

# 培養基配置殺菌和無菌操作要領

## 壹、操作用具之介紹與認識

### 一、儀器設備：無菌操作箱

殺菌釜  
震盪培養機  
恆溫培養箱（10~60°C）  
顯微鏡（1000 倍以上）  
電子秤

### 二、操作用具：玻璃試管（含蓋子、試管架）

三角瓶（500ml；2~3L）  
吸管  
培養皿  
燒杯、量桶（500ml；1L）  
血球計數器  
載玻片、蓋玻片、洋杉油  
街種環、街種柄  
酒精燈（本生燈）  
定量吸管

三、實驗室：應選擇塵埃較少處，力求清潔，以免雜菌侵入。

四、實驗桌：高 90cm 長 240cm 寬 60cm 厚 3.5cm，桌面水平（不銹鋼桌面）。

五、無菌室：長寬約 90×90~120×120cm，高約 2~3 尺，離地 90CM 起，俱裝似玻璃，室內裝紫外燈。

六、菌種：  
澱粉黴      *Amylomyces rouxii* Calmette  
米根黴      *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs  
釀酒酵母   *Saccharomyces Cerevisiae* Meyen ex Hansen

## 貳、各種培養基介紹認識與配製

### 一、培養基的定義：

1. 依組成份分爲：天然培養基（複合培養基）及合成培養基。
2. 依用途分爲：基礎培養基、增值培訓基，以及選擇性培養基、鑑別培養基和分析用培養基。
3. 依培養基形態分爲：  
固體培養基（含凝固劑）：如斜面培養基、平面培養基及高層培養基

液體培養基（不含凝固體）

半固體培養基（含 0.5%凝固劑）

## 二、培養真菌之培養基：

### 1. YM

YM Agar (YMA)	
品名	含量
酵母抽出物 (yeast extract)	0.3%
麥芽抽出物 (malt extract)	0.3%
蛋白蠟 (peptone)	0.5%
葡萄糖 (glucose)	1%
洋菜 (agar)	2%
無 agar 則為 YM broth	

### 2. ME (malt extract)

ME Agar (MEA)	
品名	含量
麥芽抽出物 (malt extract)	0.6%
工業用麥芽糖 (maltose)	0.18%
葡萄糖 (glucose)	0.6%
酵母抽出物 (yeast extract)	0.12%
洋菜 (agar)	2%
無 agar 則為 ME broth	

### 3. YPD (yeast peptone dextrose)

YPD Agar	
品名	含量
葡萄糖 (glucose)	2%
蛋白蠟 (peptone)	2%
酵母抽出物 (yeast extract)	1%
洋菜 (agar)	2%

### 4. 馬鈴薯葡萄糖培養基

Potato Dextrose Agar (PDA)	
品名	含量
馬鈴薯抽出物 (potato infusion)	20%
葡萄糖 (glucose)	2%
洋菜 (agar)	2%

## 參、殺菌原理、條件之說明與操作

### 一、殺菌方法介紹：

#### 1. 物理法：

殺菌原理：使菌體蛋白質變性甚至灰化。

蒸汽滅菌	條件	目的
蒸汽或煮沸	100°C，10 分鐘以上	殺滅一般菌體
巴斯德滅菌	60~80°C，20 秒至 30 分鐘	殺滅病原菌
高壓蒸汽滅菌	121°C，20 分鐘	殺滅大多數微生物
間歇加熱	100°C，3 天	避免原料過熱

乾熱滅菌	條件	目的
高壓蒸汽滅菌		表面完全滅菌
間歇加熱	160°C，2 小時	殺滅大多數微生物

紫外線滅菌法	條件	目的
紫外線照射	2000~2800A°	表面完全滅菌
$\alpha$ 、伽馬射線		穿透力強，須專業技術

抑菌原理：使微生物生長代謝減緩或終止。

乾燥與冷凍	條件	目的
高壓蒸汽滅菌	50~80°C，2~4 小時	食品保存
間歇加熱	5~25minittor，數小時	食品保存
冷凍	-20~-196°C	食品保存

