

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：雙叉桿菌及其胞外多醣的抗致突變
機制與活性之研究

計畫英文名稱：Study on the antimutagenic mechanism
and activity of bifidobacteria and their exopolysaccharide

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-306-

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

計畫主持人：游若菽教授

計畫參與人員：羅培仁 博士班研究生

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中華民國九十二年十一月

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

雙叉桿菌及其胞外多醣的抗致突變機制與活性之研究

Study on the antimutagenic mechanism and activity of bifidobacteria and their exopolysaccharide

計畫編號：NSC91-2313-B-002-306-

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：游若菽 教授 國立臺灣大學食品科技研究所

電子信箱：yurc@ntu.edu.tw

一、中文摘要

使用安氏法 (Ames test) 之 *Salmonella typhimurium* TA100 突變株，檢測數株益生性雙叉桿菌的 MRS 培養物對致突變劑 benzo[a]pyrene (B[a]P) 之抗致突變活性。雙叉桿菌的 MRS 培養物對 *S. typhimurium* TA100 並不具有毒性與致突變性。大部分雙叉桿菌的培養物顯示對 B[a]P 致突變性具有 50% 以上的抑制效果。*B. bifidum*, *B. lactis* 與 *B. longum* 的抗致突變效果顯著地高於 *B. adolescentis*, *B. breve* 與 *B. infantis*。然而，生物抗致突變活性較低。培養物與致突變因子例如 B[a]P 及 S9 mix 預反應後的培養物表現出特殊的抗致突變活性，在這些預反應培養物之中，*B. lactis* 的抗致突變活性最大。*B. lactis* 與 *B. longum* 細胞的抗致突變活性較其細胞上層液大。當 *B. lactis* 細胞經過 pH 2.0 (3 小時) 或 1% 膽汁 (6 小時) 處理後，相較於控制組 (pH 7.0, 0 小時) 顯示其抗致突變活性增加。在連續酸性 pH 值與膽汁處理後，雖然 *B. lactis* 活菌數低於 2.0 log cfu/ml，卻表現最高的抗致突變活性。B[a]P 的致突變性隨著菌細胞與 B[a]P、S9 mix 及 B[a]P 代謝物的反應時間延長而降低。依據反應時間的抑制作用結果顯示，細胞對於 B[a]P 的抗致突變活性主要歸因於細胞與 B[a]P 及其代謝物之間的交互作用。*B. lactis* 與 *B. longum* 的粗細胞壁顯示的抗致突變活性大於熱處理之細胞與細胞萃出物。研究顯示抗致突變性的主要機制是去致突變作用，涉及雙叉桿菌、B[a]P 與 B[a]P 代謝物之間化學複合物的形成，以及抑制 P450 的

代謝活化作用。

關鍵詞：雙叉桿菌、苯駢芘、安氏法、抗致突變性

Abstract

Antimutagenic activities of MRS cultures of several probiotic bifidobacteria against a potent mutagen, benzo[a]pyrene (B[a]P), were examined by the Ames test using *Salmonella typhimurium* TA100. MRS cultures of bifidobacteria were neither toxic nor mutagenic. Most bifidobacterial cultures showed more than 50% inhibitory effect on B[a]P. *B. bifidum*, *B. lactis* and *B. longum* showed significantly higher antimutagenicity than *B. adolescentis*, *B. breve*, and *B. infantis* against B[a]P; however, the bioantimutagenic activities were lower. The cultures preincubated with mutagenic factors such as B[a]P and S9 mix displayed characteristic antimutagenic activities. Among these cultures, *B. lactis* exhibited the highest antimutagenicity. The cells of *B. lactis* and *B. longum* showed higher antimutagenic activities than their supernatants. When *B. lactis* cells were treated at pH 2.0 for 3 h or 1% bile for 6 h, its antimutagenic activities against B[a]P were increased as compared to controls at pH 7.0 for 0 h. After sequential acidic pH and bile treatments, *B. lactis* displayed the highest antimutagenic activity although its viable cells number was less than 2.0 log cfu/ml. The mutagenicity of B[a]P decreased as the reaction time of cells with B[a]P, S9 mix and B[a]P metabolites increased. According to this time-dependent inhibition study, the antimutagenicity of cells toward B[a]P was

chiefly attributed to an interaction of cells with B[a]P and B[a]P metabolites. Crude cell walls of *B. lactis* and *B. longum* showed higher antimutagenic activities than heat-treated cells and cell extracts. Sequential preincubation studies showed that the main mechanism of antimutagenicity is action of desmutagenicity, involving the formation of chemical complexes between bifidobacteria, B[a]P, and B[a]P metabolites, and the inactivation of P450-mediated metabolism.

