

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：楊芳鏘 博士

Advisor: Fan-Chiang Yang, Ph.D.

環境因子對大腸桿菌噬菌體生產之影響

The effect of environmental factors on the bacteriophage $\phi 103p$ production
of *Escherichia coli* O103

研究生：蕭嘉豪 撰

Graduate student : Chia-Hao Hsiao

中華民國 102 年 1 月

Jan, 2013

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 蕭嘉豪 君所提供之論文

環境因子對大腸桿菌噬菌體生產之影響

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委員：

楊昇科

洪志勳

林其昌

指導教授：

楊昇科

中華民國 102 年 1 月 20 日

誌謝

在研究所生涯的這兩年半中，遇到了許多不同的事情，不管是喜或悲，真的感謝很多很多人對我的提攜與幫助。首先要感謝的是我的指導老師楊芳鏘教授，在老師的努力不懈的教導下，這篇論文才能慢慢累積，順利的如期完成。在做人處事方面，雖然研究生活難免會遭遇許多困難，但老師總是給我很多的意見和鼓勵，讓我往後在遇到各種狀況都有良好的應變能力。同時也要感謝洪志勳教授與林其昌教授對本論文的指正及建議，提供我很多不同的知識與觀念，使本論文更加充實，在此致上最誠摯的感謝。

我的研究生活終於要告一段落，很感謝實驗室裡的同學芒果、金門、凱平學長、宇萱學姐及義守大學的莉容學姊他們耐心的教導我實驗，在困惑時不斷給予協助，在研究上提供了很多有用的意見，在我這求學過程中增加許多歡笑，有很多不同的回憶，在大家的陪同下，覺得作研究很充實。最後要感謝我的爸媽，這段時間一直在忙學業的問題，與家人相處的時間真的不多，因為爸媽的體諒，才能專心完成學業。我知道曾經幫助我的朋友還有很多，在大家的幫忙我才能有今天的成果，在此再一次的謝謝大家。

摘要

近年來對於迅速崛起多種的新病原菌種中，大多數新病原菌都擁有可抵抗抗生素的抗藥性因子，造成可使用的抗生素日益減少，甚至沒有效果可殺死或清除這些病原菌。目前有科學家以噬菌體治療的方式，發現能夠有效殺死這些新病原菌，而且對生物體不會有任何副作用。但是現階段要製備大量噬菌體的技術仍然不成熟。為了能夠充分了解製備噬菌體的方法，我們利用大腸桿菌作為宿主菌，並加入噬菌體感染大腸桿菌探討其生長環境的優缺點，希望建立日後噬菌體大規模量產的基本數據。

本實驗主要的目的是探討環境因子對感染大腸桿菌 O103(*Escherichia coli* O103)之噬菌體(ϕ O103p)生產之影響，分別探討培養轉速、溫度、pH、添加金屬離子、培養基成分改變，並擴大為搖瓶實驗探討噬菌體生長之情形。實驗得知，搖瓶實驗中，原 LB Broth 培養基培養大腸桿菌的情況下，在 200rpm、37°C 下，加入噬菌體(10^9 PFU/ml)，感染後 120 min 噬菌體斑數目 PFU(plaque forming units) 為 1.70×10^9 PFU/ml；添加 0.3g $MgCl_2$ /per 100 ml 於 LB Broth 培養基中，於 200rpm、37°C 下培養並加入噬菌體，感染後 120 min，數目為 4.08×10^9 PFU/ml. LB 培養基中，培養大腸桿菌轉速為 200 rpm，培養噬菌體時轉速改為 150 rpm、37°C 下加入噬菌體，感染後 120 min，數目為 5.00×10^9 PFU/ml；。為了降低培養基成本，以酒糟(Thin Stillage)作為液態培養基，添加 $MgCl_2$ 於培養基中，於

150 rpm、37°C下震盪培養大腸桿菌，並於5小時後加入噬菌體，感染後80分鐘噬菌體數目為 1.92×10^{10} PFU/ml，是為LB Broth 培養基在200 rpm下培養的11.35倍。此外，本研究也進行小型發酵槽培養試驗，以酒糟作為液態培養基，在100rpm、37°C、無通氣量條件下培養大腸桿菌，5小時加入噬菌體感染後200分鐘，可達到 1.00×10^9 PFU/ml。

關鍵字:大腸桿菌、噬菌體、環境因子

Abstract

In recent years, some of so-called super bacteria have appeared, which normally had the characteristics of containing the genes resistant to antibiotics. One of novel ways for treatment of the disease caused by such bacteria is phage therapy. Phage therapy has been demonstrated to be effective for killing bacteria, and had no side effect to the organisms. However, the technology for large scale production of phage has not been fully developed at present. The objective of this research was to investigate the effect of different cultural conditions on the production of phage. The *Escherichia coli* O103 was chosen as the host for the production of phage (ϕ O103p).

In this study, the influence of cultural conditions including temperature, pH, ions, medium compositions were investigated. Moreover, different types of cultural vessels were also compared to understand the feasibility of large scale production. In the sample-bottle culture of using, LB Broth at 200 rpm, 37°C in shaker the level of phage PFU(plaque forming unit) reached to 1.70×10^9 PFU/ml,) after infection 120 min. The addition of 0.3 g $MgCl_2$ was proved to very effective to enhance the phage concentration to 4.08×10^9 PFU/ml. In contrast, if the rotating speed decreased 150 rpm, the phage PFU rosed to 5.00×10^9 PFU/ml. In order to lower medium cost, thin stillage from a local distiller was

used as media. Under the conditions of adding MgCl₂, 150 rpm and 37°C for 5 hours for *E.coli* growth, the phage PFU enhanced to the level of 1.92 x 10¹⁰ PFU/ml after infection of 80 minute, which was 11 times more than the control. A 5-liter stirred tank bioreactor was also used for the culture of *E.coli* and phage production. Using thin stillage culture to *E.coli* at 200 rpm, 37°C 5 hours, add the phage, after infection 120 min, the concentration in fermenter reached to 1.00 x 10⁹ PFU/ml.

Keywords: *Escherichia coli*, bacteriophage, environmental factors,

目錄

誌謝.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XIII
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機與目的.....	3
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 大腸桿菌簡介.....	4
2.2 大腸桿菌的培養.....	5
2-2-1 培養基成分.....	5
2-2-2 以發酵方式培養大腸桿菌.....	5
2.3 噬菌體的簡介.....	6
2-4 噬菌體的應用.....	8
2-4-1 噬菌體療法之治療.....	8
2-4-2 食品方面中噬菌體的應用.....	9

2-4-3 噬菌體對細菌的檢測.....	10
2-4-4 噬菌體對生物的呈現技術.....	10
2-4-5 其他方面的噬菌體應用.....	11
2-5 噬菌體的生產.....	12
2-5-1 噬菌體的培養及計算方式.....	12
2-5-2 噬菌體的成長範圍.....	13
2-5-3 商業化生產噬菌體.....	14
2-5-4 金屬離子的添加對噬菌體的影響.....	17
第三章 實驗材料與方法.....	19
3-1 實驗菌株與保存.....	19
3-1-1 大腸桿菌之菌株保存.....	19
3-1-2 噬菌體的保存.....	21
3-1-3 噬菌體的增量與濃縮.....	21
3-2 實驗儀器與藥品.....	23
3-3 實驗方法.....	25
3-3-1 實驗架構.....	25
3-3-2 探討環境因子對大腸桿菌生長之影響.....	26
3-3-2-1 大腸桿菌之隔夜菌製備.....	26
3-3-2-2 探討大腸桿菌生長曲線之測定.....	26

3-3-2-3 探討添加碳源對大腸桿菌生長之測定.....	26
3-3-2-4 搖瓶培養中大腸桿菌生長曲線之測定.....	27
3-3-2-5 搖瓶培養中以不同密閉方式培養大腸桿菌生長之測定.....	27
3-3-2-6 搖瓶培養中不同震盪轉速對大腸桿菌生長之測定.....	27
3-3-2-7 搖瓶實驗中不同 Define medium 對大腸桿菌生長之測定.....	28
3-3-2-8 搖瓶實驗中豆漿成分對大腸桿菌生長之測定.....	29
3-3-2-9 搖瓶實驗中酒糟成分對大腸桿菌生長之測定.....	29
3-3-2-10 小型發酵槽中通氣量對大腸桿菌生長之測定.....	29
3-3-3 探討環境因子對噬菌體感染之影響.....	30
3-3-3-1 不同的 MOI 差異對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	30
3-3-3-2 探討不同 pH 值對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	30
3-3-3-3 添加額外碳源對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	31
3-3-3-4 探討震盪溫度對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	31
3-3-3-5 探討改變震盪轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	32
3-3-3-6 探討添加金屬離子對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	32
3-3-3-7 搖瓶實驗中探討最佳震盪轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定..	33
3-3-3-8 搖瓶實驗中探討高震盪溫度對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定....	33
3-3-3-9 搖瓶實驗中探討不同 Define medium 對噬菌體感染之測定.....	34
3-3-3-10 搖瓶實驗中探討不同基質對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定.....	34

3-3-3-11 搖瓶實驗中酒糟在最佳環境因素對噬菌體 ϕ O103p 之影響...	35
3-3-3-12 搖瓶實驗中酒糟在高震盪溫度下對噬菌體 ϕ O103p 之影響...	35
3-3-3-13 小型發酵實驗中噬菌體 ϕ O103p 生產之影響.....	35
第四章 結果與討論.....	37
4-1 大腸桿菌液態培養實驗.....	37
4-1-1 大腸桿菌 O103 生長曲線之測定.....	37
4-1-2 添加碳源對大腸桿菌菌株 O103 之影響.....	40
4-1-3 搖瓶培養中大腸桿菌菌株 O103 生成之測定與樣品瓶結果比較...	42
4-1-4 搖瓶培養不同密封方式對大腸桿菌之影響.....	45
4-1-5 搖瓶培養 Define medium 對大腸桿菌生成之測定.....	47
4-1-6 搖瓶培養豆漿(Soy milk)對大腸桿菌生成之測定.....	50
4-1-7 搖瓶培養酒糟(Thin Stillage)對大腸桿菌生成之測定.....	52
4-1-8 小型發酵槽在不同通氣量培養酒糟對大腸桿菌生成之測定.....	54
4-2 噬菌體 ϕ O103p 液態培養實驗.....	57
4-2-1 不同 MOI 值與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	57
4-2-2 不同 pH 值與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	59
4-2-3 添加碳源與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	61
4-2-4 震盪溫度與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	63

4-2-5 震盪轉速與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	66
4-2-6 添加金屬離子與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響.....	71
4-2-7 搖瓶培養中震盪轉速與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討.....	74
4-2-8 搖瓶培養實驗在 42°C 時與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討.....	76
4-2-9 搖瓶培養實驗在不同 Define medium 時與噬菌體生產之影響.....	78
4-2-10 搖瓶培養實驗在不同基質時與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討..	80
4-2-11 搖瓶實驗以最佳環境因子對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討....	82
4-2-12 搖瓶實驗以 42°C 改變轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討... 84	
4-2-13 小型發酵槽對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討.....	86
第五章 結論與未來展望.....	87
5-1 結論.....	87
5-2 未來展望.....	91
參考文獻.....	92

圖目錄

圖 2-1 T4 噬菌體感染病原菌進行的循環路徑.....	7
圖 2-2 噬菌體在平盤培養基上溶裂的狀況.....	12
圖 2-3 專利中商業規模化概略培養步驟.....	15
圖 2-4 專利中所使用的噬菌體感染後其成長狀況.....	16
圖 2-5 添加 Mg^{2+} 與未添加的噬菌體感染生成情況.....	18
圖 3-1 菌株劃菌步驟.....	19
圖 3-2 實驗架構	25
圖 4-1 大腸桿菌 O103 菌株每小時測得的吸光值.....	38
圖 4-2 大腸桿菌菌株 O103 每小時測得的菌株數目.....	39
圖 4-3 添加不同探源對大腸桿菌菌株 O103 之影響.....	41
圖 4-4 樣品瓶與搖瓶培養之大腸桿菌生成之比較.....	43
圖 4-5 搖瓶培養之大腸桿菌 OD、酸鹼值生成之結果.....	44
圖 4-6 矽膠塞與錫箔紙密封對大腸桿菌生成之結果.....	46
圖 4-7 不同 Define medium 培養大腸桿菌生成之影響.....	48
圖 4-8 Define medium 測定大腸桿菌酸鹼值之情形.....	48
圖 4-9 豆漿培養大腸桿菌生成之影響.....	51
圖 4-10 酒糟培養大腸桿菌生成之影響.....	53
圖 4-11 發酵槽中大腸桿菌濃度生長情形.....	55

圖 4-12 發酵槽中培養大腸桿菌生成之影響.....	56
圖 4-13 噬菌體在不同 MOI 情況下生成之影響.....	58
圖 4-14 pH 值改變對噬菌體產量之影響.....	60
圖 4-15 添加碳源對噬菌體感染情況之影響.....	62
圖 4-16 不同溫度對噬菌體感染情況之影響.....	64
圖 4-17 不同溫度在短時間內對噬菌體感染情況之影響.....	65
圖 4-18 大腸桿菌以 100 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響.....	67
圖 4-19 大腸桿菌以 150 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響.....	68
圖 4-20 大腸桿菌以 200 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響.....	69
圖 4-21 不同轉速培養時以最高噬菌體產率相互比較圖.....	70
圖 4-22 添加金屬離子對噬菌體生產之影響.....	72
圖 4-23 添加不同量的 MgCl ₂ 對噬菌體生產之影響.....	73
圖 4-24 搖瓶與樣品瓶以不同轉速生產噬菌體之比較.....	75
圖 4-25 搖瓶與樣品瓶以 42°C 培養下生成溶菌斑數之比較.....	77
圖 4-26 不同 Define medium 中噬菌體生產之比較.....	79
圖 4-27 搖瓶培養豆漿、酒糟生成溶菌斑數之比較.....	81
圖 4-28 最佳環境因子下對噬菌體感染程度的影響.....	83
圖 4-29 最佳環境因子於 42°C 下對噬菌體感染程度的影響.....	85
圖 4-30 小型發酵槽在無通氣量下探討噬菌體生產之情況.....	86

表目錄

表 2-1 添加金屬離子對噬菌體感染 20min 後感染數目.....	17
表 3-1 培養基、緩衝溶液及藥品配製.....	20
表 3-2 實驗儀器設備.....	23
表 3-3 實驗藥品清單.....	24
表 3-4 LB Broth 組成成分.....	28
表 3-5 K.medium 組成成分.....	28
表 3-6 M.medium 組成成分.....	28

第一章 緒論

1-1 前言

近年來，面對迅速崛起和多種的新病原菌種中，大多數新病原菌都擁有抵抗抗生素的抗藥性，造成能使用的抗生素越來越少，甚至沒有效果能夠殺死或清除這些病原菌，世界衛生組織(*World Health Organization*)提出警告，這種病原菌可能會使得世界將沒任何抗生素能抵抗具有抗藥性的病原菌。這個問題引起關注，而開始有學者開始尋找替代抗生素的藥物，其中噬菌體(*bacteriophage*)以及病毒溶裂病原菌酵素為有效抑制病原菌以及無副作用的方法之一(*virolysin*)(*Parisien et al., 2008*)。

噬菌體是一種病毒，其特性是感染細菌來繁衍後代，具有專一性，由於這種特性，有學者用來研究高危險群的細菌。最早的發現者 Twort (*Twort, 1915*)以及 Herelle (*D'Hérelle, 1917*)在早期研究中發現對部分受細菌感染的病患治療有幫助，但是後來發展的抗生素除了可以殺死感染的細菌外，容易取得的特點使得噬菌體的研究漸漸沒落。而近年來因為新品種的細菌對抗生素的抗藥性高，抗生素殺菌效果越來越差，使得噬菌體的研究又慢慢重新發展了起來(*Contiero et al., 2000*)。噬菌體治療法(*Phage therapy*)是近年來研究熱絡起來的一種抑制細菌的療法，對生物體沒有危害，也能預防受到病原菌感染，在國外研究中用在醫學上以治療受感染細菌的病患；目前也正嘗試應用在食品上，作為食品添加劑，或者是肉食類食品，農產品等方向上以減少及預防沙門氏菌、大腸桿菌等細菌的增生

(*Johnson et al., 2008*)。在這個方法作為基礎，我們將探討如何提高噬菌體的產量

並且做大規模的培養等相關研究。

1-2 研究動機與目的

本實驗利用樣品瓶以液態培養的方式，分別在大腸桿菌及噬菌體兩個部份，探討對於環境因子不同之影響，進而擴大為三角瓶液態培養的方式與樣品瓶的結果做比較，最後以每個環境因子改變的最佳結果運用在噬菌體的方向上，而使得噬菌體產量有所提升，並能夠運用在商業上發展，達到低成本、高產量為最終目的。

第二章 文獻回顧

2.1 大腸桿菌簡介

大腸桿菌為人體或動物體內中存在最多的菌體之一，通常生存於腸道之中，可幫助宿主抵抗外來的病原菌侵襲，也可以幫助提供維生素，對人體有益處。除一些桿菌菌型會引起腹瀉之外，一般而言並不會產生病狀。

大腸桿菌簡稱為 *E.coli*，屬於革蘭氏陰性桿菌，外觀為兩端橢圓，鞭毛部分會遊走，能運動，為兼性厭氧、不具孢生作用之細菌。

大腸桿菌在致病性上可分為兩種，第一種為不致病性大腸桿菌 (*non-pathogenic*)，為體內正常菌群，約占大腸桿菌總數之 92~96% 間，當宿主免疫缺乏或免疫抑制的情況下，幫助宿主抵抗外來病菌；第二種則為病原性大腸桿菌 (*pathogenic*)，占大腸桿菌之 4~8% 間，此類大腸桿菌可藉由特殊機制或管道，入侵宿主；宿主有可能經由誤食遭其污染之食物或飲水，造成宿主的腸胃道受到感染或食物中毒。其中最著名的毒性大腸桿菌為大腸桿菌 O157:H7，感染後不僅會腹瀉，甚至有可能會休克死亡，是毒性非常強的大腸桿菌。

2.2 大腸桿菌的培養

2-2-1 培養基成分

一般所使用的培養基為合成培養基(*Synthetic medium*)以及天然培養基(*Natural medium*)，而培養基內含有碳源跟氮源兩種，有科學家為了培養大腸桿菌、沙門氏菌等菌種而調整其成分，定量配置成的化學成分培養基(*Chemically define medium*)為了使菌體能夠一定環境下生長，而且不會因過量的營養源造成負成長(*Frederick et al., 1974*)。

2-2-2 以發酵方式培養大腸桿菌

目前有學者利用批次發酵的方式來培養大腸桿菌，達到最佳發酵培養架構，來提高蛋白質的產量，或者是提高菌體濃度(*Lee, 1996*)並探討可能發生的問題以及解決方式，而有研究員利用甘油、果糖、葡萄糖加以不同比例的方式混合碳源發酵(*賁煜, 2002*)，可以減少大腸桿菌生成的醋酸，也能增加菌體濃度；而有學者利用出血性大腸桿菌 O157:H7 來做發酵研究並調整其參數，並了解其生長情形(*Coleman et al., 2003*)

2.3 噬菌體的簡介

噬菌體具有專一性，遍佈於自然界中，屬於病毒類型，外觀是一個蛋白質殼膜，裏頭包覆著自身的遺傳物質，遺傳物質的種類有分為雙股去氧核糖核酸、單股去氧核糖核酸、雙股核糖核酸及單股核糖核酸。噬菌體分類是觀察他們如何與寄宿的宿主細胞中生活途徑的情況來區別(Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004)，分別是潛溶型噬菌體(*Lysogenic phages*)以及溶裂型噬菌體(*Lytic phages*)。潛溶型噬菌體通常寄宿在宿主細胞之後，當噬菌體繁殖出來會與宿主細胞共同生存，不會對宿主細胞有任何影響(Skurnik *et al.*, 2006)，若是宿主細胞遭受到影響，如受 UV 照光破壞，或是溫度改變，噬菌體將會離開宿主細胞去尋找新的宿主細胞寄宿；而溶裂型噬菌體是將宿主細胞作為製造工廠，自己的遺傳物質注入到宿主細胞後生長，子代生長完成後將宿主細胞裂解掉之後再往下一個宿主細胞感染，大部分的噬菌體都是經由這個途徑生長的。溶裂型噬菌體的感染過程分為幾種階段，如圖 2-1：

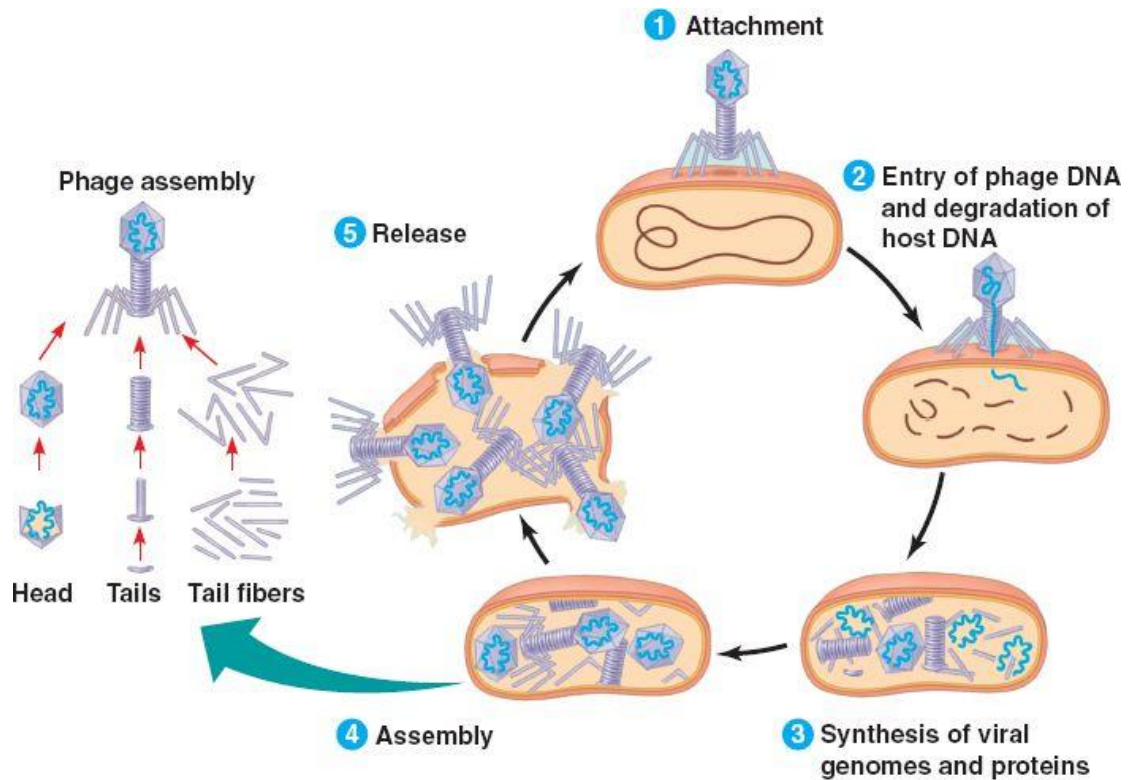


圖 2-1 T4 噬菌體感染病原菌進行的循環路徑

(取自 Biology 1131: Principles of Biological Science)

