

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：徐詮亮 博士
Advisor : Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

應用電化學法於紅茶飲料中衛生指標微生物之檢測
Quantitative determination of microorganism in black tea
drinks using electrochemical method

研究生：李昭緯 撰
Graduate Student : Hsia-Wei Li

中華民國一百零一年六月

June, 2012

謝 誌

對於從小就不怎麼喜歡念書、即使讓上了大學成績也平平的我來說，很難想像自己會念完研究所，更難想像自己會有寫謝誌的機會，回顧這兩年的研究生活，無論是酸甜苦辣的回憶全部都浮現在我腦海中，想要感謝一路上給予我鼓勵的師長、朋友、家人、以及實驗室裡一同共患難的戰友們，諸多在實驗、課業以及觀念上幫助我的貴人們，在大家的幫助下讓我的人生第一本著作得以順利完成。

首先誠摯感謝指導教授徐詮亮博士，從我進實驗室以來無論在實驗、生活上遇到了瓶頸或挫折時，老師總會適時的給予建議與鼓勵以及在論文撰寫期間耐心的指導，另外還要感謝兩位口委- 張谷昇博士這一路走來給予的協助跟建議，及詹鴻得博士過程中給予的鼓勵跟肯定，並感謝以上三位老師於百忙之中多次審閱本文，並在口試時提出論文架構與疏漏處之指正，細心與耐心審閱，逐字逐頁斧正，以及提供卓見之研究方向，使本論文更加完備，在此僅身致謝忱。

除此之外，要感謝元培科技大學的學生- 毅慧與淑帆，在我剛接觸電化學這塊領域時，無論是在實驗方向、架構甚至是技術方面毫不吝嗇給予我指導與糾正，灌輸正確的觀念，大大縮短我從頭摸索的時間，在兩位從旁協助與指正下，也讓我獲益良多，實驗上更加順利。

另外要謝謝研究所同學- 瑋翔、宏仔、昭蓁、中愷、曜寬、昭伶、慈樺、惠旻、昱仁、鈺萍等在研究所期間的陪伴，大家互相砥礪學習，趕實驗做報告，過程雖然辛苦且有時不順卻因為有你們而感覺苦中有樂，生活上有你們真的充滿歡笑，也很慶幸自己能和你們當同學，也感謝之前在蘇家的學長姐- 柏村、綱存、怡慧，謝謝你們在我剛進研究所時給予的照顧

和鼓勵，以及專題生- 文馨、柔蓁、姍螢、盧萱等人，雖然你們有時候會對學長我開玩笑，耍任性，但是因為有你們，實驗室氣氛常常很熱鬧、活潑，也謝謝你們在我最忙碌的時候給我打氣以及帶來許多歡笑，給予我動力。在此也先跟實驗室學弟妹昭蓁及中愷說聲抱歉，由於領域及方向的不同，在實驗上很難給予太多照顧與指導，但你們也都靠者自己摸索、查詢資料逐步建立自己的實驗架構及方向，在此勉勵你們能持續進步，也感謝你們的成熟及體諒。對於所有幫助過我關懷過我的人，這段期間因為有你們，讓我的研究所生活一點也不孤單，你們的協助及友情我將銘記在心，以上由衷感謝。

最後要感謝的是在背後默默支持及協助我的雙親還有姊姊，以及在教會、高中和大學的朋友們，你們無私的付出才能讓我無後顧之憂全力以赴投入在課業上，在你們的陪伴與支持下才有今天的我，在我口試完的這一刻最想將這份喜悅與你們每一個人分享。最後也祝福所有關心我的人，健康快樂。

李昭緯 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國一百零一年七月十九日

摘要

茶飲料是台灣最受歡迎的飲料之一，但常有生菌數過高、大腸桿菌群超標等問題，傳統檢測大腸桿菌及大腸桿菌群的標準方法包括：API system、Coliform agar 及 Petrifilm™ 等，但仍難擺脫繁瑣的步驟及耗時的過程。本研究主要以建立一套簡單快速、成本低廉的檢測方法為目的，實驗過程所使用的大腸桿菌群菌株包含 *Escherichia coli*、*Enterobacter*、*Citrobacter* 等，及 *Salmonella*、*Pseudomonas* 和 *Morganella* 三株非大腸桿菌群之革蘭氏陰性菌，操作條件分別設定在 0.3 及 0.5V，並維持恆溫 37°C，因為大腸桿菌培養過程所產生的代謝產物為電化學活性物質，達到一定濃度時可因通過電極之電流瞬間增加，產生明顯訊號，另外實驗中亦發現可藉由改變選擇性培養基成分達到分離大腸桿菌群及其他革蘭氏陰性菌的效果。結果顯示紅茶中之微生物濃度與檢測時間(Detection time, DT)呈線性關係，菌體濃度之檢測範圍可達 10^1 至 10^8 CFU/ml，且實驗中亦發現可藉由排除選擇性培養基中緩衝溶液之成份達到區分大腸桿菌及大腸桿菌群的效果。本研究開發之方法用於茶飲料總生菌數之檢測所需檢測時間根據實驗結果菌體濃度於 10^2 CFU/ml 以上均小於 10 小時，相較於傳統檢測方法需 24 至 48 小時，本方法明顯簡單、快速。

關鍵字詞：大腸桿菌(*Escherichia coli*)、大腸桿菌群(coliform)

- 、安培電化學法(amperometric)、紅茶(black tea)
- 、快速檢測(rapid detection)

Abstract

The contamination of highly plate counts including *Escherichia coli* in black tea drink, one of the most popular beverages in Taiwan, has been becoming a major concern for the public health. The traditional methods for detection of *E. coli* include API System, Coliform Agar and Petrifilm, etc., however, these culturing methods are excessively time-consuming and take cumbersome steps. In this study, a simple, rapid and cost-effective analytical method for the detection of *E. coli* and coliforms was established. Cultures of *E. coli*, coliforms and non-coliforms gram-negative bacteria were tested using the electrochemical method. The amperometric measurements were performed in the selective medium by the addition of black tea drink at a working potential of 0.3 V or 0.5 V and temperatures at 37 °C. The results showed that a linear relationship exists between the logarithm of the bacterial concentration (over the range of 10¹ to 10⁸ CFU/mL) and the detection time (DT). The addition of black tea drink into the selective medium caused the release of electrochemical active substances in microorganisms and produced a significant signal through the electrode reaction. The correlation coefficient (R^2) was 0.9354 and 0.9144 for the detection of *E. coli* and coliforms, respectively. The DT obtained from the proposed method is about 10 hours, which is shorter than those by traditional culturing methods. The proposed electrochemical method could both rapidly and sensitively determine the concentration of *E. coli* and coliforms in black tea drink samples.

Keywords : *Escherichia.coli* 、 Amperometric 、 Black tea 、 Rapid detection

目錄

	頁碼
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	VIII
第一章、前言.....	1
第二章、文獻回顧.....	3
2.1 大腸桿菌與大腸桿菌群.....	3
2.1.1 特性描述.....	3
2.1.2 檢測方法.....	4
2.2 生物感測器.....	7
2.2.1 電化學生物感測器.....	7
2.2.2 以電化學生物感測器開發多功能檢測平台之潛力.....	10
2.2.3 以電化學感測器檢測大腸桿菌之目前研究結果.....	13
2.3 紅茶.....	14
2.3.1 紅茶中成分分析及保健功效.....	14

2.3.2 衛生署訂定飲料類法定標準.....	17
第三章、材料與方法.....	19
3.1 儀器設備.....	19
3.2 培養基.....	20
3.3 化學試劑.....	20
3.4 茶飲料樣品.....	21
3.5 試驗用菌株.....	21
3.6 電化學檢測系統之架構.....	23
3.7 循環伏安(Cyclic voltammetry, CV)掃描.....	28
3.8 菌株活化.....	29
第四章、結果與討論.....	31
4.1 電化學檢測微生物機制之探討.....	31
4.2 電化學系統檢測微生物之最適電壓探討.....	36
4.3 電化學系統檢測微生物之最適溫度探討.....	40
4.4 以營養培養基檢測市售紅茶中微生物之探討.....	42
4.5 以循環伏安法檢測市售紅茶中微生物之探討.....	44
4.6 以電化學系統檢測市售紅茶中微生物之探討.....	46
4.7 電化學系統檢測大腸桿菌及大腸桿菌群之培養基碳源及成分 探討.....	48

4.8 電化學檢測大腸桿菌於不同糖度紅茶下生長之探討.....	54
4.9 電化學法及傳統方法對連鎖店紅茶飲料微生物之檢測.....	56
4.9.1 大腸桿菌與大腸桿菌群之檢測.....	57
4.9.2 總生菌數之檢測.....	58
第五章、結論.....	72
參考文獻.....	74

圖目錄

	頁碼
圖 2.1、生物感測器流程圖.....	9
圖 2.2、循環伏安法示意圖.....	12
圖 2.3、近年我國茶類飲料之銷售概況.....	15
圖 2.4、全球茶飲料產量概況.....	15
圖 3.1、Petri film 快速檢測操作流程.....	25
圖 3.2、電化學檢測茶飲料微生物實驗架構圖.....	26
圖 3.3、電化學檢測微生物之流程.....	27
圖 3.4、菌瓶開封及菌株活化.....	30
圖 4.1、大腸桿菌和大腸桿菌群於乳糖培養基之檢測.....	34
圖 4.2、大腸桿菌群和其他陰性菌於乳糖培養基之檢測.....	35
圖 4.3、大腸桿菌於不同電壓下之應答曲線.....	37
圖 4.4、大腸桿菌群於不同電壓下之應答曲線.....	38
圖 4.5、紅茶生菌於不同電壓下之應答曲線.....	39
圖 4.6、紅茶生菌於不同溫度下之應答曲線.....	41
圖 4.7、市售紅茶養品經由培養基圖盤之微生物檢測結果.....	43
圖 4.8、以循環伏安法針對市售紅茶微生物之檢測結果.....	45
圖 4.9、以電化學系統針對市售紅茶微生物之檢測結果.....	47

圖 4.10、大腸桿菌和大腸桿菌群於乳糖培養基添加紅茶之應答曲線...	51
圖 4.11、大腸桿菌群和其他陰性菌於無緩衝下乳糖培養基添加紅茶之 應答曲線.....	52
圖 4.12、大腸桿菌和大腸桿菌群於葡萄糖培養基添加紅茶之應答 曲線.....	53
圖 4.13、紅茶中大腸桿菌於不同糖度紅茶之應答曲線.....	55
圖 4.14、紅茶中不同大腸桿菌濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之應 答曲線.....	60
圖 4.15、紅茶中大腸桿菌菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線.....	61
圖 4.16、紅茶中不同大腸桿菌群濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之 應答曲線.....	62
圖 4.17、紅茶中大腸桿菌群菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線.....	63
圖 4.18、紅茶中不同生菌數濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之應 答曲線.....	64
圖 4.19、紅茶中生菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線.....	65

表目錄

	頁碼
表 2.1、各種茶葉主要成分含量.....	16
表 2.2、飲料類衛生標準.....	18
表 3.1、本研究所採用之本研究所採用之大腸桿菌、非大腸桿菌及大腸桿菌群菌株及來源.....	22
表 4.1、市售紅茶飲料之大腸桿菌檢測結果.....	66
表 4.2、市售紅茶飲料之大腸桿菌群檢測結果.....	67
表 4.3、市售紅茶飲料之生菌數檢測結果.....	68
表 4.4、大腸桿菌濃度於電化學法及傳統方法之標準差.....	69
表 4.5、大腸桿菌群濃度於電化學法及傳統方法之標準差.....	70
表 4.6、生菌數濃度於電化學法及傳統方法之標準差.....	71

第一章、前言

大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 廣泛存在於日常環境中(土壤、水質、食品)，是食品及飲用水是否遭受糞便污染之生物指標，大腸桿菌為兼性厭氧性的革蘭氏陰性桿菌，大部份大腸桿菌是無害且生長在健康人的腸道中，某些大腸桿菌可提供人體所需的維生素 B₁₂ 和維生素 K，亦能抑制其它病原菌之生長；由於該菌一般棲息在人和動物的腸道中，故可視為食品是否曾受糞便污染的指標。

食品遭大腸桿菌污染可能是由於加工不適、設備清洗不完全、生熟食交叉污染或儲存不當而受糞便污染，故大腸桿菌及大腸桿菌群之檢驗，正足以呈現出食品原料、半成品、食品本身及其於製造過程之基本衛生現況；此外包含其他腸內菌如果飲用水、飲料和食品中發現有大腸桿菌，表示已受污染。

傳統大腸桿菌檢測法，雖然普遍已被認可，但仍無法擺脫繁瑣之實驗步驟、費時和高成本等限制，且通常需要受過一定訓練之專業人員才可操作，且近年來微生物中毒案件層出不窮，部分傳統方法已無法符合多量且需短時檢測之理念；為此，在食品衛生、環境土壤和分析化學領域上，開發一套多樣品檢測，並具備分析快速、操作簡易及低成本之微生物檢測方法，為檢測食品衛生安全之趨勢。

目前大腸桿菌檢測法有許多種，由最傳統之最確數法(most probable number, MPN)、直接鏡檢法、到後來發展較先進的快速檢測法與分子生

物檢測法；其中快速檢測法包括染料還原試驗及電化學阻抗分析法之測定，而分子生物檢測法則包括免疫檢測法、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)及核酸生物晶片。上述方法之檢測範圍及靈敏度都很準確，但是普遍有前處理操作程序複雜繁瑣、藥劑及儀器成本過高且費時等。有鑑於此，本研究開發以電流式感測器系統為平台建立安培電化學分析法，其優點為操作簡便、快速且成本低廉，可應用於水質、市售飲料等快速為生物監控檢測。

本研究利用安培電化學法(amperometric electrochemistry)及選擇性培養基之結合來建立快速、操作簡便、精確之檢測系統，透過固定正電壓待大腸桿菌生長時釋放代謝物質，電化學活性物質改變使培養基 pH 值下降促使菌體脫離電極片使電流瞬間增加，產生明顯訊號，並應用選擇性培養基區別出大腸桿菌和大腸桿菌群。並可同時檢測多種樣品，利用微生物代謝促使電化學活性物質改變使菌體脫離電極表面所產生訊號之時間點來推算大腸桿菌濃度。紅茶為深受國人喜愛的飲料之一，不過近年來市售飲品微生物超標案件年年上升，因此開發一個能快速檢測大腸桿菌及大腸桿菌群之檢測系統即為本研究之重點。本研究目的在於快速檢測飲料是否已受到污染，若是否經適當的處理過程，以符合衛生標準，來達到及時監控及中毒事件之預防等。本研究特色為樣品短時間內快速檢測，且操作步驟簡單，並可同時檢測多種樣品，並區分待測微生物檢驗技術。

第二章、文獻回顧

2.1 大腸桿菌與大腸桿菌群

2.1.1 特性描述

大腸桿菌其屬名埃希氏菌(*Escherichia*)為人體和動物腸道的正常菌種，短桿狀、具有鞭毛、可運動，不會形成芽胞。大腸桿菌群(coliforms)還包括腸桿菌屬(*Enterobacter*)、檸檬酸桿菌屬(*Citrobacter*)、克雷柏氏桿菌屬(*Klebsiella*)等。係指一群好氣及兼性厭氧的革蘭氏陰性菌，生長溫度範圍為-2°C~ 50°C，最適合生長的溫度為37°C，生長pH值介於4.4至9.0之間，為兼性厭氧之格蘭氏陰性菌，技術上大腸桿菌群被定義為所有好氧或兼性好氧，不形成孢子，革蘭氏陰性(方等，1999)，因含有 β -D半乳糖酶(β -D-galactosidase)，可利用乳糖在48小時內35°C之下產生氣體和酸(Tryland & Fiksdal, 1998；Mittelman *et al.*, 2002)，存於溫血動物消化道下部，食品中如有大腸桿菌代表食品被糞便污染，所以衛生學上，常用於飲水、食品等衛生檢定指標(Lin *et al.*, 2008；Tokarskyy & Marshall, 2008)。飲用水中若含有大腸桿菌，表示水質受污染(Bukh *et al.*, 2010)。因大腸桿菌於生長中可產生尿甘酸化物酵素(β -glucuronidase)(許和胡，2005)，於選擇性培養基3M Petrifilm™ 上之pH指示劑反應產生藍色氣泡，而其他腸桿菌群以及出血型大腸桿菌(*E.coli O157*)不會產生此酵素，於培養基上發酵乳糖產酸，在酸的影響下pH指示劑會使培養基呈現暗紅色。

2.1.2 檢測方法

1. 直接鏡檢法

當菌種培養到單一菌落時，可進行直接鏡檢法觀察微生物的生長型態來鑑定病原菌。有些菌種的菌落比較小，也有些菌種的生長型態非常相似，往往會造成在顯微鏡下很難分辨，一般均會同時進行下述的培養法，以確保鑑定菌種的時效性與可靠性(劉等，2003)。

2. 培養法

所謂培養法須將菌體培養在膠質之固體培養基上，依菌體長到一定的菌落後，以觀察菌種的生長型態及生理生化反應來辨別菌種。一般菌種的生長需要24至72小時的培養，才會長出明顯的菌落。由於食品通常含有多種的微生物，故有時還須重新以增菌型培養基及選擇性培養基加以分離各種菌種，最後再進行鑑定試驗。此法須仰賴有經驗的技術人員來選擇適當的培養基及鑑定菌種，人力、經費及時間的花費相當可觀(劉等，2003)。

3. 膜過濾法(membrane filter method)

一般使用濾紙孔徑大小為0.45 μm 進行過濾，使液體樣品中的微生物滯留在過濾膜上，再經過鑑別性培養基培養，之後由菌落外觀顏色判定是否為大腸桿菌群，此法雖然可以過濾多種液體樣品，但是菌落培養仍需花費一定時間才有結果，且樣品中如摻雜有大量雜質、漂浮物，則會堵住濾膜孔隙，影響樣品過濾(Manafi, 2000)。

4. 酵素免疫檢測法 (enzyme immunoassay, EIA)

免疫檢測法即藉抗原與抗體的結合特性進行免疫分析，較常見的為酵素免疫檢測法，是利用酵素作為標記。首先將抗體固定於塑膠材料製成的微量反應盤上，加入含抗原的待測物與其進行結合，再藉清洗將未結合的待測物移除，最後加入鹼性磷酸酶之二次抗體及其受質，使其呈色來判斷菌種。雖EIA具高特異性及高敏感性，然其反應步驟及清洗步驟極為繁複，易造成檢驗過程不易掌握之缺點，且基本上一次只能鑑定一種菌種，在在侷限其應用。Chang & Huang (1997)是利用免疫檢測法檢測*E. coli*，其他方法如：(1)乳膠凝集作用；將抗體與乳膠結合後觀察抗原的凝集作用；(2)流體細胞計數：將抗體以螢光劑標示後藉流體細胞計數(或螢光顯微鏡)來檢測微生物。

