

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文



Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis

有機酸對*Enterobacter mori* FS08

運動性及生物膜形成的影響

Effect of organic acids on motility and biofilm formation

of *Enterobacter mori* FS08

黃筱婷

Hsiao-Ting Huang

指導教授：羅翊禎 博士

Advisor: Yi-Chen Lo, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July 2024

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE

NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

有機酸對 *Enterobacter mori* FS08 運動性及生物膜形成的影響

Effect of organic acids on motility and biofilm formation of
Enterobacter mori FS08

本論文係 黃筱婷 (R11641005) 在國立臺灣大學食品科技研究所完成之碩士學位論文，於民國 113 年 7 月 23 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Institute of Food Science and Technology on 23rd July 2024 have examined a Master's Thesis entitled above presented by Hsiao-Ting Huang (R11641005) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

林旭陽

林旭陽 博士

衛生福利部食品藥物管理署北區管理中心 副主任

李月嘉

李月嘉 博士

國立臺灣大學食品科技研究所 助理教授

王如邦

王如邦 博士

國立臺灣大學食品安全與健康研究所 助理教授

林乃君

林乃君 博士

國立臺灣大學農業化學系 教授

羅翊禎

羅翊禎 博士

國立臺灣大學食品科技研究所 教授 (指導教授)

所長

潘敏雄

潘敏雄 特聘教授

誌謝



碩士班兩年期間，我受到許多人的幫助，才能夠完成這篇碩士論文。首先，衷心感謝我的指導教授羅翊禎老師，謝謝您總是在繁忙之中抽空和我討論文獻與實驗進度，提供我許多寶貴建議，使我的實驗能夠持續改進。也謝謝您在我需要更進一步的研究時，替我聯繫相關資源。特別感謝中央研究院細胞與個體生物學研究所高承福老師，協助我進行轉錄組分析的研究，撥冗與我討論實驗的設計，並替我聯繫呂在明技師。由衷感謝細生所呂在明技師協助後續的所有分析，使我的論文研究更完善。感謝顧子欣學長提供我技術的指導與實驗改良的建議，並協助我追蹤轉錄組分析的進度，替我和業務、老師以及技師等說明我的實驗需求。

感謝所有口試委員，抽空參與我的碩士論文口試，對我的論文內容深入審查，並在口試時提出需修改的部分，讓我知道論文中還有哪些地方不足，也謝謝您們專業的問題與有益的見解，幫助我將論文描述得更詳細清楚。

在這段時間也非常感謝實驗室的夥伴沛蓁、恩池、奕慧、琦芳、湘怡、語健，你們的陪伴與談笑聲舒緩我的壓力。謝謝你們常常傾聽我實驗上的問題，並提供建議讓我思考解決方法。謝謝學長姐心柔、元睿，在我的論文研究中給予許多幫助，也經常和我們分享許多無論是學術上或是實驗中有趣的事。謝謝你們讓我的碩士求學期間增添幾分色彩。

最後，感謝我的家人一直以來的支持與幫助，讓我只需專注在碩士論文研究上。並時常給予關心和鼓勵，使我持續有進行實驗的動力。

再次感謝所有幫助過我的人，因為有你們的指導與陪伴，讓我也能順利完成這項研究。非常榮幸在這段時間有你們的支持與鼓勵！

中文摘要



細菌的運動性包括泳動和表面移行能力，對宿主定殖和環境適應至關重要。與泳動能力相關的趨化性推動細菌向營養源移動或遠離有害物質。表面移行的細胞則透過細菌群的聚集，逐漸轉變為生物膜狀態。若食物成分是引誘劑，將導致細菌趨化性增加，從而使細菌積累，這可能會導致食物腐敗。我們先前的研究自截切小黃瓜中分離的 *Enterobacter mori* FS08 具顯著的泳動能力，並且小黃瓜汁對這株菌是很強的引誘劑。然而，此菌株與小黃瓜之間的關聯性尚未建立。本研究旨在 (1) 確認 *E. mori* FS08 是否促進小黃瓜腐敗；(2) 探討小黃瓜中的有機酸成分對 *E. mori* FS08 運動性相關表型的影響。實驗結果發現直接將 *E. mori* FS08 接種至新鮮截切小黃瓜上會導致外觀變質，並且消耗小黃瓜中的醣類成分。菌株特性分析中，觀察到有機酸在相同 pH 值下，並不會影響 *E. mori* FS08 的活菌數。值得注意的是，L-蘋果酸增強了泳動能力和正向趨化反應，但減少生物膜形成。反之，檸檬酸與 DL-乳酸抑制了泳動和表面移行能力，且檸檬酸的抑制更為顯著，但這兩種有機酸皆促進了生物膜的形成。進一步的實驗證實添加 L-蘋果酸使運動性相關基因 (*fliC*、*flgM* 與 *motA*) 表現量提升，添加檸檬酸則無顯著變化。而經過 L-蘋果酸處理的轉錄組分析結果，鑑定出與運動性和生物膜形成相關的差異表達基因，其中 *fis* (促進運動性的轉錄調節因子)、*ahpC* (氧化壓力防禦基因，其解毒作用可減少生物膜形成)、*narK* (硝酸鹽轉運蛋白，硝酸鹽會抑制生物膜形成) 表現量上升。另外，調控生物膜形成的群體感應相關基因亦受到抑制。這些實驗結果證明小黃瓜中的有機酸成分會調控訊息途徑影響細菌行為，可作為新鮮截切小黃瓜的預防措施和控制方法的重要參考。

