

植物乳桿菌 BCRC 10069 發酵燕麥奶對 RAW 264.7 細胞之抗發炎作用

林晏羽 林金源*

The anti-inflammatory effect of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 fermented oat milk on RAW 264.7 cells

Yen-Yu Lin, Jin-Yuarn Lin*

National Chung Hsing University Department of Food Science and Biotechnology

(Received: August 13, 2024. Accepted: September 23, 2024.)

Abstract To date, oat milk has been a popular plant-based drink. However, lactic acid bacteria (LAB) fermentation can enhance its nutritious and health values. To improve the nutritional and health values of oat milk, this study fermented oat milk using *Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 and evaluated its anti-inflammatory health benefits. Two temperatures (30 and 37°C) and three sugar concentrations (0, 2.5, and 5%) were adopted to ferment oat milk using *Lpb. plantarum* for 72 hours, respectively. Unfermented oat milk was selected as a control for comparison. During the fermentation period, changes in pH values, LAB, total bacteria, and biogenic amines were monitored to achieve the optimal formula. They were using the optimized formula, the *Lpb. plantarum*-fermented oat milk was developed. Water and ethanol extracts of the developed product were subjected to determining the non-cytotoxic concentrations for RAW 264.7 macrophages using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The anti-inflammatory effects of the extracts on RAW 264.7 macrophages in the absence or presence of lipopolysaccharides (LPS) were assessed. Changes in pro- (TNF- α)/anti-inflammatory (IL-10) cytokines and an inflammatory mediator nitric oxide (NO) secreted by treated macrophages were determined. The results showed that oat milk fermented using 1×10^6 CFU/mL *Lpb. plantarum* with 2.5% sugar content at 37°C for 36 hours was evidenced the optimal fermentation condition, bringing in a pH value lower than 4.6, the highest number of LAB, but a low number of total bacteria. The biogenic amine content was 0.43 mg NH₂/g sample. Moreover, the ethanol extract had a better anti-inflammatory effect than the water extract. Fermented oat milk had better inhibitory effects on TNF- α and nitric oxide secretions by RAW 264.7 macrophages than the unfermented sample, indicating that the developed fermented oat milk has anti-inflammatory potential.

Key words: Anti-inflammation, Fermentation, Lactic acid bacteria, *Lactiplantibacillus plantarum*, Oat milk

前 言

* Corresponding author: Jin-Yuarn Lin

Address: 250, Kuo-Kuang Rd., South Dist., Taichung City 402, Taiwan, R.O.C.

Tel: 04-2284-0385 #2010

E-mail: jinlin@dragon.nchu.edu.tw

近年全球興起低碳素食風潮，隨著對健康飲食和身體保健的意識逐漸提高，尋找取代動物性製品之植物性食品已逐漸成為趨勢。燕麥奶是目前盛行

的一種植物性飲品，但其營養素與食用價值仍有許多可優化空間，如利用發酵技術增加其營養價值與功能性。

燕麥和其他穀物相比，可做為一種益生質（prebiotics）⁽¹⁾，具有獨特的營養成分，除了含有高生物價之蛋白質、不飽和脂肪酸、水溶性（ β -glucan）和非水溶性膳食纖維，還有許多微量營養素，如：鐵、鉀、銅和鎂、硫胺素、葉酸、鋅、磷⁽²⁾。已有研究證實發酵（fermentation）豐富了燕麥的蛋白質、必需胺基酸、必需脂肪酸和維生素。不僅如此，發酵過的穀物質地、味道與香氣不但有顯著提升，還可延長產品貨架期，更可改善穀物纖維粗糙而不易消化易腹脹的缺點、提高消化率與降低抗營養素含量，例如乳酸菌（lactic acid bacteria, LAB）發酵提供降解植酸（phytic acid）酵素適當的 pH 值環境，使本來與植酸結合的鐵、鋅、鎂、鈣與蛋白質游離出來，因此讓可溶性鐵、鋅、鈣的量增加數倍⁽²⁾，提高其營養價值。

植物乳桿菌（*Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum*）為自然界常見的乳酸菌種，在蔬菜、植物、肉類、魚類和乳製品中皆可生存，亦可見於人體口腔、腸道等處⁽³⁾。近年來，植物乳桿菌因其益生菌（probiotics）特性而被廣泛應用於食品工業中⁽⁴⁾，利用乳酸菌發酵的主要目的，在於透過微生物發酵提供食品酸度來源以抑制雜菌生長，並可將食物小分子化，增進人體腸胃道吸收率、提高維生素及礦物質的生物活性⁽⁵⁾，還可產生胞外多醣、有機酸、酚類等物質，賦予食品更豐富的味道與特殊功能性（functional property），如免疫調節與抗發炎作用。

發炎反應（inflammatory response）為免疫系統之正常防禦反應，主要由巨噬細胞（macrophages）參與，巨噬細胞屬於非專一性白血球，廣泛存在於腸胃道、腹腔和其他組織中，巨噬細胞是由單核球（monocytes）進入組織後分化成熟形成，其為一種大型的吞噬細胞，透過促進適當發炎反應消除病原體或受損組織，並維持體內平衡⁽⁶⁾，發炎反應會產生大量可溶性發炎媒介物質，包括促發炎細胞激素（如 TNF- α 及 IL-1）與發炎媒介分子（如：一氧化氮及前列腺素）等，這些細胞分泌物有助於發炎反應的發生⁽⁷⁾，此時微血管通透性增加，使抗體（antibody）、補體（complement）、激肽原（kininogens）等可溶性免疫物質到達感染部位，誘導更

多免疫細胞，如單核球（monocytes）、嗜中性白血球（neutrophils）、巨噬細胞等遷移至發炎部位對抗外來物，而細胞激素依照功能性的不同可分為促發炎細胞激素（pro-inflammatory cytokines），如腫瘤壞死因子 α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、介白素-1（interleukin (IL) -1）、IL-6 與抗發炎細胞激素（anti-inflammatory cytokines），如 IL-10^(7,8)。促發炎細胞激素主要由活化後的巨噬細胞釋放，可誘導發炎反應發生，如發燒、疼痛和組織破壞等，嚴重發炎則可能導致休克甚至死亡⁽⁹⁾。TNF- α 亦稱作惡病質素（cachectin），具有極強之抗病毒能力，可抑制癌細胞增生與腫瘤發生。體內之 TNF- α 濃度不足會導致免疫力下降，易受病毒感染，然而過量產生則與病理性疼痛⁽¹⁰⁾、結腸炎（colitis）和關節炎（arthritis）有關⁽¹¹⁾。抗發炎細胞激素 IL-10 具有抗發炎及抑制免疫反應的作用，避免免疫系統太過活躍與防止免疫細胞攻擊自身細胞，保護人體不受損害。

燕麥因其食品機能性與廣泛的應用範圍，在食品工業備受青睞，但目前市面上尚未出現發酵燕麥奶產品，若是可以以燕麥奶為基底，以發酵技術開發出不同風味且具有保健功能的飲品，將具有一定的商業潛力，加以發酵燕麥奶之免疫調節功能研究尚少，本研究欲透過植物乳桿菌 *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 發酵燕麥奶作為改良其營養價值與功能性之手段，再針對發酵燕麥奶對發炎之影響進行評估。

材料與方法

一、材料

（一）燕麥：佳格食品股份有限公司原片原味大燕麥片，購自全聯福利公司（PX Mart）。

（二）砂糖：台灣糖業股份有限公司精緻細砂糖，購自全聯福利公司（PX Mart）。

（三）發酵菌株：*Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 凍管，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（Bioresource Collection and Research Center, BCRC），保存在本實驗室液態氮桶中，使用時依建議標準程序活化。

（四）MRS 液體培養基（Lactobacilli MRS broth, Becton Dickinson and Company, DIF288130，

Franklin Lakes, New Jersey, USA)：取 55 g MRS broth 粉末，加入 1 L 去離子水中，均勻混合後加熱至溶解，在殺菌釜中以 121 °C 加熱 15 分鐘滅菌，冷卻後備用。

(五) MRS agar：取 55 g MRS broth 粉末及 15 g Agar (Becton Dickinson and Company, DIF214010, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 粉末，加入 1 L 去離子水中，混合均勻後，以 121 °C 滅菌 15 分鐘，即為 MRS agar，待冷卻約至 50 °C，適量倒入 9 公分培養皿中備用。

(六) 0.1 % 蛋白胨 (Bacteriological peptone, Thermo, Oxide, LP0037, Basingstoke, Hants, UK) 溶液：取 0.1 g 蛋白胨粉末溶於去離子水中，混合均勻，加水定量至 100 mL，在殺菌釜中以 121 °C 加熱 15 分鐘滅菌，冷卻後備用，即 0.1% 蛋白胨稀釋液。

