

# 台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：雙叉桿菌於不同優酪乳中抗氧化性之研究

得獎獎項：大會獎佳作

學 校：國立曾文高級農業工業職業學校

作 者：沈淳敏

評語與建議事項：

- 1.能設計完整之實驗流程，並進行詳細的數據分席。
- 2.口語表達略為緊張，建議加強。
- 3.能積極參與科學研究，值得鼓勵。

## 作者簡介

姓名	沈淳敏
就讀學校	台南縣麻豆鎮的國立曾文農工食品科
專長及興趣	起初對食品懵懵懂懂，但是自從學了微生物學、食品化學、生物技術概論、專題研習等課程後及在實驗室裡跟隨陳惠添老師做實驗，學習到如何尋找資料、儀器的使用、實驗方法、寫報告，結果不僅培養出對食品科的興趣，而且希望以後往食品繼續深造研究。
未來發展志向	生物技術及奈米科技，目前在台灣最有技術開發性，以及具前瞻性的科技產業，被視為未來的明星產業，因此農產品結合生物技術可帶動傳統產業走出另一條路，化危機為轉機，往這條路撩下去，應該會是一條康莊大道。



作品名稱： 雙叉桿菌於不同優酪乳中抗氧化性之研究

英文摘要(Abstract)

## **Antioxidant activities of different yogurt with bifidobacteria**

The objectives of this investigation were to evaluate the growth conditions and the antioxidant activities of fermented black bean soy milk(BBSM) with *Bifidobacterium longum* B6 and 15708 cultured in four media, namely, ( BBSM ( 100%)+ 1% glucose ), ( BBSM (100%)), ( BBSM (50%) + milk (50%)), (milk (100%)) . These results indicated that; (1) both strains attained viable cell numbers about 7.19~9.53 log CFU/ml after 18 hrs of incubation and were in the order of ( milk (100%) ) > ( BBSM (50%) + milk (50%) ) > ( BBSM (100%) + 1% glucose ) > ( BBSM (100%) ), (2) both strains in ( BBSM (100%)) exhibited higher pH value ranging from 4.79 to 5.50 , but lower titratable acidity(%) ranging from 0.27% to 0.61% than the three other media after 48h of fermentation, (3) both strains displayed an even smaller tolerance to simulated gastric juice at pH = 2.0 for 3h, especially in ( BBSM(100%)), while in simulated gastric juice at pH =3.0 for 3h had higher tolerance , (4) both strains had high resistance ranging from 72.51% to 92.62% to 0.3% bile solution for 12h, (5) the reducing power of ( BBSM (100%)) was more excellent than that of ( milk (100%)), (6) the scavenging effect of yogurt (BBSM ( 100%) + 1% glucose) on DPPH radicals was significantly higher than that of ( milk (100%)), (7) In general, at ten- fold dilution the chelating effect on copper ions of these four un-fermented media except ( milk (100%)) was significantly higher than that of fermented media with *B.longum* B6 or 15708.

## 雙叉桿菌於不同優酪乳中抗氧化性之研究

本研究是探討雙叉桿菌(*Bifidobacterium longum* B6 及 15708)在四種發酵基質(【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】、【黑豆奶(100%)】、【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】、【牛奶(100%)】)中的生長情形及抗氧化活性。結果顯示：

- (一) 兩株菌在四種培養基中的生長菌數大小順序如下：【牛奶(100%)】 > 【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】 > 【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】 > 【黑豆奶(100%)】。
- (二) 兩株菌在【黑豆奶(100%)】的 pH 值比較高於其他三種優酪乳，而最終發酵可滴定酸度比較低於其他三種優酪乳。
- (三) 兩株菌於 pH2.0 環境下，在【黑豆奶(100%)】優酪乳中耐酸性很低，而於 pH3.0 環境下卻有很高的耐酸性。
- (四) 兩株菌對 0.3%膽鹽之耐受性均很高為 72.52%~92.62%。
- (五) 在稀釋 10 倍的四種基質中，不論發酵前或發酵後的還原力皆以【黑豆奶(100%)】為最高，【牛奶(100%)】為最低。
- (六) 在濃度稀釋 10 倍時，【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】對 DPPH· 自由基清除率明顯比【牛奶(100%)】高。
- (七) 在濃度稀釋 10 倍的四種優酪乳中，除【牛奶(100%)】外，發酵後比未發酵的銅離子螯合率明顯降低，

# 研究報告

## 壹、前言

### 一、研究動機

自由基(free radical)是需氧生物生命活動過程中多種生化反應的中間代謝產物，是人體代謝的產物之一，也是生物體有效的防禦系統，但當其產生過多或清除過慢時，這些具有未成對電子，也就是處於一種不穩定的狀態的自由基由於其化學性質相當活潑，便會攻擊生物體大分子物質如DNA、蛋白質或生物膜上之多元不飽和脂肪酸及各種胞器，以尋求安定，進而造成氧化性傷害，加速生物體的衰老進程並誘發許多慢性病如癌症、白內障、動脈粥狀硬化、心肌梗塞、老化、關節炎、阿滋海默症等的發生(陳和顏，1998)。

黑豆(Black soybean, *Glycine max*(L.)Merr.)又名烏豆，據「本草綱目」記載：「服食烏豆、令人長肌膚、益顏色、填骨髓、長氣力、補虛能食」。雙叉桿菌是人體內常駐的腸道菌種，對於維持腸道的平衡扮演了重要的角色，其存在具有治療功能，包括提升免疫力、抗腫瘤活性、抗癌活性、抗菌活性、抗膽固醇活性及提高乳糖利用性等(Mitsuoka, 1990)；發酵能增進風味、防止微生物生長及增加營養價值外，發酵過程中經微生物作用也會生成具有抗氧化力之物質。

而目前學者研究的方向皆只著重於豆類的抗氧化性或乳酸菌菌體(活菌)與胞內物(死菌)的抗氧化性等單方面主題，對於兩者的整合型優酪乳的抗氧化性如何，是否有相乘的效果，尚無人研究，於是興起探討雙叉桿菌能否在黑豆奶中生長發酵如與在牛奶中一樣，產生美味可口兼具有抗氧化性的優酪乳的動機。研究植物性的優酪乳(豆奶)與動物性的優酪乳(牛奶)其抗氧化性有何差異。

