

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第一名

052207

益菌抑菌-從食品分離之胚芽乳酸桿菌對傷口癒合和發炎的預防與治療效應

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者：	指導老師：
高一 黃鈺淇	陳怡安 蔡任圃

關鍵詞：胚芽乳酸桿菌、傷口癒合、抗發炎

得獎感言

科展歷程

做研究的過程是一條漫長又未知的路。回想參展的經驗，最讓我印象深刻的，其實是一次「看似錯誤的實驗數據」。當時我覺得很沮喪，但後來才發現裡面藏著有用的訊息。那一刻我體會到，科學不是照著計畫一條路走到底，而是要在偶然和不確定裡保持敏銳和謙卑。有些收穫，往往不是來自我們一開始設想的答案。

這段經驗帶給我的，不只是知識上的進步，更是態度的改變。一次次失敗、修正、再嘗試，讓我學會耐心和細心，也逼著我誠實面對自己的不足。每次在數據和圖表前猶豫時，我都提醒自己——結論應該來自證據，而不是來自自己原本相信的方向。這份謹慎對我而言，是研究中最重要的收穫。

特別感謝教授和指導老師們。教授總是提醒我，不要急著追求漂亮的結果，而要先確定方法和數據是否可靠。這樣的提醒，讓我慢慢養成了更嚴謹的研究態度。指導老師在我遇到瓶頸時，也從來不是直接給答案，而是陪我一步步釐清問題、提供方向，甚至鼓勵我自己設計新的驗證方式。很多時候，我能撐下來，就是因為他們的耐心與支持。

當然，還有家人的默默支持，讓我能安心把心力放在研究上。成果能走到今天，真的是很多人共同的付出，而我只是把這些養分和啟發，慢慢轉化成了這份作品。

對我來說，這不是終點，而是提醒自己要更謹慎、更專業的起點。我希望把榮耀當作一種責任，也期待能和更多人交流、學習，讓科學精神能持續被傳遞。未來，我會持續努力，用謙虛的態度走在科學這條路上，希望能盡一份自己的力量。



與指導老師在比賽現場的合照

摘要

本研究透過PCR、MTT測試等，從食品篩選無細胞毒性的乳酸桿菌菌株CYLB565。此菌株顯著促進GES-1胃細胞的傷口癒合。CYLB565與其分泌物在pH4、6.5的環境下顯著抑制病原菌。抗發炎實驗中，若胃細胞預先以EPS處理，對大腸桿菌、LPS、幽門桿菌誘發的發炎具預防潛力；若於發炎反應同時以EPS處理，對大腸桿菌、LPS誘發的發炎具即時阻斷潛力；若於發炎反應之後以EPS處理，對大腸桿菌、幽門桿菌誘發的發炎具治療潛力。CYLB565在pH 3及0.3%膽鹽環境下具良好腸胃道耐受性。全基因定序結果顯示CYLB565為新發現的胚芽乳酸桿菌菌株，質體具安全性，適合應用於細菌性胃炎的預防與治療。

壹、前言

一、研究動機

臨牀上常以抗生素治療傷口的細菌感染，但神經毒性與抗藥性問題日益嚴重，因此迫切需要更安全的替代方案(Snavely & Hodges, 1984)。另外，若傷口受大腸桿菌、金黃色葡萄球菌等感染，形成細菌性胃炎，可能伴隨嘔吐、發燒、腹痛或全身性發炎(Sattar, *et al.*, 2023)。發炎過程中可能破壞正常組織、延遲傷口癒合，並增加細胞癌化機率(Eming, *et al.*, 2007)。因此，控制發炎反應能夠促進傷口癒合，降低過度發炎對細胞的傷害並防止更多病原菌感染。

已知奈及利亞發酵乳之乳酸桿菌透過細菌素抑制大腸桿菌，並改善小鼠的傷口癒合(Nwajiobi, *et al.*, 2023)。因此，本研究旨在探討乳酸桿菌在傷口癒合、抑制病原菌與抗發炎方面的潛力，以減少胃部傷口的抗生素依賴、降低感染機會。

在乳酸桿菌來源的選擇上，相較於直接從自然環境分離菌株，從食品分離出的乳酸桿菌更加安全穩定。因此，本研究以本土傳統市場食品為菌株來源。了解食品中微生物的作用，有助於提升食品的應用。

二、研究目的

- (一)、從傳統食品分離與鑑定乳酸桿菌
- (二)、以MTT測試乳酸桿菌對GES-1的細胞毒性
- (三)、測試乳酸桿菌對GES-1的傷口癒合效應
- (四)、測試癒合潛力菌株對低pH與膽鹽環境的耐受性
- (五)、驗證癒合潛力菌株的機制是否為細胞增殖
- (六)、測試乳酸桿菌抑制大腸桿菌、幽門桿菌的能力

(七)、探討癒合潛力菌株的EPS是否能抑制促發炎細胞因子

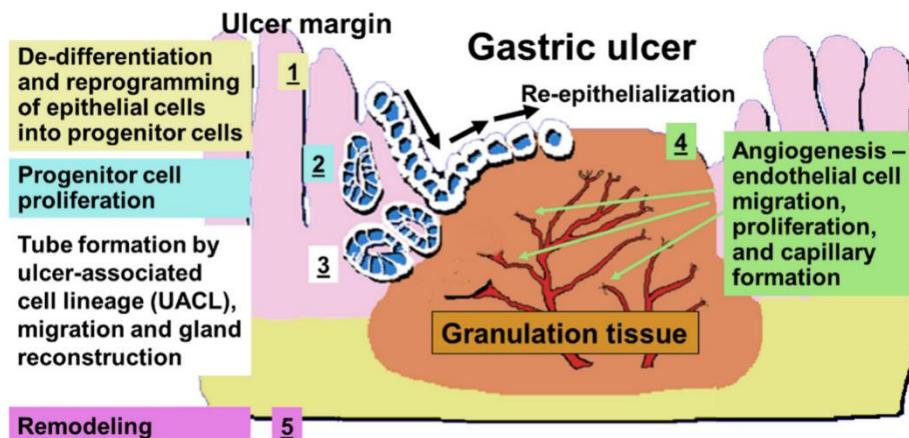
(八)、以全基因定序(WGS)鑑定菌種，並分析菌株是否含有害基因

三、文獻回顧

(一)、胃部傷口癒合過程

胃傷口癒合是一個再生過程，涵蓋止血、發炎、增殖和重塑階段，由細胞激素、轉錄因子控制(Tarnawski, *et al.*, 2021)。在發炎階段，免疫細胞清除壞死組織及病原體 (Almadani, *et al.*, 2021)。隨後，上皮細胞在增殖階段遷移至傷口處，修復組織。最後的重塑階段，透過增強細胞間質，使癒合的組織更穩定 (Wallace, *et al.*, 2023)。

已知胚芽乳酸桿菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) 及唾液乳酸桿菌(*Lactobacillus salivarius*) 可促進角質細胞增殖，加速傷口癒合(Brandi, *et al.*, 2020)；*L. plantarum*可促進大鼠胃部傷口癒合(Fauziah, *et al.*, 2023)。



圖一、胃部傷口癒合階段(Tarnawski, *et al.*, 2021)。

(二)、促發炎細胞因子對傷口的影響

發炎是傷口癒合的第二階段。發炎過程中可能破壞正常組織，延緩上皮再生(Leoni, *et al.*, 2015)。而過度的發炎反應可能延遲傷口癒合，並增加細胞癌化機率(Eming, *et al.*, 2007)。因此，控制發炎反應能夠促進傷口癒合，降低對細胞的傷害。

促發炎細胞因子(proinflammatory cytokines)是免疫調控與傷口癒合中的關鍵角色(Van Deuren, *et al.*, 1992 ; Krzyszczyk, *et al.*, 2018)。IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 是評估胃部發炎情形的常見指標(Noach, *et al.*, 1994; Santos, *et al.*, 2021)。其中，IL-6可促進免疫細胞活化，並調節急性發炎反應。IL-8 主要負責吸引中性粒細胞至發炎部位，協助清除病原體，但過量可能導致慢性發炎。IL-1 β 具高度促發炎作用，可進一步誘導 IL-6 及 IL-8 表達，形成發炎級聯反應(Dinarello, *et al.*, 2011)。而 TNF- α 則可促進細胞凋亡與發炎反應。

若能降低發炎指標表現，即可幫助傷口順利進入「增殖」與「重塑」階段(Elham, *et al.*, 2022)。研究發現，某些乳酸桿菌菌株可降低這些促發炎細胞因子的表達，緩解發炎。例如，*L. plantarum*可抑制胃腺癌細胞IL-8 的表達(Thiraworawong, *et al.*, 2014)，而*Lactobacillus reuteri* 的胞外多醣體 (EPS) 能在腸胃道傷口抑制 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 (Kšonžeková, *et al.*, 2016)。

(三)、全基因定序與乳酸桿菌安全性評估

全基因定序 (WGS) 可用於評估乳酸桿菌的安全性，檢測其是否攜帶抗藥基因或毒力因子 (McLeod, *et al.*, 2019; Chokesajjawatee, *et al.*, 2020; Peng, *et al.*, 2022)。此外，若乳酸桿菌的質體不含可轉移的抗藥性基因，則可確保其作為益生菌的安全性 (Nunziata, *et al.*, 2022)。

貳、研究設備及器材

一、重要設備

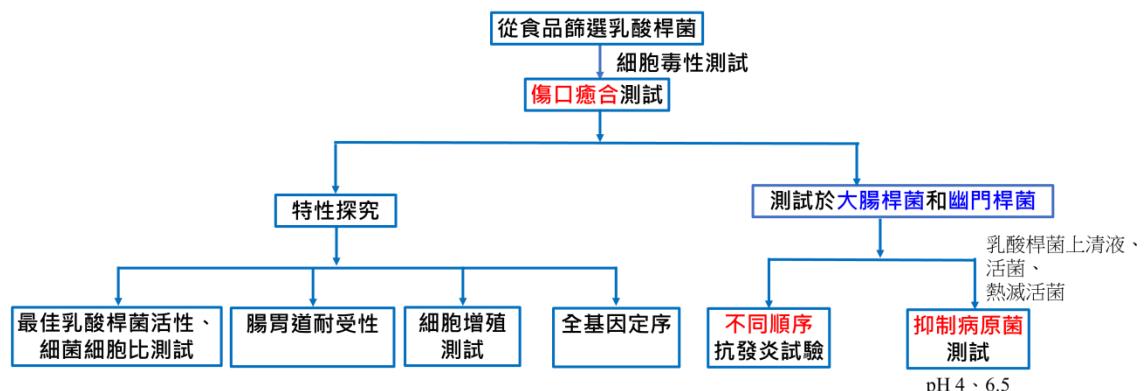
- (一)、37°C細菌培養箱
- (二)、多功能微量盤式分析儀
- (三)、分光光度計
- (四)、計數盤
- (五)、插入式細胞培養容器(culture insert)
- (六)、Nanodrop機器
- (七)、Qubit機器
- (八)、Nanopore機器

二、重要藥品

- (一)、Ethidium bromide
- (二)、氯仿(chloroform)
- (三)、TRIzol(Guanidinium thiocyanate)
- (四)、DNA萃取試劑組
- (五)、gDNA library 試劑組
- (六)、MRS培養基(De Man, Rogosa and Sharpe)
- (七)、LB培養基 (Lysogeny broth)
- (八)、Brucella培養基(Brucella broth)

參、研究過程或方法

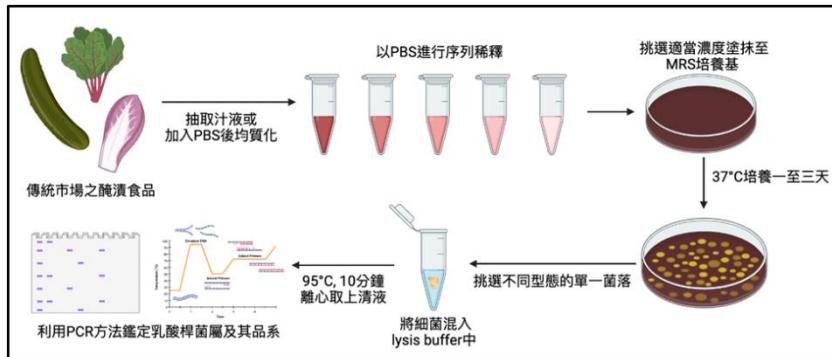
一、研究架構



圖二、研究架構圖 (資料來源：作者繪製)。

二、研究方法

(一)、分離與鑑定乳酸桿菌



圖三、分離與鑑定乳酸桿菌流程 (資料來源：作者以Biorender繪製)。

本研究的樣本為傳統市場的食品。我們選用MRS瓊脂培養基，針對乳酸桿菌的增長具選擇性。食品樣本為：桂花甜酒釀、台式泡菜、榨菜、醃芹菜、醃芥菜、醃條瓜、醬醃蘿蔔、醃薑、酸菜、辣榨菜、臭豆腐、鳳梨醬苦瓜、韓式泡菜、雪裡紅、醃黃瓜、醃青椒、黃金泡菜、老菜脯、蔭醬冬瓜、蔭醬鳳梨。

將樣本汁液序列稀釋，塗抹於MRS 瓊脂培養基，於37 °C培養。每個樣本挑選12個菌落 (colony)，萃取細菌DNA。

以聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)進行初步鑑定。樣本配製如下：DNA 2 μ L、MasterMix 10 μ L、前置引子(forward primer)和反置引子(reverse primer)(表一)各 1 μ L、純水 6 μ L。反應條件：(95°C, 10分鐘), 30 \times [(95°C, 30秒), (52°C, 1分鐘), (72°C, 2分鐘)], (72°C, 7分鐘)。以電泳分析確認菌株是否屬於乳酸桿菌。

以RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA- PCR) 透過單一引子隨機擴增DNA片段，排除相似品系。樣本配置如下：DNA 2 μ L、MasterMix 10 μ L、前置引子 2 μ L(表一)、水。反應條件：(94°C, 5分鐘), 8 \times [(94°C, 30秒), (36°C, 1分鐘), (72°C, 1分鐘 30秒)], 35 \times [(94°C, 30秒), (36°C, 30秒), (72°C, 1分鐘 30秒)], (72°C, 3分鐘)。以電泳分析判斷菌株是否為相似品系。

表一、PCR 與 RAPD-PCR 引子序列(資料來源：作者整理)

PCR Forward Primer(R16-1)	PCR Reverse Primer(LbLMA1-rev)	RAPD-PCR Primer
CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	CCG CAG CCA A

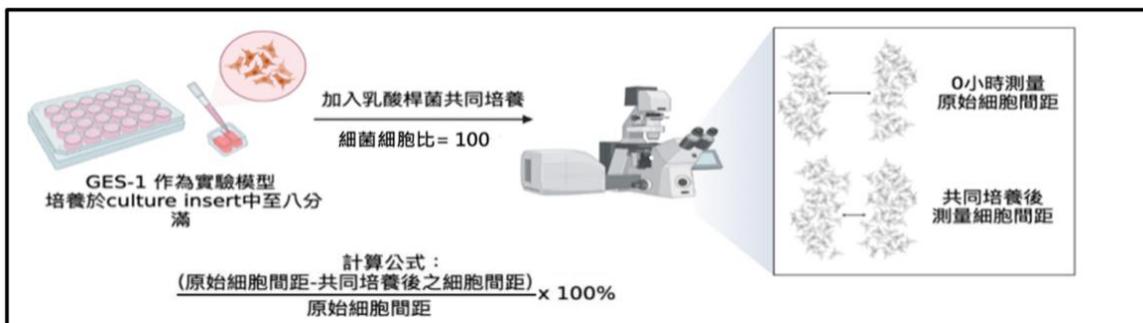
(二)、MTT 測試乳酸桿菌細胞毒性



圖四、細胞存活率測試流程 (資料來源：作者以Biorender繪製)。

本研究選用人類胃部上皮細胞(GES-1)作為細胞模型，為永生化細胞，以黏附方式生長。將GES-1細胞與不同的乳酸桿菌菌株，以細菌/細胞比=100共培養。16小時後加入黃色之MTT溶液，若細胞仍存活，細胞中的代謝酶會將其轉化為藍紫色的產物。以DMSO溶液溶解此產物。測定波長570 nm下的吸光值 (Optical Density, OD)，吸光值愈高代表細胞存活率愈高。以未與乳酸桿菌共培養的GES-1細胞之結果為陽性對照組，其細胞存活率維持正常；以加入界面活性劑 triton X-100的GES-1細胞之結果為陰性對照組，細胞存活率顯著降低。將加入乳酸桿菌的樣本吸光值與陽性對照組比較，排除顯著降低GES-1細胞存活率的菌株。

(三)、傷口癒合測試



圖五、傷口癒合測試流程 (資料來源：作者以Biorender繪製)

1. 篩選最佳菌株

在細胞培養皿中放置專用的 culture insert 製造間隙，並培養GES-1細胞至密度達80%後，以鑷子垂直取出 culture insert，隨即使用顯微鏡觀察並拍攝0小時細胞間隙區域。利用顯微鏡攝影機及影像擷取軟體 (Mosaic 2.2) 記錄。

取不同的乳酸桿菌菌株，設定細菌/細胞比= 100，和GES-1細胞共培養4小時後，測量間隙距離。以未與乳酸桿菌共培養的GES-1細胞作為對照組，其間隙縮小情況作為比較基準。利用公式計算經過4小時後，細胞間隙縮小之相對百分比(如圖五)，選出傷口癒合能力最佳的菌株。

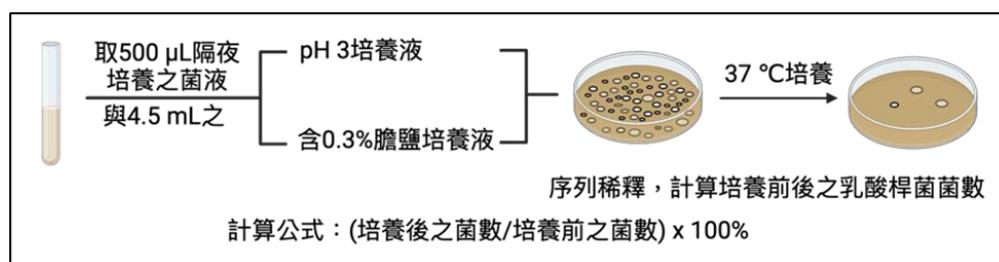
2.共培養狀態測試：

以未與乳酸桿菌共培養的GES-1細胞作為對照組。此實驗旨在確保後續實驗所採用的細菌/細胞比與細菌活性為傷口癒合效果最佳的比例。

將篩選出的最佳菌株，以細菌/細胞比=50、100、200，和GES-1共培養，測試其癒合效果，並選取最佳共培養比例用於後續實驗。

將同一菌株以活菌、熱滅活菌(heat-killed bacteria)以及菌株上清液(supernatant)狀態和細胞共培養。其中熱滅活方式是將菌液放入 70°C 烘箱 1 小時使其失去活性。選取最佳癒合活性用於後續實驗。

