

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：微生物學科

作品名稱：你喝下了多少？-台灣市售優酪乳乳酸菌生長力
及抗酸性之探討

得獎獎項：微生物學科佳作

學 校：國立臺南女子高級中學

作 者：張鈺敏、盧怡恬

作者簡介

我們，兩個，名為張鈺敏和盧怡恬，皆就讀於台南女中，相識於全台灣最優秀的女校－中山國中，國中三年同窗，促使我們現在一起作研究。國中時，老師的循循善誘激發了我們的科學興趣，高中時，學校給我們十分自由的學習空間，並給我們從事科展研究的機會，在研究期間，我們的科學精神被建構，時間的掌握及許多待人接物的道理，都豐美了我們的生命，烙印於記憶深處，即使科展落幕，但我們對科學熱情永遠不減，更希望以後還有機會可以從事相關研究。

摘 要

現今乳酸菌飲料風行，但是乳酸菌是否真能通過胃酸的考驗，到達腸道進行複製，利益人體？我們首先以市售乳酸菌粉（加拿大 Rosell 公司，含二種菌，暫時命名為"小毛"及"小白"）為預測菌種，利用分光光度計測定乳酸菌於 Thioglycollate 培養基中的生長能力（OD₆₀₀）。小毛在 pH 值 1、3、5、7 時之生長力分別為 0、0.008、0.682、0.847，小白為 0、0.015、0.973、0.636。若於培養基中添加不同濃度的螺旋藻熱分解物，如加入 0.01% 的添加物後，小毛在以上各種 pH 值生長力分別為 0.042、1.291、1.447、1.213，小白為 0.053、1.392、1.531、0.988，意外發現可大幅提升菌的生長力及抗酸力。

再取台灣市售 4 種廠牌優酪乳（以甲、乙、丙、丁代表之），分離乳酸菌，再於各種 pH 值中培養。結果在 pH 3 時，螺旋藻熱分解物僅對丙廠牌有效，乙廠牌無效，甲與丙則有無添加生長力都很差。在 pH 1 時，則對乙、丙、丁皆有效，故建議廠商慎選菌種，並於製程及成品中添加螺旋藻熱分解物。

Abstract

The yogurt is a popular drink. But whether the lactobacilli inside can resist the destruction of gastric acid and grow well in the intestinal tract is still questionable. We used pure lactobacilli powder (Rosell Company, Canada, containing two bacteria named in this report as "Little Hair" and "Small White") for pre-test. The growth ability in thioglycollate medium was determined by spectrophotometer (OD₆₀₀). The results of bacterial growth at pH 1, 3, 5, and 7 for "Little Hair" were 0, 0.008, 0.682, and 0.847, respectively. Those for "Small White" were 0, 0.015, 0.973, and 0.636, respectively. After supplement with 0.01% of the boiled lysate of *Spirulina* algae (ProBio Biotech, Taiwan), growth abilities at pH 1, 3, 5, and 7 for "Little Hair" were 0.042, 1.292, 1.447, and 1.213, respectively. Those for "Small White" were 0.053, 1.392, 1.531, and 0.988, respectively. The algae extract amply promotes the growth and acid-resistance, especially at pH 3, of these bacteria.

The lactobacilli isolated from four different products of yogurt in Taiwan, named as *A*, *B*, *C*, and *D*, were then tested as above. Results showed the supplement with the boiled lysate of *Spirulina* algae was very effective, at pH 3, for promoting growth of *C*, but not effective for *B*. Growth abilities of both *A* and *D* were very unsatisfactory with or without this supplement. At pH 1, algae lysate supplement significantly improved the growths of *B*, *C*, and *D*. Therefore, this supplement in culture and product for yogurt preparation was suggested.

近年來乳酸菌飲料風行，各家廠商紛紛推出相關產品，然而我們發現，幾乎各廠商所標示的菌種都不盡相同，活菌數不詳，抵抗胃酸的能力亦無數據可考。我們知道乳酸菌飲料的功效，關鍵在於其中的乳酸菌能否通過胃酸而到達人類的腸道進行繁殖，由於市面上許多乳酸飲料強烈標榜自己的乳酸菌能順利到達小腸，幫助吸收，但由腸胃生理學可知：食物由入口腔至由肛門排出需 40~48 小時，而唾液 pH 值 6.4，胃液 pH 值約為 2，胰液 pH 為 8，酸鹼變化頗大，而大部分的乳酸菌適合生長的 pH 值約為 5.3，是否真能通過胃酸令人質疑。雖然有廠商利用晶球膜包裹乳酸菌，以協助通過胃酸，但真正效果不知，相對的也提高了成本。

本研究即擬檢測台灣市售乳酸菌飲料乳酸菌的抗酸能力及生長能力，並進而改善之。實驗設計是利用 Thioglycollate 厭氧培養基培養之，再以分光光度計測其吸光度（OD₆₀₀），評估其在各種酸度（pH 值）時之生長力。檢測前，我們先以純乳酸菌（加拿大 Rosell 公司出品，含二種菌，暫時命名為"小毛"及"小白"）做為材料培養之，建立合適的實驗系統。實驗過程中，菌在酸性環境中的生長情形不佳，促使我們想要改進此情形，所以我們先選擇於培養基中填加富含高蛋白質、可食用之螺旋藻，用高壓高溫蒸汽滅菌之，去掉渣質後，調成各種酸度再培養菌種，希望可以提升乳酸菌的生長力，之後再以相同培養系統培養市售飲料之乳酸菌。

(一) 設備器材

1. 有蓋培養試管〈螺旋試管〉
2. 高溫高壓蒸氣滅菌鍋〈Autoclave〉
3. 恆溫培養箱〈Yowng Chenn〉
4. 垂直式層流無菌操作台〈High Ten Scientific Corporation〉
5. 分光光度計〈LKB BIOCHROM〉
6. Micropipette〈ultraspecw II〉
7. 低速離心機〈Iwaki Centrifuge〉
8. 離心管〈15ml、50ml〉
9. Micro sample tube with plug〈三美〉
10. 震盪混合器〈Vortex-Genie2〉
11. 磁攪拌器〈MS-100E Electronic Speed Control Eargo Instrument Co〉
12. 螢光顯微鏡〈Zeiss〉
13. 微量秤量機〈Sartorius〉
14. 加熱磁攪拌器〈Corning (Stirrer/Hot Plate)〉
15. 微電腦 pH 計〈Suntex SP-2200〉
16. 滅菌完成指示帶〈Merck〉
17. 比色管〈Merck〉

(二) 材料與方法

〈實驗一〉純化培養種子細菌

1. 材料

- A 乳酸菌粉〈含乳酸菌與比菲德氏菌〉〈購自加拿大 Rosell 公司〉
- B 固體洋菜培養基〈Nutrient Agar〉〈HIMEDIA〉
- C 液體洋菜培養基〈Nutrient Broth〉〈HIMEDIA〉
- D Thioglycollate 培養液〈Fluid Thioglycollate Medium〉〈HIMEDIA〉
- E 甘油
- F 革蘭氏染色〈結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅〉

2. 步驟

- A 調配 13g/1000ml 之液體洋菜培養基及 29.8g/1000ml 之 Thioglycollate 培養液，加熱至完全溶解，各分別以每管 5ml 注入試管中。
- B 將液體洋菜培養基、固體洋菜培養基、Thioglycollate 培養液及培養皿滅菌，冷卻後，在無菌下，將固體洋菜培養基倒每培養皿 50ml。
- C 無菌下，將乳酸菌粉調配為 1.5g/10ml-PBS 之溶液〈儲存溶液〉，以備日後使用。
- D 取 0.5ml 儲存溶液置於 49.5mlPBS 中，以畫線法植入固體洋菜培養

基，以接種針植入液體洋菜培養基、Thioglycollate 培養液中，並置入控溫箱，一天後觀察紀錄，並於第二天測吸光度。

- E 將觀察到之菌落以接種針反覆挑出純化培養至固體洋菜培養基、Thioglycollate 培養液中。
- F 進行革蘭氏染色，並於螢光顯微鏡下觀察。
- G 將菌種置於冰箱或加入甘油〈培養液：甘油 = 3 : 1〉保存。

〈實驗二〉酸鹼值對乳酸菌的影響

1. 材料

- A Thioglycollate 培養液〈Fluid Thioglycollate Medium〉〈HIMEDIA〉
- B HCl〈12N〉
- C NaOH〈飽和〉
- D 革蘭氏染色〈結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅〉

2. 步驟

- A 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，其中 pH 值以 HCl 與 NaOH 控制，並以石蕊試紙檢測。
- B 不同 pH 值各多配一管作為測吸光度時的對照組。
- C Thioglycollate 培養液滅菌後，以試紙確認其酸鹼值未變，確認後，將事前已培養純化之菌種取 0.1ml 植入至不同 pH 值的 Thioglycollate 培養液中各兩管〈每管 7ml〉。
- D 在其生長巔峰期測吸光度〈波長=600nm〉，觀察菌種在何 pH 值生長情形較好。
- E 進行革蘭氏染色，並於螢光顯微鏡下觀察。

〈實驗三〉螺旋藻對乳酸菌的影響

1. 材料

- A Thioglycollate 培養液〈Fluid Thioglycollate Medium〉〈HIMEDIA〉
- B 螺旋藻粉〈普羅拜耳生物科技公司〉
- C HCl〈12N〉
- D NaOH〈飽和〉
- E 革蘭氏染色〈結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅〉

2. 步驟

- A 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，不同 pH 值再加入螺旋藻粉，配成 0.0001、0.001、0.01〈g/ml〉三種不同之濃度〈每管 7ml〉。
- B 不同 pH 值與不同濃度各多配一管作為測吸光度時的對照組。
- C 加熱，初步將螺旋藻之養分溶於 Thioglycollate 培養液中，然後加以離心〈1000rpm，10 分鐘〉，每管取其清液 4ml。

- D 將清液滅菌後，每管植入菌種 0.1ml。
- E 在其生長巔峰期測吸光度〈波長=600nm〉，觀察菌種的生長情形，並比較與無螺旋藻粉的菌種數據。
- F 進行革蘭氏染色，並於螢光顯微鏡下觀察。

〈實驗四〉市售乳酸飲料之抗酸性研究〈不含食品添加物〉

1. 材料

- A 固體洋菜培養基〈Nutrient Agar〉〈HIMEDIA〉
- B Thioglycollate 培養液〈Fluid Thioglycollate Medium〉〈HIMEDIA〉
- C 螺旋藻粉〈普羅拜耳生物科技公司〉
- D HCl〈12N〉
- E NaOH〈飽和〉
- F 市售乳酸飲料

