

高苑科技大學
化工與生化工程研究所

碩士論文

乳酸菌發酵刺五加飲料最適化營養與製
程之開發

Study of Optimized Nutrients Formulation
and Process Development of Fermented
Acanthopanax Beverage by Lactic Acid
Bacteria

研究生：陳品翰
指導教授：王盛世

中華民國 102 年 06 月

摘要

本研究分為二部分：(1) 乳酸菌分離與鑑定；(2) 乳酸菌刺五加發酵保健飲料之開發。我們由市面上味全 LCA506 優酪乳分離、純化與 API 生化分析與 PCR 分子鑑定，得到乳酸菌為一 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain FQ005 (LPSPS5)。LPSPS5 乳酸菌與刺五加及水分別加入不同量的蔗糖(0%、5%、10%、15%、20%)或脫脂乳(0%、1%、2%、3%、4%)下於室溫下發酵培養。發現於含 5% 蔗糖或 3% 脫脂乳的發酵刺五加液有最大的乳酸菌數，分別為 4.7×10^8 cells/mL 與 1×10^9 cells/mL。以雙因子的中央合成設計法(central composite design, CCD)與實驗設計軟體(Design Expert)進行碳源(5% 蔗糖)與氮源(3% 脫脂乳)之最佳配方推算與實驗驗證，5% 蔗糖與 3% 脫脂乳可生成最佳乳酸菌數目。我們將乳酸菌、5% 蔗糖和 3% 脫脂乳與刺五加液進行發酵，於 86 小時發酵期間，我們發現 LPSPS5 乳酸菌生長於 36 小時與 72 小時有最佳生長數目，其生長情形呈現雙波峰之現象；其 pH 由 5.5 下降至 3.4；乳酸菌刺五加發酵液，發現都有很顯著量的總多酚，介於 120 至 220 mg Gallic acid/mL；總糖量介於 6.0 至 2.4 mg glucose/mL；有很顯著的 DPPH 自由基清除力，介於 4.7 至 5.5 mg Gallic acid/mL；很顯著的澱粉酶活性，介於 5.0 至 27.0 unit/mL；以氣相層析儀分析(GC)沒有發現甲醇、乙醇與乙酸含量；乳酸菌刺五加發酵液於風味、酸度、甜度、澀度、整體感、總接受度有很好的評價。綜其上述，乳酸菌刺五加發酵液有潛力成為一維護健康之保健飲料。

關鍵詞：乳酸菌、刺五加、API、PCR、細菌數、PH、功能性、感官品評

Abstract

This study is divided into two parts: (1) Isolation and identification of lactic acid bacteria; (2) Development of fermented health beverage of Acanthopanax by lactic acid bacteria. A lactic acid bacterium was isolated, purified and identified from Wei Chuan LCA506 yogurt obtained from market and further identified as *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain FQ005 (LPSPS5) by API biochemical analysis and PCR molecular identification. The LPSPS5 lactic acid bacteria, Acanthopanax, water with different amounts of sucrose (0%, 5%, 10%, 15%, 20%) or skimmed milk (0%, 1%, 2%, 3%, 4%) were mixed together and cultured at room temperature. The fermented Acanthopanax broth containing 3% sucrose or 5% skim milk has been found to produce maximum number of lactic acid bacteria, 4.7×10^8 cells/mL and 1×10^9 cells/mL, respectively. The best formula was selected as 5% sucrose and 3% skim milk by experimental identification of the best formula composition of lactic acid bacteria growth predicted by central composite design. The LPSPS5 lactic acid bacteria, 5% sucrose and 3% skim milk, and Acanthopanax liquid were added together and fermented. During 86 hr's fermentation, the growth curve of LPSPS5 lactic acid bacteria has shown a double peak that had the highest bacteria number at 36 and 72 hour. The pH was decreased from 5.5 to 3.4; The Acanthopanax fermentation broth were found to have a significant amount of total polyphenols, between 120 and 220 mg gallic acid / mL; The total sugar contents were ranged from 6.0 to 2.4 mg glucose / mL; There are significant DPPH radical scavenging activity, between 4.7 and 5.5 mg Gallic acid/ mL; The amylase activity was significantly existed with 5.0 to 27.0 unit / mL; There is no detectable amount of methanol, ethanol and acetic acid in fermented broth by GC analysis. There are good scores of flavor, acidity, sweetness, astringent degree, the overall sense, and the total acceptance in sensory evaluation of Acanthopanax fermentation broth. Taken together, the Acanthopanax fermentation broth by lactic acid bacteria has potential to be a health care beverage.

Keywords: Lactic bacteria, Acanthopanax, API, PCR, bacteria number, pH, functionality, sensory evaluation

誌謝

本論文承蒙指導教授 王盛世博士兩年來悉心指導與鼓勵，復蒙口試委員中國醫藥大學 高銘欽 教授、高苑科技大學 白育綸 副教授於論文初成與口試期間詳細審閱及斧正，提供寶貴意見始克完成，由衷感謝，特此僅致謝忱。

兩年研究期間，承蒙系上師長、學長姐、同學及學弟妹之關切與鼓勵，感謝筑維學長與韋助、李文、文弘、清鴻、政浩、昇修、孟珊、等學弟妹，以及我最深愛的女朋友玉嵐，由於你們的鼓勵與陪伴使我的試驗與論文得以順利完成，並使這漫漫研究生涯填滿了動力，僅此再次獻上由衷的謝意。

僅將此微薄的研究成果給多年來育我劬勞的父母，陪伴我成長並給我關懷的姊姊盈臻，感謝你們給我的支持、鼓勵與關心，使我能無後顧之憂完成學業，並與我分享生活上的歡喜與憂愁。最後籍此論文成果，獻給我敬愛的師長、家人及好友們，謝謝你們！



目錄

摘要.....	1
Abstract.....	2
誌謝.....	3
目錄.....	4
第一章 前言.....	7
第二章 文獻回顧.....	9
2.1.1 益生菌簡介.....	9
2.1.2 乳酸菌定義.....	9
2.1.3 乳酸菌之分類.....	10
2.1.4 乳酸菌益處.....	10
2.2.1 刺五加介紹.....	12
2.2.2 刺五加的由來及原性狀.....	13
2.2.3 刺五加的主要產地分布.....	13
2.2.4 刺五加於傳統醫學中的功效.....	13
2.2.5 刺五加臨床應用.....	14
2.2.6 刺五加化學成分.....	16
第三章 實驗材料與方法.....	18
3.1 實驗材料.....	18
3.1.1 使用藥品.....	18
3.1.2 使用儀器.....	19
3.2 實驗方法.....	20
3.2.1 乳酸菌培養、分離與鑑定.....	20
3.2.2 乳酸菌活化.....	20
3.2.3 液態培養.....	21
3.2.4 乳酸菌鑑定.....	21

3.2.4.1	API 生化鑑定分析	21
3.2.4.2	PCR 分子生物鑑定	22
3.2.5	乳酸菌刺五加發酵液分析	23
3.2.5.1	刺五加萃取配置	23
3.2.5.2	乳酸菌於刺五加萃取發酵	24
3.2.5.3	乳酸菌數測定	24
3.2.5.4	實驗設計與分析方法	24
3.2.6	乳酸菌刺五加發酵液功能性分析	24
3.2.6.1	總多酚測定	24
3.2.6.2	DPPH 自由基清除能力測定	25
3.2.6.3	總糖測定	27
3.2.6.4	澱粉分解酶活性測定	27
3.2.6.5	GC 分析甲醇、乙醇或有機酸生成	29
3.2.6.6	感官品評	29
3.2.6.7	數據處理	30
第四章	結果與討論	31
4.1	乳酸菌培養、分離與鑑定	31
4.1.1	乳酸菌的分離、純化及保藏	31
4.1.2	API 生化分析鑑定	32
4.1.4	PCR 分子生物鑑定	32
4.2	LPS5 乳酸菌生長與發酵刺五加飲料之開發	36
4.2.1	不同碳源或氮源的添加對 LPS5 乳酸菌生長之評估	36
4.2.1.1	LPS5 乳酸菌於含不同量蔗糖之刺五加生長	36
4.2.1.2	LPS5 乳酸菌於含不同量脫脂乳之刺五加生長	37
4.2.1.3	雙因子的中心組實驗設計推算最高生長數目之最佳配方與驗證	37
4.2.2	最適配方之發酵	39
4.2.2.1	最適配方之刺五加發酵液乳酸菌生長情況與 pH 值變化	39
4.2.2.2	最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液之功能性分析	41
4.2.2.3	總多酚	41
4.2.2.4	總糖	42
4.2.2.5	DPPH 自由基清除力	43
4.2.2.6	澱粉酶活性測定	44
4.2.2.7	GC 分析甲醇、乙醇或有機物成量	45
4.2.2.8	感官品評	47
4.3	結論	48



第一章 前言

發酵食品的利用廣泛存在於世界各文化層面，考古學家曾在高加索地區發現距今約 6500 年前盛裝過葡萄酒的陶製容器。距今約 5000 年前（西元前 2800 年）的古埃及雕刻中即有麵包與啤酒工作坊之景象，而中國的大豆發酵最早的記載距今約 3000 年（西元前 1000 年）。發酵這個字最初用在酒的製造(林, 1997)。現今多形容微生物降解營養物質的過程，發酵替食物帶來的許多的好處，微生物降解利用養分生長的同時也帶來了許多附加價值。酵母菌或乳酸菌的發酵品，如饅頭、豆腐乳、臭豆腐等(張, 2006)。麵包或饅頭帶給人的蓬鬆柔軟的口感。豆腐乳及其他豆類食品也因微生物發酵過程了將大分子的蛋白質分解成人體好吸收的氨基酸。中國人愛喝的茶飲-普洱茶，也是由微生物附著發酵製出獨特香氣而廣受喜愛(徐, 2009)。

益生菌是泛指對人體健康有益的微生物，廣泛應用在人們的飲食及生活中，也是傳統食品中重要的微生物之一(Havennar and Husis in't Veld, 1992)。乳酸菌並非學術上微生物分類的專業用語，一般指能利用碳水化合物進行發酵且可產生大量乳酸的微生物稱之為乳酸菌，通常具有：(1)格蘭氏陽性菌 (2)通常缺乏過氧化氫酶活性及細菌色素 (3)為厭氧、微好氧、耐氧厭氧性或兼性厭氧菌，一般可於有氧環境生長，但以無氧狀態生長較佳，亦有絕對厭氧者(Carr, Chill and Maida, 2002)。乳酸菌的來源相當廣泛，從母乳、嬰兒糞便、飼料到植物果實，醃製食品中都存在。研究指出乳酸菌可以提升人體免疫力(潘, 2005)。乳酸菌屬於「一般公認安全」(GRAS)之菌株，常常應用於食品添加、增進口感與風味(陳, 2008)。

刺五加為寒帶地區植物，屬於五加科(Araliaceae)五加屬(Acanthopanax)。正式學名為 *Eleutherococcus senticosus* (Ruper.et Maxim.)Maxim. 為最早公開使用之名稱。第一學名為 *Eleutherococcus senticosus* Extract(祖, 2005)。各地方俗名不同，

日本稱為蝦夷五加木。蘇俄稱為 Ereuterokoku。中國東北稱為刺拐棒。遼寧稱為刺木棒。黑龍江稱為老虎鏢子。台灣則稱為刺五加或五加皮(歐, 1999)。

先前我們將酵母菌或北蟲草與茶葉共同培養下，除了於微生物發酵過程可產生二次代謝物外，微生物更可以將茶葉的有效成分更有效率的萃取出來。本研究利用乳酸菌和刺五加共同發酵，於發酵過程中，由乳酸菌本身產生有益的代謝物，有助於人體健康，更重要的是乳酸菌可以將刺五加的有效之功能性成分有效率的萃取出來，作為身體保健之成分(許, 2011; 許, 2013; 王, 2009)。

本研究選取來自於市售優酪乳中的乳酸菌，將其培養於刺五加與水中，並添加不同比例的蔗糖(碳源)或脫脂乳(氮源)，調查乳酸菌之生長情形。本研究以 Central Composite Design 實驗設計法設計，並利用 Design Expert 實驗設計軟體計算其乳酸菌數，求出可生長最多乳酸菌之最佳化配方，並以最佳化配方進一步調查乳酸菌之最佳生長數目之時程，並進行乳酸菌刺五加發酵液的功能性分析，以期建立一具有科學文件的乳酸菌發酵刺五加飲料(徐 及 何, 2010)。

第二章 文獻回顧

2.1.1 益生菌簡介

益生菌(Probiotics)一詞起源於希臘文”for life”，意指對生命有益(李, 2003; 李及林, 2005)。1996年波特蘭之俄勒岡依學校之微生物學教授 Richard Parker，相對於會殺死微生物之抗生素物質(Antibiotics)取名有保護生命作用之有用物質(Protect of Biotics = ProBiotics)(Gomes and Malcata, 1999)。其機制為透過兩種菌株互助促進生長之共生機制(ProBiotics)改善腸道內菌群的平衡、增強免疫系以及促進營養之消化與生化作用(Kopp-Hoolihan, 2001; Perdigon et al., 1999; Sanders, 1999; Sen and Babu, 2005; Tannock, 1999)。在20世紀初期，諾貝爾得主俄國微生物學家 Eli Metchnikoff 發現巴爾幹半島當地人普遍長壽，並有食用大量優格的習慣;因而進行優格內細菌對人及其他動物益處的研究工作，並於1908年進而提倡”長壽說”(李, 2003; Heller, 2001; Kopp-Hoolihan, 2001)。當益生菌對於便秘療效之首次臨床研究於1930年完成後，使得有關乳酸菌之營養生理效果廣受重視(高野, 1998)

2.1.2 乳酸菌定義

乳酸菌是相當龐雜的菌群，在定義上是較為廣泛的。部分學者指出，乳酸菌之定義係指一種能夠利用碳水化合物進行發酵，產生多乳酸之細菌總稱(Fuller, 1997; Sanders, 1999; Sen and Babu, 2005; Tannock, 1999)。這些菌株通常具下列共同特性: (1)為革蘭氏陽性菌(無運動性、不產孢)、營養需求複雜; (2)在顯微鏡下觀察為桿菌或球菌; (3)需有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素及多種生長素養分供給其生長需求; (4)通常缺乏過氧化氫酶(Catalase)活性及細胞色素，為厭氧、微好氧、耐氧厭氧或兼性厭氧菌，一般可於有氧環境生長，但以無氧狀態生長較佳，亦有絕對厭氧; (5)代謝葡萄糖後能產生40~50%以上之乳酸; (6)乳酸菌發

