

# 2023 年【科學探究競賽-這樣教我就懂】

## 普高組 成果報告表單

題目名稱：「抑」飲「兒」盡，飲料抑菌乎？

### 一、摘要

本研究先測試了幾種常見的市售飲料，直接就口喝後，分別於喝後過一定時間取 100 $\mu$ l 塗盤，藉以觀察內部細菌生長的概況。培養基上的細菌隨著喝完的時間增加而變少，因此推測它們有抑菌的效果。而後我們改為精準定量口水(100 $\mu$ l)後加入飲料，以確保控制變因不會因「直接就口喝」有所改變，最終得到的結果則與原實驗大致相同。

接著我們決定選擇成分較簡單的綠茶來探究其抑菌效果的來源，並透過比較自行泡茶及市售罐裝茶的細菌生長狀況，來確定抑菌物質來源是否為添加物。最後本研究鎖定兒茶素及咖啡因，欲測試其是否有抑菌能力。並從培養的細菌中，挑選 5 種較常出現的菌種，設計實驗，探究兒茶素及咖啡因對細菌生長之影響。

### 二、探究題目與動機

從小在父母的耳濡目染下，「飲料喝完就不能放久」已經成為一種不容置疑的常識。再加上在網路上查看到的資訊，其內容寫道：飲料放越久細菌滋生越多，看到這裡，學過生物的人都能看出些端倪。因為罐裝飲料是密閉環境，理論上會符合族群成長曲線，所以新聞中寫得「越來越多」，看似合理，實際上則尚待考查。因此我們秉持著科學的精神，虛心請教老師後設計嚴謹的實驗，希望能以數據來推翻此說法，並探討有無特殊因素從而導致結果有所偏差。

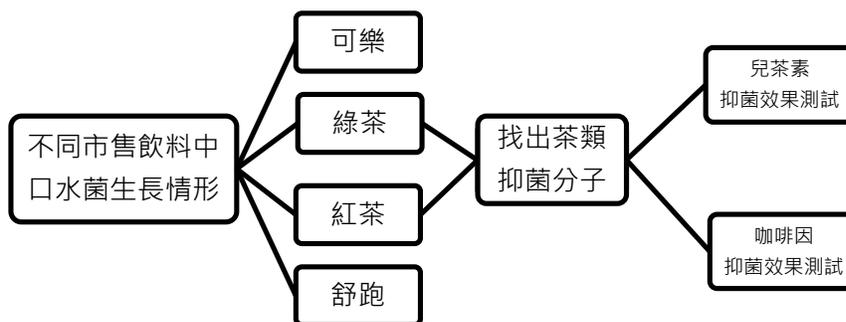
### 三、探究目的與假設

- 一、研究不同飲料中的細菌生長狀況
- 二、探究茶類中抑菌物質成分
- 三、研究兒茶素及咖啡因對口腔內不同種細菌的影響

### 四、探究方法與驗證步驟

#### 壹、研究過程及方法

##### 一、研究流程 (圖一)



圖一

## 二、研究方法

### (一) 洋菜培養基製備

取 20 公克 LB Agar 粉末置入燒杯，加入水待其全部溶解，再加入 500ml 的容量瓶，加水至 500ml。搖晃均勻後放入滅菌釜中滅菌。降溫後，在無菌操作台中將其平均倒入培養皿中，凝固後封上 parafilm 放入冰箱備用。

