

中華民國第42屆中小學科學展覽會

::: 作品說明書 :::

高中-生物科

科 別：生 物 科

組 別：高 中 組

作品名稱：螺旋藻分解物對乳酸菌抗酸性之研究

關 鍵 詞：乳酸菌、螺旋藻、抗酸性

編 號：040702

學校名稱：

國立臺南女子高級中學

作者姓名：

張鈺敏、盧怡恬

指導老師：

陳世輝、侯明全



摘要

現今乳酸飲料風行，但是乳酸菌是否真能通過胃酸到達腸道為人體利用？首先以市售乳酸菌粉做為材料，研究其適合生長的酸鹼值，再於培養基中添加不同濃度的螺旋藻分解物，利用分光光度計測乳酸菌的生長能力。結果顯示乳酸菌的抗酸能力提升，利於人體利用。

此外，還自市面取樣 4 種廠牌，種入不同螺旋藻濃度的 Thioglycollate 培養液中，測其吸光度，發現細菌的菌種與菌種數會影響螺旋藻的效果，除此，食品添加物也是妨礙乳酸菌抗酸的因素之一。

綜合此實驗所得的結果，相信妥善添加螺旋藻可提升乳酸菌的抗酸性，有助於改善人體吸收，更能促進人體健康，不啻是食品科技的一大發現。

一、研究動機

有些市售優酪乳特別標榜其中含有 AB 菌，其中 A 菌即屬於腸道中乳酸桿菌

(*Lactobacillus*) 這類的有益菌；而 B 菌則屬於腸道中雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*，或稱為比菲德氏菌) 這類的有益菌。許多科學研究皆顯示，嗜酸性乳酸桿菌與比菲德氏菌對於足以引發傷寒的沙門氏桿菌，腸炎的大腸菌、葡萄球菌及念珠菌等皆有很好的抑制作用，主要是他們能分泌乳酸，降低腸內的 pH 值，及釋出適量的過氧化氫，以殺滅害菌及使有害菌的生長環境受到破壞。

2000 年四月份的歐洲臨床營養學期刊則刊登一則紐西蘭與加拿大合作的研究報告，研究人員將受試者分成喝一般低脂低糖牛奶與加了優格菌種的優格牛奶，每天喝 180cc，經過六周，連續抽血測量體內一些免疫功能的血清指標，發現了雖然喝牛奶也有免疫力提昇的情況，但是喝加了乳酸菌的牛奶則明顯地更進一步提昇免疫力。

為何現在的研究學者都專門研發新種的優酪乳？因為優酪乳中的蛋白質因乳酸菌的分解、消化性比牛奶好；優酪乳中的乳酸亦能夠抑制腸內壞菌生長進而改善腸道細菌生態，這種作用是牛奶沒有的；優酪乳中的乳糖會被乳酸菌分解，因此對喝牛奶會有脹氣、腹痛、腹瀉等乳糖不耐症狀的消費者相當理想。

優酪乳之所以有如此偉大的功效，其原因在於優酪乳中含有的乳酸菌。腸內健康的乳酸菌為人類帶來許多好處：消化吸收更好免受傳染，增強免疫系統活力等。而螺旋藻能建造乳酸桿菌群。

二、研究目的

現代人由於飲食作息不定，攝取營養不均衡，再加上環境與水源的污染，易造成膽固醇過高，癌症，直腸道不適，肝功能異常，便秘等現象。食用乳酸菌可說是保健養生最簡單的方法，但是乳酸菌必須是活菌才能在人體發揮作用。由於市面上許多乳酸飲料強列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，而胰液 pH 為 8，許多疾病會因體液的 pH 值產生變化而使益菌生長受阻，害菌反倒猖獗不已。但現今市面上有些優酪乳產品宣稱他們的乳酸菌能通過強烈的胃酸到達小腸，以做到改善腸內的環境。我們擬定此實驗檢定乳酸菌對於各種 pH 值之忍受度。

此外，螺旋藻所含的營養素據報導包括必須脂肪酸，維他命 B12，葉綠素、胡蘿蔔素等。由於所含的營養素相當多且完整，實可稱之為「完全食品」。螺旋藻除了能促進排便外，還有調整腸胃道細菌的功能。過去日本的研究結果認為：餵飼螺旋藻的老鼠，體內乳酸桿菌含量比對照組增加了 3 倍。在老鼠飲食中加 5% 的螺旋藻，飼餵 100 天結果為：1 盲腸的重量增加 13%。2 乳酸桿菌增加 327%。

3 盲腸內維生素 B1 增加 43%。此項試驗揭示：食用螺旋藻使人體內的乳酸桿菌增多，並使人體從整個飲食中吸收維生素 B1 和其他維生素的效率提高。因此，我們也擬測定螺旋藻對乳酸菌生長之影響，將螺旋藻分解物添加於乳酸菌培養基中，觀察乳酸菌在各種 pH 值下之生長能力。

三、研究設備器材

培養皿

有蓋培養試管 螺旋試管)

高溫高壓蒸氣滅菌鍋 (Autoclave)

恆溫培養箱 (Yowng Chenn)

垂直式層流無菌操作台 (High Ten Scientific Corporation)

分光光度計 (LKB BIOCHROM)

Micropipette (ultrospecw)

低速離心機 (Iwaki Centrifuge)

離心管 15ml、50ml)

Micro sample tube with plug 三美)

震盪混合器 (Vortex-Genie2)

玻璃吸管

酒精燈

磁攪拌器 (MS-100E Electronic Speed Control Eargo Instroment Co)

螢光顯微鏡 (Zeiss)

微量秤量機 (Sartorius)

加熱磁攪拌器 (Corning (Stirrer/Hot Plate))

石蕊試紙

接種針

微電腦 pH 計 Suntex SP-2200)

定時器、燒杯、量筒

Yellow tips Merck)

滅菌完成指示帶 Merck)

比色管 Merck

針筒 Neolus

四、研究過程

實驗一 純化培養種子細菌

(一) 材料

乳酸菌粉 含乳酸菌與比菲德氏菌)(購自加拿大 Rosell 公司)

固體洋菜培養基 Nutrient Agar)(HIMEDIA)

液體洋菜培養基 Nutrient Broth (HIMEDIA)

Thioglycollate 培養液 Fluid Thioglycollate Medium (HIMEDIA)

甘油

革蘭氏染色(結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅)

(二) 步驟

- 1、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
- 2、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
- 3、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
- 4、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
- 5、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
- 6、進行革蘭氏染色，並於螢光顯微鏡下觀察
- 7、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

(一) 材料

Thioglycollate 培養液 Fluid Thioglycollate Medium (HIMEDIA)

HCl (12N)

NaOH (飽和)

革蘭氏染色(結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅)

(二) 步驟

- 1、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
- 2、不同 pH 值各多配一管作為測吸光度時的對照組
- 3、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)

- 4、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
- 5、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

(一) 材料

Thioglycollate 培養液 Fluid Thioglycollate Medium (HIMEDIA)

螺旋藻粉(普羅拜耳生物科技公司)

HCl (12N)

NaOH (飽和)

革蘭氏染色(結晶紫、碘液、95% 酒精、酚紅)

(二) 步驟

- 1、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
- 2、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
- 3、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
- 4、將清液滅菌後,每管植入菌種 0.1ml
- 5、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
- 6、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

(一) 材料

固體洋菜培養基 Nutrient Agar (HIMEDIA)

