


大學叢書

食品微生物學實驗

陳駒聲著

商務印書館

大學叢書



食品微生物學實驗

陳胸聲著

商務印書館

食品微生物學實驗內容提要

本書分為上下兩篇。上篇敘述食品的微生物概要，以水、乳、罐頭、魚、肉、蔬菜、水果、糖、蜜以及中國食品，如四川泡菜、醬油、醋、餛飩等，最為注意。下篇為二十二種實驗，着重工業及衛生方面的檢查技術。可供作大學一學期的實驗課程，亦適於一般從事食品工業及衛生工作者的參考應用。

大 學 叢 書
食 品 微 生 物 學 實 驗
陳 貽 鑒 著

★版權所有★

商 務 印 書 館 出 版

上海河南中路二一四號

中 國 圖 書 發 行 公 司 發 行

商 務 印 書 館 上 海 廠 印 刷

⊙(68624)

1963年6月初版 版面字數73,000

印數1—1,800 定價¥7,500

上海市書刊出版業營業許可證出○二五號

自序

水、乳以至一切食物，都是人類生活日常所接觸的。這等食品沾染有害微生物，對於健康問題，是有妨礙的。所以研究食品微生物的重要性，在任何微生物之上。

我國釀造發明甚早，所用方法多藉天然發酵，其中所含微生物，或為有害，或為有益。倘能加以選擇，不但可以增進健康，且對於舊式釀造方法的改良，也有很大的幫助。國內從事此種研究的人，實在不多，有提倡的必要。

著者由於上述的理由，編述此書，所涉範圍，頗為廣泛。第一編概論，簡略介紹食品微生物學的重要性和實驗的原理。第二編實驗，包括了水、乳等二十四種重要食品的檢查方法。對於國康品，尤為注意。在此大力倡導安全衛生，配合全國大規模建設的時候，本書的出版，對於社會，或有些微的貢獻。

再我著「實用微生物學實驗」「釀造學實驗」兩書，與本書有密切的連繫，可供參考，附此介紹。

一九五三年三月 陳駒馨謹識

目 錄

第一編 概論

第一章 水的微生物	1
第一節 概說	1
第二節 大腸菌屬和產氣菌屬與衛生的關係	2
第三節 水的微生物檢查概要	3
第四節 糞型與非糞型的辨認法	6
第二章 乳的微生物	8
第一節 乳的成分	8
第二節 乳色	8
第三節 乳的正常發酵	9
第四節 乳的耐藏性和溫度的關係	10
第五節 由乳而傳播的傳染病	10
第六節 乳的巴斯德消毒	12
第七節 牛乳的分級	12
第八節 磷釐酶試驗法	13
第九節 還原酶試驗法	14
第十節 平面培養法與直接鏡檢法的比較	14
第十一節 黏性乳	15
第十二節 怒濤發酵	16
第十三節 墨色牛乳	16
第十四節 白脫油	17
第十五節 冰淇淋	19
第十六節 發酵乳	19
第三章 糖的微生物	21
第一節 蔗汁中微生物的分類	21
第二節 粗糖製造各步驟所含微生物的數目	22
第三節 精製糖的耐熱性細菌	23
第四章 普通食品的微生物	24
第一節 普通食物的微生物概說	24
第二節 食物的貯藏	26
第五章 空氣的微生物	33
第一節 概說	33
第二節 空氣中微生物的收集及測定	34
第三節 空氣的滅菌法	37

