



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201113379 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：098134914

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12P19/04 (2006.01)

C12R1/225 (2006.01)

(71)申請人：財團法人食品工業發展研究所(中華民國) FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE (TW)

新竹市食品路 331 號

(72)發明人：黃崇真 HUANG, TSUNG CHEN (TW)；陳慶源 CHAN, HING YUEN (TW)；萬詩韻 WANN, SHY YUNN (TW)；林富美 LIN, FU MEI (TW)；李福臨 LEE, FWULING (TW)；廖啟成 LIAO, CHII CHERNG (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：4 共 52 頁

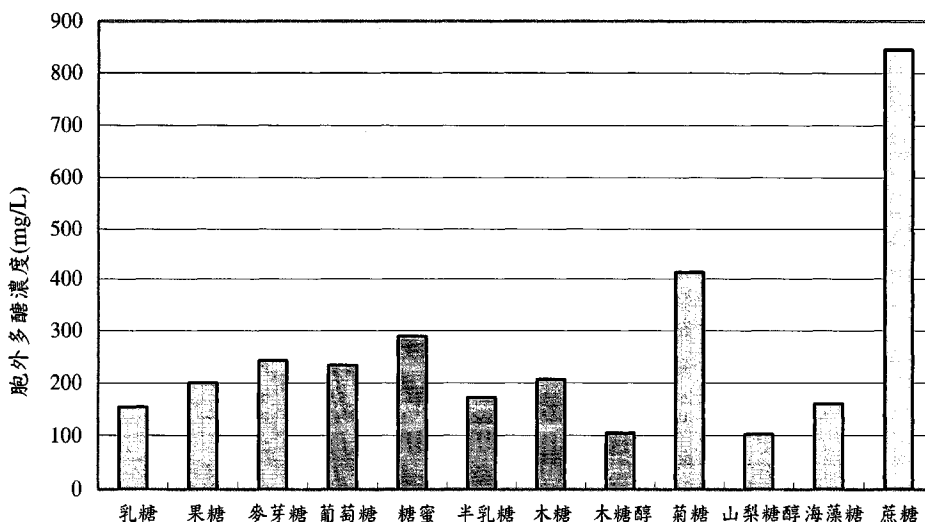
(54)名稱

生產胞外多醣的方法以及一新穎的乳酸小球菌分離株

METHODS FOR PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDES AND A NOVEL PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI ISOLATE

(57)摘要

本發明揭示一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株培養於一適於該菌株生長的培養基中。本發明亦揭示一株具有高胞外多醣-生產能力(high exopolysaccharide-producing ability)的新穎乳酸小球菌 05B0111(Pediococcus acidilactici 05B0111)，它是以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，以及以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株 (a strain of *Pediococcus acidilactici*) 培養於一適於該菌株生長的培養基中。本發明亦有關於一株具有高胞外多醣-生產能力 (high exopolysaccharide-producing ability) 的新穎乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 05B0111，它以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心 (Biosource Collection and Research Center of the Food Industry Research and Development Institute)，以及以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)。

【先前技術】

胞外多醣 (exopolysaccharides 或 extracellular polysaccharides, EPS) 是由微生物所分泌的巨分子 (macromolecules)，它們一般被分類為：(1) 莢膜 EPS (capsular EPS)，可形成一被鬆散地附著於細胞表面的黏液層 (slime layer)；以及 (2) 未附著的 EPS (unattached EPS)，可被分泌至細胞外的環境中。

乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 是屬於一般被公認為安全的 (generally recognized as safe, GRAS) 並且是為人所熟悉與廣泛使用的益生菌 (probiotics)。已知部分的乳酸菌具有

生產胞外多醣的能力，而這些會生產 EPS 的 LAB (EPS-producing LAB) 大多數是屬於鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、乳桿菌屬 (*Lactobacillus*)、乳球菌屬 (*Lactococcus*)、白念珠球菌屬 (*Leuconostoc*) 以及小球菌屬 (*Pediococcus*) (Petronella J. Looijesteijn *et al.* (1999), *Applied and Environmental Microbiology*, 65:5003-5008 ; T. Smitinont *et al.* (1999), *International Journal of Food Microbiology*, 51:105-111 ; Patricia Ruas-Madiedo *et al.* (2007), *Applied and Environmental Microbiology*, 73:4385-4388)。此外，某些雙叉桿菌屬 (*Bifidobacterium*) 的菌株 (strains) 也被顯示能夠生產胞外多醣 (P. Ruas-Madiedo and C. G. de los Reyes-Gavilán (2005), *J. Dairy Sci.*, 88:843-856)。

一般而言，乳酸菌所生產的胞外多醣可被區分為下面兩大類別：

1. 同元多醣 (homopolysaccharides, HoPS)，它是由單一類型的單醣 (monosaccharide) 所構成。HoPS 包括 α -聚葡萄糖 (α -glucans) [例如葡聚糖 (dextran)]、 β -聚葡萄糖 (β -glucans) 以及聚果糖 (fructans) [例如左聚醣類型 (levan-type) 與菊糖類型 (inulin-type)]；以及
2. 異元多醣 (heteropolysaccharides, HePS)，它是由包含有不同單醣的重複單元 (repeating units) 所構成。HePS 的重複單元通常是由 3 至 8 個單醣所形成並且大多數是含有 D-葡萄糖 (D-glucose)、D-半乳糖 (D-galactose) 以及 L-鼠李糖 (L-rhamnose)。在少數的例子中，HePS 包含有

N-乙醯葡萄糖胺糖(N-acetylglucosamine)、N-乙醯半乳糖(N-acetylgalactosamine)、海藻糖(fucose)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid)以及非醣類取代基(例如磷酸、乙醯基以及甘油)。

乳酸菌所生產的胞外多醣可賦予食品特殊的流變特性(rheological properties)與質地(texture)，因此在食品產業中常被用來作為增稠劑(viscosifiers)、安定劑(stabilizer)、乳化劑(emulsifiers)以及膠凝劑(gelling agents)。此外，乳酸菌所生產的胞外多醣已被證實具有許多有益於宿主(host)健康的功效，例如：降低膽固醇、調節免疫活性以及抗腫瘤等。基於上述的有利生物活性，乳酸菌所生產的胞外多醣已在各種產業上被廣泛地利用。

胞外多醣在細菌中的產量通常很低且又不穩定，為了因應產業界對於胞外多醣的廣大需求，現今有許多的研究人員致力於探討各種會影響乳酸菌的胞外多醣生產率(productivity)的因素，以期發展新的培養技術來提高胞外多醣的產量。例如，Petronella J. Looijesteijn 等人提到：菌株、培養條件以及培養基組成(medium composition)會影響由一特定物種所生產之微生物 EPS 的數量，而碳源的類型在 EPS 生產率上具有一巨大的影響力而且可能也會影響到 EPS 的組成。Petronella J. Looijesteijn 等人進一步提到：戴白氏乳桿菌保加利亞亞種(*Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*) NCFB 2772 使用葡萄糖作為碳源所生產的 EPS 要比使用果糖超出 3 倍，而乳酪白乳桿菌(*Lactobacillus*

casei) CG11、鼠李糖乳桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) C83 以及唾液鏈球菌嗜熱亞種 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) 所生產的 EPS 的產率 (yield) 也都明顯地受到碳源影響 (Petronella J. Looijesteijn *et al.* (1999), 同上述)。

P. Ruas-Madiedo 以及 C. G. de los Reyes-Gavilán 提到：乳酪乳桿菌 CRL87 在半乳糖中所生產的 EPS 要比在葡萄糖中高出 1.7 倍，而乳酸乳球菌乳脂亞種 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) B40 在葡萄糖中要比在果糖中能夠生產更高數量的 EPS (P. Ruas-Madiedo and C. G. de los Reyes-Gavilán (2005), 同上述)。而 T. Smitinont 等人報導：2 株由傳統泰式食物中所分離出的戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) AP-1 與 AP-3 能夠以高產率來生產 EPS，這 2 株分離株在含有 2% 蔗糖作為碳源的液態培養基中所生產的 EPS 數量分別為 6.0 以及 2.5 g/L (T. Smitinont *et al.* (1999), 同上述)。

此外，在小球菌屬的已知物種中，有害片球菌 (*Pediococcus damnosus*)、小片球菌 (*Pediococcus parvulus*) 以及戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 已被報導具有生產胞外多醣的能力 (Maite Dueñas *et al.* (2003), *International Journal of Food Microbiology*, 87:113-120; S. Velasco *et al.* (2006), *International Journal of Food Microbiology*, 111:252-258; T. Smitinont *et al.* (1999), 同上述)。然而，就申請人所知，迄今尚無任何文獻或專利前案曾經揭示乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 具有胞外多醣-生產能力而能夠實

際應用於產業界中。

經研究，申請人意外地發現乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 具有胞外多醣-生產能力 (exopolysaccharide-producing ability)。特別地，申請人從發酵食品中篩選出一株乳酸小球菌分離株 (isolate)，它在種系上 (phylogenetically) 是不同於所屬物種中已公開的菌株，並且具有極為優異的胞外多醣-生產能力，因而被預期可供用於大量生產胞外多醣。

【發明內容】

發明概要

於是，在第一個方面，本發明提供一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株培養於一適於該菌株生長的培養基中。

在第二個方面，本發明提供一種含有胞外多醣的乳酸小球菌培養物 (*Pediococcus acidilactici* culture containing exopolysaccharide)，它是藉由一如上所述的方法而被製得。

