

108 年度第一次食品技師考試

科目：食品微生物學

一、請比較冰箱中貯存的整片肝臟及大塊牛肉之腐敗菌相及腐敗機制之差異，並解釋其原因。
(20 分)

【擬答】

100% 來自志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.134-140, A02 p.67

冰箱中貯存的整片肝臟及大塊牛肉之腐敗菌相為低溫菌(psychrotrophs)，為 cold-tolerant，最適生長溫度 20~30°C，可於 0-30°C 生長，是造成冷藏食物腐敗的主因。常見低溫菌如假單孢菌屬 (*Pseudomonas*)、黃桿菌屬 (*Flavobacterium*)、食品病原菌水中產氣假單孢菌屬 (*Aeromonas hydrophilia*) 及李斯特菌屬 (*Listeria monocytogenes*)；已知目前低溫冷藏鮮奶其高溫短時間 (HTST, 72 °C 15 秒) 之巴斯德殺菌條件下無法殺死李斯特菌。

一般將肉品儲藏在冰藏溫度(2~5°C)中，若儲存開始時肉類中心溫度未降低至冰溫前，肉品內部以產氣莢膜桿菌(*Clostridium perfringens*)及腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)等肉品內部而來的細菌為主；冰藏溫度以下的腐敗主要是存在於肉品表面的外來污染菌為主。一般在冰溫下微生物不易生長，而在冷藏溫度(0~5°C)下儲藏之肉品，容易生長的微生物有無色桿菌屬(*Achromobacter*)、*Flavobacterium*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Micrococcus*、小球菌屬(*Pediococcus*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、*Pseudomonas*、*Streptococcus* 等菌屬。

1. 肝臟之腐敗菌相為加工過程中，禽肉肝臟引起組織腐敗酸味的內臟腐臭(visceral trint)，由腸道與腸內細菌接觸產生的腐臭味，主要菌種 *Enterococcus* 及 *Staphylococcus aureus*。
2. 大塊牛肉之腐敗菌相為加工過程中，畜肉大塊腰腿肉引起灰綠黑變的骨腐臭骨腐臭(bone taint)，主要菌種為 *Clostridium* 及 *Enterococcus*。

二、食品常需檢測大腸桿菌群含量。請定義大腸桿菌群，並說明為何食品需檢測大腸桿菌群含量，以及食品大腸桿菌群含量的檢測方法。(20 分)

【擬答】

100% 來自志聖阮籍老師食品微生物學 A02. p.118, p.137-139

(一)定義大腸桿菌群

大腸桿菌群(Coliform group)屬於革蘭氏陰性菌 G(-)，並非只特定菌株，而是指一群在人體腸胃道內有相同生理活性的菌群，具有能使葡萄糖發酵轉換成乳糖的能力，較其他腸胃道病原體相比其較容易被隔離、檢測。

大腸桿菌群主要包括檸檬酸桿菌 *Citrobacter*、腸桿菌 *Enterobacter*、大腸桿菌群 *Escherichia* 及克雷白氏菌 *Klebsiella* 四個菌屬，這些菌屬為腸內細菌的革蘭氏陰性菌，能在 35°C、48 小時內發酵乳糖並產生氣體，可在有氧或厭氧狀態下生長，且為非孢子形成菌。

(二)為何食品需檢測大腸桿菌群含量?

腸桿菌群細菌多存在於溫血動物糞便、人類經常活動的場所以及有糞便污染的地方，人、畜糞便對外界環境的污染是大腸菌在自然界存在的主要原因，因此大腸桿菌群常作為食品受到糞便污染的指標。

此類菌並不耐熱，故經熱處理之食物，若檢出大腸桿菌群，表示食品受到二次污染，故大腸桿菌群計數可做為製程之重要控制點，以茲確認 HACCP 規劃之控制效果。特別是經加熱過後之食品。

(三)食品大腸桿菌群含量的檢測方法

1. 大腸桿菌群已有簡易的檢測方法存在，通常是應用這類細菌可發酵乳糖產氣 產酸的特性，或是具有半乳糖苷酶 (β -D-galactosidase) 的特性。

公職王歷屆試題 (108 專技高考)

2. 大腸桿菌群檢測方法—濾膜法：先將水樣以特殊的濾膜過濾，將細菌留置在濾膜表面，再將濾膜轉移到特殊的培養基上，經 35°C 培養 24 小時，大腸桿菌群細菌的菌落就會呈現特殊的金屬光澤顏色。

