

# 2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070007

參展科別 微生物學

作品名稱 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

得獎獎項

就讀學校 臺北市私立東山高級中學

指導教師 李麗敏

作者姓名 許好瑄

關鍵詞 益生菌、抗菌能力、胞外多醣

## 作者簡介



我是許好瑄，目前就讀台北市私立東山高中。很幸運有機會讓我進到實驗室做實驗。透過參與這次的實驗，讓我學到了許多課本上沒教的知識，也讓我看到許多只能在課本上看到的圖片但卻真實的呈現在我眼前。雖然做實驗時常會遇到許多困難，例如等待許久的時間卻看不到跟自己預期的想法一樣的結果，但多虧在背後永遠支持我的老師、父母和同學們，讓我在經歷挫折時可以繼續走下去。就像牛頓說的：「如果我能看得更遠，那是因為我站在巨人的肩膀上。」謝謝許多人的幫忙，讓我有機會能參加這次的國際科展，也讓我可以跟大家分享我的研究成果，希望有機會可以再繼續作深入的研究。

## 摘要

研究發現食用醃漬食品能夠讓腸道菌相平衡、提高免疫力、降低血脂血壓等。科學家們從這些食物中分離出乳桿菌 (*Lactobacillus*)、鏈球菌 (*Streptococcus*) 和明串球菌 (*Leuconostoc*) 等。本研究希望從醃漬食品中分離出能夠維持腸道健康的益生菌。首先，我們從台北的傳統市場收集醃漬食品，利用選擇培養基分離細菌。通過 PCR 確認為乳桿菌屬後，測量他們的胞外多醣產量。我們發現菌株 1-1、3-2、3-4、3-6-2、和 3-8 能夠在含有低酸和膽鹽的環境生存，並測試他們對人類胃細胞的毒性。在 MOI=10 的情況下，所有菌株都能維持細胞 80% 的生存率。但是，菌株 1-1、3-2、3-4、3-6-2、和 3-8 的細胞貼附能力非常弱。除此之外，我們發現菌株 PV15、1-1、3-2、3-4、3-6-1、3-6-2、和 3-8 的上清液能小幅度地抑制大腸桿菌生長能力。未來，我們希望能進行腸道細胞的實驗 (CACO-2)，並利用動物來檢測菌株維持腸道健康的能力。

## Abstract

Studies have been done to investigate the benefits of consuming fermented food, which they are proved to maintain the balance of intestinal tract microbiota, modulate the immune system, and reduce blood pressure. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Leuconostoc* species are commonly found to be isolated from the food. In this study, we aim to isolate the bacteria which have the potential to be used as probiotics to maintain the health of our intestinal tract. Firstly, we collected fermented food from the traditional market in Taipei district, Taiwan. Suspected *Lactobacillus* strains were isolated from the food using selective agar medium which was De Man, Rogosa and Sharpe (MRS). After confirming the identity of the isolates as *Lactobacillus* species using PCR method, exopolysaccharide production from the isolates was detected. Furthermore, we challenged the isolates for their survival in the environment containing acid and 0.3% bile salt, respectively and found that isolate 1-1, 3-2, 3-4, 3-6-2 and 3-8 were able to survive in both environments. The following assay performed was cell cytotoxicity test to confirm that the isolates exhibit no killing effect to human gastric cells. All isolates maintained the survival of cells at 80% at MOI=10. However, isolate 1-1, 3-2, 3-4, 3-6-2 and 3-8 showed no adhesion ability to the cell lines tested. Besides, we collected the supernatant from the isolates and tested their inhibition activity on the growth of pathogen which was *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ . Isolates PV15, 1-1, 3-2, 3-4, 3-6-1, 3-6-2, and 3-8 were found to inhibit the growth of DH5 $\alpha$  at low extent. In the future, we aim to perform the assays on intestinal cell line (CACO-2) and tested the efficacy of the isolates in health maintenance in animal model.

# 壹、前言

## 一、研究背景／動機

大量且不受管制地在醫療及農業上使用抗生素引發了多重抗藥性菌隻的生成。所以，有機和全天然無添加的保健品成為大眾近年來首選的條件之一。而我好奇有無其他原因致使大眾在治療與保健上選擇從普遍受用的抗生素變成更傾向於使用益生菌。除此之外，在我們的日常生活中常常會食用醃漬或發酵食品，像是泡菜、酸菜和菜脯。國外有許多針對醃漬食品的研究，例如韓式泡菜、日本納豆和德國酸菜等。科學家們發現食用這些食物對人體有益，並且能夠讓腸道菌相平衡、調節免疫細胞、提高免疫力、降低血脂血壓等。在製作醃漬食品的過程中將會培養出細菌，其中包含乳桿菌（*Lactobacillus*）、鏈球菌（*Streptococcus*）和明串球菌（*Leuconostoc*）。而我們好奇會不會是這些食品中的細菌或是細菌的代謝物在腸道內產生化學作用，使我們的身體狀況變好。此外，我們也想知道為這些細菌開發具有市場價值的食用益生菌之可行性。

## 二、研究目的

本研究希望從醃漬食品樣本中分離出益生菌並進行特性分析、從中篩選出對胃細胞無毒性且能夠抑制腸道病原菌的益生菌。此外，我們想開發出具有市場價值且能替代或輔助一般腸胃疾病治療之藥物。

本篇研究目的為下列：

- （一）從醃漬食品分離出乳酸菌
- （二）篩選能分泌高濃度胞外多醣的菌株
- （三）篩選能適應腸胃道的環境及對人體胃細胞無毒性的菌株
- （四）篩選能有效地抑制腸胃道病原菌之生長的菌株

## 三、文獻回顧

經過閱讀後我發現因為農產業大量使用抗生素，造成高度抗藥之細菌的傳播，而無法被代謝完全的抗生素也在食用家禽內發現，引發大眾重新檢視抗生素的使用 (Toghyani et al., 2011)。所以，較為天然無副作用的益生菌開始被用為預防與控管家禽之間的傳染性疾病 (Huff et al., 2015)。另外，先前有研究指出乳桿菌目（lactic acid

bacteria)，像是腸球菌屬 (*Enterococcus*)、乳桿菌屬 (*Lactobacillus*)、魏斯氏菌屬 (*Weissella*) 和鏈球菌 (*Streptococcus*) 等作為人類和動物腸道內的正常微生物群擁有顯著性的提升及維持腸道健康的功用 (Reuben et al., 2019)。

醃漬食品類普遍擁有被認為是公認安全的菌株 (Generally recognized as safe) 且能產出具有抗菌功能的代謝物 (Mathur et al., 2020)。印度的研究顯示從醃漬食品中分離出的乳桿菌目有潛能作為食用益生菌，他們能有效的抑制食物病原菌例如仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和痢疾志賀氏菌 (*Shigella dysenteriae*) 能產出胞外多醣以及具有酵素活性的  $\beta$ -半乳糖苷酶、且對抗生素擁有感受性 (Kumar et al., 2017)。另外，乳桿菌目能夠產出細菌素 (bacteriocin)。研究顯示，細菌素能夠抑菌、作為抗癌藥物並有能力調節腸道內菌相 (Cesa-Luna et al., 2021)。先前的研究也有發現從醃製食品中 (破布子) 大量分離出乳桿菌屬，但該實驗團隊並無針對分離出的菌株進行抑菌和促進腸道健康之探討 (Chen et al., 2013)。因此，我對於台灣傳統市場中醃漬食品的益生菌對於人體腸道健康的影響極有興趣，並想找出能夠作為食用益生菌的菌株。

## 貳、研究方法與過程

### 一、研究設備及器材

#### (一)實驗材料

##### 1. 細菌培養基

De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培養基
-------------------------------------

低酸 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培養液：利用 HCl 將 pH 值調整至 pH3
---

Luria Bertani (LB)培養基
-----------------------

##### 2. 細胞培養液

Ham's Nutrient Mixture F12 培養液
--------------------------------

RPMI 1640 培養液
---------------

##### 3. DNA Primer 序列

乳酸菌屬 primer	
-------------	--

Forward primer	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA
----------------	----------------------------

Reverse primer	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC
----------------	-----------------------------

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) primer	
--	--

GGC CAC GGA A	
---------------	--

#### 4. 醃漬物樣品

表一、醃漬食品樣本與來源

內湖 737 商圈			
菜脯	酸菜	臭豆腐	韓式泡菜
			
東門市場			
桂花釀	台式泡菜	榨菜	醃製芥菜
			
太平市場	新北中和		
韓式泡菜	酸菜		
			



(二)實驗耗材

PCR 管	PCR Master mix	0.5x TBE	三次水	Ethidium bromide (EtBr)
Agarose powder	96 孔盤	棉棒	封口膜	紙錠
1x PBS 緩衝液	5N NaOH	3% 膽鹽	Saponin	Triton X
5N HCl	玻璃珠	15 mL 搖菌管	針筒	針筒過濾器

(三) 實驗器材

細菌培養箱	無菌無塵操作台	顯微鏡	高溫乾浴槽	渦漩混合器
				
PCR 機器	照膠影像系統	光學分析儀	離心機	測光儀
				



## 二、實驗方法

### (一) 益生菌之分離

收集醃漬食品的當天，我們萃取汁液、進行序列稀釋並將其滴在選擇培養基上（MRS）。從中分離出單顆菌落，選擇疑似為乳酸菌並形狀與大小各異的菌落在 37°C 的培養箱進行培養。