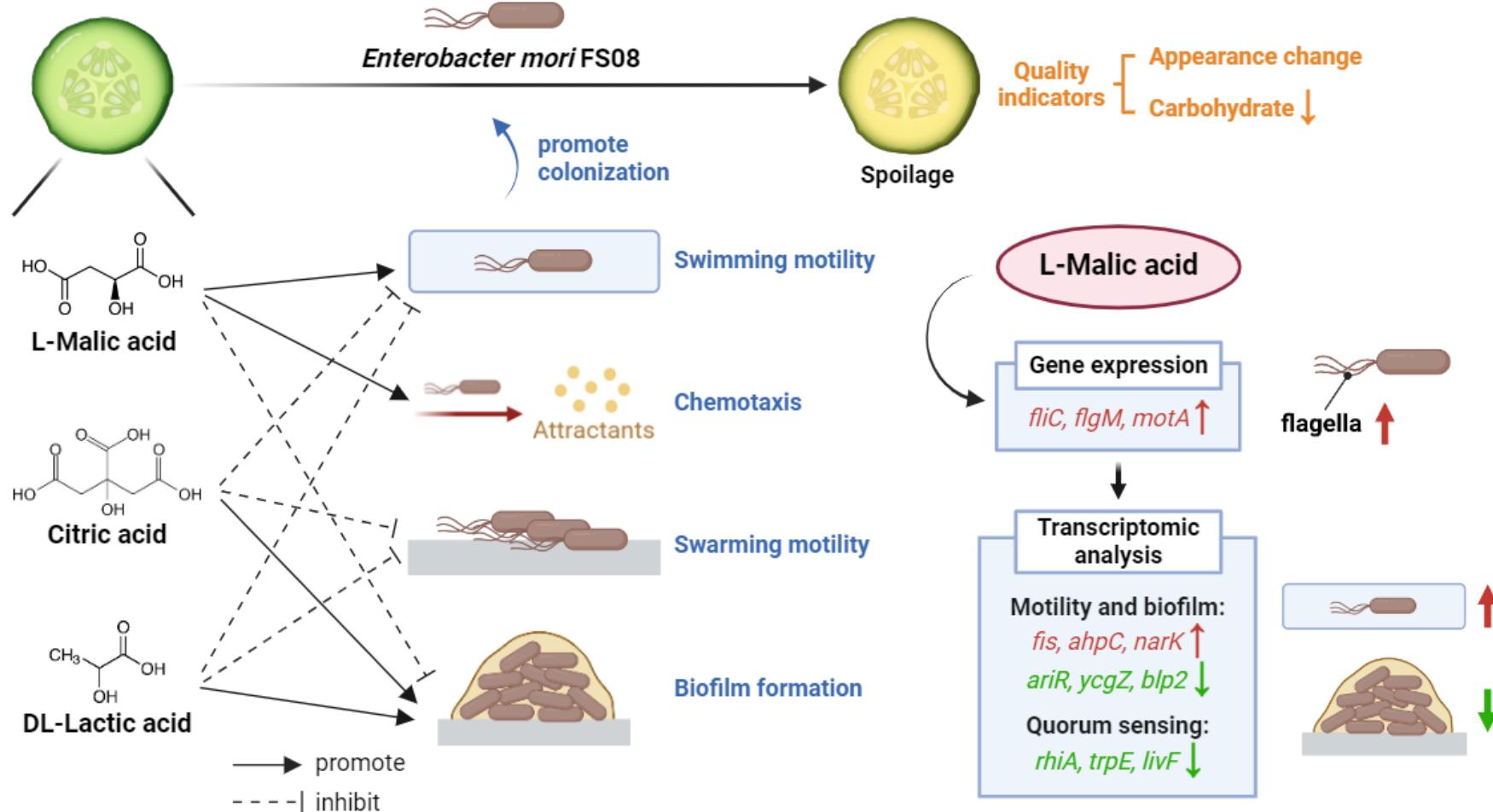
關鍵字：新鮮截切小黃瓜、有機酸、泳動、趨化性、生物膜

Abstract

Bacterial motility, encompassing swimming and swarming motility, is pivotal for host colonization and environmental adaptation. Chemotaxis, associated with swimming motility, propels bacteria toward nutrient sources or away from harmful substances. Swarming cells often aggregate and progressively transit to biofilm forming status. If the food factors are attractants, it will cause the increase of chemotaxis in bacteria, which results in bacteria accumulation. This may potentially lead to food spoilage. Our previous study isolated *Enterobacter mori* FS08 from fresh-cut cucumbers, exhibits pronounced swimming motility; however, the association between this strain and cucumber has not yet been established. The current study aimed to 1) investigate if *E. mori* FS08 leads to the spoilage of cucumber; 2) explore the impact of organic acids in cucumber on motility-related phenomena. The results demonstrate that *E. mori* FS08 caused cucumber spoilage by directly inoculating the strain onto fresh-cut cucumbers. The strain characterization indicated that organic acids did not affect the viable bacterial count of *E. mori* FS08 by the pH levels. Notably, L-malic acid enhanced swimming motility and positive chemotaxis response, but reduced biofilm formation. In contrast, citric acid and DL-lactic acid inhibited swimming and swarming motility, with citric acid having a more significant effect. However, both organic acids promoted biofilm formation. The subsequent analysis by qPCR found that the addition of L-malic acid led to the higher expression of motility-related genes (*fliC*, *flgM*, and *motA*), while the addition of citric acid showed no significant changes. Further transcriptomic analysis revealed that, in response to L-malic acid treatment, differentially expressed genes related to motility and biofilm formation were identified. The expression of *fis* (a transcriptional regulator promoting motility), *ahpC* (an oxidative stress defense gene whose detoxification activity can reduce biofilm formation), and *narK* (a nitrate transporter protein, with nitrate inhibiting biofilm formation) were upregulated. Additionally, quorum sensing-related genes that regulate biofilm formation were also downregulated. This study elucidated how organic acid components in cucumbers affect bacterial behavior and regulatory pathways, providing valuable insights into future preventative measures and control methods for fresh-cut cucumber handling.

Keywords: Fresh-cut cucumber, organic acid, swimming motility, chemotaxis, biofilm

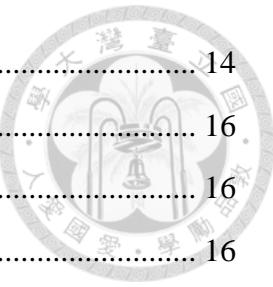
Graphical abstract



目次



口試委員審定書	i
誌謝	ii
中文摘要	iii
Abstract	iv
Graphical abstract	v
目次	vi
圖次	ix
表次	xi
附錄次	xii
第一章、前言	1
第二章、文獻回顧	2
第一節、截切蔬果的加工處理與食品安全	2
一、截切蔬果之食安問題-以小黃瓜為例	2
二、小黃瓜的主要成分	2
三、細菌汙染截切小黃瓜之途徑	3
四、截切小黃瓜之品質指標	3
第二節、腸桿菌屬 (<i>Enterobacter</i> spp.)	4
一、基本特性	4
二、引發的問題	4
第三節、細菌運動性	6
一、泳動能力 (Swimming motility)	6
二、表面移行能力 (Swarming motility)	7
第四節、細菌運動性相關之菌株特性	8
一、趨化性 (Chemotaxis)	8
二、生物膜 (Biofilm)	9
第五節、細菌運動性與生物膜形成之調控機制	11
一、c-di-GMP 調節運動性和生物膜形成	11
二、群體感應 (Quorum Sensing, QS)	12



第三章、研究目的與架構	14
第四章、材料與方法	16
第一節、材料	16
一、樣品	16
二、實驗菌株	16
三、藥品	17
四、培養基及實驗溶液之配製	18
五、儀器與設備	26
六、套裝軟體	27
第二節、實驗方法	27
一、截切小黃瓜之接菌試驗	27
二、小黃瓜品質指標測定	28
三、菌株特性分析	31
四、基因表現量分析 (qPCR)	34
五、轉錄組分析 (RNA-sequencing, RNA-seq)	40
第五章、結果與討論	44
第一節、確認 <i>E. mori</i> FS08 與截切小黃瓜腐敗之相關性	44
一、截切小黃瓜之菌數變化	44
二、 <i>E. mori</i> FS08 使小黃瓜外觀腐敗	47
三、 <i>E. mori</i> FS08 使截切小黃瓜之醣類含量減少	49
四、 <i>E. mori</i> FS08 不影響小黃瓜之有機酸含量變化	53
五、 <i>E. mori</i> FS08 不影響小黃瓜之 pH 值與可滴定酸	56
第二節、小黃瓜含有的有機酸成分對菌株特性之影響	59
一、混合碳源培養基添加不同有機酸不影響菌株生長	59
二、提高有機酸濃度不影響 <i>E. mori</i> FS08 之生長	66
三、於 30 °C 時，L-蘋果酸促進 <i>E. mori</i> FS08 泳動能力、檸檬酸則抑制	69
四、有機酸對 <i>E. mori</i> FS08 的泳動能力呈濃度效應	73
五、僅 L-蘋果酸對 <i>E. mori</i> FS08 具吸引之趨化反應	78

六、混合碳源添加 L-蘋果酸對 <i>E. mori</i> FS08 之趨化反應具加乘效果	81
七、L-蘋果酸不影響表面移行能力，檸檬酸與 DL-乳酸則抑制	84
八、L-蘋果酸使生物膜形成減少，檸檬酸與 DL-乳酸則促進生物膜的形成	87
 第三節、L-蘋果酸與檸檬酸對 <i>E. mori</i> FS08 運動性相關基因之影響	90
一、引子效率	90
二、L-蘋果酸使 <i>E. mori</i> FS08 運動性相關基因表現量上升	93
 第四節、L-蘋果酸與檸檬酸對 <i>E. mori</i> FS08 轉錄組之影響	98
一、主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA).....	98
二、差異表達基因 (differentially expressed genes, DEGs)	100
三、L-蘋果酸和檸檬酸處理與對照組相比有許多調控相似的 DEGs....	100
四、L-蘋果酸使能量產生、促進運動性和抑制生物膜形成相關的基因上調	102
五、KEGG 分析顯示 L-蘋果酸使群體感應受到抑制	108
六、GSEA 分析顯示檸檬酸使鞭毛組裝相關基因表現量下降	111
 第六章、結論與展望	113
 第七章、參考文獻	114
 第八章、附錄	126

圖次



圖一、細菌鞭毛的旋轉控制泳動方向 (修改自 Wadhwa and Berg, 2022)。	7
圖二、細菌之表面移行能力 (Partridge, 2022)。	7
圖三、趨化反應系統 (修改自 Wadhams and Armitage, 2004)。	9
圖四、革蘭氏陰性菌 LuxI/LuxR 型群體感應系統。	13
圖五、實驗架構。	15
圖六、趨化反應之培養基。	22
圖七、泳動能力與表面移行能力試驗。	32
圖八、趨化反應試驗示意圖。	33
圖九、 <i>E. mori</i> FS08 之 RNA 膠體電泳圖。	38
圖十、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之菌數變化。	46
圖十一、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之外觀變化。	48
圖十二、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之醣類變化。	52
圖十三、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之有機酸變化。	54
圖十四、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之 pH 值與可滴定酸變化。	58
圖十五、在 30 °C 時， <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。	63
圖十六、在 37 °C 時， <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。	65
圖十七、 <i>E. mori</i> FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。	68
圖十八、 <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之泳動能力。	71
圖十九、 <i>E. mori</i> FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基 (調整 pH 值至 6.6) 之泳動能力。	76
圖二十、 <i>E. mori</i> FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基 (未調整 pH 值) 之泳動能力。	77
圖二十一、 <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之表面移行能力。	85



圖二十二、 <i>E. mori</i> FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生物膜形成。	89
圖二十三、管家基因和目標基因之引子標準曲線。	91
圖二十四、 <i>E. mori</i> FS08 於混含碳源培養基添加不同有機酸在各個時間點下之運動性相關基因表現量。	97
圖二十五、 <i>E. mori</i> FS08 在不同有機酸處理下之轉錄組主成分分析。	99
圖二十六、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理與未加酸組別相比的 DEGs 之火山圖。	105
圖二十七、 <i>E. mori</i> FS08 於檸檬酸處理與未加酸組別相比的 DEGs 之火山圖。	107

