



# **Food Microbiology**

## **Fermentation & Fermented Dairy Products**

**Prof. Guo-Jane Tsai, Ph,D**



## 乳酸菌共同特性：

**G(+)**，發酵六碳糖產生大量乳酸，缺ETS (electron transport system) 及cytochrome，不進行TCA cycle，能量由substrate-level phosphorylation而得，營養需求嚴苛，常需Vit B，preformed amino acid，purine & pyrimidine bases。proteolytic & lipolytic。

## 同型發酵 (homofermentation) : homolactics

1 葡萄糖代謝  $\Rightarrow$  2 乳酸(為唯一產物)+ 2ATP

- Some produce acetic and lactic acids when utilizing pentose
- Homolactics produce twice amount of energy from a given amount of glucose as are the heterolactics

## 異型發酵 (heterofermentation) : heterolactics

1 葡萄糖代謝  $\Rightarrow$  1 乳酸+ CO<sub>2</sub>+ EtOH + acetate... 等+ 1 ATP

- *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Lactococcus* , *Vagococcus* ,  
及部份 *Lactobacillus*  $\Rightarrow$  homofermentation 。
- *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Weissella* , *Carnobacterium* ,  
*Lactosphaera* 及部份 *Lactobacillus*  $\Rightarrow$  hetero-fermentation 。
- 同型發酵行EMP代謝，異型則利用phosphoketolase行pentose pathway 。

# § Dairy Products

鮮乳微生物分佈

**Raw milk** : Predominant flora , G(+) , *Enterococcus* ,

*lactic bacteria* , *microbacterium* , *Micrococcus* 。 常含有產  
孢細菌 *Bacillus* , *Clostridium* 。

**Pasteurized milk** : thermoduric bact. 如 *streptococci* ,

*lactobacilli* , *spore formers* ( *Bacillus* , *Clostridium* ) 。

**Related Disease** : *salmonellosis* , *campylobacteriosis* ,

*listerosis* , *hemorrhagic colitis* 。

***Mycobacterium paratuberculosis*** : 造成人類 *Crohn's disease*  
(克隆氏病, 局部迴腸炎) , 迴腸末端、盲腸、升結腸變厚, 發炎,  
造成腸腔變窄, 最後阻塞。正常 HTST (72°C, 15S) 可殺死 10<sup>6</sup>  
cfu/mL 。

# Milk composition



- Water 87%, protein 3.5%, fat 3.7-3.9%, carbohydrate 4.9%, ash 0.7%

- Processing

**Skim milk** (0.5% fat), reduced fat milk (up to 2.0% fat) heating to 100 °C to remove butter fat (cream)

**Pasteurization:** 145°F (63°C), 30min; 161°F (72°C) for 15 sec

UHT milk: 275-284°F (135-140°C) for a few sec with shelf life of 40-45 days at 40°F

**Evaporated milk:** remove about 60% water

**Sweetened condensed milk:** add sucrose or glucose before evaporation, and final sugar content of about 54% or greater than 64% in solution

- Grade A milk: APC for raw milk: < 300, 000 cfu/ml,
- APC for pasteurized milk < 20,000 cfu/ml

# Pasteurized milk spoilage : 酸敗，苦味及異味、凝集或結塊

## 1. 酸敗

耐熱性細菌，可發酵lactose → lactic acid，使pH↓

## 2. 凝集或結塊：分兩大類

(1) pasteurized milk中的菌為G(+), 若有G(-), 代表後污染。因G(-)細菌如 *Pseudomonas*, *Alealigenes*, *Flavobacterium* 等而造成此現象，此等細菌具蛋白分解酵素，作用casein，造成牛奶“sweeting-curdling(因酵素作用而產生凝乳)”；另外，因酵素水解產生苦味胜肽及其他胜肽，而造成牛奶有苦味及水果味之異味等。

