

深層海水中乳酸菌的分離與鑑定

黃美瑩^{1*} · 張錦宜¹ · 張慎恩² · 洪珮馨² · 林金榮¹

¹ 行政院農業委員會水產試驗所 水產養殖組

² 國立台灣海洋大學 水產養殖系

摘 要

本研究採集台灣東部知本外海不同水深 (285 ~ 912 m) 之深層海水樣品 8 件，水樣經濾膜過濾培養 (25°C, 72 小時) 後，於 MRS Agar 上面共有 35 個菌落出現。經鑑定後，有 2 株具有乳酸菌屬的特性，該 2 株分別來自測站 ST14 水深 321 m 及 530 m，編號為 ST14-321 LA1 及 ST14-530 LA1，其革蘭氏染色為陽性，均為四聯球菌，不具觸酶活性，為同性發酵。依據各項生理及生化特性，以及對於各種碳水化合物之利用性，將菌株歸屬為 *Pediococcus urinaeequi*。該 2 株菌於不同溫度、pH 與鹽度下之成長趨勢相當接近，於 25°C 與 pH 8 時生長最良好，鹽度為 1 ~ 7% 時生長佳。雖然該 2 株菌其生理及生化特性相當接近，但對於碳水化合物之發酵利用情形則不太相同。

關鍵詞：深層海水、乳酸菌、分離、鑑定

前 言

乳酸菌 (lactic acid bacteria) 為能利用碳水化合物進行發酵產生大量乳酸之一群細菌的總稱，適宜生長溫度很廣 (15 ~ 45°C)，其特性為：(1) 革蘭氏陽性菌；(2) 桿菌或球菌；(3) 不形成內孢子；(4) 通常缺乏觸酶 (catalase) 和細胞色素氧化酶 (cytochrom oxidase)；(5) 無運動性；(6) 厭氧、微好氧或兼性厭氧性，大多可在有氧環境生長，但以無氧狀態生長較佳，亦有絕對厭氧者；(7) 對所代謝之葡萄糖，產生 50% 以上之乳酸；(8) 生長營養需求複雜，需有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素及多種生長素才能生長 (Stiles and Holzappel, 1997)。乳酸菌依其代謝途徑及最終發酵產物的不同可分為同型發酵 (homofermentation) 與異型發酵 (heterofermentation)，前者指在發酵過程中，經糖解作用使碳水化合物分解成丙酮酸後直接還原成 90 ~ 100% 的乳酸；後者是指發酵過

程中除了產生乳酸外還包括醋酸、乙醇及二氧化碳等多種產物 (李, 1989; 廖, 1998; 陳與林, 2004)。乳酸菌在食品方面的應用相當廣泛，一般而言，乳酸菌可以增加食品香味、去除異味、產生細菌素 (bacteriocin) 等抗菌物質，抑制其他有害菌，進而延長保存期限，是食品加工上最常用的菌種之一 (Tamime and Deeth, 1980; Reddy *et al.*, 1983; 李, 1989; Navder *et al.*, 1990)。近年來也證實乳酸菌對人體有相當多的保健功效，包括：抑制致病菌，維持腸道內菌叢之平衡 (Reid, 1999; Fooks and Gibson, 2002)、緩和乳糖不耐症 (Vesa *et al.*, 1997)、增加營養價值 (Sanders *et al.*, 1996)、降低血清中膽固醇 (Akalin *et al.*, 1997)、抗癌性 (Hirayama and Rafter, 2000; 邱, 2004)、降低高血壓 (Leena *et al.*, 2003) 及調節免疫反應的作用 (Cross, 2002) 等。

目前食品業所使用的乳酸菌大都分離自陸地上，而海洋孕育許多豐富的生物資源 (馮等, 2003)，但有關海洋乳酸菌研究之資料相當少 (Strøm and Olafsen, 1990; Ishikawa *et al.*, 2003; Toffin *et al.*, 2005)。深層海水係指太陽光照射不到，水深 300 公尺以下之海水，源頭為北大西洋

*通訊作者 / 基隆市 202 和一路 199 號, TEL: (02)2463-3101; FAX: (02)24628138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw

格陵蘭島外海的海面海水，經冷卻後重量加重，沉到深海所形成之溫鹽環流，隨著洋流循環於大西洋、太平洋、印度洋及南極海域之間 (中島, 2002)。深層海水具有低溫安定性、水質清淨性及營養鹽豐富等三個特性 (中島與豐田, 1979)。日本從深層海水中分離乳酸菌，並且應用於食品加工，包括製成健康食品 — 乳酸菌錠劑、鹽漬蔬菜、優格及乳酸菌飲料等，他們認為加入深層海水乳酸菌可以使食品富含特殊風味，並能提升食品的附加價值 (林等, 2003)。因此，本研究將初步篩選台灣東部海域深層海水中的乳酸菌，測定其生理生化特性，俾供應用於食品加工之可行性探討。

材料與方法

一、深層海水樣品的採集

本研究以水產試驗所水試一號試驗船進行深層海水的採集，所用的無菌採水器為 Niskin 生物採樣器 (Austin, 1988)，採水地點為台東知本外海，共設有 ST10、ST14 與 ST22 等 3 個採水站，取樣的深度為 285 ~ 912 m，共採集了 8 個水樣，其經緯度及所採集之水深如 Table 1。

Table 1 Location and depth of the sampling

Station	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Depth (m)
ST 10	22~40.580	121~04.690	285
ST 14	22~38.920	121~04.730	321, 530, 740
ST 22	22~35.845	121~04.924	301, 468, 678, 912

二、深層海水乳酸菌之分離與保存

所採集之水樣於 4°C 冷藏下，6 小時內送到實驗室。水樣 (100 ml) 以滅過菌的 0.22 μm 之濾膜過濾，將濾膜置於含有 2.5% 氯化鈉 (NaCl) 及 0.5% 碳酸鈣 (CaCO₃) 之 MRS Agar (salt-MRS Agar) (DE MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck) 上面，於 25 ± 0.5°C 培養 72 ± 2 小時。將 salt-MRS

Agar 上所有的菌落進行純化 3 次，並培養於 salt-MRS Broth (Merck) 中，於 25 ± 0.5°C 培養 48 ± 2 小時，添加 15% 甘油 (glycerol)，再以 -80°C 保存。

三、菌株鑑定

(一) 乳酸菌的鑑定

依據 Benson (2002) 及 Johnson and Case (2004) 之方法，將所分離純化的菌株先藉由革蘭氏染色、鏡檢、觸酶試驗及發酵型式等簡單試驗，作初步屬別的分類後，再依各屬別生理特性的不同，作進一步種別的分類鑑定。

(二) 生化性狀測定 (Benson, 2002)

本試驗中生化性狀測定包括：甲基紅試驗 (methyl-red test)、服潑氏試驗 (Voges-Proskauer test)、過氧化氫試驗 (hydrogen peroxide test)、檸檬酸利用試驗 (citrate test)、精胺酸水解試驗 (arginine hydrolysis test)、硫化氫形成試驗 (sulfur peroxide test)、吲哚形成試驗 (indole test)、明膠液化 (gelatin test) 及硝酸鹽還原性試驗 (nitrate reduction) 等 9 項。

(三) 菌株對碳水化合物利用性之試驗 (Johnson and Case, 2004)

試驗之碳水化合物溶液包括：葡萄糖 (glucose)、蔗糖 (sucrose)、果糖 (fructose)、乳糖 (lactose)、麥芽糖 (maltose)、甘露醇 (mannitol)、木醛糖 (xylose)、核糖 (ribose)、纖維二糖 (cellobiose)、海藻糖 (trehalose)、半乳糖 (galactose)、柳糖 (salicin)、阿拉伯糖 (arabinose)、肌醇 (inositol)、糖醇 (sorbitol) 及棉子糖 (raffinose) 等 16 種糖類。

(四) 16S rRNA 基因序列測定與菌種鑑定

1. 細菌總DNA的萃取 (Anderson and McKay, 1983)

細菌在 Marine Broth (Difco) 中培養到指數成

長期，取 2 ml 菌液，以 12000 g 離心 2 分鐘，再以 saline EDTA (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0) 清洗一次，收集菌體，將之懸浮於 500 μ l 含 0.1 mg lysozyme 的 PBS 中，並加入 20 mg/ml 的 proteinase K 2 μ l，在 37°C 靜置 45 分鐘，繼而加入 25% (w/v) 的 SDS 40 μ l，在 60°C 下作用 10 分鐘，最後，以 545 μ l phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 萃取總 DNA，萃取液經 12000 g 離心 2 分鐘後分層，收集 DNA 存在的水層，加入等體積 3 M 之 sodium acetate，再以二倍體積的乙醇將 DNA 沉澱下來。DNA 以 70% 的乙醇清洗後溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中，調整濃度至 0.25 mg/ml 備用。