### 二、研究目的

本實驗研究目的則是分為兩部份：一部份是探討雙叉桿菌在豆奶與牛奶發酵基質中的生長情形包括生長菌數測定、pH 值之測定、可滴定酸度測定、耐酸性試驗、耐膽鹽性試驗，比較雙叉桿菌(*Bifidobacterium longum* B6, 15708)在四種發酵基質【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖、黑豆奶(100%)、黑豆奶(50%)+牛奶(50%)、牛奶(100%)】中的生長情形，評估雙叉桿菌是否適合以黑豆奶為發酵基質來製作出接受度高的黑豆奶優酪乳；另一部份則是探討雙叉桿菌在以豆奶與牛奶為發酵基質的優酪乳其發酵前與發酵後之抗氧化活性，包括還原力之測定、清除 DPPH 自由基能力之測定、螯合銅離子能力之測定，探討含有不同濃度雙叉桿菌菌體(活菌)與豆奶所提供的抗氧化活性，是否會因發酵結合而有所差異。

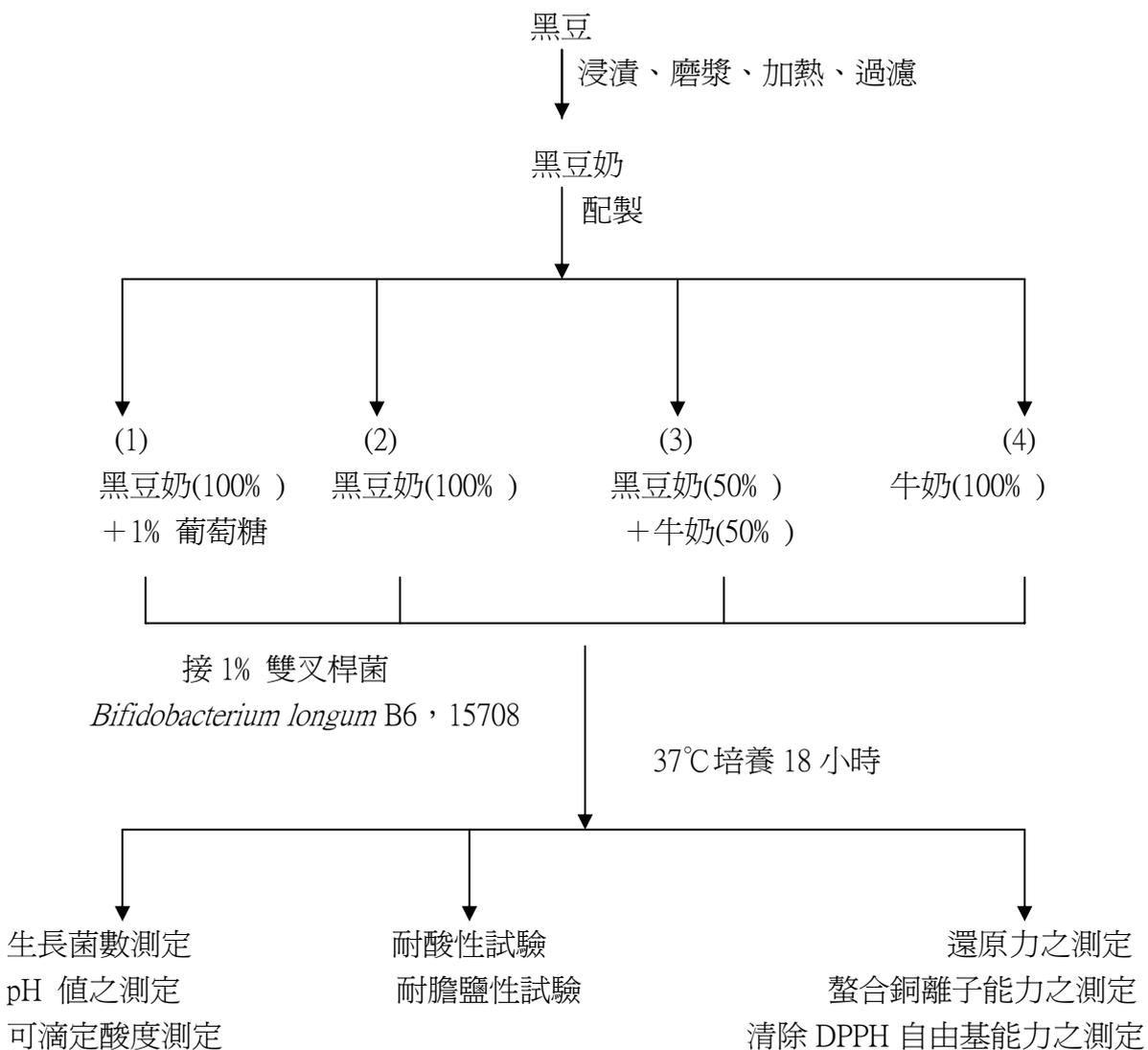
## 貳、研究方法或過程

### 一、研究設備及器材

本研究所使用的菌株包括：*Bifidobacterium longum* B6，15708 為中興大學食品科學系微生物研究室林美吟教授贈送的低溫冷凍儲藏菌株。

黑豆(Black soybean, *Glycine max*(L.)Merr.)、脫脂奶粉、Lactobacilli MRS broth、Agar。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)、ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)、Ammonium thiocyanate、2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol(BHT)、Trichloroacetate(TCA)、Tetramethylmurexide ammonium salt、Bile Bovine(Oxgall Powder)、Hexamethylenetetramine、L-Ascorbic acid(Vitamin C)、Potassium ferricyanide(99.8%)。pH 酸鹼測定儀、高速離心機、無菌操作箱、分光光度計、恆溫培養箱。

### 二、實驗流程



### 三、研究方法或過程

#### (一) 不同培養基的製備

黑豆清洗後，以蒸餾水浸泡 6 小時 (大豆乾重：水=1：5)，倒掉浸泡水後，將大豆置入豆漿機並加入蒸餾水均質成漿 (大豆乾重：水=1：10)。加熱後再以雙層棉紗布過濾後，分裝至試管中。及配製以下不同黑豆奶培養基：