(七) 實驗細胞：RAW 264.7 巨噬細胞株凍管，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (BCRC)，保存在本實驗室液態氮桶中，使用時依建議標準程序活化。

二、方法

(一) 菌種活化及保存

將 *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 凍管 (1 mL) 在 37 °C 恆溫靜態水浴槽中迅速解凍，解凍後之菌液接入 10 mL 已滅菌乳酸菌培養基 (MRS broth) 中⁽¹²⁾，置於 37 °C 培養箱中厭氣培養 48 小時進行第一次活化，離心 (4 °C, 600 × g, 15 min) 去上清液後，加入 10 mL MRS broth，再置於 37 °C 培養箱中厭氣培養 48 小時，進行第二次菌株活化，二次活化菌株即為完全活化狀態，菌株即可進行後續實驗。菌種保存，則取對數生長期之菌株，與 MRS broth 與甘油配製成之含有 30% 甘油培養液，在凍管中加入等量菌液及無菌之 30% 甘油混合，冷凍保存於 -80 °C 中供爾後實驗使用。

(二) 菌株生長曲線測量

為方便後續實驗調整菌液濃度及測量發酵各時段菌數變化，本研究先繪製吸光值對應菌數之標準曲線。取上述二次活化的菌液，以 MRS broth 進行連續稀釋 (serial dilution)，使菌液稀釋至 OD_{600nm} 之吸光值在 0.5-2.0 之間。取稀釋後的菌液，以 0.1%

蛋白胨溶液進行系列稀釋並測定吸光值及倒盤 (MRS agar) 厭氣培養 72 ± 3 小時，進行菌落計數 (菌落數落於 25-250 CFU/mL 方能採用計算菌落數)。將得到的菌落數與對應的吸光值繪製成標準曲線，供後續實驗進行菌數與吸光值的換算。

為使用生長活躍且健康的菌株發酵燕麥奶，將測定各個培養時間點之吸光值繪製成菌株生長曲線，由此得知 *Lpb. plantarum* 之對數生長期的時間。將二次活化之 *Lpb. plantarum* 菌液的濃度，依標準曲線調整至 1 × 10⁷ CFU/mL 後，取 1 mL 菌液接入 9 mL 已滅菌之 MRS broth 中 (此時菌液濃度為 1 × 10⁶ CFU/mL)，靜置於 37 °C 培養箱中厭氣培養，分別培養 0、3、6、9、12、18、24、36 及 48 小時，取出測定 OD_{600nm} 吸光值，依培養時間及吸光值變化，或培養時間及菌液濃度變化，繪製菌株生長曲線。

(三) 發酵燕麥奶製備

將燕麥片高速研磨後以 40 目數 (mesh) 篩網過篩，並收集粉末備用。稱取燕麥粉 5 公克加入發酵瓶中，與 50 mL 蒸餾水混合成燕麥液後，分別加入 20% (w/v) 糖水 0 mL、12.5 mL 及 25 mL，攪拌均勻，以蒸餾水調整體積至 100 mL，使最終燕麥粉濃度為 5% (w/v)，糖濃度分別為無加糖、2.5% 及 5% 砂糖等 3 個不同配方的燕麥奶，100 °C 水浴加熱 20 分鐘，使澱粉預糊化；接著以 121 °C 加熱 30 分鐘滅菌，冷卻至室溫；接種 1% (v/v) 已培養 12 小時、濃度為 1 × 10⁶ CFU/mL *Lpb. plantarum* 菌液，混合後樣品分別置於 30 °C 與 37 °C 發酵。

(四) 以單一菌株發酵燕麥奶之最適製程探討

1. 最適發酵溫度與最適糖度篩選

以 pH 值作為評估發酵燕麥奶的正向指標。發酵 0、24、48、72 小時之燕麥奶，分別取 3 mL 測定 pH 值，觀察不同糖度、不同發酵溫度以及不同發酵天數的發酵燕麥奶 pH 值變化。

2. 最適發酵時間探討

以乳酸菌數與總生菌數作為評估發酵燕麥奶的正向指標，以總生物胺 (biogenic amine, BA) 含量作為發酵負向指標。從發酵樣品中分別各取 1 mL 發酵液，進行乳酸菌數與總生菌數檢驗，乳酸菌數與總生菌數之檢驗方法分別參考自衛生福利部衛授食字第 1021950329 號公告食品微生物檢驗之方法—乳

酸菌之檢驗、衛生福利部衛授食字第 1121900620 號公告食品微生物檢驗之方法—生菌數之檢驗，稍加調整後進行實驗。檢體經系列稀釋後，分別利用 MRS agar、平板計數培養基 (Plate count agar, PCA) 作為營養源，並以平板計數培養基培養。

總生物胺含量測定⁽¹³⁾則利用已標定的高氯酸-冰乙酸標準溶液，滴定溶於冰乙酸-乙醇溶劑之發酵燕麥奶凍乾粉末，待溶液顏色由紫轉成藍表示達到滴定終點。紀錄每個樣品秤取的重量與其對應的消耗滴定量，以 NH₃ 代表樣品總生物胺之含量，帶入以下公式換算總生物胺含量。

$$BA \text{ (mg NH}_3\text{/g sample)} = \frac{C \times V \times 17.03}{m}$$

C：高氯酸-冰乙酸標準溶液濃度 (mol/L)

V：樣品消耗高氯酸-冰乙酸標準溶液體積 (mL)

m：樣品重量 (g)

17.03：每莫耳氮分子量 (每中和 1 g 樣品所需消耗的酸，將其換算成 NH₃ 之克數)

(五) 未發酵及發酵燕麥奶樣品之水萃取物及乙醇萃取物製備

1. 水萃取物之製備

秤取約 3 g 未發酵或發酵燕麥奶凍乾粉末 (W1)，加入 20 倍體積去離子水，在室溫下攪拌 6 小時，在室溫下 600 × g 離心 15 分鐘，分離上清液及沉澱物後，取上清液抽氣過濾，將所得濾液進行冷凍乾燥稱重 (W2)，即為水萃取物，水萃取率 (%) = (W2/W1) × 100。未發酵燕麥奶水萃取物 (water extracts of non-fermented oat milk, WNF) 及發酵燕麥奶水萃取物 (water extracts of fermented oat milk, WF)，使用前分別配製成適當濃度之貯存溶液 (stock solution)，以 0.22 μm 無菌過濾膜過濾後，在 -40°C 保存備用。

2. 乙醇萃取物之製備

秤取約 3 g 未發酵或發酵燕麥奶凍乾粉末 (W3)，加入 8 倍體積之 95% 試藥級乙醇，在室溫下攪拌 4 小時，在室溫下 600 × g 離心 10 分鐘，分離上清液及沉澱物後，取上清液抽氣過濾，將所得濾液進行減壓濃縮後秤重 (W4)，得到之油狀物即為乙醇萃取物，乙醇萃取率 (%) = (W4/W3) × 100。未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ethanol ex-

tracts of non-fermented oat milk, ENF) 及發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ethanol extracts of fermented oat milk, EF)，使用前分別配製成適當濃度之貯存溶液 (stock solution)，以 0.22 μm 無菌過濾膜過濾後，在 -40°C 保存備用。

(六) RAW 264.7 巨噬細胞活化及培養

RAW 264.7 巨噬細胞購自食品工業發展研究所，依其所提供的冷凍細胞活化步驟進行解凍及培養，以細胞培養基 (Culture medium, CM) 培養在 37 °C、5% CO₂ 培養箱中培養。解凍隔日，更換細胞培養基，避免細胞被凍存液中含有的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 破壞。本試驗使用的細胞代數均維持於 3-10 代。待盤中的細胞生長至 8-9 分滿時進行分盤。將細胞液濃度調整至 2 × 10⁵ cells/mL，接種於新的培養皿中，即完成一次繼代。每次實驗結束後，須將細胞凍存以供後續實驗使用。將細胞液與細胞凍存液 (最終為含有 20% 胎牛血清與 7% 二甲基亞砜之細胞培養基) 均勻混合，使最終凍管內細胞濃度為 2 × 10⁶ cells/mL，保存於液態氮桶中。

(七) 未發酵及發酵燕麥奶水萃取物 (WNF 及 WF) 及乙醇萃取物 (ENF 及 EF) 對 RAW 264.7 巨噬細胞之影響

1. 細胞毒性試驗(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay)

