

東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：顏宏偉 博士

Advisor : Hong-Wei Yen, Ph.D.

利用 *Streptomyces hygroscopicus* 發酵生產免疫抑制劑 Rapamycin 之

探討

The fermentation process development of rapamycin production by

Streptomyces hygroscopicus

研究生：蕭欣培 撰

Graduate student : Hsin-Pei Hsiao

中華民國 101 年 6 月

June, 2012

碩士學位論文指導教授推薦書

化學工程與材料工程研究所 蕭欣培 君所提供之論文

利用 *Streptomyces hygroscopicus* 發酵生產免疫抑制劑 Rapamycin 之探討

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

化學工程與材料工程研究所所長

指導教授：蕭欣培
日期：10年6月15日

(註：本頁可依個人意願是否貼附，可自行繕打後，列印出給指導老師、系主任簽名)

碩士學位論文口試委員會審定書

化學工程與材料工程研究所 蕭欣培 君所提供之論文

利用 *Streptomyces hygroscopicus* 發酵生產免疫抑制劑 Rapamycin 之探討

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

顏永錫
劉永銓

楊其明

指導教授：顏永錫

中華民國 101 年 6 月 15 日

謝誌

兩年的研究所生涯，終於告一段落，這一切都要感謝許多人對我的提攜與幫助。這一篇論文能夠順利完成，首先要感謝我的指導老師—顏宏偉教授。在老師悉心的教導下，論文才能夠如期的完成，除了本篇論文外，這段期間內老師也鼓勵並指導我參與比賽和國外參訪活動，讓學生得到許多寶貴的經驗。同時感謝楊芳鏘教授、劉永銓教授對本論文的指正及建議，給學生不同的觀念和視野，使得本論文能更臻充實，在此致上最誠摯的感謝。

在研究生活中，非常感謝實驗室學長姐德威、嘉麟、正雄、尚甫、志勇、瑞真、皓緯、雅婷、方瑋、于萱、永長們不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑，也感謝實驗室同學鴨子、金門、Laco、芒果、方凱平、嘉豪，學弟妹娟姊、施金衫、王義成、西瓜、毛毛、阿凱、小紀、小培、與專題生楊雅鈞、小喵、張容慈、小史、Yoyo、阿敏、娘東們，使我在求學期間增加許多歡笑，你/妳們的幫忙及搞笑我銘感在心。還有要感謝女朋友怡姩在背後的默默支持更是我前進的動力，怡姩的體諒、包容與信任是我碩士生活裡不可獲缺的。最後要感謝我的爸媽，這段時間一直在忙學業的問題，與家人相處的時間很少，因為爸媽的體諒，才能專心完成學業。

Ps:另外還有很多曾經幫助過我的朋友，因為有大家的幫助，我才能有今天的成果。

中文摘要

本研究利用放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* 發酵生產 rapamycin 免疫抑制劑之探討，目的希望找出較佳的發酵環境以及發酵控制，提高產物 rapamycin 的生產濃度與生產速率。1975 年，放線菌 *S. hygroscopicus* 在復活節島上的土壤被發現，而菌體的發酵液中分離出 rapamycin 這物質，早期一直被當做治療真菌之感染，相繼研究出具有免疫抑制劑、抗腫瘤、防止衰老延長壽命等多種效能。

本研究先以三角搖瓶進行較佳發酵環境的選定，再放大至 5L 發酵槽進行發酵控制與監測並探討與改良。在三角搖瓶方面，結果指出在種菌培養時間的探討，以培養 48 小時後再進行發酵培養，會有較佳的 rapamycin 產量。培養基中的碳源方面以葡萄糖(glucose)較佳，而氮源則以酵母萃取物(YE)有較佳的產物生成。在胺基酸的添加裡，採用胺基酸 L-Lysine 進行實驗測試，結果並無預期之效果提高產物 rapamycin 生產，在發酵培養基裡可能就含有 L-Lysine 成分，故猜測再額外添加反而會產生抑制效果。

然而在 5L 發酵槽的培養方面，發現採用兩階段溶氧策略控制，有助於提升產物產量，從空白組的最大產量 104 mg/L 增加至 288 mg/L，提升了 177%；DO50% 高溶氧下，更能使產物產量增加，從空白組的最大產量 104 mg/L 增加至 782 mg/L，提升了 652%。然而在 pH 的變化中，發現對於產物生成似乎極為重要，並做了兩段式調控 pH 來進行實驗測試，發現第二階段控制 pH 為 5.5 時，可以提高產量至 570 mg/L，相較於控制組濃度 104 mg/L 增加了約 448 %；放大至 15 L 發酵

槽下，以同樣條件培養，可以提高產量至 683 mg/L，相較於控制組濃度 104 mg/L 增加了約 557 %。由以上結果得知，在 *S.hygroscopicus* 的發酵培養裡，產物的生成與溶氧量和 pH 值的改變有相當大的關聯，在未來實驗裡將對溶氧與 pH 的影響性進行更深入的探討。

關鍵字：放線菌、*S.hygroscopicus*、免疫抑制劑、rapamycin

Abstract

Rapamycin is a 31-member ring macrolide produced by *Streptomyces hygroscopicus* and has many applications in clinical medicine. *S. hygroscopicus* isolated from an Easter Island soil sample. This natural product possesses various bioactivities including antifungal (Vezina et al. 1975), antitumor, immunosuppressant and extends the life activities (Eng et al. 1984; Sehgal et al. 1994).

This study will develop fermentation process to harvest rapamycin by *S. hygroscopicus*. The purposes want to find a better fermentation environment and fermentation control, and improve product rapamycin. First selected better fermentation environment from the flask experiment, and then transferred to a 5L fermentor for fermentation control and monitoring, and to explore and improved.

In flask experiment, the result pointed out glucose was to be carbon source, yeast extract be nitrogen source, and seed culture time for 48 hours before fermentation, there will be better of rapamycin production. However, the amino acid added experiment, added L-Lysine can increase rapamycin production (Cheng et al. 1995), but in this study didn't expect the effect to improve production. Guess that medium of yeast extract may contain L-Lysine, so further to add but will have inhibitory effects.

However, in 5L fermentor found using the two-stage dissolved oxygen control strategy help to improve the product rapamycin. The yield was reach 288 mg/L,

increased about 177%, compared with control group which concentration of 104 mg/L; using DO50% high concentration of oxygen control strategy also help to improve the product rapamycin. The yield was reach 782 mg/L, increased about 652%, compared with control group which concentration of 104 mg/L.

And found that the pH change is very interesting and very important to produce rapamycin in fermentation. And bold design a two-stage regulation of pH to ferment in 5L fermentation. Found that the second phase control to pH 5.5 which can increase production to 570 mg/L, increased about 448%; enlarged to a 15 fermentor in the same conditions can increase production to 683 mg/L, increased about 557%.

These results suggest that, in fermentation product formation, oxygen content change and pH change have relationships very much, so will to in-depth discussion in the future experiment.

Key words: antifungal · *Streptomyces hygrosopicus* · immunosuppressant · rapamycin

目錄

中文摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XIII
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 菌種介紹 (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	3
2.1.1 放線菌門 (Actinobacteria) 介紹	4
2.1.2 鏈黴菌屬 (<i>Streptomyces</i>) 介紹.....	5
2.2 Rapamycin 介紹	7
2.2.1 抗真菌.....	8
2.2.2 免疫抑制劑.....	8
2.2.3 抗腫瘤.....	9
2.2.4 延長壽命.....	10
2.3 rapamycin 合成路徑.....	11
2.4 培養條件.....	12

2.4.1 碳源影響.....	13
2.4.2 氮源影響.....	13
2.4.3 胺基酸添加的影響.....	14
2.4.4 初始 pH 值的影響.....	14
2.5 發酵策略.....	14
2.5.1 Batch	15
2.5.2 Fed-batch.....	16
2.6 文獻產值.....	18
第三章 實驗材料與方法.....	19
3.1 實驗材料.....	19
3.1.1 實驗菌株.....	19
3.1.2 實驗藥品.....	19
3.2 實驗儀器.....	21
3.3 分析方法.....	23
3.3.1 Biomass 分析方法.....	23
3.3.2 Glucose 分析方法	23
3.3.3 Rapamycin 分析方法	23
3.4 實驗方法.....	24
3.4.1 菌種保存.....	24

3.4.2 種菌培養基.....	25
3.4.3 發酵培養基.....	26
3.4.3 接菌.....	26
3.6 菌落型態與篩菌.....	28
3.7.1 三角瓶液態培養實驗.....	29
3.7.1.1 種菌培養時間的影響.....	29
3.7.1.2 不同碳源的影響.....	29
3.7.1.3 不同氮源的影響.....	29
3.7.1.4 添加胺基酸的影響.....	30
3.7.1.5 不同轉速下培養的影響.....	30
3.7.2 發酵槽 5 L 培養實驗.....	31
3.7.2.1 DO 控制之影響.....	31
3.7.2.2 pH 控制之影響.....	32
3.7.3 發酵槽 15 L 培養實驗.....	32
第四章 結果與討論.....	34
4.1 菌落型態與篩菌.....	34
4.2 發酵實驗培養.....	38
4.2.1 三角瓶液態培養實驗.....	38
4.2.1.1 種菌培養時間的影響.....	38

4.2.1.2 不同碳源與濃度的影響.....	40
4.2.1.3 不同氮源的影響.....	42
4.2.1.4 添加胺基酸的影響.....	44
4.2.1.5 不同轉速下培養的影響.....	46
4.2.2 發酵槽培養實驗.....	48
4.2.2.1 DO 控制之影響.....	49
4.2.2.2 DO 控制之比較.....	52
4.2.2.3 pH 控制之影響.....	56
4.2.2.4 pH 控制之比較.....	60
4.2.2.5 發酵槽 15 L 放大培養.....	63
第五章 結果與未來展望.....	66
5.1 結論.....	66
5.2 未來展望.....	67
參考文獻.....	68
附錄.....	74
附錄 1: 產物 rapamycin 標準曲線.....	74
簡歷.....	75

圖目錄

圖 2-1	孢子菌體產生菌絲示意圖	4
圖 2-2	產物 rapamycin 結構式 (Sehgal et al., 1975)	7
圖 2-4	rapamycin 合成路徑圖 (Sung et al., 2010)	12
圖 2-5	5L 進行 batch 式發酵趨勢圖 (李, 2001)	15
圖 3-1	菌種在固態平板上生長情形, 與孢子形成情形	24
圖 3-2	5 L 攪拌式發酵槽與監控裝置圖	31
圖 3-3	15 L 攪拌式發酵槽與監控裝置圖	32
圖 4-1	菌落照片與編號	34
圖 4-2	編號 1~7 菌落各自發酵培養後之產物 rapamycin、biomass 的比較	35
圖 4-3	編號 1、2、5、7 菌落再次發酵培養後產物 rapamycin、biomass 之比較	36
圖 4-4	控制組與編號 5 菌落再次發酵培養後產物 rapamycin 之比較	36
圖 4-5	不同種菌培養時間進行發酵之培養產物 rapamycin 之比較	39
圖 4-6	不同碳源對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響 (濃度 10 g/L)	40
圖 4-7	不同葡萄糖 (Glucose) 濃度對發酵生產 rapamycin 之影響	41
圖 4-8	不同氮源對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響 (濃度 4 g/L)	43
圖 4-9	添加不同胺基酸對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響 (濃度 1 g/L)	

.....	45
圖 4-10 胺基酸 Lysine (Lys)不同濃的添加對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之 影響.....	45
圖 4-11 不同轉速控制策略對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響.....	47
圖 4-125L 發酵槽工作體積 2L 之發酵培養，其產物 rapamycin、菌體量(biomass)、 葡萄糖與 pH 值之變化情形.....	48
圖 4-14 5L 發酵槽工作體積 2L 之兩段式控制溶氧 DO 的發酵培養，其產物 rapamycin、菌體量 (biomass)、葡萄糖與 pH 之變化情形.....	51
圖 4-15 5L 發酵槽工作體積 2L，DO50% 策略與空白組之發酵培養，其產物 rapamycin 與菌體量 (biomass) 之比較.....	53
圖 4-16 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養， 其菌體量 (biomass) 與葡萄糖值之比較.....	53
圖 4-17 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養， 其產物 rapamycin 與菌體量 (biomass) 之比較.....	54
圖 4-18 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養， 其菌體量 (biomass) 與葡萄糖值之比較.....	54
圖 4-19 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略（第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH> 6）.....	58

圖 4-20 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略（第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH=6）	58
圖 4-21 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略（第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH=5.5）	
圖 4-22 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略（第一階段添加少量鹼(NaOH) 減緩 pH 值下降幅度，第二階段不控制 pH 值之發酵情形）	59
圖 4-23 5L 發酵槽，工作體積 2L 之兩段式控制 pH 策略，分別為第二階段 pH 控制在大於 6、等於 6、等於 5.5、第一階段延緩 pH 下降與控制組之 pH 變化的比較	60
圖 4-24 產物 rapamycin 在 5L 發酵槽，工作體積 2L 以兩段式控制 pH 策略，在第二階段分別控制 pH 大於 6、等於 6、等於 5.5、在第一階段添加少量鹼延緩 pH 下降趨勢與對照組 5 組發酵情形之比較	61
圖 4-25 菌體量 biomass 在 5L 發酵槽，工作體積 2L 以兩段式控制 pH 策略，在第二階段分別控制 pH 大於 6、等於 6、等於 5.5、在第一階段添加少量鹼延緩 pH 下降趨勢與對照組 5 組發酵情形之比較	62
圖 4-26 15L 發酵槽工作體積 8L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略（第一階段不控制 pH 值，第二階段控	

制 pH=5.5)64

表目錄

表 2-1	文獻產值表	18
表 3-1	實驗藥品清單	19
表 3-2	實驗儀器清單	21
表 3-3	ISP MEDIUM 2 培養基.....	25
表 3-4	發酵培養基	26
表 4-1	控制組與篩菌後的菌體 NO.5 產物生成量比較（體積 50 ml，轉速 150 rpm，溫度 28 °C）	37
表 4-2	兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之數據比較	55
表 4-3	兩段式 pH 控制策略與空白組之數據比較	63
表 4-4	不同發酵槽之兩段式 pH 控制策略(3)與空白組之數據比較	64
表 4-5	文獻與本研究成果之產值比較表	65

第一章 緒論

1975年，放線菌*S. hygroscopicus*在復活節島上的土壤被發現，而菌體的發酵液中分離出rapamycin這物質，早期一直被當作治療真菌之感染，相繼研究出具有免以抑制劑、抗腫瘤、防止衰老延長壽命等多種效能。它的結構與另外一種*Streptomyces*的代謝產物FK506非常相似，且具有免疫抑制活性，在器官移植和自體免疫疾病的臨床實驗方面感到很大的興趣（Sung et al., 2010）。最近研究發現Rapamycin、FK506和Cyclosporine-A一般都具有很好免疫調控能力，1996年美國之American Home Product向FDA提出此藥物在腎移植後抗排斥之應用，2000年獲得FDA核准上市，其市場銷售額已達2億美金以上。在市場調查中指出1997年全球免疫抑制劑市場為13億美金，至2005年市場增加為19億美金，目前Cyclosporine-A銷售量最大，2005年銷售額為12億美金，銷售第二位為FK506為4億美金，第三位為Rapamycin銷售額為2.4億美金（李，2001）。

由於rapamycin之生產製程相當困難，僅少數幾家公司具有生產能力，國內則尚無人能生產此藥物，若能開發出具競爭力生產製程，對國內生技產業能力之提升，將有很大之幫助。目前生產Rapamycin之製程均是由野生種之*Streptomyces hygroscopicus* 經醱酵、提取精製、純化而得，然而野生株其生產Rapamycin之能力均甚低，以致生產成本大幅升高，量產困難，因此如何提高菌株之生產能力往往是此類製程能否商業化的關鍵。Rapamycin之合成是屬多基因調控，所以欲提高生產菌株之產能，很難利用簡單的培養基調整即可達到目的。利用醱酵調控技

術及代謝途徑調控等方法，是目前最常被廣泛應用在提高微生物二級代謝物產能之策略。

第二章 文獻回顧

2.1 菌種介紹 (*Streptomyces hygroscopicus*)

Streptomyces hygroscopicus 這菌種，最早是在復活節島上的土壤被取得並分離純化，且被發現有抑制 *Candida albicans*、*Microsporium gypseum* 和 *Trichophyton granulosum* 的生長，然而分離出具有抑制菌體生長活性的物質，被取名為 rapamycin (Sehgal et al., 1975)。

表 2-1 菌種分類

血統分類	中文名稱	英文名稱
域	細菌域	Bacteria
門	放線菌門	Actinobacteria
綱	放線菌綱	Actinobacteria
亞綱	放線菌亞綱	Actinobacteridae
目	放線菌目	Actinobacterales
亞目	鏈黴菌亞目	Streptomycineae
科	鏈黴菌科	Streptomycetaceae
屬	鏈黴菌屬	Streptomyces
種		Hygroscopicus

(維基百科)

2.1.1 放線菌門 (Actinobacteria) 介紹

放線菌是一類革蘭氏陽性細菌，曾經由於其形態被認為是介於細菌和黴菌之間的物種，表面上和屬於真核生物的真菌類似。

放線菌是單細胞的微生物，產生細長分枝的菌絲能夠進行分段，或再分而成為無性的孢子。放線菌除了以營養的方法繁殖外，有些可產生無性的孢子，叫做分生孢子，但是放線菌並沒有所謂的有性孢子時期。

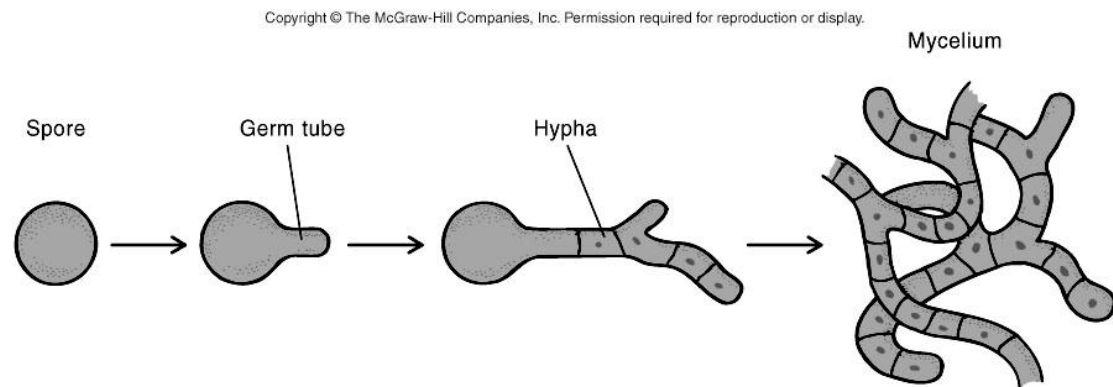


圖 2-1 孢子菌體產生菌絲示意圖

放線菌與真菌，有四點很明顯的關係存在；（1）較高等放線菌具有類似黴菌的完全分枝的菌絲。（2）許多放線菌和真菌一樣可形成棲息於空中的菌絲及分生孢子。（3）放線菌在液體培養基中培養，並不會像細菌般地造成混濁，反之，卻表現出明顯的塊狀。（4）若把某些放線菌放在完全不加限制的優良條件下生長，其生長速度並不像一般細菌成指數的增加，而是立方的增加。

