

## 利用遺傳演算法探討酸凝酪中原生菌生長速率之最適化

陳明汝<sup>1\*</sup> 陳坤男<sup>2</sup> 林慶文<sup>1</sup> 毛漢梅<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 國立台灣大學畜產學系

<sup>2</sup> 東南技術學院機械工程系

(接受刊載日期：中華民國九十三年一月十九日)

本研究旨於探討脫脂乳中同時添加多種原生菌促生長物質，對發酵期間原生菌生長速率之影響。所用之原生菌菌種為：*Lactobacillus acidophilus*、*L. casei*、*Bifidobacterium longum* 及 *B. bifidum*。在試驗設計方面，因添加因子眾多，使整個試驗龐大而複雜，故採用反應曲面法 (response surface methods, RSM) 之減次設計，減少試驗組數，以利試驗進行。本試驗添加三種原生菌促生長物質，分別為肽類、果寡醣及異麥芽寡醣，以此三者之濃度為變因，而以發酵 10 小時乳酸桿菌、雙叉乳桿菌及 *L. casei* 之生長速率作為反應性狀 (response)，根據 Box 和 Behnken 之三因子三階次設計，共得 17 個試驗組，於一個區集下進行試驗。試驗結果皆經由 Design-Expert 軟體分析找出最適方程式，再以遺傳演算法 (genetic algorithms, GAs) 搜尋原生菌最佳生長模式。經 GAs 運算後所得肽類、果寡醣、異麥芽寡醣濃度之最適添加量，在發酵 10 小時期間分別為 1.12、3、1.5%。將電腦預測結果經由實際試驗驗證，發現均無顯著差異。將 GAs 所推薦之最適解，進一步分析其發酵期間有機酸生成量與游離胺基酸組成，並與未添加促生長物質之脫脂乳發酵組比較，發現 GAs 組之有機酸生成量明顯高於脫脂乳組，且游離胺基酸總含量亦以 GAs 組較高。

關鍵字：原生菌，最適化，遺傳演算法。

## Study on the Optimal Growth Rates of Probiotics in Yogurt by Genetic Algorithms

Ming-Ju Chen<sup>1\*</sup>, Kun-Nan Chen<sup>2</sup>, Chin-Wen Lin<sup>1</sup> and Ham-Mei Mao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Taiwan University, Department of Animal Science, Taipei, Taiwan

<sup>2</sup> Department of Mechanical Engineering, Tung-Nan Institute of Technology, Taipei, Taiwan

(Accepted for publication: January 19, 2004)

This research was to study the effects of addition of growth promoters to skim milk on the viability of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium longum*, and *B. bifidum*). The purpose of this study was to optimize the activity and viability of the probiotics by the response surface modeling and the genetic algorithms. Samples were prepared by addition of three different growth promoters (peptides, fructooligosaccharides, and isomaltoligosaccharides) to skim milk. A three-factor, three-level Box Behnken Design with five replicates at the centerpoint was used to reduce number of experimental trials and increase the  $R^2$  of models. Seventeen combinations were obtained. The results showed that the quadratic model appeared to be the most accurate with no significant lack of fit with high  $R^2$ . The GA results indicated the optimal amounts of peptides, fructooligosaccharides, and isomaltoligosaccharides were 1.12, 3, and 1.5%, respectively, led to the highest growth rates of probiotics. Model verification was performed by additional independent trials, and the experimental values were very close to the predicted ones with no significant difference. The genetic algorithms (GAs) were proved to be very effective for optimizing the activity of probiotic cultures. The amount of organic acids and the composition of free amino acids in samples recommended by GAs during 10 hours fermentation were determined. Results showed addition of growth promoters could improve the activity and viability of probiotics resulting in increasing the amount of amino acids and organic acids.

Key words: Probiotics, Optimization, Genetic algorithms.

\* Corresponding author. E-mail: cmj@ntu.edu.tw

## 前　　言

原生菌(probiotics)添加對人體健康的益處已經被證實，原生菌的定殖能力及個數則是影響其機能性的主要關鍵。國際乳品聯盟(International Dairy Federation)建議原生菌製品中至少要達到 $10^7$  CFU/g 的活菌才能具有其機能性<sup>(1)</sup>，然而，由於牛乳並非原生菌優良的培養基，胃中的酸性也不利於原生菌的存活，因此，如何提升原生菌在乳製品及人體中的殘活率及活性是這幾年主要研究的課題。

近年來，對於能促進原生菌生長之物質已有相當多的研究(尤其是雙叉乳桿菌)<sup>(2,3)</sup>，例如牛乳中添加 casitone，酪蛋白水解物(casein hydrolysate)及果糖可以促進 *L. acidophilus* 的生長<sup>(4)</sup>。主要原因可能與醣類(尤其是葡萄糖及果糖)及礦物質增加有關<sup>(5)</sup>。Dave 與 Shah<sup>(6)</sup>研究添加 cysteine、tryptone、乳清蛋白濃縮物(whey protein concentrate)及乳清蛋白質對酸凝酪中原生菌的影響，發現這些添加物可以促進 *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *S. thermophilus* 的生長。

