

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：有機食品研發及廚餘有效利用

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNFS93-02

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

整合型總主持：陳椒華

子計畫一：除臭微生物放線菌之菌種鑑定分析

計畫主持人：陳椒華

子計畫二：有機生機飲食病原菌檢測分析

計畫主持人：王淑珍

執行單位：嘉南藥理科技大學

中華民國 94 年 2 月 24 日

除臭微生物放線菌之菌種鑑定分析

計畫編號：CNFS93-02

主持人：陳椒華

摘要

本研究從堆肥土壤分離出有益微生物菌種，得到數十株類放線菌屬，除做菌種鑑定檢測，也選取除臭效果良好之菌株製作成除臭菌粉並進一步應用於廚餘臭菌試驗，得到不錯之除臭效果。將有效除臭效果之放線菌 F9 進行菌種鑑定，包括菌株培養特性分析、於 ISP 培養基培養之生長觀察、菌絲觀察、產孢情形及色素產生情形觀察，也進行細胞壁成份分析、菌株醣類利用情形及電子顯微鏡觀察等，將分析結果與 Actinobase 及 International Journal of Systematic Bacteriology 比對後，鑑定此 F9 菌株為 *Streptomyces variabilis*。

前言

自然界存在許多有用的微生物，他們已被廣泛應用於食品、醫學及工業上，達到造福人類，維護環境的功能。在眾多有用的微生物中，存在有淨菌系、發酵系及光合成系等之兼性厭氣、厭氣及好氣性之微生物，其主要為一群對土壤更改良、提高作物產值的微生物，我們稱之為有用微生物群，Effective Microorganism，簡稱 EM。

EM 菌包括嫌氣性的光合菌、乳酸菌及酵母菌、放線菌等，根據研究報告指出，EM 微生物可改良土壤，使土壤中氨基酸、有機酸、多醣類及維他命等產生，提高農作物量，而且農作物抗病力亦提高，故不需使用農藥及化學肥料；EM 菌在分解有機物中會分泌抗氧化物質，可使有機物不氧化、不發生惡臭與毒素，而將有機物質轉換成良好的有機肥料，EM 分解有機物產生的抗氧化物質亦對高級動植物的健康有幫助；EM 菌可分解動植物組成份中之蛋白質、脂肪等腐敗後所產生的惡臭氣味，所以固態有機性廢棄物如畜產廢棄物、剩餘污泥及家庭廚餘垃圾等腐敗所產生的惡臭，可採 EM 菌來處理。

放線菌為革蘭氏陽性菌，多數為好氣性生長，除少部份為致病菌外，主要為存在土壤、水及植物體中之腐生菌，因此對於土壤結構及堆肥之形成有其重要性，而放線菌所分泌之胞外酵素對自然界複雜之有機物如蛋白質、核酸、多醣類及植物組織等具有分解能力，也適用於堆肥之製備。

放線菌可應用有益微生物於除臭及堆肥化之促進效果，可提昇廚餘回收意願、減少臭味產生並促進堆肥化品質。本計畫將所分離之放線菌株進行除臭測試再進行菌種鑑定，包括傳統形態、生化分析、細胞壁成份分析及顯微鏡照相分析等。

實驗方法與材料

1 放線菌的分離

分離放線菌所用的培養基為 NA(Nutrient agar)培養基(Difco 0001)。分離菌種時培養基中添加 cycloheximide(50-75 μ g/ml), Nalidixic acid(20 μ g/ml)。取農場自製的堆肥，再將之懸浮於 NB(Nutrient broth)液體培養基增殖培養後，然後適當稀釋菌液，再塗抹於 NA 培養基。

2 放線菌之除臭品評分析

所分離之放線菌分別培養於 10ml Nutrient broth 及 10ml MRS broth 一星期，各取 1ml 菌體培養液，加入 10 克 新鮮煮熟之食物樣品，如虱目魚、豬肉及雞肉的密封瓶，於室溫放置七天後，品評臭味。不加菌之樣品臭味定為"9"，臭味範圍由 1 至 10，數字越小表示臭味越弱。臭味評定結果如表一。

3 放線菌之鑑定

(1) 菌株培養特性

選擇適合放線菌生長之 ISP 培養基培養放線菌，再進行生長觀察、菌絲觀察、產孢情形及色素產生情形觀察。

(2) 細胞壁成份分析

(3) 菌株醣類利用情形

(4) 電子顯微鏡觀察

結果與討論

1 放線菌之除臭效果

將所分離之放線菌添加於虱目魚、豬肉及雞肉等密封瓶中，於室溫放置七天後，品評臭味，評定結果如表一。不加菌之樣品臭味評定為"9"，臭味範圍由 1 至 10，數字越小表示臭味越弱。