將 RAW 264.7 巨噬細胞之細胞密度調整至 2 × 10⁵ cells/mL 後，接種 100 μL 細胞液於 96 孔盤中等待細胞貼附。待細胞貼附後，吸除上清液，再分別加入 100 μL 不同組成分的培養液，細胞培養基 (CM)、0.1 μg/mL 脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)、1% 乙醇、經細胞培養基稀釋之不同濃度未發酵及發酵 36 小時燕麥奶水萃取物 (WNF 及 WF) 及乙醇萃取物 (ENF 及 EF)。培養 24 小時後去除上清液，加入 100 μL 細胞培養基 (CM) 與 10 μL MTT (5 mg/mL)，繼續培養 4 小時，室溫下 400 × g 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 100 μL 1 × 磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 清洗一次，最後加入 100 μL 二甲基亞砜 (DMSO) 作用 30 分鐘，使細胞破裂釋放 formazan (甲臈)，溶液呈藍紫色，以酵素免疫分析儀測定波長 550 nm 之吸光

值，並使用下列公式換算細胞存活率。藉此篩選出水萃取物及乙醇萃取物對 RAW 264.7 巨噬細胞之非細胞毒性最適合作用濃度，評估後續測定細胞激素分泌時之樣品添加濃度。

$$\text{Survival rate (\% of control)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

A = absorbance at 550 nm

A_{sample} = 細胞在不同濃度樣品刺激下，於波長 550 nm 所測得之吸光值

A_{blank} = 僅含 DMEM medium 不含細胞，於波長 550 nm 所測得之吸光值

A_{control} = 僅含細胞液，無添加樣品，於波長 550 nm 所測得之吸光值

2. 未發酵及發酵燕麥奶水萃取物 (WNF 及 WF) 及乙醇萃取物 (ENF 及 EF) 對 RAW 264.7 巨噬細胞細胞激素分泌之影響

(1) 自發模式 (直接培養模式)：單獨添加樣品對 RAW 264.7 巨噬細胞分泌細胞激素之影響

調整 RAW 264.7 巨噬細胞之細胞密度至 2×10^5 cells/mL，吸取 1 mL 接種於 24 孔盤中，並培養 3 小時等待細胞貼附後，吸除細胞上清液。接著分別加入 1 mL 不同組成分之培養液，包括細胞培養基 (CM)、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)、經細胞培養基稀釋之不同濃度燕麥奶萃取物及添加菌株發酵 36 小時燕麥奶萃取物，培養 24 小時後取出離心並收集上清液，保存於 -40°C 備用。

(2) 發炎模式 (LPS 共同培養模式)：模擬在體外發炎的模式下，LPS 與樣品同時存在對 RAW 264.7 巨噬細胞分泌細胞激素之影響

調整 RAW 264.7 巨噬細胞之細胞密度至 2×10^5 cells/mL，吸取 1 mL 接種於 24 孔盤中，並培養 3 小時等待細胞貼附後，吸除細胞上清液。接著分別加入 0.5 mL 脂多醣 (作用目標之 2 倍濃度 0.2 $\mu\text{g/mL}$) 與 0.5 mL 不同條件之培養液：細胞培養基 (CM)、地塞松 (Dexamethasone, DEX；濃度為 200 nM)、經細胞培養基稀釋之 2 倍目標濃度之燕麥奶萃取物及添加菌株發酵 36 小時燕麥奶萃取物，培養 24 小時後，取出離心並收集上清液，保存於 -40°C 備用。

(3) 細胞激素含量測定

使用市售試劑組測定 RAW 264.7 細胞經由自發

模式及發炎培養後所收集的上清液，觀察促發炎 (TNF- α , R&D, Minneapolis, Minnesota, USA) 及抗發炎 (IL-10, Biolegend, San Diego, California, USA) 細胞激素之分泌變化。

3. 一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 測定

收集的細胞培養上清液，以格利斯試劑 (Griess reagent) 測定一氧化氮含量。以不同濃度亞硝酸鈉 (NaNO_2) 做為標準品，標準品與待測樣品 50 μL 分別加入 96 孔盤中，接著加入格利斯試劑 (Griess reagent) 100 μL 混合，靜置 5 分鐘後，以酵素免疫分析儀測定波長 540 nm 吸光值並記錄數值，再利用以標準品繪製之標準曲線換算樣品中一氧化氮的含量。

(八) 統計分析

實驗數據以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD)，結果統計以單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行分析，再使用多重變域試驗 (Duncan's new multiple range test) 檢定之，以 $P < 0.05$ 代表組間具有顯著差異。

結 果

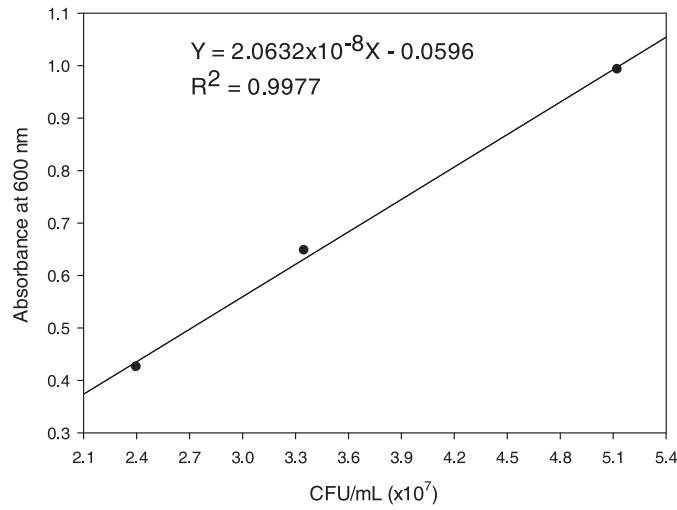
一、*Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 生長曲線

本研究先建立 *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 之生長曲線，以供後續實驗調整菌液濃度使用，圖一為 *Lpb. plantarum* 菌液不同濃度測得的吸光值 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) 與對應菌數建立之標準曲線與其生長曲線，由圖一 (B) 可知 *Lpb. plantarum* 之對數生長期約為 9-12 小時，因此確立接種培養 12 小時的菌液添加至燕麥奶中進行發酵，依本實驗結果收集已培養 12 小時之 *Lpb. plantarum* 菌液備用，並參考本研究室先前研究結果，調整菌液濃度為 1×10^6 CFU/mL *Lpb. plantarum*，接種 1% (v/v) *Lpb. plantarum* 菌液至燕麥奶中進行發酵。

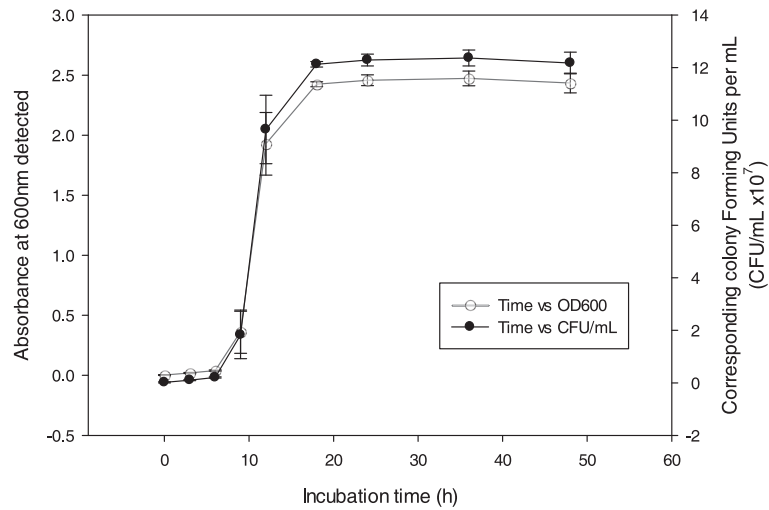
二、*Lpb. plantarum* 菌株發酵燕麥奶最適製程

為確立 *Lpb. plantarum* 菌株發酵燕麥奶之最適製程，本實驗分 2 階段設計不同溫度、糖度及發酵時間，以建立最佳製程。

(A)



(B)



圖一 *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069 菌數對應吸光值之標準曲線圖 (A) 及生長曲線圖 (B)

Figure 1. The standard curve depicted by colony numbers and corresponding optical density (A) and growth curve (B) of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069. The values are the mean ± SD (n = 6). The original bacteria density was 1 × 10⁶ CFU/mL.

