

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070005

參展科別 微生物學

作品名稱 強菌來襲！口腔大騷動！——食品中乳酸菌對
牙齒保健的影響

得獎獎項 三等獎

就讀學校 高雄市立高雄女子高級中學

指導教師 蘇純慧、許曉菁

作者姓名 王宥萱、魏芊仔

關鍵詞 乳酸菌、口腔保健、變異鏈球菌

作者簡介



魏芊仔、王宥萱是高雄市立高雄女子高級中學學生，目前就讀高三醫藥衛生組。對生活現象抱持好奇心，因欲解決日常生活觀察到的問題，同時亦對生物領域之研究感興趣，有主動探索知識的行動力，在高二時以「食品中的乳酸菌對牙齒保健的影響」為題進行專題研究，參加高雄市中小學科學展覽會農業食品類組並獲得第二名。以原作品為基礎改進研究後，以此作品參加國際科展。

摘要

乳酸菌（Lactic acid bacteria）是生活中常接觸到的菌種，除了製作食品，也有研究指出部分乳酸菌菌株可抑止造成齲齒的「變異鏈球菌」生長，目前已有牙膏等產品號稱添加乳酸菌。但乳酸菌發酵產生的乳酸，會分解牙齒的琺瑯質，所以我們從發酵乳食品中分離出9株乳酸菌，並進行氫氧基磷灰石的分解實驗與對變異鏈球菌的抑菌實驗。經過實驗，1號、5號、6號與8號乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解能力較弱，而6號、8號與15號對變異鏈球菌的抑制效果較明顯，實驗結果交互比較後，得出6號和8號菌作為牙齒保健的應用價值較高。未來若能進一步研究，可嘗試以離心將乳酸菌各部位分離，研究其真正有抑菌作用的物質，並加以純化，應用於保健食品中。

Abstract

Lactic acid bacteria are a kind of common culture in our daily life. In addition to being added in food, studies indicate that some kind of Lactic acid bacteria can help restrain *Streptococcus mutans*, which is a kind of bacteria that causes caries. There have been numerous products such as toothpaste, claiming that they added Lactic acid bacteria in markets. However, Lactic Acid generating in lactic fermentation would break down the enamel in our teeth. Thus, we separated nine strains of Lactic acid bacteria from the cultured milk we chose, and conducted the experiment about different kinds of Lactic acid bacteria's abilities of decomposing hydroxyapatite and confronting *Streptococcus mutans*. We found that Lactic acid bacteria No.1, No.5, No.6, and No.8 could decompose less hydroxyapatite; on the other hand, No.6, No.8, and No.15 could restrain *Streptococcus mutans* better. After contrasting their differences between the experiment, the result was that No.6 and No.8's applied values in dental care were higher than the others. If we keep researching for details in the future, we will attempt to break Lactic acid bacteria into parts by centrifugation, and focus on the substances which really have bacteriostasis so we can purify it and add it into health food.

壹、前言

一、研究動機

乳酸菌（Lactic acid bacteria）是生活中常被運用的菌種之一，優格、優酪乳等美味的發酵食品都需要乳酸菌的協助，且不僅在製作食品方面有妙用，它們也是一種對人體有益的益生菌，尤其能協助腸胃的消化作用，改善腹瀉、乳糖不耐症等等。

但除了以上常見的作用，乳酸菌還有一個特別的功用——防止蛀牙。研究指出，特定的幾種乳酸菌菌株，如鼠李糖乳桿菌、羅伊氏乳桿菌等，能夠妨礙造成齲齒的有害菌「變異鏈球菌」生長，進而減少牙菌斑的產生，市面上也已有牙膏、漱口水等牙齒保健產品號稱添加乳酸菌，甚至發展出「優格刷牙法」。但在高中選修生物(I)第二章代謝與能量中，乳酸菌進行代謝會產生乳酸，而酸性物質會侵蝕牙齒的重要成分——琺瑯質，既然乳酸菌同時有保護牙齒和傷害牙齒的特性，那乳酸菌究竟能不能作為牙齒保健產品的添加物使用呢？為了釐清我們的疑問，也為了找出應用價值最高的乳酸菌株，我們從常見的發酵乳等食品中分離出乳酸菌，並進行實驗來驗證我們的想法。



圖1 分離出的乳酸菌

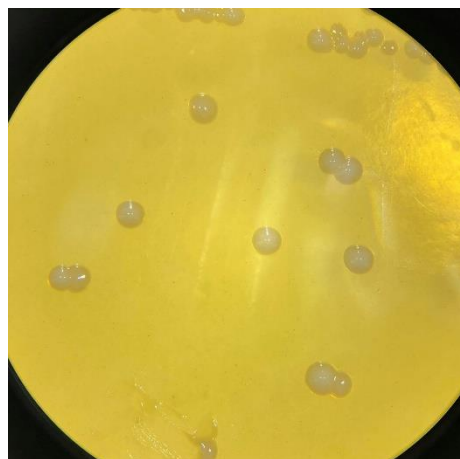


圖2 解剖顯微鏡下的乳酸菌菌落

二、研究目的

諸多研究已證實部分乳酸菌菌株有助於抑制變異鏈球菌生長，但除了已被研究過的菌株以外，其他菌株是否擁有對變異鏈球菌的抑制效果仍不得而知，且目前並不了解不同乳酸菌株對琺瑯質的分解效果是否有差異，因此本次實驗主要分為以下四點：

- 一、嘗試從各種乳酸菌食品中分離出乳酸菌
- 二、測試不同乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解作用
- 三、測試不同的乳酸菌株對變異鏈球菌的抑制效果
- 四、綜合比較出對牙齒保健有最佳效果的菌株

貳、研究方法與過程

一、研究設備及器材

(一) 菌種

1. 乳酸菌：從不同乳酸菌食品中自行分離。

表1 乳酸菌食品與其添加菌種

品名	添加乳酸菌種
AB優酪乳	嗜熱鏈球菌(<i>Streptococcus Thermophilus</i>)、 亞斯菲德菌(<i>Lactobacillus acidophilus la-5</i>)、 雷特氏B菌(<i>Bifidobacterium lactis Bb-12</i>)、 保加利亞乳桿菌(<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)
LP33益敏優多	副乾酪乳桿菌(<i>Lactobacillus paracasei</i>)、 瑞士乳桿菌(<i>Lactobacillus helveticus</i>)
養樂多	養樂多代田菌(<i>Lactobacillus casei</i>)
益生菌粉	鼠李糖乳桿菌(<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>)、 羅伊氏乳桿菌(<i>Limosilactobacillus reuteri</i>)、 嗜酸乳桿菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)

2. 變異鏈球菌(*Streptococcus mutans*)：由陽明大學口腔生物研究院提供。

3. 菌種保存：

(1) 在無菌操作台中，用燒紅滅菌過的接種環挑起指定單一菌落，以三區劃線法在新的固態培養基上畫線。

(2) 放入攝氏37度的培養箱中培養約兩日，待其生長出明顯菌落後放入冰箱保存。

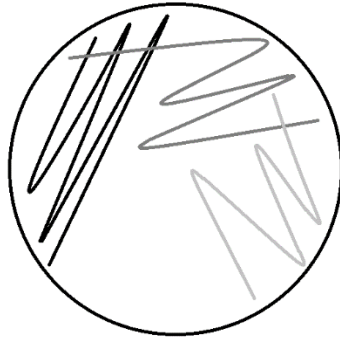


圖3 三區畫線法示意圖

4. 菌液培養：

(1) 在滅菌過的試管內放入約5mL液態培養基，以燒紅過的接種環挑取指定的單一菌落至培養基中。

(2) 將試管放上試管架，固定在震盪儀上搖晃，再放入攝氏37度的培養箱培養兩日，待菌液生長至足夠濃度便可用於實驗，或放入冰箱保存。

(二) 培養基 (成分 g/L)

1. 培養基名稱與成分

(1) MRS培養基

弱酸性不具篩選功能的培養基，營養豐富，適合用於培養乳桿菌屬的菌種，本次實驗中用於培養乳酸菌。

表2 MRS培養基成分

MRS培養基 (Lactobacillus Agar a cc. to De Man, Rogosa and Sharpe)	蛋白朊 10.0
	牛肉提取物 10.0
	酵母提取物 5.0
	葡萄糖 20.0
	檸檬酸三銨 2.0
	乙酸鈉 5.0
	MgSO ₄ 0.1
	MnSO ₄ 0.05
	K ₂ HPO ₄ 2.0
吐溫80 1.0	

