

壹、摘要

本實驗旨在篩選自體水解能力較佳之乳酸菌株應用在製作乾酪上以促進乾酪熟成為目標。實驗菌株選用購自食品工業發展研究所菌種中心而於本實驗室保存之乳酸球菌菌株、乳酸桿菌菌株及嗜熱乳鏈球菌菌株作為篩選試驗菌株，首先進行乳酸菌之蛋白分解能力與自體水解能力測試：乳酸球菌菌醃以 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 具有最高之蛋白分解能力與自體水解能力，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 次之，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 最差；乳酸桿菌菌株之乳酸去氫酶（lactate dehydrogenas；LDH）活性以 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 活性最高，*Lb. bulgaricus* CCRC 10696 活性最差。

其次依乳酸菌之蛋白分解能力與自體水解能力測試之結果，以混合菌醃方式接種於全脂殺菌乳製作乾酪，共四個處理組，分別為(1)由高自體水解能力及高蛋白分解力的 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與次高自體水解能力之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 為混合菌醃；(2)以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 添加 LDH 酵素活性最佳之 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 作為輔助菌醃；(3) 以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 添加 LDH 酵素活性最差之 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 作為輔助菌醃及(4)以高自體水解能力及高蛋白分解力的 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與自體水解能力最差之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 混合菌醃。結果顯示，所製作的四組乾酪於熟成期間，水分皆呈逐漸降低之趨勢，蛋白質及脂肪則隨水分之減少而有逐漸上升的趨勢，pH 值、NaCl 含量及 S/M 值則有波動，乳酸菌數則以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 混合菌醃之 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 存活率最低。所製作之乾酪於熟成第 84 天時，四組乾酪之熟成度與游離胺基酸之產量，皆以添加 LDH 酵素活性最差之 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 作為輔助菌醃之組別有最高之熟成度與游離胺基酸之含量 ($p < 0.05$)，但 pH 值較低 ($p < 0.05$)。若以自體水解能力菌醃比較，則以使用 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 為混合菌醃組有較高熟成率與游離胺基酸產量 ($p < 0.05$)，但以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 混合菌醃組有較高之自體水解能力。

貳、前言

乾酪 (Cheese) 是一種營養價值豐富的乳製品，不僅歷史悠久，也是現今最多種類與多樣化的乳製品，根據統計，全球所生產之牛乳有近乎 35% 是用來製作乾酪。隨著西方文化東傳，各種不同的乳製品漸漸被吾國人民所接受，近年來，各種乳製品相繼問世，台灣乳業也漸漸發展。但目前乾酪大多仰賴進口，價格也較昂貴，與鮮乳、酸酪乳的普遍度，大相逕庭。為了使國內的乳製品更多樣化，並期待解決冬季剩餘乳之問題，生產乾酪不失為一良好的方法，但如何提升乾酪的品質及促進乾酪的熟成對於乾酪之生產，是一個很重要的問題；加速乾酪的熟成即可縮短乾酪製程的時間並加快風味物質的生成，而縮短熟成期往往可節省乾酪工廠的生產成本的開支，例如因貯藏期長的資本積壓、廠房的空間利用率、減少產品失重與微生物污染問題，所帶來經濟效益也就更大了。同時在台灣冬夏兩季的鮮乳銷售相距甚遠，冬季乳滯銷，剩餘乳量大，若能製成乾酪，亦能有效大量使用冬季的剩餘乳，又能提升乳品產業的多樣化，是個兩全其美的好方法。故本實驗旨在利用正確的篩選方式期能篩選出自體水解能力較強的乳酸菌菌株以作為製作乾酪的菌醃，更期能有利於促進乾酪熟成，使廠農獲得更高的經濟效益並解決冬季剩餘乳的問題。

參、文獻回顧

一、乾酪之一般製程：

乾酪(cheese)是乳製品中種類最多的一類，根據統計有多達 2000 種以上 (Spreer, 1995)。其一般製程如下 (張，1991；林，1989)。

(一) 原料乳之處理

欲製品質優良之乾酪，應選用新鮮而風味佳之原料乳，必要時可以標準化調整乳脂率。新鮮原料乳之酸度為 0.15 ~ 0.16%。殺菌條件為 63°C，30 分鐘之保持殺菌或 73 ~ 74°C，15 ~ 30 秒之高溫短時間殺菌較多。

(二) 菌醃之添加

殺菌後隨即冷卻至 30°C，移入乾酪槽，加入 1 ~ 2% 乳酸菌醃 (starter) 並充分混合而維持於相同溫度下，以行乳酸發酵，發酵時間約為 30 分鐘到 1 小時，至酸度達 0.18 ~ 0.20%。一般使用菌醃為 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 或多併用 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 等乳酸菌。

(三) 凝乳酶之添加與凝固

凝乳酶添加前，先以少量食鹽水溶解後，計算其力價，添加劑量

以使其凝乳時間為 30 ~ 40 分鐘達到適宜截切凝乳為準。使用高溫殺菌乳時能稍遲緩凝固時間，此可併用適量氯化鈣調節。

(四) 凝乳之截切與加溫

當凝乳之硬度達適當程度，以凝乳切刀 (curd knife) 將凝乳截切 (cutting) 成為 1 ~ 2 公分立方體。其後將溫度漸次提高，以每 2 ~ 5 分鐘升溫 1°C 的速率加熱至 38°C 左右。並徐徐攪拌。凝乳截切後內部之乳清逐漸排出，表面形成光滑薄膜可防止脂肪之損失。細切之凝乳粒容易再融著，故需不停地徐徐攪拌。

(五) 乳清排除

待乳清酸度達 0.17 ~ 0.18% 時、凝乳粒收縮為截切時之一半或以手捏凝乳粒感到適度彈性時排除乳清。乳清排除時對乾酪品質大有影響，而排除乳清時之適當酸度乃依乾酪種類而異。未達適當酸度即予排除時，會影響乾酪之熟成；反之，酸度過高則製品酸味強且可能會過度乾燥。

(六) 凝乳之定型與壓榨

堆積後之凝乳置於一定形狀之模型，並以一定壓力壓榨，定型器周圍有小孔，由此滲出乳清。但如製軟質乾酪一類之乾酪，則不需壓榨。開始時緩慢施壓，再漸次加強，最後加以強力而放置一夜。加壓

時溫度約 10~15°C，壓榨終了之凝乳塊即為生乾酪 (green cheese)。

(七) 加鹽 (salting)

加鹽之目的為改善乾酪風味、排除乳清，硬化凝乳塊、調節乳酸發酵與防止雜菌污染與防腐。乾酪之食鹽含量依乾酪種類而有顯著差異。加鹽方法有三：(1)乾鹽法 (dry salting) 直接塗佈食鹽的方法，(2)濕鹽法 (wet 或 brine salting)：俟定型壓榨後浸於約 20%食鹽水溶液，(3)混合法：定型壓榨後，先塗佈食鹽而次浸入食鹽水的方法。

(八) 熟成

乾酪之熟成通常放置於一定溫度與濕度條件下之熟成室 (ripening room) 內，熟成溫度低溫比高溫佳，一般範圍在 5~15°C，因乾酪種類不同而異。低溫熟成所需時間長，但風味佳；高溫熟成所需時間短，但會減損風味。濕度在一般細菌熟成的硬質乾酪及半硬質乾酪為相對濕度 85~90%，而軟質乾酪及黴菌熟成乾酪為相對濕度 95%。

多數乾酪需經一定溫度及溼度貯存以進行熟成作用，以獲得特殊之風味與質地。質地與風味是決定乾酪製品被接受性之二大主要因素，受到原料乳、菌配種類、凝乳酶種類及用量、食鹽添加量、製造與熟成條件等因素之影響。

乾酪工業的基礎是在於以凝集乳中蛋白質的方式濃縮牛乳中的成分。在乾酪初成之時，通常僅有著富彈性的組織、粗糙的形狀和不成熟的香氣。再經由熟成期間，許多的化學及生化的變化的發生，讓乾酪擁有屬於它的特色。而熟成期的長短則根據乾酪的種類而定，短從熟成期僅四週的至熟成期長達三年者均有之 (Kheadr *et al.*, 2000)。

文獻中，多以加速乾酪熟成為主要研究課題，如何促進風味物質的生成和縮短熟成期往往是可節省乾酪工廠貯藏的資本、減少產品失重與微生物的污染等經濟及技術的開支，降低成本，增加收益。

二、乾酪製程中乳酸菌之角色

乾酪的熟成期間，乳酸菌所扮演的角色。

(一) 常用於發酵乳製品之乳酸菌主要菌屬包括：

1. 乳酸球菌屬與鏈球菌屬 (Lactococci and streptococci)

1986 年第八版的 Bergey's Manual 一書指出，此菌群為革蘭氏陽性，好氧或兼性嫌氣性，型態為圓形或橢圓形，大小在 0.5 ~ 1.0 μm 之間，以鏈狀或配對形狀存在。代表性的菌種有 *Lc. lactis* subsp. *lactis*、*Lc. lactis* subsp. *cremoris*、*Lc. lactis* subsp. *lactis* bivar *diacetylactis* 及 *Str. salvarius* subsp. *thermophilus*。其中 *Str. salvarius*

subsp. *thermophilus* 屬於高溫菌、於 45°C 仍可生長。可以發酵乳糖，但不水解酪蛋白，故於牛乳中生長緩慢。因此，用於牛乳發酵時，常與具蛋白分解力的菌醃 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 混合使用；而 *Lc. lactis* subsp. *lactis*、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 常使用於乾酪的製造，以產生風味。

2. 乳酸桿菌屬 (Lactobacilli)

乳酸桿菌屬為乳酸菌中最重要的一群，涵括之菌種有 50 多種，為革蘭氏陽性菌，通常為厭氣性，無孢子形成，呈桿狀，具有非常強的產酸能力，可在 pH 5.0 的環境下生長，1986 年第八版的 Bergey's Manual 將此菌屬依據發酵特性，再次分為絕對同質發酵 (obligately homofermentation)、兼性異質發酵 (facultatively heterofermentation) 及絕對異質發酵 (obligately heterofermentation) 三群，其中保加利亞乳桿菌 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 及嗜酸乳桿菌 (*Lb. acidophilus*) 屬於第一群。此類菌株在 45°C，甚至在 48 ~ 52°C 皆可生長良好，為製造酸酪乳之主要菌醃 (Kandler and Weiss, 1986)。

3. 白念珠球菌屬 (Leuconostoc)

此菌屬包括 *Leu. mesenteroides*、*Leu. paramesenteroides*、*Leu. lactis* 和 *Leu. oenos* 等四個菌種。其中 *Leu. mesenteroides* 包括

mesenteroides、*cremoris* 和 *detranicum* 三亞種 (Garvie, 1986)。 *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* 和 *Leu. lactis* 在牛乳發酵中，為生成聯乙醯等香氣物質的重要微生物 (Marshall, 1987)。

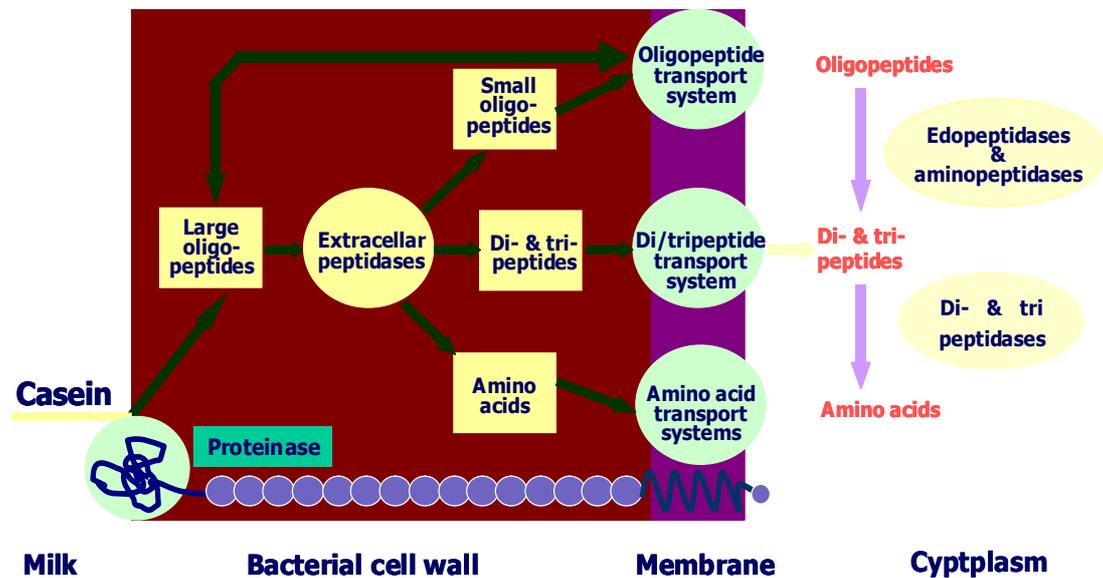
乳酸菌所分泌之蛋白酶其最適環境為中性，可將牛乳中酪蛋白水解為小分子肽及游離胺基酸以供菌體生存，其餘者則釋出。此外，乳酸菌產生乳酸，降低環境 pH 值，以利凝乳作用。

4. 菌醃分類

依據 Crow *et al.* (1995) 中指出可將菌醃歸納為三種類型。

(1) 第一類

是最常被研究的菌醃包含了中溫菌 (mesophilic)，例如 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Lc. lactis* subsp. *lactis*，以及高溫菌 (thermophilic)，例如 *Str. thermophilus* 及 *Lb. helveticus*，在許多種類乾酪製作中，是唯一被添加入原料乳的微生物，其活菌數於製作一天後即可達到 $10^8 \sim 10^9$ cfu/g，至少高於其他非菌醃乳酸菌 $10^4 \sim 10^5$ cfu/g。其功能不僅止於提供產酸並且能夠在生乾酪中產生一些由乳酸菌生成的生物質 (biomass) 如：游離胺基酸等產物，原是由乳酸菌代謝產生供自體生長所需的養分，這些生物質被認定是在乾酪熟成過程中經由菌醃菌體自體水解後催化而生成的，如圖一。



Cogan and Accolas, 1995

圖一、乳酸菌蛋白質的代謝途徑

Fig. 1. Probable pathways for the degradation of casein to supply the amino acids required by lactococci for growth in milk.

(2) 第二類

為偶發出現的非菌醃乳酸菌（non-starter lactic acid bacteria；NSLAB），多為中溫菌的 lactobacilli 和 pediococci。其存在於品質較好的乾酪中之菌數相當少，大約 10^2 cfu/g。然而，在熟成期間，其菌數可長期維持在 10^7 cfu/g 以上。

(3) 第三類

為輔助菌醃（starter adjunct）：多為 *leuconostocs*、lactobacilli 及

Lc. lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*。其主要功能非產酸形成凝乳而是於熟成期間增進乾酪風味物質之生成，其起始菌數多低於 10^6 cfu/g。

(二) 蛋白酶 (Protease)

1. 凝乳酵素 (Rennet)

犢牛凝乳酵素 (calf rennet) 為製造乾酪最廣為使用之酵素，其餘還包括為蛋白酶 (pepsin) 及一些微生物酵素，如 *Mucor pusillus*、*M. miehei*、*Endothia parasitica*。

凝乳酵素作用於 Phe-X 及 Leu-X 之鍵結處，將大部分隨乳清排除 (whey off)，排除程度則視凝乳塊含水量及所處 pH 值而定，凝乳酵素則可存在於乾酪中約 6~10%，並繼續作用 (Visser, 1993)。多數凝乳酶隨乳清排除一併流失，但是仍然有部分殘留於凝乳中，其殘留量視 pH 值及乳清排除多寡而定。製作乾酪流程添加凝乳酶量多則殘留較多，會水解較多 α_{S1} -酪蛋白。

2. 鹼性蛋白酶 (alkaline protease)

牛乳主要之內源性蛋白酶，亦稱為溶血纖維蛋白酶 (plasmin)，在分類上屬於絲胺酸蛋白酶，主要水解 β -酪蛋白及 α_{S2} -酪蛋白，作用

於 Lys-X 及 Arg-X 之鍵結處 (Law, 1997)。以原形式存在於牛乳中，經熱處理後仍具有活性，於 pH 7.5 ~ 8.0 時具有最大活性，pH 值是影響此酶活性之重要因素，其餘影響因素包括食鹽濃度、熟成溫度及水分。熟成溫度提高，使鹼性蛋白酶原易轉換成鹼性蛋白酶而增加酵素活性。此酶之抑制劑在牛乳殺菌時失活，並隨乳清一起被排除。其餘內源性蛋白酶還包括蛋白酶 (proteinase) 及胺基肽酶 (aminopeptidase)，然加熱後則失活。

3. 黴菌釋出之蛋白酶

大部分微生物是接種於乾酪表面，隨著菌絲之生長，在熟成期間釋出胞內蛋白酶或胞外蛋白酶。常用於黴菌熟成乾酪 (Blue 及 Camembert cheeses) 之青黴菌 *P. roqueforti* 及 *P. caseicolum*，會持續釋出胞外蛋白酶，如金屬蛋白酶及天門胺酸蛋白酶 (aspartyl protease)。

(三) 乾酪熟成期間蛋白質之變化

乾酪在熟成期間，起初乳蛋白質經各種酵素作用後，發生顯著的化學變化，經一連串複雜的反應過程，將酪蛋白水解成小分子肽及胺基酸，形成風味的先驅物，促成乾酪特殊之風味與質地 (Fox, 1989)。

1. 乾酪熟成期間蛋白質水解

乾酪於熟成期間，蛋白質不斷受到水解，依水解率快慢可將乾酪熟成期間蛋白質變化約略分為兩個階段（Smit *et al.*, 2000）：

(1) 第一階段水解（Primary proteolysis）

由於凝乳酶的添加， κ -酪蛋白上 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ 鍵結處是最先被切斷的，導致 para- κ -酪蛋白及酪蛋白巨肽（caseinmacropeptide；CMP）的出現。 α_{S1} -酪蛋白及 β -酪蛋白最先受到凝乳酶作用的鍵結位置分別為 Phe₂₃-Phe₂₄ 及 Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃， α_{S1} -酪蛋白受凝乳酶而水解的速度較 β -酪蛋白快，其餘 α_{S2} -酪蛋白與 para- κ -酪蛋白對凝乳酶之耐受性較高不易水解。

添加乳酸菌醃，乳酸菌所產生之胞外酵素包附在菌體細胞壁或細胞膜上，酪蛋白受到細胞壁上胞壁酶（muramidase）的作用，水解成大分子肽、寡肽、小分子肽類及少數游離胺基酸。經熟成 14 天後，凝乳酶及乳酸菌之胞外酵素快速水解 α_{S1} -酪蛋白，當水解成度達 20% 以上，便顯著降低乾酪內部之疏水性交互作用，弱化蛋白質之三級網狀構造，使乾酪質地較為鬆軟（Fox, 1989）。

(2) 第二階段水解（Secondary proteolysis）

第二階段水解即肽類水解（peptidolysis）階段。乾酪中乳酸菌受

到自體胞壁酵素作用，乳酸菌菌體水解 (lysis)，將原本在菌體內肽類分解為游離胺基酸後供應菌體本身生長所需的養分之機制相關酵素釋出至凝乳中，亦即菌體胞內酵素之釋放，直接作用凝乳。

2. 乾酪熟成期間受下列因素影響：

(1) 生乳中鹼性蛋白酶之殘留

鹼性蛋白酶存在於牛乳中，經殺菌後仍具有活性，由於此酶最適 pH 值偏高，當凝乳 pH 值較高時鹼性蛋白酶水解能力較強，可將 β -酪蛋白水解成 γ -酪蛋白 (Fox, 1997)。

(2) 鹽/水比 (salt in moisture ; S/M)

食鹽之添加會促進乾酪凝乳合成、改變酵素活性及影響乾酪風味。食鹽量與水含量呈負相關直線，故以鹽/水比表示乾酪所含鹽度。鹽/水比會影響 aminopeptidase 的活性，與蛋白質水解率有密切關係 (Laan *et al.*, 1998)。

