

紅茶菇之衛生品質與白色念珠菌之殘存試驗

陳錦樹¹⁾，劉碧雲²⁾

(接受刊載日期：中華民國 85 年 10 月 14 日)

摘要：紅茶菇為一種在含糖之紅茶湯液中接種特殊天然菌種，次於室溫下經發酵培養一、二星期後而成之家庭自製酸性飲料，其乃由上層之纖維質薄膜及下層培養液所組成，後者之成份以醋酸及葡萄糖酸為主。本研究蒐集十二種紅茶菇樣品，分別進行醋酸菌與酵母菌之分離或菌種鑑定。發現在上層薄膜內所含之醋酸菌濃度比下層之培養液部份高，分別為 10^4 - 10^5 及 10^3 - 10^4 cfu/ml 左右，而酵母菌則反之，各約 3.5 - 280×10^6 及 0.5 - 210×10^6 cf/ml。另外，所有樣品皆可分離出好氣性產膜酵母 *Pichia membranaefaciens*，其它如 *Candida sorboxylosa*, *Dekkera bruxellensis* A, *Issatchenkia scutulata* var. *exigua*, *Issatchenkia orientalis* 及 *Schizosaccharomyces pombe* 等酵母則視樣品來源而定，常有兩種或以上之酵母菌共存。又由病原菌白色念珠菌之殘存試驗知，其可在生長速率或培養初期時產酸速率較慢之紅茶菇樣品中殘存，反之則不易殘活。

關鍵詞：紅茶菇、醋酸菌、酵母菌、白色念珠菌。

前言

紅茶菇 (tea fungus)，又名海寶 (Hai Bao)，為一種目前仍普遍流行於民間的家庭自製酸性飲料，其培養方式一般為將紅茶湯液加入蔗糖 (10-20% w/v)，煮沸並冷卻至室溫後，移至乾淨之廣口玻璃瓶內，其次植入前次培養剩下之薄膜 (pellicle)，瓶口覆蓋紗布，靜置培養約一~二星期，該薄膜逐漸增厚並浮於液面上，此時即可飲用⁽¹⁾。其風味略帶酒味和醋酸味並隨糖量、接菌量及培養時間之長短而有所不同。

據稱紅茶菇具有延年益壽或養顏美容之作用，而對部份慢性疾病亦有某種程度之改善效果⁽⁴⁾。事實上，紅茶菇培養液的成份以醋酸、葡萄醋酸 (gluconic acid) 及酒精為主，此外尚有乳酸、酵素以及一些未知之成分或微量物質⁽⁷⁾。醋酸及乳酸有益人體健康殆無疑義，而近年來葡萄糖酸已被證實對腸內有益細菌，雙叉乳酸桿菌屬 (*Bifidobacteria*)，具有明顯之增殖效果⁽⁸⁾，此等腸內有益菌可利用糖類產生醋酸及乳酸，因而抑制如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 等有害細菌之繁殖。另外，酸性環境亦可刺激腸道之蠕

1) 國立中興大學食品科學研究所副教授

2) 國立中興大學食品科學研究所研究生

動現象，縮短食物在腸內的滯留時間，同時亦有抑制小腸對有害細菌所產生之氨或胺類等化合物之吸收作用⁽²⁷⁾。因此基本上紅茶菇可被視為一種具有整腸作用之保健飲料。至於浮於液面上之白色凝膠狀薄膜為一種由酵母菌、醋酸菌及其所分泌的胞外纖維素(bacterial cellulose)所構成，後者若經進一步加工，可製成類似高纖椰果(Nata)之產品^(2,5)。紅茶菇之微生物菌相視接種源而略有差異，主要為醋酸菌及酵母菌，前者以 *Acetobacter xylinum* 為主，其次為 *Acetobacter xylinoides*；後者之種類較多，視地區而定，已知的是 *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* 及 *Zygosaccharomyces* 等菌屬，另外，亦有含有乳酸菌的紅茶菇^(6,7,24)。

從食品微生物學的立場來看，由於紅茶菇開放式的培養方式，故其培養過程存在著雜菌污染問題，而在高糖濃度或酸性之培養液中易污染之雜菌大部份為酵母菌及黴菌。設若紅茶菇已污染有病原菌或腐敗菌而繼續培養飲用，對健康之影響是漸進累積而不自知。事實上，早在約二十多年前，紅茶菇在本省地區曾頗為流行，其後因日本傳來會受到可在酸性環境下生存之病原菌如白色念珠菌(*Candida albicans*)或雜菌如黑黴菌(*Aspergillus niger*)等污染危險之報導而逐漸銷聲匿跡⁽⁷⁾，最近幾年才又再度逐漸流行起來。不過，一般民衆在培養紅茶菇時，由於缺乏微生物之相關認知，因此可能不會或不知去注意培養過程中，如何去預防雜菌的污染。有關黴菌污染之問題，因常發生在薄膜表面上且具顏色，故消費者在培養期間或飲用前即因肉眼可辨認而採取適當之防範措施如捨棄不用，惟酵母類污染菌常因細胞本體太小，無明顯顏色以及懸浮在下層之湯液