5. 聚合酶連鎖反應

許多微生物檢體都需經培養以取得較大量的樣本後始能進行偵測，而PCR是一種可以在生物體外增殖DNA的技術，故被廣泛的應用在人類基因的突變檢測、微生物的偵測、動植物育種研究及開發新的醫療藥品等方面，其優點為樣品量小、敏感性高、特異性強且快速簡便。PCR只需要微量的DNA樣本，便可在數小時內將DNA增殖至好幾百萬倍；此法是利用兩小段單股DNA片段作為引子，經過PCR的反覆程序：變性、粘合及延伸，可將欲增殖的DNA片段以指數複製。一般PCR產物將經過電泳分離、

溴化乙啶染色等處理後，以紫外光照射便可觀察結果。此法的缺點在於不同的微生物需要用不同的引子進行PCR，使其實用化受到一定的限制。然已有Mansy(1999)利用此技術來鑑定 *Proteus mirabilis*，Bolton(2002)亦利用此技術配合EIA由食品中檢測 *Campylobacter jejuni* 及 *Campylobacter coli*，比傳統的方法為快。其他方法如多套式PCR雖可同時鑑定多種菌種，但多組的引子同時存在會增加引子之間互相干擾的機率，使PCR的靈敏度降低，且其他缺點為設備昂貴，前處理步驟複雜且費時，無論死菌或活菌均可檢測出來，使檢測結果可信度降低(Chang *et al.*, 2001)。

2.2 生物感測器

2.2.1 電化學生物感測器

一般臨床試驗中待測試樣均含有多種物質，若要偵測特定物種，就必須藉由專一性反應才會有明顯的結果，而生物感測器便符合這個需求，所謂生物感測器是利用生物元件所具備的專一性作為分析工具，再配合其他電子技術組成各種檢測系統，如何將生物活性分子(biological active materials)由物理反應訊號表示，即為生物感測器反應系統之主要目的(黃，2007)，生物感測器之流程圖顯示於圖 2.1。生物感測器之開端:葡萄糖生物感測器是由 Clark 及 Lyons 於西元 1962 年所開發出來(Clark and Lyons,1962)，有最早的血糖測試儀到後續開啟了酵素電極生物感測器，而生物感測器包含了下列幾項基本元件:

1. 生物感測元件(biological recognition element):

生物感測器有物理量測元件(如金屬)及化學感測元件(如電位化學)，利用此部分和待測物直接接觸產生專一性反應，可細分為生物親合性感測器(bioaffinity sensors)及生物催化型感測器(biocatalytic sensors)兩種類型之感測器，例如葡萄糖生物感測器就是催化型感測器。一般的生物元件大多利用生體組織、微生物、胞器、細胞受體、酵素、抗原、抗體、組織等生化物質來偵測樣品的存在。

2. 換能器(transduction element):

此部分將生物元件和待測物質反應後物理或化學量之改變，轉變成

電子訊號，而依物理及化學原理的不同又分為：光學(optic)、質量感應(mass-sensitive)、熱化學(thermal)、電化學(electrochemical)等(黃，2007)，如以酵素標記的免疫感測器中，酵素與受質反應過程中產生的熱能、吸收光、酸鹼值及其他化學物質等變化，而換能器的功能在於將這些變化轉變成電流訊號，在藉由紀錄器提供待測物之特性及濃度。

3. 訊號處理器(signal processor):

在樣品檢測過程中會有須多外來物質或是樣品本身雜質，都會干擾訊號造成判讀上的誤差，經由訊號處理器的處理會先將不必要的雜訊排除，讓判讀過程中可以更精確。

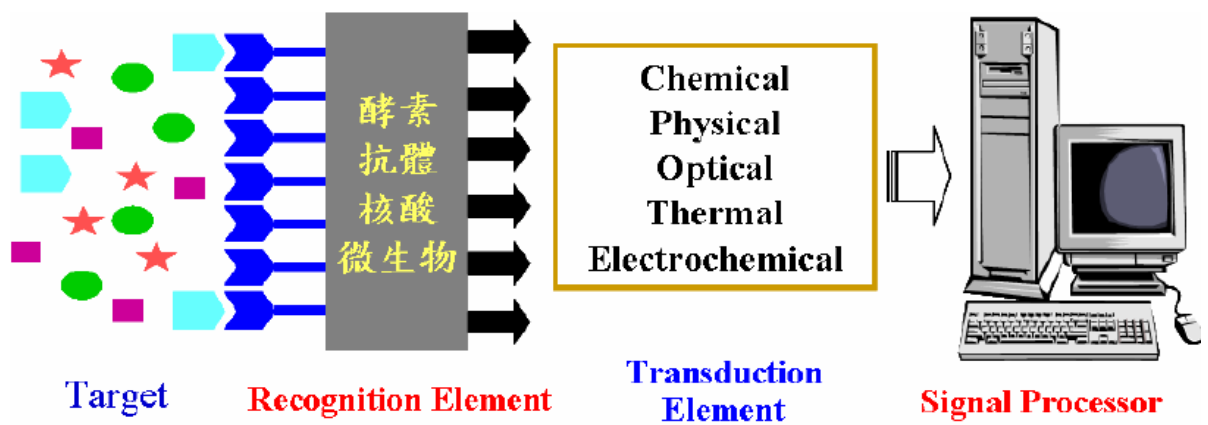


圖 2.1 生物感測器流程圖

Fig. 2.1. Flowchart of electrochemical system.

資料來源: (黃, 2007)

2.2.2 以電化學生物感測器開發多功能檢測平台之潛力

生物感測器相較於傳統檢測方法有許多優點，包刮電極可重複性使用；檢測時所需要的樣品量較低、操作步驟簡單、所花費時間短；搭配酵素修飾電極檢測之專一性及靈敏度高；攜帶方便，可用於現場檢測，當電化學生物感測器施以固定電壓時，由待測樣品所產生之電化學反應透過換能器等並連接電腦，即可判讀訊號特性進行即時檢測，且儀器成本低廉，搭配不同材質電極，可應用於多樣性之化學物質或微生物活性物質之檢測，經由上述優點克服傳統檢測方法操作複雜且費時等缺失，深具發展性 (Moorcroft *et al.*, 2001)。文獻回顧中已指出電化學生物感測器應用於食品中亞硝酸鹽含量的快速檢測(鄭，2006)，可搭配固定化酵素修飾電極來排除檢測時的干擾(Chang *et al.*, 2007)，以及經由四氧化三鐵之奈米微粒促進蛋白質分子將電子直接轉移至電極上，大幅提高感測器靈敏度及訊號值(呂，2006)。此外電化學分析法有電化學分析法尚有多樣分析技術，如循環伏安法(cyclic voltammetry)、安培法等等。循環伏安法原理為提供一如圖 2.2 之三角波電壓，促使反應物得到能量以進行氧化-還原的反應，在施以固定電位掃描速率下，就由所得到之電流-電位曲線(即循環伏安圖)，可獲得電化學活性物質於電極表面之氧化還原相關資訊，通常電流的產生是由於電子轉移所造成，其發生反應電位會由於分析物之墊子軌域能階不同而有所改變，如循環伏安法可測得氧化還原電位(Skoog *et al.*, 1994)；阻

抗法則藉由小振幅電壓促使電解液中離子流動，藉以測量電極上之電流值
(黃，2007)。

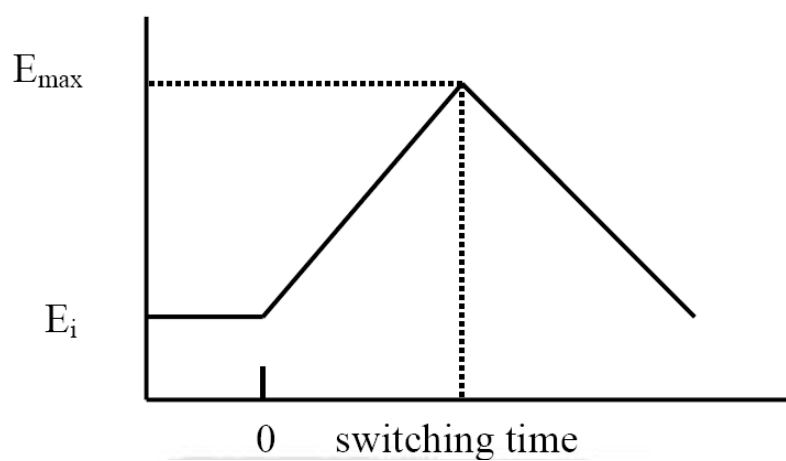


圖 2.2、循環伏安法示意圖。

Fig. 2.2. Illustration of cyclic voltammograms.

資料來源: (黃, 2007)

2.2.3 以電化學感測器檢測大腸桿菌之目前研究結果

近年來生物感測器早已成為檢測病源性微生物(如大腸桿菌)方法之一(Ivnitski *et al.*, 1999 ; Leonard *et al.*, 2003), 電化學生物感測器是利用電位、電流、電阻等變化搭配換能器使用達到快速檢測、高敏感度等優點, 如大腸桿菌群產生 β -D-galactosidase 代謝乳糖快速產酸達到明顯訊號產生(Tryland & Fiksdal, 1998 ; Mittelman *et al.*, 2002), 亦有文獻以安培電化學感應器結合甲基藍還原法檢測牛乳中大腸桿菌濃度(Lee *et al.*, 2009)目前已發展成利用酵素修飾-免疫感測器快速檢測樣品中大腸桿菌(Lin *et al.*, 2008)。而電化學生物感測器依其操作方式又分為阻抗法、安培法和電位法三種傳導機制(陳, 2006), 其中使用上又以電流式生物感測器(安培法)最廣泛, 其原理是給予一定範圍之電位, 施以固定電壓來提供電極表面能量, 使其足夠造成電子轉移形成電流, 根據大腸桿菌吸附於電極表面氧化電流變化大小與菌體的濃度關係, 間接檢測大腸桿菌(程等, 2009), 雖然目前上述方法已被廣泛使用, 但在實際操作上仍有許多缺點, 例如電極雖可重複性使用, 但重複後靈敏度穩定性不足、活菌或死菌均有可能產生活性物質(偵測上不易分辨)及再現性低等缺點。而傳感器雖然檢測時間較傳統方法來短, 但樣品分析係同仍不夠完善(湯, 2010), 仍需有須多進步空間。未來電化學生物感測器再現性和靈敏度之強化勢必為發展性之必要條件。

2.3 紅茶

2.3.1 紅茶中成分分析及保健功效

近年來茶類飲料逐漸取代碳酸飲料，成為我國飲料市場中之主流，2006 年飲料市場國產茶類飲料總銷售量成長4.5%、達10億升規模，就成長性來看，以烏龍茶飲料表現最好、綠茶次之，皆有超過10%的成長，表現在市場佔比方面，則以綠茶飲料居首，佔有35.7%，其次為奶茶及果茶飲料，分別佔約20%上下，紅茶次之(11.8%)，烏龍茶飲料則居第五佔約10%(王，2006)，圖2.3為近年來我國茶飲料銷售概況。雖然紅茶在台灣普及率不高，不過以各國茶葉市場角度看來，每年全球茶產量超過250萬噸，超越碳酸飲料產量，其中90%為全發酵的紅茶，顯示紅茶飲料早已成為全球趨勢，圖2.4為全球茶飲料產量概況(姚，2004)。茶葉中含有多種化學成分，如:胺基酸、多元酚類(單寧酸)、咖啡因、碳水化合物(還原糖、維生素)等，表2.1為各種茶類成分分析，其中作為多元酚氧化酵素(polyphenol oxidase)之基質，會依茶葉發酵程度進行氧化縮合反應導致酚類物質減少，未發酵茶(綠茶)之茶多酚含量約為87%，全發酵茶(紅茶)約為13%，由於茶多酚會進行氧化還原反應，於生物感測器偵測時會產生干擾代測物之訊號，所以就檢測上來說檢測紅茶所受茶多酚物質干擾的情形遠小於綠茶。

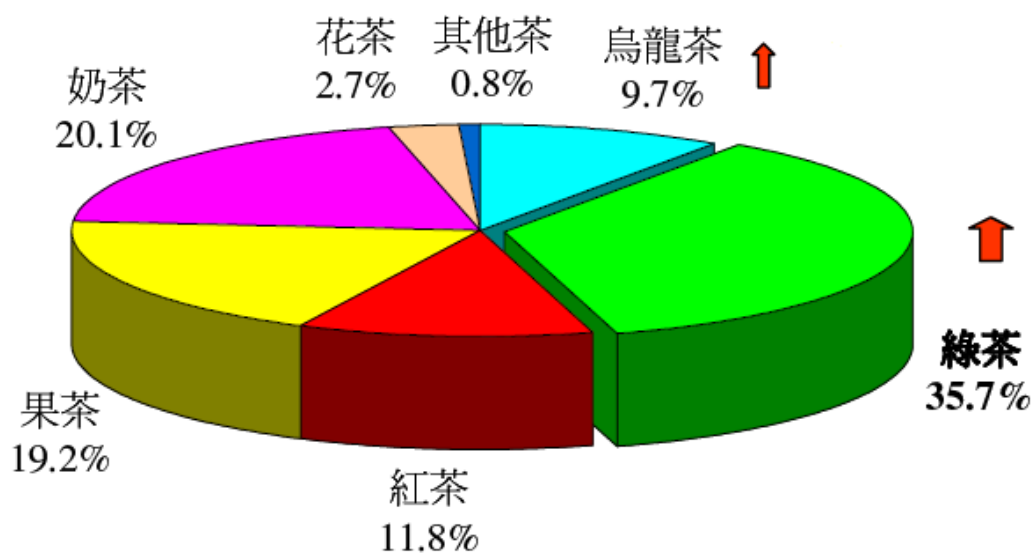


圖 2.3、近年我國茶類飲料之銷售概況。 資料來源: (王，2006)

Fig. 2.3. The sells situation of tea drinks in recent years in Taiwan.

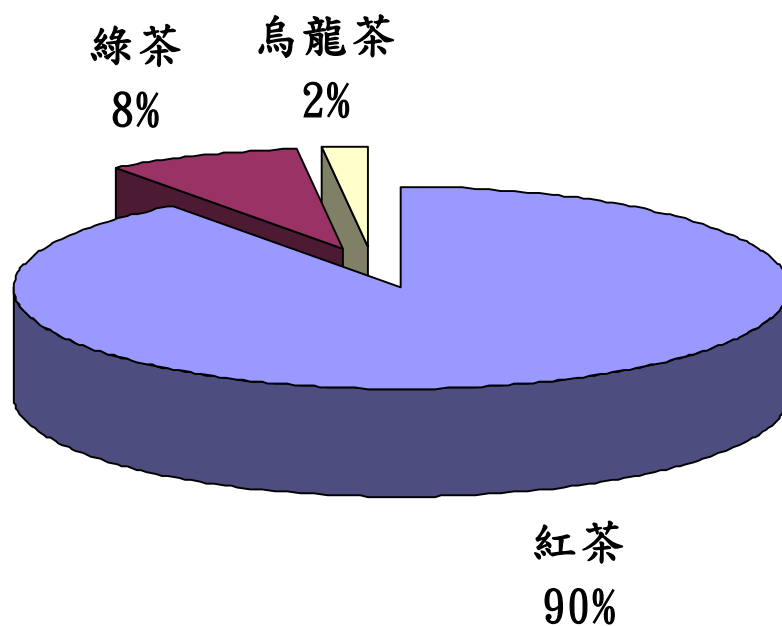


圖 2.4、全球茶飲料產量概況。 資料來源: (姚，2004)

Fig. 2.4. The production of tea drinks in the world.

表 2.1 各種茶葉主要成分含量

Table 2.1. The components in the various tea leafs

茶葉種類	單寧 (%)	全氮量 (%)	咖啡因 (%)	可溶成 分 (%)	乙醚浸 出 (%)	粗纖維 (%)	灰分 (%)
煎 茶	12.64	5.88	2.82	46.62	4.56	10.64	5.83
玉綠茶	12.53	5.17	3.11	47.83	3.70	10.18	5.19
釜炒綠茶	11.53	5.09	2.93	46.65	3.53	9.57	5.20
玉露茶	11.24	6.62	3.73	42.87	4.28	14.00	6.79
碾 茶	10.47	7.05	4.62	46.72	5.14	9.66	6.68
番 茶	10.47	3.82	1.97	40.03	4.31	18.98	5.35
烏龍茶	12.46	4.01	3.00	44.34	2.80	12.22	6.33
紅 茶	13.16	4.39	2.73	37.53	2.87	10.68	5.11
綠 茶	6.98	2.82	1.10	20.27	3.47	24.97	5.39

(資料來源: 大同茶葉股份有限公司

<http://tatung.cis.justgogo.tw/cis/ContentV2.aspx?mp=17659>)

2.3.2 衛生署訂定飲料類法定標準

近年來，我國手搖飲料連鎖店微生物超標案例是層出不窮，地方衛生機關曾多次針對「飲料店」的衛生進行抽檢，無論是知名連鎖或一般飲料店，還是有不少店家不符合衛生規定。而這類超大杯飲料店，多半採「攤車」方式經營，衛生狀況完全不清楚；大腸桿菌群和生菌數為評估製造過程的衛生指標之一，當這其中一項過高時，表示店家的原料，如水或冰塊，在製造過程中可能遭受到污染，或者是店家的貯存環境不佳，而使微生物孳長。目前衛生署針對「飲料類衛生標準」(中華民國 100 年 7 月 29 日署授食字第 1001302250 號令修正第四條、第五條規定)，含有咖啡、可可、茶或其他植物性原料之飲料，每公撮(毫升)中生菌數應於 10000 以下，大腸桿菌群則於 10 以下，表 2.2 為衛生署訂定飲料類衛生標準。根據消基會於 2010 年統計，抽查北縣 15 家知名連鎖飲料店，檢驗結果雖只有 1 件驗出過量的生菌數，但卻有 8 件大腸桿菌群超標，且均為紅茶飲品，不合格率達 53%。由於紅茶是經由沖泡方式製作而成，所以本身不會有微生物存在問題，但如果接觸到沒有充分洗淨的器具、添加於飲料的冰塊或是工作人員操作時遭到污染，都有可能造成大腸桿菌群過高，因此大腸桿菌群也是監測食品是否遭到污染或製造過程的衛生指標之一。

表 2.2、飲料類衛生標準

Table 2.2. The beverage hygiene standard in TFDA.