除菌原理：濾除菌體以防止污染。

過濾	條件	目的
膜過濾：chamber land（用瓷土 0.2 $\mu$ 以下或石綿製成之濾器）		適用於不可加熱之培養基
濾蕊	有不同規格	液體產品過濾
HEPA（高效率濾網）	有不同規格	大規模空氣過濾

#### 2. 化學法：酒精

殺菌原理：使菌體蛋白質變性或菌體內物質產生化學變化。

化解藥劑	條件	目的
酒精	70%	表面完全滅菌
消毒水、清潔劑	按產品規定使用	殺滅一般微生物

氣體	條件	目的
二氧化硫	70%	表面完全滅菌
福馬林	按產品規定使用	劇毒，薰蒸時小心

抑菌原理：使菌體生長因菌體內物質產生化學變化而終止或因外部生長環境因子改變而抑制生長。

氣體	條件	目的
Penicillin Streptomycin Chloramphenical Tetrecycline	50~200ppm	防止培養污染
有機酸	條件	目的
硼酸 己二烯酸 醋酸 丙酸	按產品規定使用	用於食品保存

## 實驗操作項目

### 一、培養基配置：

馬鈴薯培養基：Pptato Dextrose Broth（5ml 一架，10ml 四瓶，1L 四瓶）。

YMA 培養基：斜面一架、300ml 二瓶。

### 二、殺菌釜操作：

121℃，15 分鐘及 115℃，10 分鐘。

## 馬鈴薯培養基配製流程

300g 馬鈴薯切丁→加水 1 公升後熬煮 1.5 小時→紗布過濾，輕擠濾乾→加水 1 公升→再加葡萄糖 2%可加洋菜或不加→溼熱滅菌 121℃，15 分鐘。

## 麴汁培養基配製流程

米糧 1 公升→加水 4~5 公升→60℃加溫 5 小時→煮沸後冷卻→砂布過濾→加水調糖度 10~12Brix，pH5.5~6→可加洋菜或不加→溼熱滅菌 121℃，15 分鐘。

## YMA 平板配製流程

秤取 YMA12.3 克→倒入 500ml 三角瓶中→加水 300ml 混合均勻→以錫箔紙封口→溼熱滅菌 121℃，15 分鐘。

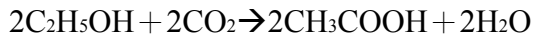
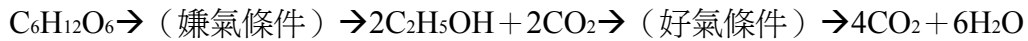
## YMA 斜面配製流程

秤取 yma12.3 克→倒入 500Mml 燒杯中→加水 300ml 混合均勻→放入微波爐煮沸→分裝 5ml 玻璃試管，蓋上蓋子→溼熱滅菌 121℃，15 分鐘。

# 真菌的培養與無菌操作概念

## 壹、培養條件

一、好氣性：Amylomyces rouxii、Rhizopus oryzae 及 Saccharomyces cerevisiae 的營養生長，需要良好的通氣條件。但是 S.菌之酒精發酵則否，因此液體大量培養時，需要震盪或通氣攪拌。



二、溫度：不同用途的操作時期有不同適合的溫度，一般發育適溫在 25~30°C。

三、pH 值：一般真菌微生物喜好微酸性，最適 Ph 值在 4.0~6.0。

四、滲透壓（水活性）：一般酵母菌可耐較高之滲透壓，而霉菌則可耐較低水活性。

五、營養：

1. 碳源：碳水化合物（單醣、雙醣及多醣）
2. 氮源：以水解蛋白或無機銨態氮為主
3. 無機鹽類：以磷酸鹽類為主

## 貳、無菌操作觀念

### 一、菌種培養實驗室無菌操作說明

1. 實驗時，必須穿著乾淨的實驗衣，進入實驗室。
2. 實驗室、實驗台、器具等，應保持清潔。
3. 用過的培養基，丟棄前應先滅菌。
4. 有雜菌污染之培養基，馬上丟棄。
5. 欲久存之菌種（三天以上），應置於冷藏室。
6. 實驗室內禁食、禁煙。
7. 水平式之無菌操作台，操作中勿聊天。
8. 實驗完畢，立即清理乾淨。