中而難以即時辨認。基於此，本研究除探討紅茶菇培養過程中主要微生物相之變化外，同時亦進行有關白色念珠菌之接種試驗，以模擬此病原菌在紅茶菇中之殘活情形期能對紅茶菇之衛生品質有一初步瞭解。

材料與方法

一、材料

(一)樣品

透過問卷調查採集 12 個不同地區或家庭來源的紅茶菇樣品(編號 A ~ L)，其中樣品 L 係來自台北市；A,C,I 及 J 為桃園或新竹縣，而 B,D,H 及 K 為台中市，其餘的(E,F,G)則來自高屏地區。樣品包括上層之薄膜及下層之培養液兩部份。

(二)菌株

Candida albicans CCRC 20513，購自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心，新竹市。菌種經活化後，在 4 °C 之 YM 培養基斜面上保存。

(三)方法

1. 樣品之前處理

稱取 20 公克之紅茶菇樣品薄膜，裝入搥碎均質機用塑膠袋(stomacher bag)內，並加入 180 毫升 0.1%(W/V)無菌腴水(peptone water)，接著以搥碎均質機(Stomacher 400, Tekmar)高速拍擊 6 ~ 12 分鐘，直至樣品破碎，所得之薄膜懸浮液供以下各種菌種分離步驟之菌源使用，至於紅茶菇液部份則直接吸取下層液體部份供作菌源使用。

2. 醋酸菌之分離、保存與初步鑑定⁽¹²⁾

取紅茶菇液或經前述處理後之薄膜懸

浮液 1 毫升，以無菌胰水經一連串稀釋後，選取三個適當之稀釋濃度各取 0.1 毫升於添加有 3% 乙醇之 G-Y-Ca medium (內含 3% (w/v) glucose, 0.5% yeast extract, 0.3% peptone, 2% agar) 上做表面塗抹，次於 30 °C 下培養 5 天，計數並挑周圍呈透明之菌落保存於 Mannitol agar [內含 2.5% (wv) mannitol, 0.3% peptone, 0.5% yeast extract] 斜面上，再進行鏡檢及革蘭氏染色。

3. 酵母菌之分離與保存⁽²²⁾

取紅茶菇液或經前述破碎處理後之菌源 1 毫升，以無菌胰水經一連串稀釋並選取三個稀釋濃度各取 0.1 毫升塗抹於 PDA 培養基 (potato dextrose agar, Difco) 另加入 1.4 毫升無菌之 10% 酒石酸上，30 °C 下培養 3-5 天，計數並挑菌保存於 YM 斜面培養基 (配方為 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose) 上，再進行鏡檢及利用 Biolog 快速鑑定系統進行菌種鑑定。

4. Biolog 快速鑑定系統 (Biolog Microstation System) 酵母菌之鑑定⁽²³⁾

將前述保存之分離菌種先以 YM broth 活化 24 小時之後，取 0.1 毫升塗抹於 BUY agar (Biolog Universal Yeast Agar) 上，於 30 °C 下培養 1 天，以無菌棉花棒挑取菌落至無菌水中，調整菌體濃度在約 10^6 cells/ml，再以八爪微量吸量管 (8-channel pipette) 將菌液接入 Biolog YT Microplate 中，每一接種槽 (well) 各接 100 μ l 之菌液。最後於 26 °C 下培養並分別在 24、48 或 72 小時，

各檢測一次，由呈色結果配合所附之電腦軟體即可鑑定出種名。

5. 乳酸菌之分離、保存與初步鑑定⁽¹⁶⁾

取紅茶菇液或經前述破碎處理後之菌源 1 毫升，以無菌胰水經一連串稀釋並選取三個適當稀釋濃度，各取 0.1 毫升塗抹於添加有 200 ppm cycloheximide 之 V-8 medium 上，35 °C 下培養 2 天，計數並挑外有黃環之墨綠色菌落，將其保存於 MRS agar (Difco) 斜面培養基上，再進行鏡檢及革蘭氏染色。

