

中華民國第42屆中小學科學展覽會

::: 作品說明書 :::

高職組-農業

科 別：農業及生物科技科

組 別：高 職 組

作品名稱：冷凍微膠技術在雙叉乳桿菌的應用

關 鍵 詞：微膠囊、雙叉乳桿菌、存活率

編 號：091401

學校名稱：

國立北門高級農工職業學校

作者姓名：

嚴灝麟、林嘉玲、蘇琳雅、陳冠豪

指導老師：

楊昆霖



冷凍微膠囊技術在雙叉乳桿菌的運用

To Apply Technique of Freezing Microencapsulation in *Bifidobacterium bifidum*.

壹. 摘要：

雙叉乳桿菌被證實具有**抗癌**，**抗腫瘤**甚至有效延長 **AIDS** 病人的壽命，且能**養顏美容**在本世紀被譽為「長春不老的靈丹」。然而雙叉乳桿菌是屬於嬰兒腸道內特有的益菌，是一種**厭氧菌**，在有氧條件下易受氧的傷害，另外易遭受人體**胃酸**及**膽鹽**之破壞，所以為了讓其有效在人體腸道內生存，必須尋求有效的解決方法。

貳. 研究動機：

在畜產加工課程中，發酵乳品一章提及其使用的菌種及特性，其中令人印象深刻的是雙叉乳桿菌，在人體腸道的存活隨著年紀的增加，菌數漸減，最後人體隨之老化、死亡，最近也有很多文獻說明其抗老化及保健的效果，但也因其易受儲存時間氧的侵害，或受胃酸、膽鹽的損害，無法在腸道內存活，因此保健效果大打折扣，所以本實驗欲尋求有效的解決方法。

最近甫發展成功的**冷凍乾燥微膠囊技術**，在製藥工業上已引起廣大的迴響，因它具有低溫穩定不起化學變化，在人體內具有有效傳送的特性，所以我們擬利用此方法在雙叉乳桿菌的膠囊化，期使能抗氧化、耐胃酸、耐膽鹽。

參. 研究目的：

以最近發展的**冷凍乾燥微膠囊技術**應用在**雙叉乳桿菌**上，期使有效通過胃酸，膽鹽的作用；順利停留在腸壁以增進人體健康，並增加儲存期間之活性。

肆. 研究設備及器材：

- 一. 菌種：*Bifidobacterium bifidum* CCRC (11844)
- 二. 培養基：Tryptone-phytone-yeast extract (簡稱 TPY)
- 三. 冷凍乾燥機
- 四. 滅菌釜
- 五. 全脂乳粉

六. 以 TPY broth 培養 *B.bifidum* 37 , 16 小時於厭氣缸內。

七. 厭氣包



八. 厭氣缸



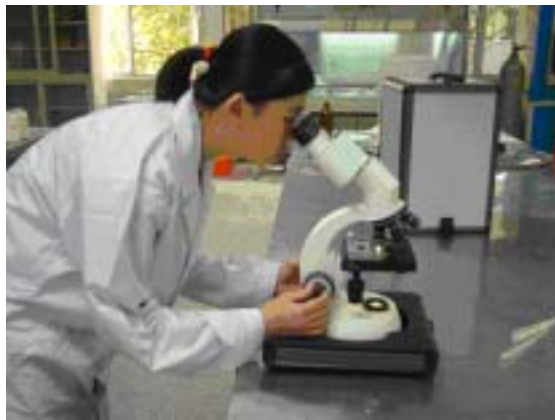
九. 以革蘭氏染色，並以顯微鏡觀察其形態。



照片 1. 革蘭氏染色：將細菌固定在玻片上。



照片 2. 革蘭氏染色。



照片 3. 革蘭氏染色：用顯微鏡觀察其形態及染色情形。

十.將 *B.bifidum* 接種於牛乳中(12%固形分)培養 37℃，16 小時於厭氣培養箱內製備發酵乳之樣品。

伍. 研究過程或方法：

- 一. 參照 Takahiro , 2001 方法，將 25 克吉利丁(動物膠)與 1.85 克聚乙二醇(PEG)加入 400ml 的水均質 5 分鐘(8000 轉/分鐘)，再加上 250ml 發酵乳樣品，再以均勻機均質 1 小時(4000 轉/分鐘)後，冷凍乾燥製成微膠囊化之乾燥發酵乳粉。



