

108 年度第二次食品技師考試

科目：食品微生物學

- 一、關於亞洲國家的傳統發酵食物，如臺灣的紅麴、日本的納豆及印尼的天貝，皆具有不同的保健功效。請比較這三種傳統發酵食品的製作及食用方法、發酵菌種及其特殊的保健功效。
(30 分)

【擬答】台北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.61, A02, p.46-48

(一)臺灣的紅麴

紅麴米簡稱紅麴是一種將紅麴菌(*Monascus spp.*)接種在蒸熟的大米上，經發酵加工的米，呈紫紅或棕紅色，用於發酵、防腐、食物上色等功能，是一種天然的食品添加劑。

紅麴米可用來製作紅麴保健食品、紅麴酒和紅糟食品。

本草綱目中記載紅麴米具有活血的功效，台灣民間還流傳說紅麴米可以用來改善小孩和老人及輕微氣喘。另外根據日本的研究報告，紅麴米具有降低血脂肪、血糖，並可強化肝臟功能，增進免疫力，對降低膽固醇，避免高血壓很有幫助，衛生福利部已針對紅麴米製品訂定「紅麴健康食品規格標準」。

(二)日本的納豆

納豆是大豆原料利用納豆菌(*Bacillus subtilis natto*)進行發酵，而使納豆具有獨特的氣味與黏性物質。

Natto 製作：(1)洗好的黃豆在 3 倍左右的水中浸泡 10-12 小時。(2)膨脹到 2 倍左右的黃豆在高壓鍋中用高火煮 30 分鐘左右，一般鍋要煮 3 個小時左右。(3)在容器中鋪上 3-4 層紗布，放入 Natto 菌：可以用粉末 Natto 菌，也可以買一些市面上出售的 Natto 摻在一起。適合 Natto 菌增殖的溫度是 40°C，發酵 8 小時左右，再放入冰箱 1 個星期燜。

納豆食品主要成分含有納豆激酶(natto kinase)、血管收縮素轉化酶抑制劑(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEs)、抗菌物質比啉二梭酸、皂角甘(saponin)、卵磷脂(lecithin)、異黃酮(isoflavone)、維生素 B1、維生素 B2、維生素 K2、粘蛋白(mucin, γ -PGA)等具生理活性物質。

納豆中富含納豆菌和優質膳食纖維，可以抑制腸內病原菌生長，清理腸道，防止便秘，改善消化系統；還具有除皺、抑制雀斑的美容功效，納豆菌還能淨化血液，溶解血栓，溶解阻塞在眼球微血管當中的血栓，並且可以減少膽固醇在血管壁的蓄積。

(三)印尼的天貝

印尼、馬來西亞等東南亞地區人民長期食用的一種傳統黃豆發酵製品，不惟含豐富的植物性蛋白質、大豆異黃酮類，另有許多對人體有益的營養素與酵素等，這種傳統黃豆發酵製品，被稱為「天貝 (Tempeh)」。

天天貝具有生產成本低廉、加工時間短、低膽固醇、豐富的胺基酸與維生素群等優點，使它具有逐漸變成全世界素食者及中老年人食物的新選擇。

1. 天貝製造的方法：

主要是將黃豆煮熟去皮後接種真菌（如 *Rhizopus oligosporus*）再發酵而成。

製作所需條件與其他一般發酵食品略有不同，需要 37~40°C，20~30 小時（濕度控制 85% 以上）。後來經 Hesseltine 及 Steinkraus 改良成兩種美式方法，使發酵更有效率；除了 Steinkraus 法使用乳酸調節酸鹼值外，其他均與傳統方法原理相同，新式改良法大豆也只需浸潤，免除脫皮及蒸煮步驟直接植入菌種，較減少污染。

2. 天貝營養：

黃豆發酵後的天貝食品，其維生素 B1、B2、B6、D、菸鹼酸、泛酸、葉酸與生物素等均

有增加；尤其由發酵微生物產生的維生素 B12，更可以防杜素食者與老年人常發生的惡性貧血與神經末梢病變。在礦物質方面，天貝本身富含磷、鎂、錳與銅等。其中磷為構成骨骼與牙齒的成分，同時也控制能量儲存與釋出；鎂有助於心血管系統與人體各種酵素活化的功用，亦為合成蛋白質之所必須；錳與銅則扮演抗氧化酵素（超氧歧化酶，SOD）的輔助角色。天貝本身不含膽固醇，動物實驗證實能夠有效降低血液中 60~70% 左右的膽固醇，也比未發酵黃豆具更佳生物價及蛋白質利用率。