6. 紅茶菇培養期間白色念珠菌之接種試驗

(1) 紅茶菇樣品之活化⁽²⁵⁾

一公升之蒸餾水加熱至 100 °C，加入 100 克之砂糖 (台糖特砂) 及 2 包紅茶包 (yellow label tea, Lipton)，煮沸五分鐘後，每 150 毫升分裝於容量 500 毫升之廣口瓶中，待冷卻至室溫，分別加入紅茶液之 1/5(v/v) 量之紅茶菇液以及 1/40 (w/v) 量之紅茶菇上層薄膜，次以乾淨紙巾蓋住瓶口並以橡皮圈束緊，於室溫 (24 \pm 2 °C) 下靜置培養一~二星期。

(2) 接種試驗

在紅茶菇培養至第 0, 2, 4, 8 日時，分別取 0.1, 0.3 或 0.5 毫升經 24 小時振盪活化之白色念珠菌菌液 (約 2.1×10^6 cells/ml) 接種至紅茶菇液中，每隔兩天取樣一次。樣品經搥碎均質後，次以塗抹法接種至選擇性培養基 BiGGY agar (Bismuth sulfite-Glucose-Glycine-Yeast Agar, Difco)，於 30 °C 下

培養 5 天，選擇中央有尖狀突起，周圍有棕色菌絲狀綫狀物 (mycelial fringe) 之菌落計數之，即為白色念珠菌菌數^(11,13)。

四、分析方法

1. 革蘭氏染色⁽²¹⁾

由染色結果，供初步判斷在 G-Y-Ca 或 V-8 等選擇性培養基上所篩選出之菌落，是否分別為醋酸菌（革蘭氏陰性）或乳酸菌（革蘭氏陽性）之依據用。

2. 光學顯微鏡鏡檢

使用光學顯微鏡 (Labophot-2, Nikon) 並分別以 10×40 及 10×100 等倍率觀察酵母菌及細菌（醋酸及乳酸菌）之菌體形態。

結果與討論

一、紅茶菇培養情形

紅茶菇培養初期（約 2-3 天後），茶湯開始混濁，冒出氣泡，表面長出一層薄膜，然後茶湯逐漸澄清，同時有酒味產生。再約 3-4 天，在表面之薄膜繼續增厚且茶湯變酸，此時培養液之 pH 值約 2-3 左右。

二、紅茶菇中微生物之分離

1. 醋酸菌

取不同來源之紅茶菇樣品（已培養五天），利用 G-Y-Ca medium 篩選在上層薄膜和下層培養液內所含之醋酸菌並計數，結果如表一所示。大致上，上層薄膜內所含之醋酸菌濃度要比下層之液體部份高約 1-10 倍，目前已知醋酸菌 *A. xylinum* 為紅茶菇中之優勢菌種，其為好氣性菌且在靜置培養時具有產胞外纖維素之能力，其等最初係以微細纖維素 (microfibrils) 方式存在，其次

再藉氫鍵結合成束狀 (ribbon)^(17,19)，最後彼此交錯形成肉眼可見之凝膠狀纖維素並浮在培養液液面上，而菌體則被包埋在內部，因而形成有利此好氣菌接近氧氣較為充足之液面環境，同時保護菌體免受紫外線之傷害⁽²⁶⁾。另外，除樣品 D 之薄膜所含醋酸菌濃度較高外，其它樣品之上層與下層之醋酸菌濃度分別為 10^4 - 10^5 及 10^3 - 10^4 cfu/ml 左右。挑選部份菌落進行鏡檢及染色結果，顯示外觀為短桿到長桿狀，革蘭氏染色皆為陰性菌（表二），為典型之醋酸菌。

2. 酵母菌

利用 PDA agar 篩選酵母菌，結果示如表一，顯示所有紅茶菇樣品，皆含為數不少的酵母菌，其菌落之形態皆類似，其中樣品 A, C, D, E, F, K 等在 PDA 培養基上各有二至三種不同形態的酵母菌菌落。另外，除樣品 I, K 及 L 外，一般湯液部份所含之菌數均比薄膜的為少。挑選之菌落並配合鏡檢進一步確認是否為酵母菌，最後並利用 Biolog 快速鑑定系統進行種名鑑定，結果如表三所示。依該系統操作手冊⁽²³⁾，在特殊培養基上經 24，以及 48 或 72 小時培養後，當菌株之近似指標值 (similarity index) 分別在 0.75 及 0.5 以上時即為可接受之結果。在十二個紅茶菇樣品中皆有 *Pichia membranaefaciens* 菌，其中 B, G, L 等三個樣品僅含該種酵母菌，其餘樣品皆有兩種或以上之酵母菌共存。例如樣品 A 另含 *Issatchenkia scutulata* var. *exigua*; C, E 另含 *Dekkera bruxellensis* A; 而 D, H, I 另含 *Issatchenkia orientalis*; F 另含 *I. orientalis*, *D. bruxellensis* A; J 另含 *Candida sorboxylosa*; K 另含 *Schizosaccharomyces pombe*，所鑑定出之酵母菌與其它文獻所記載之菌種部份類似（如表三），而