### (二) 益生菌之鑑別

為了初步鑑定益生菌，我們利用革蘭氏染色及顯微鏡觀察來判定細菌的類別與形狀，也使用加熱法抽取細菌的 DNA，進行聚合酶連鎖反應（PCR）、凝膠電泳，以初步鑑別細菌的菌屬。

表二、PCR 程式

乳酸菌屬 primer			
Forward primer	95°C	5 min	
Reverse primer	95°C	30 s	30 cycles
	55°C	30 s	
	72°C	30 s	
	72°C	7 min	
	25°C	pause	
RAPD primer			
Primer F	94°C	5 min	
	94°C	30 s	8 cycles
	36°C	1 min	
	72°C	90 s	
	94°C	20 s	35 cycles
	36°C	30 s	
	72°C	90 s	
	72°C	3 min	
	25°C	pause	

### (三) 測量益生菌的胞外多醣產量

我們將益生菌隔夜培養於含有 2%蔗糖的 MRS 培養基，利用酒精、酚與硫酸萃取益生菌的胞外多醣。接著我們使用測光儀，在 OD<sub>490</sub> 量化胞外多醣的產量。

### (四) 益生菌在低酸和膽鹽之耐受性

我們試圖模擬腸道內的環境，利用低酸 (pH3) 和膽鹽 (0.3%)，分別將益生菌在 37°C 培養 3 與 4 小時，隔天進行菌落計數，以測試並計算益生菌的環境承受能力。

### (五) 益生菌對人體細胞的毒性測試

此實驗我們使用了兩種胃細胞，分別為正常胃細胞以及胃癌細胞。我們先將胃細胞培養在 96 孔盤並以 MOI = 100 和 10 的菌量感染人類胃細胞 (MOI = 100 為以 100 隻益生菌感染 1 個細胞的比例，MOI = 10 為以 10 隻益生菌感染 1 個細胞的比例)。二十四小時後，我們將貼附在細胞表面的益生菌沖洗乾淨，利用 MTT 與活細胞作用之產物 (藍紫色結晶)，並用 DMSO 將結晶溶解，產生紫色液體，讀取吸光值 (OD<sub>600</sub>)，以判斷益生菌是否對胃細胞產生毒性。

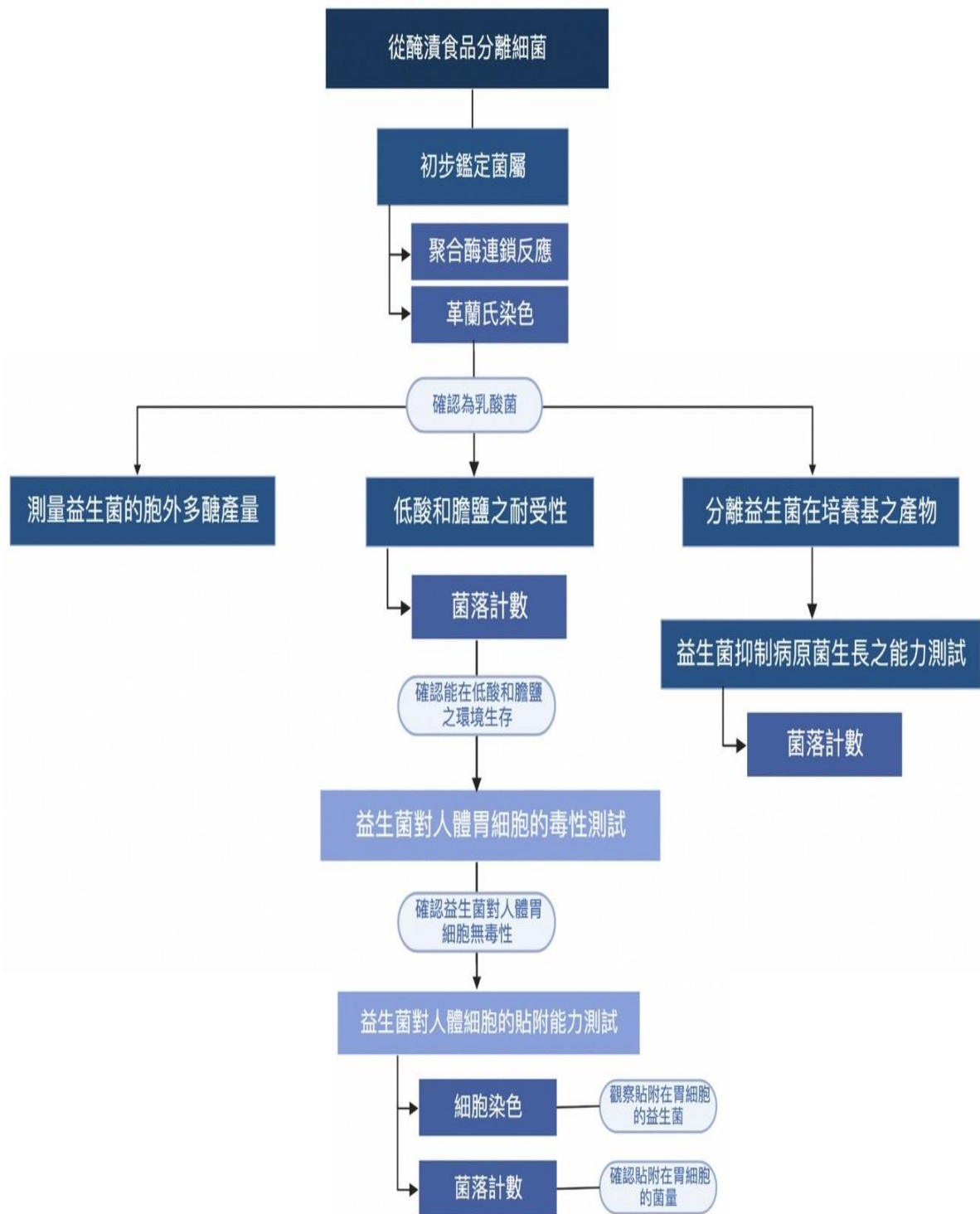
### (六) 益生菌對人體細胞的貼附能力測試

我們將益生菌與胃細胞共同培養 90 分鐘，並把無貼附在細胞表面的益生菌沖洗乾淨，利用皂苷將細胞組織破壞，釋放出貼附在細胞的益生菌，進行菌落計數，以計算益生菌貼附胃細胞的能力。

### (七) 益生菌抑制病原菌生長之能力測試

我們將益生菌隔夜培養在 MRS 培養基並將其過濾以留下上清液，調整至 pH4 和 pH6.5。我們把病原菌和上清液共同培養 3 小時後，進行菌落計數，測試益生菌有無產生能夠抑制病原菌生長的物質。