(3) 溫度

一般乾酪熟成的溫度，大多介於 7~18°C。乾酪溫度由 10°C 降至 6°C，可發現 β -酪蛋白之水解率減緩， α_{S1} -酪蛋白之減緩程度較小，故熟成溫度自 2~10°C 對乾酪熟成影響不大。當溫度提高至 10°C 以上，

蛋白質水解率加快但未伴隨風味之產生，將乾酪於 15°C 熟成 8 週，相當於 8°C 熟成 16 週，然快速之熟成會伴隨些許苦味，當熟成溫度超過 20°C，不僅產生苦味且乾酪彈性消失，最後因質地鬆軟而造成塌陷。Folkertsma *et al.* (1996) 指出 16°C 熟成有最高的風味評分，尤其於早期熟成時。

(4) pH 值

凝乳酶之活性會受乾酪 pH 值影響。乾酪熟成前 14 天，即熟成第一階段，由於乳酸代謝之緣故，乾酪之 pH 值緩慢下降，自第二階段後，乾酪 pH 值以 0.1/每月緩慢上升。第一階段 pH 值較低則有利凝乳酶作用，水解較多 α_{S1} -酪蛋白；第二階段凝乳塊 pH 值較高時鹼性蛋白酶水解能力較強，可將 β -酪蛋白水解成 γ -酪蛋白。熟成最末期之 pH 值則影響乾酪質地：最終 pH 值於 5.3 ~ 5.4 使乾酪具彈性 (springy)；pH 值於 5.1 ~ 5.2 則乾酪具塑性；pH 值於 4.9 ~ 5.0 則乾酪較易粉碎；pH 值小於 4.8 則乾酪不具任何彈性。

(四)、蛋白質水解對乾酪風味之影響

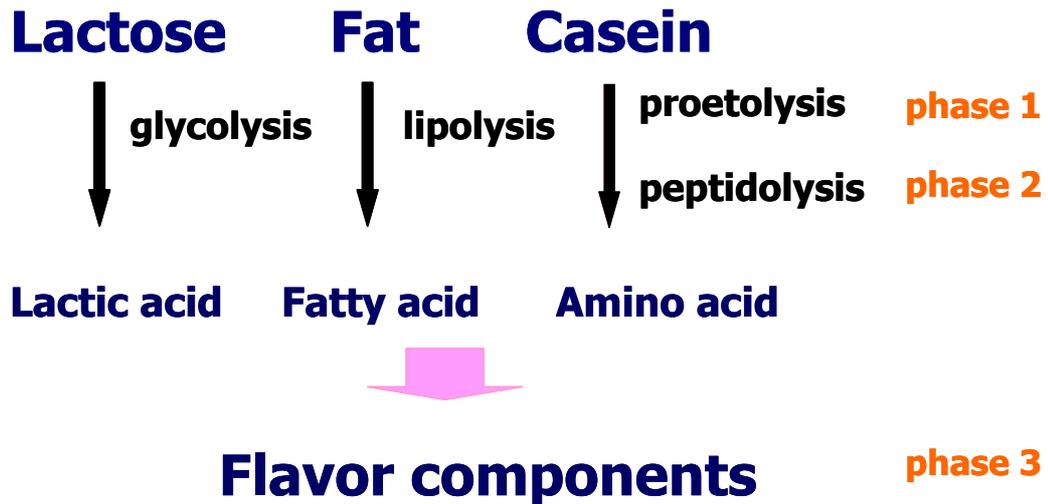
1. 風味之生成

乾酪之風味並非由單一風味物質產生，如圖二 (Smit *et al.*,

2000)。是由許多揮發性風味物質組成。風味為氣味 (odor) 及嚐味 (taste) 組成，乾酪之氣味由脂肪酸、醛、酮、醇、氨、酯、內酯 (lactone) 及揮發性含硫物質等構成，嚐味則包括乳酸、胺基酸、肽類、非揮發性脂肪酸、胺類合成物及食鹽為主。胺基酸多具嚐味，具甜味者有甘胺酸 (glycine)、丙胺酸 (alanine)、絲胺酸 (serine)、脯胺酸 (proline)、羥丁胺酸 (threonine)、麩醯胺酸 (glutamine)；具苦味者有纈胺酸 (valine)、白胺酸 (leucine)，異白胺酸 (isoleucine)、色胺酸 (tryptophan)、酪胺酸 (tyrosine)、離胺酸 (lysine)、精胺酸 (arginine)、苯丙胺酸 (phenylalanine)；具酸味者有天門冬胺酸 (aspartic acid)、麩胺酸 (glutamic acid)。

乾酪在熟成期間，蛋白質經蛋白酶作用，逐次水解為大分子肽、小分子肽至胺基酸，而游離胺基酸可進一步經由脫胺作用 (deamination)，去甲硫基作用 (decarboxylation) 產生揮發性物質構成乾酪的風味。以切達乾酪 (Cheddar cheese) 為例，由甲硫胺酸 (methionine) 經去硫氫基作用轉換之 methanethiol 是重要的風味物質，可由 *Pseudomonas putida* 等菌水解得到。

酪蛋白經凝乳作用水解， β -酪蛋白水解產生之苦味高於 α -酪蛋白，尤其 β -酪蛋白之 C 端 193 ~ 209 處水解後會造成極端苦味，這是



Smit *et al.*, 2000

圖二、乾酪風味生成圖

Fig. 2. Flavor formation in cheese.

由於疏水性胺基酸大多呈現苦味造成，而 Tyr₁₉₃ 及 Val₂₀₉ 皆為疏水性胺基酸，若 C 端及 N 端同時為游離之疏水性胺基酸，所造成苦味會較只有一端為疏水性胺基酸來得強烈 (Visser, 1993)。

2. 乾酪常見之風味缺陷

乾酪製造的過程中，若原料乳品質不佳，或選用之菌醃微生物與製造條件條控不當，甚至於遭到其他不良雜菌污染，皆會導致乾酪不良風味之生成。其中以苦味 (bitterness)、酸味、鹼味、果實臭 (fruity flavor)、nutty flavor、麥芽臭、硫化臭及陳腐臭等最為常見。乾酪中

苦味之發生是源於蛋白酶作用於酪蛋白而導致帶有苦味的肽集聚形成，以 α_{S1} -酪蛋白產生苦味之比率較 β -酪蛋白高，在於 β -酪蛋白 C-端 193 ~ 209 片段處水解後會造成極端苦味，苦味肽的分子量約在 1,000 ~ 12,000 kD，主由高比率之疏水性胺基酸所組成，如白胺酸、異白胺酸、脯胺酸及苯丙胺酸等 (Frister *et al.*, 2000)。苦味缺陷可藉篩選不產生苦味肽之菌株與添加對疏水性胺基酸具專一性之胺基肽酶 (aminopeptidase) 來改善 (Adda *et al.*, 1982)。麥芽臭與過度酸味常伴隨產生，製品中含有 0.3 ~ 0.5 ppm 3-甲基丁醛 (3-methyl-butanal) 即構成典型之麥芽臭。果實臭為切達乾酪常見之風味缺陷，主由低溫菌 (psychrotrophic bacteria) 污染所致。因低溫菌會釋出大量解脂酶 (esterase)，使揮發性短鏈脂肪快速形成，並與醇類進行酯化反應，丁酸乙酯 (ethylbutyrate) 和己酸乙酯 (ethyl hexanoate) 可構成草莓過熟之果實臭。低溫菌之污染亦會釋出高量耐熱性水解酵素，使胺基酸不正常代謝形成高量吡嗪類化合物 (pyrazine)，造成陳腐臭 (musty flavor) (Morgan, 1976)。

三、促進乾酪熟成

乾酪的熟成過程中，影響風味生成的原因有許多。乳中的醣類、脂質和蛋白質皆是形成風味物質先驅物的原料 (Law, 2001)。Soda

(1997) 將加速風味物質的生成方法整理如下：

(一) 提高熟成的溫度 (Elevated ripening temperature)

據 Folkertsma *et al.* (1996) 說明，此法是最為簡易加速熟成的方法之一，首次使用於縮短熟成期為 Sanders *et al.* (1946) 將熟成溫度調高至 16°C 時可於 3 ~ 4 月左右完全熟成。1979 年 Law *et al.* 將熟成溫度由 6°C 調至 13°C 時，增加了 50% 的風味生成。Aston *et al.* (1985) 以不同溫度實驗，於貯藏 32 週時，發現 15°C 的處理組仍維持良好品質。

一般乾酪的熟成溫度均低於 15°C，以提高熟成溫度來加速熟成雖然最為簡便，但其可能有因熟成速度過快而導致風味不良及腐敗發生之虞，故目前其應用性能侷限於菌叢單純之硬質乾酪與半硬質乾酪。

(二) 糊泥法 (slurry system)

糊泥法是在加速風味形成之訴求下發展而成。以未壓型凝乳塊和 5.2% 食鹽溶液 (2:1) 混合均質成半液狀糊化物 (semi-liquid paste) 後，置於 30°C 厭氧環境下培養 4 ~ 5 天，即可獲得良好風味之成品。進而添加穀胱甘肽 (glutathione)、鈷 (cobalt) 等微量元素或調整 pH 值，以利良好風味之形成。但糊泥法製得之終產物不能直接食用，需

再經過加工，多於乾酪製程中以 1% (w/w) 比例添加以加速熟成，可與其他食品及酵素配合使用，縮短 1/3 ~ 1/2 之熟成期。糊泥的風味生成機制並不明確，但認定可能為乳酸菌的酵素產生所致 (Law, 1997)。

(三) 酵素之添加 (addition of enzymes)

酵素反應具專一性，可藉由人為添加的方式，達成所欲加速分解的部分以達到加速熟成的目的。外源性酵素之添加，包含有：蛋白酶與肽酶、解脂酶、乳糖酶與酵素混合劑與粗酵素萃取液之添加。均有成功地運用在商業生產上。

(四) 傳統修飾菌體 (modified bacterial cells)

輔助菌醃被定義為篩選來製作乾酪時添加入原料乳，以改善乾酪品質的乳酸菌；在文獻中多指出是為了改善低脂切達乾酪的風味與品質之用。輔助菌醃分為兩類，1. 活性減弱輔助菌醃 (attenuated adjunct)；及 2. 未減弱活性輔助菌醃 (nonattenuated adjunct) (Soda *et al.*, 2000)。

1. 活性減弱輔助菌醃 (attenuated adjunct)

與自體水解的乳酸菌醃有著異曲同工之妙的功能，是除了菌醃之外，另一個裝著酵素的袋子，目的也是釋放乳酸菌胞內酵素到凝乳

中，加速乾酪之熟成。使輔助菌醃菌體活性減弱的方法有三種：I、物理方法：加熱（heat shocking）、冷凍（freeze shocking）、噴霧乾燥（spray-drying）及冷凍乾燥（freeze-drying）；II、酵素處理：溶菌酶（lysozyme）是唯一的方法。III、化學方法：有機溶劑的使用，如：丁醇，但是有殘留於乾酪的風險。而現今最可被普遍使用的方法即是物理方法，其中以加熱處理與冷凍處理最常被使用，且由文獻中得知，使用輔助菌醃 *Lb. helveticus* 與 *Lb. casei* 冷凍處理（以-20°C 冷凍 48 h，以 38°C 解凍）與加熱處理（60°C 與 70°C，15 秒）和噴霧乾燥（出口溫度 82°C），以冷凍處理具有最強的自體水解效果。

2. 未減弱活性輔助菌醃（nonattenuated adjunct）

未減弱活性的輔助菌醃於製作乾酪時添加後，菌本身能具有相當之活性，雖然仍能增進乾酪品質及加速風味的生成效果，但是，未受損的輔助菌醃其自體水解的能力較差，可能會造成過酸、苦味等不良風味生成的危險。

(五) 基因修飾菌醃（Genetically modified starter cells）

以生物科技的方法改良菌體的細胞功能，以菌體之基因修飾（genetic modifications），如，lactose negative（Lac-）、proteinase negative（Prt-）或是由 Grieve and Dully（1984）利用 *Lc. lactis* subsp. *lactis* C2

基因修飾成 Lac-及 Prt-的菌株，有效的於熟成 12 週時有顯著的風味成效且沒有任何風味上的缺陷。

(六) 乳酸菌菌體之自體水解 (Autolysis)

在乾酪熟成期間，游離胺基酸與游離脂肪酸的增加，部分是源自於乾酪中乳酸菌菌體水解後所釋出的肽酶及酯酶的作用 (Law, 1997)。文獻解釋其定義為，經由菌體本身之胞內胞壁酵素所造成的菌體瓦解，即為自體水解。更進一步解釋，與乾酪熟成期間的關係，當乳酸菌菌體水解後，菌體內的胞內酵素的釋出，將寡肽或是小分子肽水解成胺基酸，是為風味物質的先驅物。自體水解的菌株就有如一個裝著酵素的袋子，扮演著傳送系統的角色，將酵素，包括了蛋白酶、肽酶、脂肪酶、酯酶及其他酵素釋放到凝乳中，增進及加速風味物質的生成與乾酪的品質；也證實了乳酸菌的自體水解為乾酪的熟成期間影響蛋白質水解的癥結點。

測定乳酸菌在乾酪熟成期間，其菌體自體水解程度的方法有三種：

1. 監測乳酸菌數的增減

測定乳酸菌數之消長，以乳酸菌之死亡率與起始菌數判定其自體水解率 (%)，或以乳酸菌之存活率作為判定 (Boutrou *et al.*, 1998)。

2. 電子顯微鏡觀察其菌體的瓦解

Chapot-Chartier *et al.* (1994) 以電子顯微鏡觀察於 Saint-Paulin cheese 熟成期間 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 菌體的變化。AM2 在第 48 小時時細胞仍是完整（有 > 95% 的菌在一週後才分（水）解），在第七天時，AM2 的細胞壁呈現斷裂和不完整的狀態：其中 15% 細胞質液流出且可見到核糖體；55% 細胞質膜破裂有些已經完全打開了釋出胞內物質；有 15% 完全分解，在乾酪中只有殘留細胞質內物質如核糖體。

3. 測定乳酸菌釋出之胞內酵素活性

乾酪熟成期間，常測定乳酸菌釋出之特定胞內酵素活性如：乳酸去氫酶（lactate dehydrogenase；LDH）、葡萄糖-6-磷酸去氫酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase；G6PDH）或脯胺酸雙肽酶（post-proline dipeptidyl aminopeptidase；Pep X），以表示菌體之自體水解能力（Wilkinson *et al.*, 1994）。

前人為了證明最佳胞內指標酵素（intracellular marker enzyme），利用了超音波震碎乳酸菌菌體的方式，經過 15,000×g 離心 15 分鐘後，取得 cell free supernatant（CFS），於 CFS 的部分偵測到 LDH、G6PDH 及 Pep X 的存在，並證實此三種酵素活性在不同溫度及鹽含

量皆相當穩定，其中以 LDH 為最，是作為測定自體水解程度最佳的
指標酵素 (Wilkinson *et al.*, 1994 ; O'Donovan *et al.*, 1996)。

肆、材料與方法

一、實驗材料

(一) 供試菌配

乳酸桿菌菌株（表一）與乳酸球菌菌株（表二）皆供自東海大學畜產系微生物實驗室及購自食品工業發展研究所菌種保存中心。菌種保存於各菌株最適培養基，存放於-80°C 冷凍櫃，使用前經二次活化後供試。

表一、試驗 I 與 II 所使用的乳酸桿菌菌株

Table 1. Lactobacilli strains used in Exp. I and II

Strains	CCRC	培養基與溫度(°C)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	14009	MRS, 37
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	10940	MRS, 37
<i>Lb. casei</i>	10697	MRS, 37
<i>Lb. casei</i>	12249	MRS, 37
<i>Lb. bulgaricus</i>	10696	MRS, 37
<i>Lb. bulgaricus</i>	14098	MRS, 37
<i>Lb. acidophilus</i>	10695	MRS, 37
<i>Lb. helveticus</i>	11052	MRS, 37
<i>Lb. plantarum</i>	10069	MRS, 37
<i>Lb. plantarum</i>	12250	MRS, 37
<i>Lb. plantarum</i>	12944	MRS, 37
<i>Streptococcus thermophilus</i>	12257	MRS, 37
<i>Str. thermophilus</i>	12268	MRS, 37

表二、試驗 I 與 II 所使用的乳酸球菌菌株

Table 2. Lactococci strains used in Exp. I and II

Strains	CCRC	培養基與溫度(°C)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	10791	MRS, 37
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	14117	MRS, 30
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	11198	MRS, 37
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	12264	M17, 26

(二) 原料乳

1. 生乳：供自私立東海大學乳品加工廠。
2. 脫脂乳粉：為紐西蘭超特級脫脂乳粉，台紐乳品股份有限公司代理進口。組成分如下：

Composition	%
Total solid	95.84
Crude protein	38.47
Crude fat	0.69
Ash	8.44
Lactose	47.0
Glucose	0.5
Galactose	0.375

(三) 培養基

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 及 M17 液態和固態培養基皆購自於 Merck, Darmstadt, Germany。

(四) 藥品

1. Sodium chloride (NaCl) , Sodium carbonate — Ferak, Steiheim, Switzerland 。
2. Trichloroacetic acid, Folin reagent, Glucono- δ -lactone — Merck, Darmstadt, Germany 。
3. Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4) — 片山純藥工業株式會社，日本。
4. Rennet, L-tyrosine, Sodium citrate — Sigma, Louis, USA 。
5. Calcium chloride, Sodium hexametaphosphate — 林純藥工業株式會社，日本。
6. Nitric acid (HNO_3) , Ethyl ether, Potassium permanganate, Hydrochloric acid (HCl) , Silver nitrate, sulphuric acid — 聯工化學，新竹，台灣。
7. Phosphotungstic acid — J.T. Baker, USA 。
8. Potassium thiocyanate — 昭和化學株式會社，日本。
9. TRIS(hydroxymethyl)-aminomethane — Millipore, USA 。
10. Ferric ammonium sulfate — 和光純藥工業株式會社，日本。
11. Boric acid, Sodium hydroxide — 島久藥品株式會社，日本。
12. Phosphocaseinate — 零脂鮮乳以 $77,000\times g$ 超高速離心後取得。

(五) 儀器與設備

1、培養箱

恆溫培養箱：登盈儀器公司，台灣。

低溫培養箱：DBL-120 登盈儀器公司，台灣。

迴轉式低溫培養箱：HOTECH 705R 巨多儀器公司，台灣。

振盪低溫水浴槽：登盈儀器公司，台灣。

振盪恆溫水浴槽：登盈儀器公司，台灣。

恆溫培養箱：Sanyo IPR150, United Kingdom。

2、冷凍離心機：HERMLE 2323K，德國。

3、高壓滅菌釜：Tomin Inc., Taiwan。

4、超低溫冷凍櫃：三洋電器公司，日本。

5、超高速離心機：Hitachi, Japan。

6、分光光度計：UV-1601 Shimadzu, Japan。

7、超音波細胞打碎機：Misonix, New York, USA。

8、Kjeldhal system-1002：Foss tecator, Sweden。

9、Soxtec system HT 1043：Foss tecator, Sweden。

二、實驗步驟

篩選自體水解能力較佳之菌株作為促進乾酪熟成試驗之菌醃。

試驗 I：篩選自體水解能力較佳之菌醃

(一) 蛋白質分解能力試驗

各試驗菌株於 25°C 與其最適生長溫度 (optimum growth temperature) 下培養之蛋白質分解能力測定：

依 Assensio *et al.* (1995) 的方法，接種 2% 試驗乳酸菌株於 35mL 之 10% SNF 脫脂乳，置於 25°C 培養 24 h 後或置於各菌株之最適生長溫度 (26、30 或 37) 培養，分別於第 3 天與第 6 天取出，再依 Hull (1947) 測定游離胺基酸的含量。

(二) 菌醃自體水解能力試驗

依 Boutrou *et al.* (1998) 之方法。

1. 檸檬酸鈉緩衝溶液 (buffer system)

菌體在 buffer sol. (8mL of 50mM sodium citrate, pH 5.0, 15g/L of NaCl) 中，於 13 °C 培養 15 天，每 3 天取出，依據食品工業發展研

