

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

國小組 生活與應用科學科(二)

082903

「益生」的好閨「蜜」

學校名稱：康橋學校財團法人新北市康橋高級中學

作者：	指導老師：
小五 陳昀希	賴俊憲
小五 陳品璇	
小五 鄧芷縵	
小五 杜贍妤	

關鍵詞：益生菌、蜂蜜

摘要

本研究以蜂蜜對益生菌生長的影響為主題，選擇益生元組成差異較大之龍眼蜜、蕎麥蜜、麥盧卡蜜作為蜜種，並以 A 菌嗜酸乳桿菌、C 菌乾酪乳桿菌、LP 植物乳桿菌、LGG 鼠李糖乳桿菌作為益生菌種，透過細胞濃度測定、塗盤培養基等方法估算菌種生長曲線、菌種菌落數，探討不同蜜種對益生菌種繁殖的影響，並模擬胃腸道環境探究不同蜂蜜濃度對益生菌繁殖的影響。

研究結果發現蜂蜜能促進益生菌生長，且不同蜂蜜對不同益生菌的繁殖有差異。蜂蜜能提升益生菌對抗人體胃腸道中的胃酸、膽汁等耐受性。從結果推論，食用益生菌時可搭配蜂蜜一起食用，並在挑選益生菌種改善身體機能時，可選擇對該益生菌繁殖有益的蜂蜜種類一同食用，以提升益生菌的功效。

壹、 前言

一、研究動機

在去年的科展實驗中，我們發現不同的飲品對腸道中好菌及壞菌會帶來不同的生長影響，在去年所實驗的八種飲品結果皆會對腸道好菌代表菌種—益生菌 LGG 帶來抑制生長的作用。然而，在去年的研究中我們了解人體腸道的益生菌種有很多，需要更全面的實驗設計才能推導客觀的結論，由此啟發引導我們希望能設計更完善的實驗來深入探索飲品對於腸道菌種的影響。

在日常生活中，我們常聽聞飲用蜂蜜時可促進人體腸道環境的益生菌繁殖，有幫助消化、促進排便等功效。因此，這一次的科展我們想專注於探討蜂蜜～作為天然的飲品原料，是否真有促進腸道中益生菌繁殖的效用，且不同種類的蜂蜜含有不同的益生元成分，希望進一步深入探討不同種類的蜂蜜對於不同益生菌種的繁殖力是否會有不同的影響，由此深化我們的研究。

二、研究目的

本研究先探討不同蜂蜜種類對不同益生菌種繁殖的影響，找出最佳蜜種調整蜂蜜濃度觀察對不同益生菌種繁殖的影響，再以最佳的蜜種和益生菌種的組合，模擬人體胃腸道胃酸及膽汁的環境，找出益生菌繁殖最佳的蜂蜜濃度。研究目的如下：

探究不同蜜種對不同益生菌種繁殖的影響

- (一) 從菌種繁殖的細胞濃度光譜測量，找出促進益生菌繁殖的最佳蜜種
- (二) 從菌種塗菌培養的菌落數估算，找出蜜種-益生菌種可能的最佳組合

探究不同蜂蜜濃度對益生菌繁殖的影響

- (一) 探究最佳蜜種不同濃度對不同益生菌種繁殖的影響

從菌種繁殖的細胞濃度光譜測量，驗證與最佳蜜種繁殖最佳的益生菌種組合

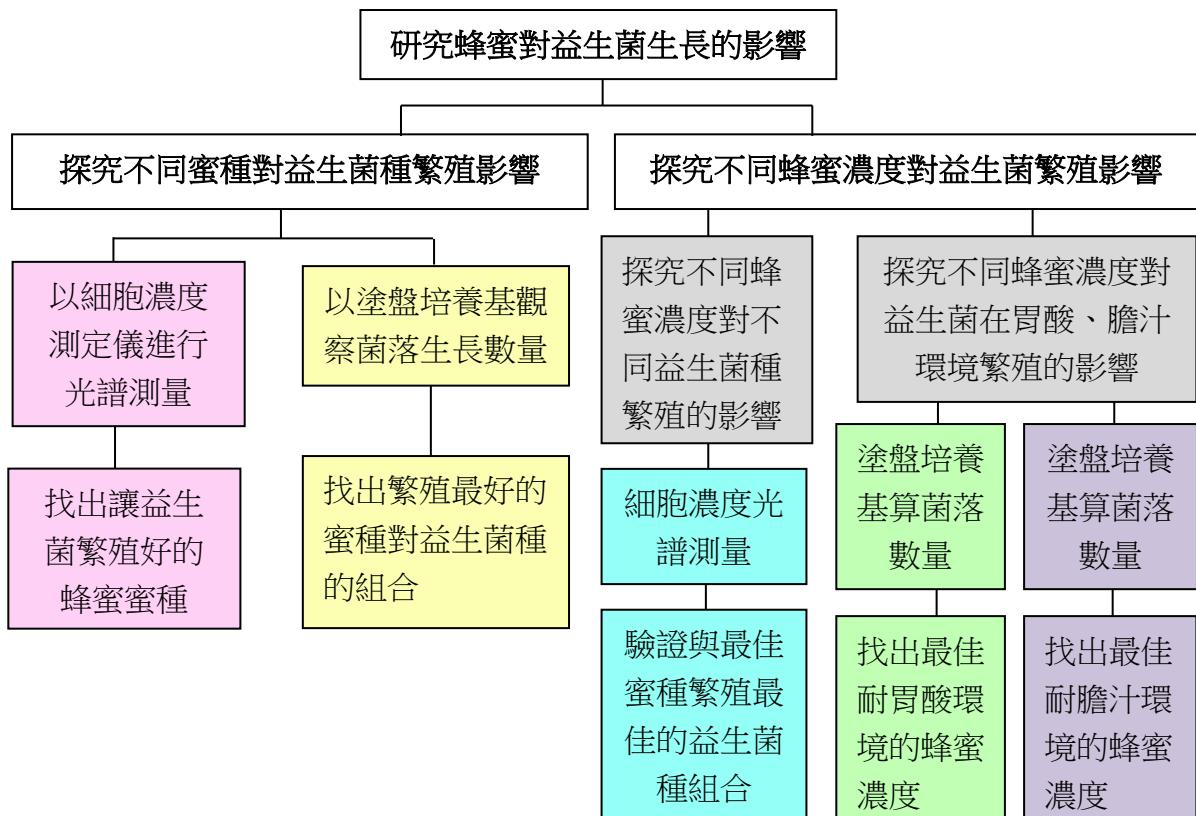
- (二) 探究最佳蜜種不同濃度對繁殖最佳益生菌耐受胃酸環境的影響

從模擬胃酸環境中的塗菌培養菌落數估算，找出最佳耐受條件的濃度

- (三) 探究最佳蜜種不同濃度對繁殖最佳益生菌耐受膽汁環境的影響

通過胃酸後從模擬膽鹽環境中的塗菌培養菌落數估算，找出最佳耐受條件的濃度

圖 1 研究架構圖



三、文獻回顧

在前次科展的文獻探討中，我們已知腸道中益菌與壞菌的平衡對身體健康帶來關鍵的影響，同時也瞭解益生菌的特性及對人體的幫助。這次的文獻我們更深入探索腸道主要的益生菌種及我們想要實驗的蜂蜜種類中益生元與益生菌之間的關係。

(一) 腸道主要益生菌種：

1. 五大機能益生菌及其功效：

參考卡羅琳衛教師網站，得知影響身體機能的主要益生菌為：A、B、C、LP、LGG 等五大益生菌種，而不同益生菌的功效及作用人體的部位不同，為人體打造良好的環境。[參考網站益生菌功用大公開](#)，統整我們實驗的四個菌種提供人體的主要改善機能如表 1。

表 1 腸道主要益生菌功效表

	A 菌	C 菌	LP 菌	LGG 菌
種類	嗜乳酸桿菌	乾酪乳桿菌	植物乳桿菌	鼠李糖桿菌
功效	<ul style="list-style-type: none">●免疫調節●消化道叢菌平衡●私密處保養	<ul style="list-style-type: none">●調整過敏體質●免疫調節●消化道叢菌平衡	<ul style="list-style-type: none">●舒壓改善情緒●消化道機能●改善過敏	<ul style="list-style-type: none">●調節體脂肪●維持消化道機能●口腔健康

2. 益生菌的好氧性與厭氧性：

參考科學月刊第三十七卷第二期的資料，我們得知五大機能益生菌中有四大類為乳酸桿菌屬的菌種為「兼氧性」菌種，而其中只有 B 菌種為「絕對厭氧性」。因此我們挑選兼氧性的乳酸桿菌種四種：A、C、LP、LGG 這四種做實驗，以避免實驗受到氧氣的影響而難以觀測實驗的結果。

3. LP 菌中的植物乳桿菌：

參考健康元宇宙網站，我們可以知道，LP 菌有兩種：植物乳桿菌及副乾酪乳桿菌。其中「植物乳桿菌」普遍存在於唾液及醃漬食品如泡菜、味噌中，特色是活性高、生命力強且抗氧化力表現佳，可以抑制腸道中產氣的細菌生長，幫助維持

腸道健康。此外更有實驗證實，植物乳桿菌有助於改善憂鬱症症狀，因此我們選用植物乳桿菌作為代表 LP 菌的實驗菌種。

由上文獻分析，我們實驗設計因此挑選：A 菌嗜酸乳桿菌、C 菌乾酪乳桿菌、LP 植物乳桿菌、LGG 鼠李糖乳桿菌等四種益生菌作為代表之菌種。

4. 食物於消化系統的過程與時間：

參考優活健康網站及朝陽科技大學應用化學系劉季湄的碩士論文得知，食物吃下肚後先至胃部與胃酸作用，停留平均時間為三小時，最慢大約經六小時後進入腸道與膽鹽作用。

所以我們實驗設計蜂蜜和益生菌作用繁殖三小時觀察其 OD 值生長濃度曲線並於三小時後接受酸性環境的考驗再於三小時後接受膽鹽的耐受試驗。

5. 益生菌於消化道中的挑戰：

參考 Glac Biotech Co 網站我們了解到，在益生菌進入人體腸胃道中會受到胃酸和膽鹽的考驗，因此這一次的實驗設計加入耐酸和耐膽鹽的實驗，以充分模擬益生菌對腸道環境的耐受性。另外，我們參考人間福報網站得知腸胃道環境的 pH 值，因此在做實驗時，我們將模擬胃酸的檸檬酸溶液的 pH 值設定在 2 左右。還把模擬膽汁的膽鹽進入小腸的環境 pH 值設定在 7-8 左右。

(二) 益生元與益生菌：

1. 益生元與益生菌的關係：

參考益生元大解密網站得知「益生元」是益生菌的食物，又稱為益菌元、益生質及益菌助生質，能幫助益生菌在腸道居住、生長、茁壯的物質。益生元在營養學上被歸類為水溶性膳食纖維，無法被人體消化及吸收，被腸道中的益菌利用後會排出體外。常見的益生元有果寡糖、菊糖、半乳寡糖等。益生元除了作為益生菌的食物來源供給，更能刺激其生長與活性，強化益生菌菌叢優生，提供更佳的保健效果。統整益生菌與益生元的關係，如表 2。

表 2 益生菌與益生元關係對照表

	益生菌	益生元
定義	一群對人體消化道有益的活性微生物，幫助改善人體內菌叢的平衡並有效調整體質。	益生菌的養分來源，不會被人體吸收，做為益生菌的食物促進腸道健康的物質。
功效	可直接提升腸道內的益菌數量，調整腸道菌叢平衡及有效調整體質。	無法被人體直接吸收，補充後可以直接被益菌利用。
來源	發酵食物、益生菌保健食品。	含有膳食纖維或寡糖(低聚糖)的食物、益生元保健食品。
常見種類	乳酸桿菌、雙歧桿菌、比菲德氏菌	果寡糖、菊糖、半乳寡糖

2. 蜂蜜中的益生元：

農業知識入口網蜂蜜-蜜蜂主題館及蜂蜜保腸道健康網站中得知蜂蜜中富有天然的益生元來源，果寡糖和低聚果糖是蜂蜜中含量最高的益生元成分，其次是菊粉，蜂蜜中的益生元成分多樣化具有多重健康效益，這些益生元共同作用利於提升益生菌在腸道中的良好環境。

3. 不同蜜種之益生元組成：

研究報告《The Potential of Honey as a Prebiotic Food》中寫到：不同蜂蜜種類中益生元（果寡糖、其他低聚糖類和菊粉等）的組成會依不同蜂蜜的植物來源影響這些成分的比例和種類。這次實驗的蜂蜜挑選，我們從日常中較容易購得的蜂蜜種類中，並由文獻歸納出益生元

組成成分差異較大的三種蜂蜜

作為本實驗的蜜種，以驗證不同

蜜種對益生菌的生長促進可能

因益生元組成的不同而有差異。

表 3 為整理本實驗選擇的三個蜜種中益生元組成的佔比。

表 3 實驗蜜種之益生元組成分析表

成分	龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜
果寡糖	高	中	低
其他低聚寡醣	中	高	低
菊粉	極低	低	極低
應用	調節消化系統	抗氧化與益生元	抗菌與腸道健康

(三) 塗盤菌液序列稀釋倍數原理：

參考衛生福利部「食品微生物之檢驗方法」中建議觀察塗盤結果的菌落數在 25-250 之間，我們在做預實驗時，發現菌液稀釋 1000-10000 倍之間其塗盤後長出的菌落數較近於此區間。因此實驗的稀釋濃度可設定從稀釋 1000 倍開始塗盤看結果，如生長數量太多則再調整稀釋 10 倍觀測結果，最後我們取菌落生長數量在 25-250 之該組稀釋倍數的數據，同時也參照網站的方法採二重複以兩個平版之平均數來計數，算出其生菌數以單位 CFU/g 或 CFU/mL 表示。

(四) 細胞濃度測定儀 (OD₆₀₀ 測值的由來)：

參考「測量微生物實驗中的關鍵技術」，透過測量 600nm 波長處的吸光值來快速估算細菌濃度，了解細菌的生長曲線。實驗室藉由分光光度計進行 OD₆₀₀ 測量，能判讀細菌細胞濃度和生長階段。我們這次實驗使用「細胞濃度測定儀」是鎖定在投射 600nm 波長來測定細菌 OD 值之儀器，在測量前需先放入無菌的背景值溶液完成「歸零」後所測出溶液的吸光值即為 ΔOD_{600} 值。

(五) 蜂蜜成分特性與對腸道菌群潛在影響之比較

不同蜂蜜含多種多酚、有機酸與抗菌成分可能影響腸道菌群。參考碩士論文《蜂蜜化學組成與生物活性之研究》整理出表 4，比較蕎麥蜜、麥盧卡蜜與龍眼蜜成分及其對腸道微生態的影響。實驗之蕎麥蜜及龍眼蜜選自取得 HACCP 、ISO 9001、CNS 1305 標準之產品，麥蘆卡蜜為標有 UMF™10+ 經蜜蜂協會《UMF Honey Association》驗證之產品，實驗蜂蜜選擇具公信力的認證或標章且三種蜂蜜皆標示純度 100%，符合含水量低於 20% 、還原糖含量高於 60% 、無添加糖等特性。

表 4 蜂蜜成分特性與對腸道菌群潛在影響之比較

蜂蜜種類	來源植物	主要活性成分	抗菌特性
蕎麥蜜	蕎麥	多酚類、有機酸	有天然抗氧化物，可以幫助好菌（益生菌）生長，也有一點抑菌效果，但不會太強。
麥盧卡蜜	麥盧卡樹	甲基乙二醛、多酚類、有機酸	抗菌力非常強，能殺死很多壞菌，但也可能影響到好菌，使用時要注意濃度。
龍眼蜜	龍眼	葡萄糖氧化酶、多酚類、有機酸	抗菌力中，會產生少量殺菌物質，會影響部分益生菌，但影響不像麥盧卡蜜那麼大。

(六) 前人相關主題的研究：

表 5 前人研究與本研究之應用關係表

前人相關主題的研究	本研究的參考與應用
2024 年新北市中小學科學展覽會 飲「腸」的危機	參考：研究結果發現不同的飲品都會對益生菌的生長帶來抑制的作用。 應用：啟發我們延伸探索蜂蜜對腸道益生菌生長的影響
	參考：標準微生物實驗方法，觀察優酪乳乳酸菌的「生長力與抗酸性」。 應用： 1.參考標準微生物實驗方法 2.蜂蜜（含益生元）能否幫助益生菌通過胃酸的考驗。
2023 年臺灣國際科學展覽會 醃漬物中的乳酸菌對胃細胞的影響分析與探討作為食用益生菌之可能	參考：乳酸菌是否能存活並對胃細胞產生影響。 應用： 1.參考益生菌在膽鹽中存活率的實驗設計 2.啟發未來探究蜂蜜對腸道中壞菌的研究

貳、 研究設備及器材

一、 實驗設備及器材

表 6 實驗設備器材表

實驗設備			
高壓蒸氣滅菌釜	恆溫培養箱(37 度)	微生物操作櫃	細胞濃度測定儀
微量吸管	電子天平	相機	冰箱 (4 度 C)
pH 值測定儀	離心機	震盪混合器	電磁攪拌器
實驗器材			
塑膠培養皿	無菌培養試管	實驗用手套	50 mL 離心管
塑膠比色管	1.5 mL 微量離心	量筒	血清瓶
燒杯	封口膠帶(parafilm)	微量吸管尖	錐形瓶
實驗材料			
三號膽鹽	檸檬酸	洋菜粉	MRS 培養基

二、實驗菌種

表 7 實驗菌種表

益生菌種學名	A 菌 Lactobacillus acidophilus	C 菌 Lactobacillus casei	LGG 菌 Lactobacillus rhamnosus	植物乳桿菌 Lactobacillus plantarum
實驗代號	A	B	C	D

