

發酵理論與應用 發酵槽介紹與操作

陳錦樹

中興大學食品暨應用生物科技學系
96年10月25日



發酵(釀造)食品的定義
發酵技術發展歷史
主要發酵代謝途徑
發酵微生物
發酵槽介紹與操作
米酒製造法
醋酸發酵



發酵食品的定義

英文“fermentation”一字源自拉丁文“fervere”(發泡之意),意指酵母菌生長於果汁或發芽穀物產生二氧化碳的現象。目前發酵一字在使用上有廣義及狹義的不同用法,狹義的發酵指微生物在無氧狀態下將碳水化合物分解的現象,是微生物獲得能量的方法之一。

廣義的發酵則指原料經由細胞(含微生物、動、植物細胞)轉化成產品的過程。依發酵所產生的主要生成物可分為酒精發酵、乳酸發酵、醋酸發酵等。透過發酵過程所產生的產品,統稱為發酵產品,若用為食品類的食品則稱為發酵食品(fermented food)。



發酵技術發展歷史(1)

- 利用微生物發酵是人類文明史上最古老的生物科技,早在數千年前,人類對微生物毫無所知的時代,就已開始釀酒。在十七世紀微生物學開始發展之前,人類已廣泛地應用各種天然產生的發酵食品,包括:酒、醋、醬油、味噌、紅糟、豆腐乳、納豆和酒釀等。直到十七世紀荷蘭人雷文霍克(Antonie van Leeuwenhoek)發明了顯微鏡後,人類才開始對微生物有所認識。



發酵技術發展歷史(2)

- 1667年,荷人Antony van Leeuwenhoek,以自製顯微鏡發現微生物存在。
- 1860~1865年,法人Louis Pasteur:食物腐敗或醱酵係因微生物引起。
- 1884年,德人Robert Koch:炭疽病原菌之分離及純粹培養。
- 1897年,德人Buchner,利用yeast之cell-free extract研究酒精發酵,發現Zymase(酶)之存

微生物純粹培養觀念建立

自然傳統發酵

發酵化學(生物化學)之肇始



發酵技術發展歷史(3)

- World War I (1914~1918),利用*Clostridium acetobutylicum*大量生產丙酮以因應軍需工廠製造火藥。
- 1917,美國人,以微菌生產檸檬酸,乳酸菌生產乳酸,其它尚有微生物酵素amylase, protease之生產。
- 1929,英人Fleming,發現*Penicillium*屬菌可分泌Penicillin;有機化學家E. chain萃取成功(1940)。Penicillin取代sulphonamides
- World War II, Penicillin正式工業化生產,美國Waksman發現Streptomycin(1944)。
- 1958,台大蘇遠志教授,日本之木下尚江發現可直接從糖質原料發酵生產麩胺酸(Na-glutamate)

1. Microbiologists, biochemists & chemical engineers
2. 生物產品量產化

其它胺基酸或核酸之發酵生產。

純粹培養大量生產化



二、發展歷史(3)

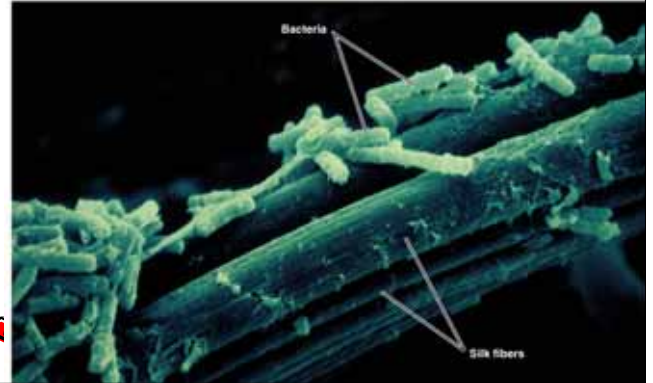
• 1973--固定化酵素、菌體之利用

→ 生物反應器(bioreactor)之設計與應用
細胞融合技術(cell fusion technique)
基因重組技術(Recombinant DNA Technology)
遺傳工程學
程序控制



1. 代謝控制原理應用於發酵上
2. 人工變異株之利用
3. 生物技術之萌起

固定化菌體



1. 早期的發酵技術大都應用在食品領域，Penicillin之用途開發成功後，微生物之非食品用途或潛在用途才正式被重視。近年來由於基因工程技術逐漸成熟，微生物發酵技術結合基因工程技術，已形成一股新的趨勢。

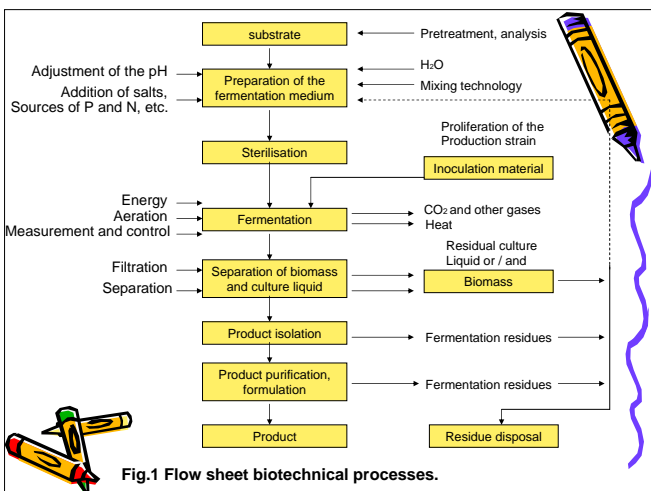
2. 在penicillin成功地大量生產以前，發酵過程並未嚴格要求微生物之純粹培養早期之發酵過程係靠以下方法進行：

- a. pH、滲透壓(如salt, sucrose)等來控制或抑制雜菌之污染。
eg, soy sauce, lactic acid, acetic (Vinegar), pickles
- b. 使用高濃度之基質或產物來抑制雜菌
eg, alcohol fermentation
- c. 嫌氧環境之利用以抑制雜菌, 如 butanol-, acetone fermentation



3. Penicillin之量產成功，使用了

- a. Fermentor (醱酵槽)，包括動力攪拌、溫度控制、pH控制、通氣培養等新觀念，不同規格fermentor皆可使用。
- b. 雜菌污染之主動預防包括：
 - (1) 菌種之純粹培養
 - (2) 培養基之殺菌、輸送管路化
 - (3) 空氣之無菌化(過濾除菌)
 - (4) 無菌接種, 無菌取樣
 - (5) fermentor及piping等之殺菌
- c. 產品之回收及精製
- d. 自動控制系統



影響發酵之因素

1. 微生物：種類、菌株活性、代謝路徑
2. 原料：種類、培養基配方
3. 發酵程序：發酵槽種類、發酵模式、發酵條件控制



微生物之特性（優點）

1. 體積小、表面積大
2. 培養簡單
3. 繁殖迅速
4. 於溫和條件下進行
5. 菌株育種容易進行
6. 種類多

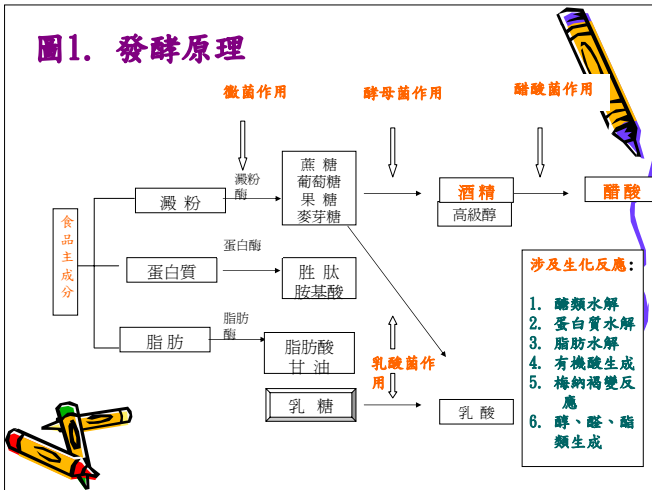


發酵（釀造）食品

食品原料經適當殺菌處理後，接種**特殊的微生物**，利用其所產生**酵素之作用**，原料中如醣類、蛋白質或脂質等成分乃逐漸被轉變成**低分子化合物**，而賦予食品良好風味或**產生目的物質**的現象，稱為發（醱）酵（圖1），所得產品謂之發酵食品或釀造食品。反之，若食品中以蛋白質為主的氮化合物，遭受微生物之分解作用而產生惡臭或不良味道之有害物質之現象，則稱為腐敗。自然界中引起食品腐敗的微生物以細菌為主，其次為黴菌及酵母。