在第三個方面，本發明提供一種藥學組成物，其包含有一如上所述的乳酸小球菌培養物，以及選擇性地一藥學上可接受的載劑。

在第四個方面，本發明提供一種食品產品，其包含有一如上所述的乳酸小球菌培養物。

特別地，經由菌株篩選以及胞外多醣-生產能力的評估，申請人發現一株新穎的乳酸小球菌分離株，它具有極為優異的胞外多醣-生產能力。

因此，在第五個方面，本發明提供一種乳酸小球菌 05B0111，它以寄存編號(accession number) BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，以及以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)。

本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯。

發明的詳細說明

要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有 (comprising)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括 (comprises)”具有一對應的意義。

除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。

乳酸菌 (lactic acid bacteria) 是一種被公認為安全的並且為大眾所熟悉與廣泛使用的益生菌 (probiotics)，它們已被證

實具有許多有益於宿主(host)健康的功效，而它們所生產的胞外多醣在各種不同的產業上均具有極高的利用價值。為了能夠在產業上大規模地生產胞外多醣，申請人嘗試從乳酸菌當中找出具有高胞外多醣-生產能力 (high exopolysaccharide-producing ability) 的乳酸菌分離株來因應產業界對於胞外多醣的需求。

於是，申請人以市售的發酵食品作為乳酸菌分離株的分離來源並從中初步篩選出 26 株具有胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株 (Lactic acid bacteria isolates)，而經由對這 26 株乳酸菌分離株進行 16S rDNA 序列分析發現到：有 5 株乳酸菌分離株在種系上 (phylogenetically) 是歸屬於乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。特別地，申請人藉由胞外多醣-生產能力以及種系新穎性 (phylogenetic novelty) 的評估發現到：在該 5 株乳酸小球菌分離株中，乳酸小球菌 05B0111 具有最佳的胞外多醣-生產能力並且是一株新穎的乳酸小球菌分離株。該乳酸小球菌 05B0111 已於民國 98 年 02 月 10 日以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心。這株分離株亦有依據布達佩斯條約 (the Budapest Treaty) 的規定，於西元 2009 年 03 月 05 日以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司。

於是，本發明提供一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株培養於一適於該菌株生長的培養基中。

如此處所用的，術語“培育(cultivation)”、“培養(culturing)”以及“發酵(fermentation)”可被交換地使用。

較佳地，該乳酸小球菌菌株是本發明的乳酸小球菌 05B0111 或其繼代培養後代(sub-cultured offspring)。

依據本發明，適用於培養乳酸小球菌的培養基是熟習此項技藝者所熟知的。例如，該培養基可以是一合成培養基(synthetic medium)或一可食性材料(edible material)。

依據本發明，適用於本發明的合成培養基包括，但不限於 MRS 肉湯培養基(MRS broth)。

依據本發明，適用於本發明的可食性材料包括，但不限於：流體乳品(fluid milk products)，例如牛奶；濃縮牛奶(concentrated milk)；奶粉(milk powder)；果汁(fruit juices)；豆奶(soybean milk)；蔬果汁(vegetable-fruit juices)；健康食品(health foods)；動物飼料(animal feeds)；農產品(agricultural products)；畜產品(livestock products)；水產品(aquatic products)；以及機能性素材(functional ingredients)。在本發明的一個較佳具體例中，該可食性材料是牛奶。在本發明的另一個較佳具體例中，該可食性材料是柳丁原汁。在本發明的又一個較佳具體例中，該可食性材料是豆奶。

依據本發明，適用於本發明的培養基包含有一選自於下列群組中的碳源：乳糖(lactose)、果糖(fructose)、麥芽糖(maltose)、葡萄糖(glucose)、糖蜜(molasses)、半乳糖(galactose)、木糖(xylose)、木糖醇(xylitol)、菊糖(inulin)、

山梨糖醇(sorbitol)、海藻糖(trehalose)、蔗糖(sucrose)，以及它們的組合。在本發明的一個較佳具體例中，該培養基包含有一選自於下列群組中的碳源：麥芽糖、葡萄糖、糖蜜、木糖、菊糖、蔗糖以及它們的組合。在本發明的一個更佳具體例中，該培養基包含有一選自於下列群組中的碳源：菊糖、蔗糖以及它們的組合。在本發明的一個最佳具體例中，該培養基包含有蔗糖。

較佳地，適用於本發明的培養基具有一範圍落在 3 至 7 內的初始 pH 值。在本發明的一個較佳具體例中，該培養基具有一為 5 的初始 pH 值。

較佳地，該乳酸小球菌菌株是於一範圍落在 25 至 37°C 內的溫度下被進行培養。在本發明的一個較佳具體例中，該乳酸小球菌 05B0111 是於一為 30°C 的溫度下被進行培養。

本發明亦提供一種含有胞外多醣的乳酸小球菌培養物，它是藉由一如上所述的方法而被製得。

有關胞外多醣的分離與純化以及濃度測定可以採用熟習此項技藝者所熟知且慣用的技術來進行。例如，有關胞外多醣的分離與純化可以採用三氯乙酸(trichloroacetic acid)或乙醇(ethanol)來進行，而有關胞外多醣濃度的測定可以採用酚-硫酸法(phenol-sulfuric method)(P. Ruas-Madiedo and C. G. de los Reyes-Gavilán (2005)，同上述)來進行。

自乳酸小球菌培養物中所分離與純化出的胞外多醣藉由與巨噬細胞(macrophages)的共-培養(co-culture)而被證實

具有免疫調節活性(immunomodulating activity)，同時基於胞外多醣的其他已知的益生性質(probiotic properties)，依據本發明之含有胞外多醣的乳酸小球菌培養物被預期在製備用於免疫調節(immune modulation)、降低膽固醇以及抗腫瘤(antitumor)等之醫藥品上的應用。

於是，本發明提供一種藥學組成物(pharmaceutical composition)，其包含有一如上所述的乳酸小球菌培養物，以及選擇性地一藥學上可接受的載劑(pharmaceutically acceptable vehicle)。

依據本發明的藥學組成物可利用熟習此藝者所詳知的技術而被製造成一適合於非經腸道地、局部地或口服地投藥的劑型(dosage form)。

較佳地，該藥學組成物被製成一適於口服投藥(oral administration)的劑型，這包括，但不限於，溶液(solution)、懸浮液(suspension)、乳劑(emulsion)、粉末(powder)、錠劑(tablet)、丸劑(pill)、糖漿(syrup)、口含錠(lozenge)、片劑(troche)、口嚼膠(chewing gum)、膠囊(capsule)、濃漿(slurry)以及類似之物。

如本文中所用的，術語“藥學上可接受的載劑”意指一種當被投藥時不會在被投予的個體內造成一過敏性反應或其它非所欲之效用的載劑。依據本發明，該藥學上可接受的載劑可包含一或多種選自於下列的試劑：溶劑(solvent)、乳化劑(emulsifier)、懸浮劑(suspending agent)、分解劑(decomposer)、黏結劑(binding agent)、賦形劑(excipient)、

安定劑(stabilizing agent)、螯合劑(chelating agent)、稀釋劑(diluent)、膠凝劑(gelling agent)、防腐劑(preservative)、潤滑劑(lubricant)以及類似之物。

此外，本發明亦預期該含有胞外多醣的乳酸小球菌培養物在製備用於免疫調節、降低膽固醇以及抗腫瘤等的保健食品與非處方醫藥品上的應用。

於是，本發明亦提供一種食品產品(food product)，其包含有一如上所述的乳酸小球菌培養物。該乳酸小球菌培養物可以被當作食品添加物(food additive)而藉由習知方法於原料製備時被添加，或是被配製成供人類與非人類動物攝食的食品產品。

依據本發明，該食品產品的種類包括，但不限於：奶粉(milk powder)、飲料(beverages)、甜點(confectionery)、糖果(candies)、發酵食品(fermented foods)、動物飼料(animal feeds)、健康食品(health foods)、膳食補充品(dietary supplements)、果凍(jellys)、嬰兒配方(infant formulas)、沙拉醬(dressings)、蛋黃醬(mayonnaise)、塗醬(spreads)、鮮乳油(creams)、醬料(sauces)、布丁(puddings)、冰淇淋(ice-cream)、烘培產品(bakery products)、蕃茄醬(ketchup)以及芥末(mustard)。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本

發明的實施上的限制。

實施例

實驗材料：

A、 MRS 肉湯培養基(MRS broth)：

在下面實施例中所使用的 MRS 肉湯培養基是商業上可購得的乳桿菌 MRS 肉湯培養基 (*Lactobacilli* MRS broth)(DIFCO, Cat. No. 0881)，它含有 2%葡萄糖(glucose)作為碳源(carbon source)。

B、 MRS-醣類肉湯培養基(MRS-carbohydrate broth)：

在下面實施例中所使用的含有不同醣類的 MRS 肉湯培養基大體上是參照 MRS 肉湯培養基的組成來進行配製，不同之處在於：使用葡萄糖以外的醣類作為碳源，且該醣類的濃度為 10%。以 MRS-蔗糖肉湯培養基(MRS-sucrose broth)為例，它含有 10%蔗糖來代替 2%葡萄糖。

C、 含有 10% (v/v)蔗糖的飲料：

在下面實施例中所使用的飲料包括：柳丁原汁(pH = 3.89)[購自於佳美食品工業股份有限公司(CHIA MEEI FOOD INDL. CORP.)]、全脂牛奶[購自於光泉牧場股份有限公司(Kuang Chuan Dairy Co., Ltd.)]以及無糖豆奶[購自於義美食品股份有限公司(I-Mei Foods Co., Ltd.)]。

