

國立台灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis

評估以克弗爾分離菌株製作克弗爾對其理化、微生物
及感官性質的影響

Assessment of the impact of milk kefir producing by isolated
kefir starters on its physicochemical, microbial and sensory
characteristics

洪立洋

Li-Yang Hung

指導教授：陳明汝博士

Advisor: Ming-Ju Chen, Ph. D.

中華民國 114 年 7 月

July, 2025



致謝



首先要感謝在讀碩班這段期間支持我最大的後盾—我的家人。謝謝爸爸、媽媽、阿公、阿嬤在經濟上與心理上的支持，也謝謝姐姐三不五時傳訊息跟我聊天，讓獨自在台北的我不會那麼孤單。謝謝我的指導老師—陳明汝老師，謝謝老師在這段期間的指導，以及對於我的論文與專討提出的建議，讓我更有方向知道該如何改進。同時也要感謝口試委員們，聖耀老師、彥伯老師、詠宗老師與、卿雲組長，謝謝各位在忙碌中抽空幫我檢查論文，並提出有錯誤的部分以及改善的建議。再來是實驗室的同學們與學長姐們，心妤、馨云、榆茵、佳琪、昶安、James、筠淇、柏勳、芸慈、欣妮，謝謝各位在實驗室的陪伴，以及在實驗上的協助，讓我能夠順利的完成實驗。特別感謝佳琪，提供了許多實驗方法上的細節，讓我在做實驗時更有方向，更加清楚自己在幹嘛。實驗室中也要感謝宥儒在行政以及各種事務上的協助，還有教我 HPLC 的操作。還有法西，謝謝妳對於我的實驗提出的建議，以及教我使用 qPCR。還要感謝系辦的游學長，幫我們處理各種生活上的事物，以及收取包裹。謝謝陳學長幫忙處理課業上以及口試相關的事務，讓口試能夠順利進行。最後要特別感謝肉加出借 TPA 以及流變儀，還要謝謝展毅教我儀器的使用，以及解決使用上的問題。還有恩仲老師實驗室的育祥，謝謝你當我的統計小老師，幫我解決很困擾我的統計問題。謝謝所有在碩班這段期間幫助過我的大家，沒有你們我可能無法順利完成學業。

中文摘要



克弗爾是一種源自於高加索、東歐與巴爾幹等地區的傳統發酵乳，近年來，克弗爾的機能性使其逐漸在世界各地受到歡迎，但由於克弗爾粒在結構上與微生物組成上的特性，使得克弗爾在商業上的生產面臨許多難題。因此，本實驗將使用從克弗爾粒中分離出來的純菌株進行發酵乳製作，以期達到簡化克弗爾生產過程，以及保存傳統克弗爾的風味與質地等目的。

實驗將分為兩個部分。第一部分為克弗爾的製作，分為使用克弗爾粒的傳統組以及使用克弗爾粒分離之純菌株的純菌株組 (*Lactobacillus kefiranofaciens* M1、*Lb. kefir* B15、*Lactococcus. lactis* MK4、*Kluyveromyces marxianus* E3)。冷凍的克弗爾粒會以 10% (w/v) 的比例加入牛乳中，於 20°C 發酵 20 小時，並重複三次，使其恢復活性，待活性恢復後，每週繼代一次即可。四種純菌株會各自於培養基中活化三次，並接種於牛乳中使其適應牛乳的環境，之後根據它們在克弗爾粒中的數量加入牛乳中混合，於 20°C 發酵 48 小時。發酵後，樣品皆分裝並保存於 4°C，待後續分析。第二部分為物理化性質分析。兩種發酵乳將會保存 21 天，並每 7 天取樣進行分析。分析項目包含，pH 值、滴定酸度、質地、黏度、總菌數、qPCR (quantitative polymerase chain reaction)、有機酸含量與消費者喜好性試驗。實驗結果顯示，純菌株組的 pH 值 (4.21-4.39) 顯著高於傳統組 (4.04-4.14)，並且純菌株組在保存期間有逐漸下降的現象。滴定酸度於傳統組 (1.13%-1.16%) 顯著高於純菌株組 (0.86%-1.07%)，在兩組中皆會隨著保存期間增加而上升。質地分析的結果顯示，純菌株組在堅實度、稠度、內聚性與內聚功皆高於傳統組，而兩組間沒有顯著差異，四個項目也都會在保存期間下降。黏度在純菌株組中顯著較高，且會在保存期間下降，而傳統組則有上下起伏的現象。乳酸菌數量在純菌株組中顯著高於傳統組，其數量約維持在 9 log CFU/mL，而傳統組的數量則在第 7 與 14 天之間減少了 1.17 log CFU/mL，同時酵母菌增加了 0.98 log CFU/mL。酵母菌突然的增加可能導致乳酸菌的減少。以 qPCR 定量四株菌的數量後發現，傳統組中以 *Lb. kefiranofaciens* 為優



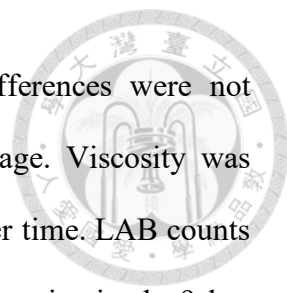
勢菌種，而純菌株組則為 *Lc. lactis*。除了傳統組的 *K. marxianus* 之外，其他菌株皆會在保存期間內減少。有機酸分析的結果指出，傳統組除了檸檬酸之外，乳酸、甲酸、乙酸與丁酸含量皆高於純菌株組，其含量除了傳統組的檸檬酸之外，在保存期間皆無顯著變化。酒精含量在兩組間無顯著差異，而在保存期間皆有顯著的增加。消費者喜好性試驗指出，純菌株組第 0 天的分數最高，不過仍低於傳統組。其中影響接受度最主要的因素為口感與風味，有受試者指出純菌株組的第 14 與 21 天有明顯的酒味，而第 14 天的因為有細小的凝乳塊，使其口感得分最低。綜上所述，以克弗爾粒分離的四株純菌株確實可以進行發酵，並製成發酵乳，達到簡化生產過程、免去使用克弗爾粒的目的。純菌株組在微生物數量方面與傳統組不同，未來也可針對其機能性做更深入的探討，以評估其機能性是否相似於傳統克弗爾或更好。不過純菌株克弗爾的發酵時間較長，並且在保存期間會產生過於明顯的酒味，因此後續可針對菌株的數量做調整，以縮短發酵時間與提升風味。此外，不同批次間發酵乳的品質穩定性與一致性也須做更進一步的試驗，以使其更加適合用於商業生產。

關鍵字：克弗爾、發酵乳、純菌株、乳酸菌、酵母菌

英文摘要

Milk kefir, an ancient fermented beverage, originates from the Caucasus Mountains, Eastern Europe, and the Balkans, with a history dating back centuries. In recent years, kefir has gained global popularity due to its health-promoting properties, resulting in increased market availability. However, the unique biological structure and variability of kefir grains pose challenges for industrial-scale production. Therefore, this study aimed to simplify the production process and preserve the traditional sensory qualities of kefir by using a defined mixture of kefir-isolated microorganisms.

This study consists of two main parts. The first part focused on kefir production. Traditional kefir was made with kefir grains, and pure culture kefir was made with four dominant kefir-derived strains (*Lactobacillus kefirianofaciens* M1, *Lactobacillus kefir* B15, *Lactococcus lactis* MK4, and *Kluyveromyces marxianus* E3). Frozen kefir grains were activated by three successive fermentations (10% w/v in fresh milk at 20 °C for 20 hours), followed by weekly subculturing. For pure culture kefir, each strain was individually activated in broth, then combined based on their proportional abundance in kefir grains and inoculated into milk, followed by fermentation at 20 °C for 48 hours. All samples were stored at 4 °C for subsequent analysis. The second part evaluated the physicochemical and microbial characteristics of both kefir types every seven days over a 21-day storage period. Parameters assessed included pH, titratable acidity, total microbial counts, qPCR (quantitative polymerase chain reaction)-based microbial quantification, texture profile, viscosity, organic acid content, and consumer preference. Results showed that the pH of pure culture kefir (4.21-4.39) was significantly higher than that of traditional kefir (4.04-4.14), and declined gradually during storage. Titratable acidity was consistently higher in traditional kefir and increased slowly over time in both groups. Texture profile analysis revealed that firmness, consistency, cohesiveness, and



work of cohesion were higher in pure culture kefir, though differences were not statistically significant. All texture attributes declined during storage. Viscosity was significantly higher in the pure culture group, but also decreased over time. LAB counts were significantly different between the groups; pure culture kefir maintained ~9 log CFU/mL, whereas traditional kefir experienced a ~1 log reduction from day 7 to 14. Yeast counts increased by ~1 log in both groups during storage, potentially contributing to the LAB decline in traditional kefir. Quantitative-PCR (qPCR) analysis indicated that *Lb. kefiranofaciens* dominated in traditional kefir, while *Lc. lactis* was most abundant in pure culture kefir. All strains, except *K. marxianus*, declined during storage in both groups. The organic acid assay indicated that except for citric acid, the contents of lactic acid, formic acid, acetic acid and butyric acid are higher in traditional group than pure culture group. The concentrations for organic acids had no significant difference during storage except for citric acid in traditional group. For ethanol content, there were no significant differences between two groups, but the concentration increased significantly during storage. The consumer preference test revealed that the pure culture group at day 0 had the highest score, but still lower than traditional group. According to the results, the main factors that affect the acceptance were texture and flavor. Some testers reported that there was distinct alcohol taste in pure culture group at day 14 and 21. Furthermore, there were small curds presence in pure culture group at day 14, hence it got the lowest score. In conclusion, kefir can be successfully produced using a simplified four-strain system. However, batch-to-batch consistency and stability remain challenges. Further optimization of microbial ratios and inoculation methods is needed for industrial scalability, as well as for reducing fermentation time and improving the flavor and texture during storage.

Key words: kefir, fermented milk, pure culture, lactic acid bacteria, yeast

目次



致謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
目次	vi
圖次	viii
表次	ix
壹、文獻探討	1
一、克弗爾(kefir).....	1
(一)克弗爾的製作.....	1
(二)克弗爾對人體健康的益處.....	2
(三)克弗爾製作上遭遇的難題.....	4
二、克弗爾粒	4
(一)克弗爾粒的微生物組成.....	6
(二)克弗爾粒中微生物間的交互作用.....	12
(三)克弗爾粒的形成.....	13
三、以純菌株製作克弗爾的可能性	21
貳、研究動機	26
參、材料與方法	27
第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作	27
一、試驗設計	27
二、克弗爾粒與菌株的活化	28
三、發酵乳製作	29
第二節：發酵乳之物理化特性分析	31
一、試驗設計	31

二、發酵乳之物理化特性分析	32
肆、結果	40
第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作	40
第二節：發酵乳之物理化特性分析	45
一、發酵乳之 pH 值與滴定酸度	45
二、發酵乳之質地變化	48
三、發酵乳中微生物數量之變化	55
四、即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR) 定量發酵乳中各菌株之數量	58
五、發酵乳中有機酸與酒精含量	63
六、消費者喜好性試驗	69
伍、討論	73
第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作	73
第二節：發酵乳之物理化特性分析	74
一、pH 值與滴定酸度	74
二、質地分析與黏度	75
三、微生物數量	75
四、發酵乳中有機酸與酒精含量	76
五、消費者喜好性試驗	77
陸、結論	80
柒、參考文獻	81



圖次

圖 1-1 乳克弗爾與水克弗爾對健康的益處.....	3
圖 1-2 巨觀的克弗爾粒構造	5
圖 1-3 克菲蘭 (kefiran) 的化學結構.....	15
圖 1-4 克弗爾粒的微結構	16
圖 1-5 生物膜表面之掃描式電子顯微鏡影像	17
圖 1-6 克弗爾粒形成的模式圖	18
圖 1-7 顆粒狀凝乳塊於第 28 天共培養後之掃描式電子顯微鏡照相圖.....	19
圖 1-8 顆粒狀凝乳塊與優勢菌株共培養形成克弗爾粒之假說.....	20
圖 1-9 克弗爾製作方法	22
圖 3-1 傳統與純菌株克弗爾製作之流程	27
圖 3-2 傳統與純菌株克弗爾物理化特性測定之試驗設計.....	31
圖 4-1 純菌株各自於牛乳中培養 24 或 48 小時後皆有形成凝乳.....	41
圖 4-2 傳統克弗爾與純菌株克弗爾在發酵後之外觀.....	42
圖 4-3 純菌株克弗爾發酵後的外觀	43
圖 4-4 傳統克弗爾與純菌株克弗爾於 4°C 保存 14 天後之外觀.....	44
圖 4-5 發酵乳在 21 天保存期間之 pH 值變化與滴定酸度變化.....	46
圖 4-6 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化.....	50
圖 4-7 兩組發酵乳於 21 天保存期間內乳酸菌與酵母菌數量之變化.....	56
圖 4-8 兩種發酵乳中各別菌株之數量	59
圖 4-9 兩種發酵乳中四株菌數量之差異	62
圖 4-10 兩種發酵乳樣品中有機酸含量	64
圖 4-11 兩種發酵乳以及不同保存天數之消費者喜好性評分.....	70

表次



表 1-1 來自不同地理位置之克弗爾樣本的微生物組成.....	8
表 1-2 從三組克弗爾粒分離出之乳酸菌 16S rDNA 定序結果	10
表 1-3 從克弗爾粒分離出之酵母菌 26S rDNA 定序結果	11
表 1-4 菌元的微生物組成與接種濃度	24
表 3-1 不同克弗爾菌株所使用之即時聚合酶鏈鎖反應引子.....	35
表 3-2 即時聚合酶鏈鎖反應之反應條件	36
表 4-1 發酵乳在 21 天保存期間之 pH 值變化與滴定酸度變化之比較.....	47
表 4-2 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化.....	52
表 4-3 兩組發酵乳於 21 天保存期間內乳酸菌與酵母菌數量之變化.....	57
表 4-4 兩種發酵乳中各別菌株之數量	60
表 4-5 兩種發酵乳樣品中有機酸含量	66
表 4-6 兩種發酵乳以及不同保存天數之消費者喜好性評分.....	71



壹、文獻探討

一、克弗爾(kefir)

克弗爾為一種源自於俄羅斯西南部高加索山區的傳統發酵乳，又可分為乳克弗爾 (milk kefir) 與水克弗爾 (water kefir)，而通常所指的克弗爾為乳克弗爾，其原料可以是牛乳、羊乳、水牛乳、駱駝乳等。與優酪乳不同的地方是，克弗爾是一種由乳酸菌與酵母菌共同發酵的發酵乳，除了乳酸菌發酵所產生的有機酸以外，酵母菌發酵產生的二氧化碳與微量酒精 (小於 1%) 賦予克弗爾額外的特殊風味與口感，例如酒精與碳酸的刺激風味。根據食品法典委員會的定義 (CODEX standards for fermented milks, CXS 243-2003, 2003)，克弗爾為利用克弗爾粒 (kefir grains) 或其菌種作為菌元進行發酵的發酵乳，其主要菌種為 *Lactobacillus kefir*，以及 *Leuconostoc*、*Lactococcus* 與 *Acetobacter* 菌屬。除了乳酸菌與醋酸菌之外，克弗爾粒中也含有可發酵乳糖的酵母菌 (例如：*Kluyveromyces marxianus*)，以及非乳糖發酵的酵母菌 [例如：*Saccharomyces unisporus* (現名為 *Kazachstania unisporus*)、*S. cerevisiae* 以及 *S. exiguus* (現名為 *Kaz. exigua*)]。這些微生物以共生的型態存在於克弗爾粒中，並形成穩定的微生物聚落。另外，水克弗爾則是將克弗爾粒加入含有蔗糖的溶液中發酵，與乳克弗爾一樣含有乳酸、二氧化碳與微量酒精。

(一)克弗爾的製作

在傳統上，克弗爾是以連續繼代的方式製作，方法為將克弗爾粒加入殺菌過的鮮乳中進行發酵，發酵後以篩網過篩，將克弗爾粒分離，而濾液則為克弗爾，分離後的克弗爾粒則可重複用於下次發酵或低溫保存。克弗爾粒的添加比例為 2~10% (w/v)，於 20~25°C 發酵 18~24 小時，直到 pH 值達到 4.2~4.6 (Saleem et al., 2023)。此方法為最傳統的克弗爾製作方法，也可以從中獲得最完整的益生菌群，不過在製作過程中，需特別注意器具與環境的清潔，避免克弗爾粒遭到汙染，使其菌相改變，進而造成批次間的品質不一。在商業上，克弗爾通常是以冷凍乾燥的菌粉或是將傳統法製成的克弗爾作為菌元 (mother culture)，並以 1~3% (v/v) 的比例接種發酵，

稱為 Russian method 或 back-slopping method (Nielsen et al., 2014)。這兩種方法的優點為節省勞力與成本、容易擴大生產規模、操作方便等，缺點為菌元無法重複使用、益生菌種類少、菌元活性隨著繼代次數增加而減少 (Bintsis et al., 2022)。

(二)克弗爾對人體健康的益處

克弗爾中含有豐富的益生菌 ($10^6 \sim 10^9$ CFU/mL 乳酸菌與 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL 酵母菌)，以及微生物的代謝產物，例如有機酸、胺基酸、多肽、多醣等，對於生理機能有預防、改善等功效 (圖 1-1)。根據 Hertzler et al. (2003) 的研究指出，飲用克弗爾有助於改善乳糖不耐症，原因是在克弗爾中的微生物會產生 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)，並且在發酵過程中將乳糖分解成半乳糖與葡萄糖，降低乳糖含量，避免乳糖不耐症的症狀產生。克弗爾中的微生物透過競爭、產生有機酸、過氧化氫、乙醛、二氧化碳、細菌素 (bacteriocins) (Powell et al., 2006) 等方式達到抗菌的效果。其抗菌效果對於沙門氏菌屬 (*Salmonella*)、志賀桿菌屬 (*Shigella*)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*)、幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 等細菌，以及酵母菌白色念珠菌 (*Candida albicans*) (Rosa et al., 2017) 皆有效。在一項臨床試驗中 (Ostadrahimi et al., 2015) 指出，當患有第二型糖尿病的成年人每天攝取兩次 600 毫升的克弗爾，並持續 8 週後，能夠顯著降低空腹血糖，以及糖化血色素。克弗爾中的多肽類具有免疫調節的功效，這些在發酵過程產生的多肽類可以活化巨噬細胞、促進吞噬作用、抑制 Th2 免疫反應、增加一氧化氮與細胞激素 (cytokines) 的產生以及促進腸腔中 B 細胞分泌 IgA 與 IgG (Adiloğlu et al., 2013)。克弗爾具有免疫調節的功效可能與其中的益生菌降低腸道穿透性的能力有關，以減少腸道中抗原與宿主接觸的機會，藉此降低發炎或過敏反應。除了對於腸道的益處之外，克弗爾也擁有促進皮膚傷口修復的能力。Huseini et al. (2012) 指出，於皮膚三度燒傷且感染綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的大鼠塗抹以克弗爾萃取物或克弗爾粒製成的凝膠後，與塗抹治療燒燙傷藥物磺胺嘧啶銀 (Silver sulfadiazine) 的組別相比，能夠顯著提升皮膚上皮組織的形成以及疤痕形成，也可顯著降低傷口的發炎。研究中也指出，於不同培養時間萃取製成的克弗爾凝膠對於

傷口修復也有顯著影響，以培養 96 小時後萃取的組別效果最佳。克弗爾具有促進傷口修復的能力與其抗菌與抗發炎的能力有關。

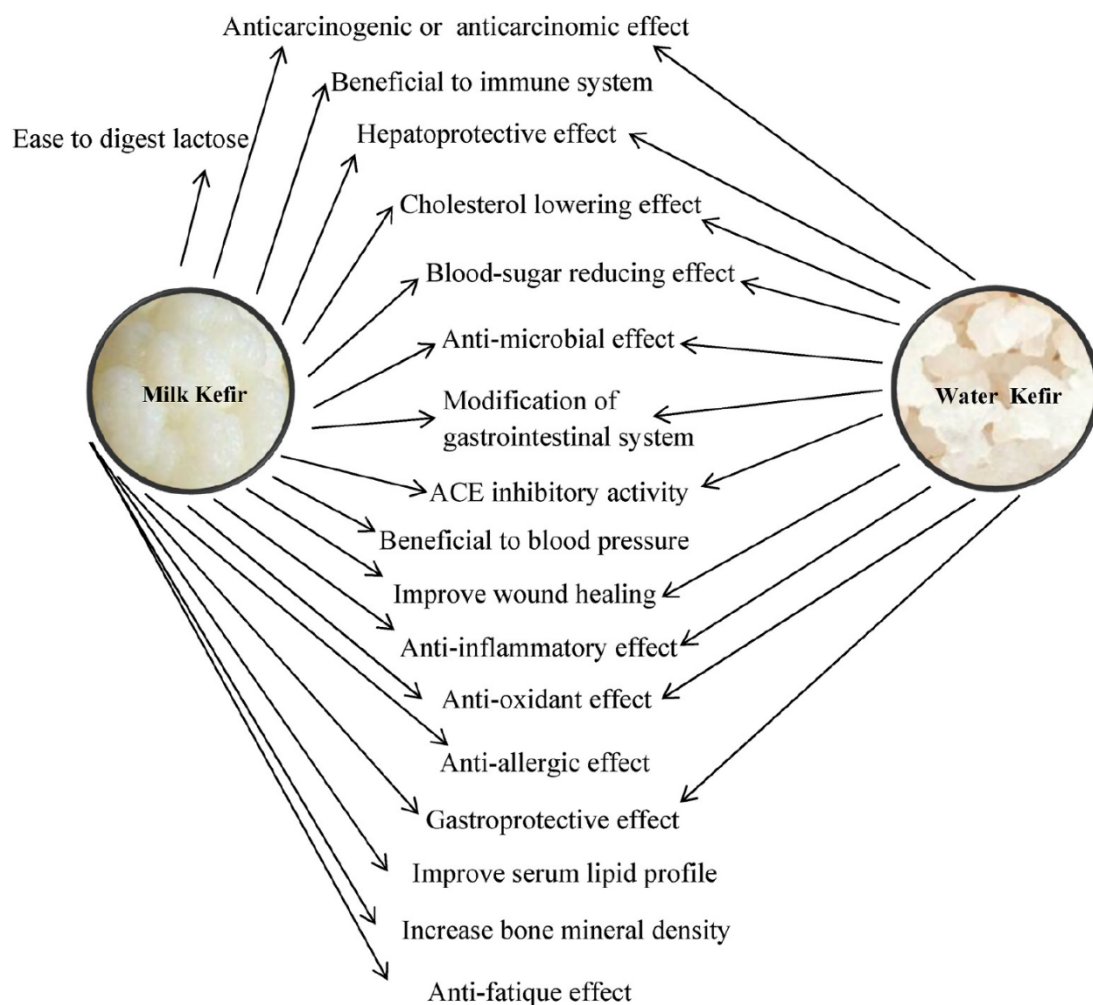


圖 1- 1 乳克弗爾與水克弗爾對健康的益處。

Fig. 1- 1 Health effects of milk kefir and water kefir.

(Guzel-Seydim et al., 2021)

(三)克弗爾製作上遭遇的難題

即使克弗爾對於人體有諸多益處，但是在克弗爾的製作上卻存在許多難題，特別是對於商業上的大規模生產。最傳統的製作方法為利用克弗爾粒作為菌元進行發酵，克弗爾粒為乳酸菌與酵母菌以及多醣類所組成的顆粒，兩者間複雜的共生關係使其成為一個穩定的微生物聚落。雖然利用克弗爾粒製作的克弗爾中含有最完整的益生菌群，但也因為克弗爾粒的特性使其在製作上較為困難。目前對於克弗爾粒的形成機制仍不明瞭，也沒有研究成功地製作出克弗爾粒，因此克弗爾粒的取得只能透過自然形成或以現有的克弗爾粒進行培養，不過其生長速度緩慢，非常難以達到商業生產所需的量，也會增加許多生產成本，且對於保存大量克弗爾粒也是一大難題。在傳統克弗爾的生產過程中，所有器具以及環境皆須維持清潔，避免遭到細菌汙染。若遭到汙染時，不同批次間產品的品質難以維持穩定，也可能使克弗爾粒中的微生物死亡，使克弗爾粒的數量減少，或使其中的菌相發生變化。基於上述原因，現今商業生產的克弗爾大多以冷凍乾燥菌粉或是以傳統克弗爾為菌元進行發酵。冷凍乾燥菌粉為一次性使用，雖然容易擴大生產規模、簡化生產過程、節省成本，但也因為需要定期購買菌粉而造成額外的支出，此外，大多數菌粉的微生物組成與種類較少，也可能含有非克弗爾的優勢菌種，如保加利亞乳桿菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*)，以及嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*)，使其風味、口感、質地等特性可能與傳統克弗爾有所差異。另外一種以傳統克弗爾為菌元的方法，同樣有容易擴大生產規模、簡化生產過程、節省成本等優點，不過隨著繼代的次數增加，可能會因為嗜菌體等因素的影響使菌元的活性逐漸降低 (Bintsis and Papademas, 2022)，進而使產品品質產生變化。

二、克弗爾粒

克弗爾粒為傳統克弗爾發酵所使用的菌元，由家家戶戶之間所流傳下來，其外型為類似白花椰菜的乳白色顆粒，外表粗糙，呈不規則狀，大小約直徑 2~9 毫米 (圖 1-2)。克弗爾粒由微生物產生的多醣、蛋白質、細胞碎片等物質組成，其構造

為多孔隙的構造，可提供微生物附著的空間，且可以將其展開成一片厚生物膜 (biofilm) (Wang et al., 2012)。克弗爾粒的發酵基質可以是牛乳、山羊乳、綿羊乳、水牛乳等，而不同種類的乳源對於發酵後的克弗爾成分也會有影響，例如在 Gul et al. (2015) 的研究中以水牛乳為發酵基質，結果顯示在微生物分布、胺基酸、有機酸、乙醇濃度等皆與牛乳克弗爾有所差異。水克弗爾粒則和乳克弗爾粒有許多差異，其外觀為半透明灰白色的顆粒，且顏色會受到發酵基質的影響。外表則較為平滑，且較少會有如同乳克弗爾粒衍生出的小顆粒 (Guzel-Seydim et al., 2021)。



圖 1- 2 巨觀的克弗爾粒構造。 (Gentry et al., 2023)

Fig. 1- 2 Macroscopic structure of kefir grains.