吸附 (*adsorption*)：噬菌體附著於宿主細胞膜中特定的受體 (*receptor*)上

穿透 (*penetration*)：將宿主細胞的細胞壁破壞。

複製 (*replication*)：將自己的遺傳物質注入到宿主細胞裡，製造新的噬菌體結構蛋白及遺傳物質。

成長 (*maturation*)：將複製在宿主細胞中的遺傳物質顆粒組裝成一個噬菌體

釋出 (*release*)：利用本身的溶裂酵素(*lysin*)將宿主細胞壁溶解後釋出新的噬菌體。

2-4 噬菌體的應用

2-4-1 噬菌體療法之治療

在專利上有披露出如何利用噬菌體來治療以及預防受細菌感染的方法，他們提供更創新的治療技術，使治療的效果更好或者是更安全，例如其中一種發明是利用噬菌體來預防及治療芽孢桿菌，或者是清除炭疽桿菌的孢子，而最近的一種專利在美國微生物學會出版的 mBio 上，於 2012 年 9 月發表，介紹說如何來治療粉刺，粉刺是因為丙酸桿菌(*Propionibacterium Acnes*)的影響。當毛孔阻塞，使得皮脂腺分泌的油脂無法正常排出，阻塞的毛孔使氧氣變少，引起厭氧性的 *P. acnes* 過度繁殖，分泌脂化酵素分解毛囊中皮脂變成游離脂肪酸，對皮膚有強刺激性，使毛囊周圍皮膚紅腫發炎，形成膿包性或囊腫性痤瘡，而丙酸桿菌噬菌體(*P. acnes phage*)則能夠用來抑制。噬菌體療法所使用的噬菌體不能使用潛溶性噬菌體，除了與細菌共同生存外，更有可能衍生出抗藥性基因的新種細菌，故實驗研究使用的皆為溶裂型噬菌體。

噬菌體對一些厭氧菌也有很好的抑制作用，研究學者 *Bachrach* 在人唾液中檢測到能夠殺死口腔中的 EI 糞腸球菌(*Enterococcus faecalis*) 的噬菌體(*Bachrach et al., 2003*)，且噬菌體能夠在唾液中穩定存在，此發現為治療口腔疾病提供一種新的途徑。研究學者 *Paisano* 利用噬菌體來感染牙齦中的糞腸球菌並觀察其生長，並確定噬菌體可以用來清除牙齦中存在的細菌。(Paisano et al., 2004)

2-4-2 食品方面中噬菌體的應用

噬菌體可以用來作為防止食品中的細菌增生的防治方法，加入噬菌體，可以使食品中細菌無法生長，或是需要發酵的產品上面不受其他菌滋生。另外一個優點是，加入後的食品並不會受噬菌體的影響而變質，顏色也不會改變。不過在美國及一些西方國家的食品藥物管理局(*Food and Drug Administration*)的法規制定只能加入少量對人體有影響的治療藥劑(*MacGregor, 2006*)，不過 FDA 有批准噬菌體能夠使用在熟肉食品以防止李斯德菌的滋生(*Greer, 2005*)，以及將多種噬菌體共同培養的方式來感染大腸桿菌。

2-4-3 噬菌體對細菌的檢測

噬菌體能夠用來檢測環境中的病原菌。例如，將食物浸泡在大腸桿菌的噬菌體液體中，經過高效液相層析儀(*High performance liquid chromatography*)可偵測到大腸桿菌的數量。為了增強效果，也有一些專利是利用螢光或者是磁性來作為標記噬菌體。(Averback et al., 2008)

2-4-4 噬菌體對生物的呈現技術

近年來，有一種技術可將抗體的變異區(*Variable domain*)表達在噬菌體表面，藉此得知其生物體內噬菌體是否有效殺死細菌並生成更多噬菌體，此方法稱為噬菌體表達(*Phage Display*)技術(*Smith, 1985*)。在製造單株抗體方面，它提供了一種有用的方法，而其所產生的抗體可應用於研究、診斷、與免疫治療上。利用噬菌體表達技術，可以呈現生物體上檢測檢體(楊文仁等, 2003)目前台灣正利用此技術來研究其他方向上的產物，如尋找登革熱抗體(吳承璋, 2000)或者是運用在靈芝上找尋其中產物(陳振漢等, 2010)。

2-4-5 其他方面的噬菌體應用

1966 年到 1996 年間有波蘭、蘇聯、美國、英國等 27 篇論文利用噬菌體以口服的方式來治療人體中的危害病菌，如金色葡萄球菌，鏈球菌、大腸桿菌等，成功率約為 80%~95%(Alisky *et al.*, 1998)。

在動物實驗方面，鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*) 易產生抗藥性，而目前沒有有效的藥物能夠治療此種菌株，而噬菌體可溶裂這種多重抗藥性菌株，並且有其一定效果，並注入至小鼠體內觀察其情況。(葉哲銘, 2007)。

2-5 噬菌體的生產

2-5-1 噬菌體的培養及計算方式

噬菌體利用感染寄生在宿主細菌的方式，將自己的遺傳物質注入在宿主細胞裡，並在細胞裡成長後溶裂掉宿主細胞，繼續向新的細胞進行感染。MOI, 全名為 multiplicity of infection，其定義為病毒數目與被感染的宿主細胞數目比，即為 $\frac{PFU}{CFU}$ 。PFU 全名為 plaque forming unit，指的是噬菌體感染後所生成的溶菌斑數目，CFU 全名為 colony forming unit，則指的是宿主細胞菌落數。根據 MOI 的比例，通常在 MOI = 10 是最能有效殺死細菌的比值(Bernard, 1989)，而從中為了計算其噬菌體的數量，利用序列稀釋法稀釋，在平板培養基上可看出噬菌體的感染數目，圖 2-2 為大腸桿菌感染後噬菌體溶裂情形。



圖 2-2 噬菌體在平盤培養基上溶裂的狀況

2-5-2 噬菌體的成長範圍

噬菌體的培養過程必須牽涉到宿主菌的濃度考量，感染細菌並且培養，從中分離出純的噬菌體，避免殘留細菌的內毒素以及剩餘的殘留物，使 PFU 能夠有所提升。最後純化噬菌體時，先做無菌檢查，再加工成液態、膠態以及粉末狀的噬菌體產品使用。

噬菌體療法的種類繁多，每種方法所要求的劑量皆由不同的研究者所提供，有些研究者指出，噬菌體成長的範圍約是 10^6 至 10^{13} PFU/ml (Bujanover, 2004)，但是有些研究者則是指出範圍應該在 10^5 至 10^{11} PFU/ml 的範圍之內 (Inal, 2003)。通常為了做點菌測試 (spot test)，將噬菌體利用液態培養的方式繁殖，在實驗室所用的噬菌體範圍為 10^9 至 10^{11} PFU/ml。但如果是要做一個人每天所需要的噬菌體藥劑，則必須要大規模培養噬菌體的產量才夠足以供給。最常用的噬菌體療法為多重混合噬菌體療法，而此治療法必須要使用大量的噬菌體，所以在提高噬菌體產量的方法就更加重要。

在提高噬菌體產率的專利中，有一種是利用半固態式培養基 (含有 <0.5 的 agar) 使噬菌體提高產率，至少有 10^{11} PFU/ml。曾經有學者提出假設，噬菌體的成長情況並不會指數成長 (Ellis et al., 1939)，因為在受感染的宿主細胞中，噬菌體並不會更進一步的分化，所以這推論也是有可能的。

2-5-3 商業化生產噬菌體：

商業化規模生產噬菌體對於目前來說仍然受到諸多限制的，每個種類型的噬菌體要量產之前必須要先了解其噬菌體的特性，包括如何調整它所適應的環境，何時為噬菌體的巔峰時期，或者是加速噬菌體在溶裂病原菌時的速度，更需考量成本，時間以及市場性。通常在商業規模培養噬菌體中，產量範圍必須至少在 $10^7 \sim 10^9$ PFU/ml 才足夠，因此需要十分有利的商業化生產，圖 2-3 以及圖 2-4 是取自專利 US7758856 (*Gavin et al., 2006*)概略商業規模生產噬菌體的步驟以及其結果，其結果顯現出其噬菌體培養結果以及每小時感染病原菌的變化。

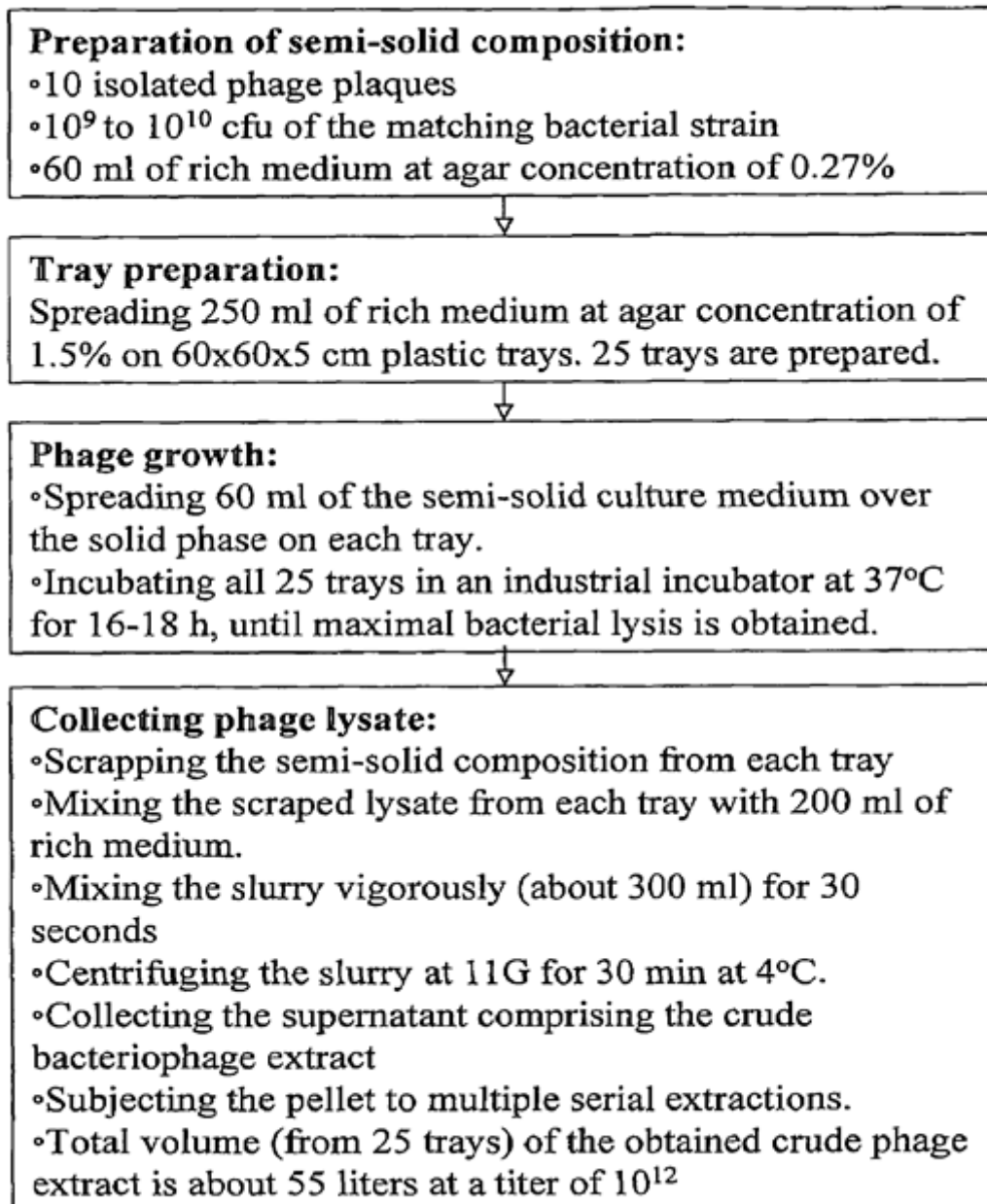


圖 2-3 專利中商業規模化概略培養步驟(Gavin et al., 2006)

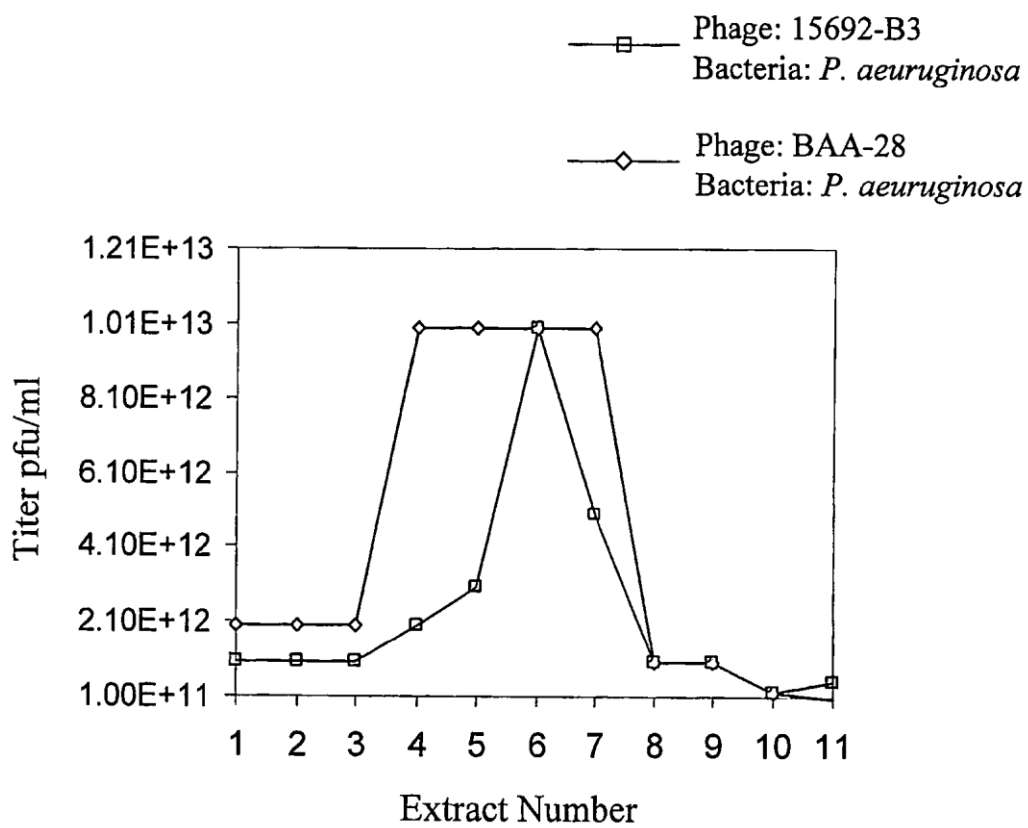


圖 2-4 專利中所使用的噬菌體生產之狀況(Gavin et al., 2006)

2-5-4 金屬離子的添加對噬菌體的影響

有學者利用芽孢桿菌(*B. megatherium*)感染噬菌體研究結果中發現添加 Mg^{2+} 後可以提升噬菌體溶裂細菌的速度(John, 1951)。而有學者以大腸桿菌做宿主菌來探討噬菌體生常情形，也確定添加 Mg^{2+} 是可以提高噬菌體生成的產量(Tucker, 1963)。如圖 2-5 顯示，為黑圈為加入 Mg^{2+} 後噬菌體的生長情形。由此可見，添加 Mg^{2+} 後所生成噬菌體感染數目是比較高的。表 2-1 則為添加金屬離子後噬菌體感染 20 min 後的結果。

表 2-1 添加金屬離子對噬菌體感染 20min 後感染數目 (Tucker, 1963)

Substance	Titre $\times 100$		Substance	Titre $\times 100$	
	Titre with $4 \times 10^{-4} M-Ca^{2+}$			Titre with $4 \times 10^{-4} M-Ca^{2+}$	
None		12	Agmatine		99
CaCl ₂		100	1,3-Diaminopropane		99
SrCl ₂		88	Spermidine		72
MgSO ₄		84	1,2-Diaminopropane		57
BaCl ₂		79	Spermine		56
MnCl ₂		74	Putrescine		34
CdCl ₂		71	CaCl ₂ +MgSO ₄		106
CoSO ₄		70	CaCl ₂ +agmatine		90
NiCl ₂		54	CaCl ₂ +1,3-diaminopropane		110
BeCl ₂		41			

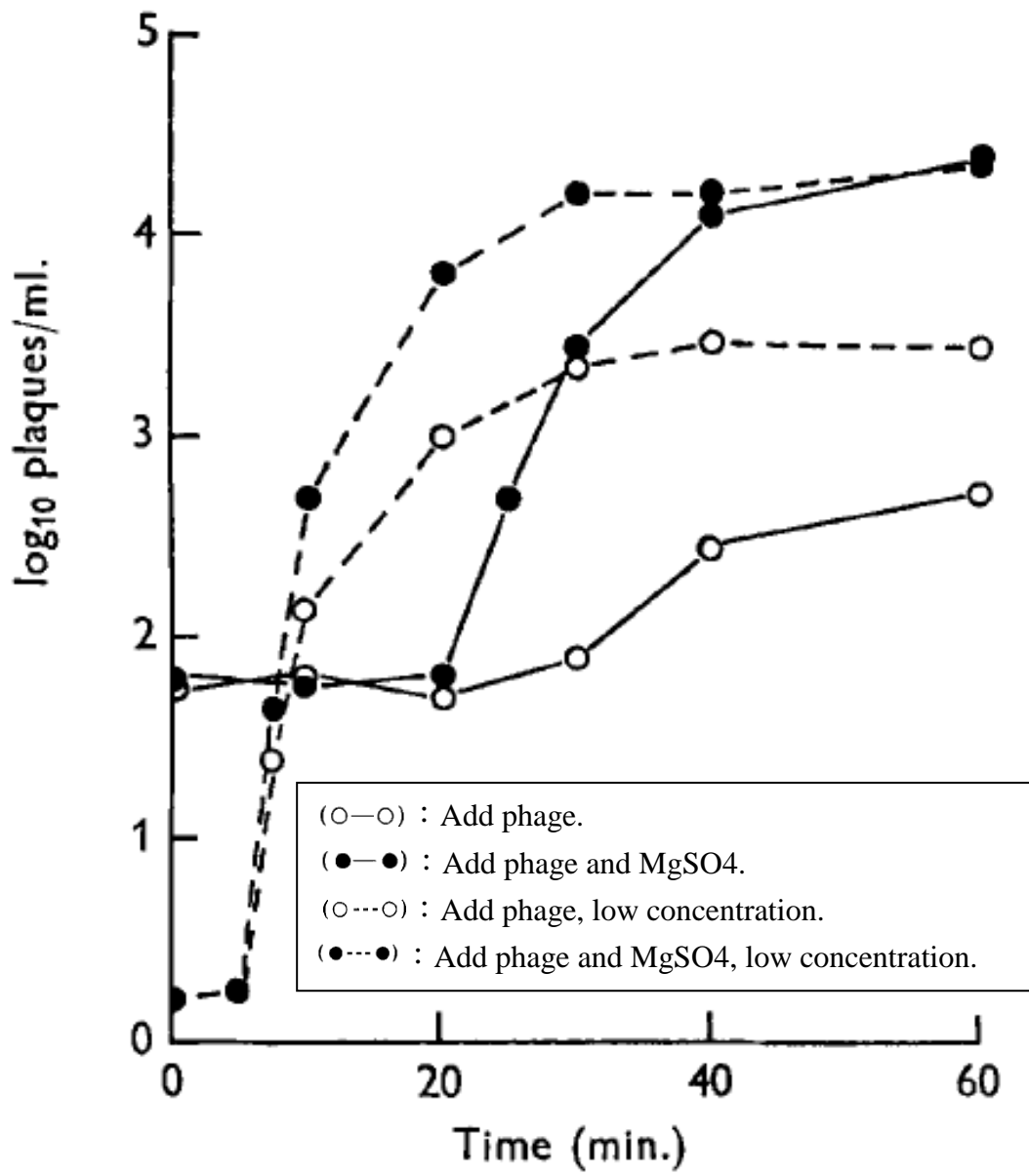


圖 2-5 添加 Mg²⁺ 與未添加的噬菌體感染生成情況 (Tucker, 1963)

第三章 實驗材料與方法

3-1 實驗菌株與保存

本實驗所使用的細菌菌株是取自於高雄義守大學化學工程學系，技術與化學工程研究所洪志勳教授所提供的大腸桿菌，其編號為 O103，而抗菌性之噬菌體菌株也是由洪志勳教授所提供，其編號為 ϕ O103 p，之後至於 4°C 冰箱中保存作後續實驗。

3-1-1 大腸桿菌之菌株保存

利用表 3-1 製作平板式固態培養基(plate)將大腸桿菌菌株利用劃菌法(圖 3-1)劃於 plate 上，培養 12 小時後，從 plate 挑選出單一菌落，利用白金鉤取出並接種於 LB Broth 液態培養液，隔夜培養菌液後，取其 900 μ l 於抗凍小管混合 300 μ l 的 87% glycerol 後，放置於零下 20°C 保存。進行後續實驗。

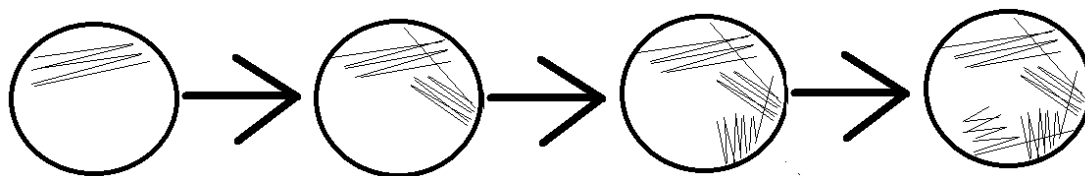


圖 3-1 菌株劃菌步驟

表 3-1 培養基、緩衝溶液及藥品配製

培養基種類	成分	含量
*LB medium 液態培養基	LB Broth	20 g
	二次過濾之純水 ddH ₂ O	加至 1 L
*LB medium 固態培養基	LB Broth	20 g
	Agar	15 g
	二次過濾之純水 ddH ₂ O	加至 1 L
*Soft agar medium 半固態培養基	LB Broth	20 g
	Agar	7.5 g
	二次過濾之純水 ddH ₂ O	加至 1 L

*以上經 121°C，15 lb/in²，高壓滅菌 20 分鐘

PBS (Phosphate-buffered saline) : KCl 0.2 g, NaCl 8 g, Na₂HPO₄ 1.44 g,

KH₂PO₄ 0.24 g 溶於 1 L ddH₂O，

調校 pH 值至 7.4，高壓滅菌。

3-1-2 噬菌體的保存

從噬菌體菌液 10^9 PFU / ml 取 600 μ l 與 600 μ l 的 87% glycerol 混合並置於冷凍小管中保存於 -20°C 。

3-1-3 噬菌體的增量與濃縮

在培養基平盤上挑選出 O103 單一菌落，接種於 LB Broth 液態培養液，震盪培養於 37°C ，200 rpm，12 小時。從中取 1 mL 菌液接種至 50 mL LB 培養液中預養三小時後，加入 MOI = 1 之 ϕ O103p 懸浮溶液 10^9 PFU / ml，混合均勻，並震盪培養於 37°C ，200 rpm，2 小時，將整個菌液以 12000 rpm 離心 40 分鐘後，取上清液以 0.45 μ m filter 過濾。40 mL 的上清液加入 40 % PEG 8000 及 5 M NaCl 各 3 mL (體積比為 40:3:3)，振盪 (vortex) 混合 1 分鐘，放置於冷藏庫 4°C 、1.5 小時後，以 12000 rpm， 4°C ，離心 2 小時，去除上清液，以 1 mL PBS 回溶試管 (pellet)。將液體取至微量離心管 (eppendorf) 中，加入 chloroform 7 滴 vortex 均勻，再以 12000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液至新 eppendorf 中再重複此步驟直至分界層無白色沉澱物為止。依序列稀釋 (serial dilution) 方法，取 100 μ l 的稀釋後的 ϕ O103p 液體、200 μ l 隔夜培養的 O103 菌液以雙層瓊脂培養法，加入至 5 mL 45°C 的 soft agar 中，vortex 均勻後立即平鋪於培養基上，形成 double layer plate，放置 37°C 震盪培養箱，並做點菌測試 (spot test) 觀察是否有溶裂。約 6 小時後清楚可見的菌斑數 (plaque count) 形成後，予

