

總結試驗報告

試驗項目

益生菌吸附試驗

試驗物質： 台灣 01 益生菌

委託單位： 我的輕食有限公司

高雄市仁武區京吉六路 29 號

試驗單位： 台美檢驗科技股份有限公司 委託研究實驗室及生物實驗室

新北市五股區五權三路 24 號 3、4 樓

新北市新莊區五工五路 21 號

備註：

- 本報告共12頁，分離使用及 / 或摘要複製無效。
- 本試驗未涉及試驗物質抽樣，總結試驗報告僅對該送驗之試驗物質負責。



蔡岳廷

報告簽署人：蔡岳廷 博士

目錄

摘要	3
試驗目的	4
一般資訊	4
試驗時程	4
試驗物質	4
試驗體系與條件	4
試驗方法	5
結果	5
結論	6
參考文獻	6

表

表 1：試驗物質吸經乳酸菌耐消化（耐胃酸、耐膽鹽）作用 0 ~ 6 小時後之結果	7
表 2：試驗物質吸附 Caco-2 細胞株數量與比例	8

圖

圖 1：乳酸菌耐消化試驗之存活率變化圖	9
圖 2：乳酸菌耐消化試驗之菌量變化圖	10

附件

附件 1：試驗物質經乳酸菌耐消化（耐胃酸、耐膽鹽）作用 0 ~ 6 小時後之結果	11
附件 2：試驗物質吸附 Caco-2 細胞株結果	12

評估「台灣 01 益生菌」之益生菌吸附試驗

摘 要

Caco-2 細胞是人類結腸腺癌細胞株，經培養為單層細胞層模擬腸道表皮細胞，與經連續消化之益生菌共同培養後分析，評估由我的輕食有限公司所提供之「台灣 01 益生菌」(台美檢體編號：MZ2-240300505) 對 Caco-2 細胞之吸附能力。本試驗以益生菌經模擬人體消化過程為研究對象，試驗物質經連續消化第 6 個小時總乳酸菌存活率為 98.32%，試驗物質經胃酸、膽鹽連續消化前及消化後，平均吸附能力分別為每 100 顆 Caco-2 細胞含 222 及 112 益生菌數。綜合以上結果，本試驗物質「台灣 01 益生菌」，在此試驗條件下對於耐胃酸及耐膽鹽能力良好，且保有吸附率為 95.56%，可有效吸附於人類腸道細胞中。

1. 試驗目的：

本試驗使用人類結腸腺癌細胞株 (Caco-2 cell line) · 經培養為單層細胞層模擬腸道表皮細胞 · 與經過模擬耐消化前處理之益生菌共同培養後分析並評估益生菌的吸附能力。

2. 一般資訊：

2.1 研究編號：MZ2-240300505。

2.2 試驗委託單位：

2.2.1 委託單位名稱：我的輕食有限公司。

2.2.2 委託單位地址：高雄市仁武區京吉六路 29 號。

2.3 試驗執行單位：

2.3.1 試驗單位名稱：台美檢驗科技股份有限公司 委託研究實驗室及生物實驗室。

2.3.2 試驗單位地址：新北市五股區五權三路 24 號 3、4 樓及新北市新莊區五工五路 21 號。

2.3.3 研究主持人：江建儀 副理及張雅迪 主任。

2.3.4 研究人員：何柏樺 分析師、童昱儒 分析師及羅凱馨 分析師。

2.3.5 研究主持人及人員地址：同試驗單位地址。

2.4 試驗場所

台美檢驗科技股份有限公司 委託研究實驗室 (地址：新北市五股區五權三路 24 號 3 樓) 及生物實驗室 (地址：新北市新莊區五工五路 21 號) 。

3. 試驗時程：

3.1 實驗起始日：2024/05/15。

3.2 實驗完成日：2024/06/07。

4. 試驗物質 (由委託單位於試驗開始前提供)：

4.1 試驗物質 (台美檢體編號：MZ2-240300505)：

4.1.1 物質名稱：台灣 01 益生菌。

4.1.2 接收日期：2024/03/18。

5. 試驗體系與條件：

5.1 試驗體系：

5.1.1 細胞株：人類結腸腺癌細胞 (Human colon adenocarcinoma, clone of Caco-2, C2BBe1, BCRC 60182)。購自財團法人食品工業發展研究所。