(一) 最適發酵溫度與糖度探討

由表一為在 30 °C 及 37 °C 發酵添加不同糖度之燕麥奶不同時間其 pH 值變化，結果發現 37 °C 發酵燕麥奶，其 pH 值下降幅度皆大於 30 °C，且以 37 °C 發酵的含糖燕麥奶在發酵 24 小時後，相同糖濃度不同溫度組別間具有顯著差異，pH 值也已明顯低於 4.6，達高酸性食物之標準，應可抑制大多數有害微生物之生長，因此依據實驗結果挑選 37 °C 作為

後續實驗之發酵溫度。在相同發酵時間下，進一步比較 2.5% 及 5% 糖度發酵燕麥奶，結果發現，不論是 30 °C 或 37 °C 發酵，pH 值皆無顯著差異，為了健康概念，因此挑選糖度較低的 2.5% 糖度燕麥奶作為後續實驗製備之糖度。經此實驗觀察到，發酵 48 小時燕麥奶之 pH 值均已達酸性食品之標準，考慮到經濟成本等因素，後續實驗將發酵時間由 72 小時縮減至 48 小時內，並從原先之 24 小時取樣一次改為 12 小時，以測定觀察其他指標之變化。

表一 以 30°C 及 37°C 發酵不同糖度燕麥奶不同時間之 pH 值變化

Table 1. Changes in pH values in fermented oat milk with different sugar concentrations at 30°C and 37°C for various incubation times.

Fermentation conditions	pH values			
	0 h	24 h	48 h	72 h
30A	6.63 ± 0.01 ^{A, a}	4.56 ± 0.07 ^{B, a}	4.51 ± 0.07 ^{B, a}	4.44 ± 0.13 ^{B, a}
30B	6.60 ± 0.01 ^{A, b}	4.39 ± 0.18 ^{B, b}	3.77 ± 0.15 ^{C, b}	3.65 ± 0.10 ^{C, b}
30C	6.59 ± 0.01 ^{A, bc}	4.09 ± 0.02 ^{B, c}	3.82 ± 0.31 ^{BC, b}	3.58 ± 0.03 ^{C, b}
37A	6.63 ± 0.01 ^{A, a}	4.52 ± 0.02 ^{B, ab}	4.53 ± 0.04 ^{B, a}	4.38 ± 0.34 ^{B, a}
37B	6.59 ± 0.01 ^{A, bc}	3.98 ± 0.02 ^{B, cd}	3.68 ± 0.07 ^{C, b}	3.44 ± 0.03 ^{D, b}
37C	6.57 ± 0.01 ^{A, c}	3.93 ± 0.06 ^{B, d}	3.60 ± 0.08 ^{C, b}	3.43 ± 0.02 ^{D, b}

Values are means ± SD (n = 3 replicates). Values within the same row not sharing a common superscript capital letter (A, B, C, D) are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Values within the same column not sharing a common superscript small letter (a, b, c, d) are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. 30A, sugar-free oat milk fermented at 30°C; 30B, oat milk with 2.5% sugar fermented at 30°C; 30C, oat milk with 5% sugar fermented at 30°C; 37A, sugar-free oat milk fermented at 37°C; 37B, oat milk with 2.5% sugar fermented at 37°C; 37C, oat milk with 5% sugar fermented at 37°C.

(二) 最適發酵時間探討

經由測定 pH 值變化之實驗評估，本研究已選擇以 37°C 發酵 2.5% 糖度燕麥奶作為接續實驗樣品之製備配方，而乳酸菌數與總生菌數為評估發酵食品發酵時間的重要指標，但因乳酸菌數與總生菌數測定方法不同，會導致菌數計算之差異，在相同方法下，比較菌數變化較為可信，為進一步探討最佳發酵時間，本實驗期望以相對較高乳酸菌與相對較低總生菌數為標準，評估最適配方發酵燕麥奶之發酵時間。因為本實驗之燕麥奶已經殺菌處理，因此推測發酵瓶中大部分細菌均為乳酸菌 *Lpb. plantarum*；表二顯示，在發酵 0-24 小時菌數皆迅速增加，推測此階段細菌生長處於對數生長期，發酵 36 小時燕麥奶之乳酸菌數有最高值，而後下降；總

生菌數則在發酵 36 小時後，較發酵 24 小時顯著下降，為相對低值，綜合乳酸菌數及總生菌數變化，最終挑選 36 小時做為最適發酵時間。

生物胺常存在於發酵食品中，主要是由微生物的胺基酸脫羧酶與食品中的胺基酸作用，使胺基酸脫去羧基而產生，若攝入過量的生物胺可能對人體造成不良影響，因此本研究使用生物胺作為評估食品安全與否的指標之一。由表三結果發現，發酵 0 小時燕麥奶之生物胺含量顯著高於控制組 (control)，推測添加菌液中即含有少量生物胺，進而導致其他發酵時間之燕麥奶與控制組相比，其生物胺含量皆高於控制組，但未達顯著差異，發酵不同時間之組別間，亦無顯著差異，且隨著 *Lpb. plantarum* 開始發酵，生物胺含量反而下降，新鮮發酵燕麥奶中的生物胺含量極低，不會造成安全疑慮，證實發

表二 以 *Lactiplantibacillus plantarum* 發酵 2.5% 糖度燕麥奶不同時間其乳酸菌數與總生菌數變化**Table 2.** Changes in total lactic acid bacteria counts and total plate counts of oat milk with 2.5% sugar fermented using *Lactiplantibacillus plantarum* for various incubation times.

Bacteria number (CFU/mL × 10 ⁶)	Incubation time				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
Lactic acid bacteria counts	2.50 ± 0.36 ^D	221 ± 8 ^C	256 ± 9 ^B	407 ± 71 ^A	280 ± 20 ^B
Total plate counts	1.00 ± 0.00 ^D	387 ± 110 ^{AB}	816 ± 439 ^A	201 ± 9 ^C	260 ± 36 ^B

Values are means ± SD (n = 3 replicates). Values within the same row not sharing a common superscript capital letter (A, B, C, D) are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test.

表三 未發酵及發酵不同時間燕麥奶之總生物胺含量

Table 3. Total biogenic amines content of non-fermented and oat milk fermented at different times.

Incubation time	Total biogenic amines	
	Dry matter (mg NH ₃ equivalent/g dry matter sample)	Fresh matter (mg NH ₃ equivalent/g dry matter sample)
Control	3.75 ± 0.40 ^B	0.27 ± 0.03 ^B
0 h	7.37 ± 3.63 ^A	0.54 ± 0.27 ^A
12 h	5.76 ± 0.59 ^{AB}	0.42 ± 0.04 ^{AB}
24 h	5.52 ± 0.80 ^{AB}	0.41 ± 0.06 ^{AB}
36 h	5.98 ± 0.32 ^{AB}	0.43 ± 0.02 ^{AB}
48 h	5.40 ± 0.66 ^{AB}	0.40 ± 0.05 ^{AB}

Values are means ± SD (n = 3 replicates). Values within the same column not sharing a common superscript capital letter (A, B) are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. Control, non-fermented oat milk with 2.5% sugar; 0 h, fermented oat milk with 2.5% sugar for 0 h; 12 h, fermented oat milk with 2.5% sugar for 12 h; 24 h, fermented oat milk with 2.5% sugar for 24 h; 36 h, fermented oat milk with 2.5% sugar for 36 h; 48 h, fermented oat milk with 2.5% sugar for 48 h.

酵 36 小時內 *Lpb. plantarum* 發酵燕麥奶產品之安全性。

三、未發酵及發酵燕麥奶水萃取物 (WNF 及 WF) 及乙醇萃取物 (ENF 及 EF) 對 RAW 264.7 巨噬細胞之抗發炎作用評估

為了解未發酵及發酵燕麥奶水萃取物 (WNF 及 WF) 和乙醇萃取物 (ENF 及 EF)，對 RAW 264.7 巨噬細胞之抗發炎作用，進行萃取實驗，結果發現未發酵燕麥奶之水萃取物 (WNF) 和乙醇萃取物 (ENF) 之萃取產率分別為 37.30% 及 4.74%；發酵燕麥奶之水萃取物 (WF) 和乙醇萃取物 (EF) 之萃取產率分別為 38.10% 及 7.03%。兩種產品之水萃取率皆明顯高於乙醇萃取率，發酵燕麥奶水萃取率及乙醇萃取率均高於未發酵燕麥奶。萃取所獲得之萃取物再進一步評估其對 RAW 264.7 巨噬細胞之作用。

(一) 細胞毒性試驗 (MTT 法)