圖1. 發酵原理



食品原料經微生物發酵產生新物質，具有如下五項優點：

1. 延長食品保藏時間，因而有調節產季之作用。
2. 賦予食品良好風味。
3. 提高消化性或營養性，包括改善食品原料品質、提高消化吸收性與營養價值、賦予原料特殊風味以及使產品特性多樣化等，而更具市場商品性。
4. 提供人體必需營養素以外，諸多有益健康如抗氧化、消除自由基或調節免疫力等所謂機能性非營養成分。
5. 產生新物質，減少資源浪費。



傳統發酵產品種類：

酒精發酵、乳酸發酵及醋酸發酵為最常見的發酵形式，而醬油、食用醋、豆瓣醬、味噌、豆腐乳、乾酪、酸酪乳、酒類、甜酒釀、紅茶菇、紅糟(麴)或醃漬物、麵包或饅頭等均是傳統發酵食品。

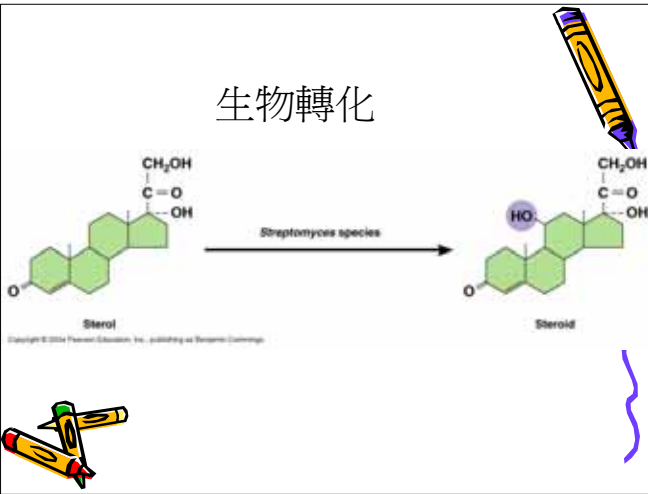


工業發酵產品種類

1. 菌體本身(biomass)：
e.g. 綠藻、乳酸菌、麵包酵母、根瘤菌、蘇立菌（生物製劑）
2. 代謝產物(metabolites)：
初級代謝產物（如酒精）、次級代謝產物（如抗生素）。
3. 生物轉化(bioconversion)：
固醇類、胺基酸、山梨糖(sorbitol)



生物轉化



微生物代謝產物

分為

1. 初級代謝產物 (primary metabolites) :
 - 發生在對數增殖期(exponential phase)。
 - 屬於維持生命之必要代謝產物或伴隨能量生成之產物 (中間物與最終產物)，如酒精、醋、TCA中間物與大分子合成之基材 (如胺基酸等)、酵素、細菌纖維素。
2. 二級代謝物 (secondary metabolites) :
 - 發生在靜止期(stationary phase)。
 - 屬於非生長所需，卻對生存有用 (如抗生素、色素、多醣體)。

木質醋酸菌產生之細菌纖維素



TABLE 28.3 Fermented Foods and Related Products

Foods and Products	Raw Ingredients	Fermenting Microorganism(s)	Location Produced
Dairy Products			
Cheeses (ripened)	Milk curd	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.	Worldwide
Kefir	Milk	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Candida</i> spp.	Primarily southwestern Asia
Kumis	Mare's milk	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. leichmanni</i> , <i>Candida</i> spp.	Russia
Yogurt	Milk, milk solids	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Worldwide
Meat and Fish Products			
Country-cured hams	Pork hams	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> spp.	Southern United States
Dry sausages	Pork, beef	<i>Pedococcus cerevisiae</i>	Europe, United States
Fish sauces	Small fish	<i>Halophilic Bacillus</i> spp.	Southeast Asia

TABLE 28.3 (continued)

Foods and Products	Raw Ingredients	Fermenting Microorganism(s)	Location Produced
Nonbeverage Plant Products			
Cacao fruits (cocoa)	Cacao fruits (paste)	<i>Candida krusei</i> , <i>Geotrichum</i> spp.	Africa, South America
Coffee beans	Coffee cherries	<i>Erwinia dasycarpa</i> , <i>Saccharomyces</i> spp.	Brazil, Congo, Hawaii, India
Kimchi (kimchee)	Cabbage and other vegetables	lactic acid bacteria	Korea
Miso	Soybeans	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxi</i>	Primarily Japan
Olives	Green olives	<i>Lactococcus mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Worldwide
Poi	Taro roots	lactic acid bacteria	Hawaii
Sauerkraut	Cabbage	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Worldwide
Soy sauce	Soybeans	<i>A. oryzae</i> or <i>A. soyae</i> , <i>Z. rouxi</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Japan, China, United States
Breads			
Rolls, cakes, breads, and so on	Wheat flour	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Worldwide
San Francisco sourdough bread	Wheat flour	<i>Saccharomyces exiguus</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Northern California

TABLE 28.4 The Production of Alcoholic Beverages by Yeasts

Beverage	Yeast	Method of Preparation	Function of Yeast
Beer and Wine			
Beer, lager	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (bottom yeast)	Germinated barley releases starches and amylase enzymes (mashing). Enzymes in malt hydrolyze starch to fermentable sugars (mashing). Liquid (wort) sterilized. Hops added for flavor. Yeast added. Incubated at 3–10°C.	Converts sugar into alcohol and carbon dioxide; > 6% alcohol. Yeast grows on bottom of fermenting vessel.
Beer, ale	<i>S. cerevisiae</i> (top yeast)	As in lager; incubated at 10–21°C.	Converts sugar into alcohol and CO ₂ ; < 4% alcohol. Yeast grows at top of fermentation vessel.
Sake	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> converts starch in steamed rice into sugar; yeast added; incubated at 20°C.	Converts sugar into alcohol; 14–16% alcohol.
Wine, natural	<i>S. cerevisiae</i>	Skin of grape provides various flavors and sugar concentrations. Grapes crushed into must, sulfur dioxide added to inhibit wild yeast; yeast added. Red wines: incubated at 20°C. Aged in oak 3–5 years and in bottle 5–15 years. White wines: incubated at 10–15°C. Aged 2–3 years in bottle.	Converts grape sugar into alcohol; 14% or less alcohol.
Wine, sparkling (champagne)	<i>S. cerevisiae</i>	As natural wine, with secondary fermentation in bottle. 2.5% sugar and yeast added to bottled wine; incubated at 15°C; bottle inverted to collect yeast in neck.	In secondary fermentation, produces carbon dioxide; yeast settles quickly.