放線菌多數是處在孢子時期，孢子對於不適的環境具有抗力，能在菌絲不能生存的環境下繼續維持生命。但是放線菌的孢子對熱的抗力不如細菌的內孢子來得大，且不活動的孢子之致死溫度也只高於菌絲數度而已。

放線菌中有許多菌株可以形成有毒的代謝物，幾乎 3/4 以上的菌株能產生抗生素，其中知名度高的有鏈黴素 (streptomycin)、氯黴素 (chloramphenicol)、金黴素 (chlorotetracycline)、土黴素 (oxytetracycline) 等。由於放線菌的發酵產物極具商業價值，所以相關的研究非常多 (簡, 2006)。

2.1.2 鏈黴菌屬 (Streptomyces) 介紹

普遍存在於大自然中的鏈黴菌是一群非常奇特的細菌。有很長的一段時間，大家都把它們當作黴菌，大概因為它們跟絲狀黴菌一樣有菌絲及孢子的分化，也會產生各種抗生素、色素及胞外蛋白。現在我們知道這些只是表面上的相似，其實鏈黴菌無論是從生化或遺傳方面來看，都是名副其實的革蘭氏陽性細菌。

鏈黴菌是土壤表層非常普遍的細菌。它們在大自然生態中扮演重要的清道夫角色，可以分解消化很多有機廢物，將動植物腐敗殘質轉化為食物。我們可以說如果沒有鏈黴菌，大自然會比較惡臭。反而，我們常提到的泥土的芬芳，其實是鏈黴菌產生的一種叫 geosmine(土味)揮發性分子的貢獻。除了生態上的重要性，鏈黴菌引起近代人們注意的最大的原因是它們產生的抗生素。雖然第一個抗生素 (盤尼西林) 是在黴菌中發現，現在已知六千種的抗生素大都是鏈黴菌產生的。

抗生素醱酵工業界在鏈黴菌的遺傳及生理的研究上，投資了大量的人力與財力。傳統改良菌種的遺傳技術，非常成功地提高抗生素的生產力。大部分的工作人員在這些實驗過程中，都會接觸到鏈黴菌的一項遺傳特徵，就是基因的不穩定性。幾乎所有的鏈黴菌種都有某些基因會呈現高度的變異性。這些基因大都與孢子的形成、抗生素的合成、對抗生素的抗性、色素及胞外的產生，甚至某些氨基酸的合成有關。但是這些基因的突變率比一般基因高出 100 至 1000 倍，而且會受某些物理及化學的刺激，而提高至 10^{-1} 之高(一般基因突變律大約在 $10^{-7} \sim 10^{-6}$)。這種突變的高頻率加上多重性，使早期的研究者以為這些基因是位在不穩定的質體上。

後來卻發現這些基因都位在染色體上非常不穩定的區域，很容易被刪除掉。鏈黴菌通常在生長後期進入停止期，才會激發一些抗生素的生合成，以及孢子的形成。調節抗生素生合成的基因有兩類：第一類是針對各別抗生素的，這些基因都與它們所控制的生合成基因群在一起，並且同時表現。第二類具廣泛性，能影響幾種不同的抗生素之生合成，有時還會影響氣生菌絲及孢子的分化（陳，1995）。

2.2 Rapamycin 介紹

Rapamycin 最早是被發現具有抑制真菌的抗生素，是由 *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 所生產分離的。

它為白色固體，分子式為 $C_{56}H_{89}NO_{14}$ ，熔點在 $183\sim 185^{\circ}C$ 之間，結構式如下圖 (Sehgal et al., 1975)。

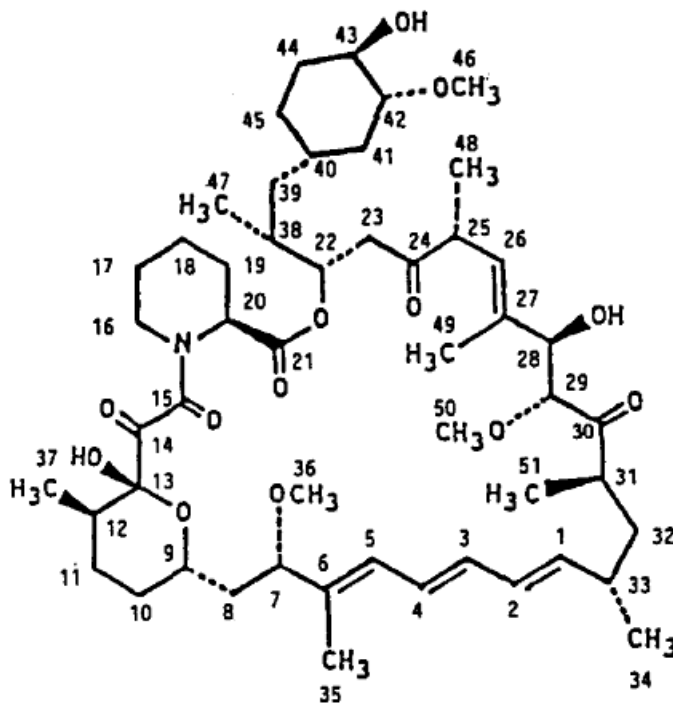


圖 2-2 產物 rapamycin 結構式 (Sehgal et al., 1975)

2.2.1 抗真菌

Rapamycin 被發表指出具有比其他抑制真菌抗生素還更有較佳的效果，最早指出低濃度的 rapamycin 可以有效抑制 *Candida albicans*，*Microsporium gypseum*，*Trichophyton granulorum*。Rapamycin 與 amphotericin B 對於抑制各種 *Candida* 相較下，rapamycin 都有較明顯的抑制效果，在 *Candida albicans* 這株真菌測試抑制下，也較 nystain 和 candicidin 兩種抗生素有更好的效果 (Sehgal et al., 1975)。

2.2.2 免疫抑制劑

Rapamycin，是新型大環內酯的抗排斥藥物，是目前世界上最新的強效免疫抑制劑，臨床上用於器官移植的抗排斥反應和自身免疫性疾病的治療。

Rapamycin 作為免疫抑制劑的主要機轉是在作用於：Sirolimus 與 FK 結合蛋白 Imunophilin (FKBP-12) 結合形成免疫抑制複合體，而此複合體對 Calcineurin 之活性並無作用。此複合體與關鍵性調節激活酵素 mTOR (mammalian Target of Rapamycin) 結合並抑制其活性，而此抑制作用阻斷了由 cytokine 主導的 T-細胞增生時 cell cycle 由 G1 進入 S 階段，進一步抑制 IL-2 response。從目前臨床應用來看，RAPA 有很好的抗排斥作用，且與環孢黴素 A (Cyclosporin A) 和 FK506 等免疫抑制劑有良好的協同作用，是一種療效好，低毒，無腎毒性的新型免疫抑制劑 (陳，2003)。

2.2.3 抗腫瘤

Rapamycin 物質的發現對醫學上有很大的突破，而發現 mTOR 分子 (mammalian Target of Rapamycin)，mTOR 其主要功能為細胞增生訊號之傳遞及細胞週期的進行。它扮演著樞紐的角色，mTOR 分子活化之後，可以帶動下游一系列的細胞訊息傳遞，進一步促使細胞產生分化或分裂。而在腫瘤細胞，這樣的調節機制出現了失調現象，導致腫瘤細胞不正常的增生及分化不良，因此，mTOR 分子提供了科學家們在研究抗癌藥物的標靶治療上一個理想的目標。

Rapamycin 及衍生的新一代的相似結構物(包括 Sirolimus、FK-50、CCI-779、RAD001、and AP23573 等等)，藉由抑制 mTOR 這個蛋白質分子達到抑制細胞生長及細胞合成蛋白質，進一步達成抑制腫瘤(癌細胞)生長，或促使癌細胞凋零。Rapamycin 已經在實驗室中被證實可抑制許多癌細胞的生長，包括橫紋肌肉瘤、神經母細胞瘤、肺小細胞癌、骨癌、胰臟癌、乳癌、攝護腺癌、白血病癌細胞及 B 細胞淋巴瘤等。

至於目前新發展出來的抑制 mTOR 分子的藥物，即 Rapamycin 的衍生物，例如 CCI-779 (Temsirrolimus)、RAD001 (Everolimus) 及 AP23573 等等，均尚在進行臨床試驗的階段，屬於較初期的臨床研究(Phase I 或 Phase II studies)，其中又以 CCI-779 這個藥物的研究較多。

未來這類 mTOR 分子抑制劑的藥物研究，重點可能放在腫瘤分子生物學的分析，也就是研究可以預測療效的生物指標，進一步找出適合使用這類藥物的病

人，另一方面，由於 mTOR 分子抑制劑副作用不大，加上具有新的抗癌機轉，研究多種抗癌藥物合併這類藥物的可行性，對抗癌工作帶來新的希望（劉，2006）。

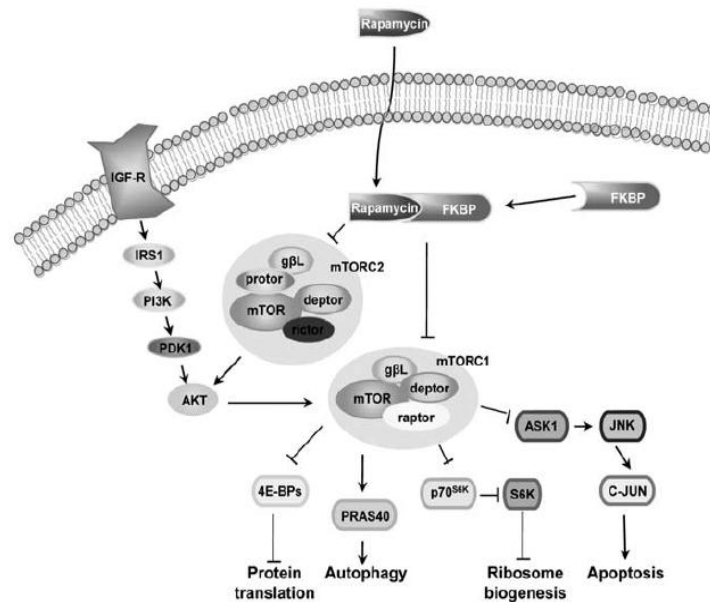


Figure 2 Mechanism of action of rapamycin. Inhibition of mTOR signaling by rapamycin regulates cell proliferation, angiogenesis and cell metabolism. mTOR, mammalian target of rapamycin; IRS1, insulin receptor substrate-1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PDK1, phosphoinositide-dependent protein kinase 1; AKT (PKB), protein kinase B; gβL, GTPase β-subunit-like protein; raptor, regulatory-associated protein of TOR; rictor, rapamycin-insensitive companion of TOR; deptor, disheveled, Egl-10, pleckstrin (DEP) domain containing mTOR interacting protein; proTOR, proline-rich protein; 4E-BPs, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins; PRAS40, proline-rich AKT substrate of 40 kDa; p70S6K, ribosomal p70 receptor; S6K, S6 kinase; ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; JNK, c-JUN N-terminal kinase.

圖 2-3 細胞中 rapamycin 作用機制示意圖（Sung et al., 2010）

2.2.4 延長壽命

Rapamycin 藉由遺傳或藥理學的介入 TOR 訊號之傳遞的抑制作用，延長無脊椎動物的壽命，包括酵母菌、線蟲、果蠅。然而在脊椎動物裡，rapamycin 對於 600 天約 20 個月後的實驗老鼠在壽命的 90% 裡（相當於人類 60 歲）餵食，發現提高雌性老鼠 14%、雄性 9% 的壽命，在患有癌症的老鼠裡也發現亦能延長老鼠壽命（David E. et al., 2009）。

2.3 rapamycin 合成路徑

最早從 *Streptomyces hygroscopicus* 提煉出的 Rapamycin，利用第 13 號碳被標記的醋酸實驗發現，rapamycin 內的大環內酯環 (macrolide ring) 是由 7 個單位的醋酸 (acetate) 與 7 個單位丙酸 (propionate) 所合成的，而含氧甲基 (O-methyl groups) 則是由蛋胺酸 (methionine) 所轉變成的。而它的合成基因已經被證實是從紅黴素 (erythromycin) 合成的 PKS (Polyketide synthase) 基因透過雜交後得來的。Rapamycin PKS 包含了三個多功能的酵素 (RapA, RapB and RapC) 組成共 14 塊的模組。

後來利用標記過的前驅物再進行研究，證明出 lysine 經由 RapL 酵素轉換成 Pipecolate，與模組 14 在 RapP (pipecolate-incorporating enzyme) 酵素進行下，合成出雜環 (heterocyclic ring) 也就 pre-rapamycin，再經過 post-PKS (RapI, J, M, N, O, Q) 多種酵素合成出最終產物 rapamycin 如下圖所示 (Sung et al., 2010)。

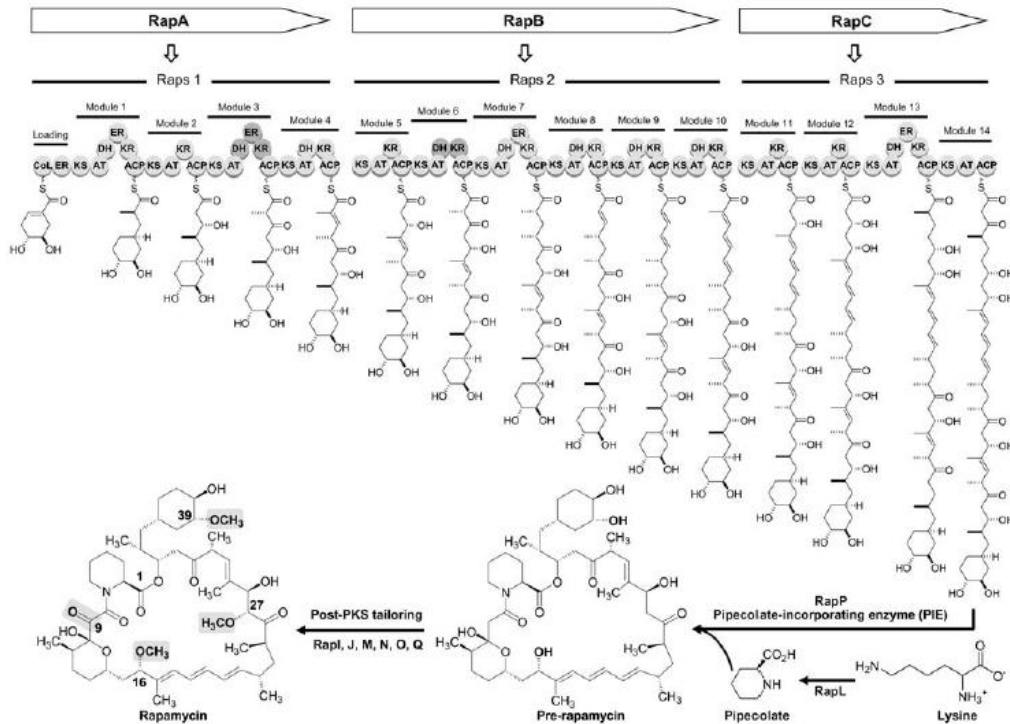


Figure 3 Rapamycin biosynthetic pathway. Rapamycin is biosynthesized by post-PKS tailoring steps through pre-rapamycin that is built up by RapA, RapB, RapC, RapP and RapL.

圖 2-4 rapamycin 合成路徑圖 (Sung et al., 2010)

2.4 培養條件

Rapamycin 在現在的研究裡，很多文獻證實了這物質具有相當多的功效，且還在持續研究中，但目前面臨很大的問題在於原始菌種產量很低，且合成途徑長，代謝調控複雜，發酵及放大培養不易，所以在培養條件與發酵策略裡如何提高產率便是值得一再研究與進步。

2.4.1 碳源影響

在碳源研究方面，有文獻研究將 35 種含碳物質作為培養基碳源成分，發現其中有 20 種裡，對於 rapamycin 的生產是有幫助的，並指出 D-fructose，D(+)-nannose，D(+)-galactose，i-inositol，D-mannitol，D(+)-xylose 和 D(+)-cellobiose 七種碳源對於生產 rapamycin 是較佳的。以 Fructose 作為碳源中，找出了 20 (g / L) 為生產 rapamycin 的最佳濃度。在次要碳源方面，mannose 較佳，最後指出 rapamycin 的生產最佳的碳源、次要碳源與濃度為 fructose 20 (g / L)，mannose 5 (g / L) (Kojima et al., 1995)。

2.4.2 氮源影響

再氮源研究方面，有文獻嘗試了 ammonium sulfate，ammonium nitrate，ammonium chloride，urea 和 potassium nitrate 五種含氮物質作為培養基氮源成分，其中只有 ammonium sulfate 對 rapamycin 的生產是有幫助的，然而在濃度上指出了 40 mM 下為最佳的生產條件，達到 147 mg/L (Lee et al., 1997)。

在培養基 (Sehgal et al., 1975) 裡的氮源 soy meal 濃度發現，20 (g / L) 無最佳的生產濃度 (Sallam et al., 2010)。

2.4.3 胺基酸添加的影響

在碳氮源的作為培養基的研究後，發現添加銨離子對於 rapamycin 有絕大部分關係，但對於菌種的生長並沒有幫助 (Cheng et al., 1995)。然而對於胺基酸的添加對生產 rapamycin 的影響做了研究，嘗試了很多胺基酸，有 L-Lysine、L-Tyrosine、L-Leucine、L-Isoleucine、L-Serine、L-Alanine、L-Threonine、L-Glutamic acid、L-Ornithine 等 18 種胺基酸，發現 L-Lysine 有助於 rapamycin 的生產，10 (g/L) 為最佳的添加濃度。L-Phenylalanine 和 L-Methionine 濃度的增加從 0.5 - 10 (g/L) 很明顯地反而會抑制 rapamycin 的生產 (Cheng et al., 1995)。

2.4.4 初始 pH 值的影響

Rapamycin 的生產對於 pH 初始值有一定的影響，有文獻指出在初始 pH 為 6 時，可以生產出較高的產物 rapamycin，然而也發現培養後最終 pH 的值為 6.3，與初始 pH 值相差不大，也提出可以不用緩衝溶液的想法 (Sallam et al., 2010)。

2.5 發酵策略

早期一開始由於培養條件還沒完全建立，故都先從搖瓶開始來做批次培養，發酵槽的批次培養，但是產量還是面臨一個較大的問題，所以為了解決這問題，漸漸地有饋料批次且放大培養的文獻出現。

2.5.1 Batch

利用5L 進行batch 式醱酵，結果如下所示。可以發現，Rapamycin 並非典型之二級代謝物，是屬一、二級混合形代謝物，因此若欲增加Rapamycin 之生產量，如何維持細胞的健康狀況是非常重要的（李，2001）。