(2) BHI培養基

不具篩選功能的培養基，可提供養分供鏈球菌、葡萄球菌等較挑剔的致病菌生長，本次實驗中用於培養變異鏈球菌。

表3 BHI培養基成分

BHI培養基 (Brain-Heart Infusion Broth)	小牛腦浸粉 12.5
	牛心浸粉 5.0
	D-葡萄糖 2.0
	蛋白朊 10.0
	氯化鈉 5.0
	磷酸氫二鈉 2.5

2. MRS培養基配製

(1) 液態培養基

- (1) 秤取55.25g的MRS粉末置於血清瓶，以二次純化水定容至1000mL。
- (2) 攪勻後以攝氏121度滅菌20分鐘，取出後待其降溫，放入冰箱保存。

(2) 固態培養基

- (1) 秤取55.25g的MRS粉末與15g的agar粉末置於血清瓶，以二次純化水定容至 1000mL。
- (2) 攪拌均勻後以攝氏121度滅菌20分鐘後取出。
- (3) 待其降溫到約攝氏60度，趁培養基還未凝固，在無菌操作台中將培養基液倒入培養皿內，高度約1cm，待凝固冷卻後放入冰箱保存。

(3) 碳酸鈣篩選培養基

額外添加5g的碳酸鈣，並依固態培養基步驟操作。

3. BHI培養基製作

秤取37g的BHI培養基粉末置於血清瓶，以二次純化水定容至1000mL。其餘步驟均與MRS培養基相同。

(三) EDTA滴定藥品

1. 藥品成分

表4 藥品與其成分

EDTA溶液	EDTA-二鈉鹽(E.D.T.A.2Na)(Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂ · 2H ₂ O)
緩衝溶液	硫酸鎂(MgSO ₄)
	EDTA-二鈉鹽(E.D.T.A.2Na)(Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂ · 2H ₂ O)

	氯化銨(NH ₄ Cl)
	氨水(NH ₃ (aq))
EBT指示劑	EBT (1-(1-Hydroxy-2-naphthylazo)-5-nitro-2-naphthol-4-sulfonic Acid 之鈉鹽)(C ₂₀ H ₁₂ N ₃ NaO ₇ S)
	氯化鈉(NaCl)









2. 藥品配製

(1) EDTA溶液：秤量EDTA-二鈉鹽3.723g溶於少量二次純化水，將溶液倒入血清瓶，以二次純化水定容至1000mL。

(2) 緩衝溶液：秤量硫酸鎂0.78g及EDTA-二鈉鹽1.179g，皆以二次純化水50mL溶解後，加入氯化銨16.9g及氨水143mL，最後用二次純化水定容至250mL。

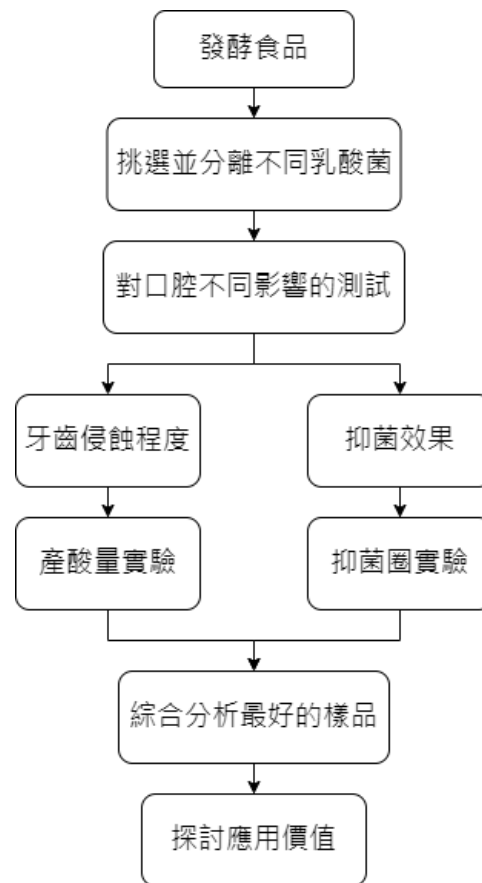
(3) EBT指示劑：秤取鉻黑T0.5g及氯化鈉50g，以研鉢磨細至看不見結晶顆粒。

(四) 其他設備與器材

			
1. 二次水純水系統	2. 恆溫培養箱	3. 抽風機	4. 滅菌釜
			
5. 無菌操作臺	6. 分光光度計	7. 震盪儀	8. 離心機

- | | | |
|-----------|--------------|-------------|
| 9. 微量滴管 | 20. 酒精/打火機 | 31. 廣用試紙 |
| 10. tip | 21. 研鉢/研杵 | 32. 15mL離心管 |
| 11. 微量離心管 | 22. 電子天平 | 33. 漏斗 |
| 12. 接種環 | 23. 刮勺 | 34. 鋁箔紙 |
| 13. L型玻棒 | 24. 秤量紙 | 35. 保鮮膜 |
| 14. 分光光度計 | 25. 培養皿 | 36. 拭鏡紙 |
| 15. 比色管 | 26. 血清瓶 | 37. 洗滌瓶 |
| 16. 燒杯 | 27. 125mL錐形瓶 | 38. 試管/試管架 |
| 17. 滴管 | 28. 滴定管 | 39. 文具 |
| 18. 鑷子 | 29. 鐵架 | 40. 濾紙 |
| 19. 量筒 | 30. 封口石蠟膜 | 41. 試管震盪器 |

二、研究流程圖



三、文獻探討

(一) 乳酸菌 (Lactic acid bacteria)

屬乳桿菌目，革蘭氏染色呈陽性，是指能夠代謝醣類，且產生50%以上乳酸的桿菌或球菌。是一種兼性厭氧菌，喜好在無氧狀態下生長，但有氧的環境並不會對其造成威脅。在自然界常出現在分解中的動植物或其分泌物，也常被用來製作優酪乳等發酵食品，對食品的風味有很大的影響。

(二) 氫氧基磷灰石

分子式為 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ，是一種白色的磷灰石礦物，有天然的礦物，也可以人工合成。人體的骨骼、牙齒表面的琺瑯質等皆由其構成，因此本次實驗以現成的氫氧基磷灰石粉末作為牙齒琺瑯質的替代物。

(三) 變異鏈球菌 (*Streptococcus mutans*)

人類口腔中常見的一種兼性厭氧菌，革蘭氏染色呈陽性，是造成齲齒與牙周病的主要細菌。黏附性很高，常見在牙齒的凹槽與裂縫，代謝產生的酸會腐蝕牙齒的珐瑯質，並且會將口中的碳水化合物轉化成具有高黏滯性的胞外基質，胞外基質大部分由水構成，能將變異鏈球菌等齲齒細菌保護在內，進而造成齲齒或牙周病。因有研究證實，部分乳酸菌株能抑制變異鏈球菌生長，故本次實驗將測試不同乳酸菌對變異鏈球菌的抑制效果是否不同。

四、嘗試從各種乳酸菌食品中分離出乳酸菌

乳酸菌食品是生活中常見的乳酸菌來源，因此本次實驗使用容易取得的三種發酵乳（AB優酪乳、LP33益敏優多、養樂多）與一種益生菌粉末作為樣品，稀釋培養後從中分離出單一菌落，並利用碳酸鈣篩選法確認其是否為乳酸菌，作為本次實驗的對象。

(一) 碳酸鈣篩選法

添加0.5%碳酸鈣至MRS培養基，作為選擇性培養基。若為乳酸菌，在該菌落旁會出現一圈透明環，因乳酸菌代謝產生的乳酸會和碳酸鈣反應形成可溶於水的乳酸鈣，使乳酸菌周遭混濁的培養基恢復透明。

下圖為碳酸鈣篩選法的結果，右下混濁部分為碳酸鈣沉澱，左上澄清部分生長的菌落能將周遭碳酸鈣溶解，即為乳酸菌。



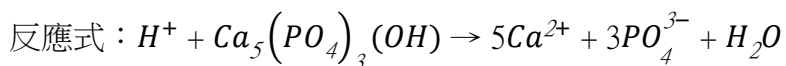
圖4 碳酸鈣培養基與乳酸菌

(二) 實驗步驟

1. 在無菌操作台中將樣品(發酵乳等)打開，將樣品原液序列稀釋至 10^{-8} 倍。
2. L型玻棒沾酒精燒乾滅菌，將稀釋液 $100\mu\text{L}$ 均勻塗抹在MRS培養基上。
3. 用奇異筆在培養皿上標示培養的日期及樣品名稱，放入攝氏37度的恆溫培養箱培養，並觀察是否有長出可分離的菌落。
4. 若有觀察到可分離的菌落，即在培養皿上圈選目標菌落並拍照紀錄，以燒紅滅菌過的接種環挑取菌落，三區畫線法畫在碳酸鈣MRS培養基上。
5. 放入攝氏37度的恆溫培養箱培養，並觀察是否有長出可分離的菌落，且菌落周遭的碳酸鈣是否有溶解。

