

109 年度第二次食品技師考試

科目：食品微生物學

- 一、請比較同一種肉品在新鮮狀態與腐敗狀態所含微生物菌種，何者較多？請寫出你的答案，並解釋其原因。在你所述明的原因中，請詳細列出並說明肉品本身影響微生物生長的因子。(20分)

【擬答】100%出自志聖阮籍老師食品微生物學 A02, p. 65-72

(一)同一種肉品在新鮮狀態與腐敗狀態所含微生物菌種，新鮮狀態所含微生物菌種較多但菌數較少。新鮮肉品中所含微生物種類較腐敗肉中多，此與腐敗菌的內在與外在因子有關，例如：食品 pH 值、氧化還原電位、營養組成、水分含量、儲存溫度；而且絞肉中微生物的數目比大型肉塊（如牛排）中多，原因有下列幾項：

1. 碎肉經過較多的人為操作過程；
2. 絞肉表面積較大，使肉品表面的能量增加；
3. 因表面積增加，使好氧菌易於生長；
4. 絞肉過程中使用的機械、切刀及儲存容器通常不清潔，微生物易污染肉品。
5. 赤肉：動物皮膚、內臟、毛髮、腳蹄等處帶有大量微生物，加上赤肉本身營養豐富，故微生物容易滋長。

新鮮赤肉須冷藏(0~4℃)，因此造成腐敗之微生物多屬低溫菌，其中最常見的是 *Pseudomonas*，但若儲藏溫度不當則嗜中溫菌亦會快速生長造成腐敗。

6. 禽肉：禽肉的污染與赤肉類相似，亦以低溫菌為主

健康新鮮禽畜動物肉品微生物分布

(1)動物外部毛髮、皮膚、腳蹄部位通常含有大量微球菌屬 (*Micrococcus*)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*)、鏈球菌屬 (*Streptococcus*)。

(2)動物內部組織

動物呼吸道(respiratory tract)與外部皮膚組織相似，分布以前述三種球菌為主。(微球菌屬、葡萄球菌屬、鏈球菌屬)。

腸胃消化道細菌之分布含革蘭氏陰性的腸道菌(enteric organisms)，如：大腸桿菌屬 (*Escherichia*)、沙門桿菌屬 (*Salmonella*)及志賀桿菌屬 (*Shigella*)等，以及假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)。

革蘭氏陽性菌則以厭氧且能產生內生孢子(endospore)的梭狀芽孢桿菌屬 (*Clostridium*)、乳酸菌（如：*Streptococcus* 及 *Lactobacillus* 等）、以及李斯特菌 (*Listeria*)等在腸道系統中繁殖為主。

(二)肉品本身影響微生物生長的因子

肉類食品內部及其衍生之因素，為內在因素(intrinsic factors)。

1. 氫離子濃度 (pH value)

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。

(1)細菌最適合的生長 pH 值在中性範圍(pH 6.5~7.5)；

(2)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，例如：

腐敗的雞蛋蛋白。

2. 水活性 (Aw, water activity)

食品的 Aw 可評估食品可自由供給微生物利用的水分之比例。

當 Aw 值高，表示在食品上微生物可利用的水分高；反之食品 Aw 的降低，會導致食品不可被微生物利用的水(unavailable water)增加。微生物生長狀況最好的水活性稱為最適生長水活性(optimum Aw)。最適 Aw：細菌較高，黴菌較低。

(1)細菌：Aw 0.9 (好鹽性細菌 Aw 0.75)

(2)酵母：Aw 0.88 (耐滲透壓酵母 Aw 0.61)

(3)黴菌：Aw 0.80 (耐乾性黴菌 Aw 0.65)

3. 相對濕度 (RH, relative humidity)

食品的水活性其實就是指相對濕度的一種平衡狀態，實際上所有地球上的物質表面上，多少都會包覆著一層水分子，這些水分子非常緊密地與物質結合在一起，無法自由游離出來，因此對水活性毫無貢獻。

4. 滲透壓 (OP, osmotic pressure)

(1)低張溶液(hypotonic solution): 細菌所處溶液為低鹽高水含量，這樣的環境稱為低張溶液，大多數的微生物比較能夠忍受高水活性的環境。

(2)等張溶液(isotonic solution): 當食品中與微生物體內的游離水分子濃度達到相等，這樣的環境稱為等張溶液，大多數的食品都是屬於這樣的環境，也是最適合微生物生長的地方。