(2) 耐熱性細菌，可發酵lactose → lactic acid，使pH↓至4.6，而造成牛乳凝集(curdling)。

(3) 最後，若mold在酸乳表面生長，使pH再上升，有利proteolytic bacteria (*Pseudomonas*) 生長，使凝集牛乳再液化。

## 3. 苦味及異味

4. UHT milk：可因耐低溫產孢細菌而造成問題，如*Bacillus*孢子經UHT可存活，產生蛋白酶，造成牛乳“sweet-curdling”。此外，牛乳所含耐熱性protease and lipase之存在，亦可造成UHT牛乳腐敗。



## § Starter cultures, Products

Lactic starter (乳酸菌菌醃)廣泛用於多種乳製品中，藉同型發酵乳酸菌，如*Lact. lactis* subsp. *lactis*，*lactis* subsp. *cremoris*等使lactose → lactic acid，藉異型發酵乳酸菌產生aroma & flavor。所用lactic starter可以為混合菌株（常用），可以液態氮凍存，甚至凍乾方式販售。藉著lactic starter使用，使乳製品可滴定酸度，為0.8 ~ 1.0 %，pH 4.3 ~ 4.5。

yogurt

Milk , Low fat milk ,  
Skim milk , Nonfat dry milk



原料標準化

乳脂肪	1~2%		1~2%
非乳脂之固形物(MSNF)	10.5%	or	12.5%
安定劑	0.7%		



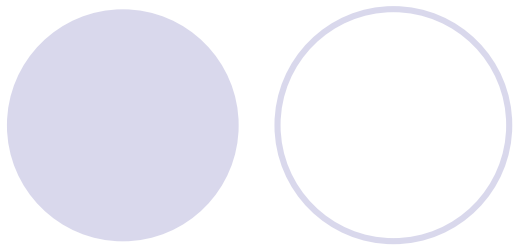
巴斯德殺菌 at 95°C, 30 min



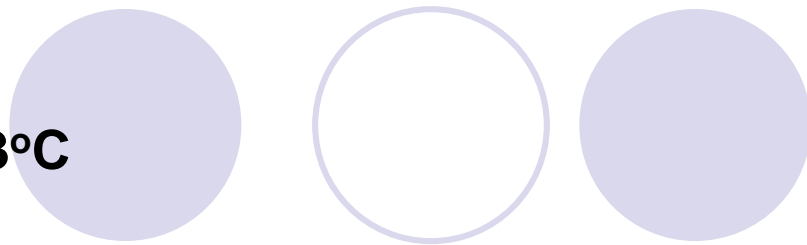
均質 at 60°C, 1500 psi







冷卻至 43°C



接菌

混合

混合,在大槽培養(43°C)至 pH 4.5

裝至最終容器

冷卻至 25°C

43°C 培養至 pH 4.5

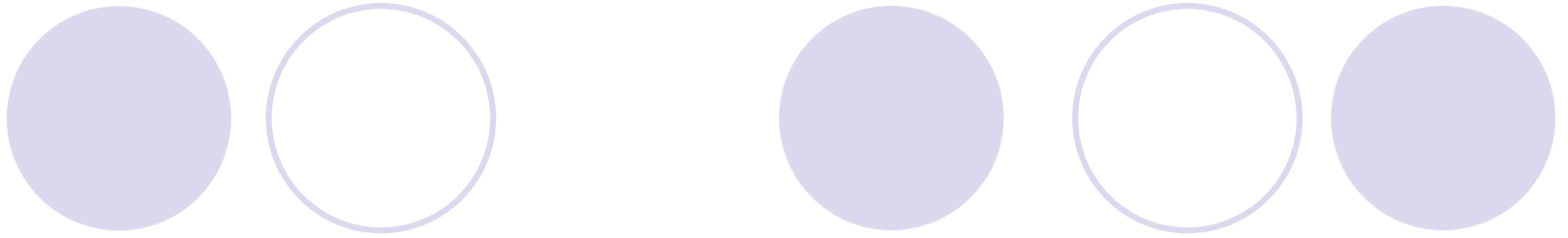
裝至最終容器

靜置型(Set type)

攪動型(Stirred type)

