

102 年公務人員高考三等 食品衛生檢驗試題

等別：三等考試

類科：食品衛生檢驗

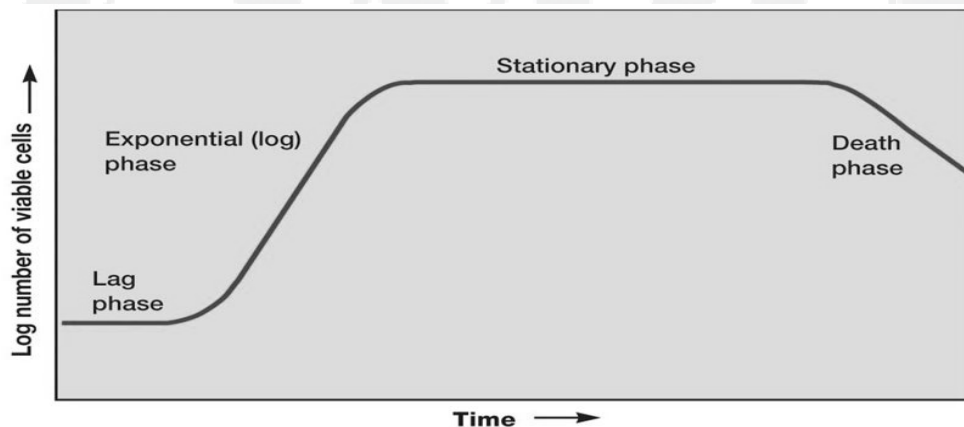
科目：食品微生物學

一、請詳細說明細菌進行批式培養時之四個生長時期。(10 分)

【擬答】 命中特區：102(春) 食品微生物學 2A, page 1-2

細菌進行批式培養時的生長曲線 (growth curve of microorganism)：以微生物菌數或其對數值為縱座標，對應其生長時間為橫座標作圖，即可得到微生物的生長曲線圖。在培養時，可以看到四個生長時期，也就是延滯期或稱誘導期(lag phase)、對數期(log phase)、穩定期(stationary phase)及死亡期(death phase)。

在休眠中的微生物受到生長因子的誘因後，經過一段緩慢的生長，就開始呈對數上升式的成長，每隔固定的時間就會成長一倍。但不可能無限制的成長下去，到某一密度之後，成長與死亡達到平衡，就到了穩定期，群落的大小不再增加，此時菌數維持平緩 (plateau)。但是隨著時間的增加，新陳代謝產生的廢物越積越多，以致於危害到個體的健康，此時死亡率高過成長率，而使個體數目開始減少，終於全部消滅。



典型的細菌批式培養時生長曲線包括四個時期，其特性如下：

(一)延滯期 lag phase

特點：生長速率常為零、菌體粗大、RNA 含量增加、代謝活力強、對不良環境的抵抗能力下降。

成因：微生物剛剛接種到培養基之上，其代謝系統需要適應新的環境，同時要合成酶、輔酶、其他代謝中間代謝產物等，所以此時期的細胞數目沒有增加。

(二)對數期 log phase

特點：生長速率最快、代謝旺盛、酵素反應活躍、活細菌數和總細菌數大致接近、細胞的化學組成形態理化性質基本一致。

成因：經過延滯期的準備，為此時期的微生物生長提供了足夠的養分，同時外界環境也是最佳狀態。

(三)穩定期 stationary phase

特點：消耗大量養分，活細菌數保持相對穩定、總細菌數達到最高水平、細胞代謝產物積累達到最高峰、是菌體的收穫期、芽孢桿菌開始形成芽孢。

成因：營養的消耗使營養物比例失調、有害代謝產物積累、pH 值 EH 值等理化條件不適宜。

(四)死亡期 death phase

特點：細菌死亡速度大於新生成的速度、整個群體出現負增長、細胞開始畸形、細胞死亡出現自溶現象。

成因：主要是外界環境對繼續生長越來越不利、細胞的分解代謝大於合成代謝、繼而導致大量細菌死亡。

二、請就原料、發酵微生物與產物之變化，說明德式酸菜(Sauerkraut)之發酵製程。(10分)

