

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫中文名稱：酸甘藍之控制發酵與輕度加工研究

計畫英文名稱：Study on controlling sauerkraut fermentation and minimal processing

計畫編號：NSC88-2313-B-002-083

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：游若萩教授 國立臺灣大學食品科技研究所

電子信箱：[yurc@ccms.ntu.edu.tw](mailto:yurc@ccms.ntu.edu.tw)

## 一、中文摘要

本研究之目的在探討以電穿孔法，將生產乳酸鏈球菌素質體轉殖入不同的乳酸菌體中，並在 2.5% 鹽度、18℃ 下，接種 *Leuconostoc mesenteroides* 及添加 0.01% EDTA、100 IU/ml nisin，探討對德式酸菜發酵之影響。實驗結果顯示將 *L. mesenteroides* 培養於含有 1.5% 甘油的培養基，再以 4,000 IU 的溶菌酶處理，製成勝任細胞，再以電穿孔法轉殖入源自 *L. lactis* 的 nisin 生產質體，可獲得較高之成功率，但此質體在 *L. mesenteroides* 系統中並不表現。德式酸菜接種乳酸菌種時其發酵能力為未接種乳酸菌種者之二倍。大腸桿菌群在發酵初期便已死滅。添加 0.01% EDTA 處理組在發酵初期產酸速度最快；而添加 0.01% EDTA 及 100 IU/ml nisin 者，可能因為乳酸菌的生長受到抑制，所以即使延長發酵時間亦無法達到成品所欲之酸度；但當接種乳酸菌種時，則無此問題。接種菌製成的德式酸菜當於 4℃ 儲存時，乳酸菌大約只可存活 1 星期；而未接種菌者乳酸菌大約可存活 3 星期，但是如果均不添加 nisin 及 EDTA 者，乳酸菌之存活可長達 4 星期以上。

**詞關鍵：**德式酸菜、控制發酵、乳酸菌、乳酸鏈球菌素

## Abstract

This study was conducted to investigate the transfer of a nisin-producing plasmid by electroporation between *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Sauerkraut was fermented at 18℃ with the addition of 2.5% salt and the following

parameters: 0.01% EDTA, 100 IU/ml nisin, inoculation with *Leuconostoc mesenteroides*. Results showed that when *L. mesenteroides* was first grown in a medium contained 1.5 % glycine, then treated with 4,000 IU lysozyme to make competent cells. These cells were then transformed with a nisin-production plasmid isolated from *L. lactis* by electroporation. The transformation efficiency was higher than other treatments, however the transferred plasmid did not express in *L. mesenteroides* system. The rate of lactic acid fermentation of sauerkraut when inoculated with starters was two fold to those without inoculants. Besides, coliforms were almost disappeared at the initial stage of sauerkraut fermentation. The addition of 0.01% EDTA made lactic acid fermentation faster. The addition of 0.01% EDTA and 100 IU/ml nisin simultaneously would hinder the growth of lactics, and the production of lactic acid even though the fermentation was extended. However, this issue could be overcome by the inoculation of lactics starter. When sauerkraut was stored at 4℃, the survival of lactics was only last one week for the inoculation control. However, lactics could survive 3 weeks for no inoculation control. On the other hand, lactics could survive for more than four weeks if sauerkraut was fermented without nisin, EDTA and lactics starters.

**Keywords:** sauerkraut, controlled fermentation, lactic acid bacteria, nisin.

## 二、緣由與目的

乳酸菌常被用於發酵乳品、肉製品、蔬菜醃漬品等發酵產品之製造。甘藍在台灣夏季較不易栽植，供給量較少，市場價格

高；冬季病蟲害少，貨源充足，將甘藍進行醃漬除了可以進行保存之目的外，更能提供有益的乳酸菌以改善腸內菌叢，增進國人之健康。

乳酸鏈球菌素 (nisin) 是由乳酸鏈球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 所分泌的一種細菌素 (bacteriocin)，對許多格蘭氏陽性菌有抑制作用、可減少熱殺菌處理之時間、能被人類腸道中之消化蛋白酶分解，且分解產物對人體無毒性，現已有許多國家允許添加於食品中。Kone 和 Fung [1]、LeBlanc 等[2]研究均指出 nisin 生產基因位於質體上。電穿孔是一種方便、快速、利於質體基因轉殖的方法。

