

壹、摘要

本試驗為選殖乳酸菌以乳清為發酵基質生產乳酸之研究，期能提高乳酸生產效率而達到降低生產成本之目的。本試驗選取 *Lb. rhamnosus* THSH-1、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCRC 14009、*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940、*Lb. casei* subsp. *casei* CCRC 10697、*Lb. acidophilus* CCRC 10695、*Lb. helveticus* CCRC 11052、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 及 *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 等 8 菌株為供試之乳酸菌株，期能選殖乳酸生成效率最佳的乳酸菌株及尋找最佳補充氮源並應用於乳清發酵生產乳酸。試驗結果顯示，在乳清滲流液與乳清中接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量、調節 pH 值及 42°C 振盪培養的發酵條件下，添加 3% 酵母萃取物的營養補充物時發酵乳清滲流液及乳清生產乳酸的效果最佳。而添加泛酸亦可以促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵補充豆奶的乳清滲流液生產乳酸。

貳、前言

乳酸是天然的有機酸，廣泛應用於醫藥、化學、皮革製品、塑膠及食品等工業。最初是利用作為食品的保存、調味劑與酸化功用。目前最受矚目的應用重點是將乳酸經聚合後生產生物可代謝聚合物（bio-degradable polymers）。而在乾酪製造過程中，乳糖及灰分是以乳清型態排出，此含有高營養價值的乳清是製造乾酪過程中的副產物，過去多供作飼料、肥料用或做為其他廢棄物處理。現今則最主要利用於作為乳酸菌發酵製造乳酸的基質。

在發酵乳清生產乳酸的過程中，多種因素皆會影響乳酸生成。其中微生物是生產乳酸時最重要的影響因數，而乳酸菌也是最普遍使用於商業化生產的微生物。本試驗利用選殖方式來尋求高產酸效能之乳酸菌，期望可以提高乳酸生產效率，達到降低生產成本，進而使乳酸可更普遍而廣泛的利用。此外，根據前人之研究指出乳酸菌使用於發酵未補充營養的乳清中時，生產乳酸的效率不佳。而在發酵過程中添加額外的營養可有效提高乳酸菌的乳酸生成效率。本試驗中選取數種常用氮源，期能選擇具有較佳促進乳酸發酵效果之營養添加物，更期望達到提高發酵乳清之乳酸生產效率，降低乳酸生產成本。

參、文獻回顧

一、 乳酸之特性與應用

(一) 來源

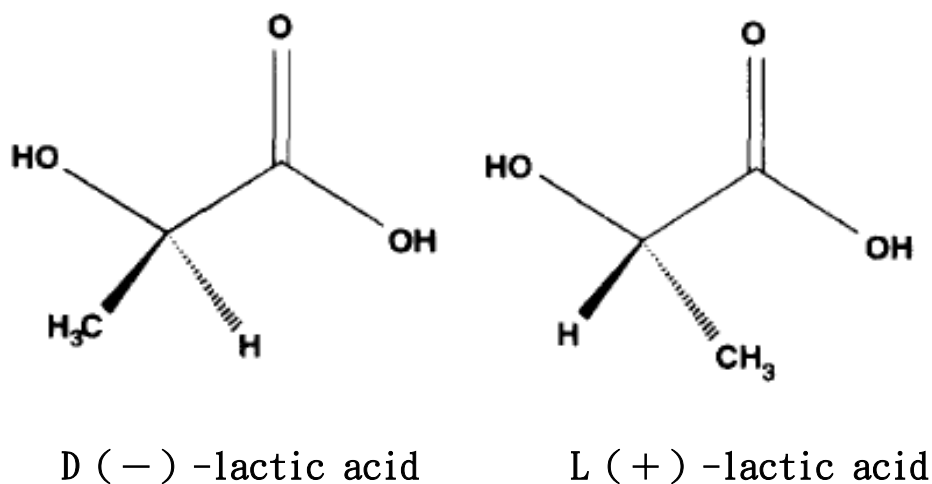
乳酸 (lactic acid) 在 1780 年是由 Carl Wilhelm Scheele 發現，然後再經 Louis Pasteur, Joseph Lister 及 Max Delbruck 定義為乳酸菌在乳酸發酵過程中所產生的成份 (Litchfield, 1996; Datta *et al.* 1995)。

乳酸的工業生產主要是以化學合成或是經發酵兩種方式製造 (Boyaval and Goulet, 1988; Litchfield, 1996)。近十年來因為以化學方式合成製造乳酸過程中會產生廢水的環保問題而受到限制，所以經發酵方式製造乳酸的方式為目前被廣泛研究的原因 (Litchfield, 1996)。最早是在西元 1931 年由 Whittier 和 Rogers 開始研究不同的發酵方法 (Boyaval and Goulet, 1988)。目前每年全世界生產超過八萬公噸乳酸，其中約有 90% 是以乳酸菌發酵所生成 (Nolasco-Hipolito *et al.* 2002)。

(二) 構造及特性

乳酸 (2-hydroxypropanoic acid、 α -hydroxypropanoic acid) 是天然的有機酸。可依菌種的乳酸去氫酶的種類而生成分為 D (－) 或 R

(-) 為右旋性和 L (+) 或 S (+) 為左旋及 DL 為不活性三種光學異構性乳酸(Tsai *et al.*1993)。圖一即是 L (+) 型及 D (-) 型乳酸光學活性結構。表一為不同型乳酸特性的概述。



圖一、L (+) 型及 D (-) 型乳酸之光學活性結構。

Fig. 1. The optically active isomeric forms of L(+) and D(-) lactic acid.

表一、 乳酸異構物之特性

Table 1 Selected properties of lactic acid enantiomers

Property	Enantiomer and chemical abstracts		
	L (+)	D (-)	DL
Molecular weight	90.08	90.08	90.08
Melting point (°C)	52.8-53.6	52.8-53.6	16.8-33
Boiling point (°C)	-	103	82-85
pK (25°C)	3.79	3.83	3.73

(Litchfield, 1996)

(三) 用途

目前每年全世界對於乳酸的需求量為 $54.5\sim 59 \times 10^3$ 公噸以上，而且每年以 12~15% 的比例成長 (Litchfield, 1996)。

乳酸被廣泛應用於醫藥、化學、皮革製品、塑膠及食品等工業 (Pauli *et al.* 2002 ; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000 ; Chiarini *et al.* 1992 ; Mehaia and Cheryan, 1986 ; Mostafa, 1996 ;)。最初是被利用作為食品的保存、調味劑與酸化功用 (Pauli *et al.* 2002 ; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000 ; Chiarini *et al.* 1992 ; Krischke *et al.* 1991 ; Mehaia and Cheryan, 1986)。乳酸及其鹽類於食品中的應用如表二所示，此表是經過美國食品藥物管理局 (FDA) 認定可安全使用 (Litchfield, 1996)。

然而全世界一半以上的乳酸是被應用於非食品用途上 (Mehaia and Cheryan, 1986)。目前最受矚目的應用重點是將乳酸經聚合生產生物可代謝聚合物例如聚乳酸 (polylactic acid ; PLA)，可作為製造醫藥、工業及消耗性產品的原料。而以生產製造生物可代謝塑膠 (biodegradable plastics) 及 PLA 纖維等為目前最主要的研究方向 (Fitzpatrick *et al.* 2003 ; Pauli *et al.* 2002 ; Fitzpatrick *et al.* 2001 ; Fitzpatrick and O'Keeffe, 2001 ; Kwon *et al.* 2000 ; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000 ; Lunt, 1998 ; Litchfield, 1996)。

表二、 乳酸及其鹽類於食品中的應用

Table 2. Food applications of lactic acids and lactic acid compounds

Compound	Food application
L(+) lactic acid D(-) lactic acid DL lactic acid	Antimicrobial agent, curing and pickling, flavoring enhancer, adjuvant, pH control, solvent and vehicle
Calcium lactate	Flavoring enhancer, firming agent, nutrient supplement, stabilizer, thickener, leavening agent
Potassium lactate	Flavoring agent, flavoring enhancer, humectant, pH control
Sodium lactate	Flavoring agent, flavoring enhancer, humectant, pH control, emulsifier
Ferrous lactate	Nutrient supplements and in infant formula
Calcium stearoyl-2-lactylate	Dough conditioner in bakery products, whipping agent in egg products, conditioning agent in dehydrated potatoes
Sodium stearoyl lactylate	Dough conditioner, emulsifier, processing aid in baked products; emulsifier, stabilizer processing aid in milk or cream substitutes, snack dips, imitation cheeses, dehydrated potatoes
Lactylated esters of fatty acids	Emulsifiers, plasticizers, surface active agents in foods
Lactylated fatty acids esters of glycerol and propylene glycol	Emulsifiers, plasticizers, surface active agents in foods
Glycero-lacto esters of fatty acids	Emulsifiers, plasticizers, surface active agents in foods

(Litchfield, 1996)

二、發酵乳清生產乳酸：

乳清是最普遍被使用當作生產乳酸時的基質（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000）。在 1930 年時期，已經有多種製造乳酸的方式是經乳酸菌發酵乳清所製造（Litchfield, 1996）。在發酵乳清生產乳酸的過程中，多種因素皆會影響乳酸生成濃度、生產量及生產效率。包括微生物種類、菌種、接種量、pH 值、溫度、發酵基質濃度及前處理、發酵液的營養狀態、發酵模式及儀器設備等（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Litchfield, 1996；Tuli *et al.* 1985）。

（一）發酵微生物

微生物是利用發酵生產乳酸時最重要的影響因數之一。改善微生物的生物特性，一般傳統的策略是利用選殖或突變的方法來改變微生物之新陳代謝能力，達到期望的目標。而利用選殖來選擇高產酸效能之微生物是普遍使用的方法（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Hujanen and Linko, 1996；Mostafa, 1996；Tsai *et al.* 1993）。

Ysai（1993）認為利用發酵生產乳酸之菌種需要具有以下數個標準：(1) 可以利用葡萄糖生長；(2) 同質發酵而且具高生產量及生成物易純化；(3) 生成所需之乳酸光學異構物；(4) 可以抵抗乳酸所造成的抑制；(5) 可於 42°C 以上生長以降低微生物的污染；(6) 具有

高的批式發酵效率；(7) 菌種之細胞具有易被分離的特性。Litchfield (1996) 也認為在選擇發酵菌種時須以所需的乳酸異構物、發酵基質、溫度、pH 及對乳酸耐受性和乳酸生產率（克/每升/每小時）等條件為基準。此外，他特別還提到發酵菌種對於抵抗噬菌體攻擊的能力也是另一考慮的重點。

在發酵乳清生產乳酸時，乳酸菌是最普遍被使用在商業化生產的微生物。一般 *Lactobacillus*、*Streptococcus* 及 *Leuconostoc* 均可用於工業化生產乳酸，但以 *Lactobacillus* 最常被使用。其中以 *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* (Bury *et al.* 1998 ; Tejayadi and Cheryan, 1995)、*Lb. helveticus*(Fitzpatrick *et al.* 2001 ; Hujanen and Linko, 1996) 或 *Lb. casei* (Fitzpatrick *et al.* 2003 ; Pauli *et al.* 2002) 是最常見的發酵菌種。另外，*Str. thermophilus* (Bury *et al.* 1998)、*Lb. rhamnosus* (Kwon *et al.* 2000)、*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* (Arasaratnam *et al.* 1996)、*Lb. delbrueckii* (Arasaratnam *et al.* 1996 ; Ye *et al.* 1996) 等也常被利用。

Rhizopus oryzae 和 *Bacillus laevolacticus* 是少數被利用於生產乳酸的非乳酸菌之菌種(Tsai *et al.*1993)。其中，*Rhizopus* spp.屬例如 *R. arrhizus*、*R. oryzae* 等是屬於具有澱粉分解酵素的黴菌，具有可以轉換澱粉或含有澱粉成份的原料成 L (+) 型乳酸的能力。此屬的黴菌可代謝 1 莫耳葡萄糖產生 1.5 莫耳的乳酸 (Litchfield, 1996)。

(二) 溫度

乳酸菌最適生長環境範圍可以從 20°C 到 45°C，然而最高乳酸生產率及生產量的溫度，會依各菌種特性不同而各有所不同。在過去的研究中發現，乳酸菌最高乳酸生產率的溫度會比最高乳酸生成濃度及乳酸生產量時低 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)。

Lb. amylophilus 可於 15°C 的環境下生長，但是不能存活於 45°C；其最高生產率及最高生產量的溫度，分別是 25 及 35°C。而 *Lb. casei* 及 *Lb. paracasei* 的最適溫度則是介於 37°C 至 44°C 的範圍內。過去研究中也發現，*Lc. lactis* 及 *Lb. rhamnosus* 最高乳酸生產量及最高生產率溫度分別是 33°C 至 35°C 及 41 至 °C 45 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)。

(三) pH 值調節

乳酸菌可以生長在寬廣的 pH 值範圍內，然而其菌數生長對於 pH 值的高低相當敏感。此原因可能是因為乳酸菌細胞質中的 pH 值較培養基中的值高所造成(Ye *et al.* 1996)。在乳酸發酵過程中，乳酸的產生會抑制乳酸菌的生長，進而造成乳酸的生成效率降低 (Ye *et al.* 1996；Litchfield, 1996)。因此，發酵過程中對 pH 值的調節有助於乳酸生成及基質轉換 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Litchfield, 1996)。

最適合乳酸菌生成乳酸的 pH 值範圍是 pH 5~7 之間。而 pH 值低於 5.7 以下時較適合乳酸桿菌生長，這是因為其比乳酸球菌對酸有較強的耐受性 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)。一般常利用鹼液滴定法或添加碳酸鈣來緩衝發酵液中的 pH 值 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Kwon *et al.* 2000；Bury *et al.* 1998；Arasaratnam *et al.* 1996；Litchfield, 1996；Mostafa, 1996；Ye *et al.* 1996)。近年來，許多研究在發酵過程中以移除發酵液中乳酸的方法達到調節 pH 值。其中，使用電透析法(electrodialysis)(Bailly, 2002)、萃取法(extraction)及吸附法 (adsorption) 將發酵過程中產生的乳酸從發酵液中移出，即可以達到降低酸抑制的問題，並得到較高的乳酸濃度及生產量 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Ye *et al.* 1996)。

(四) 營養添加物

在 1930 年時期，已經有數種發酵乳清的方式被用於製造乳酸，但是當時在發酵過程中尚未有添加任何成分於其中 (Litchfield, 1996)。在後來的研究結果中發現乳酸菌被利用於未補充營養的乳清中，產生乳酸的效率不佳。因此在發酵過程中添加額外的營養可有效提高乳酸菌的乳酸生成效率 (Fitzpatrick *et al.* 2003 ; Pauli *et al.* 2002 ; Fitzpatrick *et al.* 2001 ; Fitzpatrick and O’Keeffe, 2001 ; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000 ; Kwon *et al.* 2000 ; Bury *et al.* 1998 ; Litchfield, 1996 ; Arasaratnam *et al.* 1996 ; Chiarini *et al.* 1992 ; Krischke *et al.* 1991 ; Mehaia and Cheryan, 1986)。

研究結果發現，發酵乳清時營養添加物除了提供乳酸菌生長的氮源例如 yeast extracts、corn steep liquor、casein hydrolysates 及 malt sprout 等之外，其他一些有效促進乳酸菌生長的添加物例如胺基酸、維生素、礦物質、嘌呤類 (purines) 及嘧啶類 (pyrimidines) 等也是常被使用於促進發酵的添加物 (Fitzpatrick *et al.* 2003 ; Arasaratnam *et al.* 1996 ; Pauli *et al.* 2002 ; Fitzpatrick *et al.* 2001 ; Fitzpatrick and O’Keeffe, 2001 ; Kwon *et al.* 2000 ; Bury *et al.* 1998 ; Litchfield, 1996)。

這些胺基酸、礦物質、維生素 B 群等添加物的使用來源很廣泛，一般使用添加量範圍約從 0.5% 至 3% (Litchfield, 1996)。

1. 酵母萃取物 (yeast extracts)

大部分乳酸菌需要廣泛的生長因數作為提供其生長代謝所需。酵母萃取物含有胺基酸、勝肽、維生素和數種有機酸包括丙酮酸(pyruvic acid) 和甘油酸(glyceric acid) 等(Litchfield, 1996; Arasaratnam *et al.* 1996)。實驗結果發現酵母萃取物中所含成份可以刺激乳酸菌生長，進而促進乳酸生成並提高生產效率的最佳效果。當發酵乳清時，酵母萃取物是促進乳酸菌產生乳酸最有效的營養添加物(Fitzpatrick *et al.* 2003; Pauli *et al.* 2002; Kwon *et al.* 2000; Arasaratnam *et al.* 1996; Chiarini *et al.* 1992; Krischke *et al.* 1991; Mehaia and Cheryan, 1986)。酵母萃取物因具有特異的肽(peptide) 及其他生長因數可以有效促進乳酸菌的生長及乳酸生產，其中維生素 B 群被認為是促進乳酸生產最主要的成分(Kwon *et al.* 2000; Arasaratnam *et al.* 1996)。

然而若是添加酵母萃取物於乳酸生產過程中時，它昂貴的價格約佔 30% 以上的生產成本，造成乳酸價格也相對提高，進而限制其利用的範圍 (Kwon *et al.* 2000)。因此尋找更便宜的添加物用來替代或與其混和使用以降低生產成本並提高乳酸生成效率，為目前研究的主要目標(Fitzpatrick *et al.* 2003; Kwon *et al.* 2000; Chiarini *et al.* 1992;)。

2. 大豆

(1) 大豆之蛋白質含量及種類

大豆含有豐富營養成分，所以廣泛應用於各種工業製造中，特別是所含的蛋白質與油質更是被大量使用於食品及動物飼料的生產 (Kwon *et al.* 2000 ; Scalabrini *et al.* 1998)。目前全世界大豆產量每年超過 154.7 百萬公噸 (Kwon *et al.* 2000)。

大豆蛋白質含量，一般約為 39.5~41.5% 之間，平均為 40%。脫脂大豆蛋白約 90% 可被水萃取。水萃取蛋白約有 90% 可在 pH 4.5~4.8 間沈澱，沈澱部分稱為酸沈澱蛋白或稱為黃豆球蛋白 (soybean globulins)，而未沈澱部分則稱為大豆乳漿蛋白 (soybean whey protein)。大豆蛋白質中球蛋白為鹽溶性 (0.5~1.0M NaCl) 約佔 90%，其中含有高量的麩胺酸 (glutamine)、天門冬胺酸 (asparagine) 及精胺酸 (arginine)，但含硫胺基酸如甲硫胺酸 (methionine) 及半胱胺酸 (cysteine) 則較低。乳漿蛋白主要成分包括胰蛋白酶抑制劑 (trypsin inhibitor)、血球凝集素 (hemagglutinins)、脂肪過氧化酶 (lipoxygenase)、 β -葡萄糖酶 (β -glucosidase)、澱粉酶 (β -amylase)、磷酸酶 (phosphatase)、細胞色素 (cytochrome C) (Smith, 1972)。

(2) 豆奶 (soymilk)

豆奶是東方人固有的傳統食品，其製作過程是將大豆浸泡軟化後，加水研磨，再經煮沸而成略帶黃色之液狀大豆食品。豆奶的傳統製法是先用水浸泡大豆，加水磨碎後過濾，再經加熱後即得。

在 1917 年，Osborne & Mendel 發現生大豆的蛋白質營養價值比經適當加熱後者為低。生大豆因含有抗營養性物質，分別為胰蛋白酶抑制劑、紅血球凝集素、皂素(saponins)及抗維生素(antivitamins)等，所以在食用生大豆時之生長速率較差。加熱是豆奶製程中的重要步驟，在磨碎大豆、蒸煮及殺菌或滅菌處理均需要加熱，加熱殺滅有害微生物，並強化蛋白質等營養物質的品質與產量以及乳酸菌在發酵時之穩定性(Kwok *et al.*,1995)。但是加熱過度會導致胺基酸、維生素等被破壞，發生褐色化反應(Maillard reaction)。

豆奶是適合乳酸菌生長及生化代謝的培養基 (Scalabrini *et al.* 1998 ; Kamaly, 1997)。近年來，價廉的大豆更被期待可以取代酵母萃取物，以達到更具經濟效益的乳酸生產原料 (Kwon *et al.* 2000)。大豆中所含的維生素含量不如酵母萃取物，所以單一或複合維生素 B 群常被使用於促進發酵大豆時乳酸的生成，可節省乳酸生產的原料成本 (Kwon *et al.* 2000)。Kwon (2000) 也發現當使用水解大豆作為氮源時，乳清可以取代葡萄糖作為乳酸菌更經濟的碳源來源。

影響乳酸菌在豆奶中生長能力之因素有二，即豆奶在加工過程中之熱處理與乳酸菌之碳水化合物代謝能力。Angeles and Marth(1971)指出乳酸菌於 80°C 處理 1~60 分鐘之豆奶中，其產酸量最低。這是因為此時豆奶會產生大量的硫化物 (sulphides) 等有毒抑制劑，但若以 100°C 或更高的溫度處理豆奶者，這些有毒抑制劑將被破壞而成為良好培養基。

Mital 等人 (1974) 的實驗顯示 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*、*L. cellobiosus*, *L. fermenti*, *L. plantarum* 與 *L. buchneri* 在豆奶中之增殖情形比在牛乳中好。Kamaly (1997) 也提到豆奶對於 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*、*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*、*Lb. pentosus*、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*、*Lb. acidophilus*、*Lc. Lactis* subsp. *lactis*、*Lc. Lactis* subsp. *cremoris*、*Lb. casei* subsp. *casei*、*Lb. helveticus* 等都是適合生長的培養基。此外，影響乳酸菌在豆奶中增殖的培養條件包括接種比例、培養溫度、培養時間等。

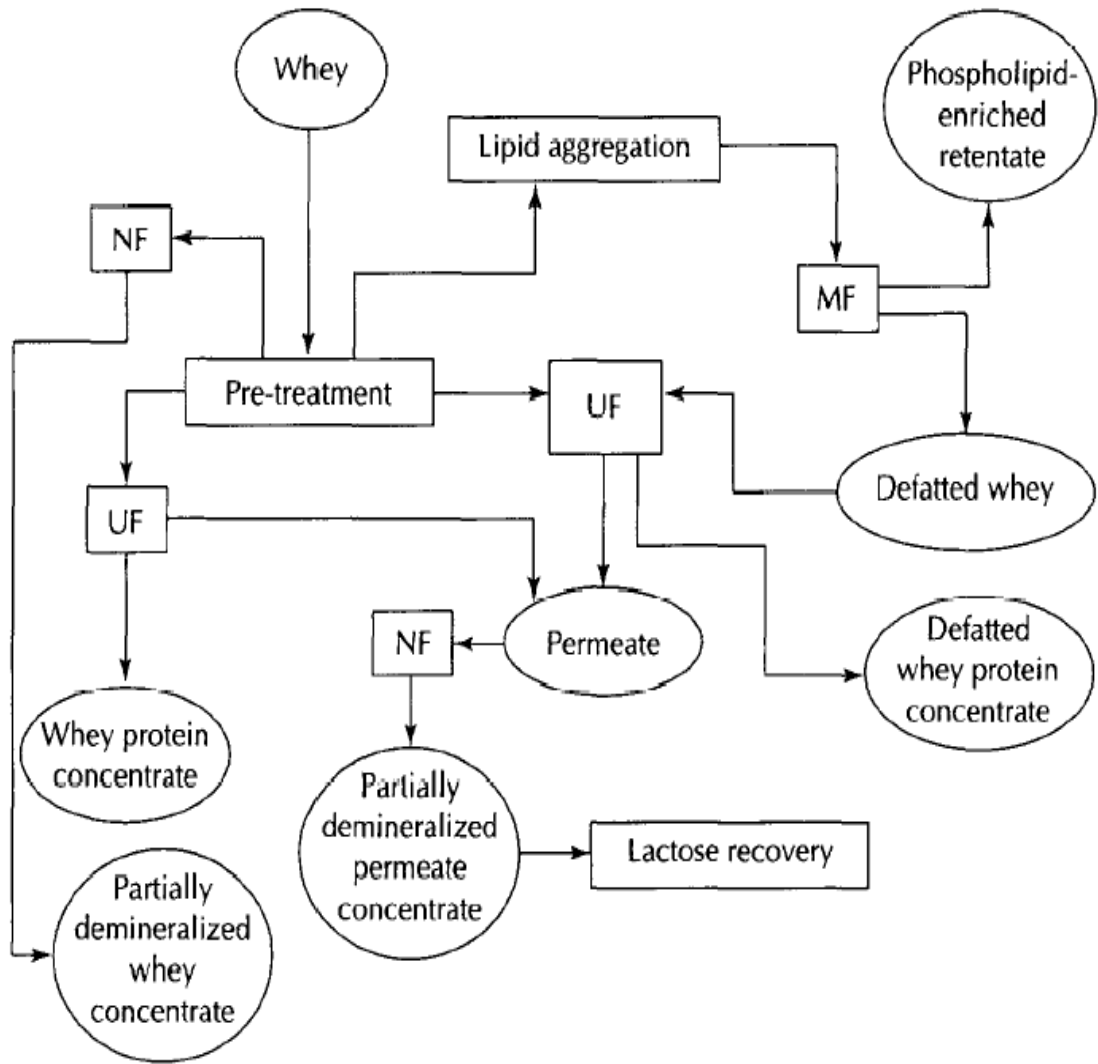
三、乳清之概述

隨著全球乾酪的生產及需求日益增加，其工廠的廢水也成為嚴重的環保問題。乾酪製造過程中，將含有乳糖和灰分的乳清排出，此含有高營養價值的乳清是製造乾酪過程中的副產物。過去多供作飼料、肥料用或做其他廢棄物處理。因此研究如何去更有效利用這些成分成為近年來重要研究目標(Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Arasaratnam *et al.* 1996；Mostafa, 1996；Chiarini *et al.* 1992；Krischke *et al.* 1991；Mehaia and Cheryan, 1986；張，1995；林，1993)。

(一) 乳清之回收

乳清含有豐富的蛋白質、乳糖、礦物質與維生素，其中高品質的蛋白質及高含量的乳糖是最主要的成分。乳清經超過濾濃縮之後可得乳清蛋白濃縮物與乳清滲液。此外，乳清因含有許多鹽類，故須將之除去。將乳清除鹽、除乳糖處理而濃縮時，可採用離子交換、電氣透析、膠濾過及逆滲透壓等方法(張，1995)。

乳清經膜過濾處理的應用流程如圖二所示 (Rosenberg, 1995)。



(Rosenberg, 1995)

圖二、 Ultrafiltration (UF)、Microfiltration (MF) 及 Nanofiltration (NF) 乳清處理之流程圖。

Fig. 2. Applications of Ultrafiltration (UF), Microfiltration (MF) and Nanofiltration (NF) in whey processing.