3. 最確數法

(1) 適用範圍：本方法適用於食品中大腸桿菌群之檢驗。

(2) 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以三階三支進行培養，配合 MPN 計數之方法。

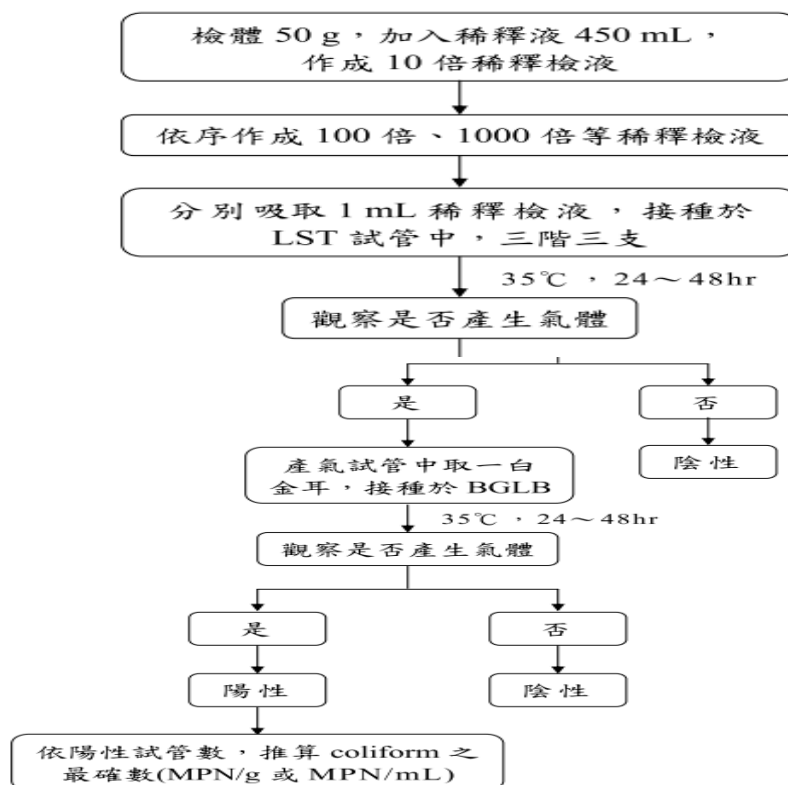
(3) 推定試驗：將稀釋檢液及(或)原液充分振搖、混合均勻後，分別吸取 1 mL 接種於已裝有硫酸月桂酸胰化蛋白胰培養液(LST)試管中，每稀釋檢液各接種 3 支(稱三階三支)，自檢液之調製至此步驟應於 15 分鐘內完成，於 35°C 培養 24±2 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24 小時。若仍無氣體產生，為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，為可疑大腸桿菌群陽性。

(4) 確定試驗：由 2.4.1.節產生氣體之各試管中取一白金耳量培養液，接種於另一支煌綠乳糖膽汁培養液(BGLB)於 35°C 培養 24±2 小時，觀察是否產生氣體；未產生氣體者，繼續培養 24 小時，若仍無氣體產生即為大腸桿菌群陰性；產生氣體者，判定為大腸桿菌群陽性。

(5) 最確數(Mostprobablenumber,MPN)：利用最確數表，推算大腸桿菌群之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

最確數 (MPN/g or MPN/mL) = MPN 表數/100 x 中間試管之稀釋倍數

(6) 食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌群之檢驗流程



註：(1) LST (Lauryl sulfate tryptose broth) 發酵乳糖，產氣。

Lactose (乳糖) + SDS (硫酸月桂酸鈉) + tryptose (胰蛋白棟)

(2) BGLG (Brilliant green lactose bile broth) 產氣煌綠色試劑、乳糖、胰蛋白棟、牛膽粉

三、釀酒常分前發酵（又稱第一次發酵或主發酵）及後發酵（又稱第二次發酵或熟成），請以啤酒為例，分別說明啤酒前發酵與後發酵的作用或功能，並請明確寫出決定啤酒後發酵完成與否的指標物質及原因。（20 分）

【擬答】

100% 來自志聖阮籍老師食品微生物學 A02 p.31-35

啤酒發酵：

1. 啤酒前發酵：第一次發酵，發酵首重防雜菌汙染。

啤酒釀造失敗的最大的原因就是"衛生"，發酵及儲藏容器清洗殺菌不全，釀造用水沒有煮沸導致生菌數過高，發酵容器密封不全導致雜菌入侵等。

前發酵可略分為兩階段：

(1) 第一階段稱為有氧發酵：主要目的在於讓酵母細胞增殖分裂，此時需要氧氣與胺基酸的供應以利細胞的增殖分裂。

(2) 第二階段為無氧發酵：主要目的為生產酒精及醇類物質。

發酵溫度：當發酵溫度太高，酵母工作太旺盛時容易產生不利於口感的物質(所以台灣的冬天是釀造手工啤酒的最佳時機)。

可把發酵桶置於陰涼通風處以利散熱(攝氏 15~20 度為上層發酵法的最佳發酵溫度)以及避免光照。

排氣：酵母排出的氣體為二氧化碳，於"第一次發酵"時需將產生的氣體排出。當"第一次發酵"約 5~7 日後測量發酵液(嫩啤酒)比重，當比重連續 24 小時無變化時(或"水密封室"連續 24 小時無氣泡產生)即可進行"第二次發酵"。