2. 步驟

- A 將市售乳酸飲料畫在固體洋菜培養基上，在其生長巔峰期挑出菌落種入 Thioglycollate 培養液，在第四天再挑出種入 Thioglycollate 培養液，如此反覆，獲得種子細菌。
- B 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，不同 pH 值再加入螺旋藻粉，配成 0.0001、0.001、0.01〈g/ml〉三種不同之濃度〈每管 7ml〉。
- C 不同 pH 值與不同濃度各多配一管作為測吸光度時的對照組。
- D 加熱，初步將螺旋藻之養分溶於 Thioglycollate 培養液中，然後加以離心〈1000rpm，10 分鐘〉，每管取其清液 5ml。
- E 將清液滅菌。
- F 利用乾淨無菌的 Thioglycollate 培養液，調配種子細菌的吸光度，使每種廠牌一致，分別種入已滅菌的清液中。
- G 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，無螺旋藻，每管 5 ml，滅菌，將已控制吸光度的種子細菌依廠牌分別種入，置入恆溫箱培養。
- H 在其生長巔峰期測吸光度〈波長=600nm〉，觀察菌種的生長情形，並比較與無螺旋藻粉的菌種數據。

〈實驗五〉市售乳酸飲料研究〈含食品添加物〉

1. 材料

- A. Thioglycollate 培養液〈Fluid Thioglycollate Medium〉〈HIMEDIA〉
- B. 螺旋藻粉〈普羅拜耳生物科技公司〉
- C. HCl〈12N〉
- D. NaOH〈飽和〉

E. 市售乳酸飲料

2. 步驟

- A. 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，不同 pH 值再加入螺旋藻粉，配成 0.0001、0.001、0.01 (g/ml) 三種不同之濃度 (每管 7ml)。
- B. 不同 pH 值與不同濃度各多配一管作為測吸光度時的對照組。
- C. 加熱，初步將螺旋藻之養分溶於 Thioglycollate 培養液中，然後加以離心 (1000rpm, 10 分鐘)，每管取其清液 5ml，將清液滅菌。
- D. 配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，無螺旋藻，每管 5ml，滅菌。
- E. 無菌下，直接自乳酸飲料中取 0.2ml 注入培養液，置入恆溫箱培養。
- F. 在其生長巔峰期測吸光度 (波長=600nm)，觀察菌種的生長情形，並比較與無螺旋藻粉的菌種數據。

(一) 結果－乳酸菌粉

〈實驗一〉純化培養種子細菌

1. 洋菜培養基的種植

無菌下，將乳酸菌粉調配為 1.5g/10ml-PBS 之儲存溶液，取 0.5ml 儲存溶液置於 49.5mlPBS 中，配置每培養皿 50ml 的洋菜培養基，滅菌後，將儲存溶液以畫線法植入培養基中，並置入恆溫箱中觀察，得〈圖一〉(附於報告後)。

觀察：

- A 第二天已可明顯觀察到菌落。
- B 菌落約在第五天~第七天達到生長巔峰。
- C 第七天後生長漸緩。
- D 第九天開始萎縮，且菌落有變薄跡象。
- E 第十一天時，菌已死亡，菌落狀似爆破。
- F 在此次培養中即可觀察到兩種菌落，一為灰色；菌落較大且邊緣毛狀；剖面為奶嘴狀，本組命名為小毛。另一為白色；菌落較小且邊緣光滑；剖面為半圓，本組命名為小白，參見〈附錄一〉。

2. 純化

藉由固體培養基，可獲得純化之種子細菌。

無菌下，將上述的洋菜培養基以接種針挑出兩種不同的菌，分別劃至另一培養皿中，放置於恆溫箱中觀察，得〈圖二〉(附於報告後)。

觀察：

- A 小毛之生長情形較小白為好。
- B 菌落在第五天~第七天為生長巔峰。
- C 第八天已停止生長，甚至萎縮。
- D 第十天菌落已明顯變薄。
- E 第十二天時已爆破死亡。

3. 液體洋菜培養基的培養

無菌下，將上述已純化的洋菜培養基以接種針挑出小白與小毛，分別以植入液體洋菜培養基中，後置入恆溫箱觀察。

但本組將菌植入後，一直未見明顯菌落，於培養後第二天測吸光度，得到
小白：0.064 小毛：0.133

4. Thioglycollate 培養液的培養

無菌下，將上述已純化的洋菜培養基以接種針挑出小白與小毛，分別以植入 Thioglycollate 培養液中，後置入恆溫箱觀察。

A 生長情形

第一天菌落佔培養液體積之 20%，第二天為 80%，此後生長漸緩，第七天長滿，第十六天完全沉落至試管底部。

B 型態，見〈照片一〉

	位置	形狀	生長範圍	吸光度
小白	下半部密度較大，上半部少許	柱狀，形似鐘乳石	佈滿培養液	0.771
小毛	下半部有生長，上半部無	接連的顆粒狀，形似葡萄	佈滿培養液	0.608

- Thioglycollate 培養液上半部呈淡粉色，下半部為黃色。若細菌生長在上半部，可知其為嗜氧菌；長在下半部為厭氧菌。由實驗結果可知小白為微嗜氧菌；小毛為厭氧菌。
- 由生長範圍可看出小白與小毛皆具移動性。
- 在第二天的吸光度，不論小白與小毛，其在 Thioglycollate 培養液的生長皆比在液體洋菜培養基中來得好。

吸光度	Broth	Thioglycollate
小白	0.064	0.771
小毛	0.133	0.608

本組也由此決定，以下將繼續進行的實驗由 Thioglycollate 培養液操作。

5. 保存

- 在細菌生長顛峰期，將 Thioglycollate 培養液置入冰箱中，則至少可保存六個月。
- 將甘油加入培養液〈培養液：甘油=3：1〉，可長期保存。

〈實驗二〉酸鹼值對乳酸菌的影響

首先先配置 pH1、3、5、7、9 的 Thioglycollate 培養液，其酸鹼值以 NaCl 與 HCl 控制，並以石蕊試紙檢測。由上述實驗的小白、小毛之 Thioglycollate 培養液中抽取 0.1ml，注入已配置好酸鹼值的培養液中，後置入恆溫箱觀察，於第二天測吸光度。

在此步驟不以接種針接種，目的在於控制細菌濃度，確保每管注入之細菌數相同。原細菌濃度之吸光度 小白：0.987 小毛：0.612

〈以上皆由放置冰箱保存 25 天以上之細菌培養液取出〉

〈實驗三〉螺旋藻對乳酸菌的影響

由於實驗二得到的結果發現乳酸菌在酸性環境生長不好，促成我們想改進情形，因而設計實驗三，實驗三包含原本實驗二的組，並添加了含螺旋藻的組別。

配置 pH1、3、5、7、9 的 Thioglycollate 培養液，不同的 pH 值再配成三種不同的螺旋藻濃度，分別為：0.0001、0.001、0.01 〈g/ml〉，經離心後，取其清液，且注入與〈實驗二〉同來源的種子細菌，每管注入 0.1ml，置於恆溫箱觀察，於第

二天測吸光度，可製得〈圖三〉、〈圖四〉（附於報告後）。

觀察：

1. 小毛適合生長在 pH3~7 的酸性環境中，小白適合生長在 pH 為 5 的環境中。
2. 兩菌在 pH 為 3、5、7 的培養液中〈未加藻〉時，其型態均與〈實驗一〉相同，但在 pH 為 1、9 的培養液中兩者皆沉澱至試管底部。
3. 濃度 0.01 〈g/ml〉對幫助小毛及小白的生長有明顯助益，唯在 pH1 的效果不顯著，濃度 0.001 〈g/ml〉及 0.0001 〈g/ml〉在 pH1、5 的效果較不明顯，但在其他 pH 值仍有明顯效果。
4. 小白與小毛皆在螺旋藻濃度為 0.01 〈g/ml〉時生長最好，0.001 〈g/ml〉次之，0.0001 〈g/ml〉最差。
5. 當濃度為 0.01 〈g/ml〉時，菌種皆在 pH5 環境生長較好，在濃度 0.001 〈g/ml〉與 0.0001 〈g/ml〉時，菌則是在 pH7 生長較理想。
6. 濃度 0.01 〈g/ml〉；pH1 的吸光度數值雖皆為 0，但與其餘兩種濃度的數值相差皆小於 0.2，故皆可視為少量。
7. 濃度 0.01 〈g/ml〉；pH9 的第二天的吸光度數值，由於人為操作不佳，數據失真，故不予採用，而於第四天測吸光度以供推演。
8. 在加入螺旋藻的細菌型態上，小白未有大改變，但小毛的顆粒體變小，且生長範圍向上移動。

革蘭氏染色—照片二~五

步驟請參見〈附錄二〉

1. 小毛與小白皆為桿菌，其中小毛形態較細長，小白較粗短。
2. 兩者皆為紫色之陽性菌。

(二) 討論

1. 目的

由於市面乳酸飲料之菌種較複雜，故以上實驗先從乳酸菌粉著手，藉由單純的菌種了解乳酸菌的生長週期與型態，並研究螺旋藻的作用。

2. 乳酸菌

乳酸菌(*lactic acid bacteria*)的特徵是革蘭氏陽性菌，是不會產生孢子、桿狀形的細菌，有時呈不定型，單一或呈鏈狀，有時亦呈柵狀(在 Thioglycollate 培養液中可產生鏈狀桿菌，以區分乳酸桿菌及鏈球菌)，會產生乳酸作為發酵代謝的主要或唯一產物。所有的乳酸菌都是厭氧菌，但大部分不會對氧產生敏感，在有氧及無氧情況均能生長，是屬於耐氧性的厭氧菌。乳酸菌可藉由黃素蛋白氧化酶系統，吸收氧氣而產生過氧化氫，

這可使腸道內有害菌的生長環境受到破壞。乳酸菌常生長在有醣的環境，其複雜的營養需要包括胺基酸、(口票)呤、嘧啶。

乳酸菌主要可分為鏈球菌屬(*Streptococcus*)、明串珠球菌屬(*Leuconostoc*)、片球菌屬(*Pediococcus*)、乳桿菌屬(*Lactobacillus*)，本次研究主要的菌多屬於乳桿菌屬，又可分為下列亞屬：德氏乳桿菌(*L.delbrueckii*)、嗜酸乳桿菌(*L.acidophilus*)、乾酪乳桿菌(*L.casei*)、植物乳桿菌(*L.plantarum*)、彎曲乳桿菌(*L.curvatus*)、發酵乳桿菌(*L.fermentum*)、短乳桿菌(*L.brevis*)、布氏乳桿菌(*L.buchneri*)、*L.bifidus*、*L.kefir*，其中包含了下個實驗：市售飲料中的菌種。