Keywords : bifidobacteria, benzo[a]pyrene, Ames test, antimutagenicity

二、緣由與目的

雙叉桿菌是腸道內的正常棲息者，可發揮多種有益於腸道健康的功效[1,2]。目前，雙叉桿菌經常被做為益生菌相關製品的活性成分[3]。Morotomi 與 Mutaip[4]及 Orrhage 等[5]探討腸道細菌，對致突變性雜環胺的結合能力，發現活的細胞顯示的抗致突變活性大於死的細胞。益生性雙叉桿菌與乳酸菌亦顯示對雜環胺、亞硝基化合物與黃麴毒素等的致突變活性具有抑制效果[6,7]。雖然雙叉桿菌細胞對致突變劑的結合作用被認為是可能的機制，雙叉桿菌的抗致突變機制仍未清楚瞭解。

依據抗致突變作用的機制，可將抗致突變劑歸類為去致突變劑或者生物抗致突變劑兩類[8]。去致突變劑是以化學性或酵素不活化作用直接地抑制致突變劑或致突變劑先質，其可預防致突變活性物質與 DNA 的交互作用。當 DNA 遭受致突變活性物質損傷後，生物抗致突變劑則是作用在細胞內致突變過程的參與因子或修復受損的 DNA，藉以調節細胞內的改變而減低致突變活性物質的有害作用與突變機率。Benzo[a]pyrene (B[a]P) 是產生自有機物質的不完全燃燒或食物在高溫製備的過程，為廣泛存在的環境與膳食的污染物，特別是在燒烤或煙燻的肉類與魚類製品中的含量非常高[9]。在動物餵與實驗結果顯示，B[a]P 是強的多環芳香烴致癌劑，而其濃度的檢測值是環境或膳食中致癌性多環芳香烴含量的指標[10]。

本研究的目的是利用安氏法以設計分段

式預反應試驗，檢測雙叉桿菌對 B[a]P 致突變活性的抑制效果，藉以分析雙叉桿菌之可能的抗致突變機制。此外，利用加熱法與超音波破碎法，製備熱致死細胞與粗細胞壁及細胞萃出物，並分別檢測其抗致突變活性與反應後的 B[a]P 殘餘量，探討在不同的細胞狀態與細胞部分對於抗致突變活性的貢獻。

三、結果與討論

一、雙叉桿菌 MRS 培養物對 B[a]P 致突變性的抑制效果

測試的雙叉桿菌 MRS 培養物 (10^8 cfu/100 μ l) 對 B[a]P (0.3 μ g/plate) 致突變性的抑制率在 48.9-87.8%。其中以 *B. bifidum*、*B. lactis* 與 *B. longum* 表現的抗致突變性較佳，顯著地高於 *B. adolescentis*、*B. breve* 與 *B. infantis* 的效果。再者，將 *S. typhimurium* TA100 (3 ml) 與 B[a]P (0.5 ml, 5 μ g/ml) 及 S9 mix (0.5 ml) 預反應，顯示 *B. breve*、*B. lactis* 與 *B. longum* 之 MRS 培養物對 DNA 損傷的 *S. typhimurium* TA100 細胞之生物抗致突變活性表現較佳，但是其效果低於抗致突變性。Cassand 等[11]檢測 *Bifidobacterium* sp. Bio Danone 173010 與 *Bifidobacterium* sp. CIRDC Danone 163040 製備的發酵乳對 B[a]P (1 μ g/plate) 的抗致突變效果，顯示的抑制率分別為 55.1 % 與 59.0 %。

二、雙叉桿菌 MRS 培養物與 B[a]P 及 S9 mix 預反應的效果

評估雙叉桿菌 MRS 培養物對 B[a]P (0.5 μ g/plate) 被 S9 mix 代謝活化的影響。首先將 MRS 培養物與 B[a]P 及 S9 mix 在 37 下反應 20 分鐘，然後加入 *S. typhimurium* TA100 繼續反應 20 分鐘後測定其抗致突變性。顯示 *B. lactis* 對 B[a]P 的代謝活化作用具有顯著的抑制率 (81.4 %)。Zhang 與 Ohta [12]研究發現 *S. cremoris* Z-25 對致突變性熱解物 (Trp-P-2) 的結合效果主要歸因於細胞壁骨架的胍太聚醣成分。此外，Zhang 與 Ohta [13] 亦發現 *L. acidophilus* IFO13951 的細胞壁骨架對 Trp-P-1 的結合作用是貢獻出菌體的抗致突變性之重要原因。