類別	生菌數 (cfu/mL)	大腸桿菌群 (MPN/mL)	大腸桿菌 (MPN/mL)	沙門氏菌
一、含有碳酸之飲料： 包含汽水、可樂	10 ⁴ 以下；但有 容器或包裝者 應在 100 以下	10 以下；但有 容器或包裝者 應為陰性	陰 性	陰 性
二、果蔬汁及果蔬汁 飲料				
(一)未經稀釋及商業 殺菌之鮮榨天然 果蔬汁	—	10 ³ 以下	10 以下	陰 性
(二)還原果蔬汁、果蔬 汁飲料、果漿(蜜)	10 ⁴ 以下；但有 容器或包裝者 應在 200 以下	10 以下；但有 容器或包裝者 應為陰性	陰 性	陰 性
(三)發酵果蔬汁、發效 果蔬汁飲料	—	10 以下；但經 加熱殺菌者應 為陰性	陰 性	陰 性
三、以食品原物料萃 取而取得之飲料 (包括咖啡、可 可、茶，供飲用之 飲料)	10 ⁴ 以下；但有 容器或包裝者 應在 200 以下	10 以下；但有 容器或包裝者 應為陰性	陰 性	陰 性
四、添加乳酸或西式 發酵乳調味汁 酸性飲料	—	10 以下；但有 容器或包裝者 應為陰性	陰 性	陰 性

(資料來源：衛生署食品藥物管理局)

中華民國 100 年 7 月 29 日署授食字第 1001302250 號令修正第四條)

參、材料與方法

3.1 儀器設備

1. 微量分注器(Model P100、P1000、P5000, Gilson Pipetman, Connecticut, USA)
2. 恆電位電流儀(CHI802B, CH Instruments Electrochemical Analyzer, USA)
3. 恆溫循環水槽(CY-130, Cheng Yang Instrument, Taichung, Taiwan)
4. 低溫恆溫培養箱(KK04-498, SANYO, Tokyo, Japan)
5. 加熱攪拌器(SK-10541, Shin Kong Industries, New Taipei city, Taiwan)
6. 類比數位轉換卡(AT-MIO-16E, National Instruments, Texas, USA)
7. 資料擷取卡(NI USB-6008, National Instruments, Texas, USA)
8. 高壓消毒氣直立式(TM-328, Tomin, New Taipei city, Taiwan)
9. 漩渦攪拌器(Model-G560, Scientific Industries, St. Louis, USA)
10. 微量電子天平(BL 120S, Precisa Instruments, Ltd., Switzerland)
11. 標準型微量電子天平(XS-6250, Precisa Instruments, Ltd., Switzerland)
12. 微生物計數器(SK-20162, Shin Kong Industries, New Taipei city, Taiwan)
13. 電子防潮箱(TMC-75, TATUNG, Taipei, Taiwan)

3.2 培養基

硫酸月桂酸胰化蛋白培養液(lauryl sulfate tryptose broth, LST broth)、營養培養基(nutrient agar, NA)、營養培養液(nutrient broth, NB)、LB 培養液(luria-Bertani broth, LB broth)、胰化蛋白(Bacto™ Tryptose) 平板計數培養基(plate count agar, PCA)均購自 BD(Becton、Dickinson and Company, Maryland, USA) ; Petrifilm™ 購自 3M Business, Maplewood, Minnesota, USA)。

3.3 化學試劑

實驗所用之樣品試劑：乳糖(lactose)購自 CHENG HSIN TANG 公司，台北市，台灣；葡萄糖(glucose)選購自 COTA 公司，台中市，台灣；蔗糖(sucrose)和果糖(fructose)選購自友和貿易公司，新北市，台灣；十二烷基磺酸鈉(sodium lauryl sulfate, SDS)選購 SIGMA 公司，St. Louis, MO, USA；磷酸二氫鉀(monopotassium phosphate, KH_2PO_4)、磷酸氫鉀(dipotassium phosphate, K_2HPO_4)、氯化鈉(sodium chloride)、磷酸二氫鈉(sodium dihydrogen phosphate)均購自島久藥品株式會社，大阪市，日本；95%乙醇(ethanol)購自景明化工公司，苗栗縣，台灣，以上所列藥品均為試藥一級。

3.4 茶飲料樣品

沖泡式紅茶包選自立頓(聯合利華公司, 桃園市, 台灣); 包裝紅茶選自茶裏王(統一企業, 台南市, 台灣); 早餐店紅茶; 市售連鎖飲料店紅茶均選自台中市龍景區東海別墅店家。大腸桿菌和大腸桿菌群之檢測將購買市售連鎖店之無糖紅茶, 待飲料中內部冰塊完全融化, 並於震盪後取 1ml 於已添加 1ml 選擇性培養基之電極玻璃管中進行檢測, 紅茶中生菌數之檢測會選購市售連鎖店之含糖紅茶, 同樣待飲料內部冰塊融化, 於震盪後取 1ml 之樣品於電極玻璃管中進行檢測。

3.5 試驗用菌株

本實驗所用菌株包括非病原性大腸桿菌(*E.coli*) 2 株, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp. 等 3 株大腸桿菌群菌株, 以及 3 株非大腸桿菌群菌株 *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Morganella morganii*。

菌株來源包括台灣食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI, Hsinchu, Taiwan)生物資源中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsinchu, Taiwan)及東海大學(Tunghai University, THU)李根永老師實驗室及微生物實驗室提供, 菌株編號列及來源列於表 3.1。

表 3.1、本研究所採用之大腸桿菌、非大腸桿菌及大腸桿菌群菌株及來源
Escherichia coli、non-coliform bacteria and coliform strains used
in this study.

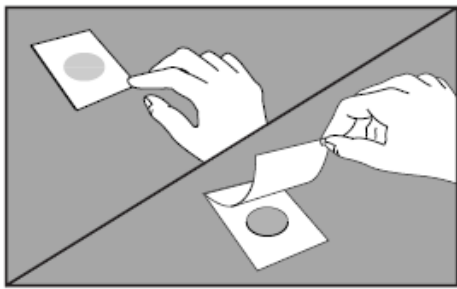
Species	LAB No.	Provenance
<i>Escherichia coli</i>	BCRC 10239	FIRDI
<i>E.coli</i>	unknown	THU
<i>Salmonella typhimurium</i>	unknown	THU
<i>Morganella morganii</i>	BCRC 10706	FIRDI
<i>Citrobacter freundii</i>	BCRC 12292	FIRDI
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BCRC 15630	FIRDI
<i>Klebsiella spp</i>	BCRC 17913	FIRDI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	unknown	THU

3.6 電化學檢測系統之架構

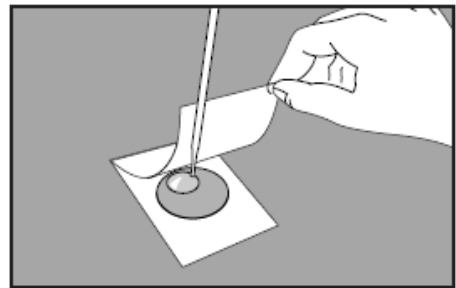
本實驗之檢驗平台主要是電極系統，在實驗上電極材質往往會影響實驗結果，所以在選擇上極為重要，研究中會以電極浸入接種微生物的培養液中並施加電壓，藉由微生物所產生電流變化訊號做判定。根據前人文獻指出鈱電極經實驗過後會產生剝落，而碳膠電極靈敏度較低，白金電極有較佳的穩定性及靈敏度(湯，2010)，所以本實驗亦用白金電極作為此平台之電極系統，將電極浸入接種微生物之培養液，電極和定電位計相結合以控制電壓輸出，另外會接上類比數位轉換卡與電腦，負責訊號輸出與儲存，數據紀錄由一慧基公司(National Instruments, Texas, USA)出產之資料擷取卡(peripheral component interconnect, PCI)，做訊號轉換工作並收集數據，最後由慧基公司出產之 Labview 套裝程式作訊號擷取、傳輸與紀錄等工作。實驗以自製電化學系統測試樣品，透過電化學儀器搭配選擇性培養基檢測大腸桿菌生長時所造成電流變化所產生相對訊號，並且同步進行傳統方法 3M petrifilm™ 之檢測，其流程為先將測試片於無菌操作台平坦表面處撕開，並取代測樣品 1ml 於測試片正中央緩慢加入，並將上膜緩慢蓋下，之後以壓板壓平待培養基凝固後，將測試片放入培養箱中 24 至 48 小時觀察結果(如圖 3.1 所示)。利用菌體濃度與電化學檢測時間即可做出檢量線，藉以利用電化學系統之反應時間推算樣品中大腸桿菌濃度。

圖 3.2 為本研究之實驗架構圖，將市售飲料分為含糖及無糖紅茶兩部分，

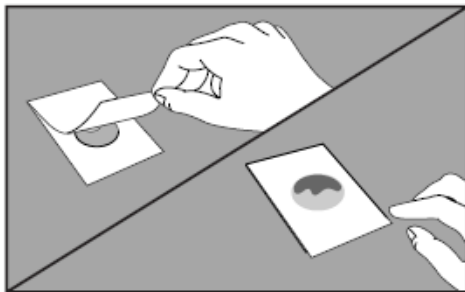
無糖紅茶部分會利用添加選擇性培養基分離出大腸桿菌，並針對選擇性培養基成份探討進一步區分出大腸桿菌及大腸桿菌群，含糖紅茶部分則會用來檢測生菌數之濃度，經由一連串最適條件探討(最適電壓和最適溫度)，製作出紅茶中大腸桿菌、大腸桿菌群和生菌數之電化學系統檢量線，並進行市售紅茶之實際樣品檢測，其中又以電化學法和 3M petrifilm™ (傳統方法)進行比較，以確認本研究之實用價值。圖 3.3 為電化學系統檢測微生物之流程圖，將市售紅茶樣品及選擇性培養基各取 1ml 加入電極玻璃管中接上電極頭，於水浴槽中設定 37°C 恆溫、電壓設定為 0.3V 及 0.5V，搭配資料擷取器做訊號收集及放大等工作，於電腦螢幕呈現出電化學反應圖。



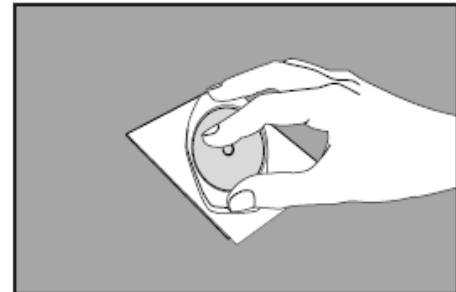
1. 將測試片至於平坦表面處，揭開上層模。



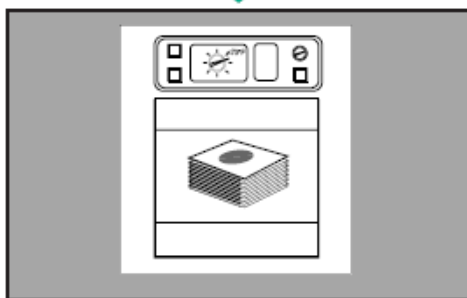
2. 以為量低管取 1ml 樣品垂直低加在測試片中央處。



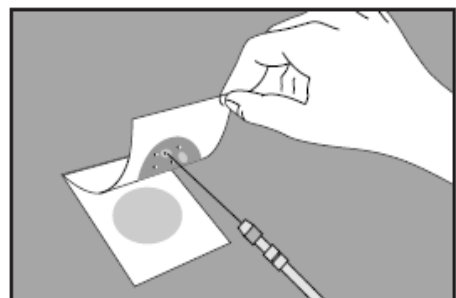
3. 將上膜緩慢蓋下，避免氣泡產生。



4. 將壓版輕輕壓下，使樣品液均勻覆蓋於圓形培養基上。



5. 將測試片置於培養箱中約 24~48h，透明面朝上。



6. 可藉由目視或菌落計數器計數，或挑取單菌落進一步鑑定。

圖 3.1、Petrifilm™ 快速檢測操作流程。

Fig 3.1. Procedure for E.coli / coliform by Petrifilm™.

(資料來源: <http://www.3m.com/product/information/Petrifilm-Plate.html>)

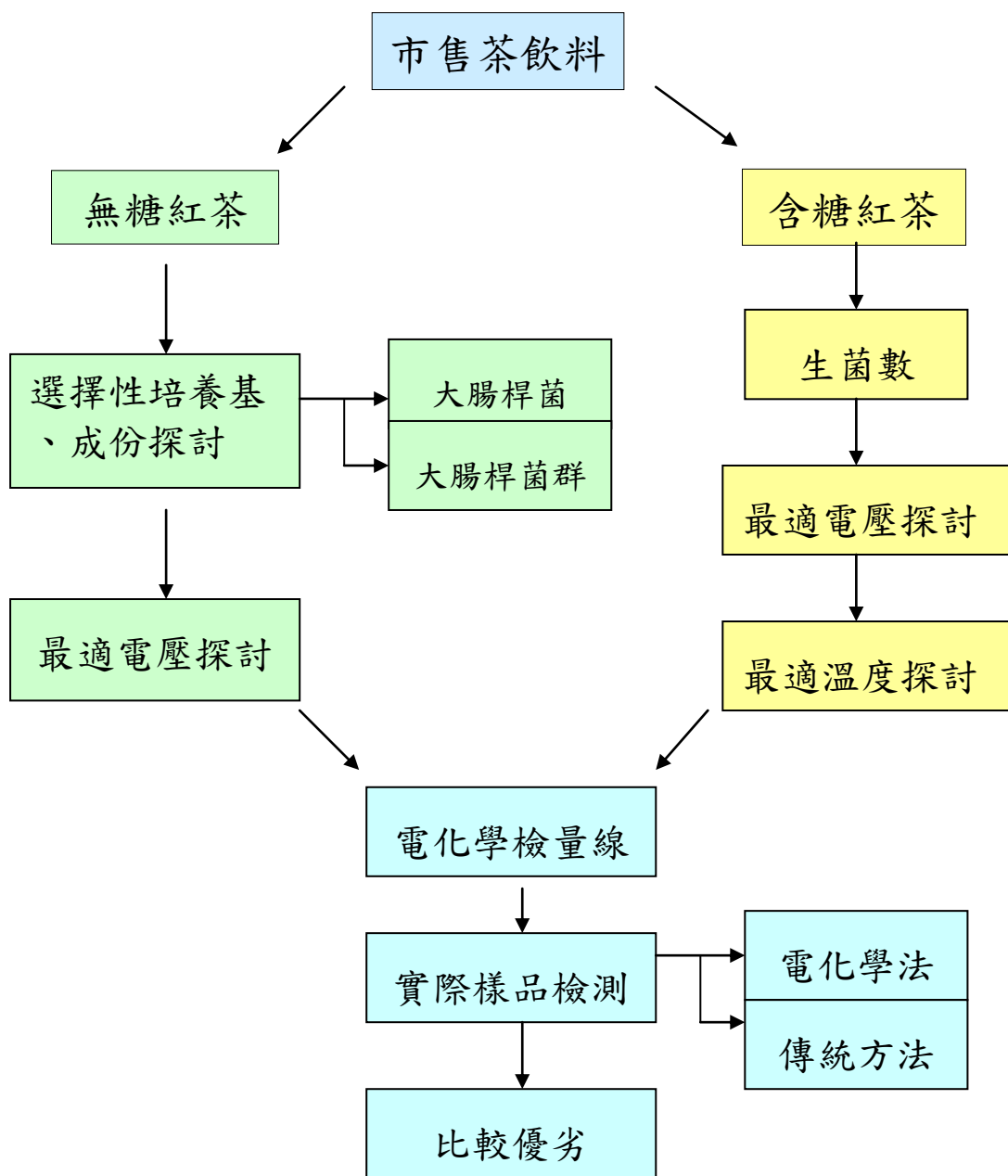
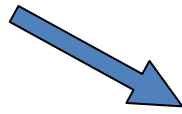


圖 3.2、電化學檢測茶飲料微生物實驗架構圖。

Fig.3.2. Electrochemical procedures for detection of microorganisms.



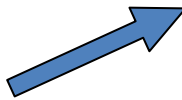
市售紅茶樣品



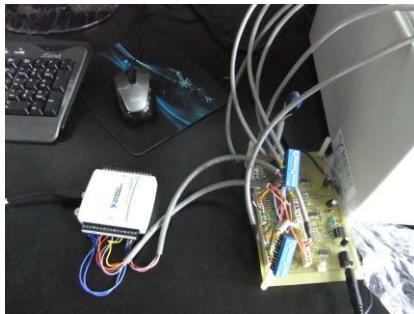
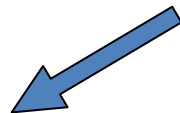
電極玻璃瓶



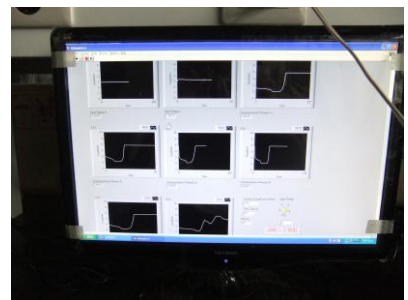
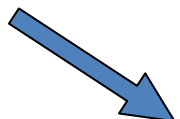
選擇性培養基 (LST broth)



恆溫槽 37°C



安培電化學系統



電化學反應圖

圖 3.3、電化學系統檢測微生物之流程。

Fig. 3.3. The process electrochemical detection.

