初期菌體快速增殖，葡萄糖消耗較快，故胞外多醣中的葡萄糖比例較低。而於培養後期，菌體增殖逐漸減緩，葡萄糖消耗少，因此在胞外多醣中的比例略為提高(Bouzar *et al.*, 1996)。

(5) 培養基成分

微生物可利用的碳源有葡萄糖、乳糖、半乳糖等物質。氮源則是尿素、胺基酸及氨 (丘, 2004)。

A、氮源

適當控制培養基含氮量可力於胞外多醣之生成 (Sebastiani and Zelger, 1998; 楊, 2009)。 *L. bulgaricus* 培養於含有酪蛋白經水解之胺基酸 casamino acid 或添加 30g/L 之 Bacto-casitone 之培養基，可增加其胞外多醣之產量 (Kimmel *et al.*, 1998)。 Degeest 及 Vuyst (1999) 指出 *S. thermophilus* 會隨培養基中含氮比例的增加而增加其胞外多醣之產量。研究指出 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LC 330 會產生兩種分子量之胞外多醣，當培養基含氮比例增加時，胞外多醣分子量會由高分子量變低分子量 (Marshall *et al.*, 1995)，而將 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 培養於 skim milk 且添加 casein 可促進胞外多醣的產生 (Garcia-Garibay and Marshall, 1991)。 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2722 培養於含三種維生素 (核黃素 (riboflavin)、鈣-泛酸 (Ca-pantothenate)及菸鹼酸 (nicotinic)) 其胞外多醣產量優於培養基中含三種胺基酸者 (麩醯胺酸 (glutamine)、天門冬胺酸 (asparagine) 及羥丁胺酸 (threonine)) (Grobben *et al.*, 1998)。混合鎂、錳、鐵等物質與組胺酸 (histidine)、酪胺酸 (tyrosine)、苯丙胺酸 (phenylalanine)、黃嘌呤 (xanthine)之培養液，可促進 *L. rhamnosus* C83 之胞外多醣產量 (Gamar -Nourani *et al.*, 1998)。 *L. helveticus* ATCC 15807 於含腺嘌呤 (adenine) 與乳糖之簡易化學培養基 (simplified chemically defined medium, SCDM)，發現可促進菌體之生長與胞外多醣產量 (Torino *et al.*, 2005)。 *Ped. damnosus* IOEB 8801 會隨培養基中碳/氮比率增加時，胞外多醣的產量也增加 (Emilie *et al.*, 2005)。

B、碳源

培養基中碳源之種類及組成比例，會影響胞外多醣之產量及組成 (林, 2008)。Cerning 等 (1994) *Lb. casei* CG11 培養於添加不同濃度的 galactose、glucose、lactose、sucrose、maltose 及 melibiose 於 basal minimum medium (BMM)，結果發現 glucose 的添加能刺激胞外多醣之生產且提高產量；而添加不同濃度之醣類對菌體之生長並無顯著的影響；且發現不同碳源對胞外多醣的組成亦有影響，因此相同乳酸菌可能可以生產出一種以上之胞外多醣。以不同濃度的葡萄糖 (0.5, 1, 2.5, 5, 與 90 g/L) 添加於培養基中培養 *Ped. damnosus* IOEB 8801，發現隨葡萄糖濃度增高其胞外多醣產量也增多。又以不同的糖類 (木糖、果糖、葡萄糖、果糖及阿拉伯糖) 添加於培養基中，發現混合葡萄糖與果糖的培養基，生成胞外多醣產量高於添加果糖、阿拉伯糖及木糖之培養基。但與單獨添加葡萄糖的培養基相比，以高濃度 (90 g/L) 的葡萄糖對胞外多醣生成有較好之利用性 (Emilie et al., 2005)。*L. acidophilus* BCRC 14079, *L. bulgaricus* BCRC 10696, *L. plantarum* BCRC 10069, *L. mesenteroides* BCRC 12273 額外添加碳源葡萄糖、乳糖及蔗糖濃度 (1、2、3 %) 時，葡萄糖為碳源時，有最高胞外多醣生成量，其次是蔗糖，以乳糖為碳源時胞外多醣產量最低。*L. rhamnosus* GG BCRC 16000 則對蔗糖有較佳之利用率。*S. thermophilus* BCRC 14085 以乳糖為碳源時，可產生最高量之胞外多醣；且都隨著提高糖之濃度，胞外多醣的產量也隨之增加 (陳, 2004)。由酸菜中篩選出 *L. plantarum* SLC 13 添加 6 % 及 8 % 之葡萄糖後，其胞外多醣合成量較無添加時高 (黃, 2006)。當額外添加 30 g/L 時，可刺激 *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* B3、*L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* G12 及 *Streptococcus thermophilus* W22 之胞外多醣生成 (Zehra, 2008)。Jung 等學者 (2008) 從發酵酸麵糰中篩選出 *L. amylovorus* DU-21，雖其本身胞外多醣產量不高，但若而外添加葡萄糖則產量有明顯提升。

異質多醣藉菌體細胞膜上之 GTFs 催化糖核苷酸 (sugar nucleotides)，進行一連串反應生成重覆單位後，在於細胞質中進行聚合作用，故利用乳酸菌生產異質多醣時，糖核苷酸之供應非常重要。然而不同糖類之添加對於促進乳酸菌 HePS 之產量與對單醣成分之影響互異 (林, 2006)。Looijesteijn and Hugenholtz (1999) 培養 *L. lactis subsp. cremoris* NIZOB 40 於 M-17 broth 且添加乳糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖或 *N*-乙酰葡萄糖胺，發現添加葡萄糖時，胞外多醣產量較多；而於果糖之培養基中，異質多醣產量較低於葡萄糖或乳糖之培養基，其可能是因

葡萄糖能促進UDP-glucose pyrophosphorylase之活性，導致糖核苷酸量比含果糖者高；但不同的碳源、培養條件及生長速率胞外多醣的單糖組成並無影響。De-geest and de Vuyst (2000) 培養*S. thermophilus* LY03於已添加半乳糖、乳糖、葡萄糖、果糖、麥芽糖、鼠李糖或蔗糖之MRS培養基中；當添加葡萄糖及乳糖時，該菌株同質發酵的特性；而含果糖、半乳糖、鼠李糖、麥芽糖及蔗糖等糖類時，此菌株並不會利用此些碳源進行發酵，但若果糖與葡萄糖或乳糖混合添加時，果糖則被利用之。比較單獨使用乳糖及葡萄糖或混合添加九種不同之碳源，*S. thermophilus* LY03 培養於只含乳糖之MRS時有最高胞外多醣產量，而異質多醣生成量比單獨含葡萄糖高，但若比較各種不同碳源之組合，無論是高分子或低分子胞外多醣，其所組成之重覆單位皆是相同的。文獻指出*L. casei* CRL87之UDP-glucose-pyrophosphorylase、dDTP-glucosepyrophosphorylase 及 dDTP-rhamnose-synthetic enzyme活性，於半乳糖培養基高於葡萄糖 (Mozzi *et al.*, 2001)。而於2003年之研究中提出UDP-galactose-4-epimerase亦為*L. casei* CRL87產生胞外多醣之主要酵素 (Mozzi *et al.*, 2003)。Degeest and de Vuyst (2000) 與 Escalant等學者 (1998) 將*S. thermophilus*培養在不同糖類之培養基，卻發現其所生成胞外多醣之成分並無差異。學者Gamar-Nourani等人 (1998) 也指出不同培養條件與添加物並無影響*L. rhamnosus* C83之胞外多醣產量。綜合上述，額外添加糖類對於胞外多醣之單糖組成研究上仍有分歧。

(三) 乳酸菌胞外多醣之應用 (陳, 2008)

1、食品工業

乳酸菌胞外多醣為安全性物質(GRAS: generally regarded as safe)(Lin *et al.*, 2007)，因其宛如天然的生物增稠劑，故可當作一種食品添加物，減少冰淇淋之溶化性(Christiansen *et al.*, 1999)、影響膠體強度、賦予產品平滑的口感、改善質地、提高產品安定性(Lin *et al.*, 2007)、增進食品之流變性(Roller and Dea, 1992)、提高產品的黏稠度與保水力及避免離水現象(Syneresis)(Hassasn *et al.*, 1998; Low *et al.*, 1998; Broadbent *et al.*, 2001; Ruas-Madiedo and Reyes-Gavilan, 2005; Marshall and Rawson, 1999)。 *L. Mesenteroides* 之 EPS 為最早被應用於賦予甜菜糖漿及甘蔗糖漿濃稠及凝膠特性。而 1969 年美國食品藥物管理局(FDA)核准第一個微生物多醣應用於食品為 *X. campestris* 產生之三仙膠(Xanthan)。再者目前已被商業化之 gellan 是由 *Spingomonas elodea* (de Vuyst and Degeest, 1999)。歐洲

某些國家禁止添加安定於優酪乳中，故利用乳酸菌產生 EPS 則可不用添加劑而提升製品品質(Gibson *et al.*, 1995)。若使用 EPS 之菌株於 yogurt 或 cheese 中，其可使網狀結構介於菌體和酪蛋白間，強化凝乳保水力，不易受外力破壞，同時也可增加融解時絲狀物之延伸(Hess *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 1997; Broadbent *et al.*, 1997; Ayala-Hernandez *et al.*, 2008)，且 EPS 亦可以增進 cheese 的機能特性(Grattepanche *et al.*, 2007)。 *Lc. cremoris* 與 *Lc. lactis* 用於優酪乳中，可提供其堅實、濃厚且黏稠之質地(de Vuyst and Degeest, 1999)。故 EPS 對低脂發酵乳製品之流體性狀、組織、與口感具重要影響(Ruijsenaars *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2005; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002)。EPS 亦具生物性之功能，*S. salivarius* 與 *S. mutans* 的胞外多醣與菌體定殖、抑制牙菌斑的形成有關(Cerning, 1990)。而 EPS 具保護菌體的功能如 *L. lactis subsp. cremoris* NZ 4010 所產之 EPS，可防禦多種抗微生物因子例如噬菌體、乳酸鏈球菌素、溶菌酶與金屬離子等(Looijesteijn *et al.*, 2001)。

2、生理功效

乳酸菌可對宿主產生有益之功效，而有學者提出乳酸菌促進人體健康的效應與其胞外多醣的生理活性有關(Ruas-Madiedo *et al.*, 2002)。目前文獻以指出胞外多醣具有多種生理功效(圖 1-6)(林, 2008; 邱, 2008) 調節免疫(Kitazawa *et al.*, 1992; Ho-sono *et al.*, 1997)、抗腫瘤(Oda *et al.*, 1983; Ebina *et al.*, 1995)、抗致突變(Lo *et al.*, 2002)、抗潰瘍(Nagaoka *et al.*, 1994)、降低血中膽固醇(Nakajima *et al.*, 1992)、促進細胞生長(Lin *et al.*, 2005)及改善胃腸道環境(Gibson and Robertfroid, 1995)。乳酸菌之胞外多醣可促進 B 細胞的分裂能力(Kitazawa *et al.*, 1993a)、誘發細胞激素之產生(Kitazawa *et al.*, 1999)及調節巨噬細胞及脾臟細胞之功能(Kitazawa *et al.*, 2000)。文獻指出 β -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖、半乳聚糖有較明顯抑癌效果，經 ¹³C 核磁共振分析推測，認為是 β -(1 \rightarrow 3) 多糖鏈骨架上的多羥基基團為主要影響因素。而含乙醯化的(1 \rightarrow 6) - β -D 葡聚糖，亦有抑癌活性；D-葡聚糖殘基的 β -構型，因具有螺旋結構，對於抑制腫瘤活性有一定之效。乳酸菌胞外多醣的抗腫瘤活性是通過增強且恢復免疫反應、刺激器官或組織(如腎上腺和網狀內皮系統) 再分泌一種物質對抗腫瘤細胞及中和細胞表面的負電荷(李, 2003)。而目前已被證實其胞外多醣具調節免疫之菌株為：*Lactococcus lactis subsp. Cremoris*、*Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus* 及 *Leu. Mesenterodies*(邱, 2008)。綜觀而言，乳酸菌胞外多醣其為具健康功效之基能性多醣，在保健食品、醫療、學術研究及經濟效益上有潛在

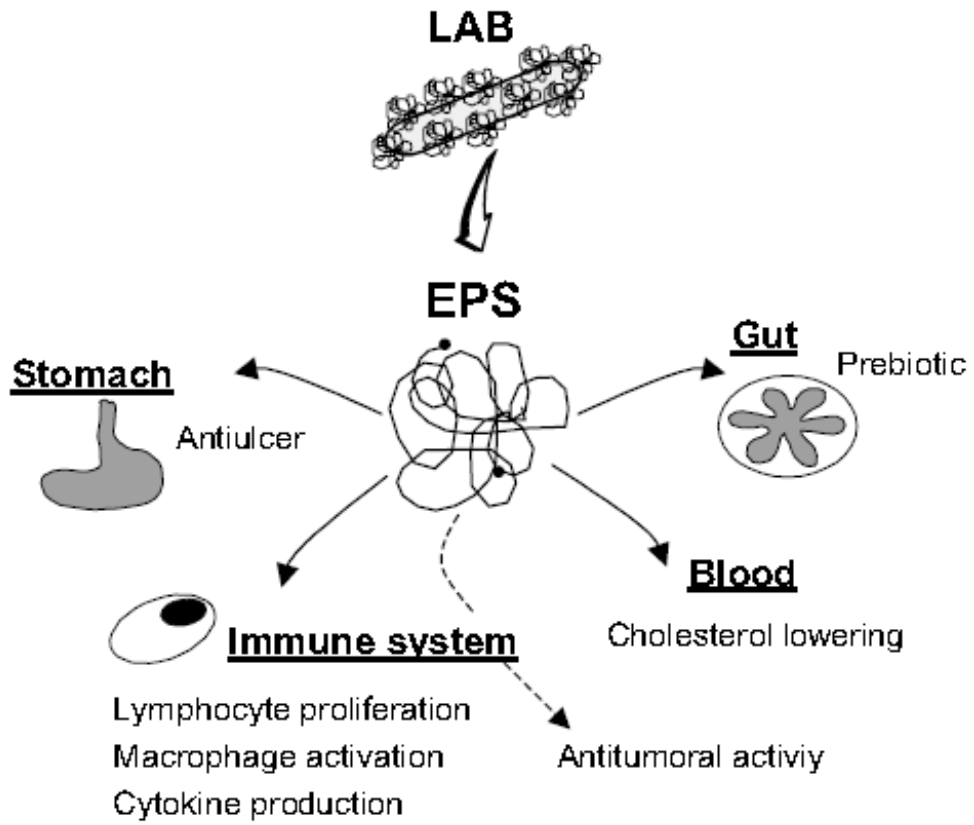
開發之價值(Welman and Maddox, 2003)。

三、糖尿病

(一) 糖尿病流行病學 (epidemiology of diabetes mellitus)

自二十世紀以來，拜醫藥科技發達所賜，傳染病已日益減少，但相對隨著經濟的成長、生活型態之改變及不健康的飲食習慣，使得代謝失衡並造成多種慢性疾病產生，例如：高血壓(hypertension)、高血脂(hyperlipidemia) 及糖尿病(diabetes mellitus, DM)...等。

第二型糖尿病為代謝症候群(metabolic syndrome) 之一，其盛行率高、併發症最多元且嚴重，故被重視之。國際糖尿病聯盟(International Diabets Federation, IDF) 表示 2011 年全球 20~79 歲人口中約有 3.66 億人罹患 DM，其中 460 萬人死於此病，並估計 2030 年將高達 5.52 億人罹患此病且逐漸年輕化；同時在 2011 年約有 2.8 億人為葡萄糖耐受異常(impaired glucose tolerance, IGT)，推測 2030 年人數攀升至約 3.98 億人。根據台灣衛生署統計指出，糖尿病一直為國人十大死因之一，並高居五名內；2005 年台灣平均約 50 分鐘就有 1 人死於糖尿病；又十大死因中心臟疾病、腦血管疾病、高血壓性疾病及腎性病變皆為糖尿病併發症，所以糖尿病之威脅性不容小覷。就經濟層面而言，依美國為例，其 2011 年醫療支出至少為 465 億美元。而在台灣地區糖尿病患者於 1988 年已超過 80 萬人，其醫療相關費用為 300 億元以上，占健保醫療費的 11.5 % (郝, 2011)。糖尿病及其併發症會成為家庭與社會的沉重負擔，影響病患及家屬的生活品質，故若能在器官病變前改善高血糖之狀態，不僅能降低病患數也可減少醫療照護之負擔。代謝症候群為合併高血糖、胰島素阻抗、高胰島素血症、高血壓及高血脂之症候群，其主要為心血管疾病危險因子。1923 年 Kylin 提出其為代謝異常所致；而 Reaven (1988) 則進一步指出代謝症候群主要是因胰島素產生阻抗使得慢性疾病產生，並命名為 X syndrome，亦稱胰島素抗性症候群(Haffner, 1992)。WHO (1999) 統一命名其為代謝症候群並定義之，但因不同協會對代謝症候群看法不同其標準而有差異(表 1-6)。學者 DeFronzo 及 Ferrannini (1991) 證實第二型糖尿病、肥胖、高血壓、血脂異常及心血管疾病皆與胰島素阻抗相關。故若能有效減緩胰島素阻抗則可降低上述疾病之發病率。



(Ruas *et al.*, 2002)

圖 1-6、乳酸菌胞外多醣之生理功效

Fig. 1-6. Proposed health benefits stemming from exopolysaccharides

(二) 糖尿病簡介 (definition of diabetes mellitus)

糖尿病是多種病因所組成之慢性全身性代謝疾病，主要是因體內胰臟中蘭氏小島 β 細胞缺乏胰島素分泌，或胰島素分泌正常但功能失效，亦或兩者皆發生，進而使血中的葡萄糖無法充分進入到細胞，導致血液中的葡萄糖濃度升高，呈現慢性及長期的高血糖狀態，使醣類、脂質及蛋白質代謝也隨之失調。其通常伴隨著長期性損害、官能障礙及器官病變，特別是眼睛、腎臟、神經系統及心血管；其明顯特徵為三多一少：多食、多渴(polydipsia)、多尿(polyuria)、體重減輕(weight loss)、視線模糊(blurred vision) 及容易感染。糖尿病也是一種漸進式的疾病，若不監控及治療可能會引發多種且複雜的併發症；嚴重急性併發症為酮酸血症和非酮酸性高滲透壓症等，而長期在高血糖下，會產生過量的多元醇(polyol)化合物或使大分子物質及組織蛋白被糖化，造成器官損害，常見為：視網膜病變(retinopathy)、腎病變(nephropathy)、周邊神經病變(peripheral neuropathy)、腸胃自主神經病變(gastrointestinal autonomic neuropathy)、生殖泌尿系統疾病(genitourinary)、性功能障礙(sexual dysfunction)、心血管疾病(cardiovascular disease)及高血壓(WHO, 1999; ADA, 2011; 陳, 2008)。故糖尿病相關治療及監控為現今重要課題之一。而控制血糖為糖尿病病患首要之務，使血糖調節至一定濃度，以避免發生併發症。調節血糖方法有三大類：食療、運動療法及藥物治療；其中食療為最基本且最廣泛之方法。根據研究，約有 50% 以上之患者可藉由良好之食物療法而改善病情。此外，食療能輔助藥物治療更能發揮其功能，提升調節血糖之效用(陳, 2002)。

(三) 糖尿病分類 (classification of diabetes mellitus)

糖尿病之分類於 1979 年、1985 年及 1997 年皆有重要改變，有些是分類方式改變，有些則是命名方式改變(陳, 2008)。但目前分類主要是根據 ADA 依病因將其分為四大類(表 1-7)，圖 1-7 為此四大類血糖失調之病程。其中最主要為第一型約占 5~10% 及第二型約占 90~95%。

1、第一型糖尿病(type 1 diabetes mellitus)

第一型糖尿病因需依賴注射胰島素調節血糖，故又稱為胰島素依賴型糖尿病(insulin dependent diabetic mellitus；IDDM)。又因其好發於兒童期及青年期，

故又被稱為幼年型糖尿病(juvenile DM)。第一型糖尿病致病因子有二：一為環境不明原因(idiopathic diabetes) 所致，如病毒或有毒物質。另一則為因胰臟 β 細胞受到自體免疫(immune mediated diabetes) 之破壞，使胰島素無法正常分泌致體內而造成血糖失衡。第一型糖尿病具下列特性：

- (1) 第六對染色體之白血球抗原(HLA; human leucocyte antigen) 異常。
- (2) 可能有不正常的自體免疫反應或免疫反應。
- (3) 胰島細胞抗體(islet cell antibody; ICA) 出現於血清中。
- (4) 易有酮血症(ketosis)。

而此型糖尿病患者通常外型較為瘦小，且有易口渴、多尿且明顯的體重減輕。其於發病初期胰島素胞會有發炎反應，此特點與第二型糖尿病相異。

2、第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus)

第二型糖尿病亦稱非依賴胰島素型糖尿病(NIDDM) 或成人型糖尿病(Adult or maturity onset DM)。大多數糖尿病病患屬於此型，且好發於40歲後的人。此類型屬於多重病因的複雜代謝疾病之一。其主要因素為：

- (1) 胰島素正常分泌，但肝臟、肌肉及脂肪組織對胰島素敏感性(insulin sensitivity) 下降，使得產生胰島素阻抗(insulin resistance)。
- (2) 胰島素分泌不足，導致組織無法利用葡萄糖，進而引起高血糖(hyperglycemia)。

此型病患通常不需要額外補充胰島素，但若胰臟 β 細胞因胰島素功能缺失，而代償性的分泌更多胰島素，則會引起高胰島素血症(hyperinsulinamia)。亦或者，胰臟過度分泌胰島素，使得胰島細胞功能缺失，造成胰島素分泌減少，進而演變成低胰島素血症(hypoinsulinamia)。而此型與第一型之最大差異為其有80%是外觀上為肥胖，病程較緩慢，不易有酮血症且三多症狀較不明顯。

3、其他特異型(other diabetes mellitus)

這類型占糖尿病病例的1~2%。可能為下列幾種因素而致：

表 1-6、代謝症候群診斷標準

Table 1-6. The criteri of metabolic syndrome

	WHO(1999)	NCEP(2001)	IDF(2005)	台灣(2007) ^{*3}
診斷標準	胰島素阻抗及 ≥ 以下兩項	≥ 以下三項	腹部肥胖及 ≥ 以下兩項	≥ 以下三項
肥胖、腹部肥胖	腰臀圍比 男 ≥ 0.90 女 ≥ 0.85 BMI ≥ 30	腰圍 男性 ≥ 102 cm 女性 ≥ 88 cm	腰圍 ^{*1} 男性 ≥ 94 cm 女性 ≥ 80 cm	腰圍 男性 ≥ 90 cm 女性 ≥ 80 cm
醣代謝	FG ≥ 110mg/dL	FG ≥ 110mg/dL	FG ≥ 100mg/dL ^{*2}	FG ≥ 100mg/dL
脂質代謝	TG ≥ 150mg/dL	TG ≥ 150mg/dL	TG ≥ 150mg/dL	TG ≥ 150mg/dL
	HDL-C 男 < 35mg/dL 女 < 39mg/dL	HDL-C 男 < 40mg/dL 女 < 50mg/dL	HDL-C 男 < 40mg/dL 女 < 50mg/dL 或已進行治療血脂異常	HDL-C 男 < 40mg/dL 女 < 50mg/dL
血壓 (BP)	≥ 140/90mmHg 或已開始採用降壓藥治療	≥ 130/85mmHg 或已開始採用降壓藥治療	≥ 130/85mmHg 或已診斷為高血壓並進行治療	≥ 130 /85 mmHg
其他	Urinary Alb > 20mg/min; Alb/Cr > 30mg/g			

*1:腰圍於不同國家之標準

國家		歐洲	南亞	中國	日本
腰圍(cm)	男	≥ 94	≥ 90	≥ 90	≥ 85
	女	≥ 80	≥ 80	≥ 80	≥ 90

*2:如果高於 5.6mmol/L 或 100mg/dL，極力建議進行 OGTT，但 OGTT 並非診斷此症候群所必須

*3:上項危險因子中「血壓上升」、「空腹血糖值上升」之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品(中、草藥除外)，血壓或血糖之檢驗值正常者。

WHO:世界衛生組織(World Health Organization);NCEP:美國國家膽固醇教育計畫(National Cholesterol Education Program);IDF:國際糖尿病聯盟(International Diabetes Federation);FG:空腹血糖值(Fasting glucose);TG:三酸甘油酯(Triglyceride);HDL-C:高密度脂蛋白膽固醇(High Density Lipoprotein -Cholesterol);BP:血壓(Blood Pressure);Urinary Alb:尿白蛋白(Urinary Albumin);Alb/Cr:尿白蛋白/肌肝(albumin/creatinine)

(陳及尹, 2008)

- (1) 基因缺陷: β 細胞功能或胰島素作用之基因缺陷 (genetic defects of β -cell function or genetic defect in insulin action), 如第 12 號染色體肝細胞核因子-1 α (chromosome 12, HNF-1 α (IMODY-3))、A 型胰島素阻抗 (type A insulin resistance)
- (2) 藥物或化學物質引起, 如糖皮素 (glucocorticoids)、殺鼠劑 Pyriminil/Vacor
- (3) 感染 (infections), 如巨細胞病毒 (cytomegalovirus)、先天性德國麻疹 (congenital rubella)
- (4) 其他疾病相關的糖尿病, 如唐氏症 (Down's syndrome)、紫質病 (povphyria)
- (5) 內分泌病變 (endocrinopathies), 如庫興氏症 (Cushing's syndrome)、肢端肥大症 (acromegaly)
- (6) 外分泌胰臟疾病 (disease of exocrine pancreas), 如外傷/胰臟摘除 (trauma/pancreatectomy)、胰臟炎 (pancreatitis)。

4、妊娠糖尿病 (gestational diabetes, GDM)

懷孕期間出現任何程度之葡萄糖耐受異常則稱為妊娠糖尿病, 通常發生在懷孕第二、三期 (24~48 周), 若懷孕前已有診斷出糖尿病就不屬於此型。此為懷孕期間孕婦體內賀爾蒙的改變引起。在妊娠的早期, 胰島細胞增大, 胰島素的分泌增加, 使空腹血糖降低。隨著懷孕週數增加至中後期時, 胎盤增加分泌人類胎盤生乳素 (Human placental lactogen, HPL), 妊娠素 (progesterone)、腎上腺皮質素 (cortisol) 及游離脂肪酸隨之增加, 產生胰島素抗性, 進而使周邊組織對葡萄糖利用減少及增加肝臟醣質新生作用。一旦胰島素分泌未能代償, 則可能導致妊娠性葡萄糖耐受不良, 即妊娠性糖尿病。若未能控制其血糖, 則會引起多種併發症, 在母體層面可能會引發酮酸血症、尿路感染在胎兒方面, 懷孕初期血糖控制不良可能會增加流產的危險性, 及發生先天性的畸形如無腦症, 水腦症, 先天性心臟病等; 在中後期則要注意持續性高血糖之母體將導致胎兒高血糖及次發性高胰島素血症, 使胎兒器官發育肥大如心室中隔肥大、皮下脂肪肥厚等現象即稱之為巨嬰症, 或胎兒呼吸窘迫症, 亦或高血糖也可能引發胎盤血管疾病, 胎兒生長遲滯、因而導致胎死腹中。

表 1-7、依病因分類之糖尿病

Table 1-7. Etiologic classification of diabetes mellitus.

-
- I. Type 1 diabetes (β -cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency)
 - A. Immune mediated
 - B. Idiopathic
 - II. Type 2 diabetes (may range from predominantly insulin resistance with relative insulin deficiency to a predominantly secretory defect with insulin resistance)
 - III. Other specific types
 - A. Genetic defects of β -cell function
 1. Chromosome 12, HNF-1 α (MODY3)
 2. Chromosome 7, glucokinase (MODY2)
 3. Chromosome 20, HNF-4 α (MODY1)
 4. Chromosome 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4)
 5. Chromosome 17, HNF-1 β (MODY5)
 6. Chromosome 2, *NeuroD1* (MODY6)
 7. Mitochondrial DNA
 8. Others
 - B. Genetic defects in insulin action
 1. Type A insulin resistance
 2. Leprechaunism
 3. Rabson-Mendenhall syndrome
 4. Lipotrophic diabetes
 5. Others
 - C. Diseases of the exocrine pancreas
 1. Pancreatitis
 2. Trauma/pancreatectomy
 3. Neoplasia
 4. Cystic fibrosis
 5. Hemochromatosis
 6. Fibrocalculous pancreatopathy
 7. Others
 - D. Endocrinopathies
 1. Acromegaly
 2. Cushing's syndrome
 3. Glucagonoma
 4. Pheochromocytoma
 5. Hyperthyroidism
 6. Somatostatinoma
 7. Aldosteronoma
 8. Others
 - E. Drug or chemical induced
 1. Vacor
 2. Pentamidine
 3. Nicotinic acid
 4. Glucocorticoids
 5. Thyroid hormone
 6. Diazoxide
 7. β -adrenergic agonists
 8. Thiazides
 9. Dilantin
 10. γ -Interferon
 11. Others
 - F. Infections
 1. Congenital rubella
 2. Cytomegalovirus
 3. Others
 - G. Uncommon forms of immune-mediated diabetes
 1. "Stiff-man" syndrome
 2. Anti-insulin receptor antibodies
 3. Others
 - H. Other genetic syndromes sometimes associated with diabetes
 1. Down syndrome
 2. Klinefelter syndrome
 3. Turner syndrome
 4. Wolfram syndrome
 5. Friedreich ataxia
 6. Huntington chorea
 7. Laurence-Moon-Biedl syndrome
 8. Myotonic dystrophy
 9. Porphyria
 10. Prader-Willi syndrome
 11. Others
 - IV. Gestational diabetes mellitus
-

Patients with any form of diabetes may require insulin treatment at some stage of their disease. Such use of insulin does not, of itself, classify the patient.

(四) 糖尿病診斷標準 (diagnostic of diabetes mellitus)

目前未懷孕之成人糖尿病診斷方式主要有三種(表 1-8)，只要符合其中任一即可視為罹患糖尿病。糖化血色素(glycosylated hemoglobin, A1C)，為一種血液測試，其可藉由葡萄糖結合至紅血球上之比列，反應出血糖之濃度，因紅血球半衰期大於 120 天，故可以監測過往 2~3 個月之血糖狀況，故可做為長期控制血糖的指標，但不適合作為診斷之標準，因為酒精、盤尼西林或尿毒會影響檢測值。空腹血漿葡萄糖值(fasting plasma glucose, FPG) 為空腹 12 小時後之血糖值，正常應為 60~110 mg/dl，若大於或等於 126mg/dl 則為罹患糖尿病。口服葡萄糖耐量試驗(oral glucose tolerance test, OGTT) 又稱為 2hPH (2-h plasma glucose)。此檢測法試驗前三天，醣類攝取應在 150g/day 以上，抽血前 10~16 小時禁食並且應在早上抽血，喝糖水前須先抽空腹血糖，再讓受試者喝下葡萄糖水，其用量為成人為 75g、兒童為 1.75g/kg、孕婦為 75g 亦或用兒童標準，並須在五分鐘內喝完，分別在喝完後的 0.5、1、1.5、2、2.5 及 3 h 抽血檢驗。正常血糖值應小於 140mg/dl，若值大於等於 200 mg/dl 則為糖尿病。隨機血糖值(casual plasma glucose, CPG)非空腹或餐後血糖值，其為參考一天中任何時間的血糖值而定，值若大於等於 200 mg/dl 且同時伴隨糖尿病之症狀，如嚴重口渴、多尿且體重快速變輕，則為糖尿病。妊娠糖尿病即為非糖尿病患者但在懷孕期間卻出現血糖異常，診斷方法(表 1-9) 為非糖尿病患者於懷孕 24~28 週，服用 75 g 葡萄糖糖水進行 OGTT 且符合下列兩項即為罹患妊娠糖尿病：Fasting 值大於等於 92 mg/dl 或 1 h 血糖值大於等於 180 mg/dl 亦或 2 h 血糖值大於等於 153 mg/dl。糖尿病高危險群又稱為前糖尿病(pre-diabetes)，主要是因為葡萄糖恆定失調，其界定之血糖值介於正常血糖值和糖尿病血糖值之間(表 1-10)。若 FPG 值大於等於 100 mg/dl 且小於 126 mg/dl 則為空腹葡萄糖異常(impaired fasting glucose, IFG)。葡萄糖耐受不良(impaired glucose tolerance, IGT)則是 OGTT 值大於等於 140 mg/dl 且小於 199 mg/dl。此無明顯病徵故容易被忽視，IDF 於 2011 年指出全球中約有 2.8 億人為此，估計 2030 年將會有 3.98 億人為前糖尿病。若能有效控制血糖則可降低罹患糖尿病及其併發症之風險。

(五) 糖尿病的併發症 (diabetes complications)

糖尿病本身無太大的威脅性，主要威脅在若血糖控制不佳，使病情惡化後所產生一連串之併發症。糖尿病其併發症相當多元（圖 1-8），主要分為急性（短期）與慢性（長期）兩大類。急性併發症為低血糖症（hypoglycemia）、糖尿病的酮酸中毒（diabetic keto-acidosis; DKA）、高滲透壓非酮性昏迷（hyperosmolar non-ketotic coma, HNKC）或稱為高血糖高滲透壓非酮性昏迷（hyperglycemic hyperosmolar non-ketotic coma, HHNC）。長期併發症包括大小血管之病變及神經病變。故若能妥善管控血糖，將可避免併發症之發生，也能減輕社會成本及個人經濟壓力。

（六）糖尿病的治疗（diabetes therapy）

糖尿病之治療主要是期望可延緩併發症及調控其血糖，而現今治療方式分為非藥物及藥物兩種治療方法。非藥物治療包括飲食治療、運動及衛教，此治療方式最常被忽略，但其重要性卻是不容小覷的。然而藥物治療又可分為兩種，一為胰島素類似物治療，如長效型 Glargine、中效型 NPH insulin、短效型 regular insulin 或速效型 insulin lispro。另一為表 1-11 中的其他藥物，其主要作用機轉為圖 1-9。雖然糖尿病藥物有如此多種，但由於其藥物皆有副作用，如：過敏、腸胃不適、葉酸吸收率降低、肝指數增高或增加心臟疾病之風險等副作用。

近年來興起健康養生觀念及自我照護及健康意識之抬頭，傳統醫學（traditional medicine, TM）及補充替代醫學（complementary and alternative medicine, CAM）亦逐受到重視。因此，促使具預防及改善高血糖潛力之中草藥及天然物逐漸受到青睞。也因此許多文獻致力於研究改善胰島素阻抗或代謝症候群之保健植物或天然物上，如人參、苦瓜、紅麴、兒茶素及發酵乳等皆已有文獻指出其可透過不同機制達到改善高血糖、胰島素抗性及對抗肥胖等（朱及周, 2011）。

四、胰島素

（一）胰島素簡介

胰臟內的蘭氏小島(islets of Langerhans) 主要分泌兩種調控血中葡萄糖之激素，分別為 α -cell 所分泌之升糖激素(glucagon)及由 β -cell 分泌的胰島素

表 1-8、糖尿病臨床診斷標準

Table 1-8. Criteria for the diagnosis of diabetes

A1C $\geq 6.5\%$. The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.*

OR

FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.*

OR

2-h plasma glucose ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) during an OGTT. The test should be performed as described by the World Health Organization, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.*

OR

In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis, a random plasma glucose ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

*In the absence of unequivocal hyperglycemia, criteria 1–3 should be confirmed by repeat testing.

(ADA, 2012)

表 1-9、妊娠糖尿病臨床診斷標準

Table 1-9. Criteria for the diagnosis of GDM.

Perform a 75-g OGTT, with plasma glucose measurement fasting and at 1 and 2 h, at 24-28 of weeks gestation in women not previously diagnosed with overt diabetes.