(一)克弗爾粒的微生物組成

克弗爾粒中存在多種微生物，主要為乳酸菌與酵母菌，也可能會有少數醋酸菌，彼此間透過複雜的交互關係形成一個穩定的共生群落，然而，諸多因素皆會影響克弗爾粒中微生物的種類、比例、數量等，例如克弗爾粒來源的地理位置、不同動物的乳汁、發酵溫度與時間、克弗爾粒與乳的比例等，使得世界各地取得的克弗爾粒在微生物組成上皆有一定程度的差異（表 1-1）(Nejati et al., 2020)。即使不同來源的克弗爾粒在微生物組成上有所差異，它們主要都含有 *Lactobacillus* spp.、*Leuconostoc* spp.、*Streptococcus* spp.、*Lactococcus* spp.等乳酸菌，以 *Lactobacillus kefiranofaciens* 與 *Lb. kefir* 為主要的優勢菌種，而酵母菌則以 *Kluyveromyces marxianus* 為優勢菌種，其他還有 *Kazachstania* spp. 與 *Saccharomyces* spp. 等菌種。在分布比例方面，以乳酸桿菌佔大多數，約 65~80%，其餘則是乳酸球菌與酵母菌 (Arslan, 2015)。

在 Blasche et al. (2021) 的研究中發現，雖然克弗爾粒的重量在 36 小時內增加了 10%，其微生物組成仍維持不變，而在發酵乳中則會產生明顯的改變。在發酵初期，主要為克弗爾粒中的優勢菌種 *Lb. kefiranofaciens* 生長，隨後為 *Lc. lactis* 與 *Leuconostoc mesenteroides* 的快速生長，最後則是 *Lb. kefir* 與 *Acetobacter fabarum*。顯示出在克弗爾的發酵過程中，克弗爾粒的微生物組成不變，而在發酵乳中，各種微生物會根據時間變化而逐漸定殖至其中。

本實驗室先前已有針對臺灣克弗爾進行微生物組成分析，在 Chen et al. (2008) 的研究中，以依賴型培養法 (culture-dependent method)、非依賴型培養 (culture-independent method) 以及聚合酶鏈鎖反應-變性梯度膠體電泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 方式針對新竹、宜蘭與蒙古來源的克弗爾粒進行菌相分析，結果顯示三種克弗爾粒皆以 *Lb. kefiranofaciens* 以及 *Lb. kefir* (佔比 50%以上) 為優勢菌種，其餘則有 *Leu. mesenteroides* 與 *Lactococcus lactis* (表 1-2)。Wang et al. (2008) 則針對臺灣克弗爾的酵母菌組成進行分析，同樣以 PCR-DGGE 分析來源自新竹與台北的克弗爾粒。結果顯示，克弗爾

粒中的酵母菌以 *K. marxianus* 為優勢菌種，佔比高達 76%，其餘則為 *Saccharomyces turicensis* 與 *Pichia fermentans* (表 1-3)。





表 1-1 來源自不同地理位置之克弗爾樣本的微生物組成

Table 1-1 Microbial composition of kefir samples of different geographical locations.

Geographic Location of Studied Sample	Method of Analysis	Identified Bacteria or Yeasts
France, Ireland and the United Kingdom	Metagenomics (16S rRNA and ITS sequencing)	<i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lb. helveticus</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp. and <i>Kazachstania</i> spp.
Belgium	Metagenomics (16S and 26S rRNA sequencing)	<i>Lb. kefiranofaciens</i> or <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. kefiri</i> , <i>Acetobacter</i> spp. and <i>Enterobacter</i> spp., <i>Kl. marxianus</i> , <i>Kazachstania exigua</i> and <i>Nauvomozya</i> spp.
Malaysia	Metagenomics (16S rRNA sequencing)	<i>Lb. kefiranofaciens</i> and <i>Lb. kefiri</i>
Italy	Metagenomics (16S rRNA and 26S rRNA sequencing)	<i>Lb. kefiranofaciens</i> as dominant and <i>Lb. kefiri</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lc. lactis</i> and <i>Acetobacter</i> spp. as subdominant bacteria, <i>Dekkera anomalus</i> , <i>Kz. exigua</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>



表 1-1 來自不同地理位置之克弗爾樣本的微生物組成 (續)

Table 1-1 Microbial composition of kefir samples of different geographical locations

Geographic Location of Studied Sample	Method of Analysis	Identified Bacteria or Yeasts
Brazil	PCR-DGGE	<i>Lb. kefiranofaciens</i> and <i>Lb. kefir</i>
	Metagenomics (16S rRNA sequencing)	<i>Lactobacillus</i> spp., such as <i>Lb. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> , and subsp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. parakefir</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. amilovor</i> us, <i>Lb. crispatus</i> and <i>Lb. buchneri</i>
Turkey	Metagenomics (16S rRNA sequencing)	<i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. helveticus</i>
Turkey	PCR-DGGE	<i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. sunkii</i> , <i>Lb. otakiensis</i>
	Culture dependent	<i>Lc. lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lb. kefir</i>
Russia	Culture dependent	<i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. parakefir</i> , <i>Lc. lactis</i> and <i>Leuconostoc</i> spp.

(Nejati et al., 2020)

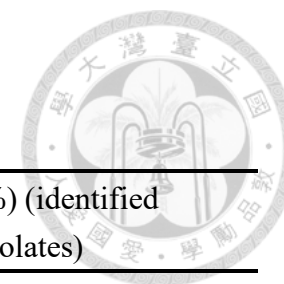


表 1-2 從三組克弗爾粒分離出之乳酸菌 16S rDNA 定序結果

Table 1-2 Sequences information from the 16S rDNA obtained from the LAB species isolated from three kefir grains

Classified group	Closet relative	Identity ^a (%)	Distribution (%) (identified number/total isolates)
Hsinchu			
HL1	<i>Lb. kefiranoficiens</i>	100	43 (30/69)
HL2	<i>Lb. kefir</i>	99	53 (36/69)
HL3	<i>Leu. mesenteroides</i>	100	3 (2/69)
HL4	<i>Lc. lactis</i>	100	1 (1/69)
Mongolia			
ML1	<i>Lb. kefiranoficiens</i>	100	24 (8/50)
ML2	<i>Lb. kefir</i>	100	58 (29/50)
ML3	<i>Leu. mesenteroides</i>	99	16 (12/50)
ML4	<i>Lc. lactis</i>	100	2 (1/50)
Ilan			
IL1	<i>Lb. kefiranoficiens</i>	100	40 (22/55)
IL2	<i>Lb. kefir</i>	100	58 (32/55)
IL3	<i>Leu. mesenteroides</i>	99	2 (1/55)

^a Identical nucleotides percentage in the sequence obtained from the agarose band and the sequence obtained found in NCBI.

(Chen et al., 2008)

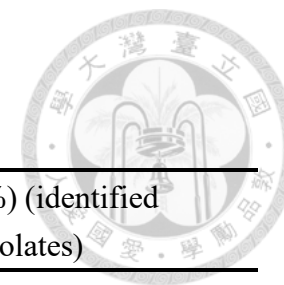


表 1-3 從克弗爾粒分離出之酵母菌 26S rDNA 定序結果

Table 1-3 Sequences information from the 26S rDNA obtained from the yeast species isolated from kefir grains

Strains isolated from kefir grains	Closet relative	Identity ¹ (%)	Distribution (%) (identified number/total isolates)
HY1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	100	76 (69/91)
HY2	<i>Saccharomyces turicensis</i>	99	22 (20/91)
HY3	<i>Pichia fermentans</i>	99	2 (2/91)

¹ Identical nucleotide percentage in the sequence obtained from the agarose band and the sequence obtained found in the NCBI database.

(Wang et al., 2008)



(二)克弗爾粒中微生物間的交互作用

克弗爾粒中的微生物會透過複雜的合作、競爭等關係來協助彼此生長，並有助於維持微生物種類與數量的穩定。微生物間的交互作用主要可分為酵母與細菌、細菌與細菌以及酵母與酵母之間的作用 (Nejati et al., 2020)。

酵母與細菌間的作用有乳酸的同化作用 (assimilation)、產生二氧化碳與減少氧氣、提供營養素給細菌等。在發酵的過程中會有乳酸堆積，而過多的乳酸會逐漸殺死乳酸菌，有些非乳糖發酵的酵母菌，例如 *S. cerevisiae* 可利用乳酸作為碳源，進而減少乳酸濃度，並延長乳酸菌的生存時間。在酵母菌的生長過程中，會消耗氧氣並排出二氧化碳，而氧氣的減少可促進乳酸桿菌等兼性厭氧菌的生長。酵母菌與乳酸菌可透過代謝產物的交換 (cross-feeding) 在資源有限的環境中生存。酵母菌可提供維生素、生長因子、胺基酸等物質給乳酸菌使用，並促進其生長。

在克弗爾中，細菌與細菌以及酵母與酵母之間作用的相關研究較少。在 Blasche et al. (2019) 的研究中指出，*Lb. kefiranofaciens* 與 *Leu. mesenteroides* 在發酵初期即有明顯的增長，而 *Acetobacter fabarum* 在發酵 36 小時後才開始生長，*Lb. kefir* 則在整個發酵過程中穩定生長，顯示出後兩者仰賴其他菌種的代謝產物生長。在酵母菌的方面，有些菌種如 *S. cerevisiae* 會分泌多肽類來抑制其他酵母菌的生長，例如 *K. marxianus* 等非 *Saccharomyces* 菌種。

在 Blasche et al. (2021) 的研究中發現，*Lb. kefiranofaciens* 與 *Leu. mesenteroides* 兩者間存在著互利共生的關係。結果發現，當牛乳中添加多種胺基酸、礦物質、維生素、DNA 鹼基、DNA 片段等物質時，雖然無法促進 *Lb. kefiranofaciens* 的發酵效率，但可以增加 *Leu. mesenteroides* 的酸化效果，其程度相似於與 *Lb. kefiranofaciens* 共培養。在另一方面，乳酸與乙酸為 *Leu. mesenteroides* 的主要代謝產物，結果顯示乳酸可以明顯促進 *Lb. kefiranofaciens* 的生長，對比於乙酸、pH 值改變與蛋白水解的影響。總結來說，兩者間的互惠關係是由 *Lb. kefiranofaciens* 的蛋白水解能力所釋出的多肽而促進 *Leu. mesenteroides* 的生長，*Leu. mesenteroides* 生長期間所產生的乳酸則反過來促進 *Lb. kefiranofaciens* 的生長。



(三)克弗爾粒的形成

克弗爾粒中的微生物是附著在由多醣、蛋白質、細胞碎片等物質所組成的基質上，其中的多醣又稱為克菲蘭 (kefiran)，是一種由大約等量葡萄糖與半乳糖組成的支鏈多醣 (圖 1-3)，可由多種乳酸桿菌分泌，例如 *Lb. kefiranofaciens*、*Lb. kefirgranum*、*Lb. parakefir*、*Lb. kefir* 以及 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Micheli et al., 1999)。在 Cheirsilp et al., (2003) 與 Cheirsilp and Radchabut (2011) 的研究中指出，當乳酸菌 *L. kefiranofaciens* 與酵母菌 *S. cerevisiae* 共培養時，可增加克菲蘭的產量。雖然我們已知克弗爾粒的組成，以及其中微生物與其的關係，不過我們對其形成的機制仍不明瞭，至今也未曾有研究成功以人工方式使克弗爾粒形成，因此目前可取得的克弗爾粒皆是自然形成，並透過連續繼代的方式使其生長。在 Wang et al., (2012) 的研究中發現克弗爾粒可被展開成一片厚生物膜，而克弗爾粒外層的微生物分布比內層更密集。外層主要含有乳酸桿菌、乳酸球菌與酵母菌，內層則與外層相似，但是有較長的乳酸桿菌與更多酵母菌 (圖 1-4)。針對從克弗爾分離的乳酸菌與酵母菌進行自聚集 (auto-aggregation)、生物膜形成能力、細胞表面疏水性等分析。結果發現乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* HL1 的自聚集能力最佳且最快，其次為 *Lb. kefiri* HL2，另外，pH 值對於自聚集能力有顯著影響，在 pH 值為 4.2 時，自聚集能力比 pH 值 6.2 時更快且更好。在細胞表面疏水性方面，以 *Lb. kefiranofaciens* HL1 與 *Lb. kefiri* HL2 的疏水性較大，而 *Lc. lactis* 的疏水性則較低。*Lb. kefiri* HL2 也表現出較好的生物膜形成能力，形成的膜有較高的細胞密度，且細胞之間會互相連結，形成較堅固的膜。相比之下，*Lb. kefiranofaciens* HL1 形成的膜則較容易脫落。在酵母菌的部分，以 *S. turicensis* HY2 的自聚集能力最好，而 pH 值對於酵母菌的自聚集能力則無顯著影響。*S. turicensis* HY2 也有最強的細胞疏水性，其次為 *K. marxianus* HY1。*S. turicensis* HY2 形成的生物膜較脆弱，而 *P. fermentans* HY3 形成的膜則較堅固，也有較高的細胞密度。

當乳酸菌與酵母菌進行共培養時，於 pH 4.2 時兩者的共聚集 (co-aggregation) 能力比 pH 6.2 時更快且更好。當 *Lb. kefiranofaciens* HL1 與 *K. marxianus* HY1 或 *S.*



turicensis HY2，以及 *Lb. kefir* HL2 與 *S. turicensis* HY2 共培養時有最好的共聚集能力。在生物膜形態方面，*Lb. kefir* HL2 形成的膜密度較高且堅固，且細胞之間會互相連結形成有空洞的網狀結構，而與酵母菌共培養時，這些空洞會被填滿，並形成較厚的膜（圖 1-5 A-D）。當克弗爾中的四種乳酸菌與三種酵母菌共培養時，則會形成厚的雙層膜，而表層由長桿乳酸菌與酵母菌覆蓋，內層則由短桿乳酸菌組成，與克弗爾粒結構相似（圖 1-5 E）。根據前述資訊，可以得出克弗爾粒形成的假說（圖 1-6），最初由 *Lb. kefirano**faciens* 與 *S. turicensis* 進行自聚集與共聚集，而隨著 pH 值下降，聚集的情況也會增強，並形成微小顆粒。隨後 *Lb. kefir*、*K. marxianus* 與 *P. fermentans* 則附著到顆粒的表面，進而形成生物膜。之後乳酸菌與酵母菌則持續聚集到膜上，並逐漸形成立體結構。隨著乳酸菌與酵母菌的生長，有越來越多的細胞與乳中的成分堆積在顆粒表面上，使克弗爾粒逐漸形成。

凌 (2024) 以 7 株臺灣克弗爾中的微生物，*Lb. kefirano**faciens*、*Lentilactobacillus kefir*、*Leu. mesenteroides*、*Lc. lactis*、*Lentilactobacillus parakefir*、*Kaz. turicensis* 與 *K. marxianus* 於牛乳中進行培養，觀察到有顆粒狀凝乳塊的形成，其中含有長桿與短桿乳酸菌、乳酸球菌與酵母菌，之後則以凝乳塊作為天然載體供微生物附著，並觀察是否可以形成克弗爾粒。進行 28 天培養並且每 7 天繼代一次後，藉由掃描式電子顯微鏡發現短桿乳酸菌、球菌與酵母菌存在凝乳塊的縫隙中，且這些微生物會自己聚集在一起，也會互相貼附在彼此身上（圖 1-7）。從顯微結構可以看到，多數桿菌都被包埋在凝乳塊的蛋白質內，而酵母菌則多裸露在外。不過由於培養時間較短，若能將培養時間延長至數個月，可能會使微生物覆蓋整個凝乳塊，再加上胞外多醣產量的增加，進而使凝乳塊形成與天然克弗爾粒相似的結構（圖 1-8）。

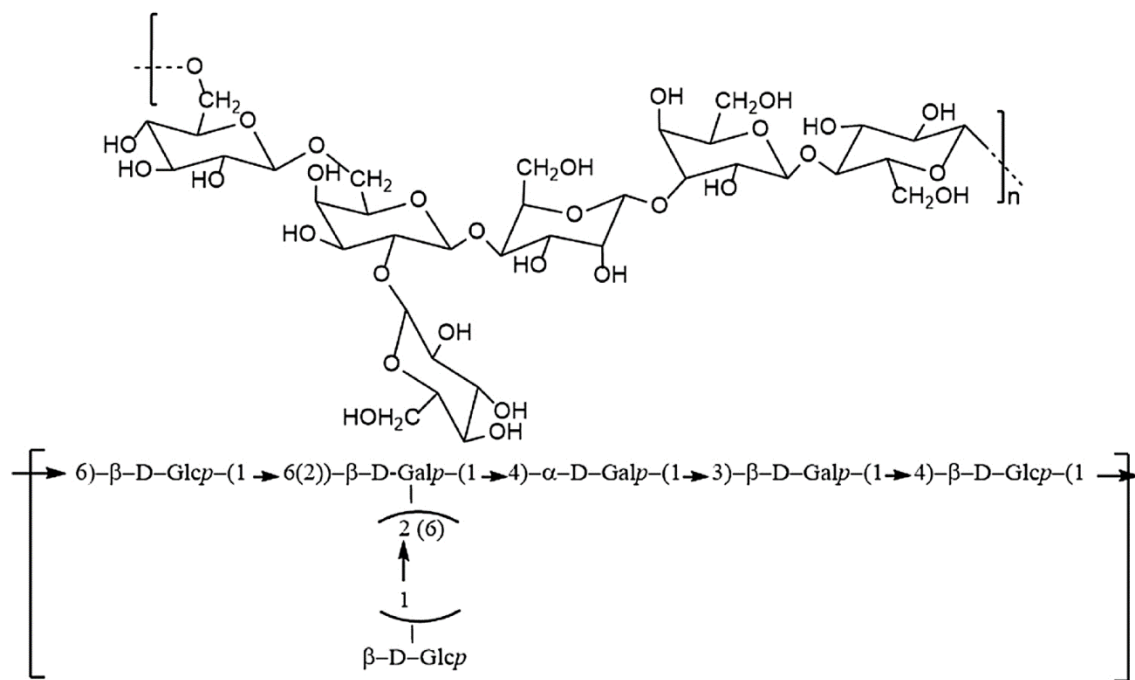


圖 1- 3 克菲蘭 (kefiran) 的化學結構。

Fig. 1- 3 Chemical structure of kefiran.

(Micheli et al., 1999)

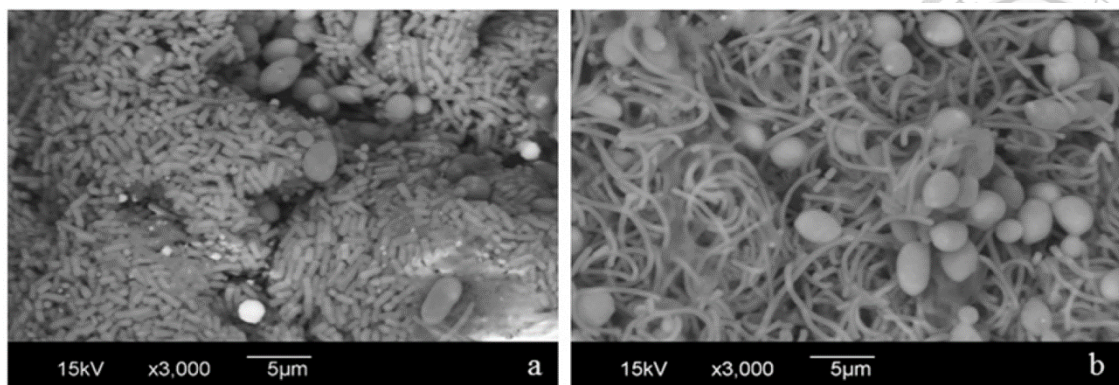
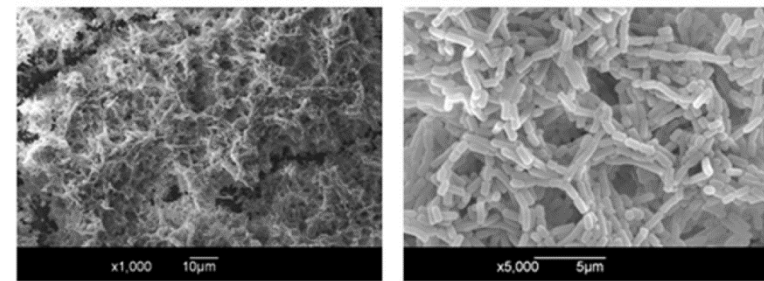


圖 1- 4 克弗爾粒的微結構。(a)克弗爾粒的外層；(b)克弗爾粒的內層。

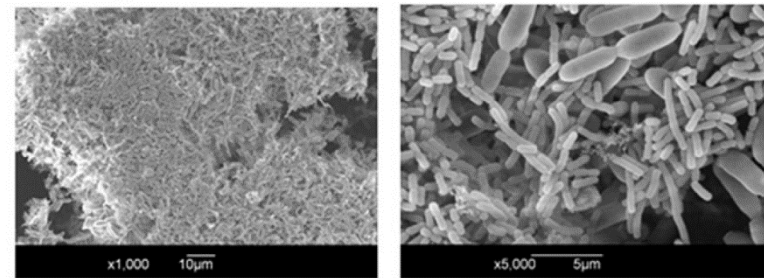
Fig. 1- 4 The microstructure of kefir grains. The outer layer of kefir grain (a); the inner layer of kefir grain (b).

(Wang et al., 2012)

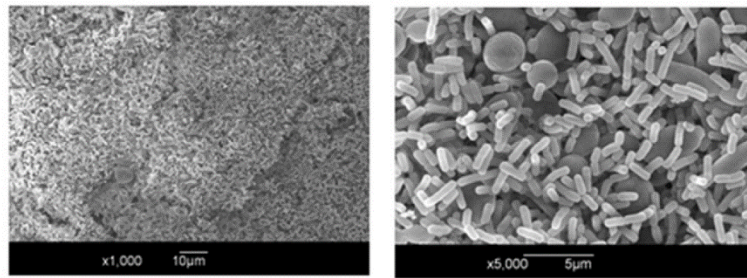
A *Lb. kefir*HL2



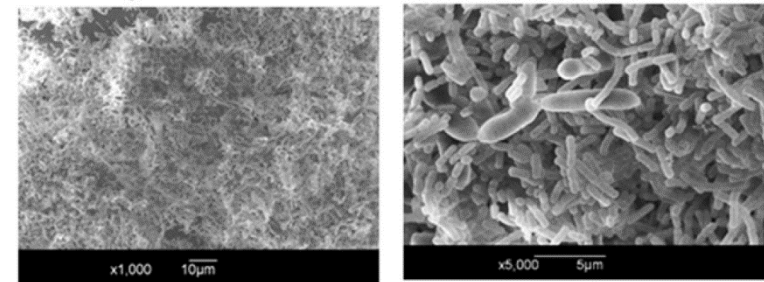
B *Lb. kefir*HL2 mixed with *Klu. marxianus* HY1



D *Lb. kefir*HL2 mixed with *P. fermentans* HY3



C *Lb. kefir*HL2 mixed with *S. turicensis* HY2



E Mixed cultures

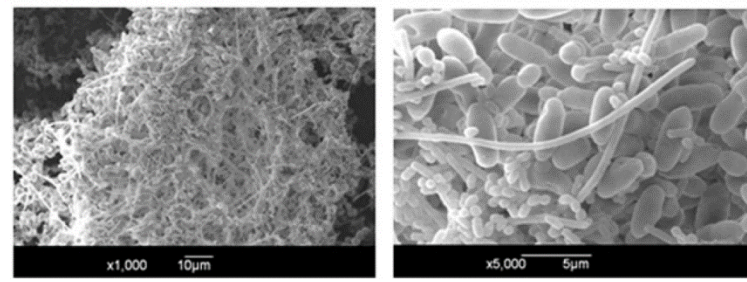


圖 1- 5 生物膜表面之掃描式電子顯微鏡影像 (A) *Lb. kefir* HL2 ；(B) *Lb. kefir* HL2 與 *Klu. marxianus* HY1 共培養 ；(C) *Lb. kefir* HL2 與 *S. turicensis* HY2 共培養 ；(D) *Lb. kefir* HL2 與 *P. fermentans* HY3 共培養 ；(E) 4 種乳酸菌與 3 種酵母菌共培養。

Fig. 1- 5 Scanning electron micrographs of biofilm surface of (A) *Lb. kefir* HL2; (B) *Lb. kefir* HL2 cultured with *Klu. marxianus* HY1; (C) *Lb. kefir* HL2 cultured with *S. turicensis* HY2; (D) *Lb. kefir* HL2 cultured with *P. fermentans* HY3, and (E) 4 LAB cultured with 3 yeasts.