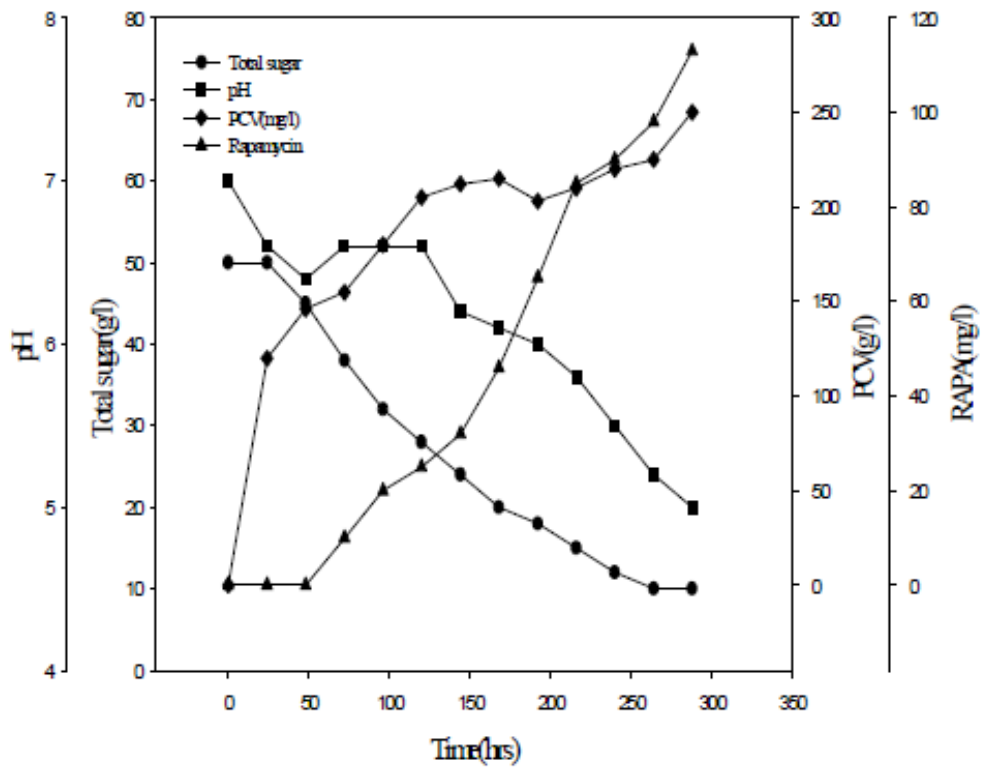


圖 2-5 5L 進行 batch 式醱酵趨勢圖（李，2001）

2.5.2 Fed-batch

有研究人員利用饋料批次且大型發酵槽 130 L，來進行放大發酵培養，且嘗試了一種新的控制策略，由於培養菌種屬於好氧菌，所以溶氧量（DO）對於發酵故相當重要（這是 DO 控制 非 fed-batch），一般發酵槽溶氧的控制都藉由攪拌速率來調控，但出現了溶氧量無法維持一定水平，所以利用了一種新的控制系統來維持溶氧水平，他可以同時監控攪拌速度、通氣速度、槽壓及槽內溫度，且藉著電腦同時相互調控為了維持溶氧 30% 的水平，pH 控制 6.20—6.80 之間，發酵培養了 110 小時，發現這樣新的調控系統，rapamycin 的產量較佳於單一利用攪拌速率來控制溶氧的策略（Chen et al., 1998）。

1993 年有文獻指出在高黏度的培養基裡，二氧化碳可以達到 190 % 的溶解量，然而在低黏度下的培養基裡可以達到 133 % 溶解量。因此，近幾年對於二氧化碳溶解量在培養絲狀細菌和真菌的菌絲發酵中的影響型態與生產力特別感到興趣，研究發現 *Streptomyces hygroscopicus* 在饋料批次發酵裡，產物 rapamycin 與饋料後二氧化碳溶解量的變化有一定的關係，定義了最高二氧化碳溶解量為一個動態參數，然而控制饋料碳源含量，結果發現碳源的限制對於細胞的生長、代謝有很大的影響，找出了較佳的培養策略，監測二氧化碳含量濃度，控制碳源甘油的饋料，結果顯示可提升產量達到 500 (mg / L) rapamycin（Chen et al., 2008）。

最近又有人指出在饋料批次發酵裡，也加入了前驅物如甘油、L-lysine、磷酸鹽來維持最佳的培養環境，藉由不同的饋料、不同的饋料時間點，相互的調控

找出了饋料批次發酵最佳的培養策略，在 60 L 放大發酵培養中 30 小時到 160 小時，以 0.17 L/h 的速度饋料甘油 250 g/L、 K_2HPO_4 10 g/L，使 rapamycin 的產量可以高達 812 (mg / L) (Zhu et al., 2010)。

2.6 文獻產值

文獻上所整理的 rapamycin 產值如下表 2-1。

表 2-1 文獻產值表

Comparison of rapamycin production by different strains of *S.hygroscopicus* under various fermentation processes.

Carbon source	Bioreactor	Mode	Rap titer (mg/L)	Time (h)	Rap productivity (mg/L h)	Refs.
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	57	192	0.297	Kojima et al. (1995)
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	134	192	0.698	Chen et al. (1995)
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	97-186	144	0.67-1.29	Lee et al. (1997)
Mannose	Shake flask	Batch	41.46	168	0.28	Sallam et al. (2010)
Glycerol, fructose	130 L fermentor	Fed-batch	110	110	1.0	Chen et al. (1998)
Soluble starch	Shake flask	Batch	420.0	120	3.5	Xu et al. (2005)
Soluble starch	Shake flask	Batch	445.0	120	3.71	Chen et al. (2009)
Glycerol, fructose	5 L fermentor	Fed-batch	500.0	120	4.17	Chen et al. (2007)

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗材料

3.1.1 實驗菌株

本研究所使用的菌株為購自生物資源保存及研究中心 (bioresource collection and research center)，菌種編號為 BCRC16270 之 *Streptomyces hygroscopicus*。

3.1.2 實驗藥品

本研究所用之藥品清單如下表 3-1。

表 3-1 實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
99.5% Ethanol	ECHO
Acetic acid	SHOWA
Ammonium Nitrate	聯工
Ammonium sulfat	SHOWA
D-(+)-Mannose	SIGMA
Glucose	ROQUETTE
Glycerol	KANTO
Hydrochloric acid	Scharlau

L(-)-Phenylalanine	關東
L(+)-Glutamine	關東
L(+)-Isoleucine	關東
L-Alanine	關東
L-Tyrosine	關東
L-Valine	關東
L-Lysine	ACROS
Malt extract	ST BIO
Methanol	ECHO
PDB (Potato Dextrose Broth)	Difco BD
p-Phenylphenol	關東
Sodium Hydroxid	SHOWA
Urea	SHOWA
Yeast extract	Difco BD

3.2 實驗儀器

本研究所用之實驗儀器清單如下表 3-2。

表 3-2 實驗儀器清單

儀器設備	廠牌	型號
5 公升攪拌式發酵槽	Biotop	BTF-A 5L
pH 計	Lutron	PH-206
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
分光光度計	Thermo	GENESYS 10UV
電子天平	Precisa	BJ100M
高效率液相分析儀幫浦	HITACHI	Pump L-2130
高效率液相分析自動取樣器	HITACHI	Autosampler L-2200
高效率液相分析 UV 偵測器	HITACHI	UV Detector L-2400
高效率層析管柱	Vercopak	C18-5ODS (250*4.68mm)
高速中型離心機	Hettich	Universal-32R
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	EA635
紅外線烘乾秤重儀	DENVER	IR-35
恆溫震盪培養箱	LIAN SHEN	LUS-150
烘箱	LIAN SHEN	LO-150
超純水製造機	Millipore	Simplicity

超音波震盪器	DECTA	DC300H
試管震盪器	IKA	MS1 minishaker
磁石攪拌加熱器	ChromTech	MS-3250B
無菌操作台	HIGH TEN	3BH-24
微電腦蒸餾水製造機	FISTEREEM	WSC044

3.3 分析方法

3.3.1 Biomass 分析方法

取發酵液，離心去除上清液後，再以純水加入回溶菌體，再置入紅外線烘乾稱重儀量測，測量其菌體乾重量。

3.3.2 Glucose 分析方法

將發酵液以離心機離心（7000 rpm, 5min），取上清液利用純水做 10 倍稀釋，再使用 YSI 1500 Sport L-Lactate analyzer 進行測量。

3.3.3 Rapamycin 分析方法

取發酵菌液 1ml，離心（7000 rpm, 10 min）後去除上清液留下菌體，再加入 1ml 甲醇萃取，利用試管震盪器充分混均勻後靜置一小時，再次離心（7000 rpm, 5 min），取上清液以高效能意象層析儀-High Performance Liquid Chromatography（HPLC）-來分析 rapamycin 濃度。

移動相：methanol/ water/ acetic acid 比例：80/ 20/ 0.1

流速：2 ml/min

管柱：C-18 Veropak Inertsil 7 ODS-3 4.6x250 mm

偵測波長：UV 254 nm

標準線：concentration (mg/L)=(Area+10635)/10000

3.4 實驗方法

將購自菌種中心的 *Streptomyces hygroscopicus* BCRC 16270 之冷凍乾燥管，接至 ISP MEDIUM 2 液態培養基活化，在 28°C 恆溫震盪培養箱培養 48 小時，之後再接種於 ISP MEDIUM 2 固態培養基 28°C 下培養，等待菌體生長至黑色孢子產生，如下圖 3-1 所示，在利用無菌水沖洗收集下來。取 0.8 ml 孢子液和 0.2 ml 甘油於微量離心管中均勻混合，放入 -20°C 冰箱保存。

3.4.1 菌種保存

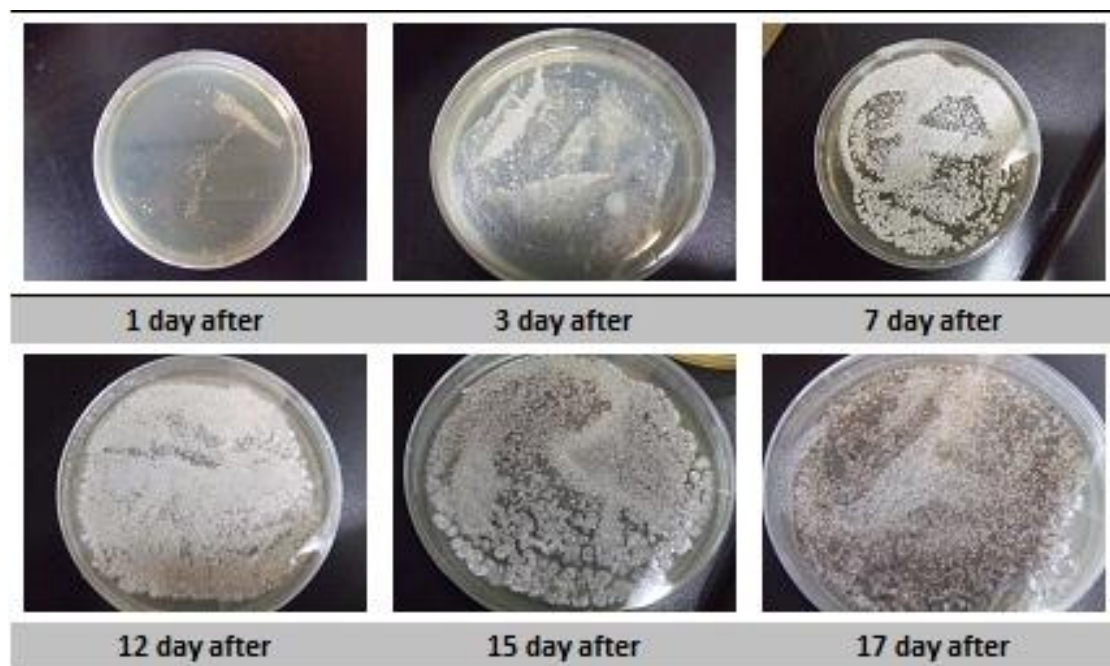


圖 3-1 菌種在固態平板上生長情形，與孢子形成情形

3.4.2 種菌培養基

配置 ISP MEDIUM 2 液態培養基 100 ml 攪拌均勻且調至 pH 7.3 後，置入 250 ml 三角搖瓶中，再用通氣栓將瓶口蓋緊，並利用紙杯覆蓋其上，放置高壓蒸氣滅菌釜殺菌 20 min (操作壓力為 1.2 kg/cm₂，溫度為 121°C)。待培養基滅菌完取出，以 75 % 酒精噴灑滅菌後，放置無菌操作台靜置冷卻；取保存於-20°C 的冷凍菌種進行 heat-shocked (70°C，20 min)，將其倒入培養基中，送至恆溫震盪培養箱以溫度 28°C，轉速 150 rpm 條件下進行培養 48 小時。

表 3-3 ISP MEDIUM 2 培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Yeast extract	4
Malt extract	10
Dextrose	4
Agar	20

3.4.3 發酵培養基

配置下列配方發酵培養基 50 ml 攪拌均勻且調至 pH 7.3 後，置入 250 ml 三角搖瓶中，再用通氣栓將瓶口蓋緊，並利用紙杯覆蓋其上，放置高壓蒸氣滅菌釜殺菌 20 min（操作壓力為 1.2 kg/cm₂，溫度為 121°C）。待培養基滅菌完取出，以 75 % 酒精噴灑滅菌後，放置無菌操作台靜置冷卻。

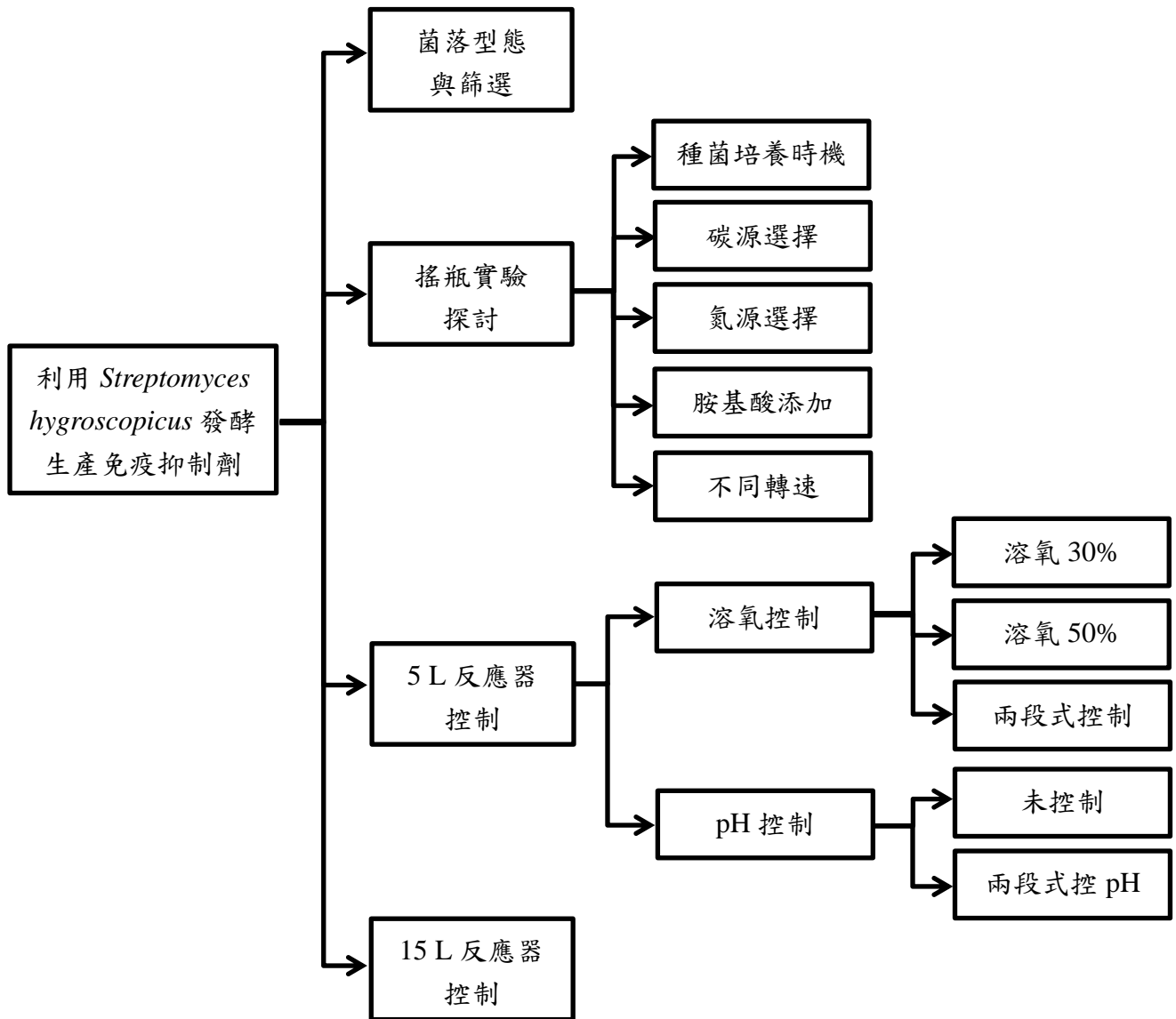
表 3-4 發酵培養基

Compounds	Concentration (g/L)
Yeast extract	4
Malt extract	10
Glucose	25

3.4.3 接菌

含有已預先培養好的 SM 與 FM 之三角搖瓶以 75% 酒精噴灑滅菌後，置入無菌操作台。取 5 ml 的 SM 加入 FM 後，均勻混合後放置恆溫震盪培養箱中，以溫度 28°C，轉速 150 rpm 下進行培養。

