

壹、摘要

本研究旨在篩選產黏乳酸菌株試製黏質酸酪乳，期能取代傳統酸酪乳中添加之膠類，以節省生產成本和改善酸酪乳品質。

利用 10 株商用乳酸菌分別於 MEPS-1, MEPS-2, MEPS-3, MRS plus broth 及 Elliker broth 等五種培養基，以 27, 32, 37, 42 等溫度培養 8, 16 及 24 小時後，結果以 MEPS-2 培養基（9% SNF 脫脂乳中添加 0.35% 酵母萃取物、0.35% 蛋白胨及 5% 乳糖）於 32 經 16 小時培養者之黏絲性程度顯著大於其他組（ $P < 0.05$ ），故選定其作為產黏乳酸菌株之篩選條件。

自市面上採集 12 種醱酵乳製品，利用 MEPS-2 培養基於 32 經 16 小時培養以篩選產黏乳酸菌株，共得 、 、 、 及 等 5 個具產黏特性之乳製品；經進行分離菌株並純化培養後，取得 4 株產黏乳酸菌，其代號分別為 A1, A2, B2 及 E，經鑑定 A1 和 A2 為 *Streptococcus thermophilus*，而 B2 和 E 為 *Lactobacillus bulgaricus*。

依桿菌與球菌混合培養方式將產黏菌株配對後，比較接種 A1+B2 及 A2+E 菌醃於 32 或 42 製備之 10% SNF 酸酪乳與接種傳統菌醃 *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098 (L) + *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 (S) 之 10% SNF 酸酪乳於 4 貯存四週期間之差異。結果顯示，不論是 32 或 42，以產黏菌株 A1+B2 及 A2+E 組之黏絲性程度顯著大於

L+S 組 ($P < 0.05$) 且黏度顯著比 L+S 組者高 ($P < 0.05$) 而乳清析出率則顯著比 L+S 組者低 ($P < 0.05$) 乳酸菌數也高於 L+S 組，其中又以 42 者之乳酸菌數高於 32 者。官能評估方面，黏質酸酪乳 A1+B2 組和 A2+E 組與傳統酸酪乳 L+S 組比較，結果顯示，黏質酸酪乳之乳清析出明顯較低、黏度明顯較高、質地明顯較平滑及整體總接受性明顯較高。

傳統酸酪乳菌醃 *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098 (L) 和 *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 (S) 混合接種產黏菌株於 12% SNF 脫脂乳，並分別於 27, 32, 37 及 42 製備酸酪乳 (L+S, L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2, L+S+E)，比較其品質之差異。結果顯示，L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2, L+S+E 組之黏絲性程度、黏度皆顯著大於 L+S 組 ($P < 0.05$)，而乳清析出率則顯著低於 L+S 組 ($P < 0.05$)，其中又以 32 製備者較其他組者佳。

黏質酸酪乳與添加果膠之傳統酸酪乳間產黏特性的比較。結果顯示，傳統酸酪乳之黏絲性程度、黏度隨著乳無脂固形物含量及果膠添加量的增加而顯著增加 ($P < 0.05$)，而乳清析出率則隨著乳無脂固形物含量及果膠添加量的增加而降低 ($P < 0.05$)；黏質酸酪乳之黏絲性程度、黏度仍顯著高於添加 0.5% 果膠之傳統酸酪乳 ($P < 0.05$)，而乳清析出率則顯著低於添加 0.5% 果膠之傳統酸酪乳 ($P < 0.05$)。

貳、前言

隨著食品消費者健康意識之普遍提升，在追求美味食物之同時，亦開始注重營養的均衡攝取，因此，許多機能性食品之需求量與日遽增。酸酪乳（Yogurt）為一健康機能性食品，具有幫助消化、維持腸道正常菌相、改善乳糖不耐症、抑制雜菌、降低膽固醇、抗致癌性等效果（Dave and Shah, 1997）。市售酸酪乳常添加有膠類或澱粉類以增進濃稠感（Ramaswamy and Basak, 1992）。但隨著生活品質的提升，使得 100% 天然性食品備受矚目；研究指出某些乳酸菌所產生之胞外多醣體（Exopolysaccharide；EPS）具有增黏劑、保水劑、安定劑等作用（Grobben *et al.*, 2000），可改善傳統酸酪乳常存在之問題，如低黏度、凝乳易破碎、高乳清析出等。

本研究之目的，乃在篩選產黏乳酸菌株以試製黏質酸酪乳，取代傳統酸酪乳中添加之膠類，進一步的改善酸酪乳品質及節省生產成本。

參、文獻檢討

微生物的胞外多醣體屬可廣泛添加於食品的生物濃厚劑 (Biothickener)，常被用作黏稠劑、安定劑、乳化劑或膠化劑 (Uemura *et al.*, 1998)。各種乳酸菌所合成的胞外多醣體具有不同的組成、分子大小及結構。嗜中溫、嗜高溫乳酸菌所產之異源胞外多醣體近來頗受關注。物性研究之結構分析結果顯示：不同形態的胞外多醣體間存有相當大的變異；其中某些可使產品呈現明顯的濃厚化性質並展現高黏性。因此，產黏乳酸菌株及其所產聚合物的機能及特質，被利用於不同產品，特別是天然的發酵乳。

一、源自微生物的胞外多醣體

胞外多醣體為可藉由溶解或分散於水中以提供食品濃厚或凝膠特性之長鏈、高分子量聚合物。此類食品聚合物亦具作為膠囊化作用及薄膜形成、乳化、安定、粒狀物的懸浮、結晶的控制以及抑制乳清析出等作用。食品業目前使用的增厚劑大部分來自植物（澱粉、果膠、刺槐豆膠、關華豆膠）或海藻（鹿角菜膠、海藻膠）。動物蛋白質性的明膠和酪蛋白也被使用 (De Vuyst and Degeest, 1999)。這些聚合物大部分已經由化學修飾以增進其結構及物性特質，因此，使用性受到某些限制 (Roller and Dea, 1992)。

微生物之胞外多醣體是以莢膜的形式連接於細胞表面，或以黏稠物形式分泌於細胞外的基質中，分別被歸屬為莢膜多醣體（capsular EPS）或黏稠多醣體（slime EPS）。胞外多醣體廣泛存在於細菌及海藻，僅少量存在酵母及真菌（Sutherland, 1998）。

胞外多醣體在原始的環境中扮演保護微生物細胞的角色。以附著於固態表面、形成薄膜等方式，防止乾燥傷害、吞噬作用及噬菌體攻擊、抗生素或毒性化合物之毒害（如：有毒金屬離子、硫酸、酒精）、原生動物的掠食、滲透壓緊迫等。而大部分的產黏菌並無分解其胞外多醣體的能力，所以胞外多醣體不可能供作微生物食物貯存（Cerning, 1990）。經乾燥後，*Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* 及 *Erwinia stewartii* 等黏多醣菌株明顯較其非黏多醣菌株有高存活率（Ophir and Gutnick, 1994）。另外，病原菌莢膜胞外多醣體及 α -antigen 脂多醣體可以免疫偵測法檢驗，如 *Streptococcus pneumoniae* 及 *S. agalactiae*（De Vuyst and Degeest, 1999）。

許多食品級微生物具產生胞外多醣體之能力，特別是乳酸菌（Cerning, 1990）、丙酸桿菌（Cerning, 1995）和雙叉桿菌（Andaloussi *et al.*, 1995）。大多產胞外多醣體之乳酸菌乃分離自乳製品，如 Scandinavian 黏質醱酵乳製品、各種酸酪乳、以及 kefir grain（Ariga *et al.*, 1992；Macura and Townsley, 1984；Yokoi *et al.*, 1990）。同時，由乾酪、醱酵

肉製品及蔬菜 (Kojic *et al.*, 1992 ; Makela, 1992 ; Makela *et al.*, 1992 ; Van den Berg *et al.*, 1993) 也可分離出產胞外多醣體之乳酸菌株。

二、乳酸菌胞外多醣體的分類、化學結構和組成

(一) 分類

源自乳酸菌的胞外多醣體可細分為兩類：(1) 同源多醣體，包含 4 個次要類別，即(a) α -D-glucan，如聚葡萄糖(由 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 及 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 所產生)，主要由第 3 位置上不同分支程度的 α -1,6 葡萄糖殘基所組成，而較少頻率發生在第 2 和 4 位置，而 alternan (由 *Leuconostoc mesenteroides* 產生) 與 mutan (由 *S. mutans* 和 *S. sobrinus* 所產生)，兩者皆由 α -1,3 及 α -1,6 鍵結組成；(b) β -D-glucan，由 α -1,6 葡萄糖分子伴隨 β -1,2 分支所組成；(c) 聚果糖 (fructan)，主由 β -2,6 鍵結的 D-fructose 分子所組成，就像 levan 有一些 β -2,1 分支是經由 O1 位置鍵結的 (由 *S. salivarius* 產生)；(d) 其他，如 polygalactan，由具有不同配糖鍵結的重複單元所組成；(2) 異源多醣體，由嗜中溫的乳酸菌株 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lb. rhamnosus*) 與嗜熱的乳酸菌株 (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *S.*

thermophilus) 所產生。異源胞外多醣體對於醱酵乳飲料的物性、質地及口感扮演一重要的角色；例如，酸酪乳品質之淡黃色、平滑的質地，可藉酸酪乳菌醱產生胞外多醣體予以改善。此外，來自乳酸菌的胞外多醣體具有發展新產品或改善產品的潛力，如低乳固形物酸酪乳、低脂酸酪乳、乳脂狀酸酪乳等 (De Vuyst and Degeest, 1999)。某些乳酸菌所產胞外多醣體對於人類的健康也有所貢獻，如：具有抗癌、抗胃潰瘍、免疫調節、降低膽固醇活性等作用 (Kitazawa *et al.*, 1993 ; Nakajima *et al.*, 1992 ; Van Kranenburg *et al.*, 1999)。Kitazawa *et al.* (2000) 也表示，來自 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 的含磷胞外多醣體可促使巨噬細胞功能的增強。因此，來自乳酸菌的胞外多醣體具有發展或開發成附有健康及經濟效益的機能性食品原物料。

(二) 化學組成

Nilsson and Nilsson (1958) 最早開始研究乳酸菌的黏質物，並推測黏質物是類似蛋白質的物質 (De Vuyst and Degeest, 1999)。後來，有些學者推測牛乳醱酵期間所生成的黏稠特性乃歸因於糖蛋白或碳水化合物-蛋白複合物的產生 (Garcia-Garibay and Marshall, 1991)。另有報告指出，胞外聚合物在進一步純化前則是富含碳水化合物 (Bouzar *et al.*, 1996 ; Cerning *et al.*, 1992 ; Kojic *et al.*, 1992)。而

現有的共識則為：來自乳酸菌的胞外聚合物屬多醣類，由具分支的重複單元（包含 -與 -鍵結）所組成，且有許多不同的類型（Cerning, 1995）。然而，其單體組成十分相似，幾乎都存有 D-galactose, D-glucose, L-rhamnose，只是比率的不同（Ariga *et al.*, 1992；Doco *et al.*, 1990；Grobben *et al.*, 1996；Nakajima and Toyoda, 1990）。來自 *Lb. acidophilus* LMG 9433（Robijn *et al.*, 1996），*Lb. helveticus* TY1-2（Yamamoto *et al.*, 1994），*Lb. helveticus* NCDO 766（Robijn *et al.*, 1995），*Lb. rhamnose* C83（Gamar *et al.*, 1997），*S. thermophilus* Sfi20（Doco *et al.*, 1990），*S. thermophilus* Sfi32（Lemoine *et al.*, 1997）和 *S. thermophilus* LY03，*S. thermophilus* BTC 及 *S. thermophilus* 480（De Vuyst *et al.*, 1998）的胞外多醣體都缺乏 rhamnose，*Lb. paracasei* 34-1 之胞外多醣體僅含 galactose（Robijn *et al.*, 1996），*S. thermophilus* OR 901 之胞外多醣體僅含 galactose 與 rhamnose（Bubb *et al.*, 1997），而 *Lb. sake* 0-1 之胞外多醣體僅含有 glucose 與 rhamnose（Robijn *et al.*, 1995）。此外，*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 420 所產的胞外多醣體含 glucose 與 fructose（1:2）（Manca de Nadra *et al.*, 1985），而 *S. thermophilus* MR-1C 之胞外多醣體含八個基本重複單元，並由 D-galactose, L-rhamnose, 和 L-fucose（5:2:1）所組成（Low *et al.*, 1998）。另外也存在其他殘基，如

sn-glycerol-3-phosphate, *N*-acetyl-aminosugars, phosphate 和 acetyl groups。Grobben *et al.* (1996) 指出相同菌株所產胞外多醣體之組成不同乃取決於所使用的醱酵條件及所應用的分離和純化技術之差異。Marshall *et al.* (1995) 從同一菌株的醱酵培養基中分離出兩個不同單糖組成、不同分子量的胞外多醣體。分別從 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 及 *S. thermophilus* 分離出之高分子量和低分子量的胞外多醣體片段，於單糖組成上則無不同 (Marshall *et al.*, 1997)。因此，所使用的培養基質和醱酵條件可能是影響單糖組成和配糖鍵變化的因素之一。

(三) 結構

來自乳酸菌之胞外多醣體的分子量分布於 4.0×10^4 至 6.0×10^6 Dalton 之間。分子量為決定胞外多醣體機能性的因素之一 (Cerning *et al.*, 1992; Van den Berg *et al.*, 1995)。然而，多醣體於溶液中的物理流變性與其三度結構及構形是緊密相關的。除了分子構形，分子內聚合力對其溶液作用也相當重要；因多醣體鍵結需從不規則的螺旋狀進行局部重整成更有規則的構形，以利於分子內作用及結合。

多醣體的二級和三級構形主要取決於其一級結構。即使一級結構只有極小的變化，也可能會造成多醣體構形及特性的巨大改變。Doco *et al.* (1990) 首先測定出 *S. thermophilus* 所產胞外多醣體之重複單元的結構。其他乳

酸菌所產胞外多醣體之重複單元的結構，近年來也經由水解、甲基化分析、過碘酸鹽氧化作用、乙酸解作用 (acetolysis) 酵素分解 Smith 降解作用 1D 及 2D ¹H-NMR 光譜分析等方法而加以確立。胞外多醣體之重複單元的結構從雙醣到七醣都有，且結構與質地特性間存有一緊密關係；另外，藉由修飾生物聚合物的結構可改變原有多醣體的特質。(De Vuyst and Degeest, 1999)

三、乳酸菌胞外多醣體之生物合成

同源多醣體，如 dextran (聚葡萄糖), mutan, alternan, levan (聚果糖) 等，其生物合成發生在細胞外且需要蔗糖作為特定介質。在聚合化反應中，需要來自蔗糖水解的能量，以及高特異性的醣基轉移酶 (glycosyl transferase) (如：dextran sucrose for dextran 合成，levan sucrose for levan 合成)；而異源多醣體的形成乃是由衍生自 sugar-1-phosphates 的糖核糖將單糖聚合化以及細胞質中的重複單元前驅物聚合而成 (Cerning *et al.*, 1986)。將 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 培養於含葡萄糖的基質中，與 UDP-glucose 及 UDP-galactose 合成有關的 UDP-glucose pyrophosphorylase 活性較含果糖者高，而與 dTDP-rhamnose 合成有關的酵素則未發現 (Grobber *et al.*, 1996)。就 *S. thermophilus* 產黏菌株而言，胞外多醣體之產生與 UDP-glucose pyrophosphorylase 活性有所關連，但在

非產黏菌株則無 (Escalante *et al.*, 1998) 來自乳糖水解的葡萄糖和半乳糖可能是乳酸菌異源多醣體生物合成的醣類來源；在這些乳酸菌中發現高量的 UDP-glucose pyrophosphorylase 活性。然而，因 *S. thermophilus* 為不具利用半乳糖能力之 Gal⁻ 菌，所以推測 UDP-galactose-4-epimerase 及 galactose-1-phosphate uridylyltransferase 最有可能的功能為合成胞外多醣體前驅物。綜合上述，衍生自 glucose-6-phosphate 的 glucose-1-phosphate 應該是胞外多醣體形成的前驅物 (Grobber *et al.*, 1997)。因此，phosphoglucomutase 為將乳糖降解路徑與胞外多醣體生物合成路徑連結的關鍵性酵素。假定醣類分解作用與醣類合成作用的連結發生在此關鍵點，則引起下列的推測：操縱胞外多醣體的超量生產是有可能的，因半乳糖可經由糖解作用被完全分解，而葡萄糖則被用作胞外多醣體生產。但癥結之一可能為：*S. thermophilus* 無利用半乳糖之能力；當乳糖被用作碳源時，*S. thermophilus* 與 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 經由 lactose/galactose antiport 運輸過程將半乳糖釋放至培養基質中，僅遺留葡萄糖做為細胞壁的能量及碳源 (Looijesteijn *et al.*, 1999)。

胞外多醣體的單糖組成可能不只取決於細胞內糖核苷的量，也可能在於胞外多醣體重複單元的組成。數百至數千個重複單元的聚合化乃透過特異醣苷轉移酶作用更多的

糖殘基而完成，進一步與 undecaprenyl phosphate carrier 結合後便產生胞外多醣體。如乳酸菌所產胞外多醣體之不同結構所顯示的，這些微生物一定含有大量的特異醣基轉移酶且都牽涉於重複單元的聚合中，但目前尚未予以利用。因此，結合不同來源之醣基轉移酶基因所賦予的機能性將可開拓多醣體工程之路。

胞外多醣體生物合成的最後一個步驟為：所合成的多醣體穿過細胞膜到達細胞表面且分泌至基質中（如黏質多醣體），或仍附屬在細胞表面（莢膜多醣體）。聚合化以及運送過程都可能影響胞外多醣體合成量或其糖類組成。

胞外多醣體生物合成是一個耗能反應。首先，每一個六糖轉變成六碳糖-phosphate 時需要一個 ATP；每一個糖核基的合成需要打斷一高能磷酸鍵，而 isoprenoid C55 lipid carrier 的磷酸化也需要一個 ATP；最後，聚合化和運送過程同樣也需要能量。與好氧菌（如 *X. campestris*）對照之下，乳酸菌能量的衍生是相當有限的，而這將嚴重限制胞外多醣體的生成量。更進一步，因 glycosyl lipid carrier 同時也與細胞壁聚合物（peptidoglycans, teichoic acids, lipopolysaccharides）的生物合成有關，因此於不同生長期對此細胞壁成分會有競爭作用（Southland, 1998）。

因此，莢膜多醣體或黏質多醣體的本質和組成受基質成分、生物合成路徑、生長期及微生物生長速率的影響。這些對於瞭解胞外多醣體的生物合成及分泌是相當重要的因子，並極需進一步的研究。

大部分用於醱酵的產黏菌株生產胞外多醣體之能力並不穩定。如 *S. thermophilus* 的產黏菌株培養期間的黏度變化範圍為 41-240 mPa S , 胞外多醣體量則為 45-340 mgL⁻¹ (Cerning *et al.*, 1988) 產黏特性可能在繼代培養、高溫下過長時間培養 (Macura *et al.*, 1984) 或高溫下的繼代培養後喪失 (Cerning *et al.*, 1992); 同樣的 , 自發性突變會造成胞外多醣體產量的減少和組成的改變 (Bouzar *et al.*, 1996 ; Gancel and Novel, 1994 ; Yamamoto *et al.*, 1994), 所以產黏菌株需定期挑選以保有其產黏特性。

嗜中溫乳酸菌株產黏特性的喪失常被歸因於質體 (plasmid) 的喪失 (Kojic *et al.*, 1992) 然而 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 及 *S. thermophilus* 菌株目前為止尚未發現有可產胞外多醣體的質體存在 (Cerning, 1990); 另有學者發現 , 某些乳酸菌產黏特性消失時 , 可於牛乳中反覆培養而再次獲得 (Cerning *et al.*, 1992 ; Gancel and Novel, 1994) 因此 , 胞外多醣體生物合成的不穩定性可能是 DNA 的缺失或重組。