以計數，回推噬菌體菌液濃度效價(PFU/mL)。

噬菌體效價 (PFU/mL) = 溶菌斑數 × 稀釋倍數 × 取樣量折算數。紀錄日期、

濃度 (PFU/mL)、φO103p 數目於離心管上，置 4°C 冷藏備用，進行後續實驗。

3-2 實驗儀器與藥品

表 3-2 實驗儀器設備

儀器設備	型號	廠牌
pH meter	pH-206	Lutron
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
高壓滅菌釜	HI-340	台灣宏霖
無菌操作台	JW-4N	台灣亮盛
試管振盪器	MSI minishaker	德國 IKA
迴轉式震盪培養箱	LUS-150	台灣亮盛
分光光度計	GENESYS UV10	美國 Thermo
微電腦蒸餾水製造機	WSC044	英國 FISTREEM
超純水製造機	Simplicity	美國 Millipore
桌上型高速離心機	Z326	德國 HERMLE

表 3-3 實驗藥品清單

藥品名稱	廠牌
LB Broth	SIGMA
Agar	BIO.BASIC.INC
Glycerol	SIGMA
KCl (Potassium chloride)	HANAWA
MgCl ₂	SHOWA
CaCl ₂	SHOWA
KH ₂ PO ₄	聯工化學
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	聯工化學
NaCl	SHOWA
PEG 8000 (polyethylene glycol 8000)	JT.BAKER
Fe ₂ Cl ₃ · 6H ₂ O	HANAWA

3-3 實驗方法

3-3-1 實驗架構

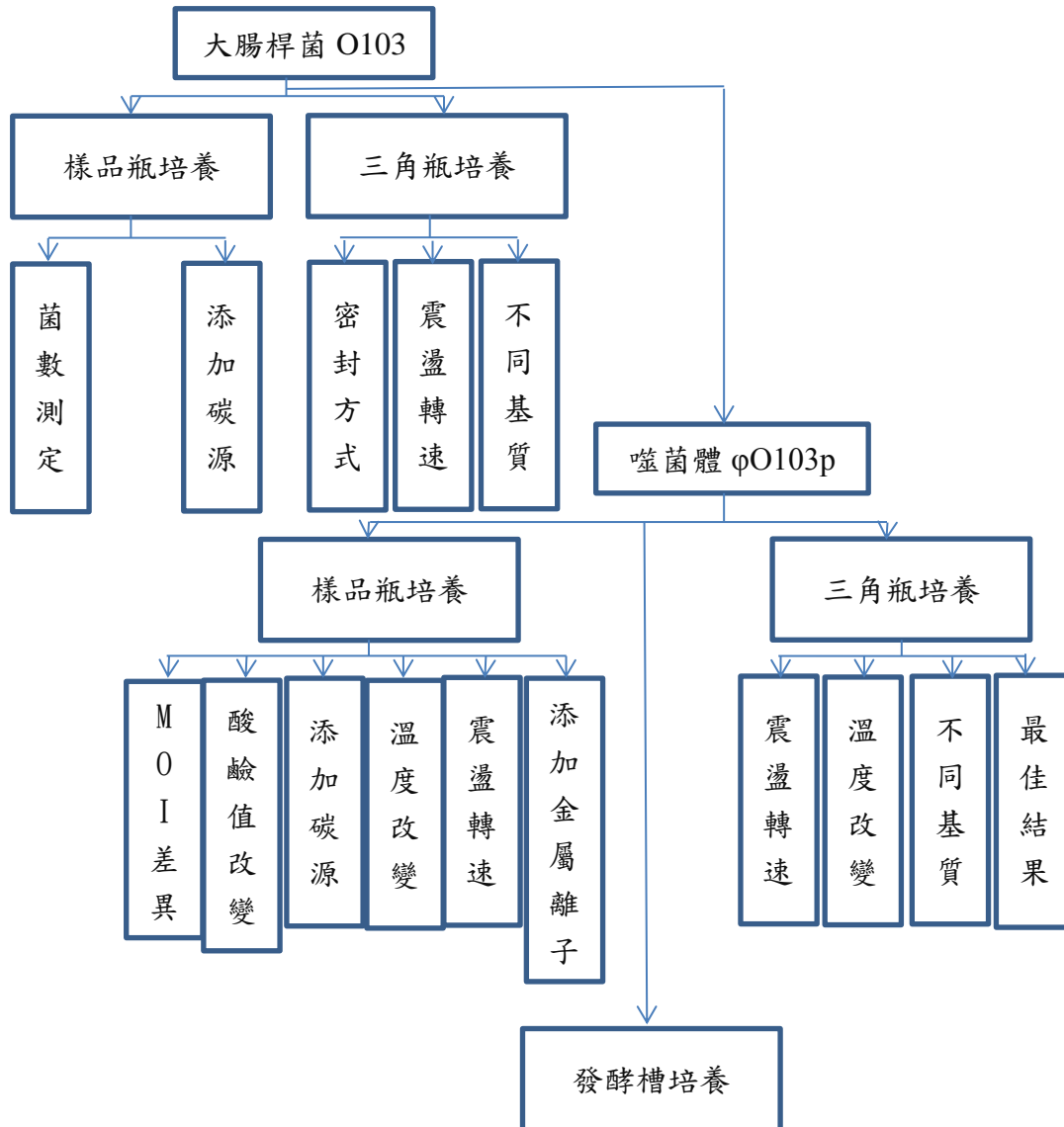


圖 3-2 實驗架構

3-3-2 探討環境因子對大腸桿菌生長之影響

3-3-2-1 大腸桿菌之隔夜菌製備：

在培養基平盤上挑選出 *E.Coli* O103 單一菌落，接種於 LB Broth 液態培養基，調整 pH = 7，震盪培養於 37°C，200 rpm，12 小時，在波長 OD₆₀₀ 測出菌液濃度，做隔夜菌液使用。

3-3-2-2 探討大腸桿菌生長曲線之測定

將隔夜菌液接種於含 5 ml LB Broth 液態培養基的 20ml 樣品瓶中，並使之 OD₆₀₀ = 0.1，震盪培養後每小時取出菌液，以十倍序列稀釋法(serial dilution)將 100 μl 菌液塗抹在 plate 上，培養 6 小時後出現桿菌菌落，並記錄數目。

3-3-2-3 探討添加碳源對大腸桿菌生長之測定

20ml 樣品瓶中含 5 ml LB Broth 液態培養基，並添加 0.1 g / per 100 ml 額外的碳源(glucose、fructose、maltose)，將隔夜菌液接種於其中並使之 OD₆₀₀=0.1，震盪培養後每小時取出菌液，以十倍序列稀釋法(serial dilution)將 100 μl 菌液塗抹在 plate 上，培養 6 小時後出現桿菌菌落，並記錄數目。

3-3-2-4 搖瓶培養中大腸桿菌生長曲線之測定

將隔夜菌液接種於含 50 ml LB Broth 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，並使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 37°C ，200 rpm，每小時取出菌液，以十倍序列稀釋法(serial dilution)將 100 μl 菌液塗抹在 plate 上，培養 6 小時後出現桿菌菌落，並記錄數目。

3-3-2-5 搖瓶培養中以不同密閉方式培養大腸桿菌生長之測定：

將隔夜菌液接種於含 50 ml LB Broth 液態培養基的 250 ml 三角瓶中，並使之 $OD_{600}=0.1$ ，利用不同密閉材料(矽膠塞、錫箔紙+橡皮筋)封裝於瓶口上，震盪培養後於每小時取出菌液，藉十倍序列稀釋法將 100 μl 菌液塗抹在 plate 上，培養 6 小時後出現桿菌菌落，並記錄數目。

3-3-2-6 搖瓶培養中不同震盪轉速對大腸桿菌生長之測定

將隔夜菌液接種於含 50 ml LB Broth 液態培養基的 250ml 三角瓶中，使之 $OD_{600}=0.1$ ，以不同轉速(100 rpm、150 rpm、200 rpm)震盪培養後每小時取出菌液，利用十倍序列稀釋法取 100 μl 菌液塗抹在 plate 上培養 6 小時後出現桿菌菌落，並紀錄數目。

3-3-2-7 搖瓶實驗中不同 Define medium 對大腸桿菌生長之測定

本實驗利用幾種已知成分的培養基做探討並與原實驗所用的 LB Broth 做比較，表 3-4 為 LB Broth 培養基組成，表 3-5 為 K.medium 培養基組成 (Odile, et al., 2011)；表 3-6 為 M.medium 培養基組成 (MacDonald et al., 1990)。利用以上幾種培養基來培養大腸桿菌，每小時取樣塗抹在 plate 上並檢測其 pH 值探討其結果。

表 3-4 LB Broth 組成成分

Typtone	10 g /L
Yeast Extract	5 g /L
NaCl	5 g /L

表 3-5 K.medium 組成成分

Glycerol	10 g /L
Soya peptone	1 g /L
KH ₂ PO ₄	2 g /L
K ₂ HPO ₄	9.7 g /L
Trisodium citrate dehydrate(檸檬酸鈉)	0.5 g /L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g /L
MgCl ₂	0.1 g /L

表 3-6 M.medium 組成成分

Bacto-Tryptone	10 g/L
NaCl	5 g/L
Yeast extract	5 g/L
Glucose	2 g/L

3-3-2-8 搖瓶實驗中豆漿成分對大腸桿菌生長之測定

含 50ml 無糖豆漿 的 250ml 三角瓶中額外添加 1 g NaCl、2 g glucose，接種隔夜菌液並震盪培養，在每小時取出菌液，塗抹在 plate 觀測其生長情形。

3-3-2-9 搖瓶實驗中酒糟成分對大腸桿菌生長之測定

250ml 三角瓶中加入已抽氣過濾後的酒糟(thin stillage)50ml，並額外添加 1 g NaCl、2 g glucose，接種隔夜菌液並震盪培養於 37°C、200 rpm，每小時取出菌液塗抹在 plate 上培養 6 小時後出現桿菌菌落，並紀錄數目。

3-3-2-10 小型發酵槽中通氣量對大腸桿菌生長之測定

於小型發酵槽中加入已抽氣過濾後的酒糟(thin stillage) 5L 並以 121°C、滅菌 40 min，靜置 1 天後，從管線利用 pump 打入隔夜菌液，使之 OD₆₀₀= 0.1，將轉速設定為 100 rpm，溫度設定為 37°C，設定通氣量 0.00 vvm、0.02 vvm 以每小時取樣塗抹在 plate 上，觀測其結果並記錄數目。

3-3-3 探討環境因子對噬菌體感染之影響

3-3-3-1 不同的 MOI 差異對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定:

含 5ml LB Broth 液態培養基的 20ml 樣品瓶，添加隔夜菌液使之 $OD_{600}=0.1$ ，培養至第 4 小時後測得 OD 值，加入 ϕ O103p 並調整成不同的 MOI 值(0.1、1、10)，震盪培養於 37°C 、200 rpm，每 40 分鐘取出感染後菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45 μm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，將 200 μl 隔夜菌液以及 100 μl 感染菌液加入至 45°C 的 5 ml soft agar 中震盪均勻，並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數(plaque count)，並計算菌斑數。

3-3-3-2 探討不同 pH 值對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

含 5ml LB Broth 液態培養基的 20ml 樣品瓶，添加隔夜菌液使之 $OD_{600}=0.1$ ，以震盪培養於 200 rpm、 37°C ，至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，利用 pH meter 在無菌操作台內調整 pH value(5~9)，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，感染 80 分鐘後取出噬菌體菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45 μm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，將 200 μl 隔夜菌液以及 100 μl 感染菌液加入至 45°C 的 5 ml soft agar 中震盪均勻，並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-3 添加額外碳源對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

20ml 樣品瓶中含 5 ml LB Broth 液態培養基，並添加 0.1 g 額外的碳源 (glucose、Fructose、maltose)，將隔夜菌液加入並使之 $OD_{600}=0.1$ ，培養至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，感染 80 分鐘後取出噬菌體菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45 μm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-4 探討震盪溫度對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

含 5ml LB Broth 液態培養基的 20ml 樣品瓶，添加隔夜菌液使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，調整震盪溫度為(27°C 、 32°C 、 42°C 、 47°C)，震盪轉速維持在 200 rpm，每 40 分鐘時取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45nm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，將 200 μl 隔夜菌液以及 100 μl 感染菌液加入至 45°C 的 5 ml soft agar 中震盪均勻，並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-5 探討改變震盪轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

含 5ml LB Broth 液態培養基的 20ml 樣品瓶，添加隔夜菌液使之 $OD_{600}=0.1$ ，以不同的震盪轉速(100 rpm、150 rpm、200 rpm)培養，至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，再以不同的震盪轉速(100 rpm、150 rpm、200 rpm)培養感染菌液，溫度維持於 37°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-6 探討添加金屬離子對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

5 ml 的 LB Broth 液態培養基的 20 ml 樣品瓶，內添加 0.1g /per 100 ml 金屬離子 (Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+})，添加隔夜菌液使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，培養至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，在 80 分鐘時取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-7 搖瓶實驗中探討最佳震盪轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

將隔夜菌液接種於含 50 ml LB Broth 液態培養基的 250 ml 三角瓶，並使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 150 rpm、 37°C ，培養至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-8 搖瓶實驗中探討高震盪溫度對噬菌體 ϕ O103p 感染之測定

將隔夜菌液接種於含 50 ml LB Broth 液態培養基的 250 ml 三角瓶，並使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，培養至第 4 小時後測得 OD 值，添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值= 1，震盪培養於 200 rpm、 42°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，將 200 μl 隔夜菌液以及 100 μl 感染菌液加入至 45°C 的 5 ml soft agar 中震盪均勻，並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-9 搖瓶實驗中探討不同 Define medium 對噬菌體感染之測定

將隔夜菌液接種於含 50ml 不同的 Define medium (LB Broth、K.medium、M.medium) 並使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，培養至最高菌數後，添加 10^9 噬菌體 ϕO103p 使 MOI 值 = 1，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-10 搖瓶實驗中探討不同基質對噬菌體 ϕO103p 感染之測定

將隔夜菌液接種於含 50ml 不同的液態培養基(豆漿、酒糟)的 250 ml 三角瓶，並使之 $OD_{600}=0.1$ ，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，豆漿培養至 6 小時，酒糟培養至 5 小時後取樣，豆漿以十倍稀釋後利用抽氣過濾法過濾菌液測出 OD 值，酒糟可直接測 OD 值。添加 10^9 噬菌體 ϕO103p 使 MOI 值 = 1，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 $0.45\ \mu\text{m}$ filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-11 搖瓶實驗中酒糟在最佳環境因素對噬菌體 ϕ O103p 之影響

含 50ml 的純酒糟液態培養基的 250 ml 三角瓶，額外添加 0.3g MgCl_2 / per 100 ml，將隔夜菌液加入並使之 $\text{OD}_{600} = 0.1$ ，震盪培養於 150 rpm、 37°C ，培養至 5 小時後取樣測 OD 值。添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值 = 1，震盪培養於 200 rpm、 37°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45 μm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-12 搖瓶實驗中酒糟在高震盪溫度下對噬菌體 ϕ O103p 之影響

含 50ml 的純酒糟液態培養基的 250 ml 三角瓶，額外添加 0.3g MgCl_2 / per 100 ml，將隔夜菌液加入並使之 $\text{OD}_{600} = 0.1$ ，震盪培養於 150 rpm、 37°C ，培養至 5 小時後取樣測 OD 值。添加 10^9 噬菌體 ϕ O103p 使 MOI 值 = 1，震盪培養於 200 rpm、 42°C ，每 40 分鐘取出感染菌液，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45nm filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

3-3-3-13 小型發酵實驗中噬菌體 ϕ O103p 生產之影響

於小型發酵槽中加入已抽氣過濾後的酒糟 (thin stillage) 5L，並加入大腸桿菌培養至最高菌數後，設定條件 100 rpm、 37°C 、0.00 vvm，利用 pump 打入

噬菌體使 $MOI = 1$ ，每 40 min 取樣，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，並利用 0.45 μ m filter 過濾，以十倍序列稀釋法稀釋，與菌液均勻混合並立即平鋪於 plate 上，等待 6 小時後浮現溶菌斑數，並計算菌斑數。

第四章 結果與討論

4-1 大腸桿菌液態培養實驗

此實驗的目的在於利用樣品瓶液態培養方式，將大腸桿菌 O103 培養於 5ml 的培養基中，測定其生長之情況，並添加額外的碳源去探討大腸桿菌生長情形是否提升，之後提高培養體積，利用搖瓶的液態培養方式，去探討大腸桿菌其生長情況，並改變環境因子，如震盪轉速、pH 值，並添加金屬離子來探討對於大腸桿菌生長是否合適。

4-1-1 大腸桿菌 O103 生長曲線之測定

經過數次漫長的培養之後，研究結果顯示，圖 4-1 是以每個小時觀測得到的吸光值記錄下來得出的結果，大腸桿菌 O103 菌株隨著培養時間的增加，所測得的吸光值也會增加；圖 4-2 菌株數目結果顯示，培養至第 4 小時之後，菌株數目開始逐漸遞減，此結果顯示 OD 值在高於 1 以後，大腸桿菌的數量也開始有所減少。

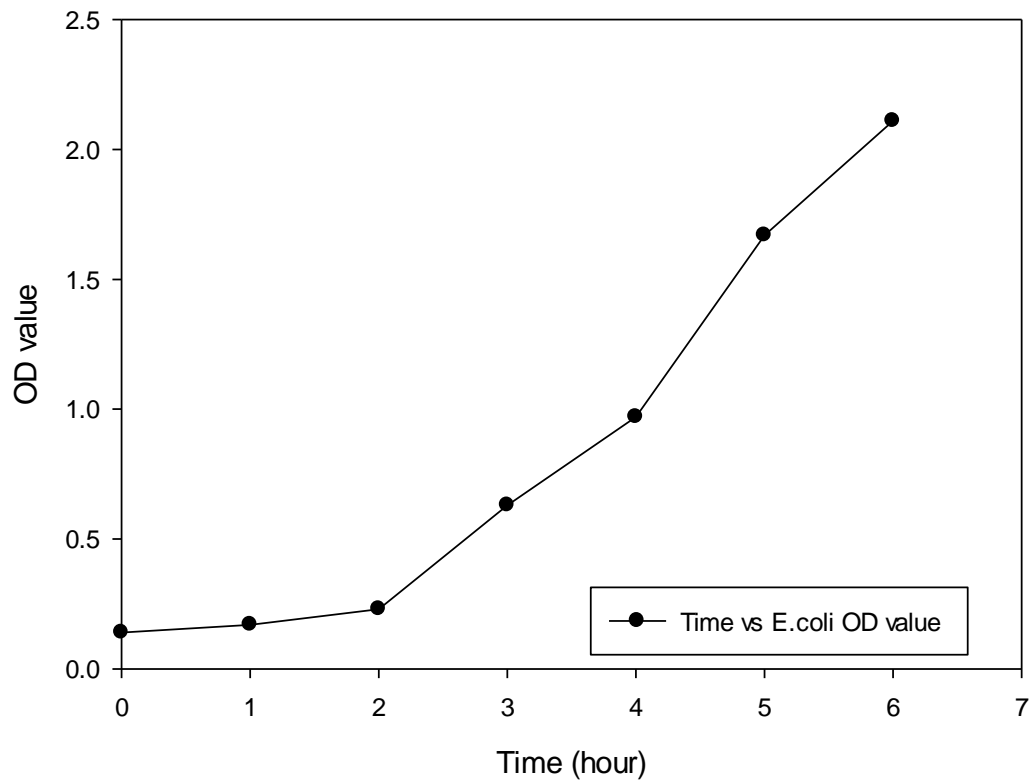


圖 4-1 大腸桿菌 0103 菌株每小時測得的吸光值

培養基成分：LB broth

Liquid types：Typtone、Yeast Extract、NaCl

培養條件：pH =7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

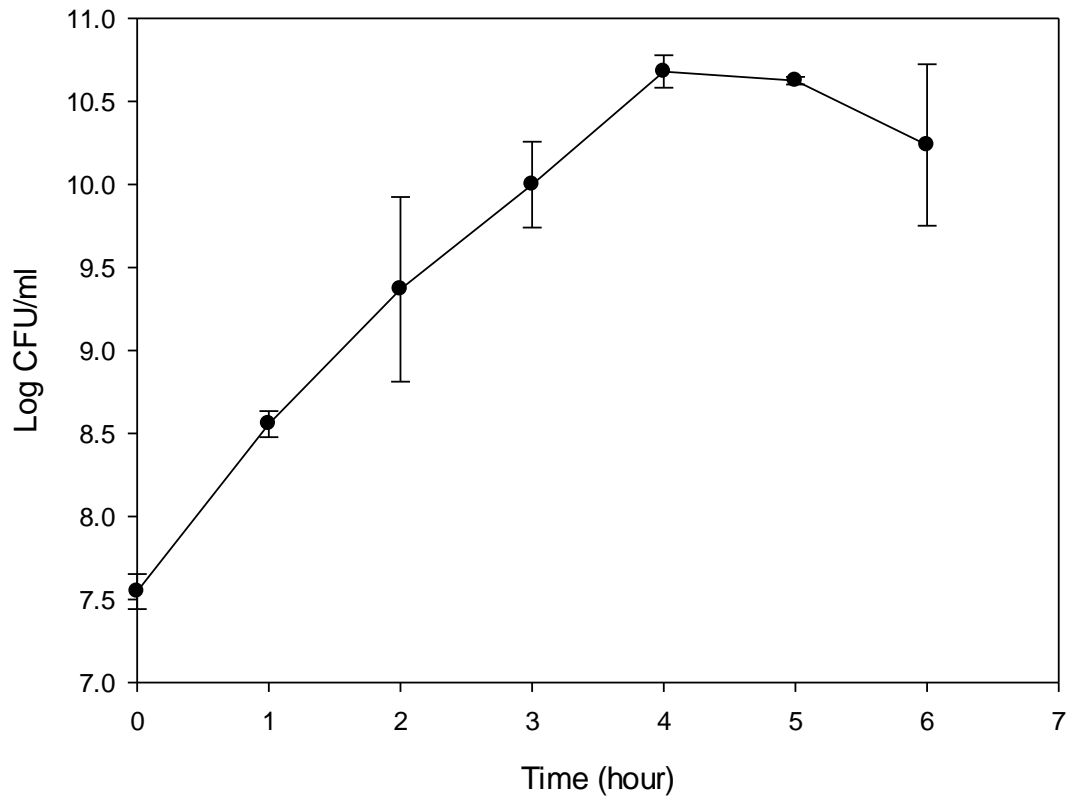


圖 4-2 大腸桿菌菌株 O103 每小時測得的菌株數目

培養基成分：LB broth

Liquid types：Typtone、Yeast Extract、NaCl

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-2 添加碳源對大腸桿菌菌株 O103 之影響:

圖 4-3 為 LB broth 液態培養基中添加碳源(Glucose、Fructose、Maltose)每小時觀測的結果，實驗並與不添加其他碳源對照組的培養基之大腸桿菌生長結果進行比較，結果來說添加碳源對大腸桿菌菌株 O103 生長並沒有任何幫助，反而是添加後，菌數的結果比對照組還來的差，原因可能是所使用的培養基成分中，本身所含有的碳源與額外添加的 Glucose、Fructose、Maltose 沒有加成作用，此株大腸桿菌不適應生長於添加其他碳源後的液態培養基中，造成成長緩慢，故結果並沒有比未添加的情況好。

