

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：雙叉乳酸桿菌之抗氧化性及在克弗爾
發酵乳之應用研究

計畫英文名稱：Antioxidative activity of bifidobacteria
and its application in kefir fermentation

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89-2313-B-002-251-

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：游若菡教授

計畫參與人員：周延芳碩士班研究生

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中華民國九十年十二月

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：雙叉乳酸桿菌之抗氧化性及在克弗爾發酵乳之應用研究
計畫英文名稱：Antioxidative activity of bifidobacteria and their application in kefir fermentation

計畫編號：NSC89-2313-B-002-251-

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：游若萩教授 國立臺灣大學食品科技研究所

電子信箱：yurc@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

本研究探討以雙叉桿菌與克弗爾粒為菌元所生產之克弗爾發酵乳，在克弗爾發酵期間雙叉桿菌、乳酸球菌、白色念珠菌及酵母菌的生長，及雙叉桿菌對克弗爾品質與抗氧化能力之影響。結果顯示雙叉桿菌可與克弗爾粒在 21 下共同發酵，雙叉桿菌菌數可達 $10^7\sim 10^8$ CFU/ml，其中以 *B. longum* 及 *B. adolescentis* 菌數為最高。*B. longum* 不會影響克弗爾粒中之菌相及酒精產量。此外，接種雙叉桿菌之處理組較控制組可縮短發酵時間，其最終可滴定酸度為 1.6-1.7%，可揮發性酸度為 0.038-0.047%。雙叉桿菌在 30 及 37 生長雖較佳，但因其快速生長導致克弗爾發酵乳產生不良風味且在 pH4.7 即造成乳清分層現象。

克弗爾菌體之胞內萃出物具有抑制抗壞血酸自氧化作用、螯合亞鐵、銅離子及清除羥自由基之能力。接種雙叉桿菌製備之萃出物雖無法抑制抗壞血酸自氧化作用，但可增加克弗爾螯合亞鐵、銅離子及清除羥自由基能力。接種雙叉桿菌之牛乳發酵液普遍較 MRS 發酵液之抗氧化力高，兩者皆在抑制抗壞血酸自氧化作用、螯合銅離子及清除羥自由基能力方面顯示具有抗氧化能力。在螯合亞鐵離子方面，以 MRS 培養液培養之發酵液，沒有螯合亞鐵離子之能力，但牛奶之發酵液則有螯合亞鐵離子能力。

關鍵詞：克弗爾、抗氧化、雙叉乳酸桿菌

Abstract

This study was conducted to investigate the growth of bifidobacteria, lactococci,

leuconostocs and yeast during kefir fermentation, using bifidobacteria and kefir grain as starters. The influence of bifidobacteria to the quality and the antioxidative property of kefir were also investigated.

Results indicated that bifidobacteria could co-cultivate with kefir grain at 21 and their cells numbers were from $10^7\sim 10^8$ CFU/ml, *B. longum* and *B. adolescentis* gave the highest cell numbers. *B. longum* did not affect the original microbial flora and ethanol content of kefir. Furthermore, the fermentation time of bifidobacteria treatments were shorter than control, titratable acidity of final fermentation broth were from 1.6 to 1.7%, volatile acidity were from 0.038 to 0.047%. Bifidobacteria grew rapidly at 30 and 37 ; however, the higher growth rate caused off-flavor and whey separation of kefir when fermentation pH reached to 4.7.

Antioxidative property of kefir indicated that intracellular extracts of kefir flora could inhibit ascorbate autooxidation, metal ion chelation for Fe^{+2} and Cu^{+2} , and scavenge of free hydroxyl radical. Bifidobacteria inoculation could increase chelation ability for Fe^{+2} and Cu^{+2} , hydroxyl radical scavenging ability, but couldn't increase the inhibition to ascorbate autooxidation. Milk fermentation broth inoculation with bifidobacteria showed higher antioxidative property than MRS broth. Inhibition rates of ascorbate autooxidation, Cu^{+2} chelation and hydroxyl radical scavenge were also found in milk and MRS fermentation broth. The supernatant obtained from MRS broth didn't show Fe^{+2} chelating ability.