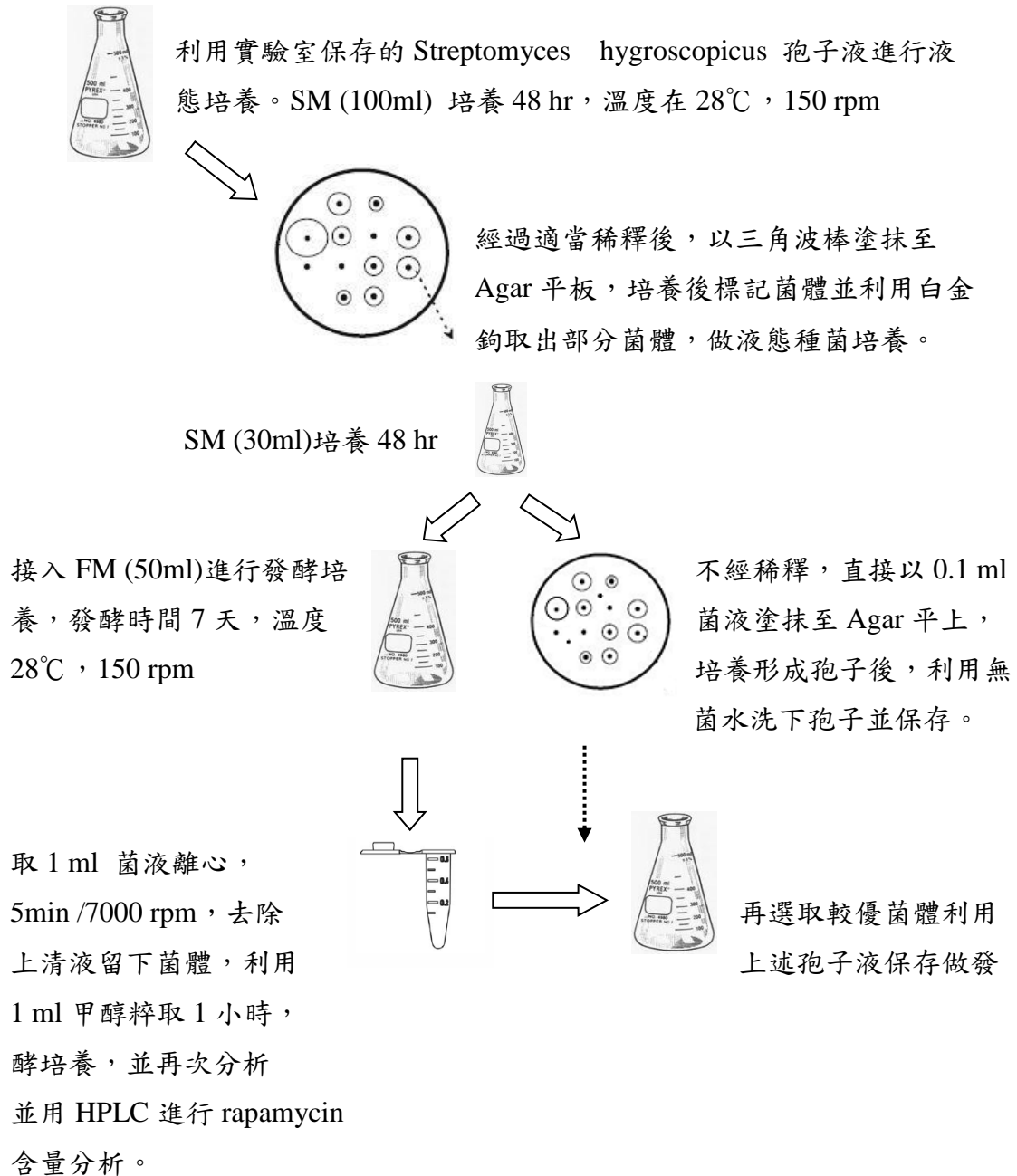
3.5 實驗架構



3.6 菌落型態與篩菌

目的：比較菌體生長不同型態的菌落，並比較產量的生產之高低。

菌種篩選流程



3.7 發酵實驗培養

3.7.1 三角瓶液態培養實驗

三角瓶實驗部分對於起始培養條件，種菌培養時間不同、碳、氮源、不同胺基酸添加，與不同轉速下培養，對於 *S.hygroscopicus* 生產 rapamycin 的影響。

3.7.1.1 種菌培養時間的影響

目的：探討種菌培養時間對發酵培養對 rapamycin 產量的影響。

- (1) 前培養 100 ml SM 培養基，分別培養 24，36，48，60 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 50 ml 發酵培養基中培養。
- (3) 置入恆溫震盪培養箱，溫度 28°C，培養 7 天。

3.7.1.2 不同碳源的影響

目的：探討不同碳源發酵培養對 rapamycin 產量的影響。

- (1) 前培養 100 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 50 ml 不同碳源的發酵培養基中培養，分別採用葡萄糖 (Glucose)、甘油 (Glycerol) 和糖蜜 (Molasses)。
- (3) 置入恆溫震盪培養箱，溫度 28°C，轉速 150 rpm，培養 7 天。

3.7.1.3 不同氮源的影響

目的：探討不同氮源發酵培養對 rapamycin 產量的影響。

- (1) 前培養 100 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 50 ml 不同氮源的發酵培養基中培養，分別採用硫酸銨($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、硝酸銨(NH_4NO_3)、尿素(Urea)和酵母萃取物(YE)。
- (3) 置入恆溫震盪培養箱，溫度 28°C ，轉數 150 rpm，培養 7 天。

3.7.1.4 添加胺基酸的影響

目的：探討不同胺基酸在初始添加，發酵培養對 rapamycin 產量的影響。

- (1) 前培養 100 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 50 ml 添加胺基酸 1 g/L 的發酵培養基中培養，分別是 Alanine (Ala)、Valine (Val)、Isoleucine (Ile)、Phenylalanine (Phe)、Glutamine (Gln)、Lysine (Lys)和 Tyrosine (Tyr)。
- (3) 置入恆溫震盪培養箱，溫度 28°C ，轉速 150 rpm，培養 7 天。

3.7.1.5 不同轉速下培養的影響

目的：探討不同轉速下與兩段式轉速下發酵培養對 rapamycin 產量的影響。

- (1) 前培養 100 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 50 ml 發酵培養基中培養，分別以轉速 100 rpm、150 rpm 和兩段式轉速策略（前段以 150 rpm、後段以 100 rpm）。
- (3) 置入恆溫震盪培養箱，溫度 28°C ，培養 7 天。

3.7.2 發酵槽 5 L 培養實驗

發酵槽部分如下圖 3-2，利用攪拌式 5L 發酵槽與監控軟體進行控制策略改變發酵條件探討對產物產量之影響。



圖 3-2 5 L 攪拌式發酵槽與監控裝置圖

3.7.2.1 DO 控制之影響

- (1) 前培養 200 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 2L 發酵培養基中培養。
- (3) 通入過濾後無菌空氣，培養條件為溫度 28°C、容氧：30%、起始 pH：7.3。
- (4) 再以不同的 DO 控制策略(DO30%、DO50%、two stages control)進行發酵。

3.7.2.2 pH 控制之影響

- (1) 前培養 200 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 以 10% 接菌量將 SM 接入 2L 發酵培養基中培養。
- (3) 通入過濾後無菌空氣，培養條件為溫度 28°C、容氧：30%、起始 pH：7.3。
- (4) 再以不同的 pH 控制（no control、two stages control of pH >6、=6、=5.5）策略進行發酵。

3.7.3 發酵槽 15 L 培養實驗

利用 15L 攪拌式發酵槽進行 5 L 發酵策略最佳條件之放大培養，探討產物產量之影響，發酵槽部分如下圖 3-3。



圖 3-3 15 L 攪拌式發酵槽與監控裝置圖

- (1) 前培養 200 ml 的 SM 培養基，培養 48 小時。
- (2) 將 200 ml 培養後 SM 接入 8L 發酵培養基中培養。
- (3) 通入過濾後無菌空氣，培養條件為溫度 28°C、容氧：30%、起始 pH：7.3。
- (4) 再以 5 L 發酵策略最佳條件的 pH 控制（two stages control of pH =5.5）策略進行發酵。

第四章 結果與討論

4.1 菌落型態與篩菌

本次實驗探討單獨菌落個體之型態差異與產物 rapamycin 產量之影響，將適量稀釋濃度的種菌發酵液接至固態培養基上培養，自菌落中選取 7 株單獨個體菌落做標記，分別是 NO.1~7，如圖 4-1 所示。

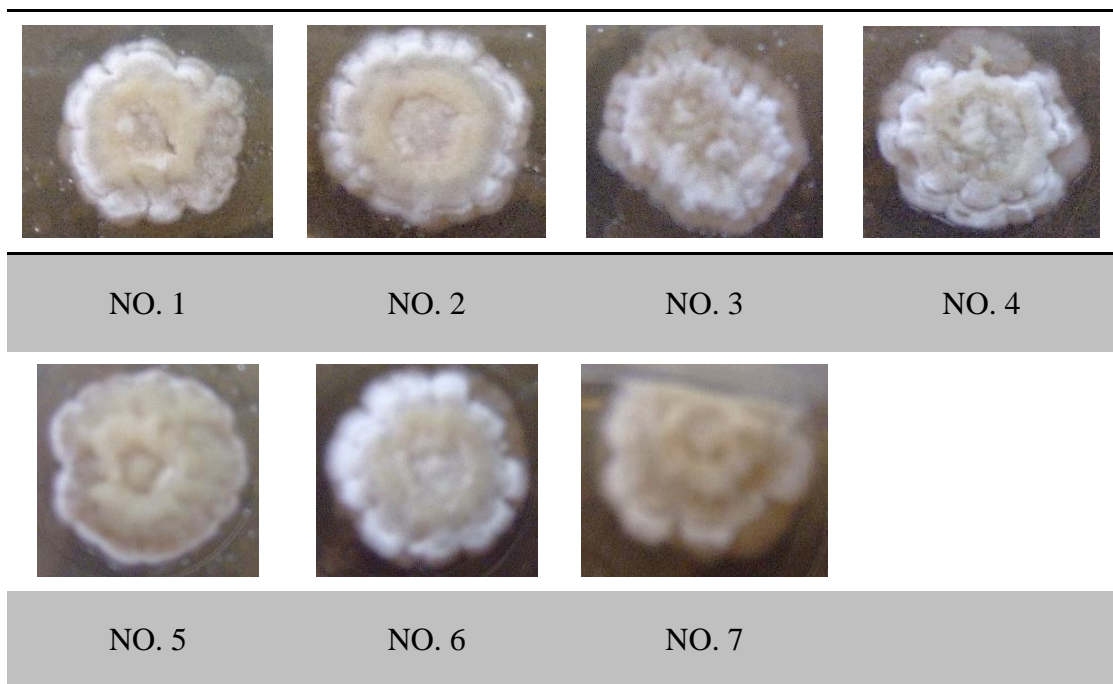


圖 4-1 菌落照片與編號

將部分菌落個別培養於體積 30 ml 的種菌培養基(SM) 48 小時，分別做發酵培養(FM)與固態培養之保存。結果如圖 4-2 所示，菌落編號 5 與 7 有較佳的 rapamycin 產量，而菌落 1、5 與 7 皆有較高的菌體量(biomass)，故選擇編號 1、5、7 進行三角搖瓶的發酵實驗。結果如圖 4-3 所示，菌落編號 5 有較佳 rapamycin

產量，與篩菌前的控制組比較，rapamycin 的產量有所提高，如圖 4-4 所示。

而菌落型態上可以發現，編號 5、7 有類似的菌落型態，其周圍白色物質較少，而菌體中間也較突起，呈現似火山形狀；而編號 1、2、3、4、6 菌落周圍有較多的白色物質。與實驗結果比較，周圍白色物質較少較小圈，rapamycin 的產量較高。

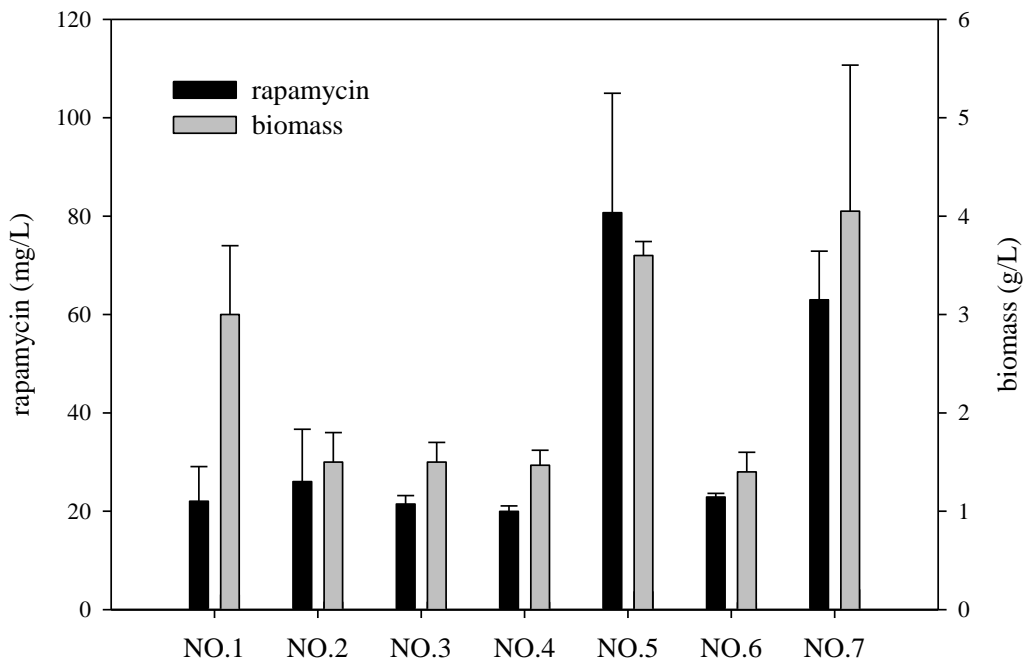


圖 4-2 編號 1~7 菌落各自發酵培養後之產物 rapamycin、biomass 的比較

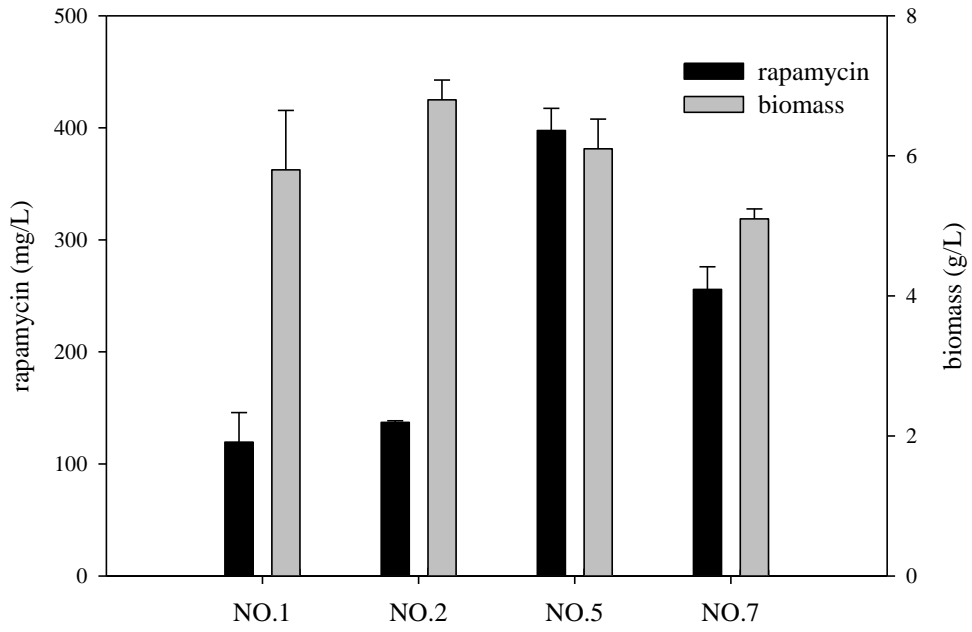


圖 4-3 編號 1、2、5、7 菌落再次發酵培養後產物 rapamycin、biomass 之比較

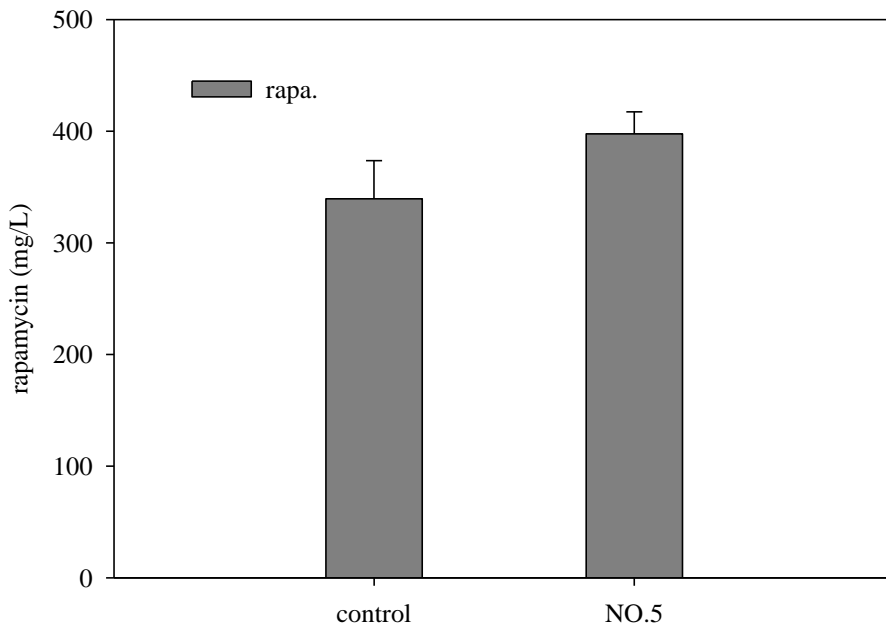


圖 4-4 控制組與編號 5 菌落再次發酵培養後產物 rapamycin 之比較

表 4-1 控制組與篩菌後的菌體 NO.5 產物生成量比較(體積 50 ml, 轉速 150 rpm , 溫度 28 °C)

Comparison	Rapamycin (mg/L)
control	339±34
NO.5	398±20

4.2 發酵實驗培養

4.2.1 三角瓶液態培養實驗

4.2.1.1 種菌培養時間的影響

本次實驗探討不同種菌培養 (SM) 時間對於之後發酵培養產物 rapamycin 生成之影響做探討。實驗結果如圖 4-5 示，以培養 48 小時之種菌培養進行的發酵培養結果最佳，其 rapamycin 產量為 379 ± 38 mg/L，biomass 產量為 6.6 ± 1.5 g/L，故以此作為之後實驗的種菌培養條件 (SM)。

文獻指出，當種菌培養時間為 52 至 60 小時時，培養液中菌體密度較均勻。而以培養 60 小時的種菌培養進行發酵培養，可得最高的產量；隨著種菌培養時間的增加，產物 rapamycin 有下降的趨勢 (陳希楊等人，2011)。而本次實驗最佳的種菌培養時間為 48 小時，結果雖有出入，但其趨勢是相符的，故之後的實驗以 48 小時作為種菌培養基的培養條件。