三、實驗蜜種

表 8 實驗蜜種表

龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜
		

參、 研究過程或方法

一、研究方法

本研究設計四個實驗來探究蜂蜜種類及濃度對益生菌種生長的影響：

探究不同蜜種對不同益生菌種繁殖的影響

實驗 1-1 蜜種對菌種的短期影響：

接種後測量 0–3 小時 OD₆₀₀ 值，並繪製出生長曲線觀察其生長。

實驗 1-2 蜜種對菌種的長期影響：

接種 3 小時後塗盤，恆溫培養 48 小時後觀察菌落生長數量。

探究不同蜂蜜濃度對益生菌繁殖的影響

實驗 2 蜂蜜濃度對菌種繁殖的影響：

接種不同菌液至不同濃度的蜂蜜(生長最佳的蜂蜜種類)，3 小時後測量菌液的 OD₆₀₀ 值。

實驗 3-1 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸前的繁殖：

挑選繁殖數量最多的益生菌種，在酸性測試前塗盤 48 小時後計算菌落數。

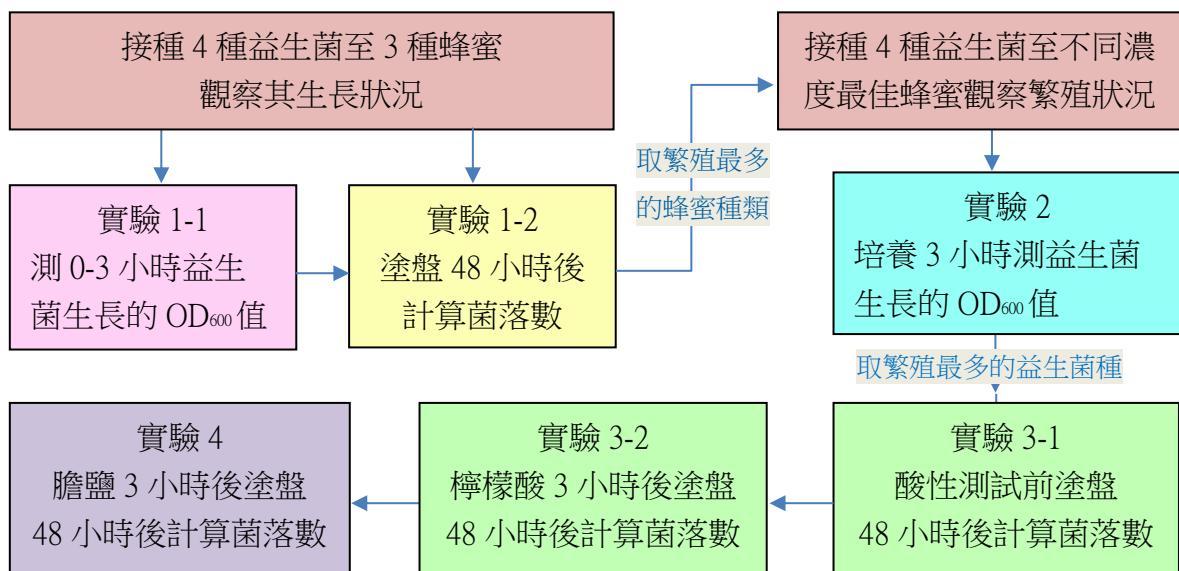
實驗 3-2 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸後的繁殖：

挑選繁殖數量最多的益生菌種，在檸檬酸下生長 3 小時後塗盤 48 小時後計算菌落數。

實驗 4 蜂蜜濃度對益生菌抗膽汁後的繁殖：

挑選繁殖數量最多的益生菌種，在膽鹽下生長 3 小時後塗盤 48 小時後計算菌落數。

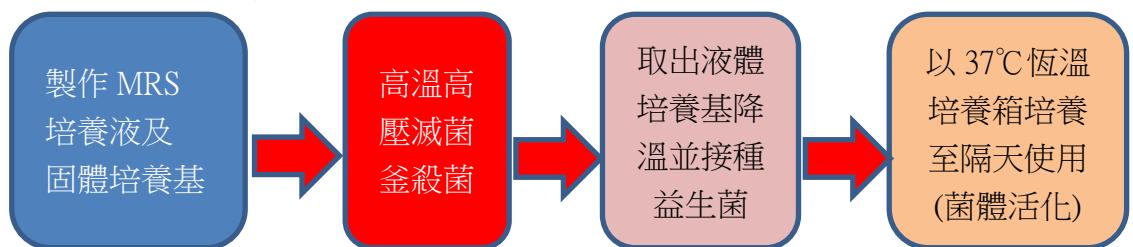
圖 2 研究方法流程圖



二、實驗步驟

(一) 實驗前一日準備

圖 3 實驗前一日準備流程圖



1. 製作實驗用的 MRS 固體培養基：

- (1) 依說明書比例，55g/L 秤量 27.5g 培養基粉末放入錐形瓶中(圖 4)
- (2) 依說明書比例 15g/L，秤量 7.5g 洋菜粉再放入瓶中，加入 500 mL 的水
- (3) 用鋁箔紙封住瓶口，放入高壓蒸氣滅菌箱滅菌
- (4) 將消毒好的培養液取出降溫至 45°C (不燙手)
- (5) 在無菌操作櫃中將 MRS 培養基倒入塑膠培養皿中，輕微水平搖晃均勻
後靜置凝固(圖 4)

2. 製作實驗用的 MRS 液體培養液：

- (1) 依說明書比例 55g/L，秤量 55g 培養基粉末放入燒杯中
- (2) 加入 1000 mL 的水溶解後分裝入錐形瓶中，用鋁箔紙封住瓶口
- (3) 再配置 2 倍濃度的培養液，秤量 27.5g 培養基粉末加入 250 mL 錐形瓶中
- (4) 用鋁箔紙封住瓶口，一起放入高壓蒸氣滅菌箱滅菌(圖 5)
- (5) 將消毒好的 MRS 培養液體取出降至室溫(圖 5)

圖 4 製作 MRS 培養基照片



秤量重量



倒入塑膠培養皿

圖 5 製作 MRS 培養液照片



高壓蒸氣滅菌箱



MRS 培養液

3. 培養實驗用的四種益生菌溶液：

- (1) 在無菌操作台中將 A、C、LGG、

LP 四種益生菌粉末各取一勺粉末倒入 3 mL 的培養液中，共製作 4 種益生菌溶液。(圖 6)

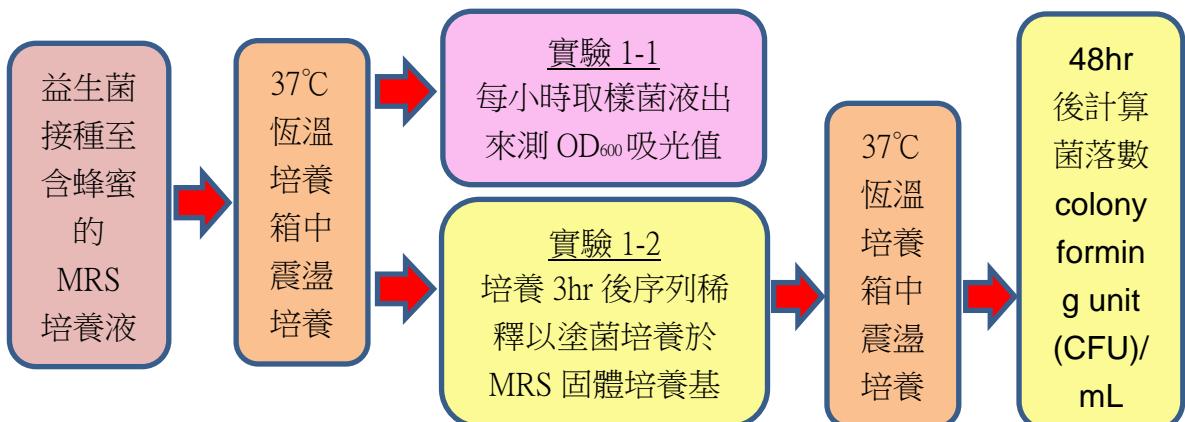
- (2) 放入 37°C 恒溫培養箱培養至隔天

圖 6 製作益生菌溶液照片



(二) 實驗 1-1 蜜種對菌種的短期影響

圖 7 實驗 1-1、1-2 流程圖



1. 配製含蜂蜜的 MRS 培養液：

(1) 在無菌操作櫃中配製含蜂蜜的 MRS 液體培養基，依照表 9 配方混合在 50 mL 離心管，共配製 3 種蜂蜜及不含蜂蜜的 MRS 培養液共 4 管。

表 9 含與不含蜂蜜之 MRS 液體配方表

溶液	含蜂蜜(3 種蜂蜜)	不含蜂蜜
I / II / III 蜂蜜	5 mL	--
2X MRS 液體培養基	25 mL	25 mL
無菌水	20 mL	25 mL
最終體積	50 mL	50 mL

(2) 依照表 9 的組別，先將配置好的含蜂蜜及不含蜂蜜的培養液共 4 管培養液各取 6 mL 加入到拋棄式的無菌塑膠試管中，同一種培養液需要倒入 4 支試管。(圖 8)

2. 調整 4 種菌液至相同的吸光值：

將事先培養好的益生菌菌液震盪搖晃均勻，取出 800 μ L 菌液用分光光度計測量 OD₆₀₀ 值，並將 4 種不同的益生菌菌液稀釋到相同的吸光值，例如都調整至 0.3，讓接種益生菌的菌數量能調整至相近。(圖 9)

圖 8 配製三種蜂蜜及不含蜜之 MRS 培養液照片



圖 9 測量 OD₆₀₀ 值照片



3. 接種 4 種菌液至 3 種蜂蜜及不含蜜的 MRS 培養液中：

在同一種益生菌不同蜂蜜組別的四支試管中接種(加入)0.3 mL 的益生菌菌液(圖 10)。因為我們只培養 3 小時，為了盡快將生長曲線提升至對數期(log phase)，因此接種益生菌與液體培養基的比率拉高至 1 : 20 (通常是 1:100 但因時間有限提高至 1:20)。再將 4 種益生菌依照表 10 的順序接種至 6 mL 的培養液中：

A : 菌株 Lactobacillus acidophilus (A 菌)

圖 10 接種菌液至培養液照片

B : 菌株 Lactobacillus asei (C 菌)

C : 菌株 Lactobacillus rhamnosus (LGG 菌)

D : 菌株 Lactobacillus plantarum (LP 植物乳桿菌)



表 10 接種 4 種菌液至 4 種 MRS 培養液編號表

試驗組別		3 種蜂蜜(不同種類)			
		I 龍眼蜜	II 蕎麥蜜	III 麥蘆卡蜜	IV (不含蜂蜜)
4 種 益生菌	A	A-I	A-II	A-III	A-IV
	B	B-I	B-II	B-III	B-IV
	C	C-I	C-II	C-III	C-IV
	D	D-I	D-II	D-III	D-IV

4. 測量各組接種後的菌液於 3 小時內的濃度改變：

(1) 將試管放入 37°C 培養箱培養，每隔 1 小時

取出 800 μL 菌液測量 OD₆₀₀ 值(圖 11)。需

要先放入無菌的背景值溶液將其數值扣除

完成歸零動作，再將測得的數據記下。

圖 11

每隔 1 小時測 OD 值照片



(三) 實驗 1-2 蜜種對菌種的長期影響

1. 將益生菌液進行序列稀釋：

(1) 先將事先培養好的益生菌菌液震盪搖晃均勻，取出 800 μL 在無菌操作

櫃中進行序列稀釋。菌液先震盪搖晃均勻後吸取 100 μL 益生菌液，加

入含 900 μL PBS 緩衝水溶液的 1.5 mL 離心管中，此為稀釋 10 倍。

(2) 再依此方法稀釋 4 次，稀釋倍數為 100,000

倍。(衛福部食品微生物檢驗方法建議菌落

數在 25-250 之間，預實驗我們從稀釋 1000

倍開始測長出菌落太多難以計算，調整至

稀釋 100,000 倍菌落數才在此區間)(圖 12)

圖 12 菌液序列稀釋照片



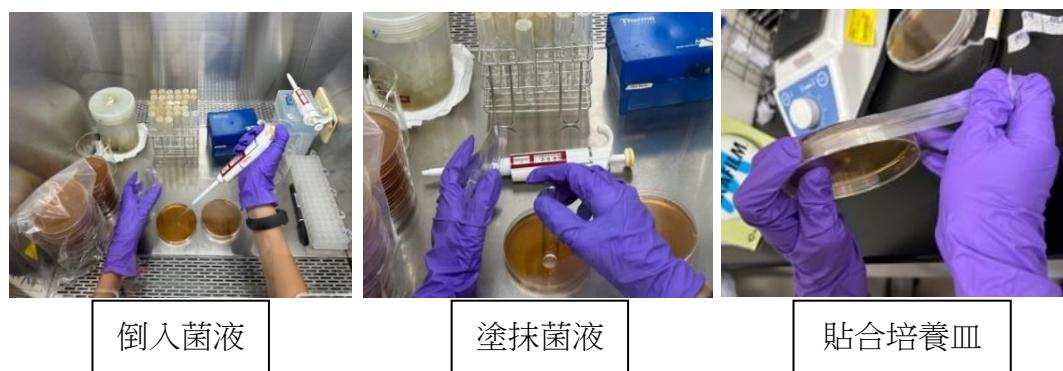
2. 將稀釋後的菌液塗抹於 MRS 固體培養基：

吸取 $200 \mu\text{L}$ 稀釋後益生菌液，均勻塗抹於 MRS 固體培養基上，放入 37°C 恒溫培養箱中培養 48 小時。每一組菌種對應蜂蜜的組合皆須塗抹兩個同樣的培養基，以減少實驗的誤差(二重複原則)。(圖 13)

3. 48 小時後觀察計數菌落數並記錄：

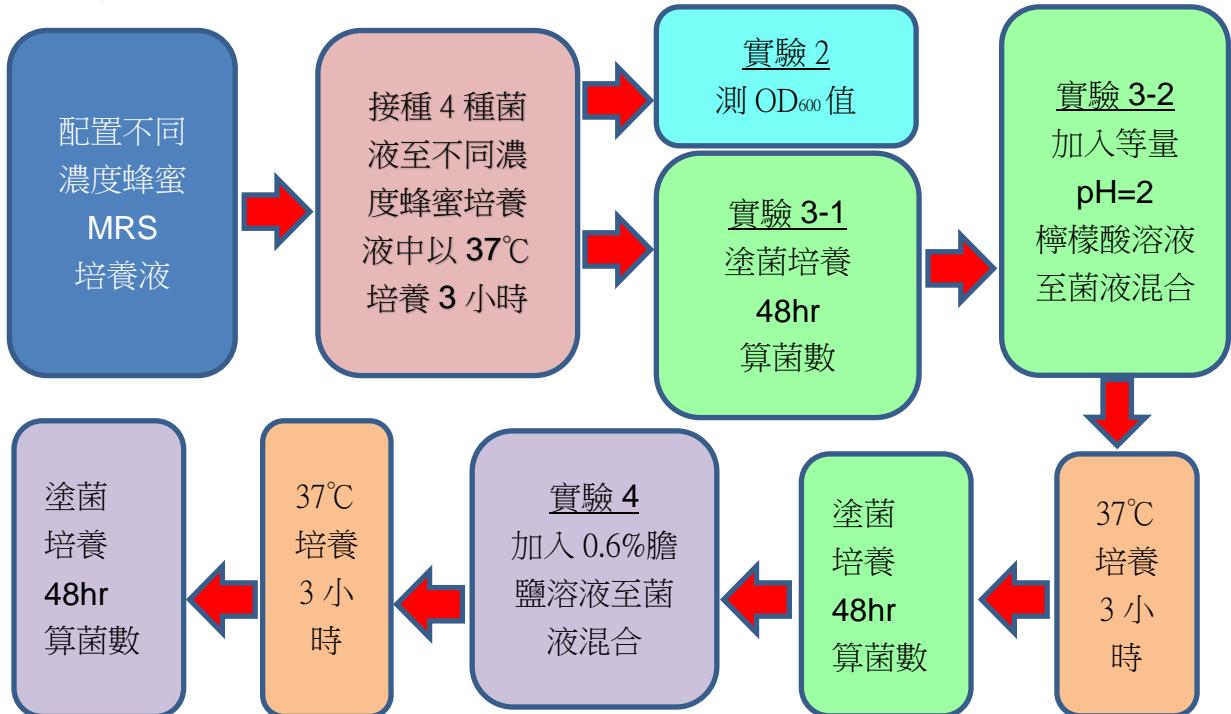
以計數器及手電筒計數培養基上的菌落數，並將兩組二重複的塗盤數據相加後取平均數，乘以稀釋倍數再乘 5 倍，計算出 colony forming unit (CFU)/mL。計數方式：在 25-300 個 CFU 之間算整個培養基的菌落數。

圖 13 菌液塗抹於 MRS 固體培養基照片



(四) 實驗 2 蜂蜜濃度對菌種繁殖的影響

圖 14 實驗 2、3、4 流程圖



1. 配製不同濃度的蜂蜜 MRS 培養液：

(1) 在無菌操作櫃中配製含蕎麥蜜的 MRS 培養液，依表 11 配方混合在 50 mL 離心管中(使用 50 mL x 2 支，共配 100 mL)。

表 11 不同濃度蜂蜜 MRS 培養液配方表

含蕎麥蜜的 MRS 培養液	含 5% 蕎麥蜜	含 10% 蕎麥蜜	含 20% 蕎麥蜜
蕎麥蜜	5 mL	10 mL	20 mL
2X MRS 培養液	50 mL	50 mL	50 mL
無菌水	45 mL	40 mL	30 mL
最終體積	100 mL	100 mL	100 mL

(2) 將配好的蕎麥蜜的 MRS 培養液，分裝 20 mL 到無菌的 50 mL 離心管中

2. 調整 4 種菌液至相同吸光值並接種：

(1) 將前一日培養的各組益生菌液個別測量 OD₆₀₀ 吸光值，稀釋四種菌液調整至 OD₆₀₀ 吸光值皆為 0.6 左右的接種用菌液。

(2) 於每一組蜂蜜培養液中各接種 2 mL 的益生菌菌液(1/10)，放入 37°C 恒溫培養箱培養 3 小時。

3. 接種 3 小時後測量各組的 OD 值：

圖 15 接種後測各組 OD 值照片

(1) 培養 3 小時後，取出測量各組的 OD₆₀₀ 吸光值並記錄之。(圖 15)

(2) 選擇蕎麥蜜搭配 OD₆₀₀ 吸光值最高(推測為生長最佳)的益生菌，接續進行後續的實驗
3、實驗 4。



(五) 實驗 3 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸的繁殖

圖 16 配製檸檬酸溶液照片

1. 配製 pH=2.0 的檸檬酸溶液：

為了模擬胃酸環境，依下表配方配置檸檬酸溶液並測得 pH= 2.15 符合胃酸(圖 16)：



表 12 檸檬酸溶液配方表

溶液	檸檬酸	二次水	最終體積
秤量(g)	1.9 g	90 mL	100 mL

2. 實驗 3-1 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸前的繁殖—

酸性考驗前第一次塗盤(培養 3 小時後)：

將實驗 2 培養 3 小時後的 LP 植物乳桿菌液，取出 $100 \mu\text{L}$ 菌液稀釋 $100,000 (10^5)$ 倍後塗菌在 MRS 培養基上(標示 3 hours)，培養 2 天後觀察菌落數。