Sreekumar 與 Hosono [14] 探討 *L. gasseri* 與 *B. longum* SBT 菌株的結合性質與抗致突變的關係，發現細胞對 Trp-P-1 (100 µg) 的結合率與抗致突變的抑制率亦呈現正的相關性，並顯示結合型 Trp-P-1 並不具有活性與經過純化的細胞壁 (purified cell wall; PCW) 的結合率大於粗的細胞壁 (crude cell wall; CCW) 與胜太聚醣，這些結果顯示致突變性熱解物的結合主要歸因於細胞壁。Sreekumar 與 Hosono [14] 在鑑定 *L. gasseri* SBT 10239 與 10241 的 Trp-P-1 結合位研究結果發現，細胞對 Trp-P-1 的結合能力降低，與碳水化合物成分的含量呈現高度的正相關性，並顯示葡萄糖在細胞壁與 Trp-P-1 的結合上扮演重要的角色。

三、雙叉桿菌 MRS 培養物與 S9 mix 及 *S. typhimurium* TA100 預反應的效果

MRS 發酵物與 S9 mix 及 *S. typhimurium* TA100 在 37 °C 下反應 20 分鐘，然後加入 B[a]P (0.5 µg/plate) 繼續反應 20 分鐘後檢測其抗致突變性，藉以探討雙叉桿菌 MRS 培養物對 S9 mix 的代謝活性與 *S. typhimurium* TA100 的致突變敏感性之影響。顯示 *B. lactis* 培養物對 B[a]P 致突變性的抑制率 (90.3 %) 最高，而其他雙叉桿菌的抗致突變性普遍降低而僅有 21.0 - 45.7 %。

Lankaputhra 與 Shah [6] 將多株的雙叉桿菌在 MRS broth 培養 18 小時 (37 °C) 後，分析有機酸的產量與其抗致突變性效果，結果發現丁酸與醋酸對多種的致突變劑與致突變劑先質具有強的抗致突變活性。Smith [15] 指出丁酸能夠誘發基因表現上的改變而防止 DNA 的致突變與致癌效應，例如轉錄速率 (transcription rate) 的影響、藉由 DNA 合成的抑制進而阻止細胞的增殖作用與改變細胞型態使癌細胞回復正常的細胞特性，由於這方面的證據甚少，故仍須進一步探討。因此，乳酸菌的抗致突變活性部分可能是來自於有機酸代謝產物的貢獻。

Sreekumar 與 Hosono [16] 探討 *B. longum* PS⁺ 對 Trp-P-1 致突變性的抑制效果，發現未純化的多醣可能藉由結合或阻礙

致突變劑及其活化代謝物與細胞之間的交互作用，進而影響雙叉桿菌與致突變劑的活性。因此，雙叉桿菌的胞外多醣顯然在抗致突變作用上扮演著重要的角色。Challa 等 [17] 發現 *B. longum* 可刺激結腸黏膜的巰胱甘太轉移酶 (glutathione S-transferase; GST) 活性的上升。GST 是參與 Phase II 酵素的成員之一，催化親電子性基因毒物或其代謝物 (例如 B[a]P 代謝活化型態的 BPDE) 與氫硫基化合物 (例如 glutathione、cysteine) 結合，然後以 GSH 結合物 (conjugates) 的形式分泌於膽汁中或進一步被代謝形成 mercapturic acid，使致突變/致癌劑的基因毒性與細胞毒性的能力喪失 [18]。因此，推測雙叉桿菌可能在 MRS broth 培養的過程中產生多種的代謝產物，然而對致突變劑的抑制效果則隨著菌種活性的差異而不同，並且可能影響 *S. typhimurium* TA100 對致突變作用的敏感性，進而表現出不同的抗致突變活性。