五、測試不同的乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解作用

乳酸菌代謝產生的乳酸會侵蝕牙齒的琺瑯質，故本實驗以氫氧基磷灰石模擬琺瑯質，測試不同菌株對其侵蝕的程度。而氫氧基磷灰石被酸分解時會產生鈣離子



故採用EDTA滴定法，測定菌液中的鈣離子濃度，加以比較菌株間相對產酸量。

(一) EDTA滴定法原理

EDTA是乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)的簡稱，是一種多用途的鉗合劑，分子量為 292.25g/mol ，結構式如下圖。EDTA可做成多種鹽類，包含此次實驗使用的EDTA-2Na，含有2個結晶水的EDTA-2Na分子量為 372.24 。

在含有鈣與鎂離子，pH值約等於10的溶液中，加入EBT指示劑會呈現酒紅色，而EDTA會將溶液中的鈣鎂離子螯合，直到所有鈣鎂離子都被螯合時，溶液即由酒紅色轉為藍色，即達到滴定終點。

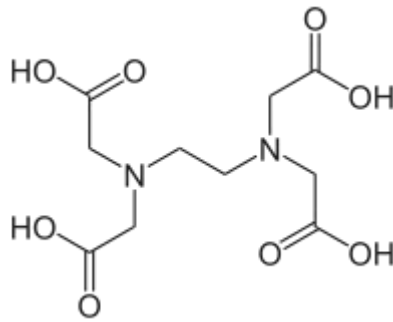


圖5 EDTA結構圖

(二) EDTA滴定法步驟

1. 以錐形瓶裝待滴定之溶液，在抽氣台內滴入數滴緩衝溶液，用廣用試紙測試帶測溶液為深藍色時即可進行實驗（pH值約等於10）。

須在滴入緩衝溶液的5分鐘內完成實驗，否則容易產生沉澱。

2. 用藥匙較小端刮取一平匙EBT指示劑，加入錐形瓶並充分搖勻，此時溶液若含有鈣鎂離子則應呈紅色。

3. 以EDTA溶液滴定待測溶液，當溶液由紅色轉為藍色即達滴定終點。

4. 紀錄EDTA用量並分析數據。

5. 計算鈣離子莫耳濃度方法： $M_{鈣鎂離子} = M_{EDTA} \times V_{EDTA}$

由於計算出的莫耳濃度極小，我們換算為ppm(mg/L)，即以下公式：

$$\frac{EDTA用量(mL) \times 0.001(L) \times 0.01(M)(莫耳濃度) \times 40.078(鈣原子量) \times 1000(mg)}{0.01(L)}$$

(三) 實驗步驟（實驗中與菌接觸之器材皆已滅菌。）

1. 實驗前兩天培養所需乳酸菌菌液，並在10個已編號的125mL錐形瓶內裝入氫氧基磷灰石1g，以鋁箔紙封口後放入滅菌釜滅菌20分鐘。

2. 在無菌操作台吸取MRS液態培養基1mL至比色管中，用分光光度計設定空白值，再分別吸取已培養好且充分搖勻的乳酸菌菌液1mL測量其吸光值(OD600nm)。
3. 根據吸光值計算菌液用量（15mL培養基液加0.5mL吸光值為1的菌液，以此比例稀釋菌液）。
4. 在無菌操作台將各個錐形瓶加入MRS液態培養基15mL及各乳酸菌所需菌液，以原鋁箔紙封口，放入培養箱，以攝氏37度培養，轉速170搖晃，達實驗時間後取出。（如圖10、11、12）
5. 取出後在每個錐形瓶內加入15mL二次純化水並充分搖晃，以溶解可能飽和的乳酸鈣。
6. 將每瓶溶液取15mL倒入已編號的離心管，放入離心機中，以轉速3200離心約3-5分鐘後取出。
7. 取上清液10mL至乾淨錐形瓶中，進行EDTA滴定，紀錄數據並拍照記錄變色前後的錐形瓶。(如圖 7、8)
8. 重複上述步驟，分別實驗放置3、6、12、18、24小時。



圖6 使用試管培養乳酸菌液

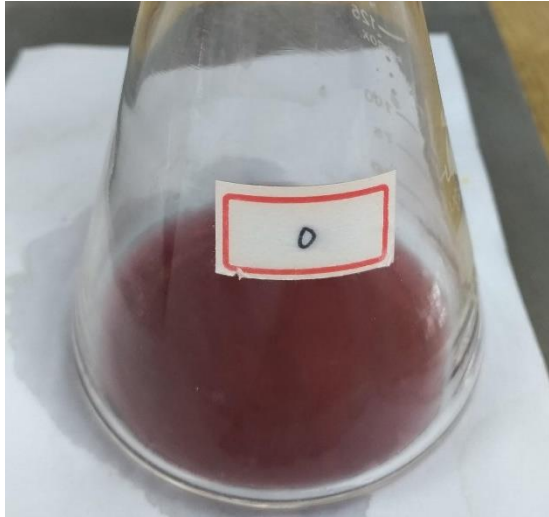


圖7 乳酸菌液與羥基灰石滴定起點

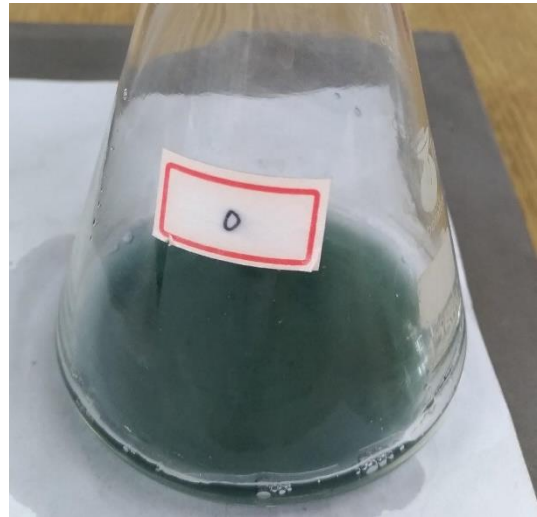


圖8 乳酸菌液與羥基灰石滴定終點

(溶液中含有橙色的培養基，故滴定起點與終點分別呈橘紅與藍綠色)

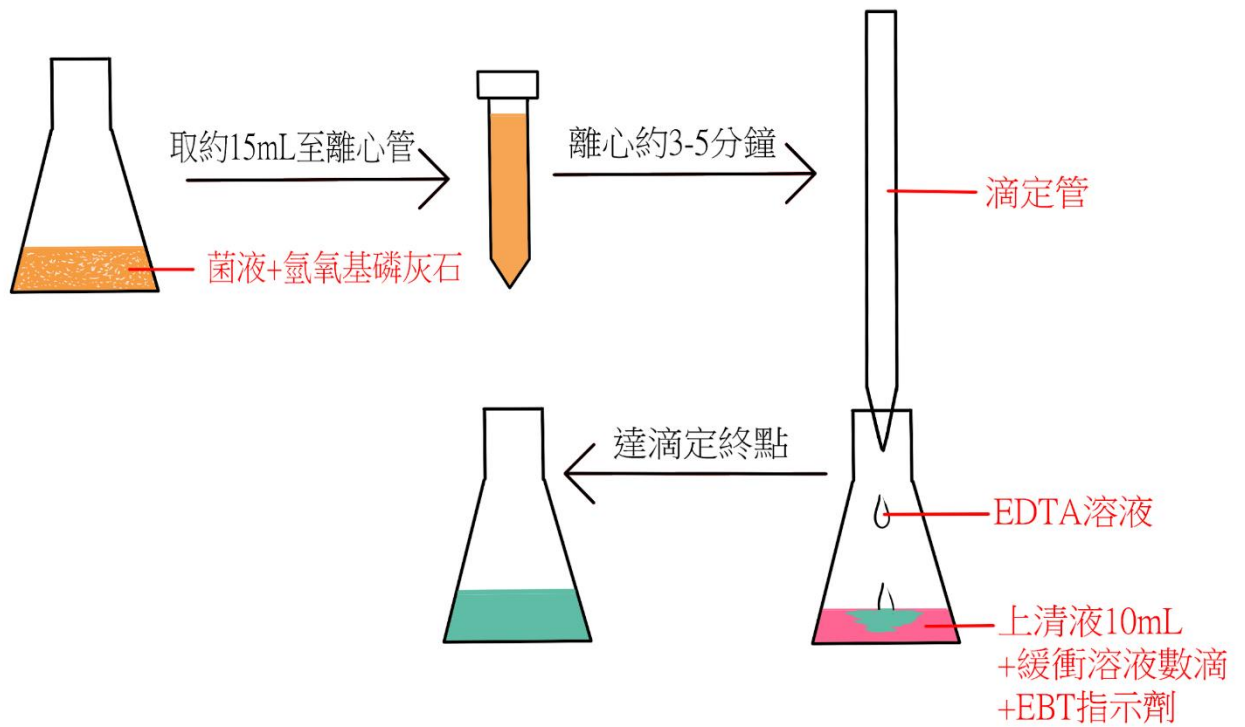


圖9 產酸量實驗示意圖



圖10 氫氧基磷灰石+菌液(未搖晃均勻)