(四)、腸胃道耐受性測試



1. 抗酸實驗

將乳酸桿菌培養於MRS培養液，取500 μ L混勻的菌液加入4.5 mL pH 3 的酸性MRS培養液中。將混合後的樣本作序列稀釋，每個濃度分別在MRS培養盤上滴三次，放入37°C培養箱。3小時後，將培養管內的菌液序列稀釋，滴於新的培養基並放入37°C培養箱。

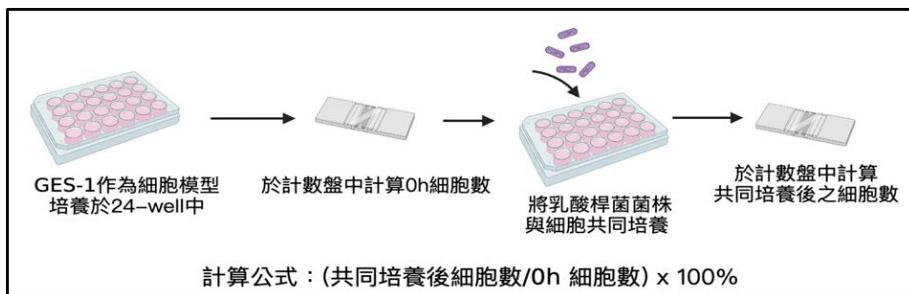
計算細菌增殖倍率百分比 $[(\text{培養後菌落數} / \text{0小時菌落數}) \times 100\%]$ 。對照組為乳酸桿菌在未調整pH值的MRS培養液中培養3小時。

2.抗膽鹽實驗

將乳酸桿菌培養於MRS培養液，取500 μ L混勻的菌液加入4.5 mL 0.3%膽鹽(bile salt) 的MRS培養液中。將混合後的樣本作序列稀釋，每個濃度分別在MRS培養盤上滴三次，放入37°C培養箱。4小時後，將培養管內的菌液序列稀釋，滴於新的培養基並培養於37°C。

計算細菌增殖倍率百分比 $[(\text{培養後菌落數} / \text{0小時菌落數}) \times 100\%]$ 。對照組為乳酸桿菌在無膽鹽的MRS培養液中培養4小時。

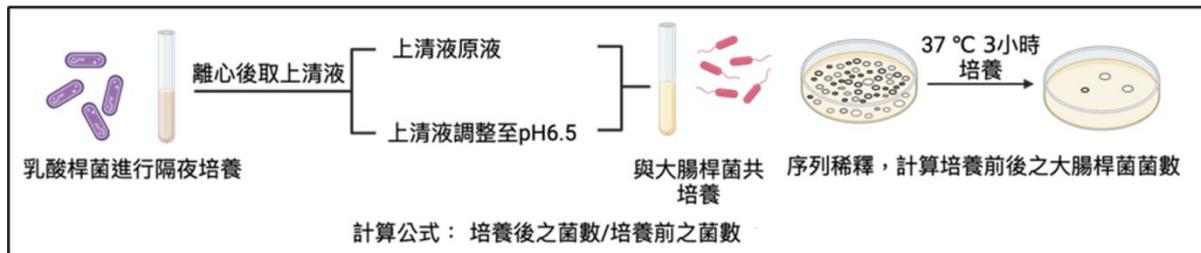
(五)、細胞增殖能力測試



圖七、細胞增殖能力測試流程 (資料來源：作者以 Biorender 繪製)。

計算0小時的細胞數，隨後將傷口癒合潛力最佳的乳酸桿菌與細胞共培養 4-8-16小時後，再次計算細胞數。以未與乳酸桿菌共培養的細胞作為對照組。細胞計數前，使用台盼藍 (trypan blue)染色，僅計算未被染色的活細胞。實驗結果以細胞增殖的百分比表示 (4-8-16小時細胞數 / 0小時細胞數×100%)。

(六)、乳酸桿菌抑制病原菌測試



圖八、乳酸桿菌抑菌能力測試流程 (資料來源：作者以 Biorender 繪製)。

1.大腸桿菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)試驗

離心取得乳酸桿菌培養上清液，調整至 pH 4及pH 6.5。準備大腸桿菌菌液，調整其OD₆₀₀至 0.2。將大腸桿菌菌液與調整好 pH 的乳酸桿菌上清液以 1：2 的體積混合，塗抹於LB瓊脂培養基，計算 0 小時大腸桿菌菌落數。將混合液於37°C下培養 3小時後，再次計數菌落數。

以細菌增殖倍率表現抑菌效果，即 (3小時的大腸桿菌菌落數 / 0小時菌落數)。實驗結果顯示不同 pH 下，乳酸桿菌上清液對大腸桿菌的抑制能力。實驗以大腸桿菌單獨培養於pH 4 和 pH 6.5 的MRS培養液作為對照組，排除MRS培養液酸鹼度對實驗結果的干擾。

2.幽門桿菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)試驗

(1).乳酸桿菌上清液抑菌測試

離心取得乳酸桿菌培養上清液，調整至 pH 4及pH 6.5。準備幽門桿菌菌液，調整其OD₆₀₀至 0.2。將幽門桿菌菌液與調整好 pH 的乳酸桿菌上清液以 1：2 的體積混合，塗抹於Brucella瓊

脂培養基，計算 0 小時幽門桿菌菌落數。將混合液於37°C培養 3小時後，再次計數菌落數。

以細菌增殖倍率表現抑菌效果，即 (3小時的幽門桿菌菌落數 / 0小時菌落數)。實驗結果顯示不同 pH 下，乳酸桿菌上清液對幽門桿菌的抑制能力。實驗以幽門桿菌單獨培養於pH 4 和 pH 6.5 的MRS培養液作為對照組，排除MRS培養液酸鹼度對實驗結果的干擾。

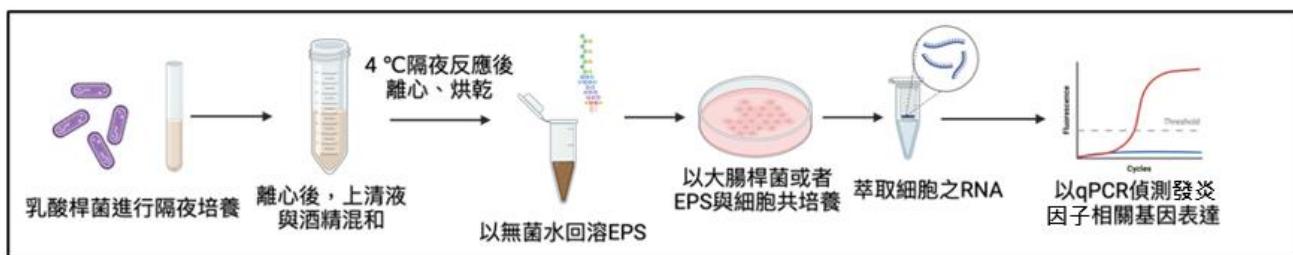
(2).熱滅活乳酸桿菌抑菌測試

將乳酸桿菌培養於 MRS 培養液中，離心去除上清液。以 PBS 將菌液調整至 $OD_{600}=1$ ，於 70°C 加熱 30 分鐘，菌液內含有熱滅活乳酸桿菌。將幽門桿菌培養於 Brucella 培養液中，將菌液調整至 $OD_{600}=0.2$ 。將幽門桿菌菌液與熱滅活乳酸桿菌菌液以 1：1 的體積混合，在微需氧環境培養 3 小時。對照組則分別以 pH4 、pH6.5 的 MRS 培養液取代熱滅活乳酸桿菌菌液。實驗結果以 $[(3\text{ 小時幽門桿菌菌落數} / 0\text{ 小時幽門桿菌菌落數}) \times 100\%]$ 表示。

(3).活乳酸桿菌抑菌測試

本測試採取紙片擴散法。將乳酸桿菌培養於MRS 培養液中，將菌液調整至 $OD_{600}=1$ 。將幽門桿菌培養於Brucella 培養液中，將菌液調整至 $OD_{600}=2$ 並塗佈於 Brucella 培養基上。將紙片置於上述Brucella 培養基，每片滴加 10 μL 乳酸桿菌菌液，兩個對照組則分別滴加pH4 、pH6.5的 MRS 培養液。將培養基於微需氧環境培養 48 小時後記錄抑菌圈直徑。抑菌圈直徑愈大，代表乳酸桿菌抑制幽門桿菌的能力愈佳。

(七)、乳酸桿菌胞外多醣體 (Exopolysaccharide, EPS) 的抗發炎測試



圖九、乳酸桿菌EPS的抗發炎測試流程 (資料來源：作者以Biorender繪製)。

1. 萃取乳酸桿菌之EPS

離心取得乳酸桿菌培養上清液，與 95 % 酒精以 1:1 的體積混合，在 4 °C 環境下進行隔夜反應。再次離心，於70°C下烘乾EPS沉澱物至完全乾燥，再加入1 mL無菌水回溶。將去除雜質後的EPS樣本、苯酚 (phenol)、95 % 硫酸以 2:1:5 的體積混合，測定吸光值 (OD_{490}) 以量化EPS濃度。

2. 誘發促發炎細胞因子試驗

(1). 大腸桿菌試驗

本實驗的刺激物為大腸桿菌(*E. coli*)和乳酸桿菌胞外多醣體 (EPS)。以不同處理順序添加乳酸桿菌EPS，探討EPS是否抑制大腸桿菌導致的細胞發炎反應。和GES-1共培養的濃度如下。

大腸桿菌：約 5×10^7 CFU/mL (colony forming unit, CFU)。EPS：4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

設計實驗組如下表二，對照組則是將細胞培養於RPMI培養液。

表二、大腸桿菌為誘發物：抗發炎實驗組別。→：代表共培養順序的前後、/：代表同時。

(資料來源：作者設計)

		組別		目的
單獨處理	medium	EPS	<i>E. coli</i>	研究細胞直接反應
不同順序處理			<i>E. coli</i> →EPS	研究 EPS 治療潛力
			EPS/ <i>E. coli</i>	研究同時交互作用
			EPS→ <i>E. coli</i>	研究 EPS 預防潛力

表三、不同順序處理組的共培養時間(資料來源：作者設計)。

<i>E. coli</i> →EPS	加 <i>E. coli</i> 0h	加EPS 4h	共培養結束 6h
EPS/ <i>E. coli</i>	加EPS和 <i>E. coli</i> 0h	共培養結束 4h	
EPS→ <i>E. coli</i>	加EPS 0h	加 <i>E. coli</i> 2h	共培養結束 6h

(2). 大腸桿菌脂多醣試驗

本實驗的刺激物為來自大腸桿菌的毒素脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)，和來自乳酸桿菌的胞外多醣體 (EPS)。以不同處理順序添加乳酸桿菌EPS，探討EPS是否能抑制大腸桿菌LPS導致的GES-1細胞發炎反應。和GES-1共培養的濃度如下。

大腸桿菌LPS：1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。EPS：4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。設計實驗組如下表四，對照組則是將細胞培養於RPMI培養液。

表四、LPS為誘發物：抗發炎實驗組別(資料來源：作者設計)。

		組別		目的
單獨處理	medium	EPS	<i>E. coli LPS</i>	研究細胞直接反應
不同順序處理			<i>E. coli LPS</i> →EPS	研究 EPS 治療潛力
			EPS/ <i>E. coli LPS</i>	研究同時交互作用
			EPS→ <i>E. coli LPS</i>	研究 EPS 預防潛力

表五、不同順序處理組的共培養時間(資料來源：作者設計)。

<i>E. coli</i> LPS→EPS	加LPS + 0h	加EPS + 24h	共培養結束 26h
EPS/ <i>E. coli</i> LPS	加EPS和LPS + 0h		共培養結束 24h
EPS → <i>E. coli</i> LPS	加EPS + 0h	加LPS + 2h	共培養結束 26h

(3)、幽門桿菌試驗

幽門桿菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是胃細胞常見的病原菌，本實驗的刺激物為幽門桿菌和乳酸桿菌胞外多醣體 (EPS)。以不同處理順序添加乳酸桿菌EPS，探討EPS是否能抑制幽門桿菌導致的GES-1細胞發炎反應。和GES-1共培養的濃度如下。

幽門桿菌：約 5×10^7 CFU/mL。EPS : 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

設計實驗組如下表六，對照組則是將細胞培養於RPMI培養液。

表六、幽門桿菌為誘發物：抗發炎實驗組別(資料來源：作者設計)。

	組別			目的
單獨處理	medium	EPS	<i>H. pylori</i>	研究細胞直接反應
不同順序處理				<i>H. pylori</i> → EPS
		研究 EPS 治療潛力		
		研究同時交互作用		
				研究 EPS 預防潛力

表七、不同順序處理組的共培養時間(資料來源：作者設計)。

<i>H. pylori</i> → EPS	加 <i>H. pylori</i> + 0h	加EPS + 4h	共培養結束 6h
EPS/ <i>H. pylori</i>	加EPS和 <i>H. pylori</i> + 0h		共培養結束 4h
EPS→ <i>H. pylori</i>	加EPS + 0h	加 <i>H. pylori</i> + 2h	共培養結束 6h

3. 促發炎細胞因子檢測

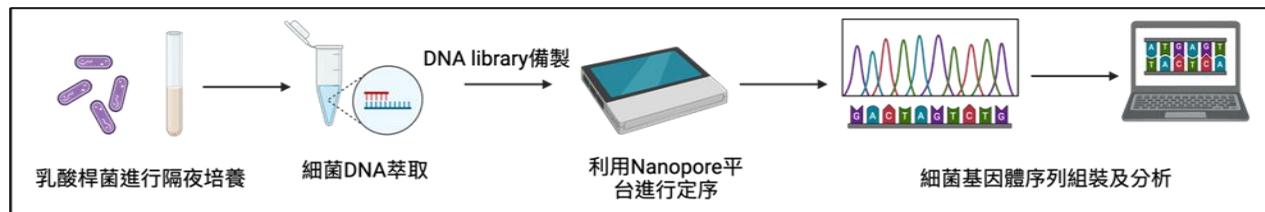
各組加入700 μL TRIzol 將細胞收集至1.5 mL 微量離心管中，再加入140 μL 氯仿混合，離心分離出透明上層的RNA。加入異丙醇沉澱RNA，以乙醇洗滌沉澱以去除雜質，最後將RNA回溶於無菌水中保存。提取1 μg RNA 反轉錄成 cDNA，以 real-time PCR 偵測促發炎細胞因子 mRNA的表達。Real-time PCR 反應條件為：(95°C, 30 秒), 40× [(95°C, 5秒), (60°C, 30 秒)]。以

常用促發炎細胞因子為指標：*IL-8*、*IL-6*、*IL-1β* 以及 *TNF-α*，並參考 *β-actin* 基因進行標準化。以 RPMI 培養液組為對照組，計算各組促發炎細胞因子 mRNA 表達量的差異倍數(fold change)。

表八、促發炎細胞因子引子序列(資料來源：作者整理)。

	Forward Primer	Reverse Primer
<i>IL-8</i>	AAG AGA GCT CTG TCT GGA CC	GAT ATT CTC TTG GCC CTT GG
<i>IL-6</i>	TTC GGT CCA GTT GCC TCT C	TTC GGT CCA GTT GCC TCT C
<i>TNF-α</i>	CTC TTC TGC CTG CTG CAC TTT G	ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT C
<i>IL-1β</i>	ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA	GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A
<i>β-actin</i>	CAC TCT TCC AGC CTT CCT TC	TGA TCT CCT TCT GCA TCC TG

(八)、基因定序分析



圖十、基因定序分析流程(資料來源：作者以Biorender繪製)。

使用 Presto™ gDNA Bacteria Advanced Kit 萃取 300 ng 的乳酸桿菌基因體 DNA (gDNA)。以 Oxford Nanopore MinION MK1C 平台進行全基因組定序分析。採用 Nanopore 定序完整的基因體，並以 FastQC v0.11.5 檢視數據品質。以 ONT Guppy 軟體將原始訊號轉換為 DNA 序列，再以 Flye 軟體組裝 de novo 基因組。最後以 RAST Annotation Server 與 Proksee 軟體分析基因功能。

本研究統計方法是用 one way ANOVA 的 post hoc (Dunnett's test)，統計符號的意義如表九。

表九、統計符號說明(資料來源：作者整理)。

符號	ns 或不標記	*	**	***	****
<i>p</i> 值範圍	大於 0.05	0.01~0.05	0.001~0.01	0.0001~0.001	小於 0.0001

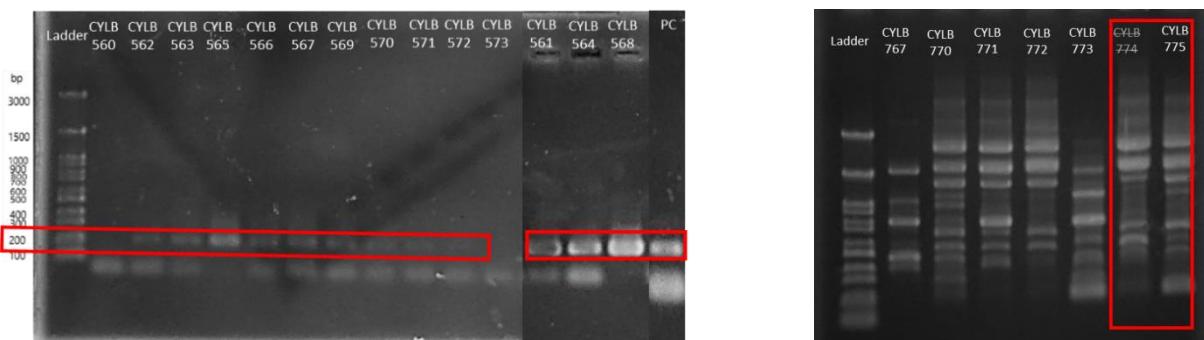
肆、研究結果

一、從傳統食品分離與鑑定出不同品系的乳酸桿菌菌株

從台北市東門、永春兩個傳統市場中收集了 23 種食品樣本，有 14 個樣本成功分離出菌株(表十)。經 PCR 與 RAPD-PCR 鑑定，共篩選出 31 個乳酸桿菌菌株。

表十、乳酸桿菌之鑑定結果(資料來源：作者整理)。

樣本來源	東門市場															永春市場							
	桂花 甜 酒 釀	台式 泡 菜 -1	榨 菜	醃 芹 菜	醃 芥 菜	醃 條 瓜	醬 醃 蘿 蔔	醃 薑	酸 菜	辣 榨 菜	臭 豆 腐	台 式 泡 菜 -2	鳳 梨 醬 苦 瓜	韓 式 泡 菜	雪 裡 紅	醃 黃 瓜	醃 青 椒	黃 金 泡 菜	老 菜 脯	蔭 醬 冬 瓜	蔭 醬 鳳 梨	韓 式 泡 菜	台 式 泡 菜
分離菌株數	12	12	14	10	12	12	0	0	0	5	12	0	0	12	12	12	5	0	0	0	0	12	12
乳酸桿菌菌株數	12	1	12	4	1	1	0	0	0	1	7	0	0	2	6	2	1	0	0	0	0	1	1



