

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶之抗氧化活性

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-309-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：周正俊

計畫參與人員：王宜婕

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 12 月 18 日

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-002-206

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

報告日期：90年10月12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之存活及對發酵豆奶成分之影響，並將發酵豆奶進行乾燥後觀察菌種的存活情形。結果顯示：乳酸菌中，*L. bulgaricus* 並不適合與所測試的雙叉桿菌進行豆奶發酵。對 *S. thermophilus* 及其混合雙叉桿菌發酵情況而言，最適的發酵時間是 24 小時；而 32 小時的發酵時間對 *L. acidophilus* 組是最有利的情況。在豆奶成分變化情況中，添加雙叉桿菌可提高乳酸菌發酵豆奶的寡糖利用率，並減少蔗糖被分解的情形，而寡糖經菌種水解會增加基質中單糖的含量。添加雙叉桿菌可提高乳酸菌發酵豆奶之醋酸的產量，但乳酸含量會降低。豆奶經乳酸菌發酵後粗蛋白質含量增加情形，以 *S. thermophilus* 組最多，此時雙叉桿菌的參與並沒有顯著提高其量；但 *L. acidophilus* 則因加入雙叉桿菌而顯著提高豆奶之粗蛋白含量。加入雙叉桿菌後，豆奶中游離胺基酸的含量比乳酸菌單獨發酵時多。相較於乳酸菌發酵豆奶，與雙叉桿菌一起發酵後所測試的維生素 B 群含量皆呈現增加的情況。發酵豆奶經冷凍乾燥後乳酸菌或雙叉桿菌的活菌數亦均較噴霧乾燥後高，其中以 *S. thermophilus* 和 *B. longum* 混合發酵後乾燥之存活情形最佳，分別為 75.12% 和 51.89%。

關鍵字：雙叉桿菌, 乳酸菌, 發酵豆奶, 乾燥

二、緣由與目的

黃豆是一種極具營養價值的豆科植物

產品，但含極高脂氧化酵素活性，常造成產品之豆臭味，且含無法被人體消化道分解之寡糖，被腸道中細菌加以水解產生氣體而造成脹氣(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，這類產品可改進產品之風味與營養價值。

近幾年由於對於雙叉桿菌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。

吾人曾初步進行雙叉桿菌在豆奶中生長之探討，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，並進一步乾燥成粉末產品，觀察其中活菌數目之變化，評估其作為膳食補助品之效益。

三、結果與討論

1. 試驗菌株之篩選

表一是在豆奶中單獨或混合接種乳酸菌或雙叉桿菌發酵期間 pH 和可滴定酸度的變化情形。期間內因發酵產酸，酸度隨者 pH 減少而增加，在所測試的乳酸菌中，單獨以 *S. thermophilus* 發酵可產生大量的酸，經 48 小時發酵後，酸度由 0.06% 升為 0.43%。與 Mital 和 Steinkraus (1974) 結果相似地，*L. bulgaricus* 在豆奶中產酸量最少。此外，與接種 *B. longum* 相較，豆奶中含 *B. infantis* 時，其 pH 較低且酸度較高，此與 Chou 和 Hou (2000) 結果相符。

Samona 等人 (1996) 以酸乳酪菌株和雙叉桿菌一起發酵牛奶發現，發酵的菌種可以反應出產酸的情形，即菌種間存在程度不同的影響力。表一中，當豆奶以不同的雙叉桿菌和乳酸菌發酵後，出現不同的 pH (6.13~4.19) 和酸度 (0.09~0.25%)，其中，以 *B. longum* 和 *L. bulgaricus* 共同發酵時，會出現最低的酸度和最高的 pH 值，當與雙叉桿菌共同培養時，*S. thermophilus* 組的產酸量會較其單獨發酵時低。同時接種雙叉桿菌和 *S. thermophilus* 的豆奶在 24 小時後即可獲得最大的酸度，另一方面，接種雙叉桿菌和 *L. acidophilus* 之豆奶在 32 小時後酸度達到最大值。