第二編 實驗法

第一章 水的微生物實驗法	39
實驗一 水的微生物檢查	39
實驗二 水的澄清及消毒	46
第二章 牛乳的微生物實驗法	50
實驗三 牛乳的細菌檢查	50
實驗四 牛乳變異的試驗	54
第三章 白脫油的微生物實驗法	58
實驗五 白脫油的細菌檢查	58
實驗六 白脫油的酵母和黴菌檢查	59
第四章 糖及麵粉微生物實驗法	60
實驗七 糖的微生物檢查	60
實驗八 麵粉的微生物檢查	62
實驗九 黏性麵包實驗法	68
實驗十 饅頭及窩窩頭的微生物檢查	66
第五章 罐頭食品的微生物實驗法	68
實驗十一 罐頭食品的微生物檢查	68
實驗十二 敗壞罐頭食品的微生物檢查	70
第六章 水果蔬菜的微生物實驗法	72
實驗十三 水果的微生物檢查	72
實驗十四 蕃茄的微生物檢查	73
實驗十五 白菜的微生物檢查	75
實驗十六 乾果的微生物檢查	77
實驗十七 蔬菜的微生物檢查	79
實驗十八 四川泡菜的微生物檢查	80
第七章 肉類的微生物實驗法	84
實驗十九 肉類的微生物檢查	84
實驗二十 肉毒素檢查	85
第八章 蛋的微生物實驗法	87
實驗二十一 鮮蛋和冷藏蛋的微生物檢查	87
實驗二十二 細菌及黴菌對於蛋殼的滲透性	88
第九章 醬、醬油及醋的微生物實驗法	91
實驗二十三 生醬醬、醬油及醬菜的微生物檢查	91
實驗二十四 醋的微生物檢查	94

食品微生物學實驗

第一編 概論

第一章 水的微生物

第一節 概說

飲料用水很容易沾染溝水中所含的腸道病原菌，但這等細菌加熱至 70°C ，維持 10—15 分鐘，就會死滅；或者，加氯或其他消毒劑，也有同樣效力。我國從古以來，就懂得飲用水必須煮沸，所以不至於因飲水而生傳染病。

行軍或長途旅行，要把飲用的水煮沸，很不方便，可用漂白粉 (CaOCl_2) 片或二氯氨基苯甲磺酸 (*p*-sulphone-di-chloroamino-benzoic acid) 片，使其消毒。每公升用新鮮漂白粉 0.8 公絲，作用一小時，或用二氯氨基苯甲磺酸 8 公絲，作用 30 分鐘，就可飲用了。

我國土井往往受溝水的污染，如圖 1。乃普通土井被地面污水污染的情形。這種土井的水，有時含有傷寒桿菌，實有改良的必要。如

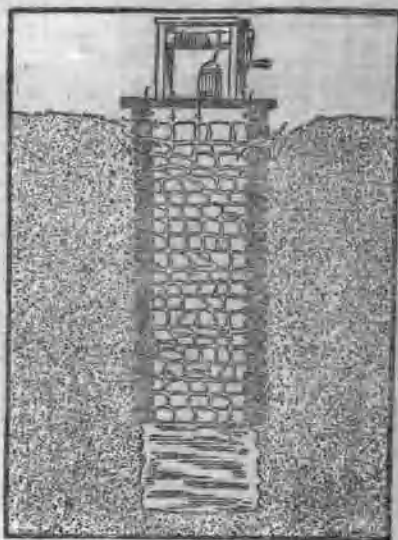


圖 1 土井

圖 2. 乃改良式井, 可以避免地面污水的沾染, 但也應遠離溝道。

大規模自來水工程, 乃將江、河的水, 先加硫酸鋁或硫酸亞鐵和石灰的混合物, 靜置數小時或數日, 使水中污物全部沈澱以後, 過濾, 再用氯氣處理, 即可應用。

第二節 大腸菌屬和產氣菌屬與衛生的關係

傷寒桿菌乃寄生存於人的糞尿中, 故污染糞尿的食物、牛乳或水, 可以傳播傷寒病。人口稠密的地方, 井水等或不免有糞的污染。

完全健康的人或有傷寒菌寄生於其腸道或尿道, 且可排泄體外, 而污染其所接觸的食物等。

水中傷寒菌好像不難檢出, 但實際上有種種困難, 例如, 傷寒桿菌在天然水中, 因為自由生存的死物寄生菌如 *Pseudomonas aeruginosa* 及海洋浮游生物的相殘作用, 所以經過一個月後, 就會死亡, 並且水流中含有傷寒菌的數量甚少, 分離手續很不容易。通常只要檢驗水中是否有任何一種糞的細菌, 即可決定其適用與否。

