

【2021 全國科學探究競賽-這樣教我就懂】

高中 (職) 組成果報告表單

題目名稱：窺看野生酵母菌的能力

一、摘要：

蘋果、開水、酵母助長劑(糖、蜂蜜)，比例為 1:2:0.07 之發酵液中發現確實有酵母菌增值之情況，培養 4 天(30°C)後酵母菌數量蘋果發酵液(添加糖)增殖 35.8 倍、蘋果發酵液(添加蜂蜜) 增殖 185 倍、蘋果發酵液增殖 25.6 倍。即發酵母粉每克有 8.8×10^{11} 細胞數，製作圓頂奶油土司所需的酵母量因而換算成 <30°C 發酵 3 天新鮮蘋果發酵液(添加蜂蜜)，30°C、培養 4 天生菌數達 $10^6 \sim 10^9$ cfu/ml，此數據已有安全衛生之疑慮。

蘋果發酵液的 pH 值培養 7 天，測得數值為 3-5 間；至於濁度(A_{600})隨著酵母菌數增加而增加，但線性關係不佳；酵液培養 5 天時酵母菌量相當製作 3 條奶油吐司，所以此酵液代替麵包水量直接製作麵包，結果無膨脹性，試驗發酵 8 天的酵液代替酵母粉，吐司產品膨脹性有提升，但沒有酵母粉之膨脹效果。改添加發酵 10 天酵液，吐司產品膨脹性沒有增加。

二、探究題目與動機

九月開始我們的新課程---烘焙食品加工實習，甜麵包、吐司、歐式麵包等製作都需要酵母菌，在課堂上老師說過酵母是用來讓麵包發酵，所以在製作麵包或是饅頭包子類的食品時一定需要加入酵母。

許多課堂上老師總不怨其煩的叮嚀，對於酵母菌要呵護，在製做麵包的時候絕對不要把鹽巴跟酵母菌放在一起，因為酵母很怕鹽巴，如果放在一起的話會全部都死光，所以在製作麵包時加酵母粉需埋在麵粉裡，而鹽巴需要放在離酵母遠一點的地方。

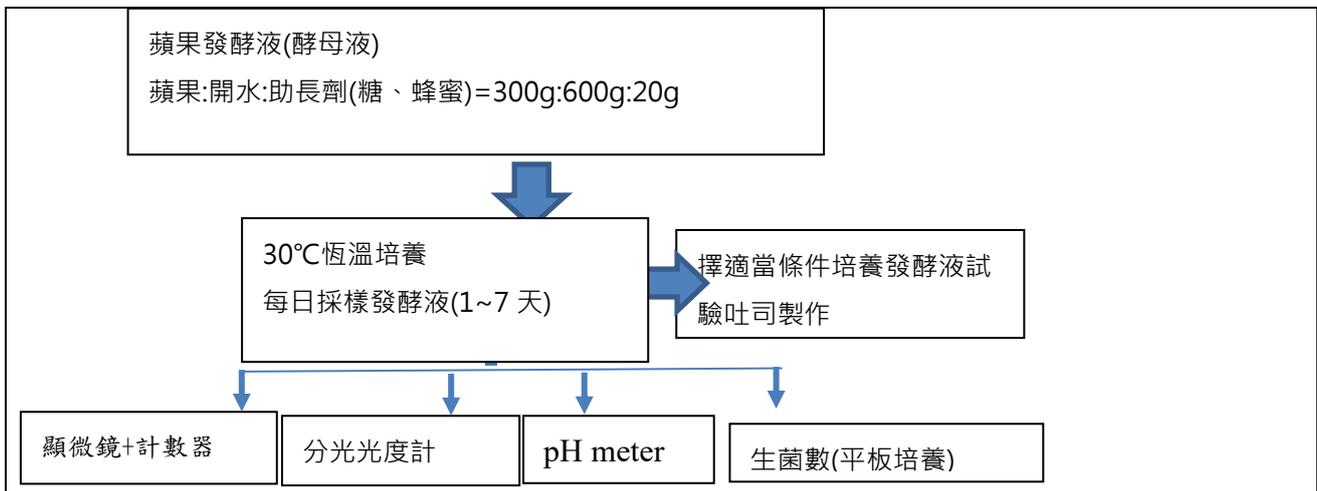
它罷工我們就沒有美味的麵包，這讓我們覺得誰是酵母菌啊!所以才想用顯微鏡看看它的廬山真面目，也有個動力去網上查了一下他是何方神聖?

