

工農技術人員手冊

釀造微生物手冊

程學達編著

中華書局出版

本書內容提要

釀造工業是我國目前的重要工業，作者爲便利從事該業者日常參考，並作進一步的研究起見，以多年實際經驗和研究成果，編成本書。內容關於釀造微生物的種類、形態、繁殖、分離、培養、生理特性和發酵力的測定等，均有詳細的說明，最後並述及釀造微生物的保藏方法。

釀造微生物手冊

目 錄

第一章 微生物的發見和釀造理論.....	3—17
第一節 微生物的發見.....	4
第二節 釀造的理論.....	7
第三節 釀造工業與微生物的關係.....	9
第二章 釀造微生物的種類.....	17—50
第一節 細菌分類法.....	19
第二節 酵母菌的種類.....	32
第三節 絲狀菌的種類.....	42
第三章 形態和繁殖方法.....	50—70
第一節 細菌的形態和繁殖方法.....	51
第二節 酵母菌的形態和繁殖方法.....	57
第三節 絲狀菌的形態和繁殖方法.....	62
第四章 採集和培養方法.....	70—88
第一節 準備工作.....	71
第二節 採集方法.....	82
第三節 分離培養.....	85

第五章	生理的特徵和它的試驗方法	88—100
第一節	細菌生理特徵和它的試驗法	89
第二節	酵母菌的生理和它的發酵力試驗法	93
第三節	絲狀菌生理特徵的試驗法	96
第四節	發酵試驗法	98
第六章	檢查和保藏方法	100—115
第一節	發酵微生物的檢查	100
第二節	發酵微生物的保藏法	113

釀造微生物手冊

第一章 微生物的發見和釀造理論

釀造的歷史，是很悠久了，尤以釀酒造醬的方法，遠在數千年以前，就已被人們所發明。我國在夏禹的時代，酒的釀製，已經是很普遍的流行於各地。戰國策曾有這樣的記載：“儀狄作酒，禹飲而甘之曰：「後世必有以酒亡其國者」，隨疏狄而絕酒旨”。醬的釀造，發明也很早，論語和齊民要術以及其他的古書上，都有釀醬的記載，在齊民要術上並述明了麥醬的釀製方法，證明了配量和釀製的程序，因此可以證明：釀造技術，是我國創始最早。日本造醬的方法，是由我國傳入的，根據日本人深井冬史的考計：“宋醬（即味噌）始於文武天皇之朝，傳自唐僧灌智”。至於歐西的釀造史，以釀製飲料酒類的歷史，較為悠久；古代希臘、埃及已能製造麥酒及葡萄酒。

人類對於釀造技術的施用雖然很悠久，但是釀造理論的認識和了解，是在微生物發見以後；換句話說：自微生物發見和研究進步的結果，闡明了釀造的理論；另一方面，由

於化學的進步和其他有關科學如生物學、物理學的昌明，逐步幫助說明了釀造呈顯的複雜變化，並擴充了釀造的領域，增加了釀造品的種類。

各種釀造過程中的變化，都是由於各種微生物的發酵作用而引起的化學變化；當時科學知識幼稚，微生物沒有發見，基本上是不能了解這一點；所以釀造的方法，也是無法改進的。爲了要提高釀造的技術，關於微生物的發見和發酵理論的認識，以及有關釀造的各種微生物的生理、形態、分離和試驗的方法，是不能不研究的。

第一篇 微生物的發見

微生物是微小的生物，必須用顯微鏡才能觀察清楚；所以微生物的發見，當在顯微鏡發明以後。顯微鏡的創製，是1590年荷蘭人Hans及Z. Janssen父子二人所首創，他們曾組合數個鏡片，以觀測微小的物件，但是它的構造，並不很好；後來經過荷蘭人A. van Leeuwenhoek (1632—1723) 的改進，擴大了透視的倍數，製得150倍的透鏡；並利用這種顯微鏡，觀測各種溶液中的微小的物體，發表了報告，說明血球、精蟲、原生動物和微生物的形態；但所發表的圖表，大部份是混合的微生物體，並不知道怎樣的分離和培養，更沒有講到微生物的增殖與物質代謝的關係。所以一般科學家，都還

以爲發酵係自然發生的。在1745年，英國牧師 Needham 首先以試驗證明自然發生的學說，他將肉和肉汁盛於有塞瓶中，煮沸，靜置一個時期，瓶裏的肉汁發酵腐敗了，因此他認爲：肉汁既經煮沸後殺滅了卵，而仍舊能發生微生物引起腐敗現象，這樣可以證明是自然發生的。此後約兩年，意大利人 A. Spallanzani 曾提出異議，反對自然發生學說，並說明 Needham 瓶所以腐敗的原因，是由於進入瓶中的空氣，未經火熱殺菌的緣故。當時的科學工作者仍舊不以爲然。到了1836年 F. Schulze 曾注意空氣中微生物的存在，用一個附有木栓的玻璃瓶，內貯蒸餾水，並於水中混入各種動物或植物汁液，瓶塞上有二個導氣玻璃管，而後將燒瓶置於沙浴上加熱至瓶中溶液沸騰，二端的導氣管可見蒸氣噴出的時候，卽各接以吸收碳酸氣的曲形玻璃管，一貯濃硫酸，一盛氫氧化鉀溶液，待冷卻以後，將此裝置放在窗櫺，每日用口吸氫氧化鉀吸收曲形管，使空氣經濃硫酸曲形管而吸入瓶中，這樣經過三個月，瓶中溶液並不腐敗；這是因爲進到瓶內的空氣，已經沒有微生物的存在，無由再引起酸醱腐敗的現象。但是將二個吸收曲形玻璃管去掉的時候，讓空氣進入，立卽可以引起腐敗的現象。此後約三年，有 T. Schwann，他也是反對自然發生學說，並將 F. Schulze 的試驗裝置，稍加改良；以金屬管代替玻璃管，但進入瓶中的空氣經過加熱殺菌，以除

去空氣中的微生物，所得的結論和 F. Schulze 是相同的。由於 T. Schwann 的試驗，創始了加熱消毒滅菌的科學方法。到了 1835 年 H. Schroder 和 Th. V. Dusch. 兩人，更進步的改變了 F. Schulze 的試驗裝置，使空氣經過裝棉花的玻璃管而進入瓶中，這樣瓶中的溶液即不至酸酵。由此可以證明了：經過棉花濾過的空氣也沒有使溶液分解（無生物生存）的能力。到了 1860 年法國大科學家 L. Pasteur 應巴黎科學院的獎題“試用適當實驗闡明自然發生問題”而從事多次試驗的結果，於 1862 年報告研究經過，歸納他的論文要點：任何物質加熱至相當時間及溫度都可使它滅菌；滅菌以後不復分解，假如外界空氣不進入，就不會變質。L. Pasteur 並舉行了接種試驗，消毒物質如經過微生物的接種，那麼就很容易旺盛繁殖。L. Pasteur 曾經製了一種微生物培養瓶，後人稱它為 Pasteur 瓶。瓶有兩個管，一個管彎長如鵝頸狀，另外一個是側管，以便用為接種；側管在接種前後皆密塞，彎管備微生物作用時所生成氣體的逸去，但空氣中的微生物沉着在彎曲處，不能進入。自從 L. Pasteur 研究總結報告以後，自然發生學說，基本上被推翻，無人置信了。同時對於微生物的發生和微生物能引起物質的酸酵或變敗的現象，已明確的被人們所了解。但是微生物何以能使物質酸酵的理論，還沒有確立。

第二節 釀造的理論

各種的釀造，主要的是經過醱酵作用；但是微生物怎樣的能引起醱酵作用？也是經過科學家長時期的研究，才獲得了正確的解答。1691年 G. E. Stahl 認為醱酵現象的發生，是由分子或物質周圍的媒介物，受到了某種力量的攻擊時，分子因而破裂，並且將此擊力遞傳到其他分子，結果使一部分的分子，被迫的由溶液而出；但是此種現象究竟如何開始，當時無法解釋。在1803年間，Fabroni 和 Thenard 都認為糖液的醱酵，是與微生物的存在有關係，Fabroni 曾發見醱酵溶液的沉澱中，含有蛋白性質的細胞。在 1810 年的時候，法國科學家 Appert 發明了罐頭製造法，並經化學家 Gay-Lussac 的研究，認為空氣是醱酵所必需的物質，說明了製罐法的原因。到了 1836 年，德國科學家 T. Schwann、F. Kützing 和法國科學家 C. Cagniard-Lutour，同時發表了醱酵的研究：T. Schwann 發明了加熱消毒法，並發見啤酒酵母的出芽狀態，認為酵母是植物體。F. Kützing 研究醋酸醱酵，認為醱酵是微生物的生活過程。C. Cagniard-Lutour 說明了啤酒酵母對於糖類溶液作用以後，可以產生碳酸氣和酒精。由於這些滴點的研究總結，確立了生物醱酵學說。到了 1838 年，德國農業化學家 Liebig 發表了有關醱

醇理論的論文，認為醱酵是純粹的化學反應，由於酵母分子的運動，產生了分子運動能力，傳達及於糖的分子，使糖的各原子的組合，失去了它的均勢而起重新的組成，因此就生成酒精和碳酸氣；反對酵母細胞是醱酵所必需，但 L. Pasteur 極力的反對這種理論，並在 1860 年發表論文，說明微生物與醱酵作用具有密切關係，認為任何物質的醱酵，均須有氧氣的存在，以便供給酵母生活所需的能力；同時酵母也有從培養物攝取氧氣的能力。彼此各持一說，互相爭持，極為熱烈，後經德人 M. Traube 以酵素為根據而發表醱酵理論，認為醱酵不是由微生物自身所引起，而是由於酵素所引起；但酵素係微生物活力的生產物，自從 M. Traube 發表了酵素醱酵理論以後，再證之以各國科學家先後於麥芽浸出汁中發見了糖化酵素和在膽汁中發見蛋白質分解酵素，遂奠定了近代酵素醱酵理論的基礎，到了 1897 年，德國科學家 Buchner 發見了酒精酵素，於是酵素醱酵之說，更為確立。Buchner 曾以酵母菌和石英砂共研成細末，使酵母細胞完全破壞以後，放在高壓下榨取它的汁，由此分離一種酵素，有酒精醱酵的能力；這酵母汁並不含生活細胞，但是可以引起酒精醱酵，惟酵素的生成，則是由於酵母的孕育。

根據以上所述的演進，說明了醱酵作用，是由於一種物質——酵素——所引起的化學變化；由於酵素的種類不同，

所引起的醱酵變化也就有了差別。例如酒精酵素能使糖液醱酵而生成酒精，糖化酵素能使澱粉質糖化，蛋白質分解酵素能使蛋白質分解而生成氫基酸類，這都是具體的例證。但是各種酵素的由來，除了由高等生物體內所含有者以外，大部份是微生物活力的生產物。總結的說：醱酵就是利用各種微生物分泌各種不同的酵素，引起的化學變化；釀造也就是利用醱酵作用而達到產製的目的。近代科學進步，各種釀造的過程，已能逐漸的用化學方程式表明它的複雜變化；同時也能用人工的方法，培養純粹優良的微生物用為醱酵，以提高它的生產能力與品質；釀造品的種類，已逐漸的加多，除酒、醬、醋、腐乳以外，還有丁醇、醋酐、乳酸、枸橼酸、甘油、戊醇、丙酸、酪酸、壓片酵母等特種醱製品，以應人類的需要。

第三節 釀造工業與微生物的關係

近代釀造品的種類很多，概括的可以把它分為下面的幾類：

第一項 酒類的釀造

酒精、果酒（如葡萄酒、蘋果酒、梨酒、桑果酒等）、麥酒、乳酒、生薑酒、日本清酒、紹興酒、米酒和各地所產的蒸餾酒，總稱為酒類。酒類釀造的手續，雖然是由於所用原料的

不同而異其方法，但主要的釀製步驟，是先把米、麥或高粱等澱粉料，使它變為糖類，然後再把糖類變為酒精，合稱為酒精發酵。營酒精發酵的最主要菌類是酵母，細菌類有這種作用的很少，絲狀菌雖然沒有產生酒精的能力（少數絲狀菌，能在厭氣的情況，產生少量的酒精），但如 *Aspergillus oryzae* 和 *Mucor rouxii*，可以分泌大量的澱粉水化酵素（*Diastase*），使澱粉糖化，促進酵母菌的酒精發酵作用。

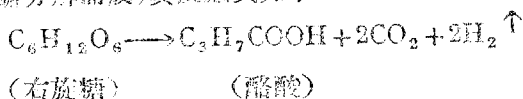
各種酵母對於各種糖類的發酵性並不一定，一般的酵母幾乎完全能發酵右旋糖，多數可以發酵麥芽糖，次多數是蔗糖，少數是能發酵乳糖（酵母常以對於糖類的發酵性做分類的標準）。果酒發酵，如葡萄酒的發酵，在正常狀況下，是由一種 *Saccharomyces ellipsoideus* 酵母；麥酒的釀造，是將已經糖化的麥芽汁，添加純粹的 *Saccharomyces cerevisiae* 酵母，使它營酒精發酵，再經後熟而成；牛乳的酒精發酵，可用含有乳糖酵素的酵母菌；日本清酒，是將米用糖化力強的麴菌 *Aspergillus oryzae*，使米糖化，並加酵母發酵而成；南非洲出產的 *Pombe*，是用粟發芽糖化，再由一種擬酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 發酵而成；*Amylo* 方法製造酒精，是用中國酒藥所分離的 *Mucor rouxii* 和 *Rhizopus japonicus*（絲狀菌），先將澱粉糖化，而後添加酵母使起酒精發酵，再行蒸餾而成酒精；高粱酒、Whisky 酒和溫

以把乳酸菌分爲兩類，一是有害的，一是有益的。前者除生成乳酸外，還能生成氣體，並使蛋白質消化，後者除了生酸以外，差不多沒有其他的化學變化。適當的糖類乳酸發酵，是由一種 *Bacterium lactic acidii* (或是 *Bacillus lactis acidii*) 乳酸菌所作用。據 Buchanan 的實驗，牛乳乳酸發酵醪中尚有鏈球狀的乳酸菌，叫做 *Streptococcus lactis*，可以發酵乳糖，產生 0.5—1.25% 酸；牛乳膠凝結不含氣泡，味香而不析出乳清；反之，如果是大腸菌和 *Bacterium aerogenes* 發酵的話，那麼乳膠分裂而生氣體，並析出乳清，氣味不佳，不適於飲用。酸菜的製造也多是鏈球狀及桿狀的乳酸菌的繁殖而營的乳酸發酵，如果不隔絕空氣，那麼氧化乳酸而使腐敗菌繁殖，成品遭受敗壞。其他如綠豆、玉米、四川泡菜和各地醃漬品，均同此理。酒母醪乳酸發酵的目的，是爲了在醪中發生適量的乳酸，藉以防止有害菌的繁殖，而且一部分蛋白質分解爲較簡單的化合物，適於酵母的生長；酒精工廠所用的純粹乳酸菌是 *Bacillus delbrückii*。

第三項 各種有機酸類的發酵

丙酸、醋酸、酪酸、枸橼酸和草酸等製造的時候，也常用微生物以達產製的目的。丙酸是由細菌(屬於 *Propionibacterium*) 發酵醱類而生成的。醋酸是由醋酸菌(*Mycoderma aceti*) 氧化酒精而成，但醋酸菌的種類很多，酒的種類也很

複雜，因此，醋酸的釀造方法較為複雜。醋酸是在厭氣狀態下，由糖分解而成，其反應式如下：

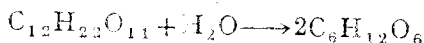


營此種發酵的主要菌類是 *Granulobacter butylicum*。醋酸具有不快的氣味，給食物釀造的影響很大。生成枸橼酸的菌，最有名的是 *Citromyces pfefferianus* 和 *Citromyces glaber*，可由 8% 的糖液生成枸橼酸。枸橼酸是檸檬、柑的主要成分，工業上用途很多。大規模用絲菌製造枸橼酸，由於無法防止其他菌的繁殖，因此還不能與由果實製造者相競爭。又含糖溶液中，由於絲菌如 *Aspergillus niger* 的繁殖發酵，可生得多量的草酸。又某種細菌尤其是 *Aërobacillus*，可以把醣(如澱粉)發酵為丙酮 ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$)，或由厭氣菌如 *Clostridium* 發酵生成丁醇。丙酮和丁醇在工業上用途很大，故此種釀造工業已逐漸的發達。

其他由醣生成的酸類，還有琥珀酸、丁烯二酸 (Fumaric acid) 及癩草酸 (Valerianic acid) 等。但有多數的微生物，尤其絲菌和 *Torulac*，在多量氧氣的下面，可以氧化有機酸為二氧化碳和水。醋的漸失酸味，酸乳和酸菜的乳酸消失，原因都是在此。

第四項 多醣類與脂肪的發酵

纖維、土木香粉 (Inulin)、植物膠質、樹膠和貳糖類 (如乳糖、蔗糖、麥芽糖) 皆可由微生物分泌各種的酵素，把它分解變為更簡單的鹽類。例如：各種細菌和絲狀菌，可以發酵，並利用半纖維 (或纖維素) 變為糖。土木香粉和澱粉可以多數絲狀菌和細菌的水化作用產生各種單糖。植物膠質由細菌或絲狀菌分泌植物膠溶解酵素，把它溶解。亞麻和大麻的浸漬，目的是使受細菌的作用，把纖維間的中層鬆解，然後可以製麻；這種菌類已經純粹培養的是 *Granulobacter pectinovorum*。樹膠可受微生物作用變成醛糖，也有多數細菌和少數的絲狀菌、酵母，在適當培養狀況下，可以合成多量的樹膠或樹膠的類似物。例如：蔗糖廠的粘液發酵，是由於 *Leuconostoc mesenteroides* 生成膠塊。麥芽汁和麥酒，由於 *Bacillus viscosus* 和 *Sarcina viridosa* 等菌類的繁殖，也可發生粘液發酵。甜菜製糖廠有時因 *Bacterium pectinatum* 的發育，生膠性發酵。牛乳的粘性發酵，已記載的細菌有三十多種，其中有六種可以生色素。這些都是微生物合成膠質顯明的例子。貳糖類如乳糖等，可被多種微生物水化為單糖類；酵母菌、絲菌及細菌可生麥芽糖酵素 (Maltase)，分解麥芽糖為二分子的右旋糖，其反應式如下：

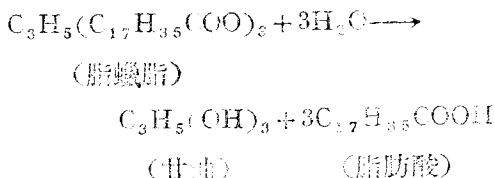


(麥芽糖)

(右旋糖)

有多種的微生物可生蔗糖酵素 (Sucrase) 或轉化酵素 (Invertase), 將蔗糖水化為右旋糖和左旋糖. 較少的微生物可使乳糖發酵, 如酵母菌.

脂肪是脂肪酸的甘油脂, 普通的公式是 $C_3H_5 \cdot R_3$, 式中“R”代表脂肪酸根. 脂肪的發酵分為三步, 一為脂肪水化為甘油和脂肪酸, 以脂蠟脂為例, 其水化反應式如下:



這種變化是由於解脂酵素 (Lipase) 的作用. 多數微生物含有解脂酵素, 尤以細菌和絲狀菌為著. 二為甘油的發酵作用, 甘油發酵, 如由大腸菌作用或分解, 即可產酒精和蟻酸; 如由 *Bacterium orthobutylicum* 作用, 可變甘油為酪酸. 三為脂肪酸的發酵, 即脂肪酸可被多種的絲狀菌和少數的細菌利用氧化為碳酸氫和水分.

第五項 蛋白質的分解

蛋白質及其類似的化合物, 都是複雜有機化合物, 含有碳、氫、氧、氮, 有時含有硫、磷、鐵等元素. 尋常的蛋白質, 其分子很大, 經多次水解以後, 最後產物是氨基酸 (Amino acid). 氨基酸可與食物中的鈉化合為鹽基的鈉, 具有美味,