5.1.2 培養基：含 10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.01 mg/mL holo-Transferrin human 及 1.0 mM sodium pyruvate 之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養液。

5.1.3 培養條件：5 ± 1% CO₂ 之 37 ± 1°C 培養箱。

6. 試驗方法：

6.1 模擬人體消化過程前處理：

- 6.1.1 使用已滅菌攪拌均質器將檢體均質混合均勻後，取 10 g 加入 pH 3 的人工胃液 90 mL，混合均勻，作為 10 倍稀釋檢液並於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 連續作用 3 小時（第 0 ~ 3 小時）。經 4,000 rpm 離心 10 分鐘去除人工胃液後，加入等量含 0.3% 膽鹽之人工腸液懸浮混合均勻，於 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 繼續作用 3 小時（第 3 ~ 6 小時）。
- 6.1.2 於第 0、1、2、3、4、5 及 6 小時取樣，使用已滅菌之吸管，吸取上述經模擬人體消化過程之檢液 10 mL，分別加至 pH 7.2 磷酸緩衝溶液 90 mL 中，依序稀釋成 100 倍、1,000 倍、10,000 倍等系列稀釋檢液。
- 6.1.3 將各系列稀釋檢液充分振搖，混合均勻。
- 6.1.4 吸取各稀釋檢液 1 mL，分別置入培養皿中，各檢液操作二重複。
- 6.1.5 分別倒入 $44 \pm 1^\circ\text{C}$ 之 MRS 培養基 18 ± 2 mL，搖動混合。
- 6.1.6 將培養基平板靜置，待培養基凝固後，倒置於 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 厭氧培養 72 ± 3 小時。
- 6.1.7 計算各模擬人體消化時間點之總乳酸菌菌量與存活率 (Survival rate)。
- 6.1.8 存活率之計算公式：存活率 (%) = 實驗組殘留菌量 (log CFU/g) \div 對照組菌量 (log CFU/g) \times 100%。

6.2 吸附試驗：

- 6.2.1 於 24 孔盤中每孔接種 1,000 μL Caco-2 細胞懸浮液 (初始細胞數為 2.0×10^5 cells/well) 後培養 21 天，形成單層細胞膜。使用前應更換並加入 1,000 μL 無抗生素 DMEM 培養基後培養 30 分鐘。
- 6.2.2 將未經消化及經連續消化前處理之益生菌以無抗生素 DMEM 培養基調整濃度 2.0×10^8 CFU/mL，每孔接種菌數為 1.0×10^8 CFU，共同培養 2 小時。每組試驗均進行三重複。
- 6.2.3 使用 PBS 清洗 5 次，除去未吸附之益生菌。每孔加入 1,000 μL 0.1% Triton X-100 於室溫作用 10 分鐘，切下細胞後經序列稀釋 10 倍序列稀釋，各稀釋倍數分別取 100 μL 進行塗盤 (MRS agar)，各檢液操作二重複，並於 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 厭氧培養 48 小時，計算菌數並評估益生菌吸附能力。

6.3 試驗數據分析：計算益生菌吸附數 (CFU/well)、保有吸附率 (%) 及吸附能力 (CFU/100 cells)。

7. 結果：

胃酸與膽鹽是人體防止外來細菌入侵的物質之一，因此，益生菌需要具有胃酸及膽鹽的耐受性才能進入腸道中並定殖，發揮益生菌的作用。本試驗採用連續性將試驗物質與人工胃液、人工腸液混合，模擬人體消化過程並計算總乳酸菌存活率，評估產品中益生菌耐胃酸及耐膽鹽的程度。結果顯示，前 0 ~ 3 小時進行耐胃酸 pH 3 試驗時，於第 3 個小時總乳酸菌存活率為 98.98%，接著於第 3 ~ 6 小時進行耐 0.3% 膽鹽濃度試驗，於第 6 個小時總乳酸菌存活率為 98.32% (試驗結果如表 1 及圖 1 所示)。試驗物質經模擬人體消化試驗達 85% 以上存活率，顯示對於耐胃酸及耐膽鹽能力良好。