Thioglycollate 培養液 Fluid Thioglycollate Medium (HIMEDIA)

螺旋藻粉(普羅拜耳生物科技公司)

HCl (12N)

NaOH (飽和)

市售乳酸飲料

(二) 步驟

- 1、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
- 2、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
- 3、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
- 4、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

- 5、將清液滅菌
- 6、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
- 7、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
- 8、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 市售乳酸飲料直接取樣研究

（一）材料

Thioglycollate 培養液 Fluid Thioglycollate Medium（HIMEDIA）

螺旋藻粉（普羅拜耳生物科技公司）

HCl（12N）

NaOH（飽和）

市售乳酸飲料

（二）步驟

- 1、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
- 2、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
- 3、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
- 4、配製 pH 值為 1、3、5、7、9 之 Thioglycollate 培養液，無螺旋藻，每管 5ml，滅菌
- 5、無菌下，直接自乳酸飲料中取 0.2ml 注入培養液中，置入恆溫箱培養
- 6、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

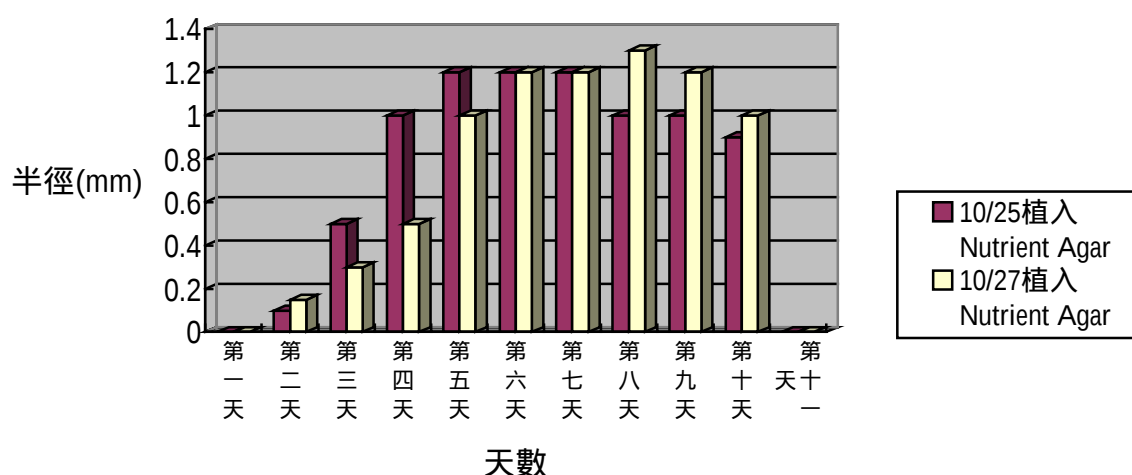
五、研究結果

實驗一 純化培養種子細菌

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 49.5ml PBS 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

(表一) 將儲存溶液植入固體洋菜培養基後，菌落半徑 (mm) 之圖表



- 1、第二天已可明顯觀察到菌落
- 2、菌落約在第五天~第七天達到生長巔峰
- 3、第七天後生長漸緩
- 4、第九天開始萎縮，且菌落有變薄跡象
- 5、第十一天時，菌已死亡，菌落狀似爆破
- 6、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）

純化

藉由固體培養基，可獲得純化之種子細菌

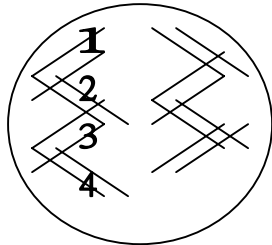
無菌下，將上述的洋菜培養基以接種針挑出兩種不同的菌，分別劃至另一培養皿中（圖一），放置於恆溫箱中觀察。

注意事項：

- 1、培養皿分成左右兩部，意即製作兩組純化菌，此時須注意兩組線不可相連交叉
- 2、畫四次線主要在於區別細菌密度，畫第一次的密度最高，第四次最低，其中

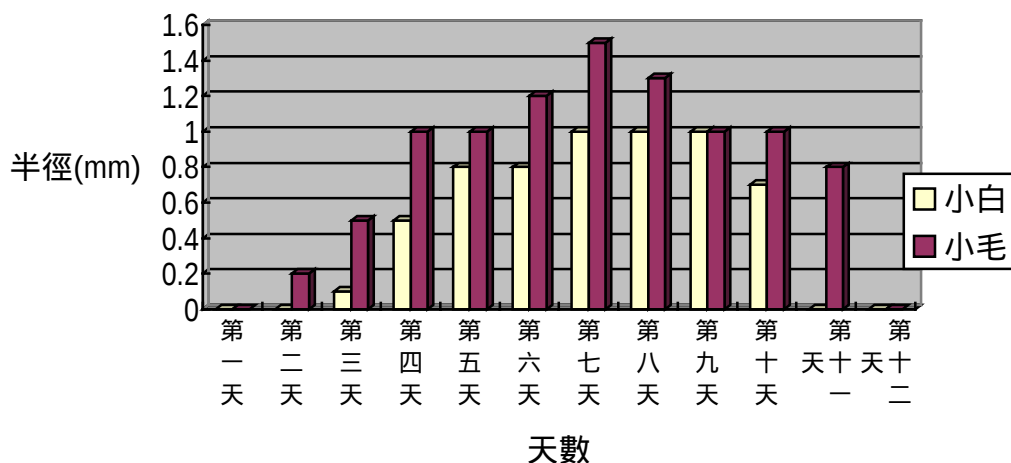
每畫完一次，接種針需在酒精燈過火後，方可再畫下一次。但畫第四次前可不必再過火，因此時密度已很低。由此可知菌種適合生長的密度

(圖一) 純化示意圖



且由實驗結果發現小白與小毛皆在密度最大處（即 1 處）生長最佳

(表二) 小白與小毛植入固體洋菜培養基後，菌落半徑 (mm) 之圖表



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

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

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

1、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死亡

2、型態

	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

(1) 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

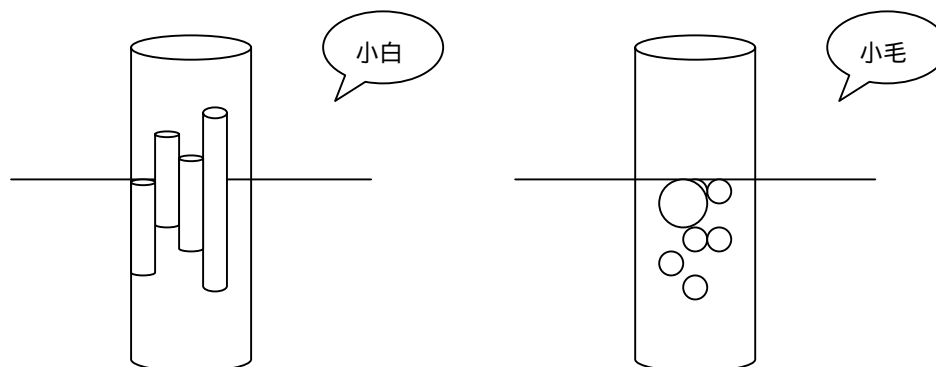
(2) 由生長範圍可看出小白與小毛皆具移動性

(3) 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將由 Thioglycollate 培養液來操作