(二) 乳清的利用

乳清含有豐富的蛋白質、乳糖、礦物質與維生素，其中高品質的蛋白質及高含量的乳糖最具利用性。傳統普遍添加於飼料中或是經分離純化為乳糖。另外也可利用於製造各種乳成分，其中乳清粉末可經乳酸菌發酵生產乳酸、維生素類之原料，以及作為各種食品與飼料之原料(Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)。此外，更可利用超過濾分為高等級的乳清蛋白和乳清滲流液再加以利用(Fitzpatrick *et al.* 2003；Mostafa, 1996；Krischke *et al.* 1991)。

目前只有約一半的乳清被轉變製造成乾燥乳清、濃縮乳清、乳清蛋白濃縮物及乳糖。而以乳酸菌發酵乳清及經超過濾處理的乳清滲流液製造乳酸是現今最主要利用的方法(Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Litchfield, 1996)。

1. 乳清蛋白

乳清蛋白為牛乳除去酪蛋白所剩下之蛋白質，約為全蛋白質之20%，可約略分為八大成分及一些微量成分。即乳白蛋白(lactalbumin)、乳球蛋白(lacto-globulin)以及蛋白月示、蛋白腓(proteose peptone)三主要部分，其中乳白蛋白含有 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白以及乳漿白蛋白，而優球蛋白與假球蛋白屬於乳球蛋白。其

中 β -乳球蛋白及 α -乳白蛋白為乳清蛋白中最主要的兩種蛋白 (Bury *et al.* 1998)。

經濃縮後乳清蛋白之蛋白質生物價與未濃縮者一樣高。因此，濃縮乳清蛋白質可提供高品質蛋白質而特別適用於蛋白質強化食品，如嬰兒、運動者、孩童及老年人之飲食。常利用於低脂肪鮮乳、發酵乳製品、再製乾酪、烘培食品、肉製品、義大利麵、飲料、糖果等食品的製造上。此外，乳清蛋白質可提高植物蛋白質（如小麥、玉米、米）之生物價（林，1993^b）。

2. 乳清滲流液

乳清滲流液是當乳清利用超過濾的方法生產乳清蛋白濃縮物時的副產物。其中含有牛乳中最主要約 4~5% 的乳糖外還有礦物質、維生素及少量的可溶性氮(Fitzpatrick *et al.* 2003；Pauli *et al.* 2002；Fitzpatrick and O’Keeffe, 2001；Fitzpatrick *et al.* 2001)。乳清滲流液可再經處理去除礦物質後純化為高品質乳糖或經乳酸菌發酵製造乳酸。

3. 乳糖之製造與利用

乳清之一大利用為製造乳糖。從乳清以製造乳糖，一般分為六個步驟：(1) 乳清的石灰處理與加熱；(2) 沈澱蛋白質之除去；(3) 濃

縮；(4) 冷卻與結晶化；(5) 結晶之洗淨；(6) 結晶之乾燥。而製品之精製為使用再結晶之方法，雖然乳糖之製造法或改良法很多，但是主要是因為除去不純物的方法不同，其中離子交換樹脂是常用的方法，用此法可得純度 98-99% 之製品。乳糖分離之難易常取決於在濃縮前，從乳清除去蛋白質與鹽類之操作，這些物質可以含在乳糖結晶中，若殘存在濃縮液中則使乳糖之分離精製困難（張，1995）。

乳糖常被用於醫藥品、食品及培養基等成分中，醫藥品則可提供作為調劑時的增量劑、錠劑等製造時的賦形劑等；食品則可用於乳幼兒用乳製品的乳糖增量、各種乳製品的調製、乳製品的乳糖結晶析出用接種物、焦糖色素製造用等；在培養基方面則可供生產抗生素用，其他用途還可用於製造水解糖漿、乳糖衍生物等（林，1993^b）。

4. 乳清粉末之加工與利用

乳清粉末之製造，乃依照乳粉之製造方法。一般以凝乳酶劑乳清為原料時，先將之冷卻至 5°C 之下，經過清淨化或濾過，除鹽濃縮，標準化（主要調整 pH 值）等處理後，再依照乳粉之殺菌，濃縮處理。而乾燥之操作，作為食品用之乳清粉末採用噴霧方式，作為飼料用之乳清粉末則採用圓筒方式（張，1995）。一般圓筒或噴霧乾燥法製成的乳清粉含有 70% 呈非結晶性玻璃狀之無水乳糖（林，1993^a）。

乳清粉末易吸濕，褐色化等，故必須設法防止。最近乳清粉末之製造技術已有進步，目前將其所含乳糖結晶化後，再予乾燥製成非吸濕性製品。而乾燥之方法亦有使用泡沫乾燥法者（張，1995）。

乳清粉之組成，多含有牛乳中之重要營養素。乳脂肪雖少，但乳糖及灰分多，且維生素 B₁、B₂ 亦多。而蛋白質成分則由乳清蛋白質所構成（林，1993^a）。

乳清粉末之用途甚多，其可以作為營養強化食品、霜淇淋原料、糕餅之品質改良劑、滋養飲料、育兒食品及大豆混合食品等之外，尚可作為家畜飼料、肥料等（張，1995；林，1993^a）。

5. 乳清發酵製品

乳清是便宜又可快速被利用於發酵的培養基(Bury *et al.* 1998；Tsai *et al.* 1993)。可以工業發酵生產丁醇、丙酮、乳酸以及維生素 B₂ 等。另外，乳清亦可作為生產飼料用酵母之生產，例如 *Saccharomyces flagilis* 可將乳清中所含 90%以上之乳糖消耗，以充分生成蛋白，並且使 BOD(biologic oxygen demand) 大為減低，以減輕廢水之污染（張，1995）。乳清以同質發酵型乳酸菌發酵生產乳酸是被認為比被利用於生產乙醇更適當，而且可以達到更高的碳源的利用效率（Mehaia and Cheryan, 1986）。

四、乳酸菌之特性

自古以來，乳酸菌即與人類的生活息息相關，在食品工業、醫藥、環保上，乳酸菌是被廣泛利用的微生物。自從西元前五千年美索布達米亞人發現葫蘆內山羊奶於炎熱氣候下竟然會凝固成凝乳時，即顯示乳酸菌參與發酵的事實。而最早有科學證據者乃是法國化學兼微生物學家巴斯德（Pasteur）於 1857 年，發現酸乳（sour milk）中有微小生物體存在，將其定名為「levue lactique」，由此發酵是經乳酸菌作用所造成的秘密才首次被發現。再經科學家多年研究後，1873 年李斯特（Lister）利用稀釋法，由酸乳中純化分離出 *Bacterium lactis*，此即是目前的 *Streptococcus lactis*，是最早被分離出來的乳酸菌。

（一） 乳酸菌之定義

乳酸菌是一群能利用醣類作為能量來源而產生大量乳酸的細菌，它們可以分解蛋白質，卻不會產生腐敗物質而造成產品腐敗(Stiles and Holzapfel, 1997；施，1992)。

乳酸菌具有一些共通特性是為革蘭氏陽性菌、兼性厭氧、無觸媒反應、無孢子形成、無運動性及高酸耐受性並且可以存活低於 pH 值 5 以下的環境，最適生長環境範圍可以從 20°C 到 45°C (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Stiles and Holzapfel, 1997；施，1992)。

(二) 乳酸菌之分類

乳酸菌一般依菌體型態、生理、生化現象及分類學上區分之，乳酸菌歸類在乳酸菌科 (Lactobacillaceae)，主要可分為球菌及桿菌。球菌又可分為乳酸球菌屬 (*Streptococcus* 包含 *Lactococcus*)、白念珠菌屬 (*Leuconostocs*) 及四鏈球菌屬 (*Pediococcus*)。而桿菌有乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 及雙叉乳桿菌屬 (*Bifidobacterium*) (Hayakawa, 1992)。

近年來，隨著分子分類科學的進步，可依據乳酸菌分子遺傳 DNA 序列相似性及 RNA 序列相似性分類，將使傳統形質特性無法判斷之菌，都可以明確獨立成一類，給與分類上的位置，使乳酸菌之分類更清晰詳細 (Stiles and Holzapfel, 1997)。

另外，乳酸菌依代謝途徑及最終產物之不同，可分為同型發酵 (homofermentation) 和異型發酵 (heterofermentation) 乳酸菌。進行同型發酵時，乳酸菌經糖解作用使將葡萄糖分解成丙酮酸後，直接還原成約 90~100% 的乳酸 (Hayakawa, 1992)，其化學反應式如下：



而進行異型發酵時，乳酸菌除經糖解作用產生約 45~50% 乳酸外，亦可經 phosphoketolase 作用，產生乙醇、醋酸及二氧化碳等其他代謝產物 (Hayakawa, 1992)，其化學反應式如下：



Bifidobacterium spp. 亦屬於異型乳酸發酵者，可將一莫耳葡萄糖發酵產生一莫耳乳酸和 1.5 莫耳醋酸(Hawkins, 1993)，化學反應式如下：



1. 乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)

此菌屬在食品工業上具有極重要的商業價值。它們是多數發酵食品中的優勢菌種，並且於人類及動物的腸道中也扮演重要的角色。經常被使用作為製造乾酪、發酵植物食品、發酵肉製品、製造啤酒及葡萄酒等食品的菌醃。此外，所有的高等生物皆有乳酸桿菌屬共生，為人類口腔、腸道、陰道中之正常菌群 (Stiles and Holzapel, 1997)。

此屬為革蘭氏陽性菌，兼性厭氧，無孢子形成，型態有桿狀、彎曲桿狀、棒狀或細絲狀，無觸酶反應。具有極強的糖類發酵能力，且產酸能力強，能產生達 50% 以上的乳酸；耐酸性高，在 pH 值 4 時能生長 (Kwon *et al.* 2000；Stiles and Holzapel, 1997)。

此菌屬依其生理代謝時關鍵酵素 fructose-1.6-diphosphate 及 phosphoketolase 的存在與否又可分為三類：

(1) 絕對正型發酵 (obligately homofermentative)

絕對正型發酵菌，經由 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 途徑產

生乳酸，如 *Lb. acidophilus* 及 *Lb. delbrueckii* 等。因此特性，此類為常用於發酵乳清生產乳酸最重要的菌株。

(2) 兼性異型發酵 (facultatively heterofermentative)

兼性異型發酵菌，受質若為六碳糖，則行正型發酵產生乳酸；若為五碳糖則行異型發酵產生乳酸及醋酸等混合物。其中包含許多來自草類的菌株，特別是 *Lb. plantarum*、*Lb. casei*、*Lb. coryniformis*、*Lb. curvatus* 及 *Lb. farciminis* 等

(3) 絕對異型發酵 (obligately heterofermentative)

代謝須具備 phosphoketolase，此類菌株可生長範圍廣從 2 至 53 °C，但最適溫度仍為 30~40°C，菌體通常會形成長絲狀，包括 *Lb. brevis*、*Lb. buchneri*、*Lb. bif fermentans*、*Lb. fermentum*、*Lb. cellobiosus* 及 *Lb. viridescens* 等。

2. 乳鏈球菌屬 (*Streptococcus*)

此菌屬為革蘭氏陽性菌，好氧或兼性厭氧，型態為圓形或橢圓形，大小約 0.5~1 μm 之間，以鏈狀或配對形狀存在。此屬在 1980 期間，又再被分為腸球菌屬 (*Enterococcus*)、乳酸球菌屬 (*Lactococcus*) 及乳鏈球菌屬 (*Streptococcus*) 等三屬 (Stiles and Holzapfel, 1997)。

由於此屬於發酵過程中能產生特殊風味，因此在食品工業中已廣

泛的應用，尤其在乳品的發酵上扮演相當重要的角色。但若發酵過度或存在的菌種不適當，則反而造成酸敗等現象，例如曾於腐敗的龍蝦及牡蠣、分解軟化的蔬果及生黏的果汁中發現其蹤跡，而如 *Str. liquefaciens* 之存在，可能造成牛奶不良風味，*streptococci* 作用也會造成巧克力牛奶香味喪失。

代表菌種有 *Lac. lactis* subsp. *lactis*、*Str. thermophilus*、*Lac. lactis* subsp. *cremoris* 等。其中最具有代表性的 *Str. thermophilus* 為高溫菌，是具有熱抵抗性的菌種。在 45°C 至 50°C 環境中可生長，15°C 時則不能生長，且於 pH 9.6 以上、4% 膽汁或 2% 食鹽時也無法生長。其於 37~50°C 始產酸，具有相當良好之產酸能力，且因在發酵過程中會產生特殊風味，因此是常被使用於製造酸酪乳及乾酪的菌醃（Stiles and Holzapfel, 1997）。

另外，*Lac. lactis* 也是本屬中另一重要的商業使用菌種。為同質發酵菌，可生長於 10°C 的環境下，但是無法存活於 45°C，可利用葡萄糖產生 L (+) 乳酸（Stiles and Holzapfel, 1997）。生長於麥芽糖、乳糖及半乳糖中時，降低溫度或提高 pH 值會有酒精、醋酸及甲酸產生。目前此菌因為其會產生抑菌物質 nisin 而受到重視（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Stiles and Holzapfel, 1997）。

3. 四鏈球菌屬 (*Pediococcus*)

此菌屬為革蘭氏陽性菌，為兼性厭氧，正型乳酸發酵，一般型態為二連或四連，產生 DL 型乳酸為其特徵。其常少量與乳酸桿菌屬共存於植物體上，且常見於許多發酵食品中，但是因為不能快速地利用乳糖，所以於牛乳中生長較差 (Stiles and Holzapfel, 1997)。

代表的有 *P. cerevisiae*、*P. acidilactici*、*P. pentosaceus*、*P. halophilus* 及 *P. urinae-equi* 等。有些菌株對溫度、pH 值及 NaCl 具有耐受性，如 *P. acidilactici* 能在 50°C 以下生長，對熱具有耐性。*P. halophilus* 能存活於 18% NaCl 的環境中。而 *P. damnosus*、*P. pentosaceus* 耐酸，且能於低溫下生長，但是需要生長在厭氧條件下，一般存在於肉製品、醃漬蔬菜、醬油及植物體中。此屬大部分為有益菌，於發酵上扮演產酸及產生風味的角色，如 *P. damnosus* 能產生聯乙醯 (diacetyl)，而且若是環境不利生長時 acetoin 和 diacetyl 也會產生。但有些會造成啤酒腐敗，如 *P. damnosus* 產生苦味，*P. cerevisiae* 產生黏膜。此菌屬亦常為製造發酵香腸的重要菌種 (Stiles and Holzapfel, 1997)。

4. 白念珠菌屬 (*Leuconostocs*)

此菌屬為革蘭氏陽性菌，為異型乳酸發酵，厭氧或兼性厭氧，一般型態為成對或鏈狀，以產生 D(-) 乳酸為其特徵。最適生長溫度為

20~30°C，在 5°C 下不生長。多數菌株生長緩慢且營養要求較其他乳酸菌嚴格。普遍存在於蔬菜水果、乳製品、未加工食品、肉品及酒類中，其在牛乳中可生產多量之聯乙醯，使乳製品具有香味，而其天然存在於蔬菜中進行發酵，可製作酸泡菜，因此為乳品工業與製作酸泡菜的重要菌株。

有些菌種可使香腸發酸生黏，如 *Leu. mesenteroides* 會形成糊精；有些則會使濃縮果汁產生不良風味。其中 *Leu. mesenteroides* 亦可以利用蔗糖生產製造葡萄聚糖（Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000；Stiles and Holzapfel, 1997）。

5. 雙叉乳桿菌屬 (*Bifidobacterium*)

於 1899 年由 Henry Tissier 首先在嬰兒糞便中發現，並於 1900 年將其命名為 *Bacillus bifidus communis*，後來才由 Berger 將其稱為 *Bifidobacterium* 屬，並歸類於放線菌科 (*Actinomycetaceae*) 中。但此菌屬是人類腸道正常菌群而且也能產生多量乳酸，多數特性與乳酸菌相同，有一段時間將其歸為 *Lactabacillus*，因此至今多數人仍將之視為乳酸菌。

此菌屬為革蘭氏陽性菌，絕大多數絕對厭氧且無孢子形成的桿菌，無運動性，無觸酶反應，其型態呈 Y 字型、V 字型或彎曲桿狀，

不形成長鏈狀。此屬具有之特殊酵素：果糖-6-磷酸激化酶 (Fructo-6-phosphate -phosphoketolase)，能將一分子葡萄糖分解為 1 分子乳酸及 1.5 分子醋酸，同時此類菌屬大都含有可分解寡糖的 α -及 β -半乳糖苷酶(galactosidase) 及 α -葡萄糖分解酶(glucosidase)，其中，具有很高的 α -半乳糖苷酶活性，是大多數乳酸菌所沒有的。

雙叉乳桿菌在哺乳動物如人類(包括乳幼兒、成人)、豬隻即鼠類等之腸道及糞便中均可發現，在草食性反芻動物的瘤胃中亦可分離出。代表菌株中以 *B. bifidum* 分佈較廣，可在成人及幼兒糞便中分離出來；而 *B. infantis* 及 *B. breve* 則分別在幼兒及哺乳兒的糞便中發現；*B. longum* 則在人類、鼠類的糞便及反芻動物的瘤胃中可發現。目前只發現 *B. dentium* 會造成齲齒或牙科疾病，其他大多為有益菌，現在大多被人為添加於發酵乳及乳酸菌飲料中。

(三) 乳酸菌之營養需求及代謝特性

乳酸菌生長時有複雜的營養需求。因此，他們常存在於富含營養的環境中，例如植物、乳及動物和人體中 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000)。此外，一些生長因數也是他們生長代謝時所需，例如胺基酸、勝肽、維生素和數種有機酸包括 pyruvic and glyceric acid 等(Litchfield, 1996；Arasaratnam *et al.* 1996)。

1. 碳水化合物

(1) 乳糖

乳糖為牛乳中最主要的醣類，乳酸菌可利用乳糖作為主要碳源以提供能量及生長所需。乳糖是由 D-半乳糖 (D-galactose) 及 D-葡萄糖 (D-glucose) 以 β 1-4 鍵結合成得雙糖。乳酸菌藉由通透酶 (permease) 或 PTS 酵素系統 (phospho-pyruvate-sugar-phospho-transferase system) 將乳糖由細胞外轉運 (transport) 進入細胞內，再被 β -galactosidase 或 phospho- β -galactosidase 分解為葡萄糖及半乳糖；另一種方式則利用 phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system (PEP-PTS) 將乳糖磷酸化而進入細胞中，再經 p- β -galactosidase 分解成 galactose-6-phosphate 及葡萄糖，進入醣酵解代謝路徑產生能量、乳酸及其他代謝產物。

(2) 葡萄糖

乳酸菌再以 PEP-PTS 路徑或 ATP-dependent 通透酶將葡萄糖攝入利用再經醣酵解路徑 (Embden-Meyerhof-Parnas) 途徑中將葡萄糖分解為 D-form 或 L-form 乳酸及能量 (Hemme et al., 1980)。

(3) 半乳糖

乳酸菌利用半乳糖之機制有二，除了 PET-PTS 外尚可藉 ATP-dependent 通透酶系統利用之，後者對半乳糖之親和力為前者之

十倍，故半乳糖之吸收與利用主要以 ATP-dependent 通透酶系統為主。

半乳糖的代謝則因菌株而異，大部分的 *S. thermophilus* 與 *L. bulgaricus* 不能利用半乳糖(Somkuti and Steinberg, 1979)。半乳糖則經由 Leloir 途徑轉換為葡萄糖-6-磷酸鹽，而同樣進入 EMP 路徑(林，1993)，但是大部分乳酸菌並不繼續利用半乳糖，故在發酵過程後有堆積現象(Loones, 1989)。

2. 蛋白質

不同的乳酸菌其蛋白質分解能力不同，但是大部份的菌株均有其蛋白質分解系統，使它們能在肉、蔬菜及牛乳等富含蛋白質之基質中生長。由於乳酸菌必須由外界攝取多種供其生長所需之胺基酸，故其蛋白質分解系統必須能有效地分解蛋白質與運送胺基酸及勝肽(Law and Haandrikman, 1997; Abraham *et al.*, 1993)。

乳酸菌具有胞內及胞外蛋白質分解酵素，胞外蛋白質分解酵素與細胞壁緊密結合，可分解牛乳中蛋白質如酪蛋白等含氮物質(Abraham *et al.*, 1993)。Friend 與 Shahan (1984) 亦提出乳酸菌可分解乳品中部份蛋白質，使得遊離胺基酸濃度提高。

雖然蛋白質分解能力可作為乳酸菌的生長依據，蛋白質分解作用提高發酵乳品中之勝肽及遊離胺基酸含量，但有時卻會造成發酵產品

苦味的產生。此外，有些乳酸菌的蛋白質分解系統最後會產生獨特的勝肽(Khalid and Marth, 1990)。

乳酸菌之蛋白質分解能力遠比其他菌屬低，其中以 *L. bulgaricus* 和 *L. acidophilus* 等嗜熱菌群(thermobacterial group)最高，鏈球菌群(streptobacterial group)次之。因此 *S. thermophilus* 常與其他菌株混合培養(Rajagopal and Sandine, 1990; Chandan *et al.*, 1982)。

Arasaratnam (1996)研究指出，當使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作為乳酸菌生長時的氮源時，其無機氮會先被轉換為胺基酸然後才會合成乳酸菌生長和生產乳酸時所需之蛋白質。此結果可用於解釋當 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 被利用添加在乳清中時，乳酸菌生長及乳酸生產較慢的原因；相對的，其他氮源例如 peptone、大豆粉及酵母萃取物等，則可直接被乳酸菌利用產生乳酸。

3. 脂質

乳酸菌之脂肪水解能力比較弱，且發酵前後脂肪酸組成變化不大。但若乳脂肪經由均質後變成為 $1-2 \mu\text{m}$ 大小，脂肪球表面積增加，會使其較易受乳酸菌的脂肪分解酶作用。

牛乳經過發酵之後，亞麻油酸 (linolic acid) 和次亞麻油酸 (linolenic acid) 會有些微下降；遊離脂肪酸之硬脂酸 (stearic acid)

及油酸 (oleic acid) 則顯著增加 (Rao and Reddy, 1984)。揮發性脂肪酸，如醋酸、蟻酸等較發酵前增加，為影響發酵乳風味的重要成份。

一般解脂酶最佳活性條件為 45°C 及 pH 9.0，而乳酸菌之解脂能力隨菌株及環境不同而有差異。

4. 維生素

Friend (1983) 發現在發酵乳製品的製造過程中，乳酸菌會影響維生素 B 群的含量。因為發酵過程中，維生素 B₁₂、riboflavin、orotic acid 等維生素會被乳酸菌消耗，而如菸鹼酸及葉酸等則會被合成。

許多乳酸菌在生長時需要維生素 B 群，特別是葉酸；而有些菌種則可自行合成這些維生素。維生素 B 群被認為具有促進乳酸菌產生乳酸的功效 (Arasaratnam *et al.* 1996)。

菌醃種類、發酵條件及原料乳組成等均會影響維生素含量。如發酵乳製品的加工過程中培養時間及溫度及培養後的貯存都會影響維生素的含量 (Rao and Shahani, 1987)。乳酸菌在不同溫度處理下，所產生之維生素 B 群濃度也有差異；在發酵乳中，產生菸鹼酸及葉酸的最適溫度為 42°C，不過當發酵乳貯存於 4~5°C 時，葉酸及維生素 B₁₂ 的溫度也隨之降低。當發酵乳製品貯存在 5°C 時，生物素、菸鹼酸及泛酸的含量變化則是相當穩定。

5. 礦物質

乳酸菌生長需要礦物質，此乃因為礦物質催化多種酵素反應。然而其需要量極少，故對於發酵乳製品之總礦物質含量並無顯著影響。

錳離子是 *L. casei* 重要的生長因數，因為它是構成乳酸去氫酶重要的成分(Fitzpatrick *et al.* 2001;Krischke *et al.* 1991)。Fitzpatrick (2001) 研究指出以 *L. casei* 發酵乳清滲液時添加錳離子可有效促進乳酸生成及乳糖的利用。Arasaratnam *et al* (1996) 提到銨離子會影響乳酸桿菌對數種胺基酸的代謝。

6. 有機酸

有機酸可作為乳酸菌代謝活動的指標，其分析更有助於發酵乳風味方面的研究。乳酸是牛乳經乳酸菌發酵作用後產生的最主要有機酸，此外檸檬酸 (citric acid)、醋酸 (acetic acid)、蟻酸 (formic acid)、琥珀酸 (succinic acid)、蘋果酸 (malic acid)、尿酸 (uric acid) 及乳清酸 (orotic acid) 等亦會被形成。

肆、材料與方法

一、試驗材料

1. 分離培養基

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, MRS agar (Merck, Darmstadt, Germany)。

2. 修飾培養基

Modified-MRS (70 g/L Lactose)

組成分如下：

Composition	Content (g / L)
Peptone (from casein)	10.0
Meat extract	8.0
Yeast extract	4.0
Lactose	70.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Tween ^R 80	1.0
Di-ammounium hydrogen citrate	2.0
Sodium acetate	5.0
Magnesium sulfate	0.2
Manganese sulfate	0.04

3. 乳清滲流液粉 (Whey permeate powder)

順億股份有限公司代理進口 (LAND O'LAKES, USA)

組成分如下：

Composition	Content (%)
Protein	3.6
Moisture	4.5
Lactose	83.0
Fat	0.2
Ash	8.4
pH (10 % solution)	6.0
Titrotable acidity (6.5g to 93.5 mL water)	0.12

4. 黃豆 (soybean)

日正食品工業股份有限公司之黃豆子。

組成分如下：

Composition	Content (%)
Protein	35
Fat	15
Carbohydrate	30
Sodium	0.0375

5. 濃縮乳清蛋白

振芳食品股份有限公司

組成分如下：

Composition	Content (%)
Protein	77.0 (Mini)
Moisture	5.0 (Max)
Lactose	12.0 (Max)
Fat	8.0 (Max)
Ash	5.0 (Max)
pH (10 % solution)	7.0

6. 分離黃豆蛋白

振芳食品股份有限公司

組成分如下：

Composition	Content (%)
Protein	88.0 (Mini)
Moisture	7.0 (Max)
Fat	1.0 (Max)
Ash	5.0 (Max)
pH (10 % solution)	7.5±0.5

7. 試験薬品

- (1) Yeast extract (Difco, Detroit, USA)。
- (2) Peptone (Difco, Detroit, USA)。
- (3) Casitone (Difco, Detroit, USA)。
- (4) Meat extract (Merck, Darmstadt, Germany)。
- (5) Lactose (Merck, Darmstadt, Germany)。
- (6) Rennet (Difco, Detroit, USA)
- (7) L (+) lactate kits (Sigma laboratory, USA)。
- (8) D- Pantothenic acid (Sigma laboratory, USA)。
- (9) CaCO₃ (Ferak, Germany)
- (10) (NH₄)₂SO₄ (Osaka, Japan)

8. 供試菌株

本次試驗使用本實驗室從國內生乳中分離、純化後之乳酸菌株，經食品工業發展研究所菌種保存及研究中心菌種鑑定為

Lactobacillus rhamnosus THSH-1 及購自其研究中心之乳酸菌醃：

- | | |
|---|------------|
| (1) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | CCRC 14009 |
| (2) <i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> | CCRC 10940 |
| (3) <i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i> | CCRC 10697 |
| (4) <i>Lb. acidophilus</i> | CCRC 10695 |
| (5) <i>Lb. helveticus</i> | CCRC 11052 |
| (6) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | CCRC 10791 |
| (7) <i>Streptococcus thermophilus</i> | CCRC 12268 |
| (8) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> THSH-1 | |