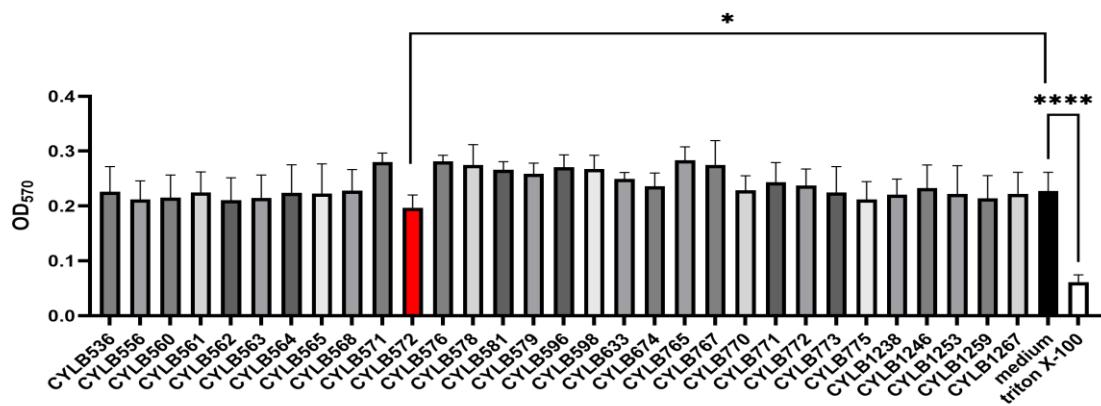
圖十一、乳酸桿菌之鑑定(資料來源：作者親自拍攝)。

(A) PCR 鑑定：以榨菜樣本為例。框線內為乳酸桿菌屬，PCR 產物在 200~250 bp。”PC”為陽性對照組戊糖乳酸桿菌(*Lactobacillus pentosus*)。

(B) RAPD-PCR 鑑定：若有兩個條帶以上相異，則判定為不同品系的菌株。框線內為相似品系，擇一進行後續實驗。

二、篩選出無細胞毒性的乳酸桿菌菌株

如圖十二，僅菌株 CYLB572 使吸光值顯著低於陽性對照組(圖中以medium表示)，顯示其降低細胞存活率，因此將其排除。其餘菌株吸光值和陽性對照組無顯著差異，判定無細胞毒性。

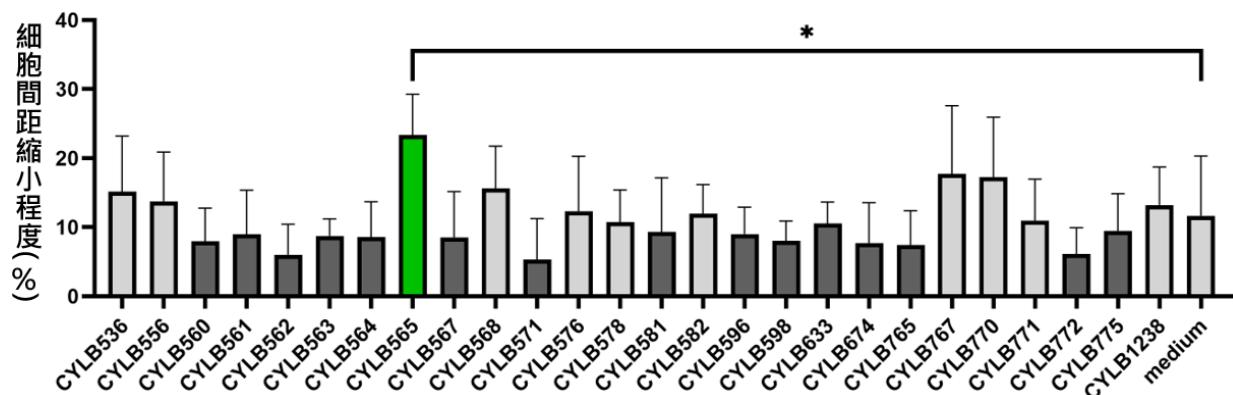


圖十二、測試分離出的菌株對GES-1之細胞毒性(資料來源：作者以GraphPad Prism 繪製)

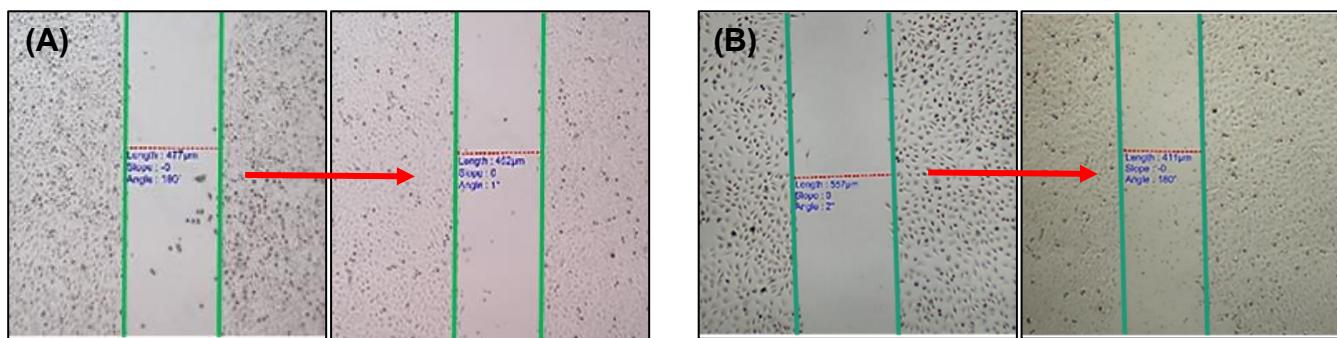
三、篩選出促進細胞間隙癒合的乳酸桿菌菌株CYLB565

(一)、篩選最佳菌株

如圖十三，菌株CYLB565 的細胞間隙顯著縮小，平均縮小程度達陰性對照組的220%，顯示此菌株最可能有效促進細胞傷口癒合，後續實驗也以此菌株作為主要的研究對象。



圖十三、無細胞毒性之菌株對GES-1的傷口癒合效果 (資料來源：作者以GraphPad Prism 繪製)。



圖十四、以CYLB565為例，乳酸桿菌對GES-1的傷口癒合效果(資料來源：作者親自拍攝)。

(A) 對照組癒合效果(左為0小時、右為4小時)

(B) CYLB565癒合效果為對照組2.2倍(左為0小時、右為4小時)

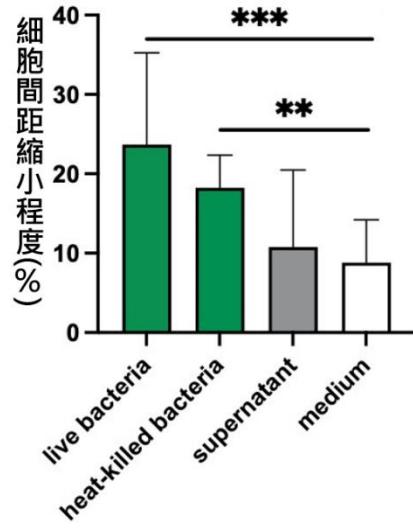
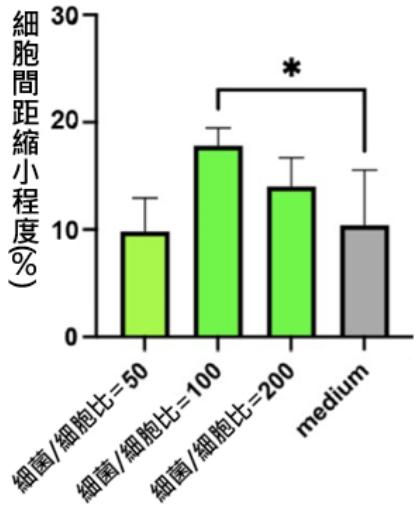
(二) CYLB565 共培養狀態測試

1. 最佳細菌/細胞比

由圖十五(A)，CYLB565在細菌/細胞比=100的傷口癒合效果最佳，顯著高於培養基對照組。50倍組與200倍組的癒合效果和對照組無顯著差異。後續採用細菌/細胞比=100進行實驗。

2. 最佳細菌活性

根據圖十五(B)，CYLB565在活菌、熱滅活狀態的癒合能力顯著高於培養基對照組。總結而言，癒合能力高低為：活菌>熱滅活菌>菌株上清液>對照組。



圖十五、CYLB565共培養狀態測試 (資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

(A)不同細菌/細胞比的CYLB565癒合效果

(B)不同細菌活性的CYLB565癒合效果

四、CYLB565具腸胃道耐受性

(一) 與MRS培養液對照組比較乳酸桿菌增殖倍率：

3小時pH 3 (95.36%) vs. 3小時中性培養液 (221.56%)

4小時膽鹽(106.55%) vs. 4小時無膽鹽培養液(471.30%)

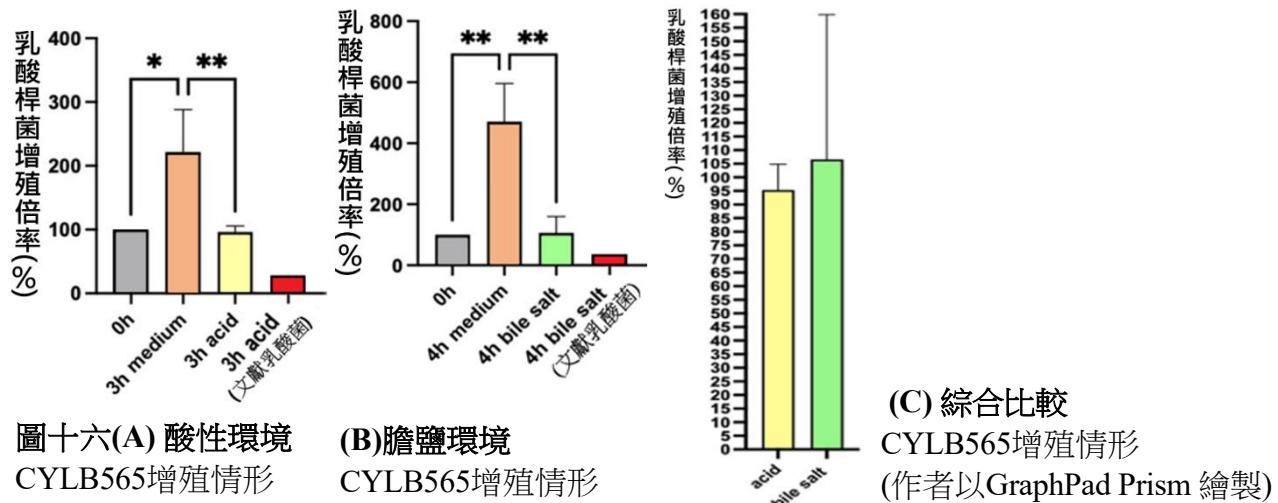
由圖十六(A)，在酸性環境培養3小時後，乳酸桿菌增殖倍率低於對照組。由圖十六(B)，在0.3%膽鹽環境培養4小時後，乳酸桿菌增殖倍率也下降。CYLB565在不利環境中仍有一定的存活能力，且存活率高於文獻中同培養條件的乳酸桿菌(Dobrea, *et al.*, 2013; Li-li, 2006)。

(二) 與0小時酸/膽鹽培養液比較乳酸桿菌增殖倍率：

3小時pH 3(95.36%) vs. 0小時MRS培養液(100%)

4小時膽鹽(106.55%) vs. 0小時MRS培養液(100%)

圖十六(C)顯示，CYLB565經過3小時的pH 3 環境測試，細菌增殖倍率仍超過0小時的95%；經過4小時的膽鹽環境實驗，CYLB565的細菌增殖倍率超過0小時的100%。

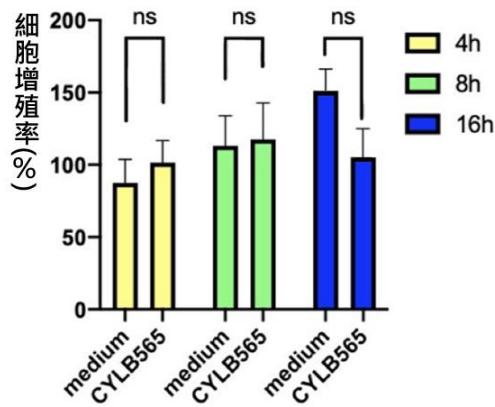


圖十六(A) 酸性環境
CYLB565增殖情形
圖十六(B) 膽鹽環境
CYLB565增殖情形

(C) 綜合比較
CYLB565增殖情形
(作者以GraphPad Prism 繪製)

五、CYLB565促進傷口癒合的主要機制非細胞增殖

GES-1與菌株CYLB565在共培養4小時、8小時和16小時後的細胞增殖倍率與對照組皆無顯著差異，如圖十七。推論菌株 CYLB565並非透過細胞增殖來促進傷口癒合。

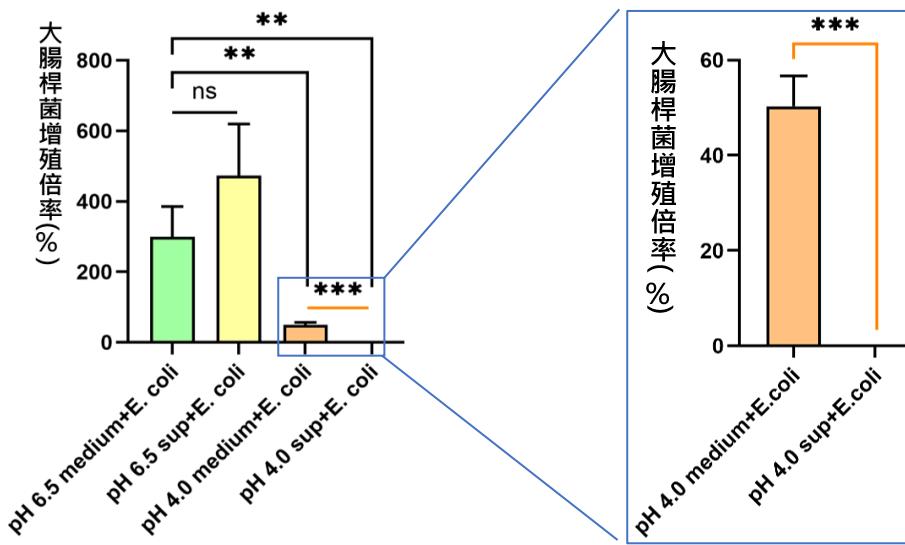


圖十七、促進傷口癒合的菌株
對GES-1細胞增殖的影響
(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

六、CYLB565 在酸性環境抑制大腸桿菌、幽門桿菌，近中性環境抑制幽門桿菌

1. CYLB565上清液在pH 4環境下，顯著抑制大腸桿菌生長

由圖十八，無論是否和乳酸桿菌共培養，大腸桿菌在pH 4 環境中的增殖倍率皆低於100%。在pH4 環境下，將大腸桿菌與CYLB565上清液共培養後，大腸桿菌增殖倍率顯著低於pH 4 培養液對照組，表明CYLB565在酸性條件下的抑菌能力較強。

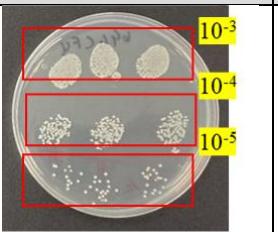
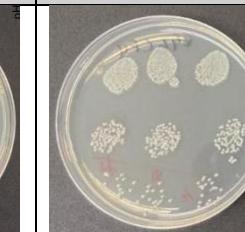
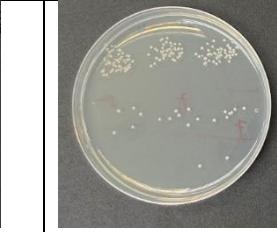
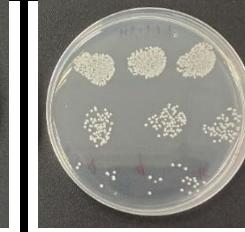


圖十八、CYLB565對大腸桿菌的抑制效果(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

其中 ”sup” 指CYLB565上清液(supernatant)，調整成不同pH值。

表十一、大腸桿菌在pH 4和6.5中，生長數量的變化(資料來源：作者親自拍攝)。

由上到下三列依序是稀釋 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍的大腸桿菌生長情形。

	pH 4 0小時	pH 4 3小時	pH 6.5 0 小時	pH 6.5 3 小時
CYLB565 上清液 共培養組				
對照組				

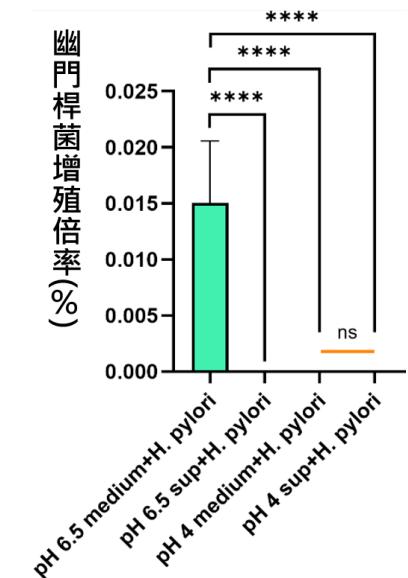
2.幽門桿菌試驗

(1). CYLB565上清液在pH 4、pH6.5環境，皆顯著抑制幽門桿菌

由圖十九，無論是否和乳酸桿菌共培養，幽門桿菌在pH 4的增殖倍率皆低於pH6.5 MRS培養液對照組。

幽門桿菌與pH4 CYLB565上清液共培養後，幽門桿菌增殖倍率和pH4 對照組無顯著差異。

幽門桿菌與pH6.5 CYLB565上清液共培養後，幽門桿菌增殖倍率顯著低於pH6.5對照組。而pH 4 、pH6.5 的CYLB565上清液，抑菌效果無顯著差異。

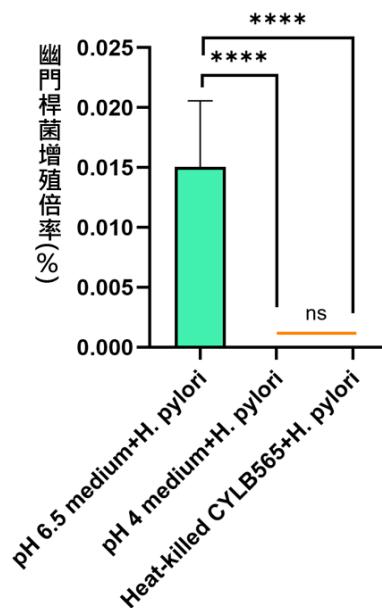


圖十九、乳酸桿菌上清液對幽門桿菌的抑制效果

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

(2).熱滅活乳酸桿菌顯著抑制幽門桿菌

由圖二十，幽門桿菌與CYLB565熱滅活菌共培養後，幽門桿菌增殖倍率顯著低於pH 6.5 MRS培養液對照組，而幽門桿菌增殖倍率和pH 4 MRS培養液對照組無顯著差異。