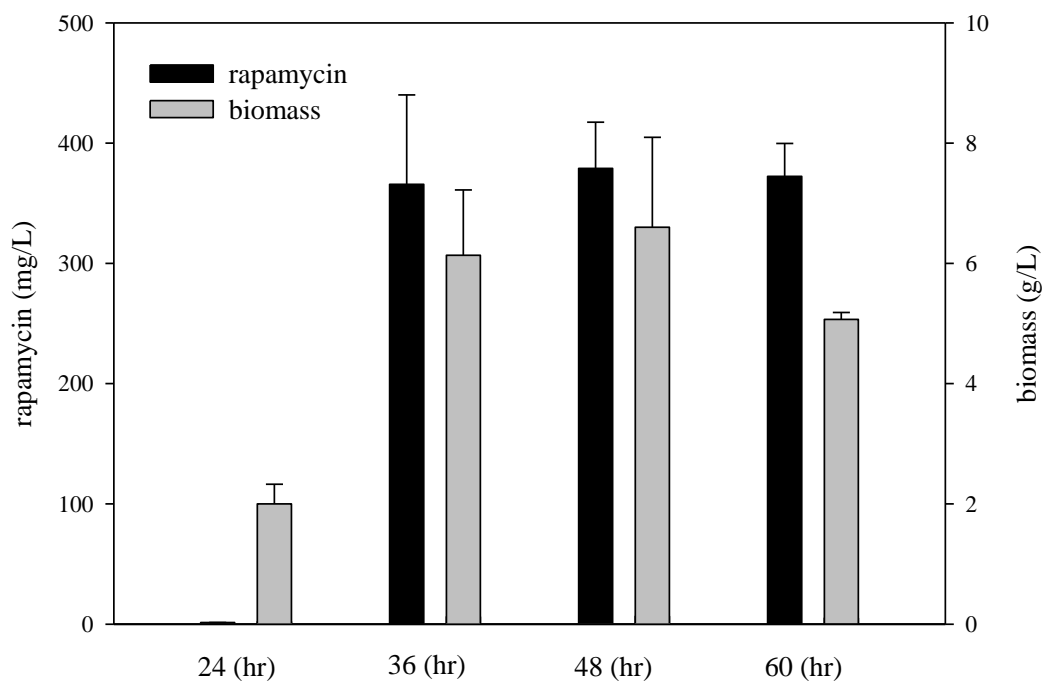


圖 4-5 不同種菌培養時間進行發酵之培養產物 rapamycin 之比較

4.2.1.2 不同碳源與濃度的影響

本次實驗探討不同碳源對於菌體 *S.hycorscopicus* 發酵之 rapamycin 產量的影響，實驗探討的碳源為葡萄糖 (Glucose)、甘油 (Glycerol)、糖蜜 (Molasses) 濃度為 10 g/L。結果如圖 4-6 顯示，葡萄糖 (Glucose) 有較佳的產物 rapamycin 生成量與較高的 biomass 產量。有文獻指出不同的碳源中，以葡萄糖 (Glucose) 及澱粉 (Starch) 有較佳產量 (李, 2001)，與本實驗結果相同。

由圖 4-6 得知以葡萄糖作為碳源有較佳的生成物產量，進而做碳源濃度最佳化之探討。由圖 4-7 顯示葡萄糖濃度為 25 g/L 有較高產值，故之後發酵培養的葡萄糖濃度都以 25 g/L 作為日後實驗之碳源。

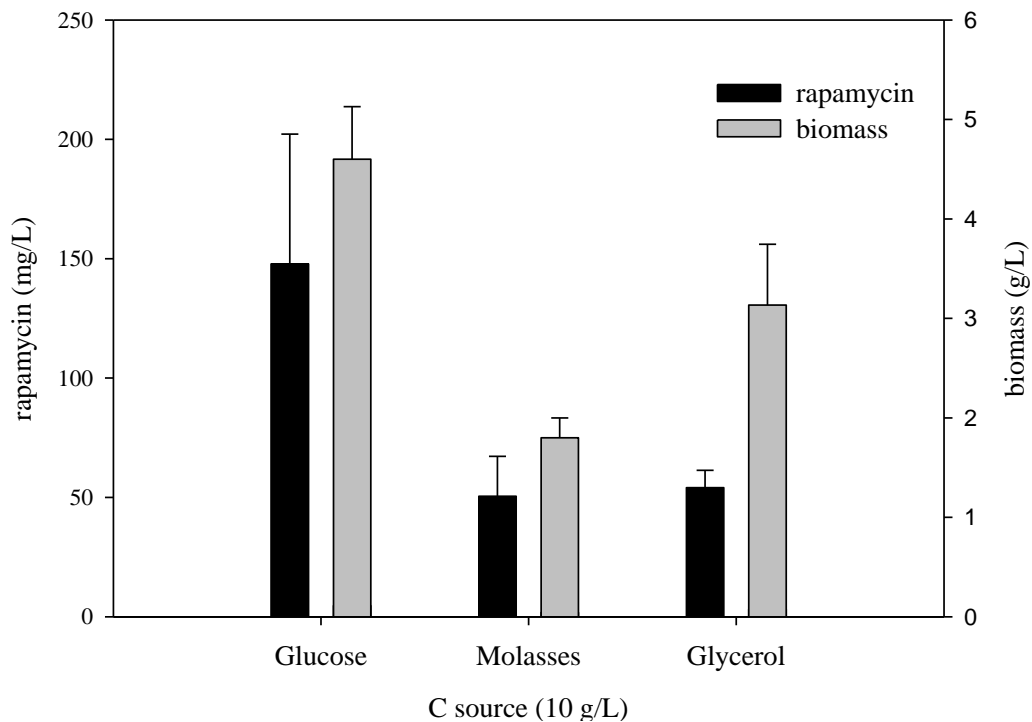


圖 4-6 不同碳源對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響 (濃度 10 g/L)

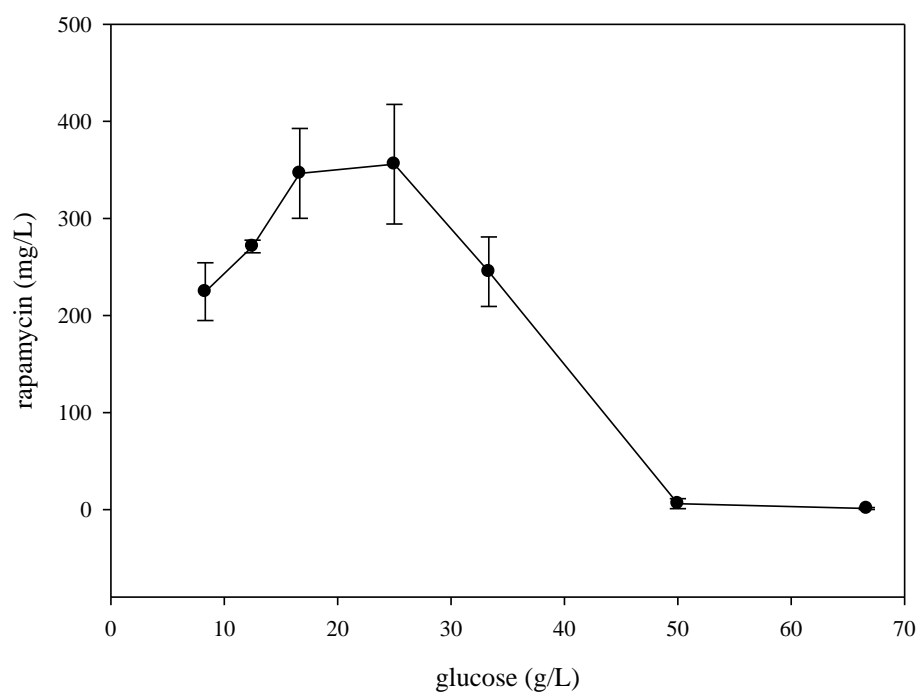


圖 4-7 不同葡萄糖 (Glucose) 濃度對發酵生產 rapamycin 之影響

4.2.1.3 不同氮源的影響

本次實驗探討不同氮源對於菌體 *S.hycorscopicus* 發酵生成產物 rapamycin 之影響，實驗探討了硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、硝酸銨 (NH_4NO_3)、尿素 (Urea) 與酵母萃取物 (YE) 作為氮源，結果如圖 4-8 顯示，以酵母萃取物 (YE) 作為氮源時有較佳的 rapamycin 生成量與較高的 biomass 產量。

文獻亦指出氮源硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 對於產物 rapamycin 的生產是有幫助的 (Lee et al., 1997)，而本實驗所使用的酵母萃取物 (YE) 是屬於複合培養基，含較多的化學成分的天然化合物，所生產的產物 rapamycin 較使用硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 培養高出許多，但在定義培養基裡，使用硫酸銨 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 培養所得的產物 rapamycin 確實比硝酸銨 (NH_4NO_3)、尿素 (Urea) 高，這點與文獻相符 (Lee et al., 1997)。在文獻中亦指出 (李順來等人, 2001)，大豆 (soybean) 及酵母萃取物 (YE) 可獲得較佳的產物生成，與本實驗結果相同，故以酵母萃取物 (YE) 作為之後實驗的氮源。

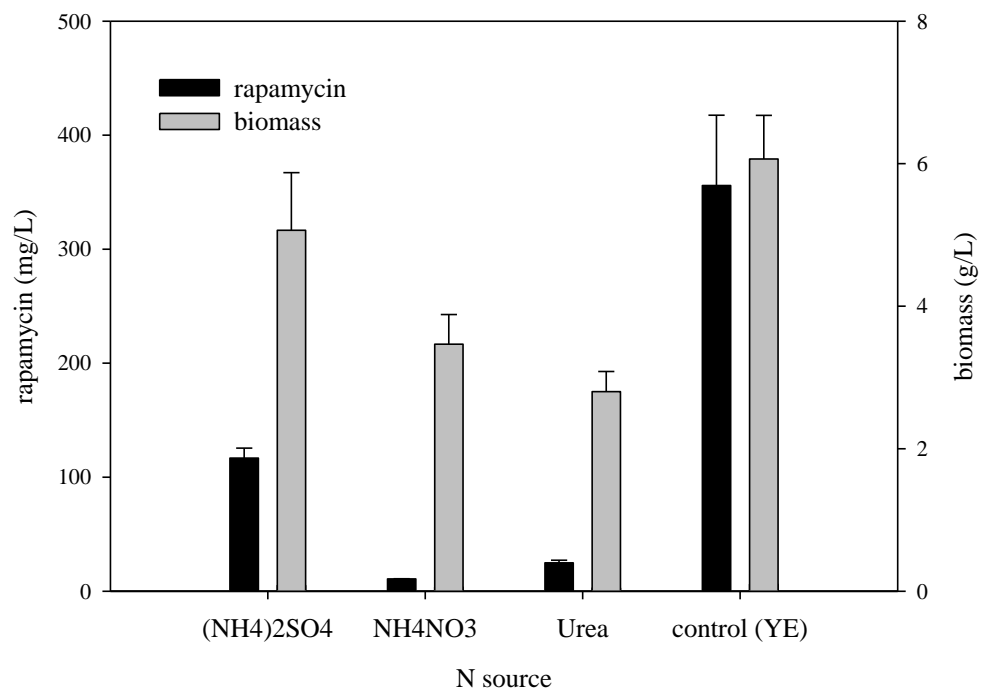


圖 4-8 不同氮源對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響 (濃度 4 g/L)

4.2.1.4 添加胺基酸的影響

本次實驗探討搖瓶添加胺基酸對於 *S.hycorscopicus* 發酵生成產物 rapamycin 之影響，分別添加濃度為 1 g/L 的 Alanine (Ala)、Valine (Val)、Isoleucine (Ile)、Phenylalanine (Phe)、Glutamine (Gln)、Lysine (Lys)、Tyrosine (Tyr) 進行發酵培養，探討產物 rapamycin 的生成與影響。結果如圖 4-9 所示，可以看出添加胺基酸 Glutamine (Gln) 與 Phenylalanine (Phe) 之產量較未添加任何胺基酸高。有文獻指出添加胺基酸 Lysine (Lys) 有助於產物 rapamycin 的生成 (Cheng et al., 1995)，但與實驗結果不符，並沒有明顯增加產物量，也許是濃度所造成的影響，因此做添加胺基酸 Lysine (Lys) 濃度變化的實驗探討，分別為 0,5 g/L、1 g/L、5 g/L。結果如圖 4-10 所示，發現隨著 Lysine (Lys) 濃度的增加，抑制效果越大，並無法提高產物 rapamycin 之生成，猜測是因為培養基內氮源酵母萃取物 (YE) 已有 Lysine (Lys) 成分在，故而外的添加反而抑制菌體的生長。

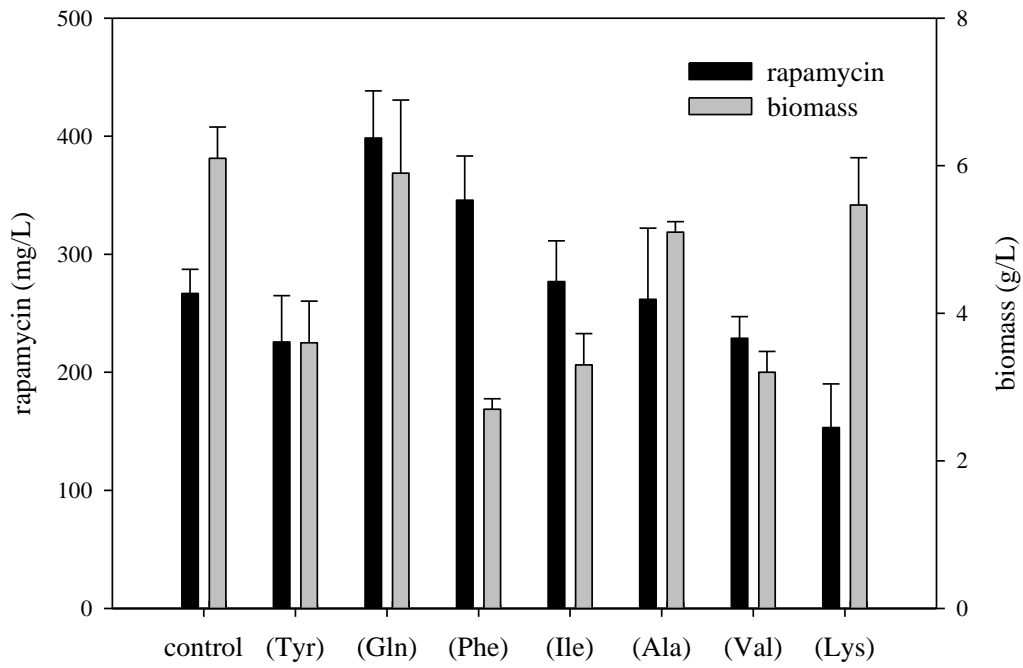


圖 4-9 添加不同胺基酸對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響(濃度 1 g/L)

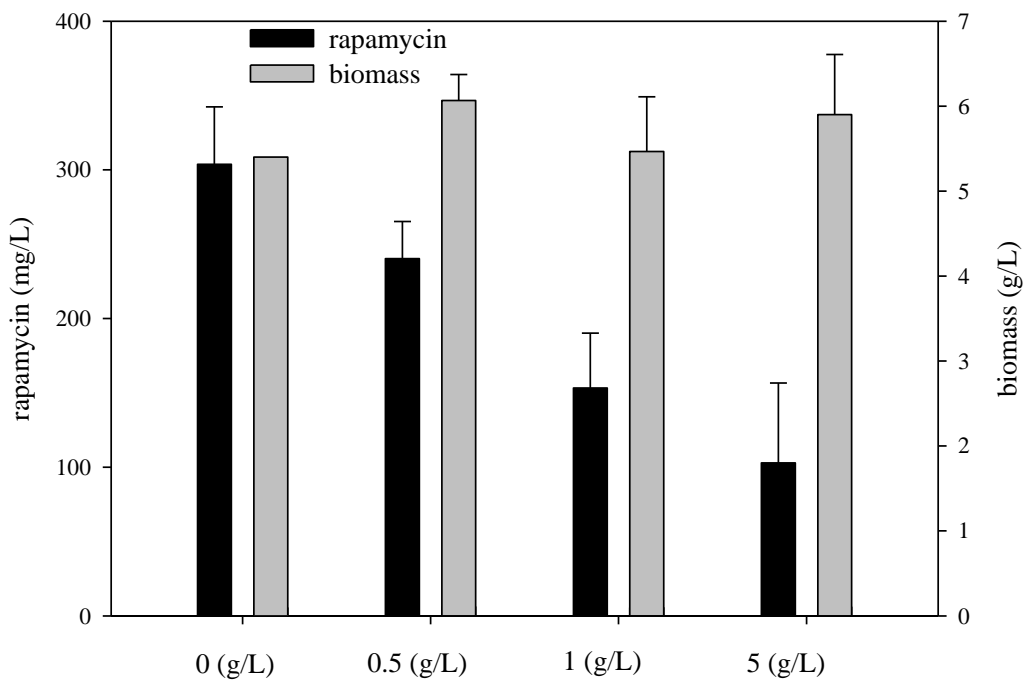


圖 4-10 胺基酸 Lysine (Lys) 不同濃的添加對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之

影響

4.2.1.5 不同轉速下培養的影響

本次實驗探討搖瓶以不同轉速培養菌體 *S.hycorscopicus* 對於發酵生成產物 rapamycin 之影響，分別以 100 rpm、150 rpm 與兩段式策略培養(前段以 150 rpm，後段以 100rpm)。文獻指出產物 rapamycin 是屬於二次代謝產物(Sung et al., 2010)，所以本實驗嘗試利用前段高轉速培養，使菌體在較高的溶氧環境下生長，提高生長速率促進 biomass 生成；後段降低轉速使溶氧量變小，希望刺激產物 rapamycin 生產。

結果如圖 4-11 所示，在低轉速的環境下培養，不利產物 rapamycin 與 biomass 的累積，而 150 rpm 與兩段式轉速控制都有較好的效果。文獻指出，以搖瓶擋板之有無作溶氧量實驗的探討，發現高溶氧下有較高的產物 rapamycin 生成 (Fang et al., 1999)，然而文獻中並無兩段式培養策略之探討。本實驗中以兩段式策略培養，其生產產物 rapamycin 可以達到 331 mg/L，較轉速單純控制於 150 rpm 的 319 mg/L 高出 12 mg/L；而第二階段後段溶氧變低，所以 biomass 較轉速單純控制於 150 rpm 的少了 0.4 g/L，差異不大。

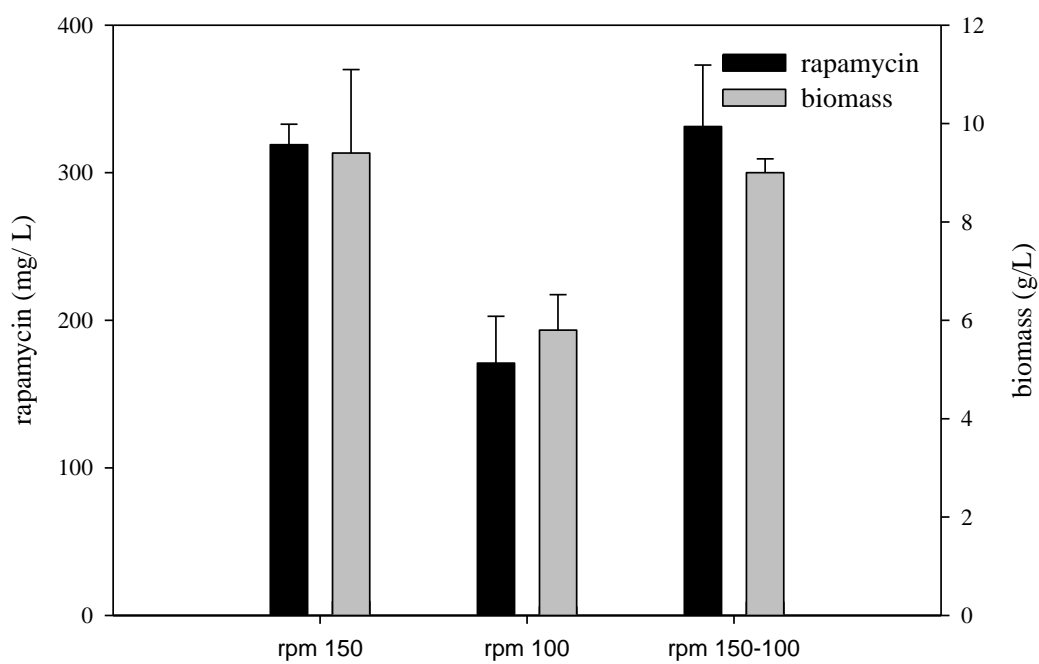


圖 4-11 不同轉速控制策略對於發酵生產 rapamycin 與 biomass 之影響

4.2.2 發酵槽培養實驗

利用前述批次搖瓶的數據來做放大培養之實驗。於 5 L 發酵槽中，反應體積為 2 L，培養並利用監測系統監控菌體生長的情形與變化，並做控制上的調控，探討產物 rapamycin 之生成。以攪拌達到 DO30 % 的控制作為空白組，如圖 4-12 所示。