共計有供試菌株 8 株。

9. 豆奶之製備

豆奶製造依鍾（1998）之方法製備：

- (1) 取大豆 33.3 g，加蒸餾水 150 mL，於 60°C 之溫水浴中浸泡 4 小時。
- (2) 浸泡後將浸泡水倒掉，加 80°C 之蒸餾水 150 mL 磨碎。
- (3) 以濾網過濾摒除去上層的泡沫。
- (4) 以滅菌釜進行 121°C，15 分鐘溼熱滅菌。
- (5) 滅菌完迅速冷卻，置於冰箱待用。

10. 乳清收集

乾酪依張（1995）之方法製備，收集排出之乳清供作試驗所用：

原料乳之處理：80°C 加熱 15 min 殺菌，冷卻至 30°C。



菌配之調製與添加：1% *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

與 *Lc. lactis* subsp. *lactis*。



凝乳酶劑添加：30°C 水浴 2 小時 30 分鐘，酸度達 0.18% ，加
凝乳酶。攪拌一分鐘即停止，靜製 35 分鐘。



凝乳之切斷：截切成丁（約 1-2cm 之立方體）



加溫、攪拌：每 5 分鐘增加 1°C 的速率加熱至 38°C（不斷攪拌）



加鹽：5% NaCl。



乳清排除：收集，經 121°C 加熱 15 分鐘滅菌後冷藏備用。



凝乳之堆積、裝入容器、壓榨



熟成

二、主要儀器設備

1. 高速冷凍離心機

Model 2323K, HERMLE, Germany

2. 分光光度計 (spectrophotometer)

Model UV-1061, Shimadzu, Japan

3. 高效能液相色層分析儀 (High performance liquid chromatography)

Model L-7100 intelligent pump, Hitachi, Japan

4. 紫外光偵測器 (UV detector)

Model L-7400, Hitachi, Japan

5. 積分儀 (chromato integrator)

Model D-2500, Hitachi, Japan

6. 管柱加熱器 (column oven)

Model L-7300, Hitachi, Japan

7. 震盪恆溫培養箱

Model S300R, 杏台, Taiwan

8. Kjeldhal system-1002

Model Foss tecator, Sweden

三、試驗步驟

試驗一：乳酸菌株分離、純化及保存

依照李 (1998) 之方法將生乳及克弗爾菌粒經連續稀釋後，取適當倍數之稀釋液 1 mL，以傾覆平板法均勻混入含環幾亞胺 (cycloheximide) 200 ppm 及丙酸鈉 0.25 % 的 MRS 培養基中，於 30°C、37°C、42°C、45°C 培養 2 天後挑取外觀型態不同之菌落，進行培養及純化。純化後之菌株接種於 MRS broth 中，各以 30°C、37°C、42°C、45°C 培養 16-20 小時後，保存於 4°C，每兩週活化一次。

純化後之乳酸菌株，進行下列之檢測：

(1) 革蘭氏染色鏡檢

(2) 觸酶試驗：將培養 48 小時之單一菌落，塗抹於 3% 過氧化氫中，觀察氣泡產生與否。

(3) 發酵型式試驗：於培養基中倒放置入一發酵管，藉由觀察發酵管中氣體產生與否來判斷菌株為同質或異質發酵。

(4) 乳酸鈉耐受試驗 (Tsai *et al.* 1993)：於培養基中添加 7-10% 的乳酸鈉 (約為等量的 5.6-8% 乳酸) 37°C 培養，觀察其生長狀況。

菌株保存：

選取革蘭氏染色陽性、無觸酶反應、同質發酵及乳酸鈉耐受性佳之菌株，以 MRS broth 活化後，於 4°C，4500 rpm 離心 10 分鐘，去除離心後之上清液並收集菌體，以滅菌之生理食鹽水清洗菌體兩次，所得之菌體加入含等量之 12% 乳固形物脫脂乳混合和 10% 甘油混合液作為抗凍劑，再迅速移入 -80°C 冷凍保存櫃保存，作為冷凍菌配待日後使用。各冷凍菌配使用前需再經滅菌之 16% SNF 脫脂乳連續活化兩次（37°C，16 小時）以恢復其活性。

試驗二：產酸能力試驗

依照 Hujanen, M. and Y.-Y. Linko (1996) 之方法，將各菌株接種 1% 於含有 modified-MRS 修飾培養基 100 mL 之容量 250 mL 血清瓶中，並添加 3% CaCO₃ 後緩衝乳酸，於 30°C、37°C、42°C、45°C，150 rpm 震盪培養，分別檢測 0、4、8、12、16、24、36、48 小時之菌數、乳糖剩餘量、乳酸生成量及 48 小時 L (+) 型乳酸生成量。

試驗三：發酵條件試驗

比較 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於下列不同發酵條件培養下之產酸效率，並以下列三種方式來選取最佳產酸發酵方式：

- (1) 無調節 pH 值及添加 3% CaCO_3 調節 pH 值
- (2) 靜態培養及 150 rpm 振盪培養
- (3) 1% 接種量及 10% 接種量（各接種量之菌液須經 4500 rpm 離心，去除上清液後取菌體接種）

菌株接種於含有 modified-MRS 修飾培養基 100 mL 之容量 250 mL 血清瓶中，以 42°C 培養，測其 0、4、8、12、16、24、36、48 小時之菌數、乳糖剩餘量及乳酸生成量。

試驗四：乳清發酵試驗

1. 氮源補充試驗

以乳清滲流液粉調配乳糖含量 4.9%，pH 6.0，氮含量為 0.46 g/L 之還原乳清滲流液。將乳清滲流液 100 mL 置於容量 250 mL 血清瓶中，並加入 3% CaCO_3 緩衝乳酸。

補充不同氮源（yeast extract、peptone、meat extract、casitone、casein、soymilk、soy-protein、whey protein、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）相同氮量

(0.5 g/L)於乳清滲流液中。接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量(接種之菌液須經 4500 rpm 離心，去除上清液後取菌體接種)，以 42°C，150 rpm 振盪培養，測其 12、24、36、48 小時之乳酸生成量。

2. 酵母萃取物補充試驗

以乳清滲流液粉調配乳糖含量 4.9%，pH 6.0，氮含量為 0.46 g/L 之還原乳清滲流液。將乳清滲流液 100 mL 置於容量 250 mL 血清瓶中，並加入 3% CaCO₃ 緩衝乳酸。

於乳清滲流液中補充不同濃度之酵母萃取物(0%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%)，接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量(接種之菌液須經 4500 rpm 離心，去除上清液後取菌體接種)，以 42°C，150 rpm 震盪培養，測 0、4、8、12、16、24、36、48 小時之菌數、乳糖剩餘量及乳酸生成量。

3. 乳清發酵試驗

收集自製乾酪排出之乳清(乳糖含量 5%，pH 5.7，氮含量 1.1 g/L，乾物質含量 5.6%，灰份 0.5%)。補充 3% 酵母萃取物，並加入 3% CaCO₃ 緩衝乳酸造成的酸抑制。接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量(接種之菌液須經 4500 rpm 離心，去除上清液後取菌體接種)，

於 42°C，150 rpm 震盪培養，測其 0、4、8、12、16、24、36、48 小時之菌數、乳糖剩餘量及乳酸生成量。

4. 豆奶補充試驗

以乳清滲流液粉調配乳糖含量 4.9%，pH 6.0，氮含量為 0.46 g/L 之還原乳清滲流液。將乳清滲流液 100 mL 置於容量 250 mL 血清瓶中，並加入 3% CaCO₃ 緩衝乳酸。

補充豆奶氮量 (0.5 g/L)，再添加泛酸 0.6 mg/L (Yoo *et al.* 1997) 於乳清滲流液中。接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量 (接種之菌液須經 4500 rpm 離心，去除上清液後取菌體接種)，以 42°C，150 rpm 震盪培養，測其 12、24、36、48 小時之乳酸生成量。

泛酸經 0.22 μ m 過濾膜過濾至乳清滲流液中。

四、分析方法

1. 乳酸菌數

依 Busta *et al.*(1984)之方法,取樣品 1 mL,置於裝有 0.1% peptone 滅菌水 9 mL 之稀釋液中,使其濃度成 10^{-1} ,以同一步驟將樣品稀釋至適當倍數,取稀釋菌液 1mL 於培養皿中,加入 MRS agar 15 mL 混合均勻後,置於 37°C 下培養 48 ± 3 小時,並計算其菌落數。

2. 乳糖含量分析

依照 Mostafa(1996)之 Phenol-sulphuric acid 測定方法,取樣品 2 mL,加 5% phenol 1 mL,再加 sulphuric acid 5 mL 混合,靜置 10 秒,放置於 25°C 水浴 15 min,測波長 480 nm 的吸光值。配置 0~0.008 % 乳糖為標準溶液製作出標準曲線,再由標準曲線計算出乳糖濃度。

分析前處理:發酵液以 4°C, $12000 \times g$ 離心 20 分鐘,取上清液供做乳糖含量的測定。

3. 乳酸生成量分析

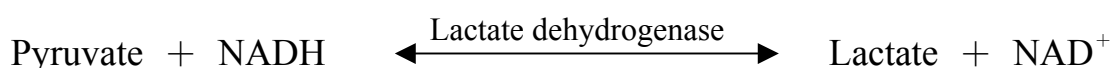
依照 Hujanen, M. and Y.-Y. Linko (1996) 之方法,藉高效能液相色層分析儀檢測。分離管柱為 BioRad (Aminex HPX-87 H, 300 m ×

7.8 mm)。測定條件：移動相為 0.008 N H₂SO₄，流速 0.6 mL/min，溫度 65°C，UV 220 nm 測定。

分析前處理：發酵液以 4°C，12000 × g 離心 20 分鐘，取上清液供做乳酸生成量的測定。樣品測定前須經適當加熱以溶解發酵液中的乳酸鈣結晶並且稀釋百倍以供分析。各樣品測定前需經 0.45 μm 過濾膜過濾至螺旋管中保存待測。

4. L (+) 型乳酸之分析

依 Noll (1974) 之方法，利用 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 與 L (+) 乳酸去氫酶之反應測定，反應機制如下：



分析前處理：取樣品 0.2 mL 與 0.6 N trichloroacetic acid (TCA) 0.4 mL 混合均勻，1500 g 離心 10 分鐘，以沈降蛋白質，取上清液 0.1 mL 待測。

Glycine Buffer 2.0 mL、蒸餾水 4.0 mL 及 Dehydrogenase 0.1 mL 與 NAD 10 mg 混合均勻。取混合液 2.9 mL 與樣品 0.1 mL 於 37°C，15 min 反應，於波長 340 nm 測定。計算方式如下：

$$\text{Lactate (mg/dL)} = A_{340} \times 130.5$$

5. 氮量分析

依中國國家標準測定粗蛋白質 (CNS 3449) 之方法測定

計算：

$$\text{氮量 (\%)} = \frac{(B - B_0) \times 0.1 \times f \times 0.01401 \times \%}{\text{樣品重 (A)}}$$

◎ B_0 為 Blank 組 0.1 N 硫酸滴定量。

◎ f 為 0.1N 硫酸之力價。

◎ B 為 0.1N 硫酸滴定量。

6. 統計分析

實驗採三重複測定，依測定項目所得數據，採用 SAS 統計套裝軟體進行分析。將試驗結果以一般線性模式 (General Linear model ; GLM) 進行不同處理間之差異性測定；另以 Least-square means (LSD) 測定法比較各處理組間平均值之差異顯著性。

伍、結果與討論

試驗一：乳酸菌株分離、純化及保存

試驗結果選取從生乳中篩選所得革蘭氏染色陽性、無觸酶反應、同質發酵及乳酸鈉耐受性佳之菌株。經新竹食品工業發展研究所菌種保存及研究中心以 16S rDNA 部分序列分析及 Biolog 鑑定系統，鑑定為 *Lactobacillus rhamnosus* THSH-1。將此菌株與乳酸生產研究文獻中曾被選用之菌種於試驗二中比較產酸能力。

試驗二：選殖高產酸乳酸菌

(一) 產酸能力試驗

微生物是利用發酵生產乳酸時最重要的影響因數。利用選殖來選擇具高產酸效率之微生物是普遍使用的方法，而乳酸菌是最常被使用在商業化生產乳酸的微生物，本試驗以選殖的方式選取具最佳發酵乳清產生乳酸效率之乳酸菌株。另外，溫度也是乳酸發酵過程中極重要的環境影響因數 (Tango and Ghaly, 1999)。

本試驗以自行選殖之 *Lb. rhamnosus* THSH-1 外，並選擇乳酸生產研究文獻中曾被選用之菌種為對象，其中有購自新竹食品工業發展研

究所菌種保存及研究中心之乳酸菌醃 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lb. casei* subsp. *rhamnosus*、*Lb. casei* subsp. *casei*、*Lb. acidophilus*、*Lb. helveticus*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 及 *Streptococcus thermophilus* 七株菌種，並比較各菌種於不同溫度下對乳酸菌生長、乳糖利用性、乳酸生成量及 L(+) 乳酸生成比例之影響，其結果如下：

1. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

此菌種常被使用當作發酵乳清生產乳酸的菌醃。最早於 1930 年代即有被記載使用在數種發酵乳清生產乳酸的步驟程式中 (Litchfield, 1996)。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 於修飾培養基中以不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時其生長曲線如圖三所示。其結果顯示，30°C 培養 16 小時期間生長狀況較其他溫度培養時佳，培養 48 小時後菌數最高為 10.1 Log cfu/mL。而 42°C 培養時初期生長不佳，但是培養 12 小時後快速生長至 36 小時有菌數 10.3 Log cfu/mL。而於 45°C 培養下，*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 生長不佳，培養 36 小時後存活菌數才開始增加。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖四所示。其結果顯示，*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 無論於何種溫度下培養，其培養初期 12 小時前之乳糖利用性及乳酸生成皆不佳。但是 42°C 培養 16 小時後乳酸生成量快速增加至 36 小時生成 66.7 g/L 乳酸。37°C 與 45°C 皆需培養 24 小時後乳酸生成量才開始增加，分別於 48 小時後生成 73.6 與 38.3 g/L 乳酸。30°C 培養時 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 雖然生長比 45°C 培養時佳，但是乳酸生成效率最差，培養 48 小時後乳酸生成量只有 22.3 g/L。

2. *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*

Lb. casei subsp. *rhamnosus* 是同質發酵乳酸桿菌，也是經常被使用於生產乳酸的菌醃 (Hujanen, M. and Y.-Y. Linko, 1996)。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 於修飾培養基中其生長曲線如圖五所示。其結果顯示，30、37 與 42°C 培養時，*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 菌數 24 小時前皆隨時間增加而提高。其中以 30 及 37°C 培養 12 小時後菌數即有 9.5 與 9.6 Log

cfu/mL，且於 24 小時菌數可達 10 Log cfu/mL 以上。而又以 37°C 培養初期 12 小時以前菌數皆高於 30 及 42°C，但是 12 小時至 16 小時期間生長緩慢，16 小時後才繼續生長至 24 小時達最高存活菌數 10.4 Log cfu/mL。*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 於 42°C 培養 24 小時達最高存活菌數，然後存活菌數持續下降至 48 小時菌數為 9.3 Log cfu/mL。而 45°C 培養至 8 小時後存活菌數才開始增加，於 36 小時後達 9.7 Log cfu/mL 之存活菌數。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖六所示。其結果顯示，在 30、37 與 42°C 培養時，*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 乳糖利用量及乳酸生成量 24 小時前皆隨時間延長而增加。其中以 37°C 培養 24 小時後乳酸生成量為 66.8 g/L 高於其他溫度培養者，乳酸生成效率最佳。但是對乳糖的利用效率則以 42°C 培養 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 時最佳，此現象推測溫度可能會影響 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 轉換乳糖成為乳酸的效率。而 45°C 培養 16 小時後，乳酸生成量才快速增加，至 36 小時達 61 g/L 乳酸生成量。*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 以 30°C 培養時存活菌數雖然皆較 45°C 培養時高，但是乳酸生成效率卻是最差。

3. *Lb. casei* subsp. *casei*

Lb. casei 可經同質發酵將乳清滲液中之乳糖轉換成 L (+) 乳酸，此菌種常被使用當作發酵乳清生產乳酸的菌醃 (Fitzpatrick *et al.* 2001)。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lb. casei* subsp. *casei* 於修飾培養基中之生長曲線如圖七所示。其結果顯示，30、37 與 42°C 培養時，*Lb. casei* subsp. *casei* 菌數 24 小時前皆隨時間增加而提高，而且於培養 24 小時存活菌數皆達 10 Log cfu/mL 以上。*Lb. casei* subsp. *casei* 培養 8 小時期間，以 37°C 培養時菌數增加最快。但培養 12~24 小時期間，則是以 42°C 培養之 *Lb. casei* subsp. *casei* 菌數高於其他溫度培養。而 30°C 培養 24 小時之後菌數則緩慢增加至 48 小時達 10.6 Log cfu/mL。而以 45°C 培養 *Lb. casei* subsp. *casei* 時生長最差，8 小時後存活菌數才開始增加，經 36 小時培養後菌數為 9.7 Log cfu/mL，然後菌數則急速減少至 48 小時為 7.9 Log cfu/mL。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *casei* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖八所示。其結果顯示，以 42°C 培養時 *Lb. casei* subsp. *casei* 乳酸生成與乳糖利用效率最佳，

於培養 24 小時後產生 69.4 g/L 乳酸。其次是 37°C 培養 36 小時後有 66 g/L 乳酸生成量。*Lb. casei* subsp. *casei* 以 30°C 與 45°C 培養時的乳酸生成效率皆較差。

4. *Lb. acidophilus*

Lb. acidophilus 為嗜熱菌種且具耐酸特性，常應用於作為發酵乳中之益生菌種。本試驗觀察不同溫度培養對其乳酸生成效率之影響。

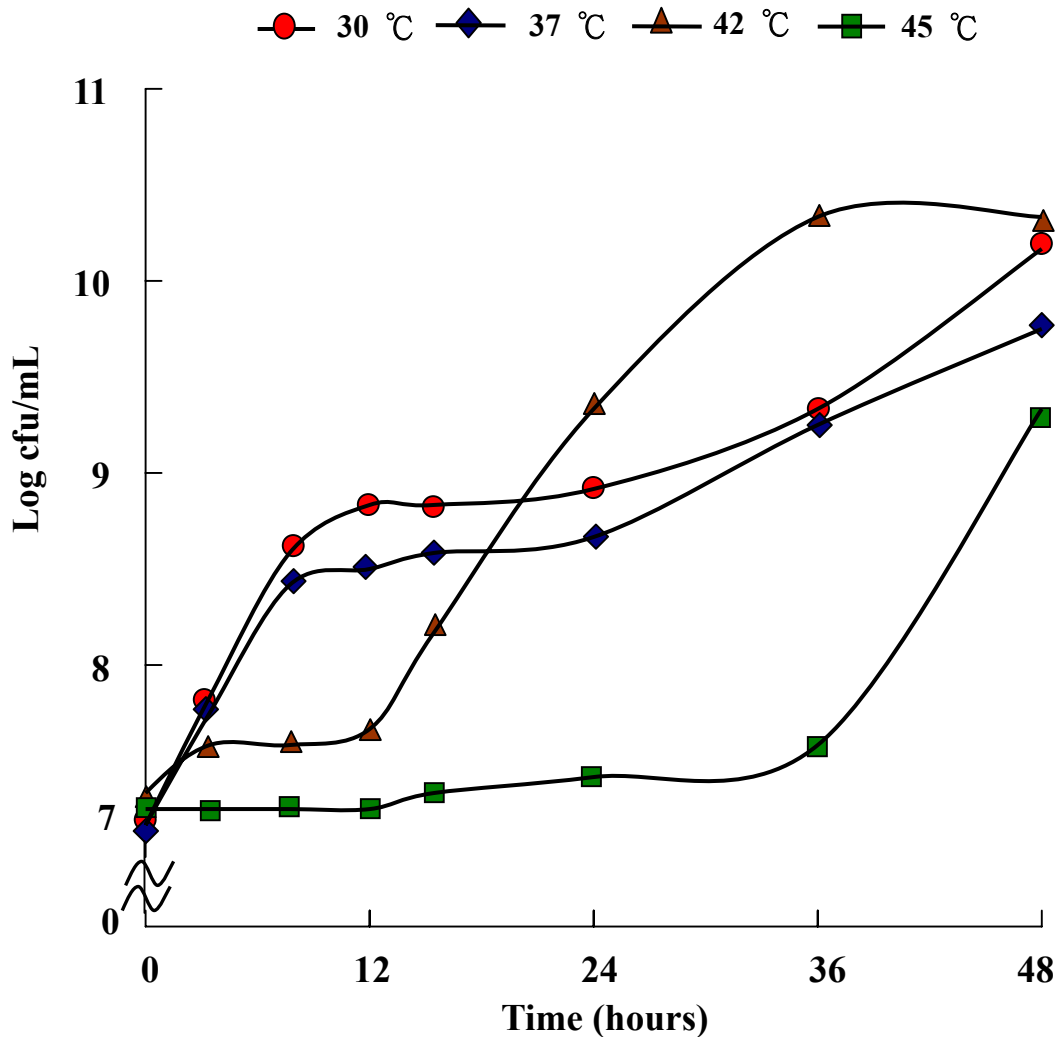
(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lb. acidophilus* 於修飾培養基中之生長曲線如圖九所示。其結果顯示，培養初期以 37°C 培養 8 小時後的菌數最高，然而 8 小時之後菌數卻生長緩慢。但以 42°C 培養時，*Lb. acidophilus* 則於培養 8 小時之後存活菌數快速增加，16 小時之後菌數皆高於其他溫度培養，而且於 36 小時達最高存活菌數 10.3 Log cfu/mL。*Lb. acidophilus* 以 45°C 培養時生長最差。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. acidophilus* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖十所示。其結果顯示，*Lb. acidophilus* 無論以何種溫度培養 16 小時時乳酸生成量皆很少，但是 37°C 培養 16 小時期間對乳糖利用性較佳。42°C 培養的 *Lb. acidophilus*

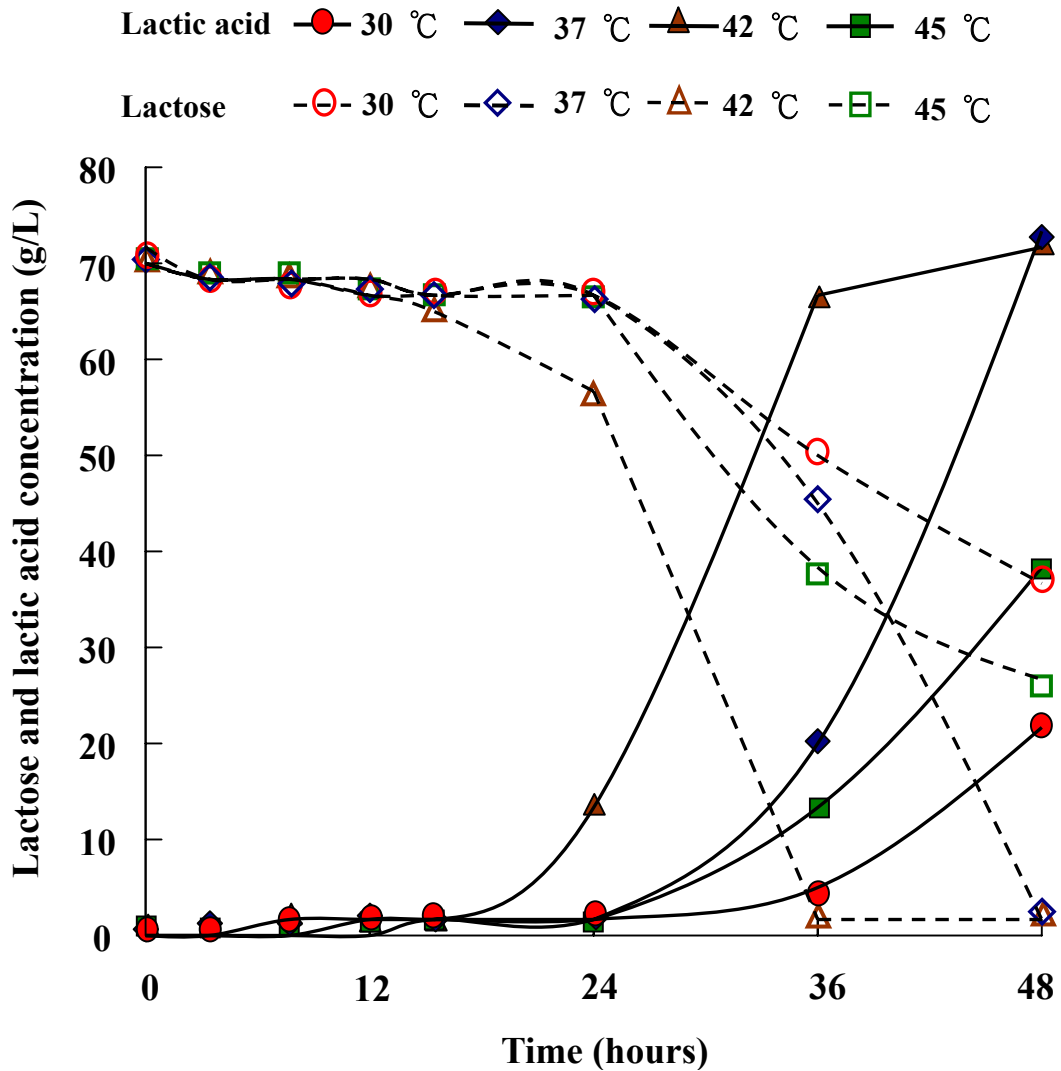
乳酸生成效率最佳，培養 24 小時後乳酸生成量開始快速增加至 48 小時後可生成 69.3 g/L 乳酸。其次是 45°C 培養 48 小時產生 54.7 g/L 乳酸。雖然 30、37°C 培養 48 小時期間 *Lb. acidophilus* 菌數皆高於 45°C，但是它們對乳糖利用性與乳酸生成效率卻較 45°C 培養時差。



圖三、不同溫度下 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 3. Growth curve of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* at different temperatures in modified-MRS.

