

109 年度第一次食品技師考試

科目：食品微生物學

一、請說明細菌及黴菌的產孢過程(sporulation)及孢子的存在對食品的影響。並列舉一種產孢細菌的菌種(學名)及黴菌各類孢子的名稱加以說明。(20分)

【擬答】100%北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.21-22; p.63-68

(一)細菌產孢:

細菌內孢子(Endospore)又稱為「芽孢」，是某些細菌特有的一種構造，是對惡劣環境具有高度抗性的特殊休眠體，類似種子的狀態，卻沒有繁殖功能。會產生內孢子的細菌多是革蘭氏陽性菌，通常會在缺乏養份的時候開始進入此休眠狀態，對抗生素、熱、酸鹼、輻射等具有強耐受性，待環境變成適合生存時，細菌內孢子會打破睡眠狀態甦醒發芽繁殖。

最常見會產生芽孢的細菌是芽孢桿菌屬(*Bacillus*)和梭菌屬(*Clostridium*)。芽孢桿菌屬這個家族有許多著名的細菌，例如：益生菌枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)和致病菌炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)。梭菌屬家族也有許多著名的細菌，大部分都是致病菌，例如：肉毒桿菌(*Clostridium botulinum*)、破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)。

內孢子的形成既不是細菌生活週期必經階段，也不是細菌繁殖的一種形式，是一種對抗環境因應生成的休眠構造。一隻細菌只會形成一顆內孢子，可抵抗大部份的消毒劑、抗乾燥、抗熱，耐酸鹼、對抗生素具有強耐受性，普通的巴斯德消毒法(加熱 60~90°C 短暫加熱)是無法殺滅細菌內孢子，必須要高溫高壓滅菌法才可殺滅細菌內孢子。內孢子強悍的抗逆性是因為其精巧且奧妙的結構特性，內孢子為多層結構，核心外有許多「層」：外壁、外套、外膜、外殼、內膜，層層含有各種不同的特殊物質，保護內孢子。核心內的重要遺傳物質 DNA 和蛋白質形成複合體，保護 DNA。

(二)黴菌產孢

黴菌的繁殖包括有性生殖和無性生殖。行無性生殖時，由假根長出菌絲，匍匐菌絲向上分支為直立菌絲，頂端的孢子囊可產生孢子，孢子落在有機物上，便可萌發菌絲。部分菌屬的子囊孢子具有高度抗熱性。有一群黴菌可形成分生孢子器，某些種類黴菌可由菌絲分段形成關節孢子。

行有性生殖時，正、負交配型的匍匐菌絲互相靠近，彼此各長出短側枝，經接合成為合子。合子成熟萌發時，經減數分裂產生孢子囊，孢子囊破裂釋出孢子，再萌發為菌絲。

黴菌是由絲狀的「菌絲」和「孢子」所組成。由許多分枝的菌絲集合而成的部分稱作「菌絲體」。「孢子」有球形、橢圓形、棒狀、鐮刀狀、螺旋狀 等各種形狀，大小也因不同的種類而有很大的差異，但直徑大多介於 2-10 μm 。我們一般看到黴菌所顯現出來的顏色，幾乎都是其孢子的顏色。

黴菌的孢子在適合增殖的條件下，2-3 日即形成肉眼可見的菌落，約一星期的時間就會產生大量孢子散落在四周，再經由風、水、或是人帶到別的地方發育。黴菌就是以此方法不斷的增殖散佈。

例如麴菌(*Aspergillus*)，是自然界最常見的一種黴菌。包括釀造時不可缺少的米麴 (*A. oryzae*)、用來製造有機酸的黑麴 (*A. niger*)以及有致癌性的黃麴菌 (*A. flavus*) 等等，約有 150 種。

二、請說明新鮮牛乳中常見既有的抗菌物質及可能發生不同類型的腐敗與主要作用菌種。(20分)

【擬答】100%北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p. 133-135, A02, p.75-76

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

(一)新鮮牛乳中常見既有的抗菌物質

1. 鮮奶中的乳抑菌乳堿素 (lactenins)

