

乳酸菌生成葉酸能力之探討

楊崇民 林美吟*

國立中興大學食品科學研究所
台中市國光路250號

摘 要

本研究以HPLC法分析八株乳酸菌包括雙歧桿菌 *Bifidobacterium longum* B6和15708、嗜酸乳桿菌 *Lactobacillus acidophilus* N-1和4356、保加利亞桿菌 *Lactobacillus bulgaricus* 448和449及嗜熱乳酸鏈球菌 *Streptococcus thermophilus* MC和573合成葉酸之能力。由研究結果發現，在乳酸菌發酵期間以發酵6 hr之葉酸生成量最大。而在測試的菌種中，雙歧桿菌顯示有最高的葉酸生成能力，*B. longum* B6和15708在37°C經發酵6 hr後葉酸分別增加了3.5倍和2.4倍，而且五甲基四氫葉酸為主要的葉酸衍生物。

關鍵詞：雙歧桿菌，嗜酸乳桿菌，保加利亞乳桿菌，嗜熱乳酸鏈球菌，葉酸，高效能液相層析法。

前 言

葉酸在B群維生素中是一種重要的營養素，其主要功能為造血功能、預防胎兒神經管缺陷⁽¹⁾、預防貧血⁽²⁾、預防心血管疾病⁽³⁾等功能，尤其在許多代謝途徑中提供單碳傳遞的功用，包括DNA及RNA的合成⁽⁴⁾。而食品中的葉酸測定是一個分析上困難的問題，因為有許多具有活性形式的葉酸衍生物存在，增加了分析上的難度，食品中葉酸成分在大部分現有的資料都是以 *Lactobacillus casei* 當測試菌株之微生物分析法所測得，雖然此法靈敏度高，但卻只能得到所有葉酸的總量，並不能了解各種形式的葉酸含量，而且使用微生物分析法測定葉酸含量也有一些限制，例如實驗過程相當費時、易受到培養環境之條件、培養容器之清潔程度及實驗者之衛生程度的影響，而導致實驗上之誤差⁽⁵⁾。而使用高效能液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 可以解決前述使用微生物法分析時產生之問題，為了能準確評估食品中的葉酸含量，適當的條

件是必須的，如樣品萃取、管柱及偵測條件的選擇等⁽⁶⁾。本研究以高效能液相層析法 (HPLC) 來測定八株乳酸菌包括雙歧桿菌 *Bifidobacterium longum* B6和15708、嗜酸乳桿菌 *Lactobacillus acidophilus* N-1和4356、保加利亞桿菌 *Lactobacillus bulgaricus* 448和449、及嗜熱乳酸鏈球菌 *Streptococcus thermophilus* MC和573生成葉酸之能力。

材料與方法

一、材料

硼砂購自聯工試藥公司 (新竹, 台灣)。甲醇購自景明化工公司 (新竹, 台灣)。五甲基四氫葉酸 (5-Methyltetrahydrofolate; 5-CH₃THF)、四氫葉酸 (Tetrahydrofolate; THF)、五甲酰基四氫葉酸 (5-Formyltetrahydrofolate; 5-CHO-THF)、抗壞血酸 (Sodium ascorbate)、人體血漿 (Human plasma) 購自Sigma (St. Louis, Mo, U.S.A.)。葉酸 (Folic acid) 為和光純藥工業株式

Journal of Food and Drug Analysis, 2000, 8(1)

會社出品 (大阪, 日本)。2-Mercaptoethanol 為日本藥理化學工業株式會社出品 (大阪, 日本)。Ortho-phosphoric acid 購自於 Fisher Scientific (New Jersey, U.S.A.)。安佳脫脂奶粉自零售商購得。過濾膜 (0.45 μ m) 購自 Gelman Sciences (Michigan, U.S.A.)。