表次



表一、菌株列表。	16
表二、平板計數培養基配方。	19
表三、添加或不添加有機酸的混合碳源 M9 培養基之配方。	21
表四、趨化反應之單一有機酸化合物配方。	23
表五、趨化反應之混合碳源添加有機酸之混合物配方。	24
表六、PBS 之配方。	25
表七、本研究中即時聚合酶連鎖反應使用之基因列表。	35
表八、本研究中即時聚合酶連鎖反應基因表現量測定設計之引子序列。	36
表九、降解 DNA 之試劑反應體積。	38
表十、逆轉錄混合試劑之配製。	39
表十一、即時聚合酶連鎖反應之混合試劑。	39
表十二、即時聚合酶連鎖反應之反應溫度與時間。	40
表十三、 <i>E. mori</i> FS08 對單一有機酸化合物的趨化反應。	80
表十四、 <i>E. mori</i> FS08 對混合碳源添加有機酸的趨化反應。	83
表十五、管家基因和目標基因之引子效率。	92
表十六、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的 KEGG 分析。	109
表十七、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的 GSEA_KEGG 富集分析。	110
表十八、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的 GSEA_KEGG 富集分析。	112

附錄次



附錄一、 <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 在 TSB 培養基中於 30 °C 培養之生長曲線。	126
附錄二、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 或 0.85% NaCl 於 30 °C 儲藏之菌數變化。	127
附錄三、小黃瓜接菌試驗中，接菌組與對照組以塗盤法培養後之菌落形態。 ..	128
附錄四、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之葡萄糖變化。	129
附錄五、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之果糖變化。	130
附錄六、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之蔗糖變化。	131
附錄七、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之蘋果酸變化。	132
附錄八、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之檸檬酸變化。	133
附錄九、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之 D-乳酸變化。	134
附錄十、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之 L-乳酸變化。	135
附錄十一、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之 pH 值變化。	136
附錄十二、截切小黃瓜接種 <i>E. mori</i> FS08 於 30 °C 儲藏之可滴定酸變化。	137
附錄十三、截切小黃瓜於 30 °C 儲藏 72 小時的正面（接菌面）與背面外觀變化。	138
附錄十四、含有不同濃度有機酸之混合碳源 M9 培養基的原始 pH 值。	139
附錄十五、 <i>E. mori</i> FS08 對單一有機酸化合物的趨化反應。	140
附錄十六、 <i>E. mori</i> FS08 對混合碳源添加有機酸的趨化反應。	141
附錄十七、 <i>E. mori</i> FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生物膜形成。	142
附錄十八、 <i>E. mori</i> FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之浮游態細胞。	143
附錄十九、 <i>E. mori</i> FS08 與 <i>E. coli</i> BCRC 17320 在 TSB 培養基於 30 °C 培養的泳動與表面移行能力。	144
附錄二十、 <i>E. mori</i> FS08 於 qPCR 測試中四個時間點之 OD _{600nm} 值。	145
附錄二十一、 <i>E. mori</i> FS08 於混合碳源培養基添加不同有機酸之運動性相關基因表現量隨著時間的變化。	146

附錄二十二、 <i>E. mori</i> FS08 於混合碳源培養 90 分鐘與初始相比的 DEGs 之火山圖。	149
附錄二十三、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理與初始相比的 DEGs 之火山圖。 ...	151
附錄二十四、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理與初始相比的 DEGs 之火山圖。 ...	153
附錄二十五、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸或檸檬酸處理與對照組相比相同的 DEGs 。	154
附錄二十六、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比所有 的 DEGs 。	155
附錄二十七、 <i>E. mori</i> FS08 於檸檬酸處理 (C90) 與未加酸組別 (G90) 相比所有的 DEGs 。	157
附錄二十八、 <i>E. mori</i> FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比群體 感應的 GSEA 富集圖。	158
附錄二十九、 <i>E. mori</i> FS08 於檸檬酸處理 (C90) 與未加酸組別 (G0) 相比鞭毛組裝 的 GSEA 富集圖。	159

第一章、前言



小黃瓜是沙拉、壽司、漢堡等食品中常見的截切蔬菜之一。雖然截切生鮮蔬果因為健康、營養以及方便而受到歡迎，但在加工過程中容易受到微生物汙染。其中腸桿菌科細菌已被發現很可能存在或污染小黃瓜，從而導致腐敗。微生物的汙染會影響食物的品質、使外觀改變，甚至可能會導致消費者食用後出現嘔吐、腹瀉等症狀，對人類健康構成威脅。因此，防止小黃瓜受到微生物污染非常重要。細菌汙染小黃瓜的過程從表面附著開始，接著定殖、繁殖到最後形成生物膜。在此過程中，相當仰賴於細菌的運動性。實驗室先前發現 *Enterobacter mori* 很有可能是小黃瓜截切後而污染的菌株。進一步自截切小黃瓜分離的菌株中，發現泳動能力最強的菌株根據全基因定序結果確認是 *Enterobacter mori*，命名為 *E. mori* FS08。並且發現小黃瓜汁對這株菌是很強的引誘劑。本研究將進一步確認此菌株對小黃瓜品質的影響，以判斷是否為腐敗菌。另外，使用混合碳源模擬食品富含醣類的情況，探討小黃中的有機酸成分如何影響菌株的行為，以了解菌株汙染小黃瓜的因素。

第二章、文獻回顧



第一節、截切蔬果的加工處理與食品安全

一、截切蔬果之食安問題-以小黃瓜為例

近年來，由於消費者對健康、新鮮、方便的水果和蔬菜的需求不斷增加，全球範圍內的新鮮截切農產品行業迅速發展 (Yousuf et al., 2020)。歐洲的新鮮切割蔬果市場主要由即食沙拉主導，占總市場份額的 50% 至 70% (Raffo et al., 2022)；在美國，包裝沙拉年銷售額超過 30 億美元，切割蔬菜為 17 億美元，切割水果目前為 3 億美元 (Raffo et al., 2022)；台灣市場也在增長，並且全球的新鮮水果市場預計從 2022 年的 5687 億美元增長到 2028 年的 7081 億美元，年增長率為 3.6% (Grand View Research)。

雖然截切蔬果有許多益處，但截切蔬果在加工過程中容易受到微生物汙染。由於截切蔬果可能經過去皮、切片、切碎的處理，因此蔬果的表面細胞被破壞而暴露細胞質，為微生物提供更豐富的營養來源。除此之外，蔬果的高水活性以及 pH 值接近中性或低酸性，促進微生物快速生長。這些條件為病原體和腐敗菌提供良好生長環境，導致與完整農產品相比，截切蔬果更容易變質並產生食品安全問題 (Qadri et al, 2015)。小黃瓜是食品中常見的截切蔬菜之一，近年來小黃瓜與幾起食源性疾病的食品中毒事件有關，常見於小黃瓜的病原菌為 *Salmonella* spp. 與 *Escherichia coli* O157:H7，兩者皆屬於腸桿菌科 (Enterobacteriaceae) 細菌，患者主要出現嘔吐、腹瀉、腹痛、發燒等症狀 (Jung and Schaffner, 2021; Laughlin et al., 2019; Mulchandani et al., 2021)。因此防止小黃瓜受到微生物的汙染相當重要。

二、小黃瓜的主要成分

根據美國農業部 (United States Department of Agriculture) 營養資料庫顯示，每 100 克小黃瓜中約含有 0.76 克葡萄糖 (約 42 mM)、0.87 克果糖 (約 48 mM) 及 0.03 克蔗糖 (約 0.87 mM) (USDA Agricultural Research Service)。另外，文獻表示蘋果酸 (Malic acid) 跟檸檬酸 (Citric acid) 為小黃瓜中最主要的有機酸，蘋果酸於小黃瓜中約含有 0.3%；在黃瓜的膨大和成熟過程中，檸檬酸成為主要的有機酸，在內果皮中的含量超過濕重的 1% (McFeeters et al., 1982)。小黃瓜中的蘋果酸含量明顯超過檸檬酸，兩種酸的濃度在成熟過程中

幾乎沒有變化，糖含量則會在成熟過程中降低 (Tarrach and Herrmann, 1986)。而先前實驗室進行截切小黃瓜儲藏試驗，最初小黃瓜之醣類含量約為 0.66% 的葡萄糖 (約為 36.8 mM)、0.78% 的果糖 (約為 43.5 mM)，而蘋果酸約 0.15% (約為 11 mM)。此外，隨著儲藏時間增加，D-form 與 L-form 乳酸含量具有上升的趨勢 (顧，2022)。

三、細菌汙染截切小黃瓜之途徑

病原菌 *E. coli* O157:H7 感染小黃瓜的過程涉及定殖 (colonization)、繁殖和生物膜形成 (Sun et al., 2022)。定殖是指微生物黏附宿主細胞並生長繁殖。細菌的運動性對定殖具有重要作用，細菌可以透過鞭毛以及趨化性移動至宿主上，並產生胞外物質形成生物膜，除了增強細菌的附著又可以保護細菌抵禦環境刺激 (Colin et al., 2021; Yuan et al., 2020; Sun et al., 2022; Wang et al., 2023)。Sun 等人 (2019) 將小黃瓜浸泡在綠色螢光標記的 *E. coli* O157:H7 菌液中，使用倒立螢光顯微鏡觀察到 *E. coli* O157:H7 主要定殖在小黃瓜表皮的氣孔周圍，而不侵入完整小黃瓜的內部組織。然而小黃瓜頭尾兩端若有受損，細菌就會滲入內部組織，定殖於小黃瓜果肉和維管束 (特別是木質部)，並沿著木質部遷移。因此，新鮮截切小黃瓜的內部組織已暴露在環境中，更容易受到微生物的汙染，潛在導致食品腐敗並產生安全疑慮 (Chitlapilly and Wang, 2022; Guttenplan and Kearns, 2013)。