究所 (2000) 分別以 M17 agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 及 MRS agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 之菌數。

2. 模擬凝乳 (pseudo curd)

菌體在 pseudo curd (115°C、15 分鐘滅菌之 100g/L native phosphocaseinate 添加 6g/L CaCl₂，以 15g/L glucono-δ-lactone (G-D-L) 調整到 pH 5.0) 中，於 13°C 貯藏 15 天，分別於第 0、3、6、9、12 及 15 天取出，分別以 M17 agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 及 MRS agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 之菌數 (食品工業發展研究所，2000)。

3. 乳酸去氫酶 (LDH) 活性測定

依 O'Donovan *et al.* (1996)，以 10,000×g 離心 15 分鐘後取得菌體，懸浮於 25mL tris-HCl (pH 7.2)。菌體以超音波震碎，取得 cell-free supernatants (CFS)。再以 15,000×g 離心 15 分鐘取得上清液，測定 LDH 活性代表其胞內酵素活性。

(三) 乳酸菌菌醃產酸度試驗

依林 (1989)，接種 3% 供試乳酸菌醃，培養於 37°C，3.5 h 後，以 0.1N NaOH 滴定；並以酚酞為指示劑，測定酸度達 0.35% 以上為良好；0.35 ~ 0.30% 為活性遲緩；0.30% 以下為不良。

試驗 II：乾酪熟成試驗

依張（1991）製作乾酪。生乳以 80°C 殺菌 15 秒後冷卻至 30°C，加入乳酸菌菌醃 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 及 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117（或 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198）置於 30°C 水浴 2 小時 30 分鐘使其酸度達 0.18% 時加入凝乳酶（分別於 A、B 兩組同時加入經過冷凍處理之輔助菌醃 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 及 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696）攪拌一分鐘即停止，靜置 35 分鐘後，進行截切。截切成丁約 1 ~ 2cm 之立方體後蒸煮（以每五分鐘增加 1°C 的速率加熱到 38°C）期間不停徐徐攪拌，直到凝乳縮至原本的 1/2 ~ 1/3 後進行乳清排除。以八層滅菌紗布過濾乳清，將 5% 食鹽與凝乳攪拌均勻後，放置於容器中施壓繼續排除乳清，乾燥 18 小時成型後分切，以真空包裝袋真空包裝分切之乾酪，分別為 A、B、C 及 D 四組，貯存於 18°C 下熟成 84 天。於 28 天內，每 7 天分別以 MRS agar 及 M17 agar 測定 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 及 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 之菌數，一個月後，則分別於第 28、56 及 84 天取出，測定其乳酸菌菌數與分析其組成分之變化。

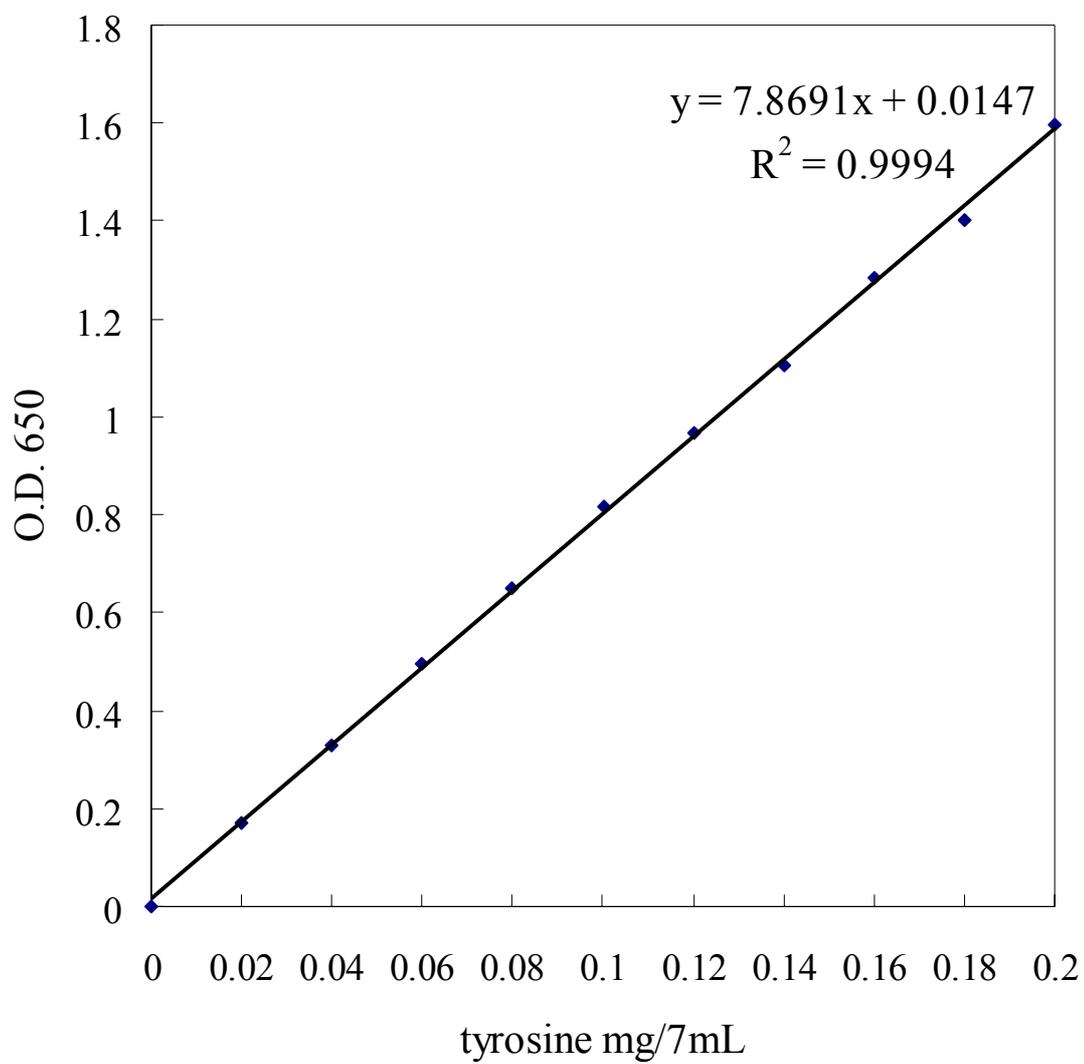
三、分析方法

(一) 游離胺基酸含量測定及標準曲線

依 Hull (1947) 之方法。各取 10mL 樣品與等量 0.72N TCA 混合均勻，靜置 10 分鐘後以 Toyo No. 5B 濾紙過濾。取濾液 1mL 或空白試液與 5 mL 0.4M Sodium carbonate –sodium hexametaphosphate 溶液混合後於 38°C 水浴中預熱，與 1mL Folin reagent (Folin-Ciocalteu's phenol reagent：蒸餾水=1：4) 於 38°C 下反應 30 分鐘，以分光光度計在 650nm 波長讀取其吸光值，以酪胺酸溶液作成之標準曲線計算出其濃度。

酪胺酸標準曲線

圖三為酪胺酸標準曲線。以 100 mg / 500 mL 為標準溶液，分別取 0.1 mL ~ 1.0 mL 標準溶液，再加入蒸餾水使其為 1mL，與 5 mL 0.4 M sodium carbonate – sodium hexametaphosphate 溶液混合後於 38°C 水浴中預熱，再與 1 mL Folin reagent 於 38°C 下反應 30 分鐘，以分光光度計測定其在波長 650 nm 之吸光值，所得之回歸方程式即為標準曲線。標準曲線公式： $y = 7.8691x + 0.0147$ ， R^2 值達 0.9994；以所測得之吸光值帶入 y 值，即求得 x 值為其酪胺酸濃度。



圖三、酪胺酸之標準曲線。

Fig. 3. Standard curve of tyrosine.

(二) 菌醃自體水解能力試驗

依 Boutrou *et al.* (1998) 之方法。

1. 檸檬酸鈉緩衝溶液 (buffer system)

以 Buffer (8mL of 50mM sodium citrate, pH 5.0, 15g/L of NaCl) 在 13 °C 培養 15 天，每 3 天分別以 M17 agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 及 MRS agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 之菌數 (食品工業發展研究所，2000)，依公式： $(A_0 - A_t) \times 100 / A_0$ (以百分比表示) 為菌體自體水解的百分比。

A_0 =起始吸光值(initial absorbance)； A_t =培養第 t 天所測得之吸光值。

2. 模擬凝乳 (pseudo curd)

於 pseudo curd(115°C 15min 滅菌之 100g/L native phosphocaseinate 添加 6g/L CaCl_2 ，以 15g/L glucono- δ -lactone 調整到 pH5.0) 中，13°C 貯藏 15 天，分別於第 0、3、6、9、12 及 15 天取出，分別以 M17 agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 及 MRS agar 培養並計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 之菌數 (食品工業發展研究所，2000)。

3. 乳酸去氫酶活性試驗

依 O'Donovan *et al.* (1996) 之方法。

(1) 菌體取得

試驗菌株於 MRS broth 中活化二次後供試，250 mL 菌液在 4°C 以 10,000×g 離心 15 分鐘後移除 MRS broth，以冰蒸餾水洗菌兩次後，以 25 mL tris-HCl pH 7.2 懸浮。

(2) 超音波震碎

菌體於冰浴中以超音波 (Ultrasonic processor, Misonix incorporated) 震碎 (每次兩分鐘，共五次；每次間隔 2 分鐘，以冰浴使其溫度回到 4°C，不能超過 15°C)，取得 cell-free supernatants (CFS)。

(3) 乳酸去氫酶活性測定

依 lactate 在 LDH 存在下伴隨著 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) 還原成 NADH。

反應式為：



菌體以超音波震碎後以 15,000×g 離心 15 分鐘取得 CFS 之上清液。酵素活性測定以 CFS 之上清液與 LD reagent(含 lactate 和 NAD^+) 混合反應後於波長 340 nm 測其吸光值，依此作為活性判定。

(三) 乳酸菌醃產酸度試驗

依林 (1989)，取 10g 脫脂乳粉溶於 90 mL 蒸餾水，於 121°C 滅

菌 10 分鐘 (10% 還原脫脂乳分裝 10mL 於試管中)，接種 3% 菌量，培養於 37°C，3.5 h。加入 5 mL 蒸餾水稀釋培養物，滴入 1 mL 酚酞，以 0.1N 氫氧化鈉滴定。酸度達 0.35% 乳酸以上為良好；0.35 ~ 0.30% 為活性遲緩；0.30% 以下為不良。

(四) 凝乳酶之力價測試

依林 (1989)，將脫脂乳粉 9g 溶於 100 mL 蒸餾水，以 0.1N 乳酸調整酸度達 0.18%。將凝乳酶稀釋 100 倍，取 0.5mL (0.005g) 凝乳酶稀釋液及 100mL 還原脫脂乳，分別加溫至 35°C 後，將兩者混合均勻，保持 35°C，測凝固所需的時間。凝乳之力價以下列公式計算：

凝乳能力 (力價) = 脫脂乳量 / 凝乳量酶 × 標準凝固時間 (2400) / 凝乳時間

凝乳能力 (力價) =

脫脂乳量 100 / 凝乳量酶 0.75 × 標準凝固時間 (2400) / 凝乳時間 60

本實驗依計算之凝乳酶力價 = 80，即可得知需使用多少凝乳酶量。

(五) 輔助菌配之冷凍處理

依 Madkor *et al.* (2000)。 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 與 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 以 MRS broth 活化兩次後供試，經 5000×g 離心後取得菌體，以滅菌之 0.85% 生理食鹽水洗菌兩次後，懸浮於 20 mL 滅菌水中。於 -20°C 冷凍 24 小時後取出，以 38°C 水浴解凍。

(六) 總氮含量測定 (Total nitrogen ; TN)

依 Kjeldahl 法 (A.O.A.C, 1990) 測定。

將 1.0g 樣品投入分解管中，加入催化錠及 20 mL 濃硫酸，置入以預熱至 410°C 分解槽加熱分解直到液體呈澄清透明。冷卻後將加入 50 mL 蒸餾水與混合指示劑之分解管置於蒸餾設備並加入過飽和 NaOH 溶液，使溶液呈鹼性；以含有 25 mL 4% 硼酸溶液及混合指示劑的收集瓶置於收集管下，進行蒸餾並收集蒸餾液，再以 0.1N 硫酸滴定至中性變色，紀錄所用之酸的體積。

依公式計算氮含量與蛋白質含量：

$$\text{氮}(\%) = 0.0014 \times f \times (\text{0.1N H}_2\text{SO}_4 \text{ mL 數} - \text{blank mL 數}) / \text{樣品重} \times 100\%$$

$$\text{蛋白質}(\%) = \text{氮}\% \times 6.38 \quad f = \text{0.1N H}_2\text{SO}_4 \text{ 之力價。}$$

(七) 熟成度測定

依 Agboola and Milena (2002) 之方法。

取 1.0g 粉碎均勻的樣品，以 2% 檸檬酸鈉水溶液定容至 4 mL，加入等量 0.72N TCA 溶液混合均勻後，靜置 30 分鐘使其反應。將其以 5000×g 離心 15 分鐘後，以濾紙 (Toyo No. 5B) 過濾，取得濾液。取 4.5 mL 濾液依 Kjeldahl 法 (A.O.A.C, 1990)，測其可溶於 TCA-N 之含量或依 Hull (1947) 測定其酪胺酸含量，再以酪胺酸標準曲線換算可溶於 TCA-胺基之含量。

(八) PTA 可溶性游離胺基酸測定

依 Macedo and Malcata (1997)，取 1.0g 粉碎均勻的樣品，以 2% 檸檬酸鈉溶液定容至 4mL，加入 2.8 mL 7.9N 硫酸與 1.2mL 33.3% PTA 溶液混合均勻後，靜置 24 h(overnight)使其反應。將其以 5000×g 離心 15 分鐘後，以濾紙(Toyo No. 5B)過濾，取得濾液。依 Hull(1947)測定酪胺酸含量，再以酪胺酸標準曲線換算 PTA-游離胺基酸之含量。

(九) 乳脂肪測定

取 5.0g 粉碎均勻的樣品，經乾燥後，依 A.O.A.C. (1990) 測定其乳脂肪含量。

(十) 水分測定

依 Lepeuple *et al.* (1998)，取 5.0g 粉碎均勻的樣品，以 100 ± 2 °C 烘乾 16 h 後秤重，以公式計算其水分含量。

(十一) 食鹽含量測定

依陳 (1994)，秤取 1.0g 粉碎均勻的樣品至三角錐瓶中，加入 25 mL 0.1N 硝酸銀溶液，旋轉至樣品與溶液呈親密接觸後，添加 15 mL 濃硝酸煮沸至完全溶解且添加 5% 高錳酸鉀促進反應，待溶液顏色呈透明。而後添加 25 mL 蒸餾水煮沸 5 分鐘，冷卻後以蒸餾水稀釋至 150 mL。

加入 25 mL 乙醚與 2 mL ferric alum 指示劑後強力震盪，以 0.1N 硫氰酸鉀溶液滴定過剩的硝酸銀至滴定終點成永久淡褐色。

(十二) pH 值測定

依 Agboola *et al.* (2002)，取 5.0g 粉碎均勻的樣品，加 45 mL 無菌蒸餾水，攪拌均勻後以 pH meter (Melter) 測定其 pH 值。

(十三) 乳酸菌菌數測定

依 O'Donovan *et al.* (1996)，取 5.0g 粉碎均勻之樣品，加入 45g 2% 滅菌檸檬酸鈉溶液後粉碎混勻，經過一連串稀釋，分別以 MRS agar 於 37°C 培養 48 ± 3 小時後計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 之菌落數及 M17 agar 於 25°C 培養 48 ± 3 小時後計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 之菌落數 (食品工業發展研究所，2000)。

(十四) 統計分析

實驗重複三次，依測定項目所得數據，採用 SAS 統計套裝軟體 (1999) 進行分析。將試驗結果以一般線性模式 (General linear model; GLM) 進行不同處理間之差異性測定；另以 Least-square means (LSD) 測定法比較各處理組平均值之差異顯著性。

伍、結果與討論

一、試驗 I：篩選自體水解能力較佳之菌醃

(一) 蛋白質分解能力試驗

1. 各菌株於 25°C 下培養 24 h 對乳蛋白質分解力之影響

依 Assensio *et al.* (1995)，將各菌株於 25°C 培養 24 h 後測定蛋白質分解能力，並依 Hull (1947)，以波長 650nm 測定酪胺酸 (tyrosine) 產量，將所測定之吸光值換算成酪胺酸濃度，以之代表游離胺基酸含量作為蛋白質分解能力之比較。

表三是各菌株於 25°C 培養 24 h 後蛋白質分解能力以酪胺酸含量表示。各菌株於 25°C 均具分解乳蛋白質之能力，乳酸球菌菌株以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 具有最強之蛋白質分解能力，於 24 h 後其酪胺酸含量最高，可達 0.235 mg/mL，與各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 次之，其酪胺酸含量為 0.110 mg/mL，與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 沒有顯著差異 ($p > 0.05$)；*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 分解力微弱，酪胺酸含量在 0.101 mg/mL 以下。乳酸桿菌菌株 *Lb. bulgaricus* CCRC 14009、*Lb. casei* subsp. *rahamnosus*

CCRC 10940、*Lb. casei* CCRC 10697、*Lb. casei* CCRC 12249、*Lb. bulgaricus* CCRC 14098 及 *Lb. helveticus* CCRC 11052 分解力中等，酪胺酸含量範圍在 0.139 ~ 0.152 mg/mL 之間；其餘則分解力較微弱，酪胺酸含量範圍在 0.087 ~ 0.127 mg/mL 之間，以 *Lb. plantarum* CCRC 12944 分解力最微弱，與各菌株間皆有顯著差異。若以乳酸球菌與乳酸桿菌同時比較，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 於 25°C 培養 24 h 後，仍為蛋白分解能力最強之菌株，顯著較其他各組為高 ($p < 0.05$)。Asensio *et al.* (1995) 指出，*Lc. lactis* subsp. *lactis* IFPL 60 為其試驗菌株中所測得之游離胺基酸含量最高者，代表其蛋白分解能力最佳。

2. 各菌株於個別最適生長溫度 (37、30 及 25°C) 下對乳蛋白質分解力之影響及其 pH 值之變化。

(1) 蛋白分解能力

表四是各菌株於其最適生長溫度之蛋白分解能力，以酪胺酸 (mg/mL) 含量表示，各菌株於其最適生長溫度均具分解乳蛋白質之能力，並表現其最佳之分解力，且各菌株於第 6 天者之分解力皆大於第 3 天者，*Lb. bulgaricus* CCRC 14009、*Lb. casei* CCRC 12249、*Lb. plantarum* CCRC 12944、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791、*Str.*

thermophilus CCRC 12257 及 *Str. thermophilus* CCRC 12268 六菌株差異不顯著 ($p > 0.05$)，*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940、*Lb. casei* CCRC 10967、*Lb. bulgaricus* CCRC 10696、*Lb. bulgaricus* CCRC 14098、*Lb. acidophilus* CCRC 10695、*Lb. helveticus* CCRC 11052、*Lb. plantarum* CCRC 10069、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 及 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 則皆達差異顯著水準 ($p < 0.05$)。第 3 天時，以 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 蛋白分解能力最強，其酪胺酸含量達 1.373 mg/mL，與其他各菌株酪胺酸含量達差異顯著 ($p < 0.05$)，*Lb. bulgaricus* CCRC 14009 次之，而以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 分解力最微弱，其酪胺酸含量僅 0.076 mg/mL；第 6 天亦以 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 酪胺酸含量最高，達差異顯著 ($p < 0.05$)，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 之酪胺酸含量則增加至 0.612 mg/mL，為增加最多的菌株。

表三、各菌株於 25°C 培養 24 h 乳蛋白質分解力之測定，以酪胺酸含量 (mg/mL) 表示

Table 3. Proteolytic activity of different strains at 25°C after 24 h incubation

Strains	CCRC	tyrosine (mg/mL)	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	14009	0.149	B
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	10940	0.147	B
<i>Lb. casei</i>	10697	0.141	BC
<i>Lb. casei</i>	12249	0.152	B
<i>Lb. bulgaricus</i>	10696	0.106	DE
<i>Lb. bulgaricus</i>	14098	0.147	B
<i>Lb. acidophilus</i>	10695	0.128	C
<i>Lb. helveticus</i>	11052	0.139	BC
<i>Lb. plantarum</i>	10069	0.127	C
<i>Lb. plantarum</i>	12250	0.105	DE
<i>Lb. plantarum</i>	12944	0.087	G
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	10791	0.101	DEF
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	14117	0.110	D
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	11198	0.096	EFG
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	12264	0.235	A
<i>Streptococcus thermophilus</i>	12257	0.091	FG
<i>S. thermophilus</i>	12268	0.059	H

A-H：同行中不同字母表示有顯著差異 (p<0.05)。

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

表四、各乳酸菌株於其最適生長溫度（25、30 及 37°C）下培養 3 天

及 6 天後乳蛋白質之分解力，以酪胺酸含量（mg/mL）表示

Table 4. Proteolytic activity of different strains at optimum growth temperature after 3 and 6 days incubation

Strains	CCRC	Day 3	Day 6
		tyrosine (mg/mL)	
<i>Lb. bulgaricus</i>	14009	1.333 ^{aB}	1.420 ^{aA}
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	10940	0.661 ^{aI}	0.769 ^{bE}
<i>Lb. casei</i>	10697	0.844 ^{aF}	0.968 ^{bD}
<i>Lb. casei</i>	12249	0.975 ^{aE}	0.990 ^{aD}
<i>Lb. bulgaricus</i>	10696	1.374 ^{aA}	1.449 ^{bA}
<i>Lb. bulgaricus</i>	14098	0.756 ^{aHI}	0.862 ^{bE}
<i>Lb. acidophilus</i>	10695	0.928 ^{aF}	1.008 ^{bD}
<i>Lb. helveticus</i>	11052	1.020 ^{aDE}	1.109 ^{bC}
<i>Lb. plantarum</i>	10069	0.961 ^{aDE}	1.096 ^{bC}
<i>Lb. plantarum</i>	12250	0.583 ^{aJ}	0.758 ^{bF}
<i>Lb. plantarum</i>	12944	0.726 ^{aGH}	0.717 ^{aE}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	10791	0.740 ^{aHI}	0.768 ^{aF}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	14117	0.076 ^{aL}	0.611 ^{bG}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	11198	0.854 ^{aFG}	1.021 ^{bD}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	12264	0.486 ^{aK}	0.617 ^{bH}
<i>Str. thermophilus</i>	12257	1.200 ^{aC}	1.226 ^{aB}
<i>Str. thermophilus</i>	12268	1.048 ^{aD}	1.048 ^{aCD}

A-L：同行中不同字母表示有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

a-b：同列中不同字母表示有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

A-L：Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

a-b：Different letters in the same row indicate significant difference ($p < 0.05$).