圖11 氫氧基磷灰石+菌液(搖晃均勻)



圖12 培養箱中搖晃的錐形瓶



圖13 滴定實驗裝置圖

六、測試不同乳酸菌對變異鏈球菌之抑菌效果

已有前人研究指出，部分乳酸菌株能抑制變異鏈球菌的生長，但乳桿菌屬有眾多不同菌種，我們猜測或許不同的乳酸菌對變異鏈球菌生長的抑制效果也有差異，因此本次實驗以濾紙瓊脂擴散法（well diffusion method），以抑菌圈的大小判斷乳酸菌對變異鏈球菌的抑制效果。

(一) 變異鏈球菌培養

我們與陽明大學口腔衛生研究所的教授聯絡，取得了變異鏈球菌的冷凍菌管，我們以BHI培養基將其培養出菌落並保存，以利後續使用。

步驟：

1. 預先配置好BHI固態培養基，步驟如上述。
2. 在無菌操作台中打開冷凍菌管，用燒紅滅菌過的接種環刮起冷凍菌液的表面液體。
3. 在BHI培養基上，以三區畫線法畫線。
4. 將培養基放入恆溫培養箱，以攝氏37度培養約2日後，觀察是否有長出菌落。
5. 若變異鏈球菌有生長，將培養基放入冰箱冷藏保存，並將剩餘菌液連同菌管放回冷凍庫保存。

(二) 實驗培養基挑選

由於不知道哪一種培養基適合用於抑菌圈實驗，而能測試的培養基有PDB、MRS與BHI，而己知變異鏈球菌不易生長在PDB培養基上，故我們隨意取一種乳酸菌，測試MRS培養基或BHI培養基適用於此實驗。

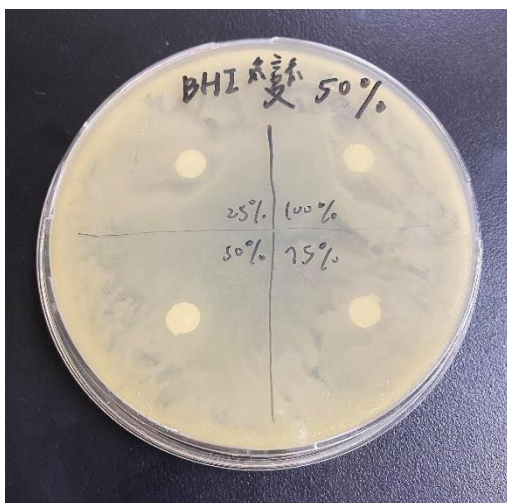


圖14 BHI培養基抑菌圈測試



圖15 MRS培養基抑菌圈測試

經過測試，可知在MRS培養基上能有較明顯的抑菌圈，推測是因為乳酸菌無法在BHI上生存，而變異鏈球菌亦屬乳桿菌目，故可在MRS培養基上生存。因此本次實驗將以MRS培養基作為菌的營養來源。

(三) 實驗步驟 (實驗中與菌接觸之器材皆已滅菌。)

1. 在做實驗前2-3天用試管培養所需乳酸菌及變異鏈球菌菌液；將濾紙以打洞機打成小圓片並滅菌備用。
2. 測定乳酸菌與變異鏈球菌液的吸光值(OD600nm)，並以吸光值計算濃度。將乳酸菌液稀釋至吸光值約等於1，再依序稀釋成100、75、50、25%；將變異鏈球菌菌液稀釋至吸光值約等於1備用。
3. 在無菌操作台將MRS固態培養基用奇異筆均分為四區，將L型玻棒沾酒精過火消毒，吸取稀釋過的變異鏈球菌菌液0.1mL，以滅菌過的L型玻棒將其均勻塗抹至整盤培養皿。
4. 在配置好的乳酸菌液中放入濾紙片，浸泡約10分鐘。
5. 鑷子沾酒精過火消毒，降溫後夾取浸泡完全的濾紙片放在對應濃度的格子中央。
6. 將培養皿放入恆溫培養箱，以攝氏37度培養，1天後拿出來觀察是否出現抑菌圈，以直尺測量含濾紙透明圈直徑大小及拍照記錄。

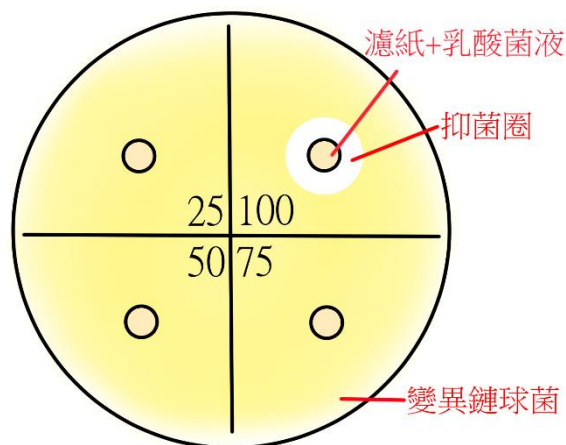


圖16 抑菌圈實驗示意圖

參、研究結果及討論










一、嘗試從各種乳酸菌食品中分離出乳酸菌

我們從市面上買得到的發酵乳中分離了共16株菌，並依分離順序編號。經碳酸鈣篩選法確認其中9株為乳酸菌，分別為以下編號：

表5 分離菌株

編號	來源	型態
1	LP33益敏優多	飽和的乳白色，外觀光滑呈圓形，菌落較其他乳酸菌細小。
3	AB優酪乳	飽和的乳白色不透明菌落，外觀光滑，形狀較接近立體的圓球。
4	養樂多	中間是較不飽和的乳白色，邊緣有一圈半透明的環，外觀光滑，菌落大致呈圓形但較扁平。
5	養樂多	顏色為較不飽和的乳白色，外觀光滑呈圓形。
6	LP33益敏優多	顏色為較不飽和的乳白色，外觀光滑，菌落呈圓形而較扁平，稍小於其他乳酸菌。
7	LP33益敏優多	菌落是有光澤的飽和乳白色，外觀光滑，菌落呈立體的球狀，略大於其他乳酸菌。
8	LP33益敏優多	顏色是有些透明的乳白色，外觀光滑，菌落呈圓形而較扁平。
10	養樂多	菌落特別透明但仍是乳白色，外觀光滑，菌落呈圓形而略為扁平。
15	益生菌粉	飽和且有光澤的乳白色，外觀光滑呈略為扁平的圓形，菌落明顯大於其他乳酸菌。

表6 分離出的各菌株菌落型態

		
1號	3號	4號
		
5號	6號	7號
		
8號	10號	15號

經培養發現，乳酸菌的菌落型態大多相似，為乳白色的菌落，邊緣光滑且形狀趨近圓形，黏附性低，容易以接種環將其整個刮下。各菌株間的菌落大小有明顯的差異，例如1號菌的菌株特別細小且大多聚在一起生長，很難挑起單一的菌落，而15號則有較大且看起來較紮實的菌落，易於辨識單一菌落與挑取。

本次實驗即以此9株乳酸菌做為目標對象進行實驗，將長有乳酸菌的固態培養基放入冰箱冷藏保存，需要使用時再將其培養成液態菌液。

二、測試不同乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解作用

我們將氫氧基磷灰石與乳酸菌置於同一環境，讓其作用固定時間後，乳酸菌產生的乳酸會將氫氧基磷灰石中的鈣離子溶出，因此以EDTA滴定法測定溶液中的鈣鎂離子濃度。因培養基中的鎂離子極少可忽視，故計算出來的鈣鎂離子濃度能直接作為鈣離子濃度，進而得知各種乳酸菌對氫氧基磷灰石的分解能力。