乳抑菌乳堿素是鮮乳中可含 N 蛋白質抑制乳酸菌的一種抑菌物質，巴斯德滅菌法無法破壞 lactenins。

2. 抗腸菌因子(anticoliform factor)

鮮奶中的抗腸菌因子可抑制大腸桿菌群(coliform)的生長。

3. 新擠出的牛奶中含有溶菌酶(lysozyme)等抗菌活性物質，能夠在 4°C 下儲存 24 小時~36 小時。這種牛奶無需加熱，不僅營養豐富，而且保留了牛奶中的一些微量生理活性成分，對兒童的生長很有好處。

4. 新鮮牛乳中會加入乳酸鏈球菌素 (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除消化，是一種高效、安全、無毒、無副作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)鮮奶中不同類型的腐敗與主要作用菌種

1. 牛奶中微生物主要的來源來自於動物體乳腺、擠乳工具及不潔的盛裝容器。

其中主要的微生物大多為革蘭氏陽性菌，包括 *Enterococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Microbacterium*、*Listeria* 及 *Proteus* 等，另外，還有大腸桿菌群(*Coliform*)之菌屬，這些菌種大多無法在低溫下生長，故於低溫冷藏的生乳也存在一些低溫產孢菌及致病性分枝桿菌(*Mycobacteria*)。

乳製品的腐敗：牛乳在擠乳前後易受微生物的污染，因此乳製品之原料乳必須加熱及冷藏。故引起生乳或乳製品腐敗的微生物通常是一些在加熱後污染原料乳之低溫菌，或者是在加熱前污染生乳之耐熱性低溫菌。

2. 生乳之腐敗形式包括有：

(1) 不良風味：產生酸味通常是耐熱性乳酸菌在溫度較高的情況下發生，苦味則由一些低溫菌如 *Pseudomonas* 屬分解酪蛋白後所產生。

(2) 脂肪酸敗：由一些細菌或黴菌所引起。

(3) 產氣：由產氣菌如大腸桿菌、梭菌及異質乳酸發酵菌所引起。

(4) 乳蛋白凝結：由 *Pseudomonas*、*Bacillus*、*Micrococcus* 等破壞酪蛋白之結構後產生凝乳。

(5) 產生黏絲或質地變黏稠：由 *Pseudomonas*、*Alcaligenes*、*Micrococcus* 等在低溫或低 pH 情況下產生黏質多醣類或黏蛋白(mucin)。

(6) 變色：成藍假單胞菌(*Pseudomonas synayanea*)與乳酸鏈球菌 (*Streptococcus lactis*)共同存在時，牛乳會變藍。*Serratia* 之細菌會造成牛乳表面變紅。*Pseudomonas* 細菌產生色素或酵素氧化酪胺酸會引起牛乳變褐色。

(7) 發霉：許多黴菌如 *Penicillium*、*Aspergillus*、*Mucor* 等會在牛乳或乳製品表面生長，造成各種色變，有些會產生黴菌毒素。

三、請分別就食品的 pH、Aw 及溫度等影響因子，說明一般細菌及黴菌的適當生長範圍及個別因子對生長的影響。並說明在特定食品中調控此三種因子的相互作用對微生物生長的影響狀況。(20 分)

【擬答】100%北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.124-138; p.122-123

(一)食品的 pH 對一般細菌及黴菌的影響

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

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。

微生物依據最適合生長的 pH 值，可以分類為：

1. 嗜酸菌(acidophilic)：能生存於 pH3.0-4.5 間的微生物，如真菌類。
2. 嗜鹼菌(alkaliphilic)：能生存於 pH8.0-11.0 間的微生物，如芽孢桿菌屬。