2. 啤酒後發酵(又稱第二次發酵或熟成)：即"裝瓶發酵"，目的是為了產生二氧化碳，形成啤酒不可或缺的泡沫氣體。此時需要加入葡萄糖或蔗糖來發酵以產生二氧化碳，以每公升啤酒加入 6~7 公克就好，太多會造成"暴瓶"(啤酒炸彈)。在比利時，許多愛爾啤酒(頂部發酵)在裝瓶前會再加入糖與酵母進行二次發酵。建議釀好的啤酒最好儲藏 3~4 週才好喝、最好把它放到夏天。

四、人們可藉由增加食品貯存環境中二氧化碳濃度來延長食品保存期限。請說明二氧化碳抑菌機制，並說明食物的酸鹼值、以及貯存環境的溫度與氣壓對二氧化碳抑菌活性的影響。(20 分)

【擬答】

100% 來自志聖阮籍老師食品微生物學 A01. P.118-138, A02 p.221-222

(一)增加食品貯存環境中二氧化碳濃度來延長食品保存期限是為調氣保存法，以及柵欄技術的好氧菌抑菌作用。

正常大氣中氧含量為 20.9%，氮含量為 78%，二氧化碳含量為 0.03%，而調氣保存法則是在低溫儲藏的基礎上，調節空氣中氧、氮及二氧化碳的含量，即改變儲藏環境的氣體成分，降低氧的含量至 2~5%，提高氮氣的含量至 90~99%，提高二氧化碳的含量至 0~5%，這樣的儲藏環境能保持蔬果在採摘時的新鮮度，減少鮮度損失，且保鮮期長，無污染；與冷藏相比，調氣保存法之保鮮技術更趨完善。

(二)食物的酸鹼值、以及貯存環境的溫度與氣壓對二氧化碳抑菌活性的影響

主要是環境物理性的改變，對微生物生長發生影響，例如溫度、pH 值、氧氣、光線、滲透壓...等。

1. 食物的酸鹼值

微生物的生長繁殖與繁殖的種類，與生長所在的食物 pH 值具有很大的關係。

(a)細菌最適合的生長 pH 值在中性範圍(pH 6.5~7.5)

(b)酵母菌與黴菌則較耐酸性(acid-tolerant)，酵母菌可在 pH 4~6 生長，而黴菌可在 pH 2~8 範圍生長。

一般而言，酵母菌與黴菌屬於耐酸性的微生物，比較容易存在中性與酸性的食物，如果汁、泡菜的酵母菌。大部分細菌喜歡生長在接近中性的食物中，如導致食品中毒的病原菌。但有些生產蛋白質分解酶的細菌，則特別喜歡生長在高 pH 的食物中。

2. 食品儲存溫度

各種微生物的生長與繁殖皆有其最適宜的溫度範圍，有最高生長溫度與最低生長溫度，因此，食品儲存的溫度，會影響微生物的生長。

溫度範圍決定因素為：(a)其細胞內各種代謝酵素活性的最適合溫度；

(b) 細胞膜脂肪層通透性最佳的溫度（受飽和與不飽和脂肪酸比例影響）。

微生物在適合的溫度範圍內生長，則生長的遲緩期(lag phase) 縮短；反之則遲緩期變長。目前已發現的菌種中，最高生長溫度為 90°C，最低生長溫度為 -24°C。

3. 外在氣壓：調控大氣儲存

利用調整空氣組成，達到保存食品之目的，稱為調控大氣儲存(controlled atmosphere storage, CA storage)。一般做法：降低 O₂ 濃度、提高 CO₂ 濃度、配合低溫。當 CO₂ 濃度提高到 10% 左右，就具有防腐的效果。

利用組合幾種較溫和抑菌因子的應用條件，比單獨使用一種較嚴厲抑菌因子的條件下，具有更好的保存效果，同時，對產品理化特性之影響也可達到最低，而不致於使產品因抑菌因子之應用而造成感官無法接受的結果。