四、截切小黃瓜之品質指標

微生物是導致食品腐敗的關鍵因素之一。而截切蔬果的腐敗可以從許多層面定義。目前文獻中明確定義腐敗指標的僅有外觀變化與總生菌數。從外觀的變化，鮮切小黃瓜的感官特性包括顏色、形狀、質地和氣味，其標準為新鮮小黃瓜顏色翠綠、質地酥脆、具清新的小黃瓜氣味；腐敗之小黃瓜形狀腐爛、顏色深黃、質地枯萎、有異味 (Sun et al., 2022)。從微生物學的角度來看，食品中微生物的數量可以顯示食品腐敗的可能性。當總生菌數為 0~2 log CFU/ml 被認為微生物負荷較低；3~4 log CFU/ml 需輕微關注；5~6 log CFU/ml 已視為高微生物計數；而腐敗的指標為 7 log CFU/ml (Fung, 2009)。由於鮮切水果和蔬菜是受傷的組織，且通常未經熱處理，切面富含營養成分和水分，因此腐敗微生物和病原微生物都有一個完美的培養基來快速生長和繁殖 (Yousuf et al.,

2020)。其中碳水化合物 (包括醣類和澱粉)，是許多園藝作物的主要風味和質地成分，因此決定了作物的營養價值、採後品質和儲存期限，是已知的品質決定因素 (Yu et al., 2022)。而蔬果中普遍含有檸檬酸和蘋果酸，有機酸在維持食品的營養價值和感官品質方面發揮重要作用 (Shi et al., 2022)。另外，微生物代謝產生的有機酸，例如乳酸菌產生的乳酸，會改變食品的 pH 值與酸度，影響食品的感官品質 (Alegebeleye et al., 2022; Korkeala et al., 1990)。腐敗食品的 pH 值範圍會隨食品種類不同而異。一般新鮮蔬果的 pH 值接近中性 (Qadri et al., 2015)。當 pH 值大幅下降或上升通常是食品腐敗的指標。因此外觀變化、總生菌數、醣類與有機酸含量、pH 值以及可滴定酸，這些指標為先前實驗室在分析截切蔬果品質劣變的主要因子。而小黃瓜的品質變化亦可參照這些指標。

第二節、腸桿菌屬 (*Enterobacter* spp.)

一、基本特性

Enterobacter spp. 屬於腸桿菌科 (Enterobacteriaceae)，為革蘭氏陰性、桿狀、兼性厭氧菌，透過周鞭毛 (peritrichous flagella) 運動，其最適生長條件通常在 20 至 37 °C 的溫度範圍內，及中性 pH 值。腸桿菌科廣泛分佈於環境中，在土壤、水、植物、動物和人類的胃腸道、糞便以及食品加工設備皆能檢測到，因此很容易污染食物鏈並引起食物腐敗。此外，腸桿菌科已被用作食品品質和食品安全的指標。腸桿菌科計數是評估環境 (例如食品接觸表面) 的有效方法，有助於快速確定潛在的污染源 (Cooney et al., 2014; D'Agostino and Cook, 2016; Davin-Regli et al., 2019; Halkman and Halkman, 2014)。

二、引發的問題

已有許多文獻發現 *Enterobacter* spp. 是植物病原體。從染病的桑樹根分離出的桑樹致病菌 *Enterobacter mori* LMG 25706 會導致桑葉乾枯甚至落葉，染病的桑樹根木質部濕潤、變色並出現褐色條紋，且感染後期韌皮部腐爛 (Zhu et al., 2011)。另外，從患病的奇異果植株中分離出的 *Enterobacter mori* CX01，此菌株會使奇異果樹的葉子以及桑葉產生棕色壞死現象，而奇異果樹的樹枝則是會產生褐色病斑 (Zhang et al., 2021)。而 *Enterobacter ludwigii* 是引起洋蔥



疾病的植物病原菌，此菌株會導致洋蔥球莖腐爛，其特徵是內部鱗葉變色成淺棕色 (Schroeder et al., 2010)。*Enterobacter cloacae* 的不同菌株則會引起稻米、大豆、玉米和番茄幼苗黃化、發育遲緩、枯萎、乾燥和死亡等細菌性疾病症狀 (Cao et al., 2020)。

除了植物病源體的問題外，*Enterobacter* spp. 亦被認為是伺機性病原體，較少於健康個體中引起疾病。這些微生物與菌血症、下呼吸道感染、皮膚和軟組織感染、尿路感染、心內膜炎、骨髓炎、關節炎和眼部感染有關 (Rogers et al., 2016)。特別是 *Enterobacter aerogenes* 與 *Enterobacter cloacae* 在近三十年是醫院病房中的重要病原體。而 *Enterobacter cloacae* 複合群 (*Enterobacter cloacae* complex, Ecc) 在自然界中廣泛存在，Ecc 屬於伺機性致病菌，包含 6 個菌種：*E. cloacae* subsp. *cloacae*, *E. asburiae*, *E. kobei*, *E. hormaechei*, *E. ludwigii* 與 *E. nimipressuralis*，它形成生物膜和分泌各種細胞毒素 (腸毒素、溶血素、成孔毒素) 的能力可引起下呼吸道感染和菌血症 (Davin-Regli 2015; Mustafa et al., 2020)。另外，自患有急性外耳炎患者的耳拭子中分離出 *Enterobacter mori*，該分離株在體外表現出對碳青黴烯類 (carbapenem) 抗生素的抗藥性，此類抗生素通常被視為治療多重抗藥性細菌的最後防線 (Hartl et al., 2019)。

綜合上述，*Enterobacter* spp. 若存在於食品上，勢必會產生食品安全疑慮。目前已有許多食品中發現 *Enterobacter* spp.，包括巧克力、黃瓜、乳製品、雞蛋、魚、新鮮冷凍水果和蔬菜、穀物、豆類產品、肉類等。此菌屬具有引起人類感染的能力，構成食品安全威脅 (Cooney et al., 2014)。Nyenje 等人 (2012) 的研究中，對各種即食食品進行微生物分析，包括蔬菜、馬鈴薯、米、餡餅、牛肉和燉雞。分離出的細菌中，*Enterobacter* spp. 占了 18%。許多即食食品樣品不符合細菌學的衛生品質標準，可能導致食源性感染。而這類細菌亦會造成食品腐敗。根據聯合國糧食及農業組織之資料，每年世界生產的水果和蔬菜總量中，有很大一部分因腐敗而被浪費。農產品腐敗具有廣泛的社會經濟影響，造成世界某些地區的糧食短缺、糧食浪費和飢餓等問題 (Alegbeleye et al., 2022)。因此，食品中 *Enterobacter* spp. 的存在或是汙染應受到重視。

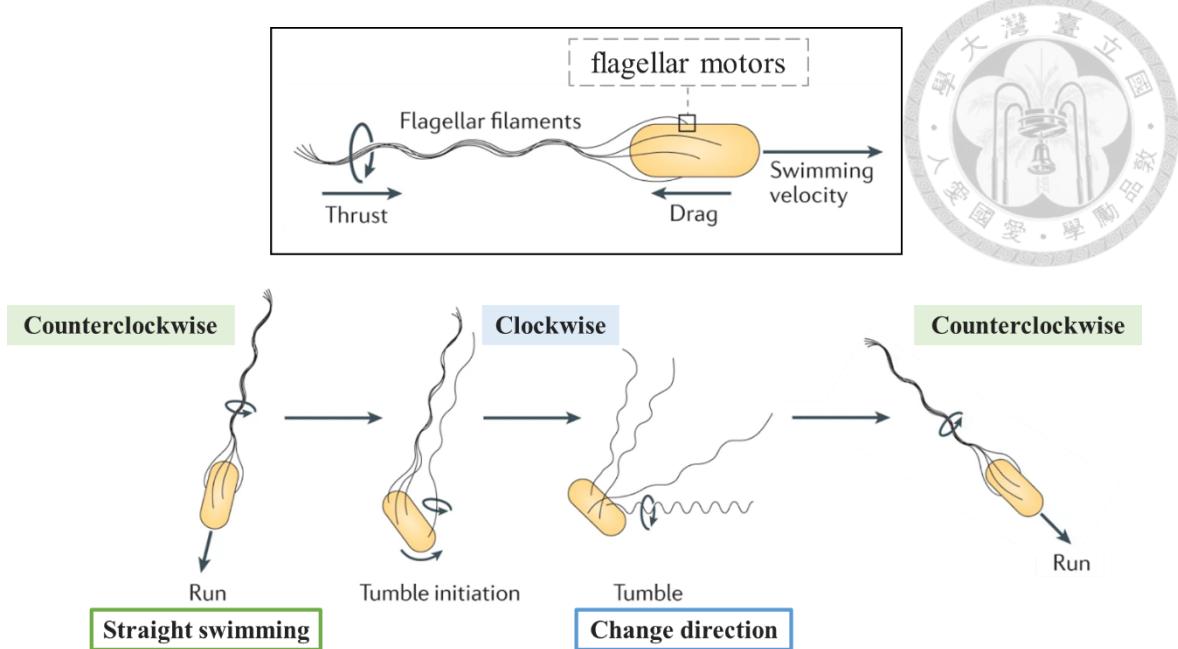


第三節、細菌運動性

一、泳動能力 (Swimming motility)