### (二) 養細菌及觀察

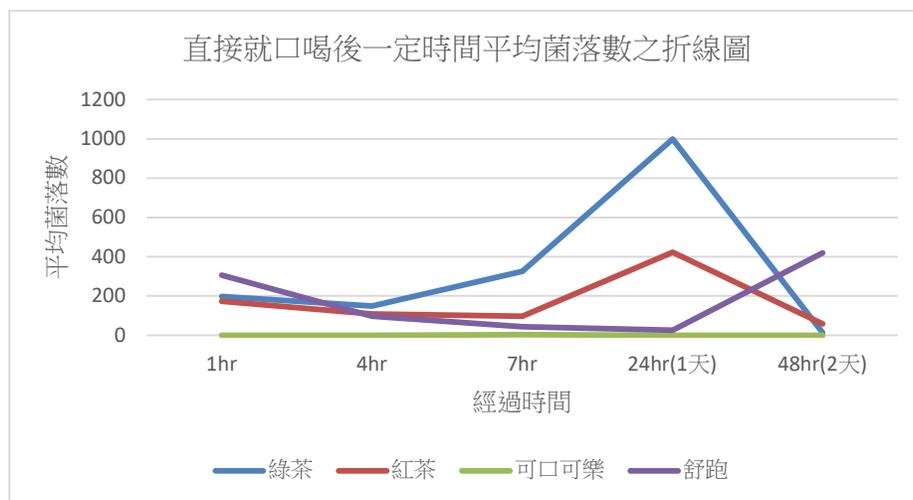
1. 飲料直接就口喝後，分別於喝後過一小時、四小時、七小時、一天和兩天，搖晃均勻後，用微量滴管吸取 100 $\mu$ l 滴入無菌的洋菜培養基中，再用消毒過後的 L 型玻棒將其均勻塗盤。然後將其放入細菌培養箱中培養，五天(120 小時)後記錄培養基上的菌落數數量和其型態。

2. 先將口水吐在空的培養皿上，再用微量滴管吸取 100 $\mu$ l 加入飲料中。之後步驟同上。

## 貳、初步研究結果 ( 實驗一 )

### 一、討論

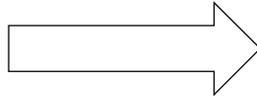
我們將培養基上的菌落數量記錄下來並繪製成折線圖 (圖二)。這些數據說明了飲料內部確實有某些物質在影響細菌的生長。從可樂的數據推斷，其內部應存在著能養細菌生長的物質，抑或是口水內細菌不適合在酸性環境生長，這也推翻了我們之前在新聞看到的內容，但也不能說飲料內完全無菌，只能說數量沒到非常的多。至於舒跑、綠茶和紅茶的細菌生長情況一度困擾著我們，重複做了好幾次也是得到差不多的結果。且仔細觀察不同時間的培養基，發現喝後過一小時和兩天的細菌型態差異非常大(圖三和圖四)。



圖二



圖三（一小時）



圖四（兩天）

## 二、推論

因為口水中有很多種細菌，每種細菌對飲料內部抑菌物質的對抗程度又不同，所以才導致型態差異很大。在舒跑、綠茶及紅茶中，經過競爭後，最後僅有少數菌被篩選出來，但由於是密閉環境，廢物累積太多，導致最後細菌量變得比前面的幾組的少。

經過一番討論，我們決定針對茶類進行後續的實驗探討。因為可樂的菌落數極少，沒有明顯細菌生長的消長狀況。舒跑內部則是有抑菌的物質，能夠在一開始(一天以內)，有效的降低細菌量，但時間一拉長，對抑菌物質抗性較高的細菌，便開始快速生長。而我們無法確認市售罐裝茶之抑菌效果是否因為其化學添加物，但茶類可以自行利用茶葉泡出，成分也較簡單，因此，為了能更好的掌握其抑菌物質，我們設計了進一步的實驗以驗證此假說。