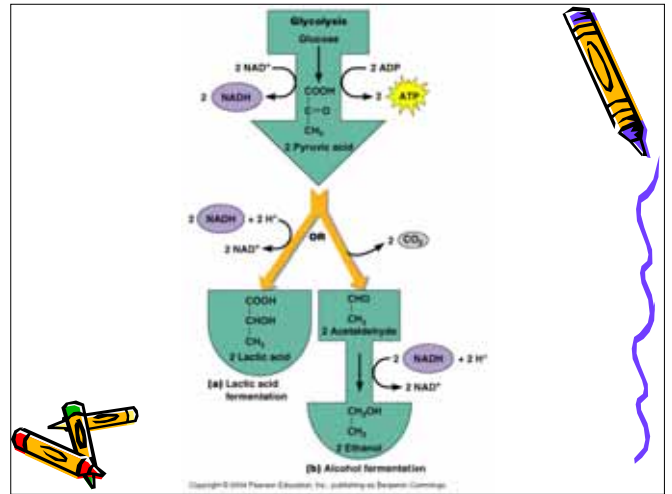
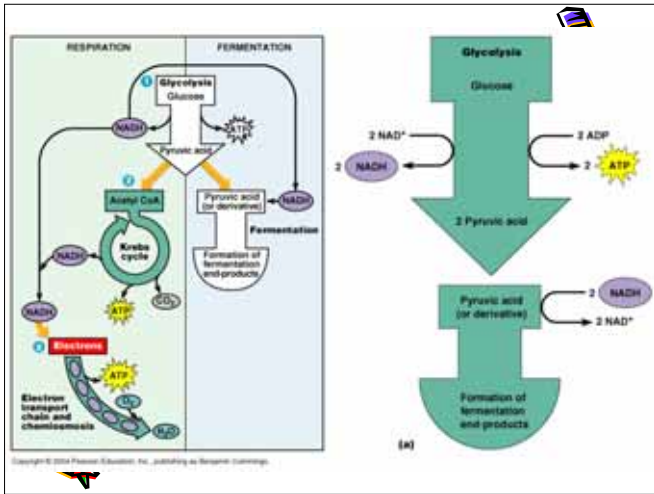
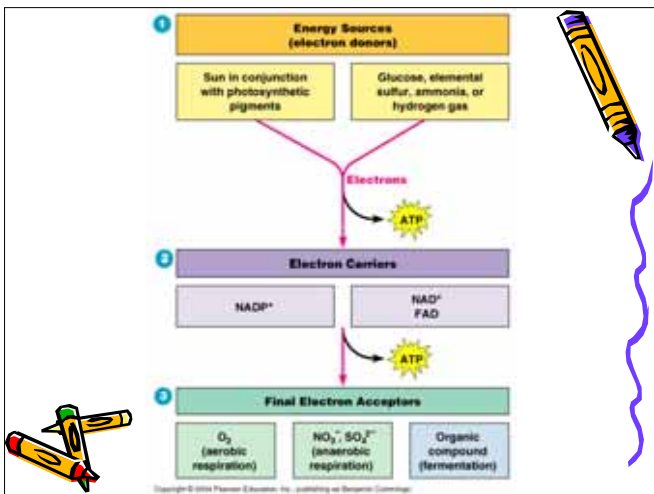
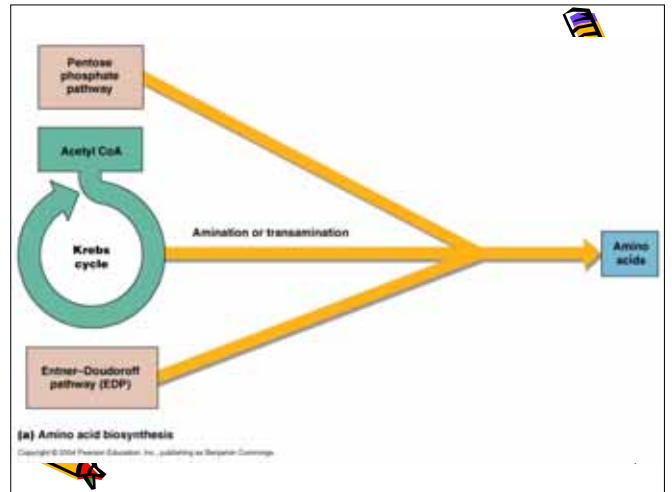


TABLE 5.3 ATP Yield During Prokaryotic Aerobic Respiration of One Glucose Molecule

Source	ATP Yield (Molecule)
Glycolysis	
1. Oxidation of glucose to pyruvic acid	2 ATP (substrate-level phosphorylation)
2. Production of 2 NADH	6 ATP (oxidative phosphorylation in electron transport chain)
Preparatory Step	
1. Formation of acetyl CoA produces 2 NADH	6 ATP (oxidative phosphorylation in electron transport chain)
Krebs Cycle	
1. Oxidation of succinyl CoA to succinic acid	2 GTP (equivalent of ATP; substrate-level phosphorylation)
2. Production of 6 NADH	18 ATP (oxidative phosphorylation in electron transport chain)
3. Production of 2 FADH	4 ATP (oxidative phosphorylation in electron transport chain)
Total:	38 ATP

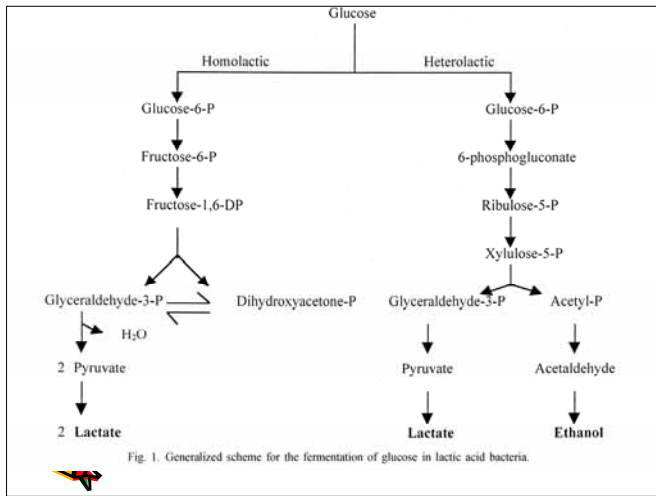
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



乳酸菌的發酵形式

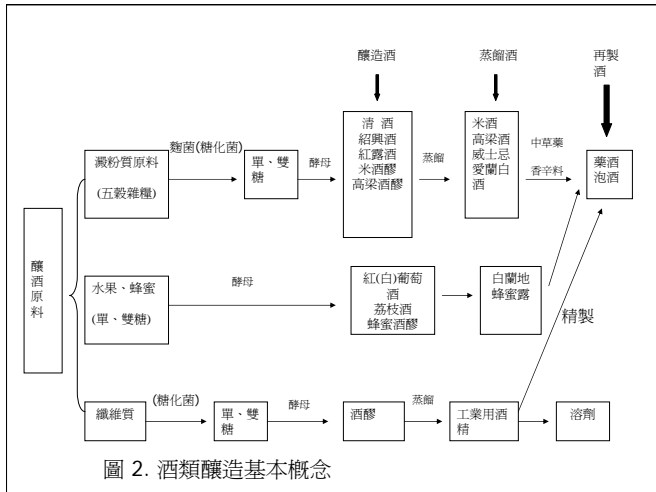
乳酸菌對糖的發酵可分為同型發酵 (homo fermentation) 及異型發酵 (hetero fermentation)。

- 同型發酵可將葡萄糖經由Embden-Meyerhof-Parnas(EMP)代謝路徑產生100%的乳酸生成物： $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$
- 異型發酵則經由Hexosemonophosphate (HMP) 代謝路徑以產生乳酸，乙醇及二氧化碳： $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$



發酵微生物 - 以酒類釀造為例

- 主要用於食品發酵的微生物包括細菌 (bacteria), 酵母菌 (yeasts) 及黴菌 (molds)。
- 與酒類釀造有密切關係的酵母和黴菌屬於真菌類。細菌亦與酒類釀造有關, 但部分有益, 有些則不利。
- 微生物細胞內含有許多和代謝途徑有關之酵素, 故微生物可視為一種生物催化劑。不同種類之微生物具有不一樣之酵素活性。以和釀酒相關之黴菌與酵母為例, 前者含有很多和澱粉分解有關之酵素, 而後者則含有將糖類代謝成酒精之酵素, 但卻缺乏將澱粉分解之相關酵素。



1) 黴菌 (絲狀菌)

黴菌又名絲狀菌, 廣泛存在於自然界中。黴菌由菌絲體以及子實體所構成。菌絲體由許多菌絲構成, 為黴菌之發育器官, 又分生殖菌絲與營養菌絲。子實體為繁殖器官, 位於菌絲之頂端, 由孢子及擔子體所構成。

黴菌的繁殖以經由菌絲增殖產生孢子為主, 由菌絲向上伸展形成子實體, 匍菌生成分生孢子, 根黴菌則產生子囊孢子, 成熟後飛散著床發芽繁殖。

2. 黴菌的繁殖以經由菌絲增殖產生孢子為主, 由菌絲向上伸展形成子實體, 匍菌生成分生孢子, 根黴菌則產生子囊孢子, 成熟後飛散著床發芽繁殖。

重要之釀酒用黴菌: 糖化菌

(1) 匍菌屬 (*Aspergillus*): 自古以來, 即為用於釀造醬油、日本清酒、紹興酒等的黴菌。菌絲體中含有大量可分解澱粉、脂肪及蛋白質等之酵素。匍菌一般以無性的分生孢子繁殖。較重要之匍菌有下列二種:

(a) 米匍菌 (*Aspergillus oryzae*)

又名醬油黴, 亦普遍存在於如紹興酒、黃酒等酒麴中。其所分泌之酵素種類甚多, 尤以澱粉及蛋白質水解酵素最多。

(b) 黑黴菌 (*Aspergillus niger*)

廣泛存在於空氣、土壤、腐敗的果實及麵包上。其分生孢子及菌叢呈黑褐色, 澱粉糖化力很強, 亦具分解纖維素能力。

(2) 根黴菌屬 (*Rhizopus*)

酒麴中大部分含有此屬菌。繁殖時菌落外觀最初如棉花之綿白狀, 後因形成孢子囊而漸呈暗色。具有強力之澱粉酶 (glucoamylase), 亦具生產有機酸及微弱酒精之發酵能力。

(3) 紅匍菌屬 (*Monascus*)

菌絲呈鮮紅色或紫紅色, 可生成紅色素, 為製造紅露酒、紅糟及紅豆腐乳用之原料紅麴。

(4) 毛黴菌屬 (*Mucor*)

孢子囊之表面覆蓋著細刺, 呈黃、褐色或略帶青色。廣泛存在於土壤、酒麴或腐敗的動植物如堆肥、腐木及果蔬中。具澱粉糖化及酒精發酵能力。

2). 酵母

• 酵母廣泛存在於自然界中，如果實表面、花的蜜腺及土壤中。自古以來即被用於釀造酒類或製造酒精。但有些（產膜）酵母，反而會消耗酒精，為釀酒之有害菌，不過有些產膜酵母則會賦予酒特殊香氣。

• 酵母為單細胞之生物，直徑約4~8 μm ，長5-12 μm ，比細菌大，但較黴菌小。大多為球形、卵形、檸檬狀或假菌絲等。不過，同一種類的形態有時會隨環境條件而變異。酵母之世代時間短，視種類和生長環境而定，在最激烈之發酵過程中約每半小時即可增生一代。

• 直接從自然界中分離而得之酵母叫野生酵母（wild yeast），例如存在於葡萄果皮上，尤其較近梗或有破皮之果皮，之酵母。而具有某些良好特性之酵母在被分離出來後，吾人可依目的不同而加以馴養，並予以人工培養之酵母謂之培養酵母（culture yeast），如啤酒酵母（brewer's yeast）、麵包酵母（baker's yeast）、葡萄酒酵母（wine yeast）及釀酒酵母（distiller's yeast）等。

• 活性乾酵母（active dry yeast）：將上述具優良特性之培養酵母，經大量培養（保持低糖濃度下大量通氣）後，再收集菌體並予冷凍乾燥而得之乾燥酵母，水分含量約為5-7.5%，活菌數通常達1010 CFU/g。活性乾酵母通常以真空鋁箔包裝，使用時通常須先以溫水（40°C）復水再加入葡萄汁中。

• 葡萄果皮上附著之野生酵母雖可行天然發酵，但因大部分在發酵完全之前即已死滅，致使成品酒甜度過高及風味不平衡。不過，仍有釀酒業者偏好自然發酵。

• 酵母為兼性嫌氣菌。在通氣下，生長（繁殖）旺盛，產生大量菌體及二氧化碳。但在嫌氣或高糖環境下，則變成進行酒精發酵，產物以酒精及二氧化碳為主，只產生少量菌體。

• 和釀酒有關之酵母可分為發酵酵母和產（皮）膜酵母二類：

(1). 發酵酵母：

此類酵母以發酵生產酒精為主，不會形成薄膜，亦為重要之烘焙用酵母菌種。包括 *Saccharomyces* spp. 如 *Saccharomyces cerevisiae* (可生產酒精濃度高達16%)，另外，在啤酒釀造時極易凝聚成團而沈於桶底之底部酵母 *S. carlsbergensis* 或 *S. uvarum*，係 *Saccharomyces cerevisiae* 之一變種。其他如 *Brettanomyces* (可生產高濃度酒精，10%，但亦會生成帶酚臭或皮革臭之4-ethylphenol，為消毒不全之發酵容器常見之污染源。而 *Zygosaccharomyces bailii* 可耐高滲透壓，會生長於濃縮果汁中，造成糖度下降及產生酒味，對SO₂、山梨酸及苯甲酸等亦具有耐力。*Kloeckera* 或 *Hanseniaspora* 則易於未添加亞硫酸鹽之發酵液中，在發酵初期即因生長活躍而發展成優勢菌，但其等之發酵能力弱，在發酵中期即逐漸死滅，同時被發酵能力強且較耐高酒精濃度之 *S. cerevisiae* 所取代。

(2). 產膜酵母：

常在發酵液表面形成粉狀膜（film, pellicle），有時會有水泡狀或長成酒花。在有氧環境下此類酵母能代謝酒精、甘油、有機酸，而形成乙醛、醋酸、乙酸乙酯等揮發性成分，屬於氧化型酵母。若不控制其生長，易造成酒精濃度降低、酸度改變及風味改變，影響酒品質。包括 *Candida*，*Hansenula* (兼具發酵生產酒精及氧化代謝酒精之能力，產生酒精、醋酸及酯類)、*Pichia* (一般為短桿形，耐二氧化硫，過度生長易使產品帶有醛類) 等酵母菌。其他尚有 *Debaromyces*，*Candida*，*Trichosporon* 等。

3). 細菌

廣泛存在於自然界中，為單細胞生物，寬度約在1 μm 以下。

細菌有三種基本形態，即球菌、桿菌、螺旋菌。

有些桿菌在特殊環境下，如營養物缺乏時，會形成內孢子

（endospore），通常一個細胞僅產生一個內孢子。內孢子由於具有堅硬的外膜故能抵抗如乾燥或高熱等不良環境。例如枯草桿菌因能產生耐熱性內孢子，故為米飯或麵包等食品發生腐敗之原因。

和釀酒相關之重要細菌

(1). 醋酸菌：能氧化酒精生成醋酸，為釀酒之有害菌。為革蘭氏陰性之好氣性桿菌，如 *Acetobacter aceti*。醋酸菌有很多來源，其中最常見者為與果蠅或昆蟲接觸所致。在液體表面上產生黏且具彈性之被膜，菌落成膠狀，酒液會有醋味。

(2). 乳酸菌：

用於清酒釀造上。例如乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 通常以長鏈狀出現，為不生孢子，不具移動性之革蘭氏陽性菌，可行厭氧或微氧呼吸。*Pediococcus* 屬為球狀菌，亦為不生孢子，不具移動性之革蘭氏陽性菌，可行有氣或兼性厭氧發酵。而 *Leuconostoc* 屬亦為球狀菌，以鏈狀出現，不生孢子，不具移動性，好氣性。雖然某些乳酸菌對酒是有益的，但大部分都是有害的。

乳酸菌亦為造成葡萄酒細菌性劣敗之主要細菌。最常見之現象為：

酸敗：主要由異型乳酸菌，如 *Lactobacillus brevis*，所引起，將糖轉換成酸。

苦味：如將甘油逐步降解成具苦味之 *acrolein*。

酒液混濁或黏稠：酒中加糖會促進乳酸菌 *Leuconostoc* 生產聚糊精 (*dextran*)，導致酒液黏稠。

有益之乳酸菌作用：

蘋果酸-乳酸發酵 (*malo-lactic acid fermentation*; MLF)，此反應在製酒階段可能隨時發生，將酸味較高之蘋果酸發酵成較低之乳酸，故有提高 pH 值及緩和酸味之效果。最常用之乳酸菌為異型乳酸球菌 *Leuconostoc oenos*，故通常會伴隨產生少量氣體，有時也會增加可揮發性酸度。

釀酒的生化學原理

酒類釀造之過程大致分成蒸餾、(液)糖化、發酵、蒸餾等步驟。若直接使用單糖、雙糖等糖質原料釀酒時，如葡萄、糖蜜或蜂蜜，則可省略糖化步驟。東方酒類使用酒麴來糖化，而西方酒類則使用麥芽，這是二者最大的差異。糖化部分所牽涉到之麴菌或酵素如上述，至於在酒精發酵部分，二者則都依靠酵母之作用，差別只在酵母種類之不同而已。