四、乳酸菌胞外多醣體之生產

來自乳酸菌之胞外多醣體的生物合成和分泌發生於不同時期，而聚合物的數量及類型皆受生長條件的影響。於 MRS 或合成培養基質中並無發現胞外多醣體產生，大多以牛乳作為培養基質，也有以乳清或以乳清為主作為培養基質 (Gassem *et al.*, 1997)。近幾年則有半合成及複合培養基質之研究 (Garcia-Garibay and Marshall, 1991 ; Kimmel *et al.*, 1998 ; Van den Berg *et al.*, 1995)。一個包含碳水化合物、礦物鹽類、胺基酸、維生素及核酸的化學性培養基質更適於評估營養物對乳酸菌胞外多醣體生長、代謝路徑、生物合成的影響，如：胞外多醣體的定性及定量、組成的測定。進一步的，大部分研究者將焦點著重於黏度測量，因傳統上黏度測定被用作液態培養基質中胞外多醣體生產的指標 (Cerning *et al.*, 1988)。只有少數報告著重於胞外多醣體的定量 (Cerning, 1995)。

(一) 乳酸菌胞外多醣體產率

乳酸菌所產胞外多醣體的總量取決於培養基質中碳及氮源組成分，以及溫度、pH 值、培養時間等菌株培養條件。依據 Cerning (1995) 報告，生長於非最適條件下之不同乳酸菌，其細胞合成胞外多醣體的量為 0.045-0.350 g/L；生長於最適條件下者，其胞外多醣體量則為 0.150-0.600 g/L。接種 *S. thermophilus* 產黏菌株與 *Lb.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* 產黏菌株之酸酪乳，胞外多醣體的產量達到 0.800 g/L (Cerning *et al.*, 1994)。就 *S. thermophilus* LY03 而言，牛乳及 MRS 中適當的碳氮比可產生 1.1 g/L 的胞外多醣體 (De Vuyst *et al.*, 1998)。

(二) 提高乳酸菌生長胞外多醣體的基質成分

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 之胞外多醣體產量可藉由於脫脂乳中添加水解酪蛋白而提升(Garcia-Garibay and Marshall, 1991)。Cerning *et al.* (1994) 發現酪蛋白可促進 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 生產胞外多醣體，並促進其本身生長；另一方面，於 MRS 培養基質中添加水解酪蛋白並不會增加胞外多醣體的產量 (Garcia-Garibay and Marshall, 1991)。Gamar *et al.* (1997) 指出：碳源本質及其單糖組成、濃度對胞外多醣體生物合成有一促進效應，補充葡萄糖或蔗糖於牛乳或牛乳超過濾之濾液中可促進 *Lb. casei* 胞外多醣體的生產、甚至修飾胞外多醣體的單糖組成，並使葡萄糖的比率增多 (Cerning *et al.*, 1992)。
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 於含葡萄糖或乳糖的基質比含果糖者有較多的胞外多醣體產量，且其胞外多醣體的單糖組成並不相同；於含甘露糖者則有相當低的生長速率和胞外多醣體產量 (Grobben *et al.*, 1996)。當 *Lb. rhamnosus* C83 生長於含 4% 甘露糖及 2% 葡萄糖與果糖 (1 : 1) 之化學性修飾培養基質時，胞外多醣體產量

可增加 3-4 倍 (Gamar *et al.*, 1997)。

對於 *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. 及 *Rhizobium* spp. 等產胞外多醣體菌株而言，氮源的限制導致胞外多醣體產量的增加。然對於乳酸菌，最適的碳氮比是提升胞外多醣體產量所必須的 (Sebastiani and Zelger, 1998)。培養基質中的礦物鹽類、胺基酸、維生素等成分也會影響胞外多醣體組成 (Mozzi *et al.*, 1995)。

(三) 碳、氮源對胞外多醣體分子量大小及組成的影響

Marshall *et al.* (1995) 發現 *L. lactis* subsp. *cremoris* LC 330 可同時產生兩種胞外多醣體：一為分子量高於 1.0×10^6 Dalton 的不帶電胞外多醣體，另一為分子量趨於 1.0×10^4 Dalton 的帶電胞外多醣體；而與低分子量胞外多醣體對照下，高分子量者之產率因氮源的受限而增加。De Vuyst and Degeest (1999) 指出：*S. thermophilus* LY03 於氮源濃度增加時，胞外多醣體有從高分子量轉變成低分子量的情形。Grobben *et al.* (1996) 表示：當 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 於含定量乳糖的連續培養基質中，其胞外多醣體的糖組成為半乳糖：葡萄糖：鼠李糖 = 6.8 : 1.0 : 0.7；而含果糖者，其胞外多醣體產量極低且單糖組成為半乳糖：葡萄糖 = 2.5 : 1.0，但無鼠李糖的存在。

(四) 控制胞外多醣體生產之最適條件

將溫度、pH 值及培養時間等調控在最適條件下可增進胞外多醣體的產率 (Gancel and Novel, 1994; Grobber *et al.*, 1998 ; Mozzi *et al.*, 1996) 而較低的培養溫度可誘導黏稠物的產生 (Gassem *et al.*, 1997 ; Kontusaari and Forsen, 1988 ; Van den Berg *et al.*, 1995)。對革蘭氏陰性菌而言，細胞生長較慢伴隨而來的是細胞壁聚合物合成速率也較緩慢，因而更利於胞外多醣體生物合成過程中的 isoprenoid lipid carrier 之生成。然而，亦有研究者發現乳酸菌於較高溫度培養、最適 pH 值、氧氣張力下有較高的胞外多醣體產量 (De Vuyst *et al.*, 1998 ; Grobber *et al.*, 1998 ; Mozzi *et al.*, 1994)。

Van den Berg *et al.* (1995) 表示，糖類轉變為胞外多醣體的最適 pH 值為 5.8，但轉變為生物質量的最適 pH 值則為 6.2。Gassem *et al.* (1997) 推測：維持稍高的 pH 值可造成胞外多醣體產量的增加，此乃因為延長了菌株生長對數期的時間。較高的 pH 值也可能造成較長的生長平穩期而降低了 peptidoglycan 與 teichoic acid 之合成，而導致胞外多醣體產量的增加。於連續調控 pH 值之培養基質中的胞外多醣體產量顯著高於無調控 pH 值者；而且調整 pH 值的效應較補充營養物質的效應大。

(五) 生產胞外多醣體之酵素

嗜中溫乳酸菌株於非最適生長條件下，如較低的培養溫度，可產生最大量的胞外多醣體；然嗜熱乳酸菌株所產之胞外多醣體似乎與生長相關連，如於最適生長條件下有最大量的胞外多醣體 (De Vuyst *et al.*, 1998)。在與生長相關連的例子中，胞外多醣體的生物合成幾乎與生長同步，在對數生長期時表現最大的合成速率，並於生長期終點達到最大量。Marshall *et al.*(1995)指出，來自 *L. lactis* subsp. *cremoris* 菌株的胞外多醣體生物合成持續至對數生長期終點。其他研究者也觀察到胞外多醣體的合成可持續至平穩生長期後或止於平穩生長期 (Bouzar *et al.*, 1996 ; Grobben *et al.*, 1998 ; Kojic *et al.*, 1992)。因此，為求胞外多醣體產量的增加而需提高生物質量的形成。*Xanthomonas* spp.及 *Alcaligenes* spp. 胞外多醣體則產生於平穩生長期；就嗜中溫乳酸菌而言，只要有足夠數量的細胞形成就可增進胞外多醣體的產生。

此外 Bouzar *et al.* (1996) 指出，在發酵期間 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 1187 所產生的胞外多醣體之糖類組成會有變化；而 De Vuyst *et al.* (1998) 則發現，在整個發酵過程 *S. thermophilus* LY03 所產生的胞外多醣體之糖類組成維持不變。綜觀牽涉於胞外多醣體生物合成之機制，聚合化的建構受醣類及酵素活性的影響，而醣類及酵素活性更取決於環境中可用的介質或特殊刺激物。

在培養時間過長之情況下，常造成胞外多醣體之降解 (Mozzi *et al.*, 1996)。此可能是因為糖類水解酶的作用 (Cerning *et al.*, 1992)。然而，菌株差異、培養條件 (pH 值、溫度) 均對此現象有所影響。因此，適當的培養時間、溫度及 pH 值可避免此一問題。

(六) 乳酸菌胞外多醣體的生產

乳酸菌所產胞外多醣體的產量很難與 *X. campestris* 等好氣菌所產胞外多醣體相抗衡 (0.1-1.5 g/L v.s 30-50 g/L)。就經濟觀點來看，若欲使乳酸菌所產胞外多醣體成為一食品添加物，則將其產量增加 10 倍是需要的。嗜熱乳酸菌產生之胞外多醣體與乳酸菌之生長有關，且乳酸菌生長因乳酸鹽之存在而受抑制，因此減少培養液中乳酸鹽的濃度可望提昇胞外多醣體的產量。胞外多醣體可明顯增加培養液之黏度，使得分離細胞、獲得產物及純化等過程更加複雜。因此，可經由添加電解質以中和帶電多醣體而有助胞外多醣體的沈澱。

利用三氯醋酸移除殘存的蛋白質，再於上清液中以酒精或丙酮沈降胞外多醣體等以取得胞外聚合物。Kimmel *et al.* (1998) 利用離心、超過濾、有機溶劑沈澱等方法從 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR 醱酵液中獲得大量的胞外多醣體 (29 g)。另外，經由陰離子交換色層分析法 (Anion exchange chromatography) 或凝膠滲透法 (Gel permeation) 已可成功的純化乳酸菌之胞外多醣體 (Doco *et al.*, 1991)。

五、乳酸菌胞外多醣體之應用

乳酸菌所產胞外多醣體目前被廣泛利用者為同源多醣體，如工業用聚葡萄糖（dextran）被用於凝膠過濾產物的製造以及作為血量擴增劑（blood volume extender）血流改良劑（blood flow improver）紙板和金屬版印過程以及作為食品糖漿安定劑；levan 做為食品濃厚劑；Alternan 則因獨特結構所賦予的高溶解性和低黏度特性而具有於食品和化妝品應用的潛力（De Vuyst and Degeest, 1999）。

北歐醃酵乳飲料如 viili, langmjolk, langfil, tatmjolk, piima, pitkapiima, fil, skyr 等皆呈現一堅實、濃厚、黏稠的質地，乃因 *L. lactis* subsp. *lactis* , *L. lactis* subsp. *cremoris* 等嗜中溫產黏菌株的產酸能力及伴隨的異源胞外多醣體生成。在歐洲聯盟的一些國家因為禁止酸酪乳中添加安定劑，因而大量使用產黏乳酸菌醃。

開發乳酸菌之胞外多醣體及具產胞外多醣體機能性的乳酸菌醃為食品工業發展的新趨勢。增進流變性、改善質地、提升安定性及保水力，可解決酸酪乳常發生低黏度、凝膠破碎或高乳清析出等問題（Bouzar *et al.*, 1997）。另 *S. thermophilus* 產黏菌株可增加低脂 Mozzarella cheese 的水分含量（Perry *et al.*, 1997）。

產胞外多醣體之 *Leuc. mesenteroides* 被發現於西元 1878 年，可賦予甜菜糖漿及甘蔗糖漿的濃厚化及凝膠化，被認為是最早應用於食品的乳酸菌胞外多醣體。X.

campestris 之漢生膠 (Xanthan) 於西元 1969 年通過美國食品暨藥物管理局 (FDA) 批准而成為第一個允許用於食品的微生物多醣體。來自 *S. elodea* 的 gellan 也已商業化 (De Vuyst and Degeest, 1999)。

利用產黏菌株可促使大規模生產之攪拌型酸酪乳質地的一致性、改善酸酪乳黏度、降低乳清析出和粒狀感。因酸酪乳含有胞外多醣體，而可降低在推送幫浦、混合機和充填機下所受的傷害，並保護凝乳受熱與物理性的衝擊。節省任何安定劑的添加，此類型的生產方式於西方國家頗受歡迎，因消費者對 100% 天然產品有更多的偏好。以產黏菌株醱酵的牛乳可充當安定劑而用於冰淇淋的製造。Christiansen *et al.* (1999) 指出，添加 25% 或 50% 的黏質牛乳於冰淇淋混料中，發現胞外多醣體使得混料的黏度增加而且耐溶化力與添加商用安定劑者相似，於熱衝擊試驗中胞外多醣體也具有一保護的作用。此外，於其他酸酪乳飲料 (如 Kefir) 和低乳固形物酸酪乳的生產，也可利用產黏菌株產生胞外多醣體之特性以改善組織和質地。

肆、材料與方法

一、培養基、試藥、菌醃等

1. Elliker broth, M17 agar, MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, USA)
2. Bacterial agar, Casamino acid, Casitone, Cysteine, Glucose, Lactic acid, Lactose, Peptone No.3, Yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, USA)
3. Pectin (YM-100H, 振芳食品公司, 台灣)
4. Skimmilk powder (Murray Goulburn Co-operative Co. Ltd., Australia)
5. 供試菌株

(1) *S. thermophilus* CCRC 12268, 12257

(2) *L. bulgaricus* CCRC 14098, 14009

(3) *L. helveticus* CCRC 11052

(4) *L. casei* subsp. *casei* CCRC 12249, 10697

(5) *L. casei* subsp. *rhamnosces* CCRC 10940

(6) *L. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791

(7) *L. acidophilus* CCRC 10695

以上購自新竹食品工業發展研究所菌種保存及研究中心。

6. MEPS-1, MEPS-2, MEPS-3, MRS Plus broth 及 Elliker broth 等液態篩選培養基之組成分如表一所示。MEPS-1 培養基依據 Van den Berg *et al.* (1993),

MEPS-2 及 MEPS-3 培養基則修飾自 MEPS-1 培養基，MRS plus 係 MRS 培養基添加 Cysteine, Casamino acid 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 而成，而 Elliker broth 則為一般乳酸菌之培養基。

二、樣品製備、菌醃活化

1. 酸酪乳之製備

- (1) 依設定之 SNF 製備還原脫脂乳，再以 105°C ，10 分鐘之條件殺菌後，冷卻至室溫；
- (2) 接種 3% 混合乳酸菌醃；
- (3) 依設定溫度培養至 pH 4.6 左右。

2. 含果膠之還原脫脂乳之製備

先將果膠粉末溶於 70°C 左右之熱水中，待溫度降至 40°C 左右，再加入室溫之還原脫脂乳中，經混勻並以 105°C ，10 分鐘之條件殺菌後，冷卻至室溫備用。

3. 菌醃之活化

將菌醃接種至 MEPS-2 培養基中，於 32°C 經 16 小時培養以達到活化之目的；連續活化兩次後，開始進行試驗。

三、分析方法

(一) 儀器

1. pH meter (Model 691, Metrohm, Swiss)
2. 黏度計 (Model DV-I+, Brookfield , USA)
3. 高速離心機 (Model KN-70, Kubota, Japan)

- 4.光學顯微鏡 (Model Eclipse E400, Nikon, Japan)
- 5.菌種自動鑑定系統 (Microstation, Biolog, USA)
- 6.厭氣培養操作箱 (Model 1024/1025, Forma Scientific, USA)
- 7.數位式相機 (Model DC 210, Kodak, Japan)

(二) 分析步驟

1. pH 值

將樣品攪拌均勻後以 pH meter 直接測定之。

2. 滴定酸度 (Titratable acidity)

依中國國家標準 CNS 3441 測定之。取約 9 mL 樣品於白色杯中精稱，加 9 mL 不含 CO₂ 之蒸餾水稀釋，加 0.5 mL 之 1% 酚酞酒精溶液，而以 0.1N NaOH 滴定至呈現微粉紅色且 30 秒不退色。計算方式如下：

$$\text{乳酸}(\%) = \frac{0.1\text{N NaOH 滴定數}(\text{mL}) \times 0.009 \times \text{力價}}{\text{樣品重量}(\text{g})} \times 100$$

3. 黏絲性 (Thread forming property)

依 Ariga *et al.* (1992) 之方法，以玻璃棒順時針 10 次、逆時針 10 次攪拌樣品後，再以勾拉方式評估其黏絲性程度，並以數位式相機照相留存。

4. 黏度 (Viscosity)

依 Ariga *et al.* (1992) 之方法，以玻璃棒順時針 10

次 逆時針 10 次攪拌樣品後,續以 Brookfield DV-I+ 黏度計及 LV 組之 3 號轉軸進行黏度測定。每個黏度值為連續測定三次之平均值。

5. 乳清析出率 (Syneresis)

依 Rawson and Marshall (1997) 之方法, 秤取樣品 10 g 於 15 mL 離心管中, 以半徑 13 cm 之高速離心機 3000 rpm 離心 15 分鐘後, 計算其乳清析出率。

6. 菌株分離及純化

依 Champagne *et al.* (1998) 之方法, 將收集之乳製品於 MEPS-2 液態培養基中以 32 ℃ 經 16 小時培養後, 具黏絲性者以劃菌法分別劃於固態 MRS agar (pH 5.5) 與 M17 agar 後, 以 42 ℃ 培養 48 ± 3 小時; 挑出形態不同之菌落於 MEPS-2 液態培養基中, 並以 32 ℃ 培養 16 小時; 重複上述步驟四 五次, 以達純化之目的。

7. 乳酸菌數 (CFU/ mL)

取 11 g 樣品於裝有 99 mL 0.1% 蛋白胨溶液之稀釋瓶, 經充分震盪均勻混合, 作成 10 倍稀釋液, 然後取 1 mL 於裝有 9 mL 0.1% 蛋白胨溶液之試管中, 經漩渦式混合機均勻混合, 作成 100 倍稀釋液, 繼續此一系列稀釋步驟至適宜稀釋倍數, 最後吸取 1 mL 稀釋液於培養皿中, 並倒入 15 mL MRS agar 混勻, 以 37 ℃ 培養 48 ± 3 小時後計算其菌落數。

8. 革蘭氏染色法 (Gram' s stain)

(1) 固定

- A. 吸取 200 μ L 滅菌水於 1.5 mL 微離心管中；
- B. 以白金餌挑出單一菌落於上述溶液中進行稀釋；
- C. 吸取稀釋液數滴，並滴於載玻片上；
- D. 以酒精燈進行烘乾以固定菌體。

(2) 染色

- A. 草酸銨結晶紫溶液 (Gentian violet) , 1 分鐘
- B. 蒸餾水沖洗數秒鐘
- C. 碘溶液, 1 分鐘
- D. 蒸餾水沖洗數秒鐘
- E. 95% 酒精褪色
- F. 蒸餾水沖洗數秒鐘
- G. 番紅溶液 (Fuchsin) , 30 秒鐘
- H. 蒸餾水沖洗數秒鐘
- I. 烘乾

(3) 鏡檢

以光學顯微鏡直接進行鏡檢 (1000 倍) , 並照相留存。

9. Biolog 公司 Microstation System 菌種自動鑑定系統

- (1) 用無菌之棉棒從培養基表面塗抹菌落，將其懸浮於生理食鹽水；
- (2) 以濁度計調整菌體懸浮液之濃度；
- (3) 將菌體懸浮液加入 Microplate 中培養；

(4)利用儀器自動辨別，再經菌種資料庫比對。

10.官能評估 (Sensory evaluation)

選定具有經驗之官能評估人員，對樣品之乳清析出、風味、黏稠性、質地及整體總接受性做評分。評分方式採七點評分法，乳清析出：1 = 極多，2 = 多，3 = 稍多，4 = 可接受，5 = 稍少，6 = 少，7 = 極少；風味：1 = 極討厭，2 = 討厭，3 = 稍討厭，4 = 可接受，5 = 稍喜歡，6 = 喜歡，7 = 極喜歡；黏稠性：1 = 極稀薄，2 = 稀薄，3 = 稍稀薄，4 = 可接受，5 = 稍黏稠，6 = 黏稠，7 = 極黏稠；質地：1 = 極粗糙，2 = 粗糙，3 = 稍粗糙，4 = 可接受，5 = 稍平滑，6 = 平滑，7 = 極平滑；整體總接受性：1 = 極討厭，2 = 討厭，3 = 稍討厭，4 = 可接受，5 = 稍喜歡，6 = 喜歡，7 = 極喜歡。