表一、放線菌加入樣品七天後之除臭品評分析^a

加入所分離的放線菌	樣品		
	虱目魚	豬肉	雞肉
Control(不加菌)	9	9	9
CNCS1	5.8 \pm 2.05	5.6 \pm 2.39	6.7 \pm 2.26
CNCF1	5.6 \pm 2.50	7.8 \pm 1.80	5.2 \pm 2.09
CNCF2	4.4 \pm 1.44	5.6 \pm 2.36	5.2 \pm 1.76
CNCF5	5.2 \pm 1.82	10	5.9 \pm 1.77
CNCF9	4.2 \pm 1.72	5.2 \pm 2.2	4.6 \pm 1.36
CNCF10	5.2 \pm 1.84	4.7 \pm 1.46	5.0 \pm 1.45
CNCF11	8.8 \pm 0.80	8.0 \pm 1.61	4.5 \pm 1.99

CNCF15	5.2±1.91	5.9±2.60	5.9±1.81
CNCF16	4.2±1.46	5.5±2.03	7.2±1.74
CNCF19	4.5±1.38	5.8±2.34	5.3±2.02
CNCF24	5.3±1.80	6.7±2.14	4.0±1.96
CNCF25	5.3±1.83	5.4±1.77	7.2±1.76
CNCF27	4.8±1.77	6.0±2.50	6.7±2.02

^a註：臭味評定標準從 0~9，對照組臭味定為 9，數字越小表示越不臭

2 菌種鑑定結果

(1) 菌株培養特性

F9 菌株在 ISP 2, 3, 4 培養基均生長及產孢良好，於 ISP 5 培養基生長稍差、產孢很差 (poor)。營養菌絲為黃褐色或灰褐色，氣生菌絲為乳白色或褐灰色，不產生可溶性色素及黑色素(表二)。孢子鏈(spore chain)為螺旋狀(spiral)，孢子表面具有突起(warty)(附圖一)。

(2) 細胞壁成份分析

F9 菌株之細胞壁氨基酸及全細胞糖類成份分別為 L-DAP 及 glucose, ribose。根據 Lechevalier 等人的分類，是屬於 Chemotype IC 型，由此可以判斷其屬名為 *Streptomyces*。

(3) 菌種對各種糖類的利用如表三

(4) 電子顯微鏡照相結果如圖一。

(5) 根據結果與 Actinobase 及 International Journal of Systematic Bacteriology 比對後，鑑定此 F9 菌株為 *Streptomyces variabilis*。

Table 2 Cultural characteristics of *Streptomyces variabilis* (F9) on ISP media

	Growth	Substrate mycelia	Aerial mycelia	Sporulation	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar(ISP2 medium)	well	Moderate olive brown	Light brownish gray	Well	None
Oatmeal agar(ISP3 medium)	well	Dark grayish yellow	brownish gray	Well	None
Inorganic salts starch agar(ISP 4 medium)	well	Light olive gray	Yellowish gray	Well	None
Glycerol asparagines agar(ISP 5 medium)	well	Light yellowish brown	Yellowish white	Poor	None

Table 3 Carbon source utilization of *Sreptomycetes varabilis* (F9)

Carbon source	<i>S. varabilis</i> (F9)
D-glucose	+
D-xylose	+
D-fructose	+
Sucrose	-
L-arabinose	+
Rhamnose	-
Raffinose	+
D-mannitol	+
L-inositol	-
Cellulose	-
Salicin	-





圖一、*Streptomyces variabilis* 的氣生菌絲及孢子鏈

參考文獻

Identification of the catalytic residues in the double-zinc aminopeptidase from *Streptomyces griseus* • SHORT COMMUNICATION

FEBS Letters, Volume 571, Issues 1-3, 30 July 2004, Pages 192-196

Identification and typing of *Streptomyces* strains: evaluation of interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fingerprinting • ARTICLE

Research in Microbiology, Volume 151, Issue 10, December 2000, Pages 853-864

Reevaluation of the Final Steps in the Biosynthesis of Blasticidin S by *Streptomyces griseochromogenes* and Identification of a Novel Self-Resistance Mechanism • ARTICLE

Tetrahedron, Volume 56, Issue 5, 28 January 2000, Pages 693-701

Numerical classification and identification of *Streptomyces* species — a review • ARTICLE