細菌透過多種機制在其棲息地內移動和分散，或感染並定殖宿主，其中最明確的機制依賴於鞭毛。泳動是細菌的運動模式之一，主要是浮游狀態的單獨細胞在液態環境中游動。細菌透過鞭毛馬達使鞭毛旋轉，當所有鞭毛逆時針旋轉時，鞭毛會在細胞後方形成一束，使細菌沿直線方向前進。如果有一個或多個鞭毛馬達將旋轉方向切換為順時針，會導致鞭毛散開，使細胞可以停留在原地翻滾並改變方向。最終，鞭毛馬達切換回逆時針旋轉，細胞就可以朝著新的方向前進 (圖一) (Partridge, 2022; Wadhwa and Berg, 2022)。

鞭毛的長絲為嵌入細胞膜中的結構，並且基底具有鞭毛馬達。定子複合體 (stator complexes) 為鞭毛馬達的一部份，根據 *Escherichia coli* 的研究，每個定子複合物均由蛋白質亞基 MotA 和 MotB 組成，並以 4MotA-2MotB 的二聚體組裝。定子複合體為離子通道蛋白，由離子梯度 (通常是質子或鈉離子) 提供動力。離子梯度驅動鞭毛馬達的機制包括 (1) 質子驅動力 (Proton Motive Force, PMF)：細菌細胞膜的內外兩側存在著質子濃度差 (即 pH 差) 和電位差 (電化學梯度)。通過細菌的呼吸作用，質子從細胞內被幫浦運輸到細胞外，形成細胞外高內低的質子梯度。當質子重新流回細胞內時，這種質子流動通過定子複合體轉化為機械能，推動鞭毛旋轉。(2) 鈉驅動力 (Sodium Motive Force, SMF)：原理同質子驅動力，某些細菌利用鈉離子的電化學梯度來驅動鞭毛運動。細胞內外的鈉離子濃度差和電位差產生驅動力，當鈉離子流回細胞內時，驅動定子複合體運動。穿過這些通道的離子與 MotB 跨膜片段中的保守天冬胺酸殘基結合，導致 MotA 發生構象變化。這些構象變化透過 MotA 和轉子蛋白 FliG 之間的特定靜電相互作用，使鞭毛產生旋轉所需的扭矩 (Baker and O'Toole, 2017; Partridge, 2022; Pfeifer et al., 2022)。

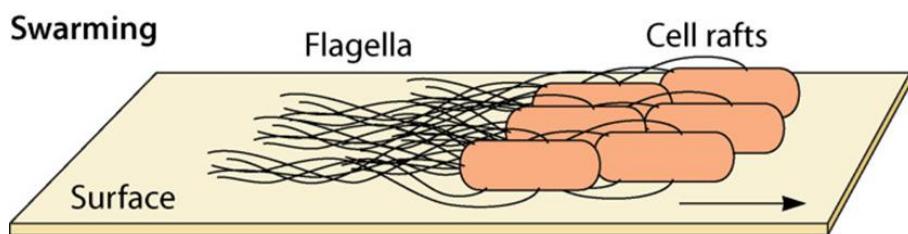


圖一、細菌鞭毛的旋轉控制泳動方向 (修改自 Wadhwa and Berg, 2022)。

Figure 1. The rotation of bacterial flagella controls swimming direction (modified from Wadhwa and Berg, 2022).

二、表面移行能力 (Swarming motility)

在自然界中，細菌通常附著在生物和非生物表面。細菌利用表面移行能力在表面或表面附近移動。表面移行能力同樣是受到鞭毛趨動的運動行為，與泳動不同的是，表面移行能力是細菌群組織成多細胞筏 (rafts)，群體細胞一起在表面移動 (圖二)。細菌的許多特性有助於表面移行能力，包括鞭毛位於群體邊緣、每個細胞鞭毛數量的增加、提高細胞密度、細胞伸長、相鄰細胞沿著長軸排列、分泌滲透劑或界面活性劑以降低表面張力 (Kearns, D. B., 2010; Partridge, 2022; Wadhwa and Berg, 2022)。



圖二、細菌之表面移行能力 (Partridge, 2022)。

Figure 2. Bacterial swarming motility (Partridge, 2022).

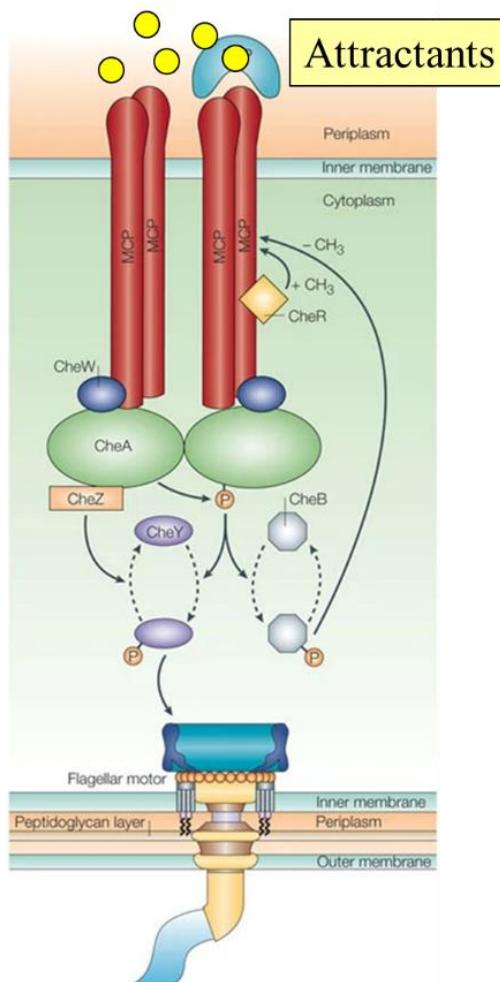
第四節、細菌運動性相關之菌株特性

一、趨化性 (Chemotaxis)

細菌泳動時，鞭毛旋轉方向的交替與切換頻率由趨化系統調控 (Partridge, 2022)。趨化性是指細菌向營養較豐富的區域移動或遠離有害區域的過程，細菌可能是受到引誘劑吸引或是遠離趨避劑。引誘劑跟趨避劑都是趨化信號或稱為配體 (ligand)。而趨化反應會調節鞭毛馬達的旋轉，使泳動這個運動方式可以轉換方向 (Wadhams and Armitage, 2004; Wadhwa and Berg, 2022)。

趨化反應系統的組成如圖三。細菌細胞膜上的跨膜化學受體，又稱為甲基接受趨化蛋白 (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCP)，可以識別配體；CheA 為組氨酸蛋白激酶 (histidine protein kinase)；CheY 為反應調節因子，負責控制鞭毛馬達切換；CheW 為連結 CheA 與 CheY 的轉接蛋白(adapter protein)；CheZ 為磷酸酶 (phosphatase)；CheB、CheR 分別是甲酯酶跟甲基轉移酶，可以控制化學受體反應。趨化反應的機制如下：(1) 當引誘劑濃度降低導致引誘劑與 MCP 的結合減少，會刺激 CheA 自磷酸化。CheY 會被 CheA 磷酸化，CheY-P 擴散到細胞質和鞭毛馬達結合，使鞭毛切換為順時針旋轉，導致細胞翻滾和方向改變。隨後 CheY-P 被 CheZ 去磷酸化而終止這個反應。改由 CheB 被磷酸化，使甲酯酶活性增加導致 MCP 去甲基化。去甲基化的 MCPs 誘導 CheA 自磷酸化的能力降低，因此 CheA 自磷酸化的速率恢復到刺激前水平，鞭毛馬達切換回逆時針旋轉，使細菌朝新的方向直線前進。(2) 若引誘劑濃度增加則會抑制 CheA 的自磷酸化，因此 CheY-P 的濃度降低，從而減緩馬達切換的頻率。這使細菌朝這個方向游動更久。CheB 活性降低，這使得 CheR 增加 MCP 的甲基化。高度甲基化的 MCP 再次刺激 CheA 自磷酸化，使 CheA 自磷酸化的速率恢復到刺激前的水平，因而細菌恢復到正常的方向並改變馬達頻率 (Sun et al., 2021; Wadhams and Armitage, 2004)。





圖三、趨化反應系統 (修改自 Wadhams and Armitage, 2004)。

Figure 3. Chemotaxis response system (Modified from Wadhams and Armitage, 2004).