圖一與圖二為豆奶發酵期間雙叉桿菌和乳酸菌的生長行為。雙叉桿菌單獨或混合乳酸菌接種於豆奶中的生長情形與 Chou 和 Hou (2000) 相似，*B. infantis* 和 *B. longum* 可於豆奶中生長，然而 *B. infantis* 生長較 *B. longum* 為佳。經 48 小時培養後，*B. infantis* 的數量增至 8.12 log CFU/ml，然而 *B. longum* 最後菌數約為 7.27 log CFU/ml。另外，*B. infantis* 及 *B. longum* 共同與乳酸菌培養時，雙叉桿菌最後菌數因乳酸菌和雙叉桿菌菌種而異，雖然在前 8 小時培養中，單獨以 *B. infantis* 培養並無顯著的生長情形，但是與乳酸菌共同發酵時，菌數增加 1.05~1.24 log CFU/ml；48 小時後，混合乳酸菌生長的 *B. infantis* 之最後菌數均較單獨培養時為高，其中以和 *L. bulgaricus* 共同培養者為最。混合乳酸菌的培養中，*B. longum* 的生長型態和單獨培養時很相近，經 24 小時後菌數以混合培養者較高，

Matsuyama 等人 (1992) 指出，*B. longum* 與 *L. acidophilus* 在豆奶中同時培養 20 小時後之菌數較單獨培養時高；然而在本研究中，發酵末期時混合乳酸菌培養的雙叉桿菌只有 6.40~6.87 log CFU/ml，較單獨培養時 7.27 log CFU/ml 少。

圖二為乳酸菌單獨培養於豆奶時表現出不同程度的生長情況，在所測試的乳酸菌中，*L. acidophilus* 經 48 小時發酵之菌數最高，約 7.17 log CFU/ml，而 *L. bulgaricus* 最低，約 6.48 log CFU/ml，這與 Mital 和 Steinkrans (1974) 及 Murti 等人 (1993) 結果相同，推測是由於 *L. bulgaricus* 無法利用豆奶中最主要的糖--蔗糖所致 (Mital and Steinkrans 1974; Pinthong et al., 1980)。*S. thermophilus* 單獨培養初期於豆奶中生長快速且於 24 小時達其菌量最大值，之後菌數下降。Murti 等人 (1993) 報告中，雙叉桿菌在 16 小時發酵期內誘發酸乳酪菌株的最大生長，而本研究發現乳酸菌的生長受雙叉桿菌影響的程度，因乳酸菌菌種而異。*L. acidophilus* 與雙叉桿菌混合培養時表現與單獨培養時相同的生長型態，但混合培養時 *L. acidophilus* 菌量之最大值較高。經混合培養 24 小時後，配合著最大產酸量，*S. thermophilus* 和雙叉桿菌出現最大菌量。此外，混合培養時 *S. thermophilus* 之菌量最大值與單獨培養時不相上下，而混合 *B. infantis* 發酵的豆奶經 32 和 40 小時，*B. infantis* 菌數分別為 7.64 和 7.62 log CFU/ml，兩者之間並無顯著性差異 ($p < 0.05$)，但 *S. thermophilus* 菌量則於 32 到 40 小時內顯著減少。

雖然 *L. bulgaricus* 單獨培養時可於豆奶中生長，但與 *B. longum* 或 *B. infantis* 共同培養 8 小時就測不到其之存在，Murti 等人 (1993) 亦有相似的結果，因此在豆奶中，雙叉桿菌對 *L. bulgaricus* 有負面的影響。這除了與雙叉桿菌會競爭豆奶中的營養成分之外，*L. bulgaricus* 死亡也可能受到雙叉桿菌所產生的醋酸抑制所致。