Keywords: kefir, antioxidative property, bifidobacteria

二、緣由與目的

傳統發酵乳飲料—克弗爾(kefir)，源於西元 1300 年之北高加索區，為著名的酒精發酵乳，主要由乳酸菌與酵母菌發酵牛乳製成，除具有一般發酵乳的風味外，更含有微量酒精與二氧化碳所產生之獨特口感。其具有預防病原菌感染、抑制腸內有害菌、促進腸的蠕動、促進胃液分泌、提高肝功能、降低膽固醇、溶解血栓、緩和神經壓力及抑制癌細胞等功效，因而於日常生活中被廣泛飲用。

隨著現代人飲食習慣改變，尤其是對於脂肪的攝取量逐日遽增，造成體內自由基過多，引起老化與慢性病的發生。近年來則發現許多乳酸菌具有抗氧化功能，而克弗爾是由乳酸菌與酵母菌共同發酵製成，有關其抗氧化之功效值得研究。乳酸菌中又以雙叉桿菌的抗氧化效果較顯著，且其為人體之益生菌，所以本研究嘗試將其與克弗爾粒(kefir grain)共同發酵，以期增強克弗爾之抗氧化及健康功效。此外，雙叉桿菌發酵過程中會產生醋酸(乳酸：醋酸 = 2：3)，使發酵產品產生不良風味，因此如將雙叉桿菌與其他乳酸菌共同發酵當可減少風味不佳之問題。

本研究目的在探討接種雙叉桿菌於克弗爾發酵期間，雙叉桿菌與其他克弗爾中菌叢間的消長與存活情形，雙叉桿菌對克弗爾品質及抗氧化性質的影響。

三、結果與討論

一、測定接種雙叉桿菌於克弗爾發酵期間之微生物菌數

本實驗探討雙叉桿菌與克弗爾粒共同發酵對克弗爾微生物菌數的影響。結果顯示雙叉桿菌在 30 及 37 生長最佳，在 21 則生長較差。在 30 及 37 下，*B. adolescentis*、*B. infantis* 及 *B. longum* 最終菌數為最高，*B. bifidum* 則最低，但其菌數皆到達 10^7 - 10^8 CFU/ml 左右。在 21 則雙叉桿菌普遍生長不佳，但以 *B. longum* 菌數最高，達 10^8 CFU/ml 左右；*B. adolescentis*、*B. infantis* 次之，菌數在 10^7 - 10^8 CFU/ml 左右；*B. bifidum* 則最低，為 10^7 CFU/ml 左右。37 及 30 分別在第 20 小時及第 25 小時菌數達到最大值，21 則在第 30 小時菌數才達到最大值。而在 21、30 及 37 的培養下，雙叉桿

菌在 30 及 37 的最終菌數較高，在 21 的最終菌數則較低。

二. 克弗爾品質之測定

本實驗探討以雙叉桿菌與克弗爾粒為菌元對克弗爾品質的影響。在 21 下，控制組之 pH 值較接種雙叉桿菌的處理組為高，可滴定酸度則較低。在可滴定酸度方面，處理組之最終可滴定酸度大約為 1.6-1.7%，*B. longum* 的酸度最高，*B. bifidum*、*B. adolescentis* 與 *B. infantis* 則較低。在 30 及 37 下，克弗爾之產酸趨勢大致上與 21 相同，控制組之 pH 值皆較接種有雙叉桿菌的處理組為高，可滴定酸度則較低。但在 30 及 37 下，雙叉桿菌產酸的能力似乎較 21 強，此乃因雙叉桿菌在 30 及 37 生長較好所致。在 30 下，接種不同雙叉桿菌之處理組 pH 值無明顯差異，最終 pH 值為 4.5-4.6；但在可滴定酸度方面則以 *B. longum* 及 *B. bifidum* 的酸度較高，其最終酸度為 1.2% 及 1.1%。在 37 下，pH 值較低的為 *B. longum* 及 *B. bifidum*，最終 pH 值為 4.3；但酸度則以 *B. infantis* 1.5% 較高，*B. longum* 及 *B. bifidum* 為 1.4% 次之，*B. adolescentis* 則最低為 1.1%。由此可知，溫度越高隨著菌之生長越快產酸能力也越快，此外也發現 30 及 37 之克弗爾不管有無雙叉桿菌參與發酵其皆會產生不良的風味，使克弗爾品質下降。

