

私立東海大學化學工程暨材料工程研究所

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

傳統攪拌式發酵槽培養基因重組大腸桿菌之 colicin Ib 發酵製程探討

The study of colicin Ib production in an agitation tank by using
recombinant *Escherichia coli*.

研究生：梁禮凡 撰

Graduate student : Liang Li Fan

中華民國 108 年 7 月

July, 2019

誌謝

終於到了這一刻，一路走來首先要感謝顏宏偉老師不厭其煩的諄諄教誨，讓我在迷惘時，指引迷津使我能夠順利完成實驗和論文，也讓我在讀碩士的時候增加了許多生物相關的專業知識，讓我對未來方向能更加有目標，以及感謝我的父母不論在金錢或是生活方面，總是無怨無悔默默地支持我完成學業。

感謝中興大學陳建華老師和鍾睿語學姐在實驗研究上的提點、對於菌種培養的教導以及為我的研究結果解惑。還有在化材所中曾幫助與陪伴過我的同學們，感謝阿賢、蕾貝卡大方的借助儀器或藥品，還熱心的教導實驗方法以利我完成研究，也要感謝我的好朋友堯哥在我寫論文時給我許多的幫助與指導，有你們的幫忙我才有辦法完成本研究。另外，要感謝 203 實驗室的同學，有你們的陪伴和幫忙，才能順利完成實驗並豐富我的實驗室生活。最後，還要感謝之前大學時的實驗室老師和學長，有你們的鼓勵和幫助，我才能堅持完成學業。

在實驗研究方面之外，要感謝時常陪我一同在研究所受難的研究生們：戴緯、和順、大熊、阿賢，恭喜我們順利的從化材系畢業了，經過東海大學化材系 6 年的荼毒希望能對我們的未來有很大的幫助，因為需要感謝的人非常多，所以就此感謝老天爺能讓我遇到這些人事物，才能讓我順利完成這篇研究，由衷的感謝大家！

中文摘要

為了避免離乳小豬感染產生下痢症狀，傳統的飼養方式是在飼料中添加抗生素以增強腸道健康，從而間接幫助預防離乳豬下痢症。過去的研究與實證經驗顯示，使用精選飼料添加劑進行營養干預可以有效預防離乳小豬下痢症。雖然抗生素可以預防離乳豬下痢症，但抗生素除能殺死危害的細菌，也可能影響有益於身體的細菌。當體內的益菌減少時，一些伺機性感染的微生物，如黴菌可能就反而大量繁殖導致疾病。

同時大量抗生素的使用也會造成環境汙染問題，進而造成超級抗藥性細菌的產生。因此在本實驗中所製造的 colicin Ib 將可用來取代抗生素使用，除了能避免離乳小豬下痢症，更可以解決抗生素濫用的問題，而且蛋白質的吸收速度較快速藥效也比傳統化學藥物更好、副作用更少穩定性更能提升。可以有效率的預防離乳豬下痢症，也能減少養豬產業的經濟損失。

本實驗將使用 5L 攪拌式發酵槽培養基因重組大腸桿菌，改變不同培養條件探討碳/氮源、培養溫度，接種量以及溶氧量、pH 值等對於大腸桿菌生長及大腸桿菌素產率與活性的影響。本研究發現增加攪拌速度到達 550 rpm、槽體壓力增加至 1.5 kg/cm^2 、葡萄糖濃度達到 40 g/L 可以增加菌量到 OD 值 13.7 的高密度，但良好的菌體生長卻會導致生產大腸桿菌素效率變差，蛋白抑菌活性只有 2^{13} 。進一步探討誘導條件時，發現在誘導其抑制菌體生長，可以使得菌體有效提高戴白活性，結果發酵降低溶氧至 5%、溫度至 $26 \text{ }^\circ\text{C}$ 、能有效的抑制菌體生長，使抑菌蛋白活性達到 2^{16} ，雖然改變 pH 也能抑制菌體生長，但 pH 值在 5 和 9 的環境下會影響抑菌蛋白活性只有 2^5 、 2^9 所以是較不可行的。

關鍵字: 大腸桿菌、誘導反應、發酵

Abstract

In order to avoid the symptoms of diarrhea caused by the infection of the weaned piglets, the traditional method of feeding is to add antibiotics to the feed to enhance the health of the intestines, thereby indirectly helping to prevent diarrhea from weaned piglets. Past research and empirical evidence have shown that the use of selected feed additives for nutritional interventions can effectively prevent diarrhea from weaned piglets. Although antibiotics can prevent diarrhea from weaned piglets and also kill bacteria that are harmful to the body, those can also affect bacteria that are good for the body. When the beneficial bacteria in the body are reduced, some opioid-infected microorganisms, such as mold, may multiply and cause disease.

Meanwhile, the use of a large number of antibiotics can also cause environmental pollution problems, which in turn leads to the emergence of super-resistant bacteria. Therefore, the protein produced in this experiment will be used to replace the use of antibiotics, in addition to avoiding the symptoms of diarrhea in the weaned piglets. Compare to traditional chemical drugs, the absorption of the protein is faster and the effect is better. Also, it has less side-effects and the stability can be improved. It can effectively prevent diarrhea from weaned piglets and reduce the economic loss of pig industry.

This project is planned to explore the use of 5L stirred fermentation tank to cultivate *Escherichia coli* to change different cultivate conditions to observe growth conditions, carbon source, cultivate temperature, inoculum and dissolved oxygen, cultivate temperature, pH value. Effects on growth of *Escherichia coli* and activity of

Escherichia coli. This study found that increasing the stirring speed(550 rpm), pressure(1.5 kg/cm²), and carbon source(40 g/L) can give the bacteria a good growth space, which can make our bacteria reach a higher density(OD=13.7), but the growth of the bacteria is too good, resulting in poor production of bacteriostatic protein and the protein bacteriostatic activity is relatively low just 2¹³. In the induction, it is necessary to change the growth conditions of the cells, so that the cells can effectively induce the reaction to produce the required protein, and the dissolved oxygen(5 %), temperature(26°C) and pH value 5 · 9 can effectively inhibit the growth of the cells, so that the bacteria can produce the antibacterial protein in better activity 2¹⁶. The pH value affects the activity of the bacteriostatic protein just 2⁵ · 2⁹ in the hyperacid and peralkalic environment, so it is a less feasible method.

Keywords: *Escherichia coli* · induction reaction · fermentation

目錄

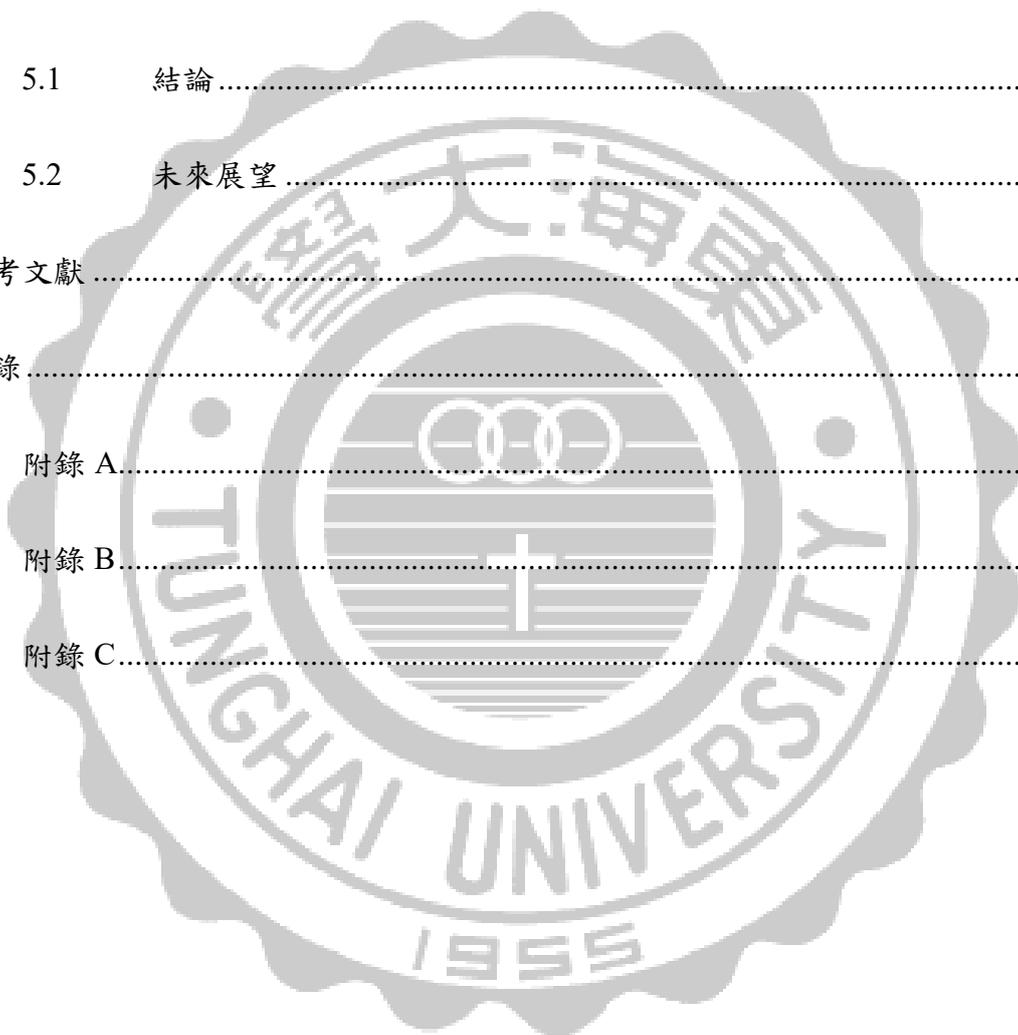
中文摘要	I
Abstract.....	II
目錄.....	IV
表目錄	IX
圖目錄	XI
第一章 緒論	14
第二章 文獻回顧	15
2.1 離乳豬下痢症 (piglets with postweaning diarrhea ; PWD)	15
2.2 腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic <i>E.coli</i> ; ETEC)	16
2.3 大腸桿菌素 (Colicin)	17
2.3.1 大腸桿菌素毒殺機制	17
2.3.2 大腸桿菌素的結構	18
2.4 培養環境因子 (Cultivating environmental factors)	21
2.5 SOS 反應 (SOS response)	23
2.6 IPTG 誘導反應(IPTG induced response)	25
2.7 發酵技術	27
2.8 發酵槽	28

第三章	實驗材料與方法	30
3.1	實驗材料	30
3.1.1	實驗菌株	30
3.1.2	實驗藥品	31
3.2	實驗儀器	33
3.3	實驗方法	36
3.3.1	菌種保存	36
3.3.2	培養基組成	36
3.3.3	菌種培養	36
3.4	分析方法	37
3.4.1	菌體濃度分析方法	37
3.4.2	碳源（葡萄糖）分析方法	37
3.4.3	蛋白質活性分析方法	37
3.4.4	可溶性蛋白分析方法	42
3.5	實驗架構	45
3.5.1	增加菌液濃度	45
3.5.2	增加菌液蛋白濃度	46
3.6	懸浮菌液培養	47

3.6.1	探討不同轉速對菌量之影響.....	47
3.6.2	探討不同接菌量對菌量之影響.....	47
3.6.3	探討不同濃度的碳源對菌量之影響.....	48
3.6.3.1	探討不同濃度的碳源對菌量之影響(Mitomycin C 誘導方法)	48
3.6.3.2	探討不同濃度的碳源對菌量之影響(IPTG 誘導方法)....	48
3.6.4	探討分次添加葡萄糖對菌量之影響.....	49
3.6.5	探討增加壓力對菌量之影響.....	49
3.7	懸浮菌液蛋白活性培養.....	50
3.7.1	探討不同誘導策略對活性之影響.....	50
3.7.1.1	探討不同誘導劑添加次數對活性之影響.....	50
3.7.1.2	探討不同誘導劑添加濃度對活性之影響.....	50
3.7.2	探討不同溶氧策略對活性之影響.....	51
3.7.3	探討不同溫度對活性之影響.....	51
3.7.4	探討不同酸鹼值對活性之影響.....	52
3.7.5	探討不同誘導劑加入時間對活性之影響.....	52
3.7.6	5L 攪拌式發酵槽培養系統.....	53
第四章	結果與討論.....	54

4.1	懸浮菌液培養.....	54
4.1.1	探討不同轉速對菌量之影響.....	54
4.1.2	探討不同接菌量對菌量之影響.....	56
4.1.3	探討不同濃度的碳源對菌量之影響.....	58
4.1.3.1	探討不同濃度的碳源對菌量之影響(Mitomycin C 誘導方法)	58
4.1.3.2	探討不同濃度的碳源對菌量之影響(IPTG 誘導方法)....	60
4.1.4	探討批次添加葡萄糖對菌量之影響.....	62
4.1.5	探討增加壓力對菌量之影響.....	65
4.2	懸浮菌液蛋白活性培養.....	67
4.2.1	探討不同誘導策略對活性之影響.....	67
4.2.1.1	探討不同誘導劑添加次數對活性之影響.....	67
4.2.1.2	探討不同誘導劑添加濃度對活性之影響.....	69
4.2.2	探討不同溶氧策略對活性之影響.....	71
4.2.3	探討不同溫度對活性之影響.....	73
4.2.4	探討不同酸鹼值對活性之影響.....	75
4.2.4.1	探討在酸性培養下對活性之影響.....	75
4.2.4.2	探討在鹼性培養下對活性之影響.....	77

4.2.5	探討不同誘導時間對活性之影響.....	79
4.3	可溶性蛋白分析.....	81
4.4	培養基因重組大腸桿菌之發酵實驗與文獻比較.....	82
第五章	結論與未來展望.....	83
5.1	結論.....	83
5.2	未來展望.....	85
參考文獻	86
附錄	89
附錄 A	89
附錄 B	90
附錄 C	91



表目錄

表 2.1 大腸桿菌素的分類.....	19
表 2.2 大腸桿菌素的種類.....	20
表 3.1 實驗所使用之藥品.....	31
表 3.2 為本研究所使用之儀器設備清單.....	33
表 3.3 為本研究所使用之 LB 培養基.....	36
表 3.4 為本研究所使用之 SDS-PAGE 膠.....	42
表 4.1 不同轉速與蛋白活性比較.....	55
表 4.2 不同接菌量與蛋白活性比較.....	57
表 4.3 不同葡萄糖濃度與蛋白活性比較.....	59
表 4.4 不同葡萄糖濃度與蛋白活性比較.....	61
表 4.5 批次添加葡萄糖與蛋白活性比較.....	63
表 4.6 增加壓力與蛋白活性比較.....	66
表 4.7 不同誘導劑添加次數與蛋白活性比較.....	68
表 4.8 不同誘導劑添加數量與蛋白活性比較.....	70
表 4.9 不同溶氧與蛋白活性比較.....	72
表 4.10 不同溫度與蛋白活性比較.....	74
表 4.11 不同酸鹼值與蛋白活性比較.....	76

表 4.12 不同酸鹼值與蛋白活性比較..... 78

表 4.13 不同誘導時間與蛋白活性比較..... 80

表 4.14 培養基因重組大腸桿菌之發酵實驗與文獻比較..... 82



圖目錄

圖 2.1 大腸菌素的結構圖	18
圖 2.2 SOS 反應圖	24
圖 2.3 IPTG 誘導反應圖	26
圖 2.4 (a)Mechanically agitated fermentor	29
圖 2.5 (b)(bubble column fermentor).....	29
圖 2.6 (c、d)(air-lift fermentor)	29
圖 3.1 <i>E-coli</i> 生長在發酵槽之外觀及顯微鏡觀測圖(40x).....	30
圖 3.2 測量蛋白抑菌圈活性菌盤圖(3 重複)	39
圖 3.3 SDS-PAGE 裝置圖	44
圖 3.4 5L 攪拌式發酵槽培養系統	53
圖 4.1 不同轉速與菌量比較	54
圖 4.2 不同轉速與葡萄糖消耗量比較	55
圖 4.3 不同接菌量與菌量比較	56
圖 4.4 不同接菌量與葡萄糖消耗量比較	57
圖 4.5 不同葡萄糖濃度與菌量比較.....	58
圖 4.6 不同初始濃度的葡萄糖消耗量比較	59
圖 4.7 不同葡萄糖濃度與菌量比較.....	60

圖 4.8 不同初始濃度的葡萄糖消耗量比較.....	61
圖 4.9 批次添加葡萄糖與菌量比較.....	62
圖 4.10 批次添加葡萄糖的消耗量比較.....	63
圖 4.11 乙酸與丁酸產生與時間比較.....	64
圖 4.12 增加壓力與菌量比較.....	65
圖 4.13 增加壓力與葡萄糖消耗量比較.....	66
圖 4.14 不同誘導劑添加次數與菌量比較.....	67
圖 4.15 不同誘導劑添加次數與葡萄糖消耗量比較.....	68
圖 4.16 不同誘導劑添加數量與菌量比較.....	69
圖 4.17 不同誘導劑添加數量與葡萄糖消耗量比較.....	70
圖 4.18 不同溶氧與菌量比較.....	71
圖 4.19 不同溶氧與葡萄糖消耗量比較.....	72
圖 4.20 不同溫度與菌量比較.....	73
圖 4.21 不同溫度與菌量比較.....	74
圖 4.22 不同酸鹼值與菌量比較.....	75
圖 4.23 不同酸鹼值與葡萄糖消耗量比較.....	76
圖 4.24 不同酸鹼值與菌量比較.....	77
圖 4.25 不同酸鹼值與葡萄糖消耗量比較.....	78

圖 4.26 不同誘導時間與菌量比較..... 79

圖 4.27 不同誘導時間與葡萄糖消耗量比較 80

圖 4.28 SDS-PAGE 圖 81



第一章 緒論

抗生素造成環境汙染是一個為人熟知的議題，尤其日益嚴重的抗生素抗藥性菌體的發現，造成了許多危害。每年全球大約有 70 萬人因為抗藥性細菌感染而死亡。抗藥性細菌的產生主要是因為不同菌體之間通過接合(conjugation)交換遺傳物質，形成交叉反應進而產生一代比一代更強的抗藥性細菌，因此濫用抗生素以及畜牧業過度使用抗生素於養殖過程中，都會增加培養超級細菌的機會。

畜牧業中養殖動物大量服用的抗生素絕大部分以原形排出體外，而環境中的抗生素絕大部分最終都會進入水環境，因此對水環境影響最嚴重，再通過水產等食物進入人體，從而增加人體內細菌耐藥性並影響健康。以大陸而言光，一年的抗生素總使用量約為 16.2 萬噸，其中動物用抗生素占到總量 52%，每年平均花廢水資源處理高達 4000 億人民幣。

以豬隻飼養為例，小豬斷奶後腸道健康狀況與其日後生長表現密切相關，斷奶後離乳豬下痢症是與飼育豬腸道健康有關的主要問題之一，其通常由腸毒性大腸桿菌 (ETEC) 感染引起。離乳豬在離乳後一至三週內，因其腸道免疫系統未完全發育，常發生急性或慢性下痢，並且逐漸脫水，嚴重甚至死亡。豬隻死亡、醫藥費用等對全球養豬產業造成重大經濟損失。

近年來已有相當多文獻對抗菌肽與抗菌蛋白提出相關機制的研究，然而對於後段量產的研究與描述並不多，希望透過這個研究，可以建立一套發酵放大製程的 know-how，對於未來商業化量產的製程預先準備，也期待透過這樣的研究可以完全取代抗生素於畜牧業上的使用，以達到一個綠色永續製程的目標。

第二章 文獻回顧

2.1 離乳豬下痢症 (piglets with postweaning diarrhea ; PWD)

小豬斷奶後對保育豬的腸道健康與其生長表現密切相關，斷奶後腹瀉 (PWD) 是與飼育豬腸道健康有關的主要問題之一，其通常由腸毒性大腸桿菌 (ETEC) 感染引起[1]。

離乳豬在離乳後一至三週內，因其腸道免疫系統未完全發育，常發生急性或慢性下痢，並且逐漸脫水，嚴重甚至死亡。而存活下來的離乳豬，雖因其腸道黏膜的免疫系統逐漸建立而不會再下痢，但生長緩慢，稱為離乳豬下痢症 (postweaning diarrhea, PWD) [2]。

豬流行性下痢，是一種極具重大破壞力與高傳染性的腸道性疾病，好發於冬季。可感染所有年齡豬隻，主要徵狀為水樣性下痢，會伴隨嘔吐、脫水、食慾減退...等問題，此疾病於冬季時最為嚴重。其潛伏期為病毒感染後 12 小時內出現臨床症狀，感染最多僅需 5 天，發病率近 100%。

PWD 導致的豬隻死亡、醫藥費用及存活的豬隻生長減緩等對全球養豬產業重大經濟損失。一些其他飼料添加劑，如核苷酸，飼料酶，益生元低聚糖和粘土礦物質可以增強腸道健康，從而間接幫助預防 PWD。大量論文表明，使用精選飼料添加劑進行營養干預可以有效預防 PWD[3-5]。

2.2 腸毒性大腸桿菌 (*enterotoxigenic E.coli* ; ETEC)

大腸桿菌是一種共生細菌，通常存在於人體腸道和其他溫血動物中。一些大腸桿菌菌株具有毒力特性並導致腸道或腸外疾病[6]。

腸外大腸桿菌 (ExEPEC) 的致病菌株引起腦膜炎，敗血症和尿路感染。腸道致病性大腸桿菌分為幾種病原體，如：腸道聚集性大腸桿菌 (EAEC)、腸致病性大腸桿菌 (EPEC)、腸出血性大腸桿菌 (EHEC)、產腸毒素大腸桿菌

(ETEC)、腸侵襲性大腸桿菌 (EIEC) 和彌散粘附的大腸桿菌 (DAEC)。大腸桿菌的病原體在兒童和成人中引起腹瀉，並且一些還在其他哺乳動物和鳥類中引起感染。

基於毒力標記，EPEC 分為兩種亞型：典型的 EPEC (tEPEC) 和非典型的 EPEC (aEPEC)。典型的 EPEC 具有大的毒力質粒，其中存在形成束的菌毛編碼基因 (bfp)。這種依從性因素在 aEPEC 中是不存在的[7]。非典型 EPEC 是來自發展中國家和發達國家的新興腹瀉病原體，並且在動物源性食品中也經常被發現[8, 9]。

2.3 大腸桿菌素 (Colicin)

細菌素是由大多數細菌產生的多種核糖體合成的蛋白質抗生素。它們的範圍從乳酸菌產生的小型多肽，到革蘭氏陰性菌的大多數多域蛋白，如大腸桿菌中的大腸桿菌素。[10, 11]對於活性，必須從生產細胞中釋放細菌素，然後結合敏感細胞表面以引發導致細胞死亡的輸入過程[12-14]。

2.3.1 大腸桿菌素毒殺機制

大腸桿菌進入目標菌的內膜或細胞質後，進行毒殺作用。根據毒殺機制可分為三型[15]。

1. 孔洞形成型 (Pore-forming type) :

此型的大腸桿菌素會進入內膜，形成孔洞或通道，因此造成目標菌株因離子滲漏流失而死亡，例如：colicin A、B、Ia、Ib、K、E1、N、5 等 [16, 17]。

2. 核酸分解型 (Nuclease type) :

此型的大腸桿菌可進入細胞質非特異性分解核酸，可分為 DNase 型、16S rRNases 型和 tRNase 型，例如：colicin E2-E9、N、5 等 [18]。

3. 抑制肽聚糖合成型 (Peptidoglycanase type) :

此型的大腸桿菌素會進入間質中，抑制肽聚糖 (peptidoglycan) 形成，導致目標菌的細胞壁無法生成而死亡。例如 colicin M [19]。

2.3.2 大腸桿菌素的結構

大腸桿菌素是具有三個功能結構域的模塊化蛋白質，它們共同作用以結合敏感細胞的外部。結合的外膜受體和根據通過宿主易位的機制對大腸桿菌進行分成 2 類 colicin A and cilicin B [12] 。