除了原生菌生長促進物的添加之外，藉由益菌質(prebiotics)促進腸道中的原生菌生長也被廣泛的研究<sup>(7,8)</sup>。益菌質是指不具消化性之食物成分，可選擇性的刺激腸道中一種或數種益菌的生長及活性，促進宿主健康<sup>(9)</sup>。其中不可消化性寡醣(non-digestible oligosaccharides, NODs)已被許多研究結果證實為益菌質(prebiotics)，如：果寡醣(fructo-oligosaccharides, HO)、牛乳寡醣(galacto-oligosaccharides, IHO)、異麥芽寡醣(isomaltoligosaccharides)、木寡醣(xylo-oligosaccharides)、大豆寡醣(soybean oligosaccharides)等<sup>(10)</sup>。食物中同時添加原生菌及益菌質可被稱為 synbiotics。Bielecka 等人<sup>(11)</sup>研究證實慎選 synbiotics 可以提升原生菌的活性。

本研究同時添加肽類、果寡醣及異麥芽寡醣等多種原生菌促生長物質於牛乳中，並以 *Lactobacillus acidophilus*、*L. casei*、*Bifidobacterium longum* 及 *B. bifidum* 作為菌配發酵 10 h，製成新發酵乳飲品。研究的目的主要是探討原生菌及益菌質同時添加於牛乳中，是否可以增加原生菌在牛乳中的活性。並藉由 Box Behnken Design<sup>(12)</sup> 之反應曲面試驗設計，建立目標方程式，再將此模式經由遺傳演算法進行最適化運算，以尋求原生菌促生長物質之最適添加比例。遺傳演算法(genetic algorithms, GAs)為模

仿生物演化系統所發展出的最適化(optimization)模式<sup>(13)</sup>，適合處理大規模、複雜的最適化問題。近年來運用廣泛，多用於機械、航太等工程方面<sup>(14,15)</sup>，在食品方面的應用仍很少，今將其用於原生菌的生長，看效果能否如預期般準確，也期能為愈益複雜的食品工業開發一新的最適化方式。

## 材　　料　　與　　方　　法

### 一、乳酸菌原之保存、更新

*L. acidophilus* (CCRC 14079) 及 *L. casei* (CCRC 12321) 保存於滅菌(121 °C, 15 分鐘)之 Lactobacilli deMan, Rogosa 和 Sharp 培養液(Lactobacilli MRS broth)，於 4 °C 下保存，每週活化一次，每次接種 1% 於 37 °C 培養箱培養 24 小時，供試前連續活化 2-3 次備用。*B. longum* (CCRC 14605) 及 *B. bifidum* (CCRC 11844) 之培養液為含 0.05% cysteine 之 Lactobacilli MRS 培養液，其保存、更新方式與上述方法同，唯培養時置於厭氧操作箱(Bug box dual gas moder, Ruskinn Technology, Bolton, UK)。

### 二、樣品製備

12% 的脫脂乳加入果寡醣及異麥芽寡醣(依試驗設計比例添加)，於 85 °C 下殺菌 15 分鐘，而肽類因含有含硫胺基酸，若與脫脂乳一起加熱會產生凝集，故單獨殺菌，待兩者皆冷卻後再混合均勻，並接種四株原生菌各 1%，於 37 °C 下培養，測其發酵 10 小時之原生菌生長速率。

### 三、探討原生菌於酸凝酪中生長最佳模式之試驗設計

本試驗旨於探討脫脂乳中同時添加多種原生菌促生長物質，對發酵期間原生菌生長速率之影響。試驗設計結合反應曲面法之減次設計，並利用 Design-Expert 5 (Stat-Ease, Inc., 1996) 軟體分析多次方程式，再使用遺傳演算法計算原生菌最佳生長模式。

#### 1. 反應曲面模式之建立

以肽類、果寡醣、異麥芽寡醣之濃度作為變數因子，簡化變數及原變數如表一所示。根據 Box Behnken Design (BBD)<sup>(12)</sup> 之三因子三階次設計進行試驗，而以 10 小時

表一 三因子三階次反應曲面設計中之操作條件變數及其階次

Table 1. Process variables and their levels in the three variables-three levels response surface design

Independent variable	Symbol	Level	
		Coded	Nature
Peptides conc. (%)	$X_1$	-1	0.00
		0	0.75
		+1	1.50
FOS conc. (%)	$X_2$	-1	0.00
		0	1.50
		+1	3.00
IMO conc. (%)	$X_3$	-1	0.00
		0	1.50
		+1	3.00

FOS: fructo-oligosaccharides

IMO: isomalto-oligosaccharides

間乳酸桿菌 (*Lactobacillus* spp.)、雙叉乳桿菌 (*Bifidobacteria* spp.) 及 *L. casei* 之生長速率作為反應性狀 (response)。依本試驗設計，可得 17 個試驗組 (其中中心點重複五次)。