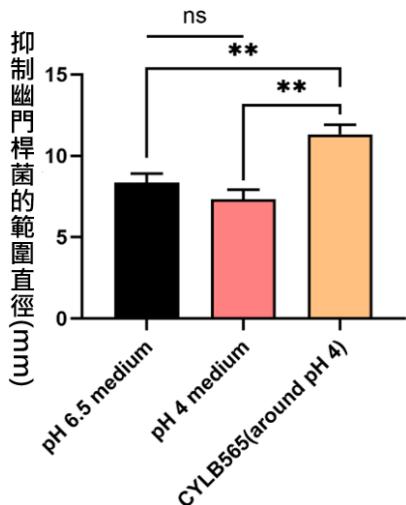
圖二十、熱滅活乳酸桿菌對幽門桿菌的抑制效果

其中，即便在實驗前調整pH值，
實驗後pH值仍會被熱滅活乳酸桿菌降低至4左右。

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

(3).活乳酸桿菌抑菌測試

由圖二十一，幽門桿菌與活乳酸桿菌CYLB565共培養後，幽門桿菌抑菌圈直徑顯著大於pH 4與pH 6.5 MRS培養液對照組。



圖二十一、活乳酸桿菌對幽門桿菌的抑制效果：

柱狀圖愈高，抑制效果愈強。而即便在實驗前調整pH值，實驗後pH值仍會被活乳酸桿菌降低至4左右。

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)。

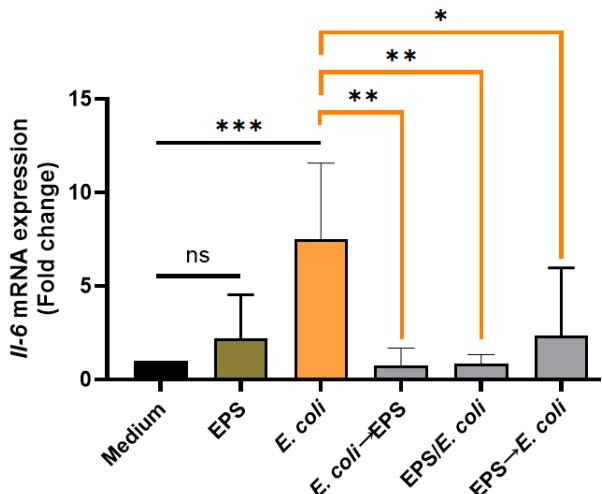
七、CYLB565抗發炎能力：

由本研究實驗六得知，乳酸桿菌CYLB565上清液可抑制病原菌，故從上清液中分離出胞外多醣體(EPS)，探討其是否能進一步抑制病原菌誘發的發炎反應。

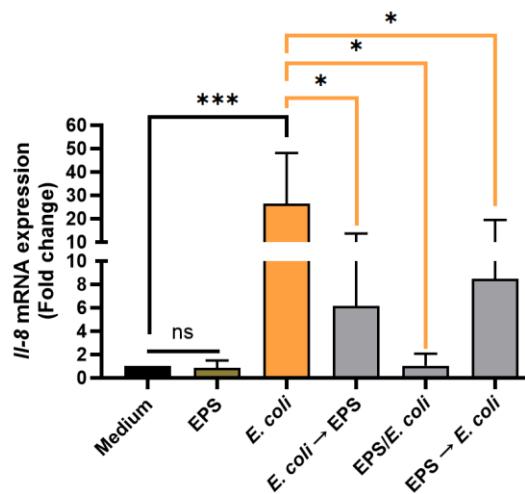
(一)、CYLB565的EPS可抑制大腸桿菌誘發的發炎反應

與 RPMI 培養液對照組相比，EPS 本身不會促進或抑制 *IL-6*、*IL-8*、*IL-1β* 和 *TNF-α* 的表達。對大腸桿菌誘發的發炎，EPS 無論添加順序，都顯著抑制 *IL-6*、*IL-8*、*IL-1β*、*TNF-α*。

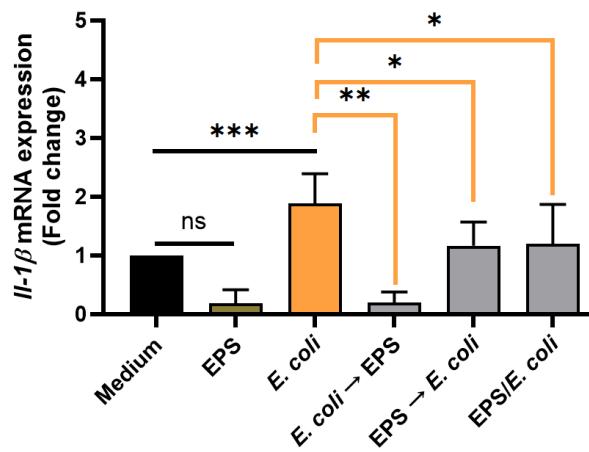
1. *IL-6* 表達方面，如圖二十二(A)所示，*E. coli* 單獨處理組能顯著誘導 *IL-6*。添加EPS的組別中，後處理組(*E. coli* → EPS)抑制 *IL-6* 的效果最顯著。
2. *IL-8* 表達方面，由圖二十二(B)可知，*E. coli* 單獨處理組可顯著誘導 *IL-8*。添加EPS的組別中，同時處理組(EPS / *E. coli*)抑制 *IL-8* 的效果最顯著。
3. *IL-1β* 表達方面，根據圖二十二(C)，*E. coli* 單獨處理組可顯著誘導 *IL-1β*。添加EPS的組別中，後處理組(*E. coli* → EPS)抑制 *IL-1β* 的效果最顯著。
4. *TNF-α* 表達方面，圖二十二(D)顯示，*E. coli* 單獨處理組可顯著誘導 *TNF-α*。添加EPS的組別中，前處理組(EPS → *E. coli*)抑制 *TNF-α* 的效果最顯著。



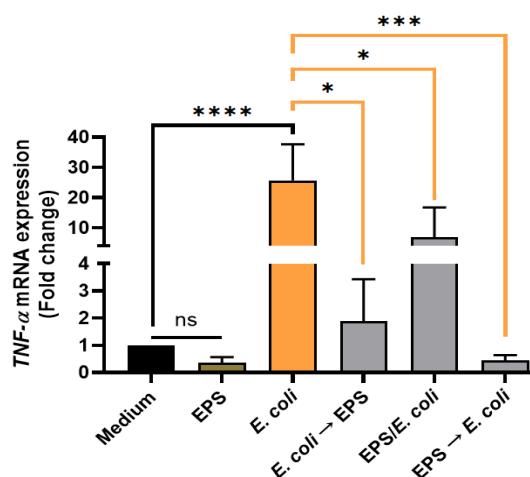
圖二十二(A)、EPS對IL-6表達量的影響



(B)、EPS對IL-8表達量的影響



(C)、EPS對IL-1 β 表達量的影響



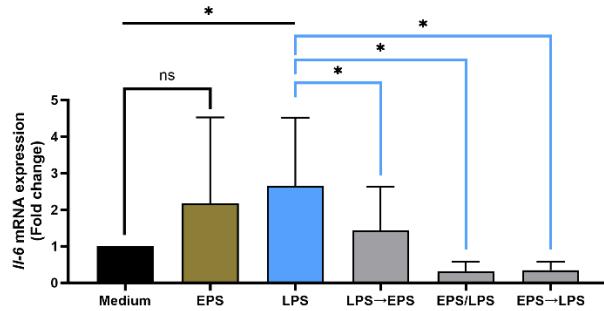
(D)、EPS對TNF- α 表達量的影響

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)

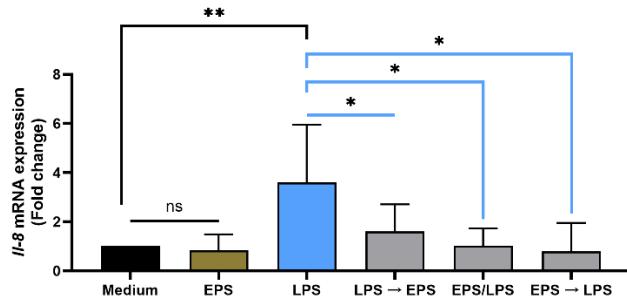
(二)、CYLB565的EPS可抑制大腸桿菌脂多醣 (LPS) 誘發的發炎反應

對大腸桿菌LPS誘發的發炎，EPS無論添加順序，都顯著抑制IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 。

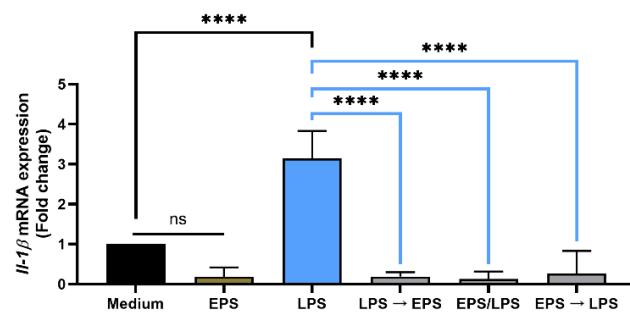
1. IL-6 表達方面，如圖二十三(A)所示，LPS 單獨處理組能顯著誘導IL-6。添加EPS的組別中，同時處理組(EPS / LPS)抑制IL-6的效果最顯著。
2. IL-8 表達方面，由圖二十三(B)可知，LPS 單獨處理組可顯著誘導 IL-8。添加EPS的組別中，前處理組(EPS → LPS)抑制IL-8的效果最顯著。
3. IL-1 β 表達方面，根據圖二十三(C)，LPS 單獨處理組可顯著誘導 IL-1 β 。添加EPS的組別中，同時處理組(EPS / LPS)抑制IL-1 β 的效果最顯著。
4. TNF- α 表達方面，圖二十三(D)顯示，LPS 單獨處理組可顯著誘導 TNF- α 。添加EPS的組別中，同時處理組(EPS / LPS)抑制TNF- α 的效果最顯著。



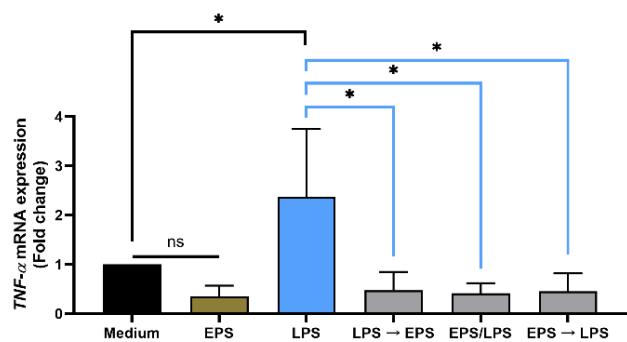
圖二十三(A)、EPS對IL-6表達量的影響



(B)、EPS對IL-8表達量的影響



(C)、EPS對IL-1β表達量的影響



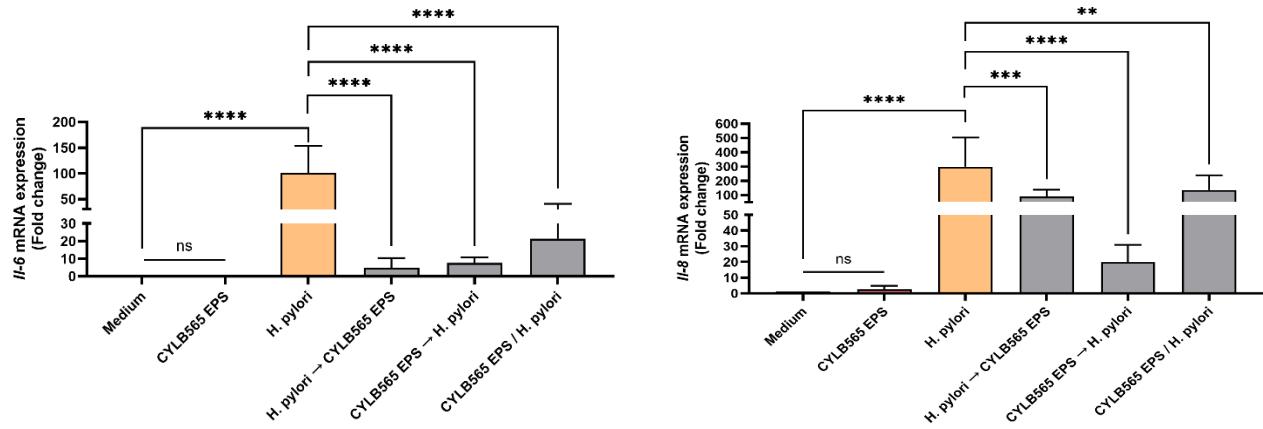
(D)、EPS對TNF-α表達量的影響

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)

(三)、CYLB565的EPS可抑制幽門桿菌誘發的發炎反應

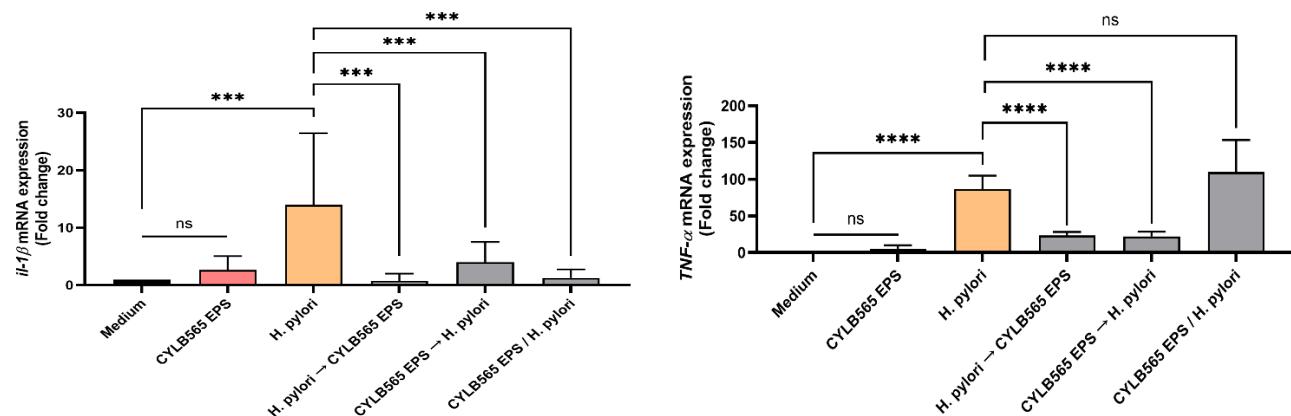
對幽門桿菌誘發的發炎，EPS無論添加順序，幾乎都顯著抑制IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α。

1. *IL-6* 表達方面，如圖二十四(A)所示，LPS 單獨處理組能顯著誘導*IL-6*。添加EPS的組別中，後處理組(*H. pylori* → EPS)抑制*IL-6*的效果最顯著，*IL-6* 表達降至培養液對照組的4.88倍。
2. *IL-8* 表達方面，由圖二十四(B)可知，LPS 單獨處理組可顯著誘導 *IL-8*。添加EPS的組別中，前處理組(EPS → *H. pylori*)抑制*IL-8*的效果最顯著，*IL-8* 表達降至培養液對照組的20.01倍。
3. *IL-1β* 表達方面，根據圖二十四(C)，LPS 單獨處理組可顯著誘導 *IL-1β*。添加EPS的組別中，後處理組(*H. pylori* → EPS)抑制*IL-1β*的效果最顯著，*IL-1β* 表達降至培養液對照組的0.77倍。
4. *TNF-α* 表達方面，圖二十四(D)顯示，EPS在 *H. pylori* 感染前、後加入，皆可顯著抑制 *TNF-α*。其中，前處理組(EPS → *H. pylori*)效果最為顯著，*TNF-α* 表達降至培養液對照組的22.13倍。而EPS、*H. pylori* 同時處理組，未顯著抑制 *TNF-α*。



圖二十四(A)、EPS對IL-6表達量的影響

(B)、EPS對IL-8表達量的影響



(C)、EPS對IL-1 β 表達量的影響

(D)、EPS對TNF- α 表達量的影響

(資料來源：作者以GraphPad Prism繪製)

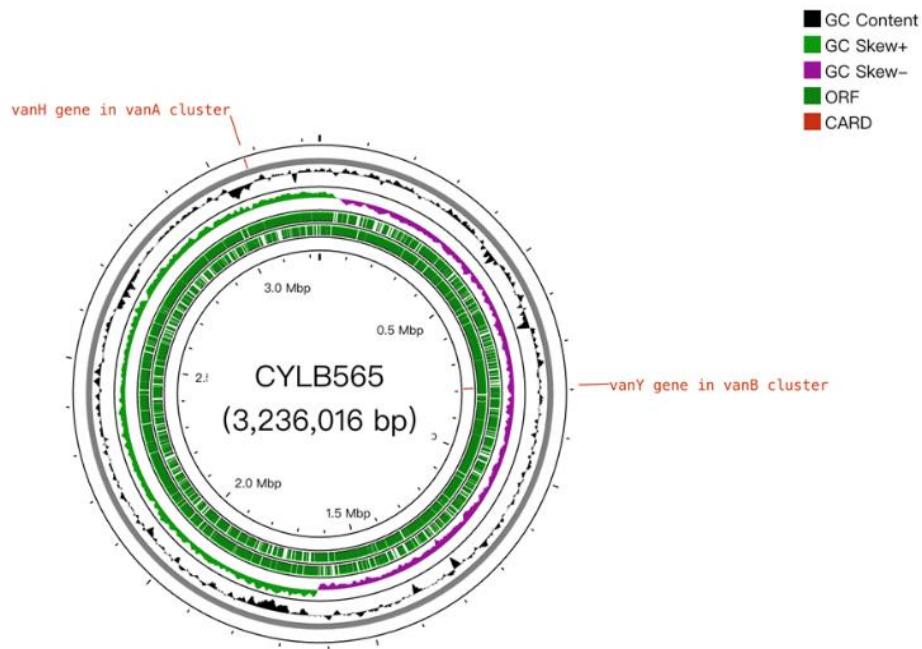
八、全基因定序顯示 CYLB565為相對安全的菌株

(一)、染色體基因

全基因定序顯示，CYLB565 屬於胚芽乳酸桿菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*)，其染色體大小為 3,236,016 bp，含 3,114 個編碼基因，GC 含量為 44.6%。根據序列分析，CYLB565 是未發表在資料庫的全新菌株。CYLB565 染色體中具有潛在的抗萬古黴素基因 (*vanH*、*vanY*)，但相關序列與已知腸球菌屬 (*Enterococcus* spp.) 的抗萬古黴素基因 (*vanA*、*vanB*) 有顯著差異，且菌株分離自安全的食品，故判斷 CYLB565 相對安全。未來可分析 CYLB565 抗萬古黴素基因的表達量。