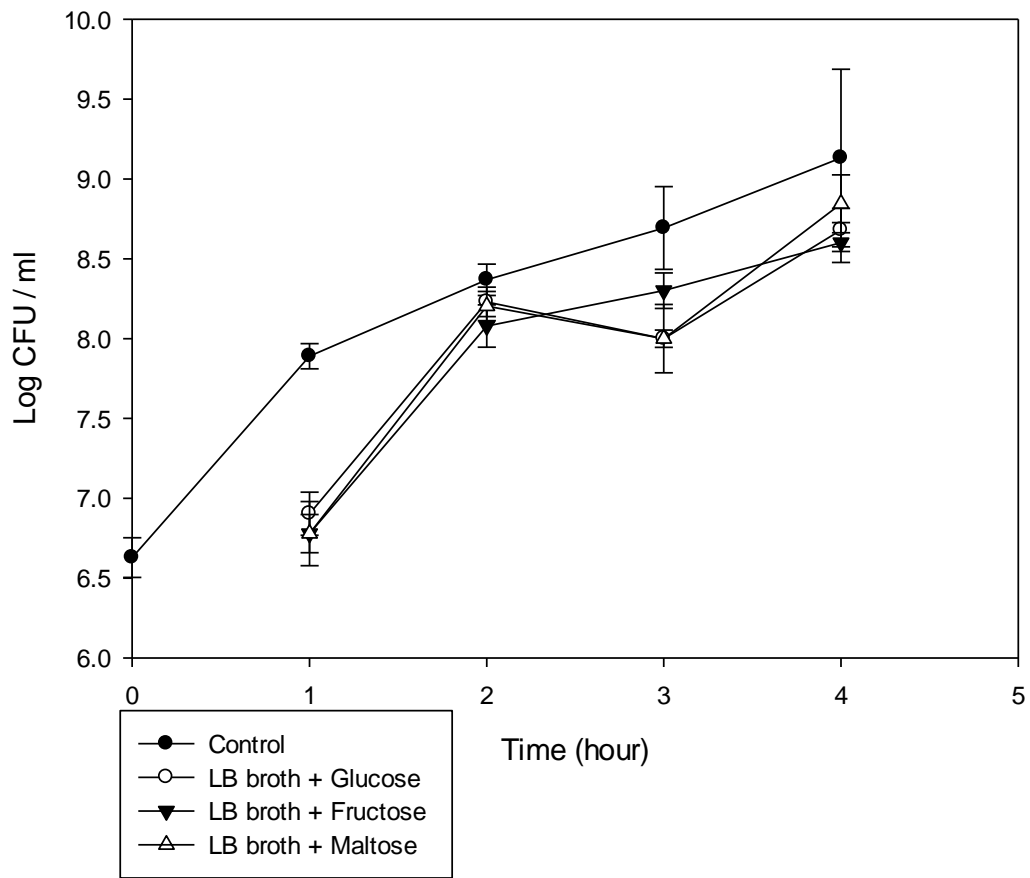


圖 4-3 添加不同探源對大腸桿菌菌株 O103 之影響

培養基成分：LB broth、glucose、fructose、maltose

培養條件：pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-3 搖瓶培養中大腸桿菌菌株 O103 生成之測定與樣品瓶結果比較:

由圖 4-4 顯示，設定條件皆以 pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 的情況下培養，在 20 ml 樣品瓶培養的 5 ml LB broth 液態培養基中，培養至 4 小時後所生成的大腸桿菌數量最高，為 5.29×10^9 CFU/ml；而 250 ml 搖瓶培養的 50 ml LB broth 液態培養基中，以矽膠塞封住的瓶口，培養至 5 小時後所生成的大腸桿菌數量最高，為 3.38×10^9 CFU/ml。樣品瓶則比搖瓶實驗中大腸桿菌數目還多。推測可能原因是，震盪培養時，體積與瓶身比例不同，樣品瓶的體積比為 1:3，搖瓶體積比為 1:4，所以搖晃的範圍不同而使大腸桿菌生長造成些許差異。由圖 4-5 結果表示，OD 隨著時間上升到 6 小時過後開始有逐漸平穩的狀態，pH 值則是在 7 小時開始有趨近平穩的狀態，並且有一定的回升，推測原因為有一定通氣的情況下可以減少大腸桿菌生成醋酸，並使 pH 維持在可持續生長菌體的環境中(游大慶, 2001)。

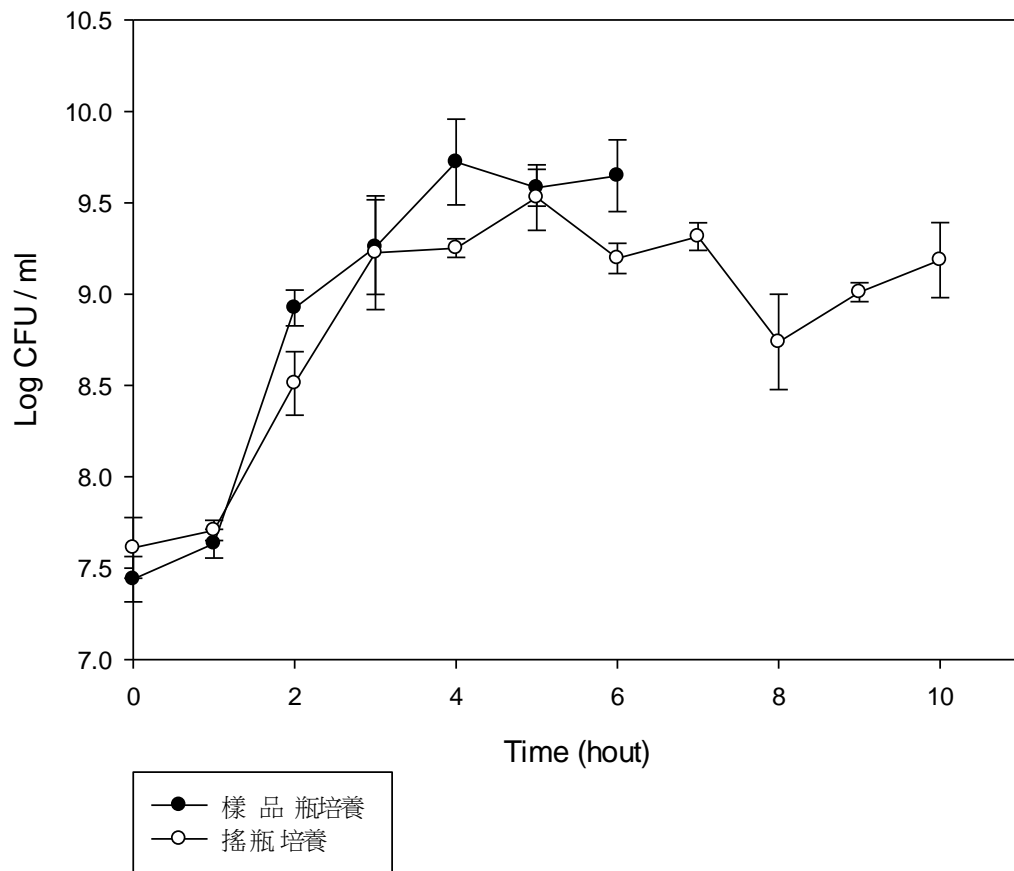


圖 4-4 樣品瓶與搖瓶培養之大腸桿菌生成之比較

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

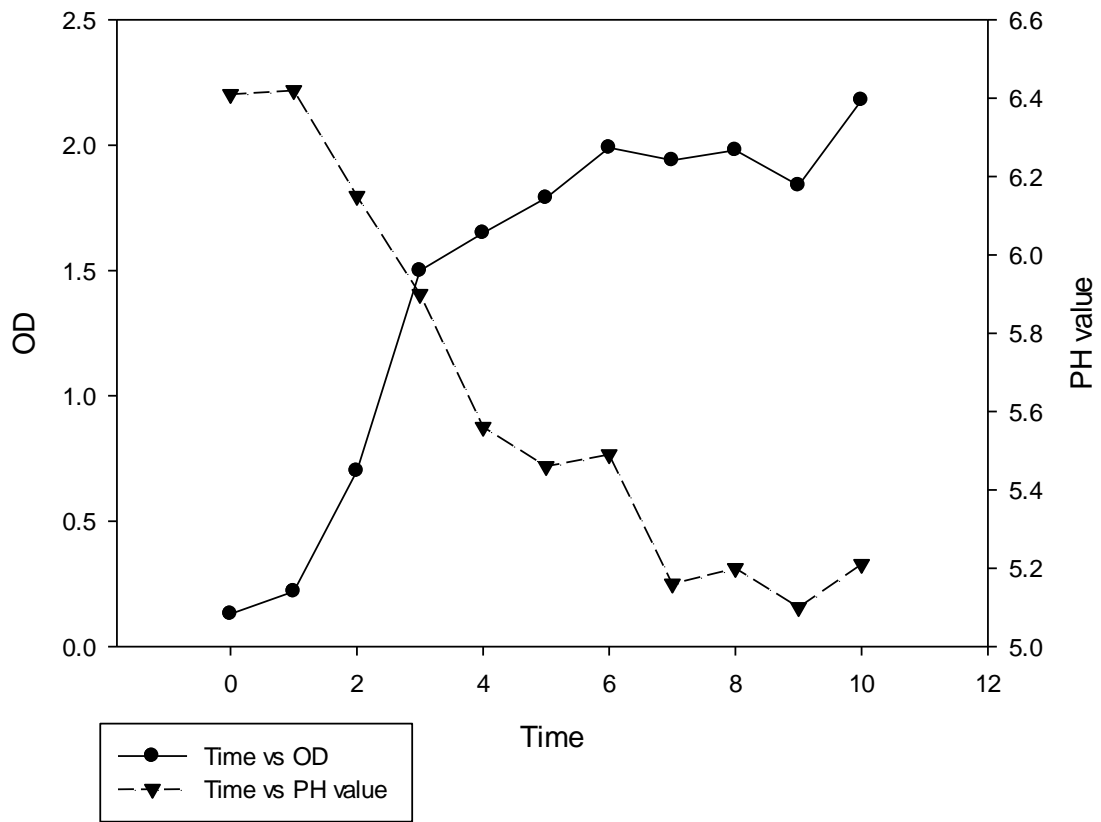


圖 4-5 搖瓶培養之大腸桿菌 OD、酸鹼值生成之結果

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-4 搖瓶培養不同密封方式對大腸桿菌之影響：

由圖 4-6 結果顯示，設定條件為 pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 的情況下培養，利用錫箔紙密封三角瓶瓶口所生長的大腸桿菌數目，培養至第 4 小時達到最高，為 7.85×10^8 CFU/ml；矽膠塞密封時生長的數目，培養至第 5 小時達到最高，為 6.20×10^8 CFU/ml。兩者比較結果差異不大，但以培養時間來看，錫箔紙封裝的搖瓶培養時間較早達到最高菌數，而最高菌數為錫箔紙封裝的較高，故我們以封裝錫箔紙的方式來做後續實驗。

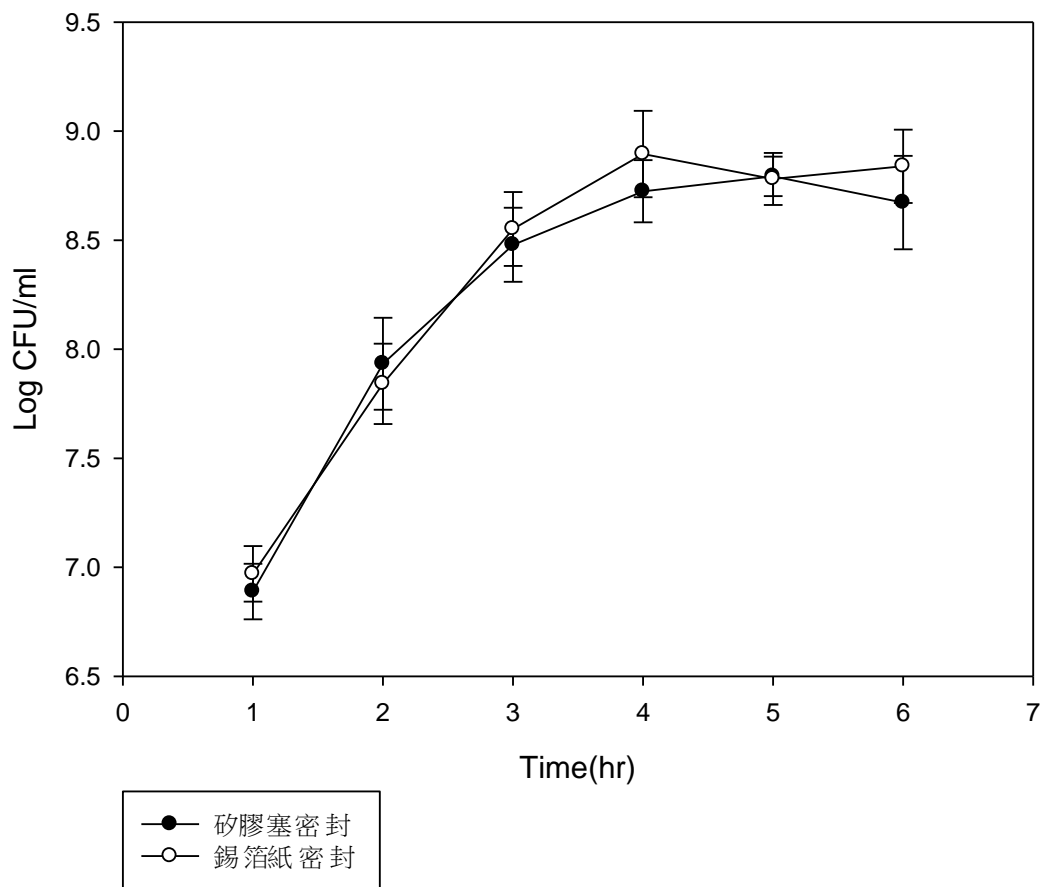


圖 4-6 矽膠塞與錫箔紙密封對大腸桿菌生成之結果

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-5 搖瓶培養 Define medium 對大腸桿菌生成之測定：

由圖 4-7 結果表示，設定條件為 pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 的情況下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，至第 5 小時達到的大腸桿菌數目最高，為 3.38×10^9 CFU/ml；以 K.medium 作為液態培養基培養，至第 6 小時達到最高菌數，為 1.37×10^9 CFU/ml；以 M.medium 作為液態培養基培養，至第 3 小時達到最高菌數，為 1.22×10^9 CFU/ml。研究結果發現，LB Broth 生成的大腸桿菌菌數較多，而 M.medium 則是較短時間內達到最高菌數，K.medium 則較緩慢。圖 4-8 結果表示，M.medium 在三小時後 pH 值就開始回升；而 LB broth 則是培養 5 小時後開始有回升的情形；K.medium 則是持續減少，後續我們以此結果來做噬菌體培養實驗。

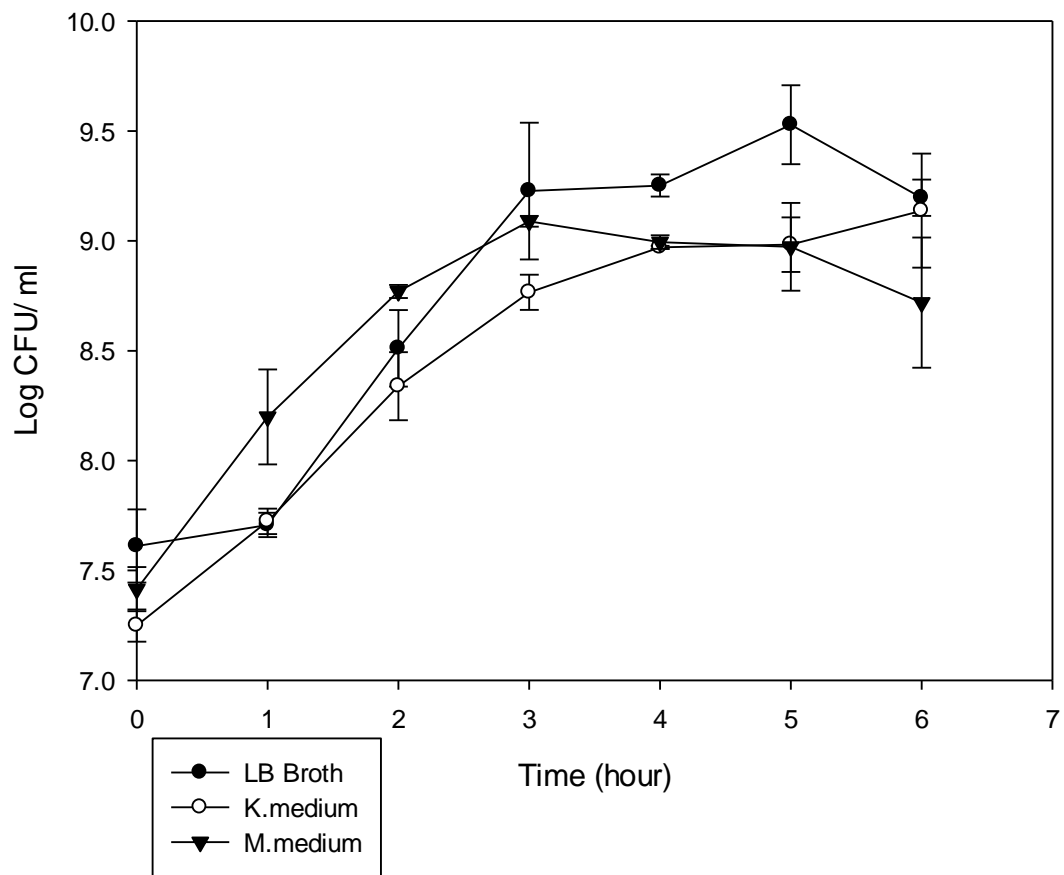


圖 4-7 不同 Define medium 培養大腸桿菌生成之影響

培養基成分：LB broth、K.medium、M.medium

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

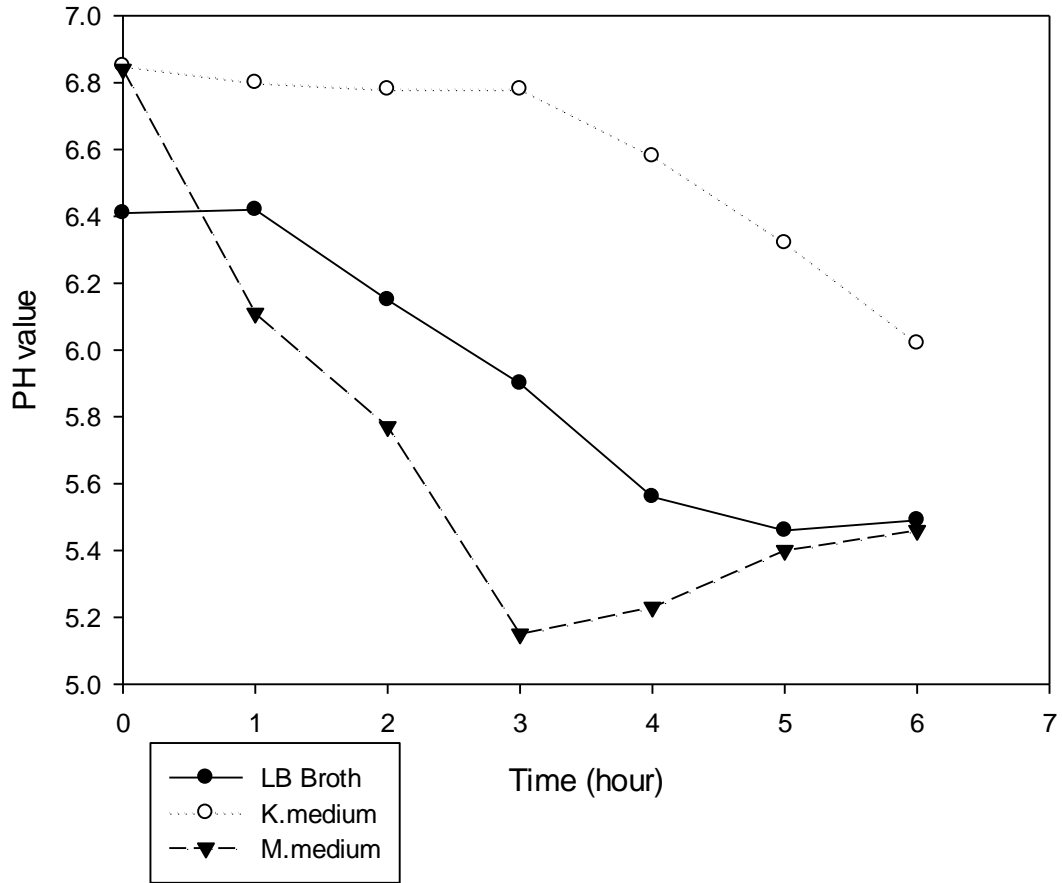


圖 4-8 Define medium 測定大腸桿菌酸鹼值之情形

培養基成分：LB broth、K.medium、M.medium

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-6 搖瓶培養豆漿(Soy milk)對大腸桿菌生成之測定：

由圖 4-9 結果表示，設定條件為 pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 的情況下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，至第 4 小時達到的大腸桿菌數目最高，為 7.85×10^8 CFU/ml；以純豆漿作為液態培養基培養，至第 6 小時達到最高菌數，為 1.75×10^9 CFU/ml；LB broth 內含有 NaCl 成分，而我們添加 NaCl 至豆漿裡，研究結果發現培養至第五小時達到最高菌數，為 1.44×10^9 CFU/ml；由於所使用的豆漿成分無糖，而添加 Glucose 至豆漿並與無糖豆漿作探討。研究結果發現培養至第 4 小時達到最高菌數，為 5.9×10^8 CFU/ml。從此實驗發現，利用豆漿培養大腸桿菌時，生長之菌株數目比用 LB broth 培養較高，而添加 NaCl 以及 Glucose 的豆漿培養大腸桿菌，並沒有比純天然的豆漿生長的較佳。推測可能原因為，豆漿中所使用的碳源與額外添加的碳源 Glucose 以及 NaCl 不同，所以在生長上大腸桿菌可能不適應，而生長較差。