## 2. 反應曲面模式分析

將上述試驗結果經由 Design-Expert 5 軟體進行分析，以找出最能代表試驗結果之一至三次方程式，如下所示：

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \varepsilon \quad [1]$$

$\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$  表示各獨立變數 (independent variable)，即原變數， $y$  為應變數 (dependent variable)， $\varepsilon$  為誤差。為了試驗上運算的方便，將獨立變數轉換為簡化變數，方程式如下：

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad [2]$$

$x_1, x_2, \dots, x_k$  表示簡化變數。

方程式的適切性則經由變異分析及契合度分析決定。其中平方和、模式分析、不契合度分析及相關係數之計算公式如下：

$$\text{平方和} (\text{sum of square}, SS) = \sum_i (Y_i - \bar{Y})^2 \quad [3]$$

$$\text{模式分析} (\text{model analysis}) = SS_{\text{model}} / DF_{\text{model}} \quad [4]$$

$SS_{\text{model}}$  代表模式的平方和； $DF_{\text{model}}$  代表模式係數的個數，但不包括截距 (intercept) 項。

$$\text{不契合度分析} (\text{lack of fit}) = SS_{\text{lack of fit}} / DF_{\text{lack of fit}} \quad [5]$$

$SS_{\text{lack of fit}}$  代表模式的平方和； $DF_{\text{lack of fit}}$  代表所有試驗的點數減去模式係數的個數，再減去 1。

$$\text{相關係數} (\text{R-squared}, R^2) = 1 - [SS_{\text{residual}} / (SS_{\text{residual}} + SS_{\text{model}})] \quad [6]$$

$$SS_{\text{residual}} = SS_{\text{lack of fit}} + SS_{\text{pure error}} \quad [7]$$

最適方程式應用 Matlab 5.3 (The Math Work, Inc., 1999) 軟體繪製反應曲面圖，探討各獨立變數與應變數之間的關係。

## 3. 以遺傳演算法進行最適化分析

經由反應曲面法所得之最適方程式，以遺傳演算法進行最適化分析。將欲最適化函數之變數，以二進位碼編碼 (encoding)，再將這些二進位碼組合起來形成字串，再以逢機的方式產生族群 (population)，模仿遺傳學上染色體複製 (reproduction) 之過程，選取族群中適應度較高的做為父代染色體，再經交換 (crossover)、突變 (mutation) 的方式運算，處理最適化的問題。GA 之變數是由 20 個位元 (bits) 所組成，族群大小 (population size) 設定為 10，交換率 (crossover rate) 為 0.5。最佳化選擇則採用精英政策 (elitist strategy)，將最佳的個體留下作為下一世代使用。遺傳演算法是應用自行撰寫之軟體，利用國家科學委員會高速電腦中心之電腦運算。

上述最適化所得之預測結果，經由實際試驗驗證後，利用 SPSS 10.0 (SPSS, Inc., 1999) 軟體分析預測值與實際值間有無顯著差異，用以評估所得最佳化結果之正確性。

## 四、測定項目及分析方法

### 1. 原生菌生長速率

利用 MRS、LP-MGLmodified Gerche's lithium-chloride (LP-MGL)、LP-MRS 培養基分別測定乳酸桿菌、雙叉乳桿菌、*L. casei* 之菌數，LP-MRS 培養基及 LP-MGL 培養基是依照 Vinderola 和 Reinheimer<sup>(16)</sup> 的方法修飾，將 MRS 或 MGL 培養基再加入 0.2% 之氯化鋰 (lithium chloride) 與 0.3% 之丙酸鈉 (sodium propionate) 配製而成。測法如下：

將樣品經適當倍數稀釋，取 1 mL 於培養皿中，加入 9 mL 培養基，混合均勻待凝固後倒置，將含 MRS、LP-MRS 培養基之培養皿置於一般 37 °C 恒溫培養箱，48 小時後計數；而含 LP-MGL 培養基之培養皿則置於厭氧操作培養箱，亦為 37 °C 下培養，72 小時後計數。

為了探討原生菌促進生長物質的添加是否可以促進原生菌的生長速率，且避免起始發酵菌數(原則上控制在  $10^6 \text{ CFU/mL}$ )的不同影響結果的判讀，試驗中計算原生菌生長速率。原生菌生長速率為發酵  $t_2$  小時之菌數對數值( $\log N_{t_2}$ )，減去  $t_1$  小時之菌數對數值( $\log N_{t_1}$ )，再除以時間差( $t_2 - t_1$ )，即為每單位小時之原生菌生長速率。

$$\text{growth rate} = \frac{\log N_{t_2} - \log N_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad [8]$$

## 2. 有機酸含量

依劉<sup>(17)</sup>之方法修飾。取 30 mL 試樣，以  $10,621 \times g$  離心(Kubota KR-20000T, Tokyo, Japan) 10 分鐘，取上清液 10 mL，加入過氯酸溶液 5 mL (10%, v/v)，於室溫下反應 20 分鐘，再以  $10,000 \times g$  離心 10 分鐘，去除沉澱物，上清液以  $0.45 \mu\text{m}$  濾膜過濾純化，以高效能液相層析儀(Gilson HPLC System, Wisconsin, USA)進行分析，測定結果以有機酸標準品定量。乳酸及醋酸之標準檢量線製作法如下：將濃度為  $200 \text{ mg/mL}$  之乳酸(或醋酸)標準品稀釋為 1、2、3、4、5、6 mg/mL，注入高效能液相層析儀進行分析，檢量線繪圖及計算並以試算表軟體(Microsoft Excel 2002, Microsoft Corporation)進行計算。