Gene, Volume 115, Issues 1-2, 15 June 1992, Pages 225-233

黃瑞彰 林晉卿 林經偉 卓家榮(2002) 微生物在農業生產之應用. 台南區農業專訊第41期: 7~12 頁

有機生機飲食病原菌檢測分析

計畫編號：CNFS93-03

主持人：王淑珍

摘要

本實驗進行民間自製之有機生機飲食回春水、黃豆芽漿優格及有機醋之病原菌分析，分析項目包括：沙門氏菌、大腸桿菌、大腸桿菌群、腸內菌、金黃色葡萄球菌及總生菌數等，在十二個有機醋樣品中，僅二個樣品之原液、三種培養基各檢測出一個菌落(含 Coliform 及 Enterococcus)；在回春水及黃豆芽漿優格樣品，市售回春水及黃豆優格之病原微生物檢測情形為所有檢體總菌數皆高於 10^7 ，乳酸菌高於 10^5 ，七個樣品檢測出 Coliform。

前言

為追求健康生活，國內有機生機健康飲食正日益受到大眾喜愛，市場需求急遽增加，有機食品商機也持續擴大中，根據美國 CNN 在 1999 年的報導指出，美國有機食品 (Organic Food) 的消費量年成長率竟高達 25% 的市場奇景。有機食品中尤其是無污染的有機食品更是已逐漸為消費者熟知及接受，更被認為是一種保健食品最佳原料。

隨著生機飲食的發展，國民在飲食方面越來越講究，而生機飲食的定義為：儘量不吃經人工程序干擾或污染的食品，而應多吃沒有經過烹煮動作及新鮮的動、植物，並按照正確的方式進食。事實上，動物類如生魚片、活跳蝦，這些仍屬於生機飲食的範疇；因人類究竟還是雜食動物，因此葷、素皆可吃。

生機飲食的好處是減少許多污染，可吃到最乾淨、最有能量的食物，這樣的食物可增加我們的免疫力，使我們健康、精力充沛，甚至讓精神更好；同時生機飲食最大的好處是可幫助排除體內聚集多年的毒素，治療許多疾病。因為許多疾病的造成是由於熟食後，缺少酸、酵素和活力，因此多吃有活力的生機飲食，可使許多醫學上無法解決的疾病迎刃而解，輕易贏得健康、有機的身體。

基於此，本研究選定受歡迎之有機生機飲食如黃豆芽漿與回春水進行微生物的存在檢測，進行有機生機飲食的食用安全性探討，所檢測病原菌如大腸桿菌、沙門氏菌、金黃色葡萄球菌等。

另外，由於有機醋亦為受歡迎之有機食品，其能在短時間內排除血液變成酸性的乳酸及焦性葡萄酸，而使血液維持正常的微鹼性，因此，醋是屬於微鹼性食物」。醋也是

生機飲食的一種，其功能為：(1) 促進新陳代謝 (2) 對人體胖瘦的適用性 (3) 能去腥解膩 (4) 促進食慾 (5) 保持維他命 C (6) 青春源頭、延年壽益 (7) 可消除疲勞 (8) 有助於鈣的吸收 (9) 可用來消除異味 (10) 殺菌的效果。本研究也進行民間自行釀造醋分析病原菌，測定項目包括：沙門氏菌、大腸桿菌、大腸桿菌群、腸內菌、金黃色葡萄球菌、總生菌數。

實驗方法與材料

1. 有機生機飲食

(1) 回春水：材料：有機紅小麥 (1 斤小麥約可做 2 瓶)

作法：有機紅小麥用鹽水洗 1 次，再用清水洗 3 次，將壞的小麥剔除，淨泡 5 小時左右 (或用活) 後，再洗 2 遍。置入濾藍中瀝乾催芽，用紗布蓋住 (防止有綠芽可加報紙) 或用毛巾。每天 4 次，大約隔 4 小時，倒入盆中漂洗並將未發芽的小麥挑出。發芽中若有怪味，可用鹽洗，發芽至 1.5 公分左右，芽黃色根白色。放入不銹鋼鍋，用冷開水清洗 1 次倒乾，倒入純淨冷 (冰) 開水，水面比小麥芽超過 1 公分以內，蓋上毛巾。9.10 小時後可將下方之小麥芽倒翻上。淨泡時間：夏天約 18-20 小時，冬天約 25 小時，途中試飲又甘又甜則大功告成。換裝至玻璃罐放冰箱，保存期限約 10 天