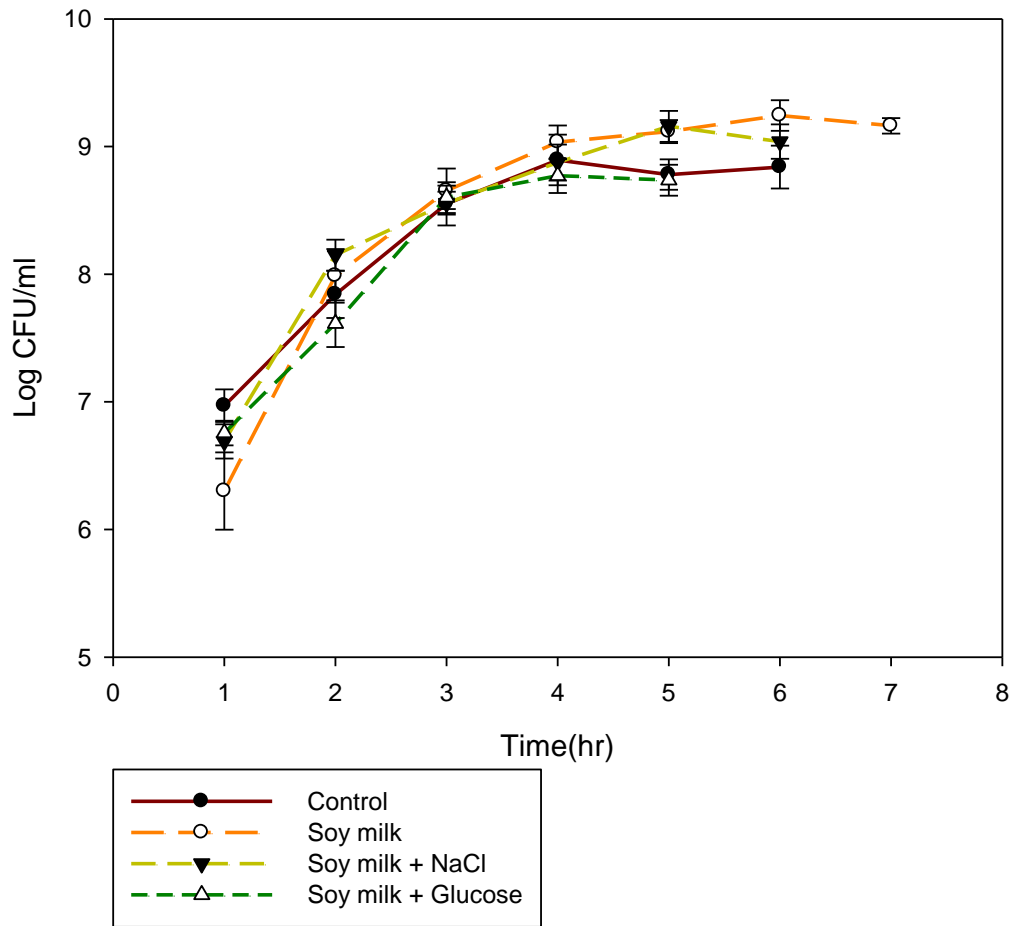


圖 4-9 豆漿培養大腸桿菌生成之影響

培養基成分：豆漿(Soy milk)

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-7 搖瓶培養酒糟(Thin Stillage)對大腸桿菌生成之測定：

由圖 4-10 結果表示，設定條件為 pH= 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，至第 4 小時達到的大腸桿菌數目最高，為 7.85×10^8 CFU/ml；以純酒糟為液態培養基培養，至第 5 小時達到最高菌數，為 1.17×10^9 CFU/ml；以添加 NaCl 的酒糟為液態培養基培養，至第 4 小時達到最高菌數，為 9.10×10^8 CFU/ml；以添加 Glucose 的酒糟為液態培養基培養，至第 4 小時達到最高菌數，為 6.56×10^8 CFU/ml。利用酒糟培養大腸桿菌時，生長之菌株數目比用 LB broth 培養較高，而添加 NaCl 以及 Glucose 的酒糟培養大腸桿菌，比無添加的酒糟生長的較差，原因可能為其添加的成分比酒糟所含有的差，影響大腸桿菌所生長的環境。

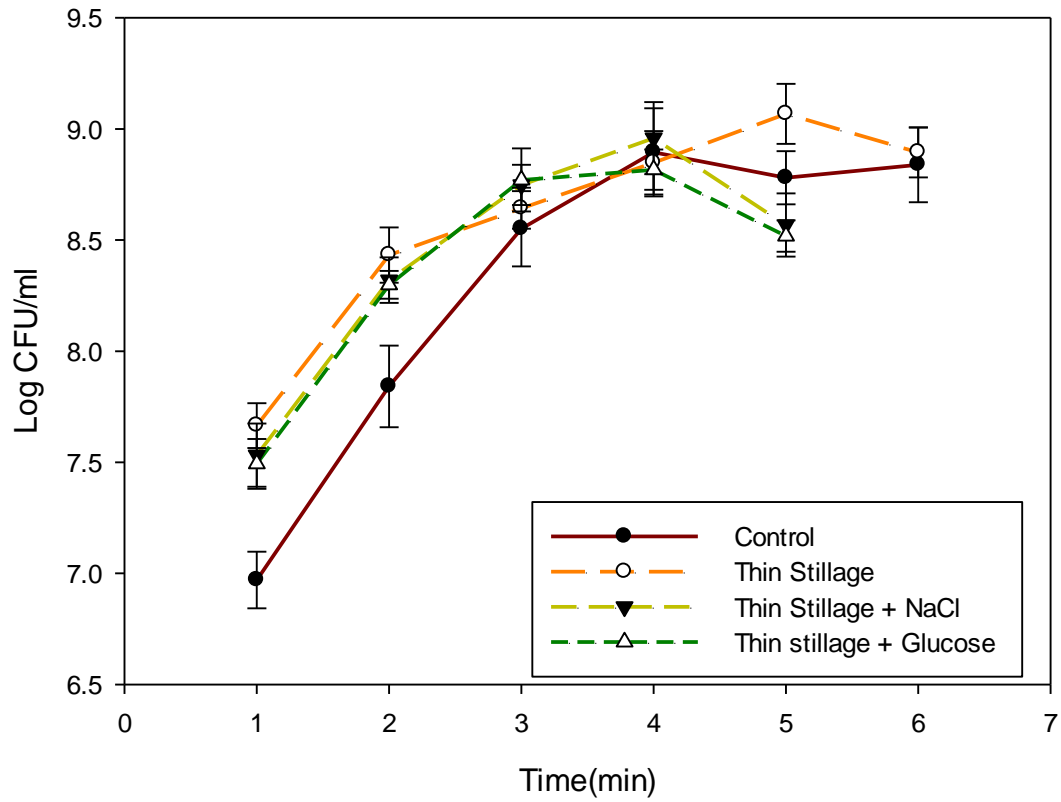


圖 4-10 酒糟培養大腸桿菌生成之影響

培養基成分：酒糟(Thin Stillage)

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-1-8 小型發酵槽在不同通氣量培養酒糟對大腸桿菌生成之測定：

由圖 4-11 結果表示，設定條件為培養溫度 37°C、轉速 100 rpm 下培養，觀測得到的 OD 情況無太大變化，兩者皆在培養 6 小時後逐漸穩定。圖 4-11 結果表示，不通氣的情況下培養大腸桿菌，在 5 小時生成的菌數最高為 1.55×10^9 CFU/ml，而通氣的情況下，大腸桿菌的情況開始有一定起伏，而在 7 小時生成的菌數較高為 1.13×10^9 CFU/ml，培養時大腸桿菌會回升，推測可能原因為，在通氣的情況下，大腸桿菌會減少醋酸的生成，而使得 pH 值減少至一定範圍後會開始回升，而此時菌數也開始有回升的情況，並能夠持續生長，但不通氣的情況下菌數仍然較高，而我們以此結果來做後續培養噬菌體實驗。

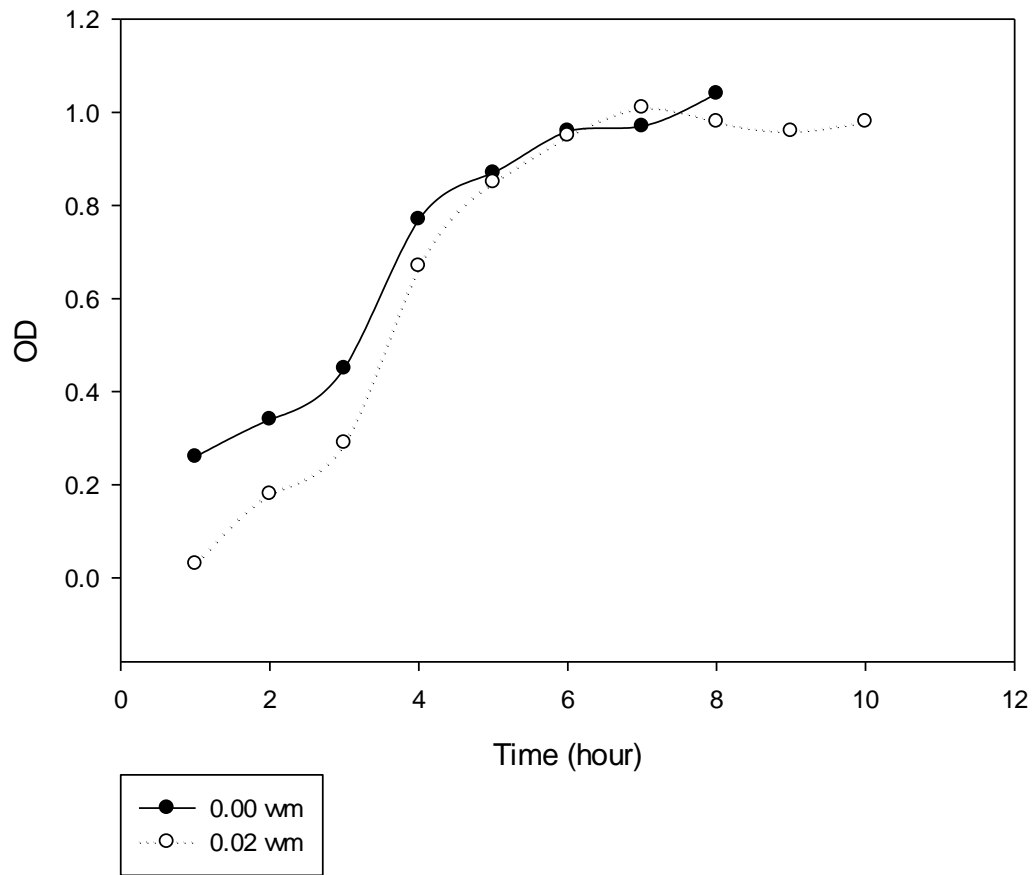


圖 4-11 發酵槽中大腸桿菌濃度生長情形

培養基成分：酒糟(Thin Stillage)

培養條件：pH= 7、培養溫度 37°C、轉速 100 rpm

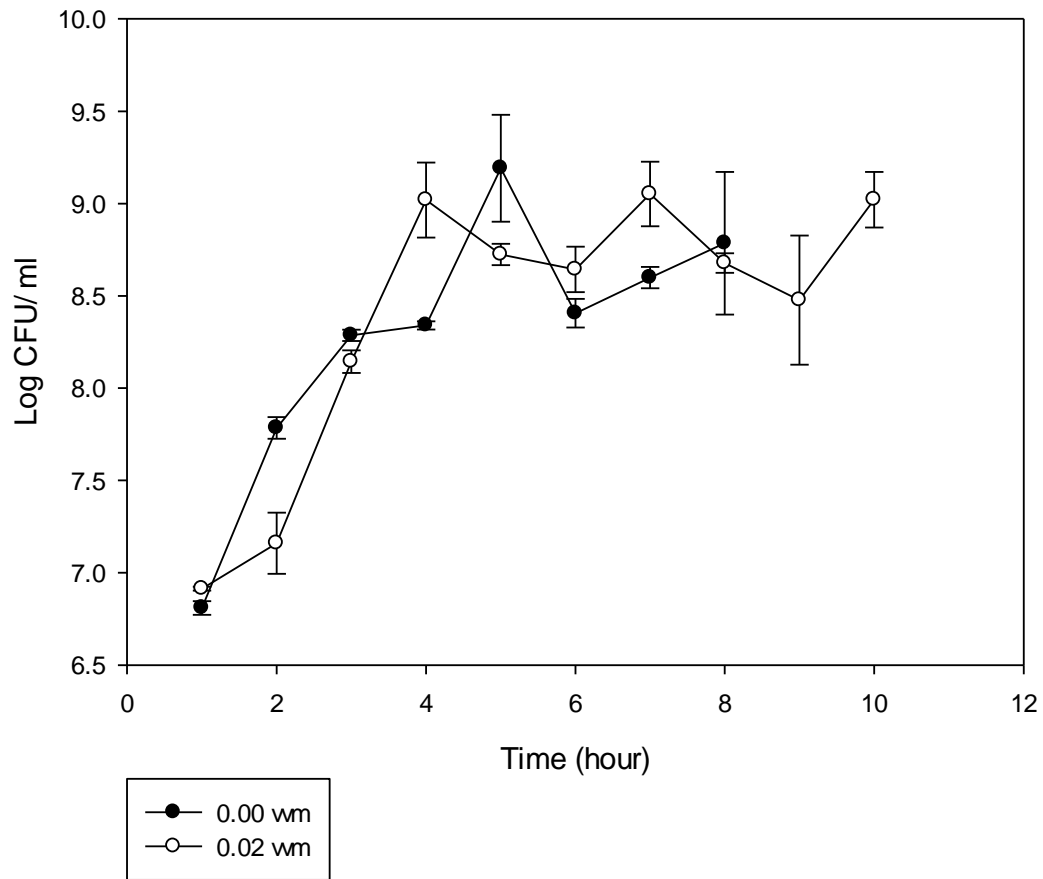


圖 4-12 發酵槽中培養大腸桿菌生成之影響

培養基成分：酒糟(Thin Stillage)

培養條件：pH= 7、培養溫度 37°C、轉速 100 rpm

4-2 噬菌體 ϕ O103p 液態培養實驗

此實驗的目的是為了找出最佳環境因子，能夠提升噬菌體的感染活性，並且嘗試添加其他因子使得活性能夠更高，而從中我們以大腸桿菌菌株 O103 探討環境因子且嘗試提高菌株數量，並根據細菌菌株越多而噬菌體感染並繁殖的程度會越好的理論去實踐此結果。最後則增加培養體積並找出最佳的環境因子並探討此結果。

4-2-1 不同 MOI 值與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響：

由圖 4-13 的結果顯示，設定條件皆以 pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 培養，並以不同的 MOI 值去觀察噬菌體 ϕ O103p 的感染情況，以 MOI=0.1 情況下培養，至 120 分鐘培養的噬菌體溶菌斑數達到最高，為 3.00×10^9 PFU/ml；以 MOI=1 的情況下培養，至 120 分鐘培養的噬菌體菌數達到最高，為 3.10×10^9 PFU/ml；以 MOI=10 的情況下培養，至 120 分鐘培養的噬菌體菌數達到最高，為 4.00×10^9 PFU/ml。發現 MOI=1 與 MOI=10 時。MOI 在不同比值下無顯著差異，為了減少噬菌體量過度消耗，噬菌體量太少在未來擴大培養時有其差異，故我們以 MOI=1 做為固定比值做後續實驗。

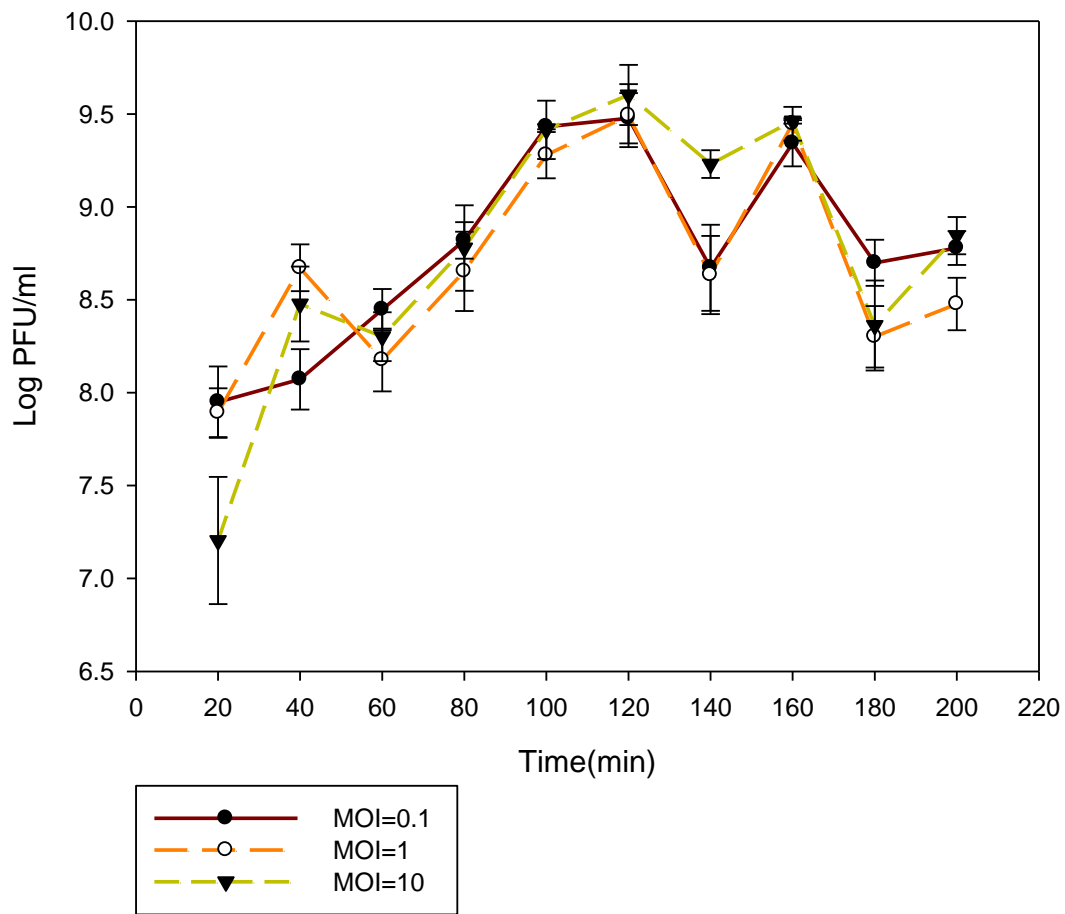


圖 4-13 噬菌體在不同 MOI 情況下生成之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-2 不同 pH 值與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響:

由圖 4-14 的結果顯示，設定條件皆以培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm、MOI=1 的情況下培養，pH 範圍在 pH=7 時是對噬菌體生產的影響最好，其數目為 3.50×10^8 PFU/ml。而其他 pH 範圍與在 pH = 7 培養比較有明顯落差，由此可見，噬菌體在 pH = 7 才能擁有較好的適應環境，在其他 pH 範圍培養下，並無法找到更好的適應環境。原因可能在於，大腸桿菌菌株原本生長的環境為 pH = 7 上下，所以當 pH 被改變之後，大腸桿菌無法適應於其他 pH 範圍內，故造成菌數成長緩慢或無法成長，而噬菌體可溶裂的大腸桿菌菌數減少，故噬菌體所測得的數目也相對減少。

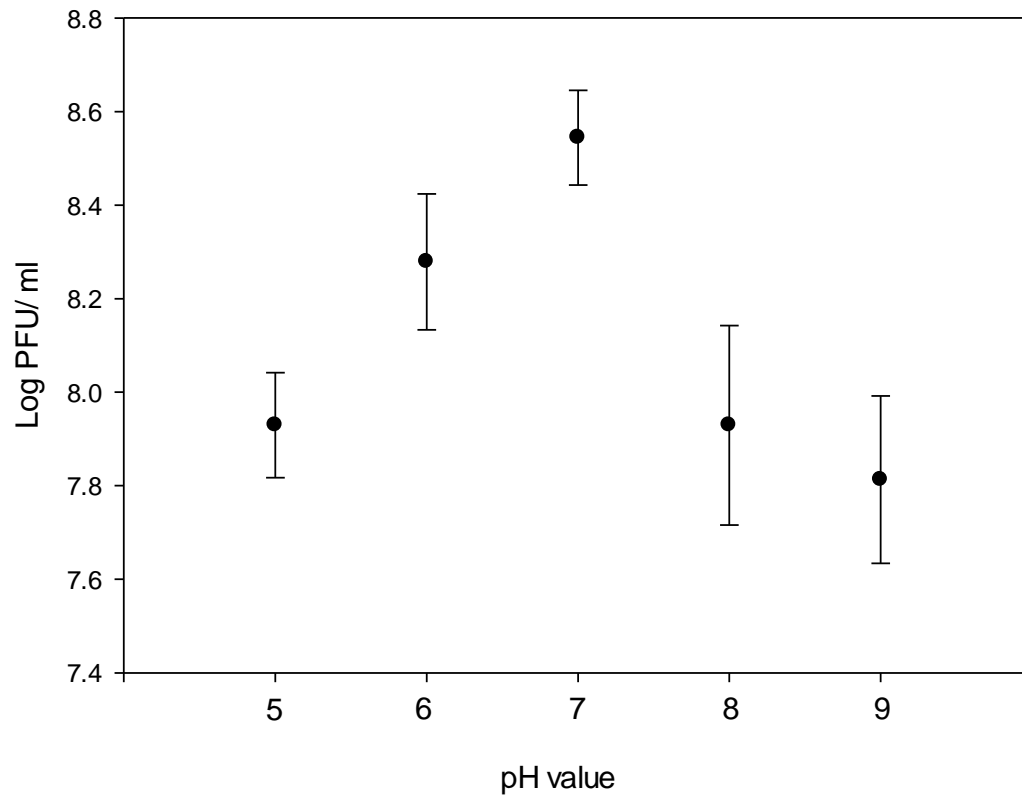


圖 4-14 pH 值改變對噬菌體產量之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH =5~pH=9、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-3 添加碳源與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響：

由圖 4-15 的結果顯示，設定條件為 pH= 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，所觀測的噬菌體溶菌斑數為 6.50×10^9 PFU/ml；含添加 Glucose 的 LB Broth 為液態培養基培養，所觀測的溶菌斑數為 7.00×10^8 PFU/ml；含添加 Fructose 的 LB Broth 為液態培養基培養，所觀測的溶菌斑數為 6.05×10^8 PFU/ml；含添加 Maltose 的 LB Broth 為液態培養基培養，所觀測的溶菌斑數為 8.60×10^8 PFU/ml。與原先添加碳源的大腸桿菌實驗結果相同，添加碳源對噬菌體 ϕ O103p 感染數會有所減少，推測原因是添加碳源後的大腸桿菌生長較差，由於噬菌體可感染的寄主數明顯減少，故觀測的溶菌斑數也減少。表示此結果無法提升感染後觀測的溶菌數量，故培養時並不需要額外添加碳源。

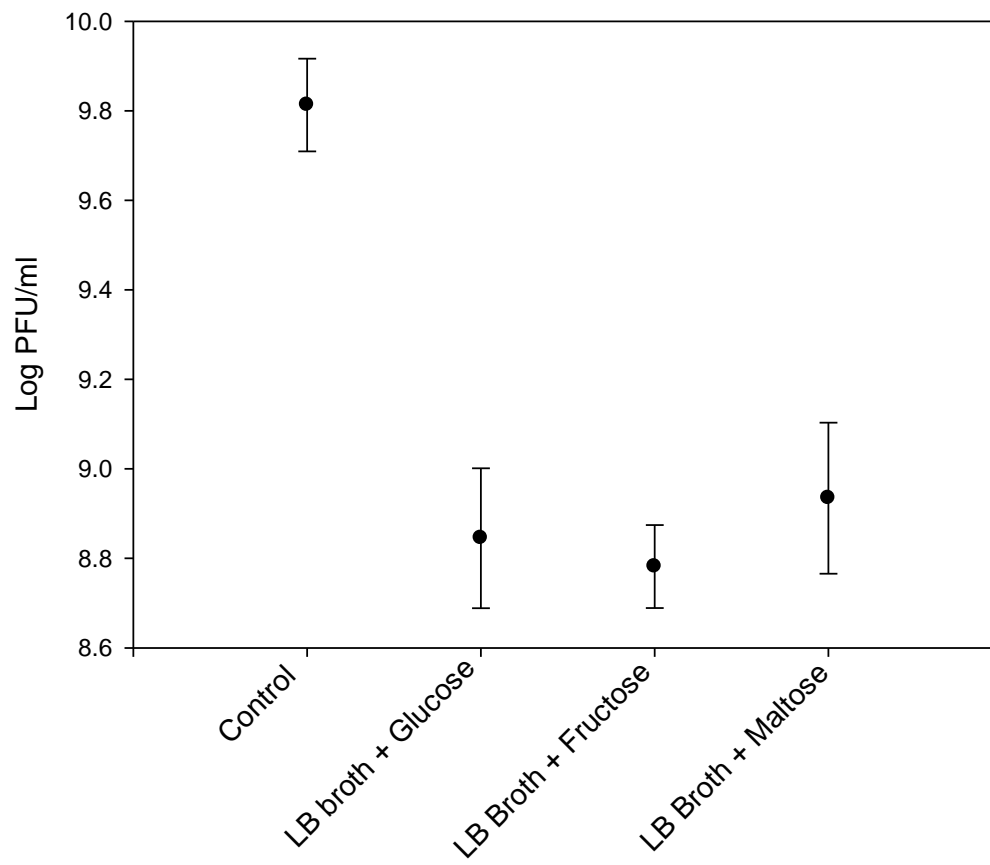


圖 4-15 添加碳源對噬菌體感染情況之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH= 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-4 震盪溫度與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響：