## 3. 游離胺基酸

依 Beckman System 6300 / 7300 使用手冊建議方法加以修飾。將 1 mL 試樣於 4 °C 下以  $14,300 \times g$  離心 10 min，取上清液  $400 \mu\text{L}$  加入 10% SSA 磺酸基水楊酸(5-sulfosalicylic acid, SSA)  $100 \mu\text{L}$  混合均勻，置於 4 °C 下 30 min，再以  $20,600 \times g$  離心 10 min，取上澄層液以胺基酸分析儀(Beckman 6300 amino acid analyzer, Beckman Inc., Minnesota, USA)進行分析。

## 結果與討論

### 一、反應曲面數學模式建立

## 1. 模式契合度探討

本試驗以肽類、果寡醣、異麥芽寡醣三者之濃度作為變數因子，根據 BBD 之三因子三階次設計，可得 17 組試驗組，以 10 小時乳酸桿菌、雙叉乳桿菌、*L. casei* 之生長速率作為反應性狀。結果經由 Design-Expert 軟體分析，每個反應性狀可以一階至三階方程式做為代表，並藉由模式契合度的探討，決定最適方程式。

比較一階、二階及三階模式之模式分析、模式不契合度及相關係數。在模式分析方面，若“linear”之 F 值具顯著性( $p < 0.05$ )，表示將一次項加入截距形成一次模式，對整個模式有改進的效果；若“quadratic”之 F 值具顯著性，表示將二次項加入一次模式形成二次模式，對整個模式有改進的效果；同理，以此類推，故在模式分析方面要選擇 F 值具顯著性之最高階次模式。而當模式不契合度不顯著時，表示此模式與反應性狀契合；若顯著，則不契合。在相關性分析部分，最重要的就是相關係數，越接近 1 的模式越能代表試驗數據；而“press”值越小越表示此模式越符合試驗本身。

根據上述原則進行分析，在發酵 10 小時期間模式分析方面(表二(a))，二階方程式皆具極顯著性( $p < 0.01$ )，選擇二階方程式；而模式不契合度部分(表二(b))，二階模式均不具顯著差異，此部分選擇二階方程式；在相關性分析(表二(c))，二階模式之相關係數皆顯著高於一階，且“press”值均較一階低。綜合上述，發酵 10 小時期間之原生菌生長速率選擇二階方程式進行最適化分析。

綜合上述模式分析結果，原生菌生長速率皆可以用二階模式代表，其數學方程式如下所示：

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad [9]$$

$y$  為反應性狀， $X_i$ 、 $X_j$  代表各變數因子， $\beta_0$ 、 $\beta_i$ 、 $\beta_{ij}$  為方程式係數。發酵 10 小時原生菌生長率之方程式係數示於表三。

## 2. 以反應曲面圖探討促生長因子對原生菌生長之影響

將上述方程式以 Matlab 軟體所繪之圖形示於圖一。藉此圖形可看出促生長因子

表二 發酵 10 小時期間原生菌生長速率模式之 (a) 模式分析 (b) 模式不契合度分析 (c) 相關係數分析

Table 2. (a) Model analysis (b) Lack of fit tests (c) R-square analysis of probiotic growth rate model during 10 h fermentation

(a) Model analysis

Source	AC <sup>1</sup>		B		C	
	Sum of squares	p > F	Sum of squares	p > F	Sum of squares	p > F
Mean	0.73		0.70		0.75	
Linear	$3.12 \times 10^{-3}$	0.01*	$3.50 \times 10^{-3}$	0.03*	$3.70 \times 10^{-3}$	0.01*
Quadratic	$2.38 \times 10^{-3}$	< 0.01**	$3.45 \times 10^{-3}$	< 0.01**	$2.77 \times 10^{-3}$	< 0.01**
Cubic	$5.67 \times 10^{-5}$	0.41	$1.42 \times 10^{-4}$	0.11	$1.75 \times 10^{-5}$	0.85
Residual	$6.22 \times 10^{-5}$		$4.77 \times 10^{-5}$		$8.88 \times 10^{-5}$	
Total	0.73		0.71		0.76	

(b) Lack of fit tests

Source	AC		B		C	
	Sum of squares	p > F	Sum of squares	p > F	Sum of squares	p > F
Linear	$2.44 \times 10^{-3}$	< 0.01**	$3.59 \times 10^{-3}$	< 0.01**	$2.79 \times 10^{-3}$	0.01*
Quadratic	$5.67 \times 10^{-5}$	0.41	$1.42 \times 10^{-4}$	0.11	$1.75 \times 10^{-5}$	0.85
Cubic	0		0		0	
Pure error	$6.22 \times 10^{-5}$		$4.77 \times 10^{-5}$		$8.88 \times 10^{-5}$	

(c) R-square analysis

Source	AC		B		C	
	R-squared	Press	R-squared	Press	R-squared	Press
Linear	0.56	$4.42 \times 10^{-3}$	0.49	$5.99 \times 10^{-3}$	0.56	$4.85 \times 10^{-3}$
Quadratic	0.98	$1.01 \times 10^{-3}$	0.97	$2.35 \times 10^{-3}$	0.98	$4.19 \times 10^{-4}$
Cubic	0.99		0.99		0.99	

\*Significant at 5% level; \*\*significant at 1% level.