表7 不同菌株隨時間的鈣離子濃度平均值

編號	3hr	6hr	12hr	18hr	24hr
1	84.164	110.882	208.406	343.335	475.592
3	78.152	109.547	213.749	450.210	927.138
4	80.156	106.875	264.515	451.545	603.842
5	80.156	90.843	231.116	359.366	496.967
6	78.152	97.523	267.187	332.647	470.249
7	82.160	148.289	702.701	498.303	865.685
8	86.168	108.211	205.734	375.397	468.913
10	80.156	109.547	400.780	480.936	507.655
15	80.156	130.921	671.974	1095.465	1235.738
空白	86.168	81.492	90.843	85.500	81.492

(單位：ppm)

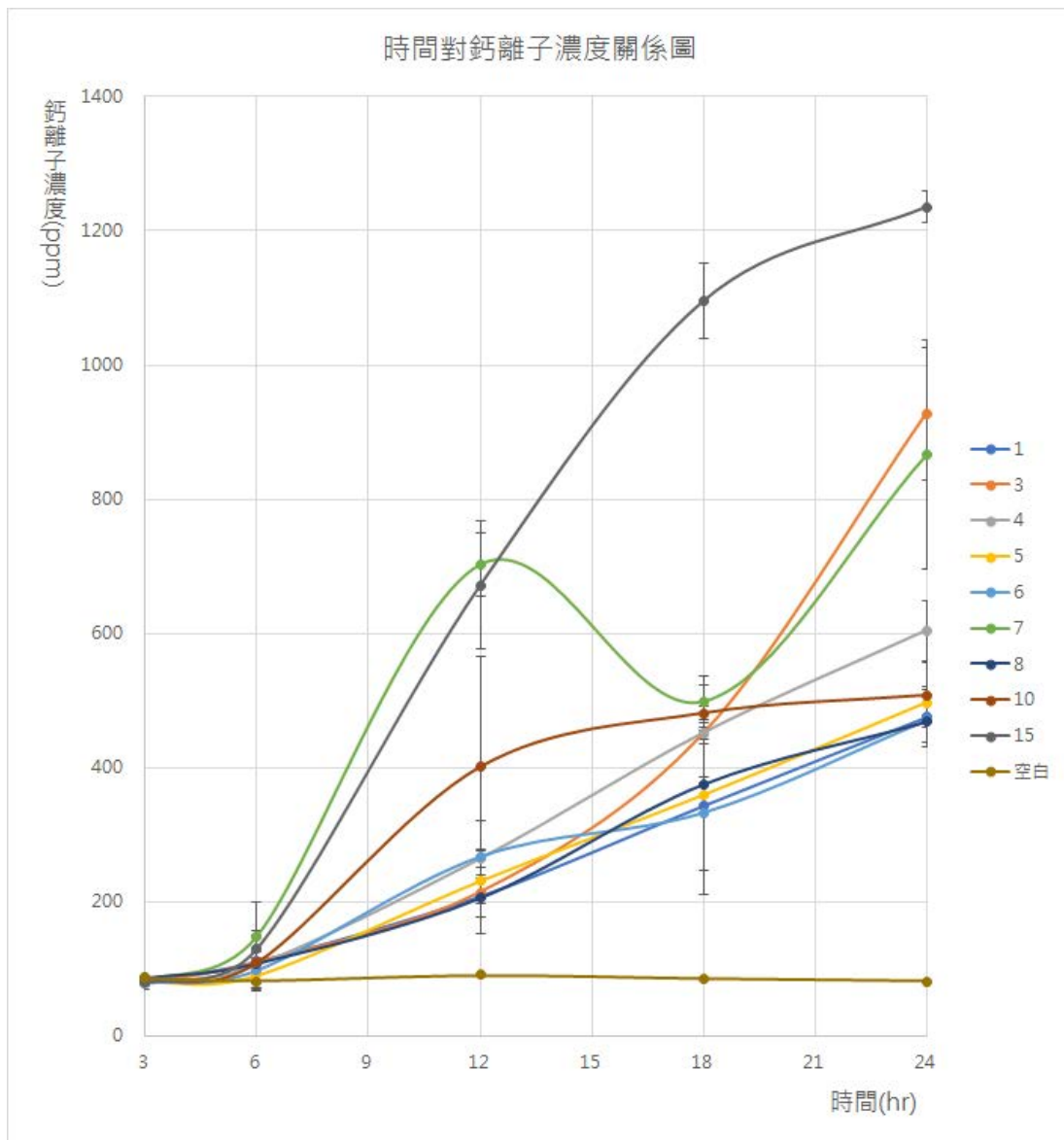


圖17 各菌株在不同時間下與產生的鈣離子濃度關係圖

本實驗採用雙因子變異數分析，雙因子分別為時間與菌種，交互作用的P值 <0.05 ，故可得知各菌種間分解氫氧基磷灰石的表現有顯著差異。

由圖表可知，隨著放置時間增加，乳酸菌液中的鈣離子濃度也逐漸上升，且實驗時用以調整pH值的緩衝溶液用量也增加，可得知乳酸菌在適當的環境中，便會持續進行乳酸發酵產生乳酸，使氫氧基磷灰石被分解。

溶液中的鈣離子含量越高，代表此種乳酸菌越容易產酸分解氫氧基磷灰石，作為牙齒保健品的價值則越低。在9種乳酸菌液中，1號、5號、6號、8號的上升曲線較為平緩，

放置24小時的結果也相近且較其他菌種低；4號的上升曲線則略高於以上四種菌；3號初期較緩，18小時後卻快速上升；10號在6到12小時之間鈣離子含量快速上升，12小時後趨緩；15號的曲線則一開始就快速上升，24小時後也高於其他乳酸菌。只有7號的曲線不是穩定上升而是有先降後升，但24小時後的產酸量亦高於大部分乳酸菌。

三、測試不同的乳酸菌株對變異鏈球菌的抑制效果

(一) 變異鏈球菌培養

變異鏈球菌菌落型態如圖，為乳白色菌落，表面粗糙形狀不規則，生長速度快且黏附性強，很難以接種環將整個菌落挑起，刮菌時需要反覆刮取將菌落刮散才容易取出。

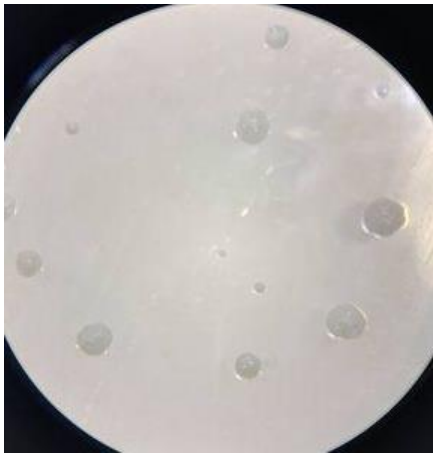


圖18 變異鏈球菌菌落放大圖



圖19 變異鏈球菌的生長狀況

(二) 研究結果

抑菌圈的判讀容易，若有明確抑菌圈則如圖20，可看出整個MRS培養基幾乎被變異鏈球菌覆蓋導致菌盤看起來混濁，只有吸附乳酸菌液的濾紙片周遭有明顯透明的抑菌圈，能直接從培養皿背面量取直徑；反之如圖22，能從培養基背面分辨出濾紙，但能看出整個菌盤均被變異鏈球菌所覆蓋而沒有抑菌圈產生。

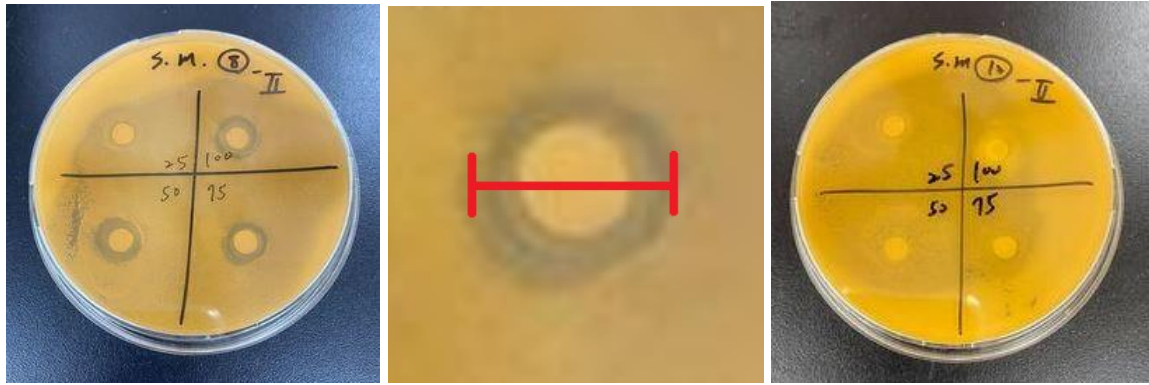


圖20 有抑菌圈的菌盤 圖21 抑菌圈（紅線為直徑） 圖22 無抑菌圈的菌盤

表8 不同乳酸菌在其不同濃度下的抑菌圈大小

編號	100%	75%	50%	25%
1	6.0	6.0	6.0	6.0
3	8.1	6.5	6.0	6.0
4	7.8	6.5	8.1	6.0
5	6.6	6.0	6.0	6.0
6	12.3	12.4	9.4	6.5
7	7.4	6.0	6.8	6.0
8	12.9	12.5	11.7	8.8
10	6.4	8.5	7.1	7.2
15	10.2	10.2	10.3	9.8
0	8.3	7.2	7.1	9.2