2. 細菌 16S rRNA 基因序列測定 (Weisburg *et al.*, 1991)

細菌 16S rRNA 以通用引子 (16S_F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 及 16S_R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 經 PCR 方式擴增。PCR 反應體積為 50 μ l，包括：0.5 μ l *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l, Promega)，0.5 μ l 之 10 \times PCR 緩衝液，2 μ l 之 10 mM dNTP 混和液，10 μ l 之 10 mM MgCl₂，2 μ l 之 16S_F 引子，2 μ l 之 16S_R 引子，2 μ l 前述萃取之細菌總 DNA 及 31 μ l 之純水。反應條件為 94°C 2 分鐘、94°C 2 分鐘、46°C 1 分鐘 30 秒、72°C 2 分鐘，共 35 個循環，最後再以 72°C 延伸 2 分鐘。PCR 產物經 QIA quick PCR 純化套組 (Qiagen) 純化後，連接到 pGEM-T easy 載體 (Promega) 並轉化到 *E. coli* 上，為了確認插入的 DNA 片段確為 16S_F/16S_R 擴增片段，先以 M-13_F (5'-TGTAACCGCCAGT-3') 及 M-13_R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') 為引子進行分子選殖，再隨機篩選 3 個插入片段大小與 16S_F/16S_R 擴增片段相仿 (約 1.5 k) 的菌株進行 DNA 定序，定序結果利用 BLAST 程式 (Pearson and Lipman, 1999) 與 GeneBank 資料庫的基因進行比對，選取相似度最高且達 99% 以上的物種作為細菌鑑定之參考。

四、最適生長條件之測定 (Benson, 2002)

(一) 最適生長溫度

將菌株以 MRS Broth (pH 8.0, 含 2.5% NaCl) 活化後，以無菌水稀釋，使其在波長 600 nm 之吸光值為 0.3，取 0.1 ml 加入 10 ml 無菌之 MRS Broth (pH 8.0, 含 2.5% NaCl) 中，分別在 5、15、25、35 及 45°C 振盪培養 (200 rpm) 48 小時，測 600 nm 之吸光值，並以不種菌者為對照。

(二) 最適生長鹽度

各取 0.1 ml 上述活化菌液種於含 0、0.5、1.0、2.0、4.0、7.0 及 10% NaCl 之 MRS Broth (pH 8.0) 中，在 25°C 下培養 48 小時，分別測 600 nm 之吸光值，以不種菌者為對照。

(三) 最適生長 pH

各取 0.1 ml 活化菌液種於 pH 分別為 2.0、4.0、6.0、8.0 及 10.0 之 MRS Broth (含 2.5% NaCl) 中，在 25°C 培養 48 小時，分別測 600 nm 之吸光值，並以不種菌者為對照。

結 果

一、各採水站採集之深層水於 salt-MRS Agar 上的菌落數

各採水站所得深層水樣 (100 ml) 在 salt-MRS Agar 上所產生的菌落數相當少，為 0-15 個 (Table 2)，共 35 個菌落。

Table 2 Numbers of colonies formed on the salt-MRS Agar

Station	Depth (m)	Colony
ST 10	285	15
ST 14	321	1
	530	8
	740	0
ST 22	301	3
	468	3
	678	1
	912	4

Table 3 Characteristics of two presumptive *Pediococcus* isolates

Strains number	ST14-321 LA1	ST14-530 LA1
Gram stain	+	+
Morphology	Cocci in tetrads	Cocci in tetrads
Catalase reaction	—	—
Methyl-red test	—	±
Voges Proskauer test	—	—
Hydrogen peroxide test	—	—
Citrate test	—	—
Arginine hydrolysis test	±	—
Nitrate reduction	—	—
Indole test	—	—
Hydrogen sulfur test	—	—
Gelatin liquefaction test	—	—
Fermentation type	Homofermentation	Homofermentation
Presumptive identification	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
16S rRNA sequence analysis	<i>Pediococcus urinaeequi</i>	<i>Pediococcus urinaeequi</i>

+: strong reaction.

±: weak reaction.

—: no reaction.