三、研究流程：  
如圖一所示

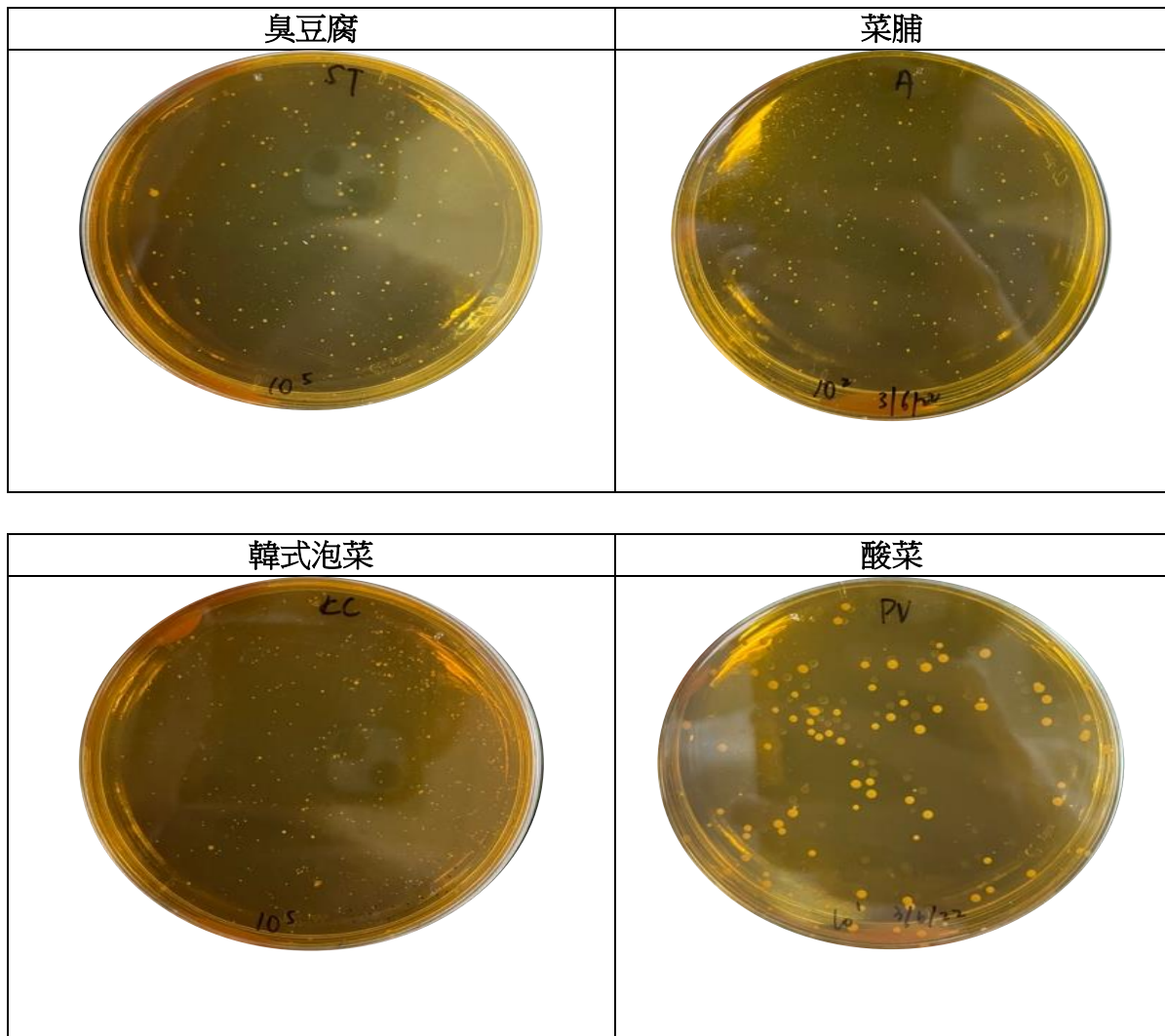


## 參、研究結果與討論

### 一、醃漬食品收集與益生菌之分離

我們從台灣北部的傳統市場收集不同的醃漬食品，利用 MRS 瓊脂盤分離益生菌。我們從培養基上挑選形狀與顏色各異的菌落，盡可能選擇不同種類的益生菌。

表三、食物樣本菌落生成（顯示為部分結果）



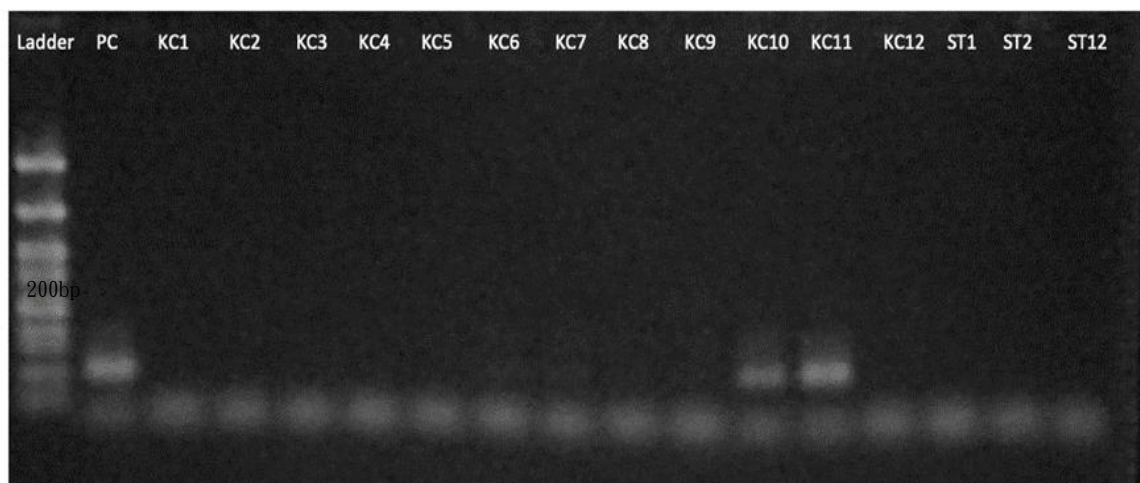
我們觀察的菌落大小、形狀、顏色、型態，我們發現：

1. 菜脯、韓式泡菜的形狀皆為點狀。酸菜為圓形。
2. 臭豆腐、菜脯、韓式泡菜皆為平高。酸菜為突狀。
3. 四個樣本的邊緣皆為平整。

## 二、凝膠電泳

利用加熱法抽取益生菌的 DNA 後，我們進行了聚合酶連鎖反應，放大只有乳酸桿菌擁有的特定 DNA 片段（約 200 bp），透過凝膠電泳染色顯示成功被放大的 DNA 片段。核酸標誌標示為 Ladder；陽性對照標示為 PC；韓式泡菜為 KC1-12；臭豆腐為 ST1、2、12；酸菜為 PV13-20；菜脯為 A1-8。

圖二、凝膠電泳結果（韓式泡菜(KC)、臭豆腐(ST)）

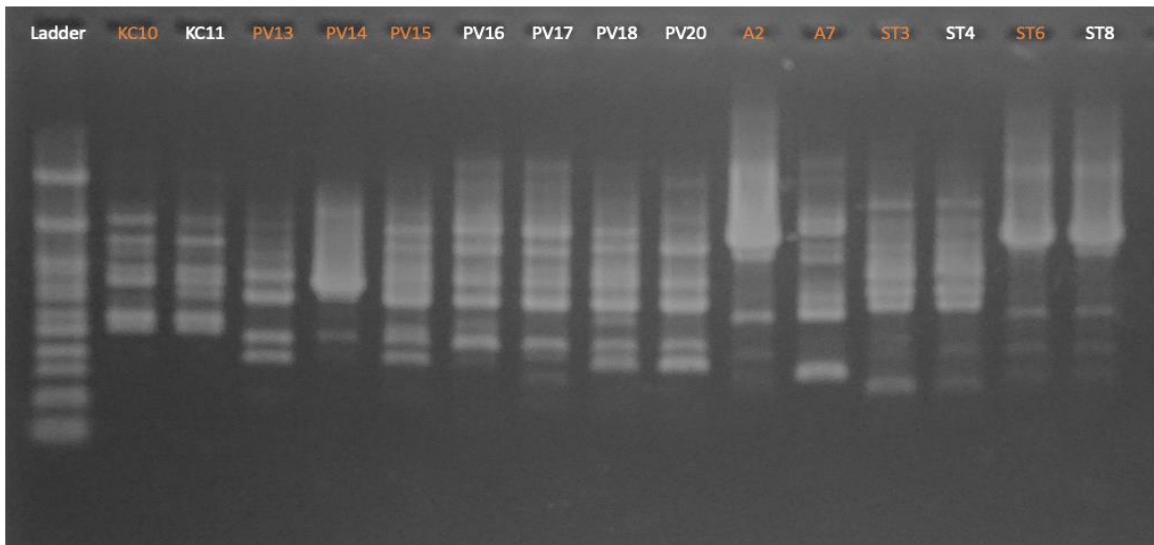


圖三、凝膠電泳結果（酸菜(PV)、菜脯(A)）（顯示為部分結果）



接著，我們利用隨機放大菌株 DNA 片斷的 primer 以初步區分菌株的親緣性。凝膠電泳結果越不相似，我們可以推斷其為不同的菌株，以增加實驗菌株的多樣性。圖四中，我們選擇了 KC10、PV13-15、A2、A7、ST3 和 ST6 以進行下一步的實驗，另有其他凝膠電泳圖結果無置入此報告。

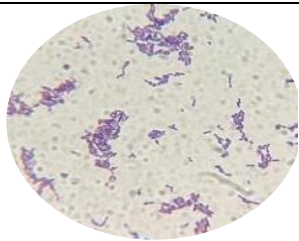
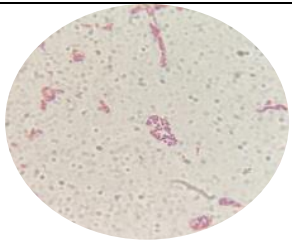
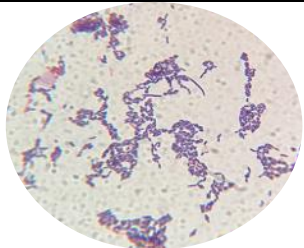
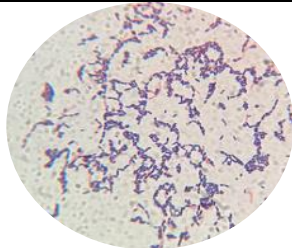
圖四、RAPD-PCR 凝膠電泳結果（顯示為部分結果）



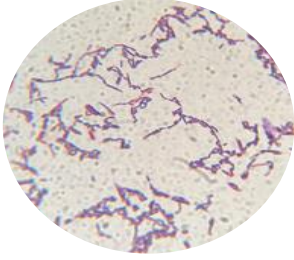
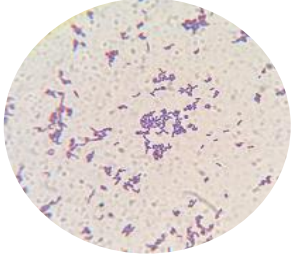
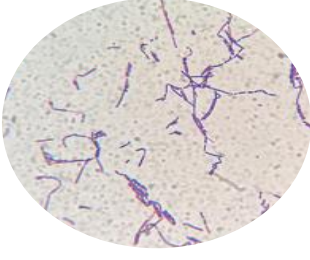