表一、不同來源之紅茶菇經培養五天後之醋酸菌與酵母生菌數。

Table 1. Viable counts of acetic acid bacteria and yeasts for various sources of tea fungus determined after five days of cultivation

Sample	Upper pellicle portion		Lower liquid portion	
	Acetic acid bacteria ($\times 10^4$ cfu/ml)	Yeasts ($\times 10^6$ cfu/ml)	Acetic acid bacteria ($\times 10^4$ cfu/ml)	Yeasts ($\times 10^6$ cfu/ml)
A	3.7	8.5	0.24	1.8
B	36.0	37.0	5.9	1.9
C	48.0	27.0	2.6	3.8
D	170.0	210.0	4.5	2.1
E	16.0	280.0	8.5	1.3
F	25.0	3.5	5.6	0.53
G	6.9	23.0	0.35	3.1
H	11.0	270.0	2.1	27.0
I	8.0	63.0	6.1	210.0
J	5.0	140.0	0.53	56.0
K	54.0	20.0	1.6	89.0
L	2.6	2.5	0.6	72.0

表二、自不同來源之紅茶菇中分離出之醋酸菌其革蘭氏染色與形態。

Table 2. Gram staining and morphology of acetic acid bacteria isolated from various sources of tea fungus

Sample	Gram stain	Morphology
A	Negative	short-rod
B	Negative	short-rod
C	Negative	short-rod
D	Negative	rod
E	Negative	rod
F	Negative	short-rod
G	Negative	short-rod
H	Negative	rod
I	Negative	short-rod
J	Negative	rod
K	Negative	rod
L	Negative	rod

Issatchenkia 和 *Dekkera* 兩屬則可能尚未見諸於其它文獻。由此可知紅茶菇之來源不同，其中所含之酵母菌菌種不盡相同。另外，在十二種樣品中，雖然有部份酵母分離菌株在 BiGGY agar 上呈現疑似 *Candida* 屬之特徵（數據未附），不過經 Biolog 快速鑑定系統進一步鑑定後，除有一株為 *C. sorboxylosa* 外，其餘均非白色念珠菌。

好氣性產膜酵母 (film forming yeast), *P. membranaefaciens*，因可利用乙醇作為碳源，故為啤酒或葡萄酒等釀造酒在釀造過程中常見之有害菌 (spoilage yeast)⁽¹⁵⁾。而裂殖酵母菌 (fission yeast)，*Schizosaccharomyces pombe* 其酒精發酵力不僅強且和 *Saccharomyces cerevisiae* 相近；而對於低 pH 環境或醋酸的忍受性也比後者強⁽²⁸⁾，故可在紅茶菇培養液中殘存。一般酒精酵母對培養液中醋酸之濃度甚為敏感，例如當醋酸

在 0.1%(w/v) 時，其他酵母之發酵能力即被抑制，而 *S. pombe* 在 1.0% 時仍僅些微受到抑制。至於 *Dekkera bruxellensis* 則為啤酒或葡萄酒中所曾發現之野生酵母菌 (wild yeast)⁽¹⁵⁾，另外 *Candida* 屬酵母菌廣泛存在

於土壤、各種動植物、食物、加工器具或加工製品中，不過，該屬有部份菌種，如 *C. albicans*，亦為人畜等動物中所常見之病原菌⁽¹⁸⁾。

表三、紅茶菇之主要微生物相

Table 3. Major microorganisms in the tea fungus

Acetic acid bacteria	Yeasts	Lactic acid bacteria	Reference
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Candida</i> spp.	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7
<i>Gluconobacter</i> spp.	<i>Debaryomyces</i> spp.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
<i>Acetobacter xylinoides</i>	<i>Mycotorula</i> spp.		
	<i>Saccharomyces</i> spp.		
	<i>Torula</i> spp.		
	<i>Zygosaccharomyces</i> spp.		
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i>		9
	<i>Saccharomyces</i> spp.		
	<i>Torulopsis famata</i>		
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		24
<i>Acetobacter xylinoides</i> (<i>Bacterium gluconicum</i>)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Acetobacter xylinum</i>	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>		25
<i>Acetobacter xylinoides</i> (<i>Bacterium gluconicum</i>)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Pichia</i> spp.		6
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Dekkera</i> spp.		
<i>Acetobacter</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		
	<i>Candida sorboxylosa</i>		this study
	<i>Dekkera bruxellensis</i> A		
	<i>Issatchenkia</i> spp.		
	<i>Pichia membranaefaciens</i>		
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		

