

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫執行進度報告

## 含雙叉桿菌乳酸菌發酵豆奶產品之製備

計畫編號：NSC89-2313-B-002-080

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

報告日期：89年5月24日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

### 一、中文摘要

本研究乃探討含雙叉桿菌及乳酸菌發酵豆奶產品之製造，比較不同雙叉桿菌及乳酸菌在豆奶乳酸發酵過程中之存活，以瞭解其對發酵豆奶成分之影響。

結果顯示：雙叉桿菌單獨培養的生長情形以 *B. infantis* 之情況較佳，48 小時後菌數可達 8.12 log cfu/ml；乳酸菌單獨培養時，*L. acidophilus* 經 48 小時培養後菌數為 7.17 log cfu/ml，然 *L. bulgaricus* 卻只有 6.48 log cfu/ml，*S. thermophilus* 則生長快速，但經 16 小時之發酵即致豆奶發生過度酸化 (late-acidification) 現象。混合雙叉桿菌及乳酸菌發酵的結果，*B. infantis*、*B. longum* 分別與 *L. acidophilus* 共同培養時，*L. acidophilus* 於 32 小時後菌數達到最高值，分別為 7.63 log cfu/ml 和 7.07 log cfu/ml，而其後雙叉桿菌則只有些微的成長。雙叉桿菌與 *L. bulgaricus* 共同培養時，後者並無生長跡象。雙叉桿菌與 *S. thermophilus* 於豆奶中發酵時，*S. thermophilus* 於 24 小時即可產生最多的菌數。加糖至發酵豆奶中使糖度達 15° Brix 後，貯存在 25 或 5 下，並另以無菌水取代糖溶液作為對照組進行試驗，過程中豆奶之 pH 值均隨貯存時間之延長而呈下降之現象。在 25 貯存者，pH 下降之幅度，高於在 5 貯存者，而其中又以添加有糖液者，pH 下降之幅度最大。菌數減少情形亦以在 25 貯存者多於在 5 貯存者，且加糖組又多於未加糖組。然而經 5 貯存十天者，無論加糖或未加糖的組別，其菌數均能維持在 10<sup>6</sup> CFU/ml 以上，故均達可

接受之標準而對人體健康有益。然而四組在試驗過程中，無論在搭配何種雙叉桿菌發酵，乳酸菌變化情形均相似，故雙叉桿菌似乎不影響乳酸菌之生長，然而雙叉桿菌卻因乳酸菌產酸的結果，特別是在 25 加糖處理的情況下，活菌數大幅下降。發酵過程中豆奶之醋酸和乳酸含量隨著發酵時間之延長而增加，其中由於乳酸菌在後期產生乳酸，使乳酸增加量提高，然而降低豆奶 pH 值致雙叉桿菌無法存活而不能產生醋酸，故醋酸增加量減少。

關鍵字：雙叉桿菌、乳酸菌、發酵豆奶

### 二、緣由與目的

黃豆(Soybean, *Glycine max* L. Merrill) 是一種極具營養價值的豆科(Leguminose)植物產品，它含有大約 40%(N×6.25)的蛋白質及 25%的油脂。但黃豆中含極高脂氧化酵素(lipoxygenase)活性，常造成產品之豆臭味，而黃豆中含無法被人體消化道分解之寡糖，被腸道中能分泌 -galactosidase 的細菌加以水解而產生氣體，會造成消化不良、脹氣(Thananunkul *et al.*, 1976)。為了減少黃豆產品上述之缺點，利用乳酸菌來進行乳酸發酵乃被認為是可行途徑之一，這類產品除提供良好之營養價值外，亦如乳酸菌對牛乳之發酵一樣，進一步改進產品之風味與營養價值。

近幾年由於對於雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*) 在牛奶及奶製品中之生長及扮演功能之研究與之瞭解，在乳製品中添加雙叉桿菌乃為一種趨勢，因為如此可提供具良好風味之產品又能有益於使用者

之健康。雙叉桿菌有助於腸道中正常微生物族群之維持 Haenel (1970)指出喝母乳之嬰兒腸道中之腐敗菌如 *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Proteus* 等皆明顯的較少。此種拮抗機制，主要在於雙叉桿菌可透過生長代謝中產生的醋酸和乳酸，有效維持腸道保持在較低之 pH 值 (pH 約 5.5) (Barbero *et al.*, 1952)，而使病原性及腐敗性細菌不易生長。