3. 螺旋藻

螺旋藻在日本是一種有機健康食品，高蛋白但卻低熱量，且含有許多可令人恢復年輕的養分—核酸，此外尚含有 γ —次亞麻油酸；可抗氣喘、過敏，調解血壓，預防腫瘤，預防老化。螺旋藻除了對人體有益外，其優質的蛋白預料也可以提升乳酸菌的抗酸性。

〈表一〉脂肪酸比較〈%〉

	必須脂肪酸	亞麻油酸	γ —次亞麻油酸
螺旋藻	44.6	24.7	22.9
母乳	16.7	15.1	1.6
牛乳	1.3	1.3	微量

〈表二〉營養分析表〈相當於 100 克〉

蛋白質	65g	煙酸	15mg
脂肪	2g	肌醇	71mg
糖質	23g	葉綠素	1.7mg
纖維	0.2g	磷	300mg
灰質	4g	鈉	12mg
水	6g	鈣	26mg
維他命 B 1	4.8mg	鎂	240mg
維他命 B 2	4.3mg	維他命 B 6	0.5mg
鉀	150mg	維他命 B 1 2	0.1mg
鋅	5mg	維他命 E	6mg
錳	4mg	類胡蘿蔔素	450mg

4. 實驗探討

由此系列實驗可發現螺旋藻濃度越高，菌的生長情形越好。實驗數據顯示：小毛在 pH 值 1、3、5、7 時之生長力分別為 0、0.008、0.682、0.847，小白為 0、0.015、0.973、0.636。加入 0.01 〈g/ml〉螺旋藻熱分解物後，小毛在以上各種 pH 值生長力分別為 0.042、1.291、1.447、1.213，小白為 0.053、1.392、1.531、0.988。而濃度較低的組，在 pH5 的效果不如預期，菌除了在濃度 0.01 〈g/ml〉生長較佳，0.001 〈g/ml〉與

0.0001 (g/ml) 反而不及未加螺旋藻的數值，且數據差值大於 0.2，形成負效果，因此以整體而言，濃度 0.01 (g/ml) 是效果最好最穩定的。由實驗結果也可發現，目前螺旋藻的濃度尚無法提升乳酸菌的抗酸性，人體胃酸最酸時其 pH 值約為 2，在未加入螺旋藻前，乳酸菌幾乎只能存活於最酸環境 pH5，但在加入螺旋藻後，已可存活於 pH3 的環境下，可考慮再提升螺旋藻濃度為 0.05 或 0.1，推測應可提升乳酸菌對 pH1 的抗酸性，使可以通過強烈胃酸而到達腸道。乳酸菌原適合生長於弱酸，而人體腸道的胰液 pH 值約為 8，在〈實驗三〉中，可發現乳酸菌在添加螺旋藻後，其在 pH9 的吸光度也大大增加，我們相信這可使乳酸菌更能存活於腸道，與有害菌拮抗，活化人體生理機能。綜合以上，推測螺旋藻所含的養分，有幫助乳酸菌生長及抗酸的趨勢，但其作用機制在此實驗中尚不明瞭，仍需更進一步的研究。而若要利用螺旋藻培養乳酸菌，相信可提升活性與抗酸性，唯需考量濃度。

(三) 結果－市售飲料

〈實驗四〉市售乳酸飲料之抗酸性研究〈不含食品添加物〉

取市售四種廠牌的優酪乳，各廠牌每 1ml 皆含有一億隻以上活菌，以石蕊試紙檢測，四廠牌的 pH 值皆約為 5。

甲廠牌：含 *Acidophilus*、*B.lactis* 兩種菌。

乙廠牌：含 *Acidophilus*、*Bifiduds*、*Casei* 三種菌。

丙廠牌：強調含有特殊菌種，可安全通過人體胃酸。

丁廠牌：含 *Acidophilus*、*Bifidobacterium*、*Bulgaricus*、*Streptococcus thermophilus* 四種菌。

本擬將菌由優酪乳中直接由接種針畫至洋菜培養基上，但生長情形十分不理想，菌落生長緩慢且小，由於在實驗三已知螺旋藻的效果，故調配螺旋藻濃度 0.1g/ml 之 Thioglycollate 培養液，無菌下自市售飲料吸取 0.1ml 種入，兩天後發現菌生長力旺盛，幾乎長滿培養液，遂將其轉劃至洋菜培養基，生長也較由優酪乳直接劃皿為快，推測是由於經含藻培養液培養後之乳酸菌濃度較高，或接種 Thioglycollate 培養液後，食品添加物濃度降低所致。四天後再利用接種針將隸屬同一廠牌的菌落重新劃至同一固體培養基，反覆幾次，目的在使菌不受食品添加物之影響，之後在菌落生長之第四天以接種針依廠牌種入 Thioglycollate 培養液，觀察生長情形，後又再轉種入 Thioglycollate 培養液，兩天後以滅菌乾淨之 Thioglycollate 培養液稀釋，控制每種廠牌之濃度相同，分別種入不同酸鹼值與螺旋藻濃度的組，兩天後測吸光度。

1. 洋菜培養基的種植

型態：

	外型	剖面	菌落邊緣
甲	水灘狀	凹凸不平	鋸齒
乙	細小顆粒	半圓	光滑
丙	細小點狀	半圓	光滑
丁	橢圓	半圓	曲率小的兩端毛狀
	不規則圓形〈有凹角〉	乳頭狀	毛狀
	圓形	乳頭狀	毛狀

* 丁廠牌觀察到三種菌落

2. Thioglycollate 培養液的培養，見〈照片六〉

型態：

	位置	形狀	生長範圍
甲	嗜氧與厭氧區的交界附近	顆粒	上半部少許且遍佈，下半部多集中於中央
乙	嗜氧與厭氧區的交界附近	下半部鐘乳石狀，但尾端分叉	上半部混濁微粒，下半部多集中於試管中央
丙	嗜氧與厭氧區的交界附近	顆粒，上半部較下半部大，且下半部的顆粒相連，形似葡萄	上半部遍佈，下半部多集中於中央
丁	嗜氧與厭氧區的交界附近	顆粒	上半部少許遍佈〈但比甲牌為多〉，下半部多集中於中央

- A 菌在厭氧區的生長範圍皆較嗜氧區大得多。
- B 可知各廠牌生長於下半部之菌皆較不具移動性，故多集中於接種針畫過之附近。

3. 市售飲料之抗酸性研究〈不含食品添加物〉

目的在了解市售優酪乳中乳酸菌的抗酸性，又經實驗三我們初步了解螺旋藻的效用，故本實驗亦設計螺旋藻的組別，希望可以加以驗證。

現控制注入的種子細菌吸光度皆為 0.096 ± 0.008 ，實驗兩次，於第二天測吸光度取平均值，得到〈圖五〉～〈圖八〉（附於報告後）。

觀察：

- A 螺旋藻濃度 0.01g/ml 對甲廠牌有產生效果，但只在 pH5、7、9 效果較顯著，其餘酸鹼值雖有效果，但吸光度差距皆小於 0.2。高濃度組在 pH9 吸光度特高，探究原因我們比較了平均前的數據，發現有一次測得的數據為 1.492，其餘皆約 0.2，故應為實驗誤差所致。
- B 由資料，乙廠牌的菌在 pH3、5 以濃度 0.001g/ml 的生長情形最好，吸光度差距大於 0.2。但在其餘 pH 值，菌在濃度 0.01g/ml 的生長較佳，吸光度差距也大於 0.2。
- C 在丙廠牌中，可明顯看出濃度愈高，菌的生長情形愈好，吸光度差距皆大於 0.2，濃度 0.01g/ml 在 pH7、9 的效果尤其優異，在 pH11

對乳酸菌的抗酸更有顯著的影響。

D 濃度 0.01g/ml 對丁廠牌效果較佳，但吸光度差距多半維持在 0.2 上下，其中以 pH1、9 的效果最佳，對乳酸菌的抗酸很有效果。

〈實驗五〉市售乳酸飲料直接取樣研究〈含食品添加物〉

由於考慮食品添加物，如防腐劑等可能會影響乳酸菌抗酸性，飲料直接吸取 0.2ml 注入培養液中，也設計含藻及不含藻的組，加以比較，製得〈圖九〉～〈圖十一〉（附於報告後）。

觀察與比較：

1. 〈實驗四〉與〈實驗五〉的數據不可直接比較，〈實驗四〉注入的是種子細菌，濃度不高，〈實驗五〉乃直接抽取優酪乳，細菌濃度本已較高，又優酪乳本身具有濁度，故〈實驗五〉所得的數值會普遍高於〈實驗四〉，所以應比較數字曲線，不可比較數字。
2. 對甲廠牌而言，濃度愈高效果愈好，且與〈圖五〉相比，螺旋藻仍是在最高濃度發揮了最好的效果，且兩者同在 pH9 效果十分顯著。而〈圖五〉圖形多為圓滑曲線，但在此表中為倒 W 型，推測食品添加物對菌在 pH5 的生長產生影響。
3. 螺旋藻的效果在乙廠牌極不顯著，認為食品添加物在此廠牌中會強烈影響螺旋藻的效果。與〈圖六〉比較，圖形相似，並發現此廠牌的細菌幾乎無法生長於強酸與弱鹼中。
4. 丙廠牌在食品添加物的影響下，螺旋藻的效果顯得難以發揮，只在 pH9 有良效，而在〈實驗四〉中，pH9 在最高濃度也有很好的效果，故推測螺旋藻對此廠牌只在酸鹼與濃度特定時有較好的效果。與〈圖七〉相比，圖形皆圓滑。

(四) 討論

1. 優酪乳

根據國家標準第三零五八號「發酵乳」的規定，每毫升含活性乳酸菌一千萬隻以上者稱濃稠發酵乳，含一百萬隻以上者稱稀釋發酵乳，本次實驗的取樣皆屬濃稠發酵乳。活性乳酸菌在體內發揮的功效較大，人體的腸道內本就存在著乳酸菌，但是隨著年齡的增長，以及壓力、生活習慣、飲食的改變，都會使腸道內的乳酸菌減少，而使壞菌滋生，容易造成便秘或腹瀉，甚至引起大腸癌，故需隨時補充乳酸菌。