3. 實驗 3-2 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸後的繁殖—

酸性考驗後第二次塗盤(培養 6 小時後)：

- (1) 將實驗 2 培養 3 小時後的 LP 植物乳桿菌液，取出 10 mL 到 50 mL 離心管中，再加入 10 mL 的檸檬酸緩衝溶液並混合均勻，放入 37°C 恒溫培養箱培養 3 小時。
- (2) 酸性環境培養 3 小時後，取出 $100 \mu\text{L}$ 菌液稀釋 $100,000 (10^4)$ 倍後，塗菌在 MRS 培養基上(平板上標示 6 hours)，培養 2 天後觀察菌落數。

(六) 實驗 4 蜂蜜濃度對益生菌抗膽汁後的繁殖

1. 配製 0.3% 膽鹽溶液：

為了模擬膽汁於小腸內的環境，依照表 13 配方配置 0.6% 膽鹽溶液，並測得 pH 值為 7.5 符合小腸環境：

表 13 膽鹽溶液配方表

溶液	3 號膽鹽	二次水	最終體積
秤量(g)	0.6 g	90 mL	100 mL

2. 鹼性考驗後第三次塗盤(培養 9 小時後)：

- (1) 將實驗 3-2 培養 6 小時後的 LP 植物乳桿菌液，取出 10 mL 到 50 mL 離心管中，再加入 10 mL 的膽鹽溶液混合為 0.3% 膽鹽溶液，放入 37°C 恒溫培養箱培養 3 小時。

(2) 膽鹽環境培養 3 小時後，取出 $100 \mu\text{L}$ 菌

液稀釋 1,000 倍，塗菌在培養基上(平板上標示 9hours)，培養 2 天後觀察菌落數。

計數方式：在 25-300 個 CFU 之間算整個培養基的菌落數。當菌落數太密難以計算時改以計算單位面積 $1 \times 1\text{cm}^2$ 的菌數，取 3-5 區算出單位面積平均菌數後，再乘上培養基的面積，可推算得到約略的總菌落數(圖 17)。

圖 17 觀察菌落數照片



肆、研究結果與討論

一、實驗 1-1 蜜種對菌種的短期影響

(一) 四種益生菌接種在不同蜂蜜培養液中培養之結果：

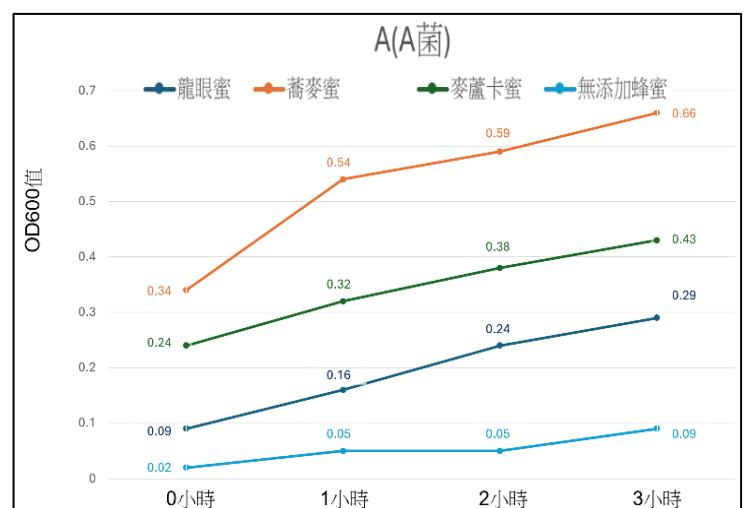
1. A (A 菌)：

A 菌在蕎麥蜜的 OD₆₀₀ 值最高，且隨時間生長的幅度也最大。麥蘆卡蜜和龍眼蜜的生長幅度曲線則差不多。無加蜂蜜的在 OD 值濃度測出最小生長的幅度也最小，甚至在 2 小時和 3 小時測得的數值一樣。

表 14 實驗 1-1 A 菌 OD 數值表

A(A菌)		添加蜂蜜種類			
OD600值		龍眼蜜	蕎麥蜜	麥蘆卡蜜	無添加蜂蜜
經過時間	0 小時	0.09	0.34	0.24	0.02
	1 小時	0.16	0.54	0.32	0.05
	2 小時	0.24	0.59	0.38	0.05
	3 小時	0.29	0.66	0.43	0.09

圖 18 實驗 1-1 A 菌生長曲線圖



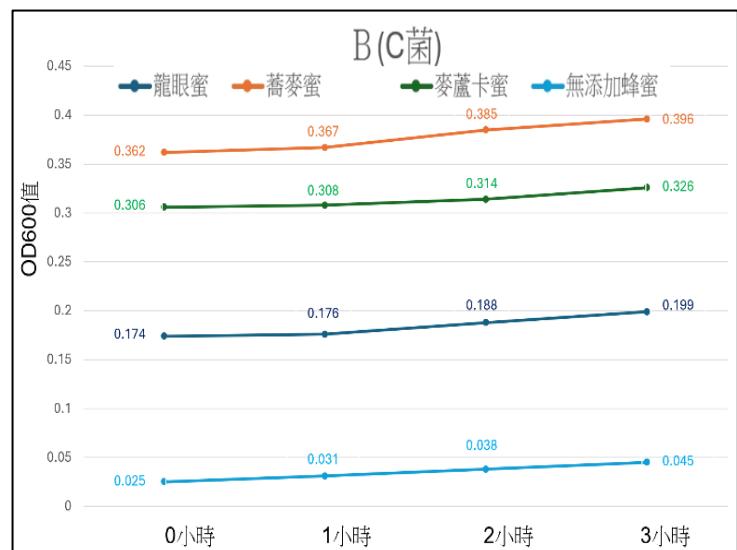
2. B (C 菌) :

C 菌的 OD 值由高至低依序為蕎麥蜜、麥蘆卡蜜、龍眼蜜、無蜂蜜。C 菌隨時間生長的幅度在四組菌種中無論哪支蜂蜜皆是上升幅度最少的，並且和無蜂蜜的對照組上升的數值相近表示三種蜂蜜對 C 菌促進生長效果皆不好。

表 15 實驗 1-1 B 菌 OD 數值表

B (C 菌)		添加蜂蜜種類			
OD600 值		龍眼蜜	蕎麥蜜	麥蘆卡蜜	無添加蜂蜜
經過時間	0 小時	0.174	0.362	0.306	0.025
	1 小時	0.176	0.367	0.308	0.031
	2 小時	0.188	0.385	0.314	0.038
	3 小時	0.199	0.396	0.326	0.045

圖 19 實驗 1-1 B 菌生長曲線圖



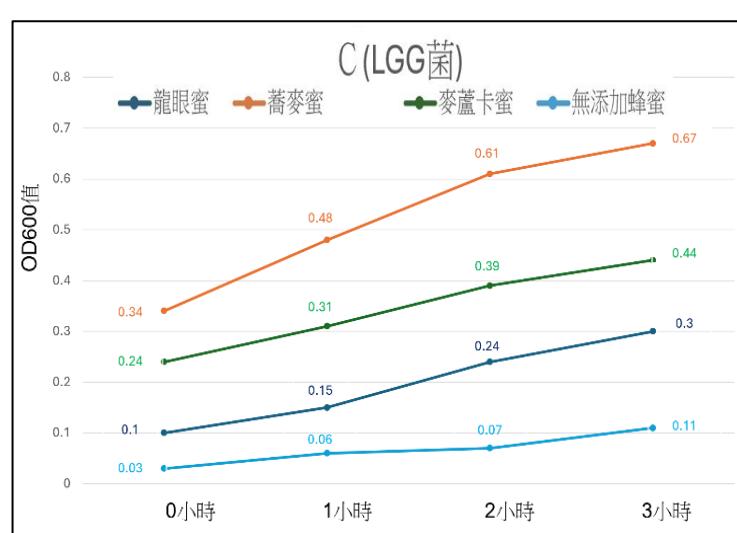
3. C (LGG 菌) :

LGG 的 OD 值由高至低依序為蕎麥蜜、麥蘆卡蜜、龍眼蜜、無蜂蜜。LGG 菌隨時間生長的幅度以蕎麥蜜最高，麥蘆卡蜜和龍眼蜜生長幅度曲線則差不多。無添加蜂蜜的在 OD 值濃度測出最小生長的幅度也最小，甚至在 2 小時和 3 小時測得的數值相近。

表 16 實驗 1-1 C 菌 OD 數值表

C (LGG 菌)		添加蜂蜜種類			
OD600 值		龍眼蜜	蕎麥蜜	麥蘆卡蜜	無添加蜂蜜
經過時間	0 小時	0.10	0.34	0.24	0.03
	1 小時	0.15	0.48	0.31	0.06
	2 小時	0.24	0.61	0.39	0.07
	3 小時	0.30	0.67	0.44	0.11

圖 20 實驗 1-1 C 菌生長曲線圖



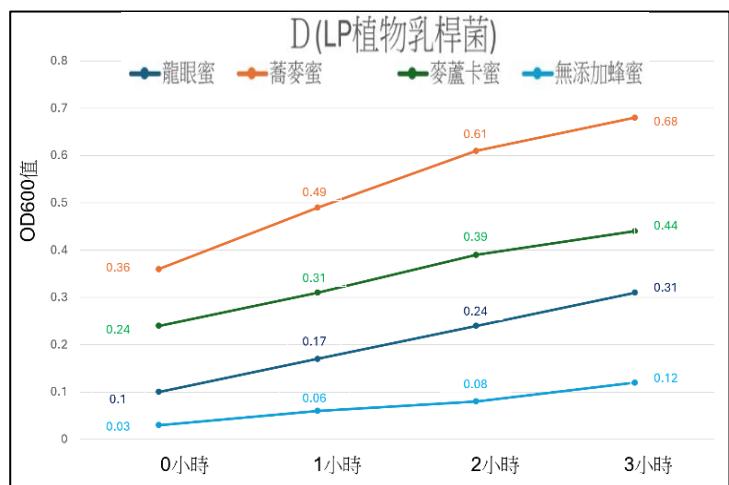
4.D(LP植物乳桿菌):

表 17 實驗 1-1 D 菌 OD 數值表

LP 植物乳桿菌的 OD 值由高至低依序為蕎麥蜜、麥蘆卡蜜、龍眼蜜、無蜂蜜。LP 植物乳桿菌隨時間生長的幅度以蕎麥蜜最高，麥蘆卡蜜和龍眼蜜的生長幅度曲線則差不多。無添加蜂蜜的在 OD 值濃度測出最小且隨時間下生長的幅度也是最小。

D(LP植物乳桿菌)		添加蜂蜜種類			
OD600值		龍眼蜜	蕎麥蜜	麥蘆卡蜜	無添加蜂蜜
經過時間	0 小時	0.10	0.36	0.24	0.03
	1 小時	0.17	0.49	0.31	0.06
	2 小時	0.24	0.61	0.39	0.08
	3 小時	0.31	0.68	0.44	0.12

圖 21 實驗 1-1 D 菌生長曲線圖

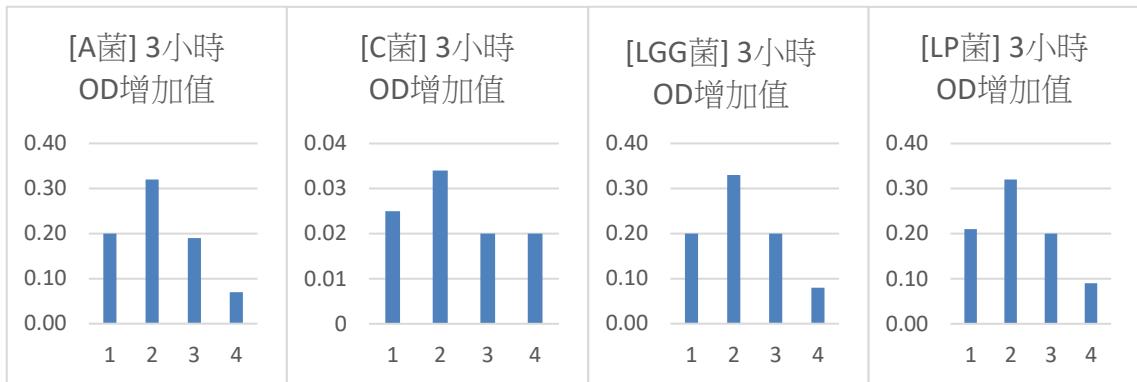


4 種菌在蕎麥蜜中測出的 OD 值都是最高的，有可能因為蕎麥蜜本身的濃度最高，也有可能是蕎麥蜜能讓益生菌在 3 個小時內快速繁殖。但我們觀察生長曲線時，發現除了 C 菌以外蕎麥蜜在其他 3 種菌種中的生長幅度變化都是最大的，表示蕎麥蜜是 3 種蜂蜜對益生菌幫助最多的蜜種。研究結果也發現 C 菌是 4 種菌中唯一加入 3 種蜂蜜對它的繁殖都沒有幫助的菌種，同時發現龍眼蜜和麥蘆卡蜜在 4 種菌種中的生長幅度都是相近的，表現比蕎麥蜜較差一些。

(二) 實驗 1-1 蜜種對菌種的短期影響 小結：

在實驗 1-1 的數據分析中，除了畫出生長曲線外，我們進一步以四種菌接種到不同蜂蜜中 OD 值的「變化量」評估蜂蜜對菌種生長的幫助。以變化量：「三小時後的 OD 值 – O 小時的 OD 值」畫出四種菌液接種到不同蜂蜜的長條圖看出(圖 22)，蕎麥蜜（編號 2）在四個菌種中都是 OD 值增加最多的蜜種！

圖 22 四種菌液於四種蜂蜜組合 OD₆₀₀增長值比較圖



實驗 1-1 短期實驗的結果雖然看出短時間蜂蜜的添加對四種益生菌都有促進的效果，但因為 O D 值僅能代表液體實際的透光率，無法準確代表菌液的濃度，菌液的濃度實際上會受到該菌種本身的體積大小及死掉的菌數數量等因素影響，食物在消化系統的作用也需拉長時間來觀察，因此我們仍須以實驗 1-2 長期實驗塗盤的結果，以最終實際生長的菌落數來確認菌種實際的生長狀況。

二、實驗 1-2 蜜種對菌種的長期影響

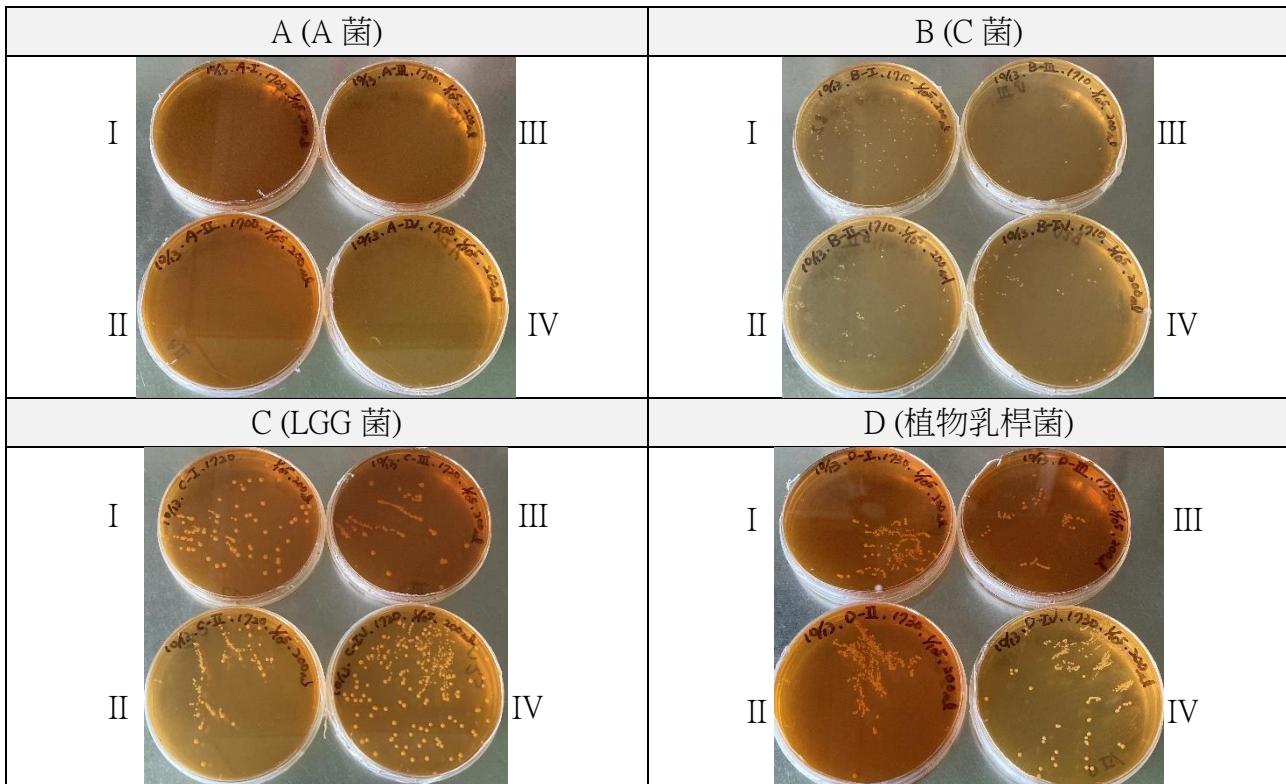
(一) 四種益生菌於四種培養液培養後塗盤觀察其結果：

16 種益生菌對應蜜種的組合，以稀釋 100,000 倍的菌液塗盤後 48 小時觀察記錄各組的菌落數，如圖 23 與表 18，取二重複結果的平均值繪製長條圖，分析比較各組的結果：