萃取緩衝液 (Extraction buffer)：將配好的 0.1M phosphate buffer，以 NaH₂PO₄ 調 pH 值為 6.0，並加入 sodium ascorbate，使得 sodium ascorbate 最後濃度為 0.5%。

二、培養時間對乳酸菌葉酸生成之影響

(一) 乳酸菌之培養

本研究中所使用之八株乳酸菌，包括雙歧桿菌 *Bifidobacterium longum* B6 和 15708、嗜酸乳桿菌 *Lactobacillus acidophilus* N-1 和 4356、保加利亞桿菌 *Lactobacillus bulgaricus* 448 和 449 及嗜熱乳酸鏈球菌 *Streptococcus thermophilus* MC 和 573，為本研究室自美國明尼蘇達大學食品科學暨營養系收集之菌株。將八株乳酸菌接種 2% 至 10 mL 滅菌過的 10% 還原脫脂乳中，經 0-18 hr 培養於 37°C。

(二) 葉酸的製備

根據 Wigertz and Jagerstad⁽⁷⁾ 和 Wigertz *et al.*⁽⁸⁾ 之方法進行樣品的製備如下：

於 0、6、9、12、15 和 18 hr 取出不同發酵時間的培養液，將取出的 6 mL 培養液加入 10 mL 萃取緩衝液，均質 1 min 後，置於沸水浴中 15 min，並以 4000 \times g 離心 10 min。取上清液 3 mL 調 pH 至 4.5，加入 0.4 mL 人體血漿後，置於 37°C 水浴中 1 hr，再置於沸水浴中 5 min，以 27000 \times g 離心 10 min。以 0.45 μ m 過濾膜過濾後，直接使用於高效能液相層析儀分析葉酸或儲存於 -20°C。

三、高效能液相層析 (HPLC)

高效能液相層析儀：包括注射器 (Injector, Rheodyne 7125 型)、幫浦 (Pump, L-6200 型)、檢測器 (Detector, F-1050 型)、記錄器 (Recorder, D-2500 型) 為日本 Hitachi 公司出品。分析管柱為 Hypersil (Cheshire, England) 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m 粒徑。管柱溫度為 ambient temp。依據 Lucock *et al.*⁽⁹⁾ 之方法，將所得之

樣品以移動相溶液組成為 15% (v/v) Methanol 和 0.05 M KH₂PO₄ (以 ortho-phosphoric acid 調 pH 至 3.5)、流速為 0.4 mL/min，經分析管柱送入高效能液相層析系統中，最後以 365 nm 配合激發波長 295 nm 之螢光偵測器進行測定。

四、統計分析

每一試驗進行三重覆，葉酸的合成以 SAS⁽¹⁰⁾ (Statistical Analysis System; SAS Guide for Personal Computers, 1989) 進行 ANOVA 變方分析，利用顯著性的差異來比較平均值。

結果與討論

對照葉酸標準品的層析圖與 *B. longum* 15708 和 *S. thermophilus* 573 於發酵 6 hr 之層析

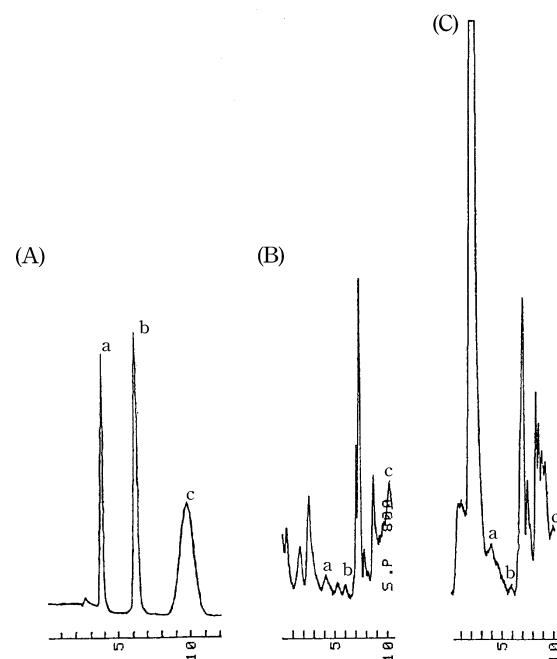


Figure 1. (A) HPLC chromatogram of a standard mixture of THF, 5-CH₃THF and 5-CHOTHF. (B) HPLC chromatogram of milk inoculated with *Bifidobacterium longum* B6 (incubated for 6 hr). (C) HPLC chromatogram of milk inoculated with *Streptococcus thermophilus* 573 (incubated for 6 hr).