二、分離菌株之初步鑑定

將上述 35 個菌落純化，進行革蘭氏染色、鏡檢、觸酶試驗及發酵型式等簡單試驗後，發現有 2 株具有乳酸菌屬的特性。該 2 株分別來自測站 ST14 的 321 m 及 530 m，編號為 ST14-321 LA1 及 ST14-530 LA1，其革蘭氏染色為陽性，均為四聯球菌，不具觸酶活性，為同性發酵，初步鑑定為 *Pediococcus* 屬 (Table 3)。

三、分離菌株之生化特性

本試驗所進行之生化特性包括：methyl-red test、Voges-Proskauer test、hydrogen peroxide test、citrate test、arginine hydrolysis test、sulfur peroxide test、indole test、gelatin test 及 nitrate reduction 等，其中，除了 ST14-530 LA1 對 methyl-red test 及 ST14-321 LA1 對 arginine hydrolysis test 的反應為弱陽性外，其餘試驗均為負反應 (Table 3)。

四、分離菌株對碳水化合物之利用性

該 2 株分離菌株對碳水化合物之利用性如 Table 4 所示，ST14-321 LA1 對 glucose、maltose、cellobiose、sorbitol、trehalose、sucrose、lactose、salicin、galactose 及 fructose 等 10 種碳水化合物均能有效發酵利用，以作為菌體生理代謝之碳源，並提供作為菌株代謝所需的能量，而對於 mannitol 及 ribose 的發酵能力較弱，對於 xylose、inositol、arabinose 與 raffinose 則無法利用。而 ST14-530 LA1 對於 glucose、maltose、cellobiose、trehalose、sucrose、ribose、salicin 及 fructose 等 8 種碳水化合物均能有效發酵利用，而對於 mannitol 則發酵能力較弱，對於 xylose、inositol、sorbitol、lactose、arabinose、raffinose 及 galactose 等 7 種碳水化合物均無法利用。

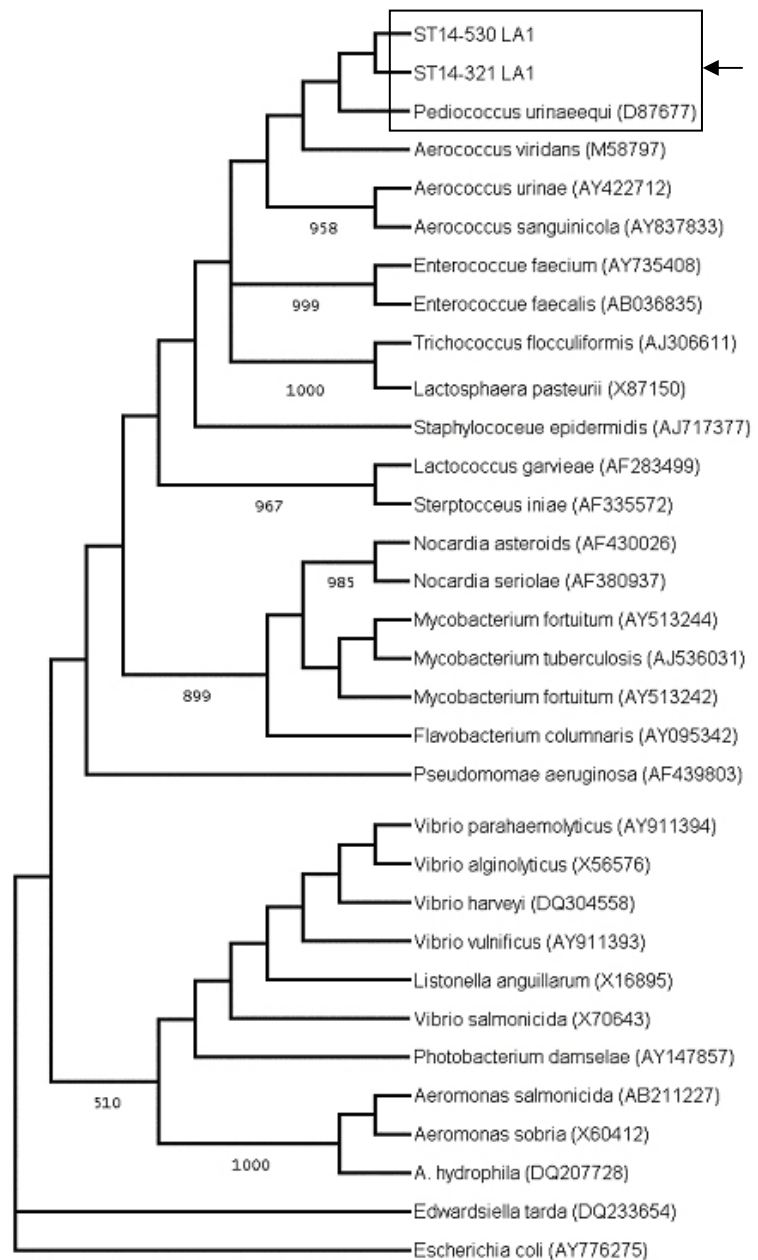


Fig. 1 Phylogenetic tree showing the 16S rRNA relationships of two isolates with other relevant species. The rectangular cladogram is the results from the neighbor-joining method, with bootstrap values from 1000 replicates. The sequences were obtained from the GenBank databases with their nucleotide sequence accession numbers in brackets. Isolates and the closest species were boxed and delineated with an arrow.