首先，將適量的蔗糖溶解於 ddH₂O 中以配製具有一濃度為 50% (v/v)的蔗糖原液(sucrose stock solution)，接著於 121°C 下進行滅菌歷時 15 分鐘，待冷卻後備用。將柳丁原汁置於 90°C 水浴下進行滅菌歷時 1 分鐘，另外，將全脂牛

奶與無糖豆奶分別置於 100°C 水浴下進行滅菌歷時 30 分鐘。待這 3 種飲料冷卻至室溫後，取一部分的柳丁原汁(pH=3.89)並以氫氧化鈉(NaOH)來調整 pH 值，藉此而得到具有一為 5.0 之 pH 值的柳丁原汁。

之後，將適量的 50% (v/v)蔗糖原液分別加入至經滅菌的柳丁原汁(pH=3.89 以及 5)、全脂牛奶以及無糖豆奶中，而得到含有 10%蔗糖的柳丁原汁(pH=3.89 以及 5)、牛奶以及豆奶。

一般實驗方法：

A、胞外多醣的分離與純化(Isolation and purification of exopolysaccharides)：

將一預定體積的測試樣品(test sample)與等體積的 20% 三氯乙酸(trichloroacetic acid)以一旋轉混合器(suspension mixer)予以混合均勻(200 rpm, 2 小時)。接著，在 3,000 rpm 下進行離心歷時 20 分鐘之後，收取上清液並加入 2 倍體積的 95%酒精(4°C)，繼而置於 4°C 下過夜。之後，以 3,000 rpm 來進行離心歷時 20 分鐘，倒除上清液，而沉澱物(precipitate)以 1 倍體積的 ddH₂O 予以回溶，接著加入 2 倍體積的 95%酒精(4°C)，然後置於 4°C 下過夜。在 3,000 rpm 下進行離心歷時 20 分鐘之後，倒除上清液，將沉澱物進行冷凍乾燥以得到呈膠狀(gelatinous)或薄膜狀(membranous)的胞外多醣(exopolysaccharide, EPS)備用。

B、胞外多醣濃度的測定(Determination of EPS concentration)：

將依據上面「A、胞外多醣的分離與純化」中所得到的胞外多醣溶於 ddH₂O (其具有一與上述“預定體積”相同的體積)中以形成一胞外多醣溶液(EPS solution)。吸取 1 mL 的胞外多醣溶液，接而依序地加入 0.5 mL 的 5% 酚溶液(phenol solution)以及 2.5 mL 的濃硫酸並予以混合均勻。將所形成的混合物置於室溫下進行反應歷時 10 分鐘，然後轉移到 30°C 水浴下作用歷時 15 分鐘。最後，以一 ELISA 讀取儀(ELISA reader)(SpectraMax M2, Molecular Devices)來測量該混合物在波長 490 nm 下的吸光值(OD₄₉₀)。由此所測得的 OD₄₉₀ 數值接而根據預先以具有不同已知濃度(0、20、40、80 以及 100 mg/L)的胞外多醣標準品相對於它們自身的 OD₄₉₀ 數值所作出的相關曲線(correlation curve)而被換算成濃度(mg/L)來表示。

實施例 1. 具有胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株的篩選
(Screening of lactic acid bacteria isolates having
EPS-producing ability)

A、試驗菌株的來源與分離：

申請人使用購自於傳統市場的數種發酵食品(包括酸菜、泡菜、豆腐乳、醃梅子以及醃漬食品等)作為樣品來源來進行乳酸菌分離株的分離。首先，將適量的樣品加入至 MRS 肉湯培養基中並於 37°C 下進行培養歷時 1 至 3 天。接著，將所形成的細菌培養物進行 10 倍連續稀釋(10-fold serial dilution)而配製成具有不同稀釋倍數(10¹~10⁷-倍)後，分別取出 0.2 mL 之經 10²-、10³-、10⁴-、10⁵-、10⁶-以及

10^7 -倍稀釋的菌液，並將之均勻塗佈於 MRS 瓊脂平板培養基(MRS agar plate)上，於 37°C 下靜置培養歷時 72 小時。然後，依據菌落形態以及鏡檢結果，申請人挑選出 121 株乳酸菌分離株並分別予以純化數次。接著，該等經純化的乳酸菌分離株分別被混合以等體積的 20% 甘油，繼而予以置入冷凍管(frozen vial)中並冷凍保存於 -80°C 下備用。

B、製備乳酸菌分離株的接種源 (Preparation of the inoculum of lactic acid bacteria isolates) :

將依據上面「A、試驗菌株的來源與分離」中所得到的乳酸菌分離株以一為 1% (v/v) 的接種量接種至 5 mL MRS 肉湯培養基中，並於 37°C 下進行培養歷時 18 小時。此培養步驟被重複 2 次，俾以活化菌株。所形成的培養物被使用作為下面實施例中的乳酸菌分離株的接種源。

C、初步篩選具有胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株：

將依據上面「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得到的 121 株乳酸菌分離株的接種源分別以一為 1% (v/v) 的接種量接種至 EPS 選擇培養基(EPS selection medium, ESM)中，並於 37°C 下進行培養歷時 72 小時。之後，將適量之所形成的培養物吸取至黏度計(BROOKFIELD, model DV-1+ viscometer, USA)上來進行黏度(centipoise, cp)的測定。

另外，將適量之依據上面「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得到的 121 株乳酸菌分離株的接種源分別以四區劃線法(four-quadrant streak method)的方式塗佈至 MRS-蔗糖瓊脂平板培養基(MRS-sucrose agar plate)上，並於 37°C

下進行培養歷時 5 天。之後，以肉眼來觀察菌落外觀，繼而使用牙籤的尖端沾取菌落並將之往上拉提，俾以評估是否會產生拉絲(ropy strand)現象。

當乳酸菌分離株有符合下面 2 項條件中的至少一者時，即被判斷為具有胞外多醣-生產能力的菌株：

- (1) 黏度達 150 cp 以上；以及
- (2) 在菌落周圍被觀察到有黏液(slime)，或者以牙籤的尖端沾取菌落並將之往上拉提時被觀察到有拉絲現象。

依據上面所示的條件，並同時考量樣品來源以及開發成為食品產品的合適性等因素後，申請人由 121 株乳酸菌分離株中初步篩選出 26 株潛力菌株並將它們拿來進行下面的 16S rDNA 序列分析以確認它們分別所屬的菌種。

D、16S rDNA 序列分析(16S rDNA sequence analysis)：

將依據上面「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得到的 26 株乳酸菌分離株的接種源分別添加至 MRS 瓊脂平板培養基上並以一 L 型玻棒予以塗佈均勻，繼而於 37°C 下進行培養歷時 24 小時。之後，從 MRS 瓊脂平板培養基上刮取少量的新鮮菌體置於 1.5 mL 微量離心管中，並使用血液&組織基因組 DNA 萃取 Miniprep 系統(Blood & Tissue Genomic DNA Extraction Miniprep System)(Viogene, U.S.A.)來進行基因組 DNA (genomic DNA)的萃取。由此所得到的基因組 DNA 被溶於適量的 ddH₂O 中，藉此而形成 26 個分別含有該等潛力菌株之基因組 DNA 的樣品。

以所得到的基因組 DNA 作為模版(template)，並且在一 GeneAmp® PCR 系統 9700 (GeneAmp® PCR system 9700)(Applied Biosystem)中使用 MicroSeq®完整基因 16S rDNA 細菌鑑定 PCR 套組(MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit)(Applied Biosystem)來進行 16S rDNA 的聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)。於完成 PCR 之後，藉由 1%的瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)來確認是否有得到一大小約為 500 bps 的 PCR 擴增產物。接著，使用 PCR 清除-M 系統(PCR Clean up-M System)(Viogene)從凝膠中回收並純化出該經確認的 PCR 擴增產物。

經純化的 PCR 擴增產物是在該 GeneAmp® PCR 系統 9700 中使用 MicroSeq®完整基因 16S rDNA 細菌鑑定定序套組(MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing Kit)(Applied Biosystem)來進行循環定序(cycle sequencing)，而所得到的循環定序產物(cycle sequencing product)繼而以 Performa™ DTR 凝膠過濾系統凝膠過濾匣盒(Performa™ DTR Gel Filtration Systems Gel Filtration Cartridges)(Edge BioSystems)來予以純化。經純化的循環定序產物接而使用一 3730 DNA 分析儀(3730 DNA Analyzer)(Applied Biosystems)來進行定序，而所得到的定序結果是使用 MicroSeq®ID 分析軟體(MicroSeq®ID Analysis Software)(v. 1.40, Applied Biosystems)來與 NCBI 網站上的資料庫進行比對分析，所得到的比對分析結果被

顯示於下面的表 1。

表 1. 乳酸菌分離株的 16S rDNA 序列的比對分析結果

乳酸菌分離株 編號	所屬菌種*	同源性(homology) (%)
05B0001	<i>Lactobacillus kimchii</i> <i>Lactobacillus paralimentarius</i>	99
05B0002	小球菌屬物種(<i>Pediococcus</i> sp.)	99
05B0003	戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i>)	99
05B0025	發酵乳桿菌 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	99
05B0100	胚芽乳桿菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	99
05B0108	戊糖片球菌	99
05B0111	乳酸小球菌	99
05B0114	(a) <i>Streptococcus macedonicus</i> (b) <i>Streptococcus waius</i>	99
05B0115	類腸膜魏斯氏菌 (<i>Weissella paramesenteroides</i>)	99
05B0116	糞腸球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	99
05B0117	加氏乳桿菌 (<i>Lactobacillus gasserii</i>)	99
05B0164	乳酸小球菌	99
05B0165	戊糖片球菌	99
05B0166	<i>Lactobacillus pontis</i>	98
05B0167	乳酸小球菌	98
05B0168	乳酸小球菌	99
05B0169	胚芽乳桿菌	99
05B0G5-2	短毛乳桿菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	99
05B013-2	胚芽乳桿菌	99
05B017-1	發酵乳桿菌	99
05B017-2	戴白氏乳桿菌保加利亞亞種 (<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>)	99
05B018-1	發酵乳桿菌	99
05B029-2	胚芽乳酸桿菌	99