## 參、設計實驗（實驗二）

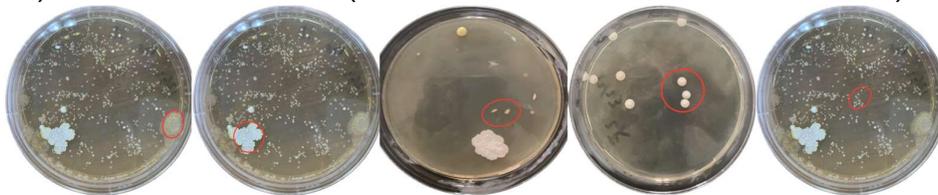
### 一、自行泡茶

為了確定抑菌物質是否為化學添加物，我們自行泡了綠茶及紅茶，置入容器放入滅菌釜滅菌後放涼。取用適量口水後，重複「實驗一：養細菌」的實驗步驟並記錄。

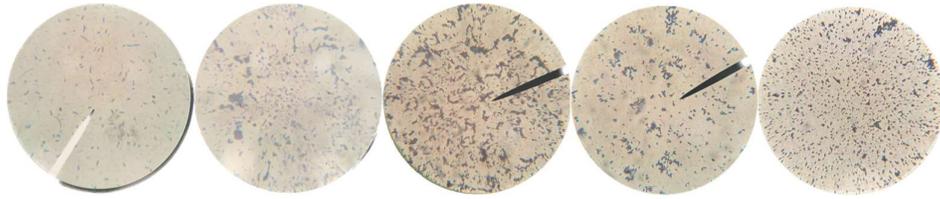
結果如我們所料，其細菌生長情況皆和市售罐裝茶無太大的差別，所以我們推論其內部抑菌物質為兒茶素或咖啡因。經過文獻查詢，發現大部分的相關文獻皆著重於紅茶中茶黃質的抑菌效果，而較少針對綠茶內兒茶素的研究。因此，我們在接下來的實驗中，鎖定綠茶進行兒茶素與咖啡因之抑菌效果的探討。

### 二、養細菌

取 6 公克的 LB 粉末置入燒杯，加入水待其全部溶解，再加水至 150ml 的容量瓶中。搖晃均勻後放入滅菌釜中滅菌。降溫後，在無菌操作台中，從先前養好的菌落中挑選幾種較常見的細菌(編號 1 到 5)投入。將其放入細菌培養箱培養一天後，對 1 號到 5 號菌進行了革蘭氏染色法，並拍下它們在顯微鏡下的型態，主要有球菌(2 號、4 號、5 號)、桿菌(1 號)和鏈球菌(3 號)三種，且都是陽性菌。(圖五及圖六，由左到右分別是一號至五號)



圖五



圖六

### 三、兒茶素與咖啡因的設計實驗

#### (一) 配置水溶液

為了取得較純的藥品，我們從網路上購買了純化綠茶素膠囊和咖啡因。

取 5 公克的兩種粉末，用無菌水配成飽和溶液，再將其稀釋成原濃度(飽和)的 1、1/5 和 1/10 倍。然後投入無菌的紙錠，浸泡 20 分鐘，取出後放入試管備用。

#### (二) 設計實驗

將養有細菌的液態培養液，用微量滴管吸取 100 $\mu$ l 滴入無菌的洋菜培養基中，再用消毒過後的 L 型玻棒將其均勻塗盤。塗完盤後，將紙錠從試管中取出，輕放在塗好的培養基中，紙錠濃度為原飽和溶液的 1、1/5、1/10 倍，不同濃度的紙錠各放置兩片，一盤共六片。然後將其放入細菌培養箱中培養。