表四、不同來源之紅茶菇中分離之酵母菌之鑑定

Table 4. Identification of yeasts isolated from various sources of tea fungus by Biolog Microstation system

Sample	Species	Similarity index ¹
A	<i>Issatchenkia scutulata</i> var. <i>exigua</i>	0.761 (72 h) ²
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.915 (48 h)
B	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.932 (48 h)
C	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.841 (48 h)
	<i>Dekkera bruxellensis</i> A	0.869 (24 h)
D	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.875 (48 h)
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	0.761 (48 h)
E	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.885 (48 h)
	<i>Dekkera bruxellensis</i> A	0.854 (48 h)
F	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.799 (48 h)
	<i>Dekkera bruxellensis</i> A	0.803 (48 h)
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	0.776 (48 h)
G	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.921 (48 h)
H	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.913 (48 h)
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	0.751 (48 h)
I	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.904 (48 h)
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	0.754 (48 h)
I	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.915 (48 h)
	<i>Candida sorboxylosa</i>	0.789 (48 h)
K	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.906 (48 h)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.853 (48 h)
L	<i>Pichia membranaefaciens</i>	0.911 (48 h)

¹ Similarity index greater than 0.75 at 24h, and 0.5 at 48 h or 72 h was acceptable.

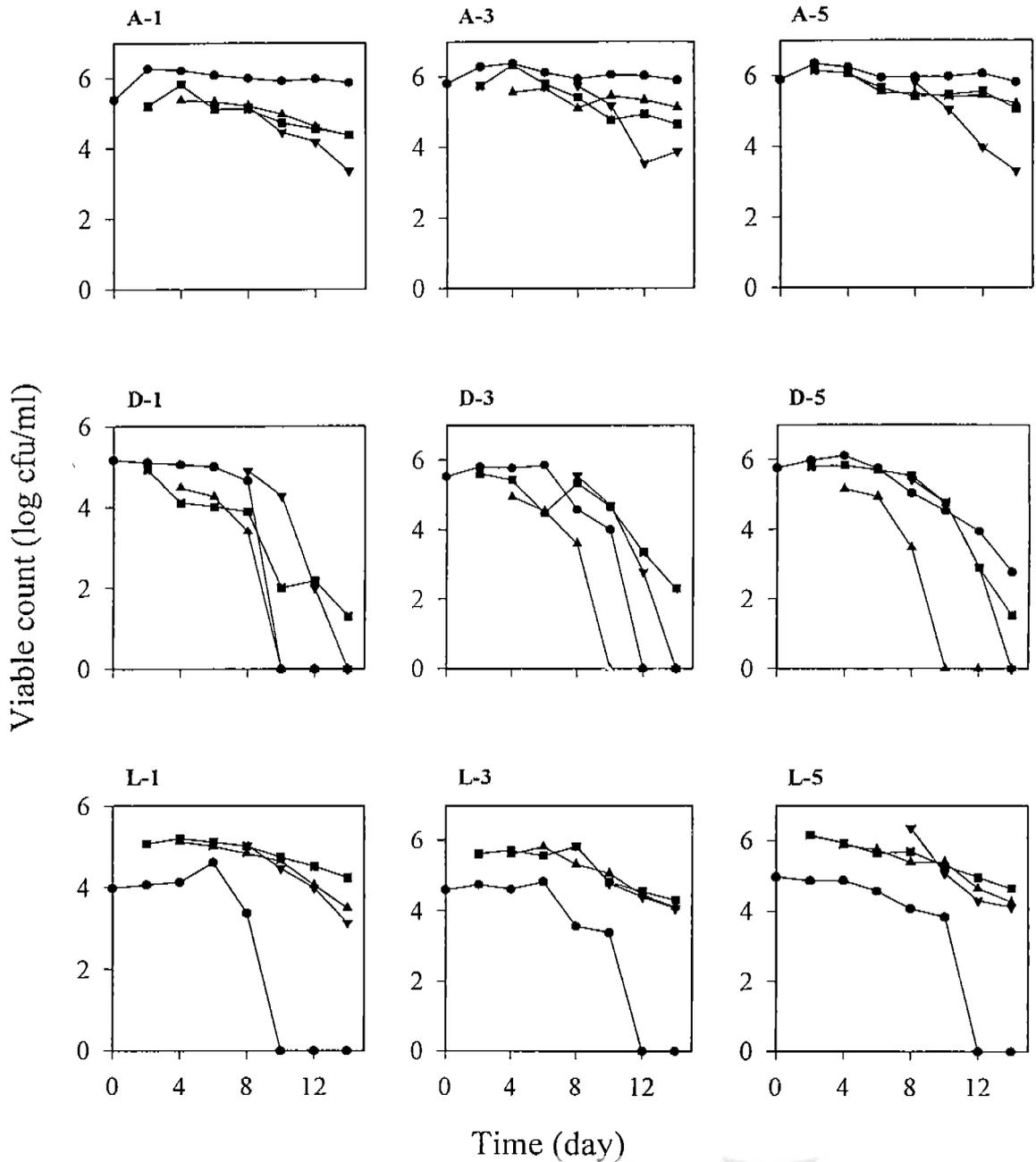
² Numbers in parentheses indicate the incubating time in hour when the results were read.