【擬答】 命中特區：102(春) 食品微生物學 5A, page 20

德式酸菜 Sauerkraut 在德文意思就是「酸的白菜」，最初是將切碎的高麗菜(cabbage)浸於酸葡萄酒或其他酸性水果汁發酵製得，到了 16 世紀才以鹽水取代酸性汁液。

(一)德式酸菜中之微生物作用

當酸菜發酵初期稱異質發酵或產氣階段，腸膜白念珠菌(*L. mesenteroides*)快速生長，代謝白菜中的糖分產生乳酸、醋酸及二氧化碳，使 pH 快速下降而能抑制革蘭氏陰性菌的生長，二氧化碳所形成的厭氧環境則可減緩白菜的褐變與維生素 C 的氧化。

但腸膜白念珠菌對酸敏感性較強且世代週期較短，當發酵進入第二週後其菌數即快速下降，繼而興起的是短乳酸桿菌(*L. brevis*)及植物乳酸桿菌(*L. plantarum*)，此時稱同質發酵或不產氣階段，菌體利用剩餘的碳水化合物繼續產生乳酸，將 pH 值降至 3.5 以下。

(二)德式酸菜之製程

製作德式酸菜時多選用白色、頭端碩大、口味偏甜的高麗菜為原料，將高麗菜去除綠色及破損的葉片與菜心，菜葉切成 0.08~0.16 公分厚度的碎片，置於發酵槽中，添加 2~2.5% 的食鹽與白菜中滲出的汁液形成鹽溶液，用重物將菜葉完全壓入食鹽水中，並於 18~20°C 下發酵 2~8 週，最終產品的乳酸含量約 1.6~2.3%，pH 值約 3.5 或更低。酸菜經 74~82°C，30 分鐘的巴氏德殺菌即可常溫儲藏，低溫冷藏則不需殺菌，以添加 0.1% 苯甲酸鈉和亞硫酸氫鉀為防腐劑。

三、請就下列抑制微生物生長之方法，說明其抑制機轉。(每小題 8 分，共 40 分)

(一)滲透壓 命中特區：食品微生物學 2A, page 13

(二)有機酸 命中特區：食品微生物學 2A, page 7-8, 8A, page 18

(三)商業滅菌法 命中特區：食品微生物學 8A, page 25

(四)氯 命中特區：食品微生物學 8A, page 16-17

(五)抗生素 命中特區：食品微生物學 8A, page 23-24

【擬答】

(一)滲透壓

微生物的基本單元就是細胞，每個細胞是由細胞膜所圍繞，而細胞膜具有特殊的性質，可以讓水分子以被動運輸的方式（或稱為擴散作用）進出細胞膜，但是其中溶解的物質（例如：鹽類

分子) 則無法通過, 這種水通過細胞膜的擴散作用就稱為滲透作用(osmosis)。

細胞必須在潮濕的環境才能生存, 當細胞被置放在某個環境, 其中細胞內容質分子的濃度遠高於環境中的溶質分子濃度, 水分子就會通過具半通透性的細胞膜擴散進入細胞, 直到細胞內外溶質分子的濃度達到平衡; 反之, 當細胞所處的環境比細胞內含有較高的溶質分子濃度時, 水就會擴散出細胞外, 這種水分子的移動方向與動力就會產生一種滲透的壓力, 稱之為滲透壓(osmotic pressure), 滲透壓的高低, 取決於細胞膜內外游離水分子濃度的落差。

當食品中含有較高的游離水分子濃度(水活性高), 超出微生物體內的游離水分子濃度, 食品中的游離水分子就會往微生物體內擴散, 造成微生物體脹大, 不過幾乎所有的微生物都具有細胞壁的保護, 因此游離水分子不會無限制地擴散進入微生物體內, 對微生物的生存比較不會造成傷害。

因此, 大多數的微生物比較能夠忍受高水活性的環境, 這樣的環境稱為低張溶液(hypotonic 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(isotonic solution), 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; 反之, 當食品中的游離水分子濃度遠低於微生物體內的游離水分子濃度時(水活性低), 微生物體內的游離水分子就會大量滲透出來, 造成微生物體萎縮, 無法正常進行生理代謝, 生長受抑制, 這樣的環境稱為高張溶液(hypertonic solution)。

(二) 有機酸(考題出處-食品微生物學 2A, page 7-8, 8A, page 18)