表 18 實驗 1-2 結果菌落數值表

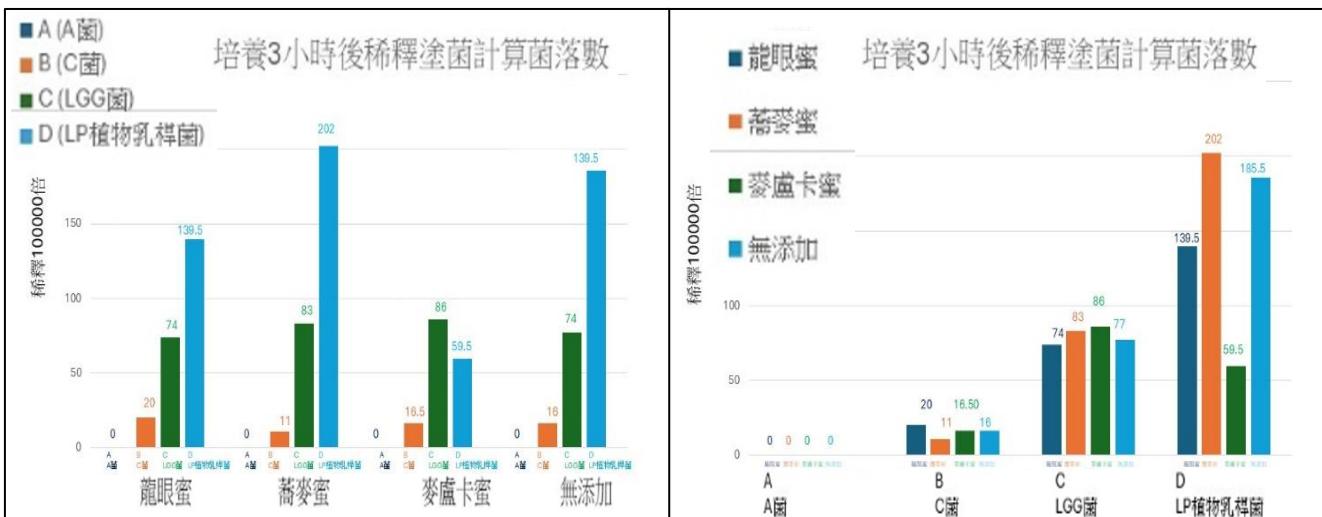
組別		A (A菌)				B (C菌)			
菌種		Lactobacillus acidophilus				Lactobacillus casei			
培養液種類		I	II	III	IV	I	II	III	IV
添加蜂蜜種類	龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜	無添加	龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜	無添加	
培養3小時後稀釋塗菌計算菌落數									
稀釋倍數	100000	0	0	0	0	22	10	17	13
	100000	0	0	0	0	18	12	16	19
平均值	0	0	0	0	20	11	16.5	16	
組別		C (LGG菌)				D (LP植物乳桿菌)			
菌種		Lactobacillus rhamnosus				Lactobacillus plantarum			
培養液種類		I	II	III	IV	I	II	III	IV
添加蜂蜜種類	龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜	無添加	龍眼蜜	蕎麥蜜	麥盧卡蜜	無添加	
培養3小時後稀釋塗菌計算菌落數									
稀釋倍數	100000	95	143	101	91	224	239	99	202
	100000	53	23	71	63	55	165	20	169
平均值	74	83	86	77	139.5	202	59.5	185.5	

圖 23 實驗 1-2 結果菌落照片



1. 比較不同種類蜂蜜中益生菌繁殖的狀況：

圖 24 不同蜂蜜中益生菌種繁殖數量比較分析圖



龍眼蜜、蕎麥蜜、無添加蜂蜜的這三組培養液菌落繁殖數量的結果排序是一樣的，

如圖 24 左：菌落數最多都是 LP 植物乳桿菌、第二名是 LGG、第三名是 C 菌、長得最差的皆為 A 菌（皆無生長），如圖 24 右。而麥蘆卡蜜中益生菌的排名與其他三組蜜種不同，麥蘆卡蜜中菌落數的排序依序是 LGG 最好、LP 菌次之、C 菌第三名、A 菌最差（無生長）。如圖 24 左。

分析 A 菌不長可能因 A 菌於稀釋倍數 100,000 倍時，在三種蜂蜜及無添加蜂蜜這四種培養液中皆難以生長，進一步的原因可能因 A 菌種的體積較大，所以在四種菌液的 OD 值相近的情況下，A 菌液的菌數每單位體積的含量較少，所以在相同的稀釋倍數下，原始的菌數因太少導致塗盤後難以長出菌落。

2. 比較四種益生菌於不同蜜種的繁殖狀況：

LP 植物乳桿菌在蕎麥蜜、龍眼蜜、無添加蜂蜜這三組中繁殖的菌落數都是最多的，其中 LP 植物乳桿菌在蕎麥蜜中的繁殖數量是最高、在不添加蜂蜜的組合中繁殖數量是第二名。LGG 菌在龍眼蜜中是繁殖最好的、在蕎麥蜜中菌數第二名、麥蘆卡蜜是第三名，不添加蜂蜜是最後一名。

C 菌繁殖數量最多蜜種是龍眼蜜，蕎麥蜜是最少的，而麥蘆卡蜜和不添加蜂蜜的繁殖數量差不多。

實驗結果發現不同菌在不同蜂蜜中繁殖最好的組合都大不同，例如 C 菌在龍眼蜜中長得最好，LGG 菌在麥蘆卡蜜中長得最好，LP 植物乳桿菌在蕎麥蜜中長得最好。這表示不同蜜種對應不同種類益生菌的繁殖作用皆不同，可能因為不統種類蜂蜜的益生元含量和蜂蜜成分都不一樣，因此對不同益生菌有不同的作用。

觀察 4 種益生菌在不同蜜種中的生長對應無添加蜂蜜的對照組，發現 4 個菌種除了 A 菌因為都沒有生長無法比較之外，其他 3 個菌種都有添加蜂蜜後促進生長和添加蜂蜜後生長較差的菌種，這表示蜂蜜的添加不見得對所有的菌種都有幫助，須找到適合該菌種的蜂蜜，才能有效幫助該菌種繁殖。

最後在所有組合當中發現 LP 植物乳桿菌在蕎麥蜜中的繁殖數量是最高的，對應此菌種在沒加蜂蜜的情況下繁殖數量也高(第 2 名)，這表示 LP 植物乳桿菌在我們設定的恆溫培養環境下本身的繁殖力是最好的，除此之外蕎麥蜜的添加對此菌種的繁殖更有顯著的幫助。

(二) 實驗 1-2 蜜種對菌種的長期影響 小結：

實驗 1-2 長期實驗結果發現不同蜜種對不同益生菌種的促進效果皆有不同，如

蕎麥蜜是對植物乳桿菌的繁殖最有幫助的蜜種、龍眼蜜是對 C 菌、麥蘆卡蜜對 LGG 的繁殖最有幫助。在實驗 1-1、1-2 我們選擇的三種蜂蜜是市售常見的蜂蜜，依據文獻探討發現三個蜜種中益生元的組成有所不同，如龍眼蜜中的果寡糖較高，蕎麥蜜除了果寡糖及其他低聚糖類含量較高外，也含有較多的菊粉益生元，而麥蘆卡蜜則為益生元相較含量較少的蜜種，因此我們從實驗 1-2 的結果推測有可能是因為不同蜜種的益生元組成不同而對益生菌的促進生長作用不同導致。

(三) 實驗 1 結果討論

實驗 1-1 及 1-2 的結果發現，蕎麥蜜在短期實驗中不論在哪一種益生菌中都是濃度最高且上升趨勢最高的蜜種，並且蕎麥蜜搭配植物乳桿菌這組的繁殖菌落數也是最多的，所以蕎麥蜜是我們這次選擇的三種蜂蜜中益生菌生長最好的蜂蜜。分析蕎麥蜜是我們選擇的蜜種中益生元組成果寡糖及其他低聚糖類及菊粉等益生元含量最高的菌種，因此間接推論可能蜂蜜中這類的益生元對於益生菌尤其對植物乳桿菌的生長促進最有幫助的。

三、實驗 2 蜂蜜濃度對菌種繁殖的影響

(一) 稀釋接種用菌液至 $OD_{600}=0.6$ 之配方如下表：

表 19 稀釋菌液至 $OD_{600}=0.6$ 配方表

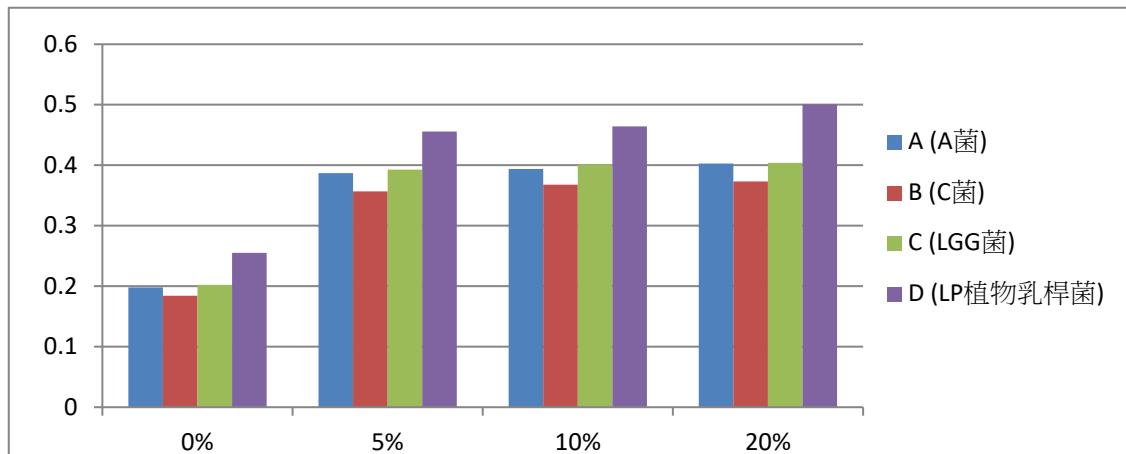
菌種	A (A 菌)	B (C 菌)	C (LGG 菌)	D (LP 植物乳桿菌)
菌液	250 μL	240 μL	400 μL	260 μL
生理食鹽水	750 μL	760 μL	600 μL	740 μL
最終稀釋 OD_{600}	0.604	0.613	0.610	0.603

(二) 接種菌液至不同濃度蕎麥蜜 3 小時後 OD_{600} 值：

表 20 不同濃度蕎麥蜜 3 小時後 OD_{600} 數值表

組別	A (A 菌)	B (C 菌)	C (LGG 菌)	D (LP 植物乳桿菌)
菌種	Lactobacillus acidophilus	Lactobacillus casei	Lactobacillus rhamnosus	Lactobacillus plantarum
蕎麥蜜含量	0%	0.198	0.184	0.202
	5%	0.387	0.357	0.393
	10%	0.394	0.368	0.401
	20%	0.403	0.373	0.404

圖 25 不同濃度蕎麥蜜 3 小時後 OD₆₀₀ 值長條圖



(三) 實驗 2 蜂蜜濃度對菌種繁殖的影響 小結：

在未添加蕎麥蜜的情況下 LP 菌的繁殖能力優於其他菌株，表示 LP 菌在我們設定的培養環境下能維持較好的繁殖能力。四種益生菌的繁殖能力均隨著蕎麥蜜濃度的增加出現穩定的成長趨勢，表示蕎麥蜜對益生菌的繁殖力是有幫助的。蕎麥蜜濃度增加至 20%，LP 菌的繁殖效果最為顯著。因文獻探討中得知蜂蜜的最佳飲用濃度一般建議在 10%-20% 間，所以本次實驗設定的濃度最高值為 20%，蕎麥蜜濃度分別為 5%、10%、20%，其中以濃度 20% 的 OD 值最佳。

四、實驗 3 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸的繁殖

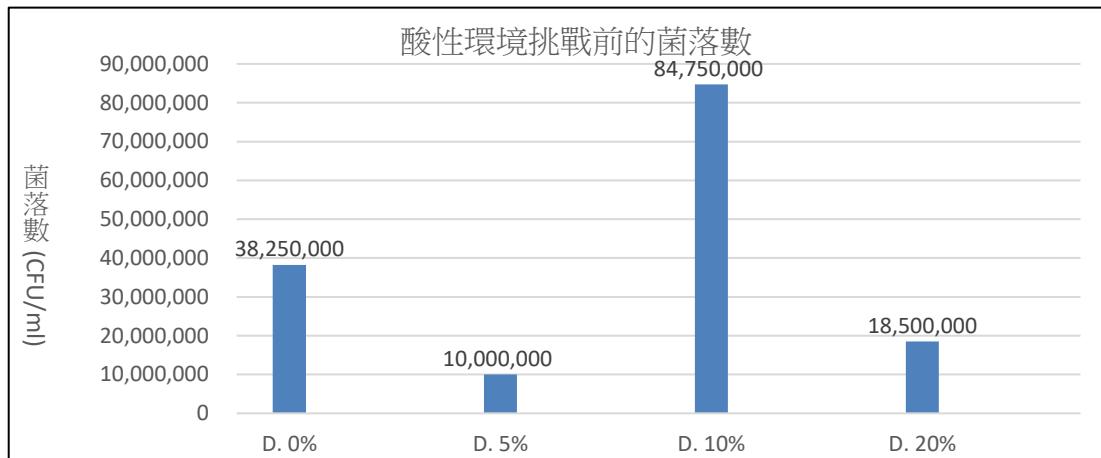
(一) 酸性挑戰前（培養 3 小時）塗盤觀察結果：

酸性環境挑戰前（培養 3 小時後）將菌液稀釋 10⁵ 倍，菌落數顯示蜂蜜濃度 10% 組表現最為優異，濃度增加至 20% 時菌落數反而下降，菌落數最低的是濃度 5%。

表 21 酸性挑戰前塗盤結果菌落數表

LP 植物	稀釋倍數	塗菌液體積	菌落數	總菌數	平均總菌數
蕎麥蜜 0%	100,000	0.2 ml	65	32,500,000	38,250,000
	100,000	0.2 ml	88	44,000,000	
蕎麥蜜 5%	100,000	0.2 ml	21	10,500,000	10,000,000
	100,000	0.2 ml	19	9,500,000	
蕎麥蜜 10%	100,000	0.2 ml	171	85,500,000	84,750,000
	100,000	0.2 ml	168	84,000,000	
蕎麥蜜 20%	100,000	0.2 ml	44	22,000,000	18,500,000
	100,000	0.2 ml	30	15,000,000	

圖 26 酸性挑戰前塗盤結果菌落數長條圖



(四) 酸性挑戰後（培養 6 小時）塗盤觀察結果：

酸性環境挑戰後（培養 $3+3=6$ 小時後）將菌液稀釋 10^4 倍，結果發現在 0% 和 5% 低濃度的情況下，LP 植物乳桿菌很難通過酸性環境的考驗，存活率均偏低。隨著蜂蜜濃度增加，菌數存活率也明顯增加，其中表現最優異的是蜂蜜濃度 20% 最高，菌落數到 7,975,000。表示蕎麥蜜在酸性的環境下對益生菌的生長提供一定的保護力。

表 22 酸性挑戰後塗盤結果菌落數表

LP 植物	稀釋倍數	塗菌液體積	菌落數	總菌數	平均總菌數
蕎麥蜜 0%	10,000	0.2 ml	9	450,000	550,000
	10,000	0.2 ml	13	650,000	
蕎麥蜜 5%	10,000	0.2 ml	30	1,500,000	2,025,000
	10,000	0.2 ml	51	2,550,000	
蕎麥蜜 10%	10,000	0.2 ml	89	4,450,000	3,675,000
	10,000	0.2 ml	58	2,900,000	
蕎麥蜜 20%	10,000	0.2 ml	167	8,350,000	7,975,000
	10,000	0.2 ml	152	7,600,000	

圖 27 酸性挑戰後塗盤結果菌落數長條圖

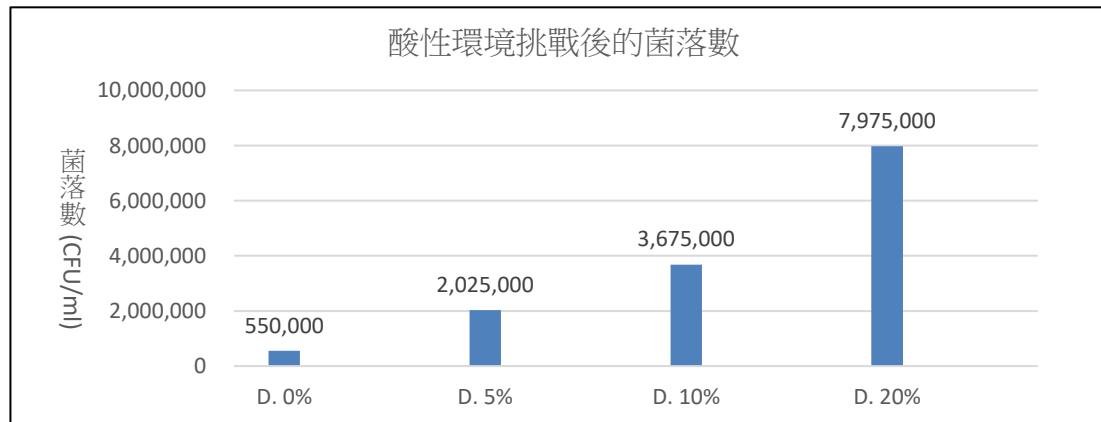
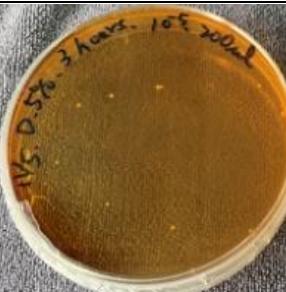
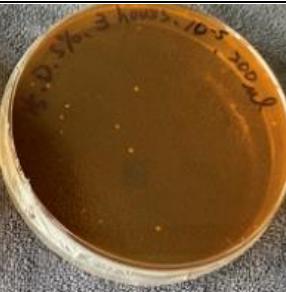


圖 28 酸性挑戰後塗盤結果菌落生長照片

酸性挑戰前菌落數(3 小時)	酸性挑戰後菌落數(6 小時)
0%	0%
	
5%	5%
	
10%	10%
	
20%	20%
	

實驗結果發現在酸性環境挑戰前蜂蜜濃度以 10% 蕎麥蜜對 LP 植物乳桿菌的生長效果最好，而接受酸性挑戰培養三小時後，則變為濃度 20% 的菌落數最多。由此可分析增加蕎麥蜜的濃度對 LP 植物乳桿菌對抗體內胃酸環境的耐受度確實有提升的作用。

(三) 實驗 3 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸的繁殖 小結：

在實驗 2 和實驗 3 中，我們用相近胃酸的檸檬酸做模擬，實驗後證實經過檸檬酸環境挑戰過後的益生菌，無論蜂蜜濃度大或小，菌組數量都比酸性考驗前大幅降低，表示益生菌確實會受到酸性環境的影響減少數量。