# Yogurt

- **Starter** : *Streptococcus thermophilus* : *Lactobacillus bulgaricus* (1:1)
- Whole milk or skim milk + milk solid 調整固形物含量為 12.5 % (非脂肪之乳固形物) , 再於 82 ~ 93°C , 30 ~ 60 min 殺菌 , 冷卻至 43 ~ 45°C , 接 starter 發酵 , 約 5 ~ 6 h 完成 , acidity 為 0.85 ~ 0.90 % , pH 4.2 ~ 4.5 , 若發酵時間延長 , pH 可繼續下降至 3.8 。
- 產品於 5°C 貯存 , 剛發酵完菌數達  $10^9$  cfu/g , 隨貯存時間增加 (2 mon) , 菌數降至  $10^6$ /g , 一般國際乳品協會標準 yogurt 菌數  $\geq 10^7$ /g 。



Exp.

Yogurt (pH 3.65 ~ 4.40) , butter milk (pH 4.1 ~ 4.9) , sour cream (pH 4.8 ~5.1) 分別接種 *Enterobacter aerogenes* , *E. coli* , 貯存7.2°C在 yogurt & butter milk 中 , 菌迅速下降 , 三天後 , yogurt 中已測不到此二種菌。在sour cream中 , 此coliform降低速度較慢 , 在cheese中 , 菌數甚至增加。

## Kefir

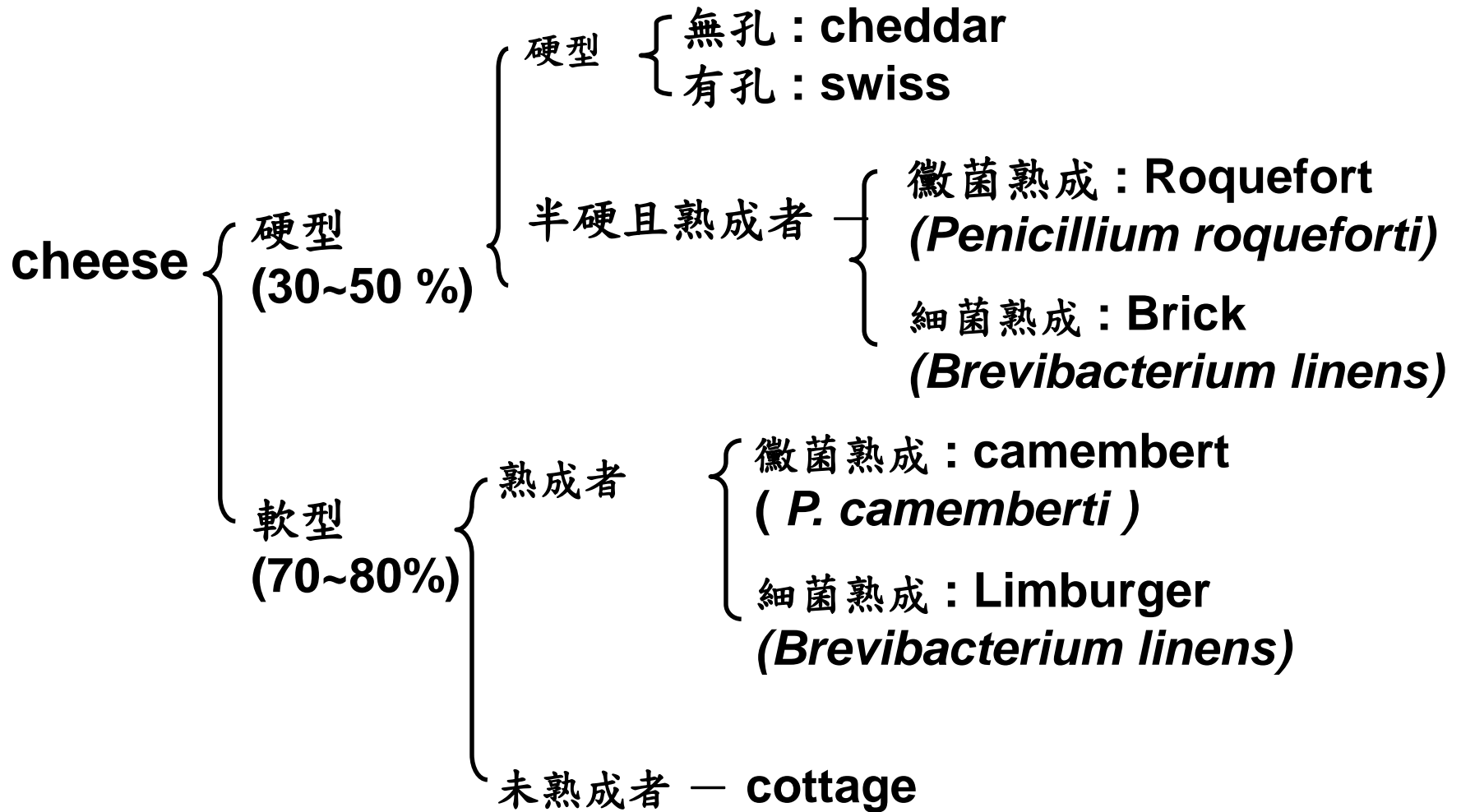
**Kefir grain**：凝集蛋白中含有*L. lactis*，*L. bulgaricus*，lactose-fermenting yeast (*Kluyveromyces*)。乳酸菌負責產酸，yeast產 EtOH，最終二者含量可達1%。