比較在 21、30 及 37 下，雙叉桿菌與克弗爾粒共同發酵之處理組，其產酸會較控制組快。其可能原因有二，一為酸是由雙叉桿菌產生的；另一原因為處理組之起始菌數與控制組不同，這是因為處理組接種雙叉桿菌 10^5 - 10^6 CFU/ml 的關係，使得處理組的發酵時間縮短較快到達發酵終點 pH4.5-4.6，而控制組則仍未到達發酵終點所致。此外也發現克弗爾在 30 及 37 發酵時，在 pH4.7 左右就有乳清分層的現象，且溫度越高分層現象越嚴重。

酒精為克弗爾風味之一，因其可產生微量酒精，本試驗因而探討接種雙叉桿菌後對克弗爾酒精產量之影響。結果顯示 *B. longum* 的接種並不會影響酵母菌的生長，最初控制組之酵母菌長得較處理組快，但最終酵母菌菌數則無差異，其最終菌數約為

10⁶-10⁷CFU/ml 左右。

克弗爾中之酒精主要是由酵母菌生產，雖然 *Leuconostocs* 利用乳糖時也會產生酒精，但在共同代謝乳糖與檸檬酸下，*Leuconostocs* 無法產生酒精。在本實驗中發現接種 *B. longum*，對克弗爾的酒精產量並不會造成影響，其最終酒精含量為 2.7g/L 左右。又本實驗中也發現隨著酵母菌的生長，克弗爾的酒精產量亦隨之增加，尤其是在發酵末期酒精含量增加較快。

三. 抗氧化活性

(1) 抑制抗壞血酸自氧化能力

本實驗則利用抗壞血酸自氧化(ascorbate autooxidation)系統進行抗氧化測試。結果顯示以牛乳培養的菌體胞內萃出物對抗壞血酸自氧化抑制力(16.5-18.2%)明顯較以 MRS 培養液培養者(28.3-30.8%)為低，接種不同雙叉桿菌之處理組間則不具顯著性差異。有可能是因為以牛乳培養的樣品其沈澱物為凝乳，而所萃出的胞內菌體萃出物則是將此凝乳以超音波振碎所製成的，造成萃出物內有許多微小懸浮物而影響實驗值。所以，為了去除牛乳中凝乳所造成的誤差，另外以 MRS 培養液培養，以確認菌體是否真的具有抑制抗壞血酸自氧化能力。結果顯示克弗爾(控制組)本身即具有抑制抗壞血酸自氧化能力(28.3%)，另外接種雙叉桿菌之處理組實驗值與控制組無顯著性差異，但接種 *B. adolescentis* 之處理組其抑制抗壞血酸之自氧化作用明顯為所有樣品中之最高者，其抑制力達 30.8%。

在測定克弗爾發酵液抑制抗壞血酸自氧化能力方面，則是以牛乳發酵液的抑制能力較高(16.0~20.1%)，這是因為其含有許多蛋白質或其他物質具有抗氧化能力所致。而以 MRS 培養液的樣品中，證實雖然克弗爾本身具有抑制抗壞血酸自氧化能力(7.12%)，但雙叉桿菌的接種可明顯提高其發酵液的抗氧化活性，其中以 *B. adolescentis* 及 *B. bifidum* 能力最高分別為 11.4%及 11.1%，*B. infantis* 次之，*B. longum* 則與控制組無顯著差異。此外，不管有無接種雙叉桿菌，克弗爾皆表現出抑制能力，而根據上述實驗條件推論，其抑制能力的表現應是克弗爾菌體胞內萃出物及發酵液具有清除或降低溶液中溶