2. 營養與功效

在〈實驗四〉中，四種廠牌的營養標示如下

	甲廠牌	乙廠牌	丙廠牌	丁廠牌
--	-----	-----	-----	-----

熱量(Kcal)	64	36	69	77
脂肪(g)	0.4	0	1	2.1
碳水化合物(g)	11.5	6.7	12	11.5
蛋白質(g)	3.5	2.3	3	3
鈉(mg)	42.9	25	36	50
鈣(mg)	未標	64	未標	未標

由〈實驗四〉及〈實驗五〉來看，不論有無食品添加物的影響，甲、丁廠牌在未加螺旋藻的情形下，生長效果奇差，螺旋藻可提升其抗酸性。乙廠牌未加藻時生長情形良好，唯在強酸及 pH9 幾乎無法生長。丙廠牌強調其菌種可抗強酸，經由實驗結果，其吸光度在 pH3~9 的確有較高，然而在關鍵的 pH1，卻與他種廠牌相差無幾〈吸光度差距 <0.2 〉。總括而言，在未加螺旋藻的情形下，此四種廠牌在 pH1 的吸光度皆遠低於其他酸鹼值組的數值，因此其乳酸菌是否真能通過人體胃酸，達到廠商廣告的健康效果，值得我們再多加探討。

3. 實驗探討

在〈實驗四〉中，四廠牌在 pH1 及 pH9 的生長情形皆不佳。螺旋藻的添加對每種廠牌皆有很大的助益。在甲、丙廠牌中，螺旋藻濃度愈高，菌也生長得愈好，不過甲廠牌的效果較小。以提升抗酸性而言，甲廠牌效果不彰，但在 pH9 有極佳的效果，針對 pH1 的部分，推測提高螺旋藻濃度應可改善。而乙廠牌反而在 pH9 無效果可言，不過在其他酸鹼值方面，不同濃度卻分別在不同的酸度中發揮了良好效果，大幅提升乙廠牌的抗酸性。對丙廠牌而言，螺旋藻效果可說是極佳的，連 0.0001g/ml 的低濃度也有十分明顯的效果。至於丁廠牌，只有 0.01g/ml 有明顯效果，且特別的是，螺旋藻特別能提升丁廠牌細菌在 pH1 及 9 的生長。

由於不同的菌彼此間會產生交互作用，受環境的影響而表現出的特徵也與單一菌不同，如甲、乙、丁三廠牌皆含 A 菌，但吸光度所呈現的曲線各不相同，且又與實驗三中的單一菌不同。螺旋藻與酸鹼值搭配的環境不同，也將對不同的菌造成不同的影響，故我們推測在不同的酸鹼值，因為各種菌的適應性不同，可能在不同的濃度下有最大的吸光度。而在〈實驗三〉中我們也發現，對甲廠牌而言，雖有效果，但以弱鹼的效果較好。乙廠牌在不同的 pH 值需搭配不同的濃度才能有優良的效果，且螺旋藻無法有效提升該廠牌細菌抵抗弱鹼的能力。丙廠牌只含一種菌，由吸光度曲線可看出藻的濃度愈高；吸光度數值也愈大，推測是由於單一菌種，故實驗數值能較趨理論值。而在丁廠牌中，只 0.01g/ml 有效果，特別是在強酸及弱鹼。根據此結果，我們認為螺旋藻對單一菌的效果較佳，若含兩種以上的菌，則需仔細搭配螺旋藻濃度與酸鹼值，才能使螺旋藻的效果發揮到最大，而有效增進人體健康。

由於我們日常喝入的乳酸飲料都是含有食品添加物的，故設計了〈實驗五〉來探討添加物的影響，結果發現在有螺旋藻與沒有螺旋藻的組，菌的吸光度曲線幾乎貼近。以甲廠牌而言，0.01g/ml 仍是發揮了良好效果，食品添加物的影響並不明顯。但在乙廠牌，螺旋藻卻幾乎喪失了提升細菌抗酸的能力，乙廠牌的吸光度差距幾乎都小於 0.2。就丙廠牌而言，螺旋藻也是效果不彰，只在 pH9 效果優異。我們推測兩種可能：第一，食品添加物本身牽制了乳酸菌的活性，因為在〈實驗四〉未加藻的組中，菌在 pH5 幾乎都是生長最好的，即吸光度曲線開口向下，但在〈實驗五〉，pH5 的吸光度數值皆有受影響，圖形為倒 W；而添加藻的組，菌可能也因食品添加物而無法有效生長。第二，食品添加物直接影響了螺旋藻的功能，或影響乳酸菌利用螺旋藻的養分，使得螺旋藻無法發揮作用，只在某些酸鹼環境下能有功效。綜合以上，食品中若要添加螺旋藻，除了要仔細搭配濃度及酸鹼值外，食品添加物也是重要的考量因素。

本研究不僅令我們了解乳酸菌適合生長的環境，更令我們發現螺旋藻分解物對乳酸菌抗酸性的幫助。在本次研究裡，發現優酪乳的效果並不如預期，其中所含的菌在培養基的酸性環境中皆生長不良，我們喝下的優酪乳中到達人體腸胃的乳酸菌可能更只屬少量，且不同廠牌間，乳酸菌的生長力落差也頗大，對消費民眾而言，廠商的宣傳詞不免顯得略有誇大。此外，我們也得到螺旋藻分解物與乳酸菌抗酸性的關係，依菌種及菌數的不同，效果也有所不同，此外也發現了食品添加物的影響。在食品應用方面，若只是單純的要大量培養乳酸菌，可利用螺旋藻濃度與 pH 值的搭配來控制生長環境，使乳酸菌能生長得更多更好。但若要將螺旋藻加入食品中提升乳酸菌抗酸性，則須依菌種及菌數來調整濃度。螺旋藻的效果需視細菌情況改變螺旋藻濃度與 pH 值，並考慮食品添加物，才可將乳酸菌的抗酸性提升到最大值。

- (一) 蔡文城，實用臨床微生物診斷學，第七版，九州圖書文物有限公司〈83年〉
- (二) 下，Elmer W·Koneman，M·D等，微生物診斷學上，陳柏熹譯，合計圖書出版社〈85年〉
- (三) 陳得源、魏秀娟譯，腸胃生理學，合計圖書出版社〈73年〉
- (四) 光岡知足，酸乳酪與健康，陳義譯，正義出版社〈77年〉
- (五) 黃慶雲，螺旋藻，青春出版社〈87年〉
- (六) 張國明等編譯，醫用微生物學 17 版，藝軒圖書出版社〈76年〉
- (七) 王進琦，基礎微生物學，藝軒圖書出版社〈76年〉
- (八) Thomas D. Brock；Michael T.Madigan，微生物生物學，謝哲松譯，國立編譯館〈84年〉
- (九) 王進琦，食品微生物學，藝軒圖書出版社〈80年〉
- (十) Microbiology，James G·Cappuccino 等著，偉明圖書有限公司代理進口〈85年〉

成功大學

方誠傑 先生
吳佳容 小姐
李青蓓 小姐
周婉琪 小姐
侯敏榮 先生
洪順培 先生
張權英 老師
許文鴻 先生
陳文馨 小姐
陳世輝 老師
戴博陞 先生
鄭至暉 先生
鄭瑞清 先生

台南一中

王廷元 先生
林靜吟 老師

台南二中

吳濟宇 先生
曾泰迪 先生

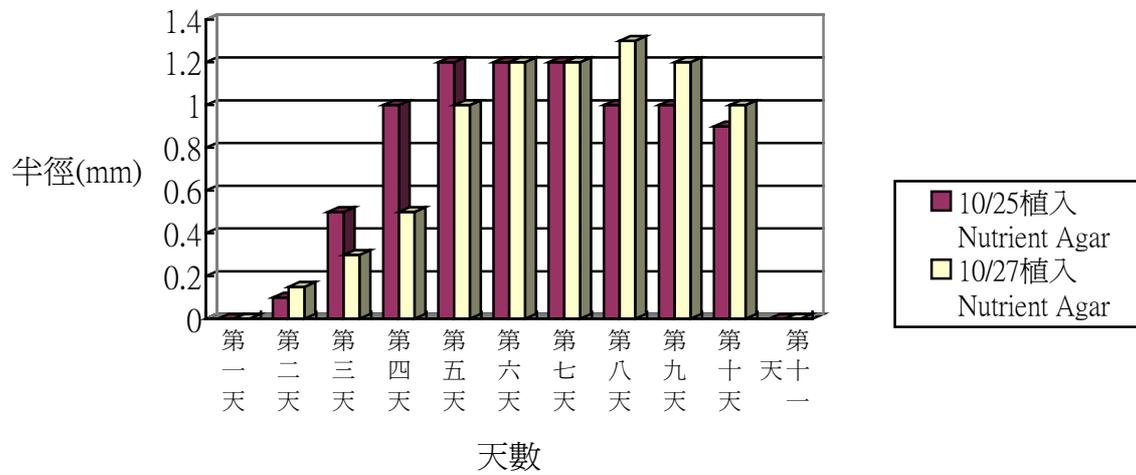
台南女中

李碧芬 老師
侯明全 老師
邱世寬組長及設備組所有老師

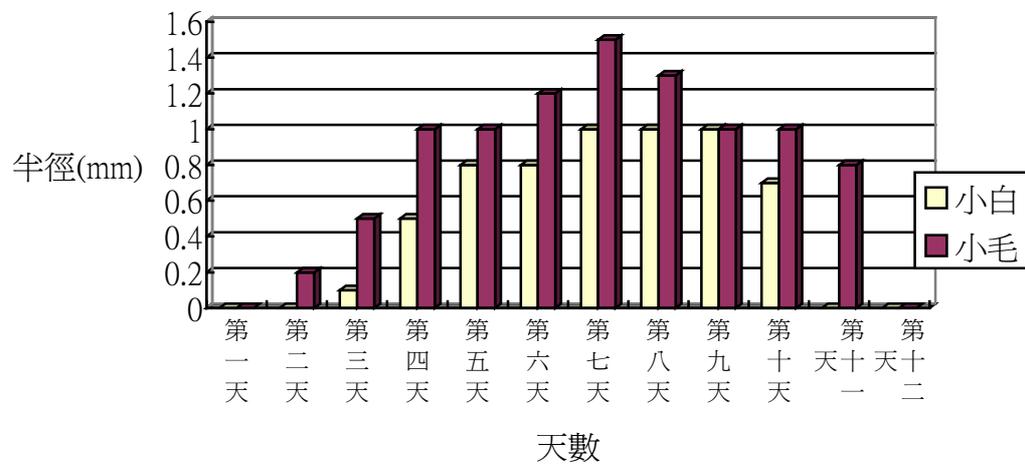
親愛的父母及激勵我們的朋友們

感謝侯明全老師、陳世輝老師及青蓓學姊給予我們的協助，豐富我們的思考；及對我們實驗精神的培養，在此由衷致上十二萬分的感謝，也謝謝學姊學長們給予的幫助及意見，使我們的實驗得以順利進行。感謝我們的父母，容忍我們每天做實驗到深夜，並不辭接送的辛苦。並謝謝每一位為我們加油打氣的朋友們，是你們的鼓勵使我們忘卻實驗的辛苦，謝謝！