照片 4.材料

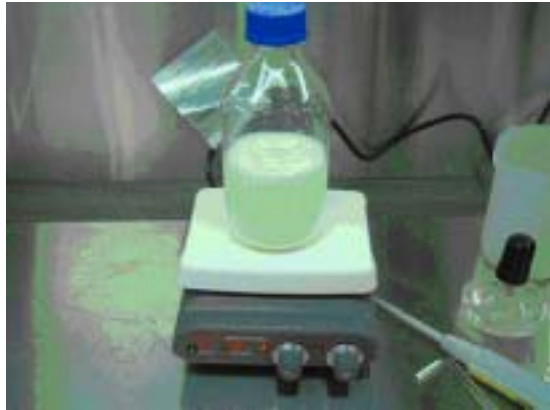
PEG 聚乙烷甘醇

↓

吉利丁(動物膠)

↓

發酵乳 → 液態均質 → 冷凍乾燥 → 微膠囊形成



照片 5. 微膠囊的製作。



照片 6. 膠囊組與對照組的發酵乳樣品。



照片 7.膠囊組與對照組的冷凍乾燥。

二. 膠囊組與對照組生菌數之測量。



照片 8.計算膠囊組與對照組的生菌數。

三. 微膠囊與對照組外觀形態之觀察

(一) 以電子顯微鏡觀察膠囊組與對照組之差異。

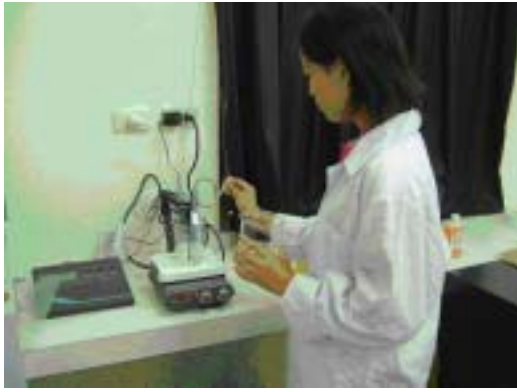
(二) 依 Modler, 1983, 方法, S.E.M.必須將樣品鍍上一層 150A 厚的黃金並埋植在樹脂內以便做觀察。

四. 儲存試驗

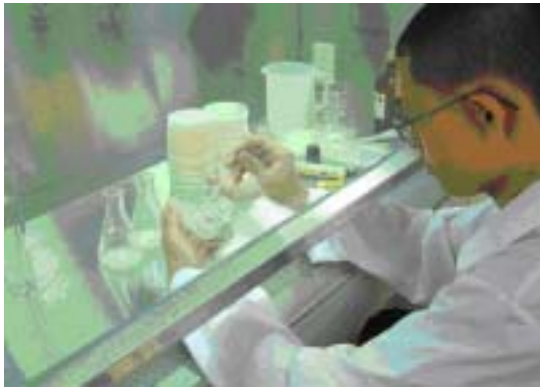
將膠囊組與對照組兩組樣品分別以夾鏈袋常溫儲存 7.14.21.28 天, 測其生菌數。

