

食品微生物之檢驗方法－乳酸菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms-Test of Lactic Acid Bacteria

1. 適用範圍：本方法適用於食品中乳酸菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為 100 呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。
 - 2.2. 器具及材料
 - 2.2.1. 乾熱滅菌器。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.4. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.5. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.6. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
 - 2.2.7. 天平：可稱量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g，靈敏度為 5 mg。
 - 2.2.8. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.9. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.10. 菌落計數器：適用於菌落之計算者。
 - 2.2.11. 厭氧缸(Anaerobic jar)或厭氧培養箱：適用於厭氧培養者。
 - 2.2.12. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.13. 吸管(Pipette)：已滅菌。1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。
 - 2.2.14. 培養皿：已滅菌，內徑約 90 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
 - 2.2.15. 稀釋用容器：無菌袋或有 1000 mL、500 mL、99 mL 及 90 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
 - 2.2.16. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
 - 2.2.17. pH 試紙：範圍 6-8。
 - 2.2.18. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 或以下之親水性醋酸纖維濾膜。
 - 2.2.19. 試藥：葡萄糖(dextrose)、聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80, Tween 80)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、醋酸鈉(sodium acetate)、檸檬酸銨(ammonium citrate)、硫酸鎂(MgSO_4 ·

7H₂O)、硫酸錳(MnSO₄ · 4H₂O)、碳酸鈣、磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)、硫酸銨((NH₄)₂SO₄)、L-半胱胺酸鹽(L-cysteine · HCl · H₂O)、丙酸鈉(sodium propionate)、轉半乳糖苷寡糖(transgalactosylated oligosaccharides, TOS)、疊氮化鈉(sodium azide)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)及莫匹羅星鋰(lithium mupirocin)均採用化學試藥級；蛋白胨(peptone)、牛肉抽出物(beef extract)、酵母抽出物(yeast extract)、胰蛋白胨(tryptose)及洋菜均採用微生物級。

2.2.20. 0.1%蛋白胨稀釋液(0.1% peptone diluent)之配製：取蛋白胨 1 g 溶於蒸餾水，使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.1。

2.2.21. 培養基^(註)

2.2.21.1. MRS 培養基(MRS agar, MRSA)

蛋白胨(peptone)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	5 g
葡萄糖(dextrose)	20 g
聚山梨醇酯 80 (polysorbate 80, Tween 80)	1 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2 g
醋酸鈉(sodium acetate)	5 g
檸檬酸銨(ammonium citrate)	2 g
硫酸鎂(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.1 g
硫酸錳(MnSO ₄ · 4H ₂ O)	0.05 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.5 ± 0.2。

若需添加碳酸鈣，則稱取碳酸鈣 5 g，預先以 180°C 乾熱滅菌 1~2 小時，加入上述培養基中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.5 ± 0.2。

2.2.21.2. 轉半乳糖苷寡糖-莫匹羅星培養基(Transgalactosylated oligosaccharides-mupirocin medium, TOS-MUP)

基礎培養基(Basic medium)：轉半乳糖苷寡糖-丙酸鹽培養基(TOS-propionate agar medium)

蛋白胨(peptone)	10 g
酵母抽出物(yeast extract)	1 g

磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	3 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	4.8 g
硫酸銨($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	3 g
硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
L-半胱氨酸鹽(L-cysteine · HCl · H_2O)	0.5 g
丙酸鈉(sodium propionate)	15 g
轉半乳糖苷寡糖(transgalactosylated oligosaccharides, TOS)	10 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	950 mL

攪拌加熱溶解後，每瓶分裝 190 mL，以 115°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.3±0.2。配製好之基礎培養基置於 2~4°C 冷藏條件下，可儲存 1 週。

莫匹羅星補充溶液(MUP supplement solution)

稱取莫匹羅星鋰(lithium mupirocin) 50 mg 溶於蒸餾水 50 mL，以無菌膜過濾，臨用時配製。

完全培養基(Complete medium)

取配製好之基礎培養基，加熱溶解冷卻至 48±1°C，每 190 mL 加入莫匹羅星補充溶液 10 mL(最終濃度為 50 mg/L)，小心混勻避免氣泡產生，冷卻至約 48°C 使用。

2.2.21.3. 腸球菌培養基(Enterococcus agar)