1. A 組大腸桿菌的導入通過 Tol 依賴性易位系統發生，該系統由蛋白質 TolA，TolB，TolQ，TolR 和肽聚糖相關脂蛋白（Pal）組成。
2. B 組大腸桿菌的輸入通過由蛋白質組成的 TonB 依賴性易位系統發生。

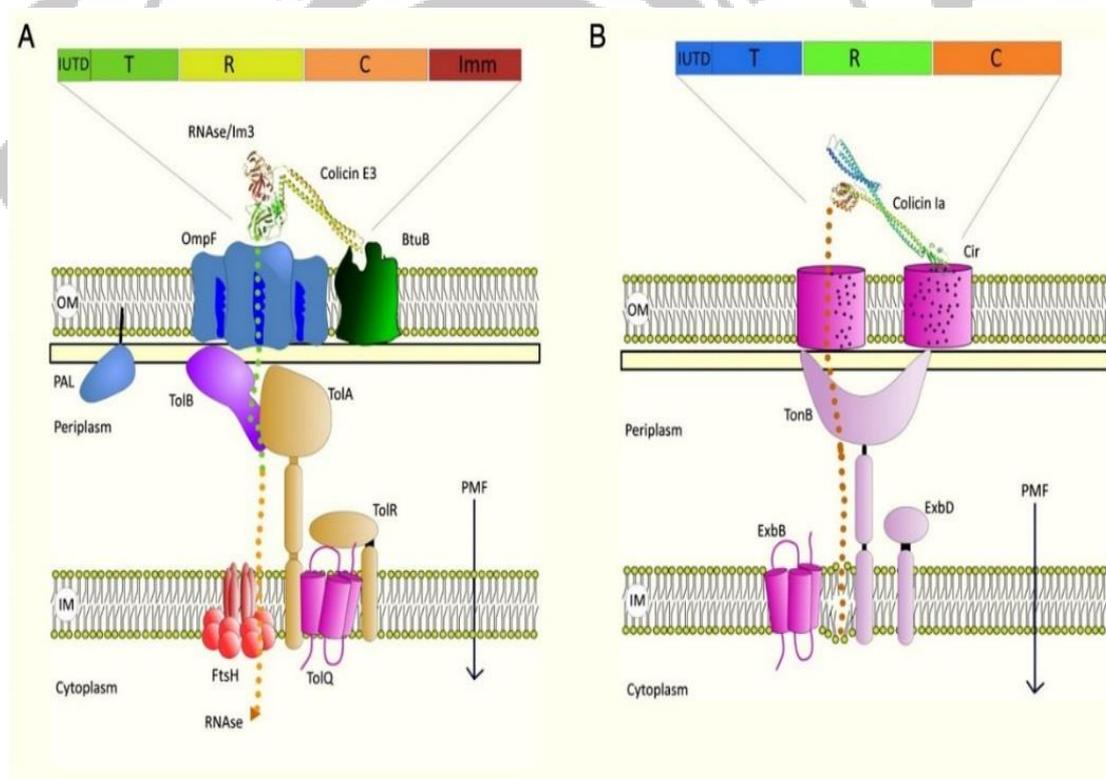


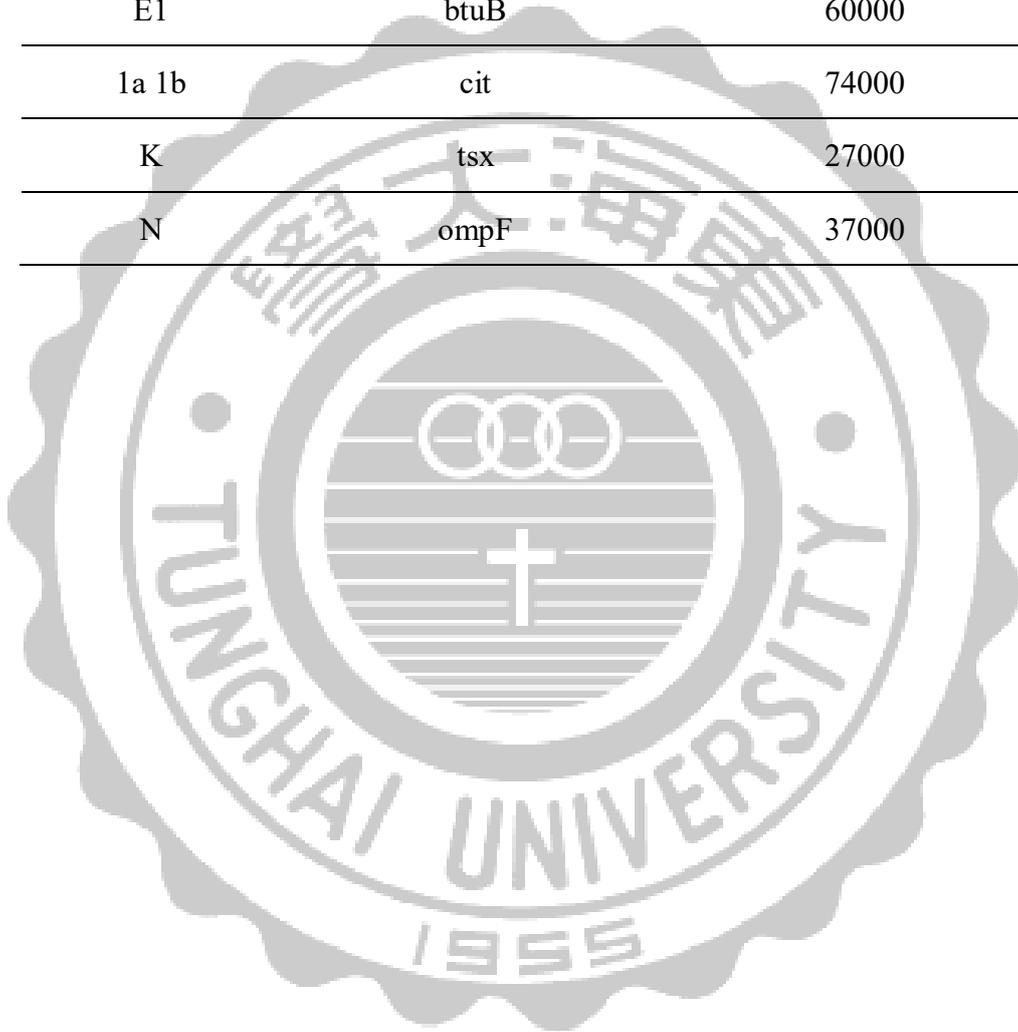
圖 2.1 大腸菌素的結構圖[12]

表 2.1 大腸桿菌素的分類[20]

大腸菌素	外膜受體“主要受體”	“轉運蛋白”或“二級受體”	易位機制	細胞毒性
<i>A組</i>				
一個	BtuB	OmpF的	Tol A, B, Q, R	成孔
E2, E7, E8, E9	BtuB	Omp F.	Tol A, B, Q, R	DNA酶
E3, E4, E6	BtuB	OmpF的	Tol A, B, Q, R	rRNase
E5	BtuB	OmpF的	Tol A, B, Q, R	tRNase
E1	BtuB	TolC外	Tol A, R	成孔
ñ	LPS	OmpF的	Tol A, Q, R	成孔
k ₅	TSX	OmpF的	Tol A, B, Q, R	成孔
S4	OmpW的	Omp F.	Tol A, B, Q, R	成孔
ü	Omp A.	Omp F, LPS	Tol A, B, Q, R	成孔
28B	Omp A.	Omp F, LPS	Tol A, B, Q, R	成孔
Cloacin DF13	IutA	未知	Tol A, Q, R	核糖核酸酶
<i>B組</i>				
5,10	TSX	TolC外	TonB, Exb B, D	成孔
Ia, Ib	CIR	CIR	TonB, Exb B, D	成孔
乙	FEPA	未知	TonB, Exb B, D	成孔
d	Fep A.	未知	TonB, Exb B, D	tRNase
中號	F A.	未知	TonB, Exb B, D	肽聚醣合成抑制劑

表 2.2 大腸桿菌素的種類

Colicin	Genetic locus	Molecular weight
A	btuB ompF	60000
B	fepA(cbr)	81000
E1	btuB	60000
1a 1b	cit	74000
K	tsx	27000
N	ompF	37000



2.4 培養環境因子 (Cultivating environmental factors)

1. 培養基組成:

由於微生物發酵程序需考慮各種因子間的相互作用才能獲得最佳的生產效率，而培養基組成則是關係到微生物生存及生長好壞最基本的影響條件，養份的供應對蛋白質合成至有極大的影響，也關係到蛋白的產量。一般大腸桿菌培養常用的培養基為 LB 培養基，其組成包含 tryptone、yeast extract、NaCl 當中的胺基酸含量分別為 80.18% 和 65.85%。批次發酵要培養出高密度的細胞濃度所需的營養源濃度也要提高，然而高濃度的營養源通常會抑制細胞的生長使得細胞濃度無法提高，例如：葡萄糖濃度 >50 g/L、氮 >3 g/L、鐵 >1.15 g/L、鎂 >8.7 g/L、磷 >10 g/L、鋅 >0.038 g/L 就會對大腸桿菌的生長造成抑制。

2. 溫度:

根據文獻發現可溶性蛋白質的產量容易受到溫度的影響而有所不同，當操作溫度調整為 25~30°C 時可將可溶性蛋白質提高較 37°C 時的數倍之多，文獻實驗結果顯示較高的溫度會造成細胞表現速度過快，進而容易產生結構不完整的蛋白質。有些研究會利用較低溫培養大腸桿菌，以減少代謝過程中生化與化學反應的發生，例如：減少抑制產物生成之蛋白質的質量、降低重組蛋白產物的分解作用、增加重組蛋白產物的溶解度等，因此在發酵過程中溫度常降至 20~30°C，以便提高重組蛋白產物之產率

3. 溶氧量(Dissolved Oxygen):

水中氧氣濃度通常是限制好氧性菌體高密度培養的一個重要因素，由於氧氣在水中的溶解度很低，在一大氣壓、溫度為 25 °C 的水中飽和溶氧約只有 7 ppm 左右，可通入少量純氧與空氣組成的混合氣體、增加反應器內的壓力與轉速，進而改善水中溶氧不足的問題，然而加壓培養同時也會增加其他有害氣體在培養基中的濃度，例如：二氧化碳，當分壓超過 0.3 大氣壓時會降低細胞的生長速度而會加劇醋酸的生成，另外降低菌體生成速率和培養溫度也是減少氧氣消耗的方法。

在批式培養的情況下，溶氧量最好維持在 30~50 % 以上，溶氧量不足將會導致菌體生長速率受限，而在誘導相時則將會造成重組蛋白表現不佳的情形發生。[21]

2.5 SOS 反應 (SOS response)

SOS 是指細菌對 DNA 損傷所作出的反應，通過加入協調的細胞反應來阻止細胞分裂，由 LexA 和 RecA 蛋白，阻遏蛋白和誘導物控制，它們在開啟和關閉狀態之間交替。SOS 響應意味著一組基因負責 DNA 修復，表達原噬菌體誘導和伴隨的誘變。SOS 系統是一個程序化的 DNA 修復系統，可以導致 DNA 恢復和遺傳變異在不利影響時促進細菌進化。因此 SOS 修復是轉錄反應，不僅包括 DNA 修復酶，還包括環境脅迫後參與細菌適應的多種蛋白質[22]。

在細菌細胞於 DNA 損傷後，引發宿主細胞的 SOS 反應，其主要包括 recA 基因的活化。RecA 活化蛋白以 ATP 依賴性方式與 DNA 損傷產生的 ssDNA 結合，並活化未結合的 LexA 蛋白的自切割活性。這特異性地帶來了 LexA 的自我裂解與原本被抑制的 SOS 基因表現出蛋白，導致 SOS 誘導型啟動[23]。

編碼大腸桿菌素結構蛋白，免疫蛋白和裂解蛋白的基因被示為 CXA，CXI 和 CXL 分別。箭頭顯示轉錄的方向的基因。標記為 T1 和 T2 的點表示轉錄終止子位點的位置。

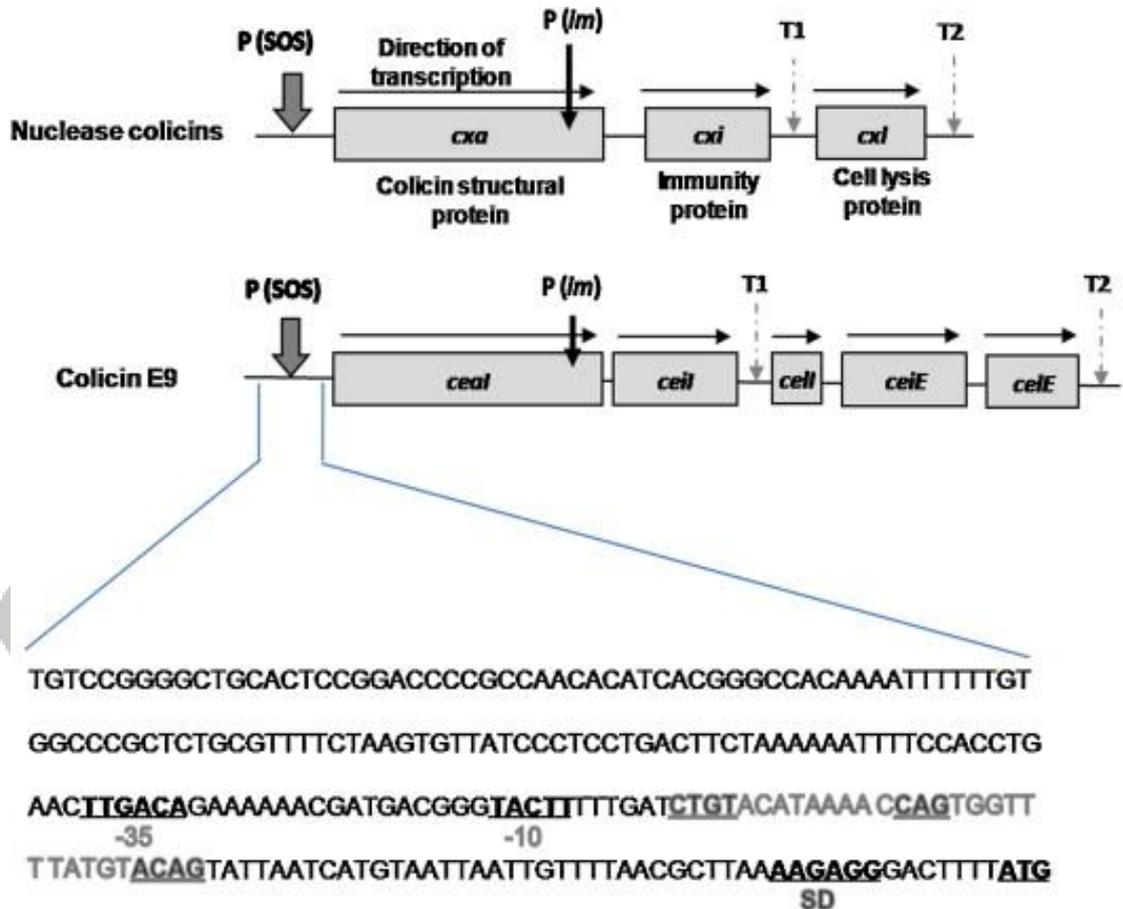


圖 2.2 SOS 反應圖[22]

2.6 IPTG 誘導反應(IPTG induced response)

IPTG 誘導的反應大腸桿菌是最廣泛用於產生重組蛋白的宿主之一，因為它具有眾所周知的遺傳學，代謝組學和蛋白質組，以及遺傳操作工具的可用性，lac 操縱子是最常用的之一[24]。

大腸桿菌的乳糖操縱子含 Z、Y、A 三個結構基因，分別編碼 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)、通透酶(permease)和乙酰基轉移酶(transacetylase)。

此外還有調控基因:操縱序列 O(operator)、啟動序列 P(promoter)、而 I(編碼 Lac 阻遏物, Lacrepressor)不屬於乳糖操縱子。

在沒有乳糖存在時，lac 操縱子(元)處於阻遏狀態, Lac 阻遏物能與操縱基因 O 結合，阻礙 RNA 聚合酶與 P 序列結合，抑制轉錄起動。而當有誘導劑與阻遏蛋白結合後，其蛋白構像就發生變化，導致阻遏物從操縱基因 O 上解離下來，RNA 聚合酶不再受阻礙，發生轉錄反應。

乳糖進入細胞,經 β -半乳糖苷酶催化，轉變為半乳糖即生理上的誘導劑。而在實驗中,通常選用異丙基硫代半乳糖苷(IPTG)作為誘導劑，IPTG 是一種作用極強的誘導劑，不被細菌代謝而十分穩定。

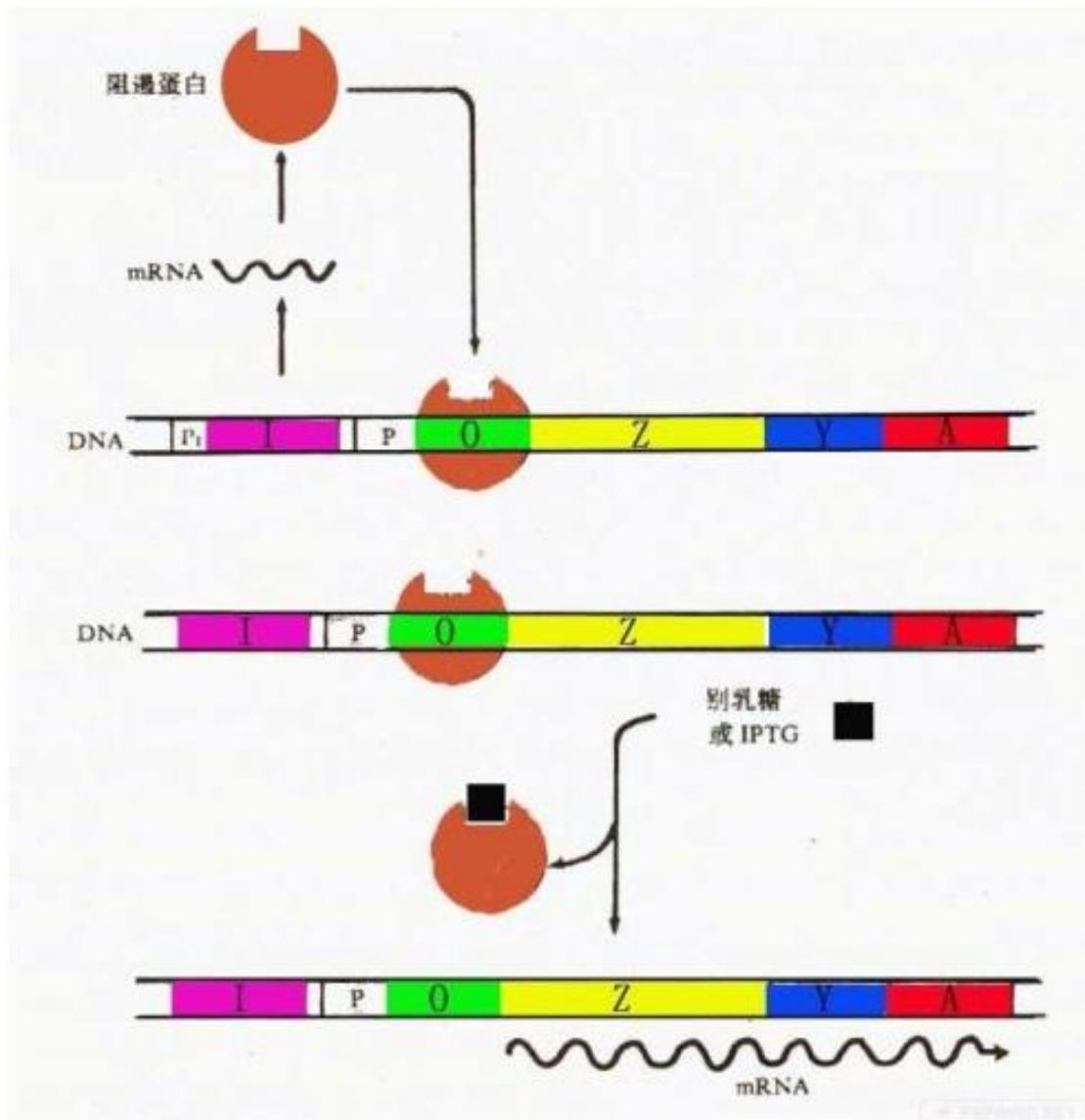


圖 2.3 IPTG 誘導反應圖

2.7 發酵技術

生物科技產業對於人類未來的生活、健康與環境品質有深遠的影響，被公認為未來最具有發展潛力的高科技產業之一，生物科技包括生物、化學與工程三大科學領域，發酵為現今生物技術產業的重要核心之一。

在現今發酵產業上，為了提高產率且降低成本，通常會將發酵槽放大，以滿足大量生產的需求，利用發酵槽最大的優點，將不穩定或是稀少(例如:野生菇菌類、靈芝、牛樟芝、綠藻、大腸桿菌、紅酵母等)的來源，使用產業上廣泛應用的液態發酵或固態發酵技術進行生產，縮短生產時間及放大產能。

發酵是指將原料利用微生物進行轉化或生產的製程，在十七世紀以前人類就廣泛應用各種天然的方式產生發酵食品。微生物發酵技術起源於青黴素的生產，而美國製藥廠成功使用大腸桿菌生產胰島素，開始將發酵產業帶入基因工程製藥的時代。

在1915年底一次世界大戰時，英國人為了製造火藥，對丙酮之需要量迅速增加，由 Weizmann 帶領開發已發酵槽培養從土壤裡分離出來的丙酮及丁醇梭桿菌(*Clostridium acetobutylicum*)，成功製造丙酮及丁醇，此技術成為世界最早的大量培養[25]。

2.8 發酵槽

攪拌式發酵槽是利用機械攪拌方式，增加發酵槽內的溶氧量，質傳效率，槽體內部包含軸、葉片以及擋板搭配使養分與氣泡均勻分布。微生物細胞之所以能存活於發酵槽中，主要是具有強韌的細胞壁，能夠適應發酵槽中的剪切力 [25]。

攪拌式發酵槽的攪拌速度和攪拌葉片決定混合的效能，為了達到良好的混合效能，發酵槽設計槽高(H)與內徑(D)之比例(H/D 值)通常在 2~3 左右。此種發酵槽在培養過程中，攪拌葉片會將通入槽內的氣泡擊碎，使氣泡均勻散佈在發酵液中，液氣介面變薄而增加溶氧量，也能夠有效地混合營養基質與微生物，避免因菌絲體聚集而影響質傳效果降低，還可以將槽體內的溫度形成均勻狀態。

每個菌體的生長條件與生長環境接不痛，現今發酵槽設計能夠控制多種條件來配合多種菌體的生長，例如:溫度、溶氧量、攪拌速度、pH 值、壓力等...，使得菌體能穩定的生長，來更有效率與便利性的來製造我們所需的產物。

利用生物特性進行相關生化反應的裝置稱為生物反應器(bioreactor)或發酵槽(fermentor)。隨著生物技術的發展，面對多樣性的微生物及其生長情形與特性，目前除了傳統機械攪拌式發酵槽(mechanically agitated fermentor)之外，還有氣動攪拌式發酵槽(pneumatically agitated fermentor)如泡塔式發酵槽(bubble column fermentor)和氣舉式發酵槽(air-lift fermentor) [26]。

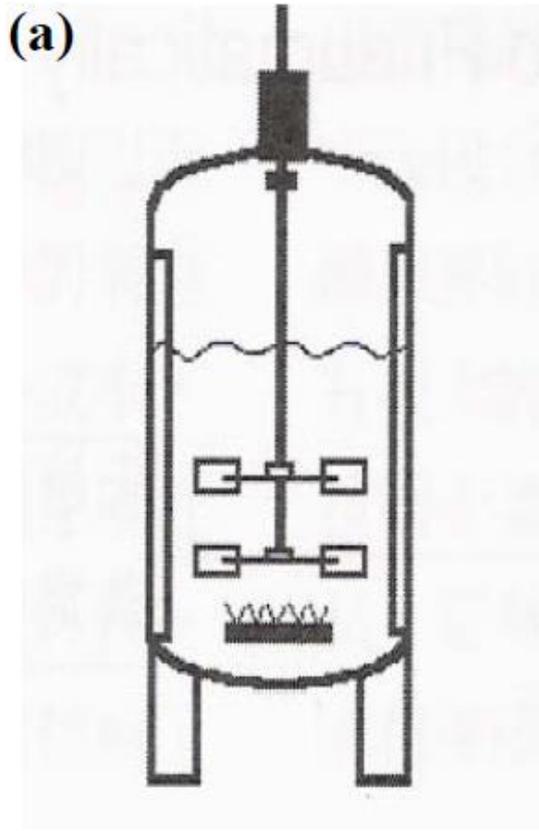


圖 2.4 (a)Mechanically agitated fermentor[27]

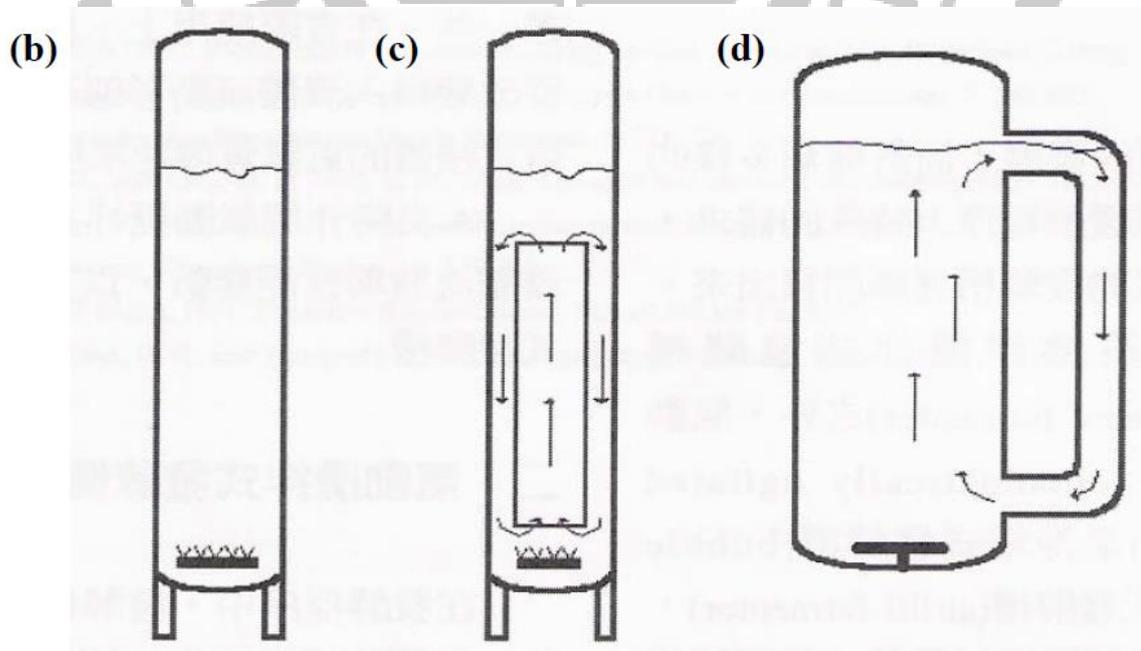


圖 2.5 (b)(bubble column fermentor) ;
圖 2.6(c、d)(air-lift fermentor)[27]