a: Tetrahydrofolate (THF; Retention time: 4.06 min); b: 5-methyl-tetrahydrofolate (5-CH₃THF; Retention time: 6.16 min); c: 5-formyl-tetrahydrofolate (5-CHOTHF; Retention time: 9.75 min).

Journal of Food and Drug Analysis, 2000, 8(1)

圖中，可以發現此兩株菌所發酵的發酵乳中皆含有四氫葉酸、五甲基四氫葉酸、五甲酰基四氫葉酸，如Figure 1所示。實驗結果發現以還原脫脂乳培養，葉酸的生成情況良好，八株乳酸菌葉酸量於發酵6 hr時達到最大值，如Figure 2所示，其中以*B. longum* B6合成的葉酸量最高，*B. longum* 15708生成的葉酸量次之，而*S. thermophilus* 573葉酸增加幅度最小，因此可選擇*B. longum*以還原脫脂乳進行發酵以增加葉酸生成的量。Table 1中並將八株乳酸菌在培養6 hr所合成之葉酸的量進行統計分析比較。而且可以發現在發酵6 hr之還原脫脂乳中以五甲基四氫葉酸佔多量，如Table 2所示。此

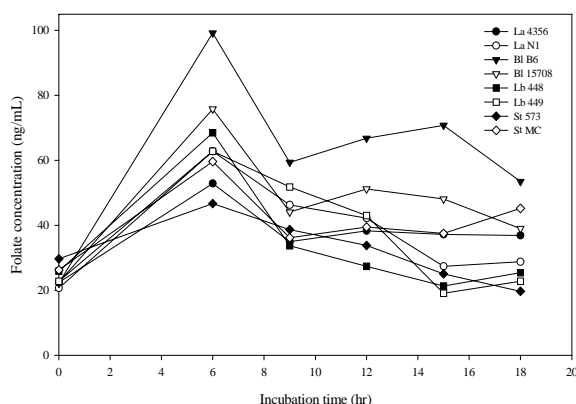


Figure 2. Time course of folate synthesis of lactic acid bacteria in 10% reconstituted non-fat dry milk.

Folate is expressed as the total of THF, 5-CH₃THF and 5-CHOTHF.

外根據一些研究報告的指出，*L. bulgaricus*其葉酸量經過發酵後會有下降的情形，學者推論原因是*L. bulgaricus*雖然會合成葉酸但是亦會利用葉酸，以致於在發酵後有下降的趨勢(11,12)，但是根據我們的實驗發現所使用的*L. bulgaricus* 448和449在培養溫度37°C，發酵6 hr葉酸有增加的情形，而發酵18 hr則與未發酵時葉酸含量差距不大，Rao *et al.* (11)所使用的菌株*L. bulgaricus* ATCC 11842培養溫度為45°C，發酵八小時的葉酸含量有稍稍下降的情形。而施與葉的實驗菌株*L. bulgaricus*