二、試比較同型發酵與異型發酵之作用，並舉出實例。(25 分)

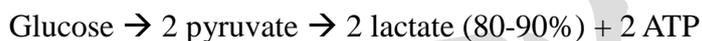
【擬答】台北志聖阮籍老師食品微生物學 A02, p.5-6

常見的發酵形式：乳酸發酵、酒精發酵與醋酸發酵。

乳酸發酵係指乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)在厭氧的環境下，將碳水化合物代謝產生 ATP 供其生長所需，並產生乳酸的發酵過程。

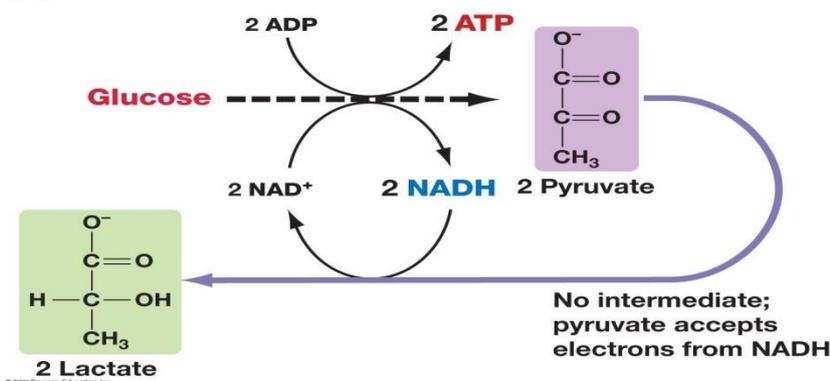
發酵食品中常用的乳酸菌多屬於革蘭氏陽性菌，依菌體對葡萄糖代謝副產物的差異，分為同質乳酸發酵菌(homofermentative LAB)與異質乳酸發酵菌(heterofermentative LAB)。

1. 同質乳酸發酵(homolactofermentation)與同質乳酸發酵菌：在醱解作用伴隨乳酸發酵後，產生 2 分子 ATP，其主要代謝副產物為乳酸，產量可達 80-90%，而其他化合物的產量甚少。



常見的菌體為乳酸球菌屬 (*Lactococcus* spp.)、鏈球菌屬 (*Streptococcus* spp.)、小球菌屬 (*Pediococcus* spp.)及部分的乳酸桿菌(*Lactobacillus* spp.)。

(a) Lactic acid fermentation occurs in humans.