實驗結果同時也發現最高濃度 20%蜂蜜保留了相對最高比例的菌數，這表示在濃度 0-20%之間，蜂蜜濃度越高益生菌受到酸性環境的打擊越小，證實蜂蜜提升了益生菌對酸性環境的耐受度。

五、實驗 4 蜂蜜濃度對益生菌抗膽鹽後的繁殖

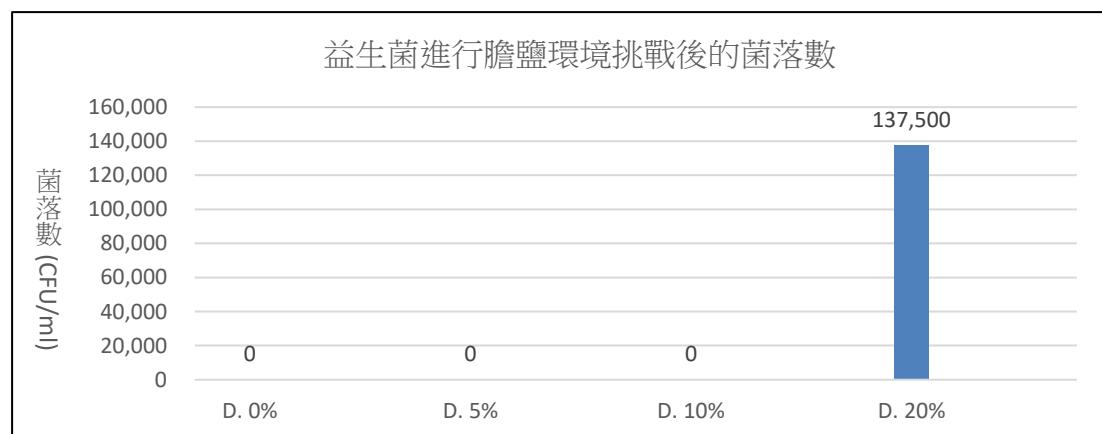
(一) 膽鹽挑戰後（培養 9 小時）塗盤觀察結果：

通過酸性環境挑戰 3 小時再接受膽鹽環境挑戰 3 小時（培養 $6+3=9$ 小時）後，將菌液稀釋 10^3 倍，結果顯示 0%、5%、10% 蕎麥蜜組在酸性及膽鹽環境挑戰後，存活率均為 0，只有 20% 濃度的這組經膽鹽挑戰後仍有益生菌存活。

表 23 膽鹽挑戰後塗盤結果菌落數表

LP 植物	稀釋倍數	塗菌液體積	菌落數	總菌數	平均總菌數
蕎麥蜜 0%	1,000	0.2 ml	0	0	0
	1,000	0.2 ml	0	0	
蕎麥蜜 5%	1,000	0.2 ml	0	0	0
	1,000	0.2 ml	0	0	
蕎麥蜜 10%	1,000	0.2 ml	0	0	0
	1,000	0.2 ml	0	0	
蕎麥蜜 20%	1,000	0.2 ml	36	180,000	137,500
	1,000	0.2 ml	19	95,000	

圖 29 膽鹽挑戰後塗盤結果菌落數長條圖



實驗結果顯示蕎麥蜜在濃度 0%、5%、10% 時皆無法通過膽鹽環境的挑戰，當蕎麥蜜濃度提高至 20% 時，才能通過膽鹽環境的考驗，表示隨著蕎麥蜜濃度的增加，對 LP 植物乳桿菌對抗體內膽鹽環境耐受度有提升的作用。

(二) 實驗 4 蜂蜜濃度對益生菌抗膽鹽後的繁殖 小結：

實驗結果中發現，菌落數在膽鹽的作用下，除了最高濃度 20% 的蜂蜜仍保留很少量的菌數之外，其他較低濃度蜂蜜及無蜂蜜的組別益生菌皆無法存活，驗證了 20% 濃度較高的蜂蜜對提升益生菌抗膽鹽環境的耐受度也是有幫助的。

伍、 結論

一、 在測試蜂蜜對益生菌生長變化的影響實驗中，從菌液的吸光值變化曲線我們證實蜂蜜對益生菌繁殖確實是有幫助。另外我們的實驗也證實了在 0-20% 濃度間，蜂蜜濃度最高 20% 時，益生菌生長的數量最多。由抗酸、抗膽鹽的實驗結果證實了提高蜂蜜濃度對提升益生菌對抗人體腸胃道環境的耐受性是有益的。媒體廣告常以「益生菌種對抗胃酸、膽汁的耐受性」作為該益生菌功效之指標，由我們實驗結果建議平時在食用益生菌時，可搭配蜂蜜一起食用，以提升益生菌的功效！目前市面上已有添加蜂蜜的優格產品，益生菌對腸道消化的好處很多，建議未來可開發更多種添加蜂蜜的益生菌產品如冰淇淋、糖果、果凍等，讓人們在食用益生菌產品的同時可更增加其效益。

二、 我們的實驗結果除了得知不同蜜種對應不同益生菌種的促進效果不同之外，也得知蕎麥蜜對於植物乳桿菌的提升有顯著的幫助，而我們在益生菌功效的文獻探討中也了解到不同益生菌對於改善人體的機能有所不同，比如植物乳桿菌和其他益生菌相比，較為特別的機能在於能舒壓及改善情緒。因此，由我們的實驗結果建議，如希望藉由攝取植物乳桿菌來舒壓提升心情，在食用益生菌的同時也可搭配蕎麥蜜一起食用以提升其效益。日後，我們也可進一步研發針對特定益生菌添加的特定蜂蜜食品，用以提供民眾想藉由食用特定益生菌來改善特定身體機能時，能獲得更好的效果。

陸、未來展望

(一) 關於蜂蜜與益生元的研究：

1、蜂蜜對壞菌的影響：

本研究證實蜂蜜對腸道益生菌有促進生長的作用，然而腸道中也同時存在如大腸桿菌之類對消化系統有害的壞菌，如要進一步驗證蜂蜜對人體消化系統的益處，可透過相同的實驗方法設計蜂蜜對人體腸道壞菌的實驗，如能證實蜂蜜對腸道主要壞菌有抑制生長的作用，也能進一步驗證蜂蜜對人體腸道的益處。

2、蜂蜜濃度的影響：

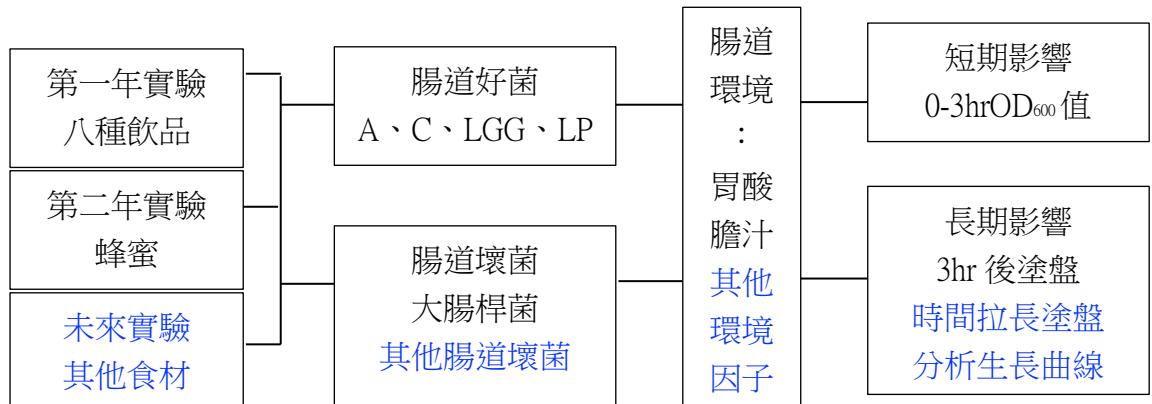
本次實驗設定的濃度最高值為 20%，後續研究可以再提高蜂蜜濃度做實驗，嘗試測出繁殖數量的最高值，找出對抗胃酸膽汁等腸道環境最有利的蜂蜜濃度。在這次的蜂蜜濃度的實驗中我們僅取蕎麥蜜來做實驗，未來也可再以其他種類的蜂蜜來做實驗，驗證是否不同蜜種下提高濃度仍可提供抗酸、抗鹼的耐受性。

3、益生元的研究：

未來的研究我們可以直接取得蜂蜜中所含的特定益生元來對益生菌的生長繁殖做實驗，驗證是否和這次實驗結果特定蜂蜜對特定益生菌生長的促進組合有符合的結果，以進一步驗證我們的推測。

(二) 關於食品對人體腸道好壞影響的研究：

圖 30 未來研究展望圖



- 1、富含益生元食材的比較: 可用其他富含益生元的天然食材如大蒜、洋蔥等實驗，對照本次蜂蜜的結果，驗證益生菌的繁殖和食材中益生元的多寡有無直接相關。
- 2、腸道中壞菌的研究: 第一年的研究僅挑選腸道中好、壞菌各一種為代表，今年我們選出腸道主要的幾種益生菌來代表腸道好菌群，未來我們也可以歸納出腸道的主要壞菌代表壞菌群做實驗，對於食材如能同時驗證它對腸道好菌群有益、對壞菌群有害，則可說明對腸道的影響是好的，這樣的推論會更為客觀。
- 3、腸道環境的模擬: 用來模擬腸道環境的因子除了檸檬酸、膽鹽，未來也可再加入腸道內的其他消化酵素等因子，更貼近腸道的環境，實驗的結果更具代表性。
- 4、長期實驗的生長研究: 針對長期實驗未來可將接種後作用的時間拉長後再進行塗盤，舉例可以每 6 小時或 12 小時為單位間隔，分別塗盤觀察結果，和短期實驗一樣繪製生長曲線能更深入地看出長期時間的影響。

柒、 參考文獻資料

一、網路參考資料來源：

- crassna (2023 年 8 月 3 日)。益生菌功用大公開！菌數菌株傻傻分不清？各年齡層益生菌推薦吃哪種？怎麼吃最好？ [線上文章]。達弘生物科技有限公司。取自
<https://www.crassna.com/blogs/%E5%81%A5%E5%BA%B7%E7%9F%A5%E8%AD%98/132847>
- Glac Biotech Co., Ltd. (n.d.)。耐胃酸、耐膽鹽測試 [線上文章]。取自
<https://www.glac.com.tw/data-108561>
- Sonia 營養師 (2023, 7 月 14 日)。7 大益生菌功效有哪些？益生菌食物、好處、挑選原則一次看。BIOJOY 百喬生醫。https://www.biojoy.com.tw/zh-TW/blogs/choose_product/85953
- Uho 編輯部 (2022 年 3 月 15 日)。吃宵夜怕不消化？看圖秒懂怎麼吃！ [線上文章]。（原始發表於 2017 年 8 月 5 日）。優活健康網。取自
<https://www.uho.com.tw/article-44407.html>
- 黃惠宇 (2006)。腸道系統守護神—乳酸菌。科學月刊, 37(2), 104 – 107。
<http://www.talab.org.tw/download/lactic%20acid%20bacteria.pdf>
- 林明瀅、王復德、王永衛 (2001)。不同培養基測定總菌落數的比較。院內感染控制雜誌, 11(5), 289 – 298。https://nics.org.tw/download_datax.php?id=517
- 劉季湄 (2014)。不同乳酸菌醣之發酵乳貯存期間對菌醣成長影響及消費者喜好度之研究 [博碩士論文，朝陽科技大學]。

<https://ir.lib.cyut.edu.tw/bitstream/310901800/27906/1/102CYUT0500004-001.pdf>
農業知識入口網。(2007年9月20日)。蜂蜜-蜜蜂主題館。取自
<https://reurl.cc/r38Wb1>

海山基因團隊(2022,3月25日)。蜂蜜保腸道健康 鎮咳抗炎助復元。HSK GeneTech。<https://hskgene.com/blogs/probiofirst/honey>

勢動科技(2017,9月5日)。認識分光光度計（一）原理與設計概念 | 勢動科技。勢動科技。<https://www.acttr.com/tw/tw-report/tw-report-technology/335-tw-tech-spectrophotometer-principle-concept.html>

微笑藥師(2023,3月25日)。益生元大解密！那些你不知道的益生元好處。微笑藥師。<https://www.smilerx.com.tw/the-probiotic-benefits-you-didnt-know/>

衛生福利部食品藥物管理署(2023,5月2日)。食品微生物之檢驗方法—生菌數之檢驗。衛生福利部食品藥物管理署。

<https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f638180331003805697>

Mina 保健食品顧問(2022,9月1日)。益生菌怎麼吃才有效？解析5大益生菌功效，腸胃健康沒煩惱！。健康元宇宙。
<https://healthmetaverse.com.tw/probiotics-benefit/>

陳昱喬(2022)。蜂蜜化學組成與生物活性之研究（碩士論文）。臺北醫學大學，生藥學研究所。<https://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gsweb.cgi/ccd=UrV1RN/record?r1=1&h1=0>

黃詩茵(2024年9月3日)。5大機能益生菌種比較，常見益生菌4個好處，原來還有這個功效 [線上文章]。卡蘿琳益生菌。取自
<https://www.carloine.com.tw/Article/Detail/74009?lang=zh-TW>

岑祥股份有限公司(2024年9月12日)。OD600 測量：微生物實驗中的關鍵技術 [PDF 技術報告]。取自
<https://www.thco.com.tw/files/OD600%E6%B8%AC%E9%87%8F%EF%BC%9A%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AF%A6%E9%A9%97%E4%B8%AD%E7%9A%84%E9%97%9C%E9%8D%B5%E6%8A%80%E8%A1%93.pdf>

因仔(2024年11月7日)。你身體裡 pH 值是多少？人間福報。取自
<https://www.merit-times.com.tw/NewsPage.aspx?unid=898178>

二、歷屆相關主題科展報告：

張鈺敏、盧怡恬(2003,8月29日)。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。國立臺灣科學教育館科展資訊管理系統。
<https://www.ntsec.edu.tw/article/FileAtt.ashx?id=2359>

許好瑄(2023,8月29日)。醃漬物中的乳酸菌對胃細胞的影響分析與探討作為食用益生菌之可能。國立臺灣科學教育館科展資訊管理系統。
<https://www.ntsec.edu.tw/article/FileAtt.ashx?id=16827>

2024年新北市中小學科學展覽會參展學生(2024)。飲「腸」的危機(未出版的科學展覽會報告)。新北市。

【評語】082903

1. 本研究探討不同蜂蜜來源的益生源成分對不同益生菌生長的影響，並模擬胃腸道環境探究不同蜂蜜濃度對益生菌耐受性的影響。研究主題明確，對於益生菌產品的研究成果具實用性的參考價值。
2. 建議可新增蜂蜜與益生菌的科學文獻探討，例如蜂蜜對益生菌（尤其是腸道有益菌）的促生長作用，並說明本研究與其他研究文獻的亮點差異。
3. 菌數生長試驗主要以培養 3 小時觀察其 OD 值變化，建議可觀察較長的時間已持續監測 OD 值和/或 CFU 變化，提供益生菌在蜂蜜環境中更完整的生長週期資訊。

作品海報

的好閨



壹

摘要

以蜂蜜對益生菌生長的影響為題，選擇龍眼蜜、蕎麥蜜、麥盧卡蜜為蜜種，並以A菌、C菌、LP植物乳桿菌、LGG菌為益生菌種，透過細胞濃度測定、塗盤培養基等方法估算菌種生長曲線、菌種菌落數，探討不同蜜種與益生菌種繁殖的影響，並模擬胃腸道環境探究蜂蜜濃度對益生菌繁殖的影響。

研究結果發現蜂蜜能促進益生菌生長，不同蜂蜜對不同益生菌的繁殖有差異。蜂蜜能提升益生菌對抗人體胃腸道中的胃酸、膽汁耐受性。從結果推論，食用益生菌時可搭配蜂蜜一起食用，並在挑選益生菌種改善身體機能時，可選擇對該益生菌繁殖有益的蜂蜜種類一同食用，以提升益生菌的功效。

貳

研究動機

去年科展中我們發現不同飲品對腸道好菌及壞菌有不同的影響，去年實驗結果八種飲品皆對腸道益生菌—LGG有抑制的作用。然而人體腸道益生菌種很多，需要更完善的實驗設計才能推導客觀結論，深入探索飲品對腸道菌種的影響。常聽聞飲用蜂蜜有幫助消化、促進排便等功效，今年我們專注於探討蜂蜜對於腸道益生菌繁殖的效用及不同蜜種對於不同益生菌種繁殖力的影響。

伍

研究方法

[探究不同蜜種對不同益生菌種繁殖的影響]

- 實驗1-1 蜜種對菌種的短期影響
- 實驗1-2 蜜種對菌種的長期影響

[探究不同蜂蜜濃度對益生菌繁殖的影響]

- 實驗2 蜂蜜濃度對菌種繁殖的影響
- 實驗3-1 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸前的繁殖
- 實驗3-2 蜂蜜濃度對益生菌抗胃酸後的繁殖
- 實驗4 蜂蜜濃度對益生菌抗膽汁後的繁殖

陸

實驗步驟

[實驗1-1步驟]

- 1.配製含蜂蜜的MRS培養液
- 2.調整四種菌液至相同吸光值
- 3.接種四種菌液至三種蜂蜜及不含蜜培養液
- 4.測量各組接種後菌液三小時內的濃度改變

[實驗1-2步驟]

- 1.將益生菌液進行序列稀釋
- 2.將稀釋後的菌液塗抹於MRS固體培養基
- 3.48小時候觀察計數菌落數並記錄

[實驗2步驟]

- 1.配置不同濃度的蜂蜜MRS培養液
- 2.調整四種菌液至相同的吸光值並接種
- 3.接種三小時後測量各組的OD值

[實驗3步驟]

