

國立台灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

富含胞外多醣及益生菌酸凝酪製品之研究

Study on Exopolysaccharide and Probiotic-Rich Yogurt



Chia-Chun Lin

指導教授：蘇和平 博士

林棟雍 博士

Advisor : Hou-Pin Su, Ph. D.

Tung-Yung Lin, Ph. D.

中華民國九十七年六月

June, 2008

誌謝

本論文承蒙指導教授 蘇和平博士及林棟雍博士於碩士班兩年期間悉心指導與策勵及生活上之照顧，論文內容與口試方面，承蒙 蘇和平博士、林棟雍博士、駱秋英博士、林美貞博士及 黃加成博士詳細審閱與撥冗斧正，厚蒙寶貴意見使論文更加完善，特此敬致謝忱。

在學期間非常感謝 林慶文老師、蘇和平老師、林棟雍老師、陳明汝老師、王翰聰老師、黃秋容老師以及羅玲玲老師於研究上的指導與人生觀的指引。感謝實驗室的學長姊鴻榮、志維、耀耀、希嘉偉盛、美如及正鑫；學弟妹阿爹爹、昀真、惠文、哲維、世傑、千祥、馨儀、怡安、明諺、銘崧、莊平、宗原、盈香及聖閔；一起為實驗、專討和論文奮鬥的頌溫、立慈、幼君、小天、瑛璟以及挺軒，能認識你們我真的非常高興，相處的時間雖只有短暫的兩年，但我會一直記得大家一起生活的點點滴滴；也很感謝系辦奕雯學姊及位育學長在系上事務及生活上的幫助與照顧以及陳姊在日常生活的叮嚀。

最後特別感謝我最親愛的家人，謝謝爸媽在精神上及實質上的全力支持，讓我可以順利完成碩士學位；也謝謝我最優秀的姊姊總是得幫忙我中翻英；此外也很感謝博楷的包容與支持。最後僅以無限感激之心將此論文獻給所有鼓勵我及愛護我的人。

目錄

頁次

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
緒言.....	v
壹、 文獻檢討.....	1
1.1 乳酸菌.....	1
1.1.1 乳酸菌之定義.....	1
1.1.2 乳酸菌之種類.....	2
1.2 益生菌.....	2
1.2.1 益生菌之定義.....	2
1.2.2 益生菌之健康功效.....	3
1.3 微生物來源之胞外多醣.....	5
1.3.1 胞外多醣之分類、組成及分子量.....	5
1.3.2 胞外多醣之生合成.....	6
1.3.3 胞外多醣之生理活性.....	11
1.4 胞外多醣於酸凝酪中之顯微構造.....	15
1.5 胞外多醣對酸凝酪物理特性之影響.....	18
1.6 影響乳酸菌胞外多醣產量之因素.....	20
1.6.1 菌元.....	20
1.6.2 物理因素.....	20
1.6.3 化學因素.....	23
1.7 乳酸菌胞外多醣之應用.....	23
貳、 材料與方法.....	24
2.1 實驗材料.....	24
2.1.1 試驗菌元.....	24
2.1.2 培養基.....	24
2.1.3 藥品.....	24
2.1.4 儀器與設備.....	25

2.2	實驗方法.....	27
2.2.1	乳酸菌元之活化.....	27
2.2.2	酸凝酪之生產.....	27
2.2.3	乳酸菌菌數之測定.....	30
2.2.4	酸凝酪黏度之測定.....	35
2.2.5	酸凝酪離水性之測定.....	35
2.2.6	胞外多醣之分離與定量.....	35
2.2.7	胞外多醣黏絲性之測定.....	36
2.2.8	胞外多醣單糖組成之分析.....	36
2.2.9	品評試驗.....	37
2.2.10	統計分析方法.....	38
參、	結果與討論.....	39
3.1	乳酸菌菌數之測定.....	39
3.2	酸凝酪黏度之測定.....	43
3.3	酸凝酪離水性之測定.....	46
3.4	胞外多醣產量之測定.....	51
3.5	胞外多醣黏絲性之測定.....	54
3.6	胞外多醣單糖組成之分析.....	56
3.7	品評試驗.....	58
肆、	結論.....	60
伍、	參考文獻.....	62
陸、	作者小傳.....	74

圖目錄	頁次
圖 一 益生菌之健康功效.....	4
圖 二 胞外多醣之生合成路徑.....	9
圖 三 果糖-6-磷酸形成糖核苷酸的代謝途徑.....	10
圖 四 乳酸菌生產之胞外多醣促進健康的特性.....	14
圖 五 使用共軛焦顯微鏡觀察接種菌種 13 和 16 所生成酸凝酪之顯微構造...	16
圖 六 使用共軛焦顯微鏡觀察菌種接種 17 和 32 所生成酸凝酪之顯微構造...	17
圖 七 酸凝酪製備流程圖.....	29
圖 八 接種 5 種乳酸菌元於 30 、40 與 50℃下所生產酸凝酪之黏度.....	45



表目錄

頁次

表一	益生菌及 <i>L. helveticus</i> BCRC 14030 所使用的選擇性培養基之成分....	32
表二	五株乳酸菌分別培養於三種培養基，以厭氧方式培養，於 37 °C 恆溫培養 48hr 後之菌數.....	33
表三	益生菌及 <i>L. helveticus</i> BCRC 14030 所須之培養基.....	34
表四	以 30°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間之益生菌數與 <i>L. helveticus</i> BCRC 14030 菌數.....	40
表五	以 40°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間之益生菌數與 <i>L. helveticus</i> BCRC 14030 菌數.....	41
表六	以 50°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間之益生菌數與 <i>L. helveticus</i> BCRC 14030 菌數.....	42
表七	以 30°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間離水量之變化.....	48
表八	以 40°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間離水量之變化.....	49
表九	以 50°C 培養之酸凝酪於 4°C 保存期間離水量之變化.....	50
表十	接種 4 種乳酸菌元於 30、40 與 50°C 下生產酸凝酪之胞外多醣產量...	53
表十一	接種 4 種乳酸菌元於 30、40 與 50°C 下生產酸凝酪之胞外多醣黏絲性...	55
表十二	4 種乳酸菌元於 30、40 與 50°C 之胞外多醣單糖組成.....	57
表十三	酸凝酪官能品評.....	59

中文摘要

乳酸菌胞外多醣 (exopolysaccharide, EPS) 係指乳酸菌分泌於細胞外之多醣。乳酸菌來源的胞外多醣具有多項優點，它屬於食品級安全物質，且可改善產品濃稠度與組織特性，然而乳酸菌之胞外多醣應用於商業上面臨到低產量的問題。本研究的目的為探討接種不同乳酸菌元及培養溫度對胞外多醣產量的影響，以期生產富含胞外多醣及益生菌的酸凝酪產品。分別取(A) 5%酸凝酪菌元 (*Lactobacillus bulgaricus* 與 *Streptococcus thermophilus*)，(B) 5%酸凝酪菌元與 5%黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030，(C) 5%酸凝酪菌元與 5%益生菌 (*L. acidophilus*、*Bifidobacterium bifidum* 與 *L. casei*)，(D) 5%酸凝酪菌元、5% *L. helveticus* BCRC14030、與 5%益生菌與(E) 5%酸凝酪菌元及 0.17%果膠，接種於含 17%脫脂乳粉之還原乳後，於 30、40 與 50°C，培養至 pH 4.6±0.1，攪拌均勻後製成濃稠酸凝酪，其後進行胞外多醣產量、黏絲性及單醣組成分析、酸凝酪之黏度、離水性、益生菌及 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數的分析。

結果顯示以 30 和 40°C 進行發酵顯著會有較佳的胞外多醣產量 (0.2~0.6 g/L) ($P < 0.05$)。然而四種不同菌種組合對胞外多醣產量沒有顯著差異 ($P > 0.05$)。50°C 發酵的酸凝酪有嚴重的離水現象。此外發現使用酸凝酪菌元及黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 的組別，以 30°C 進行發酵培養，有最高 EPS 黏絲性 (96.0 cm)。使用 D 處理組菌元於 30、40 及 50°C 三種不同溫度下進行發酵培養，EPS 黏絲性皆高於使用 A 處理組菌元。以 30°C 進行發酵，發現 B 處理組酸凝酪，其黏度雖沒有明顯高於 A 處理組 ($P > 0.05$)，但有顯著高於 E 處理組。於 30、40 與 50°C 下生產酸凝酪，C 與 D 組產品之益生菌數在貯藏 15 天後，菌數不會下降；B 組產品在貯藏 15 天後之 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數會下降，D 組之 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數則維持不變；以 *L. helveticus* BCRC 14030 進行發酵，所生成之 EPS 會有較高含量的鼠李糖；接種酸凝酪菌元，EPS 單醣組成皆不含鼠李糖。官能品評部分，B、C 及 D 產品的濃稠度皆優於商業產品；A、C 及 D 組產

品與商業產品有較佳的總接受度。

綜合上述結論，接種 5%酸凝酪菌元、5% *L. helveticus* BCRC 14030、5%益生菌組，於 30 °C 發酵 18 小時能生產富含 EPS、益生菌與 *L. helveticus* BCRC 14030、具較佳黏絲性以及最低離水現象之酸凝酪。

關鍵字：胞外多醣、益生菌、酸凝酪、乳酸菌、離水性



Abstract

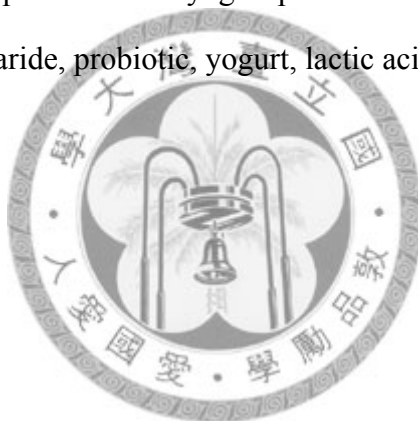
Exopolysaccharides (EPS) of lactic acid bacteria are polysaccharides secreted extracellularly by lactic acid bacteria. Several advantages of producing exopolysaccharide by lactic acid bacteria include GRAS nature of the organisms and the enhanced consistency and texture of the products by EPS. However, low EPS yield limited the commercial use of lactic acid bacteria on EPS production. The objective of this study, therefore, was to investigate the effects of lactic acid bacteria and incubation temperature on EPS production for producing EPS and probiotic-rich yogurt. Each of the 4 culture strains including (A) 5% yogurt bacteria (*Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*), (B) 5% yogurt bacteria and 5% ropiness *L. helveticus* BCRC14030, (C) 5% yogurt bacteria and 5% probiotics (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* and *L. casei*), and (D) 5% yogurt bacteria, 5% ropiness *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics was inoculated into a reconstituted milk containing 17% dried milk powder. After incubated at 30, 40, and 50°C until pH reaching 4.6 ± 0.1 , the fermented medium was homogenized to yield stirred yogurt. EPS yield, ropiness value, the composition of monosaccharide, viscosity of fermented medium, viable count, syneresis and sensory evaluation were analyzed.

The highest EPS yield of (0.20-0.60 g/L) was observed at 30 and 40 °C. However, no significant difference in EPS production was found among four different culture strains. The syneresis of yogurt was severe at 50°C. Highest ropiness value of EPS (96 cm) was found in the yogurt inoculated with yogurt bacteria and *L. helveticus* BCRC14030 at 30°C. Treatment D was fermented under 30, 40 and 50°C, and the results showed that treatment D had higher EPS ropiness value than treatment A. Under 30°C of fermentation, the viscosity of treatment B were not significantly higher than treatment A ($P > 0.05$), but was significantly higher than the treatment E.

Under 30°C, 40 and 50°C of fermentation, probiotic counts did not decrease in treatments C and D during 15 days of storage. However, the viable count of *L. helveticus* BCRC 14030 decreased in treatment B. In addition, the viable counts of neither probiotics nor *L. helveticus* BCRC 14030 changed in treatment D during storage. In sensory evaluation, mouth thickness of treatments B, C and D were better than commercial yoghurt. Treatments A, C, D and commercial yoghurt had acceptable.

In conclusion, inoculation of yogurt bacteria, *L. helveticus* BCRC 14030 and probiotics with a reconstituted milk and incubated at 30°C produced the highest EPS yield, ropiness value and probiotic counts, and lowest degree of syneresis, therefore, was suggested for EPS and probiotic-rich yogurt production.

Key words : exopolysaccharide, probiotic, yogurt, lactic acid bacteria, syneresis



緒言

酸凝酪的外觀和其物理特性是其重要的品質特徵，品質佳的酸凝酪應該具有黏稠且滑順的口感，並且於酸凝酪的表面沒有明顯的離水現象。乳酸菌所分泌的胞外多醣 (exopolysaccharide, EPS) 近年來廣泛應用於乳品業，其能改善發酵乳製品的流變性、質地與離水現象，並提升產品濃稠度及口感，此外也發現其具有多項生理機能。在多數歐洲國家全面禁止乳製品添濃稠劑下，使用黏質 EPS 生成菌取代濃稠劑，以生產具健康概念的發酵乳製品為未來新趨勢。本實驗以商業酸凝酪菌醃 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 與 *Streptococcus thermophilus*, YC-380) 為主要發酵菌醃，並再接再種黏質 EPS 生成菌種 (*L. helveticus* BCRC 14030)，以及三株商業上普遍使用的益生菌 (*L. acidophilus* LA 5、*Bifidobacterium bifidum* BB 46、*L. casei* LC 01)，於三種不同溫度 (30、40 及 50°C) 進行發酵生產酸凝酪，期能提供產業界生產富含 EPS 與益生菌，且品評分數佳之酸凝酪，亦能為 EPS 理化性狀之研究提供相關資訊供產業界參考。



壹、文獻檢討

1.1 乳酸菌

1857年，法國微生物學家巴斯德 (Louis Pasteur) 發現酸奶中有微小生物體存在，將其定名為”Levue lactique”；1873年，李斯特 (Joseph Lister) 利用稀釋法，由酸乳中純化分離出 *Bacterium lactis*，此乃目前的 *Streptococcus lactis*，為最早被分離出來的乳酸菌。

1.1.1 乳酸菌之定義

乳酸菌為一群能利用碳水化合物進行發酵生產多量乳酸之細菌總稱，多具有以下特性 (廖，1998)

- (1) 革蘭氏陽性菌。
- (2) 無運動性。
- (3) 非產孢菌 (除 *Sporolactobacillus* 以外)。
- (4) 菌體型態常為球菌或桿菌。
- (5) 通常缺乏過氧化氫酵素活性及細胞色素。
- (6) 須有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素及多種生長素等養分才可生長。
- (7) 為厭氧、微好氧或兼性厭氧，一般可於有氧環境生長，但以無氧環境較佳，也有絕對厭氧者。依據乳酸菌之代謝途徑及最終產物的差異分為同質發酵型乳酸菌 (homofermentative lactic acid bacteria) 及異質發酵乳酸菌 (heterofermentative lactic acid bacteria)，前者經醱解作用產生丙酮酸後，直接還原成 90%~100% 的乳酸，當環境中存在有五碳糖，代謝產物尚可能還含有醋酸，後者除了經醱解作用產生 45%~50% 的乳酸，還可經 phosphoketolase 產生乙醇及二氧化碳。異質發酵會較同質發酵可產生較多的乙醯乙醛和聯乙醯等風味物質 (Collins, 1972)。此外雙叉乳桿菌屬雖屬於異質型發酵菌種，但其代謝途徑和上述有很大的不同，產物為醋酸和乳酸，其比例為 3：2，但不會產生乙醇及二氧化碳。

1.1.2 乳酸菌之種類

廣義的乳酸菌分類可包含 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Streptococcus*、*Bifidobacterium*、與 *Sporolactobacillus* 此六個屬，隨著分子遺傳學的發達，以及對乳酸菌的生理特性有更進一步的認識，至2007年10月則將乳酸菌分為21個屬 (Genus) 463種 (Species)，分別為：乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)、肉品桿菌屬 (*Carnobacterium*)、*Atopobium*、*Weissella*、鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、乳酸球菌屬 (*Lactococcus*)、徘徊球菌屬 (*Vagococcus*)、*Abitrophia*、小球菌屬 (*Pediococcus*)、四體球菌屬 (*Tetrahenaococcus*)、白念球菌屬 (*Leuconostoc*)、*Oenococcus*、有孢子乳桿菌 (*Sporolactobacillus*)、雙叉桿菌屬 (*Bifidobacterium*)、*Olsenella*、*Granulicatella*、*Paralactobacillus*、*Halolactibacillus*、*Marinilactibacillus* 及 *Pilibacter* (廖，2007)。

1.2 益生菌

商品化的酸凝酪，一般會使用 *L. bulgaricus* 及 *S. thermophilus* 混合菌作為發酵菌種以產生良好風味及質地的酸凝酪，其混合比例為 1：1，但是此兩種菌無法定殖於人類腸道，僅可短暫調節、平衡腸道菌相及抑制壞菌生長，故功能有限。現今很多商品化的酸凝酪除了固定會有的發酵菌種外，還會再添加如 *L. acidophilus* (A 菌)、*Bifidobacterium* (B 菌)、*L. casei* (C 菌) 等益生菌，使酸凝酪有更多健康功效。

1.2.1 益生菌之定義

益生菌 (probiotic) 源自希臘語，意指“for life”，1965年 Lilly and Stillwell 首度提出，原意是指某一微生物可產生有利於另一微生物生長的物質。Parker (1974) 則認為只要能夠促進宿主腸道菌相平衡的微生物或物質，即可稱為益生菌。到了1989年，Fuller 重新定義，認為益生菌是一種能夠改善腸道微生物平衡，並有益於宿主的活菌型態補給物。Salminen (1996) 則定義益生菌為對宿主健康有益的微

