



Food Microbiology

Fermentation & Fermented Dairy Products

Prof. Guo-Jane Tsai, Ph,D



乳酸菌共同特性：

發酵六碳糖產乳酸，缺ETS及cytochrome
不行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) :

葡萄糖代謝，乳酸為唯一產物。

- 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) :

葡萄糖代謝產物除乳酸外，尚有CO₂，EtOH等。

- *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Lactococcus* , *Vagococcus* ,
及部份 *Lactobacillus* ⇒ homofermentation 。
- *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Weissella* , *Carnobacterium* ,
Lactosphaera 及部份 *Lactobacillus* ⇒ heterofermentation 。
- 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 10⁶
cfu/mL 。

Milk composition



- Water 87%, protein 3.5%, fat 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) 因G(-)細菌 *Pseudomonas*，*Alealigenes*，*Flavobacterium* 等而造成此現象，此主要由於後污染所致。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%		

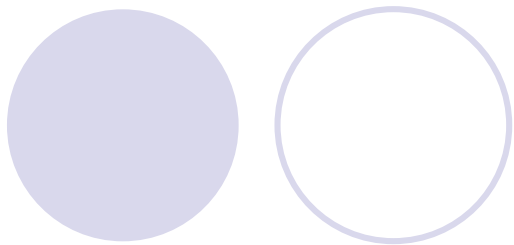


巴斯德殺菌 at 95°C, 30 min

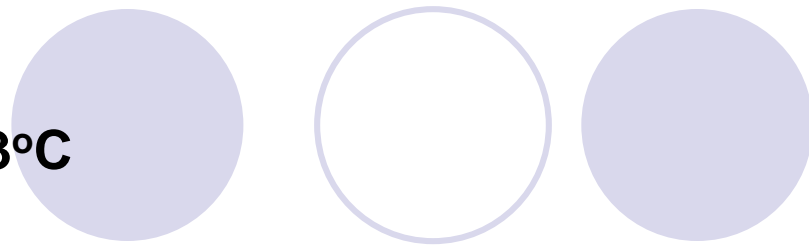


均質 at 60°C, 1500 psi





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

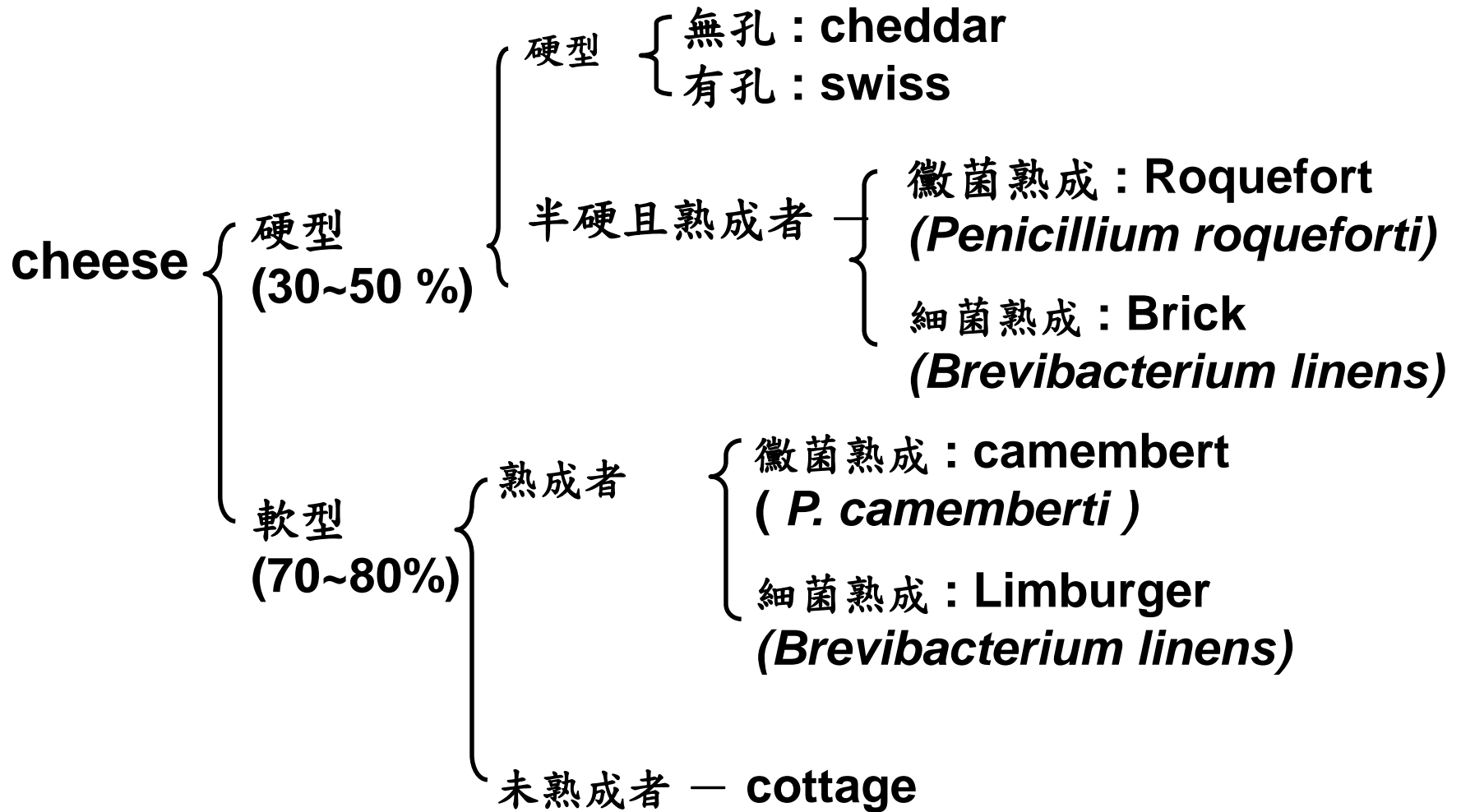
Kefir grain：凝集蛋白中含有*L. lactis*，*L. bulgaricus*，lactose-fermenting yeast (*Kluyveromyces*)。乳酸菌負責產酸，yeast產 EtOH，最終二者含量可達1%。