查資料時發現一堆養酵母的資料，覺得很酷!沒有酵母粉也能做麵包，這就是研究新鮮酵母之契機，有養過酵母的師長覺得這很難，照網路上的方式養，又不知長得好不好?有沒有雜菌造成衛生安全之問題?所以覺得既然顯微鏡看的到?我們就來數一數新鮮酵母液酵母菌量，我們認為用數量一樣的細胞數製麵包，發酵力才夠膨脹麵包。

三、探究目的與假設

網路上記載著，沒有即時酵母也能夠製作麵包，所以我們認為可以先培養新鮮酵母液，利用自製的天然新鮮酵母取代日常普遍使用的即時酵母，用更天然的方式去製作大眾食用的麵包。

探究流程設計:



四、探究方法與驗證步驟

一、材料與器具

新鮮酵母液	蘋果、開水、糖、蜂蜜、恆溫箱
細胞數計數	顯微鏡、血球氣數器、無菌水
生菌數	生理食鹽水、培養基、micropipette、無菌操作台、
濁度	分光光度計
pH 值	pH meter、校正液、洗滌瓶
麵包製作與物性測定	攪拌機、發酵箱、烤箱、物性儀

各試驗過程紀錄

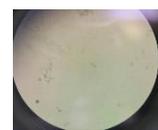
(一) 新鮮酵母培養

- 1、 發酵玻璃瓶水煮滅菌
- 2、 蘋果去蒂與種子，不削皮，切塊(每塊約 1~2 克)
- 3、 混合蘋果、開水、酵母助長劑(糖、蜂蜜)，比例為 1:2:0.07 保鮮膜封口，滅菌牙籤紮小洞、30°C恆溫箱培養



(二) 酵母菌計數

1. 準備無菌水(9ml/管)約 100 支
2. 蘋果發酵液樣品有蘋果+水、糖+蘋果+水、蜂蜜+蘋果+水
3. 各取發酵液 1ml 加入 9ml 的無菌水,充分混和均勻，為稀釋 10^{-1} 倍檢液，
4. 以此類推稀釋到酵母菌適合的量
5. 把稀釋後的酵母液取樣滴在血球計算盤上的小凹槽,蓋上蓋玻片,以顯微鏡觀察(10×40 倍)。
6. 計數中間及四角共五個區域之酵母菌細胞數(算平均數)
7. 即發酵母菌粉連續稀釋後，觀察細胞數，擇稀釋後每格細胞數為 2-5，計數每克酵母粉所含有之細胞數。



$$\text{酵母菌數/ml} = \text{平均每格酵母數量} \times \text{稀釋倍數} \times 4000000$$

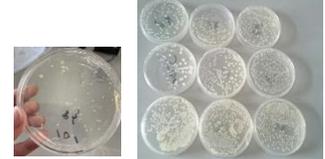
$$4000000=1 \times 1000 / (0.05 \times 0.05 \times 0.1)$$

(二) PH 值測定

1. pH 計打開電源溫機，以 RO 水洗滌玻璃電極，吸水紙擦拭多餘水
2. 校正:分別以 pH 7、pH4 緩衝溶液校正 1 次(中間需洗滌與拭乾)
3. 檢測 3 種發酵液 pH 值 (每次測完後以 RO 水沖洗玻璃電極在用衛生紙擦乾)
4. 連續 1 週檢測

(三) 生菌數檢測

1. 配製生理食鹽水與殺菌約 100 支(9ml/支)
2. 配製培養基後以殺菌釜滅菌，滅菌後趁熱於無菌操作台分倒平面培養基，冷卻後蓋好二重皿，冷藏備用。
2. 取發酵液 1ml，放入 9ml 生理食鹽水中充分混合成為 10^{-1} 倍，以此類推至 10^{-8} 倍
4. 取適當倍數稀釋液 0.1ml 塗抹於培養基平面(二重複)
5. 37°C 恆溫 24 小時；計算菌數； 連續 1 週檢測