3.7 循環伏安掃描(cyclic voltammetry, CV)

循環伏安法為一固定電位掃描下之電化學反應，是一種三角波信號，電位在兩極之間做循環改變，一開始會以現性方式增加至最大值，當電流衰減至某一程度(某一電位)再以現性方式(相同斜率)將電位做反向掃描回到原值，此即循環伏安法(CV)(呂，2006)，此循環可以重複數次。循環伏安法由於操作簡單、訊息數據較多，並可進行理論基礎探討，因此為電化學量測機制中常見的方法(黃，2007)。從循環伏安法之分析圖譜中，可以詳細觀察到待測分析物種的氧化還原電位及電流特性。

3.8 菌株活化

本研究中所使用之菌株包含 *Escherichia coli*、*Enterobacter*、*Citrobacter*、*Klebsiella* 和 *Morganella* 購自食品工業發展研究所生物資源中心，其形態為粉末，菌株使用前須經過活化的過程，其步驟如圖 3.4 所示，步驟為以沾有 70% 酒精的棉花，擦拭外管並在火焰上加熱外管之隔熱纖維前端，滴水於加熱處使外管即龜裂，再以硬棒敲破，取出隔熱纖維和內管，以鑷子取出內管之棉塞。以無菌吸管，吸取 0.3 ~ 0.5 ml 指定之液體培養基，滴入內管將菌體洗下；吸放數次，並使菌液充分均質並儘快吸取此菌體懸浮液，滴入指定之液體培養基內，在指定之溫度下培養 3 ~ 4 天。培養液呈混濁即表示菌株。

。

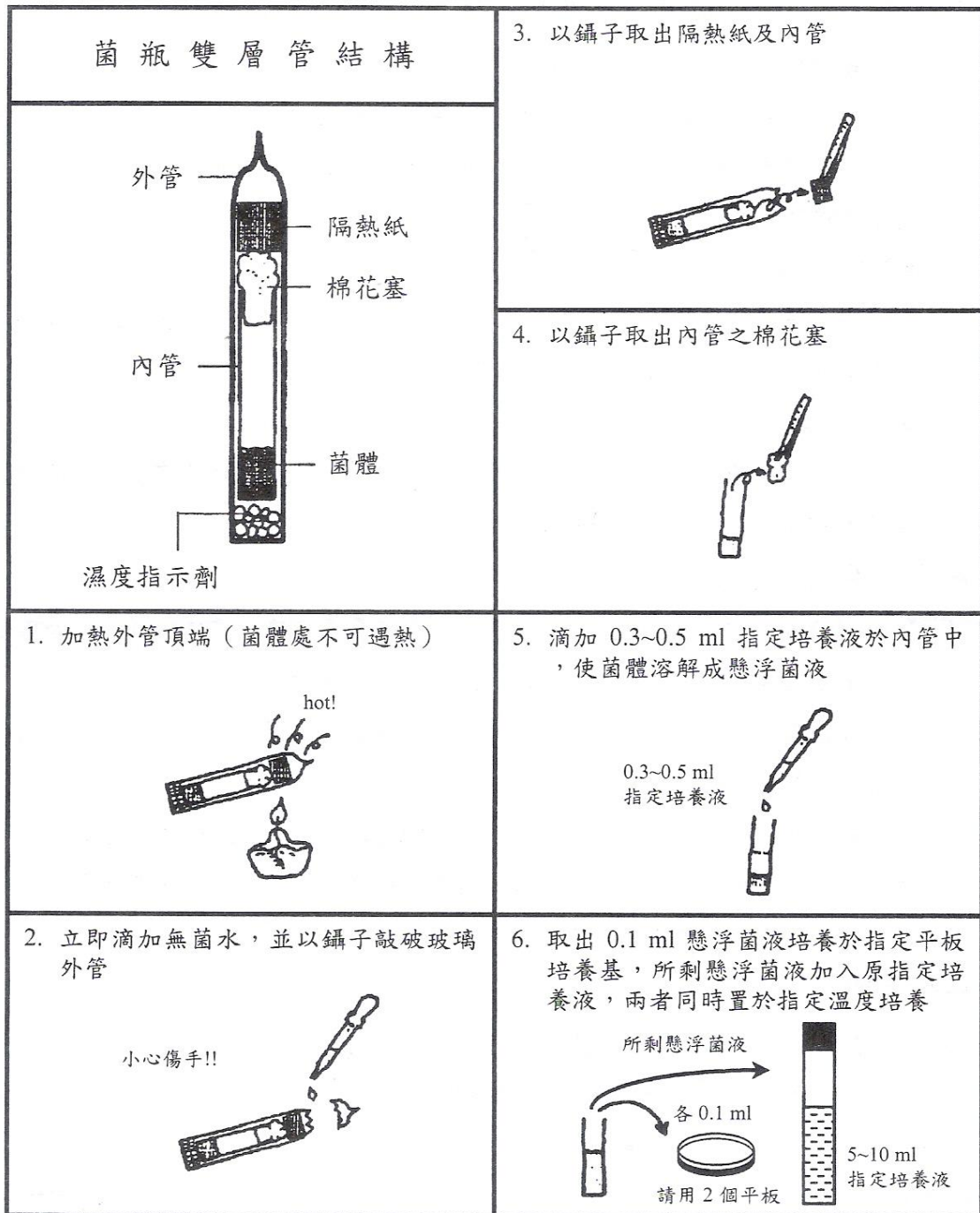


圖 3.4 菌瓶開封及菌株活化。

Fig. 3.4. The activity of microorganism.

(資料來源: 食品工業發展研究所生物資源中心)

第四章、結果與討論

4.1 電化學檢測微生物機制之探討

一般傳統大腸桿菌檢測法可簡單分為兩部份，(1)初步檢測:待測樣品於乳糖發酵管中產酸產氣，表示樣品中可能含有大腸桿菌群;(2)確定試驗:將產酸之菌液於 EMB Agar 培養，產生綠色金屬光澤菌落，且細菌染色為 (G-)，表大腸桿菌陽性結果，但由於其他大腸桿菌群如 *Yersinia enterocolitica*、*Citrobacter* 等產酸較強的細菌也可能產生類似金屬光澤之表現(湯，2010)，所以本研究之傳統方法檢測會以大腸桿菌及腸桿菌群專用 Petrifilm 取代 EMB Agar，以提升實驗準確性，圖五為 3M Petrifilm™ 快速檢測流程。本研究結合安培電化學法及選性培養基建立一套快速、簡便的檢測系統。實驗操作流程見圖 3.2，電化學檢測法流程見圖 3.3，將白金電極浸入已接種微生物的選擇性培養基中，一般而言微生物(如大腸桿菌群)在中性培養基的環境下，當細菌所處的環境 pH 值高於菌體等電點時會帶負電(Poortinga et al., 2002)，一般革蘭式陽性菌之等電點為 pH 2-3，比陰性菌的 pH 4-5 還來的低，因此所有微生物在中性培養基環境下均會帶負點，在施加固定電壓(正電壓)情況下，微生物會順者電極方向移動，吸附並且在電極表面繁殖，此時電極所產生之電流會因微生物的吸附而微幅下降，加上大腸桿菌生長時產酸快速(相較於其他腸桿菌群)，促使菌體為本身由負電荷轉變成正電荷迅速脫離電極表面，同時因為電壓使培養液

產生電化學變化其電解成分於較低 pH 下，電極周圍形成靜電壓，改變菌體正常生長環境下原有的電位差，因而打破細胞內外的離子濃度平衡狀況，在此加乘作用下可造成大腸桿菌破裂，胞內物質流出促使電流訊號變動(湯，2010)。由上述推論可知，大腸桿菌與其他革蘭式陰性及陽性菌的辨別關鍵在於大腸桿菌於含有乳酸之培養基下能發酵產生非常高量的酸，促使周圍環境產生大幅度的酸鹼變化使微生物達到脫離電極的效果，文獻中亦指出在大腸桿菌與大腸桿菌群同時於含乳糖之培養基下，於一段時間培養後，大腸桿菌 pH 值可下降至 5.0 左右，而大腸桿菌群(如 *Enterobacter*、*Citrobacter*)變動有限，最下降至約 6.0，且經由同步檢測發現只有大腸桿菌與特定時間內會產生訊號變化，大腸桿菌群則否，顯示大腸桿菌產酸能力更強，圖 4.1 為大腸桿菌和大腸桿菌群於乳糖培養基之檢測。

大多數培養基成分中皆會添加緩衝 pH 值改變的化學物質或試劑，例如 LST 培養液中即添加了 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 兩種磷酸緩衝液，可以讓培養液維持在 pH 值維持在 6.8(丘，2004)，因此本實驗利用此特性鑑別出大腸桿菌群與其他革蘭式陰性菌，其關鍵在於配置 LST broth 中排除兩種磷酸緩衝液，讓大腸桿菌群於檢測過程中產酸讓培養液 pH 值迅速下降，同樣促使菌體脫離電極、菌體電位差改變進而達到微生物胞內物質流出產生訊號變化的效果，經由紀錄此電極誘發產生電流峰所需時間，即可推測樣

品中大腸桿菌或大腸桿菌群濃度，圖 4.2 為大腸桿菌群和其他陰性菌於無緩衝下乳糖培養基之檢測，而其他陰性菌由於無法分解乳糖產酸，所以不會造成電流訊號變化。

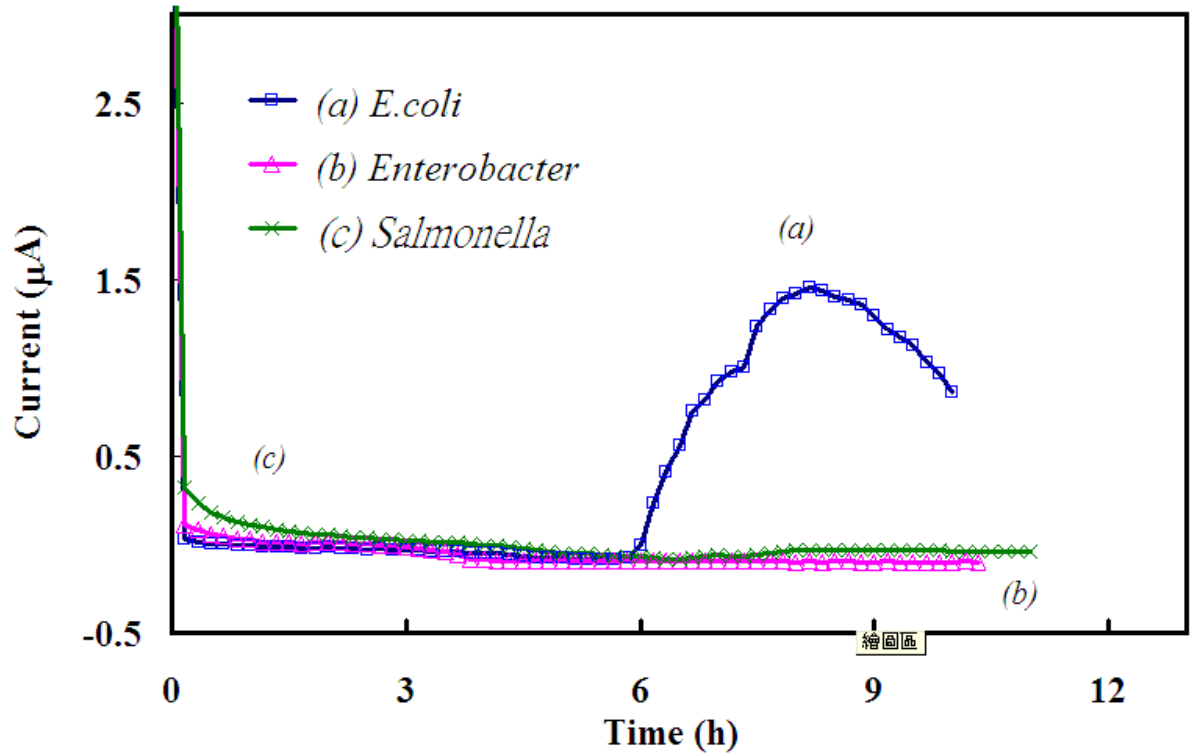


圖 4.1、大腸桿菌和大腸桿菌群於乳糖培養基之檢測。

Fig. 4.1. Detection current profile of the amperometric sensor when electrode was immersed in LST-Lactose (a) *E.coli* (b) *Enterobacter* (c) *Salmonella* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

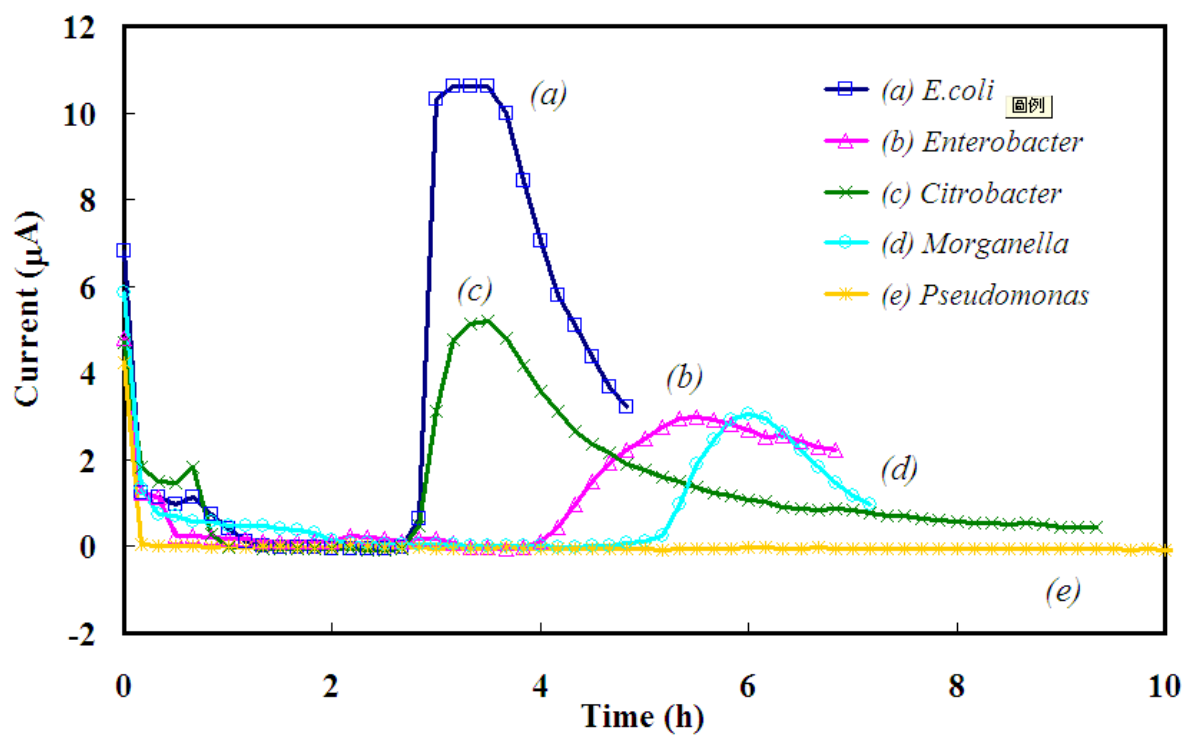


圖 4.2、大腸桿菌群和其他陰性菌於無緩衝下乳糖培養基之檢測。

Fig. 4.2. Detection current profile of the amperometric sensor when electrode was immersed in non-buffer solution LST-Lactose (a) *E.coli* (b) *Enterobacter* (c) *Citrobacter* (d) *Morganella* (e) *Pseudomonas* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

4.2 電化學系統檢測微生物之最適電壓探討

實驗中以安培電化學法對大腸桿菌、大腸桿菌群和生菌數分別進行 0、0.1、0.3、0.5 和 0.7V 等不同電壓檢測，溫度設定為 37°C，經由白金電極進行培養與檢測果顯示大腸桿菌於 0.1V 下之應答相對微弱，且相較於其他電壓下其檢測時間亦是最長，而 0.7V 下之應答極不穩定，推論是電壓過大引起細菌細胞破裂之緣故，至於 0.3 和 0.5V 下均有顯著的波峰，以不同電壓檢測大腸桿菌之應答結果如圖 4.3 所示，文獻中指出以循環伏安電壓 1 至 -1V 範圍內掃描顯示 0.3V 和 -0.3V 均有電流峰，且安培電化學法檢測下顯示 0.3V 可產生較大的電流強度(湯，2006)，故後續大腸桿菌檢測電壓條件接設定為 0.3V。大腸桿菌群和生菌數之最適電壓探討分別顯示於圖 4.4 和圖 4.5，由結果可知在相同濃度下大腸桿菌群於 0.5V 下訊號最大，檢測時間也愈短，而總生菌數在 0.5V 與 0.7V 下之訊號無明顯差異，且由於 0.7V 下之起始電流較為不穩定，所以大腸桿菌群和生菌數之最適電壓均設定為 0.5V。

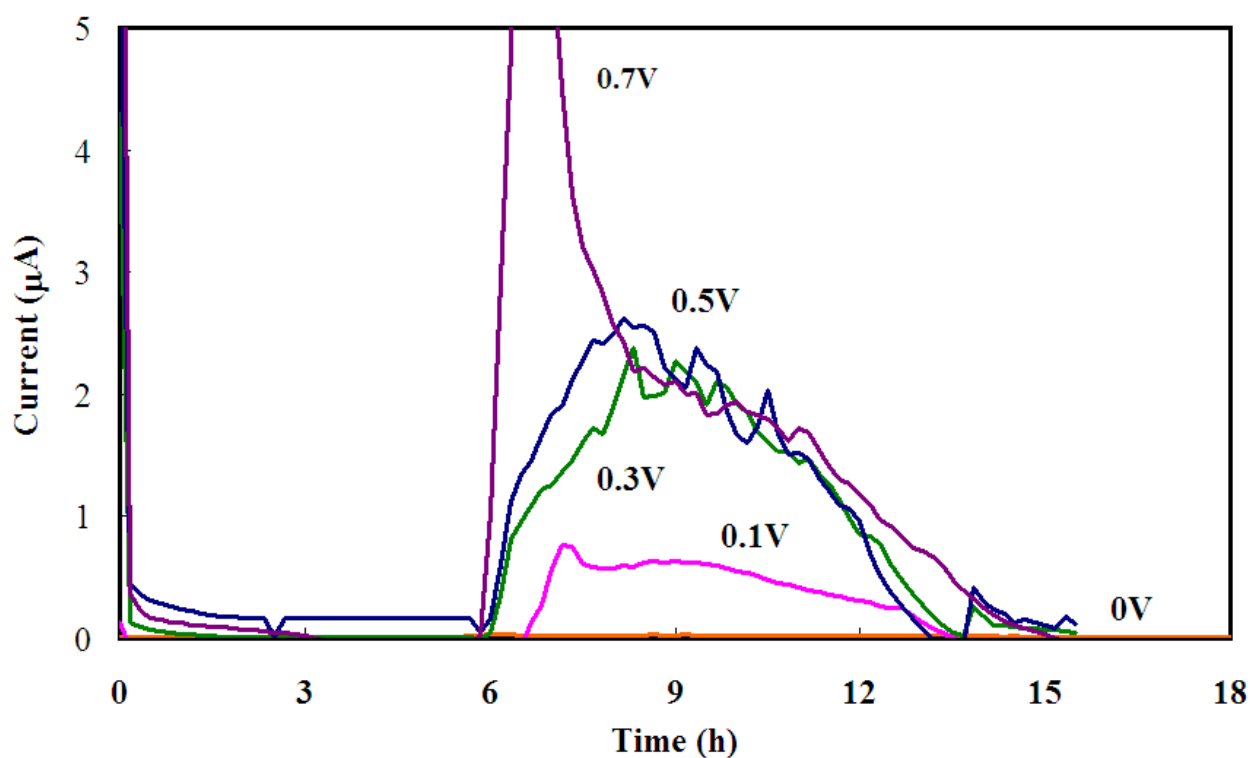


圖 4.3、大腸桿菌於不同電壓下之應答曲線。

Fig. 4.3. Current response curves of *E.coli* at 37°C using the sensor. The electrode was immersed in media with *E.coli* inoculums 10^5 CFU/mL. The amperometric measurement was performed between 0V to 0.7V.