酵母之酒精發酵主要以醣解代謝途徑 (*glycolysis*) 為主，酵母將糖類攝取進入體內，然後經由一系列由不同酵素所負責催化進行的反應伴隨產生 ATP，最後變成酒精和二氧化碳，並排出至體外。這是酵母在無氧環境下，必須藉助此醣解代謝途徑以獲取能量 (ATP)，供維持生命所需，而酒精是酵母進行酒精發酵之必要副產物，為一種初級代謝產物 (*primary metabolite*)。酒精發酵屬於生長關連型 (*growth-associated*) 發酵模式。

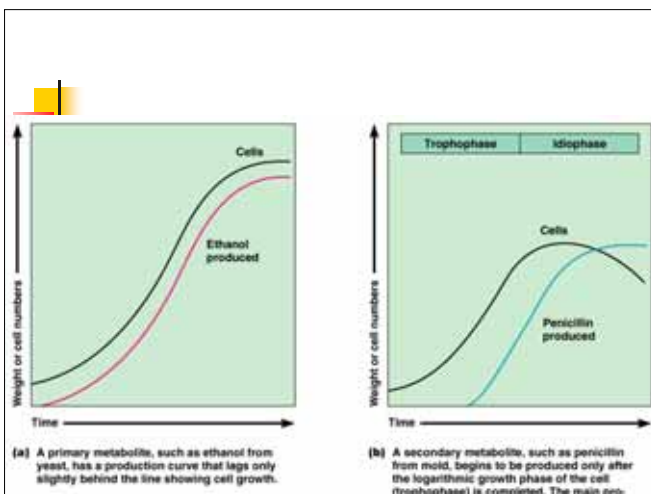
發酵酵母在利用糖類時，受到發酵液中葡萄糖濃度及溶氧量影響很大。以 *S. cerevisiae* 為例，當其在嫌氣環境下，其利用糖之速率 (即醣解 (*glycolysis*) 速率)，反而比有氧存在時還要快，此現象在其他營養源不足時更明顯。反之，當酵母處於高葡萄糖濃度 (一般為 $> 5\text{mM}$) 環境下時，縱然通氣有氧下，呼吸作用停止改進行酒精發酵，產生酒精。而在有氧及低葡萄糖 (一般為 $< 5\text{mM}$) 環境下，則改走檸檬酸循環之代謝途徑 (即呼吸作用)，此途徑由於可獲得較多的能量，酵母因此會大量繁殖，生產更多的菌體及二氧化碳，而非酒精。麵包或飼料酵母即循此模式大量生產。

發酵型態 (fermentation pattern)

依據基質消耗、菌體增殖與產物生成等三者關係，可將發酵型態分為三種：

1. 生長關聯型 (*growth associated*):
基質消耗、菌體生長與產物生成，呈比例關係
$$dP/dt = \alpha dX/dt$$

e.g. Alcohol fermentation, lactic acid fermentation



2. 部分關聯型 (*mixed growth associated*)
基質消耗與產物生成，部分相關。
菌體增殖與產物生成分兩階段
$$dP/dt = \alpha dX/dt + \beta X$$
3. 非生長關聯型 (*non-growth associated*)
基質消耗與產物生成，無明顯關係

例如利用過量的 *glucose* 與少量的其他養分培養 *Aspergillus niger*，當養分用盡且菌體之增殖停止後，則將過量的 *glucose* 進行 *citric acid* 生產。

例如 *Penicillium chrysogenum* 增殖所需之基質 (碳水化合物)，與抗生素 (benzyl penicillins) 生成所需之基質 (phenylacetic acid) 無關

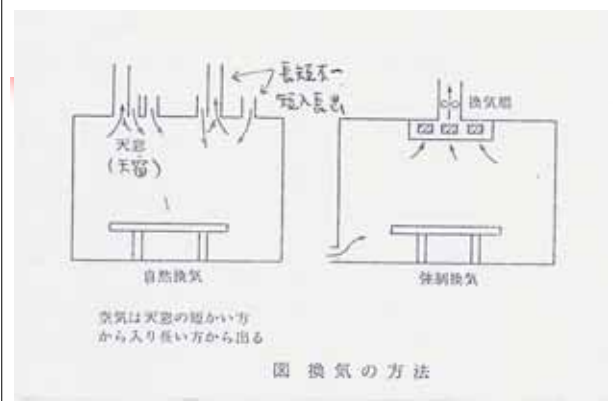
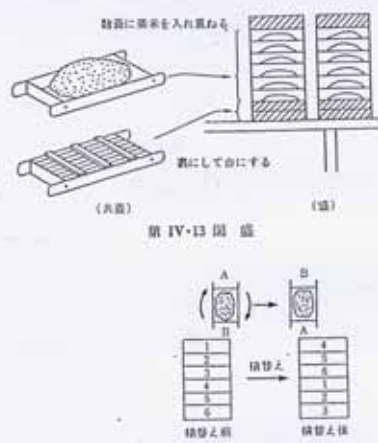
半開放式食品發酵之衛生管理

1. 原料之新鮮度，是否已有腐爛現象？原料、設備用具、用水、環境、人員以及等是否經適當殺菌或消毒？
2. 注意菌種來源、純度及保存方式，避免遭到雜菌污染
3. 妥善控制發酵條件：包括溫度、原料用量、pH值、營養素、溶氧、攪拌及發酵時間，在發酵過程中防止有害雜菌的污染或侵入。

固態發酵

(solid state fermentation)

- 讓微生物在含水量低之固態基質上繁殖，產生所需代謝產物後，再加水或緩衝液萃取。
- 較適合黴菌或蕈類等真菌類微生物培養。
- 麩：指黴菌繁殖在固態基質後所得之混合產物。如米麩、麥麩、黃豆麩。

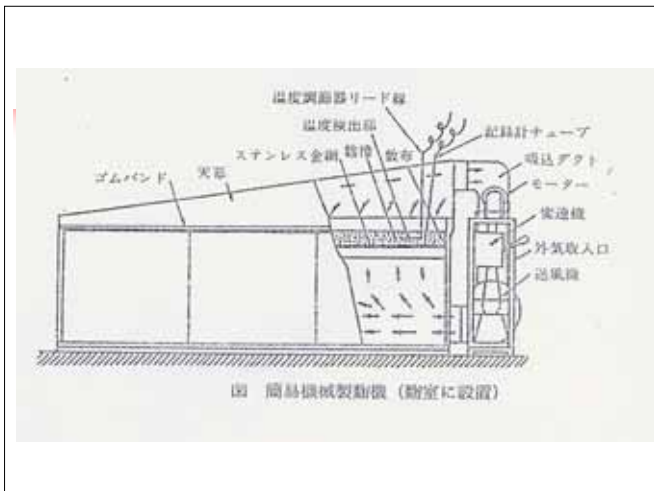


米麩製作-翻麩



佈滿菌絲之米麩外觀





液態發酵 (submerged fermentation)

- 凡利用試管、三角瓶、桌上型發酵槽、中間試驗型、大型發酵槽等培養工具進行微生物培養或發酵者皆屬之。

發酵槽介紹與操作

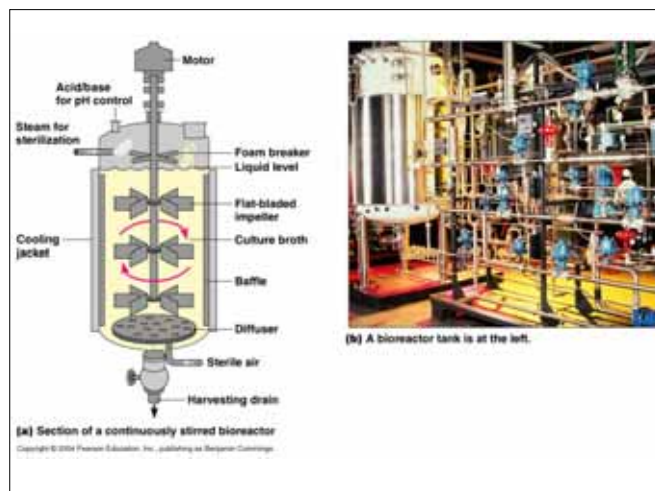
- 以人為方式提供生物細胞繁殖之最適環境，期能成為有利於預期生產之條件。
- 為生物學與化工學間之結合，最終以工業化規模進行生物生長過程之模擬，達成生產工業化之目標。
- 依規模大小而有不同程度之控制設備，包括搖瓶、攪拌、溫度控制、pH控制、溶氧控制、消泡控制、發酵程序控制等；附屬設備包括空氣壓縮機、冰水機、鍋爐或電熱器、殺菌釜、原位殺菌系統、接種箱。