針對物理柵欄食物的酸鹼值、以及貯存環境的溫度與氣壓的抑制微生物生長的柵欄條件之下，可以加強二氧化碳抑菌活性的能力。

五、請試述下列名詞之意涵：（每小題 5 分，共 20 分）

(一) Lactic antagonism

(二) Sweet curdling

(三) Cold sterilization

(四) Flat sour spoilage

【擬答】

100%來自志聖阮籍老師食品微生物學 A01,p. 137, A02 p.9, p.83-84, p.213

(一) Lactic antagonism (乳酸菌拮抗作用)

乳酸菌拮抗作用 antagonism 例如乳酸菌細菌素。當微生物一起生長時，一方的生長受到另一方的抑制或致死。不同種類的細菌、酵母菌、黴菌之間都會在食物中產生競爭，根據食物提供的特定環境與生長條件，產生微生物族群的消長，此稱為拮抗作用。

革蘭氏陽性菌及革蘭氏陰性菌均可生產各類細菌素，由乳酸菌所生產的細菌素依分子量大小可分為 class I (< 5 kDa)、class II (< 10 kDa)及 class III (> 30 kDa)。其中對熱具安定性的乳酸菌細菌素可被區分為 (1)胺基酸經轉譯後修飾者歸類在 class I 中，稱為 lantibiotic，包括 nisin 和 lacticin 等；(2)胺基酸未經轉譯後修飾者被歸類在 class II 的 non-lantibiotics，包括 carnobacteriocin、enterocin、pediocin、及 sakacin 等。歸類在 class III 的乳酸菌細菌素，為對熱具敏感的大分子胜肽。無法以上述原則歸類者，屬於非典型 (atypical) 細菌素，如 bifidocin、leucocin B-TA33a、及 mesenterocin 52B 等。主要生產細菌素的乳酸菌有 *Carnobacterium*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Pediococcus* 及 *Streptococcus* 等。乳酸菌細菌素主要抑制對象為革蘭氏陽性細菌，可抑制的菌種包括污染性的乳酸菌以及 *Listeria*、*Bacillus*、*Clostridium* 及 *Sta. aureus* 等食品病原菌營養細胞的生長及產孢菌孢子的萌發，故能廣泛應用在發酵或非發酵的乳品、肉品、魚製品、醃漬食品及穀類等食品系統。

乳酸鏈球菌素 (Nisin) 亦稱乳鏈菌肽，是 *Streptococcus lactis* 產生的天然抗生素多肽物質，由 34 個胺基酸組成，形成 5 個內環，最用於微生物細胞膜，造成細胞質與 ATP 外滲，使微生物細胞溶解。可被人體內的酶所降解消化，是一種高效、安全、無毒、無副作

公職王歷屆試題 (108 專技高考)

用的天然食品防腐劑。它能抑制多數革蘭氏陽性菌，尤其對產生芽孢的革蘭氏陽性菌如枯草芽孢桿菌、嗜熱脂肪芽孢桿菌、產氣性的梭狀芽孢桿菌等有很強的抑制作用，而對革蘭氏陰性菌、酵母菌和黴菌一般無效。

(二) Sweet curdling (無酸凝乳)

無酸凝固或為無酸凝結，細菌分泌類凝乳酶使得牛乳凝固。

利用凝乳酶(chymosin, or rennin)或乳酸菌將乳汁中的乳糖代謝產生乳酸，乳蛋白因 pH 值下降而凝固，經脫水、加鹽與加入風味料進行熟成等步驟而製成之發酵乳製品。在氣候溫暖情況下，乳酸菌的生長快速，使儲藏的乳汁酸化與凝固，經攪拌後成為凝乳(curd)與乳清(whey)，而分別被當成食物與飲料。

(三) Cold sterilization (冷滅菌法)

以食品保存之觀點而言，冷凍並非是殺滅微生物之方法。

冷凍造成微生物的殘存依菌種而異，且受冷凍方式、食品本質與成分、冷凍保存時間、以及其他因素如冷凍溫度之影響。

當食品以急速凍結的方式儲存時，因為溫度急速變化會對食品中的微生物造成冷震或冷休克(cold shock)的效用。當食品冷凍的速度緩慢時，食品中所形成的冰晶較大且不規則。冰晶的形成除了可減少微生物可利用的自由水，不規則的冰晶亦會破壞微生物細胞。

(四) Flat sour spoilage (平酸腐敗)

平酸腐敗 flat-sour spoilage 是由耐高溫之 *Bacillus* 屬產孢桿菌分解碳水化合物後，產酸不產氣所造成，罐頭內容物變酸但外觀正常，常見的微生物有嗜熱桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*, pH>4.5)及凝結桿菌 (*Bacillus coagulans*, pH<4.5)。