(圖二) Thioglycollate 培養液生長示意圖



3、保存

(1) 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

(2) 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

注意事項：

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

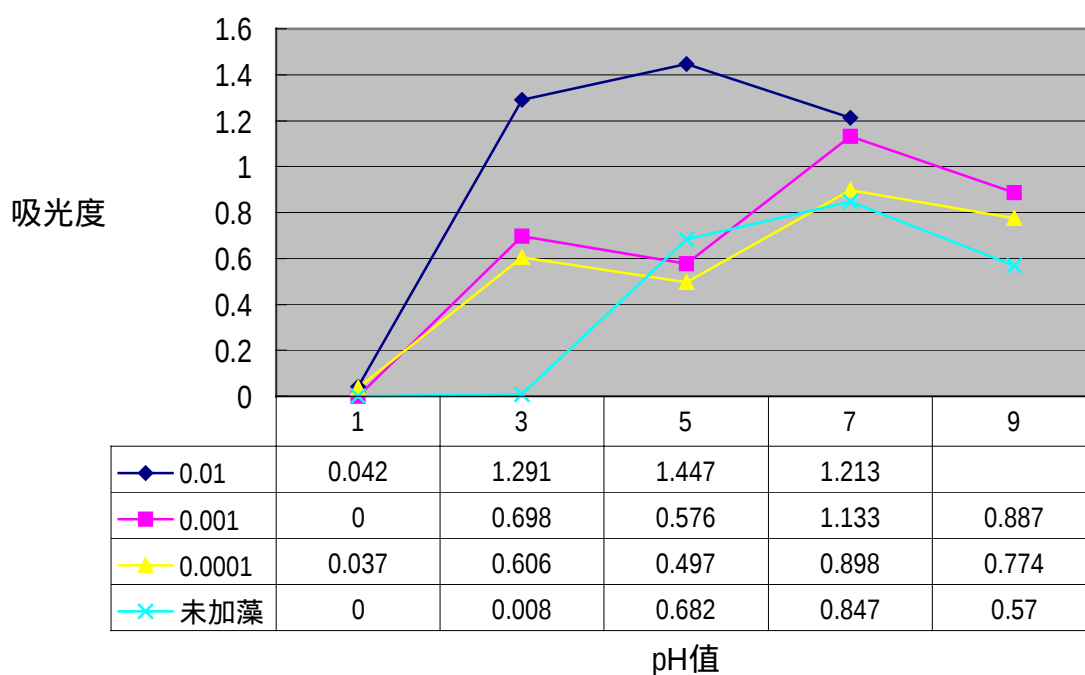
以上皆由放置冰箱保存 25 天以上之細菌培養液取出)

實驗三 螺旋藻對乳酸菌的影響

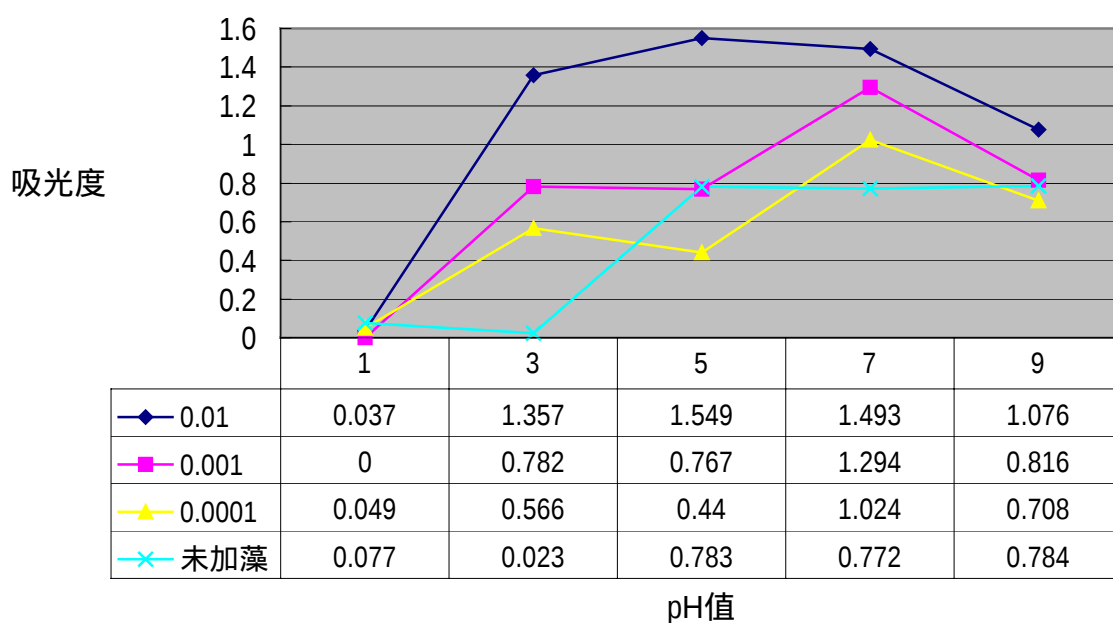
配置 pH1、3、5、7、9 的 Thioglycollate 培養液，不同的 pH 值再配成三種不同的螺旋藻濃度，分別為：0.0001、0.001、0.01 g/ml，經離心後，取其清液，且注入與（實驗二）同來源的種子細菌，每管注入 0.1ml，置於恆溫箱觀察

將（實驗二）與 實驗三 比較，可製得以下圖表

（表三）小毛加入螺旋藻之吸光度變化表（第二天）



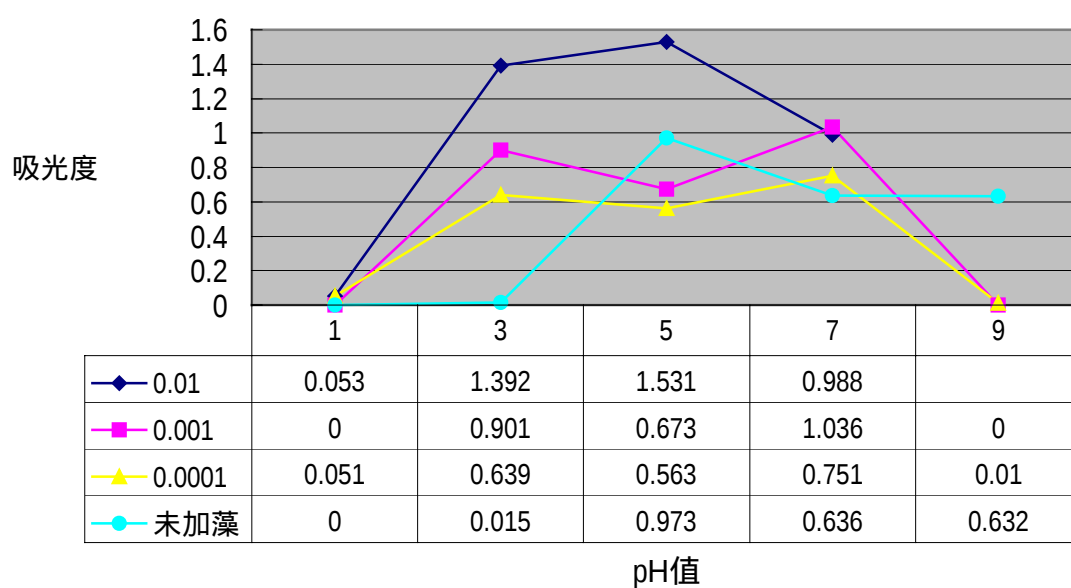
(表四) 小毛加入螺旋藻之吸光度變化表 (第四天)