11.統計分析

依測定項目所得數據，採用 Statgraphics 統計軟體進行分析。將試驗結果以一般線性模式 (General linear model ; GLM) 進行不同處理組間之差異性測定；另以 Least-square means (LSD) 測定法比較各處理組平均值之差異顯著性。

三、實驗方法

本實驗共分為六個部分：

1.試驗一：產黏乳酸菌篩選條件之選擇

使用購自新竹食品工業發展研究所之 10 株商用乳酸菌分別在 MEPS-1, MEPS-2, MEPS-3, MRS plus broth 及 Elliker broth 等五種液態培養基，以 27, 32, 37, 42 等四種溫度，及 8, 16, 24 小時等三個時間配對培養，評估各培養基質之黏絲性和黏度等。

2. 試驗二：產黏乳酸菌株之選擇

收集市售酸酪乳、乾酪及克弗爾等共計 12 種醱酵乳製品，將其接種至試驗一之選定基質並以選定條件培養，測定其黏絲性程度。

3. 試驗三：篩選菌株之鑑定

將試驗二中挑出具黏絲性之乳製品，進行分離菌株並經純化培養後，續依試驗一之選定條件培養，藉其黏絲性現象以篩選出單株菌種，並以形態學進行初步鑑定。續以 Biolog 公司之 Microstation 菌種自動鑑定系統做進一步確認。

4. 試驗四：篩選菌株之生理特性

分析篩選菌株之產酸能力、醱酵特性及產黏情形等。

5. 試驗五：酸酪乳之製備及品質評估

第一階段：產黏菌株製備酸酪乳。篩選之產黏菌株 (A1, A2, B2 及 E)，經兩兩配對共得六個組合 A1+A2, A1+B2, A1+E, A2+B2, A2+E 及 B2+E，將其接種至 8-12% SNF 脫脂乳中以 32 及 42 培養製備酸酪乳，

分析其黏絲性程度、黏度、乳清析出率及滴定酸度等。

第二階段：傳統酸酪乳菌醎加入產黏菌株製備之酸酪乳。傳統酸酪乳菌醎 *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098 (L) 和 *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 (S) 加入篩選之產黏菌株試製酸酪乳 (L+S, L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2, L+S+E), 分析其黏絲性程度、黏度、乳清析出率及滴定酸度等。

第三階段：產黏菌株製備酸酪乳之官能評估。接種 L+S、 A1+B2 及 A2+E 菌醎以 42 製備之 10% SNF 酸酪乳，選定具有經驗之官能評估人員進行官能評估。

第四階段：產黏菌株製備酸酪乳於貯存期間之品質評估。接種 L+S、 A1+B2 及 A2+E 菌醎以 32 或 42 製備之 10% SNF 酸酪乳貯存於 4 ，評估貯存四週期間之黏絲性程度、黏度、乳清析出率、滴定酸度及乳酸菌數等變化。

6. 試驗六：黏質酸酪乳與添加果膠酸酪乳之品質探討

比較接種產黏菌株之酸酪乳與添加果膠之傳統酸酪乳間之品質特性。

伍、結果與討論

試驗一、產黏乳酸菌篩選條件之選擇

利用 10 株商用乳酸菌於 MEPS-1, MEPS-2, MEPS-3, MRS plus broth 及 Elliker broth 等液態培養基, 以 27, 32, 37, 42 培養 8, 16 及 24 小時, 觀察培養基質之黏絲性程度, 作為產黏菌株之篩選條件。

黏絲性程度之評估方式如圖一所示, (A) 為黏絲性程度小者, (B) 為黏絲性程度大者。

乳酸菌在不同培養基和培養條件下之黏絲性程度如表二所示。於 MRS plus broth 與 Elliker broth 培養基中, 只 32, 16 小時具有黏絲性, 且其黏絲性程度較 MEPS-1, 2, 3 者為低; Gassem *et al.* (1997) 指出, MRS 培養基並無促進胞外多醣體產生之能力。MEPS-1 培養基於 27, 24 小時、32, 8, 16 及 24 小時、37, 8 及 16 小時等皆具有黏絲性, 其中以 32, 16 小時組之黏絲性程度較高。MEPS-2 培養基於 27, 24 小時、32, 8, 16 及 24 小時、37, 8 及 16 小時、42, 8 小時等皆具有黏絲性, 其中以 32, 16 小時之黏絲性程度最高, 而 32, 8 及 24 小時兩組次之; 而且, MEPS-2 培養基於 32, 16 小時組之黏絲性程度較 MEPS-1 培養基質於 32, 16 小時者高。MEPS-3 培養基僅於 32, 8, 16 及 24 小時、37, 8 小時等組具有黏絲性, 但彼此間並無差異, 且各組黏絲性程度皆較 MEPS-2 培養基者為低。各培養基於 42 經 8, 16 及 24 小時培養後均不具有黏絲性。MEPS-2 培養基質具有正常乳

成分，且以 0.35% 酵母萃取物、0.35% 蛋白胨及 5% 乳糖強化；Gassem *et al.* (1997) 表示，以乳清為主之培養基質可促進胞外多醣體的產生。據 Gancel and Novel (1994) 研究，*S. thermophilus* S22 於添加乳糖的基質中比添加蔗糖者可產生較多的胞外多醣體，添加不同碳源影響了胞外多醣體的量及組成，但並不改變菌株細胞壁的組成。Racine *et al.* (1991) 指出，*Propionibacterium acidi-propionici* 以 25 培養之胞外多醣體量較以 35 培養者高了一倍。Gassem *et al.* (1995) 表示，產黏菌株 CH15 於乳清強化培養基 (SWP) 以 35 培養後之黏度較 37, 40 者高。Mozzi *et al.* (1995) 報告顯示，*Lb. casei* CRL 87 於添加半乳糖的基質中有較高的胞外多醣體產量；*Lb. acidophilus* 以 30 培養 72 小時之黏度、胞外多醣體產量比培養 24 小時者高，而以 37 及 42 培養之胞外多醣體產量則隨培養時間的增長而減少。Van den Berg *et al.* (1995) 指出，*Lb. sake* O-1 生長於 20 所產之胞外多醣體產量比生長於 30 者多了 2 倍。Gassem *et al.* (1997) 指出，*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR 以低於最適生長溫度 (32) 及較長時間 (72 小時) 培養後，基質有較高的黏度。

本試驗顯示以低於最適生長溫度、較長時間培養且在 MEPS-2 培養基質中之黏絲性程度顯著較高。所以，選擇 MEPS-2 培養基於 32 經 16 小時培養作為產黏乳酸菌株之篩選條件。為了更加確認試驗一之篩選條件，因此試驗二中使用 27, 32, 37 及 42 等四種培養溫度、8, 16 及 24 小時等三種培養時間進行產黏菌株之篩選。

表一、篩選培養基之組成分

Table 1. The selective media used in the experiments

Component (g)	MEPS-1	MEPS-2	MEPS-3	MRS plus broth
Skimmilk powder	9	9	9	
Yeast extract	0.35	0.35	0.35	
Peptone	0.35	0.35	0.35	
Glucose	1			
Lactose		5	5	
Casitone			0.35	
Cysteine				0.05
Casamino acid				0.5
FeSO ₄ 7 H ₂ O				0.003
MRS ^R broth powder				5.5

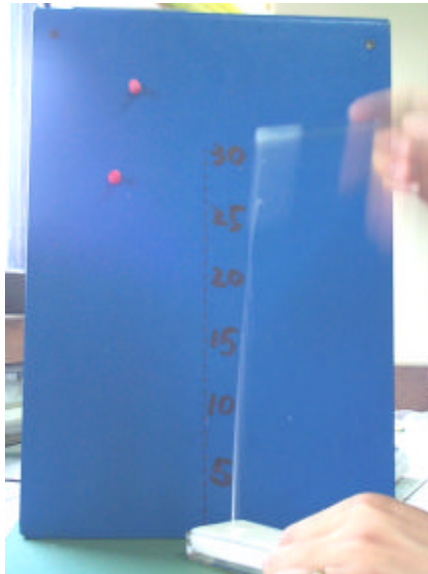
Elliker^R broth is the product of DIFCO Laboratories.

All ingredients are dissolved in distilled water and diluted to 100 mL.

(A)



(B)



圖一、黏絲性程度之評估；(A)程度小者，(B)程度大者。

Fig. 1. Macroscopic observation of the thread forming property. (A) Low level, (B) High level.

表二、乳酸菌在不同篩選培養基和培養條件下之黏絲性程度

Table 2. Macroscopic observation of the thread forming property of medium fermented with different strains of lactic acid bacteria under various conditions

Media	27			32			37			42		
	8hr	16hr	24hr	8hr	16hr	24hr	8hr	16hr	24hr	8hr	16hr	24hr
MRS plus broth	--	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--
Elliker broth	--	--	--	--	+	--	--	--	--	--	--	--
MEPS-1	--	--	+	+	+++	+	+	+	--	--	--	--
MEPS-2	--	--	+	+++	++++	+++	+	+	--	--	--	--
MEPS-3	--	--	--	++	++	++	++	--	--	--	--	--

+, ++, +++, +++++ Means the level of the thread forming property.

試驗二、產黏乳酸菌株之篩選

收集市售酸酪乳、乳酪及克弗爾等共計 12 種醱酵乳製品，將其接種至試驗一之選定基質培養，觀察其產黏現象。

於 MEPS-2 培養基質培養後具黏絲性之醱酵乳製品如表三所示。在培養 8 小時組，27 中具黏絲性的乳製品有 和 ；32 中有 、 、 及 ；而 37 及 42 中則有 、 、 、 及 。整體而言，五個具黏絲性之乳製品中，以 37 培養 8 小時之 的黏絲性程度較其他組高。

在培養 16 小時組，27 中具黏絲性的乳製品有 、 、 及 ；而 32 、 37 及 42 中則有 、 、 、 及 。整體而言，五個具黏絲性之乳製品中，以 32 培養 16 小時者之黏絲性程度較其他組為高 ($P < 0.05$)，其中又以 及 之黏絲性程度最高 ($P < 0.05$)。

在培養 24 小時組，27 、 32 及 37 中具黏絲性的乳製品有 、 、 、 及 ，且各溫度間並無顯著差異；而 42 中只有 及 ，其黏絲性程度顯著低於其他溫度者。

綜合上述結果，仍以 32 培養 16 小時後之乳製品的黏絲性程度較其他組高，因此選定 、 、 、 及 等五種乳製品進行後續之試驗。

表三、於 MEPS-2 培養基培養後具黏絲性之醱酵乳製品

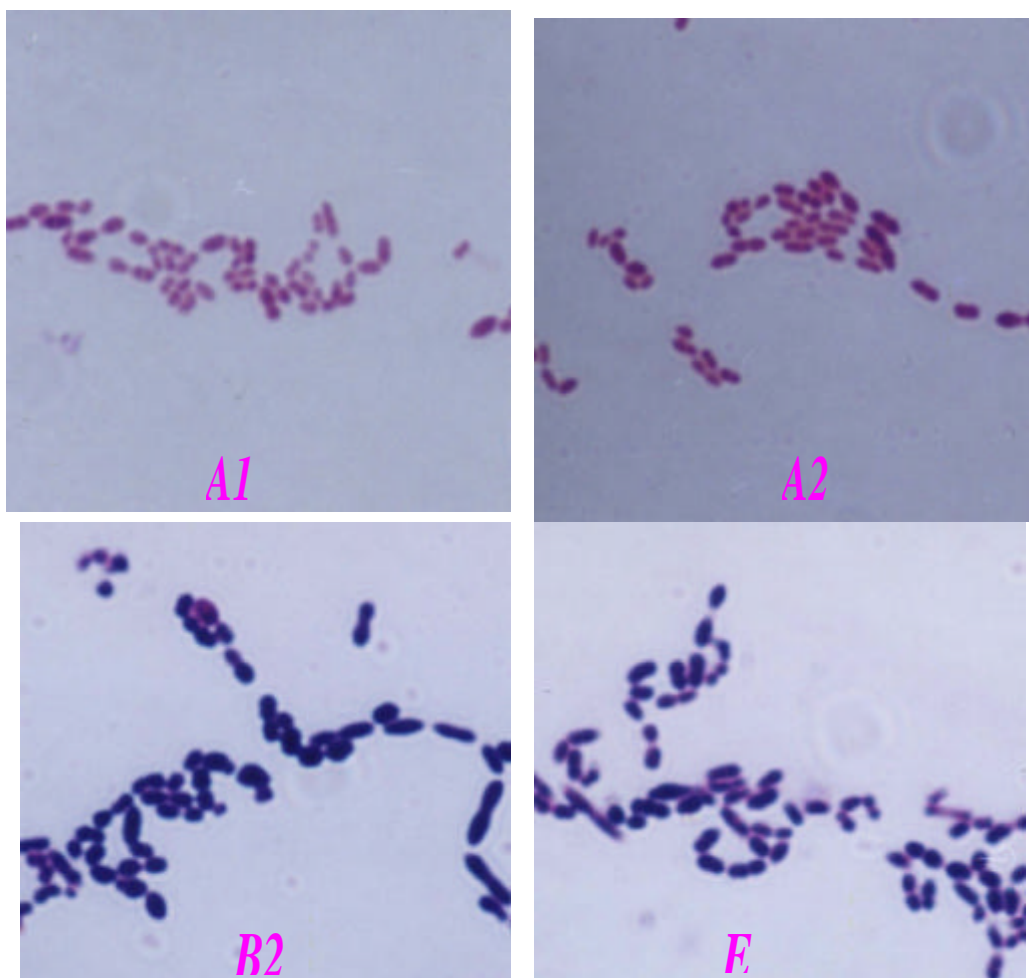
Table 3. Fermented dairy products that with the thread forming property in MEPS-2 medium under various incubation conditions

Incubation conditions	Fermented dairy products				
【 8 hr 】					
27			+	+	
32	+	+	++	+	
37	++	++	+++	+	++
42	++	++	++	++	+
【 16 hr 】					
27	+	+	++	++	
32	++	++	+++	++	+++
37	+	+	++	+	++
42	+	+	+	+	+
【 24 hr 】					
27	+	+	++	+	++
32	+	+	++	+	++
37	+	+	++	+	++
42			+	+	

+, ++, +++, +++++ Means the level of thread forming property.

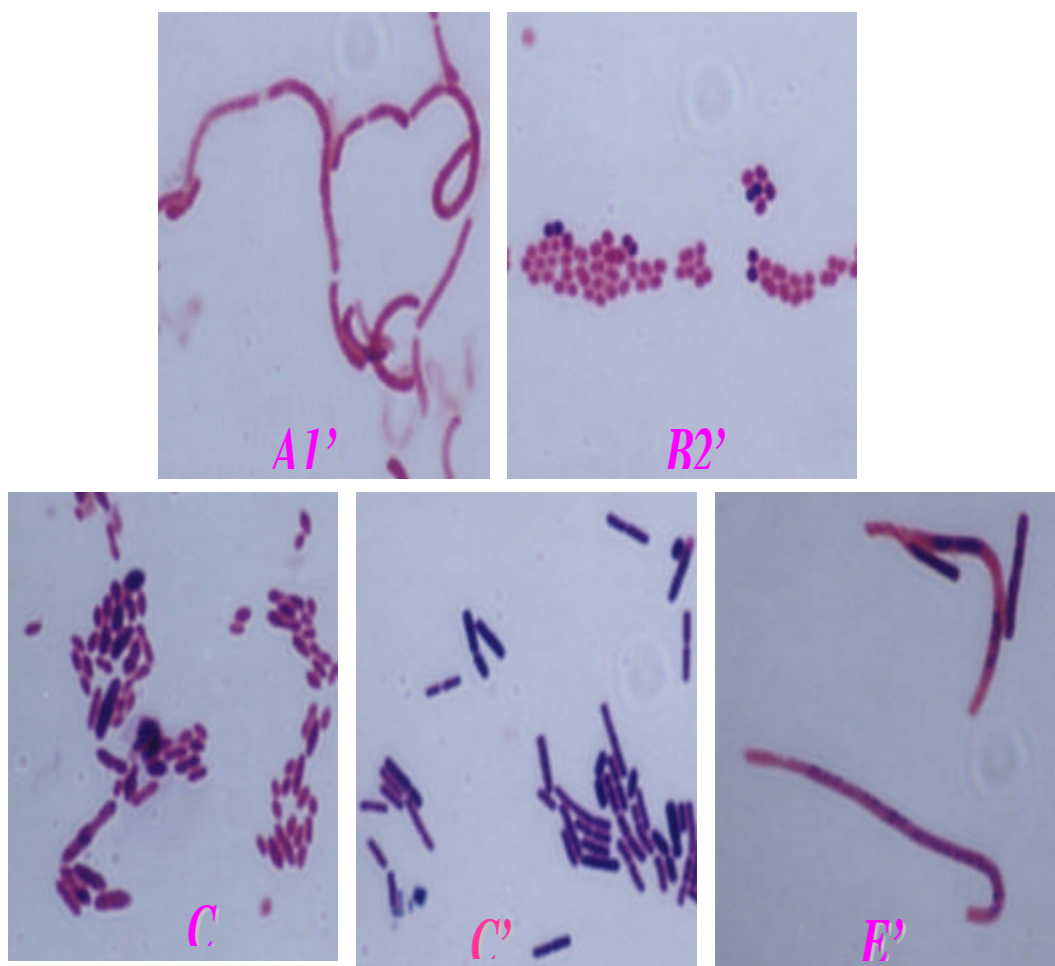
試驗三、篩選菌株之鑑定

就具有黏絲性程度之五組醱酵乳製品（ 、 、 、 及 ）進行菌株分離及純化步驟， 組乳製品所分離出之產黏乳酸菌於連續的純化過程中失去其產黏特性，所以只得 4 株產黏乳酸菌，代號為 A1, A2, B2 及 E。Macura *et al.*(1984)表示，產黏特性可能在重複的繼代培養中喪失；Garcia-Garibay and Marshall (1991) 指出，菌株產黏能力於重複的繼代培養及較高溫培養情況下減低；自發性突變也會造成胞外多醣體產量的減少和組成的改變(Bouzar *et al.*, 1996； Gancel and Novel, 1994； Yamamoto *et al.*, 1994)。產黏菌株經革蘭氏染色鏡檢為革蘭氏陽性菌，依據乳酸菌形態初步判定分別屬於 *Streptococcus spp.* 及 *Lactobacillus spp.*。產黏菌株之顯微鏡檢如圖二所示。非產黏菌株之顯微鏡檢如圖三所示。產黏菌株使用菌種自動鑑定系統 (Microstation, Biolog, USA) 判讀結果，A1 和 A2 為 *Streptococcus thermophilus*，而 B2 和 E 為 *Lactobacillus bulgaricus*。A1 菌株經菌種自動鑑定系統判讀結果如表四所示。



圖二、具黏絲性之篩選乳酸菌之顯微鏡檢圖。

Fig. 2. Microscopy photographs (1000 ×) of the isolated lactic acid bacteria with the thread forming property .



圖三、不具黏絲性之篩選乳酸菌之顯微鏡檢圖。

Fig. 3. Microscopy photographs (1000 ×) of the isolated lactic acid bacteria without the thread forming property .