Caco-2 細胞是人類結腸上皮細胞株，許多文獻於體外試驗中證實此細胞具有表現型態和功能上分化：包括極化、有功能性的微絨毛和分泌水解酶的能力，具備成熟腸道細胞的特性。因此許多研究利用 Caco-2 細胞單層

膜作為模擬腸道上皮細胞 (王啟賢, 2002; 陳鈺馨, 2012)。微生物會因宿主腸道的蠕動收縮或分泌黏液等機制被排出體外, 乳酸菌必須具有吸附腸道上皮的能力, 才可在腸道中增生並發揮益生菌功能。

益生菌吸附性試驗結果顯示, 對照組 (未經連續消化) 及試驗組 (經胃酸、膽鹽連續消化 6 小時) 之益生菌平均吸附數分別為 6.15×10^6 CFU/well 及 3.1×10^6 CFU/well, 平均吸附能力分別為每 100 顆 Caco-2 細胞含 222 及 112 益生菌數, 經胃酸、膽鹽連續消化處理後之保有吸附率為 95.56% (表 2)。

8. 結論：

本試驗以益生菌經模擬人體消化過程為研究對象, 試驗物質經連續消化第 6 個小時總乳酸菌存活率為 98.32%, 試驗物質經胃酸、膽鹽連續消化前及消化後, 平均吸附能力分別為每 100 顆 Caco-2 細胞含 222 及 112 益生菌數。綜合以上結果, 本試驗物質「台灣 01 益生菌」, 在此試驗條件下對於耐胃酸及耐膽鹽能力良好, 且保有吸附率為 95.56%, 可有效吸附於人類腸道細胞中。

9. 參考文獻：

- 9.1 衛生福利部食品藥物管理署。102.09.06。部授食字第 1021950329 號公告修正：食品微生物之檢驗方法 - 乳酸菌之檢驗。
- 9.2 王啟賢。益生菌 *L.GG* 吸附在 Caco-2 細胞上對抗生素及生物黃酮通透的影響。2002, 大同大學生物工程研究所碩士論文。
- 9.3 陳鈺馨。乳酸菌減緩過敏之體外和體內功能評估。2012, 東海大學食品科學研究所碩士論文。
- 9.4 Delgado S, Leite AM, Ruas-Madiedo P, Mayo B. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front Microbiol.* 2015 Jan 14; 5: 766.
- 9.5 Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 2012 Nov; 30(11): 591-600.
- 9.6 Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2012 Feb 1; 153(1-2):216-22.
- 9.7 Lim SM, Ahn DH. Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *J Microbiol Biotechnol.* 2012 Dec; 22(12):1731-9.
- 9.8 Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. Á. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*, 2012; 4(2), 531-541.

表 1：試驗物質吸經乳酸菌耐消化（耐胃酸、耐膽鹽）作用 0 ~ 6 小時後之結果

耐消化試驗 模擬環境	連續作用時間 (hr)	總乳酸菌			
		CFU/g	log CFU/g	存活率 (%)	
對照組	0	5.5×10^{10}	10.74	-	
	1	5.1×10^{10}	10.71	99.72	
	pH 3 胃酸	2	4.8×10^{10}	10.68	99.44
		3	4.3×10^{10}	10.63	98.98
0.3%膽鹽	4	4.4×10^{10}	10.64	99.07	
	5	3.9×10^{10}	10.59	98.60	
	6	3.6×10^{10}	10.56	98.32	