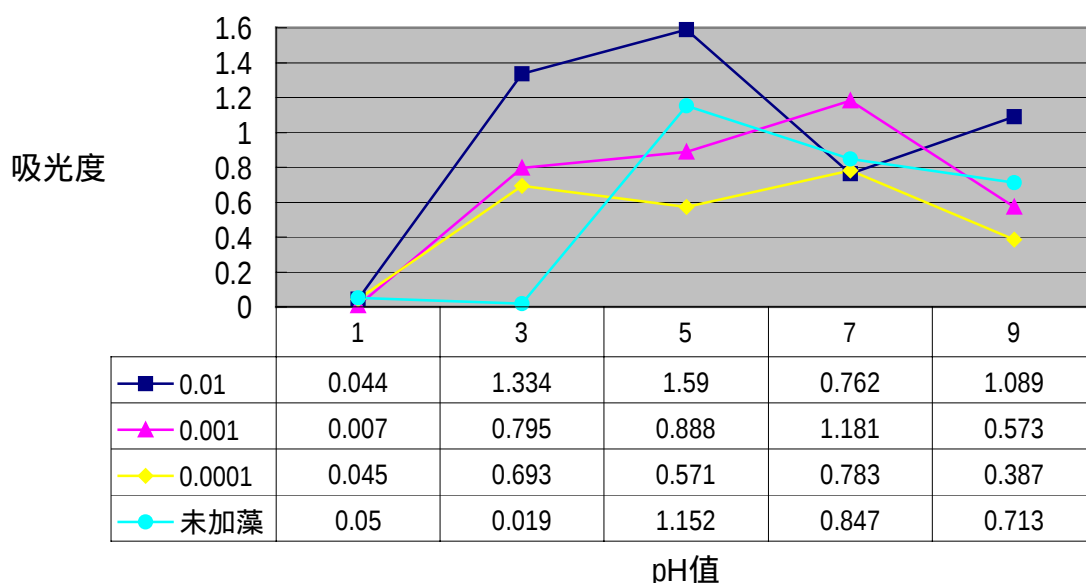
由 (表三) 與 (表四) 可看出

- 1、小毛適合生長在 pH3~7 的酸性環境中
- 2、濃度 0.01 (g/ml) 對幫助小毛的生長有明顯助益，唯在 pH1 的效果不顯著
- 3、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

(表五) 小白加入螺旋藻之吸光度變化表 (第二天)



(表六) 小白加入螺旋藻之吸光度變化表 (第四天)



由(表五)及(表六)可看出

- 1、小白適合生長在 pH 為 5 的環境中
- 2、濃度 0.01 (g/ml) 對幫助小白的生長有明顯助益，唯在 pH1 的效果不顯著，且至第四天時，在 pH7 的吸光度已與未加藻的組別相差不到 0.2
- 3、濃度 0.001 (g/ml) 及 0.0001 (g/ml) 再 pH5 時，對幫助小白的生長效果不佳
- 4、在第四天時，濃度 0.001 (g/ml) 在 pH7 的環境下，其吸光度遠大於其餘三組
- 5、濃度 0.001 (g/ml) 及 0.0001 (g/ml) 在 pH3、5 有較佳的效果

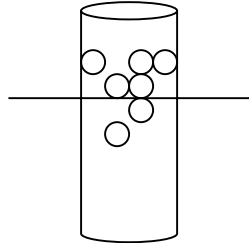
比較

- 1、兩菌落在 pH 為 3、5、7 的培養液中時，其型態均與 (圖二) 相同，但在 pH 為 1、9 的培養液中兩者皆沉澱至試管底部
- 2、在未加藻的管中，雖然兩種菌在第四天時， pH 3 皆生長得比 pH1 為佳，但就數據上而言，其吸光度要相差至少 0.2 以上才算有意義，故在此可視 pH1 與 3 的生長情形皆為少量
- 3、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
- 4、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
- 5、濃度 0.01 (g/ml) ; pH1 的第二天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

6、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

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

(圖三)



革蘭氏染色

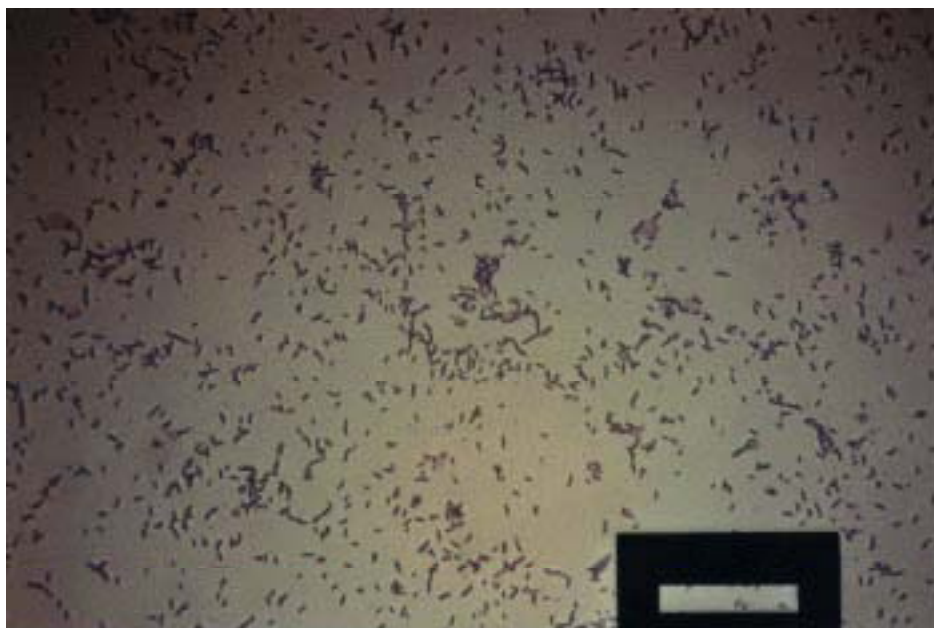
步驟請參見 (附錄二)