（單位：mm）

(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, 濾紙直徑 : 6mm)

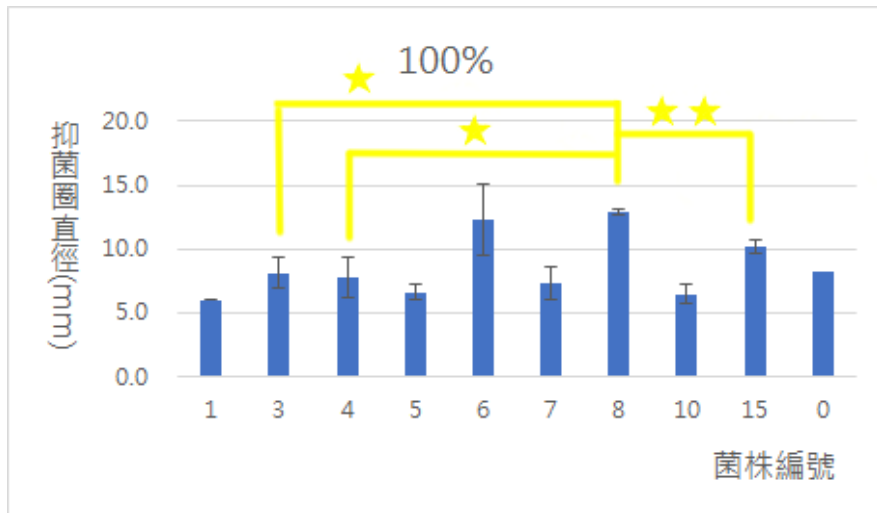


圖23 不同乳酸菌濃度100%的抑菌圈大小

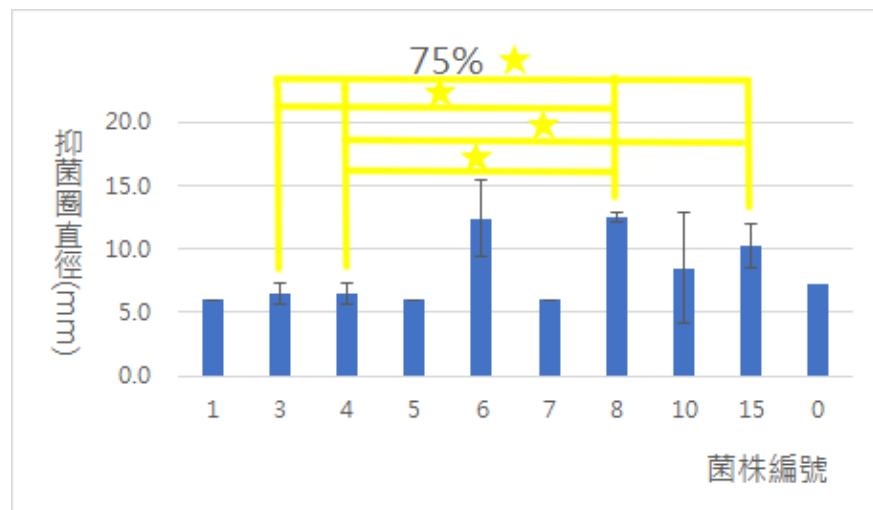


圖24 不同乳酸菌濃度75%的抑菌圈大小

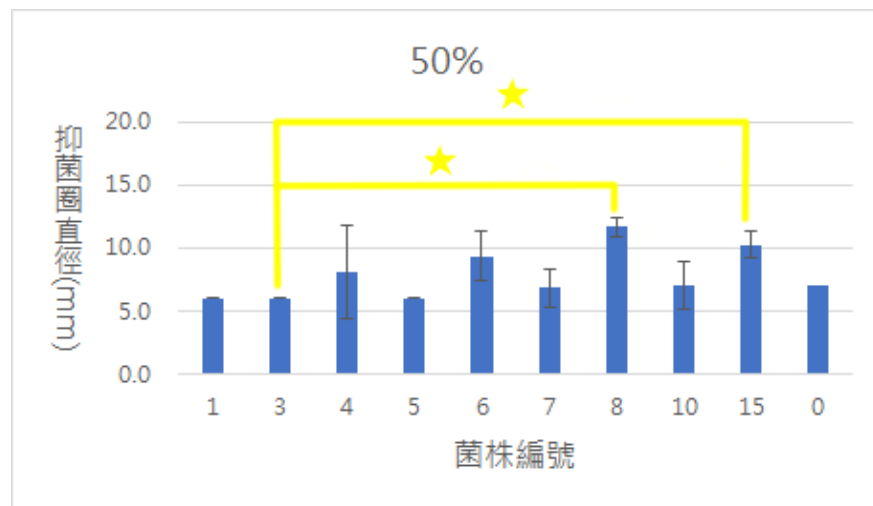


圖25 不同乳酸菌濃度50%的抑菌圈大小

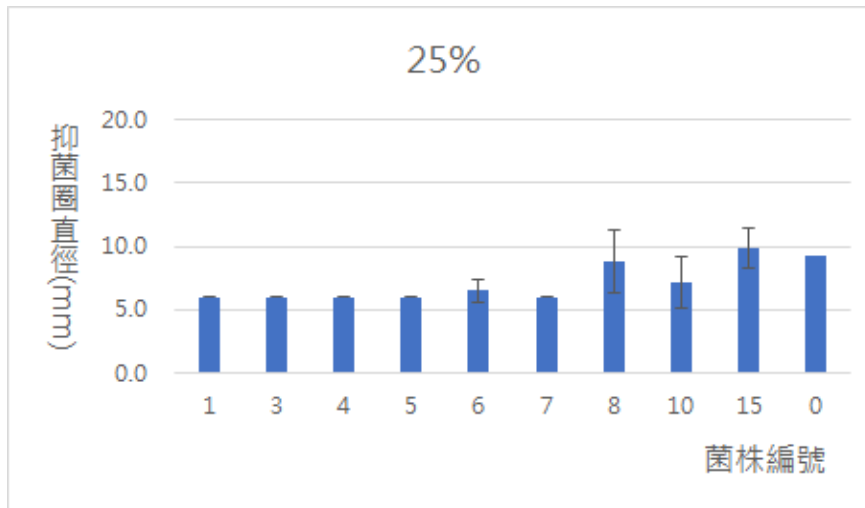


圖26 不同乳酸菌濃度25%的抑菌圈大小

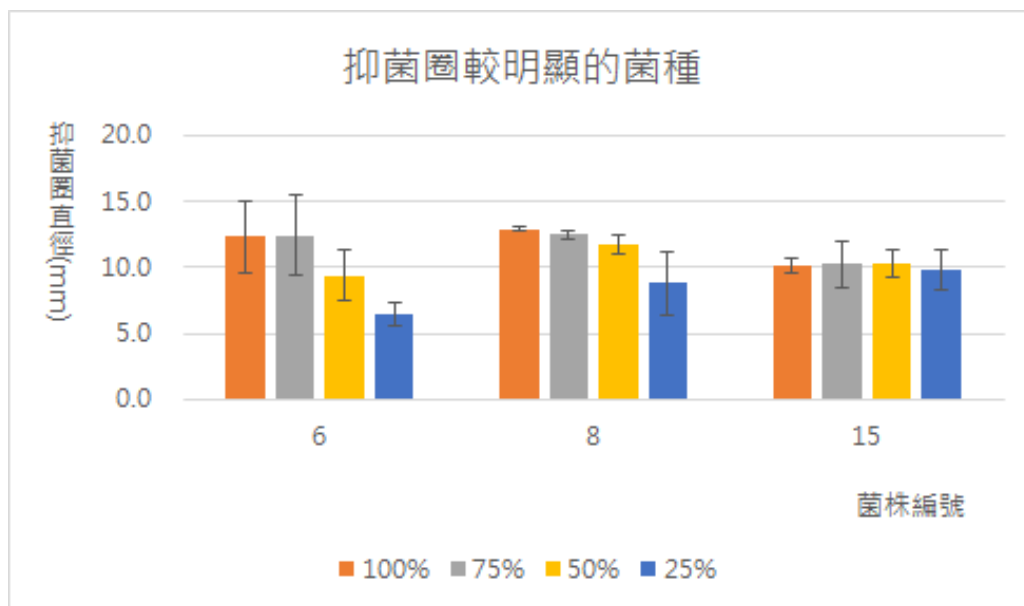


圖27 6號、8號、15號在不同濃度的抑菌圈大小

依以上結果，我們挑選抑菌圈較明顯的6、8、15號畫出四個濃度的綜合比較圖，可得知6號與8號的濃度越高，抑菌的效果則越好，而15號的抑菌圈未與濃度呈明顯正相關，可推測濃度不太影響其抑菌效果。利用 t 檢定（兩個母體平均數差的檢定，假設變異數不相等），以此三種菌分別與1號、5號與10號以外的所有菌株兩兩進行比較（1號、5號各濃度的抑菌圈都很小，故不納入比較；10號的生長情況較為特殊，詳細將在討論說明），發現在濃度100%時，8號和3號、4號菌有具顯著差異， P 值 <0.05 ；與15號菌有更明顯的差異， P 值 <0.005 。在濃度75%時，8號與3號、4號菌有顯著差異， P 值 <0.05 ；15號與3號、4號菌有顯著差異， P 值 <0.05 。在濃度50%時，8號與15號都和3號有

顯著差異， P 值 <0.05 。在濃度25%時，各菌株之間的表現沒有顯著差異，推測是濃度太低，對變異鏈球菌抑制效果低落。

9種乳酸菌中，6號、8號、15號都在低濃度即能表現出抑菌圈，6號和8號的抑菌圈尤其明顯，推測具有較佳的抑制變異鏈球菌效果，15號的抑菌圈大小變化不明顯，推測濃度對其抑制變異鏈球菌的效果可能影響不大。3號、4號、7號在濃度較高時才有可辨識的抑菌圈，而1號、5號和10號則幾乎沒有抑菌圈出現。

四、綜合比較出對牙齒保健有最佳效果的菌株

根據兩個實驗，我們得知對氫氧基磷灰石分解效果較差的菌株有1號、5號、6號、8號，而對變異鏈球菌有較佳抑制效果的菌株有6號、8號、15號，兩者交互比較後，我們判斷作為牙齒保健產品有較高潛力的菌株為6號和8號，未來或可針對此兩種菌延伸研究。

五、討論

(一) 嘗試從各種乳酸菌食品中分離出乳酸菌

1. 本實驗均使用碳酸鈣MRS培養基，以便於篩選乳酸菌，從6號的培養基上可以見到部分培養基呈混濁，可見大部分乳酸菌已將周遭的碳酸鈣幾乎全部溶解，以致培養基呈半透明。
2. 菌落在解剖顯微鏡下的型態大致相同，碳酸鈣篩選法也只能分辨菌種是否為乳酸菌，因此除了觀察菌落外觀以外，我們沒有其他較容易操作的方法可辨識分離出的菌種，僅以肉眼觀察並不精確，故有可能分離到相同的菌種。其中6號與8號在兩個實驗中的表現都十分接近，來源也相同，因此我們猜測此兩種乳酸菌可能是同一種菌株。