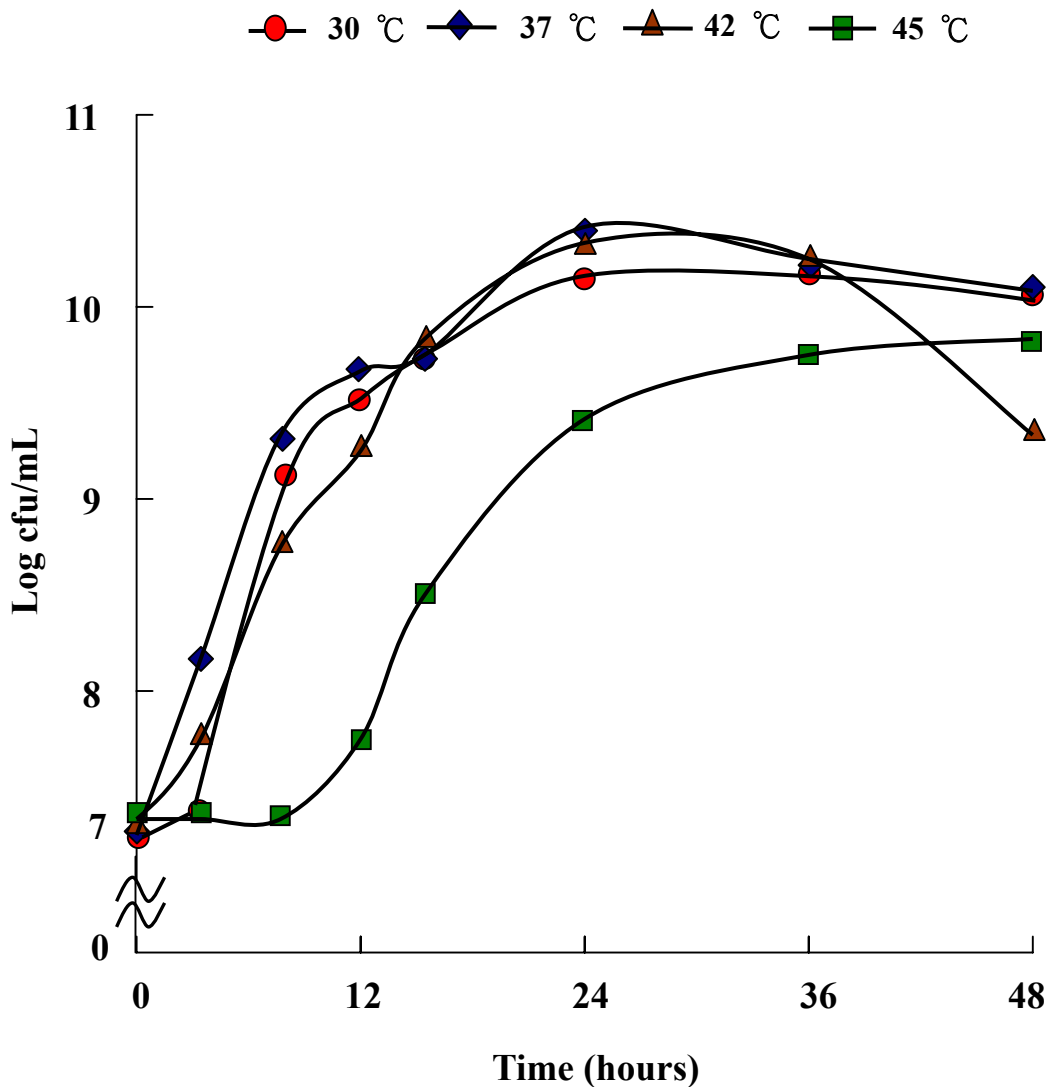
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖四、不同溫度下 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 4. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* at different temperature in modified-MRS.

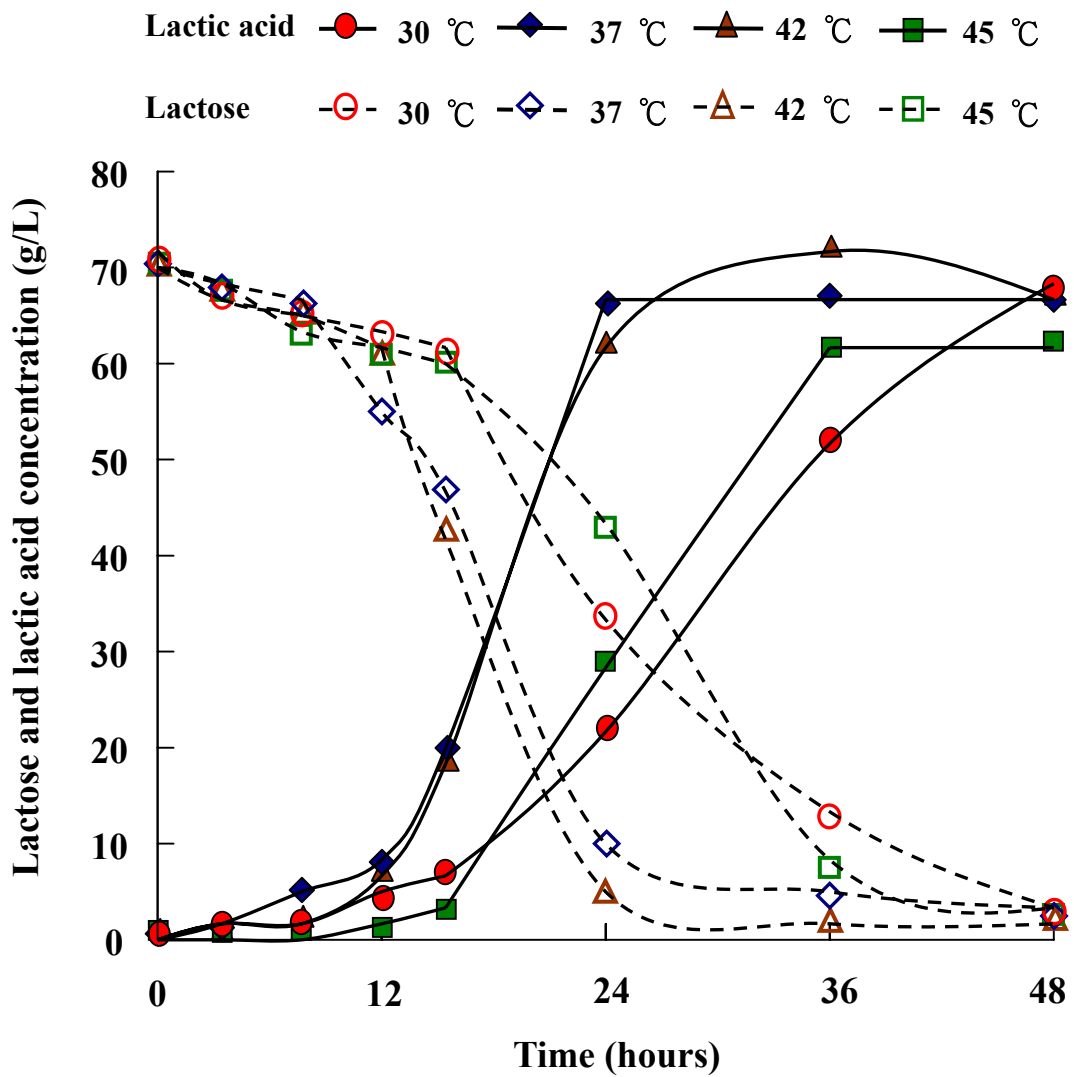
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖五、不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 5. Growth curve of *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* at different temperatures in modified-MRS.

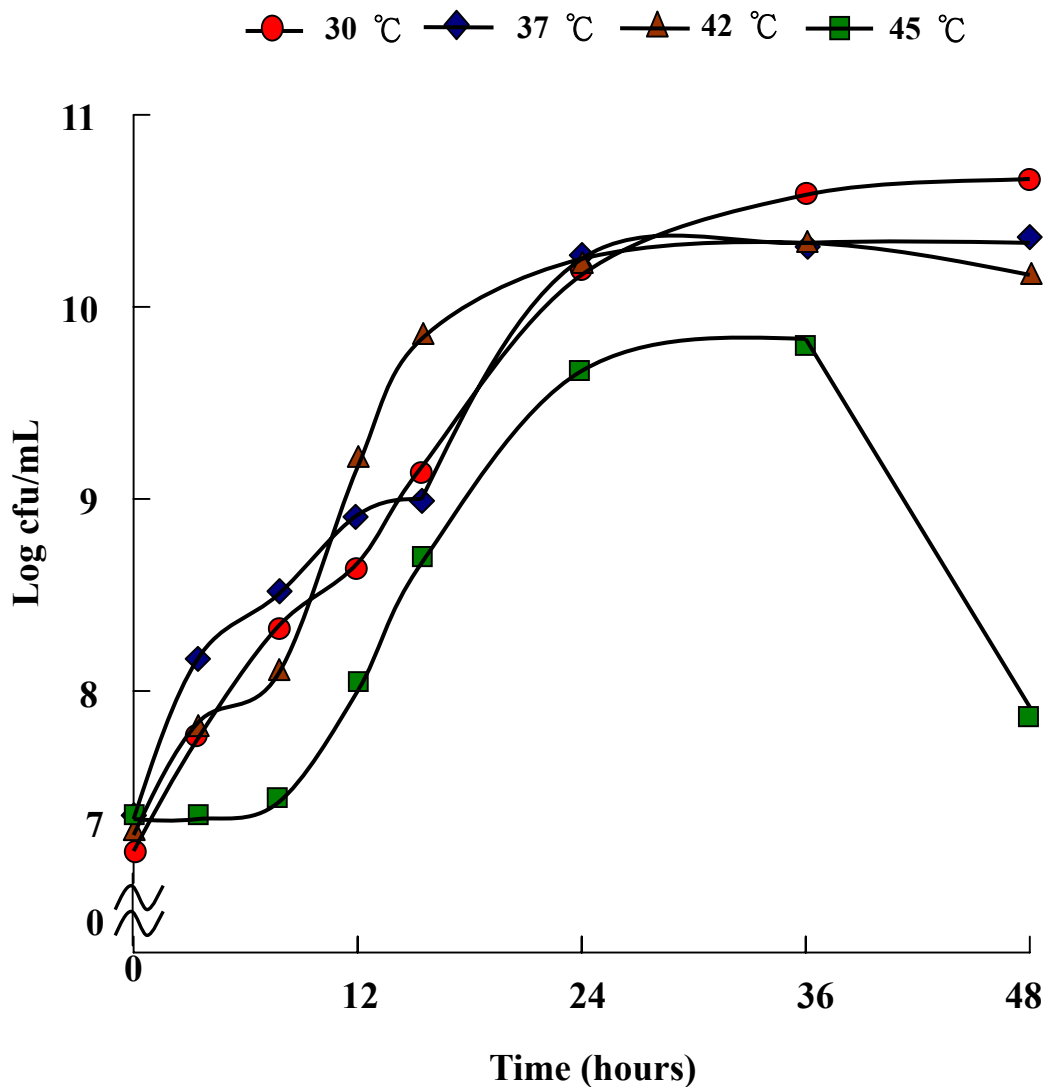
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖六、不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 6. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* at different temperature in modified-MRS.

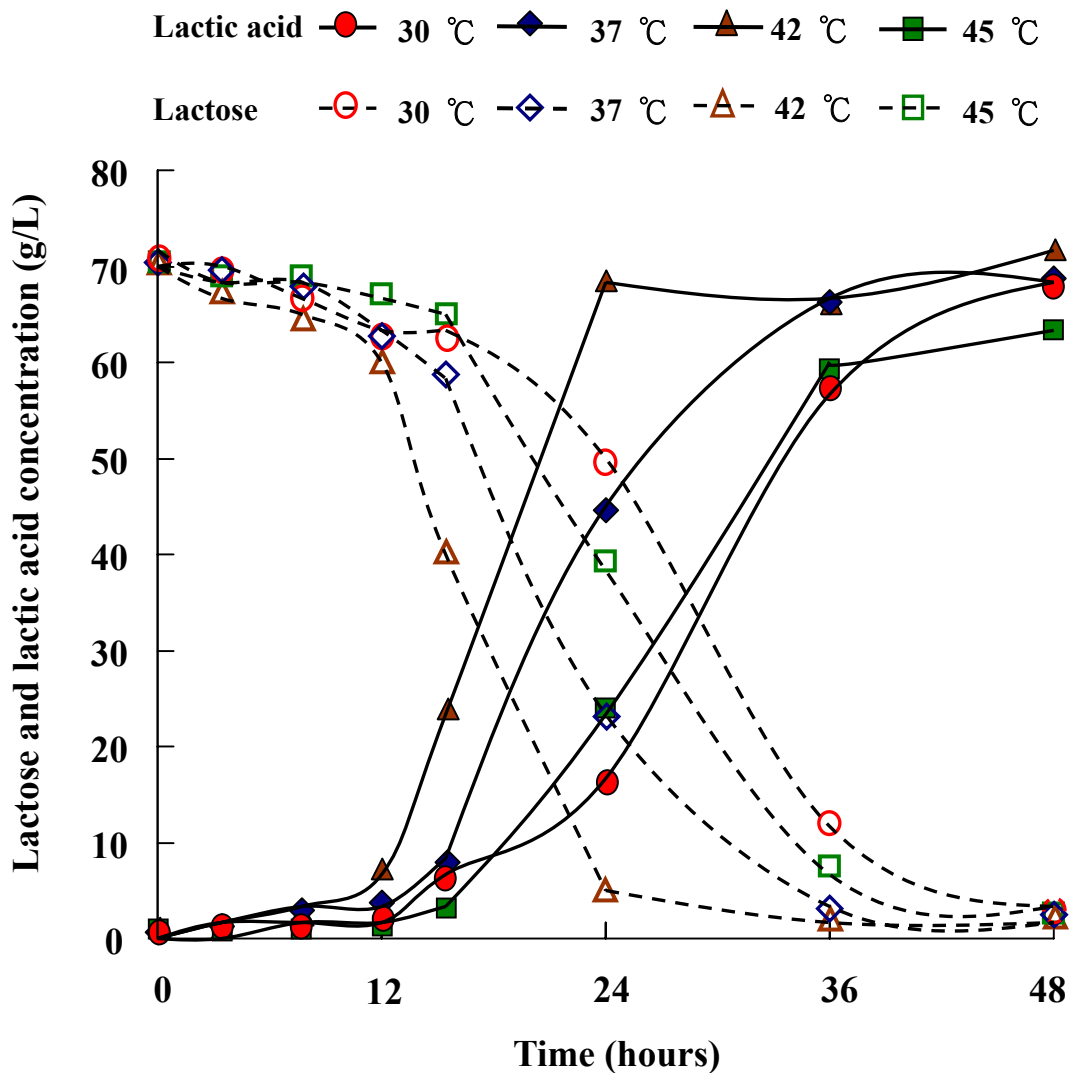
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖七、不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *casei* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 7. Growth curve of *Lb. casei* subsp. *casei* at different temperatures in modified-MRS.

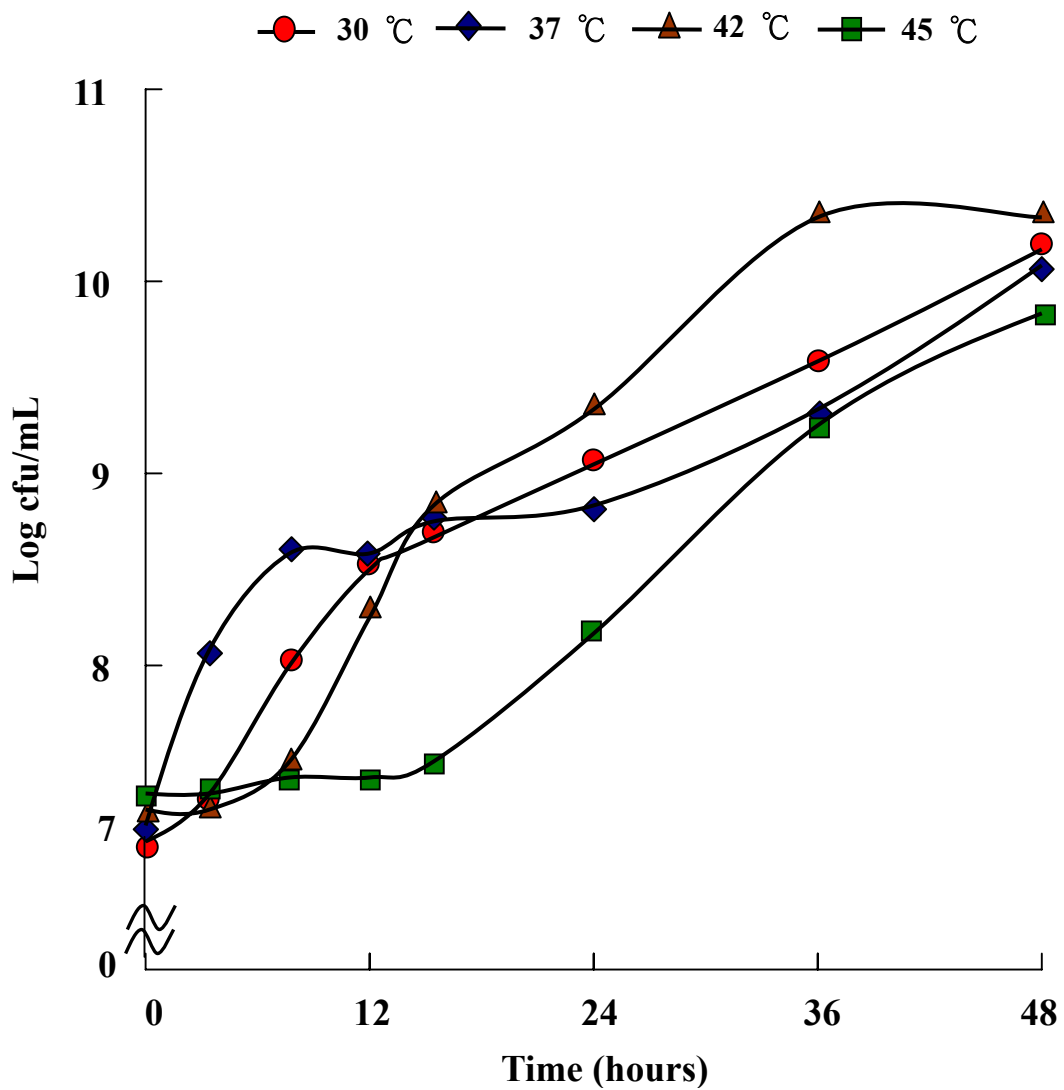
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖八、不同溫度下 *Lb. casei* subsp. *casei* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 8. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. casei* subsp. *casei* at different temperature in modified-MRS.

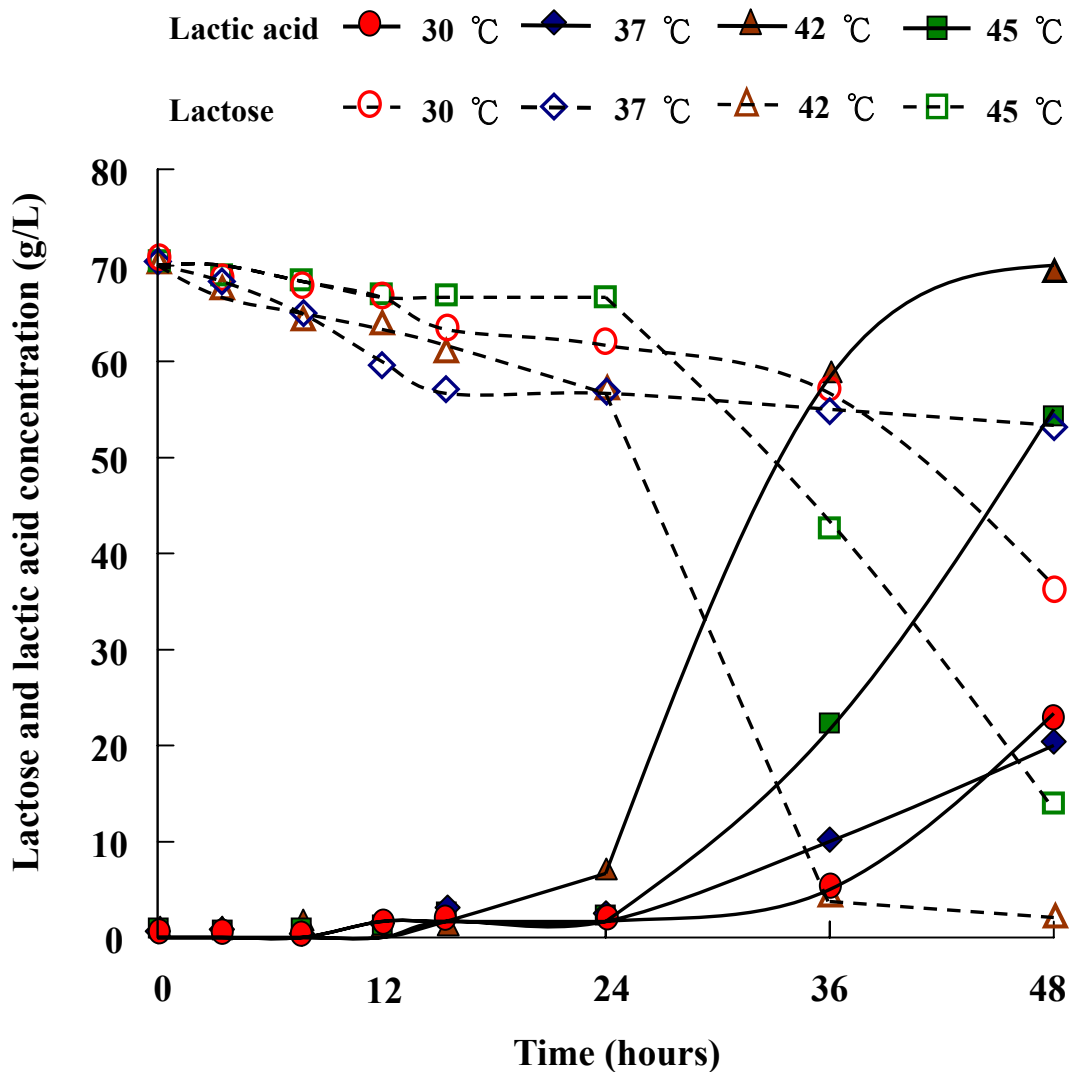
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖九、不同溫度下 *Lb. acidophilus* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 9. Growth curve of *Lb. acidophilus* at different temperatures in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十、不同溫度下 *Lb. acidophilus* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 10. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. acidophilus* at different temperature in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3

5. *Lb. helveticus*

Lb. helveticus 是同質發酵乳酸菌。在牛乳中，相較於其他乳酸菌，此菌種具有較佳利用乳糖生產高產量乳酸的特性，又因其屬於嗜熱和嗜酸的菌種，所以具有可以生長於污染微生物所無法生長的環境下，所以常被作為發酵乳清生產乳酸的菌種 (Tango and Ghaly, 1999 ; Chiarini *et al.*1992)。其生成 DL 型乳酸也是另一項不同於其他乳酸菌的特點 (Chiarini *et al.*1992)。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lb. helveticus* 於修飾培養基中之生長曲線如圖十一所示。其結果顯示，30、37 與 42°C 培養時，*Lb. helveticus* 菌數 24 小時前皆隨時間延長而增加。其中以 30 及 37°C 培養 12 小時後菌數即皆有 9.6 Log cfu/mL，培養 24 小時後菌數可達 10 Log cfu/mL 以上。而以 42°C 則培養 36 小時後有 10.1 Log cfu/mL 存活菌數。*Lb. helveticus* 於 45°C 培養時菌數生長最差。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. helveticus* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖十二所示。其結果顯示，37°C 培養時 *Lb. helveticus* 乳酸生成效率最佳，培養 36 小時後可產生 68 g/L 乳酸。而 30°C 培養 *Lb. helveticus* 期間的菌數生長雖然皆高於 42

及 45°C 培養，但是其乳酸生成效率卻較差。

6. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lc. lactis 是重要的商業使用菌種。為同質發酵乳酸菌，可生長於 10°C 的環境下，並可利用葡萄糖產生 L(+) 乳酸 (Stiles and Holzapfel, 1997)。此菌種也常被使用當作發酵乳清生產乳酸的菌醃。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 於修飾培養基中之生長曲線如圖十三所示。其結果顯示，*Lc. lactis* subsp. *lactis* 於 30、37 與 42°C 培養時，菌數 24 小時期間皆隨時間增加而提高，但是 37°C 培養 12~16 小時期間菌數生長會有停滯現象，然後才又恢復生長。而 42°C 培養 12~24 小時期間菌數快速增加並高於其他溫度培養，可是培養 36 小時之後 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 菌數則會快速減少。45°C 培養 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 時生長較差，而且培養 36 小時之後，菌數減少更快速至 48 小時後存活菌數只剩 7.1 Log cfu/mL。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖十四所示。其結果顯示，*Lc. lactis* subsp. *lactis* 於 42°C 培養時乳糖利用與乳酸生成效率最

佳，24 小時培養可產生 68.8 g/L 乳酸。其次是 37°C 培養 36 小時產生 70 g/L 乳酸。 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 以 30°C 培養時的乳糖利用及乳酸生成效率最差。

7. *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus 為高溫菌，是具有熱抵抗性的菌種。在 45°C 至 50°C 環境中可生長，15°C 時則不能生長。其於 37~50°C 始產酸，具有相當良好之產酸能力 (Stiles and Holzapfel, 1997)。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *S. thermophilus* 於修飾培養基中之生長曲線如圖十五所示。其結果顯示，*S. thermophilus* 無論於何種溫度下培養 24 小時期間菌數皆隨時間延長而增加。*S.*

thermophilus 於 30 與 37°C 培養時菌數生長較佳，培養 12 小時菌數即有 9.5 及 9.6 Log cfu/mL，且於 24 小時後存活菌數皆維持 10 Log cfu/mL 以上。*S. thermophilus* 於 45°C 培養時生長最差，而且比 42°C 培養 36 小時後存活菌數減少更快。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *S. thermophilus* 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖十六所示。其結果顯示，*S.*

thermophilus 無論於何種溫度下培養 16 小時期間乳酸生成量皆緩慢增加，而乳糖利用量則以 37°C 較佳。雖然 *S. thermophilus* 以 45°C 培養時菌數生長最差，但是其乳糖利用性及乳酸生成效率則於優於其他溫度培養，培養 36 小時後可產生 70.7 g/L 乳酸。其次則是以 42°C 培養 48 小時後可產生 64.9 g/L 乳酸。

8. *Lb. rhamnosus* THSH-1

此菌株是本實驗室從生乳中篩選所得，經新竹食品工業發展研究所菌種保存及研究中心鑑定為 *Lactobacillus rhamnosus* THSH-1。

(1) 不同溫度培養之生長狀況

在不同溫度 30、37、42 及 45°C 培養時 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中之生長曲線如圖十七所示。其結果顯示，30、37 與 42°C 培養時，*Lb. rhamnosus* THSH-1 菌數 24 小時期間皆隨時間增加而提高，而且 24 小時後存活菌數皆維持 10 Log cfu/mL 以上，其中 30°C 培養 48 小時後有最高存活菌數為 10.5 Log cfu/mL。但是 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於 45°C 培養時無法生長，存活菌數低於 10⁶ 以下。

(2) 乳糖利用性與乳酸生成量

在 30、37、42 及 45°C 之不同溫度下 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖十八所示。其結果顯

示，42°C 培養時 *Lb. rhamnosus* THSH-1 的乳糖利用性及乳酸生成效率高於其他溫度培養，並於培養 24 小時後有 67.4 g/L 乳酸生成量。雖然 37°C 培養 24 小時之後也有 65.5 g/L 乳酸生成量，但是培養 16 小時的乳酸生成量 20.2 g/L 卻遠低於同時間 42°C 培養的 35.5 g/L 乳酸生成量。而 *Lb. rhamnosus* THSH-1 以 30°C 培養 36 小時後可產生 74 g/L 乳酸。

綜合以上各菌種於不同溫度下培養之結果，以 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在 42°C 培養 16 小時的乳酸生成量為 35.5 g/L 及乳糖利用量為 37.4 g/L，顯著高於其他菌種培養相同時間下的乳酸生成量及乳糖利用量，具有最佳的乳糖利用性及乳酸生成效率，故選取此菌株作為乳清發酵試驗之菌醃。