四、雙叉桿菌 MRS 培養物中的細胞與上層液對 B[a]P 致突變的抑制效果

為了進一步瞭解雙叉桿菌 MRS 培養物對 B[a]P 的抗致突變效果，因此選取 *B. lactis* 與 *B. longum* 的 MRS 培養物，以離心區分細胞與上層液後分別測定對 B[a]P (0.5 µg/plate) 的抗致突變效果。顯示 *B. lactis* 與 *B. longum* 的菌細胞對 B[a]P 致突變性的抑制率分別為 75.9% 與 61.2%，而上層液部分則為 10.3% 與 7.8%，細胞的抗致突變效果約為培養上層液的 7 - 8 倍。因此，細胞為 MRS 培養物抑制 B[a]P 致突變活性的重要因子。*B. lactis* 細胞經過 pH 7.0 (0 h, control) 與 pH 2.0 (3 小時) 的 PBS 溶液或含 1% 膽汁的 MRS 培養基 (pH 6.5, 6 小時) 的處理後，可提高 *B. lactis* 表現對 B[a]P 的抗致突變活性。El-Nezami 等 [19] 發現酸處理可能改變細菌的細胞壁結構而使致突變劑較容易與細胞壁或細胞膜成分接觸而結合所致。Tanaka 等 [20] 發現雙叉桿菌具有結合型膽鹽水解酶 (conjugated bile salt hydrolase) 活性，催化結合型膽鹽水解而轉變成胺基酸殘基與去結合型膽鹽。而

Yamada 等[21] 與 Hayatsu 等[22] 發現部分的膽汁鹽分解產物具有抗致突變活性。再者，連續的酸性 pH 值與膽汁處理後，雖然 *B. lactis* 存活菌數降低至 2.0 log cfu/ml 以下，然此菌株顯現對 B[a]P 的抗致突變活性最高，抑制率為 71.5%。

五、雙叉桿菌的細胞對 B[a]P、S9 mix 與 B[a]P 活化代謝物的抗致突變效果

B. lactis 與 *B. longum* 的 PBS 細胞懸浮液分別與 (1) B[a]P (0.1 ml, 3 µg/ml)、(2)、S9 mix 及 (3) B[a]P (0.1 ml, 3 µg/ml) + S9 mix 預反應 0, 20, 40 分鐘後，測定雙叉桿菌的細胞之抗致突變性。藉以探討細胞抑制 B[a]P 致突變性的作用機制與反應時間對抗致突變性的影響。顯示 (1) 細胞對致突變劑先質 B[a]P 的抑制效果隨著菌細胞與 B[a]P 預反應的時間延長而增加。*B. lactis* 的抑制效果大於 *B. longum*，在無預反應時間的情況下顯示的抑制率為 81.4%，並且在 40 分鐘預反應後的抗致突變活性顯著地增加 (91.1%)。*B. longum* 則需要在 40 分鐘預反應後，對 B[a]P 致突變性的抑制效果才能達到 85.2%。(2) 細胞對於 S9 mix 代謝活性的影響結果顯示，*B. lactis* 的細胞對 B[a]P 的抗致突變性隨著菌細胞與 S9 mix 的預反應時間的延長而增加。例如，*B. lactis* 細胞與 S9 mix 預反應 40 分鐘後，對 B[a]P 致突變性的抑制率可達到 69.8%。*B. longum* 的細胞與 S9 mix 預反應 0 與 20 分鐘後，對 B[a]P 致突變性的抑制效果並無改變 (64.0 64.1%)，延長至 40 分鐘後則抑制 B[a]P 致突變性的效果顯著地降低 (52.1%)。(3) 細胞對代謝 B[a]P 活化物致突變性的影響，結果顯示在預反應 20 分鐘後，*B. lactis* 與 *B. longum* 的細胞之抑制效果顯著地提高。在 40 分鐘預反應顯示，*B. longum* 的細胞對 B[a]P 活化代謝物的致突變性之抑制率 (89.6%) 則較大於 *B. lactis* (81.8%)。基於上述結果顯示，*B. lactis* 與 *B. longum* 的細胞對 B[a]P 致突變性的抑制效果主要是歸因於細胞與 B[a]P 及 B[a]P 活化代謝物之間的交互作用，而細胞可能影響 S9 mix 的代謝活化作用，隨著菌株種類的不同而異，通常需要較長的反應時間才具有顯著的抑制效果。然而，不能排除 B[a]P 代謝物彼此間的交互作用與抑制 S9 mix 酵素的活性。