二、生物膜 (Biofilm)

生物膜保護微生物抵禦環境壓力，包括免受紫外線 (UV) 輻射、極端 pH、極端溫度、高鹽度、高壓、營養不良、抗生素等的侵害，從而有利於微生物的存活和毒性。食源性病原體和腐敗菌是食品工業的主要障礙，這些微生物很可能在加工過程中污染原料和食品，若他們形成生物膜，將使他們免受普通清潔程序的影響，因此能夠在環境中持續存在。這將導致食品加工環境和最終食品的微生物負擔增加，進一步導致食品腐敗、變質和保存期限縮短，加劇食源性疾病感染的風險，造成重大食品安全問題並導致不利的經濟損失。因此防止微生物生物膜的產生是近期食品產業的重要課題 (Carrascosa et al., 2021; Galié et al., 2018; Liu et al., 2023; Olanbiwoninu and Popoola, 2023)。

生物膜形成的步驟如下，浮游在液體中的細菌會先附著於固體表面，細菌持續生長，使菌落聚集體不斷擴大，接著產生胞外多醣，使菌落聚集體不斷擴大，這個包含多醣、蛋白質、細胞外的 RNA 和 DNA (eDNA) 等細胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 的結構稱為生物膜。當細胞網絡內部的細菌過於密集，生物膜就會破裂而釋放細菌，細菌往外形成新的附著點，形成一個循環 (Di Martino, P., 2018; Sauer et al., 2022; Wagner et al., 2020)。

生物膜的形成與細菌的運動性密切相關。文獻證實運動性有缺陷的 *E. coli* 會形成較小和較稀疏的生物膜 (Wood et al., 2006)。現在已經清楚的是，細菌表面移行能力的許多調控途徑也會影響生物膜的形成。這代表了細菌運動生活方式和固著生活方式之間的轉變 (Verstraeten et al., 2008)。以下將說明這樣的轉變：首先，細胞聚集形成單層細胞 (monolayer swarm)。隨著細胞密度的增加，細胞形成快速移動的筏 (raft)，可能會發生碰撞並形成短暫的堵塞。碰撞筏之間邊界處的細胞被向上推並從周圍的單層中突出。表面覆蓋度的增加可以促進類似動態聚集體 (dynamic islands) 的形成，其中細胞不斷積累，同時仍然處於動態狀態。細胞的高密度與不均勻分佈導致空間異質性，最終伴隨細胞外聚合物的產生，導致生物膜的形成 (Grobas et al., 2021; Worlitzer et al., 2022)。

目前也有許多作者認為，表面移行能力與生物膜的形成受到相反地調節和拮抗 (Kearns, D. B., 2010; Worlitzer et al., 2022)。Guttenplan 與 Kearns (2013) 表示，假設存在運動性到生物膜的轉變，則菌株在生物膜形成的早期需要運動性，但後期抑制運動性會促進生物膜的形成。並且有結果發現生物膜中的細胞會減少鞭毛絲 *fliC* 基因的表達。Caiazza 等人 (2007) 的研究表示，SadB 是伺機性病原體 *Pseudomonas aeruginosa* PA14 生物膜形成的早期步驟所必需的蛋白。而過度表現 SadB 的野生型菌株，其生物膜形成在 4 小時內增強約 3 倍，卻抑制菌株的表面移行能力。另外，Rcs (Regulator of Capsule Synthesis) 系統與生物膜形成有關，該系統由三個核心蛋白組成，分別為跨膜雜合激酶 RcsC、跨膜蛋白 RcsD 和反應調節因子 RcsB。RcsC 同時具有激酶和磷酸酶活性，與反應調節劑 RcsB 一起代表細菌典型的雙組分系統 (two-component system, TCS)。根據 *E. coli* 中觀察到的系統，在接受胞外刺激後，RcsC 以 ATP 依賴

性方式自磷酸化，再調控 RcsB 磷酸化。此系統在腸桿菌科中，當 RcsB 磷酸化水平高，會抑制細菌的運動性並促進生物膜的形成；Rcs 系統受抑制時，會活化趨化行為和鞭毛合成 (Meng et al., 2020; Meng et al., 2021)。這些數據顯示生物膜形成和細菌運動性之間存在反比關係。

而細菌生物膜的形成可能會受到氧化壓力的影響。氧氣連續接受電子產生的超氧化物 (O_2^-) 和過氧化氫 (H_2O_2) 被稱為活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，會在細菌呼吸或發酵代謝過程中產生。ROS 對蛋白質和 DNA 具有破壞作用，因此對細菌具有毒性。而大多數細菌擁有氧化壓力防禦基因，如烷基氫過氧化物還原酶 (*ahpC*)、過氧化氫酶 (*katA*、*katG*) 和超氧化物歧化酶 (*sodB*)，因此能夠清除 ROS 進行解毒作用。已有文獻顯示，氧化壓力防禦基因 (尤其是 *ahpC*) 的突變會顯著增強生物膜的形成 (Jang, et al., 2016; Oh and Jeon, 2014; Oh et al., 2016)。

第五節、細菌運動性與生物膜形成之調控機制

一、c-di-GMP 調節運動性和生物膜形成

c-di-GMP [cyclic bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate] 是腸桿菌科中普遍存在的第二信使 (second messenger)，它是許多不同表型的調節劑，包括運動性、生物膜形成和毒力 (Yuan et al., 2020)。c-di-GMP 是決定細菌處於運動狀態還是生物膜狀態的重要調節分子。低量的 c-di-GMP 促進運動，高量的 c-di-GMP 制鞭毛運動並刺激表面附著和生物膜形成。c-di-GMP 的合成為兩分子 GTP (guanosine-5'-triphosphate) 透過含有 GGDEF 結構域的二鳥苷酸環化酶 (diguanylate cyclase, DGC) 轉化為 c-di-GMP；而含有 EAL 或 HD-GYP 結構域的磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 則會將 c-di-GMP 降解為 5'-磷酸鳥苷-(3'-5')-鳥苷或兩個 GMP 分子 (Baker and O'Toole, 2017; Rinaldo et al., 2018; Sisti et al., 2013; Whiteley and Lee, 2015)。

許多文獻皆證實 c-di-GMP 同時調控細菌的運動性和生物膜形成。YcgR 為 c-di-GMP 結合蛋白，其功能為減慢 MotA / FliG / FliM 的旋轉速度並改變反轉頻率，YcgR 已被證明可以調節泳動能力與生物膜形成。當細胞可能準備形成生物膜時，c-di-GMP 存在的情況下，YcgR 會抑制鞭毛運動 (Guttenplan and



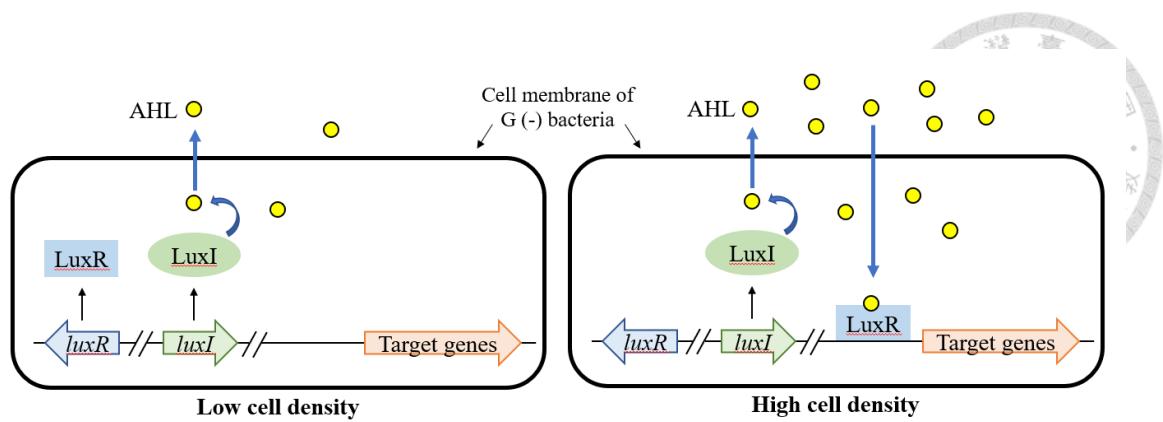
Kearns, 2013)。Dong 等人 (2022) 的研究則發現合成和降解 c-di-GMP 的蛋白質在有益根際細菌 *Bacillus velezensis* SQR9 促進定殖作用。合成 c-di-GMP 有助於生物膜的形成，降解 c-di-GMP 有助於趨化性和運動性。

二、群體感應 (Quorum Sensing, QS)

表面移行能力和生物膜的形成都涉及細菌群的累積，並且都允許菌種內和菌種之間的相互作用。根據報導，物理訊號 (例如：表面接觸) 和化學訊號 (例如：群體感應) 觸發營養細胞分化為集群表型。其中群體感應被證明可以透過調節泳動能力與群體運動來發揮其對生物膜發育的控制 (Gmister and Kaca, 2022; Shrout et al., 2016; Tran and Hadinoto, 2021; Wadhwa and Berg, 2022)。