氧而抑制抗壞血酸自氧化的進行。

(2) 金屬離子螯合能力

研究指出雖有多種金屬離子可促進氧化反應但其中以鐵、銅離子最具代表性，因此在金屬離子螯合能力的測試以此二者為研究材料。

本試驗首先針對亞鐵離子螯合力進行測試，在菌體胞內萃出物中，以牛乳培養之樣品螯合亞鐵離子能力明顯高於 MRS 培養液者。這是因為牛乳中含有各式各樣的蛋白質，其中一種為人熟知的乳鐵蛋白(lactoferrin)是種運鐵蛋白(transferrin)，具有鐵離子結合能力的醣蛋白。乳鐵蛋白為人體攝食後可在小腸腔中藉由結合鐵離子的能力，幫助腸細胞吸收鐵離子，同時也可排除因催化自由基反應生成的多餘鐵離子，所以造成以牛乳培養者測出的數值較高之原因。此外，克弗爾菌體胞內萃出物本身亦具有螯合亞鐵離子能力，而接種雙叉桿菌可大幅提高其螯合亞鐵離子能力，其中又以 *B. adolescentis*、*B. infantis* 及 *B. longum* 能力最強。Kot(1995)發現雙叉桿菌可將亞鐵離子轉至細胞內，並經由胞內鐵氧化酶(ferroxidase)轉成 Fe(OH)₃，以保持細胞內的亞鐵離子濃度較低而有利於細胞外亞鐵離子進入細胞內。至於克弗爾發酵液對亞鐵離子的螯合能力方面，則以 MRS 培養液者並未測得有此能力，但在以牛乳培養者則有測得，且接種雙叉桿菌之處理組(60-82.0ppm)與控制組(58.4ppm)有顯著差異。

銅離子螯合能力試驗結果，不管是在菌體胞內萃出物或發酵液方面，牛乳培養者與 MRS 培養液培養者並無顯著差異，所以，牛乳以此方法測試，可能並不含銅離子螯合物質。其主要可能是來自菌體內部，或菌體代謝物所具有的能力。以 MRS 培養液培養之菌體胞內萃出物及發酵液處理組中，可發現雙叉桿菌可提高克弗爾的螯合銅離子能力，其中在萃出物以 *B. adolescentis* 及 *B. longum* 能力較強，發酵液則是以 *B. adolescentis*、*B. bifidum* 及 *B. infantis* 較強。

(3) 對羥自由基之清除能力

克弗爾對羥自由基的清除能力以同樣具有清除能力的尿酸作為標準物質表示，以牛乳培養者胞內萃出物清除能力較高(4.23-4.57 mM)，MRS 培養液培養的較低(0.93-2.02

mM)。在發酵液方面也有相同的結果，牛乳發酵液之清除能力範圍由 2.1-3.63 mM，MRS 培養液發酵液則為 0.38-0.45 mM。這可能是因為牛乳內許多蛋白質具有抗氧化能力所致。接種雙叉桿菌於克弗爾中，不管是以牛乳或 MRS 培養液培養及胞內萃出物或發酵液方面，大致上 *B. longum* 及 *B. adolescentis* 處理組的羥自由基的清除能力均為較高者，且與控制組有明顯差異。而胞內萃出物及發酵液為一混合物，無法得知何種物質發揮捕捉羥自由基的能力。

(4) 還原力

菌體胞內萃出物及發酵液之還原力的測定以半胱氨酸(cysteine)為標準物，實驗結果發現在胞內萃出物方面，以牛乳為基質者所測出的值較 MRS 培養液者為高，其範圍分別為 89.3-114 μ 及 57.6-89.4 μ 。這有可能是因為牛乳中的許多胺基酸、 ϕ 及蛋白質具有還原力的關係。胞內萃出物之還原力中又以 *B. longum*、*B. adolescentis* 及 *B. infantis* 為較高，且可明顯的提高克弗爾的還原力，而克弗爾本身亦具還原力。