五、分離菌株的歸屬

依據 ST14-321 LA1 及 ST14-530 LA1 分離菌株之前述各項生理及生化特性，以及對於上述各種碳水化合物之利用性，再對照 Garvie (1986) 所列之資料，將菌株歸屬為 *Pediococcus urinaeequi*。此外，16S rRNA 基因比對的結果顯示，與 ST14-321 LA1 及 ST14-530 LA1 相似度最高者亦均為 *P. urinaeequi*，其相似度分別為 99.79 % (1412 個鹼基對中有 1409 個完全相同) 及 99.72 % (1419

個鹼基對中有 1415 個完全相同)，從系統發生樹狀圖分析 (Fig. 1) 亦可見此 2 分離菌株與 *P. urinaeequi* 最為接近。

六、分離菌株之最適生長條件

在不同溫度成長情形方面，ST14-321 LA1 及 ST14-530 LA1 2 株菌於不同溫度成長趨勢相當接近 (Fig. 2)，於 25°C 生長最良好，於 15 及 35°C 亦能成長，但，均不及 25°C 者，而 4 及 45°C 生

長不佳。在耐酸鹼能力方面，該 2 株菌都是在 pH 8 時生長最良好 (Fig. 3)，ST14-530 LA1 於 pH 6 次之，於 pH 10 仍能生長，但是 pH 4 以下則不佳，而 ST14-321 LA1 於 pH 6 以下生長就不良了。在耐鹽度試驗方面，該 2 株菌於鹽度 1~7% 之環境均能成長 (Fig. 4)，於 0 及 10% 之狀況下生長不佳。

Table 4 Carbohydrate fermentation tests of the isolated strains

Strains number	ST14-321 LA1	ST14-530 LA1
Arabinose	—	—
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	—
Glucose	++	++
Inositol	—	—
Lactose	+	—
Maltose	+	++
Mannitol	±	±
Raffinose	—	—
Ribose	±	+
Salicin	+	+
Sorbitol	+	—
Sucrose	++	++
Trehalose	+	+
Xylose	—	—

++: very strong fermentation.

+: strong fermentation good.

±: weak fermentation.

—: no fermentation.

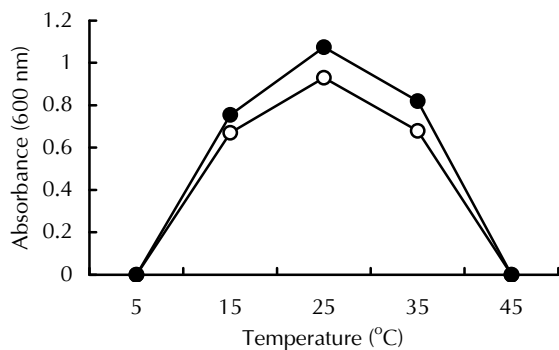


Fig. 2 Growth of strains ST14-321 LA1 (○) and ST14-530 LA1 (●) at various temperature for 48 hr.

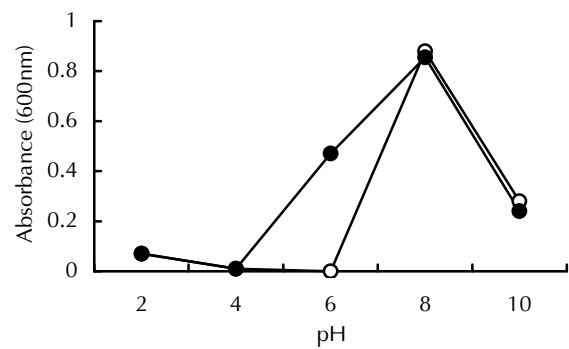


Fig. 3 Growth of strains ST14-321 LA1 (○) and ST14-530 LA1 (●) at various pH for 48 hr.