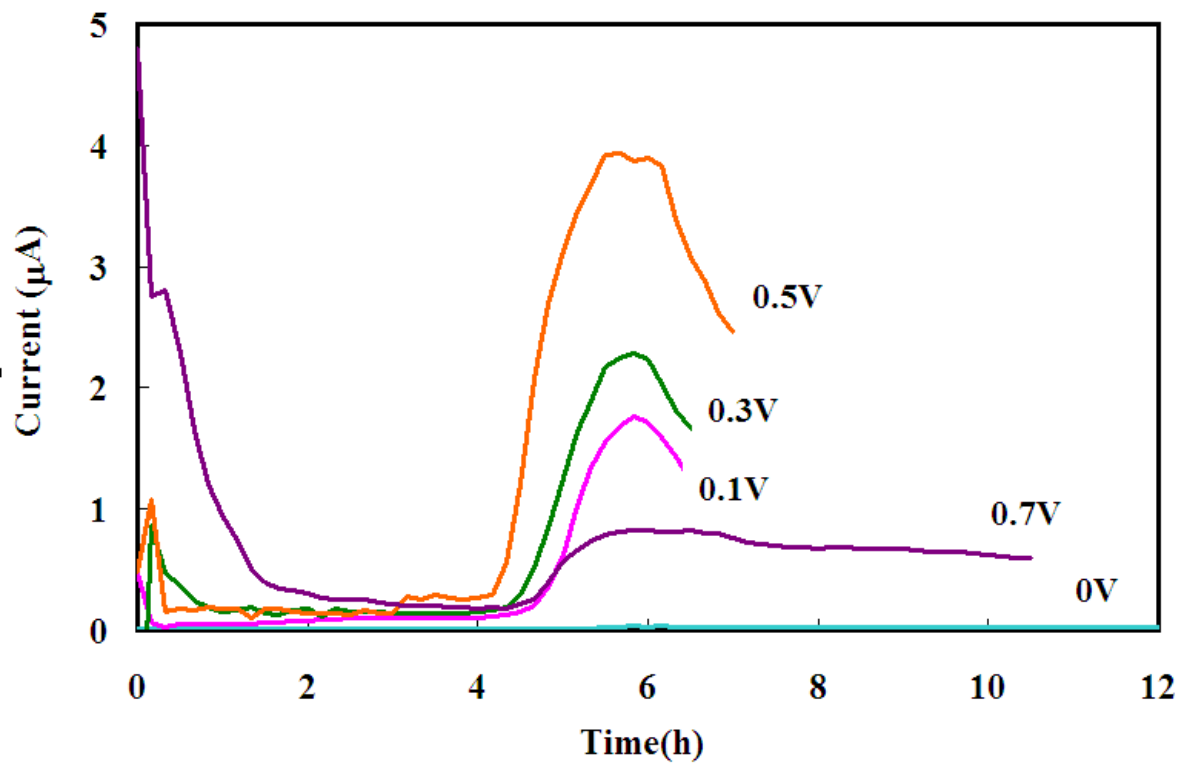


圖 4.4、大腸桿菌群於不同電壓下之應答曲線。

Fig. 4.4. Current response curves of coliform at 37°C using the sensor. The electrode was immersed in media with coliform inoculums 10^5 CFU/mL. The amperometric measurement was performed between 0V to 0.7V.

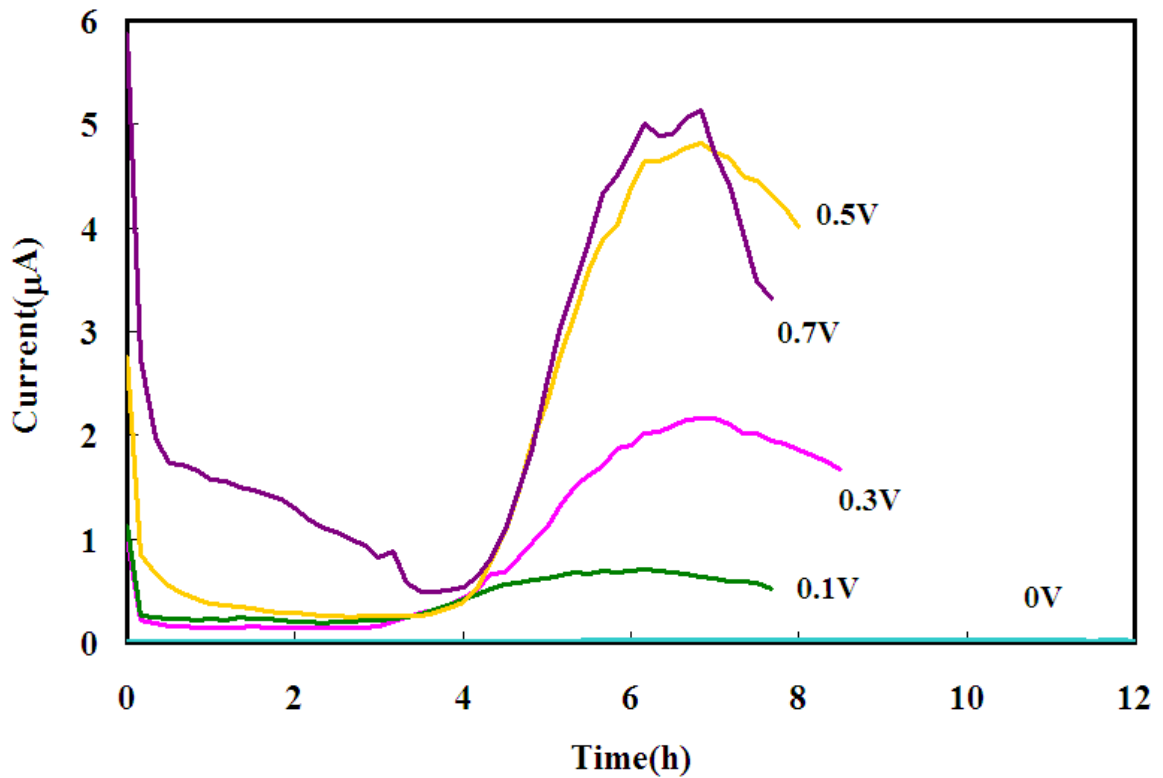


圖 4.5、紅茶生菌於不同電壓下之應答曲線。

Fig. 4.5. Current response curves of bacteria count at 37°C using the sensor. The electrode was immersed in media with total bacteria count inoculums 10^5 CFU/mL. The amperometric measurement was performed between 0V to 0.7V.

4.3 電化學系統檢測微生物之最適溫度探討

以安培電化學檢測系統搭配恆溫循環水槽設定 25°C、30°C、37°C、42°C 等不同溫度對市售紅茶中生菌數進行檢測，結果顯示 25°C、30°C、37°C 均有電流峰；如圖 4.6 所示，相較於 30°C、37°C 的條件，25°C 的檢測時間明顯較長，亦可排除掉，而 30°C 下產生的電流強度較低，故後續實驗溫度條件皆使用 37°C；此外在大腸桿菌及大腸桿菌群的部分由於最適生長溫度均為 37°C，所以本研究不再另外探討。

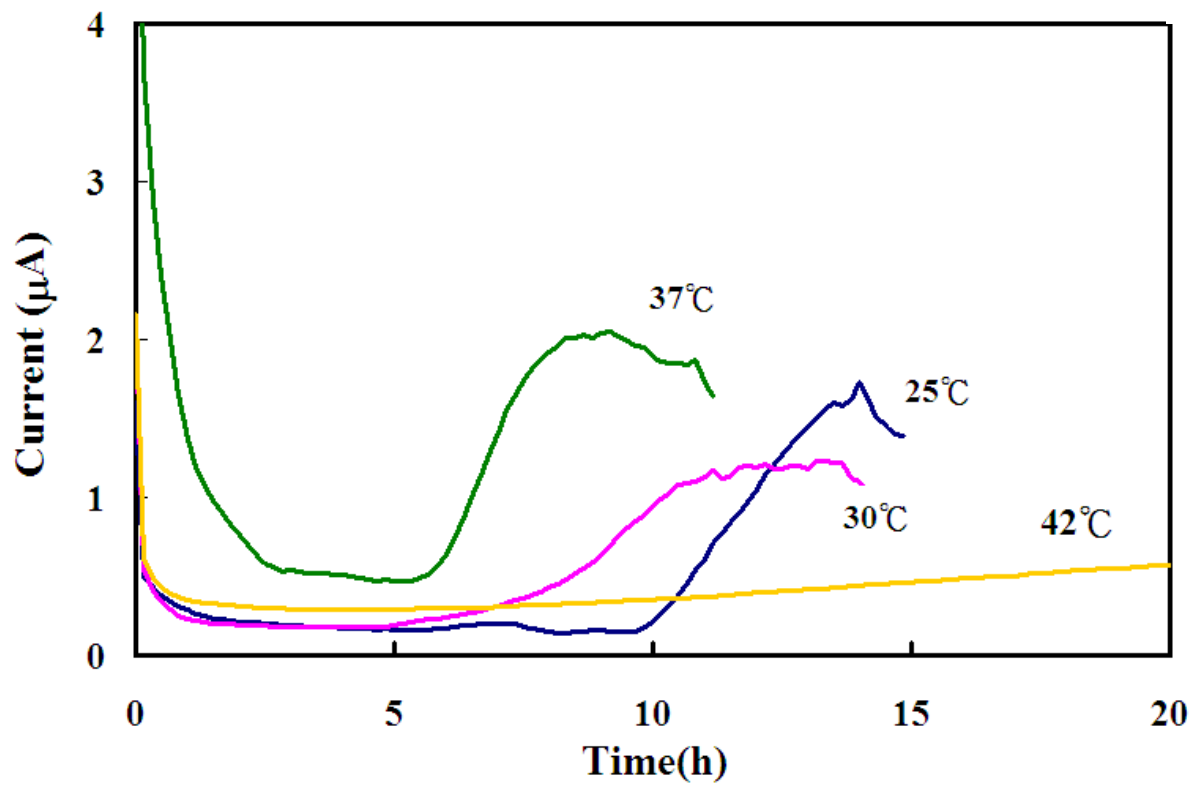
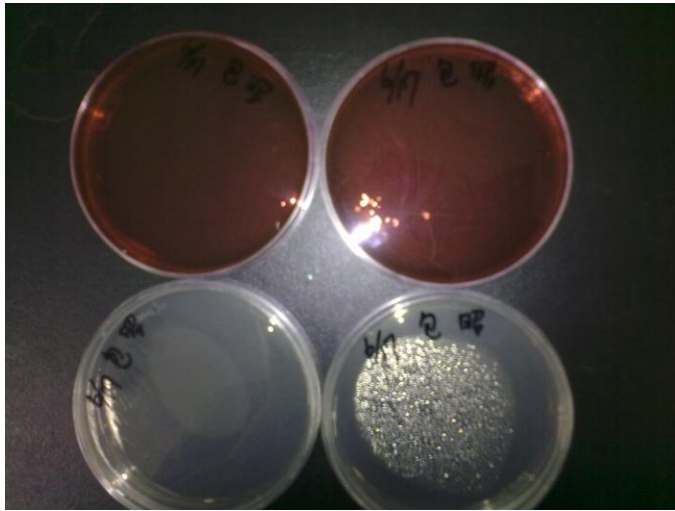


圖 4.6、紅茶生菌數於不同溫度下之應答曲線。

Fig. 4.6. Effect of the current response curves at 0.5V using the sensor. The electrode was immersed in media with bacteria count inoculums 10^5 CFU/mL. The amperometric measurement was performed between 25°C to 42°C.

4.4 以營養培養基檢測市售紅茶中微生物之探討

實驗中針對各種市售紅茶飲品包含:包裝紅茶、早餐店紅茶及市售連鎖店紅茶進行微生物探討，經由系列稀釋至特定濃度後各取等量(0.1ml)經由營養培養基 NA 圖盤並置於培養箱 24 至 48 小時培養，由結果圖 4.7 顯示包裝紅茶中無任何微生物生長，早餐店紅茶及市售連鎖紅茶生菌數分別為 10^3 及 10^5 ，可知市售連鎖紅茶微生物含量最多，因此日後實驗皆使用市售連鎖飲料店飲品，此外實驗中亦發現市售連鎖飲料中微生物污染主要源自添加於飲料中的冰塊以及未洗淨的器具，因此實驗前須先將飲料內部冰塊完全溶化後且震盪混合均勻再取樣。



包裝紅茶(0)



早餐店紅茶(10^3)



市售連鎖紅茶(10^5)

圖 4.7、市售紅茶養品經由培養基圖盤之微生物檢測結果。

Fig. 4.7. Detection of microorganism in various black tea samples cultured in NB medium.

4.5 以循環伏安法檢測市售紅茶中微生物之探討

循環伏安法為施以一定範圍電位，做電位來回掃描，藉由改變電位已得到氧化還原電流方向之方法，當電位掃描結束，循環伏安出現氧化還原峰，則表示物質有電化學活性(Rabaey *et al.*, 2004)。本研究使用循環伏安法以檢測包裝紅茶以及市售連鎖紅茶於培養箱培養 0 至 7 小時(每隔 1 小時檢測一次)之微生物生長，亦即檢測在無微生物及有微生物的狀態下之比較。CV 掃描範圍定為-1.0 至 1.0V，掃描速率為 0.1V/S，使用白金電極檢測，其原理為通入一定範圍可變電壓，當所測定之微生物於培養後，細胞表面出現損傷促使胞內細胞色素等電化學活性物質流出，誘發測量期間電流產生，且細胞色素具有傳導電子之作用可使電流變大(湯，2006)。文獻中亦指出大腸桿菌生長過程中會由外膜滲出對苯二酚(hydroquinone)及其衍生物，可直接將電子傳遞到電極(Qiao Y *et al.*, 2008)。由結果圖 4.8 顯示市售連鎖紅茶含有電流變化出現，而包裝紅茶(無微生物)則否，因此證實微生物可以產生活性物質造成電流改變，且隨者培養時間增加其電流變化愈大。另外是否可藉由微生物產生不同活性物質之電化學活性反應達到選擇菌株的效果還需要進一步探討。

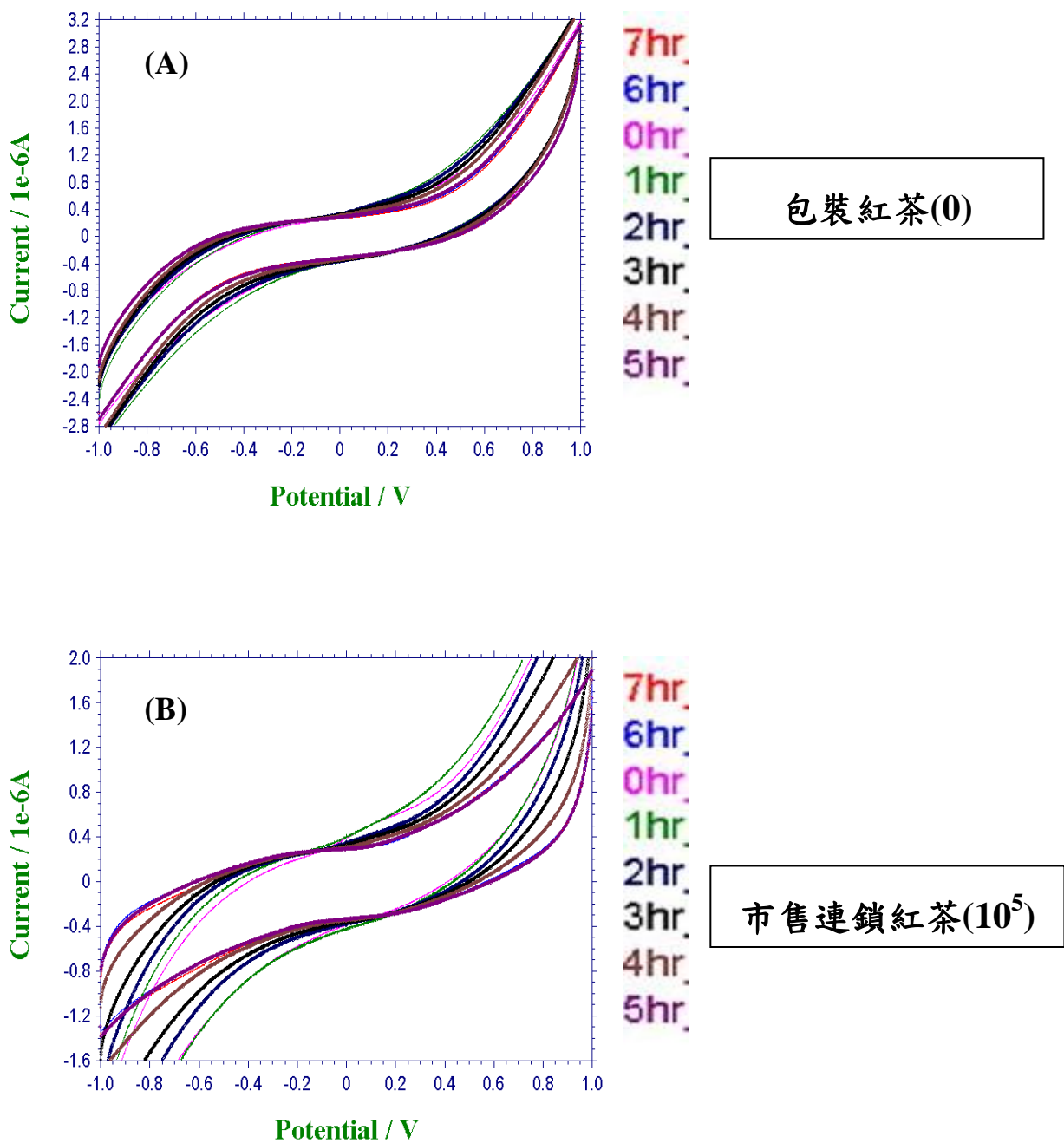


圖 4.8、以循環伏安法針對市售紅茶微生物之檢測結果。

Fig. 4.8. Detection of microorganism in various black tea samples using Cyclic voltammograms .

4.6 以電化學系統檢測市售紅茶中微生物之探討

經由循環伏安法之掃描後，本實驗進一步確認三種紅茶飲料於電化學反應之結果，顯示包裝紅茶在無微生物存在情況下沒有任何電流峰產生，而連鎖紅茶及早餐店紅茶之電流峰檢測時間分別為 5.83 及 18.5 小時，如圖 4.9 所示，而前面塗盤結果已顯示連鎖紅茶及早餐店紅茶生菌數分別為 10^5 及 10^3 ，由此可知隨者微生物濃度升高，其電化學檢測時間愈短，日後實際樣品檢測部份均以市售連鎖紅茶為檢測樣品。此外，實驗中發現，紅茶中多少含有微量雜質、沉澱物均有可能造成電化學反應干擾，導致檢測時背景值偏高，產生靈敏度不足獲訊號檢測時間判斷之誤差，但經由初步實驗發現可經由過濾方式除去雜質解決靈敏度不足等問題，或經由樣品離心以及電極修飾都是可行的方法。

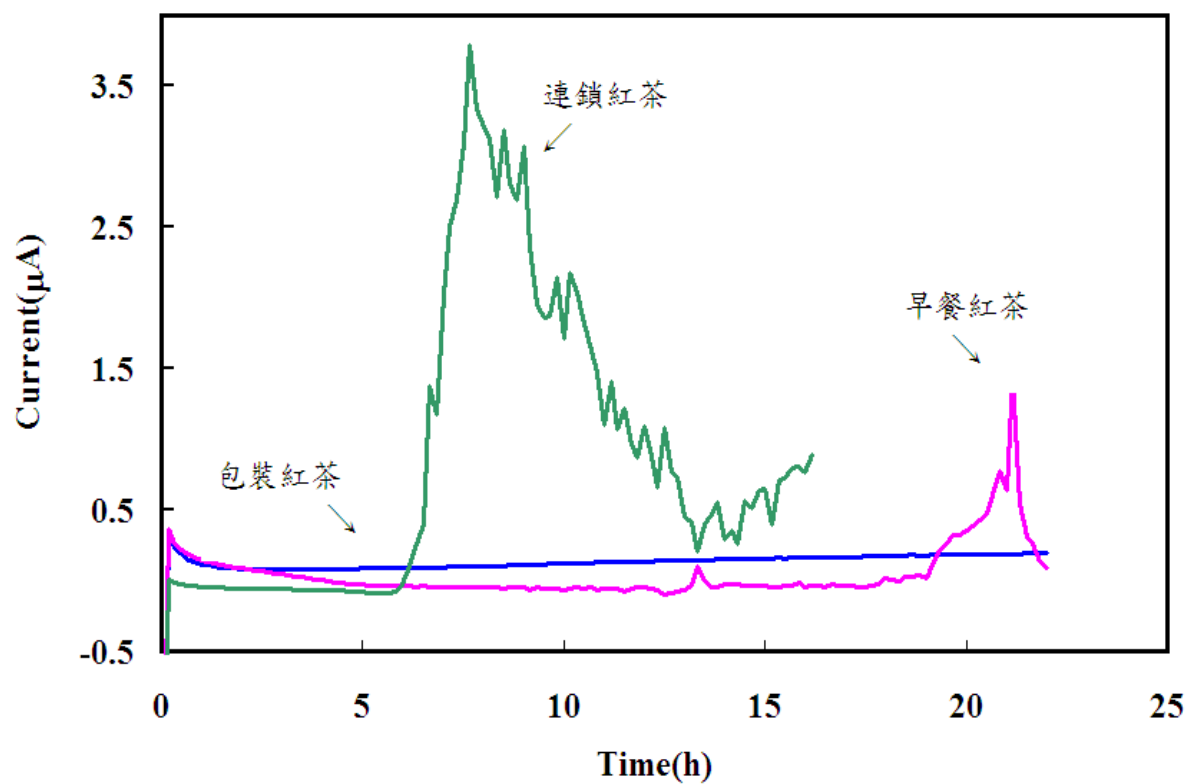


圖 4.9、以電化學系統針對市售紅茶微生物之檢測結果。

Fig. 4.9. Detection of microorganism in various black tea samples using electrochemical sensor .