酵產生乳酸、乙醇及二氧化碳為其主要發酵產物，並可產生乙醛及雙乙醯等芳香代謝物質，而促進良好風味之生成(廖, 1998; Desiere et al., 2002; Lin et al., 2006)。

乳酸菌分布廣泛，在許多環境中都可以和其他微生物構成穩定的生態系共存共榮。在自然界只有動植物的地方，就有足夠的營養供乳酸菌生長，舉凡動的乳汁、消化道、陰道、糞便、動物殘骸堆積物、植物的樹液、花蜜、植物殘骸堆積物、果實損傷部位等，都可發現乳酸菌的存在(蔡, 1998)。

2.1.3 乳酸菌之分類

乳酸菌為一種被廣為研究之菌株，且以各種技術予以鑑定及分類(Kunene et al., 2000)。乳酸菌可明顯將糖類(例如葡萄糖)發酵成為乳酸，原有一般常見的主要成員包括 *Lactobacillus* (Lb.)、*Leuconostoc* (Leu.)、*Pediococcus* (Ped.)及 *Streptococcus* (Str.)等 4 個菌屬，但是因為菌株不斷被發現並且重新分類命名(Yanagida et al., 1997)，因此目前乳酸菌菌屬共計包括有 *Aerococcus*(A.)、*Carnobacterium*(Carn.)、*Enterococcus*(Ent.)、*Lactococcus*(Lc.)、*Lactobacillus*(Lb.)、*Leuconostoc*(Leu.)、*Oenococcus*(O.)、*Pediococcus*(Ped.)、*Streptococcus*(Str.)、*Tetragenococcus*(Tet.)、*Weissella*(W.)以及 *Vagococcus*(V.)等 12 個菌屬(Adams, 1999; Bottazzi, 1998; Liu, 2003; Stiles and Holzapfel, 1997)。

2.1.4 乳酸菌益處

Black 等學者於 1989 年給予 94 位埃及觀光客 *Bifidobacteria* 及 *Lactobacilli* 乳酸菌進行試驗，結果顯示下痢發生機率減少了 39%。Lin 等學者於 1991 年以含有 10^8 CFU/ml *Lactobacilli* 乳酸菌牛奶給予 10 位年齡分佈於 24~40 歲有乳糖不耐症的人數週，結果顯示 *Lactobacilli* 可以促進乳糖代謝，明顯改善其因飲用牛奶而造成之腹瀉現象(Black, F.T., Anderson, P.L., Qrskov, K. and Laulund, S., 1989)。Linbeck 等學者於 1991 年給予健康自願者

Lactobacilli 及 Bifidobacteria 乳酸菌，及果顯示糞便中厭氧革蘭氏陽性球菌、Bifidobacteria、Eubacteria 和 Lactobacilli 菌量均提高 (Linbeck,A. and Nord,C.E., 1991)。Alm 於 1993 年以 23 位有長期便秘的老人，給予 5~6 週 Lactobacilli 及 Bifidobacteria 乳酸菌，可減少急性痢疾及輪狀病毒的發生 (Alm,L et al., 1993)。以 Lactobacilli 和 Bifidobacteria 乳酸菌膠囊給予 23 位健康受試者服用 14 天，結果顯示給予乳酸菌膠囊的受試者有 18% 感染 *C.difficile*，而對照組有 41% 感染 *C.difficile* (Nord et al., 1996)。以 Lactobacilli 和 Bifidobacteria 乳酸菌給予 30 位年齡 19~59 的健康成人服用 3 週，結果顯示其糞便中 *L. acidophilus* 及 *Bifidobacterium* 的菌量增加，血清抗體 IgA 總量明顯上升 (Link Amster et al., 1994)。Fukushima 等於 1998 年每天以 10^9 的 *Bifidobacterium* 給予 7 位年齡在 15~31 個月健康幼兒服用 21 天，結果顯示糞便中總血清抗體 IgA 及小兒麻痺病毒抗體均比測試前提高 (Fukushima,Y et al., 1998)。1974 年 Mann 與 Spoerry 兩位學者發現非洲的馬賽族人在吃大量由 *Lactobacillus* strains 發酵的牛奶後，血清中的膽固醇含量會下降，也因此開啟了關於乳酸菌是否具有降低膽固醇能力的研究 (Mann,G.V. and Spoerry,A., 1974)。

Gilliland 等學者於 1980 年自腸道中分離出許多珠乳酸菌培養於含有 0.5% 膽鹽之 MRS 培養基中，並同時進行乳酸菌降低膽固醇之體外試驗，發現具降低膽固醇功效之乳酸菌株在含有膽鹽培養基中生長速率較快，並且發現當培養基中沒有添加膽鹽時，菌株就不具有降低膽固醇的能力。根據以上結果，Gilliland 等學者推測具有降低膽固醇功效的菌株，具有較好的膽鹽耐受性，且同時發現乳酸菌必須要有膽鹽的存在，才能降低培養基中的膽固醇 (Gilliland et al., 1980)。

Gilliland 等學者於 1985 年將具有降低膽固醇功效之 *L.acidophilus*，培養於含有膽固醇培養基中 24 小時之後，同時分析培養基與菌體中的膽固醇含量，發現

培養基中減少的膽固醇量，和菌體中增加的膽固醇量幾乎相等，因此推測膽固醇似乎是以某種方式進入菌體內，或適合菌體結合。而 Gilliland 等學者也同時發現，雖然乳酸菌為兼性厭氧，但是必須培養於厭氧環境下，才具以降低膽固醇之活性 (Gilliland et al., 1985)。

Klaver 及 ven der meer 於 1993 年利用 HPLC 的分析方法，發現培養具降低膽固醇功效之 *B.bifidum* 時，*B.bifidum* 會將培養基中所添加的結合性膽鹽，轉變成非結合性膽鹽，使其和膽固醇形成共沉澱，顯示 *B.bifidum* 利用將膽鹽變成非結合性膽鹽並使其沉澱的方式，而不是利用吸附膽固醇的方式來降低培養基中的膽固醇 (Klaver F.A. and ven der Meer R., 1993)。1997 年 Tahri 等人在體外試驗時發現，培養於含 0.1~0.5% 膽鹽培養基中的 *B.breve*，在越高膽鹽濃度的培養基中，菌株降低膽固醇的能力亦越強。因此證明，在乳酸菌可以耐受的膽鹽濃度範圍內，乳酸菌降低膽固醇的能力和環境中膽鹽的量成正相關，當培養基中膽鹽的含量增加，乳酸菌降低膽固醇的能力也就越強 (Tahri et al., 1997)。

Dambekodi 與 Gilliland 於 1998 年將 *L.acidophilus* 分別培養於含有膽固醇與不含有膽固醇的培養基中，並於培養 24 小時之後，對菌體進行超音波震盪。發現培養在含膽固醇培養基中的乳酸菌，相較於培養在含有膽鹽但是沒有膽固醇培養基中的乳酸菌，對於超音波震盪具有耐性，因此推測乳酸菌吸收膽固醇作為細胞膜的組分之一 (Dambekodi P.C. and Gilliland S.E., 1998)。綜合上述所言，食用乳酸菌菌株及其製品，確實可以改善一些諸如下痢、乳糖不耐等症狀，並提高自己抑制病原菌及降低膽固醇之效果。

2.2.1 刺五加介紹

刺五加為寒帶地區之植物，屬於五加科 (Araliaceae) (Ohashi, 1989)。生藥名為 *Radix Acanthopanax Senticosi* (歐, 1999)，植物正式學名為 *Eleutherococcus Senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. (中藥志, 1981)。植物保留學名為

Acanthopanax Senticosus (Ruper.et Maxim.) Harms.，俗名 Ciwujia。第一學名為 Eleutherococcus senticosus Extract，西方國家報導資料採用此名，俗名西伯利亞人蔘 Siberian Ginseng(Eleuthero-Ginseng)。第二學名為 Acanthopanax Extract。中文學名為刺五加，又名五加蔘。日本名為蝦夷五加木。蘇聯名為 EREUTEROKOKKU。在中國大陸東北別名為刺拐棒，於黑龍江為老虎鐮子、於遼寧為刺木棒（食用中醫辭典, 1992）。

2.2.2 刺五加的由來及原性狀

與人蔘同屬五加科植物，藥效部分為刺五加的乾燥根及根莖，以根為主。繁殖是以根部延伸的方式，生於山地林下、林邊，長成與地表呈水平的地下莖部。夏秋採挖，剝取根皮曬乾。原植物為灌木，高一米多。莖枝密生細刺。掌狀複葉，小葉 3-5 枚，有短柄，橢圓狀倒卵形至矩圓形，長 6-12 厘米，邊緣有雙重銳尖鋸齒。傘型花序單個頂生或 2-4 個聚生，聚多花；花梗長 1-2 厘米，單性異株或雜株。果實近球形，有五稜。刺五加的藥材性狀為根莖成節狀不規則圓柱形，直徑 1.4~4.2 厘米。根呈圓柱形、多扭曲、長 3.5~12 厘米、直徑 0.3~1.5 厘米；表面灰褐色或黑褐色、粗糙、有細縱溝及皺紋、皮較薄、有的剝落，剝落處呈灰黃色。質硬、斷面黃白色(中華人民共和國藥典, 1995; 祖, 2005)。果實近球型，五稜型，直徑約 8 毫米。

2.2.3 刺五加的主要產地分布

刺五加主要生長在寒溫帶的大陸東北及俄國西伯利亞，其中以中國黑龍江省流域產量最大。在中國之吉林、遼寧、河北、陝西等省地也有分布，向南往西可經長白山、霧靈山到太行山，向北往東，可達朝鮮和日本北海道(中藥大辭典, 1980)。

2.2.4 刺五加於傳統醫學中的功效

刺五加自古以來是我國一種常用的藥材，作為藥品的歷史已有兩千多年。味辛、微苦、性溫，歸脾、腎、心經(中藥志, 1981)。補中、益精、壯筋骨、強意志，久服”輕身耐勞”(趙一等, 1989)。益氣健脾，補腎安神。對於脾臟虛弱、體虛乏力、食慾不振、腰膝痠痛及失眠多夢尤其有效(黑澤, 1994)。刺五加的功效側重於補益強壯方面，最早見於漢代[神農百草精]，將它列為上品藥。上品乃指無毒，久服可以輕身、延年益壽而無害(楊, 1991)。

中國歷代本草醫藥書籍均有紀載，刺五加被視為具有添精補髓及抗衰老作用的良藥。明朝李時珍[本草綱目]對刺五加做了很高的讚譽:以五葉交加者良，故名五加，又名五花;五加治風濕，壯筋骨，其功良深。寧得一把五加，不用金玉滿車。刺五加於[實用補養中藥一書]中記載，屬於補氣藥，具有補虛扶弱的功效，可用來預防或治療體質虛弱之症候，滋補強壯，延年益壽(楊, 1995)。黑龍江省中醫研究指出，刺五加是一種良好的扶正固本藥，具有與人蔘相似的療效(史都, 1987)。

2.2.5 刺五加臨床應用

刺五加在中醫學界廣泛使用，中國大陸黑龍江醫藥研究所中藥研究室(吳, 1984)對刺五加的功能和臨床治療應用皆有記述。刺五加對以下病症亦有西方研究實驗的效果實例(Baranov, 1982; Brekhman II and Kirillov OI, 1969a; Brekhman II and Dardymov IV, 1969b; Winterhoff et al., 1993)。

1. 慢性氣管炎:中國大陸 6 個醫療單位共 402 例慢性氣管炎臨床觀察，刺五加對慢性氣管炎明顯改善。病人用刺五加後睡眠改善，飲食增加，抗寒及抗感冒能力提高，體力增加(杭, 1998)。利用小白鼠觀察到刺五加有一定的鎮咳祛痰作用，並可減輕感冒症狀(Roxas and Jurenka, 2007)。

2. 神經衰弱:刺五加對神經衰弱有顯著療效。在中國大陸 9 個醫療單位觀察 559 例，總效率在 90% 以上。患者服藥後起效時間為 3-5 天，感到服用後比服用前提前入睡，增加睡眠時間和深度，明顯改善病人失眠、多夢、心悸、健忘、乏力等症(廖，1994)。病人體重增加，消除患者全身無力、失眠、食慾不振的症狀(Baranov,1982)。另外對抑鬱型的精神病有較好的療效，使抑鬱減輕、活動和工作能力提高(苗，2001)。人蔘、刺五加及紅景天保護大腦神經免受各種損傷，並對治療帕金森病退化可能有效(Bocharov et al., 2008)。

3. 心血管系統：在治療過程中觀察到，刺五加具有“益氣、安神、活血”三方面功能，並有相互協同作用(Golotkin and Bojko, 1966)。刺五加對冠心病、高血壓、低血壓有一定療效，能減輕各種症狀，對不正常血壓有調節作用(Brekhman II and Kirillov OI, 1969a)。對高血壓患者，產生一種逐漸、溫和地降低動脈壓的作用(吳, 1984; 張等, 2008)。刺五加被證實有助適應力(Brekhman II and Dardymov IV, 1969b)。對於麻醉貓皮下或靜脈注射刺五加，能擴張腦血管改善大腦供血量(陳, 2002)。Maslov and Guzarova(2007)刺五加提取物(ESE)(1 毫升/公升)補充 8 天，可預防大暑心臟損害，因刺五加增加大暑血漿中 beta-腦內啡的水準，具抗心律失常的保護作用。Facchinetti et al. (2002)刺五加降低健康人的心血管應激反應。

4. 補虛弱:刺五加用於過度疲勞及艱苦條件下工作的人可以預防疲勞(Bahrke and Morgan, 2000)。而對運動過少者，服用刺五加則可增加運動能力(吳, 1984)。刺五加增強耐缺氧能力，增強身體在低壓、低氧狀態之活力(空氣稀薄區如高山、下水道、隧道、潛水、密閉空間等)(傅, 1981)。Panossian and Wilman (2009)刺五加的適應原作用可上調 Hsp70JNK-1 和 DAF-16，導致精神和身體的性能增強可能增加長壽。