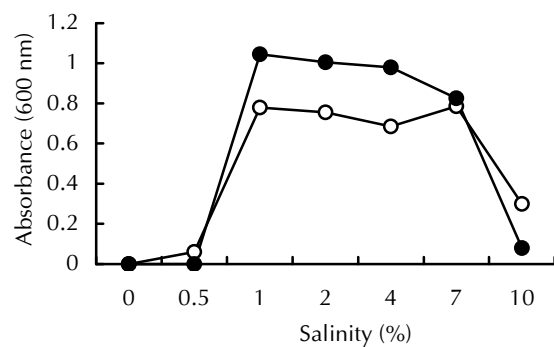


Fig. 4 Growth of strains ST14-321 LA1 (○) and ST14-530 LA1 (●) at various salinity for 48 hr.

討 論

一、海洋來源乳酸菌

海洋乳酸菌之研究相當少，只有少許研究者自魚類的腸道、海洋生物及深層海水等分出乳酸菌，相關資料說明如下：Strøm and Olafsen (1990) 自鱈魚 (*Gadus morhua*) 仔魚的腸道中分出的乳酸菌 - *Lactobacillus*，約佔總菌相的 10%。Ringø and Gatesoupe (1998) 指出，*Carnobacterium*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、與 *Streptococcus* 等乳酸菌是健康魚類腸道之菌叢。

Franzmann *et al.* (1991) 自 Ace Lake (鹽度為 0.6 ~ 4.3%) 中分出 2 株乳酸菌 *Carnobacterium funditum* sp. nov. 及 *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov.，他們認為該 2 株乳酸菌可能係來自海洋，其特性為革蘭氏陽性菌、異型發酵、產生乳酸、並具運動性，可將 glucose 及 ribose 發酵為 lactic acid、formic acid 及 ethanol。

林等 (2003) 自日本富山灣的深層海水 (水深 322 m 及 384 m) 中分離出的乳酸菌包括: *Enterococcus* (*Ec.*) *faecalis*、*Ec. faecium*、*Ec. durans*、*Leuconostoc mesenteroides* 與 *Weissella paramesenteroides* 等 5 種, 另 2 種無法鑑定 (*Lactobacillus* sp. 與 *Leuconostoc* sp.)。又, 以上菌株均可耐受 3.0 % 的鹽度, 對於 6.5 % 的鹽度則視菌株不同其耐受程度有異。而本研究自深層海水 (水深 321 m 及 530 m) 中分出的 2 株乳酸菌 *Pediococcus urinaeequi* 與林等 (2003) 所分出的不同, 且其對於 7.0 % 的鹽度均有耐受性。

Ishikawa *et al.* (2003) 自日本周邊海域中的海綿、藻類、貝類及魚蟹類中分離出新種海洋乳酸菌 – *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., 屬革蘭氏陽性菌, 不形成孢子, 具有周邊毛可運動, 微好鹽, 耐鹼能力高; 最適鹽度為 2.0 ~ 3.75 % (W/V), 而在 17.0 ~ 20.0 % 之鹽度均可生長; 最適 pH 值為 8.0 ~ 9.5, 於 6.0 ~ 10.0 之範圍均可生長; 溫度方面, 於 -1.8 °C 及 40 ~ 45 °C 也可生長, 其最適溫度為 37 ~ 40 °C。而本研究自深層海水中分出的 2 株乳酸菌 *Pediococcus urinaeequi* 與 Ishikawa *et al.* (2003) 所分出的不同, 其最適鹽度、pH 值及溫度分別為 1.0 ~ 7.0 %、8.0 及 15 ~ 35 °C, 較前述海洋乳酸菌 – *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov. 之生長條件為狹窄。又, 該乳酸菌將葡萄糖轉化成乳酸產量為 87 ~ 100 %, 其他產物為 formic acid、acetate、及 ethanol, 且發酵的產物受 pH 值影響很大, 於高 pH (9.0) 值時, 乳酸產量下降 (60 ~ 65 %), 其他產物比例則增加。DNA 的 G + C 比例為 34.6 ~ 36.2 mol %。由 16S rRNA 序列分析、16S rRNA 的 V6 二級結構、及序列分析資料, 推測該乳酸菌為新種 (Ishikawa *et al.*, 2003)。

Toffin *et al.* (2005) 自日本海洋底泥中分出新種的耐壓中溫海洋乳酸菌 – *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., 為革蘭氏陽性菌、桿狀、不形成孢子且不會運動。於 4 ~ 50 °C 均可以生長, 最適溫度為 37 ~ 40 °C, 最適 pH 值為 7.0 ~ 8.0, 最適壓力為 1 MPa, 可耐受 30 MPa 之壓力。細胞中最主要的磷脂為 phosphatidylglycerols (25%)、diphosphatidylglycerol 及 ammonium-containing phosphatidylserines (32%)。DNA 中的 G + C 比例