3. 乳酸菌

以 V-8 medium 擬就不同來源之紅茶菇樣品中分離乳酸菌，結果發現，所有樣品皆未篩出乳酸菌（數據未附），此可能和乳酸菌是在培養過程中由環境中隨機進入培養體系並非紅茶菇原有之微生物種類有關⁽⁷⁾。

4. 白色念珠菌接種試驗

為瞭解不同接種量之白色念珠菌在不同培養階段下之紅茶菇之存活情形，乃分別選擇 A, D, L 等三種樣品，在培養至第 0, 2, 4 及 8 天時分別接種 0.1, 0.3 或 0.5 毫升之白色念珠菌菌液，其次取樣觀察其在培養液之消長情形，結果如圖一所示。樣品 A（圖一 A-1 ~ A-5）若在第 0 天即接種白色念珠



圖一、白色念珠菌接種至不同培養階段之紅茶菇樣品 A、D 及 L 後之殘存曲線。紅茶菇（每瓶 250ml）在培養至 0(●)、2(■)、4(▲)、8(▼) 天後，分別接種 0.1、0.3、0.5ml 白色念珠菌菌液 (2.1×10^6 cells/ml)。

字母 A,D,L 分別表示紅茶菇樣品 A,D,L；而數字 1,3,5 則表接種量為 0.1、0.3 及 0.5ml。

Fig.1. Survival curves of *C. albicans* inoculated in the tea fungus A, D and L at different growth stages. Inoculum of *C. albicans* cell suspension (2.1×10^6 cells/ml) at 0.1, 0.3 or 0.5 ml was inoculated into the tea fungus that had grown for 0(●), 2(■), 4(▲), 8(▼) days. Alphabets A, D, and L designate the respective tea fungus sources, A, D, and L, while numbers 1,3,5 correspond to the volume of inoculum being at 0.1, 0.3 and 0.5 ml, respectively.

菌，則不管接種量多寡，培養液中白色念珠菌菌數在二星期內大致維持不變並無死滅的現象出現，推測可能和在培養初期所接種的白色念珠菌係處於相對優勢狀態以及培養液中各種有機酸量仍低有關（醋酸濃度約為0.22%，而葡萄糖酸濃度則約在0.37%左右）⁽³⁾，此時pH值約為3.1。相反地，若在紅茶菇培養至第2、4、8天後才接種白色念珠菌者，其等之生菌數一般有下降的趨勢，尤其對於第8天方才添加之實驗組，此種現象特別明顯，此可能和是時紅茶菇中其它酵母菌及醋酸菌均已成優勢生長菌，且各種有機酸量也升高有關（如培養至第九天時，醋酸濃度約為0.56%，而葡萄糖酸濃度則為0.45%）⁽³⁾，此時pH值降為2.5。白色念珠菌可生存之pH範圍頗廣，約在pH2.2~9.6之間，但最適pH值則在7.0左右⁽²⁰⁾。另外，有機酸大都具有抑菌作用，例如0.4%醋酸即可抑制金黃色葡萄球菌⁽¹⁰⁾，因此低pH值或較高濃度有機酸之環境對白色念珠菌之生長不利，菌數下降的趨勢變為明顯。