(四) 濁度分析

1. 熱機、設定波長為 600nm
2. 以蒸餾水校正，吸光值校正成零
3. 試樣槽(cell)以檢測發酵液淋洗，外圍不能有雜物(需要時已拭鏡紙擦拭)，紀錄機器螢幕上各蘋果發酵液之 A_{600} ， 連續 1 週檢測



(五) 新鮮酵母液製作吐司試驗

1. 實驗組以發酵之新鮮酵母液製作吐司/對照組以即發酵母製作吐司
2. 麵包配方:

材料	量(克)	材料	量(克)
高筋麵粉	922	蛋	55
砂糖	92	水	534
奶粉	37	酵母	9
食鹽	14	蘋果發酵液*	538
改良劑	9		

對照組

實驗組

*培養 4 天的酵液細胞數 $1.52 \times 10^{10} / \text{ML}$

蘋果發酵液: $(9 \times 880000000000) / 1.52 \times 10^{10} = 538$ 毫升

3. 材料攪拌到完全階段；基本發酵 27°C 發酵 1 小時
4. 分割 560 克/個、滾圓、整形；最後發酵 38°C 發酵至 8 分滿、烘烤

(六) 探討麵包製造成效: 1. 人為評論 2. 物性儀分析

五、結論與生活應用

研究結果數據整理:

1. 酵母菌計數

表 1、血球計數器測定是售酵母粉每克量中酵母菌細胞數

稀釋倍數	區域 1	區域 2	區域 3	區域 4	區域 5	數量平均
1×10^{-2}	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	2.2
1×10^{-3}	78	83	76	89	80	
1×10^{-4}	8	6	7	6	13	
1×10^{-5}	1	4	2	2	2	
1×10^{-6}	2	1	2	1	2	
1×10^{-7}	1	0	0	0	0	

每克酵母菌量 = $2.2 \times 10^5 \times 4000000 = 880000000000$ (細胞數/ml)

表 2、發酵液中新鮮酵母菌生長數量觀測紀錄

發酵條件	日期	天數	區域					稀釋倍數	平均 酵母菌量	*4000000
			1	2	3	4	5			酵母菌數
蘋果發酵液(添加糖)	1月4日	0	3	2	2	3	2	1×10^0	24	96000000
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		2	3	4	1	4	1×10^0	28	112000000	
蘋果發酵液		1	2	1	2	3	1×10^0	18	72000000	
蘋果發酵液(添加糖)	1月5日	1	24	21	16	8	22	1×10^0	182	728000000
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		13	16	20	26	25	1×10^0	200	800000000	
蘋果發酵液		6	10	2	15	30	1×10^0	126	504000000	
蘋果發酵液(添加糖)	1月6日	2	2	5	4	8	11	1×10^0	600	2400000000
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		10	12	14	16	15	1×10^0	1340	5360000000	
蘋果發酵液		5	6	7	6	2	1×10^0	520	2080000000	
蘋果發酵液(添加糖)	1月7日	3	5	8	5	9	11	1×10^0	76	304000000
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		3	2	4	5	2	1×10^0	32	128000000	
蘋果發酵液		3	0	3	2	1	1×10^0	18	72000000	
蘋果發酵液(添加糖)	1月8日	4	10	7	8	8	10	1×10^0	860	3440000000
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		4	1	4	10	7	1×10^0	5200	20800000000	
蘋果發酵液		4	6	3	4	6	1×10^0	460	1840000000	
蘋果發酵液(添加糖)	1月11日	7	8	2	1	4	5	1×10^0	40000000	$1.6E+14$
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		6	8	3	17	25	1×10^0	11800000	$4.72E+16$	
蘋果發酵液		6	3	5	7	9	1×10^0	600	2400000000	

2. 蘋果酵母液發酵期間生菌數變化

表 3、計算生菌數(採計 25-250 cfu)

天數	蘋果發酵液		蘋果發酵液 (添加糖)		蘋果發酵液 (添加蜂蜜)		稀釋倍數
	8	12	32	24	28	3	
0	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	10^1
	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	10^2
1	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	10^3
	358	742	328	367	697	900	10^5
2	18	19	56	32	276	251	10^6
	119	115	794	TNTC	312	368	10^6
3	19	11	465	477	55	76	10^7
	184	180	368	TNTC	25	30	10^7
4	64	45	65	87	10	21	10^8