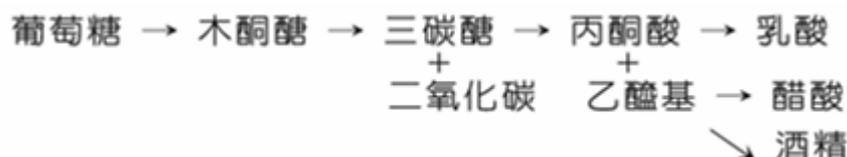


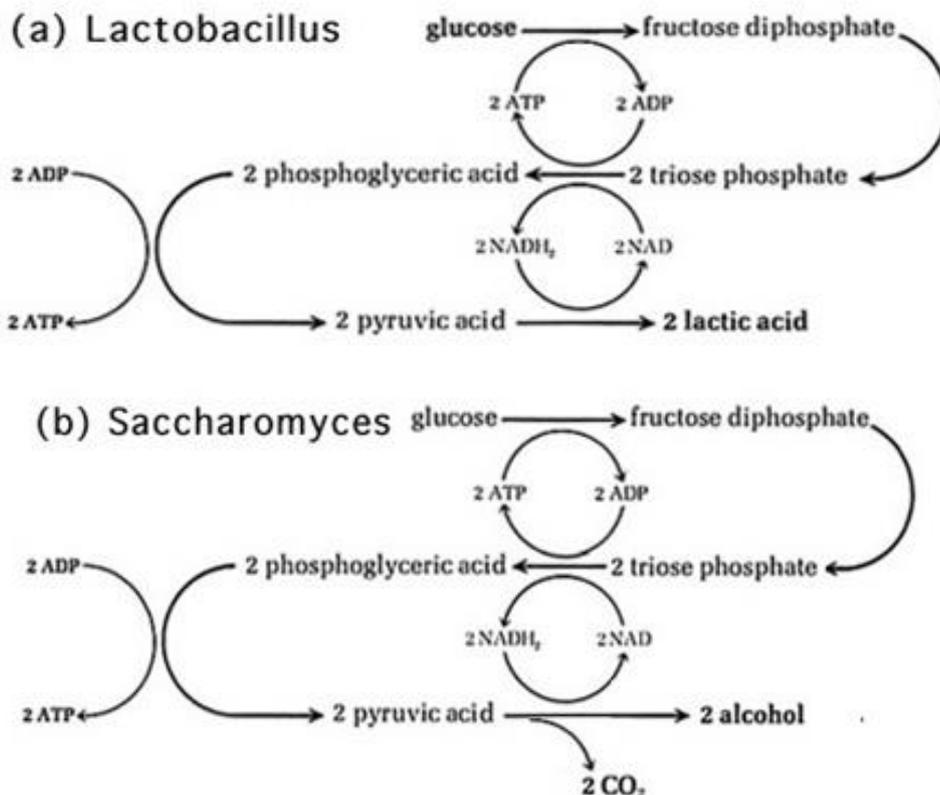
2. 異質乳酸發酵(heterolactofermentation)與異質乳酸發酵菌：

其代謝過程除了乳酸外還會連帶產生醋酸、酒精、CO₂ 等副產物。也產生較多的乙醯乙醛(acetyl aldehyde)及雙乙醯(diacetyl)等香氣物質。乳酸產率只有 50%，此種乳酸發酵又稱異型(雜)乳酸發酵。

常見的菌屬為白念珠菌屬 (*Leuconostoc* spp.)及短乳酸桿菌(*Lactobacillus brevis*)。如乾酪(cheese)製作，在過程中以異質乳酸發酵產生乳酸，造成凝乳，而白念珠菌屬會促使風味產生。

代謝途徑以五碳糖磷酸鹽代謝路徑(PPP, pentose phosphate pathway)為主，如下：





三、關於細菌細胞壁的脂多醣體 lipopolysaccharide (LPS)：何謂脂多醣體？其於格蘭氏染色法中所扮演的角色為何？並敘述格蘭氏染色過程、機制與關鍵步驟。另外，LPS 與食物中毒的關係為何？又與細菌分類之相關性為何？(25 分)

【擬答】台北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.5-13

(一)脂多醣體 lipopolysaccharide (LPS)

脂多糖(LPS)是 G-的內毒素，LPS 包括：(1)脂質 A(內毒素生物活性的主要成分，引起毒性作用的主要臨床症狀包括發燒、白細胞反應、內毒素血症、休克、DIC) (2)核心多糖 (具有屬特異性)(3)特異性多糖 (如 O 抗原，決定細菌抗原的特異性)。

脂多醣體為革蘭氏陰性細菌外壁層中特有的一種化學成分，分子量大於 10,000，結構複雜，在不同類群、甚至菌株之間都有差異。以沙門氏菌為例，其脂多醣由核心多醣、O-多醣側鏈、和類脂 A 組成。為革蘭氏陰性細菌細胞壁的主要成分，脂多醣是內毒素和重要群特異性抗原(O 抗原)。

LPS 中的類脂 A 部分作為脂質雙分子層外層的組成部分進入到脂質層中，糖鏈部分暴露在細胞外面，然後以這種形式存在於革蘭氏陰性細菌的細胞表面。

在 LPS 的生理活性表現中被認為最重要作用的是類脂 A 部分，類脂 A 可以單獨體現其生理作用。

LPS 很難從細胞壁脫落，當細菌死亡等時它會通過溶解、破壞細胞來脫落，並通過作用於動物細胞等而發揮其毒性。由於這種性質，它不是細菌分泌到體外的毒素(外毒素)，而是不被分泌的“存在於細菌體內的毒素”，所以又被稱為內毒素。