至於白色念珠菌在樣品D之存活情形示如圖一(D-1~D-5)，顯示不論於第0、2、4或第8天接種白色念珠菌，其都有明顯之死滅現象，且速率均比在樣品A的情形為快，在培養至中、後期時菌數即迅速減少，推測和樣品D在培養過程中葡萄糖酸之濃度（第九天時為0.52%）均較樣品A的為高有關。

至於樣品L之白色念珠菌接種試驗結果示如圖一之L-1~L5。除第0天之接種試驗組較為特殊之外，其餘的變化趨勢大致和樣品A的相似，也有緩慢之死滅現象。以上結果顯示，在紅茶菇培養至適合飲用的14天內，紅茶菇本身之活性大小影響白色念珠

菌之殘活率最大，其次為其等在受污染時已培養之天數。樣品A或L之活性較小，產酸速率較慢，故大部分之念珠菌得以殘存下來；反之，樣品D因活性較大，故培養液中有機酸之濃度上升迅速進而抑制外來污染菌之生存機會。

整體而言，在十二種紅茶菇樣品中，其等之上層薄膜所含之生菌數均有比下層液體來得高之現象，而微生物種類以醋酸菌和酵母菌為主，並未發現有乳酸菌之存在。

至於紅茶菇於培養過程中，可能發生之雜菌或病原菌污染問題，基本上由於紅茶菇於培養末期所形成之低pH值及高濃度之有機酸環境抑制了大部份細菌生存之機會，惟黴菌和酵母菌如白色念珠菌等之污染則可能發生。黴菌類如黑黴菌(*A. niger*)或青黴菌屬(*Penicillium* spp.)之最適生長pH值均在酸性範圍，各約為3.0-6.0及4.5-6.7，而最低生長pH值(minimum pH)則分別為1.2及1.9⁽¹⁴⁾。由白色念珠菌之接種試驗可知，其等仍可在紅茶菇之酸性環境中存活，對於生長速率較慢的紅茶菇如樣品A，由於其薄膜增厚及在培養初期之產酸速率均比其它樣品的為緩慢，故若在培養初期即遭到白色念珠菌之污染則頗為危險，而對一些生長情況較佳且在後期才遭受污染之紅茶菇（如樣品D及L），在培養至可飲用的14天期間內，白色念珠菌仍可殘存，故在紅茶菇之製備或培養過程中應注意環境、器皿或雙手之潔淨與衛生，避免黴菌或白色念珠菌之污染。

謝誌

本研究承蒙台灣省政府衛生處經費補助，謹此誌謝。

參考文獻

1. 李錦楓。1976。關於健康飲料海寶（紅茶菇）的真象，食品工業，8(3):35-37。
2. 吳東和、林慶福。1994。Nata-被遺忘的機能性食品，食品工業，26(6):42-47。
3. 陳錦樹。1996。紅茶菇衛生品質與安全之調查。臺灣省政府衛生處研究報告，pp.1-57。
4. 曾文哲、吳靜美、詹汝娟。1994。紅茶菇—健胃整腸新興健康飲料。In “偏方？秘方？還是處方？認識民俗療法”，pp.17-21，皇冠文學出版公司，台北市。
5. 閻立平、曾乙仁、溫銘嘉。1994。以醋酸菌發酵鳳梨汁生產纖維素(Nata)之研究，中華民國食品科學技術學會第二十四屆會員大會手冊。pp.157。
6. 劉繼賢、許文浩、李福臨、黃國杰、張平平、廖啓成。1994。紅茶菇之微生物群的分離與鑑定，中華民國食品科學技術學會第二十四屆會員大會手冊。pp.157
7. 賴敏男。1976。紅茶菇的微生物及成份，食品工業。8(9):45-49。
8. 中村俱康。1995。見直されゐるグルコン酸とその利用。食品と開發，30(4):17-20。
9. 寺田澄子、西村濶子。1976。紅茶きのこに関する研究（予報）。市邨學園短期大學自然科學研究會會誌。10(1):15-18。
10. 淺井以和男、奧野薰、竹内昌則。1995。酸味料の有効利用，食品と開發，30(4):5-8。
11. Anonymous. 1984. Bacto BIGGY agar. In "Difco Manual-Dehydrated culture media and reagents for microbiology", 10 th ed. pp.127-128. Difco Laboratories, Detroit, MI.
12. Asai, T., Iizuka, H. and Komagata, K. 1964. The flagellation and taxonomy of genera gluconobacter and acetobacter with reference to the existence of intermediate strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 10(2):95-125.
13. Atlas, R. M. 1993. Handbook of microbiological media. Parks, L. C. (ed.) pp.131-132. CRC Press, Inc. U. S. A.
14. Banwart, G. J. 1989. Factors that affect microbial growth in food. In "Basic Food Microbiology", 2nd ed., G.J. Banwart(ed.), pp.101-163. Van Nostrand Reinhold, NY.
15. Benda, I. 1981. Wine and Brandy. In "Prescott & Dunn's Industrial Microbiology", 4th ed., G. Reed(ed), pp.293-402. Avi Publishing Co., Westport, CT.
16. Fabian, F. W., Flulde, R.C. and Merrick, J.E. 1953. A new V-8 medium for determining *Lactobacilli*. Food Research. 18:280-289.
17. Forge, A. and Preston, R. D. 1977. An electron microscope examination of *Acetobacter xylinum* showing the ultrastructure of the cells and the association of cellulose microfibrils. Annu. Bot. 41:437-446.
18. Gentles, J.C. and La Touche, C.J. 1969. Yeasts as human and animal pathogens. In "The Yeasts", vol. 1. A. H. Rose and J. S. Harrison(eds.), pp.107-182. Academic Press Inc., NY.
19. Haigler, C. H., Brown, R. M. and Benziman, M. 1980. Calcofluor White ST alters the *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. Science. 210:903-906.
20. Henrici, A. T. 1947. Henrici's molds, yeasts, and actinomycetes: a handbook for students of bacteriology. 2nd ed., A.T. Henrici(ed.), pp.50. Wiley, Inc., NY.