(2) pH 值之變化

各菌株於其最適生長溫度均具產酸能力，如表五，各菌株 pH 值於第 6 天者幾乎都低於第 3 天，*Lb. bulgaricus* CCRC 14009、*Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940、*Lb. casei* CCRC 10697、*Lb. casei* CCRC 12249、*Lb. bulgaricus* CCRC 14098、*Lb. plantarum* CCRC 10069、*Lb. plantarum* CCRC 12250、*Lb. plantarum* CCRC 12944、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 及 *Str. thermophilus* CCRC 12268 達差異顯著 ($p < 0.05$)，其餘則差異不顯著。各組產酸能力頗強，如表五。*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 於第 3 天時最高，pH 僅下降至 5.64 於第 6 天時則降到 3.94；又 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 於第 3 天時達 pH 4.28，第 6 天時僅下降 0.02，產酸沒有持續，無顯著差異 ($p > 0.05$)。其餘乳酸桿菌菌株與嗜熱乳鏈球菌菌株本來就是適合製作酸酪乳之菌配，所以產酸能力較強，第 3 天時已降到 pH 4.0 以下，第 6 天時已達到 pH 3.16~3.59。其中僅 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 於第 6 天較第 3 天高且達差異顯著 ($p < 0.05$)。

表五、各乳酸菌株於各最適生長溫度（25、30 及 37°C）下培養 3 天
及 6 天後 pH 值之變化

Table 5. The pH value of different strains at optimum growth temperature after 3 and 6 days incubation

Strains	CCRC	Day 3	Day 6
		pH value	
<i>Lb. bulgaricus</i>	14009	3.21 ^{aGH}	3.16 ^{bK}
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	10940	3.55 ^{aF}	3.35 ^{bH}
<i>Lb. casei</i>	10697	3.53 ^{aF}	3.45 ^{bFG}
<i>Lb. casei</i>	12249	3.65 ^{aD}	3.50 ^{bE}
<i>Lb. bulgaricus</i>	10696	3.10 ^{aI}	3.18 ^{bJ}
<i>Lb. bulgaricus</i>	14098	3.63 ^{aD}	3.56 ^{bD}
<i>Lb. acidophilus</i>	10695	3.22 ^{aGH}	3.21 ^{aI}
<i>Lb. helveticus</i>	11052	3.18 ^{aH}	3.05 ^{aL}
<i>Lb. plantarum</i>	10069	3.22 ^{aG}	3.18 ^{bIJ}
<i>Lb. plantarum</i>	12250	3.80 ^{aC}	3.59 ^{bC}
<i>Lb. plantarum</i>	12944	3.58 ^{aE}	3.42 ^{bG}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	10791	3.57 ^{aEF}	3.41 ^{bG}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	14117	5.64 ^{aA}	3.94 ^{bB}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	11198	3.55 ^{aF}	3.47 ^{bF}
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	12264	4.28 ^{aB}	4.26 ^{aA}
<i>Str. thermophilus</i>	12257	3.22 ^{aGH}	3.16 ^{bJ}
<i>Str. thermophilus</i>	12268	3.22 ^{aGH}	3.21 ^{aI}

A-L：同行中不同字母表示有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

a-b：同列中不同字母表示有顯著差異（ $p < 0.05$ ）。

A-L：Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

a-b：Different letters in the same row indicate significant difference ($p < 0.05$).

(二) 菌醃自體水解能力試驗

1. 乳酸球菌菌醃於 Buffer system 中之自體水解能力

依 Boutrou *et al.* (1998)，將各乳酸球菌菌株培養於 13°C，組成分為 50 mM sodium citrate 及 15g/L NaCl，pH 5.0 的 buffer 環境下，以計數菌落數的方式，每 3 天測一次，計算其 15 天內之自體水解能力，結果以自體水解率(%)=死亡菌數/第 0 天起始菌數×100%表示。

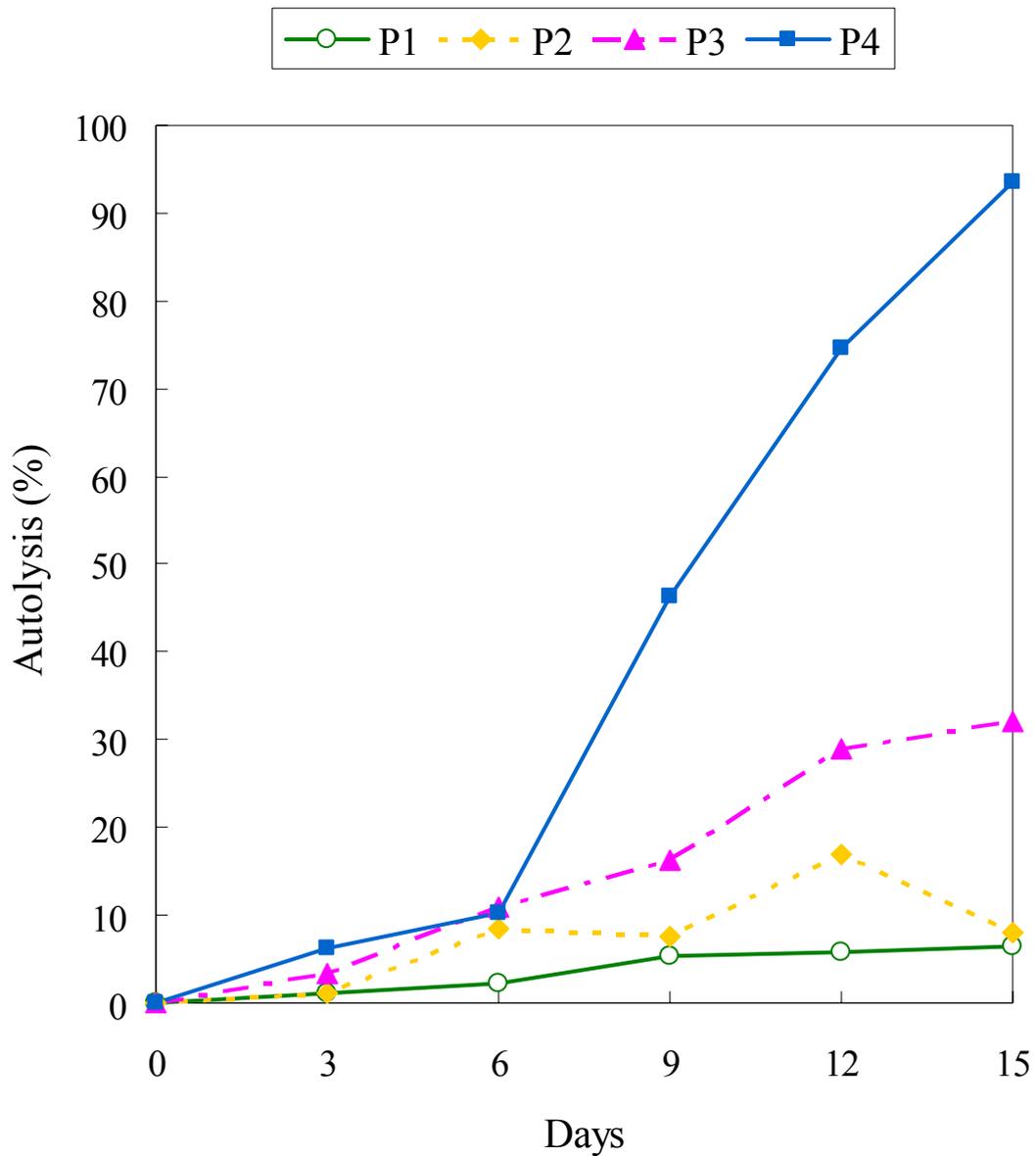
結果顯示如圖四，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 具有高度自體水解的能力，於第 3 天時，自體水解率達 6.24%，但與其他三組沒有差異。第 6 天時 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 與 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 的自體水解率分別為 8.37%、10.88%與 10.29%，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 有顯著差異 ($p < 0.05$)，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 與之則沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 於 buffer 中則存活率較高。當第 9 天時，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 的自體水解率達 46.29%，與其他三組有顯著差異($p < 0.05$)。而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 次之，自體水解率達 16.26%，與 *Lc. lactis* subsp. *lactis*

CCRC 10791、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 兩組有顯著差異 ($p < 0.05$)。第 12 天時，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 自體水解率已達 74.63%，第 15 天時，達 93.61%，與其他三組差異顯著 ($p < 0.05$)。而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 於第 12 天與第 15 天時，自體水解率達約 30.0%；而第 12 天時，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 達 16.96%，於第 15 天時僅 8.0%，與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 達差異顯著 ($p < 0.05$)。 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 於培養 15 天內，自體水解率僅 6.42%。

2. 乳酸球菌菌醃於 Pseudo curd 中之自體水解能力

依 Boutrou *et al.* (1998)，將各乳酸球菌菌株於 13°C，組成分為 100g/L native phosphocaseinate、6g/L 氯化鈣 (CaCl_2) 及 15g/L 葡萄糖酸- δ -內酯 (G-D-L) 之 pseudo curd 中培養 15 天，每 3 天取出測其菌數，結果以自體水解率 (%) = 死亡菌數/第 0 天起始菌數 \times 100% 表示。如圖五所示，以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 及 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 自體水解率較低，又以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 為最差，其自體水解率於第 15 天僅 3.15%，與其他三組皆達差異顯著；而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 及 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 有較高之自體水解能力，且 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 於第 3 天時，其自體水解率達 46.98%，與其他

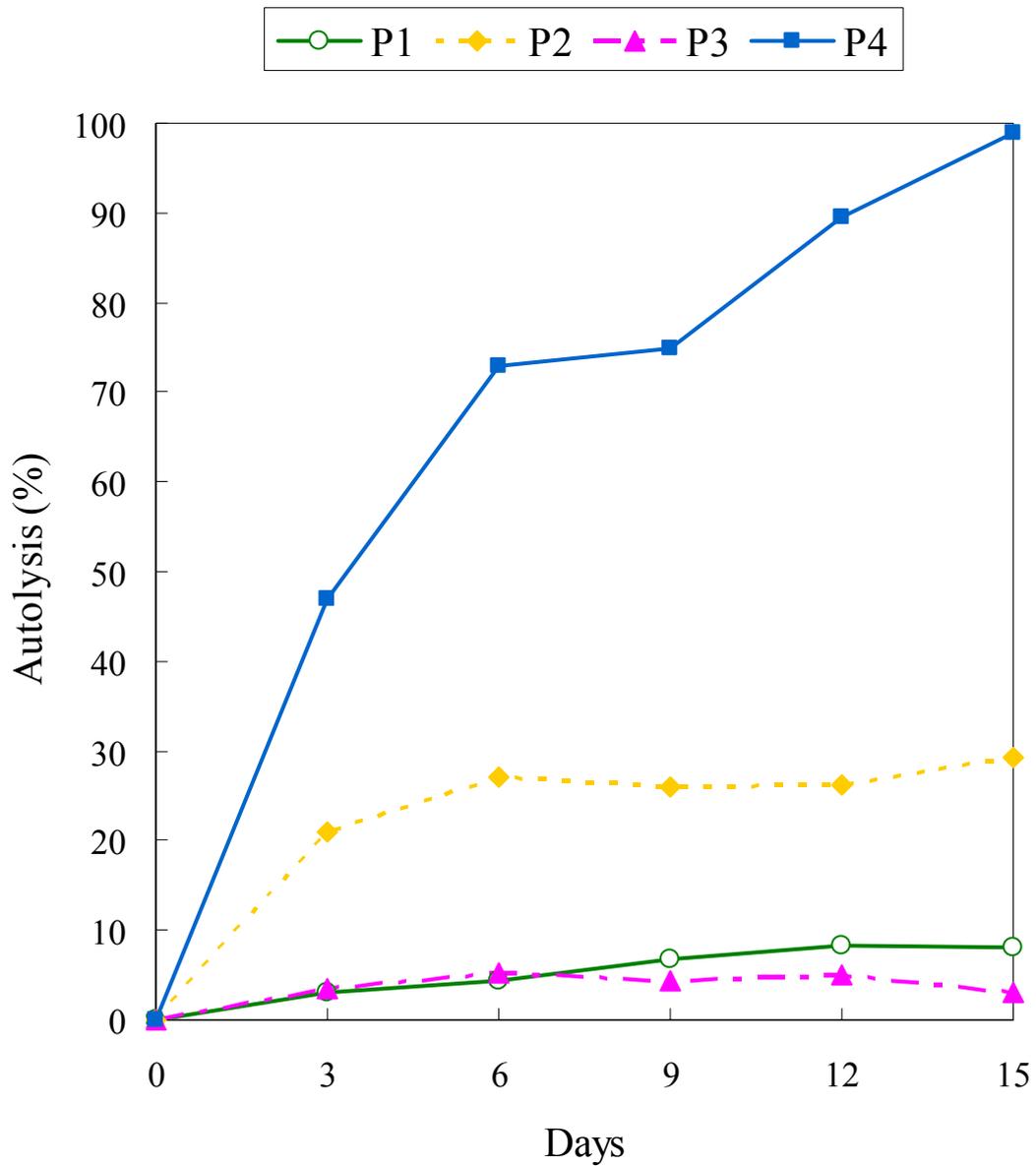
三組差異顯著 ($p < 0.05$)。 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 於第三天之後自體水解率為 21.01%，第 15 天時達到 29.24%，與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791、*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 達差異顯著 ($p < 0.05$)。四組間，以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 具有最高之自體水解能力，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 次之，而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 及 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 有較高之存活率。



圖四、乳酸球菌菌株於 Buffer system 中以 13°C 培養，其自體水解能力以 % 表示。

Fig. 4. Autolysis (%) of lactococci at 13°C in the buffer system.

P1: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791; P2: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117;
P3: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198; P4: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264

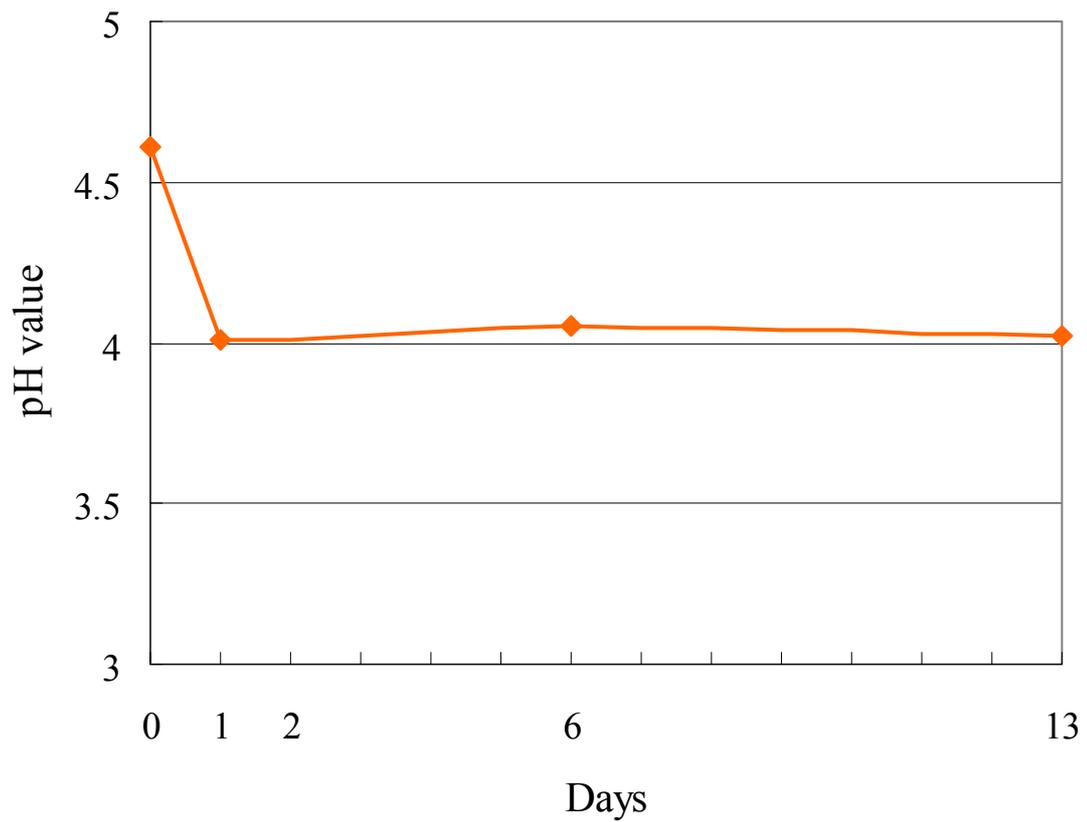


圖五、乳酸球菌菌株於 pseudo curd 中以 13°C 培養，其自體水解能力以 % 表示。

Fig. 5. Autolysis (%) of lactococci at 13°C in the pseudo curd.