LPS 具有熱穩定性和化學穩定性，用一般的高壓滅菌器或乾熱滅菌法是無法讓其滅活的。要想讓其滅活就需要用 250°C 的高溫加熱 30 分鐘。

(二)於格蘭氏染色法中所扮演的角色

革蘭氏染色的對象是細菌的細胞壁。

染色後細菌可在顯微鏡下觀察，將細菌分成革蘭氏陽性細菌與革蘭氏陰性細菌。

1. G(+)細菌細胞壁具有較厚(20-80nm)而緻密的肽聚醣層，多達20層，佔細胞壁成分的60%~90%，它同細胞膜的外層緊密相連。有的G(+)細菌細胞壁中含有磷壁酸(teichoic-acid)，也稱胞壁質(murein)，它是甘油和核糖醇的聚合物，磷壁酸通常以糖或氨基酸的酯而存在。由於磷壁酸帶負電荷，它在細胞表面能調節陽離子濃度。磷壁酸與細胞生長有關，細胞生長中有自溶素(autolysins)酶起作用，磷壁酸對自溶素有調節功能，阻止胞壁過度降解和壁溶。

2. G(-)菌細胞壁中肽聚糖含量低，而脂類含量高。當用乙醇處理時，脂類物質溶解，細胞壁通透性增強，使結晶紫極易被乙醇抽出而脫色；再度染上復染液番紅的時候，便呈現紅色了。

革蘭氏陰性菌的病原能力通常與其細胞壁組成相關，具體說來有脂多糖(LPS, lipopolysaccharide 或者內毒素 endotoxin)層。在人體中，LPS 可以激發一種固有免疫反應(innate immune response) 這種反應是通過細胞素製造和免疫系統活化等來描述其特徵的。比如，紅腫就是細胞素內毒產生並釋放導致的。

因為脂多糖在革蘭氏陰性菌的細胞牆表皮，所以大多數或舊型抗生素都不能有效抑制此類細菌。

(三) 格蘭氏染色過程、機制與關鍵步驟

革蘭氏染色流程：染色→媒染→脫色→復染。

1. 初染劑(primary stain)：使用結晶紫(crystal violet)染色。

結晶紫(crystal violet)是一種三苯甲烷系染料。使用於組織學染色，也用在革蘭氏染色以區別不同種類的細菌。

2. 媒染劑(mordant)：複方碘溶液或稱革蘭氏碘液(Gram's iodine)

加入複方碘溶液或稱革蘭氏碘液(Gram's iodine)後會形成不溶性的結晶紫-碘(CV-I)複合體，使細菌呈紫黑色。

這步驟是關鍵，它的目的是分辨細菌的革蘭氏染色特性。若為革蘭氏陽性菌，此複合體係結合於細菌細胞壁的鎂、核糖核酸(Magnesium ribonucleic acid)，形成鎂-核糖核酸-結晶紫-碘(Mg-RNA-CV-I)複合體，不易脫去。

3. 脫色劑(decolor agent)：以酒精脫色

使用95%酒精脫色，試劑具脂溶劑(lipid solvent) & 蛋白脫水劑(protein dehydrating agent) 雙重功能。此步驟對革蘭氏陽性細菌無效，因為細胞壁上厚厚的細胞壁層阻隔了結晶紫-碘複合體的外滲，只能留在細菌體內。革蘭氏陰性菌細胞壁層薄，會被脫色而成為無色。

酒精脫色原理：

(1) Gram(-)細菌之細胞壁脂質含量高，以酒精處理時會將部份脂質溶出，而使細胞壁結構鬆動，通透性增加，因此CV-I複合體被帶出細菌體外脫色而呈無色。

(2) Gram(+)細菌之細胞壁幾乎不含脂質，酒精甚至會使細胞壁脫水，故結構更形緻密，CV-I複合體就被留在細菌體內。

(3) 酒精處理時，會使細胞壁的肽聚糖(peptidoglycan)空隙縮小，Gram(+)細菌之肽聚糖較厚而Gram(-)者較薄，所以Gram(-)染色時，CV-I複合體離開細菌而脫色的機會較大。