微生物的生長繁殖與繁殖的種類, 與生長所在食品 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。

食品可區分為不同的類別, 以區隔分類食品的 pH 值屬性與可能影響微生物生長的種類。

(a) pH>5.0: 幾乎所有微生物都能生長。

(b) 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(金黃色葡萄球菌除外)。

(c) 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, 也不會產生毒素。

(d) 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。

利用有機酸控制因微生物引起之食品腐敗已有多年歷史, 這些有機酸部分是自然存在於食品中, 有些是發酵聚積的終產物, 有些則是故意添加於配方中, 但作用通常只達到靜菌而非殺菌程度。

目前已實際應用於食品而一般被認為是安全(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。
常見有機酸對微生物抑菌效果如下。

微生物 有機酸	細菌	酵母菌	黴菌
醋酸	++	++	+
丙酸	++	+++	+++
乳酸	+	-	-
己二烯酸	+++	++++	++++
苯甲酸	+++	++++	++++

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，亦能與微生物的細胞膜相互反應，抑制代謝作用。

醋酸抑制革蘭氏陰性菌的效果較抑制革蘭氏陽性菌、酵母菌及黴菌的效果強。

實驗顯示，在屠宰雞的冷卻槽中添加 1~2% 乳酸，可降低屠體表面的微生物，同時對其風味及色澤並無顯著影響。若配合調氣包裝，可以有效延長儲存期限，主要原因為可延長微生物的遲滯期(lag phase)，因而達到保存效果。

(三)商業滅菌法

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。

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。

(四)氯

氯是殺菌劑，作為食品與水添加物，常用二氧化氯與次氯酸鈉。二氧化氯透過氧化作用達到消毒抑菌的目的，是以分子型態存在的消毒劑，因為特殊的單一電子轉移機制，使得二氧化氯是一具有選擇性的氧化劑，當其攻擊外圍佈滿電子的有機物分子團時，搶走一電子而成為亞氯根離子。不同於氯氣，是將氯原子與反應物發生加成或取代反應。二氧化氯水溶液在 2-10ppm、1 分鐘內就可殺死大腸桿菌，20-100 ppm、2 分鐘內就可殺死金黃色葡萄球菌，2-20ppm、1 分鐘內就可殺死沙門氏菌、和綠膿桿菌。次氯酸鈉的滅菌原理主要是透過它的水解形成次氯酸，次氯酸再進一步分解形成活性氧，活性氧的極強氧化性使菌體和病毒的蛋白質變性，因而殺滅病原微生物。

(五)抗生素

抗生素為微生物的二級代謝產物，少量即能殺死或抑制其他不同種類的微生物，主要由黴菌及鏈絲菌屬(*Streptomyces*)所產生。

食品中使用抗生素，需考慮的因素有：

- (1)需能殺死而非抑制微生物，能被分解成無毒性的物質，或經烹調可被破壞。
- (2)不會因食品成分或微生物代謝物的作用而失活。
- (3)不易有抗藥性菌株被誘導出來。
- (4)若已用作治療藥物或動物飼料添加物，則不應使用。

E. coli 會分泌一種蛋白質類似物質，且此物質能抑制其他 *E. coli* 的生長。

隨後陸續有報告指出，在他種微生物中亦有此類物質存在，同樣具有窄效性的抑菌特性，此類物質便命名為細菌素(bacteriocin)。

細菌素是由細菌所分泌之具有抑菌活性的小分子蛋白或多肽(polypeptide)之物質，一般而言，其抑菌範圍較抗生素窄，多限於與其分類上較接近之菌屬或菌種。

目前在食品中常用的細菌素有乳酸鏈球菌素(nisin)、納塔黴素(natamycin)、四環黴素(tetracycline)、枯草菌素(subtilin)及泰黴素(tylosin)。

乳酸菌分泌的細菌素是一種具有抑菌作用的小分子蛋白質或多肽類物質，其抑菌範圍較一般細菌產生的細菌素廣，如乳酸鏈球菌素可抑制 *C. botulinum*、*Bacillus spp*、*Enterococcus faecalis*、*Listeria monocytogenes* 和 *Staphylococcus aureus* 等食品腐敗菌、食品病原菌及孢子的萌發，此外還可產生一些如過氧化氫、雙乙醯等物質抑制細菌。