- 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

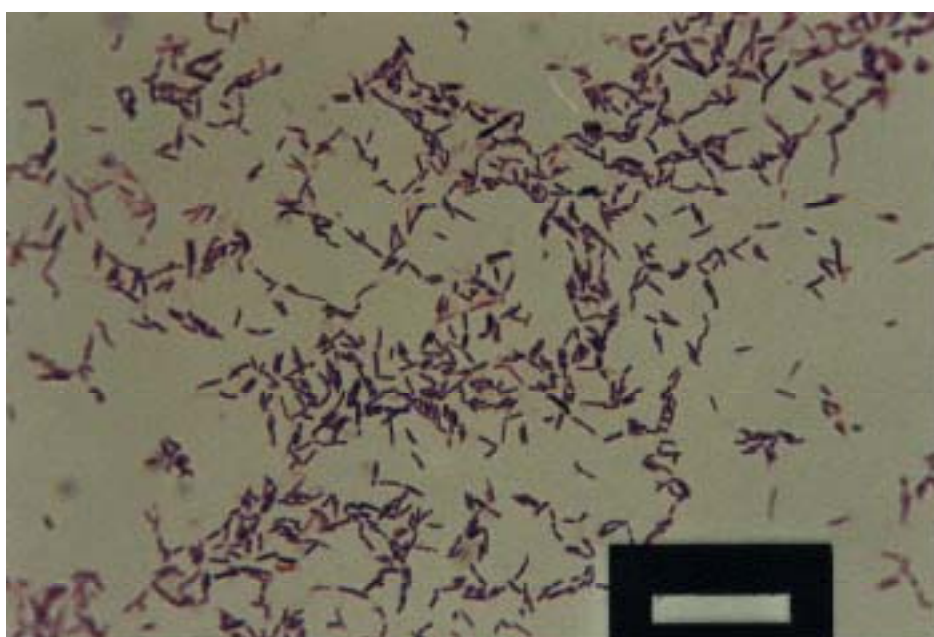
(照片一) 小毛 400X



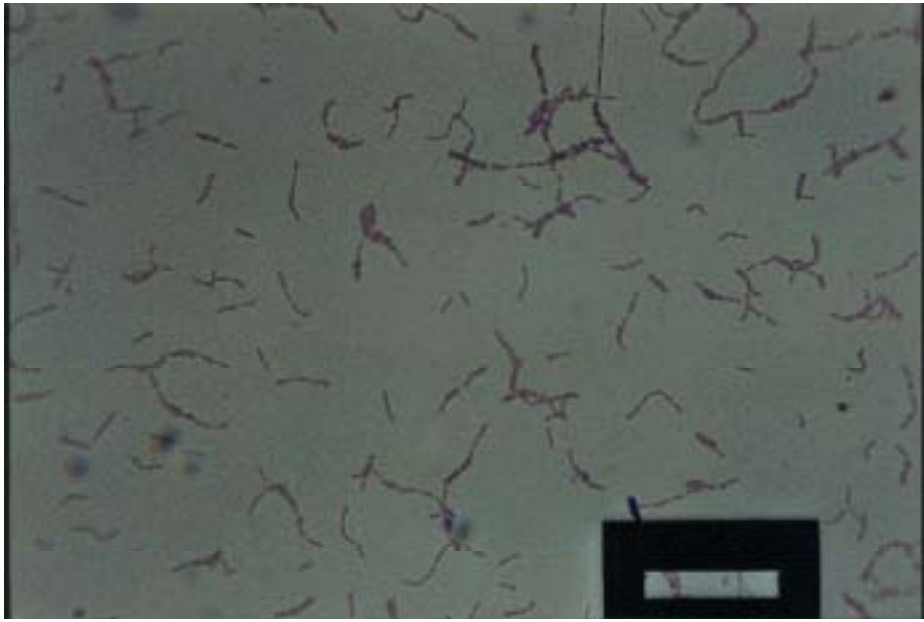
(照片二) 小白 400X



(照片三) 小毛 1000X



(照片四) 小白 1000X



實驗四 市售乳酸飲料之抗酸性研究

取市售四種廠牌的優酪乳

甲廠牌：含 *Acidophilus*、*B.lactis* 兩種菌

乙廠牌：含 *Acidophilus*、*Bifidobacterium*、*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

四種廠牌每 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

將菌由優酪乳中直接由接種針畫至洋菜培養基上，再挑出菌落種入 Thioglycollate 培養液，四天後再由液體培養基種入液體培養基，如此反覆

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	曲率大的兩端毛狀
	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

Thioglycollate 培養液的培養

型態：

	位置	形狀	生長範圍
甲	上半部及下半部	顆粒	上半部少許且遍佈，下半部多集中於中央
乙	上半部及下半部	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	上半部及下半部	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	上半部及下半部	顆粒	上半部少許遍佈 但比甲牌為多，下半部多集中於中央