(2) 黃豆芽漿優酪乳的製作

A 黃豆芽催芽

材料：有機黃豆一斤

清洗：先用清水洗 1 次，加少許鹽洗再以清水洗 4 次。

淨泡：夏天 4-6 小時，冬天 8 小時中途至少換水 1 次或用活水篩選黃豆：將不好的豆子剔除

催芽：將豆子置於漏水藍子蓋上紗布，每 2 小時沖水一次，一天至少 3 次，晚上可先泡 5 分鐘將豆子置於通風處，第 2 天再沖水，芽長至 0.5 公分，大約 1 天至 1 天半。黃豆芽不可生食，水煮沸後續滾 30 秒，加少許鹽或味增最好晚上勿食且不要吃皮。

B 黃豆芽漿製作

材料：一斤黃豆 4000cc 水

做法：1500cc 水打漿，2500cc 水煮沸，關小火將豆漿倒入，勿攪拌以免沉澱燒焦

蓋鍋煮 6-8 分鐘 (中火)，滾後 20 分略攪拌，熄火，夏天悶 30 分鐘，冬天 40-60 分鐘，將渣濾除再煮滾，鍋子放入冰水中急速冷凍 (換水 1-2 次)，裝瓶放進冷凍室 2-3 小時再冷藏。

C 黃豆芽漿優酪乳製作

做法：急速冷卻黃豆芽漿 (不要掀開鍋蓋)，溫度降至 20°C 30°C 之內，容器可以滾水燙 2 分鐘並晾乾，加入 800cc 豆漿+回春水，置室溫 20-30 小時 (夏天 12 秋天

16 冬天 24) 後放冰箱 2 小時即可。

(3) 水果醋/露的製作

材料：水果 10 斤(樣品：蘋果醋 (A)、桑椹醋 (B)、檸檬醋 (C)、橄欖醋 (D)、葡萄醋 (G)、梅子醋 (M)、金桔醋 (N)、橘子醋 (O)、蕃茄醋 (T)、鳳梨醋 (W)、柚子醋 (Y)、楊桃醋 (Z)、金桔醋(X)。糖約 10 斤(二級砂糖、冰糖、蜂蜜)，純釀米醋 2-4 瓶，適當大小之玻璃瓶或甕(最好用甕)。

作法綱要：水果洗淨(可用冷開水、RO 水或能量水洗淨、曬乾後入甕，桑椹不用曬，鳳梨不用洗)。砧板、玻璃瓶或甕等器具及雙手洗淨、乾燥。水果切塊，鋪一層水果、一層糖、水果....最上層鋪滿糖覆蓋之，再倒入蜂蜜。加蓋，但不可旋緊。待糖逐漸下陷時，將未加完之糖繼續補入，待水果露出後開始每日用洗淨且乾燥之長杓子將水果壓下及攪拌之。約二週後若欲做水果醋則加入適量之醋。偶而攪拌之，淨置約 3-4 個月之後使用。

2 病原菌檢測

(1) 檢測培養基：

a. PCA：

Plate Count Agar 2.25g + RO 水 100ml

b. EMB：

EMB 3.6g + RO 水 100ml

c. Coliformer Agar：(勿用殺菌釜滅菌，勿過熱)

Coliformer Agar 2.65g + RO 水 100ml

d. XLD Agar：(勿用殺菌釜滅菌，勿過熱)

Xylose Lysine Deoxycholate Agar 5.668g + RO 水 100ml

e. BPA：(冷卻至 45 後再加入 5ml EYTE)

BPA 5.8g + RO 水 100ml

f. MRS：

Lactobacillus MRS Agar 6.715g + RO 水 100ml

(2) 檢測方法

總生菌數之檢測：樣品原液以無菌水稀釋至適當濃度為 10^{-1} ，各取原液和 10^{-1} 稀釋液 100 μ l 至 PCA 平板中塗抹，做二重複，培養於 37°C 、24 小時後計算其菌落數

沙門氏菌之檢測：樣品原液以無菌水稀釋至適當濃度為 10^{-1} ，各取原液和 10^{-1} 稀釋液 100 μ l 至 XLD 平板中塗抹，做二重複，培養於 37°C 、24 小時後觀察生長菌落顏色情形

大腸桿菌和大腸桿菌群之檢測：樣品原液以無菌水稀釋至適當濃度為 10^{-1} ，各取原液和 10^{-1} 稀釋液 100 μ l 至 CCA 平板中塗抹，做二重複，培養於 37°C 、24 小時後觀察生長菌落顏色情形

腸內菌之檢測：樣品原液以無菌水稀釋至適當濃度為 10^{-1} ，各取原液和 10^{-1} 稀

釋液 100 μ l 至 ENT 平板中塗抹，做二重複，培養於 37°C、48 小時後觀察生長菌落顏色情形

金黃色葡萄球菌之檢測：樣品原液以無菌水稀釋至適當濃度為 10^{-1} ，各取原液和 10^{-1} 稀釋液 100 μ l 至 BPA 平板中塗抹，做二重複，培養於 37°C、48 小時後觀察生長菌落顏色情形