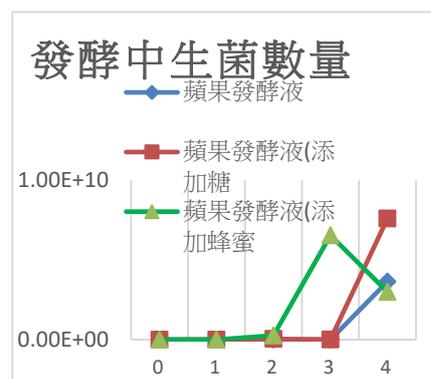


圖 1 發酵中生菌數變化

3. 追蹤發酵液濁度、pH 值變化

表 4、發酵期間 pH 與吸光值之檢測紀錄

發酵材料	天數	pH	A ₆₀₀
蘋果發酵液(添加糖)	0	3.66	0.04
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		3.64	0.089
蘋果發酵液		3.6	0.029
蘋果發酵液(添加糖)	1	4.95	0.204
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		5.08	0.282
蘋果發酵液		5.2	0.131
蘋果發酵液(添加糖)	2	3.7	0.413
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		4.73	0.47
蘋果發酵液		4.78	0.323
蘋果發酵液(添加糖)	3	4.09	0.348
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		4.17	0.469
蘋果發酵液		4.14	0.327
蘋果發酵液(添加糖)	4	4.87	0.376
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		4.94	0.509
蘋果發酵液		4.92	0.371
蘋果發酵液(添加糖)	7	4.45	0.542
蘋果發酵液(添加蜂蜜)		4.36	1.112
蘋果發酵液		4.18	0.538

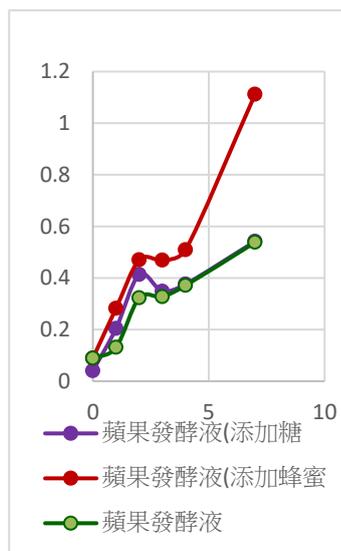


圖 2、發酵期間各種酵液濁度變化

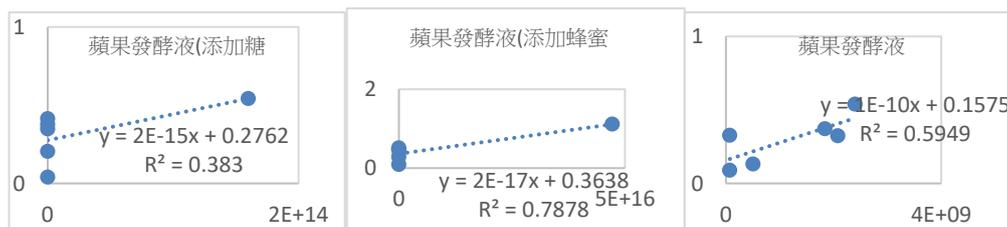


圖 3、發酵期間各種酵液濁度變化與酵母菌增殖數量之相關性

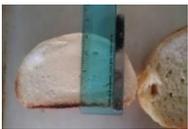
4 各種麵包製作所需酵母菌量

表 5、計算製作麵包時需要之酵母菌數量

麵包種類	數量	酵母粉用量 g	酵母菌量
奶油圓頂吐司	3	9	8170000000000

5.製作麵包成效紀錄

表 6、即發酵母粉與發酵液發酵麵包麵團之膨脹性紀錄

發酵 5 天酵液			4.1CM/發 酵 4.3 成	
	9.5CM/(即發酵母)		麵包的無法發酵，烘烤後麵團沒有蓬鬆的感覺反而有種烤不熟的現象，發酵 2 小時左右，呈現非常扎实的質地，影響烘烤	