群體感應 (Quorum Sensing, QS) 是一種細胞間的溝通模式，革蘭氏陰性菌會產生稱為自誘導劑 (autoinducers, AI) 的訊號分子。AI 是由 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 合成的酰基高絲氨酸內酯 (acyl-homoserine lactones, AHLs) 或其他分子，它們在細胞中產生並自由擴散穿過細胞膜。在低細胞密度 (low cell density, LCD) 下，AI 的濃度低於 QS 檢測所需的閾值；在高細胞密度 (high cell density, HCD) 下，累積高濃度的 AI，使細菌透過細胞質或細胞膜中的受體偵測到訊號。AI 與受體結合後會激活受體的活性，使其自體磷酸化，並將磷酸鹽傳遞給細胞質的轉錄因子，進而改變 QS 調節的基因表現。此外，AI 驅動的 QS 活化刺激了 AI 合成的增加，從而建立了一個前饋自誘導循環 (feed-forward autoinduction loop)，促進群體中的同步基因表現。

有些革蘭氏陰性菌 QS 受體是雙組分系統 (two-component system, TCS)，雙組分系統是由膜結合的組胺酸激酶 (histidine kinase) 受體和反應調節劑 (response regulator) 組成。除了雙組分系統外，革蘭氏陰性細菌通常還會使用 LuxI/LuxR 型 QS 系統，LuxR 是一種細胞質轉錄因子作為受體，可檢測由 LuxI 型合成酶產生的 AHL。在低細胞密度下，AHL 的濃度較低，並不會被細胞內的 LuxR 感測，當 LuxR 型蛋白不與 AHL 結合時，LuxR 會迅速降解；在高細胞密度下，累積高濃度 AHL，AHL 通過細胞膜被細胞內的 LuxR 感測，AHL 穩定結合 LuxR 時，使 LuxR 能夠折疊、結合 DNA 並激活目標基因的轉錄 (圖四)。QS 控制的過程包括生物發光、抗生素產生、生物膜形成、毒力因子分泌等 (Papenfort and Bassler, 2016; Rutherford and Bassler, 2012)。



圖四、革蘭氏陰性菌 LuxI/LuxR 型群體感應系統。

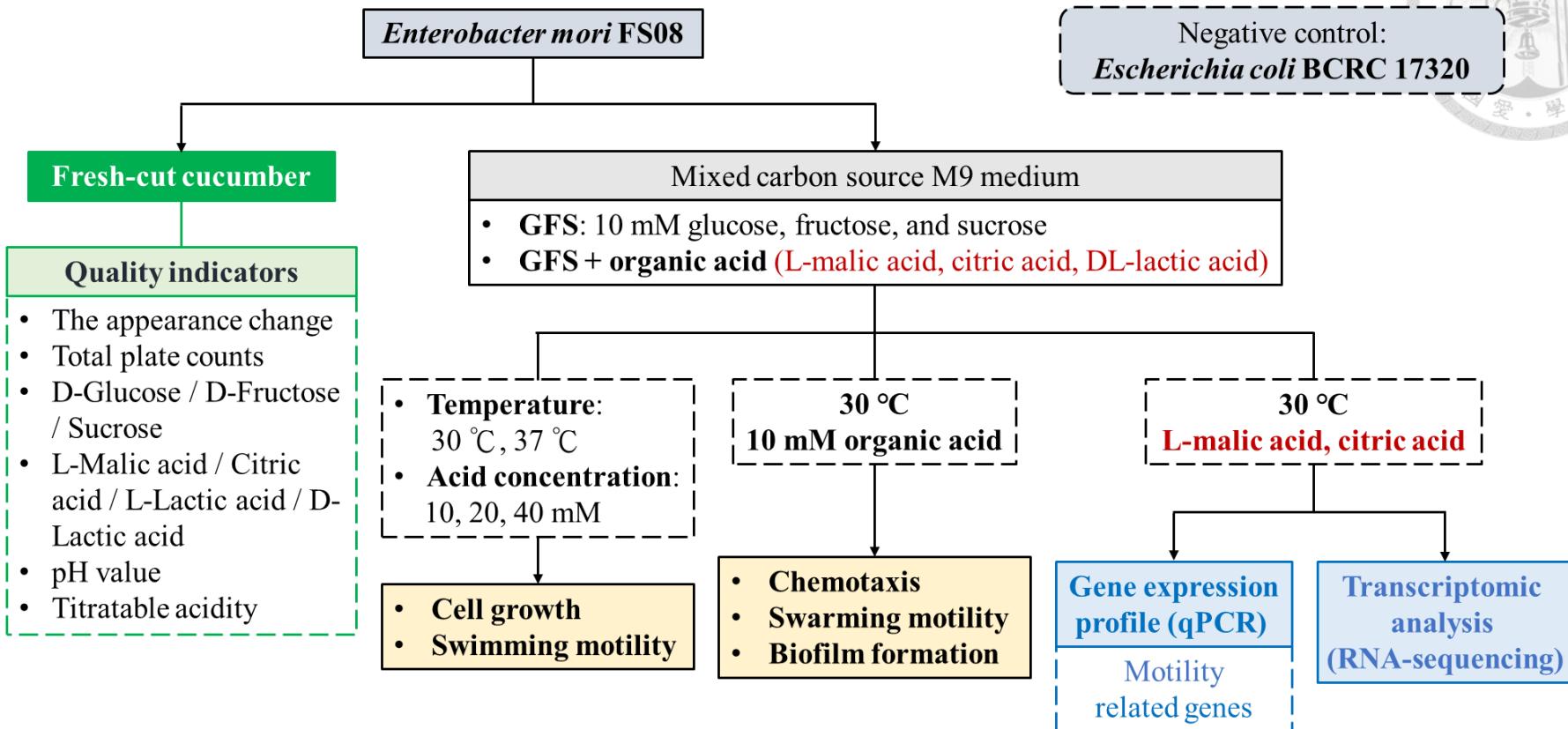
Figure 4. Gram-negative bacteria LuxI/LuxR type quorum sensing system.

第三章、研究目的與架構



小黃瓜中含有多種成分，包括葡萄糖、果糖、蔗糖等醣類以及蘋果酸、檸檬酸、乳酸等有機酸。若這些成分是引誘劑，則食品加工過程中引誘劑的濃度高，將導致細菌的趨化性增強，使細菌聚集並增加生物膜的形成。可能引起小黃瓜嚴重的細菌污染。然而，這些化合物是引誘劑或驅避劑，以及如何影響菌株特性仍未知。先前實驗室進行小黃瓜截切前後的菌相分析，發現截切後的小黃瓜 *Enterobacter mori* 的豐度提高，因此推測它可能是截切後污染的菌株。實驗室從截切小黃瓜中分離出菌株 *E. mori* FS08，與其他小黃瓜分離株相比，具有更高的泳動能力。趨化性測試顯示，小黃瓜基質對此菌株的吸引最明顯，而在單一碳源的培養基中，葡萄糖和蘋果酸也會吸引菌株（顧，2022）。然而，此菌株與小黃瓜之間的關聯性尚未建立。因此，本研究的目的為（1）確認 *E. mori* FS08 是否會造成小黃瓜腐敗。（2）以混合碳源模擬食品富含醣類的情況，探討小黃瓜中的有機酸成分對細菌的生長、運動性、趨化性以及生物膜形成的影響。期望了解小黃瓜中的成分對細菌定殖的調節機制。

實驗架構如圖五。主要分為兩個部分：第一部分，進行小黃瓜接菌試驗，將 *E. mori* FS08 接種至新鮮截切的小黃瓜上，隨著儲藏時間測定品質指標變化，探討菌株對小黃瓜的腐敗情形。第二部分，測定 *E. mori* FS08 在混合碳源培養基添加不同有機酸對菌株特性的影響，混合碳源以 GFS 表示，代表培養基中含有葡萄糖、果糖跟蔗糖，三者濃度皆為 10 mM，模擬食品成分中富含各種醣類的情況。而添加的有機酸為 L-蘋果酸、檸檬酸及 DL-乳酸。研究在不同溫度及有機酸濃度下，菌株的生長情形及泳動能力。根據前面的結果，選定在 30 °C、10 mM 有機酸濃度下，測定不同有機酸對趨化性、表面移行能力及生物膜形成的影響。另外，透過基因表現量、轉錄組分析，以證實有機酸對這些特性的影響。其中，測定菌株於混合碳源培養基添加 10 mM 有機酸之生長曲線、泳動能力與表面移行能力時，將 *Escherichia coli* BCRC 17320 作為負控制組，與 *E. mori* FS08 的結果進行比較。



圖五、實驗架構。

Figure 5. Experimental flow chart.