由圖 4-16 結果表示，設定條件皆以 pH=7、震盪轉速 200 rpm 下培養，控制組以 37°C 下培養，開始感染後 80 分鐘後測得噬菌體產量為 3.50×10^8 PFU/ml；溫度為 27°C 下培養，開始感染後 80 分鐘後測得 5.00×10^7 PFU/ml；溫度為 32°C 下培養，開始感染後 80 分鐘後測得 3.75×10^8 PFU/ml；溫度為 42°C 下培養，開始感染後 40 分鐘後測得 5.20×10^8 PFU/ml；溫度為 47°C 下培養，開始感染後 40 分鐘後測得 3.30×10^8 PFU/ml；由此得知，溫度範圍在 42°C、感染 40 分鐘後，噬菌體 ϕ O103p 觀測得到的數量比其他溫度觀測的數量較高。這可能代表在高溫下可以短時間提高大腸桿菌生長數，也或許是噬菌體在高溫下能夠快速裂解大腸桿菌產生更多溶菌數。為了瞭解是否為更短時間內可提升溶菌斑數，故我們在以觀測前 40 分鐘情況下培養。

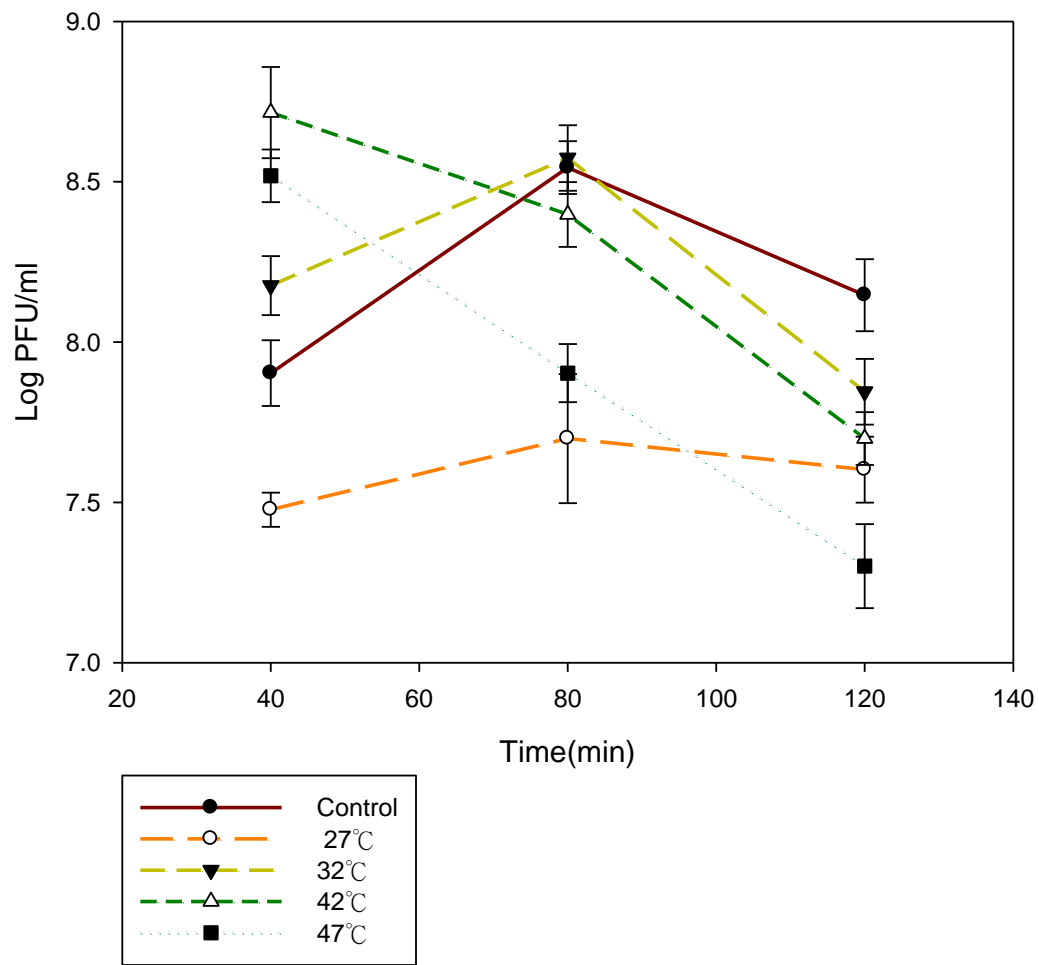


圖 4-16 不同溫度對噬菌體感染情況之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 27°C ~ 47°C、震盪轉速 200 rpm

在圖 4-17 結果表示，設定條件皆以 pH=7、震盪轉速 200 rpm 下培養，溫度範圍在 42°C、30 分鐘測得的溶菌數為 2.00×10^9 PFU/ml，而 40 分鐘測得的溶菌數為 2.40×10^9 PFU/ml，代表高溫下短時間內可提高噬菌體裂解大腸桿菌的速度，與控制組相比，高出至 6.86 倍。

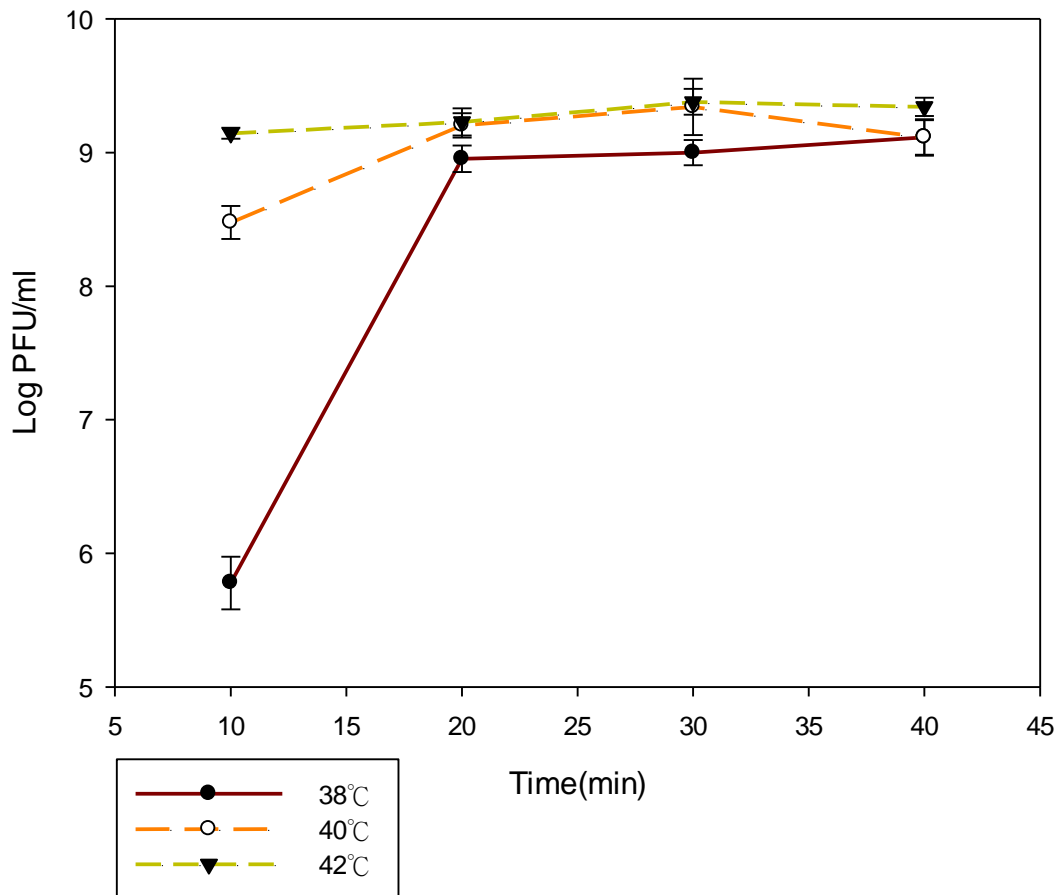


圖 4-17 不同溫度在短時間內對噬菌體感染情況之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 38、40、42°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-5 震盪轉速與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響:

由圖 4-18 結果表示，大腸桿菌在 100 rpm 震盪培養時，噬菌體感染後，震盪轉速調整成 200 rpm 值所觀測的菌斑數最好；由圖 4-19 結果表示，大腸桿菌在 150 rpm 震盪培養時，噬菌體感染後，震盪轉速調整成 200 rpm 所觀測的菌斑數最好；由圖 4-20 結果表示，大腸桿菌在 200 rpm 震盪培養時，噬菌體感染後，震盪轉速調整成 150 rpm 值所觀測的菌斑數最好；由圖 4-21 結果表示，將上述的結果做一個比較，發現大腸桿菌在 150 rpm 震盪培養時，噬菌體感染後，將震盪轉速調整成 200 rpm 值所觀測的菌斑數是最多的，所觀察到的數量為 1.47×10^{11} PFU/ml。

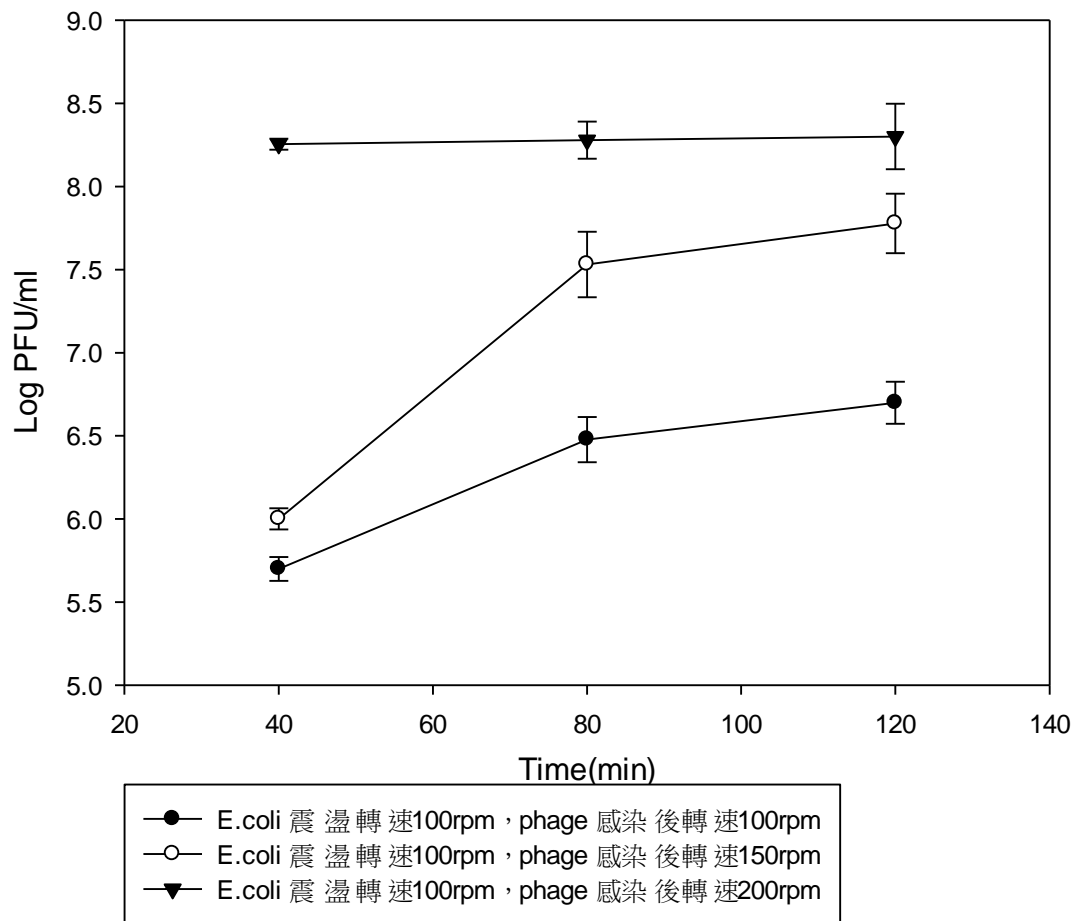


圖 4-18 大腸桿菌以 100 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH= 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 100 rpm~200 rpm

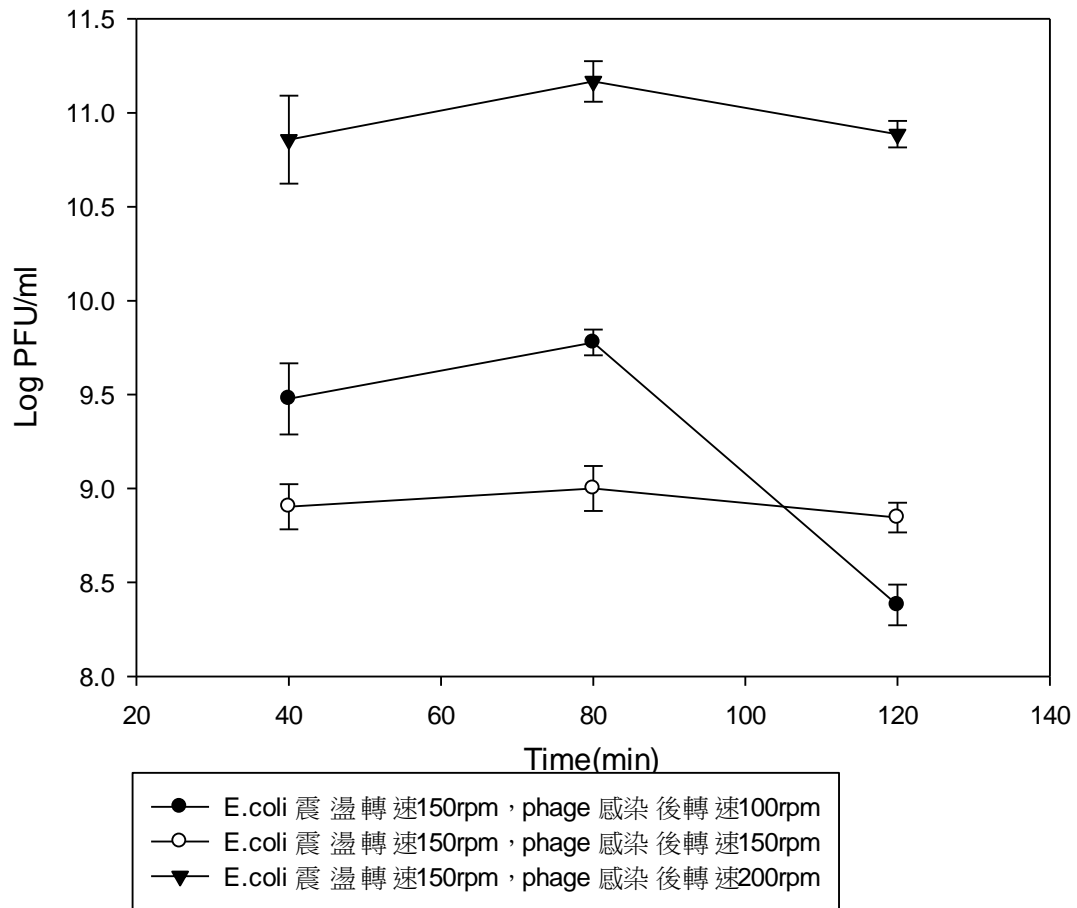


圖 4-19 大腸桿菌以 150 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 100 rpm~200 rpm

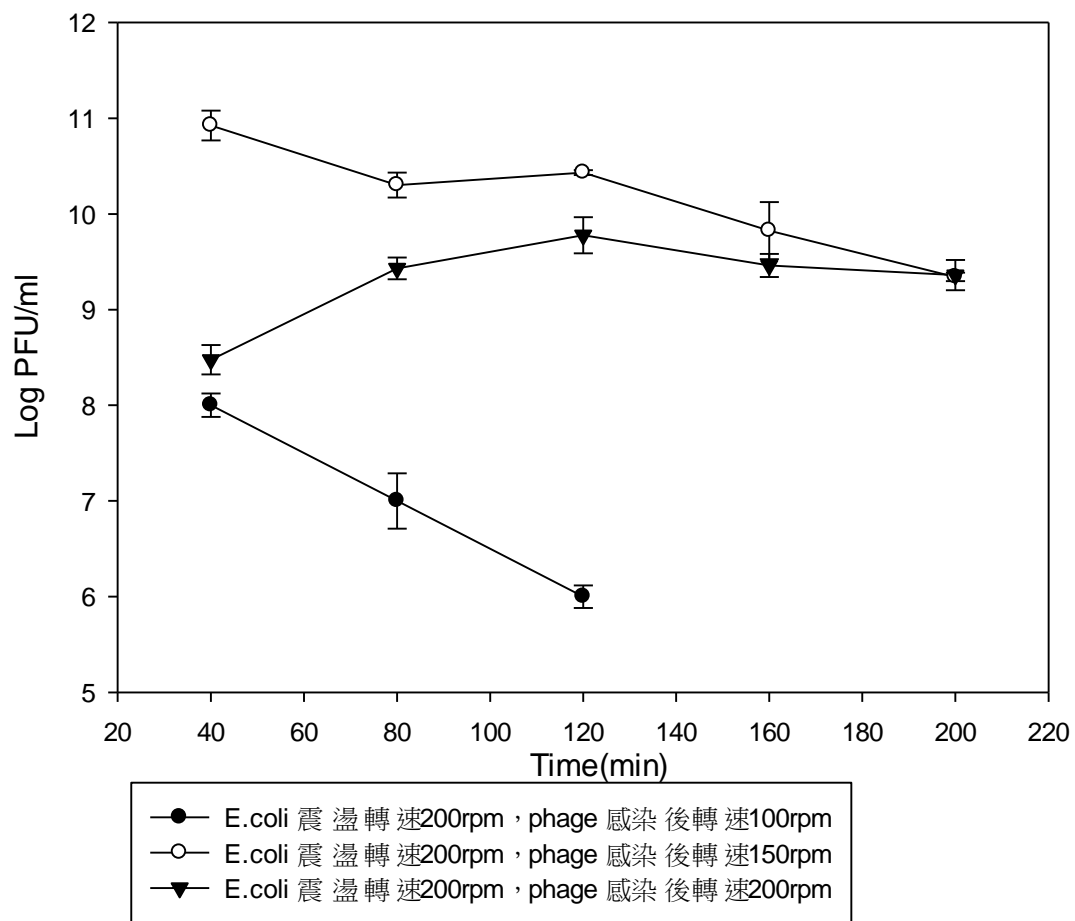


圖 4-20 大腸桿菌以 200 rpm 培養時，改變培養箱震盪轉速之影響

培養基成分：LB broth

培養條件：pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 100 rpm~200 rpm

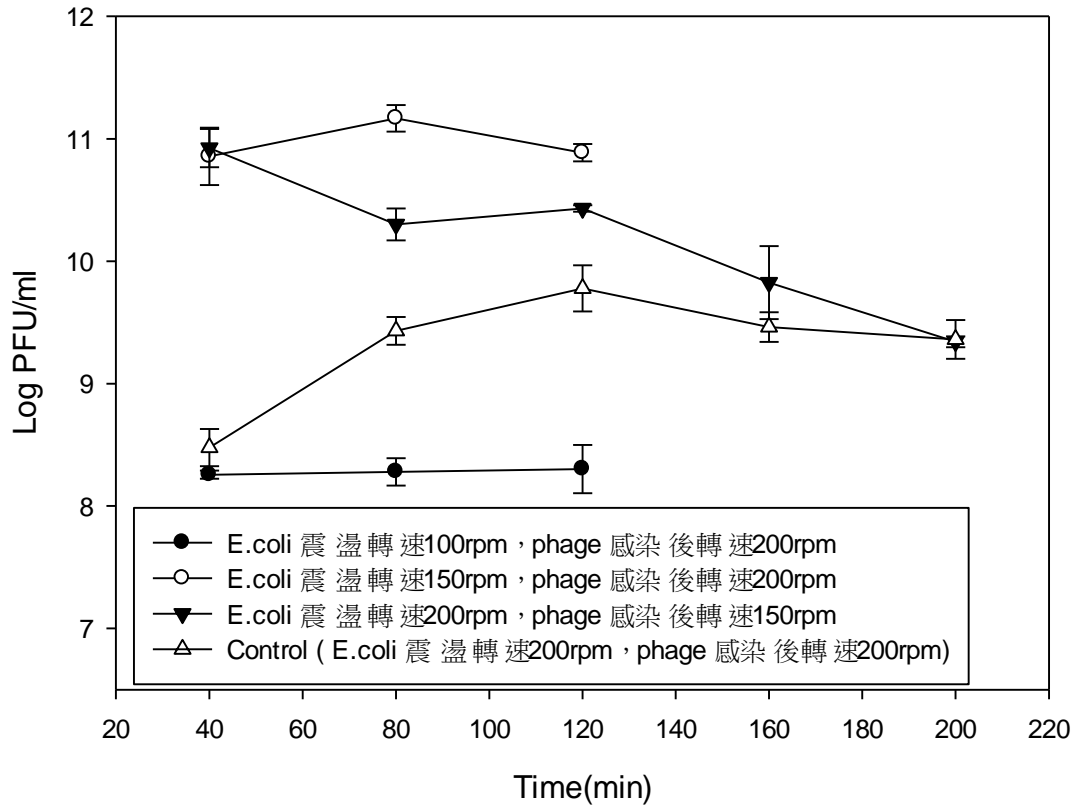


圖 4-21 不同轉速培養時以最高噬菌體產率相互比較圖

(擷取圖 4-18、圖 4-19、圖 4-20 最高噬菌體產率感染情形)

培養基成分：LB broth

培養條件：pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 100 rpm~200 rpm

4-2-6 添加金屬離子與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之影響：

由圖 4-22 結果表示，設定條件以 pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 下培養，控制組為 LB Broth 液態培養基下培養，所測得的噬菌體溶菌斑數為 4.80×10^8 PFU/ml；含 0.1 g MgCl_2 / per 100 ml 的 LB Broth 液態培養基下培養，所測得的溶菌斑數為 1.62×10^9 PFU/ml；含 0.1 g CaCl_2 / per 100 ml 的 LB Broth 液態培養基下培養，所測得的溶菌斑數為 2.30×10^8 PFU/ml；含 0.1 g KCl / per 100 ml 的 LB Broth 液態培養基下培養，所測得的溶菌斑數為 4.80×10^8 PFU/ml；各 0.1 g / per 100 ml FeCl_3 、 AlCl_3 的 LB Broth 液態培養基，在培養下觀測的溶菌數則不到 10^7 PFU/ml，由此得知，此大腸桿菌添加 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 後，可能產生排斥作用，造成大腸桿菌無法生長，而使得噬菌體可溶裂的寄主數量極少，產生的溶菌斑數極低；添加 Mg^{2+} 後，大腸桿菌的成長快速，提高生長活性，而使噬菌體裂解速度提高，其數最與控制組比較高出 3.37 倍，而我們在以此結果來探討添加 Mg^{2+} 多寡是否能更增加噬菌體的溶菌數。