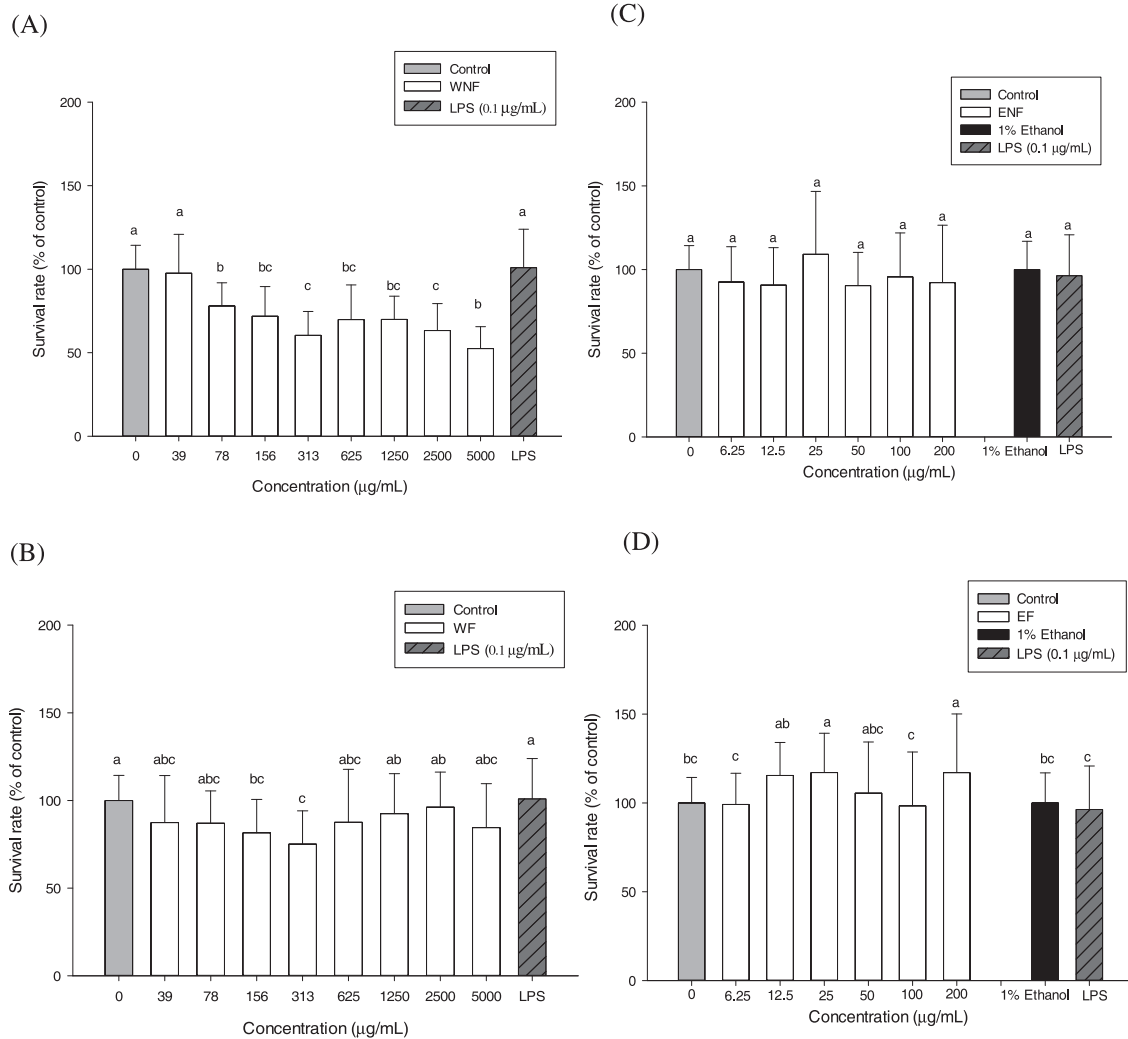
在測定巨噬細胞細胞激素分泌前，需了解不同濃度的樣品對細胞是否有毒性，以求得測試樣品之不具細胞毒性的合適作用濃度，避免因細胞毒性影響細胞激素的分泌。由圖二 (A) 可以發現，添加未發酵燕麥奶水萃取物 (WNF) 濃度在 78 - 156 µg/mL 時，細胞存活率均高於 70%，選擇此濃度範圍進行後續實驗；由圖二 (B) 顯示，添加發酵燕麥

奶水萃取物 (WF) 濃度 313 µg/mL 的樣品對細胞生長抑制最顯著，但該濃度細胞存活率仍達到 77%，高於 70% 顯示該濃度仍為安全劑量範圍內。綜合水萃取物之結果評估，本實驗挑選 39、78 及 156 µg/mL 作為後續測定細胞激素時水萃取物與細胞共同培養所使用濃度。由圖二 (C) 可得知，添加未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ENF) 之所有組別，與控制組相比皆無顯著差異，顯示所有濃度對細胞存活率皆無不良影響；由圖二 (D) 可知，當發酵燕麥奶乙醇萃取物 (EF) 添加濃度為 6.25-200 µg/mL 對細胞皆沒有不良影響，綜合乙醇萃取物結果，挑選 12.5、50 及 200 µg/mL 等 3 個濃度，作為後續測定細胞激素與細胞共同培養之樣品使用濃度。

(二) 細胞激素含量測定

1. 自發模式

脂多醣 (LPS) 為一種內毒素，可以引發生物體產生免疫反應並促進發炎細胞分泌細胞激素，因此在本實驗模式下將單獨添加 LPS 作為正控制組。結果顯示，不論未發酵 (WNF) 及發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 處理的組別，TNF-α 及 IL-10 的含量與控制組比較，皆無顯著差異，說明未發酵 (WNF) 與發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 對巨噬細胞無明顯刺激性 (表四)。然而，未發酵 (ENF) 及發酵乙醇萃取物 (EF) 就細胞激素分泌趨勢而言，皆具有劑量反應關係 (dose-dependent effect)，未發酵組為



圖二 未發酵燕麥奶及 *Lactiplantibacillus plantarum* 發酵 36 小時燕麥奶水萃取物 (A、B) 及乙醇萃取物 (C、D) 對 RAW 264.7 巨噬細胞存活率之影響

Figure 2. Effects of water extracts (A, B) and ethanol extracts (C, D) from non-fermented oat milk and 36-h *Lactiplantibacillus plantarum* fermented oat milk on the survival rate of RAW 264.7 macrophages. Values are mean \pm SD (n = 6 biological determinations). Bars in the same plot not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. The original cell density was 2×10^6 cells/mL. LPS, lipopolysaccharide alone at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ was selected as a positive control in each experiment. WNF, water extracts of non-fermented oat milk; WF, water extracts of fermented oat milk; ENF, ethanol extracts of non-fermented oat milk; EF, ethanol extracts of fermented oat milk.

濃度越高，TNF- α 分泌量越多；但是發酵組介入的濃度越高，TNF- α 的分泌量越少，發酵燕麥奶乙醇萃取物 (EF) 具有抗發炎潛力；而不論介入何種濃度的發酵 (EF) 或未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ENF)，IL-10 的含量與控制組皆無顯著差異，說明介入的樣品對 IL-10 的分泌無顯著影響。

2. 發炎模式

地塞松 (dexamethasone, DEX) 為一種人工合

成的皮質類固醇，可以抑制發炎反應，因此在本實驗模式下，添加地塞松之組別作為處理對照組 (treatment control)。結果顯示，使用高濃度的未發酵燕麥奶水萃取物 (WNF) 可以有效減少 TNF- α 的分泌 (表五)，但是低劑量的發酵燕麥奶則具有較好的抗發炎效果；不論是未發酵 (WNF) 或是發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 組別，IL-10 的分泌量皆顯著低於控制組，IL-10 是抗發炎細胞激素，通常在

表四 未發酵燕麥奶及 *Lactiplantibacillus plantarum* 發酵 36 小時燕麥奶水和乙醇萃取物在自發模式下對 RAW 264.7 巨噬細胞促發炎及抗發炎細胞激素分泌之影響

Table 4. Effects of treatments with water and ethanol extracts from non-fermented oat milk and 36-h *Lactiplantibacillus plantarum* fermented oat milk on spontaneous pro- and anti-inflammatory cytokines secretions by RAW 264.7 macrophages.