綜合以上得知，*L. bulgaricus* 並不適合與所測試的雙叉桿菌進行豆奶發酵。對 *S. thermophilus* 及其混合雙叉桿菌發酵情況

而言，最適的發酵時間是 24 小時；而 32 小時的發酵時間對 *L. acidophilus* 組是最有利的情況。

2. 雙叉桿菌對乳酸菌發酵豆奶之成分影響

表二在醣類的變化情形中，乳酸菌單獨發酵時，寡醣的減少量以 *S. thermophilus* 組較多，且與雙叉桿菌一起發酵後，減少情形更顯著，尤以搭配 *B. infantis* 者為優，棉實糖減少 0.62 mmol/L 而水蘇四糖減 4.11 mmol/L，此乃因雙叉桿菌具有高活性的 α -galactosidase 及 β -galactosidase，可水解利用寡醣類(Desjardins *et al.*, 1990)所致。而蔗糖亦有含量下降的情況，加入雙叉桿菌的發酵組之下降狀況較乳酸菌單獨發酵時少，故知添加雙叉桿菌於乳酸菌發酵豆奶中，可減少蔗糖的利用情況，且以 *B. longum* 之作用較明顯。豆奶經發酵後單醣量會增加，以含 *L. acidophilus* 組，特別是配合 *B. infantis* 時增量最大，果糖及葡萄糖-半乳糖皆提高約 2.50 mmol/L。綜合以上得知，添加雙叉桿菌可提高乳酸菌發酵豆奶的寡醣利用率，並減少蔗糖被分解的情形，此外，寡醣經菌種水解後，會增加基質中單醣的含量。

有機酸含量方面，單獨以乳酸菌發酵豆奶時，會產生大量乳酸，並伴隨少量之醋酸，且以 *S. thermophilus* 的乳酸產量較佔優勢，而加入 *B. infantis* 共同發酵時產量最多，達 21.98 mmol/L；然而，與雙叉桿菌共同發酵所產生的乳酸則未如乳酸菌單獨發酵時多。故知以乳酸菌發酵豆奶時，添加雙叉桿菌可提高醋酸的產量，但乳酸含量會降低。

豆奶經發酵後粗蛋白質含量增加情形，以 *S. thermophilus* 組最多，而雙叉桿菌的參與並沒有顯著提高其量；但 *L. acidophilus* 則因加入雙叉桿菌而顯著提高粗蛋白含量達 0.09 0.21%。與雙叉桿菌共同發酵時，游離胺基酸的含量比乳酸菌單獨發酵時多，以 *S. thermophilus* 為例，加入雙叉桿菌發酵可分別提高游離胺基酸含量 3.05 (*B. infantis* 組) 和 3.32 (*B. longum* 組) mmol/L。

維生素 B1、B2 及菸鹼酸的含量變化情形中，以 *L. acidophilus* 單獨發酵後，豆奶中菸鹼酸增加為 36.44 mg/100 ml，維生素 B2 減少 10.96%，維生素 B1 則無顯著的變化，此與 Denter 和 Bisping (1994) 的結果相符。若混合雙叉桿菌發酵時，所測試的維生素 B 群含量皆呈現增加的情況。以 *S. thermophilus* 發酵豆奶後，菸鹼酸及維生素 B2 分別減少 15.68% 及 10.54%，而 B1 的變化與 *L. acidophilus* 單獨發酵相似，不存在顯著性差異。混合雙叉桿菌發酵時，除菸鹼酸含量減少外，維生素 B1 及 B2 的含量均被提高。Keuth 和 Bisping (1993) 指出，在黃豆培養基質中，若菌數增多而維生素含量減少，則維生素應為此菌所分解利用，例如：菸鹼酸可被分解為 NAD^+ 或 NADP^+ ，而成為細菌之能量來源。由於 *S. thermophilus* 無論單獨或混合雙叉桿菌進行發酵時，生長情況良好，故推論豆奶中菸鹼酸含量減少，是被此菌所分解以產生能量來源。