由圖 4-23 結果表示，添加 0.3 g MgCl_2 / per 100 ml 的培養下，所觀測的溶菌數為 8.13×10^9 PFU/ml，為所添加克數裡最高的溶菌數量，與控制組相比較高出約為 17 倍，而再增加 MgCl_2 的克數發現噬菌體生成的溶菌斑數開始減少，代表大腸桿菌已達最佳的適應環境，無法再有所提升，故可得知添加 Mg^{3+} 是有助於提高噬菌體生長的。

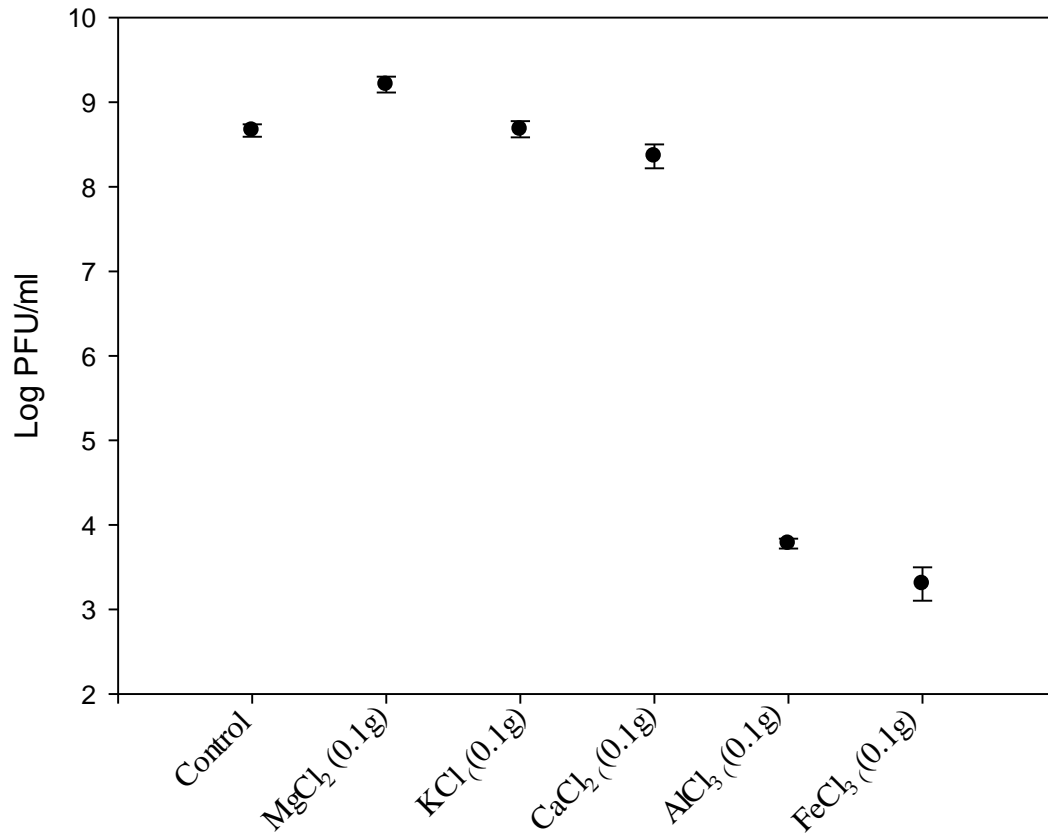


圖 4-22 添加金屬離子對噬菌體生產之影響

培養基成分：LB broth、Ions(MgCl₂、KCl、CaCl₂、AlCl₃、FeCl₃)

培養條件：pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

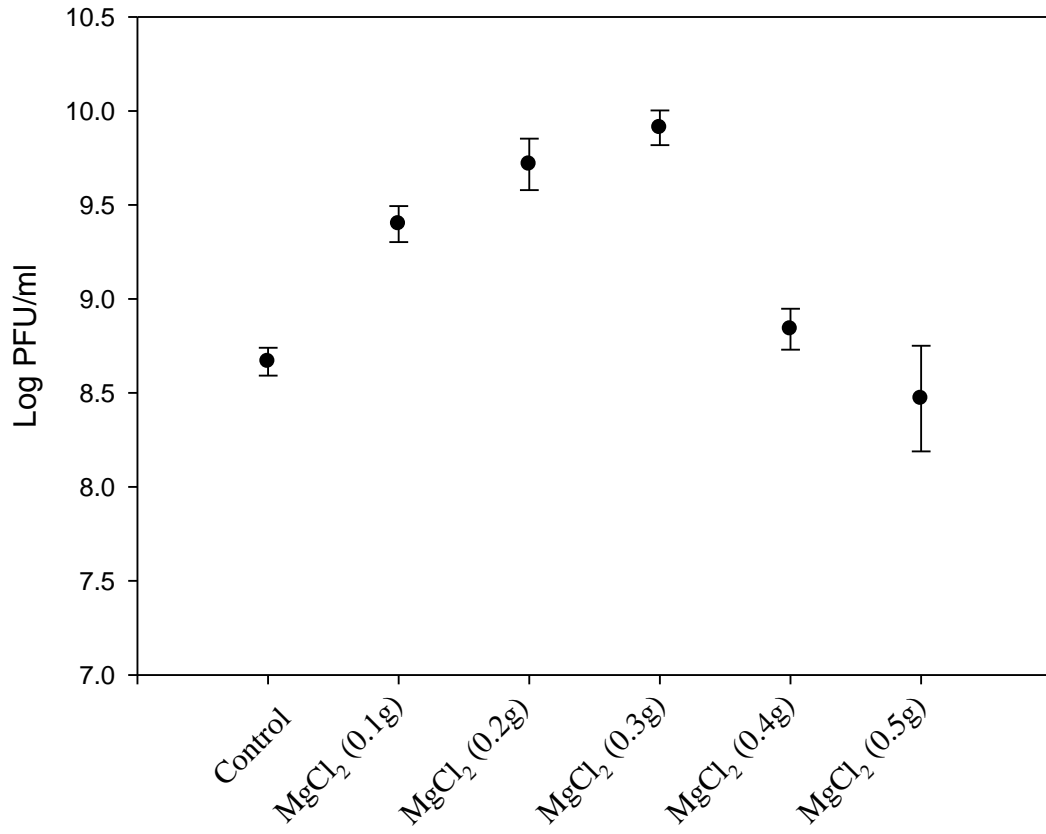


圖 4-23 添加不同量的 MgCl₂ 對噬菌體生產之影響

培養基成分：LB broth、MgCl₂

培養條件：pH = 7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-7 搖瓶培養中震盪轉速與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討:

由圖 4-24 結果表示，設定條件以 pH= 7、培養溫度 37°C 下培養，以樣品瓶培養下，大腸桿菌以及噬菌體時固定以 200 rpm 培養，感染後 120 分鐘噬菌體所生成的溶菌斑數為 6.00×10^9 PFU/ml；培養大腸桿菌以 150 rpm 培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養，80 分鐘後溶菌斑數達到最高，為 1.47×10^{11} PFU/ml；搖瓶培養下，大腸桿菌以及噬菌體時固定以 200 rpm 培養，感染後 120 分鐘噬菌體所生成的溶菌斑數為 1.70×10^9 ；培養大腸桿菌以 150 rpm 培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養，120 分鐘後溶菌斑數達到最高，為 5.00×10^9 PFU/ml。樣品瓶產生的溶菌斑較搖瓶培養的溶菌斑數多，推測是培養用的體積不同，在同一時間內，樣品瓶裡培養的濃度可能比搖瓶培養的濃度高，而感染後所觀測的溶菌斑數有些許差異。

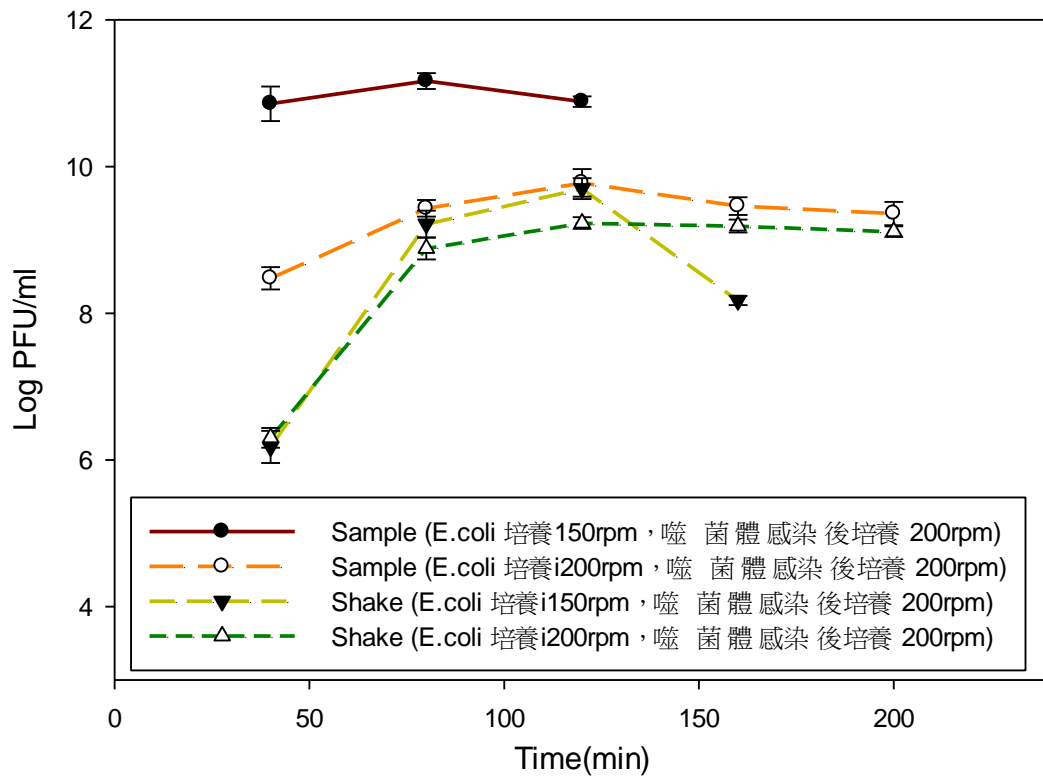


圖 4-24 搖瓶與樣品瓶以不同轉速生產噬菌體之比較

培養基成分：LB broth

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 150 rpm~200 rpm

4-2-8 搖瓶培養實驗在 42°C 時與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討:

由圖 4-25 結果表示，控制組在 80 分鐘後所感染的噬菌體溶菌斑數最高，為 3.50×10^8 PFU/ml；溫度調整為 42°C 時培養下，加入噬菌體後感染，樣品瓶在經過 40 分鐘後所生成的溶菌斑數最高，為 5.20×10^8 PFU/ml；搖瓶培養下感染後 40 分鐘所生成的溶菌斑數最高，為 4.30×10^9 PFU/ml；以搖瓶培養下實驗結果也與樣品瓶的實驗結果相同，更可確定感染時間過了 40 分鐘後，所生成的溶菌斑數快速遞減，代表在高溫下所生成的大腸桿菌短時間內生成量提高，感染後只能在短時間內快速裂解產生溶菌斑數。與原控制組最高數量比較，高出約為 12 倍，故可利用提高溫度的方式培養宿主菌，短時間內萃取出大量的噬菌體，做為未來大規模培養使用。

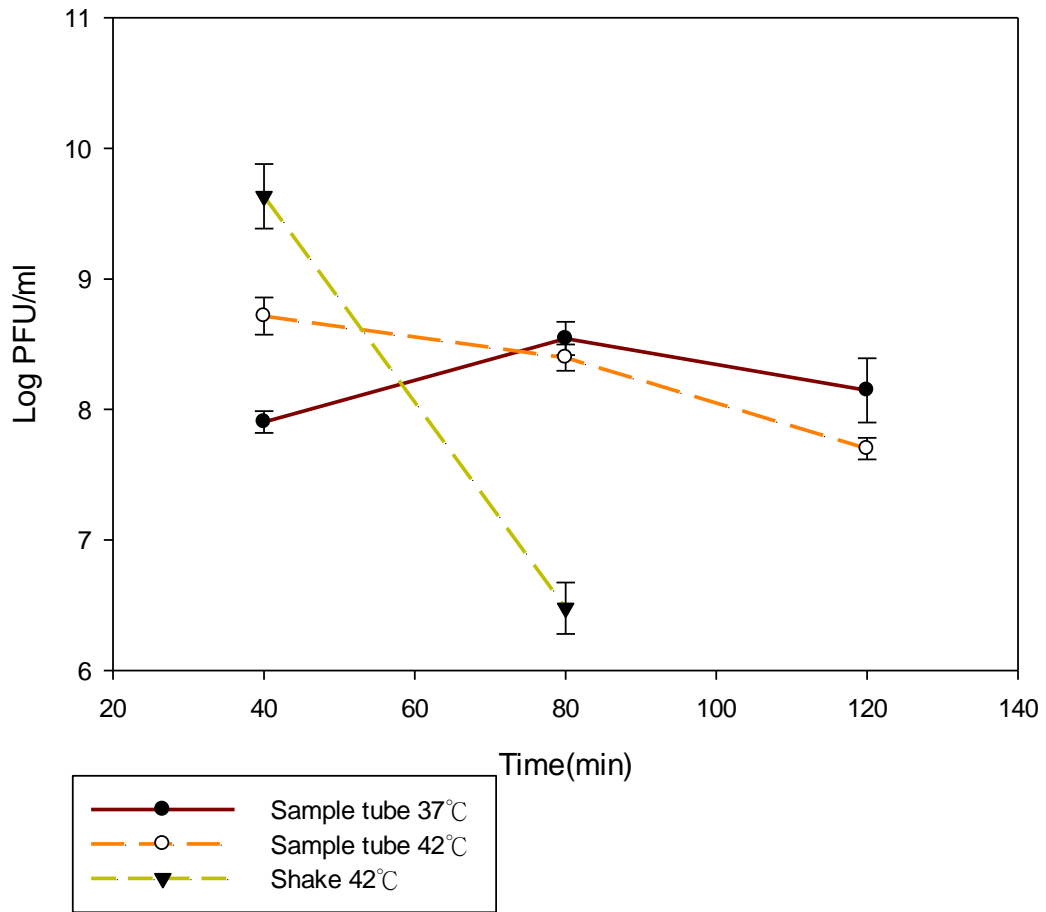


圖 4-25 搖瓶與樣品瓶以 42°C 培養下生成溶菌斑數之比較

培養基成分：LB broth、MgCl₂

培養條件：pH=7、培養溫度 42°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-9 搖瓶培養實驗在不同 Define medium 時與噬菌體 ϕ O103p 生產之影響

從圖 4-26 結果顯示，設定條件以 pH =7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 160 分鐘時噬菌體溶菌斑數達到最高，為 3.47×10^9 PFU/ml；以 K.medium 為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 80 分鐘時達到最高溶菌斑數，為 1.10×10^9 PFU/ml；以 M.medium 為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 80 分鐘時達到最高溶菌斑數，為 6.00×10^8 PFU/ml。由此可知，在 LB Broth 生長噬菌體的環境比其他兩者佳，而 M.medium 的噬菌體生產僅維持在 $10^8 \sim 10^9$ PFU/ml 之間，沒有提高的趨勢；K.medium 則是感染 80 分鐘後逐漸減少，故 LB Broth 比較適合做為培養基培養。

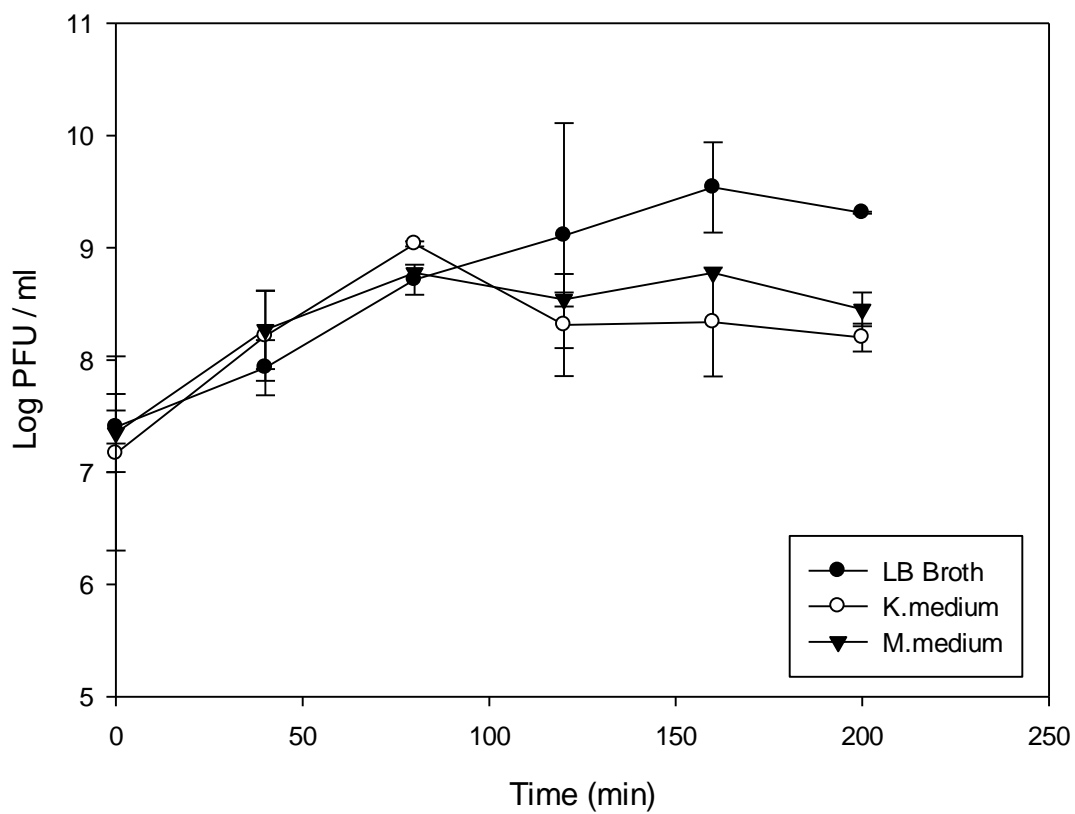


圖 4-26 不同 Define medium 中噬菌體生產之比較

培養基成分：LB broth、K.medium、M.medium

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-10 搖瓶培養實驗在不同基質時與噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討

從圖 4-27 結果顯示，設定條件以 pH =7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm 下培養，以 LB Broth 為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 120 分鐘時噬菌體溶菌斑數達到最高，為 1.70×10^9 PFU/ml；以酒糟為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 160 分鐘時達到最高溶菌斑數，為 4.60×10^9 PFU/ml；以豆漿為液態培養基培養，加入噬菌體感染後，在 160 分鐘時達到最高溶菌斑數，為 4.10×10^9 PFU/ml。由此可知，大腸桿菌在酒糟以及豆漿的培養下比在 LB Broth 培養較佳，故在噬菌體感染後所測得的溶菌斑數也較高，豆漿與控制組相比較，則高 2.41 倍；酒糟與控制組比較，則高 2.71 倍。以大腸桿菌培養下是在豆漿培養下較佳，而在噬菌體感染下，則是酒糟較佳，這可能代表酒糟培養下可提高噬菌體的活性，加快噬菌體裂解的速度，而使得同一時間內所測得的溶菌斑數比豆漿培養下的溶菌斑數較高出一些，故之後我們以酒糟作為後續實驗探討。

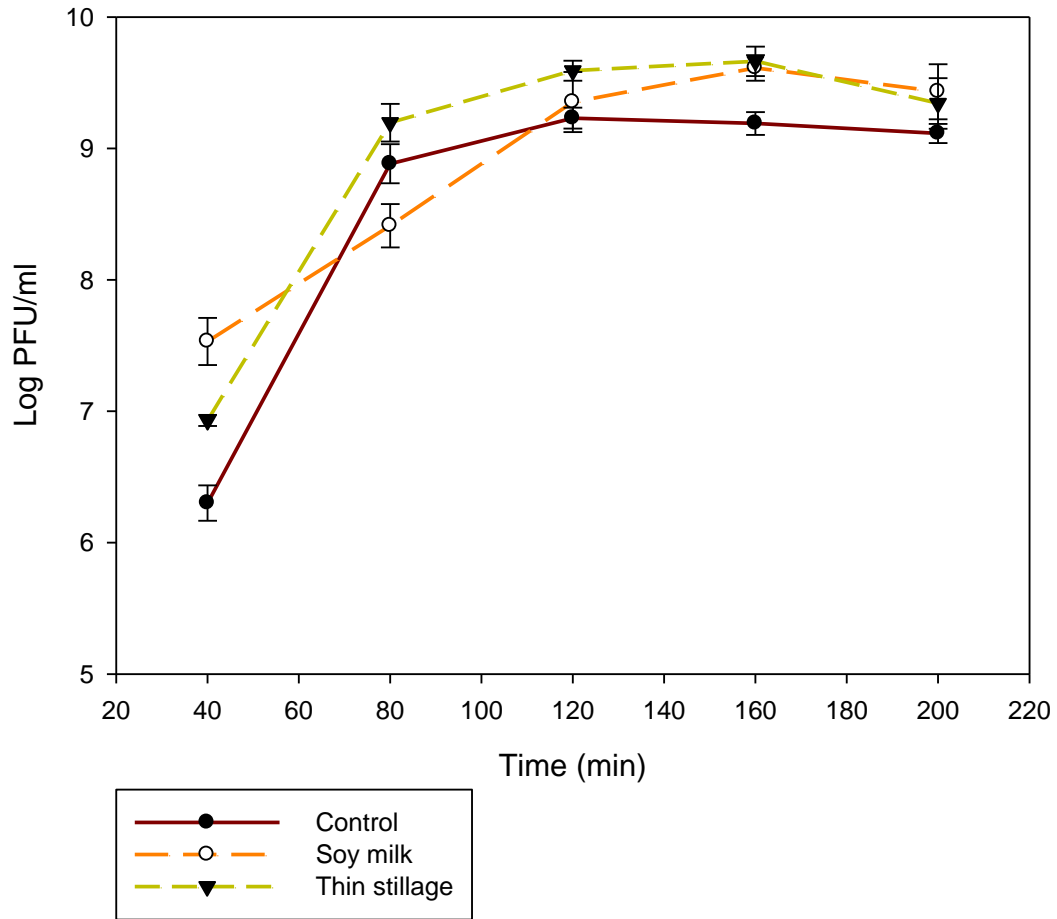


圖 4-27 搖瓶培養豆漿、酒糟生成溶菌斑數之比較

培養基成分：LB broth、Soy milk、Thin stillage

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 200 rpm

4-2-11 搖瓶實驗以最佳環境因子對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討

由改變震盪轉速實驗得知，大腸桿菌以 150 rpm 下培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養；添加金屬離子實驗中，添加 $MgCl_2$ 的培養基較佳；在不同基質下培養實驗中，酒糟為增加噬菌體數量最好的培養基。這些結果的最佳因子合併在一起，並與控制組做比較後，由圖 4-28 結果表示：設定條件皆以 pH=7、培養溫度 $37^\circ C$ 下培養，控制組固定以 200 rpm 培養，在感染後 120 分鐘噬菌體溶菌班數達到最高，為 1.70×10^9 PFU/ml；添加 $MgCl_2$ 的 LB Broth 液態培養基，大腸桿菌與噬菌體固定以 200 rpm 培養，120 分鐘後達到最高溶菌班數，為 4.08×10^9 PFU/ml；以 LB Broth 液態培養基培養下，大腸桿菌以 150 rpm 培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養，在 120 分鐘後達到最高溶菌班數，為 5.00×10^9 PFU/ml；添加 $MgCl_2$ 的酒糟液態培養基，大腸桿菌以 150 rpm 培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養，80 分鐘後達到最高溶菌班數，為 1.92×10^{10} PFU/ml。此結果代表，改變轉速後，提升噬菌體裂解大腸桿菌的速度；添加 $MgCl_2$ 後，大腸桿菌的數量相對提高，增加噬菌體可感染的寄主數量；培養基再以酒糟培養，其感染能力又大幅提升，與控制組比較，至少高 11.35 倍。而這結果認為是噬菌體最佳環境，而且是最大數量的範圍中。