乙二胺四乙酸 (EDTA)，可使格蘭氏陰性菌之細胞膜發生改變增加其通透性，達到抑菌效果。當 nisin 一般對格蘭氏陽性菌較具效果，然而 Stevens 等[3-5]指出 EDTA 及 nisin 合用對格蘭氏陰性菌如 *E. coli* 亦有抑制效果。

本研究目的在嘗試將 *L. lactis* 生產 nisin 的質體，經由電穿孔方式，轉殖入德式酸菜主要作用菌株 *L. mesenteroides* 來生產細菌素；並且添加 nisin、EDTA，乳酸菌種，藉以探討德式酸菜在 18、2.5% NaCl 下之發酵、4 貯存期間，乳酸菌的存活、酸度變化、及製品之儲存性。

### 三、結果與討論

#### 一、電穿孔法之最適反應條件

本實驗第一部份嘗試從 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 抽取 nisin 生產質體，藉由電穿孔方式導入德式酸菜發酵主要菌株 *Leuconostoc mesenteroides* 中，希望菌體能於發酵同時亦產生 nisin 來抑制其他菌體生長。但由於 *L. mesenteroides* 本身亦會受 nisin 抑制，因此以 Breidt 等[6]之方法篩選出可耐受 nisin 達 25,000 IU/ml 的菌株作為勝任細胞 (competent cells)。

添加 1.5% 甘油於 *L. mesenteroides* 培養基 MRS broth [7]，並參考 Chassy 和 Flickinger[8]、Harlander[9]等之電穿孔實驗方法，將菌體先以 4,000 IU lyzosome 處理，製備勝任細胞，再以 Gene pulser 25KV

/ 2.5  $\mu$ F / 100 ohm 之條件下使 *L. mesenteroides* 轉殖入由 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 抽取 42 kb 具有 nisin 生產能力及 nisin 耐受能力的質體。

結果顯示若勝任細胞於生長時未添加 1.5% 甘油且未以 4,000 IU lyzosome 處理則幾乎無電穿孔成功菌株。有經過 4,000 IU lyzosome 前處理之勝任細胞較未經處理之勝任細胞則有較高的電穿孔效率；質體添加量對電穿孔效率則沒有差異。總之：在本試驗中先以 1.5% 甘油及 4,000 IU lyzosome 之前處理方式，再以 gene pulser 25KV / 2.5  $\mu$ F / 100 ohm 條件下質體添加量為 0.5  $\mu$ g /  $\mu$ l 時，進行電穿孔實驗可獲得最高的轉形效率。

雖然可使質體成功轉殖入勝任細胞，不過，無論經由何種方式的前處理，電穿孔轉型株均無法表現與 nisin 具有相似效果的抑制能力。再將此電穿孔轉型株接種培養，發現轉殖入的 42 kb 質體已經消失，可能是 *L. lactis* subsp. *lactis* 之質體在 *L. mesenteroides* 菌體中無法複製，隔代培養後漸漸消失。

#### 二、添加 nisin 與 EDTA 對德式酸菜發酵的影響

本實驗第二部份，探討添加抑制劑對德式酸菜發酵的影響。分別做對照組和添加 0.01% EDTA、100IU/ml nisin 及二者均添加等共四組，添加 2.5% 粗鹽於 18 下行控制發酵，並在發酵過程中測量微生物相及 pH 值、可滴定酸度之變化