Lactic acid bacteria (LAB): *Lb. kefir*HL2, *Leuconostoc mesenteroides* HL3 and *Lc. lactis* HL4

Yeasts: *K. marxianus* HY1, *Saccharomyces turicensis* HY2 and *Pichia fermentans* HY3

(Wang et al., 2012)

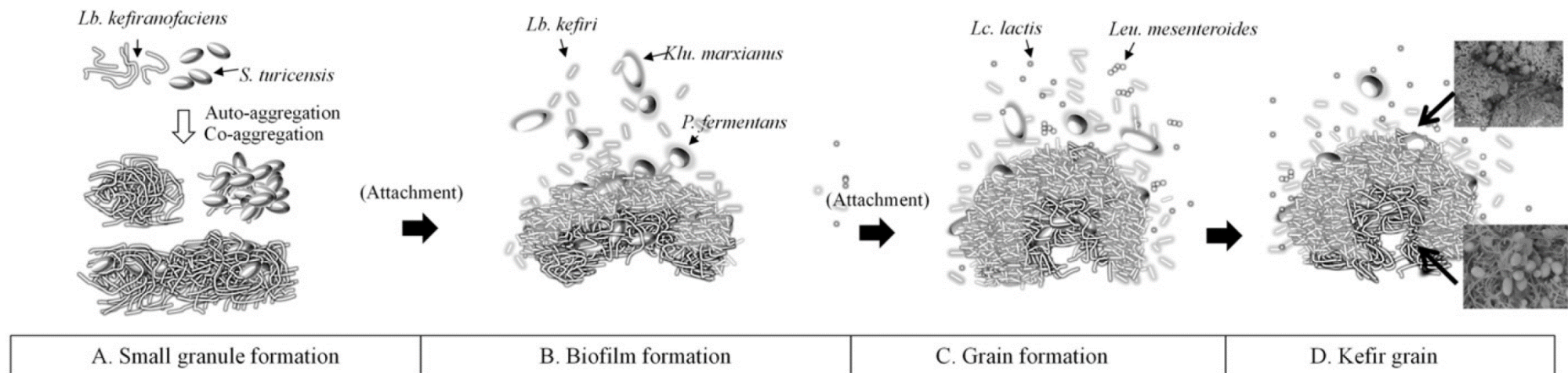


圖 1- 6 克弗爾粒形成的模式圖。

Fig. 1- 6 The schematic model of kefir grain formation.

(Wang et al., 2012)

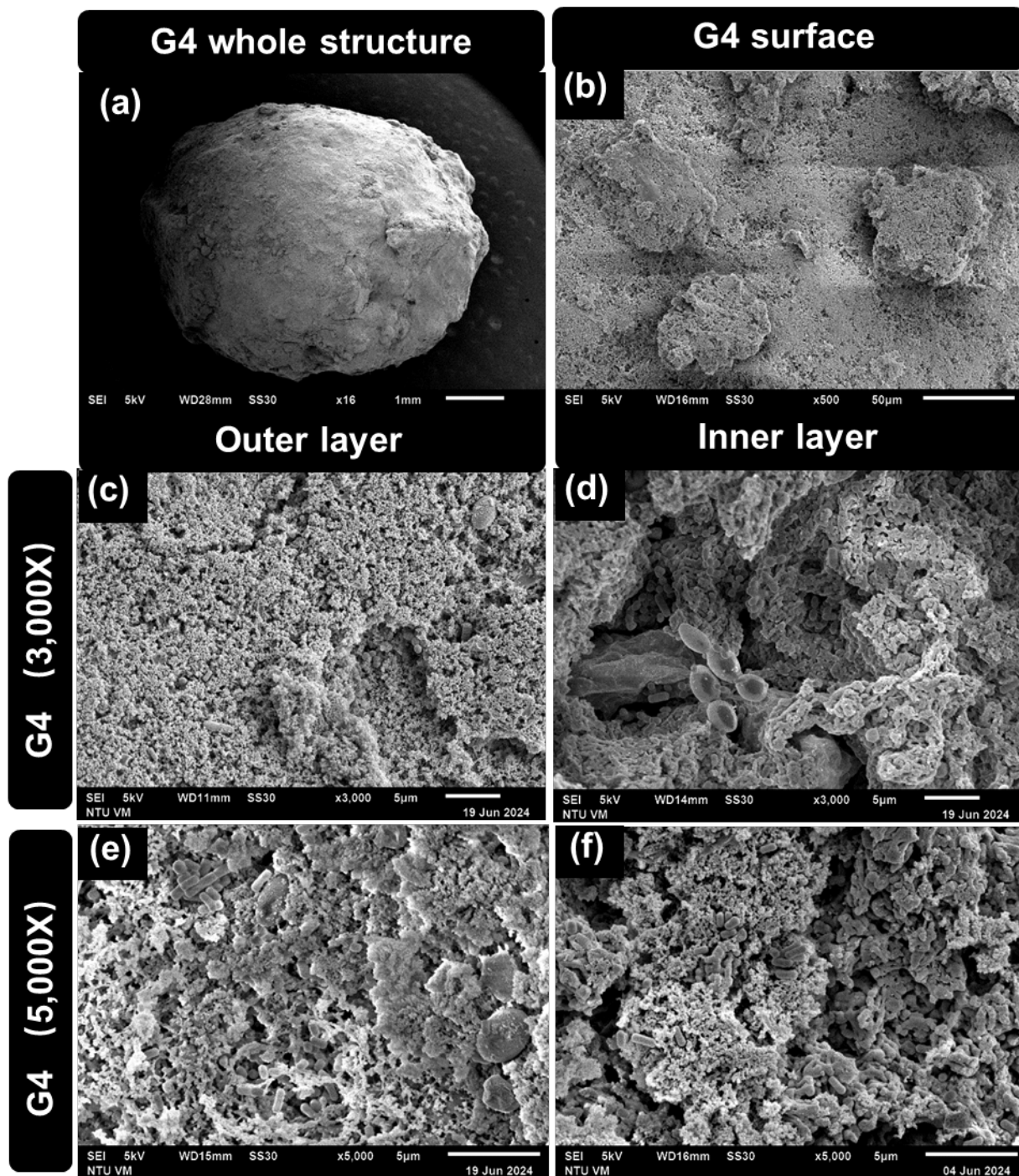


圖 1- 7 顆粒狀凝乳塊於第 28 天共培養後之掃描式電子顯微鏡照相圖。(a) 顆粒狀凝乳塊外觀 (16X 放大) 與 (b) 表面構造 (500X)。外層微結構以 (c) 3,000X 及 (e) 5,000X 放大觀察；內層以 (d) 3,000X 及 (f) 5,000X 放大觀察。

Fig. 1- 7 The scanning electron micrographs of granular curd during day 28 after 7-day-interval subcultures. (a) Morphology of granular curd under 16X magnification and (b) surface structure under 500X magnification observations. Outer layer microstructure with (c) 3,000X and (e) 5,000X magnification; inner layer with (d) 3,000X and (f) 5,000X magnification to observe.

(凌, 2024)

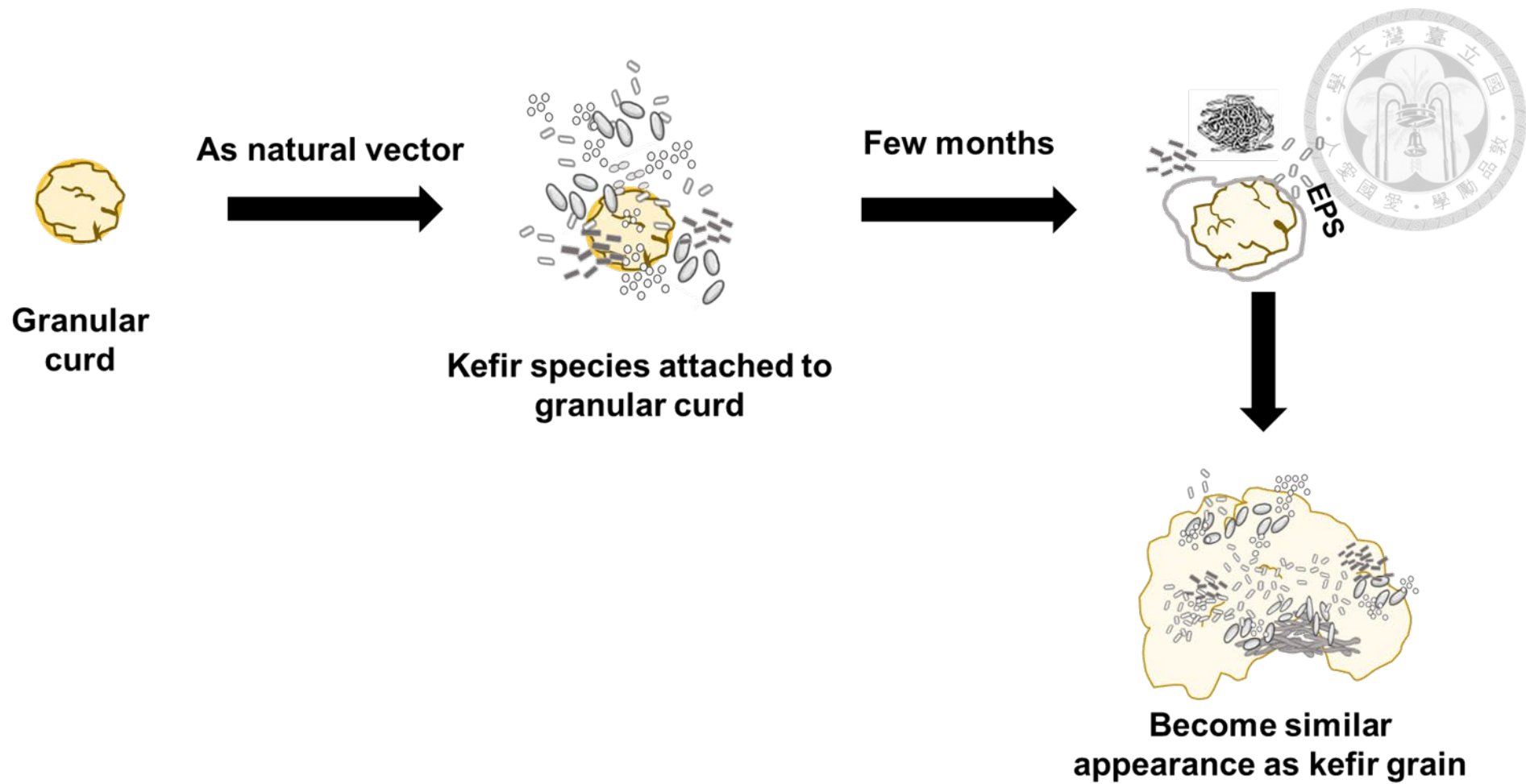


圖 1-8 顆粒狀凝乳塊與優勢菌株共培養形成克弗爾粒之假說。

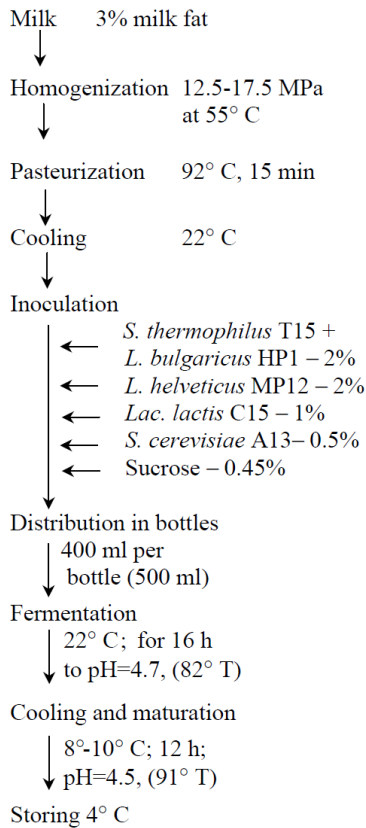
Fig. 1-8 Hypothesis of kefir grain formation by granular curd with dominant species co-culture method.

(凌, 2024)

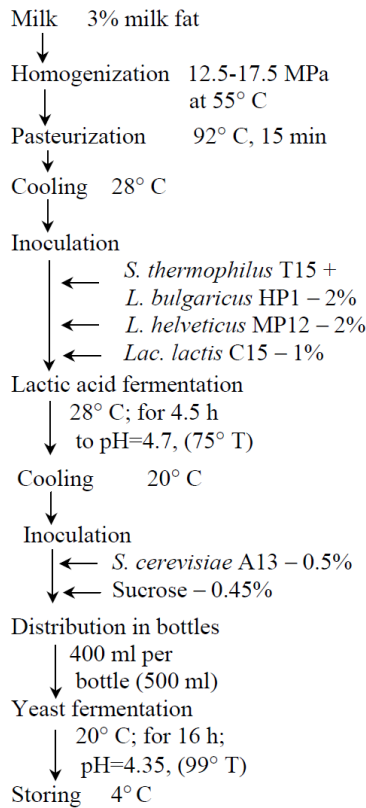
三、以純菌株製作克弗爾的可能性

有鑑於克弗爾粒本身的性質，有研究者嘗試以從克弗爾分離出來的純菌直接進行發酵，以期重現傳統克弗爾的風味、口感與質地，並減少克弗爾製作上的困難。在 Beshkova et al. (2002) 的研究中，以三株從克弗爾分離的菌株 *Lactobacillus helveticus* MP12、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C15 以及 *Saccharomyces cerevisiae* A13，加上 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HP1 與 *Streptococcus thermophilus* T15 進行發酵 (圖 1-9)，並與傳統克弗爾比較。結果顯示，在三組之間的 pH 值、乳酸濃度與黏稠度皆無顯著差異，而酒精與二氧化碳濃度則有顯著差異。在微生物數量方面，克弗爾 A (乳酸菌與酵母菌同時發酵) 與 C (以克弗爾粒發酵) 的生長模式相近，同樣都是以球菌 (cocci) 為優勢菌種。在克弗爾 B (先使用乳酸菌發酵，在以酵母菌發酵) 中，乳酸桿菌 (lactobacilli) 與球菌的數量相近，作者推測是因為，克弗爾 B 先以 28°C 發酵 4.5 小時，再以 20°C 發酵 16 小時，相較於克弗爾 A 與 C 都是以 22°C 發酵，最初發酵溫度的提升可能影響了乳酸桿菌的生長，使其數量皆比克弗爾 A 與 C 多。在感官性質方面，由 10 位品評員針對各組的酸度、黏稠度、風味以及發泡性進行評分。結果顯示在克弗爾 A 與 B 之間沒有顯著差異，且克弗爾 B 的接受度較高，它有較濃稠的質地、獨特的酵母香味以及強烈的發泡性。克弗爾 A 則有不如克弗爾 B 濃稠、擁有酵母香味、較溫和的酸味以及良好的發泡性等特質。克弗爾 C 則有傳統克弗爾的滑順口感、較弱的酵母香味以及較低發泡性等特質。這些感官性質在儲藏 7 天後仍存在。

(a) With pure cultures by simultaneous lactic acid and yeast fermentation (kefir A)



(b) With pure cultures by consecutive lactic acid and yeast fermentation (kefir B)



(c) With kefir grains (kefir C)

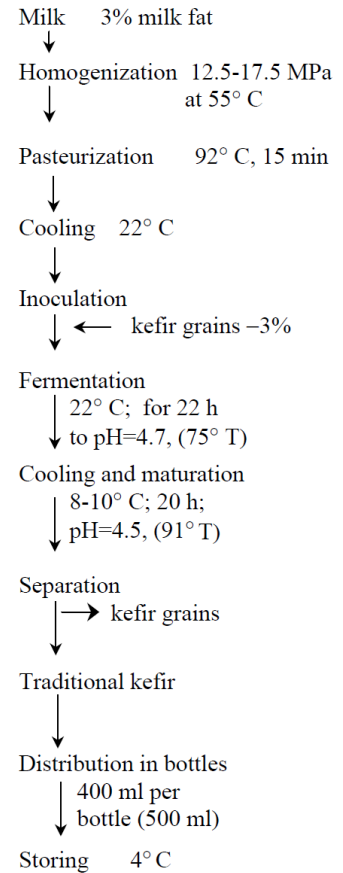


圖 1- 9 克弗爾製作方法：(a)以純菌株同時進行乳酸與酵母發酵 (b)以純菌株先進行乳酸發酵，再進行酵母發酵 (c)以克弗爾粒發酵。

Fig. 1- 9 Method of kefir production: (a)With pure cultures by simultaneous lactic acid and yeast fermentation (kefir A), (b) with pure cultures by consecutive lactic acid and yeast fermentation (kefir B), (c) with kefir grains (kefir C).

(Beshkova et al., 2002)



在另一項研究中 (Nambou et al., 2014)，利用了 6 種從克弗爾中分離出來的菌株進行發酵，包含 *Lactobacillus kefir* BD00002、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BD00014、*Lactococcus lactis* BD00736、*Streptococcus thermophilus* BD00089、*Leuconostoc mesenteroides* BD01701 以及 *Kluyvermyces marxianus* BD01004，並依照不同組成與比例分為 7 組 (表 1-4)，其中的優勢菌種為乳酸菌，又以球菌的數量多於乳酸桿菌。不同菌種的數量在發酵過程中有增有減，是因為微生物之間的適應過程，以及多種不同的交互作用所造成，不過這些菌種的生長模式與克弗爾粒中微生物的變化相似，也代表這些組合的菌元是穩定的。在物理化性質方面，pH 值在發酵第 24 小時介於 4.06~4.32；48 小時介於 3.86~4.12。與市售商品 (pH 值 4.3~4.4) 以及其他文獻 (pH 值 4.29~4.40) 比較是相近的。黏稠度在各組間為 0.044~0.055 Pa·s，其他文獻指出克弗爾的黏稠度介於 0.014~0.050 Pa·s 之間。乙醇濃度在發酵第 24 小時為 1085~1569 mg/kg；48 小時為 1802~3681 mg/kg。作者提到乙醇濃度已經足夠賦予產品克弗爾的特殊風味。此外，由於 k1 組中沒有加入酵母菌 *K. marxianus*，在產品中也沒有偵測到乙醇，故可確定克弗爾中的乙醇是由酵母菌產生。乳酸濃度在發酵第 48 小時為 7.23~14.18 g/kg，與其他文獻報告的結果相近。在揮發性化合物的部分，其組成與傳統克弗爾相似，以乙醇與乙酸乙酯為主要揮發性化合物。



表 1-4 菌元的微生物組成與接種濃度

Table 1-4 Microbial composition and inoculum concentration (% v/v) of formulated combination of starter cultures.

Combinations	Microbial composition and inoculum concentration ^a
k1	<i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (1%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (1%)
k2	<i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004 (1%)
k3	<i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (0.5%); <i>Lc. lactis</i> BD00736 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004
k4	<i>Lb. kefir</i> BD00002 (0.5%); <i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>Ln. mesenteroides</i> BD01701 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004 (1%)
k5	<i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>Ln. mesenteroides</i> BD01701 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004 (1%)
k6	<i>Lb. kefir</i> BD00002 (0.5%); <i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> BD00014 (0.5%); <i>Lc. lactis</i> BD00736 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>Ln. mesenteroides</i> BD01701 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004 (1%)
k7	<i>Lb. kefir</i> BD00002 (0.5%); <i>Lc. lactis</i> BD00736 (0.5%); <i>St. thermophilus</i> BD00089 (0.5%); <i>Ln. mesenteroides</i> BD01701 (0.5%); <i>K. marxianus</i> BD01004 (1%)

^a *K.*, *Kluyveromyces*; *Lb.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus*; *Ln.*, *Leuconostoc*; *St.*, *Streptococcus*.

(Nambou et al., 2014)



Bourrie et al (2023) 則是探討利用重組的克弗爾菌群對代謝產物組成的影響。實驗中使用了 *Acetobacter pasteurianus* KC001、*Lc. lactis* KC002、*Leu. mesenteroides* KC003、*Lt. kefir* KC004、*Lb. kefiranofaciens* KC005、*P. fermentans* KC006、*S. cerevisiae* KC007、*Kaz. unispora* KC008 以及 *K. marxianus* KC009 等九種菌株。結果顯示，純菌株製作的克弗爾與傳統克弗爾在乳酸菌與酵母菌數量以及 pH 值方面皆無顯著差異。代謝產物的部分，在傳統克弗爾與重組克弗爾之間總共有 51 種化合物有顯著差異。此外，在傳統克弗爾中發現含量較高的多種酯類、葡萄糖與乙醇；重組克弗爾中則含有較多的有機酸，例如乙酸、丁酸等，以及醛類，例如苯甲醛等。發酵時間的長短對於代謝產物的產生也有影響，發酵 12 小時與 18 小時比較之下，發酵 18 小時克弗爾中的酯類、有機酸、乙醇、醣類等含量皆有顯著提升。雖然我們已經知道重組克弗爾與發酵時間對於代謝產物的含量會有影響，不過這些物質含量的差異對於風味是否會有影響，仍需進行感官品評才可得知。

藉由上述提到的文獻可以得知，傳統克弗爾雖然對於健康有諸多好處與機能性，但也因為克弗爾粒的特性使其難以應用於商業上的大規模生產。為了因應近年來克弗爾逐漸被大眾所接受，冷凍乾燥菌粉可以大幅簡化克弗爾的製程，但由於這些菌粉是一次性使用，因此必須定期購買，此外，這些菌粉中的微生物種類可能較少，也可能含有非克弗爾來源的菌種，使其機能性與風味可能和傳統克弗爾有所差別。另外一種使用純菌株的方法可以挑選數種克弗爾中的優勢菌種，並調整其組成比例，使其接近傳統克弗爾，也已經有研究指出利用此方法做出的克弗爾與傳統克弗爾相近，此外，這些菌種可以由廠商自行保存，不須定期購買。

貳、研究動機



克弗爾為近代逐漸興起的發酵乳，它和一般優酪乳不同的是它有特殊的酒精風味、氣泡口感、種類更多的益生菌等，且其中的有機酸、胺基酸、多醣、多肽類等有維持人體健康的潛力，例如改善乳糖不耐症、抗菌能力、免疫調節、傷口修復等。克弗爾目前面臨最大的難題是生產的方法，若以傳統的克弗爾粒進行發酵，將會使生產更加耗時、費力，且克弗爾粒的發酵容易受到環境影響，使產品品質難以標準化，因此不適合用於商業上的生產。現在商業生產克弗爾多數是以冷凍乾燥菌粉或是以傳統克弗爾做為菌元，雖然有簡化製程、節省時間與人力、品質穩定等優點，不過由於這些菌元無法重複使用，故需要定期購買，也可能會造成額外的支出。此外，乾燥菌粉中的微生物組成可能會為了要增加發酵的效率而進行變動，使其組成與傳統克弗爾不同，也可能不含有克弗爾中的典型菌株，進而使產品風味、質地等特性與傳統克弗爾有異。

本研究將會以臺灣克弗爾中分離出的乳酸菌與酵母菌直接進行發酵，將菌數調整至與克弗爾粒相近，並觀察其在物理化特性、風味等方面是否與傳統克弗爾有差異，並評估是否可擴大生產規模的可能性，以期更加優化商業上克弗爾的生產，使克弗爾成為更加大眾化的飲品，也可讓臺灣市面上有更多種類的發酵乳可供選擇。此外，若自行保有菌株，只需要在每次使用時將其擴增，將可以長久使用，因此減少了向外購買菌粉的支出，也可能達到節省生產成本的目的。

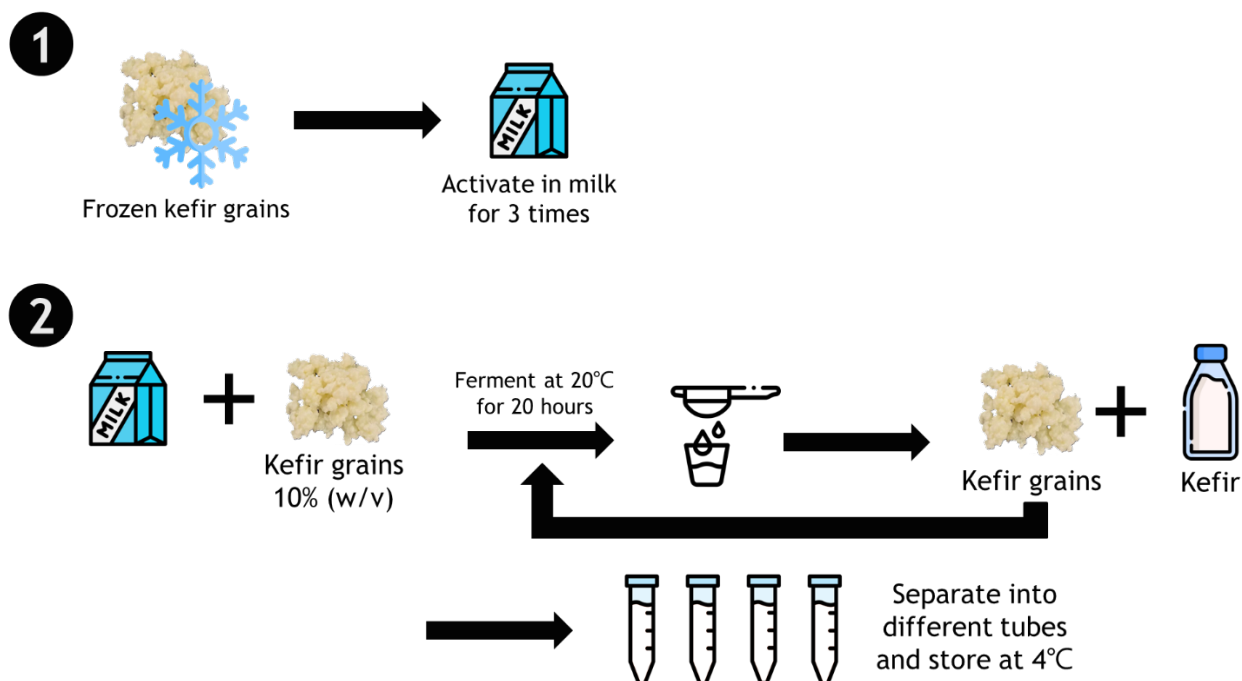


參、材料與方法

第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作

一、試驗設計

(A)



(B)

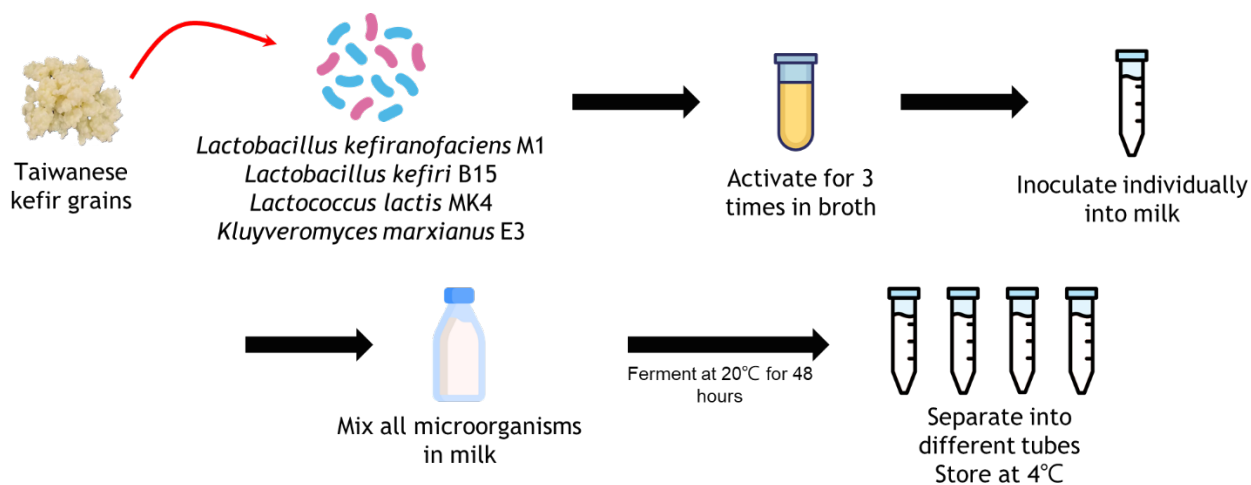


圖 3- 1 傳統 (A) 與純菌株 (B) 克弗爾製作之流程。

Fig. 3- 1 Flow chart of traditional and pure culture kefir production.