P1: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791; P2: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117;
 P3: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198; P4: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264

Boutrou *et al.* (1998) 表示，乳酸球菌菌株於 buffer system 與 pseudo curd 中培養，所得之結果呈現正相關， $R^2=0.9181$ 。於本實驗中，於兩者培養下，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791 有相似的結果，其分別為四菌株中自體水解能力最高與最低者。而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 及 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 則有不同結果，於 buffer system 中 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 菌株有較高之死亡率，在 pseudo curd 中則存活率較高；*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 則有相反結果。根據 Boutrou *et al.* (1998) 中，添加 15g/L G-D-L 於 pseudo curd，其 pH 之變化甚劇如圖六，添加 15g/L G-D-L 於 10%SNF 脫脂乳中(pH 6.73) 後隨即測定其 pH 值，已下降至 4.61，第 1 天時，pH 4.025，一直到第 13 天時，pH 停滯於 4.00 上下。並不如文獻中所描述，添加 15g/L G-D-L 調整 pH 至 5.0；所以推斷，於 pseudo curd 中之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198，應該是由於耐酸特性較差，而致死亡率提高。而 buffer system 僅以 50mM sodium citrate、pH5.0 及 15g/L of NaCl 模擬乾酪滲透壓及食鹽濃度的緩衝溶液；故自體水解能力試驗以 pseudo curd 中所得之結果作為篩選依據；以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 有最高自體水解能力，而 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 次之；*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 則有較高之存活率。



圖六、於 10%脫脂乳中添加 15g/L 葡萄糖酸- δ -內酯之 pH 值變化。

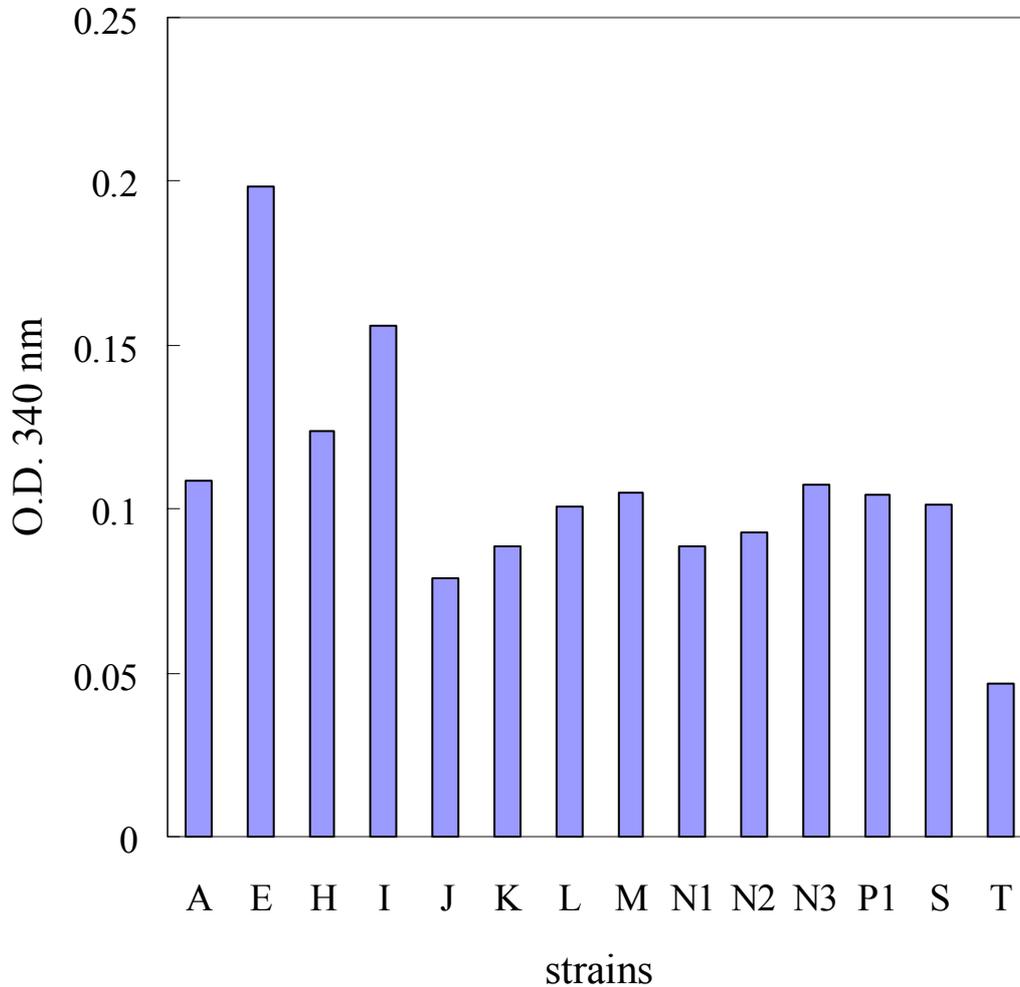
Fig. 6. The change of pH value in 15g/L G-D-L added to 10% SNF milk.

3. 乳酸去氫酶 (LDH) 活性試驗

實驗將菌體以超音波震碎後以 15,000×g 離心 15 分鐘取得 CFS 之上清液。酵素活性測定以 CFS 之上清液與 LD reagent (含 lactate 和 NAD^+) 混合反應後於波長 340 nm 測其吸光值。即為乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase; LDH) 的活性，以測定 LDH 活性表示胞內酵素活性。如圖七所示，各菌株中，以 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 所測出的 LDH 活性最高，於 340 nm 吸光值為 0.198，與各組間有顯著差異 ($p < 0.05$)；*Str. thermophilus* CCRC 12268 活性最低，與各組間皆有顯著差異 ($p < 0.05$)；其餘菌株之 LDH 活性約在 0.079 ~ 0.156 之間。乳酸桿菌中，仍以 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 之 LDH 活性最高，*Lb. bulgaricus* CCRC 10696、*Lb. bulgaricus* CCRC 14098、*Lb. plantarum* CCRC 10069 及 *Lb. plantarum* CCRC 12250 活性較低，四組間沒有顯著差異，但以 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 活性最弱。O'Donovan *et al.* (1996) 與 Hannon *et al.* (2003) 指出，於乾酪中所測定 LDH 較高之組別，其菌株有較高的自體水解能力，且熟成較快速。

經由測定 LDH 活性代表胞內酵素含量篩選試驗，選擇乳酸桿菌屬中 LDH 活性最強的菌株為 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC

10940，而活性最弱的菌株為 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696。



圖七、各乳酸菌菌株 LDH 之活性。

Fig. 7. The activity of LDH of different strains.

A: *Lb. bulgaricus* CCRC 14009; E: *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940; H: *Lb. casei* CCRC 10697; I: *Lb. casei* CCRC 12249; J: *Lb. bulgaricus* CCRC 10696; K: *Lb. bulgaricus* CCRC 14098; L : *Lb. acidophilus* CCRC 10695; M: *Lb. helveticus* CCRC 11052; N1: *Lb. plantarum* CCRC 10069; N2: *Lb. plantarum* CCRC 12250; N3: *Lb. plantarum* CCRC 12944; P1: *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 10791; S: *Str. thermophilus* CCRC 12257; T: *S. thermophilus* CCRC 12268.

(三) 乳酸菌產酸度試驗

表六為各菌醃最適生長溫度及 30°C 產酸度試驗與活性判定。於各最適生長溫度及 30°C 下培養 3.5 h，酸度（乳酸%）達 0.35% 以上為良好；0.35 ~ 0.30% 為活性遲緩；0.30% 以下為不良。於各溫度下，四組乳酸球菌菌醃活性均不良，於 30°C 時，僅 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 活性遲緩。

表六、各乳酸球菌菌醃於最適生長溫度及 30°C 產酸試驗之活性判定

Table 6. Activity of different strains at optimum growth temperature and 30°C after 3.5h incubation in 10% SNF milk

Strains	acidity(%)	活性判定
37 °C		
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCRC 10791	0.246	不良
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCRC 11198	0.232	不良
30 °C		
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCRC 10791	0.238	不良
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCRC 14117	0.218	不良
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCRC 11198	0.228	不良
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCRC 12264	0.336	遲緩
25 °C		
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCRC 12264	0.236	不良

酸度達 0.35% 以上為良好；0.35 ~ 0.30% 為活性遲緩；0.30% 以下為不良。

綜合以上篩選試驗，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 為乳酸球菌菌株中，於培養 25°C，24 h 後蛋白分解能力最高者；且於自體水解能力試驗中，為自體水解率最高者，因此選擇其為乾酪製作的菌醃之一。又乾酪多以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 併用 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 製作而成，所以選擇自體水解力次於 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 與自體水解能力最差之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 作為試驗菌醃，以之對照。依 LDH 活性試驗所得結果，選擇乳酸桿菌菌株中 LDH 活性最高的 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 及 LDH 活性最低的 *Lb. bulgaricus* CCRC 10969，以輔助菌醃的方式於試驗 II 乾酪熟成試驗中添加入原料乳中，以作為兩組不同之處理組。

二、試驗 II：乾酪熟成試驗

試驗 II 中，承接試驗 I 所篩選的蛋白分解能力較佳之菌株，以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 14117 或 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 11198 併用 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 12264 以混合菌醃的方式製作乾酪，及使用 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 與 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696，以 -20°C，24 h 冷凍處理，以作輔助菌醃，實驗分成 A、B、C 及 D 四組，如表七。

表七、實驗分組

Table 7. Experiment treatments

組別	主體菌醃	輔助菌醃 (經-20°C 24 h 處理)
A	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 14117 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 12264	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CCRC 10940
B	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 14117 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 12264	<i>Lb. bulgaricus</i> CCRC 10696
C	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 14117 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 12264	無
D	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 11198 + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 12264	無

乾酪熟成期間，主要受到微生物相及其內酵素的作用，而導致乾酪在熟成期間發生一連串的物理及化學變化，造成乾酪之組成分、風味、質地與外觀上的改變。組成分的變化如下：

(一) 水分含量之變化

乾酪主要由水分、蛋白質、脂肪三部分組成，水分關係著乾酪的硬度。如表八所示，第 0 天時，初成生乾酪，A 與 C 兩組的水分含量分別為 48.70% 與 49.31%，其兩者間沒有差異 ($p > 0.05$)，B 與 D 兩組水分含量分別為 51.93% 與 51.75%，兩組間沒有顯著差異 ($p > 0.05$)；B 與 D 兩組水分含量顯著較 A、C 兩組為高 ($p < 0.05$)。第 28 天時，四組間沒有顯著差異，其水分含量介於 39.62% ~ 40.97% 之間。與 Madkor *et al.* (2000) 及 Wilkinson *et al.* (1994) 中，Cheddar cheese 於壓榨後的水分含量相仿，約佔 37.50 ~ 41.00% 之間。第 56 天時，僅 B 組水分含量較高，為 40.49%，與其他三組有顯著差異 ($p < 0.05$)，其餘 A、C 與 D 三組差異不顯著 ($p > 0.05$)，其水分含量介於 37.63% ~ 40.26% 之間。第 84 天時，D 組水分含量較高，與 A 組有顯著差異 ($p < 0.05$)，而 B 與 C 兩組則與其他兩組差異不顯著 ($p > 0.05$)。

各處理組，隨著天數的增加，水分含量有下降的趨勢。A 組在第

0 天時水分含量最高，為 48.70%與第 28、56 與 84 天達差異顯著 ($p < 0.05$)，於第 28 天與第 56 天時，分別為 39.62%與 38.43%，兩者間沒有顯著差異，但與第 84 天水分含量為 37.37%有顯著差異 ($p < 0.05$)。

A、B、C 與 D 四個處理組皆以第 0 天有最高水分含量，與其他三個時間點達差異顯著 ($p < 0.05$)。

表八、乾酪熟成期間組成分之變化

Table 8. The change of composition during cheese ripening (days)

Sample cheese	A	B	C	D
Ripening time (days)	Moisture (%)			
0	48.70 ^{a A}	51.93 ^{a B}	49.31 ^{a A}	51.75 ^{a B}
28	39.62 ^{b A}	40.92 ^{b A}	40.95 ^{b A}	40.97 ^{b A}
56	38.43 ^{bc A}	40.50 ^{b B}	37.63 ^{c A}	40.26 ^{b A}
84	37.37 ^{c A}	38.69 ^{c AB}	38.87 ^{c AB}	39.61 ^{b B}
	Fat (%)			
0	25.20 ^{c A}	23.68 ^{c B}	25.03 ^{b A}	22.77 ^{b B}
28	30.88 ^{b A}	30.30 ^{b A}	30.70 ^{a A}	30.84 ^{a A}
56	31.71 ^{ab A}	30.70 ^{a A}	31.50 ^{a A}	31.59 ^{a AB}
84	32.41 ^{a B}	32.37 ^{a A}	31.54 ^{a A}	30.91 ^{a B}
	Protein (%)			
0	18.35 ^{a A}	18.29 ^{a A}	18.55 ^{a A}	17.65 ^{a B}
28	21.78 ^{b A}	22.43 ^{b B}	20.92 ^{b C}	21.48 ^{b A}
56	22.24 ^{c AB}	22.58 ^{b A}	21.47 ^{c C}	22.12 ^{c B}
84	23.01 ^{d A}	23.11 ^{c A}	22.05 ^{d B}	22.04 ^{c B}
	NaCl (%)			
0	1.52 ^{a A}	1.79 ^{a AB}	1.98 ^{a B}	1.47 ^{a A}
28	1.16 ^{b A}	1.36 ^{b AB}	1.59 ^{bc B}	1.24 ^{ab AB}
56	1.20 ^{ab A}	1.35 ^{b A}	1.53 ^{d A}	1.11 ^{b A}
84	1.30 ^{ab A}	1.40 ^{b A}	1.54 ^{cd A}	1.26 ^{ab A}

A-B：同列中不同字母表示有顯著差異 (p<0.05)。

a-d：同行中不同字母表示有顯著差異 (p<0.05)。

A-B：Different letters in the same row indicate significant difference (p<0.05).

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

(二) 乳脂肪含量之變化

乳脂肪為乾酪成形及風味的重要元素，如表八所示，第 0 天時，A、B、C 及 D 四組的脂肪含量在 22.77% ~ 25.20% 之間。A 組最高與 C 沒有顯著差異，但顯著高於其他兩組。第 28 天之後，因為水分的減少，脂肪的比率增加，四組分別為 30.88%、30.30%、30.70% 及 30.84%。四組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。熟成第 56 天時，四組分別為 31.71%、31.70%、31.50% 及 31.59%，四組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。熟成第 84 天，以 A 組脂肪含量最高，為 32.41%，與 B 及 C 兩組無顯著差異；D 最低，為 30.91%，與 C 無顯著差異，但與 A、B 兩組達顯著差異 ($p < 0.05$)。本實驗中，乾酪是以全脂生乳製作，其脂肪含量多在 30.0 ~ 32.0% 之間，O'Donovan *et al.* (1996) 中，切達乾酪 (Cheddar cheese) 之脂肪含量與本實驗所測得之脂肪含量相仿，約 32 ~ 33% 之間。

(三) 蛋白質含量之變化

蛋白質是構成乾酪嗜味物質之主要來源。乳蛋白含量是以所測得之總氮量 $\times 6.38$ 得到。乾酪熟成第 0 天，A、B、C 及 D 四組的蛋白質含量分別為 18.35%、18.28%、18.55% 及 17.65%，D 與其他三組有

顯著差異 ($p < 0.05$)，三組間則沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，如表八。

由於第 0 天時，生乾酪的水分含量較高，蛋白質的含量相對減少，故熟成第 28 天時，水分減少，蛋白質含量相對上升，A、B、C 及 D 四組的蛋白質含量分別為 21.78%、22.43%、20.92% 及 21.48%，與第 0 天相較之下，皆明顯有升高的趨勢且達差異顯著 ($p < 0.05$)。A 與 D 差異不顯著 ($p > 0.05$)，B 與 C 兩組間差異顯著且與其他兩組皆有顯著差異 ($p < 0.05$)。Madkor *et al.* (2000) 及 Wilkinson *et al.* (1994) 中，Cheddar cheese 於壓榨後的蛋白質含量，約佔 23.0~25.0%。熟成第 56 天，A、B、C 及 D 四組的蛋白質含量分別為 22.24%、22.58%、21.47% 及 22.11%，四組皆較第 28 天時略為升高，A、C 及 D 三組達顯著差異 ($p < 0.05$)，僅 B 組在第 56 天與第 28 天相比沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。熟成第 84 天，A、B、C 及 D 四組的蛋白質含量分別為 23.01%、23.11%、22.05% 及 22.03%，A 與 B 差異不顯著，C 與 D 亦沒有顯著差異，但 A 與 B 分別與 C 與 D 有顯著差異 ($p < 0.05$)。

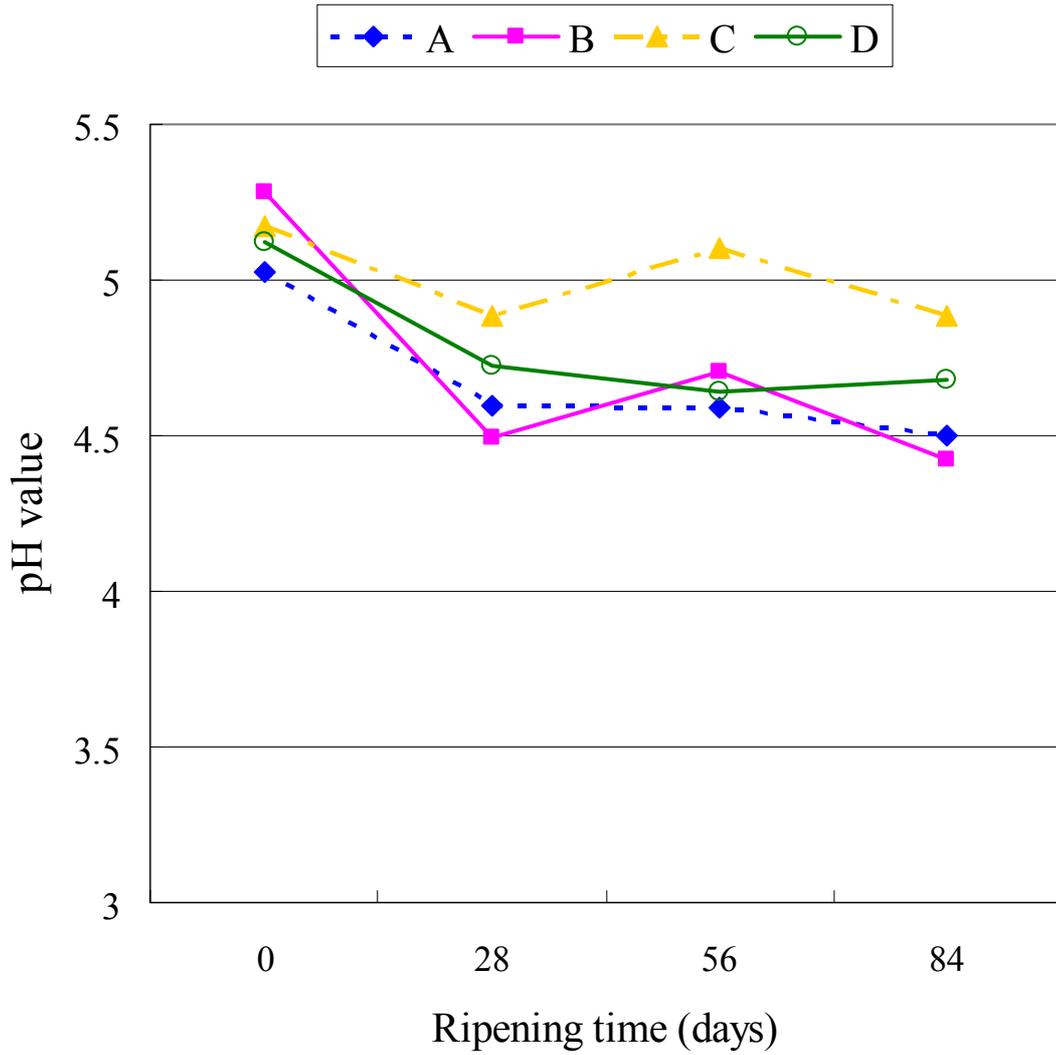
(四) pH 值之變化

於 84 天熟成期間，四組乾酪之 pH 值變化如圖八。乾酪初成即生乾酪時期，各組 pH 值落於 5.025~5.29 之間，以 B 組之 pH 值最高，與 C 無顯著差異，而 A 及 D 兩組有顯著差異；A 組之 pH 值最低，

與 D 組沒有差異，而與其他兩組差異達顯著 ($p < 0.05$)。第 28 天時，四組 pH 值分別為，4.60、4.50、4.88 及 4.72。以 C 產酸較少，與其他三組有顯著差異。而 B 組下降最多，輔助菌醃雖經過冷凍處理，仍具有高度產酸能力，其 pH 值與添加輔助菌醃之 A 組，無顯著差異，而與 C 及 D 兩組皆有顯著差異。熟成第 56 天時，仍以 C 組有最高之 pH 值，為 5.11，有上升的趨勢與第 28 天有顯著差異 ($p < 0.05$)。B 組亦有上升趨勢，為 pH 4.71，A 組則些微下降，與第 28 天時無顯著差異。四組間，C 最高與其他三組有顯差異，B 組次之，但與 A、D 兩組無顯著差異，以 D 最低。熟成第 84 天時，仍以 C 組之 pH 4.89 為最高，達差異顯著，D 次之，pH 4.68，亦顯著高於 A 與 B 兩組 ($p < 0.05$)。而 A、B 兩組則無差異。

文獻中所製成之乾酪，pH 值多落於 5.00 ~ 5.40 之間，鮮少低於 5.00，但本實驗中所測得之 pH 於第 0 天後，每隔 28 天測一次，於第 28 天時，所測得之 pH 值為 4.50 ~ 4.88 之間。Soda *et al.* (2000) 指出，以物理的處理法使輔助菌醃之活性減弱，可降低其產酸能力與使菌體受損，增加輔助菌醃之自體水解能力；Asensio *et al.* (1995) 亦表示以物理加熱法處理所篩選之菌株，可使菌株減少 44% 的產酸。但本實驗中，添加輔助菌醃之 A、B 兩組，其 pH 下降較快，與文獻中，前人實驗的 pH 5.0 ~ 5.4 有所差別，仍然有較高的產酸能力，使

pH 值降至 4.50 ~ 4.60 左右。Johnson *et al.* (1995) 指出添加輔助菌醃之乾酪組會有最低的初始 pH 值。



圖八、乾酪熟成期間 pH 值之變化。

Fig. 8. The change of pH value during cheese ripening (days).