(二)、質體組成

CYLB565 有 6 個質體，大小分別為：70,825、58,730、43,436、27,054、25,608、23,711 個鹼基對。質體中沒有毒力、抗藥性或接合作用基因，顯示 CYLB565 不會透過質體傳播抗藥基因。



圖二十五、全基因體圖譜(資料來源：作者以Proksee製作)。

伍、討論

一、促進傷口癒合的主要機制

GES-1細胞與菌株CYLB565共培養4小時後，細胞間距顯著縮小，此現象可源於細胞遷移與細胞增殖的雙重機制(Elham, *et al.*, 2022)。而本研究發現CYLB565未顯著促進細胞增殖，因此在4小時內，CYLB565促進傷口癒合的主機制可能是細胞遷移。

二、乳酸桿菌癒合能力最佳的共培養狀態

CYLB565在細菌/細胞比=100的傷口癒合效果最佳。細菌數過低時，可能無法有效激發細胞遷移訊號。細菌數過高時，可能導致細菌間的競爭與代謝產物累積，反而不利於傷口癒合。

CYLB565活菌的癒合效果最佳，推測是因為活菌能與宿主細胞直接作用，且持續分泌生物活性物質。而熱滅活菌仍促進癒合，可能是菌株細胞壁中的脂壁酸(Lipoteichoic acid)發揮癒合效果(Tsai, *et al.*, 2021)，以及滅活前產生的活性代謝物有殘留。而上清液未能顯著促進癒合，故可溶性分泌物的影響有限。總結而言，推測促進傷口癒合的是細菌本體表面分子與特定代謝物。

三、腸胃道中的耐受性

在pH 3條件培養3小時後，乳酸桿菌CYLB565增殖倍率下降。推測是因為乳酸桿菌最適生長環境為pH 4~6.5(Vera-Peña & Rodriguez-Rodriguez, 2020)，故pH 3環境影響其增殖倍率。

乳酸桿菌對膽鹽的耐受性與其膽鹽水解酶(bile salt hydrolase, BSH)活性密切相關，具BSH活

性的菌株主要分離自哺乳動物 (Tanaka, *et al.*, 1999)。因此，推測本研究CYLB565因分離自醃漬榨菜，故BSH活性較低，膽鹽環境下的增殖倍率低於對照組。

CYLB565雖然不是低pH與膽鹽的高度耐受菌株，但仍具一定適應能力，可能透過其他修復機制減輕腸胃道環境對自身功能的影響。

四、乳酸桿菌抑制病原菌的效果

比較pH 6.5和pH 4 MRS培養液的病原菌增殖倍率，發現大腸桿菌、幽門桿菌在pH 4環境皆受培養液抑制，展現兩病原菌對酸性環境的敏感性。已知乳酸桿菌會釋放酸性物質(Adesulu-Dahunsi, *et al.*, 2022)，綜合實驗結果，推論乳酸桿菌可能透過調整環境pH值抑制病原菌。

對照pH4 MRS培養液，pH4的CYLB565上清液抑制大腸桿菌的能力更強、CYLB565活菌抑制幽門桿菌的能力更強。在酸性環境，乳酸桿菌還能發揮更顯著的抑菌效果。

表十二、乳酸桿菌 CYLB565 對大腸桿菌、幽門桿菌的抑菌效果(資料來源：作者整理)。

病原菌	pH	乳酸桿菌狀態	抑制效果 (對照pH6.5培養液)	抑制效果 (對照pH4培養液)	推論原因
大腸桿菌	4	上清液			抑菌效果來自 CYLB565 與酸性環境的共同作用
	6.5	上清液	無抑制		CYLB565無法在近中性環境釋放抑菌酸性物質
幽門桿菌		活菌			CYLB565 與幽門桿菌競爭、釋放活性物質
		熱滅活菌		相近	CYLB565的抑菌效果可能被酸性的作用所掩蓋
	4	上清液		相近	CYLB565的抑菌效果可能被酸性的作用所掩蓋
	6.5	上清液			1. CYLB565的抑菌物質是酸性 2. 在pH 4~6.5範圍，抑菌物質的作用不依賴pH值

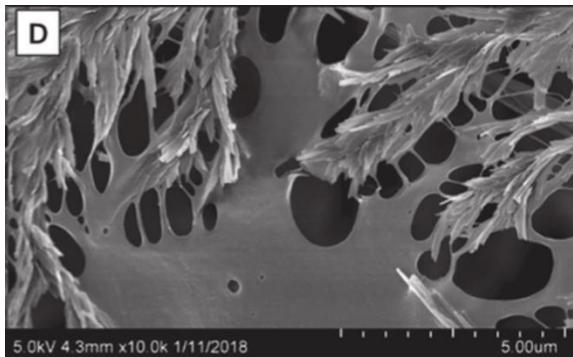
五、EPS的抗發炎效果

本研究發現，乳酸桿菌CYLB565分泌的天然胞外多醣體(EPS)具有抗發炎效果。

EPS是由微生物分泌至外部環境的長鏈碳水化合物聚合物，屬於次級代謝物(Dailin, *et al.*, 2016)。探討EPS的形態，如圖二十六，胚芽乳酸桿菌的EPS聚合成片狀結構，孔隙多而明顯。

EPS表面積大，推論能夠增加EPS附著於細胞並抗發炎的效率。而EPS呈網狀結構，故具有一定的機械強度和穩定性。

本研究分離出的有效物質EPS，在調節免疫反應、替代抗生素方面具有廣泛的應用潛力。透過降低發炎指標表現，幫助傷口順利進入「增殖」與「重塑」階段(Elham, *et al.*, 2022)，減緩過度發炎對細胞的傷害。



圖二十六、EPS電子顯微鏡照片
(Jiang, *et al.*, 2021)。

六、EPS的最佳抗發炎順序的重要性

本研究中，EPS顯著抑制大腸桿菌、大腸桿菌脂多醣、幽門桿菌所誘發的促發炎細胞因子IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 。

(一) 治療發炎

服用EPS可減緩促發炎細胞因子的持續釋放，防止發炎惡化。即使在發炎已發展一段時間後，EPS仍具調節免疫與降低細胞毒性的潛力，有助於組織修復與傷口癒合。

(二) 即時阻斷發炎

發炎是一個愈漸嚴重的過程，可誘發多條訊息傳遞路徑。發炎對細胞的傷害經促發炎細胞因子的層層誘發而放大，故即時阻斷發炎訊息傳遞非常關鍵。

(三) 預防發炎

當病患出現傷口或受病原菌感染時，可先服用EPS，以預防後續可能出現的嚴重發炎。

1. EPS → *E. coli*組，*E. coli*可透過抑制胃酸與破壞上皮屏障促進定殖，EPS可強化胃黏膜屏障、減少病原入侵的機會。
2. EPS → *E. coli* LPS組，EPS可預先阻斷LPS與TLR4受體的結合。從源頭抑制TLR4傳遞路徑，降低後續對EPS的用量需求，無需更多EPS來抑制TLR4本身(Kwon, *et al.*, 2020)。
3. EPS → *H. pylori*組，胃細胞受幽門桿菌感染後，會釋放促發炎細胞因子，增加其他非胃細胞中的促發炎細胞因子表達量(Jung, *et al.*, 1997)。因此，若能在發炎開始的源頭，預防胃細胞的發炎，將可避免發炎情形從胃部擴散到全身。

表十三、GES-1的促發炎細胞因子在大腸桿菌試驗的表達量(資料來源：作者整理)。

刺激物		<i>IL-6</i> 表達量	<i>IL-8</i> 表達量	<i>IL-1β</i> 表達量	<i>TNF-α</i> 表達量
	EPS	■	■	■	■
	<i>E. coli</i>	↑	↑	↑	↑
對照 <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> → EPS	最顯著 ↓	↓	最顯著 ↓	↓
	EPS/ <i>E. coli</i>	↓	最顯著 ↓	↓	↓
	EPS → <i>E. coli</i>	↓	↓	↓	最顯著 ↓

表十四、GES-1的促發炎細胞因子在大腸桿菌LPS試驗的表達量(資料來源：作者整理)。

刺激物		<i>IL-6</i> 表達量	<i>IL-8</i> 表達量	<i>IL-1β</i> 表達量	<i>TNF-α</i> 表達量
	EPS	■	■	■	■
	<i>E. coli</i> LPS	↑	↑	↑	↑
對照 LPS	<i>E. coli</i> LPS → EPS	↓	↓	↓	↓
	EPS/ <i>E. coli</i> LPS	最顯著 ↓	↓	最顯著 ↓	最顯著 ↓
	EPS → <i>E. coli</i> LPS	↓	最顯著 ↓	↓	↓

表十五、GES-1 中促發炎細胞因子在幽門桿菌實驗的表達量(資料來源：作者整理)。

刺激物	<i>IL-6</i> 表達量	<i>IL-8</i> 表達量	<i>IL-1β</i> 表達量	<i>TNF-α</i> 表達量
EPS	■	■	■	■
<i>H. pylori</i>	↑	↑	↑	↑
對照 <i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i> → EPS	最顯著 ↓	↓	最顯著 ↓
	EPS/ <i>H. pylori</i>	↓	↓	↓
	EPS → <i>H. pylori</i>	↓	最顯著 ↓	↓

( : 顯著抑制 /  : 顯著誘導上升 /  : 最顯著抑制 / ■ : 不顯著)

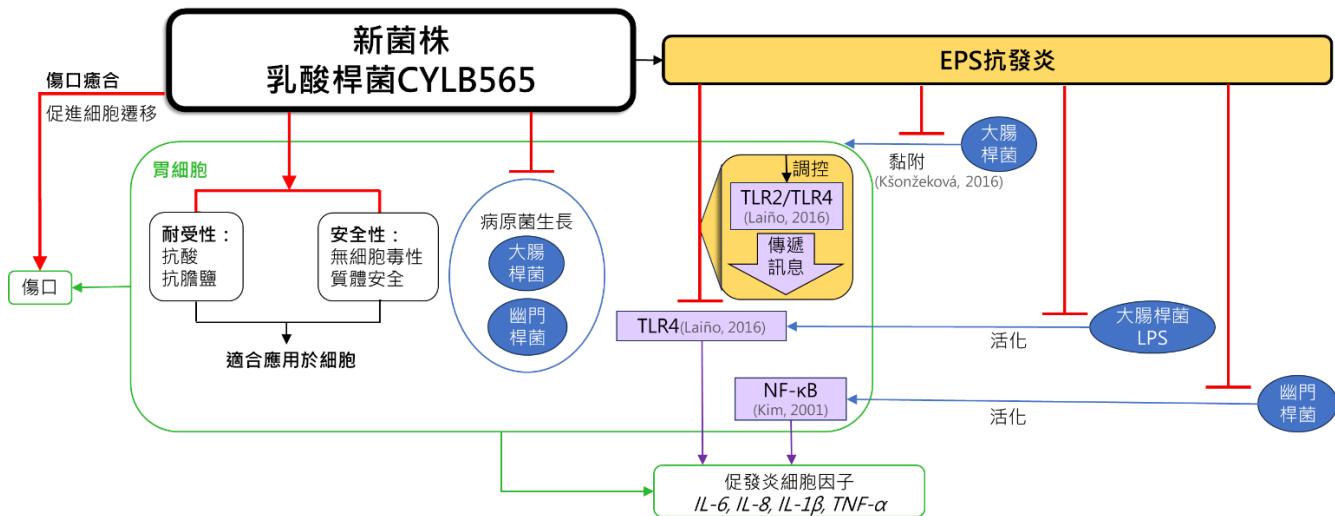
七、EPS 在不同添加順序，抑制不同促發炎細胞因子的途徑

整體而言，EPS可降低*E. coli*分泌之LPS的影響，間接降低*E. coli*對細胞的傷害。而*H. pylori*會透過活化NF- κ B來誘發發炎，因此EPS可能抑制NF- κ B路徑，來抑制*H. pylori*引發的發炎(Kim, et al., 2001)。

(一)對EPS→*E. coli*組的*IL-6*、*IL-1 β* ，EPS可事先阻斷*E. coli*對細胞的附著(Kšonžeková, et al., 2016)。

(二)對EPS/ *E. coli* LPS組，EPS可誘發抗促發炎細胞因子*IL-10*來抑制*IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6*(Zhang, et al., 2021; Fiorentino, et al., 1991)。

(三)對EPS → *E. coli* LPS組，EPS可和TLR2/ TLR4作用，引發一連串訊號傳遞，抑制TLR4本身或阻斷LPS和TLR4的結合，抑制促發炎細胞因子*IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* , *TNF- α* (Laiño, et al., 2016)。綜上所述，將CYLB565各項潛力與可能機制整理成圖二十七。



圖二十七、乳酸桿菌 CYLB565 之傷口癒合、抑菌、抗發炎潛力及可能機制(作者繪製)。

(———): 抑制符號

八、本研究應用性

本研究發現新菌株CYLB565與其分泌物具有傷口癒合、抑菌、抗發炎等潛力。CYLB565各狀態應用性如下。

- (一)活菌可開發成菌粉與複方益生菌。
- (二)熱滅活菌在應用上更加安全穩定，且能保留活菌的結構。
- (三)上清液便於保存，其中的活性物質(有機酸、細菌素)純度較高，可製成凝膠、敷料。
- (四)胞外多醣體(EPS)可抑制病原菌與毒素LPS誘發的發炎。因為EPS是萃取而來，所以對細胞的作用較直接、容易調整劑量，更可針對發炎情形以不同順序添加。此外，EPS具有網狀結構，便於製成凝膠，可進一步開發成貼布、外用藥。

未來期望探索CYLB565最佳應用配方，並測試於皮膚角質細胞、結腸癌細胞與動物模型，並探討對於創傷、糖尿病患者傷口及術後使用的癒合效果。

九、結論

- 一、食品為乳酸桿菌多樣來源，從 23 種樣本分離的菌株有 60.9%為乳酸桿菌。
- 二、不同品系的菌株中， 96.8 % 的乳酸桿菌對 GES-1 無細胞毒性，確認其安全應用潛力。
- 三、菌株 CYLB565 在共培養 4 小時後顯著縮小細胞間距，且 CYLB565 在細菌/細胞比=100、活菌狀態時的傷口癒合效果最佳。
- 四、CYLB565 在腸胃道環境具耐受性，pH 3 增殖倍率達 95.36%，膽鹽環境增殖倍率達 106.55%，適合應用於腸胃道傷口癒合。

五、CYLB565 促進傷口癒合的主要機制並非細胞增殖。

六、pH 4 的 CYLB565 上清液顯著抑制大腸桿菌。pH 4、pH6.5 的 CYLB565 上清液，皆顯著抑制幽門桿菌。CYLB565 热滅活菌、CYLB565 活菌，皆顯著抑制幽門桿菌。

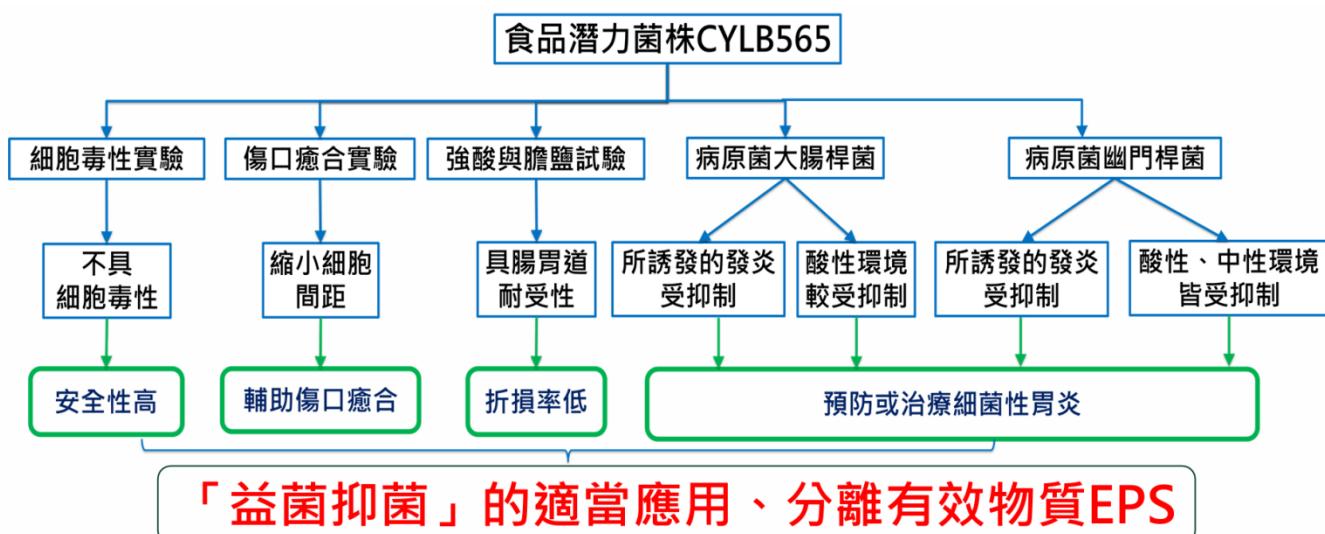
七、CYLB565 之胞外多醣體可抑制大腸桿菌所誘發的發炎反應，其中抗發炎最顯著的是 *IL-6*、

IL-1β 的 *E. coli* → EPS 組，*IL-8* 的 EPS / *E. coli* 組、*TNF-α* 的 EPS → *E. coli* 組。

CYLB565 之胞外多醣體可抑制大腸桿菌 LPS 所誘發的發炎反應，其中抗發炎最顯著的是 *IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α* 的 EPS / LPS 組，*IL-8* 的 EPS → LPS 組。

CYLB565 之胞外多醣體可抑制幽門桿菌所誘發的發炎反應，其中抗發炎最顯著的是 *IL-6*、*IL-1β* 的 *H. pylori* → EPS 組，*IL-8*、*TNF-α* 的 EPS → *H. pylori* 組。

八、CYLB565 屬於胚芽乳酸桿菌，其質體沒有可轉移之毒力基因或強抗藥性基因，且此菌株序列尚未發表於資料庫。



圖二十八、結論(資料來源：作者整理)

柒、參考文獻資料

- Adesulu-Dahunsi, A. T., Dahunsi, S. O., & Ajayeoba, T. A. (2022). Co-occurrence of *Lactobacillus* Species During Fermentation of African Indigenous Foods: Impact on Food Safety and Shelf-Life Extension. *Frontiers in microbiology*, 13, 684730.
- Almadani, Y. H., Vorstenbosch, J., Davison, P. G., & Murphy, A. M. (2021). Wound healing: A comprehensive review. *Seminars in Plastic Surgery*, 35(3), 141–144.
- Brandi, J., Cheri, S., Manfredi, M., Di Carlo, C., Vita Vanella, V., Federici, F., Bombiero, E., Bazaj, A., Rizzi, E., Manna, L., Cornaglia, G., Marini, U., Valenti, M. T., Marengo, E., & Cecconi, D. (2020). Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic, and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 11572.