## Acidophilus milk

Sterile skim milk + *L. acidophilus* (1 ~ 2%) → 37°C → curd

另外，有變通法，在pasteurized milk中加入*L. acidophilus*，即裝瓶，放在冰箱貯存。此時產品幾乎如同正常pasteurized milk般，此種產品特稱“sweet”acidophilus milk。

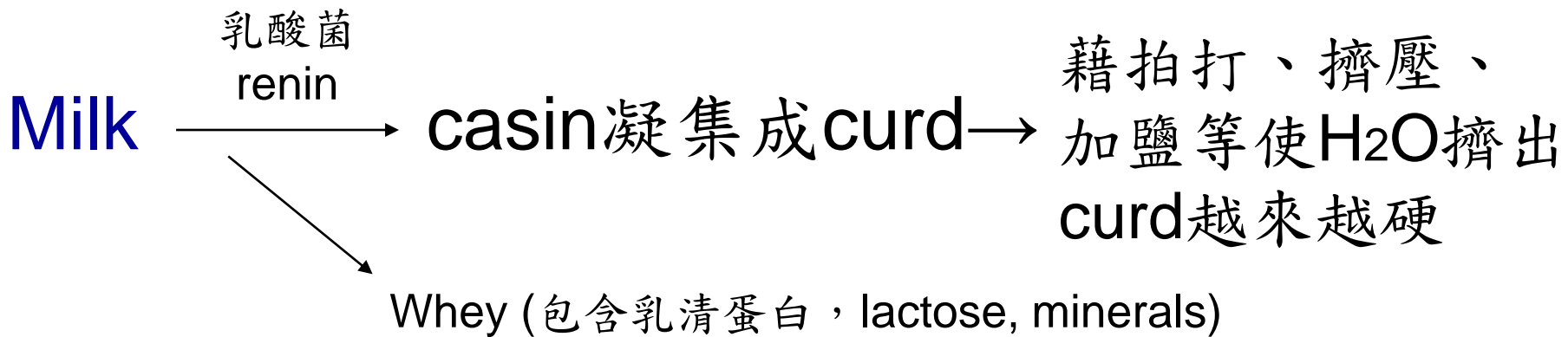
# cheese





# §Cheese

種類很多，一般製造基本原則



—————> 部分cheese再經ripen，使風味更濃厚



## Cheese ripen

Protein → Polypeptide → Peptide

Lipid → FFA

- 風味較濃，此可藉所接乳酸菌 starter 完成，亦可另外加其他 bact. or mold 加強之。如 swiss cheese 所用 starter 即包含 *L. bulgaricus*，*S. thermophilus* 及 *Propionibacterium shermanii*。
- blue cheese (Roquefort)，添加 *Penicillium roqueforti*，camember cheese 則加 *Penicillium camemberti*。