### 三、革蘭氏染色

我們進行了革蘭氏染色，再次確認收集的菌株為革蘭氏陽性且是桿狀。

表四、在顯微鏡 1000 倍數下之乳酸菌的形狀與顏色（顯示為部分結果）

菌株	PV14	PV15
顯微鏡圖		
	革蘭氏陽性，短桿狀	革蘭氏陽性，短桿狀
菌株	3-2	3-4
顯微鏡圖		
	革蘭氏陽性，短桿狀	革蘭氏陽性，短桿狀



菌株	3-6-1	3-6-2
顯微鏡圖		
	革蘭氏陽性，短桿狀	革蘭氏陽性，短桿狀
菌株	3-8	3-9
顯微鏡圖		
	革蘭氏陽性，長桿狀	革蘭氏陽性，短桿狀

#### 四、胞外多醣產量

確認為乳酸桿菌之後，我們利用酚與硫酸萃取與測量胞外多醣的產量。先前研究表示，乳酸菌產的胞外多醣具有抗氧化和抑菌的特性，因此我們想要篩選出胞外多醣產量高的乳酸桿菌。為了計算出菌株的胞外多醣產量，我們利用已知濃度的標準繪製了標準曲線圖。

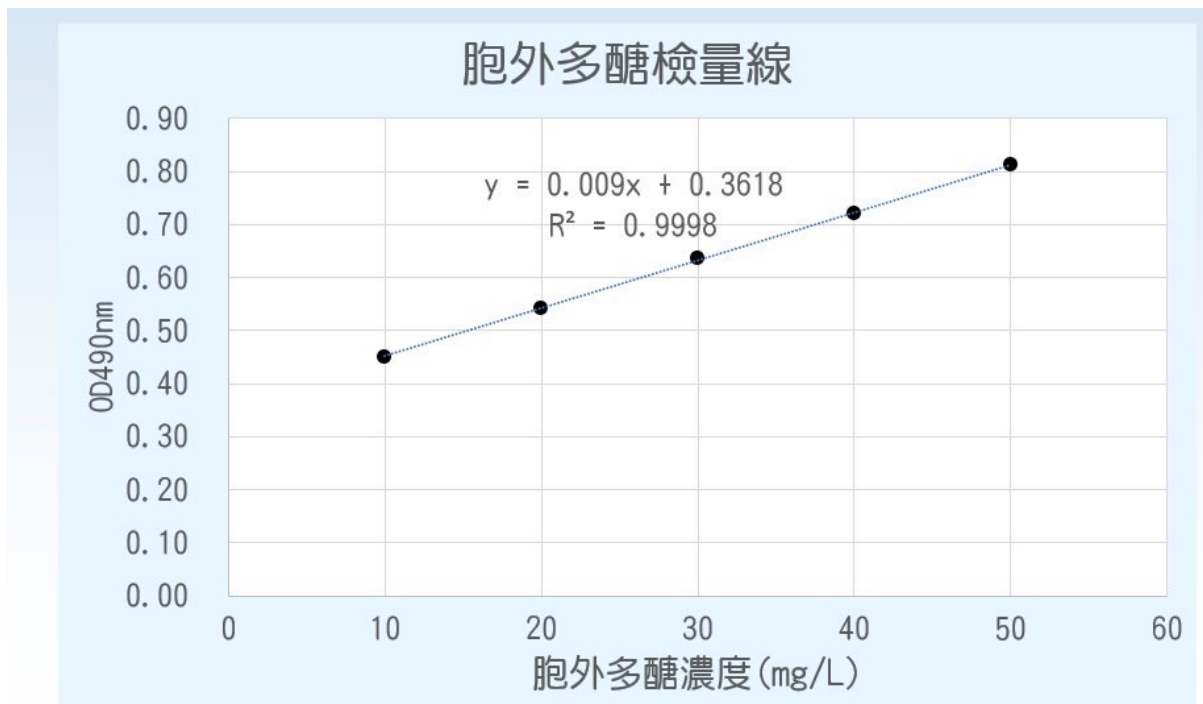
#### 圖五、胞外多醣標準曲線圖

胞外多醣計算：1. 利用標準曲線方程式： $y = 0.009x + 0.3618$

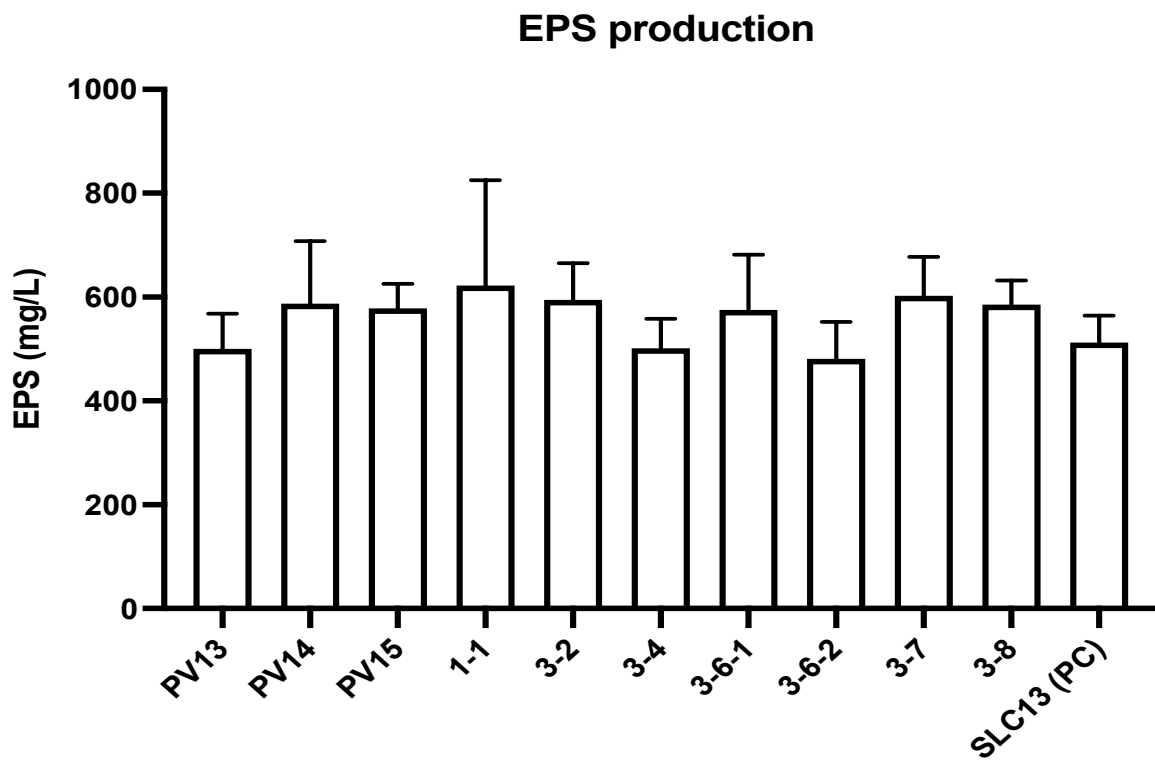
2.  $y$  為 OD 值， $x$  為胞外多醣的濃度 (mg/L)

3. 計算方式為代入測量的 OD 值，以取得菌株分泌的胞外多醣濃度





圖六、乳酸菌胞外多醣的產量

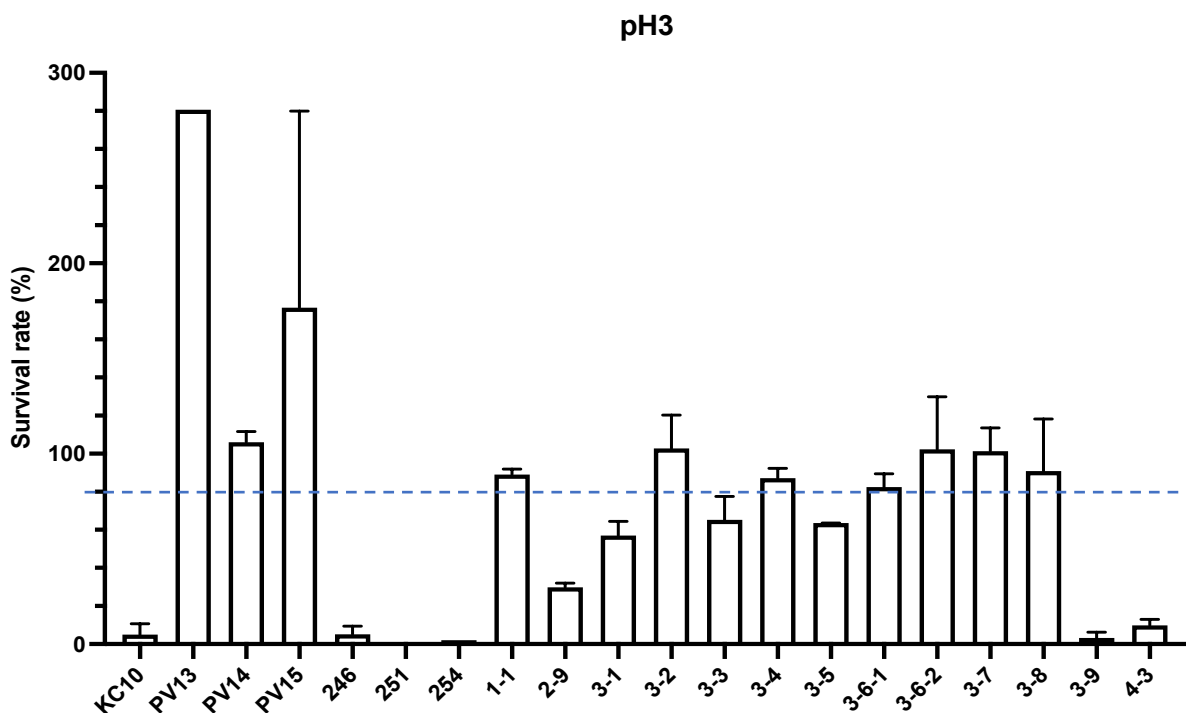


結果顯示所測試的菌株中，胞外多醣的產量都高於陽性對照（高於 500mg/L）。

## 五、低酸和膽鹽耐受性

低酸為乳酸桿菌通過腸胃道之第一道關卡。我們把乳酸菌培養於 pH3 的培養液中 3 小時，篩選出存活率高於 80% 的菌株，他們為 PV13、PV14、PV15、1-1、3-2、3-4、3-6-1、3-6-2、3-7 和 3-8。