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗菌株

本實驗所使用的特殊基因重組大腸桿菌，取自中興大學分子生物學研究所陳建華老師實驗室，轉型株可利用 colicin Ib 本身的啟動子以 mitomycin C 誘導，產生具有抑菌活性的 colicin Ib 蛋白，並且誘導前後菌株皆生長良好。

大腸桿菌是一種共生細菌，通常存在於人體腸道和其他溫血動物中。大腸桿菌是一種兩端鈍圓、能運動、無芽孢的革蘭氏陰性短桿菌，外型為短桿狀（長度 2 μm ，寬度 0.8 μm ），生長於含氧、中溫(37 $^{\circ}\text{C}$)及 pH 中性的環境下，如圖 3-1 所示。

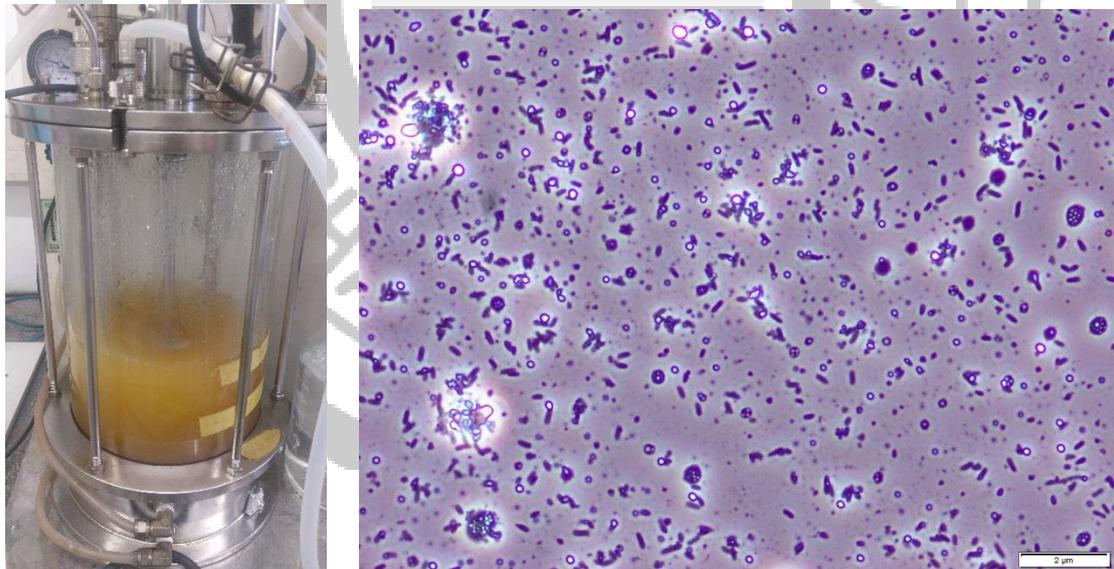


圖 3.1 *E-coli* 生長在發酵槽之外觀及顯微鏡觀測圖(40x)

3.1.2 實驗藥品

表 3.1 實驗所使用之藥品

中文名稱	英文名稱	廠牌
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
酵母萃取物	Bacto™ Yeast Extract	CMP
胰蛋白胨	Bacto™ Tryptone	CMP
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
氨苄青黴素	Ampicillin sodium salt	UNI-ONWARD
排多癌注射劑	Mitomycin-C	Kyowa
乳糖操縱子	IPTG	UNI-ONWARD
培養基固化試劑	Difco™ Agar , Granulated	CMP
鹽酸	Hydrochloric acid	SCHARLAU
硫酸	Sulfuric acid	SCHARLAU
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
甘油	Glycerol	SHOWA

(接續前頁)

中文名稱	英文名稱	廠牌
三羥甲基氨基甲烷	Tris	Hopax
硫酸鎂	Magnesium sulfate	SHOWA
消泡劑	Antifoaming agent	永信藥品
十二烷基硫酸鈉	Sodium Dodecyl Sulfate	Affymetrix
過硫酸銨	Ammonium persulfate	BP
丙烯醯氨	Acrylamide-bis	BioEast
四甲基乙二胺	TEMED	Scharlau
快速型蛋白質染色劑	InstantBlue	Expedeon
甘胺酸	Glycine	usb

3.2 實驗儀器

表 3.2 為本研究所使用之儀器設備清單

儀器設備	廠牌	型號
電子天平	Precisa	BJ 100M
磁石攪拌加熱器	CORNING	PC-420D
pH 計	INSPECTED	PL-700PV
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
超純水系統	RODA	D11031218.1
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
高效液相層析儀 RI detector	Hitachi	RI 5450
恆溫水槽	DENG YNG	G-10
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
超音波震盪器	DECTA	DC300H
微電腦分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV

(接續前頁)

儀器設備	廠牌	型號
數位型離心機	HSIANTAI	CN-650
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
強力磁石攪拌器	雷伯斯	SM-1
光學顯微鏡	OLYMPUS	BX53
冷凍乾燥機	PANCHUM	FD-5020+MF-4
-80°C 直立式冷凍櫃	NIHON FREEZER	CLN-32U
樣品冷藏箱	Marupin	HD-200
5L 攪拌式發酵槽	Biotop	BTF-A5L
超音波細胞破碎機	Qsonica	Q700
震盪器	YIHDR	TS-500D
電泳槽電源供應器	Bio-Rad	164-5050

(接續前頁)

儀器設備	廠牌	型號
膠體框架	Cavoy	MP-8350
迷你電泳槽	Bio-Rad	525BR



3.3 實驗方法

3.3.1 菌種保存

將菌體接至 LB 培養基並放入培養箱中以 37 °C，150 rpm 培養 12 hr，OD₆₀₀ 測量至(2.6~3.0)之間即可，取 0.5 mL 菌液和 0.5 mL 凍菌液於微量離心管中均勻混合後，放入-80°C 冰箱保存。

3.3.2 培養基組成

表 3.3 為本研究所使用之 LB 培養基

Composition(pH=7)	Concentration (g/L)
Bacto-tryptone	10
Bacto-yeast extract	5
NaCl	10

3.3.3 菌種培養

1. 取 3 支菌保分別加入 100 ml 含有抗生素的培養基搖瓶中，37 °C、150 rpm 培養 12 hr。
2. 將培養好 300 ml 菌液加入含有抗生素 2.7 L 培養基發酵槽中培養，轉速上限 450 rpm 下限 300 rpm、固定 30%溶氧、進氣量 1 vvm 培養 12 hr。
3. 再加入誘導劑 Mitomycin C 1.2 ml 再培養 6 hr 改至固定 5%溶氧。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.4 分析方法

3.4.1 菌體濃度分析方法

取菌液與 LB 培養基稀釋 20 倍，並利用分光光度計在波長 600 nm 下測量光學密度(Optical density, O.D)。

3.4.2 碳源（葡萄糖）分析方法

1. 取 5 mL 菌液，在轉速 7000 rpm、4 °C 下離心 10 分鐘，取上清液取得培養基以 Membrane filter(0.22 μm pore size, Chrom Tech)過濾。
2. 利用高效液相層析儀 HPLC (Hitachi RI detector 5450, Hitachi pump 5110, Hitachi Auto Sampler 5210, Hitachi High-Technology Corporation, Japan) 分析葡萄糖濃度。
3. 分析條件：管柱 C18 (COREGEL-87H3, 250 mm ×4.6 mm, Taiwan)，移動相為 0.01 N H₂SO₄，流速 1.5 mL/min，注射量 30μL。

3.4.3 蛋白質活性分析方法

1. 底菌（被殺菌）之準備：

將 pUC19/DH5α 加入至含有 50 μg/mL ampicillin (Ap)的 LB 培養基中，37 °C 培養 2 hr。培養至 OD=0.7。取 150 μL 菌液加入 4.5 mL 約 45 °C 的 0.75 % LB agar 中，混勻後倒至 9 cm 培養皿，置於室溫下待凝固。

2. 上層菌（待測菌）的上清液準備：

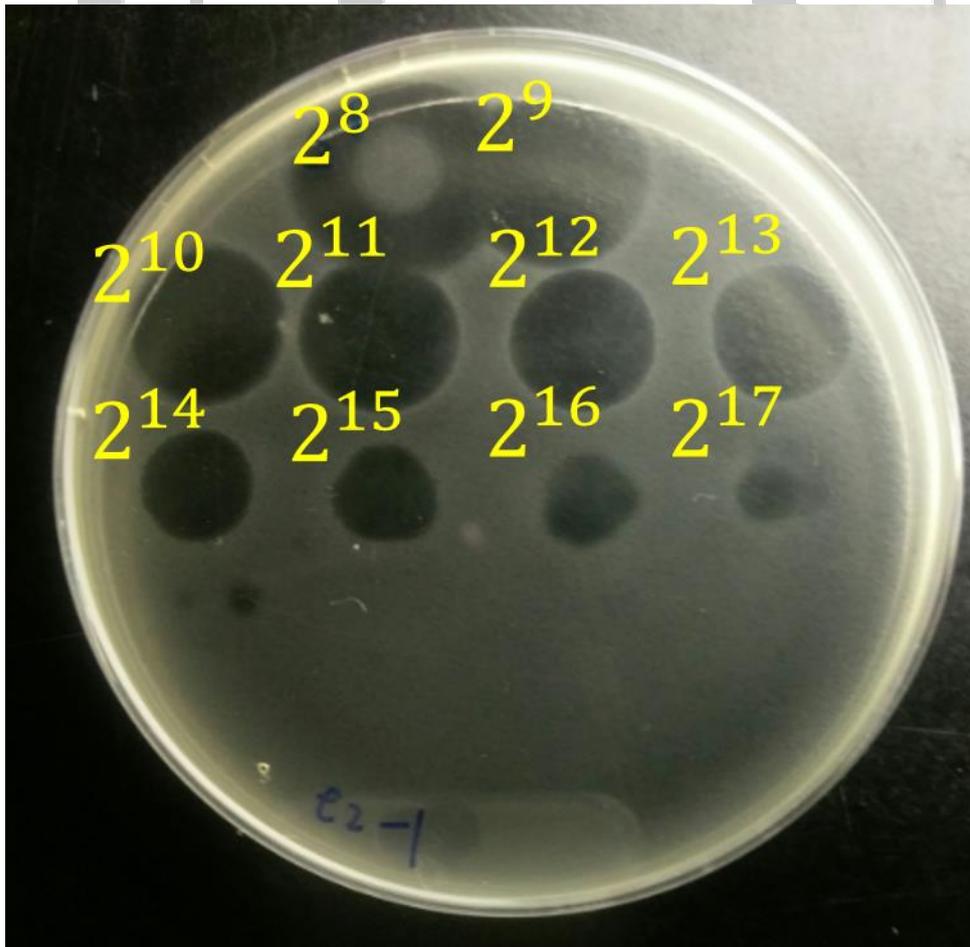
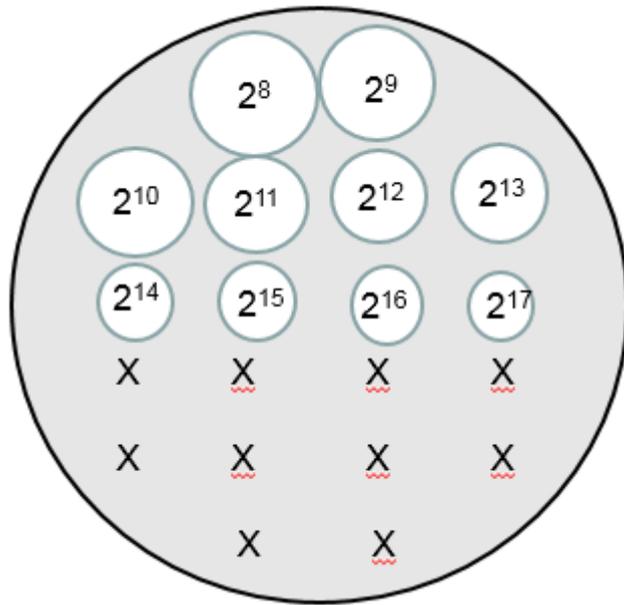
將待測菌液以 LB 培養基調到 OD=1。取 1mL OD=1 的菌液，以 7000 rpm 再離心 10 分鐘，取上清液後使用 Membrane filter(0.22 μ m pore size, Chrom Tech)過濾，再以無菌水進行二倍連續稀釋 20 次，置冰上於兩個小時內使用。

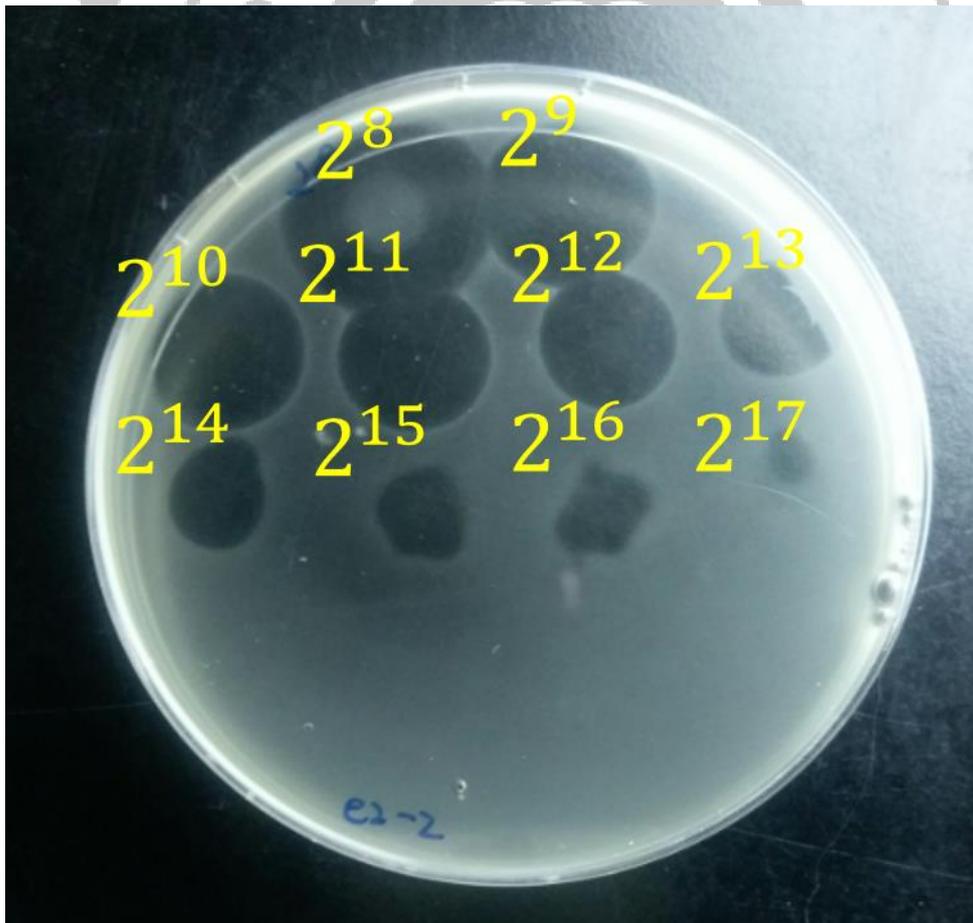
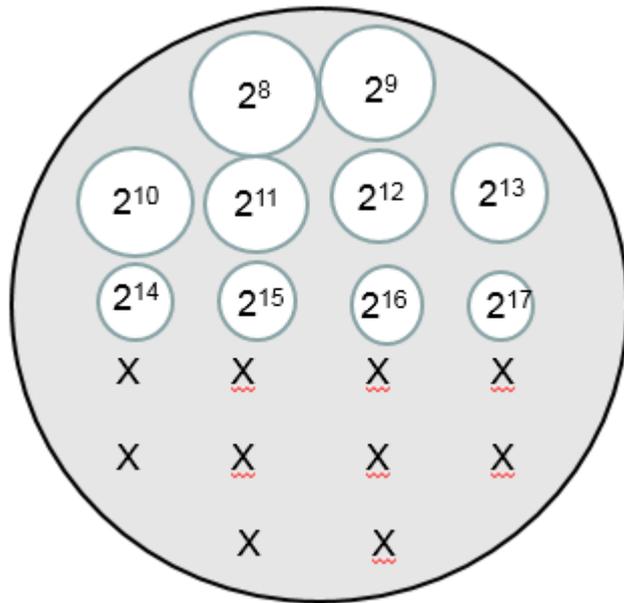
3. 上層菌（待測菌）的破菌液準備：

取 5 mL 待測菌液，以 7000 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液後，以無菌 ddH₂O 懸浮菌體稀釋至 OD=1。以超音波破菌機進行破菌（破菌總時間 1.5 分鐘、破菌 10 秒、停止 10 秒、功率 10 %）。之後以 Membrane filter(0.22 μ m pore size, Chrom Tech)過濾，再以無菌水進行二倍連續稀釋 20 次，置冰上於兩個小時內使用。

4. 取二倍連續稀釋後的上清液及二倍連續稀釋後的破菌液各 10 μ L 滴於含底菌的 LB agar 培養基進行 3 重複測試活性，置於 37 °C 培養 6~12 hr，檢查是否產生抑菌圈(如圖 3.2)，以及產生抑菌圈之最高稀釋倍數(n)。2ⁿ 即為菌蛋白或菌液上清液 10 μ L 的抑菌活性。

活性 2^{17}





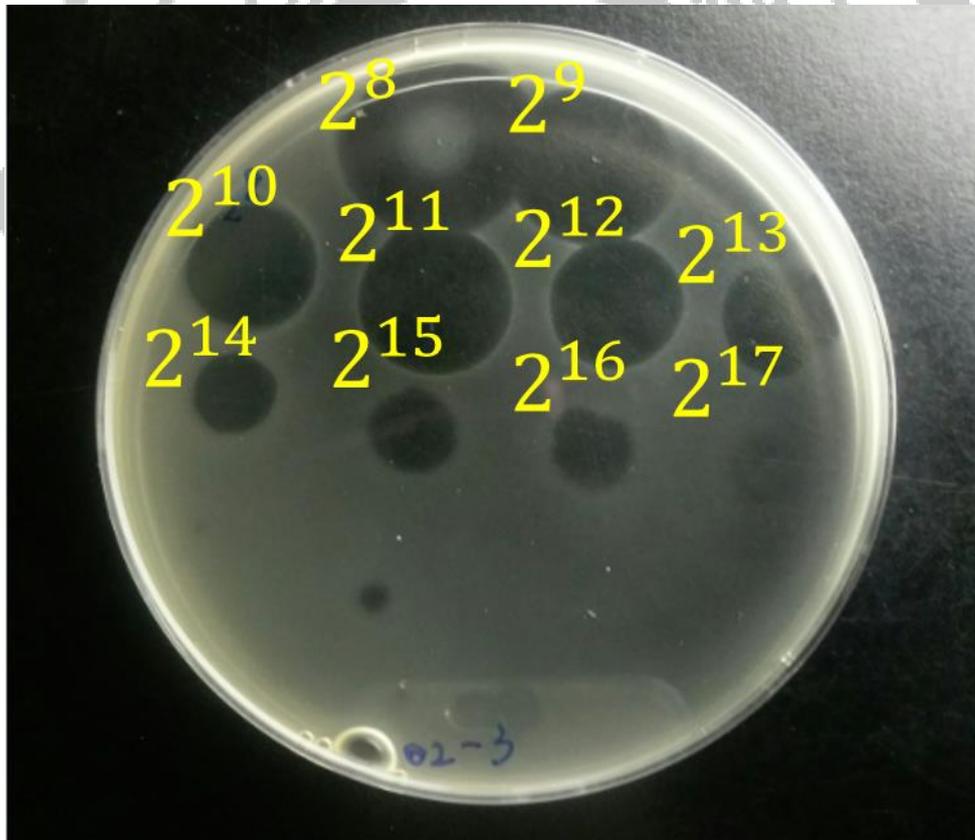
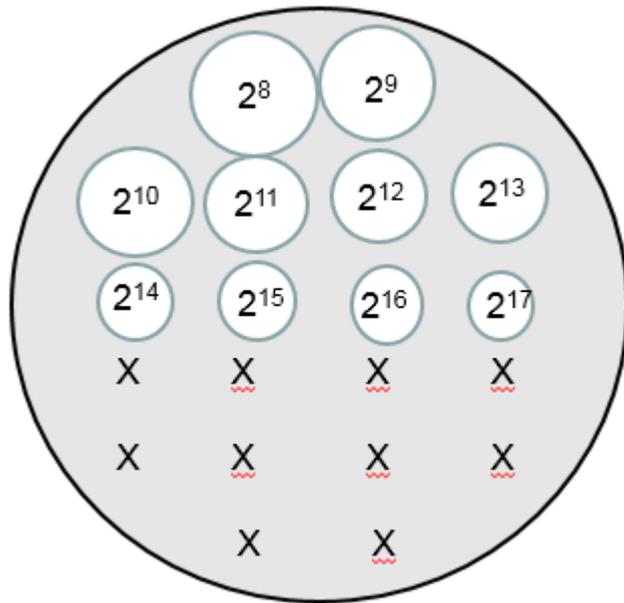


圖 3.2 測量蛋白抑菌圈活性菌盤圖(3 重複)

3.4.4 可溶性蛋白分析方法

1. SDS-PAGE 膠組成：

表 3.4 為本研究所使用 SDS-PAGE 膠

4 片	下膠	上膠
膠濃度	10%	5%
DDW	19.6 ml	12.3 ml
1.5 M Tris	10 ml	X
0.5 M Tris	X	5 ml
10 % SDS	40 μ l	20 μ l
10 % APS	120 μ l	60 μ l
Acrylamide-bis	10 ml	2.5 ml
TEMED	60 μ l	30 μ l

2. 待測蛋白液準備：

將養好的菌液離心 7000 rpm，10 分鐘，分開上清液及沉澱菌體，上清液與染色劑已 4:1 比例調配總量至 25 μ l，至冷凍保存。沉澱菌體與 PBS 回溶清洗 1 次在進行離心留下已清洗好的沉澱菌體，再與 PBS 與染色劑已 4:1 比例調配總量至 25 μ l。再取所有需測式蛋白液在 95 $^{\circ}$ C 下煮 15 分鐘，放至室溫等上膠製備完畢加入。

3. SDS-PAGE 下膠準備：

取調配好的 10 % running gel solution 注入已架設好之電泳玻璃片中，再小心注入 95 % 的酒精將膠片表面壓平。待 30 分鐘等膠片凝固，將 95 % 的酒精倒出，並使用紙巾將上膠部分擦乾，即可加入上膠。

4. SDS-PAGE 上膠準備：

再注入已調配好的 5 % stacking gel solution 並插入齒梳，待 30 分鐘等膠片凝固，拔出齒梳，將電泳玻璃片組裝至蛋白質迷你電泳槽 (Bio-Rad, Mini-protein III electrophoresis system)，於蛋白質迷你電泳槽中倒入 1x protein running buffer 直到 buffer 覆蓋膠片。蛋白質樣品取 20 μ l 注入凝膠 well 中，以 Model 1000/500 Power Supply (Bio-Rad) 進行電泳，先以 85 V 電壓電泳 15 分鐘，再以 185 V 的電壓電泳 35 分鐘，即可停止電泳取出膠片。

5. InstantBlue 染色：

蛋白質樣品以 SDS-PAGE 分離後，取出膠片加入 InstantBlue 直到蓋過膠片，以 50 rpm 搖晃 1 小時，將 InstantBlue 回收。加入 RO 水，蓋過膠片，搖一搖，倒掉液體，此清洗步驟重複 2 次 (共 3 次)。