Table 1. Folate synthesis of lactic acid bacteria in 0 and 6 hr*

Strains**	0 hr	6 hr
	Folate content (ng/mL)	
<i>S. thermophilus</i> 573	22.8 ± 1.5	46.7 ± 5.0 ^e
<i>S. thermophilus</i> MC	23.3 ± 2.1	59.6 ± 2.3 ^{cd}
<i>L. acidophilus</i> N1	20.7 ± 0.4	63.9 ± 7.4 ^c
<i>L. acidophilus</i> 4356	22.4 ± 1.8	53.9 ± 2.8 ^{de}
<i>B. longum</i> B6	22.2 ± 1.7	99.2 ± 6.0 ^a
<i>B. longum</i> 15708	22.5 ± 0.6	75.8 ± 9.5 ^b
<i>L. bulgaricus</i> 449	22.8 ± 1.4	62.8 ± 4.1 ^{cd}
<i>L. bulgaricus</i> 448	22.9 ± 3.9	68.5 ± 1.8 ^{bc}

* Results are means of triplicate determinations. Means of folate concentration within the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

** 2% inoculation in milk incubated at 37°C for 6 hr.

Table 2. Folate contents of fermented milk^a

Folate content (ng/mL)	Tetrahydrofolate (THF)	5-methyl-tetrahydrofolate (5-CH ₃ THF)	5-formyl-tetrahydrofolate (5-CHOTHF)
<i>S. thermophilus</i> 573	13.5 ± 1.9	19.5 ± 4.7	13.7 ± 1.9
<i>S. thermophilus</i> MC	18.5 ± 2.5	24.6 ± 1.3	16.5 ± 2.7
<i>L. acidophilus</i> N1	10.7 ± 3.1	25.5 ± 3.4	26.6 ± 3.5
<i>L. acidophilus</i> 4356	27.2 ± 0.7	17.0 ± 5.5	8.6 ± 2.4
<i>B. longum</i> B6	14.0 ± 1.6	52.9 ± 2.0	32.3 ± 3.7
<i>B. longum</i> 15708	10.3 ± 1.1	48.6 ± 6.6	16.9 ± 4.4
<i>L. bulgaricus</i> 449	10.7 ± 3.1	40.0 ± 2.2	12.1 ± 1.1
<i>L. bulgaricus</i> 448	9.9 ± 0.4	41.6 ± 3.0	17.0 ± 1.2

^a Results are means of triplicate determinations.

^b 2% inoculation in milk incubated at 37°C for 6 hr.

Journal of Food and Drug Analysis. 2000. 8(1)

CCRC14009 培養溫度為37°C，發酵6 hr的葉酸含量下降，此與本研究結果不同，應該是因為所使用的菌株不同而造成的差異。因此，若所使用的菌株、發酵時間、溫度等條件的不同，也會影響到葉酸生成的量，以致於各研究報告的結果不一樣。在此研究中同時發現五甲基四氫葉酸 (5-CH₃THF) 為主要的葉酸衍生物，而在Vahteristo *et al.* (5) 的研究報告也提到蔬果類中以五甲基四氫葉酸 (5-CH₃THF) 為主要的葉酸形式，說明了五甲基四氫葉酸在許多食品為主要葉酸形式；因為五甲基四氫葉酸為一重要之輔酶(co-enzyme)，在許多生化反應中扮演傳遞“甲基”(methyl group)的功能，此功能對嘧啶(purines)和嘧啶(pyrimidines)之合成具有重大之影響，而嘧啶和嘧啶為組成DNA之主要物質。攝取適量的葉酸可以預防心血管疾病發生，在新血管疾病的發生原因中，一部份是因為血液中的同胱胺酸(homocysteine)濃度過高，而引起高濃度的同胱胺酸原因之一為維生素的攝取不足，因為活化型的葉酸能提供甲基給同胱胺酸進而轉變成合成甲硫胺酸(methionine)，其代謝途徑需要活化型式的葉酸、B₆及B₁₂的參與，才能將同胱胺酸代謝掉，若是這些維生素缺乏或不足，將會引起心血管疾病等疾病⁽¹³⁾。