圖七、乳酸桿菌在低酸環境的耐受性

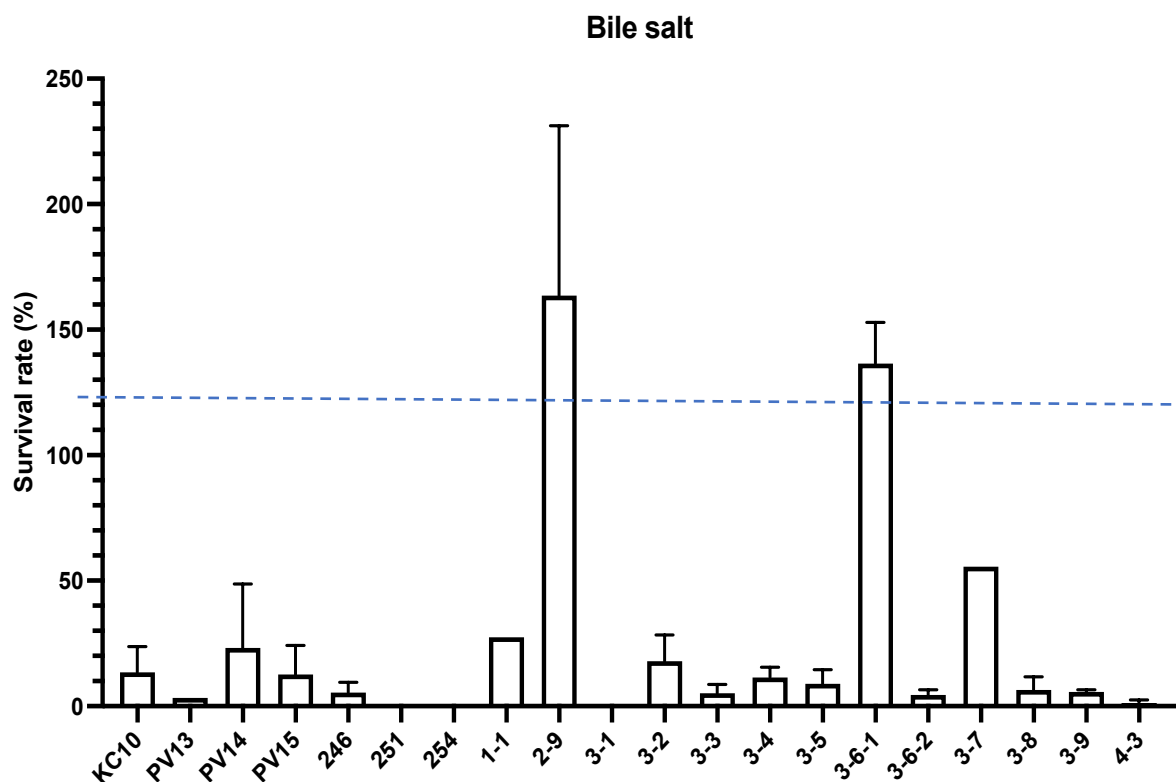


【KC10-泡菜、PV13-15 酸菜、246，251，254-臭豆腐、1-1 桂花釀、2-9 泡菜、3-1 至 4-3 榨菜】

由圖七可知，酸菜和榨菜上的菌株在低酸環境下的生存率較好，有可能是因為原本的食物就是酸性，所以對於低酸環境的耐受性比較高，生存率也比較高。相較之下，泡菜、臭豆腐、桂花釀，屬於鹼性食物，在低酸的環境下生存率就沒有那麼的突出。

接著，乳酸桿菌在人體內將通過帶有膽鹽的環境，所以他們必須能夠在含有膽鹽環境中生存。從 4 小時後的結果得知，只有菌株 2-9 和 3-6-1 在含有 0.3% 膽鹽的培養液中存活率高於 80%（圖八）。

圖八、乳酸桿菌在膽鹽環境的耐受性

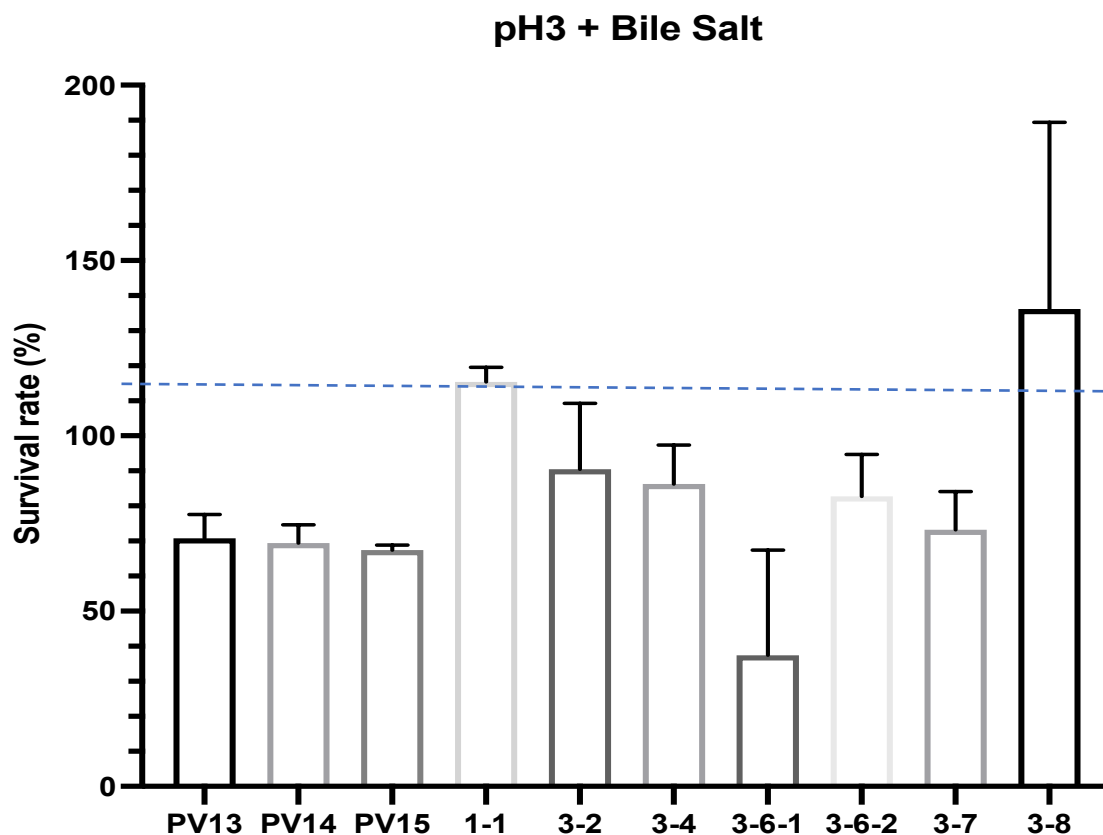


【KC10-泡菜、PV13-15 酸菜、246，251，254-臭豆腐、1-1 桂花釀、2-9 泡菜、3-1 至 4- 3 榨菜】

從這結果我推斷菌株擁有較低的膽鹽耐受性也許是因為從原本的食物環境中並沒有這種挑戰，所以這些菌株不能好好地適應且生存。但是，菌株 2-9（從泡菜分離）和菌株 3-6-1（從榨菜分離）卻擁有超過 100%的生存率，這可能和他們原本帶有的環境壓力機制有關，進而使他們能夠在 0.3%的膽鹽環境繼續複製。

另外，我們好奇能夠生存於低酸環境的乳酸桿菌能否繼續接下膽鹽的挑戰，所以將在 pH3 培養的菌株繼續培養於含有 0.3% 膽鹽的培養液。我們發現菌株的存活率提升了，並有 5 株的存活率高於 80%，分別為 1-1、3-2、3-4、3-6-2 和 3-8（圖九）。

圖九、乳酸桿菌在低酸和膽鹽環境的耐受性



【菌株的生存機制受到環境刺激而改變，對於膽鹽的耐受性比較高】

經過低酸環境的試驗，菌株在膽鹽環境的耐受性比起僅在膽鹽環境接受測試的菌株高很多。這也許是因為菌株受到環境刺激，生存機制發生改變，使他們擁有更高不同環境的耐受能力。