表 2：試驗物質吸附 Caco-2 細胞株數量與比例

組別	益生菌吸附試驗			
	吸附數 (CFU/well) ^a	Log	保有吸附率 (%) ^b	吸附能力 (CFU/100 cells) ^c
對照組 (未經連續消化)	$6.15 \times 10^6 \pm 3.00 \times 10^5$	6.79	—	222
試驗組 (經連續消化 6 小時)	$3.10 \times 10^6 \pm 5.38 \times 10^5$	6.49	95.56	112

^a 每個組別皆進行三重複測試，數據均以 Mean ± SD 表示。

^b 保有吸附率 (%) = (試驗組吸附數對數值 ÷ 對照組吸附數對數值) × 100 %。

^c 吸附能力 (CFU/100 cells) = 加總 (三重複吸附益生菌數分別除以第 21 天細胞總數) × 100 之後，計算平均值。第 21 天平均細胞總數 2.77×10^6 cells/well。

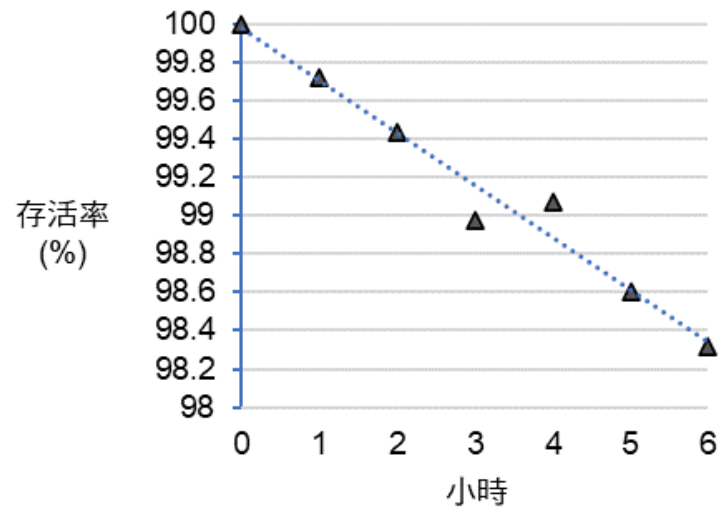


圖 1：乳酸菌耐消化試驗之存活率變化圖

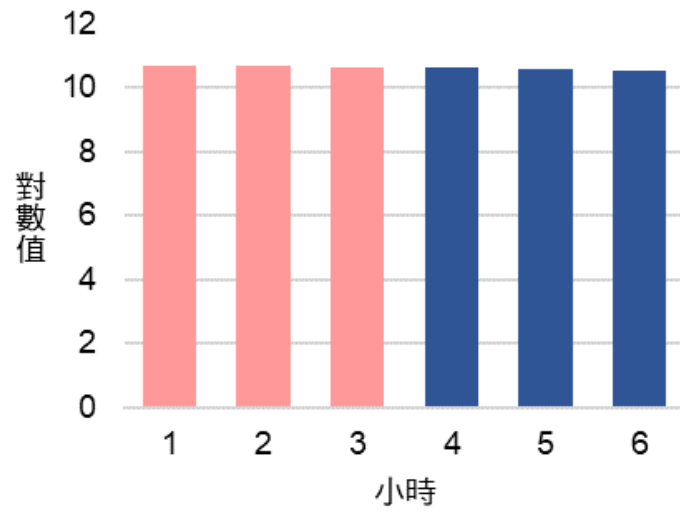
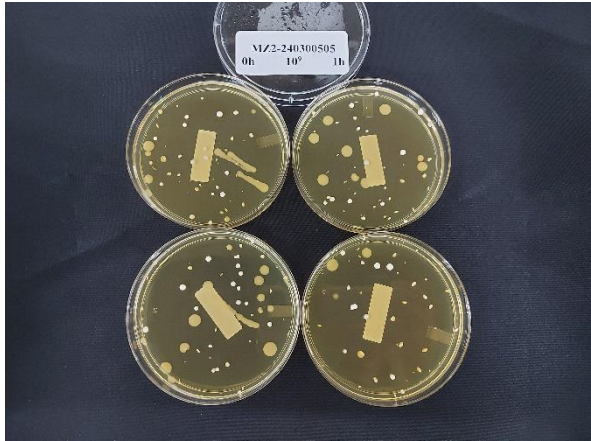
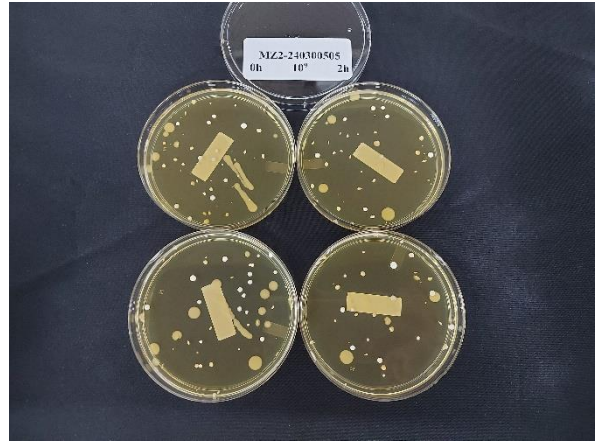