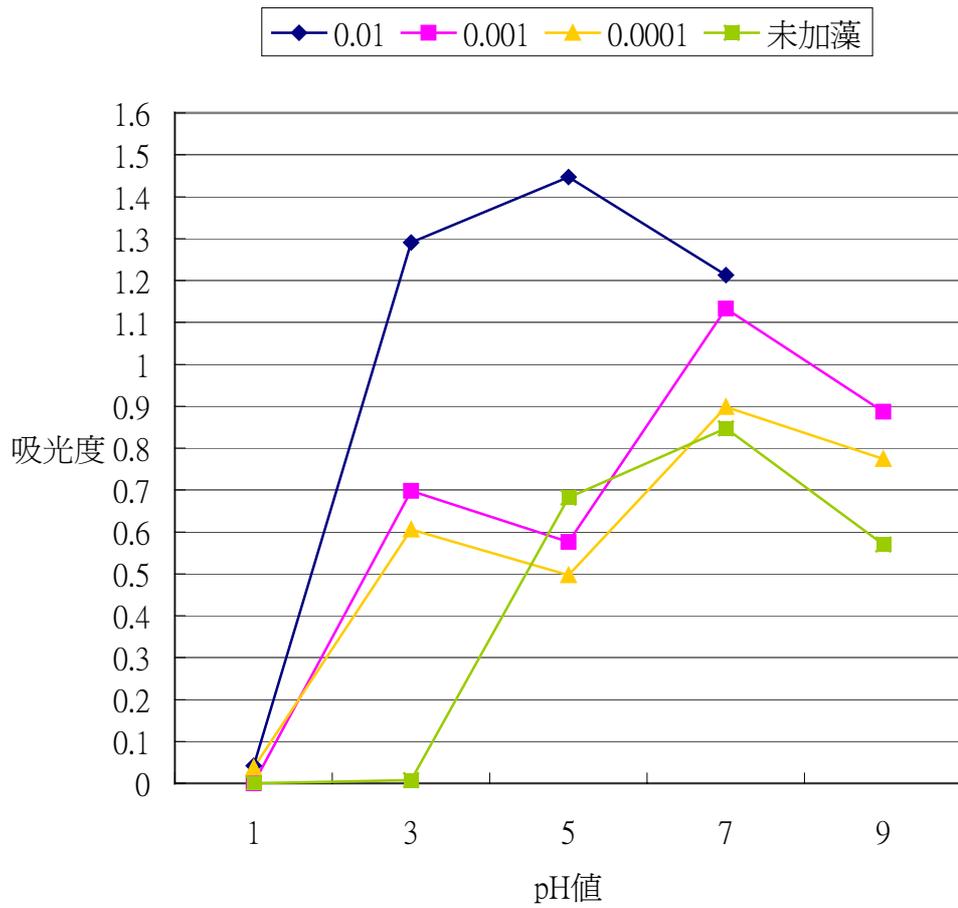
〈圖一〉將儲存溶液植入固體洋菜培養基後，菌落半徑〈mm〉之圖表



〈圖二〉小白與小毛植入固體洋菜培養基後，菌落半徑〈mm〉之圖表



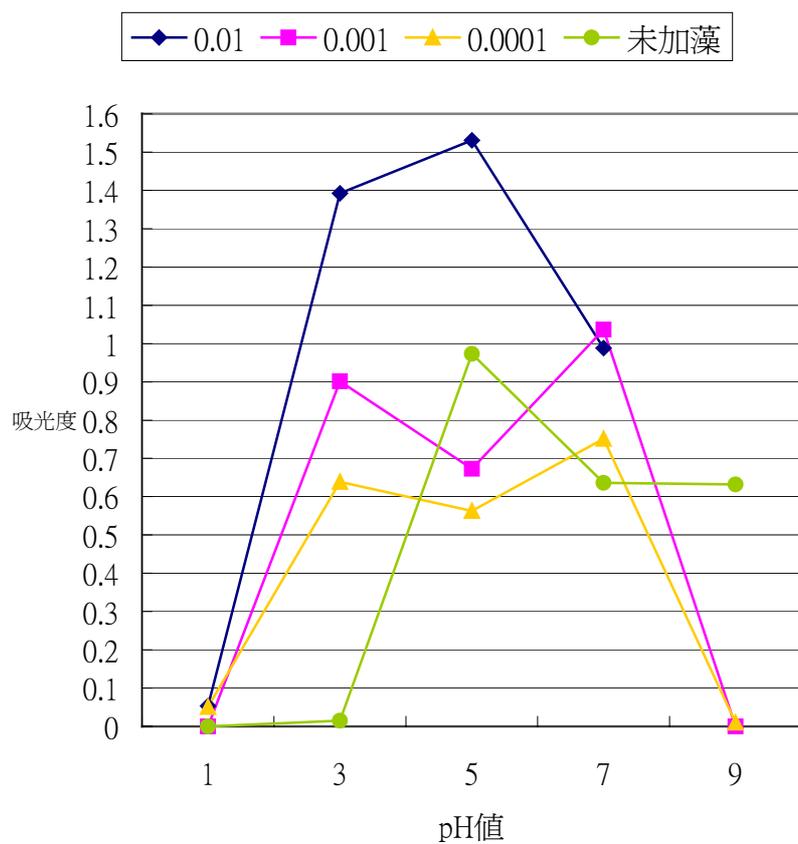
〈圖三〉小毛加入螺旋藻之吸光度變化表



第四天 pH9

濃度	0.01	0.001	0.0001	未加藻
吸光度	1.076	0.816	0.708	0.784

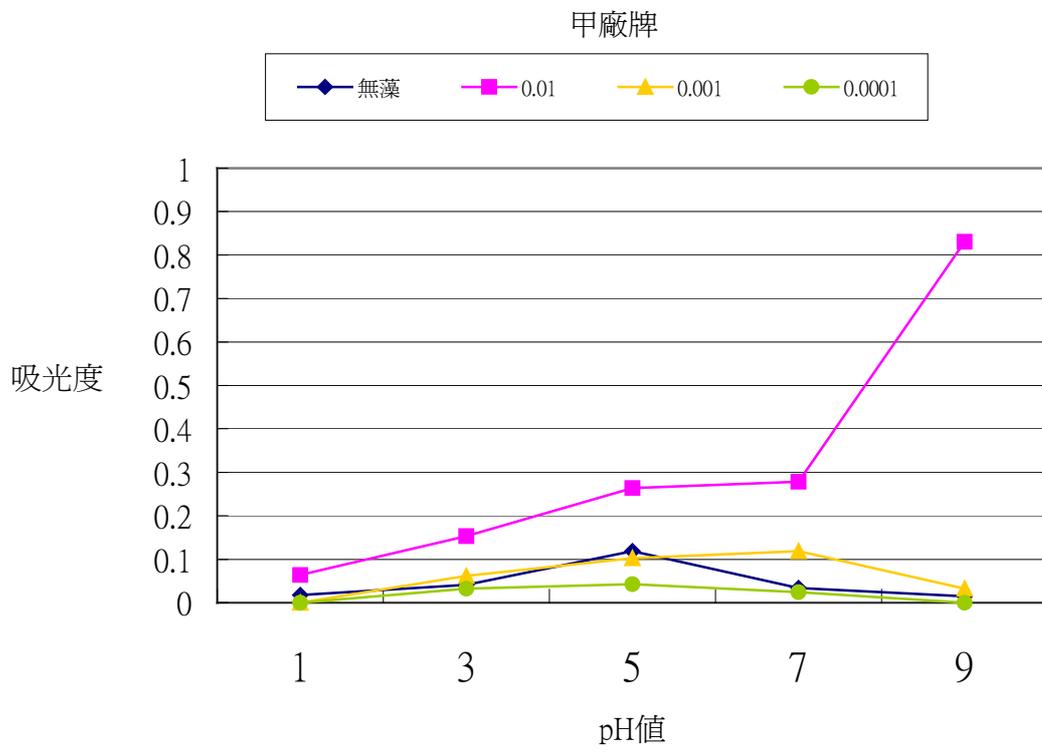
〈圖四〉小白加入螺旋藻之吸光度變化表



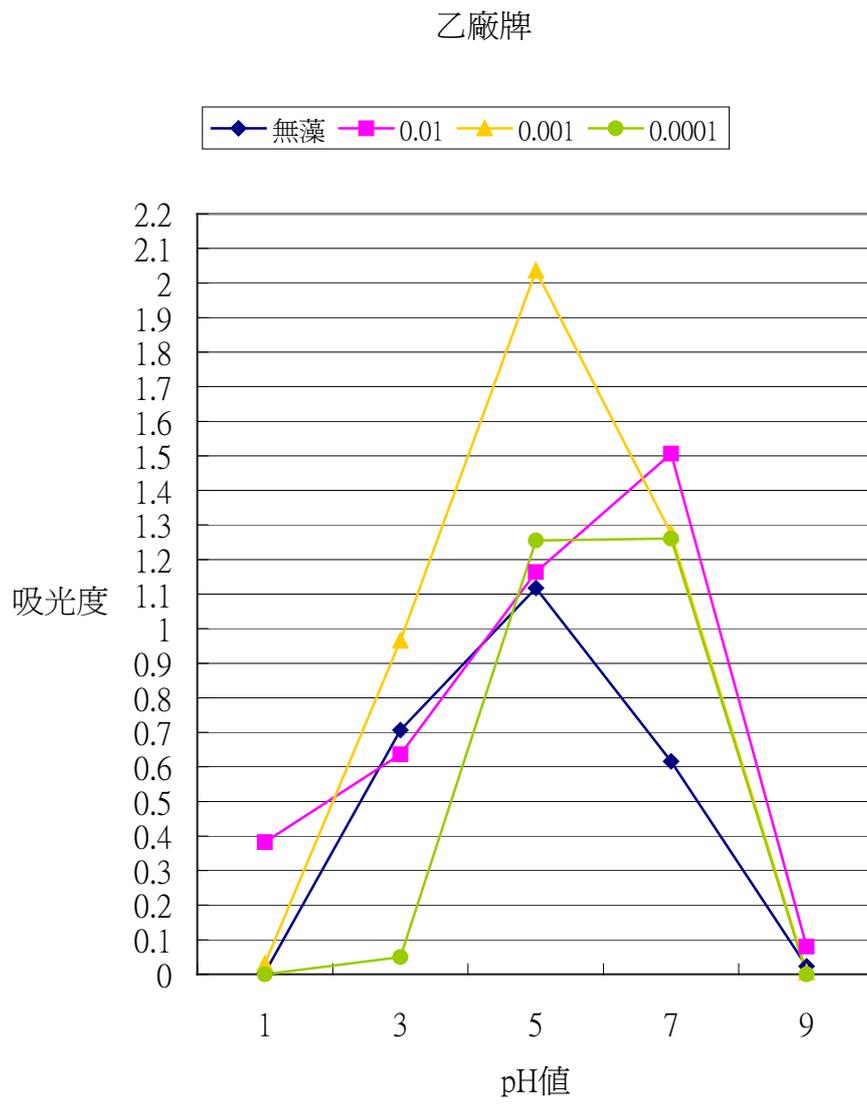
第四天 pH9

濃度	0.01	0.001	0.0001	未加藻
吸光度	1.089	0.573	0.387	0.713

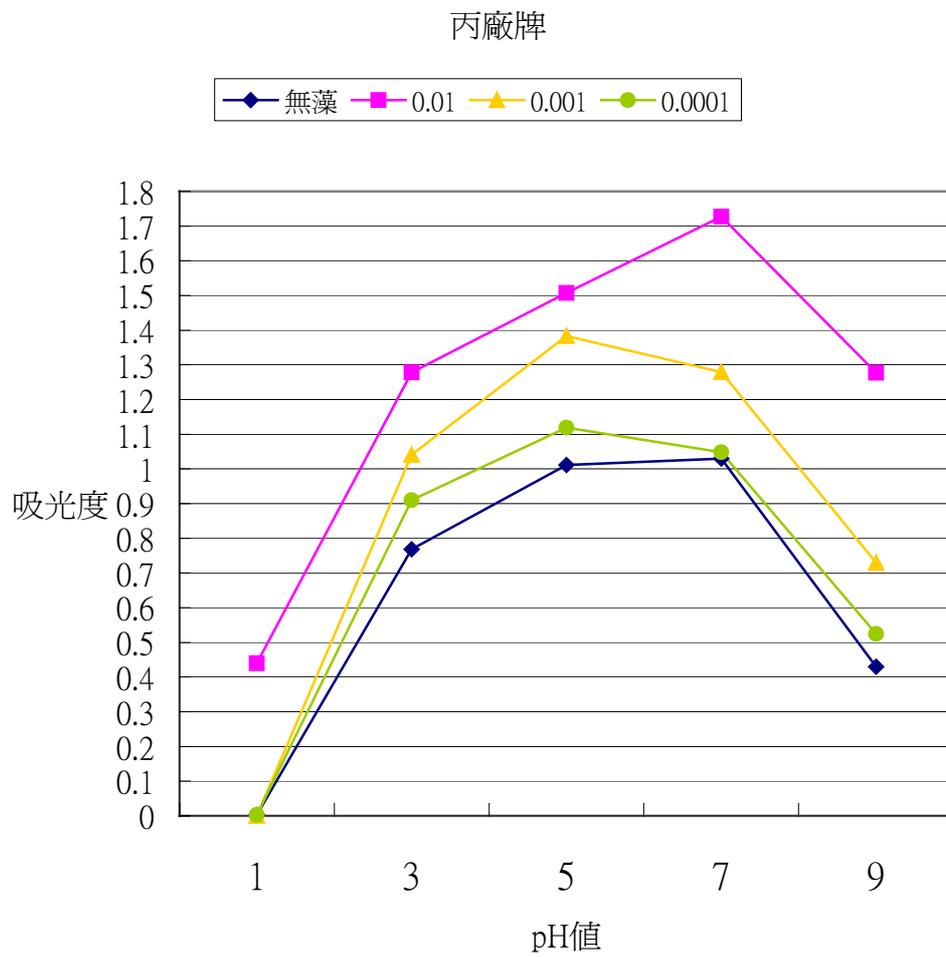