5. 改善白血球減少症:刺五加有增強骨髓造血功能，對正常大鼠有升高紅血球及血色素的作用，對白血球減少有升高作用(Nishibe et al., 1990)。

6. 糖尿病:刺五加治療糖尿病,可減輕病人口渴、虛疲等症狀。尿尿糖減低,血糖也稍降,從而減少胰島素的用量(吳, 1984)。

7. 降血脂、改善動脈血管硬化:刺五加對於血液中的脂質有正常化的效果(Facchinetti et al., 2002)。日本東京大學藥學研究所發現,刺五加可使血中膽固醇降低 21-100mg/dl (久保, 1993)。配糖體 A 可促進排泄人體中膽固醇,抑制血液從胃腸中吸收不良的膽固醇及脂肪,以慢慢除去附在血管內壁的膽固醇及脂肪,治療高血膽固醇症;亦可軟化血管及回復血管能力,促進血液循環,預防動脈血管硬化。上海第七藥廠實驗證明,刺五加根、莖、葉和果實均有增加動脈流量的作用(廖, 1994)。

8. 提升免疫能力:Glatthaar et al. (2001)及 Schmolz et al. (2001)指出刺五加有提升免疫力的作用。蘇州醫院微生物研究室的研究發現,刺五加提取物可以促進免疫細胞產生,可以促進體內殺手細胞(NK)細胞的產量與活性(久鄉, 2001)。刺五加具有極為顯著的免疫提升作用(Steinmann et al., 2001; Rogala et al., 2003)。

2.2.6 刺五加化學成分

一般從刺五加中可分離到七種配糖體(刺五加苷;Elutheroside),其比例為 A:B:B1:C:D:E:F=8:30:10:12:24:2:1。刺五加另含 SOD (Superoxide dismutase)可抑制自由基,具有抗氧化作用,可增加人體免疫力、防止老化及促進健康(久保德三, 1993)。刺五加亦含微量的維生素 B1, 維生素 B, 維生素 C 及維生素 A (久鄉晴彥, 1991)。礦物質方面,刺五加含微量的錳、銅、鉛、鎂、鐵、鈉、鉀及鈣(久鄉晴彥, 1991)。

刺五加之成分及其生理作用

成分	生理作用
刺五加苷 A (胡蘿蔔苷, Daucosterol , β-sitosterol glucoside)	促進膽固醇排泄、防止血液中膽固醇過高症
刺五加苷 B (紫丁香苷, Syringin)	促進腺功能、抗疲勞作用、降血糖、抗輻射作用
刺五加苷 B₁ (Isofraxidin-7-α-1-glucoside)	促進腺功能、促膽汁分泌、具鎮靜作用、抗癌作用
刺五加苷 C 乙基半乳糖苷 (Methyl-β-glucoside)	
刺五加苷 D (Syringaresinol)	
刺五加苷 E (Syringaresinol 4',4"-di-O-β-D-glycopyranoside)	抵抗壓力、抗疲勞作用、促進腺分泌
刺五加苷 E ₂	
多醣類 (Polysaccharides PES-A,PES-B)	增強免疫作用、保護肝臟解毒作用
芝麻素 (Sesamin)	止咳、祛痰作用、抗結核菌
咖啡酸 (Caffeic acid)	抗氧化、抗肝炎、抗癌、抗痛風
咖啡酸乙醯酯 (Caffeic acid ethyl ester)	抗氧化作用
金絲桃甙 (Hyperin)	有鎮痛，保護腦缺血損傷等作用，並對鈣離子內流有影響
三萜皂苷 (Triterpenoid Saponins)	抗癌、免疫調節、抗血小板凝集及抗菌等

(Frolova et al., 1971; Dardymov IV et al., 1978; Farnsworth et al., 1985; Anetai et al., 1987; Nishibe et al., 1990; Segiet-Kujawa E & Kaloga M, 1991; McGuffin et al., 1997;

Davydov and Krikorian, 2000; Li et al., 2001; Wang et al., 2003; Lee et al., 2004; Ryu et al., 2004; Shi et al., 2005; Park et al., 2006) ◦



第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

LCA506 活菌發酵乳(Lactobacilius casei)購自味全公司、刺五加藥材購自高雄市路竹、二級砂糖來自台糖、紐西蘭脫脂奶粉由恆天然(Fonterra)公司供應、Lactobacilli MRS Broth 購自 BD Difco™ 公司。

3.1.1 使用的藥品

藥品名稱	化學式	型號/形態
SIGMA		
Gallic acid 沒食子酸	$C_7H_6O_5$	G7384 Solid
Azocasein 偶氮酪蛋白		SI-A2765 Solid
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 2,2-二苯基-1-苦味肼基(DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	SI-D9132 Solid
Phenol 酚	C_6H_6O	SI-P-1037 Solid
3,5-Dinitrosalicylic acid 3,5-二硝基水楊酸	$C_7H_4N_2O_7$	
J.T.Baker		
Potassium sodium tartrate , 4-hydrate,crystal 酒石酸鉀鈉	$KOCO(CHOH)_2COONa$ $\cdot 4H_2O$	JT-3262-01 Solid

sodium phosphate,dibasic, Anhydrous 磷酸氫二鈉	Na_2HPO_4	JT-3828-01 Solid
Sodium Phosphate,monodasic ,monohydrate ,Crstal 磷酸二氫鈉	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	JT-3818-01 Solid
Trichloride acetic acid 三氯醋酸	Cl_3CCOOH	JT-0414-01 Solid
MERCK		
Starch soluble 澱粉		1252 Solid
Iron chloride 無水氯化鐵	FeCl_3	803945A Solid
Acetic acid 醋酸	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	

3.1.2 使用儀器

儀器名稱	廠牌	型號
加熱攪拌器	CORNING	PC-320
恆溫培養箱	HIPOINT	600
振盪器	VORIEX	G-560
微電腦低溫離心機	Hettich	UNIVERSAL32R
高速離心機	EPPENDORF	CENTRIFUGE5810R

pH 計	SUNTEX	SP-2200
氣相層析分析儀	TRACE GC	Therom Finnigan
氣相層析管柱	RESTEK	RT-QPLOT
酵素免疫分析儀	Dynamica	Halo MPR-96
-80 度冰箱	SAYAN	MDF-U50V
-20 度冰箱	SAYAN	MDF-U333
冷藏冰櫃	SAYAN	MPR-311D(CH)
恆溫水槽	WISOOM	SB-7D

3.2 實驗方法

3.2.1 乳酸菌培養、分離與鑑定

選取來自味全公司生產之 LCA506 活菌原味發酵乳，以 10 倍稀釋法，依次進行稀釋。吸取稀釋的菌懸液 1 mL 塗佈於 MRS (含 0.5% CaCO₃) 固體培養基，於 37°C 條件下培養 2~3 天。挑取周圍有透明圈、形狀各異的單一菌落，在 MRS 平板上反復劃線純化直到得到單一菌落。將其分別轉移至 MRS 斜面培養基上，做好標記，於 4°C 條件下保藏。乳酸菌的初步鑑定：對分離純化所得到菌落分別進行革蘭氏染色，於顯微鏡下觀察其細胞形態，乳酸菌可被染劑染成藍紫色，其形態為桿狀，並將純化後的乳酸菌於液態培養基培養後，加入 50% 甘油，震盪混合後置放於 -70°C 冰箱貯藏。

3.2.2 乳酸菌活化

由-70°C 冰箱將其取出，將冷凍保存管置於碎冰上，回溫至可操作後並沾取 10 µl 保存菌液，培養於液態 MRS 培養基中，置於 37°C 培養箱中、100 rpm 搖盪 16 hr，沾取 10 µl 以四區畫線塗佈於 MRS 培養基上。

3.2.3 液態培養

將活化培養乳酸菌之單一菌落於液態 MRS 培養基，於 37°C 培養箱中、100 rpm 搖盪培養 16 hr。

3.2.4 乳酸菌鑑別

3.2.4.1 生化分析鑑別：以 API 鑑定試劑盒鑑定與判別乳酸菌之類別

1. 原理及鑑定菌種

在 API 50 CH strip 的各個試驗孔中，含有 49 種不同的碳水化合物，可測知細菌對碳源的利用情形；在接種細菌之後，細菌在其中生長會造成培養基的 pH 值的變化，由培養基的顏色變化來判定細菌的種類。

2. 操作步驟

取出分離純化好的乳酸菌，並將菌活化培養 18-24 小時成為純菌落。調配細菌懸浮液及接種：將培養基上所有菌落挑入 2 毫升無菌水中混合均勻為濃菌液 S。再將 S 菌液滴入 5 毫升無菌水中，調整濃度至 McFarland No2，記下所滴入的滴數為 n。接著在 API 50 CHL Medium (10 毫升) 中滴入 2n 滴的 S 菌液，混合均勻使其最後濃度成為 McFarland No.2。將此菌液加滿 API 50 CHB strip 各個試驗孔的 tube 部分，在各個試驗孔的 cupule 部分覆蓋無菌礦物油。在需氧環境下 36°C 培養 48 小時。判讀：在 24 小時及 48 小時各作一次判讀。當培養基中所含的 bromocresol purple 因為 pH 值的轉變而由紫色轉成黃色時，即為正反應。第 25 號管的 Esculin 試驗，由紫色轉成黑色亦為正反應。將結果記錄在

result sheet 上，正反應塗黑，負反應留白，+/- 或-/+則劃 X，再以電腦 APILAB 軟體查詢結果。

3.2.4.2 分子生物鑑定：以 PCR 鑑定乳酸菌之類別

1. 乳酸菌培養與製備

將置於-70 °C 下儲藏之乳酸菌菌株取出至於冰桶當中解凍，取 50 µl 轉移於 MRS 液態培養液培養 12~15 hr。然後原液態培養液分別製備或稀釋成為原液、10 倍、100 倍。

2. PCR 反應

準備 3 管 0.2 ml 或 0.5 ml 的 PCR tube，視 PCR 機型的不同而定，分別加入 10X PCR buffer 5 µl、dNTP Mixture (2.5 mM) 4µl、Primer1 (Forward primer: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) PFD1(5uM)0.5 µl、Primer2 (Reverse primer: ACGGCTACCTTGTTACGACTT)PFD2(5uM) 0.5 µl、Nuclease free water 39 µl、稀釋之 P(+) Control DNA 0.5 µl 或 0.5 mL 菌液、Taq DNA polymerase (2 U/µl) 0.5µl，total 50 µl 為配置標準反應溶液總量，再加入 80 µl 礦物油覆蓋，將 PCR tube 置入 PCR 機器的反應槽中，蓋上上蓋，設定標準 PCR 反應溫度及時間 94 °C 3 分鐘、94 °C 1 分鐘、45 °C 1 分鐘、72 °C 2 分鐘、72 °C 10 分鐘、4 °C 24 小時，後開始反應。完成 PCR 反應後，其 DNA 經由 Clean set 套組清洗過後，並以電泳分析如下

〈1〉勝任細胞 JM-109 製作:隔夜培養菌液取 1.5 ml 加入 150 ml 液態培養基中，37°C 震盪培養 4 hr 之後至於冰浴 5 min，取出 25 ml 菌液加入離心試管離心，6000 rpm，溫度 4°C 離心 5 min，將離心管中的上清液倒掉，加入 25ml 100 mM 的 CaCl₂，並 pipetting，置放於離心機，6000 rpm，溫度 4°C 離心 5 min，重複加入 CaCl₂，並 pipetting 及離心，並置放於冰上冰浴 20 min，再放入離心機中 3000 rpm，溫度 4°C 離心 10 min，去除上清液，加入 1 ml 100 mM 的 CaCl₂，緩和的 pipetting 混合，完成製備，與 50% 甘油等量混合後存放於-70°C 保存。

〈2〉Ligation：首先將分裝好之 Vector DNA (YT&A 0.5 μ l)取 2 支分加入 10X Liartion bufferA 與 B 各 1 μ l、10mM ATP 1 μ l、insert DNA(步驟 6.lane1、lane2 產物)1 μ l、Sterile water 4.5 μ l、T4 ligase 1 μ l，TOTAL 10 μ l 均勻混和完後，置於 15°C 安定箱 overnight。

〈3〉Transformation：將分裝好之勝任細胞 JM-109 取出，加入 Ligation 之產物 5ul，於冰域中 30 分鐘，之後再將勝任細胞轉至 42°C 恆溫水域 90 秒，再將勝任細胞轉至冰域 2 分鐘，時間到後加入 1000 μ l 之 LB 新鮮培養液於 37°C 安定箱 1 小時，之後於離心機 3000 rpm 離心 10 秒，將上清液吸取 800 μ l 丟掉，將剩下的 200 μ l 菌液震盪均勻後加至 Amp(100 μ l)+LA 推盤，放於 37°C 安定箱 12~16 小時培養。

〈4〉大量培養：隔天將 Amp(100ul)+LA 培養基取出觀察菌落，結果有 14 個單一菌落，將多數單一菌落各別取出加入 15ml 離心管(含 10 ml LB+10 ul Amp)中進行大量培養 12~16 小時。

〈5〉Plasmid DNA 分離：先將 14 管大量培養之勝任細胞離心於 3000 rpm 10 分鐘，到去上清液後分別加入 PD1 藥劑 400 μ l 於 15 ml 離心管與底部菌液混和抽吸至 DF 離心管打散菌快均勻混和，再加入 PD2 藥劑 400 μ l 使產物呈現澄清色(需 45°角搖晃 4~5 次)，再加入 PD3 藥劑 600 μ l 使產物呈現白色蛋花狀(需 45°角搖晃 4~5 次)，之後吸取下清液 600 μ l 至 DF column+DF 離心 13000 rpm 離心 30 秒，倒去 DF 廢液後再加入 W1 藥劑 600 μ l 離心 13000 rpm 離心 3 分鐘，倒去 DF 廢液後加入 Wash 藥劑 600 μ l 離心 13000 rpm 離心 3 分鐘，倒去 DF 廢液後乾離 13000 rpm 離心 10 分鐘，倒去廢液換 DF 離心管，最後加入 Elution buffer 藥劑 25 μ l，靜置 2 分鐘後，設定 13000 rpm 離心 2 分鐘(Elution buffer 步驟重複進行 2 次)，而離心後之 50 μ l 液體為最終產物，於-20°C 作為為保存。