二、克弗爾粒與菌株的活化

1. 試驗材料

1.1 克弗爾粒與菌株

本實驗所使用的臺灣克弗爾粒與克弗爾粒分離菌株來自國立臺灣大學動物科學技術學系動物產品研究室所保存。菌株包含乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* M1、*Lb. kefir* B15、*Lc. lactis* MK4 以及酵母菌 *K. marxianus* E3。

1.2 乳品來源

乳品來源為國立臺灣大學生物資源暨農學院附設農業試驗場生產之全脂鮮乳。

1.3 微生物培養基

Lactobacilli MRS 培養基 (Lactobacilli de Man, Rogosa and Sharpe broth, Acumedia Manufactures, Lansing, Michigan, USA)、PDB 培養基 (Potato dextrose broth, PDB, Acumedia Manufactures)、M17 培養基 + 0.5% 乳糖 (0.5% lactose + M17 broth, Biolife, Milano, Italy)。

2. 試驗方法

2.1 菌株活化

實驗所使用的菌株皆保存在 -80°C 冷凍庫中，使用前需先進行活化。*Lb. kefiranofaciens* M1 與 *Lb. kefir* B15 皆於 MRS broth 中、30°C 厭氧培養 48 小時；*Lc. lactis* MK4 於 M17 broth + 0.5% 乳糖中、30°C 培養 24 小時；*K. marxianus* E3 於 PDB broth 中、25°C、150 rpm 震盪培養 24 小時。此步驟重複進行兩次。

2.2 菌株之牛乳基質適應

將活化兩次後的菌株以 3500 rpm 離心 10 分鐘，以去除培養液。隨後加入等量 0.85% 滅菌食鹽水，將沉澱的菌塊震散後，再以 3500 rpm 離心 10 分鐘，此步

驟進行兩次，以去除殘留的培養液以及代謝產物。菌株以食鹽水清洗過兩次後，去除食鹽水並加入等量鮮乳，放入培養箱培養，條件與「2.1 菌株活化」相同。



2.3 微生物數量之計算

將適應完牛乳的菌株以無菌之 0.85% 食鹽水序列稀釋至適當倍率後，以塗盤法將 0.1mL 稀釋液塗抹在培養基上。乳酸桿菌以 MRS agar、30°C 厭氧培養；乳酸球菌以 M17 agar + 0.5%乳糖、30°C培養；酵母菌以 PDB agar、25°C培養。三天後取出進行計數，選擇菌落數為 30~300 的培養皿計算。單位以 colony forming unit (CFU)/mL 表示。

2.4 克弗爾粒之活化

將冷凍保存於脫脂乳中之克弗爾粒取出解凍後，以 10% (w/v) 之比例加入鮮乳中，於 20°C培養 20 小時，之後以滅菌過的篩網將克弗爾粒分離，再加入鮮乳中發酵，此步驟重複三次。活化之後，則每週進行一次繼代即可。

三、發酵乳製作

1. 試驗材料

1.1 活化後的克弗爾粒與菌株

臺灣克弗爾粒與克弗爾粒分離菌株來自國立臺灣大學動物科學技術學系動物產品研究室所保存。活化方式如同「材料與方法第一節之二、克弗爾粒與菌株的活化」所述。

1.2 乳品來源

乳品來源為國立臺灣大學生物資源暨農學院附設農業試驗場生產之全脂鮮乳。



2. 試驗方法

2.1 傳統克弗爾之製作

將活化過的克弗爾粒以 10% (w/v) 的比例加入鮮乳中，放入培養箱中以 20°C 培養 20 小時，發酵完成後取出以滅菌過的篩網將克弗爾粒分離，濾液分裝至 50mL 離心管中保存於 4°C，待後續分析。克弗爾粒則加入鮮乳中再次進行發酵。

2.2 純菌株製作克弗爾

將適應過牛乳以及計數過的乳酸菌與酵母菌根據該菌種在克弗爾粒中的數量加入鮮乳中混合，其數量根據「材料與方法第一節之二、克弗爾粒與菌株的活化」而定，以 CFU/mL 計算。菌種在克弗爾粒中的數量根據凌 (2024) 的報告而定，*Lb. kefiranofaciens* 為 10^8 CFU/mL；*Lb. kefir* 為 10^7 CFU/mL；*Lc. lactis* 為 10^7 CFU/mL；*K. marxianus* 為 10^6 CFU/mL。添加至牛乳中的比例 (v/v) 為，*Lb. kefiranofaciens* 5%、*Lb. kefir* 4.25%、*Lc. lactis* 2.5%、*K. marxianus* 0.5%。四株菌加入鮮乳並混合均勻後，置於 20°C 培養 48 小時，取出後，將發酵乳分裝至 50mL 離心管，之後置於 4°C 冰箱中保存，待後續分析。

第二節：發酵乳之物理化特性分析

一、試驗設計

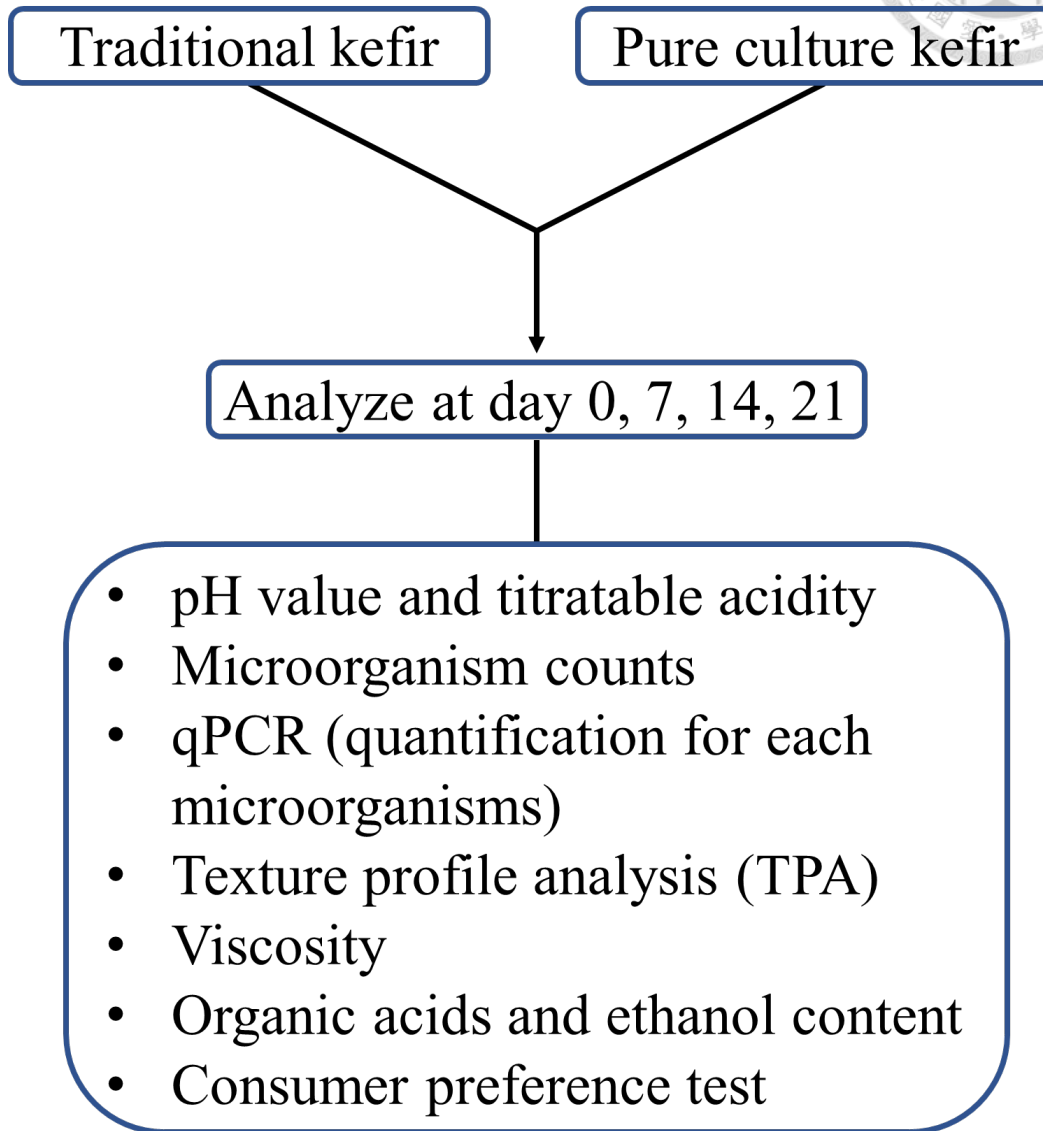


圖 3-2 傳統與純菌株克弗爾物理化特性測定之試驗設計。

Fig. 3- 2 Experimental design of physicochemical properties analysis for traditional and pure culture kefir.



二、發酵乳之物理化特性分析

1. 試驗材料

1.1 發酵乳

根據「材料與方法第一節之三、發酵乳製作」發酵完成之傳統克弗爾以及純菌株製作之克弗爾。

2. 試驗方法

2.1 發酵乳活菌數之計算

將發酵乳樣品以無菌之 0.85% 生理食鹽水序列稀釋至適當倍率後，取 0.1 mL 稀釋液塗抹至培養基上，並將培養皿倒置，MRS 培養基於 30°C 厭氧培養，PDA 培養基於 25°C 培養，三天後選取菌落數約為 30~300 的培養皿以菌落計數器計算，結果以 CFU/mL 表示。MRS 培養基的菌落數為乳酸菌之活菌數，PDA 培養基則為酵母菌之活菌數。

2.2 發酵乳中各菌種活菌數之定量

2.2.1 樣品前處理

於無菌操作台中取發酵乳樣品 400 μ L 至 2 mL 均質管中，以 20000 $\times$ g、4°C 離心 5 分鐘，去除上清液後，加入 0.1 N 氫氧化鈉 (sodium hydroxide, NaOH, AppliChem, Darmstadt, Germany) 於沉澱物中使乳脂皂化，再以 20000 $\times$ g、4°C 離心 5 分鐘，去除上清液後用無菌冰棒棍將乳脂移除，此步驟需進行兩次。以氫氧化鈉處理過後，將沉澱物以 400 μ L 無菌 0.85% 生理食鹽水懸浮，於避光環境中加入 1 μ L 溴化丙錠 (propidium monoazide, PMA, Biotium Inc., CA, USA)，並於黑暗中靜置 10 分鐘，之後將 PMA 處理過的樣品置於冰上，以波長約 500 nm 之藍光曝光 5 分鐘，使 PMA 與死亡細菌之 DNA 結合，以抑制其 PCR 反應。



2.2.2 發酵乳樣品之菌體 DNA 萃取

2.2.2.1 DNA 萃取

PMA 處理過後之樣品以 5000rpm、4°C 離心 15 分鐘後並去除上清液，接著進行 DNA 萃取。於沉澱物中加入約 300mg 組織研磨珠 (0.1mm zirconia/silica beads, Bio-Spec Products Inc., OK, USA) 與 500 μ L DNA extraction buffer [200mM Tris-HCl (Amresco Inc., Solon, OH, USA), 80mM EDTA (pH 9.0, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 與 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Biotools Co. Ltd., New Taipei City, Taiwan) 以 5:1 比例混合]，使用 FastPrep-24™ 5G 均質機 (MP Biomedicals, CA, USA) 以 5.0m/s 之速率均質 30 秒，將菌體打破並釋出 DNA，之後以 12000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，離心後吸取 400 μ L 上清液至新的均質管中，並加入 400 μ L PCI 溶液 (phenol: chloroform: isoamyl alcohol solution= 25: 24: 1, Sigma-Aldrich Inc.)，以 4.0 m/s 均質 45 秒使蛋白質變性，再以 12000 rpm、4°C 離心 10 分鐘，取 250 μ L 上清液至 1.5 mL 微量離心管中備用。

2.2.2.2 DNA 沉澱

於 PCI 處理過後之 250 μ L 上清液中加入 25 μ L 3M 醋酸鈉溶液 (sodium acetate, pH 5.4, Showa Chemical Co. Ltd., Meguroku, Tokyo, Japan) 以及 250 μ L 異丙醇 (isopropanol, Sigma-Aldrich Inc.)，使用震盪機以 3000rpm 震盪 30 秒，隨後以 12000rpm、4°C 離心 10 分鐘，去除上清液後，加入 500 μ L 70% 乙醇 (ethanol, Honeywell Research Chemicals, Morris Plains, NJ, USA)，以 12000rpm、4°C 離心 5 分鐘，去除上清液並加入 500 μ L 100% 乙醇，再以 12000rpm、4°C 離心 5 分鐘並去除上清液，將含有 DNA 的微量離心管放入真空乾燥皿中，並真空風乾 30 分鐘，關閉真空幫浦後靜置於乾燥皿中持續風乾至隔天。

2.2.2.3 DNA 回溶

完全風乾後，加入 50 μ L 無菌去離子水回溶，以 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher

Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 測定 DNA 濃度與品質，隨後將 DNA 樣品保存於-20°C 待進行後續實驗。



2.2.3 即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time/quantitative polymerase chain reaction)

參考商業 qPCR 酵素套組 [Fast SYBR Green Master Mix (2X) Kit, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA] 配製試劑之方法，以 qPCR 進行各別菌株之定量。於每一 0.1mL PCR 反應管中加入 5 μ L Fast SYBR Green Master Mix (2X)、0.2 μ L 之 10 μ M forward primer、0.2 μ L 之 10 μ M reverse primer，以及 2 μ L 待測 DNA 樣本，並以無菌去離子水將整體體積調整至 10 μ L。同時將各菌株 DNA 及樣本 DNA 序列稀釋至適當濃度，使用即時聚合酶鏈鎖反應儀 (QuantStudio 3 real-time PCR system, Applied Biosystems) 進行分析。即時聚合酶鏈鎖反應所使用之引子與反應條件如表 3-1 與 3-2 所示。



表 3-1 不同克弗爾菌株所使用之即時聚合酶鏈鎖反應引子

Table 3-1 qPCR primers for different kefir species

Species	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Reference
<i>Lb. kefiranofaciens</i>	LK1-2F	GAGCGGAACCAGCAGAATCA	Wang et al., 2018
	LK1-2R	GCTGTTCATGCGAACTGCTT	
<i>Lb. kefir</i>	LK-F	CAAACCAACGACTTGAAGAAG	Tanizawa et al., 2017
	LK-R	CAAGCTTTTGGCGTTGATCG	
<i>Lc. lactis</i>	Lc-F	TACCAACTGGATGAGCAGCG	凌, 2024
	Lc-R	GCCTTGGTGAGCCTTTACCT	
<i>K. marxianus</i>	KluMx-F	GGGCTGCGTGTCAAGTCTAT	凌, 2024
	KluMx-R	AAGCCGTATGCCTCAAGGAG	



表 3-2 即時聚合酶鏈鎖反應之反應條件

Table. 3-2 Reaction conditions for qPCR

Stage	Step	Temperature (°C)	Time
Hold stage		50	2 min
	Initial denaturation	95	10 min
PCR stage (40 cycles)	Denaturation	95	15 sec
	Annealing and extension	60	1 min
Melt curve stage		95	15 sec
		50	1 min
		95	15 sec



2.3 發酵乳之 pH 值測定

將發酵乳攪拌均勻後，以 pH 值測定儀 (AB41PH pH meter, Aquasearcher, Ohaus, Parsippany, NJ, USA) 測定。將讀數模式設定為連續讀數，將電極放入乳樣中，直到數值不再變動為止，即為樣品之 pH 值。

2.4 發酵乳之可滴定酸度測定

2.4.1 樣品前處理

樣品製備的方法參考 ISO/TS 11869:2012。將冷藏的樣品回溫至室溫後，將其攪拌混合均勻，並秤取 10g 之樣品，再加入 10 mL 的純水混合均勻備用。

2.4.2 滴定

將滴定管以 0.1 N 氫氧化鈉溶液潤洗過後，裝入新的氫氧化鈉溶液備用。在乳樣中滴入數滴酚酞指示劑，並放入磁攪拌子，以攪拌台持續攪拌。滴定直到樣品呈現淡紫紅色，且顏色維持至少五秒以上不會消退，即為滴定終點，並記錄所使用的氫氧化鈉體積。可滴定酸度的計算方法參考 ISO/TS 11869:2012。公式如下

$$w = \frac{V \times 0.9}{m}$$

其中 w 為每 100g 樣品中含有的乳酸克數

V 為滴定所用掉的氫氧化鈉體積(mL)

m 為乳樣的重量(g)

2.5 發酵乳之質地分析

將發酵乳從 4°C 冰箱中取出後，以湯匙將其攪拌均勻，秤取約 30g 發酵乳至樣品杯中，再以質地分析儀 (TA.XT2 plus texture analyzer, Stable Micro Systems, Surry, UK) 測定。分析儀上裝置 5 kg 測力器以及發酵乳專用的反擠壓裝置 (A/BE-d35, back extrusion rig 35mm disc)，測定參數的設定為，測試前速度 (pre-test speed)

為 2 mm/s；測試速度 (test speed) 為 1 mm/s；測試後速度 (post-test speed) 為 10 mm/s；距離 (distance) 為 10 mm；觸發力道 (trigger force) 為 0.5 g；數據擷取速率為 500 pulse per second (pps)。透過軟體 (Exponent v 6.1.16.0, Stable Micro Systems, Surry, UK) 進行數據分析，圖表的最大正峰值代表堅實度 (firmness)；正值面積代表黏稠度 (consistency)；最大負峰值代表內聚性 (cohesiveness)；負值面積代表內聚功 (work of cohesion)。

2.6 發酵乳樣品之黏度 (viscosity) 測定

發酵乳樣品經攪拌混合均勻後，保存於 4°C 中備用。使用流變儀 (RST-CPS Touch Rheometer, Brookfield Engineering Laboratories Inc., MA, USA) 進行黏度測定。於測量平台上放置 2mL 之發酵乳樣品，使用平板型探頭 (RPT-50 mm spindle)，間隙設定為 1mm，於 4°C 下以剪切率 (shear rate) 30s⁻¹ 持續測定至 300 秒，每 15 秒記錄一次數據，以毫帕·秒 (millipascal-second, mPa·s) 表示黏度。

2.7 發酵乳之有機酸與酒精含量測定

2.7.1 樣品前處理

修改自 Vénica et al. (2014) 的方法。取 4 mL 發酵乳樣品至 50 mL 離心管中，加入等量之 0.01N 硫酸 (sulfuric acid 98%, for HPLC LiChropur, Supelco Inc., Germany)，震盪 1 分鐘混合均勻後，以 10000 × g 於 4°C 離心 10 分鐘，離心後以 1 mL 針筒吸取約 0.4 mL 上清液，並以 0.22 μm 濾膜過濾至 HPLC 樣品瓶中，保存於 -20°C，待後續分析。

2.7.2 高效能液相層析(HPLC)之分析

使用高效能液相層析儀 (PU-2089 plus quaternary high performance liquid chromatography, Jasco International Co. Ltd, Japan)，以 0.01 N 硫酸 (sulfuric acid 98%, for HPLC LiChropur, Supelco Inc., Germany) 做為移動相，流速設定為 0.5mL/min，

洗針液為去離子水 (double distilled water, ddH₂O)，偵測波長為 UV 210 nm，以自動取樣器吸取 10 μ L 樣品注入樣品注射器中。層析柱 (Carbomix H NP5, 8% Crosslinking, 7.8 $\times$ 300 mm, Sepax Technologies Inc., USA) 溫度設定為 40°C，測定時間為 35 分鐘，標準品為甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、檸檬酸 (皆為 HPLC 專用，Sigma-Aldrich Inc.) 稀釋至適當倍率後注入 HPLC 分析，以繪製該有機酸的標準曲線與迴歸方程式，將待測樣品之積分面積代入迴歸方程式以求出該有機酸在樣品中之含量。

測定酒精使用的層析柱為 Sugar SH1011, 8.0 $\times$ 300mm (Resonac Corporation, Tokyo, Japan)，以 0.01N 硫酸做為移動相，流速設定為 1.0mL/min，洗針液為去離子水 (ddH₂O)，使用折射率 (refractive index, RI) 偵測器，以自動取樣器吸取 5 μ L 樣品注入樣品注射器中。層析柱溫度設定為 50°C，測定時間為 20 分鐘，標準品為 99.8% 乙醇 (Fisher scientific, Loughborough, UK)，稀釋至適當倍率後注入 HPLC 分析，以繪製酒精的標準曲線與迴歸方程式。

2.8 消費者喜好性試驗

徵求 20 至 30 位民眾針對傳統克弗爾、純菌組克弗爾的顏色、風味、氣味、口感、整體接受度進行 1 至 9 分之評分，以得知消費者對於哪種克弗爾的接受度較高，以及它們之間在不同項目上的差異。

2.9 統計分析

各分析項目所得到的數據以 GraphPad Prism v9.0.0 (GraphPad Software Inc., Boston, MA, U.S.A.) 進行統計分析與圖表繪製。數據以單因子變異數分析 (one-way ANOVA) 或雙因子變異數分析 (two-way ANOVA) 進行分析，再以 Tucky's multiple comparisons test 作為事後檢定 (post-hoc)。所有組別於每個時間點皆取三個樣品 (n=3)。數據以平均值與標準差 (mean $\pm$ SD) 表示。



肆、結果

第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作

一、菌株之活化與發酵乳之製作

1. 克弗爾分離菌株之活化

四株從臺灣克弗爾粒中分離出的菌株 *Lb. kefiranoferiens*、*Lb. kefir*、*Lc. lactis* 與 *K. marxianus* 各自於牛乳中培養 24 或 48 小時後，皆有呈現凝乳的狀態 (圖 4-1)。顯示出這四株菌皆可在獨自培養的情況下生長，並形成凝乳。四株菌各自於牛乳中培養後的數量為，*Lb. kefiranoferiens* 6.33×10^7 CFU/mL、*Lb. kefir* 2.4×10^8 CFU/mL、*Lc. lactis* 4.2×10^8 CFU/mL、*K. marxianus* 3.77×10^8 CFU/mL。

2. 發酵乳之製作

傳統組與純菌株克弗爾發酵後之外觀如圖 4-2。在傳統克弗爾中 (圖 4-2 A)，可以觀察到發酵乳上方有許多孔洞與氣泡，這是酵母菌所產生的二氧化碳造成的。而在圖 4-2 B 中的純菌株克弗爾中則沒有氣泡的產生。在兩組中都有乳清分離的現象產生。在圖 4-3 中，可以看到純菌株克弗爾在發酵後的質地呈現類似豆花或優格的狀態，需要使用湯匙攪拌後使其質地更為接近發酵乳，也可以利用篩網將無法攪散的凝乳塊過濾掉，使其質地更為滑順。在圖 4-4 中，兩組發酵乳在分裝後並保存於 4°C 冰箱 14 天後，皆有發現乳清分離的現象，而在上方發酵乳的部分也都有氣泡與孔洞的產生，代表酵母菌在保存期間仍然會持續產生二氧化碳。