- Chokesajjawatee, N., Santianont, P., Chantarasakha, K. *et al.* Safety Assessment of a *Nham* Starter Culture *Lactobacillus plantarum* BCC9546 via Whole-genome Analysis. *Sci Rep* 10, 10241 (2020).
- Daniel Joe Dailin, Elsayed Ahmed Elsayed, Nor Zalina Othman, Roslinda Malek, Hiew Siaw Phin, Ramlan Aziz, Mohamad Wadaan, Hesham Ali El Enshasy(2016). Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefiransfaciens* in semi industrial scale bioreactor, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 23, Issue 4, 495-502.
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720–3732.
- Dobrea, A., Savu, C., Dobrea, M., Murariu, G., Dimitriu, B., Stanescu, R., & Gâjâilă, I. (2013). The influence of extreme pH values 2.8 and 10.3 against two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from dental root canal and *Lactobacillus* probiotic strains. *Bulletin USAMV serie Veterinary Medicine/ Clinical sciences*, 69(1-2).
- Elham, A., Reyhaneh, M., Niki, P., & Fatemeh, G. B. (2022). Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration. In *Emerging nanomaterials and nano-based drug delivery approaches to combat antimicrobial resistance* (pp. 485–530). Elsevier.
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*, 127(3), 514–525.
- Fauziah, P., Athiyyah, A. F., Darma, A., Ranuh, R. G., Widjiati, W., Riawan, W., Sumitro, K. R., & Sudarmo, S. M. (2023). *Lactobacillus plantarum* IS-10506 accelerates healing of gastric injury induced by Ketorolac. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(1), 55-60.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(11), 3815–3822.
- Jiang, Yunyun & Zhang, Min & Zhang, Yang & Zulewska, Justyna & Yang, Zhennai. (2021). Calcium (Ca2+)-regulated exopolysaccharide biosynthesis in probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 as analyzed by an omics approach. *Journal of Dairy Science*. 104.
- Jie Zhang, Huiqin Zhang, Yue Xiao, Hongchao Wang, Hao Zhang, Wenwei Lu. (2024). Interspecific differences and mechanisms of *Lactobacillus*-derived anti-inflammatory exopolysaccharides, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 263, Part 2.
- Jung, H. C., Kim, J. M., Song, I. S., & Kim, C. Y. (1997). *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: Quantification of mRNA for interleukin-8, -1 α / β , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor- α . *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 12(6), 473–480.
- Kim, H., Lim, J. W., & Kim, K. (2001). *Helicobacter pylori*-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor kappaB. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 36 7, 706-16.
- Kwon, M., Lee, J., Park, S., Kwon, O. H., Seo, J., & Roh, S. (2020). Exopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 Has Anti-Inflammatory Effects via the Toll-Like Receptor 4 Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9283.
- Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P., & Kitazawa, H. (2016). Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: New insights into molecular interactions with host cells. *Microorganisms*, 4(3), 27.
- Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal immunology*, 8(5), 959–968.
- Li-li, H. (2006). Studies on the antagonistic properties of lactobacilli from human to acid and bile salt and its systematic biochemical identification. *Modern Preventive Medicine*.

- Nemska, V., Logar, P., Rasheva, T., Sholeva, Z., Georgieva, N., & Danova, S. (2019). Functional characteristics of lactobacilli from traditional Bulgarian fermented milk products. *Turkish Journal of Biology*, 43(1), 174–182.
- Noach, L. A., Bosma, N. B., Jansen, J., Hoek, F. J., Van Deventer, S. J. H., & Tytgat, G. N. J. (1994). Mucosal Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1/3, and Interleukin-8 Production in Patients with *Helicobacter pylori* Infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 29(5), 425–429.
- Nunziata, L., Brasca, M., Morandi, S., & Silvetti, T. (2022). Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria strains of dairy origin: An update. *Food Microbiology*, 104, 103999.
- Nwajiobi, F. O., Anyamene, C. O. and Abana. C. C., 2023. “Effects of Bacteriocin Extracted from *Lactobacillus Rhamnosus* on Cutaneous Wound Healing in Mice”. *Journal of Advances in Microbiology* 23 (7):15-25.
- Peng, X., Ed-dra, A., & Yue, M. (2022). Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63, 11244–11262.
- Sattar, S. B. A., & Singh, S. (2023). Bacterial Gastroenteritis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Snavely, S. R., & Hodges, G. R. (1984). The neurotoxicity of antibacterial agents. *Reactions*, 102, 3-4.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of dairy science*, 82(12), 2530–2535.
- Tarnawski, A. S., & Ahluwalia, A. (2021). The Critical Role of Growth Factors in Gastric Ulcer Healing: The Cellular and Molecular Mechanisms and Potential Clinical Implications. *Cells*, 10(8), 1964.
- Tsai, W.-H., Chou, C.-H., Huang, T.-Y., Wang, H.-L., Chien, P.-J., Chang, W.-W., & Lee, H.-T. (2021). Heat-killed Lactobacilli preparations promote healing in the experimental cutaneous wounds. *Cells*, 10(11), 3264.
- Vera-Peña, Madalyd & Rodriguez-Rodriguez, Wendy. (2020). Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolated from sour cream. *Universitas Scientiarum*. 25. 341-358.
- Wallace, H. A., Basehore, B. M., & Zito, P. M. (2023). Wound Healing Phases. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

【評語】052207

在當前抗藥性問題日益嚴重的背景下，從食品中分離的胚芽乳酸桿菌在傷口癒合及抗發炎方面是很有發展潛力，這對於尋找抗生素替代品也具有重要意義。研究中使用了 PCR、MTT 測試等多種科學方法來驗證乳酸桿菌的效果，顯示出研究的嚴謹性和科學性。研究結果以圖表和數據形式清晰呈現，能有效地傳達乳酸桿菌在不同環境下的抑菌效果及對細胞的影響，讓讀者易於理解。文獻回顧部分涵蓋了相關的背景知識，為研究提供了堅實的理論基礎，並展示了對相關領域的深入理解。

研究中所分離出的新發現菌株，應該收集更多相關資料並考慮申請專利保護。

建議在描述實驗過程時，可以提供更多的細節，例如每一步的具體操作時間和環境條件，以便其他研究者能夠重現實驗。

在結論部分，可以更具體地提出未來的研究計劃或改進建議，幫助讀者理解如何進一步探索乳酸桿菌的應用潛力。

本研究係從市場所蒐集來的 23 種醃製食品中，分離出多個乳酸桿菌，具有安全應用潛力，並從其中找到一個新菌株，能促

進腸胃道傷口癒合，且對大腸桿菌與幽門桿菌均有預防或治療細菌性胃炎之效果，未來在醫學上可能具有很大之發展潛力。本研究中使用之所有儀器、研究架構、試驗步驟、思考模式及撰寫模式都是超越一般高中生等級。本研究報告文筆流暢，亦符合科學論文之書寫格式，具有很高之學術及應用價值。

作品海報

益菌抑菌-從食品分離之胚芽乳酸桿菌 對傷口癒合和發炎的預防與治療效應

抗生素治療→神經毒性、抗藥性問題

細菌性胃炎
破壞正常組織、
延遲傷口癒合傷口癒合：乳酸桿菌縮小傷口間距，降低細菌感染風險
益菌抑菌：以食品中安全的胚芽乳酸桿菌，抑制病原菌
抗發炎應用：預防、即時阻斷、治療胃細胞發炎的潛力提升食品應用、
減少抗生素依賴

研究目的與方法

圖表皆為
作者自行整理繪製從食品篩選乳酸桿菌
細胞毒性測試
傷口癒合測試

特性探究

最佳乳酸桿菌活性、
細菌細胞比測試

腸胃道耐受性

細胞增殖
測試

全基因定序

測試於大腸桿菌和幽門桿菌

pH 4、6.5
抑制病原菌
測試

萃取上清液中的EPS

不同順序
抗發炎試驗

研究結果

(柱狀圖皆以平均 + 標準差SD呈現)

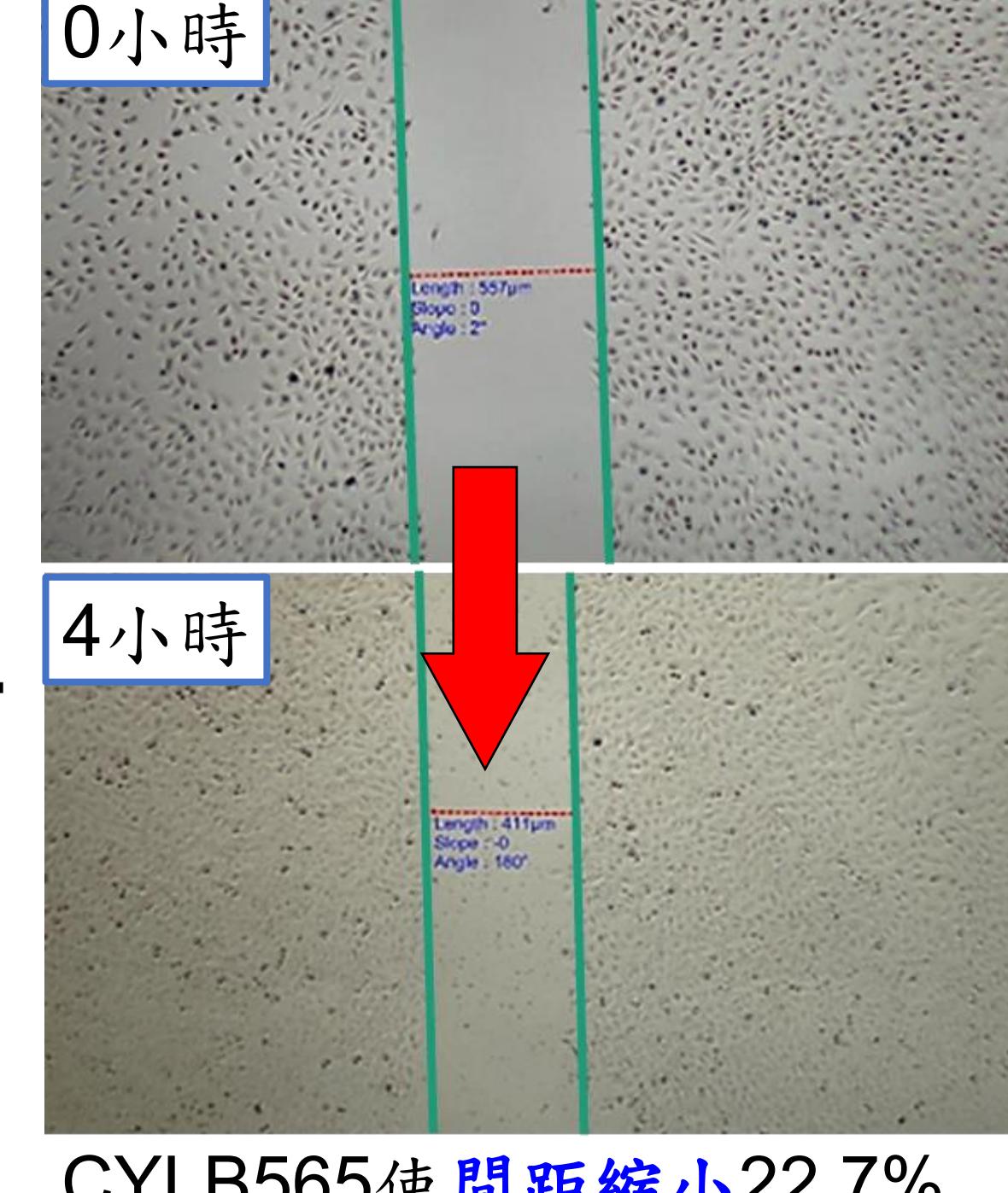
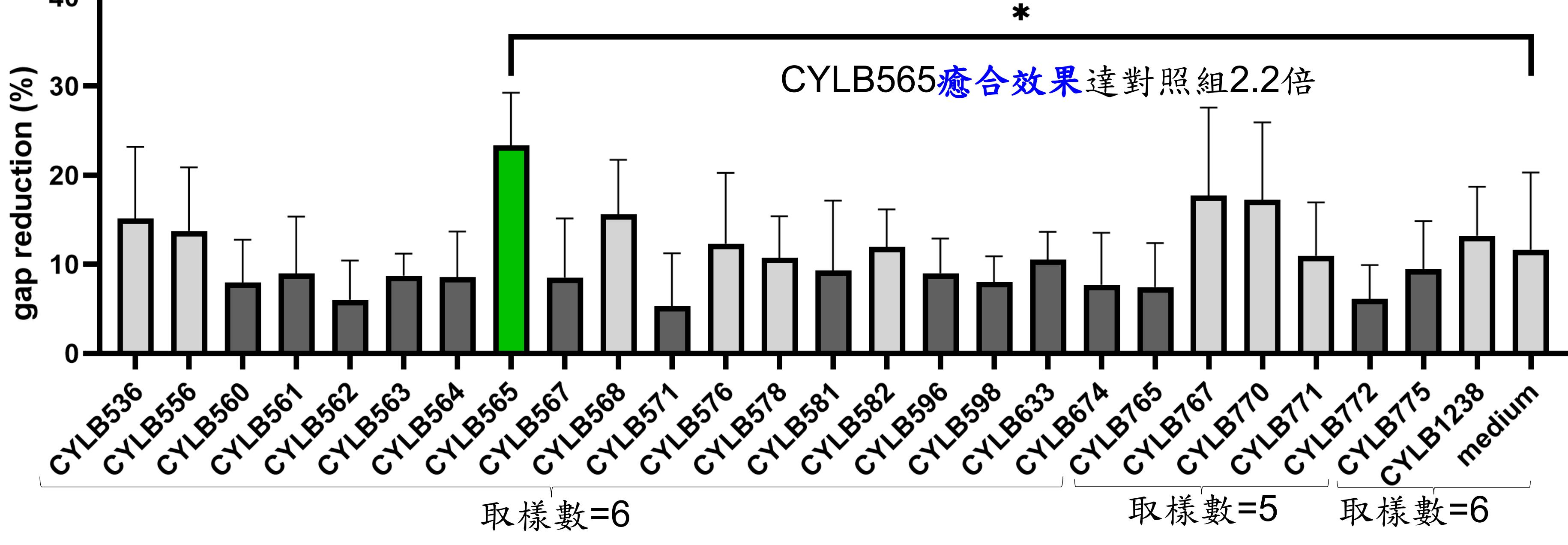
從傳統食品分離與鑑定乳酸桿菌

- 食品是乳酸桿菌的多樣來源，從23種樣本分離菌株，以PCR鑑定，有60.9%菌株為乳酸桿菌
- 細胞毒性測試MTT中，菌株CYLB572顯著降低胃上皮細胞(GES-1)的存活率，因此將其排除

樣本來源	東門市場								永春市場								東門市場							
	榨菜	桂花 甜酒 釀	臭豆腐	雪裡 紅	韓式 泡菜	醃黃 瓜	台式 泡菜 -1	醃芥 菜	醃條 瓜	韓式 泡菜	台式 泡菜	醃芹 菜	辣榨 菜	醃青 椒	醃蘿 蔔	醃薑	酸菜	台式 泡菜 -2	鳳梨 醬苦 瓜	黃金 泡菜	老菜 脯	蔭醬 冬瓜	蔭醬 鳳梨	
分離菌株數	14	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
乳酸桿菌的菌株數	12	12	7	6	2	2	1	1	1	1	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