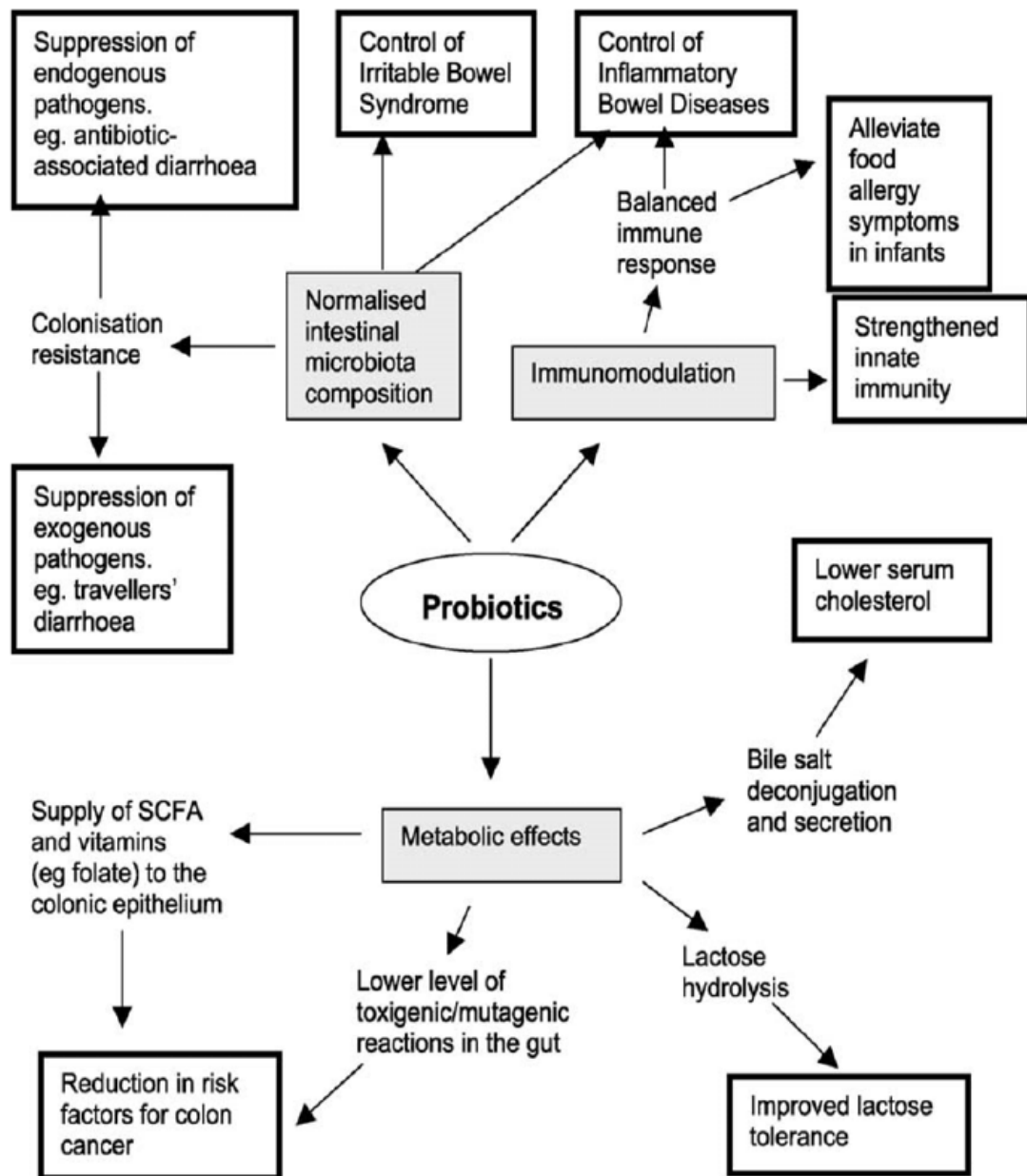
生物及其細胞組成份，且益生菌不一定要活菌。完善有效益生菌應具有以下特性 (Hull *et al.*, 1992)。

- (1) 源自人體之有益菌。
- (2) 對酸及膽鹽具很高之耐受性。
- (3) GRAS之菌株。
- (4) 可定殖於人類腸道之上皮細胞。
- (5) 可維持腸道菌相平衡，保持腸道健康。
- (6) 在腸道中能保持代謝活性，並成為腸道之優勢菌種。
- (7) 於產品製造及儲存期間須維持良好之穩定性及活性。
- (8) 可大量生產並具商業價值。

1.2.2 益生菌之健康功效

益生菌對人體的健康功效如圖一所示，包括維持腸道菌相平衡、預防腹瀉及舒緩其症狀、改善乳糖不耐症、降低結腸癌發生率、改善便秘、降低膽固醇、強化免疫系統以及改善過敏現象等。





圖一、益生菌之健康功效。

Fig. 1. Proposed health benefits stemming from probiotic consumption.

(Saarela *et al.*, 2002)

1.3 微生物來源之胞外多醣

微生物所合成的多醣可分為三種，並且根據它們與細胞的相對位置而有不同的定義與名稱：1.合成儲存性多醣，其存在於細胞質內，提供細胞本身營養所需，例如肝醣。2.結構性多醣，其為細胞壁之成分，例如肽聚醣 (peptidoglycan) 與脂胞壁酸 (liopteichoic acids) 即為革蘭氏陽性菌 G(+) 細胞壁的成分，而脂多醣為革蘭氏陰性菌 G(-) 之細胞壁成分，3.有些微生物會將多醣類分泌至細胞壁外，且和醣蛋白結合在一起，一般合稱為醣蓋 (glycocalyx)，此種細胞壁外聚合物即為胞外多醣 (exopolysaccharide, EPS)，分為兩種類型，即莢膜多醣 (capsular polysaccharide) 與黏質多醣 (ropy / slime / mucoid polysaccharide)，前者會與細胞表面做緊密的結合，後者則會以黏性物質的型態分泌於細胞外基質中，不與細胞壁接觸。凡存於細胞壁外之多醣即為 EPS。在原始環境中，EPS 可助於保護微生物，以抵抗乾燥傷害、吞噬作用、噬菌體、抗生素及毒性化合物 (例如有毒金屬離子、硫酸及酒精) (Cerning, 1995)。

1.3.1 胞外多醣之分類、組成、分子量及結構

乳酸菌 EPS 依化學組成可區分為兩種類型

(A) 同質多醣 (homopolysaccharide)

由單一類型的單醣組成，依據單醣種類可將其分為四個類別 (a) α -D-聚葡萄糖 (α -D-glucans)：如由 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 與 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 所生成之聚葡萄糖 (dextrans)，主要以 α -1,6 的形態將葡萄糖單元鍵結，也有少部分以 α -1,2、 α -1,3 或 α -1,4 形態鍵結；由 *S. sobrinus* 和 *S. mutans* 所生產的多醣 mutans，以 α -1,3 及 α -1,6 鍵結形式將葡萄糖單元鍵結在一起。(b) β -D-聚葡萄糖 (β -D-glucan)：由 *Pediococcus* 和 *Streptococcus* 所生產之多醣，主要以 β -1,3 之形式將葡萄糖單元鍵結在一起。(c) 聚果糖(fructans)：由 *S. salivarius* 所生成的果聚糖(levan)，此種多醣以 β -2,6 的形式將 D-果糖單元體鍵結在一起。(d) 其他，如 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* H 414 所生成的多聚半乳糖 (polygalactan)，以不同形式的醣苷鍵，鍵結結構相同的單元體(Cerning, 1990)。

(B) 異質多醣 (heteropolysaccharide)

通常由兩種以上的單醣以不同比例組合而成，常見的單醣有 D-葡萄糖 (D-glucose)、D-半乳糖 (D-galactose)、L-鼠李糖 (L-rhamnos)、N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine)、N-乙醯半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine)、葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 或海藻糖 (fucose) 等，有些多醣也會含有一些非碳水化合物的結構，如磷酸鹽 (phosphate)、乙醯基 (acetyl) 及甘油 (glycerol) (Low *et al.*, 1998)。

EPS 的機能性與其分子量相關 (Cerning *et al.*, 1992 ; Van den Berg *et al.*, 2004)。EPS 的分子量為 1×10^4 至 2×10^6 或以上，可分為高分子量多醣 ($>1 \times 10^6$) 與低分子量多醣 ($<1 \times 10^6$) (Vanningelgem *et al.*, 2004)。一般而言異質多醣的分子量會比同質多醣高 (Cerning, 1990)。

EPS 的結構對流變性及機能性有很大的影響。很多 EPS 的結構特性會影響發酵乳的組織，例如 EPS 之分子量及體積 (Faber *et al.*, 1998)、EPS 之分支 (Tuinier *et al.*, 2001)、EPS 結構中側鏈的種類、EPS 單醣成分以及單醣間的鍵結形式 (Tuinier *et al.*, 1999)。EPS 結構不同會影響酸凝酪的凝膠化 (gelation)，EPS 若以 β -1,4 的形式鍵結，則會造成 EPS 有較堅硬 (stiffness) 的骨架 (backbone)，因此便可促進酸凝酪的凝膠化，若是以 β -1,3、 β -1,2 及 α -形式鍵結，則會造成 EPS 有較柔軟 (flexible) 的骨架 (Low *et al.*, 2001 ; Girard and Schaffer-Lequart, 2007)。

1.3.2 胞外多醣之生合成

EPS 之生合成是一耗能反應，首先，當六碳醣轉變為六碳醣-phosphate 會消耗一個 ATP，每一個醣核苷的合成皆須打斷一高能磷酸鍵，isoprenoid C55 lipid carrier 的磷酸化也會須要一 ATP，此外最後的聚合和運送過程也會需要能量。與好氧菌 (*X. campestris*) 對照，兼性厭氧的乳酸菌，其能量的產生是相當有限的，而這將嚴重限制 EPS 的產量。由於 isoprenoid glycosyl lipid carrier 同時會與細胞壁聚合物的生合成有關，因此 EPS 與細胞壁的合成會產生競爭作用 (Southland, 1998)，即

菌體的生長會與 EPS 生合成互相競爭。

乳酸菌 EPS 之生合成 (圖二)。具有代謝半乳糖能力的菌種，如 *L. lactis*，則藉由 phosphoenolpyruvate dependent lac phosphotransferase system (PEP-PTS)，將乳糖磷酸化形成乳糖磷酸化物 (lactose-6-phosphate, lactose-6-P)，並且運送至細胞內，乳糖磷酸化物再經磷酸- β -半乳糖苷酶 (phospho- β -galactosidase) 作用形成半乳糖-6-磷酸 (galactose-6-P) 與葡萄糖，前者轉變為塔格糖 (tagatose)，再繼續做進一步的代謝，後者則參與醣解作用，產生 ATP 提供為生物質量 (biomass) 及 EPS 重複單元體合成之用；不具有代謝半乳糖能力的菌種，例如 *L. bulgaricus* 與 *S. thermophilus* 則以乳糖/半乳糖次級反向運輸系統 (lactose/galactose antiport secondary transport system)，藉由滲酶 (permease) 將乳糖直接運送至細胞內，且並未將其磷酸化，再以 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 將其水解，形成葡萄糖與半乳糖 (Welman and Maddox, 2003)。

葡萄糖之代謝 (圖二)：葡萄糖經由磷酸化形成 glucose-6-P，glucose-6-P 有兩個途徑，一為去進行醣解作用，二為被 phosphoglucomutase (PGM) 轉化成 glucose-1-phosphate。glucose-1-phosphate 是合成糖核苷酸的重要中間物，可能路徑有二 (Boels et al., 2001)：一是先經由 UDP-glucose pyrophosphorylase 轉變成 UDP-glucose，接著被 UDP-galactose-4-epimerase 催化形成 UDP-galactose；二是經過一連串的轉移、脫水、差向異構化 (epimerization) 與還原等生合成酵素系統，催化產生 dTDP-rhamnose (Welman and Maddox, 2003)。所生成的 UDP-glucose、UDP-galactose 及 dTDP-rhamnose 即為 EPS 合成之前驅物。

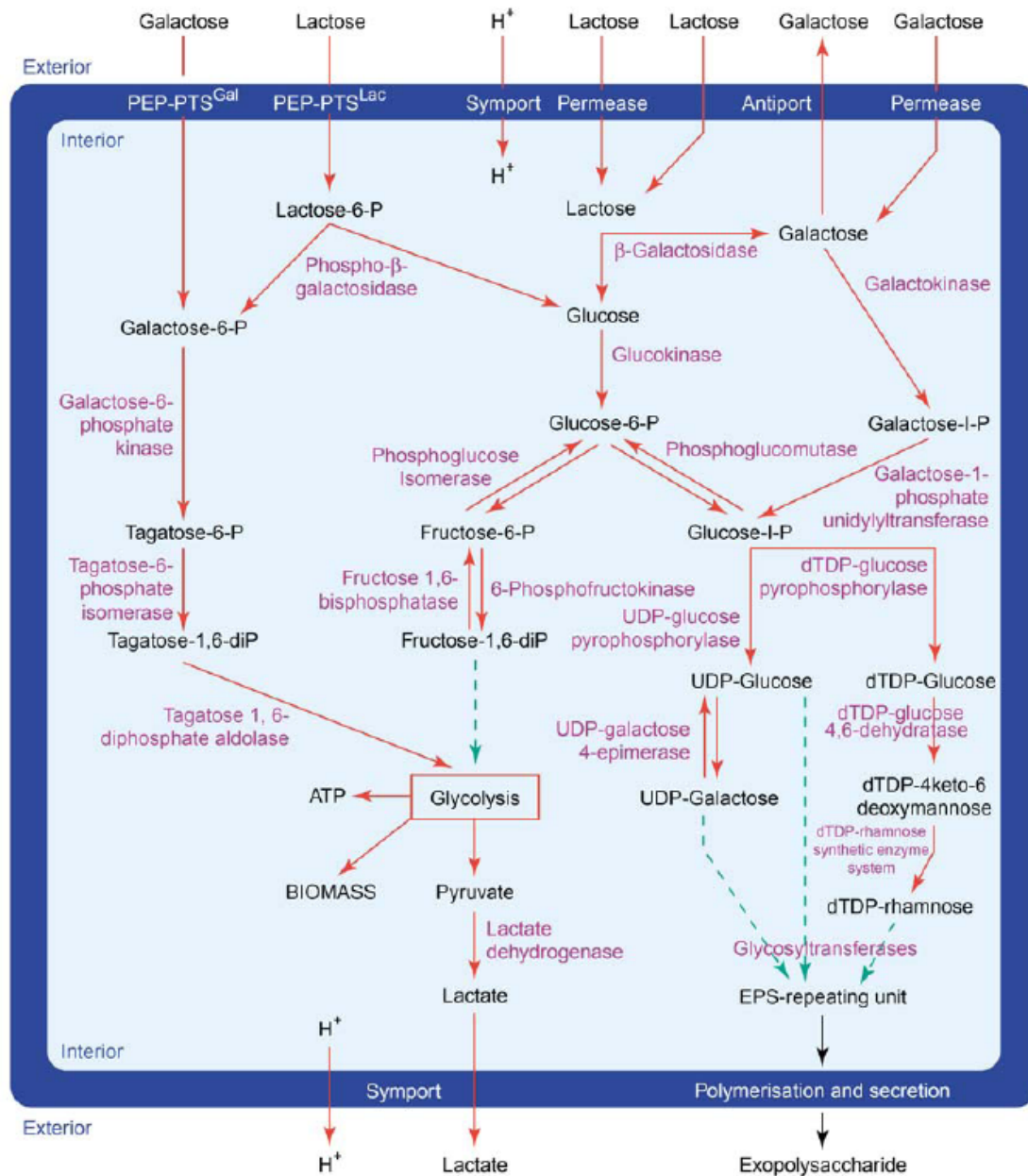
半乳糖之代謝 (半乳糖核苷酸之生合成)：不能利用半乳糖的菌種，因其缺乏 Lelior pathway 相關酵素，會將半乳糖以反向運輸的方式排至細胞外，把半乳糖排到細胞外，乳糖則直接運送至細胞內。能利用半乳糖的菌種，就會有 galactokinase 將半乳糖轉變為 galactose-1-P，再經由 galactose-1-phosphate uridylyltransferase 則再轉變為 glucose-1-P，經過一連串代謝反應產生的糖核苷物質作為合成 EPS 的先

驅物 (de Vuyst *et al.*, 2001)。

醣解作用中的 fructose-6-phosphate 也是參與糖苷物質生合成的另一個重要中間物 (圖三)， fructose-6-phosphate 經由胺-糖代謝 (amino-sugars metabolism) 轉變成 UDP-GlcNAc 與 UDP-GalNAc 或是利用果糖 - 甘露糖代謝 (fructose-mannose metabolism) 形成 UDP-fucose (Boels *et al.*, 2001)。

經由代謝反應所產生的 UDP-glucose、UDP-galactose、UDP-fucose、UDP-N-Ac-glucosamine (UDP-N-乙醯葡萄糖胺，UDP-GlcNAc) 及 dTDP-rhamnose 即所謂的糖苷 (sugar nucleotide) 物質，糖苷物質即為 EPS 合成之前驅物，這些糖苷物質經過糖苷轉移酶系統 (glycosyl transferase system) 作用將這些先驅物攜帶至連接細胞膜的 isoprenoid glycosyl lipid carrier (undecaprenyl phosphate carrier) 上聚合成完整的 EPS，最後釋放到細胞外 (van Kranenburg *et al.*, 1998)。

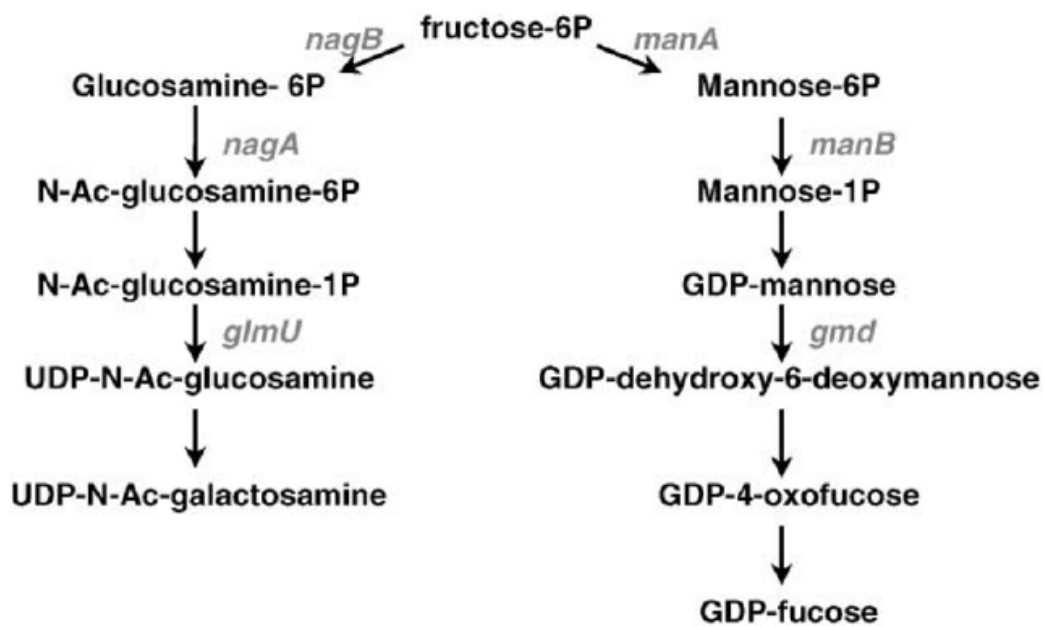




圖二、胞外多醣之生合成路徑。

Fig. 2. Pathways involved in exopolysaccharide biosynthesis in lactic acid bacteria.