〈6〉確認質體與 PCR 插入 DNA 尺寸：以電泳 (Electrophoresis)分析質體大小為 2.8Kbp 與 Bam H1 限制酶切質體後的 DNA 大小為 4.3Kbp：利用限制酶將 Lane1.2.3.5.6.7.8.10.11.12.13.14 之質體切成超螺旋體，於電泳才內會呈現 4.3Kbp，

取 12 管 DF 離心試管加入 Sterile water 6.5 μ l、Bam H1 buffer 1 μ l、Bam HI(限制酶)0.5 μ l、plasmid DNA 2 μ l (使用步驟 12 結果之產物)，TOTAL 10 μ l 均勻混和完後，放置於室溫 90 分鐘。

〈7〉定序：送源資生物科技核酸實驗室進行序列分析。

3.2.5 乳酸菌刺五加發酵液與分析

3.2.5.1 刺五加萃取液配置

取 6.25g 刺五加藥材放置於 500 ml 的三角錐形瓶中，加入 250 ml RO 水。於每三角錐形瓶分別加入 0.5%、1%、2%、3% 之脫脂奶粉(氮源)或 5%、10%、15%、20% 之蔗糖(碳源)。無添加脫脂奶粉與蔗糖為控制組。

3.2.5.2 乳酸菌於刺五加萃取液發酵

將刺五加萃取液配置含有不同蔗糖及脫脂乳滅菌後，加入乳酸菌液態培養的菌液 3%，混和均勻後置於 37°C 培養箱中、100rpm 搖盪 24hr 取樣。

3.2.5.3 乳酸菌數測定：序列稀釋

將含有乳酸菌之刺五加發酵液取 1ml 裝入 9ml 無菌水的離心試管(10 倍稀釋)。混和均勻後取 1ml 至 9ml 無菌水的離心試管(102 倍稀釋)，以此類推直到 1010 做序列稀釋。取出 100 μ l 推盤，將推盤後的 MRS 培養基放置 37°C 培養箱 16hr，計算含有菌落數 30 至 300 之間的培養基統計菌落數。

3.2.5.4 實驗設計與分析方法

傳統實驗上，在找尋實驗因素時通常使用『逐一因素法』，使用這個方法時，一個因素的不同階次，是在固定單一因素條件下做比較，這方法常常會忽略個因素之間的交互作用，導致實驗結果誤認為最佳條件，實際上卻並不一定是最佳值。

為了改善傳統的缺點，於是有『全因素實驗設計法』，此種實驗設計法必須研究因素階次的所有組合，進而了解到所有因素的主效應以及交互作用的引響。

當實驗的引響因素增多，實驗的次數也就跟著增加。如 2 階次 5 個因素，實驗次數為 $2^5=32$ ，或 2 階次 10 個因素，實驗次數為 $2^{10}=1024$ ，如此龐大的實驗次數往往無法令人接受，於是 Box 和 Hunter 等人在 1961 年提出『部分因素實驗設計法』，實驗配置發法利用定義關係的方式處理因素的交互作用及一洩可被忽略的交錯關係，不僅可以降地實驗數數還可以得到全因素實驗一致的結果。(Box, Hunter, and Hunter, 1978)

以二階次因素設計法，若有 n 個因素，則必須進行 2^n 個實驗，實驗將隨因素數目的增加而呈倍數成長，當選擇的因素過多時，不但實驗次數相當多，而且統計分析工作也將繁重，在此情況下有兩種方法來減輕實驗上的負擔：(1)刪除不重要因素，只對主要引響因素做測試；(2)利用部分因素實驗設計法(Montgomery, 1997)。

本研究進行乳酸菌於含不同碳源及氮源的刺五加萃取液之生長數目調查，將取得的乳酸菌生長數目，以雙因素(蔗糖與脫脂乳)的中心組實驗設計(central composite design, CCD)與應用實驗設計軟體(Design Expert, Stat-Ease Design Expert Version 7)推算其最高生長數目之最佳配方。

3.2.6 乳酸菌刺五加發酵液功能性分析

3.2.6.1 總多酚測定

原理：多酚廣泛存在於食物及植物中，且大都存在植物的表皮，不安定，易發生氧化聚合。多酚的結構賦予其獨特的化學性質，能與蛋白質、生物鹼、多糖結合，使其發生物理或化學變化。本實驗總多酚量(Total phenolic contents)之測定採用 Folin-Ciocalteu 比色法測定總多酚，是以 Folin 及 Denis 的方法改進，Folin-Ciocalteu 試劑中的鎢鉬酸可以將總多酚化合物定量，自身被還原(Mo^{6+} 變為 Mo^{5+})，生成藍色化合物，顏色的深淺與總多酚含量呈正相關。Folin-Ciocalteu 試

劑與酚類化合物在酸性穩定，必須在鹼性條件下反應方可顯色，比色體系中碳酸鈉是顯色的重要因子。

〈1〉藥品配製

精秤 0.05 g 的沒食子酸(Gallic acid)，放入 50 ml 的量瓶，加入去離子水，搖盪至溶解為止，再加去離子水至刻度線。

50% Folin-Ciocalteu Reagentn：取 10 mL 的 Folin-Ciocalteu Reagentn 再加入 10 mL 的去離子水，混合均勻用鋁箔紙包住，在避光環境下。

5% Na_2CO_3 ：取 5g 的 Na_2CO_3 溶於去離子水中至 100 mL 的定量瓶的刻度線，混合均勻。

〈2〉標準曲線備製

1. 將沒食子酸依序稀釋成不同濃度至 5 mL。

2. 步驟 1 中之液體每瓶吸取 1 ml 新的離心試管中，每瓶再加入 95% 乙醇 1 ml 和 5 ml 去離子水以及加入 0.5 ml、50% Folin-Ciocalteu Reagent。(置於 35°C 恆溫水槽中)

3. 靜置 5 分鐘，加入 1 ml 5% Na_2CO_3 (w/w)，在黑暗中靜置 60 分鐘。

4. 另外依 3、4 步驟準備一瓶當空白樣本，為不加 Folin-Ciocalteu Reagent，其餘步驟一樣(空白樣品：5 ml 去離子水+1 ml 95% 乙醇 1 ml、5% Na_2CO_3)。

5. 完後用分光光度計以吸收值 (725 nm) 測定波長，並製作標準曲線。

〈3〉樣品備製

拿取預測定之樣品經振盪搖晃均勻後吸取 1 ml 樣品，放入離心試管中再加入預定稀釋倍數之 95% 乙醇經振盪搖晃均勻後，放入離心機中以 3500 rpm/5 min 離心。

取 1 ml 離心上清液放入離心試管中，依(標準標準曲線備製)步驟 3、4、5、6 之方法依序加入藥品後測定其吸光值。

3.2.6.2 DPPH 自由基清除能力測定

原理：DPPH 是一種較穩定的自由基，而 DPPH 自由基的甲醇溶液在波長 517 nm 下有最強吸收值，當 DPPH 自由基與抗氧化物質作用後，抗氧化物質提供氫質子而清除自由基之能力，因而自由基就會失去本身藍紫色的特性而造成吸光值的下降，反應機制為 $\text{DPPH} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH}:\text{H} + \text{A}\cdot$ ，因此藉由測定 517 nm 的吸光值則可判斷樣品抗氧化能力之強弱。然而，抗氧化物質與 DPPH 自由基作用時，任何可以提供電子或氫質子給 DPPH 自由基的分子都可與之反應而降低 DPPH 自由基在特殊波長(517 nm)之吸光，因此 DPPH 自由基清除能力的測定結果可能會因反應物構造不同而使其敏感度較其他方法為低，但是仍不失一個快速且較簡便之方法。反應如圖 3-2

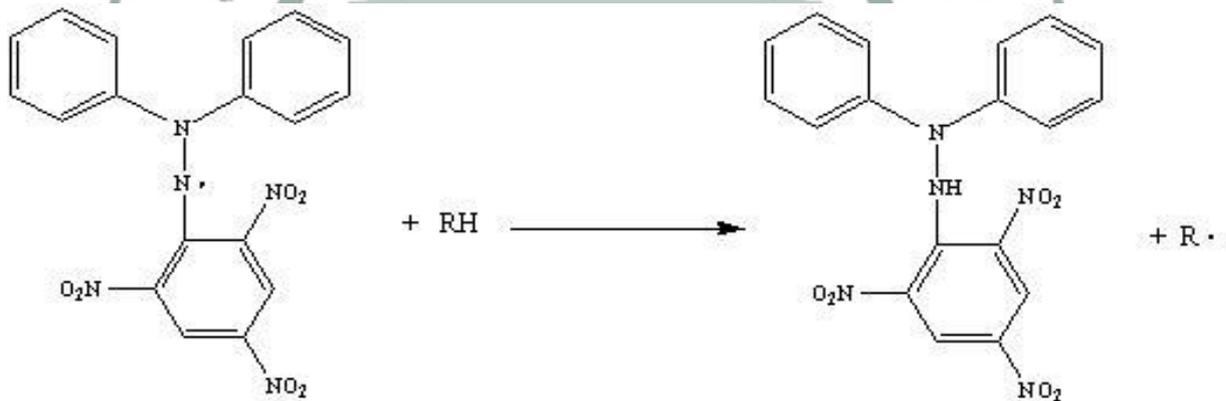


圖 3-2 DPPH 反應式

〈1〉 藥品配製

1. 1 mM DPPH：取 40 mg 的 DPPH 溶於 100 mL 的 methanol 中。
2. 80 μM Gallic acid：取 2 mg 的 Gallic acid 溶於 100 mL 的 methanol 中。

〈2〉 標準曲線測定

1. 標準品為將 Gallic acid 的稀釋成不同的溶度取 4 ml。
2. 加入 1 mL 濃度 1 mMDPPH，靜置 30 分鐘，在 490 nm 波長下，測定其吸光值。

〈3〉 樣品測定

1. 將樣品稀釋成不同的溶度，取 4 ml 溶液。
2. 加入 1 mL 濃度 1 mM DPPH，靜置 30 分鐘，在 490 nm 波長下，測定其吸光值。

3.2.6.3 總糖測定

原理：本實驗採用酚-硫法(Phenol-Sulfuric acid)，因醣類是一群由碳、氫、氧三元素所組成的有機化合物，有些醣類含有硫及氮。而醣類的定性分析是利用許多醣類具有的還原能力，或利用醣類和無機酸加熱所生成的醣醛或其衍生物與許多試藥反應而呈色的性質。本實驗利用單醣、雙醣、多醣類及其衍生物與酚及濃硫酸作用會生成極穩定的橙黃色物質，由此物質以比色法定量樣品中總醣含量。

〈1〉 藥品配製

1. 稱取 0.01 g 葡萄糖溶於 100 ml 去離子水中。
2. 2.5% Phenol: 取 5 mL 的 Phenol 加水中至 100 mL 定量瓶的刻度線，混合均勻。

〈2〉 標準曲線

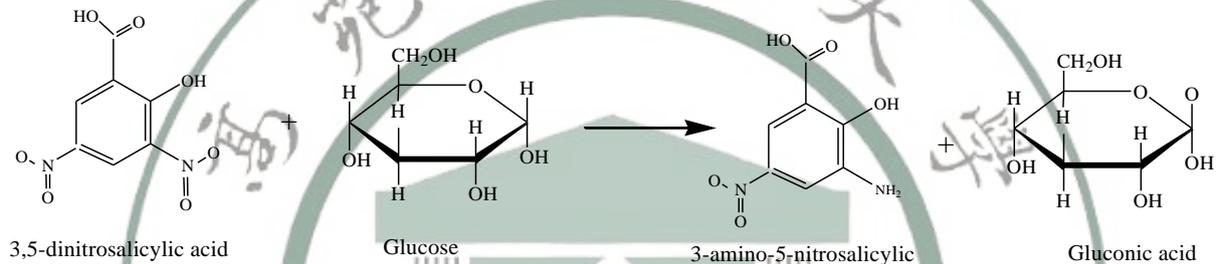
1. 將葡萄糖依序稀釋成不同濃度的溶液。
2. 取 200 μ L 葡萄糖溶液加入 100 μ L 5 % Phenol 及 500 μ L 濃硫酸，靜置 20 分鐘在波長 490 nm 下測其吸收值。

〈3〉 樣品測定

1. 將醱酵液稀釋成不同濃度的溶液，
2. 取 200 μ L 稀釋醱酵液加入 100 μ L 5% phenol 及 500 μ L 濃硫酸，靜置 20 分鐘在波長 490 nm 下

3.2.6.4 澱粉分解酶活性測定

原理：本實驗採用 DNS 法，因為微生物會產生澱粉水解酵素，所以可以分解澱粉，藉由這些酵素作用，讓澱粉產生還原醣類，而還原醣與 dinitrosalicylic acid 反應，可用分光光度計測得其酵素產物的吸收值，而獲得還原醣的濃度。若有還原醣存在，顏色會由黃色變紅棕色，當還原糖的含量愈高，呈色劑的顏色愈深。酵素活性單位以 U 來表示，定義為在測試分析條件下，每分鐘釋放出 $1\mu\text{mol}$ 還原糖的酵素量，即 $U=1\mu\text{mol}/\text{分鐘}$ 。



〈1〉 藥品配製

1. 20 mM Sodium phosphate buffer(含 6.7mM NaCl): 取 0.142 g 的 Na_2HPO_4 及 0.138 g NaH_2PO_4 及 0.04 g NaCl 溶於 80 mL 去離子水中，調 pH 值至 6.9，加水至 100 mL。
2. DNS 試劑配製：稱取 5 g 3,5-Dinitrosalicylic 和 150 g Potassium sodium tartrate 及 2N NaOH 100 mL 溶於 500 mL 去離子水中。
3. 3.1%澱粉溶液：取 1 g 可溶性澱粉，溶於 100 mL 的 20 mM Sodium phosphate buffer 中。
4. 4 mM 葡萄糖溶液：取 0.072 g 的葡萄糖溶於 100 mL 的去離子水中。

〈2〉 標準曲線作法

1. 將葡萄糖溶液稀釋成不同濃度，取 1 mL 和 1 mL DNS 試劑混合均勻後，於 100°C 水浴中加熱反應 10 分鐘。
2. 反應後拿出冷卻至室溫，加入 4 mL 去離子水混合均勻，取 300 μL 於 96 孔盤，