	<b>Cheddar cheese</b>	<b>牛奶</b>
水分 %	<b>33-34</b>	<b>87.0</b>
脂肪%	<b>30-37</b>	<b>3.7</b>
蛋白質 %	<b>21-26</b>	<b>3.5</b>
乳糖 %	<b>0</b>	<b>4.9</b>
灰份 (礦物質) %	<b>3-7</b>	<b>0.7</b>



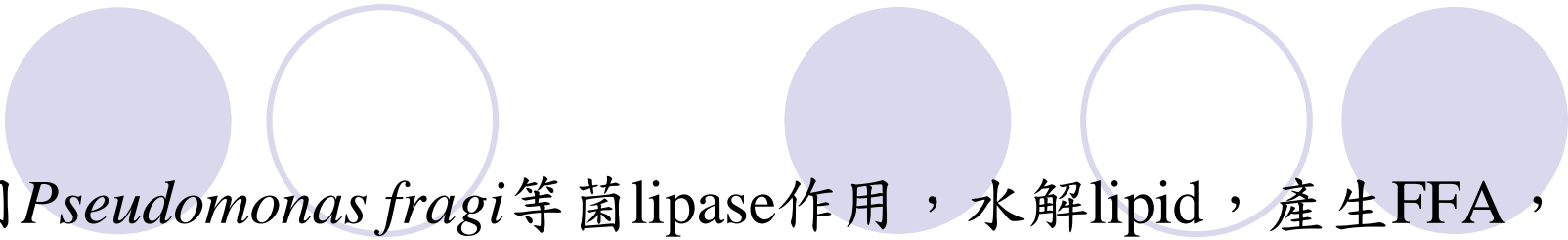
# § Spoilage

**butter** : 含15 % H<sub>2</sub>O , 81 % fat , ≤ 0.5 % (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> 。

雖為非易腐敗產品，但仍會腐敗，菌主要來自原料 cream，使用 pasteurized cream，則降低 butter 中 M. O. 。

## 有二種主要腐敗現象

1. **surface taint**，主要為表面 *Pseudomonas putrefaciens* 生長，產生有機酸，尤其 isovaleric acid 所致，在 4 ~ 7°C 貯存下，約 7 ~ 10 天即可產生。



2. 因 *Pseudomonas fragi* 等菌 lipase 作用，水解 lipid，產生 FFA，造成 rancidity（非常常見）。

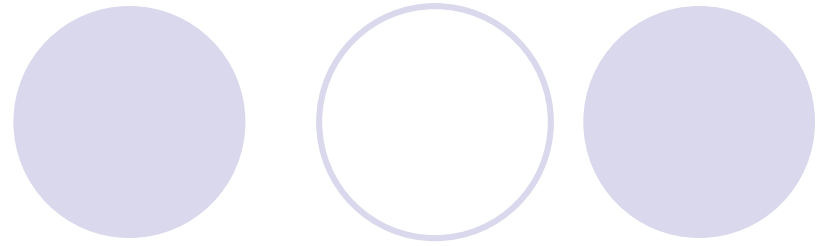
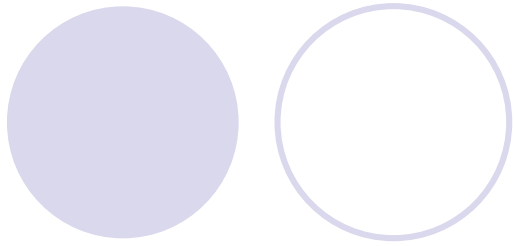
另外，尚有三種較不常見腐敗現象：

1. **malty flavor** : *Lactococcus lactis var. maltigenes*

2. **skunk-like odor** : *Pseudomonas mephitica*

3. **black discoloration** : *Pseu. Nigrifaciens*

另外，**fungi** 亦可造成腐敗，視黴菌種類不同所產生顏色變化隨之不同，一般由於其 high fat %，使得 mold 比 bact. 更容易造成腐敗。



## Cottage cheese

- slimy curd，主要由*Alcaligenes*造成，雖然*Pseudomonas*，*Proteus*等亦可參與。
- 多種mold生長所造成off-flavor。