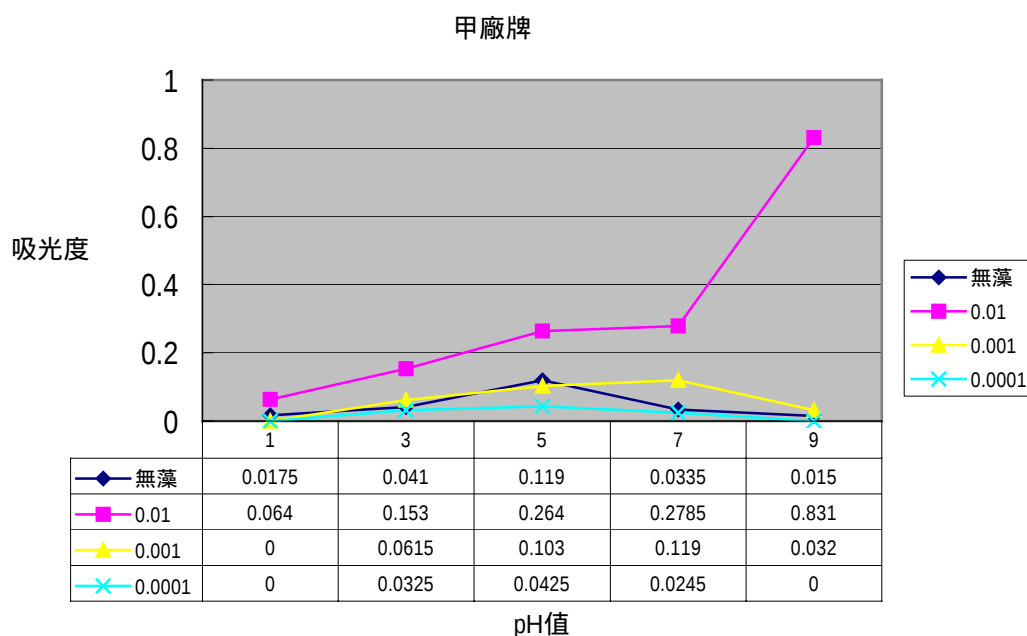
(1) 各廠牌皆含有厭氧及嗜氧菌

(2) 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

螺旋藻對市售飲料之抗酸性研究

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，得到下表

表七



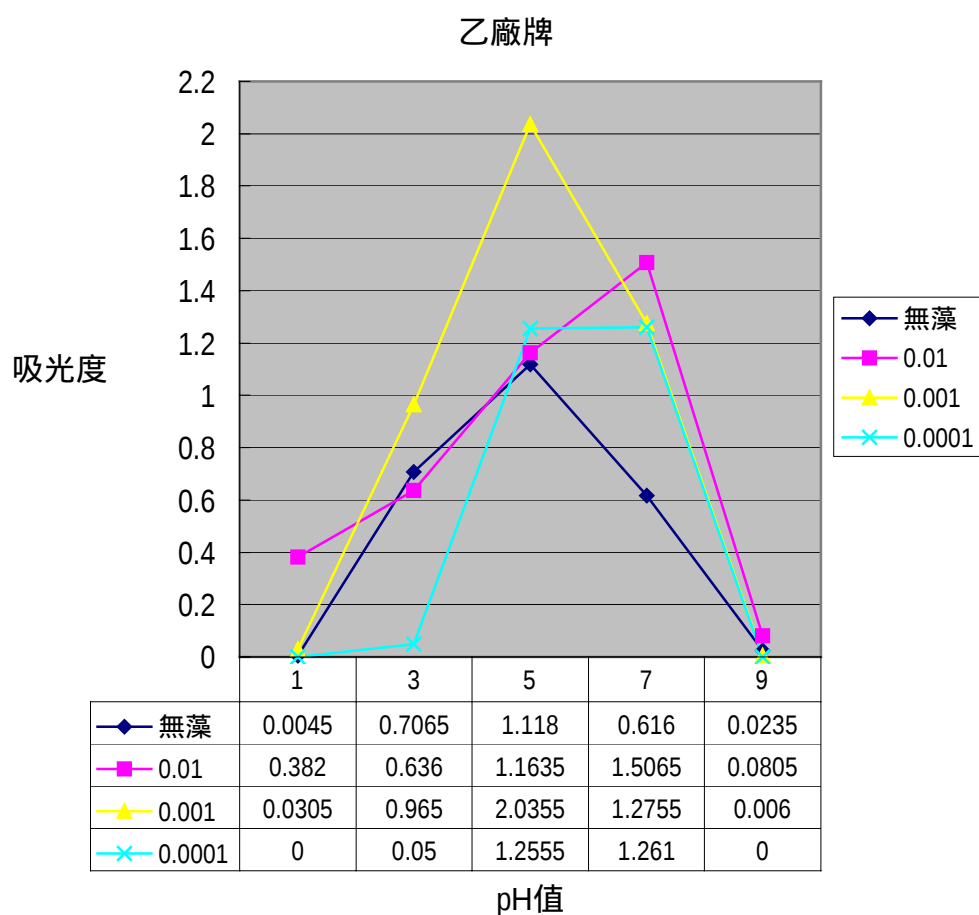
甲廠牌原始資料

	1	3	5	7	9
無藻-1 st	0.012	0	0.022	0.049	0.03
0.01-1 st	0.012	0.043	0.368	0.383	1.492
0.001-1 st	0	0.043	0.064	0.097	0.064
0.0001-1 st	0	0	0.058	0.049	0
無藻-2 nd	0.02	0.082	0.216	0.018	0
0.01-2 nd	0.116	0.263	0.16	0.174	0.17
0.001-2 nd	0	0.08	0.142	0.141	0
0.0001-2 nd	0	0.065	0.027	0	0

* 粗體字為效果最佳者

- 1、由平均資料，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
- 2、在 pH9 吸光度特高，起因於第一次實驗所得的數據，但在第二次的實驗數據卻沒有顯示出特殊的現象，推測是第一次實驗的誤差
- 3、由原始資料，可明顯看出 0.01g/ml 的濃度效果較好，在第二次實驗中，pH5 以未加螺旋藻的菌生長情形較好 紅字，但與其他酸鹼值的數據及第一次的數據比較，推測應是實驗誤差，並非此菌在 pH5 有過人的生長

表八

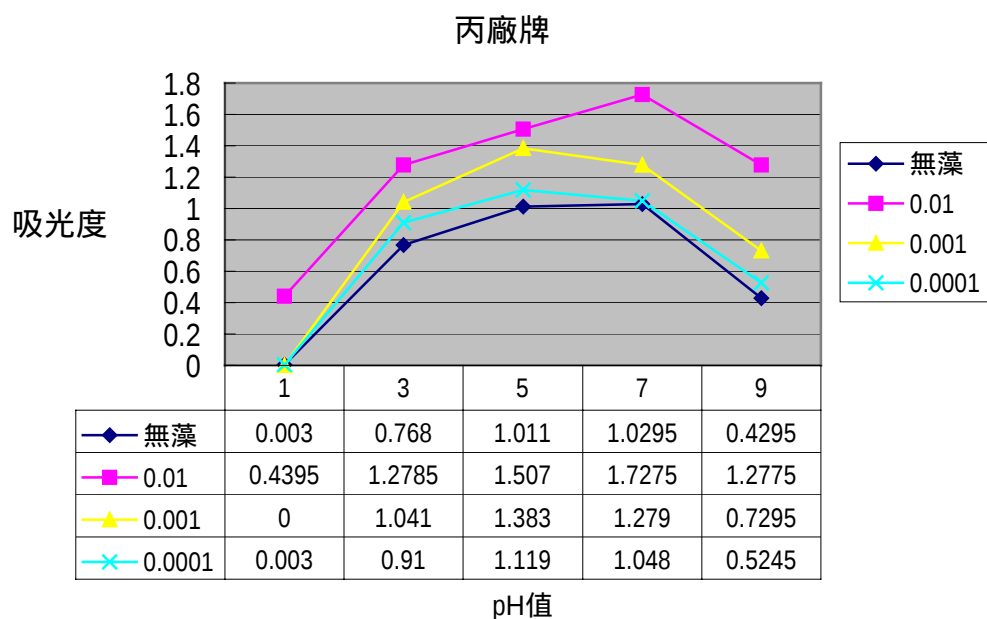


乙廠牌原始資料

	1	3	5	7	9
無藻-1 st	0.002	0.285	1.109	0.058	0.047
0.01-1 st	0.002	0.27	1.276	1.795	0.135
0.001-1 st	0.007	0.795	2.681	1.426	0.012
0.0001-1 st	0	0.035	1.327	1.491	0
無藻-2 nd	0.007	1.128	1.127	1.174	0
0.01-2 nd	0.762	1.002	1.051	1.218	0.026
0.001-2 nd	0.054	1.135	1.39	1.125	0
0.0001-2 nd	0	0.065	1.184	1.031	0

- 1、由平均資料，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
- 2、由原始資料，在 pH1，兩次實驗分別在濃度 0.001g/ml 及 0.01g/ml 生長最好，但第一次的效果不佳。pH9 兩次實驗中，第二次效果較不佳
- 3、綜合以上兩點，可確定此廠牌在 pH3、5 時，適合 0.001g/ml 的濃度，在 pH7、9 適合 0.01g/ml 的濃度

表九

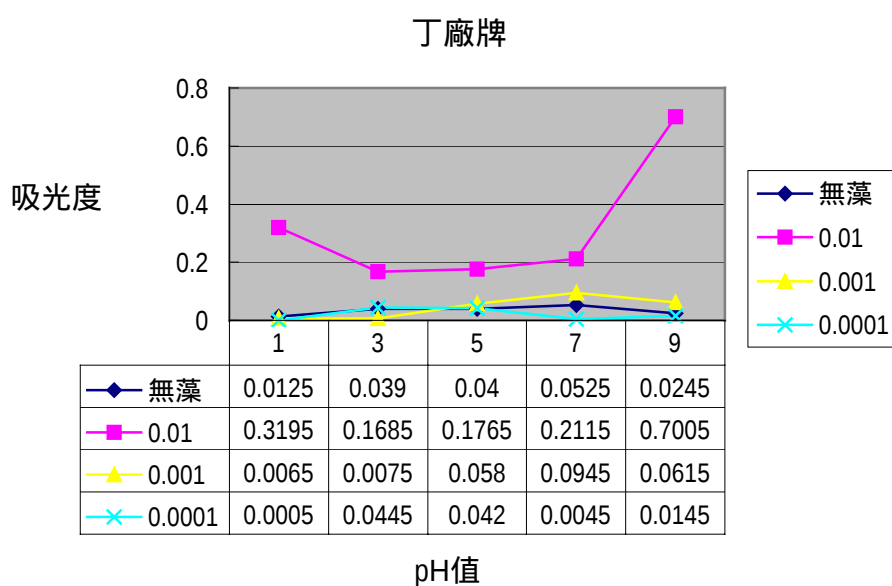


丙廠牌原始資料

	1	3	5	7	9
無藻-1 st	0.006	1.07	1.51	1.468	0.859
0.01-1 st	0.012	1.322	1.632	1.931	1.452
0.001-1 st	0	1.194	1.648	1.539	1.124
0.0001-1 st	0.006	1.166	1.581	1.563	1.018
無藻-2 nd	0	0.466	0.512	0.591	0
0.01-2 nd	0.876	1.235	1.382	1.524	1.103
0.001-2 nd	0	0.888	1.118	1.019	0.335
0.0001-2 nd	0	0.654	0.657	0.533	0.031