- 1.配置pH=2.0的檸檬酸溶液
- 2.實驗3-1：酸性考驗前第一次塗盤（培養3小時後）
- 3.實驗3-2：酸性考驗後第二次塗盤（培養6小時後）

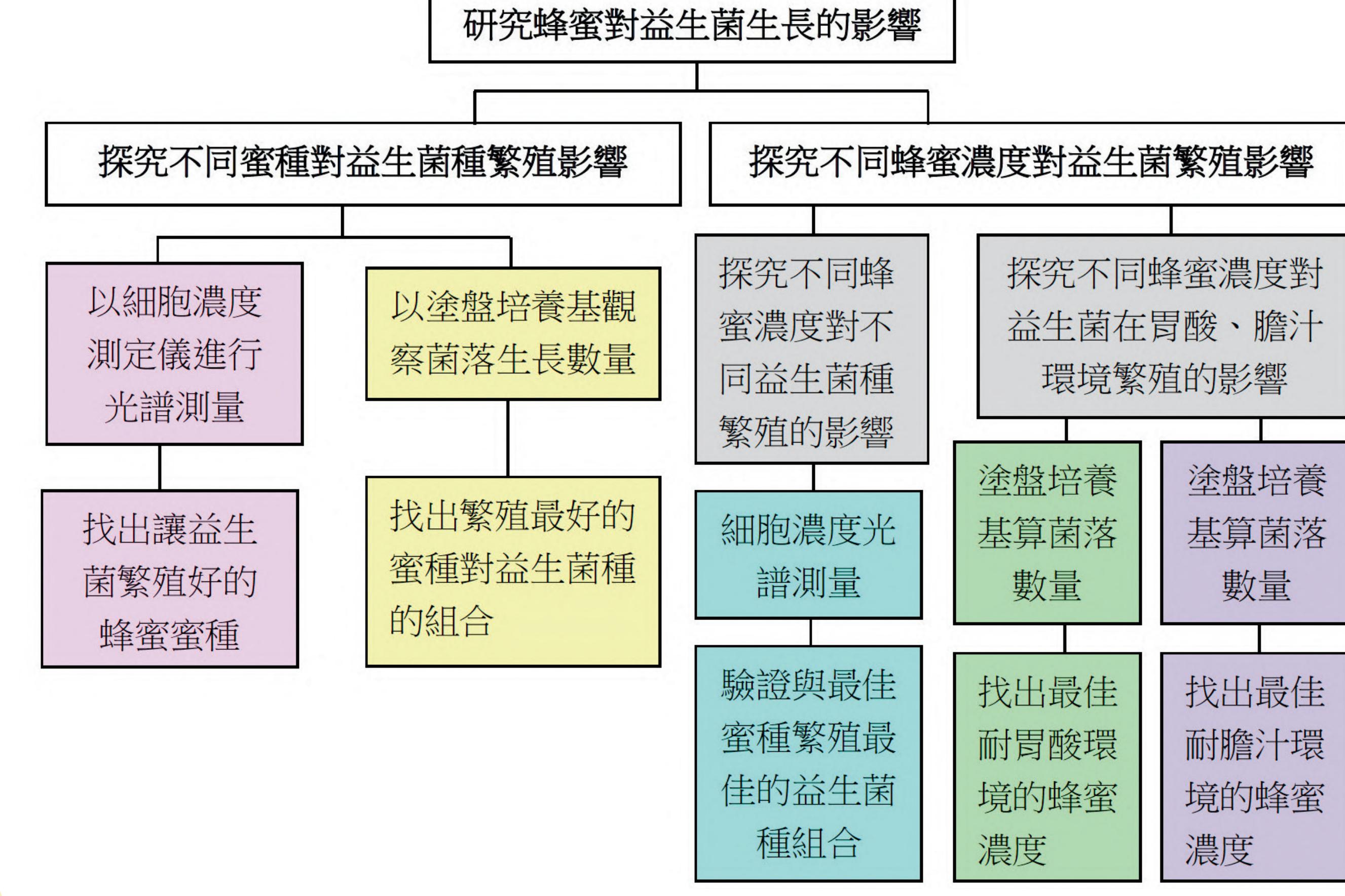
[實驗4步驟]

- 1.配製0.3%膽鹽溶液
- 2.鹼性考驗後第三次塗盤（培養9小時後）

參

研究目的

• 研究架構圖

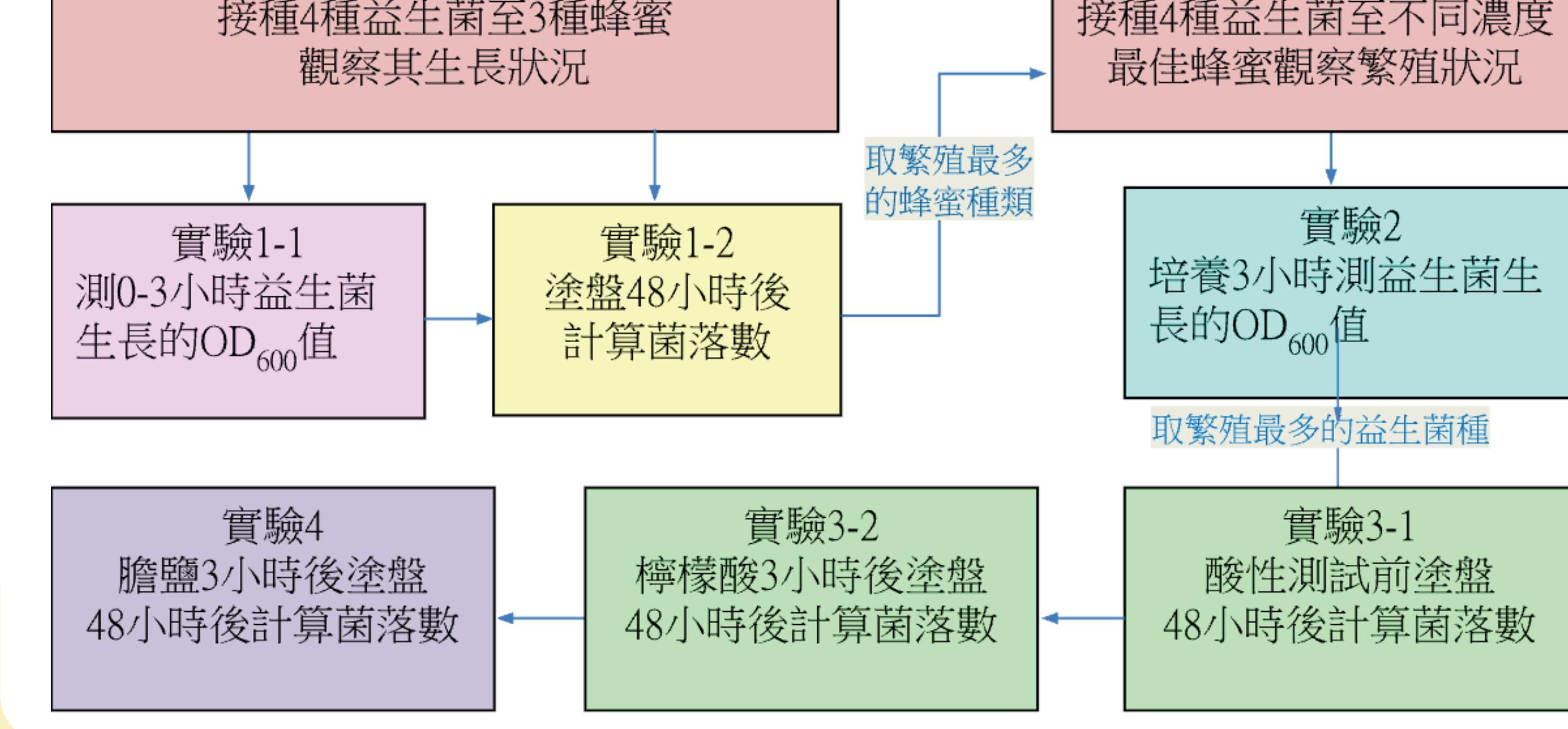


肆

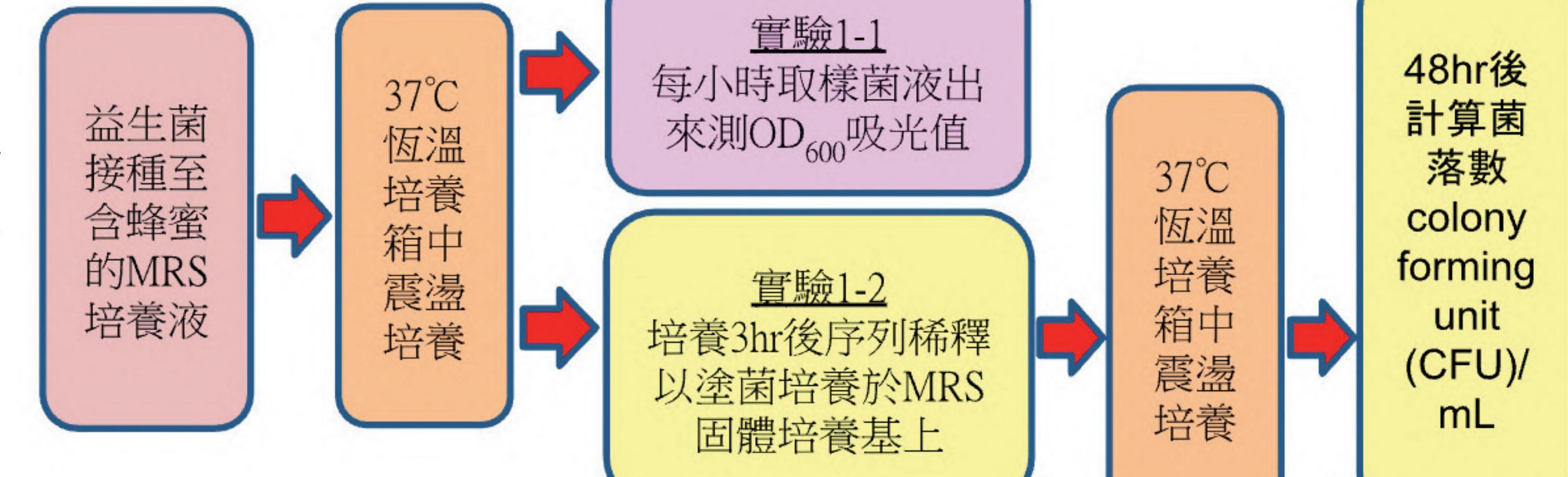
設備器材

設備	高壓蒸氣滅菌釜、恆溫培養箱、微生物操作櫃、細胞濃度測定儀、微量吸管、電子天平、離心機、相機、冰箱、pH值測定儀、震盪混合器、電磁攪拌器			
器材	塑膠培養皿、無菌培養試管、量筒、血清瓶、實驗用手套、50 mL 離心管、塑膠比色管、錐形瓶、1.5 mL 微量離心管、燒杯、封口膠帶(parafilm)、微量吸管尖			
材料	三號膽鹽、檸檬酸、洋菜粉、MRS 培養基龍眼蜜、蕎麥蜜、麥盧卡蜜			
益 生 菌 學 名	A 菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	C 菌 <i>Lactobacillus casei</i>	LGG 菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	植物乳桿菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>
代號	A	B	C	D
照片				

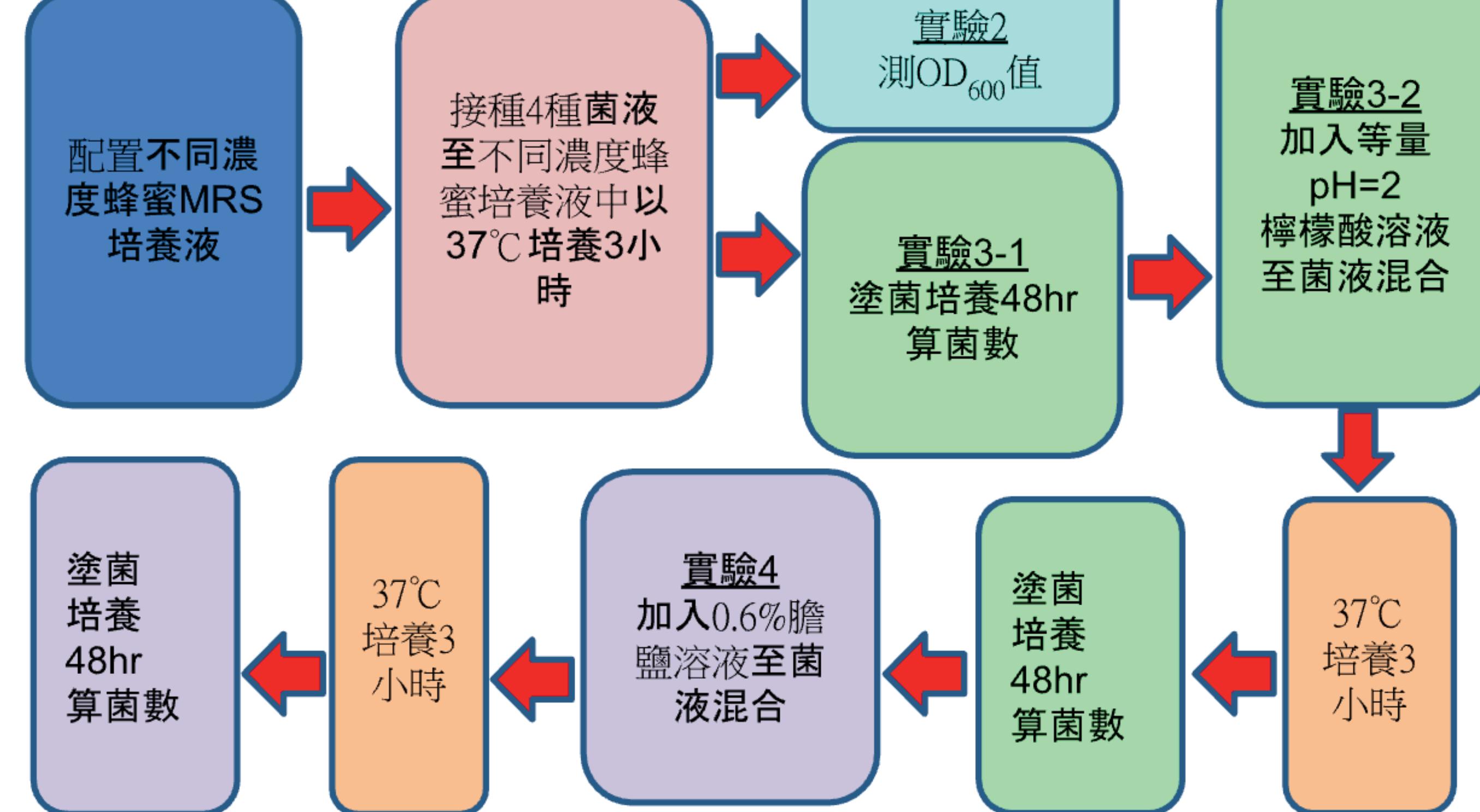
• 研究方法流程圖



• 實驗1-1、1-2流程圖



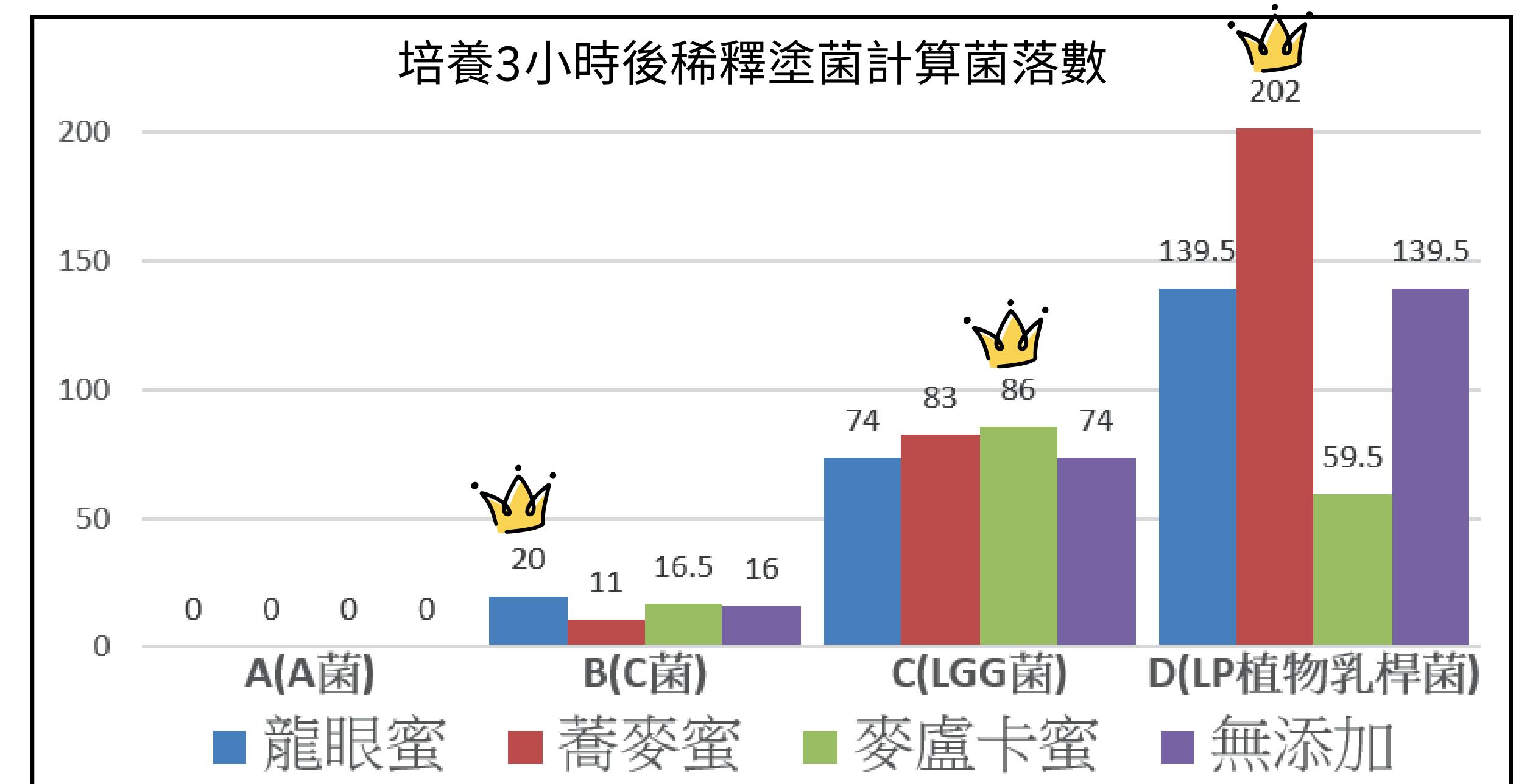
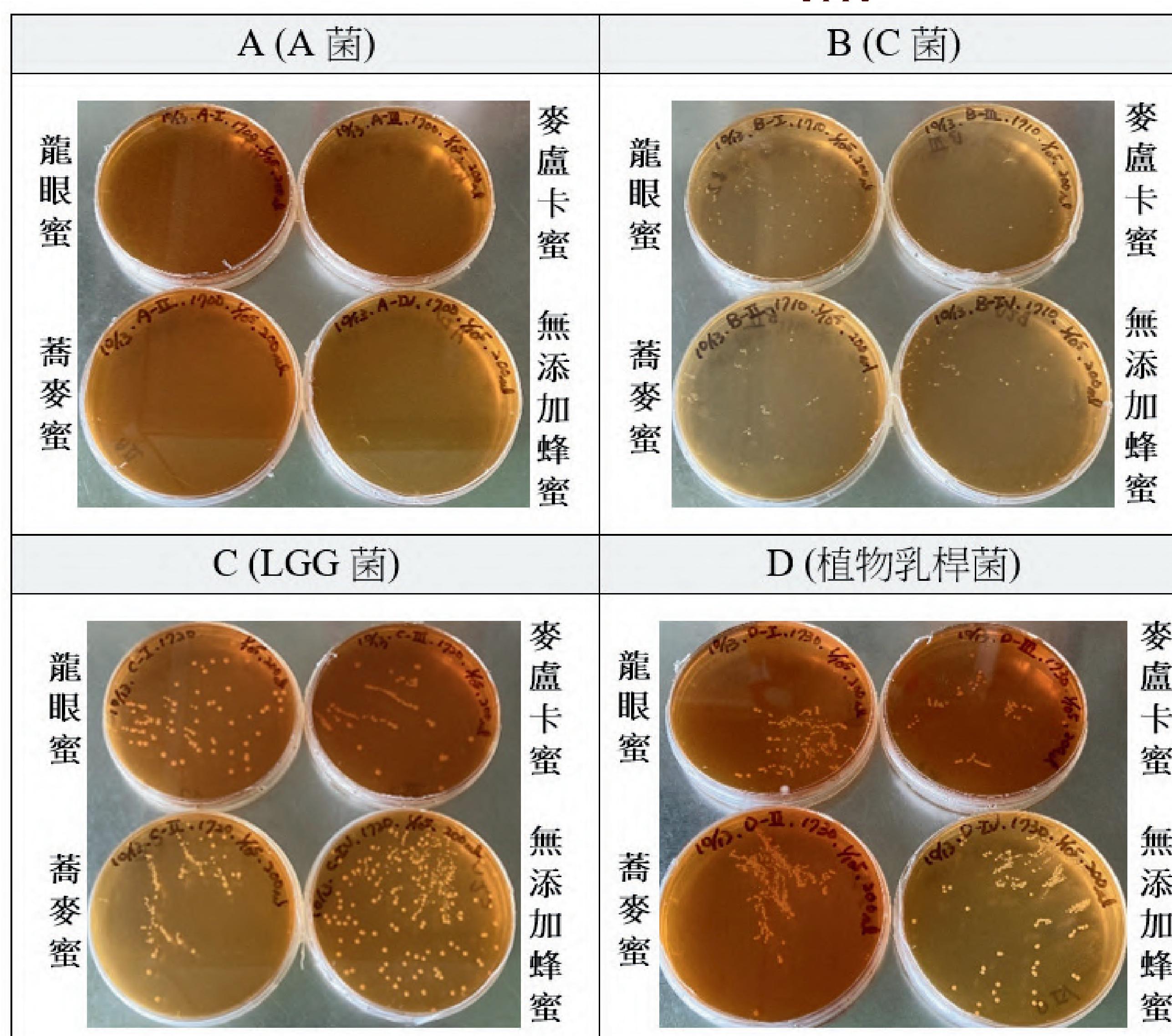
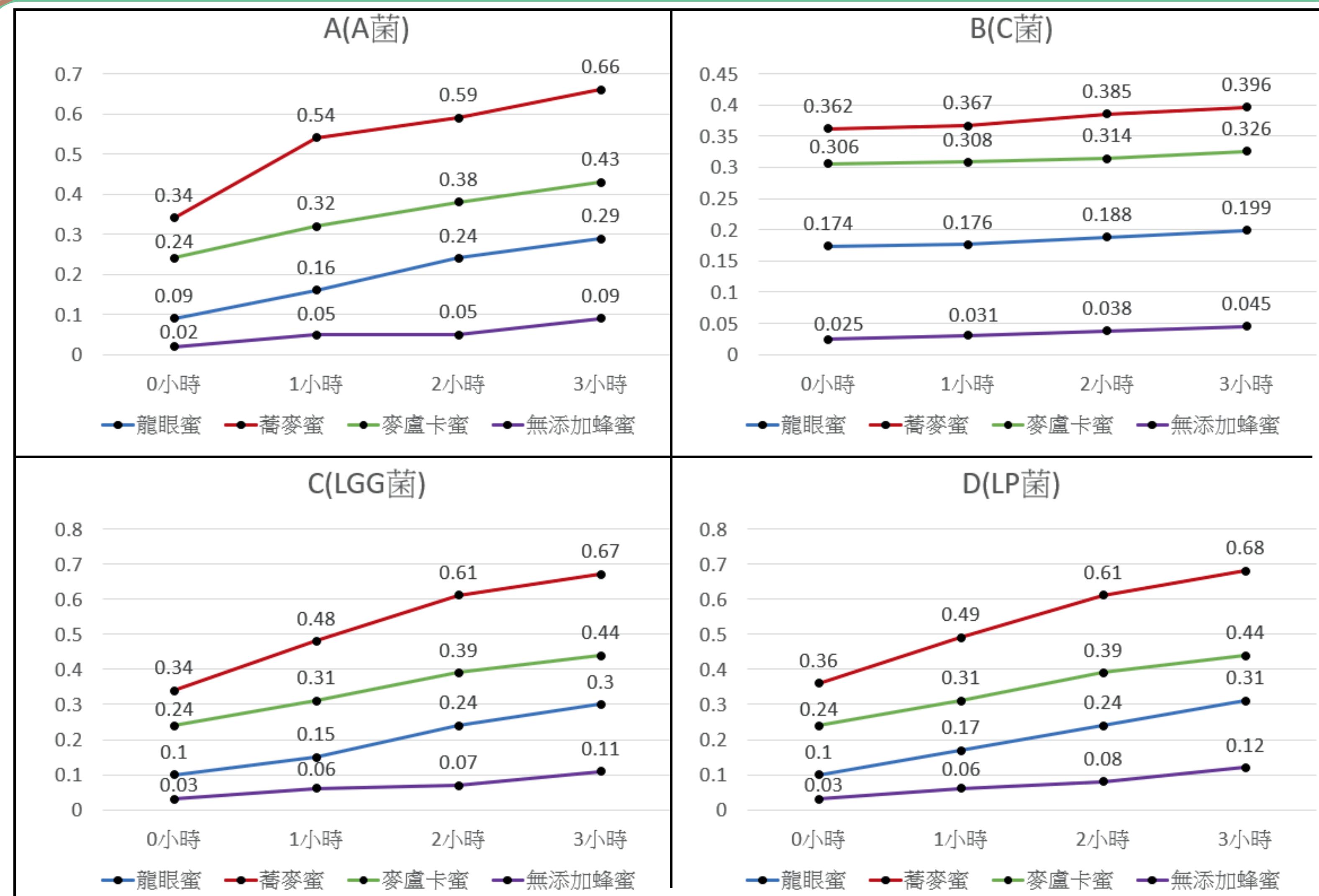
• 實驗2、3、4流程圖



實驗1研究結果

[實驗1-1小結]

4種菌在蕎麥蜜中測出的OD值都是最高的，有可能因為蕎麥蜜本身的濃度最高，也有可能是蕎麥蜜能讓益生菌在3個小時內快速繁殖。進一步分析生長曲線變化，發現蕎麥蜜的生長幅度變化都是最大的，表示蕎麥蜜是對益生菌幫助最多的蜜種。



[實驗1-2小結]

實驗結果發現不同蜜對不同菌的促進效果不同，如蕎麥蜜對植物乳桿菌、龍眼蜜對C菌、麥蘆卡蜜對LGG的繁殖最有幫助。依文獻探討發現三個蜜中益生元的組成都不同，如龍眼蜜中的果寡糖較高，蕎麥蜜除了果糖及其他低聚糖類含量外，也有較多的菊粉益生元，而麥蘆卡蜜的益生元含量較少，因此我們從實驗結果推測有可能因不同蜜種益生元組成不同而對菌種的促進生長作用不同。

[實驗1結論]

實驗1-1及1-2的結果發現，蕎麥蜜在OD值實驗的菌種中是上升曲線變化最高的蜜種，在塗盤實驗中蕎麥蜜對植物乳桿菌這組的繁殖菌落數也最多，所以蕎麥蜜是三種蜂蜜中益生菌生長最好的蜂蜜。進一步分析蕎麥蜜是三種蜜種中益生元組成果寡糖及其他低聚糖類及菊粉等益生元含量最高的菌種，因此間接推論可能蜂蜜中這類的益生元對於益生菌尤其對植物乳桿菌的生長促進最有幫助。

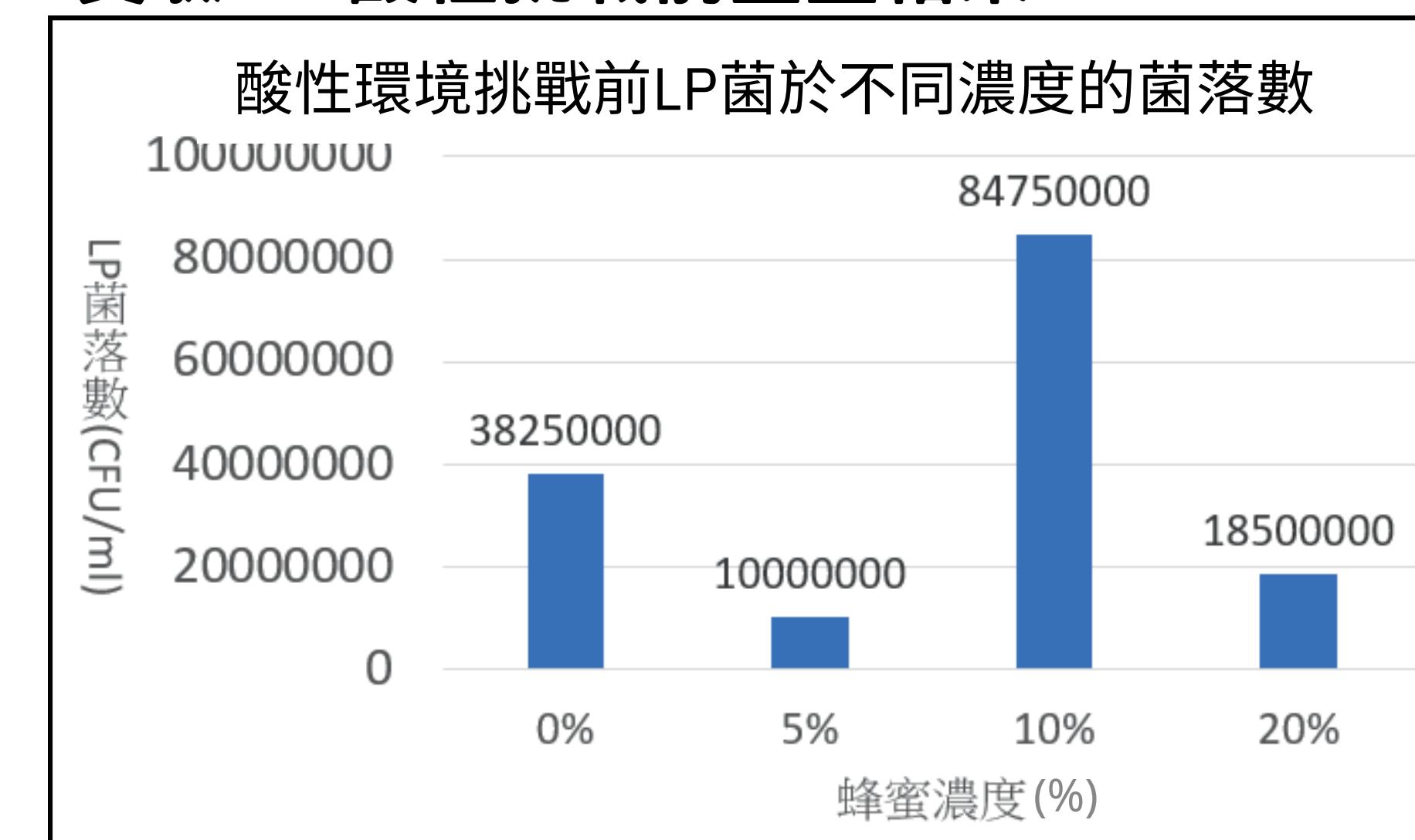
實驗2研究結果

[實驗2結論]

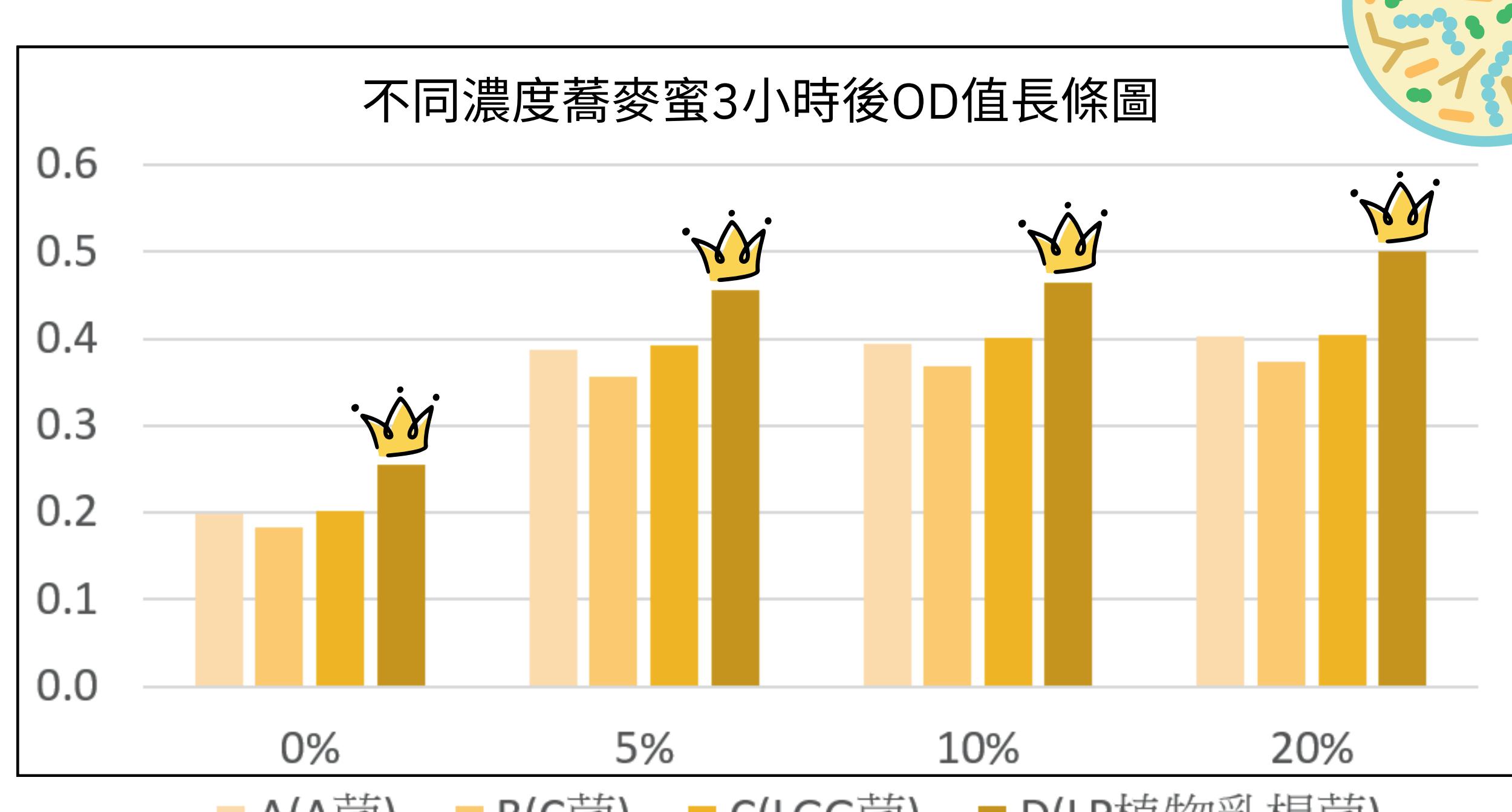
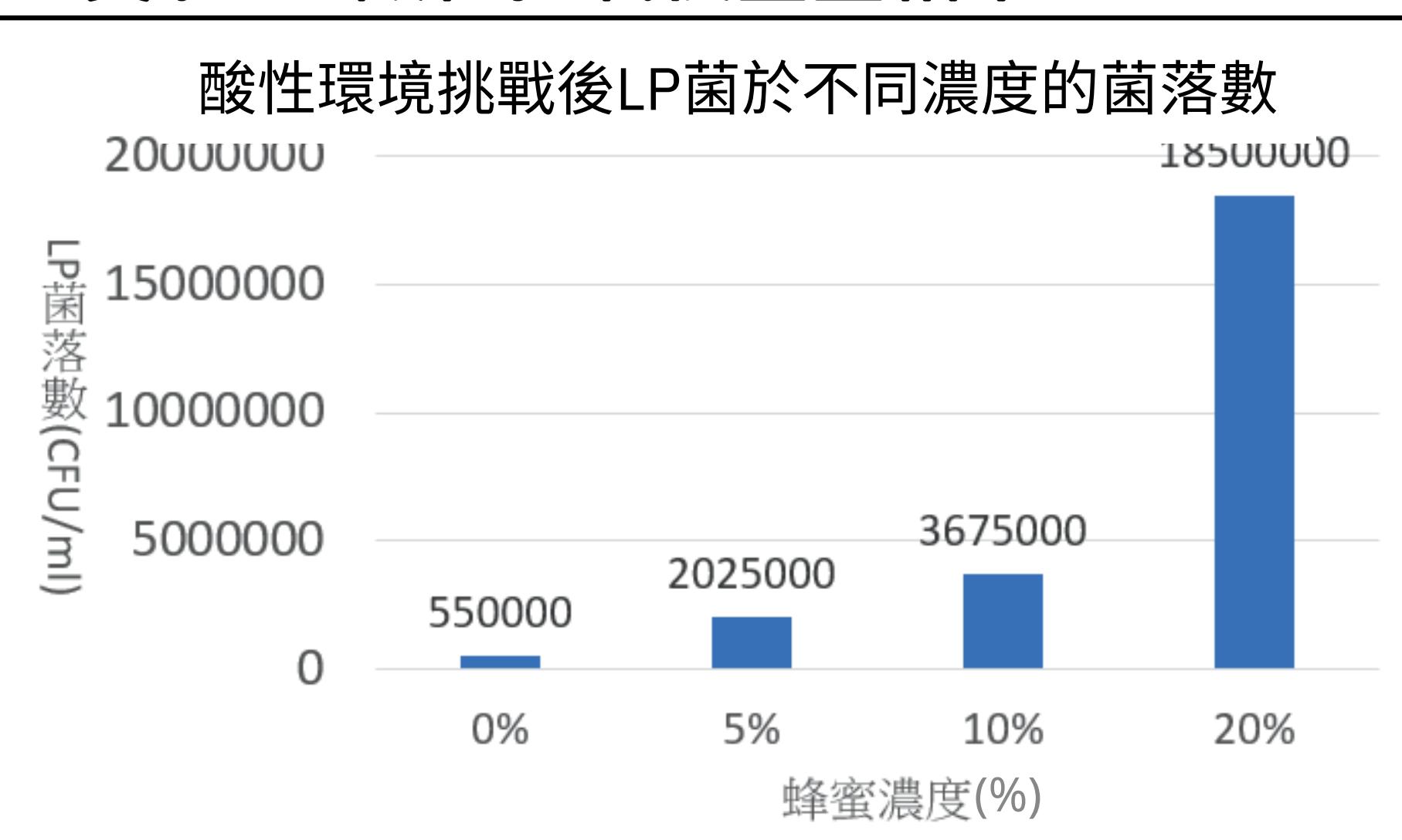
未添加蕎麥蜜時，LP菌繁殖力優於其他菌株。隨蕎麥蜜濃度提高，四種益生菌的繁殖力呈穩定成長趨勢，由此顯示蕎麥蜜有助於益生菌種的繁殖。蕎麥蜜濃度提高至20%時，在四種菌中，以LP菌的繁殖效果最為顯著。