在發酵液方面則是以 MRS 培養液之還原力較牛乳者高，但接種不同雙叉桿菌之處理組間卻無明顯差異。所以對未發酵新鮮之 MRS 培養液的還原力進行探討，結果發現其測值高達 586 μ ，這有可能是 MRS 培養液本身即具有還原力，而至於 MRS 培養液的還原力到底是不是克弗爾菌體所產生的就無法得知，因為 MRS 培養液本身的測值即太高，易造成測出的吸光值產生誤差，即使克弗爾菌體所產生的物質具有還原力也不易測出。在牛乳方面也具有相同情形，但礙於所使用的方法無法對原有牛乳進行檢測，因為未發酵牛乳呈混濁狀，易造成實驗誤差，所以在此沒有進一步做探討。雖然克弗爾菌體所產生的物質到底具不具有還原力在此無法測出，但可以肯定的是克弗爾牛乳發酵液具有還原力。

同其他生物體一般，克弗爾菌體胞內物及發酵液含有多種抗氧化劑。實驗結果指出，克弗爾菌體胞內萃出物及發酵液均表現出還原力的存在，而此種還原力的表現應是體內抗氧化劑及蛋白等綜合表現的結果。

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. 林慶文。1998。農業推廣手冊 44—克弗爾與健康 p.9。國立台灣大學農學院農業推廣委員會印行。台北，台灣。
2. Shiomo, M. K., Sasaki, K., Murofushi, M. and Aibara, K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 35:75-80.
3. Lin, M. Y. and Yen, C. L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47:1460-1466.
4. 黃建榕。1997。 *Bifidobacterium* 屬乳酸菌試製酸酪乳之研究一(Ø)酸酪乳風味成分之分析⁽¹⁾。 *畜產研究*。30 (2) : 135-141。
5. Clark, P. A. and Martin, J. H. 1994. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: - Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. *Cult. Dairy Prod. J.* 29(3): 18-21.
6. Mishra, O. P. and Kovachich, G. B. 1984. Inhibition of the autooxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyrium*, *Megasphaera elsdenii*, and *Escherichia coli*. *Life Sci.* 35:849-854.
7. Yamauchi, R., Goto, Y., Kato, K. and Ueno, Y. 1984. Prooxidant effect of dihydroxyacetone and reducing sugars on the autooxidation of methyl emulsions. *Agric. Biol. Chem.* 48:843-848.
8. Oyaizu, M. 1986. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35: 771-775.
9. Tabatabaie, T. and Floyd, R. A. 1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 314:112-119.
10. Gutteridge, J. M. C. 1987. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and

- benzoate. *Biochem. J.* 243:709-714.
11. 沈明來。1993。試驗設計學。九州圖書公司。台北市，台灣。
 12. Wanasundrara, U., Amarowicz, R. and Shahidi F. 1994. Isolation and identification of an antioxidative component in canola meal. *J. Agric. Food Chem.* 420:1285-1290.
 13. Benkerroum, N., Misbah, M., Sandine, W. E. and Elaraki, A. T. 1993. Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2):607-609.
 14. Husain, S. R., Gillard, J. and Gillard, P. 1987. -Tocopherol prooxidant effect and malondialdehyde production. *JAOCs.* 64:109-111.
 15. Rashid, M. H., Kato, F., Murata, A. and Kondo, W. 1993. Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus sojae* K. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:935-939.
 16. Buettner, G. R. 1990. Use of ascorbate as test for catalytic metals in sample buffers. *Methods Enzymol.* 186:125-127.
 17. Halliwell, B. and Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715S-725S.
 18. Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidant : a personal view. *Nutrition Reviews.* 52: 253-265.
 19. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-4.
 20. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Clarendon Press, Inc. Oxford, England p50.
 21. Halliwell, B., Murcia, H. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in *vivo* : what they do and how they work. *CRC Crit Rev in Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
 22. Pokorny, J. 1991. Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci. Technol.* 2: 223-227.
 23. Kot, E., Furmanov, S. and Bezkorovainy, A. 1995. Accumulation of Iron in Lactic acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Food Sci.* 60(3): 547-550.
 24. Gutteridge, J. M. C. Richmond, R. and Halliwell, B. 1979. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 184:469-472.
 25. Garnder, H. W. 1995. Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. Enzymic reactions compared with nonenzymic. *J. Agric. Food Chem.* 23:129-136.