最適 pH 值培養基生長的微生物，經一段時間後，微生物產生的代謝產物會改變培養基的 pH 值，使得微生物的生長受到抑制。

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。

(二) 食品的 A_w 對一般細菌及黴菌的影響

食品的 A_w 可評估食品可自由供給微生物利用的水分之比例。

當 A_w 值高，表示在食品上微生物可利用的水分高；反之食品 A_w 的降低，會導致食品不可被微生物利用的水(unavailable water)增加。

每種微生物都有其適合生長的 A_w 範圍，當食物中的 A_w 降至其生長之最低水活性範圍時，微生物的生長速度減緩，代謝產物的生成也會減少。多數細菌在 A_w 0.91 以上生長，大部分的酵母菌在 A_w 0.88 以上生長；而黴菌在 A_w 0.80 以上生長，此為乾燥加工保存食品的一般依據。

微生物生長狀況最好的水活性稱為最適生長水活性(optimum A_w)。

最適 A_w ：細菌較高，黴菌較低。

1. 細菌： A_w 0.9 (好鹽性細菌 A_w 0.75)
2. 酵母： A_w 0.88 (耐滲透壓酵母 A_w 0.61)
3. 黴菌： A_w 0.80 (耐乾性黴菌 A_w 0.65)

食品的 A_w 降低引起的效應包括：

1. 供微生物生長的可利用水減少；
2. 食品中溶質相對提高，環境滲透壓變大，微生物須抵抗外界溶質的滲透作用才能生存。

耐鹽菌(halotolerant bacteria)最低生長 A_w 為 0.75，而屬於耐鹽菌的 *Staphylococcus aureus* 最低生長 A_w 為 0.86。

(三) 溫度對一般細菌及黴菌的影響

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：

1. 其細胞內各種代謝酵素活性的最適溫度；

2. 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。

依微生物生長的溫度範圍，微生物可分類為：

1. 嗜冷菌(psychrophiles)：又稱 cryophiles，是一種 cold-loving 菌種，生長的溫度範圍 -10°C ~ 20°C，最低生長溫度 $\leq 0^\circ\text{C}$ ，最高生長溫度 20°C，最適生長溫度在 15 至 20°C 的微生物稱為嗜冷菌，某些種類當曝露在室溫 (25°C 以上) 短時間即會死亡，理由可能是溫度太高會造成某些酵素或細胞膜的傷害。

真菌、細菌、藻類、原生動物都有低溫型，它們存在海洋、極地的冷水或土壤中。大多數海洋微生物都屬低溫型。在冰箱溫度 4 至 10°C 的條件下，嗜冷菌會使長期儲存的食物敗壞。許多嗜冷菌屬於李斯特菌、耶辛尼菌、假單胞菌屬 *Pseudomonas*、黃桿菌屬 *Flavobacterium*、產鹼桿菌屬 *Alcaligenes* 等。

2. 低溫菌(psychrotrophs)：為 cold-tolerant，生長的溫度範圍 0°C ~ 30°C，最適生長溫度 20~30°C，可於 15°C 以下生長。常見低溫菌如假單胞菌屬 *Pseudomonas*、黃桿菌屬 *Flavobacterium*、食品病原菌水中產氣假單胞菌屬 *Aeromonas hydrophilia* 及李斯特菌屬 *Listeria monocytogenes*；已知目前低溫冷藏鮮奶經高溫短時間 (HTST, 72 °C 15 秒) 之巴斯德殺菌條件下無法殺死李斯特菌。

低溫菌是造成冷藏食物腐敗的主因。

黴菌最適生長溫度 20~35°C，最低 0°C，最高 40°C。

3. 中溫菌(mesophiles)：可以在 10~50°C 生長，最適生長溫度 30~40°C。多數的黴菌如麴菌屬 *Aspergillus* 及細菌如乳酸菌、醋酸菌及大部分細菌(包括病原菌)等屬於中溫菌。

4. 高溫菌(thermophiles)或稱嗜熱菌：可以在 40~70°C 生長，最適生長溫度 50-60°C。高溫菌與罐頭食品敗壞有關。如造成低酸性罐頭食品的腐敗—平酸腐敗(flat sour spoilage)的芽孢桿菌 *Bacillus stearothermophilus* 及罐頭食品產氣性腐敗的梭孢桿菌 *Clostridium thermosaccharolyticum*。