### 二、無菌操作台操作注意事項

1. 盡量避免操作台內空氣，發生流動。
2. 物品放入前應先行滅菌。
3. 直立式無菌操作台之前窗，應盡量放低。
4. 使用前先以酒精擦拭桌面，再以酒精噴霧殺菌，放置 20~30 分鐘。
5. 結束操作後或開機前，先用紫外燈照射 20 分鐘。

## 參、真菌的純化，前培養及大量培養

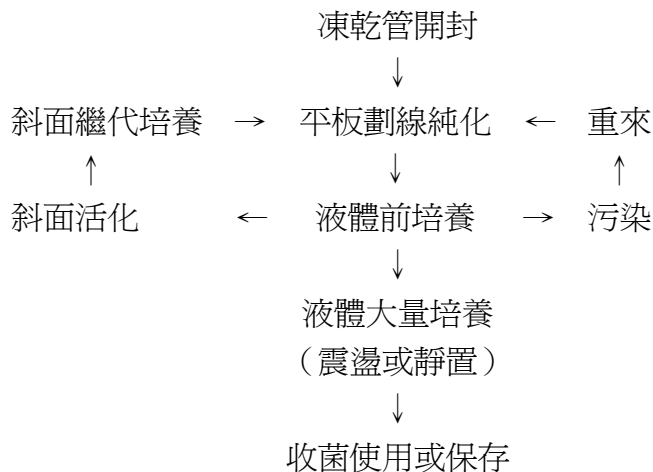
### 一、酵母菌劃線純化之原理與方法

1. 用接種環沾取菌種。
2. 在平板之一側塗滿約四分之一。
3. 利用劃線法，將接種環上之菌體，在平板培養基上，逐漸稀釋。
4. 最終在平板上即會出現，由單一細胞逐漸長成之單一菌落。
5. 連續純化三次。

### 二、糖化菌純化原理與方法

純粹培養之種類	使用容器	方法	目的
斜面培養	試管	使用接種環在培養基表面塗抹或劃線	活化，保存
穿刺（身層）培養	試管	使用接種針將菌體植入培養基裡面培養	厭氣培養（乳酸菌）
平板培養	培養皿	使用接種環在培養基表面塗抹或劃線	純化，活化
液體培養	試管三角瓶或發酵槽	取菌體或菌體懸浮液與培養基均勻混合後，靜置、攪拌或震盪培養	活化（靜置），大量培養

### 三、酵母菌大量培養之流程

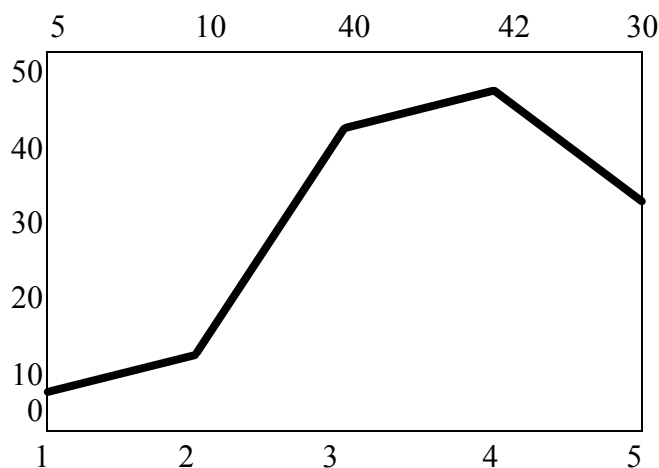


### 四、酵母菌大量培養方法種類

1. 震盪培養→培養溫度 30℃，震盪轉速 150rpm，培養 2~3 天。
2. 靜置培養→巴士德瓶培養法。
3. 發酵槽培養→pH4.2~4.5，溫度 26~30，轉速 50rpm，通氣量 0.1~0.2vvm。