3. 我們從養樂多中分離出4號、5號、10號三種菌，均通過碳酸鈣篩選法確認為乳酸菌，但養樂多中應只有一種乳酸菌，且三種菌在各項實驗中的表現亦不相同，無法確認為是作為樣品的養樂多中有雜質，或者其中有幾種菌的來源不明。

(二) 測試不同乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解作用

1. 若滴定溶液中不含鈣鎂離子，加入EBT指示劑後應呈藍色，即不須滴定；但空白值（只含液態培養基的對照組）滴定結果用掉約2mL的EDTA溶液，我們推測因為MRS培養基本身為弱酸性，使少部分氫氧基磷灰石被分解出鈣離子，故乳酸菌真正的產酸量皆須扣除此基本值。

2. 由實驗結果可知，大多數乳酸菌產酸量與時間關係為正相關，與一般預期結果相符；唯獨7號的趨勢為先升後降再升，累積鈣離子濃度不符合常理。綜合分析後，我們推論出有以下幾種可能：

(1) 此菌株的生長方式較為特別，不適用於常態分析。

(2) 實驗誤差。

3. 可能誤差來源：

(1) 用分光光度計測試吸光值時，時常出現同一個試管取出的溶液測出來的數據差距很大的情況，故推測此數值可能有一定誤差，導致各菌液的初始濃度即不同。

(2) 吸光值測出的是菌液中的活菌與死菌（細胞可能已失去活性，殘存細胞壁或其他物質）濃度總和，所以菌液中可能混有部分比例的死菌與雜質，造成活菌初始濃度低於所需濃度。

(3) EBT到達滴定終點時的變色過程較為緩慢，且顏色變化細微，故可能在此過程中滴了過量的EDTA而造成誤差。

(4) 將錐形瓶從培養箱中取出到開始滴定之間的前置作業需要約半小時的時間，此段時間有可能足以使乳酸菌繼續產酸而造成誤差。

(5) 在實驗中發現，最終鈣離子濃度較高的菌液，在滴入緩衝溶液時更容易產生碳酸鈣沉澱，因而影響滴定終點的判讀，可能造成誤差。

(三) 測試不同的乳酸菌株對變異鏈球菌的抑制效果

1. 在有抑菌圈出現的培養皿上可以觀察到有一圈白色菌落緊貼著濾紙周遭，推測應是濾紙上吸附的乳酸菌向外生長，而在白色菌圈之外才是透明的抑菌圈，故抑菌的原理應為乳酸菌分泌的某種物質抑止了變異鏈球菌的生長，而此物質實際上是什麼值得延伸研究，或許能有更高的應用價值。
2. 預期結果中，我們認為0號（即空白值）並不會產生任何抑菌圈，然而實際觀察中濾紙邊緣卻有些許透明環，推測可能是吸附在濾紙上的液態培養基滲出，使變異鏈球菌不易依附與生長。
3. 觀察15號菌株的培養皿中菌落生長情形，可以發現似乎是乳酸菌的白色小點以濾紙為中心向外擴展生長，甚至爬過變異連球菌（如圖），可推論兩者競爭關係為乳酸菌大於變異鏈球菌，雖然並未產生抑菌圈，但仍是具有一定優勢的乳酸菌。

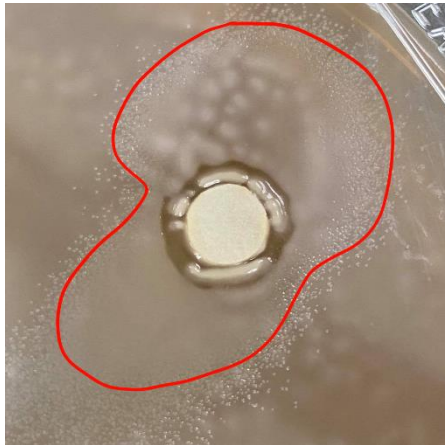


圖28 從抑菌圈擴散出去白色小點可能是乳酸菌(紅圈)

4. 在記錄數據後的幾天，我們仍把培養皿放在恆溫培養箱，但約2天後再次觀察，發現有幾個培養基上的變異鏈球菌菌落局部或全盤增厚，甚至將原有的抑菌圈覆蓋過去。我們推測有可能是塗盤的時候沒有塗均勻，造成變異鏈球菌在菌液較濃的地方持續生長，而使乳酸菌無法發揮抑制效果。
5. 每一個菌種我們都做了三次重複並取平均，但10號菌的其中一重複使用的培養皿在製作時未完全凝固，比其他正常的固態培養基更軟一些，也只有此培養基上的10號乳酸菌呈現出抑菌圈，另外兩盤則都沒有抑菌圈，故我們推測這一個培養基上的抑菌圈