The OGTT should be performed in the morning after an overnight fast of at least 8 h.

The diagnosis of GDM is made when any of the following plasma glucose values are exceeded

Fasting : ≥ 92 mg/dl (5.1 mmol/l)

1 h : ≥ 180 mg/dl (10.0 mmol/l)

2 h : ≥ 153 mg/dl (8.5 mmol/l)

(ADA, 2012)

表 1-10、糖尿病高危險群之臨床診斷標準

Table 1-10. Categories of increased risk for diabetes*

FPG 100 mg/dl (5.6 mmol/l) to 125 mg/dl (6.9 mmol/l) 【IFG】

2-hPG in the 75-g OGTT 140 mg/dl (7.8 mmol/l) to 199 mg/dl (11.0 mmol/l) 【IGT】)

A1C 5.7-6.4%

*for all three test, risk is continuous, extending below the lower limit of the range and becoming disproportionately greater at higher ends of the range.

(ADA, 2012)

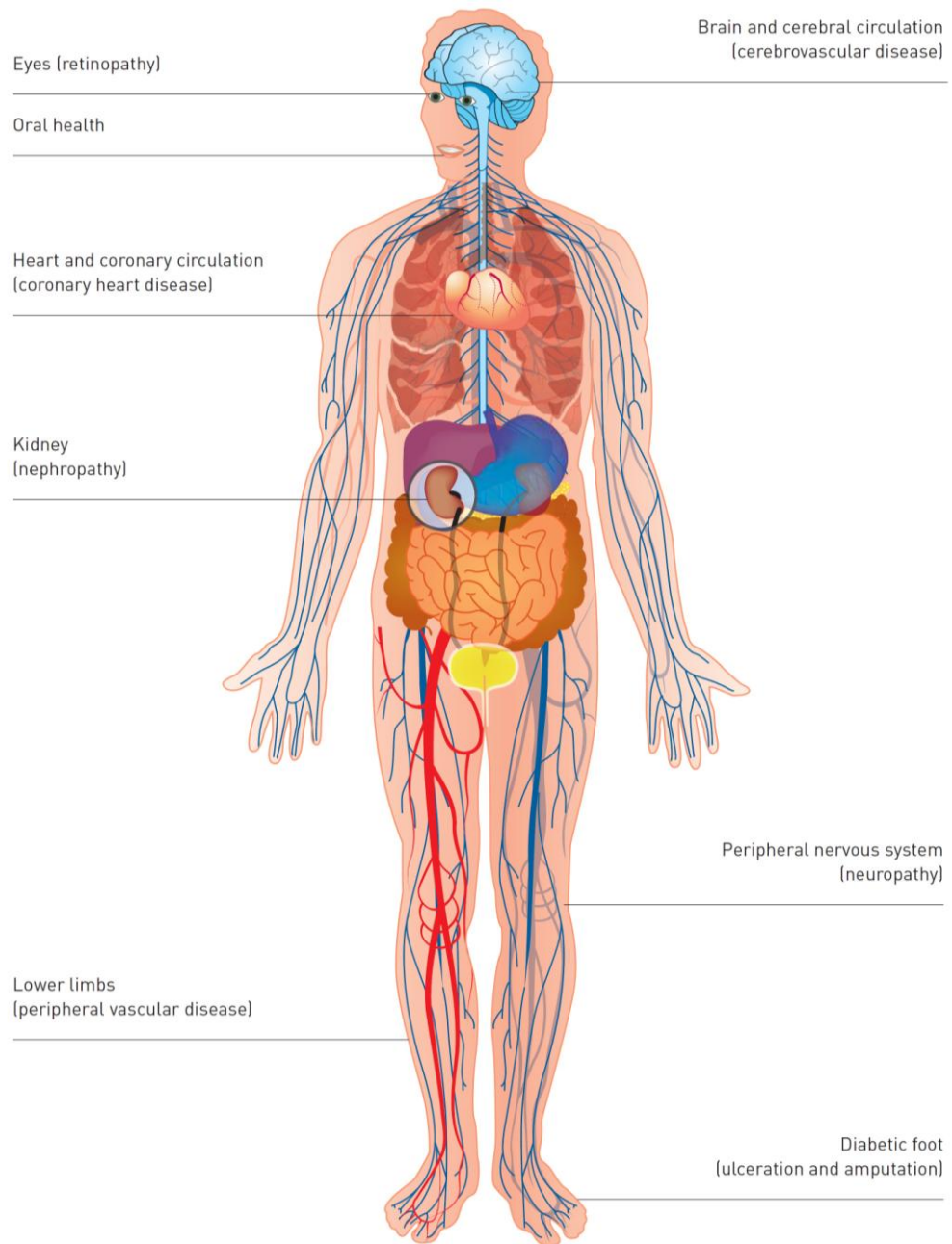


圖 1-8、糖尿病主要併發症
Fig 1-8. Major diabetes complications

(IDF, 2012)

表 1-11. 口服降血糖藥物

Table 1-11. Orally administered antihyperglycemic agents

名稱	第一型類升醣素胜肽 (Glucagons-like peptide -1; CLP-1)	二胜基肽酶-4 抑制劑(DPP-4 inhibitor)	Amylin 類 似物	α -Glucosidase inhibitor	Biguanide	Sulfonylureas 類促胰島素 分泌藥	非 sulfonylureas 促 胰島素分泌藥	Thiazolidinedione(或 稱 glitazones)
簡 述	CLP-1 為腸胃道所分泌 的一種腸促胰素 (incretin)。其缺點為會被 體內酵素二胜基肽酶 -4(dipeptidyl peptidase 4, DPP-4)快速代謝，故臨床 上使用受限。	抑 制 DPP-4(dipeptid yl peptidase 4)，使腸泌素 (incretin) 或使 CLP-1 不易被 分解。	Amylin 為 胰臟 β 細 胞所分泌 之荷爾蒙	此類藥物較常 使用為 acarbose 及 miglitol。藥物的 結構與醣類 相似，故會競 爭胰臟及腸內 之醣類消化酵 素	Biguanides 類 為 Biguanide 之衍生物常 用藥物為 metformin。	目前臨床上 所使用之抗 高血糖劑大 多為此類	Meglitinide 類 似 物。分為 repagl inide(Novonorm®) 及 nateglinide (Starlix®) 兩種。	簡稱 TZDs。亦稱胰 島素增敏劑(insulin sensitizer)
機 轉	在血糖上升時，促進胰島 素分泌、增加胰島素敏感 性、抑制升醣素 (glucagon)分泌、抑制食 慾、降低胃排空速度、促 進胰臟 β 細胞生長、分化 與再生	腸泌素濃度增 加，促進 β 細 胞胰島素分 泌、抑制升醣 素合成	抑制升醣 素 (glucagon) 分泌、抑 制食慾、 降低胃排 空速度	延遲胃腸道對 碳水化合物 的吸收、刺激 glucagons-like peptide 分泌	抑制肝臟製 造葡萄糖； 增加肝臟與 肌肉對胰島 素的敏感性	與胰臟 β 細 胞受體有高 度親和力，使 得 β 細胞葡 萄糖敏感度 提高，進而促 進胰島素分 泌	刺激 β 細胞之 醯尿素接受 器，快速促 進胰島素分 泌	為活化細胞核表面 接受器 peroxisome proliferative-activated receptor- γ (PPAR- γ)，增加脂肪細胞 攝取游離脂肪酸及 增加脂肪組織、肝 臟、骨骼肌之胰島素 敏感性
副 作用	嘔吐、腹瀉、頭暈、頭痛 或消化不良，在臨床上有 引起急性胰臟炎之報告。	噁心、嘔吐、 腹瀉、過敏	嘔心、噁 吐或血糖 過低	脹氣、腹瀉、 腹痛	腸胃道副作 用	血糖過低、體 重增加	血糖過低、體重 增加	水腫、貧血、體重增 加、心臟衰竭

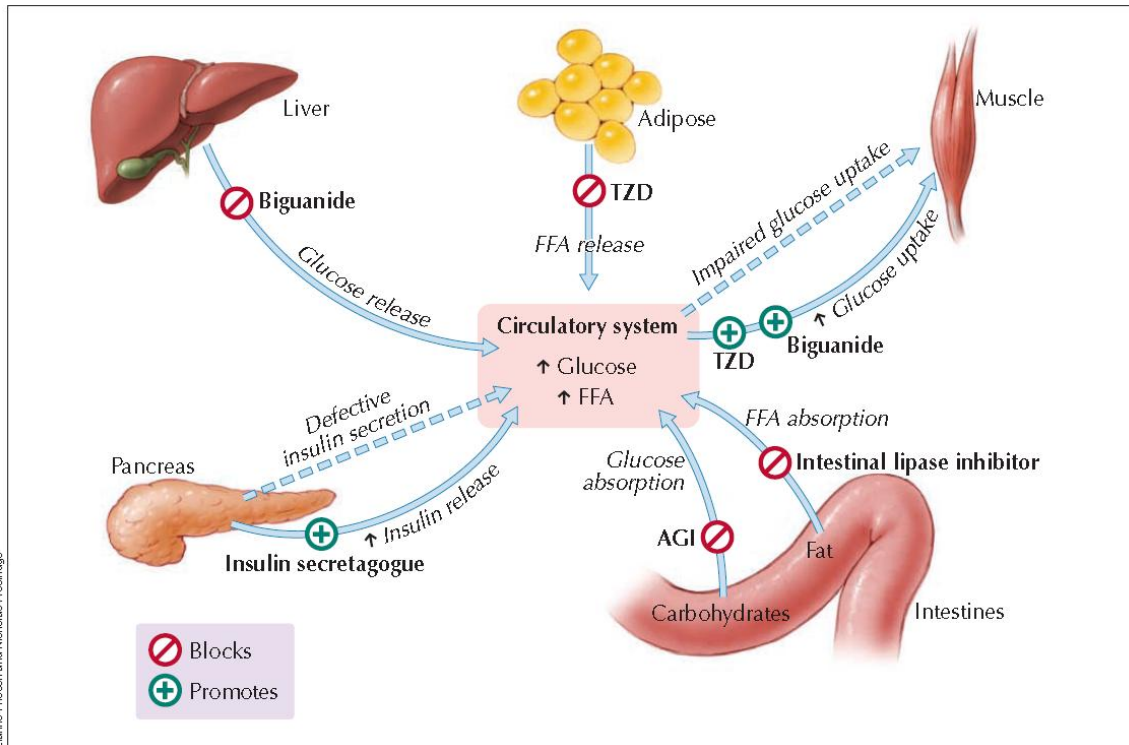


Fig. 2: Major target organs and actions of orally administered antihyperglycemic agents in type 2 diabetes mellitus. TZD = thiazolidinedione; FFA = free fatty acid; AGI = α -glucosidase inhibitor.

圖 1-9、口服抗高血糖藥物之作用位置

Fig 1-9. Major target organs and action of orally administered antihyperglycemic agents

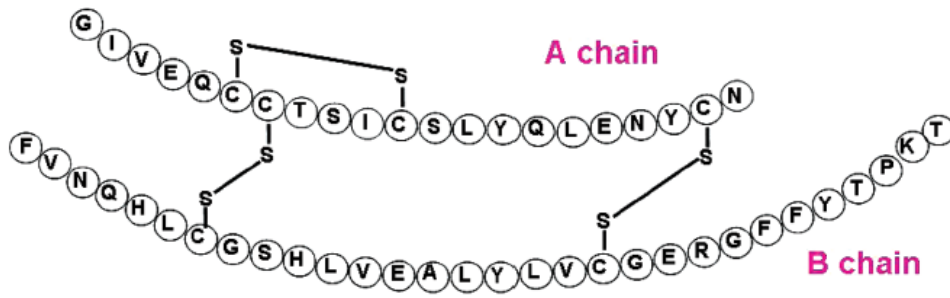
(insulin)。升糖激素主要反應於低濃度之血糖時，其可刺激肝糖分解作用(glycogenolysis)產生葡萄糖，進而使血中葡萄糖濃度上升。同時，升糖激素也可促進脂解作用(lipolysis)，釋放游離脂肪酸至血液中，以維持身體於飢餓時所需之能量。而升糖激素能與其他激素一起作用刺激脂肪酸轉換成酮體(ketone body)，藉由肝臟分泌至血液中，提供其他器官作為能量之來源。而胰島素其作用與升糖激素恰好相好，其主要反應於血糖濃度較高時，使葡萄糖以肝糖及脂肪之形式儲存能量。升糖激素與胰島素具有拮抗的效用。人類胰島素結構(圖 1-10)主要為 A 鏈(11 種 21 個胺基酸)及 B 鏈(15 種 30 個胺基酸)藉由雙硫鍵所組成之分子量約為 6000 的蛋白質，若雙硫鍵被打開則胰島素會失去活性。成熟的胰島素儲存於蘭氏小島 β 細胞內的分泌囊泡，以與鋅離子配位的六聚體型式存在。在外界環境刺激下胰島素被釋放至血液中，並發揮其作用(林, 1986; 陳, 1999)。

(二) 胰島素分泌

調節胰島素分泌之因素相當多種，如葡萄糖、胺基酸、游離脂肪酸、胃腸激素(如 GIP)、神經和神經激素(如腎上腺素)、生長抑素或其他激素，其中以葡萄糖刺激胰島素分泌為主要因素(圖 1-11)。人體攝取食物後，血糖濃度升高至一定濃度後，將可刺激胰島素之分泌。葡萄糖可藉由 GLUT-2 進入細胞內，並藉由代謝葡萄糖產生 ATP，當 ATP 濃度增高時會關閉依賴 ATP 之鉀離子通道(potassium-ATP channel)，進而使細胞膜去極化(depolarization)且開啟受電壓控制之鈣離子通道(voltage-gated calcium channel)，當細胞內鈣離子濃度增加會刺激含胰島素之囊泡的胞吐作用(exocytosis)，胰島素釋放隨之增加(Rutter *et al.*, 1993; Worley *et al.*, 1994; Novak, 2008)。

(三) 胰島素作用

胰島素是促進合成代謝及調節血糖穩定的主要賀爾蒙，其具同化作用。胰島素可調節細胞之醣類、脂質及蛋白質的代謝(圖 1-12)，其扮演著重要的調控角色之一(White and Kahn, 1994)。



	A8	A9	A10	B30
Human	Thr	Ser	Ile	Thr
Porcine	Thr	Ser	Ile	Ala
Bovine	Ala	Ser	Val	Ala
Sheep	Ala	Gly	Val	Ala

圖 1-10、胰島素之結構

Fig 1-10. The structure of insulin

(Mayer *et al.*, 2007)

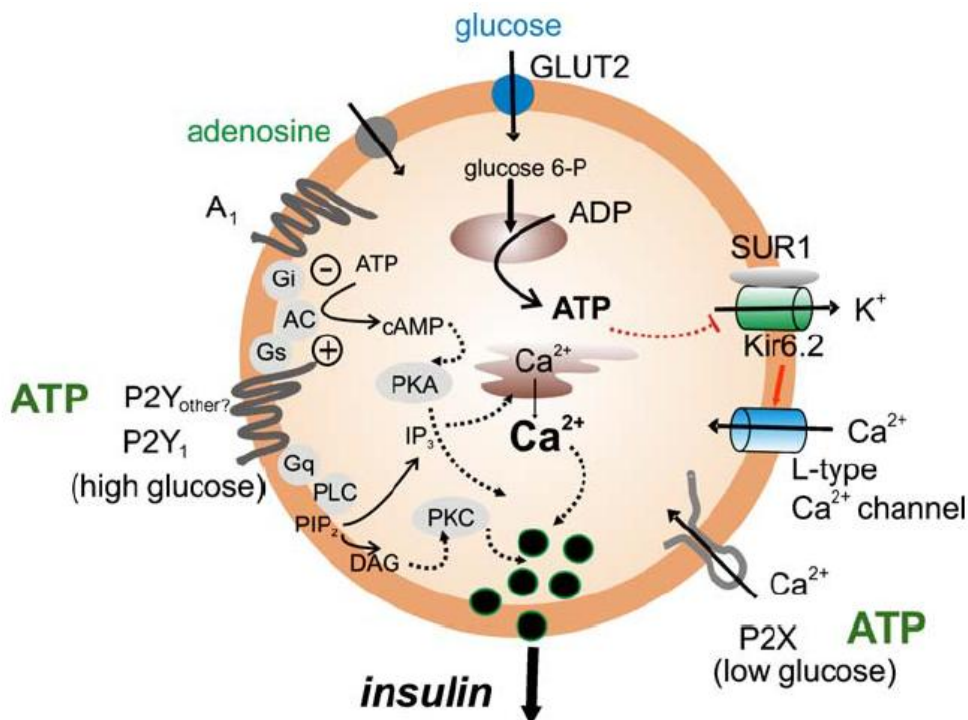


圖 1-11、胰島素之分泌機制

Fig 1-11. The section of insulin

(Novak, 2008)

1、醣類代謝

胰島素對於醣類代謝之影響可分為下列幾種(林, 1986; 鄭, 1992)

(1) 增加 pyruvate dehydrogenase 及 6-phosphofructo-2-kinase 的活性進而促進糖解作用(Glycolysis)，使組織及細胞對葡萄糖的利用率及攝取率增加。

(2) 抑制糖質新生作用(Gluconeogenesis) 所需酵素，如：phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK)、glucose-6-phosphate (G6Pase) 或 fructose 1,6-diphosphate 之基因轉錄，降低葡萄糖之生成(Shepherd and Kahn, 1999; Collier *et al.*, 2004)。

(3) 刺激肝醣合成(glycogen synthesis)且抑制其分解作用(glycogenolysis)。肝醣之含量可反映其合成及分解雙向路徑之平衡點。胰島素可增加 glucokinase、glycogen synthase 等酵素活性進而促使肝醣合成隨之增加；亦可抑制 glucose 6-phosphatase 及 glycogen phosphorylase 之活性而使肝醣分解降低。

(4) 促進脂質合成(lipogenesis) 及抑制脂質分解作用(lipolysis)：胰島素可增加 acetyl-CoA carboxylase 之活性，且同時提升丙酮酸激酶之活性，增加磷酸甘油(phosphoglycerol)，促使合成脂質；亦可抑制脂解酶(hormone sensitive lipase)進而抑制脂質分解。

當胰島素缺乏導致醣類代謝異常時，將會發生高血糖、尿糖及脫水等現象。

2、脂質代謝

胰島素抑制脂解酶(hormone sensitive lipase) 的活性，減緩脂肪分解作用，且減少三酸甘油酯分解成甘油(glycerol) 及游離脂肪酸(free fatty acid; FFA)，進而降低血中 FFA 含量。同時，胰島素也可增加 acetyl-CoA carboxylase 之活性，促進肝合成脂肪酸並於脂肪細胞貯存。同時脂肪細胞也能合成少量的脂肪酸。胰島素亦可促進葡萄糖進入於脂肪細胞，提升丙酮酸激酶之活性，除了提升合成脂肪酸外，還可轉化為 α -磷酸甘油，進而形成三酸甘油酯並貯存於脂肪細胞中。

當胰島素不足時，因脂解作用增強導致血中 FFA 增高，加速其在肝中氧化形成大量乙醯輔酶 A，故形成酮體(ketone bodies) 進而導致酮酸血症(ketonemia)、酮尿症(ketonuria) 或酸中毒(acidosis)。同時，因胰島素濃度不足，會導致脂肪細胞對三酸甘油酯利用率下降，進而蓄積在血液中而產生高三酸甘油脂血症(hypertriglyceridemia)。

3、蛋白質代謝

胰島素可促使細胞膜對胺基酸之通透性，並可加速細胞核的複製及轉錄過程，增加 DNA 和 RNA 的生成，亦可加速核糖體之轉譯過程，促進蛋白質合成。

當胰島素缺乏時，蛋白質代謝異常導致高胺基酸血症(hyperaminoacidemia)及血糖增高。又因糖質新生作用提升，進而肌肉蛋白質作用增加，也使鉀離子流失隨之增高(林, 1986; 何, 1986)。

(四) 胰島素細胞層面之傳訊路徑

當攝取食物後，血中葡萄糖濃度達到 5 mM 時，可刺激胰臟 β 細胞分泌胰島素(Matschinsky, 1990)。胰島素釋放至體內會與其標的細胞(如肝臟細胞、肌肉細胞及脂肪細胞)上之胰島素受體(IR)結合，並透過一連串傳訊分子相互作用，調控細胞內的代謝及生長反應(圖 1-13)。當胰島素與 IR 結合後，受體構型發生改變進而活化其膜上的 β 次單元，而磷酸化之 IR 會刺激下游胰島素受體基質(Insulin receptor substrates, IRS)家族之蛋白質中酪胺酸單元被磷酸化，當其磷酸化後會結合 PI3-Kinase 次單元 p85 蛋白，進而合成 PIP₃，藉此啟動下游 Akt (Protein kinase B, PKB)、aPKC (atypical protein kinase C) 的活化(表 1-12, 1-13; 圖 1-14)，調控將葡萄糖攝入細胞中轉為肝醣、蛋白質、脂質等巨分子儲存之代謝作用並維持血糖的恆定(Saltiel and Kahn, 2001; Taniguchi, 2006)。AMPK (AMP-activated protein kinase)能夠上調或下調與 IRS-1 相結合的 PI3K 和 Akt/PKB 的活性，而胰島素和 Akt 能夠下調 AMPK 的活性 (Tao *et al.*, 2010) 故抑制 AMPK 活性會造成胰島素敏感性受損(Carling, 2004; Yam-auchi *et al.*, 2002)。而臨床應用上，AMPK 被證明介導一些抗糖尿病藥物的治療效應，因此被視為抗糖尿病藥物的熱門靶效藥物(Kahn *et al.*, 2011)。綜合上述論點，AMPK 對主要調節能量恆定的組織臟器均發揮管制作用，包含促進血糖吸收、脂肪酸氧化、膽固醇合成、脂質與 TG 合成、脂肪細胞進行之脂肪分解、糖解反應與改善胰島素抵抗性等(圖 1-15)。

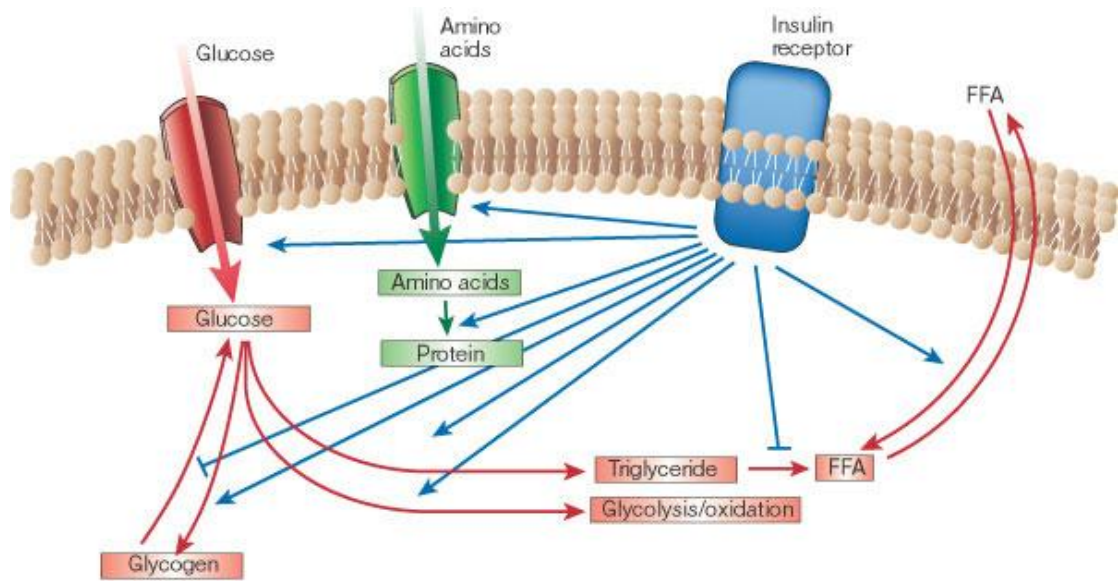


圖 1-12、胰島素之代謝調控

Fig 1-12. The regulation of metabolism by insulin

(Saltiel and Kahn, 2001)

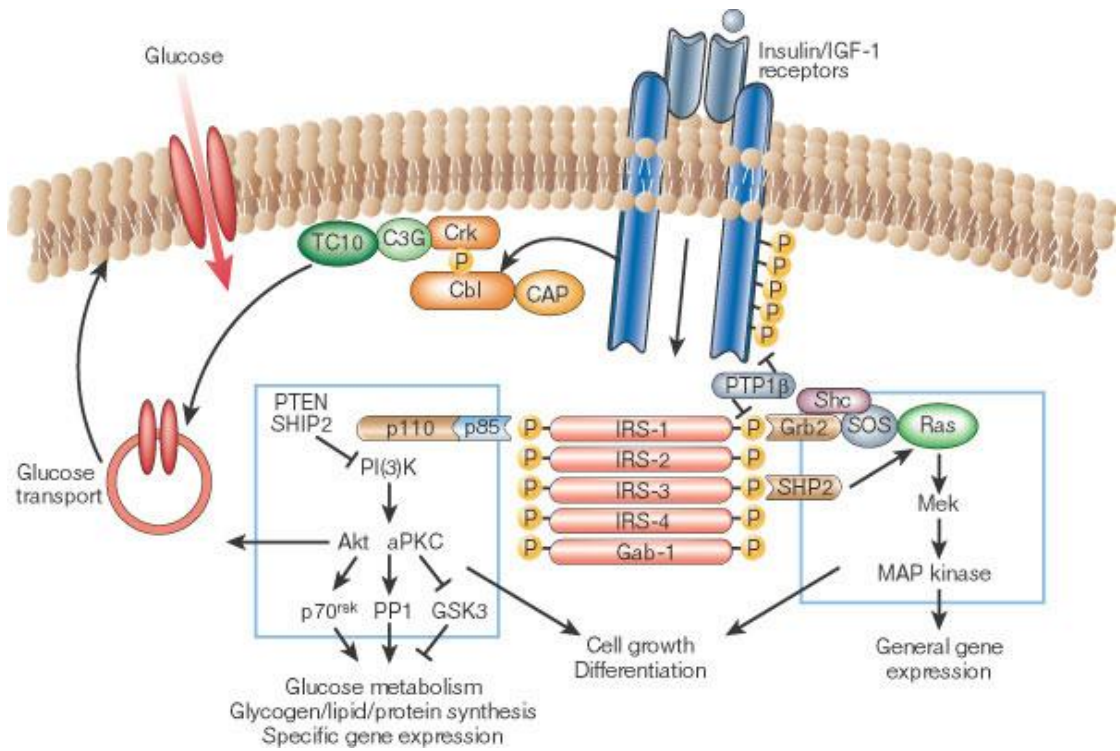


圖 1-13、胰島素訊息傳遞路徑

Fig 1-13. The pathway of insulin signaling

(Saltiel and Kahn, 2001)

表 1-12、PKB 異構物在各組織中的表現情形

Table 1-12. The isoforms of PKB in tissue

	High expression levels	Low/moderate expression level
Akt1	Brain, heart, testis, thymus	Kidney, liver, spleen
Akt2	Brown fat, cerebellum(Purkinje cells), heart, skeletal muscle	Brain, kidney, lung spleen, testis
Akt3	Brain, testis	Heart, kidney, liver, lung, skeletal muscle, spleen

(Zdychova and Komers, 2005)

表1-13、Akt異構型之作用

Table 1-13. The function of Akt isomer

Isoform	Function
PKB α /Akt1	Placental development and animal growth Adipogenesis
PKB α /Akt2	Glucose metabolism Adipogenesis and maintenance Animal growth
PKB α /Akt3	Postnatal brain growth

(Zdychova and Komers, 2005)

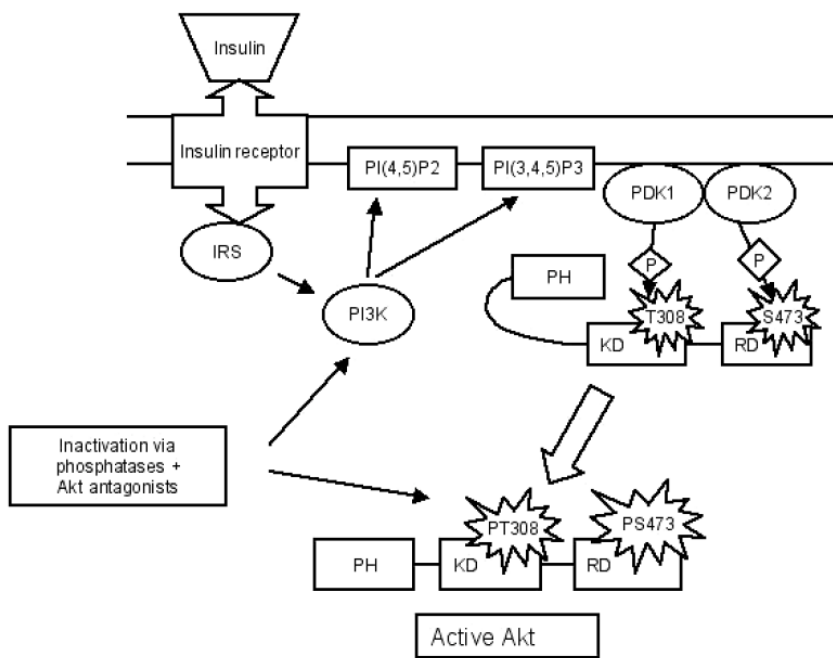


圖 1-14、胰島素刺激 PKB 活化的路徑

Fig 1-14. The pathway of PKB by insulin

(Zdychova, Komers, 2005)

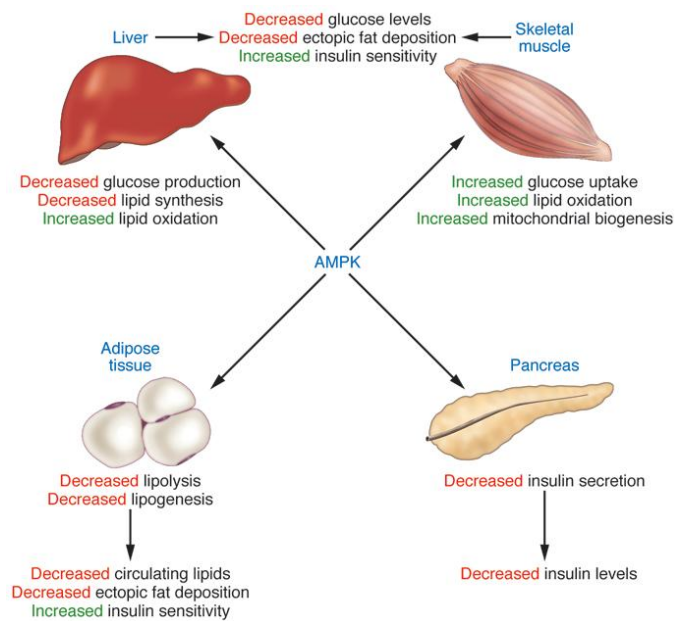


圖 1-15、AMPK 調節體內血糖平衡之角色

Fig 1-15. Role of AMPK in the regulation of whole-body glucose homeostasis

(Long and Zierath, 2006)

(五) 胰島素與醣類代謝

1、肝臟中葡萄糖代謝途徑

葡萄糖之恆定主要依賴胰臟 β 細胞胰島素之作用，使肝臟、肌肉及脂肪攝入葡萄糖 (圖1-16)，藉由調節細胞帶入與釋放來維持血糖恆定 (Zierath, 2003)。其中肝臟是維持血糖平衡的最重要之組織，其藉由葡萄糖帶入或釋出而調節且維持血糖的平衡 (Nordlie *et al.*, 1999)。在飽食及飢餓狀態下人體血糖濃度維持在4-7 mM (Saltiel *et al.*, 2001)。當處於飢餓狀態 (血糖濃度低) 時，大部分葡萄糖消耗在腦 (50%) 與內臟 (25%)，剩餘1/4主要提供肌肉利用，此時血糖恆定乃依賴肝醣分解 (佔2/3) 與糖質新生 (1/3) 作用，產生葡萄糖以提供其他組織所需的能量 (Nordlie *et al.*, 1999)。於飽食狀態 (高血糖濃度)，葡萄糖主要消耗在肌肉 (約3/4) 與肝臟，脂肪細胞僅佔相對小比例 (Zierath, 2003)。當胞外葡萄糖濃度增加時，葡萄糖轉運蛋白將葡萄糖運送至細胞中，而葡萄糖經由胞內的葡萄糖激酶 (Glucokinase, GK) 作用而磷酸化，藉由肝醣合成作用轉化為肝醣儲存或走向糖解作用。如欲由高血糖狀態回復恆定，肝臟需要帶入過多之葡萄糖，也要能減少糖質新生與葡萄糖的釋出；而骨骼肌為最重要的葡萄糖消耗者也必需感應血糖而帶入葡萄糖，兩者皆需仰賴胰島素與脂泌素進行細胞膜上的訊息傳遞與下游之代謝與基因表現改變，以及轉運蛋白的供應來進行管制 (Lange, 2001)。

(1) 葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporters; GLUTs)

GLUTs即為轉運極性葡萄糖的專一性載體，使葡萄糖能進出肝臟、肌肉與脂肪細胞膜。GLUTs家族 (表1-14) 在哺乳類目前至少已發現13種異構型 (isoforms)，且在不同的組織有不同形式及功能 (Joost *et al.*, 2002)。其中有些異構型具有轉位 (translocation) 的能力，如GLUT4可透過胰島素傳訊將其由胞質轉移到胞膜上，並且抑制其胞飲作用 (Litherlane *et al.*, 2001)，增加在胞膜上的密度，藉此提高葡萄糖帶入細胞的效率。而其他與葡萄糖相關之轉運蛋白，如廣泛存於各組織之GLUT1，其於細胞膜上恆定表現，介導基礎葡萄糖轉運，在受到胰島素調控葡萄糖轉運的組織中屬於次要的葡萄糖轉運角色 (Herman and Kahn, 2006)。GLUT2存於肝臟、腎臟及胰臟等；其葡萄糖轉運活性會隨著胞內或胞外葡萄糖濃度增加，被視為細胞之葡萄糖感應器 (glucose sensor)。研究顯示，在高

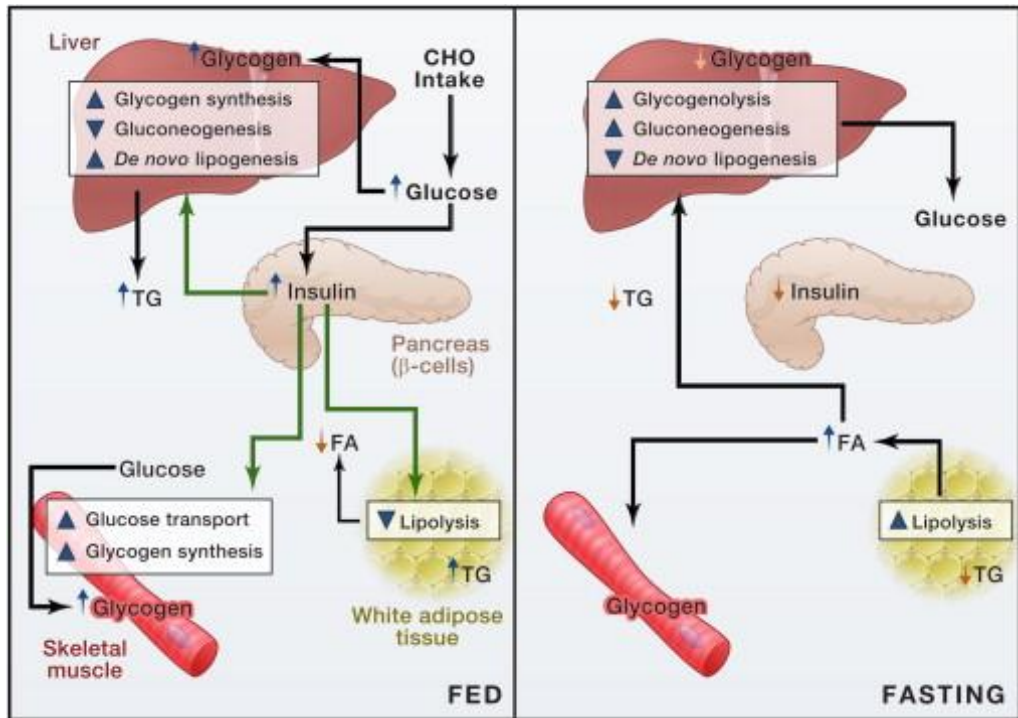


圖1-16、胰島素作用於目標組織之功能

Fig 1-16. The action of insulin on target tissue

(Samuel and Shulman, 2012)