乳酸菌細菌素異於一般藥用抗生素，其優點為不具抗藥性及毒性，且不易於被小腸中之胰蛋白酶(trypsin)破壞，能有效抑制革蘭氏陽性菌和產孢菌的生長，因此廣泛應用於生乳、乾酪、香腸、醃肉、罐頭及低酸性食品中，可減少加熱處理的溫度和時間、延長保存期限及確保產品之安全。此物質可抑制 *Salmonella*、*Staphylococcus*、*E. coli* 和 *Vibrio* 等病原菌。牛乳中 *Lactococcus lactis* 產生之乳酸鏈球菌素可使牛乳之結核菌死滅。

乳酸菌細菌素作用在細胞膜後，其作用可能分成：

- (1)藉由細胞內低分子物質的漏出，和質子移動力的消失，而改變細胞膜的通透性；
- (2)降解細胞不可缺之大分子，如 DNA、RNA；
- (3)抑制蛋白質、DNA、RNA、和肽聚糖的合成；
- (4)細胞溶解。

如乳酸鏈球菌素可在細胞膜上形成孔洞，使得細胞內的小分子如鉀離子、氫離子、胺基酸、ADP、ATP 等物質流出，最後導致菌體死亡。目前乳酸菌細菌素只有乳酸鏈球菌素被允許以食品防腐劑的形式添加於食品中，以抑制 *C. botulinum* 及其他雜菌之生長，我國衛生署亦核准其使用在乾酪中作為食物防腐劑。

四、(一)請說明食品產生腐敗與微生物數量之關係。(10分) 命中特區：食品微生物學 2A, page 24

(二)請說明造成肉品腐敗之內、外在因素。(10分) 命中特區：食品微生物學 5A, page 60-69

【擬答】

(一)食品腐敗(putrefaction)係指食品之外觀、氣味、味道、顏色、質地、觸感等品質發生了不良變化，而導致不為消費者接受或無法食用的現象稱之。食品腐敗可能由老鼠、昆蟲、動植物本身酵素、非酵素性化學變化、物理傷害及微生物本身或其酵素等原因所引起。

引發食品變敗和品質降低的微生物可概分為腐敗性微生物(saprophyte)和病原性微生物(pathogen)，前者使食品劣變(spoilage)，後者常引發人的胃腸性障礙。

食品腐敗與腐敗微生物種類和數目成正相關：

1. 污染的種類和程度：污染食品的微生物種類和食品腐敗狀況，會造成微生物的種類和數量的差異。
2. 供給微生物生長的機會：包括食品的種類以及食品儲存的环境條件的影響。
3. 食物預處理的情形：例如食物調理過程以及儲放的环境對微生物的數目多寡有所影響。

(二)肉品中含有豐富且可供微生物利用的營養成分，所以是最易腐敗的食品之一。

1. 肉品腐敗的內在因素：

- (1)在動物體死亡後，因無法合成 ATP，造成肌肉僵硬與腐敗。
- (2)因氧氣供應減少，體內呈厭氧狀態，造成大多數肝醣(glycogen)降解並轉變為乳酸。
- (3)未腐敗的禽畜肉之微生物包括細菌、酵母菌及黴菌，微生物的種類與屠宰及加工環境有關，其中以革蘭氏陰性菌為主，陽性菌則以腸球菌為主。
- (4)魚貝類較家禽類易腐敗，其主因為：(1)魚貝類的肌肉構造簡單，(2)組織較脆弱，(3)水分含量較高，(4)魚體死後的 pH 值(5.5~6.5)較禽肉高(5.3~5.7)，(5)魚體之天然免疫物質少，(6)含較多的不飽和油脂，易生氧化敗壞，(7)魚肉含較多酵素，易自行分解。
- (5)新鮮冰藏魚類之腐敗主要由細菌所造成，而鹽醃魚及乾製魚則可能由真菌造成。魚類腐敗之微生物主要為非產孢子性之革蘭氏陰性菌，例如：*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Moraxella*。淡水魚和海水魚之腐敗現象相同，但微生物種類不同。
- (6)蝦蟹貝類的腐敗：蝦蟹貝類和魚類組成不同，主要是含有 0.5% 碳水化合物，蝦類的游離胺基酸含量比魚類高，細胞自溶酵素含量也較高，故其蛋白質會迅速被分解。許多新鮮魚類中存在的微生物亦存於甲殼類中，例如：*Pseudomonas*、不動桿菌屬(*Acinetobacter*)、莫拉克斯氏桿菌屬(*Moraxella*)及酵母菌為主要腐敗菌，其腐敗現象也與魚類相似。
- (7)其他影響腐敗微生物生長的內在因子：(1)氫離子濃度(2)水活性(3)相對濕度(4)滲透壓(5)氧化還原電位(6)食品營養成分(7)天然抗菌成分(8)食品的生物結構