4. 復染劑(counter stain)：番紅復染

加入番紅(Safranin)進行復染，革蘭氏陰性菌被染成紅色，而革蘭氏陽性菌仍保有原來的紫色。番紅是鹼性染料，能溶於水和酒精。

5. 染色結果與鑒定

革蘭氏染色陽性菌 (G+) 細胞壁肽聚醣層數厚，且肽聚醣為空間網狀結構，再經乙醇脫水，網狀結構更為緻密，CV-I 染料複合物不易從細胞內漏出，仍為藍色。而革蘭氏染色陰性菌 (G-) 細胞壁脂類含量多，肽聚醣層數少，且肽聚醣為平面片層結構，易被乙醇溶解，使細胞壁通透性增高，結合的染料複合物容易洩漏，細菌被脫色為無色，再經石炭酸復紅稀釋液復染成紅色。革蘭氏染色陰性菌 (G-) 細胞壁脂類含量多，肽聚醣薄，且肽聚醣為平面片層結構，易被乙醇溶解，使細胞壁通透性增高，結合的 CV-I 染料複合物容易洩漏，細菌被脫色為無色，再番紅復染成紅色。

革蘭氏陽性菌仍保有原來的紫色。革蘭氏陰性菌被染成紅色。

(四) LPS 與食物中毒的關係

脂多糖體是革蘭氏陰性細菌外膜的主要組成部分，提供並保持細菌結構的完整性，保護細菌的細胞膜抵抗某些化學物質的攻擊。脂多糖是內毒素，可引起強烈免疫反應。脂多糖在人體內，會結合到細胞膜上的脂多糖受體複合體 (CD14/TLR4/MD-2) 上，促進炎症細胞分泌多種細胞因子。LPS 很難從細胞壁脫落，當細菌死亡等時它會通過溶解、破壞細胞來脫落，並通過作用於動物細胞等而發揮其毒性。由於這種性質，它不是細菌分泌到體外的毒素 (外毒素)，而是不被分泌的“存在於細菌體內的毒素”，所以又被稱為內毒素。

LPS 具有熱穩定性和化學穩定性，用一般的高壓滅菌器或乾熱滅菌法是無法讓其滅活的。要想讓其滅活就需要用 250°C 的高溫加熱 30 分鐘。

(五) LPS 與細菌分類之相關性

LPS 組成成分中，O-抗原是細菌菌體抗原的抗原決定區。由多個寡糖重復單位組成。通常由 1 至 6 個糖殘基重復單位構成，具有很高的可變性，做為細菌血清學分類的依據，如 O157 : H7 與 H104 : H4。多醣鏈存在與否決定 LPS 是粗糙或光滑，標準長度的多醣鏈會使 LPS 光滑，而缺少或減少多醣鏈則會使 LPS 變得粗糙。具有粗糙 LPS 的細菌通常具有比疏水性抗生素更滲透的細胞膜，因為粗糙 LPS 更具疏水性。

四、試比較 sterilization、commercial sterilization 及 pasteurization 的加熱條件、目的及如何應用各方法於食品工廠的生產與品管。(20 分)

【擬答】台北志聖阮籍老師食品微生物學 A02, p.206-211

污染食品的微生物可以利用加熱來控制，甚至將其殺滅。由加熱處理程度的不同，可決定只殺死部分或大部分 (或全部) 的微生物。

(一) sterilization

滅菌 (sterilization) 係將所有微生物及孢子完全殺滅的加熱處理方法稱為滅菌法或絕對無菌法。

要達到完全無菌之程度，通常需以 121°C 之高溫加熱 15 分鐘以上，但有些罐頭食品之內容物傳熱速度相當慢，可能需數小時才能達到完全無菌，但會導致食品的品质降低。

(二) commercial sterilization

商業滅菌法 (commercial sterilization) 是將病原菌、毒素產生菌及食品腐敗菌殺死，但可能殘存有耐熱性孢子，但在常溫無冷藏狀態的儲運過程中，不得有微生物再繁殖，並且無有害人體健康之活性微生物或孢子存在。商業滅菌法是以 100°C 以上 (110°C~120°C) 在滅菌釜內加熱殺菌 (10-30 分鐘)。

(三) pasteurization

巴斯德殺菌法係以 100°C 以下之溫度來加熱，以殺死病原菌及無芽孢細菌，但無法完全殺滅腐敗菌。

巴斯德殺菌法一般使用的條件為 62°C、15-30 分鐘，現在則利用一種稱為高溫短時(high temperature short time；HTST)的方法 (72°C、15 秒)。

公職王