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	pro-inflammatory cytokine (pg/mL)		anti-inflammatory cytokine (pg/mL)	
	TNF- α		IL-10	
WNF	Control	570 \pm 97 ^{BC}	18.2 \pm 0.5 ^B	
	39	510 \pm 3.9 ^{BC}	18.7 \pm 3.1 ^B	
	78	212 \pm 154 ^{BC}	17.5 \pm 2.6 ^B	
	156	184 \pm 61 ^C	23.1 \pm 3.7 ^{AB}	
WF	Control	570 \pm 97 ^{BC}	18.2 \pm 0.5 ^B	
	39	234 \pm 120 ^{BC}	20.4 \pm 1.6 ^B	
	78	761 \pm 449 ^B	20.2 \pm 2.5 ^B	
	156	405 \pm 206 ^{BC}	25.2 \pm 5.0 ^{AB}	
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)		2594 \pm 593 ^A	31.4 \pm 11.2 ^A	
ENF	Control	567 \pm 97 ^D	18.2 \pm 0.5 ^B	
	12.5	760 \pm 132 ^{CD}	20.1 \pm 4.3 ^{AB}	
	50	1136 \pm 280 ^{BC}	19.2 \pm 2.1 ^B	
	200	1421 \pm 260 ^B	21.6 \pm 3.8 ^{AB}	
EF	Control	567 \pm 97 ^D	18.2 \pm 0.5 ^B	
	12.5	580 \pm 25 ^D	18.1 \pm 6.0 ^B	
	50	310 \pm 113 ^D	23.4 \pm 10.9 ^{AB}	
	200	291 \pm 77 ^D	16.1 \pm 0.5 ^B	
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)		2594 \pm 593 ^A	31.4 \pm 11.2 ^A	

Values are mean \pm SD (n = 3 biological determinations). Values within the same column in the same extract treatment not sharing a common superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. The detection limit of ELISA kits used in this study was TNF- α <31.2 pg/mL and IL-10 <15.6 pg/mL, respectively. The original cell density was 2×10^5 cells/mL. LPS, lipopolysaccharide alone at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ was selected as a positive control in each experiment. WNF, water extracts of non-fermented oat milk; WF, water extracts of fermented oat milk; ENF, ethanol extracts of non-fermented oat milk; EF, ethanol extracts of fermented oat milk.

發炎後期分泌，以抑制 TNF- α 的過度分泌，推測水萃取物樣品抑制 TNF- α 的分泌，因此造成樣品介入反而抑制 RAW 264.7 巨噬細胞 IL-10 的分泌。進一步探討乙醇萃取物之抗發炎作用，結果顯示，不論介入何種濃度的未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ENF) 皆無法抑制 TNF- α 的分泌。反之，介入三個濃度的發酵燕麥奶乙醇萃取物 (EF) 皆可有效抑制 TNF- α 的分泌，具有抗發炎作用，而所有組別中，僅在介入 200 $\mu\text{g/mL}$ 未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ENF) 時，IL-10 與控制組無顯著差異，結果說明在抑制促發炎細胞激素時，可能同時也抑制了抗發炎細胞激素的分泌。

(三) 一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 測定

當病毒、細菌或是內毒素等入侵人體內，巨噬細胞會被活化並釋放大量一氧化氮分子，因此，一氧化氮測定常被用作於評估發炎反應的重要指標之一。本實驗自發模式結果 (圖三 (A、B)) 顯示，未發酵 (WNF) 及發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 雖然會刺激一氧化氮分泌，但發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 相較未發酵組別不易刺激細胞刺激一氧化氮分泌及發炎 (圖三 (A))；所有濃度的未發酵 (ENF) 及發酵燕麥奶乙醇萃取物 (EF) 與控制組相比皆無顯著差異 (圖三 (B))，顯示乙醇萃取

表五 未發酵及 *Lactiplantibacillus plantarum* 發酵 36 小時燕麥奶水萃取物和乙醇萃取物在脂多醣刺激發炎模式下對 RAW 264.7 巨噬細胞促發炎及抗發炎細胞激素分泌之影響

Table 5. Effects of treatments with water and ethanol extracts from non-fermented oat milk and 36-h *Lactiplantibacillus plantarum* fermented oat milk on pro- and anti-inflammatory cytokines secretions by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

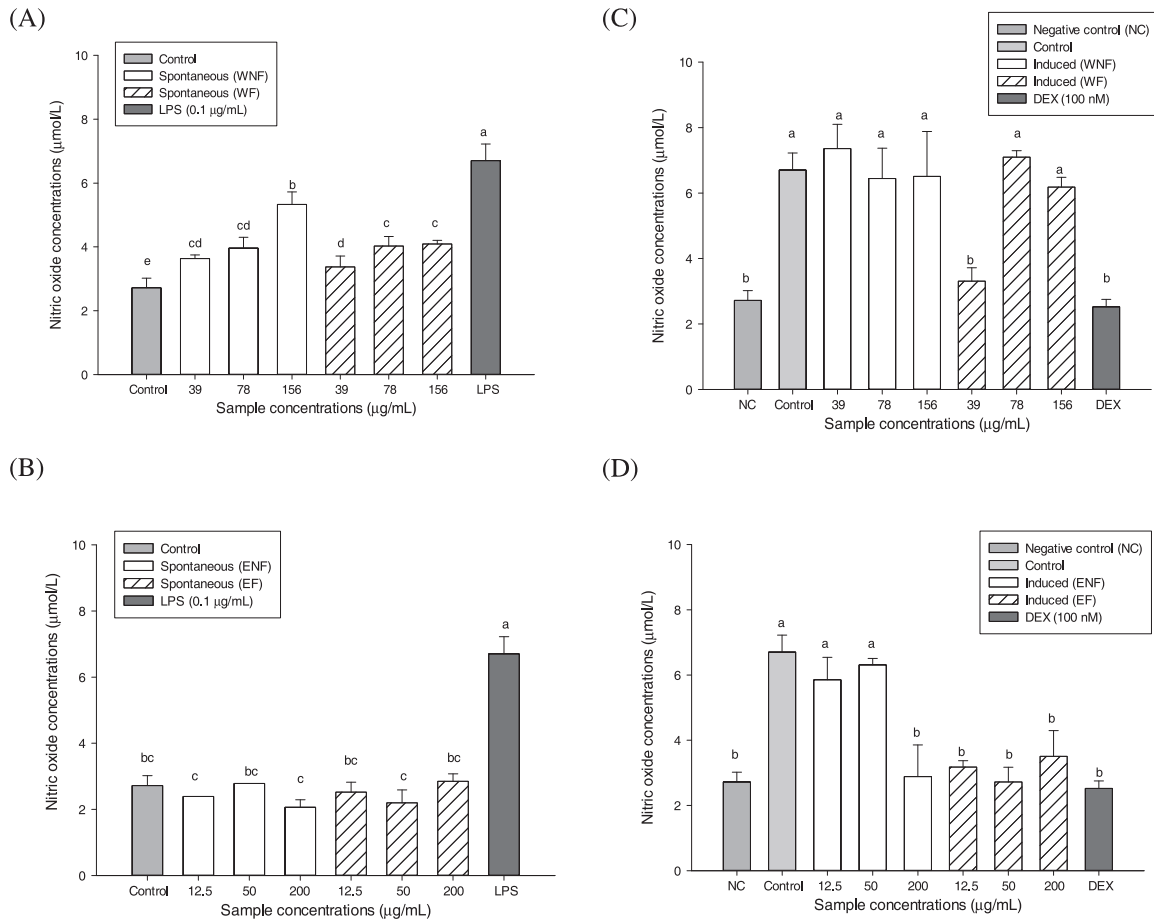
Sample conc. ($\mu\text{g/mL}$)	pro-inflammatory cytokine (pg/mL)		anti-inflammatory cytokine (pg/mL)	
		TNF- α		IL-10
Negative control		570 \pm 97 ^D		18.2 \pm 0.50 ^B
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	0	15173 \pm 614 ^A		99.6 \pm 15.5 ^A
+	39	13165 \pm 437 ^{AB}		29.3 \pm 4.3 ^B
WNF	78	13943 \pm 1066 ^{AB}		27.2 \pm 2.2 ^B
	156	10607 \pm 4534 ^{BC}		23.1 \pm 1.9 ^B
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	0	15173 \pm 614 ^A		99.6 \pm 15.5 ^A
+	39	7356 \pm 2376 ^C		24.0 \pm 1.8 ^B
WF	78	15882 \pm 957 ^A		29.4 \pm 1.5 ^B
	156	14176 \pm 402 ^{AB}		29.6 \pm 4.9 ^B
LPS+DEX (100 nM)		3541 \pm 2136 ^D		38.8 \pm 26.6 ^B
Negative control		570 \pm 97 ^C		18.2 \pm 0.5 ^E
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	0	15173 \pm 614 ^A		99.6 \pm 15.5 ^A
+	12.5	14961 \pm 1210 ^A		25.0 \pm 4.2 ^{DE}
ENF	50	15784 \pm 605 ^A		38.8 \pm 26.6 ^{CDE}
	200	12382 \pm 3565 ^A		81.0 \pm 8.2 ^{AB}
LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)	0	15173 \pm 614 ^A		99.6 \pm 15.5 ^A
+	12.5	4689 \pm 932 ^B		65.0 \pm 22.1 ^{BC}
EF	50	6530 \pm 3160 ^B		55.9 \pm 25.0 ^{BCD}
	200	6914 \pm 2540 ^B		23.9 \pm 3.7 ^{DE}
LPS+DEX (100 nM)		3541 \pm 2136 ^{BC}		38.8 \pm 26.6 ^{CDE}

Values are mean \pm SD (n = 3 biological determinations). Values within the same column in the same extract treatment not sharing a common superscript capital letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. The detection limit of ELISA kits used in this study was TNF- $\alpha < 31.2$ pg/mL and IL-10 < 15.6 pg/mL, respectively. The original cell density was 2×10^5 cells/mL. LPS, lipopolysaccharide alone at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ was selected as a control in each experiment. DEX, dexamethasone at 100 nM, was chosen as a treatment control in each experiment. WNF, water extracts of non-fermented oat milk; WF, water extracts of fermented oat milk; ENF, ethanol extracts of non-fermented oat milk; EF, ethanol extracts of fermented oat milk.