表四、A1 菌株之 Biolog Microstation™ 菌種自動鑑定系統判讀結果

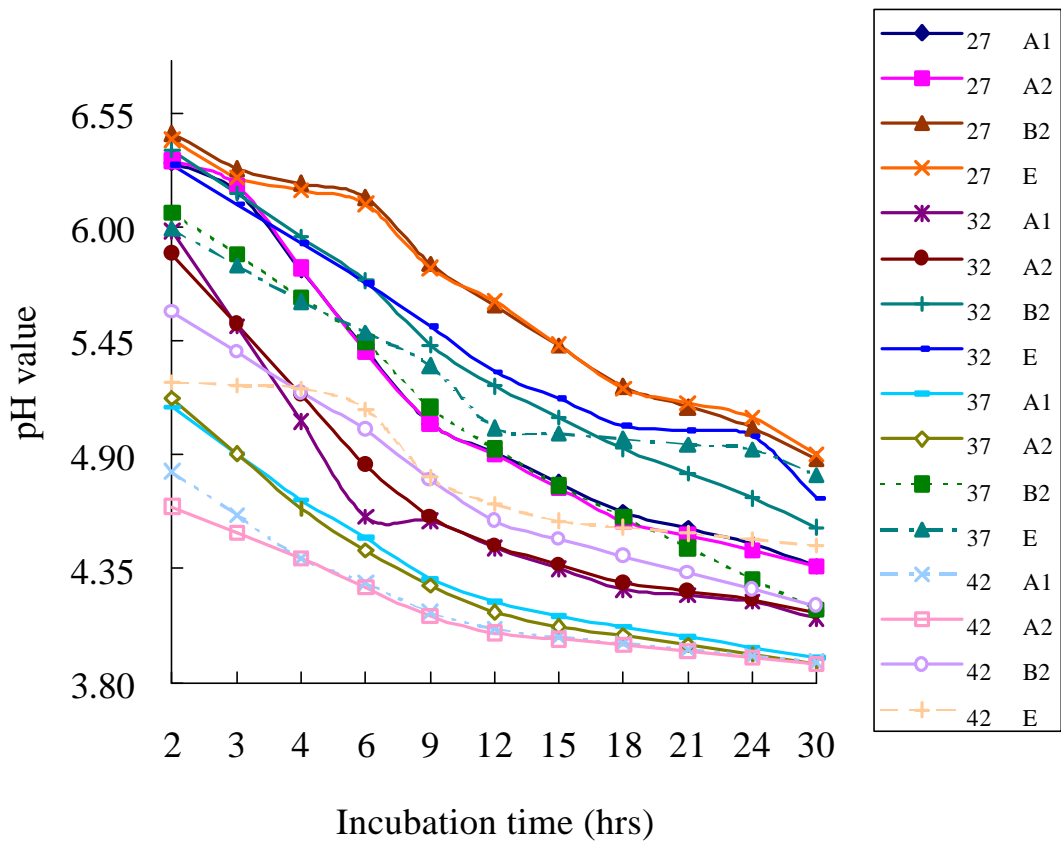
Table 4. The results of Microstation™ automated system of A1 strain

試驗四、篩選菌株之生理特性

將產黏菌之球菌 A1 和 A2, 桿菌 B2 和 E, 接種於 10% SNF 脫脂乳中分別以 27, 32, 37 及 42 培養 30 小時, 分析其 pH 值、滴定酸度、黏絲性程度、黏度及乳酸菌數等。

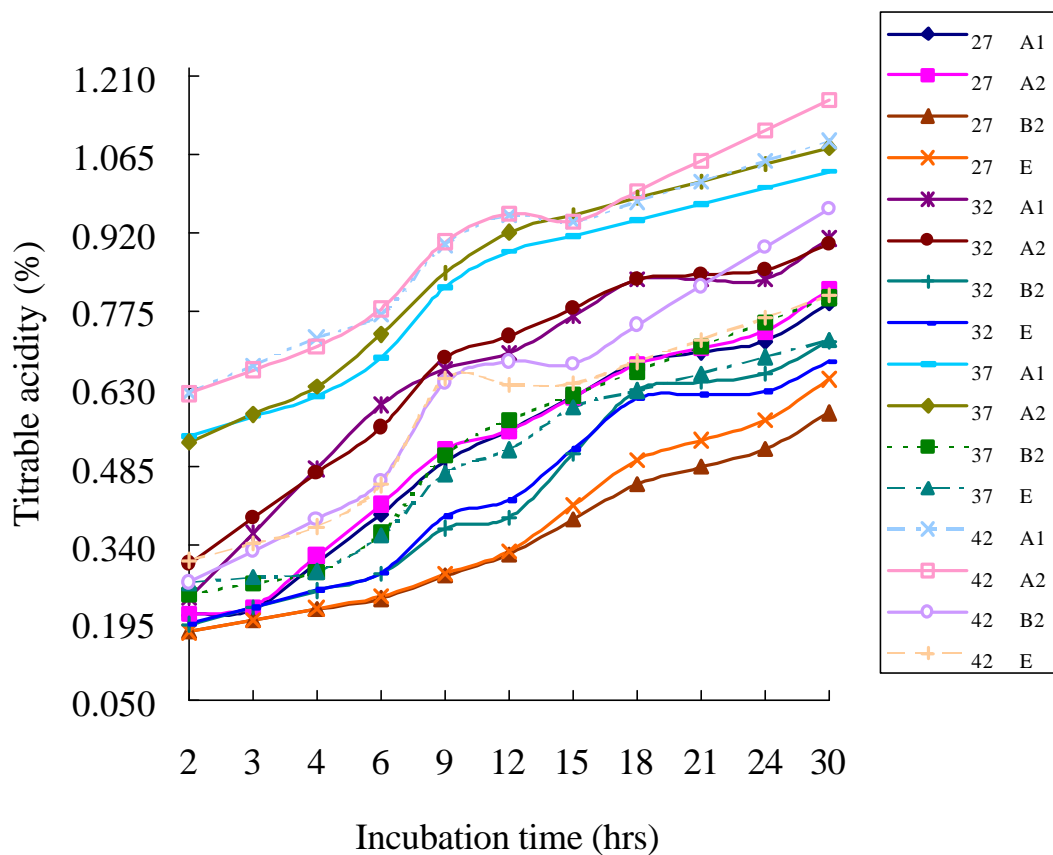
pH 值如圖四所示, 經 2 小時培養以 27 , 桿菌 B2 株之 pH 6.45 和 27 , 桿菌 E 株之 pH 6.42 高於其他組, 而 42 , 球菌 A1 株之 pH 4.82 和 42 , 桿菌 A2 株之 pH 4.65 低於其他組。4 個培養溫度組別皆有一共同現象, 於培養期間以球菌 A1 和 A2 株之 pH 值低於 B2 和 E 株。此外, 各組之 pH 值隨著培養時間、培養溫度而降低, 而經 30 小時培養之 pH 值仍以 27 , 桿菌 B2 株之 pH 4.88 和 27 , 桿菌 E 株之 pH 4.90 高於其他組, 而 42 , 球菌 A1 株之 pH 3.90 和 42 , 球菌 A2 株之 pH 3.89 低於其他組。

滴定酸度如圖五所示, 經 2 小時培養之滴定酸度以 27 , 桿菌 B2 株之 0.180% 和 27 , 桿菌 E 株之 0.178% 低於其他組, 而 42 , 球菌 A1 株之 0.622% 和 42 , 球菌 A2 之 0.611% 高於其他組。4 個培養溫度組別皆有一共同現象, 於培養期間以 A1 和 A2 株之滴定酸度低於 B2 和 E 株。此外, 各組之滴定酸度隨著培養時間、培養溫度而增加, 而經 30 小時之滴定酸度仍以 27 , 桿菌 B2 株之 0.585% 和 27 , 桿菌 E 株之 0.648% 低於其他組, 以 42 , 球菌 A1 株之 1.090% 和 42 , 球菌 A2 株之 1.166% 高於其他組。所以, 經鑑定為球菌之篩選菌株 A1 和 A2 之產酸能力高於鑑定為桿菌之篩選菌株 B2 和 E。



圖四、產黏菌株接種於 10% SNF 脫脂乳以 27, 32, 37 及 42 培養 30 小時之 pH 值變化。

Fig. 4. The pH value of 10% SNF skimmilk inoculated with slime-producing lactic acid bacteria fermented at 27, 32, 37 and 42 for 30 hours. A1, A2: *Streptococcus thermophilus* ; B2, E: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖五、產黏菌株接種於 10% SNF 脫脂乳以 27, 32, 37 及 42 培養 30 小時之滴定酸度變化。

Fig. 5. The titrable acidity of 10% SNF skim milk inoculated with slime-producing lactic acid bacteria fermented at 27, 32, 37 and 42 for 30 hours. A1, A2: *Streptococcus thermophilus* ; B2, E: *Lactobacillus bulgaricus*.

黏絲性程度如表五所示，經 2 小時培養之黏絲性程度以 32 ，球菌 A1 和 A2 株之 23 cm 高於其他組，42 ，桿菌 E 株之 3 cm 低於其他組。除了 27, 32 及 37 之桿菌 E 株與 42 之桿菌 B2 和 E 株外，其他各組之黏絲性程度隨著培養時間而增加，經 12 小時培養後開始下降；另外，各組之黏絲性程度隨著培養溫度的升高而降低。經 30 小時培養，各產黏菌株之黏絲性程度以 27 者較高、42 者較低。依據本實驗結果，培養溫度越高、培養時間越長，黏絲性程度則越小。

黏度如圖六所示，經 2 小時培養之黏度以 42 ，球菌 A1 株之 717cp 和球菌 A2 株之 585 cp 明顯高於其他組，37 ，桿菌 B2 株之 5 cp 和桿菌 E 株之 6 cp。4 個培養溫度組別中皆有一共同現象，球菌 A1 和 A2 株之黏度較桿菌 B2 和 E 株高；同時，各組之黏度隨著培養時間、培養溫度而增加。經 30 小時培養之黏度則以 42 ，球菌 A1 株之 2447 cp 和球菌 A2 株之 2363 cp 高於其他組，27 ，桿菌 B2 株之 573 cp 和桿菌 E 株之 580 cp 低於其他各組。因此，培養溫度越高、培養時間越長，黏度則越高。就黏絲性和黏度而言，黏絲性程度與黏度之間呈現反比的關係。

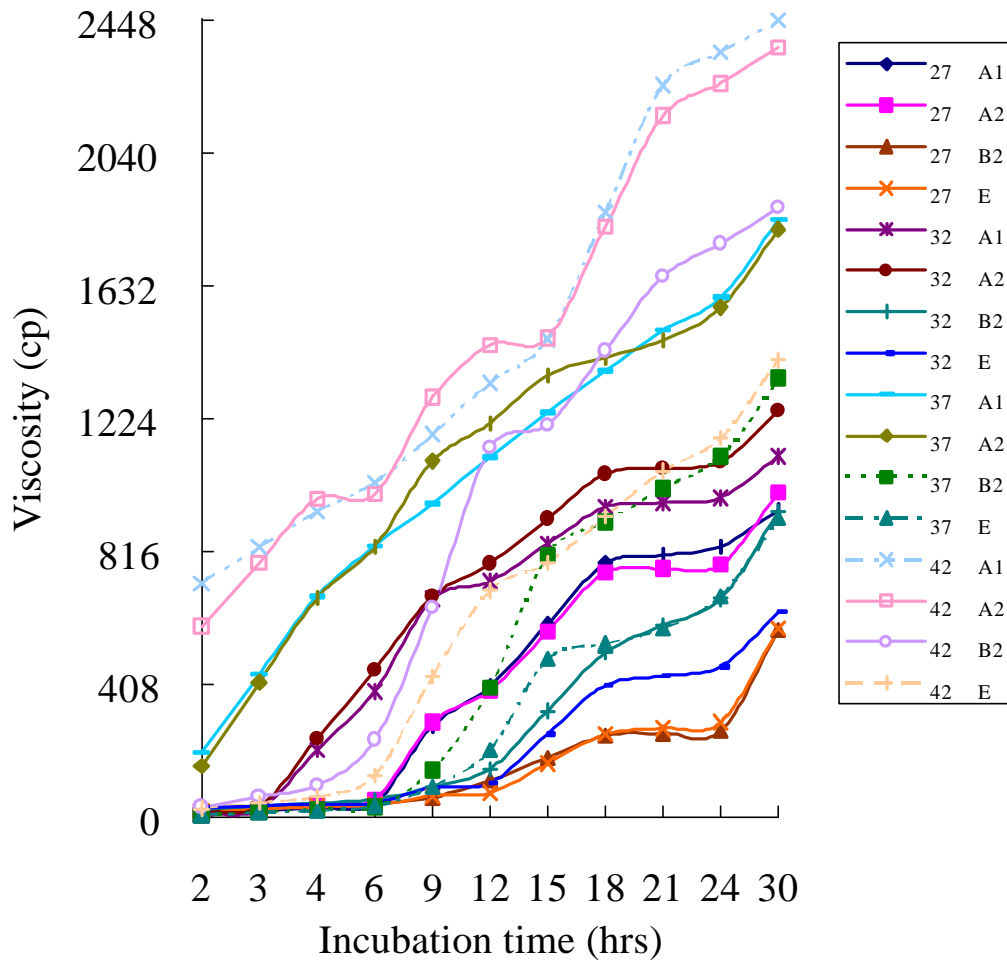
乳酸菌數如圖七所示，經 4 小時培養之乳酸菌數以 42 ，球菌 A1 株之 9.08 Log CFU/mL 高於其他各組，37 ，桿菌 E 株之 7.21 Log CFU/mL 低於其他各組。各產黏菌株以 27 和 32 培養之乳酸菌數隨著培養時間而增加，而以 37 和 42 培養之乳酸菌數則於培養 9 小時後開始下降。經 24 小時培養之乳酸菌數則以 32 ，球菌 A1 和 A2 株之 9.06 Log CFU/mL 高於其他組，37 ，桿菌 E 株之 7.21 Log CFU/mL 低於其他組。

表五、產黏菌株接種於 10% SNF 脫脂乳以 27, 32, 37 及 42
 培養 30 小時之黏絲性程度變化

Table 5. The thread forming property of 10% SNF skimmilk
 inoculated with slime-producing lactic acid bacteria
 fermented at 27, 32, 37 and 42 for 30 hours.

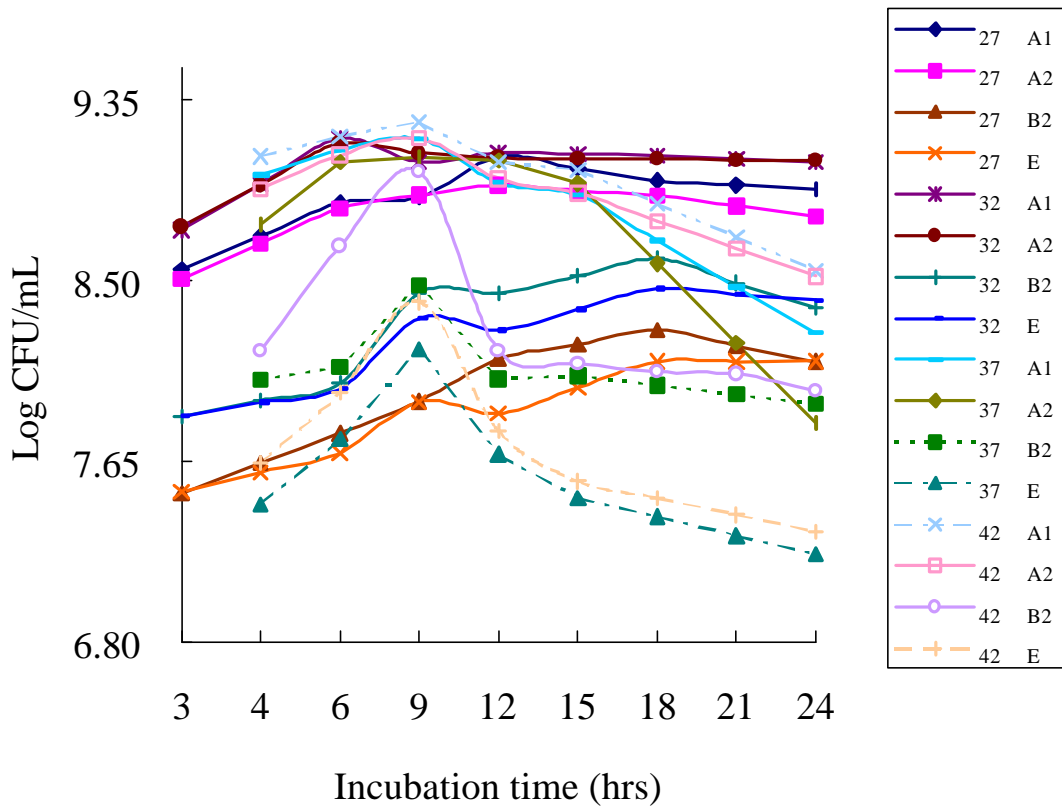
Incubation time	Thread forming property (cm)															
	27				32				37				42			
	A1	A2	B2	E	A1	A2	B2	E	A1	A2	B2	E	A1	A2	B2	E
2	9	9	9	5	23	23	11	6	15	15	11	5	7	9	5	3
3	11	10	10	5	25	25	12	6	15	16	12	5	9	10	5	3
4	19	18	11	5	28	28	14	6	15	16	12	5	10	10	5	3
6	27	25	12	5	30	30	15	6	15	16	12	5	10	10	5	2
9	30	30	15	5	30	30	17	6	15	15	11	4	7	5	2	1
12	30	30	15	5	30	30	20	5	13	13	5	3	5	4	1	1
15	30	30	15	5	28	29	16	5	10	9	1	2	3	3	1	1
18	29	30	14	5	25	28	12	4	8	7	1	2	2	2	1	1
21	29	29	14	5	24	27	11	3	5	5	1	1	1	1	1	1
24	28	28	13	4	22	25	10	1	3	3	1	1	1	1	1	1
30	25	26	13	3	19	17	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A1, A2: *Streptococcus thermophilus* ; B2, E: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖六、產黏菌株接種於 10% SNF 脫脂乳以 27, 32, 37 及 42 培養 30 小時之黏度變化。

Fig. 6. The viscosity of 10% SNF skimmilk inoculated with slime-producing lactic acid bacteria fermented at 27, 32, 37 and 42 for 30 hours. A1, A2: *Streptococcus thermophilus* ; B2, E: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖七、產黏菌株接種於 10% SNF 脫脂乳以 27, 32, 37 及 42 培養 30 小時之乳酸菌數變化。

Fig. 7. The lactic acid bacterial counts of 10% SNF skimmilk inoculated with slime-producing lactic acid bacteria fermented at 27, 32, 37 and 42 for 30 hours. A1, A2: *Streptococcus thermophilus* ; B2, E: *Lactobacillus bulgaricus*.