05B033-1	類腸膜魏斯氏菌	99
05B034-2	乳酸小球菌	98
05B046-2	(a) 食澱粉乳桿菌 (<i>Lactobacillus amylovorus</i>) (b) <i>Lactobacillus kitasatonis</i> (c) 豬腸道乳桿菌 (<i>Lactobacillus sobrius</i>) (d) <i>Lactobacillus gallinarum</i>	99

*：在 16S rDNA 序列的比對分析結果中，欄位“所屬菌種”中顯示與試驗分離株具有最高序列同源性之標準菌株(type strain)的物種名稱(亦即，學名)。若在該欄位中顯示有 1 個以上的物種名稱，表示所試驗的分離株與 1 種以上的標準菌株具有等高的 16S rDNA 序列同源性。

依據表 1 所示的 16S rDNA 序列比對分析結果，有 13 株分離株為乳桿菌屬物種，9 株為小球菌屬物種，2 株為類腸膜魏斯氏菌，1 株為鏈球菌屬物種，以及 1 株為糞腸球菌。特別地，申請人注意到，在隸屬於小球菌屬的 9 株分離株中有 5 株(編號分別為 05B0111、05B0164、05B0167、05B0168 以及 05B034-2)為乳酸小球菌。就申請人所知，迄今不曾有任何文獻曾經揭示乳酸小球菌具有胞外多醣-生產能力。

為了進一步篩選出具有高胞外多醣-生產能力的菌株以供用於在產業上大規模生產胞外多醣，申請人將這 26 株乳酸菌分離株拿來進行下面的實驗。

E、篩選具有高胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株：

將依據上面「C、初步篩選具有胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株」中所篩選出的 26 株乳酸菌分離株的接種源分別以一為 1% (v/v)的接種量接種至 15 mL 的 MRS-蔗糖肉湯培養基(MRS-sucrose broth)中，並於 37°C 下進行培養歷時

72 小時。所形成的培養物分別依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。

由實驗結果發現，在上面「D、16S rDNA 序列分析」中被初步鑑定為乳酸小球菌的 5 株分離株中，編號為 05B0111、05B0164、05B0167、05B0168 以及 05B034-2 的乳酸小球菌的培養物所測得的胞外多醣濃度分別為 845、11.34、29.51、17.99 以及 17.74 mg/L。另外，在其餘的 21 株乳酸菌分離株中，有 4 株乳酸菌分離株的培養物所測得的胞外多醣濃度是落在 60 至 110 mg/L 之間，而其餘分離株的培養物所測得的胞外多醣濃度則是落在 50 mg/L 以下，但最低濃度仍有 2.89 mg/L。根據本實驗結果，申請人認為乳酸小球菌 05B0111 是最具開發潛力的菌株，並將它拿來進行下面的種系新穎性(phylogenetic novelty)評估。

實施例 2. 乳酸小球菌 05B0111 的種系新穎性的評估
(Assessment of phylogenetic novelty of
***Pediococcus acidilactici* 05B0111)**

為了確認在實施例 1 中所篩選出的乳酸小球菌 05B0111 在種系上是不同於所屬物種中已公開的菌株，乳酸小球菌 05B0111 被拿來進行下面的初步試驗、16S rDNA 序列分析、生理與生化試驗(physiological and biochemical tests)以及 DNA-DNA 雜交分析(DNA-DNA hybridization analysis)。

實驗材料與方法：

A、初步試驗：

對乳酸小球菌 05B0111 進行初步試驗，試驗項目包括：革蘭氏染色 (Gram stain)、形態觀察 (morphological observation)、運動性 (motility)、觸酶 (catalase) 與氧化酶 (oxidase) 反應、在好氧 (aerobic) 與厭氧 (anaerobic) 條件下的生長情形，以及是否會形成內生孢子 (endospore) 等。

依據初步試驗結果，乳酸小球菌 05B0111 為革蘭氏陽性球菌，不具運動性，不具觸酶或氧化酶的活性，在好氧與厭氧條件下均可生長，不會形成內生孢子。

B、16S rDNA 序列分析：

依照實施例 1 的「D、16S rDNA 序列分析」當中所述的方法來進行乳酸小球菌 05B0111 的 16S rDNA 序列分析。所得到的全長 16S rDNA 序列分析結果被顯示於圖 1 中，而將所得到的序列以 MicroSeq®ID 分析軟體來與 NCBI 網站上的資料庫進行比對分析，比對分析結果顯示：乳酸小球菌 05B0111 的全長 16S rDNA 序列(序列辨識編號：1)與乳酸小球菌 [Genbank 寄存編號 (accession number) AJ249535]、*Pediococcus stilesii* (Genbank 寄存編號 AJ973157) 以及 *Pediococcus claussenii* (Genbank 寄存編號 AF404716) 的 16S rDNA 之序列相似度 (sequence similarity) 均可達 97% 以上。

C、生理與生化試驗：

在本實驗中，申請人針對乳酸小球菌 05B0111 的溫度耐受性 (temperature tolerance)、pH 耐受性 (pH tolerance)、NaCl 耐受性 (NaCl tolerance) 以及醣類發酵型態 (carbohydrate

fermentation profile)來進行分析。

有關溫度耐受性、pH 耐受性以及 NaCl 耐受性試驗的操作步驟是參照 Charles M. A. P. Franz *et al.* (2006), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:329-333 當中所述的方法並稍作修改後來進行。簡言之，將適量的於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所製備出的乳酸小球菌 05B0111 的接種源添加至 MRS 瓊脂平板培養基上並以一支 L 型玻棒予以塗佈均勻，繼而於 37°C 下進行培養歷時 5 天。之後，觀察乳酸小球菌 05B0111 在 MRS 瓊脂平板培養基上的生長情形。

有關醣類發酵型態的分析是使用 API 50 CHL 鑑定系統 (API 50 CHL identification system)(bioMérieux)並參照廠商所提供的操作指引來進行，所試驗的醣類包括：阿拉伯糖 (arabinose)、半乳糖 (galactose)、乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、核糖 (ribose)、木糖 (xylose)、甘油 (glycerol)、葡萄糖酸鉀 (potassium gluconate)、2-酮葡萄糖酸鉀 (potassium 2-keto gluconate) 以及海藻糖 (trehalose)。

另外，在參考上面「B、16S rDNA 序列分析」的實驗結果之後，申請人使用購自於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (BCRC) 的 3 株小球菌屬標準菌株 (*Pediococcus* type strains) 作為比較菌株來進行比對分析，它們分別為：

(1) 乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*) BCRC 17599^T，

對應於 DSM 20284^T，分離來源為大麥 (barley)；

(2) *Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T，對應於 DSM 14800^T、ATCC BAA-344^T 以及 KCTC 3811^T，分離來源為腐敗的啤酒 (spoiled beer)；以及

(3) *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T，對應於 DSM 18001^T、CCUG 51290^T 以及 LMG 23082^T，分離來源為白玉米顆粒 (white maize grains)。

本發明的乳酸小球菌 05B0111 以及 3 株小球菌屬標準菌株的溫度耐受性、pH 耐受性、NaCl 耐受性以及醱類發酵型態試驗結果被歸納在下面的表 2 中。

表 2. 乳酸小球菌 05B0111 以及 3 株小球菌屬標準菌株的生理與生化試驗結果

試驗項目		乳酸小球菌 05B0111	乳酸小球菌 BCRC 17599 ^T	<i>Pediococcus</i> <i>claussenii</i> BCRC 17600 ^T	<i>Pediococcus</i> <i>stilesii</i> BCRC 17601 ^T
pH 耐受性*	pH 4.2	+	+	+	+
	pH 7.0	+	+	+	+
	pH 8.0	+	+	+	+
	pH 9.0	+	-	-	+
溫度 耐受性*	35°C	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+
	45°C	+	-	-	+
	50°C	+	-	-	-
NaCl 耐受性*	4% NaCl	+	+	+	+
	5% NaCl	+	+	+	+
	6% NaCl	+	+	-	+
	8% NaCl	+	+	-	+
	10% NaCl	-	+	-	-
醣類發酵 型態**	阿拉伯糖	-	+	-	-
	半乳糖	+	+	-	+
	乳糖	-	-	-	-
	麥芽糖	-	-	+	+
	核糖	+	+	+	+
	木糖	-	+	-	-
	甘油	-	-	-	+
	葡萄糖 酸鉀	-	-	-	+
	2-酮葡萄 糖酸鉀	-	-	-	+
	海藻糖	+	+	+	-

* : 在 pH 耐受性、溫度耐受性以及 NaCl 耐受性的試驗結果中，“+”表示試驗菌株可生長於 MRS 瓊脂平板培養基上，而“-”表示試驗菌株無法生長於 MRS 瓊脂平板培養基上。