1 AC: *L. acidophilus* + *L. casei*; B: *Bifidobacterium*; C: *L. casei*.

表三 發酵 10 小時原生菌生長速率方程式係數

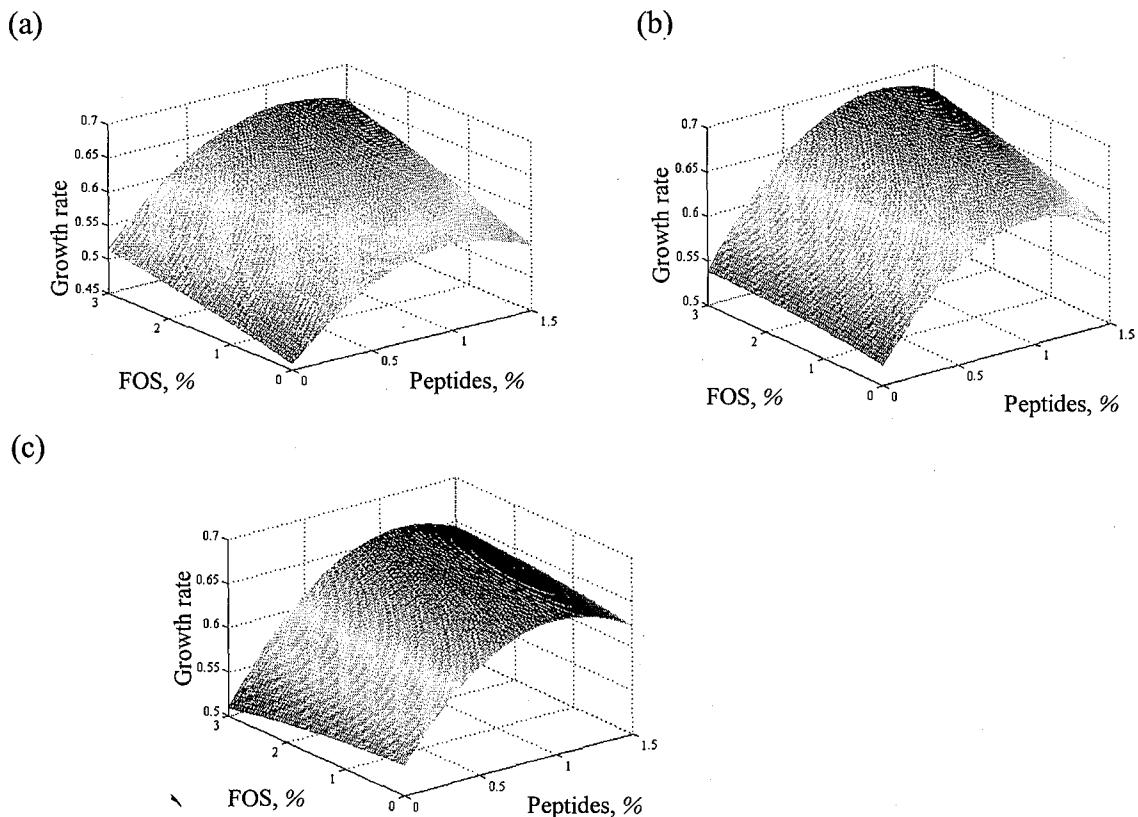
Table 3. The coefficients of probiotic growth rate model during 10 h fermentation

Coefficient \ Y	GR (AC) <sup>1</sup>	GR (B)	GR (C)
$\beta_0$	$1.50 \times 10^{-1}$	$1.50 \times 10^{-1}$	$1.60 \times 10^{-1}$
$\beta_1$	$7.20 \times 10^{-2}$	$8.40 \times 10^{-2}$	$8.00 \times 10^{-2}$
$\beta_2$	$8.76 \times 10^{-3}$	$5.32 \times 10^{-3}$	$9.49 \times 10^{-3}$
$\beta_3$	$2.30 \times 10^{-2}$	$2.30 \times 10^{-2}$	$1.40 \times 10^{-2}$
$\beta_{11}$	$-3.40 \times 10^{-2}$	$4.30 \times 10^{-2}$	$-4.20 \times 10^{-2}$
$\beta_{22}$	$-3.95 \times 10^{-5}$	$-9.13 \times 10^{-4}$	$-8.68 \times 10^{-4}$
$\beta_{33}$	$-3.24 \times 10^{-3}$	$-5.51 \times 10^{-3}$	$-2.91 \times 10^{-3}$
$\beta_{12}$	$3.79 \times 10^{-3}$	$3.98 \times 10^{-3}$	$2.69 \times 10^{-3}$
$\beta_{13}$	$-2.39 \times 10^{-3}$	$3.69 \times 10^{-4}$	$2.32 \times 10^{-3}$
$\beta_{23}$	$-4.66 \times 10^{-3}$	$-2.18 \times 10^{-3}$	$-2.07 \times 10^{-3}$

GR: growth rate; 1 AC: *L. acidophilus* + *L. casei*; B: *Bifidobacterium*; C: *L. casei*.