### 五、生長曲線之介紹

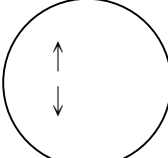
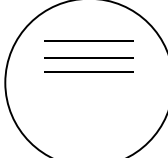
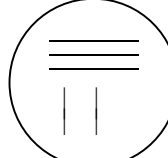
#### 1-1 生長曲線



- 1-2 適應期 (lag phase)：菌體細胞長大，但菌數未明顯增加。
- 2-3 對數期 (Logarithmic phase)：菌體重量明顯增加，細胞數呈對數成長。
- 3-4 靜止期 (stationary phase)：有毒物質累積營養消耗細胞生長數目與死亡數目相等。
- 4-5 死亡期 (death phase)：細胞死亡速率加快。

# 實驗操作項目

## 壹、酵母菌劃線培養之步驟

1	 植 菌	2		3		4	(平板標示項目) 1.操作日期 2.培養基名稱 3.品名(菌號或菌名)
---	--	---	---	---	--	---	--

## 貳、前培養、繼代培養及三角瓶大量培養之操作

前培養：試管或三角瓶 — 液體 — 靜置或震盪培養

繼代培養：試管 — 斜面 — 劃線或塗抹培養

三角瓶大量培養：三角瓶 — 液體 — 震盪培養

## 澱粉糖化菌種、酒精發酵菌種形態觀察及檢驗

### 壹、菌種介紹及用途

- 一、*Aspergillus oryzae* 米麴黴，*Aspergillaceae* 麴菌科，屬於子囊菌。應用於醬油、米醬、清酒製造，具有多種酵素。
- 二、*Rhizopus oryzae* 米根黴，*Mucoraceae* 毛黴科，屬於藻狀菌。應用於米酒及其他發酵食品生產，具有澱粉及蛋白質分解酵素，可產生各種有機酸如檸檬酸、乳酸。
- 三、*Amylomyces ruxii* 魯氏澱粉黴，同屬毛黴科。只存在於白麴中，應為 *Rhizopus oryzae* 馴化種。
- 四、*Mucor rouxii* 魯氏毛黴，它與 *Rhizopus* 非長類似，同屬毛黴科。應用於豆腐乳生產，具有很強之澱粉及蛋白質分解能力。
- 五、*Saccharomycopsis fibuligera* 扣囊腹孢膜酵母，*Saccharomycetaceae* 真正酵母科，*Saccharomycodiaceae* 真正酵母亞科。存在白麴及澱粉物質原料中，包括中國、韓國、印尼、台灣等東南亞國家，具有澱粉分解能力，及生產酒精能力。
- 六、*Saccharomyces cerevisiae* 啤酒酵母（釀酒酵母）同屬真正酵母亞科，是酒精生產主要菌種。

## *Rhizopus oryzae*

在 MEA 上 25°C 培養七天，菌叢顏色隨著生長由白色變成褐色，直徑大約 5.5~14.5cm 呈棉毛狀。假莖透明至褐色，假根褐色至淡褐色。孢囊柄直立，褐色至黑褐色，長約 620  $\mu\text{m}$ 。孢子圓形，黑褐色，直徑 100~200  $\mu\text{m}$ 。

澱粉黴三大菌種：*Rhizopus japonicus*，*Rhizopus tonkinensis*，*Mucor rouxii*（後來改成 *Amylomyces rouxii*）。前二種已改為 *Rhizopus oryzae* 之同種異名。早期 Hessel 教授認為大自

然界中 *Amylomyces rouxii* 應該不存在，而是 *Rhizopus delemar*，*Rhizopus javanicus*，*Rhizopus chinensis*，*Rhizopus peka*。