胰蛋白胨(tryptose)	20 g
酵母抽出物(yeast extract)	5 g
葡萄糖(dextrose)	2 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	4 g
疊氮化鈉(sodium azide)	0.4 g
2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)	0.1 g
洋菜(agar)	10 g
蒸餾水	1000 mL

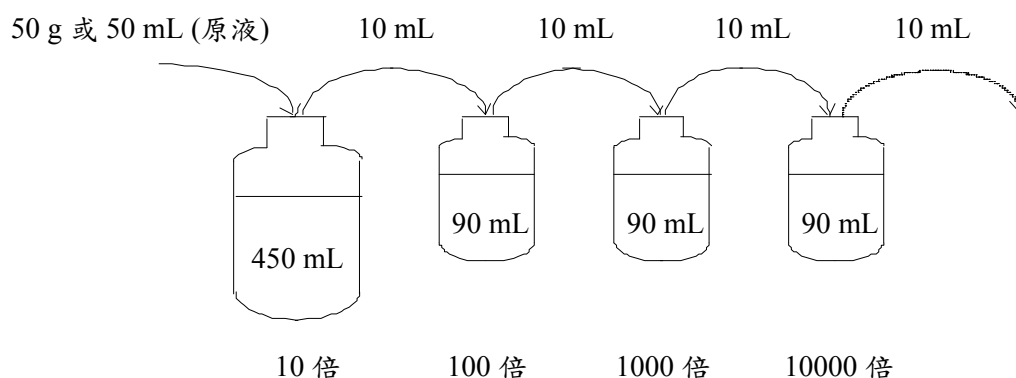
加熱沸騰 1 分鐘，使培養基完全溶解，最終 pH 值為 7.2±0.2。

- 註：
1. 本方法之 MRS 培養基適用於總乳酸菌之計數；轉半乳糖苷寡糖-莫匹羅星培養基適用於雙叉桿菌之計數；腸球菌培養基適用於腸球菌之計數。
 2. 特殊營養需求之菌株，可依其菌株特性探討適合之培養基。

3. 計數複合菌株時，若採用多種培養基，應排除重複計數之可能。

2.3. 檢液之調製：

- 2.3.1. 固態檢體：將檢體切碎混合均勻後，取 50 g，加入 0.1% 蛋白胰稀釋液 450 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液。
- 2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：以已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎後，混合均勻，取 50 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。
- 2.3.3. 液態檢體：將檢體振搖均勻混合，取 50 mL，作為原液，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。
- 2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5°C，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(置於 45°C 以下之水浴中，可在 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。解凍後，再予以切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依照 2.3.1. 節方法，製成 10 倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於 -20°C。
- 2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等檢體，經攪拌均勻後，取 50 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。
- 2.3.6. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之 10 倍稀釋檢液 10 mL，加至 0.1% 蛋白胰稀釋液 90 mL 中，依序作成 100 倍、1000 倍、10000 倍等一系列稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



2.4. 乳酸菌之培養：

- 2.4.1. 將 2.3. 節之稀釋檢液及(或)原液充分振搖，混合均勻。
- 2.4.2. 吸取各稀釋檢液及(或)原液 1 mL，分別置入培養皿中，

各檢液至少作二重複。

2.4.3. 2.4.2.節之各培養皿，分別倒入 43~45°C 之培養基 15~20 mL，搖動混合。

2.4.4. 將 2.4.3.節之培養基平板靜置，待培養基凝固後，置於 35~37°C 厭氧培養 72 ± 3 小時，腸球菌之培養則採好氧培養 24~48 小時。

2.5. 乳酸菌之計算：

2.5.1. 觀察菌落之生長狀態，添加碳酸鈣於 MRS 培養基中，使其濃度為 0.5%，為選擇性培養基，乳酸菌菌落會產生透明環；TOS-MUP 培養基中，典型雙叉桿菌為白色菌落，直徑約 1~4 mm；腸球菌培養基中，腸球菌為紅色菌落。

2.5.2. 菌數之計數：選取 25~250 個菌落之平板進行計數，其菌數之表示方式為 CFU/g 或 CFU/mL，記錄菌數時應將該數字第三位數字四捨六入(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)，使其有效數為兩位。

2.6. 檢驗流程圖