- 1、在丙廠牌中，不論是從平均資料或原始資料，都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
- 2、菌原先在 pH1 生長並不理想，但濃度 0.01g/ml 對其有明顯的效果，但就原始資料來看，第一次的效果不佳
- 3、濃度 0.01g/ml 在 pH7、9 的效果尤其優異

表十



丁廠牌原始資料

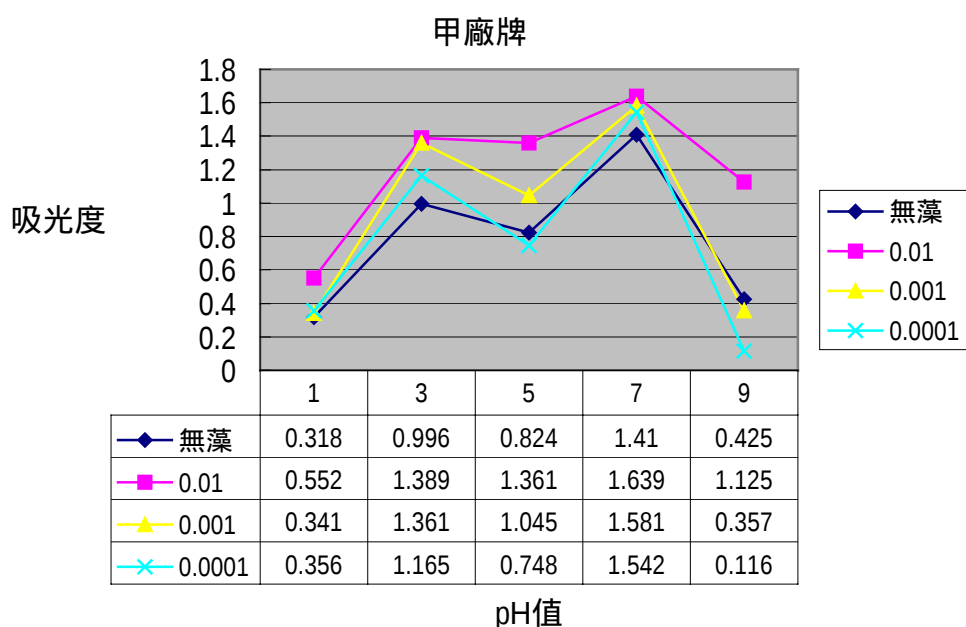
	1	3	5	7	9
無藻-1 st	0.012	0	0.022	0.05	0.049
0.01-1 st	0.584	0	0.321	0.164	1.371
0.001-1 st	0.013	0.015	0.01	0.117	0.123
0.0001-1 st	0.001	0.002	0.06	0.008	0.029
無藻-2 nd	0.013	0.078	0.058	0.055	0
0.01-2 nd	0.055	0.337	0.032	0.259	0.03
0.001-2 nd	0	0	0.106	0.072	0
0.0001-2 nd	0	0.087	0.024	0.001	0

- 1、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
- 2、由平均資料認為濃度 0.01g/ml 在 pH1、9 效果甚佳，但若由原始資料看來，皆是由於兩次實驗數據的歧異度大 有一次數值特高，以致平均數據較高所致，不過較低的數據認為並無失真，因為在 0.001g/ml 及 0.0001g/ml 的數據皆為 0，故 0.01g/ml 的數值雖低，但仍可看出其效果
- 3、總括而言，可以確定濃度 0.01g/ml 在 pH1、7、9 的效果

實驗五 市售乳酸飲料直接取樣研究

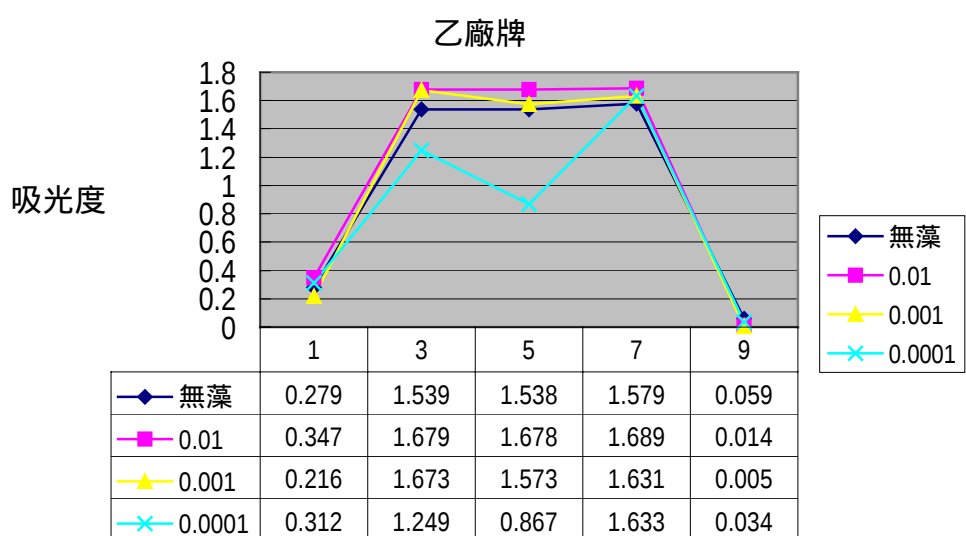
由於考慮食品添加物，如防腐劑等可能會影響螺旋藻的效果，故現將乳酸飲料直接吸取 0.2ml 注入培養液中，製得下表

表十一



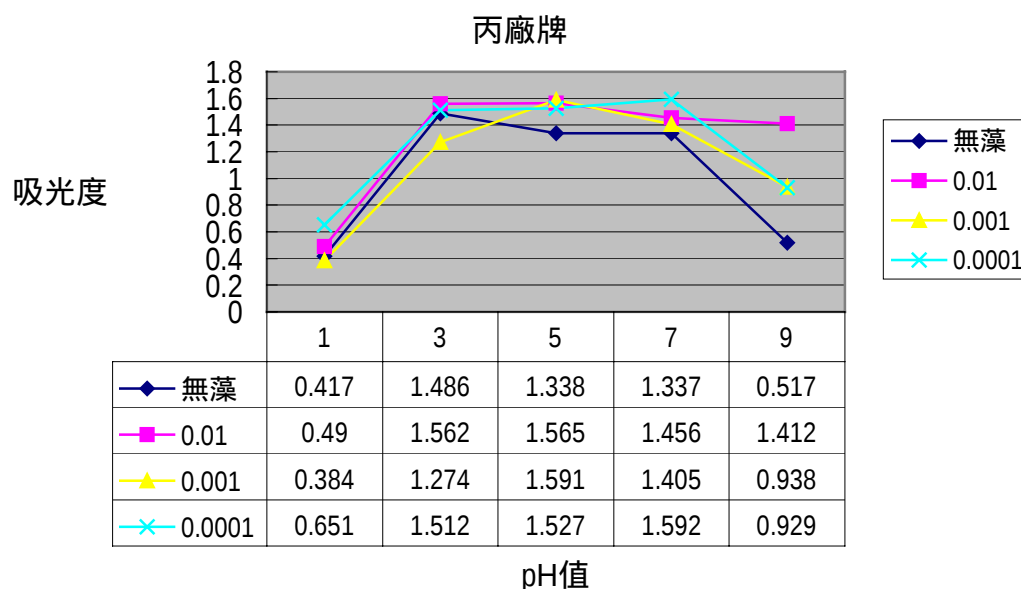
- 1、濃度愈高，效果愈好，與 表七 相比，螺旋藻仍是在最高濃度發揮了最好的效果，且兩者同在 pH9 效果十分顯著
- 2、表七 圖形多為圓滑曲線，但在此表中為倒 W 型，推測食品添加物對菌在 pH5 的生長產生影響