實驗3研究結果

• 實驗3-1酸性挑戰前塗盤結果：

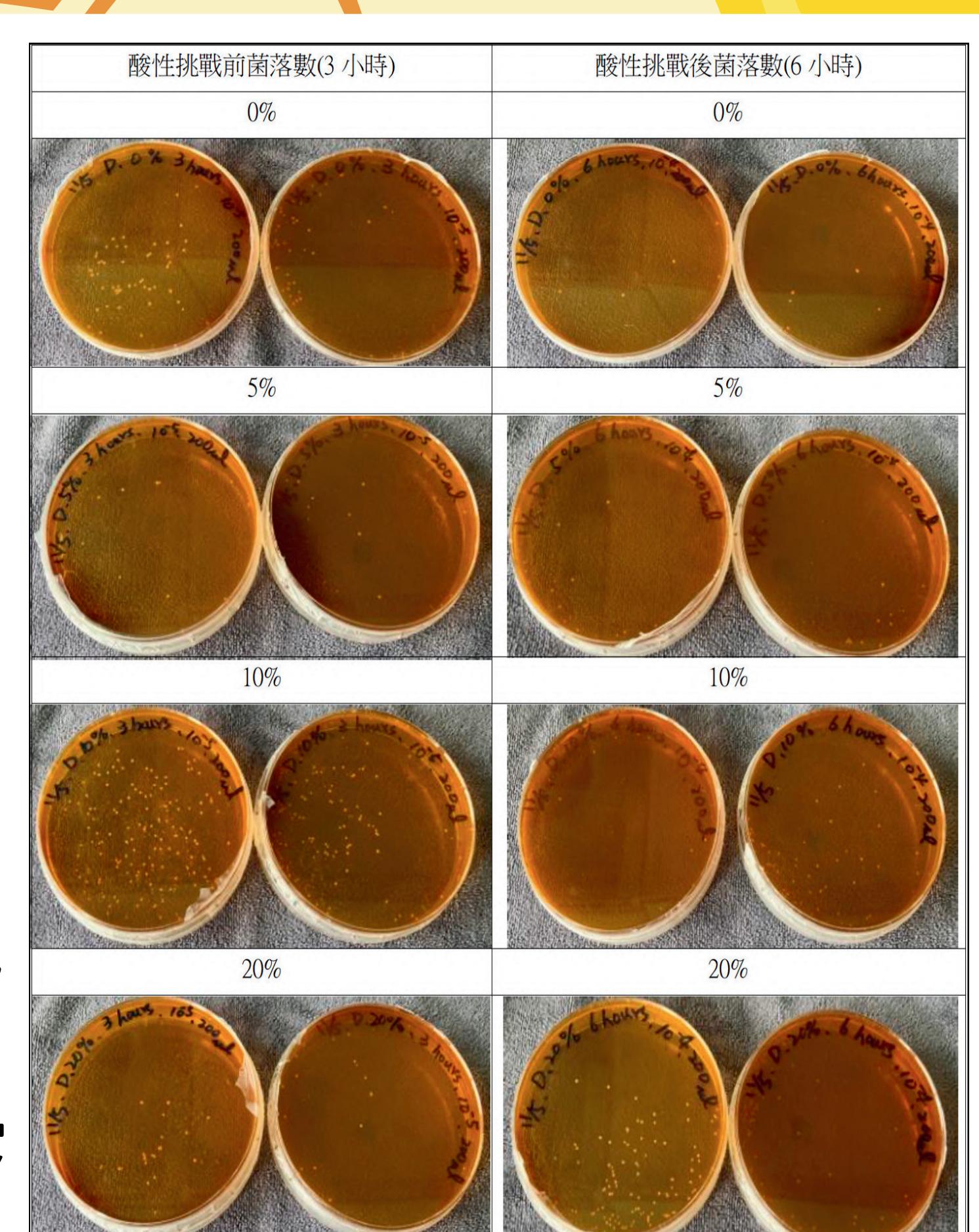


• 實驗3-2酸性挑戰後塗盤結果：



[實驗3結論]

以檸檬酸模擬胃酸環境，實驗證實經檸檬酸挑戰後的菌，在不同蜂蜜濃度下，數量都比酸性考驗前低，表示益生菌會受到酸性環境而降低繁殖量。同時發現最高濃度的蜂蜜保留了最高的菌數。濃度0-20%間，蜂蜜濃度越高，益生菌受酸性環境的打擊較小，證實蜂蜜提升益生菌對酸性環境的耐受度。



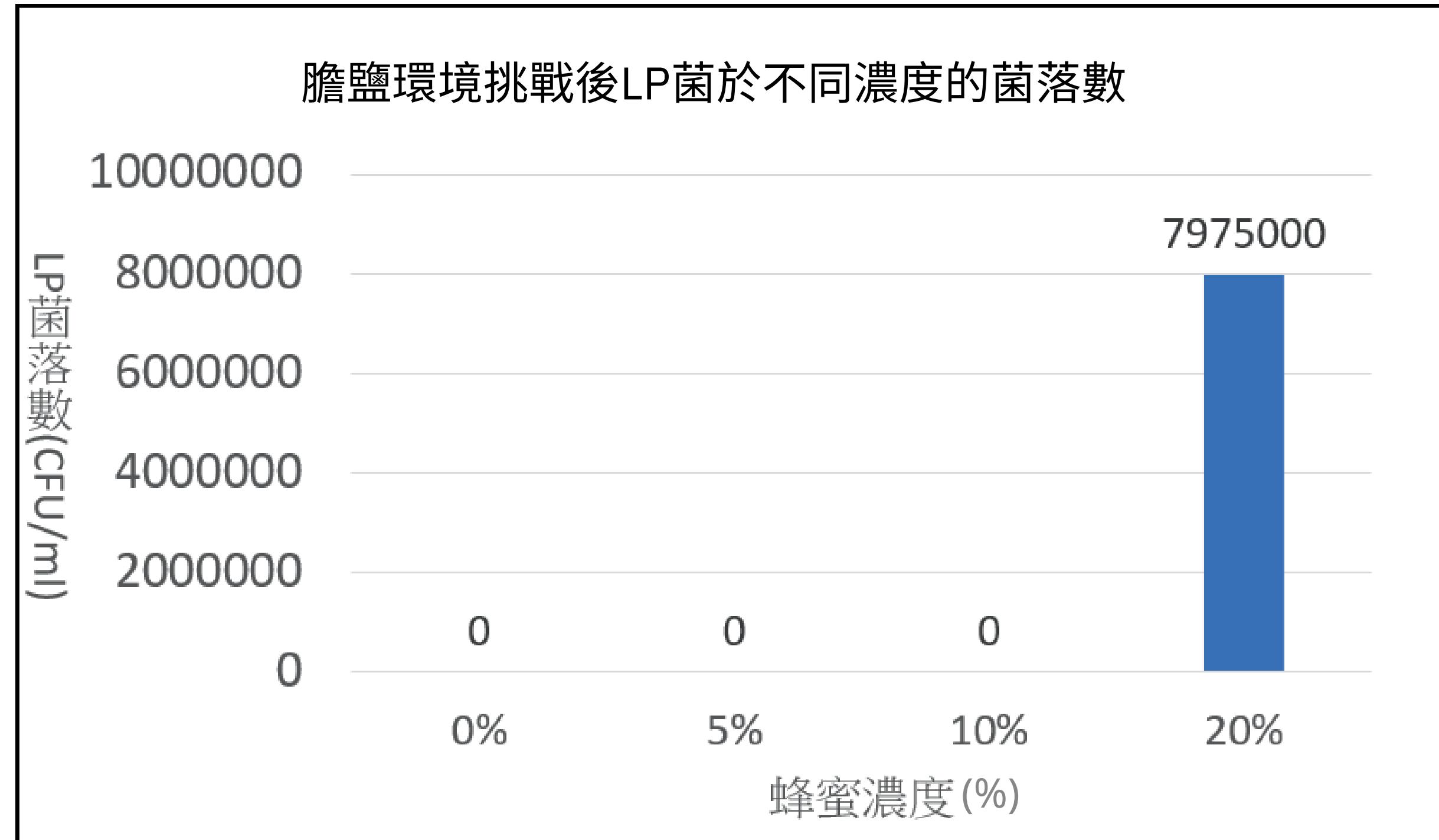
實驗4研究結果

[實驗4結論]

實驗結果顯示菌落數在膽鹽的作用下，除了最高濃度20%的蜂蜜仍保留很少量的菌數之外，其他較低濃度蜂蜜及無蜂蜜的組別益生菌皆無法存活，驗證了20%濃度較高的蜂蜜對提升益生菌抗膽鹽環境的耐受度有幫助。

捌

結 論 *



一、在測試蜂蜜對益生菌生長變化的影響實驗中，從菌液的吸光值變化曲線我們證實**蜂蜜對益生菌繁殖確實有幫助**。另外我們的實驗也證實了在0-20%濃度間，蜂蜜濃度最高20%時，益生菌生長的數量最多。由抗酸、抗膽鹽的實驗結果證實了**提高蜂蜜濃度對提升益生菌對抗人體腸胃道環境的耐受性是有益的**。

- 媒體廣告常以「益生菌種對抗胃酸、膽汁的耐受性」作為該益生菌功效之指標，由我們實驗結果建議，平時在食用益生菌時，可搭配蜂蜜一起食用，以提升益生菌的功效！
- 目前市面上已有添加蜂蜜的優格產品，益生菌對腸道消化的好處很多，建議未來可開發更多種添加蜂蜜的益生菌產品如冰淇淋、糖果、果凍等，讓人們在食用益生菌產品的同時可更增加其效益。

二、實驗結果除了得知**不同蜜種對應不同益生菌種的促進效果不同**之外，也得知**蕎麥蜜對於植物乳桿菌的提升有顯著的幫助**，而我們在益生菌功效的文獻探討中了解到不同益生菌對於改善人體的機能有所不同，比如植物乳桿菌較為特別的機能在於能舒壓及改善情緒。

- 實驗結果建議，如想藉由植物乳桿菌來舒壓提升心情，在食用益生菌時可搭配蕎麥蜜一起食用以提升其效益。
- 日後我們可進一步研發針對特定益生菌添加的特定蜂蜜食品，用以提供民眾想藉由食用特定益生菌來改善特定身體機能時，能獲得更好的效果。

玖

未來展望

一、關於蜂蜜與益生元的研究：

(一) 蜂蜜對壞菌的影響：

透過相同的實驗方法設計蜂蜜對人體腸道壞菌的實驗，如果能證實蜂蜜對腸道主要壞菌有抑制的作用，也能進一步驗證蜂蜜對人體腸道的益處。

(二) 蜂蜜濃度的影響：

實驗可再提高蜂蜜濃度，嘗試測出繁殖數量的最高值，找出對抗腸道環境最有利的蜂蜜濃度。也可再以其他種類的蜂蜜來做實驗，驗證是否不同蜜種下提高濃度仍可提供抗酸、抗鹼的耐受性。

(三) 蜂蜜益生元的研究：

直接取得蜂蜜中所含的特定益生元來對益生菌的生長繁殖做實驗，驗證是否和這次實驗結果特定蜂蜜對特定益生菌生長的促進組合有符合的結果。

二、關於食品對人體腸道好壞影響的研究：

(一) 富含益生元食材的比較：

用其他富含益生元的天然食材驗證益生菌的繁殖和益生元多寡的關係。

(二) 腸道中壞菌的研究：

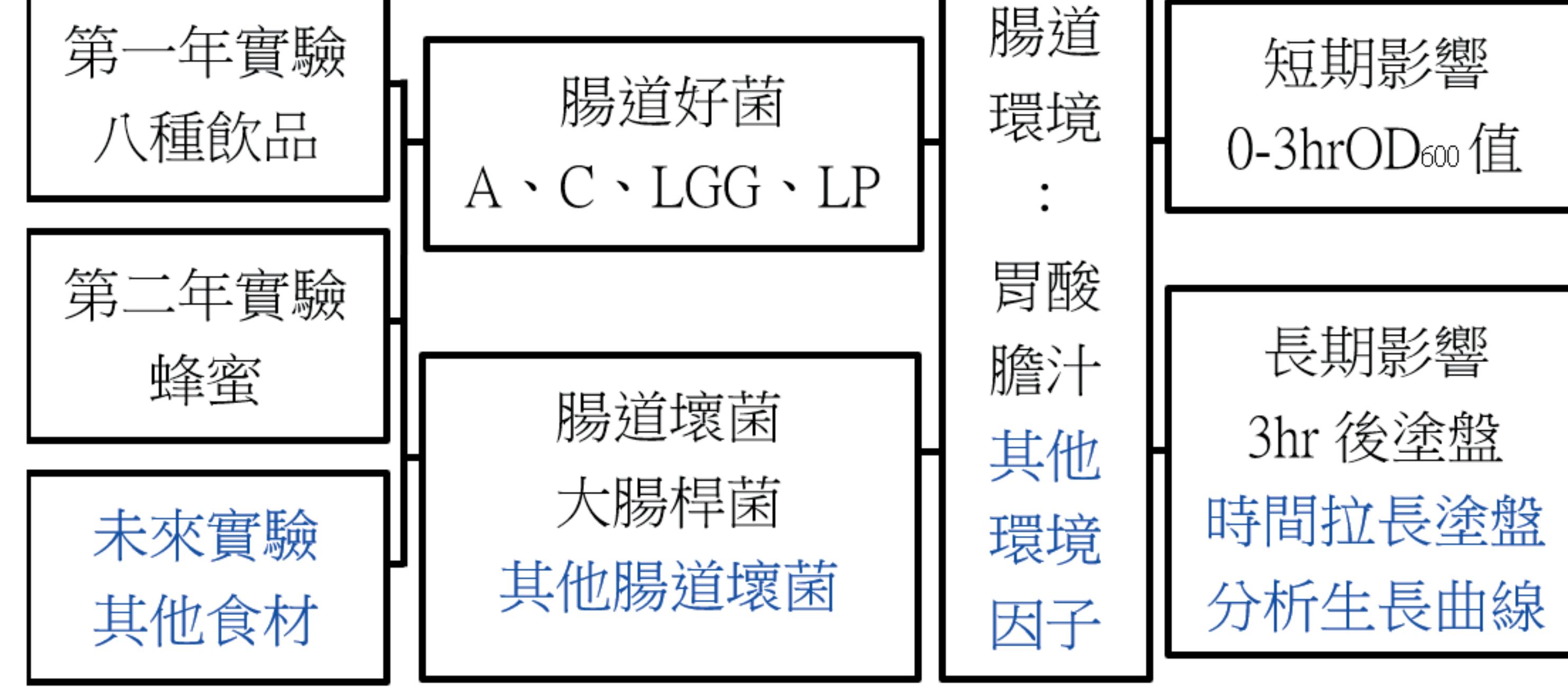
歸納腸道的主要壞菌，以代表壞菌群做實驗，如能同時驗證食材對腸道好菌有益、對壞菌有害，則對腸道的影響為好。

(三) 更貼近腸道環境的模擬：

可再加入腸道內其他消化酵素等因子

(四) 長期實驗的生長研究：

可將接種後作用的時間拉長後再塗盤，和短期實驗一樣繪製生長曲線，能更深入地看出長期的影響。



拾

參考文獻

一、腸道主要益生菌種：

- 1、五大機能益生菌及其功效：卡羅琳衛教師網站 <https://reurl.cc/6jl306>
- 2、益生菌的好氧性與厭氧性：科學月刊第三十七卷第二期
- 3、LP菌中的植物乳桿菌：健康元宇宙網站 <https://reurl.cc/M6dxDp>
- 4、食物於消化系統的過程與時間：優活健康網站、朝陽科技劉季湄的碩士論文
- 5、益生菌於消化道中的挑戰：<https://reurl.cc/r3aMbN>

二、塗盤菌液序列稀釋倍數原理：

食品微生物之檢驗方法 <https://reurl.cc/b3zvvl>

三、細胞濃度測定儀：

測量微生物實驗中的關鍵技術 <https://reurl.cc/kM0Y7n>

四、益生元與益生菌：

- 1、益生元與益生菌的關係：益生元大解密網站
- 2、蜂蜜中的益生元：農業知識入口網蜂蜜-蜜蜂主題館、蜂蜜保腸道健康網站
- 3、不同蜜種益生元組成：研究報告《The Potential of Honey as a Prebiotic Food》

五、蜂蜜成分特性與對腸道菌群潛在影響之比較：

碩士論文《蜂蜜化學組成與生物活性之研究》

本海報中照片、圖表與研究內容為作者團隊原創製作。

部分圖像素材取自Canva教育版，僅供非商業教育用途。