過去吾人曾初步進行雙叉桿菌在豆奶中生長的探討，發現雙叉桿菌在豆奶中生長 2 天後菌數可增殖至約  $10^8$ /ml 且可分解黃豆造成食用者脹氣之寡糖類，復因乳酸菌有益人體健康且能幫助產生良好風味，故吾人企圖進行含雙叉桿菌乳酸菌發酵豆奶產品製造之探討。在此研究中將比較不同雙叉桿菌在豆奶乳酸發酵過程中之存活，以瞭解其對發酵豆奶成分之影響。

### 三、結果與討論

#### 1. 試驗菌株之篩選

在雙叉桿菌菌株選擇上，侯 (1997) 曾進行雙叉桿菌在豆奶中生長的探討，發現 *B. infantis* 及 *B. longum* 在豆奶中生長 48 小時後，菌數可增殖至  $10^8$  cfu/ml，且可分解黃豆造成食用者漲氣之寡醣類。*B. longum* 是嬰兒腸道、成人腸道及人體陰道等三個部位最常見之雙叉桿菌，而 *B. infantis* 則主要分佈在嬰兒腸道中 (Scardovi, 1986)。由於雙叉桿菌具有寄主專一性 (host-specificity)，因此，在選擇雙叉桿菌為膳食添加物時，應考慮其為人體來源 (human-origin) 之菌株，才能期待其能在人體腸道中成為優勢族群，進而維持菌叢生態相之平衡，發揮其機能性功能，故選擇此二株雙叉桿菌菌株為實驗菌株。至於乳酸菌菌株則擇取常用於發酵乳製造的 *Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus acidophilus* 及 *L. bulgaricus* 進行試驗。

將活化過的雙叉桿菌及乳酸菌菌株分別及混合接種至豆奶中，使其初始菌數為  $10^3$   $10^4$  cfu/ml，置於 37 °C 下培養 48 小時，定時取出，測其 pH 值及滴定酸度，並以平板計數法 (pour plate) 來測定其菌落

數。單獨培養時，雙叉桿菌的生長情形見圖一、二，顯示以 *B. infantis* 之情況較佳，48 小時後菌數可達  $8.12 \log$  cfu/ml，此與侯 (1997) 之結果相符。圖三 五則為乳酸菌的生長情形，*L. acidophilus* 經 48 小時培養後菌數為  $7.17 \log$  cfu/ml，然 *L. bulgaricus* 卻只有  $6.48 \log$  cfu/ml，*S. thermophilus* 則生長快速，但經 16 小時之發酵即致豆奶發生過度酸化 (late-acidification) 現象，故含 *S. thermophilus* 組不需太長的發酵時間。

混合雙叉桿菌及乳酸菌發酵的結果示於圖六 十一。圖六及圖七顯示，*B. infantis* *B. longum* 分別與 *L. acidophilus* 共同培養時，*L. acidophilus* 於 32 小時後菌數達到最高值，分別為  $7.63 \log$  cfu/ml 和  $7.07 \log$  cfu/ml，而其後雙叉桿菌則只有些微的成長。圖八及九顯示，雙叉桿菌與 *L. bulgaricus* 共同培養時，後者並無生長跡象，Wang 等 (1974) 指出，*L. bulgaricus* 在豆奶中經 48 小時培養後，並無生長情況，推測是豆奶中缺乏容易供其代謝利用的醣類所致；而 *L. acidophilus* 於豆奶中則能生長，且添加葡萄糖及乳糖至豆奶中可提高其生長速率。學者將 *B. bifidum* 加入含 *L. bulgaricus* 及 *S. thermophilus* 脫脂奶粉以製成發酵乳發現，*B. bifidum* 的存在會使 *L. bulgaricus* 較於未添加 *B. bifidum* 之發酵乳中所含菌數為低，推測是由於 *L. bulgaricus* 得不到某些兩者都需要之生長因子，或 *B. bifidum* 可能產生對其有害的代謝物所致 (Baig and Prasad, 1996)。故以雙叉桿菌和 *L. bulgaricus* 為菌叢時，可能由於營養需求及生長習性相近而發生競爭現象，致影響 *L. bulgaricus* 的生長，故 *L. bulgaricus* 並不合適與雙叉桿菌搭檔成為豆奶發酵的菌叢。由圖十及十一中發現，*B. infantis*、*B. longum* 分別與 *S. thermophilus* 於豆奶中發酵時，*S. thermophilus* 於 24 小時即可產生最多的菌數，分別為  $7.52 \log$  cfu/ml 及  $7.41 \log$  cfu/ml，又因快速產酸，豆奶的 pH 值較同時期其他混合菌所得結果為低，且此時雙叉桿菌菌數亦分別達到  $7.21 \log$  cfu/ml 及  $6.90 \log$  cfu/ml，其後只有些微的成長，表示雙叉桿菌與 *S. thermophilus* 可於