物不會刺激一氧化氮 (NO) 分泌。脂多醣刺激發炎模式 (圖三 (C、D)) 實驗, 顯示低濃度發酵燕麥奶水萃取物 (WF) 可以有效降低一氧化氮的含量 (圖三 (C)); 反之, 高濃度的未發酵燕麥奶乙醇萃取物 (ENF) 及所有添加濃度的發酵燕麥奶乙醇萃取物 (EF) 可以有效減少巨噬細胞分泌一氧化氮的含量 (圖三 (D)), 具有顯著抗發炎作用。

討 論

透過發酵技術可以改善食品的營養素⁽⁵⁾ 及風味, 使發酵物成為益生菌的載體產生功能性物質及風味物質, 發酵還可延長食品的保存期限。本實驗使用的單一菌種為植物乳桿菌 *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069, 為一種乳酸菌亦為益生菌, 發現期間可以將醣類轉換成乳酸提供食品新的



圖三 未發酵及 *Lactiplantibacillus plantarum* 發酵 36 小時燕麥奶水萃取物及乙醇萃取物在自發模式 (A、B) 及脂多糖刺激發炎模式 (C、D) 下對 RAW 264.7 巨噬細胞之一氧化氮分泌之影響

Figures 3. Effects of treatments with water and ethanol extracts from non-fermented oat milk and 36-h *Lactiplantibacillus plantarum* fermented oat milk on nitric oxide secretions by RAW 264.7 macrophages under spontaneous (A, B) and LPS-stimulated (C, D) experiment model. Values are means ± SD (n = 2-3 biological determinations). Bars in the same plot not sharing a common letter are significantly different ($P < 0.05$) from each other, analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test. The original cell density was 2×10^5 cells/mL. LPS, lipopolysaccharide alone at 0.1 µg/mL was selected as a positive control and control in the spontaneous and LPS-stimulated inflammation experiment, respectively. DEX, dexamethasone at 100 nM, was chosen as a treatment control in the LPS-stimulated inflammation experiment. WNF, water extracts of non-fermented oat milk; WF, water extracts of fermented oat milk; ENF, ethanol extracts of non-fermented oat milk; EF, ethanol extracts of LPS fermented oat milk.

風味，還可以降低 pH 值至 4.6 以下（表一），成為高酸性食品，以抑制雜菌的生長並延長食品的保存期限。不僅如此，因 *Lpb. plantarum* 益生菌的特性，可以調節人體的腸道微菌叢與免疫系統避免生態失調的發生⁽¹⁴⁾。

為建立發酵燕麥奶之最適合發酵條件，本實驗在相同糖度不同發酵溫度相比較，37°C 發酵燕麥奶 pH 值下降幅度皆大於 30°C，因此建議採用 37°C 作為後續實驗之發酵溫度（表一）。2.5% 及 5% 糖度發酵燕麥奶在相同發酵時間下，pH 值皆無顯著差異（表一），為建立低糖健康概念，因此挑選糖度較

低的 2.5% 糖度燕麥奶做為後續實驗製備之糖度，不僅可降低製造成本還可以達到較為健康又適口的目的。透過無添加糖與添加糖配方的比較亦可知植物乳桿菌在含適度砂糖環境下生長更佳，由此推斷其可以利用砂糖作為能量來源並產生更多的乳酸，從而使 pH 值下降更為迅速；由食品安全的角度觀察，含低糖發酵的燕麥奶，能快速促進乳酸菌生長（表二），應更為安全。本實驗接著利用乳酸菌數、總生菌數變化及總生物胺含量進行第二次配方的發酵時間篩選，期望以較高乳酸菌數、較低總生菌數與較低生物胺含量作為評估標的，結果發酵 36

小時燕麥奶之乳酸菌數有最高值(表二)，而總生菌數相對低值，結合pH值(表一)的結果可推測，發酵燕麥奶中如有少數雜菌，也會因pH值的下降而被抑制(表二)，具有相當安全性；生物胺含量的測定結果顯示，所有測定發酵的組別皆含有低量的生物胺(表三)，生物胺大部分存在蛋白質含量高的發酵產品中，如動物性發酵食品，尤其以含有高量組胺酸(histidine)的食材為多，可能造成有些人的過敏反應，大多數植物性發酵產品相對的過敏性胺類含量較少，因此，目前我國法規也僅針對新鮮魚類及其加工製品之組織胺含量訂定限量標準，根據本實驗結果顯示未發酵及發酵燕麥奶中仍含有少量生物胺，其含量應不致對人體造成危害，但後續仍需嚴謹的監控，針對個別胺類的變化進行深入研究。綜合評估，本實驗證實 37°C 發酵 36 小時 2.5% 糖度燕麥奶為最具潛力配方。

RAW 264.7 巨噬細胞株目前廣泛應用於免疫調節劑的體外篩選⁽¹⁵⁾，此細胞係被認為是最符合體內巨噬細胞的體外模型，因其能夠在體外執行吞噬作用和胞飲作用⁽¹⁶⁾，且因其具有易於培養且增殖快速的特性，故本實驗使用RAW 264.7 巨噬細胞株進行不同濃度未發酵及發酵燕麥奶水萃取物(WNF及WF)及乙醇萃取物(ENF及EF)對細胞毒性之測試及刺激細胞分泌細胞激素與一氧化氮含量之測定。綜合圖二結果發現，4種不同萃取物對免疫細胞之反應並未呈現一致的劑量反應效應(dose-dependent effect)，未發酵燕麥奶水萃取物(WNF)隨濃度增加而抑制細胞存活(圖二(A))；而發酵燕麥奶的水萃取物(WF)卻只在中濃度 313 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 會抑制細胞存活(圖二(B))，顯示免疫細胞對發酵後產物樣品濃度有較高耐受度，推測發酵後成分改變，使發酵燕麥奶水萃取物(WF)中之細胞毒性物質減少。另外，未發酵燕麥奶乙醇萃取物(ENF)各濃度對細胞之存活無影響(圖二(C))；而發酵燕麥奶乙醇萃取物(EF)則在中濃度(12.5、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和高濃度(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 卻有促進細胞存活的作用(圖二(D))，推測發酵使成分改變，導致發酵燕麥奶乙醇萃取物(EF)成分更趨複雜，在不同濃度下所造成的生理影響可能不同，不同成分之間可能有加乘或拮抗作用，加以免疫反應有所謂低劑量耐受及高劑量耐受(low-zone tolerance and high-zone tolerance)的現象，因此對複雜成分而言，免疫反應不容易得到最佳的劑

量反應範圍，建議將來更進一步進行有效成分分析或純化，以純化物質深入探討其免疫調節作用機制，並進行發酵燕麥奶萃取物中指標性生物活性成分的鑑定，特別是與抗發炎或抗氧化作用相關的成分，將有助於理解其作用機制。另外，發酵過程中，乳酸菌可以產生短鏈脂肪酸(short-chain fatty acids; SCFAs)，如醋酸、丙酸和丁酸等。這些SCFAs是腸道微生物發酵膳食纖維和其他碳水化合物產物的產物，對於腸道健康和抗發炎具有重要作用。在發酵燕麥奶的過程中，乳酸菌可能會利用燕麥中的碳水化合物進行發酵，從而產生SCFAs，這些SCFAs不僅能夠改善腸道微生物組的平衡，還能促進腸道上皮細胞的健康，並具有抗發炎的潛力，因此，發酵燕麥奶可能含有SCFAs，這也是其潛在的健康益處之一，進一步的實驗可以透過氣相層析法(gas chromatography, GC)或高效能液相層析法(high-performance liquid chromatography, HPLC)等技術來定量分析發酵燕麥奶中的SCFAs含量，以確認其存在及其對健康的影響。