試驗五、產黏菌株配對或與傳統菌株共同接種製備酸酪乳之品質性狀

一、產黏菌株相互配對於並於 32 和 42 製備 8-12% SNF 酸酪乳之性狀

篩選之產黏乳酸菌株，經兩兩配對共得六個組合 A1+A2, A1+B2, A1+E, A2+B2, A2+E 及 B2+E，將其接種至 8-12% SNF (Solid-non-fat)脫脂乳中以 32 及 42 培養製備酸酪乳，分析其黏絲性程度、黏度、乳清析出率及滴定酸度等。

(一) 黏絲性程度如表六所示，不論 32 或 42 之 8%，10% 及 12% SNF 組中，A1+A2 組、A1+B2 組、A1+E 組、A2+B2 組及 A2+E 組彼此間無顯著差異，但顯著比 L+S 組和 B2+E 組大 ($P<0.05$)，且 L+S 組和 B2+E 組間無顯著差異。

(二) 黏度如圖八所示，於 32 之 8%，10% 及 12% SNF 組中，A1+A2 組、A1+B2 組、A1+E 組、A2+B2 組和 A2+E 組間無顯著差異，但顯著較 L+S 組和 B2+E 組高 ($P<0.05$)，而且 L+S 組和 B2+E 組間無顯著差異；而以 32，12% SNF 之 A1+B2 組的 1677 cp (centipoise) 最高，而 8% SNF 之 B2+E 組的 461 cp 最低。整體而言，除 B2+E 組之外，其他產黏菌株組合之黏度皆顯著高於

L+S 組 ($P < 0.05$)。

於 42 ℃ 之 8%、10% 及 12% SNF 組中，A1+A2 組、A1+B2 組、A1+E 組、A2+B2 組及 A2+E 組間並無顯著差異，但顯著比 L+S 組和 B2+E 組高 ($P < 0.05$)，而且 L+S 組和 B2+E 組間無顯著差異，其中又以 42 ℃，12% SNF 之 A1+A2 組的 1667 cp 最高，42 ℃，8% SNF 之 B2+E 組的 156 cp 最低。整體而言，除 B2+E 組之外，其他產黏菌株組合所製成之酸酪乳的黏度皆顯著高於 L+S 組 ($P < 0.05$)。

綜合上述結果，不論於 32 ℃ 或 42 ℃ 下，各菌株組合之黏度隨乳固形物含量的增加而提升，而 32 ℃ 組皆高於 42 ℃ 組。所以較低溫培養可促使黏度之增加。Marshall and Rawson (1997) 引述 Rhom and Kovac (1994) 報告指出，產黏菌株可形成一蛋白質—多醣體複合體進而影響酸酪乳凝膠的流變特性。

表六、產黏乳酸菌株於 32 和 42 製備之 8-12% SNF 酸酪乳之黏絲性程度

Table 6. The macroscopic observation of the thread forming property of 8-12% SNF yogurt made by slimy lactic acid bacteria incubated at 32 and 42

Cultures	32			42		
	8%	10%	12%	8%	10%	12%
L+S	++	+++	++++	+	++	+++
A1+A2	+++	++++	+++++	++	+++	++++
A1+B2	+++	++++	+++++	++	+++	++++
A1+E	+++	++++	+++++	++	+++	++++
A2+B2	+++	++++	+++++	++	+++	++++
A2+E	+++	++++	+++++	++	+++	++++
B2+E	++	+++	++++	+	++	++

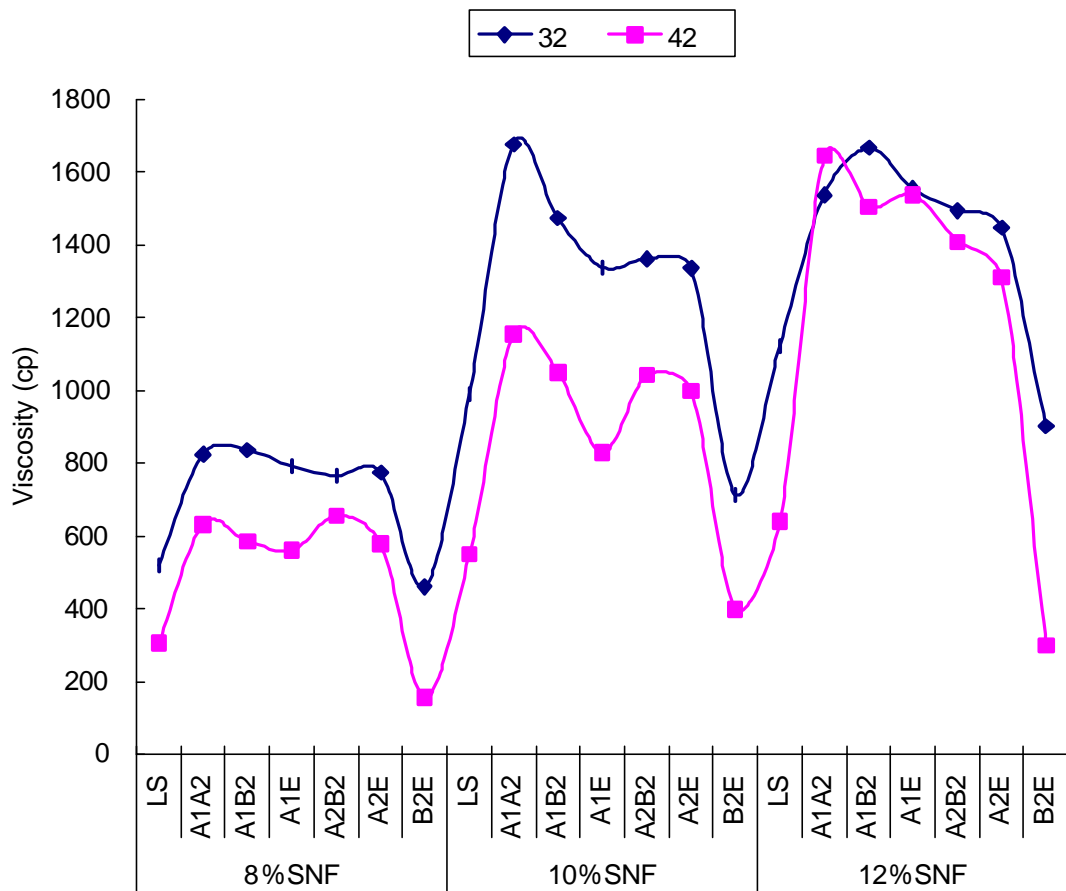
+, ++, +++, +++++ Means the level of thread forming property.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖八、產黏乳酸菌株於 32 和 42 製備之 8-12% SNF 酸酪乳之黏度。

Fig. 8. The viscosity of 8-12% SNF yogurt made by slimy

lactic acid bacteria incubated at 32 and 42 .

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

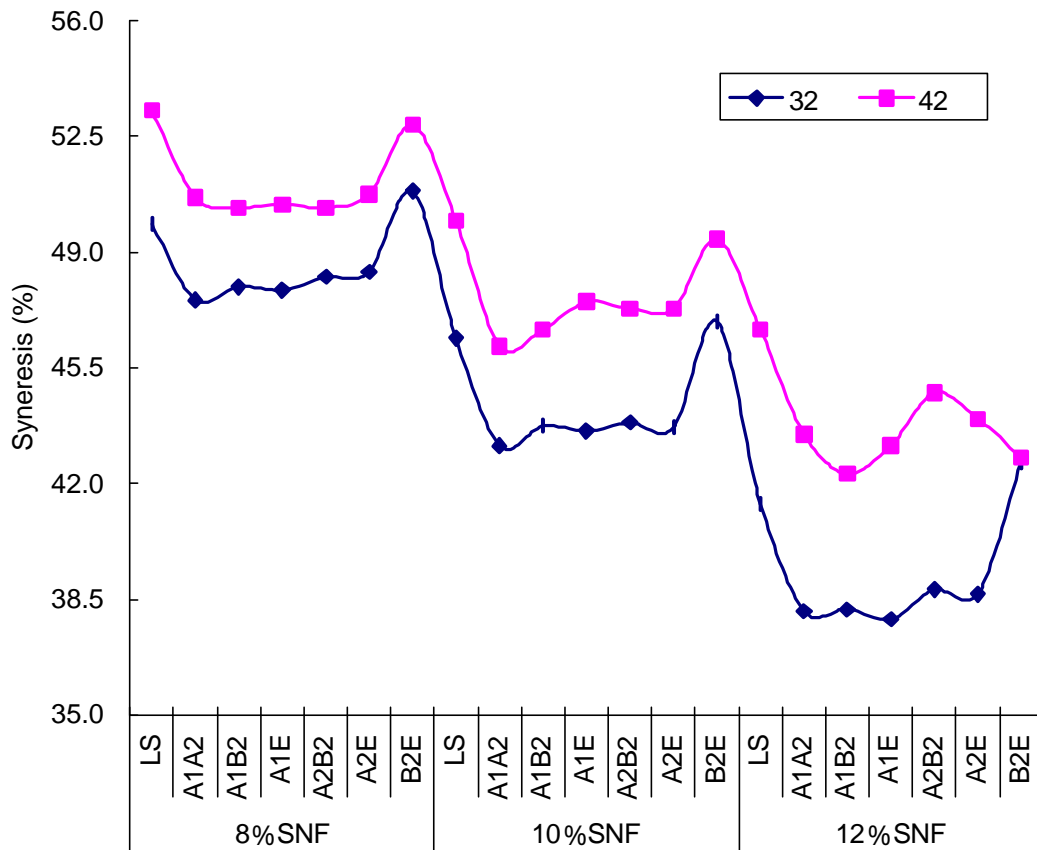
(三) 乳清析出率如圖九所示，不論 32 或 42 之 8%、10% 及 12% SNF 組之乳清析出率，L+S 組和 B2+E 組間無顯著差異，但顯著高於 A1+A2 組 A1+B2 組 A1+E 組 A2+B2 組及 A2+E 組 ($P < 0.05$)；而 A1+A2 組 A1+B2 組 A1+E 組 A2+B2 組及 A2+E 組彼此間無顯著差異。整體而言，32 者除 B2+E 組之外，其他產黏菌株組合之乳清析出率皆顯著低於 L+S 組 ($P < 0.05$)，其中又以 8% SNF 之 B2+E 組的 50.9% 最高、12% SNF 之 A1+E 組的 37.9% 最低。

42 者除 8% SNF 和 10% SNF 中之 B2+E 組外，其他產黏菌株組合之乳清析出率皆顯著低於 L+S 組 ($P < 0.05$)，其中又以 8% SNF 之 L+S 組的 53.3% 最高、12% SNF 之 A1+B2 組的 42.3% 最低。而 32 各組之乳清析出率皆顯著低於 42 各組 ($P < 0.05$)，同時乳清析出率隨乳固形物含量的增加而減少。Schellhaass and Morris (1985) 表示，含 11% SNF 之黏質酸酪乳的乳清析出率較非黏質者為低，而且以 32 培養者之乳清析出率較以 37 或 45 培養者低。Wacher-Rodarate *et al.* (1993) 指出，以黏質菌株製成之酸酪乳的乳清析出率較以非黏質菌株製成者為低，且含 17% 總固形物之黏質酸酪乳的乳清析出率較含 12% 總固形物之非黏質酸酪乳者為低。Hess *et al.* (1997) 報告指出，接種產黏菌株之酸酪乳的乳清析出率顯著比接種非產黏者低，且乳清

析出率隨著無脂乳固形物含量的增加而減少。乳清析出率的降低可能是因為黏質菌株產生的胞外多醣體與酪蛋白網狀組織間形成更一致化的凝膠結構所致。

(四) 滴定酸度如圖十所示, 不論 32 或 42 之 8%, 10% 及 12% SNF 組之滴定酸度, A1+A2 組之滴定酸度最高、B2+E 組之滴定酸度最低, 原因可能為: 球菌之最適生長溫度較桿菌為低, 所以 32 , 16 小時培養較有利於球菌 A1 和 A2 的生長, 而較不利於桿菌 B2 和 E 的生長, 因此酸度較低。但在不同乳固形物含量下, 各組於 32 製備之滴定酸度皆較 42 者高, 可能係 32 製備時培養時間較長之原因。

A1+A2 為球菌與球菌之組合, 其黏絲性與球菌和桿菌組合間無顯著差異; B2+E 為桿菌與桿菌之組合, 其黏絲性、黏度及乳清析出率則皆顯著較其他產黏組差。



圖九、產黏乳酸菌株於 32 和 42 製備之 8-12% SNF 酸酪乳之乳清析出率。

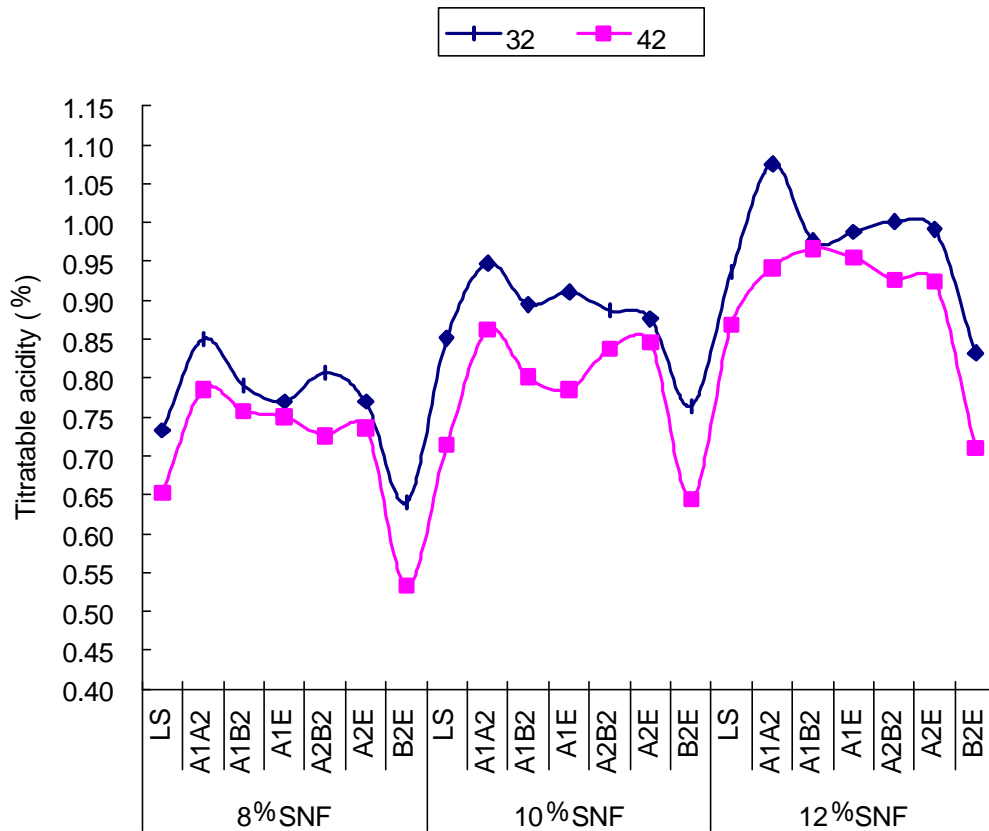
Fig. 9. The syneresis of 8-12% SNF yogurt made by slimy lactic acid bacteria incubated at 32 and 42 .

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十、產黏乳酸菌株於 32 和 42 製備之 8-12% SNF 酸酪乳之滴定酸度。

Fig. 10. The titratable acidity of 8-12% SNF yogurt made by slimy lactic acid bacteria incubated at 32 and 42 .
 L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.
 S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.
 A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.
 B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

二、傳統酸酪乳菌醃混合產黏菌株於 27, 32, 37 及 42 製備 12% SNF 酸酪乳之性狀

傳統酸酪乳菌醃 *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098 (L) 和 *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 (S) 混合接種產黏菌株於 12% SNF 脫脂乳，並分別於 27, 32, 37 及 42 製備酸酪乳 (L+S, L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2, L+S+E)，分析其黏絲性程度、黏度、乳清析出率及滴定酸度等。

(一) 黏絲性如表七所示，於 27, 32, 37 及 42 時，黏絲性程度皆以 L+S+A1 組和 L+S+A2 組最高，而 L+S 組最低。含產黏菌株之組別於 32 下的黏絲性程度較其他溫度者高，且顯著高於 L+S 組。

(二) 黏度如圖十一所示，L+S 組於 27, 32, 37, 42 之黏度分別為 610 cp, 584 cp, 674 cp 及 720 cp，皆較其他組低，其中又以 32 者最小 ($P < 0.05$)；L+S+A1 組 L+S+A2 組、L+S+B2 組及 L+S+E 組等之黏度於 27 最低，分別為 587 cp, 172 cp, 581 cp 及 653 cp；於 32 上升至最高，分別為 1024 cp, 1128 cp, 984 cp 及 1014 cp；於 37 稍微降低，分別為 864 cp, 982 cp, 715 cp 及 722 cp；於 42 又再度上升，分別為 1034 cp, 900 cp, 812 cp 及 840 cp。各組黏度皆以 32 者最高 ($P < 0.05$)，其中又

以 $L+S+A2 > L+S+A1 > L+S+E > L+S+B2$, 本試驗中酸酪乳之黏度因產黏菌株及較低溫度的培養而增加。Teggatz and Morris (1990) 指出 , 接種黏質 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR 與非黏質 *S. thermophilus* C3 所製成酸酪乳之黏度比接種非黏質 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 880 與非黏質 *S. thermophilus* C3 者高,而且以 32 製成者較以 45 製成者高。Bouzar *et al.* (1997) 表示 , 接種產黏 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 與非產黏 *S. thermophilus* CNRZ 389 所製成酸酪乳之黏度比接種非產黏 *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 398 與非產黏 *S. thermophilus* CNRZ 389 者高 , 而且未經攪拌之酸酪乳的黏度比經攪拌者高。Beal *et al.* (1999) 指出 , 以產黏菌株並在較低醱酵溫度所製備的酸酪乳具有較高的黏度 , 而此歸因於較慢的酸生成速度。Torino *et al.* (2000) 表示 , 胞外多醣體與酪蛋白及菌體表面的作用會影響酸酪乳黏度 , 而且此作用受乳酸等代謝產物或機械性破壞的影響。

表七 傳統酸酪乳菌醃混合產黏菌株製備之 12% SNF 酸酪乳
之黏絲性程度

Table 7. The macroscopic observation of the thread forming property of 12% SNF yogurt made by traditional cultures mixed with slime-producing lactic acid bacteria

Cultures	27	32	37	42
L+S	+	+	+	+
L+S+A1	++++	++++	++++	+++
L+S+A2	++++	++++	+++	+++
L+S+B2	++	+++	+++	++
L+S+E	++	++	++	++

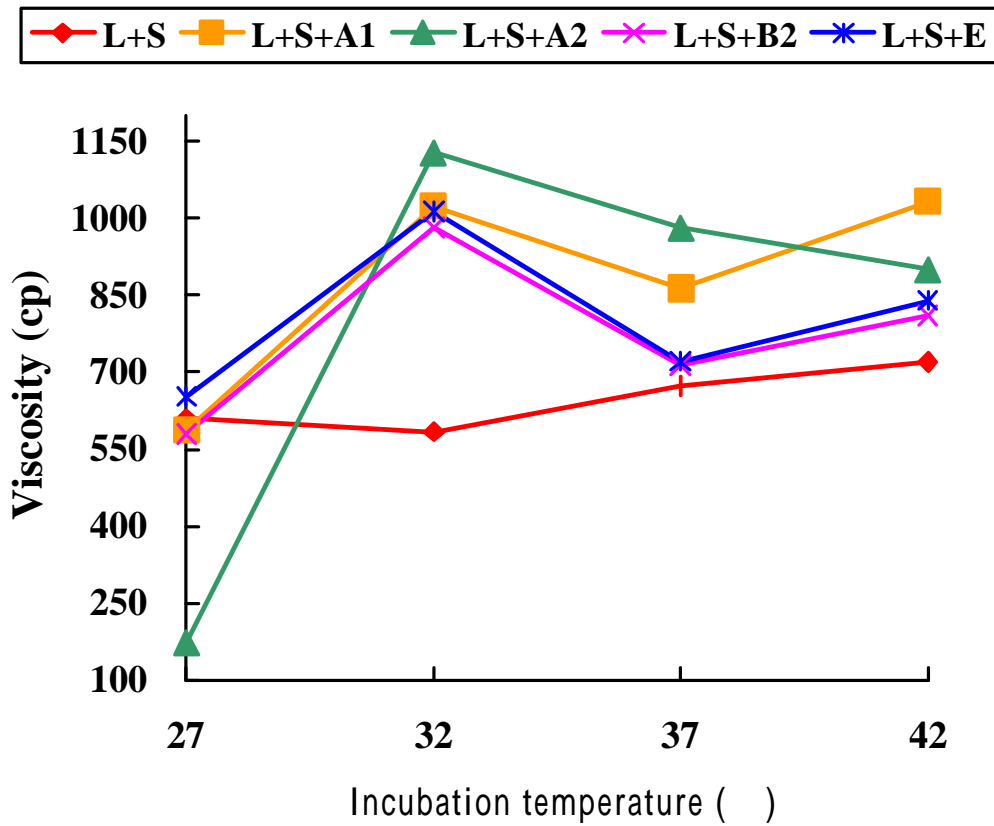
+, ++, +++, +++++ Means the level of thread forming property.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十一、傳統酸酪乳菌醃混合產黏菌株製備之 12% SNF 酸酪乳之黏度。

Fig. 11. The viscosity of 12% SNF yogurt made by traditional cultures mixed with slime-producing lactic acid bacteria.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