(Welman and Maddox, 2003)



圖三、果糖-6-磷酸形成糖核苷酸的代謝途徑

Fig. 3. Pathways involved in sugar nucleotide metabolism from fructose-6P in lactic acid bacteria.

nagB : glucosamine-6P isomerase.

nagA : N-acetylglucosamine-6P deacetylase.

glmU : UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase.

manA : mannose-6P isomerase.

manB : phosphomannomutase.

gmd : GDP-mannose-4,6 dehydratase.

(Boels *et al.*, 2001)

1.3.3 胞外多醣之生理活性

諸多細菌學檢測與老鼠飼養試驗報告指出，益生菌促進人體健康的效應與其生成之 EPS 的生理活性有關，如圖四所示，EPS 具有免疫調節 (Kitazawa *et al.*, 1993; Hosono *et al.*, 1997)、抗腫瘤 (Oda *et al.*, 1983)、抗致突變 (Lo *et al.*, 2002)、抗潰瘍 (Nagaoka *et al.*, 1994) 等活性或降低血中膽固醇的功效 (Nakajima *et al.*, 1992)。胞外多醣之生理活性會受其單醣組成、分支程度以及醣苷鍵結種類之影響，而乳酸菌生長時的培養條件 (pH、溫度以及培養時間)、營養成分 (碳源、氮源以及其它營養素)，以及分離方法皆是影響 EPS 重複單元組成與產量的重要因子 (Looijesteijn *et al.*, 2000; Grobber *et al.*, 2000)。

(A) 降低膽固醇

肝內膽固醇經氧化後可產生膽酸，其可與醣類或氨基酸形成結合型膽鹽。部分益生菌具有膽鹽水解酵素 (bile salt hydrolase, BSH)，可將結合型膽鹽分解形成去結合型膽鹽，去結合型膽鹽會與血清中膽固醇產生共沉澱，將血清膽固醇隨著糞便排出體外，避免膽固醇被人體吸收，並促進肝臟膽固醇的分解產生膽鹽，因而降低人體的膽固醇含量；不具去結合能力的菌株則不會發生此類的共沉澱機制 (Brashears *et al.*, 1998; Klaver and van der Meer, 1993; St-Onge *et al.*, 2000)。膽鹽是體內排除毒素、致癌物以及藥物的重要途徑，其對微生物而言是一種抑制因子，乳酸菌抵抗膽鹽的能力越強，則定殖於腸道的能力越強，此為益生菌之重要特質 (Scheinbach, 1998)。以 EPS 生成菌 *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 發酵製得之酸凝酪飼食大鼠，其膽固醇降低量顯著高於非 EPS 生成菌所製得之酸凝酪，推論 EPS 可能有類似膳食纖維多醣的作用，可吸附腸道膽固醇或游離的膽酸 (Nakajima *et al.*, 1992)。另有研究發現，乳酸菌所產生的有機酸與抑制膽固醇合成系統的酵素 HMG CoA reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase) 活性有關，可能調節降低膽固醇的合成 (廖, 1998)。

(B) 調節免疫活性

乳酸菌為格蘭氏陽性菌 (Gram-positive bacteria)，其所具有的免疫刺激作用，被認為和其細胞壁的多醣成分有關，例如 peptidoglycan 的鍵結位置可被淋巴細胞及巨噬細胞 (macrophages) 所辨識；peptidoglycan 的主成分 muramyl dipeptide 會刺激單核球分泌 IL-1、IL-6 及 TNF- α ，並刺激淋巴細胞分泌 IFN- γ 及 IL-4 (Attouri and Lemoonier, 1997)；乳酸菌細胞壁成分 teichoic acids 會刺激單核球分泌 IL-1、IL-6 及 TNF- α (Meydani and Ha, 2000)。乳酸菌的細胞質成分 (*L. acidophilus* 及 *B. longum*) 也會刺激免疫反應。Tzianabos (2000) 指出源自真菌多醣體，除會活化體內巨噬細胞以進行吞噬作用，也會引發補體的活化反應，這些被活化的補體與吞噬細胞表面的受體結合，更能促進巨噬細胞的吞噬能力 (Tzianabos, 2000)。此外有研究指出乳酸菌的菌體本身或其代謝物，也有刺激人體或動物的免疫系統之效，格蘭氏陽性菌的細胞壁也有類似格蘭氏陰性菌細胞壁的脂多醣基，具活化免疫系統之能力 (Klimp *et al.*, 2002)。以陰離子交換層析法將源自 *L. bulgaricus* OLL 1073R-1 所產生的 EPS，分為酸性與中性多醣，其中，中性多醣無法刺激 B 細胞增生的能力，而酸性多醣則可刺激小鼠 B 細胞增生 (Kitazawa *et al.*, 1998)；Kitazawa *et al.* (2000) 指出不論是體內或體外試驗，皆可增加小鼠巨噬細胞吞噬能力。另外，臨床證實 *L. casei* strain Shirota 會誘導 Th0 (T helper 0 cell) 變異成 Th1，活化細胞免疫系統，抑制腫瘤的生成，降低引起過敏反應之 IgE 抗體的含量 (Hosono *et al.*, 2002)，而 *B. breve* YIT4064 則誘使 Th0 變異成 Th2，刺激體液免疫系統，增加對輪狀病毒及流行性感冒的抵抗力。

益生菌可預防及緩和食物過敏現象與遺傳性過敏疾病，許多過敏性疾病是由於 Th1 與 Th2 免疫反應不平衡所致，且對過敏原的反應較偏向 Th2 的免疫反應。益生菌可增加 IFN- α 與 IFN- γ 的表現量，誘發 Th1 的免疫反應，減緩過敏反應 (Cross *et al.*, 2001)。研究顯示，添加 *L. rhamnosus* GG 與 *B. lactis* Bb-12 於牛乳乳清中，可緩和嬰兒遺傳性過敏濕疹的發炎反應 (Majamaa and Isolauri,

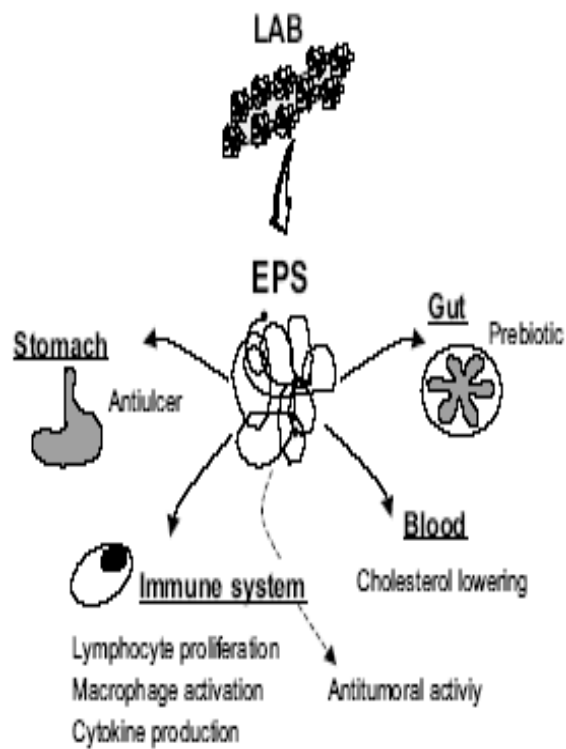
1997 ; Isolauri *et al.*, 2000)。

(C) 胞外多醣之抗致突變率

腸內益生菌的數量增加，能夠有效降低致癌酵素，研究顯示乳酸菌其細胞壁上的肽聚糖或多糖可吸附腸內有害的突變物，使其突變力失活。乳酸菌須具有附著於腸黏膜才能定殖於腸道中，能定殖於腸道中的乳酸菌才得以發揮其效用，因菌體進入腸道後，常會因遭受腸道蠕動收縮而減少，故為發揮其益生菌特性，挑選能存活於腸胃道之菌種有其必要性。Brooker (1975) 推測碳水化合物是乳酸菌吸附於腸壁之重要角色。Nadathur *et al.* (1995) 以 Ames test 分析酸凝酪對結腸致癌物 MNNG 及 DMBA 之抗致突變率，實驗結果發現未經發酵的牛奶較酸凝酪之抗致突變率低 2.5 倍。

(D) 胞外多醣可作為益生質

益生質無法被人體消化吸收，但卻可刺激腸道常駐菌群的生長，因而可改善宿主健康 (Gibson and Roberfroid, 1995)。不被消化的碳水化合物，例如抗性澱粉 (resistant starch)、果寡糖 (fructooligo-saccharide) 及菊糖 (inulin) 為常見的益生質。*L. casei* 於 MRS-glc 培養基所得 EPS 對 *B. infantis* BCRC14602、*B. adolescentis* BCRC14606 及 *B. bifidum* BCRC14615 的助生性較佳；*L. casei* 於 MRS-fru 培養基所得 EPS 對 *B. longum* BCRC14634 及 *B. lactis* Bb-12 助生性佳，且效果都比果寡糖好 (陳，2005)。



圖四、乳酸菌生產之胞外多醣促進健康的特性。

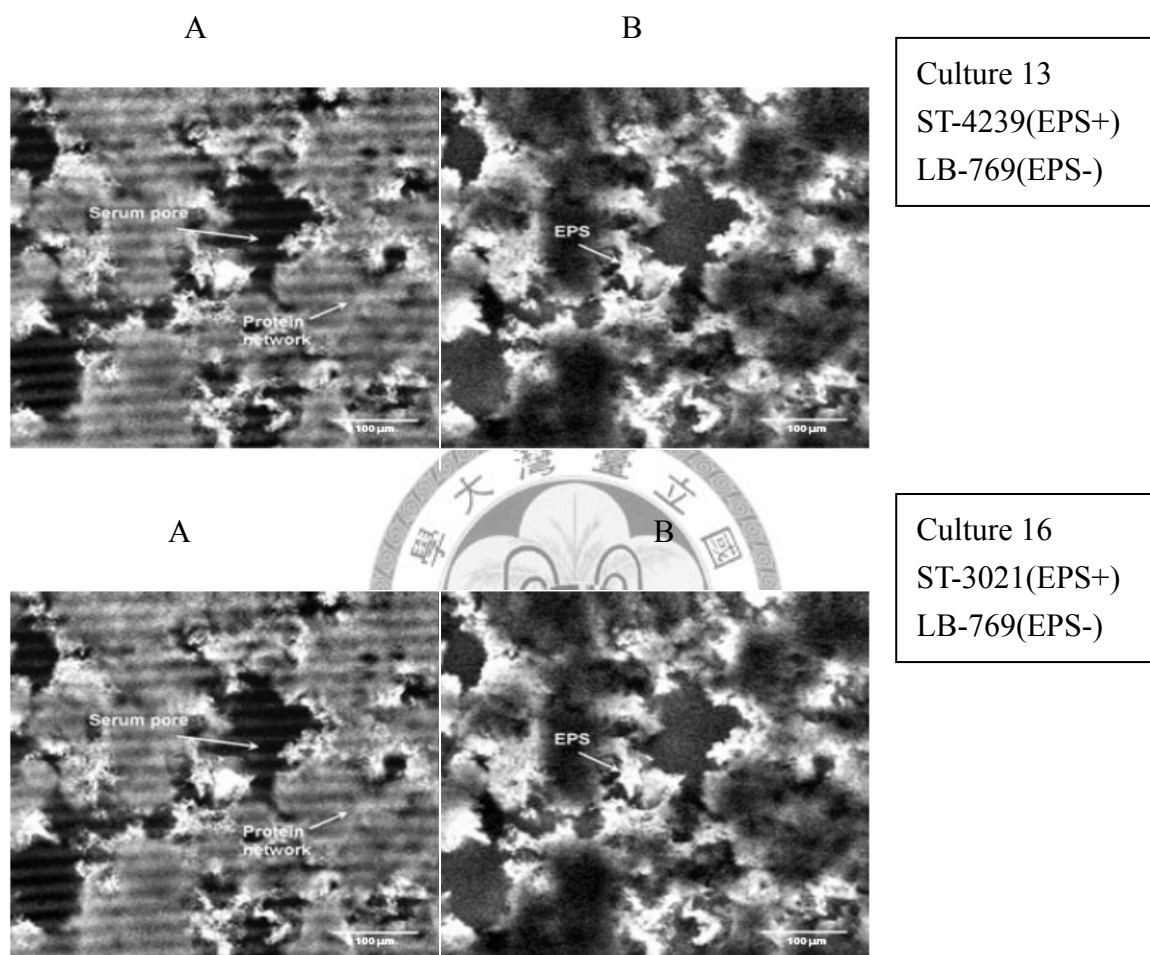
Fig. 4. Schematic representation of the possible health-promoting properties of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.

(Ruas-Madiedo *et al.*, 2002)

1.4 胞外多醣於酸凝酪中之顯微構造

使用 EPS 生成菌種 (EPS-producing starter) 和非 EPS 生成菌種 (non-EPS-producing starter) 發酵之酸凝酪，前者的顯微結構會發現有較大的乳清孔洞 (serum pore) (Amatayakul, *et al.*, 2006b)。含有 EPS 的酸凝酪，其顯微結構分為兩種形式(1) EPS 和蛋白質的網狀結構相連在一起，相容兩者呈相容 (compatible) 狀態 (圖五)；(2) EPS 位於蛋白質網狀結構的乳清孔中，即兩者不相容(imcompatible) 狀態 (圖六)(Folkenberg *et al.*, 2005)。使用非 EPS 生成菌種，其酸凝酪的顯微結構似乎是呈現均質狀，且有較小且分布均勻的乳清孔洞，且蛋白質網狀結構相對是由較細的 strand 構成；使用 EPS 生成菌種其酸凝酪的顯微結構相對有較大的乳清孔洞，這是由於有 EPS 的存在，其蛋白質網狀結構相對是由較粗的 strand 構成 (Hassan *et al.*, 2003)。

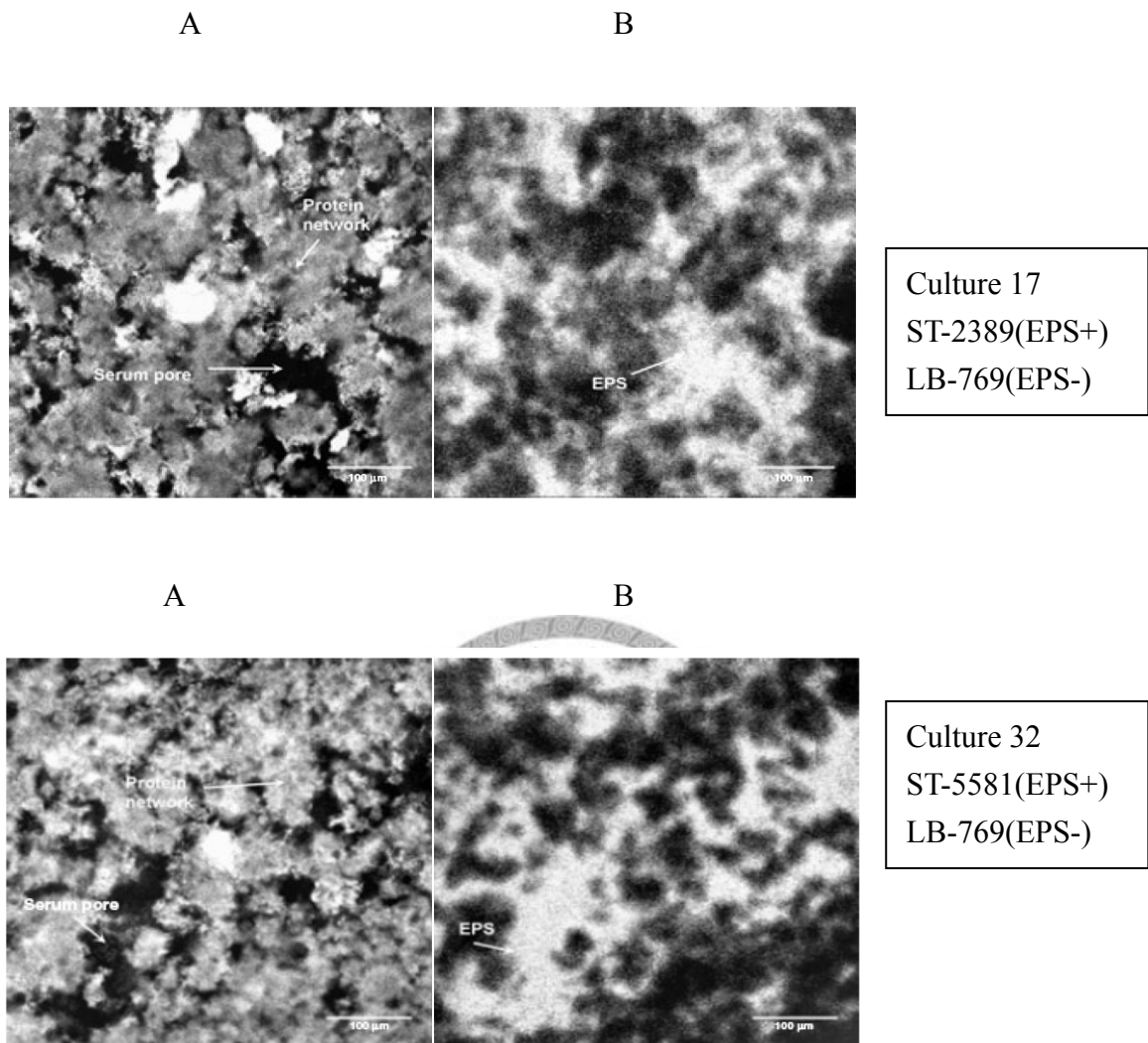




圖五、使用共軛焦顯微鏡觀察接種菌種 13 和 16 所生成酸凝酪之顯微構造，圖 A 為蛋白質網狀構造的反射模式，圖 B 為胞外多醣(於同一樣本的相同位置所做的觀察)。

Fig. 5. Confocal laser scanning microscope image of yoghurt produced with culture 13 and Culture 16. Image A: protein network observed in reflectance mode. Image B: exopolysaccharides (EPS)(at the exact same position in the sample).

(Folkenberg *et al.*, 2005)



圖六、使用共軛焦顯微鏡觀察接種菌種 17 和 32 所生成酸凝酪之顯微構造，圖

A 為蛋白質網狀構造的反射模式，圖 B 為胞外多醣(於同一樣本的相同位置所做的觀察)。

Fig. 6. Confocal laser scanning microscope image of yoghurt produced with culture 13 and Culture 16. Image A: protein network observed in reflectance mode. Image B: exopolysaccharides (EPS)(at the exact same position in the sample).

(Folkenberg *et al.*, 2005)

1.5 胞外多醣對酸凝物理特性之影響

(A) 黏度

許多研究指出 EPS 須與酸凝酪中的酪蛋白結合，才可促進產品黏度 (de Vuyst and Degeest, 1999 ; Duboc and Mollet, 2000 ; Law and Marshall, 2001)。有文獻指出 EPS 之黏性係數與與發酵乳製品黏度雖成正相關，但由於通常酸凝酪中的 EPS 產量皆很低，故對黏度促進效果並不明顯 (Madico *et al.*, 2002)。酸凝酪之黏度除了受 EPS 影響，也受酸凝酪之蛋白質網狀結構所影響，有很多研究指出蛋白質網狀結構之空間架構才是決定酸凝酪性狀之主要因素。EPS 的產量、化學組成、結構、多醣一級結構的複雜程度、分子大小 (迴轉半徑大小)、單醣組成、分子帶電荷、鏈長、分支程度、分子量以及重複單元間 α 或 β 鍵結，均會影響其物理特性，進而影響多醣溶液的黏度及流變性 (Nordmark *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2000)。Marshall and Rawson (1999) 發現 EPS 的含量並不是影響酸凝酪流變性之最重要因子，EPS 的類型與 EPS 和蛋白質之間的交互作用才是決定酸凝酪流變性的最重要因子。以共軛焦顯微鏡觀察四株 EPS 生成菌株的顯微結構，且別針對 EPS 於蛋白質網狀結構中的分佈做觀察，發現到有兩種不同的顯微結構 (1) EPS 和蛋白質的網狀結構相連在一起，相容兩者呈相容 (compatible) 狀態；(2) EPS 位於蛋白質網狀結構的乳清孔中，即兩者呈不相容 (incompatible) 狀態，兩者相比，前者會有較高的黏性、較低的離水現象以及較強的抵抗攪拌的能力；後者會有較低的黏性且較高的乳清分離現象 (Folkenberg *et al.*, 2005)。

EPS 是乳酸菌於發酵期間所生產的，且 EPS 會顯著影響酸凝酪之組織特性 (Cerning, 1990)。分別以 EPS 生成菌 (EPS producing cultures) 和非 EPS 生成菌 (Non-EPS producing cultures) 進行發酵，前者所生產的酸凝酪會有較高的濃稠度 (mouth thickness)、黏絲性 (ropiness) 及硬度，較低的離水現象 (syneresis) (Folkenberg *et al.*, 2006)。Shihata and Shah (2002) 指出混合菌醃會顯著提升酸凝酪黏度。

(B) 離水性

不論使用非 EPS 生成菌種 (non-EPS-producing starter)、莢膜式 EPS 生成菌種 (capsular-EPS-producing starter) 或黏質式 EPS 生成菌種 (ropy-EPS-producing starter)，當酪蛋白/乳清蛋白的比例下降時 (即乳清蛋白含量提高)，皆會降低離水現象 (Amatayakul *et al.*, 2006b; Puvanenthiran *et al.*, 2002)。Guzman-Gonzalez *et al.* (1999) 也發現若添加乳清蛋白濃縮物於牛奶培養基中進行發酵，會降低離水現象 (這是與沒添加乳清蛋白濃縮物的培養基相比)。此外也發現培養基中若添加乳清蛋白濃縮物會使酸凝酪有較緊密的蛋白質基質，因此增加毛細現象，故可阻止酸凝酪離水現象 (Amatayakul *et al.*, 2006b)。Harwalkar and Kalab (1986) 的研究顯示蛋白質基質密度增加，可降低離水現象。當酪蛋白/乳清蛋白的比例下降時，觀察酸凝酪的顯微結構，發現蛋白質結構的緊密度上升，會導致膠體中自由水的固定性增加 (Amatayakul, *et al.*, 2006b)。使用 EPS 生成菌種 (包括莢膜式和黏質式 EPS 生成菌種) 與非 EPS 生成菌種，前者會有較低的離水性 (Amatayakul *et al.*, 2006a)。乳清蛋白和 EPS 被認為有高度水的結合能力，故可減緩離水現象 (Cerning, 1990; de Vuyst and Degeest, 1999)。

(C) 硬度

於培養基添加酪蛋白，可提升酸凝酪的硬度，但於培養基中添加乳清蛋白則沒有一致的結果，部分研究者認為可以提升硬度，但也有持相反意見的研究者。於含 9% 或 14% 固形物中皆可發現隨著酪蛋白/乳清蛋白比例下降，硬度也隨之下降 (Amatayakul *et al.* 2006b)。然而 Puvanenthiran *et al.* (2002) 認為酸凝酪之硬度隨著酪蛋白/乳清蛋白比例下降而上升。Amatayakul *et al.* (2006a) 發現使用莢膜式 EPS 菌種或黏質式 EPS 生成菌種來生產酸凝酪，其酸凝酪的硬度會低於使用非 EPS 菌種，有很多研究也有相似的結果 (Hassan *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1997; Marshall and Rawson 1999)。EPS 會部分影響酪蛋白網狀結構的形成，使其網狀結

構中的孔洞較大，堅實度就降低 (Hassan *et al.*, 1995)。Amatayakul *et al.* (2006b) 也發現到以 EPS 生成菌種發酵生產的酸凝酪，其顯微結構會發現有較大的乳清孔，且也發現此種酸凝酪的硬度會有降低的現象。以流變儀測定酸凝酪凝膠強度，發現以黏質乳酸菌發酵製成之酸凝酪，有較弱之凝膠強度 (Hess *et al.*, 1997)。酸凝酪之硬度與彈性受蛋白質影響大於 EPS。

1.6 影響乳酸菌胞外多醣產量之因素

1.6.1 菌元

欲利用菌株的共培養以提升 EPS 產量，關鍵在於此菌株是否為黏質式的 EPS 生成菌 (ropy-EPS producing)，若共培養的菌株為莢膜式的 EPS 生成菌 (capsular-EPS producing)，則可能會造成 EPS 的產量下降，這是由於莢膜式的 EPS 和菌體是鍵結在一起，並非是分泌至培養基中 (Zisu and Shah, 2003)。混合使用一產黏菌株 *S. thermophilus* 和一非產黏菌株 *L. bulgaricus* 多醣產量可由 0.2 g/l 提升到 0.8 g/l (Cerning *et al.*, 1988)。若利用混合菌株共生培養可以提升 EPS 產量，則可取代或減少額外添加的碳源或氮源。

1.6.2 物理因素

(A) 培養溫度：

有研究指出嗜高溫乳酸菌 EPS 的生產和菌體生長有關，於生長對數期終點 EPS 可到達最大產量，即嗜高溫乳酸菌於最適生長條件下有較高 EPS 產量 (de Vuyst *et al.*, 1997；Gamer *et al.*, 1998；Kimmel *et al.*, 1998)。Marshall (1995) 觀察嗜中溫性乳酸菌 *L. lactis* subsp. *cremoris*，其開始進行 EPS 生合成時是在生長對數期的終點，此類似的結果亦發現在其它嗜中溫乳酸菌的 EPS 生產，顯示嗜中溫性菌似乎於非最適的生長條件下，其 EPS 可達最大產量 (Kojic *et al.*, 1992；Grobben *et al.*, 1998)。對於嗜中溫性菌而言，低於最適培養溫度 (30°C) 進行發酵培

養，雖菌的增殖速率降低，但多醣產量卻會增加 (van den Berg *et al.*, 1995)。乳酸菌培養於比其最適生長溫度略低的環境中，雖菌體生長速度慢，但卻有較高 EPS 產量 (Cerning, 1992)，有此現象可能的機制為較遲緩的細胞生長，使細胞壁合成速率也隨之變慢，對於類異戊二醯磷酸 (isoprenoid phosphate) 的需求也減緩，相對的就有較多的類異戊二醯磷酸可供作 EPS 合成之用，這是由於菌體的生長和 EPS 生合成於類異戊二醯脂質攜帶分子方面，有相互競爭之關係 (Whitfied, 1988)。然而也有持相反意見的文獻，報告指出乳酸菌於最適培養溫度下會有最高的產量 (Mozzi *et al.*, 1995)。 *L. acidophilus* 於 37°C 培養，其 EPS 產量高於 30°C (Mozzi *et al.*, 1995)。 *S. thermophilu* LY03 於 42°C 培養比在 30、37 及 50°C 有較高的 EPS 產量 (de Vuyst *et al.*, 1998)。

(B) pH 值

EPS 產量會受 pH 所影響，然而不同菌種其最適生產 EPS 之 pH 也不盡相同，大部分研究顯示 EPS 合成之最理想的 pH 為 6。Zisu and Shah (2003) 發現以較低的 pH 5.5 進行發酵則 EPS 產量會增加，然而 Gassem *et al.* (1997) 卻指出，培養基若具較高之 pH 值，可提高其產量。這可能都是由於太高或太低之 pH 值，皆不是菌體最適的生長條件，因此使得發酵時間延長，故菌體生長維持在對數生長期 (exponential growth phase) 及平緩期 (stationary phase) 的時間延長所致，而對數生長期及平緩期的時間延長將會降低肽聚醣 (peptidoglycan) 與胞壁酸 (teichoic acid) 等細胞壁成分的生合成，使得 isoprenoid lipid carrier 轉向參與胞外多醣的生產，因而提高其產量，但發酵的時間也不可以過長，因為有文獻指出培養時間過長，EPS 可能會被 EPS 降解酵素作用，導致 EPS 產量減少 (Marshall *et al.*, 1995)。 *L. bulgaricus* 生成多醣最適之 pH 為 6.5，與該菌最適生長之 pH 相同 (Cerning *et al.*, 1992)。找出菌體最適生產 EPS 之 pH，然後以此 pH 進行發酵作用，其 EPS 產量會較自然發酵 (沒控制 pH) 高。Zisu and Shah (2003) 發現 *S.*

thermophilus 1275於37℃，pH 5.5 (此為*S. thermophilus* 1275最適生產EPS之pH) 進行發酵24小時，或採以自然發酵的方式培養溫度同為37℃，同樣也是發酵24小時，發現前者的 EPS 產量 (458 mg/L) 會比後者 (406 mg/L)。Zisu and Shah (2003) 於培養基中額外添加乳清蛋白濃縮物以 *S. thermophilus* 1275 進行發酵，發酵條件為37℃、pH 5.5 發酵 24 小時，或採以自然發酵的方式培養溫度為 37℃，同樣也是發酵24小時，發現前者的EPS產量 (1092 mg/L) 也有比後者 (491 mg/L) 高的現象。Gassem *et al.* (1997) 也指出連續調控 pH 值之培養基，其EPS產量顯著高無調整 pH 值者。*L. casei* CRL 87 於維持在 pH 6 的培養環境中，具最高的多醣產量 488 mg/L 與生菌數，相較於為調控 pH的培養基所得之 EPS產量，高出了 3.6 倍 (Mozzi *et al.*, 1996)。雖然很多研究指出固定pH進行發酵會有較高量EPS，但也並不是指隨意固定任何pH去進行發酵，其產量就會高於自然發酵者，還必須要考量的是此 pH 是否為提升 EPS 產量最適的 pH。綜合上述，發現固定 pH 以進行發酵作用，其 EPS 產量會較自然發酵高，因此以產 EPS 生成菌種應用於食品發酵產業上，會發現 EPS 產量常無法達到理想產量。

(C) 培養時間

培養時間過久，EPS 總產量會有減少的趨勢，此乃乳酸菌除了有合成 EPS的酵素，也有分解 EPS 的酵素，當培養條件適合分解酵素時，則 EPS 產量可能會下降。*L. bulgaricus*與 *S. thermophilus* 於脫脂乳中培養24小時，其 EPS 產量比培養72小時者高，可能原因為培養後期 EPS 水解酵素的作用大於合成酵素之作用所致 (Mozzi *et al.*, 1995)。

1.6.3 化學因素

培養基中添加可利用的氮源，例如酵母萃取物或 peptone 去進行發酵，發現 EPS 產量會增加 (de Vuyst *et al.*, 1998; Gorret *et al.*, 2001)。添加 WPC392 (whey protein concentrate 392)，可提供一個額外的氮源去增加 peptide 及胺基酸以供菌體生長之用，會發現在24小時的發酵期間，EPS產量漸漸增加 (Zisu and Shah 2003)。接種 *S. thermophilus* 1275 於還原脫脂乳中及還原脫脂乳中額外添加WPC392之培養基，以 pH 5.5、培養溫度 37°C 進行發酵培養 24小時，發現有添加WPC392的培養基，其EPS產量顯著增加 (458~1029 mg/L)。Looijesteijn and Hugenholtz (1999) 將 *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 培養於添加果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、甘露糖或N-乙醯葡萄糖胺 M-17 broth，發現添加葡萄糖的培養基會有較高 EPS 產量，可能是由於葡萄糖能促進乳酸菌所含之UDP-glucosepyrophosphorylase 活性，醣核甘酸含量因此提高，故 EPS 產量較高。

1.7 乳酸菌胞外多醣之應用

利用產黏菌株可提升大規模生產攪拌型酸凝酪質地的穩定性、降低離水現象，也可降低在推送幫浦、混合機和充填機對酸凝酪質地之物理性傷害。乳酸菌所產的聚葡萄糖可被應用於作為凝膠過濾物以及血量擴增劑，在食品方面也會被應用作為食品糖漿安定劑及麵糰質地改良劑。Alternan 因有特殊的醣苷鍵結形式，因而有特殊的溶解度和低度的黏性，固可應用於化妝品或食品(de Vuyst and Degeest, 1999)。

貳、 材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 試驗菌元

菌種 *Lactobacillus helveticus* BCRC 14030 購自新竹食品工業研究所菌種保存及研究中心；真空乾燥之商用發酵乳菌元 YC-380 (含 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 與 *Streptococcus thermophilus*)(YC-380, 50 U, Chr. Hansen A/S, Horsholm, Denmark)、*L. acidophilus* LA 5、*Bifidobacterium bifidum* BB 46 及 *L. casei* LC 01，皆購自振芳股份有限公司(台北市)。

2.1.2 培養基

安佳脫脂奶粉 (Anchor, New Zealand Milk Ltd.)(購自全聯福利中心)

Lactobacilli MRS agar (Difco, USA)(購自台灣現用股份有限公司，台北市)

Lithium chloride and sodium propionate MRS agar (LP-MRS agar)

Bile- MRS agar

果膠 (Pectin, YM-150-H，購自振芳股份有限公司)

2.1.3 藥品

鹽酸 (Hydrochloric acid, 關東化學株式會社，日本)

氫氧化鈉 (Sodium hydroxide Fisher Scientific, Inc., USA)

三氯醋酸 (Trichloroacetic acid, Lancaster Synthesis, England)

三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid, Fisher Scientific, Inc., USA)

葡萄糖 (Glucose, 石津製藥株式會社，日本)

L-鼠李糖 (L-rhamnose, Sigma, USA)

D (+)-半乳糖 (D (+)- galactose, Sigma, USA)

N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, Sigma, USA)

分子量標準品 Shodex Standard P-82 ($0.59-78.8 \times 10^4$, 富田製藥, 日本)

Polymer Standard (1.67×10^7 , Polymer Standard Service GmbH, Germany)

乙晴 (Acetonitrile, TEDIA, USA)

乙醇 (Ethanol, 台灣菸酒公賣局, Taipei, Taiwan)

膽汁 (Bile)

氯化鋰 (Lithium chloride)

丙酸鈉 (Sodium propionate)

2.1.4 儀器與設備

超高速離心機 (HITACHI CR21G, Japan)

凍乾機系統 (Freeze Dryer, Eyela FDU-830, Tokyo, Japan)

厭氧缸 (BBL GasPak system 為 Cockeysville, MD, USA)

厭氧產氣包 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, U.K.)

pH 值測定儀 (Laboratory pH meter LnoLab pH level 1, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Germany)

恆溫培養箱 (LM-570, 台灣易德公司)

滅菌釜 (TM-329, Tomin, Taiwan)

高效能液相色層分析儀 (High performance liquid chromatography, Jasco Co., Tokyo, Japan)

幫浦 (Pump, JascoPU-980, Tokyo, Japan)

屈折率偵測器 (SFD RI2000, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef, Germany)

管柱用控溫箱 (Column Oven)

分析管柱 (TOSOH TSK-gel GMPW_{XL}, 7.8mm id $\times$ 300 mm stainless steel, Tosoh Corp., Tokyo, Japan)

保護管柱 (TOSOH TSK-gel GMPW_{XL} guard column, 6.0 mm id $\times$ 40 mm stainless

steel, Tosoh Corp., Tokyo, Japan)

分析管柱 (Shodex Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 mm id × 250 mm stainless steel, Tokyo, Japan)

保護管柱 (Shodex Asahipak NH2P-50 4A, guard column, 4.6 mm id ×10 mm stainless steel, Tokyo, Japan)



2.2 實驗方法

2.2.1 乳酸菌元之活化

購自新竹食品工業研究所菌種保存及研究中心之 *L. helveticus* BCRC 14030 菌元雙重管，以沾有70%酒精之棉花，擦拭外管，並於火焰上加熱其之尖端，滴數滴無菌水於加熱處，使其破裂，取出隔熱纖維和內管，以滅菌過之鑷子取出棉花塞，滴加 0.3~0.5 mL MRS培養液於內管中，使菌體溶解成懸浮菌液，取 0.1 mL 懸浮液於 MRS平板中，觀察純度及活化情形；其他菌液則各取 0.1 mL 注入已滅菌(121 °C，15 min) 17%還原乳中，並於 37 °C 恆溫培養 24hr後，置於 4 °C 保存，活化約2~3次後，取5%培養液量接種於已滅菌 (121°C、15 min)冷卻之 17% 還原乳中，在37 °C下培養24 hr備用。

購自振芳股份有限公司，真空乾燥之商用酸凝酪菌元 (YC-380)，與 1 L 已滅菌之 17%還原乳混合均勻後，置於4°C，1 hr內使用。真空乾燥之益生菌菌元 *L. acidophilus* LA 5、*B. bifidum* BB 46 及 *L. casei* LC 01各取 0.25 g，分別添加於 1000 mL已滅菌之 17%還原乳中，並於 37 °C 恆溫培養 24hr後置於 4 °C 保存，再取 5% 培養液量接種於已滅菌之 17%於還原乳中，在 37 °C 下培養 24 hr備用。

2.2.2 酸凝酪之生產

(A) 使用不同菌元處理組

- (a) 5%酸凝酪菌元(YC-380) (yogurt bacteria、*L. bulgaricus* 與 *S. thermophilus*)
- (b) 5%酸凝酪菌元與 5%黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030
- (c) 5%酸凝酪菌元與 5%益生菌(*L. acidophilus* LA 5、*B. bifidum* BB 46、*L. casei* LC 01)
- (d) 5%酸凝酪菌元、5% *L. helveticus* BCRC 14030、與 5%益生菌
- (e) 5%酸凝酪菌元(含有 0.17%果膠)

(B) 酸凝酪製備

(a) 不添加果膠

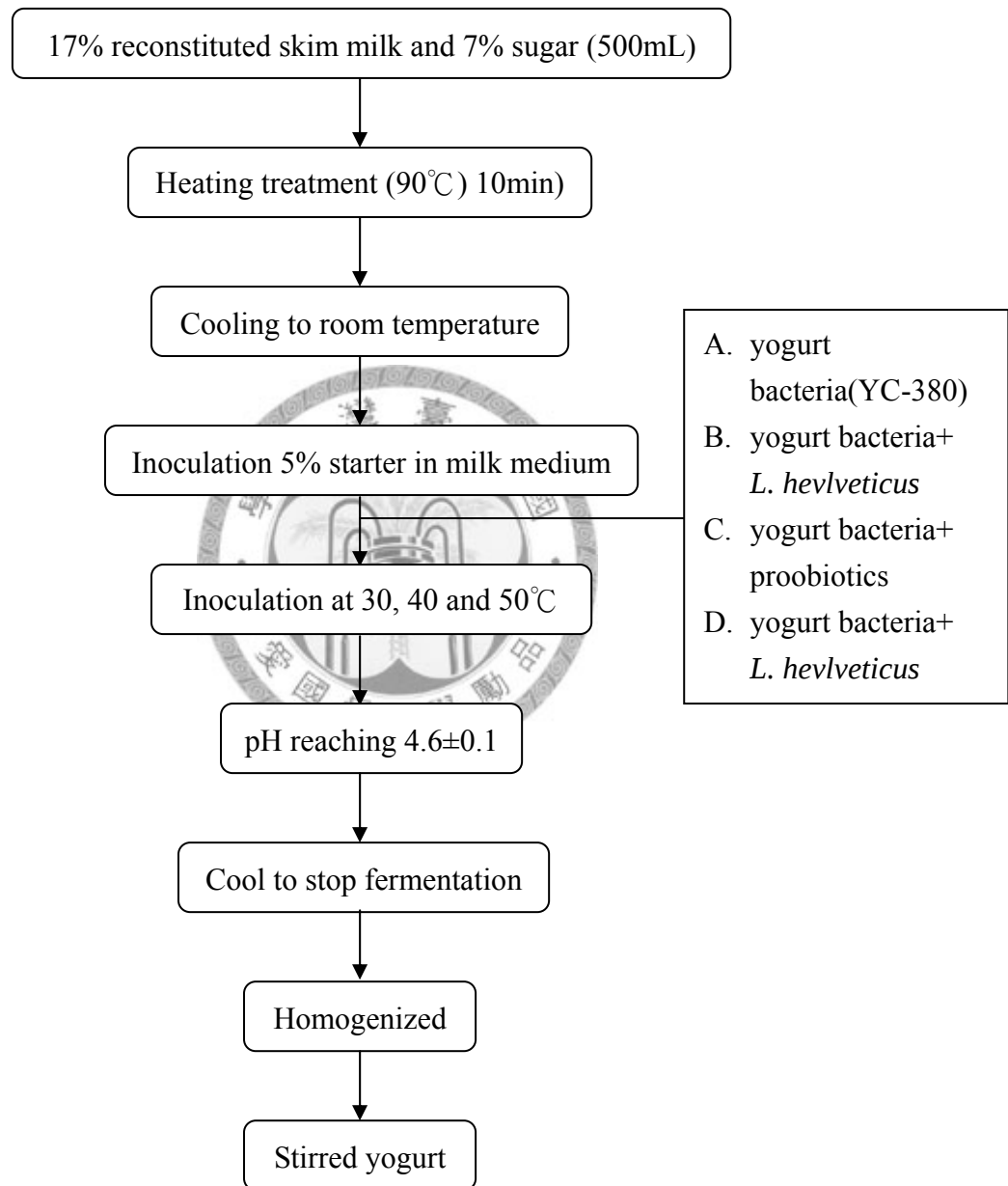
依 Lin (2003) 法修飾之。500mL 原料乳 (17%脫脂奶粉及 7%砂糖) 經 90°C，10 分鐘殺菌，冷卻後分別接種上述 a、b、c 及 d 組菌元後，培養於 30、40、與 50°C，發酵 6-24 hr，發酵期間隨時以 pH-meter 測定每一酸凝酪之 pH 值，測定 pH 值過程均於無菌操作臺進行，直至 pH 達 4.6 ± 0.1 ，再攪拌均勻作成濃稠酸凝酪(圖七)。

(b) 添加果膠

先將 0.17%果膠粉末與 7%砂糖乾混均勻，倒入適量的 70°C 熱水，待溶解均勻後再加入於已準備好的 17%還原脫脂奶中，混合均勻並定量至 500mL 經 90°C，10 分鐘殺菌，冷卻後接種上述 e 組菌原後，培養於 30、40、及 50°C，發酵 6-24 hr，發酵期間隨時以 pH-meter 測定每一酸凝酪之 pH 值，測定 pH 值過程均於無菌操作臺進行，直至 pH 達 4.6 ± 0.1 ，再攪拌均勻作成濃稠發酵乳。

(C) 分析項目與方法：

酸凝酪將進行 EPS 產量、黏絲性以及單糖組成分析，酸凝酪離水性、酸凝酪黏度、乳酸菌菌數與總益生菌數 (包含 *L. acidophilus* LA 5、*B. bifidum* BB 46 及 *L. casei* LC 01) 測定。



圖七、酸凝酪製備流程圖。

Fig. 7. Process for stirred yogurt manufacture.

2.2.3 乳酸菌菌數之測定

表一為選擇性培養基 LP-MRS 及 Bile-MRS 之成分。由表二發現 LP-MRS 培養基會抑制發酵乳菌元 (YC-380) 及 *L. helveticus* BCRC 14030 的生長，但三種益生菌皆可生長於此平板，因此以 LP-MRS 平板來計算總益生菌數；Bile-MRS 平板會抑制酸凝酪菌元 (YC-380)，但 *L. helveticus* BCRC 14030 可生長於此平板，因此可以 Bile-MRS 平板來計數 *L. helveticus* BCRC 14030 之菌數。

(A) 益生菌菌數之測定

取各發酵時間之採樣液 1 mL，以 0.85% NaCl 滅菌水做連續稀釋，取適當稀釋倍數之稀釋液 1 mL，滴入培養皿中，並倒入 10 mL LP-MRS 培養基 (Lapierre *et al.*, 1992) 混勻，於 37 °C 進行厭氧培養，培養 48 hr 後計數，再乘以稀釋倍數，所得之菌數即為益生菌菌數(表三)。

(B) *L. helveticus* BCRC 14030 菌數之測定

(a) Treatment B

取各發酵時間之採樣液 1 mL，以 0.85% NaCl 滅菌水做連續稀釋，取適當稀釋倍數之稀釋液 1 mL，滴入培養皿中，並分別倒入 10 mL MRS 培養基與 Bile-MRS 培養基混勻，於 37 °C 進行厭氧培養，培養 48 hr 後計數，再乘以稀釋倍數，所得之菌數即為 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數(表三)。

(b) Treatment D

取各發酵時間之採樣液 1 mL，以 0.85% NaCl 滅菌水做連續稀釋，取適當稀釋倍數之稀釋液 1 mL，滴入培養皿中，並倒入 10 mL LP-MRS 培養基與 Bile-MRS 培養基混勻，於 37 °C 進行厭氧培養，培養 48 hr 後計數，再乘以稀釋倍數，並將 Bile-MRS 平板所得之菌數減去 LP-MRS 平板所得之菌數即為 *L. helveticus* BCRC

14030 菌數(表三)。



表一、益生菌及 *L. helveticus* BCRC14030 所使用的選擇性培養基之成分

Table 1. Selective media used in this study for viable cell counts of probiotics and *L.*

helveticus BCRC14030

Agar medium	Final composition of selective compounds in the media(% w/v)	
Bile-MRS	Bile	0.15
LP*-MRS	Lithium chloride	0.2
	Sodium propionate	0.3

LP*: Lithium chloride and sodium propionate

(Vinderola and Reinheimer, 1999)



表二、五株乳酸菌分別培養於三種培養基，以厭氧方式培養於 37 °C 恆溫培養
48 小時後之菌數

Table 2. Five strains of lactic bacteria were inoculated with three medium under
anaerobic conditions, and the bacteria counts were calculated after 37°C
and 48hours of inoculation

Culture Agar medium	YC-380 (log CFU /mL)	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i> (log CFU /mL)	<i>B. Bifidum</i> (log CFU /mL)	<i>Lb. casei</i> (log CFU /mL)	<i>L. helveticus</i> BCRC14030 (log CFU /mL)
MRS	8.5	9.5	9.2	9.1	8.9
Bile-MRS	0	9.3	9.4	9.1	8.3
LP-MRS	0	9.7	9.0	9.2	0



表三、益生菌及 *L. helveticus* BCRC 14030 之培養基

Table 3. Medium used to count probiotics and *L. helveticus* BCRC 14030

Treatment Culture	B YC-380+ <i>L. helveticus</i> BCRC14030	C YC-380+ Probiotics	D YC-380+ <i>L. helveticus</i> BCRC14030 +Probiotics
<i>L. helveticus</i> BCRC 14030	Bile ^a		Bile-LP ^b
Probiotics ^d		LP ^c	LP

^aBile means Bile- MRS medium.

^bBlie-LP means Bile- MRS medium minus LP- MRS medium.

^c LP means LP - MRS medium.

^d Probiotics involves *L. acidophilus* LA5, *Bifidobacterium bifidum* BB46 and *L. casei* LC01.



2.2.4 酸凝酪黏度之測定

黏度之測定將使用 Brookfield DV-1 Viscometer，以 500 mL 燒杯裝取 500 mL 酸凝酪樣本，置於超音波震盪器（添加碎冰使溫度控制在 4°C）中 15 min 進行除氣泡，使用 4 號 spindle，轉速為 6 rpm 之條件進行黏度測試，測定結果以 CPS 表示之。

2.2.5 酸凝酪離水性之測定

500 mL 原料乳經 90°C，10 分鐘殺菌，冷卻後分別接種 a、b、c、d 及 e 組菌元後，再將已接種菌元之原料乳分裝至 7 個已滅菌之保鮮盒容器中（容積為 100ml），每一保鮮盒容器中均裝 70 mL，培養於 30、40、與 50°C，發酵 6-24 hr，發酵期間隨時以 pH-meter 測定每一酸凝酪之 pH 值，測定 pH 值過程均於無菌操作臺進行，直至 pH 達 4.6 ± 0.1 即完成發酵，先分別取 5 組各一盒製備好的酸凝酪進行第 0 天之離水性測定，其餘酸凝酪則置於 4°C 冰箱待第 3 天、第 6 天、第 9 天、第 12 天以及第 15 天再取出進行測定。離水性測定方法為將裝有酸凝酪的杯子傾斜約 45 度角，利用塑膠吸管收集酸凝酪表面上的乳清，整個過程於 10 sec 內完成 (Amatayakul *et al.*, 2006)。測定結果以百分比(w/w)表示之。

2.2.6 EPS 之分離與定量

發酵完成的酸凝酪，添加三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA)，添加的比例為 25:1 (v/w)，以磁石攪拌器攪拌 2 小時混合均勻後離心 ($22000 \times g$, 4°C, 35 min; rotor NO.31, HITACHI CR21G, Japan)，移除沉澱的蛋白質及菌體，取上層液並加入等量冰乙醇 (95% ethanol, 4°C)，並以磁石攪拌器攪拌 15 分鐘混合均勻，置於 4°C，24 hr，再經離心後 ($22000 \times g$, 4°C, 35 min; rotor NO.31, HITACHI CR21G, Japan)，刮取下層黏稠物即為 EPS (Yang *et al.*, 1999)。

將離心所得之 EPS 黏稠物先於 -80°C 預冷 24 hr，再放入冷凍乾燥機 (Freeze

Dryer, Eyela FDU-830, Tokyo, Japan)進行冷凍乾燥，36 hr 後取出並秤重之 (Torino *et al.*, 2001)。

2.2.7 EPS 黏絲性之測定

將純化出的 EPS 黏稠物質置於-20℃冰箱 24 hr，再取 EPS 黏稠物質約 0.05 g，以刮勺沾拉方式向左右延伸，計時 3min 後，開始以尺測量可延伸而不斷裂之最大長度，介於 0-5 mm 表示菌醃為 nonropy 菌醃，>6 mm 表示菌醃為 ropy 菌醃(Torino *et al.*, 2001)。

2.2.8 EPS 單糖組成之分析

將 EPS 黏稠物質以 1 : 100 (w/v)溶解於水，以磁石攪拌器攪拌混合均勻，取 18 mL 以 5 kDa nominal molecular weight cutoff 之 Centrion Plus-20 過濾膜離心管 (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)，離心處理 ($1290 \times g$, 4℃, 60 min ; rotor NO.47, HITACHI CR21G, Japan) 後，先將離心管上半截內液體收集，再將其反轉離心 ($320 \times g$, 4℃, 60 min ; rotor NO.47, HITACHI CR21G, Japan) 後收集液體與先前收集之液體混合，取 3 mL EPS 溶液加入 0.375 mL 3 M trifluoroacetic acid 於小玻璃瓶中混合均勻，蓋上瓶蓋，置入 120℃烘箱，反應 2 小時，再以不同濃度的 NaOH 將 pH 調整至 7，再以 0.45 μm 的過濾膜過濾，並以高效能液象層析儀分析 (high performance liquid chromatography, Jasco Co., Tokyo, Japan)，配備幫浦(pump, JascoPU-980, Tokyo, Japan)、SFD RI2000 屈折率偵測器(SFD RI2000, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef, Germany)、自動採樣儀、管柱用控溫箱 (column oven)、分析管柱 (shodex Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 mm id $\times$ 250 mm stainless steel, Tokyo, Japan)、保護管柱 (shodex Asahipak NH2P-50 4A, guard column, 4.6 mm id $\times$ 10 mm stainless steel, Tokyo, Japan)，移動相 (mobile phase)為 acetonitrile : water = 80 : 20 (v/v)，分析流速 (flow rate) 為 0.8 mL/min，管柱壓力為 67~70 kg/cm²，屈折率偵

測器溫度設定為 39℃，管柱用控溫箱溫度也設定為 39℃，四種單醣標準品：葡萄糖、半乳糖、鼠李糖及 N-乙醯葡萄糖胺，標準品注入體積為 30 μL，試樣注入體積為 30 μL，分析時間為 20 分鐘 (Lin and Chang Chien, 2007)。

2.2.9 品評試驗

品評試驗採嗜好性品評評分法進行，其條件如下

- (1) 人員：由台灣大學動物科學所師生 30 人擔任品評試驗者
- (2) 評分法：以 hedonic scale (1-9 分；1：非常不喜歡；2：很不喜歡；3：不喜歡；4：有點不喜歡；5：不喜歡也不討厭；6：有點喜歡；7：喜歡；8 很喜歡；9：非常喜歡)(Larmons, 1982)。
- (3) 品評樣本：共分五組，分別為(a) 5%酸凝酪菌元(YC-380) (yogurt bacteria、*L. bulgaricus* 與 *S. thermophilu*.)，(b) 5%酸凝酪菌元與 5%黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030，(c) 5%酸凝酪菌元與 5%益生菌 (*L. acidophilus* LA 5、*B. bifidum* BB 46、*L. casei* LC 01)，與(d) 5%酸凝酪菌元、5%*L. helveticus* BCRC 14030、與 5%益生菌，以 30℃進行發酵培養至 pH 4.6±0.1，再攪拌均勻作成濃稠酸凝酪 (e)市售統一 AB 優格。
- (4) 品評項目：包含外觀、氣味、嚐味、濃稠度與總接受度。
- (5) 品評方法：由 30 位品評員，每次間隔一至二日，共做三次重複品評，品評時樣品置於鐵置托盤並放在黑色實驗桌，品評員先以開水漱口後進行品評，且在每個樣本品評間，以開水漱口和蘇打餅清除前個樣品之殘留味，每一重複試驗之樣本編號與位置皆不同。

2.2.10 統計分析方法

試驗所得資料以 SAS 套裝軟體 (SAS 8.2, SAS institute) 進行變方分析，並以鄧肯氏多次變域測定法 (Duncan's multiple rang test)，檢測均值差異顯著性。



參、 結果與討論

3.1 乳酸菌菌數之測定

以 30°C 進行發酵，發現 B 組產品在貯藏 15 天後之 *L. helveticus* 菌數會下降，D 組之 *L. helveticus* 菌數則維持不變，而在益生菌部分，C 與 D 組產品於 4°C 冰箱貯藏 15 天後，其益生菌數菌數不會下降(表四)。以 40°C 進行發酵，發現 B 組產品在貯藏 15 天後之 *L. helveticus* 菌數會下降，D 組之 *L. helveticus* 菌數則維持不變，而在益生菌的部分，C 與 D 組產品之益生菌數在貯藏 15 天後，菌數也不會下降(表五)。以 50°C 進行發酵，發現 B 組產品在貯藏 15 天後之 *L. helveticus* 菌數會下降，D 組之 *L. helveticus* 菌數則維持不變，而在益生菌的部分，C 與 D 組產品之益生菌數在貯藏 15 天後，菌數不會下降(表六)。隨著儲藏時間延長至 15 天，益生菌菌數仍沒有下降的現象，推測可能原因為乳酸菌所生成的 EPS 可作為益生菌的益生物質，故益生菌菌數沒有隨著儲藏天數變長而減少。



表四、以 30℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間之益生菌數與 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數

Table 4. Viable counts (log CFU/mL) of probiotics and *L. helveticus* BCRC 14030 of yogurt fermented at 30 °C and stored at 4 °C

Storage period(d) (4 °C)	Probiotics (log CFU/mL)		<i>L. helveticus</i> BCRC 14030 (log CFU/mL)	
	C	D	B	D
0	8.83±0.11 ^c	8.70±0.01 ^b	7.85±0.07 ^a	7.93±0.07 ^b
3	8.75±0.04 ^c	8.71±0.02 ^b	7.28±0.11 ^{bc}	8.81±0.01 ^a
6	9.04±0.15 ^b	8.81±0.04 ^{ab}	7.34±0.03 ^b	8.12±0.08 ^b
9	9.20±0.05 ^{ab}	8.82±0.07 ^{ab}	7.01±0.01 ^d	7.89±0.16 ^b
12	9.27±0.01 ^a	8.89±0.01 ^a	7.14±0.07 ^{cd}	7.84±0.20 ^b
15	9.26±0.01 ^a	8.83±0.10 ^{ab}	6.81±0.10 ^e	8.16±0.17 ^b

^{abcde} Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

表五、以 40℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間之益生菌數與 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數

Table 5. Viable counts (log CFU/mL) of probiotics and *L. helveticus* BCRC 14030 of yogurt fermented at 40 °C and stored at 4 °C

Storage period(d) (4 °C)	Probiotics (log CFU /mL)		<i>L. helveticus</i> BCRC14030 (log CFU /mL)	
	C	D	B	D
0	8.65±0.09 ^{ab}	8.61±0.06 ^{abc}	7.72±0.57 ^a	7.15±0.21 ^c
3	8.80±0.13 ^a	8.79±0.16 ^a	7.47±0.10 ^{ab}	8.29±0.35 ^a
6	8.77±0.05 ^{ab}	8.69±0.04 ^{ab}	7.39±0.03 ^{ab}	8.00±0.00 ^{ab}
9	8.22±0.50 ^b	8.59±0.06 ^{abc}	7.65±0.07 ^a	7.36±0.26 ^{bc}
12	8.65±0.11 ^{ab}	8.55±0.02 ^{bc}	7.46±0.40 ^{ab}	7.71±0.32 ^{abc}
15	8.67±0.01 ^{ab}	8.48±0.05 ^c	6.86±0.01 ^b	7.50±0.28 ^{bc}

^{abc} Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3) .

B : 5% yogurt bacteria and 5% *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

表六、以 50℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間之益生菌數與 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數

Table 6. Viable counts (log CFU/mL) of probiotics and *L. helveticus* BCRC 14030 of yogurt fermented at 50 °C and stored at 4 °C

Storage period(d) (4 °C)	Probiotics (log CFU /mL)		<i>L. helveticus</i> BCRC14030 (log CFU /mL)	
	C	D	B	D
0	8.02±0.02 ^a	7.90±0.02 ^b	8.31±0.03 ^a	7.48±0.22 ^{ab}
3	8.11±0.04 ^a	8.00±0.06 ^{ab}	7.98±0.03 ^b	7.74±0.09 ^{ab}
6	8.15±0.09 ^a	8.13±0.07 ^a	8.04±0.03 ^b	7.17±0.08 ^c
9	8.05±0.07 ^a	8.02±0.03 ^{ab}	8.07±0.17 ^b	7.08±0.00 ^c
12	8.10±0.04 ^a	8.16±0.09 ^a	6.69±0.04 ^c	7.21±0.01 ^{bc}
15	8.03±0.05 ^a	7.97±0.14 ^{ab}	6.64±0.12 ^c	7.24±0.11 ^{bc}

^{abc} Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

B : 5% yogurt bacteria and 5% rop *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% rop *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

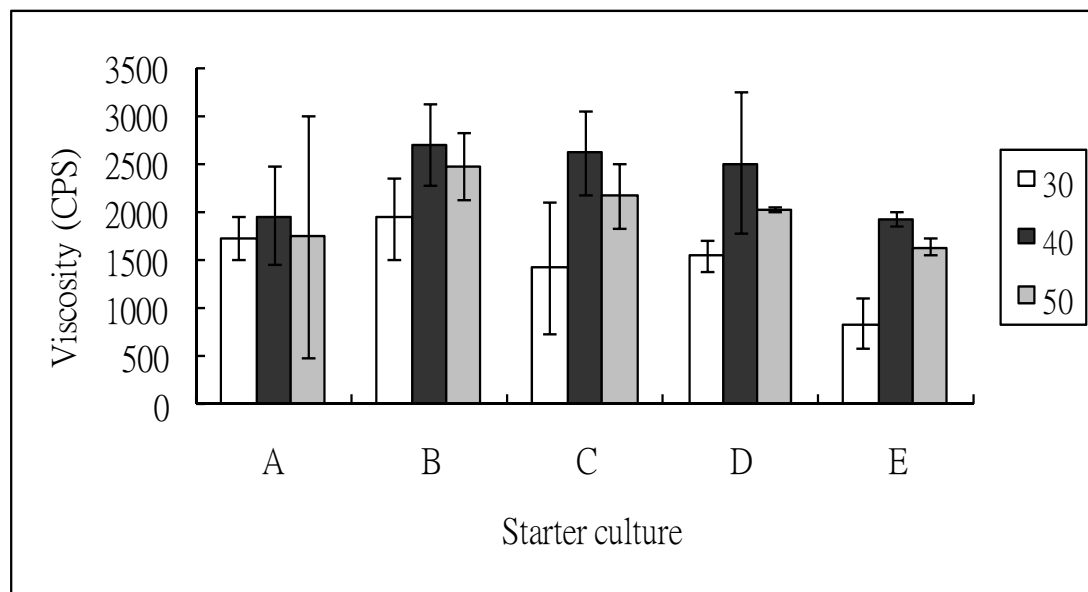
3.2 酸凝酪之黏度測定

黏度測定時須注意待測樣本的溫度，因為溫度對黏度會有很大的影響。本實驗所有樣本均維持在 4℃ 進行黏度測定。黏度會受 pH、離子強度以及溫度影響 (de Vuyst and Degeest, 1999)。以 30 °C 進行發酵，發現有添加黏質 EPS 生成菌 *L. helveticus* BCRC14030 的 B 和 D 處理組，其兩者的黏度與 A 組無顯著差異，但兩者的黏度都顯著高於 E 處理組 ($P < 0.05$) (圖八)。雖然接種 B 和 D 處理組菌元，所產生的 EPS 黏絲性顯著高於 A 處理 ($P < 0.05$) (表十一)，但接種 B 和 D 處理組菌元發酵所生成之酸凝酪，其黏度與 A 組無顯著差異，這表示就 EPS 的黏絲性對酸凝酪的黏度而言，沒有顯著的影響。影響黏度的因素很多，包括 EPS 的結構、分子量、分支程度、產量、鏈長以及和 EPS 和酸凝酪中酪蛋白結合的方式等，機制相當複雜，並非僅有單一影響因子。由圖八發現接種 A、B、C 及 D 處理組菌元，於三種溫度下進行發酵培養，其黏度皆沒有顯著差異，但仍然可以發現以 30 °C 進行發酵會有較低黏度，以 40 °C 進行發酵會有較高黏度的趨勢，50°C 的黏度值則居於兩者之間。接種 E 處理組菌元 (有添加果膠的組別)，發現以 40°C 與 50°C 發酵培養所得之酸凝酪黏度顯著高於 30°C (圖八) ($P < 0.05$)，然而此結果和 Mozzi *et al.* (1995) 所指出培養溫度過高 (高於 45°C)，易使菌體發生突變因而喪失產黏特性，因此發酵液黏度下降，有不一樣的結果。

由表十發現使用酸凝酪菌元(A 處理組)，以 30°C 和 40°C 進行發酵，其酸凝酪的 EPS 產量最高 (0.6 g/L)，但由圖八發現此酸凝酪的黏度並非最高。有研究顯示 EPS 產量的多寡和溶液的黏度並無顯著的關係 (Vanningelgem *et al.*, 2004)。許多研究指出 EPS 須與酸凝酪中的酪蛋白結合，才可促進產品黏度 (de Vuyst and Degeest, 1999)。此外 de Vuyst *et al.* (2003) 也發現 *S. thermophilus* LY03 可生產高量多醣，但其發酵乳質地卻未達到理想的黏稠質地。由圖八發現接種 B、C 及 D 處理組菌元於三種不同溫度進行發酵所生成之酸凝酪，其黏度有較高於 A 處理的趨勢，即混合菌元的使用可以提高酸凝酪黏度。Marshall and Rawson (1999) 也發現

相同的結果，混合使用兩株產黏菌元 *L. bulgaricus* 與 *S. thermophilus*，雖總多醣量沒有顯著提高，但溶液黏度有提高現象。





圖八、接種 5 種乳酸菌元於 30 、40 與 50℃ 下所生產酸凝酪之黏度*。

Fig. 8. Viscosity of yogurt were measured by reconstituted skim milk which are inoculated with five culture strains at 30,40 and 50 °C .

^a Means in the same row and column followed by the same superscripts are not significantly different ($P>0.05$). (n=3)

*Shear rate : 6 rpm, Spindle : No4, Sample temperature : 4 °C .

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% rop *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% rop *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

E : 5% yogurt bacteria(pectin).

3.3 酸凝酪之離水性測定

培養溫度為 30°C 的酸凝酪離水現象 (syneresis) (0~1.8 %) 皆低於 50°C (3.6~12.4 %)(表七與表九)。以 30°C 發酵所得之所有酸凝酪皆維持著很低的離水現象，推測可能原因為低溫發酵不會造成劇烈的蛋白質凝集現象，因此乳清不會自乳清孔分離至酸凝酪表面，且由表十得知所有的酸凝酪中皆含有 EPS，EPS 會有高度水的結合能力，溫度和 EPS 兩者相加乘效應，故 30°C 有最低的離水性。另外也有研究指出，含有 EPS 的酸凝酪，其蛋白質基質的結構會較為緊密，故可降低離水現象 (Hassan *et al.*, 1995)。由表七也發現不同菌種間，其酸凝酪的離水現象皆沒有顯著不同 ($P > 0.05$)，推測於低溫培養時，菌種對離水性的影響程度小於溫度對於離水性的影響，故可以低溫發酵改善酸凝酪離水性。發現當培養溫度為 30°C，所有酸凝酪之離水現象皆不會隨著儲藏天數延長增加 (表七)。Amatayakul *et al.* (2006a) 也有相同的結果，在 28 天的儲藏期間，不同處理組的酸凝酪，其離水現象沒有顯著不同。由表七也發現，接種 A、B、C 及 D 四個處理組菌元發酵所生成之酸凝酪，其離水現象和接種 E 組菌元 (有添加果膠) 差異不顯著 ($P > 0.05$)。以 EPS 生成菌種來取代果膠的添加來改善酸凝酪離水現象具有相當大的潛力。

以 40 °C 去進行發酵 (表八)，發現酸凝酪於儲存 15 天後再和第 0 天相比，其離水現象也沒有顯著增加 ($P > 0.05$)，於 5 個處理組中皆有此現象。由表 3-5 發現儲存天數為第 3、9 及 12 天，接種 B 和 D 處理組菌元發酵所生成之酸凝酪，其離水性皆有顯著較低於 A 或 C 的現象 ($P < 0.05$)，推測可能是由於 B 和 D 處理組含有黏質 EPS 生成菌 *L. helveticus* BCRC14030，且由表十一可發現接種 B 和 D 處理組菌元，所產生的 EPS 其黏絲性較接種 A 和 C 處理菌元高，因此造成蛋白質基質密度增加，且毛細作用上升，故可阻止酸凝酪的離水現象。Harwalkar and Kalab (1986) 的研究發現，若蛋白質基質密度增加，則可降低離水現象。

雖然以 50 °C 去進行發酵，酸凝酪的離水現象也不會隨著儲藏天數延長而增加(表九)，但和 30°C 相比，發現到 50 °C 會有嚴重的離水現象，有兩個可能原因

(1) 50°C 是屬於較高的發酵溫度，高溫使蛋白質較為聚集，因此造成乳清孔縮小，因此水分滯留在乳清孔的空間變小，故乳清大量析出，因此離水現象變較劇烈，(2) 以高溫進行發酵，可能是因為 EPS 的黏絲性被破壞，所以即便是加了 *L. helveticus* BCRC14030 這株產黏的菌株，離水現象仍然也很劇烈。



表七、以 30℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間離水量之變化

Table 7. The syneresis of yogurt of yogurt fermented at 30 °C and stored at 4 °C

Starter culture	The syneresis during storage period (%w/w)					
	0 day	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day
A	1.8±2.6 ^{ax}	1.2±1.3 ^{ax}	0.4±0.6 ^{ax}	0.5±0.5 ^{ax}	0.5±0.7 ^{ax}	0.1±0.1 ^{ax}
B	0.6±0.8 ^{ax}	0.3±0.4 ^{ax}	0.2±0.3 ^{ax}	0.3±0.0 ^{ax}	0.6±0.5 ^{ax}	0.4±0.3 ^{ax}
C	0.1±0.1 ^{ax}	0.0±0.0 ^{ax}	0.0±0.0 ^{ax}	0.1±0.1 ^{ax}	0.3±0.4 ^{ax}	0.1±0.1 ^{ax}
D	0.0±0.0 ^{ax}	0.5±0.7 ^{ax}	0.2±0.0 ^{ax}	0.0±0.0 ^{ax}	0.4±0.5 ^{ax}	0.0±0.0 ^{ax}
E	0.1±0.0 ^{ax}	1.0±0.6 ^{ax}	0.1±0.0 ^{ax}	0.3±0.2 ^{ax}	0.1±0.0 ^{ax}	0.1±0.0 ^{ax}

^a Means in the same row followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

^x Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05).

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

E : 5% yogurt bacteria(pectin).

表八、以 40℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間離水量之變化

Table 8. The syneresis of yogurt of yogurt fermented at 40 °C and stored at 4 °C

Starter culture	The syneresis during storage period (%w/w)					
	0 day	3 day	6 day	9 day	12 day	15 day
A	4.3±1.2 ^{abx}	3.3±0 ^{abxy}	2.9±1 ^{bxy}	6.4±1.1 ^{ax}	3.8±2 ^{abxy}	4.4±1.6 ^{abx}
B	2.8±1.6 ^{ax}	1.2±0.4 ^{ay}	1.8±0.5 ^{ay}	3.0±0.2 ^{az}	1.4±1.3 ^{ay}	1.8±1.7 ^{ax}
C	5.6±1.3 ^{abx}	6±0.1 ^{ax}	5.6±0.4 ^{abx}	6.0±0.9 ^{axy}	5.7±0.2 ^{abx}	3.5±1.4 ^{bx}
D	2.6±2.6 ^{ax}	2.8±1.4 ^{ay}	3.3±1.9 ^{axy}	2.3±0.9 ^{az}	1.9±0.9 ^{ay}	4.4±0.6 ^{ax}
E	5.4±0.0 ^{ax}	1.7±2.1 ^{by}	3.0±0.5 ^{abxy}	4.1±0.6 ^{ax}	3.1±0.6 ^{ax}	4.4±0.6 ^{ax}

^{ab} Means in the same row followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

^{xyz} Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05).

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

E : 5% yogurt bacteria(pectin).

表九、以 50℃ 培養之酸凝酪於 4℃ 保存期間離水量之變化

Table 9. The syneresis of yogurt of yogurt fermented at 50 °C and stored at 4 °C

Starter culture	The syneresis during storage period (%w/w)					
	0	3	6	9	12	15
A	6.0±0.7 ^{az}	5.6±1.5 ^{abx}	4.2±0.1 ^{aby}	4.0±0.7 ^{abz}	3.6±0.5 ^{by}	3.7±0.7 ^{by}
B	9.3±0.2 ^{axy}	9.1±5.3 ^{ax}	10.3±0.6 ^{ax}	10.0±0.2 ^{ay}	9.8±1.6 ^{ax}	10.1±0.6 ^{ax}
C	10.3±2.0 ^{ax}	8.0±3.1 ^{ax}	6.7±3.5 ^{axy}	12.4±1.1 ^{ax}	7.6±3.0 ^{axy}	8.2±3.0 ^{axy}
D	7.0±0.4 ^{abyz}	9.1±0.2 ^{ax}	4.3±0.2 ^{by}	9.7±1.4 ^{ay}	8.0±2.4 ^{abxy}	6.3±3.0 ^{abxy}
E	4.7±0.8 ^{az}	4.7±0.4 ^{ax}	3.5±0.4 ^{ay}	3.9±0.6 ^{az}	4.0±0.2 ^{ay}	4.2±0.0 ^{ay}

^{ab} Means in the same row followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

^{xyz} Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05).

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

E : 5% yogurt bacteria(pectin).

3.4 胞外多醣之產量

接種4種乳酸菌元 (A. 5%酸凝酪菌元、B. 5%酸凝酪菌元、5% *L. helveticus* BCRC14030、C. 5%酸凝酪菌元、5%益生菌、D. 5%酸凝酪菌元、5% *L. helveticus* BCRC14030、5%益生菌) 於含17%乳粉之還原乳後，以 30、40 與 50°C 進行發酵，發酵時間為6~24小時，直至 pH 為 4.6 ± 0.1 ，所生產的酸凝酪其 EPS 產量以 30 與 40°C 之產量 (0.20~0.60 g/L) 顯著高於 50°C (0.06~0.12 g/L) (表十)，這和 van den Berg *et al.* (1995) 所指出的結論相符，以較低的溫度30°C進行培養，發現 EPS 產量會增加。Ruas-Madiedo *et al.* (2002) 也指出較低的培養溫度 (20°C) 能讓 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* B35 有較高 EPS 產量。培養溫度低於乳酸菌最適生長溫度，會有較高量 EPS，此可能原因為培養溫度低，細胞壁合成速率較為緩慢，因此有較多的醣苷物質可用於 EPS 的合成，若乳酸菌生長於其最適溫度，則菌體的代謝速率會較快，大部分的合成物質及產生的能量均會用於菌體的生長繁殖上，EPS 的合成量相對就會減少。Cerning (1992) 也提到，乳酸菌培養於比其生長溫度略低的條件下，雖然乳酸菌的菌數會較低，但 EPS 產量會有較高現象。*L. plantarum* 接種於添加葡萄糖之 CDM (chemically defined medium)，以不同的溫度進行發酵培養，發現以18°C培養所得之 EPS 產量較 25、30 和 37°C 高 (Tallon *et al.*, 2003)。但也有些前人的研究有相反的結果，認為最適菌體生長的溫度會有較高的 EPS 產量 (de Vuyst *et al.*, 1998; Knoshaug *et al.*, 2000)。

所有商業化的酸凝酪均需要 *S. thermophilus* 與 *L. bulgaricus* 的混合菌種，前者可以提供風味後者可以提供良好質地 *S. thermophilus* 會先生長，待 *S. thermophilus* 產生乳酸致使 pH 降至 5.0 以下，*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 才會開始迅速生長，*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 會產生氨基酸再提供給 *S. thermophilus* 生長，這種共生現象在很多混合菌珠的表現中可被發現。使用酸凝酪菌醃 (yogurt bacteria) 以及產黏乳酸菌 (*L. helveticus* BCRC14030) 的組別 (B 處理組)，於不同溫度下進行發酵，發現 EPS 產量皆無顯著高於僅使用酸凝酪菌醃

的組別 (A 處理組) ($P > 0.05$) (表十)，亦即此黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 在此條件下 (三種溫度 30、40 及 50°C，發酵至 pH 為 4.6 ± 0.1) 進行發酵培養，無法顯著提升其 EPS 產量，可能原因為此黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 於 pH6，溫度為 25°C 才為達最高 EPS 產量之培養條件(楊，2005)，或許也有可能 *L. helveticus* BCRC 14030 所產的 EPS 被酸凝酪菌元 (yogurt bacteria) 當作益生質，故產量無法提升。如果利用混合菌元去共生培養可以提升 EPS 產量，那就可以取代或減少額外添加的碳源或氮源之添加量，但由表 3-7 的結果發現混合菌元對 EPS 產量提升的效果好像沒有單一菌元好。混合使用酸凝酪菌元以及益生菌的組別 (C 處理組)，於不同溫度下進行培養，發現 EPS 產量皆無顯著高於僅使用酸凝酪菌元 (A 處理組) ($P > 0.05$)，意指在此培養條件下混合使用此三株益生菌無法提升 EPS 產量(表十)。混合使用酸凝酪菌元、益生菌以及 *L. helveticus* BCRC14030 的組別 (D 處理組)，於不同溫度下進行培養，發現 EPS 產量皆 A 處理組無顯著差異 ($P > 0.05$)，亦即此種菌種組合對 EPS 產量沒有顯著的提升(表十)。綜合上述結果發現溫度對產量的影響大於菌種，這和 Ruas-Madiedo *et al.* (2002) 的結果剛好相反，不同菌種間對 EPS 產量之影響大於培養溫度對其的影響。

由實驗結果發現 EPS 產量在不同重複間變異很大，有可能是生產 EPS 的乳酸菌菌株，其合成 EPS 的能力不穩定性很高，而造成不穩定性高的原因可能是由於乳酸菌生產 EPS 基因所在的質體很容易遺失所致 (de Vuyst and Degeest, 1999)。很多研究指出固定 pH 以進行發酵作用，其 EPS 產量會較自然發酵 (沒控制 pH) 高 (Gassem *et al.*, 1997; Zisu and Shah, 2003)。但商業生產的酸凝酪，通常都採取不控制 pH，讓牛奶採自然發酵至適當的 pH，因此要運用產黏質乳酸菌株於商業生產之酸凝酪，勢必要面臨無法提升酸凝酪中 EPS 產量的問題。雖然很多研究指出固定 pH 進行發酵會有較高量 EPS，但也並不是指隨意固定任何 pH 去進行發酵，其產量就會高於自然發酵者，還必須要考量的是此 pH 是否為提升 EPS 產量最適的 pH。

表十、接種 4 種乳酸菌元於 30、40 與 50℃ 下生產酸凝酪之胞外多醣產量

Table 10. Amount of exopolysaccharide were measured by reconstituted skim milk which are inoculated with four culture strains at 30℃, 40 and 50℃

Inoculated temperature (°C)	EPS yield (g/L)			
	A	B	C	D
30	0.60±0.60 ^{ax}	0.28±0.10 ^{ax}	0.42±0.26 ^{ax}	0.44±0.10 ^{ax}
40	0.60±0.34 ^{ax}	0.20±0.09 ^{ax}	0.20±0.11 ^{ax}	0.33±0.34 ^{ax}
50	0.06±0.00 ^{ay}	0.07±0.00 ^{ay}	0.12±0.04 ^{ay}	0.09±0.07 ^{ay}

^aMeans in the same row followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3) .

^{xy}Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) .

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

3.5 胞外多醣之黏絲性

Torino *et al.* (2001) 將黏質 EPS 生成菌 (ropy-EPS-producing culture) 定義為菌種產生的 EPS，若其伸展的長度超過 6 mm 則為 ropy(+)，若介於 0-5 mm 表示菌元為 nonropy(-)。由表十一的結果發現除了以 50°C 進行發酵的 A 和 C 處理，所有酸凝酪的 EPS 之黏絲性 (ropiness) 皆超過 6 mm。培養溫度為 50°C 的酸凝酪，其 EPS 的黏絲性皆低於 30 與 40°C (表十一)，推測有可能是高溫使菌體失去產黏特性。有很多研究也指出培養溫度過高 (高於 45°C)，乳酸菌會很快失去產黏的性，這是由於溫度過高，易使菌體發生突變因而喪失產黏特性 (Gancel and Novel, 1994; Mozzi *et al.*, 1995)。此外很多研究皆發現合成 EPS 的乳酸菌合成 EPS 的能力不穩定性很高，因此造成重複試驗的標準偏差提高。接種 5% 酸凝酪菌元及 5% 黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC14030 (B 處理組) 於脫脂乳培養基，以 30°C 進行發酵培養，所得酸凝酪之 EPS 黏絲性 (96.0 cm) 顯著高於僅接種 5% 酸凝酪菌元 (A 處理) 的黏絲性 (21.1 cm) ($P < 0.05$)，顯示 *L. helveticus* BCRC 14030 確實可提升 EPS 黏絲性 (表十一)。使用酸凝酪菌元以及益生菌的組別 (C 處理)，於 30、40 及 50°C 三種不同溫度進行發酵培養，EPS 黏絲性無法顯著高於僅接種酸凝酪菌元的組別 (A 處理) ($P > 0.05$)，此結果顯示混合使用三種益生菌無法提升 EPS 黏絲性。由表十一發現有添加黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC14030 的 B 及 D 處理，於 30、40 及 50°C 三種不同溫度進行發酵培養，EPS 黏絲性皆有較高於僅接種酸凝酪菌元的組別 (A 處理) 的趨勢，此結果顯示接種 *L. helveticus* BCRC14030 其產黏特性較酸凝酪菌元 (yogurt bacteria) 佳，此結果與林 (2007) 結果一致。

表十一、接種 4 種乳酸菌元於 30、40 與 50°C 下生產酸凝酪之胞外多醣黏絲性

Table 11. Ropiness of exopolysaccharide were measured by reconstituted skim milk which are inoculated with four culture strains at 30°C, 40 and 50°C

Inoculated temperature (°C)	Ropiness (cm)			
	A	B	C	D
30	21.1±9.9 ^{bx}	96.0±39.2 ^{ax}	8.0±6.8 ^{bx}	48.2±3.4 ^{bx}
40	16.6±13.0 ^{ax}	52.1±32.7 ^{axy}	12.5±10.2 ^{ax}	42.6±32.5 ^{ax}
50	3.2±0.7 ^{ax}	13.7±7.0 ^{ay}	4.3±2.5 ^{ax}	33.5±38.4 ^{ax}

^{ab}Means in the same row followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) (n=3).

^{xy}Means in the same column followed by the same superscripts are not significantly different (P>0.05) .

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

3.6 胞外多醣單醣組成之分析

將醣類標準樣品注入 HPLC 分析後，單醣出現順序分別為鼠李糖：7.15 分鐘，N-乙醯葡萄糖胺：9.24 分鐘，半乳糖：12.21 分鐘，葡萄糖：13.02 分鐘。以三種溫度去進行發酵培養，除了 50°C 的 B 及 D 組其 EPS 為同質多醣外，其餘組別所生成之 EPS 皆為異質多醣(表十二)。

由表十二結果發現，以三種不同溫度去進行發酵，直至 pH 達到 4.6 停止發酵，僅添加酸凝酪菌元的 A 處理組，其 EPS 單醣組成皆不含鼠李糖，這與林(2007)所指出接種酸凝酪菌元於發酵槽中，以 25°C，pH6 培養 96 小時，EPS 單醣組成含有 27%鼠李糖結果不同。乳酸菌於不同環境發酵所產之 EPS，其化學組成皆不同(Grobber *et al.*, 2000)。即使是相同菌株，因發酵條件及分離純化技術不同，則所生成之 EPS 也會隨之不同(Grobber *et al.*, 1996)。

以三種不同溫度去進行發酵，發現有添加 *L. helveticus* BCRC 14030 的 B 及 D 處理組，其 EPS 單醣組成中鼠李糖所佔的比例皆較高(表十二)，此結果與林(2007)所指出接種酸凝酪菌元於發酵槽中，以 25°C，pH6 培養 96 小時，EPS 單醣組成含有較高鼠李糖(60%)結果相同，推測以 *L. helveticus* BCRC 14030 進行發酵，所生成之 EPS 會有較高含量的鼠李糖。

比較黏度與單醣組成之關係，以 40°C 進行發酵發現其酸凝酪的黏度較佳(圖八)，由表十二發現以 40°C 發酵，則其四個處理組中 EPS 的葡萄糖含量皆高於 30 及 50°C，與 Perty *et al.* (2003)指出，高黏性與葡萄糖含量有關，葡萄糖含量越高黏度越佳的結果相同。

表十二、4 種乳酸菌元於 30、40 及 50°C 之胞外多醣單糖組成

Table 12. Composition of exopolysaccharide produced with four culture strains at 30, 40 and 50°C

Inoculated Temperature	Starter Culture	Rhamnose (%)	N-acetyl-glucosamine (%)	Galactose (%)	Glucose (%)	Other Sugars (%)
30	A	0	35	15	14	36
	B	63	11	0	0	26
	C	0	19	0	5	76
	D	79	1	7	13	0
40	A	0	13	14	22	51
	B	53	37	10	0	0
	C	0	14	9	17	60
	D	35	0	0	40	25
50	A	0	32	0	17	51
	B	100	0	0	0	0
	C	29	0	0	0	71
	D	100	0	0	0	0

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

3.7 品評試驗

由表十五的結果發現，C 與 D 組產品其有最差的外觀，可能是由於其外觀的顏色較偏黃褐色，因為用來活化菌元的牛奶培養基經過滅菌(121℃、15 分鐘)後會有褐變現象，又 C 與 D 組產品接種的菌元較多，故產品的外觀變成偏黃褐色，故較不為品評員所接受。在氣味方面，D 組產品的氣味與商業產品差異不顯著($P > 0.05$)。在嚐味方面，A 組產品與商業產品有較佳的嚐味。在濃稠度方面，B、C 及 D 產品皆有優於商業產品。在總接受度方面，A、C、D 組產品與商業產品有較佳的總接受度。



表十三、接種 4 種乳酸菌元於 30℃ 生產酸凝酪之品評試驗，E 為市售酸凝酪產品

Table 13. Sensory evaluation of yogurt were measured by reconstituted skim milk which are inoculated with four culture strains at 30℃, and E treatment was commercial yogurt product

Items	Appearance	Aroma	Taste	Thickness	Total Acceptance
A	6.60±0.31 ^a	6.39±0.33 ^a	6.55±0.15 ^a	6.04±0.08 ^{ab}	6.32±0.20 ^a
B	6.08±0.21 ^{ab}	5.80±0.23 ^b	5.26±0.11 ^c	6.24±0.10 ^a	5.95±0.08 ^b
C	5.59±0.33 ^b	5.74±0.07 ^b	6.29±0.06 ^a	6.28±0.12 ^a	6.09±0.11 ^{ab}
D	5.45±0.09 ^b	6.13±0.15 ^{ab}	5.66±0.12 ^b	6.17±0.25 ^a	5.72±0.18 ^{ab}
E	6.36±0.18 ^a	6.49±0.15 ^a	6.34±0.23 ^a	5.58±0.15 ^b	6.29±0.15 ^a

Score in a one-to-nine hedonic scale, where 1 is for “extremely dislike” and 9 for “extremely like”.

^{abcd} Means without the same letters in the same column are significantly different (P<0.05) (n=3).

A : 5% yogurt bacteria.

B : 5% yogurt bacteria and 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030.

C : 5% yogurt bacteria and 5% probiotics.

D : 5% yogurt bacteria, 5% ropy *L. helveticus* BCRC14030, and 5% probiotics.