5. 極高溫菌(extreme thermophiles)：可以在 70~110°C 生長，最適生長溫度在 90°C 以上，如生長於熱溫泉中的古細菌 *Thermus aquaticus*、高溫性肉毒桿菌、脂肪嗜熱芽孢桿菌。

(四) 調控此三種因子的相互作用對微生物生長的影響狀況

結合內在因素與外在因素，利用多重因子或技術來有效控制食品微生物生長，以確保食物安全保存，是為柵欄技術(barrier technology)或障礙概念(hurdle concept)。最早用於阻止肉毒桿菌孢子發芽及生長因子(結合三種因子的相互作用: pH < 4.6, Aw, 0.94, temperature < 10°C)。

四、請說明下列微生物可存在食品的主要類別、存在意義及可能對人體造成不良的影響。(每小題 5 分，共 20 分)

(一) *Aspergillus parasiticus*

(二) *Penicillium expansum*

(三) *Campylobacter jejuni*

(四) *Enterobacteriaceae*

【擬答】100% 北志聖阮籍老師食品微生物學 A01, p.65, p.72-75; p.79; p.39, p.55-56; p.40。

(一) *Aspergillus parasiticus*

寄生麴黴 (*Aspergillus parasiticus*) 是屬於散囊菌目發菌科麴黴屬的一種真菌，可生長在土壤、稻穀等穀物上。35°C 為最適溫度，也會產生黃麴毒素的菌株，在 25°C 產生高量的黃麴毒素。黃麴毒素是人體的肝毒、腎毒、神經毒、光敏皮膚毒、胸腺毒、致癌物與致突變物。

(二) *Penicillium expansum*

黴菌造成的植物疾病大都被冠以「青黴病」的名字。常見的主要疾病有擴展青黴 (*P. expansum*) 引發的柑橘青黴病。以及同樣由擴展青黴 (*P. expansum*) 引發的蘋果青黴病、甘薯青黴病等。棒麴黴素(patulin)主要由擴展青黴菌所產生，*P. expansum* 為水果的腐敗菌株，所以棒麴黴素常存在於被污染的水果或以水果製成的製品，如果汁、果醬或西打等，棒麴黴素限量<50 ppb，為神經毒素，抑制免疫系統，目前被懷疑可能為致癌物。

(三) *Campylobacter jejuni*

曲狀桿菌(*Campylobacter jejuni*)是革蘭氏陰性(G(-))桿菌、具有鞭毛、微好氧菌、最適合生長的溫度是在 42~45°C 之間，低於 30°C 或者高於 47°C 則無法生長。

曲狀桿菌通常發現於野生或飼養的牛、馬、綿羊、山羊、猴子、豬、狗、貓和各種禽鳥類之腸胃道，大量動物宿主是人感染來源。

曲狀桿菌是全世界最常造成細菌性腸胃炎的人類致病菌之一，是旅遊者下痢常見病因。曲狀桿菌症為全世界性人畜共通傳染病，是常見的細菌性食物媒介疾病，只需 500 個細菌就可以致病。曲狀桿菌為病原菌，造成腸炎。

(四) *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae 腸內細菌科在環境中是無所不在，為 G(-)、兼性厭氧及呈棒狀的細菌，屬於腸桿菌目腸桿菌科。

腸道細菌是院內感染最常見的病原。其細菌的主要特性，包括：

大小約(0.3~1.0) × (1.0~6.0) mm；不形成孢子；有些有夾膜，如克雷白氏桿菌，但有些則無；對一般理化因子具感受性，但可抵抗低溫；有些有鞭毛具運動性；但有些則無，如志賀菌(*Shigella*)及克雷白氏桿菌(*Klebsiella*)；在有氧或無氧情況下均可生長，對營養不苛求，在血液培養基或選擇培養基(MacConkey agar)即可迅速生長，且生長良好；均能發酵葡萄糖，產生酸或產生酸或氣體。