結 論

由研究結果可知，經由高效能液相層析系統，只要我們事先打入各種葉酸標準品，就可知道待測物品中含有何種形式的葉酸，而本實驗使用最常偵測出的葉酸：五甲基四氫葉酸、四氫葉酸和五甲醛基四氫葉酸來當葉酸標準品；在本研究的測試菌株中，雙歧桿菌具有最高的葉酸生成能力，本實驗中的發酵乳在發酵六小時時葉酸達到最大量，且以五甲基四氫葉酸 (5-CH₃THF) 為主要的葉酸衍生物。

參考文獻

1. Collins, K. 1994. Folic acid supplements provide useful benefits. *Better Nutrition for Today's Living* 56: 18-19.
2. Sauberlich, H. E. 1990. Vitamin B₆, B₁₂ and folate. *Advances in Meat Research* 6: 461-495.

3. Morrison, H. 1996. Folic acid levels linked to risk of coronary death. *JAMA*. 275: 1893-1896.
4. Shane, B. 1990. Folate metabolism. In "Folic Acid Metabolism in Health and Disease". pp. 65-78. Picciano, M. F., Stokstad, E. R. and Gregory, J. F. ed. John and Sons, New York, U.S.A.
5. Vahteristo, L., Lehtikoinen, K., Ollilainen, V. and Varo, P. 1997. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland. *Food Chem.* 59: 589-597.
6. Gregory, J. F. III., Day, B. P. F. and Ristow, K. A. 1982. Comparison of high performance liquid chromatographic, radiometric and *Lactobacillus casei* methods for the determination of folacin in selected food. *J. Food Sci.* 47: 1568-1571.
7. Wigertz, K. and Jagerstad, M. 1995. Comparison of a HPLC and radioprotein-binding assay for the determination of folates in milk and blood samples. *Food Chem.* 54: 429-436.
8. Wigertz, K., Svensson, U. K. and Jagerstad, M. 1997. Folate and folate-binding protein content in dairy products. *J. Dairy Res.* 64: 239-252.
9. Luccock, M. D., Green, M., Priestnall, M., Daskalakis, I., Levene, M. I. and Hartley, R. 1995. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissue for nutritional and clinical work. *Food Chem.* 53: 329-338.
10. Statistical Analysis System. 1989. SAS Guide for Personal Computers. SAS Institute Inc., North Carolina, U.S.A.
11. Rao, D. R., Reddy, A. R., Pulusani, S. R. and Cornwell, P. E. 1984. Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B₁₂ by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
12. Shih, C. H. and Yeh, C. K. 1997. Studies of different lactic acid bacteria on the production of goat's yogurt. Master Thesis. Department of Animal Science. Private TungHai University.

Journal of Food and Drug Analysis. 2000. 8(1)

13. Ubbink, J. B., Vermaak, W. J. H., Merwe, A. van der. and Becker, P. J. 1993. Vitamin B-12, Vitamin B-6 and folate nutritional status in

men with hyperhomocysteinemia. Am. J. Clin. Nutr. 57: 47-53.

Determination of Folates Synthesized by Lactic Acid Bacteria

CHUNG-MING YOUNG AND MEEI-YN LIN*

Institute of Food Science, National Chung-hsing University, 250 Kuokuang Rd., Taichung 402, Taiwan R.O.C.

ABSTRACT

Eight strains of lactic acid bacteria, including *Bifidobacterium longum* B6 and 15708, *Lactobacillus acidophilus* N-1 and 4356, *Lactobacillus bulgaricus* 448 and 449, and *Streptococcus thermophilus* MC and 573 were investigated for their folate synthesizing ability by applying the high-performance liquid chromatographic method. The results showed that lactic acid bacteria synthesized maximum levels of folate in six hours in fermented milk. *B. longum* B6 demonstrated the highest folate synthesizing ability, and *B. longum* 15708 also produced folate satisfactorily. These two strains increased folate 3.5 and 2.4 fold, respectively, after 6h fermentation at 37°C. 5-Methyltetrahydrofolate was the main derivative of folate found in fermented milk.

Key words: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, folate, HPLC.