對原生菌生長之作用，因試驗之因子有三個，其影響無法在三維圖形中同時看出，需固定其中一個因子之濃度，比較其他兩者之效果。圖

一為發酵 10 小時期間，將 IMO 濃度分別固定於 0、1.5、3%，肽類及 FOS 對原生菌生長速率之影響。結果顯示就三種 IMO 添加比例而言，以添



圖一 添加 (a) 0% (b) 1.5% (c) 3% 不同濃度異麥芽寡醣，肽類及果寡醣濃度對發酵 10 小時原生菌生長速率影響之反應曲面圖

Fig. 1. Response surface plots of composite function fitness showing effects of peptides and fructo-oligosaccharides (FOS) at (a) 0% (b) 1.5% (c) 3% of isomaltoligosaccharides (IMO) during 10 h fermentation.

加 1.5% 時生長速率最好(圖一(b))。隨著 FOS 及肽類添加量的增加，原生菌生長速率提高，最大原生菌之生長速率則是落在 FOS 及肽類添加量皆偏高處(圖一(a)、(b)、(c))。整體而言，IMO、肽類及 FOS 隨著添加比例的增加，原生菌生長率皆增加，證實具有益菌的效果。許多早期的研究證實短鏈肽類可作為腸內雙叉乳桿菌的氮來源<sup>(5, 6, 18)</sup>。Dave 和 Shah<sup>(6)</sup>也證實於酸凝酪中添加肽類可以增加雙叉乳桿菌的殘活率。寡醣包括了果寡醣、葡萄寡醣及異麥芽寡醣具有益菌的效果已經被證實<sup>(10)</sup>。餵食果寡醣可以增加腸內雙叉乳桿菌及乳酸桿菌菌數，增加短鏈肽脂肪酸的含量，降低酸鹼值，抑制致病菌數目<sup>(19, 20)</sup>。

## 二、GAs 推薦之最佳模式

將二階模式經由 GAs 做最適化分析。由於本試驗所用的反應性狀有共有三個(乳酸桿菌、雙叉乳桿菌及 *L. casei* 菌的生長率)，因此，使用複合函數適應值 (composite function

fitness，[4])代表所有反應性狀，最佳模式的選取則是尋求最高的複合函數適應值。

$$\text{the composite function fitness} = \\ (R_1 + R_2 + R_3) \quad [10]$$

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  分別代表乳酸桿菌、雙叉乳桿菌及 *L. casei* 菌的生長速率。

所得之最佳解如表四(a)所示，在發酵 10 小時期間，GAs 推薦的肽類最適添加量為 1.12%，FOS 添加量為 3.00% 及 IMO 添加量為 1.54%。GAs 最大的優點在於不會受限於局部性區域中，可找出整體性最佳解。整體而言，發現發酵 10 小時間，肽類與寡醣類添加量的預測值，與反應曲面圖(圖一)結果一致。

## 三、最佳模式驗證

將電腦預測之結果經由實際試驗驗證，並由 SPSS 軟體分析(表四(b))，發現均符合預期，顯示此次試驗之模式相當契合。證明了以 RSM 減次設計模式，配合 GAs 的最適化運算確實可

表四 GAs 所推薦發酵乳飲品之 (a) 最適添加量 (b) 最佳解及試驗驗證結果

Table 4. (a) The optimum producing models (b)  
The validation of the optimum producing models of drinking yogurt recommended by GAs

(a)

Concentration (%)	Peptides	FOS	IMO
10 h	1.12	3.00	1.50

(b)

Growth rate	GR(AC)		GR(B)		GR(C)	
	Pred	Exp	Pred	Exp	Pred	Exp
10 h	0.23	0.22	0.22	0.18	0.24	0.22

FOS: fructo-oligosaccharides; IMO: isomalto-oligosaccharides;  
GR: growth rate; AC: *L. acidophilus* + *L. casei*, B: *Bifidobacterium*, C: *L. casei*, Pred: predicted value, Exp: expected value.