較短時間內完成豆奶發酵。

就生長速度而言，*B. infantis* 和 *L. acidophilus* 發酵 32 小時後，*B. infantis* 增加 3.72 log cfu/ml，*L. acidophilus* 增加 4.04 log cfu/ml；而 *B. longum* 和 *L. acidophilus* 發酵 32 小時後，*B. longum* 增加 3.39 log cfu/ml，*L. acidophilus* 增加 3.25 log cfu/ml，其量均較含 *B. infantis* 組者為少，而同樣的情形亦於兩株雙叉桿菌分別與 *S. thermophilus* 共同發酵時出現，故知 *B. infantis* 較 *B. longum* 能於豆奶中促進乳酸菌生長。

表一彙整了圖一 十一各發酵過程之關鍵時刻的菌數及 pH 值。以 *B. infantis*、*L. acidophilus* 及 *B. longum*、*L. acidophilus* 共同發酵豆奶，經過 32 小時後，乳酸菌數均達最高值，分別增加了 4.04 log cfu/ml 及 3.25 log cfu/ml，均較單獨以 *L. acidophilus* 發酵豆奶之同期增加量（2.65 log cfu/ml）為多，而雙叉桿菌則亦達到高且趨於穩定的菌量，其增加量也比個別單獨發酵豆奶之同時期為多。以 *B. infantis*、*S. thermophilus* 及 *B. longum*、*S. thermophilus* 進行發酵，經 24 小時 *S. thermophilus* 均達到最高菌量，其後雖雙叉桿菌仍有少許增加的菌量，但 pH 值已分別降至 4.37 與 4.22 以下，Rasic and Kurmann（1983）指出，當培養液 pH 值下降至 4.3 以下時，菌數會快速下降，是以其環境並不適和雙叉桿菌持續存活，故以 24 小時為發酵終點；此外，混合培養時個別菌株所增加的菌量亦較單獨培養時所增加者為高。

## 2. 發酵豆奶貯存時雙叉桿菌及乳酸菌之存活

發酵飲料之微生物組成和產品貯存時菌數穩定性之維持，是發酵產品之重要特性。Hammer and Marth（1984）提出在酸酪乳（yogurt）之安全貯存期間內，乳酸菌活菌數至少應維持在  $10^6$  CFU/ml 以上，才為可接受之產品標準。將雙叉桿菌與乳酸菌接種於豆奶進行適當之發酵後，將有無添加糖液之豆奶分別置於 5 及 25 下貯存 10 天，觀察雙叉桿菌、乳酸菌之存活及

pH 變化之情形，結果示於圖十二 十六。無論是在 25 或 5 下，發酵豆奶在貯存過程中其 pH 值均隨貯存時間之延長而呈下降之現象。在 25 貯存者，pH 下降之幅度，高於在 5 貯存者，而其中又以添加有糖液者，pH 下降之幅度最大。菌數減少情形亦以在 25 貯存者多於在 5 貯存者，且加糖組又多於未加糖組。然而經 5 貯存十天者，無論加糖或未加糖的組別，其菌數均能維持在  $10^6$  CFU/ml 以上，故均達可接受之標準而對人體健康有益。

圖十二為 *B. infantis* 與 *L. acidophilus* 共同發酵豆奶貯存 10 天的菌數變化及 pH 值變化結果。由（A）所代表的 *B. infantis* 菌數變化可發現，*B. infantis* 隨著貯存時間增加而減少，其中以 25 貯存並加糖處理者，10 天後減少 5.96 log cfu/ml，Rasic and Kurmann（1983）推測是由於 *L. acidophilus* 會產生過氧化氫，而雙叉桿菌無法生成分解過氧化氫的觸<sup>o</sup>，故為過氧化氫所直接毒害致死。圖十三為 *B. infantis* 與 *S. thermophilus* 共同發酵後貯存的結果，經 25 貯存並加糖處理後，由於 *S. thermophilus* 迅速產酸的結果，十天後 pH 值降為 3.56，而 *B. infantis* 於 8 天即無法測到菌數。圖十四為 *B. longum* 與 *L. acidophilus* 的貯存結果，與圖十二相較，*B. longum* 活菌數下降情形較 *B. infantis* 為明顯，於 5 貯存並加糖處理後，菌數十天後下降 6.28 log cfu/ml。圖十五為 *B. longum* 與 *S. thermophilus* 的貯存結果，以 25 貯存並加糖處理時，*B. longum* 於 6 天後即無法測得，其死滅的速度同與 *S. thermophilus* 一起發酵、貯存之 *B. infantis* 為快。