##### 1. 添加抑制劑對德式酸菜中微生物相的影響

添加 100 IU/ml nisin 在初期發酵主要的乳酸菌可能因為受到抑制，故到第七天時總菌數才到達最高 ( $1.47 \times 10^8$  CFU/ml)；對於同時添加 0.01% EDTA 及 100 IU/ml nisin 則在第四天時為最高 ( $1.06 \times 10^7$  CFU/ml) 隨即下降，整體而言發酵情形較其他組別都明顯來的差。總乳酸菌數始終與總菌數接近，只有對照組初期的菌相較不一致，表示德式酸菜的發酵過程中，以乳酸菌 (尤其為 *L. mesenteroides*) 佔優勢[10]。德

式酸菜發酵中後期主要乳酸菌 *L. plantarum* 在實驗組中於第十天才發現，而其他組別則於第七天即可測得，*L. plantarum* 在德式酸菜中漸占優勢且繼續產生乳酸，使酸度達 1.5 2.0% 同時消耗 *L. mesenteroides* 所產生的甘露糖醇，去除苦味[11]。大腸桿菌群的生長情形與抑制劑的添加並無顯著相關性，當 pH 值降至 4.0 以下時大腸桿菌群菌數即小於 3 log CFU/ml，與 Etchells 和 Johns[12] 曾指出，大腸桿菌群對酸甚為敏感，所以當漬液中乳酸菌開始發酵產酸時，大腸桿菌群便會受到抑制的理論相符。

## 2. 抑制劑對德式酸菜 pH 值及可滴定酸的影響

添加 0.01% EDTA 的德式酸菜初期發酵最快，且一直都保持具有最好的發酵情形，發酵至第 14 天時 pH 值最低，可達到 3.43，可滴定酸達 1.75%；添加 100 IU/ml nisin 的 pH 值為 3.57，可滴定酸 1.67%；同時添加 0.01% EDTA 及 100 IU/ml nisin 於發酵至第 14 天時 pH 值只能達到 3.89，可滴定酸 1.06%，無法達成足夠酸度製成成品，可能在此情形下乳酸菌存活率較低所造成。

## 三、Nisin、EDTA 及 *L. mesenteroides* 對德式酸菜發酵的影響

本實驗第三部份，針對添加不同抑制劑及菌 對德式酸菜於 18、2.5% 粗鹽下行控制發酵的情形來進行討論，以添加乳酸菌種的方式控制德式酸菜發酵時微生物相的變化。高濃度的接種可以使接種之乳酸菌在短時間內成為最優勢菌種，藉此影響其他微生物的生長趨勢，進而控制德式酸菜的發酵速率，並有效抑制腐敗性微生物，以確保德式酸菜的安全與衛生。實驗共有五組處理，分別為：單獨接種菌 *L. mesenteroides*；添加 *L. mesenteroides*、0.01% EDTA；添加 *L. mesenteroides*、100 IU/ml nisin；添加 *L. mesenteroides*、0.01% EDTA 及 100 IU/ml nisin；另外添加 *L. mesenteroides* 及具有 nisin 生產能力的 *L. lactis* 來探討經由商品化的 nisin 及直接經由微生物生產的 nisin 對於德式酸菜發酵時

的差異性。所接種之 *L. mesenteroides* 為篩選出對 nisin 具有耐受能力達 25,000 IU/ml 之菌株。

## 1. 添加抑制劑及乳酸菌種對德式酸菜中微生物相的影響

(1). 單獨接種菌 *L. mesenteroides* 及添加 *L. mesenteroides*、具有 nisin 生產能力的 *L. lactis* 兩組在第二天時總菌數及乳酸菌數才達最高，分別為  $2.6 \times 10^8$  CFU/ml 其他三組則於第一天時即可達到相似水準，可能是因為這組並未額外添加抑制劑，而因為有接種菌 使其快速成為優勢菌種，因此乳酸菌數、總菌數及 *L. mesenteroides* 菌數一直都相近，也因為 *L. mesenteroides* 的快速生長產酸使得 *L. plantarum* 在各種處理下在第二天時均可測出。大腸桿菌群則都只於第一天時可測出，在第二天時就少於  $1.0 \times 10^3$  CFU/ml，不過大腸桿菌群的生長情形與抑制劑的添加仍有相關性，在添加 nisin 及 EDTA 情形下大腸桿菌群的菌數最少，Stevens 等[4]指出 EDTA 及 nisin 合用對格蘭氏陰性菌如 *E. coli* 會產生抑制效果，相較於 EDTA 於單獨使用下具較佳之抑菌效果，顯示 EDTA 有助於對格蘭氏陰性細菌的抗菌效果。