五. 耐酸試驗

依 Gorbach1987, 方法, 以 pH 2 之鹽酸稀釋液(滅菌後)9ml 加入 1g 的酸酪乳粉, 測其不同時間之生菌數。



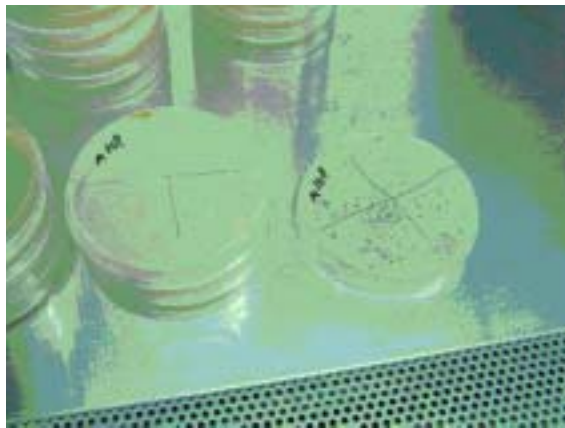
照片 9. 耐酸試驗：調製 pH 2 的鹽酸稀釋液。



照片 10.耐酸試驗。



照片 11.耐酸試驗：生菌數測量。



照片 12. 生菌數測量

六.耐膽鹽試驗

依 Gorbach1987，方法，以 0.5% 膽鹽培養液(滅菌後)9ml 加入 1g 的酸酪乳粉，測其不同時間之生菌數。



照片 13.耐膽鹽試驗：膽鹽液的配製。



照片 14.耐膽鹽試驗：生菌數測量。

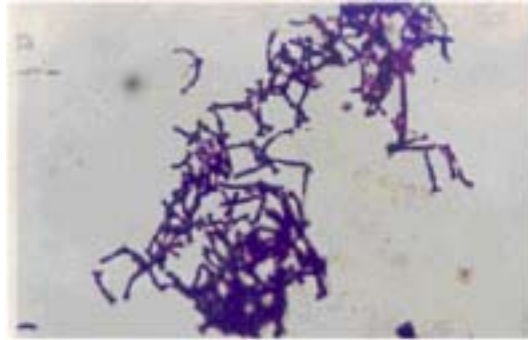
七. 生菌數測量

以 1g 冷凍乾燥之酸酪乳粉溶於 9ml 之生理食鹽水，以連續稀釋的方法求其最適當之稀釋倍數(30-300 colony 之平板)，並計算其生菌數。

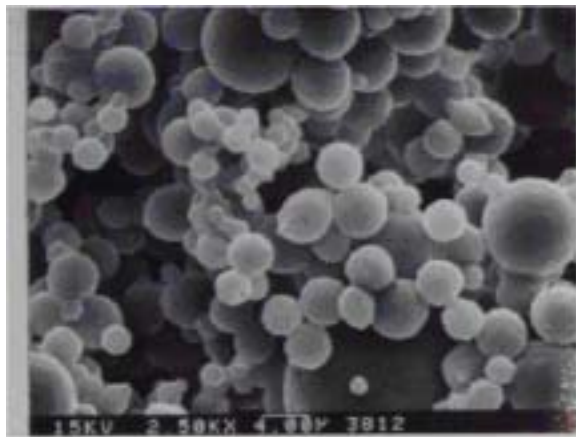
陸. 研究結果：

- 一. 以 TPY 培養基厭氣培養 16 小時後，用革蘭氏染色，再以顯微鏡觀察其外型。

照片 16. 雙叉乳桿菌培養在 TPY 培養基，37℃，革蘭氏染色，1000 倍。



二. 電子顯微鏡鏡 S.E.M..之結果



照片 17. 冷凍乾燥膠囊組在電子顯微鏡下的顆粒。(2500x)



照片 18.冷凍乾燥對照組在電子顯微鏡下的顆粒。(2500x)

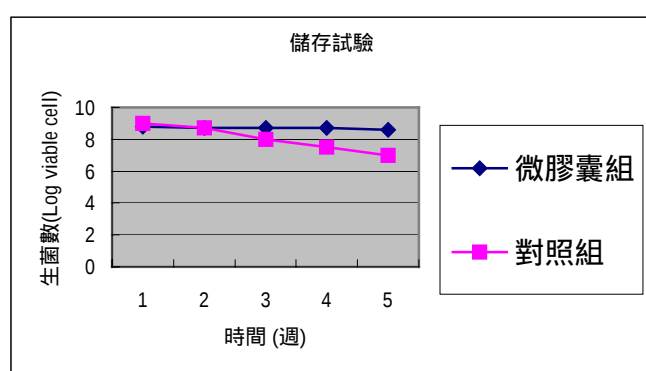


表 1.儲存試驗(三次實驗之平均值)