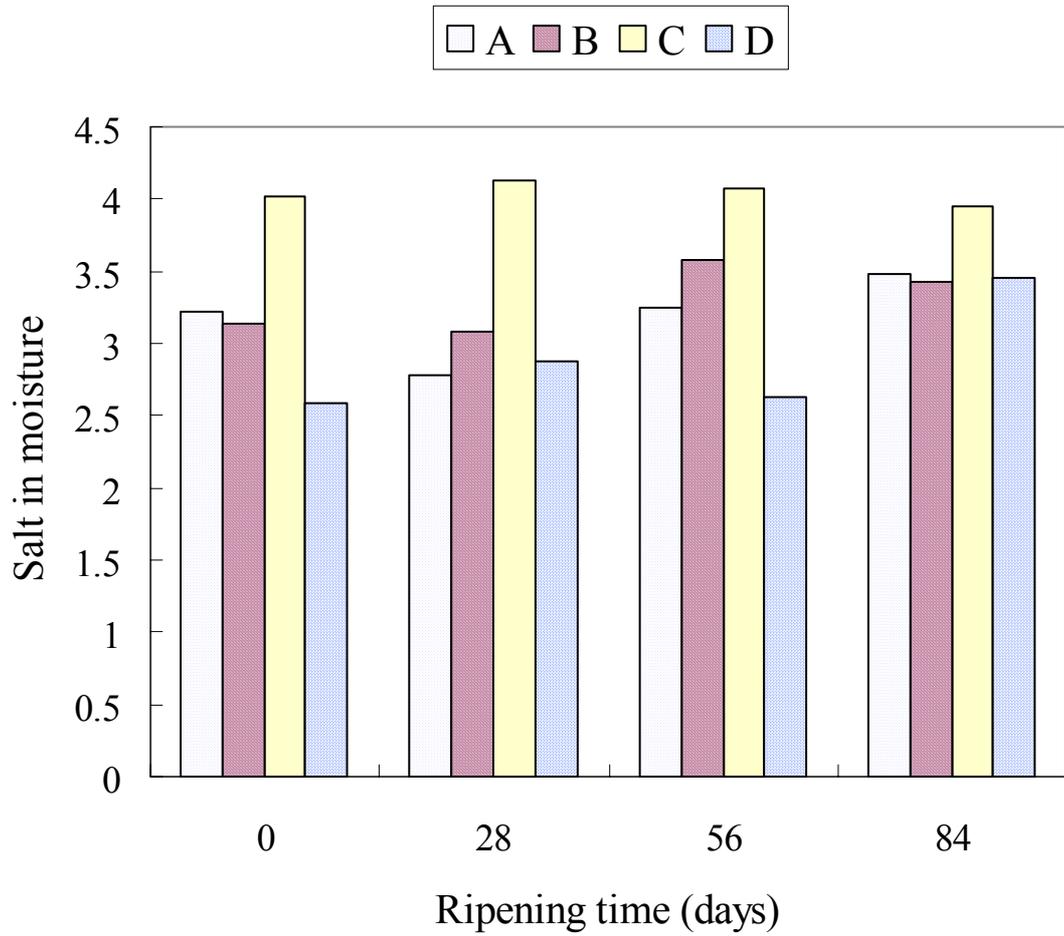
(五) 食鹽含量之變化

乾酪製造過程中，適量添加食鹽可增進乾酪風味及提高質地品質及抑制雜菌生長而增加保存性。鹽濃度亦會改變酵素的活性。本試驗，乾酪中食鹽的含量，第 0 天時，以 C 組之食鹽含量 1.98% 為最高，與 B 組差異不顯著，而與 A、C 兩組達差異顯著，如表八。第 28 天時，以 B 之食鹽含量 1.78% 最高，但與 C 無顯著差異；以 A 組食鹽含量 1.16% 為最低。第 56 天時，以 C 有最高食鹽含量，但與 A、B 兩組無顯著差異，以 D 食鹽含量 1.11% 為最低，與 C 有顯著差異。熟成第 84 天時，四組間無顯著差異，但仍以 C 食鹽含量最高。

(六) 鹽水比 (S/M) 之變化

乾酪中食鹽含量隨著熟成天數的增加，水分減少而有下降的趨勢。文獻中指出，蛋白質分解的程度受到 salt in moisture (S/M) 的影響甚鉅，以 4% S/M 之分解度最佳，酵素活性最大，以利乾酪熟成。乾酪中 S/M 的數值，如圖九，於熟成 84 天內，以 C 組的 S/M 值最高，達 3.95% ~ 4.13%，顯著較其他組為高 ($p < 0.05$)。Wilkinson *et al.* (1994) 指出，食鹽對菌醃之自體水解似乎有影響，不同 NaCl 濃度對 LDH、G6PDH 及 PPDA 等胞內酵素活性有不同影響，進而影響到

蛋白質的水解程度。



圖九、乾酪熟成期間 S/M 之變化

Fig. 9. The change of salt in moisture during cheese ripening (days).

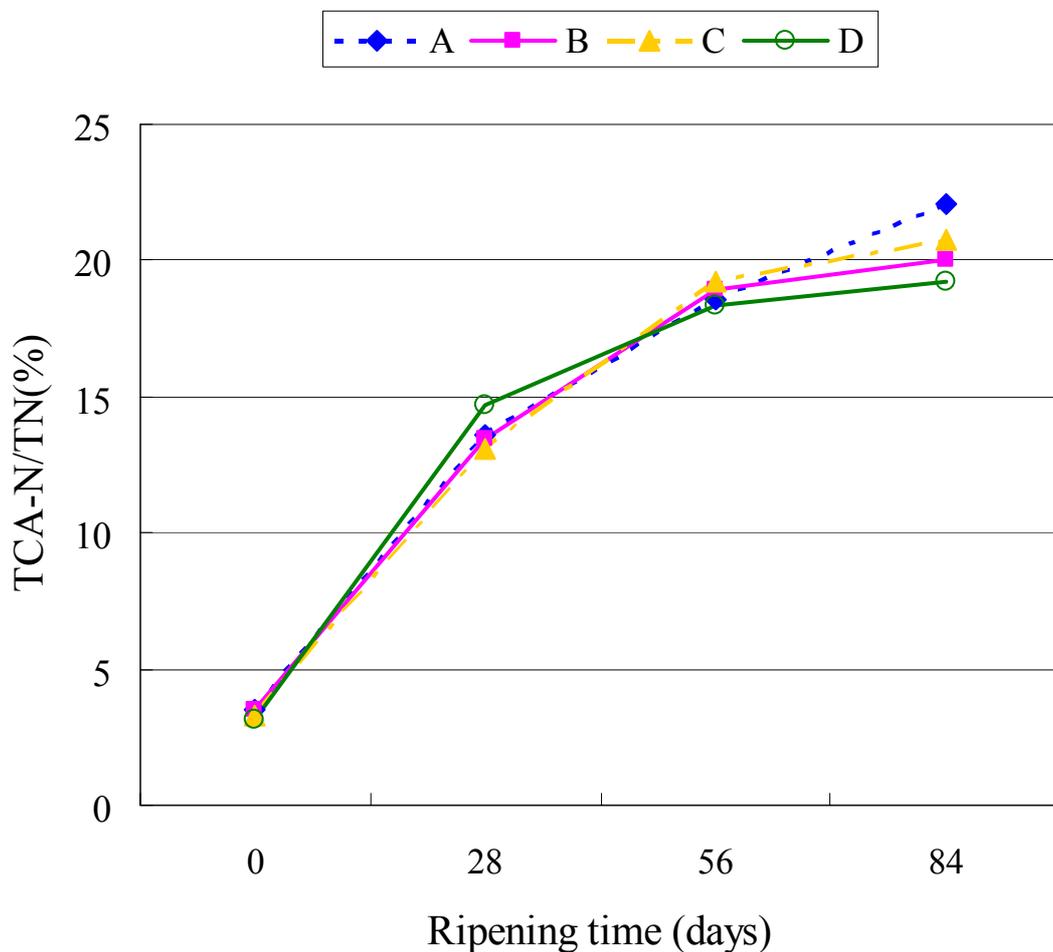
(七) 熟成度之變化

1. TCA 可溶性氮 (12% trichloroacetic acid-soluble N ; TCA-N/TN)

圖十是以 Kjeldahl method 所測得之溶於 12%TCA-N/TN 的百分比 (%) 表示乾酪熟成度。隨著熟成天數的增加，可溶性氮百分比有上升的趨勢，且在各處理內於第 0 天、第 28 天、第 56 天及第 84 天皆達差異顯著 ($p < 0.05$)。第 0 天時，A、B、C 及 D 的百分比分別為 3.50%、3.48%、3.30%及 3.14%，四組間沒有顯著差異。第 28 天時，分別為 13.59%、13.47%、13.08%及 14.70%，以 D 組熟成度最高，與其他三組達顯著差異 ($p < 0.05$)，其他三組間則無顯著差異。第 56 天時，分別為 18.59%、18.93%、19.21%及 18.38%，四組之間沒有顯著差異。第 84 天時，其值分別為 22.08%、20.03%、20.77%及 19.19%，四組中以 A 組熟成度最高與其他三組有顯著差異，D 組熟成度最低，與 A 組及 C 組有顯著差異，與 B 則無差異。

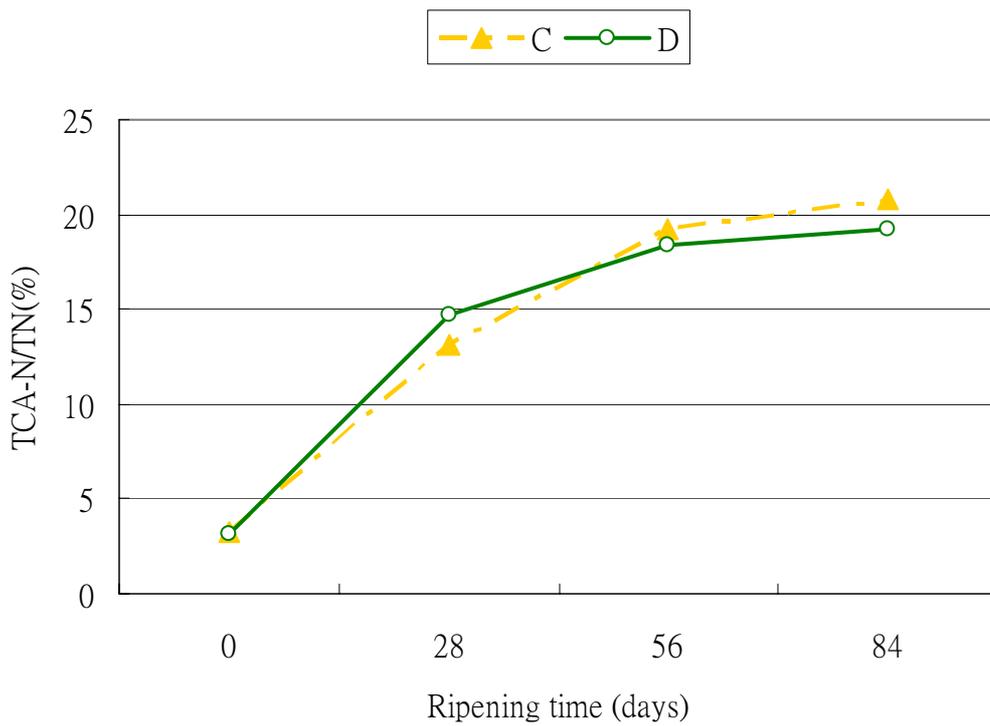
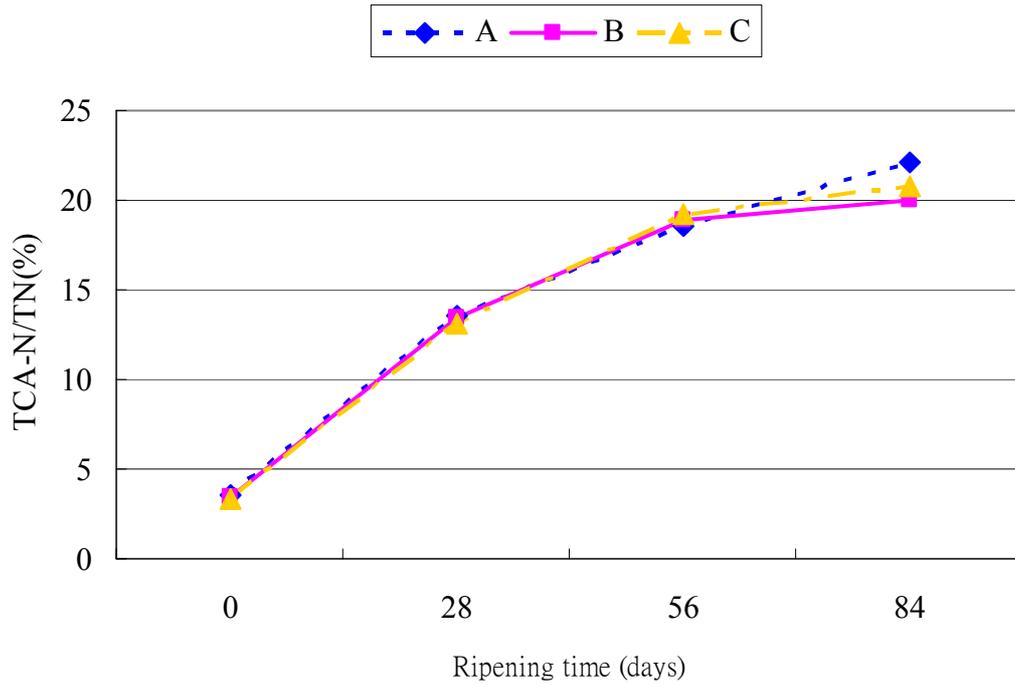
A 及 B 組為添加輔助菌醃處理組，以 C 為對照組，結果顯示，第 84 天時，A 組有最高熟成度，達差異顯著 ($p < 0.05$)。以自體水解能力不同之 C、D 兩組作比較，C 組與 D 組有顯著差異，以 C 組有較高熟成度，如圖十一所示。

O'Donovan *et al.* (1996) 中以水溶性氮/總氮 (%) (WSN/TN%) 作為熟成度之判定，自體水解能力較高之組別有較高之熟成度。Macedo *et al.* (1997) 指出，WSN 溶液是由不同成分組成，包括了乳清蛋白、大、中、小肽類及游離胺基酸的複合體；12% TCA-N/TN 僅包含小分子肽 (2~20 個胺基酸組成) 及游離胺基酸，因此 12% TCA-N/TN 的數值顯著低於 WSN/TN。



圖十、84 天乾酪熟成期間 A、B、C 和 D 四組，TCA 可溶性氮之變化。

Fig. 10. The change of 12% TCA-N/TN in Cheese A, B, C, and D during cheese ripening (days).



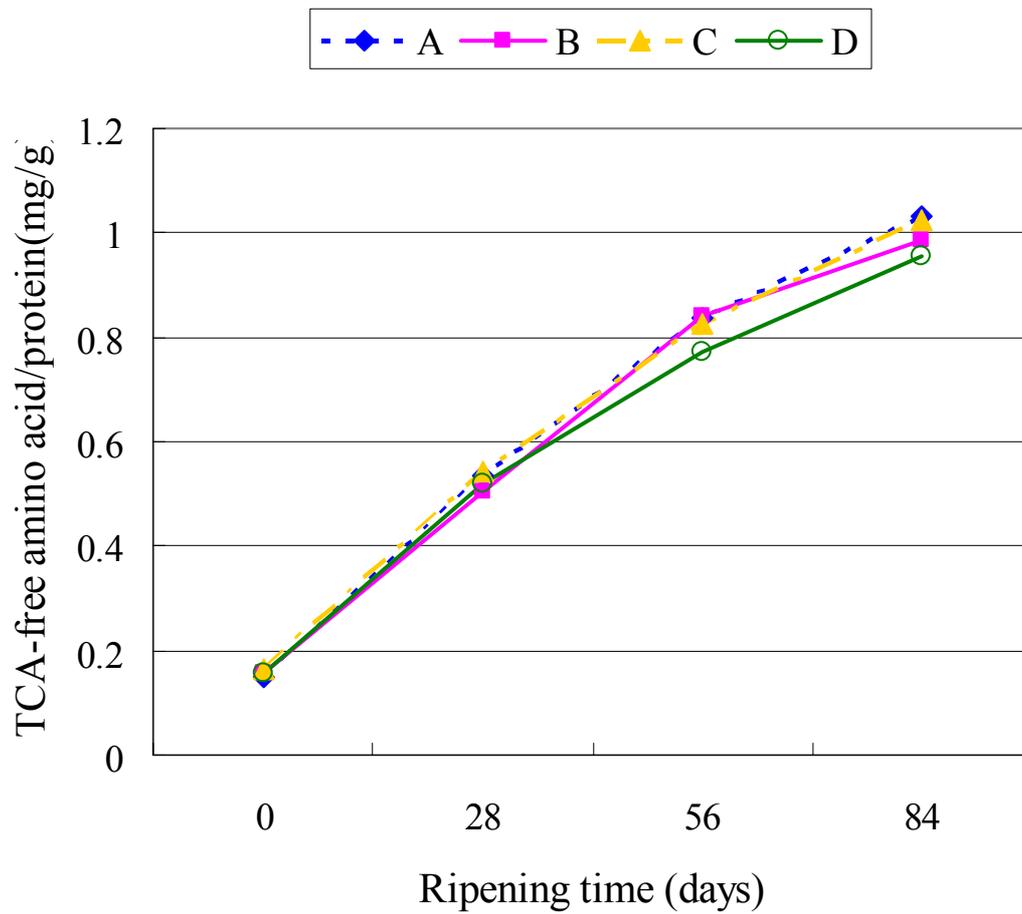
圖十一、(A) 乾酪熟成期間 A、B 和 C 三組，TCA 可溶性氮之變化。
 (B) 乾酪熟成期間 C、D 兩組，TCA-N/TN 之變化。
 Fig. 11. (A) The change of 12% TCA-N/TN in cheese A, B, and C during cheese ripening days. (B) The change of 12% TCA-N/TN in cheese C and D during cheese ripening (days).