表十二



- 1、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
- 2、與 表八 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

表十三



- 1、由此表認為，在食品添加物的影響下，螺旋藻仍是難以發揮其功效
- 2、只在 pH9 有良好效果，此特點與 實驗四 中，丙廠牌的實驗結果相符
- 3、與 表九 相比，圖形皆圓滑

* 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

六、討論

(一) 乳酸菌(*Lactobacillus*)菌種，主要分布於人體之口腔、腸道及陰道。大多數的乳酸菌屬於微嗜氧性，僅少部分為絕對厭氧菌；乳酸菌是不會產生孢子、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)。乳酸桿菌在臨床實驗室裡是常常遇到的菌種，在人體內的腸道微生物中，是相當重要的組成分子。其生活方式是採共生，這些菌種的鑑定是不需要鑑定到種的程度，所以將其分離出來是不具有很大的臨床意義，通常就以乳酸菌統稱。

一般乳酸菌適合生長在弱酸的環境，在(實驗一)中，我們的確也得到了小白與小毛適合生長於 pH5~7 的環境

(二) 螺旋藻為一種高蛋白的營養食品，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

(表十一) 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

(表十二) 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

(三) 由(表三)~(表六)可發現螺旋藻濃度越高，菌的生長情形越好，特別是在 pH3、5，足見螺旋藻確實有助於提升乳酸菌的抗酸性。此外，濃度 0.01 (g/ml) 在 pH5 生長較佳，而 0.001 (g/ml) 與 0.0001 (g/ml) 則是 pH7 生長較佳，更可以佐證“螺旋藻濃度越高越能提升抗酸性”的論點。在添加螺旋藻後，特別是濃度 0.01 (g/ml)，與未加入螺旋藻的組比較，其吸

光度皆有大幅成長，有些組甚至是以兩倍成長，效果驚人，更加確立了螺旋藻與乳酸菌抗酸性的關係。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，清除腸道內的害菌，活化人體生理機能。綜合以上，推測應是螺旋藻所含的養分發揮了作用，增加了乳酸菌的活性與抗酸性。

（四）由（圖二）與（圖三）可發現小毛的生長範圍有移動，推測應是螺旋藻的養分可使小毛不再一定要生長於無氧的環境

（五）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

（六）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

由此推斷，螺旋藻對不同廠牌的菌 菌種及菌數多寡 有不同程度的影響，在（實驗三）中，我們已證實了螺旋藻對單一菌的效果，即“螺旋藻濃度越高越能提升抗酸性”，但市售乳酸飲料多半都含有 2 種以上的菌，廠商認為不同的菌彼此間會影響，對人體產生更好的效果，故在（實驗四）中，我們並沒有將每一種菌都純化挑出，而是依據廠牌來種植。而實驗結果發現，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，可明顯看出“螺旋藻濃度越高越能提升抗酸性”的結果。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，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，如此才可有效增進人體健康

（七）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**食品添加物會影響螺旋藻的效果**。以甲廠牌而言，0.01g/ml 仍是發揮了良好效果，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。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

（八）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）。故在未加螺旋藻的情形下，此四種廠牌能否通過人體胃酸，達到廠商廣告的健康效果，值得我們再多加探討

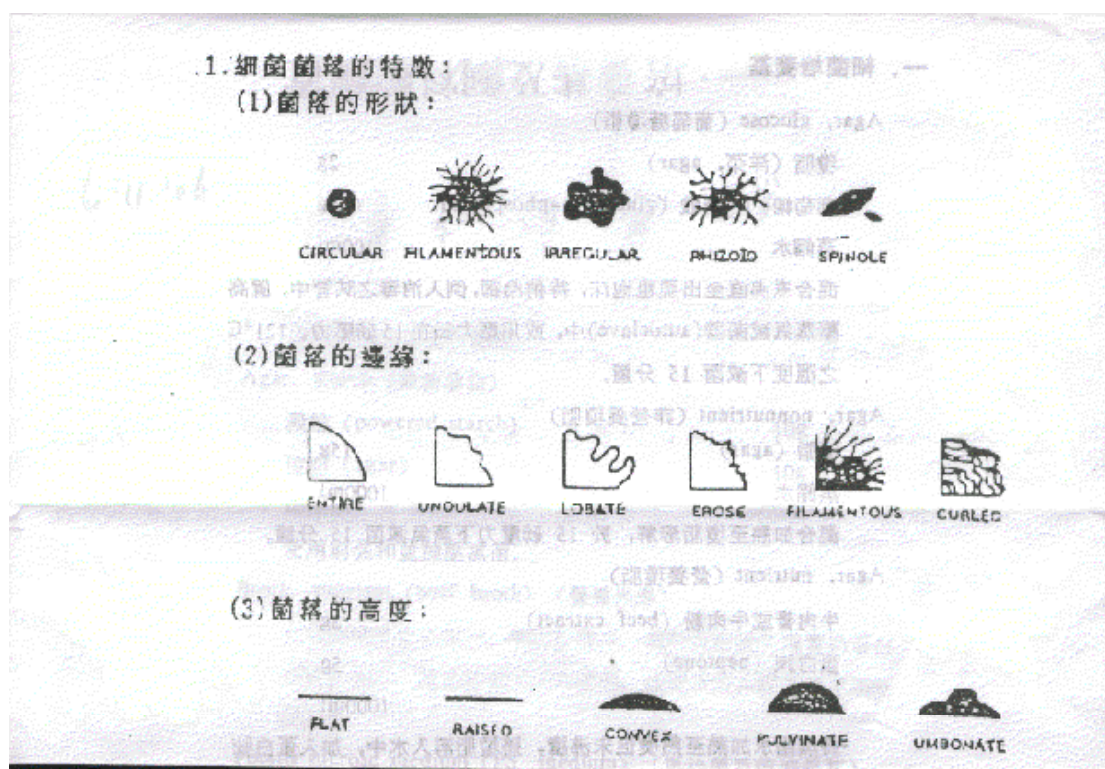
七、結論

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，可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。螺旋藻的效果無庸置疑，唯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

八、參考資料

- (一) 實用臨床微生物診斷學，第七版，蔡文城著，九州圖書文物有限公司(83年)
- (二) 微生物診斷學上、下，Elmer W. Koneman, M. D 等著，陳柏熹譯，合計圖書出版社(85年)
- (三) 腸胃生理學，陳得源、魏秀娟譯，合計圖書出版社(73年)
- (四) 酸乳酪與健康，光岡知足著，陳羲譯，正義出版社(77年)
- (五) 螺旋藻，黃慶雲，青春出版社(87年)
- (六) Microbiology, James G. Cappuccino 等著，偉明圖書有限公司代理進口(85年)

(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