在波長 490 nm 下測其吸光值，以取得葡萄糖標準曲線。

〈3〉 樣品測定

1. 取 0.5 ml 醱酵液加入 0.5 ml 澱粉基質溶液，在 40°C 的恆溫水浴槽中反應 10 分鐘。
2. 反應完加入 1 ml 的 DNS 試劑並混合均勻，在 100°C 水浴中反應 10 分鐘。
3. 反應完退溫於室溫後，加入 4 ml 去離子水混合均勻。
4. 取 300 μ L 於 96 孔盤，在波長 490 nm 下測其吸光值。

3.2.6.5 GC 分析甲醇、乙醇或有機酸生成

1 mL 茶醱酵液在離心機 Hettich (UNIVERSAL32R)，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。取出上清液後，以 0.22 μ m 膜過濾。於氣相層析分析系統下 (gas chromatography, GC, Thermo Finnigan, Thermo Quest Italia S.P.A., Italy)，將 1 μ L 的過濾液注入 Chromatography Rt-Q PLOT 管柱 (30m \times 0.32mm, RESTEK, USA)，使用火焰型離子偵測器 (Flame Ionization Detector, FID) 來偵測，來進行氣相層析分析。攜帶的氣體含有氮(45)、氫(40)和合成空氣(450)。溫度由 60 °C (1 分鐘) 以 20 °C / 分鐘增加至 200 °C (8.5 分鐘)。流速為 1 mL/min。注入器的溫度為 200 °C 和偵測器的溫度為 250 °C。甲醇、乙醇與醋酸為標準品，並建立其滯留時間的標準圖譜。發酵液內之成份以滯留時間與標準品相同為確認。發酵液內之乙醇濃度是由以乙醇為標準品的計量曲線計算得來。氣相層析分析系統的控制與資料處理是經由 6890 GC systems。

3.2.6.6 感官品評

問卷設計採用五點 Likert 尺度量表方式評量，受訪者回答選項從『非常不喜歡』到『非常喜歡』，分別依序給予 1 到 5 分數值代表，受訪者在此量表得分愈高，表示對此產品喜愛程度愈高；反之若所得分數較低，則表示對喜愛程度有所保留。接受度的品評項目包含：外觀、色澤、風味、酸度感、甜度感、澀度感、整體感、總接受度。

您對乳酸菌發酵茶口味的品評

項目	您對乳酸菌發酵茶口味的品評				
	非常 不 喜 歡	不 喜 歡	尚 可	喜 歡	非 常 喜 歡
外觀	<input type="checkbox"/>				
色澤	<input type="checkbox"/>				
風味	<input type="checkbox"/>				
酸度感	<input type="checkbox"/>				
甜度感	<input type="checkbox"/>				
澀度感	<input type="checkbox"/>				
整體感	<input type="checkbox"/>				
總接受度	<input type="checkbox"/>				

3.2.6.7 數據處理

本實驗的資料數據處理以平均值±標準誤差(mean±SD)。

第四章 結果與討論

我們由夠自市面上味全 LCA506 優酪乳的乳酸菌，進行乳酸菌之分離、純化與鑑定。將所獲得的純菌與刺五加及水分別加入不同量的蔗糖或脫脂乳下於室溫下發酵培養，測試乳酸菌的數目。然後將求出的最大化之乳酸菌數，以雙因子的中央合成設計法(central composite design, CCD)與實驗設計軟體(Design Expert)進行碳源與氮源之最佳配方推算與驗證。我們進一步將乳酸菌、最佳配方與刺五加液進行發酵，並檢視其刺五加發酵液乳酸菌生長情況、pH 值變化與其功能性成份分析。

4.1 乳酸菌培養、分離與鑑定

4.1.1 乳酸菌的分離、純化及保藏

選取來自味全公司生產之 LCA506 活菌原味發酵乳，以 10 倍稀釋法，依次進行稀釋。吸取稀釋的菌懸液 1 mL 塗佈於 MRS (含 0.5% CaCO_3) 固體培養基，於 30°C 條件下培養 2~3 天。挑取周圍有透明圈、形狀各異的單一菌落，在 MRS 平板上反復劃線純化直到得到單一菌落。取單一菌落的菌於顯微鏡下觀察其細胞型態，其形態為桿狀且可被染劑染成藍紫色，初步判別為乳酸菌(Fig. 1)。將其分別轉移至 MRS 斜面培養基上，做好標記，於 4°C 條件下保藏。

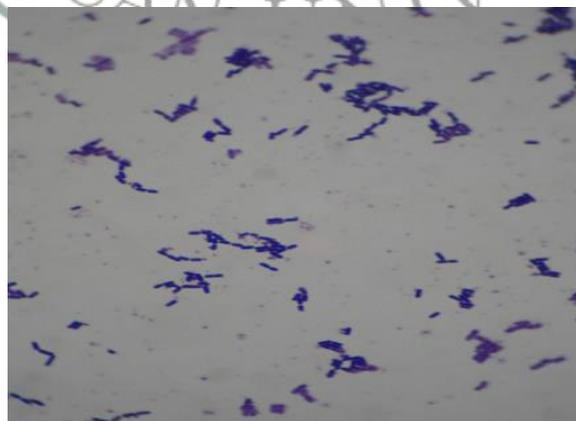


Fig. 1：顯微鏡下觀察其細胞型態與染色

Sbjct	374	TCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTG	433
Query	431	GAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAC	490
Sbjct	434	GAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAC	493
Query	491	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTAT	550
Sbjct	494	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTAT	553
Query	551	TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC	610
Sbjct	554	TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC	613
Query	611	GAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT	670
Sbjct	614	GAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT	673
Query	671	GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC	730
Sbjct	674	GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC	733
Query	731	TGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	790
Sbjct	734	TGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	793
Query	791	CCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCT	850
Sbjct	794	CCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCT	853
Query	851	AACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA	910
Sbjct	854	AACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA	913
Query	911	CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCCTTA	970

4.2 LPS5 乳酸菌生長與發酵刺五加飲料之開發

4.2.1 不同碳源或氮源的添加對 LPS5 乳酸菌生長之評估

4.2.1.1 LPS5 乳酸菌於含不同量蔗糖之刺五加液生長

以 LPS5 乳酸菌於分別含有 0、5、10、15、20% (W/V) 蔗糖之刺五加液於室溫下發酵培養 24 小時。我們取出 1 mL 發酵液，進行序列稀釋，測試乳酸菌的數目。我們發現 0% 蔗糖之刺五加液的菌數量為 7×10^5 cells/mL、5% 蔗糖之刺五加液的菌數量為 4.7×10^8 cells/mL、10% 蔗糖之刺五加液的菌數量為 3.4×10^8 cells/mL、15% 蔗糖之刺五加液的菌數量為 2×10^7 cells/mL、20% 蔗糖之刺五加液的菌數量為 8×10^7 cells/mL (Fig. 4)。

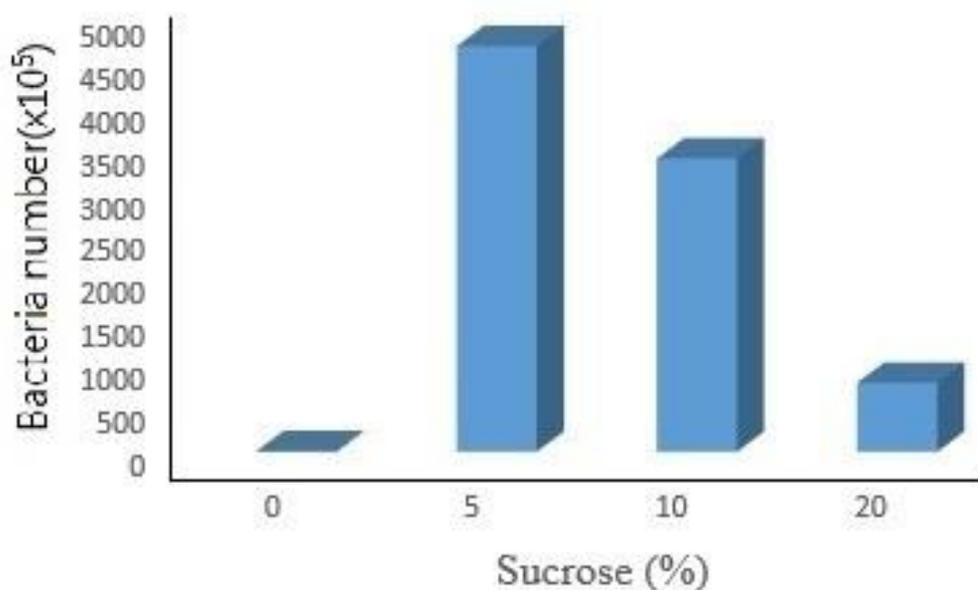


Fig. 4 LPS5 乳酸菌於添加不同比例蔗糖之刺五加液生長的乳酸菌量

4.2.1.2 LPS5 乳酸菌於含不同量脫脂乳之刺五加液生長

以 LPS5 乳酸菌於分別含有 0、0.5、1、2、3% (W/V) 脫脂乳之刺五加液於室溫下發酵培養 24 小時。我們取出 1 mL 發酵液，進行序列稀釋，測試乳酸菌的數目。我們發現 0% 脫脂乳之刺五加液的菌數量為 7×10^5 cells/mL、0.5% 脫脂乳之刺五加液的菌數量為 4.3×10^8 cells/mL、1% 脫脂乳之刺五加液的菌數量為 4×10^7 cells/mL、2% 脫脂乳之刺五加液的菌數量為 6.2×10^8 cells/mL、3% 脫脂乳之刺五加液的菌數量為 1×10^9 cells/mL (Fig. 5)。

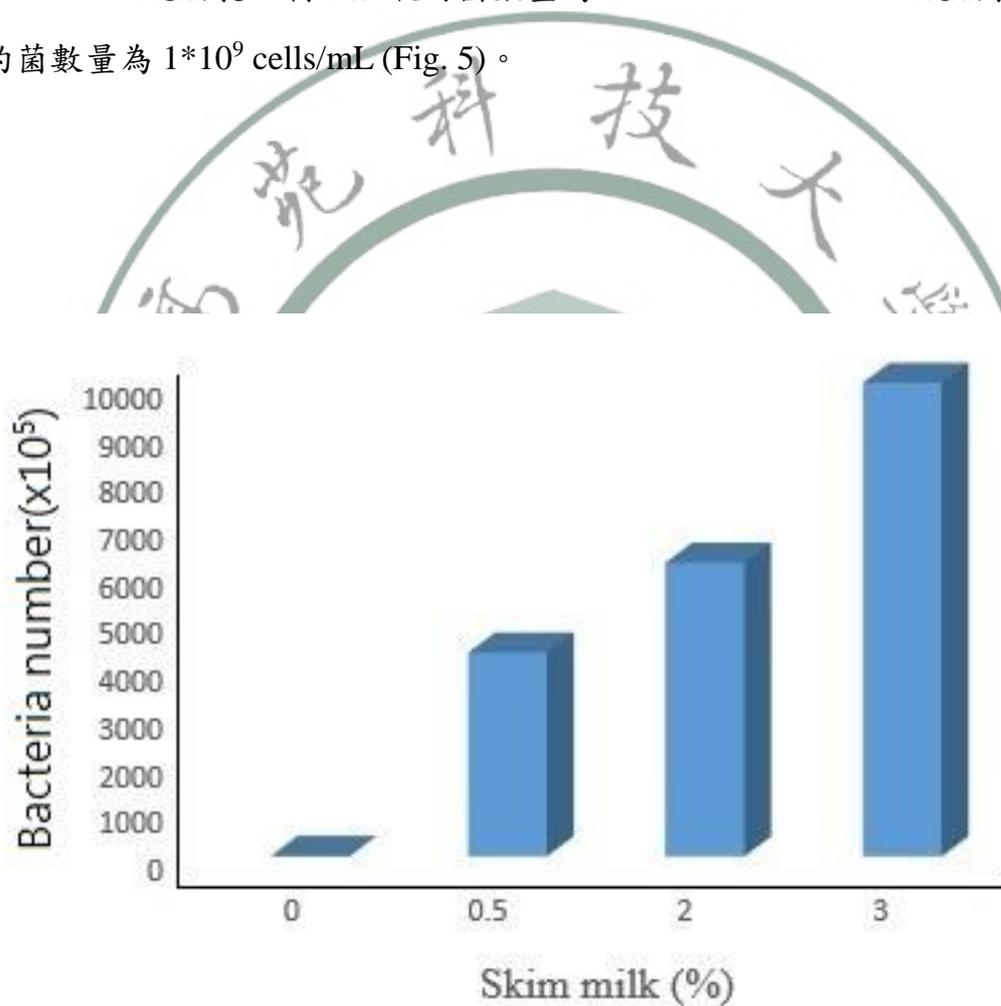


Fig. 5 LPS5 乳酸菌於添加不同比例脫脂乳之刺五加液生長的乳酸菌量

4.2.1.3 雙因子的中心組實驗設計推算其最高生長數目之最佳配方與驗證

由上述之資料，於含 5% 蔗糖或 3% 脫脂乳的發酵刺五加液有最大的乳酸菌數。以雙因子(蔗糖與脫脂乳)的中央合成設計法(central composite design, CCD)執行試算，我們取得 11 組不同量之蔗糖和脫脂乳組合，預計有可能產生最大之乳酸菌數(表一)。以 11 組不同量之蔗糖和脫脂乳組合分別添加於刺五加液，並於室溫下培養 24 小時，我們發現添加 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳組合的刺五加液有最大的乳酸菌數產生(表一)。將 11 組不同組合的乳酸菌數，以實驗設計軟體運算得到乳酸菌數中心組合設計圖(Fig. 6)。越往中心組合設計圖之內部其乳酸菌數越高，在最中心圓圈之蔗糖與脫脂乳的組合均可產生最佳之乳酸菌數量。蔗糖添加量範圍可由 4.6% 至 6.1%；脫脂乳添加量範圍可由 2.4% 至 3.6% (Fig. 6)。