食品所菌種中心保存之白麴菌株：

CCRC31150	CCRC31152	CCRC31546	CCRC32229
CCRC32237	CCRC32802	CCRC33486	CCRC33491

## Mucor indicus

在 MEA 上 25°C 培養七天，黃灰色菌叢顏色隨著生長逐漸呈現淡黃色。菌落高度約 4mm。孢囊柄呈透明狀，直徑 5.0~10  $\mu\text{m}$ 。孢囊初期黃色透明狀，成熟後變成黃褐色到褐色，直徑 35~60  $\mu\text{m}$ 。囊柱類圓形至橢圓形，包括小頸長度約 22.5~32.5×27.5~35  $\mu\text{m}$ 。孢子圓形至橢圓形大小約 3.9~4.9×4.4~6.9  $\mu\text{m}$ 。具有很多厚膜孢子。有性世代屬異宗交配型，生長適溫 30~37°C，產孢溫度 20~40°C。它與 *Rhizopus* 非常相似，同屬毛黴科。最明顯得差異在 *Mucor* 沒有假根。

食品所菌種中心保存菌株：

<i>Mucor indicus</i>	CCRC32482	CCRC32718
<i>Mucor rouxii</i>	CCRC30546	CCRC30895
<i>Mucor</i> sp.	CCRC31748	

## Aspergillus oryzae

在 Czapeks agar 上 25°C 培養 10 天，菌落直徑 3.5~4.0cm，表面扁平或呈放射狀鄒摺，菌絲白色逐漸轉呈乳白色。Conidial heads 放射狀或呈疏鬆排列的圓筒狀，顏色由黃色→黃綠色→綠色。菌柄 110~1030×4.8~20.0  $\mu\text{m}$ ，平滑或粗糙，沒有顏色。泡囊 0~40  $\mu\text{m}$  寬，呈棍棒狀、梨型或類圓形。*Aspergilla* 單列，瓶梗，約佔泡囊 2/5 至 3/4，大小約 6.4~19.8×3.6~8.7  $\mu\text{m}$ 。分生孢子圓形、類圓形或橢圓形，長度可達 11.0  $\mu\text{m}$ ，孢子壁平滑或粗糙。

## 酵母菌形態觀察 (*Saccharomyces cerevisiae*)

- 一、細胞之形態：形狀 → 卵形      球形      橢圓形      長筒形  
大小 → (5-9) × (5-11)  $\mu\text{m}$   
增殖方式 → 多極出芽  
細胞聚集 → 單一或對或團狀
- 二、菌落之形態：組織 → 奶油狀  
顏色 → 乳白色  
表面 → 平滑  
隆起 → 扁圓、凸圓  
邊緣 → 全緣、波浪、少部份呈亂絲狀



光澤 → 閃亮或亮的

三、菌絲之形態：無菌絲或雛形的偽菌絲

四、有性世代之形態：交配後或由母細胞直接形成子囊，產生 1~4 個圓形子囊孢子，子囊不易破裂。

## Saccharomycopsis fibuligera

一、細胞之形態：

在 5%MEB 上 25°C 培養三天，出芽細胞卵形或會延長。大小在 (2.2-5.1) × (3.3-12.5)  $\mu\text{m}$ 。多極出芽細胞單一或成對排列。

二、菌落之形態：

在 5%MEB 上 25°C 培養七天，菌落呈現粉狀或亂絲狀，暗白色，不具反光。

三、菌絲之形態：

在 5%MEB 上 25°C 培養七天，在真菌絲上有許多芽生分生孢子。亦具有偽菌絲，菌絲呈現暗灰色。

四、有性世代之形態：

在 5%MEB 上 25°C 培養 3~30 天，細胞沒有接合現象。在菌絲頂端所形成單一得營養細胞轉變成子囊，再產生 2~4 個帽子形子囊孢子。子囊圓形或卵形，而且成熟時會破。

食品所菌種中心保存菌株：CCRC21380

## 平板計數法 (Total count) — 酸化法

壹、樣品製備

一、取樣品 50g，加入內含 450ml 無菌水之刀口瓶中，做 10 倍稀釋。

二、用攪拌機 (blender) 打均勻一分鐘。

三、做 10 倍系列稀釋至  $10^{-6}$  (酵母菌一般在液體培養時，濃度大約可達到 10CFU/ml)。

四、每個稀釋度各取 1ml，加入平板內 (做 3 重覆)。

貳、培養基製備

一、配製 YMA 或 PDA (200ml 一瓶可做一種樣品約 12 個平板)。

二、若樣品為自然物，則培養基在降溫至 50~55°C 時，須再添加 10% Tataric acid 1.6ml/100ml 培養基。以降低 pH 值 (約 3.5~3.8) 抑制細菌生長。