4.7 電化學系統檢測大腸桿菌及大腸桿菌群之培養基碳源 及成分探討

大腸桿菌具有對乳糖發酵產酸及產氣之特性，在水質標準檢驗法中，可以利用硫酸月桂酸胰化蛋白培養液為選擇性培養基視為初步驗證大腸桿菌群存在試驗，且其中含有 Sodium lauryl sulfate(又稱 Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)可以抑制革蘭氏陽性菌無法生長，若待測樣品經由此培養基培養後產酸產氣，則可推測該樣品中可能含有大腸桿菌群 (Pederson & Skinner, 1955)。先前文獻中已指出 LST broth 具有分離大腸桿菌及其他腸桿菌群之效果，本實驗針對 LST broth 成分及額外添加紅茶樣品的情形下做探討，由於先前實驗中證實加入含糖紅茶樣品會干擾實驗結果，所以實驗中皆以沖泡式紅茶(無糖紅茶)取代市售紅茶樣品。在 LST broth 中主要成分包含 sodium lauryl sulfate、NaCl、tryptose、lactose、 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 等，其中 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 為磷酸緩衝液，可讓培養基中 pH 值維持在 6.2，不輕易受微生物產酸或鹼的影響有所變動，而實驗中將大腸桿菌、其他腸桿菌群及其他非大腸桿菌之陰性菌分別接入有添加及無添加磷酸緩衝液之 LST broth 情況下比較，其條件為 37°C 下培養 18 小時，再經由系列稀釋至 10^5 CFU/ml 後於電極管內，另外加入沖泡冷卻後之紅茶樣品並震盪混合後進行電化學檢測，施以 0.5V 之固定電壓，溫度維持 37°C。圖 4.10 為大腸桿菌和大腸桿菌群於含有磷酸緩衝液之

LST broth 下添加紅茶樣品之比較，由於大腸桿菌能發酵乳糖產生大量的酸，縱使有磷酸緩衝液的存在還是能使培養基的酸鹼值下降一定的程度，促使菌體轉呈正電荷脫離電極表面而造成電流的變化，反觀其他腸桿菌群雖然亦能發酵乳糖產酸，但仍無法造成培養基酸鹼值大幅度的改變因而無法產生電流變化(湯，2006)。另外比較大腸桿菌群與其他陰性菌於無添加磷酸緩衝液之 LST broth 下之結果，如圖 4.11 所示，可知偵測大腸桿菌群 (a) *Escherichia*，(b) *Enterobacter*，(c) *Citrobacter*，(d) *Morganella* 均有電流訊號產生，而非大腸桿菌群之陰性菌(e) *Pseudomonas* 由於無法發酵乳糖產酸，所以亦不會有電流訊號產生，藉此可藉由(不)添加磷酸緩衝液以達到分離大腸桿菌和大腸桿菌群及大腸桿菌群和其他非大腸桿菌之陰性菌的效果。而培養過程中須大幅度的酸鹼變化才可使菌體達到脫離電極的程度，所以菌種檢測時間取決於菌體之產酸能力，產酸能力強者如大腸桿菌，其檢測時間愈短，所以由結果中檢測時間亦可知道大腸桿菌群中菌體產酸能力強弱依序為為 *Escherichia* > *Citrobacter* > *Enterobacter* > *Morganella*。

此外，本實驗近一步探討培養基之最佳碳源組成分析，除了上述 LST broth 中的 lactose 以外，亦選用 glucose 以改變培養基探源成分，研究是否能同樣達到分離菌種的效果。實驗中以大腸桿菌、大腸桿菌群及非大腸桿菌群(*Enterobacter* 及 *Salmonella*)各一株接種於以 glucose 為碳源之

LST broth 做比較，同樣以 0.5V 固定電壓、溫度設定 37°C 於電化學系統檢測，結果顯示於圖 4.12，結果顯示並不具有選擇性，可知最佳培養基探源成分為 lactose.

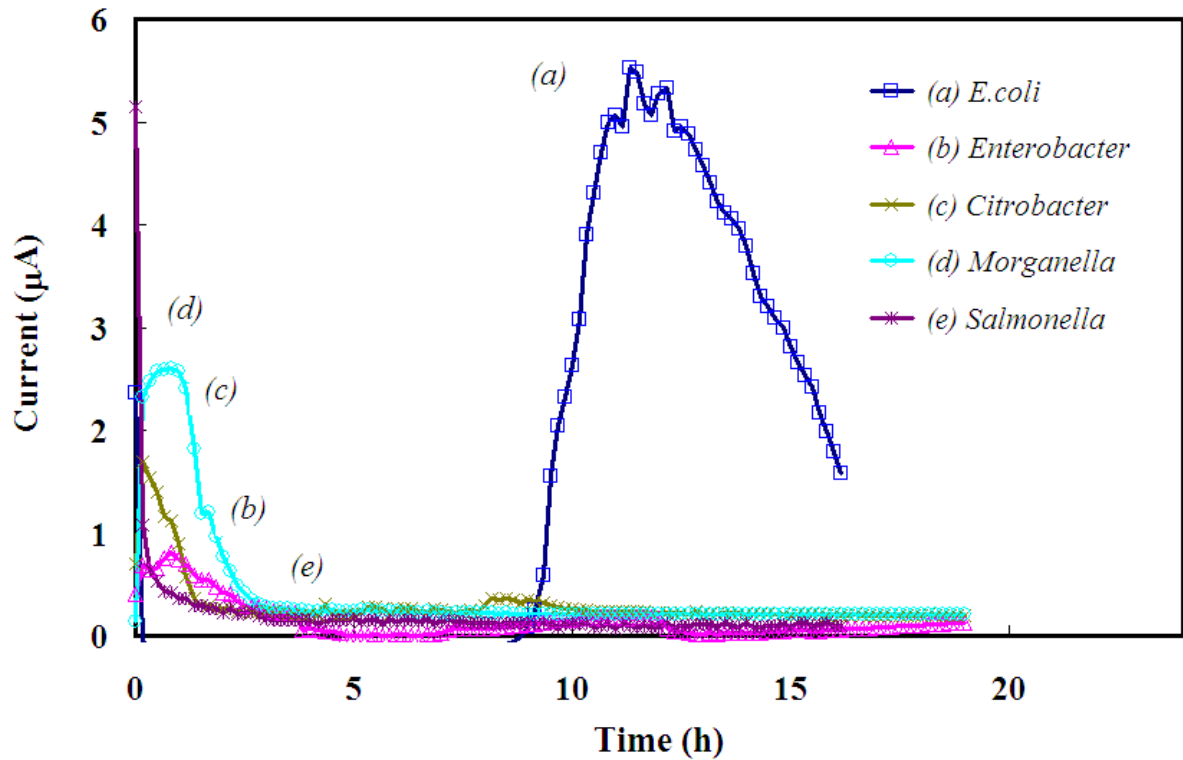


圖 4.10、大腸桿菌和大腸桿菌群於乳糖培養基添加紅茶之應答曲線。

Fig. 4.10. Current profile of the amperometric sensor when electrode was immersed in LST-Lactose with black tea (a) *E.coli* (b) *Enterobacter* (c) *Citrobacter* (d) *Morganella* (e) *Salmonella* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

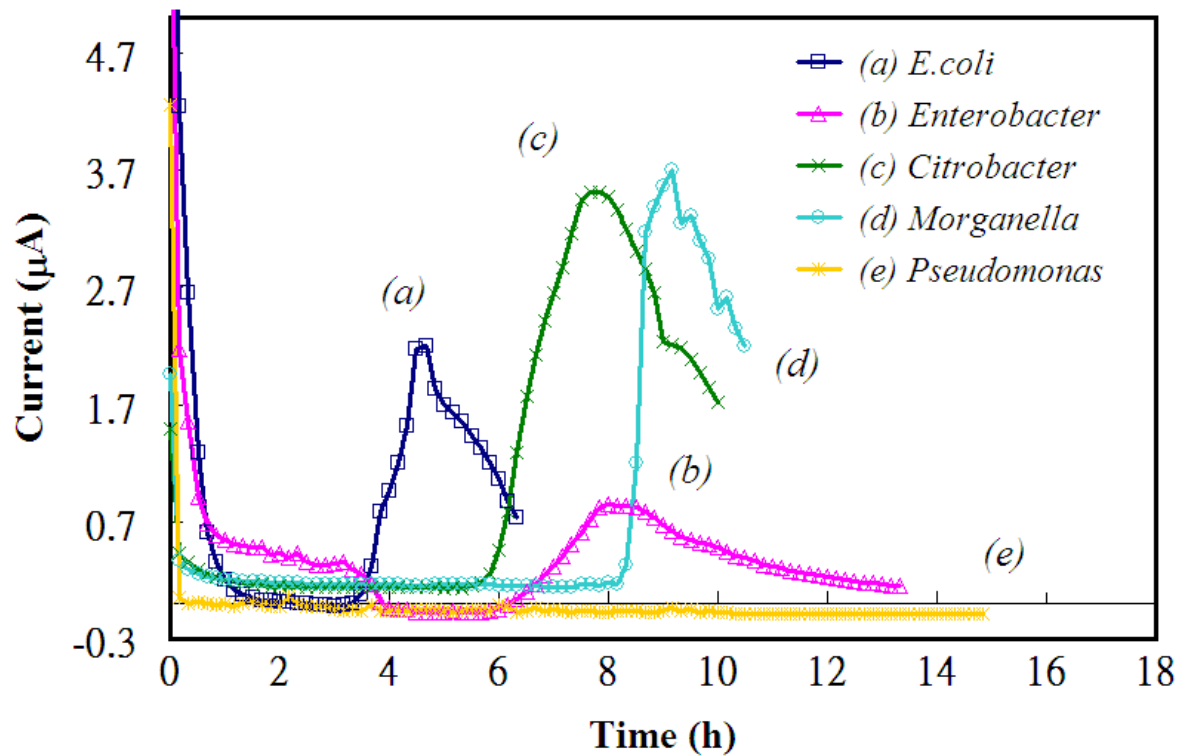


圖 4.11、大腸桿菌群和其他陰性菌於無緩衝溶液下乳糖培養基添加紅茶之應答曲線。

Fig. 4.11. Current profile of the amperometric sensor when electrode was immersed in non-buffer solution LST-Lactose with black tea (a) *E.coli* (b) *Enterobacter* (c) *Citrobacter* (d) *Morganella* (e) *Pseudomonas* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

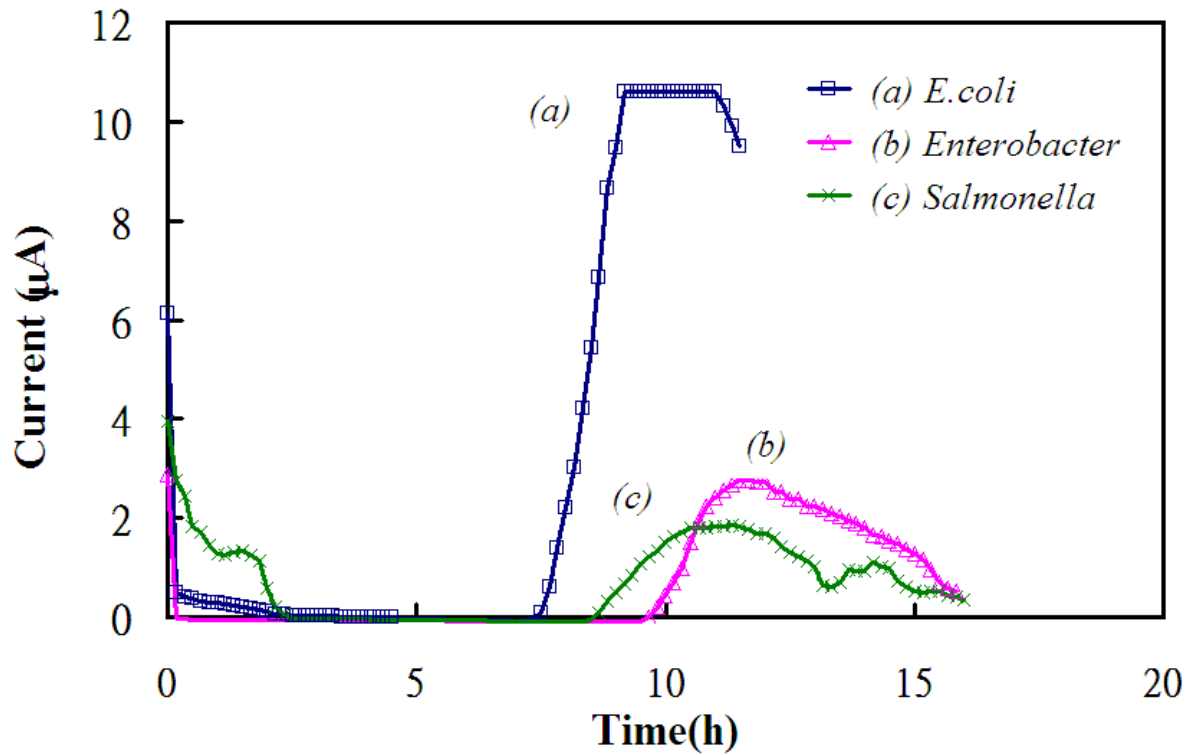


圖 4.12、大腸桿菌和大腸桿菌群於葡萄糖培養基添加紅茶之應答曲線。

Fig. 4.12. Current profile of the amperometric sensor when electrode was immersed in LST-Glucose with black tea (a) *E.coli* (b) *Enterobacter* (c) *Salmonella* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

4.8 電化學檢測大腸桿菌於不同糖度紅茶下生長之探討

本研究為探討大腸桿菌於紅茶中最適生長糖量，以大腸桿菌接種於 LST broth 中稀釋至特定濃度，加入紅茶並添加與市售飲料相同之高果糖漿分別調整為 5、8、10、12、15、20°brix，以不添加紅茶作為對照組，在 37°C、0.3V 下進行電化學系統檢測。其結果顯示於圖 4.13，除了無添加紅茶及添加 0°brix 紅茶中外，其餘糖量都有電化學應答反應，並且隨者糖量增加反應訊號亦有增大的趨勢，而其中又以添加 10°brix 糖度之紅茶反應最強，之後隨糖量增加訊號也隨之下降，可知是滲透壓過大對微生物生長產生負面之影響，故大腸桿菌最適生長糖量為 10°brix。

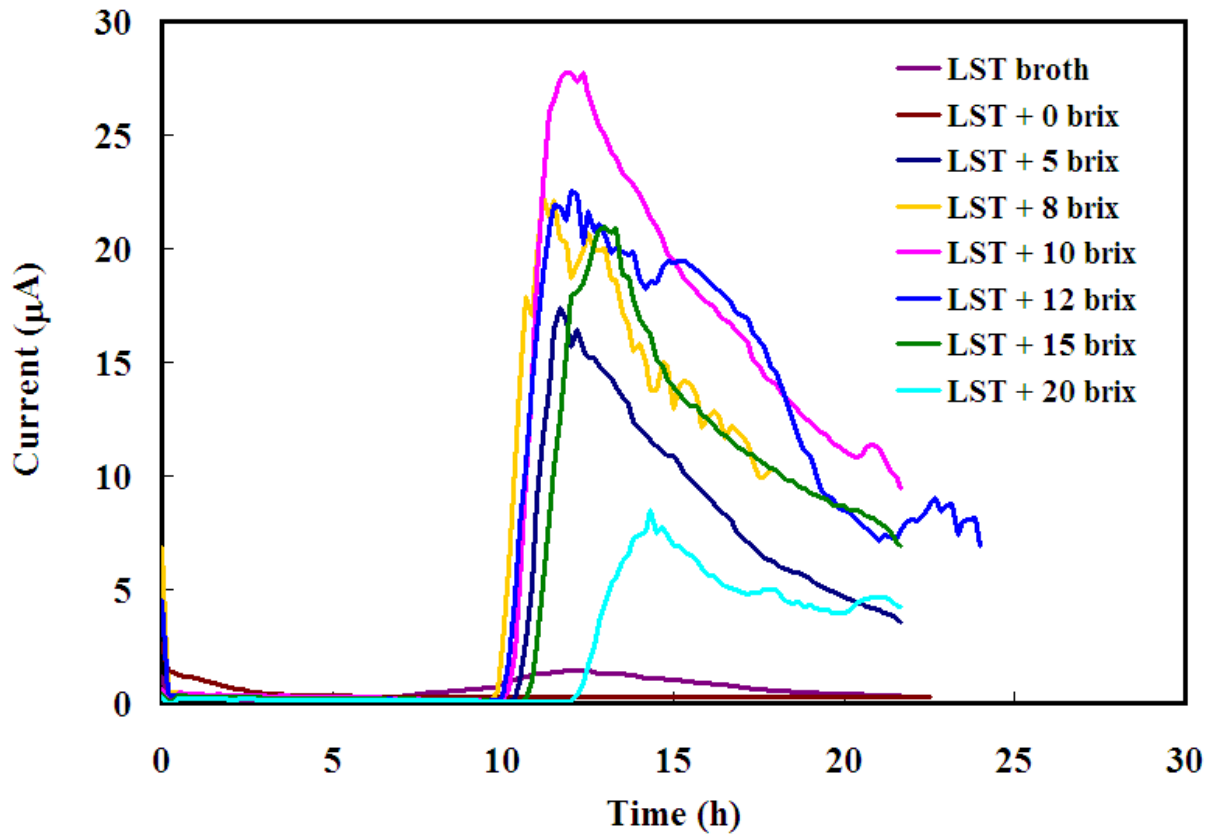


圖 4.13、大腸桿菌於不同糖度紅茶之應答曲線。

Fig. 4.13. Current profile of the amperometric sensor when the electrode was immersed in LST broth with black tea, LST+0, 5, 8, 10, 12, 15, 20°brix Media with *E.coli* inoculums of 10^5 CFU/mL. The sample volume was totally 2 mL and the sensor was placed in an incubator with the temperature precisely controlled at $37\pm 0.1^\circ\text{C}$.