2. TCA 可溶性胺基 (12% trichloroacetic acid-soluble peptide ; TCA-soluble peptide)

以波長 650nm 所測得之酪胺酸含量表示乾酪中可溶於 12% TCA 之胺基的量與蛋白質總重的比值，代表乾酪之熟成度。TCA 可溶性胺基隨著熟成時間的增加，亦有增加的趨勢，且各組於第 0 天、第 28 天、第 56 天及第 84 天彼此之間皆達差異顯著 ($p < 0.05$)，如圖十二所示。第 0 天時，數值分別為 0.148%、0.156%、0.165% 及 0.156%，四組間沒有顯著差異。第 28 天時，四組間亦無顯著差異 ($p > 0.05$)。第 56 天時，A、B、C 及 D 分別為 0.836%、0.841%、0.826% 及 0.774%。四組同時比較，結果顯示 A、B 及 C 三組間無顯著差異 ($p > 0.05$)，D 與 A、B 差異達顯著，以 D 熟成度最低，但與 C 無顯著差異。第 84 天時，其值分別為 1.034%、0.985%、1.025% 及 0.956%，其中以 A 組之熟成度最高，但與 B、C 兩組間無顯著差異。以 D 熟成度最低，與 A、C 達差異顯著 ($p < 0.05$)，但與 B 組無顯著差異。

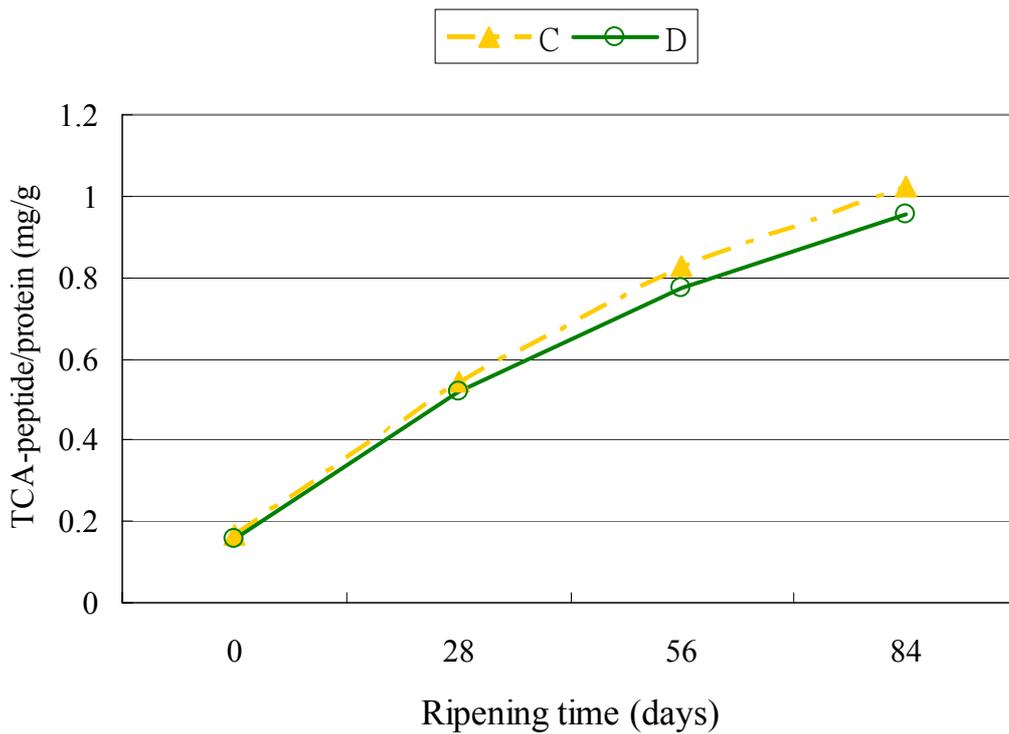
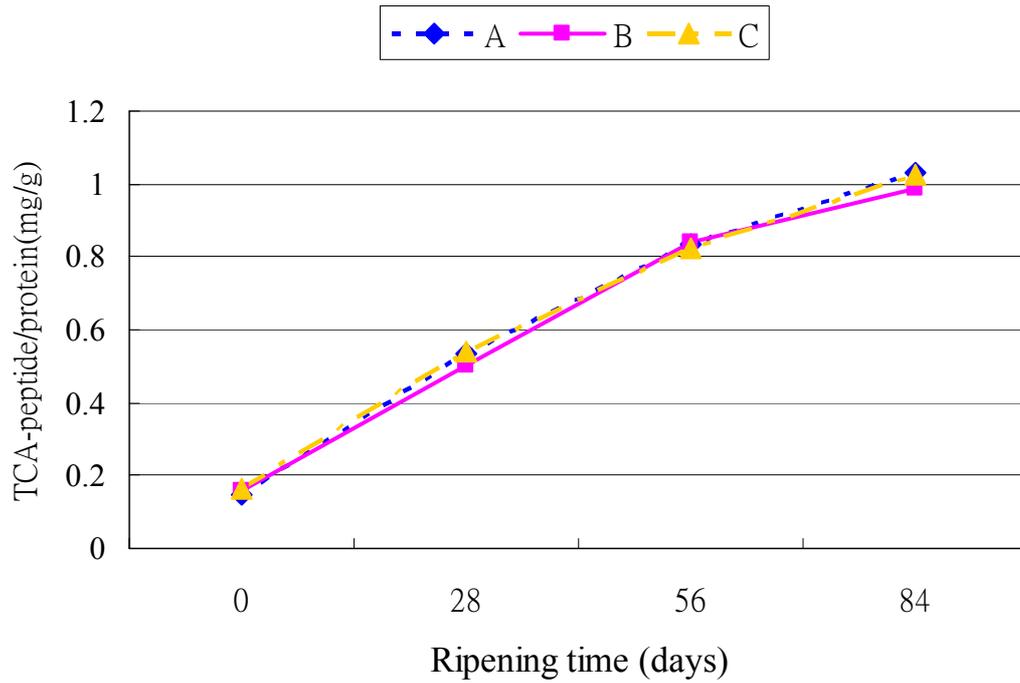
以添加輔助菌醃的 A、B 組與 C 組作比較時，於第 0 天、第 28 天、第 56 天及第 84 天時三組間皆無顯著差異；但以 A 組有最高可溶性胺基，熟成度最高 (圖十三)。以自體水解能力不同的 C 與 D 兩組比較，於第 56 天之前皆無顯著差異，而到了第 84 天時，以 C 組的

熟成度較高，兩組達差異顯著 ($p < 0.05$)。



圖十二、乾酪熟成期間 A、B、C 和 D 四組，TCA 可溶性胺基之變化。

Fig. 12. The change of TCA- soluble peptide in cheese A, B, C, and D during cheese ripening (days).



圖十三、(A) 乾酪熟成期間 A、B 和 C 三組，TCA 可溶性胺基之變化。(B) 乾酪熟成期間 C 和 D 二組，TCA 可溶性胺基之變化。

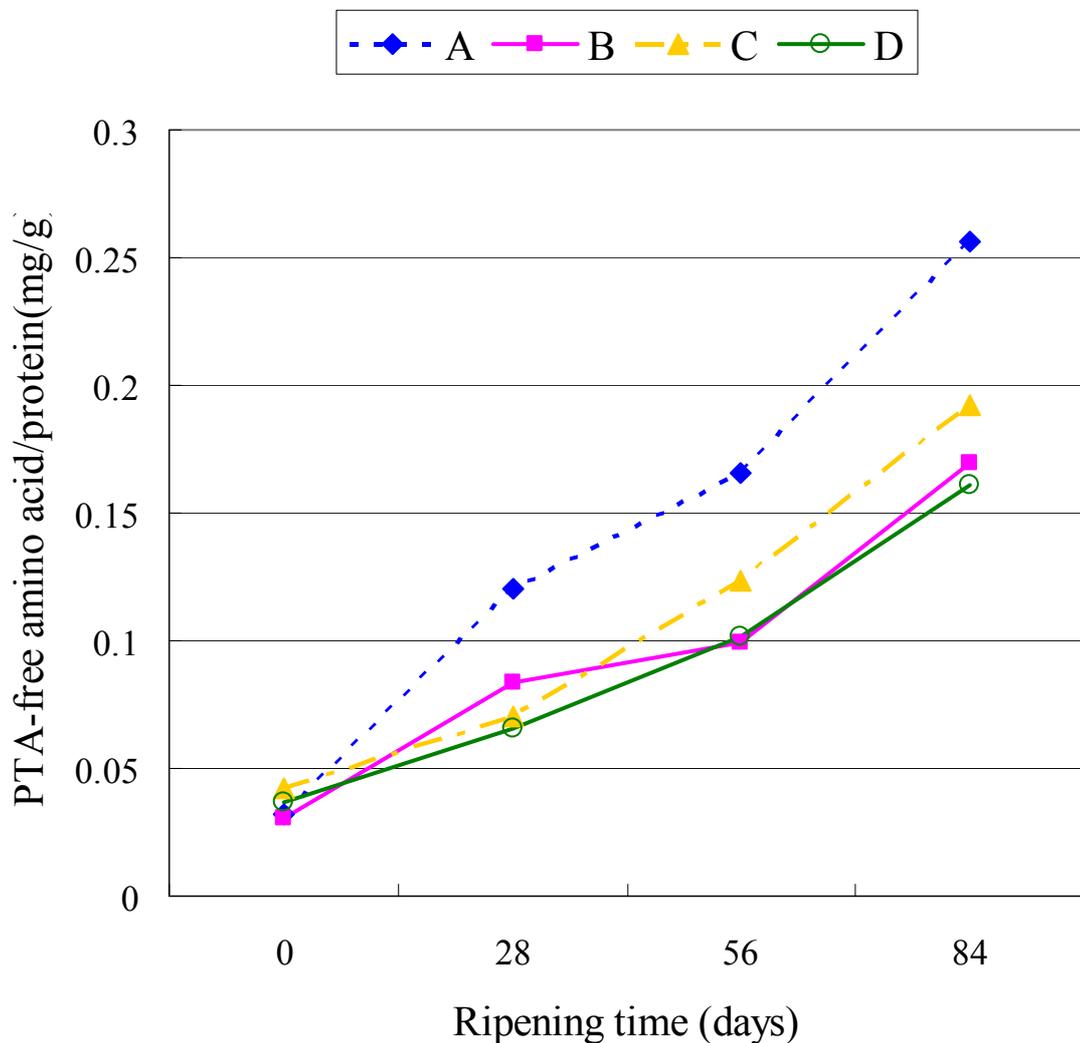
Fig. 13. (A) The changes of TCA-peptide/protein (mg/g) in cheese A, B, and C during ripening time. (B) The changes of TCA-peptide/protein (mg/g) in Cheese C and D during ripening time.

(八) 乾酪中游離胺基酸 (5% phosphotungstic acid-soluble free amino acid ; PTA-soluble FAA) 之變化

以樣品溶於 5% PTA 溶液，測定其溶於 5% PTA 中游離胺基酸之含量與總蛋白質的重量比值 (mg/g) 以代表乾酪中游離胺基酸的含量。隨著熟成時間的增長四組皆有增加的趨勢且各組內皆達差異顯著 ($p < 0.05$)。如圖十四所示，第 0 天時，四組分別為 0.032、0.030、0.042 及 0.036，彼此間差異不顯著。第 28 天時，A、B、C 及 D 分別為 0.120、0.083、0.070 及 0.066，A 組有顯著較高的游離胺基酸含量，與其他三組有顯著差異。第 56 天與第 84 天時，A 組游離胺基酸含量仍然顯著較其他三組高，分別為 0.166 及 0.257。

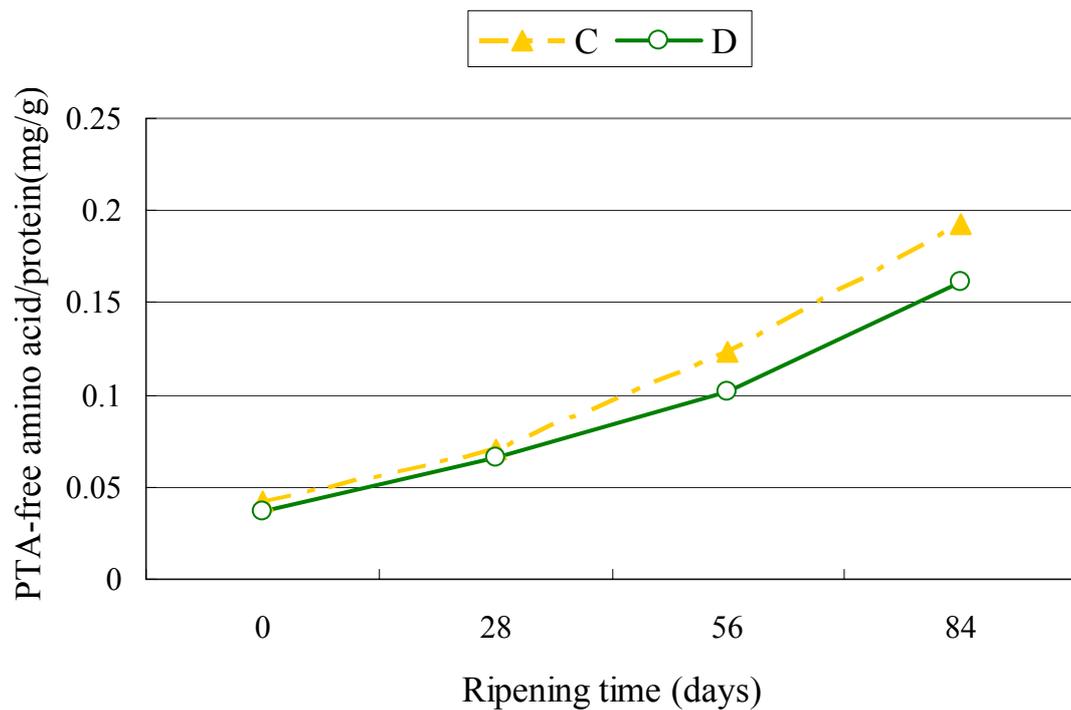
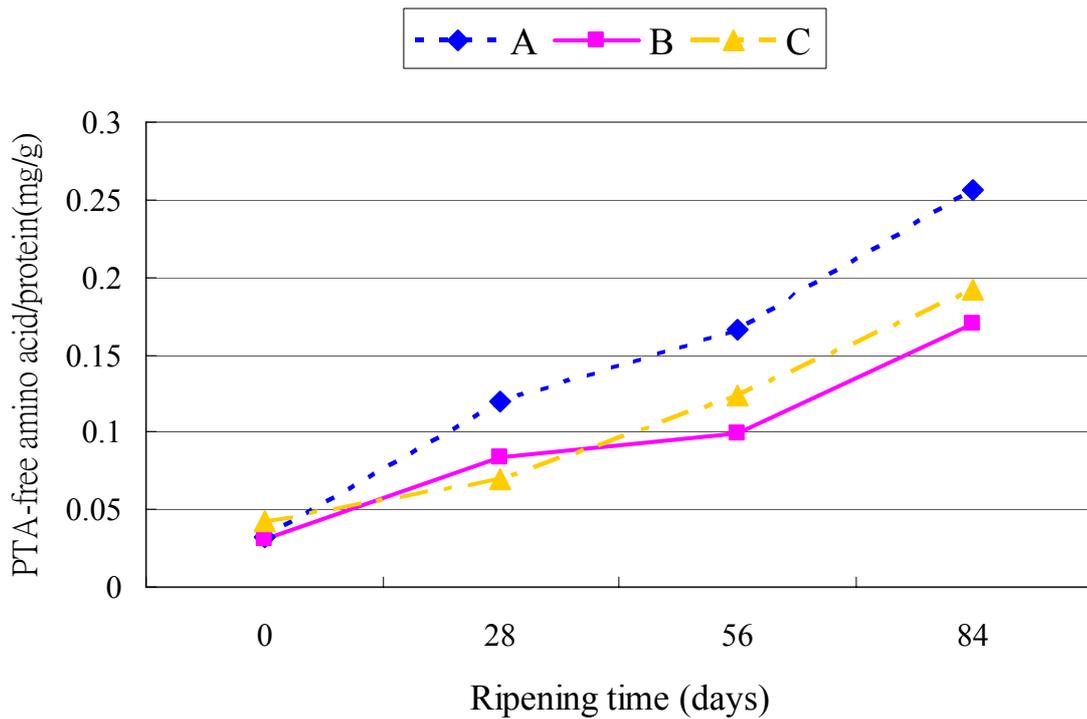
以添加輔助菌醃 A、B 兩組與 C 比較時，仍以添加試驗 I 所作之 LDH 活性試驗中活性較高的 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 之 A 組於第 28 天時即顯著高於 C，而於第 56 及 84 天時，顯著高於其他兩組 ($p < 0.05$)，且 B 組於熟成第 56 天與第 84 天時亦顯著高於 C。Johnson *et al.* (1995) 指出，以添加 -20°C 冷凍處理輔助菌醃之減脂切達乾酪，有較高之 5% PTA-N。Macedo *et al.* (1997) 指出 5% PTA-N/TN 是以 WSN/TN 經過 5%PTA 作用後，過濾掉沉澱物，5%PTA 溶液中僅有小分子肽 ($< 600 \text{ Da}$) 及游離胺基酸。

以自體水解能力不同之 C 與 D 兩組作比較，於熟成第 0 天與第 28 天時沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，當熟成達第 56 天之後，C 組比 D 組有較高 5 % PTA-tyrosine 且達差異顯著 ($p < 0.05$)，如圖十五所示。Hannon *et al.* (2003) 中，以自體水解能力較高的菌株製作之乾酪，有較高的 PTA-N/TN (%)，且於第 56 天時達差異顯著 ($p < 0.05$)。



圖十四、乾酪熟成期間 A、B、C 和 D 四組，游離胺基酸之變化。

Fig. 14. The change of free amino acid in cheese A, B, C, and D during cheese ripening (days).



圖十五、(A)乾酪熟成期間 A、B 和 C 三組游離胺基酸之變化。(B)乾酪熟成期間 C&D 兩組游離胺基酸之變化。

Fig. 15. (A) The changes of free amino acid in cheese A, B, and C during ripening time. (B) The changes of free amino acid in Cheese C and D during ripening time.