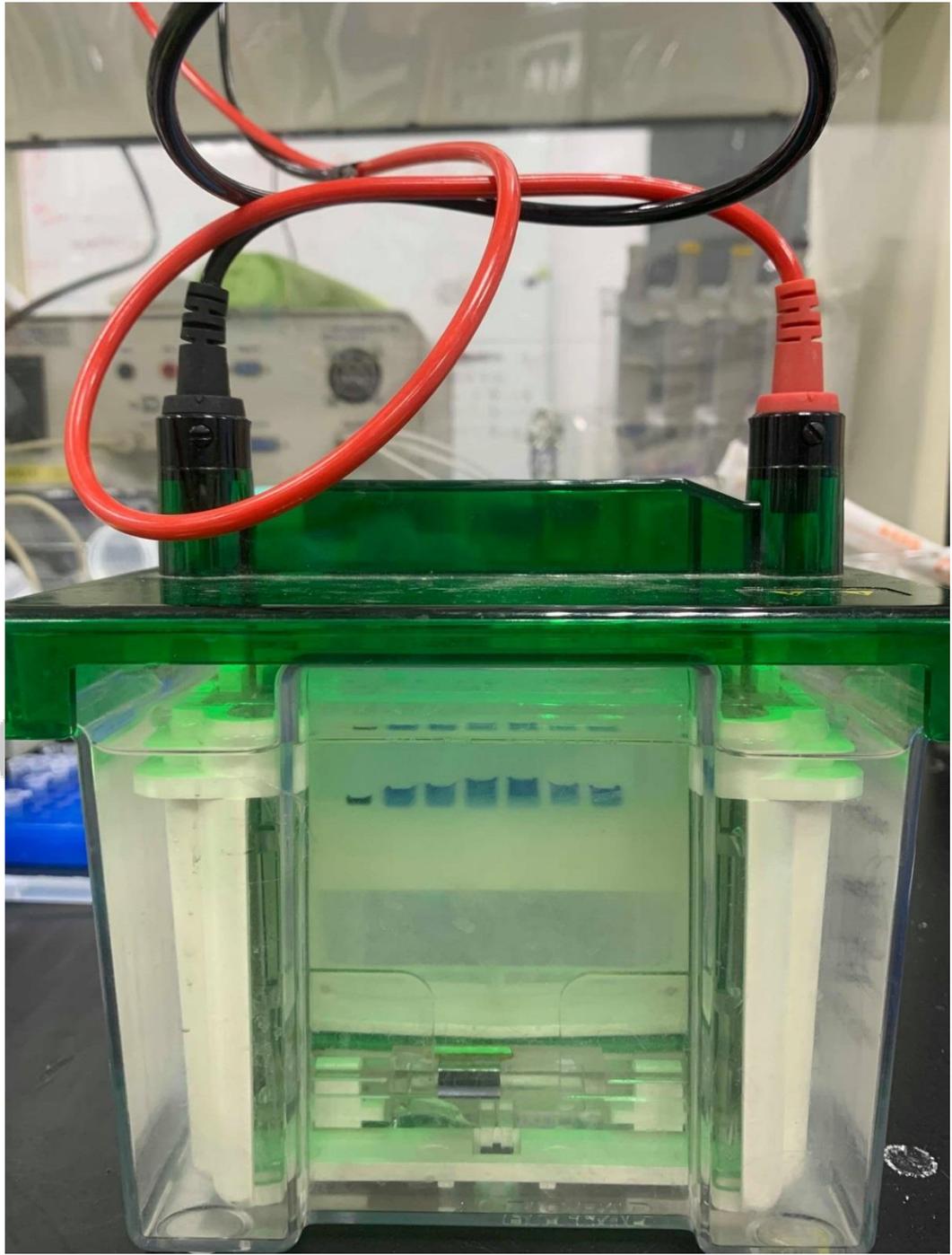
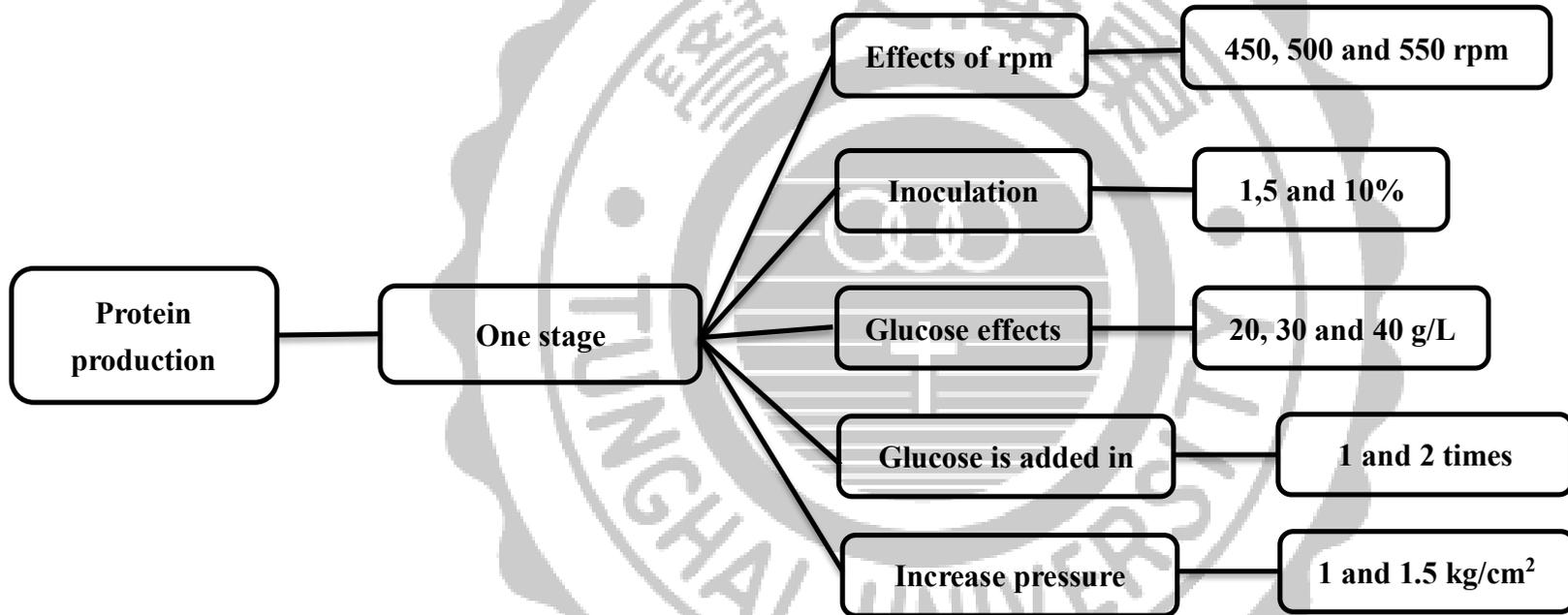


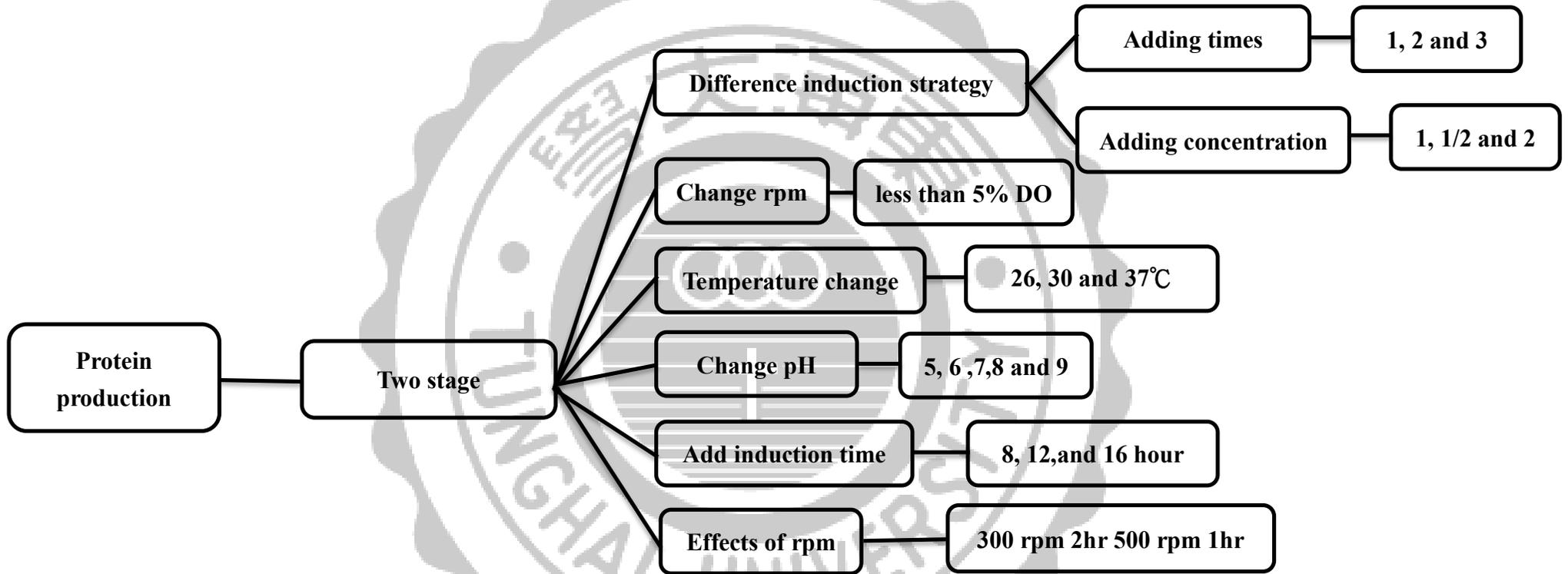
圖 3.3 SDS-PAGE 裝置圖

3.5 實驗架構

3.5.1 增加菌液濃度



3.5.2 增加菌液蛋白濃度



3.6 懸浮菌液培養

3.6.1 探討不同轉速對菌量之影響

目的：探討不同轉速（450,500,550 and 300 rpm 2 hr 500 rpm 1 hr）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C取3支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，改變轉速上限固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30%溶氧、進氣量 1 vvm 培養（14,15,16 and 12）hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5 %。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.6.2 探討不同接菌量對菌量之影響

目的：探討不同接菌量（1%,5% and 10%）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C取適量菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 加入不同容量菌液含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 %溶氧、進氣量 1 vvm 培養（15,15 and 14）hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5 %。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.6.3 探討不同濃度的碳源對菌量之影響

3.6.3.1 探討不同濃度的碳源對菌量之影響(Mitomycin C 誘導方法)

目的：探討不同濃度葡萄糖（20, 30 and 40 g/L）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C取3支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 不同濃度葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30% 溶氧、進氣量 1 vvm 培養（15,15 and 16） hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5%。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.6.3.2 探討不同濃度的碳源對菌量之影響(IPTG 誘導方法)

目的：探討不同濃度葡萄糖（0, 20 and 40 g/L）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C取3支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 不同濃度葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30% 溶氧、進氣量 1 vvm 培養 6 hr。
3. 加入誘導劑 IPTG 0.238 (mg/L)，再培養（5,6,and 5.5） hr 溶氧改至 5%。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.6.4 探討分次添加葡萄糖對菌量之影響

目的：探討分次添加葡萄糖（1 and 2 次）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C 取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 的 100ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 2.7 L 分次添加葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 550 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1.5 vvm 培養 10 hr。
3. 加入誘導劑 IPTG 0.238 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5%。
4. 取菌液測量 OD 及活性

3.6.5 探討增加壓力對菌量之影響

目的：探討增加壓力（1 and 1.5 kg/cm^2 ）對發酵產菌之影響。

1. 從-80 °C 取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 2.7 L 增加壓力培養基中發酵培養，固定轉速上限 550 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1.5 vvm 培養 10 hr。
3. 加入誘導劑 IPTG 0.238 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5 %。
4. 取菌液測量 OD 及活性

3.7 懸浮菌液蛋白活性培養

3.7.1 探討不同誘導策略對活性之影響

3.7.1.1 探討不同誘導劑添加次數對活性之影響

目的：探討不同誘導劑(量不變)添加次數 (1, 2 and 3 次) 對活性影響。

1. 從-80 °C取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30%溶氧、進氣量 1 vvm 培養 (14,12 and 15) hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，再培養 6hr 溶氧改至 5 %。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.1.2 探討不同誘導劑添加濃度對活性之影響

目的：探討不同誘導劑濃度 (1, 1/2 and 2 倍) 對活性之影響。

1. 從-80 °C取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1 vvm 培養 (14,17 and 15) hr。
3. 加入不同誘導劑 Mitomycin C 的濃度 (0.2, 0.1 and 0.4 (mg/L))，再培養 6hr 溶氧改至 5 %。

4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.2 探討不同溶氧策略對活性之影響

目的：探討不同溶氧 (DO = 5%) 對活性之影響。

1. 從-80 °C 取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 的 100ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1 vvm 培養 16 hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，再培養 6 hr 溶氧改至 5%。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.3 探討不同溫度對活性之影響

目的：探討不同溫度 (26, 30 and 37 °C) 對活性之影響。

1. 從-80 °C 取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1 vvm 培養 (14,15 and 16) hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，培養 6 hr 溶氧改至 5 %，再改變不同溫度下培養。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.4 探討不同酸鹼值對活性之影響

目的：探討不同酸鹼值 (pH = 5, 6, 7, 8 and 9) 對活性之影響。

1. 從-80 °C取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150rpm，O/N。
2. 300 ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1 vvm 培養 16 hr。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，培養 6 hr 溶氧改至 5%，再改變不同 pH 值下培養。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.5 探討不同誘導劑加入時間對活性之影響

目的：探討不同誘導劑加入時間 (8, 12, and 16 hour) 對活性之影響。

1. 從-80 °C取 3 支菌保分別加入含有 Ap50 (1 µl/ml)的 100 ml LB 搖瓶中，37 °C，150 rpm，O/N。
2. 300ml 菌液加入含有 Ap50 (1 µl/ml) 2.7 L 葡萄糖培養基中發酵培養，固定轉速上限 450 rpm，固定轉速下限 300 rpm、控制維持 30 % 溶氧、進氣量 1 vvm 培養。
3. 加入誘導劑 Mitomycin C 0.2 (mg/L)，培養 6 hr 溶氧改至 5 %，再改變不同誘導劑加入時間下培養。
4. 取菌液測量 OD 及活性。

3.7.6 5L 攪拌式發酵槽培養系統



圖 3.4 5L 攪拌式發酵槽培養系統

第四章 結果與討論

4.1 懸浮菌液培養

4.1.1 探討不同轉速對菌量之影響

因為水的溶氧性不好，希望藉由增加攪拌速度將氧氣分子細化後，溶入到水分子間的空隙裡，提高了水中的溶氧性。本次實驗探討不同轉速（450, 500, 550 and 300 rpm 2 hr 500 rpm 1 hr）對菌體發酵產生長之影響。實驗結果如圖 4.1、4.2，轉速達到越高越能增加培養基中溶氧值，使菌體生長情況較好，以 550 rpm 有較高的 OD 值，溶氧量越高糖解反應所產生的 ATP 能越多使得菌體生長更加快速，但菌體生長太好導致產蛋白效率變差，由表可觀察出菌體生長越好蛋白抑菌活性相對越低，如表 4.1。

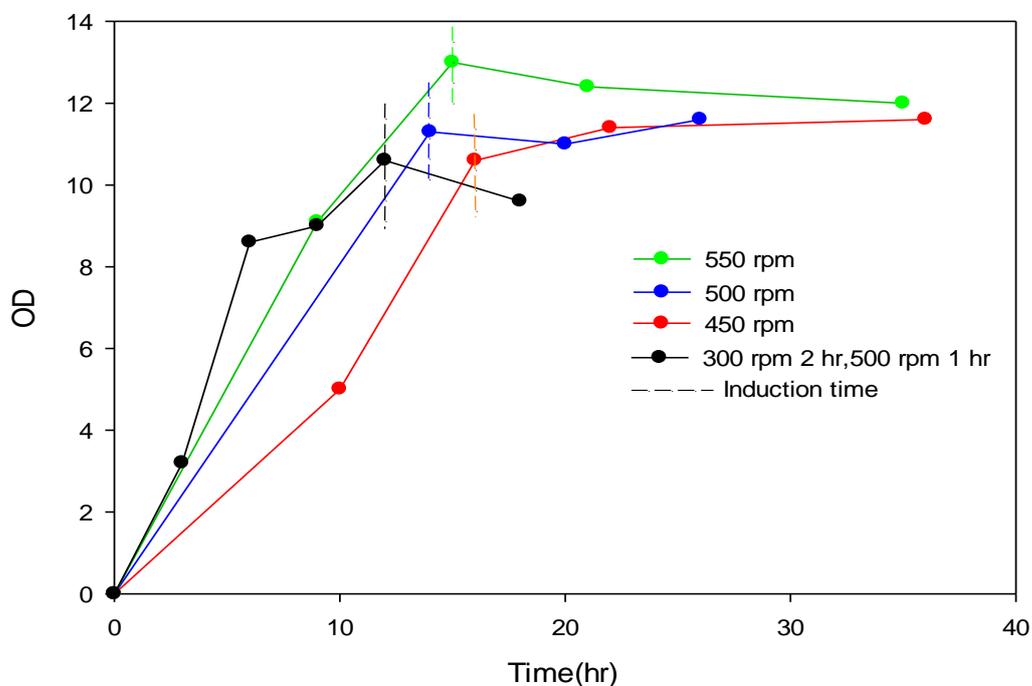


圖 4.1 不同轉速與菌量比較

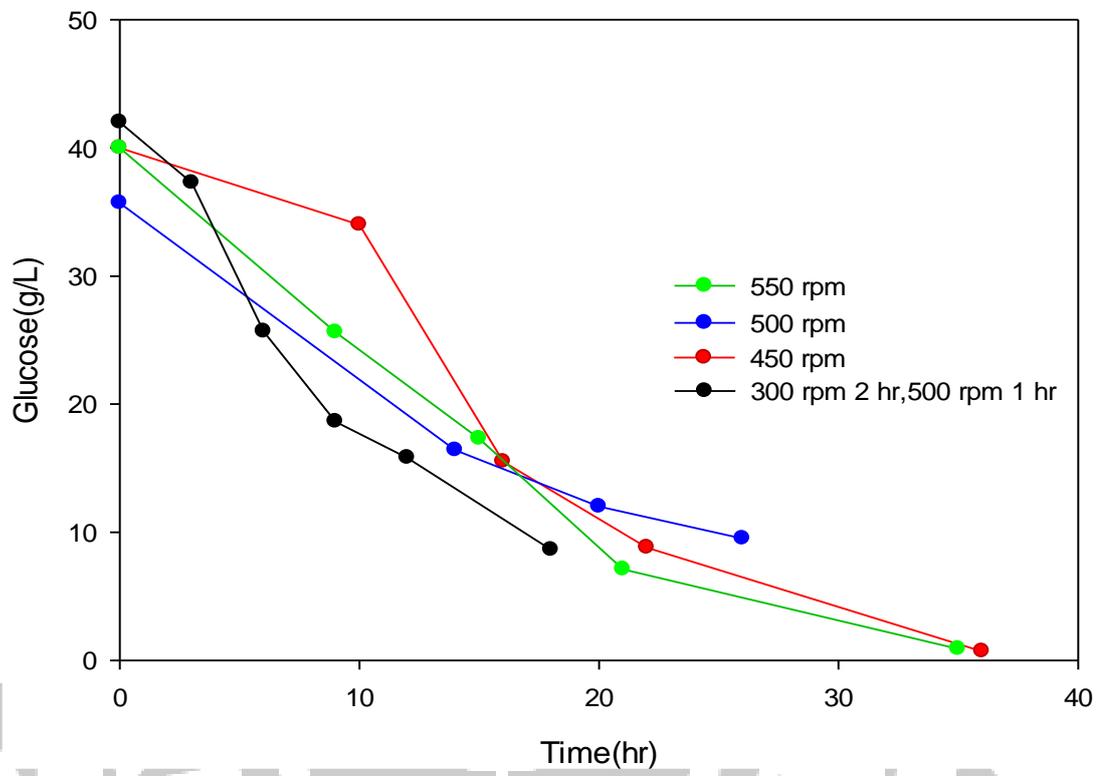


圖 4.2 不同轉速與葡萄糖消耗量比較

表 4.1 不同轉速與蛋白活性比較

	450 rpm	500 rpm	550 rpm	300 rpm 2 hr, 500 rpm 1 hr
activity	2^{16}	2^{15}	2^{13}	2^{15}

4.1.2 探討不同接菌量對菌量之影響

接種量通常不是被認為是微生物生長的重要因素。然而，接種量可能會影響整個過程包含：增長率、產量、生產力和目標代謝物或產物。使用高接種量也是無菌發酵的有前景的方法，本次實驗探討不同接種量（1 %，5 %，and 10 %）對菌體發酵產生長之影響。實驗結果如圖 4.3、4.4，以 1 % 與 5 % 的接種量能產生具有較高的 OD 值，在加入誘導劑後菌體還在持續生長，10 % 接種量在誘導後生長曲線已經趨近於水平維持固定 OD 值。在誘導後接種量 1 % 菌體持續生長幅度高於 5 % 及 10 %，但是蛋白抑菌活性相對起來差非常多，如表 4.2，由此可以證明菌體在誘導後持續生長效果越好導致於產蛋白效率越差，雖然 1 % 與 5 % 的接種量能達到比較高的 OD 值但是蛋白活性是相對比較差的。

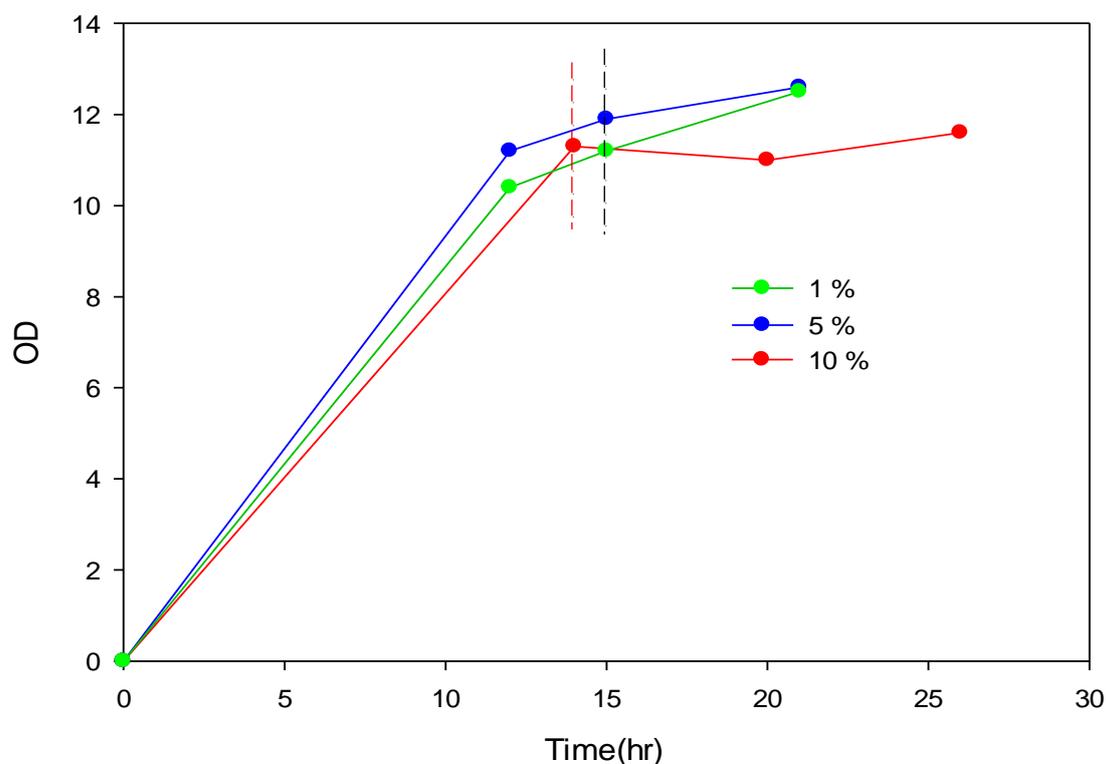


圖 4.3 不同接菌量與菌量比較

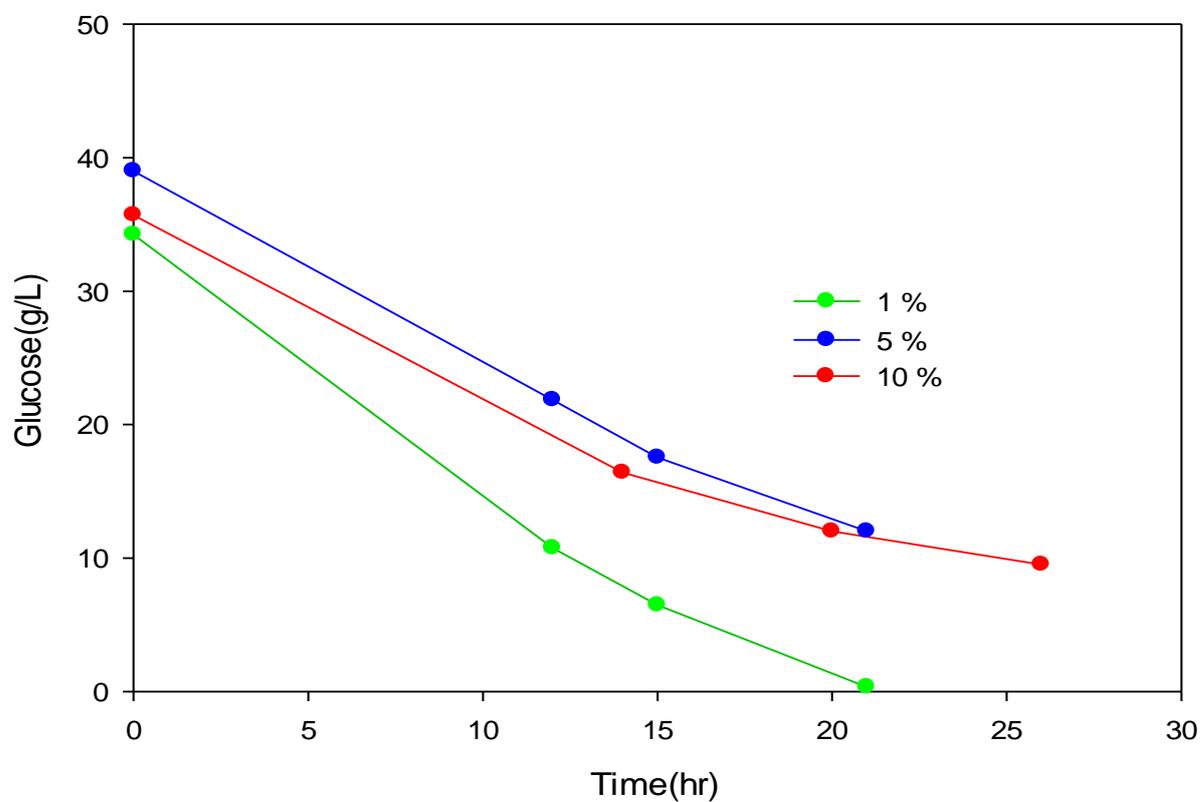


圖 4.4 不同接菌量與葡萄糖消耗量比較

表 4.2 不同接菌量與蛋白活性比較

	1 %	5 %	10 %
activity	2^5	2^{14}	2^{15}

4.1.3 探討不同濃度的碳源對菌量之影響

4.1.3.1 探討不同濃度的碳源對菌量之影響(Mitomycin C 誘導方法)