- (1)黑豆奶(100% )+1% 葡萄糖
- (2)黑豆奶(100% )
- (3)黑豆奶(50% )+牛奶(50% )
- (4)牛奶(100% )

最後以殺菌釜滅菌(121°C，15 分鐘)，滅菌完冷卻後，於無菌操作台中分別接 1% 已活化的不同菌種 *Bifidobacterium longum* B6，15708。

#### (二) 菌數測定

雙叉桿菌於不同培養基培養 18 小時後，取 1mL 黑豆奶優酪乳，注入 9 mL 無菌水中做系列稀釋，並取 1 mL 稀釋液以傾注平板法(Pour plate method)加入 MRS agar，混合均勻後凝固，在 37°C 下培養 48 小時後，進行平板計數，觀察其菌落形態並計數 25-250 CFU/ml 的菌落數，計算存活之雙叉桿菌菌數並以對數值(log CFU/ml)表示之。

#### (三) pH 值之測定及可滴定酸度測定

- (1) 將樣品振盪均勻後以 pH meter 直接測之。
- (2)可滴定酸度測定

依中國國家標準 CNS 3441 之方法測定，精確秤取 9.0 g 之試樣，加入等量之蒸餾水稀釋，再加入 1% phenolphthalein 0.5 ml，以 0.1 N NaOH 滴定至試樣達 pH 7.0 時為滴定終點。酸度以乳酸(%)表示(陳，2002)，計算公式如下：

0.1 N NaOH 溶液 1 mL 等於 0.009 g 乳酸

$$\text{乳酸}(\%) = \frac{0.1 \text{ N NaOH 滴定數}(\text{ mL }) \times 0.009 \times f}{\text{試樣重量}(\text{ g })} \times 100$$

f：0.1 N NaOH 之力價

#### (四) 耐酸性試驗

取經過 37°C 下培養 18 小時後之不同發酵液 1 ml，分別加入不同 pH 值(pH 2.0、和 3.0)之 9ml 磷酸鹽緩衝溶液(PBS)中，樣品與緩衝液充分混合後，立刻取出 1 ml 混合液，於 9ml 之無菌水中做系列稀釋，然後以傾注平板法(Pour plate method)加入 MRS agar，混合均勻後凝固，在 37°C 下培養 48 小時，計算 0 小時存活之乳酸菌菌數並以對數值(logCFU/ml)表示之。另外剩餘樣品與磷酸鹽緩衝液(PBS)之混合液以 37°C、80rpm 培養之，3 小時後立刻取出 1 ml

混合液，於 9ml 之無菌水中做系列稀釋(serial dilution)，然後以傾注平板法加入 MRS agar，混合均勻後凝固，在 37°C 下培養 48 小時，計算 3 小時存活之乳酸菌菌數並以對數值 (logCFU/ml) 表示之。

$$\text{存活率}(\%) = (\text{3 小時後殘存的菌數}) / (\text{0 小時後殘存的菌數}) \times 100$$

### (五) 耐膽鹽性試驗

取經過 37°C 下培養 18 小時後之不同黑豆奶優酪乳液 0.1ml，分別接種至 10 ml 之 MRS broth(不含 ox gall)及含 0.3%(w/v)ox gall 之 MRS broth 中，置於 37°C 下培養 12 小時後，立刻取出 1 ml 混合液，於 9ml 之無菌水中做系列稀釋，然後以傾注平板法加入 MRS agar，混合均勻後凝固，在 37°C 下培養 48 小時，計算 12 小時存活之乳酸菌菌數並以對數值(log CFU/ml) 表示之。所得實驗數據依下列公式求出膽鹽耐受力(bile tolerance)之百分率：

$$\text{膽鹽耐受力百分率}(\%) = \frac{\text{含膽鹽}(0.3\%)\text{之乳酸菌菌數}(\log\text{CFU}/\text{ml})}{\text{不含膽鹽之乳酸菌菌數}(\log\text{CFU}/\text{ml})} \times 100\%$$

## 抗氧化性

### (六) 還原力之測定

參考 Oyaizu(1986)的方法，取 1ml 經活化 18 小時之乳酸菌菌試液，加入 2.5 ml 0.2M 之磷酸緩衝溶液(pH 6.6)和 2.5 ml 1% 的赤血鹽(potassium ferrocyanide,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )，於 50°C 水浴中反應 20 分鐘，經快速冷卻後加入 5ml 10% 的 TCA(trichloroacetic acid)溶液，以 3000rpm 離心 10 分鐘，取上清液 5 ml 加入 5 ml 蒸餾水和 1 ml 0.1% 的氯化鐵( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ferric chloride)溶液，混合均勻於 10 分鐘後測定 OD 700nm 之吸光值，並與 1 mg/ml 之 BHT 作為對照比較之。吸光值愈高表示還原力愈強。

### (七) 清除 DPPH 自由基能力之測定

參考 Shimada, *et al.*(1992)之方法，取 1ml 乳酸菌菌液，加入 2 ml 新鮮配置 0.4mM 的  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH)之甲醇溶液均勻混合，在室溫下靜置 30 分鐘後，以分光光度計測定波長 517nm 的吸光值，並以 BHT、ascorbic acid 作為對照組。吸光值愈低表示清除能力愈強，清除率的計算公式如下：

$$\text{清除率}(\%) = \left[ 1 - \frac{\text{試樣在 } 517\text{nm 的吸光值}}{\text{控制組在 } 517\text{nm 的吸光值}} \right] \times 100\%$$

### (八) 螯合銅離子之測定(Shimada *et al.*,1992)：

取 20 mM hexamine、60 mM 之 potassium chloride 及 6mM 之 ferrous sulfate (或 copper

sulfate)混合液 2ml，加入 1 ml 乳酸菌液(調pH =5)，及 0.15ml 的 2mM 之 TMM(tetramethyl murexide)。室溫下反應 5 分鐘後立即以分光光度計測其 485nm 的吸光值。並以citric acid和 EDTA 作為對照組。吸光值愈低代表螯合金屬離子之效果愈強。螯合金屬離子能力的百分比表示為：