** : 在醣類發酵型態的試驗結果中，“+”表示試驗菌株能夠利用所測試的醣類進行發酵並產酸，而“-”表示試驗菌株無法利用所測試的醣類進行發酵。

依據表 2 所示的生理與生化試驗結果，申請人認為乳酸小球菌 05B0111 的生理與生化特性符合小球菌屬 (*Pediococcus*) 所具者，並且與乳酸小球菌 BCRC 17599^T、*Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T 以及 *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T 的特性相似。

D、DNA-DNA 雜交分析：

為了進一步確認乳酸小球菌 05B0111 的所屬物種，申請人依照上面「B、16S rDNA 序列分析」當中所述的方法來分別製備出乳酸小球菌 05B0111、乳酸小球菌 BCRC 17599^T、*Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T 以及 *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T 的基因組 DNA 樣品，並且參照 TAKAYUKI EZAKI *et al.* (1989), *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, 39:224-229 當中所述的方法來進行 DNA-DNA 雜交分析。首先，將各個基因組 DNA 樣品進行加熱-變性(heat-denaturing)，繼而分別以磷酸鹽緩衝的生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)(含有 0.1 M MgCl₂)予以配製成具有一濃度為 20 µg/mL 的 DNA 溶液，其中乳酸小球菌 05B0111 的 DNA 溶液被使用作為 05B0111 組，而乳酸小球菌 BCRC 17599^T、*Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T 以及 *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T 的 DNA 溶液被使用作為標準菌株組(type strains)。另外，胎牛胸腺(calf thymus)的 DNA 溶液(Merck, Cat. No. 2618)被使用作為負對照組(negative control)。將各組的 DNA 溶液分別取 100 µL 並加入至一個 96-井的培養盤(96-

well plate)的各井中，繼而在 37°C 下進行培育歷時 1 小時。之後，移除各井中的 DNA 溶液並以 PBS (含有 0.1 M MgCl₂)予以清洗，繼而於 60°C 下乾燥過夜。

另一方面，將 5 μL 的光生物素(photobiotin)與 5 μL 之經加熱-變性的(heat-denatured)乳酸小球菌 05B0111 的基因組 DNA 樣品(1 μg/μL，配於蒸餾水中)加入至一微量離心管中並予以混合均勻。在以太陽燈(sunlamp, 500 W)予以照射歷時 15 分鐘之後，藉由 2-丁醇萃取(2-butanol extraction)來移除游離的光生物素(free photobiotin)，俾以得到含有經生物素化的 DNA (biotinylated DNA)備用。

取出經乾燥過夜的 96-井的培養盤，繼而將 200 μL 的預雜交溶液(prehybridization solution)[含有 2X SSC、5X 登哈特溶液(Denhardt solution)、經變性的鮭魚精子 DNA (denatured salmon sperm DNA)(200 μg/mL)以及 50%甲醯胺(formamide)]加入至已被覆(coated)有 DNA 溶液的各井中，並於 37°C 下培育歷時 1 小時。之後，移除各井中的液體，繼而將 100 μL 的雜交溶液(hybridization solution)[含有 2X SSC、5X 登哈特溶液、3%硫酸聚葡萄糖(dextran sulfate)、50%甲醯胺、經變性的鮭魚 DNA (denatured salmon DNA)(50 μg/mL)以及 50 ng 經生物素化的 DNA]加入至各井中，並於 42°C 下進行雜交反應歷時 1 小時。之後，移除各井中的液體並以 300 μL 的 2X SSC 緩衝液予以洗滌 4 次，繼而加入 100 μL 的鏈黴抗生物素蛋白-β-D-半乳糖苷酶溶液(streptavidin-beta-D-galactosidase solution)[10 ng/mL，配於

PBS (含有 0.5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin)以及 0.1% Triton X-100)中]並於 37°C 下進行反應歷時 30 分鐘。

之後，移除各井中的液體並以 PBS (含有 0.1% Triton X-100)予以洗滌 2 次，繼而對各井加入 100 μ L 的 4-甲基繖形基 - β -D- 乳糖 哌 喃 糖 苷 (4-methylumbelliferyl-beta-D-galactopyranoside)(3×10^{-4} M，配於 PBS 中)並於 37°C 下進行反應歷時 10 分鐘。最後，使用一 Fluoroskan II 培養盤螢光計(Fluoroskan II microplate fluorometer)(Labsystems)並於一為 360 nm 的激發波長(excitation wavelength)與一為 450 nm 的放射波長(emission wavelength)下來測量各井的螢光強度(fluorescence intensity)。

乳酸小球菌 05B0111 與乳酸小球菌 BCRC 17599^T、*Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T 以及 *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T 的 DNA 親源數值(DNA relatedness value)是藉由將上面所測得的螢光強度代入下列公式而被計算出：

$$\text{DNA 親源數值 (\%)} = [(A - C)/(B - C)] \times 100$$

其中： A = 標準菌株組的螢光強度

B = 05B0111 組的螢光強度

C = 負對照組的螢光強度

實驗結果發現，乳酸小球菌 05B0111 的基因組 DNA 與乳酸小球菌 BCRC 17599^T、*Pediococcus clausenii* BCRC 17600^T 以及 *Pediococcus stilesii* BCRC 17601^T 的基因組 DNA 的 DNA 親源數值分別為 75.5%、21.1%以及 4.9%。依

據本實驗結果，申請人確認本發明的乳酸小球菌 05B0111 為乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*)。

綜合以上的各項分析結果，同時參考 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.* (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, Williams & Wilkins) 以及 Franz *et al.* (2006), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:329-333 等微生物學相關文獻，申請人認為：本發明的乳酸小球菌 05B0111 是一株新穎的乳酸小球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 分離株。

本發明的乳酸小球菌 05B0111 已於西元 2009 年 02 月 10 日以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所 (FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (BCRC) (300 新竹市食品路 331 號，台灣)。這個分離株亦有依據布達佩斯條約 (the Budapest Treaty) 的規定，於西元 2009 年 03 月 05 日以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)。

實施例 3. 乳酸小球菌 05B0111 的耐酸性以及膽鹽耐受性試驗

本發明的乳酸小球菌 05B0111 被拿來進行下面的實驗，俾以確認該菌株在攝食之後是否能夠通過消化道的嚴苛條件而存活下來。

實驗方法：

A、耐酸性試驗(Acid tolerance test)：

將適量的於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源接種至 10 mL MRS 肉湯培養基中，並於 37°C 下進行培養歷時 24 小時，繼而以 3,000 rpm 離心歷時 10 分鐘。之後，移除上清液並加入 1 mL 的 PBS 以充份散浮菌體，藉此而得到一懸浮液。接著，將 0.5 mL 懸浮液分別接種至 pH 值為 2 與 7.2 的 PBS (體積皆為 10 mL) 中並予以充分混合，然後將所形成的混合物置於 37°C 下靜置培養歷時 2 小時。之後，取出 1 mL 的培養物並以 PBS 來進行 10 倍連續稀釋(10-fold serial dilution)，繼而進行塗盤以檢測存活的菌數。

B、膽鹽耐受性試驗(Bile salt tolerance test)：

將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源以一為 2% (v/v) 的接種量分別接種至 10 mL MRS 肉湯培養基與 10 mL 之含有 0.3% (v/v) 牛膽汁(ox gall)(DIFCO)的 MRS 肉湯培養基中並予以充份混合，然後將所形成的混合物置於 37°C 下靜置培養歷時 24 小時。之後，取出 1 mL 的培養物並以 PBS 來進行 10 倍連續稀釋(10-fold serial dilution)，繼而進行塗盤以檢測存活的菌數。

結果：

當以 pH 值為 2 與 7.2 的 PBS 來培養本發明的乳酸小球菌 05B0111 歷時 2 小時之後，所測得的存活菌數分別為 9.05 log CFU/mL 與 9.40 log CFU/mL。此外，當以不含有牛

膽汁與含有 0.3% (v/v)牛膽汁的 MRS 肉湯培養基來培養本發明的乳酸小球菌 05B0111 歷時 24 小時之後，所測得的存活菌數分別為 9.07 log CFU/mL 與 8.40 log CFU/mL。這個實驗結果顯示：本發明的乳酸小球菌 05B0111 具有耐酸性與膽鹽耐受性，因此，在攝食之後能夠克服人類消化道的環境壓力，而可以有效到達腸道內。

實施例 4. 不同的培養條件對於乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣-生產能力之影響

A、醣類對於乳酸小球菌 05B0111 在胞外多醣-生產能力上的影響：

本實驗是探討使用 12 種不同的醣類[包括乳糖、果糖、麥芽糖、葡萄糖、糖蜜(molasses)、半乳糖、木糖、木糖醇(xylitol)、菊糖(inulin)、山梨糖醇(sorbitol)、海藻糖(trehalose)以及蔗糖]作為碳源對於乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣-生產能力的影響。

將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源以一為 1% (v/v)的接種量分別接種至 12 種 MRS-醣類肉湯培養基(15 mL)中，並於 37°C 下進行培養歷時 72 小時。之後，所形成的培養物依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。所得到的實驗結果被顯示於圖 2 中。

從圖 2 可見，乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣-生產能

力會隨著所使用的碳源種類而有不同，特別地，相較於其他的醣類，使用蔗糖作為碳源可以得到較高的胞外多醣產量(大約為 850 mg/L)。這個實驗結果顯示：當本發明的乳酸小球菌 05B0111 以蔗糖作為生長所需的碳源與能量來源時，可以生成大量的胞外多醣。

B、溫度對於乳酸小球菌 05B0111 在胞外多醣-生產能力上的影響：

本實驗是探討在使用蔗糖作為碳源的培養條件下，不同的培養溫度對於乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣-生產能力的影響。