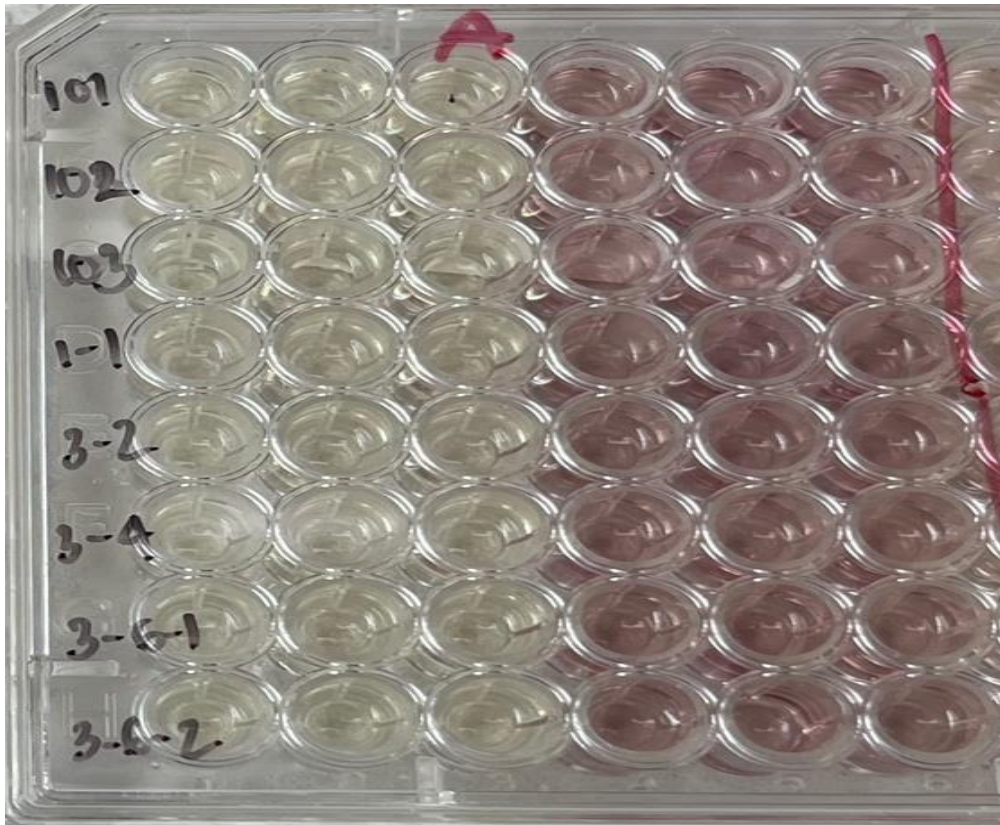
## 六、胃細胞毒性測試

如果乳酸桿菌需要做為食用益生菌，他們必須對人類細胞無毒性，所以我們進行了菌株對於胃細胞的毒性測試。我們將 MOI=100 和 MOI=10 的乳酸桿菌感染胃和胃癌細胞 24 小時，並檢測細胞的存活率。

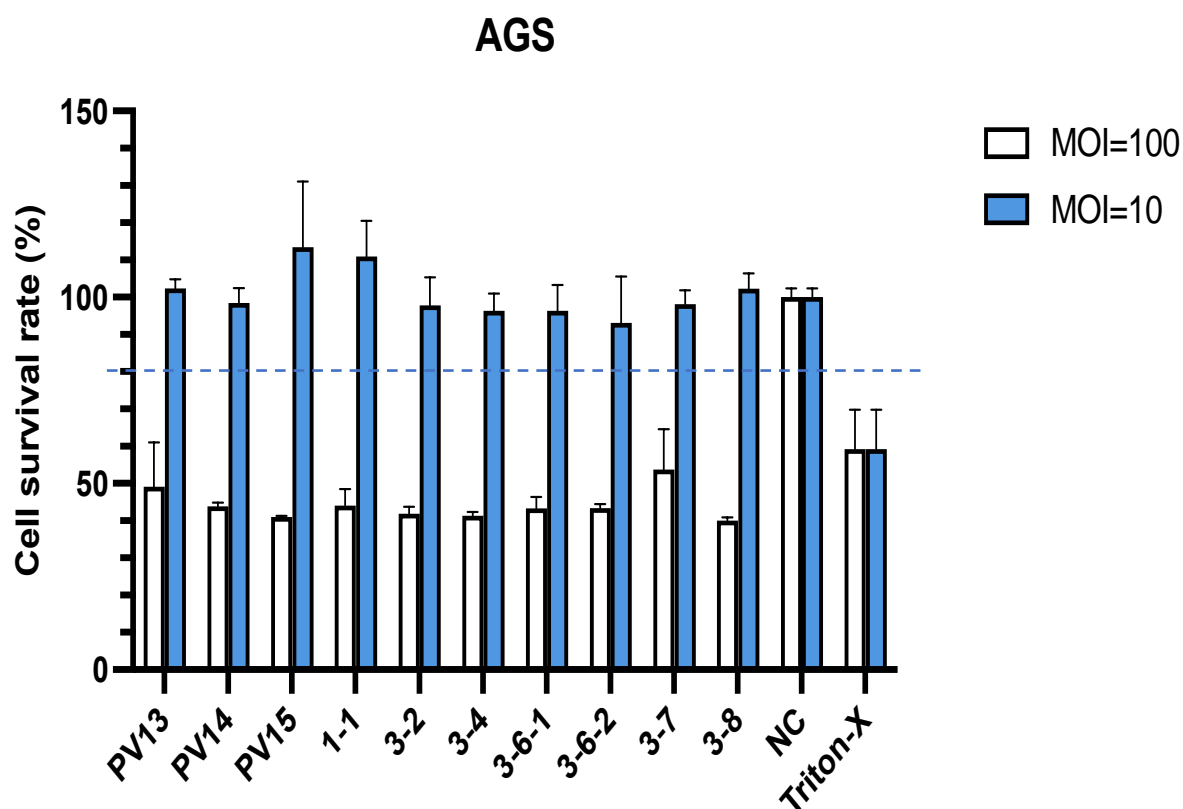
在胃癌細胞（AGS）中，MOI=100 的乳酸桿菌對細胞擁有較高的毒性，細胞存活率為 50% 左右。當 MOI 降低至 10 時，胃細胞的存活率提升了約 2 倍，與無細菌感染的