表 1 中心組合實驗設計探討最佳乳酸菌成長參數

Run	脫脂乳 (%)	蔗糖 (%)	菌數 ($\times 10^7$ cells/mL)
1	2.00	4.00	14
2	4.00	4.00	17
3	2.00	6.00	15
4	4.00	6.00	30
5	1.59	5.00	5
6	4.41	5.00	36
7	3.00	3.59	37
8	3.00	6.41	40
9	3.00	5.00	50
10	3.00	5.00	50
11	3.00	5.00	50

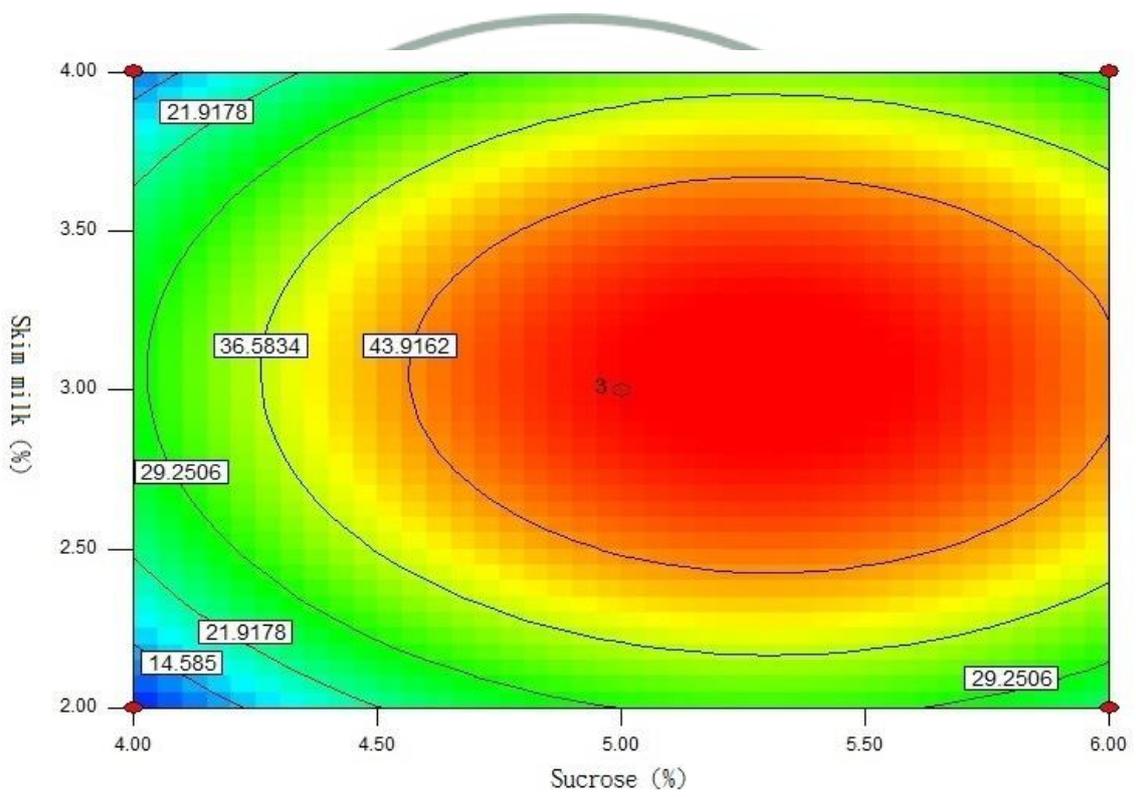


Fig. 6 : 影響 LPS5 乳酸菌生長之蔗糖與脫脂乳配方之中心組合設計圖

4.2.2 最適配方之發酵

4.2.2.1 最適配方之刺五加發酵液乳酸菌生長情況與 pH 值變化

以刺五加液與最適比率的 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳混和後，並加入特定的 3%(v/v) LPS5 乳酸菌細胞發酵，觀察乳酸菌生長情形與 pH 值分析。於 86 小時之培養中，我們發現 LPS5 乳酸菌生長於 36 小時與 72 小時有最佳生長數目，其生長情形呈現先升、最高點、後下降之二週期的循環現象(Fig.7)。其 pH 值由 5.5 下降至 3.4 (Fig.8)。於 36 小時，發酵液的 pH 值為 3.63，所以導致乳酸菌的生長受到抑制，使得乳酸菌數目開始減少。於 48 小時乳酸菌數目開始增加至 72 小時有最佳生長數目，可能歸諸於乳酸菌經過一段時間後對低 pH 值環境已產生適應，使得再度地恢復生長。於 72 小時後，乳酸菌的生長再度受到抑制，可歸諸於生長環境又趨於惡劣。

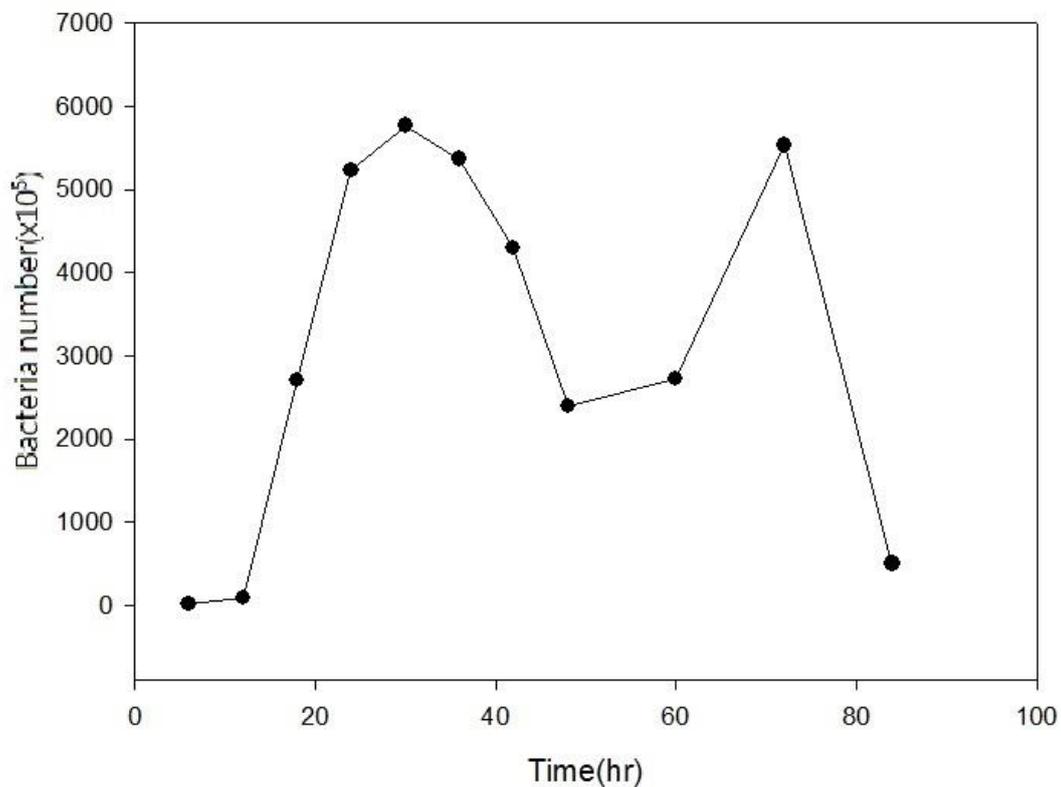


Fig. 7 LPS5 乳酸菌於添加 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳之刺五加發酵液中的生長變化

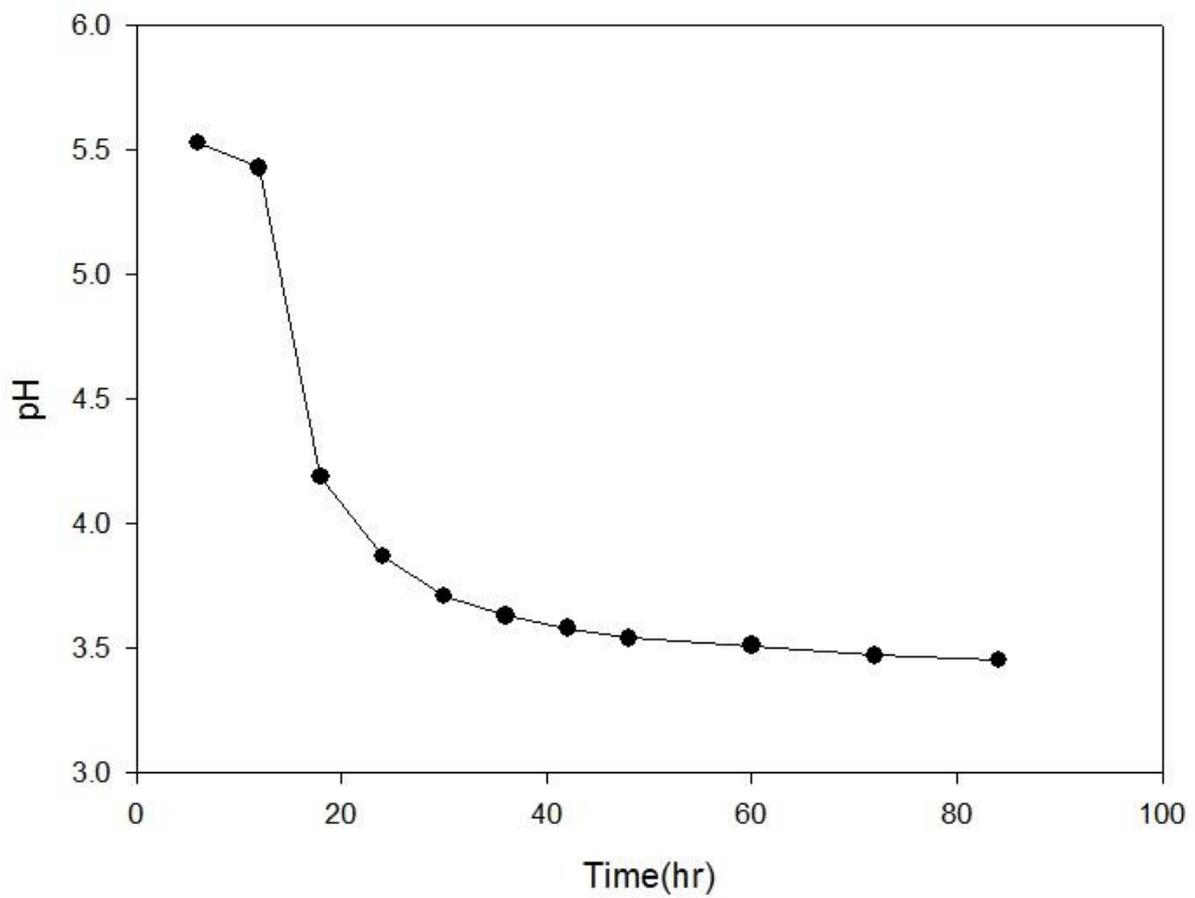


Fig. 8 LPS55 乳酸菌於添加 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳之刺五加發酵液中的 pH 變化

4.2.2.2 最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液之功能性成份分析

我們以 LPS5 乳酸菌和最適比率配方 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳和刺五加液進行發酵。並於不同發酵期間取發酵液樣品進行總多酚、DPPH 自由基清除能力、總糖、蛋白酶活性、甲醇、乙醇或有機酸生成量之功能性成份分析。

4.2.2.3 總多酚

於 86 小時發酵期間，最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液，發現都有很顯著量的總多酚，介於 120 至 220 mg Gallic acid/mL；總多酚量呈現先平穩、上升、平穩、後下降之趨勢。於 24 小時發酵有最佳的總多酚量(Fig. 9)。

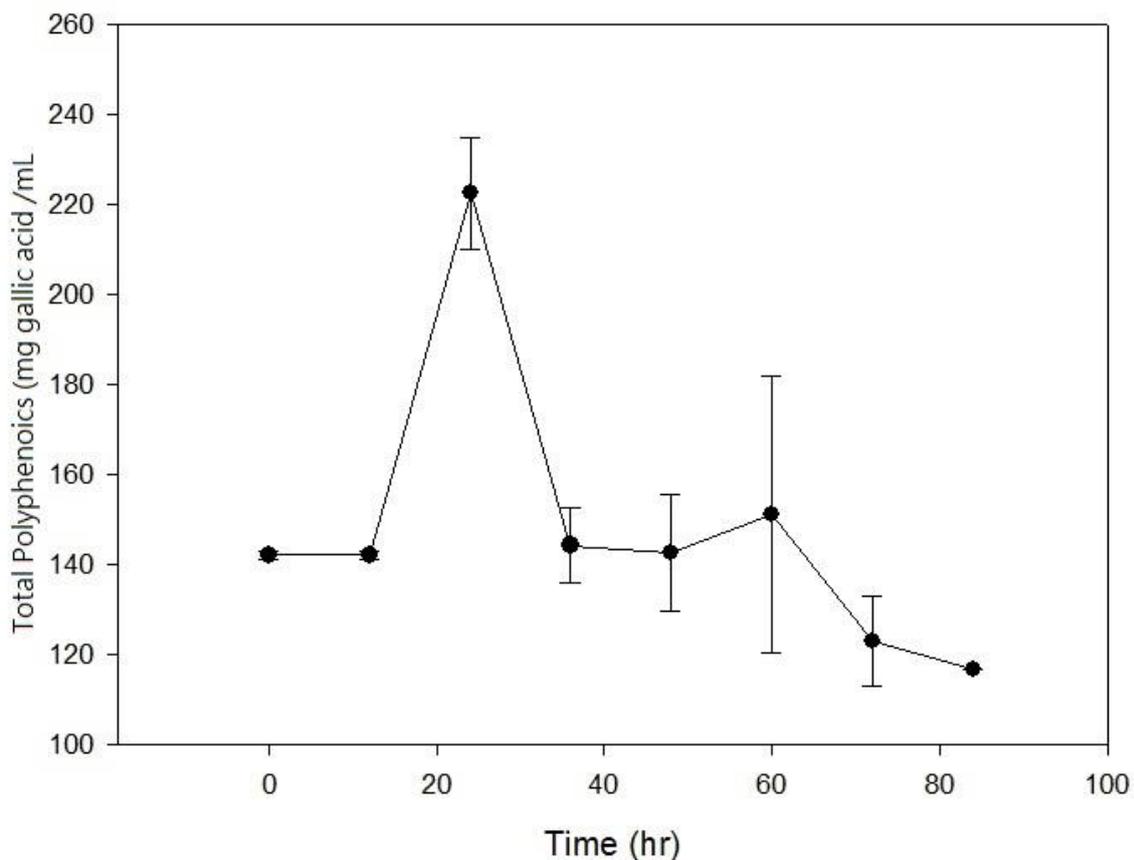


Fig. 9 乳酸菌刺五加發酵液總多酚量變化

4.2.2.4 總糖

於 86 小時發酵期間，最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液，發現都有總糖量有較大的差異，介於 6.0 至 2.4 mg glucose/mL；總糖量由 6 mg glucose/mL 減少至 2.4 mg glucose/mL 後，呈現平穩之趨勢。相對於 0 至 28 小時發酵有最佳的細菌生長數量，與 pH 值快速下降至 3.6，我們可推測總糖量大多耗用於生長與代謝 (Fig. 10)。