(2). 添加 *L. mesenteroides*、具有 nisin 生產能力的 *L. lactis* 在第二天時總菌數及乳酸菌數才達最高，為  $1.31 \times 10^8$  CFU/ml，可能是因為雖然添加 *L. lactis* 可產生 nisin，但必須當菌體進入對數生長期時才進行生合成[13]，所以在第二天時菌數升到最高；而因為有接種菌 使其快速成為優勢菌種，因此乳酸菌數、總菌數及 *L. mesenteroides* 菌數一直都相近，也因為 *L. mesenteroides* 的快速生長產酸使得 *L. plantarum* 在各種處理下在第二天時均可測出。大腸桿菌群則都只於第一天時可測出，在第二天時就少於  $1.0 \times 10^3$  CFU/ml。

## 2. 添加抑制劑及乳酸菌種對德式酸菜 pH 值及可滴定酸的影響

各組由於接種乳酸菌種，在第一天時，即可使 pH 值下降至 4.0 左右，也因此使得大腸桿菌群快速死滅；添加 *L.*

*mesenteroides*、nisin 及添加 *L. mesenteroides*、nisin 及 EDTA 兩組初期（前兩天）的發酵程度較慢，可能因為前者 nisin 添加抑制了自然存於高麗菜中的 *L. mesenteroides*，而後者也符合本實驗第二部份推論，當添加 nisin 與 EDTA 時乳酸菌的存活率較低，不過由於有接種乳酸菌種，因此 *L. mesenteroides* 仍可順利生長、產酸；同時添加 *L. mesenteroides* 及 *L. lactis* 組由於 *L. lactis* 屬於同型發酵乳酸菌，會以醱解途徑將碳水化合物分解成丙酮酸後直接還原成乳酸，且每分鐘產生之乳酸超過其重量的 10%，造成環境 pH 值急速下降而抑制菌體的生長[14,15]。

#### 四、自製德式酸菜與市售產品之比較

Trial 等[16]曾調查美國市售 11 種德式酸菜，其中可滴定酸為 0.9 ~ 1.5%。台灣市售之德式酸菜（商品名：Home & Garden Sauerkraut，製造商：Market Wholesale Grocery Co.），其酸鹼值 3.39，乳酸含量 1.69%，可滴定酸度 1.72%。若以市售商品為標準，德式酸菜於未接種菌，只添加抑制劑時發酵約需十四天的時間，即可達到所需要的酸度。添加 *L. mesenteroides* 同時添加抑制劑發酵需要七天左右完成。由此可知，德式酸菜接種菌，*L. mesenteroides* 及抑制劑約為只添加抑制劑為接種菌 發酵速率之二倍。

#### 五、德式酸菜儲存時的變化

本實驗第五部份，即是將發酵完成之德式酸菜分裝儲存於 4℃，探討乳酸菌之存活、酸度改變等品質之變化，以瞭解德式酸菜在低溫下的保藏性質。

##### 1. 抑制劑對德式酸菜在 4℃ 儲存時的影響

添加 nisin 組儲存時菌體的死滅較快，於第三星期乳酸菌菌數小於 3 log CFU/ml，於第四星期則連總菌數也小於 3 log CFU/ml；實驗組菌體的死滅情形較慢，當儲存了四星期時，乳酸菌及總菌數均仍可測得。