這個屬下的七個種都是病原及使宿主免疫受損的機會性感染的細菌。泌尿道及肺部是一般受感染的地方。

五、以太空包培養食用菇類產製子實體 (fruiting body)時，請說明培養基組成分(包括使用木屑為主原料的前處理、其它組成分及各組成分對菇類生長的影響)、如何設定太空包培養基的物理因子及培養期間環境條件的管理。(20 分)

【擬答】

菇類屬於真菌界，真菌主要特徵是細胞具有細胞核和各種不同功能的胞器。真菌的營養狀態多以菌絲形態存在，在顯微鏡下，菌絲呈長長的管狀，並有許多分支。在營養模式方面，真菌沒有葉綠素，不能像植物行光合作用。真菌又不像動物一樣，可直接吞食食物消化。它們是藉由胞外酵素的分泌，把有機物質分解成可吸收形式的小分子如糖類、胺基酸等，再經由擴散或主動運輸的方式把養分輸送至細胞中。

菇類的栽培過程主要分成菌種製備、栽培基質製作、接種、走菌、刺激出菇等步驟。第 1 個步驟是使單一菇類菌株的菌絲在滅過菌的培養基上生長，做為初始的菌種。在大量栽培時，需要有一定數量的接種源，因此必須把它從培養基先行放大，這時會選用煮熟的麥粒、裸麥、高粱等穀類種子做為培養基質，等菌絲長滿後，就可以做為接種的菌種。有些菇類可直接以木屑混合米糠做為菌種栽培的基質，所做成的菌種稱為木屑菌種。

早期用木頭種香菇及木耳，不僅耗費的時間長，且砍伐的樹種來源堪慮。之後發展出用耐熱的塑膠袋填裝木屑等材料，這種種菇的方式稱為太空包栽培。後來更發展出可以重複使用的塑膠瓶，且利用機械自動填裝，因而可以大規模商業化生產。

公職王歷屆試題 (109 專技高考)

台灣目前菇類栽培仍以太空包為主，根據農糧署的官方統計，台灣每年生產兩億包以上的太空包。目前台灣靈芝栽培一般都採用太空包栽培法，中國稱為「袋栽」。

台灣適合在夏季生產，於 4 月製包接種，6 月可開始採收至入秋之前。栽培時，先製備母種，取靈芝子實體內部組織，培養於 PDA 洋菜培養基上，經過純化培養即為靈芝母種。再以含有木屑 84%、米糠 15%、碳酸鈣 1% 或木屑 78%、米糠或麥麩 15%、玉米粉 5%、石膏 1%、蔗糖 1% 的配方，含水量 60%-65%，混合均勻後裝瓶，經高壓高溫滅菌，接入菌種後於 25-28°C 培養室進行培養，待菌絲長滿即為栽培種。然後進行太空包的製作，配製培養料時先將主料木屑、棉籽殼及輔料米糠、麥麩、玉米粉、大豆粉、糖、石膏粉等拌勻，調節含水量 60%-65%，拌料完成後立即裝袋。

台灣太空包(聚丙烯 (PP) 或聚乙烯 (PE)袋)，每袋混合料 1-1.2 公斤，中國每袋裝乾料 350-500 公克。PE 袋採用常壓滅菌 14 小時，PP 袋則採用高壓滅菌 2 小時，將滅菌完成的料袋移入接種室，以無菌操作進行接種，再將菌袋移入培養室中培養。培養室保持 26-28°C，空氣相對濕度保持 60%-70%，一般經 28-30 天左右菌絲便可長滿菌袋。

長滿菌絲之菌袋移至栽培室，進行開包，促進出菇，出菇溫度維持 24-28°C，空氣相對濕度提高至 90%-95%，並提供散射光和充足的氧氣，保持地面潮濕。袋口會產生原基體並逐漸發育形成菌傘，菌傘邊緣白色漸消失，邊緣變紅褐，菌傘開始木質化，30 天後收集孢子粉，並採收子實體。

職
王