傷口癒合

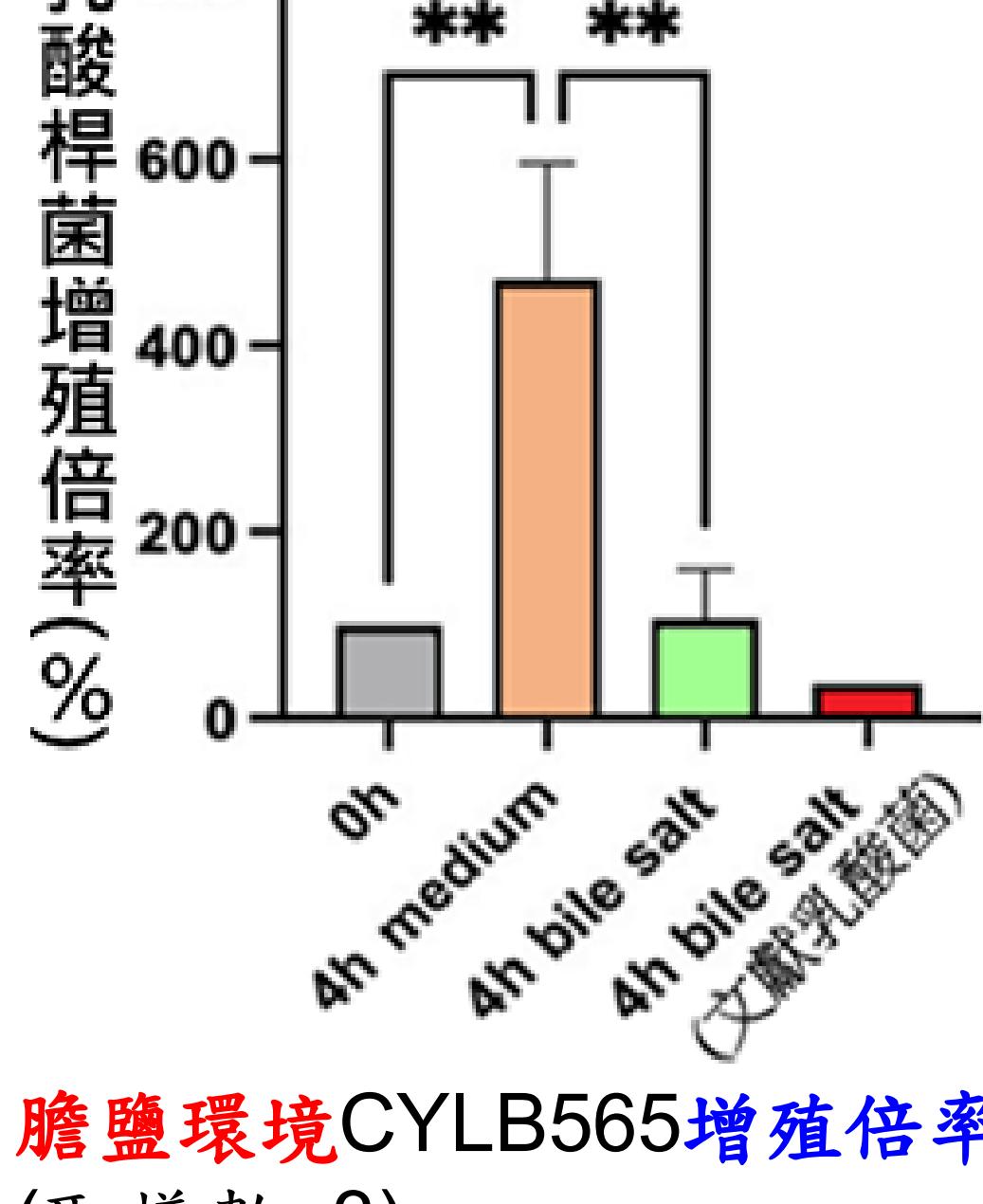
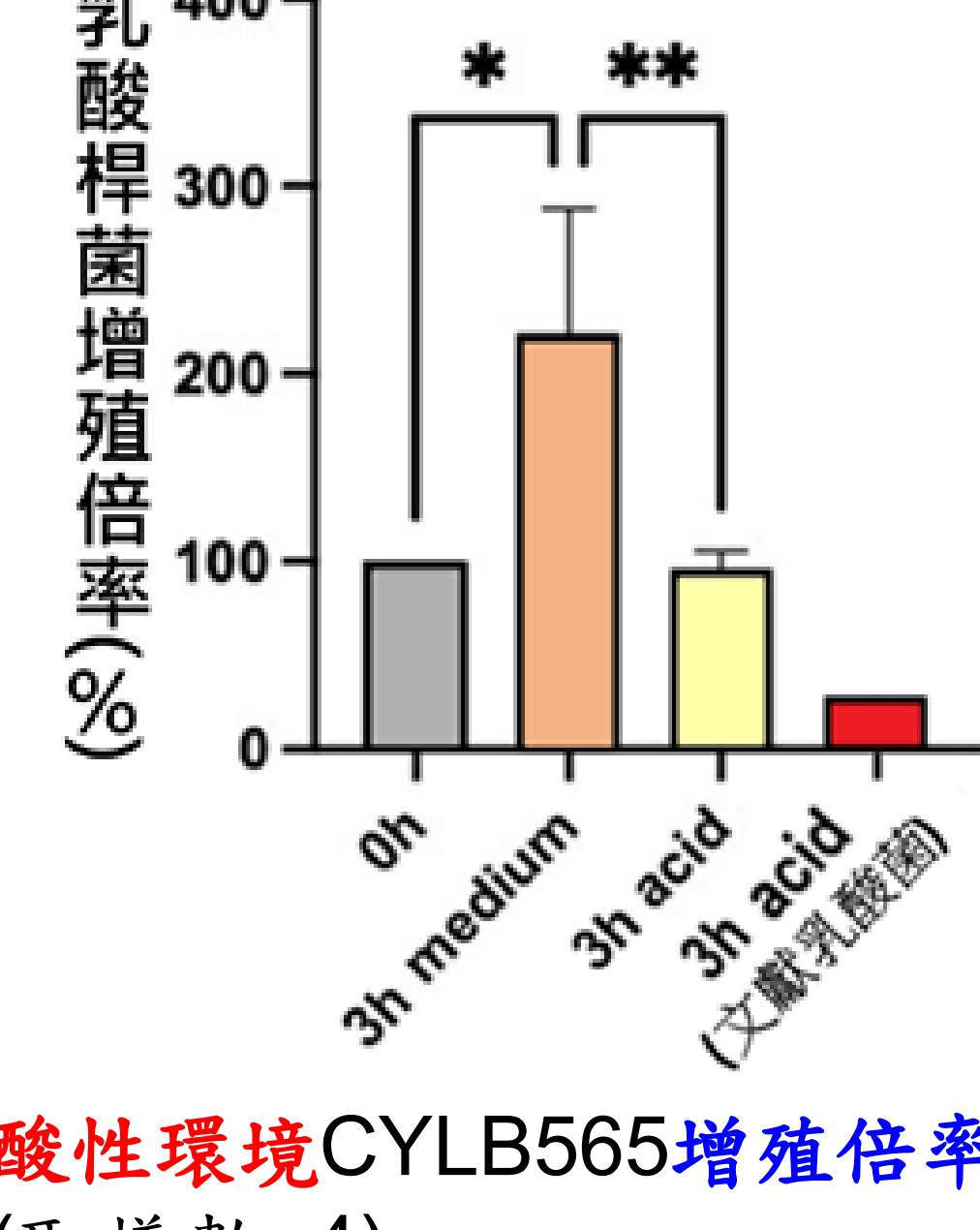
- 來自榨菜的菌株CYLB565，和GES-1細胞共培養4小時後顯著縮小細胞間距



- 乳酸桿菌數/細胞數=100時，CYLB565對GES-1癒合效果最佳
- 經細菌活性測試，CYLB565癒合效果：活菌>熱滅活菌>上清液

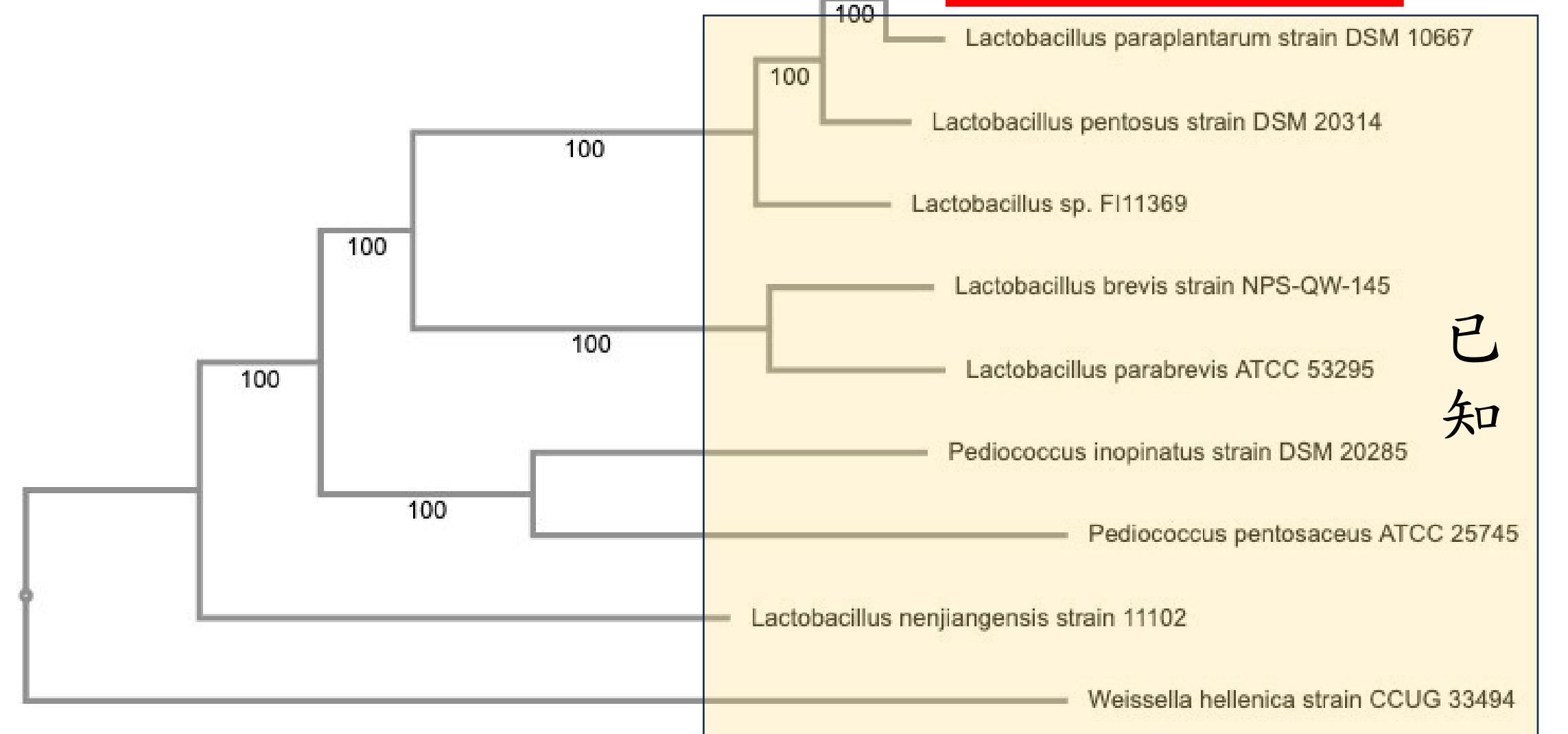
特性探究

- 乳酸桿菌CYLB565在腸胃道環境具耐受性



- 全基因體定序結果顯示：

- CYLB565的菌種是食品常見的胚芽乳酸桿菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*)
- CYLB565基因序列未發表在菌株資料庫，屬於全新品系
- CYLB565的質體沒有毒力或強抗藥性基因



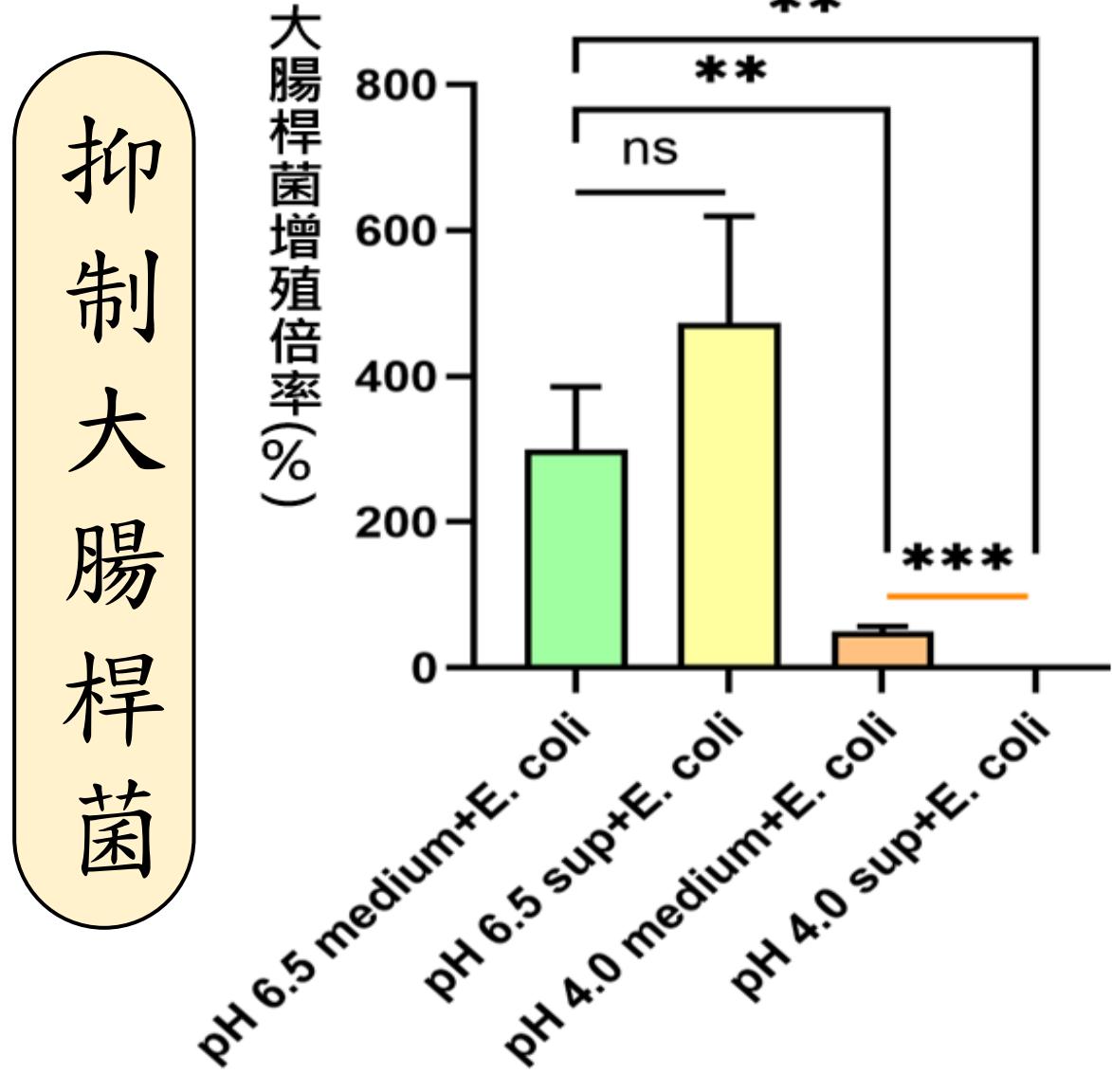
- 傷口癒合機制：
- 根據4、8、16小時實驗：CYLB565未顯著促進細胞增殖
- 根據初步實驗：CYLB565具促進細胞遷移的潛力(取樣數=1)