三、混合均勻倒入平板內。

四、將平板沿著 8 字形，來回輕搖均勻。

五、靜置凝固，25°C 培養三天後，計數。

六、取菌落數在 25~250 個之內的平板，總計後取平均值。

七、公式：菌落數 × 稀釋倍數。

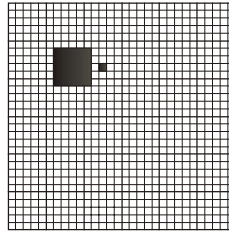
# 血球計數器計數法

公式：壹  $N \times$  貳  $4 \times 10^6 \times$  參 稀釋倍數

壹、 $N$  值為小格之細胞數（長寬各為  $0.05\text{mm}$ ）

16 大格

400 小格



貳、 $4 \times 10^6$  為  $1\text{cm}^3$  之容積

∴血球計數器上之面積為  $1\text{mm}^2$

共有長 20 個小格寬 20 個小格

∴ $1\text{mm}/20 = 0.05\text{mm}$ （小格長寬各為  $0.05\text{mm}$ ）

故  $0.005\text{mm} \times 0.05\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.00025\text{mm}^3$

∴要換算成  $1\text{cm}^3$

∴	$1\text{cm}^3$	$1000\text{mm}^3$
	$0.00025\text{mm}^3$	$0.00025\text{mm}^3$

參、若無稀釋則為 0

## 麩種

### 一、麩

什麼叫做麩？依原料之名稱所製出來的大概有：

1. 米麩—酒酢、味噌、甜酒釀、豆腐乳等。
2. 麥麩—醬油、酢、味噌等。
3. 豆麩—味噌等。
4. 高粱等.....

### 二、古早之麩

1. 豆麩
2. 草麩—台灣之原住民利用粟、玉米之莖葉之灰混合來製麩
3. 木灰來製麩

### 三、麩之種類

※製好麩除了好的原料及水質外，還須注意溼熱、溫度與良好之衛生。

1. 餅麩（固型麩）—主要以中國為中心及東南亞全境。（韓國、西藏、布丹、尼泊爾、印尼、馬來西亞、越南、泰國、菲律賓等）原料以大麥、小麥、高粱等。
2. 散麩—只有日本使用，原料為米。

### 四、製麩之種類

1. 手工製麴—麴蓋法、箱麴法、麴室法……。
2. 機械製麴—半自動製麴、滾桶型製麴機、全自動製麴、圓盤製麴、箱型製麴、麴盤式製麴……。

### 手工製麴

1. 洗米
2. 浸漬（活水）放溫度計 25~30°C 低溫浸漬
3. 切水
4. 蒸煮
5. 放冷→空揉之後，降溫至適當之溫度（冬 38°C、夏 35°C）
6. 植菌→預植
7. 混合
8. 堆麴→保持適當的發酵溫度（放大概 20~25 小時，溫度會慢慢上升 38°C）。
9. 手入→將結塊之麴揉勻，以利溫度平均分散，避免結塊之內部品溫過高（翻 2~3 次）。
10. 攤麴→將堆麴攤開，主要保持一定厚度大約 7~8cm。
11. 手入
12. 種麴→要放到場出孢子。

## 製麴方式及種類

1. 機械式製麴—圓盤製麴、箱式製麴、滾桶式製麴、方盤式製麴。
2. 麴室法—
3. 麴蓋法—長 45cm、寬 30cm、高 5cm，每盤之重量約 1.5kg~2.5kg，
4. 箱麴法—
5. 床麴法—

## 傳統酒麴之製造流程

米糧粉+藥草→加水搓成丸子→丸子滾在舊白麴→培養密閉→培養開放→烘焙→白麴。

## 製麴之品質簡易判定法

眼看→鼻聞→口嚐→破精（HAZEKOMI）→米粒縱斷面檢視法→簡易糖化量判定法→Ph 值。

米粒之縱斷面