三角搖瓶培養特性

- 體積(50-1000 mL), 操作簡便，一次可同時進行數十個搖瓶試驗。
- 限制：**氧氣供給速率較差**，除溫度外，難以進行培養環境之調控。
- 可調控變數：溫度、裝液量、震盪速率、接種量、搖瓶容積量與型式
- 用途：菌株篩選、培養基組成探討與最適化

桌上型發酵槽培養特性 (1)

- 容積：1-20 L，玻璃製槽體，在殺菌釜中殺菌。
- 主動通氣與機械攪拌，**氧氣供給速率與混合效能最高**。
- 培養環境容易控制，如溫度、pH、溶氧濃度與培養基濃度等。
- 可提供多樣培養環境，有利誘導菌種代謝物。



國產5 L桌上型發酵槽(Firstek)



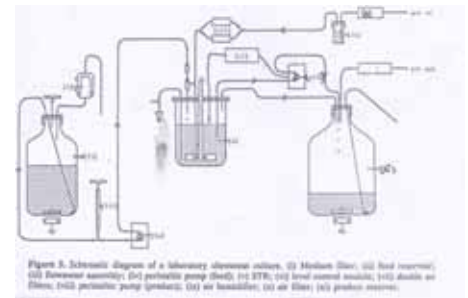
10 L桌上型發酵槽(B. Braun)



桌上型發酵槽培養特性 (2)

- 可調控變數：溫度、pH、通氣量、DO、攪拌速率。
- 操作模式：批式(batch type)、連續式(CSTR)、饋料批式(fed-batch)等。
- 用途：培養基組成最適化、培養條件最適化、菌種生長動力學。

連續式發酵(CSTR ; chemostat)



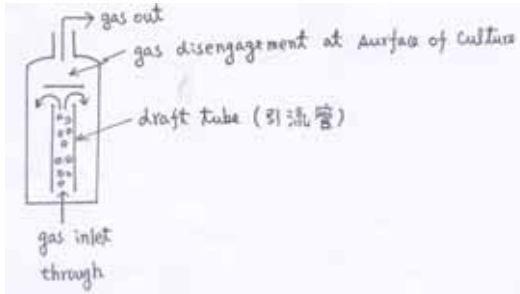
中間工廠級發酵槽培養特性

- 容積：50 – 數百公升。原地滅菌式發酵槽，槽體為不鏽鋼製。
- 限制：試驗成本高、槽體容積愈大**混合效果愈差（不均勻）**，易有槽內溫度梯度、基質濃度梯度、溶氧濃度與pH梯度等問題。
- 用途：驗證小型試驗數據，修正操作條件。為評估商業生產規模效益之重要依據。

發酵槽種類

- 機械攪拌式發酵槽(STR, stirred tank reactor): 最常見。
- 氣舉式發酵槽(air-lift column reactor) : 構造簡單、提供較低剪應力傷害之培養環境。
- 管柱型反應槽(column reactor, plug flow reactor) : 適合固定化菌體或酵素反應。

氣舉式發酵槽



評估發酵槽性能之重要參數

1. $K_L a$ (oxygen transfer coefficient, 容積氧氣質傳係數)：供氧能力指標

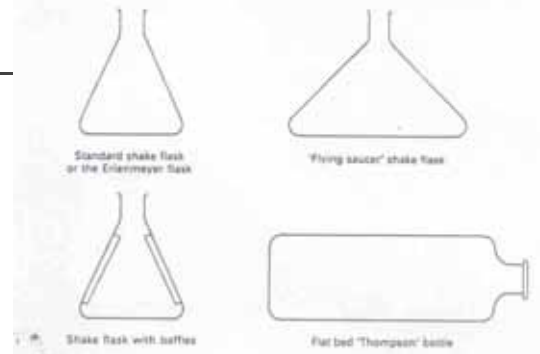
$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a \Delta C_{O_2}$$

↑ 氧氣輸送速率
↑ 溶氧濃度差

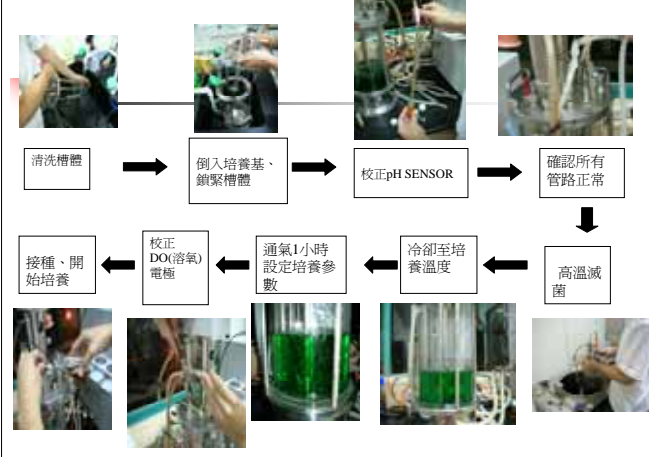
2. ϵ (gas hold-up, 氣體佔有率)：氣體體積在全部氣液混合培養體積中所佔比例，和氣體滯留時間與氣液接觸面積有關。
3. Mixing time (液相混合時間)：混合效能指標。

不同培養工具之 $K_L a$ 值比較

Fermenter	$k_L a$ value (h^{-1})
Test-tube	20
Flat-bed bottle	50
Shake flask	500
Shake flask (with baffles)	1200
Mini-fermenter	3000-4000



發酵槽操作流程(桌上型5 L)



中型/大型發酵槽

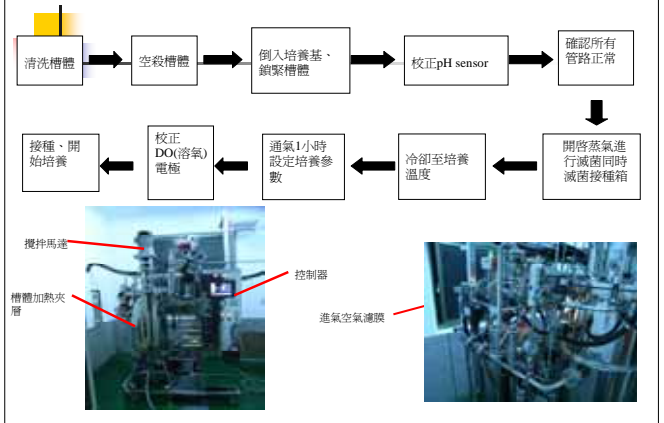
100-500 L的發酵槽通常歸類為中型發酵槽，500 L以上則為大型發酵槽。可供中間試驗或小規模量產用。

- 發酵槽操作可分為全自動及半自動，而在殺菌方面則分為本殺及搭配熱交換器。
 - **全自動**：由開機設定一些參數後，槽體自動滅菌、冷卻及將培養基維持於設定參數內。
 - **半自動**：由開機設定一些參數後，槽體需人工操作滅菌步驟及時間，大部分程序需人工控制。
 - **本殺**：指培養基裝入發酵槽後，利用槽體的夾層加熱、冷卻，完成培養基滅菌。
 - **搭配熱交換器的槽體**：指除槽體外，另加一套可連續滅菌、冷卻之設備，滅菌後培養基透過管線直接進入槽體內。