細胞存活率無異（NC）。此實驗中，我們讀取在 96 孔盤中 DMSO 的吸光值，值越高為越高的細胞生存率。

圖十、胃細胞毒性測試，列 1-3 為 MOI=100、列 4-6 為 MOI=10

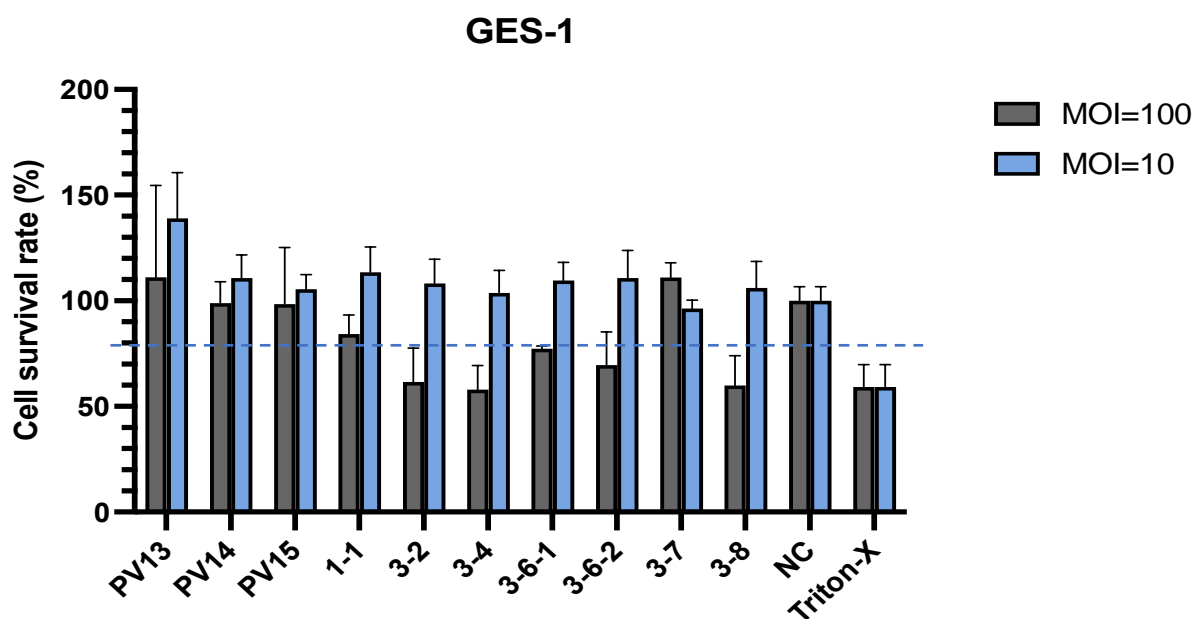


圖十一、胃癌細胞存活率



在正常胃細胞（GES-1）中，MOI=10的乳酸桿菌對細胞較無毒性。有趣的是，不同的菌株在 MOI=100 時，擁有對胃癌細胞不同的毒性。

圖十二、正常胃細胞存活率

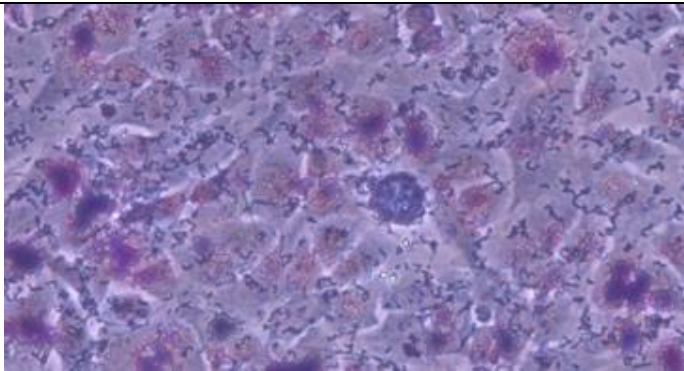
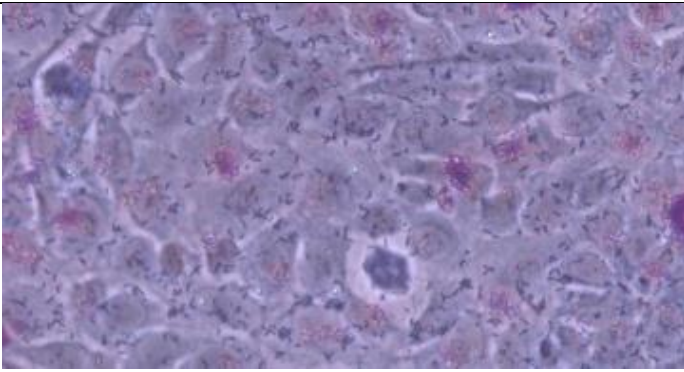
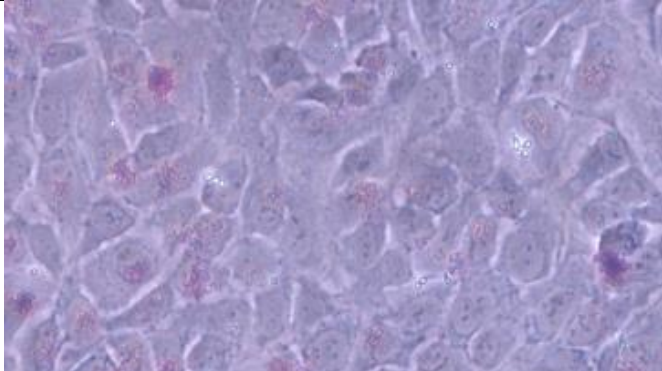


## 七、乳酸桿菌在人類胃細胞的貼附能力

確認乳酸桿菌對胃細胞無毒性後，我們測試他們在細胞上的貼附能力。如欲作為保健品，他們必須有良好的細胞貼附能力，他們的效用才能盡可能的發揮在細胞上，提供更有利於細胞生長的環境。此外，良好的貼附能力也將幫助乳酸桿菌與病原菌競爭養分與生長空間，以限制病原菌的生長。

表五、乳酸桿菌貼附於胃癌細胞的能力（觀察於顯微鏡 400 倍數）

(紫色為結晶紫染色的乳酸桿菌，大顆細胞為胃細胞)

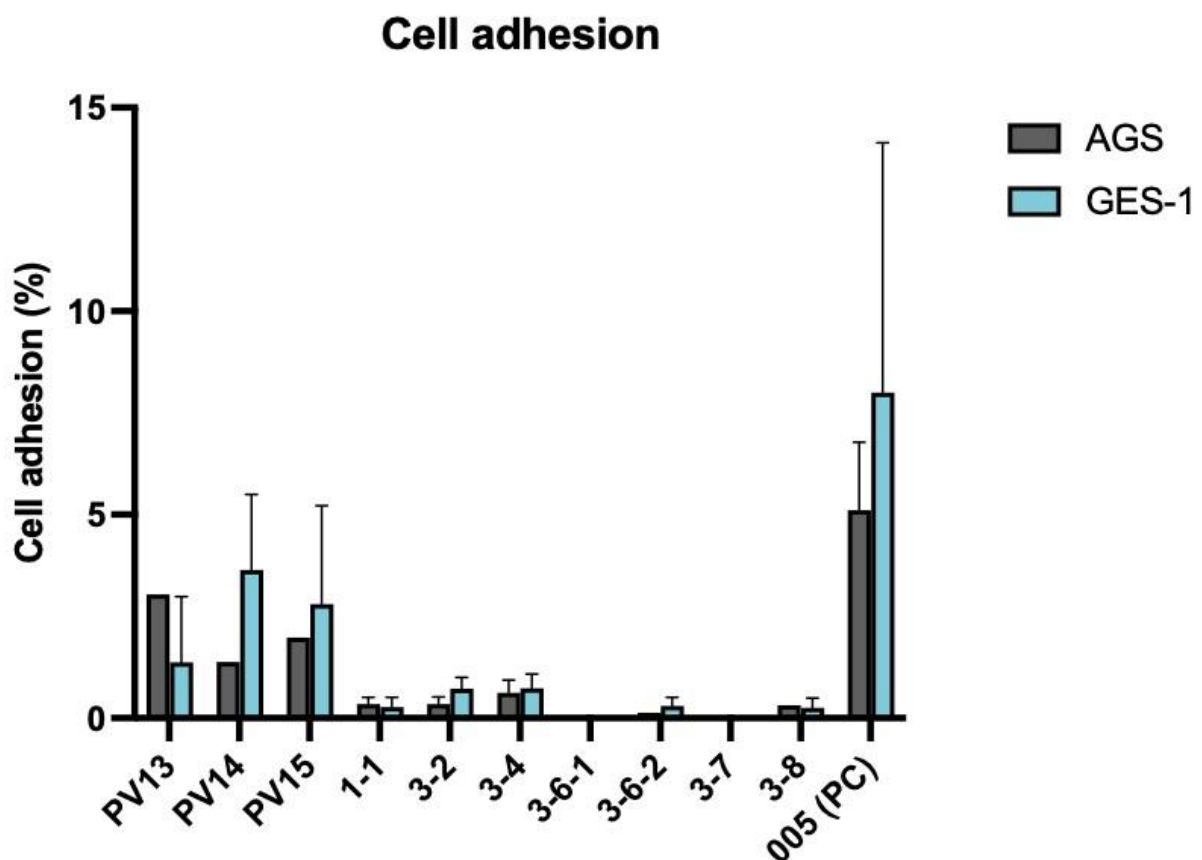
菌株	005 (陽性對照)
	
菌株	PV14
	
菌株	1-1
	



在兩組胃細胞中，菌株 PV13、PV14、PV15 幾乎擁有陽性對照菌株（005-PC）一半的貼附能力。相較而言，菌株 1-1、3-2、3-4、3-6-1、3-6-2、3-7 和 3-8 的細胞貼附能力非常弱，少於 1%。這個現象能在表四中看出，相較於陽性對照，胃癌細胞周圍無法觀察菌株的貼附（菌株 1-1）。

根據圖上的照片，我們們可以發現，結晶紫染色的乳酸桿菌大多都貼附在細胞上，紫色的部分越密集代表乳酸桿菌的細胞貼附能力越強。

圖十三、乳酸桿菌貼附於胃細胞和胃癌細胞的能力



對比陽性對照（005 PC），本研究的測試菌株沒有良好的細胞貼附能力，這有可能是因為他們的細胞壁上沒有表現能夠讓他們貼附在人類細胞的受體（receptor）。菌株與胃細胞之間沒有連結，所以經過緩衝液的沖洗之後，他們不被保留在細胞表面。