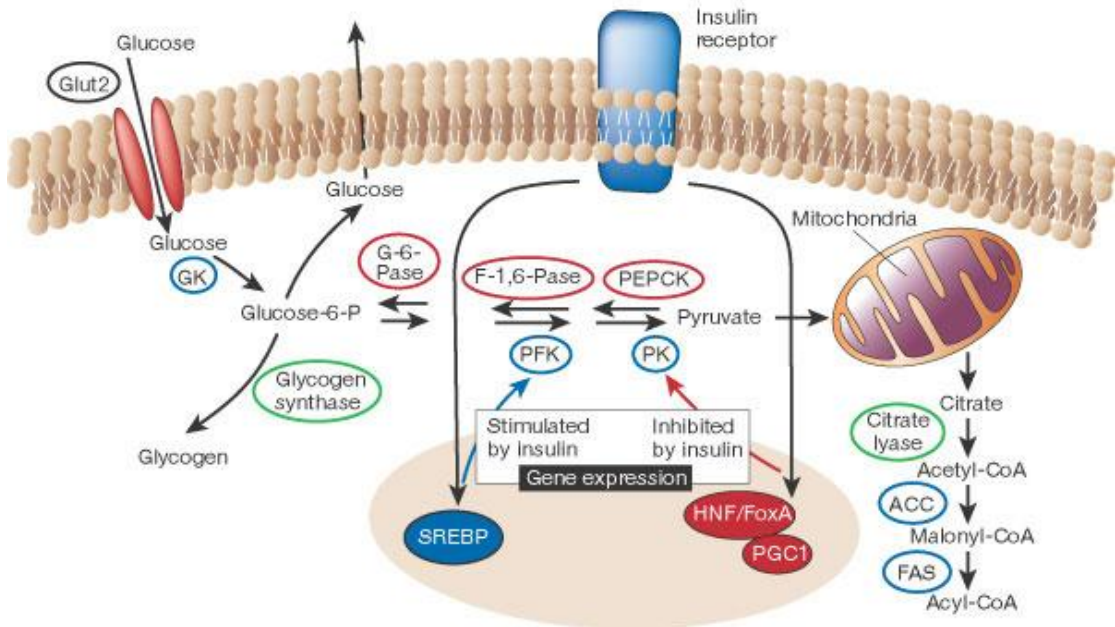


圖 1-17、肝臟細胞之葡萄糖代謝

Fig 1-17. The metabolism of glucose in the liver

(Saltiel and Kahn, 2001)

血糖的環境下會增進肝臟組織中 GLUT2 的基因表現，而在高血胰島素下則反之。文獻指出，肌肉的葡萄糖代謝速率與肝醣合成之速率決定步驟皆由專一性轉運蛋白所調控葡萄糖之轉運(Fink *et al.*, 1992; Yki-Jarvinen *et al.*, 1992)。當血糖濃度上升時，肝臟組織經 GLUT2 轉運將葡萄糖帶入細胞，再藉由六碳糖激酶(HK) 將葡萄糖轉化為 Glucose-6-phosphate (G6P)，隨後分別走向肝醣合成或繼續進行糖解作用。反之，當血糖濃度過低時，肝臟組織經由肝醣分解作用及糖質新生作用，再透過 GLUT2 將葡萄糖釋出細胞外，維持血糖的恆定，故其 GLUT2 扮演葡萄糖雙向運輸之角色。另外在肝臟組織中，胰島素的傳訊對於 GLUT2 表現之影響仍不甚明朗(Ahn *et al.*, 1993; Hah *et al.*, 1992; Eisenberg *et al.*, 2005)。

而 GLUT4 則大量表現於受胰島素調控的肌肉與脂肪組織中，負責藉胰島素刺激轉運葡萄糖，其於細胞中的轉位與基因表現均受到調控 (Herman and Kahn, 2006; Huang and Czech, 2007)。正常情況下，超過九成的 GLUT4 會儲存於細胞質的小泡內，當受到胰島素或肌肉收縮、脂聯素等刺激後便會轉位至細胞膜上，將葡萄糖帶入細胞中 (Douen *et al.*, 1990; Ryder *et al.*, 2001; Thong *et al.*, 2005)。GLUT4 的轉位經胰島素刺激而增加，且也提升細胞膜上 GLUT4 的活性，進而促使葡萄糖攝入量達到最大 (Furtado *et al.*, 2002)。藉基因剔除的實驗中證實，當 GLUT4 表現量減少時，肌肉的葡萄糖攝入減少，並造成高血糖及肌肉與脂肪組織中產生嚴重的胰島素抵抗與葡萄糖耐受性異常 (Kim *et al.*, 2001; Minokoshi *et al.*, 2003; Zisman *et al.*, 2000)；而若增加 GLUT4 表現量，可促進胰島素刺激的葡萄糖攝取率，改善葡萄糖耐受性與胰島素敏感性 (Leturque *et al.*, 1996; Tsao *et al.*, 1996)。綜合上述，無論 GLUT2 或 GLUT4 對葡萄糖代謝皆具有重要的影響。因此，無論是提高 GLUT 的基因表現量或是使其轉位增加，均能增加胰島素的敏感性與周邊葡萄糖利用率，以維持血糖的恆定。

(2) 六碳糖激酶 (hexokinase, HK)

人體的能量來源為經由糖解作用之產物葡萄糖，其中最初之步驟是葡萄糖透過 HK 而磷酸化成葡萄糖六磷酸 (Glucose-6-phosphate, G6P) (圖 1-17)。其此第一步驟為葡萄糖進入糖解作用與肝醣合成兩個主要路徑的共同把關者，因此具高度重要性。目前哺乳類的 HK 可分為四類，分別為 I、II、III 及 IV 型，存在於不同組織中，具有不同的調控性質。其中 I~III 型具高度葡萄糖親和性， K_m 為 10⁻⁶ 至 10⁻¹ mM，第 IV 型為低親和型， K_m 約 6 至 11 mM (Bouche *et al.*, 2004)。肌肉細胞中含少量第 I 型，但第 II 型幾乎包含所有 HK 活性。大部分為

第 II 型位於胞液或粒線體中，其會受 G6P 抑制。因糖尿病產生之高血糖，常同時抑制肌肉 HK 之表現。胰島素可透過 PI3K/p70 (s6k) 依賴型傳訊路徑增高 HK 表現。而肝臟組織的第 IV 型六碳糖激酶，亦稱為葡萄糖激酶 (glucokinase, GK)，GK 因其 K_m 相當高，且不受其產物葡萄糖六磷酸的抑制，亦如同 GLUT2 般可視為細胞的葡萄糖感測器 (glucose sensor)。當胞外葡萄糖濃度低時，GK 大多都被調節蛋白結合而留在胞核內。

2、肝醣合成 (glycogen synthesis) 之調節

葡萄糖進入細胞內後開始進行糖解作用 (Glycolysis)，葡萄糖透過 Glucokinase 或 Hexokinase 被磷酸化成 glucose 6-phosphate (G6P)，隨後走入克氏循環/檸檬酸循環 (Krebs cycle / Tricarboxylic acid cycle)、進行五碳糖磷酸路徑 (pentose phosphate pathway)，或走向肝醣合成作用 (glycogen synthesis)。而 G6P 可促使肝醣合成酶 (Glycogen synthase, GS) 構型改變，轉變為活化態 GS (Ferrer *et al.*, 2003)。肝醣合成主要催化酵素為 GS，其活性主要透過 PI3K 的下游激酶 PKB (Akt) 及 aPKC 之磷酸化來活化肝醣合成激酶 (glycogen synthase kinase 3; GSK3)，促進肝醣合成 (Cross *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2004)。而肝醣含量可反應肝醣合成與分解雙向路徑的平衡點。

3、糖質新生作用 (gluconeogenesis) 與糖解作用 (Glycolysis)

脂肪酸與蛋白質均能經由糖質新生而產糖。肝臟組織利用本身特有的 G6Pase 將糖質新生產物 G-6-P 轉化成葡萄糖而釋放到胞外，使血糖維持恆定。肌肉細胞因並無 G6Pase，故無釋放葡萄糖增加血糖機制。肝臟在糖質新生作用下所產之葡萄糖深受胰島素影響，遠較其對於葡萄糖利用要敏感。胰島素可阻礙肝臟之糖質新生及肝醣分解而抑制葡萄糖產生，其主要透過磷酸化及去磷酸化直接控制醣類代謝酵素之活性及調節糖質新生與肝醣分解的相關酵素基因之表現 (Pilkis and Granner, 1992)。如胰島素傳訊可抑制糖質新生路徑上關鍵酵素 PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) 及 G6Pase (glucose-6-phosphatase) 基因轉錄，降低葡萄糖生成 (Collier *et al.*, 2004)。

五、胰島素阻抗 (insulin resistance)

(一) 胰島素阻抗之定義及病因

胰島素阻抗在代謝症候群機轉中為主要核心異常因子，更是第二型糖尿病最主要前驅因子。當血液中胰島素調控體內能量代謝力降低時即為胰島素阻抗

表 1-14、葡萄糖轉運蛋白種類

Table 1-14. Facilitative glucose transporters

Name	Tissue distribution	Proposed functions
GLUT 1	Many fetal and adult tissues; abundant in human red cells, endothelia and many immortalized cell lines	Basal glucose and increased supply for growing dividing cells; transport across blood brain barrier and other barrier tissues
GLUT 2	Hepatocytes, pancreatic β -cells, intestine, kidney	High-capacity low-affinity transport; transepithelial transport (basolateral membrane)
GLUT 3	Widely distributed in human tissues; restricted to brain in other species	Basal transport in many human cells ; uptake from cerebral fluid into brain parenchymal cells
GLUT 4	Skeletal muscle, heart, adipocytes	Rapid increase in transport in response to elevated blood insulin; important in whole-body glucose disposal
GLUT 5	Intestine (jejunum), lesser amounts in adipose, muscle, brain and kidney tissues	Intestinal absorption of fructose
GLUT 7	Hepatocytes and gluconeogenic tissues	Mediates flux across endoplasmic reticulum membrane

(Bouche *et al.*, 2004)

(Zick, 2001)。亦即在正常胰島素濃度下，肌肉、肝臟與脂肪等組織對其敏感度下降，而造成於正常血糖濃度時，胰島素濃度上升、飯前或飯後血中胰島素增加、及飯後有葡萄糖受性不良之情形，此些為構成胰島素阻抗之要件 (Saltiel, 2000; 陳, 2006)。而文獻將其分為組織性胰島素阻抗 (Systemic insulin resistance) 及細胞性胰島素阻抗 (Cellular insulin resistance)。組織性胰島素阻抗是因為組織對胰島素感受性下降，而形成週邊性胰島素阻抗 (peripheral insulin resistance)，其可能為目標組織之接受器受到結抗或接受器有缺損(如胰島素受體 insulin receptor, IR)所導致。細胞性胰島素阻抗則是因細胞內胰島素受體活化之訊息被改變而導致，如訊息蛋白之磷酸化、激酶活應之改變等因素 (Leclercq, 2007)；學者發現 AKT2 突變者會產生胰島素阻抗 (Gorge, 2004)。

導致胰島素阻抗之病因，可能與老化、缺乏運動、飲食、藥物、遺傳因素及結抗性賀爾蒙等有關。其中肥胖為主要重要因素之一 (Gerich, 1998)。朱 (2011) 報告指出某些特定營養素之攝取會引發氧化壓力及發炎，進而使胰島素敏感性降低，產生胰島素阻抗。如過多之糖類或脂肪攝取造成毒性，及發炎反應伴隨著氧化壓力，更加使胰島素抗性與內皮細胞機制不正常化 (圖 1-18)。

(二) 誘發胰島素阻抗之肝臟細胞模式

體內維持血糖之恆定主要依賴胰臟 β 細胞分泌胰島素，且作用於重要的下游臟器，即肝細胞、肌肉細胞與脂肪細胞，因此三個臟器其相關細胞株常作為研究平台，利用體外方式誘導細胞產生胰島素抗性，並藉此模式探討改善胰島素阻抗的有效成分對於細胞之影響。較常應用於評估改善葡萄糖耐受異常之體外細胞模式有三種：骨骼肌肉細胞 C2C12 與脂肪細胞 3T3-L1，皆需經分化為成熟細胞，方可應用於篩選改善血糖恆定之成分，操作步驟繁複且耗時。而肝臟細胞 HepG2 及 FL83B 皆常當作篩選之平台，但其 HepG2 為人類肝癌細胞，故近期研究常應用小鼠肝臟細胞 FL83B，其不需分化即可有胰島素感受性 (Cheng, 2008)，且同時可產生並儲存肝醣及 HDL (Breslow, 1973)。再者，現今研究主要誘發胰島素抗性之物質為 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)、脂質或糖類。而其機制及使用意義分別歸納如下：

1、TNF- α 誘導之阻抗

TNF- α 為分子量 26 kDa 之細胞膜穿透蛋白，是一種發炎性細胞激素 (inflammatory cytokine)，與免疫調節相關。研究指出於大鼠體內注射 TNF- α 會

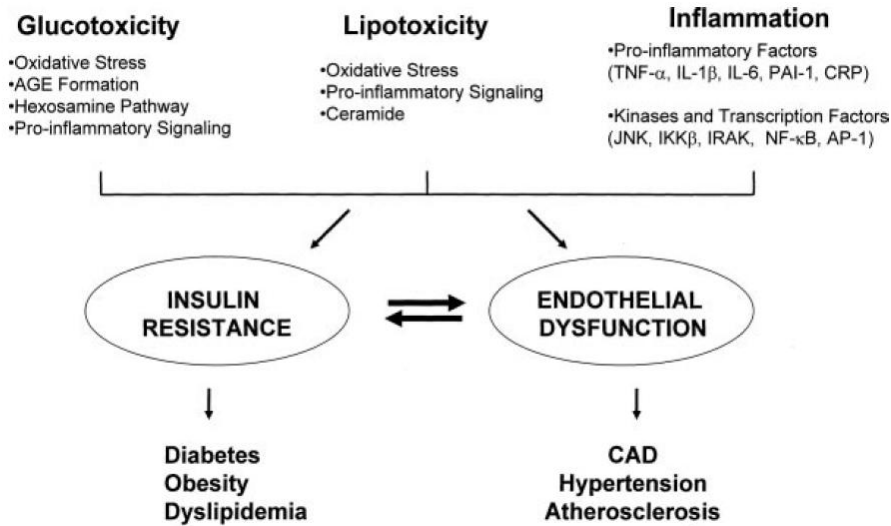


圖 1-18、糖類與脂質之毒性及發炎反應所產生之胰島素抗性與內皮細胞之非正常之交互作用

Fig 1-18. Shared and interacting mechanisms of glucotoxicity, lipotoxicity, and inflammation underlie reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction

(Kim *et al.*, 2006)

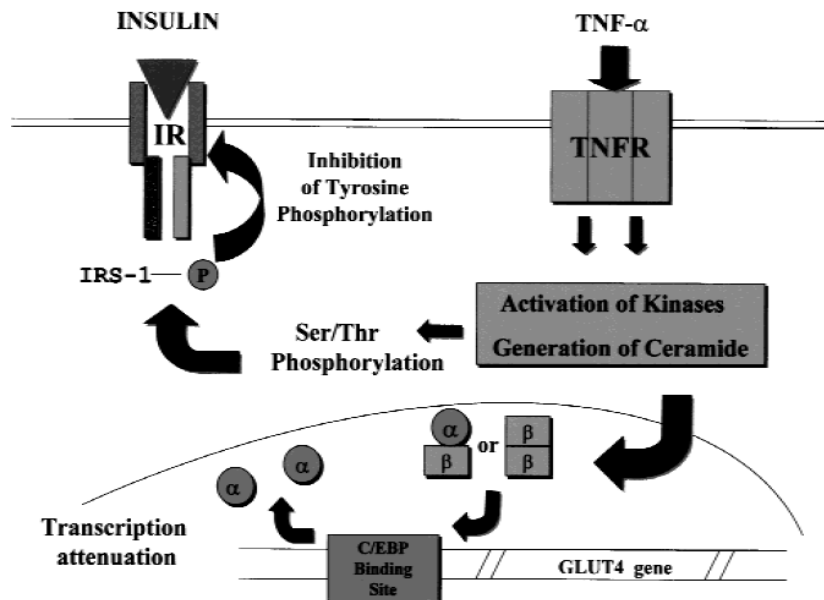


圖 1-19、TNF- α 於脂肪細胞中誘導胰島素阻抗之機制

Fig 1-19. The mechanism of TNF- α induced insulin resistance in adipocytes

(Chen and Phillip, 2000)

導致胰島素阻抗(Lang *et al.*, 1992)。其可能原因為TNF- α 與細胞膜上之受器結合，經一連串反應而產生神經醯胺(ceramide)及膽鹼(choline)，其中神經醯胺會刺激IRS-1 serine之磷酸化，以至於IR受到抑制進而干擾胰島素傳訊路徑(圖1-19)(Hsu *et al.*, 1996; Peraldi and Spiegelman, 1998)。再者，TNF- α 可刺激其他與胰島素相關之促發炎激素之產生，如interferon- γ (INF- γ)、interleukin-1(IL-1)、interleukin-6 (IL-6) 等(Tracey and Cerami, 1993; Vandenabeele *et al.*, 1995; Peraldi *et al.*, 1996; Senn *et al.*, 2002)。亦有研究證實TNF- α 會干擾肝臟細胞(hepatocytes)、骨髓細胞(myeloid cells)及纖維母細胞(fibroblasts)之胰島素傳訊途徑(Feinstein *et al.*, 1993; Peraldi *et al.*, 1996; Kroder *et al.*, 1996)。學者Moller (2000)歸納出下列幾點引發胰島素抗性之因素：

- (1) 抑制胞內葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter, GLUT)
- (2) 抑制脂肪代謝之相關酵素
- (3) 加速脂解提高血中游離脂肪酸
- (4) 減少 peroxisome proliferator-activator receptor γ (PPAR γ) 之合成
- (5) 抑制 IR 及 IRS-1 tyrosine 之磷酸化
- (6) 增加 protein tyrosine phosphatase (PTPase)活性等

黃(2005)及Cheng等學者(2008)皆以TNF- α 誘導FL83B肝細胞產生胰島素阻抗，發現葡萄糖攝入量會隨TNF- α 濃度增加而減少進而產生抗性。另外，Huang與Wu等人(2009)亦以誘導FL83B胰島素阻抗，結果顯示放射線標定之葡萄糖攝入量會因添加TNF- α 而下降。綜合上述，可藉由TNF- α 誘導細胞產生胰島素抗性，作為篩選影響血糖恆定之有效成分的平台。

2、脂質誘導之阻抗(脂質毒性 lipotoxicity)

過多的葡萄糖或游離脂肪酸(圖1-20)，導致 β 細胞功能受損，使胰島素分泌減少，再者過多葡萄糖會抑制週邊組織對胰島素之利用率，產生胰島素抗性，因此惡性循環導致血糖失衡(Poitout *et al.*, 2010)。當體內長期攝取過量脂質時，胰臟 β 細胞功能產生異常，即稱脂質毒性(lipotoxicity)(Unger, 1985)。已有多篇文獻指出人體血中FFA含量與胰島素阻抗性成正比。在糖尿病發展過程初期，胰臟 β 細胞質量(cell mass)及胰島素基因表現會增加，先代償性的分泌更多胰島素，此稱之為高胰島素血症(hyperinsulinemia)(Chang-Chen *et al.*, 2008; Poitout *et al.*, 2010)。而於此時期，體內空腹及飯後血糖皆維持在正常範圍內。隨著增加血中FFA，細胞則以脂肪酸為能量優先來源，進而對葡萄糖敏感度逐漸降低，此現象

為 glucolipoadaptation (圖1-21)。脂肪氧化後，胞內生成大量檸檬酸(citrate) 進而抑制PFK(糖解酶之一)，而使G-6-P蓄積，導致葡萄糖代謝受阻。此是因脂肪酸代謝過慢或肌肉組織中過多脂肪酸蓄積，產生代謝物DAG (diacylglycerol)、fatty acid CoA及ceramide，此些物質阻斷IRS/PI3K傳訊路徑，GLUT4轉位至細胞膜因而減少，並透過磷酸化IRS的serine而阻礙胰島素之傳訊，而出現葡萄糖耐受異常(陳等, 2006; Schinner *et al.*, 2005)。

體內處於高糖和高脂肪酸環境中，葡萄糖透過TCA cycle而生成部分citrate，其會被合成malonyl-CoA，進而抑制CPT-1 (carnitine-plmitoyl-transferase-1) 將脂肪酸運送到粒線體內行 β 氧化，進而堆積long-chain fatty acyl CoA (LC-CoA)， β 細胞之功能受LC-CoA之影響，且間接形成其他脂肪代謝產物ceramide和DAG，促使胰島素阻抗，並造成胰臟細胞傷害(圖1-22)(Poitout and Robertson, 2008; Prentki and Corkey, 1996; Prentki *et al.*, 2001)。

FFA 與胰島素抗性之主要機制如下(蔡, 2011)：

(1) 胰臟細胞凋亡

添加 FFA 於人類胰島細胞中培養，隨 FFA 劑量增高，胰島細胞的損害越明顯(Lupi *et al.*, 2001)。而透過細胞試驗及 ZDF 大鼠胰島細胞之實驗證實，過多的脂肪酸最終會導致胰島素 β 細胞的凋亡(Cnop *et al.*, 2001; Hagman *et al.*, 2005; Maedler *et al.*, 2001; Pick *et al.*, 1998; Shimabukuro *et al.*, 1998)。而 Bcl-2 蛋白之表現亦受 FFA 抑制。而 FFA 亦可誘發 JNK(C-jun N-terminal kinase) 活化 caspase 走向細胞凋亡。

(2) 內質網壓力(endoplasmic reticulum stress, ER stress)

A、處於高游離脂肪酸環境下，加速產生過多活性氧(reactive oxygen species, ROS) 並造成氧化壓力上升

B、不完全摺疊蛋白(unfolded protein) 的蓄積源自於內質網內的恆定被改變，生成 ER stress (Chang-Chen *et al.*, 2008)。

C、胰臟 β 細胞加入飽和脂肪酸棕櫚酸培養之，會增加 ER stress，且 JNK 和 CHOP 的表現明顯提升，導致胰臟細胞走向凋亡、胰島素分泌及合成能力降低，進而血糖無法被正常調控(Eizirik *et al.*, 2008; Karaskov *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2008; Laybutt *et al.*, 2007)。但單元不飽和脂肪酸卻無此現象(Hirabara *et al.*, 2009)。

D、ER stress受激活後會抑制胰島素基因mRNA及其蛋白質表現，並促使增加ATF3和SREBP。

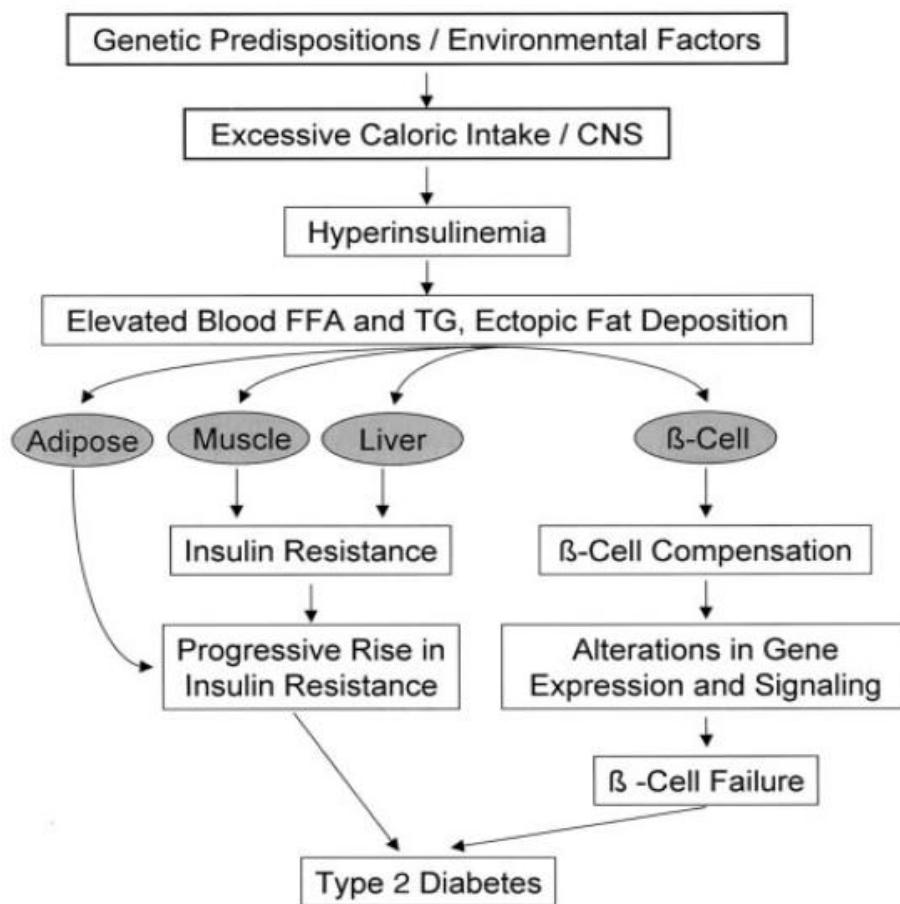


圖 1-20、攝取過量之產熱量營養物對由脂質引起的第二型糖尿病之病因

Fig 1-20. Models illustrating the influence of calorogenic nutrients and overnutrition in the etiology of adipogenic type 2 diabetes

(Prentki *et al.*,2002)

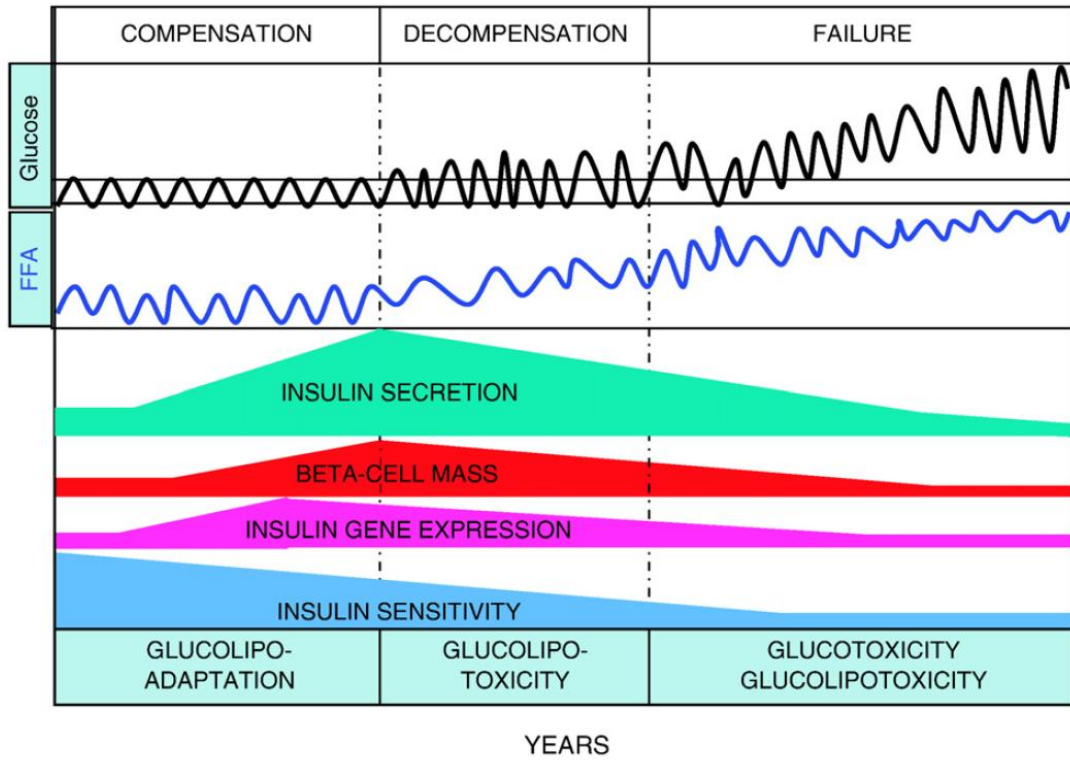


圖 1-21、在面對肥胖誘導胰島素阻抗及糖脂毒性作用下， β 細胞代償失敗之時期
 Fig 1-21. Hypothetical representation of the progression from beta-cell compensation to failure in the face of obesity-induced insulin resistance and the role of glucolipotoxicity

(Poitout et al., 2009)

ATF3 和 SREBP 為負調控 IRS 的訊息傳遞與 IRS2 的轉錄作用，而達到抑制胰島素訊息傳遞途徑。

(3) 胰島素分泌失常

長期處於高濃度脂肪酸環境會有下列幾種情形：

A、干擾正常的糖解及糖質新生作用

B、大量增加 β 細胞胰島素之釋放，形成高胰島素血症

C、抑制葡萄糖刺激性的胰島素分泌(glucose induced insulin secretion, GSIS) 及胰島素基因的表現(Poitout *et al.*, 2006)

D、藉由 FFA 使細胞中 acyl-CoA 衍生物數量增多，促進細胞傳訊分子 serine kinase 的活性。活化之 serine kinase 會抑制正常胰島素受體下游的一連串酪胺酸磷酸化過程，進而阻礙正常胰島素訊息傳遞，造成胰島素阻抗(Segall *et al.*, 1999)

E、飽和脂肪酸代謝所生產的毒性分子，如 ceramide，其使胰島素激因表現受限(Gremlich *et al.*, 1997; Jacqueminet *et al.*, 2000; Poitout *et al.*, 2006; Ritz-Laser *et al.*, 1999)

(4) 發炎反應

脂肪酸與一氧化氮(nitric oxide,NO) 具相關性。在病理生理環境中，NO 則成為細胞毒素(Gao, 2010)。NO 的形成取決於 NOS(nitric oxide synthase)；NOS 具三類異構酶，而其中 inducible NOS(iNOS) 與免疫系統的防衛機制最具關聯(Luiking *et al.*, 2010)。脂肪酸代謝產物 ceramide 會誘發胰島細胞中 NF- κ B，進而誘昇 iNOS 表現量。多量之 iNOS 具細胞毒殺效果，且增加 NO 量， β 細胞的功能進而產生異常及損害(Van Raalte *et al.*, 2010)。除此之外，高 FFA 濃度會促使細胞激素 IL-1、IL-6、IL-8 之生成， β 細胞因此發炎且受損(Bikopoulos *et al.*, 2008; Boni-Schnetzler *et al.*, 2009; Busch *et al.*, 2002; Ehses *et al.*, 2009)。亦有文獻指出糖尿病與發炎反應具相關性(Shoelson *et al.*, 2006; Donath *et al.*, 2008; Donath and Shoelson, 2011; Donath *et al.*, 2011)。

3、醣類誘導之阻抗

為了回應血中高濃度葡萄糖，當體內發生因代償性導致之高胰島素血症(hyperinsulinemia) 時，其血糖仍維持在正常範圍內。但基於長期過度負荷下，最終 β 細胞受損，使胰島細胞對葡萄糖失去感受性，逐漸失去代償作用，同時周邊組織亦開始產胰島素抗性，更促使胰臟 β 細胞功能損壞進而無法製造足夠之胰島素，加劇高血糖之情形，並再惡化胰臟 β 細胞之作用，此即為糖質毒性

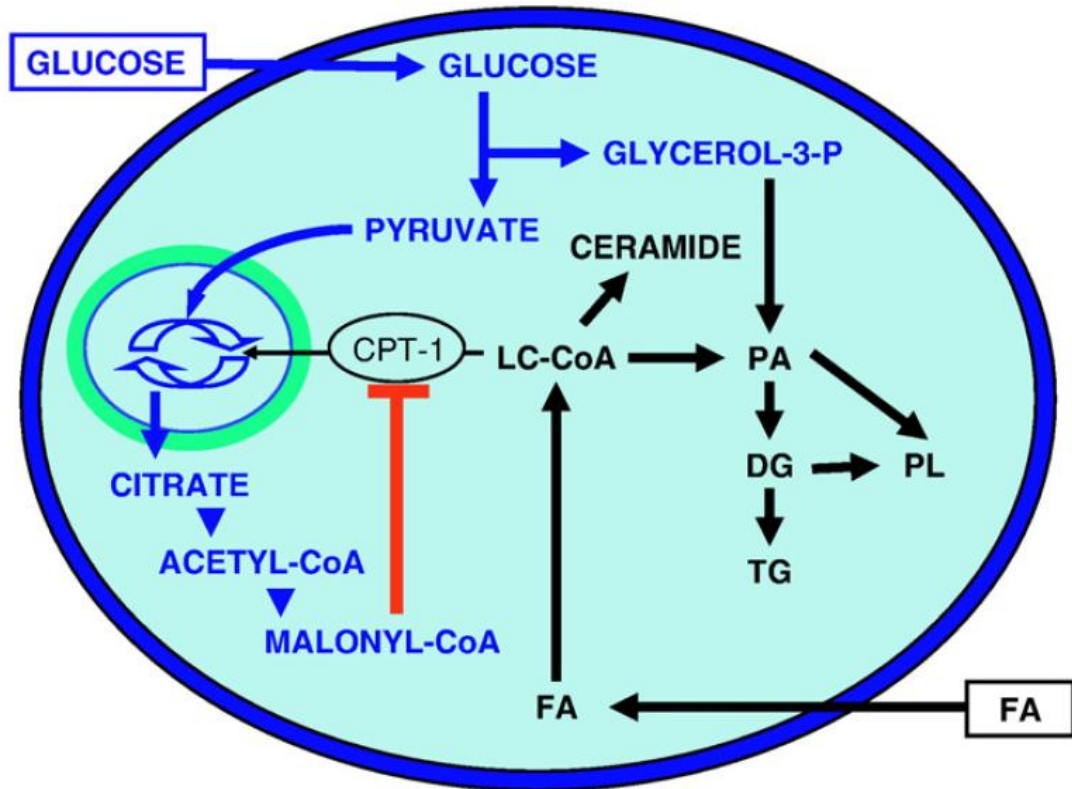


圖 1-22、在 β 細胞中葡萄糖與脂質之關係

Fig 1-22. Effects of glucose on lipid partitioning in the beta cell

(Poitout et al., 2010)