試驗過程中，無論搭配何種雙叉桿菌發酵，乳酸菌變化情形均相似，故雙叉桿菌似乎不影響乳酸菌之生長，然而雙叉桿菌卻因乳酸菌產酸的結果，特別是在 25 加糖處理的情況下，活菌數大幅下降。

## 3. 豆奶發酵過程中醋酸和乳酸含量之變化

雙叉桿菌最初被歸類為乳酸菌屬（*Lactobacillus* spp.），但由於其具特殊之代謝途徑，不同於乳酸菌之同型發酵

( homofermentative ) 與異型發酵 ( heterofermentative )，而將其自乳酸菌屬中分離出來，單獨成為一屬。理論上，雙叉桿菌利用其特殊之酵素 fructose-6-phosphate phosphoketolase ( F6PPK ) 將 2 莫耳之六碳糖發酵產生 3 莫耳之醋酸與 2 莫耳之乳酸，但有時雙叉桿菌會將丙酮酸經 phosphoroclastic splitting 分解成醋酸，使得培養液中醋酸與乳酸之比例大於 3/2，此種現象主要發生於菌體生長之對數期 ( Rasic and Kurmann, 1983 )。乳酸菌依產物的不同分為同型發酵及異型發酵，對醣類分解時前者僅產生乳酸，後者則除乳酸外還伴隨其他物質，而 *L. acidophilus* 及 *S. thermophilus* 均屬於同型發酵乳酸菌，故發酵時會產生大量乳酸。表二為所試之雙叉桿菌及乳酸菌發酵豆奶產生之醋酸和乳酸的含量及其比例。結果顯示，在不同發酵時間，混合菌株在豆奶中代謝所產生的醋酸和乳酸比值隨著發酵時間之延長而減少。*B. infantis* 和 *L. acidophilus* 共同發酵 8 小時後，其比值為 1.65，可能是期間 *B. infantis* 處於對數期且生長較 *L. acidophilus* 為迅速，菌體將丙酮酸經 phosphoroclastic splitting，產生較多之醋酸所致。其後乳酸菌生長，逐漸蓄積乳酸，致比例於 32 小時降至 1.40。*B. longum* 和 *L. acidophilus* 共同發酵 8 小時後，其比值為 1.95，較含 *B. infantis* 組為高，應是由於初期 *L. acidophilus* 生長不及含 *B. infantis* 組者；而 32 小時後其比值降為 1.02，較含 *B. infantis* 組為低，推測是由於 *B. longum* 所產生的醋酸較 *B. infantis* 為少所致。*B. infantis* 和 *S. thermophilus* 共同發酵之豆奶則因 *S. thermophilus* 快速產酸的結果，致比值自培養初期即無法超越 1.5，並於 32 小時降至 0.54 在 *B. longum* 和 *S. thermophilus* 共同發酵的豆奶也有相似的情況。

#### 四、參考文獻

1. 侯仁琬. 1997. 雙叉桿菌發酵豆奶之研究. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文. 台北市, 台灣。
2. Baig, M. I. and Prasad, V. 1996. Effect

- of incorporation of cottage cheese whey solids and *Bifidobacterium bifidum* in freshly made yogurt. J. Dairy Res. 63:467-473.
3. Barbero, G. J., Runge, G., Fischer, D., Crawford, M. N., Torres, F. E. and Gyorgy, P. 1952. Investigation the bacterial flora, pH and sugar content in the intestinal tract of infants. J. Pediat. 40:152-163.
4. Dave, R. I. and Shah, N. P. 1996. Evaluation of the media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. J. Dairy. Sci. 79:1529-1536.
5. Haenel, H. 1970. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. Amer. J. Clin. Nutr. 23:1433-1439.
6. Hammer, W.T. and Marth, E.H. 1984. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. J. Food Prot. 47:781-786.
7. Rasic, R.L. and Kurmann, J.A. 1983. Bifidobacteria and their role. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
8. Samona, A. and Robinson, R. K. 1994. Effect of yogurt culture on the survival of bifidobacteria in fermented milks. J. Soc. Dairy Technol. 47:58-60.
9. Scardovi, V. 1986. The genus *Bifidobacterium*. In " Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. " ed. J.G. Holt. Vol. 2, p.1418-1434. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, Md.
10. Tamime, A. Y. Marshall, V. M. E. and Robinson, R. K. 1995. Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria. J. Dairy Res. 62:151.
11. Tamime, A. E. and Robinson, R. K. 1985. Yogurt: Science and Technology. Oxford: Pergamon Press.
12. Wang, H. L., Kraidej, L. and Hesseltine, C. W. 1974. Lactic acid fermentation of soybean milk. J. Milk Food Technol. 37