肆、 結論

1. 於 30、40 與 50°C 生產之酸凝酪，皆可發現 C 與 D 組產品之益生菌數在 4°C 貯藏 15 天後菌數皆不會下降；B 組產品在貯藏 15 天後之 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數會下降，D 組之 *L. helveticus* BCRC 14030 菌數則維持不變。
2. 於 30、40 與 50°C 生產酸凝酪，發現有添加黏質 EPS 生成菌 *L. helveticus* BCRC 14030 的 B 和 D 組，其兩者的黏度與僅接種酸凝酪菌元之組別(A 組)無顯著差異。
3. 以 30°C 進行發酵，發現接種酸凝酪菌元與黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 的酸凝酪黏度與僅接種酸凝酪菌元之組別(A 組)差異不顯著($P > 0.05$)，但其黏度顯著高於添加果膠的組別。
4. 培養溫度為 30°C 的酸凝酪離水現象 (syneresis) (0~1.8 %) 皆低於 50°C (3.6~12.4 %)。以 50°C 進行發酵培養所得之酸凝酪有嚴重的離水現象。
5. 於 30、40 與 50°C 下生產酸凝酪皆可發現所有酸凝酪其離水現象皆不會隨著儲藏天數延長而有離水現象增加之情形。
6. 以 40°C 進行發酵，有接種黏質 EPS 生成菌 *L. helveticus* BCRC 14030 的 B 和 D 兩個處理組所生成之酸凝酪，儲存天數為第 3、9 及 12 天，其離水現象皆顯著低於沒有接種黏質 EPS 生成菌 A 和 C 兩個處理組 ($P < 0.05$)。
7. 使用產黏乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 在此條件下 (三種溫度 30、40 及 50°C，發酵至 pH 為 4.6 ± 0.1) 進行發酵培養，無法明顯提升其 EPS 產量。
8. 以 30 和 40°C 進行發酵所生成之胞外多醣有顯著較佳產量 (0.2~0.6 g/L)($P < 0.05$)。
9. 使用酸凝酪菌元以及益生菌組，與僅使用酸凝酪菌元組，於不同溫度下進行培養，發現 EPS 產量差異不顯著 ($P > 0.05$)。
10. 使用酸凝酪菌元及黏質乳酸菌 *L. helveticus* BCRC 14030 組，以 30°C 進行發酵

培養，所得 EPS 黏絲性 (96.0 cm) 會顯著高於僅接種 5%酸凝酪菌元的 EPS 黏絲性 (21.1 cm) ($P < 0.05$)。

11. 以三種不同溫度去進行發酵，發現有添加 *L. helveticus* BCRC 14030 的 B 及 D 處理組，其 EPS 單糖組成中鼠李糖所佔的比例皆較高；以三種不同溫度去進行發酵，僅添加酸凝酪菌元的 A 處理組，其 EPS 單糖組成皆不含鼠李糖。



伍、 參考文獻

- 李福臨。2000。乳酸菌分類之研究近況。食品工業。32(8)：36-42。
- 林富美。2004。乳酸菌與免疫調節作用。食品工業。36(3)：16-26。
- 林佩璇。2007。糖類的添加對乳酸菌胞外多醣生成之研究。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
- 楊政儒。2005。生長溫度與 pH 值對乳酸菌胞外多醣生成影響之研究。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
- 廖啟成。1998。乳酸菌之分類及應用。食品工業。30(2)：1-10。
- 廖啟成。2007。乳酸菌產業研發服務能量之建構。益生菌之益生機制與應用開發研討會。
- Amatayakul, T., A. L. Halmos, F. Sherkat and N. P. Shah. 2006a. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharideproducing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. Int. Dairy J. 16 : 40-51.
- Amatayakul, T., F. Sherkat and N. P. Shah. 2006b. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. Food Hydrocoll. 20 : 314-324.
- Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition medicine and technology. Nutr. Res. 19 : 1559-1597.
- Attouri, N. and D. Lemonnier. 1997. Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus* : role of CD4+ and CD4+ lymphocytes. Nutr. Biochem. 8 : 25-31.
- Beaugerie, L. and J. C. Petit. 2004. Microbiol-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhea. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 18 : 337-352.
- Black, F. T., P. L. Andersen, J. Orskov, F. Orskov, K. Gaarslev and S. Laulund. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveller's diarrhoea. Travel Medicine. 1 : 333-335.

- Boels, I. C., R. van Kranenburg, J. Hugenholtz, M. Kleerebezem and W. M. de Vos. 2001. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11 : 723-732.
- Brashears, M. M., S. E. Gillil and L. M. Buck. 1998. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 81 : 2103-2110.
- Brooker, B. F. and R. Fuller. 1975. Adhension of lactobacilli to the chicken crop epithelium. *J. Ultrastruct. Res.* 52 : 21-31.
- Brashears, M. M., S. E. Gilliland and L. M. Buck. 1998. Bile salt Deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 81 : 2103-2110.
- Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 113-130.
- Cerning, J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Le. Lait.* 75 : 463-472.
- Cerning, J., C. Bouillanne, M. J. Desmazeaud, and M. Landon. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* 10 : 255-260.
- Cerning, J., C. Bouillanne, M. Landon and M. Desmazeaud. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 75 : 692-699.
- Collins, E. B. 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* 55 : 1022-1028.
- Cross, M. L., L. M. Stevenson and H. S. Gill. 2001. Anti-allergy properties of fermented food : An important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria.

Int. Immunopharmacol. 1 : 891-901.

De Vos W. M., P. Hols, R. Van Kranenburg, E. Luesink, O. P. Kuipers, J. Van der Oost, M. Kleerebezem and J. Hugenholtz. 1998. Making more of milk sugar by engineering lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 3 : 227-233.

De Vuyst, L. and B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23 : 153-177.

De Vuyst, L., F. de Vin, F. Vaningelgem and B. Degeest. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11 : 687-707.

De Vuyst, L., F. Vanderveken, S. Van de Ven and B. Degeest. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence of their growth-associated biosynthesis. J. Applied Microbiol. 84 : 1059-1068.

De Vuyst, L., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, V. Marshall, B. Degeest and F. Vaningelgem. 2003. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks.

Duboc, P. and B. Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. Int. Dairy J. 11 : 759-768.

Ericsson, C. D. 2003. Traveller's diarrhoea. Int. J. Antimicrob. Agents. 21 : 116-124.

Faber, E. J., P. Zoon, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegenthart. 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. Carbohydr. Res. 310 : 269-276.

Folkenberg, D. M., P. Dejmek, A. Skriver and R. Ipsen. 2005. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and stirred yoghurts

- produced with different starter cultures. J. texture stud. 36 : 174-189.
- Folkenberg, D. M., P. Dejmek, A. Skriver, H. Skov Guldager and R. Ipsen. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. 2006. 16 : 111-118.
- Gamer-Nourani, L., K. Blondeau and J. Simonet. 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 83: 281-287.
- Gancel, F., and G. Novel. 1994. Exopolysaccharides production by *Streptococcus salivarius* spp. Thermophilus cultures. 1. Conditions of production. J. Dairy Sci. 77 : 685-688.
- Gassem, M. A., K. A. Schmidt and J. F. Frank. 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Food Sci. 62 : 171-173.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125 : 1401-1412.
- Girard, M. and C. Schaffer-Lequart. 2007. Gelation and resistance to shearing of fermented milk : Role of exopolysaccharides. Int. Dairy J. 17 : 666-673.
- Grobbe, G. J., I. C. Boels, J. Sikkema, M. R. Smith, and J. A. M. Bont. 2000. Influence of ions on growth and production of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. J. Dairy Res. 67 : 131-135.
- Grobbe, G. J., I. Chin-Joe, V. A. Kitzen, I. C. Boels, F. Boer, J. Sikkema, M. R. Smith and J. A. De Bont. 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 1333-1337.
- Grobbe G. J., M. R. Smith, J. Sikkema, J. A. M. De Bont. 1996. Influence of fructose

- and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 279-284.
- Hamann, C., V. E. L. Samalouti, A. J. Ulmev. H. D. Flad and E. T. Rietschel. 1998. Components of gut bacteria as immunomodulators. Int. J. Food Microbiol. 41 : 141-154.
- Harwalkar, V. R. and M. Kalab. 1986. Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yoghurt made from reconstituted non-fat dry milk. Food Microstruct. 5 : 287-294.
- Hassan, A. N., J. F. Frank, M. A. Farmer, K. A. Schmidt and S. I. Shalabi. 1995. Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. J. Dairy Sci. 78 : 2629-2636.
- Hassan, A. N., J. F. Frank, K. A. Schmid and S. I. Shalabi. 1996. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. J. Dairy Sci. 79 : 2098-2103.
- Hassan, A. N., R. Ipsen, T. Janzen and K. B. Qvist. 2003. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. J. Dairy Sci. 86:1632-1638
- Hess, S. J., R. F. Roberts and G. R. Ziegler. 1997. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. J. Dairy Sci. 80 : 252-263.
- Hosono, A., H. Otani, H. Yasui and M. Watanuki. 2002. Impact of fermented milk on human health : Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of

fermented milk. Anim. Sci. J. 73 : 241-256.

Hosono. A., J. Lee, A. Ametani, M. Natsume, M. Hirayama, T. Adachi, S. Kaminogawa. 1997. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 312-316.

Hull, R. R., P. L Conway and A. J. Evans.1992. Probiotic foods - a new opportunity. Food Aust. 44 : 112-113.

Isolauri, E., T. Arvola, Y. Sutas, E. Moilanen and S. Salminen. 2000. Probiotics in the management of atopic excema. Clin. and Exp. Allergy. 30 : 1604-1610.

Jiang, T., A. Mustapha and D. A. Savaiano. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by injection of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. J. Dairy Sci. 79 : 750-757.

Kimmel, S. A., R. F. Roberts and G. R. Ziegler. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 659-664.

Kitazawa, H.,T. Harata, J. Uemura, T. Saito, T. Kaneko and T. Itoh. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Int. J. Food Microbiol. 40 : 169-175.

Kitazawa, H., T. Yamaguchi, M. Miura, T. Saito and H. Itoh. 1993. B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk. J. Dairy Sci. 76 : 1514-1519.

Kitazawa, H., Y. Ishii, J. Uemura, Y. Kawai, T. Saito. T. Kaneko and T. Itoh. 2000. Augmentation of macrophage functions by an extracellular

- phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Food Microbiol. 17 : 109-118.
- Klaver, F. A. and R. van der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1120-1124.
- Klimp, A. H., E. G. E. de Vries, G. L. Scherphof, and T. Daemen. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 44 : 143-161.
- Knoshaug, E. P., J. A. Ahlgren and J. E. Trempy. 2000. Growth associated exopolysaccharide expression in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ropy 352. J. Dairy Sci. 83 : 633-640.
- Kojic, M., M. Vujcic, A. Banina, P. Cocconcelli, J. Cerning and L. Topisorovic. 1992. Analysis of polysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 58: 4086-4088.
- Law, A., Y. Gu and V. Marshall. 2001. Biosynthesis, characterization, and design of bacteria exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnol. Adv. 19 : 597-625.
- Looijesteijn, P. J. and J. Hugenholtz. 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and Optimization of its synthesis. J. Biosci. Bioengineering. 88 : 178-182.
- Looijesteijn, P. J., W. H. M. van Casteren, R. Tuinier, C. H. L. and Dosewijk-Voragen and J. Hugenholtz. 2000. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. J. Appl. Microbiol. 89 : 116-122.

- Lo, P. R., R. C. Yu, C. C. Chou and T. H. Tsai. 2002. Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a] pyrene. J. Biosci. Bioeng. 94: 148-153.
- Low, D., J. A. Ahlgren, D. Horne, D. J. McMahon, C. J. Oberg and J. R. Broadbent. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. App. Environ. Microbiol. 64 : 2147-2151.
- Lin, T. Y., Chang Chien, M. F. 2007. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. Food Chemistry 100: 1419-1423.
- Macedo, M. G., C. Lacroix, N. J. Gardner and C. P. Champagne. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. Int. Dairy J. 12 : 419-426.
- Majamaa, H. and E. Isolauri. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 99 : 179-185.
- Marshall, V. M., E. Z. Cowie and R. S. Moreron. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. J. Dairy Res. 62 : 621-628.
- Marshall, V. M. and H. L. Rawson. 1999. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. Int. J. Food Sci. Technol. 34 : 137-143.
- Meydani, S. N. and W. K. Ha. 2000. Immunology effects of yogurt. Am. J. Clin. Nutr. 71 : 861-872.
- Mozzi, F., G. S. de Giori, G. Oliver and G. F. de Valdez. 1995. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. Milchwissenscha. 50: 80-82.
- Mozzi, F., G. S. de Giori, G. Oliver and G. F. de Valdez. 1996. Exopolysaccharide

- production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnol. Lett. 18 : 435-439.
- Mustapha, A., T. Jiang and D. A. Savaiano. 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: Influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 80 : 1537-1545.
- Nadathur, S. R., S. J. Gould and A. T. Bakalinsky. 1995. Anitmutagenicity of an acetone extrace of yogurt. Mutat. Res. 334 : 212-224.
- Nagaoka, M., S. Hashimoto, T. Watanbe, T. Yokokura and Y. Mori. 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides. Biol. Pharm. Bull. 17 : 1012-1017.
- Nakajima, H., Y. Suzuki, H. Kaizu and T. Hirota. 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. J. Food Sci. 57 : 1327-1329.
- Nordmark, E. L., Z. Yang, E. Huttunen, and G. Widmalm. 2005. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* THS. Biomacromolecul. 6 : 105-108.
- Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe and F. Tsuchiya. 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 47: 1623-1625.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics the other half of the antibiotic story. Anim. Nutr. Health. 29 : 4-8.
- Petry, S., S. Furlan, E. Waghorne, S. Waghorne, L. Saulnier, J. Cerning and E. Maguin. 2003. Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. FEMS Microbiol. Lett. 221 : 285-291.
- Plummer, S., M. A. Weaver, J. C. Harris, P. Dee and J. Hunter. 2004. *Clostridium*

difficile pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. Int. Microbiol. 7 : 59-62.

Puvanenthiran, A., R. P. W. Williams and M. A. Augustin. 2002. Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. Int. Dairy J. 12 : 383–391.

Ruas-Madiedo, P., R. Tuinier, M. Kanning and P. Zoon. 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. Int. Dairy J. 12 : 689–695.

Saarela, M., L. Lahteenmaki, R. Crittenden, S. Salminen and T. Mattila-Sandholm. 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. Int. J. Food Microbiol. 78 : 99-117.

Saavedra, J. M., N. A. Bauman, I. Oung, J. A. Oerman and Y. R. Holken. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. Lancet. 344 : 1046-1049.

Salminen, S., E. Isolauri and E. Salminen. 1996. Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier. Asia Pacific J. Clin. Nutr. 5 : 53-56.

Scheinbach, S. 1998. Probiotics : Functionality and commercial status. Biotechnol. Adv. 16 : 581-608.

Shihata, T. and N. P. Shah. 2002. Influence of addition of proteolytic *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* to commercial starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. Int. Dairy J. 12 : 765-772.

Southland, I. W. 1998. Novel and established application of microbial polysaccharide. Tibtech. 16 : 41-46.

St-Onge, M. P., E. R. Farnworth and P. J. H. Jones. 2000. Consumption of fermented

- and metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 71 : 674-681.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established application of microbial polysaccharides. Tibtech. J. 16 : 41-46.
- Tallon, R., P. Bressollier and M. C. Urdaci. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res. Microbial. 154:705-712.
- Tanaka, R. and K. Shimosaka. 1982. Investigation of the stool frequency in elderly who are bedridden and its improvement by ingesting of bifidus yogurt. Jpn. Geriater. 19 : 577-582.
- Torino, M. I., M. P. Tarnato, F. Sesma and F. de Valdez. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. J. Appl. Microbiol. 91 : 846-852.
- Tuinier, R., P. Zoon, C. Olieman, M. A. Cohen-Stuart, G. J. Fleer and C. G. de Kruif. 1999. Isolation and physical characterization of an exocellular polysaccharide. Biopolymers. 49 : 1-9.
- Tuinier, R., W. H. M. Van Casteren, P. J. Looijesteijn, H. A. Schols, A. G. J. Voragen and P. Zoon. 2001. Effect of structural modifications on some physical characterization of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. Biopolymers. 59 : 160-166.
- Tzianabos, A. O. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agent : Structural aspects and biologic function. Clin. Microbiol. Res. 13 : 523-533.
- Van den Berg, D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliehenthart, A. M. Ledeboer and C. T. Verrips. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 2840-2844.

- Vanangelgem, F., M. Zamfir, F. Mozzi, T. Adriany, M. Vancanney, J. Swings and L. De Vuyst. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 900-912.
- Vinderola, C. G. and J. A. Reinheimer. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *Int. Dairy J.* 9 : 497-505.
- Welman, A. D. and L. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21 : 269-274.
- Wheeler, J. G., M. L. Bogle, M. A. Shema, K. C. Stine, A. J. Pittler, A.W. Burks and R. M. Helm. 1997. Impact of dietary yogurt on immune function. *Am. J. Med. Sci.* 313 : 120-123.
- Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34(4) : 415-420.
- Yang, Z., M. Staaf, E. Huttunen, and G. Widmalm. 2000. Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* k16. *Carbohydr. Res.* 329 : 465-469.
- Zisu, B. and N. P. Shah. 2003. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci.* 86:3405–3415.

陸、 作者小傳

林嘉君，彰化市人，生於民國七十年十月十二日。先後畢業於彰化市中山國民小學、陽明國中、雲林縣私立崇先高級中學、私立中國文化大學。民國九十五年考取國立台灣大學動物科學技術學系碩士班生產技術組。在學期間，追隨恩師蘇和平博士與 林棟雍博士修習碩士學位，於兩位恩師諄諄指導與鼓勵下完成此論文。