(glucotoxicity) (Unger and Grundy, 1985)。而到中後期時，因胰島素功能損壞使得無法有效抑制 HSL (hormone-sensitive lipase)，促使脂解作用，產生更多 FFA 運送到血中。當血中高濃度葡萄糖及 FFA 會產生交互作用，促使 β 細胞之凋亡，此稱為糖脂毒性 (glucolipotoxicity) (Prentik *et al.*, 2001)。故高血糖是脂質毒性發生的先決條件。除此之外，在高糖與高脂肪酸環境下，增進 ER stress 並抑制胰島素基因之 mRNA 和蛋白質的表現，促使細胞大量表現轉錄因子 ATF-3 (activating transcription factor 3) 而造成細胞凋亡。另外 SREBP 的表現量也會增加，且減少 IRS 的訊息傳遞和 IRS2 的轉錄作用。另一方面，TOR (target of rapamycin) 為 PI3K-related Ser/Thr kinase 家族，其活性受 TSC1/TSC2 負向調控 (Bachar *et al.*, 2009; Chang-Chen *et al.*, 2008)。由此可知，當高濃度葡萄糖抑制 TSC1/TSC2 複合物的磷酸化時，激活 mTOR (mammalian target of rapamycin) 的複合體 (mTOR:Raptor: G β L)，mTOR 藉由激活下游受質來調節蛋白質轉譯而活化，如核糖體 40S 的蛋白質激酶 S6 kinase (S6K) 和 eIF 的結合蛋白 (eIF4E binding protein, 4EBP)，而增加 S6K 和 4EBP 磷酸化程度進而使 IRS-1 及 IRS-2 受到抑制。同時 TSC1/TSC2 亦調控 PKB/Akt 之活性 (Hung *et al.*, 2008)。除此之外，ROS 亦可藉由高糖與高脂肪酸而大量生成，進而導致 JNK 被活化，抑制 IRS-1 及 IRS-2，且影響下游 Akt 活化，進而抑制 GSK3 β (glycogen synthase kinase beta)。

糖毒性造成胰島素抗性之機制 (Yan *et al.*, 1994; 蔡, 2011)：

(1) ER stress

其作用同 FFA 引起之 ER stress。

(2) 葡萄糖可透過多種方式，使 ROS 的增加進而提升氧化壓力

文獻指出，長期處在高血糖的狀況，胰臟 β 細胞具破壞性 ROS 被誘發(圖 1-23)，故高血糖引起的氧化壓力是造成 β 細胞功能受損的一個重要機制(Poitout and Robertson, 2008)

A、葡萄糖的氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)：葡萄糖透過酵素系統、粒線體電子傳遞鏈或氧化還原過程中產生大量的自由基(Brownlee, 2001; Reusch, 2003; Poitout and Robertson, 2008)

B、在高糖狀態下，細胞會促使葡萄糖走向多元醇代謝途徑(polyol pathway) 產生山梨醇(sorbitol)，大量消耗輔酶 NADPH 與 NADP⁺，進而影響需要輔酶參與之化學反應(Miwa *et al.*, 2003; Naruse *et al.*, 2000)。

C、處於正常生理狀況下，少量葡萄糖會透過六糖胺途徑(hexosamine pathway) 代謝之。但若細胞於血中高濃度葡萄糖環境中，會經由此途徑產生

過多的 fructose-6-phosphate，並藉由一連串反應形成 glucosamine (GlcNAc)，GlcNAc 會藉由 O-GlcNAc transferase (OGT) 與蛋白質上的 serine 或 threonine 鍵結成 proteoglycan 和 O-linked glycoprotein。O-GlcNAc 因經蛋白質修飾而改變原來之活性，且進而影響細胞核內基因轉錄轉譯作用及訊息傳遞，甚至導致細胞凋亡(Du *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2001)。

E、高血糖會促使糖解作用中間代謝物 dihydroxyacetone phosphate 增多，其透過還原及醯化作用形成 DAG，而 DAG 會刺激 PKC 之活性，造成氧化壓力提升(Brownlee, 2001; Madsen-Bouterse and Kowluru, 2008)。根據研究指出，高糖模式培養之細胞可刺激 PKC 活性，並提高轉錄因子 NF- κ B 的含量，進而增加與發炎反應相關的轉錄因子如 TNF- α 等。同時活化之 PKC 亦可透過誘發 NAD(P)H 依賴性氧化酶之活性而促使 ROS 的生成，造成細胞氧化損傷。除此之外，促發炎激素會導致 IRS-1 serine 307 磷酸化，而非在正常位置 tyrosine 位置上，故使 IRS-1 無法繼續活化下游 PI3K，再者促發炎激素會抑制 PI3K 及 Akt 之活性，使 GLUT4 無法轉位至細胞膜上，故葡萄糖無法被帶入細胞中(陳, 2011)。

F、糖化終產物(advanced glycation end-products,AGEs) 之生成

高血糖會促使蛋白質進行非酵素性的糖化作用，即梅納反應，而其產物經分子重排(amadori rearrangement) 與氧化作用形成 AGEs。糖化作用與蓄積生成的 AGEs 會造成自由基的生成，造成胰臟小島細胞破壞(Ceriello, 2003)。

然而高血糖亦可透過自氧化產生 enediol radical，不僅增加 AGEs 生成，也催化氧分子變成氧自由基，因此 ROS 量增多。而其亦可藉由 NO 形成更具氧化能力 peroxynitrite (ONOO⁻)，進一步造成 DNA 損傷，並刺激 RARP (poly-ADP-ribose polymerase) 的活性，而大量消耗 NAD⁺，使葡萄糖代謝中 GAPDH 之活性受限(Reusch, 2003)，加使 glyceraldehyde-3-phosphate 濃度上升，導致細胞內 AGEs 的合成增加。

(3)胰島素分泌異常

胰臟-十二指腸同源區蛋白質(pancreas-duodenum homeobox-1,PDX-1)，亦稱胰島素促進因子 1 (insulin promoter factor-1, IPF-1)，主要調控胰腺發育與維持 β 細胞正常功能之主要轉錄因子(Ahlgren *et al.*, 1996; Leibowitz *et al.*, 2005)。若活化 PDX-1 可助於 β 細胞生長、胰島素分泌與葡萄糖轉運蛋白的表現(Poitout and Robertson, 2002)。在正常情況下，Pdx-1、MafA 和 Beta2 會結合至 A1-A4、C1 和 E1 調控區域，藉此調控內源性胰島素轉錄的激活作用。發生糖或糖脂毒性之

情形時，PDX-1 和 MafA 轉錄因子進入細胞核的結合力降低，導致胰島素基因表現受阻，造成胰島素分泌下降。除此之外，長期於高糖環境中，脂肪酸氧化會被抑制，且產生 ceramide、改變脂肪之組成，最終也導致 β 細胞功能失常，細胞量減少。

綜合上述論點，可得知當攝取過多醣類時，會引起糖質毒性，且此種模式更能反應真實體內狀況，故已有文獻利用葡萄糖添加於細胞膜式中，探討其有效物質改善胰島素抵抗之效果。將 HepG2 培養於無 glucose、low glucose (1mg/mL) 及 high glucose (3 mg/mL) 之 medium 中，培養 1~5 天，發現未添加 glucose 者細胞生長較優於其他兩組，而在葡萄糖消耗量上，low glucose 消耗量較大於 high glucose，其是因為 glucose 有負調控之代謝機制(Iyer *et al.*, 2010)。Lin 等學者(2008)藉以高糖誘發 HepG2 之胰島素抵抗，發現控制組之 Akt 磷酸化表現量多於添加葡萄糖(33mM)組；而於高糖誘導之模式下，添加降血糖成分 EGCG，其 Akt 磷酸化表現量有明顯回復之趨勢。Yun 等學者(2009)亦透過 HepG2 經高糖誘發胰島素抵抗之模式，探討其有效物質之影響效果，研究發現 Akt 磷酸化表現量，添加葡萄糖組(30mM)明顯少於控制組，而若添加降血糖成分物質後 Akt-Ser473 有顯著回升。而若藉由 33mM 之 glucose 培養 48 小時，可使 FL83B 之葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量下降、減少 Akt 磷酸化、AMPK 與 GS 之表現量及 ROS 生成量上升；當加入代測物質其可使上述之表現量回復至正常量(Lee *et al.*, 2012)。這些研究表示以高糖可以誘導肝細胞造成細胞層次之胰島素抵抗，並應用於降血糖成分之評估。

六、研究動機與實驗架構

乳酸菌現今研究相當多元，其在免疫調控層面為較多研究之方向，但亦有文獻表示糖尿病其與免疫反應具相關性，然而乳酸菌應用於調控血糖之能力，目前篩選平台多為動物試驗，而較少文獻探討細胞膜式，而在眾多文獻中，下列菌株已被證實可改善葡萄糖攝入量，進而達到血糖平衡。*Lactobacillus casei* 經動物實驗發現其具降血糖之功效，且能促使生成細胞激素 IL-4、IL-5、IL-6R 及 IL-10，降低 IFN γ IL-2 皆被抑制(Matsuzaki *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 1999)。 *Lactobacillus GG* 可改善 n-STZ rat 之 HbA1c 及血糖量(Tabuchi *et al.*, 2003)。Yamano 等學者(2006)指出，餵食 n-STZ Wistar rat 之含 7.56×10^7 CFU/mL *Lactobacillus johnsonii* strain La1 (LJLa1) 水，藉由注射 2DG(40 μ

mol/20ul)後其血糖 LjLa1 明顯低於控制組；而 LjLa1 亦可減少 renal sympathetic nerve 活性，且強化 gastric vagal nerve 活性，故 LjLa1 可能藉由自體免疫之改變而影響葡萄糖代謝。透過 21% 高果糖引起第二型糖尿病 Wistar 鼠，投予含 *Lactobacillus acidophilus* 及 *Lactobacillus casei* 之低脂(2.5%) dahi 飲食，其結果顯示血糖、HbA1c、TG、總膽固醇、LDL-C、VLDL-C 及 FFA 等生化特性皆比高糖誘導之老鼠的結果低，而 HDL-C 則為增高，藉由結果表示其可減少糖尿病生成且延緩其併發症(Yadav *et al.*, 2007)。Harisa 等學者(2009) 將 7.56×10^7 CFU/mL 之 *Lactobacillus acidophilus* (LA) 單獨使用或合併 acarbose (AC)，研究證實給予 Wistar 糖尿病鼠 LA 或 AC，皆可降低其血糖、HbA1C 及 TA；且 AC 組更低於 LA 組；若 LA 與 AC 同時使用，其結果優於單獨使用 AC 或 LA。Abeer 於 2009 年研究單獨使用 *Bifidobacterium* (10^8 CFU/day) 或 *Lactobacillus acidophilus* (10^8 CFU/day) 之降血糖效益，結果指出單獨給予 *Bifidobacterium* 或 *Lactobacillus acidophilus* 與控制組相比，其可明顯減少血糖濃度、總膽固醇、TG、LDL-C 及 VLDL-C，而 HDL-C 及胰島素分泌則有顯著提升。而有研究應用 *Lactobacillus plantarum* 發酵人蔘果實(FSGB)，經老鼠試驗證實其可提升胰島素分泌、調控血糖濃度、並改善胰島素抗性(Kim *et al.*, 2012)。Moroti 等學者(2012) 利用人體試驗模式，投予 *Lactobacillus acidophilus*、*Bifidobacterium bifidum* 及 fructooligosaccharides，證實其 HDL-C 有顯著提升，且血糖濃度亦明顯減少。

學者 Ruas-Madiedo 等(2002) 提出乳酸菌能擁有多種生理功效，主要是其 EPS 之影響。*Bifidobacterium* 分離之 EPS 具抗菌效果並有免疫調節之作用(Wu *et al.*, 2010)。服用 EPS 二到七天(100 mg/kg body weight/day 之 *Lactobacillus kefiranofaciens*)，可有效減少細胞激素釋放到血液中(Vinderola *et al.*, 2006)。kefiran 為 *Lactobacillus* 屬分泌的其中一種 EPS，給予高膽固醇兔子 1% w/w 之 kefiran，可藉由抗發炎及抗氧化特性預防且延緩動脈硬化(Liu *et al.*, 2011)。而由先前文獻論點指出，細胞激素、發炎反應及氧化能力皆與糖脂毒性有關，除此之外，中草藥及茶類中多醣已被確定其藉由調節血中葡萄糖，而改善胰島素阻抗(胡, 2002; Xie and Du, 2011; Patel *et al.*, 2012)。

本實驗室先前研究，利用 FL83B 細胞透過高濃度葡萄糖產生胰島素抗性，並添加黃金銀耳之酸性多醣體觀察其是否具調控血糖平衡之效用，結果證實加入待測物後，其可增加細胞 2-NBDG 之帶入量及肝糖合成。故本研究細胞試驗將

套用此模式，探討乳酸菌株之 EPS 是否可行同樣之模式進而達到調節血糖。而乳酸菌 EPS 之產率，會因為菌株或生長條件之不同而有異，所以本論文將探討乳酸菌於不同 pH 值、溫度、培養時間及葡萄糖添加之 EPS 產量，找出乳酸菌株最適生長 EPS 之條件，以增加 EPS 的生成量。

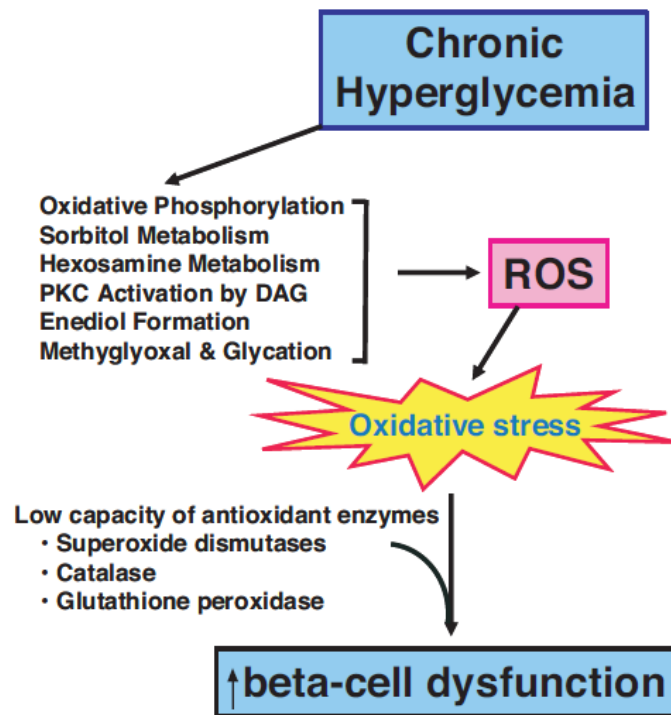


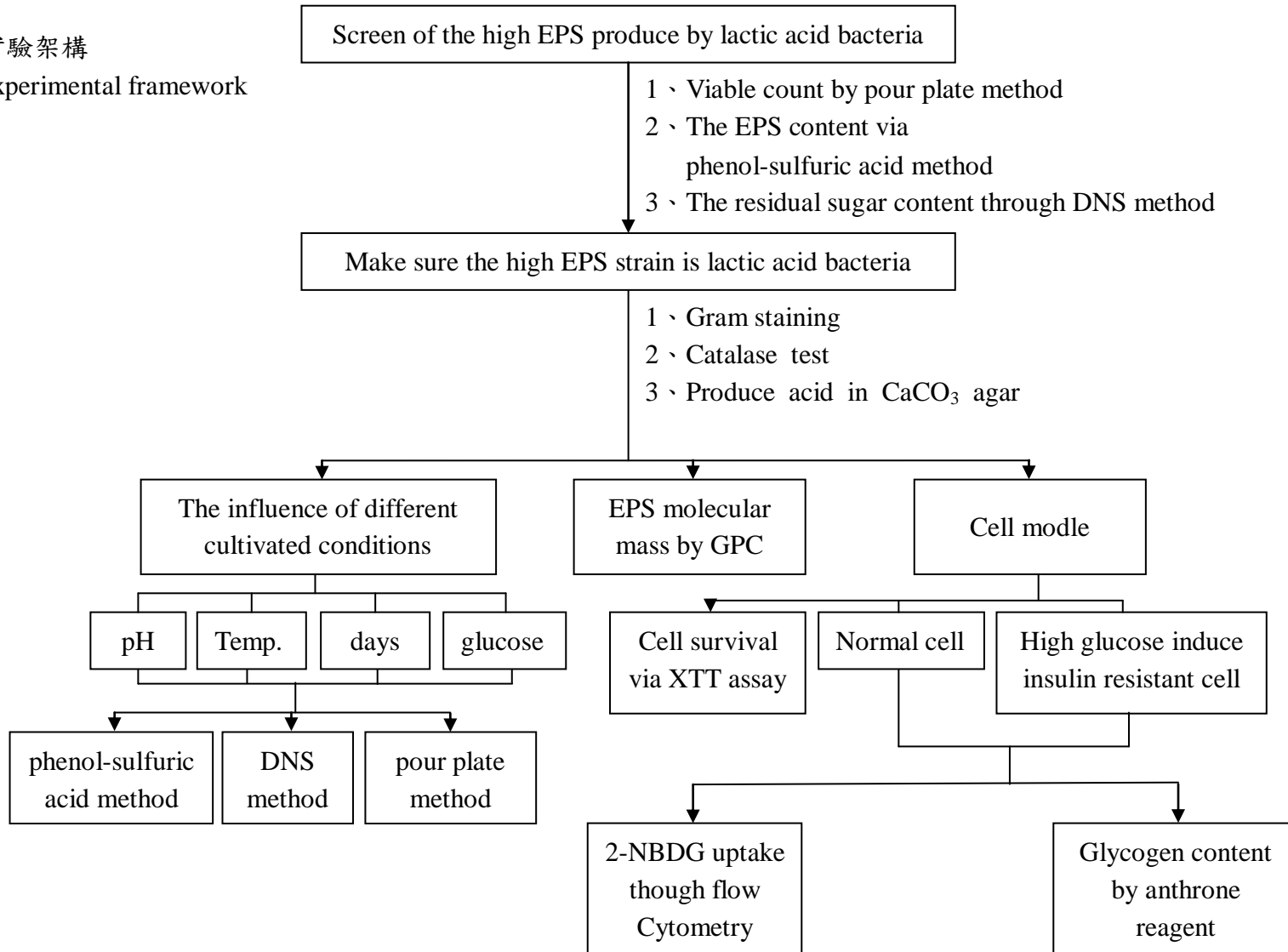
圖1-23、高血糖產生之ROS透過氧化壓力造成 β -cell功能異常

Fig 1-23. Biochemical pathways through which elevated levels of glucose can form excessive levels of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative stress and lead to β -cell dysfunction

(Poitout and Robertson, 2008)

圖 1-24、實驗架構

Fig 1-24. Experimental framework



參、材料與方法

一、藥品及培養基

(一) 乳酸菌相關藥品

1、試驗菌株

本研究菌株主要來源有二：一為購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)之 BCRC 菌株，共有 22 株；KT 為東海大學食品科學系李根永教授研究室由酸菜所篩選之菌株，並已鑑定出其為 *L. plantarum* (附錄一及二)。及弘光科技大學食品營養系蔡政志教授所提供之菌株 LDB4-2。

BCRC Number	Name	BCRC Number	Name
12248	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	14622	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>
12251	<i>Lactobacillus plantarum</i>	10069	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
14625	<i>Lactobacillus reuteri</i>	12574	<i>Lactobacillus salivarius</i>
10695	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	14759	<i>Lactobacillus salivarius</i>
12256	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	14741	<i>Lactobacillus intestinalis</i>
14691	<i>Lactobacillus fermentum</i>	12931	<i>Lactobacillus agilis</i>
12936	<i>Lactobacillus helveticus</i>	14735	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
10696	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10790	<i>Enterococcus durans</i>
12945	<i>Lactobacillus brevis</i>	14926	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
14011	<i>Lactobacillus kefir</i>	14677	<i>Bifidobacterium boum</i>
16000	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	14662	<i>Bifidobacterium dentium</i>

2、乳酸菌培養基

Lactobacilli MRS broth 購自 Criterion (CA, USA)。L-cysteine 購自 sigma (MO, USA) 及 agar 購自 Difco (MI, USA)。

3、培養乳酸菌之相關藥品

Sodium chloride 及 Glycerol 購自 Panreac (Barcelona, Spain)。Potassium chloride 及 Sodium bicarbonate 購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。Po-tassium dihy-drogenphosphate 購自石津製藥株式會社 (Osaka, Japan)。disodium hydrogenphosphate 購自 Merck (Darmstadt, Germany) 及 glucose 購自 Sigma (MO, USA)。

4、乳酸初步鑑定之藥品

H₂O₂ 購自九仁製藥 (Nantou, Taiwan)。Calcium carbonate (CaCO₃) 購自關東化學 (Japan)。革蘭氏染色組 (Rapid Gram Stain) 購自三市儀器 (Taichung, Taiwan) 及 API 購自 API Bio Merieux Research Laboratory (La Balme Les Grottes, Mo-ntalien, Jeraen, France)。

5、DNS 殘糖之藥品

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 購自 Sigma (MO, USA)。Sodium sulfate (Na₂SO₄) 購自和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。Phenol 購自 Amresco (OH, USA)。酒石酸鉀鈉及 NaOH 聯工 (Taipei, Taiwan)。

6、檢測胞外多醣含量及分子量之藥品

TCA 購自 J.B.BARKER (PA, USA)。95% 乙醇購自景明化工 (Miaoli, Taiwan)。phenol 購自 Amresco (OH, USA)。硫酸購自聯工 (Taipei, Taiwan)。GPC standards (Pullulan) 為 Shodex, Japan。

(二) 細胞相關藥品

1、小鼠細胞株

小鼠肝臟細胞株 FL83B cell (mouse hepatocyte line ; BCRC number 60325)，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)，其為貼附型細胞。

2、細胞培養基

取 11.1 g 之 F12K (Kaighn's modification of nutrient Ham's F12 medium) 粉末 (Sigma, USA)，以 900 mL 滅過菌之去離子水溶解後，添加碳酸氫鈉 1.8 g/L，測定 pH 值約 7.2，再以 0.22 μm 過濾膜 (Millipore, USA) 過濾，再加入 100 mL 胎牛血清 (Charcoal/Dextran treated fetal bovine serum ; FBS, Lot : 315734)，混合均勻後儲存於 4 °C 備用。

3、細胞培養其他藥品

Insulin 購自 Gibco (NY, USA)。Trypsin-EDTA 及 Trypan blue 均購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)。Potassium chloride 及 Sodium bicarbonate 為林 純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。Sodium chloride 購自 Panreac (Barcelona, Spain)。Potassium dihydrogen phosphate 購自石津製藥株式會社 (Osaka, Japan)。disodium hydrogenphosphate 購自 Merck (Darmstadt, Germany) 及 glucose 購自 Sigma (MO, USA)。Acetic acid 購自 TEDIA (OH, USA)。XTT reagent 購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)。

4、流式細胞儀分析藥品

(1) 葡萄糖擬似物

2-NBDG 為一種葡萄糖擬似物，購自 Invitrogen (OR, USA)。結構為 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose，其分子量為 342.26 (Yoshioka *et al.*, 1996)。可受波長 487 nm 激發，於 542 nm 放出螢光。在避光環境下以 PBS 配製，且濃度為 29.2 mM，儲存於 -20 °C 冰箱備用。

(2) Propidium iodide

PI (Propidium iodide) 為一種碘化物染劑，買自 Sigma (MO, USA)。其可插入細胞核 DNA 或 RNA 鹼基對中，於波長 488 nm 激發且在 562~588 nm 間釋放螢光，故可做為細胞凋亡或染色體受損之細胞的依據。

5、肝醣分析藥品

Potassium hydroxide 購自林 純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。Anthrone 購自 Sigma (MO, USA)。硫酸購自聯工 (Taipei, Taiwan)。

(三) 主要儀器及設備

1、CO₂ 恆溫培養箱(型號 HEPA CLASS100)(Thermo, USA)。菌用培養箱(FIRSTEK 型號 RI-150)(New Taipei, Taiwan)。加熱恆溫循環槽(型號 WB212-B1)(Kansin, USA)。加熱水浴槽(FIRSTEK 型號 B206)(New Taipei, Taiwan)。血球計數器(hemocytometer) (Superior, Bad Marienfeld, Germany)。無菌操作台(Bellco, USA)。

菌用無菌操作台(型號 VCM-420)造鑫(Taipei, Taiwan)。倒立螢光顯微鏡(型號 IX-71)(Olympus, Japan)。液態氮貯存桶(型號 LS-750)(Taylor-Wharton, Germany)。震盪機 Vortex (型號 Vortex-2 genie)(Scientific Industries, USA)。混勻機 super shaker-4X (GenePure)(Taichung, Taiwan)。流式細胞儀(型號 FACScan) (Becton Dickinson, USA)。乾浴槽 (型號 MC-01S)(Major Science, Taiwan)。酵素免疫分析儀 ELISA reader (型號 MRXII microplate reader, DYNEX USA)。桌上型離心機(型號 UFO-2100)(Pantech, Taiwan)。高速低溫離心機(型號 5810R)(Eppendorf, USA)。分光光度計 Thermo (USA)。pH meter (Mettler toledo 型號 MP 220) (Swiss)。低溫高速離心機：Himac CR 22G II (HITACHI, Japan)。送風烘箱(FIRSTEK 型號 OV-180) (New Taipei, Taiwan)。冷凍乾燥機(FREEZE DRYER FD-5N)(EYELA, Japan)。

2、膠體滲透層析法 (gel permeation chromatography, GPC)

Pump：Hitachi model L-6000 pump，Japan。

Column：PolySep-SEC-P 5000 300×7.80mm column，Phenomenex

Integrator：Hitachi model D-2500 chromatointegrator，Japan。

Detector：Bischoff model 8110 RI detector (Bischoff, Germany)。

二、藥品及培養基

(一) 乳酸菌相關實驗方法

1、培養基及緩衝液配置

(1) MRS broth

0.005 % cystine 與 55.5 g MRS broth 之粉末溶於 1 公升之去離子水，經 121 °C 滅菌 15 min。

(2) MRS agar

0.005 % cystine、55.5 g MRS broth 粉末與 15 g agar，於 1 公升之去離子水中，經滅菌釜 121 °C 滅菌 15 min。

(3) 含 1 % CaCO₃ MRS agar

10 g CaCO₃、0.005 % cystine、55.5 g MRS broth 粉末與 15 g agar，溶於 1 公升之去離子水，放置 121 °C 滅菌 15 min。

(4) PBS solution

5.36 mM KCl、0.44 mM KH₂PO₄、4.17 mM NaHCO₃、0.14 M NaCl 及 0.35 mM Na₂HPO₄，調至 pH 7.2 在 121 °C 滅菌 15 min。

(5) DNS solution

A 液：1 % 3,5-dinitrosalicylic acid、1 % NaOH 及 0.2 % phenol 加 d.dH₂O 定量至 100 mL。B 液為 10 % Na₂SO₄。C 液則是 40 % 酒石酸鉀鈉。

2、乳酸菌初步鑑定

(1) 產酸能力

乳酸菌因會產乳酸及醋酸，進而分解 CaCO₃ 故可用此原理初步判斷其是否為乳酸菌。將培養 24h 後之菌液劃線培養於含 1 % CaCO₃ 之 MRS plate 上，經 48 h 培養後，觀察其菌落周圍之變化，若菌落周圍成透明則為正反應 (+)，反之則為負反應 (-)。

(2) 觸酶試驗

當微生物行有氧呼吸時，會產生過氧化氫等有毒物質，微生物本身為延續生命，菌體內的酵素如觸酶會分解過氧化氫等酵素，但乳酸菌不含觸酶，所以不會分解過氧化氫。用滴管取一滴 3 % H₂O₂ 溶液於載玻片上，再用接種環取經隔夜培養的菌液至溶液中，觀察期是否會產氣泡，若產氣泡則為正反應 (+)，反之則為負反應 (-)。

(3) 革蘭氏染色

利用格蘭氏陰性菌及陽性菌其細胞組成不同的特性來染色。取隔夜培養之菌液塗抹於載玻片上，並以無菌水稀釋後過火熱固定，加入 crystal violet 染色五秒

後水洗並甩乾，隨後用 iodine solution 染色五秒後水洗並甩乾，加入 decolorizer 脫色十到二十秒後水洗並甩乾，再加 safranin 複染五秒後水洗並風乾，最後再鏡檢觀察其形態為桿菌或球菌。

(4) API 50 CHL

API 50 CHL strip 試劑條有 50 個孔洞，分別含有 49 種不同的碳水化合物，利用乳酸菌對不同碳水化合物有不同之發酵情形，而比對其結果得知乳酸菌之種別。從培養 18 h 的 Lactobacilli MRS broth 之乳酸菌菌液取 1 mL 於 eppendorf 管中，經 6000 rpm 離心 10 min，去除上清液後，加入 1 mL PBS 緩衝溶液振盪回溶，再離心倒掉上清液，重複清洗兩次後，以無菌吸管吸取乳酸菌懸浮液滴入含 5 mL PBS 緩衝溶液之試管中，調製成混濁度為 McFarland 2 之懸濁液，並記取所製備之滴數 (n)。在含有 10 mL API 50 CHL 培養液中滴入菌液量為 2 n 滴，調製成試驗用菌液。用無菌吸管注入約 90 μ L 之試驗用菌液至每個測試條之孔洞中，且須避免氣泡產生，並覆蓋一層礦物油，置於 37 $^{\circ}$ C 培養，於 24 及 48 h 紀錄結果，輸入電腦進行判讀。結果鑑定以 API LAB software 系統鑑定受試菌株之種別。

3、菌種保存及活化

將菌株培養於 MRS broth 中，於隔夜取其 0.75 mL 之菌液至 eppendorf 管中，並加入無菌之 80 % 甘油，混額均勻後放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存之。

菌種活化：將 1 % 融化之菌株保存液於 MRS broth 中，經 37 $^{\circ}$ C 培養 22 h 活化後，再取其 1 % 菌液於 MRS broth 活化第二次，以同條件培養 16~22 h 即可使用。

4、培養條件之影響

(1) 利用 HCl 或 NaOH 調整其 broth 之 pH 至 pH 4.5、5.5、6.5 及 7.5，取 1 % 之菌液於上述各條件之 broth (原含 2 % glucose)，於 37 $^{\circ}$ C 培養 48 h 後取出其菌液做後續分析。

(2) 額外添加無菌之 1 %、5 % 或 10 % 之 glucose 於 MRS broth (原含 2 % glucose,

pH 6.5) 中，取 1 % 之菌液於上述各條件之 broth，37 °C 經 48 h 後取出其菌液做後續分析。

(3) 取 1 % 之菌液於 broth (原含 2 % glucose, pH 6.5) 中，分別培養在 15、25、30、37 及 45 °C 中，經 48 h 後取出其菌液做後續分析。

(4) 取 1 % 之菌液於 broth (原含 2 % glucose, pH 6.5) 中，分別培養 1~7 天後取出其菌液做後續分析。

5、乳酸菌計數

取乳酸菌培養液 1 mL 序列稀釋於 9 mL 之 PBS 中震盪混勻，取其 100 μ L 於 dish 中，再倒入溶融狀態之 MRS agar 混合均勻，於 37 °C 培養 48 h 觀察其菌數。

6、pH 值測定

將 pH meter 電極校正後即可檢測待測物之 pH 值。

7、DNS (3,5- dinitro-salicylic acid) 殘糖分析

葡萄糖具還原力，可使鹼性溶液中黃色之雙硝基水楊酸 (DNS ; 3,5-dinitro-salicylic acid) 還原成深色之 3-氨基,5-硝基水楊酸 (圖 2-1) ，其產物安定，且在 575 nm 有最大吸光值 (Miller *et al.*, 1959)。

培養 48 h 之菌液離心 10000 rpm 15min，適當稀釋上清液。取 1 mL 之稀釋液加入 1 % B 液及 99 % A 液震盪混合，經 100 °C 水浴 15 min，再加入 0.5 ml C 液震盪混勻，置於 25 °C 水浴中 10 min，於 575 nm 之波長偵測其吸光值。本身 broth 中已含 2 % glucose。殘糖檢量線：配製不同濃度的葡萄糖溶液以 D- (+)-Glucose (Sigma, USA) 為標準品。濃度分別為：0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 及 1.0 g/L。藉此標準曲線求得樣品中殘糖量。標準曲線如附錄四。

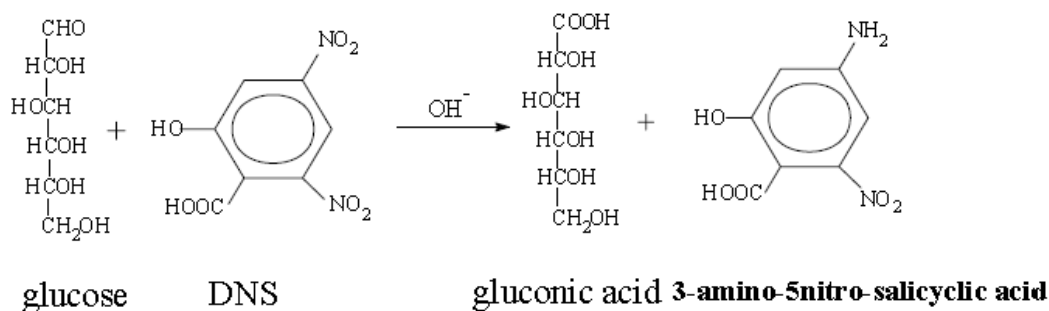


圖 2-1、DNS 反應式

Fig 2-1. The reaction of DNS reagent

8、胞外多醣萃取

培養 48 h 的菌液，加入 4 % TCA 攪拌 2 h 去除蛋白質後，於 15 °C 10000 rpm 離心 15 min。取上清液加入 2 倍體積之 95 % 乙醇，放置 4 °C 且 overnight，因乙醇會與多醣搶水，使多醣沉澱，再於 15 °C 11000 rpm 離心 20 min。將沉澱物回溶於 d.d. H₂O 並加入 2 倍體積 95 % 乙醇放置 4 °C overnight 後，15 °C 下離心 11000 rpm 20 min。將沉澱物 50 °C 烘乾，若為大量萃取則使用冷凍乾燥機凍乾之。

9、胞外多醣含量分析-酚硫酸法

多醣在硫酸的作用下先水解成單糖，並迅速脫水生成糖醛衍生物，再與酚生成橙黃色化合物 (Keleti and Lederer, 1974)。

將乾燥的多醣加入 1mL d.d.H₂O 於 60 °C 水浴 1 h 回溶之。加入 5 mL 濃硫酸及 1 mL 5 % 酚 (phenol) 溶液靜置 20 min 後，再 25 °C 水浴 10 min。於 490 nm 之波長偵測其吸光值。配製不同濃度的 D- (+) -Glucose (Sigma, USA) 溶液做為標準曲線，分別為：0.04、0.08、0.12、0.16 及 0.20 g/L。藉此標準曲線求得樣品中胞外多糖量，標準曲線如附錄五。

10、胞外多醣分子量之測定

胞外多醣分子量以膠體滲透層析法 (gel permeation chromatography, GPC)，又稱為分子排斥層析法 (size exclusion chromatography) 或膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 分析之。分離不同分子量之原理為，移動相中小分子物質則較易進入孔徑間隙，故滯留時間長；大分子物質較難進入固定相孔徑內而隨

間隙流出，故滯留時間短；固定相則為孔徑大小相同的物質所組成（呂等, 2001）。

取胞外多醣粉末溶於水中，經適當稀釋後，以 0.45 μm 濾膜過濾，取 20 μL 濾液進行分析，依其遲滯時間 (retention time) 與標準品對照推算其分子量。分析條件如下：

標準品：pullulan (分子量 3.77、4、4.33、4.68、5.05、5.32、5.56 及 5.90 kDaltons or Da, retention time 分別為 11.22、10.92、10.33、9.68、8.97、8.46、7.87 及 7.34) 。標準曲線如附錄三。

移動相：去離子水

流速：0.8 mL / min

分析管柱：PolySep-SEC-P 5000 300 \times 7.80 mm column

管柱溫度：40 $^{\circ}\text{C}$

幫浦：Hitachi model L-6000 pump

偵測器：Bischoff model 8110 RI detector

積分儀：Hitachi model D-2500 chromatointegrator

(二) 細胞培養相關實驗方法

1、細胞培養與繼代

先將培養基於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽回溫，再將其移入無菌操作台內備用。從液態氮桶中取出 FL83B 肝臟細胞之冷凍小管，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中快速解凍，以 75 % ethanol 擦拭試管外部再移入無菌操作台內。已解凍之 FL83B 細胞懸浮液加入 10 cm dish，逐漸滴入 10 mL 培養基，混合均勻，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5 % CO_2 之培養箱中，培養 1~2 天後待細胞生長至約 7-8 分滿時，再進行繼代培養。