用於原生菌生長速率上。

GAs 本身相當適於處理規模龐大而複雜的最適化問題，因其不會受到局部性區域之限制，甚至在函數不連續的狀態下亦能找出整體性最佳解，但必須要在模式很契合的前提下才有意義。故欲最適化分析變異較大的生物性試驗，一定要將誤差控制到最小，使整個模式能契合試驗本身，最適化才能達到最大效果。

#### 四、GAs 推薦之最適添加量對發酵期間有機酸產量之影響

Lee 和 Salminen<sup>(21)</sup>指出，乳酸桿菌及雙叉乳桿菌代謝產生之主要有機酸有乳酸、醋酸及蟻酸，因此，在比較試驗二中，GAs 在發酵 10 小時期間所推薦之最佳解與對照組 (12% skim milk) 於發酵 2、6、10 小時乳酸及醋酸產量 (表

五)。另外，本試驗亦同時檢測蟻酸產生的情形。結果顯示本試驗所選用的四株原生菌並不會產生蟻酸。

由表五中可看出，GAs 組之有機酸產量明顯比對照組高出許多，尤其是乳酸產量，發酵二小時即可達對照組之 1.54 倍；發酵六小時為 3.21 倍；至 10 小時更達到 4.64 倍之多，顯示 GAs 所推薦之最適添加量對發酵期間原生菌之有機酸產量也有促進的影響。

有機酸的生成對風味影響很大，一般發酵乳中造成良好風味之獨特酸味主要來自於乳酸，而醋酸略帶澀味，含量太高對風味有不良影響。有機酸多寡也會影響菌飴的活性，生成過多會抑制菌飴的生長<sup>(22,23)</sup>，表四中試驗的生長速率與預測值雖無統計上的差異，但生長速率仍低於預測值，尤其是雙叉乳桿菌，推測可能與有機酸生成有關。

#### 五、GAs 推薦之最適添加量對發酵期間游離胺基酸含量之影響

結果可參見表六，許多胺基酸如白胺酸 (leucine)、異白胺酸 (isoleucine) 等含量皆隨著發酵時間增加而減少，可能已轉化為某些風味物質，如 3-methylbutanal、2-methylbutanal 等。而 GAs 推薦組之息寧胺酸 (threonine)、丙胺酸 (alanine)、穎胺酸 (valine)、甲硫胺酸 (methionine)、異白胺酸、白胺酸、酪胺酸 (tyrosine)、苯丙胺酸 (phenylalanine)、離胺酸 (lysine) 含量皆高於未添加生長促進劑之脫脂乳發酵組，且 GAs 推薦組游離胺基酸總量也較高，應是添加了肽類的影響。但兩組隨著發酵時間增加各胺基酸含量雖各有增減，但在總量上變化並不大。GAs 推薦組與脫脂乳組發酵後風味差異甚大，除了有機酸生成量較高造成酸

表五 GAs 推薦之最適添加量對發酵期間乳酸及醋酸產量之影響

Table 5. The effect of the optimum producing models recommended by GAs on lactic acid and acetic acid (n = 3)

Time (h)	2		6		10	
	Lactic acid (mg/mL)	Acetic acid (mg/mL)	Lactic acid (mg/mL)	Acetic acid (mg/mL)	Lactic acid (mg/mL)	Acetic acid (mg/mL)
Gas <sup>1</sup>	0.43	0.18	2.31	0.41	7.38	0.95
Control <sup>2</sup>	0.28	— <sup>3</sup>	0.72	0.39	1.59	0.67

1 The optimal producing models recommended by GAs.

2 12% skim milk.

3 Not detected.

表六 GAs 推薦之最適添加量對發酵期間游離胺基酸含量之影響

Table 6. The effect of the optimum producing models recommended by GAs on free amino acid content

Amino acid	Concentration (mg/L)							
	Control <sup>2</sup>				GAs <sup>2</sup>			
	0 h	2 h	6 h	10 h	0 h	2 h	6 h	10 h
Asp	1.20	1.01	0.40	0.39	1.17	1.18	1.12	1.25
Thr	0.81	0.93	0.67	0.15	9.96	9.90	9.59	9.04
Ser	0.69	0.70	0.41	0.05	0.74	0.76	1.07	1.49
Asn	0.12	— <sup>3</sup>	—	—	0.47	0.43	—	—
Gln	0.50	0.35	0.03	0.12	1.59	1.56	0.83	0.09
Pro	1.03	1.13	2.04	3.86	1.40	—	1.82	—
Gly	3.22	3.36	3.44	3.97	2.19	2.23	3.16	3.71
Ala	1.48	1.51	1.53	1.49	4.85	4.81	4.68	2.87
Val	0.70	0.64	—	0.04	1.33	1.34	1.58	0.87
Met	0.06	0.05	—	—	2.54	2.55	2.47	1.99
Ile	0.25	0.18	0.02	—	0.93	0.93	1.01	0.28
Leu	0.45	0.32	0.06	0.19	6.09	6.10	5.99	5.21
Tyr	0.14	0.15	0.01	0.03	0.63	0.62	0.60	0.44
Phe	0.25	0.22	0.10	0.17	7.04	7.06	7.04	6.95
Trp	0.04	0.04	0.02	—	0.04	0.04	0.04	—
Lys	0.90	1.01	1.29	2.14	23.12	23.07	22.88	23.19
His	0.21	0.25	0.62	1.06	0.27	0.29	0.35	0.47
Arg	0.04	0.74	0.86	1.68	0.48	0.51	0.45	0.50
total	20.99	21.16	18.01	19.00	68.65	67.13	69.70	67.87

<sup>1</sup> 12% skim milk.<sup>2</sup> The optimal producing models recommended by GAs.<sup>3</sup> Not detected.