CYLB565品系序列演化樹(使用BV-BRC資料庫分析)：
100表示在不同次取樣中，該分支出現的機率為100%

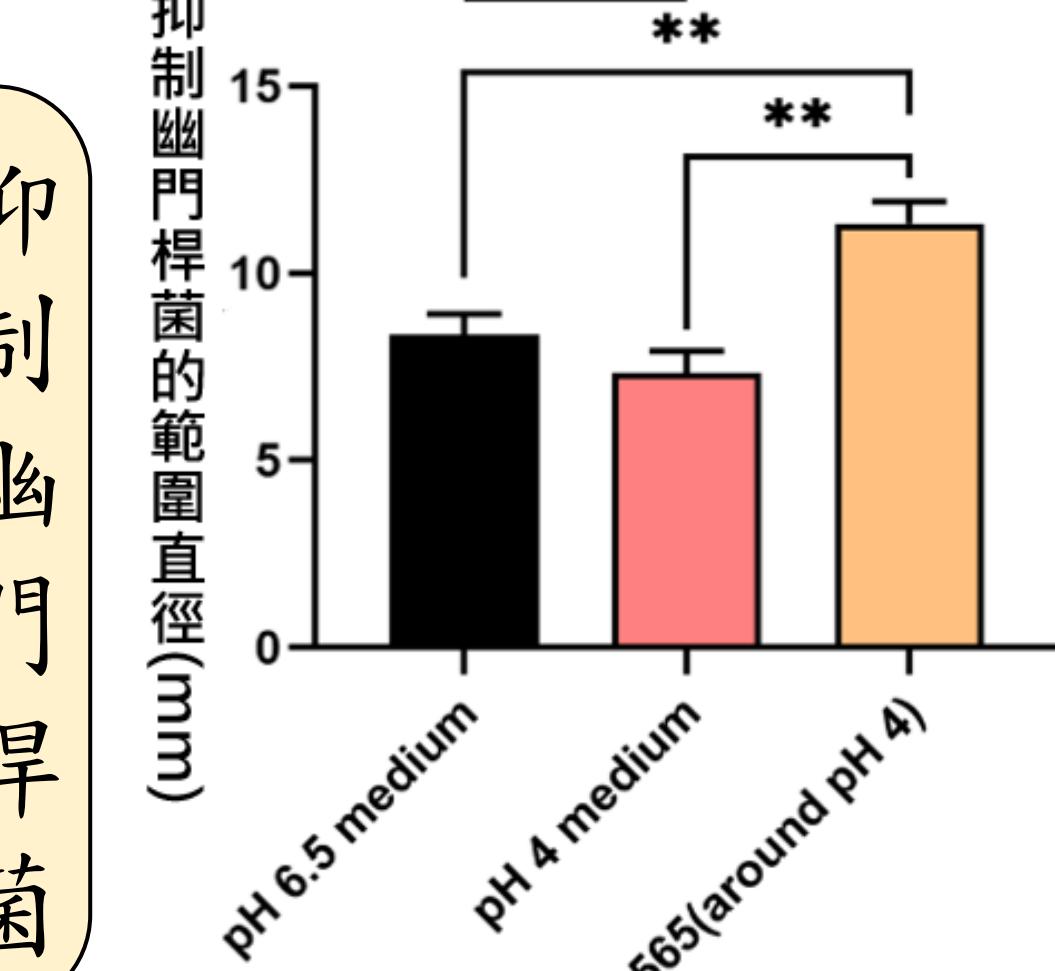
CYLB565 抑制病原菌實驗

1. 病原菌：常見的胃腸道病原菌，大腸桿菌(引發細菌性胃炎)、幽門桿菌(引發胃潰瘍，甚至是胃癌)
 2. 環境：皆分別在pH 4、pH 6.5測試

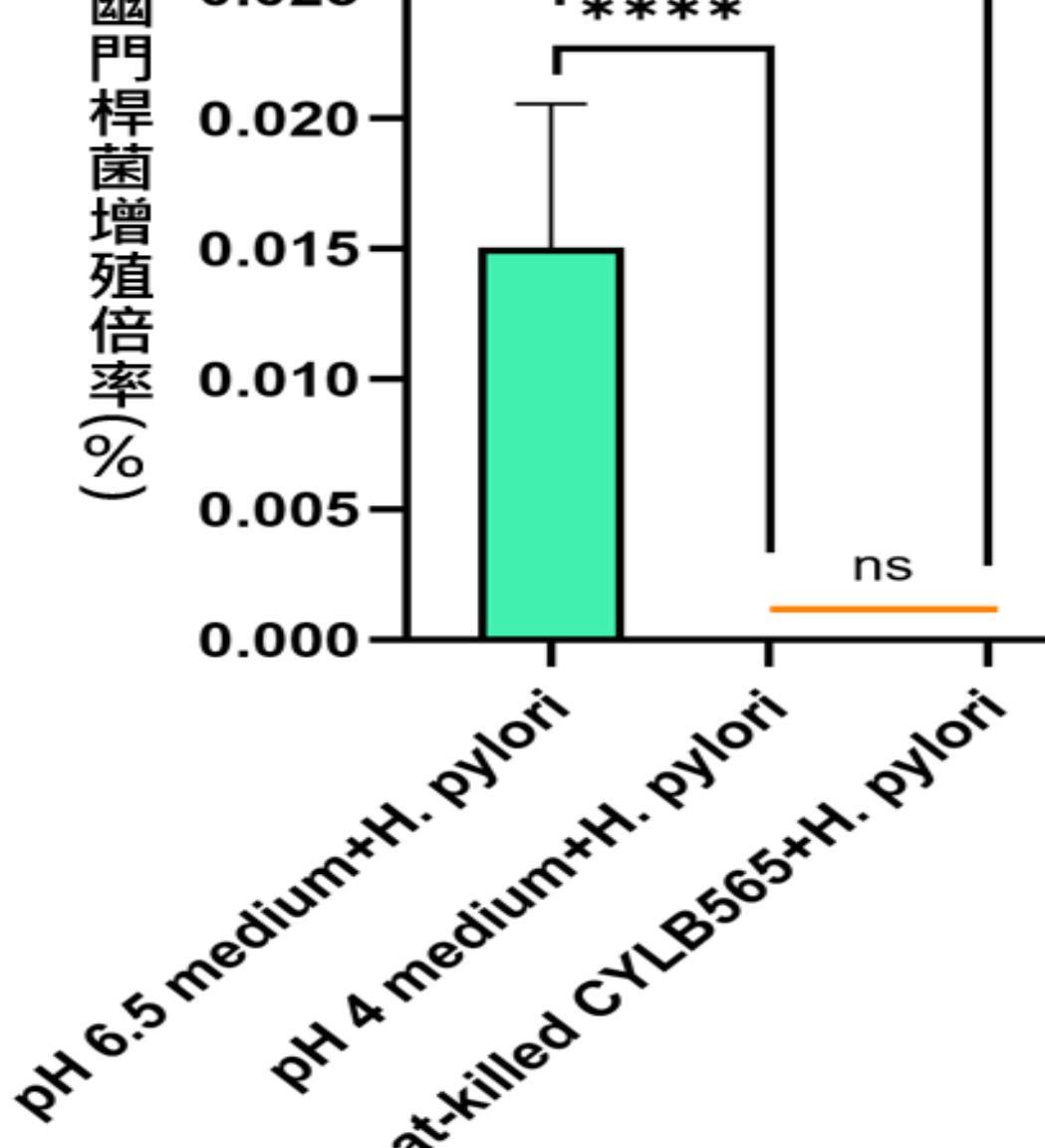
抑制大腸桿菌



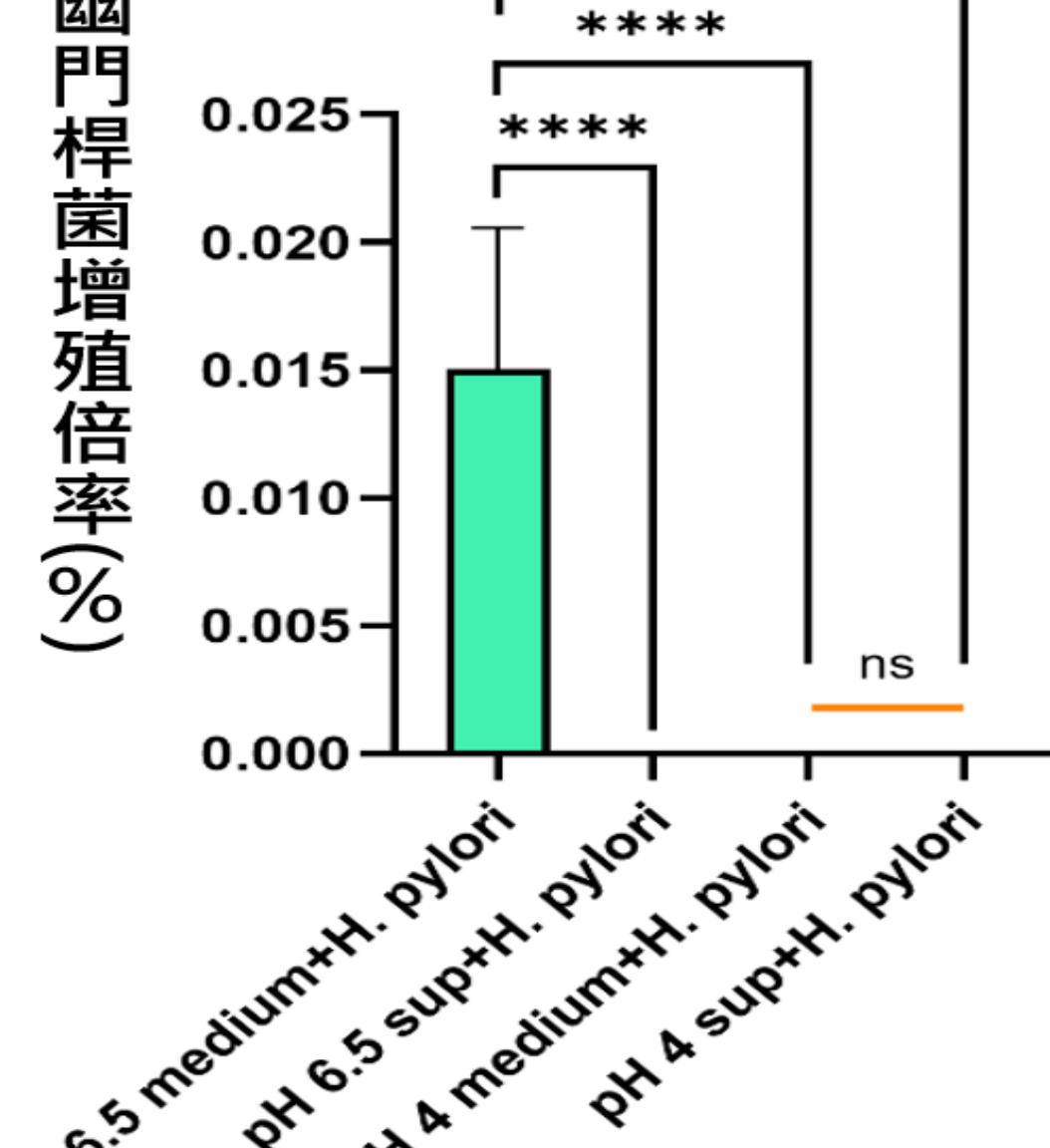
乳酸桿菌上清液抑制大腸桿菌實驗
(取樣數=5)



活乳酸桿菌抑制幽門桿菌實驗
(取樣數=3)
(柱狀圖愈高，抑菌效果愈佳)



熱滅活乳酸桿菌抑制幽門桿菌實驗
(取樣數=3)



乳酸桿菌上清液抑制幽門桿菌實驗
(取樣數=3)

CYLB565 EPS 抗發炎實驗

挑選胞外多醣體 (EPS) 進行抗發炎：

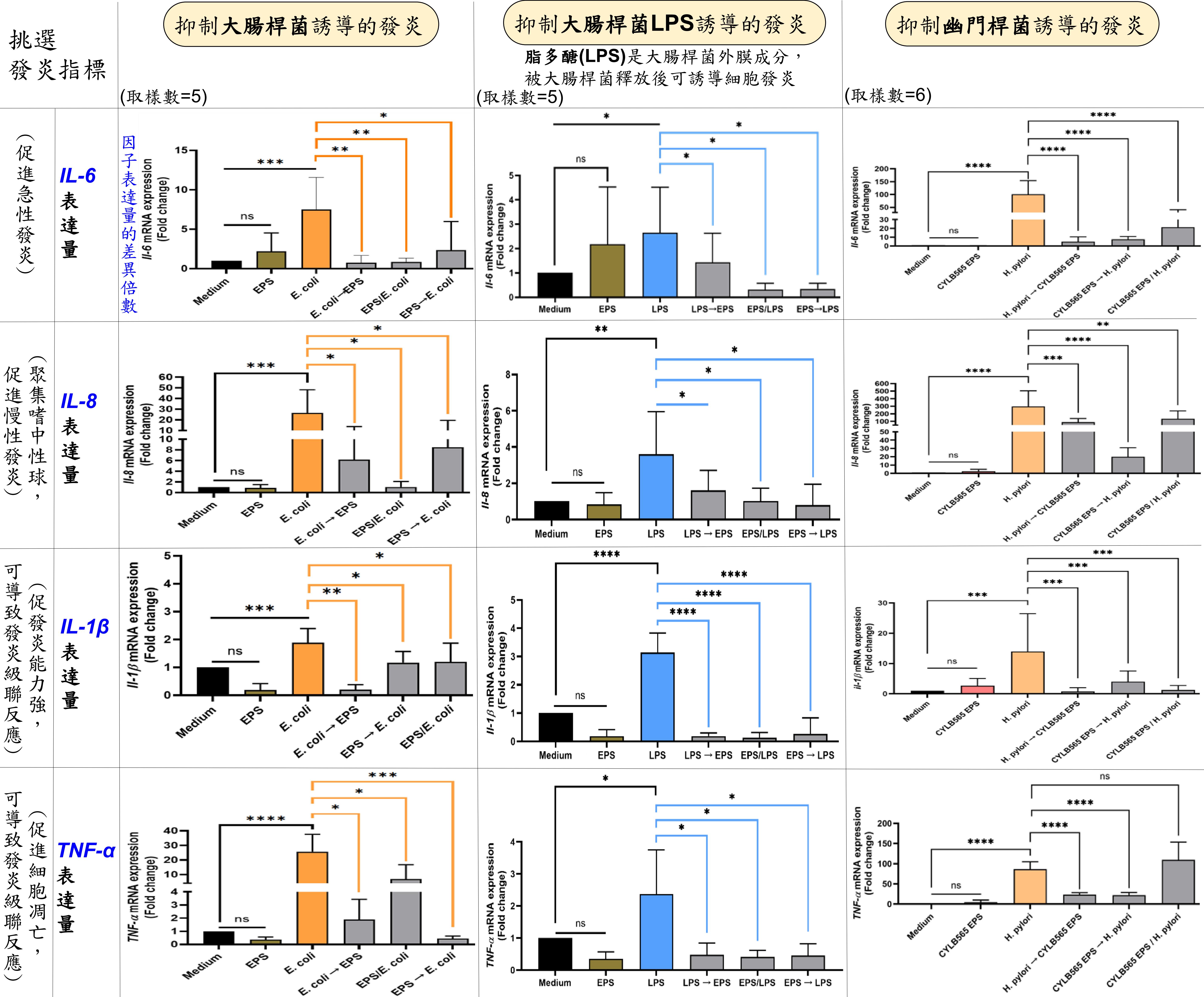
前一實驗顯示CYLB565上清液具抑菌效果，故進一步從上清液萃取出EPS。EPS是微生物分泌至外部環境的天然多醣。根據文獻，乳酸桿菌分泌的EPS可強化人體腸胃屏障、調控免疫反應。

1. 對GES-1細胞添加發炎誘導物大腸桿菌(*E. coli*)、大腸桿菌脂多醣(LPS)、幽門桿菌(*H. pylori*)
2. 對於每種發炎誘導物，皆以三種順序(後加/同時加/先加)將胞外多醣體(EPS)添加至GES-1細胞
3. 依文獻挑選發炎指標 $IL-6$ 、 $IL-8$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ ，

探討胞外多醣體(EPS)是否抑制病原菌與其毒素所引起的細胞發炎，並探討EPS最佳抗發炎順序

	組別(→：代表添加順序的前後 / : 代表同時添加)			目的	
	單獨處理組	medium	EPS	發炎誘導物	
不同順序處理組				發炎誘導物→EPS(後加)	研究EPS治療潛力
				EPS(同時加)/發炎誘導物	研究EPS即時阻斷發炎潛力
				EPS(先加)→發炎誘導物	研究EPS預防潛力

實驗結果：EPS顯著抑制發炎



CYLB565廣泛抑制病原菌

乳酸桿菌 狀態	病原菌	抑菌結果 對照pH6.5培養液	抑菌結果 對照pH4培養液	推論原因
pH4 上清液	大腸桿菌			抑菌效果來自CYLB565 與酸性環境的共同作用
	幽門桿菌		相近	CYLB565的抑菌效果可能被酸性的作用所掩蓋
pH6.5 上清液	大腸桿菌	無抑制		CYLB565無法在近中性環境釋放抑菌酸性物質
	幽門桿菌			1. CYLB565的抑菌物質是酸性 2. 在pH 4~6.5範圍內，pH變化不影響抑菌能力
活菌	幽門桿菌			CYLB565與幽門桿菌競爭、釋放活性物質
熱滅活菌	幽門桿菌		相近	CYLB565的抑菌效果可能被酸性的作用所掩蓋

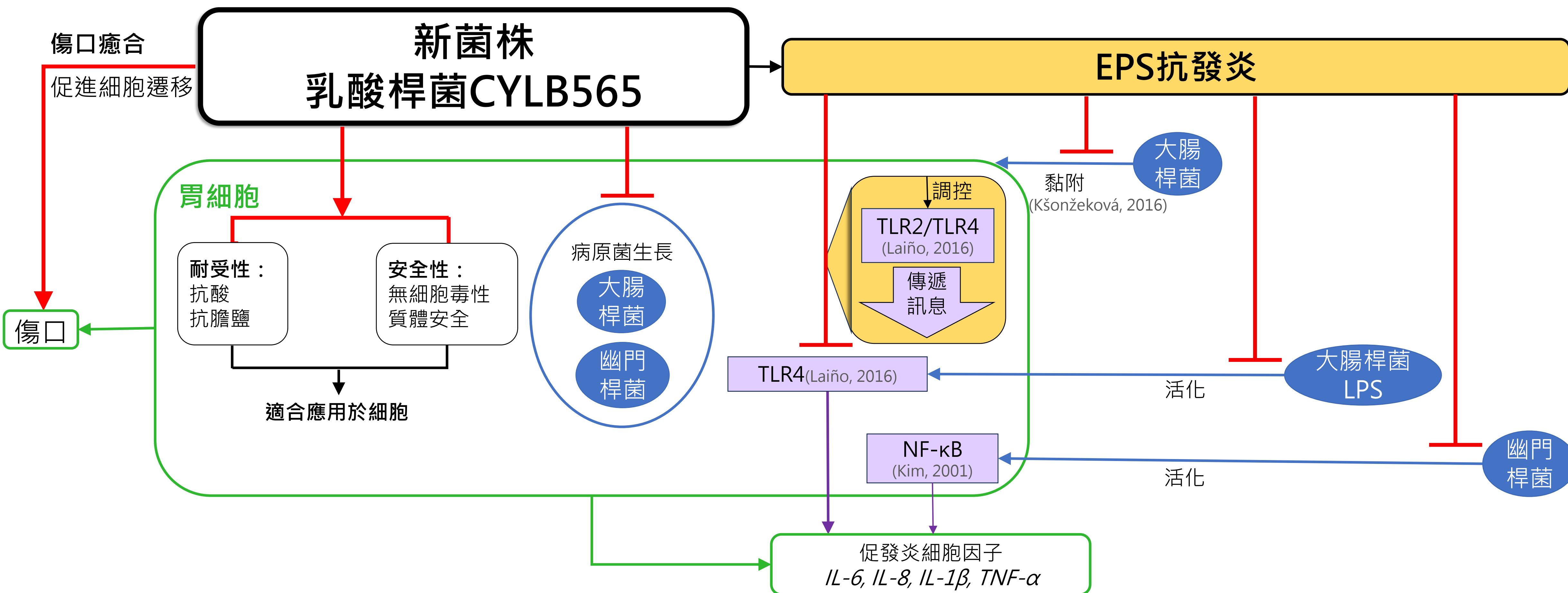
(: 對照pH6.5培養液，顯著抑制病原菌/ : 對照pH4培養液，顯著抑制病原菌)

以不同順序添加CYLB565 EPS，可顯著抗發炎

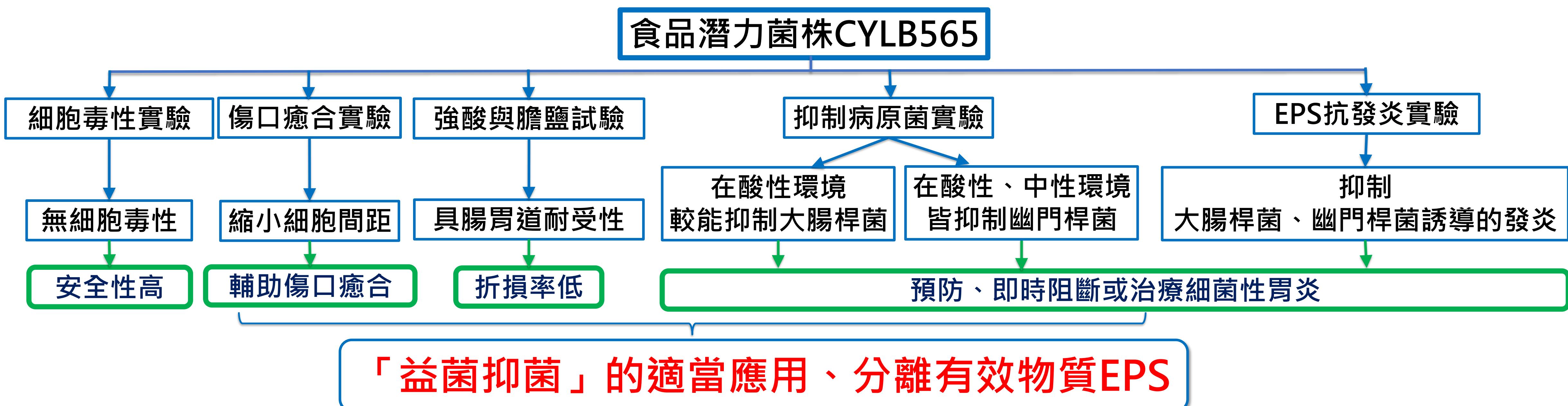
大腸桿菌誘導發炎		大腸桿菌脂多醣(LPS)誘導發炎		幽門桿菌誘導發炎										
刺激物	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α	刺激物	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α	刺激物	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α
EPS	■	■	■	■	EPS	■	■	■	■	EPS	■	■	■	■
<i>E. coli</i>	↑	↑	↑	↑	<i>E. coli</i> LPS	↑	↑	↑	↑	<i>H. pylori</i>	↑	↑	↑	↑
<i>E. coli</i> → EPS	最顯著	↓	最顯著	↓	<i>E. coli</i> LPS → EPS	↓	↓	↓	↓	<i>H. pylori</i> → EPS	最顯著	↓	最顯著	↓
對照 <i>E. coli</i>	EPS / <i>E. coli</i>	↓	最顯著	↓	對照 LPS	最顯著	↓	最顯著	最顯著	對照 <i>H. pylori</i>	↓	↓	↓	—
EPS → <i>E. coli</i>	↓	↓	↓	最顯著	EPS → <i>E. coli</i> LPS	↓	最顯著	↓	↓	EPS → <i>H. pylori</i>	↓	最顯著	↓	最顯著

(: 顯著抑制 / : 顯著誘導上升 / : 最顯著抑制 / ■ : 不顯著)

總結討論CYLB565



結論



重要參考資料

- Kim, H., Lim, J.W., & Kim, K. (2001). *Helicobacter pylori*-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor kappaB. Scandinavian journal of gastroenterology, 36 7, 706-16.
- Krzeszczak, P., et al. (2018). The role of TNF- α in wound healing: A double-edged sword. Frontiers in Immunology, 9, 2741.
- Santos-Moreno, P., Burgos-Angulo, G., Martínez-Ceballos, M. A., Pizano, A., Echeverri, D., Bautista-Niño, P. K., Roks, A. J. M., & Rojas-Villarraga, A. (2021). Inflammaging as a link between autoimmunity and cardiovascular disease: the case of rheumatoid arthritis. *RMD open*, 7(1), e001470.
- Thiraworawong, T., Spinler, J. K., Werawatganon, D., Klaikew, N., Venable, S. F., Versalovic, J., & Tumwasorn, S. (2014). Anti-inflammatory properties of gastric-derived *Lactobacillus plantarum* XB7 in the context of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 19(2), 144–155.
- Van Deuren, M., Dofferhoff, A. S. M. and Van Der Meer, J. W. M. (1992). Cytokines and the response to infection. *J. Pathol.* 168: 349-356.