細胞於培養皿中生長至八分滿左右時，去除培養液，以 3~5 mL PBS 清洗後，添加 2 mL 之 1 \times Trypsin- EDTA 於培養箱約 5 min，待細胞浮起後，加入 2~3 倍體積的培養基終止 Trypsin-EDTA 之作用，再將該細胞懸浮液平均分配至新的培養皿中，置於培養箱中培養。

2、誘導 FL83B 細胞產生胰島素抗性

將 FL83B 細胞培養至八分滿，更換不含血清之培養基培養 24 h，再額外添加不同濃度 (10~60 mM) Glucose 之培養基於理細胞，培養 24 h 後移去培養基，最後加入含有胰島素及 2-NBDG 之培養基作用 1 h，以流式細胞儀檢測擬葡萄糖之帶入量。

3、細胞活性試驗

利用活細胞粒線體中琥珀酸去氫酶 (Succinate-tetrazolium reductase) 將 XTT 的 tetrazolium 環打斷，形成橘紅色之 formazan 化合物 (圖 2-2)。形成顏色的深淺與存活的細胞數目成正比，於波長 450~500 nm 下測其吸光值，可推算細胞存活率 (percent of viable cells)。

將細胞培養於 96 孔盤中種適量細胞 (10^4 cells/well) 進行培養，添加不同濃度之胞外多醣 24 h 後，移去培養基並以 PBS 潤洗一次，加入 XTT 試劑 50 μ L (XTT reagent : activation reagent = 50 : 1) 混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 反應 2 h，於波長 595 nm 扣除背景值，於 450 nm 下測其吸光值。活細胞中 dehydrogenases 會將 XTT 試劑轉成 formazan，所以活細胞越多酵素活性相對較高吸光值也成正比越高。

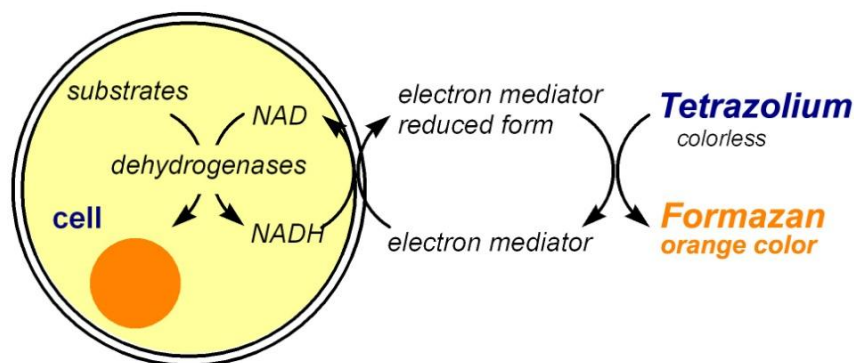


圖 2-2、 XTT 試劑反應式

Fig 2-2. The reaction of XTT reagent

4、FL83B 細胞葡萄糖擬似物帶入量分析

於 12 孔盤中種適量細胞 (10^4 cells/well) 進行培養，經不同處理 (高糖、胞外多醣) 後，加入含有 5 μ g/mL 胰島素及 2-NBDG 之培養基作用 1 h，去除其培養基，以 1 \times PBS 潤洗兩次，再以 Trypsin 收集細胞於管中，加入 PI 後，以流式細胞儀檢測擬葡萄糖之帶入量。

5、FL83B 細胞內肝醣之測定

主要使用蒽酮-硫酸法分析肝醣含量。當肝醣遇濃硫酸脫水生成的糠醛或其衍生物，可與蒽酮試劑發生縮合反應而生成藍綠色化合物，於波長 625 nm 中具最大吸收，吸收值與糖含量呈線性關係。其測定較為靈敏及微量，可測定至 0.05 μg 之肝醣含量 (Lawrence *et al.*, 1961)。

肝醣測定主要依據本實驗室中先前之論文 (吳, 2011)，其參考並修改 Lawrence 等學者 (1961) 及顏 (2003) 之方法。將活細胞總數調整為 10^5 cell/mL 鋪於 6 cm dish，加入不同濃度胞外多醣於正常及阻抗細胞 24 h 後，以 trypsin 使細胞懸浮並收於離心管，而後加入 500 μL 30 % KOH 混合均勻，於 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min，再加入 3 倍體積之乙醇，放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱隔夜，再以 4000 $\times\text{g}$ / 離心 15 min，除去上清液，將沉澱物回溶於 500 μL 二次水中，加入現配之 1 mL 0.2 % anthrone reagent，置於 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min，最後以分光光度計測量 620 nm 吸光值。

(三) 統計分析

實驗所得結果以平均值 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) 表示，使用 Student's t-test 來評估數據間的差異性。p < 0.01 時表示極顯著差異、p < 0.05 時表示達顯著差異，p > 0.05 則表示為沒有顯著差異。亦有利用 SAS 9.1 套裝軟體進行全隨機設計 (completely randomized design)、變異分析 (ANOVA) 及 Duncan's new multiple range test 分析，當機率值小於 0.05 (p < 0.05) 表示各組於統計上有顯著差異。並使用 SigmaPlot 10.0 (Systat software, USA) 軟體進行作圖。

肆、結果與討論

一、高產量 EPS 之乳酸菌篩選

(一) 篩選高產量 EPS 之乳酸菌菌株

從 22 株 BCRC 乳酸菌菌株及其他實驗室所提供之菌株 LDB 4-2 及 KT，篩選此 24 株中高產量 EPS 之菌株。將菌株四區劃線培養，確認其為單一菌落後，於 MRS broth 中 37 °C 發酵 48 h 進行分析試驗。其中 BCRC 12256-2 及 BCRC 14691-2 為非白色之圓形菌落，且經過觸酶試驗、產酸能力及革蘭氏染色及鏡檢，與乳酸菌之菌落型態及基本特性不符，故未繼續探討之。文獻指出乳酸菌 EPS 產量大部分範圍於 0.2~0.4 g/L，故藉由酚硫酸法且以 0.4 g/L 為基準，可得知 BCRC 14741 (1.08 g/L)、14622 (0.696 g/L)、14662 (0.995 g/L)、12945 (0.439 g/L)、14759 (0.581 g/L)、BCRC14691 (0.458 g/L)、BCRC12574 (0.630 g/L)、BCRC16000 (0.670 g/L)、LDB4-2 (0.602 g/L) 及 KT (0.416 g/L) 皆具有高 EPS 產量 (圖 4-1)。若與 DNS 試驗中控制組(未接菌之培養液)相比，BCRC 14741、14622、14662 及 12945 菌株雖具有高 EPS 產量，但均因 DNS 殘糖量也偏高(圖 4-2)，其表示可能酚硫酸法於檢測時，同時偵測到殘留的單糖，進而干擾酚硫酸法檢測結果，因此未獲選用。而 LDB4-2、KT、BCRC 14759、14691、12574 及 16000 等六株菌 EPS 產量稍高、DNS 殘糖含量較低，且經乳酸菌基本特性鑑定後確定其為乳酸菌，因此採用於後續研究。

(二) 初步鑑定高產量 EPS 之乳酸菌菌株

LDB 4-2、KT、BCRC 14759、14691、1257 及 16000，皆經產酸能力試驗、觸酶試驗及革蘭氏鏡檢，結果產酸能力均為正反應，觸酶試驗均為負反應，均屬革蘭氏陽性菌並為桿菌，故初步認定這些均為乳酸菌，將應用於後續實驗。因胞外多醣之產量會因菌種及培養條件不同而有所差異，故利用此六株菌株探討其最適生成胞外多醣之產量。而於細胞模式中，則採用同一培養條件(37 °C, 48h) 生成之胞外多醣做為試驗之樣品，探討其可否增進葡萄糖帶入量及肝醣合成量。

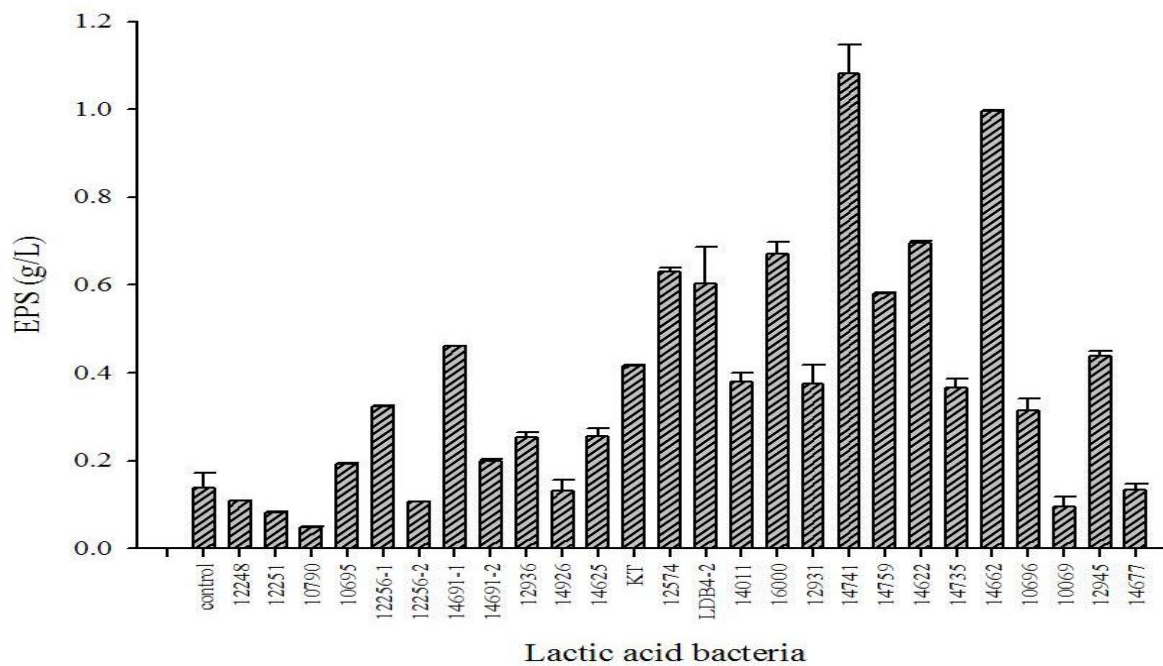


圖 4-1 乳酸菌胞外多醣之產量

Fig 4-1 The EPS production of lactic acid bacteria

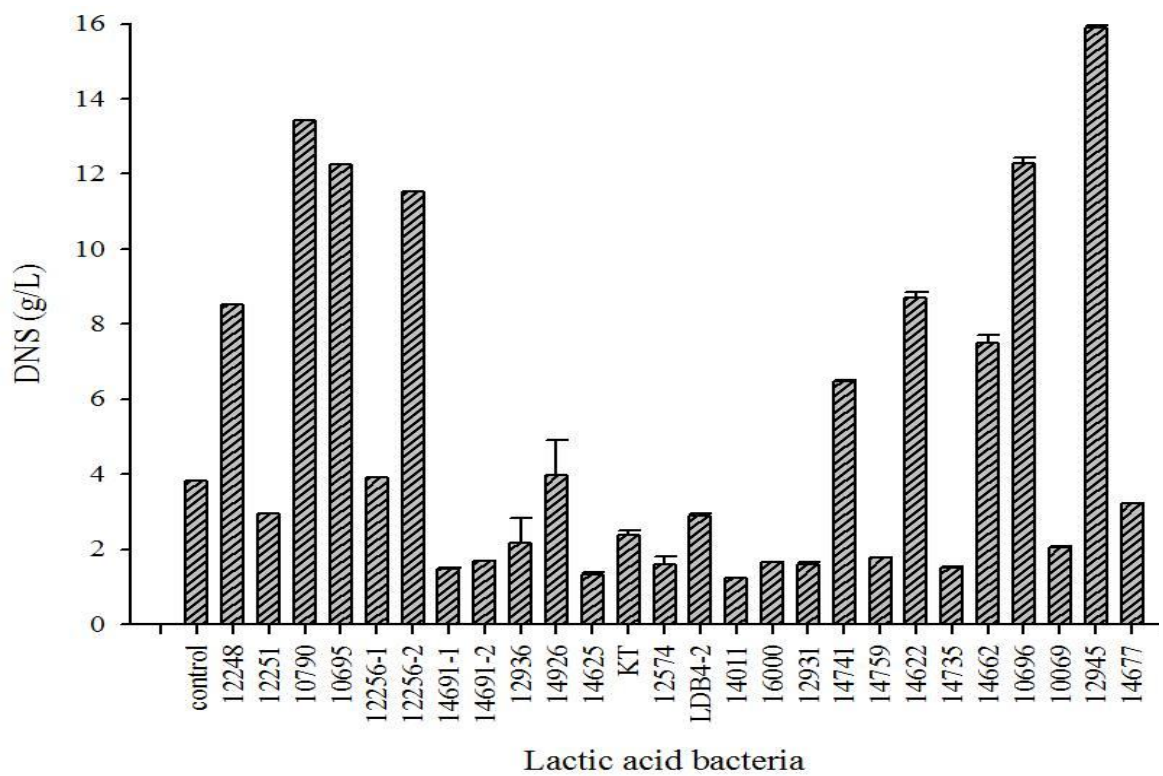


圖 4-2 乳酸菌菌液之殘糖量

Fig 4-2 The residual sugar of lactic acid bacteria in MRS broth

二、探討不同菌株及生長條件對胞外多醣產量之影響

(一) 初始 pH 值之影響

許多研究指出pH值於中性偏酸時，有較多之胞外多醣合成量。故本研究採pH 4.5、5.5、6.5及7.5，於37°C發酵48 h探討EPS的產量，結果如下。pH值對於BCRC 12574於pH 4.5時較不利於EPS之生成，但在pH 7.5時有最佳產量(875.63mg/L)，且此時菌數(7.28 log CFU/ mL)及殘糖量(3.34 g/L) 較其他pH值組別低，而菌液pH值(pH=3.86) 較其他組別高(表4-1)。此結果可能是因為此菌不適合於pH 7.5下生長，故乳酸產量低使得菌液pH值偏高，再者EPS為菌體於惡劣環境下生成以保護菌體本身(Sutherland, 1998)，故pH為7.5時EPS量增高，且殘糖量低。BCRC 14691於pH 6.5時有最佳菌數(8.16 log CFU/ mL)，但在EPS產量上，則為pH 5.5 (522.15 mg/L)較優於其他組之產量，且殘糖量也較低(表4-2)。由此可得知菌數與EPS產量並無直接相關性。BCRC 14759於pH 5.5時，EPS產量優於其他各組(631.62mg/L)，但對於葡萄糖利用率則是為pH 4.5較佳，並且於pH 4.5時菌數較高，故推測菌體大量利用葡萄糖當作能量增殖，使殘糖量低於其他組別(表4-3)。BCRC 16000之EPS生成量於pH 7.5 (478.53 mg/L)較優於其他組別，且殘糖量低於其他組，同時菌數較其他組別低，但高於初始菌數(表4-4)。Toda等學者(2000) 指出，在pH5~8之培養基中培養*Aureobasidium pullulans*，發現其於第10天且pH為7時有較高產量，並培養液之黏度有non-Newton-fluid現象。培養KT於pH 4.5 (883.48 mg/L) 及5.5 (900.85 mg/L)時，其EPS產量較優於pH 6.5及7.5，殘糖量則為pH 4.5 (2.64 g/L) 低於其他組別，且同時菌數於此pH值下有較高值 (8.26 log CFU/mL)，推測菌體大量利用糖類繁殖，並推估此菌株本身之遺傳特性具有高EPS之基因，故EPS優於他菌株(表4-5)。LDB 4-2於pH 5.5 (932.35 mg/L)及7.5 (920.22 mg/L) 時有較佳EPS生成量，且pH 5.5之DNS還原糖量為較低 (2.25 g/L)，且此時菌數為最高值(9.21 log CFU/ mL)，推斷糖類被菌體大量利用且增殖，又因此菌株本身之遺傳特性可能具有高EPS產量之基因，故EPS優於他菌株(表4-6)。綜合上述六株菌於不同pH值影響下，BCRC 12574及16000於pH 7.5下有最佳EPS產量。BCRC 14691、14759、KT及LDB 4-2於pH 5.5下有最佳EPS生成量。其中LDB 4-2之EPS產量高於其他五株菌株，且其菌數亦高於其他者(表4-7)。研究指出*L. helveticus* ATCC 15807 培養36 h於pH 4.5、5.0及6.2 的脫脂奶培養基

中，結果指出pH 4.5有最高EPS產量(0.549 g/L)(Torino *et al.*, 2001)。而楊(2004)使用相同菌株於25 °C、pH 6培養48~108 h，有最佳EPS產量(1.79~2.81 g/L)。研究指出pH 6.2時，可能延長菌株生長之對數期及平穩期進而增加EPS產量(Gassem *et al.*, 1997)。Mozzi等學者(1996) *L. casei* 於不同pH值培養下，pH 6的菌數及EPS生成量優於pH 5及4，同時亦發現乳酸菌具合成EPS之能力外，亦含EPS水解酵素，故當培養時間增長時無法提升EPS產量。綜合上述，於培養期間調控培養基之pH值可提升EPS產量，且效果優於額外補充營養物質(Sebastiani and elger, 1998)。Gassem等學者(1997)之研究，糖類最適轉變為胞外多醣之pH 值為5.8，但轉變為生物質量的最適pH值則為6.2 (van den Berg *et al.*, 1995)。但總括而言，維持中性偏酸的pH值因為延長了菌株生長對數的時間，且其也可能造成較長的生長平穩期，而降低的肽聚糖(peptidoglycan) 及胞壁酸(teichoic acids) 之合成，進而使胞外多醣產量增加(de Vuyst *et al.*, 1998)。

(二) 培養溫度之影響

多篇文獻指出培養溫度對於EPS生成量之影響其結果並無一致性。故本篇研究利用溫度15、25、30、37及45 °C下，培養菌株48 h觀察其溫度對EPS產量的影響，其結果如下。BCRC 12574 (表4-8) 培養於不同溫度時，EPS產量於統計上並無顯著差異($p>0.05$)，且菌數於兩種極端溫度下(15及45 °C) 有最低值(4.84及4.98 log CFU/ mL)，其中以15 °C時殘糖量為最高，推測此株菌最適生長溫度非為15及45 °C，而在25及30 °C時為此株菌最適生長溫度(9.39及9.04 log CFU/ mL)。BCRC 14691 (表4-9) 在25 °C時有最佳菌數(9.25log CFU/ mL) 及EPS產量(697.77 mg/L)，而於45 °C有最低菌數量，故較不耐高溫生長，同時EPS產量為第二高(615.15 mg/L)，推測EPS為菌體於惡劣環境下生成以保護菌體本身(Sutherland, 1998)。BCRC 14759 於45 °CEPS產量為最佳，推測此溫度菌體生長較為緩慢，故可合成較多之EPS，而於15 °C之殘糖量(7.87g/L) 較高於其他溫度(表4-10)。BCRC 16000(表4-11) 於15 °C下有較低EPS (215.26 mg/L)生成且殘糖量也較低(3.09 g/L)，推測此使菌體利用glucose維持生長(9.1 log CFU/mL)；而在45 °C下有最低菌數(6.76 log CFU/mL)及最佳EPS產量(482.11 mg/ mL)。文獻指出 *S. thermophilu* LY03在42 °C培養時，較於30、37及50 °C培養生成較多的胞外多醣 (de Vuyst *et al.*, 1998)。Kimmel等學者(1998)指出 *L. bulgaricus* RR胞外多醣產量在40 °C下優於30 °C，且其EPS生成速率比在30 °C快。而在高溫時 (高於45 °C)

表 4-1 不同 pH 對 BCRC 12574 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-1 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 12574 after 48hr of incubation

pH	Viable count		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	(log CFU/mL)		Initial	Final		
	Initial	Final				
4.5	6.26±0.14 ^b	7.91±0.21 ^{ab}	4.52±0.02	3.37±0.00	3.40±0.01 ^B	189.46±16.24 ^z
5.5	6.26±0.14 ^b	7.81±0.10 ^{ab}	5.55±0.02	3.56±0.02	3.12±0.13 ^C	355.15±4.05 ^y
6.5	6.26±0.14 ^b	8.01±0.16 ^a	6.61±0.01	3.75±0.03	4.80±0.28 ^A	444.77±11.00 ^x
7.5	6.26±0.14 ^b	7.28±0.71 ^b	7.53±0.02	3.86±0.01	3.34±0.02 ^{BC}	875.63±19.01 ^w

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-2 不同 pH 對 BCRC 14691 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-2 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14691 after 48hr of incubation

pH	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	4.5	6.95±0.10 ^a	6.76±0.16 ^d	4.52±0.02	3.62±0.01	2.47±0.00 ^A
5.5	6.95±0.10 ^a	7.21±0.12 ^c	5.55±0.02	4.07±0.03	1.52±0.00 ^D	522.15±21.30 ^x
6.5	7.18±0.03 ^a	8.16±0.15 ^a	6.61±0.01	4.28±0.04	2.43±0.01 ^B	463.36±8.31 ^y
7.5	6.95±0.10 ^a	7.53±0.12 ^b	7.53±0.02	4.41±0.06	2.31±0.01 ^C	509.99±5.80 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-3 不同 pH 對 BCRC 14759 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-3 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14759 after 48hr of incubation

pH	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	4.5	6.51±0.13 ^a	7.50±0.19 ^a	4.52±0.02	3.39±0.04	2.67±0.08 ^D
5.5	6.51±0.13 ^a	6.58±0.11 ^b	5.55±0.02	3.55±0.01	3.23±0.02 ^C	631.62±13.70 ^x
6.5	6.51±0.13 ^a	6.47±0.16 ^b	6.61±0.01	3.76±0.02	4.50±0.13 ^A	463.02±8.96 ^y
7.5	6.51±0.13 ^a	6.57±0.07 ^b	7.53±0.02	3.84±0.03	4.06±0.02 ^B	452.06±3.16 ^y

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-4 不同 pH 對 BCRC 16000 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-4 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 16000 after 48hr of incubation

pH	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	4.5	7.49±0.18 ^c	8.44±0.03 ^d	4.52±0.02	3.49±0.01	3.42±0.00 ^A
5.5	7.49±0.18 ^c	8.37±0.11 ^d	5.55±0.02	3.69±0.02	3.41±0.07 ^A	460.86±1.80 ^y
6.5	8.22±0.07 ^a	8.94±0.04 ^b	6.61±0.01	3.80±0.03	3.11±0.01 ^B	462.61±3.67 ^y
7.5	7.49±0.18 ^c	8.10±0.15 ^e	7.53±0.02	3.86±0.01	2.39±0.00 ^C	478.53±6.31 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-5 不同 pH 對 KT 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-5 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with KT after 48hr of incubation

pH	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	4.5	7.09±0.17 ^a	8.26±0.04 ^a	4.52±0.02	3.35±0.01	2.64±0.00 ^D
5.5	7.09±0.17 ^a	7.97±0.08 ^b	5.55±0.02	3.56±0.01	2.74±0.03 ^C	900.85±4.77 ^w
6.5	7.09±0.17 ^a	7.85±0.01 ^{bc}	6.61±0.01	3.77±0.01	2.84±0.07 ^B	667.16±20.83 ^y
7.5	7.09±0.17 ^a	7.71±0.23 ^c	7.53±0.02	3.89±0.01	4.72±0.09 ^A	456.11±1.87 ^z

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-6 不同 pH 對 LDB 4-2 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-6 Effects of various pH value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with LDB 4-2 after 48hr of incubation

pH	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
4.5	7.27±0.14 ^d	8.87±0.05 ^c	4.52±0.02	3.61±0.01	2.63±0.01 ^{BC}	886.73±12.10 ^y
5.5	7.27±0.14 ^d	9.21±0.07 ^a	5.55±0.02	3.68±0.00	2.25±0.01 ^C	932.35±10.79 ^x
6.5	7.27±0.14 ^d	9.17±0.06 ^{ab}	6.61±0.01	3.86±0.01	3.31±0.01 ^{AB}	776.55±32.22 ^z
7.5	7.27±0.14 ^d	9.08±0.01 ^b	7.53±0.02	3.95±0.02	3.86±0.06 ^A	920.22±18.34 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-7 總結:不同菌株於最佳 pH 值之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-7 Summary: effects of best pH value of various strains on growth, residual sugar and EPS yield

strain	Best pH	EPS (mg/L)	DNS (g/L)	Log CFU/mL
BCRC 12574	7.5	875.63±19.01	3.34±0.02	7.28±0.71
BCRC 14691	5.5	522.15±21.30	1.52±0.0	7.21±0.12
BCRC 14759	5.5	631.62±13.70	3.23±0.02	6.58±0.11
BCRC 16000	7.5	478.53±6.31	2.39±0.0	8.10±0.15
KT	5.5	900.85±4.77	2.74±0.03	7.97±0.08
LDB 4-2	5.5	932.35±10.79	2.25±0.01	9.21±0.07

乳酸菌會因突變而失去製造 slime 及胞外多醣能力(Gancel and Novel, 1994; Mozzi *et al.*, 1995)。KT 於 15 (867.10mg/L)、25 (944.22 mg/L)及 30 °C(865.10 mg/L)皆有最佳產量，且於 25 °C 時有最佳菌數，15 °C 有最少殘糖量 (2.83 g/L)，推測此菌株較適合低溫下生長，且同時菌株本生生成 EPS 能力較優於其他菌株 (表 4-12)。文獻指出乳酸菌在較低最適溫度之下有較高的胞外多醣產量(Cerning *et al.*, 1992; Gassem *et al.*, 1997; Kontusaari and Forsen, 1988)。Kandler and Weiss (1986)指出將 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 培養於低於 37 °C，發現有較高胞外多醣之生成量。當 *S. thermophilus* 於 30 °C 培養時其產量比 37、42、45 °C 高 (Gancel and Novel, 1994)。若在其對數生長期將培養溫度由 37 °C 降為 25 °C 時，胞外多醣產量有顯著的上升 (Gamar-Nourani *et al.*, 1997; Gamar-Nourani *et al.*, 1998)。於不同培養溫度下，含葡萄糖之 CDM (chemically defined medium) 接種 *L. plantarum*，25、30 及 37 °C 胞外多醣產量較低於 18 °C (Tallon *et al.*, 2003)。LDB 4-2 於 15 °C (9.25 log CFU/mL) 之菌數較 45 °C (5.48 log CFU/mL) 高，故表示此菌可耐低溫生長 (表 4-13)。但於 EPS 產量分析中，45 °C (917.72 mg/L) 高於 15 °C (486.86 mg/L)，可解釋為 LDB 4-2 於低溫時利用 glucose 繁殖，而在高溫時因為菌株生長環境較惡劣，故生成 EPS 保護菌體之生長。綜合上述六株菌株於不同溫度影響下 (表 4-14)，BCRC 12574 (467.06 mg/L)、14759 (769.26 mg/L)、16000 (482.11 mg/L)及 LDB 4-2 (917.72 mg/L)於 45 °C 下皆有最佳 EPS 生成量；而 BCRC 14691 (697.77 mg/L) 及 KT (944.22 mg/L)則於 25 °C 下有最高之 EPS 產量。學者 ven den Berg 等 (1995) 認為因乳酸菌於次適生長溫度 (suboptimal temperature) 時生長速率較緩慢，而有較多之 isoprenoid lipid carrier 供胞外多醣之合成；但若於生長適溫時，菌體之代謝速率高，大部分合成物質及產生能量均用於菌體之生長繁殖上，故胞外多醣合成較少。

(三) 額外添加葡萄糖之影響

多種文獻指出額外添加糖類可促進EPS生成。由其以高濃度 (9%) 的葡萄糖對胞外多醣生成有較好之利用性 (Emilie *et al.*, 2005)。故本研究額外添加1、5及10%glucose於原本已含有2% glucose 的MRS broth中，其結果如下。表4-15為BCRC 12574對於不同葡萄糖濃度影響EPS生成量。添加1、5% glucose時菌數有

表 4-8 不同溫度對 BCRC 12574 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-8 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 12574 after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
15	6.70±0.34 ^b	4.84±0.12 ^c	6.61±0.01	3.94±0.00	6.18±0.15 ^B	402.69±34.00 ^x
25	6.70±0.34 ^b	9.39±0.17 ^a	6.61±0.01	3.97±0.00	3.17±0.04 ^D	454.56±11.63 ^x
30	6.70±0.34 ^b	9.04±0.25 ^a	6.61±0.01	3.84±0.03	4.73±0.07 ^C	442.94±4.12 ^x
37	6.26±0.14 ^b	8.01±0.16 ^b	6.61±0.01	3.75±0.03	1.92±0.37 ^A	392.32±20.27 ^x
45	6.70±0.34 ^b	4.98±0.31 ^c	6.61±0.01	4.27±0.02	3.28±0.00 ^D	467.06±3.82 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-9 不同溫度對 BCRC 14691 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-9 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14691 after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	15	7.18±0.03 ^{bc}	7.88±0.32 ^c	6.61±0.01	3.96±0.00	7.19±0.06 ^A
25	7.18±0.03 ^c	9.25±0.06 ^a	6.61±0.01	4.09±0.00	2.89±0.02 ^D	697.77±15.83 ^v
30	7.18±0.03 ^c	8.59±0.19 ^b	6.61±0.01	3.82±0.01	5.01±0.04 ^B	412.57±27.10 ^y
37	7.18±0.03 ^c	8.16±0.15 ^{bc}	6.61±0.01	4.28±0.04	2.43±0.01 ^E	463.36±8.31 ^x
45	7.18±0.03 ^c	3.17±0.61 ^d	6.61±0.01	4.03±0.01	3.47±0.05 ^C	615.15±25.17 ^w

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E ; v, w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-10 不同溫度對 BCRC 14759 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-10 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14759 after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	15	6.51±0.13 ^c	5.55±0.16 ^e	6.61±0.01	3.92±0.00	7.87±0.16 ^A
25	6.51±0.13 ^c	9.39±0.16 ^a	6.61±0.01	3.97±0.02	3.67±0.06 ^C	428.02±1.44 ^z
30	6.51±0.13 ^c	8.42±0.04 ^b	6.61±0.01	3.88±0.01	3.61±0.09 ^C	450.31±3.42 ^{yz}
37	6.51±0.13 ^c	6.47±0.16 ^d	6.61±0.01	3.76±0.02	4.50±0.13 ^B	463.02±8.96 ^y
45	6.51±0.13 ^c	2.70±0.00 ^f	6.61±0.01	3.97±0.00	2.91±0.05 ^D	769.26±3.28 ^w

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ;w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-11 不同溫度對 BCRC 16000 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-11 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 16000 after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
15	8.22±0.07 ^a	9.1±0.16 ^b	6.61±0.01	3.93±0.01	3.09±0.08 ^D	215.26±8.13 ^z
25	8.22±0.07 ^a	9.18±0.08 ^b	6.61±0.01	3.80±0.01	5.25±0.04 ^C	361.99±2.21 ^y
30	8.22±0.07 ^a	9.02±0.21 ^b	6.61±0.01	3.81±0.01	6.37±0.10 ^A	433.91±8.67 ^x
37	8.22±0.07 ^a	8.94±0.04 ^b	6.61±0.01	3.80±0.03	3.11±0.01 ^D	462.61±3.67 ^w
45	8.22±0.07 ^a	6.76±0.25 ^c	6.61±0.01	4.02±0.01	5.61±0.03 ^B	482.11±3.76 ^v

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; v, w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-12 不同溫度對 KT 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-12 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with KT after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
15	7.33±0.11 ^c	9.37±0.16 ^b	6.61±0.01	3.96±0.01	2.83±0.08 ^D	867.10±18.68 ^x
25	7.33±0.11 ^c	9.62±0.08 ^a	6.61±0.01	3.83±0.01	5.46±0.03 ^A	944.22±8.25 ^w
30	7.33±0.11 ^c	8.52±0.06 ^c	6.61±0.01	3.87±0.02	4.16±0.04 ^B	865.10±27.07 ^x
37	7.33±0.11 ^c	8.50±0.17 ^c	6.61±0.01	3.81±0.01	4.16±0.04 ^B	655.56±5.91 ^z
45	7.33±0.11 ^c	7.31±0.07 ^d	6.61±0.01	3.99±0.00	3.46±0.04 ^C	680.89±8.023 ^y

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-13 不同溫度對 LDB 4-2 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-13 Effects of various temperature value on growth, pH, residual sugar and EPS yield with LDB 4-2 after 48hr of incubation

Temp. (°C)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
15	7.27±0.14 ^a	9.25±0.14 ^a	6.61±0.01	3.99±0.00	4.27±0.12 ^A	486.86±1.93 ^z
25	7.27±0.14 ^a	9.28±0.02 ^{ab}	6.61±0.01	4.16±0.00	2.73±0.09 ^C	899.60±13.44 ^w
30	7.27±0.14 ^a	9.49±0.11 ^a	6.61±0.01	3.84±0.01	2.60±0.01 ^D	807.17±0.51 ^x
37	7.27±0.14 ^a	9.17±0.06 ^a	6.61±0.01	3.86±0.01	3.31±0.01 ^B	776.55±32.22 ^y
45	7.27±0.14 ^a	5.48±0.23 ^b	6.61±0.01	3.99±0.01	2.74±0.02 ^C	917.72±13.76 ^w

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-14 總結:不同菌株於最佳溫度之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-14 Summary: effects of best tempatrue of various strains on growth, residual sugar and EPS yield

strain	Best temp.	EPS (mg/L)	DNS (g/L)	Log CFU/mL
BCRC 12574	45	467.06±3.82	3.28±0.00	4.98±0.31
BCRC 14691	25	697.77±15.83	2.89±0.02	9.25±0.06
BCRC 14759	45	769.26±3.28	2.91±0.05	2.70±0.00
BCRC 16000	45	482.11±3.76	5.61±0.03	6.76±0.25
KT	25	944.22±8.25	5.46±0.03	9.62±0.08
LDB 4-2	45	917.72±13.76	2.74±0.02	5.48±0.23

增加之趨勢，而在 10% glucose 下菌數低於其他組，故此株菌株對於高濃度 glucose 耐受性較不佳。當隨著 glucose 濃度增加時，DNS 殘糖量隨之增加，EPS 產量亦增加，其中於添加 10% glucose 有較佳 EPS 產量(929.62 mg/L)。BCRC 14691 於添加 10% glucose 有最佳之 EPS 生成量(975.22 mg/L)及最高殘糖量(6.60 g/L)，同時菌數為 7.21 log CFU/mL 比其他組低，此表示菌體對於高濃度 glucose 耐受性低，生長較遲緩，所以利於 EPS 之生成(表 4-16)。BCRC 14759 經高濃度葡萄糖之處理後有最佳 EPS 產量(1223.40~1476.50 mg/L)，但菌數隨著葡萄糖濃度上升而下降(5.75~7.04 log CFU/mL)，且於添加 5 及 10 % 時菌數較初始菌數低(表 4-17)。此乃因於菌株對於葡萄糖耐受度不佳，當添加過濃之葡萄糖使得滲透壓改變，進而影響菌株之生長。BCRC 16000 添加葡萄糖時皆有較優之產量(1591.37~1716.36 mg/L)，且隨著濃度增高 DNS 含量也隨之增高(6.27~7.56 g/L)，而於菌數方面，與初始菌數相比，添加高濃度之葡萄糖可有利於菌株之增殖 (8.22~8.73 log CFU/mL)。故此株菌除了可利用葡萄糖當作能量繁殖外，亦可藉由高濃度之葡萄糖提升 EPS 之生成(表 4-18)。培養 KT 於濃度 10% glucose 中，其 EPS 量(1803.85 mg/L)及殘糖量(7.62 g/L) 高於 1 及 5 % 之 glucose 組，而菌數方面則皆高於初始菌數，推測 KT 除了利用 glucose 當作主要能量生長外，亦可藉由添加 glucose 提升轉換 EPS 之能力(表 4-19)。表 4-20 為不同濃度之 glucose 對於 LDB 4-2 EPS 產量、菌數及殘糖量之影響。LDB 4-2 於 10 % glucose 中，有較佳 EPS 產量(1829.47 mg/L)，較高之殘糖量(10.52 g/L)，但菌數及 pH 值則較其他組低，意指此菌株對於高濃度葡萄糖之耐受力較其他濃度差。藉由上述結果可得知(表 4-21)，BCRC 16000 於添加 1 % glucose 時有最佳 EPS 產量，BCRC 14759 於添加 5 % 時有較佳之 EPS 生成量，而在添加 10 % glucose 時，BCRC 12574、14691、KT 及 LDB 4-2 皆有最佳 EPS 產量。其中以 KT (1803.85 mg/L) 及 LDB 4-2 (1829.47 mg/L) 有最高 EPS 產量。綜合上述添加葡萄糖可促進 EPS 之生成，亦可能提供能量給菌株提升合成 EPS，但對於葡萄糖之利用率會因菌株不同而有所異。而當培養基中碳源之種類及組成比例，會影響胞外多醣之產量及組成 (林, 2008)。Cerning 等(1994) *Lb. casei* CG11 培養於添加不同濃度的 galactose、glucose、lactose、sucrose、maltose 及 melibiose 於 basal minimum medium (BMM)，結果發現 glucose 的添加能刺激胞外多醣之生產且提高產量；且發現不同碳源對胞外多醣的組成亦有影響，因此相同乳酸菌可能可以生產出一種以上之胞外多醣。以不同濃度的葡萄糖(0.5, 1, 2.5, 5, 與 90 g/L) 添加於培養基中培養 *Ped. damnosus* IOEB 8801，發現隨葡萄糖濃度增