螯合銅離子之能力 (%) =  $【1-(樣品的吸光值(OD_{485nm})/control的吸光值(OD_{485nm}))】 \times 100$

## 參、研究結果與討論

### 一、生長菌數測定

為探討 *Bifido. longum* B6, 15708 在黑豆奶中之生長情形，將活化過的乳酸菌接種至基質中，使其初始菌數(0小時)為  $10^7$  CFU/ml，置於  $37^\circ\text{C}$  下培養 18 小時後，測其菌數結果如表 1 所示。兩株菌在四種培養基中的生長菌數大小順序如下：**【牛奶(100%)】** > **【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】** > **【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】** > **【黑豆奶(100%)】**。 *Bifido. longum* B6 及 15708 在四種培養基中皆以在**【牛奶(100%)】**中之生長最佳，*Bifido. longum* B6 菌數比 *Bifido. longum* 15708 多 0.97 log CFU/ml，菌數分別可達約 9.53 log CFU/ml 及 8.56 log CFU/ml，*Bifido. longum* B6 在**【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】**優酪乳中生長情形居次，菌數可達約 9.35 log CFU/ml，而 *Bifido. longum* B6, 15708 在四種培養基中皆以在**【黑豆奶(100%)】**生長最差，菌數分別只達約 7.19 log CFU/ml、8.23 log CFU/ml。兩株菌在**【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】**優酪乳中生長情形比在**【黑豆奶(100%)】**生長情形佳。尤其 *Bifido. longum* B6 在**【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】**優酪乳中生長情形更顯著。

實驗顯示在豆奶中的生長情形較牛奶差，但在未添加額外醣類的情形下仍可生長，顯示其應該可利用豆奶中的醣類。而添加少量(1%)的葡萄糖即可改善其生長情形。

### 二、pH 值、可滴定酸度(%)之測定

*Bifido. longum* B6, 15708 在黑豆奶中之產酸情形如圖一、二 所示。兩株菌種在四種發酵基質中產酸情形相類似，**【黑豆奶(100%)】**的 pH 值很明顯高於**【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】**、**【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】**、**【牛奶(100%)】**等三種優酪乳，且差異顯著。*Bifido. longum* B6 及 15708 在四種發酵基質中產酸情形為在 0 小時 pH 值皆在 6.3 附近相差不大，之後隨著發酵時間的增長，pH 值漸漸下降，*Bifido. longum* B6：**【黑豆奶(100%)】**在 12 小時至 36 小時發酵期間 pH 值變化趨緩，36 小時後 pH 值大幅下降，由 5.63 降至 4.79，而其他三種優酪乳在 24 小時至 48 小時發酵期間 pH 值變化趨緩，最終發酵 pH 值，**【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】**為 3.32、**【黑豆奶(100%)】**為 4.79、**【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】**為 3.27、**【牛奶(100%)】**為 3.33。*Bifido. longum* 15708：最終發酵 pH 值，**【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】**為 3.32、**【黑豆奶(100%)】**為 5.50、**【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】**為 3.27、**【牛奶(100%)】**為 3.35。兩株菌種在四種發酵基質中產酸，最終發酵 pH 值除**【黑豆奶(100%)】**外，其餘三種優酪乳的 pH 值幾乎相同，差異不大。實驗顯示只要在豆奶中添加少量(1%)的葡萄糖，兩株菌種在豆奶中的 pH 值可以與在

牛奶的pH值相等。

*Bifido. longum* B6、15708在四種發酵基質中的最終發酵可滴定酸度(%)除在【黑豆奶(100%)】較低外，*Bifido. longum* B6為0.27，*Bifido. longum* 15708為0.61，其餘三種優酪乳的最終發酵可滴定酸度為1.06 ~ 1.92。兩株菌種在四種發酵基質中的最終發酵可滴定酸度(%)大小順序為：【牛奶(100%)】>【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】>【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】>【黑豆奶(100%)】，且*Bifido. longum* 15708在四種發酵基質中的最終發酵可滴定酸度(%)一般高於*Bifido. longum* B6，除在【牛奶(100%)】外。兩株菌種在四種發酵基質中的可滴定酸度(%)皆隨著發酵時間的增長而增加。

### 三、耐酸性試驗

雙叉桿菌是人體內常駐的腸道菌種，對於維持腸道的平衡扮演了重要的角色，其存在具有治療功能，然而，此益生菌必須能存活於人體腸道中，在小腸中定殖，對人體才有益生作用，但因攝食階段受到口腔中的酵素、胃中低 pH 值、腸道的蠕動及膽鹽的存在及胃腸中的消化酵素等，這抑制了雙叉桿菌在小腸中的定殖(Fuller, 1992)。

耐酸性試驗結果如表 2 所示。*Bifido. longum* B6在【黑豆奶(100%)】、【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】等二種優酪乳中，於pH2.0環境下，測不到菌數，即耐酸性很低，而在pH 3.0 靜置 3小時後存活率可達80%以上。而在【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】、【牛奶(100%)】等二種優酪乳中，於pH2.0環境下，耐酸性達50% 以上。在pH 3.0 靜置3 小時後存活率可達90%以上。*Bifido. longum* 15708在【黑豆奶(100%)】中於pH2.0環境下，測不到菌數，即耐酸性很低，而在pH 3.0 靜置3 小時後存活率可達90%以上。而在【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】、【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】、【牛奶(100%)】等三種優酪乳中，於pH2.0環境下，耐酸性達40% 以上。在pH 3.0 靜置3 小時後存活率可達90%以上。由試驗結果顯示，不同的pH值(pH2.0、3.0)磷酸鹽緩衝溶液，對優酪乳中的雙叉桿菌菌數、存活率有相當明顯的影響。在pH2.0環境下，3小時後的存活菌數皆比0小時明顯降低，而當磷酸鹽緩衝溶液 pH值提高至 pH3.0時，所有的優酪乳中的雙叉桿菌存活率有相當明顯的提高。【黑豆奶(100%)】優酪乳於pH2.0環境下，不論是*Bifido. longum* B6或15708皆不能生長，耐酸性很低，可是只要在豆奶中添加少量(1%)的葡萄糖，皆能明顯提高兩株菌種對酸的耐受性與在【牛奶(100%)】的耐受性一樣好。

### 四、耐膽鹽性試驗

高濃度之膽鹽對腸內微生物(包括乳酸菌)具有抑制作用，因此動物體腸道內的膽鹽是影響乳酸菌存活的因素之一(Gilliland and Walker, 1990)。膽鹽耐受性試驗結果如表 3 所示。結果顯示兩株菌種 *Bifido. longum* B6、1570對膽鹽之耐受性均很高為72.52%~92.62%，尤其以*Bifido. longum* 1570在【黑豆奶(100%)】基質對膽鹽之耐受性最高為92.62%，在【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】基質對膽鹽之耐受性次高為90.09%。

### 抗氧化活性測定法

本實驗將各培養液稀釋10倍、100倍、1000倍於下列 in vitro試驗中，測定其抗氧化能力。比較發酵前與發酵後其抗氧化能力有何差異。

## 五、還原力之測定

含有雙叉桿菌的優酪乳還原能力如表 4 所示，將1 mg/ml BHT 在517nm下的吸光值視為100%的還原力，再把含有雙叉桿菌的優酪乳的吸光值換算為還原率。結果顯示所有測試樣品的還原力皆隨著雙叉桿菌菌體含量的遞減而減少。【黑豆奶(100%)】在稀釋10倍的四種基質中，不論發酵前或發酵後的還原力皆最高，發酵前為44.42%，發酵後的還原力接種 *Bifido. longum* B6菌為45.99%，接種 *Bifido. longum* 15708菌為46.73%最高。【牛奶(100%)】在四種基質中，不論發酵前或發酵後的還原力皆最低，發酵前為29.51%，發酵後的還原力接種 *Bifido. longum* B6菌為30.07%，接種 *Bifido. longum* 15708菌為30.79%。實驗數據顯示發酵後的還原力比發酵前所增加的還原力不多，由此可推論雙叉桿菌菌體所貢獻的還原力不及豆奶、牛奶所貢獻的還原力多。

## 六、 $\alpha, \alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力之測定

含有雙叉桿菌的優酪乳對DPPH·清除之能力如圖 三 所示，結果顯示所有測試樣品對DPPH·自由基清除率皆隨著雙叉桿菌菌體含量的遞減而減少。

對照組 BHT在濃度1.0 mg/ml時對 DPPH·自由基清除率為87.7%，ascorbic acid在濃度1.0 mg/ml時對 DPPH·自由基清除率為94.83%，在濃度0.1mg/ml時清除率為30.21%。

在濃度稀釋10倍時，含有 *B. longum* B6，15708菌的四種優酪乳對DPPH·自由基清除率大小順序為【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】>【黑豆奶(100%)】>【黑豆奶(50%)+牛奶(50%)】>【牛奶(100%)】。未發酵與發酵後四種基質顯示含有豆奶濃度越高，則對DPPH·清除率越高。發酵後的【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】、【黑豆奶(100%)】、【牛奶(100%)】三種基質比未發酵的三種基質對DPPH·清除率為低，【牛奶(100%)】基質對DPPH·清除率在四種基質中最差，約略為30%與ascorbic acid在濃度0.1mg/ml時清除率相當，且發酵後與未發酵的差異最不明顯。

## 七、螯合銅離子能力之測定

含有雙叉桿菌的優酪乳螯合銅離子能力如圖 四 所示。對照組金屬螯合劑 EDTA、檸檬酸(citric acid)在濃度1.0mg/ml時對銅離子螯合率分別為12.68%，15.13%。

在濃度稀釋10倍的四種優酪乳中，除【牛奶(100%)】外，發酵後比未發酵的銅離子螯合率明顯降低，尤其【黑豆奶(100%)】降低最多，未發酵的【黑豆奶(100%)】其銅離子螯合率為21.82%，發酵後的銅離子螯合率接種 *Bifido. longum* B6菌為5.38%，接種 *Bifido. longum* 15708菌為7.41%。不論接種何種菌，【黑豆奶(100%)+1%葡萄糖】的銅離子螯合率比【黑豆奶(100%)】其銅離子螯合率高很多，接近2倍之多，顯示只要在豆奶中添加少量(1%)的葡萄糖即可提高優酪乳的銅離子螯合率。接種 *Bifido. longum* 15708菌【牛奶(100%)】其銅離子螯合率比接種 *Bifido. longum* B6菌【牛奶(100%)】其銅離子螯合率高。

表 1. 厭氧環境下，優酪乳經 37°C 18 小時培養後，在 MRS agar 培養基上的活性雙叉桿菌菌數

優酪乳	雙叉桿菌菌數 (log CFU/ml)	
	0 小時	18 小時
<i>B. longum</i> B6 菌發酵		
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	7.51±0.09	8.61±0.07
黑豆奶(100%)	7.51±0.09	7.19±0.05
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	7.51±0.09	9.35±0.32
牛奶(100%)	7.51±0.09	9.53±0.27
<i>B. longum</i> 15708 菌發酵		
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	7.41±0.32	8.44±0.20
黑豆奶(100%)	7.41±0.32	8.23±0.24
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	7.41±0.32	8.53±0.23
牛奶(100%)	7.41±0.32	8.56±0.29

每項數據為 3 重複，以平均值 ± 標準偏差表示

表 2. 不同優酪乳中的雙叉桿菌於 pH 2.0、3.0 的酸性溶液中經 3 小時後之存活率

優酪乳	存活率(%)	
	pH 2.0	pH 3.0
<i>B. longum</i> B6 菌發酵		
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	50.60±0.99	100±1.28
黑豆奶(100%)	0.00±0.00	84.67±5.68
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	0.00±0.00	100.76±0.14
牛奶(100%)	53.72±3.34	99.61±2.11
<i>B. longum</i> 15708 菌發酵		
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	49.40±3.10	102.05±0.37
黑豆奶(100%)	0.00±0.00	99.71±1.34
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	41.96±4.33	99.73±2.08
牛奶(100%)	47.48±2.36	101.06±3.27

1. 每項數據為 3 重複，以平均值 ± 標準偏差表示。

2. 存活率(%) = (3 小時後殘存的菌數)/(0 小時後殘存的菌數)×100

表 3. 膽鹽(0.3% )對不同優酪乳中的雙叉桿菌之生長影響

優酪乳	雙叉桿菌菌數(logCFU/ml)		膽鹽耐受力( % )
	0%	0.3%	0.3%
<i>B. longum</i> B6 菌發酵			
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	9.35±0.04	6.86±0.07	73.33±0.68
黑豆奶(100%)	7.94±0.08	6.19±0.29	77.98±3.05
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	9.33±0.10	6.77±0.17	72.51±2.24
牛奶(100%)	9.18±0.05	7.35±0.07	80.05±0.69
<i>B. longum</i> 15708 菌發酵			
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	9.20±0.02	8.29±0.03	90.09±0.55
黑豆奶(100%)	9.35±0.02	8.66±0.00	92.62±0.20
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	8.75±0.05	7.19±0.04	82.23±0.11
牛奶(100%)	8.66±0.05	6.82±0.10	78.70±0.72

1. 膽鹽耐受力( % )= 【0.3% 膽鹽的雙叉桿菌菌數 ( logCFU/ml)】 / 【0% 膽鹽的雙叉桿菌菌數 ( logCFU/ml)】 × 100

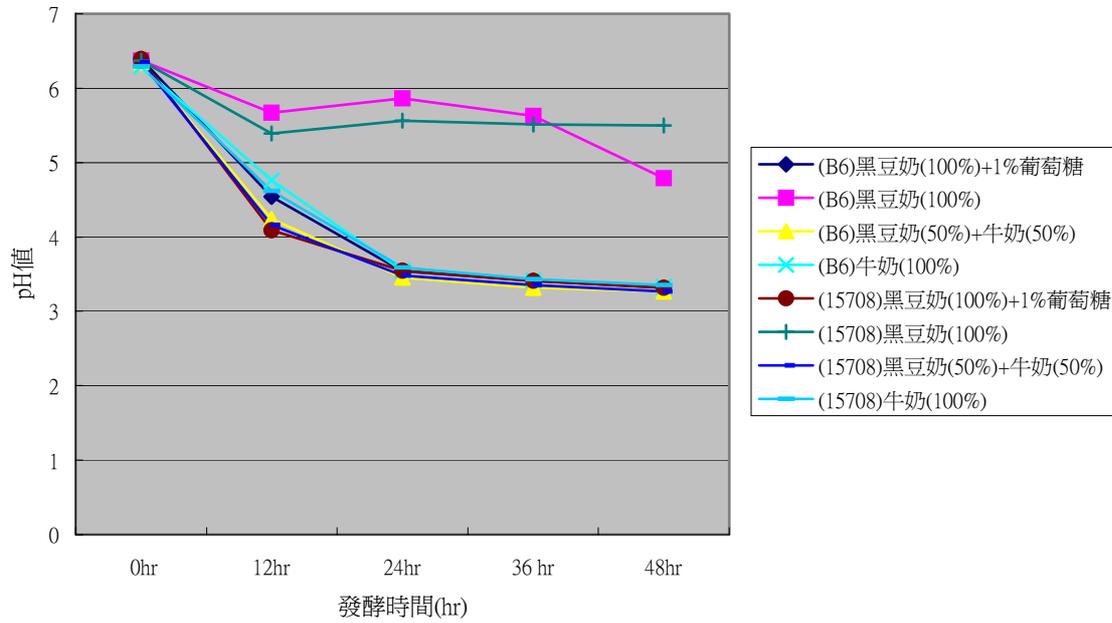
2.每項數據為 3 重複，以平均值 ± 標準偏差表示。

表 4. 不同的優酪乳之還原力(reducing effect (%))

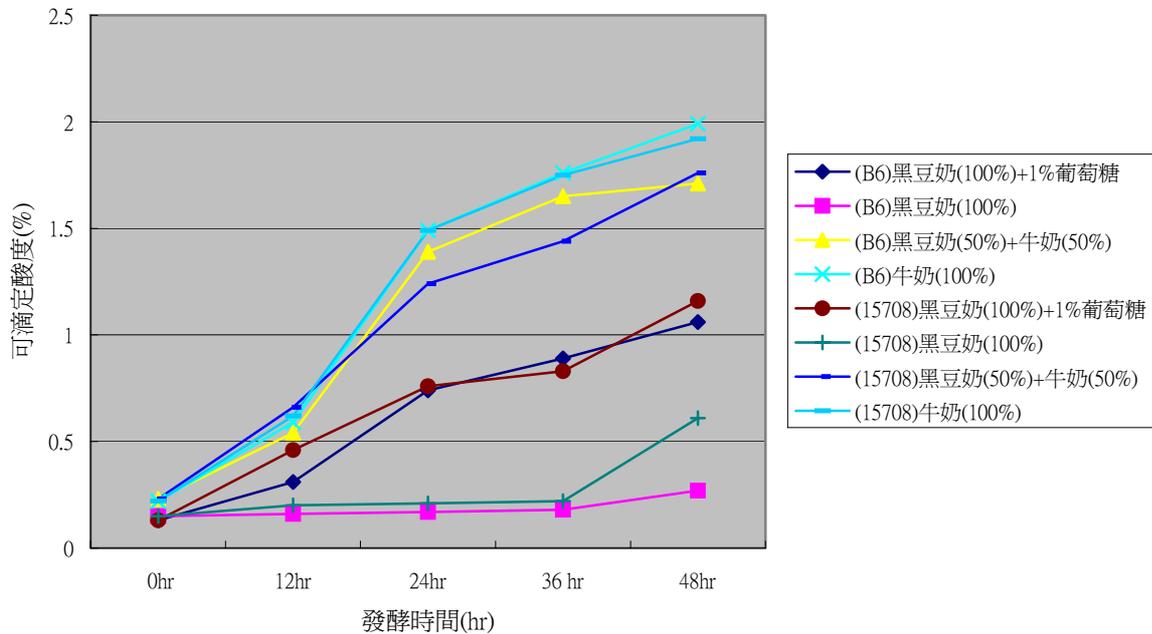
優酪乳	還原力(%)		
	稀釋 10 倍 (10 <sup>8</sup> CFU/ml)	稀釋 100 倍 (10 <sup>7</sup> CFU/ml)	稀釋 1000 倍 (10 <sup>6</sup> CFU/ml)
BHT( 1.0 mg/ml)	100±0.00	100±0.00	100±0.00
BHT( 0.1 mg/ml)	53.88±0.04	53.88±0.04	53.88±0.04
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	45.47±0.17	19.50±0.00	18.83±0.04
黑豆奶(100%)	44.42±0.07	21.85±0.00	18.33±0.00
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	38.05±0.04	20.40±0.04	18.98±0.00
牛奶(100%)	29.51±0.04	19.63±0.00	18.05±0.04
<i>B. longum</i> B6 菌發酵			
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	38.94±0.07	22.77±0.00	18.29±0.04
黑豆奶(100%)	45.99±0.00	21.33±0.00	20.61±0.00
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	34.18±0.00	20.57±0.04	18.72±0.04
牛奶(100%)	30.07±0.00	19.63±0.00	18.33±0.00
<i>B. longum</i> 15708 菌發酵			
黑豆奶(100%)+1%葡萄糖	43.90±0.07	21.9±0.04	19.63±0.00
黑豆奶(100%)	46.73±0.04	21.96±0.04	19.63±0.00
黑豆奶(50%)+牛奶(50%)	37.12±0.00	21.22±0.10	19.98±0.08
牛奶(100%)	30.79±0.00	23.27±0.04	19.83±0.00

還原力(%) = 【樣品的吸光值(OD700nm)】 / 【BHT( 1.0 mg/ml)的吸光值(OD700nm)】 ×100

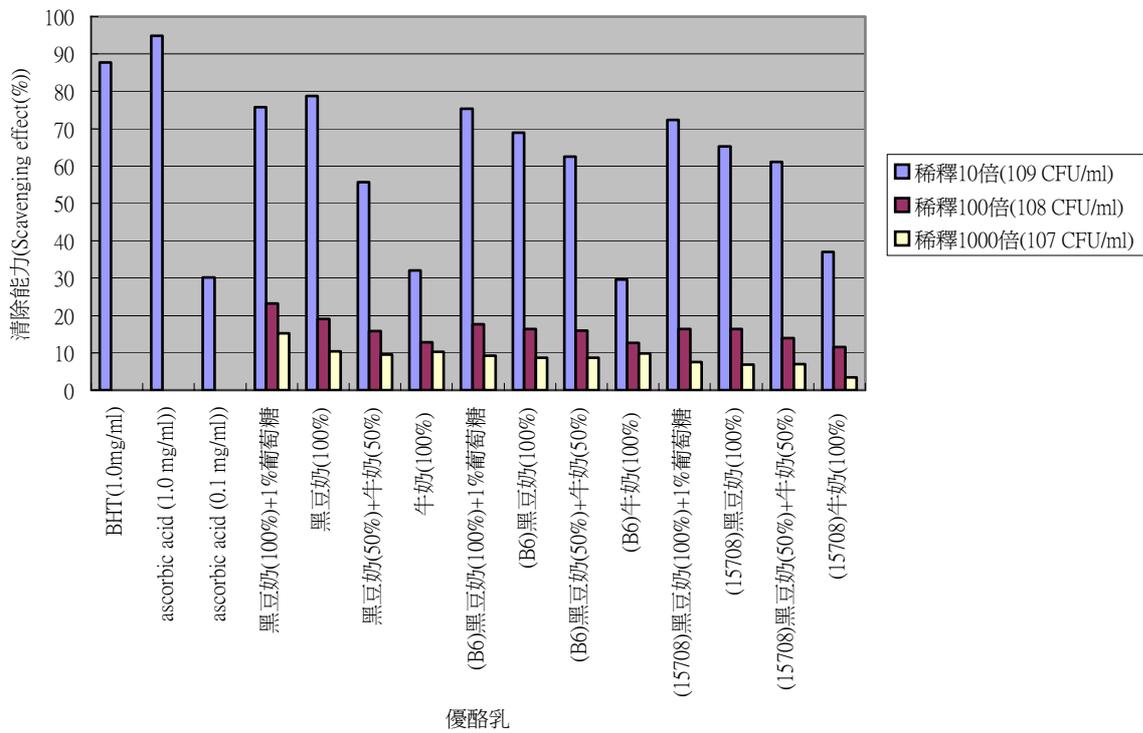
圖一 雙叉桿菌在不同的優酪乳中37°C下培養48小時pH值之變化



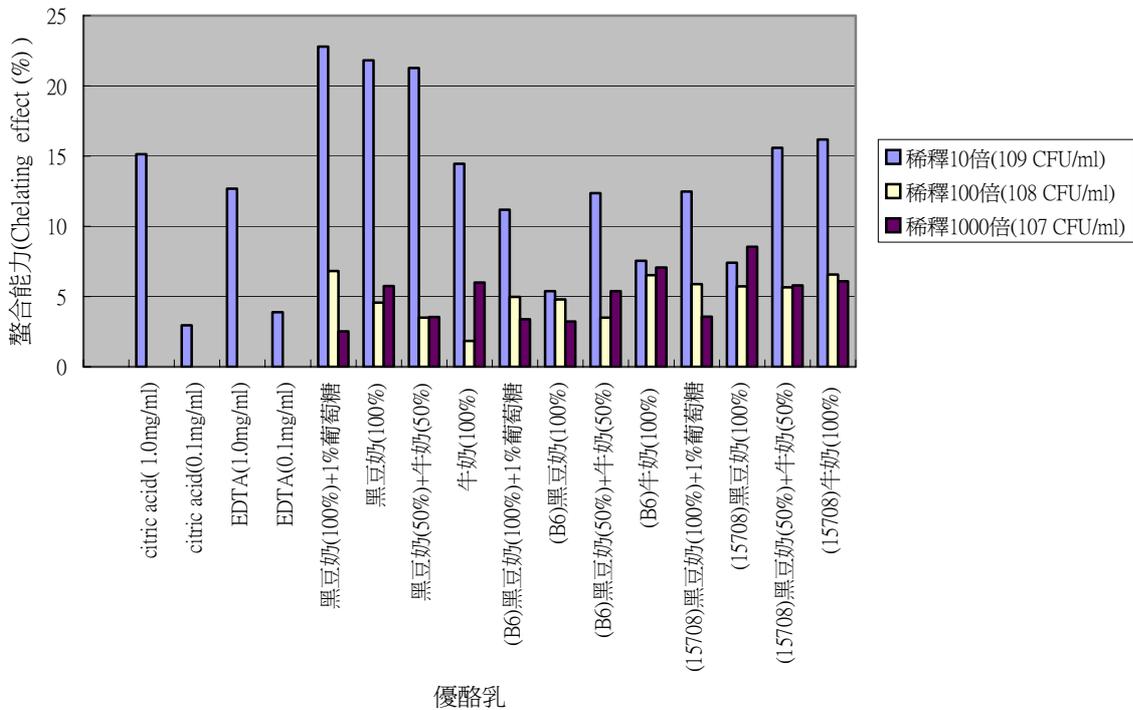
圖二 雙叉桿菌在不同的優酪乳中37°C下培養48小時可滴定酸度(%)之變化



圖三 不同的優酪乳對  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH ·)自由基清除之能力



圖四 不同的優酪乳螯合銅離子之能力



## 肆、結論與應用

*Bifidobacterium longum* B6, 15708 在無任何添加物加入情況下，在【黑豆奶(100%)】培養基中可以生長並且菌數可達健康效益  $10^6$  CFU/ml以上，可是只要在【黑豆奶(100%)】中添加少量(1%)的葡萄糖即可提高其生長菌數、產酸、耐酸性、耐膽鹽性、螯合銅離子能力、清除DPPH自由基能力。

近年益生菌製品頗受各界所重視，加上豆奶營養價值高成本低廉，因此利用益生菌發酵豆奶的研究漸漸受到重視，黑豆發酵乳是以黑豆蛋白為原料結合中西方之發酵技術所製得之植物性發酵乳，其不含膽固醇及動物性油脂也不含乳糖，可作為不敢喝牛乳者及乳糖不耐症患者之代替品。此外黑豆發酵乳也含有豆類特有之植物性化學物質 (phytochemicals)，再加上雙叉桿菌於發酵過程中可能生成之抗氧化物質，所以是一種很好的保健食品。

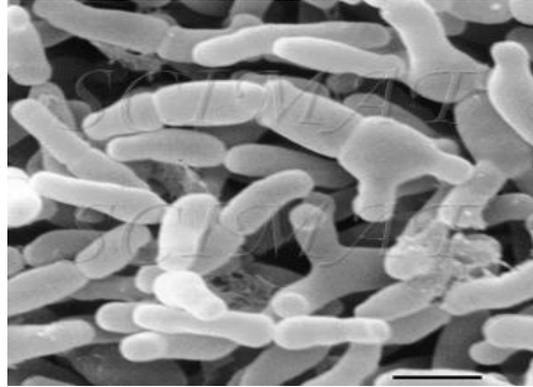
## 伍、參考資料

1. 陳惠英，顏國欽，1998自由基、抗氧化防禦與人體健康，Nutr·Sci·J., 23(1):105-121