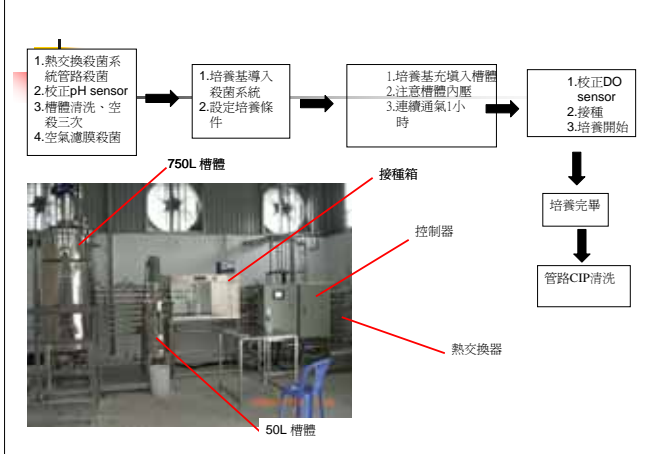
	本殺	搭配熱交換殺菌系統
清洗	可進行CIP清洗，清洗時間較短。	可進行CIP清洗，管路較多，清洗時間較長
殺菌	1. 槽體未充填培養基前，可不須利用蒸氣預先殺菌。 2. 充填培養基後利用夾層加熱、冷卻，完成培養基滅菌。	1. 槽體在充填前，須利用蒸氣預先殺菌。 2. 熱交換管線須進行管路殺菌。
殺菌所需時間	長(視槽體大小)	短
優缺點	1. 若只有一槽，且需連續擴大培養時，中途須間斷一段時間。 2. 較浪費能源。 3. 因升溫速度慢，培養基成分較易改變 4. 設備費用低	1. 擴大培養毋須中斷 2. 節省能源 3. 設備費用高

中型發酵槽(中間試驗級)

1. 本殺型(100 L)



2. 槽體搭配熱交換殺菌系統(750 L)



米酒製造法

酒的種類 (以發酵型式分類)

- 並行複式發酵：原料的澱粉糖化與酒精發酵在一個容器中同時並行。如清酒、紹興酒。
- 單行複式發酵：原料的糖化與酒精發酵在二個容器中分別進行，先糖化後發酵。如啤酒。
- 單式發酵：糖質原料不須經糖化，只有單一的酵母酒精發酵作用。如葡萄酒。
- 無發酵：酒精為外加，無酵母酒精發酵作用之進行。如藥酒。

一、米酒釀造方法

米酒之釀造須經(液)糖化、酒精發酵及蒸餾等三大步驟，其中又以前二者最重要。目前常見的米酒釀造方式有四種，即阿米洛法、酵素糖化法、在來白麴法及生料澱粉用麴法，四者間之不同處主要在(液)糖化和發酵此二步驟。

1. 在來白麴法：

為傳統之米酒釀造法，亦為過去大多私釀米酒業者所採用之方法。此法利用市售白麴(內含根黴菌及酵母菌)之根黴菌進行米飯之液化及糖化工作，而酵母則同時進行酒精發酵，故屬於一種並行複式發酵模式。另外，其亦為一種開放式發酵，故易受白麴活性、氣溫、環境或設備衛生程度等之影響。因雜菌污染機會高(尤其在夏季氣溫較高時)故製酒率較低，且成品酒品質較不穩定，但因技術及設備簡單故適合自製或大量釀造。

2. 阿米洛法 (Amylo process) :

為現行台灣菸酒股份有限公司採用之方法，製造流程見圖1。其乃使用高溫高壓蒸煮設備蒸米，並**添加鹽酸**（每公噸原料米添加13-15公升濃鹽酸，或最終pH值約在4.5左右）順便將米液化。其次，在**無菌環境下接種經純粹培養**的糖化菌及酵母進行後續之糖化暨酒精發酵。本法由於先進行米飯之液、糖化步驟，然後再接入酵母進行酒精發酵，故屬於一種**單行複式發酵模式**。另外，本法特點為使用單一菌種純粹培養技術，配合可控制溫度與通氣量之**發酵槽**，糖化菌和酵母菌皆經過適當之活化與擴大培養後再使用，故不僅菌種活性高且菌體密度亦較他法高。本法有製程短、酒精收率高且成品酒品質穩定之優點，但缺點為設備較複雜，且菌種與發酵槽之操作員需有基本微生物學專業背景之限制。

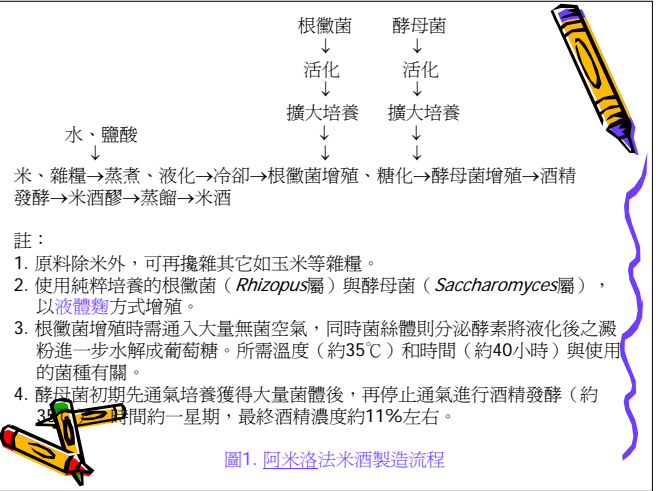


圖1. 阿米洛法米酒製造流程

2. 酵素糖化法：

本法顧名思義，主要在「**糖化**」步驟上以**商業酵素**取代「白麴」之微生物菌種 (白麴) 或「阿米洛法」之鹽酸。目前等商業酵素常由二種酵素組成，即液化酵素 (由耐熱性細菌所生產之澱粉酶 α -amylase) 及糖化型澱粉酶 (glucoamylase)。目前現代化之米醋大量生產方法，其糖化步驟即常用此方法。原料米先以蒸煮方式 (110℃, 30 分鐘) 煮成稀飯，次降低溫度至90℃，加入液化酵素，保溫約一小時。然後再將已液化之稀飯降低溫度至55-60℃，此時添加糖化酵素，進一步將稀飯完全水解成葡萄糖。冷卻至30℃左右接種酵母進行酒精發酵。此法由於使用酵素進行米飯之液化及糖化，故有速率相當快之優點，常在數小時內即能完成。但由於酵素是一種消耗品，必須外購。另外，由於酵素活性受到溫度及pH值影響很大，故於液、糖化過程中此二條件之是否控制在何種狀態非常重要。



4. 生料澱粉用麴法：

近幾年來，有部分業者使用以所謂生料澱粉分解用麴代替傳統之白麴以釀造米酒，依製法可分成二類。一是由一些具水解生澱粉能力之商業液化型與糖化型澱粉水解酵素，以及活性乾燥酵母 (active dry yeast) 等所調配而成之混合物，通常生澱粉所需的分解酵素力價要比上述「**酵素糖化法**」所用之酵素高，達上萬倍；此外，為加速生原料之降解速率，常再輔以適量之酸性蛋白酶、纖維酶等。又，並非所有微生物來源之澱粉水解酵素都適用，一般以來自根黴菌的效果最佳。另一種生料酒麴，則係將根黴菌、黑麴菌和酵母各自大量培養後，再依一定比例混合並添加酵素而製成的一種多功能微生物複合酵素酒麴，其觀念類似目前已普遍用於廢棄物之環保用「**生物製劑**」。



生料澱粉用麴法之**優點**有原料米不必預先蒸煮 (即澱粉不經糊化過程) 即可直接加入適 (足) 量之水及麴進行糖化與酒精發酵。因此省下和蒸飯操作有關之蒸飯機設備、能源消耗與人工等費用；可依原料性質而適當調整酵素種類及用量、麴菌或酵母種類及比例等，機動性強。但是相對地，「**麴**」本身之價格會比傳統白麴貴。而由於原料米未經蒸煮且初期即將用水一次加足，若酵母之活性不強，此相對增加在後續之酒精發酵時發生雜菌污染之機會，容易導致發酵失敗，例如變酸或低酒精收率等。另外，所得米酒風味較差。基本上，在來白麴及生料澱粉用麴等兩種方法都屬於開放式發酵，因而都有**雜菌污染問題**存在，尤其在氣溫較高之夏季更應注意。