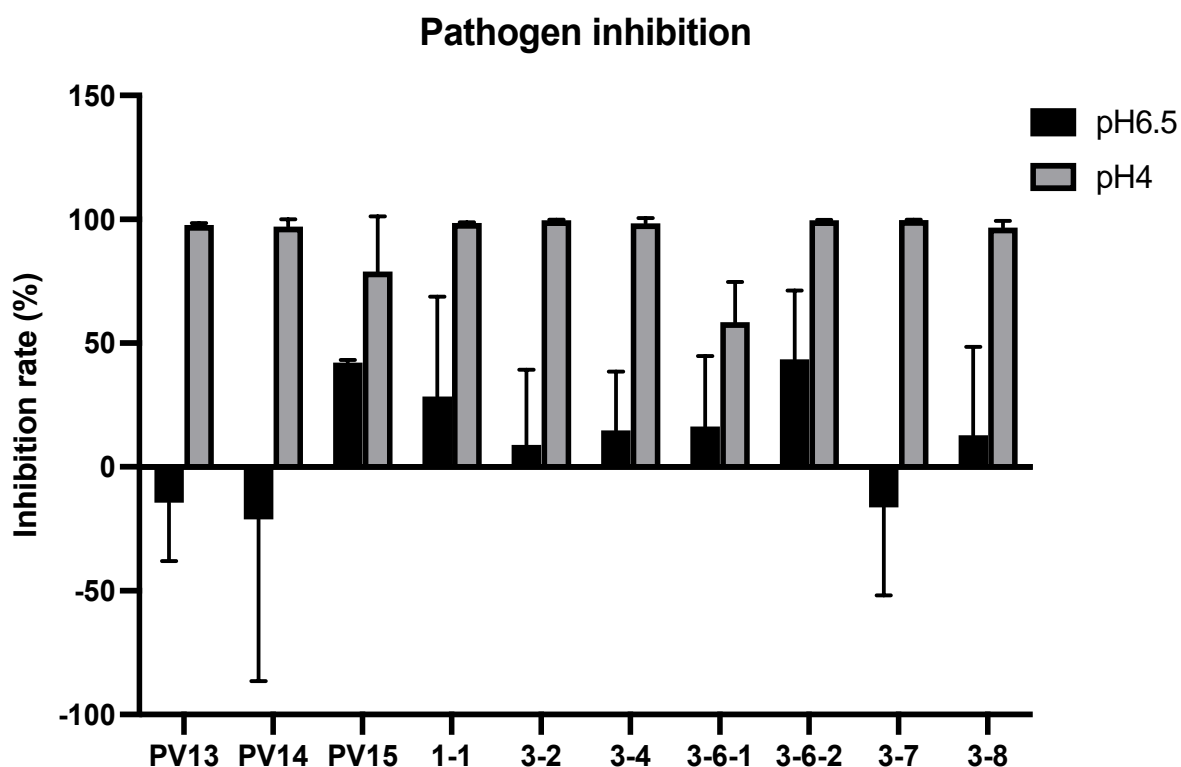
## 八、抑制病原菌生長能力的測試

由於乳酸桿菌不能良好的貼附於胃細胞，我們嘗試使用其他方法以探討他們的抑菌效能：利用乳酸桿菌的代謝物來檢測抑制病原菌生長的能力。多篇研究顯示乳酸桿菌能在複製的過程中分泌出細菌素，而這個蛋白可能有效的抑制其他細菌的生長或孢子的萌芽。

我們的結果顯示在低酸的環境下（pH4），乳酸桿菌的代謝物擁有較好的抑菌能力。相較於其他菌株，菌株 3-6-1 的抑菌能力比較弱，只有約 50%。在中性的環境下（pH6.5），乳酸桿菌的抑菌能力都低於 50%。其中，菌株 PV13、PV14 和 3-7 的代謝物能小幅度的促進病原菌的生長（約 20%）。

從這個現象的推斷，我認為低酸環境能夠大幅度地抑制病原菌的生長原因有可能為菌株表現的抑菌蛋白之活動能力在低酸環境才能發揮作用。我推斷這和蛋白質折疊有關，因為在不同酸鹼程度的環境會影響蛋白質的摺疊，蛋白質有可能在 pH6.5 的環境下失去活性，以至於偵測不到抑制病原菌生長的能力。

圖十四、乳酸桿菌之代謝物抑制病原菌的能力試驗



## 肆、結論與應用

### 一、結論

#### (一) 篩選能分泌高濃度胞外多醣的菌株

在部分樣本中的胞外多醣產量都高於陽性對照

#### (二) 篩選能適應腸胃道的環境及對人體胃細胞無毒性的菌株

1. 菌株 PV13、PV14 和 PV15 在模擬腸胃道的環境下生存率約 70%
2. 能適應腸胃道的菌株有: 1-1、3-2、3-4、3-6-2 以及 3-8
3. 擁有貼附能力的菌株有: PV13、PV14 和 PV15
4. 所有測試的菌株都對正常胃細胞和胃癌細胞無毒性

#### (三) 篩選能有效地抑制腸胃道病原菌之生長的菌株

PV15 是目前實驗裡在各方面表現最佳的菌株，最有機會再做後續的深入研究發展。

從實驗結果總結，我們發現 5 株從醃漬食品分離出的乳酸桿菌能夠存活於低酸和膽鹽的環境，分別為 1-1、3-2、3-4、3-6-2 以及 3-8。在 MOI=10 之下，所有測試的菌株都對正常胃細胞和胃癌細胞無毒性，而在 MOI=100，菌株能夠小幅度的抑制胃癌細胞 (AGS) 的生存。但只有 3 株測試菌株 (PV13、PV14 和 PV15) 擁有細胞貼附能力。另外在低酸的環境之下，乳酸桿菌的代謝物擁有接近 100% 的抑菌能力。

雖然菌株 PV13、PV14 和 PV15 在低酸和膽鹽的測試中存活率只有約 70%，但他們的細胞貼附能力較強。而其中，培養 PV15 的上清液也許含有其菌株分泌的抑菌代謝物。在實驗中，pH6.5 或 pH4 的上清液都擁有抑制病原菌生長的能力。另外，PV15 的胞外多醣產量也高於陽性對照。也許我們可針對 PV15 進行更多功能性測試，例如偵測細菌

素 (bacteriocin) 的分泌(證實可抑菌)、動物實驗 (確保該菌對人體無傷害) , 以探討它作為具有市場價值的食用益生菌之可能性。在未來, 我期待可以更進一步的探討乳酸桿菌的代謝物是如何抑制病原菌的生長, 並希望有機會能辨認該蛋白以及解釋其抑制機制。

## 二、建議

本研究的限制為無法從台灣的其他地區獲取食品樣本, 無法檢測不同地區的乳酸桿菌, 測試他們的抑菌能力。除此之外, 本研究欠缺對菌屬鑑定更為準確的實驗, 即 16S rRNA 基因定序。該實驗能更準確的判定菌屬的類別, 以確認它為乳酸桿菌。除了人類胃細胞, 我們也可將此菌株在人類腸道細胞 (CACO-2) 進行細胞毒性測試以及貼附能力測驗, 以更全面的探討菌株在維持腸道健康的可行性。

## 三、應用

我認為本研究擁有更多潛力以探討乳酸桿菌在維持腸道健康的應用性。乳酸桿菌作為世界公認的安全菌株, 可促進腸道及免疫系統的平衡。對於無法生存於低酸和膽鹽環境以及不能貼附於胃細胞的菌株, 也許我們能萃取他們的代謝物或胞外多醣, 不利用活菌來進行改善腸道環境的測試, 盡可能地發揮他們的抑菌能力。

若未來他們能替代抗生素的使用, 我們希望能大幅度地減低人類在醫療以及畜牧業對於抗生素的依賴。在未來, 多重抗藥性菌株的發展也許能受到控制並加以運用乳酸桿菌在疾病的治療, 進而降低醫療成本。

## 伍、參考文獻

1. Cesa-Luna, C., Alatorre-Cruz, J.-M., Carreno-Lopez, R., Quintero-Hernandez, V., and Baez, A. (2021). Emerging applications of bacteriocins as antimicrobials, anticancer drugs, and modulators of the gastrointestinal microbiota. **Polish Journal of Microbiology** 70, 143-159.
2. Chen, Y.-s., Wu, H.-c., Wang, C.-m., Lin, C.-c., Chen, Y.-t., Jhong, Y.-j., and Yanagida, F. (2013). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from pobuzihi (fermented cummingcordia), a traditional fermented food in Taiwan. **Folia Microbiologica** 58, 103-109. 10.1007/s12223-012-0188-4.
3. Huff, G., Huff, W., Rath, N., El-Gohary, F., Zhou, Z., and Shini, S. (2015). Efficacy of a novel prebiotic and a commercial probiotic in reducing mortality and production losses due to cold stress and *Escherichia coli* challenge of broiler chicks. **Poultry Science** 94, 918-926.
4. Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T.C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. **Journal of food science and technology** 54, 1945-1952.
5. Mathur, H., Beresford, T.P., and Cotter, P.D. (2020). Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. **Nutrients** 12, 1679.
6. Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Alam, R.-U., and Jahid, I.K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. **BMC Microbiology** 19, 253. 10.1186/s12866-019-1626-0.
7. Toghyani, M., Toghyani, M., and Tabeidian, S.A. (2011). Effect of probiotic and prebiotic as antibiotic growth promoter substitutions on productive and carcass traits of broiler chicks. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering** 82-86.

## 【評語】 070007

本研究從不同的醃製食品中分離出乳酸菌，並進行多種生化分析得到具體初步結果，從醃製食品中分離出能夠維持腸道健康的益生菌有實用價值，值得肯定。

建議：

1. 已有研究顯示從醃製食品中分離出的乳桿菌目有潛能作為食用益生菌，應該比較本研究分離出實驗裡在各方面表現最佳的乳酸菌 PV15 有何不同。之前分離出的益生菌能有效的抑制食物病原菌，本研究只有測試大腸桿菌，不足以顯示其重要性。
2. 圖六、乳酸菌胞外多醣的產量，都很高，應該有不高(非益生菌)的對照組。
3. 圖十一、十二顯示在胃癌細胞 (GES-1) 中，MOI=10 的乳酸桿菌對細胞較無毒性，不同的菌株在 MOI=100 時擁有對胃癌細胞不同的毒性。但若在同樣的 MOI=100 時，乳酸桿菌對細胞的毒性比對胃癌細胞的毒性強。結論說所有測試的菌株都對正常胃細胞和胃癌細胞無毒性，也不符實驗結果。

4. 圖十三顯示對比陽性對照 (005 PC)，本研究的測試菌株沒有良好的細胞貼附能力。
5. 圖十四、乳酸桿菌之代謝物抑制病原菌的能力試驗，應該也要有低抑制能力菌株的對照組。
6. 他們說蛋白質有可能在 pH6.5 的環境下失去活性，以至於偵測不到抑制病原菌生長的能力。蛋白質應該不會在 pH6.5 的環境下失去活性。反倒可能是 pH6.5 的環境下病原菌長的比較好，不容易被抑制。