為 42 mol %。而本研究自深層海水中分出的 2 株乳酸菌 *Pediococcus urinaeequi* 與 Toffin *et al.* (2005) 所分出的不同, 其最適鹽度、pH 值及溫度分別為 1.0 ~ 7.0%、8.0 及 15 ~ 35 °C, 較前述海洋乳酸菌 – *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov. 之生長條件為狹窄。

二、*Pediococcus urinaeequi* 之特性

Pediococcus 屬目前有 8 種, 在發酵植物原料上分佈普遍, 如醬油、味噌、醃漬物、腐敗啤酒和釀造用酵母中 (李, 1989)。*Pediococcus* 屬之乳酸菌均不產氣, 也非動植物之病原菌 (Garvie, 1986)。*P. urinaeequi* 最早的紀錄是來自馬的尿液中, Huerta *et al.* (2004) 在法式乾燥香腸 (French dry sausage) 中分離出該種菌, 而本篇報告係首次自海洋中分離出 *P. urinaeequi*, 目前有關該種菌之分佈情形仍不明。*P. urinaeequi* 之在有氧的狀況下生長良好, 因此培養時不需要特別的條件, 一般培養時也不需要鹽份, 初期培養的 pH 在 6.5-7.0 即可生長, 於 pH 8.5-9.0 生長最佳, 最適溫為 25-30 °C。平常培養時, 培養基不必額外添加碳水化合物; 該菌可以將葡萄糖轉變為 L-(+) 乳酸, 但, 於牛奶中可能生長不好, 因為這類菌對於乳糖的利用性不好, 牛奶中也缺乏其他生長因子; 又, 該菌對於五碳糖之利用差, 也無法利用多醣類 (Garvie, 1986)。

本研究所分離出的 2 株 *P. urinaeequi* 與上述資料不大一致的是, 該 2 株菌於不含鹽份的培養基當中生長相當緩慢, 可能係該 2 株菌是分離自海水中, 其原來的生存環境鹽度較高 (約 3.3 %) 所致。又, 雖然該 2 株菌其生理及生化特性相當接近, 但對於碳水化合物之利用情形卻不太相同, 其中 ST14-321 LA1 對 sorbitol、lactose 及 galactose 均能有效發酵利用, 但 ST14-530 LA1 對前述 3 種碳水化合物則無法利用, 因此, 雖然該 2 株是同一種菌, 但其對於碳水化合物之利用性有差異。

謝 辭

感謝本所海洋漁業組、東部海洋研究中心及

水試一號試驗船所有參與深層海水採集的同仁。本研究進行期間，承蒙海洋大學食品科學系潘教授崇良提供許多寶貴的經驗，另，試驗研究期間，莊桓昌同學、陳柏璇同學及林佳陵小姐的協助，謹此致謝。