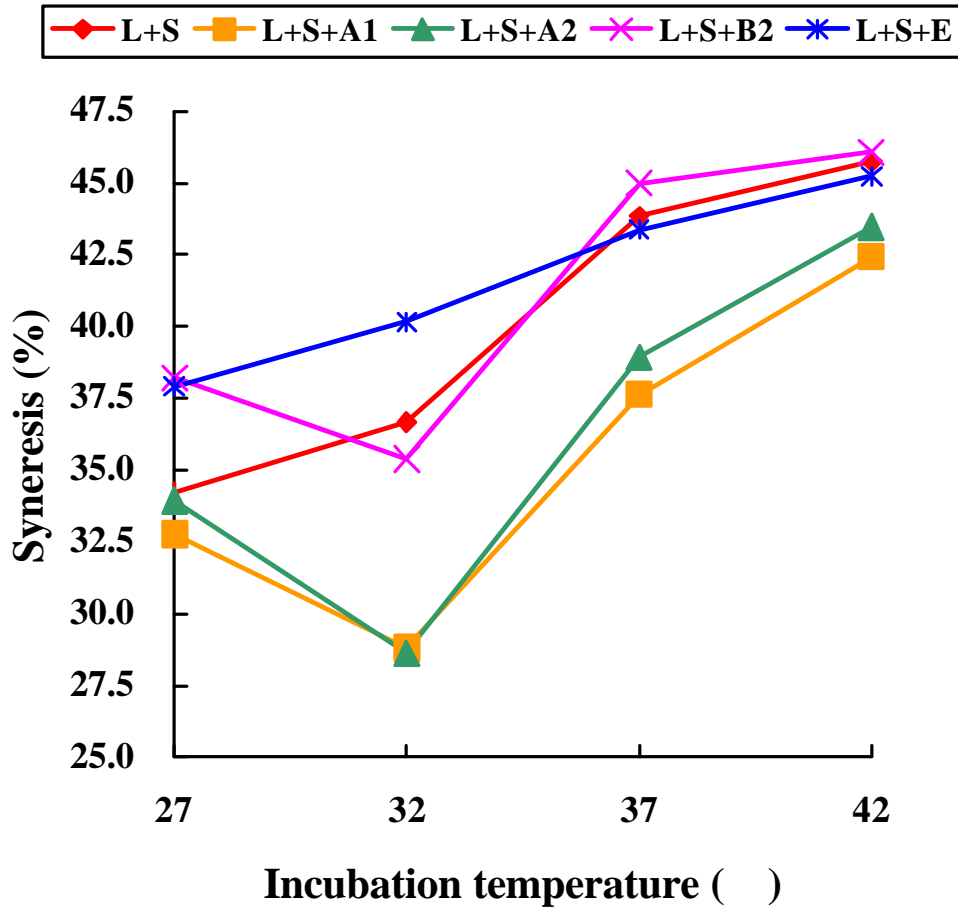
A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

(三) 乳清析出率如圖十二所示，L+S 組和 L+S+E 組之乳清析出率隨溫度之上升而增加，而 L+S+A1 組、L+S+A2 組及 L+S+B2 組等之乳清析出率於 32 最低，分別為 28.8%，28.6%，35.4%，同時隨溫度之上升也隨之增加；於 27, 32, 37, 42 培養下，其中又以 L+S+A1 組和 L+S+A2 組之乳清析出率顯著低於各組 ($P < 0.05$)；L+S 組 L+S+B2 組和 L+S+E 組於各溫度之乳清析出率並無顯著差異。

(四) 滴定酸度如表八所示，各組酸度皆以 42 者最高，其中又以 L+S 組之 0.917% 最高。

綜合上述結果，傳統酸酪乳菌醱混合產黏菌株製備之 12% SNF 酸酪乳之黏絲性程度明顯比只接種 L+S 者高、其黏度明顯比只接種 L+S 者大、而乳清析出率明顯比只接種 L+S 者低。Oba *et al.* (1999) 引述 Toba *et al.* (1990) 報告指出，接種產黏菌株之酸酪乳因蛋白質網狀組織的作用而具有較低的乳清析出率。Hess *et al.* (1997) 指出，以產黏 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 菌株醱酵的牛乳，於細胞與牛乳蛋白質網狀組織間除有胞外多醣體繩索的存在外，更有胞外多醣體層均勻覆蓋於細胞表面，因而減少乳清析出現象。



圖十二 傳統酸酪乳菌醃混合產黏菌株製備之 12% SNF 酸酪乳之乳清析出率。

Fig. 12. The syneresis of 12% SNF yogurt made by traditional cultures mixed with slime-producing lactic acid bacteria.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

表八 傳統酸酪乳菌醎混合產黏菌株製備之 12% SNF 酸酪乳之滴定酸度

Table 8. The titratable acidity of 12% SNF yogurt made by traditional cultures mixed with slime-producing lactic acid bacteria.

Culture	Titratable acidity (%)			
	27	32	37	42
L+S	0.827	0.780	0.804	0.917
L+S+A1	0.807	0.843	0.788	0.903
L+S+A2	0.713	0.793	0.796	0.837
L+S+B2	0.867	0.796	0.825	0.869
L+S+E	0.821	0.801	0.912	0.892

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

三、產黏菌株製備酸酪乳之官能評估

接種 L+S A1+B2 及 A2+E 菌醃以 42 製備之 10% SNF 酸酪乳，以選定具有經驗之官能評估人員對酸酪乳之乳清析出、風味、黏稠性、質地及整體總接受性進行評估。

黏質酸酪乳與傳統酸酪乳之官能評估如表九所示，傳統酸酪乳 L+S 組之風味評分較黏質酸酪乳 A1+B2 組和 A2+E 組高，但並不明顯；乳清析出、黏稠性、質地及整體總接受性方面，則皆以黏質酸酪乳 A1+B2 組和 A2+E 組明顯較傳統酸酪乳 L+S 組高。亦即黏質酸酪乳與傳統酸酪乳比較，黏質酸酪乳之乳清析出明顯較低、黏度明顯較高、質地明顯較平滑及整體總接受性明顯較高。

表九、黏質酸酪乳與傳統酸酪乳之官能評估

Table 9. The sensory evaluation of ropy and traditional yogurt

Yogurt	Syneresis	Flavor	Viscosity	Texture	Overall acceptability
Control					
L+S	2.8	4.6	2.8	3.2	2.4
Ropy					
A1+B2	4.4	3.8	5.0	5.2	4.0
A2+E	5.0	4.2	4.8	5.4	4.8

The sensory evaluation was based on a 7-point scale.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

四、產黏菌株製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之品質變化

接種 L+S、A1+B2 及 A2+E 菌醃以 32 或 42 製備之 10% SNF 酸酪乳貯存於 4 ，評估貯存期間之黏絲性程度、黏度、乳清析出率、滴定酸度及乳酸菌數等變化。此試驗在探討較低醱酵溫度製備之傳統酸酪乳與黏質酸酪乳於 4 貯存期間之品質性狀。

(一) 產黏菌株以 32 或 42 製備之酸酪乳於貯存 0-4 週期間之黏絲性評估值如表十所示，而黏絲性程度評估狀況如圖十三所示。第零週時不論 32 或 42 中，皆以 A1+B2 組及 A2+E 組之黏絲性程度顯著高於 L+S 組 ($P<0.05$)，而 32 之 L+S 組與 42 之 L+S 組間無顯著差異，其中以 32 之 A2+E 組之黏絲性評估值約 20 公分最高、32 及 42 之 L+S 組的 5 公分最低。貯存一至四週之間，32 之 A2+E 組的黏絲性評估值分別為 21, 25, 30 及 32 公分、42 之 L+S 組分別為 5, 9, 8 及 8 公分。

各組之黏絲性程度隨著貯存週數而增加，其中又以產黏菌株 A1+B2 組及 A2+E 組顯著高於 L+S 組 ($P<0.05$)，而且以 32 者顯著高於 42 者 ($P<0.05$)。

表十、接種產黏菌株以 32 和 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於
貯存期間之黏絲性評估值

Table 10. The thread forming property level of 10% SNF yogurt
made with L+S, A1+B2 or A2+E culture incubated at
32 and 42 during storage

Week	Thread forming property level (cm)					
	32			42		
	L+S	A1+B2	A2+E	L+S	A1+B2	A2+E
0	5 ^{ax}	18 ^{cx}	20 ^{cx}	5 ^{ax}	13 ^{bx}	14 ^{bx}
1	5 ^{ax}	20 ^{cy}	21 ^{cx}	5 ^{ax}	20 ^{cy}	17 ^{by}
2	9 ^{ay}	21 ^{by}	25 ^{cy}	9 ^{ay}	21 ^{by}	24 ^{cz}
3	14 ^{bz}	30 ^{dz}	30 ^{dz}	8 ^{ay}	24 ^{cz}	25 ^{cz}
4	11 ^{by}	30 ^{dz}	32 ^{dz}	8 ^{ay}	24 ^{cz}	25 ^{cz}

^{abcd} Means in the same row having different superscripts are significantly different (P<0.05).

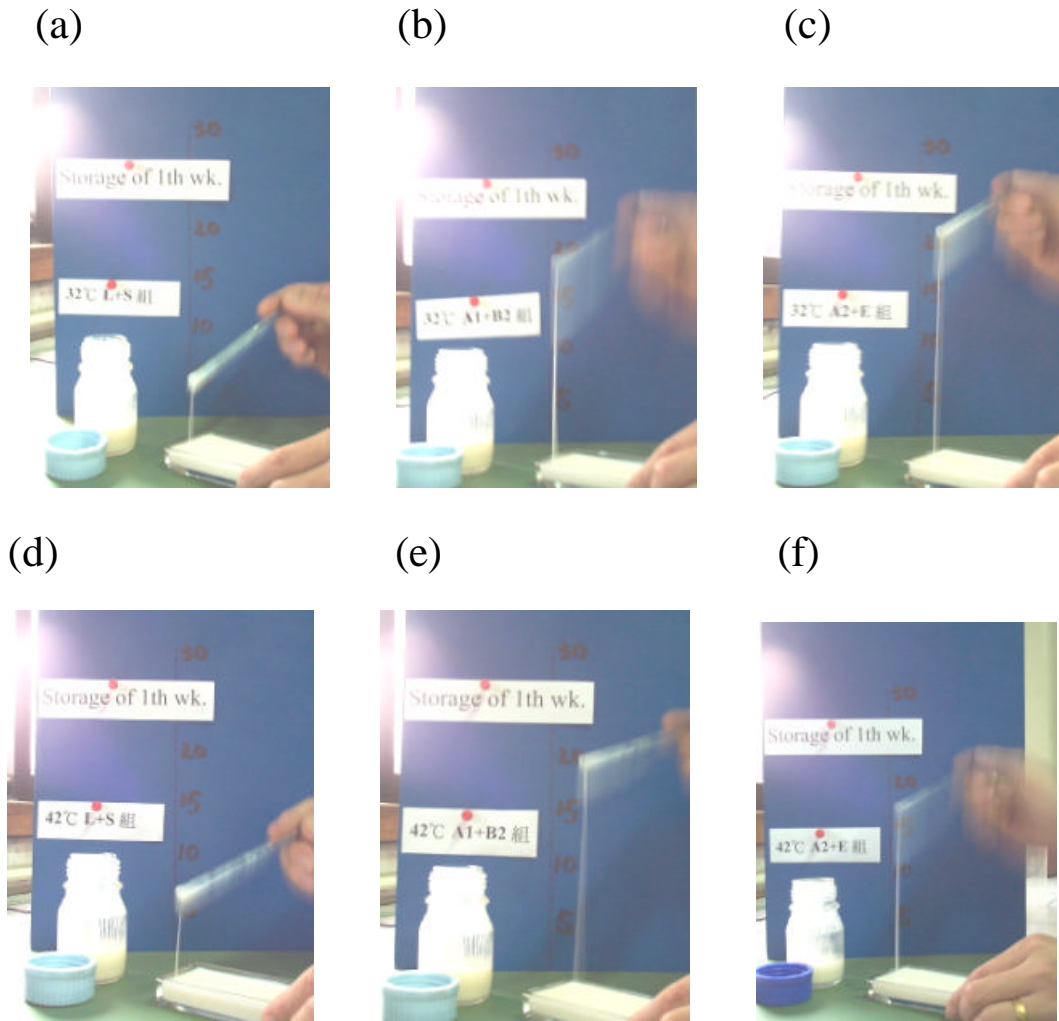
^{xyz} Means in the same column having different superscripts are significantly different (P<0.05).

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十三、接種產黏菌株以 32 和 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之黏絲性程度。

Fig. 13. The thread forming property of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 or A2+E culture incubated at 32 and 42 . (a)32 , L+S set; (b)32 , A1+B2 set; (c)32 , A2+E set; (d)42 , L+S set; (e)42 , A1+B2 set; (f)42 , A2+E set.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

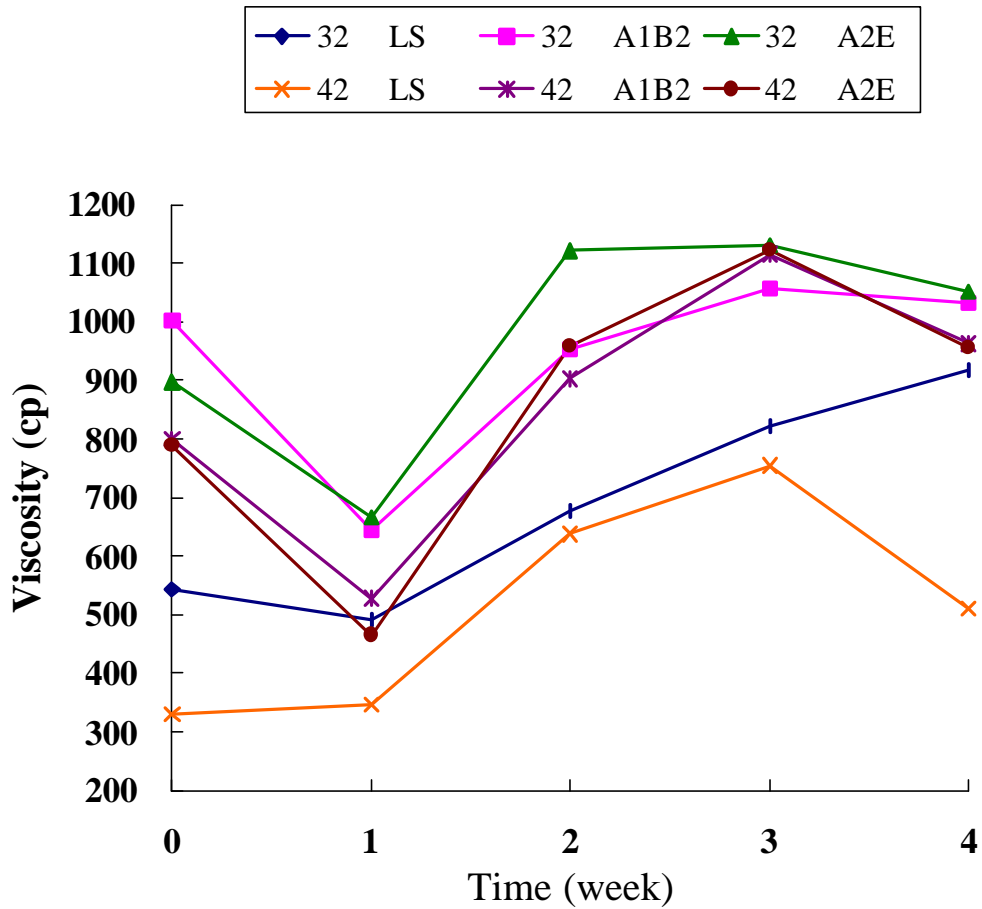
B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

(二)產黏菌株以 32 或 42 製備之酸酪乳於貯存四週期間之黏度變化如圖十四所示。除了 32 , L+S 組與 42 , L+S 組外，其餘各組之黏度於貯存一週後均明顯下降，但是於貯存兩週後又持續上升。貯存第三週之 32 , A2+E 組的黏度 1131 cp 最高 ($P < 0.05$)，第零週之 42 , L+S 組的黏度 330 cp 最低 ($P < 0.05$)。於貯存四週期間，產黏菌株組之黏度皆比 L+S 組者高，其中又以 32 者高於 42 者。Cerning *et al.* (1988) 表示，酸酪乳可能因糖類水解酵素的持續作用進而使得酸酪乳的黏度下降。Sebastiani and Zelger (1998) 指出，若酸酪乳黏度的增加乃受胞外多醣體之影響，則於 7 貯存一週後酸酪乳黏度下降的原因可能是糖類水解酵素的作用。

(三)產黏菌株以 32 或 42 製備之酸酪乳於貯存四週期間之乳清析出率變化如圖十五所示。第零週的乳清析出率以 32 之 A1+B2 組及 A2+E 組顯著低於其他各組 ($P < 0.05$)，其中以 32 之 A2+E 組的 43.0% 最低、42 之 L+S 組的 48.0% 最高。貯存四週期間，除了 32 , L+S 組外，其餘各組之乳清析出率隨著貯存週數而增加，且均以 32 者顯著低於 42 者 ($P < 0.05$)。42 組之乳清析出率高於 32 者可能是乳酸的快速生成所導致，同時乳清析出率隨貯存週數而增加，可能是貯存期間乳酸持續的生成破壞了酪蛋白網狀組織所造成。

(四)產黏菌株以 32 或 42 製備之酸酪乳於貯存四週期間之滴定酸度變化如圖十六所示。第零週之滴定酸度以 32 和 42 之 L+S 組顯著低於其他各組 ($P < 0.05$)，其中以 32 之 A1+B2 組的 0.896% 最高、42 之 L+S 組的 0.579% 最低。各組之滴定酸度隨著貯存週數而上升，而以第四週 32 之 A2+E 組的 1.028% 最高，且產黏菌株組高於傳統菌株組。

(五)產黏菌株以 32 或 42 製備之酸酪乳於貯存四週期間之乳酸菌數消長如圖十七所示。不論 32 或 42，第零週產黏菌株製備之酸酪乳各組的乳酸菌數皆顯著高於 L+S 組 ($P < 0.05$)，其中以 42 之 A1+B2 組的 9.17 log CFU/mL 最高，L+S 組的 8.15 log CFU/mL 最低。各組之乳酸菌數皆有隨著貯存週數而減少之趨勢，然而產黏菌株組仍高於傳統菌株組。