添加不同抑制劑於儲存時對德式酸菜

中可滴定酸及 pH 值之變化，在一個月的儲藏後可滴定酸都有略微上升，pH 值略微下降的現象，在儲藏一個月後，其酸度仍在可接受的範圍。德式酸菜在分裝後於 4℃ 保存一個月並未造成品質的劣變，不過此時近乎已無乳酸菌存活，無法藉此方法食入對身體健康有益之乳酸菌。

##### 2. 接種乳酸菌種及抑制劑進行發酵對德式酸菜在 4℃ 儲存時的影響

單獨接種 *L. mesenteroides*；添加 *L. mesenteroides*、nisin；添加 *L. mesenteroides*、EDTA 及 nisin；添加 *L. mesenteroides* 及具有 nisin 生產能力的 *L. lactis* 等四組均於儲存二星期時菌體即死滅至菌數小於 3 log CFU/ml；而添加 *L. mesenteroides*、EDTA 組則於第四星期才乳酸菌及總菌數都菌數小於 3 log CFU/ml。

添加不同抑制劑對儲存時德式酸菜可滴定酸及 pH 值之影響顯示，在一個月的儲藏後兩者的變化均不大，在儲藏一個月後，其酸度仍在可接受的範圍。德式酸菜在 4℃ 下儲存一個月並未造成品質的劣變，但乳酸菌已死滅。

#### 四、計畫成果自評

1. 本研究計畫成果報告內容與原申請研究計畫書內容相符，並達成預期目標。
2. 研究成果具學術及應用價值，適合在學術期刊發表。

#### 五、參考文獻

1. Kone, K. and Fung, D. Y. C. 1992. Understanding bacteriocins and their uses in foods. Dairy Food Environ. Sanitation. 12:282-285.
2. LeBlanc, D. J., Crow, V. L. and Lee, L. N. 1980. Plasmid mediated carbohydrate catabolic enzyme among strains of *Streptococcus lactis*, p. 31-41. In C. Stuttard and K. R. Rozee (ed.), plasmid and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms. Academic Press, Inc., New York.

3. Stevens, K. A., Klapes, N. A., Sheldon, B. W. and Klaenhammer, T. R. 1992a. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. J. Food Prot. 58: 1786-1788.
4. Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. 1992b. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. J. Food Prot. 55: 763-766.
5. Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. 1992. Effect of treatment condition on nisin inactivation of gram-negative bacteria. J. Food Protect. 55:763-766
6. Breidt, K. A., Crowley, K. A. and Fleming, H. P. 1993. Isolation and characterization of nisin-resistant *Leuconstoc mensenteroides* for use in cabbage fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3778-3783.
7. Holo, H. and Nes I. F. 1989. High-frequency transformation, by electroportion, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. Appl. Environ. Microbiol. 55:3119-3123.
8. Chassy, B. M., Mercenier, A. and Flickinger, J. 1988. Transformation of bacteria by electroportion. Trends in Biotechnol. 6:303-309.
9. Harlander, S. K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation. pp. 229-233. In: "Streptococcal Genetics", Ed. by J. J. Feretti and R. Curtiss . American Society for Microbiology, Washington, D. C.
10. 劉嘉煉。1984。應用微生物學 p.141-142。華香園出版社，台北。
11. Pederson, C. S. 1960. Sauerkraut. Adv. Food Res. 10: 233.
12. Etchells, J. L. and Johns I. D. 1943. Bacteriological changes in cucumber fermentation. Food Ind. 15:54-56.
13. 陳元宏、游若 。1995。乳酸鏈球菌素作為做微生物防腐劑之生產研究。食品科學。22: 77-85。
14. 方祖達。1983。醃漬及發酵蔬菜生產之改進。科學發展。11(2): 157-158。
15. Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
16. Trial, A.C., Fleming, H.P., Young, C.T., McFeeters, R.F. 1996. Chemical and sensory characterization of commercial sauerkraut. J Food Qual. 19: 15-30.