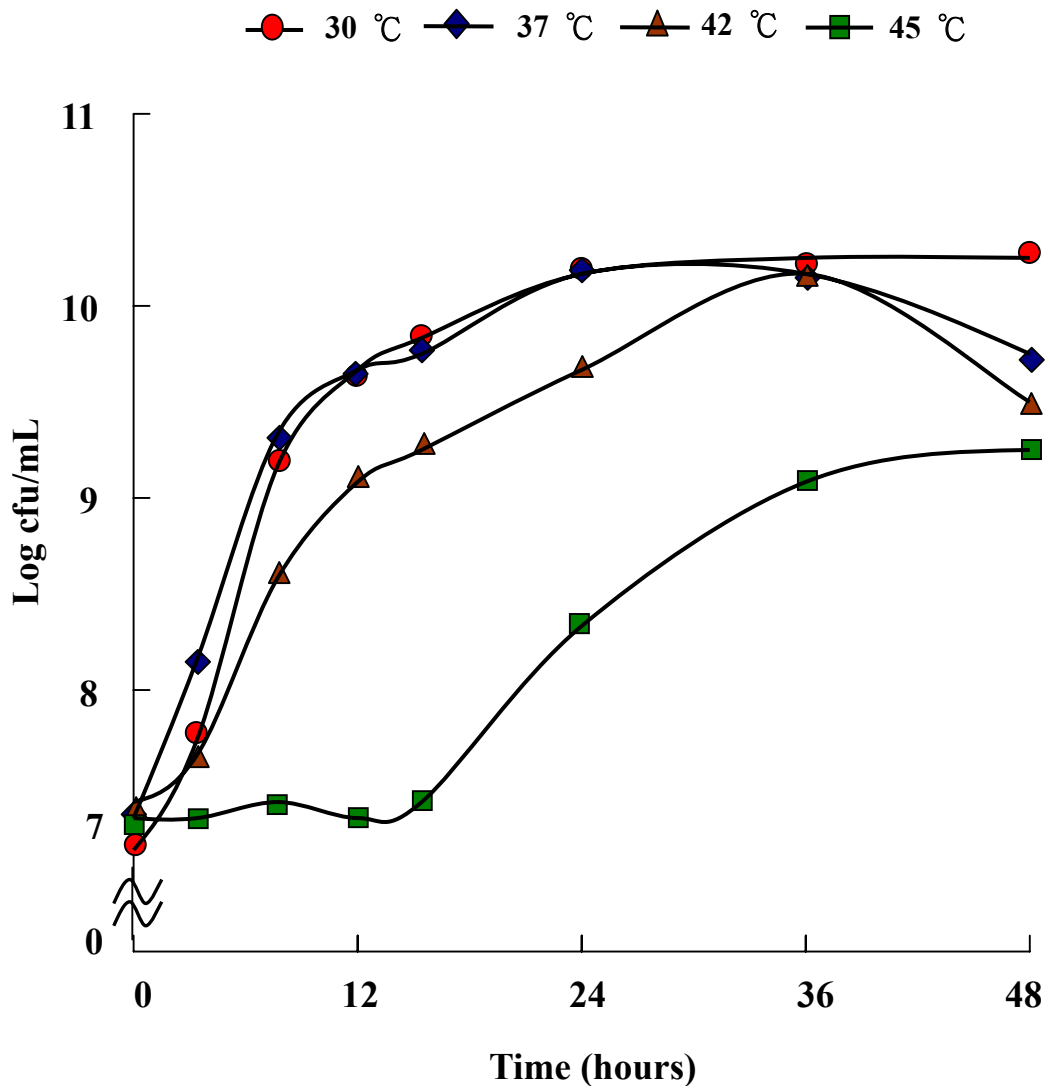
(二) L(+) 型乳酸試驗

乳酸是天然的有機酸。可依菌種的乳酸去氫酶的種類型態而產生分為 D(-) 型和 L(+) 型及 DL 型三種光學異構性乳酸。L(+) 型乳酸除了因為較容易為人體所吸收外，亦可再經聚合而作為生產生物可代謝聚合物的原料，所以具有較佳的利用性(Tsai *et al.*1993)。本試驗比較不同溫度下對於不同乳酸菌種的 L(+) 型乳酸生成的影響。

溫度對乳酸菌在修飾培養基中培養 48 小時後 L(+) 型乳酸生成

之影響如表三所示。其結果顯示，30°C 培養 48 小時後，*Lb. rhamnosus* THSH-1 的 L (+) 型乳酸產量及百分比比例高於同溫度下其他菌種的產量 ($P < 0.05$)。但是其他無論是在 37、42 或 45°C 培養 48 小時後，*Lc. lactis subsp. lactis* 的 L (+) 型乳酸產量及百分比比例皆顯著高於同溫度下其他菌種的產量 ($P < 0.05$)。尤其是以 45°C 培養 48 小時後，其 L (+) 型乳酸產量為 63.6 g/L，百分比比例 96.1% 最高。而 *Lb. helveticus* 與 *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* 是產生乳酸中 L (+) 型百分比比例較低的菌種，尤其是 37°C 培養時兩者所生成的 L (+) 型乳酸含量百分比比例皆低於 50%。

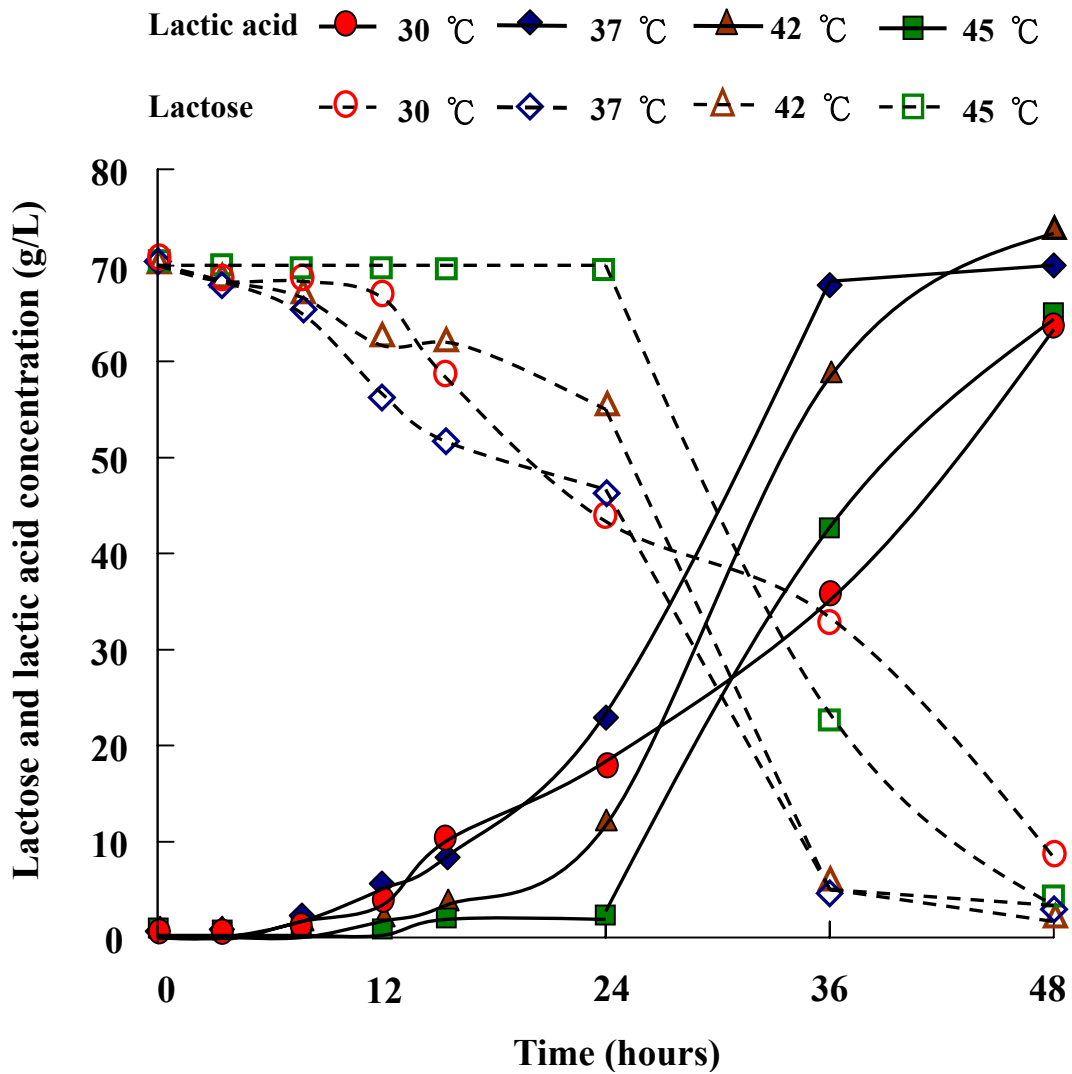
Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus 與 *Lb. rhamnosus* THSH-1 是以 42°C 培養時，其所產生乳酸中 L (+) 型的百分比比例高於其他溫度培養者。而其他各菌種皆是在 45°C 培養時，產生乳酸中 L (+) 型的百分比比例高於其他溫度培養者 ($P < 0.05$)。



圖十一、不同溫度下 *Lb. helveticus* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 11. Growth curve of *Lb. helveticus* at different temperatures in modified-MRS.

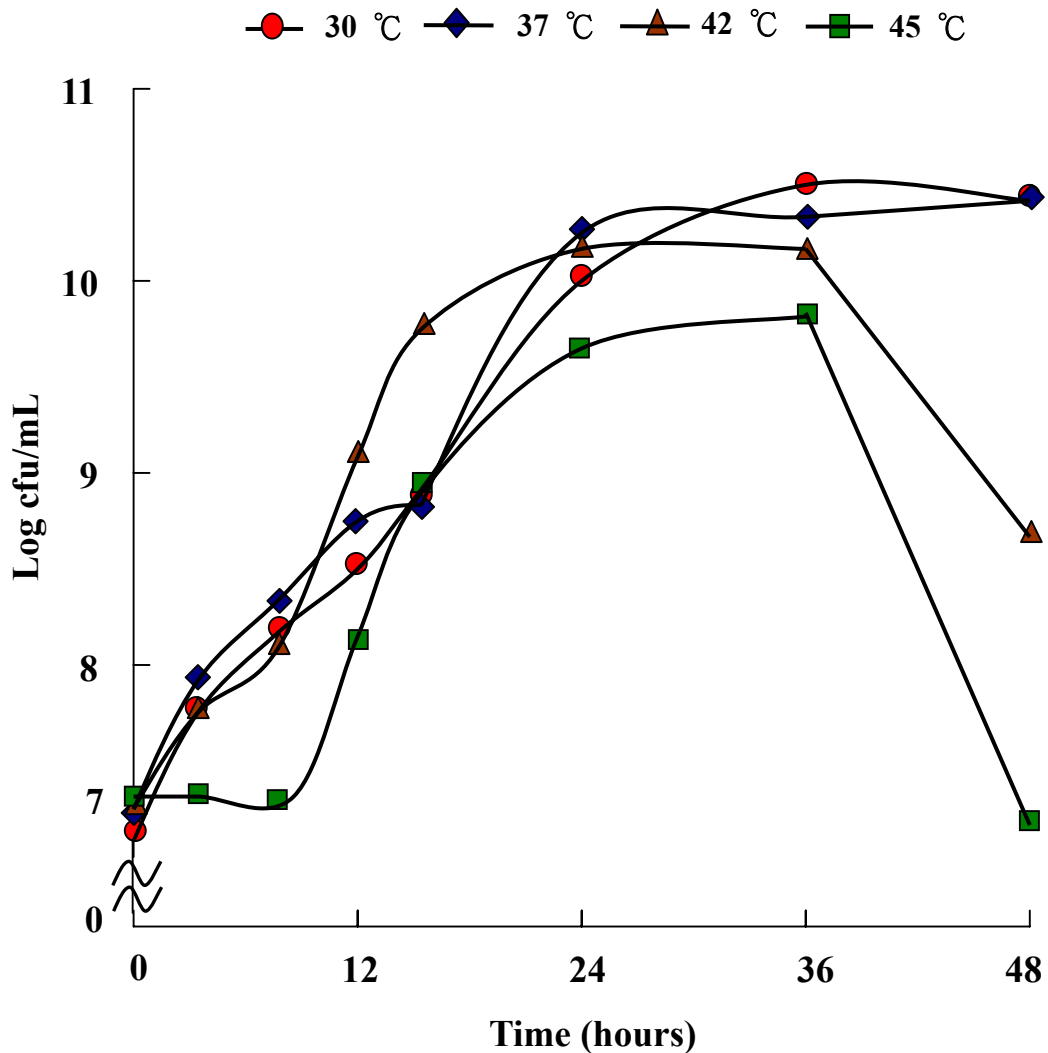
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十二、不同溫度下 *Lb. helveticus* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 12. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. helveticus* at different temperature in modified-MRS.

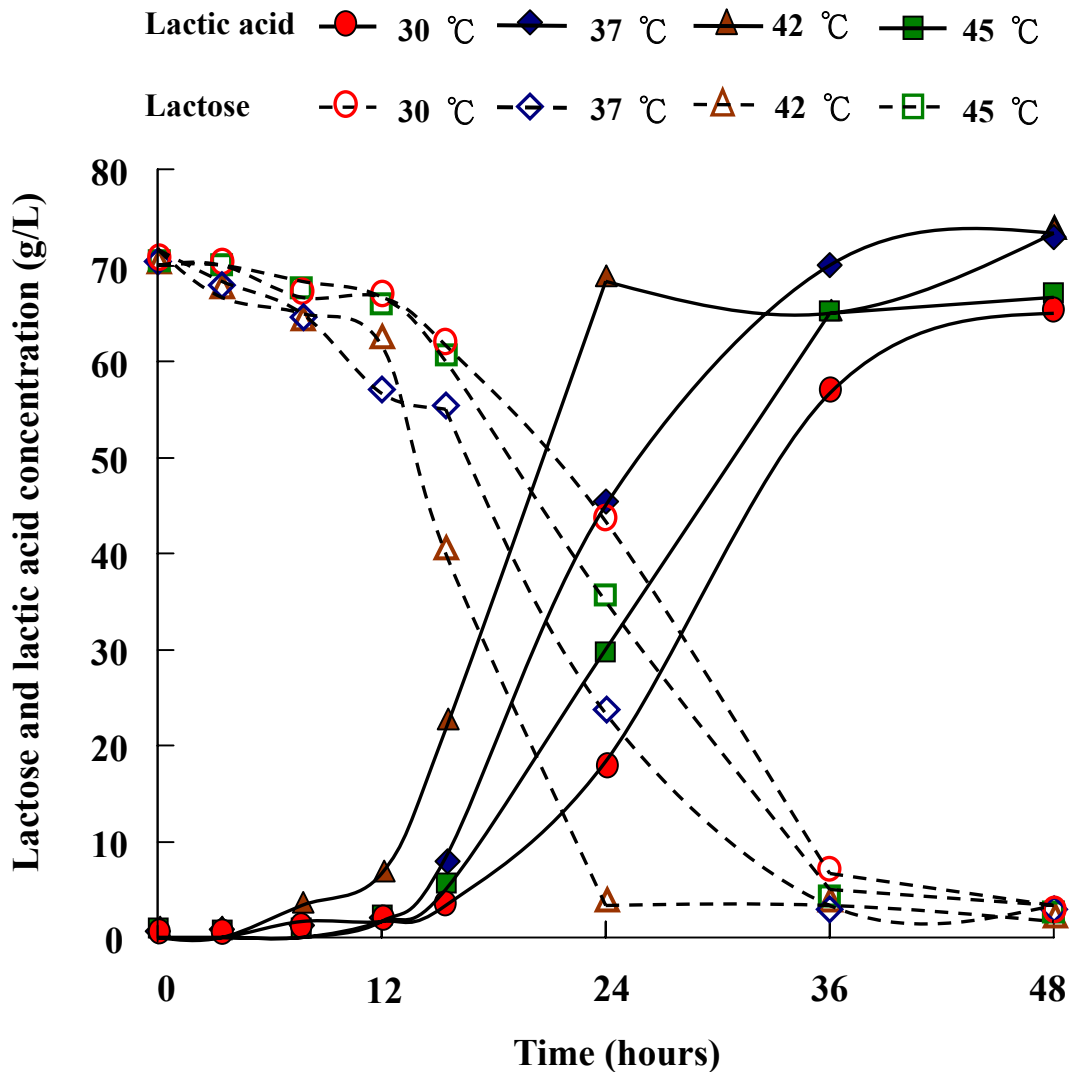
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十三、不同溫度下 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 13. Growth curve of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* at different temperatures in modified-MRS.

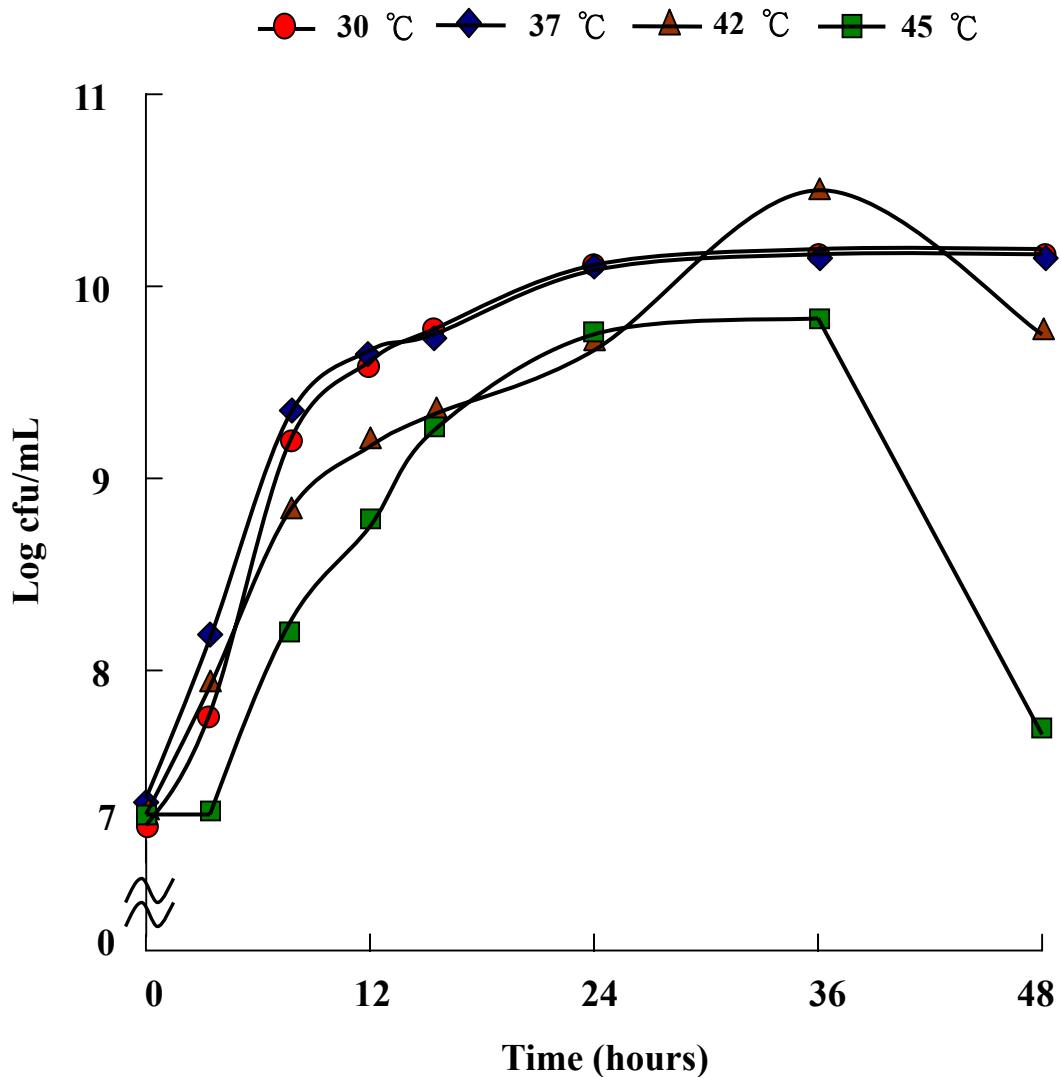
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十四、不同溫度下 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 14. Lactose utilization and lactic acid production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* at different temperature in modified-MRS.

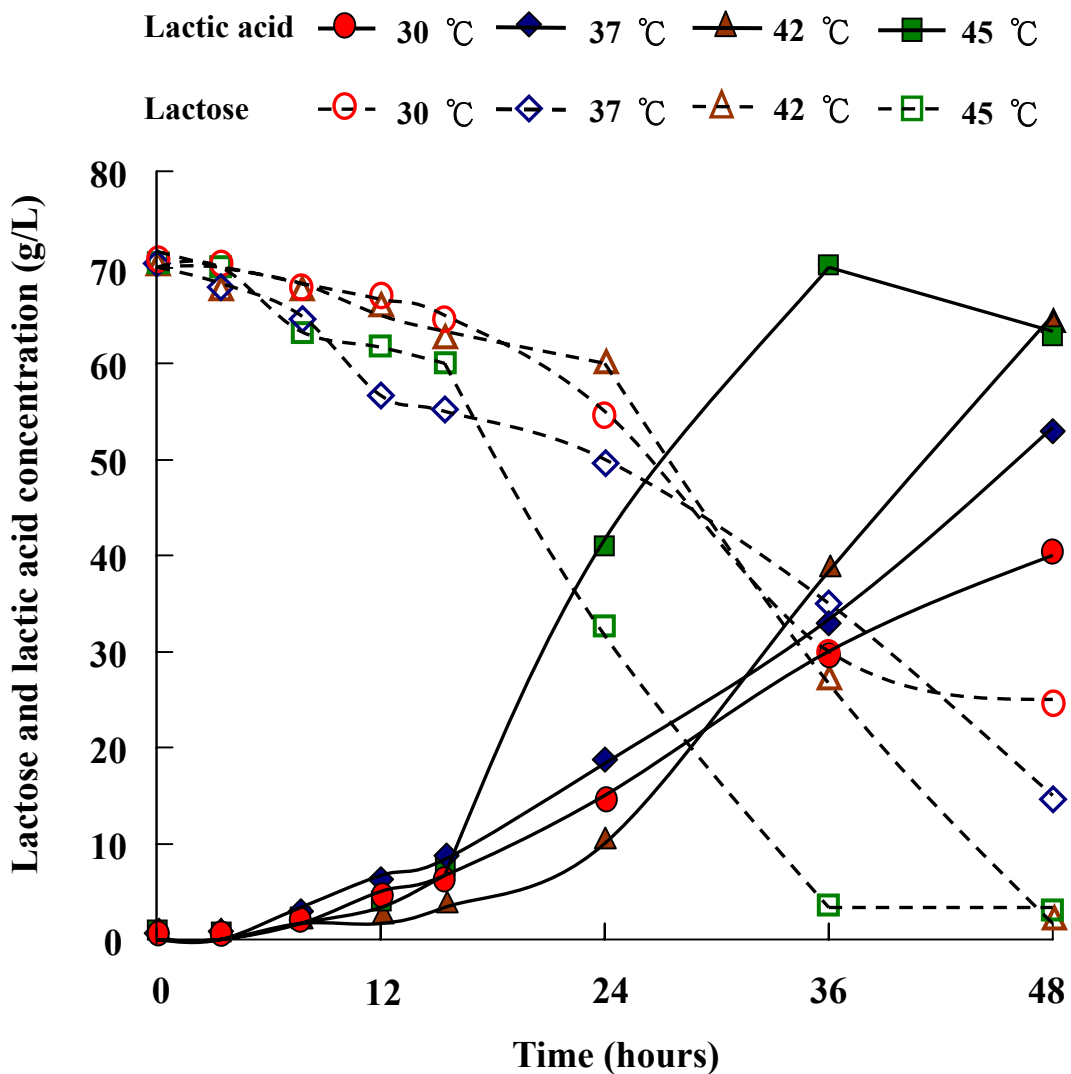
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十五、不同溫度下 *Streptococcus thermophilus* 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 15. Growth curve of *Streptococcus thermophilus* at different temperatures in modified-MRS.

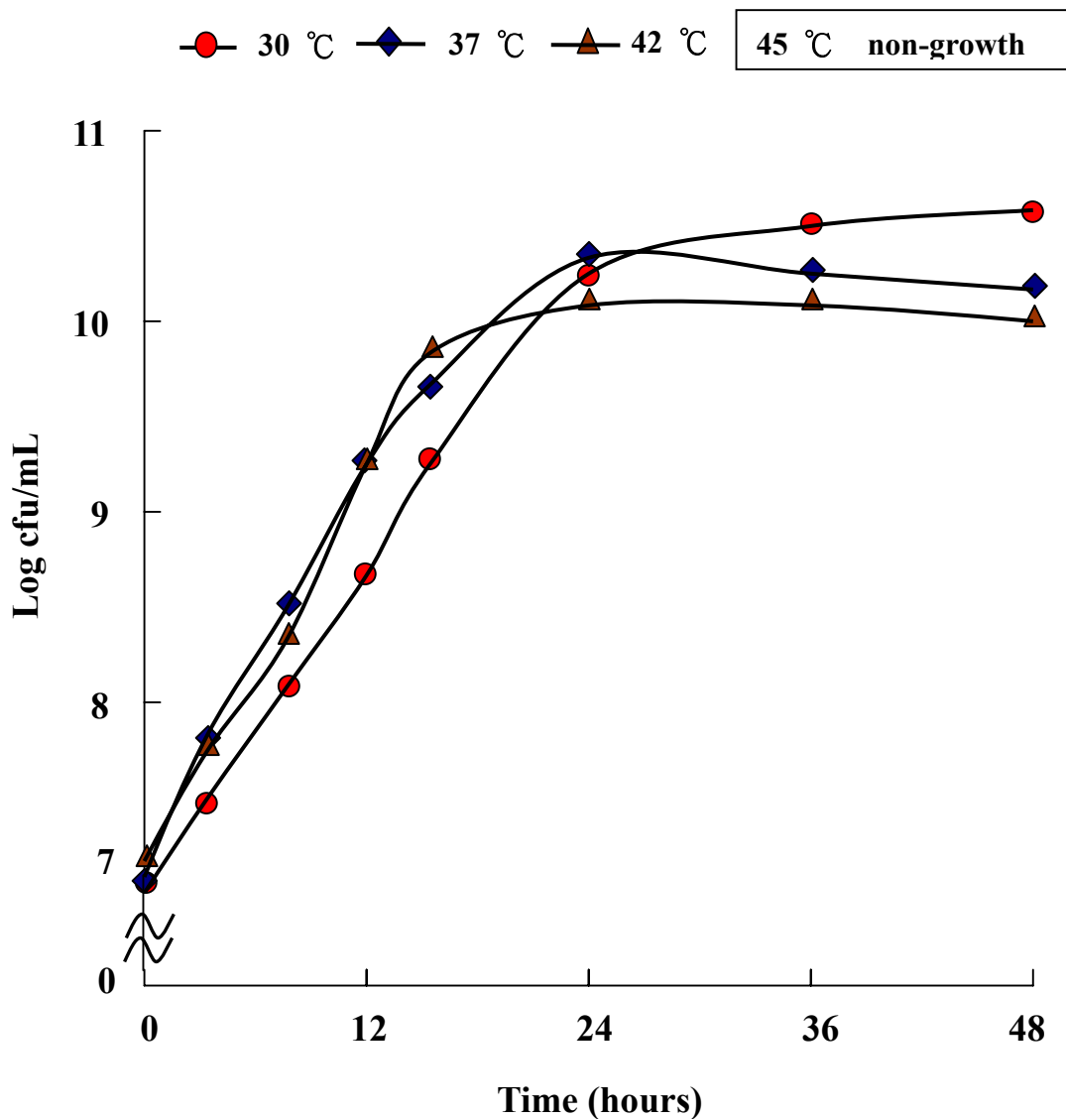
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十六、不同溫度下 *Streptococcus thermophilus* 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 16. Lactose utilization and lactic acid production of *Streptococcus thermophilus* at different temperature in modified-MRS.