21. Johnson, T. R. and Case, C.L. 1987. Microbiology: A laboratory manual, 2nd ed., pp.29-31. The Benjamin Cummings publishing company, Inc. U.S.A.
22. Koburger, J. A. and Marth, E. H. 1984. Yeasts and molds. In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", 2nd ed., M. L. Speck(ed.), pp.197-202, American Public Health Association, Inc. Washington, D.C.
23. Microstation System Release 3.50. 1993. Biolog, Inc. Hayward, CA.
24. Reiss, J. 1987. Der Teepilz und seine stoffwechselprodukte. Dtsch. Lebensm. Rdsch. 83:286-290.
25. Reiss, J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 198:258-261.
26. Williams, W. S. and Cannon, R. E. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. Appl. Environ. Microbiol. 55:2448-2452.
27. Yamada, H., Itoh, K., Morishita, Y. and Taniguchi, H. 1993. Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran. Cereal Foods World, 38:490-492.
28. Yang, H. Y. 1973. Effect of pH on the activity of *Schizosaccharomyces pombe*. J. Food Sci. 38, 1156-1157.



Studies in Microbiological Quality and Survival of *Candida albicans* in the Tea Fungi

Chin-shuh Chen¹⁾ and Bih-Yun Liu²⁾

(Accepted for publication : Oct 14, 1996)

Abstract

Tea fungus is a home-brewed beverage which is prepared by fermenting the sugar added in the black tea decoction with a specific, but naturally occurring starter. The fermentation is usually carried out under uncontrolled conditions at room temperature for one to two weeks. Tea fungus is composed of two portions, a floating cellulosic pellicle layer and the sour liquid broth. Both acetic acid and gluconic acid are the major ingredients found in the liquid broth. In this study, acetic acid bacteria and yeast flora were isolated, and some were identified further, from 12 collections of tea fungi. Cell counts of acetic acid bacteria present in the pellicle layer were higher than those in the liquid broth, i.e., at concentrations of 10^4 - 10^5 and 10^3 - 10^4 cfu/ml, respectively. On the contrary, the respective cell counts of yeast flora ranging from 3.5 to 280×10^6 , and from 0.5 to 210×10^6 cfu/ml were determined. Moreover, the *Pichia membranaefaciens*, a film-forming yeast, was isolated from all the samples, while other yeasts including *Candida sorboxylosa*, *Dekkera bruxellensis* A, *Issatchenkia scutulata* var. *exigua*, *Issatchenkia orientalis*, and *Schizosaccharomyces pombe* were present either two or three of them occasionally, depending upon the sources of tea fungi. The survival curves of a pathogenic *Candida albicans* inoculated to tea fungi at various growth stages were also studied. The results indicated that *C. albicans* could survive from the acidic environment produced by the tea fungus having lower growth rate or acid production rate during the early stage of fermentation; however, it died readily if the tea fungus was an actively growing one.

Keywords: Tea fungus, acetic acid bacteria, yeasts, *Candida albicans*

1) Associate professor, Graduate Institute of Food Science, National Chung Hsing University.

2) Graduate student, Graduate Institute of Food Science, National Chung Hsing University.