# Cheese

- 依H<sub>2</sub>O % 高低，分為hard、semi-hard及soft cheese。hard & semi-hard ripened cheese因H<sub>2</sub>O % 低，較不易腐敗，mold最易在表面生長。若A<sub>w</sub>夠，則常有anaerobe (*Clostridium tyrobutyricum*) 及aerobe (*Bacillus polymyxa*) 產氣，造成gassiness現象，主要由於代謝cheese內lactic acid，產生CO<sub>2</sub>所致
- cheese製造若以un-pasteurized milk為原料，易導致食物中毒。

## §發酵乳品有益健康之處

- 有利lactose-intolerant individuals
- serum cholesterol↓
- anticancer activity

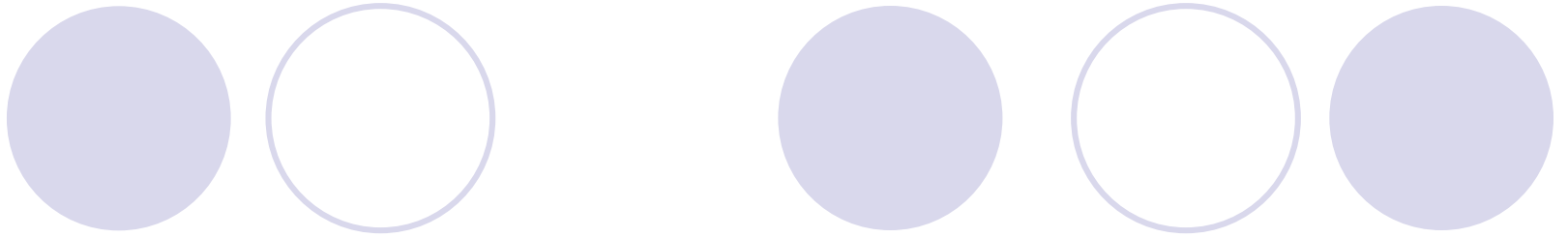
發酵乳品生理活性因所用乳酸菌株(strain)不同而異

▲ lactose intolerance 乃由於腸道缺乏lactase，無法分解lactose，使得lactose為腸內細菌所用，產生氣體（可由呼吸氫氣測試法，得知乳糖不症）。

發酵乳品由於所含lactose量少，且又有來自MO之 $\beta$ -galactosidase，故有利lactose-intolerance者。

## ▲ Cholesterol

- 最早發現非洲masai部落人食大量肉，但cholesterol低，甚少有心臟冠狀動脈疾病，乃由於其每天喝大量（4~5 L/day）發酵乳。由志願者test，yogurt → cholesterol↓，可能其內含抑制cholesterol合成之因子。
- 另外，喝*L. acidophilus*之發酵乳，亦有同樣效果，可能由於此菌在腸道可直接利用cholesterol或其precursor，但此能力可因菌株不同而異，近來發現*Propionibacterium freudenreichii*可吸附培養液中cholesterol。
- 然而亦有實驗顯示cultured butter milk，yogurt，  
“sweet”acidophilus milk無法降低serum cholesterol。



## ▲ Anticancer effects

Goldin & Gorbach：以21位志願者，探討口服*L. acidophilus*對腸內酵素 $\beta$ -glucuronidase，nitroreductase及azoreductase活性影響，此三種酵素可間接將inactive carcinogen轉換成proximal carcinogens，結果顯示口服*L. acidophilus*可使此酵素活性降低2 ~ 4X。



- Probiotics 益生菌

- Prebiotics 益生質，能選擇性的有助益生菌生長的物質(壞菌無法利用)，例如許多  $\beta$ -form glycolytic bound 的寡醣

## △ Diseases caused by lactic acid bacteria

過去50年來，有68件因lactobacilli而致病之報告，leuconostocs也在7年內導致27件案例，pediococci則在3年內有18例，腸球菌中，則以*E. faecalis*與*E. faecium*為二種最常見造成醫院感染之菌，似乎部份乳酸菌為“機緣性病菌”（opportunist）。