4.9 電化學法及傳統方法對連鎖店紅茶飲料微生物之檢測

目前，國內檢測食品中大腸桿菌在 ISO(International Standard Organization)及 BAM/AOAC(Bactriological Analytical Manual/Association of official Analytical Chemists)認可方法包含:多管發酵法、最大可能計數法(MPN)和 Petrifilm 等(Akir *et al.*, 2002)，但是從前處理到達可以判讀菌落的時間約為 48 至 72 小時，與現階段環境檢測要求準確及快速需求不符，因而國內或商業間已陸續發展使用出多種大腸桿菌群快速檢測法。

本實驗透過自製電化學儀器來檢測微生物生長時造成電流之變化，由微生物開始培養至電流迅速變化所需的時間稱為檢測時間(detection time, DT)，檢測時間愈短，即待測物中所含菌體濃度愈高，待微生物培養至平穩期，經由系列稀釋至特定濃度並同步進行平盤塗抹法及電化學檢測，利用檢測時間和傳統培養法作對比，即可建立大腸桿菌或大腸桿菌群之標準生長曲線，即可檢測待測樣品中大腸桿菌或大腸桿菌群之菌量濃度。

而總生菌數部份則會將市售含糖紅茶飲料置於培養箱中培養 24 至 48 小時、37°C，並進行平盤塗抹，待內部生菌數生長至最高濃度，即可經由系列稀釋至特定濃度與電化學檢測時間建立總生菌數檢量線。

4.9.1 大腸桿菌與大腸桿菌群之檢測

本研究以大腸桿菌及大腸桿菌群之最適溫度 37°C 進行監控其生長時產生之電流變化，大腸桿菌及大腸桿菌群之不同菌數的應答曲線結果分別顯示於(圖 4.14)及(圖 4.16)，可知菌體濃度與檢測時間成反比，檢測範圍分別為 10^1 - 10^8 及 10^1 - 10^7 CFU/mL。大腸桿菌菌數與檢測時間之檢量線， R^2 為 0.9354(圖 4.15)，大腸桿菌群菌數與檢測時間檢量線， R^2 為 0.9144(圖 4.17)，檢測時間均小於 20 小時。大腸桿菌與大腸桿菌群實際紅茶樣品檢測，其結果分別顯示於表 4.1 及表 4.2，根據法規公告，茶飲料中大腸桿菌須呈現陰性，而大腸桿菌群須低於 10 CFU/ml，由電化學法之大腸桿菌檢測中可得知在七家飲料店中有四家店不合格，傳統方法之檢測結果亦是如此，而電化學法之大腸桿菌群檢測七家店中則有六家店超標，和傳統方法之檢測結果相同，顯示出市售紅茶飲料中大腸桿菌群超標案例之平凡，而大腸桿菌及大腸桿菌群之電化學法檢測時間分別約為 10 及 15 小時以內。實驗過程以檢測樣品與選擇性培養基各取 1ml 加入電極管中，施加特定電壓於電極、溫度 37°C 進行培養檢測，再經過傳統方法 Petrifilm 之塗抹同步進行檢測結果比較，發現電化學法中多數樣品檢測與傳統方法結果有一致性，大腸桿菌之 Petrifilm 結果呈陽性之樣品於電化學檢測中均有電流峰產生，代表本方法確實可用於紅茶中微生物之檢測，大腸桿菌及大腸桿菌群於電化學法與傳統方法檢測之標準差分別顯示於表 4.4 及表

4.5。下面為傳統方法及電化學法標準偏差公式。

$$\text{Standard Error(\%)} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{mod}} - Y_{\text{exp}})^2}{N}}$$

Y_{mod} = Traditional method value

Y_{exp} = Electrochemical method value

N = sample numbers

4.9.2 總生菌數之檢測

本研究中紅茶總生菌數檢測使用市售含糖紅茶作為實驗樣品，並以最適溫度 37°C、固定電壓 0.5V 進行監控其生長時之電流變化，總生菌之不同菌數應答曲線結果顯示於(圖 4.18)，檢測範圍為 10^2 - 10^7 CFU/mL。紅茶總生菌菌數與檢測時間之檢量線， R^2 為 0.9144，檢測時間亦在 20 小時以內(圖 4.19)，紅茶中總生菌數實際樣品檢測，其結果顯示於表 4.3，根據法規公告茶飲料之生菌數須小於 10^4 CFU/ml，由結果可得知於電化學法中，所有店家之生菌數均在標準範圍內，傳統方法檢測中則有一家超過標準，而紅茶生菌數之電化學法檢測時間約為 10 小時。實驗中取檢測樣品 1ml 於電極管中，以定電壓 0.5V、固定溫度 37°C 進行電化學檢測，並同步進行傳統平盤塗抹法培養，結果顯示於電化學法培養過程中觀察到特定檢測時間內電流大幅上升反應之樣品，再經由 Plate Count Agar 上菌落數

對照，電化學法與傳統方法之紅茶總生菌數檢測結果比較，其標準差顯示於表 4.6。經由本實驗檢測結果得知，除了少數幾家連鎖店驗出大腸桿菌及部分店家驗出超標之大腸桿菌群紅茶，所有店家總生菌含量均在合格範圍內(未超過 10^4 CFU/mL)，推論是由於檢測時間不是在夏天之緣故，未來可以夏天所檢測到之菌量做為紅茶飲料超標案例之標準。

由各實際樣品檢測之電化學法及傳統方法標準差中可得知無倫是在大腸桿菌、大腸桿菌群或是生菌數之檢測均可發現部分結果中電化學法及傳統方法檢測之微生物菌數有明顯落差(約 1 個 log 值)，推測主要是由於取樣不均勻所導致，或是實驗過程中有樣品被汙染等情況，都是造成微生物濃度有落差等原因。

另外由結果可知無論是大腸桿菌、大腸桿菌群和總生菌數於電化學檢測法於 20 小時內均有反應，而傳統平盤塗抹或是 Petrifilm 培養均需花費 24 至 48 小時才可觀察菌落，本實驗不必添加酵素，不必再經由電極修飾及可達到檢測目的，顯示其快速及便利性。

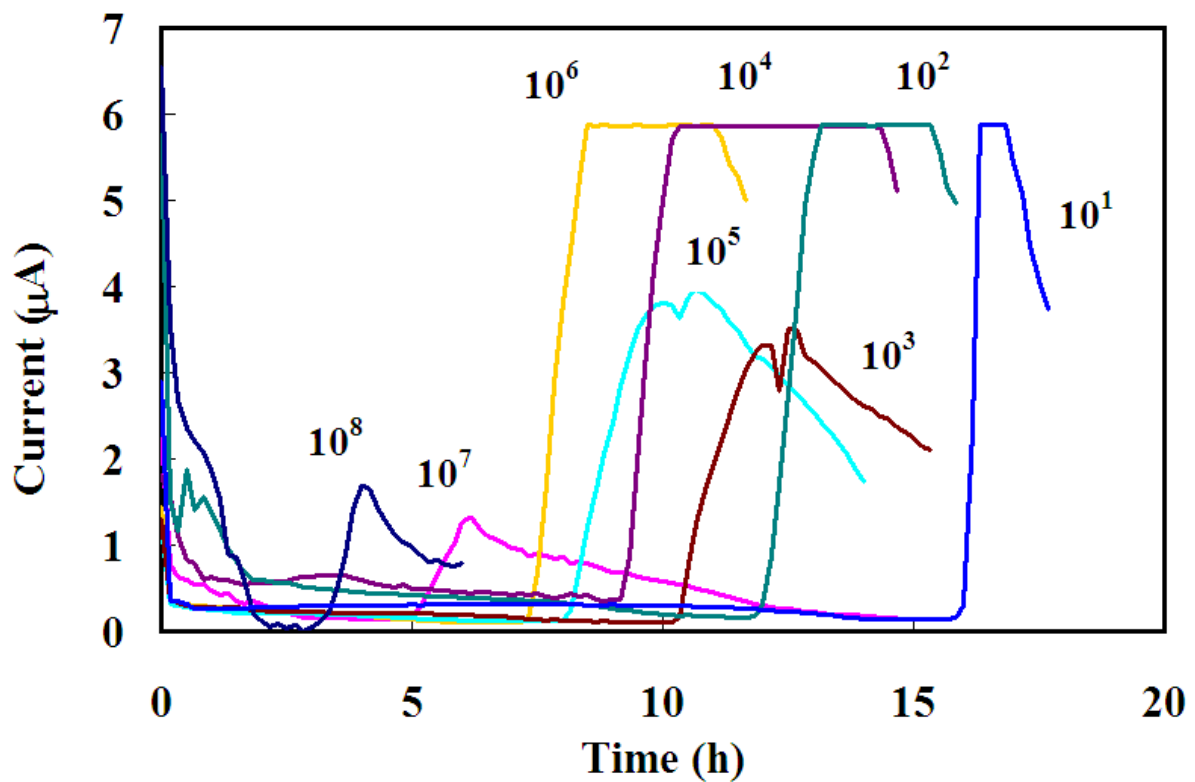


圖 4.14、紅茶中不同大腸桿菌濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之應答曲線。

Fig. 4.14. The current response of *E.coli* detected by electrochemical sensor. The range of cell density was between 10^1 to 10^8 CFU/mL in black tea. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

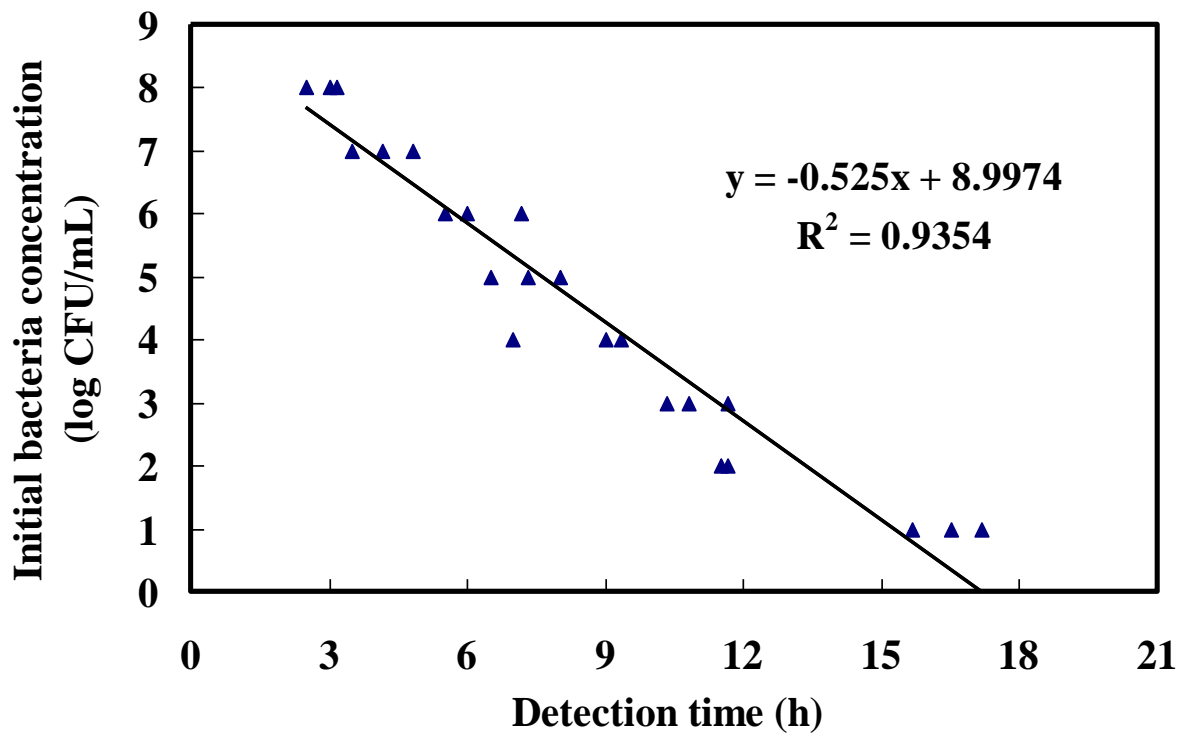


圖 4.15、紅茶中大腸桿菌菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線。

Fig. 4.15. Calibration curve of initial cell density of *E.coli* in black tea vs. respons time. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

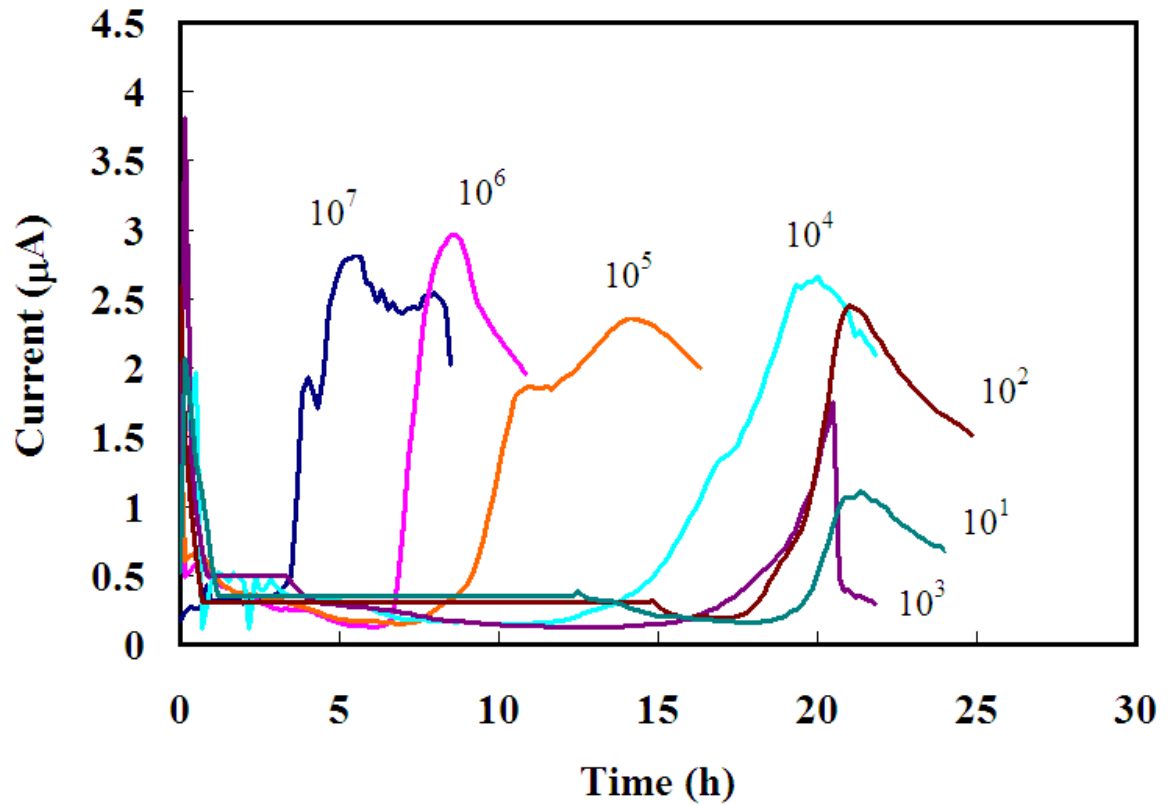


圖 4.16、紅茶中不同大腸桿菌群濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之應答曲線。

Fig. 4.16. The current response of coliform detected by electrochemical sensor. The range of cell density was between 10^1 to 10^7 CFU/mL in black tea. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

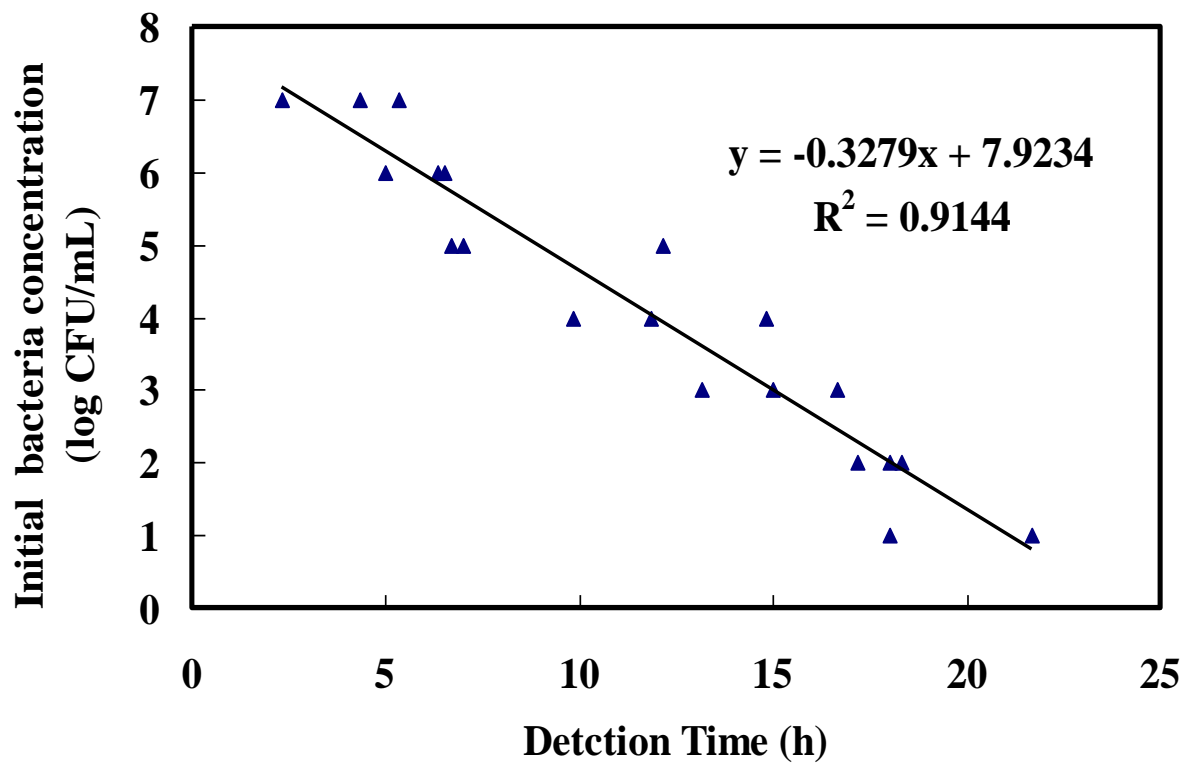


圖 4.17、紅茶中大腸桿菌群菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線。

Fig. 4.17. Calibration curve of initial cell density of coliform in black tea vs. response time. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