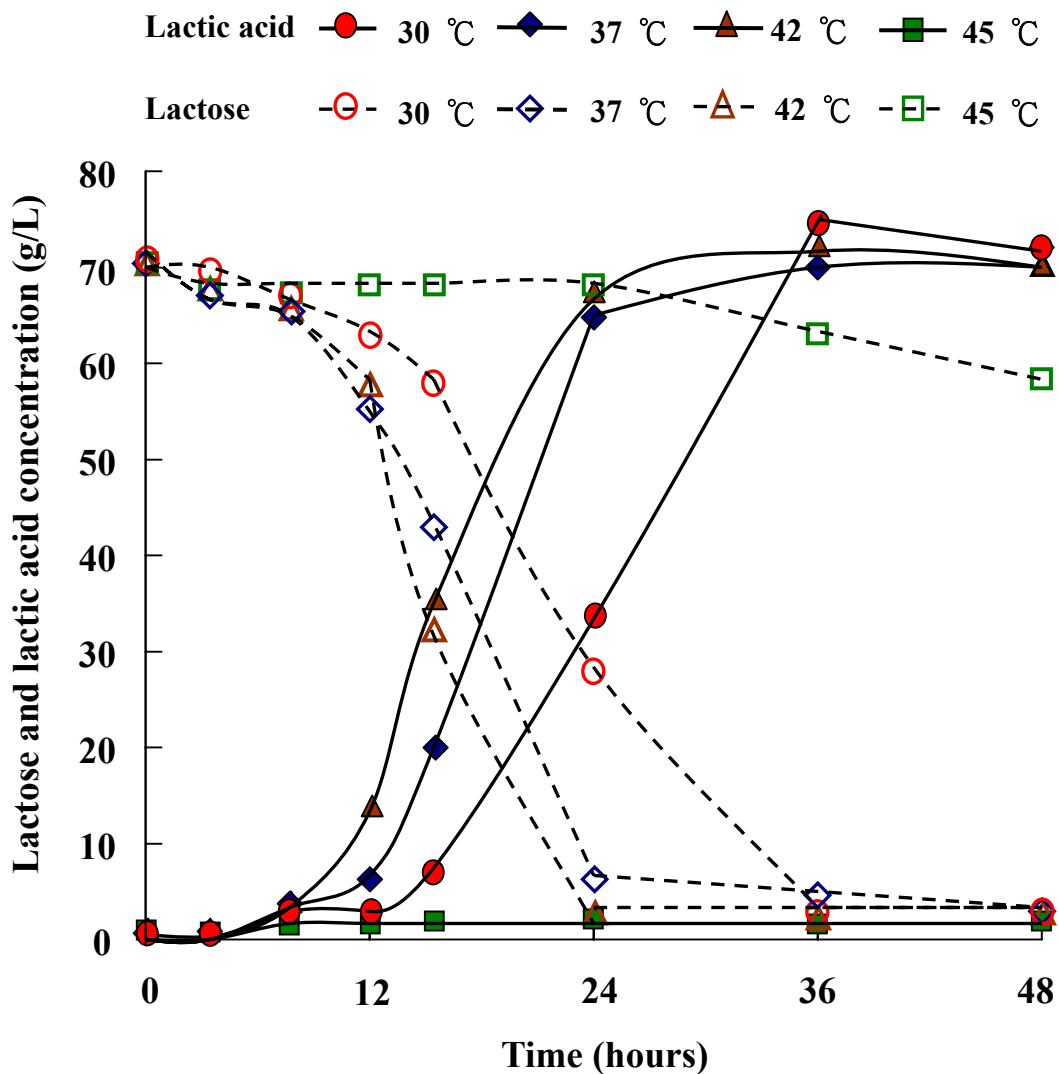
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十七、不同溫度下 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 17. Growth curve of *Lb. rhamnosus* THSH-1 at different temperatures in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖十八、不同溫度下 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 18. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. rhamnosus* THSH-1 at different temperature in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO

試驗二：發酵條件試驗

本試驗是比較 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於下列不同發酵條件培養下之產酸效率，並以下列三種方式來選取最佳產酸發酵方式。

(一) pH 值調節

本試驗添加碳酸鈣於培養基中，來緩衝乳酸對 *Lb. rhamnosus* THSH-1 所造成的酸抑制作用。試驗中並比較 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於沒有添加碳酸鈣之培養基中對其生長狀態、乳糖利用性及乳酸生成之影響。

pH 值調節對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中的生長影響之結果如圖十九所示。其結果顯示，無調節 pH 值的培養基中 *Lb. rhamnosus* THSH-1 培養 8 小時之後，存活菌數皆低於有調節 pH 值之培養基，且培養 12 小時後菌數即不再增加。而 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於有調節 pH 值的培養基中，培養 24 小時之後存活菌數皆高於 10 Log cfu/mL 以上。

pH 值調節對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中的乳糖利用性及乳酸生成影響之結果如圖二十所示。其結果顯示，無調節 pH 值的培養基中 *Lb. rhamnosus* THSH-1 其乳酸生成量及乳糖利用量除了培養 8 小時之前高於有調節 pH 值之培養基之外，在培養期間皆以

緩慢的速度增加，培養 48 小時之後乳酸生成量僅有 20 g/L。相對的，有調節 pH 值的培養基中 *Lb. rhamnosus* THSH-1 其乳酸生成量及乳糖利用量於培養 12 小時後急速增加，至 24 小時後即產生 67 g/L 乳酸。綜合以上結果發現，pH 值調節有助於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 的生長、乳糖利用性及乳酸生成。

Tango and Ghaly (1999) 認為 pH 是乳酸發酵過程中極重要的環境影響因數。乳酸菌雖然可以生長在寬廣的 pH 範圍內，然而其細胞生長對於 pH 值的高低相當敏感。在乳酸發酵過程中，乳酸的產生會抑制乳酸菌的生長，進而造成乳酸的生效率降低。因此，發酵過程中對 pH 值的調節有助於乳酸生成及基質轉換，本試驗結果與前人研究結果相當近似。

(二) 振盪培養

本試驗在比較振盪培養與靜態培養對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 的生長、乳糖利用性及乳酸生成之影響。

振盪對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中的生長影響之結果如圖二十一所示。其結果顯示，*Lb. rhamnosus* THSH-1 靜態培養 12 小時期間存活菌數皆高於振盪培養，然而 16 小時之後振盪培養菌數則高於靜態培養。振盪培養於 24 小時之後菌數皆高於 10 Log

cfu/mL 以上，而靜態培養從 12 小時後菌數則緩慢增加，至 36 小時才達最高菌數 9.9 Log cfu/mL。

振盪對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中的乳糖利用性及乳酸生成影響之結果如圖二十二所示。其結果顯示，*Lb. rhamnosus* THSH-1 培養 12 小時期間靜態培養的乳糖利用量與乳酸生成量高於振盪培養，然而 16 小時之後振盪培養的乳酸生成量則高於靜態培養。振盪培養於 24 小時之後 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成量達最高之 67 g/L，而靜態培養 48 小時後才產生 58.3 g/L 乳酸。

綜合以上結果發現，振盪培養可促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 的生長、乳糖利用性及乳酸生成。此結果推測是因為振盪有助於培養基中的碳酸鈣與乳酸中和，而達到較佳緩衝 pH 的效果，因此使振盪培養的 *Lb. rhamnosus* THSH-1 較不會受到因為乳酸所造成 pH 值下降導致生長抑制的影響。

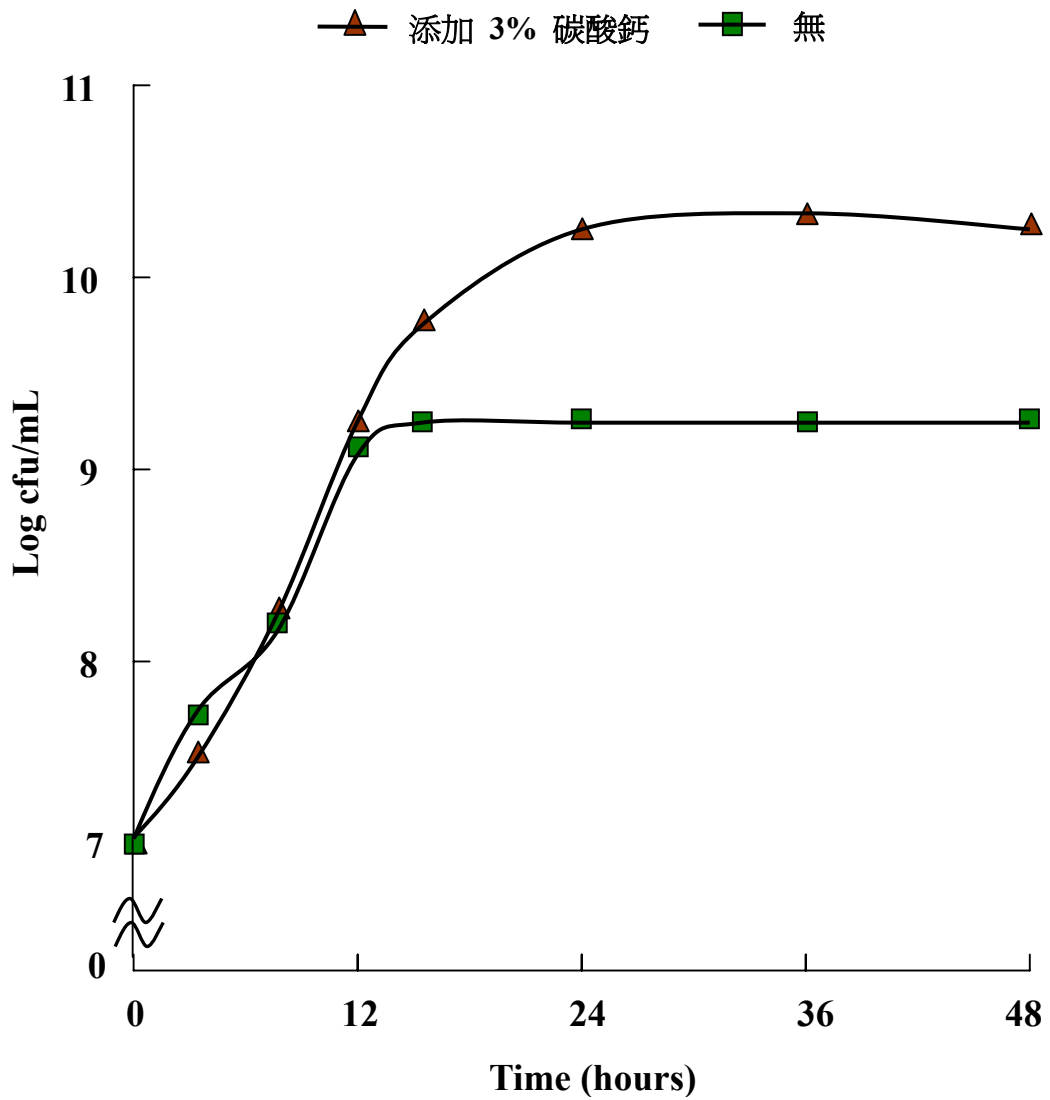
(三) 接種量

Litchfield (1996) 及 Chiarini *et al.* (1992) 皆認為接種量對於發酵過程中乳酸菌的乳酸產量有顯著的影響。故本試驗比較不同接種量 (1%、10%) *Lb. rhamnosus* THSH-1 之生長、乳糖利用性及乳酸生成。

不同接種量 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中之生長曲線如圖二十三所示。其結果顯示，接種 10% 菌量之 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在培養 48 小時期間存活菌數皆高於接種 1% 菌量之菌數。

不同接種量 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之結果如圖二十四所示。其結果顯示，接種 10% 菌量之 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在培養 24 小時期間的乳糖利用量及乳酸生成量皆高於接種 1% 菌量。接種 1% 與 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量培養 24 小時後，兩者乳酸生成量皆為 67 g/L。結果發現，接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量的乳糖利用性及乳酸生成效率較只接種 1% 菌量佳。

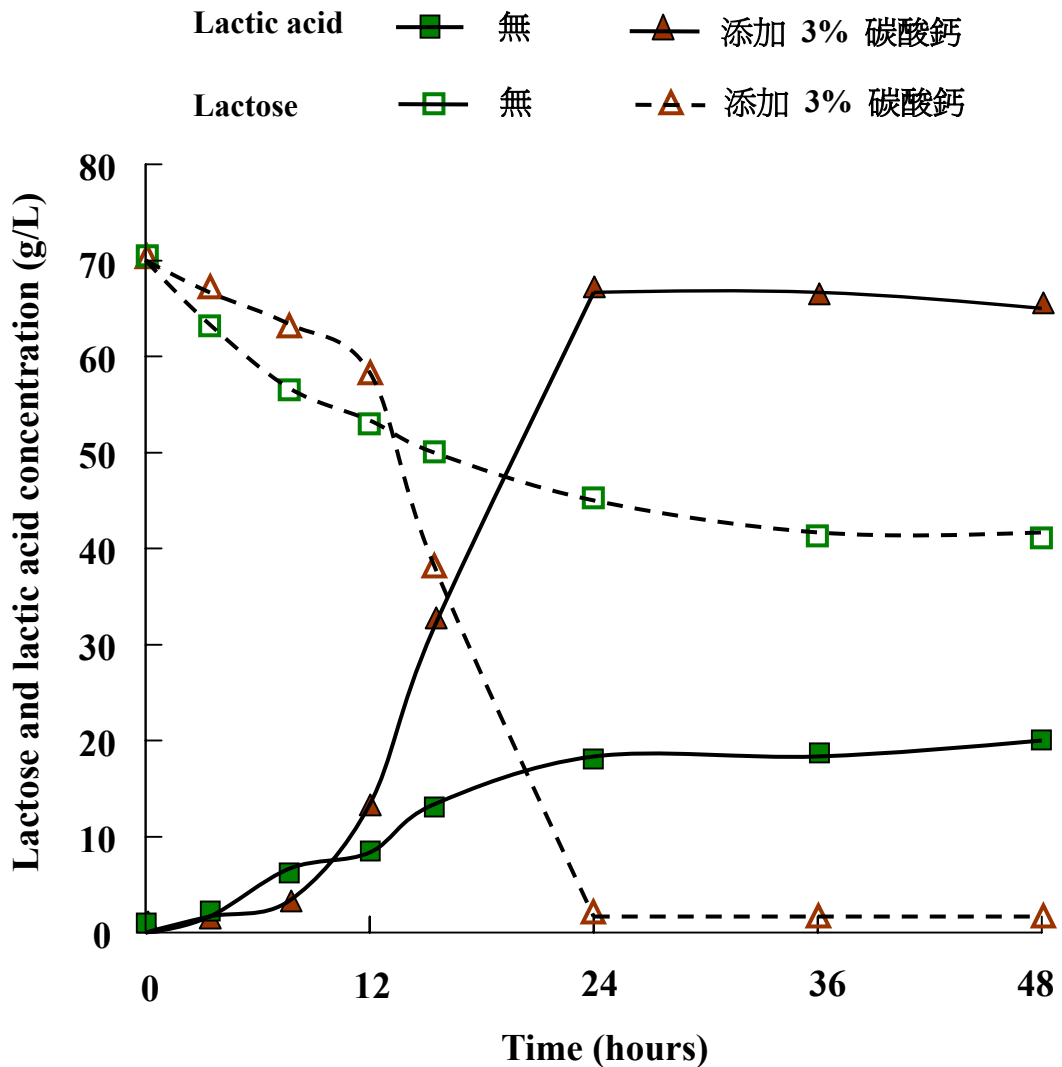
綜合以上試驗結果，接種 10% 菌量、調節 pH 值並震盪培養的發酵條件，*Lb. rhamnosus* THSH-1 有較佳的乳酸生成效率。



圖十九、pH 值調節對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中生長之影響。

Fig. 19. Effect of pH adjustment on growth of *Lb. rhamnosus* THSH-1 in modified-MRS.

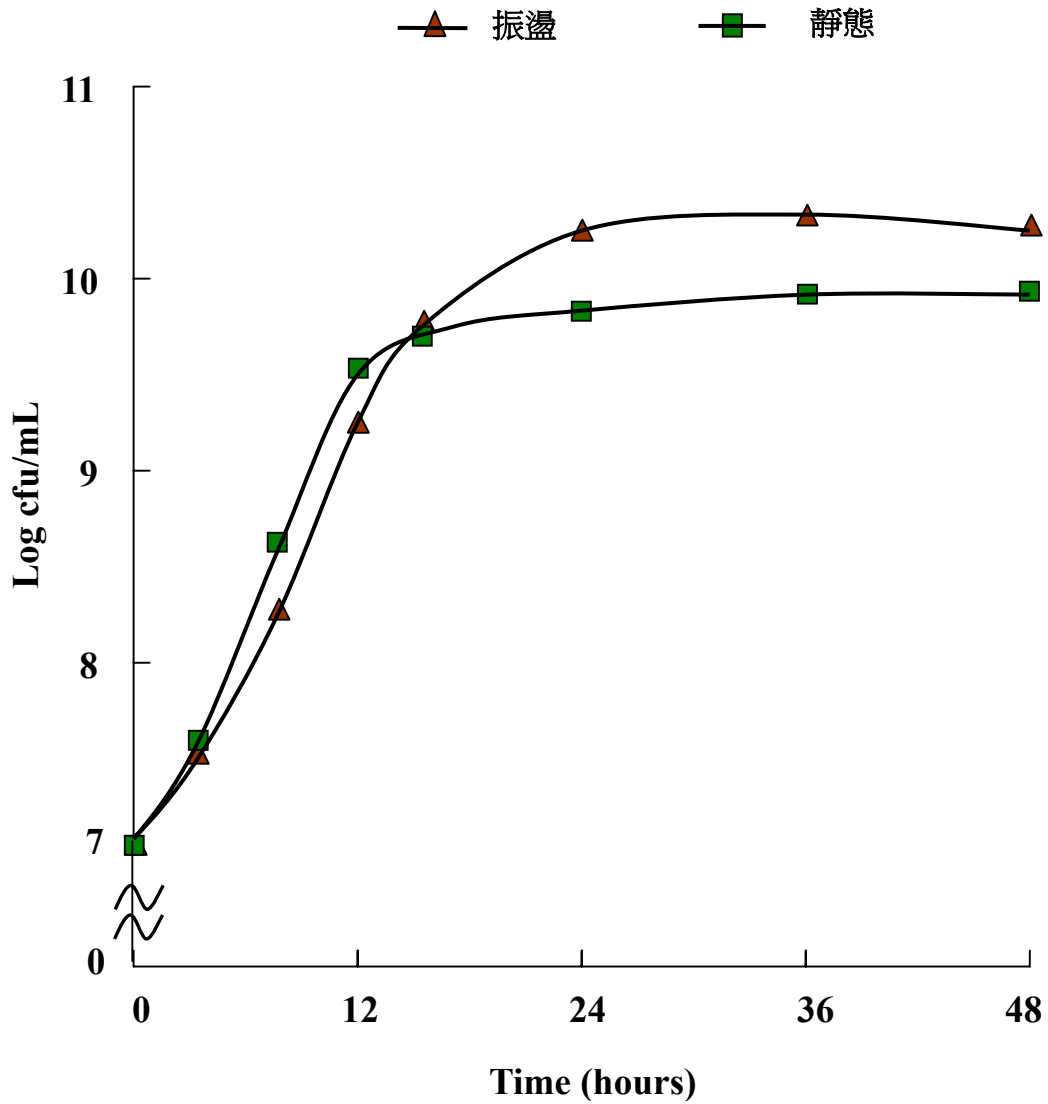
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十、pH 值調節對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成之影響。

Fig. 20. Effect of pH adjustment on lactose utilization and lactic acid production of *Lb. rhamnosus* THSH-1 in modified-MRS.

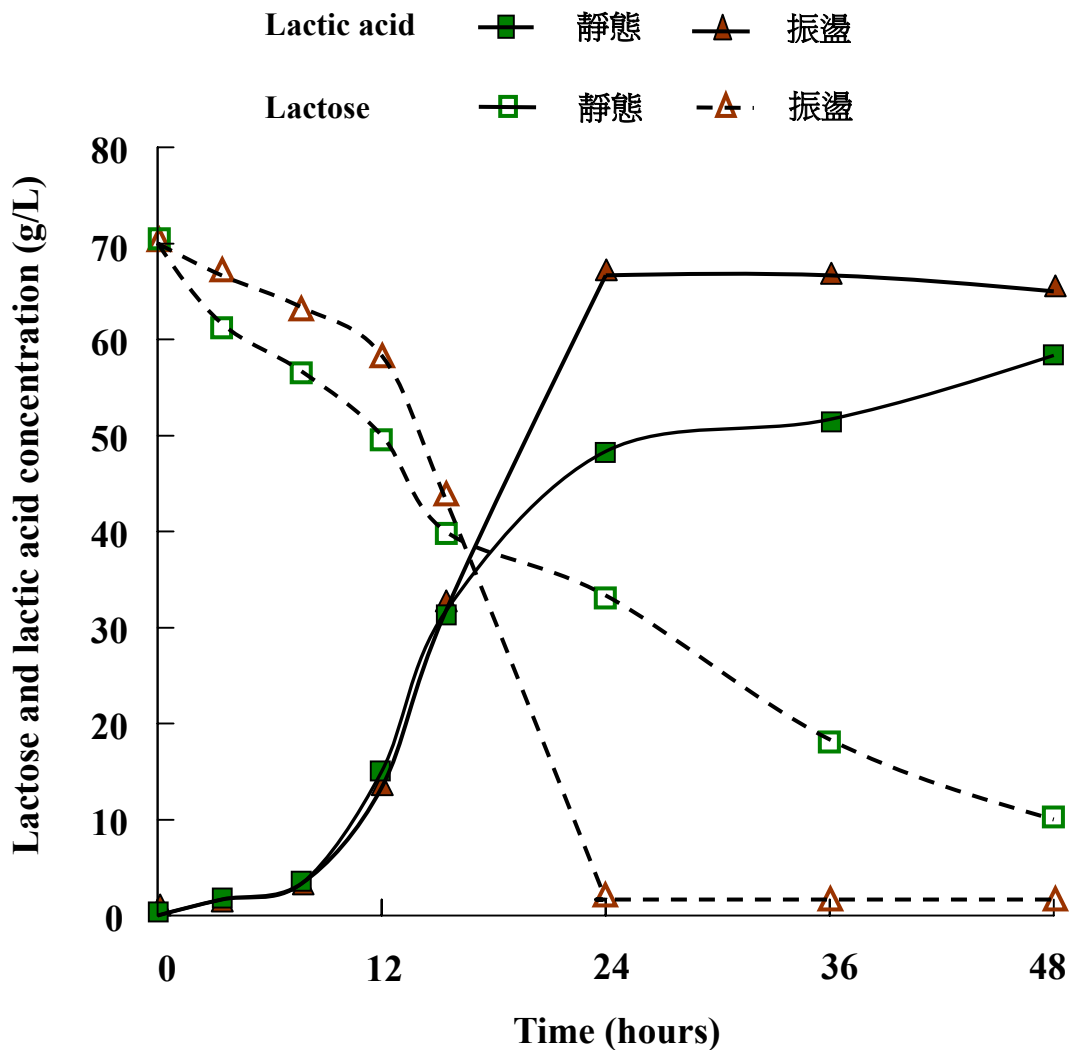
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十一、振盪對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中生長之影響。

Fig. 21. Effect of agitation on growth of *Lb. rhamnosus* THSH-1 in modified-MRS.

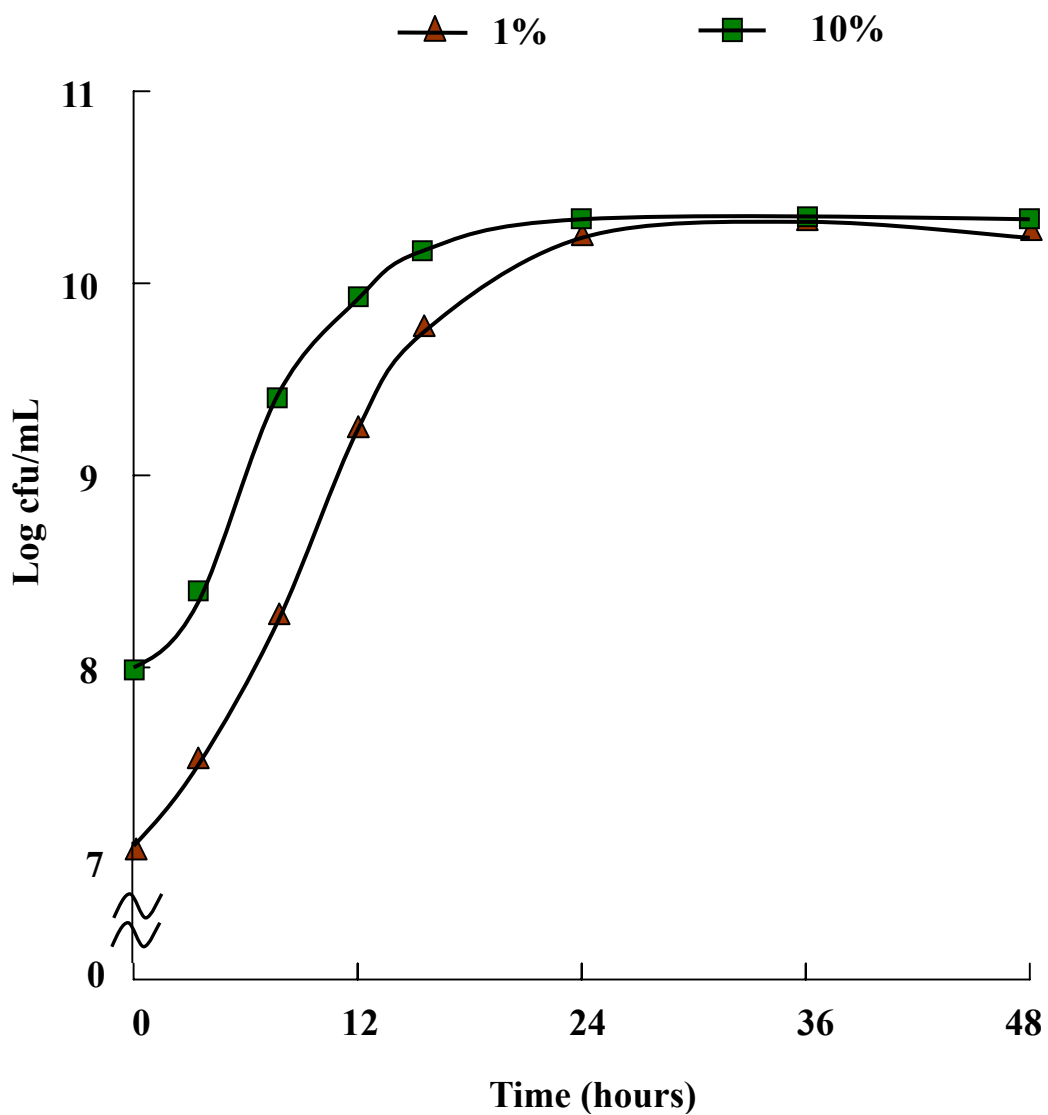
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十二、振盪對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於修飾培養基中的乳糖利用性及乳酸生成之影響。

Fig. 22. Effect of agitation on lactose utilization and lactic acid production of *Lb. rhamnosus* THSH-1 in modified-MRS.