3. 乾燥對發酵豆奶中菌數存活之影響

表三中，發酵豆奶藉出口溫度 60 進行噴霧乾燥後，以 *B. longum* 和 *S. thermophilus* 共同發酵者存活情形最佳，高達 16.23% (*S. thermophilus*) 和 23.06% (*B. longum*)，雖然 *S. thermophilus* 與 *B. infantis* 發酵組中 *S. thermophilus* 存活率為 17.44%，但與 16.23% 間並無顯著性差異。單就雙叉桿菌而言，*B. longum* 存活情形顯著較 *B. infantis* 為佳，至於乳酸菌則以 *S. thermophilus* 優於 *L. acidophilus*，此與 Kim 和 Bhowmik (1990) 結果相符。

經冷凍乾燥後發酵豆奶菌數存活情形中，乳酸菌以 *S. thermophilus* 的存活率較高，達 74.68 75.12%，即具有較佳的抗凍能力。Kim 和 Bhowmik (1990) 以 *L. bulgaricus* 及 *S. thermophilus* 發酵酸酪乳再進行冷凍乾燥後發現，與 *Lactobacillus* spp. 相較，*S. thermophilus* 不易出現冷凍傷害的情況，此與本結果相符。雙叉桿菌則以 *B. longum* 的抗凍性較佳，若與 *S. thermophilus* 共同發酵後再進行冷凍乾燥，存活率最

高，可達 51.89%。

實驗中無論是乳酸菌或雙叉桿菌，經冷凍乾燥後的存活率亦均較噴霧乾燥後高，Johnosn 和 Etzel(1995)將 *L. helveticus* 分別進行噴霧及冷凍乾燥後發現，冷凍乾燥後的存活率為 48%，而噴霧乾燥（出口溫度 82℃）則只有 15%的存活率，由此可得到印證。

四、參考文獻

1. Barbero, G. J., Runge, G., Fisher, 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.
2. Chou, C. C. and Hou, J. W. 2000. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *Int. J. Food Microbiol.* 56:113-121.
3. Denter, J. and Bisping, B. 1993. Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 22:23-31.
4. Desjardins, M-L. and Roy, D. 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* 73:299-307.
5. Haenel, H. 1970. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Amer. J. Clin. Nutr.* 23:1433-1439.
6. Johnson, J. A. C., Etzel, M. R. Chen, C. M. and Johnson, M. E. 1995. Accelerated ripening of reduced-fat cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. *J. Dairy Sci.* 78:769-776.
7. Keuth, S. and Bisping, B. 1993. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. *J. Appl. Bacteriol.* 75:427-434.
8. Kim, S. S. and Bhowmik, S. R. 1990. Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. *J. Food Sci.* 55:1008-1010.
9. Matsuyama, J., Hirata, H., Yamagishi, T., Hayashi, K., Hirano, Y., Kuwata, K., Kiyosawa, I. and Nagasawa, T. 1992. Fermentation profiles and utilization of sugars of bifidobacteria in soymilk. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 39:887-893.
10. Mital, B. K. and Steinkraus, K. H. 1974. Growth of lactic acid bacteria in soy milks. *J. Food Sci.* 39:1018-1023.
11. Murti, T. W., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. J. 1993. Bacterial growth and volatile compounds in yogurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp. *J. Food Sci.* 58:153-156.
12. Pinthong, R., Macrae, R. and Rothwell, J. 1980. The development of a soya-based yoghurt. I. Acid production by lactic acid bacteria. *J. Food Technol.* 15:647-652.
13. Samona, A., Robinson, R. K. and Marakis, S. 1996. Acid production by bifidobacteria and yogurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* 13:275-280.
14. Thananunkul, D., Tanaka, M., Chichester, C. O. and Lee, T.-C. 1976. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polyacrylamide gel. *J. Food Sci.* 41:173-175.