〈圖五〉甲廠牌－不含食品添加物



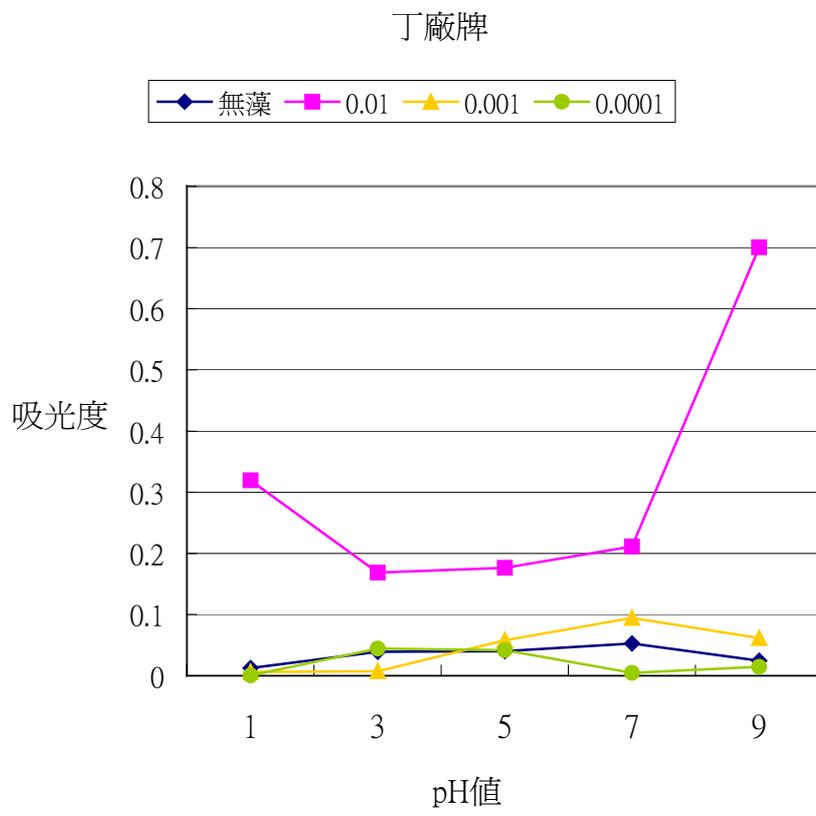
〈圖六〉乙廠牌－不含食品添加物



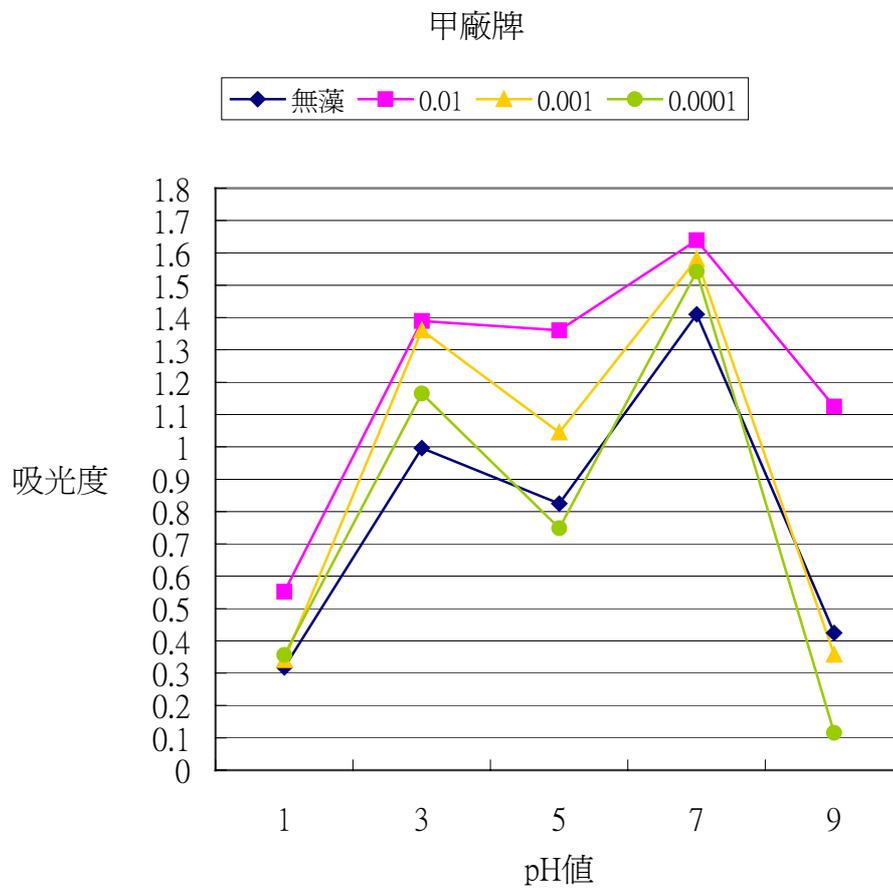
〈圖七〉丙廠牌－不含食品添加物



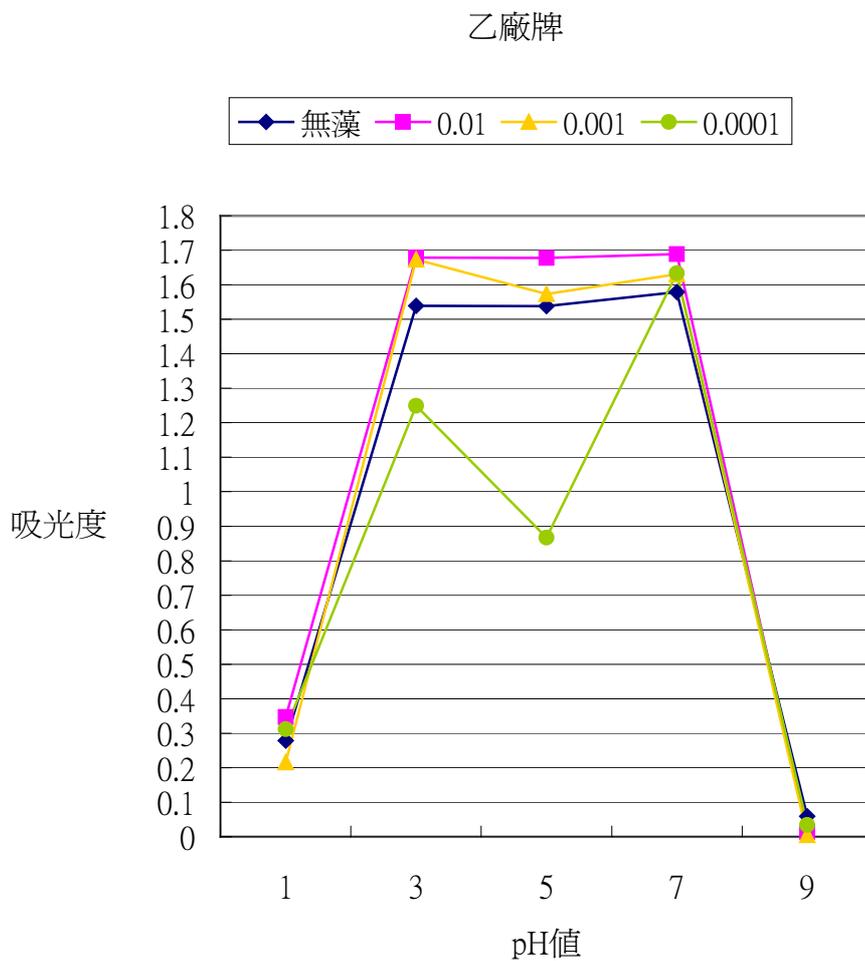
〈圖八〉丁廠牌－不含食品添加物



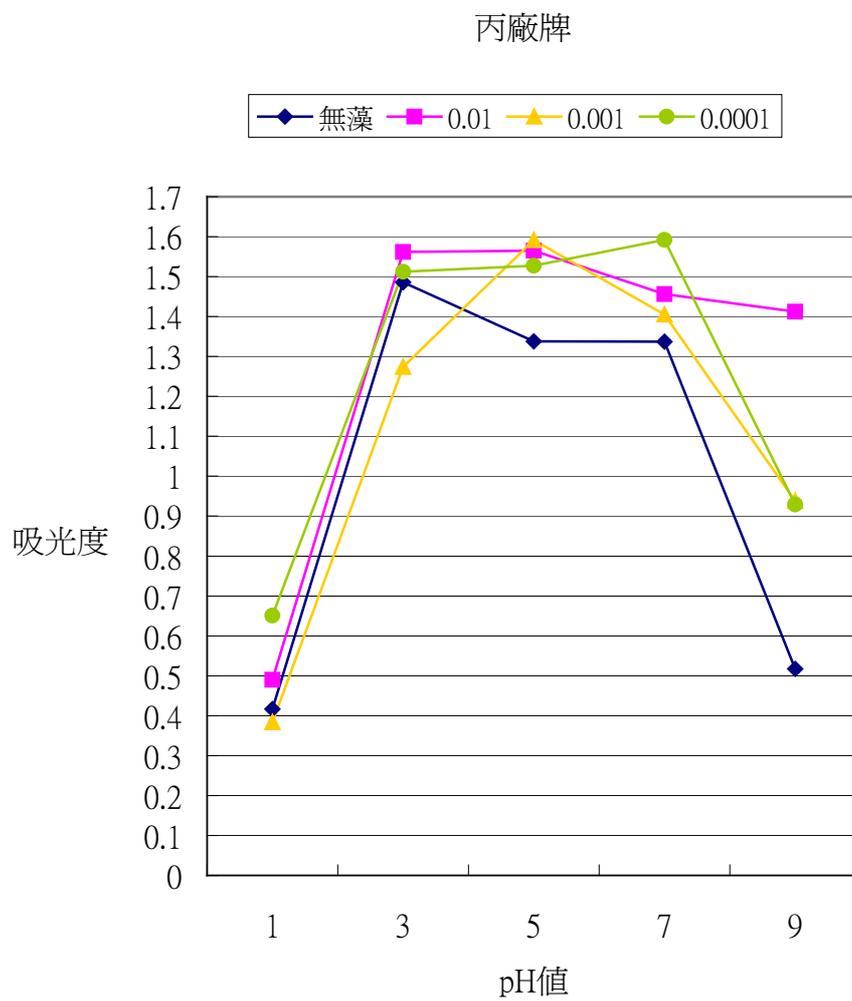
〈圖九〉甲廠牌－含食品添加物



〈圖十〉乙廠牌－含食品添加物



〈圖十一〉丙廠牌－含食品添加物



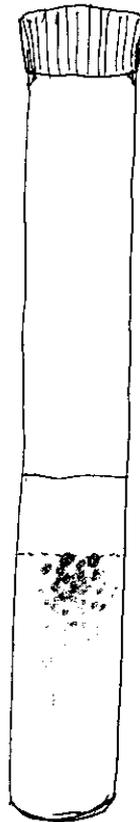
〈照片一〉小白與小毛之生長型態

$\frac{1}{17}$ 種入 $\frac{1}{22}$ 觀察

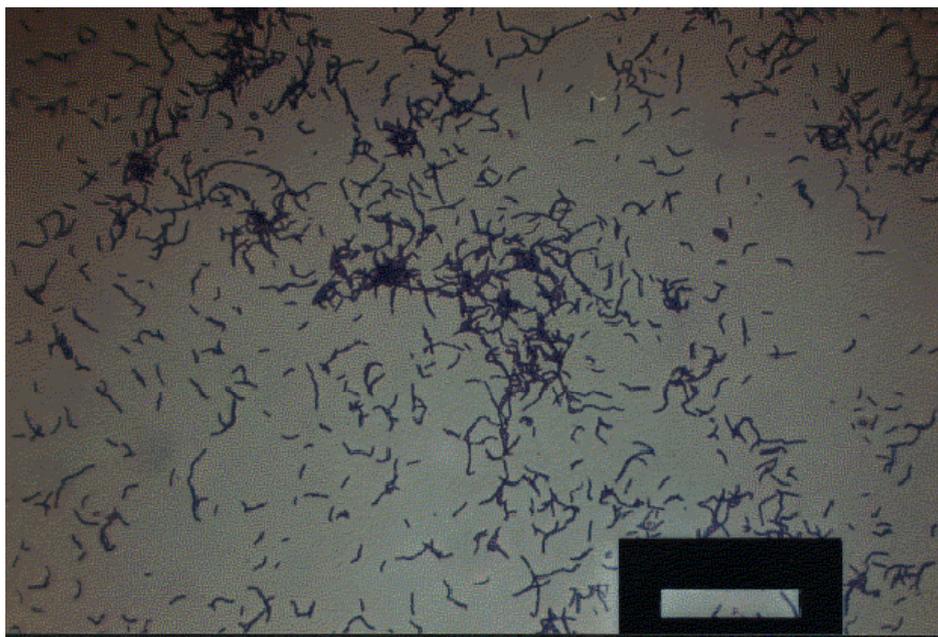
小白