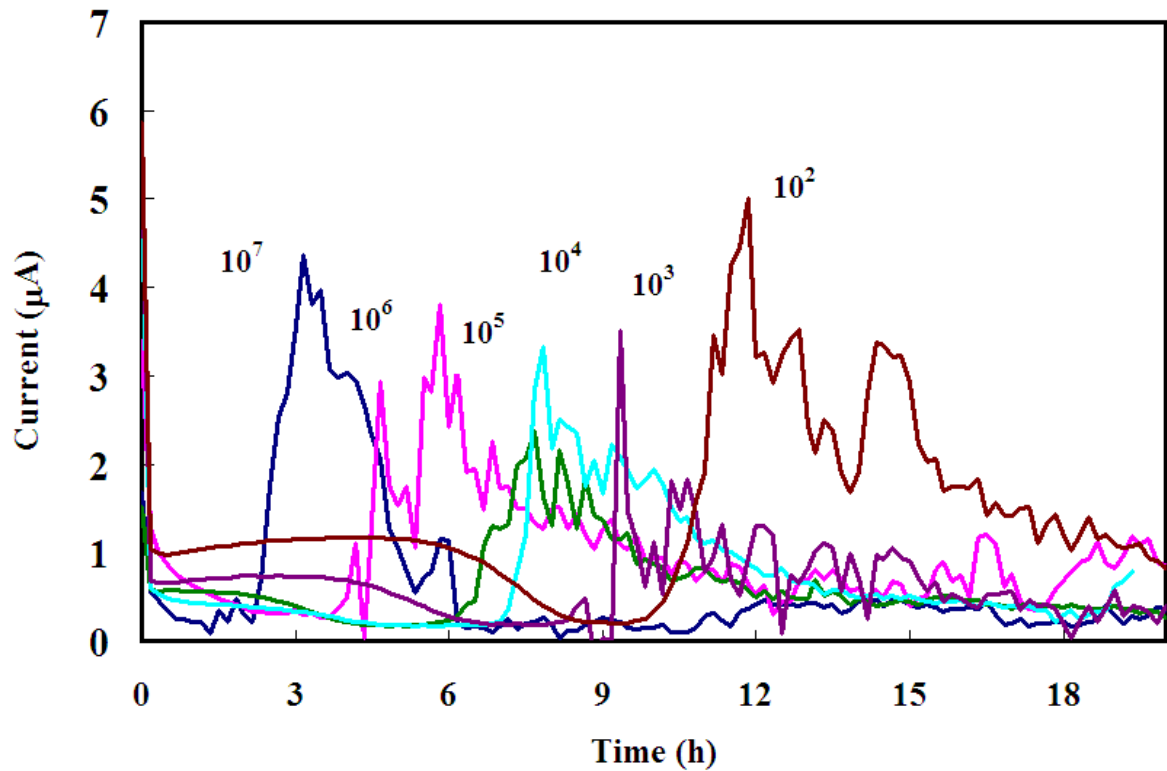


圖 4.18、紅茶中不同生菌數濃度(CFU/ml)其檢測時間與電流之應答曲線。

Fig. 4.18. The current response of total bacterial count detected by electrochemical sensor. The range of cell density was between 10^2 to 10^7 CFU/mL in black tea. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

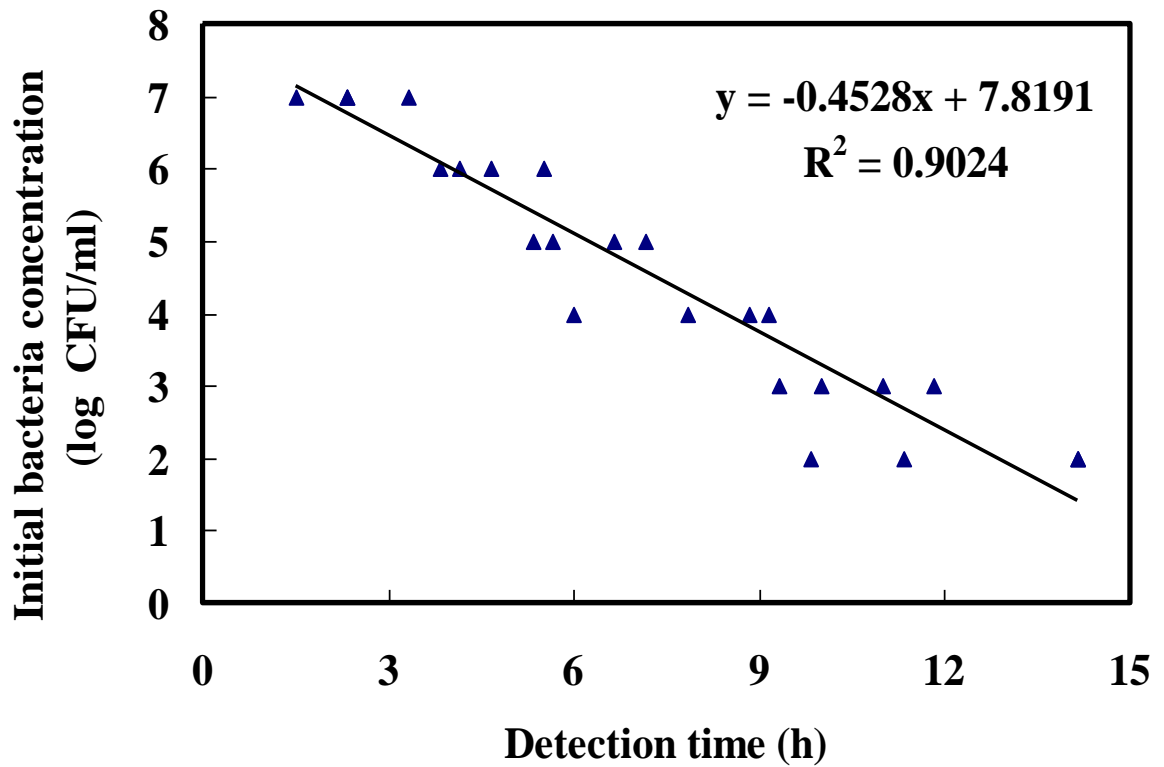


圖 4.19、紅茶中生菌數(CFU/ml)與檢測時間之檢量線。

Fig. 4.19. Calibration curve of initial cell density of total bacteria count in black tea vs. response time. The sample volume was totally 2mL. The temperature of incubator was $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

表 4.1、市售紅茶飲料之大腸桿菌檢測結果

Table. 3. Detection of E.coli concentration in black tea samples using electrochemical system.

店家	編號	樣品 實際菌數 ^a (loCFU/ml)	電化學法檢測 時間(h)	電化學法檢測 之菌數 ^b (log CFU/ml)
A	1	1.30	14.83	1.21
A	2	1.47	15.16	1.04
B	3	1.95	11.50	2.95
B	4	1.90	—	—
C	5	—	—	—
C	6	—	—	—
D	7	3.69	8.50	4.53
D	8	3.77	9.33	4.10
E	9	—	—	—
E	10	—	—	—
F	11	0.90	—	—
F	12	0.85	—	—

^a Detection by Petrifilm™.

^b formula : $y = -0.525x + 8.9974$.

—: 未檢出

表 4.2、市售紅茶飲料之大腸桿菌群檢測結果

Table. 4. Detection of coliform concentration in black tea samples using electrochemical system.

店家	編號	樣品 實際菌數 ^a (log CFU/ml)	電化學法檢測 時間(h)	電化學法檢測 之菌數 ^b (log CFU/ml)
A	1	1.60	17.00	2.35
A	2	1.78	17.67	2.13
B	3	2.39	13.33	3.55
B	4	2.17	14.67	3.11
C	5	2.98	11.17	4.26
C	6	3.11	10.67	4.42
D	7	—	—	—
D	8	—	—	—
E	9	1.48	19.83	1.42
E	10	1.30	20.17	1.30
F	11	2.52	15.33	2.90
F	12	2.49	16.00	2.68

^a Detection by Petrifilm™.

^b formula : $y = -0.3279x + 7.9234$.

—: 未檢出

表 4.3、市售紅茶飲料之生菌數檢測結果

Table. 5. Detection of Total bacterial count concentration in black tea samples using electrochemical system.

店家	編號	樣品 實際菌數 ^a (log CFU/ml)	電化學法檢測 時間(h)	電化學法檢測 之菌數 ^b (log CFU/ml)
A	1	2.08	13.83	1.57
A	2	2.08	14.00	1.49
A	3	1.30	—	—
B	4	3.78	7.83	4.28
B	5	3.40	9.00	3.75
B	6	2.70	12.17	2.32
C	7	3.26	9.67	3.44
C	8	3.18	11.83	2.47
C	9	3.00	12.17	2.32
D	10	3.84	11.00	2.84
D	11	3.82	11.17	2.77
D	12	3.89	10.17	3.22
E	13	3.36	11.50	2.62
E	14	3.20	12.00	2.40
E	15	3.28	11.83	2.47
F	16	1.85	—	—
F	17	1.78	—	—
F	18	1.48	—	—

^a Detection by Petrifilm™.

^b formula : $y = -0.4528x + 7.8191$.

—: 未檢出

表 4.4、大腸桿菌濃度於電化學法及傳統方法之標準差

Table 6. The standard deviation of detection of *E.coli* concentration in black tea samples using both of electrochemical and traditional method.

店家	傳統方法 ^a (log CFU/ml)	電化學法 ^a (log CFU/ml)	傳統方法 & 電化學法 ^b (%)
A	1.39± 0.12	1.13±0.12	0.31
B	1.93±0.03	0.00	1.00
C	—	—	—
D	3.69±0.06	4.32±0.30	0.64
E	—	—	—
F	0.875±0.04	—	—

^aMean ± standard deviation (n=2).

^b

$$\text{Standard Error(\%)} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{mod}} - Y_{\text{exp}})^2}{N}}$$

Y_{mod} = Traditional method value

Y_{exp} = Electrochemical method value

N = sample numbers

表 4.5、大腸桿菌群濃度於電化學法及傳統方法之標準差

Table. 7. The standard deviation of detection of coliform concentration in black tea samples using both of electrochemical and traditional method.

Number	Traditional method ^a (log CFU/ml)	Electrochemical method ^a (log CFU/ml)	Traditional & Electrochemical ^b (%)
A	1.69±0.13	2.34±0.04	0.66
B	2.28±0.16	3.35±0.30	1.07
C	3.05±0.09	4.35±0.11	1.31
D	1.39±0.13	1.39±0.08	0.04
E	2.51±0.02	2.80±0.16	0.31
F	1.39±0.13	1.74±0.19	0.41

^aMean ± standard deviation (n=2).

^b

$$\text{Standard Error}(\%) = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{mod}} - Y_{\text{exp}})^2}{N}}$$

Y_{mod} = Traditional method value

Y_{exp} = Electrochemical method value

N = sample numbers

表 4.6、生菌數濃度於電化學法及傳統方法之標準差

Table. 8. The standard deviation of detection of Total bacteria count concentration in black tea samples using both of electrochemical and traditional method.

店家	傳統方法 ^a (log CFU/ml)	電化學法 ^a (log CFU/ml)	傳統方法 & 電化學法 ^b (%)
A	1.82±0.45	—	—
B	3.19±0.71	3.45±1.01	0.35
C	3.15±0.13	2.74±0.61	0.57
D	3.85±0.04	2.94±0.24	0.92
E	3.28±0.08	2.50 ±0.11	0.79
F	1.70±0.20	—	—

^a Mean ± standard deviation (n=2).

$$^b \text{Standard Error(\%)} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{mod}} - Y_{\text{exp}})^2}{N}}$$

Y_{mod} = Traditional method value

Y_{exp} = Electrochemical method value

N = sample numbers

伍、結論

本研究以電化學安培感測器搭配選擇性培養基，用於檢測市售紅茶飲料中大腸桿菌、大腸桿菌群及總生菌數，利用微生物代謝造成培養基電化學活性物質改變促使電流反應變化以檢測微生物菌數，且建立之大腸桿菌及大腸桿菌群準生長曲線之最低濃度均可達 10^1 CFU/mL，相較於傳統方法須約 24 至 48 小時才可觀察菌落，本研究之方法 10 至 15 小時之監控即可得知微生物含量。

以電流式感測系統為平台，搭配選擇性培養基並且藉由培養基中成份改變，可用來分離出大腸桿菌和大腸桿菌群，可用於市售紅茶飲料之檢測，且儀器架設、攜帶方便，可搭配電腦軟體連接作即時監控。比起操作複雜、步驟繁瑣的傳統微生物檢測方法，本實驗技術相對簡單，亦不需要專業人員即可上手，且本方法相對來說檢測也更快速。

實驗中探討大腸桿菌、大腸桿菌群和總生菌之電化學系統最適電壓分別為 0.3、0.5 及 0.5V，最適溫度均設定為 37°C，並搭配選擇性培養基(LST broth)有效分離、檢測出大腸桿菌，並藉由改變培養基成分(排除緩衝系統)，藉以讓其他腸桿菌群產酸使環境中 pH 值下降因而脫離電極，達到與其它革蘭氏陰性菌分離的效果，其操作流程簡單快速，亦顯示本研究開發方法之便利性，未來亦可利用此系統搭配不同選擇性培養基，進而分離出樣品中各種微生物。

本研究已針對市售紅茶進行衛生品質探討，且檢測結果與傳統方法比較之標準偏差(standard error)幾乎在 1% 以內，除了便利性外，亦顯示本方法之實用性，未來可進一步針對其他茶飲料如綠茶、烏龍茶等進行衛生品質之。

參考文獻

一、英文部分

Akir, U., H. B. Douan, E. Batpinar, F Keven, and A. K. Halkman. 2002. The need for cofirmation in coliform and E.coli enumeration in foods. *Turk. J. Anim Sci.* 26: 1049-1053.

Bukh, A. S. and P. Roslev. 2010. Characterization and validation of a chemiluminescent assay based on 1,2-dioxetanes for rapid detection of viable *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1947-1957.

Bolton, F. J., A. D. Sails, A. J. Fox, D. R. A. Wareing, and D. L. A. Greenway. 2002. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Prot.* 65: 760-767.

Chang, T. C. and H. S. Huang. 1997. An immuno-polymerase chain reaction for the detection of β -glucuronidase from *Escherichia coli*. *J. Immunol. Meth.* 208: 35-42.

Chang, H. C., S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Wu, and T. C. Chang. 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3466-3471.

Chang, K. S., H. D. Jang, C. F. Lee, Y. G. Lee, C. J. Yuan, and S. H. Lee. 2007. Series quartz crystal sensor for remote bacteria population monitoring in row milk *via* the Internet. *Biosensors and Bioelectronics.*

Clark, L. C. and C. Lyons. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in Cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences.* 102 : 29-45.

Ivnitski, D., I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins. 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 14(7): 599-624.

Lin, Y. H., S.H. Chen, Y. C. Chuang, Y. C. Lu, T. Y. Shen, C.A. Chang, and C.S. Lin. 2008. Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens. Bioelectron.* 23(12): 1832-1126.

Leonard, P., S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, and Kennedy. 2003. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water *Enzyme. Microb. Technol.* 32(1): 3-13.

Lee, Y. G., H. Y. Wu, C. L. Hsu, H. J. Liang, C. J. Yuan, and H. D. Jang. 2009. A rapid and selective method for monitoring the growth of coliforms in milk using the combination of amperometric sensor and reducing of methylene blue . *Sensors and Actuators B.* 575-580.

Moorcroft, M. J., J. Davis, and R. G. Compton. 2001. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta.* 54:785-803.

Manafi, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Microbiology.* 60: 205-218.

Mittelman, A. S., E. Z. Ron, and I. Rishpon. 2002. Amperometric quantification of total coliforms and specific detection of *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* 74(4): 903-907.

Mansy, M. S., A. A.Fadl, M. S. Ashour, and M. I. Khan. 1999. Amplification of *Proteus mirabilis* chromosomal DNA using polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 13:133-140.

Pederson, H. T. and C. E. Skinner. 1955. A comparison of standard lactose broth with lauryl sulphate broth and with the Eijkman method for demonstrating fecal coliform bacteria, *Applied and Environmental Microbiology.* 3, 55-58.

Poortinga, A. T., R. Bos, W. Norde, and H. J. Busscher. 2002. Electric double layer interactions in bacteria adhesion to surfaces. *Surface Science Reptors.* 47: 3-32.

Qiao Y, Li CM , Bao SJ, and Hong Y, 2008. Direct electrochemistry and electrocatalytic mechanism of evolved *Escherichia coli* cells in microbial fuel cells. *Chemical Communications*. 21, 1290-1292.

Rabaey K, Boon N, Sicilano SD, Verhaege M, and Verstraete W, 2004. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer, *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 5373-5382.

Skoog DA and Leary JJ, 1994. Saunders college publishing, Principles of instrumental analysis(4th edition) , 中譯本, 535-564.

Tokarskyy, O. and D. L. Marshall. 2008. Effects of ionizing irradiation and hydrostatic pressure on *Escherichia coli* O157:H7 inactivation, chemical composition, and sensory acceptability of ground beef patties *Food Microbiol.* 25(1): 1-12.

Tryland, I. and L. Fiksdal. 1998. Rapid enzymatic detection of heterotrophic activity of environmental bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3): 1018-1023.

二、 中文部分

丘志威、吳定峰。2004。食品微生物學精要，第 38-54 頁。藝軒圖書出版社，台北市。

王素梅。2006。茶類飲料之消費與市場發展，財團法人食品工業發展研究所，新竹市。

呂博文。2006。 Fe_3O_4 奈米微粒修飾性網印探電極於葡萄糖生物感測器之究，國立雲林科技大學化學耕程系碩士論文。

方繼、李根永、李清福、林建谷、林順福、范晉嘉、陳惠英、虞積凱、蔡國珍等。1999。現代食品微生物學，第 421-429 頁，偉明圖書有限公司。

姚念周。2004。台灣茶飲料產業趨勢。食品資訊(201) 10-15。

飲料類衛生標準— 微生物限量。2007。行政院衛生署食品藥物管理局公告。

許元馨、胡奇琪。2005。食品中大腸桿菌群快速檢測方法探討。經濟部 94 年度研究發展專題。

湯淑帆。2010。新穎電化學檢測法檢測液體樣品中之大腸桿菌濃度，元培科技大學食品科學系碩士論文。

陳燕惠。2006。奈米碳管與膠體金於電化學生物測器上之應用，國立中興大學化學工程系碩士論文。

程欲曉、金利通。2009。電化學/生物感測器快速檢測大腸桿菌研究進展。

化學感測器，29(1)。

黃建豪。2007。結合奈米金-免疫抗體作用 SAM 修飾電極上之電化

學阻抗特性變化進行微量 Protein A 的檢測，國立國立成功大學

醫學工程研究所碩士論文。

劉向寧、吳靖宙、張長泉、張憲彰。2003。生物晶片與食品微生物檢測。

國際農業科系新知 17: 1-8。

鄭凱暹。2006。利用市售焦炭電極開發電流式生物感測器對食品中亞

硝酸鹽含量之快速檢測法，元培科技大學生物技術研究所碩士

論文。