培養基組成是關係到微生物生存及生長好壞最基本的影響條件，養份的供應對蛋白質合成、產量有極大的影響，批式發酵要培養出高密度的細胞所需的營養源濃度也要提高。本次實驗探討不同濃度的碳源（20, 30 and 40 g/L）對菌體發酵產生長之影響。實驗結果如圖 4.5，以 30 g/L 與 40 g/L 的葡萄糖濃度具有較高的 OD 值。在菌體生長期間（0~16 hr）20 g/L 與 30 g/L 的葡萄糖濃度是不足來作為碳源，如圖 4.6。在誘導後 30 g/L 的葡萄糖濃度不夠導致生長蛋白效率變差，如表 4.3，在生產蛋白時需要少量的葡萄糖來維持菌體生長與蛋白生產，葡萄糖濃度太高會使菌體先進行糖解反應而影響誘導反應的進行。

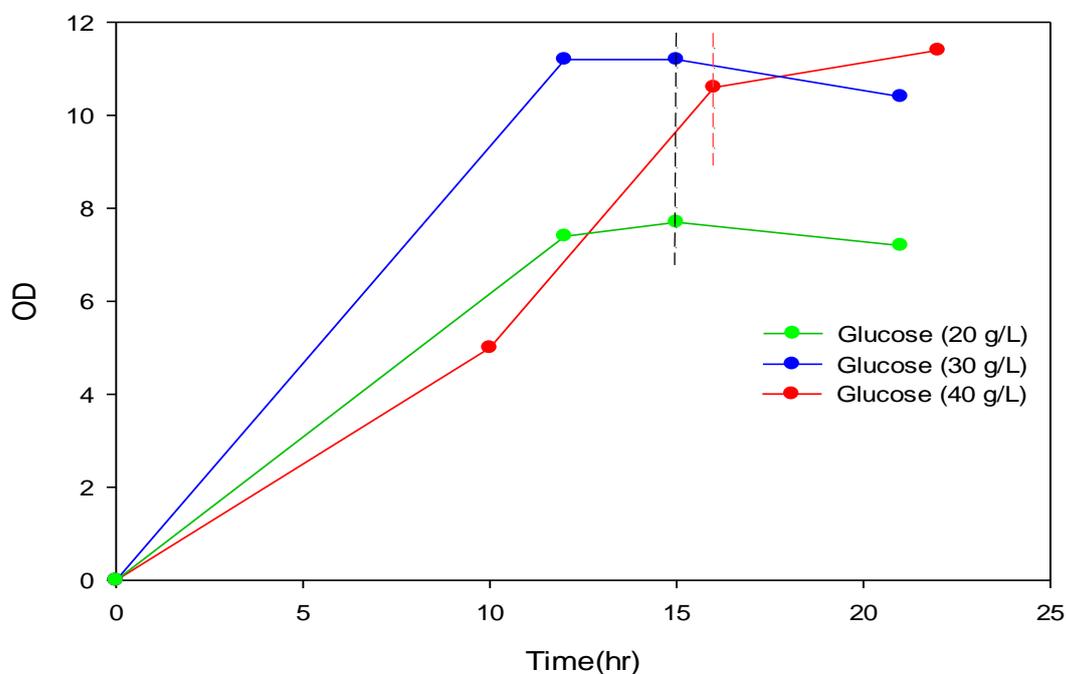


圖 4.5 不同葡萄糖濃度與菌量比較

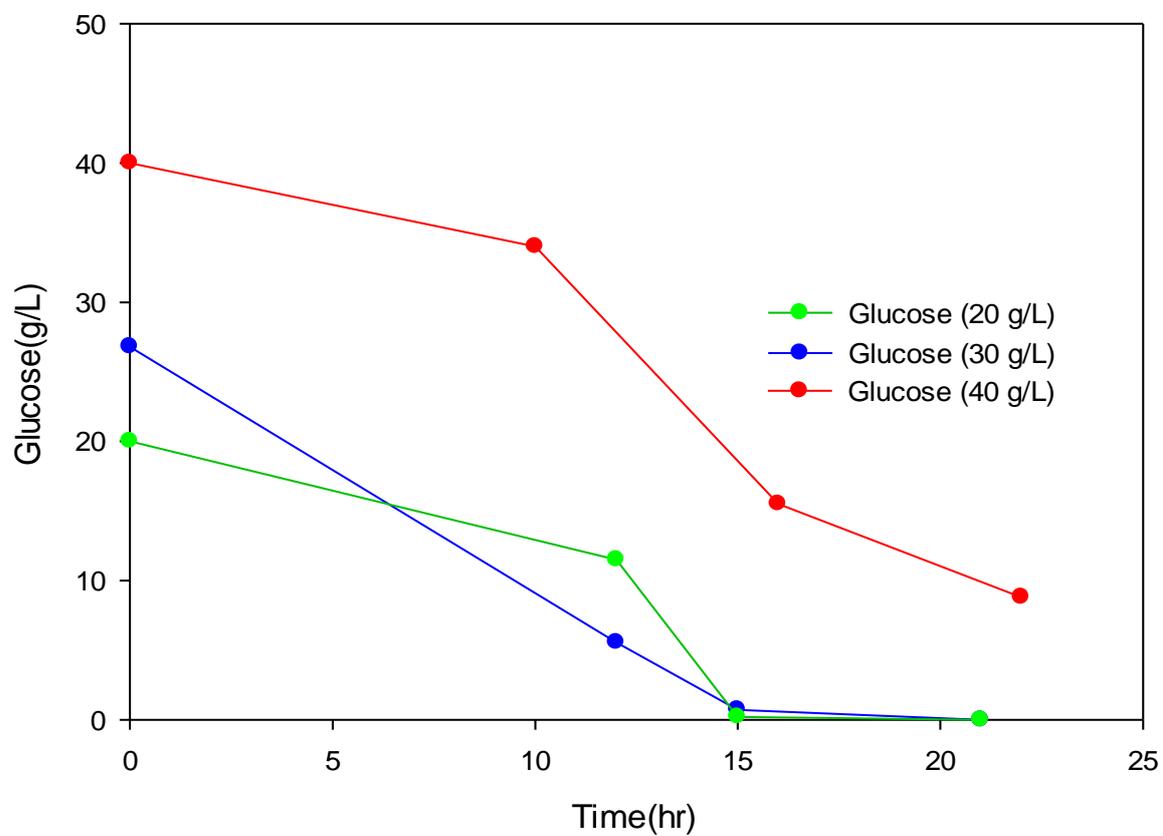


圖 4.6 不同初始濃度的葡萄糖消耗量比較

表 4.3 不同葡萄糖濃度與蛋白活性比較

	20 g/L	30 g/L	40 g/L
activity	2^{13}	2^{11}	2^{16}

4.1.3.2 探討不同濃度的碳源對菌量之影響(IPTG 誘導方法)

本次實驗探討不同濃度的碳源 (0, 20 and 40 g/L) 對菌體發酵產生長之影響。實驗結果如圖 4.7，以 20 g/L 比 40 g/L 的葡萄糖濃度具有較高的 OD 值，且在菌體生長期間 (0~16hr) 20 g/L 與 40 g/L 的葡萄糖濃度是都足夠來作為碳源的，如圖 4.8。0 g/L、20 g/L 與 40 g/L 蛋白活性都是一樣高的，此實驗可證明葡萄糖濃度對 IPTG 誘導菌株所產生蛋白活性沒有太大的影響，只會對 OD 值產生影響，如表 4.4。

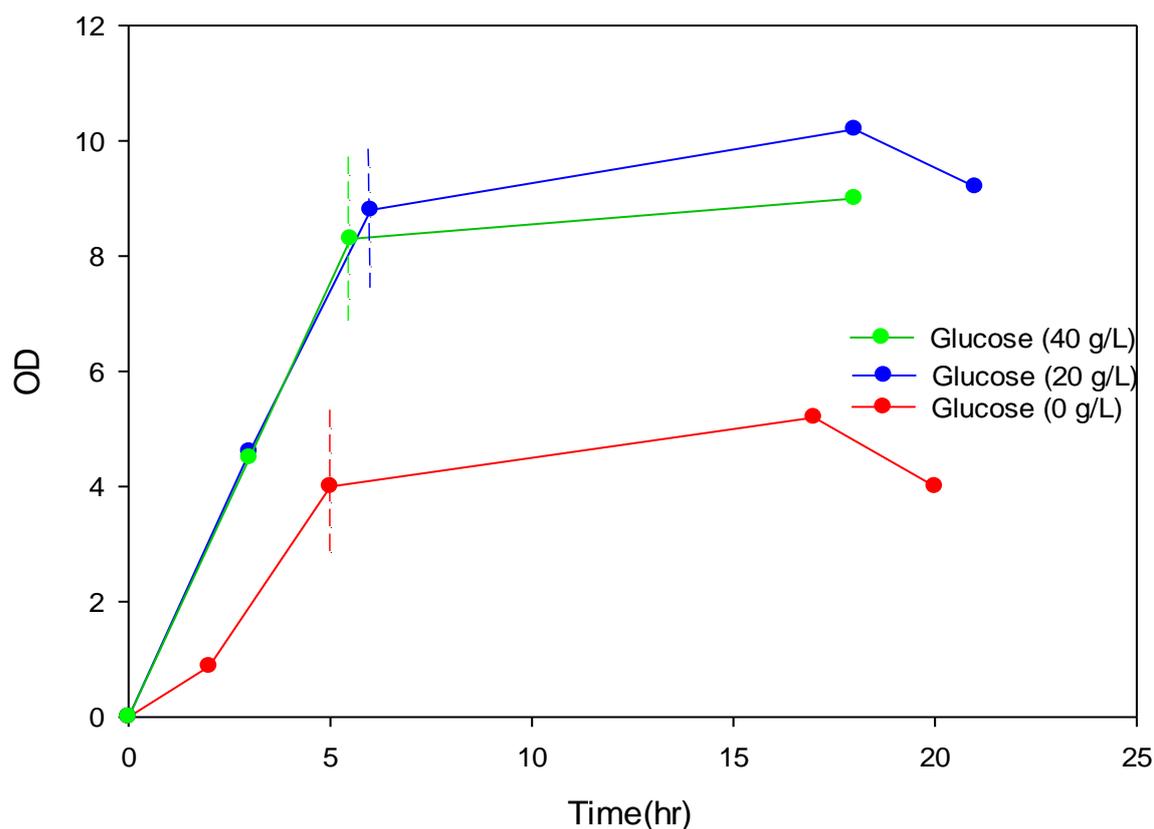


圖 4.7 不同葡萄糖濃度與菌量比較

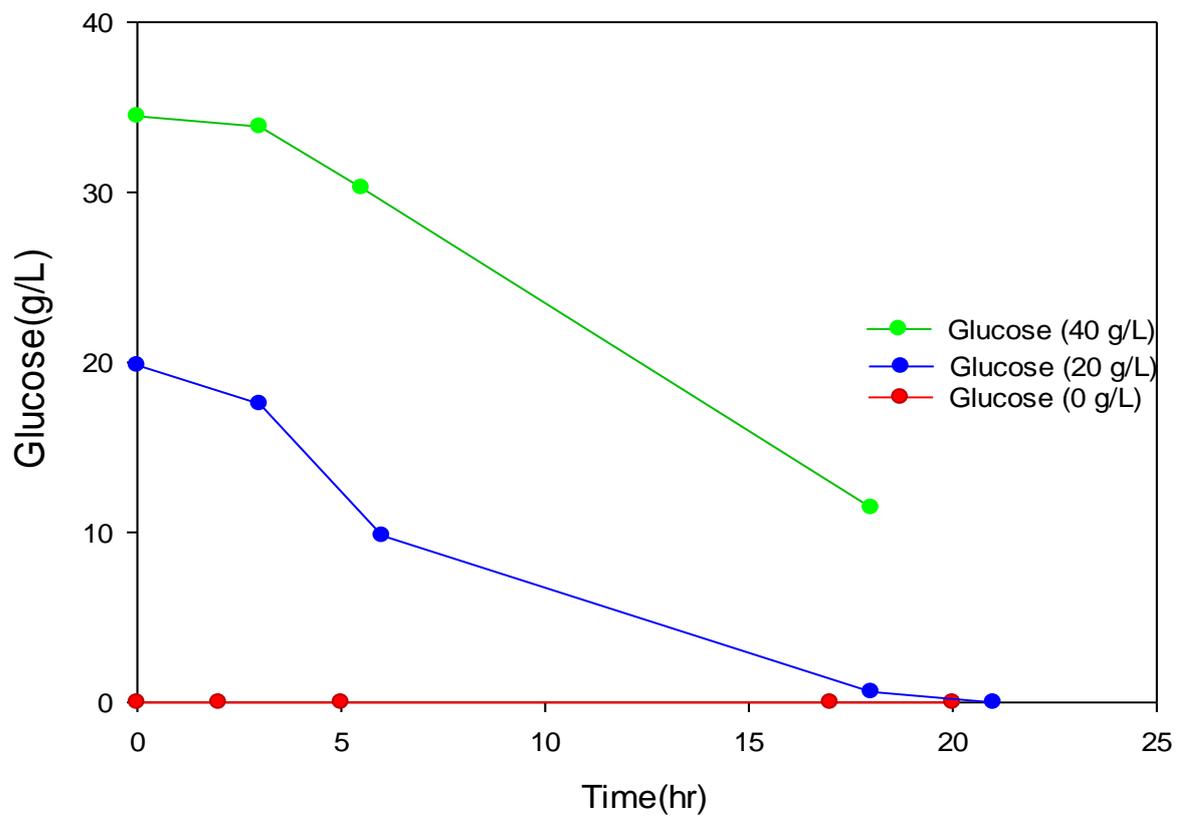


圖 4.8 不同初始濃度的葡萄糖消耗量比較

表 4.4 不同葡萄糖濃度與蛋白活性比較

	0 g/L	20 g/L	40 g/L
activity	2^{16}	2^{16}	2^{16}

4.1.4 探討批次添加葡萄糖對菌量之影響

批式發酵要培養出高密度的細胞濃度所需的營養源濃度也要提高，然而高濃度的營養源通常會抑制細胞的生長，使得細胞濃度無法提高。本次實驗探討批次添加葡萄糖（1 and 2 times）對菌體發酵產生長之影響，探討一次直接添加與一開始添加一半、誘導時再添加另一半葡萄糖對菌體發酵產生長之影響。實驗結果在菌體生長期間（0~10 hr）一次添加的葡萄糖消耗量會高於批次添加的數量，但菌體卻是批次有較高的 OD 值，如圖 4.9、4.10。蛋白活性在一次添加相對是比較高的，雖然批次培養情況下糖效率較高，但是菌體生長太好導致產蛋白效率變差，如表 4.5。

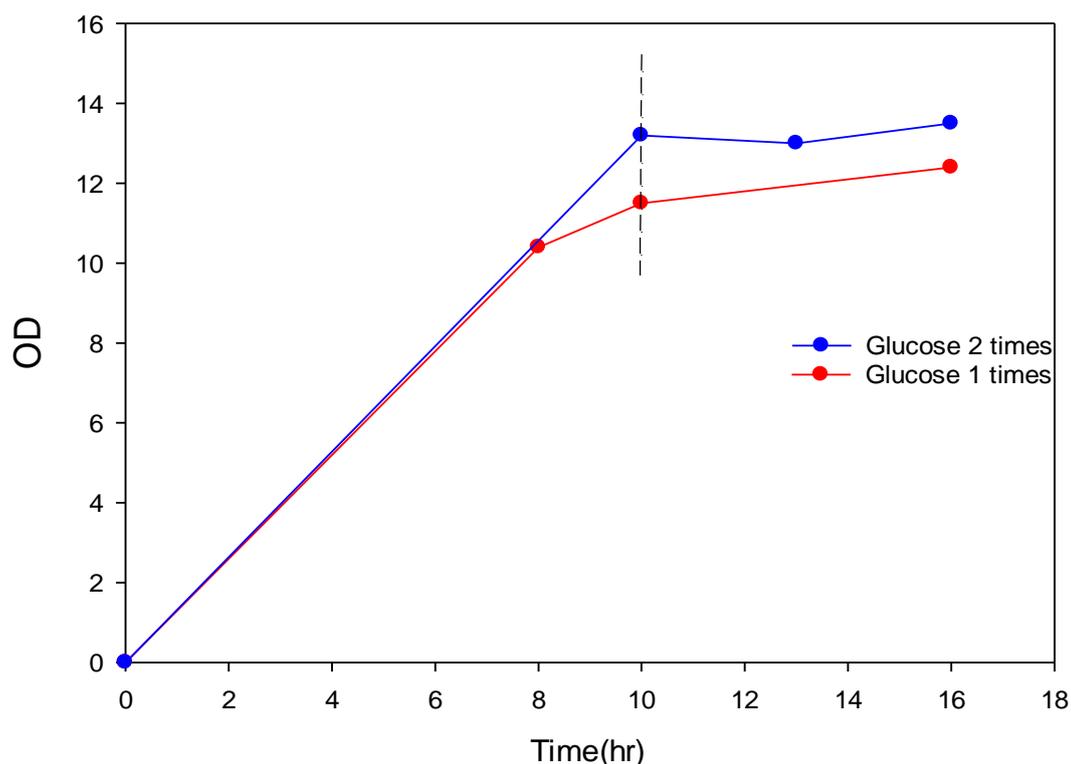


圖 4.9 批次添加葡萄糖與菌量比較

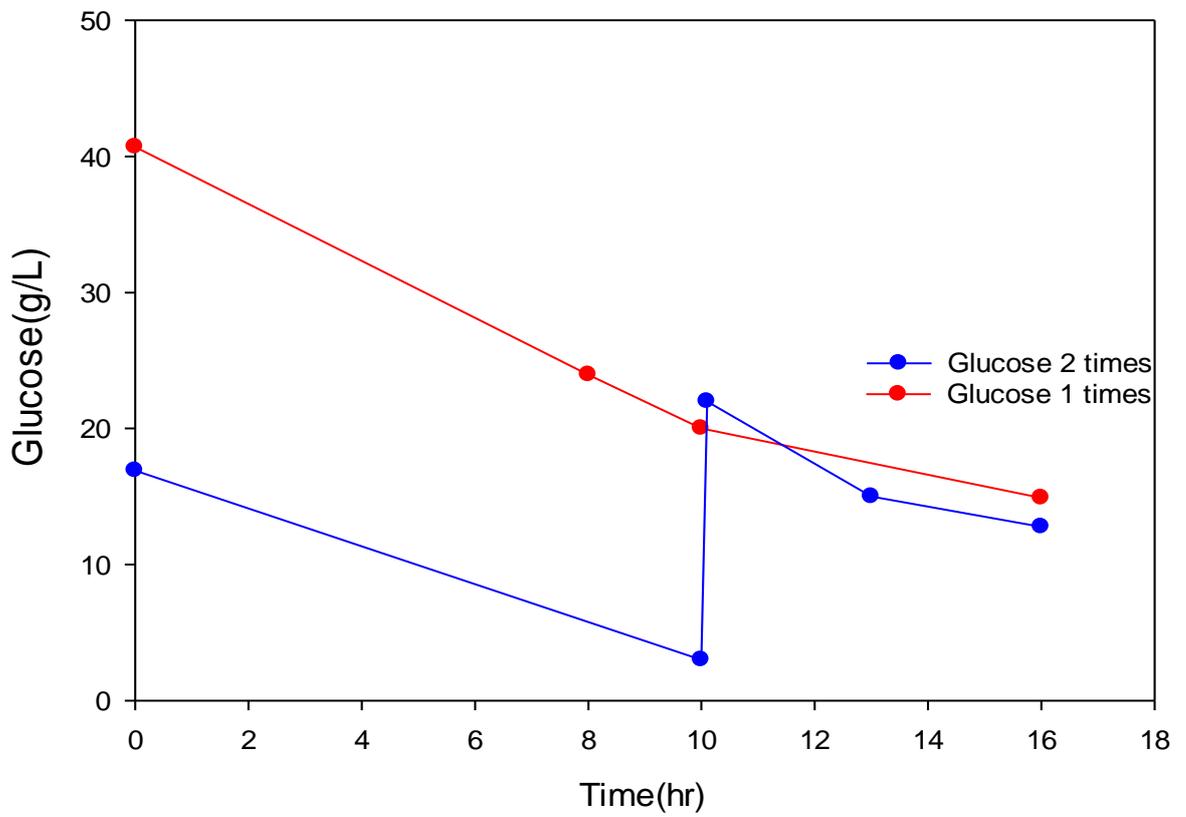


圖 4.10 批次添加葡萄糖的消耗量比較

表 4.5 批次添加葡萄糖與蛋白活性比較

	1 times	2 times
activity	2^{16}	2^{13}

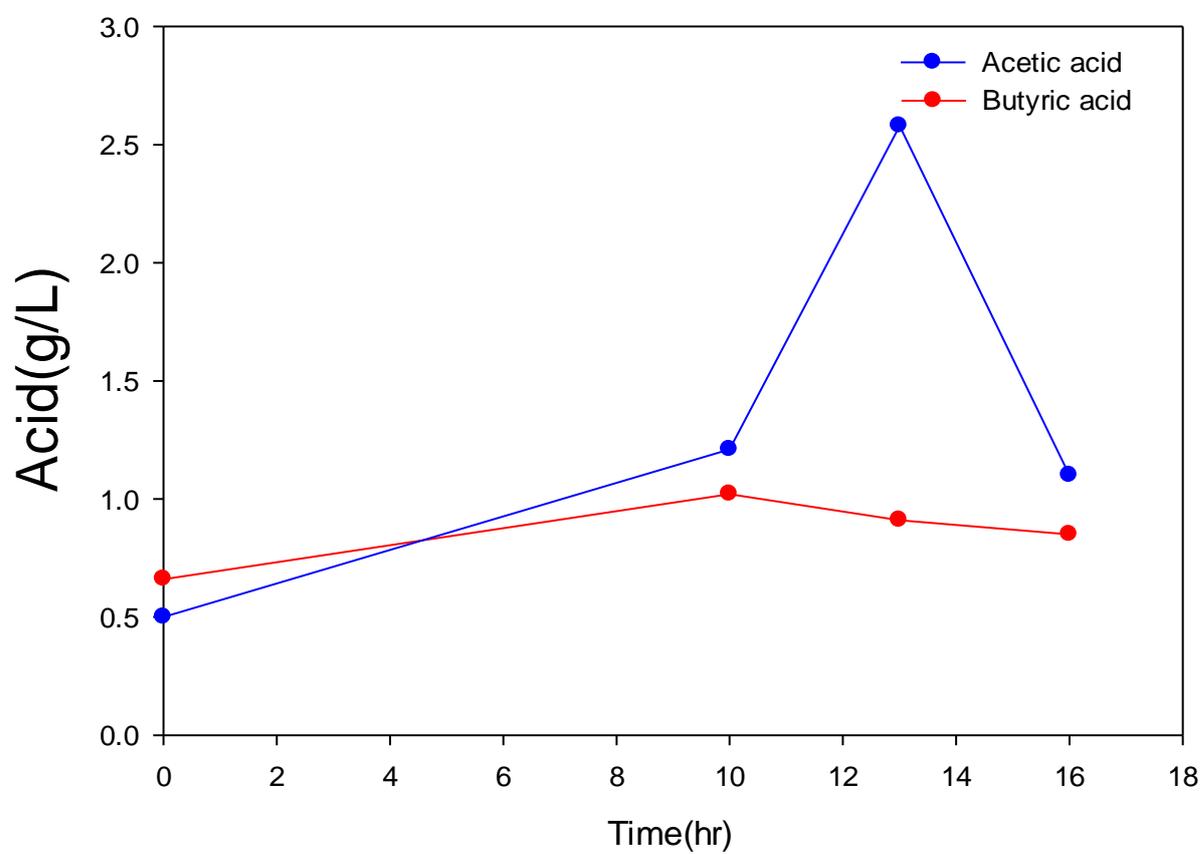


圖 4.11 乙酸與丁酸產生與時間比較



4.1.5 探討增加壓力對菌量之影響

由於氧氣在水中的溶解度很低，在一大氣壓、溫度為 25 °C 的水中飽和溶氧約只有 7 ppm 左右，溶氧量不足將會導致菌體生長速率受限，氣體經過壓力的壓縮後，氣體分子就變為小顆的氣泡提升了它在水中的滯留度，使得水中溶氧量比當時氣溫下飽和溶氧量還高，希望藉由增加壓力來提高氧氣在水中的溶氧量。本次實驗探討添加壓力 (1 and 1.5 kg/cm²) 對菌體發酵產生長之影響。實驗結果如圖 4.12、4.13，增加壓力能增加培養基中溶氧值，使菌體生長情況較好，以 1.5 kg/cm² 有較高的 OD 值，但效果並不是特別明顯。溶氧量越高糖解反應所產生的 ATP 能越多使得菌體生長更加快速，但菌體生長太好導致產蛋白效率變差，由表可觀察出菌體生長越好蛋白抑菌活性相對越低，如表 4.6。