味較重外，其特殊之風味應是受胺基酸組成影響。

胺基酸對於發酵乳的風味有很大的影響，不同種類的胺基酸具有不同味感，如丙胺酸呈甜味、白胺酸為微甜至苦味、麩胺酸(glutamic acid)則帶有鮮味及酸味。此外，發酵乳製品中有許多揮發性風味物質皆由胺基酸轉變而來，例如：半胱胺酸(cysteine)可轉為硫化氫，甲硫胺酸可轉為 methanethiol 及 dimethyl disulphide，白胺酸、異白胺酸、穎胺酸則分別可轉化為 3-methylbutanal、2-methylbutanal、2-methylpropanal，而所有胺基酸皆會產生氨(ammonia)，對風味影響很大<sup>(2,24)</sup>。

### 結論

- 一、本試驗所添加之促生長物質中，IMO、肽類及 FOS 隨著添加比例的增加，原生菌生長率皆增加，證實具有益菌的效果。
- 二、在發酵 10 小時期間，GAs 推薦的肽類最適添加量為 1.12%，FOS 添加量為 3.00% 及

IMO 添加量為 1.54%。

三、GAs 適合用於規模龐大而複雜的最適化問題，其最大優點在於不會受限於局部性區域中，能找到整體性最佳解。應用 RSM 減次設計建立數學模式，配合 GAs 之最適化搜尋可有效使用於原生菌促生長物質之最適添加比例上。

四、發酵期間，GAs 組之有機酸產量明顯比對照組高出許多，顯示 GAs 所推薦之最適添加量對發酵期間原生菌之有機酸產量也有促進的影響。

### 參考文獻

- (1) A. C. Ouwehand, P. S. Kirjavaine, C. Shortt and S. Salminen: Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.*, 9: 43-52 (1999).
- (2) A. Bezkorovainy: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 (suppl): 399-405s (2001).
- (3) 蕭宏基：利用明膠與水溶性澱粉以低溫噴霧乾燥為膠囊化雙叉桿菌。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，台北，台灣 (2002)。

- (4) S. N. Saxena, B. K. Mital and S. K. Garg: Effect of casitone and fructose on the growth of *L. Acidophilus* and its survival during storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 21: 271-276 (1994).
- (5) A. Lourens-Hattingh and B. C. Viljoen: Yogurt as prebiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 11: 1-17 (2001).
- (6) R. I. Dave and N. P. Shah: Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.*, 81: 2804-2816 (1998).
- (7) T. Mattila-Sandholm, P. Mylärinen, R. Crittenden, G. Mogenesen, R. Fonden and M. Saarela: Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.*, 12: 173-182 (2002).
- (8) L. J. Fooks, R. Fuller and G. R. Gibson: Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.*, 9: 53-61 (1999).
- (9) W. H. Holzapfel and U. Schillinger: Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, 35: 109- 116 (2002).
- (10) P. V. S. Suresh, P. Venkateswara Rao and S. G. Deshmukh: A genetic algorithmic approach for optimization of surface roughness predication model. *Int. J. Machine Tool & Manufacture*, 42: 675-680 (2002).
- (11) M. Bielecka, E. Biedrzycka and A. Majkowska: Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.*, 35: 125-131 (2002).
- (12) G. E. P. Box and E.W. Behnkin: Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2: 455-475 (1960).
- (13) D. E. Goldberg: Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, MA, USA (1989).
- (14) P. V. S. Suresh, P. Venkateswara Rao and S. G. Deshmukh: A genetic algorithmic approach for optimiza-
- tion of surface roughness predication model. *Int. J. Machine Tool & Manufacture*, 42: 675-680 (2002).
- (15) 徐伯雄：基因演算法於飛行軌跡重建之應用。成功大學航空太空工程研究所碩士論文，台南，台灣 (1999)。
- (16) C. G. Vinderola and J. A. Reinheimer: Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria. *Fermented Dairy J.*, 10: 271-275 (2000).
- (17) 劉益忠：微膠囊化酒釀萃風味製劑之開發。國立台灣大學畜產學研究所博士論文，台北，台灣 (2002)。
- (18) T. Mitsuoka, H. Hidaka and T. Eida: Effect of oligosaccharides on intestinal microflora. *Die Nahrung*, 31: 427-436 (1987).
- (19) G. R. Gibson, R. A. Rastall and M. B. Roberfroid: Prebiotics In: *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. pp. 101-124. Kluwer, Academic Publish, Dordrecht, Netherlands (1999).
- (20) K. Hayakawa, J. Mizutani, K. Wada, T. Masai, I. Yoshihara and T. Mitsuoka: Effects of soybean oligosaccharides on human fecal flora. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 3: 293-303 (1990).
- (21) Y. H. Lee and S. Salminen: The coming of age of probiotics. *Trends in Food Sci.*, 6: 241-245 (1995).
- (22) L. T. Axelsson: Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria* (S. Salminen and A. von Wright Eds.), pp.1-63. Marcel Dekker, NY, USA (1993).
- (23) H. W. Molder, R. C. McKellar and M. Yaguchi: Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Inst. Food Sci. Technol. J.*, 23: 29-41 (1990).
- (24) G. Urbach: Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.*, 5: 877-903 (1995).