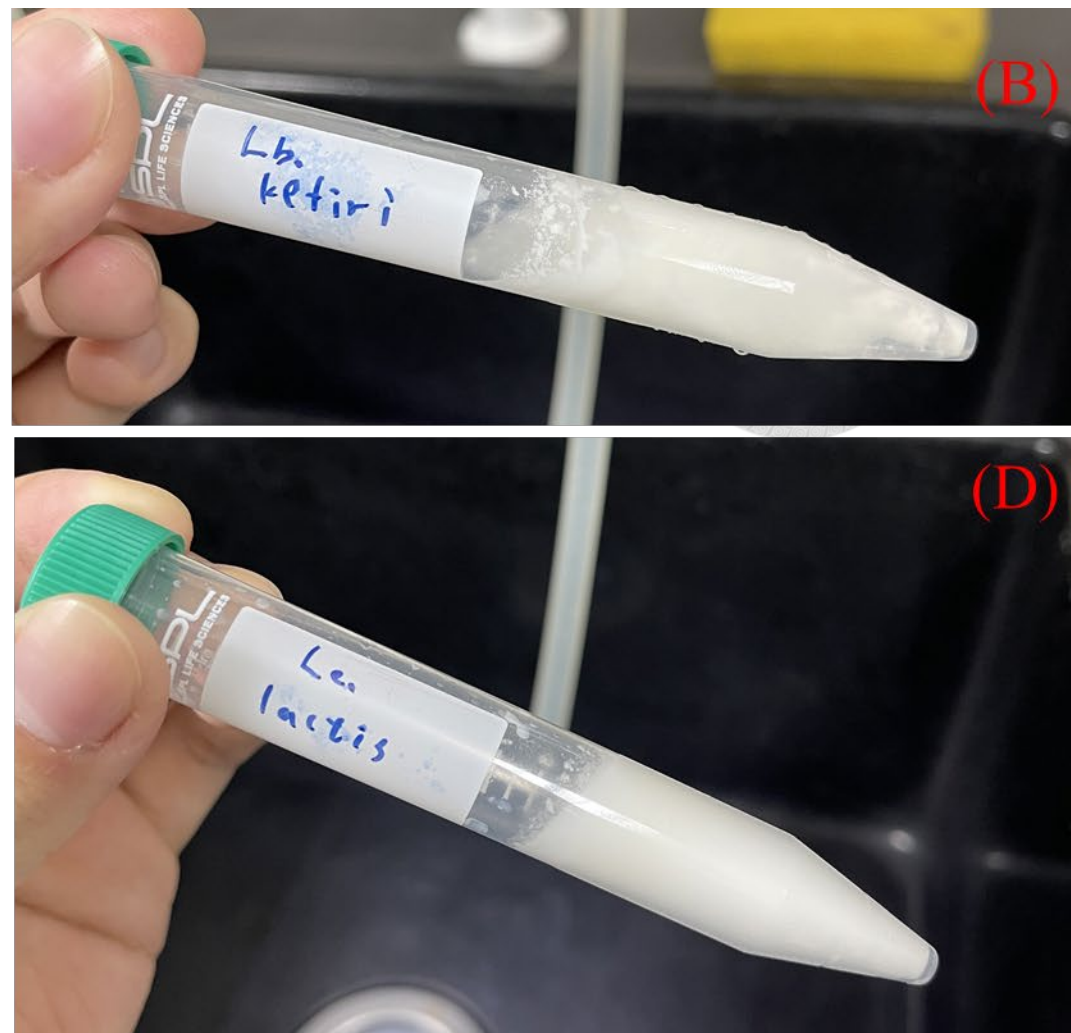
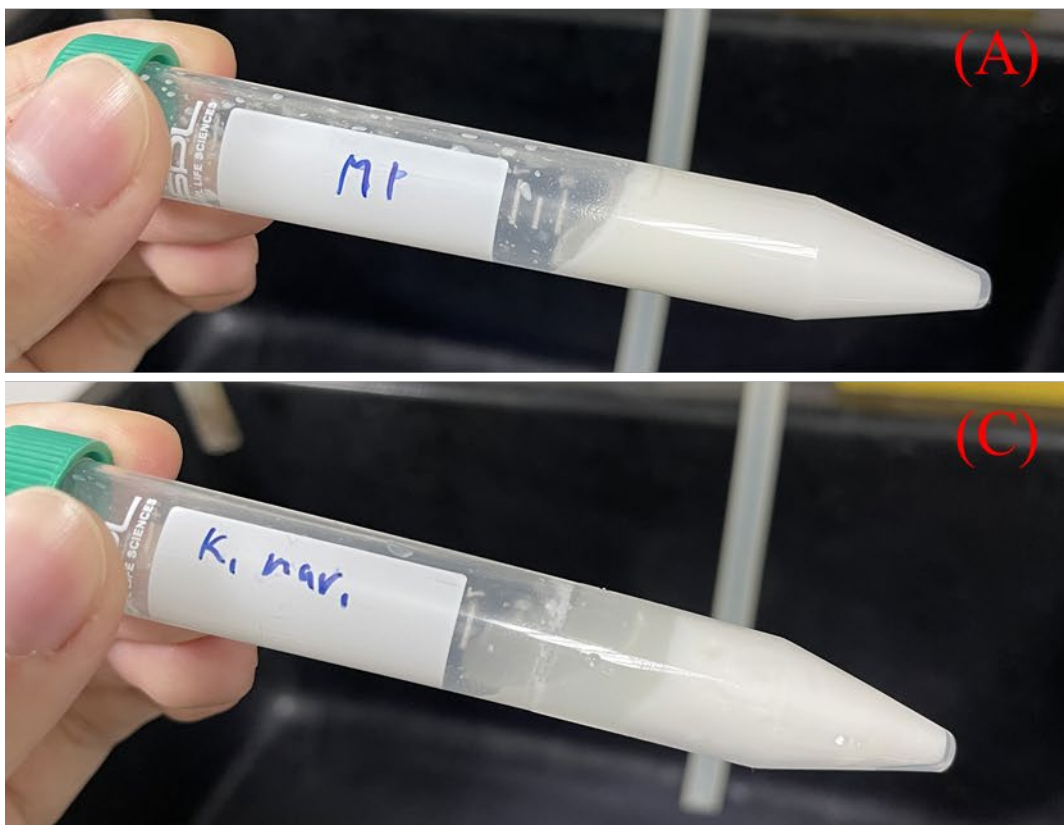
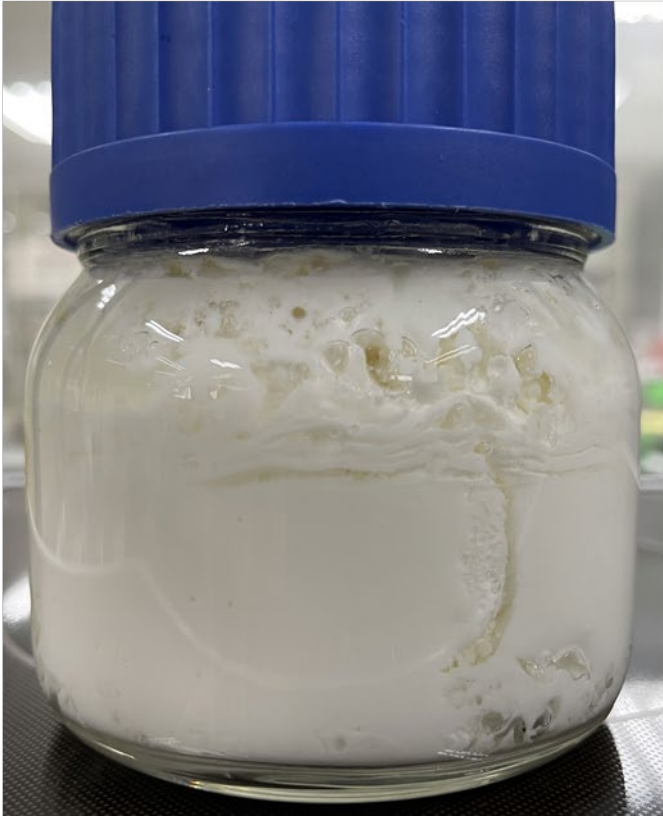


圖 4-1 純菌株各自於牛乳中培養 24 或 48 小時後皆有形成凝乳 (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefiri* (C) *K. marxianus* (D) *Lc. lactis*。

Fig. 4-1 Curds were formed after four microorganisms incubated individually in milk for 24 or 48 hours. (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefiri* (C) *K. marxianus* (D) *Lc. lactis*.

(A)



(B)



圖 4- 2 傳統克弗爾 (A) 與純菌株克弗爾 (B) 在發酵後之外觀。

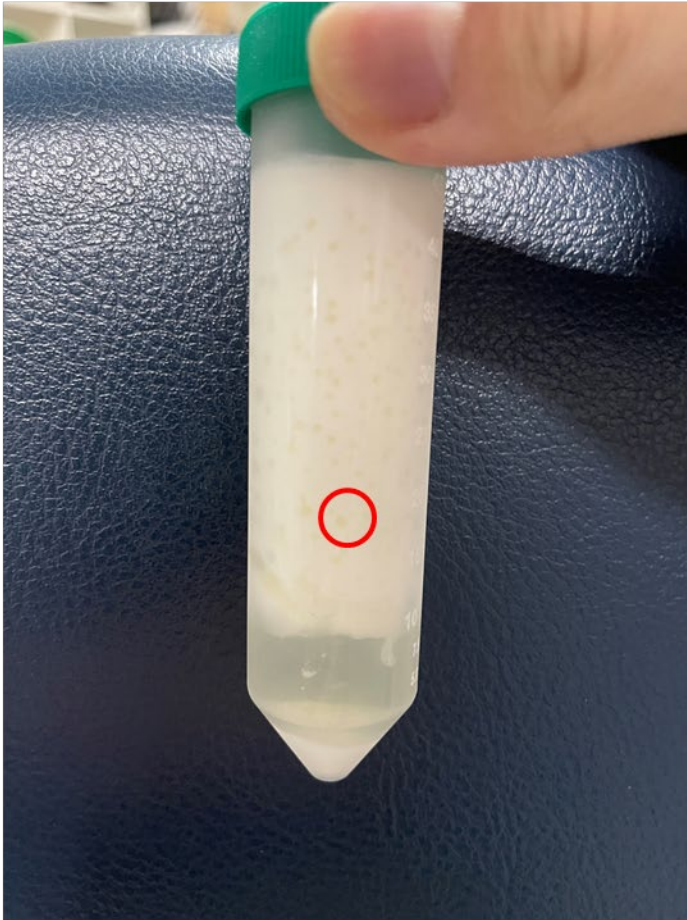
Fig. 4- 2 The appearances of traditional kefir (A) and pure culture kefir (B) after fermentation.



圖 4- 3 純菌株克弗爾發酵後的外觀。

Fig. 4- 3 The appearance of pure culture kefir after fermentation.

(A)



(B)

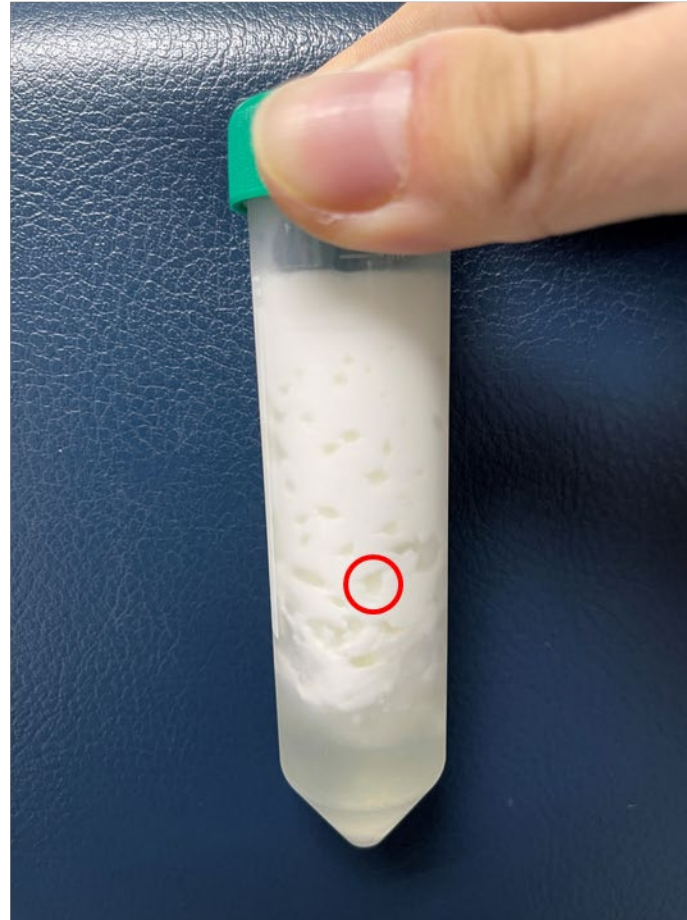


圖 4- 4 傳統克弗爾 (A) 與純菌株克弗爾 (B) 於 4°C 保存 14 天後之外觀。

Fig. 4- 4 The appearances of traditional kefir (A) and pure culture kefir (B) after 14 days of storage at 4°C.



第二節：發酵乳之物理化特性分析

一、發酵乳之 pH 值與滴定酸度

1. pH 值變化

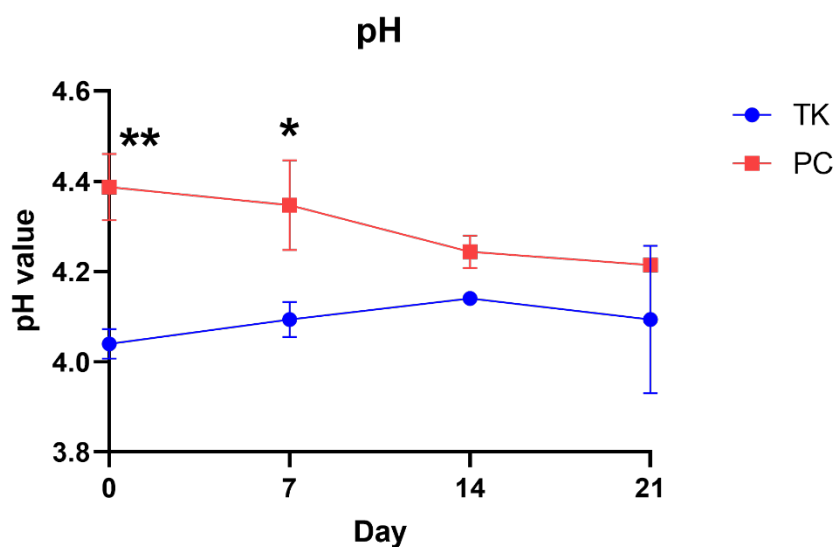
傳統克弗爾 (TK) 與純菌株克弗爾 (PC) 的 pH 值變化如圖 4-5 A 與表 4-1 A 所示。整體來說，TK 組的 pH 值顯著低於 PC 組 ($p < 0.001$)。TK 組發酵後 (D0) 的 pH 值為 4.04 ± 0.03 ，而 PC 組為 4.39 ± 0.07 ，兩組間有顯著差異 ($p < 0.01$)。TK 組的 pH 值從發酵後的 4.04 ± 0.03 上升至第 14 天的 4.14 ± 0.01 ，而在第 21 天時稍微下降至 4.09 ± 0.16 ，整體的變化大約維持在 0.01，而沒有顯著變化 ($p = 0.73$)。PC 組的 pH 值從發酵後的 4.39 ± 0.07 逐漸下降至第 21 天的 4.21 ± 0.003 ，整體的變化沒有顯著差異 ($p = 0.14$)。除此之外，兩組間的 pH 值在第 7 天也有顯著差異 ($p < 0.05$)。

2. 滴定酸度變化

圖 4-5 B 與表 4-1 B 為兩組發酵乳的滴定酸度在 21 天保存期間的變化。整體來說，TK 組的滴定酸度顯著高於 PC 組 ($p < 0.001$)。TK 組的滴定酸度在發酵後為 $1.13 \pm 0.01\%$ ，PC 組為 $0.86 \pm 0.04\%$ ，兩組間有顯著差異 ($p < 0.05$)。TK 組的滴定酸度在保存期間些微上升至 $1.16 \pm 0.10\%$ ，與發酵後沒有顯著差異 ($p = 0.96$)。PC 組則是上升至 $1.07 \pm 0.03\%$ ，與發酵後比較有顯著的上升 ($p < 0.01$)。除此之外，PC 組的滴定酸度在保存第 14 天時，與發酵結束後即有顯著的增加 ($p < 0.05$)。



(A)



(B)

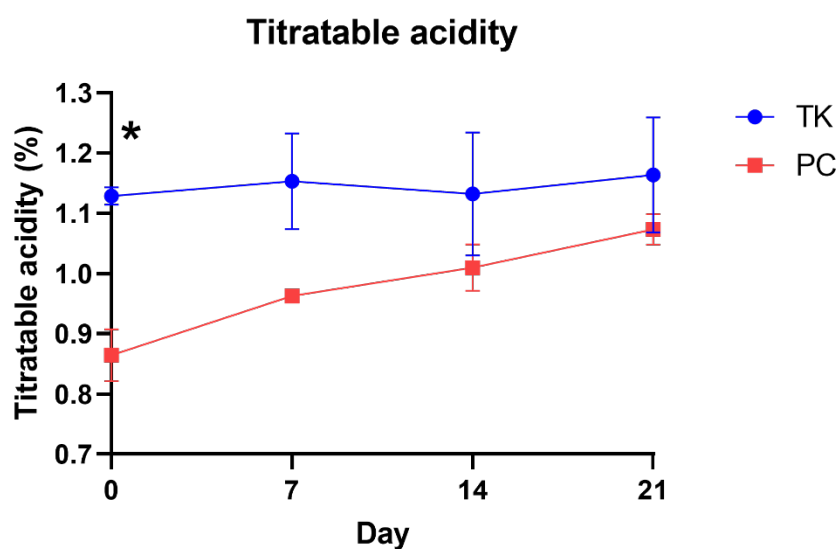


圖 4- 5 (A) 發酵乳在 21 天保存期間之 pH 值變化與 (B) 滴定酸度變化。

Fig. 4- 5 (A) The changes of pH value and (B) titratable acidity for fermented milk during 21-day storage. The data shown as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicates significant difference between two groups. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



表 4- 1 (A) 發酵乳在 21 天保存期間之 pH 值變化與 (B) 滴定酸度變化之比較

Table 4- 1 (A) The changes of pH value and (B) titratable acidity for fermented milk during 21-day storage

(A) pH value

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	4.04 ± 0.03 ^B	4.09 ± 0.04 ^B	4.14 ± 0.01	4.09 ± 0.16
Pure culture	4.39 ± 0.07 ^A	4.35 ± 0.10 ^A	4.24 ± 0.04	4.21 ± 0.003

(B) Titratable acidity (%)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	1.13 ± 0.01 ^A	1.15 ± 0.08	1.13 ± 0.10	1.16 ± 0.10
Pure culture	0.86 ± 0.04 ^{Bb}	0.96 ± 0.01 ^{ab}	1.01 ± 0.04 ^a	1.07 ± 0.03 ^a

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=3)



二、發酵乳之質地變化

1. 堅實度 (Firmness)

指樣品的堅硬程度 (圖 4-6 A) (表 4-2 A)。兩組發酵乳的堅實度沒有顯著差異 ($p=0.10$)，整體來說，以 PC 組較高。PC 組的堅實度在發酵後為 16.97 ± 2.32 g，並且在保存期間內逐漸下降至 14.19 ± 1.23 g，整體並沒有顯著的減少 ($p=0.31$)。TK 組則是從 16.76 ± 2.07 g 下降至第 21 天的 12.81 ± 0.63 g，同樣也是沒有顯著的減少 ($p=0.13$)。

2. 稠度 (Consistency)

指樣品的濃稠程度 (圖 4-6 B) (表 4-2 B)。稠度在兩組發酵乳之間沒有顯著差異 ($p=0.08$)，PC 組稠度高於 TK 組。PC 組從發酵後的 135.37 ± 21.45 g·sec 逐漸下降至 111.79 ± 10.87 g·sec，沒有達到顯著差異 ($p=0.38$)。TK 組的稠度從 132.15 ± 17.31 g·sec 下降至保存 21 天後的 99.42 ± 6.51 g·sec，下降的程度沒有顯著差異 ($p=0.13$)。

3. 內聚性 (Cohesiveness)

指液體聚在一起或黏在一起的能力，由其內部分子間的引力決定。內聚性高的液體不容易產生延展的現象，例如水；內聚性低的液體容易產生延展的現象，也較容易黏附在其他物體的表面，例如蜂蜜或糖漿 (圖 4-6 C) (表 4-2 C)。兩組間的內聚性沒有顯著差異 ($p=0.14$)，以 PC 組較高。PC 組的內聚性在發酵後為 11.50 ± 1.57 g，於保存第 7 天時些微上升至 11.86 ± 1.29 g，隨後則逐漸下降至 9.87 ± 0.97 g，整體的減少沒有達到顯著差異 ($p=0.49$)。TK 組的內聚性在發酵後為 11.88 ± 1.52 g，於保存第 21 天時下降至 9.01 ± 0.47 g，整體的下降同樣也沒有達到顯著差異 ($p=0.13$)。



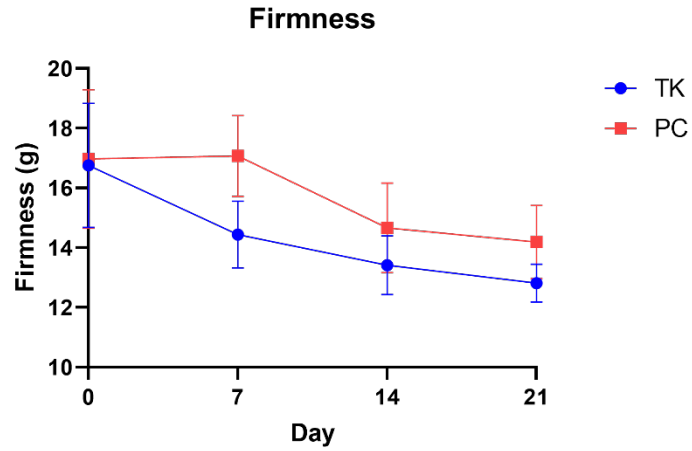
4. 內聚功 (Work of cohesion)

指分離一均質的液體時，每產生一單位面積時所需做的功。內聚功越大，液體越不容易分散，反之則越容易分散 (圖 4-6 D) (表 4-2 D)。兩組間的內聚功沒有顯著差異 ($p=0.18$)，以 PC 組較高。PC 組的內聚功在發酵後為 $5.52 \pm 1.88 \text{ g}\cdot\text{sec}$ ，並於第 7 天時些微上升至 $5.98 \pm 0.86 \text{ g}\cdot\text{sec}$ ，之後則逐漸下降至 $3.84 \pm 0.89 \text{ g}\cdot\text{sec}$ ，整體的下降沒有顯著差異 ($p=0.46$)。TK 組的內聚功在發酵後為 $5.84 \pm 1.19 \text{ g}\cdot\text{sec}$ ，並逐漸下降至第 21 天的 $3.13 \pm 0.99 \text{ g}\cdot\text{sec}$ ，整體的下降同樣也沒有達到顯著差異 ($p=0.22$)。

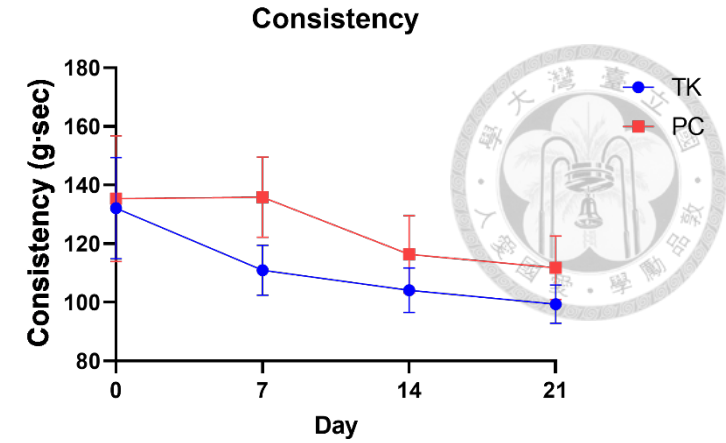
5. 黏度 (Viscosity)

如圖 4-6 E 與表 4-2 E 所示。整體來說，兩種發酵乳之間的黏度有顯著差異 ($p<0.01$)，PC 組顯著高於 TK 組。PC 組的黏度在發酵結束後為 $299.84 \pm 38.51 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，並且在保存期間逐漸減少，直到第 21 天的 $268.31 \pm 11.38 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，在保存期間內沒有顯著的減少 ($p=0.56$)。TK 組的黏度在發酵結束後為 $258.63 \pm 11.46 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，保存 7 天後下降至 $238.33 \pm 18.10 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，第 14 天時又上升至 $269.47 \pm 4.81 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，最後則下降到 $246.47 \pm 11.22 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ，呈現上下波動的情況，不過皆沒有達到顯著差異 ($p=0.20$)。

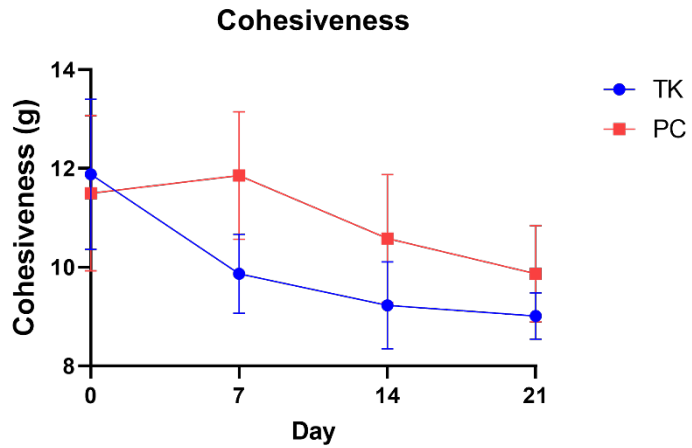
(A)



(B)



(C)



(D)

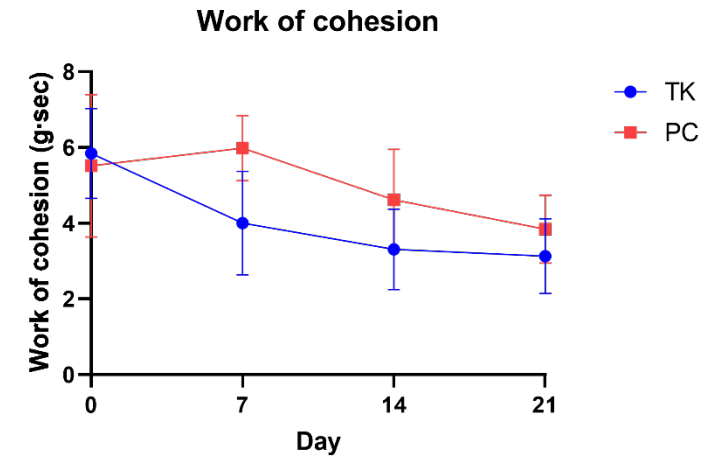


圖 4-6 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化。(A) 堅實度 (B) 稠度 (C) 內聚性 (D) 內聚功。

Fig. 4- 6 The texture changes for two fermented milks during 21-day storage. (A) Firmness (B) Consistency (C) Cohesiveness (D) Work of cohesion.