2. 肉品腐敗的外在因素：

- (1)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及腸桿菌科等肉品內部而來的細菌為主；
- (2)新鮮禽畜肉中微生物污染的主要來源有：
 - ①切割刀
 - ②動物毛皮隱蔽處
 - ③腸胃道
 - ④調理者手部
 - ⑤食品盛裝容器
 - ⑥調理與儲藏環境
 - ⑦動物淋巴結。
- (3)新鮮肉品中所含微生物種類較腐敗肉中多，此與腐敗菌的外在因子有關，例如：食品儲存溫度、食品儲存環境的相對濕度、食品儲存環境氣體狀態、食品添加物的使用、其他微生物及其活性、拮抗作用與共生作用等。

(4)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：

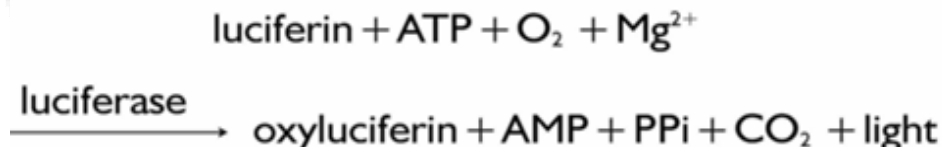
- ①碎肉經過較多的人為操作過程；
 - ②絞肉表面積較大，使肉品表面的能量增加；
 - ③因表面積增加，使好氧菌易於生長；
 - ④絞肉過程中使用的機械、切刀及儲存容器通常不清潔，微生物易污染肉品。
- (5)法蘭克福香腸等煙燻加工肉品中主要的腐敗菌以細菌和酵母菌為主，此類產品的腐敗現象有三種，包括表面黏液、變酸及變綠。

五、請說明 ATP 光度測定法（ATP photometry）之原理、分析流程及其可能產生之問題（20 分）

【擬答】命中特區：102(春) 食品微生物學 3A, page 27-29

(一)原理：ATP 測定法是屬於生物化學方法，因 ATP 是所有生物的主要能量儲存形式，同種細菌細胞內的 ATP 含量大致相同，細菌細胞內的 ATP 含量約為 10^{-18} ~ 10^{-17} mol/cell。另一方面，ATP 會在細胞死亡後二小時內降解消失。因此，藉由檢測樣品中的 ATP 含量，可大致估算出樣品中的總生菌數。故此法具有快速及操作簡便的優點。

(二)分析流程：利用螢火蟲的螢光素(luciferin)－螢光素酶(luciferase)複合物反應系統來檢測 ATP。在鎂離子與氧的參與下，當 ATP 存在時，螢光素會被螢光素酶催化而產生螢，此螢光與螢火蟲尾端所發出的光相同，利用冷光儀(luminometer)可測量螢光，並以相對光單位(relative light unit；RLU)表示螢光的強弱，而螢光強度與 ATP 含量成正比，ATP 的含量愈多，產生的螢光愈強。因每種微生物細胞所含的 ATP 量為恆定，所以，可間接計算出樣品的總生菌數。由於此法牽涉到螢光的產生，故又稱為 ATP 生物冷光法(ATP bioluminescence method)，其反應式如下：



(三)應用限制：可能產生的問題

ATP 測定法的靈敏度可高達 10^{-18} ~ 10^{-17} mol/l，相當於菌數濃度 103 CFU/ml，目前已應用於儀器設備表面污染及雞、豬、牛等屠體的微生物污染檢測上。而在食品工廠的品管方面，由於此法的檢測時間均可於數分鐘至數十分鐘內完成，大幅降低了產品出廠時間及倉儲壓力。但此法最大的缺點為易受檢測物中非微生物來源之 ATP 及螢光物質的干擾，例如：某些水產品本身就具有會產生螢光的物質，而易導致檢測結果菌數偏高的情形發生。