表一、雙叉桿菌與乳酸菌在豆奶中之 pH 值及菌數變化情形

Table 1. pH value and colony counts of *Bifidobacterium* spp. and lactics growing in soymilk

Micro-organisms	Initial range		After 24 h		After 32 h	
	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	CFU/ml
<i>B. infantis</i>	6.50	3.61 ± 0.06	6.33	6.88 ± 0.34	5.57	7.23 ± 0.12
<i>B. longum</i>	6.50	3.61 ± 0.06	6.08	6.32 ± 0.24	6.04	7.26 ± 0.12
<i>L. acidophilus</i>	6.50	3.34 ± 0.03	6.45	5.97 ± 0.13	6.44	5.99 ± 0.14
<i>S. thermophilus</i>	6.50	3.63 ± 0.10	3.95	7.88 ± 0.07	3.88	7.69 ± 0.07
<i>B. infantis</i> + <i>L. acidophilus</i>	6.50	3.92 ± 0.17 3.59 ± 0.22	5.98	7.57 ± 0.24 7.36 ± 0.21	5.59	7.64 ± 0.03 7.63 ± 0.29
<i>B. infantis</i> + <i>S. thermophilus</i>	6.50	3.01 ± 0.10 3.10 ± 0.01	4.45	7.21 ± 0.19 7.52 ± 0.06	4.37	7.20 ± 0.20 7.39 ± 0.08
<i>B. longum</i> + <i>L. acidophilus</i>	6.50	3.86 ± 0.13 3.82 ± 0.24	6.24	6.94 ± 0.39 6.98 ± 0.13	6.07	7.25 ± 0.37 7.07 ± 0.04
<i>B. longum</i> + <i>S. thermophilus</i>	6.50	3.02 ± 0.03 3.03 ± 0.09	4.34	6.90 ± 0.09 7.41 ± 0.04	4.22	6.94 ± 0.08 7.30 ± 0.17

表二、利用雙叉桿菌和乳酸菌發酵豆奶產生之醋酸和乳酸之含量變化

Table 2. Contents of acetic acid and lactic acid in soymilk fermented with *Bifidobacterium* spp. and lactics

Fermentation time (h)	Content (mmol/L)		Acetic acid/ Lactic acid
	Acetic acid	Lactic acid	
—Fermented with <i>B. infantis</i> and <i>L. acidophilus</i> —			
8	15.41 ± 0.52 d	9.33 ± 0.44 d	1.65
16	18.31 ± 1.27 c	12.80 ± 0.86 c	1.43
24	18.85 ± 0.42 b	13.34 ± 0.09 b	1.41
32	19.01 ± 0.08 a	13.56 ± 0.38 a	1.40
—Fermented with <i>B. infantis</i> and <i>S. thermophilus</i> —			
8	11.32 ± 0.21 b	9.99 ± 0.89 d	1.13
16	11.54 ± 0.61 b	13.45 ± 0.38 c	0.86
24	13.84 ± 0.14 a	21.98 ± 0.92 b	0.63
32	13.93 ± 0.45 a	25.78 ± 0.02 a	0.54
—Fermented with <i>B. longum</i> and <i>L. acidophilus</i> —			
8	10.08 ± 0.32 c	5.52 ± 0.06 d	1.95
16	12.02 ± 0.72 b	6.47 ± 0.39 c	1.86
24	12.11 ± 0.42 b	7.47 ± 0.72 b	1.62
32	12.36 ± 0.55 a	12.15 ± 0.36 a	1.02
—Fermented with <i>B. longum</i> and <i>S. thermophilus</i> —			
8	11.33 ± 0.33 c	10.08 ± 0.20 d	1.12
16	11.68 ± 0.29 c	11.17 ± 0.74 c	1.05
24	12.64 ± 0.17 b	12.15 ± 0.30 b	1.04
32	13.14 ± 0.58 a	13.84 ± 0.17 a	0.95

\*Values in the same column with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )