

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

生質單體催化技術及其應用效益評估研究
Assessment of bio-monomer catalytic technology and its application

計畫編號：110A006

受委託機關(構)：國立清華大學化工系

計畫主持人：沈若樸

聯絡電話：03-5715131 ext 35706

E-mail address：crshen@mx.nthu.edu.tw

核研所聯絡人員：梁鎮顯

報告日期：110 年 11 月 23 日

目 錄

目 錄	I
中文摘要	1
英文摘要	2
壹、計畫緣起與目的	3
貳、研究方法與過程	5
一、VIOLACEIN 生產菌株篩選流程.....	5
二、VIOLACEIN 及相關產物生產實驗.....	5
三、優化 VIOLACEIN 生產實驗.....	7
四、產物分析方法	8
參、主要發現與結論	9
一、建構及測試不同質體對於紫色桿菌素產量之影響	9
二、大腸桿菌中色胺酸抑制及競爭基因之剔除	10
三、優化培養盤以提高呈色法之辨別度	11
四、建立 RBS LIBRARY 調控色胺酸及紫色桿菌素代謝途徑基因表現	12
五、以呈色法篩選具有生產潛力之菌株	13
六、穩定度及再現性測試	15
七、生產條件優化	16
(一)溫度.....	16
(二)培養基.....	18
(三)碳源.....	20
(四)誘導點.....	21
(五)培養基之 pH 值.....	22
八、條件再優化	23
九、結論	25
肆、參考文獻	27

中文摘要

在之前的工作中，我們將選定的 RBS library 與 violacein 合成途徑上各基因結合，並透過培養盤菌落呈色法篩選出多種可有效生產紫色桿菌素之 RBS 組合，其中產量最好之組合在 10mL minimal medium (M9+2g/L tryptophan) 搖瓶培養 24 小時，violacein 與 deoxyviolacein 最高產量分別能達 103.8 mg/L 與 351.2 mg/L。而由於上游色胺酸途徑尚未被優化，這一切入點成為了可提高紫色桿菌素類化合物產量之可能性。

在上半期中，我們選定了幾個酵素去過度表現，也剔除了幾種會影響色胺酸產量之基因，並將優化紫色桿菌素途徑之方法套用至色胺酸合成途徑中，以此可達到不須額外添加色胺酸就可合成高產量 violacein 或是 deoxyviolacein，之後利用 RBS Library 以及呈色法搭配上紫色桿菌素途徑之質體篩選出 178 株具有生產潛力的菌株。而在下半期，我們將已篩選菌株進行穩定度的測試，之後將穩定性或產量較高的菌株送往定序以確認其 RBS 序列組合，並使用 RBS calculator 估算各 RBS 之轉譯強度以分析不同酵素間的規律關係。此外，我們也優化了 violacein 最佳生產菌株的生產環境等參數，並於生物反應器中進行初步放大規模的生產。而之後我們更參考了其它文獻中產量較好的培養基溶液並做測試及優化，目前我們的最佳菌株分別能在 72 小時內產生 1.6 g/L violacein 或 4 g/L deoxyviolacein。

英文摘要

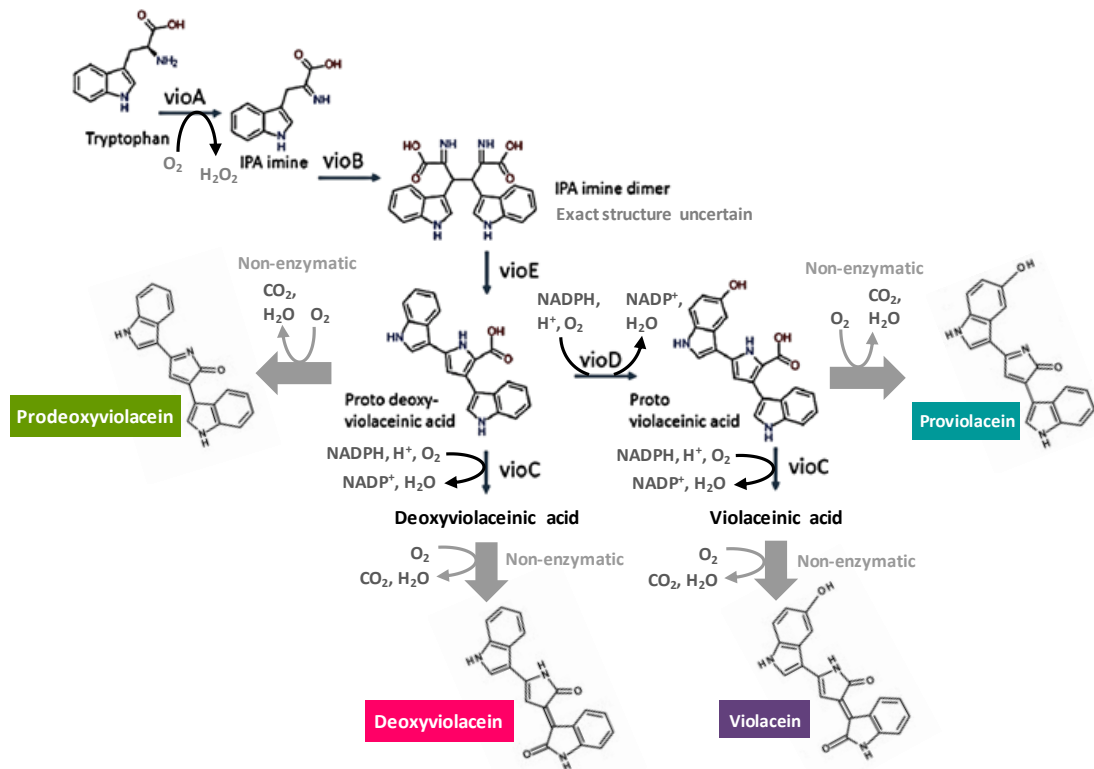
In the previous work, we combined the selected RBS library with the genes in the violacein pathway, and screened out a strain based on the colony color on the agar plate that can effectively produce violacein. The best strains can produce 103.8 mg/L violacein or 351.2 mg/L deoxyviolacein in 10 mL minimal medium (M9+2g/L tryptophan) shake flask culture for 24 hours, respectively. Since the upstream tryptophan pathway has not been optimized, this point can be the possibility to increase the production of violacein compounds.

In the first half of the period, we selected several enzymes to overexpress and eliminated several genes that affect the production of tryptophan, besides, we also optimized the tryptophan pathway to achieve the high production of violacein while it won't need the addition of tryptophan. Afterwards, 178 strains with potential production of violacein or deoxyviolacein were screened by using RBS Library and coloring method. In the second half, we test the stability of the higher productive strains. After that, we sequenced the stable strains to confirm their RBS sequence combination while also used the RBS calculator to estimate the translation initial rate of each RBS sequence to analysis the regulation or correlation between these enzymes. In addition, we also optimized the production parameters of the best violacein productive strain and carried out preliminary scale-up production in the 1 L bioreactor. Furthermore, we also tested the medium in other literatures and did the optimization. At present, our best strains can produce 1.6 g/L violacein or 4 g/L deoxyviolacein in 72 hours, respectively.

壹、計畫緣起與目的

紫色桿菌素(violacein)及脫氧紫色桿菌素(deoxyviolacein)為微生物的二級代謝產物。他們具有抗氧化[1]、抗菌[2]、抗病毒及抗腫瘤[3, 4]等特性，且 violacein 已被成功使用於對抗白血病、肺癌和淋巴瘤細胞等[5]。此外，violacein 作為生物染料具有良好的色調及穩定性同時也具有天然的抗菌效果[6, 7]，這些具有發展性的特點使人們對於生產 violacein 和 deoxyviolacein 越來越感興趣[8]。

紫色桿菌素類化合物為色胺酸(tryptophan)之衍伸物，透過基因操縱組 vioABCDE 可產生四種不同的有色化合物(如圖一)。且已有文獻指出添加色胺酸可提高紫色桿菌素在天然生產者甚至是重組菌株中的產量[9, 10]，而 Rodrigues 等人也曾提及紫色桿菌素的產生會造成微生物體內色胺酸之累積量下降[11]，這些都證實了色胺酸在生產紫色桿菌素的重要地位。而以往透過微生物進行生產時都會額外添加色胺酸以提高紫色桿菌素的產量，不過此方式是比較經濟不實惠的。若微生物能夠自我生產色胺酸使其足以過量生產紫色桿菌素，那麼我們可以透過微生物的生物轉換方式，將相對較便宜的簡單碳源轉化為經濟價值較高的紫色桿菌素。

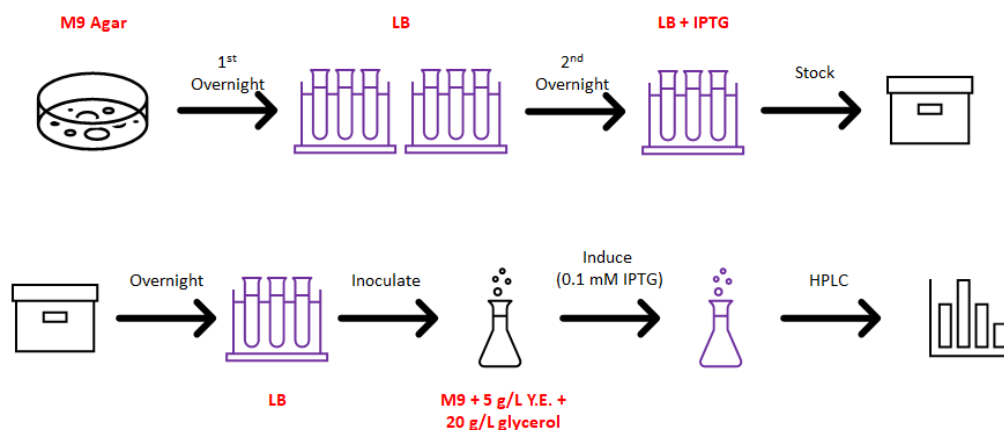


圖一 violacein 代謝途徑

貳、研究方法與過程

一、Violacein 生產菌株篩選流程

經移植含 RBS Library 質體之菌液塗在 M9 agar 培養盤上，生長成菌落後透過呈色法挑選顏色較深之菌株，接種於試管內含 2 mL LB 與適當濃度之抗生素(50 μ g/mL kanamycin、50 μ g/mL spectinomycin 與 50 μ g/mL chloramphenicol)，以 37°C、250 rpm 培養，隔天將生長之種菌以 1%比例再次接種至含 2 mL LB、適當濃度之抗生素及 0.1mM IPTG 之試管內，隔天將生長之種菌進行挑選，留下顏色較深之菌液，並將已篩選之菌株保存於-80°C 之甘油保存管中。



圖二 violacein 生產菌株之篩選流程圖

二、Violacein 及相關產物生產實驗

含有紫色桿菌素途徑基因之種菌將由-80°C 之甘油保存管或 LB agar 培養盤上的單一菌落，接種於含有 2 mL LB broth 與適當濃度抗生素(50 μ g/mL kanamycin、50 μ g/mL spectinomycin 與 50 μ g/mL chloramphenicol)的試管內並以溫度 37°C、轉速 250 rpm 培養 16~18 小時。隔天將生長之種菌以 1%的比例接種至 M9-YE

medium 或 TB medium 中並再以溫度 37°C、轉速 250 rpm 進行培養。因為菌株在培養的過程中所產生的紫色桿菌素會使溶液變色而無法透過測量 OD₆₀₀ 值的方式得知菌液濃度，因此選擇在接種完約 2.5~4 小時加入 0.1 mM IPTG 進行誘導並以溫度 30°C、轉速 250 rpm 進行生產，於 24 小時之後進行取樣。

M9-YE medium 中含有 5g/L yeast extract、12.8g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O、3g/L KH₂PO₄、0.5g/L NaCl、1g/L NH₄Cl、1mmol/L MgSO₄、1mg/L vitamin B1、0.1mmol/L CaCl₂ 以及 1000x trace metal mix A5，其中 trace metal mix A5 的組成為 2.86g/L H₃BO₃、1.81g/L MnCl₂ · 4H₂O、0.222g/L ZnSO₄ · 7H₂O、0.39g/L Na₂MoO₄ · 2H₂O、0.079g/L CuSO₄ · 5H₂O 和 0.049g/L Co(NO₃)₂ · 6H₂O。TB medium 中含有 12g/L tryptone、2.4g/L yeast extract、0.017 M KH₂PO₄ 以及 0.072 M K₂HPO₄。以上兩種培養基皆會加入 20g/L glycerol 作為碳源以及適當濃度之抗生素(50μg/mL kanamycin、50μg/mL spectinomycin 與 50μg/mL chloramphenicol)。

MR medium(pH=7.0)中含有 4 g/L (NH₄)₂HPO₄、6.67 g/L KH₂PO₄、0.8 g/L citric acid、0.39 g/L MgSO₄ 以及 0.5% trace metal solution。其中 trace metal solution(TMS)的組成為 0.1M HCl、10 g/L FeSO₄ · 7H₂O、2.25 g/L ZnSO₄ · 7H₂O、1 g/L CuSO₄ · 5H₂O、0.407 g/L MnSO₄ · H₂O、0.02 g/L Na₂B₄O₇ · 10H₂O、2 g/L CaCl₂ · 2H₂O 以及 0.1 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O。此外會額外加入 20 g/L glycerol、3 g/L yeast extract 以及 3 g/L (NH₄)₂SO₄ 作為碳源與氮源以及適當濃度之抗生素(50 μ g/mL kanamycin、50 μ g/mL spectinomycin 與 50 μ g/mL chloramphenicol)。

R/2 medium(pH=6.8)中含有 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、6.75 g/L KH_2PO_4 、0.85 g/L citric acid、0.39 g/L MgSO_4 以及 0.5% trace metal solution。其中 trace metal solution(TMS)的組成為 5M HCl、10 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.25 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.351 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.23 g/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 以及 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。此外會額外加入 20 g/L glycerol、3 g/L yeast extract 以及 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作為碳源與氮源以及適當濃度之抗生素(50 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin、50 $\mu\text{g/mL}$ spectinomycin 與 50 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol)。

三、優化 Violacein 生產實驗

優化過程分成(1)溫度、(2)培養基、(3)碳源、(4)誘導點與(5)調整 pH 值。在(1)種菌培養如小節 3.4.1 中述，隔天生長好之種菌以 1%接種比例至 20mL 之 M9-YE 培養基，組成成分如小節 3.4.1 中所述，於溫度 37 °C、轉速 250 rpm 培養 3 小時後以 0.1mM IPTG 誘導並分別將溫度切換為 37 °C、30 °C 與 25 °C，24 小時後進行取樣。在(2)種菌培養如小節 3.4.1 中述，隔天生長好之種菌以 1%接種比例至 20mL 之各培養基，包含 M9-YE(0.5% yeast extract)、LB、TB、MR 及 R/2 medium，組成皆如小節 3.4.1 中所述，於溫度 37 °C、轉速 250 rpm 培養 2.5~4 小時後以 0.1 mM IPTG 誘導並將溫度切換至 30 °C，24 小時後進行取樣。(3)種菌培養如小節 3.4.1 中述，隔天生長好之種菌以 1%接種比例至 20mL 之 M9-YE 培養基，並分別加入 20g/L 的 glycerol、glucose 以及 xylose，於溫度 37 °C、轉速 250 rpm 培養 3 小時後以 0.1mM

IPTG 誘導並將溫度切換至 30 °C，24 小時後進行取樣。(4) 種菌培養如小節 3.4.1 中述，隔天生長好之種菌以 1%接種比例至 20mL 之 M9-YE 培養基，分別於溫度 37 °C、轉速 250 rpm 培養 160、180、200、220 以及 240 分鐘後以 0.1 mM IPTG 進行誘導並將溫度切換至 30 °C，24 小時後進行取樣。(5) 種菌培養如小節 3.4.1 中述，隔天生長好之種菌以 1%接種比例至 20mL 之 M9-YE 培養基，於溫度 37 °C、轉速 250 rpm 培養 220 分鐘後以 0.1mM IPTG 誘導並將溫度切換至 30 °C，於 24 及 48 小時後調整 pH 值至 7 且進行取樣。

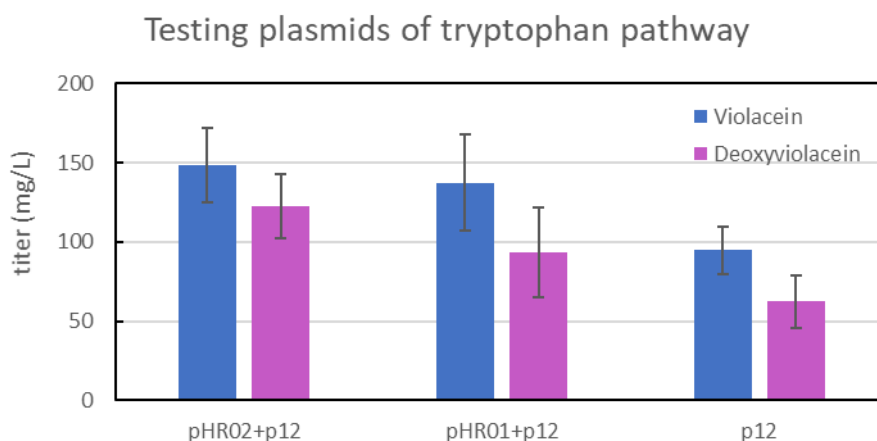
四、產物分析方法

含產物紫色桿菌素之菌液經過轉速 13300 rpm 離心十分鐘，去除上清液之後，加入 1mL 之乙醇懸浮菌體，並將含懸浮物之溶液加至事先已填裝好 1mL 之 glass bead 破菌管進行破菌萃取(MiniBeadBeater-16, model 607)。經過 2 輪 1 分鐘的破菌並以轉速 13300 rpm 離心十五分鐘後即可得到含紫色桿菌素之萃取液。而我們使用液相層析儀(HPLC)做萃取液的分析計算，HPLC 機型為 SHIMADZU LC-2030C 3D PLUS、管柱為 InertSustain C18 column、移動相組成為 75% MeOH 及 25% H₂O、流速為 1mL/min 以及管柱溫度 25 °C。Violacein 及 deoxyviolacein 在光譜上的吸收值為 570 nm 以及 563 nm，並以波峰面積推算產物之產量。

參、主要發現與結論

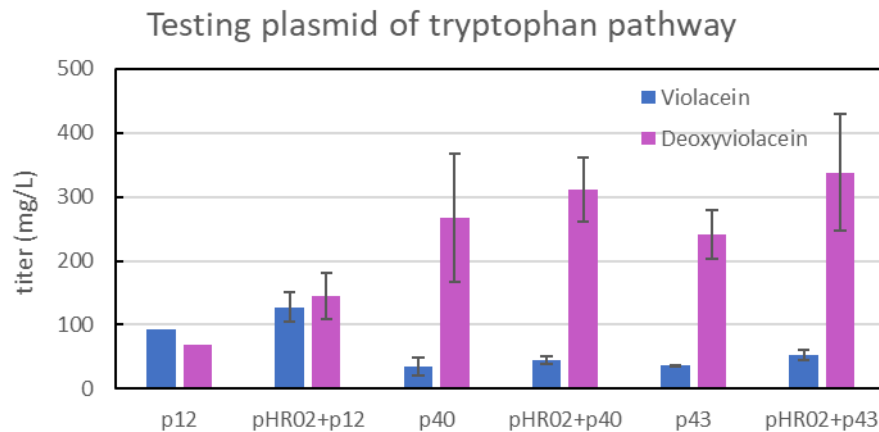
一、建構及測試不同質體對於紫色桿菌素產量之影響

色胺酸為紫色桿菌素的前驅物，為了達到無須額外添加色胺酸但又能提高下游紫色桿菌素的產量，我們參考了相關文獻[11-13]，挑選了 *trpE*、*trpD*、*aroG*、*serA* 這四種基因、建構了兩種質體分別為 pHR01(*trpE*、*trpD*、*aroG* 和 *serA*)和 pHR02(*trpE* 和 *trpD*)。將上述兩種質體分別與紫色桿菌素合成途徑之質體一起植入大腸桿菌中，並帶著控制組(p12，只含紫色桿菌素合成途徑之質體)於 TB medium 中進行生產測試(圖三)。可以發現無論是 pHR01 或是 pHR02 都確實能夠提高最終產物紫色桿菌素的產量，另外雖然 pHR01 比 pHR02 多表現了 *aroG* 及 *serA*，但產量卻沒有所提升，推測可能是所要表現之基因種類過多，加重了大腸桿菌在代謝上的負擔，以致產量無法更進一步上升。鑒於大腸桿菌的代謝負擔及之後 RBS Library 理論大小的設計，我們選擇了 pHR02 去過量表現 *trpE* 和 *trpD*，並進行實驗的下一步驟。



圖三 色胺酸合成途徑之質體測試

然而為了確認所選定的質體 pHR02 適用於各 RBS 組合的紫色桿菌素合成途徑之質體，我們將先前已篩選出的數種較有生產潛力的紫色桿菌素質體與 pHR02 一起植入大腸桿菌中做生產測試，從下圖中(圖四)可以發現，pHR02 即使在不同 RBS 組合之紫色桿菌素質體的情況下，也能夠提高紫色桿菌素的產量，這一結果更加推使我們將 RBS Library 一起套用至色胺酸及紫色桿菌素合成途徑中。



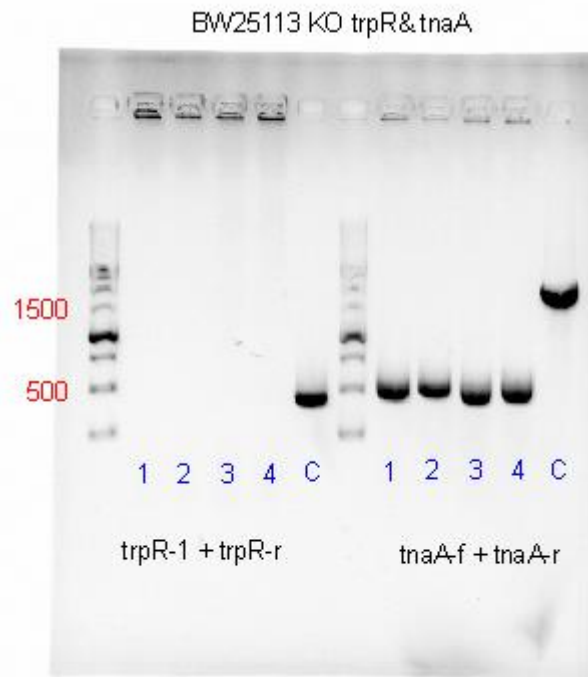
圖四 測試色胺酸途徑質體對於不同 RBS 組合的紫色桿菌素質體之影響

(p12、p40、p43 為分別帶有不同的 RBS 組合之紫色桿菌素質體)

二、大腸桿菌中色胺酸抑制及競爭基因之剔除

在大腸桿菌中，有些基因會與色胺酸合成途徑做競爭如 *sdaA*、*tnaA*、*pheA* 等[11, 12]。當中的 *tnaA* 為將色胺酸降解為吲哚之基因，是最直接影響到色胺酸的競爭基因之一，另外 *trpR* 為色胺酸的調控基因，當大腸桿菌生成色胺酸後，其調控子會與色胺酸結合並抑制色胺酸之生成，因此我們選擇將上述兩種基因從大腸桿菌中剔除以增加色胺酸在細菌體內之生成累積

量，圖五為成功剔除基因 *tnaA* 和 *trpR* 之凝膠電泳圖。



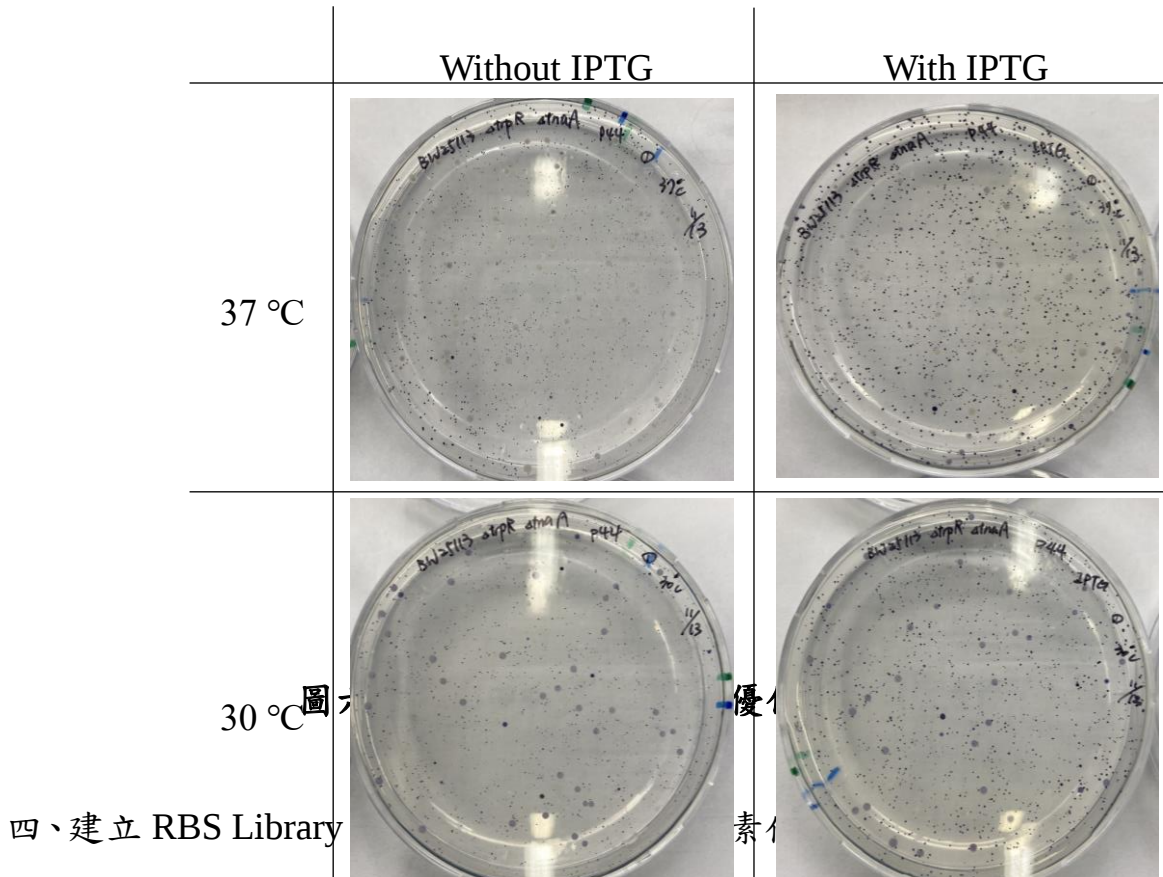
圖五 剔除大腸桿菌基因之凝膠電泳圖

(c 為控制組、左半邊為成功剔除 *trpR*、右半邊為成功剔除 *tnaA*)

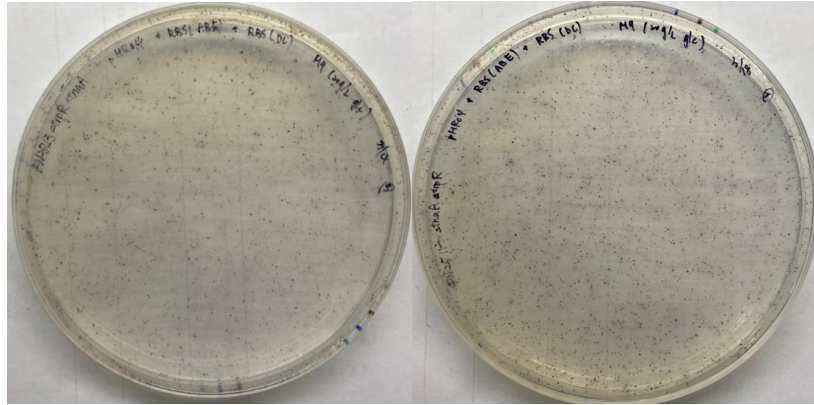
三、優化培養盤以提高呈色法之辨別度

由於在培養盤上紫色桿菌素超過一定產量後，其顏色就會維持較深的藍紫色而難以透過肉眼進行顏色深淺的判斷，為了提高呈色法在培養盤上的辨別度，我們將培養盤進行了優化的工作，透過不同組成、不同溫度及是否添加誘導劑來使相同菌株在不同培養盤上的顏色有所不同。而由於 LB agar 培養盤上含有較多利於生長及生產的混合物，這會使菌落顏色過深不利於呈色法篩選，因此選擇了 M9 agar 培養盤進行下一步的優化。我們將先前已篩選過最好的紫色桿菌素質體 p44 植入大腸桿菌 BW25113 Δ *trpR* Δ *tnaA* 中，之後將菌液分別塗在不同組成的 M9

agar 培養盤上並於不同溫度下進行培養，期望能得到顏色較淺的培養盤組成及溫度。如圖六中可以看到在加了誘導劑(IPTG)之後，菌落顏色會有比較深的現象，然而培養溫度只會影響生長速度而對於顏色深淺並沒有太大的改變。以此，之後呈色法將以 M9 agar 培養盤在不加誘導劑且在 37°C 的條件下進行篩選。



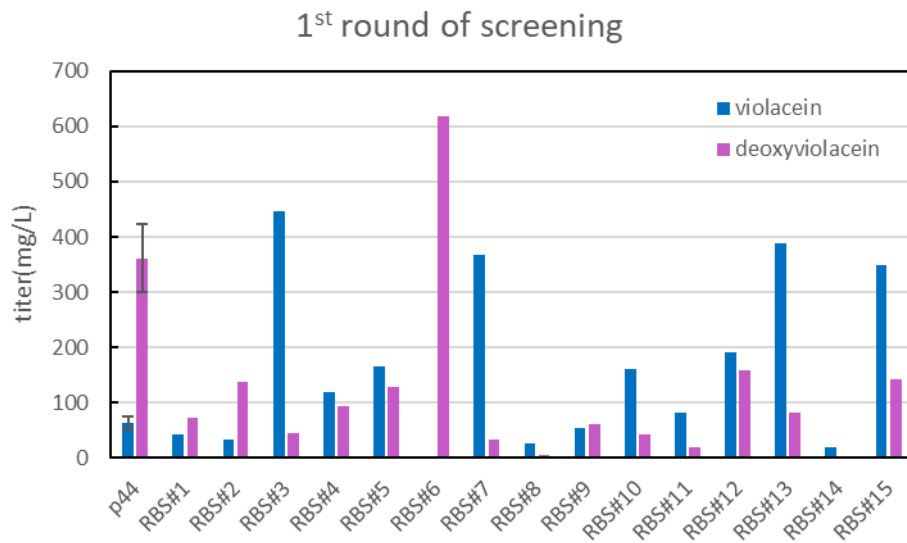
將質體植入大腸桿菌 BW25113 Δ trpR Δ tnaA 後，由於有 7 種可調控 RBS 的基因，我們可以得到一個理論大小為 96^7 的 Library，之後將菌液塗在已優化過的培養盤上，可以觀察到各菌落的顏色有深淺之分(圖八)，而每盤培養盤約有 5000 顆菌落。



圖七 結合 RBS Library 後之菌落顏色表現

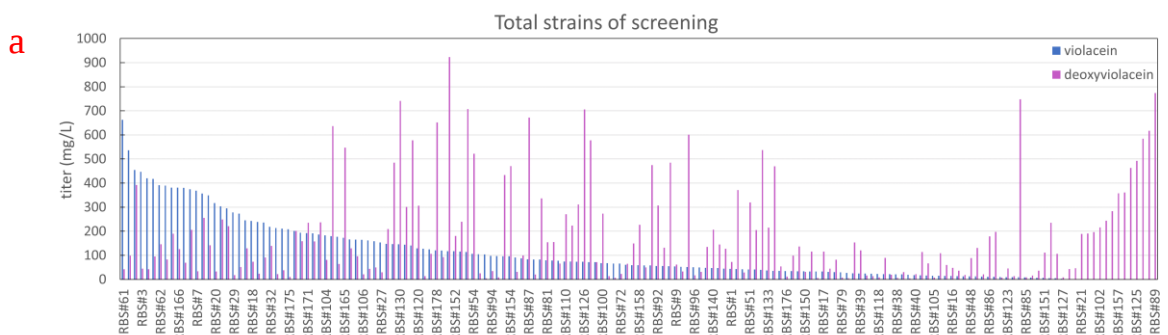
五、以呈色法篩選具有生產潛力之菌株

為了確認 RBS 組合為造成菌落顏色深淺的主要原因，我們隨機挑選了培養盤上的菌落進行培養並分析產物。經過 24 小時的搖瓶培養並透過 HPLC 分析後，可以得知與對照組相比，擁有 RBS Library 組合的菌株在產物及產量上都發生了變化。如圖九，作為對照組的 p44 為偏好生產 deoxyviolacein 的菌株，而經過 RBS 組合的調控後，我們得到了編號 3、7、13 和 15 為 violacein 的偏好生產菌株，在 deoxyviolacein 的方面，編號 6 也比對照組多生產了約一倍，這可以證實我們所設計並套用的 RBS Library 能夠藉由調整基因轉譯的速率去影響到最終的產物及產量。

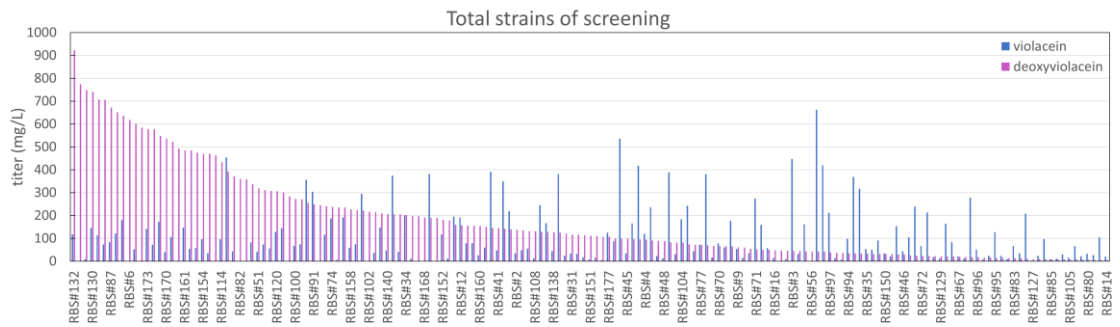


圖八 隨機挑選含 RBS Library 之菌落經培養後的產量

在證實經過結合我們所設計的 RBS Library、質體及菌株，對於改變最終產物及產量為可行的之後，接著透過呈色法挑選在培養盤上顏色較深的菌株，再利用接種到培養液的方式進行二次篩選。而通過二次之菌株將會進一步進行搖瓶生產並分析產物及產量。圖十為所有經過篩選之菌株的產物及產量，當中共包含了 178 顆菌株。



b

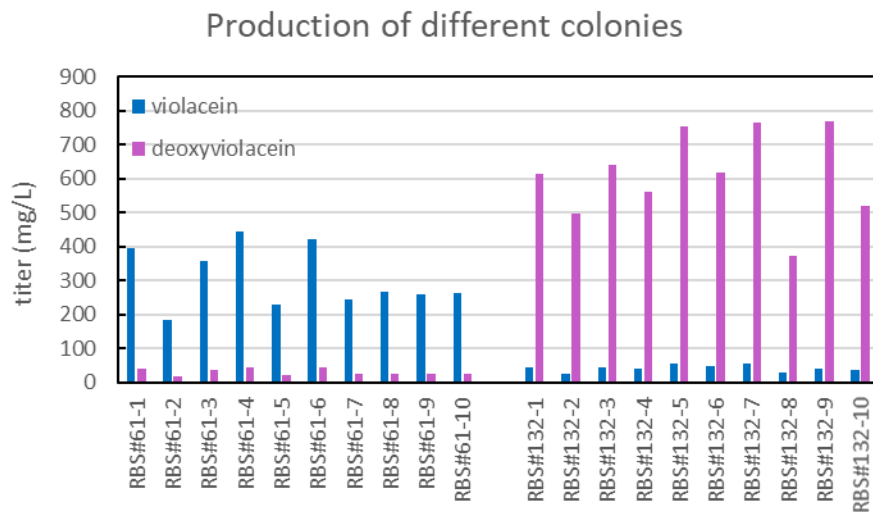


圖九 所有經篩選菌株之產物及產量分布

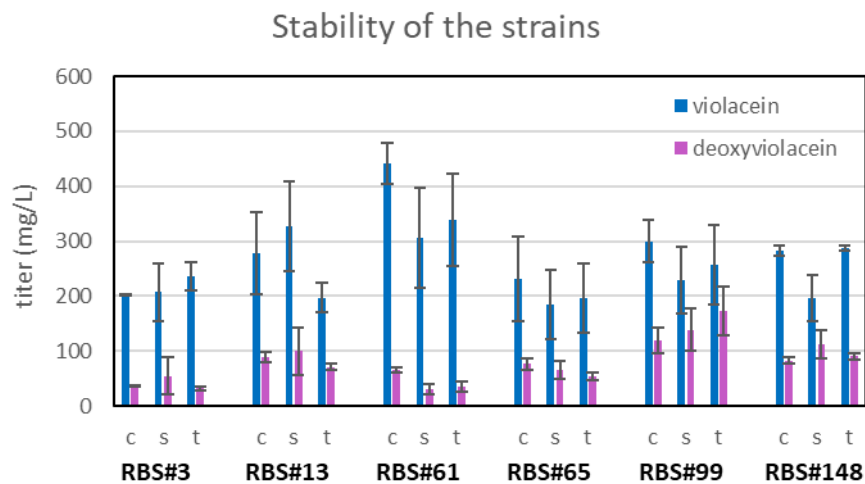
(a 為依照 violacein 產量多寡為順序作排列，b 為依照 deoxyviolacein 產量多寡為順序作排列)

六、穩定度及再現性測試

文獻中曾指出擁有 *vio* 基因操縱組的重組大腸桿菌具有較高的可能性會形成低產量甚至不產生紫色桿菌素的突變體 [14]，因此在完成篩選之後，為了確認紫色桿菌素的產量是可再現的，我們將菌株從 -80°C 之甘油保存管中重新塗盤並於培養盤上隨機挑選數顆菌落做生產測試，如圖十一中可以發現即使是相同菌株，不同菌落在產量上也會有所差異。之後我們從產量較好的菌落中取出質體，重新植入到大腸桿菌 BW25113 $\Delta trpR \Delta tnaA$ 中並測試是否能達到相同的產量。測試的結果如圖十二，大部分的菌株在重新轉植後皆可達到差不多的產量，而我們之後也將產量、穩定度及再現性較好的菌株送定序以確認其 RBS 序列組合。



圖十 相同菌株不同菌落之產量



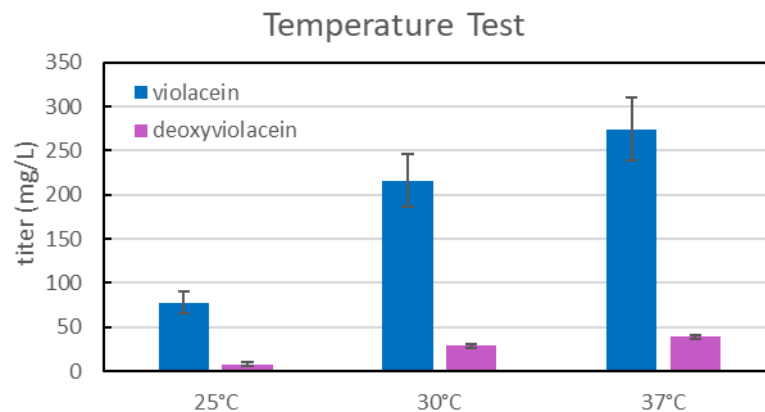
圖十一 菌株穩定度及產量再現性

七、生產條件優化

菌株的生產環境包含培養液組成、溫度以及酸鹼值等皆會影響到最終產物紫色桿菌素的產量。我們將 violacein 最佳生產菌株的編號 61 作為優化的基準並進行了數種不同條件下的測試，以下將一一探討各條件所造成的產量影響。

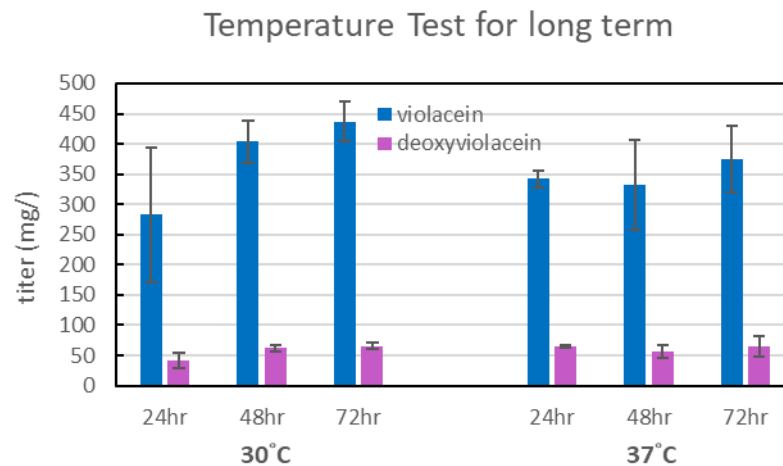
(一)溫度

菌株的生長速度及蛋白質的折疊都會受到溫度的影響，通常溫度較低能穩定蛋白質的折疊但會使菌株的生長速度受影響而緩慢許多，如文獻中[11]就曾提到在 20°C 的條件下較適合酵素的表現。反之，較高的溫度雖不利於蛋白質的折疊但能提高菌株的生長速度。為了找出較適合我們菌株的生產溫度，我們測試了三種不同的生產溫度，結果如圖十四，而令人意外的是在 24 小時內，該菌株在生產溫度為 37°C 的條件下擁有最高的產量，雖然這與 Zhang 等人[15]所做的結果相似，這但仍不禁讓我們懷疑菌株的生長速度所帶來的效益是否大於蛋白質的折疊，於是我們再次以 30°C 與 37°C 為比較條件，測試長時間下的生產結果是否相同。



圖十二 溫度測試

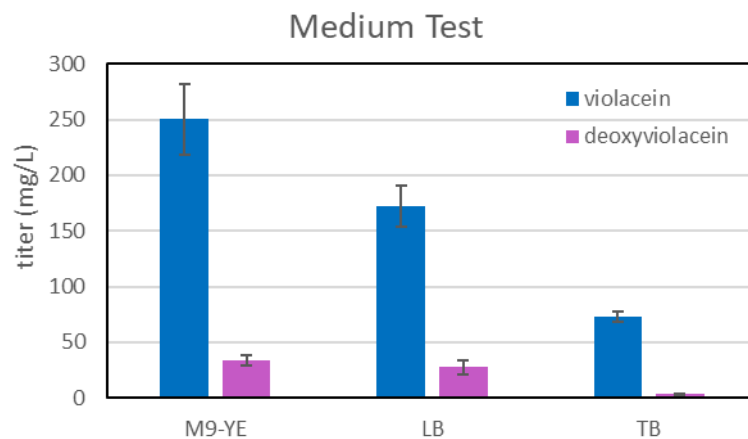
圖十五為長時間生產的測試結果，可以發現在 24 小時內的生產結果如圖五所述，然而在 48 小時之後，推測菌株生長已達指數期末端甚至達停滯期，較低溫(30°C)的環境能使蛋白質良好折疊而有了優勢，因此才在產量上反超了 37°C。



圖十三 長時間之溫度測試

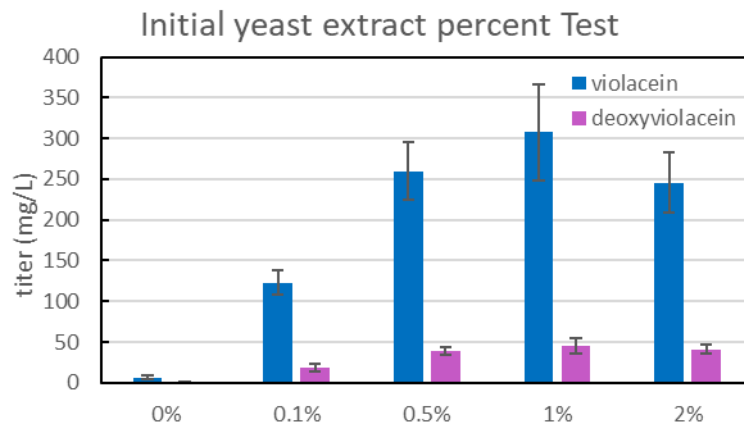
(二)培養基

我們將菌株分別在三種不同的培養基中培養 24 小時並分析其產量，從圖十六中可以發現編號 61 在 M9-YE 培養基下的產量最好，與其相比擁有相等濃度酵母菌萃取物(0.5%)的 LB 培養基則下降了許多，推測 M9-YE 培養基中所含有的金屬離子以及微量元素能夠幫助菌株生產更多紫色桿菌素。另外，TB 培養基擁有濃度更高的酵母菌萃取物(2.4%)，但實驗結果顯示其不但無法使產量提升反而還下降了許多。



圖十四 培養基測試

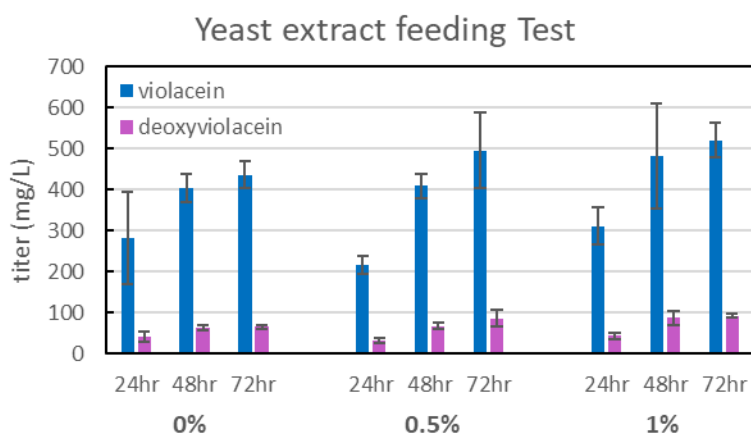
我們比較了 M9-YE 和 LB 培養基，確認 M9-YE 培養基中的金屬離子及微量元素有助於提升紫色桿菌素的產量，另外透過 LB 與 TB 培養基也可得知不同濃度的酵母菌萃取物也具有改變產量的可行性。因此，我們在 M9 培養基中分別加入不同濃度的酵母菌萃取物以找出菌株在生長及生產中的最佳平衡關係。實驗結果如圖十七，我們共測試了五種不同濃度的酵母菌萃取物，得知菌株在 1% 酵母菌萃取物的培養基中能夠達到最好的生長及生產關係。由於該菌株需要額外表現三種質體，在代謝上造成較大的負擔，在不加任何酵母菌萃取物的情況下，菌株缺少養分而生長速度過慢，因此才使得紫色桿菌素的產量不甚理想。另外在 2% 酵母菌萃取物的情況下，菌株偏好生長大於生產，使得產量沒有 1% 的情況下來的高。



圖十五 酵母菌萃取物初始濃度測試

然而若要進行長時間的培養及生產，除了補充作為生產來源的碳源，氮源因可供給菌株生長也會額外被添加至培養基中，經實驗後得知酵母菌萃取物在培養基中的初始濃度影響前 24 小時的產量甚多，那麼我們推測在生產過程中額外饋入酵

母菌萃取物或許也能在產量上有莫大的影響。因此，我們於 24 及 48 小時分別補充 0.5% 以及 1% 的酵母菌萃取物溶液，並以未添加(0%)的培養基為對照組做測試。實驗結果如圖十八，可以發現在 72 小時，有額外饋入 1% 酵母菌萃取物溶液之培養基相比於對照組提高了約 20% 的產量。不過，這不禁讓我們懷疑在初始濃度實驗的測試中，造成 2% 產量較低的原因可能是菌株於 24 小時還在生長階段。

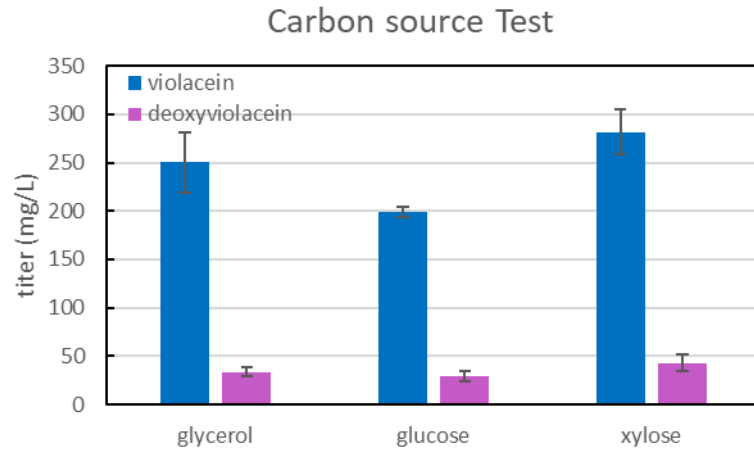


圖十六 饋入酵母菌萃取物測試

(三)碳源

菌株能攝取不同的簡單碳源並將他們轉化為目標產物，然而不同碳源可能因代謝的途徑不同而使最終產物的產量發生改變，如文獻中就曾提出葡萄糖可能會抑制紫色桿菌素生成的說法[16]。而我們利用了三種簡單且易取得的葡萄糖、木糖以及甘油，去測試菌株以不同碳源生產紫色桿菌素的能力。圖十九為實驗結果，如文獻所述以葡萄糖作為碳源確實會降低紫色桿菌素的產量，然而使用木糖所得到的產量雖然會比甘油的高一些，但考慮到其價格及競爭領域上的效益，我們決定以甘油

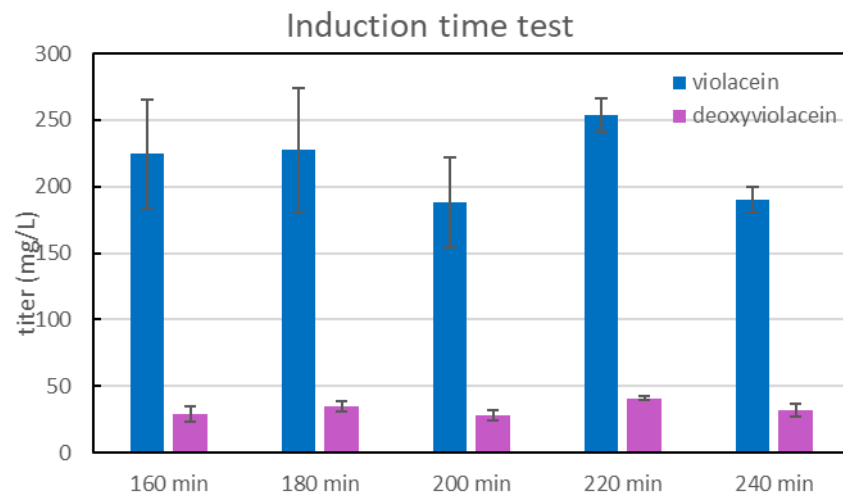
為主要的碳骨架來源。



圖十七 不同碳源測試

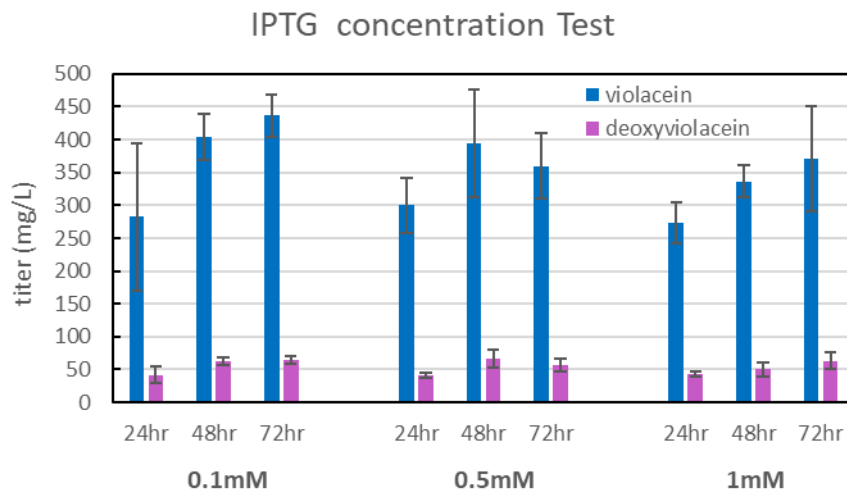
(四)誘導點

誘導的時間點也是會造成產量改變的因素之一，通常我們進行誘導的依據是溶液在波長 600 奈米的阻光密度值(optical density)，其值越大代表光的穿透率較低，然而紫色桿菌素所具有的紫色光澤會吸收他的互補色，也就是 600~650 奈米左右的波長，因此會使我們高估了原本的 OD 值而使誘導時間過早。我們透過測試不同的誘導時間點來解決此問題，文獻中[17]也曾指出僅僅間隔 15 分鐘的誘導時間點就可以在產量上出現改變，而我們則以間隔 20 分鐘來測試最佳的誘導時間點，如圖二十經過實驗之後得知最佳的誘導時間點為 220 分鐘。



圖十八 誘導時間點測試

此外，誘導濃度有時也是提升產量的方法之一，不過經過我們實驗的結果，增加誘導物 IPTG 的濃度並沒有使產量更進一步地上升，如圖二十一。

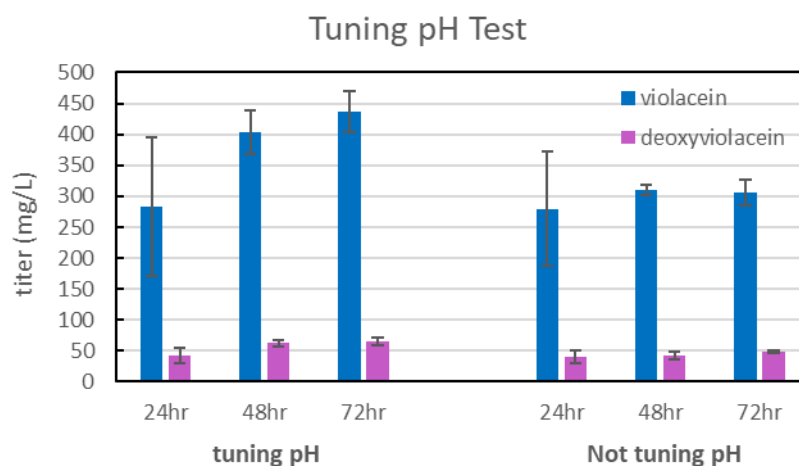


圖十九 誘導濃度測試

(五)培養基之 pH 值

菌株在生長與生產的過程中不免會產生一些代謝物使培養基溶液變成微酸性的環境，而這將不利於我們的菌株繼續生

產紫色桿菌素。於是我們測試了調整 pH 值對產量的影響力，在 24 及 48 小時分別調整與不調整溶液 pH 值至 7，圖二十二中就可清楚看出比起有調整酸鹼值的對照組，未調整溶液至中性環境將大大減少紫色桿菌素之產量，此外，我們發現於 48 小時之後，未調整的實驗組溶液其 pH 值約固定在 5.3 左右而不再下降。因此在生產的過程中我們會加入適當的氫氧化鈉溶液將培養基溶液調整回中性環境。

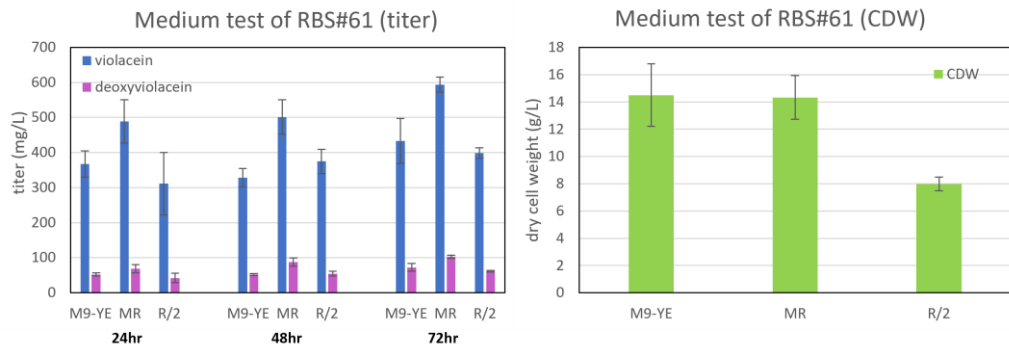


圖二十 調整 pH 與否之測試

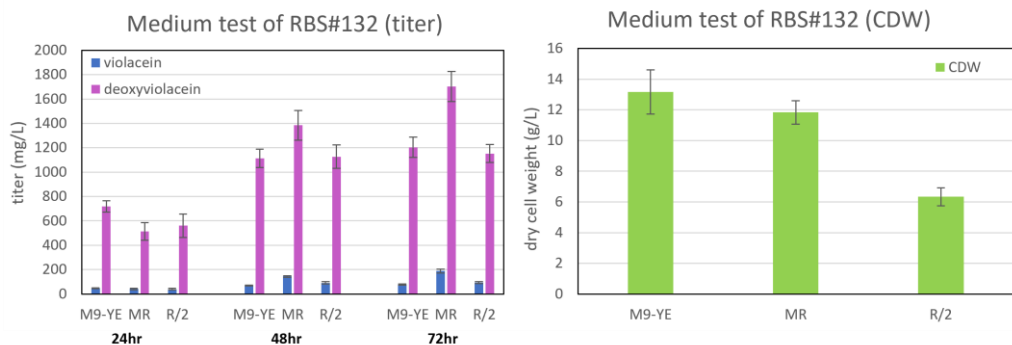
八、條件再優化

之後我們更參考了其他有利於大腸桿菌生長或 violacein 生產的相關培養基文獻[18, 19]，並再額外測試了兩種培養基，分別為 MR 以及 R/2 培養基，如圖二十六與圖二十七，以先前產量較好的 M9(1% Y.E.)作為控制組，可以發現在產量方面，使用 MR medium 約能提高 40%，而 R/2 medium 的產量則跟控制組差不多。而在 dry cell weight 方面，M9-YE 及 MR medium 所累積的菌量是差不多的，這說明了 MR medium 中的其他微量金屬及

元素比起 M9 培養基中的還更有利於 violacein 的生產，然而使用 R/2 medium 所累積的菌量則是其他兩種培養基的一半，這顯示出了使用 R/2 medium 所達到每單位菌量的產量能較高。



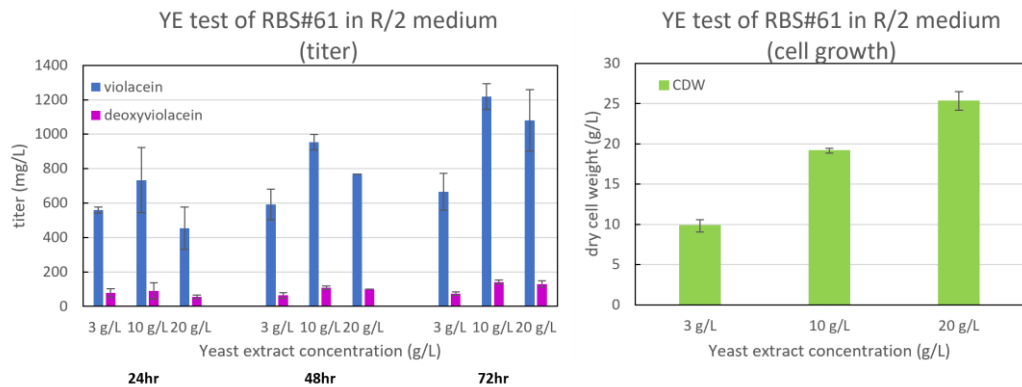
圖二十一 不同培養基對生產 violacein 的測試



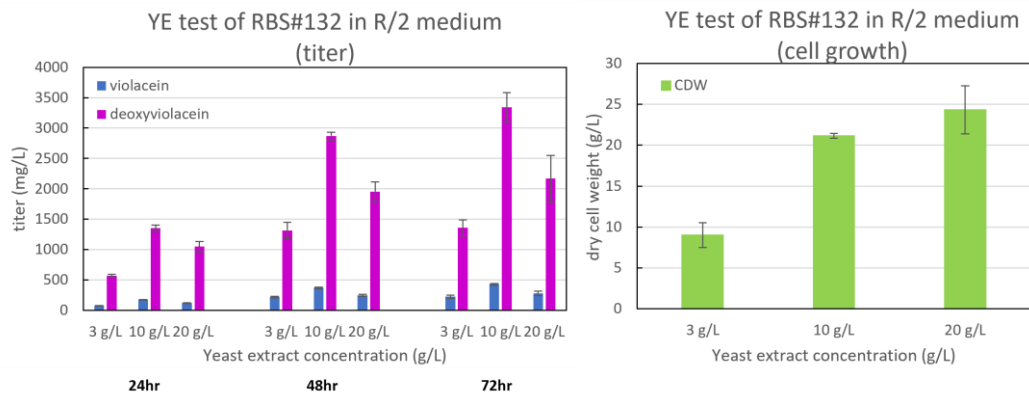
圖二十二 不同培養基對生產 deoxyviolacein 的測試

而由於 MR medium 有額外添加 yeast extract 以及 ammonium sulfate，我們接著也在 MR medium 中嘗試了不同濃度的 yeast extract 對產量的影響，如圖二十八及圖二十九。可以發現在產量方面，額外添加 10 g/L 的酵母菌萃取物所能達到的產量最高，而接著再提高到 20 g/L 並不會繼續增加產量。在菌量累積的方面，10 g/L 的實驗組所達到的菌量大約是 3 g/L 的控制組的兩

倍，而他們之間的產量關係也大約是兩倍，因此我們可以藉由增加酵母菌萃取物濃度去提高菌的累積量再進一步的突破產量。目前我們的最佳生產菌株分別能在 72 小時的搖瓶內生產 1.6 g/L 的 violacein 或 4 g/L 的 deoxyviolacein。



圖二十三 不同濃度之酵母菌萃取物於 MR medium 對生產 violacein 的測試



圖二十四 不同濃度之酵母菌萃取物於 MR medium 對生產 deoxyviolacein 的測試

九、結論

我們成功建構出能夠提升紫色桿菌素產量之上游色胺酸途

徑的質體及宿主，並利用 RBS Library 去隨機變異 *trpE*、*trpD*、*vioA*、*vioB*、*vioE*、*vioD*、*vioC* 這七個基因以改變不同基因的轉譯速率，而這些菌株無須額外添加色胺酸即可高產量的生產 violacein 和 deoxyviolacein。此外，為了使呈色法能夠更精確且容易判斷，我們透過優化培養盤來改善顏色深度易達飽和之問題。在篩選數量大小的部分，其 RBS Library 之理論大小為 96^7 ，而每盤培養盤約有 5000 顆菌株，當中約可篩出 30 顆菌株，而我們總共移植並培養了 6 盤且篩選出共 178 株不同 RBS 組合之菌株。

接著，我們透過將已篩選之菌株重新塗盤和轉植來測試其穩定度及再現性，經過此步驟會淘汰掉於篩選階段有生產潛力但卻無法再現的菌株以減少往後無法再現產量等問題。之後我們以 violacein 最佳生產菌株為基準進行生產環境優化，包含了溫度、培養基、碳源、誘導點以及調整 pH 值的差異，並於此階段找到了較適合的生產參數，我們也有在生物反應器內進行產量的初步測試，但如先前所述，仍然還有很大的優化空間。而之後我們更進一步測試了文獻中有利於微生物生長及生產的其他培養基，經過測試並再優化後，我們能在 72 小時內透過搖瓶生產 1.6 g/L 的 violacein 或 4 g/L 的 deoxyviolacein。

肆、參考文獻

1. Bromberg, N. and N. Durán, *Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **11**(4): p. 463-467.
2. Durán, M., et al., *Potential applications of violacein: a microbial pigment*. Medicinal Chemistry Research, 2012. **21**(7): p. 1524-1532.
3. Ferreira, C.V., et al., *Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1459-1464.
4. Kodach, L.L., et al., *Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells*. Carcinogenesis, 2005. **27**(3): p. 508-516.
5. Durán, N., et al., *Violacein: properties and biological activities*. Biotechnol Appl Biochem, 2007. **48**(Pt 3): p. 127-33.
6. Shirata, A., et al., *Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing*. Japan Agricultural Research Quarterly, 2000. **34**: p. 131-140.
7. Shirata, A., et al., *Production of bluish-purple pigments by *Janthinobacterium lividum* isolated from the raw silk and dyeing with them*. The journal of sericultural science of Japan, 1997. **66**: p. 377-385.
8. Rodrigues, A.L., et al., *Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison*. Biotechnology Letters, 2012. **34**(4): p. 717-720.
9. Yang, C., et al., *Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol*. Biochemical Engineering Journal, 2011. **57**: p. 55-62.
10. Mendes, A.S., et al., *Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(23): p. 1963-1969.
11. Rodrigues, A.L., et al., *Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for*

- production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein*. Metab Eng, 2013. **20**: p. 29-41.
12. Fang, M.Y., et al., *High crude violacein production from glucose by Escherichia coli engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway*. Microb Cell Fact, 2015. **14**: p. 8.
 13. Fang, M., et al., *Intermediate-sensor assisted push-pull strategy and its application in heterologous deoxyviolacein production in Escherichia coli*. Metab Eng, 2016. **33**: p. 41-51.
 14. Sánchez, C., et al., *Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis*. Chembiochem, 2006. **7**(8): p. 1231-40.
 15. Zhang, Y., et al., *Direct RBS Engineering of the biosynthetic gene cluster for efficient productivity of violaceins in E. coli*. Microbial Cell Factories, 2021. **20**(1): p. 38.
 16. Pantanella, F., et al., *Violacein and biofilm production in Janthinobacterium lividum*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(4): p. 992-9.
 17. Jones, J.A., et al., *ePathOptimize: A Combinatorial Approach for Transcriptional Balancing of Metabolic Pathways*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11301.
 18. Yang, D., et al., *Expanded synthetic small regulatory RNA expression platforms for rapid and multiplex gene expression knockdown*. Metab Eng, 2019. **54**: p. 180-190.
 19. Yang, D., S.Y. Park, and S.Y. Lee, *Production of Rainbow Colorants by Metabolically Engineered Escherichia coli*. Adv Sci (Weinh), 2021. **8**(13): p. e2100743.