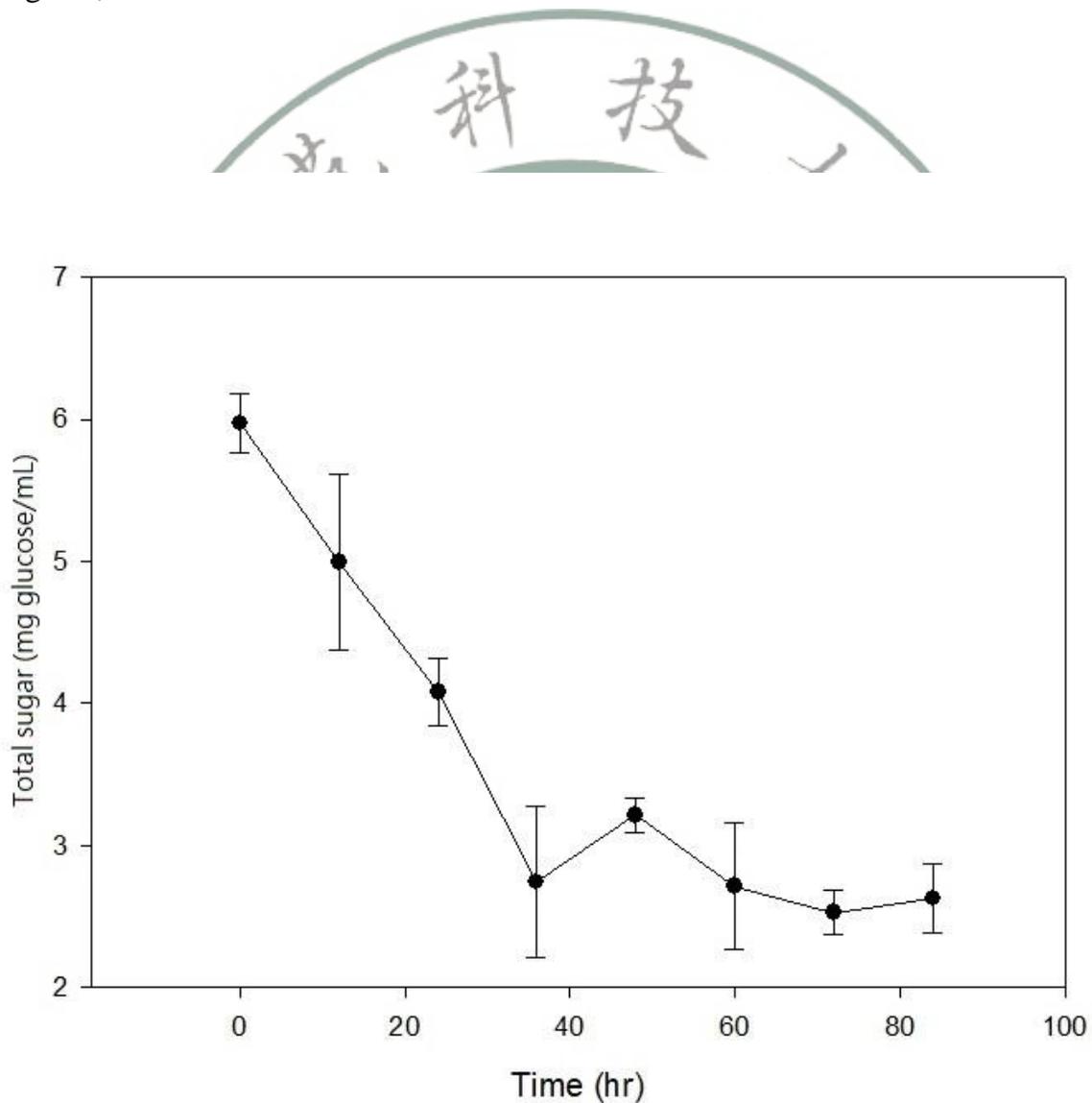


Fig. 10 乳酸菌刺五加發酵液總糖量變化

4.2.2.5 DPPH 自由基清除力

於 86 小時發酵期間，最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液，發現都有很顯著的 DPPH 自由基清除力，介於 4.7 至 5.5 mg Gallic/mL；DPPH 自由基清除力呈現先上升、下降、平穩、後平穩上升之趨勢。於 28 小時發酵有最佳的 DPPH 自由基清除力 5.5 mg Gallic acid /mL (Fig. 11)。

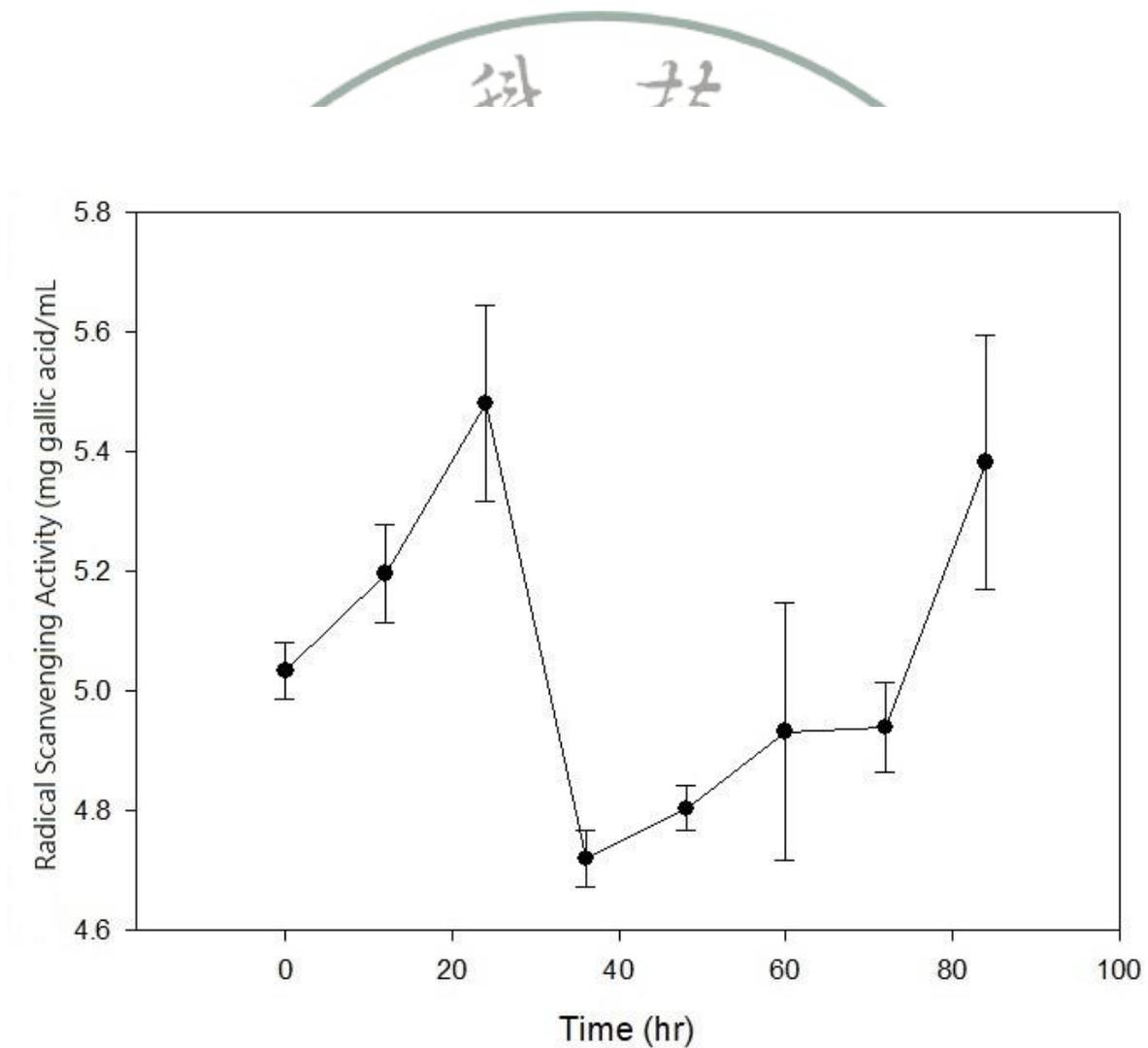


Fig. 11 乳酸菌刺五加發酵液 DPPH 自由基清除力變化

4.2.2.6 澱粉酶活性測定

於 86 小時發酵期間，最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液，發現都有很顯著的澱粉酶活性，介於 5.0 至 27.0 unit/mL；澱粉酶活性呈現先急速上升，於 18 小時達至最高活性 27.0 unit/mL，然後緩慢下降，於 36 小時時平穩於 20.0 unit/mL，至 72 小時後又有上升之趨勢(Fig. 12)。

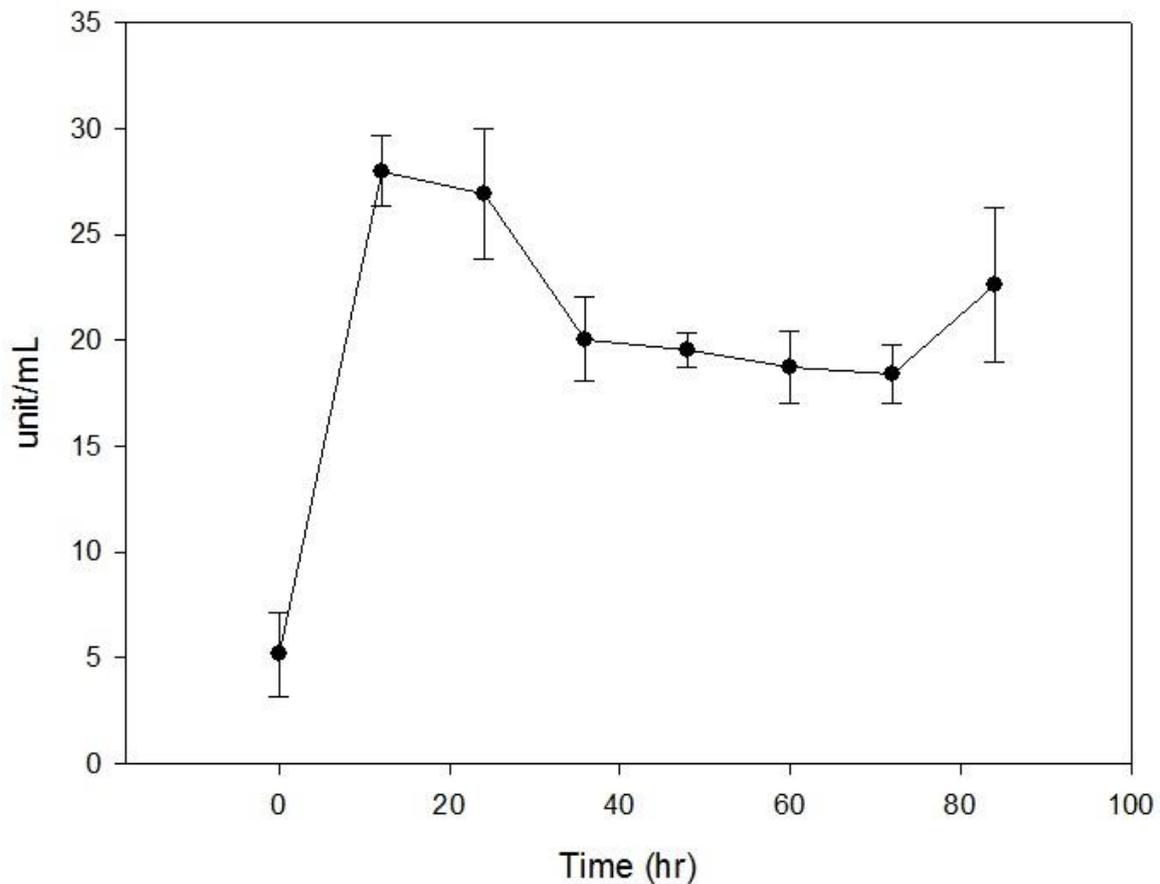
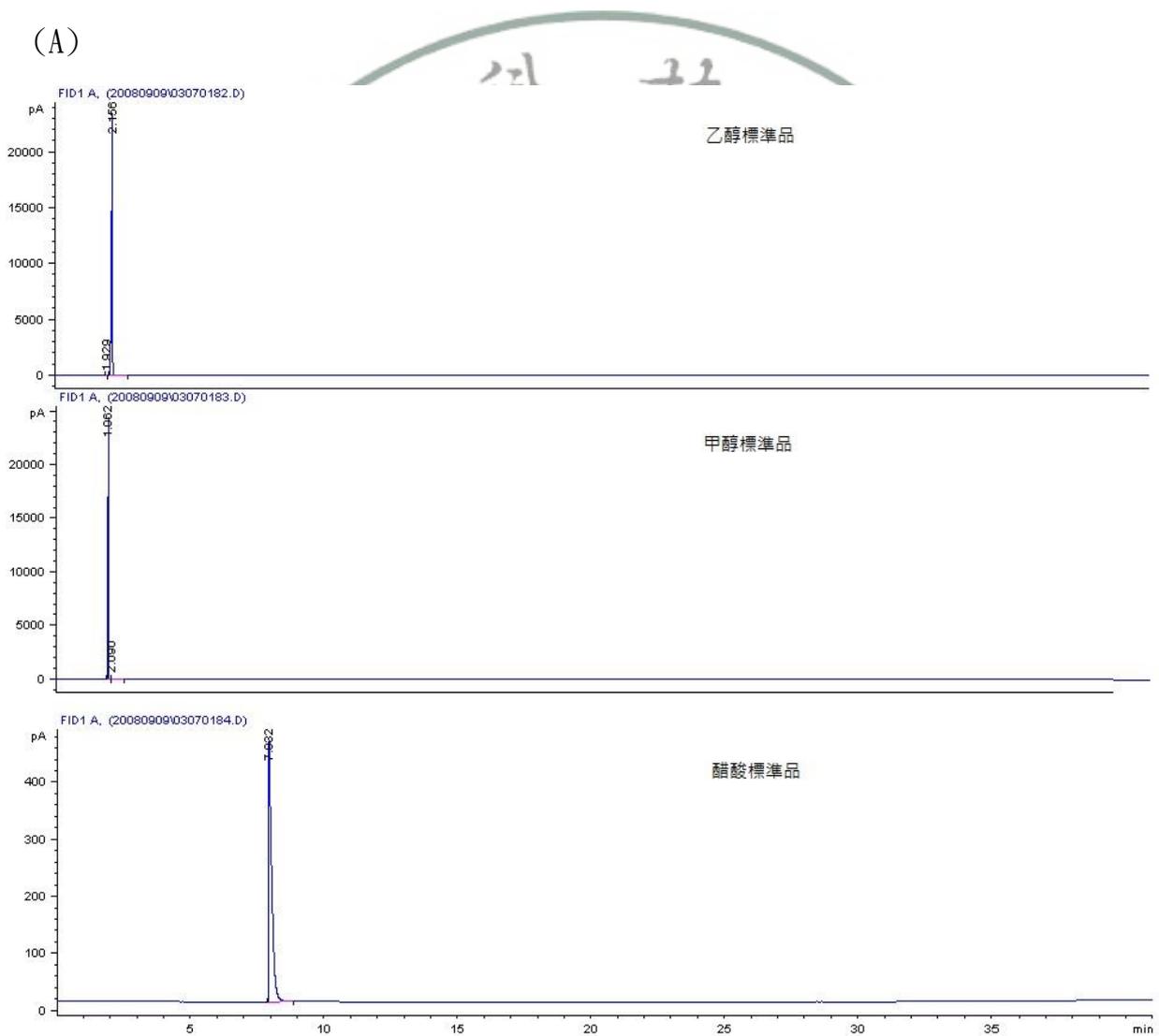