高其胞外多醣產量也增多。而單獨添加葡萄糖的培養基時，以高濃度 (90 g/L) 的葡萄糖對胞外多醣生成有較好之利用性(Emilie *et al.*, 2005)。 *L. acidophilus* BCRC 14079, *L. bulgaricus* BCRC 10696, *L. plantarum* BCRC 10069, *L. mesenteroides* BCRC 12273 額外添加碳源葡萄糖、乳糖及蔗糖濃度(1、2、3 %) 時，葡萄糖為碳源時，有最高胞外多醣生成量，其次是蔗糖，以乳糖為碳源時胞外多醣產量最低。*L. rhamnosus* GG BCRC 16000 則對蔗糖有較佳之利用率。*S. thermophilus* BCRC 14085 以乳糖為碳源時，可產生最高量之胞外多醣；且都隨著提高糖之濃度，胞外多醣的產量也隨之增加(陳, 2004)。由酸菜中篩選出 *L. plantarum* SLC 13 添加 6 % 及 8 % 之葡萄糖後，其胞外多醣合成量較無添加時高(黃, 2006)。當額外添加 30 g/L 時，可刺激 *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* B3、*L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* G12 及 *Streptococcus thermophilus* W22 之胞外多醣生成(Zehra, 2008)。Jung 等學者(2008)從發酵酸麵糰中篩選出 *L. amylovorus* DU-21，雖其本身胞外多醣產量不高，但若而外添加葡萄糖則產量有明顯提升。

(四)培養天數之影響

乳酸菌繁殖過程中，胞外多醣已持續合成。故將菌株培養於 37 °C 發酵 1 到 7 天，探討培養時間對於 EPS 生成之影響。表 4-22 為 BCRC 12574 經不同時間培養下 EPS 之生成量。BCRC 12574 隨著培養時間增加，菌數隨之減少，此乃因營養物質耗盡，導致菌體無法能量來源所致。而其 EPS 產量於第三天到第六天時有最佳化(432.19~448.56 mg/L)，其中以第三天殘糖量為最低(2.93 g/L)。乳酸菌繁殖時，EPS 已持續合成，但其於增殖穩定期及死滅期時具有最高產量，此是因為菌體生長減緩後，才有較多能量提供給胞外多醣之合成。BCRC 14691 (表 4-23) 隨著培養時間增長菌數隨之減少。於培養第三天時有最佳 EPS 生成量(460.19 mg/L)，而第六天及第七天時，EPS 之生成量為最低值(188.46、177.96mg/L)，推測因為水解酵素使產量減少之。在 DNS 殘糖量試驗中，以第三天有最低值(3.94 g/L) 及第七天有最高值(5.13 g/L)，表示於第三天有最佳醣類轉化 EPS 利用率，而於第七天菌株活性差，利用單醣之能力較弱，故殘糖量較高。表 4-24 為 BCRC 14759 之結果。菌數會因培養時間增加而減少，於第三天菌數較初始菌數低。推測是因為培養時使用靜置培養，亦使菌體沉澱於下層，導致菌株利用營養物質率下降而死亡。在第三及四天時有最佳之 EPS 生成量

表 4-15 不同葡萄糖濃度對 BCRC 12574 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-15 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 12574 after 48hr of incubation

Glucose Conc (%).	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	6.70±0.34 ^a	8.04±0.20 ^{ab}	6.61±0.01		
5	6.70±0.34 ^a	8.17±0.20 ^b	6.61±0.01	3.73±0.02	6.25±0.03 ^B	873.13±7.17 ^y
10	6.70±0.34 ^a	7.66±0.12 ^a	6.61±0.01	3.67±0.01	6.64±0.01 ^A	929.62±66.18 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-16 不同葡萄糖濃度對 BCRC 14691 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-16 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14691 after 48hr of incubation

Glucose Conc. (%)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	6.95±0.10 ^a	7.45±0.10 ^{bc}	6.61±0.01	3.73±0.05	5.75±0.02 ^C
5	6.95±0.10 ^a	7.51±0.11 ^b	6.61±0.01	3.73±0.01	6.43±0.01 ^B	860.63±17.50 ^y
10	6.95±0.10 ^a	7.21±0.17 ^c	6.61±0.01	3.67±0.02	6.60±0.06 ^A	975.22±16.67 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-17 不同葡萄糖濃度對 BCRC 14759 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-17 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 14759 after 48hr of incubation

Glucose Conc. (%)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	6.24±0.14 ^a	7.04±0.09 ^b	6.61±0.01	3.69±0.01	6.46±0.01 ^A
5	6.24±0.14 ^a	6.05±0.13 ^c	6.61±0.01	3.68±0.02	6.22±0.05 ^B	1476.50±30.07 ^x
10	6.24±0.14 ^a	5.75±0.25 ^d	6.61±0.01	3.63±0.01	6.04±0.01 ^C	1338.38±33.14 ^y

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-18 不同葡萄糖濃度對 BCRC 16000 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-18 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with BCRC 16000 after 48hr of incubation

Glucose Conc. (%)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	7.49±0.18 ^{ab}	8.49±0.16 ^b	6.61±0.01	3.71±0.02	6.27±0.14 ^C
5	7.49±0.18 ^{ab}	8.73±0.03 ^a	6.61±0.01	3.64±0.00	6.67±0.02 ^B	1591.37±49.80 ^z
10	7.49±0.18 ^{ab}	8.22±0.06 ^c	6.61±0.01	3.58±0.03	7.56±0.02 ^A	1662.61±32.15 ^y

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-19 不同葡萄糖濃度對 KT 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-19 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with KT after 48hr of incubation

Glucose Conc. (%)	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	7.09±0.17 ^a	7.45±0.08 ^b	6.61±0.01	3.71±0.03	6.74±0.01 ^C
5	7.09±0.17 ^a	7.45±0.18 ^b	6.61±0.01	3.70±0.01	7.10±0.11 ^B	1685.11±10.94 ^y
10	7.09±0.17 ^a	7.58±0.27 ^b	6.61±0.01	3.63±0.01	7.62±0.02 ^A	1803.85±53.46 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-20 不同葡萄糖濃度對 LDB 4-2 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-20 Effects of various glucose concentration on growth, pH, residual sugar and EPS yield with LDB 4-2 after 48hr of incubation

Glucose Conc.(%)	Viable count		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	(log CFU/mL)					
	Initial	Final	Initial	Final		
1	7.04±1.35 ^a	8.41±0.02 ^a	6.61±0.01	3.72±0.00	5.94±0.07 ^C	902.04±5.31 ^y
5	7.04±1.35 ^a	8.03±0.05 ^a	6.61±0.01	3.74±0.00	8.55±0.04 ^B	933.66±5.21 ^y
10	7.04±1.35 ^a	7.68±0.02 ^a	6.61±0.01	3.67±0.01	10.52±0.09 ^A	1829.47±40.83 ^x

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C ; x, y) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-21 總結:不同菌株於最佳葡萄糖濃度之菌數、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-21 Summary: effects of best glucose concentration of various strains on growth, residual sugar and EPS yield

strain	Best glucose conc.	EPS (mg/L)	DNS (g/L)	Log CFU/mL
BCRC 12574	10	929.62±66.18	6.64±0.01	7.66±0.12
BCRC 14691	10	975.22±16.67	6.60±0.06	7.12±0.17
BCRC 14759	5	1476.50±30.07	6.22±0.05	6.05±0.13
BCRC 16000	1	1716.36±72.11	6.27±0.14	8.49±0.16
KT	10	180385±53.46	7.62±0.02	7.58±0.27
LDB 4-2	10	1829.47±40.83	10.52±0.09	7.68±0.02

(460.02 及 472.10 mg/L)，但因第四天之殘糖量 (4.14 g/L) 較第三天 (2.93 g/L) 高，故其於 EPS 分析可能是因偵測到單糖分子而使結果值偏高。BCRC 16000 (表 4-25)，菌數於第四到七天時皆低於初始菌數。EPS 產量則於第三天較佳 (461.44 mg/L)，且殘糖量較其他組低(3.51 g/L)。推測當菌數於增殖穩定期及死滅期時，會因菌體生長減緩後，提供較多能量提供給胞外多醣之合成。KT 於培養天數之影響下，殘糖量於第一及三天時有最低量(3.65 及 3.62 g/L)，前者是因此時菌體大量繁殖，故將醣類轉化成能量使用而提高菌數(8.53 log CFU/mL)；後者則是因為菌株達穩定期及死滅期，故可提供能量於生成 EPS 路徑中，故於第三天其 EPS 有最高量(829.57mg/L)。LDB 4-2 於培養天數第三天時有最高 EPS 產量 (916.72mg/L)，此時殘糖量較低(3.62 g/L)，但自第四天後產量 EPS 漸低 (818.32~449.49 mg/L)，當於第七天時有最低產量(449.49 mg/L)，此時有最低之菌數 (3.40 log CFU/mL)。當培養時間過久，EPS 總產量有減少的趨勢，是因乳酸菌除了有合成 EPS 能力外，亦會產生此等胞外多醣之水解酵素，因而在生長後期多醣產生漸緩和時，此類酵素的作用趨於明顯(Marshall *et al.*, 1995)。然而，大多由葡萄糖與半乳糖組成胞外多醣，隨培養時間增長，葡萄糖佔有的比例逐漸增加。此因菌體對葡萄糖的利用率較半乳糖佳，因此培養初期菌體快速增殖，葡萄糖消耗較快，故胞外多醣中的葡萄糖比例較低。而於培養後期，菌體增殖逐漸減緩，葡萄糖消耗少，因此在胞外多醣中的比例略為提高(Bouzar *et al.*, 1996)。綜合六株菌之結果(表 4-28)，此六株菌皆於第三天有最佳之 EPS 產量，其中以 LDB 4-2 (916.72 mg/L) 為最高值。而菌數方面則為 BCRC 16000 有最高菌數(8.01 log CFU/mL)。文獻指出乳酸菌繁殖過程中，胞外多醣已持續合成，但胞外多醣最高產量則是在菌體於增殖穩定期及死滅期時，乃因菌體生長減緩後，才有較多能量提供給胞外多醣之合成。而培養時間太久，胞外多醣總產量亦有減少的趨勢，此是因乳酸菌除了有合成胞外多醣能力外，亦會產生此等胞外多醣之水解酵素，因而在生長後期多醣產生漸緩和時，此類酵素的作用趨於明顯(Marshall *et al.*, 1995)。 *L. helveticus* BCRC 14030 於 25 °C 培養 48、72、96、108 小時，於 96 小時下所生成之 EPS 產量及黏絲性為最佳(楊, 2005)。培養菌株 32、36、48、60、72 及 84 h 後，發現 *L. helveticus* BCRC 14030 及 *L. helveticus* BCRC 14076 於 60 小時有最大胞外多醣生成量，而 *Strep. Thermophilus* BCRC 14085 則在 60 及 72 小時有較高產量(Lin, 2007)。Mozzi 等(1995)指出，*L. bulgaricus* 與 *S. thermophilus* 於脫脂乳中培養 24 小時後，其胞外多醣產量優於培養 72 小時者，或許是因為培養後期胞外多醣水解酵素之作用大於菌體之生產所導致。

表 4-22 不同培養時間對 BCRC 12574 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-22 Effects of various incubation time for BCRC 12574 on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	6.26±0.14 ^a	8.17±0.13 ^a	6.61±0.01	3.81±0.00	4.25±0.03 ^B
2	6.26±0.14 ^a	8.01±0.16 ^b	6.61±0.01	3.76±0.01	4.11±0.03 ^C	392.32±20.27 ^x
3	6.26±0.14 ^a	6.55±0.21 ^c	6.61±0.01	3.79±0.00	2.93±0.02 ^E	448.10±7.14 ^w
4	6.26±0.14 ^a	4.34±0.06 ^d	6.61±0.01	3.84±0.05	4.06±0.02 ^D	448.56±0.34 ^w
5	6.26±0.14 ^a	4.27±0.25 ^d	6.61±0.01	3.80±0.02	4.06±0.01 ^E	441.06±7.70 ^w
6	6.26±0.14 ^a	4.10±0.17 ^d	6.61±0.01	3.83±0.00	4.26±0.04 ^B	432.19±12.92 ^w
7	6.26±0.14 ^a	3.60±0.26 ^e	6.61±0.01	3.83±0.05	4.67±0.01 ^A	347.57±14.82 ^y

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-23 不同培養時間對 BCRC 14691 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-23 Effects of various incubation time for BCRC 14691 on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
1	6.95±0.10 ^a	7.95±0.03 ^a	6.61±0.01	3.92±0.02	4.01±0.01 ^B	414.94±8.68 ^y
2	6.95±0.10 ^a	7.31±0.18 ^b	6.61±0.01	3.87±0.00	4.11±0.18 ^C	428.69±7.85 ^y
3	6.95±0.10 ^a	6.71±0.12 ^c	6.61±0.01	4.13±0.17	3.94±0.02 ^A	460.19±8.52 ^x
4	6.95±0.10 ^a	6.54±0.27 ^{cd}	6.61±0.01	3.96±0.08	4.11±0.03 ^C	422.69±5.08 ^y
5	6.95±0.10 ^a	6.38±0.02 ^d	6.61±0.01	3.86±0.00	4.36±0.04 ^D	449.69±6.96 ^x
6	6.95±0.10 ^a	6.10±0.02 ^e	6.61±0.01	3.91±0.01	4.15±0.02 ^C	188.46±15.90 ^z
7	6.95±0.10 ^a	5.76±0.32 ^f	6.61±0.01	3.95±0.02	5.13±0.03 ^E	177.96±17.05 ^z

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-24 不同培養時間對 BCRC 14759 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-24 Effects of various incubation time for BCRC 14759 on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	6.24±0.09 ^a	7.24±0.06 ^b	6.61±0.01	3.82±0.01	4.33±0.07 ^B
2	6.24±0.09 ^a	6.44±0.21 ^c	6.61±0.01	3.80±0.00	4.50±0.02 ^A	441.81±6.70 ^y
3	6.24±0.09 ^a	4.83±0.06 ^d	6.61±0.01	3.79±0.02	2.93±0.01 ^E	460.02±11.15 ^x
4	6.24±0.09 ^a	1.28±0.06 ^e	6.61±0.01	3.87±0.04	4.14±0.03 ^D	472.10±1.14 ^w
5	6.24±0.09 ^a	1.06±0.04 ^f	6.61±0.01	3.79±0.00	4.45±0.03 ^A	444.94±3.08 ^y
6	6.24±0.09 ^a	0.84±0.03 ^g	6.61±0.01	3.81±0.00	4.11±0.02 ^D	429.94±2.08 ^d
7	6.24±0.09 ^a	0.69±0.01 ^h	6.61±0.01	3.88±0.04	4.22±0.02 ^C	439.23±1.54 ^{yz}

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E ; w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-25 不同培養時間對 BCRC 16000 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-25 Effects of various incubation time for BCRC 16000 on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
1	7.49±0.18 ^a	8.27±0.15 ^b	6.61±0.01	3.97±0.01	6.04±0.01 ^A	426.61±2.81 ^y
2	7.49±0.18 ^a	8.17±0.22 ^b	6.61±0.01	3.85±0.00	4.46±0.16 ^C	440.48±11.35 ^y
3	7.49±0.18 ^a	8.01±0.01 ^b	6.61±0.01	3.78±0.02	3.51±0.14 ^F	461.44±4.12 ^x
4	7.49±0.18 ^a	7.32±0.15 ^c	6.61±0.01	3.85±0.05	4.07±0.02 ^E	432.28±5.05 ^y
5	7.49±0.18 ^a	7.39±0.28 ^c	6.61±0.01	3.78±0.01	4.77±0.02 ^B	434.06±0.71 ^y
6	7.49±0.18 ^a	7.18±0.09 ^c	6.61±0.01	3.83±0.00	4.23±0.02 ^D	404.44±10.62 ^z
7	7.49±0.18 ^a	6.64±0.26 ^d	6.61±0.01	3.86±0.03	4.78±0.02 ^B	406.27±21.33 ^z

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E, F ; x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-26 不同培養時間對 KT 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-26 Effects of various incubation time for KT on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
1	7.33±0.11 ^a	8.53±0.19 ^a	6.61±0.01	3.84±0.00	3.65±0.01 ^E	683.32±14.93 ^X
2	7.33±0.11 ^a	8.50±0.17 ^a	6.61±0.01	3.81±0.01	4.16±0.04 ^C	655.56±5.91 ^Y
3	7.33±0.11 ^a	6.26±0.02 ^b	6.61±0.01	3.8±0.02	3.62±0.02 ^E	829.57±11.87 ^u
4	7.33±0.11 ^a	5.18±0.56 ^c	6.61±0.01	3.89±0.05	4.08±0.05 ^D	754.04±11.67 ^v
5	7.33±0.11 ^a	3.46±0.04 ^d	6.61±0.01	3.79±0.01	4.47±0.04 ^A	732.27±9.94 ^w
6	7.33±0.11 ^a	1.37±0.05 ^e	6.61±0.01	3.83±0.00	4.38±0.03 ^B	721.10±11.23 ^w
7	7.33±0.11 ^a	1.16±0.04 ^e	6.61±0.01	3.85±0.04	4.16±0.03 ^C	444.11±9.78 ^z

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C, D, E ; u, v, w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-27 不同培養時間對 LDB 4-2 於培養之菌數、pH 值、殘糖量及胞外多醣生產之影響

Table 4-27 Effects of various incubation time for LDB 4-2 on growth, pH, residual sugar and EPS yield

days	Viable count (log CFU/mL)		pH value		Residual sugar (g/L)	EPS yield (mg/L)
	Initial	Final	Initial	Final		
	1	7.04±1.35 ^a	8.35±0.25 ^a	6.61±0.01	3.83±0.01	4.14±0.09 ^A
2	7.04±1.35 ^a	7.54±0.03 ^a	6.61±0.01	3.83±0.00	3.86±0.00 ^{AB}	888.14±3.61 ^y
3	7.04±1.35 ^a	6.73±0.18 ^a	6.61±0.01	3.88±0.04	3.62±0.02 ^B	916.72±11.31 ^u
4	7.04±1.35 ^a	5.60±0.32 ^{bc}	6.61±0.01	3.89±0.05	3.95±0.03 ^A	818.32±9.53 ^w
5	7.04±1.35 ^a	5.17±0.11 ^b	6.61±0.01	3.81±0.00	4.30±0.03 ^A	684.61±6.29 ^x
6	7.04±1.35 ^a	4.42±0.14 ^{bc}	6.61±0.01	3.85±0.01	4.19±0.01 ^A	491.19±10.37 ^y
7	7.04±1.35 ^a	3.40±0.11 ^c	6.61±0.01	3.88±0.04	4.09±0.05 ^A	449.49±4.57 ^z

Statistical differences were calculated by Duncan's new multiple range test. Values in the same column (a,b,c ; A, B, C; u,v, w, x, y, z) with different superscripts are significantly different (p<0.05). Data were shown as mean ± SD for triplicates.

表 4-28 總結:不同菌株於最佳培養天數之菌數、殘糖量及胞外多醣生產

Table 4-28 Summary: effects of best incubation time for various strains on growth, residual sugar and EPS yield

strain	Best glucose conc.	EPS (mg/L)	DNS (g/L)	Log CFU/mL
BCRC 12574	3	448.10±7.14	2.93±0.02	6.55±0.21
BCRC 14691	3	460.19±8.52	3.94±0.02	6.71±0.12
BCRC 14759	3	460.02±11.15	2.93±0.01	4.83±0.06
BCRC 16000	3	461.44±4.12	3.51±0.14	8.01±0.01
KT	3	829.57±11.87	3.62±0.02	6.26±0.02
LDB 4-2	3	916.72±11.31	3.62±0.02	6.73±0.18

除此之外，隨著培養時間的變化，乳酸菌胞外多醣的產量會受影響外，亦影響其的組成。大多由葡萄糖與半乳糖組成胞外多醣，隨培養時間增長，葡萄糖佔有的比例逐漸增加。此因菌體對葡萄糖的利用率較半乳糖佳，因此培養初期菌體快速增殖，葡萄糖消耗較快，故胞外多醣中的葡萄糖比例較低。而於培養後期，菌體增殖逐漸減緩，葡萄糖消耗少，因此在胞外多醣中的比例略為提高 (Bouzar *et al.*, 1996)。

三、調節血糖恆定

(一) 分子量

藉以高效能液相層析儀及膠體滲透層析管柱進行分子量的分析。利用不同分子量多醣標準品(α -D-葡聚糖, pullulan) 滯留時間之標準曲線，與樣品滯留時間相對照後得之其分子量(附錄三)。由圖 4-3 膠體通透層析圖譜顯示，其各樣品滯留時間並藉由標準曲線推算其分子量分別為 KT (1142.46 kDa)、LDB4-2 (1166.81 kDa)、BCRC 14759 (1038.32 kDa)、BCRC 14691 (1107.03 kDa)、BCRC 16000 (894.67 kDa) 及 BCRC 12574 (1138.04 kDa)。胞外多醣其分子量主要介於 $4.0 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^6$ Da (Luc *et al.*, 1999)；當分子量大胞外多醣其黏性也較大 (Lin *et al.*, 2007)。Ruas-Madiedo 等學者(2002)提出 *Lc lactis subsp. cremoris* B35, B39, B40 及 B91 之 EPS 分子量介於 $10 \sim 9 \times 10^3$ kDa。楊(2004)培養 *L. helveticus* BCRC 14030 於 25、37 及 50 °C 與 pH 5、6 及 7 之脫脂奶培養基中經 48~108 h 後，分子量為 347~324168 kDa 及 3.309~84.733 kDa。接種 Yogurt bacteria 與 *L. helveticus* BCRC 14030 於脫脂奶培養基添加 1、5 % 的葡萄糖、半乳糖及果糖於 pH 6 發酵槽中經 25 °C、96 h 後，可得到 2~3 種不同分子量之 EPS (10~98 kDa、101~975 kDa 及 1056~15464 kDa)。Lee 等學者(2007)添加葡萄糖、麥芽糖、果糖、蔗糖及乳糖於培養基中，培養 *Ganoderma applanatum* 發現有兩種不同分子量之 EPS，範圍位於 502~2716 kDa 之間。Lin and Chang Chien (2007) 將 *L. helveticus* BCRC 14030 培養 32~60 h，發現有 1~4 種不同分子量之 EPS 其分子量範圍為 3~26500 kDa。而 *S. thermophilus* ST111 生成之 EPS 分子量較大，且大於 5000 kDa (Vaningelgem *et al.*, 2004)。EPS 分子量大小及其比例與黏度有密切相關性。一般而言分子量較

大者，其黏性較低。

多醣之分子量大小於生理功效上，扮演著重要角色，有文獻指出 30 kDa 以上具抗發炎之效用，在 3~5 kDa 之間具降血糖功能，然而具降血糖之分子量大小目前仍分歧(黃, 1998)。此可能是因為糖尿病被視為發炎之疾病之一，故若具抗發炎功效之大分子量，亦可調節血糖之平衡。有文獻指出脂肪細胞會分泌 TNF- α 及 IL-6 等促發炎細胞激素可藉由多種機制影響胰島素訊息傳遞，使得細胞出現胰島素阻抗，其主要作用包括抑制 IR 及 IRS-1 之酪胺酸磷酸化反應(Hotamisligil *et al.*, 1994)、增加 IRS-1 之絲胺酸磷酸化程度，使 IRS-1 無法繼續活化下游分子 PI3-kinase (Rui *et al.*, 2001)，以及抑制 PI3-kinase 與 Akt 之活性，使 GLUT4 無法從核內轉位至細胞膜，使葡萄糖無法被轉運至細胞中。但因結構及組成之不同，其效用也有所差異，故仍需以細胞及動物實驗進行功能性探討。

(二) XTT 試驗探討其對細胞活性之影響

不同菌株之 EPS 粗萃物添加於小鼠 FL83B 肝細胞中，藉由 XTT 試驗探討其對細胞活性之影響。BCRC 12574 及 BCRC 16000 實際產率較其他四株菌低，故測試濃度範圍採用 50 到 2000ppm (圖 4-4A 及 4-4D)；其他菌株則為 200 到 2000 ppm。結果顯示 KT、LDB4-2、BCRC 14759 及 BCRC 14691 添加量達到 2000 ppm 時對細胞存活率均無顯著影響 (圖 4-4 B、4-4 C、4-4 E 及 4-4 F)；而 BCRC 12574 添加至 2000ppm，BCRC 16000 添加至 1000ppm，顯著降低 FL83B 細胞活性。推測 BCRC 16000 之 EPS 分子量較小，結構及組成上異於其他菌株之 EPS，故在 1000 ppm 時有顯著降低細胞活性。藉由結果得知，EPS 粗萃物於適當濃度下除了無毒害細胞生長外，亦可使細胞增生。推測其是因為不同菌株之 EPS 組成不盡相同，所以使其對於細胞活性結果也會不同。而後續研究以 400、600 及 800ppm 為主要測試濃度。

(三) 葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量

1、不同濃度葡萄糖誘導 FL83B 產生胰島素阻抗

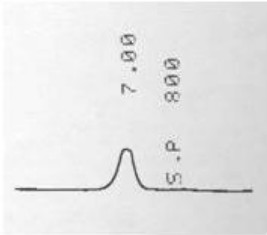
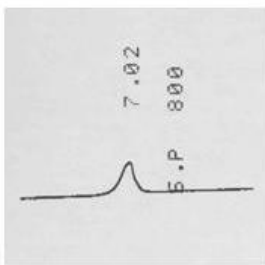
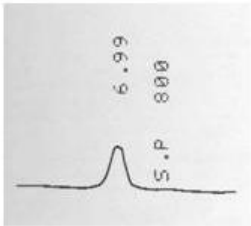
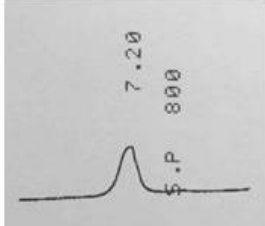
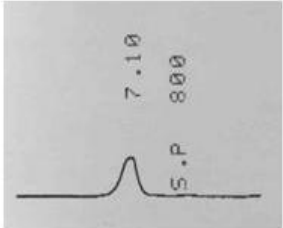
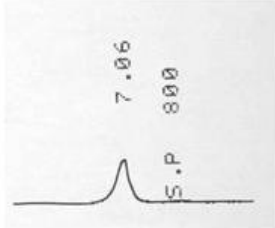
name	Retention time (min)	MW (kDa)	name	Retention time (min)	MW (kDa)
KT		1142.462	BCRC 12574		1138.038
LDB 4-2		1166.811	BCRC 16000		894.6692
BCRC 14759		1038.32	BCRC 14691		1107.032

圖 4-3 EPS 膠體通透層析圖譜

Fig. 4-3 Molecular weight chromatograms of EPS by gel permeation chromatography.

經文獻證實高糖會干擾許多細胞之胰島素訊息傳遞，如肝細胞、肌肉細胞及脂肪細胞等，進而影響細胞對葡萄糖攝入及代謝之能力。FL83B 之培養基 F12K 培養基原含 7 mM 葡萄糖，本實驗額外添加 10 到 80 mM 之葡萄糖於細胞中，且經胰島素處理後，利用流式細胞儀，進行葡萄糖擬似物攝入 (2-NBDG uptake) 測試，可得知不同濃度的 Glucose 對於 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入之影響。結果如圖 4-5 所示，經胰島素 (800nm) 作用於 FL83B 細胞，2-NBDG 之帶入量從原本之 11.62 % 提升至 16.04 %。當額外添加 60、70 及 80 mM 之 Glucose 及胰島素處理 24 小時後，2-NBDG 攝入量明顯低於胰島素組 0.7~0.8 倍。於肝醣合成量之表現，藉以 60 mM 葡萄糖濃度處理細胞後，其肝醣合成量明顯低於胰島素組 0.75 倍，且較 70 及 80 mM 低 (圖 4-6)。而於先前實驗室，藉由胰島素傳訊路徑證實，於額外添加 60 mM 之葡萄糖，可使 Akt 蛋白質磷酸化表現量顯著降低 (吳, 2011)。故本研究以總量 60 mM 葡萄糖誘導 FL83B 細胞 24 小時形成胰島素阻抗。

2、不同菌株之多種 EPS 濃度對 FL83B 之 2-NBDG 攝入量

過往研究於葡萄糖之吸收作用，常添加放射性葡萄糖分子於培養基中，如 [³H]-、[¹⁴C]- 或 [¹⁸F]-2-Deoxy-D-glucose (Yu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003; Kumar and Dey, 2003)，藉由液體閃爍計數器偵測細胞的放射性以代表其葡萄糖吸收量。亦或以臨床應用之血糖濃度檢驗試劑，測定培養基中葡萄糖濃度之減少量，以代表其葡萄糖吸收率 (Shimokawa *et al.*, 2000; Yuen and McNeill, 2000)，此方法較安全且較不污染環境，但其靈敏度較低。而本研究使用 2-NBDG 已有文獻證實可以被哺乳動物之 glucose transporter 所吸收及運輸，似葡萄糖分子，故可以用於葡萄糖吸收分析，且其螢光性分析靈敏度較高 (Yoshioka *et al.*, 1996)，且其已被應用於多篇文獻中。

以流式細胞儀分析 FL83B 添加 EPS 後其 2-NBDG 帶入量 (圖 4-7)。結果顯示，BCRC 12574 之 EPS 為 200~800ppm 與 control 組 (不含 EPS 及 insulin) 相比，其可提升 2-NBDG 帶入量 1.1 到 1.5 倍；若與胰島素共同作用時，相較胰島素組，400 到 800ppm 有顯著上升 1.5 到 1.6 倍 (圖 4-7 A)。圖 4-7B 為 BCRC 14759 之葡

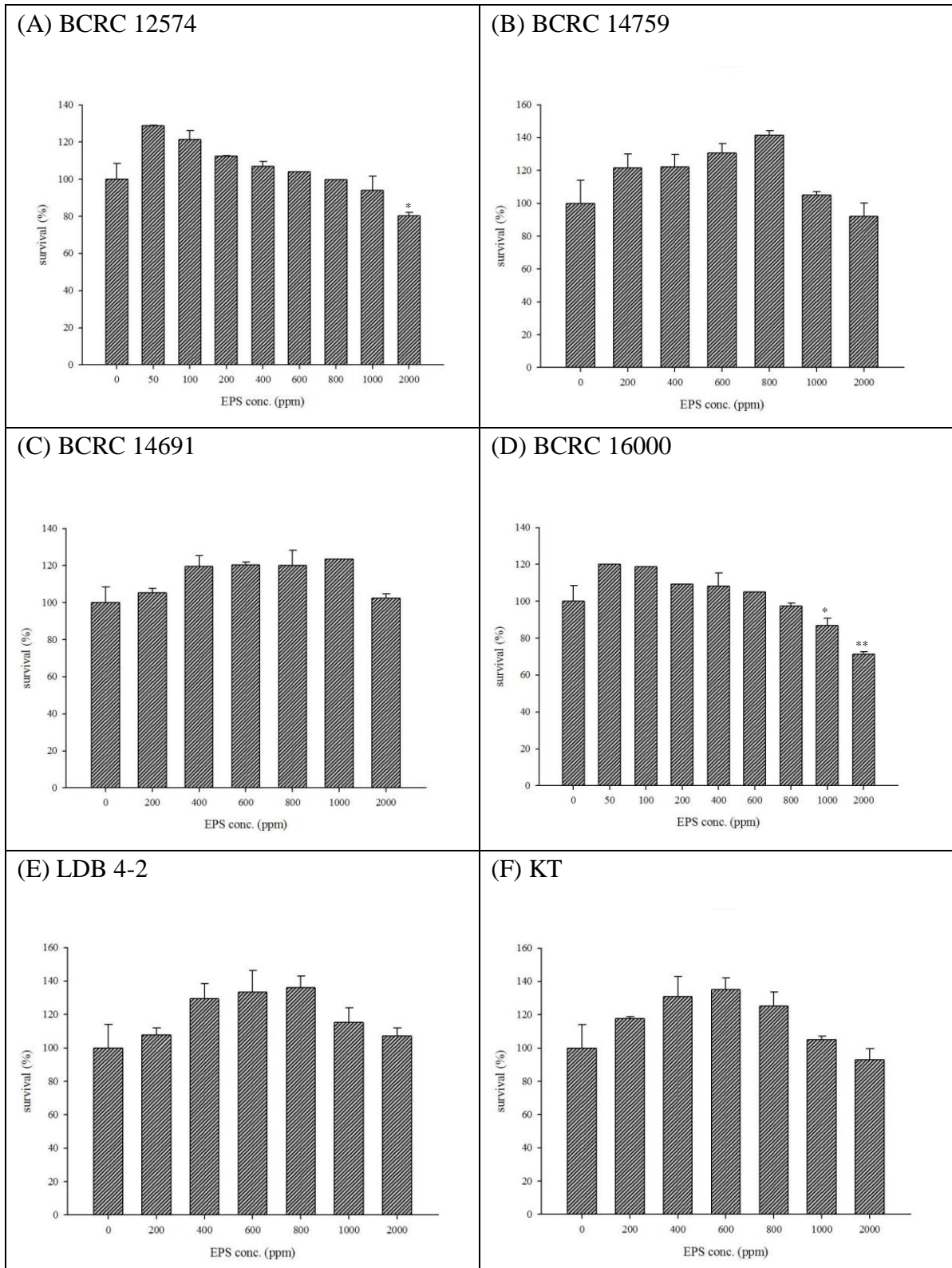


圖 4-4 不同菌株之 EPS 及多種濃度對於 FL83B 之存活性測定

Fig 4-4. XTT cell viability assay for FL83B by treated with various EPS concentration from different strains

Statistical differences were calculated by Student t-test. * means significantly different ($p < 0.05$). Data were shown as mean \pm SD for triplicates.