將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源以一為 4% (v/v)的接種量接種至含有 10%蔗糖的柳丁原汁(5 L)中，接著分別於 30 以及 37°C 下靜置培養。之後，在培養的第 8 與第 72 小時之時，分別收取一部分的培養物並依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。所得到的實驗結果被顯示於圖 3 中。

從圖 3 可見，無論是在培養的第 8 或者第 72 小時之時，於一為 30°C 的培養溫度下所測得的胞外多醣濃度均高於在一為 37°C 的培養溫度下所測得者。這個實驗結果顯示：當本發明的乳酸小球菌 05B0111 利用蔗糖作為碳源並於一為 30°C 的溫度下進行培養時會具有較佳的胞外多醣-生產能力。

C、 初始 pH 值(initial pH)對於乳酸小球菌 05B0111 在胞外多醣-生產能力上的影響：

本實驗是探討使用蔗糖作為碳源並且在一為 30°C 的溫度下進行培養時，不同的初始 pH 值對於乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣-生產能力的影響。

將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源以一為 4% (v/v) 的接種量分別接種至初始 pH 值為 3.89 與 5.0 之含有 10% 蔗糖的柳丁原汁(80 mL)中，然後於 30°C 下靜置培養歷時 72 小時。之後，所形成的培養物依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。

實驗結果發現，在具有一初始 pH 值為 3.89 的培養條件下所測得的胞外多醣濃度為 677.33 mg/L，而在具有一初始 pH 值為 5.0 的培養條件下所測得的胞外多醣濃度為 1154 mg/L。這個實驗結果顯示：當本發明的乳酸小球菌 05B0111 利用蔗糖作為碳源，並且在一為 30°C 的溫度下以及一為 5.0 的初始 pH 值下進行培養時會具有較佳的胞外多醣-生產能力。

實施例 5. 乳酸小球菌 05B0111 在不同飲料中的胞外多醣-生產能力的評估

為瞭解在含有 10% (v/v) 蔗糖的飲料中的胞外多醣濃度是否會因為本發明的乳酸小球菌 05B0111 的添加而有所差

異，首先，分別取出適量之各個含有 10% (v/v)蔗糖的柳丁原汁、牛奶以及豆奶並依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。

之後，將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源分別以一為 4%、2%以及 2% (v/v)的接種量接種至含有 10%蔗糖的柳丁原汁(5 L)、牛奶(30 mL)以及豆奶(50 mL)中，然後將接種有本案菌株的柳丁原汁置於 30°C 下，而將接種有本案菌株的牛奶與豆奶置於 37°C 下，分別予以培養歷時 72 小時。之後，所形成的培養物依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。

由實驗結果發現，在本發明的乳酸小球菌 05B0111 的接種之前，含有 10%蔗糖的柳丁原汁、牛奶以及豆奶的胞外多醣濃度分別為 452、10 以及 157 mg/L，而當它們分別被接種以本發明的乳酸小球菌 05B0111 並經過 72 小時的培養之後，所形成之培養物的胞外多醣濃度分別為 677、655 以及 1128 mg/L。這個實驗結果顯示：本發明的乳酸小球菌 05B0111 在不同來源的飲料中均具有胞外多醣-生產能力，因而被預期可供用於各種食品產業中。

實施例 6. 乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激小鼠巨噬細胞 (macrophages) 分泌前發炎性細胞激素 (proinflammatory cytokines) 以及一氧化氮

(nitric oxide, NO)能力的評估

在本實施例中，本發明的乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣被拿來與小鼠巨噬細胞(macrophage)進行培養，並且選用介白素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-10、單核球趨化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α)以及 IL-12p70 來作為評估前發炎性細胞激素(proinflammatory cytokines)的表現量之指標，同時，亦選用亞硝酸鹽來作為評估一氧化氮(NO)的表現量之指標。

實驗材料與方法：**A、巨噬細胞的來源與培養：**

首先，將 13.4 g 的 DMEM 粉末(HyClone)以及 1.5 g 的碳酸氫鈉(sodium bicarbonate, NaHCO_3)分別加入至 600 mL 以及 300 mL 的 ddH₂O 中，待充分溶解後，將兩者混合均勻並以 1N 的 HCl 將 pH 值調整至 7.2~7.4 而得到杜貝可氏改良的依格氏培養基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)。之後，加入 10%之加熱去活化(heat inactivation)的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)以及 2%的麩醯胺酸(glutamine)，繼而以一孔徑為 0.22 μm 的過濾膜(Millipore)予以過濾後儲存於 4°C 下備用。

在本實施例中是使用小鼠 BALB/c 巨噬細胞 RAW 264.7 (mouse BALB/c macrophage RAW 264.7)[它是購自於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，寄存編號(accession number)為 BCRC 60001]來進行實驗。首先，

將 RAW 264.7 細胞培養於含有 DMEM [含有 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、4 mM 的麩醯胺酸 (glutamine) 以及 1.5 g/L 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, NaHCO_3), pH = 7.2~7.4] 的 10 cm 培養皿 (petri dish) 中，並在培養條件被設定為 37°C 與 5% CO_2 的培養箱中進行培養。

當培養皿底部的面積有 80 至 90% 被 RAW 264.7 細胞所覆蓋且在顯微鏡下所觀察到的細胞生長形態為正常時，移除培養皿中的培養基，繼而加入 3 mL 的新鮮 DMEM 並以量吸管 (pipette) 吸取培養皿中的新鮮 DMEM 來反覆地沖提培養皿底部的細胞，藉此而使得細胞自培養皿的底部脫離而形成一懸浮液。然後，將適量的懸浮液加入至含有 10 mL DMEM 的新培養皿中，並在培養條件被設定為 37°C 與 5% CO_2 的培養箱中進行培養。

B、製備胞外多醣試驗溶液：

將於實施例 1 的「E、篩選具有高胞外多醣-生產能力的乳酸菌分離株」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的胞外多醣溶液 (845 mg/L) 使用無菌水予以稀釋成具有最終濃度分別為 845、422.5、169 以及 84.5 mg/L 的胞外多醣試驗溶液，繼而以一孔徑為 0.22 μm 的過濾膜予以過濾後備用。

C、乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激 RAW264.7

細胞分泌前發炎性細胞激素能力的評估：

在進行實驗之前，收取依據上面「A、巨噬細胞的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞並且以 DMEM 來調整細胞濃度，藉此而得到一具有一細胞濃度為 8×10^5 細

胞/mL 的細胞懸浮液。將 100 μ L 的 RAW 264.7 細胞懸浮液加入至 96-井培養盤的各井內，接著，以 1,000 rpm 來進行離心歷時 5 分鐘。之後，將 96-井的培養盤置於培養箱(37°C、5% CO₂)中進行培養歷時 1 至 2 小時，俾以使得 RAW 264.7 細胞貼附於各井的底部。接著，將 RAW 264.7 細胞分成 7 組，其中包括 4 個實驗組、2 個對照組以及 1 個空白組，並分別予以加入：(1)實驗組 1、2、3 以及 4，20 μ L 的最終濃度分別為 84.5、169、422.5 以及 845 mg/L 的胞外多醣試驗溶液；(2)正對照組(positive control)，20 μ L 的脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)(10 μ g/mL)；(3)負對照組(negative control)，20 μ L 的 DMEM；以及(4)空白組，20 μ L 的無菌水。

在培養箱(37°C、5% CO₂)中進行培養歷時 24 小時之後，收取各井中的液體來分別進行使用小鼠 TNF- α /TNFSF1A (mouse TNF- α /TNFSF1A, R&D Systems, Cat. No. DY410)的酵素結合免疫吸附分析(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)。另外，取一部分的實驗組 4 以及空白組的細胞培養物來分別進行使用小鼠發炎套組(Mouse Inflammation Kit)(BD, Cat. No. 552364)的流式微球陣列(Cytometric Bead Array)分析。

D、乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激 RAW264.7 細胞分泌 NO 能力的評估：

將依據上面「A、巨噬細胞的來源與培養」來進行繼代培養的 RAW 264.7 細胞接種至 96-井培養盤的各井(1×10^5 細

胞/井)內，並且在 37°C 下培養過夜。之後，分成 3 組(包括 1%、5%以及 10%胞外多醣組)來分別加入 100 μ L 的測試溶液，其中測試溶液含有 100 ng/mL 的脂多醣、1 ng/mL 的 IFN- γ 以及不同濃度[亦即，1%、5%以及 10% (v/v)]的胞外多醣試驗溶液，繼而在 37°C 下進行培養歷時 24 小時。另外，添加有脂多醣以及 IFN- γ 的 RAW 264.7 細胞被用來作為正對照組並進行相同的實驗。

之後，自各井中收取 50 μ L 的液體並將之分別加入至一個新的 96-井培養盤的各井中以便進行下面的一氧化氮分析(nitric oxide assay, NO assay)。將 50 μ L 的胺苯磺醯胺(sulfanilamide)(60 mM)以及 50 μ L 的 N-1-萘基乙二胺(N-1-naphthylethylenediamine)(4 mM)加入至 96-井培養盤的各井內，並予以震盪歷時 5 分鐘。接著，以 ELISA 讀取儀來讀取各井在波長 540 nm 下的吸光值(OD₅₄₀)。將所獲得的 OD₅₄₀ 數值分別根據預先以具有不同已知濃度的亞硝酸鈉(NaNO₂)相對於它們自身的 OD₅₄₀ 數值所作出的相關曲線而被換算成亞硝酸鹽濃度。將正對照組所測得的亞硝酸鹽濃度當作 100%，其他各組相對於正對照組的亞硝酸鹽濃度百分比被計算出。