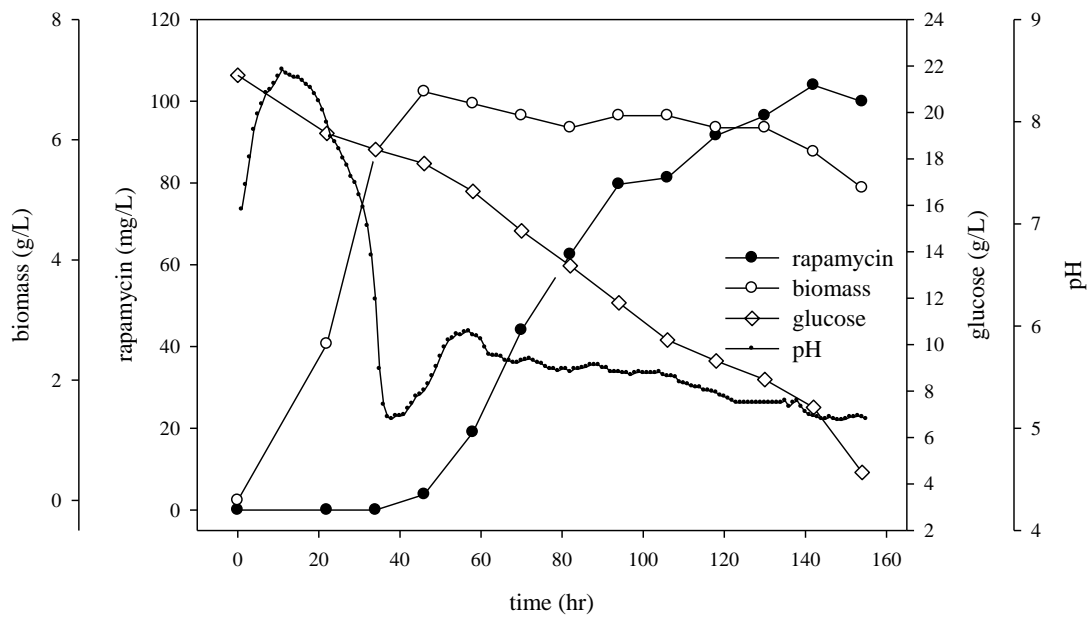


圖 4-12 5L 發酵槽工作體積 2L 之發酵培養，其產物 rapamycin、菌體量 (biomass)、葡萄糖與 pH 值之變化情形

4.2.2.1 DO 控制之影響

在控制組裡以 DO30% 維持溶氧量濃度，本實驗探討在 5 L 發酵槽裡發酵培養，DO 控制的變化對於產物 rapamycin 生產的影響，分別以 DO50% 和兩段式控制溶氧策略進行實驗。

在搖瓶轉速實驗之探討中得知，在單一轉速控制中，以較高轉速所生產的產物 rapamycin 較高，換句話說就是較高溶氧下的培養環境有較高的產量，所以將搖瓶數據中放大培養至 5 L 發酵槽培養並探討，結果如下圖 4-13 所示。產物 rapamycin 在高溶氧環境下最高可以達到 782 mg/L，相較於空白組的 104 mg/L，產量提升了 678 mg/L，明顯可以看出在高溶氧下能提升生產量，但在 biomass 生長趨勢中，與空白組比較並沒有提升反而有下降趨勢。

又由搖瓶轉速實驗之探討中得知，兩階段轉速的控制優於轉速單純控制之培養效果，故本次實驗將利用監控設備，改變轉速，調控溶氧 DO，監控菌體生長情形，以探討發酵槽中兩階段 DO 控制對培養的影響。

在發酵槽實驗，空白組與三角搖瓶實驗的結果有所出入，發酵槽以較佳的設備控制 DO 30%，rapamycin 產量只有 104 mg/L，而三角搖瓶轉速 150 rpm 時所得的 rapamycin 產量為 319 mg/L，相差了 215 mg/L。

在三角搖瓶實驗中，也做過了以轉速控制溶氧之實驗，結果顯示對於菌體生產產物 rapamycin 並無太大的效果，猜測可能是在搖瓶中培養，以轉速 150 rpm 進行實驗之溶氧量會低於發酵槽內的溶氧控制，所以在搖瓶兩段式培養實驗中，

雖然產物有少許增加，但幅度很小。

故以發酵槽進行兩段式控制溶氧策略之發酵實驗，前段採取較高溶氧量 DO 30% 進行培養，培養至約 65 小時時，biomass 趨於平穩，再進行第二階段轉速 100 rpm，DO < 5% 以下培養，使菌體在較低溶氧環境下促使菌體代謝出二次產物 rapamycin。結果如圖 4-14 所示，兩階段控制溶氧培養所得之產物 rapamycin 為 288 mg/L，相較於空白組的 104 mg/L，產量提升了 184 mg/L。而在較低轉速下培養，因葡萄糖尚未用完，故 biomass 仍持續上升至 6.5 g/L 左右。

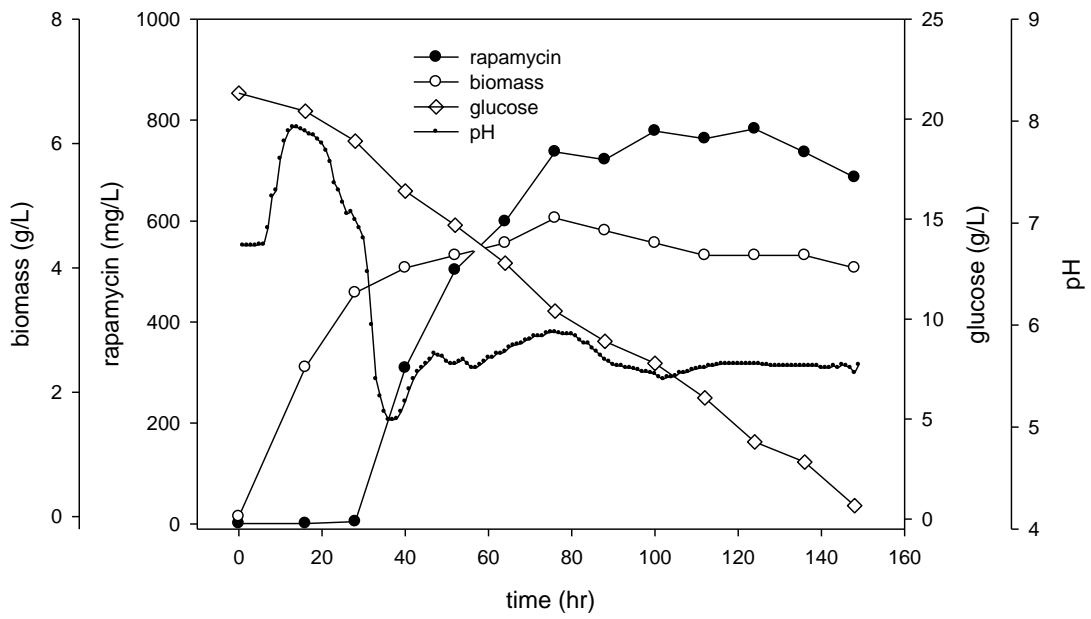


圖 4-13 5L 發酵槽工作體積 2L 之溶氧 DO50% 的發酵培養，其產物 rapamycin、菌體量 (biomass)、葡萄糖與 pH 之變化情形

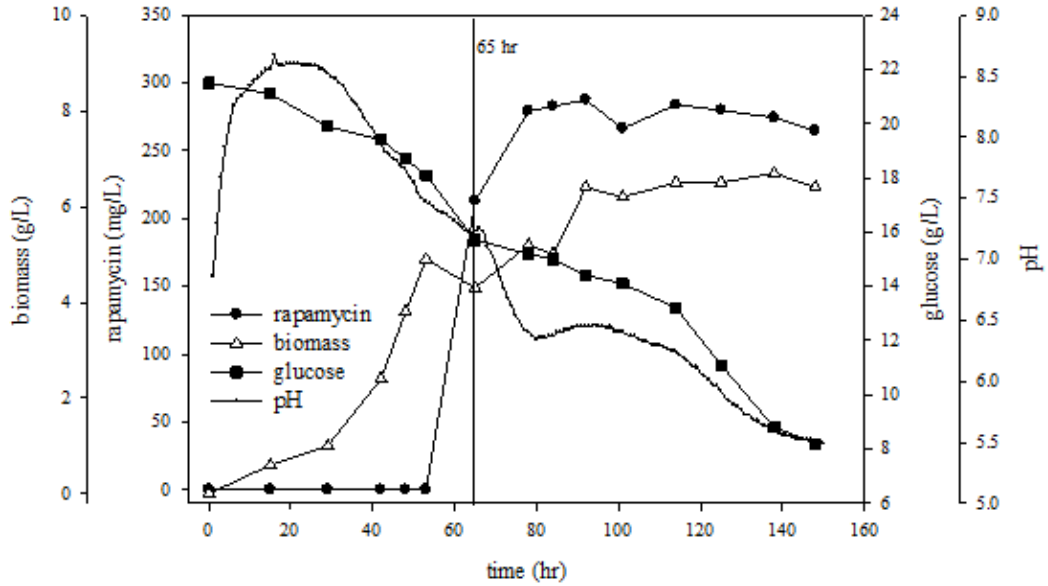


圖 4-14 5L 發酵槽工作體積 2L 之兩段式控制溶氧 DO 的發酵培養，其產物 rapamycin、菌體量 (biomass)、葡萄糖與 pH 之變化情形

4.2.2.2 DO 控制之比較

由圖 4-15 顯示產物 rapamycin 與菌體之發酵情形，高溶氧環境下，產物 rapamycin 生成方面，從空白組最大產量 104 mg/L 增加至 782 mg/L，提升了 678 mg/L，表 4-2 指出生產率 productivity 也從 0.546 上升至 6.306 mg/L h，可以證明 DO50% 的溶氧策略的確是對菌體生產 rapamycin 有幫助。在菌體量方面由圖 4-16，高溶氧條件下在後期卻比空白組少了約 2 g/L，但葡萄糖消耗速率卻比較快，猜測在高溶氧環境下培養，能促使碳源在代謝路徑中轉換成產物並非直接提升 biomass 量。

由圖 4-17 顯示產物 rapamycin 與菌體之發酵情形，在產物生成方面，兩段式控制溶氧 DO 策略的效果也比空白組好，從空白組的最大產量 104 mg/L 增加至 288 mg/L，提升了 184 mg/L，表 4-2 指出生產率 productivity 也從 0.546 上升至 3.128 mg/L h，可以證明兩段式的控制溶氧策略的確是對菌體生產 rapamycin 有幫助。在菌體量方面在後期則差異不大都維持在 6 g/L 左右，圖 4-18 顯示，由於採用兩段式控制溶氧 DO 策略，第二階段維持較低轉速下，葡萄糖消耗速率並無空白組佳，但從結果來說採用兩段式控制溶氧策略的確是有效提升產物 rapamycin 之生成的。

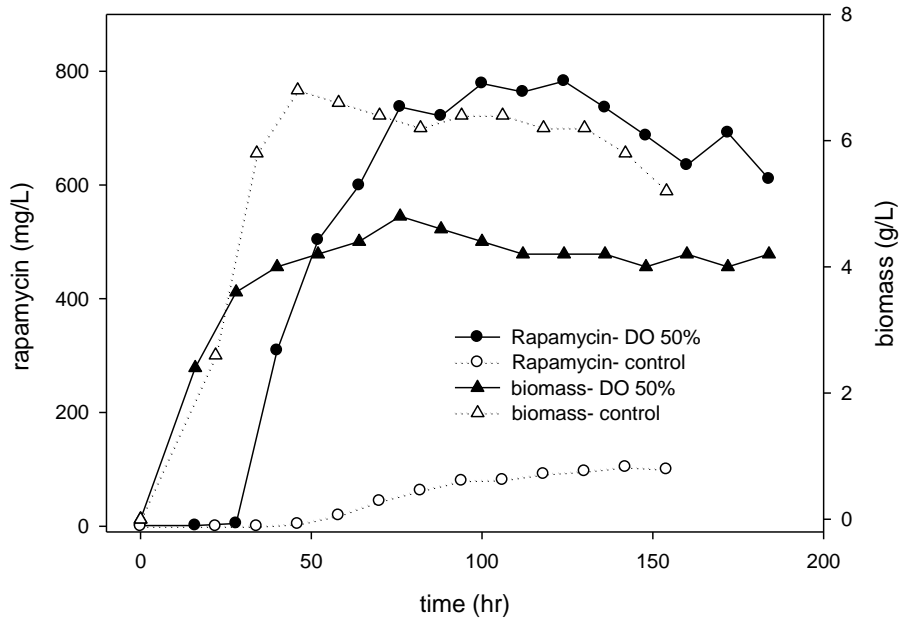


圖 4-15 5L 發酵槽工作體積 2L，DO50% 策略與空白組之發酵培養，其產物

rapamycin 與菌體量 (biomass) 之比較

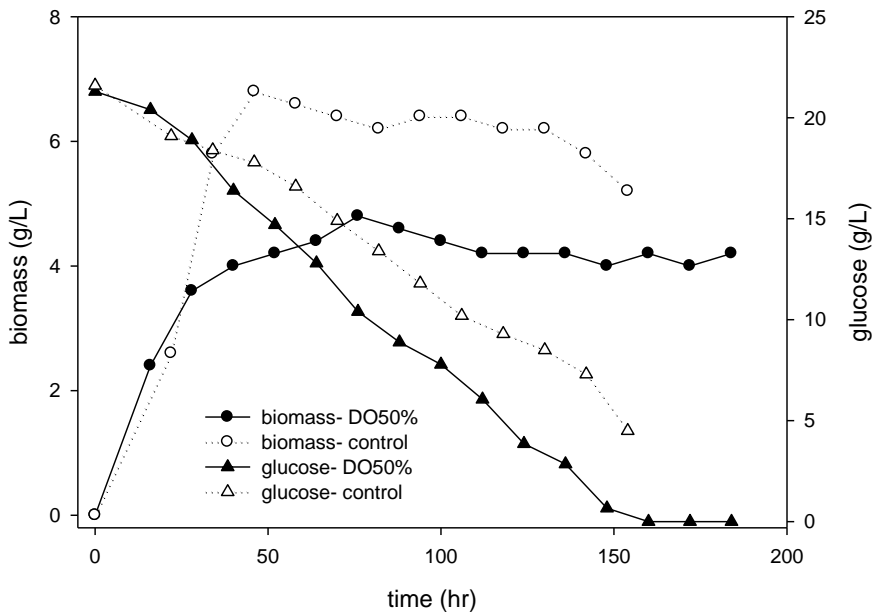


圖 4-16 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養，

其菌體量 (biomass) 與葡萄糖值之比較

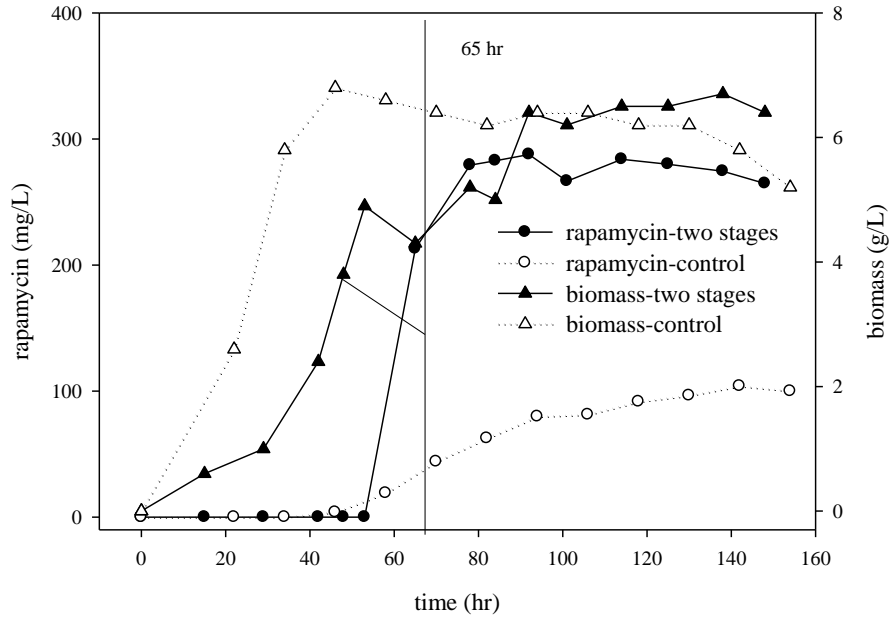


圖 4-17 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養，其產物 rapamycin 與菌體量 (biomass) 之比較

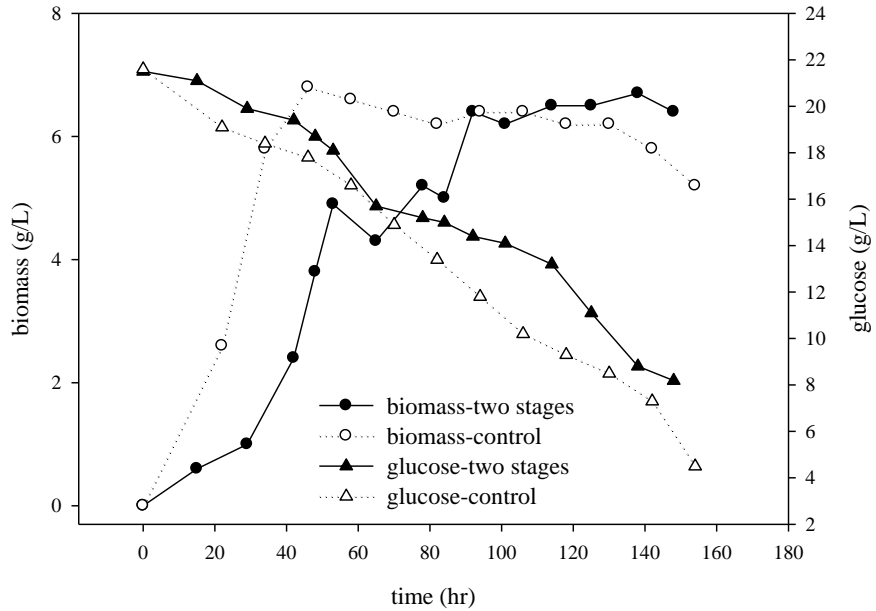


圖 4-18 5L 發酵槽工作體積 2L，兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之發酵培養，其菌體量 (biomass) 與葡萄糖值之比較