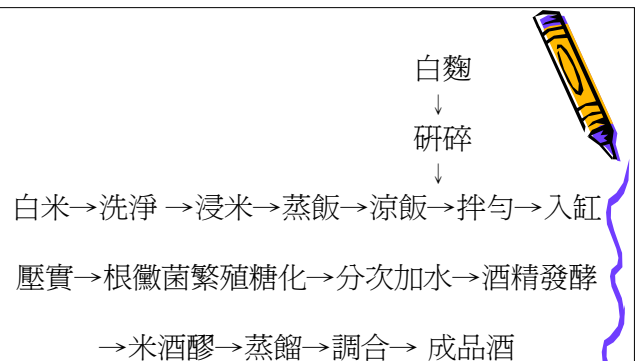


圖2. 在來白麴法米酒基本製造流程

三、結論

米酒製造法如前言所述，雖然表面上有四種（或以上）製造法，但事實上其等之差別主要在：

1. 使用商業酵素或微生物菌種進行蒸飯之糖液化？
2. 若使用菌種進行蒸飯之糖液化，係單一純粹菌種或混合菌種？
3. 發酵模式係採並行複式發酵或單行複式發酵
4. 發酵係在開放式狀態或在密閉式發酵槽中進行

至於在酵母之酒精發酵方面則大致相似，但是酵母之種類、發酵能力與產物中微量成分之比例，卻又是導致成品酒風味或品質差異之一項重要因素。另外，不同製造方法有不同之發酵管理方式與應注意事項，以在來白麴法釀造米酒為例，其成敗和原料米（新或陳米）、白麴之品質、釀造用水、操作人員及釀造環境之衛生程度有密切關係，其中以白麴之品質最為重要，也較難掌握。白麴品質（指其內相菌與酵母之種類、活菌數與活性、乾燥方式及雜菌污染程度）攸關米酒製酒率、製程時間及米酒品質甚鉅，必須注意。

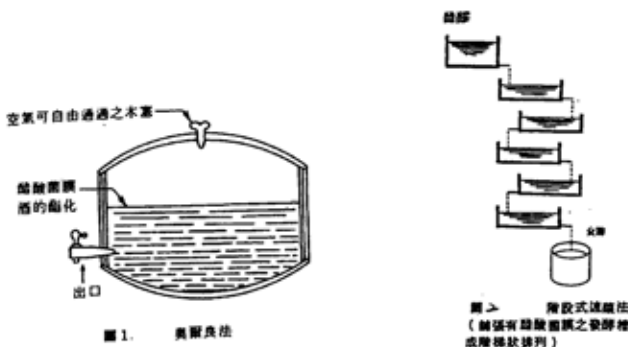
醋酸釀造

醋酸釀造- 奧爾良法(Orleans process):

- 是一種表面發酵法，一般都在地下室進行，以自然氣溫控制發酵溫度。十九世紀初即盛行於法國奧爾良一帶，其後經Pasteur氏改良，而成為現今所用之方法。最初在種醋中添加少量的酒液發酵，俟發酵完畢後在不破壞皮膜之情形下，取出10-15%，並補上同量的酒。本法裝置簡單，設備費低，操作容易，所得醱液比較澄清，易過濾，香味不易散失，產品品質優良。相對舊法而言，發酵時間較短（但仍長達1-3個月），發酵速率較高。不適合大量生產。

為了改進靜置發酵法的缺點而發展出靜置連續發酵法，即使用多槽連續醱酵法以改良之。將淺發酵槽分段排列，發酵液由上向下流。於醱酵期間，在發酵醪表面的菌膜不取出、不打破情況下，僅靜靜、連續地取出液面下之發酵醪，同時注入新鮮之原料酒精液。液體只在菌膜下流動進行發酵，此種發酵法不但可縮短發酵時間，而且可以保持良好風味。

靜置發酵法（奧爾良法）：



醋酸發酵-靜置發酵法



通氣培養法

有幾種型式：

A、速釀法(Frings process)：

又名淋醋法。藉增進醋酸菌發酵的表面積以提高釀醋的效率。在發酵塔(Frings generator)內充填山毛櫸(beech)刨木片，然後繁殖醋酸菌，再由塔上方噴灑含酒精之培養液至刨木片上，原料液由塔之上部因重力自然下流，空氣則由下向上打入。培養液之供應方式可分為循環式及滴流式二種；前者是培養液流至發酵塔底部後再由幫浦打至塔頂，循環直至發酵完成，只需5天；而後者則是培養液調整適當流速，由發酵塔頂經填充物滴流至塔底即成爲醋。本法適於做高酸度之酒精醋及果實醋，填充物除刨木片外，也有樺之小枝、玉米穗軸等。此法缺點有：死菌會在木屑上累積因而阻礙發酵液之流動、產纖維素的醋酸菌(*Acetobacter xylinum*)會在木屑上生長、醋蠅(anguilulas, vinegar eels)的污染、溫度控制不易及因爲通氣而造成酒精揮發等。



速釀法：



B、通氣攪拌或深部發酵(submerged culture process)法：

- 使用天然菌或純粹菌種，將培養液於密閉式發酵槽(醋化器acetator)中一面通空氣一面攪拌，以提供足夠的溶氧使醋酸菌得以快速發酵產生醋酸，空氣並不須過濾除菌，但爲防止雜菌之繁殖，醪之酒精含量與酸度，均以較高爲宜，起始酸度以6-7%，酒精約5%爲最佳。至所有酒精約完全變成醋後，即行停止通氣，此時酸度可達11%，取出半量，餘則作爲下一批種醋之用。由於醋酸發酵係在最適條件下進行，故發酵效率佳，時間短，操作成本低，生產成本較低爲其特點，適合商業大量生產，但由於醋之特殊香氣易因通氣而散失，成品之風味品質一般不如前述諸法所製者。發酵系統包括一個容量可達10-40 KL的不鏽鋼發酵桶及氧氣供應系統、冷卻系統、氣泡控制系統、進出閥等設備。



未來發酵食品的展望

1. 傳統發酵食品技術提升、製程之改良與機械化
2. 利用生物技術進行菌種改良
3. 開發新型發酵食品(非發酵食品)，賦予或加強發酵食品之保健成分。例如以液態深層發酵生產菌絲如靈芝或冬蟲夏草，富含微量元素(硒、鎘、鋅、鉻)之微生物製劑。

參考資料

1. 米食加工(豐年叢書HV#981)，豐年社。
2. 應用微生物學，王三郎編著，高立圖書有限公司。
3. 發酵食品講義，黃文哲、陳錦樹，中興大學。
4. 發酵製程之分析與設計，王培銘，財團法人自強工業科學基金會。
5. Microbiology- an introduction, 8th ed. (eds. G.J. Tortora, B. R. Funke, C.L. Case), Pearson/Benjamin Cummings Publishing Co.



表 1.10 微生物資源之新利用技術

藉由人工突變技術改善且育種出全新機能之新微生物	(1) 紫外線、γ 線照射	(2) 化學藥品處理
新穎有用微生物之篩選及育種改良	(3) 基因重組	(4) 細胞融合
擴大微生物及其所生產酵素之機能	(1) 高溫微生物	(2) 厭氧菌
	(3) 海洋微生物	(4) 特殊環境微生物
代謝產物之利用	(1) 生物反應器	(2) 生物感測器
	(3) 誘導酵素	(4) 家畜臨床診斷用試藥
	(1) 酵素	(2) 胺基酸、核 酸關聯物質
	(3) 生理活性物質	(4) 醫療用藥



表 1.10 微生物資源之新利用技術(續)

於食飼料資源開發方面之應用	(1) 新的發酵食品 (2) 食品品質之維持、除臭 (3) 微生物蛋白質 (4) 木質素分解菌及真菌之生產
於能源生產方面之應用	(1) 生質能源(酒精) (2) 甲烷發酵 (3) 微生物生產氫氣 (4) 微生物電池
於農林水產物生產方面之應用	(1) 利用共生微生物提昇產量 (2) 利用天敵微生物、拮抗微生物防治病害 (3) 利用微生物循環物質之機能於土壤之肥沃化
於環境保護方面之利用	(1) 有機廢棄物之堆肥化 (2) 微生物之脫氮、脫磷處理 (3) 農藥、除草劑之分解 (4) 難分解塑膠之分解

微生物學，王三郎



謝謝！
敬請指教