(3)高張溶液(hypertonic solution): 細菌所處溶液為高鹽低水含量，這樣的環境稱為高張溶液，微生物體內的游離水分子就會大量滲透出去，造成微生物體萎縮，無法正常進行生理代謝，生長受抑制。

5. 氧化還原電位 (ORP, oxidation-reduction potential)

含有大量氧氣（好氧性）的環境或食品具有較高的氧化還原電位 (+電位)，而缺少氧氣（厭氧性）的環境或食品具有較低的氧化還原電位 (-電位)。

好氧菌需要正的電位差(氧化態)，如 *Bacillus*。

厭氧菌需負的電位差(還原態)才可生長，如 *Clostridium*。

6. 食品營養成分 (nutrient content)

微生物在食品上增殖必須進行能量代謝及生長合成作用，食物所含的營養成分之種類與比例，對食品中微生物的生長會有很重要的影響，這些營養成分包括(1)碳源 Carbon source (2)氮源 Nitrogen source (3)礦物質和維生素(Minerals and vitamins)，可以提供微生物生長時的需求。

7. 天然抗菌成分 (antimicrobial substances)

食品的組成分中，含有天然存在的抗菌物質，能抑制某些族群微生物的繁殖，常見的天然抗菌成分。

8. 食品的生物結構 (food biological structure)

食物大多來自生物體的組織，而其本身即具有防止微生物侵入的結構與功能。

健康組織的內部，一般而言都是無菌狀態，縱使有些共生的細菌，也都屬微量。因此，保護食物整體的完整性，也就可以初步防止微生物的污染。

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

二、請敘述說明乾酪 (cheese) 製作時造成牛奶蛋白凝集的方法及原理。有些乾酪需經熟成(aging) 操作，其目的為何？熟成過程乾酪的組成成分產生何種變化？(20 分)

【擬答】100% 出自志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.9-12

(一) 乾酪製作時造成牛奶蛋白凝集的方法及原理

乾酪是利用凝乳酶(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。新鮮乾酪為牛乳的 9%。

不同的乾酪有其特殊之製程：牛乳先經殺菌 (62.5°C, 30 分鐘)，迅速冷卻，再加入適當之菌種 (2%)，進行乳酸發酵，於酸度約 0.2~0.8% 時添加凝乳酵素(rennin)加速乳蛋白的凝結，凝乳經切割、燙洗、除水、成形、鹽漬、熟成後即為成品。

牛奶蛋白凝集凝乳機轉：

(1) κ -酪蛋白經凝乳酶的作用，產生副 κ -酪蛋白與糖聚胨肽，其中，副 κ -酪蛋白在 Ca^{2+} 存在下，形成副酪蛋白鈣複合物而凝結成凝乳(curd)。

(2) 乳汁中的乳糖代謝產生乳酸，乳蛋白因 pH 值下降而凝固。

(二) 有些乾酪需經熟成操作，其目的與組成變化：

乾酪熟成指的是添加微生物以進行 >8 小時的發酵。常用微生物如下：

(1) 嗜中溫菌之最適生長溫度為 30~40°C，工業上的應用溫度範圍在 20~40°C 間，以乳酸球菌屬(*Lactococcus*)與白色念珠菌屬(*Leuconostoc*)之菌株為代表，與(2)嗜高溫菌之最適生長溫度為 40~45°C，工業上的應用溫度範圍在 30~50°C 間，以鏈球菌屬(*Streptococcus*)與乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)為代表。

1. 乳酸發酵作用：產生乳酸、雙乙醯、二氧化碳等風味物質。

2. 酪蛋白分解作用：凝乳酶作用，產生胨肽、胺基酸、質地、風味。

3. 脂質分解作用：經乳酸菌分解為酪酸及其他產物。

4. 調和作用：所有風味物質相互混合。

三、乳品工廠可用染劑還原法 (dye reduction method) 來分析生乳總菌數。請敘述說明以染劑還原法分析食品總菌數的原理與操作步驟，並寫出常用的染劑名稱。(20 分)