The data shown as mean $\pm$ SD. (n=3). TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



(E)

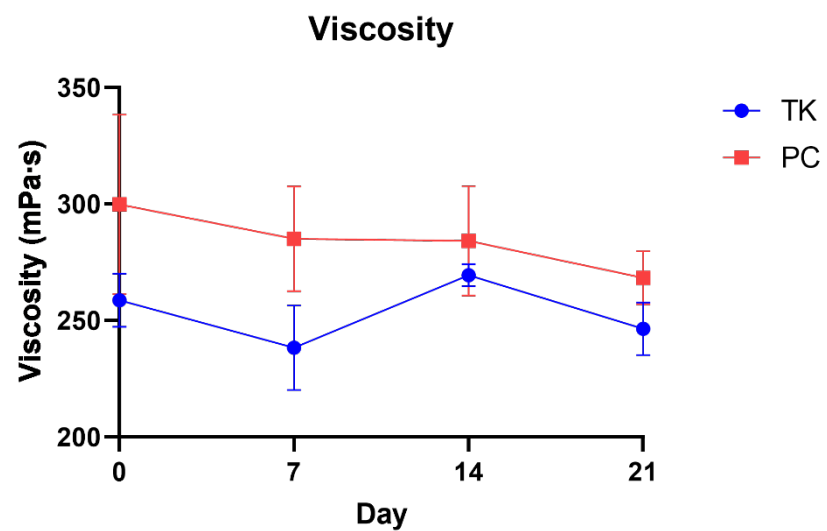


圖 4- 6 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化 (續)。(E) 黏度

Fig. 4- 6 The texture changes for two fermented milks during 21-day storage (continued). (E) Viscosity. The data shown as mean $\pm$ SD. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



表 4-2 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化。(A) 堅實度 (B) 稠度

Table 4- 2 The texture changes for two fermented milks during 21-day storage. (A) Firmness (B) Consistency

(A) Firmness (g)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	16.76 ± 2.07	14.44 ± 1.12	13.42 ± 0.99	12.81 ± 0.63
Pure culture	16.97 ± 2.32	17.07 ± 1.36	14.66 ± 1.50	14.19 ± 1.23

(B) Consistency (g·sec)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	132.15 ± 17.31	110.93 ± 8.54	104.13 ± 7.56	99.42 ± 6.51
Pure culture	135.37 ± 21.45	135.87 ± 13.66	116.37 ± 13.26	111.79 ± 10.87

(n=3)



表 4-2 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化 (續)。(C) 內聚性 (D) 內聚功

Table 4- 2 The texture changes for two fermented milks during 21-day storage (continued). (C) Cohesiveness (D) Work of cohesion

(C) Cohesiveness (g)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	11.88 ± 1.52	9.87 ± 0.80	9.23 ± 0.88	9.01 ± 0.47
Pure culture	11.50 ± 1.57	11.86 ± 1.29	10.58 ± 1.29	9.87 ± 0.97

(D) Work of cohesion (g·sec)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	5.84 ± 1.19	4.01 ± 1.37	3.31 ± 1.06	3.13 ± 0.99
Pure culture	5.52 ± 1.88	5.98 ± 0.86	4.61 ± 1.34	3.84 ± 0.89

(n=3)



表 4-2 兩種發酵乳於 21 天保存期間之質地變化 (續)。(E) 黏度

Table 4- 2 The texture changes for two fermented milks during 21-day storage (continued). (E) Viscosity

(E) Viscosity (mPa·s)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	258.63 ± 11.46	238.33 ± 18.10	269.47 ± 4.81	246.47 ± 11.22
Pure culture	299.84 ± 38.51	285.02 ± 22.54	284.24 ± 23.55	268.31 ± 11.38

(n=3)



三、發酵乳中微生物數量之變化

以塗盤法所得之兩種發酵乳中乳酸菌與酵母菌之總數。PC 組中天數-2 代表發酵前，剛加入菌株時。

1. 乳酸菌 (LAB counts)

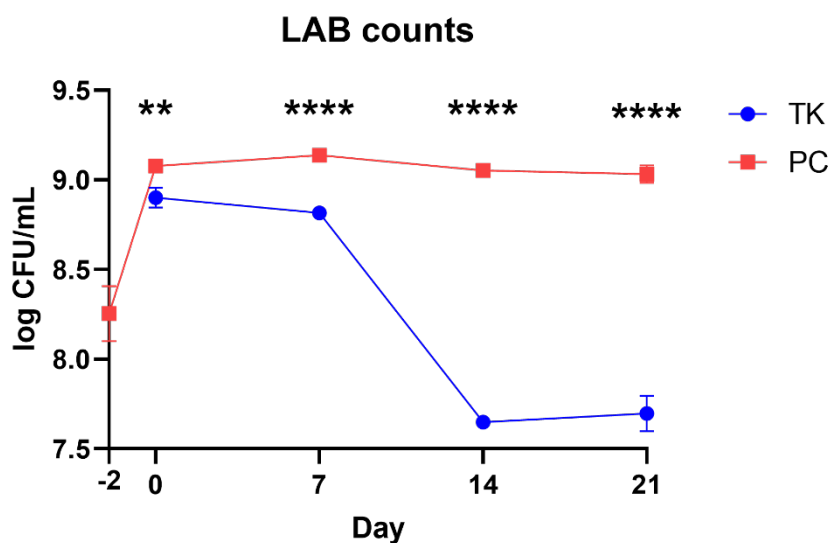
如圖 4-7 A 與表 4-3 A 所示，乳酸菌數量在兩組間有顯著差異 ($p < 0.0001$)。在 PC 組中，發酵前乳酸菌的數量為 $8.25 \log \pm 0.15 \text{ CFU/mL}$ ，經過 48 小時的發酵後，顯著上升至 $9.08 \log \pm 0.04 \log \text{ CFU/mL}$ ($p < 0.0001$)，而在後續的保存期間中，乳酸菌的數量大約維持在 $9.03 \pm 0.05 \log \text{ CFU/mL}$ 與 $9.14 \pm 0.03 \log \text{ CFU/mL}$ 之間，沒有顯著的變化 ($p > 0.05$)。第 0、7、14、21 天的數量皆顯著高於發酵前 ($p < 0.0001$)。在 TK 組中，發酵後乳酸菌的數量為 $8.90 \pm 0.05 \log \text{ CFU/mL}$ ，於第 7 天時稍微下降至 $8.82 \pm 0.01 \log \text{ CFU/mL}$ ，而在第 14 天時則顯著減少至 $7.65 \pm 0.03 \log \text{ CFU/mL}$ ($p < 0.0001$)。

2. 酵母菌 (Yeast counts)

如圖 4-7 B 與表 4-3 B 所示。整體來說，酵母菌的數量在兩組間沒有顯著差異 ($p = 0.06$)，只有在第 14 天時兩組間的數量有顯著差異 ($p < 0.05$)。在 PC 組中，酵母菌的數量在發酵前為 $5.96 \pm 0.05 \log \text{ CFU/mL}$ ，經過發酵 48 小時後數量顯著上升至 $6.40 \pm 0.20 \log \text{ CFU/mL}$ ($p < 0.01$)，直到保存第 14 天時，每週的數量都有顯著增加 ($p < 0.05$)，最後到第 21 天時數量為 $7.27 \pm 0.04 \log \text{ CFU/mL}$ 。TK 組酵母菌在發酵後的數量為 $6.56 \pm 0.17 \log \text{ CFU/mL}$ ，保存 7 天後數量稍微減少至 $6.46 \pm 0.22 \log \text{ CFU/mL}$ ，隨後則顯著上升至第 14 天的 $7.44 \pm 0.08 \log \text{ CFU/mL}$ ($p < 0.001$)。



(A)



(B)

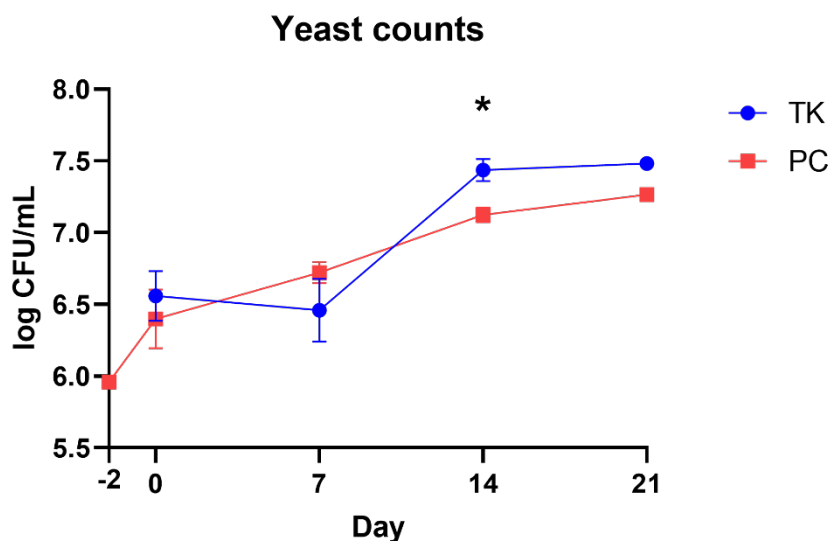


圖 4- 7 兩組發酵乳於 21 天保存期間內乳酸菌 (A)與酵母菌 (B) 數量之變化。

Fig. 4- 7 The LAB counts (A) and yeast counts (B) for two fermented milks during 21-day storage. The data shown as mean $\pm$ SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001 indicates significant difference between two groups. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



表 4-3 兩組發酵乳於 21 天保存期間內乳酸菌 (A)與酵母菌 (B) 數量之變化

Table 4- 3 The LAB counts (A) and yeast counts (B) for two fermented milks during 21-day storage.

(A) LAB counts (CFU/mL)

Group \ Day	-2	0	7	14	21
Traditional	-	8.90 ± 0.05^{Ba}	8.82 ± 0.01^{Ba}	7.65 ± 0.03^{Bb}	7.70 ± 0.10^{Bb}
Pure culture	8.25 ± 0.15^b	9.08 ± 0.04^{Aa}	9.14 ± 0.03^{Aa}	9.05 ± 0.03^{Aa}	9.03 ± 0.05^{Aa}

(B) Yeast counts (CFU/mL)

Group \ Day	-2	0	7	14	21
Traditional	-	6.56 ± 0.17^b	6.46 ± 0.22^b	7.44 ± 0.08^{Aa}	7.48 ± 0.02^a
Pure culture	5.96 ± 0.05^d	6.40 ± 0.20^c	6.72 ± 0.07^b	7.12 ± 0.05^{Ba}	7.27 ± 0.04^a

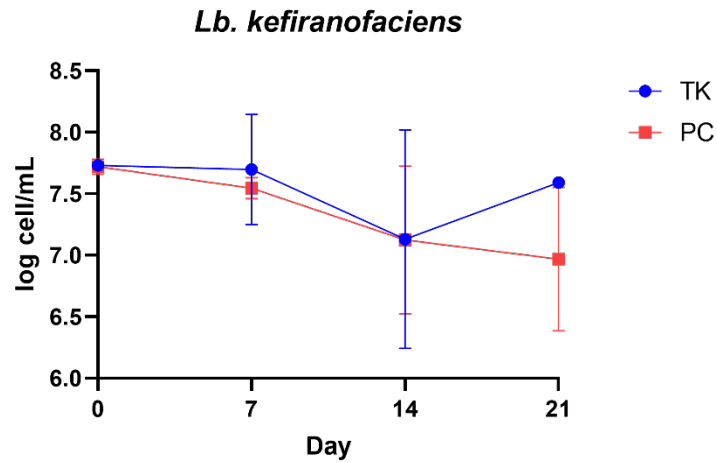
^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b, c, d} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=3)

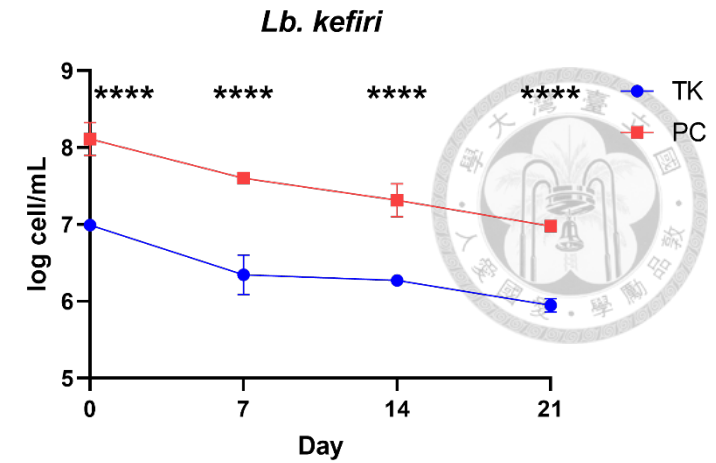
四、即時聚合酶鏈鎖反應 (qPCR) 定量發酵乳中各菌株之數量

Lb. kefiranofaciens (圖 4-8 A) (表 4-4 A) 的數量在兩組間除了第 21 天之外相差不大，兩組間沒有顯著差異 ($p=0.39$)。PC 組的數量在發酵結束後為 $7.72 \pm 0.06 \log \text{ cell/mL}$ ，並在 21 天保存期間下降至 $6.97 \pm 0.58 \log \text{ cell/mL}$ ，沒有顯著的變化 ($p=0.24$)。TK 組的數量在發酵後為 $7.73 \pm 0.001 \log \text{ cell/mL}$ ，到了保存第 14 天時下降至 $7.13 \pm 0.89 \log \text{ cell/mL}$ ，而在第 21 天時又上升至 $7.59 \pm 0.02 \log \text{ cell/mL}$ ，整體的變化沒有顯著差異 ($p=0.64$)。*Lb. kefir* (圖 4-8 B) (表 4-4 B) 的數量在兩組間有顯著差異 ($p<0.0001$)，PC 組的數量顯著高於 TK 組。PC 組中，發酵結束後的數量為 $8.11 \pm 0.21 \log \text{ cell/mL}$ ，並且在保存期間顯著下降至 $6.98 \pm 0.04 \log \text{ cell/mL}$ ($p<0.001$)。TK 組在發酵後的數量為 $6.99 \pm 0.02 \log \text{ cell/mL}$ ，在保存期間逐漸減少至 $5.95 \pm 0.09 \log \text{ cell/mL}$ ，達到顯著差異 ($p<0.01$)。*Lc. lactis* (圖 4-8 C) (表 4-4 C) 的數量在兩組間有顯著差異 ($p<0.0001$)，PC 組的數量顯著高於 TK 組。在 PC 組中，發酵結束後的數量為 $8.93 \pm 0.08 \log \text{ cell/mL}$ ，且在保存期間持續下降至 $8.15 \pm 0.35 \log \text{ cell/mL}$ ，數量的減少有顯著差異 ($p<0.05$)。TK 組的數量在發酵後為 $6.61 \pm 0.06 \log \text{ cell/mL}$ ，而在保存期間內顯著減少至 $5.47 \pm 0.07 \log \text{ cell/mL}$ ($p<0.0001$)。*K. marxianus* (圖 4-8 D) (表 4-4 D) 的數量在兩組間有顯著差異 ($p<0.001$)，PC 組顯著高於 TK 組。在 PC 組中，發酵後的數量為 $6.87 \pm 0.12 \log \text{ cell/mL}$ ，並且於保存 14 天後增加至 $7.01 \pm 0.15 \log \text{ cell/mL}$ ，最後則下降至 $6.40 \pm 0.56 \log \text{ cell/mL}$ ，整體的變化沒有顯著差異 ($p=0.21$)。TK 組的數量在發酵後為 $5.76 \pm 0.01 \log \text{ cell/mL}$ ，並且在保存期間上升至 $6.10 \pm 0.56 \log \text{ cell/mL}$ ($p=0.79$)。圖 4-9 顯示出四株菌在兩種發酵乳中數量的差異。在 TK 組中 (圖 4-9 A)，數量最多的菌株是 *Lb. kefiranofaciens*，其次是 *Lb. kefir* 與 *Lc. lactis*，後兩者的數量會隨著保存時間延長而減少，到第 21 天時數量少於 *K. marxianus*。在 PC 組中 (圖 4-9 B)，數量最多的乳酸菌為 *Lc. lactis*，其次為 *Lb. kefiranofaciens* 與 *Lb. kefir*，且四株菌的數量都會隨著保存期間的增加而逐漸減少。

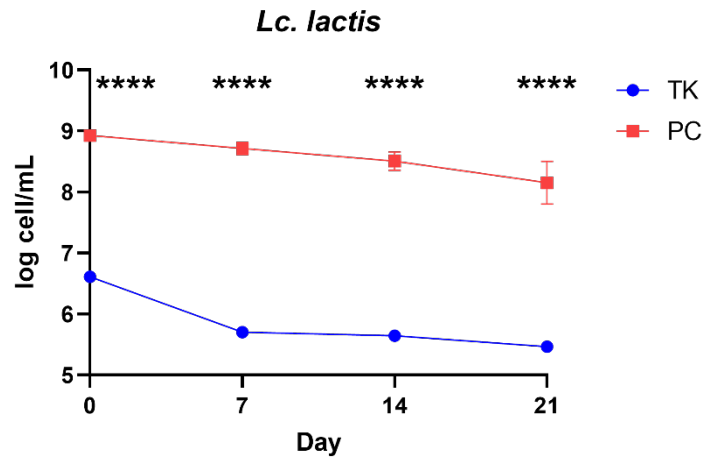
(A)



(B)



(C)



(D)

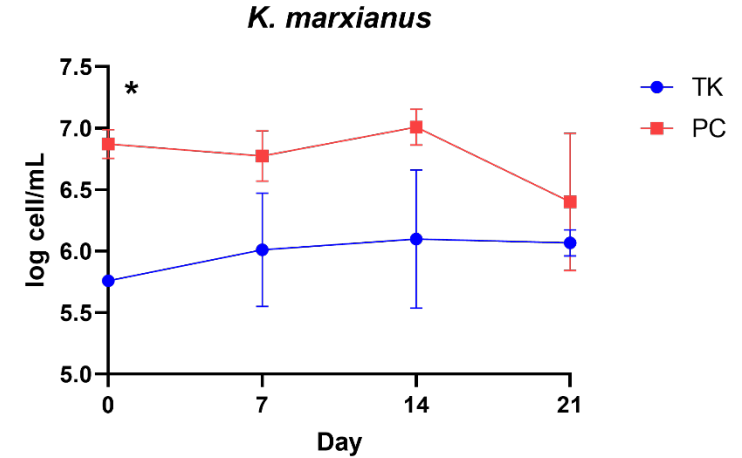


圖 4- 8 兩種發酵乳中各別菌株之數量 (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefir* (C) *Lc. lactis* (D) *K. marxianus*。

Fig. 4- 8 The amount of four microorganisms in two fermented milks. (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefir* (C) *Lc. lactis* (D) *K. marxianus*. The data shown as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ indicates significant difference between two groups. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



表 4- 4 兩種發酵乳中各別菌株之數量 (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefiri*

Table 4- 4 The amount of four microorganisms in two fermented milks. (A) *Lb. kefiranofaciens* (B) *Lb. kefiri*

(A) *Lb. kefiranofaciens* (log cell/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	7.73 ± 0.001	7.70 ± 0.45	7.13 ± 0.89	7.59 ± 0.02
Pure culture	7.72 ± 0.06	7.54 ± 0.09	7.12 ± 0.60	6.97 ± 0.58

(B) *Lb. kefiri* (log cell/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	6.99 ± 0.02 ^{Ba}	6.34 ± 0.26 ^{Bb}	6.27 ± 0.01 ^{Bb}	5.95 ± 0.09 ^{Bb}
Pure culture	8.11 ± 0.21 ^{Aa}	7.60 ± 0.02 ^{Ab}	7.32 ± 0.22 ^{Abc}	6.98 ± 0.04 ^{Ac}

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b, c} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=3)



表 4- 4 兩種發酵乳中各別菌株之數量 (續) (C) *Lc. lactis* (D) *K. marxianus*

Table 4- 4 The amount of four microorganisms in two fermented milks. (continued) (C) *Lc. lactis* (D) *K. marxianus*

(C) *Lc. lactis* (log cell/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	6.61 ± 0.06 ^{Ba}	5.70 ± 0.02 ^{Bb}	5.64 ± 0.05 ^{Bbc}	5.47 ± 0.07 ^{Bc}
Pure culture	8.93 ± 0.08 ^{Aa}	8.71 ± 0.10 ^{Aab}	8.51 ± 0.15 ^{Aab}	8.15 ± 0.35 ^{Ab}

(D) *K. marxianus* (log cell/mL)

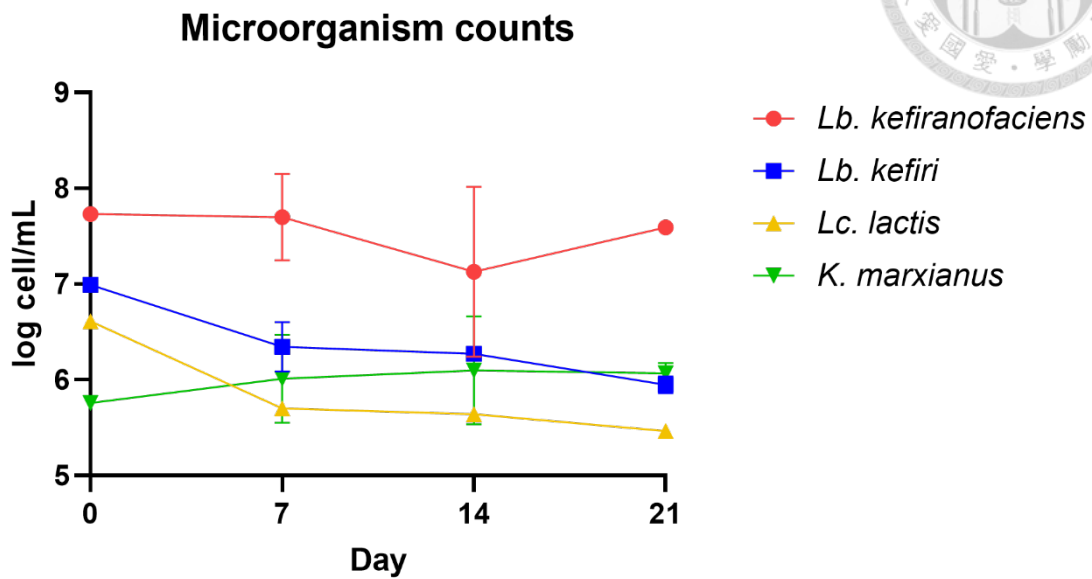
Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	5.76 ± 0.01 ^B	6.01 ± 0.46	6.10 ± 0.56	6.07 ± 0.11
Pure culture	6.87 ± 0.12 ^A	6.77 ± 0.20	7.01 ± 0.15	6.40 ± 0.56

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b, c} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=3)



(A)



(B)