(九) 乳酸菌菌數之消長

於 84 天熟成期間，不同處理組的乾酪，以 M17 agar 計數 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 之菌數；以及 MRS agar 計數 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 及輔助菌醃之總菌數，如圖十六與圖十七。

1. *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

Lc. lactis subsp. *cremoris* CCRC 12264 以 M17 agar 培養 48 ± 3 小時後計數得到。在第 0 天時，以 A 組之菌數最高，B 組最低，但四組間無顯著差異 ($p < 0.05$)。於熟成 28 天內，每 7 天所測得之菌數，以 D 組有較低的存活率，於第 7 天時，即下降 10^2 cfu/mL，於第 14 天時，菌數已降至 10^4 cfu/mL，當熟成第 84 天時，則降至 10^3 ，與其他三組達差異顯著 ($p < 0.05$)。而 A、B 兩組於熟成期間，其菌數一直維持在 10^8 cfu/mL 以上；A 組在第 21 天時，其菌數才由 10^9 cfu/mL 下降至 10^8 cfu/mL，有顯著差異 ($p < 0.05$)。而 B 組則於第 56 天時，才降至 10^8 。C 組於熟成第 56 天時，其菌數才降至 10^6 cfu/mL，第 84 天時，菌數已降至 10^4 cfu/mL，下降了近 10^4 cfu/mL，仍與 D 組有顯著差異 ($p < 0.05$)。

2. *Lc. lactis* subsp. *lactis*

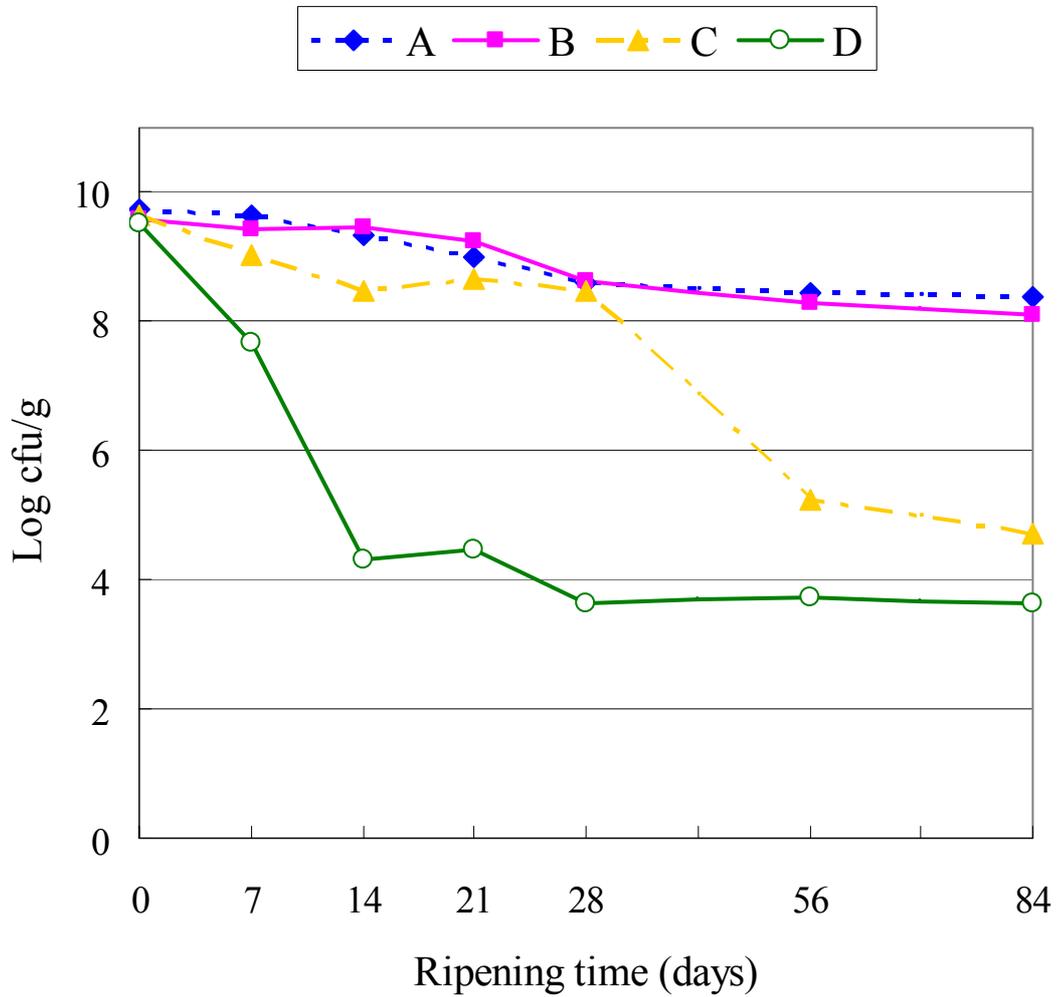
以 MRS agar 計數各處理組乾酪中之乳酸菌數。添加輔助菌醃之 A、B 兩組，由於 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940、*Lb. bulgaricus* CCRC 10696 與 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 14117 之菌落無法辨識，所以 MRS agar 計數處理組之菌數，包含輔助菌醃即菌醃之總菌數。

第 0 天時，C 組中 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 14117 之菌數為四組中最低，僅達 10^7 cfu/mL，與其他三組達差異顯著 ($p < 0.05$)。A 與 D 兩組之菌數較高，接近 10^9 cfu/mL，與 B 及 C 兩組有顯著差異。在熟成 84 天內，四組之 MRS 總菌數，皆維持在 10^8 cfu/mL 以上。

Boutrou *et al.* (1998) 指出，依 autolysis 試驗所得之最佳自體水解能力 *Lc. lactis* AM2 菌株，於乾酪熟成試驗中，有最高之死亡率，於熟成第 48 天時菌數由 10^8 cfu/mL 降至 10^6 cfu/mL。但本實驗中，以混合菌醃製作乾酪，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 於不同組中，有不同的水解力，且達差異顯著 ($p < 0.05$)；且於乾酪熟成試驗中與文獻相反之結果，D 組之 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 自體水解率最高，但其熟成率與游離胺基酸含量不因此為最佳；反而以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 存活率較佳之 A 組有較高之 5% PTA-N 生成量，達差異顯著 ($p < 0.05$)。D 組與 C 組比較，則以

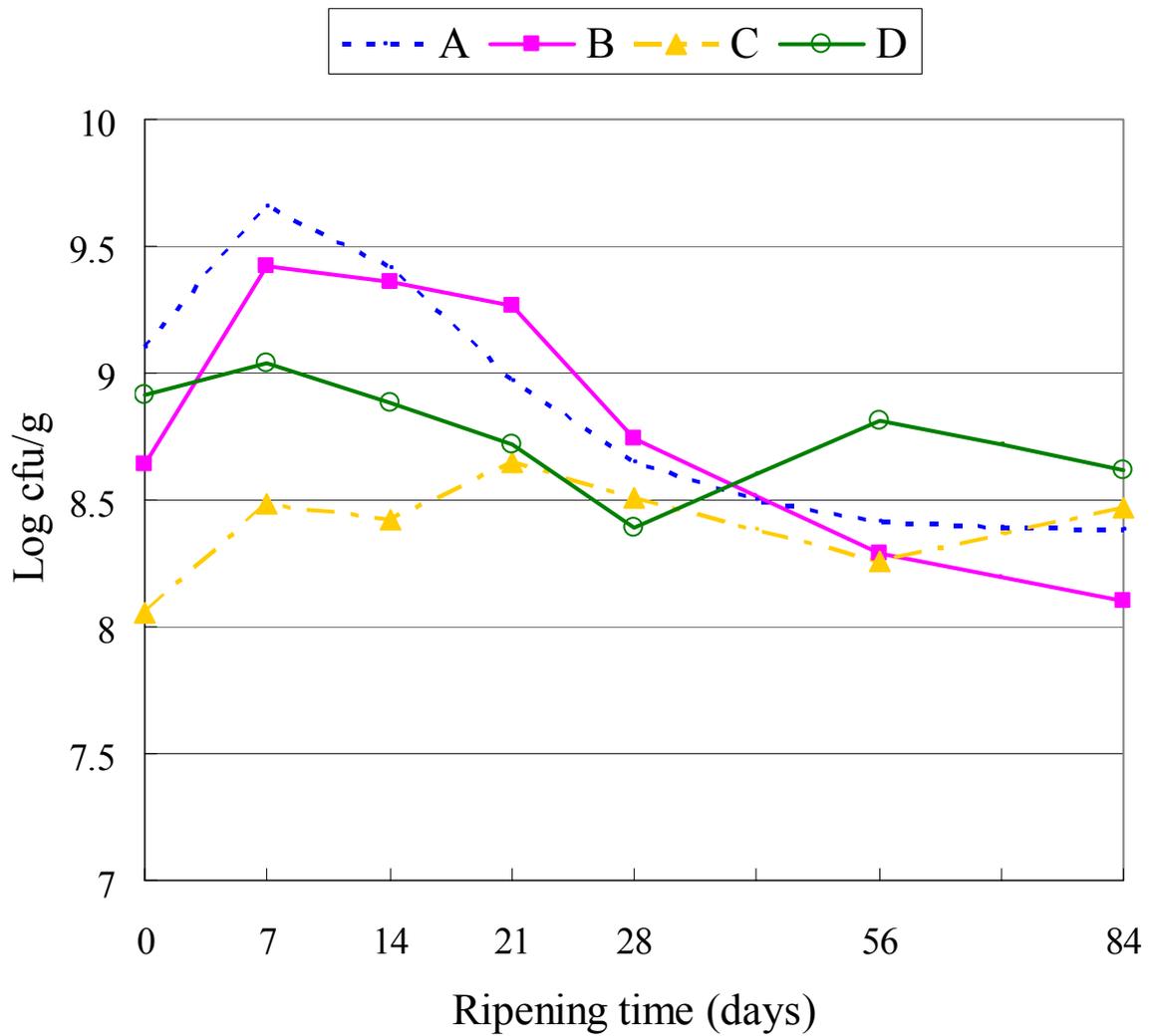
Lc. lactis subsp. *cremoris* CCRC 12264 死亡菌數較少的 C 組有較高的熟成度及游離胺基酸含量 ($p < 0.05$)。

推測其可能原因，由於文獻中皆以單一菌株製作乾酪，而直接比較單一菌株對乾酪熟成度之影響，而本實驗是以混合菌醃的方式製作乾酪，使得結果不如預期。



圖十六、乾酪熟成期間，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 之菌數變化。

Fig. 16. Variation of cell counts of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 during cheese ripening.



圖十七、乾酪熟成期間，培養於 MRS agar 中乳酸菌菌數之變化。

Fig. 17. Variation of cell counts of lactic acid bacteria in MRS agar during cheese ripening.

陸、結論

1. 蛋白質分解能力試驗，於 25°C，24 h 培養後，*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 為分解力最強之菌株與各菌株皆差異顯著 ($p < 0.05$)。於最適生長溫度培養下，從第 3 天至第 6 天間，*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 為分解力最強者，與各菌株達差異顯著 ($p < 0.05$)。
2. 自體水解能力試驗，*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 為自體水解能力最高者；*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 次之；*Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 最差。
3. 自體水解能力較佳之菌株為 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117，其與 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 混合菌株製成之 C 組乾酪有顯著較高之熟成度；但在熟成期間並沒有表現較高之自體水解能力，反而以 D 組之 *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 的有較高之自體水解能力，但熟成度及游離胺基酸含量顯著較差。
4. 以自體水解能力較高之菌株製作乾酪，於熟成期間，其菌醃之死亡率並非為最高者，可能係混合菌醃會影響菌株彼此間之存活率。

5. 乳酸脫氫酶 (LDH) 活性試驗，代表胞內酵素之活性，以此作為挑選輔助菌醃之指標。*Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* CCRC 10940 表現出顯著較高之 LDH 活性；而 *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 之活性最差。輔助菌醃處理組 A、B 組與 C 組，以添加 -20°C 24 h 冷凍處理之 *Lb. casei* subsp. *ramnosus* CCRC 10940 之 A 組乾酪，有較高熟成度與游離胺基酸含量，達差異顯著 ($p < 0.05$)。
6. 四組乾酪中，以添加輔助菌醃 *Lb. casei* subsp. *ramnosus* CCRC 10940 之 A 組乾酪，有最高熟成度與游離胺基酸含量，證實添加 LDH 活性較高之輔助菌醃有促進熟成的效果 ($p < 0.05$)。

柒、參考文獻

- 周文玲。1992。紅麴菌發酵東方式乾酪之研究。國立台灣大學畜產學研究所碩士論文。
- 林慶文。1989。乳品加工學。pp. 41-73, 347-386。華香園出版社。
- 林慶文。1993。乳製品之特性與機能性。pp. 19-34, 76-89。華香園出版社。
- 食品工業發展研究所。2000。細菌目錄。pp. 57-64, 189-212。經濟部技術處。
- 張勝善。1991。牛乳與乳製品。pp. 25-122, 467-498。長江出版社。
- 莊榮輝。酵素化學實驗酵素純化分析
<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>.
- 陳明照。1997。肉品加工理論與應用。pp. 532-546。藝軒出版社。
- 鐘穎皓。1995。紅麴發酵乾酪之熟成期間蛋白質的變化。國立台灣大學畜產學研究所碩士論文。
- Adda J., J. C. Gripon, and L. Vassal, 1982. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. Food Chem. 9: 115-129.
- Agboola S. O., and R.-T. Milena. 2002. Influence of Australian native herds on the maturation of vacuum-packed cheese. Lebensm.-Wiss. U-Technol. 35(7): 575-583.
- Asensio C., R. Gómez and C. Peláez. 1995. Effect of heat treatment on the proteolytic activity of mesophilic bacteria isolated from goats' milk cheese. Lett. Appl. Microbiol. 21: 25-30.

- Boutrou R., A. Sepulchre, G. Pitel, C. Durier, L. Vassal, J. C. Gripon and V. Monnet. 1998. Lactococcal lysis and curd proteolysis: Two predictable events important for the development of cheese flavor. *Int. Dairy J.* 8: 409-616.
- Boutrou R., A. Sepulchre, J. C. Gripon ,and V. Monnet. 1998. Simple tests for predicting the lysis behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *J. Dairy Sci.* 81: 2321-23328.
- Chapot-Chartier M.-P., C. Daniel, M. Rousseau, L. Vassal and J.-C. Gripon.1994. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 4: 251-269.
- Christensen Jeffrey E., Mark E. Johnson, and James L. Steele. 1995. Production of Cheddar cheese using a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *Int. Dairy J.* 5: 367-379.
- Crow V. L., T. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKay, and H. Riepe. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5: 855-875.
- Dako E., M. El Soda, J.-C. Vuilleumard, and R. E. Simard. 1995. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 28(5): 503-509.
- Drake M. A., T. D. Boylston, K. D. Spence, and B. G. Swanson. 1996. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese. *Food Res. Int.* 29(3-4): 381-387.
- Drake M. A., T. D. Boylston, K. D. Spence, and B. G. Swanson. 1997. Improvement of sensory quality of reduced fat Cheddar cheese by a *Lactobacillus* adjunct *Food Res. Int.* 30(1): 35-40.
- Folkertsma B., P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 1996. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.* 6: 1117-1134.

- Fox P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72: 1379-1400.
- Fox P. F. and P. L. H. McSweeney. 1997. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: B. A. Law (Ed). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, second edition. pp. 1-49. Blackie A.& P., London, U.K.
- Hannon J. A., M. G. Wilkinson, C. M. Delahunty, J. M. Wallace, P. A. Morrissey, and T. P. Beresford. 2003. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 13: 313-323.
- Johnson J. A. C. , M. R. Etzel, C. M. Chen, and M. E. Jonson. 1995. Accelerated ripening of reduced-fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. *J. Dairy Sci.* 78: 769-776.
- Kang O. J., L.-P. Vézinz, S. Laberge, and R. E. Simard. 1998. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 81: 639-646.
- Kawabata S., L. Vassal, D Le Bars, B. Cesselin, M. Nardi, J.-C. Gripon, and M.-P. Chapot- Chartier. 1997. Phage-induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait* 77: 229-239.
- Kneadr E. E., J.-C. Vullemard, and S. A. El Deeb. 2000. Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *Int. J. Food Sci. Tech.* 35: 483-495.
- Lane C. N., and P. F. Fox. 1996. Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 6: 715-728.
- Law B. A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11: 383-398.

- Lepeuple A.-S., L. Vassal, B. Cesselin, A. Delacroix- Buchet, J.-C. Gripon, and M.-P. Chapot-Chartier. 1998. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 8: 667-674.
- Lovisi P., P. Jolivet, D. Dalgleish, and T. Chardot. 2003. A protein kinase is located in the micellar fraction of fresh pasteurized skimmed farm milk. *J. Dairy Sci.* 86: 1147-1156.
- Macedo Angela C. and F. Xavier Malcata. 1997. Secondary proteolysis in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. *Z Lebensm Unters Forsch A.* 204: 173-179.
- Martinez-Cuesta M. Carmen, Carmen Pelaez, Manuela Juarez, and Teresa Requena. 1997. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 125-131.
- Meijer W., C. Dobberlaar, and J. Hugenholtz. 1998. Thermoinducible lysis in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110: Implications for cheese ripening. *Int. Dairy J.* 8: 275-280.
- Monnet V., S. Condon, T. M. Cogan, and J. C. Gripon. 1995. Metabolism of starter cultures. In: Cogan T. M. and J. -P. Accolas (Ed). *Dairy starter cultures*. VCH publishers, Inc.
- Morgan M. E. 1976. The chemistry of some microbially induced flavor defects in milk and dairy foods. *Biotech. Bioeng.* 18: 953-965.
- Morgan S., R. P. Ross, and C. Hill. 1997. Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *J. Dairy Sci.* 80: 1-10.
- O'Donovan C. M., M. G. Wilkinson, T. P. Guinee, and P. F. Fox. 1996. An investigation of the autolysis properties of three lactococcal strains during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 6: 1149-1165.

- Oliveira M. N., I. Sodini, F. Remeuf and G. Corrieu. 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 11: 935-942.
- Smit Gerrit, Annette Verheul, Richard van Kranenburg, Eman Ayad, Roland Siezen, and Wim Engels. 2000. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Res. Int.* 33: 153-160.
- Soda M. E, S. A. Madkor, and P. S. Tong. 2000. Adjunct cultures: Recent developments and potential significance to the cheese industry. *J. Dairy Sci.* 83: 609-619.
- Soda M. E. 1997. Control and enhancement of flavor in cheese. In: B. A. Law (Ed). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, second edition. pp. 219-252. Blackie A.& P., London, U.K.
- Spreer Edgar. 1998. *Milk and dairy product technology*. pp. 243-334. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- Visser S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci.* 76: 329-350.
- Wedad El-Kholy, El-Soda Morsi, Ezzat Nihal, and Shafei Hassan El. 1998. Autolysis and intracellular enzyme release from cheese related dairy lactobacilli. *Lait* 78: 439-452.
- Wilkinson M. G, T. P. Guinee, and P. F. Fox. 1994. Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 4: 141-160.
- Wilkinson M. G, T. P. Guuinee. D. M. O'callaghan, and P. F. Fox. 1994. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 61: 249-262.

捌、英文摘要

Acceleration of Cheese Ripening Using Autolytic Ability of Lactic Acid Bacteria

Che-Chun Liu
Graduate Institute of Animal Science
Tunghai University

Abstract

The process of cheese making is an ancient craft that dated thousands of years ago. There is approximately 35% of the total milk supply in the world, which is converted into cheese. Ripening time of cheese varies from four weeks (soft cheeses) to three years (very hard cheeses), which depends on the varieties of cheese. If the ripening time of cheese was accelerated, it would provide both the economic and technical advantages such as reducing the refrigeration costs, weight loss and microbiological risks.

The purpose of this experiment was to examine and select the best lactic acid bacteria in autolysis to accelerate cheese ripening. Seventeen strains of lactic acid bacteria were used as starters in this experiment, which included 4 lactococci, 11 lactobacilli, and 2 streptococci. According to the results, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 performed the highest ability in proteolysis and autolysis and *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 presented the second high ability. However, *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198 performed the lowest ability in proteolysis and autolysis. In addition, the results for testing the

lactate dehydrogenase (LDH) activity presented that *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 was the most active strain and *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 is the less active one.

In order to identify the autolysis ability of *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264, four mixed cultures were prepared to manufacture cheese samples, which included treatment A (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 + *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117 + *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* CCRC 10940 as adjunct), treatment B (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264+ *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117+ *Lb. bulgaricus* CCRC 10696 as adjunct), treatment C (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264+ *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 14117), and treatment D (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 + *Lc. lactis* subsp. *lactis* CCRC 11198). After experiment, the results indicated that the components of sample cheeses were changed that included moisture content decreased along with ripening days, protein and fat contents increased and pH and S/M value were unstable. In addition, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCRC 12264 in treatment D presented the lowest viability ($p < 0.05$). After 84 days of ripening, treatment A performed the highest ripening ratio and the production of free amino acid ($p < 0.05$), however treatment A had low performance in pH value ($p < 0.05$). Based on the results of comparing autolysis abilities within two treatments, treatment C presented the higher ripening ratio and the production of free amino acid ($p < 0.05$) than the other treatments. To sum up, using the highest autolytic starter and adjunct culture with the high LDH activity can accelerate proteolysis and cheese ripening.

玖、小傳

筆者劉哲君係台北市人，生於民國 68 年 4 月 20 日，先後畢業於台北市福星國小、衛理女中附設國中部與松山高中。民國 86 年考取私立東海大學畜產學系，於民國 90 年畢業，取得東海大學農學學士學位；並於同年考取母校畜產研究所，追隨恩師 施宗雄教授研習畜產加工與應用微生物學。承蒙恩師於研究所求學期間之悉心指導與鼓勵，方於民國 93 年 7 月順利完成此論文。