結果：

有關 ELISA 的結果，4 個實驗組在波長 450 nm 下所測得的吸光值(OD₄₅₀)分別根據預先以具有不同已知濃度的 TNF- α 標準品相對於它們自身的 OD₄₅₀ 數值所作出的相關曲線而被換算成濃度(mg/L)，所得到的結果被顯示於圖 4 中。

從圖 4 可見，當 RAW 264.7 細胞分別與不同濃度的胞外多醣試驗溶液進行共培養(co-culture)時，RAW 264.7 細胞的 TNF- α 分泌量會隨著胞外多醣濃度的增加而上升。這個實驗結果顯示：乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣可以促進 RAW 264.7 細胞分泌 TNF- α ，表示乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣有助於活化巨噬細胞。

有關流式微球陣列分析的結果，就空白組而言，當 RAW 264.7 細胞與無菌水進行共培養歷時 24 小時之後，所測得的 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- γ 、TNF 以及 IL-12p70 的濃度分別為 0、0、113、0、1362 以及 0 pg/mL。就實驗組 4 而言，將 RAW 264.7 細胞與具有一濃度為 845 mg/L 的胞外多醣試驗溶液進行共培養歷時 24 小時之後，所測得的 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- γ 、TNF 以及 IL-12p70 的濃度分別為 7、68、215、26、2473 以及 4.92 pg/mL。這個實驗結果顯示：本發明乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣可以刺激 RAW 264.7 細胞分泌 TNF，但是對於刺激 RAW 264.7 細胞分泌 IL-6、IL-10、MCP-1、IFN- γ 以及 IL-12p70 這 5 種前發炎性細胞激素則不具有明顯的效用。

有關一氧化氮分析的結果，當 RAW 264.7 細胞分別與 1%、5%以及 10%的胞外多醣試驗溶液進行共培養歷時 24 小時之後，各組所測得的亞硝酸鹽濃度百分比都有降低的情形，並且降低的程度會隨著胞外多醣濃度的增加而趨於明顯，特別地，10%胞外多醣組的亞硝酸鹽濃度被降低至約為正對照組濃度的 69%。這個實驗結果顯示：乳酸小球菌

05B0111 所生產的胞外多醣可以抑制 RAW 264.7 細胞分泌 NO，以減緩發炎反應的發生。

已知 TNF- α 可作為判斷巨噬細胞是否被活化的指標之一，而前發炎性細胞激素以及 NO 可作為判斷發炎反應的指標。因此，依據上述的實驗結果，申請人認為：本發明乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣可以活化巨噬細胞，但是不會刺激巨噬細胞引起發炎反應，因而具有調節免疫活性的效用。

實施例 7. 在使用不同醣類作為碳源的培養條件下，乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激小鼠巨噬細胞分泌 TNF- α 能力的評估

實驗材料與方法：

將於實施例 1 的「B、製備乳酸菌分離株的接種源」中所得之乳酸小球菌 05B0111 的接種源以一為 1% (v/v) 的接種量分別接種至 15 mL 的 MRS 肉湯培養基(葡萄糖組，含有 10% 葡萄糖)、MRS-蔗糖肉湯培養基(蔗糖組)以及 MRS-麥芽糖肉湯培養基(麥芽糖組)中，並於 37°C 下進行培養歷時 72 小時。之後，所形成的培養物依照上面「一般實驗方法」的「A、胞外多醣的分離與純化」以及「B、胞外多醣濃度的測定」當中所述的方法來進行胞外多醣的分離純化與濃度測定。接著，將經純化的胞外多醣溶於 ddH₂O 中並使用無菌水進行 2 倍、5 倍以及 10 倍稀釋，藉此而得到具有不同濃度的胞外多醣試驗溶液。所得到的具有不同濃度的胞外多醣試驗溶液大體上是參照實施例 6 的「實驗材料與

方法」的「C、乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激 RAW264.7 細胞分泌前發炎性細胞激素能力的評估」當中所述的方法來測定 RAW 264.7 細胞的 TNF- α 分泌量，而與無菌水進行共培養的 RAW 264.7 細胞被用來作為空白組。所得到的實驗結果被顯示於下面的表 3。

結果：

表 3. 在使用不同醣類作為碳源的培養條件下，乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣刺激 RAW 264.7 細胞分泌 TNF- α 的功効評估

組別	胞外多醣溶液		TNF- α 分泌量 (pg/mL)
	稀釋倍數	濃度 (mg/L)	
葡萄糖組	未經稀釋	233.20	5145.04
	2X	116.60	1081.73
	5X	46.64	234.64
	10X	23.32	92.74
蔗糖組	未經稀釋	845.11	2473.00
	2X	422.56	1358.94
	5X	169.02	1039.80
	10X	84.51	784.38
麥芽糖組	未經稀釋	242.80	3810.41
	2X	121.40	892.49
	5X	48.56	239.42
	10X	24.28	74.32
空白組	-	0	502

從表 3 可見，無論是以葡萄糖、蔗糖或者麥芽糖作為碳源，乳酸小球菌 05B0111 所生產的胞外多醣皆會刺激 RAW 264.7 細胞分泌 TNF- α ，並且 TNF- α 分泌量會隨著胞外多醣濃度的增加而上升。此外，相較於空白組，葡萄糖

組、蔗糖組以及麥芽糖組的胞外多醣在不同的濃度下對於刺激 RAW 264.7 細胞分泌 TNF- α 的能力是不同的。申請人推論：乳酸小球菌 05B0111 可能會因為所使用的碳源種類之不同而導致所生成的胞外多醣在分子量、結構以及分支程度 (degree of branching) 上的差異，進而影響胞外多醣在刺激巨噬細胞分泌 TNF- α 上的效用。

於本案說明書中被引述之所有文獻資料以及專利文件以它們的整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案的詳細說明 (包含界定在內) 將佔上風。

雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，顯著地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示本發明的乳酸小球菌 05B0111 的全長 16S rDNA 核苷酸序列；

圖 2 顯示不同醣類對於本發明的乳酸小球菌 05B0111 在胞外多醣-生產能力上的影響；

圖 3 顯示將接種有本發明的乳酸小球菌 05B0111 之含有 10% 蔗糖的柳丁原汁分別置於 30 以及 37°C 下進行培養，在培養的第 8 小時以及第 72 小時之時所分別測得的胞外多醣濃度；以及

圖 4 顯示小鼠 BALB/c 巨噬細胞 RAW 264.7 在分別與不同濃度的胞外多醣試驗溶液進行共培養後所測得的 TNF- α

分泌量。

【主要元件符號說明】

(無)

序列表

<110> 財團法人食品工業發展研究所
 <120> 生產胞外多醣的方法以及一新穎的乳酸小球菌
 分離株
 <130> 乳酸小球菌(*Pediococcus acidilactici*) 05B0111
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 513
 <212> DNA
 <213> 乳酸小球菌(*Pediococcus acidilactici*) 05B0111

<400> 1
 agtttgatcc tggctcagga tgaacgctgg cgacgtgcct aatacatgca agtcgaacga 60
 acttccgtta attgattatg acgtgcttgc actgatgaga ttttaacacg aagtgagtgg 120
 cggacgggtg agtaaacacgt gggtaacctg cccagaagca ggggataaca cctggaaaca 180
 gatgctaata ccgtataaca gagaaaaccg cctggttttc ttttaaaaga tggctctgct 240
 atcacttctg gatggacccg cggcgcatta gctagttggt gaggtaacgg ctcaccaagg 300
 cgatgatgcg tagccgacct gagagggtaa tcggccacat tgggactgag acacggccca 360
 gactcctacg ggagggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca 420
 acgccgcgtg agtgaagaag ggtttcggct cgtaaagctc tgttgttaaa gaagaacgtg 480
 ggtgagagta actgttcacc cagtgacggt att 513

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98134914

C12P19/04

2000000

※申請日：98.10.15

※IPC 分類：

C12R1/225

2000000

一、發明名稱：(中文/英文)

生產胞外多醣的方法以及一新穎的乳酸小球菌分離株
METHODS FOR PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDES
AND A NOVEL *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* ISOLATE

二、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株培養於一適於該菌株生長的培養基中。本發明亦揭示一株具有高胞外多醣-生產能力 (high exopolysaccharide-producing ability) 的新穎乳酸小球菌 05B0111 (*Pediococcus acidilactici* 05B0111)，它是以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，以及以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司。

三、英文發明摘要：

Disclosed herein are methods for producing exopolysaccharides, comprising cultivating a strain of *Pediococcus acidilactici* in a medium suitable for the growth of the strain. Also disclosed herein is a novel *Pediococcus acidilactici* 05B0111 having high exopolysaccharide-producing ability, which is deposited in the Biosource Collection and Research Center of the Food Industry Research and Development Institute under accession number BCRC 910420 and in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH under accession number DSM 22345.