圖十四、接種產黏菌株以 32 和 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之黏度。

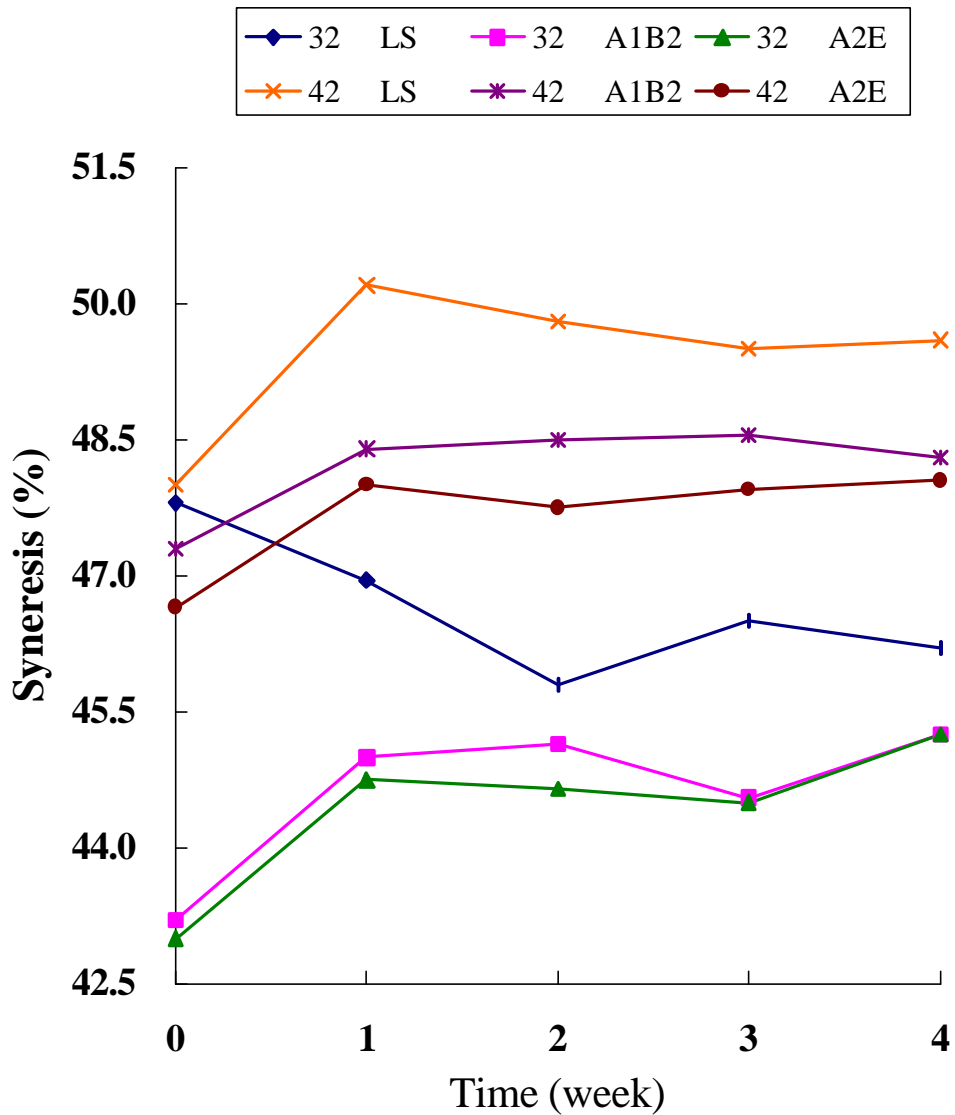
Fig. 14. The viscosity of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 or A2+E culture incubated at 32 and 42 during storage.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十五、接種產黏菌株以 32 和 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之乳清析出率。

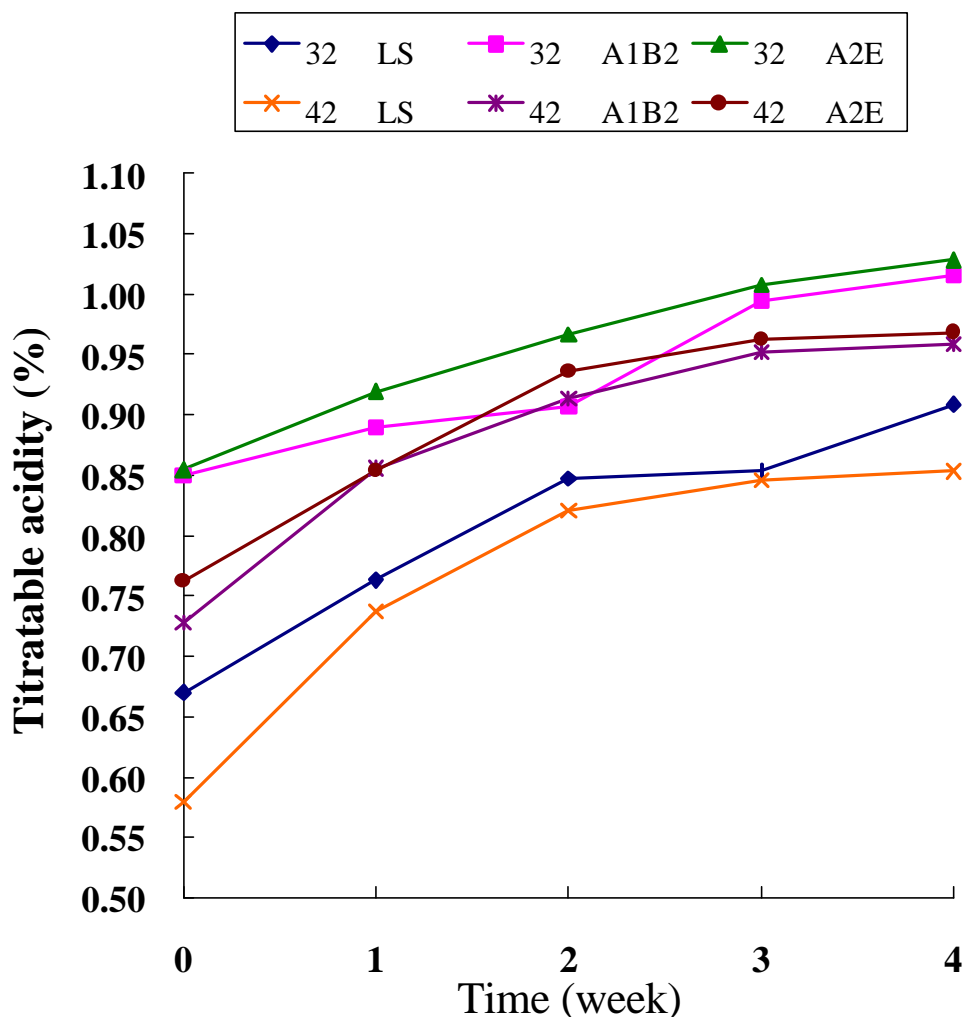
Fig. 15. The syneresis of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 or A2+E culture incubated at 32 and 42 during storage.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十六、接種產黏菌株以 32 或 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之滴定酸度。

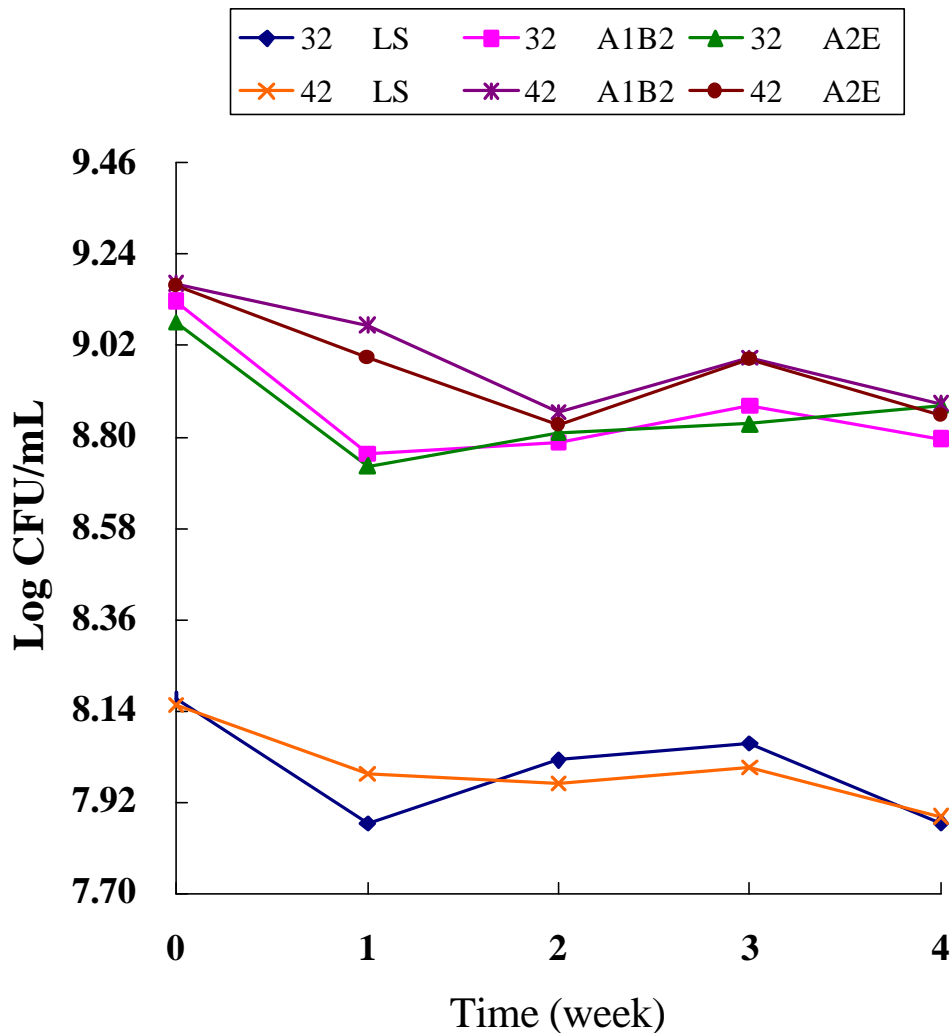
Fig. 16. The titratable acidity of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 and A2+E culture incubated at 32 or 42 during storage.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖十七、接種產黏菌株以 32 或 42 製備之 10% SNF 酸酪乳於貯存期間之乳酸菌數。

Fig. 17. The lactic acid bacterial counts of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 and A2+E culture incubated at 32 and 42 during storage.

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

試驗六、黏質酸酪乳與添加果膠之傳統酸酪乳比較

本試驗乃在探討於非生長最適溫度 32 製備之黏質酸酪乳與添加果膠之傳統酸酪乳之品質 添加 0.2-0.5% 果膠於 32 製備之 8-12% SNF 傳統酸酪乳 (L+S), 分析其黏絲性程度、黏度、乳清析出率及滴定酸度等與產黏菌株製備之酸酪乳作比較。

(一)黏絲性程度如表十一所示。不論是 8% , 10% 或 12% SNF 組 , 其黏絲性程度隨著果膠添加量的增加而增大 , 同時 , 隨著乳無脂固形物含量的增加而增大 , 但 10% 與 12% SNF 組之間並無明顯差異。

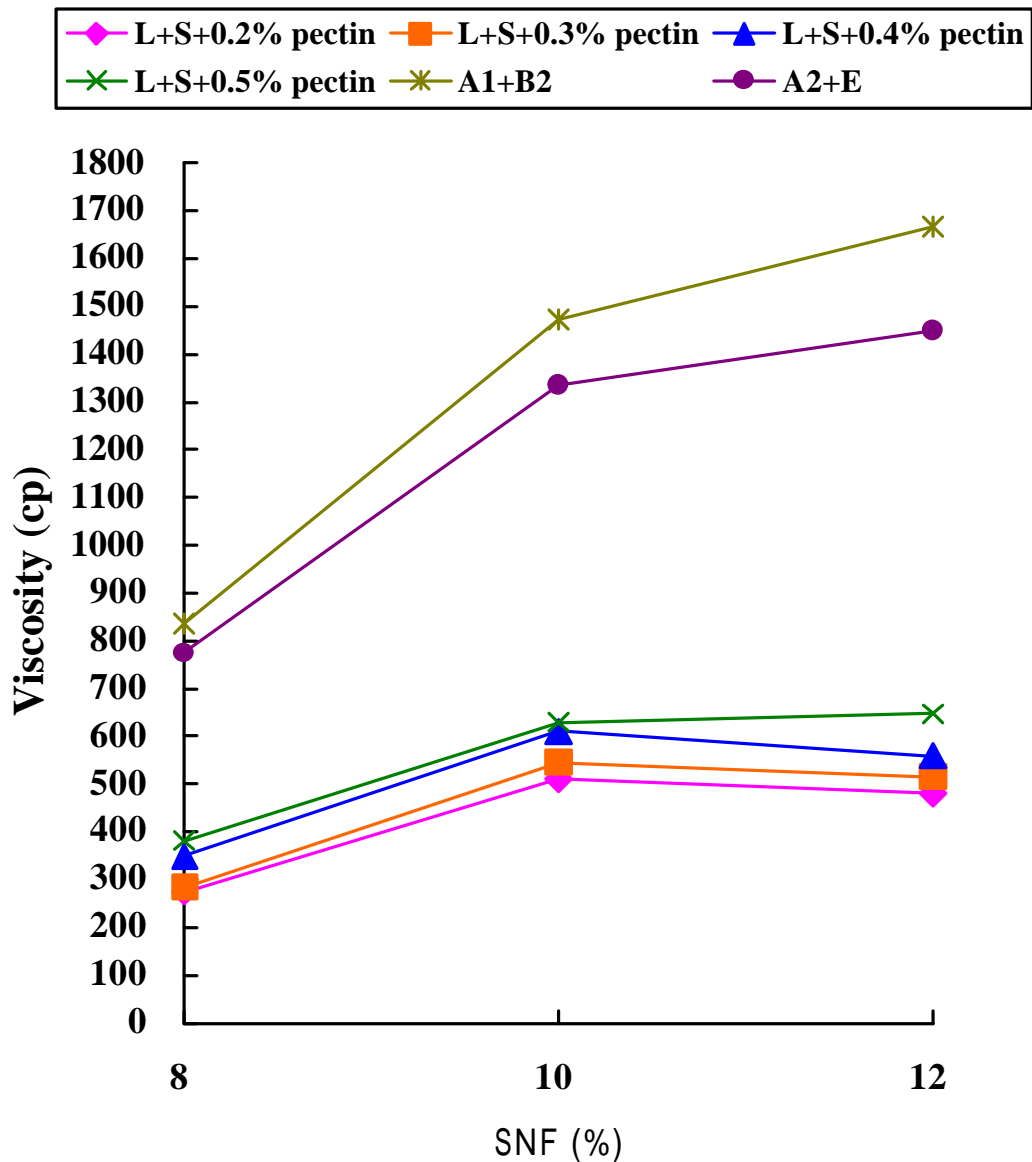
(二)黏度如圖十八所示。於 8% 和 10% SNF 中 , 添加果膠各組間無顯著差異 ; 而 12% SNF 中 , 添加 0.5% 果膠者之黏度顯著大於添加 0.2% 者 ($P < 0.05$), 但與添加 0.3% 及 0.4% 果膠者之間並無顯著差異。傳統酸酪乳黏度隨著果膠添加量的增加而提升 , 且隨著乳無脂固形物含量的增加而提升 , 但 10% 與 12% SNF 組之間無顯著差異 , 其中以 12% SNF 組之添加 0.5% 果膠者黏度 647 cp 最高 , 而 8% SNF 組之添加 0.2% 果膠者黏度 274 cp 最低 與 12% SNF 黏質酸酪乳比較時發現 , A1+B2 及 A2+E 組的黏度分別為 1667 cp 及 1448 cp , 仍顯著高於添加 0.5% 果膠之傳統酸酪乳 ($P < 0.05$)。 May (1992) 及 Ramaswamy and Basak (1992)指出 , 酸酪乳之黏度隨著乳無脂固形物含量或果膠添加量的增加而增加。

表十一、於 32 製備之添加果膠之 8-12% SNF 傳統酸酪乳
之黏絲性程度

Table 11. The macroscopic observation of the thread forming
property of 8-12% SNF yogurt containing pectin
incubated at 32

Pectin (%)	SNF (%)		
	8	10	12
0.2	+	++	++
0.3	++	+++	+++
0.4	+++	++++	++++
0.5	++++	+++++	+++++

+, ++, +++, +++++ Means the level of thread forming property.



圖十八、於 32 製備之黏質酸酪乳與添加果膠之 8-12% SNF 傳統酸酪乳之黏度。

Fig. 18. The viscosity of 8-12% SNF ropy yogurt and traditional yogurt containing pectin incubated at 32 .

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

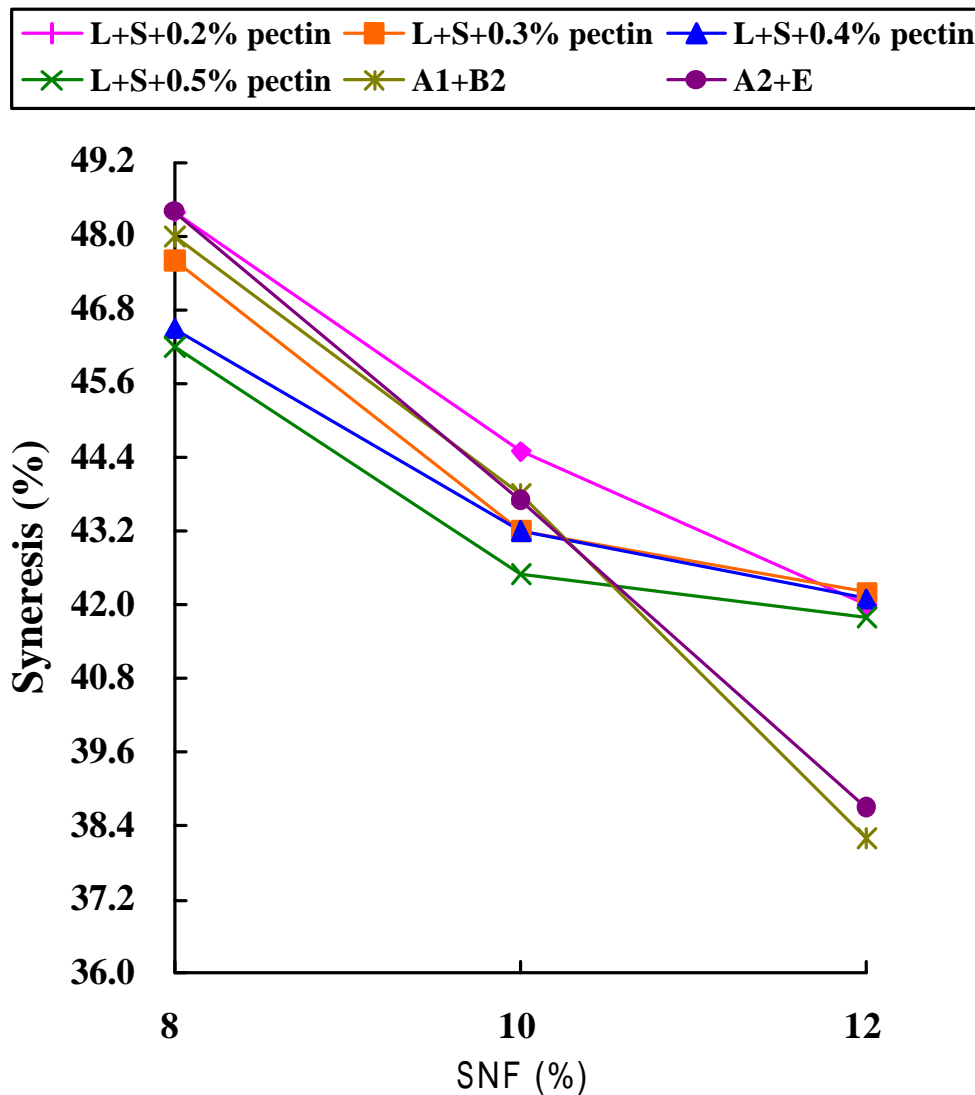
S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

(三)乳清析出率如圖十九所示。於 8% 及 10% SNF 中，添加 0.2% 果膠者與添加 0.3% 及 0.4% 果膠者之間無顯著差異，但顯著高於添加 0.5% 果膠者 ($P < 0.05$)；而 12% SNF 中，添加果膠各組間並無顯著差異。乳清析出率隨著果膠添加量的增加而減少，且隨著乳無脂固形物含量的增加而減少，而除了 10% SNF 之添加 0.2% 果膠者外，10% SNF 其他組與 12% SNF 組間無顯著差異，但顯著低於 8% SNF 各組 ($P < 0.05$)，其中又以 12% SNF 之添加 0.5% 果膠者乳清析出率 41.8% 最低，而 8% SNF 之添加 0.2% 果膠者乳清析出率 48.4% 最高。與 12% SNF 黏質酸酪乳比較，A1+B2 及 A2+E 組的乳清析出率分別為 38.2% 及 38.7%，仍顯著低於添加 0.5% 果膠之傳統酸酪乳 ($P < 0.05$)。Rolin (1993) 及 Schmidt and Bledsoe (1995) 指出，乳無脂固形物含量或果膠添加量愈高，酪蛋白網狀組織或果膠網狀結構可保持的水分子愈多。