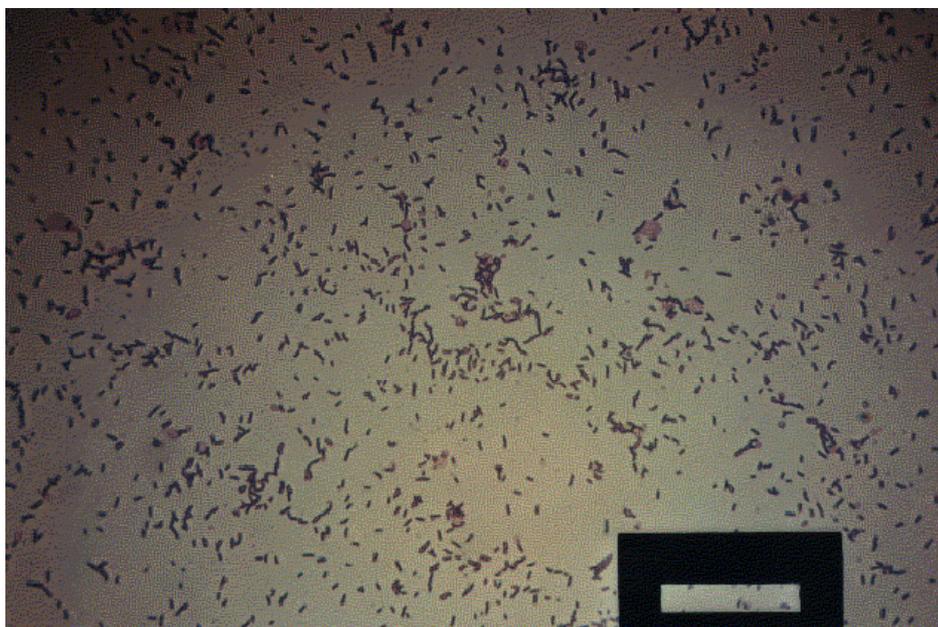
小毛



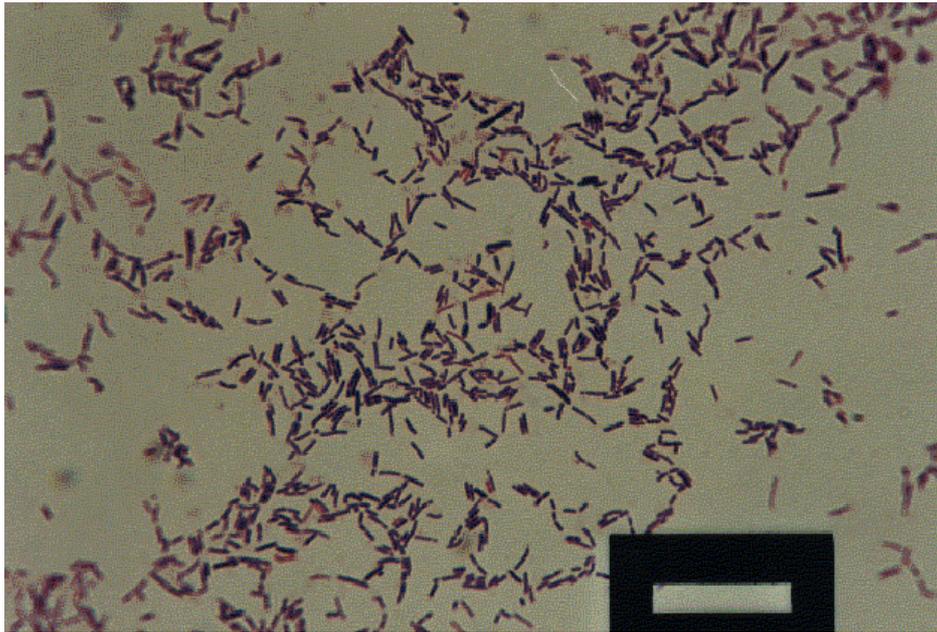
〈照片二〉小毛 400X



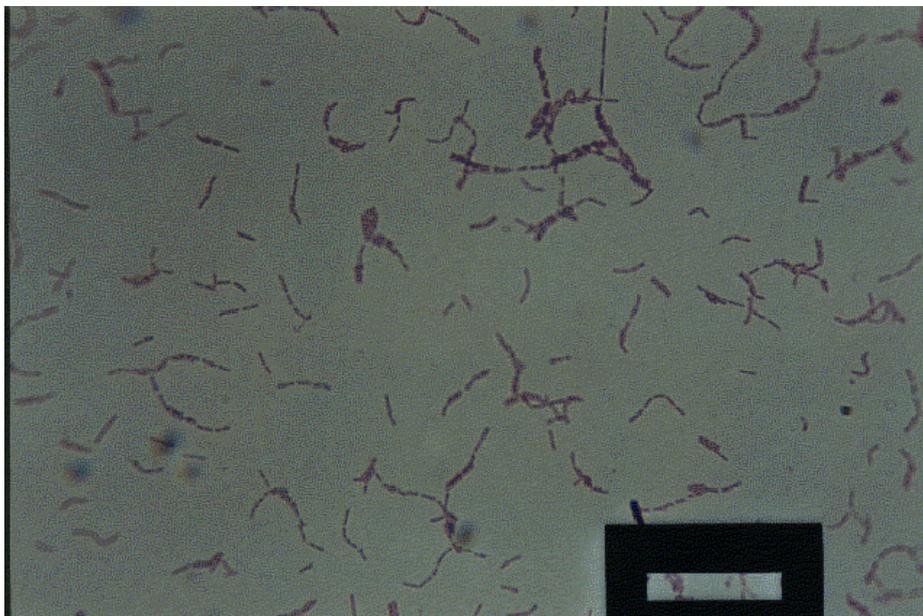
〈照片三〉小白 400X



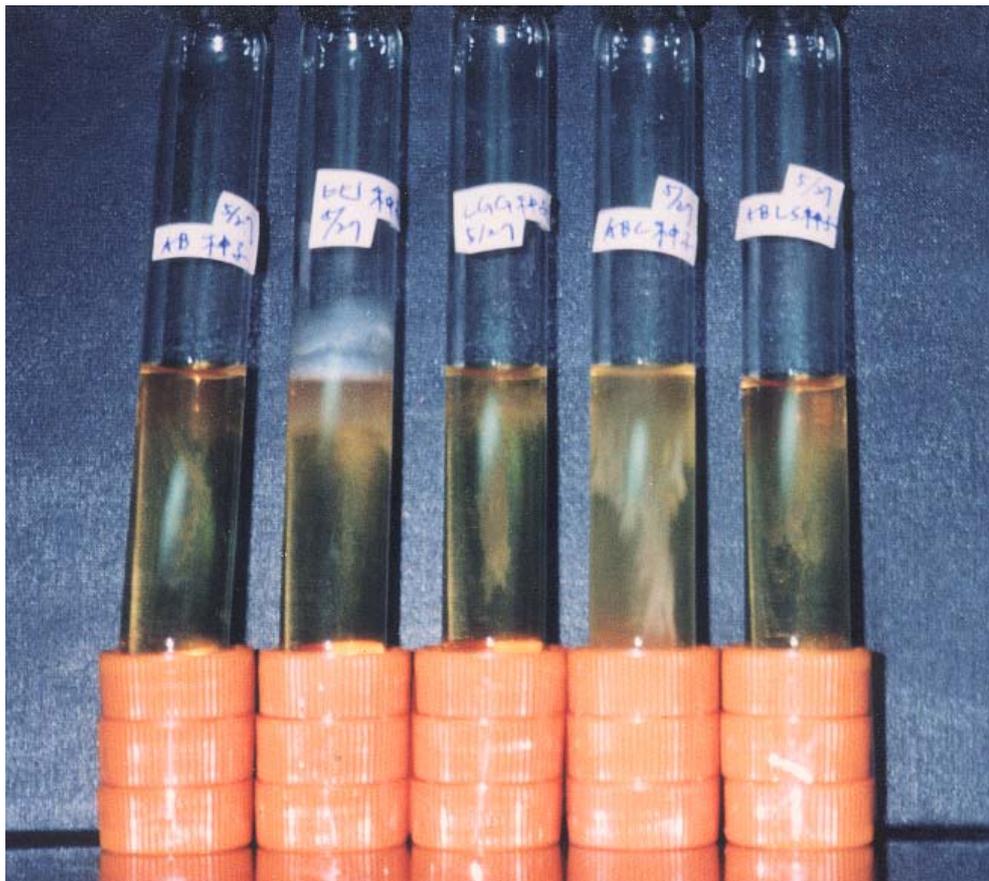
〈照片四〉小毛 1000X



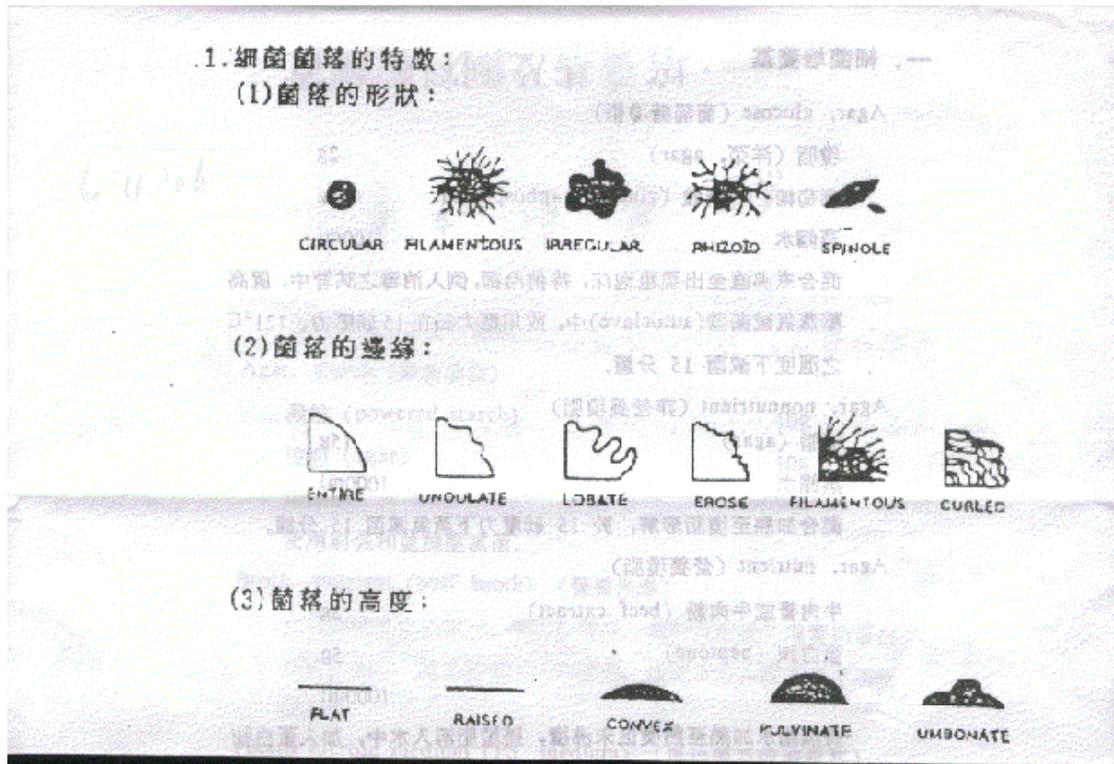
〈照片五〉小白 1000X



〈照片六〉市售優酪乳乳酸菌於 Thioglycollate 培養液中的生長型態



〈附錄一〉細菌的生長型態



〈附錄二〉革蘭氏染色

1、前言

若在脫色處理後，仍能保留最初的結晶紫及碘複合物 CV-I，則為革蘭氏陽性菌〈藍紫色〉，若細菌被脫色，並能接受複染劑，則為革蘭氏陰性菌〈紅色〉

2、步驟