由巨噬細胞促發炎及抗發炎細胞激素分泌的實驗結果得知，乙醇萃取物抗發炎的功效優於水萃取物，而發酵燕麥奶乙醇萃取物(EF)的抗發炎效果明顯優於未發酵組(表四及表五)，且經比較發現，發酵燕麥奶抗發炎功效較接近地塞松，皆為抑制細胞激素分泌的方式；乙醇萃取物抗發炎能力更好的原因，推測可能為乙醇萃取物中除了含有一些酚類物質，更多的是脂溶性維生素與黃酮類化合物等活性物質，因為這些物質在有機溶劑中有更好的溶解性，有研究⁽¹⁷⁾指出，乙醇被認為是營養保健品和食品應用中黃酮類等生物活性化合物萃取和分離的最佳選擇，因為與甲醇和其他有機溶劑相比，乙醇毒性較低，選擇性較低，但對二氧化碳的溶解度又比水更好。另外，發酵組抗發炎潛力優於未發酵組則推測是因為經過乳酸菌轉化後，食物中的大分子轉化成小分子活性物質，因此提高當中的功能性成分，如總酚酸、單酚酸、黃酮類化合物⁽¹⁸⁾與許多維生素和礦物質，發酵燕麥具有高營養價值，是維生素A、B、D的豐富來源，微生物在發酵過程中可以合成並提高維生素B2、B9、B11、B12的含量⁽¹⁹⁾，且經由乳酸菌發酵的燕麥含有多量的必需礦物質，如鋅、鎂、鐵、鈉、磷、鈣、錳、銅⁽²⁾，研究證實發酵燕麥中總酚酸、單酚酸、黃酮類化合物的含量也有所提高⁽¹⁸⁾，故推測本實驗所得

之萃取物成分含維生素 B 群、多種礦物質、酚酸及黃酮類等活性物質。本研究透過一氧化氮含量測定的實驗（圖三）亦可佐證細胞激素測定的結果，一氧化氮含量結果證實，發酵燕麥奶乙醇萃取物（EF）的抗發炎潛力優於其他組別，且中低劑量發酵燕麥奶乙醇萃取物（EF）比高劑量組更具發展潛力；比較水萃取物對一氧化氮（NO）分泌之影響，WF 在自發狀態會稍微增加 NO 分泌，但是和 LPS 共同處理時，WF（39 $\mu\text{g/mL}$ ）則明顯抑制 NO 分泌量。EF 自發狀態不影響 NO 分泌，和 LPS 共同處理則顯著抑制 NO 分泌，也證明發酵後不同萃取法（WF 和 EF）成分之不同，推測發酵後水萃取物（WF）中，可能含有包括胞外多醣（exopolysaccharides）的複雜成分^(20,21)，近年來益生菌發酵產生的胞外多醣已被證實具有許多生理等功能，如抗發炎、抗癌等功能，胞外多醣的主題值得將來更深入研究。綜合本研究結果，在細胞實驗中，發酵組可以顯著抑制促發炎細胞激素 TNF- α 的分泌，也說明發酵燕麥奶抗發炎功效明顯優於未發酵組。

結 論

本研究透過測定 pH 值、乳酸菌數及總生菌數變化以及總生物胺含量以篩選最具潛力發酵燕麥奶配方，並以未發酵燕麥奶做為控制組。綜合本研究結果顯示，以植物乳桿菌（*Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069）濃度 1×10^6 CFU/mL，在 37°C 發酵 36 小時之 2.5% 糖度燕麥奶為最適配方。此最適配方之水及乙醇萃取物進行抗發炎作用評估，證實乙醇萃取物效果優於水萃取物，且發酵組對 RAW 264.7 巨噬細胞分泌 TNF- α 之含量顯著低於未發酵組，顯示最適配方發酵燕麥奶在抗發炎作用中具有一定的潛力。

致 謝

本研究之經費來自國家科學及技術委員會之大專生研究計畫 NSTC 112-2813-C-005-046-B 及國科會研究計畫 NSTC 112-2320-B-005-013，感謝國科會之經費支持。

利益衝突

本文作者皆無利益衝突。

參考文獻

1. Remus DM, van Kranenburg R, van Swam II, Taverne N, Bongers RS, Wels M, et al. Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Fact.* 2012;11:1-10.
2. Das G, Maria JM. Nutrient profile of fermented oats. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2017;2:69-71.
3. Gupta S, Abu-Ghannam N. Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012;52(2):183-99.
4. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73(2):365s-73s.
5. Dimidi E, Cox SR, Rossi M, Whelan K. Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients.* 2019;11(8):1806.
6. Daskalaki MG, Tsatsanis C, Kampranis SC. Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(9):6495-507.
7. Allam R, Anders H-J. The role of innate immunity in autoimmune tissue injury. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2008; 20(5):538-44.
8. Wu J, Zhang Y, Ye L, Wang C. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review. *Carbohydr. Polym.* 2021;253:117308.
9. Mencoboni M, Lerza R, Bogliolo G. Tumor necrosis factor: A cytokine with multiple actions. *Recenti. Progressi. Med.* 1992;83(1):15-7.
10. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 2007;45(2):27-37.
11. Tato CM, Cua DJ. SnapShot: Cytokines I. *Cell.* 2008; 132(2):324, 324.e1.
12. Kao CC, Lin JY. *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* BCRC10069 co-fermented cucumber safety and functional characteristics. *Food Biosci.* 2023;55:103085.
13. Kao CC, Lin JY. Culture condition optimization of naturally lacto-fermented cucumbers based on changes in detrimental and functional ingredients. *Food Chem.-X.* 2023;19:100839.
14. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2015; 31(1):69-75.
15. Elisia I, Pae HB, Lam V, Cederberg R, Hofs E, Krystal G. Comparison of RAW 264.7, human whole blood and

- PBMC assays to screen for immunomodulators. *J. Immunol. Methods.* 2018;452:26-31.
16. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* 2018;13(6):e0198943.
 17. Chaves JO, de Souza MC, da Silva LC, Lachos-Perez D, Torres-Mayanga PC, Machado A, et al. Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Front. Chem.* 2020;8:507887.
 18. Djorgbenoo R, Hu J, Hu C, Sang S. Fermented oats as a novel functional food. *Nutrients.* 2023;15(16):3521.
 19. Capozzi V, Russo P, Duenas MT, Lopez P, Spano G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: A great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012;96(6):1383-94.
 20. Angelin J, Kavitha, M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;162:853-65.
 21. Kavitha D, Tiwari S, Shah IA, Devi PB, Delattre C, Reddy GB, Shetty PH. Antipathogenic potentials of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and their food and health applications. *Food Control* 2023; 152:109850.

植物乳桿菌 BCRC 10069 發酵燕麥奶對 RAW 264.7 細胞之抗發炎作用

林晏羽 林金源*

國立中興大學 食品暨應用生物科技學系

(收稿日期：113 年 08 月 13 日。接受日期：113 年 09 月 23 日)

摘要 燕麥奶為目前盛行的一种植物性飲品，但仍可利用乳酸菌發酵技術以增進其營養與保健價值，因此，本研究探討利用植物乳桿菌 (*Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum* subsp. *plantarum* BCRC 10069) 製備發酵燕麥奶及評估其抗發炎保健功能。發酵期間，監控樣品 pH 值、乳酸菌數、總生菌數變化及總生物胺含量變化，以獲得乳酸菌在兩個發酵溫度 (30 及 37°C) 及三種糖度配方 (0、2.5 及 5%) 分別發酵 72 小時之最適配方，並以未發酵燕麥奶做為控制組。最適配方之成品再利用水及乙醇做為萃取溶劑進行萃取，萃取物分別與 RAW 264.7 巨噬細胞株共同培養，並以 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法，確定非細胞毒性劑量後，利用酵素免疫分析法測定巨噬細胞在有、無脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 存在下，萃取物對巨噬細胞分泌細胞激素促發炎細胞激素 TNF- α 與抗發炎細胞激素 IL-10 之影響，以及測定發炎媒介物一氧化氮的含量。結果顯示，植物乳桿菌 (1×10^6 CFU/mL) 在 37°C 作用 36 小時，2.5% 糖度之發酵燕麥奶為最適配方，其酸度低於 pH 4.6、乳酸菌數含量最高及總生菌數含量較低，總生物胺含量為 0.43 mg NH₂/g 樣品。在抗發炎作用評估方面，乙醇萃取物之效果優於水萃取物，且發酵燕麥奶對巨噬細胞分泌 TNF- α 及一氧化氮之分泌量，顯著低於未發酵組；本研究結果顯示最適配方之發酵燕麥奶，在抗發炎作用具有相當潛力。

關鍵字：抗發炎、發酵、乳酸菌、植物乳桿菌、燕麥奶

* 通訊作者：林金源

通訊地址：402 台中市南區國光路 250 號食品生物科技大樓

電話：04-2284-0385 #2010

電子郵件：jinlin@dragon.nchu.edu.tw