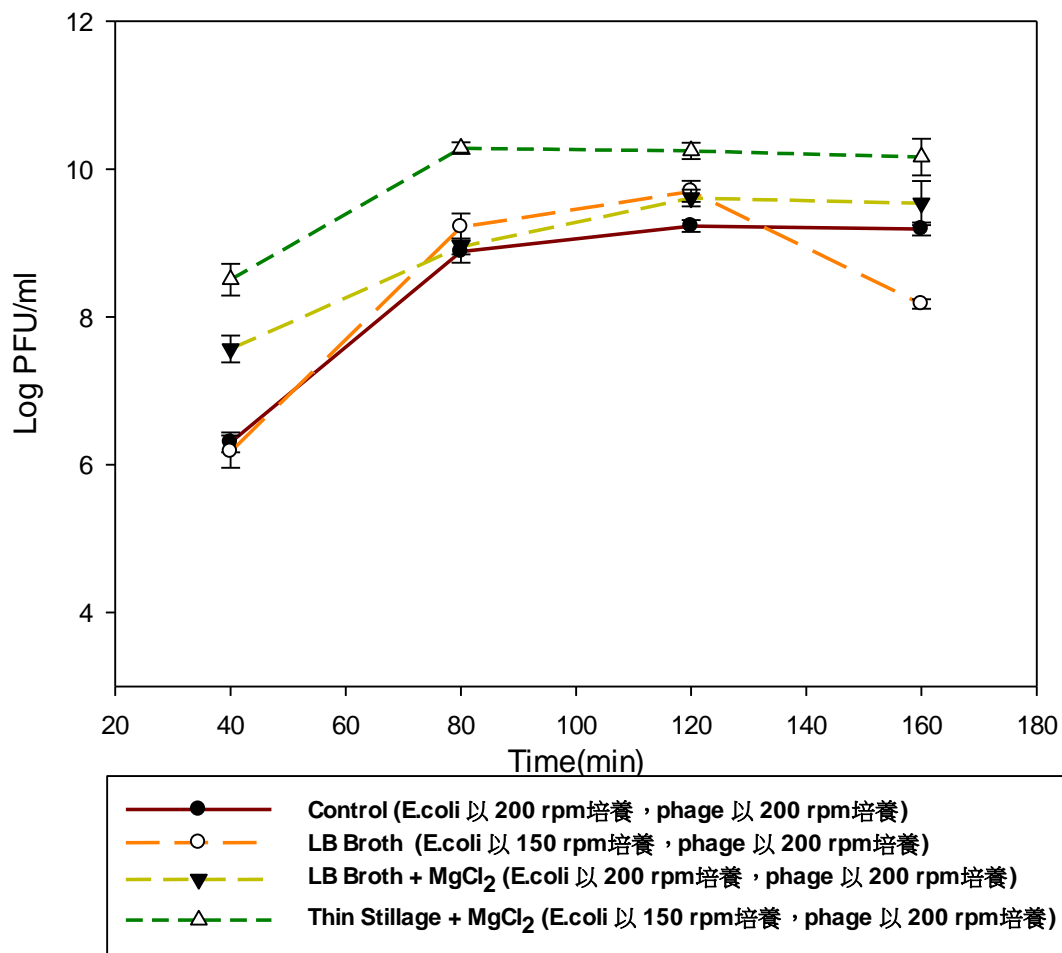


圖 4-28 最佳環境因子下對噬菌體感染程度的影響

培養基成分：LB broth、Thin stillage、MgCl₂

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 150 rpm ~ 200 rpm

4-2-12 搖瓶實驗以 42°C 改變轉速對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討

由改變震盪轉速實驗得知，大腸桿菌以 150 rpm 下培養，噬菌體感染後以 200 rpm 培養；添加金屬離子實驗中，添加 $MgCl_2$ 的培養基較佳；在不同基質下培養實驗中，酒糟為增加噬菌體數量最好的培養基。這些結果的最佳因子合併在一起，並與控制組做比較後，由圖 4-29 結果表示：此實驗討論在 42°C 時短時間內噬菌體感染所觀測到的溶菌斑數較高，而希望添加最佳因子後能夠增加更大量的溶菌斑數，沒有添加任何的 LB Broth 在感染後 40 分鐘測得出來的噬菌體數量為 4.30×10^9 PFU/ml；添加 $MgCl_2$ 的 LB Broth 在感染後 40 分鐘測得的數量為 1.50×10^8 PFU/ml；添加 $MgCl_2$ 的酒糟在感染後 40 分鐘測得的數量為 1.50×10^9 PFU/ml。由此結果可得知，添加 $MgCl_2$ 後，高溫下培養會產生反效果，測得的溶菌斑數明顯比未添加的控制組還差，而添加 $MgCl_2$ 的酒糟，雖然能提升噬菌體的裂解速度，但因為 $MgCl_2$ 的影響下而數量略少於控制組約 3 倍，故若以短時間內培養下，不可添加金屬離子，才能保持較高的噬菌體感染數量。

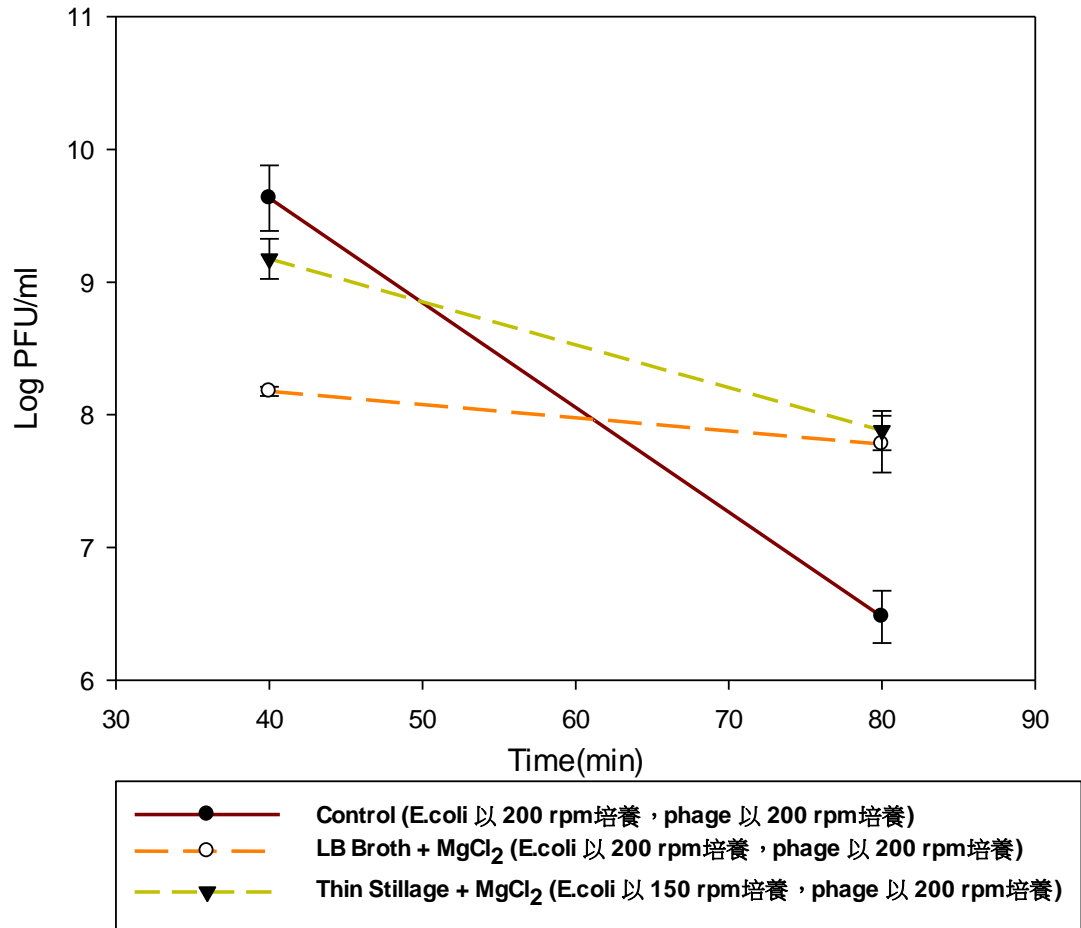


圖 4-29 最佳環境因子於 42°C 下對噬菌體感染程度的影響

培養基成分：LB broth、Thin stillage、MgCl₂

培養條件：pH=7、培養溫度 37°C、震盪轉速 150 rpm ~ 200 rpm

4-2-13 小型發酵槽對噬菌體 ϕ O103p 感染程度之探討

由圖 4-30 結果顯示，設定條件以 pH = 7、溫度 37°C、轉速 100 rpm、通氣量 0.00 vvm，以 5L 酒槽作為液態培養基培養大腸桿菌，後加入噬菌體生長之結果。發酵槽在感染後 200 min 生成菌數最高為 1.00×10^9 PFU/ml，與之前搖瓶培養的方式不同，搖瓶培養是以震盪的方式來培養，而發酵槽則是以內部轉速來培養；體積比不同，搖瓶培養的體積比固定為 1:4，而發酵槽則是 1:0.2。雖無法比較，但結果來看差異並不大。

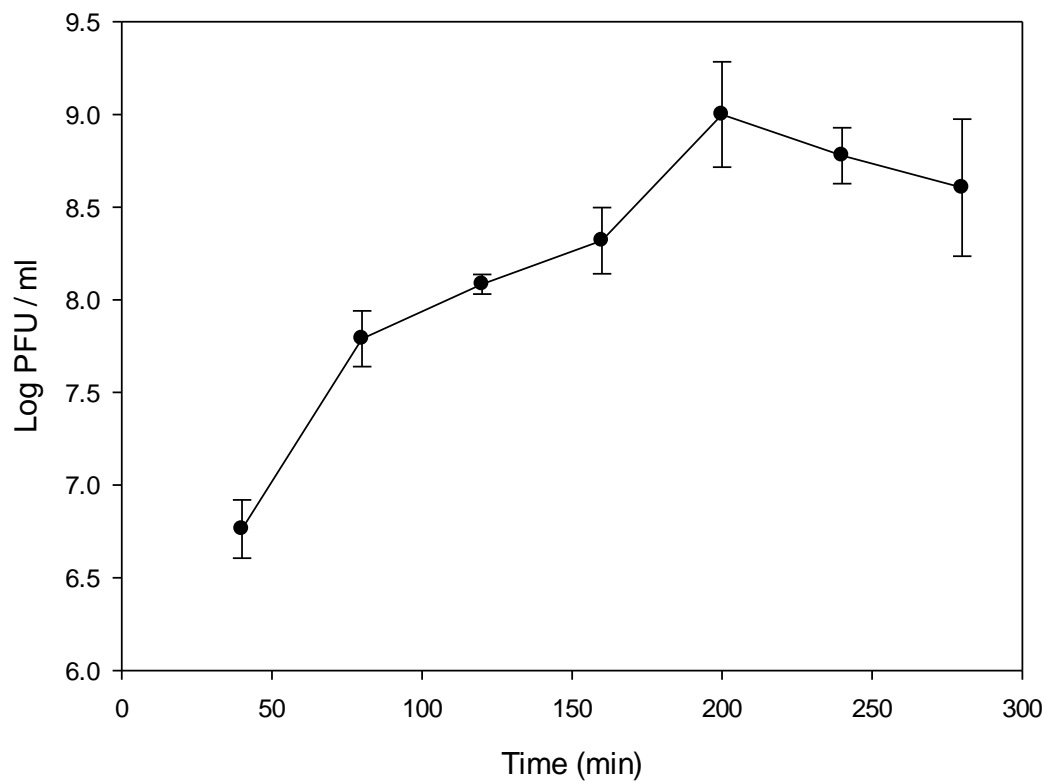


圖 4-30 小型發酵槽在無通氣量下探討噬菌體生產之情況

培養基成分：LB broth

培養條件：pH= 7、培養溫度 37°C、轉速 100 rpm 通氣量 0.00 vvm

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

實驗中。培養大腸桿菌菌株 O103 以及噬菌體 ϕ O103p 所探討的幾個研究方向：

(1) 藉由改變環境因子以提高大腸桿菌生成之數量；(2) 藉由添加碳源、添加金屬離子以提高大腸桿菌生成之數量；(3) 藉由改變環境因子以提高噬菌體 ϕ O103p 生成之數量；(4) 藉由添加碳源、添加金屬離子以提高噬菌體生成之數量；(5) 藉由搖瓶培養實驗探討出最佳化培養噬菌體生成之數量。綜合以上幾個研究方向，我們可以得到以下幾點結論：

1. 大腸桿菌最適應的 pH 值為 pH = 7，而在其他不同的 pH 範圍中，對於大腸桿菌 O103 培養是不適合的，故培養時必須維持在 pH = 7 才能保持在最佳的菌株數量。
2. 搖瓶培養實驗中，利用不同密封方式來培養大腸桿菌 O103 時，以錫箔紙來密封的培養時間較短達到最大菌數，與矽膠塞密封的結果略顯較高，內部通氣量不同，產生的結果也不同，因大腸桿菌屬於兼性厭氧菌，故保持在一定通氣量下會較好。
3. 利用不同的 Define medium 培養大腸桿菌時，其結果仍然為 LB Broth 液態培養基時較佳，大腸桿菌培養至 5 小時後可達最高數量 3.38×10^9 CFU/ml，與其他比較仍為較好。噬菌體生產實驗中，LB Broth 液態培養基感染噬菌體後 160 分鐘菌數最高為 3.47×10^9 PFU/ml，與其他培養基相比仍然較高。

4. 利用豆漿以及酒糟來培養大腸桿菌 O103 時，發現兩者比控制組生成的菌株數量較高，豆漿在培養第 6 小時可達到最高數量 1.75×10^9 CFU/ml，是控制組的 2.28 倍；酒糟在培養第五小時可達到最高數量 1.17×10^9 CFU/ml，是控制組的 1.49 倍。
5. 在不同 MOI 之測定噬菌體 ϕ O103p 實驗中，可發現所觀測的溶菌數量差別不大，故考慮後續實驗差異性及減少噬菌體量過度消耗而以 MOI = 1 為定值來做培養，而不考慮以 MOI = 10 來培養。
6. 以 pH 為變數培養噬菌體 ϕ O103p 時，在 pH = 7 時會比其他範圍所測得的溶菌斑數高，更加確立培養此實驗時最佳的 pH 值已經是最適合大腸桿菌 O103 以及噬菌體 ϕ O103p 的環境因子。
7. 添加碳源培養噬菌體 ϕ O103p，其中以不添加任何碳源的控制組比其他有添加碳源的液態培養基所生成的溶菌斑數較高，代表添加額外碳源反而會造成反效果。
8. 以培養溫度作為變數來培養噬菌體 ϕ O103p，發現在提高溫度後短時間內噬菌體的溶菌斑數偏高，而降低溫度的話測得的溶菌斑數明顯的偏低，在 42°C 時 40 分鐘內測得的溶菌斑數為 5.20×10^8 PFU/ml，而後續以短時間內培養實驗中，在 30 分鐘時測得的菌斑數為 2.40×10^9 PFU/ml，比 40 分鐘實測得的較高，以此結果來作為後續實驗的最佳因子之一。
9. 以震盪轉速作為變因來培養噬菌體 ϕ O103p，從中發現在低轉速培養大腸桿菌

O103，噬菌體 ϕ O103p 開始感染時提高轉速來培養，可發現測得的溶菌斑數明顯偏高，而在 150 rpm 來培養大腸桿菌 O103，200rpm 來培養噬菌體 ϕ O103p，80 分鐘時觀測的溶菌斑為 1.47×10^{11} PFU/ml，比原先控制組所測得最高數量高出數十倍，以此結果作為後續實驗的最佳因子之一。

10. 額外添加金屬離子來探討噬菌體 ϕ O103p，發現部分添加金屬離子的培養液，噬菌體的溶菌斑數比控制組的較高，其中以添加 0.1g $MgCl_2$ / per 100 ml 培養液所測得的溶菌斑數為 1.62×10^9 PFU/ml，為控制組的 3.37 倍；而後續實驗中，以添加 0.3g $MgCl_2$ / per 100 ml 在培養基中測得的溶菌數為 8.13×10^9 PFU/ml，比原先的更高，故以此結果作後續實驗的最佳因子之一。

11. 以酒糟、豆漿作為培養液來培養噬菌體 ϕ O103p，發現豆漿在 160 min 所測得的溶菌斑數最高，為 4.10×10^9 PFU/ml，是控制組最高數量的 2.41 倍，而酒糟在 160 min 所測得的溶菌斑數最高，為 4.60×10^9 PFU/ml，是控制組最高數量的 2.70 倍，故以此結果作為後續實驗的最佳因子之一。

12. 綜合以上結果得到的最佳環境因子、添加金屬離子以及培養基來培養噬菌體 ϕ O103p，以酒糟作為液態培養液，並添加 $MgCl_2$ ，調整震盪轉速以 150 rpm 培養大腸桿菌 O103，200 rpm 培養噬菌體 ϕ O103p，在 80 min 時測得的溶菌斑數為 1.92×10^{10} PFU/ml，是控制組的 11.35 倍。而固定 42°C 培養時，則是發現噬菌體生成的溶菌斑數偏低，原因可能是金屬離子的影響而使得高溫下溶菌斑數無法提高，故高溫培養時不添加金屬離子來培養較佳。

13. 小型發酵槽中以改變通氣量的方式觀察大腸桿菌生長情況，在無通氣量下培養 5 小時可達到最高菌數為 1.55×10^9 CFU/ml，而有少量通氣的情況下會有一定起伏，而在 7 小時生成的菌數較高為 1.13×10^9 CFU/ml，培養時大腸桿菌會回升，推測可能原因為，在通氣的情況下，大腸桿菌會減少醋酸的生成。

5-2 未來展望

噬菌體是未來在生物科技中，作為抑制細菌最有效的方法之一，而目前首要條件則是擴大培養，並且找出最佳環境因子、最佳基質、添加外在因子等因素來提高至最高噬菌體的產率，而此實驗結果將可以運用於其他類型之噬菌體培養參考，並調整至最大量化，最終希望能以商業模式經營此研究，並且量產最適宜之噬菌體菌株，除了可防止抗生素使用氾濫，而且能提高人體防止細菌免疫力，也不會造成任何副作用。

參考文獻:

- 葉哲銘(2007)。以噬菌體 ϕ km18p 治療受多重抗藥性鮑氏不動桿菌感染小鼠之研究。義守大學生物技術與化學工程研究所碩士論文。
- 楊文仁、黃玫琪、曹雯珊、宣大衛 (2003)。噬菌體呈現技術及其在生物科技上之應用, 生物科學第 46 卷第 1 期 12 - 26 頁
- 吳承璋(2000)。挑選並改善以噬菌體表達方式呈現之登革熱抗體, 慈濟醫學院研究所碩士論文
- 陳振漢、楊承育、翁啟惠、楊文彬(2010)。使用噬菌體表達方法測定靈芝萃取物 F3 的結合標的, 中央研究院專利 28T-950913
- 貴煜(2002)。混合碳源對大腸桿菌生產重組蛋白之影響, 成功大學化學工程學系研究所碩士論文
- 游大慶(2001)。生長條件及誘導溫度對大腸桿菌生產白細胞介素-20 之影響, 成功大學化學工程學系研究所碩士論文
- Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport, N. Troitsky. (1998), Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *Journal of Infection* 36(1): 5-15
- Averback, P., J. Gemmell. (2008), Bacteriophage composition useful in treating food products to prevent bacterial contamination. *European Patent Application* EP1930417
- Bachrach G., M. Leizerovici-Zigmond, A. Zlotkin, R. Naor, D. Steinberg. (2003),

- Bacteriophage isolation from human saliva. *Letters in Applied Microbiology*
36(1):50-3
- Bernard, N. F. (1989), Fields' virology 2nd edition. *Lippincott Williams and Wilkins*,
Volume 2 41-50
- Bujanover, S. (2004), Production of bacteriophage compositions for use in phage
therapy. *World Intellectual Property Organization Patent Application 052274*
- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, ML, Dillmann, H. Brussow. (2004), Phage-host
interaction: an ecological perspective. *Journal of bacteriology* 186(12), 3677-3686
- Coleman ME, ML. Tamplin, JG. Phillips, BS. Marmer. (2003), Influence of agitation,
inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of *Escherichia coli*
O157:H7--relevance to risk assessment. *International Journal of Food*
Microbiology 83(2):147-60
- Courchesne, NM., A. Parisien, CQ. Lan. (2009), Production and application of
bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. *Recent Patents on Biotechnology*,
3(1), 37-45.
- Contiero, J., C. Beatty, S. Kumari, C. DeSanti, L.WR. Strohl. (2000), A wolfe effects
of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*.
Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24(6):421-430
- D'Hérelle, F. Sur. (1917), Un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.

- Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série I. Mathématique. Académie des Sciences, Paris* 165:373-375
- Ellis EL., M. Delbrück. (1939). The growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology* 22(3): 365–384
- Frederick, C. N., LB. Philip, FS. David. (1974), Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology* 119(3):736-747
- Gavin, H., T. W. James, S. Richard, H. Anthony. (2006), Bacteriophage for the treatment of bacterial biofilms. *Biocontrol Limited* US7758856
- Greer, GG. (2005), Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection* 68(5):1102-11.
- Inal, J.M. (2003), Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)* 51(4):237-44.
- John, H. N. (1951), Growth and phage production of lysogenic *B. megatherium*. *The Journal of General Physiology* 34(5): 715–735.
- Johnson, R. P., CL. Gyles, WE. Huff, S. Ojha, GR. Huff, NC. Rath, AM. Donoghue. (2008), Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Reviews* 9(2):201–215
- Lee, SY. (1996), High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14(3):98-105.

- MacDonald, H. L., J. O. MacDonald. (1990). Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol* 56(3): 640–645.
- MacGregor, H. E. (2006), Getting to meat of the matter: virus kills bacteria in cold cuts. *Los Angeles Times* Sep. 5th
- Odile, FR., C. Donatella, D. R. Mario, C. Angela, S. Chiara. (2011), High cell density cultivation of *Escherichia coli* K4 in a microfiltration bioreactor: a step towards improvement of chondroitin precursor production. *Microb Cell Fact* **10:10**.
- Paisano AF., B. Spira, S. Cai, AC. Bombana. (2004), In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiol Immunol* 19(5):327-30
- Parisien, A., B. Allain, J. Zhang, R. Mandeville, CQ. Lan. (2008), Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104(1):1-13.
- Skurnik, M., E. Strauch. (2006), Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296(1):5-14.
- Smith, G. P. (1985), Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface *Science* 228(4705):1315-1317
- Tucker, R. G. (1963), Effect of metal Ions and polyamines on the development of

bacteriophage ϕ R. *Journal of General Microbiology* 32:287-294

Twort, F. W. (1915), An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses.

The Lancet 186, 1241-1243.