【擬答】100% 出自志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.167-168

染劑還原法(dye reduction method)為具有代謝活性的微生物對於氧化還原染料所產生的反應，用以檢測微生物的方法。

(一) 原理

氧化還原染料能由活化態檢測微生物中獲取電子(被還原)，使得染料顏色改變，通常氧化型呈色而還原無色。常用氧化態甲烯藍為藍色染料，由活菌取得電子後，被還原為無色的還原態染料。反應過程中，需要一定量菌數作為標準反應曲線，才可以直接測數。

優點：迅速簡易、成本低。

缺點：並非所有微生物的還原力都相同，除非特殊處理，否則無法用於含還原劑之食品。

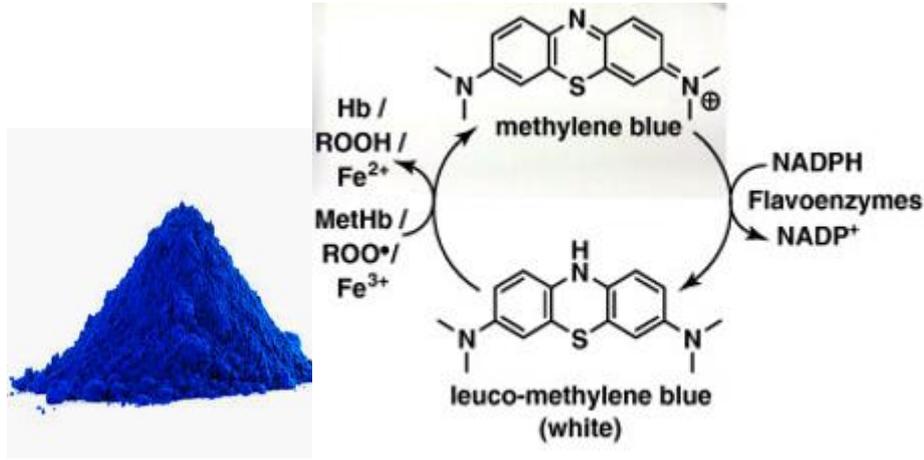
(二) 操作步驟：甲烯藍或亞甲基藍試驗(methylene blue test)。

1. 菌液樣品加於藍色甲烯藍標準溶液中 (A635 nm 強吸光)，顏色會被還原為無(白)色。如果菌群是中溫菌、可發酵性而且具有還原色素活性的微生物，如鏈球菌與大腸桿菌群，則可由色素還原的速度測出菌量。

2. 菌株生長使 O_2 被消耗，去除 O_2 使 methylene blue 被還原為無色。

3. 以不同菌數的菌液，進行反應，做出標準曲線圖。

氧化態：藍色 (A635 nm 吸光值)。還原態：無色。



四、請說明食品的酸鹼值 (pH value)如何影響微生物生長。人們可利用添加酸化劑來調整食品成酸性食品，以抑制病原菌生長。人們發現金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)可以在以鹽酸為酸化劑所調整之 pH 4.5 牛乳中生長，確無法在以醋酸為酸化劑所調整之 pH 4.5 牛乳中生長，請解釋其原因。(20 分)

【擬答】100% 出自志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.124-125, A02, p.199-200

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。

(1)細菌最適合的生長 pH 值在中性範圍(pH 6.5~7.5)；(2)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。

食品一般分類是以 pH 4.5 為分界，依酸鹼性常分類為：

(一) pH > 4.5 的低酸性食品 (low acid food)：常見者為禽畜及多數魚肉製品、乳製品。需依一定程序高壓滅菌。

(二) pH < 4.5 或以下，稱為酸性食品 (acid food)，在 100°C 以下，常壓熱水殺菌即可。

微生物生長的酸鹼值：

(一) pH > 5.0：幾乎所有微生物都能生長。

(二) pH 4.5-5.0: 肉毒桿菌、沙門氏菌、金黃色葡萄球菌均能生長，也會產生毒素。

(三) pH 3.7~4.5 間 (含) 的酸性食品：常見於水果及部分蔬菜如蕃茄等。食品中毒菌幾乎不生長，也不會產生毒素。

(四) pH < 3.7 的高酸性食品 (high acid food)：常見於酸性水果、酸性飲料等。乳酸菌、醋酸菌及一部分黴菌可生長，但腐敗菌幾乎無法生長。

pH 值影響微生物生長的原因：不適宜的 pH 值會：1. 改變微生物細胞膜電位 2. 改變微生物體內酵素反應 3. 高濃度氫離子降解蛋白質與核酸，因而抑制微生物生長。