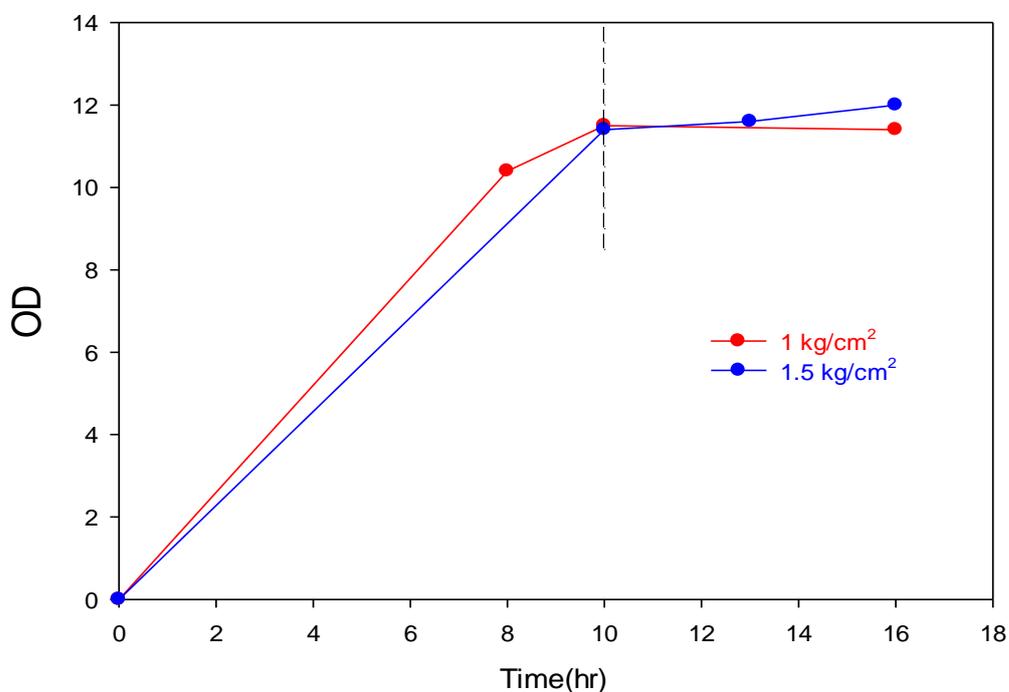


圖 4.12 增加壓力與菌量比較

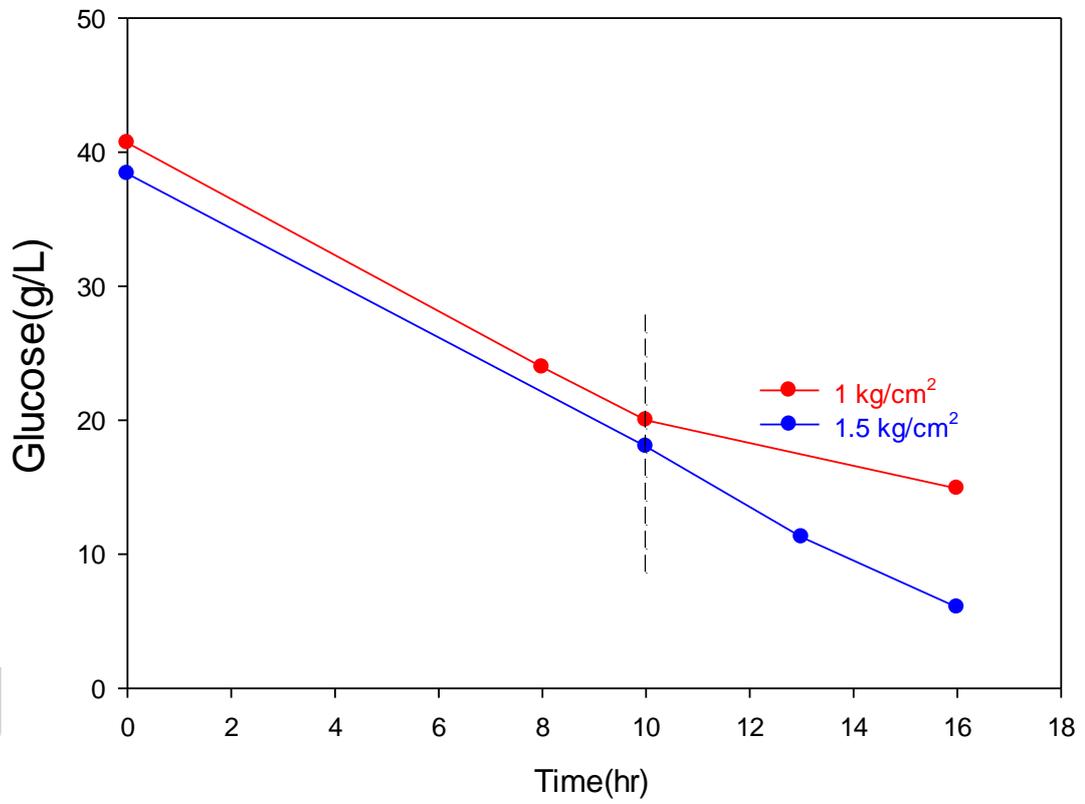


圖 4.13 增加壓力與葡萄糖消耗量比較

表 4.6 增加壓力與蛋白活性比較

	1 kg/cm ²	1.5 kg/cm ²
activity	2 ¹⁶	2 ¹³

4.2 懸浮菌液蛋白活性培養

4.2.1 探討不同誘導策略對活性之影響

4.2.1.1 探討不同誘導劑添加次數對活性之影響

在一次添加高濃度的誘導劑量下或許會破壞菌體與影響菌體的生長，在分次添加希望能減緩菌體受破壞的程度並不影響活性的生產。在本次實驗探討不同誘導劑添加次數（1, 2, and 3 次）對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.14、4.15，分成 3 次添加誘導劑在開始誘導後的 OD 值還會持續的上升，誘導劑濃度不夠高造成菌體持續生長影響蛋白生產，導致抑菌活性較差，如表 4.7，其餘 1 次添加與 2 次添加則是停止生長，但在考慮染菌風險與實驗的便利性 1 次添加誘導劑的情況下造成風險較小。

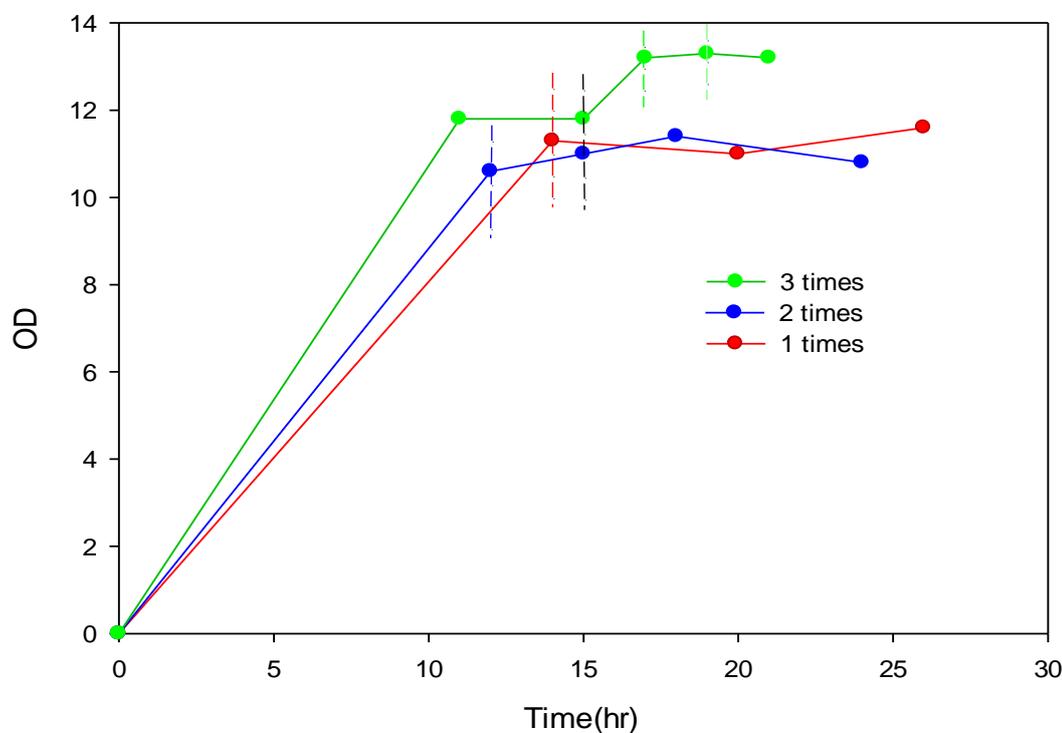


圖 4.14 不同誘導劑添加次數與菌量比較

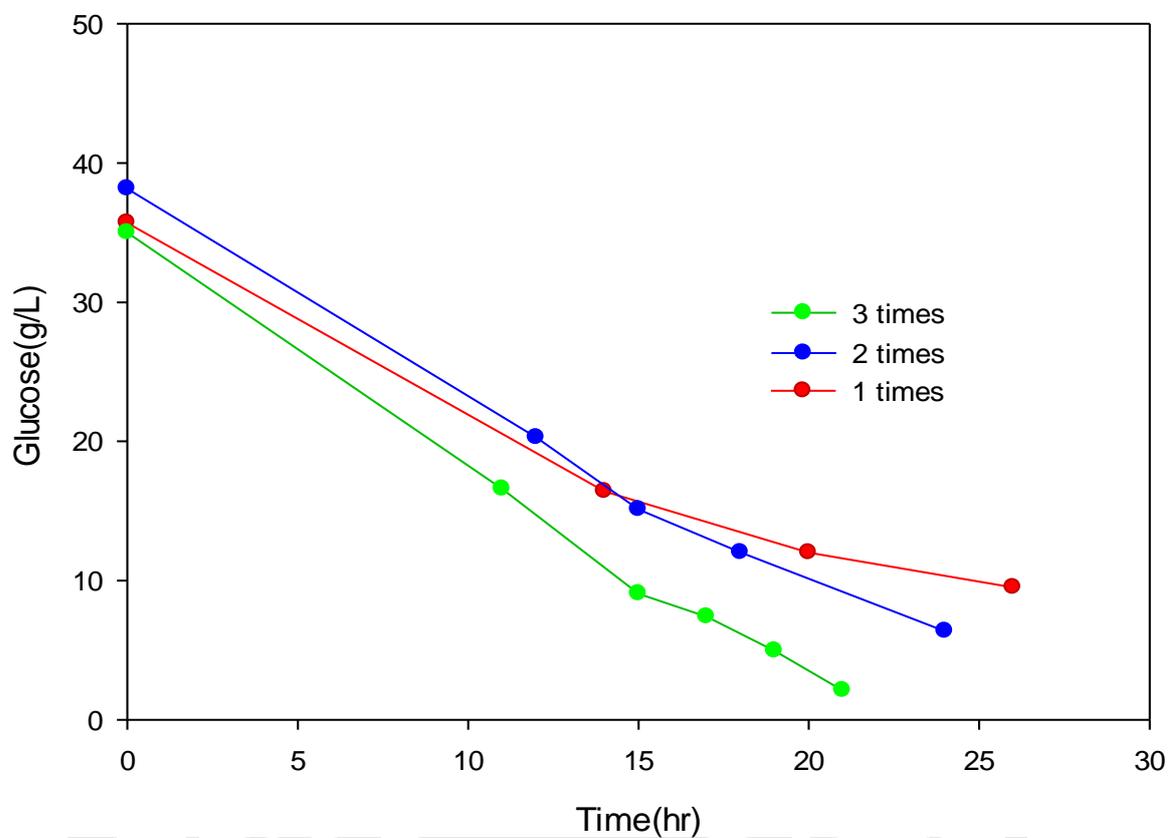


圖 4.15 不同誘導劑添加次數與葡萄糖消耗量比較

表 4.7 不同誘導劑添加次數與蛋白活性比較

	3 times	2 times	1 times
activity	2^{11}	2^{15}	2^{15}

4.2.1.2 探討不同誘導劑添加濃度對活性之影響

在參考的文獻中改變誘導劑添加濃度，為了提升蛋白生產效率進而提高誘導劑濃度，為了降低減緩菌體受破壞的程度並不影響活性的生產進而降低誘導劑添加量。本次實驗探討不同誘導劑添加濃度（1/2, 2, and 正常倍數(0.2 mg/L)）對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.16、4.17，菌體在誘導後 6 hr 的 OD 值其實差不多，誘導劑添加濃度多寡不會影響菌體生長，但會影響最後產生抑菌蛋白的活性，如表 4.8。

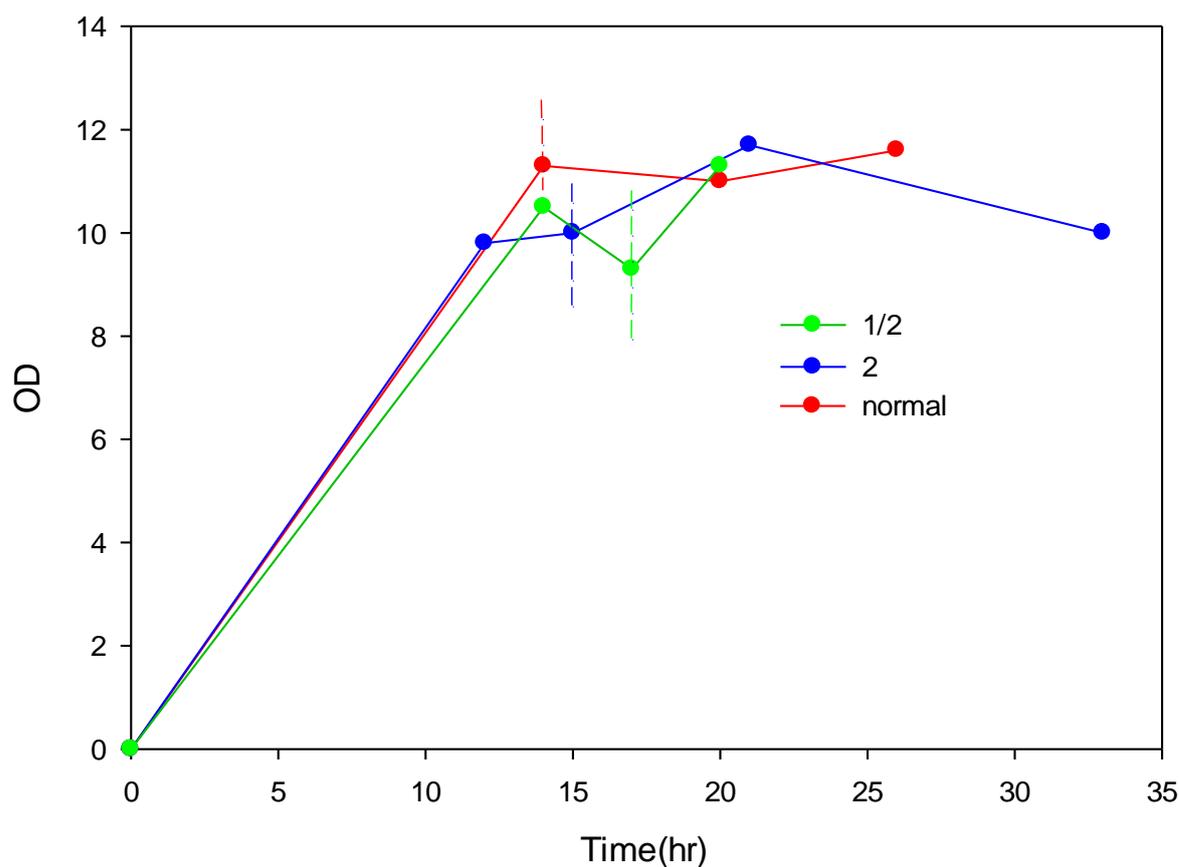


圖 4.16 不同誘導劑添加濃度與菌量比較

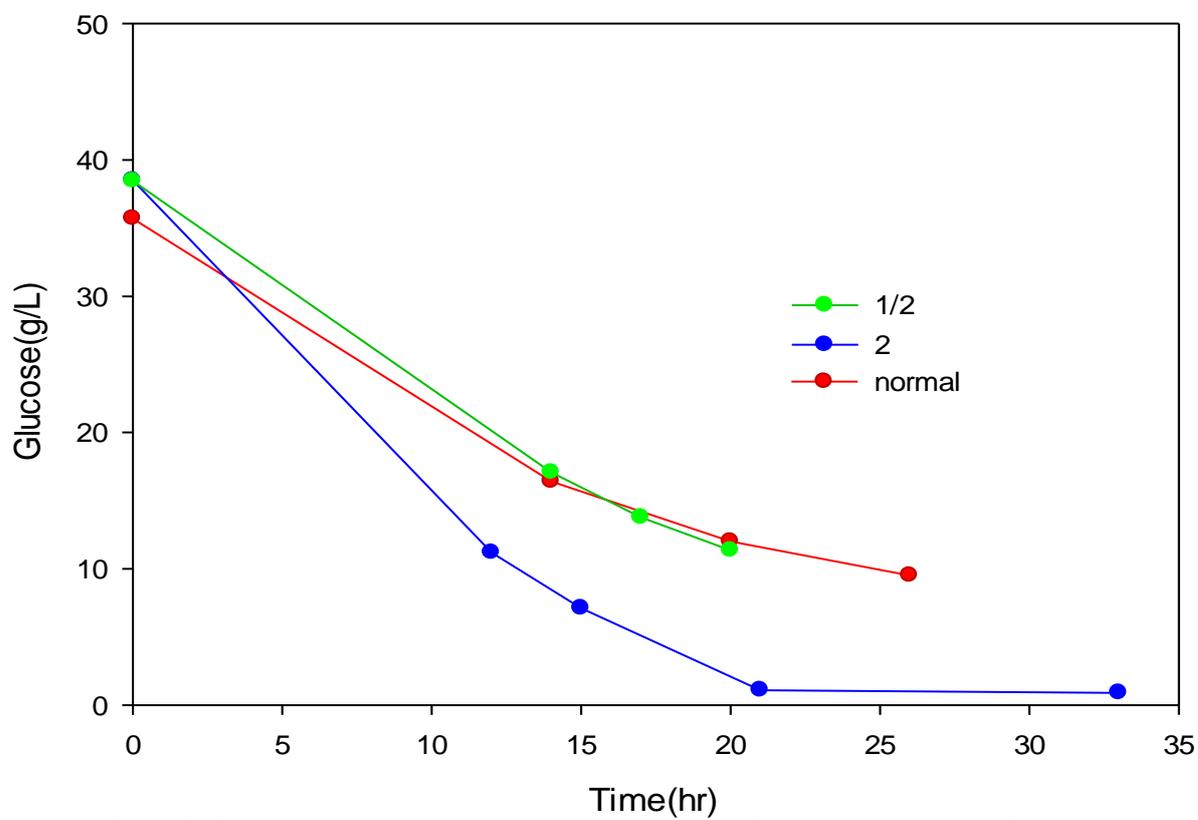


圖 4.17 不同誘導劑添加濃度與葡萄糖消耗量比較

表 4.8 不同誘導劑添加濃度與蛋白活性比較

	1/2	2	normal
activity	2^{10}	2^{10}	2^{15}

4.2.2 探討不同溶氧策略對活性之影響

在大腸桿菌誘導時需要改變其生長條件，當水中溶氧值高過設定值會降低轉速並且降低溶氧量使得菌體 ATP 生產減緩，菌體生長反應受限制才能更有效的進行誘導反應去生產所需蛋白。本次實驗探討誘導後不同溶氧策略 (DO = 5 % and 30 %) 對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.18、4.19，在誘導後在 30 % 時雖然有著比 5 % 較高的 OD，因為溶氧量足夠使得菌體可以進行糖解反應製造更多 ATP 來持續生長，在誘導後在溶氧不足的情況下 OD 值會開始慢慢下降，但是 5 % 抑菌蛋白活性是比較好的，如表 4.9，如果在誘導後菌體持續生長反而會影響蛋白的生產，所以需要降低溶氧使菌體不在成長而去進行誘導反應。

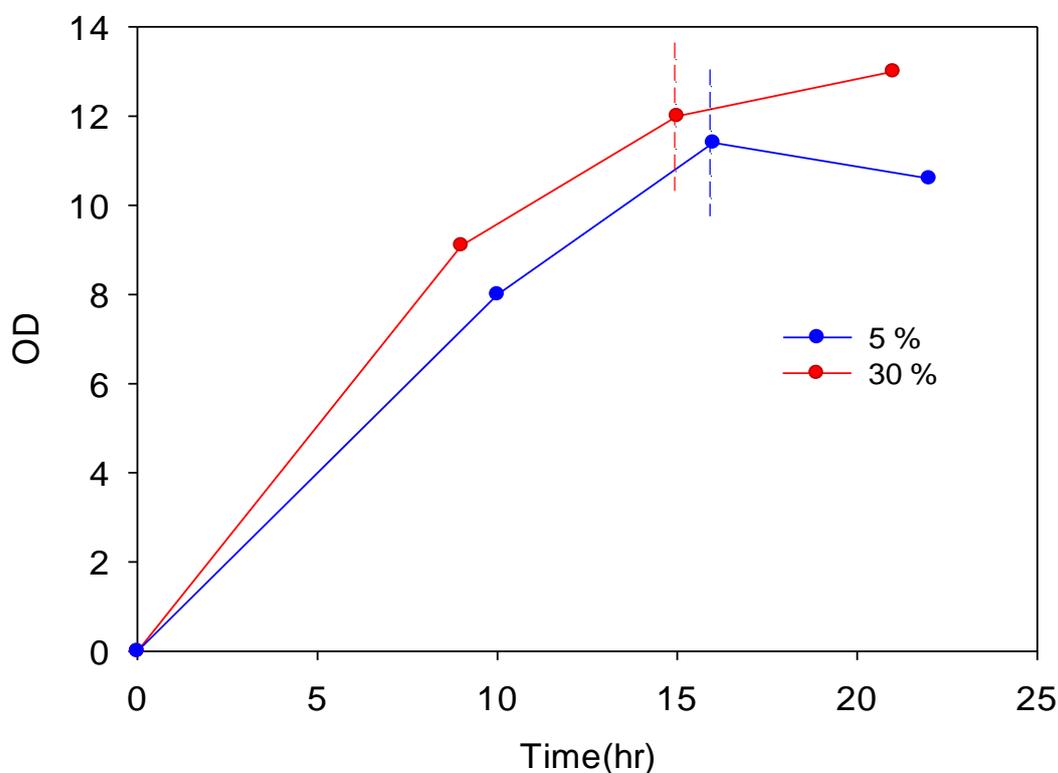


圖 4.18 不同溶氧與菌量比較

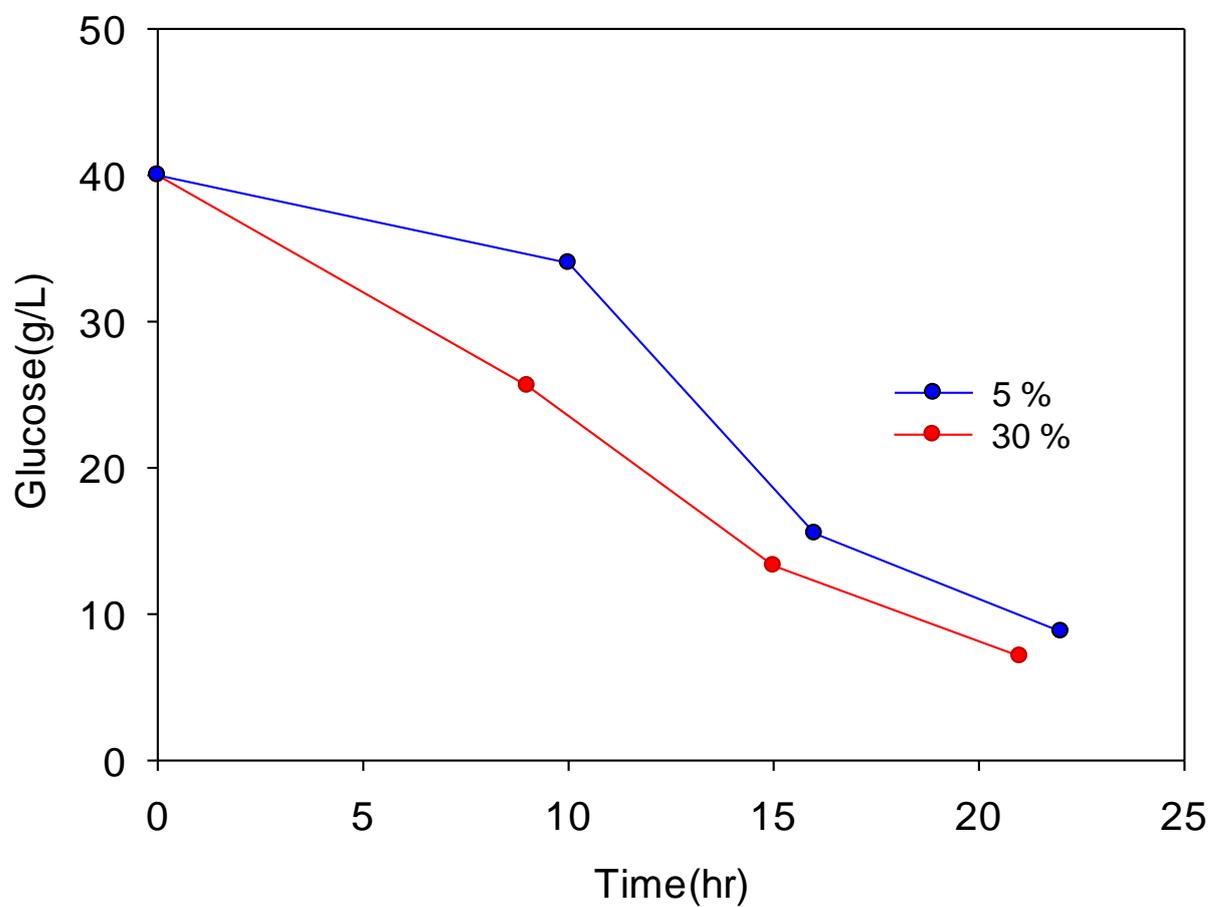


圖 4.19 不同溶氧與葡萄糖消耗量比較

表 4.9 不同溶氧與蛋白活性比較

	5 %	30 %
activity	2^{16}	2^{10}

4.2.3 探討不同溫度對活性之影響

在大腸桿菌誘導時需要改變其生長條件，較高的溫度會造成細胞表現速度過快，進而容易產生結構不完整的蛋白質，所以降低溫度能更有效的進行誘導反應去生產所需蛋白。本次實驗探討誘導後不同溫度（26, 30 and 37 °C）對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.20、4.21，因為在 26 °C 不適合菌體生長的環境下生長情形會受到阻礙，導致菌體生長速度減緩 OD 值會開始慢慢下降，相對的在誘導後在 37 °C 時會有著比較高的 OD，37 °C 雖然是裡面 OD 值最高的但是活性不是最好的如，表 4.10，如果在誘導後菌體持續生長反而會影響蛋白的生產，所以需要降低溫度使菌體不在成長而去進行誘導反應。