表 4-2 兩段式控制溶氧 DO 策略與空白組之數據比較

Model	Rap yield (mg/glucose consumed)	Max Rap (mg/L)	Time (hr.)	Rap productivity (mg/L h)
DO30% (control)	7.27	104	190	0.546
DO50%	44.84	782	124	6.306
Two -stages	40.54	288	92	3.128

4.2.2.3 pH 控制之影響

本實驗探討在發酵過程中 pH 的變化與影響，藉由 pH 的調控來刺激產物 rapamycin 的生成。文獻中有對初始 pH 的變化作探討，指出藉培養基添加緩衝溶液，控制 pH 在 6 時，rapamycin 的產量可達 445 mg/L (Chen et al., 2009)。

於圖4-12中發現 pH 值在60小時期間有個劇烈的變化，從初始值7上升至8點多，在24小時內又降至5，之後又上升至6，再緩慢下降。從實驗中發現當 pH 值降到 5 時，正是產物 rapamycin 開始生成的時候，而 biomass 開始趨近平穩。而文獻亦指出，pH 值在 6 時有最佳之 rapamycin 產量 38.14 mg/L (Sallam et al., 2010)，故設計兩段式 pH 控制策略，第一階段不做 pH 控制，當 pH 值降至最低點時進行 pH 控制，分別探討 pH 大於 6、等於 6 與 5.5 時對菌種生長之影響。

首先在兩段式 pH 控制策略實驗中，pH 值會從最低值回升至最高值。從空白組圖 4-12 所示得知 pH 下降至最低點回升後，pH 會持續緩慢下降，過低的 pH 會造成菌體死亡，故(1)利用 NaOH 控制 pH 於 6 以上作為大於 6 之兩段式 pH 控制策略，培養 48 小時後，pH 值便持續上升至 8 左右，如圖 4-19 顯示。結果顯示，產物 rapamycin 確實有提升的效果，從空白組的 104 mg/L 提升至 253 mg/L，增加了 49 mg/L。

(2)利用 NaOH 與 HCl 控制 pH 為 6 作為兩段式 pH 控制策略，結果如圖 4-20 所示，產物 rapamycin 從空白組的 104 mg/L 提升至 467 mg/L，增加了 363 mg/L。

(3)利用 NaOH 與 HCl 控制 pH 為 5.5 作為兩段式 pH 控制策略的發酵培養，

結果如圖 4-21 所示，產物提升至 570 mg/L，較空白組 104 mg/L 增加了 466 mg/L 之產量。而文獻亦指出在酸性環境下 pH 值約 5 左右為產物 rapamycin 之最適生成環境 (Zhu et al., 2010)，與本實驗在兩段式 pH 控制策略中，第二階段維持在 pH 5.5 下，有較佳產量之結果相近。

於三組兩段式 pH 控制策略之實驗中，相對於空白組，菌體量 biomass 逐漸下降之趨勢，而在第一階段之 pH 變化恰為菌體 biomass 大量生長的階段，故做了一組修改過的兩段式 pH 控制策略之實驗。其操作策略為(4)第二階段不控制 pH 值，而在第一階段藉逐步添加少量的鹼 (NaOH) 來延緩 pH 下降的趨勢，使菌體量 biomass 增加，進而增加產物 rapamycin 的生成。圖 4-22 顯示，pH 之變化並不如預期，pH 值在第一階段添加少量的鹼雖有延緩 pH 下降的趨勢，但卻影響了菌體的代謝，使 pH 變化趨勢無法與空白組一樣下降至 5 再回升，而是下降至 6.5 左右便回升，並持續增加。菌體量 biomass 確實比空白組高出 2 g/L 左右，且產物 rapamycin 達 312 mg/L 也較空白組 208 mg/L 高，但效果並不如之前兩段式 pH 控制策略。

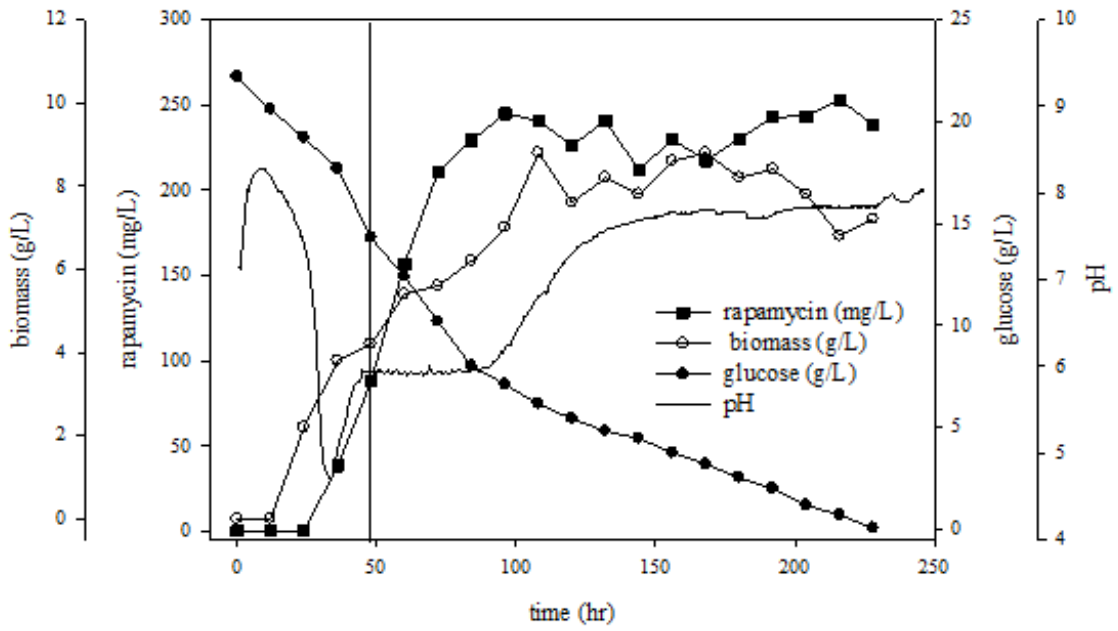


圖 4-19 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略(第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH> 6)

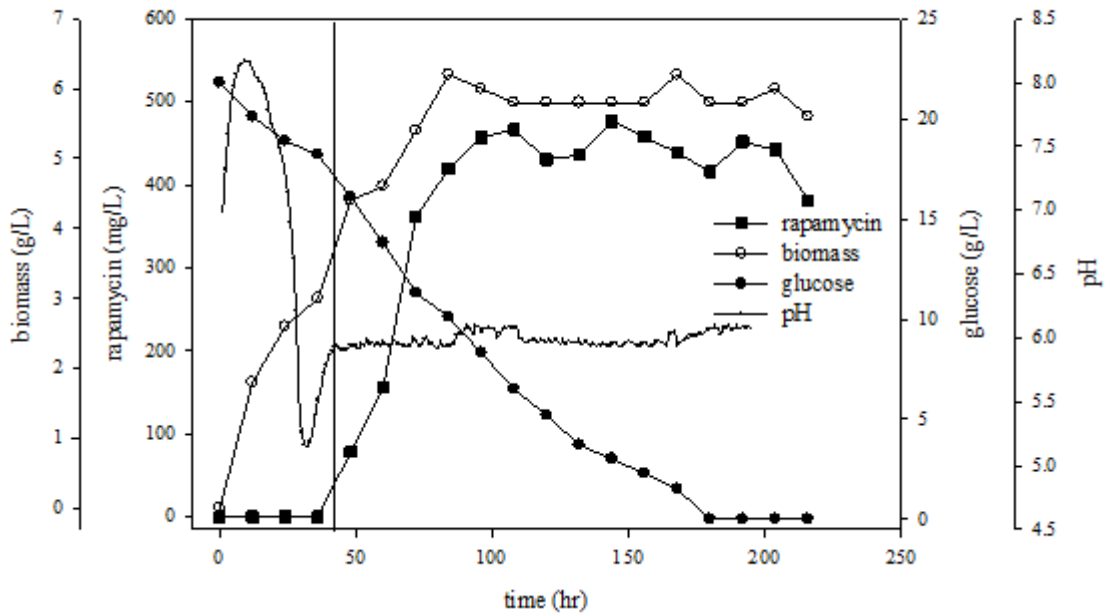


圖 4-20 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略(第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH= 6)

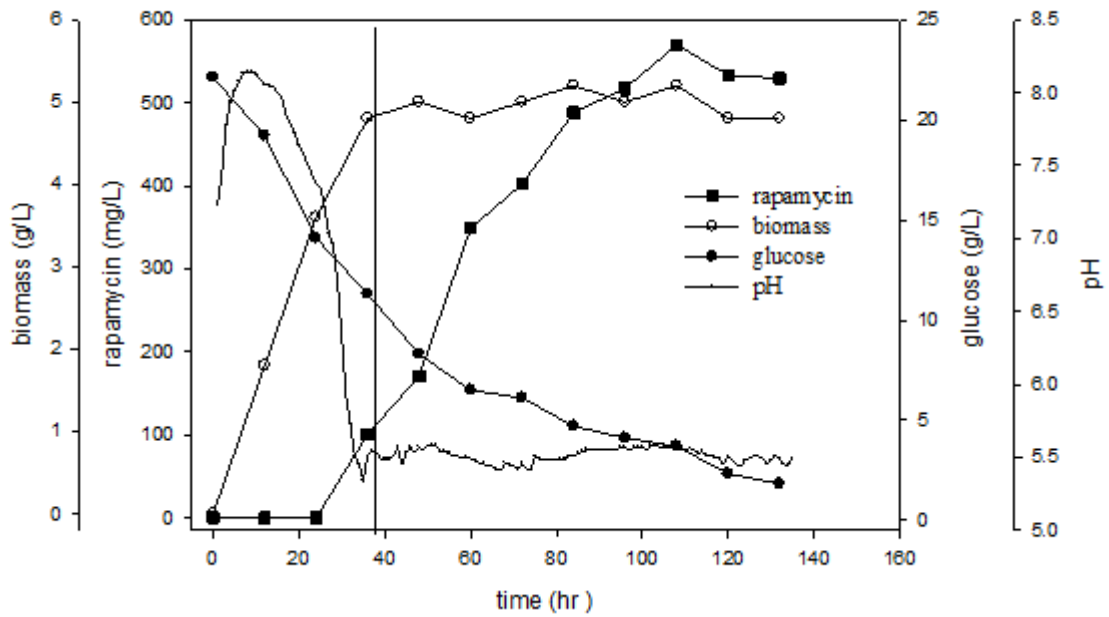


圖 4-21 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略(第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH=5.5)

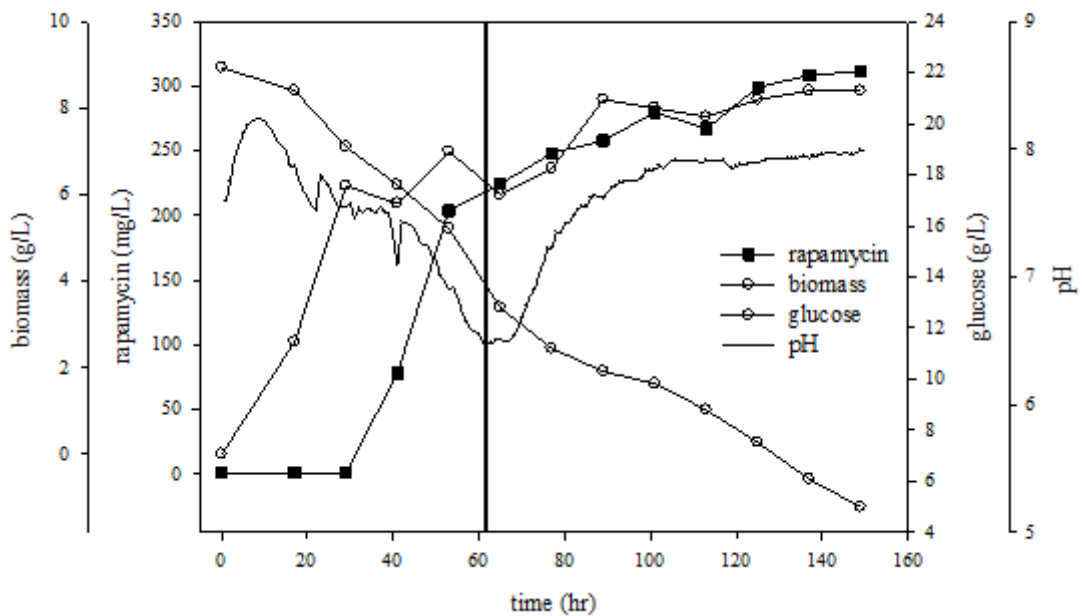


圖 4-22 5L 發酵槽工作體積 2L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略(第一階段添加少量鹼 (NaOH) 減緩 pH 值下

降幅度，第二階段不控制 pH 值之發酵情形)

4.2.2.4 pH 控制之比較

圖 4-23 的 pH 趨勢比較圖顯示不同發酵策略的 pH 值在培養約 10 小時左右皆會達最高點，約 8.5 左右，之後便下降再回升，故推測菌體在此過程進行了必要的代謝路徑，而在前段添加少量鹼減緩 pH 下降趨勢之實驗中，可能影響了代謝產物的生成，使結果不如預期。

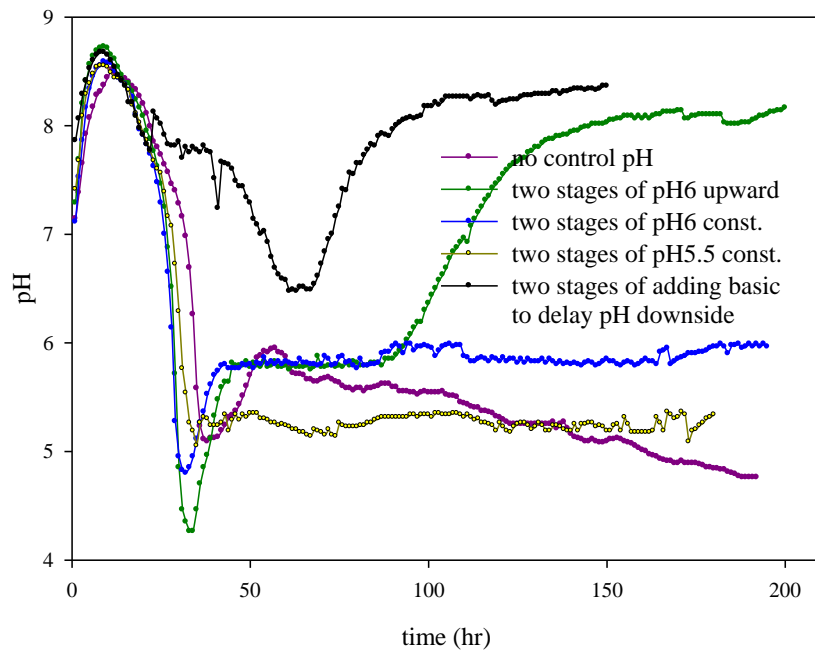


圖 4-23 5L 發酵槽，工作體積 2L 之兩段式控制 pH 策略，分別為第二階段 pH 控制在大於 6、等於 6、等於 5.5、第一階段延緩 pH 下降與控制組之 pH 變化的比較

由圖 4-24 產物 rapamycin 比較圖中顯示，在不同 pH 的控制策略下其產物 rapamycin 的變化趨勢，可以得知兩階段控制 pH 策略中，第二階段控制在 pH 於 5.5 時，有最高之產量，高達 570 mg/L；次之則是第二階段控制在 pH 於 6 時，達 467 mg/L。表 4-3 數據亦顯示在第二階段控制 pH 於 5.5 時，生產率 (productivity) 也從空白組的 0.546 mg/L h 上升至 5.275 mg/L h；次之則是第二階段控制在 pH 於 6 時達 4.320 mg/L h。

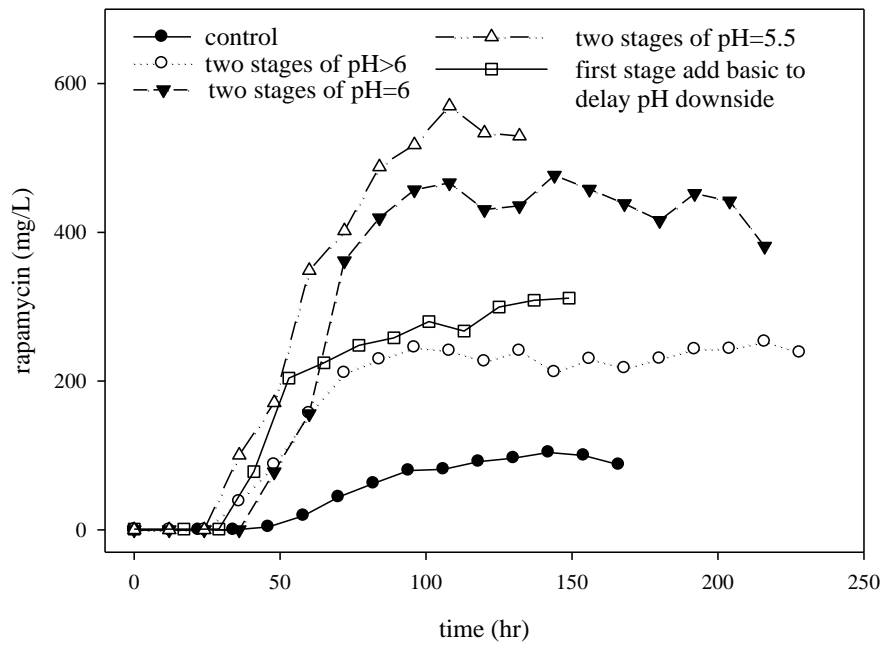


圖 4-24 產物 rapamycin 在 5L 發酵槽，工作體積 2L 以兩段式控制 pH 策略，在第二階段分別控制 pH 大於 6、等於 6、等於 5.5、在第一階段添加少量鹼延緩 pH

下降趨勢與對照組 5 組發酵情形之比較

由圖 4-25 菌體量 biomass 比較圖中顯示，在不同 pH 的控制策略下其菌體量 biomass 的變化趨勢，可以得知在兩階段控制 pH 策略中，當第二階段 pH 控制在 大於 6 時，與第一階段延緩 pH 下降之實驗，有最高之菌體量 biomass，約為 8.5 g/L。第二階段 pH 控制為 6 時，其菌體量 biomass 與空白組差不多，約為 6 g/L；而在第二階段 pH 控制為 5.5 時，有最低的菌體量 biomass，約為 5 g/L，但卻有最高的產物產量達 570 mg/L。