發酵 8 天酵液		6.4CM/發酵 6.7 成 	
麵包的發酵力弱，基本發酵翻面 3 次，發酵約 6 小時，發酵高度無法達即發酵母之程度，烘烤後麵團有膨脹，內部多孔洞，不夠蓬鬆。			
發 酵 10 天 酵液		4.8CM/發酵 5 成 	
麵包的發酵力弱，基本發酵翻面 3 次，發酵約 7 小時，發酵高度無法達即發酵母之程度，烘烤後麵團稍有膨脹，內部孔洞變少，質地變紮實，麵包體高度下降。			

6、結論

酵液中酵母菌從表 2 發現 1~4 天，不管哪種酵液，呈現一種消長的循環，添加蜂蜜的第四天增殖較高，比起沒添加營養劑的酵液增加 11 倍之數量；比起添加糖的酵液增加 6 倍之數量(表 2)。培養酵液時因為遇到假日，隔週一繼續計數時，添加糖與蜂蜜之酵液在培養滿七天後酵母菌數是大增殖的狀況，與第四天比較，沒添加營養劑的酵液只增殖 1.3 倍之數量；添加糖的酵液增加 46511.6 倍；添加蜂蜜的酵液增加 2269230.8 倍

發酵液中生菌數變化，從表 3 大致可發現發酵 4 天後生菌數均達 10^9 cfu。食品安全上攝食 $10^6 \sim 10^9$ cfu 致病生菌有可能造成食品中毒。雖然不知發酵液中是不是致病菌，但生菌數很高，有食品安全疑慮，所以製作麵包之酵液為 4 天，但 4 天的發酵液酵母菌數太少，無法換算成製作吐司需要量，製作吐司試驗時用 5 天發酵之酵液。

不管如何從圖 6 發現 pH 值介於 3-5 都屬於酸性。發酵液之 pH 為酸性，雜菌不易滋長，其實發酵液培養 10 天仍很香，沒腐敗之味道，有很濃之酒精味。

發酵液隨著發酵天數增加， A_{600} 也隨之增加，從圖 5 發現 R^2 都很小(<0.9)，參考意義因而比較打則扣，雖然線性回歸不佳(表 4、圖 3)，若要以 A_{600} 測得相當吸光值代替血球計數，表示酵母菌量。亦可再試驗其他波長之吸光值尋找最適合代替酵母菌量之濁度。

利用表 1、表 5 數據計算出，製作奶油圓頂吐司時需要之酵母菌的數量為 8.17×10^{12} 。培養 4 天的酵液每毫升細胞數達 1.52×10^{10} ，換算成製作圓頂吐司需要之酵母菌量為 538 毫升，麵包配方中 9 克之即發酵母由 538 毫升蘋果發酵液(發酵 5 天)代替製作吐司，製得之吐司並沒膨脹，質地很緊實，烘烤時麵團太緊實，無法受熱均勻，色白，表面不著色。推測自己培養之酵母發酵力差，改用發酵 8 天的酵液(天數 >7 日)，利用酵母菌大量增殖，增加發酵力，以同樣酵液量添加製作吐司，是有膨脹力，孔洞很多，但吐司高度仍不足，發酵 6.7 成，表面著色，表皮外層皮厚，發酵時間很耗時為 6 小時。所以在試用發酵 10 天之酵液製作吐司，發酵只有 5 成，膨脹效果差於發酵 8 天之酵液(表 6)。

本來想試用如何直接添加發酵液製作麵包(簡單化操作)，雖然同樣酵母量，但品種不同，嚴重影響發酵力，所以網路上許多新鮮發酵液製好後，得很辛苦再將酵液，培養成酵種，才夠有發酵力製作麵包。其實即發酵母粉乾燥有 4-15% 酵母會死滅，這些酵母雖然死了殘留在酵母粉中，當用於製作麵包時，這些細胞會溶出胺基酸、酵素等有提升製作麵包之效能，所以新鮮酵母液若能濃縮其酵母成粉末狀，應該可提升發酵膨脹性，且培養時間不用太長亦可維持食品安全性。

參考資料

- 1.黃明利、黃文哲(2001)。應用微生物實習。台北市:精華出版社
- 2.楊美桂(2006)。普通微生物學實驗。新北市:藝軒圖書出版社
- 3.竹谷光司(2016)。麵包科學。台北市:大境文化
- 4.馬宗能、林宏宗(2015)。食品化學與分析實習 I:實習 14。台南市:復文圖書