同而異，通常需要較長的反應時間才具有顯著的抑制效果。然而，不能排除 B[a]P 代謝物彼此間的交互作用與抑制 S9 mix 酵素的活性。

六、雙叉桿菌的活細胞、熱處理細胞、未純化的細胞壁與細胞萃出物對 B[a]P 的抑制作用

B. lactis 與 *B. longum* 的活細胞、熱處理細胞、未純化的細胞壁與細胞萃出物與 B[a]P (5 µg/ml) 預反應後，以離心收集反應上層液，然後測定反應上層液中剩餘的致突變性與 B[a]P 量。顯示 *B. lactis* 活細胞 (8 9 log cfu/plate) 對 B[a]P 致突變性的抑制率為 81.7%，經過熱處理 (100 °C, 20 min) 後的死細胞之抗致突變性則顯著地降低至 31.7%，而未純化的細胞壁部分對 B[a]P 的抗致突變性 (61.0%) 顯著地大於細胞萃出物 (22.0%)。在反應上層液中的 B[a]P 殘餘量檢測結果顯示，B[a]P 的初始濃度為 0.5 µg/0.1 ml，經過與 *B. lactis* 的活細胞預反應後的殘餘量為 0.043 µg，而熱致死細胞僅將反應上層液中的 B[a]P 量降低至 0.32 µg，表示活細胞的移除效果大於熱致死細胞。同樣地，未純化的細胞壁對反應上層液中 B[a]P 的降低能力則高於細胞萃出物，B[a]P 殘餘量分別為 0.16 µg 與 0.38 µg。類似的結果亦出現在 *B. longum* 的試驗。因此，活細胞對 B[a]P 致突變性的抑制效果與降低殘餘量的能力大於熱致死細胞，且其抑制作用主要來自未純化的細胞壁部分，其次是細胞萃出物。表示活細胞抑制 B[a]P 致突變性的作用機制，主要是藉由細胞壁部分與 B[a]P 或 B[a]P 活化代謝物之間的交互作用，藉由結合或其它化學及酵素的作用將 B[a]P 與 B[a]P 活化代謝物移除或不活化。

四、計畫成果自評

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。

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.Rasic, J., Kurmann, J., 1983. Bifidobacteria

- and their role. *Experiential Suppl*, 39: 81-101.
2. Mitsuoka, T. 2000. Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Biosci. Microflora*, 19: 15-25.
 3. Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutr. Res.*, 19: 1559-1597.
 4. Morotomi, M. and Mutai, M. 1986. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates by intestinal bacteria. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77: 195-201.
 5. Orrhage, K., Sillerstrom, E., Gustafsson, J. A., Nord, C. E. and Rafter, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.*, 311: 239-248.
 6. Lankaputhra, W. E. and Shah, N. P. 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat. Res.*, 397: 169-182.
 7. Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998a. Antimutagenicity and influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *J. Dairy Sci.*, 81: 1508-1516.
 8. Kuroda, Y. 1990. Antimutagenesis studies in Japan. In "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism ." Ed. by Y. Kuroda, D. M. Shankel and M. D. Waters. pp: 1-22, Plenum Press, New York.
 9. Phillips, D. H. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.*, 443: 139-147.
 10. Kazerouni, N. Sinha, R., Hsu, C.H., Greenberg, A. and Rothman, N. 2001. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem. Toxicol.* 39: 423-436.
 11. Cassand, P., Abdelali, H., Bouley, C., Denariaz, G. and Narbonne, J. F. 1994. Inhibitory effect of dairy products on the mutagenicities of chemicals and dietary mutagens. *J. Dairy Res.*, 61: 545-552.
 12. Zhang, X. B. and Ohta, Y. 1991a. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J. Dairy Sci.*, 74: 1477-1481.
 13. Zhang, X. B. and Ohta, Y. 1993. Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolysates. *Mutat. Res.*, 298: 247-253.
 14. Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998b. The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat. Res.*, 421: 65-72.
 15. Smith, J. G. 1995. Molecular and genetic effects of dietary derived butyric acid. *Food Technol.*, 11: 87-90.
 16. Sreekumar, O. and Hosono, A. 1998c. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Can. J. Microbiol.*, 44: 1029-1036.
 17. Challa, A., Ramkishan-Rao, D., Chawan, C. B. and Shackelford, L. 1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane - induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18: 517-521.
 18. Ketterer, B. 1986. Protective role of glutathione and glutathione transferase in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 202: 343-361.
 19. El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.*, 61: 466-468.
 20. Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., Mierau, I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.*, 82: 2530-2535.
 21. Yamada, K., Lim, B. O., Nonaka, M., Sugano, M. 1993. Measurements of mutagenic and antimutagenic activities of bile acids by Rec-assay. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 599-602.
 22. Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T. 1988. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 202: 429-446.