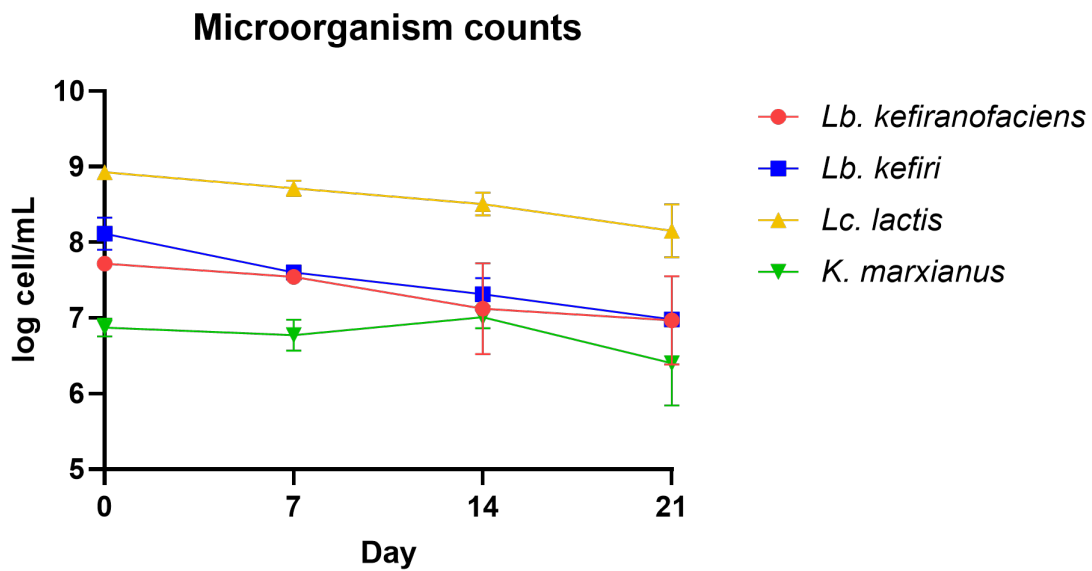


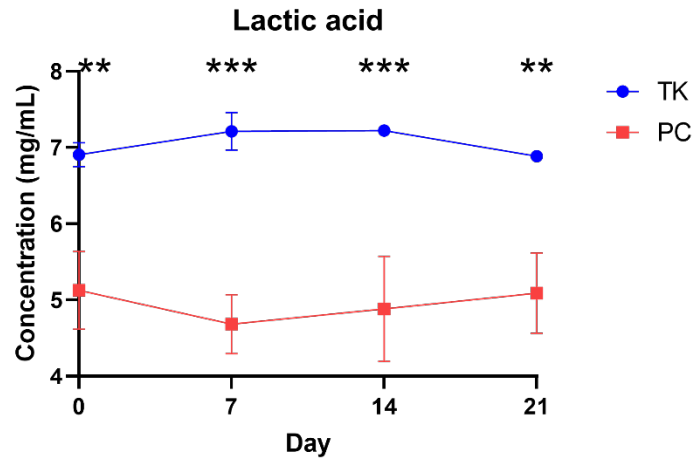
圖 4- 9 兩種發酵乳中四株菌數量之差異 (A) Traditional kefir (TK) (B) Pure culture kefir (PC)。

Fig. 4- 9 The differences of the amount for the four microorganisms in two fermented milks. (A) Traditional kefir (TK) (B) Pure culture kefir (PC) The data shown as mean $\pm$ SD. (n=3)

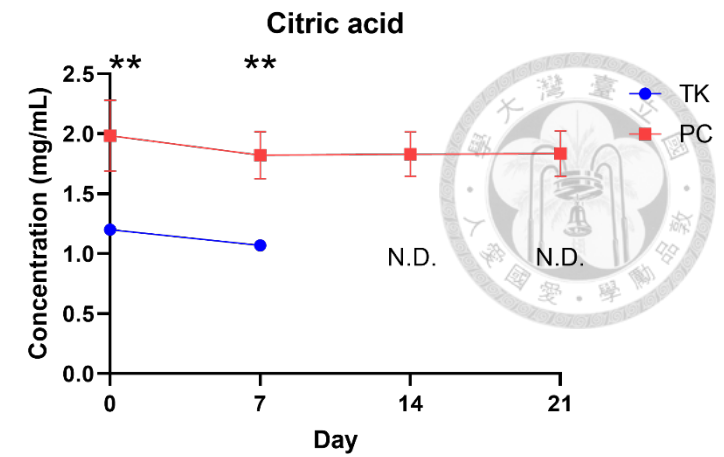
五、發酵乳中有機酸與酒精含量

兩組發酵乳中有機酸的含量如圖 4-10 與表 4-5 所示。乳酸 (圖 4-10 A)(表 4-5 A) 為含量最多的有機酸，其含量在兩組間有顯著差異 ($p < 0.0001$)，以 TK 組的含量較高，從發酵後的 6.91 ± 0.16 mg/mL 上升至 7.22 ± 0.02 mg/mL，而在第 21 天時則下降至 6.89 ± 0.01 mg/mL，在保存期間沒有顯著的變化 ($p = 0.15$)。PC 組則從發酵後的 5.12 ± 0.51 mg/mL 下降至第 7 天的 4.68 ± 0.39 mg/mL，之後則又上升至 5.09 ± 0.53 mg/mL，在保存期間同樣沒有顯著的變化 ($p = 0.73$)。檸檬酸 (圖 4-10 B)(表 4-5 B) 在兩組間有顯著差異 ($p < 0.0001$)，PC 組的含量較多，從發酵後的 1.99 ± 0.30 mg/mL 下降至第 7 天的 1.82 ± 0.20 mg/mL，之後則大約維持在 1.83 ± 0.19 mg/mL，在保存期間內沒有顯著變化 ($p = 0.77$)。TK 組的含量則在保存的 7 天內從 1.20 ± 0.01 mg/mL 下降至 1.07 ± 0.002 mg/mL，有顯著的變化 ($p < 0.01$)，而從保存第 14 天起，則無法偵測到檸檬酸的存在。甲酸 (圖 4-10 C)(表 4-5 C) 在兩組間沒有顯著差異 ($p = 0.20$)，TK 組的含量在保存的 14 天之間大約維持在 0.25 ± 0.01 mg/mL 左右，第 21 天時則稍微下降至 0.24 ± 0.001 mg/mL，沒有達到顯著差異 ($p = 0.052$)。PC 組則在保存 7 天之間從 0.26 ± 0.02 mg/mL 下降至 0.23 ± 0.01 mg/mL，達到顯著差異 ($p < 0.05$)，之後則大約維持在 0.23 ± 0.01 mg/mL。乙酸 (圖 4-10 D)(表 4-5 D) 的含量在兩組間有顯著差異 ($p < 0.0001$)，以 TK 組的含量較高，從發酵後的 0.64 ± 0.003 mg/mL 逐漸上升至 0.73 ± 0.01 mg/mL，沒有達到顯著差異 ($p = 0.16$)。PC 組則是介於 0.43 ± 0.01 mg/mL 與 0.48 ± 0.04 mg/mL 之間，在保存期間沒有顯著變化 ($p = 0.45$)。丁酸 (圖 4-10 E)(表 4-5 E) 則只有在 TK 組中被偵測到，其含量在保存期間從 0.36 ± 0.01 mg/mL 上升至 0.40 ± 0.02 mg/mL，沒有顯著變化 ($p = 0.09$)。酒精 (圖 4-10 F)(表 4-5 F) 含量在兩組間除了第 21 天之外沒有顯著差異，發酵後 TK 組的含量較高，從 1.16 ± 0.03 mg/mL 逐漸上升至 1.85 ± 0.15 mg/mL，在保存期間內有顯著的上升 ($p < 0.05$)。PC 組則是從 0.72 ± 0.03 mg/mL 上升至 2.85 ± 0.34 mg/mL，在保存期間內也有顯著的上升 ($p < 0.0001$)。

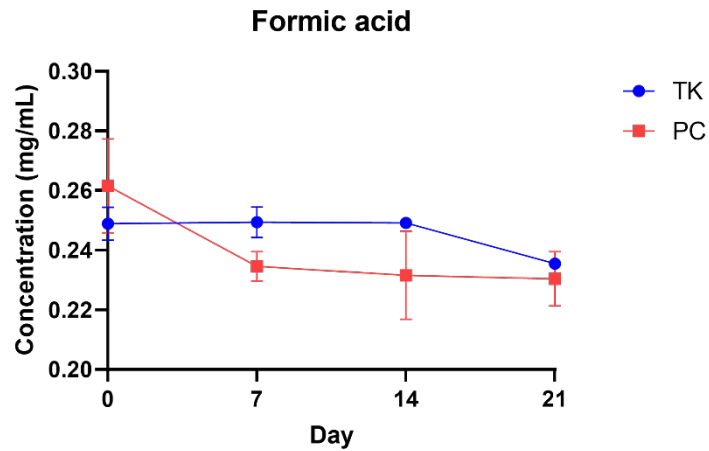
(A)



(B)



(C)



(D)

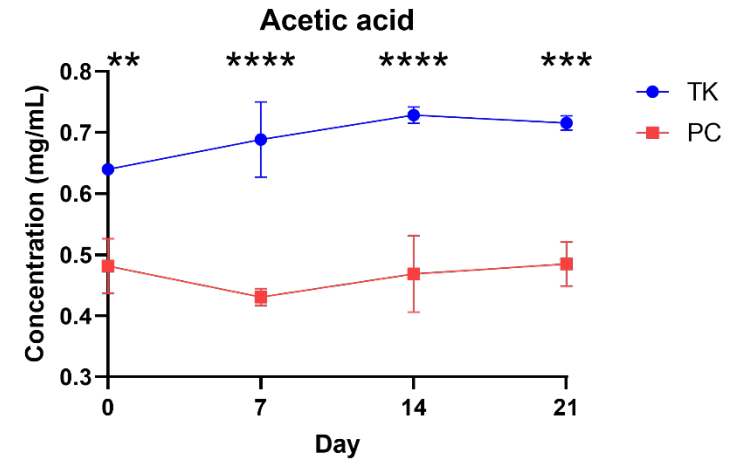
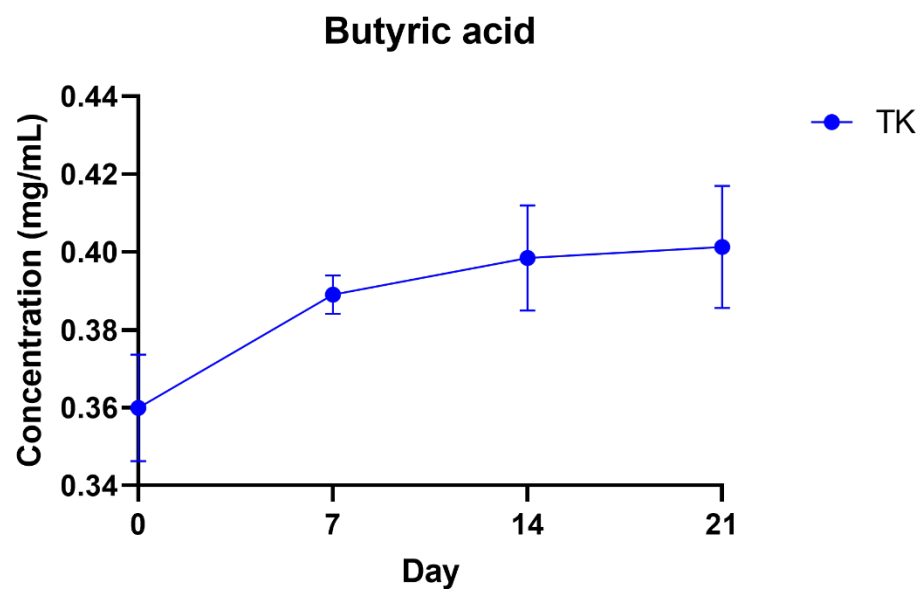


圖 4- 10 兩種發酵乳樣品中有機酸與酒精含量 (A) 乳酸 (B) 檸檬酸 (C) 甲酸 (D) 乙酸。

Fig. 4- 10 The organic acids and ethanol content in two fermented milks. (A) Lactic acid (B) Citric acid (C) Formic acid (D) Acetic acid. The data shown as mean $\pm$ SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ indicates significant difference between two groups. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir; N.D.- Not detected

(E)



(F)

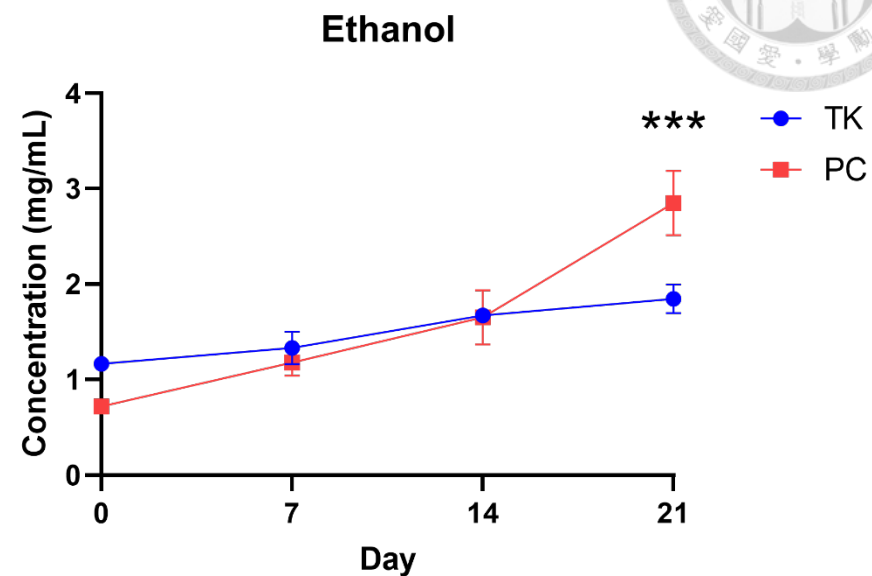


圖 4- 10 兩種發酵乳樣品中有機酸與酒精含量 (續)(E) 丁酸 (F) 酒精。

Fig. 4- 10 The organic acids and ethanol content in two fermented milks (continued). (E) Butyric acid (F) Ethanol. The data shown as mean $\pm$ SD.

*** $p < 0.001$. (n=3)

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir



表 4- 5 兩種發酵乳樣品中有機酸與酒精含量 (A) 乳酸 (B) 檸檬酸

Table 4- 5 The organic acids and ethanol content in two fermented milks. (A) Lactic acid (B) Citric acid

(A) Lactic acid (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	6.91 ± 0.16 ^A	7.21 ± 0.25 ^A	7.22 ± 0.02 ^A	6.89 ± 0.01 ^A
Pure culture	5.12 ± 0.51 ^B	4.68 ± 0.39 ^B	4.88 ± 0.69 ^B	5.09 ± 0.53 ^B

(B) Citric acid (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	1.20 ± 0.01 ^{Ba}	1.07 ± 0.002 ^{Bb}	N.D.	N.D.
Pure culture	1.99 ± 0.30 ^A	1.82 ± 0.20 ^A	1.83 ± 0.19	1.83 ± 0.19

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=3)

N.D.- Not detected



表 4- 5 兩種發酵乳樣品中有機酸與酒精含量 (續) (C) 甲酸 (D) 乙酸

Table 4- 5 The organic acids and ethanol content in two fermented milks (continued). (C) Formic acid (D) Acetic acid

(C) Formic acid (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.001
Pure culture	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.005	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01

(D) Acetic acid (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	0.64 ± 0.003 ^A	0.69 ± 0.06 ^A	0.73 ± 0.01 ^A	0.72 ± 0.01 ^A
Pure culture	0.48 ± 0.04 ^B	0.43 ± 0.01 ^B	0.47 ± 0.06 ^B	0.48 ± 0.04 ^B

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$). (n=3)



表 4- 5 兩種發酵乳樣品中有機酸與酒精含量 (續) (E) 丁酸 (F) 酒精

Table 4- 5 The organic acids and ethanol content in two fermented milks (continued). (E) Butyric acid (F) Ethanol

(E) Butyric acid (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	0.36 ± 0.01	0.39 ± 0.004	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.02
Pure culture	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

(F) Ethanol (mg/mL)

Group \ Day	0	7	14	21
Traditional	1.16 ± 0.03 ^b	1.33 ± 0.17 ^{bc}	1.67 ± 0.04 ^{ac}	1.85 ± 0.15 ^{Ba}
Pure culture	0.72 ± 0.03 ^c	1.18 ± 0.14 ^{bc}	1.65 ± 0.28 ^b	2.85 ± 0.34 ^{Aa}

^{A, B} different superscript letters in a same column were significantly different between groups ($p < 0.05$)

^{a, b, c} different superscript letters in a same row were significantly different between days ($p < 0.05$). N.D.- Not detected. (n=3)

六、消費者喜好性試驗

圖 4- 11 與表 4- 6 為兩種發酵乳經消費者喜好性試驗後得到的分數。TK 組在六個項目中，不同保存天數之間皆沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。其中風味、氣味、口感與整體接受度皆為第 21 天時最高，而且這四個項目的分數有隨著保存時間增加而上升的趨勢。PC 組的風味於第 0 天顯著高於第 14 與 21 天 ($p < 0.05$)；口感於第 14 天顯著低於其他天數 ($p < 0.05$)；整體接受度在第 0 天時顯著高於其他天數 ($p < 0.05$)。PC 組的風味、氣味、口感與整體接受度皆為第 0 天時最高，且有隨著保存時間的增加而減少的趨勢。在兩組之間的比較，TK 組第 21 天的風味顯著高於 PC 組 ($p < 0.001$)；TK 組的口感與整體接受度在第 14 與 21 天顯著高於 PC 組 ($p < 0.01$)。顏色的部分，因為兩種發酵乳在發酵後與保存期間顏色相差不大，因此分數也相差不多，大約介於 6.3-6.5 之間。氣泡感除了在 PC 組第 21 天較高之外，其他則較低，介於 2-3 之間，另外，也因為每個人對於氣泡感的感受不同，使得它們的標準差較大。綜合來看，TK 組的分數在第 21 天時最高 (31.8)，而第 0、7、14 天次之 (皆為 30.7)；PC 組在第 0 天時分數最高 (30.6)，第 7 與 21 天次之 (分別為 28.3 與 28.5)，第 14 天最低 (25.5)。

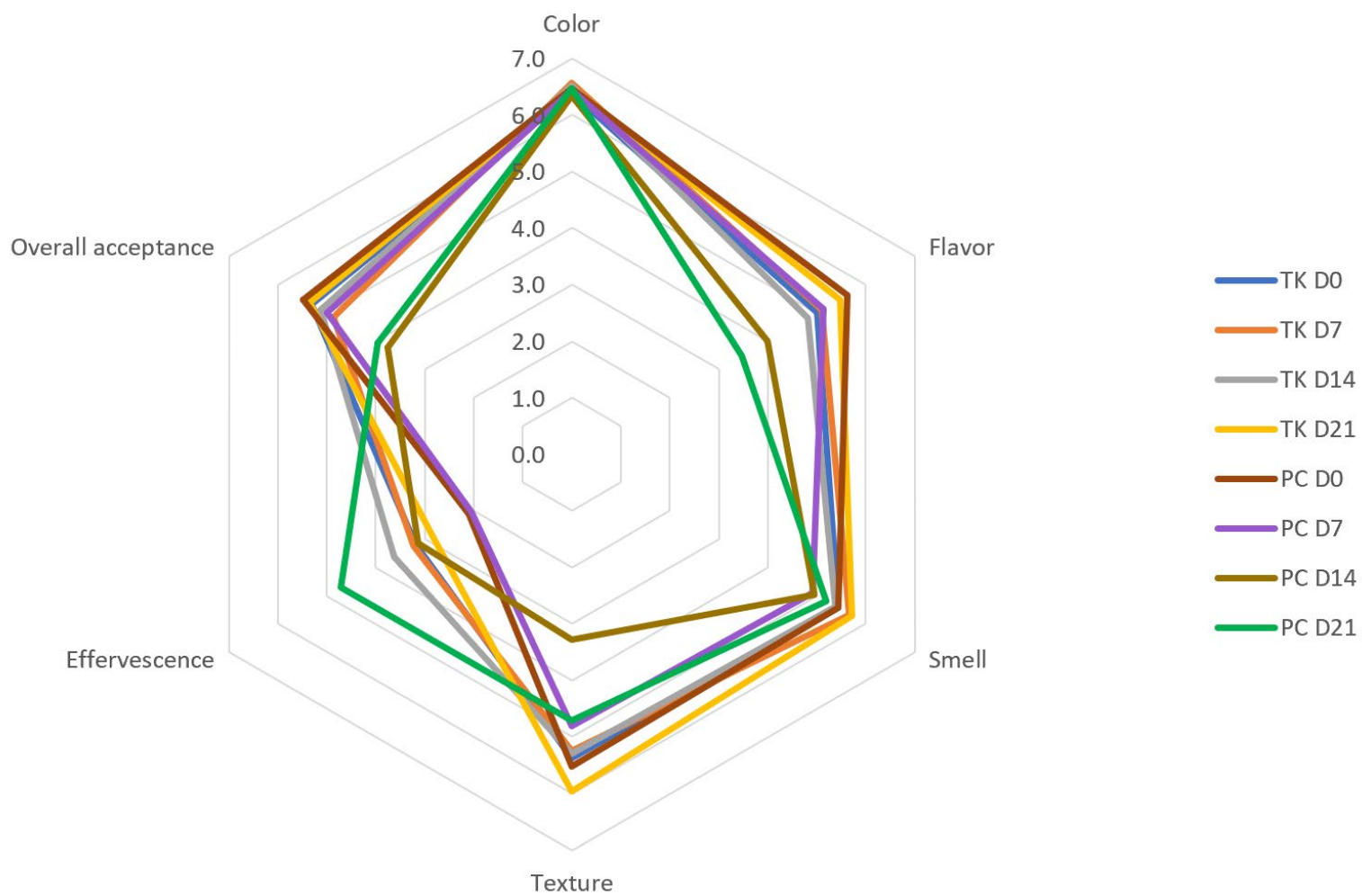
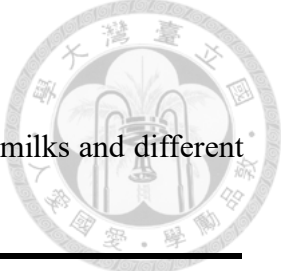


圖 4- 11 兩種發酵乳以及不同保存天數之消費者喜好性評分。

Fig. 4- 11 The scores of consumer preference test for two fermented milks and different storage times. (n=21)

表 4- 6 兩種發酵乳以及不同保存天數之消費者喜好性評分

Table 4- 6 The scores of consumer preference test for two fermented milks and different storage times.



Day	TK	PC
Color		
0	6.4 ± 1.5	6.5 ± 1.4
7	6.6 ± 1.4	6.4 ± 1.6
14	6.5 ± 1.5	6.3 ± 1.4
21	6.5 ± 1.3	6.5 ± 1.4
Flavor		
0	5.0 ± 1.8	5.6 ± 1.5 ^a
7	5.1 ± 1.6	5.1 ± 1.9 ^{ac}
14	4.8 ± 1.6	4.0 ± 1.6 ^{bc}
21	5.5 ± 1.5 ^A	3.5 ± 1.7 ^{Bb}
Smell		
0	5.4 ± 1.6	5.4 ± 1.9
7	5.7 ± 1.9	4.9 ± 2.0
14	5.4 ± 1.4	5.0 ± 1.6
21	5.7 ± 1.4	5.2 ± 1.7

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir

^{A, B} different superscript letters in a same row were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b, c} different superscript letters in a same column were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=21)

表 4- 6 兩種發酵乳以及不同保存天數之消費者喜好性評分 (續)

Table 4- 6 The scores of consumer preference test for two fermented milks and different storage times (continued).

Day	TK	PC
Texture		
0	5.4 ± 1.5	5.5 ± 1.5 ^a
7	5.2 ± 1.6	4.8 ± 1.7 ^a
14	5.3 ± 1.4 ^A	3.3 ± 1.6 ^{Bb}
21	6.0 ± 1.2 ^A	4.7 ± 1.7 ^{Ba}
Effervescence		
0	3.2 ± 2.1	2.1 ± 1.6 ^b
7	3.2 ± 2.1 ^A	2.0 ± 1.7 ^{Bb}
14	3.6 ± 2.3	3.1 ± 2.4 ^{ab}
21	2.9 ± 1.8 ^B	4.7 ± 2.1 ^{Aa}
Overall acceptance		
0	5.3 ± 1.4	5.5 ± 1.5 ^a
7	4.9 ± 1.8	5.0 ± 1.6 ^{ab}
14	5.1 ± 1.7 ^A	3.8 ± 1.5 ^{Bb}
21	5.4 ± 1.3 ^A	4.0 ± 1.6 ^{Bb}

TK- Traditional kefir; PC- Pure culture kefir

^{A, B} different superscript letters in a same row were significantly different between groups ($p < 0.05$).