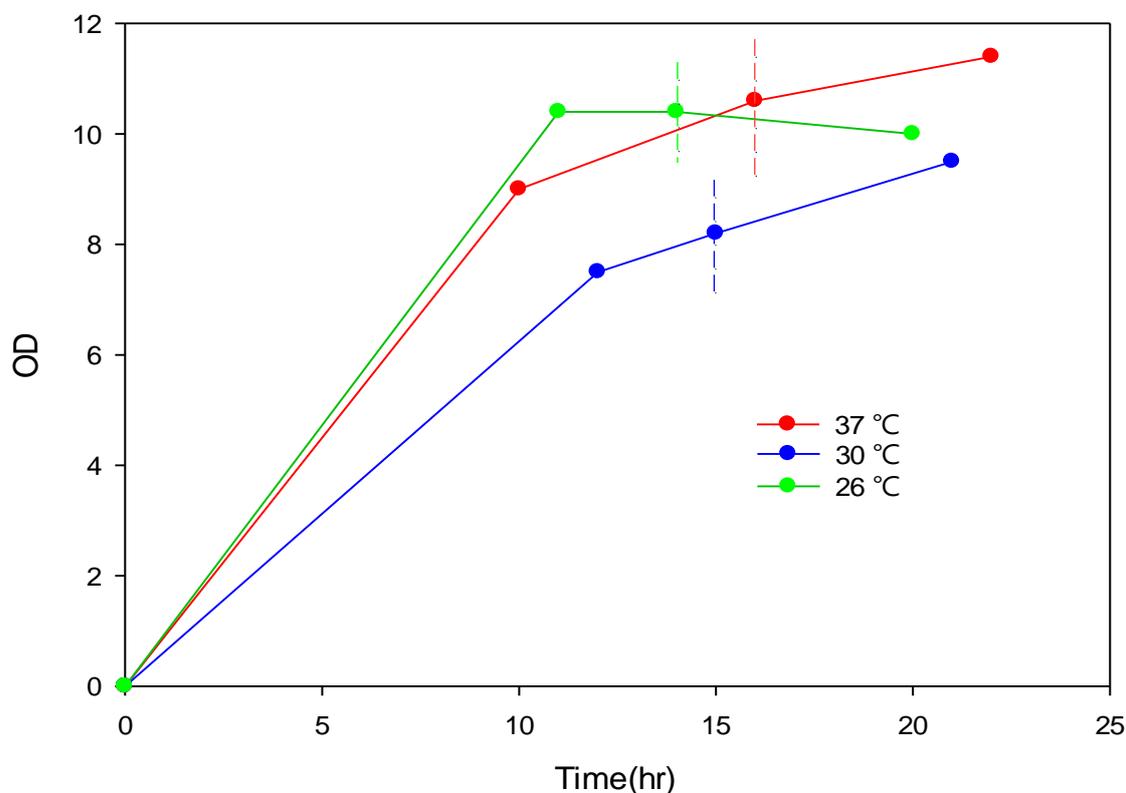


圖 4.20 不同溫度與菌量比較

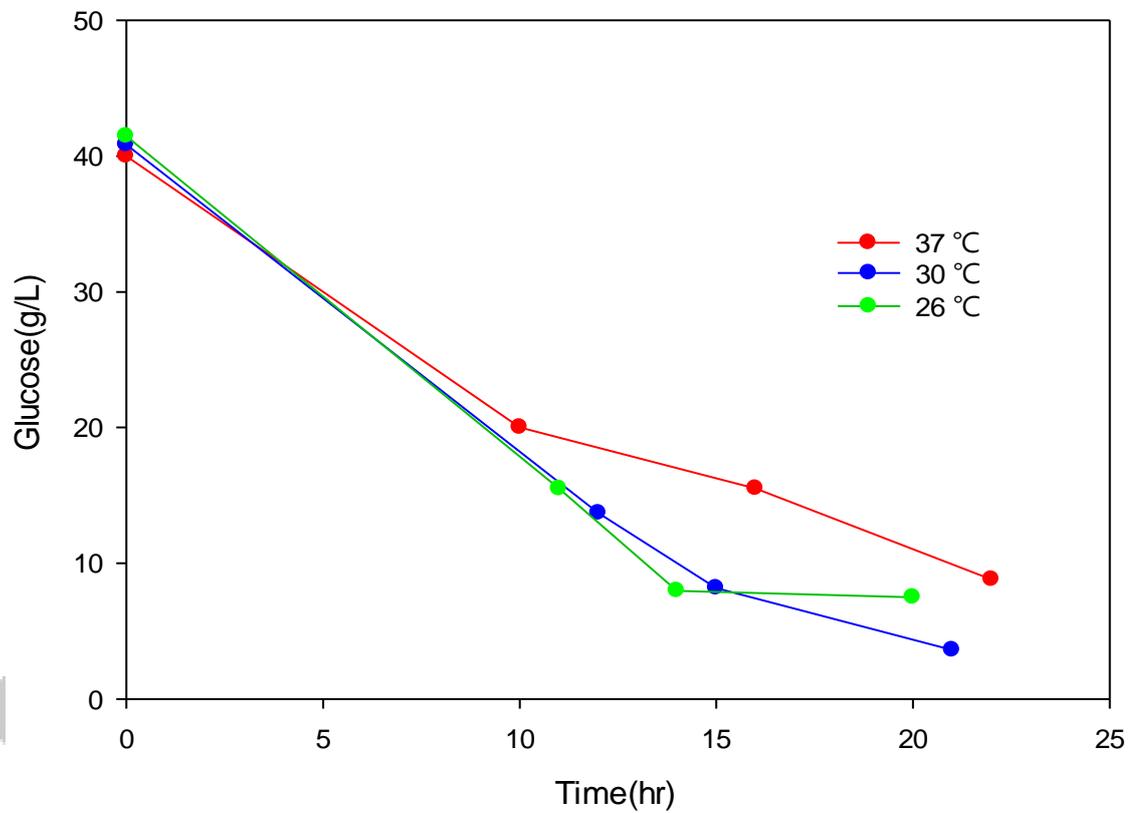


圖 4.21 不同溫度與菌量比較

表 4.10 不同溫度與蛋白活性比較

	37 °C	30 °C	26 °C
activity	2^{13}	2^{11}	2^{16}

4.2.4 探討不同酸鹼值對活性之影響

4.2.4.1 探討在酸性培養下對活性之影響

在大腸桿菌誘導時需要改變其生長條件，改變培養基的環境條件能使得菌體生長減緩，菌體生長反應受限制才能更有效的進行誘導反應去生產所需蛋白。本次實驗探討誘導後改變 pH 值在酸性環境培養下 (pH=5, 6, and 7) 對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.22、4.23，大部分菌體都能在中性環境下生長，誘導後 pH 值在 5、6 的情況下菌體還能穩定持續生長，但過酸的環境下會影響蛋白的活性，當環境越酸蛋白抑菌效果會變的越弱，在 pH 值 7 的情況下還是最適合菌體生長與生產蛋白，如表 4.11。

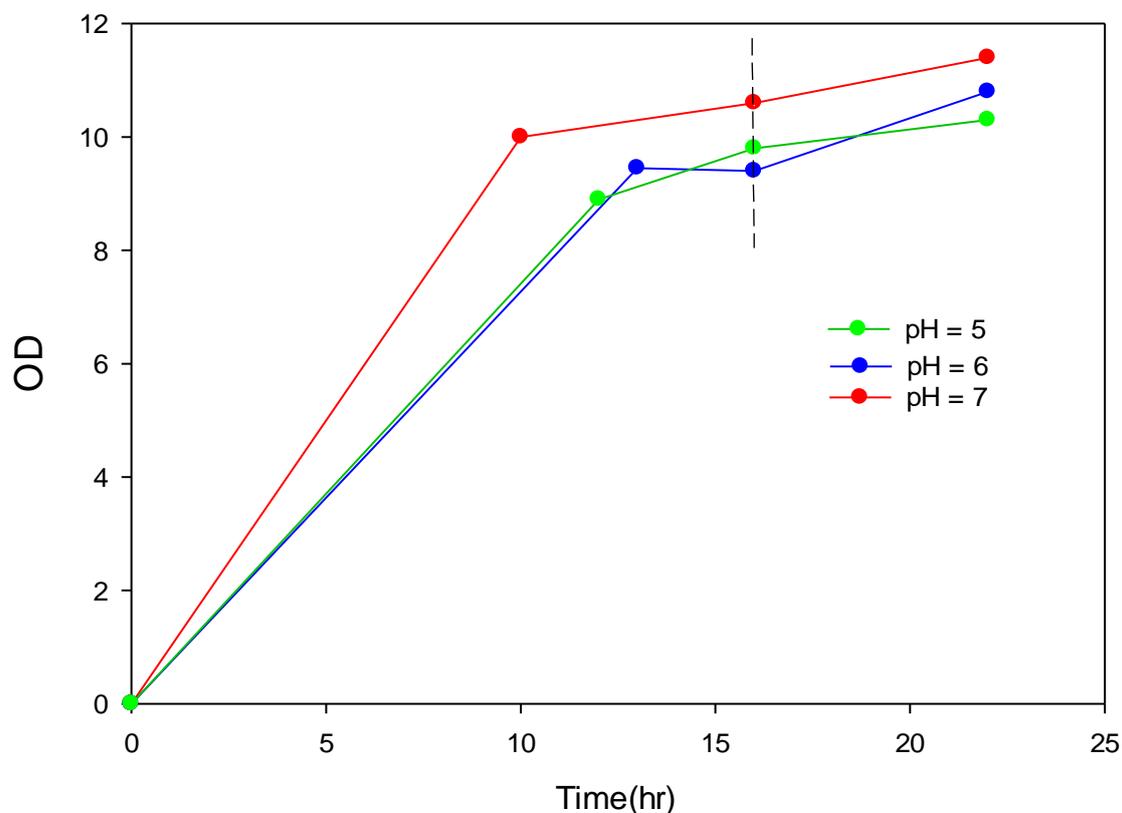


圖 4.22 不同酸鹼值與菌量比較

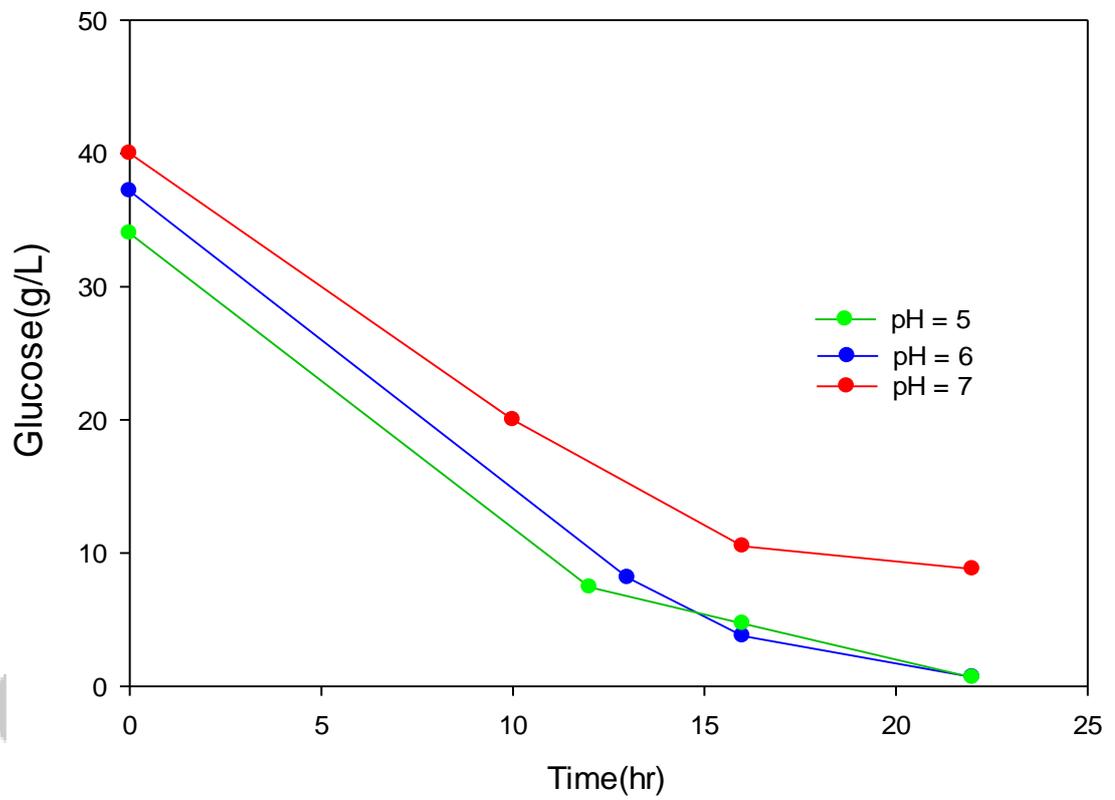


圖 4.23 不同酸鹼值與葡萄糖消耗量比較

表 4.11 不同酸鹼值與蛋白活性比較

	pH=5	pH=6	pH=7
activity	2^5	2^9	2^{16}

4.2.4.2 探討在鹼性培養下對活性之影響

在大腸桿菌誘導時需要改變其生長條件，改變培養基的環境條件能使得菌體生長減緩，菌體生長反應受限制才能更有效的進行誘導反應去生產所需蛋白。本次實驗探討誘導後改變 pH 值在鹼性培養下 (pH=9, 8, and 7) 對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.24、4.25，大部分菌體都能在中性環境下生長，誘導後 pH 值在 8 的情況下菌體還能穩定持續生長，但 pH 值在 9 的情況下菌體開始大量死亡無法在生長，過鹼的環境下會影響蛋白的活性，當環境越鹼蛋白抑菌效果會變的越弱，菌體也會逐漸死亡，在 pH 值 7 的情況下還是最適合菌體生長與生產蛋白，如表 4.12。

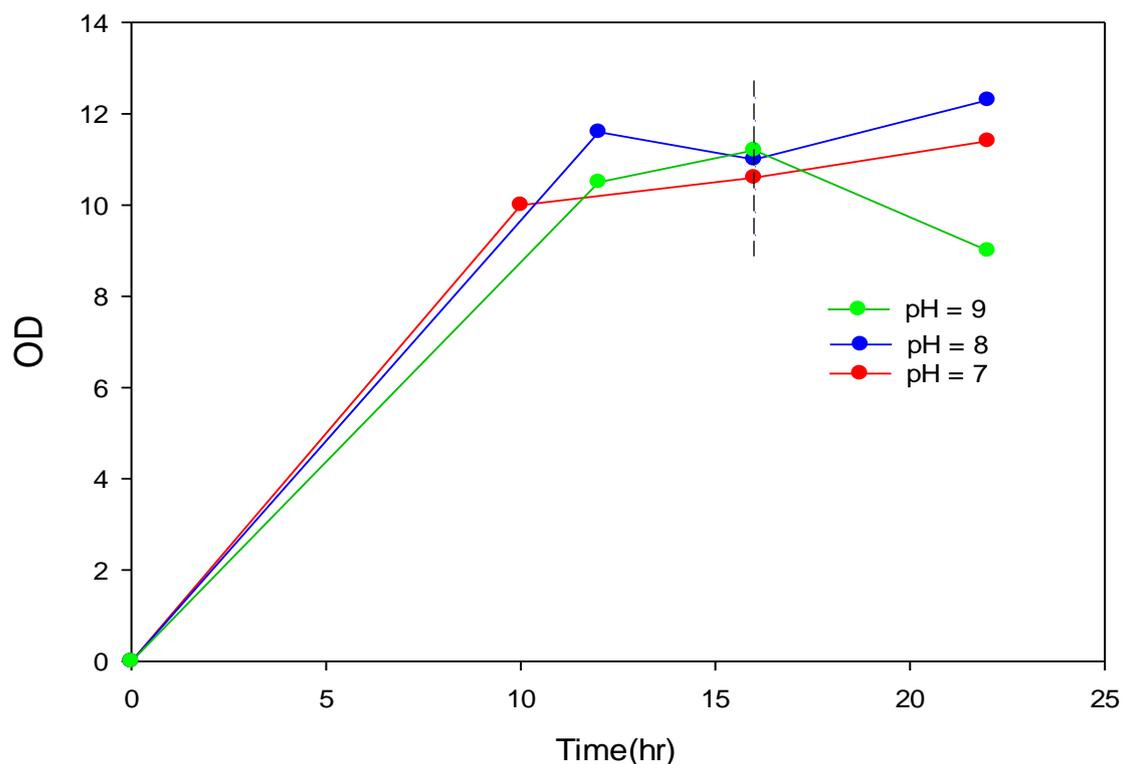


圖 4.24 不同酸鹼值與菌量比較

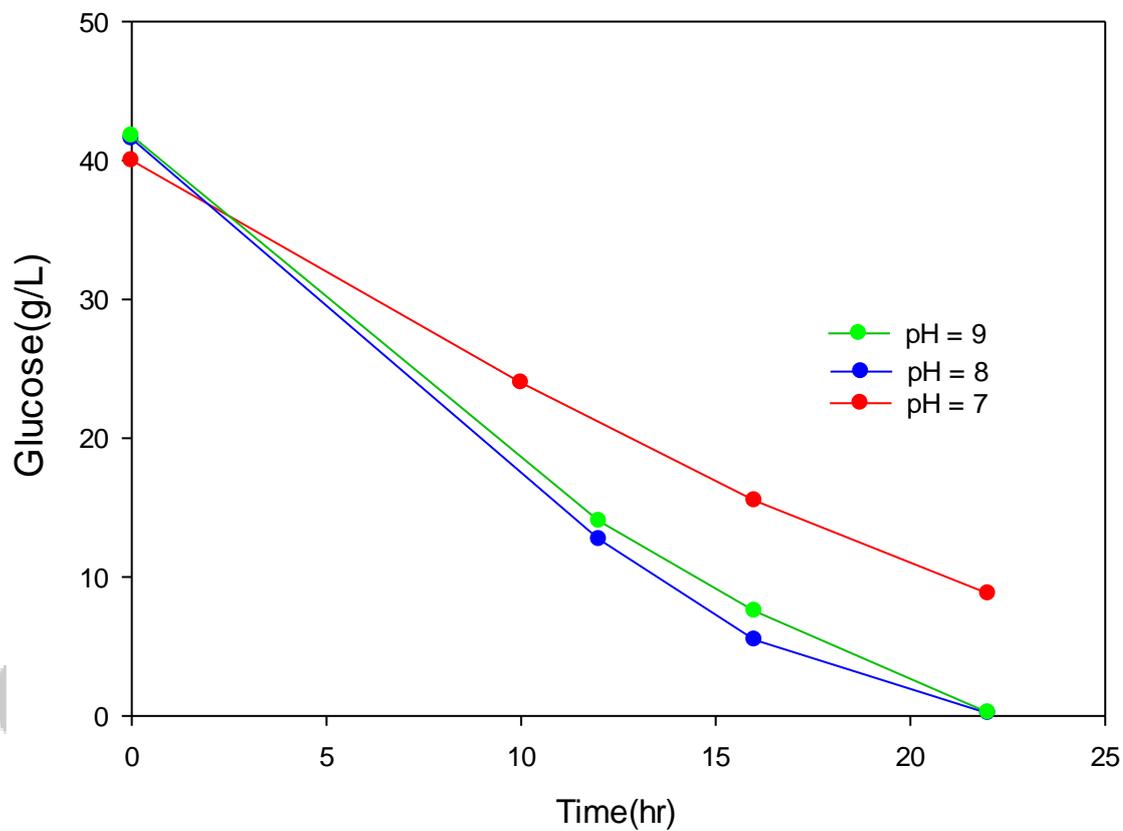


圖 4.25 不同酸鹼值與葡萄糖消耗量比較

表 4.12 不同酸鹼值與蛋白活性比較

	pH=9	pH=8	pH=7
activity	2^9	2^{10}	2^{16}

4.2.5 探討不同誘導時間對活性之影響

大部分的菌體都希望能在菌體最健康、成長曲線趨近平緩前幾小時進行誘導，找出此菌體最好的誘導劑加入時間，希望能幫我們製造活性最好與最多最健康的蛋白。本次實驗探討不同誘導時間 (8, 12 and 16 hr) 對生產蛋白活性之影響。實驗結果如圖 4.26、4.27，大部分的菌體都希望能在菌體最健康、成長曲線趨近平緩前幾小時進行誘導，能幫我們製造活性最好與最多的蛋白，當越早進行誘導菌體就生長的越好，但體菌本身過於進行生長反應而降低產蛋白的反應，使得蛋白抑菌活性較低，如表 4.13。

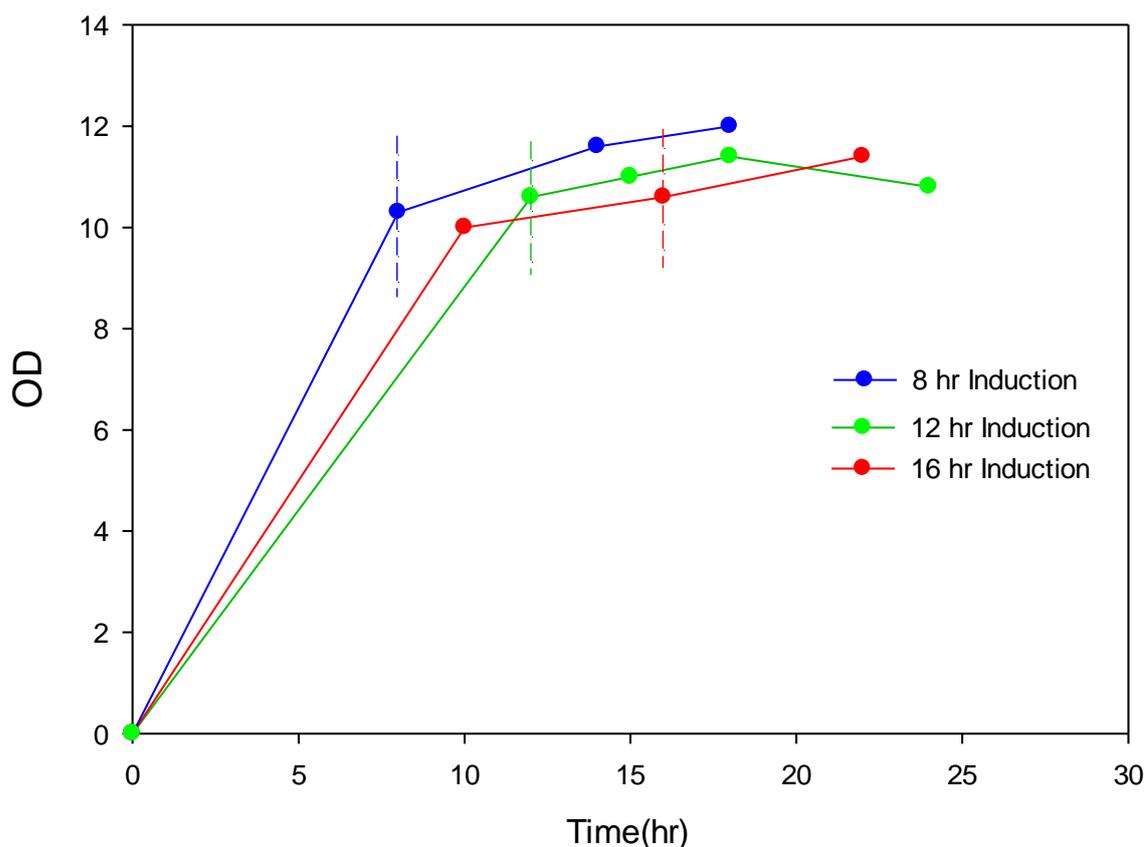


圖 4.26 不同誘導時間與菌量比較

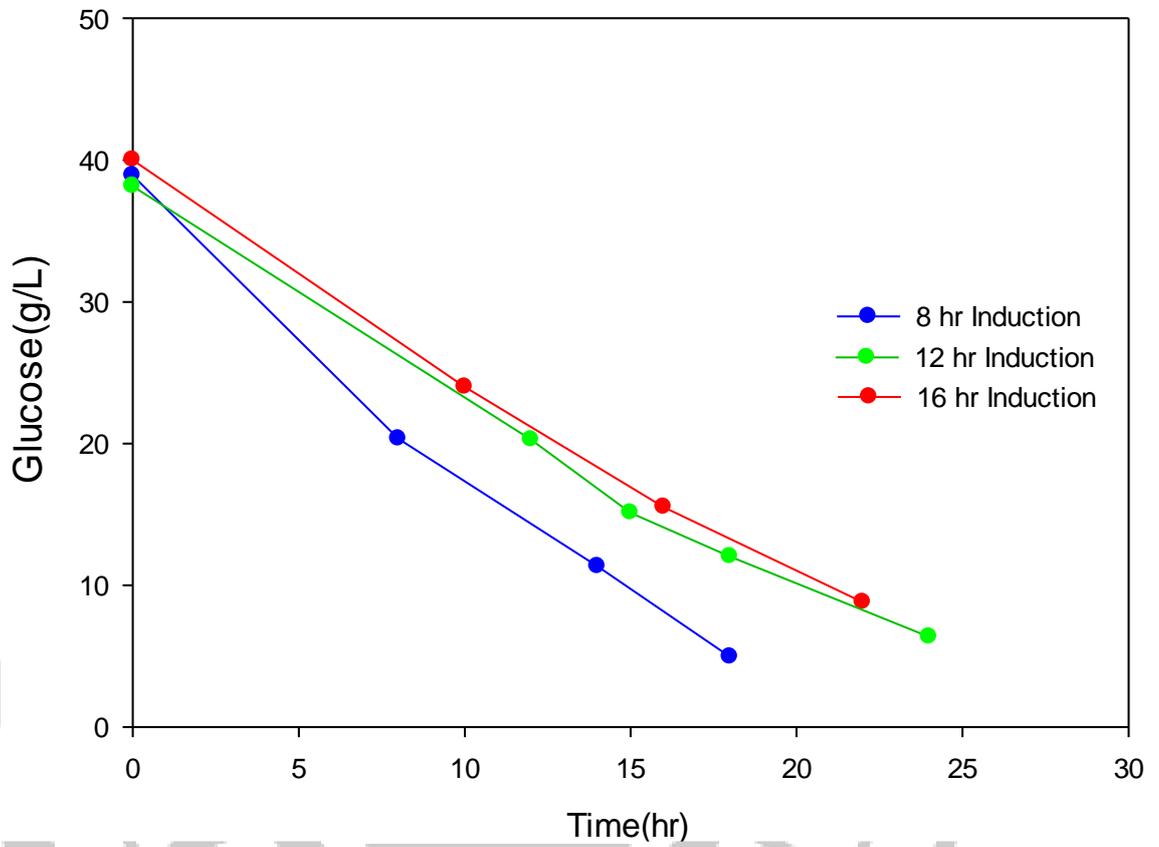


圖 4.27 不同誘導時間與葡萄糖消耗量比較

表 4.13 不同誘導時間與蛋白活性比較

	8 hr	12 hr	16 hr
activity	2^{14}	2^{15}	2^{16}

4.3 可溶性蛋白分析

本次實驗在探討誘導後是否有存在我們所需要蛋白，由(1,2)可明顯看出誘導後在 72 (kDa)下(2)有出現我們所需蛋白，表示經誘導之後會生產有抑菌效果的蛋白，由(1,2,3,4)可看出此菌需要經由破菌才能取得我們所需蛋白，將(5)破菌後的破菌液(6)能明顯的觀察的出蛋白主要都製造於菌體內少部分在外產生。