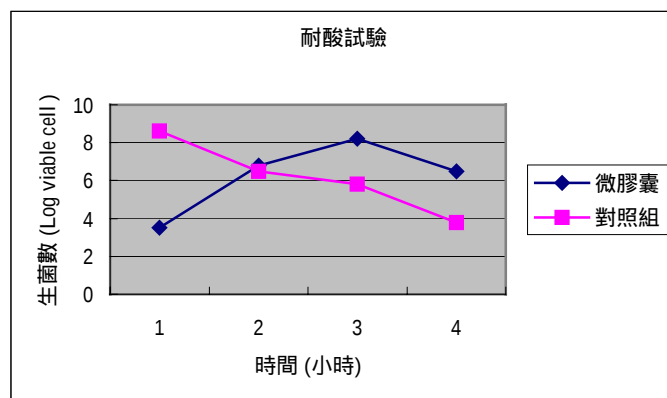


表 2.耐酸試驗(三次實驗之平均值)

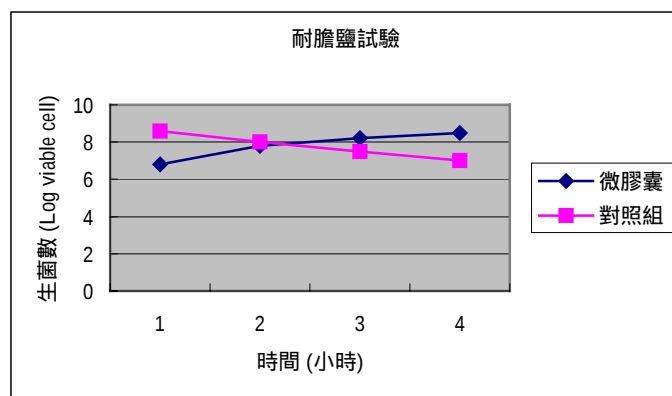


表 3.耐膽鹽試驗(三次實驗之平均值)

柒. 討論：

一. 電子顯微鏡 S.E.M. 外觀形態的觀察得知膠囊組顆粒形成球狀的形式，對照組形成不規則狀，有顯著差異。

二. 儲存試驗

由儲存試驗可以知道微膠囊化後其阻隔氧氣的侵害，所以在一個月內生菌數變化甚少，而對照組在前二週菌數與微膠囊組差異不大，由此可以看出冷凍乾燥在菌的乾燥過程損傷是最小的，但對照組在二週後菌數隨之遞減，預期對照組隨儲存時間增加受氧的傷害跟著增加，生菌數將持續遞減。

三. 耐酸試驗

可以觀察到剛開始時膠囊組的生菌數較低，而對照組的生菌數較高，推測可能由於膠囊內之菌數沒有完全釋放，所以對照組反較膠囊組有較高之生菌數，但 2 小時後則相反，而 4 小時後，膠囊組與對照組的生菌數都明顯下降，表示雙叉乳桿菌不耐酸。

一般而言，菌通過胃所需時間都不會停留超過 4 小時，所以膠囊化有助於通過胃酸的傷害。

四. 耐膽鹽試驗

對照組雖然在開始時生菌數較高於膠囊組，但膠囊組隨時間增加，推測因雙叉乳桿菌數慢慢被釋出，在第 3 小時後就高於對照組，膠囊組與對照組並沒有太大的差異，所以本菌對膽鹽的耐受性較高，但推測隨時間的增加，不管是膠囊組與對照組，生菌數將會因膽鹽的作用而慢慢下降。

捌. 結論：

- 一. 冷凍微膠囊技術應用在雙叉乳桿菌能有效抗氧化、耐胃酸、耐膽鹽，有助於儲存及在人體腸道內存活之機率，以達到其更高的保健效果。
- 二. 本株雙叉乳桿菌具有較高膽鹽耐受性，但對酸及氧有明顯的敏感度。

玖. 參考資料及其它：

- 一. Gorbach S.C. and B. R. Golbin. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1-12.
- 三. Modler, H. W. et al, 1983. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins J. Dairy Sci. 66 : 430-437.
- 三. Takahiro, M. et al, Preparation of gelatin microparticles by colyophilization with polyethylene : characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres. International Journal of pharmaceutics 219 : 127-137(2001)。

結語：

實驗架構完整性佳，唯實驗方法（生菌數測量）應再精確，令作者並非所有實驗都親自參與，應予改進。

(第三名)

實驗架構完整性佳，唯實驗方法（生菌數測量）應再精確，令作者並非所有實驗都親自參與，應予改進。