Fig. 12 乳酸菌刺五加發酵液澱粉酶活性變化

4.2.2.7 GC 分析甲醇、乙醇或有機酸生成量

以氣相層析儀分析(GC) 最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液之甲醇、乙醇與乙酸含量，Fig. 13 顯示乳酸菌刺五加醱酵液於發酵過程無產生甲醇、乙醇與乙酸。於發酵期間，於 8.41、10.68、20.00、23.44、25.33、29.58、31.86 分鐘有呈現或增加、或減少的變動趨勢(Fig. 13)。



(B)

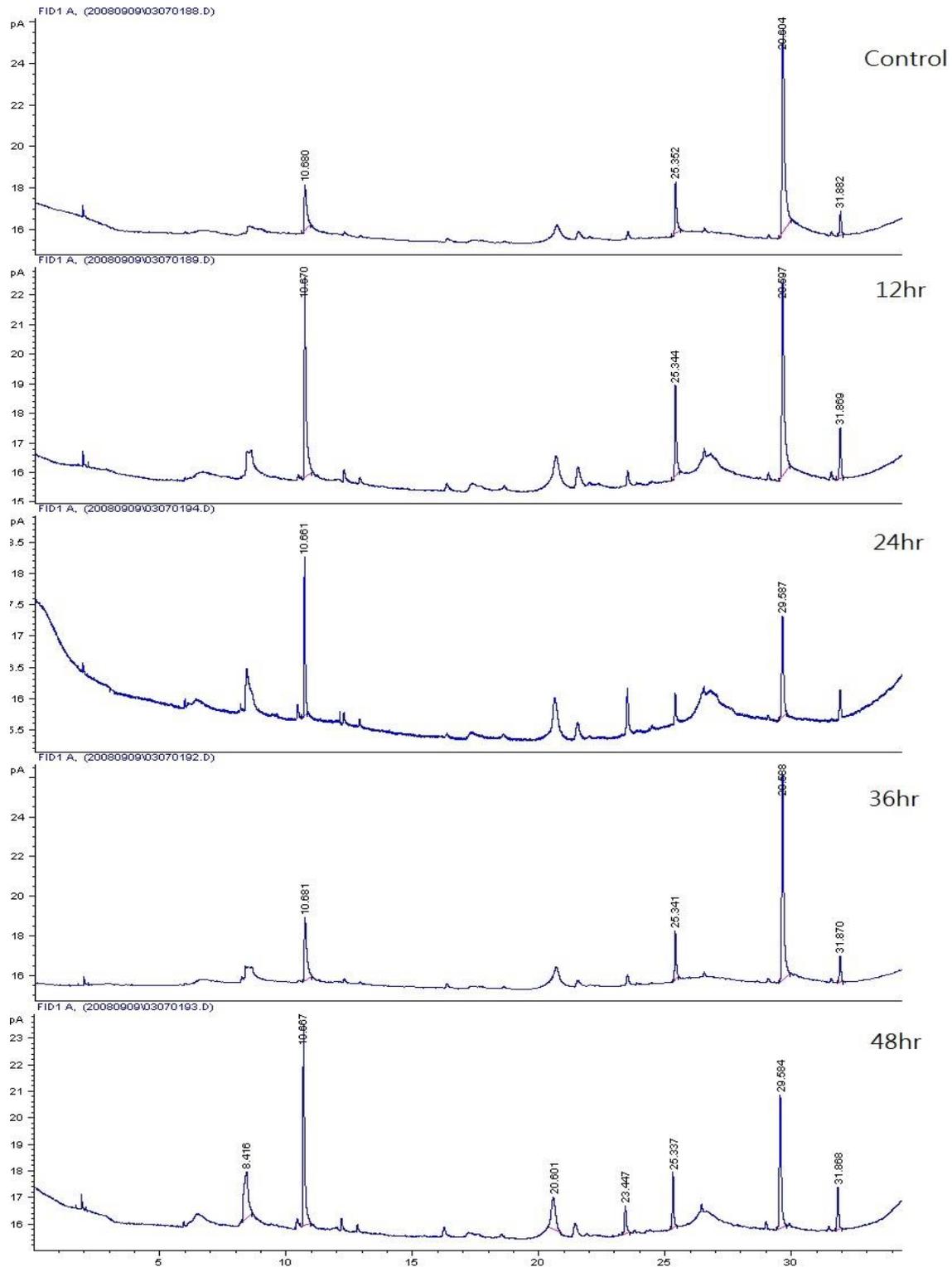


Fig. 13 氣相層析(GC)分析乳酸菌刺五加發酵液之成分變化

(A) 甲醇、乙醇及醋酸標準品；(B) Control、12、24、36 及 48 小時

4.2.2.8 感官品評

乳酸菌刺五加發酵液經由 10 人組成風味品評小組品嚐，問卷設計採用五點 Likert 尺度量表方式評量，發現發酵原液於風味、酸度、甜度、澀度、整體感、總接受度都接近 4.0，顯示乳酸菌刺五加發酵液有潛力成為市場上的銷售保健飲料了(表 3)。

表 3 乳酸菌刺五加發酵液之感官品評

項目	發酵原液
外觀	3.8
色澤	4.1
風味	3.7
酸度	3.9
甜度	3.6
澀度	4.1
整體感	4.1
總接受度	4.2

4.3 結論

本研究由市面上味全 LCA506 優酪乳的乳酸菌，進行乳酸菌之分離、純化與 API 生化分析與 PCR 分子鑑定，得到乳酸菌唯一 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain FQ005 (LPSPS5)。將 LPSPS5 乳酸菌與刺五加及水分別加入不同量的蔗糖或脫脂乳下於室溫下發酵培養，發現於含 5% 蔗糖或 3% 脫脂乳的發酵刺五加液有最大的乳酸菌數。以雙因子的中央合成設計法(central composite design, CCD)與實驗設計軟體(Design Expert)進行碳源(5% 蔗糖)與氮源(3% 脫脂乳)之最佳配方推算，產生 11 組配方。由 11 組配方進一步實驗驗證 5% 蔗糖與 3% 脫脂乳可生成最佳乳酸菌數目。我們將乳酸菌、最佳配方(5% 蔗糖與 3% 脫脂乳)與刺五加液進行發酵，於 86 小時發酵期間，我們發現 LPSPS5 乳酸菌生長於 36 小時與 72 小時有最佳生長數目，其生長情形呈現先升、最高點、後下降之二週期的循環現象。其 pH 由 5.5 下降至 3.4。乳酸菌刺五加發酵液，發現都有很顯著量的總多酚，介於 120 至 220 mg Gallic acid/mL。總糖量介於 6.0 至 2.4 mg glucose/mL；有很顯著的 DPPH 自由基清除力，介於 4.7 至 5.5 mg Gallic/mL；很顯著的澱粉酶活性，介於 5.0 至 27.0 unit/mL；以氣相層析儀分析(GC) 最適配方發酵之乳酸菌刺五加發酵液之甲醇、乙醇與乙酸含量；乳酸菌刺五加發酵液於風味、酸度、甜度、澀度、整體感、總接受度都接近 4.0，顯示乳酸菌刺五加發酵液有潛力成為市場上的銷售保健飲料。

第五章 參考文獻

- 林裕森.葡萄酒全書.台北市:宏觀文化.1997。
- 張永和.發酵與發酵食品.靜宜大學食品營養系。
- 徐華強.Hirschfelder:15.2009。
- 潘子明.我國乳酸菌最近的研究趨勢暨通過健康食品認證之乳酸菌產品現況.農業生技產業季刊 3: 19-27. 2005.
- 陳慶源.綜論乳酸菌之多元化應用.食品工業 40(9): 1-3. 2008.
- 郭婕.認識刺五加.輔仁大學食品營養研究所博士班。
- 歐明 (1999)。常用中藥手冊。台北市：旺文社。
- 祖元剛 (2005)。刺五加生活史型特徵及其形成機制。北京市：科學出版社。
- 許筑維、王盛世。以酵母菌製備綠茶飲料之量產製程開發與分析。2011 綠環境技術學術研討會論文集, p24-31, 2011/11/24, (高苑科技大學)。國際標準書號 (ISBN) : 978-986-6755-42-2
- 王盛世*、謝震、徐嘉澤、李岱紋。酵母菌發酵綠茶液過程中酶活性與糖的變化探討。2009 綠環境技術學術研討會論文集, p19-25, 2009/12/19, (高苑科技大學)。國際標準書號 (ISBN) : 978-986-6755-42-2
- 許筑維、王盛世。不同碳源或氮源引響北蟲草於綠茶液生長及生長時期綠茶發酵液之功能能力變異之探討。高苑科技大學化工與生化工程系研究所碩士論文。
- 徐向宏,何明珠.实验设计与 Design- Expert 、 SPSS 应用 [M].北京:科学出版社, 2010: 146 — 157.
- 中國醫學科學院藥物研究所(1981):中藥志(第一冊)。中國。
- 中國中醫研究院(1992):實用中醫辭典。台北。知音出版社。
- 中藥大辭典, 第一冊。昭人出版社。台北。(1980)
- 久保德三(1993):刺五加的效用。台北:青春出版社。

- 久郷晴彦、近藤嘉和(1991):刺五加的驚人療效。台北縣:正義出版社。
- Alm, L., Ryl-Kjelln, E., Setterberg, G and Blomquist, L. 1993. Effect of a new fermented milk product "sultura" on constipation in geriatric patients. The Lact Acid Bact Comp Conf.1-4
- Black, F.T., Andersen, P.L., Qrskov, F., Gaarslev, K. and Laulund, S.1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on travel's diarrhea. Travel Medicine.3:333-335
- Dambekodi P.C. and Gilliland S.E. 1998. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of Bifidobacterium longum. J Dairy Sci 81:1818-1824
- Folin O, Denis W: A colormetric method for the determination of phenols (and phenol derivates) in urine, J Bio Chem 1915, X X II, No 2.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara H., Terada, A. and Mitsuoka, T. 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol.42:39-44
- F. J. Carr, D. Chill and N. Maida, The lactic acid bacteria: a literature survey. Crit Rev Microbiol 28: 281-370. 2002.
- Gilliland, S.E., Bruce, B.B., Bush, L.J. and Staley, T.E. 1980. Comparison of two strains of Lactobacillus acidophilus as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy Sci.63:964-972
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol.49:377-381
- Gomes AMP, Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci 10: 139-157.
- Kaur, C. and H. C. Kapoor. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. Int. J. Food Sci. Technol. 36: 703-725.
- Klaver F.A., and van der Meer R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity. Appl Environ Microbiol 59:1120-1124
- Linbeck, A. and Nord, C. E. 1991. Lactobacilli in relation to human ecology and antimicrobial therapy. Int J Tiss Reac 13:115-122
- Link-Amster H., Rochat F., Saudan K. Y., Mignot O. and Aeschlimann J.M. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. FEMS Immunol Med Microbiol 10:55-63
- Mann, G.V. and Spoerry, A. 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Massai. Am J Clin Nutr.27:464-469

- M. Sarrela, L. Lahteenmaki, R. Crittenden, S. Salminen and T. Mattila-Sandholm, Gut bacteria and health foods 3/4 the European perspective. *Int J Food Microbiol* 78: 99-117. 2002.
- Naik, G. H., K. I. Priyadarsini, J. G. Satav, M. M. Banavalikar, D. P. Sohoni, M. K. Biyani and H. Morhan. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochem.* 63: 97-104.
- Nord C.E., Lidbeck A., Orrhage K. and Sjostedt S. 1996. Oral supplementation with lactic acid-producing bacteria during intake of clindamycin. *Clinical Microbiol.Infect.*,3:124-132
- Ruch, R. J., S. Cheng and J. E. Klaungig. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechin isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis.* 10: 1003-1008.
- R. Havennar and J. H. J. Husis in't Veld, *The Lactic Acid Bacteria.* Wood B.J.B. ed. 1:151-170. 1992.
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. 1992. Antioxidant properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945-948.
- Tahri K., Grill J.P. and Schneider F. 1997. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Curr Microbiol* 34:79-84