(四)滴定酸度如圖二十所示。於 8%、10% 及 12% SNF 中，滴定酸度隨果膠添加量的增加而增高，並以添加 0.5% 果膠者顯著高於各組 ($P < 0.05$)；而於 12% SNF 中，滴定酸度雖隨果膠添加量的增加而增高，但各組彼此間並無顯著差異。與 12% SNF 黏質酸酪乳比較，A1+B2 及 A2+E 組的滴定酸度分別為 0.977% 及 0.991%，仍顯著高於添加 0.5% 果膠之傳統酸酪乳 ($P < 0.05$)。



圖十九、於 32 製備之黏質酸酪乳與添加果膠之 8-12% SNF 傳統酸酪乳之乳清析出率。

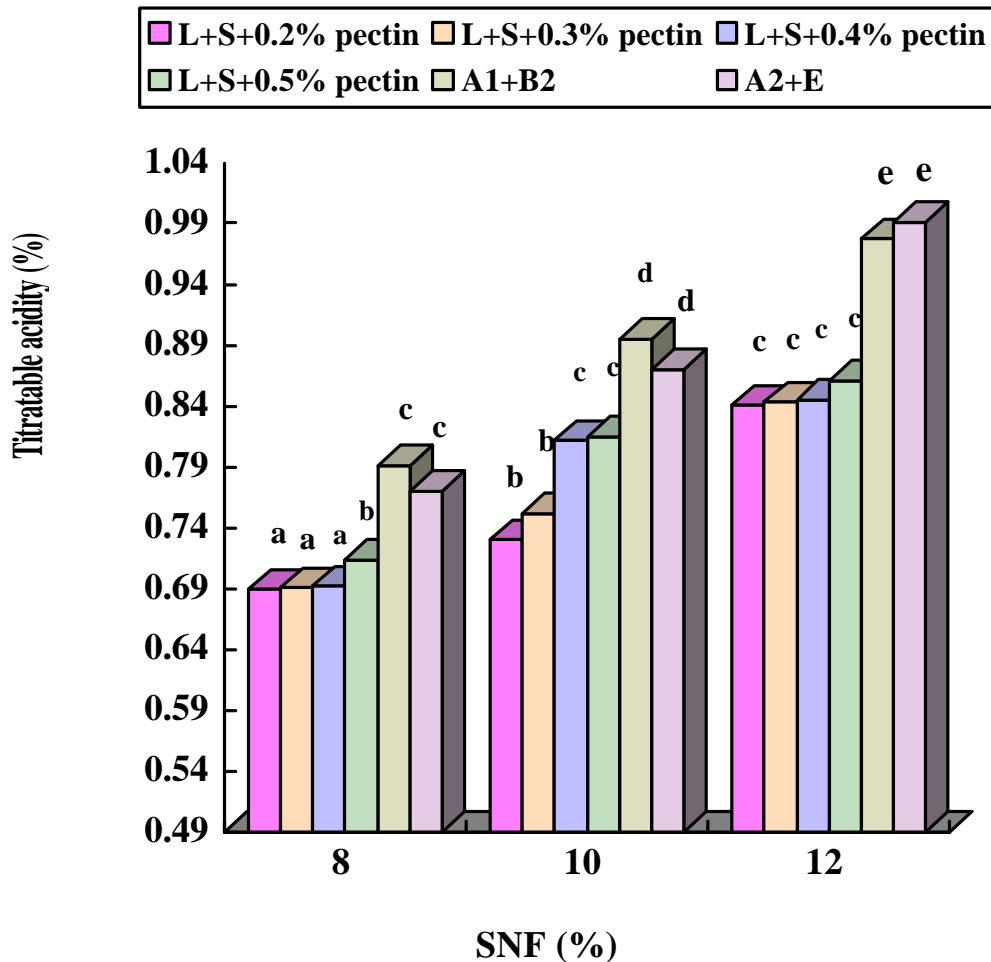
Fig. 19. The syneresis of 8-12% SNF ropy yogurt and traditional yogurt containing pectin incubated at 32 .

L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.

S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.

A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.

B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.



圖二十、於 32 製備之黏質酸酪乳與添加果膠之 8-12% SNF 傳統酸酪乳之滴定酸度。

Fig. 20. The titratable acidity of 8-12% SNF ropy yogurt and traditional yogurt containing pectin incubated at 32 .
 L: *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098.
 S: *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268.
 A1 and A2 slimy strain: *Streptococcus thermophilus*.
 B2 and E slimy strain: *Lactobacillus bulgaricus*.

陸、結論

1. 於 9% SNF 脫脂乳中添加 0.35% 酵母萃取物、0.35% 蛋白胨及 5% 乳糖之培養基，並於 32 經 16 小時培養可作為產黏乳酸菌株之篩選條件。
2. 篩選之產黏菌株 *Streptococcus thermophilus* A1, A2 和 *Lactobacillus bulgaricus* B2, E 製備的酸酪乳和傳統酸酪乳比較，具較高的黏絲性、黏度及乳酸菌數、較低的乳清析出率，除了乳酸菌數以 42 者高於 32 者外，其餘皆以 32 者較 42 者佳。
3. 篩選之產黏菌株所製備的酸酪乳和添加果膠之傳統酸酪乳比較，顯著具較高的黏度、較低的乳清析出率 ($P < 0.05$)。
4. 利用產黏菌株並採取 32 經 16 小時培養之醱酵條件，可顯著改善酸酪乳品質。

柒、參考文獻

- Andaloussi, S. A., H. Talbaoui, R. Marczak and R. Bonaly. 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 995-1000.
- Ariga, D., T. Urashima, E. Michihata, M. Ito, N. Morizono, T. Kimura and S. Takahashi. 1992. Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* OR 901 isolated from commercial yogurt. J. Food Sci. 57(3): 625-628.
- Beal, C., J. Skokanova, E. Latrille, N. Martin and G. Corrieu. 1999. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. J. Dairy Sci. 82(4): 673-681.
- Bouzar, F., J. Cerning and M. Desmazeaud. 1996. Exo-polysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. J. Dairy Sci. 79(2): 205-211.
- Bouzar, F., J. Cerning and M. Desmazeaud. 1997. Exo-polysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter culture in yogurt production. J. Dairy Sci. 80(10): 2310-2317.
- Bubb, W. A., T. Urashima, R. Fujiwara, T. Shinnai and H. Ariga. 1997. Structural characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. Carbohydr. Res. 301: 41-50.
- Cerning, J., C. Bouillanne, M. Landon and M. Desmazeaud. 1986. Isolation and characterization of extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Lett. 8(9): 625-628.

- Cerning, J., C. Bouillanne, M. Landon and M. Desmazeaud. 1988. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 10(4): 255-260.
- Cerning, J. 1990. Exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 113-130.
- 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(3): 692-699.
- Cerning, J., C. M. G. C. Renard, J. F. Thibault, C. Bouillanne, M. Landon, M. Desmazeaud and L. Topisirovic. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60(11): 3914-3919.
- Cerning, J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy and dairy propionibacteria. Lait 75: 463-472.
- Champagne, C. P., D. St-Gelais and A. de Candolle. 1998. Acidification rates and population ratios of lactic starters in carbonated milk. Lebensm. Wiss. u. Technol. 31(2): 100-106.
- Christiansen, P. S., A. I. M. R. Madeira and D. Edelsten. 1999. The use of ropy milk as stabilizer in the manufacture of ice cream. Milchwissenschaft 54(3): 138-140.
- Dave, R. I. and N. P. Shah. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. Int. Dairy J. 7: 31-41.
- De Vuyst, L., F. Vanderveken, S. Van and B. Degeest. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. J. Appl. Microbiol. 84: 1059-1068.

- De Vuyst, L. and B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharide from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- Doco, T., J. M. Wieruszeski and B. Fournet. 1990. Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.* 198: 313-321.
- Doco, T., D. Carcano, P. Ramos, A. Loones and B. Fournet. 1991. Rapid isolation and estimation of polysaccharide from fermented skim milk *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupled anion exchange and gel-permeation high-performance liquid chromatography. *J. Dairy Res.* 58: 147-150.
- Escalante, A., C. Wachter-Roderte, M. Garcia-Garibay and A. Farres. 1998. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 108-114.
- Gamar, L., K. Blondeau and J. M. 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. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *J. Dairy Sci.* 77(3): 685-688.
- Gancel, F. and G. Novel. 1994. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants *J. Dairy Sci.* 77(3): 689-695.
- Garcia-Garibay, M. and V. M. E. Marshall. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 325-328.

- Gassem, M. A., K. A. Schmidt and J. F. Frank. 1995. Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria. *Cult. Dairy Prod. J.* 30(3): 18-21.
- 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(1): 171-173.
- Gassem, M. A., K. A. Sims and J. F. Frank. 1997. Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR in a continuous fermentor. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 30(3): 273-278.
- Grobben, G. J., M. R. Smith, J. Sikkema and J. A. M. Bont. 1996. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharide 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.
- Grobben, G. J., W. H. M. van Casteren, H. A. Schols, A. Oosterveld, G. Sala, M. R. Smith, J. Sikkema and J. A. M. de Bont. 1997. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 516-521.
- Grobben, G. J., W. H. M. van Casteren, H. A. Schols, A. Oosterveld, G. Sala, M. R. Smith, J. Sikkema and J. A. M. 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.
- Grobben, 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.

- Hess, S. J., R. F. Roberts and G. R. Ziegler. 1997. Rheological property of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. *J. Dairy Sci.* 80: 252-263.
- 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(2): 659-664.
- Kitazawa, H., T. Yamaguchi, M. Miura, T. Saito and T. Itoh. 1993. B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, villi. *J. Dairy Sci.* 76: 1514-1519.
- Kitazawa, H., Y. Ishii, J. Uemura, Y. Kawai, T. Saito, T. Kaneko, K. Noda and T. Itoh. 2000. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiol.* 17: 109-118.
- Kojic, M., M. Vujcic, A. Banina, P. Cocconcelli, J. Cerning and L. Topisirovic. 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(12): 4086-4088.
- Kontusaari, S. and R. Forsen. 1988. Finnish fermented milk “villi”: Involvement of two cell surface proteins in production of slime by *Streptococcus lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* 71(12): 3197-3202.
- Lemoine, J., F. Vhirat, J. M. Wieruszkeski, G. Strecker, N. Favre and J. R. Neeser. 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3512-3518.
- Looijesteijn, P. J., I. C. Boels, M. Kleerebezem and J. Hugenholtz. 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 5003-5008.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6): 2147-2151.
- Macura, D. and P. M. Townsley. 1984. Scandinavian ropy milk-identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. *J. Dairy Sci.* 67(4): 735-744.
- Makela, P. M. 1992. Fermented sausage as a contamination source of ropy slime-producing lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 55: 48-51.
- Makela, P. M., H. J. Korkeala and J. J. Laine. 1992. Survival of ropy slime-producing lactic acid bacteria in heat processes used in the meat industry. *Meat Sci.* 31: 463-471.
- Manca de Nadra, M. C., A. M. Strasser de Saad, A. A. Pesce de Ruiz Holgado and G. Oliver. 1985. Extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft* 40: 409-411.
- Marshall, V. M., E. N. Cowie and R. S. Moreton. 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. 1997. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34: 137-143.
- May, C. D. 1992. 'Pectin' in Thickening and Gelling Agents for Food. Pp. 124-152. Edited by A. I. Chapman and G. Hall. Great Britain.
- Mozzi, F., G. Oliver, G. S. de Giori and G. F. de Valdez. 1994. Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft* 49: 667-670.

- Mozzi, F., G. Oliver, G. S. de Giori and G. F. de Valdez. 1995. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 50(2): 80-82.
- Mozzi, F., G. Oliver, G. S. de Giori and G. F. de Valdez. 1995. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I. Influence of salts. *Milchwissenschaft* 50: 186-188.
- Mozzi, F., G. Oliver, G. S. de Giori and G. F. de Valdez. 1995. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II. Influence of the carbon source. *Milchwissenschaft* 50(6): 307-309.
- Mozzi, F., G. S. de Giori, G. Oliver and G. F. de Valdez. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft* 51(12): 670-673.
- Nakajima, H. and S. Toyoda. 1990. A novel phosphopolysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *J. Dairy Sci.* 73(6): 1472-1477.
- Nakajima, H., Y. Suzuki, H. Kaizu and T. Hirota. 1992. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci.* 57(6): 1327-1329.
- Nilsson, R. and G. Nilsson. 1958. Studies concerning Swedish ropy milk. The antibiotic qualities of ropy milk. *Arch. Microbiol.* 31: 191-197.
- Oba, T., M. Higashimura, T. Iwasaki, A. M. Matser, P. A. M. Steeneken, G. W. Robijn and J. Sikkema. 1999. Viscoelastic properties of aqueous solutions of the phosphopolysaccharide "Viilian" from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT0495. *Carbohydr. Polymers* 39: 275-281.
- Ophir, T. and D. L. Gutnick. 1994. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(2): 740-745.

- Perry, D. B., D. J. McMahon and C. Oberg. 1997. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 80(5): 799-805.
- Racine, M., J. Dumont, C. P. Champagne and A. Morin. 1991. Production and characterization of the polysaccharide from *Propionibacterium acidi-propionici* on whey-based medium. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 233-238.
- Ramaswamy, H. S. and S. Basak. 1992. Pectin and raspberry concentrate effects on the rheology of stirred commercial yogurt. *J. Food Sci.* 57(2): 357-360.
- Rawson, H. L. and V. M. Marshall. 1997. Effect of “ropy” strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on the rheology of stirred yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32: 213-220.
- Rhom, H. and A. Kovac. 1994. Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yoghurt gels. *J. Text. Stud.* 25: 311-329.
- Robijn, G. W., D. J. C. van den Berg, H. Haas, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegthart. 1995. Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* O-1. *Carbohydr. Res.* 276: 117-136.
- Robijn, G. W., J. R. Thomas, H. Haas, D. J. C. van den Berg, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegthart. 1995. The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Carbohydr. Res.* 276: 137-154.
- Robijn, G. W., H. L. J. Wienk, D. J. C. van den Berg, H. Haas, J. P. Kamerling and J. F. G. Vliegthart. 1996. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydr. Res.* 285: 129-139.
- Rolin, C. 1993. ‘Pectin’ in *Industrial Gums*. pp. 257-288. Edited by R. L. Whistler and N. Bemiller. Harcourt Brace Jovanovich, New York.

- Roller, S. and I. C. M. Dea. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. Crit. Rev. Biotechnol. 12: 261-277.
- Schellhaass, S. M. and H. A. Morris. 1985. Rheology and scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and nonropy strains of lactic acid bacteria. Food Microstruct. 4: 279-287.
- Schmidt, K. and K. Bledsoe. 1995. Effect of homogenization pressure on physical and sensory characteristics of low fat yogurt. Cult. Dairy Prod. J. 30(4): 7-10.
- Sebastiani, H. and G. Zelger. 1998. Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. Milchwissenschaft 53(1): 15-20.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Tibtech. 16: 41-46.
- Teggatz, J. A. and H. A. Morris. 1990. Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shear. Food Struct. 9: 133-138.
- Toba, T., H. Nakajima, A. Tobitani and S. Adachi. 1990. Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. Int. J. Food Microbiol. 11: 313-320.
- Torino, M. I., F. Mozzi, F. Sesma and G. F. de Valdez. 2000. Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. Milchwissenschaft 55(4): 204-206.
- Uemura, J., T. Itoh, T. Kaneko and K. Noda. 1998. Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1. Milchwissenschaft 53(8): 443-446.

- Van den Berg, D. J. C., A. Smits, B. Pot, A. M. Ledebøer, K. Kersters, J. M. A. Verbakel and C. T. Verrips. 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.* 7(3): 189-203.
- Van den Berg, D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, A. M. Ledebøer 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(8): 2840-2844.
- Van Kranenburg, R., I. C. Boels, M. Kleerebezem and W. M. Vos. 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 498-504.
- Wacher-Rodarte, C., M. V. Galnan, A. Farres, F. Gallardo, V. M. E. Marshall and M. Garcia-Garibay. 1993. Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *J Dairy Res.* 60: 247-254.
- Yamamoto, Y., S. Murosaki, R. Yamauchi, K. Kato and Y. Sone. 1994. Structural study on an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.* 261: 67-78.
- Yokoi, H., T. Watanabe and Y. Fujii. 1990. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *J. Dairy Sci.* 73(7): 1684-1689.

捌、英文摘要

Selecting Slime-producing Lactic Acid Bacteria for Improving the Quality of Yogurt

Jun-You Chien

Abstract

The study was conducted to select slime-producing lactic acid bacteria for manufacturing ropy yogurt, in order to replace the addition of pectin in the traditional yogurt, and to save the cost of production and improve the quality of yogurt.

Ten strains of commercial lactic acid bacteria, five modified media (MEPS-1, MEPS-2, MEPS-3, MRS plus broth and Elliker broth), four incubation temperatures (27, 32, 37 and 42 °C) and three incubation times (8, 16 and 24 hours) were used in the experiments. The results showed that the thread forming property of MEPS-2 medium (9% SNF skimmilk containing 0.35% yeast extract, 0.35% peptone and 5% lactose) under 32 °C at 16 hours was significantly higher than other treatment combinations ($P < 0.05$), so using it as the selective conditions.

Twelve commercial fermented dairy products were collected and then the above selective conditions were used to select the slime-producing lactic acid bacteria. It was found that five products named , , , and , had the thread forming property. After a series of isolation procedures, four slime-producing strains named A1, A2, B2 and E were purified. A1 and A2 were identified as *Streptococcus thermophilus*, and B2 and E were identified as *Lactobacillus bulgaricus*.

According to the combination of rod and coccus to match A1, A2, B2 and E. The change of qualities during four-weeks storage of 10% SNF yogurt made with L+S, A1+B2 or A2+E

culture incubated at 32 °C and 42 °C was determined. The results showed that, the thread forming property, viscosity, syneresis and lactic acid bacterial counts of A1+B2 and A2+E sets were significantly better than L+S set when incubating at 32 °C or 42 °C ($P<0.05$), and 32 °C group was better than 42 °C group. The sensory evaluation results of ropy and traditional yogurt showed that, A1+B2 and A2+E sets had lower syneresis, higher viscosity, smoother texture and higher overall acceptability.

Evaluating the qualities of 12% SNF yogurt made with *Lactobacillus bulgaricus* CCRC 14098 (L) + *Streptococcus thermophilus* CCRC 12268 (S), L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2 and L+S+E culture incubated at 27, 32, 37 and 42 °C. The results showed that, the thread forming property, viscosity and syneresis of L+S+A1, L+S+A2, L+S+B2 and L+S+E sets were significantly better than L+S set ($P<0.05$), and 32 °C group was significantly better than others ($P<0.05$).

Comparing the qualities of ropy yogurt and traditional yogurt containing pectin. It was found that, the thread forming property and viscosity of traditional yogurt were significantly increased with the amount of SNF and pectin increased ($P<0.05$), and the syneresis was significantly decreased with the amount of SNF and pectin increased ($P<0.05$). In addition, the thread forming property, viscosity and syneresis of ropy yogurt were still significantly better than the traditional yogurt containing 0.5% pectin ($P<0.05$).

玖、作者小傳

作者簡君祐，台灣省南投縣人，民國 65 年 4 月 3 日生。先後畢業於台中市和平國小、台中市崇倫國中、台中縣立人高中。民國 83 年考取東海大學畜產系、民國 87 年畢業獲東海大學農學士學位，並於同年考取東海大學畜產學研究所加工組，追隨恩師 洪連欉 副教授從事發酵乳製品之研究。承蒙恩師兩年來的悉心指導與鼓勵，方可於民國 89 年順利完成此論文。

拾、發表著作

1. Chien, J. Y., L. T. Hung and C. H. Shih. 1999. The study on the selective condition of slime-producing lactic acid bacteria. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 28 (Suppl.): 224.
2. Lin, W. Y., J. Y. Chien, L. T. Hung and H. S. Chang. 1999. Effect of threonine on the goat milk yogurt containing soymilk. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 28 (Suppl.): 225.

拾壹、獲頒獎項

- 1.中國畜牧學會八十八年度壁報論文比賽論文新人獎。