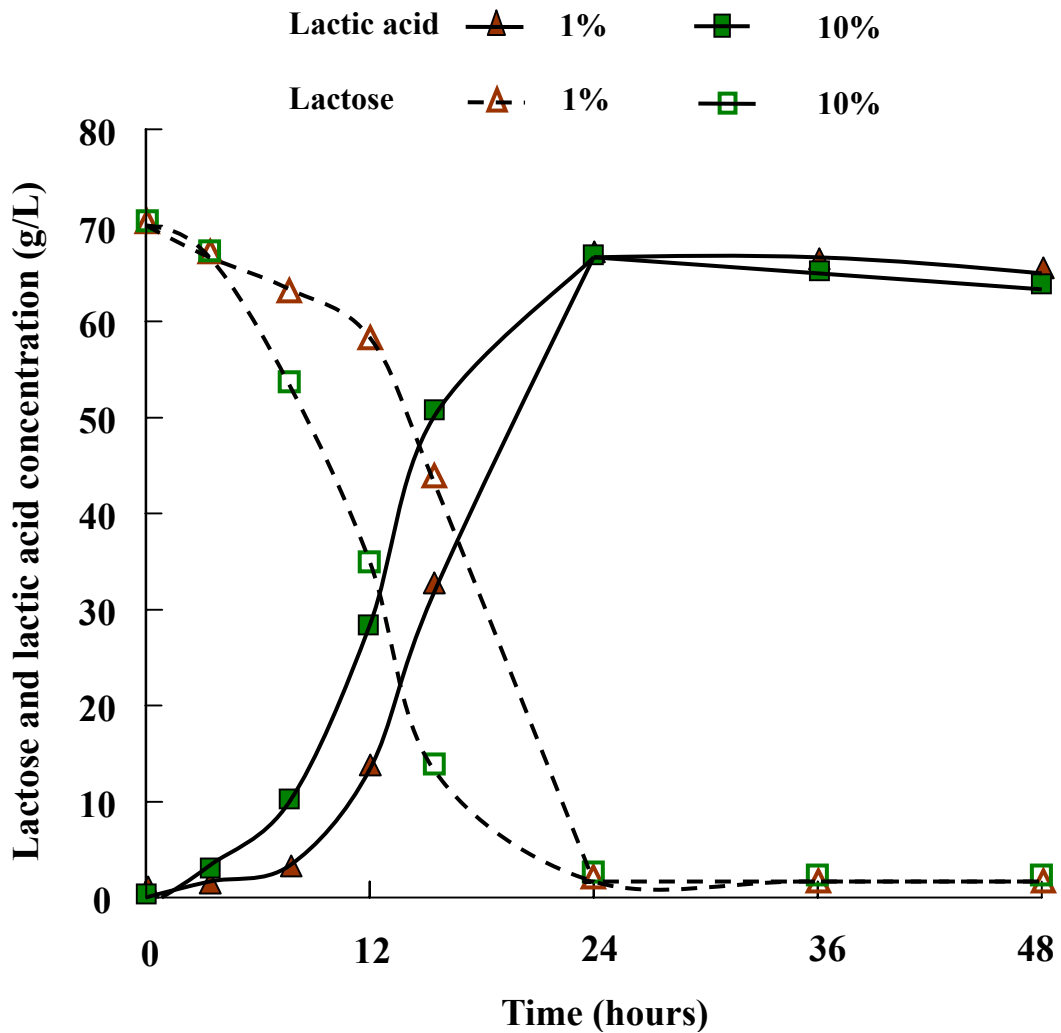
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十三、不同接種量 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中之生長曲線。

Fig. 23. Growth curves of *Lb. rhamnosus* THSH-1 with different inoculum in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十四、不同接種量 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在修飾培養基中之乳糖利用性及乳酸生成。

Fig. 24. Lactose utilization and lactic acid production of *Lb. rhamnosus* THSH-1 with different inoculum in modified-MRS.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3

試驗三：乳清發酵試驗

(一) 氮源補充試驗

乳清滲流液是當乳清利用超過濾的方法生產乳清蛋白濃縮物時的副產物。然而其中所含氮量是遠低於乳酸菌代謝所有乳糖生成乳酸所需 (Krischke *et al.* 1991)。由過去研究結果中發現乳酸菌被利用於未補充營養的乳清中，產生乳酸的效率不佳。所以在發酵過程中補充額外的營養可有效提高乳酸菌的乳酸生成效率，其中以補充氮源為最常用於促進乳酸生成的營養添加物。本試驗是依前人研究結果於乳清滲流液（乳糖含量 4.9% ，氮含量為 0.46 g/L ，pH 6.0）中補充相同氮量的數種氮源，試比較不同氮源促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清滲流液生成乳酸的效果。

補充不同氮源於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成影響之結果如表四所示。補充相同氮量（0.5 g/L）的 9 種氮源分別為有機氮源 yeast extract、peptone、meat extract、casitone、casein、soymilk、soy protein 和 whey protein 及無機氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。試驗結果顯示在乳清滲流液中接種 *Lb. rhamnosus* THSH-1 添加 yeast extract（酵母萃取物）時的乳酸生成效率最佳，發酵 24 小時即產生 51.9 g/L 乳酸（ $P < 0.05$ ）。相較於其他氮源以 meat extract 居次，發酵

24 小時產生 49.8 g/L 乳酸。而補充 casitone 的乳清滲流液中乳酸生成量於 36 小時發酵後為 44.5 g/L，peptone 處理組也於發酵 48 小時乳酸生成量為 44.5 g/L。另外補充 soymilk 的乳清滲流液經發酵 48 小時後生成 39.5 g/L 乳酸，高於補充 casein、soy protein、whey protein 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的乳清滲流液中乳酸生成量 ($P < 0.05$)。其中補充無機氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清滲流液是促進產酸效果最差的補充物，經 48 小時發酵後只生成 3.2 g/L 乳酸。

試驗結果發現，在乳清滲流液中接種 *Lb. rhamnosus* THSH-1 添加酵母萃取物是生產乳酸的最佳補充氮源。此結果推測是因為酵母萃取物含有特異的肽及其他生長因數可以有效促進乳酸菌生長及乳酸生成，其中維生素 B 群被認為是促進乳酸生產最主要的成分(Kwon *et al.* 2000；Arasaratnam *et al.* 1996)。Arasaratnam *et al.*(1996)研究也指出，當使用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作為乳酸菌生長時的氮源時，其無機氮需要先被轉換為胺基酸然後才會合成乳酸菌生長和生產乳酸時所需之蛋白質。此結果可用於解釋當 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 被利用添加在乳清滲流液中時，*Lb. rhamnosus* THSH-1 生長及乳酸生產較慢的原因；相對的，其他有機氮源例如 yeast extract、meat extract、casitone 與 peptone 等，則可直接被 *Lb. rhamnosus* THSH-1 利用產生乳酸。

表四、補充不同氮源於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成之影響

Table 4. Effects of supplementing whey permeate with different nitrogen sources on lactic acid production by *Lb. rhamnosus* THSH-1.

Nitrogen source	N* (%)	Lactic acid (g/L)			
		12 h	24 h	36 h	48 h
Yeast extract	10.0	21.2 ^{ap}	51.9 ^{bp}	49.3 ^{cp}	45.0 ^{dp}
Meat extract	11.6	10.6 ^{aq}	49.8 ^{bq}	45.4 ^{cq}	43.7 ^{dq}
Casitone	12.7	4.7 ^{ar}	36.7 ^{br}	44.5 ^{cr}	45.8 ^{dr}
Peptone	15.0	3.2 ^{as}	21.3 ^{bs}	38.7 ^{cs}	44.5 ^{ds}
Casein	13.5	2.0 ^{at}	9.0 ^{bt}	21.1 ^{ct}	34.6 ^{dt}
Whey protein	11.4	1.8 ^{atu}	4.6 ^{bu}	10.6 ^{cu}	21.1 ^{du}
Soy-milk	0.85	4.8 ^{ar}	20.4 ^{bv}	30.6 ^{cv}	39.5 ^{dv}
Soy-protein	13.0	1.7 ^{atu}	9.4 ^{bt}	22.4 ^{cw}	35.3 ^{dw}
(NH ₄) ₂ SO ₄	20.7	1.5 ^{au}	2.2 ^{bw}	2.7 ^{cx}	3.2 ^{dx}

*The nitrogen content of all media supplement was 0.05% .

a-d : Different letters in the same row indicate significant difference (P < 0.05) .

p-x : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05) .

Lactic acid produced was neutralized by CaCO₃

(二) 酵母萃取物補充試驗

由氮源補充試驗結果所得，酵母萃取物是促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 產生乳酸最有效的氮源。本試驗於乳清滲流液中補充不同濃度（0%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%）之酵母萃取物，比較不同濃度之酵母萃取物對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長、乳糖的利用性及乳酸生成量的影響。

補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長影響之結果如圖二十五所示。其結果顯示，隨著添加濃度的增加發酵 12 小時期間 *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌數生長也隨之較佳。其中以添加 3% 酵母萃取物的乳清滲流液中生長最佳，發酵 12 小時後有 9.94 Log cfu/mL 之最高存活菌數。其他有添加酵母萃取物的乳清滲流液中 *Lb. rhamnosus* THSH-1 的存活菌數皆於 16 小時達到最高菌數。然而添加 1% 與 1.5% 濃度的乳清滲流液在發酵 16 小時期間，存活菌數無顯著差異 ($P > 0.05$)。 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於未添加酵母萃取物的乳清滲流液中發酵期間之存活菌數皆低於 8.6 Log cfu/mL。

補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳糖利用性影響之結果如圖二十六所示。其結果顯示，隨著添加濃度的增加，*Lb. rhamnosus* THSH-1 對乳糖的利用速率也隨之較

快。其中以添加 3% 酵母萃取物的乳清滲流液中之 *Lb. rhamnosus* THSH-1 對乳糖的利用速率最佳，於 12 小時利用量可達 90% 以上。添加 2%、1.5%、1% 濃度的乳清滲流液中的乳糖利用速率也隨著添加濃度增加而提高，並於發酵 16 小時後乳糖利用量達 90% 以上。但是添加 0.5% 濃度之處理組則需發酵 24 小時才達 90% 乳糖利用量。*Lb. rhamnosus* THSH-1 於未添加酵母萃取物的乳清滲流液中的乳糖利用速率最差。

補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成影響之結果如圖二十七所示。其結果顯示，隨著添加濃度的增加，*Lb. rhamnosus* THSH-1 的乳酸生成效率也隨之提高。結果也是以添加 3% 酵母萃取物的乳清滲流液中，*Lb. rhamnosus* THSH-1 的乳酸生成效率最佳，發酵 12 小時乳酸生成量為 55 g/L。添加 2%、1.5% 及 1% 濃度的乳清滲流液中的乳酸生成速率也隨著添加濃度增加而提高，*Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成量也皆於 16 小時達最高乳酸產量。然而添加 0.5% 之處理組則於 24 小時才達最高乳酸產量 53.8 g/L。*Lb. rhamnosus* THSH-1 於未添加酵母萃取物的乳清滲流液中乳酸生成效率最差。

綜合以上結果所得，補充酵母萃取物濃度越高，無論是對於促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長、乳糖利用性及乳酸生成效率皆有越佳的

效果。其中以添加 3% 酵母萃取物促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清滲流液的乳酸生成效果最佳 ($P < 0.05$)。

(三) 乳清發酵試驗

乳清是比經過超過濾之後的乳清滲流液更適合乳酸菌生長與產酸的培養基，因為一些較微量的生長因數可能會因超過濾而被移除 (Bury *et al.* 1998)。本試驗以 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清 (乳糖含量 5% ，pH 5.7，氮含量 1.1 g/L，乾物質 5.6% ，灰分 0.5%)，並比較補充酵母萃取物對於其生長、乳糖利用性及乳酸生成效果之影響。

補充酵母萃取物於乳清中對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長影響之結果如圖二十八所示。其結果顯示，補充 3% 酵母萃取物可以促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於乳清中快速的生長，發酵 16 小時後存活菌數可達 10 Log cfu/mL 以上。而 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於乳清中則生長緩慢，發酵 36 小時後才達到最高存活菌數 9.5 Log cfu/mL。

補充酵母萃取物於乳清對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳糖利用性及乳酸生成影響之結果如圖二十九所示。其結果顯示，補充 3% 酵母萃取物可以促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 對於乳清中乳糖的利用性，而且提高乳酸生成效率。補充酵母萃取物乳清中之乳酸生成量於發酵 16 小時後為 55.7 g/L，而 *Lb. rhamnosus* THSH-1 於未補充酵母萃取物

之乳清中發酵 48 小時後才產生 29.9 g/L 乳酸。

綜合以上結果所得，補充酵母萃取物可以促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清時之生長、乳糖利用性及乳酸生成效率。然而補充酵母萃取物於乳酸生產過程中時，它昂貴的價格會使生產成本提高，乳酸價格也因此提高，進而限制其利用的範圍。因此尋找更便宜的添加物用來替代或與其混和使用以降低生產成本並提高乳酸生成效率，為近年來研究的主要目標。

(四) 豆奶補充試驗

大豆因含有豐富營養成分，所以廣泛應用於各種工業製造中，特別是所含的蛋白質更是被大量使用於食品及動物飼料的生產。近年來，價廉的大豆更被期待可以取代酵母萃取物，以達到更具經濟效益的乳酸生產原料。

而豆奶是東方人固有的傳統食品，其製作過程是將大豆浸泡軟化後，加水研磨，再經煮沸而成略帶黃色之液狀大豆食品。過去研究發現豆奶是適合乳酸菌生長及生化代謝的培養基。但是，因為大豆中所含的維生素含量不如酵母萃取物，所以單一或複合維生素 B 群被研究並應用於促進發酵大豆時乳酸的生成 (Kwon *et al.* 2000 ; Yoo *et al.* 1997)。本試驗補充豆奶於乳清滲流液中，並試比較添加泛酸對於促

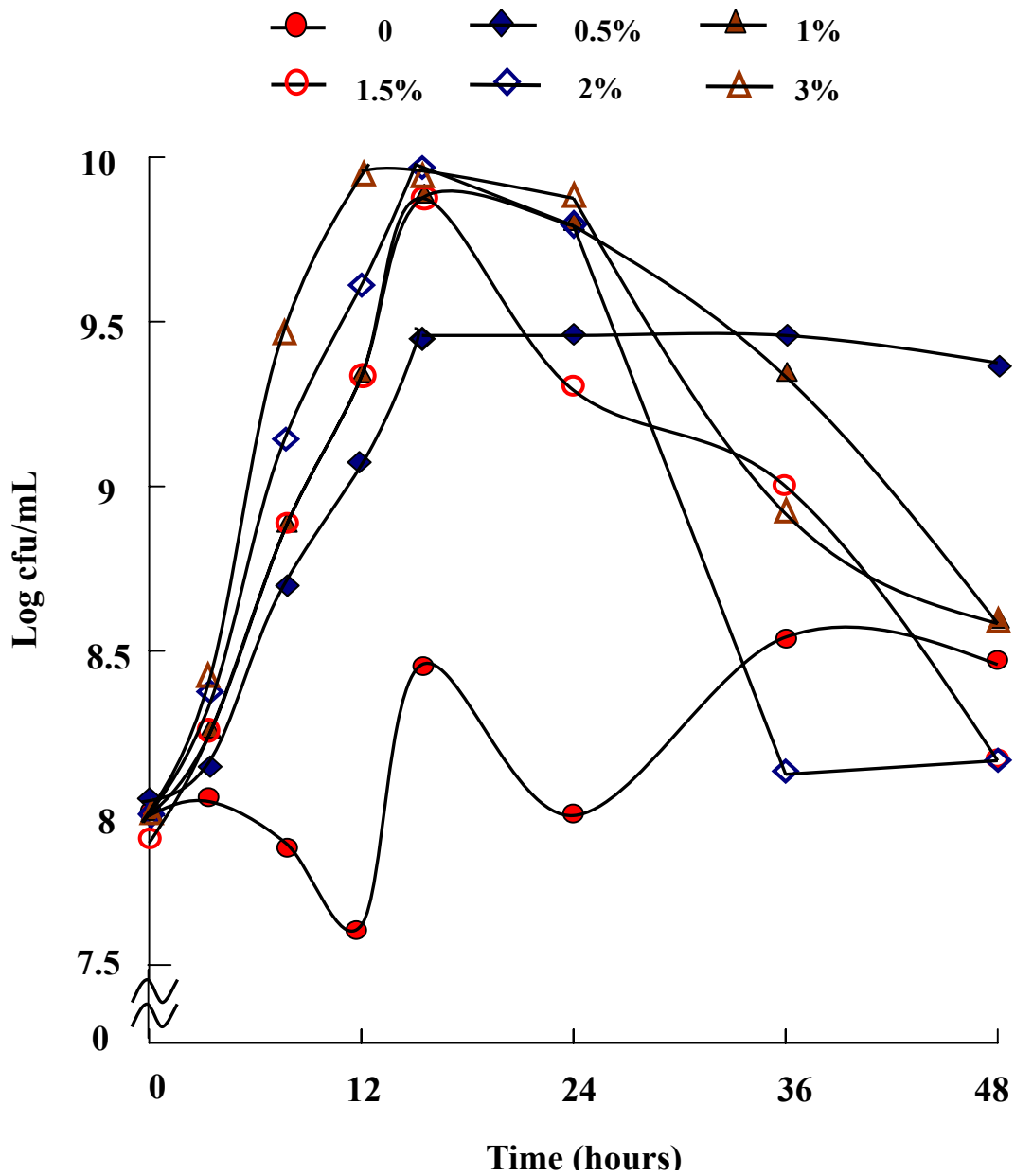
進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清滲流液生產乳酸之影響。

泛酸添加對 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在補充豆奶之乳清滲流液中
乳酸生成影響之結果如圖三十所示。其結果顯示，添加泛酸可以促進
Lb. rhamnosus THSH-1 發酵補充豆奶的乳清滲流液，48 小時後可生成
43.6 g/L 乳酸，顯著高於未添加泛酸的乳酸生成量 39.5 g/L ($P <$
0.05)，乳酸生成量多出 10.5%。

Yoo *et al.* (1997) 試驗發現，維生素 B 群可以促進 *Lb. casei* 利用
soy peptone 並且提高乳酸生成量。同樣 Kwon *et al.* (2000) 試驗也發
現，多種維生素可以促進 *Lb. rhamnosus* 利用大豆的酵素水解物
soytone，其中泛酸 (pantothenic acid) 被評估是最適合使用於促進發
酵並且提高乳酸生成量的維生素。

試驗結果雖然添加泛酸有顯著促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵
補充豆奶的乳清滲流液的效果，但是乳酸增加量卻不如前人試驗。此
結果差異推測是因為豆奶在加工過程中沒有經過複雜的處理，所以一
些生長因數及成份保留較多。而相較經過複雜處理的大豆水解物 soy
peptone 及 soytone 所含的生長成分被破壞，因此添加維生素 B 群促
進乳酸生成的效果較佳。另外，相較於本試驗中只添加單一維生素 B
泛酸的使用量，過去的試驗中使用多種維生素 B 的添加量較高，這也
可能是乳酸增加量有所差異的地方。但是若要實際應用於商業化生產

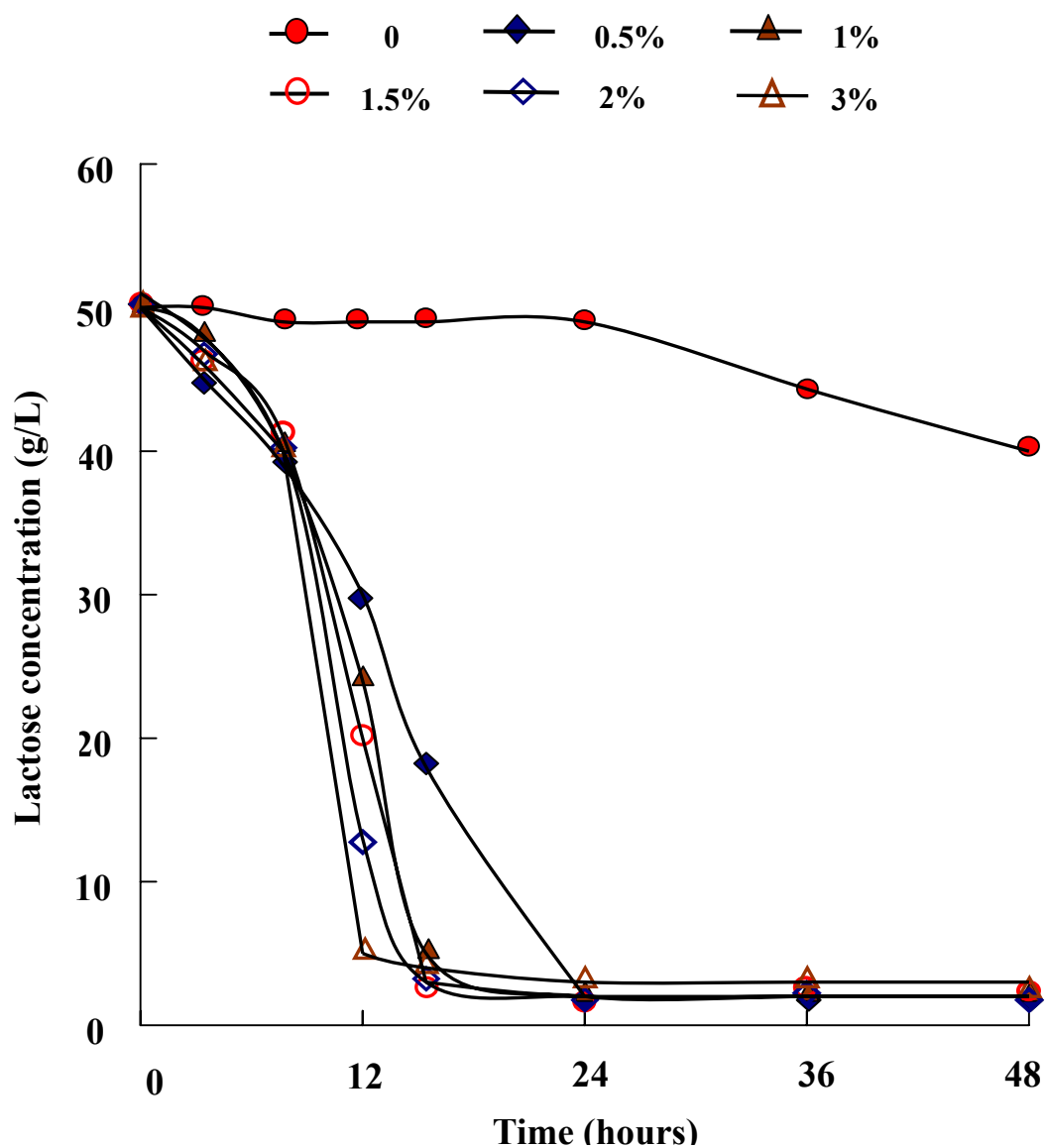
乳酸時，維生素 B 群的添加量可能會影響生產成本，因此利用維生素 B 群促進發酵大豆生產乳酸時，添加量是重要的影響因素。



圖二十五、補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長之影響。

Fig. 25. Effect of supplementing whey permeate with different concentration of yeast extract on growth of *Lb. rhamnosus* THSH-1.

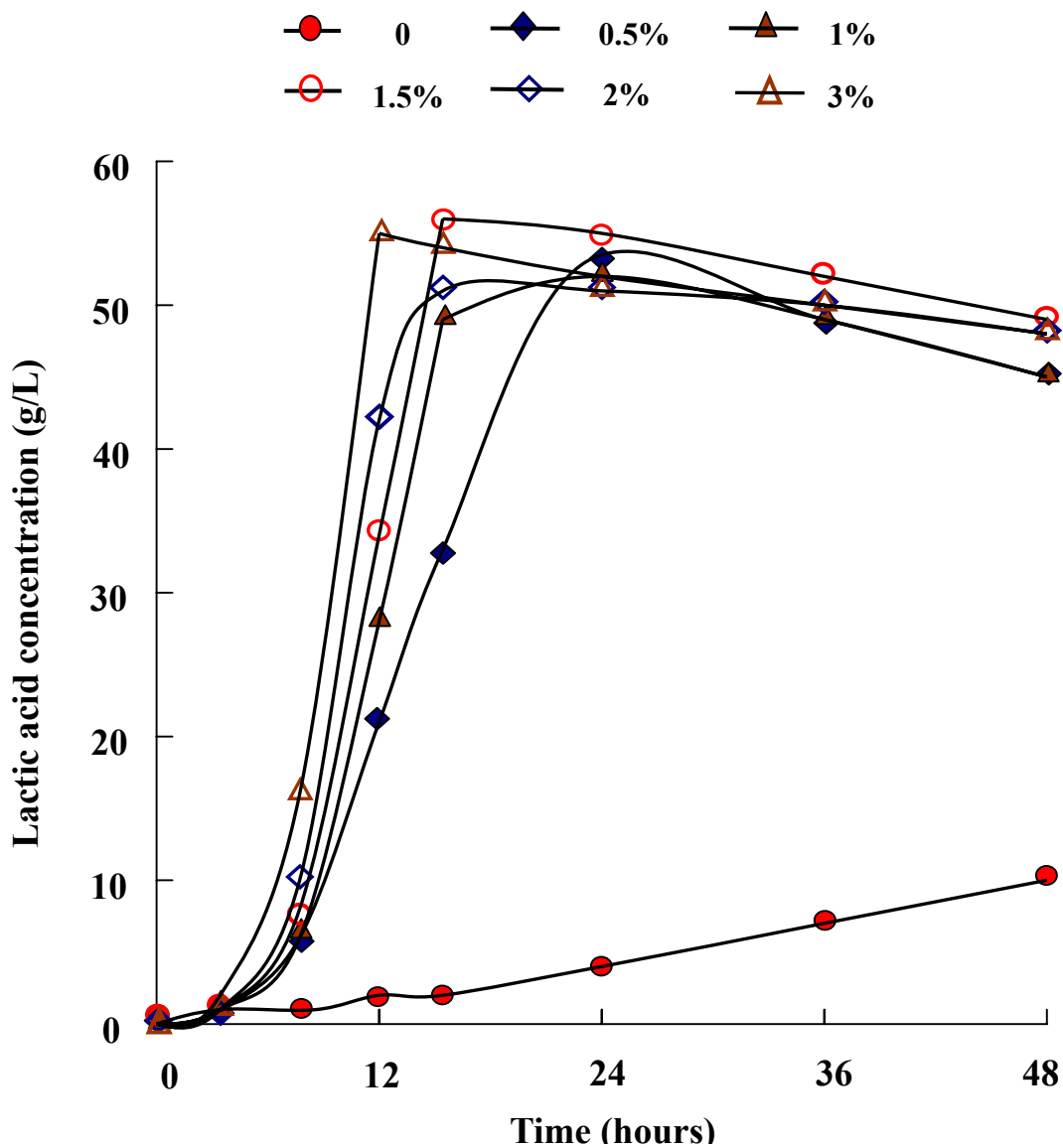
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十六、補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳糖利用性之影響。

Fig. 26. Effect of supplementing whey permeate with different concentration of yeast extract on lactose utilization by *Lb. rhamnosus* THSH-1.