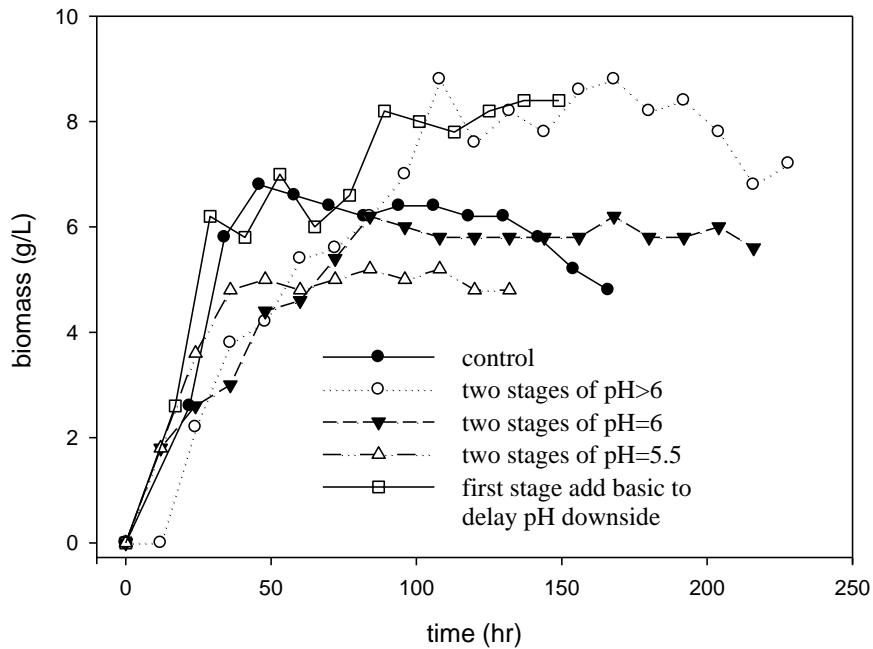


圖 4-25 菌體量 biomass 在 5L 發酵槽，工作體積 2L 以兩段式控制 pH 策略，在第二階段分別控制 pH 大於 6、等於 6、等於 5.5、在第一階段添加少量鹼延緩 pH 下降趨勢與對照組 5 組發酵情形之比較

表 4-3 兩段式 pH 控制策略與空白組之數據比較

Model	Rap. yield (mg/glucose consumed)	Max. Rap. (mg/L)	Time (hr.)	Rap. productivity (mg/L h)
Control	7.27	104	190	0.546
two stages-pH > 6	11.77	253	216	1.172
two stages-pH = 6	30.5	467	108	4.320
two stages-pH = 5.5	30.96	570	108	5.275
delay of pH at first stage	18.03	312	149	2.094

4.2.2.5 發酵槽 15 L 放大培養

本實驗依照 5 L 發酵槽，pH 值控制策略中的最佳條件，兩段式控制(3)利用 NaOH 與 HCl 控制 pH 為 5.5 作為兩段式 pH 控制策略的發酵培養，從工作體積 2 L 放大至 8 L 操作，其結果如下圖 4-26 所示，其放大培養之效果產物 rapamycin 有再提升至 683 mg/L，較空白組 104 mg/L 增加了 579 mg/L 之產量。

而下表 4-4 為不同大小發酵槽的比較數據，可以看出由 5 L 放大至 15 L 發酵槽，可以提升 rapamycin 產物的產量，而葡萄糖轉換速率由 30.96 提升至 42.08，由放大製成的結果可指出兩段式 pH 控制策略(3)，是有助於生產產物 rapamycin

。

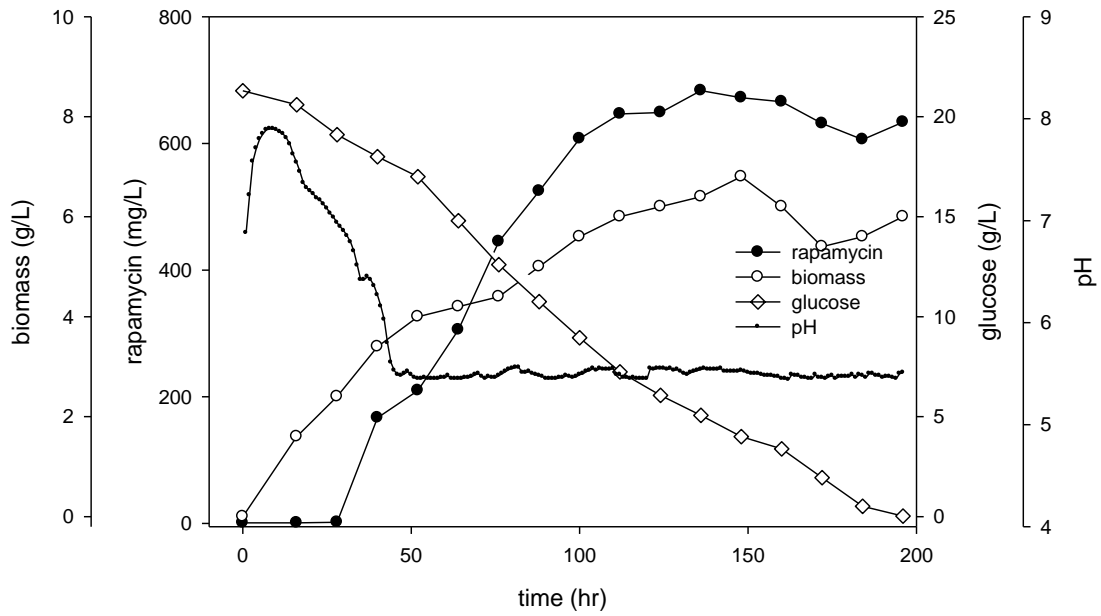


圖 4-26 15L 發酵槽工作體積 8L，其產物 rapamycin、菌體量 biomass、葡萄糖與 pH 值變化之兩段式 pH 控制策略(第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH=5.5)

表 4-4 不同發酵槽之兩段式 pH 控制策略(3)與空白組之數據比較

Fermentor	Rap. yield (mg/glucose consumed)	Max. Rap. (mg/L)	Time (hr.)	Rap. productivity (mg/L h)
5 L-control	7.27	104	190	0.546
5 L-two stages(3)	30.96	570	108	5.275
15 L-two stages(3)	42.08	683	136	5.022

(two stages(3)-第一階段不控制 pH 值，第二階段控制 pH=5.5)

表 4-5 文獻與本研究成果之產值比較表

Comparison of rapamycin production by different strains of *S.hygroscopicus* under various fermentation processes.

Carbon source	Bioreactor	Mode	Rap titer (mg/L)	Time (h)	Rap productivity (mg/L h)	Refs.
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	57	192	0.297	Kojima et al. (1995)
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	134	192	0.698	Chen et al. (1995)
Fructose, mannose	Shake flask	Batch	97-186	144	0.67-1.29	Lee et al. (1997)
Mannose	Shake flask	Batch	41.46	168	0.28	Sallam et al. (2010)
Soluble starch	Shake flask	Batch	420.0	120	3.5	Xu et al. (2005)
Soluble starch	Shake flask	Batch	445.0	120	3.71	Chen et al. (2009)
Dextrin, glycerol	Shake flask	Batch	450.0	120	3.75	Zhu et al. (2010)
Glucose	15 L fermentor	Batch	683	136	5.022	This study
Glucose	5 L fermentor	Batch	782	124	6.306	This study

第五章 結果與未來展望

5.1 結論

由上章節產物 rapamycin 生產之探討中得到的結論如下：

1. 三角搖瓶批次實驗之種菌培養基培養時間之探討中，顯示當菌種培養時間為 48 小時時，其發酵培養效果最佳。
2. 三角搖瓶批次實驗之碳氮源探討中，顯示當碳源為 glucose，且初始濃度為 25 g/L 時為較佳之選擇，而氮源則以酵母萃取物 (YE) 效果較佳。
3. 三角搖瓶批次實驗之轉速探討中，顯示兩段式策略培養即前段轉速為 150 rpm，後段為 100rpm 時，有較佳的產量生成，達 331 mg/L，較單純控制轉速為 150 rpm 的 319 mg/L 高出 12 mg/L。
4. 在 5L 發酵槽的溶氧策略調控之探討中，以高溶氧環境 DO50% 策略下，效果較空白組顯著，空白組的產量從 104 mg/L 增加至 782 mg/L，提升了 678 mg/L，而兩段式溶氧 DO 控制之策略的效果也較空白組好，空白組的產量從 104 mg/L 增加至 288 mg/L，提升了 184 mg/L；表 4-2 亦顯示 DO50% 策略下的生產率從 0.546 mg/L h 上升至 6.306 mg/L h，是在目前文獻產值表 4-5 中，批次發酵產量與產率最高的，而兩段式的溶氧控制策的生產率從 0.546 mg/L h 上升至 3.128 mg/L h，顯示出高溶氧與兩段式的溶氧控制策略對菌體生產 rapamycin 有很大的幫助。

5. 在 5 L 發酵槽的兩階段 pH 控制策略之探討中，顯示於第二階段 pH 控制為 5.5 時，產量高達 570 mg/L；生產率 (productivity) 也從空白組的 0.546 mg/L h 上升至 5.275 mg/L h，可以證明兩段式的 pH 控制策略對菌體生產 rapamycin 是有幫助的。
6. 在 15 L 發酵槽放大培養之探討中，採用於 5 L 兩階段 pH 控制策略最佳條件下培養，有更高之產量，高達 683 mg/L；生產率 (productivity) 也從空白組的 0.546 mg/L h 上升至 5.022 mg/L h，是在目前文獻表 4-5 中，批次發酵產量與產率次高的，亦可以證明兩段式的 pH 控制策略對菌體生產 rapamycin 是有幫助的。

5.2 未來展望

由於免疫抑制劑 (rapamycin) 之產量至今仍偏低。文獻中，批次產量最高只有 450 mg/L (Zhu et al., 2010)，而本研究利用兩段式 pH 控制策略，產量有效提升至 683 mg/L；DO50% 高溶氧下，產量提升至 782 mg/L。由本研究中可知，高溶氧 DO 控制策略與兩段式 pH 控制策略對 rapamycin 的生產有提升的效果，未來可嘗試更有策略性的溶氧 DO 與 pH 控制以提升 (rapamycin) 免疫抑制劑之產值。

參考文獻

- Baker H., Sidorowicz A., Sehgal S.N., Vezina C. (1978). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Antibiot (Tokyo)*. 31(6): 539-45.
- Chen X.Y., Wei P.L., Fan L.M., Yang D., Zhu X.C., Shen W.H., Xu Z.N., Cen P.L. (2009). Generation of high-yield rapamycin-producing strains through protoplasts-related techniques. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 83: 507-512.
- Chen Y.L., Krol J., Huang W., Cino J.P., Vyas R., Mirro R., Vaillancourt B. (2008). DCO₂ on-line measurement used rapamycin fed-batch fermentation process. *Journal of Process Biochemistry*, 43: 351-355.
- Chen Y.L., Krol J., Sterkin V., Fan W.N., Yan X.K., Huang W.N., Cino J.L., Julien C. (1999). New process control strategy used in a rapamycin fermentation. *Journal of Process Biochemistry*, 34: 383-389.
- Chen Y.R., Fang A., Demain A.L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 43: 1096-1098.
- Chen Y.R., Hauck L., Demain A.L. (1995). Phosphate, ammonium, magnesium and iron nutrition of *Streptomyces hygroscopicus* with respect to rapamycin

- biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 424-427.
- Cruzado J.M. (2008). Nonimmunosuppressive effects of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Journal of Transplantation Review*, 22: 73-81.
- David E.H., Randy S., Zelton D.S., James F.N., Clinton M. (2009). Rapamycin fed larvae in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Journal of Nature*, 460(10): 1038.
- Fang, A., Pierson, D.L., Mishra S.K., Demain A. L. (2000). Growth of *Streptomyces hygroscopicus* in rotating-wall bioreactor under simulated microgravity inhibits rapamycin production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 54: 33-36.
- Francis J.D., Qingxiang S. (1995). Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Journal of Life Sciences*, 58(5): 373-395.
- Kojima I., Cheng Y.R., Mohan V., Demain. A.L. (1995). Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 436-439.
- Kojima I., Demain A.L. (1998). Preferential production of rapamycin vs. prolylrapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20: 309-316.
- Law K.B. (2005). Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? . *Journal of*

Critical Reviews in Oncology and Hematology, 56: 47-60.

Lee M.S., Kojima I., Demain A.L. (1997). Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19: 83-86.

Liao Y., Wei Z.H., Bai L., Deng Z., Zhong J.J. (2009). Effect of fermentation temperature on vaildamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. Journal of Biotechnology, 142: 271-274.

Michaela K., Francis B., Monique P., Theo F., Jean-J.S. (1997). Microbial conversion of rapamycin. Journal of Enzyme and Microbial Technology, 21: 405-412.

Nancy L.P., Arnold L.D. (1991). Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Natural Products, 54(1): 167-177.

Paiva N.L., Roberts M.F., Demain A.L. (1993). The cyclohexane moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus*. Journal of Industrial Microbiology, 12: 423-428.

Sallama L.A.R., El-Refaia A.F., Osmanb M.E., Hamdya A.A., Ahmeda E.M., Mohameda M.A. . (2010). Some physiological factor affecting rapamycin production by *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253. Journal of American Science, 6(6).

Sehgal S.N., Baker H., Vezina C. (1975). rapamycin (AY-22,989), A new antifungal

antibiotic II. fermentation, isolation and characterization. Journal of

Antibiotics, 28(10).

Shi Y., August David A. (2008). A New trick for an old drug: mTOR inhibitor

rapamycin augments the effect of fluorouracil on hepatocellular carcinoma by

inducing cell senescence. Journal of Cancer Biolog and Therapy, 7(3): 1-2.

Staunton.James. (1997). Biosynthesis of Erythromycin and Rapamycin. Journal of

Chemistry Review, 97: 2611-2629.

Sung R.P., Young J.Y., Yeon H.B., Yeo J.Y. (2010). Biosynthesis of rapamycin and its

regulation: past achievements and recent progress. Journal of Antibiotics, 63:

434-441.

Tresner H.D., Backus E. J. (1956). A broadened concept of the characteristics of

streptomyces hygrosopicus.

Vézina C., Kudelski A., Sehgal S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), A new

antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing Streptomyces and isolation

of the active principle. Journal of Antibiotics, 28(10): 721-6.

Xiaoan R., Diane S., Stuart A.L., Leonard K. (1997). A second type-I PKS gene

cluster isolated from *Streptomyces hygrosopicus* ATCC 29253, a

rapamycin-producing strain. Journal of Gene, 203: 1-9.

Xu Z.N., Shen W.H., Chen X.Y., Lin J.P., Cen P.L. (2005). A high-throughput method for screening of rapamycin-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus* by cultivation in 96-well microtiter plates. *Journal of Biotechnology*, 27: 1135-1140.

Zhu X., Zhang W., Chen X., Wu H., Duan Y., Xu Z. (2010). Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 107(3).

李志元、蔡孟昆. (2007). 免疫抑制劑. 台灣醫學, 第 11 卷, 第 1 期.

李順來、郭錦瑜、盧玥文、陳嘉珮、陳仲華、何慧敏. (2001). 免疫抑制劑-Rapamycin 之生化製程開發. 行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告.

陳文盛. (1995). 鏈黴菌. 台灣分子生物學近況(下).

陳希楊、朱湘成、楊冬、沈文和、徐志南、岑沛霖. (2011). 培養條件優化和菌種選育提高雷帕霉素發酵水平. *Journal of Chemical Engineering (CHINA)*, 39(1).

陳明鎮、李伯璋. (2003). Rapamycin 藉由抑制血管新生來抑制原發性與轉移性腫瘤生長.

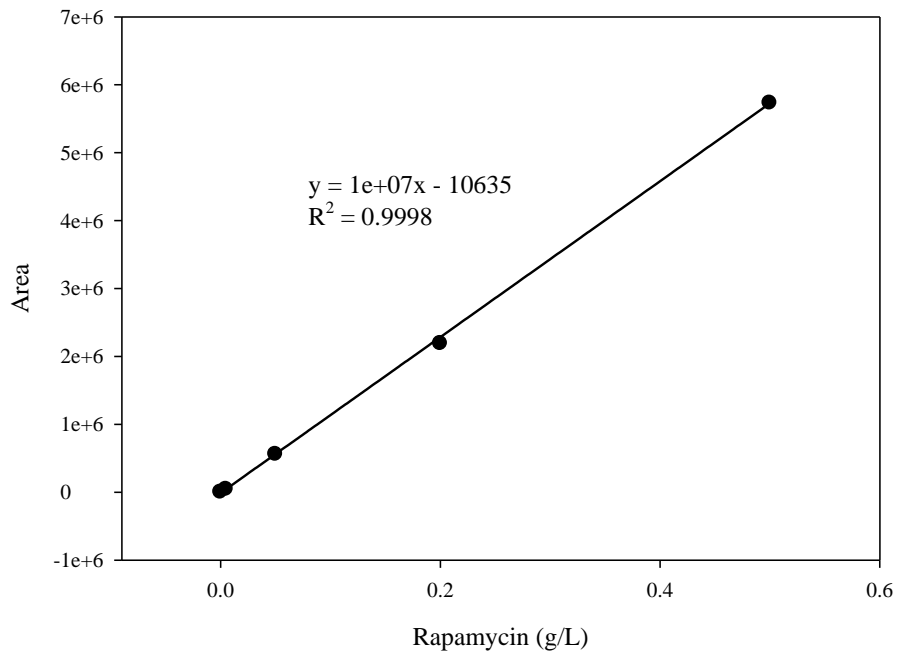
劉峻宇. (2006). 抗癌新藥: mTOR 抑制劑. 台灣癌症臨床研究發展基金會.

劉峻宇. (2006). 抗癌新藥: mTOR 抑制劑. 台灣癌症臨床研究發展基金會.

簡道南.(2006). 土壤中的放線菌. 台肥月刊, 第 47 卷, 第 1 期.

附錄

附錄 1: 產物 rapamycin 標準曲線



產物 rapamycin 標準曲線方程式： $\text{Rapamycin (mg/L)} = (\text{Area} + 10635) / 10^7 * 1000$

簡歷

姓名：蕭欣培

籍貫：台灣省彰化縣田中鎮

生日：77 年 7 月 18 日

學歷：



教育背景	學校	科(系)別	畢業日期
高中	國立清水高中	普通科	民國 95 年 6 月
大學	東海大學	化學工程學系	民國 99 年 6 月
研究所	東海大學	化學工程與材料工程學系	民國 101 年 6 月

經歷：

- 2011 年 第二十九屆台灣觸媒研討會 研習
- 2012 年 廈門大學之學術交流 研習
- 2012 年 第十七屆台灣生化工程研討會 研習



2010 年 7/30 實驗室成員於新竹-司馬庫斯巨木合影