結果與討論

1、釀造醋之病原微生物檢測

表-1 為各有機醋樣品中之病原微生物檢測結果，僅三件樣品測出病原菌，為金桔醋 (X) 及鳳梨醋 (W)，其他皆無病原菌檢測出。在 (1) 原液：金桔醋 (X-1) 原液於 CCA 及 ENT 培養基各測出 1 cfu/plate，而鳳梨醋 (W1) 原液於 ENT 培養基測出 1 cfu/plate。

表一 有機醋病原微生物檢測情形

		檢 體 名 稱									
培養基	稀釋濃度	G1-1	G1-2	N - 1	N - 2	X - 1	X - 2	W - 1	W - 2	Y - 1	Y - 2
PCA	原液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCA	10^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCA	原液	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
CCA	10^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLD	原液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLD	10^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPA	原液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BPA	10^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENT	原液	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
ENT	10^{-1}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2 檢測市售回春水及黃豆優格之病原微生物

市售回春水及黃豆優格之病原微生物結果如表二。所有檢體總菌數皆高於 10^7 ，乳酸菌高於 10^5 ，七個樣品測出有 E. coli 及 Coliform.

表二、市售回春水及黃豆優格之病原微生物檢測

		檢 體 名 稱							
培養基	稀釋濃度	白 Y-1	白 Y-2	紅 Y-1	紅 Y-2	kW-1	kW-2	紫 W - 1	紫 W - 2
PCA	10^{-6}	TNTC	>250	113	186	43	67	184	34

PCA	10 ⁻⁵	TNTC	>250	>250	>250	197	>250	>250	88
CCA	10 ⁻²	-	-	1	-	-	-	-	-
CCA	10 ⁻¹	10	26(1)	16(1)	12	3	1	-	-
CCA	原液	51	83	89	68	8	4	2	-
BPA	原液	-	-	-	-	-	-	-	-
MRS	10 ⁻³	TNTC	>250	TNTC	TNTC	TNTC	>250	TNTC	TNTC
MRS	10 ⁻²	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
MRS	10 ⁻¹	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC	TNTC
XLD	原液	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	10 ⁻²	-	23	-	-	-	-	-	1
PDA	10 ⁻¹	88	97	-	-	-	2	1	4

註：

(1)樣品代號：白色罐子優酪乳(WY)，白色罐子優酪乳(紅Y)，回春水(kW)

回春水(紫W)

(2)“-”代表無菌落生長，TNTC：代表菌落>300

(3) PCA: 檢測 total count, CCA: 檢測 E. coli 及 coliform, BPA: 檢測

Staphylococcus aureus, XLD: 檢測 *Salmonella*, TCBS: 檢測 *Vibrio*, ENT: 檢測

Enterococcus, (4)病源菌在各培養基之生長菌落顏色情形：沙門氏菌，紅色；大腸桿菌，紫色；大腸桿菌群，粉紅色；腸內菌，粉紅色；金黃色葡萄球菌，黑色；總生菌數，計算其菌落數。

經由本研究結果，可知民間自行釀造的有機醋之病源菌量非常少，包括沙門氏菌、大腸桿菌、大腸桿菌群、腸內菌、金黃色葡萄球菌及總生菌數檢測，僅三個平板，有三個 CFU/平板。因此推論有機醋之微生物檢測合格。至於市售回春水及黃豆優格之病原微生物檢測，總菌數皆高於 10⁷，乳酸菌高於 10⁵，而七個樣品也測出有 Coliform，因此建議此二種生機飲食應儘速食用，不可放置超過安全期限。

參考文獻

王添貴 蔡金來 林建生 何淑瑛 邱乾順 許世元 黃華州 潘子明 1999 近年食品中毒沙門氏菌血清型之新趨勢，疫情報導，14: 1-7.

W. S. Jen¹ H. W. Hwei² and C. J. Hua¹(2002), Isolation and Characterization of a Photosynthetic Bacterium, *Rhodobacter* JH413, 102nd General Meeting of American Society for Microbiology. Hover, D. G., Tatini, S. R., and Maltais, J. B. 1983 Characterization of staphylococci. Appl. Environ. Microbiol. 46: 649-60. Bean, N. H., Griffin, P. M., Goulding, J. S. and Ivey, C. B. 1990. Foodborne disease outbreaks, a 5-year summary, 1983-1987. J. Food Protect. 53: 804-17.