### 肆、研究結果 ( 實驗二 )

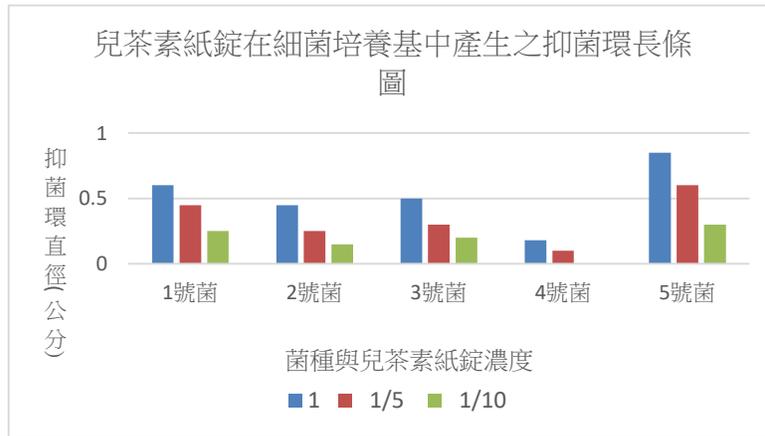
#### 一、細菌分布

##### (一) 兒茶素

觀察培養基可以發現，浸泡過兒茶素水溶液的紙錠周圍，出現了一個細菌無法生長的環形空白區域(即抑菌環)(圖七)，且紙錠所泡的溶液濃度越高，其抑菌環的直徑越大。我們將此環的直徑紀錄並繪製成表格(圖八)，此結果正驗證了兒茶素的抑菌效果。有趣的是，能在綠茶中存活到實驗末期(喝後過兩天)的 4 號菌，對兒茶素的抗性最強，空白區域最小；而大量出現在實驗初期(喝後過一小時)的 5 號菌，抗性則最弱。



圖七



圖八

## (二) 咖啡因

浸泡過咖啡因的紙錠周圍則皆未出現抑菌環(圖九)(以 1 號菌作為代表)，顯示其無抑制細菌生長的能力。



圖九

## 五、結論與生活應用

### 一、結論

從我們的設計實驗中，清楚的驗證了兒茶素的抑菌效果。最後，回歸我們最初的主題，也是一開始引起我們好奇心的問題：飲料就口喝過，放了一段時間後，能否繼續飲用？而依據最一開始的實驗數據，可推測常見市售罐裝飲料中，有添加具有抑菌效果的化學物質。這類物質能抑制細菌的生長與繁殖，甚至使某些抗性較差的細菌死亡，導致觀測到的菌落數減少。即使是含糖綠茶這類較富含營養的罐裝飲料，也會因茶的作用使細菌的繁殖速度大打折扣。

因此，即便將喝過的飲料放置於常溫中，一定時間內再度飲用所攝入的細菌量也不多，成功推翻了網路上的錯誤資訊以及「不容置疑」的常識。我們測試過喝一口飲料所進入的口水量大約是 5 $\mu$ l 至 10 $\mu$ l，但是，加入的口水量到 25 $\mu$ l 以上時，塗有喝過後兩天飲料的培養基上就有出現菌落。因此，飲料就口喝過後，還是將飲料於開封當日飲用完畢較適當，避免喝下了「細菌湯」！

### 二、應用與未來展望

經過文獻整理，我們了解到兒茶素與血管生成、細胞外基質降解、細胞凋亡的調節、保護神經作用、影響多種細胞內信號通路、基因調控和蛋白質功能的調節等機制皆有相互作用，但目前對其內部的完整反應方式尚不清楚。即便如此，相信仍可藉由調控發酵時間與溫度等因素來保證飲料中兒茶素含量與活性，以提升飲品的安全性。在實驗證明其抑菌效果後，我們也認為，或許有朝一日能將兒茶素含量納入食品標示中並言明其抑菌效果，以供消費者作為選擇市售飲品時的指標之一。

#### 參考資料

Robert L. Viventi(2021/03/13),HOW MANY BACTERIA ARE SECRETLY LIVING INSIDE YOUR MOUTH?[部落格文章]. <https://reurl.cc/9VXEbj>

Naghma Khan & Hasan Mukhtar(2018/12/25).Tea Polyphenols in Promotion of Human Health ,PubMed Central (PMC) , 11(1),39. <https://reurl.cc/5MqlXV>

盧映慈(2019 年 3 月 20 日)。乾眼有人工淚液可以點，那口乾舌燥可以用人工唾液來治療嗎？ <https://reurl.cc/2Wg0av>

維基百科(2022 年 9 月 2 日)。兒茶素。 <https://reurl.cc/Dm69x5>

Melanie Esselen & Stephan W. Barth(2014/10/03). Chapter Four - Food-Borne Topoisomerase Inhibitors: Risk or Benefit, 8 , 123-171 . <https://reurl.cc/EGz7mk>