可能是因為變異鏈球菌較不易在軟濕的的培養基上生長而出現，故推測10號實際的抑菌能力應較實驗得出的數值低落。

6. 可能誤差來源：

(1) 如上述，吸光值的測量偏差與死菌在菌液中佔的比例均有可能影響實驗結果。

(2) 濾紙吸附菌液的時間為固定，取出時亦盡可能瀝乾，但吸附的多餘菌液量可能不同，導致每片濾紙上有不同程度的殘留菌液滲出，造成實驗誤差。

(3) 變異鏈球菌菌液抹在培養基上時已盡可能均勻塗抹，但仍有可能有生長不均的狀況造成實驗誤差。

(4) 使用直尺直接測量抑菌圈，故肉眼判讀可能造成誤差。

(四) 此研究與〈台灣本土發酵食品內乳酸菌對牙齒保健效果之研究〉之差異

在我們之前已有一份未出版的碩士論文探討的項目與我們的研究很接近，但我們和這份論文的內容仍有所差異，以下將條列說明：

1. 實驗對象的不同

論文中採用的乳酸菌是從各種本土植物性發酵食物中挑選，以及陽明大學實驗室所提供的乳酸菌株，並經過DNA定序確認菌株種類；而我們則針對生活中常見的優酪乳等發酵乳中的乳酸菌進行實驗，礙於高中實驗室的限制與研究時間緊迫，造成我們沒有時間對其進行定序，因此未能確定其種類，只能確定分離出來的菌株是屬於發酵乳包裝所標示的其中一種。

2. 實驗方法的不同

碩士論文中同樣有進行氫氧基磷灰石的分解實驗，但測定方法是利用鈣離子檢測液使被分解的鈣離子顯色，並使用分光光度計測定吸光值；因我們無法獲取這種鈣離子檢測液，因此我們採用的是在高中實驗室較為方便操作且同樣精確的滴定實驗來測定鈣離子的量。

肆、結論與應用

一、結論

(一) 嘗試從各種乳酸菌食品中分離出乳酸菌

我們成功從不同發酵乳與保健食品中分離出9種乳酸菌，並依照分離順序為其編號。乳酸菌的菌落型態大致相似，為乳白色的中小型圓形菌落，但各菌株之間的菌落大小有明顯差異，邊緣光滑且部分菌株的菌落表面有光澤，黏附性低，容易以接種環從培養基上刮起。

(二) 測試不同乳酸菌株對氫氧基磷灰石的分解作用

1. 實驗中我們發現，鈣離子濃度與放置時間大致呈正相關，可得知乳酸菌在有足夠營養的適當環境中，會持續進行乳酸發酵，分解氫氧基磷灰石，若在人體口腔中，則表示乳酸菌在牙齒上的時間越長，琺瑯質就會持續被分解，使牙齒表面變得脆弱，進而增加齲齒的可能性。

2. 根據實驗結果，對氫氧基磷灰石分解效果最佳的是15號，而較差的是1號、5號、6號與8號，故可推測1號、5號、6號、8號等四種菌株若應用在牙齒保健，對琺瑯質的侵害會較小。

(三) 測試不同的乳酸菌株對變異鏈球菌的抑制效果

1. 在實驗前，我們先測試了兩種培養基，分別是BHI與MRS，以決定用哪一種作為日後實驗使用的培養基。在MRS上，變異鏈球菌可以生長，吸附乳酸菌的濾紙周圍也能表現出抑菌圈；在BHI上，變異鏈球菌也能生長，但相同的乳酸菌卻不能在BHI上出現抑菌圈，我們推測是因為變異鏈球菌屬於乳桿菌目，故可以在適合乳酸菌生長的MRS培養基上生長。因此，後續實驗皆採用MRS培養基。

2. 根據實驗結果，6號、8號與15號等三株菌的抑菌能力最好，在25%的濃度時即可表現出抑菌圈，且濃度越高，抑菌圈的直徑就越大，顯示抑菌的效果隨著濃度上升。故此三株菌在抑制變異鏈球菌的牙齒保健上，有較高的應用潛能。

(四) 綜合比較出對牙齒保健有最佳效果的菌株

綜合以上兩種實驗，我們判斷6號與8號是有較佳應用價值的乳酸菌株。

二、應用

此次實驗仍有許多能延伸探討的部分，分為以下幾點討論：

（一）乳酸菌定序：由於時間與器材不允許，我們只有分離出乳酸菌而未鑑定其菌種，故可以透過DNA定序確認菌種後再進行實驗會更加精確，也更容易辨別有潛能的菌株。

（二）本次實驗僅在培養基環境上進行實驗，並未模擬真實的口腔環境，未來可嘗試模擬口腔的溫度、pH值甚至濕度等等因素，以相似的環境進行測試，能更精確的了解乳酸菌在牙齒保健上的應用價值。

（三）未來進行實驗時，可嘗試以離心等方式將乳酸菌的細胞壁、細胞質與其分泌物等不同部分分離，並各自測試對變異鏈球菌的抑制效果，找出乳酸菌能抑止此菌生長的原因。

（四）乳酸菌產生的乳酸會腐蝕牙齒的琺瑯質，而依據抑菌圈實驗的結果及相關資料佐證，初步推測抑制變異鏈球菌的物質為乳酸菌的分泌物（細菌素等化學物質），故未來可嘗試將此物質分離出來獨立研究利用，便可只取其優而淘汰會腐蝕牙齒的缺點。

（五）本次實驗得知6號與8號乳酸菌對變異鏈球菌有較佳的抑制效果，未來可以此兩種乳酸菌進行對其他造成齲齒的菌之抑菌實驗，或許能發現乳酸菌在抑制其他菌種上的更多應用價值。

（六）未來可以此為基礎深入研究，研發相關保健食品，添加具優勢之乳酸菌或其分泌抑制細菌的物質，改善口腔環境，利用乳酸菌預防齲齒或牙周病。

伍、參考文獻

- 一、 閻立平（2013）。利用乳酸菌發酵香蕉皮汁基質生產 γ -胺基丁酸最適化培養條件之研究。未出版之碩士論文，私立東海大學食品科學研究所，台中市。
- 二、 游雅婷（2011）。台灣本土發酵食品內乳酸菌對牙齒保健效果之研究。未出版之碩士論文，國立臺北教育大學理學院自然科學教育學系，台北市。
- 三、 食品微生物之檢驗方法－乳酸菌之檢驗（民101）。
- 四、 台灣乳酸菌協會。2020年11月17號，取自 <https://www.talab.org.tw/knowledge.htm>
- 伍、 水中硬度檢測方法－EDTA滴定法（民95）。
- 六、 Habibah TU., Amlani DV., Brizuela M.(2020, Oct 13). Hydroxyapatite Dental Material. [Electronic version]. *StatPearls [Internet]*. Retrieved November 20, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513314/>
- 七、 Maoyang Lu., Songyu Xuan.,Zhao Wang.(2019). Oral microbiota: A -new view of body health. [Electronic version]. *Food Science and Human Wellness*. 8(1). 8-15.
- 八、 Samira Soltani., Riadh Hammami., Paul D Cotter., Sylvie Rebuffat., Laila Ben Said., H el ene Gaudreau., Fran ois B edard., Eric Biron., Djamel Drider., Ismail Fliss.(2020). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. [Electronic version]. *FEMS Microbiology Reviews*. 45(1).

【評語】 070005

本研究由某牙膏產品中發現含有乳酸菌而引發靈感，進而嘗試從各種乳酸食品中分離出數種菌株，並測試其對氫氧基磷灰石的分解能力及對變異鏈球菌的抑制效果，最後能成功找到具保健牙齒的潛力乳酸菌。本研究目標明確，實驗設計完整，雖有些實驗結果說服力不高，但書面報告撰寫清楚，討論亦非常詳盡，對於各種可能問題都能提出解釋及看法。口頭報告詳實有自信，能清楚、簡潔、且思考縝密地回答問題。本研究具有高中生自發性與原創性的探究精神，並是件生活化及實用性的高中生科展作品，值得肯定。

其它具體建議如下：

1. 若能加入口腔環境應用模擬試驗，將更顯有趣，並強化原先利用乳酸菌防治齲齒的應用想法。
2. 科學論文之材料方法，不需列出儀器設備的照片。
3. 由型態和菌落外觀和顏色來分成 9 株乳酸菌很不科學，有些可能是同一種菌種，作者也於討論中推測 6 號和 8 號可能是同一種菌，故需進一步做菌種鑑定較好。
4. 用四種不同濃度(100%, 75%, 50%. 25%)抑菌效果沒有顯示劑量差異的效益，說明實驗的誤差性頗大，需進一步確認定量的方法。
5. 建議應先測試各菌株之生長曲線，生長的效率不同，可能影響實驗結果。