糞的細菌以大腸菌 (*Escherichia coli*) 最佔優勢, 如水中含有一個傷寒桿菌, 同時就有數百萬的大腸菌。所以檢定

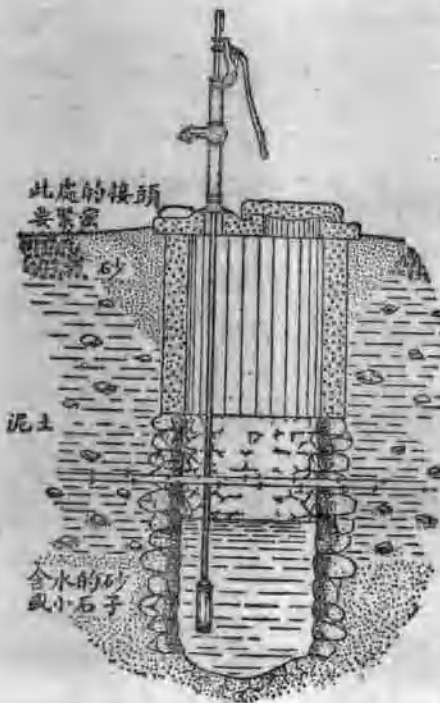


圖 2 改良式井

水中是否含有大腸菌，就可決定水的適用性。

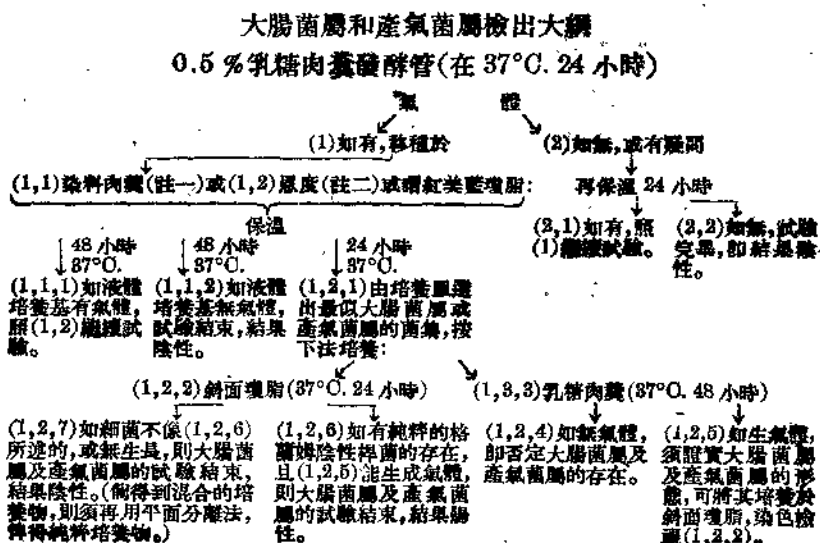
測定大腸菌的存在與否，可以利用此菌發酵乳糖時，生成氣體的性質。但是產氣菌屬 (*Aerobacter*) 和 *Esch. freundii*，也可於發酵乳糖時，生成氣體，所以這三種細菌，也要加以區別。因為大腸菌是明確的腸內細菌，而產氣菌屬和 *Esch. freundii* 則常發現於土壤中。

自來水及汽水，每 c.c. 中含細菌不得超過 100 個，每 100 c.c. 中不得發現大腸菌 (以上均在 37°C. 24 小時)。

第三節 水的微生物檢查概要

水的微生物檢查，以分離大腸產氣菌為主要。大腸產氣菌又分為糞型 (即大腸菌) 和非糞型 (*Escherichia freundii* 和產氣菌屬)。含有此兩型細菌的水，不能充作飲料。至於糞型和非糞型的辨識方法，至今仍然在辯論之中。

標準的水的檢查法如下圖：



簡單言之，將待試的水，移種於盛有 0.5% 乳糖的肉羹的試管中，如有氣體的生成，便可為大腸菌存在的初步證明。

但是產氣菌屬、他種微生物例如 *Clostridium perfringens*、酵母、以及兩種微生物的共同作用，均可由乳糖生成氣體。為證明大腸菌的存在起見，第二步可將乳糖肉羹培養物直接移植於光綠乳糖膽汁肉羹，如在此液培養基中培養以後，產生氣體，即為含有大腸型細菌有力的證體。因為大多數他種細菌可被光綠染料所遏止的緣故。此培養物如用曙紅美藍瓊脂培養基作劃線培養（閱實驗 1），可以養到更有力的證明。

曙紅美藍培養基的特點有三：（1）乳糖易被大腸型細菌所發酵或體化；（2）含有曙紅和美藍，可以防止大腸型以外的細菌生長；（3）因養於乳糖有微酵力的大腸產氣菌，可使乳糖酸化，因此瓊脂內的染料（菌集的內部及四周）變為顯明的紅色、黃色或紫色，所以易於識別。

將曙紅美藍瓊脂培養皿上的菌集抽出，再移植於乳糖肉羹中，養以證明其乳糖發酵的性質。另種一管瓊脂斜面培養基，用以檢視形態，並施行染色試驗。如為格蘭姆陰性，不生孢子的桿菌，則除大腸產氣菌外，不可能再為他種細菌，因他種細菌在上述情形下，是無法生存的。

上述試驗為決定性試驗，即所做現的細菌或為大腸菌腸，或為產氣菌屬，這兩屬倘欲分別，必須另行試驗。

（註一）選擇性染料肉羹內，含有某種染料，可以遏止大腸產氣菌以外細菌的生長。例如光綠乳糖膽汁肉羹（brilliant green lactose bile broth）、結晶某肉羹、復紅乳糖肉羹等。茲述光綠乳糖膽汁肉羹的配製法如次：

將 10 公分消化蛋白及 10 公分乳糖溶化於不超過 500 c.c. 的蒸餾水中。

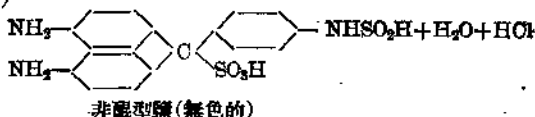
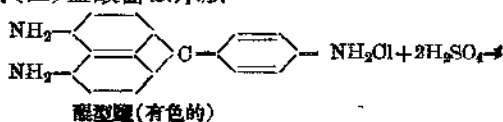
將 200 c.c. 鮮牛膽汁或 20 公分無水牛膽汁，溶化於 200 c.c. 蒸餾水(溶化後 pH 7.0—7.3)，傾於上述溶液中，用蒸餾水對成約 975 c.c.，調節 pH 值為 7.4。

添加 13.3 c.c. 1% 的光綠溶液後，再用蒸餾水對成 1000 c.c.，按常法裝管並滅菌，滅菌後 pH 應為 7.1，而不可超過 pH 7.4。

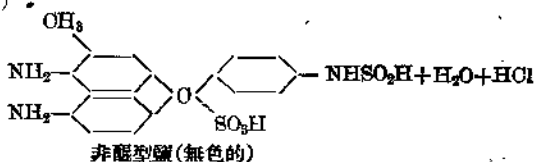
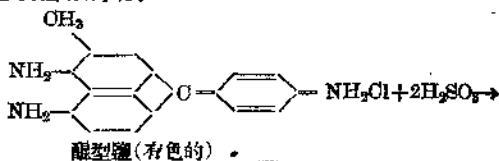
(註二)恩度瓊脂培養基係 1904 年恩度(Endo)氏所首創。此培養基含有已被亞硫酸鈉脫色的檢復紅。當乳糖發酵時生成乙醛。此乙醛可與脫色的化合物內的亞硫酸鹽或亞硫酸相作用而生加成物，因此染料遂由脫色的化合物游離而出，其結果紅色可以恢復。

檢復紅大部份含有對(位)薔薇苯胺(*p*-rosaniline)和鹽酸薔薇苯胺(rosaniline hydrochloride)的混合物，當添加亞硫酸鹽時，這些化合物即被脫色。其反應如次：

對(位)鹽酸薔薇苯胺：



鹽酸薔薇苯胺：



第四節 糞型與非糞型的辨識法

大腸菌屬於糞型，產氣桿菌屬於非糞型，*Escherichia freundii* 為中間型。這些細菌辨識方法如次：

糞型與非糞型的辨識

	吲哚	甲基紅試驗	Voges Proskauer 反應	檸檬酸鹽的利用	氣體比例 (CO ₂ /H ₂)
大腸菌	+	+	-	-	1:1 或 CO ₂ : <H ₂
<i>Escherichia freundii</i> (中間型)	-	+	-	+	1:1 或 CO ₂ : <H ₂
產氣菌	-	-	+	+	2:1 或 CO ₂ : >H ₂

(I) 吲哚的生成 詳「實用微生物學實驗」實驗 35。大腸菌可以生成吲哚，而其他二種則不然。

(II) 甲基紅試驗 (Clark 及 Lubs 反應) 大腸菌屬及產氣菌屬發酵葡萄糖時，均能生成酸及氣體。大腸菌屬培養物在數日內，保持強酸性，如將甲基紅 (一種酸及鹼的指示劑) 加入已經保溫 4—5 日之培養物，則呈顯明的紅色，此為陽性的甲基紅試驗。反之，產氣菌屬可以分解葡萄糖發酵時所生之酸，在 4—5 日後，變為碳酸鹽或其他鹼物質，此時培養基呈中性或鹼性反應，故如添加甲基紅，則呈黃色 (即顯示相當的鹼度)，此為陰性甲基紅試驗。

(III) 醋嗪反應 (Voges Proskauer 反應) 當產氣菌屬及數種其他微生物 (例如靈菌 *Serratia marcescens*) 發酵葡萄糖時，不但生成酸及氣體，且生一種化合物，名曰醋嗪 (acetoin) 或乙酰基甲基代甲醇 (acetyl-methyl-carbinol)。試驗的方法，乃添加氫氧化鈉濃溶液於培養物中，善為通氣，此時醋嗪因氧化作用，變為聯乙酰基 (diacetyl)，後者可與消化蛋白化合，而呈赭色、桃紅色或紅色，此為陰性的醋嗪反應。大腸菌屬永不生成醋嗪。

應用此法至為迅速而且簡便。將多量培養的幼細菌種入葡萄糖肉羹中，在數小時以內，所生的醋噴，就可呈明顯的反應，而不必等候數日之久。

(IV) 檸檬酸鹽的利用 這試驗乃應用簡單的礦物質溶液（以檸檬酸鹽為唯一的碳素源）為培養基移植培養物，觀察其繁殖（或混濁）與否。當培養物由瓊脂培養基移於上述檸檬鹽溶液時，必須避免瓊脂培養基內所含消化蛋白的沾染，否則試驗用溶液，不免混濁，試驗結果便不正確。

(V) 氣體比例 右旋糖可被大腸菌屬及產氣菌屬所分解，但兩屬細菌的產物，有顯著的差異。當右旋糖被大腸菌屬發酵時生成酸和兩種氣體，即氫和二氧化碳。二氧化碳的容量，永遠不超過氫的容量，後者常有過量的存在。產氣菌屬生成同樣的氣體，但其比例相反，即二氧化碳在混合物中常佔優勢。

如圖 3 表示在 Durham 管中的葡萄糖肉羹的氣體比例的測定。

A. 任何大腸型細菌在 37°C . 24 小時後氣體混合物的全容量，X 表示在添加 NaOH 前的內管的液高；B. 產氣菌屬在添加 NaOH 後液體由 X 升至 X' ，即表示 CO_2 被 NaOH 吸收後的容量。 CO_2 與未吸收氣體(H)的比例，約為 $\frac{\text{CO}_2}{\text{H}} = \frac{2}{1}$ ；C. 大腸菌屬在添加 NaOH 於管中後，其中氣體比例，約為 $\frac{\text{CO}_2}{\text{H}} = \frac{1}{2}$ 或 $\frac{1}{2}$ 。

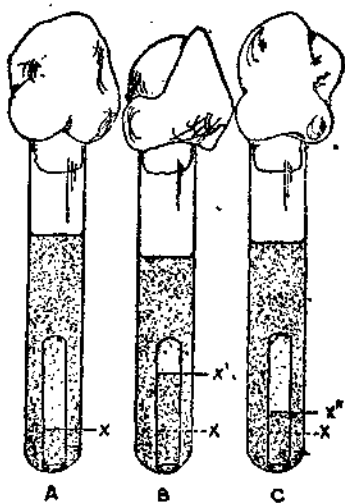


圖 3. 在 Durham 管中測葡萄糖肉羹的氣體比例

第二章 乳的微生物

第一節 乳的成分

乳乃哺乳動物的乳腺分泌物之一種，是天然界造成的最圓滿的單獨食品。乳的成分，依其溶解度可分為下列三類：

I. 在真正溶液中的成分：

- | | |
|--------|-----------------------|
| 1. 乳糖 | 5. 氯 |
| 2. 檸檬酸 | 6. 維他命 B ₁ |
| 3. 鉀 | 7. 維他命 G |
| 4. 鈉 | 8. 維他命 C. |

II. 一半在溶液中，又一半在懸浮液或膠體溶液中的成分：

- | | |
|----------|------|
| 1. 蛋白質 | 3. 鈣 |
| 2. 無機磷酸鹽 | 4. 鎂 |

III. 完全在懸浮液或膠體溶液中的成分：

- | | |
|-------|-----------|
| 1. 脂肪 | 3. 維他命 A |
| 2. 酪素 | 4. 維他命 D. |

第二節 乳色

乳中含有黃色色素名曰胡蘿蔔色素 (carotene)。胡蘿蔔色素至少有三種同分異構體，即 α , β 和 γ 三種。其他色素名曰 cryptoxanthin，乃在黃色玉蜀黍中所發現的，與胡蘿蔔色素有關係。這些色素，均為維他命 A 的前身物。一分子的 β -胡蘿蔔色素可以生成兩分子的維他命 A。每分子的 α 胡蘿蔔色素或 γ 胡蘿蔔色素，祇各能生成一分子的維他命 A。

乾草、青草、青菜、某種果實、胡蘿蔔等等含有胡蘿蔔色素。牛乳的胡蘿蔔色素含量，依飼料的胡蘿蔔色素含量而定。胡蘿蔔色素並非全部變為維他命 A。當母牛食了含有胡蘿蔔色素的食物時，一部分色素變為無色的維他命 A，一部分不生變化，仍是黃色，而存於乳中。

第三節 乳的正常發酵

通常乳的 pH 值略呈酸性，自約 6.3 至 7.2，平均約 6.75。

將乳置於尋常溫度下，乳中乳糖先因水解作用，而變為葡萄糖和半乳糖 (galactose)。這些已糖，再發酵而成乳酸。當酸量達 pH 6.0 時，覺出酸味。如生酸作用繼續進行，pH 值達 4.78—4.64 時，酪素開始沈澱。酸度繼續增高，直至此酸度可以阻礙細菌的生長為度。生成的乳酸可以阻止大多數細菌的生長，實際上這乳酸可當作乳的防腐劑。不過黴菌和酵母菌可以生長於酸乳中，同時消耗乳中所含的酸，等到酸被消耗以後，腐敗菌便逞其作用，使乳中蛋白質分解。通常需要經過數星期後，開始腐敗。倘將乳盛於淺盤內，則酸的消耗較速，腐敗亦較速。

使正常乳發酵的細菌，名曰乳鏈球菌 (*Streptococcus lactis*)。乳鏈球菌有數變種，對於發酵乳的氣味和性質，酸的生成速度，石蕊的還原速度和其他性質各不相同。

乳鏈球菌不發現於母牛的奶房，而牛糞則常有此菌的存在，故牛乳或因沾染牛糞，故含有此菌。植物中常含乳鏈球菌，動物食植物後，植物中一部分乳鏈菌依然存在，所以跟着動物糞而排出。

乳鏈菌為格蘭姆陽性，成雙短鏈或長鏈。此菌球形，有時依鏈的方向而略延長。可以生成右乳酸，而不生成氣體。有數系不能發酵乳糖。在肉羹培養基中，最後 pH 值降至 4.0—4.8。此菌在 pH 9.2 可以生長，而在 pH 9.5 不能生長。在 10°C. 或以下和 40°C. 可以生長，但在