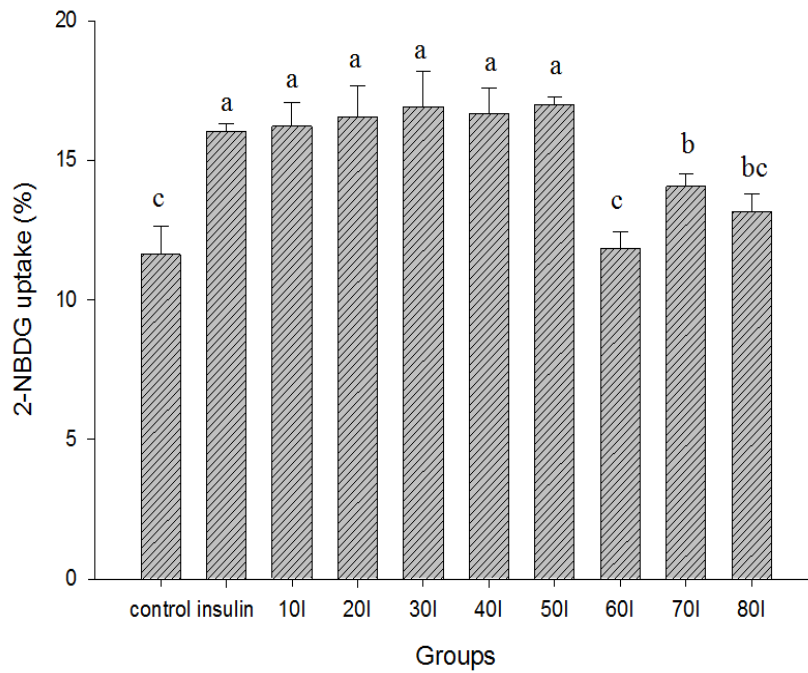


圖 4-5 高糖抑制小鼠肝臟 FL83B 細胞之 2-NBDG 攝入量分析

Fig. 4-5 2-NBDG uptake of insulin resistance FL83B cell by high glucose

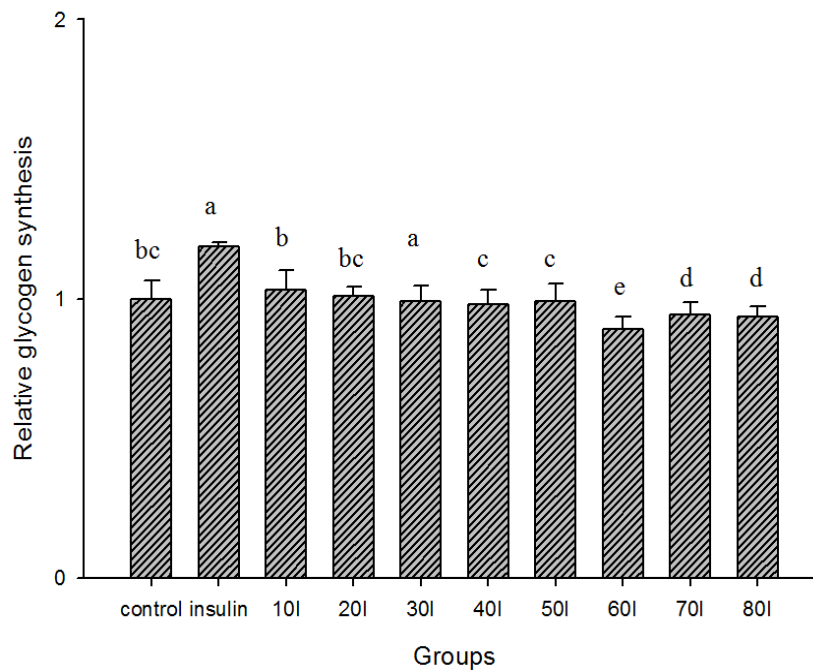


圖 4-6 高糖抑制小鼠肝臟 FL83B 細胞之肝醣合成量分析

Fig. 4-6 Glycogen synthesis of insulin resistance FL83B cell by high glucose

葡萄糖擬似物帶入量之分析，由結果得知與 control 組相比，添加濃度為 600 及 800 ppm 時可增加帶入量 1.4 及 1.7 倍；但與胰島素協同作用下，與胰島素組比較於統計上無顯著差異。其可能是因為肝臟中 Glut 2 葡萄糖運輸蛋白為雙向運輸，可將葡萄糖帶入到細胞內，亦可因胞內葡萄糖濃度過高而將它丟出。BCRC 14691 EPS 與控制組相比，於 600 及 800ppm 作用下有顯著增加 1.1 及 1.2 倍之 2-NBDG 帶入。若與胰島素共同作用之下，經 400~800 ppm EPS 處理細胞後，帶入量為胰島素組的 1.3 到 2 倍(圖 4-7 C)。BCRC 16000 所產之 EPS 無論是否與胰島素協同作用，皆有使 2-NBDG 顯著攝入到細胞內。與 control 相比其在 100~800 ppm 可提升 1.4~1.5 倍之帶入量；若含有胰島素及 EPS 處理下，50 到 800 ppm 之 EPS 皆可增加 1.2 倍之葡萄糖擬似物帶入量(圖 4-7 D)。當添加 400~800 ppm LDB 4-2 之 EPS (圖 4-7 E)，與控制組相比，濃度為 600 及 800 ppm 有顯著增加帶入量(1.7 及 2.3 倍)；在含 800 nM 胰島素時，與胰島素組相比，400~800 ppm 接顯著促進 2-NBDG 帶入(1.3~2.4 倍)。圖 4-7 F 為添加 400~800 ppm KT 之 EPS 於正常 FL83B 細胞。未含胰島素之 EPS 與 control 組經統計分析，600 及 800 ppm 可顯著提升 2 及 2.4 倍；若與胰島素協同作用之下，相較於胰島素組，當添加 EPS 400~800 ppm 可顯著增加 1.7~2.1 倍 2-NBDG 帶入量。綜合上述六株菌之 EPS 結果，KT 800 ppm 相較於其他菌株之 EPS，與控制組相比有最佳之帶入量(2.4 倍)；若與胰島素協同作用下，與胰島素組相比，KT 及 LDB 4-2 之 2-NBDG 帶入量(2.4 倍)優於其他菌株之 EPS。此結果與吳(2011)黃金銀耳之酸性多醣(GXM)相比，當其添加純化之 GXM 800 ppm 於正常 FL83B 時，無論是否有胰島素協同作用，皆可促進 2-NBDG 之帶入量(1.9 及 2.6 倍)。雖其效果優於不同菌株之 EPS，但推測本研究中 EPS 未經純化，故效用可能比經純化之 GXM 差。

在高糖誘導之胰島素阻抗中，添加 EPS 亦可回復 2-NBDG 之帶入量，其結果如圖 4-8。經 60 mM glucose 及其與胰島素協同作用下，可發現與胰島素組相比，含胰島素 800 nM 的 60 mM glucose 之阻抗組帶入量下降 0.64 倍；而無含胰島素組之 60 mM glucose 則無明顯差異。其是因為正常體內皆有胰島素作用，若於細胞模式下無添加胰島素，則無法使胰島素傳訊路徑開啟並藉由高醣使之受阻；亦或於細胞模式中，葡萄糖可藉由主動運輸進入胞內，其未經分子傳訊路徑故未使傳訊路徑中主要蛋白如 IR、pAkt 受阻。添加 BCRC 12574 EPS 400~800 ppm 於誘導阻抗之細胞中(圖 4-8 A)。與正常胰島素相比，無論有無胰島素協同作用下，經高醣誘導之阻抗細胞添加 400~800 ppm EPS 後，皆可回復

至 1.2~2.6 倍之代入量；若與阻抗組相比，添加 800 ppm 及含胰島素作用之 400~800 ppm 皆可促進 1.5~1.7 倍之代入量。圖 4-8 B 為添加 400~800 ppm BCRC 14759 之 EPS 於高糖誘導阻抗之細胞中，與正常胰島素組相比，有無疑島素作用之下皆有顯著回復 2-NBDG 帶入量之效用 (1.8~2.7 倍)；若與阻抗組相比，添加 800 ppm 及含胰島素作用之 400~800 ppm 皆可促進 1.3~1.7 倍之代入量。阻抗細胞中，藉由 BCRC 14691 之 400~800 ppm EPS 處理後可得知 (圖 4-8 C)，與正常胰島素組比較，600 及 800 ppm 及含胰島素之 400~800 ppm 皆有顯著回復帶入量之效 (1.2~2.1 倍)；與阻抗組相比，600~800 ppm 與胰島素協同作用及無含胰島素之 800 ppm，皆可提升帶入量 (1.1~1.3 倍)。誘導阻抗之細胞經 BCRC 16000 EPS 400~800 ppm 處理 (圖 4-8 D)，無論有無胰島素協同作用下，400~800 ppm 與胰島素組相比，皆有回復 2-NBDG 之帶入量 (1.6~2.3 倍)，由其在與胰島素協同作用下，顯著最明顯。若與阻抗組相比，600 與 800 ppm 及含胰島素之 400~800 ppm 皆可促進 2-NBDG 之代入量 (1.1~1.5 倍)。LDB 4-2 之 EPS 於誘導阻抗細胞中 (圖 4-8 E)，與正常胰島素組及阻抗組相比，添加 400~800 ppm 有無胰島素協同作用下，皆可回復 2-NBDG 之代入量 (1.7~2.8 倍及 1.1~1.8 倍)。圖 4-8 F 為 KT 之 400~800 ppm EPS 應用於阻抗細胞中，添加 400 到 800 ppm 且有無胰島素作用下，與正常胰島素組及阻抗組相比，皆可回復且提升 2-NBDG 帶入到細胞內 (1.7~3 倍及 1.1~1.9 倍)，降低血中之葡萄糖。綜合上述六株菌之 EPS 結果，無胰島素共同作用之 LDB 4-2 EPS 800 ppm 比阻抗組增加 2.8 倍之帶入量，此結果優於其他菌株之 EPS。若含胰島素共同作用下，KT 之 800 ppm EPS 與阻抗組相比有最佳之帶入量 (3 倍)，且效果較佳於其他組別。藉由上述，以流式細胞儀分析結果可知，EPS 對於 2-NBDG 之攝入量有顯著增加。已有研究指出利用黃金銀耳 GXM，添加 400 ppm 且與胰島素協同作用下，胰島素阻抗 FL83B 細胞之 2-NBDG 帶入量為阻抗組之 2.1 倍，且其可藉由 pAKT 之胰島素傳訊路徑來增進 2-NBDG 之帶入量，由此推測 EPS 可經由胰島素傳訊路徑 pAkt 促進 2-NBDG 之帶入 (吳, 2011)。Kiho 等人(2000)以熱水萃取 *Tremella aurantia* 之酸性多醣體，可提升 glucokinase、hexokinase 活性，以增進胞外葡萄糖攝入。故可以推測增加 2-NBDG 之帶入量，可能是因為與改善酵素活性及提升 pAKT 之胰島素傳訊路徑相關，以達到增加胞外葡萄糖帶入於細胞中，以達到降低胞外葡萄糖之功效。

(四) 不同 EPS 濃度對 FL83B 肝醣合成量之影響

肝醣含量可反應肝醣合成與分解雙向路徑的平衡點。本實驗研究正常態 (圖 4-9) 及阻抗態細胞 (圖 4-10) 以添加不同濃度 400~800 ppm EPS，觀察對肝醣含量之影響，若有提升趨勢，表示肝醣合成量大於分解量，以降低外界含糖量。正常態及阻抗態細胞皆有隨添加 EPS 濃度增加而肝醣有增加之趨勢。BCRC 12574 於正常態 FL83B 細胞中添加 400~800 ppm (圖 4-9 A)，其肝醣合成量與 control 組及胰島素組相比，可發現當濃度越高，肝醣合成相對量也隨之增高 (1.3~1.4 倍)。此結果呼應正常態 FL83B 之 2-NBDG 帶入量，確定此株菌 EPS 可提升葡萄糖擬似物帶入量並將其轉換成肝醣儲存。圖 4-9 B 為 BCRC 14759 之 EPS 於肝醣合成相對量之結果，無論有無胰島素協同作用下，經 400~800 ppm 處理細胞後，與 control 及胰島素組相比，其皆可促進肝醣合成 (1.2~1.4 倍及 1.2~1.6 倍)。將此結果與 2-NBDG 帶入量對照之，可發現含有胰島素作用時，雖然 EPS 並未明顯促進 2-NBDG 攝入，但卻可提升肝醣合成量。推測此乃葡萄糖可藉由主動運輸進入到細胞內，進而轉換肝醣儲存。BCRC 14691EPS 於正常態 FL83B 細胞中添加 400~800 ppm (圖 4-9 C)，其肝醣合成相對量與 control 組及胰島素組相比，當濃度越高，肝醣合成相對量也隨之增高 (1.4~1.7 倍)。此結果與正常態 FL83B 之 2-NBDG 帶入量相呼應，確定此株菌 EPS 可促使葡萄糖擬似物帶入至細胞內並將其轉換成肝醣儲存。圖 4-9 D 表示 BCRC 16000 400~800 ppm 之 EPS，無論有無胰島素協同作用下，與 control 及胰島素組相比，其皆可促進肝醣合成 (1.7~2.3 倍)。將此結果與 2-NBDG 帶入量對照之，證實此菌株 EPS 可促進細胞帶入 2-NBDG 之能力，並將葡萄糖有效轉換成肝醣貯存。LDB 4-2 經 800 ppm 與含胰島素之 600 及 800 ppm 處理時 (圖 4-9 E)，可促進肝醣合成相對量，約為 1.2~1.3 倍。與 2-NBDG 帶入量對照後，可得知當此菌株之 EPS 為 800ppm 與 600 及 800 ppm 伴隨胰島素作用之下，可增加葡萄糖擬似物之帶入量，且促進肝醣之合成。圖 4-9 F 表示 KT 添加 400~800 ppm 時對於肝醣合成量之影響，無論是否有胰島素協同作用，EPS 於 400~800 ppm 皆可增進合成肝醣量。與葡萄糖攝入量試驗相比對，含有胰島素作用之 400~800 ppm 與無胰島素作用之 600~800 ppm，較能提升 2-NBDG 帶入量且轉換成肝醣貯存。綜合上述六株菌之 EPS 結果，BCRC 16000 EPS 800 ppm 與其他菌株之 EPS 相比，有最佳之肝醣合成相對量。吳 (2011) 研究指出，添加 800 ppm GXM 且伴隨胰島素作用，可提升肝醣合成相對量 3.1 倍，其可能因為純化之多醣，故效用較佳。

在高糖誘導之胰島素阻抗中，添加 400~800 ppm EPS 亦可回復肝醣合成相

對量，其結果如圖 4-10。經 60 mM glucose 及其與胰島素協同作用處理細胞後，可發現與胰島素組相比，含胰島素 800 nM 的 60 mM glucose 之阻抗組肝醣合成量減少 0.6 倍；而無含胰島素組之 60 mM glucose 則下降 0.7 倍。此說明高糖可誘導胰島素阻抗，且進一步影響肝醣合成量。BCRC 12574 EPS 於阻抗態 FL83B 細胞之肝醣合成相對量影響，當與阻抗組相比，於阻抗細胞中添加 400~800 ppm EPS，無論有無胰島素作用，皆可回復其肝醣合成效用(1.4~1.9 倍)；若與正常胰島素組相比，經 800 ppm 有無胰島素作用下，皆可回復甚至提升其合成量 (1.1 及 1.2 倍)。此結果與阻抗態之 2-NBDG 帶入量相呼應。圖 4-10 B 為 BCRC 14759 之 400~800 ppm 於阻抗細胞中肝醣合成之效用。結果與阻抗組及正常胰島素組相比，無論是否有胰島素共乘作用，皆可促進其肝醣合成相對量 (1.4~2.1 倍及 1.2~1.8 倍)。此結果與 2-NBDG 於阻抗態細胞之帶入量結果相呼應。BCRC 14691 於阻抗之肝醣合成相對量之結果中，與阻抗組相比，無論是否有胰島素協同作用，不同濃度皆可回復合成肝醣之效用(1.5~1.9 倍)；若與正常胰島素相比，600 及 800 ppm 與含胰島素之 400~800 ppm EPS 皆可促進其合成量(1.1~1.3 倍)。BCRC 16000 EPS 於阻抗模式下肝醣合成量之影響為圖 4-10 D，600 及 800 ppm 與 400~800 ppm 含胰島素協同作用之 EPS，與正常胰島素相比皆可提升肝醣合成量(1.3~1.7 倍)；若與阻抗組相比，不同濃度皆可在有無胰島素作用下增進其合成量(1.6~2.6 倍)。LDB 4-2 其添加 EPS 400~800 ppm 於阻抗細胞中(圖 4-10 E)，無論是否含有胰島素作用下，皆比阻抗組顯著增加肝醣合成量(1.3~2 倍)；若與正常胰島素組相比較，600 及 800 ppm 有無胰島素協同作用與含胰島素之 400 ppm EPS 可回復肝醣合成作用(1.2~1.4 倍)。圖 4-10 F 為 KT 400~800 ppm 對阻抗態細胞之合成量影響，結果與阻抗細胞 2-NBDG 帶入量相呼應，與正常胰島素及阻抗組相比，不同濃度與有無胰島素作用之下，皆可回復甚至提升其合成量(1.1~1.5 及 1.6~2.2 倍)。綜合上述六株菌之 EPS 結果，BCRC 16000 於 800 ppm 及胰島素作用下，比阻抗組增加 2.6 倍之肝醣合成量，此結果優於其他菌株之 EPS。吳(2011) 指出，含胰島素之 400 及 800 ppm GXM，可改善阻抗態細胞之肝醣量(2.5 及 3.3 倍)。多醣可能是主要催化肝醣合成酵素 GS，其活性主要透過 PI3K 的下游激酶 PKB (Akt)及 aPKC 之磷酸化來活化肝醣合成激酶 (glycogen synthase kinase 3; GSK3)，促進肝醣合成(Cross *et al.*, 1995;Yang *et al.*, 2004)。

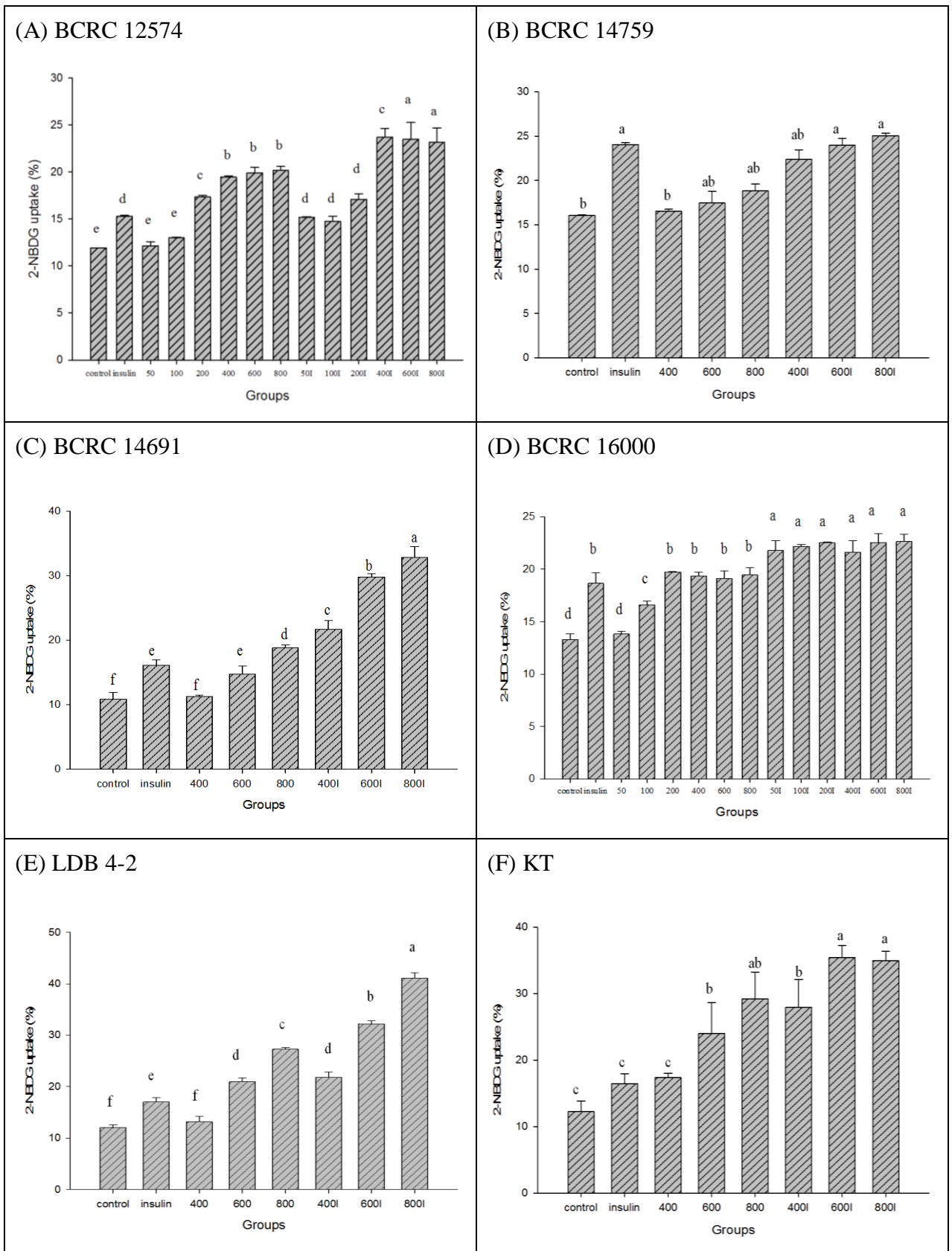


圖 4-7 不同菌株之多種 EPS 濃度處理正常態 FL83B 的 2-NBDG 攝入量影響

Fig 4-7. 2-NBDG uptake of FL83B cell via EPS concentration of various strains

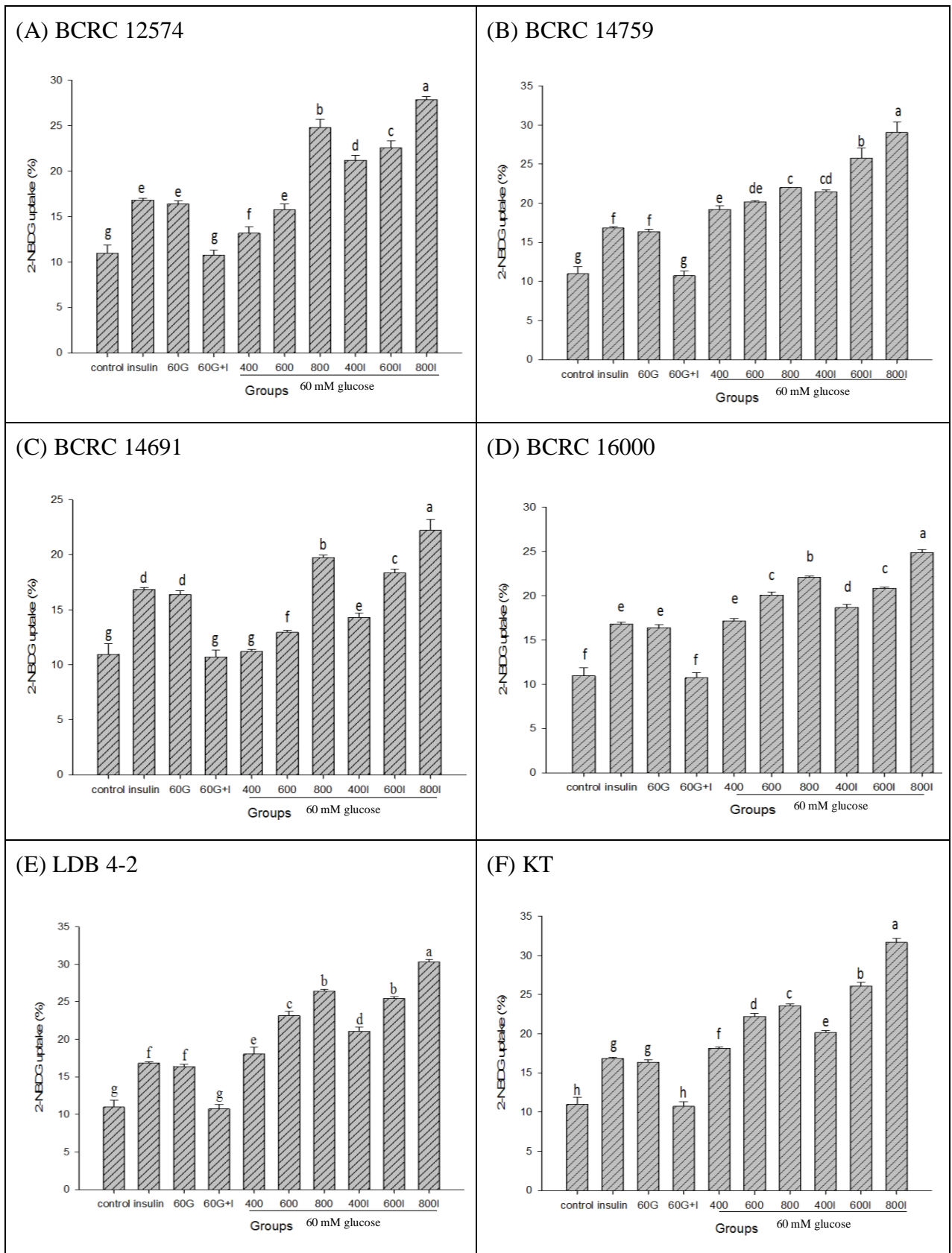


圖 4-8 不同菌株之多種 EPS 濃度處理抗拒態細胞的 2-NBDG 攝入量影響

Fig 4-8. 2-NBDG uptake of insulin resistance FL83B cell via EPS concentration of various strains

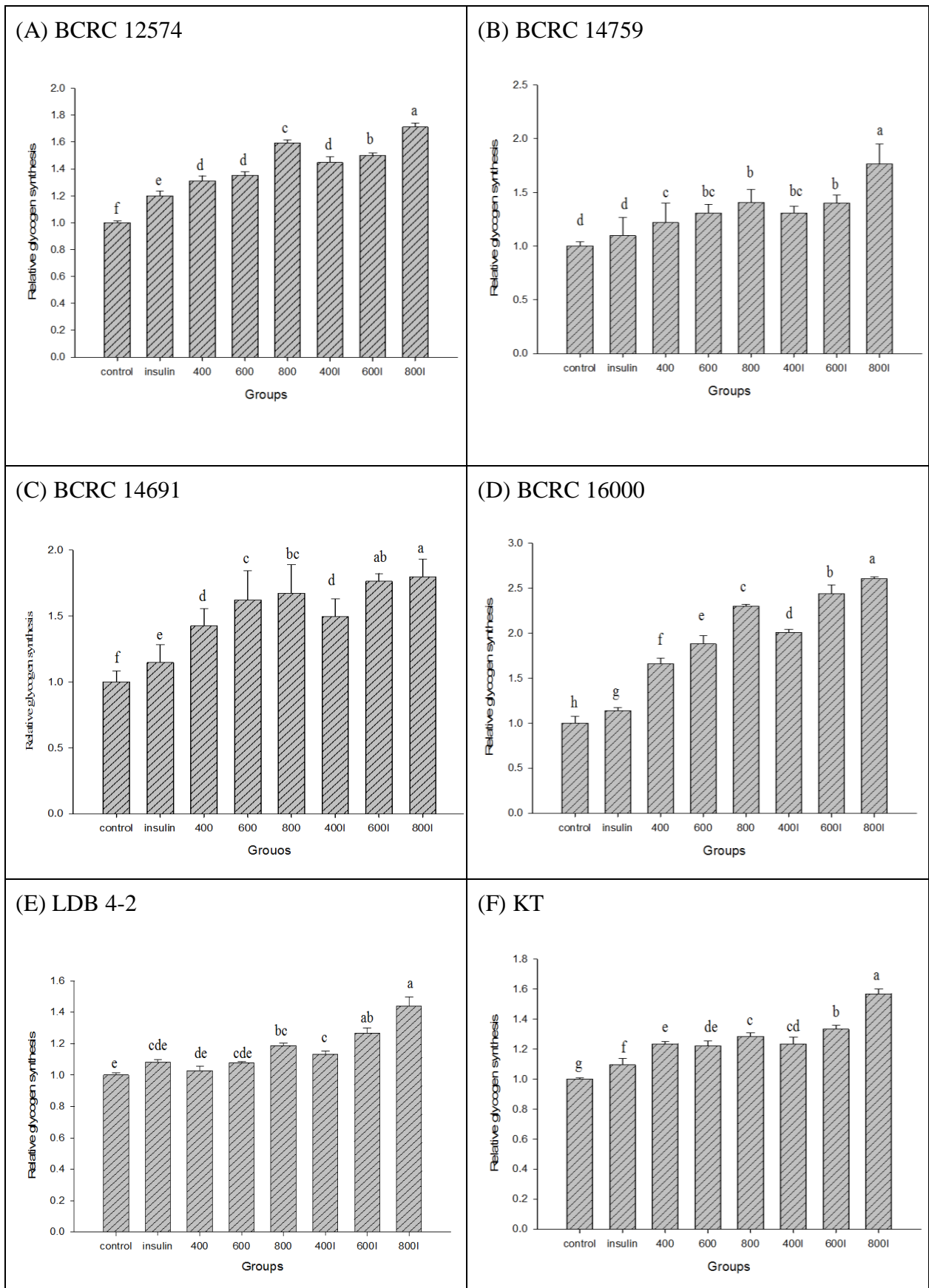


圖 4-9 不同菌株之多種 EPS 濃度處理正常態細胞的肝糖合成量影響

Fig 4-9. Glycogen synthesis of FL83B cell via EPS concentration of various strains

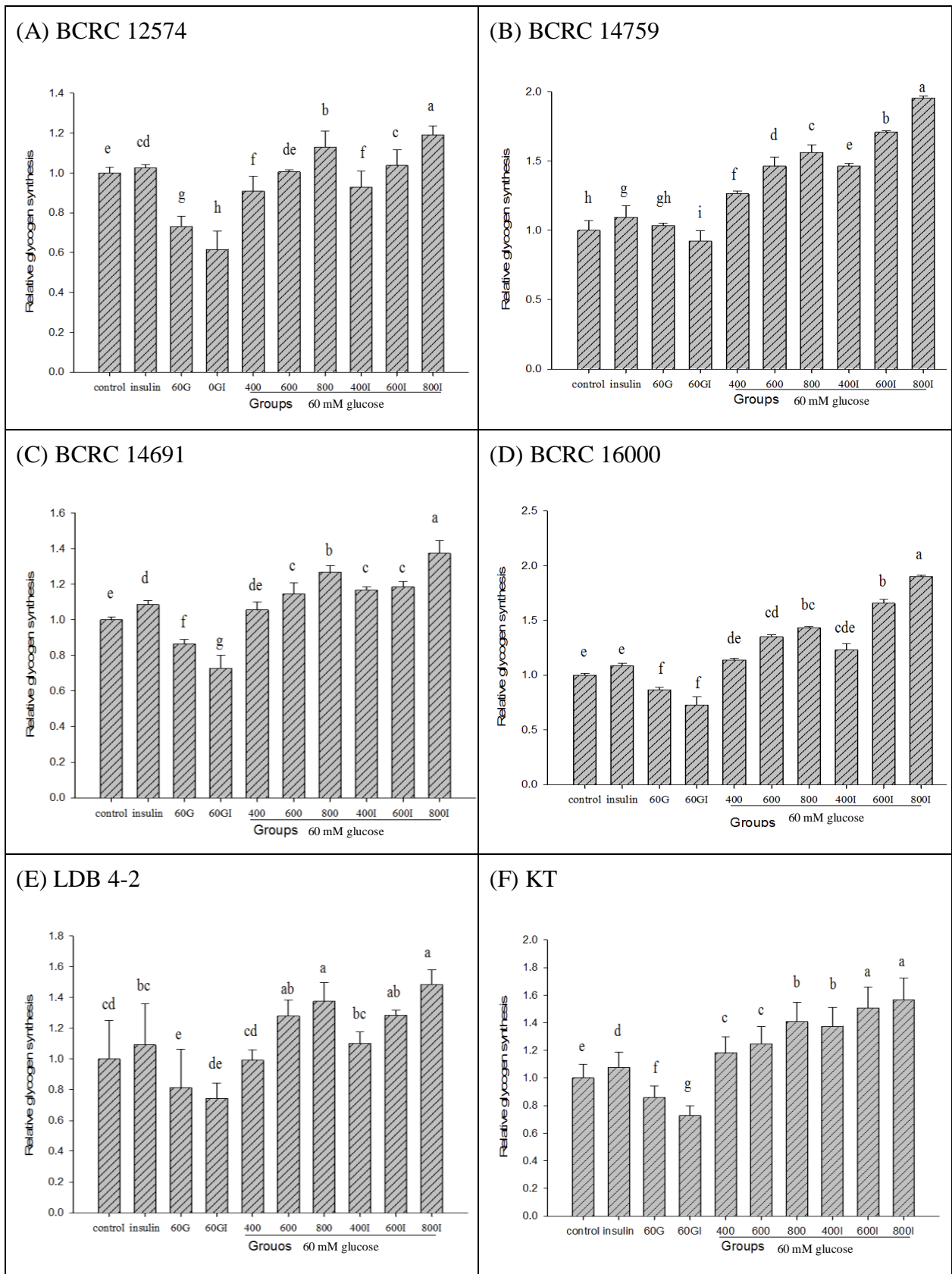


圖 4-10 不同菌株之多種 EPS 濃度處理阻抗態細胞的肝糖合成量影響

Fig 4-10. Glycogen synthesis of insulin resistance FL83B cell via EPS concentration of various strains

伍、結論

本研究主要分為兩大部分，一部分為乳酸菌 EPS 產量之生長條件分析，另一則為藉由細胞模式探討 EPS 影響 2-NBDG 及肝醣合成量之效果。由 24 株乳酸菌篩選出六株高 EPS 產量之乳酸菌進行後續生成 EPS 之條件探討。當額外添加葡萄糖時，KT、LDB 4-2、BCRC 12574、14759、16000 及 14691 皆會促進 EPS 之生成。而在不同培養時間下，此六株菌皆會因培養時間過久而使 EPS 產量變低。於不同初始 pH 中，主要會於 pH 5.5 有高產量，但亦有菌株為 pH 7 有最佳產量。可能是因為維持中性偏酸的 pH 值因為延長了菌株生長對數的時間，且其也可能造成較長的生長平穩期，而降低的肽聚糖(peptidoglycan)及胞壁酸(teichoic acids)之合成，進而使胞外多醣產量增加。pH 5 亦可能為 EPS 水解酶的最適作用 pH 值，故會使 EPS 被水解使偵測量減低。當培養於不同溫度中，此六株皆有不同結果，但皆在非 37°C 有較佳之產量。萃取於同 37°C 發酵此六株菌 48 h 之 EPS，並經 GPC 分子篩檢測發現此六株菌株 EPS 分子量介於 850~1200 kDa 之間。並將其應用於正常態及阻抗態細胞中，探討其 2-NBDG 及肝醣合成量。此六株菌皆可提升 2-NBDG 及肝醣合成量，其結果由 KT、LDB 4-2 及 BCRC 16000 尤佳。但其影響路徑及相關蛋白，須再進一步研究，期能更確立其具調節血糖之功效。

陸、參考文獻

<http://minori-lab.com/> 株式会社 農 (Minori.Inc)