- a、將結晶紫溶液溢滿玻片使之反應一分鐘，再以自來水沖洗玻片
- b、加碘液〈媒染劑〉使作用一分鐘
- c、以自來水沖洗玻片，加 95%酒精脫色，不要超過 10 秒或直至沒有藍色出現
- d、馬上水洗玻片，並加上酚紅複染 30~60 秒
- e、水洗吸乾，並於空氣中乾燥

3、雖然革蘭氏染色為診斷微生物學之重要技術，但有時會因為細菌老化或生長在不良環境〈暴露在抗微生物藥劑中〉會使革蘭氏陽性菌染成陰性，並且許多 *Bacillus* 菌種常呈現陰性反應。另外，一些 *colostridia* 雖具有陽性細胞壁，卻易被染呈陰性菌之顏色，因此應選擇年輕之培養菌染色。

〈附錄三〉實驗器材

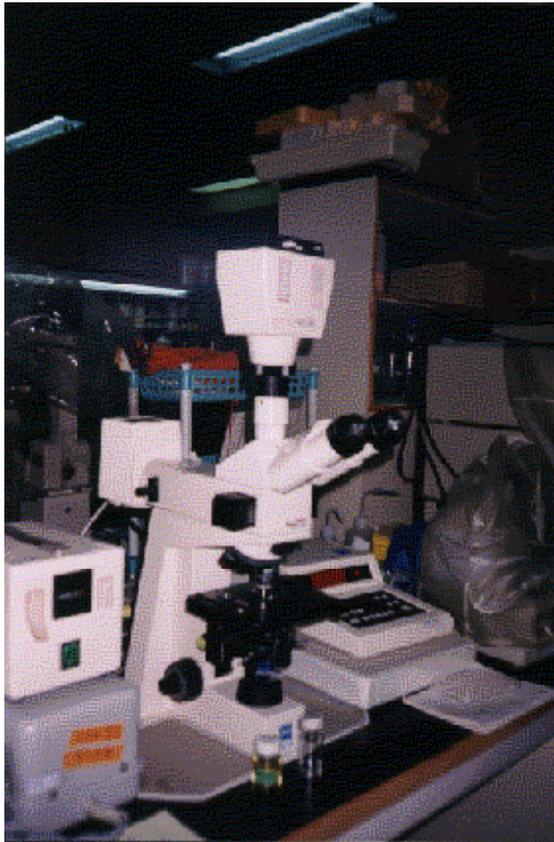
〈照片五〉垂直式層流無菌操作台



〈照片六〉分光光度計



〈照片七〉 螢光顯微鏡



評語

加入螺旋藻探討對乳酸菌生長及抗酸性之變化，能夠觀察到預測的結果，但精確的變因控制如單一菌種、測量次數等均應加強。