45°C. 不能生長。其最適溫度為 30°C.。在乳生成凝塊前，石蕊可以完全被還原。

第四節 乳的耐藏性和溫度的關係

I. 乳在冰點以下(-0.55°C.)，全部凍結，所以微生物無從獲得營養料而不能繁殖。如此處理的乳，細菌含量可以減少。倘將乳逐漸冰凍，則酪素漸成沈澱，脂肪的乳濁液亦被破壞。縱將此凍乳置於室溫下，使其解凍，亦不能恢復正常的稠度，尤以長久凍結的乳為甚。

II. 生乳在 70°C. 下消毒以後，在 0—5°C. 放置 24 小時，則平面培養所得細菌數目減少。經過一星期後，細菌數目較原始的生乳的細菌數目尤多，此後繼續增多。這等細菌或能生酸，或為中性型，或具強力的蛋白質分解力。最後乳中蛋白質腐敗，同時生成有毒的廢物，對人體有害。通常牛乳在 10°C. 的貯存時間不能超過 10 日，其原因就在此。

III. 乳在 10°C. 以下甚少凝結，在 10°C. 以上，則因凝乳酶和生酸細菌共同作用，在數日內即行凝結。在 20°C. 時，鏈球菌約佔細菌全部百分之九十，更容易使乳凝結。在 20°C. 以上，桿菌佔優勢，生成更多的酸。在這溫度下，厭氣性酪酸菌也能繁殖。

需氣性細菌生長於乳的表面，而厭氣性細菌和乳鏈球菌則生長於乳的底部，所以乳當自然凝結時，常自下部開始，漸達於上部。

第五節 由乳而傳播的傳染病

乳為多種細菌的最優良培養基。病菌和死物寄生菌不但可在乳中生活相當時間，同時也能繁殖，所以純淨的乳，不但不易得到，且不易保存其純淨狀態。如何防止由乳而傳播的病，實為公共衛生最宜注意的問題。

由乳分出的病菌，或來自牛，或來自人，茲分述如次：

I. 以牛為來源的病菌 乳中以牛為來源的病菌，包括(1)結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*)，(2) *Streptococcus agalactiae*，(3) *Brucella abortus*。

母牛常發現結核桿菌。此種結核桿菌與使人生肺病的結核桿菌，極為相似，成年人不易感染，而兒童(尤其五歲以下者)飲乳後則有被感染的危險。母牛奶房如有此菌，則無法避免。如肺部有此菌，則因牛不知吐痰，祇知吞嚥，所以牛糞內常發現此菌。牛乳因污染牛糞，就含有此菌。此菌能否在乳中繁殖，固屬疑問，但在乳中保持其毒力的時間，相當長久。

Streptococcus agalactiae 乃發現於被傳染的奶房。為母牛的原因。如乳房炎嚴重，則乳中發現膿血，所以乳中含有多數細菌且有血者，即不宜飲用。

Brucella abortus 常發現於牛乳中，可使母牛發生傳染性的流產，對驢、羊、兔和豚鼠亦然。病山羊所發現 *B. melitensis*，豬所發現的 *B. suis*，都具同 *Brucella abortus* 相似的性質。

以上三種細菌均為人類的病菌，可生一種病，名曰馬耳他 (Malta) 熱。

馬耳他熱乃地中海馬耳他島人飲被傳染的山羊乳所發現的病。其病原菌首先由 Bruce 氏自患馬耳他熱的死人脾中分離而得，故又名布氏桿菌病 (*brucellosis*)。此菌可用加熱法殺滅，所以飲用消毒乳較為安全。

II. 以人為來源的病 乳中因人而傳播的疾病，有 1. 傷寒；2. 猩紅熱；3. 白喉病；4. 嬰兒的痢病；5. 嬰兒的麻痺等病。當擠乳時，患病工作者的咳嗽、噴嚏、談話或唾沫如濺於乳中，就有這危險。