七、申請專利範圍：

1. 一種乳酸小球菌(*Pediococcus acidilactici*) 05B0111，其以寄存編號 BCRC 910420 被寄存於財團法人食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，以及以寄存編號 DSM 22345 被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司。
2. 一種用於生產胞外多醣的方法，其包括：將一乳酸小球菌菌株培養於一適於該菌株生長的培養基中。
3. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該乳酸小球菌菌株是一如申請專利範圍第 1 項的乳酸小球菌 05B0111。
4. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該培養基是選自於由下列所構成的群組：一合成培養基以及一可食性材料。
5. 如申請專利範圍第 4 項的方法，其中該可食性材料是選自於由下列所構成的群組：流體乳品、濃縮牛奶、奶粉、果汁、豆奶、蔬果汁、健康食品、動物飼料、農產品、畜產品、水產品以及機能性素材。
6. 如申請專利範圍第 4 項的方法，其中該培養基包含有一選自於下列群組中的碳源：乳糖、果糖、麥芽糖、葡萄糖、糖蜜、半乳糖、木糖、木糖醇、菊糖、山梨糖醇、海藻糖、蔗糖，以及它們的組合。
7. 如申請專利範圍第 6 項的方法，其中該培養基包含有蔗糖。
8. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該培養基具有一範

圍落在 3 至 7 內的初始 pH 值。

9. 如申請專利範圍第 8 項的方法，其中該培養基具有一為 5 的初始 pH 值。
10. 如申請專利範圍第 2 項的方法，其中該乳酸小球菌菌株是於一範圍落在 25 至 37°C 內的溫度下被進行培養。
11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其中該乳酸小球菌菌株是於一為 30°C 的溫度下被進行培養。
12. 一種含有胞外多醣的乳酸小球菌培養物，它是藉由一如申請專利範圍第 2 至 11 項中任一項的方法而被製得。
13. 一種藥學組成物，其包含有一如申請專利範圍第 12 項的乳酸小球菌培養物，以及選擇性地一藥學上可接受的載劑。
14. 一種食品產品，其包含有一如申請專利範圍第 12 項的乳酸小球菌培養物。

AGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGACGTGCCTAATACATGC
AAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGATGA
GATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTAT
AACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCAC
TTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGG
GTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTA
ACTG TTCACCCAGTGACGGTATT

圖 1

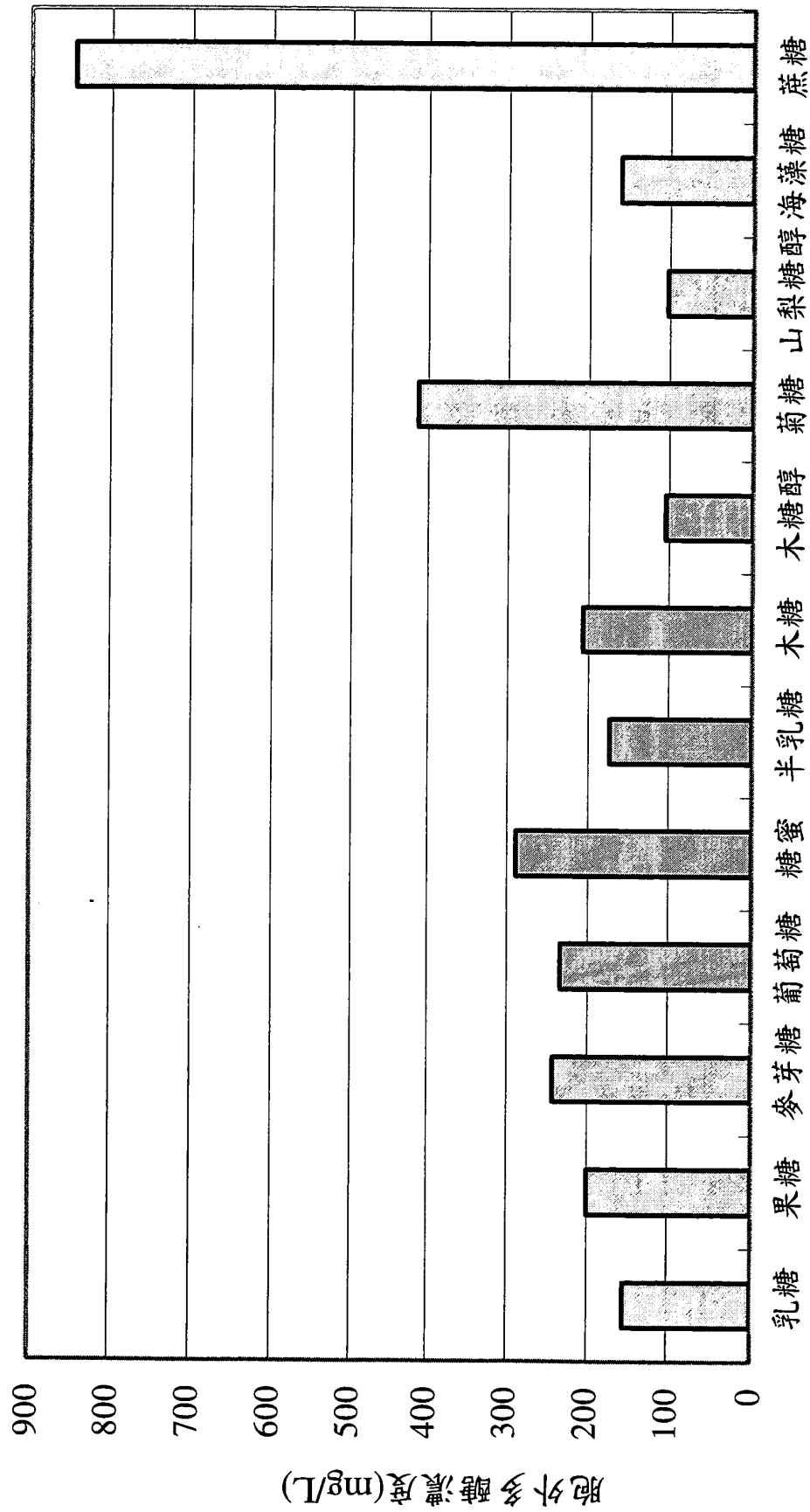


圖 2

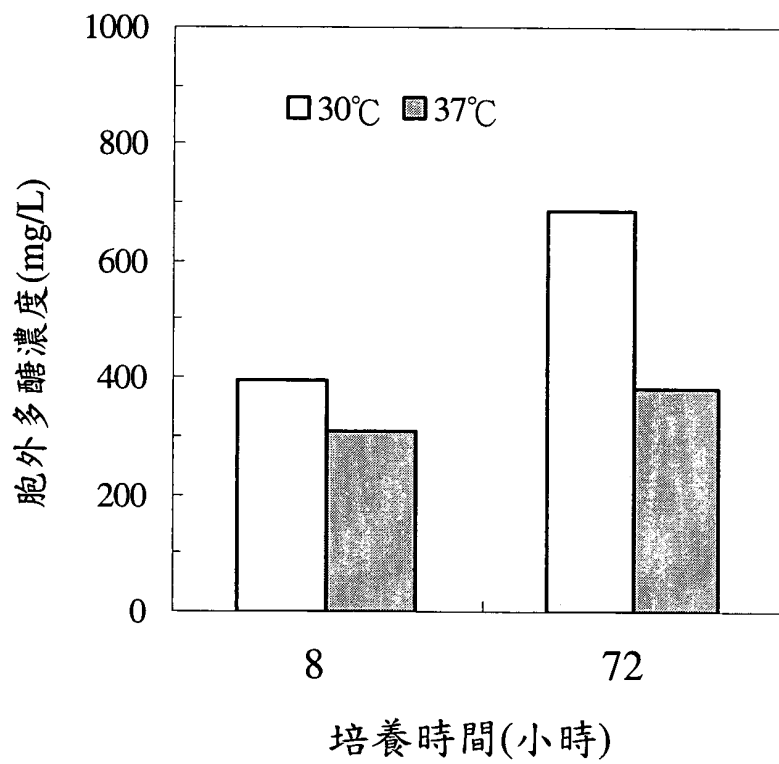


圖 3

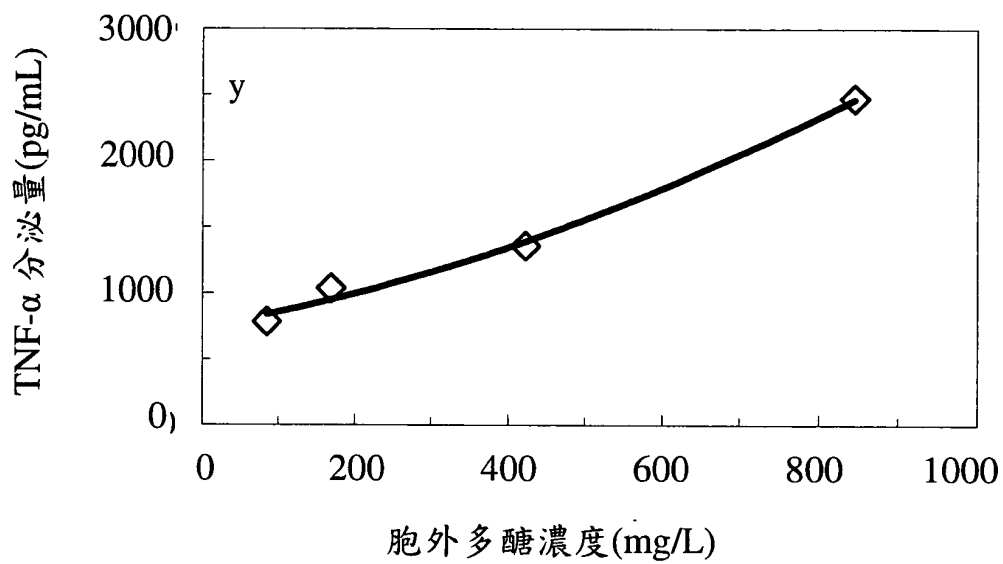


圖 4

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 (2)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)