^{a, b, c} different superscript letters in a same column were significantly different between days ($p < 0.05$). (n=21)



伍、討論

第一節：克弗爾粒與菌株之活化與發酵乳之製作

根據上述的結果得知，利用從臺灣克弗爾粒中分離出來的四個菌株 *Lb. kefiranofaciens*、*Lb. kefiri*、*Lc. lactis* 與 *K. marxianus* 可以進行發酵，並形成發酵乳。不過，因為其中的 *Lb. kefiranofaciens* 以及 *Lb. kefiri* 兩株菌需要培養 48 小時，使得活化以及適應牛乳等前置作業需要約 6 天的時間，再加上發酵的 48 小時，前後約需耗時 8 天才可製成發酵乳，因此未來在菌株活化與發酵時間的部分仍有許多改善空間。與傳統克弗爾發酵的 20 小時相比，純菌株克弗爾需要較多的時間才可以完成發酵，純菌株需要更多的時間發酵可能與微生物在空間中的分布有關。在 Michiels et al. (2024) 的文獻中提到，當微生物分布於生物膜等結構性的環境中時，會比浮游狀態有更好的穩定性、產量、代謝協同作用等，而這些結構也提供了對於環境壓力以及外來微生物的保護，使得整體微生物的群落更加穩定。以克弗爾粒為例，克弗爾粒的環境減少了各種微生物之間的距離，使得它們之間有更多的機會進行代謝產物交換，以促進彼此生長，以及促進某些無法單獨於牛乳中存活的微生物生長，例如 *Lb. kefiranofaciens*，它可以在與 *Leuconostoc mesenteroides* 共培養下有更好的生長，甚至成為優勢菌種 (Blasche et al., 2021)。因此克弗爾粒中的微生物，相較於分散在牛乳中純菌株，生長更快速，也產生更多的有機酸，使得發酵的時間加快。



第二節：發酵乳之物理化特性分析

一、pH 值與滴定酸度

結果顯示，純菌株組的 pH 值在發酵結束後顯著高於傳統組，純菌株組的 pH 值會在保存期間中逐漸下降，而傳統組則維持在一定的範圍內。滴定酸度則是傳統組顯著高於純菌株組，且兩組的滴定酸度都會逐漸增加。會有這樣的差異可能與上述提到的微生物在空間分布的差異有關，克弗爾粒中微生物之間的交互作用較多、生長較快，也因此產生較多有機酸，使 pH 值較低、滴定酸度較高。相似的結果在 Szkolnicka et al. (2024) 與 Gul et al. (2015) 的文獻中也有觀察到，兩篇文獻中，以乾燥菌粉製作的發酵乳相較於使用克弗爾粒製作，有較高的 pH 值與較低的滴定酸度。在保存期間也有觀察到 pH 值下降、滴定酸度上升的現象。另外 Szkolnicka et al. (2024) 提到 pH 值與滴定酸度在保存期間會有稍微的上升或下降，可能是因為酵母菌的關係，酵母菌產生的酒精減緩了乳酸菌的生長，或甚至將其殺死，使乳酸的產量減少，而保存的溫度可能也是影響因素之一，在低溫下，乳酸菌的生長緩慢，乳酸的產量也減少，因此使得 pH 值與滴定酸度有上下波動的情況發生。除此之外，先前有研究利用甘蔗丁 (Ng et al., 2020) 與海藻酸鈉 (Chen et al., 2009) 來固定克弗爾的菌株。以甘蔗丁的方法製作發酵乳時，在 28 天連續繼代的期間 pH 值介於 4.74-4.98，而滴定酸度介於 0.65-0.81%；以海藻酸鈉的方法製作時，pH 值需要在連續繼代 7 次後才會低於 5.0，而之後則介於 4.4-4.6 之間，滴定酸度則需要連續繼代 4 次以後才會上升到 0.6% 的最低標準，最後則逐漸上升至 1.0%。與本實驗的結果相比，使用菌株固定化的方式製作發酵乳時，pH 值較高而滴定酸度較低，另外，也需要額外的步驟與處理來將菌株固定，固定後也有需要進行活化的問題。總結來說，使用純菌株製作發酵乳時，因為 pH 值較低、滴定酸度較高，減少了發酵乳中生長雜菌的機會，使安全性與品質的影響降低，因此使用純菌株仍然是較好的方法。



二、質地分析與黏度

從質地分析的結果得知，純菌株組的堅實度、稠度、內聚性、內聚功與黏度皆高於傳統組，而其中黏度具有顯著差異。在兩組中都有觀察到質地與黏度有隨著保存時間的增加而減少的情況。相似的情況在 Barukčić et al. (2017)、Beshkova et al. (2002)、Saygili et al. (2022) 與 Szkolnicka et al. (2024) 等人的文獻中皆有觀察到使用乾燥菌粉製作發酵乳時，黏度與質地性質都會比使用克弗爾粒製作時還要高。可能是因為使用乾燥菌粉時，微生物是直接被加入到牛乳中，因此它們可以馬上開始生長，而使用克弗爾粒時，所有微生物都是集中在克弗爾粒上，加入牛乳後需要等微生物逐漸擴散到牛乳中，使得在相同發酵時間下所生長的數量較少。較少的微生物也代表著產生較少的胞外多醣，使發酵乳的質地與黏度較低。除此之外，Irigoyen et al. (2005) 與 Szkolnicka et al. (2024) 皆有觀察到發酵乳的質地與黏度會在 21 天與 28 天保存期間內下降，使用乾燥菌粉與克弗爾粒皆有相同現象。質地與黏度的下降可能與微生物數量的減少有關，因為發酵乳在保存期間會累積有機酸，其中的養分也會逐漸減少，使微生物的生長減緩或死亡，進而使胞外多醣產量減少，進而影響到質地與黏度。

三、微生物數量

藉由塗盤法得知，純菌株組的乳酸菌數量在發酵後到保存 21 天後大約維持在 $9 \log \text{CFU/mL}$ 左右，而酵母菌則是會在保存期間逐漸增加；傳統組的乳酸菌在保存第 7 和 14 天之間顯著的減少了約 $1.17 \log \text{CFU/mL}$ ，同時酵母菌則增加了 $0.98 \log \text{CFU/mL}$ 。顯示出以克弗爾粒製作的發酵乳在微生物數量上可能較不穩定。會產生這樣的變化可能是因為酵母菌數量的增加，使酒精產量增加，抑制了乳酸菌的生長或將其殺死，進而使其數量減少。後續以 qPCR 進行活菌數的定量後發現，除了 *Lb. kefiranofaciens* 的數量在兩組間相差不大以外，*Lb. kefiri*、*Lc. lactis* 與 *K. marxianus* 的數量都是以純菌株組較多，而且它們的數量都會在保存期間內逐漸減少。可能是因為有機酸的累積、養分的減少、低溫等因素所造成。微生物數量的減



少也呼應了前面所提到的 pH 值、滴定酸度、質地與黏度的變化。在其他文獻中，以乾燥菌粉或純菌株製作的發酵乳 (Beshkova et al., 2002; Gul et al., 2015) 也發現含有比克弗爾粒製作的發酵乳更多的微生物。除了這兩篇文獻外，Irigoyen et al. (2005) 與 Szkolnicka et al. (2024)，皆有觀察到微生物數量在保存期間有起伏或下降的趨勢。除此之外，從結果中也可以看到純菌株組整體的菌數較多，是因為在純菌株組中，直接加入各菌株在克弗爾粒中的數量，並且可以馬上開始生長，而使用克弗爾粒時，因為需要等待微生物擴散到牛乳中才可以開始生長，時間上的延遲使得各菌株生長的數量較少。如同 Nejadi et al. (2022) 的文獻中所提到，在傳統克弗爾中有數種乳酸菌與酵母菌在克弗爾粒中的數量較多，而在克弗爾液體中較少，兩者間的差異大約有 1-2 log CFU/mL。

四、發酵乳中有機酸與酒精含量

從上述的結果得知，發酵乳中含量最多的有機酸為乳酸，檸檬酸為次之。有機酸的含量可呼應 pH 值與滴定酸度的變化，以及各菌株數量減少的現象。結果也發現，除了檸檬酸以外，其他四種有機酸的含量在傳統組中都較高，可能與菌種數量以及其代謝有關。Wang et al. (2021) 提到，乳酸菌在代謝乳糖的過程中會產生檸檬酸，檸檬酸可被轉換成乙酸以及草醯乙酸，而草醯乙酸可再轉變成丙酮酸與二氧化碳，之後丙酮酸則可被代謝成乳酸、甲酸、乙酸、乙醇等產物。在傳統組中因為有較多種類的乳酸菌，消耗掉較多的檸檬酸，並產生其他有機酸，使檸檬酸的含量比純菌株組低，而其他酸的含量則較高。在 Grønnevik et al. (2011) 的文獻中發現，乳酸、檸檬酸與乙酸的含量在保存兩週後逐漸趨於穩定，之後則只有些微的增減，與本實驗的結果相似。而在 Gul et al. (2015) 的文獻中指出，使用乾燥菌粉製作發酵乳時，與使用克弗爾粒相比，有較多的乳酸與乙酸，而檸檬酸較少，與本實驗的結果恰好相反，推測可能與菌種組成以及數量有關。

在本實驗中，傳統組從保存第 14 天開始即偵測不到檸檬酸存在，可能是因為在樣品中含有許多不同的化合物，而檸檬酸的含量低於其他物質，使其在 HPLC 圖

譜上的波峰被掩蓋掉，而無法計算，導致低估的情形發生。在丁酸的部分則只有傳統組有偵測到，可能是因為傳統克弗爾中的乳酸菌種類更多，其中某些菌種能夠產生丁酸。此外，有機酸是決定發酵乳風味的因素之一，傳統組除了檸檬酸以外的有機酸含量皆高於純菌株組，也因此使其帶有更豐富的風味，使其評分高於純菌株組。

酒精的含量在發酵後為傳統組較高，而在保存第 14 天時，兩組的含量相近，到了第 21 天時則為純菌株組顯著高於傳統組，兩組的酒精含量在保存期間都有顯著的增加。在 Grønnevik et al. (2011)、Gul et al. (2015)、Guzel-Seydim et al. (2000) 與 Leite et al. (2013) 等文獻中皆有觀察到發酵乳中的酒精含量會隨著保存時間的延長而增加，與本實驗的結果相符，也顯示出在低溫保存下，酵母菌仍然會持續產生酒精。純菌株組酒精含量較高與其酵母菌數量較多的現象相符，此外，酒精含量的增加也可能是各菌株數量減少的因素之一。純菌株組在第 14 與 21 天時，因為酒精含量較多，使其帶有較明顯的酒味，因此而影響到它在風味項目的評分。

五、消費者喜好性試驗

從消費者喜好性試驗的結果來看，傳統克弗爾從發酵後到 21 天保存期間的整體接受度高於純菌株克弗爾，而純菌株克弗爾則是在第 0 天有最高的分數。在風味與氣味的方面，純菌株克弗爾少了發酵乳的香味，整體來說較為平淡，並且有時會有類似沒有完全發酵的奶味。Bourrie et al. (2023) 提到傳統克弗爾中因為酵母菌代謝的關係有數種酯類的含量較高，也因此使其含有較豐富的風味。也有受試者提到第 14 與 21 天的純菌株組有酒味，而在先前的微生物數量方面也發現純菌株組中含有較多酵母菌，而從酒精含量的分析結果得知該組在第 14 與 21 天時含有較多酒精，使發酵乳中帶有酒味，而影響到其風味的評分。雖然兩組發酵乳在第 14 天時酒精含量相近，不過可能因為傳統組中含有更多的風味物質，也因此蓋過酒精的味道，使其較不受影響。在口感的部分，傳統組的分數有在保存期間中上升的趨勢，而純菌株組則相反。其中純菌株組第 14 天的分數最低，有受試者提到發酵乳



中有許多細小的凝乳塊，因此而使得分顯著低於其他天數，可能是因為篩網孔徑太大，使凝乳塊仍然進入到發酵乳中。此外，也有受試者提到純菌株組第 0 天的口感較不濃稠，因此而給它較高的分數，這也顯示出每個人對於發酵乳濃稠度的喜好不同。若與質地分析與黏度的結果共同討論的話，雖然兩組的質地與黏度都有下降的現象，不過傳統組的口感評分上升，純菌株組則下降，顯示出質地與黏度不完全會影響對於發酵乳口感的評分。氣泡感的部分，有受試者提到感覺較不明顯，也有受試者能感覺出明顯的差別，使得整體的標準差較大。進一步的分析也發現氣泡感與整體接受度之間有負相關，顯示出消費者對於發酵乳中的氣泡感較不喜歡。整體接受度在傳統組 21 天最高，而在純菌株組為第 0 天最高，後續則受到口感與風味的影響使接受度下降至 3.8-4.0。就本實驗的結果來看，純菌株克弗爾的保存期限可能最多為 14 天，再延長的話可能會使發酵乳中產生過於明顯的酒味。雖然以純菌株製作的克弗爾在質地與微生物數量上具有優勢，但其風味複雜度與傳統克弗爾相比仍有差異，後續應評估如何調整菌數與比例以使風味達到更佳的平衡，也可針對其揮發性化合物（如酯類、醇類、醛類等）進行分析，以判斷兩組間的差異以及對於風味的影響。

綜上所述，本研究以四株源自臺灣克弗爾粒的代表性菌株構建純菌株系統進行發酵，並與傳統克弗爾進行比較，結果顯示純菌株組在酸度、微生物穩定性、質地等方面表現良好。然而，風味接受度與保存後期酒味產生成為其商品化應用之主要挑戰。

從微生物動態觀察，發酵初期純菌株組以 *Lc. lactis* 為優勢菌株，與傳統克弗爾中 *Lb. kefiranofaciens* 主導的情形有所不同。根據 Blasche et al. (2021)，不同優勢菌種將導致代謝路徑差異，進而影響有機酸與揮發性化合物的產生。本研究發現純菌株組後期酒味明顯，可能與 *K. marxianus* 在保存期中之代謝活性提升有關，導致乙醇與酯類化合物累積。Bourrie et al. (2023) 亦指出，在菌群中，*K. marxianus* 與 *S. cerevisiae* 等酵母菌能促進醇類與酯類生成，對口感風味具有決定性影響。質地

方面，純菌株組於儲藏初期顯示出較高的稠度與內聚性，可能與 *Lb. kefiranofaciens*、*Lb. kefiri* 與 *Lc. lactis* 產生的胞外多醣 (EPS) 有關。此類 EPS 可增加發酵乳的凝膠網絡與保水性，對產品穩定性與口感具正向貢獻。

本研究也發現酵母菌數於貯存期間有增加的趨勢，可能影響乳酸菌穩定性，形成菌種間競爭或資源偏移現象。根據 Nambou et al. (2014)，調整酵母菌接種濃度或發酵時間可有效控制乙醇與酸味平衡，進而改善風味穩定性。因此，後續建議針對 *K. marxianus* 接種量、與乳酸菌之比值，以及發酵時間進行優化試驗。此外，純菌株在菌數穩定性與操作再現性方面顯示其潛力，有助於解決傳統克弗爾粒易受環境污染、批次變異大之缺點，符合商業化生產的基本需求。然為建立產品一致性與功能性基準，後續仍需進行長期儲藏試驗、菌群結構追蹤與機能性驗證 (如免疫調節能力、益生性評估等)。



陸、結論

從上述的結果得知，利用四株從臺灣克弗爾粒分離出的純菌株可以製成發酵乳，並省去使用克弗爾粒的麻煩。實驗指出，消費者對於發酵乳的喜好主要會受到質地與風味的影響，從質地分析與黏度的結果得知兩組間沒有顯著差異，但因為在純菌株組第 14 天時發酵乳中有較多微小的凝乳塊，因此使其接受度較低，未來可透過使用更細緻的篩網或是均質機使其質地更為一致。在風味的部分，因為純菌株組中的酵母菌數量較多，使其在保存後期會產生較明顯的酒味，另外也因為純菌株組的菌種組成較單純，其風味也不如傳統組豐富。而在製作過程中，純菌株組所添加的菌量是基於菌數而決定，使其百分比總量高於傳統組（純菌株組 12.25%；傳統組 10%），因此未來需選擇以百分比或菌數做為標準，以確保兩組間菌數不會有太大的差異。此外，純菌株組中各菌株的數量仍需進一步調整，以減少在保存後期所產生的酒味，或甚至可以增加菌種數量，以增加其風味的豐富度。發酵時間較長也是純菌株組面臨的問題之一，實驗中發現純菌株組需要 48 小時才可發酵完成，因此可能較不利於商業生產，可透過調整培養條件或菌數以達到減少發酵時間的效果。未來若要將純菌株使用於商業生產時，可將各菌株製作成菌粉後以特定比例混合，並根據發酵時間決定最適當的添加量，使生產過程更加標準化，以確保產品品質的一致。

本研究驗證了以克弗爾粒分離純菌株所製成之發酵乳在物理化性質與菌數穩定性方面具備產業應用潛力。惟其風味表現仍有進一步優化空間，未來可由菌株調配、共發酵設計與風味控制機制三方面著手強化其商品競爭力。

柒、參考文獻



凌佳琪。2024。藉由共培養方法探討克弗爾微生物的交互作用與克弗爾粒之形成。

國立臺灣大學動物科學技術學研究所碩士論文。

Adiloğlu, A. K., N. Gönülateş, M. İşler and A. Senol. 2013. The effect of kefir consumption on human immune system: a cytokine study. *Mikrobiyol Bul.* 47: 273-281. doi: 10.5578/mb.4709

Arslan, S. 2015. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA J. Food.* 13: 340-345. doi: 10.1080/19476337.2014.981588

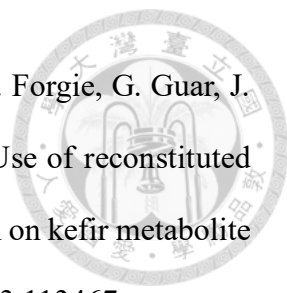
Barukčić, I., L. Gracin, A. R. Jambrak and R. Božanić. 2017. Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. *Mljekarstvo.* 67: 169-176. doi: 10.15567/mljekarstvo.2017.0301

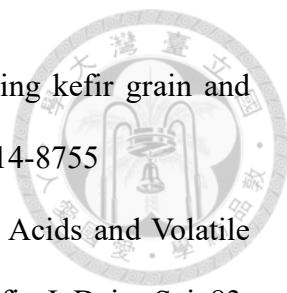
Beshkova, D. M., E. D. Simova, Z. I. Simov, G. I. Frengova and Z. N. Spasov. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* 19: 537-544. doi: 10.1006/fmic.2002.0499

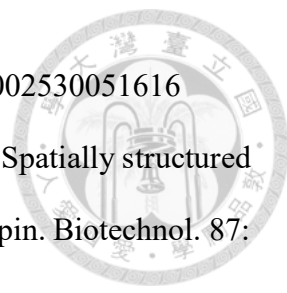
Bintsis, T. and P. Papademas. 2022. The Evolution of Fermented Milks, from Artisanal to Industrial Products: A Critical Review. *Fermentation.* 8: 679. doi: 10.3390/fermentation8120679

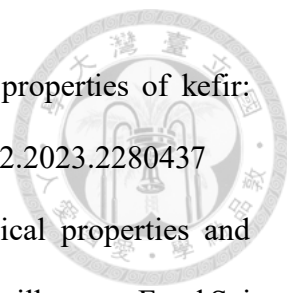
Blasche, S., Y. Kim, R. Mars, E. Kafkia, M. Maansson, D. Machado, B. Teusink, J. Nielsen, V. Benes, R. Neves, U. Sauer and K. R. Patil. 2019. Emergence of stable coexistence in a complex microbial community through metabolic cooperation and spatio-temporal niche partitioning. *bioRxiv.* 541870. doi: 10.1101/541870

Blasche, S., Y. Kim, R. Mars, D. Machado, M. Maansson, E. Kafkia, A. Milanese, G. Zeller, B. Teusink, J. Nielsen, V. Benes, R. Neves, U. Sauer and K. R. Patil. 2021. Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nat. Microbiol.* 6: 196-208. doi: 10.1038/s41564-020-00816-5

- 
- Bourrie, B. C. T., N. Diether, R. P. Dias, S. L. Nam, A. P. Mata, A. J. Forgie, G. Guar, J. J. Harynuk, M. Gänzle, P. D. Cotter and B. P. Willing. 2023. Use of reconstituted kefir consortia to determine the impact of microbial composition on kefir metabolite profiles. *Food Res. Int.* 173: 113467. doi: 10.1016/j.foodres.2023.113467
- Cheirsilp, B., H. Shimizu and S. Shioya. 2003. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 100: 43-53. doi: 10.1016/s0168-1656(02)00228-6
- Cheirsilp, B. and S. Radchabut. 2011. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefirianofaciens* in mixed cultures with yeasts. *N. Biotechnol.* 28: 574-580. doi: 10.1016/j.nbt.2011.01.009
- Chen, H. C., S. Y. Wang and M. J. Chen. 2008. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* 25: 492-501. doi: 10.1016/j.fm.2008.01.003
- Chen, T. H., S. Y. Wang, K. N. Chen, J. R. Liu and M. J. Chen. 2009. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *J. Dairy Sci.* 92: 3002-3013. doi: 10.3168/jds.2008-1669
- Codex Alimentarius. 2003. Standard for fermented milks (CXS 243-2003). World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- Gentry, B., P. Cazón and K. O'Brien. 2023. A comprehensive review of the production, beneficial properties, and applications of kefir, the kefir grain exopolysaccharide. *Int. Dairy J.* 144: 105691. doi: 10.1016/j.idairyj.2023.105691
- Grønnevik, H., M. Falstad and J. A. Narvhus. 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *Int. Dairy J.* 21: 601-606. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.01.001.
- Gul, O., M. Mortas, I. Atalar, M. Dervisoglu and T. Kahyaoglu. 2015. Manufacture and

- 
- characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. J. Dairy Sci. 98: 1517-1525. doi: 10.3168/jds.2014-8755
- Guzel-Seydim, Z., A. C. Seydim and A. K. Greene. 2000. Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir. J. Dairy Sci. 83: 275-277. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74874-0
- Guzel-Seydim, Z. B., Ç. Gökırmaklı and A. K. Greene. 2021. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. Trends. Food Sci. Technol. 113: 42-53. doi: 10.1016/j.tifs.2021.04.041
- Hertzler, S. R. and S. M. Clancy. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. J. Am. Diet. Assoc. 103: 582-587. doi: 10.1053/jada.2003.50111
- Huseini, H. F., G. Rahimzadeh, M. R. Fazeli, M. Mehrazma and M. Salehi. 2012. Evaluation of wound healing activities of kefir products. Burns. 38: 719-723. doi: 10.1016/j.burns.2011.12.005
- International Organization for Standardization. 2012. Fermented milks-Determination of titratable acidity-Potentiometric method (ISO/TS 11869:2012). ISO Central Secretariat. Geneva, Switzerland.
- Irigoyen, A., I. Arana, M. Casteilla, P. Torre and F. C. Ibáñez. 2005. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. Food Chem. 90: 613-620. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.04.021
- Leite, A. M. O., D. C. A. Leite, E. M. Del Aguila, T. S. Alvares, R. S. Peixoto, M. A. L. Miguel, J. T. Silva and V. M. F. Paschoalin. 2013. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. J. Dairy Sci. 96: 4149-4159. doi: 10.3168/jds.2012-6263
- Micheli, L., D. Uccelletti, C. Palleschi and V. Crescenzi. 1999. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide

- 
- kefir. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 69-74. doi: 10.1007/s002530051616
- Michielsen, S., G. T. Vercelli, O. X. Cordero and H. Bachmann. 2024. Spatially structured microbial consortia and their role in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 87: 103102. doi: 10.1016/j.copbio.2024.103102
- Nambou, K., C. Gao, F. Zhou, B. Guo, L. Ai and Z. J. Wu. 2014. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. *Int. Dairy J.* 34: 237-246. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.03.012
- Nejati, F., S. Junne and P. Neubauer. 2020. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms.* 8: 192. doi: 10.3390/microorganisms8020192
- Nejati, F., C. C. Capitain, J. L. Krause, G. U. Kang, R. Riedel, H. D. Chang, J. Kurreck, S. Junne, P. Weller and P. Neubauer. 2022. Traditional Grain-Based vs. Commercial Milk Kefirs, How Different Are They? *Appl. Sci.* 12: 3838. doi: 10.3390/app12083838
- Ng, K. S., S. Y. Wang and M. J. Chen. 2020. A novel immobilized cell system involving Taiwanese kefir microorganisms and sugar cane pieces for fermented milk production. *J. Dairy Sci.* 103: 141-149. doi: 10.3168/jds.2019-16763
- Nielsen, B., G. C. Gürakan and G. Ünlü. 2014. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 6: 123-135. doi: 10.1007/s12602-014-9168-0
- Powell, J. E. 2006. Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains. Master's thesis, University of Stellenbosch.
- Rosa, D. D., M. M. S. Dias, Ł. M. Grześkowiak, S. A. Reis, L. L. Conceição and M. C. G. Peluzio. 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Rev.* 30: 82-96. doi: 10.1017/S0954422416000275
- Saleem, K., A. Ikram, F. Saeed, M. Afzaal, H. Ateeq, M. Hussain, A. Raza, A. Rasheed,

- 
- A. Asghar and M. A. Shah. 2023. Nutritional and functional properties of kefir: review. *Int. J. Food Prop.* 26: 3261-3274. doi: 10.1080/10942912.2023.2280437
- Saygili, D., D. Döner, F. İçier and C. Karagözlü. 2022. Rheological properties and microbiological characteristics of kefir produced from different milk types. *Food Sci. Technol.* 42. doi: 10.1590/fst.32520
- Szkolnicka, K., I. Dmytrów, A. Mituniewicz-Malek and E. Bogusławska-Was. 2024. Quality Assessment of Organic Kefirs Made with Kefir Grains and Freeze-Dried Starter Cultures. *Appl. Sci.* 14: 11746. doi: 10.3390/app142411746
- Tanizawa, Y., H. Kobayashi, E. Kamimura, M. Sakamoto, M. Ohkuma, Y. Nakamura, M. Arita and M. Tohno. 2017. Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. *Biosci. Microbiota Food Health.* 36: 129-134. doi: 10.12938/bmfh.16-026
- Vénica, C. I., M. C. Perotti and C. V. Bergamini. 2014. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Sci. Technol.* 94: 561-580. doi: 10.1007/s13594-014-0180-7
- Wang, S. Y., H. C. Chen, J. R. Liu, Y. C. Lin and M. J. Chen. 2008. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters. *J. Dairy Sci.* 91: 3798-3805. doi: 10.3168/jds.2007-0468
- Wang, S. Y., K. N. Chen, Y. M. Lo, M. L. Chiang, H. C. Chen, J. R. Liu and M. J. Chen. 2012. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiol.* 32: 274-285. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.001
- Wang, Y., J. Wu, M. Lv, Z. Shao, M. Hungwe, J. Wang, X. Bai, J. Xie, Y. Wang and W. Geng. 2021. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9: 612285. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285
- Wang, X., J. Xiao, Y. Jia, Y. Pan and Y. Wang. 2018. *Lactobacillus kefiranofaciens*, the

sole dominant and stable bacterial species, exhibits distinct morphotypes upon colonization in Tibetan kefir grains. *Heliyon*. 4: e00649. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285