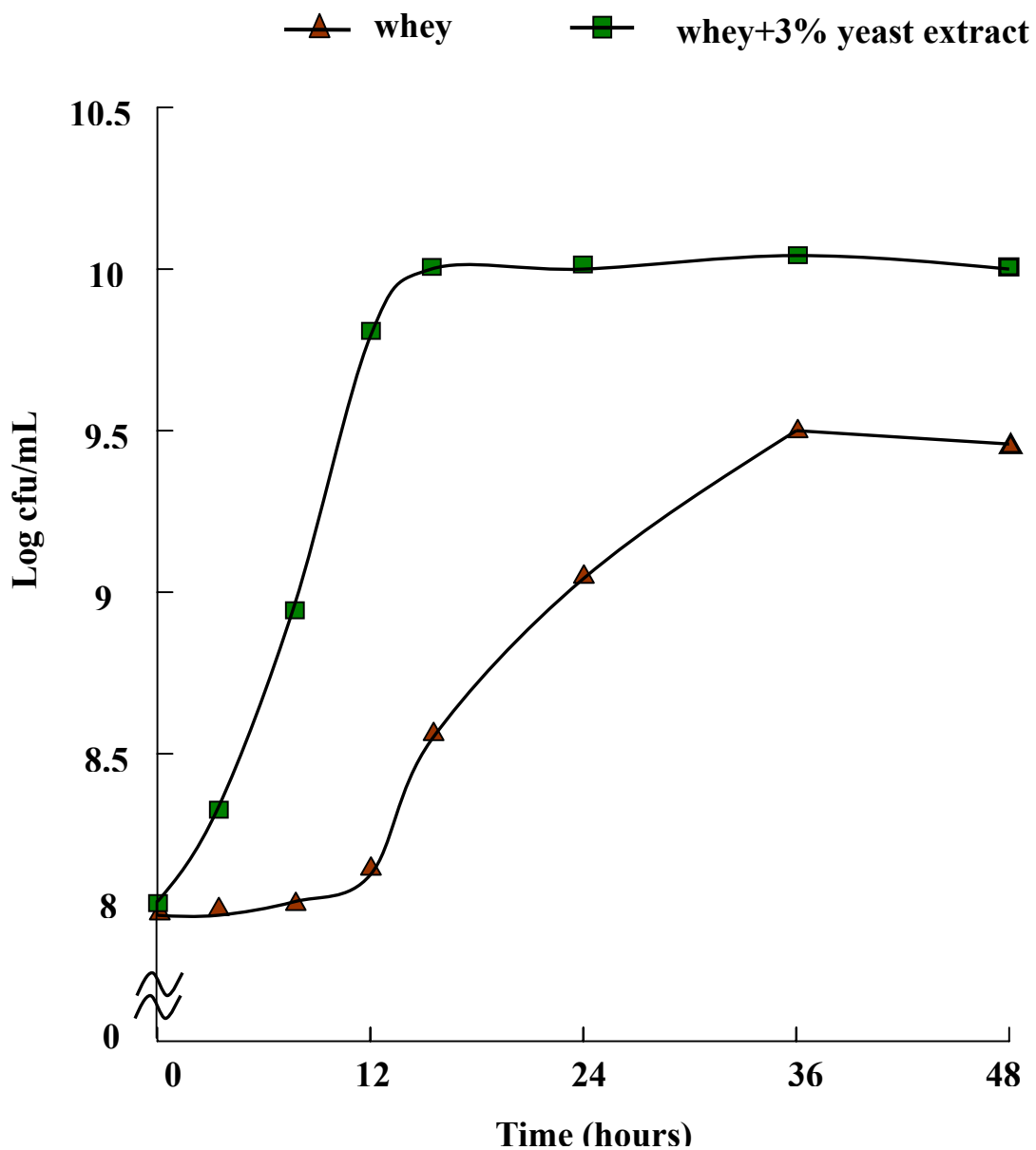
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十七、補充不同濃度酵母萃取物於乳清滲流液對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳酸生成之影響。

Fig. 27. Effect of supplementing whey permeate with different concentration of yeast extract on lactic acid production by *Lb. rhamnosus* THSH-1.

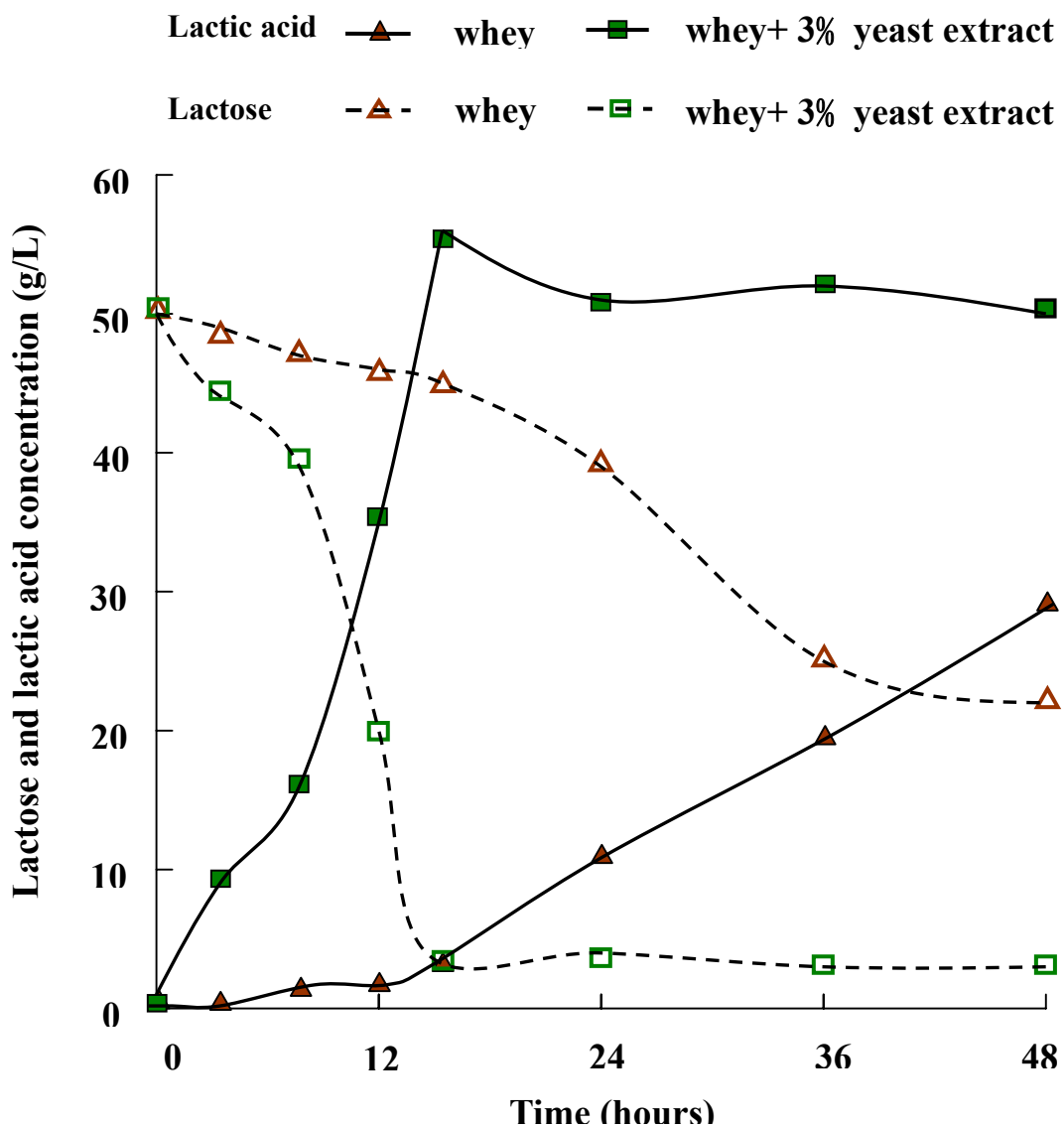
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十八、補充酵母萃取物於乳清對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 生長之影響。

Fig. 28. Effect of supplementing whey with yeast extract on growth of *Lb. rhamnosus* THSH-1.

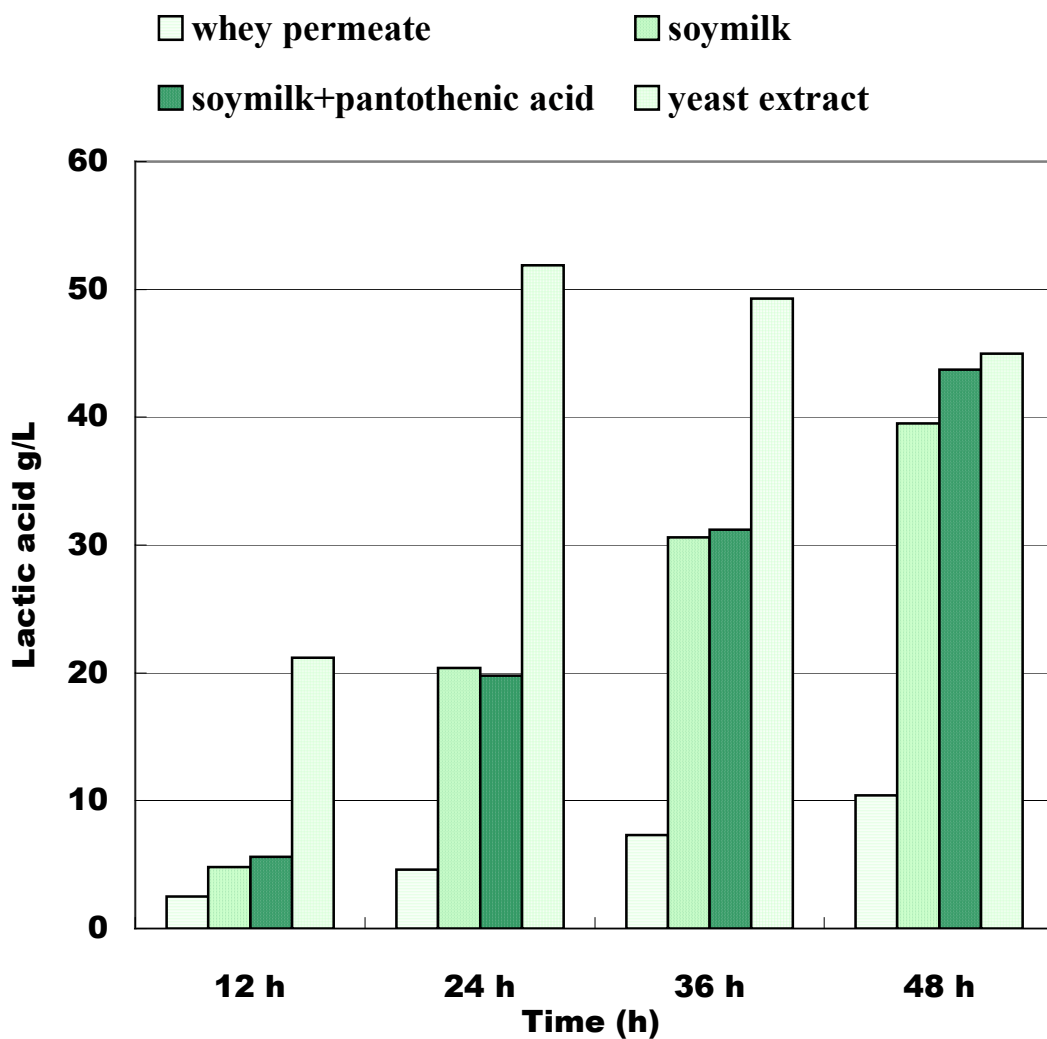
*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖二十九、補充酵母萃取物於乳清對於 *Lb. rhamnosus* THSH-1 乳糖利用性及乳酸生成之影響。

Fig. 29. Effect of supplementing whey with yeast extract on lactose utilization and lactic acid production by *Lb. rhamnosus* THSH-1

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3



圖三十、泛酸添加對 *Lb. rhamnosus* THSH-1 在補充豆奶之乳清滲流液中乳酸生成之影響。

Fig. 30. Effect of pantothenic acid additions in whey permeate supplemented with soymilk on lactic acid production by *Lb. rhamnosus* THSH-1.

*Lactic acid produced was neutralized by CaCO_3

陸、結論

1. 以 *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* CCRC 14009、*Lb. casei subsp. casei* CCRC10697、*Lb. acidophilus* CCRC 10695、*Lc. lactis subsp. lactis* CCRC 10791 及 *Lb. rhamnosus* THSH-1 五菌株為菌醃，在 42°C 培養時對乳糖利用性及乳酸生成效率都較其他溫度培養時佳。
2. 試驗菌株中 *Lb. casei subsp. rhamnosus* CCRC 10940 以 42°C 培養時乳糖的利用效率較佳，而以 37°C 培養時乳酸生成效率較佳。另外，*Lb. helveticus* CCRC 11052 與 *S. thermophilus* CCRC 12268 分別以 37°C 與 45°C 培養時有較佳的乳糖利用性與乳酸生成效率。
3. *Lb. rhamnosus* THSH-1 在 42°C 培養時的乳糖利用性及乳酸生成效率是所有菌株中效率最高。
4. 在 30°C 培養 *Lb. rhamnosus* THSH-1 48 小時後的 L (+) 型乳酸產量及百分比比例高於同溫度下培養的其他菌株之產量。而在 37、42 或 45°C 培養 48 小時，*Lc. lactis subsp. lactis* CCRC 10791 的 L (+) 型乳酸產量及百分比比例皆顯著高於同溫度下其他菌株的產量，其中 45°C 培養 48 小時後 L (+) 型乳酸的產量與百分比比例最高。

5. 接種 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 菌量、調節 pH 值並振盪培養的發酵條件下有較佳的乳酸生成效率。
6. 在乳清滲流液中接種 *Lb. rhamnosus* THSH-1 添加酵母萃取物是生產乳酸的最佳補充氮源。
7. 添加 3% 酵母萃取物促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵乳清滲流液及乳清生產乳酸的效果最佳。
8. 添加泛酸可以促進 *Lb. rhamnosus* THSH-1 發酵補充豆奶的乳清滲流液生產乳酸。

柒、參考文獻

李淑娟。1998。褐藻膠固定克弗爾菌醃之發酵特性與保存性。私立東海大學畜產學研究所碩士論文。

林慶文。1993^a。乳品加工學。pp. 48-50, 415-419。華香園出版社。

林慶文。1993^b。乳製品之特性與機能性。pp. 182-186, 455-459。華香園出版社。

施宗雄。1992。乳酸菌之定義及對人類生活上之貢獻。東海畜牧學報 15：1-4。

張勝善。1995。牛乳與乳製品。pp. 51-58, 480。長河出版社。

鍾德豫。1998。接種乳酸菌試製發酵豆奶之研究。私立東海大學畜產學研究所碩士論文。

Angeles, A. G. and E. H. Marth. 1971. Growth and activity of lactic acid bacteria in soymilk.IV. Proteolytic activity. J. Milk Food Technol. 34:124.

Arasaratnam, V., A. Senthuran and K. Balasubramaniam. 1996. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Enzyme Microb. Technol. 19 : 482-486.

Bailly, M. 2002. Production of organic acids by bipolar electrodialysis : realizations and perspectives. Desalination. 144 : 157-162.

Boyaval, P. and J. Goulet. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*. Enzyme Microb. Technol. 10 : 725-728.

- Bruno-Barcena, J. M., A. L. Ragout, P. R. Cordoba and F. Sineriz. 1999. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 : 316-324.
- Burgos-Rubio, C. N., M. R. Okos and P. C. Wankat. 2000. Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Prog.* 16 : 305-314.
- Bury D., P. Jelen and K. Kimura. 1998. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *Int. Dairy Journal.* 8 : 149-151.
- Busta, F. F., E. H. Peterson, D. M. Adams and M. G. Johnson. 1984. Colony count methods. In : Speck, M. L. (Ed) . *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* pp. 62-83. American Public Health Association, USA.
- Chiarini, L., L. Mara and S. Tabacchioni. 1992. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 : 461-464.
- Datta, R., S.-P. Tsai, P. Bonsignore, S.-H. Moon and J. R. Frank. 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16 : 221-231.
- Fitzpatrick, J. J., M. Ahrens and S. Smith. 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochem.* 36 : 671-675.
- Fitzpatrick, J. J. and U. O'Keeffe. 2001. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochem.* 37 : 183-186.

- Fitzpatrick, J. J., C. Murphy, F. M. Mota and T. Pauli. 2003. Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics. *Int. Dairy Journal*. 13 : 575~580.
- Garde, A., G. Jonsson, A. S. Schmidt and B. K. Ahring. 2002. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Biores. Technol.* 81 : 217-223.
- Hickey, M. W., A. J. Hillier and G. R. Jago. 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 825-831.
- Hujanen, M. and Y.-Y. Linko. 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 : 307-313.
- Hujanen, M., S. Linko, Y.-Y. Linko and M. Leisola. 2001. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 : 126-130.
- Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26 : 87-107.
- Kamaly, K. M. 1997. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. *Food Res. Int.* 30 : 675-682.
- Kosikowski, F. V. 1979. Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* 62 : 1149~1160.

- Krischke, W., M. Schroder and W. Trosch. 1991. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 573-578.
- Kwon, S., P. C. Lee, E. G. Lee, Y. K. Chang and N. Chang. 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. Enzyme Microb. Technol. 26 : 209-215.
- Kyla-nikkila, K., M. Hujanen, M. Leisola and A. Palva. 2000. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 3835-3841.
- Litchfield, J. H. 1996. Microbiological production of lactic acid. Adv. Appl. Microbiol. 42 : 45-95.
- Lund, B., B. Norddahl and B. Ahring. 1992. Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. Biotechnol. Lett. 14 : 851-856.
- Lunt, J. 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym. Degradation Stab. 59 : 145-152.
- Mehaia, M. A. and M. Cheryan. 1986. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. Enzyme Microb. Technol. 8 : 289-292.
- Mital, V. K., K. H. Stenikraus and H. B. Naylor. 1974. Growth of lactic acid bacteria in soymilks. J. Food Sci. 39:1018.
- Mostafa, N. A. 1996. Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor. Energy Convers. Manage. 37 : 253-260.

- Nancib, N., A. Nancib, A. Boudjelal, C. Benslimane, F. Blanchard and J. Boudrant. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Biores. Technol.* 78 : 149-153.
- Nolasco-Hipolito, C., T. Matsunaka, G. Kobayashi, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2002. Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *J. Biosci. Bioeng.* 93 : 281-287.
- Noll, F. 1974. L-(+)-Lactate : determination with LDH, GPT and NAD. In : H. U. Bergmeyer (Ed.) . *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. pp. 1475-1479. Verlag Chemie Weinheim/Academic Press, Inc., New York, San Francisco, and London.
- Ohashi, R., T. Yamamoto and T. Suzuki. 1999. Continuous production of lactic acid from molasses by perfusion culture of *Lactococcus lactis* using a stirred ceramic membrane reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 87 : 647-654.
- Olmos-Dichara, A., F. Ampe, J.-L. Uribelarrea, A. Pareilleux and G. Goma. 1997. Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment. *Biotechnol. Lett.* 19 : 709-714.
- Pauli, T. and J. J. Fitzpatrick. 2002. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochem.* 38 : 1-6.
- Rosenberg, M. 1995. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends food sci. technol.* 6 : 12-19.

- Roukas, T. and P. Kotzekidou. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 22 : 199-204.
- Scalabrini, P., M. Rossi, P. Spettoli and D. Matteuzzi. 1998. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 39 : 213-219.
- Siebold, M., P. V. Frieling, R. Joppien, D. Rindfleisch, K. Schugerl and H. Roper. 1995. Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electro dialysis. *Process Biochem.* 30 : 81-95.
- Smith, A. K., and S. J. Circle. 1972. Soybeans: Chemistry and technology. Vol. I. Proteins. AVI Publishing Co., Westport, CT., USA.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- Tango, M. S. A. and A. E. Ghaly. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass Bioenergy* 16 : 61-78.
- Tejayadi, S. and M. Cheryan. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 : 242-248.
- Tsai, S. P., R. D. Coleman, S. H. Moon, K. A. Schneider and C. Sanville Millard. 1993. Strain screening and development for industrial lactic acid fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39 : 323-335.
- Tuli, A., R. P. Sethi, P. K. Khanna, S. S. Marwaha and J. F. Kennedy. 1985. Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. *Enzyme Microb. Technol.* 7 : 164~168.

Ye, K., S. Jin and K. Shimizu. 1996. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 81 : 240-246.

Yoo, I.-K., H. N. Chang., E. G. Lee., Y. K. Chang. and S.-H. Moon. 1997. Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *J. Ferment. Bioeng.* 84 : 172-175.

捌、英文摘要

The Studies for the Selection of Lactic Acid Bacteria and the Production of Lactic Acid from Whey Fermentation

Pei-Chun Huang
Graduate Institute of Animal Science
Tunghai University

Abstract

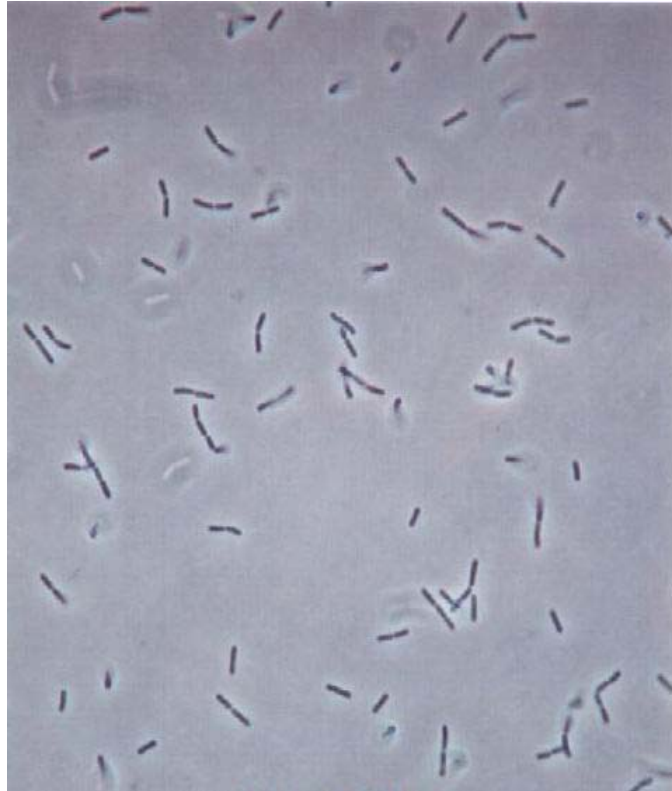
This study aimed at selecting homofermentative lactic acid strains for lactic acid production from whey fermentation. According to this study results, *Lb. rhamnosus* THSH-1 performed the better results than other strains in lactic acid productivity and lactose utilization ($P < 0.05$). Optimisation of temperature for lactic acid production by *Lb. rhamnosus* THSH-1 was 42 °C. pH adjustment and agitation culture provided beneficial effects on lactic acid production during the fermentation process ($P < 0.05$). Inoculum of 10% *Lb. rhamnosus* THSH-1 was the superior to 1% inoculum on production of lactic acid ($P < 0.05$). The addition of nutrients presented a positive effect on the lactic acid production. Among the different nitrogen sources supplemented to whey, yeast extract performed the best lactic acid productivity ($P < 0.05$). At 3

% w/v yeast extract supplementation, the lactic acid productivity was the best ($P < 0.05$) . The addition of pantothenic acid in whey permeate supplemented with soymilk presented a significant beneficial affect with lactic acid production ($P < 0.05$) .

玖、作者小傳

筆者黃培鈞係台灣省嘉義縣人，生於民國 67 年 1 月 23 日。先後畢業於嘉義市立僑平國小、嘉義市立北興國中、台灣省立嘉義高中。民國 86 年考取東海大學畜產學系，於民國 90 年畢業，並於同年考取東海大學畜產學系研究所，追隨恩師 施宗雄教授從事畜產品加工及應用微生物之研究。承蒙恩師悉心指導，於民國 93 年七月完成此論文。

拾、附錄



(引用自食品工業研究所鑑定報告)

附圖一、*Lactobacillus rhamnosus* THSH-1 之型態。

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC
AAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATT
TTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAG
TGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAAC
CGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGAC
CCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGAT
ACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA
GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAA
CTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTTCGGCGTGAC
GGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC

(引用自食品工業研究所鑑定報告)

附圖二、*Lactobacillus rhamnosus* THSH-1 之 16S rDNA 部分序列。

附表一、*Lb. rhamnosus* THSH-1 之 Biolog 鑑定系統分析結果

```

Program           : Biolog MicroLog3 4.01C
Worksheet File    : C:\BIOLOG40\93ID003.W4C

Read Time        : Mar 25 2004 11:36 AM
Incubation Time  : 20-24
Sample Number    : 93ID006
Plate Type       : AN
Strain Type      : AN GP-ROD
Strain Number    :
Strain Name      :
Other            :
Data Generation Mode : Manual
Number +/b/- Reactions : 37 / 5 / 54
Database To Search : MicroLog
Data Base(s) Searched : C:\BIOLOG40\AN401.KIC
    
```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	{/}	<+>	<+>	-	<+>	-	<+>	<+>	-	-	<+>
B	<+>-	-	<+>	-	<+>	- +	<+>	{/}	-	<+>	-	-
C	{/}	-	-	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	<+>	- +	<+>
D	-	<+>	<+>	<+>	<+>	-	-	<+>	<+>	-	<+>	<+>
E	<+>	-	-	-	-	<+>	-	-	<+>	-	<+>	{/}
F	<+>-	{/}	<+>	-	<+>	<+>	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	<+>	-	<+>	-	-	-

=> Species ID : LACTOBACILLUS RHAMNOSUS <=

ML4.0	SPECIES	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1) LACTOBACILLUS RHAMNOSUS	100	0.775	3.39	AN GP-ROD
2) LACTOBACILLUS CASEI	0	0.000	6.60	AN GP-ROD
3) LACTOBACILLUS GASSERI	0	0.000	9.28	AN GP-ROD
4) LACTOBACILLUS PARACASEI SS PARACASEI	0	0.000	9.33	AN GP-ROD
5) LACTOBACILLUS BIFERMENTANS	0	0.000	10.59	AN GP-ROD
6) LACTOBACILLUS PLANTARUM	0	0.000	10.78	AN GP-ROD
7) CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII	0	0.000	11.00	AN GP-ROD
8) ACTINOMYCES CANIS	0	0.000	11.01	AN GP-ROD
9) PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI	0	0.000	11.12	AN GP-ROD
10) LACTOBACILLUS DELBRUECKII SS LACTIS	0	0.000	11.69	AN GP-ROD

(引用自食品工業研究所鑑定報告)