參考文獻

- 中島敏光 (2002) 21 世紀の循環型資源 – 海洋深層水の利用. 株式会社綠書房, 日本, 東京, 39 pp.
- 中島敏光, 豐田孝義 (1979) 深層水利用による海域の肥沃化海洋科學技術センター試驗研究報告, 3: 117-125.
- 李福臨 (1989) 食品加工上乳酸菌之利用. 食品工業, 21(12): 32-38.
- 邱雪惠 (2004) 乳酸菌之抗癌機制. 食品工業, 36(3): 27-33.
- 林篤志, 大林晃, 田貴志, 元永智惠, 古米保 (2003) 海洋深層水由來乳酸菌を利用した食品. 日本國特許廳, 特願 2003-198153.
- 馮士箝, 李鳳岐, 李少菁 (2003) 海洋科學導論. 藝軒圖書出版社, 臺北, 92-98, 123-126, 272.
- 陳慶源, 林富美 (2004) 益生菌之保健功效. 食品工業, 36(3): 1-3.
- 廖啟成 (1998) 乳酸菌之分類及應用. 食品工業, 30(2): 1-10.
- Akalin, A. S., S. Gonc and S. Duzel (1997) Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. J. Dairy Sci., 80: 2721-2725.
- Anderson, D. G. and L. L. McKay (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol., 46: 549-552.
- Austin, B. (1988) Microbiological methods. In Marine Microbiology, Great Britain at the University Press, Cambridge, 15-17.
- Benson, H. J. (2002) Microbiological Applications - Laboratory Manual in General Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill Co., Inc., New York, USA, 90, 104-109, 129-159.
- Cross, M. L. (2002) Microbes versus microbes : immune signals generated by probiotics lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 34: 245-253.
- Fooks, L. J. and G. R. Gibson (2002) Probiotics as modulators of the gut flora. Br. J. Nutr., 88: 39s-49s.
- Franzmann, P. D., P. Hopft, N. Weiss and B. J. Tindall (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. Arch. Microbiol., 156: 255-262.
- Garvie, E. I. (1986) Genus *Pediococcus* Clausen 1903, 68 AL. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2 (Holt, J. G. ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1075-1079.
- Hirayama, K. and J. Rafter (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes Infect., 2: 681-686.
- Huerta, R., R. Jordano, L. M. Medina and C. Lopez (2004) Population dynamics of the constitutive biota of French dry sausages in a pilot-scale ripening chamber. J. Food Prot., 67(10): 2306-2309.
- Ishikawa, M., K. Nakajima, M. Yanagi, Y. Yamamoto and K. Yamasato (2003) *Marinilactibacillus phychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 711-720.
- Johnson, T. R. and L. C. Case (2004) Laboratory Experiments in Microbiology (7th ed). Pearson Education, Inc., San Francisco, USA, 35-37, 103-105.
- Leena, S., J. Tiina, P. Tuija and K. Ritta (2003) A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. Am. J. Clin. Nutr., 77: 326-330.
- Navder, K. P., R. S. Huang, E. B. Fryer and H. C. Fryer (1990) Effect of fermentation and storage on the concentration of orotic acid and uric acid in skim milk. J. Food Sci., 55: 585-586.
- Pearson, W. R. and D. I. Lipman (1999) Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448.
- Reddy, G. V., K. M. Shahani, B. A. Friend and R. C. Chandan (1983) Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* III. Production and partial purification of bulgaricin from *Lactobacillus bulgaricus*. Cult. Dairy Prod. J., 18: 15-19.
- Reid, G. (1999) The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl. Env. Microbiol., 65: 3763-3766.
- Ringø, E. and F. J. Gatesoupe (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160: 177-203.
- Sanders, M. E., D. C. Walker, K. M. Walker, K.

- Aoyama and T. R. Klaenhammer (1996) Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.*, 79 (6): 943-955.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36 (1): 1-29.
- Strøm, E. and J. A. Olafsen (1990) The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. *In* *Microbiology in Poecilotherm* (R. Lesel ed.), Elseviers, Amsterdam, 181-185.
- Tamine, A. Y. and H. C. Deeth (1980) Yogurt: Technology and biochemistry. *J. Food Prot.*, 43: 939-997.
- Toffin, L., K. Zink, C. Kato, P. Pignet, A Bidault, N. Bienvenu, J-L, Birrien and D. Prieur (2005) *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from subseafloor sediment of the Nankai Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 345-351.
- Vesa, T. H., P. R. Marteau, F. B. Breat, M. C. Boutron-Ruault and J. C. Rambaud (1997) Raising milk energy content retards gastric emptying of lactose in lactose-intolerant humans with little effect on lactose digestion. *J. Nutr.*, 127: 2316-2320.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Deep Sea Water

Mei-Ying Huang^{1*}, Chin-I Chang¹, Shen-En Chang², Pei-Hsin Hung² and King-Jung Lin¹

¹Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) from deep sea water were conducted in this study. Eight samples (from 285 m to 912 m) of deep sea water were collected from Chinpen (eastern Taiwan) off-shore. The samples were filtered through membranes (0.22 µm) and cultured on MRS agar at 25°C for 72 hours. Among the 35 isolates, 2 isolates were identified as LAB. The 2 isolates, named ST14-321 LA1 and ST14-530 LA1, were sampled from the depth of 321 m and 530 m of the station 14, respectively. They were both Gram positive, cocci in tetrads, catalase negative, and homofermentative. Based on the physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis, the 2 isolates were identified as *Pediococcus urinaeequi*. In addition, the results showed that optimum temperature, pH, and salinity for their growth were similar, which were 25°C, 8.0, and 1-7%, respectively. However, their fermentation profiles were different.

Key words: lactic acid bacteria, deep sea water, isolation, identification

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 24633101; FAX: (02)24628138; E-mail: myhuang@mail.tfrin.gov.tw