2. 林衫郁。2001。乳酸菌和雙叉桿菌益生特性之探討。國立中興大學畜產學系碩士論文。台中。台灣。
3. Fuller, R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Chapman and Hall. London.
4. Gilliland, S. E. , and D.K. Walker.(1990). Factors to consider when selecting a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73 : 905-911
5. 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.
6. Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. J. Ind. Microbiol. 6:263-268.
7. Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 945-948.

## 陸、附圖



(一)分光光度計



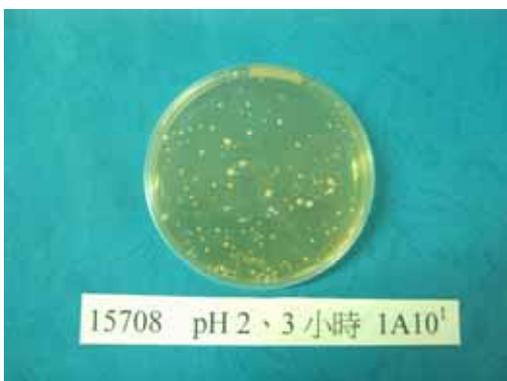
(二)雙叉桿菌的電子顯微鏡形狀



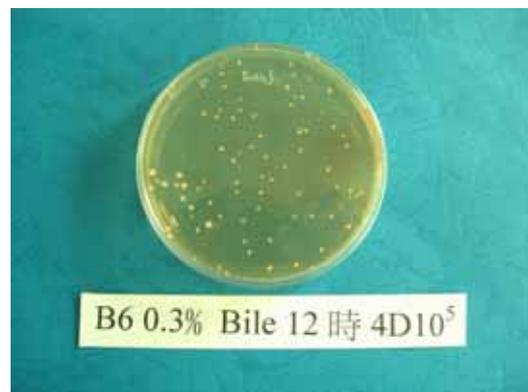
(三)生長菌數測定



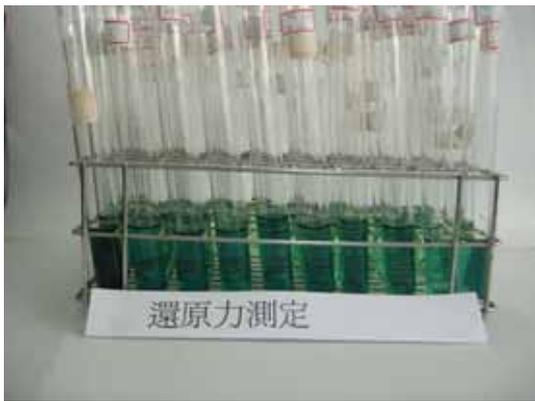
(四)黑豆



(五) 耐酸性試驗



(六) 耐膽鹽性試驗



(七) 還原力測定



(八) DPPH測定



(九) 銅離子螯合力測定



(十) 優酪乳



(十一) 優酪乳