- 丁懷謙。2000。益生菌與胃腸保健功效。食品工業 32(10):1-7。
- 王舒徽。2000。原生菌之機能性簡介。食品工業 32(7):41-51。
- 丘志威、吳定峰。2004。食品微生物精要。藝軒圖書出版社。
- 朱燕華。2011。代謝症候群。食品工業期刊 43(6): 1-2。
- 朱燕華。2011。飲食與代謝症候群之相關性。食品工業 43(6):1-9。
- 佐佐木隆。1998。乳酸菌生物技術之進展。生物產業。9(4):227-233。
- 何橈通。糖尿病與公共衛生。臨床醫學。1986。17: 300-317。
- 吳青蓉。2011。黃金銀耳酸性多醣對 FL83B 小鼠肝臟細胞具胰島素增敏功效。東海大學食品科學所碩士論文。
- 吳淑芬。2008。共軛亞麻油酸的保健功能及其乳酸菌生物轉換。食品工業 40(9):38-49。
- 李清春、張景強、賀稚非。2003。乳酸菌胞外多醣的研究。科技大學學報 32(6): 764-769。
- 李福臨。1989。食品加工上乳酸菌之利用。食品工業 21(12):32-38。
- 李福臨。2000。乳酸菌分類之研究近況。食品工業 32(8):36-42。
- 林志侯。2010。乳酸菌載體表現系統之研究現況與趨勢。食品生技期刊 20:29-36。
- 林佩璇。2006。醣類之添加對乳酸菌胞外多醣生成之研究。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
- 林富美。2004。乳酸菌與免疫調節作用。食品工業 36(3):16-26。
- 林富美。2008。乳酸菌胞外多醣之生產與生理功能。食品工業 40(9):21-28。
- 林進丁。胰島素。藥學雜誌。1986。2: 57-63。
- 邱雪惠。2008。乳酸菌胞外多醣之免疫調節特性。食品工業 40(9):29-37。
- 施智源、黃怡文、黃芳亮。2009。益生菌的臨床應用：文獻回顧。感染控制雜誌 19(3):182-188
- 胡智柏。2007。口服降血糖製劑與天然調控血糖物質。食品工業 34(6): 19-37。
- 張郁瑩、李保宏、潘子明。紅麴代謝產物對肝細胞胰島素阻抗之改善效應。台灣農業化學與食品科學期刊 49(2): 82-88。

- 陳秀雯。2011。糖脂毒性。食品工業 43(8): 1-2。
- 陳秀雯。2011。糖脂毒性對免疫反應的影響。食品工業 43(8): 45-55。
- 陳炎祥。2004。提升免疫力的乳酸菌。科學發展 373: 34-37。
- 陳金柱、李思遠、郭宗正。2006。胰島素阻抗之病理生理學。台灣醫界。49(9): 28-34。
- 陳勁初。1991。以乳酸菌保存食品之機制。食品工業 23(9):17-21。
- 陳建甫、徐美菁、謝昌成、吳克恭。2007。益生菌臨床應用現況。基層醫學 22:290-293。
- 郭昭宏、吳登強。2010。益生菌之最新應用。高雄醫師會誌。18(4):336-338
- 陳倩琪、彭宣融、廖麗玲。2007。基因體研究對乳酸菌機能保健品之產業發展潛力。食品生技 11:52-59。
- 陳國群 (1999) 糖尿病治療藥物。藝軒圖書出版社。第 1-5 頁
- 陳智強。2004。培養條件對乳酸菌胞外多醣生產及抗氧化性之影響。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 陳慶源、林富美。2004。益生菌之保健功效。食品工業 36(3):1-3。
- 陳慶源、黃崇真、邱雪惠、廖啟成。2007。乳酸菌之保健功效與產品開發。食品生技 11:60-68。
- 陳慶源。2004。益生菌治療法。食品工業期刊 36(3): 45-53。
- 陳慶源。2008。傳統發酵食品中乳酸菌之多樣性。食品工業 40(9):5-20。
- 陳慶源。2008。綜論乳酸菌之多元化應用。食品工業期刊 40(9): 1-3。
- 黃加成。1991。乳酸菌之特性與利用。雜糧與畜產。221:21-28。
- 黃美瑩。2006。乳酸菌之保健功效。水試專訊 14:43-45。
- 黃崇真。2004。腸道微生物與益生菌。食品工業。36(3): 4-15。
- 黃惠宇。2006。腸道系統守護神-乳酸菌。科學月刊 37(2):104-107。
- 黃靖堯。2006。台灣酸菜中高胞外多醣益生乳酸菌之篩選與其醃漬液製作酸菜醃蛋可行性之研究。國立中興大學食品暨應用生物科技研究所碩士論文。
- 黃德強、羅凌玉、王麗麗。2011。AMPK 在胰島素信號轉錄通路中的作用。中國細胞生物學學報 33(11): 1220-1229
- 楊政儒。2005。生長溫度與 pH 值對乳酸菌胞外多醣生成影響之研究。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。

- 楊筱姿。2009。乳酸菌胞外多醣體之合成與應用。食品工業 41(9): 52-61。
- 廖啟成。1998。乳酸菌之分類及應用。食品工業 30(2):1-10。
- 劉玉茹。2004。乳酸菌之降血壓研究。食品工業期刊 36(3): 34-44。
- 潘子明。2008。乳酸菌保健食品。國立台灣大學生命科學院微生物與生化學研究所。
- 蔡英傑。1998。乳酸菌與益生菌。生物產業 9(2):98-103。
- 蔡蕙芸。2011。糖質毒性和脂質毒性對胰臟細胞功能之影響。食品工業 43(8):3-19。
- 鄭澄意。老化伴生脂質代謝異常之研究。1992。國防醫學院醫學科學研究所博士論文。
- 顏文俊。1991。腸內菌群與人體健康。食品工業 23(9):46-52。
- Abeer ELS. 2009. Effect of bifidobacterium and lactobacilius acidophilus in diabetic rats. Lecturer of home economic Dept. 2427: 12-18.
- Abu-Lebduh HS and Sreekumaran NK. 1996. Protein metabolism in diabetes mellitus. Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab. 10: 589-601.
- Ahlgren U, Jonsson J and Edlund H.1996.The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice.Development 122:1409-1416.
- Alan RS, and Kahn CR. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 414: 799-806.
- Arunachalam KD. 1999. Role of Bifidobacteria in Nutrition, Medicine and Technology. Nutrition Research. 19:1559-1597.
- Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E and Kaiser N.2009.Glucose Amplifies Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β -Cells via Activation of mTORC1. PLoS ONE 4: e4954.
- Baron V, Kaliman P, Gautier N and Obberghen EV. 1992. The insulin receptor activation process involves localized conformational changes. J. Biol. Chem. 267: 23290-23294.
- Beaugerie L and Petit JC.2004. Microbiol-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhea. Best Pract Res Clin Gastroenterol.18:337-352.

- Bengmark S. 2001. Use of pro-,pre- and synbiotics. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 4:571-579.
- Benno Y, Mitsuoka T, Kanazawa K. 1991. Human fecal flora in health and colon cancer. *Acta. Chir. Scand.* 62:15-23.
- Bernet-Camard MF, Lievin V, Barrassart D, Neeser JR, Servin AL and Hudault S.1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a non bacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Env. Microbiol.* 63:2747-2753.
- Betsi GI, Papadavid E, Falagas ME. 2008. Probiotics for the treatment or prevention of atopic dermatitis: a review of the evidence from randomized controlled trials. *Am J Clin Dermatol.* 9:93-103.
- Bielecka M, Biedrzycka E and Majkowska A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int.* 35: 125-131.
- Bikopoulos G, da Silva Pimenta A, Lee SC, Lakey JR, Der SD, Chan CB, Ceddia RB, Wheeler MB and Rozakis-Adcock M. 2008. Ex vivo transcriptional profiling of human pancreatic islets following chronic exposure to monounsaturated fatty acids. *J Endocrinol.* 196:455-464.
- Biller JA, Katz AJ, Flore AF, Buie TM and Gorbach SL. 1995. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*21: 224-226.
- Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, Kerr-Conte J, Pattou F, Ehse JA, Schuit FC and Donath MY. 2009. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology.* 150:5218-5229
- Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM. 1998. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci* 81: 2103-2110.
- Broadbent JR, McMahon DJ, Oberg CJ and Welker DL, 2001. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *Int. Dairy J.* 11:433-439.

Brown WV and Collins EB.1997. End products and fermentation balances for lactic streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Appl Environ Microbiol.* 33: 38-42.

Brownlee M.2001.Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.*Nature* 414: 813-820

Busch AK, Cordery D, Denyer GS, Biden TJ. 2002. Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic beta-cell function. *Diabetes.* 51:977-987.

Butler AA and LeRoith, D. 2001. Tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*, 142:1685-1688.

Ceriello A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 26:1589-1596.

Cerning J. 1990. Exocellular exopolysaccharides by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 87: 113-130.

Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. 2008. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 9:329-333.

Cheatham B and Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16: 117-138.

Cheng HS, Huang HK, and Chou CH. 2008. A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase. 56: 6853-6843.

Christiansen PS, Madeira AIMR, Edelsten D. 1999. The use of ropy milk as stabilizer in the manufacture of ice cream. *Milchwissenschaft.* 54:138-140.

Collins EB.1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J Dairy Sci.*55: 1022-1028.

De Vuyst L, Vanderveken F, van de Ven S and Degeest B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.*

84:1059-1068.

Degeest B and de Vuyst L. 2000. Correlation of activities of enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3519-3527.

Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A and Ehses JA. 2008 Islet Inflammation in Type 2 Diabetes From metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* 31:Supplement 2 S161-S164

Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. 2009. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*. 24:325-331.

Donath MY, Shoelson SE. 2011 .Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 11:98-107

Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C and Brownlee M. 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 112:1049–1057.

Dueñas M, Munduate A, Perea A and Irastorza A. 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *Int. J. Microbiol.* 87: 113-120.

Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EM, O'Sullivan GC, Shanahan F and Collins JK. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:279-92.

Ehses JA, Lacraz G, Giroix MH, Schmidlin F, Coulaud J, Kassis N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Homo-Delarche F, Donath MY. 2009. L-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 13998-14003

Escalant A, Wachter-Rodarte C, Garcia-Garibay M and Farres A. 1998. Enzymes

involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84:108-114.

Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B and Karasik A. 1993. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.* 268: 26055-26058.

Felley CP, Corthesy-Theulaz I, Rivero JL, Sipponen P, Kaufmann M, Bauerfeind P, Wiesel PH, Brassart D, Pfeifer A, Blum AL and Michetti P. 2001. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. of Gastroenterol & Hepatol.* 13:9-25.

Fooks LJ and Gibson GR. 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 67-75.

Fooks LJ and Gibson GR. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 88:39-49.

Forsen R, Heiska E, Herva E and Arvilommi H. 1987. Immunobiological effect of *Streptococcus cremoris* from cultured milk, "villi", application of human lymphocyte culture techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 5:41-47.

Fuller R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Chapman and Hall. London.

Gancel F and Novel G. 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants. *J. Dairy Sci.* 77: 689-695.

Gao Y. 2010. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* 459:829-39

Gassem MA, Sims KA and Frank JF. 1997. Exopolysaccharides production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Food Sci.* 62:171-173.

Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 124:1401-1412.

Gill HS. 1998. Stimulation of the immune system by lactic cultures. *Int. Dairy J.* 8: 535-544.

Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B,

- Poggioli G, Miglioli M and Campieri M. 2003. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 124:1202-1209.
- Grattepanche F, Audet P and Lacroix C. 2007. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *Int. Dairy J.* 17:123-132.
- Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B. 1997. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem.* 272:30261-30269.
- Grill JP, Cayuela C, Antoine JM and Schneider F. 2000. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 154-156.
- Grobben GJ, Chin-joe I, Kitzen VA, Boels IC, Sikkema J, Smith MR and de Bont JAM. 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1333-1337.
- Guarner F and Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 361:512-9.
- Hariom YMS, Shalini JMS and Sinha PR. 2007. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*. 62-68.
- Harisa GI, Taha EI, Khalil AF and Salem MM. 2009. Oral Administration of *Lactobacillus Acidophilus* Restores Nitric Oxide Level in Diabetic Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3: 2963-2969.
- Havenaar R, Brink BT and Huis In't Veld JHJ. 1992. Selection of strains for probiotics. In: *Probiotics, The scientific basic*. Fuller R (Ed.), p. 209-222. Chapman & Hall, London, New York.
- Havenaar R. and Huis In't Veld JHJ. 1992. in "The Lactic Acid Bacteria" (B.J.B. Wood ed.) vol.1. pp.151-170.
- Herrera R and Rosen OM. 1986. Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro.

Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. *J. Biol. Chem.* 261: 11980-11985.

Hess SJ, Roberts RF and Ziegler GR. 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *J. of Dairy Sci.* 80: 252-263.

Hirabara SM, Curi R and Maechler P. 2009. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Journal of cellular physiology.* 20: 187-194.

Hirayama K and Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes. Infect.* 2:681-686.

Holzappel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 41:85-101.

Hsu H, Shu HB and Pan MG. 1996. Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-ADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signaling transduction pathways. 84: 299-308.

Huang DW and Shen SC. 2012. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. *Journal of functional foods.* 4: 358-366.

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M. and Manning BD. 2008. The TSC1-TSC2 Complex Is Required for Proper Activation of mTOR Complex 2. *Mol. Cell. Biol.* 28:4104-4115

Iyer VV, Yang H, Ierapetritou MG and Roth CM. 2010. Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism. *Biotechnol Bioeng.* 107:347-356

Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G and Poitout V. 2000. Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism.* 49: 532-536.

Jalonen T, Isolauri E, Heyman M, Crain-Denoyelle AM, Sillanaukie P and Koivula T. 1991. Increased beta-lactoglobulin absorption during rotavirus enteritis in infants:

relationship to sugar permeability. *Pediatr Res.*30:290-293.

Kampman E, Goldbohm RA, van den Brandt PA and Van't Veer P. 1994. Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Res.* 54: 3186-3190.

Kandler O and Weiss N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: Holt, L.G., Sharpe, M.E., Moir NS and Sneath PHA. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 1, pp. 1208-1234.

Kim ST, Kim HB, Lee KH, Choi YR, Kim HJ, Shin IS, Gyoung YS, Joo SS. 2012. Steam-Dried Ginseng Berry Fermented with *Lactobacillus plantarum* Controls the Increase of Blood Glucose and Body Weight in Type 2 Obese Diabetic db/db Mice. *J Agric Food Chem.* 60:5438-5445

Kimmel SA, Roberts RF and Ziegler GR. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 659-664.

Kitazawa H, Itoh T, Tomioka Y, Mizugaki M and Yamaguchi T. 1996. Induction IFN-g and IL-1 a production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*. *Int. J. Food Microbiol.* 31:99–106.

Klaver FAM and Meer VD. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120-1124.

Kontusaari S and Forsen R. 1988. Finnish fermented milk “*viili*”: involvement of two cell surface proteins in production of slime by *Streptococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 71: 3197-3202.

Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *Int. Dairy J.* 13: 3-13.

Kroder G, Bossenmayer B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Muhlhofer A, Berti L, Horikoshi H, and Ullrich A. 1996. Haring, H. Tumor necrosis factor-alpha and hyperglycemia-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 97: 1471-1477.

Landon J. 1976. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann Rev Microbiol.* 30: 279-301.

Lee CC, Hsu WH, Shen SR, Cheng YH and Wu SC. 2012 Fagopyrum tataricum (Buckwheat) Improved High-Glucose-Induced Insulin Resistance in Mouse Hepatocytes and Diabetes in Fructose-Rich Diet-Induced Mice. *Experimental Diabetes Research*.

Leibowitz G, Ferber S and Apelqvist A. 2001. IPF1/PDX1 deficiency and beta-cell dysfunction in *Psammomys obesus*, an animal with type 2 diabetes. *Diabetes*. 50:1799-1806

Lin CL and Lin JK. 2008. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res*. 52:930-939.

Lin TY and Chein MFC. 2005. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food chemistry*. 100: 1419-1423.

Ling WH, Korpela R, Mykknen H, Salminen S. and Henninen O. 1994. Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J. Nutr*. 124: 18-23.

Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH and Pan TM. 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. *J Sci Food Agric*. 91:2284-2291

Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T and Hugenholtz J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64: 71-80.

Lourens-Hattingh A and Vilijoen BC. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J*. 11: 1- 17.

Low D, Ahlgren JA, Horne D, McMahon DJ, Oberg CJ and Broadcent JR. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol*. 64:2147-2151.

Luiking YC, Engelen MP and Deutz NE. 2010. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13:97-104

Lye HS, Chiu YK, Joo AE, Wai YF and Min TL. 2009. The improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and

- Phytoestrogens. *Int. J Mol. Sci.* 10: 3755-3775.
- Madsen-Bouterse SA and Kowluru RA. 2008. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.* 9: 315-327.
- Maija S, Soile T and Willem M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology.* 16: 204-211.
- Majamaa H and Isolauri E. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*99:179-85.
- Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M and Vesikare T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 20: 333-338.
- Marco ML, Pavan S and Kleerebezem M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Biotechnology.* 17: 204-210.
- Marshall VM and Rawson HL. 1999. Effects of exopolysaccharide- producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34: 137-143.
- Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF and Rambaud JC. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.* 64: 71-79.
- Matsuzaki T and Chin J. 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol.*78:67-73.
- Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S, Uchida K, Hashimoto S and Yokokura T. 1997. Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *APMIS.* 105:637-642.
- Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S, Uchida K, Kato I, Hashimoto S and Yokokura T. 1997. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS* 105:643-649.
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S and Yokokura T. 1997. Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes

mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J.* 44:357-65.

Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Kasuya Y, Yasuda Y, Kamiya H and Hotta N. 2003. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 60:1–9

Moller DE. 2000. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 6: 212-217.

Montes RG, Bayless TM and Perman JA. 1995. Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *J. Dairy Sci.* 78 (8): 1657-1664.

Moroti C, Magri LFS, de Rezende MC, Cavallini DCU and Sivieri K. 2012. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis.* 11: 29

Moule SK and Denton RM. 1997. Multiple signaling pathway involved in the metabolic effects of insulin. *Am J. Cardiol.* 80: 41-49.

Mozzi F, de Giori GS, Oliver G, de Valdez GF. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. *Biotechnol. Lett.* 18:435-439.

Mozzi F, Oliver G, De Giori GS and De Valdez GF. 1995. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft.* 50: 80-82.

Mozzi F, Rollan G, de Giori GS and de Valdez GF. 2001. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharides production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL87. *J. Appl. Microbiol.* 91:160-167.z

Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, LaNoue KF, Robinson KA, Buse MG and Gardner TW. 2001. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 276: 43748–43755

Narusea K, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chayaa S, Komoria T, Katoa K, Kasuyaa Y, Miwaa K, Naruseb K and Hottaa N. 2000. Aldose Reductase Inhibition Prevents Glucose-induced Apoptosis in Cultured Bovine Retinal Microvascular Pericytes. *Experimental Eye Research.* 71:309–315.

- Noh DO and Gilliland SE. 1993. Influence of bile on cellular integrity and β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 76: 1253-1259.
- Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hmlinen P, Ihantola-Vormisto A, Muurasniemi-Isoviita L, Nikkari S, Oksanen T, Prsti I, Salminen E, Siitonen S, Stuckey H, Toppila A and Vapaatalo H. 1990. Prevention of travelers' diarrhea by *Lactobacillus GG*. *Annals of medicine* 22: 53-56.
- Ouwehand AC and Salminen SJ. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749-758.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health.*29: 4-8.
- Parvez S, Malik KA, Kang SA and Kim HY.2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.*100:1171-1185.
- Patel DK, Kumar R, Laloo D and Hemalatha S. 2012.Naturalmedicines from plantsource used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects.*Asian Pacific Journal of Tropical Disease.*2: 239–250
- Patel S, Majumder A and Goyal. A. 2012. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian J Microbiol.* 52(1): 3-12.
- Peradi P and Xu M. 1998. Spiegelman, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. *J. Clin. Invest.* 100: 1863-1869.
- Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF and Spiegelman BM. 1996. Tumor necrosis factor (TNF- α) inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* 271:13018-13022.
- Perry DB, McMahan DJ. and Oberg CJ. 1997. Effect of exopolysaccharide-producing culture on moisture retention in low fat mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 80: 799-805.
- Petry S, Furlan S, Waghorne E, Saulnier L, Cerning J and Maguin E. 2003.

Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiol. Letters.* 221: 285-291.

Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P and Hunter J. 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. *Int Microbiol.*7:59-62.

Poitout V and Robertson RP. 2002. Minireview: Secondary β -Cell Failure in Type 2 Diabetes—A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology*143: 339.

Poitout V and Robertson RP. 2008. Glucolipotoxicity: Fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29:351-366.

Poitout V, Amyota J, Semachea M, Zarroukia B, Hagmana D, Fontésa G. 2010. Glucolipotoxicity of the pancreatic β -cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.*1801: 289–298

Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP and Harmon JS. 2006. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J. Nutr.* 136: 873-876

Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes.*51 Suppl 3:S405-13.

Prentki M, Roduit R, Lameloise N, Corkey BE and Assimacopoulos-Jeannet F. 2001. Glucotoxicity, lipotoxicity and pancreatic β -cell failure: a role for malonyl-CoA, PPAR and altered lipid partitioning. *Can J Diabetes Care* 25: 36-46

Reusch JEB. 2003. Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J. Clin. Invest.* 112:986–988

Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A and Philippe J. Glucose-Induced Preproinsulin Gene Expression Is Inhibited by the Free Fatty Acid Palmitate. *Endocrinology.* 140: 4005-4014

Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilan CG. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 88:843-856.

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J and Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12:163–171.

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J and Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 12:163-171.

Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen S and Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods--the European perspective. *Int J Food Microbiol.* 78:99-117.

Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA and Yolken RH. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 344:1046-1049.

Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA and Yolken RH. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 334: 1046-1049.

Salminen S, Isolauri E and Salminen E. 1996. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 5: 53-56.

Saltiel AR and Kahn CR. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

Samuel VT and Gerald IS. 2012. Mechanisms for insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell.* 148: 852-871.

Sanders ME. 1999. Probiotics. *Food Technol.* 53: 67-77.

Sarrela M, Lahteenmaki L, Crittenden R, Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 78:99-117.

Savaino DA, Abauelanor A, Smith DE and Levitt MD. 1984. Lactose Malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactose-deficiency individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 756-761.

Schaafsma G, Meuling WJA, van Dokkum W and Bouley C. 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 436-440.

Sebastiani H and Zelger G. 1998. Texture formation by thermophilic lactic acid

bacteria. *Milchwissenschaft* 53: 15-19.

Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S, Corkey BE and Prentki M. 1999. Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *AJP – Endo* 277:E521-E528

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. 2002. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51:3391-3399.

Shepherd PR and Khan BB. 1999. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 341: 248-257.

Shoelson SE, Chatterjee S, Chaudhuri M and White, MF. 1992. YMXM motifs of IRS-1 define substrate specificity of the insulin receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(6): 2027-2031.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 116:1793-1801.

Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkänen H and Vesikari T. 1997. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 24:399-404.

Shu CH and Lung MY. 2004. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochem.* 39: 931-937.

Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R and Kirkkola AL. 1990. Effect of *Lactobacillus GG* yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med.* 22:57-59.

Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volumn 2. Williams and Wilkins, Baltimore. USA.

Steer T, Carpenter H, Tuohy K and Gibson GR. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 13: 229-254.

St-Onge MP, Farnworth ER, Jones PJH. 2000. Consumption of fermented and

nonfermented dairy products: Effects on cholesterol concentrations and metabolism. *Am J Clin Nutr* 71: 674-681.

Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M, Hosono A. 2003. Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67:1421-1424.

Tallon R, Bressollier P and Urdaci MC. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. in Microbiol.* 154: 705-712.

Thakur CP and Jha AN. 1981. Influence of milk, yogurt, and calcium on cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 30: 211-215.

Toda K, Gotoh Y, Asakura T, Yabe I and Furuse H. 2000. Fluid viscosity of *Aureobasidium pullulans* cultures obtained at two different initial pH values. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 258-261.

Torino MI, Hébert EM, Mozzi F, de Valdez GF. 2005. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in an adenine- supplemented chemically defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 99:1123-1129.

Torino MI, Taranto MP, Sesma F and Font de Valdez G. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 in response to environmental pH. *J. Appl. Microbiol.* 91: 846-852.

Tracey KJ, Cerami A. 1993. Tumor necrosis factor, and other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:317-343.

Tremblay F and Marette A. 2001. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70S6 kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276:38052-38060.

Tuinier, R., van Casteren, W. H. M., Looijesteijn, P. J.,

Tuomola E, and Salminen S.J. 1998. Adhesion of some probiotics and dairy *Lactobacillus* strain to Caco-2 cell culture. *International Journal of Food Microbiology.* 41: 45-51.

Unger RH and Grundy S. 1985. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for

the management of diabetes. *Diabetologia*. 28:119-21.

Unger RH. 1995. Diabetes. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 44:863-70.

van den Berg DJC, Robijn GW, Janssen AC, Giuseppin MLF, Vreeker R, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Ledebroer AM and Verrips CT. 1995. Production og novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2840-2844.

van Raalte DH, van der Zijl NJ and Diamant M. 2010 .Pancreatic steatosis in humans: cause or marker of lipotoxicity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13:478-85.

Vandana S. 2010. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 59(3): 68-75.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. 1995 .Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell. Biol* 5: 392-399.

Vincent SJ, Faber EJ, Neeser JR, Stinglel F and Kamerling JP. 2001. Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiol.* 11: 131-139.

Vinderola G, Perdigón G, Duarte J, Farnworth E and Matar C. 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*. 36:254-260.

Walling E, Dols-Lafargue M, Lonvaud-Funel A. 2005. Glucose fermentation kinetics and exopolysaccharide production by ropy *Pediococcus damnosus* IOEB8801. *Food Microbiol.* 22:71-78.

Wu MH, Pan TM, Wu YJ, Chang SJ, Chang MS and Hu CY. 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *Int J Food Microbiol.* 144:104-110

Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshidat K, Hiramatsu A, Lwatsuki K, Kokubo S and Hosono A. 2003. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J. Nutr.* 133:100-106.

Dairy Sci. 86: 2452-2461.

Xie W and Du L. 2011. Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines. *Diabetes Obes Metab.* 13:289-301.

Yadav H, Jain S and Sinha PR. 2007 .Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition.* 23:62-68.

Yamano T, Tanida M, Nijjima A, Maeda K, Okumura N, Fukushima Y and Nagai K. 2006. Effects of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on autonomic nerves and blood glucose in rats. *Life Sci.* 79:1963-1967

Yuksekdag ZN and Aslim B. 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian archives of biology and technology.* 51: 581-585.

Yun H, Lee JH, Park CE, Kim MJ, Min BI, Bae H, Choe W, Kang I, Kim SS and Ha J. 2009. Inulin increases glucose transport in C2C12 myotubes and HepG2 cells via activation of AMP-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *J Med Food.* 12:1023-8.

Yun SI, Park HO and Kang JH. 2009. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of Applied Microbiology.* 107: 1681-1686.

Ziemer CJ and Gibson G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8: 473-479.

Zierath JR and Kawano Y . 2003. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17: 385-398.

Zommara M, Tachibana N, Sakono M, Suzuki Y, Oda T, Hashiba H. and Imaizumi K. 1996. Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats. *Nutr. Res.* 2: 293-302

Zourari A, Accolas JP and Desmazeaud MJ. 1992. Metabolism and biochemical

characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*. 72:1-34.

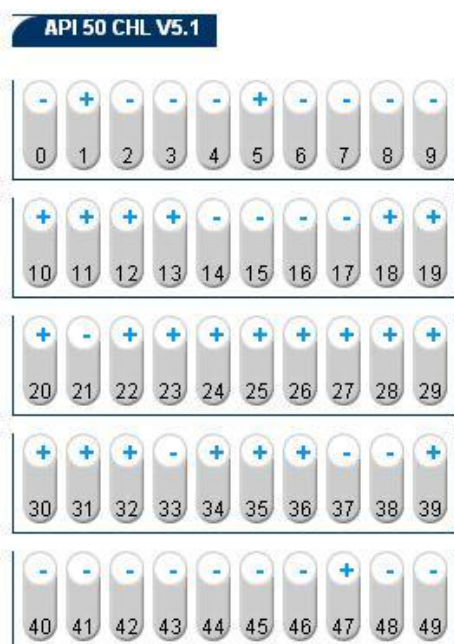
Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R and Boccio J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res.* 21:569–579.

柒、附錄

附錄一、KT 定序之序列

GTCCTCGAGCGCGCTATCATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTG
CTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGT
GGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGAAACACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTA
TCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTA
CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA
CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTC
GGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTC
AGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAA
GAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGT
GTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTGGGGA
CATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAG
TTGGGCACTCTGGTGAGACTCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAGCCAT
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTACACCATGGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAA
CCTTTTAGGAACCAGCCGCCA

附錄二、鑑定 KT 藉由 API 套組

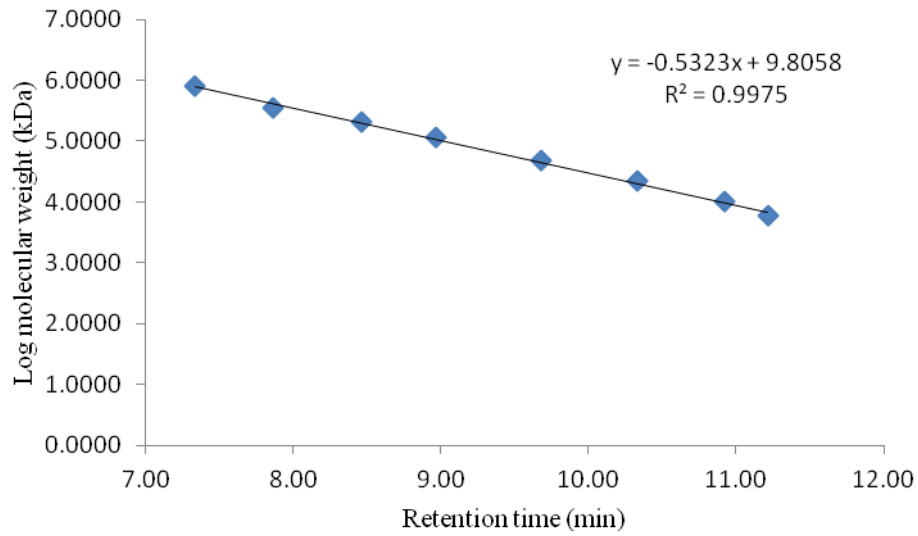


REFERENCE DATE
 KT 5/25/11
 COMMENT

VERY GOOD IDENTIFICATION						
Strip	API 50 CHL V5.1					
Profile	- - - - + - - - + + + - - - + - - - - - - - - - -					
Note						
Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus plantarum 1	99.9	0.63	GLY	1%	AMD	7%

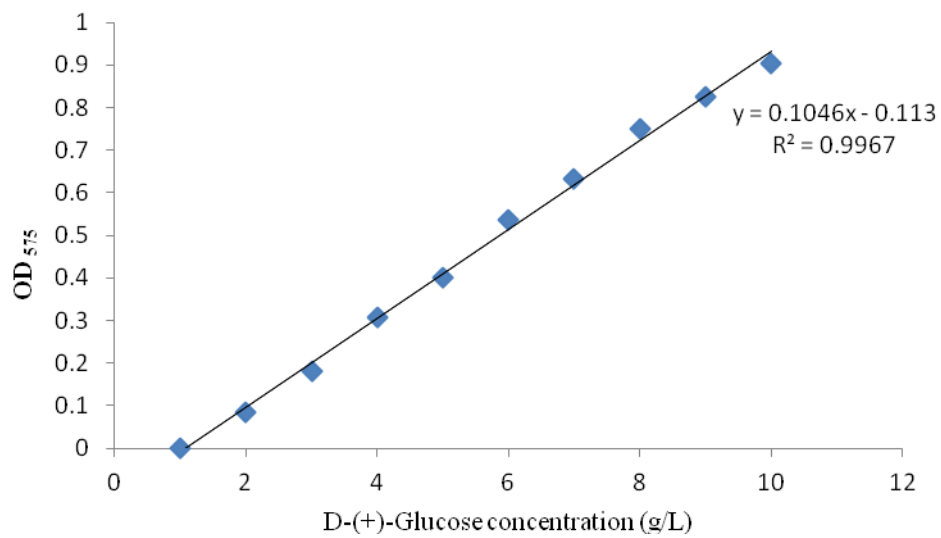
此株菌發酵之醣類為下

- Glycerol, Ribose, Galactose,
- D-Glucose, D-Fructose,
- D-Mannose, Mannitol, Sorbitol,
- αMethyl-D-mannoside,
- α Acetyl glucosamine, Amygdaline,
- Arbutine, Esculine, Salicine, Coilobiose,
- Maltose, Lactose, Melibiose, Saccharose,
- Trehalose, Melezitose, D-Raffinose, Amidon,
- Glycogene, Xylitol, βGentiobiose, Gluconate



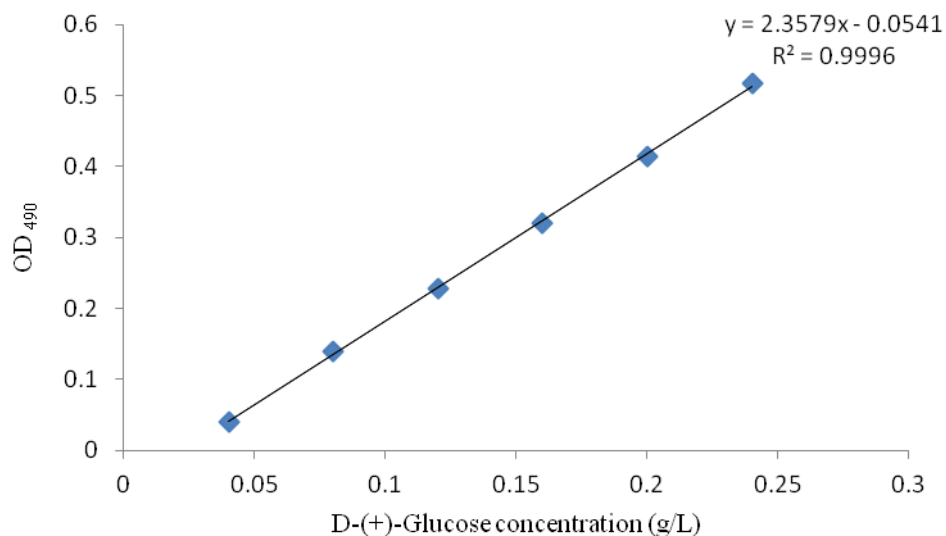
附錄三、多醣分子量之標準曲線

Appendix 3. Standard curve of pullulan.



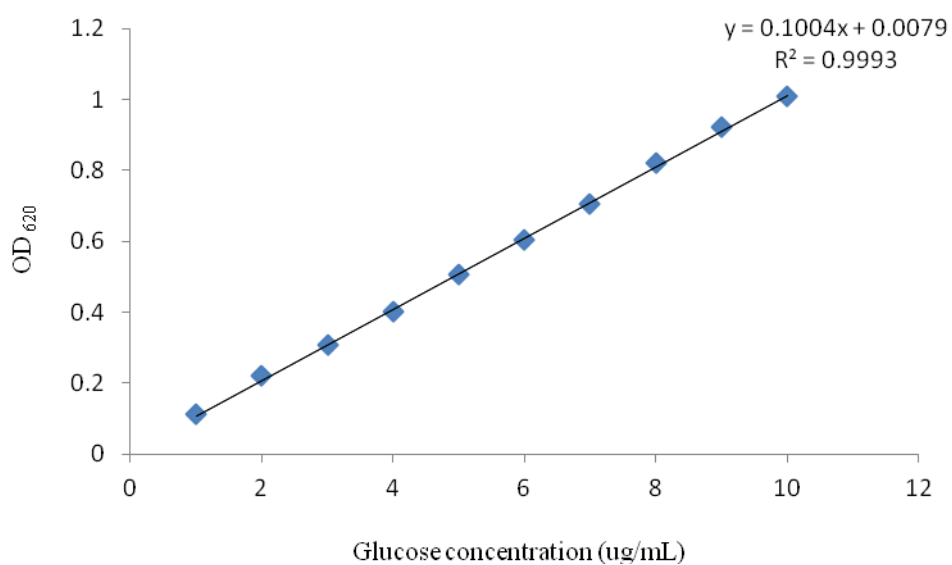
附錄四、DNS 法之標準曲線

Appendix 4. Standard curve of DNS method.



附錄五、酚硫酸法之標準曲線

Appendix 5. Standard curve of phenol-sulfuric acid method.



附錄六、蒽酮法之標準曲線

Appendix 6. Standard curve of anthrone assay.