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。

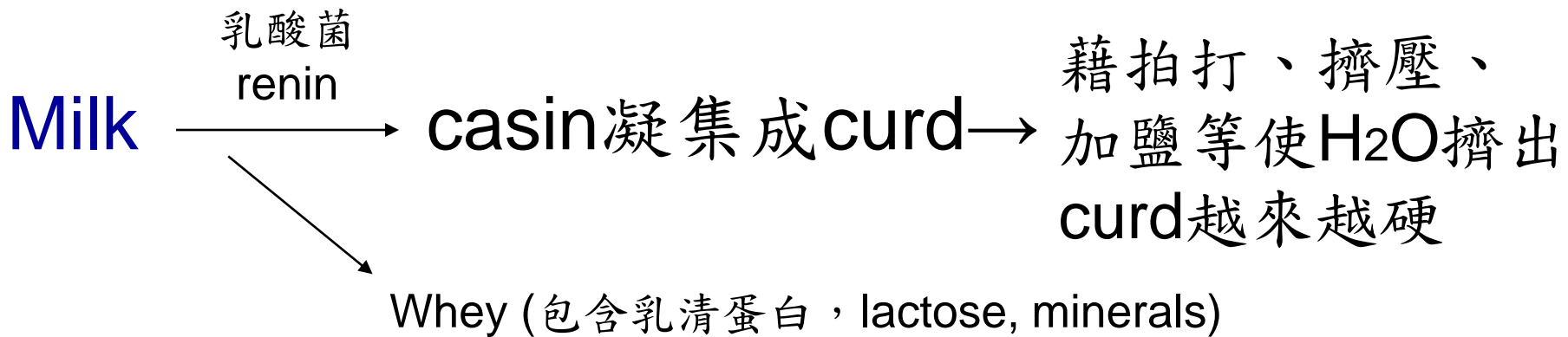
cheese





§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*。

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

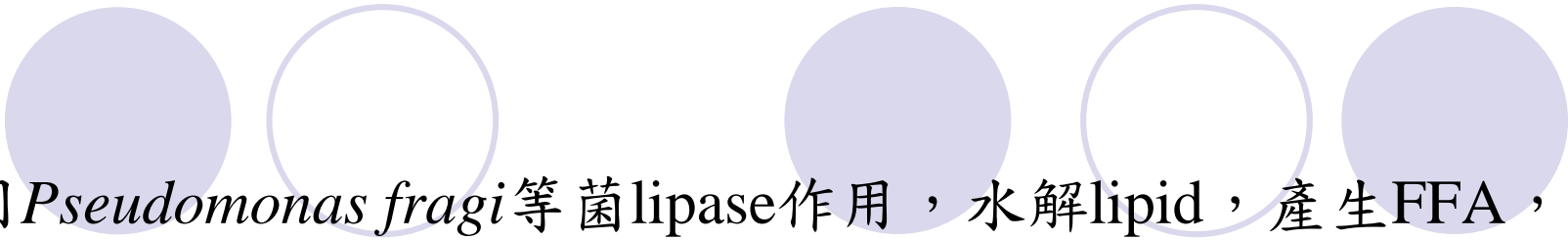
§ Spoilage

butter : 含15 % H₂O , 81 % fat , ≤ 0.5 % (CH₂O)_n 。

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）。

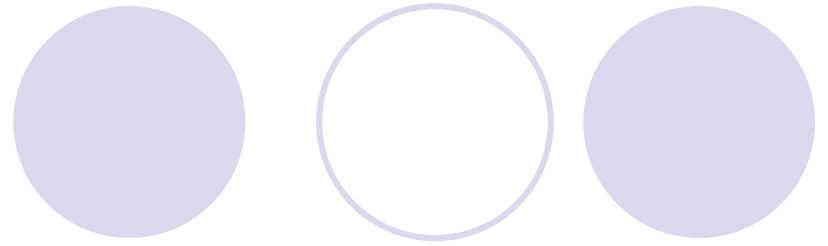
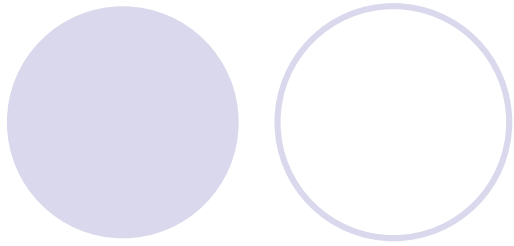
另外，尚有三種較不常見腐敗現象：

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H₂O % 高低，分為hard、semi-hard及soft cheese。hard & semi-hard ripened cheese因H₂O % 低，較不易腐敗，mold最易在表面生長。若A_w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CO₂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

▲ 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 β -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 β -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 β -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”（opportunistic）。