圖 2：乳酸菌耐消化試驗之菌量變化圖

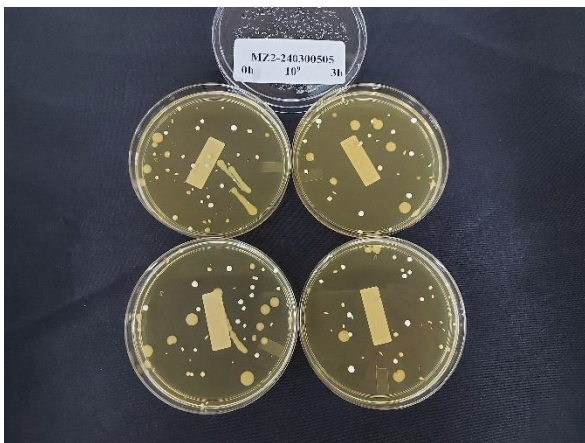
附件 1：試驗物質經乳酸菌耐消化（耐胃酸、耐膽鹽）作用 0 ~ 6 小時後之結果



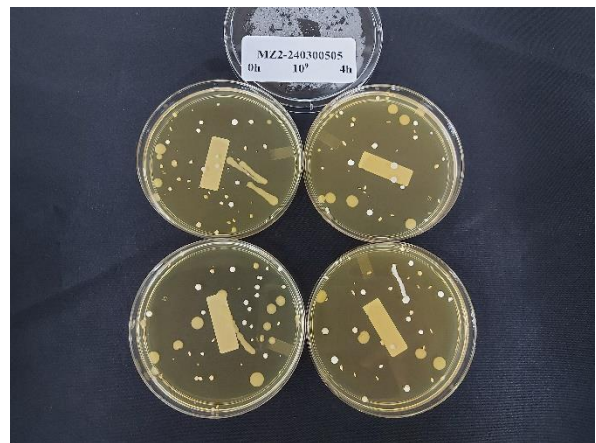
A：對照組第 0 小時及實驗組第 1 小時。



B：對照組第 0 小時及實驗組第 2 小時。



C：對照組第 0 小時及實驗組第 3 小時。



D：對照組第 0 小時及實驗組第 4 小時。



E：對照組第 0 小時及實驗組第 5 小時



F：對照組第 0 小時及實驗組第 6 小時

附件 2：試驗物質吸附 Caco-2 細胞株結果

組別	吸附數 (CFU/well)		
	1	2	3
對照組 (未經連續消化)	5.85×10^6	6.45×10^6	6.15×10^6
試驗組 (經連續消化 6 小時)	3.50×10^6	2.49×10^6	3.33×10^6