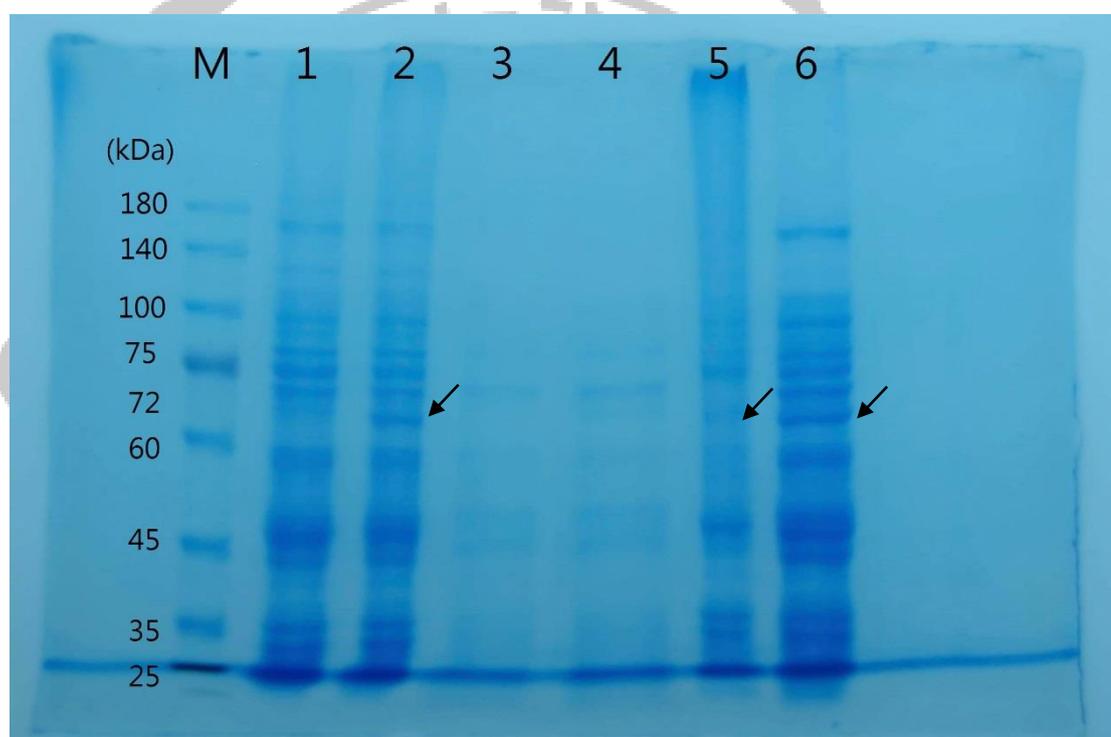


圖 4.28 SDS-PAGE 圖

M:maker

1:表達前全蛋白

2:表達後全蛋白

3:表達前上清液

4:表達後上清液

5:表達後破菌 pellet

6:表達後破菌液

4.4 培養基因重組大腸桿菌之發酵實驗與文獻比較

表 4.14 培養基因重組大腸桿菌之發酵實驗與文獻比較

Fermentation Strategy Feeding volume	Carobn source	Aeration	rpm	OD	Reference	Product
Batch 5 L stirred tank	Glucose 20 g/L	1 vvm	100	1.355	東海碩士論文 高國倫 2006	RPLKPW 胜肽
Batch 5 L stirred tank	Sucrose 20 g/L	1 vvm	100	2.14	東海碩士論文 高國倫 2006	RPLKPW 胜肽
Batch 5 L stirred tank	Fructose 20 g/L	1 vvm	100	1.74	東海碩士論文 高國倫 2006	RPLKPW 胜肽
Batch 5 L stirred tank	Glucose 40 g/L	1.5vvm	550	12.2	This study	抑菌蛋白
Fed-batch 5 L stirred tank	Glucose 20 g/L	1 vvm	800	10.7	台科碩士論文 盧三吉 2004	水母 冷光酶
Fed-batch 5 L stirred tank	Glucose 40 g/L	1.5vvm	550	13.7	This study	抑菌蛋白
Continuous 5 L stirred tank	Glucose 750 g/L	1 vvm	800	35	台科碩士論文 盧三吉 2004	水母 冷光酶
Continuous 5 L stirred tank	Glucose 226.8 g/L	1 vvm	500	47.8	Electronic Journal of Biotechnology 2019	蘇氨酸
Batch 2 L stirred tank	Cellobiose 10 g/L	-	150	0.16	[29]	D-乳酸
Continuous 2 L stirred tank	Cellobiose 10 g/L	-	150	0.68	[29]	D-乳酸

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究探討利用 5 L 攪拌式發酵槽培養基因重組大腸桿菌改變不同培養條件來觀察生長情形，主要分成兩大部分進行討論：(1)懸浮菌液培養，(2)懸浮菌液蛋白活性培養。從基礎碳/氮源、培養溫度，接種量以及溶氧量、培養溫度等對於大腸桿菌生長及大腸桿菌素產率與活性的影響，以下整理列出幾點結論：

1. 因為氧氣對水的溶解性不高，所以增加攪拌速度及壓力增加培養基中溶氧值，溶氧量越高糖解反應所產生的 ATP 能越多，所以能使菌體生長情況變得更好，但菌體如果注重生長會導致菌體誘導反應效率變差，蛋白產率變少抑菌活性相對越低。
2. 不同接菌量 (1 %, 5 %, and 10 %) 中，接菌量越低雖然生長的速度越慢，但能持續生長的時間更長所以能夠生產更多的菌體。
3. 在批次添加葡萄糖下 (1 and 2 times)，在菌體生長期間 (0~10 hr) 一次添加的葡萄糖消耗量會高於批次添加的數量，但菌體卻是批次有較高的 OD 值，批次培養情況下糖效率較高，也可以降低發酵的成本。
4. 在誘導時分次添加誘導劑情況下，生產抑菌蛋白活性不會變高，反而會增加染菌風險與時間成本。增加誘導劑濃度生產抑菌蛋白活性不會變高，但過量誘導劑可能會傷害菌體導致死亡進而降低活性，少量誘導劑會因為濃度太低，菌體持續生長而減緩誘導反應，因此以一次添加誘導劑與誘導劑濃度維持濃度效果為佳。

5. 在誘導時需要改變大腸桿菌的生長條件，使得菌體生長反應受限制才能有效的進行誘導反應去生產所需蛋白。降低溶氧、溫度能有效的抑制菌體生長使菌體生產抑菌蛋白，改變 pH 值雖然可以抑制菌體生長，但是菌體本身會被破壞，過酸過鹼環境下也會影響活性所以是較不可行的辦法。

6. 在成長曲線趨近平緩前幾小時進行誘導，能獲得活性最好與最多量蛋白，但如果太早進行誘導，也會降低生產蛋白的反應使得蛋白抑菌活性較低。



5.2 未來展望

對於重組基因大腸桿菌在發酵過程方面，對培養條件已有全面性發展，若能結合本實驗最佳的菌種培養方法及蛋白活性培養方法，若能繼續研究變更不同培養基並有更高密度菌量，不但能降低生產所需成本也能有更高的產量，以及誘導後製造抑菌蛋白穩定性，在工業上是相當不利的因素，並對蛋白活性有更多深入影響性的探討，必定能使其發展更向前邁進。



參考文獻

1. 鄭晏宜, 1. 下痢仔豬病原大腸桿菌之鑑定 2. 大腸桿菌素相對應之免疫蛋白在大腸桿菌中的角色. 國立中興大學分子生物學研究所博士論文, 2017.
2. Sun, Y. and S.W. Kim, *Intestinal challenge with enterotoxigenic Escherichia coli in pigs, and nutritional intervention to prevent postweaning diarrhea*. Anim Nutr, 2017. **3**(4): p. 322-330.
3. Kalita, A., J. Hu, and A.G. Torres, *Recent advances in adherence and invasion of pathogenic Escherichia coli*. Curr Opin Infect Dis, 2014. **27**(5): p. 459-64.
4. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., and B. B., *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 2013. **26**(4): p. 822-80.
5. Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., and Frankel, G., *Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli*. Gut Microbes, 2012. **3**(2): p. 71-87.
6. Dutta, S., Pazhani, G. P., Nataro, J. P., and Ramamurthy, T., *Heterogenic virulence in a diarrheagenic Escherichia coli: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC*. Int J Med Microbiol, 2015. **305**(1): p. 47-54.
7. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin. Microbiol, 1998.
8. Dutta, S., Guin, S., Ghosh, S., Pazhani, G. P., Rajendran, K., Bhattacharya, M. K., Takeda, Y., Nair, G. B., and Ramamurthy, T., *Trends in the prevalence of diarrheagenic Escherichia coli among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56068.
9. Comery, R., Thanabalasuriar, A., Garneau, P., Portt, A., Boerlin, P., Reid-Smith, R. J., Harel, J., Manges, A. R., and Gruenheid, S., *Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic Escherichia coli strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(12): p. 3892-6.
10. Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E., *Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins*. Probiotics Antimicrob Proteins, 2010. **2**(1): p. 52-60.

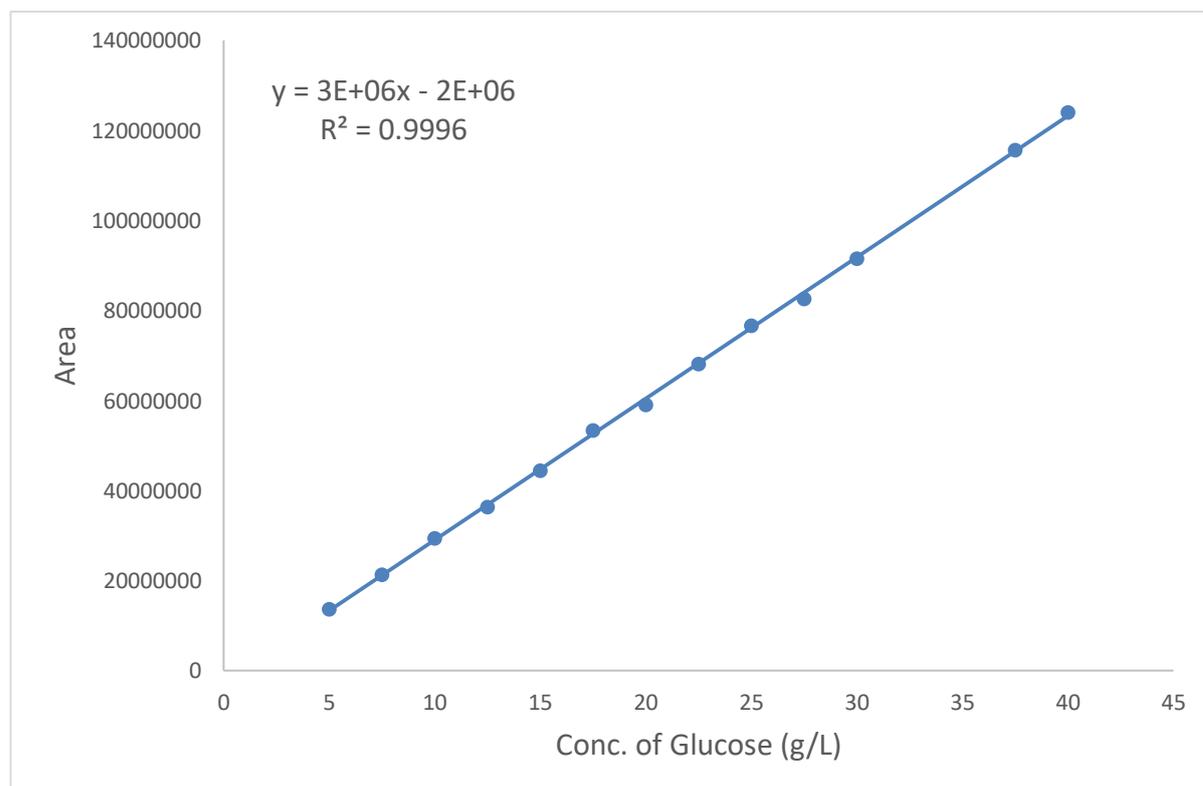
11. C.J. Lazdunski, D.Baty, V. Géli, and D.Cavard, J, *The membrane channel-forming colicin A: synthesis, secretion, structure, action and immunity*, *Biochim. Biophys.* 1988.
12. Kim, Y.C., A.W. Tarr, and C.N. Penfold, *Colicin import into E. coli cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(8): p. 1717-31.
13. El Ghachi, M,Bouhss, A,Barreteau, H,Touze, T,Auger, G,Blanot, D, and Mengin-Lecreulx, D, *Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22761-72.
14. H. Brötz, G,Bierbaum, K,Leopold, P.E, and Reynolds, H.-G, *The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II*, *Antimicrob.* 1988.
15. 鍾睿語, *大腸桿菌素 colicin Ib 純化及特性分析*. 國立中興大學分子生物學研究所博士論文, 2017.
16. Mosbahi, K,Walker, D,James, R,Moore, G. R, and Kleanthous, C, *Global structural rearrangement of the cell penetrating ribonuclease colicin E3 on interaction with phospholipid membranes*. *Protein Sci*, 2006. **15**(3): p. 620-7.
17. Barnéoud-Arnolet, A. and G, M & Llobès, R., *Machinery in the periplasm of Escherichia toxin with components of its import*. *Journal of Bacteriology*, 2010.
18. Cascales, E.,Buchanan, S. K, Duché, D, Kleanthous, C, Llobes, R, Postle, K, and Cavard, D, *Colicin biology*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007. **15**(3): p. 620-7.
19. Papadakos, G., J.A. Wojdyla, and C. Kleanthous, *Nuclease colicins and their immunity proteins*. *Q Rev Biophys*, 2012. **45**(1): p. 57-103.
20. Lee, E. J,Yun, U. J,Koo, K. H,Sung, J. Y,Shim, J,Ye, S. K,Hong, K. M, and Kim, Y. N, *Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1841**(1): p. 190-203.

21. 盧三吉, 饋料批式發酵重組大腸桿菌生產水母冷光酶(*Renilla reniformis luciferase*)之探討. 國立臺灣科技大學化工所, 2004.
22. Bano, S, Vankemmelbeke, M, Penfold, C. N, and James, R, *Pattern of induction of colicin E9 synthesis by sub MIC of Norfloxacin antibiotic*. Microbiol Res, 2013. **168**(10): p. 661-6.
23. Bano S, Vankemmelbeke M, Tunio SA, Penfold C, and James R., *Complete nucleotidesequencing and molecular characterization of the pColE9-J plasmid*. Sindh UnivRes J (Sci Ser), 2012.
24. Fernandez-Castane, A, Vine, C. E, Caminal, G, and Lopez-Santin, J, *Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by Escherichia coli in fed-batch high cell density cultures*. J Biotechnol, 2012. **157**(3): p. 391-8.
25. 李珮菁, 攪拌式發酵槽三維流場之數值模擬與研究. 遠東科技大學機械工程研究所, 2011.
26. 賴佩君, 雲芝(*Trametes versicolor*)在不同發酵槽及不同培養條件對菌絲體及多醣體之影響. 東海大學食品科學系, 2008.
27. Y, C., *Airlift bioreactors*. Biochem, 1989: p. 13:121-214.
28. Yanjun Li, Dezhi Zhang, Ningyun Cai, Chao Han, Qian Mao, Ting Wang, Qian Zhou, Ning Chen, and Xixian Xie, *Betaine supplementation improved l-threonine fermentation of Escherichia coli THRD by upregulating zwf (glucose-6-phosphate dehydrogenase) expression*. 2019.
29. Yuji Aso, Mikikazu Tsubaki, Bui Hoang Dang Long, Ryo Murakami, Keisuke Nagata, Hirohisa Okano, Ngo Thi Phuong Dung, and Hitomi Ohara, *Continuous production of D-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using b-glucosidase-displaying Escherichia coli*. 2019.

附錄

附錄 A

葡萄糖(Glucose)濃度檢量線

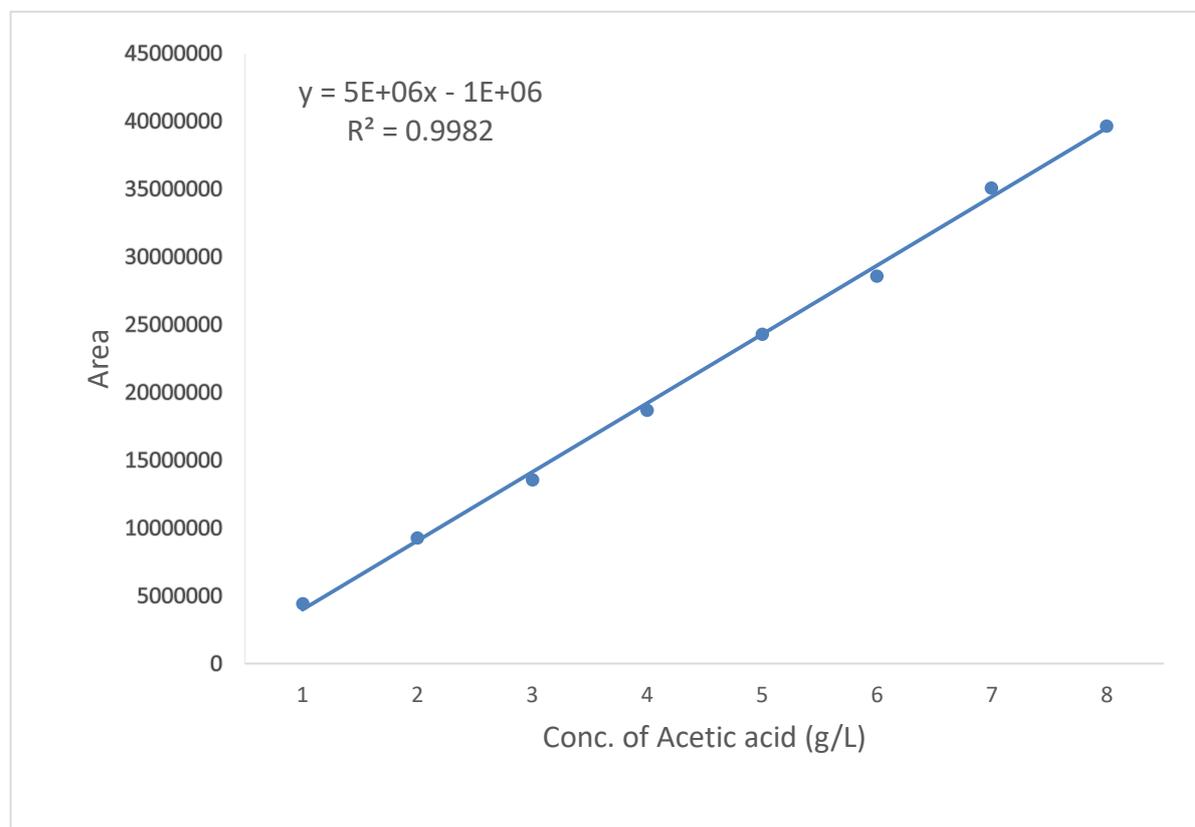


葡萄糖濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Glucose (g/L)} = (\text{Area} + 2000000) / 3000000$$

附錄 B

乙酸(Acetic acid)濃度檢量線

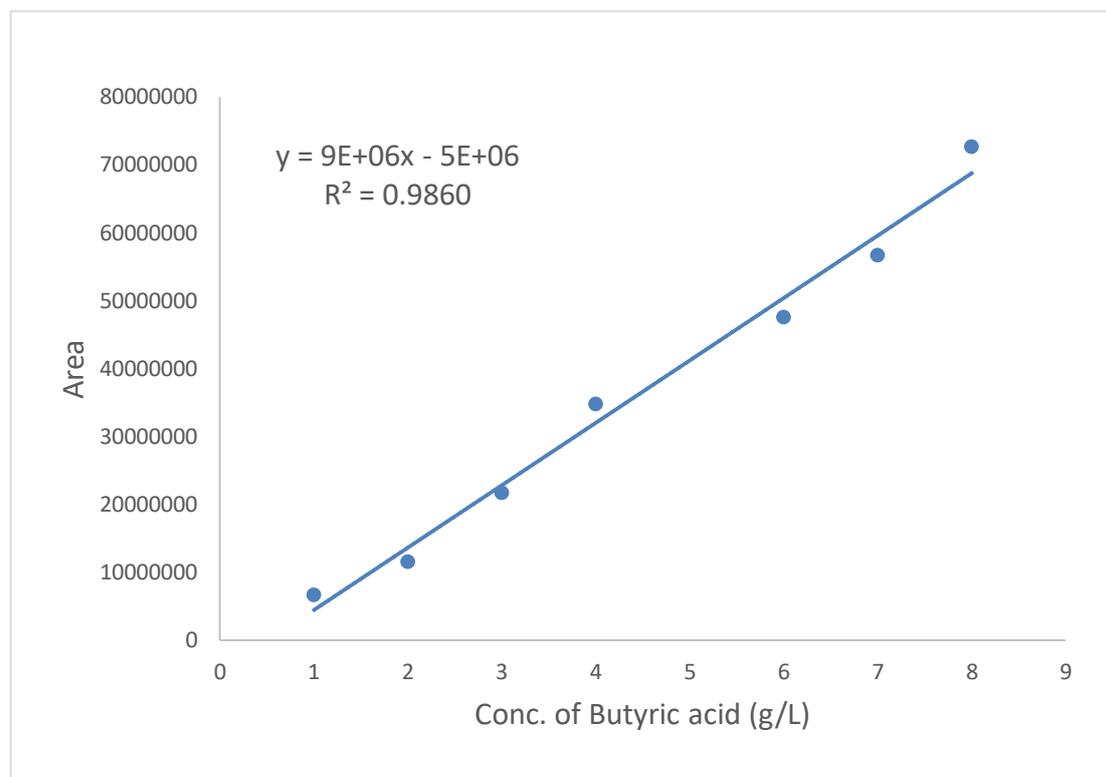


乙酸濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Acetic acid (g/L)} = (\text{Area} + 1000000) / 5000000$$

附錄 C

丁酸(Butyric acid)濃度檢量線



丁酸濃度檢量線方程式：

$$\text{Conc. of Butyric acid (g/L)} = (\text{Area} + 5000000) / 9000000$$