食物中的 pH 值可以使用酸鹼度計來測量，但實際上 pH 值不是唯一真正影響食物中微生物生長的因子，例如：在相同的 pH 值條件下，若使用不同的酸類，其對微生物的生長也會有不同的影響。

目前已實際應用於食品而一般被認為是安全(general recognized as safe, GRAS)之有機酸多為脂溶性弱酸。

一般認為弱酸之抑菌效果直接與未解離酸分子之多寡有關，而大部分有機酸之 pKa 值介於 3~5，因此降低 pH 值能增加未解離酸之濃度，增加抗菌效果。

醋酸及乳酸為食品中最常使用的有機酸：

在同一 pH 值下，因為醋酸的未解離度較高，所以抑菌能力比乳酸、檸檬酸強。有機酸的抑菌作用，主要是因降低 pH 值達到一般腐敗性微生物無法生長的範圍。除此之外，亦能

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

與微生物的細胞膜相互反應，抑制代謝作用。

鹽酸酸化劑： $\text{HCl} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Cl}^-$ ， $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ ，無法影響微生物細胞膜電位。

醋酸為酸化劑： $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ ， $\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{CH}_3\text{COO}^-]/[\text{CH}_3\text{COOH}]$ ，在 pH 4.5 時， CH_3COOH 不帶電荷，能夠擴散進入微生物細胞內，影響微生物細胞膜電位差，抑制微生物生長。

五、請說明高溫殺菌的原理。細菌的耐熱性依菌株不同而異，請分別說明食品的水分、碳水化合物、蛋白質與脂質含量，以及食物的酸鹼值對同一株細菌耐熱性的影響。(20 分)

【擬答】100% 出自志聖阮籍老師食品微生物學 A02, p.206-208

(一) 高溫保存法

污染食品的微生物可以利用加熱來控制，甚至將其殺滅。加熱滅菌的原理在使蛋白質變性，尤其是使代謝所需的酵素活性消失，是謂高溫保存法。

高溫加熱方式：

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。前者如只將飲用牛乳中對人體有害的細菌殺滅的巴斯德殺菌法(pasteurization)，後者如罐頭加熱，將微生物完全殺滅的滅菌(sterilization)。

巴斯德殺菌法一般使用的條件為低溫長時間滅菌法(low temperature long time, LTLT): 62°C 、15-30 分鐘，現在則多利用一種稱為高溫短時間滅菌法(high temperature short time, HTST)的方法 (72°C 、15 秒)。

滅菌的條件最少須 100°C 或以上的溫度加熱，使污染食品的微生物喪失活性甚或死滅。下述三種加熱方法為目前常使用的方法。

1. 滅菌 (sterilization)

將所有微生物及孢子完全殺滅的加熱處理方法稱為絕對滅菌法(absolute sterilization)。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。

2. 商業滅菌法 (commercial sterilization)

商業滅菌法是將病原菌、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($110^\circ\text{C}\sim 120^\circ\text{C}$) 在滅菌釜內加熱殺菌 (10-30 分鐘)。

3. 巴斯德低溫殺菌法 (pasteurization)

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

畜產物等肉製品及 pH4.6 以上的蔬菜是以 100°C 以上的高溫進行殺菌；然而，果實及 pH4.6 以下的蔬菜則是以 100°C 或以下加熱殺菌。

(二) 影響微生物抗熱性的因素

加熱處理過程中，影響微生物對於熱的抵抗性的因素有(1)微生物本身的特性及(2)食品本身的成分二大主因。

1. 微生物本身的特性

微生物的種類、菌數多寡、不同生長階段等因素，均會影響微生物對於熱的抵抗性。

(1) 微生物的種類：一般而言，微生物抗熱性與其最適生長溫度有關，其抗熱性依序為高溫菌 > 中溫菌 > 低溫菌。產孢菌之抗熱性較非產孢菌為佳；革蘭氏陽性菌之抗熱性較陰性菌為佳；球狀菌較非產孢桿菌為佳；酵母及黴菌對熱相當敏感。

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

- (2)菌數多寡：菌數愈多者，其抗熱程度愈佳，高菌數之抗熱性來自於菌體所分泌之保護物質所致，由於蛋白質可提供某種程度之抗熱性，故微生物所分泌之胞外物質可能為蛋白質。

公
職
王