第四章、材料與方法



第一節、材料

一、樣品

本研究使用之小黃瓜（學名：*Cucumis sativus*）購自全聯福利中心，其產地來源為嘉義縣，由崇美農場與全聯合作銷售。小黃瓜由實驗室自行無菌截切，以避免操作過程中的交叉污染。

二、實驗菌株

本研究使用之菌株來源與資訊如表一。*Enterobacter mori* FS08 為實驗室先前自截切小黃瓜中分離之菌株（顧，2022）；*Escherichia coli* BCRC 17320 購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹，台灣），作為本研究負控制組之參考菌株。

E. coli BCRC 17320 與主要研究菌株 *E. mori* FS08 同為腸桿菌科 (Enterobacteriaceae)，且 *E. coli* 的泳動行為、趨化性及生物膜形成之相關文獻資訊豐富 (Sharma, et al., 2016; Wadhams and Armitage, 2004)。亦有文獻探討病原菌 *E. coli* O157:H7 在小黃瓜上的定殖 (Sun et al., 2019; Sun et al., 2022)。由於我們考量安全性，並未直接採用病原菌做為控制組，因此選擇同為 *E. coli* 但無致病性的標準菌株。另外，先前實驗室研究 *E. mori* FS08 的菌株特性分析時，包括耐受性測試（清潔劑、滲透壓、pH 值）、趨化性試驗等，即是以 *E. coli* BCRC 17320 作為負控制組（顧，2022）。負控制組的定義為以上的菌株特性相較於 *E. mori* FS08 明顯較弱的菌株。由於 *E. coli* 的研究已相當豐富，但我們觀察到 *E. mori* FS08 的一些表型比 *E. coli* 更強，突顯 *E. mori* FS08 的重要性。

表一、菌株列表。

Table 1. Bacteria list.

Bacteria	Source	References
<i>Enterobacter mori</i> FS08	Isolated from cucumber	顧，2022
<i>Escherichia coli</i>	BCRC 17320	財團法人食品工業發展研究所

三、藥品

1. 培養基材料

D-glucose、Tryptone、Sodium chloride (NaCl) 與 Agar，購自 Bioshop Canada (伯靈頓，美國)。Yeast extract、Tryptic soy broth 與 M9 minimal salts 5X，購自 BD (Franklin Lakes, U.S.A)。D-(-)-Fructose ($\geq 99\%$)、Sucrose 購自 Sigma Aldrich (Saint Louis, U.S.A)。MgSO₄ 購自 Merck (德國)。Glycerol 購自 J. T. Baker Chemical (Philipsburg, U.S.A)。

2. 化學試劑

- (1) Hydrogen chloride (HCl)、Crystal Violet 購自 Sigma Aldrich (Saint Louis, U.S.A)。
- (2) L (-)-Malic acid (99%) 購自 Thermo scientific (Waltham, U.S.A)
- (3) Citric acid 購自 Nacalai Tesque (京都，日本)
- (4) DL-Lactic acid、Potassium hydrogen phthalate (KHP)、Phenolphthalein (酚酞) 購自島久藥品株式會社 (日本)
- (5) Sodium hydroxide (NaOH) 購自昭和化學株式會社 (東京，日本)
- (6) Ethanol (EtOH) 購自 Fisher scientific (Pittsburgh, U.S.A)
- (7) Acetic acid ($\geq 99.8\%$) 購自 Honeywell (德國)

3. 分生實驗材料

- (1) GENEzol™ Reagent (GZR050) 購自 Geneaid Biotech Ltd. (新北市，台灣)。
- (2) DreamTaq DNA polymerase、10X DreamTaq buffer、Water, nuclease-free、DNase I, RNase-free (1 U/ μ L)、10X Reaction Buffer with MgCl₂、50 mM EDTA 與 RNA Gel Loading Dye (2X) 購自 Thermo scientific (Waltham, U.S.A)。
- (3) Random hexamer、10mM dNTP mix 購自 Invitrogen (Carlsbad, U.S.A)。
- (4) 100 bp DNA ladder 與 1 kb DNA ladder 購自 Bioman scientific Co., Ltd. (新北市，台灣)。
- (5) Agarose 購自 Cambrex Bio Science Rockland (Thomaston, U.S.A)
- (6) TRIS powder 購自 Bioman scientific Co., Ltd. (新北市，台灣)。

- 
- (7) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 購自 Sigma Aldrich (Saint Louis, U.S.A)。
 - (8) Ethidium Bromide (EtBr)、Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 購自 Sigma Aldrich (Saint Louis, U.S.A)。
 - (9) Lysozyme powder TM 與 Bacteria lysis buffer 購自 Geneaid Biotech Ltd. (新北市, 台灣)。
 - (10) 5X First-Strand Buffer、100 mM DTT 與 SMART[®]MMLV Reverse Transcriptase 購自 Takara Bio (Canada, U.S.A)。
 - (11) KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal 購自 U-Vision Biotech Inc. (台北市, 台灣)。

4. 商業套組

- (1) SUCROSE / D-FRUCTOSE / D-GLUCOSE ASSAY KIT (KSUFRG)、L-MALIC ACID (Liquid Ready Reagents) ASSAY KIT (K-LMALQR)、CITRIC ACID ASSAY KIT (KCITR)、D-LACTIC ACID Kit、L-LACTIC ACID ASSAY Kit (K-LATE) 購自 Megazyme (Chicago, U.S.A)。
- (2) Genezol TM TriRNA Pure Kit (GZX100)、TriRNA Pure Kit (TRP050)與 RNA Cleanup Kit (PR050) 購自 Geneaid Biotech Ltd. (新北市, 台灣)。
- (3) Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit (R3000) 購自 Zymo Research (California, U.S.A)

四、培養基及實驗溶液之配製

1. 0.85% NaCl

0.85 g 的 NaCl 加入 100 mL RO 水，以磁石攪拌均勻並高壓滅菌。

2. 胨蛋白酶大豆培養基 (Tryptic Soy Broth, TSB)

以 3 g Tryptic Soy Broth powder 加入 100 mL RO 水的比例混合均勻，並進行 121°C 高壓滅菌。

3. 平板計數培養基 (Plate Count Agar, PCA)

依照表二配製，混合均勻後以 121°C 高壓滅菌，再倒入培養皿中待其凝固，保存於 4 °C。



表二、平板計數培養基配方。

Table 2. Formula of plate count agar (PCA).

Material	Content
Tryptone	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Glucose	2.5 g
Agar	15.0 g
RO water	1000 mL

4. 添加或不添加有機酸之混合碳源 M9 培養基

本研究中測定生長曲線及生物膜形成能力使用之微生物培養基為混合碳源培養基，含 10 mM 之葡萄糖 (Glucose)、10 mM 果糖 (Fructose) 及 10 mM 蔗糖 (Sucrose)，以 GFS 表示。另外，含有 1X M9 溶液與 2 mM MgSO₄。M9 Minimal Salts 是一種高度參考的微生物生長培養基，此種經過緩衝的基本微生物培養基僅包含鹽和氮，因此會根據需要補充碳源，而硫酸鎂則提供 DNA 酶促複製所需的鎂離子，作為細胞內多種酶的輔助因子 (Walker, G. M., 1994)。

混合碳源 M9 培養基之配方如表三，預先配製碳源 (20% Glucose、Fructose、Sucrose)、有機酸 (1 M L-Malic acid、Citric acid、DL-Lactic acid) 與 0.1 M MgSO₄ 之 Stock 溶液，溶解於二次水並定量後，再過 0.22 μm 濾膜除菌，其中有機酸 Stock 溶液先以 NaOH 將 pH 值調整至 4.0。5X M9 溶液及 RO 水以 121 °C 高壓滅菌後，與上述配製好之 Stock 溶液依照表三之體積加入容器中。另外，添加有機酸之混合碳源培養基，則分別添加 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸，使培養基中有機酸最終濃度為 10 mM、20 mM 與 40 mM。最後以 HCl 與 NaOH 將配製好的各個培養基調整至相同 pH 值 (pH 約 6.6)，再以 0.22 μm 濾膜過膜至已滅菌之容器中混合均勻。

5. 泳動 (Swimming) 培養基與表面移行 (Swarming) 培養基

為了維持泳動與表面移行培養基條件一致，此類培養基皆需當天配製，以避免水分蒸發影響培養基瓊脂 (Agar) 百分比。其配方同混合碳源培養基 (表三)，唯泳動培養基需添加 0.3% 瓊脂；表面移行培養基則需添加

0.4%瓊脂。將瓊脂與表三中 RO 水混合均勻並以 121 °C高壓滅菌後，將 Stock 溶液與已滅菌之 5X M9 溶液依照表三配方的體積加入僅含瓊脂及水的容器中混合均勻，並將各個培養基以 HCl 與 NaOH 調整至相同 pH 值後 (pH 約 6.6)，以移液管吸取 8 mL 培養基至直徑 5.5 cm 的培養皿，靜置 30 分鐘待其凝固。尚未進行倒盤之培養基可放置於 50°C 培養箱保持溫度，避免培養基凝固。



表三、添加或不添加有機酸的混合碳源 M9 培養基之配方。

Table 3. Formula of the mixed carbon source M9 medium with or without addition of organic acids.

	20% Glc	20% Fru	20% Suc	1 M *Organic acid	0.1 M MgSO ₄	M9 salt 5X solution	RO water	Total volume
mL								
*GFS	0.9	0.9	1.7	-	2	20	74.5	100
GFS + 10 mM Organic acid	0.9	0.9	1.7	1	2	20	73.5	100
GFS + 20 mM Organic acid	0.9	0.9	1.7	2	2	20	72.5	100
GFS + 40 mM Organic acid	0.9	0.9	1.7	4	2	20	70.5	100

*GFS represents the media were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose.

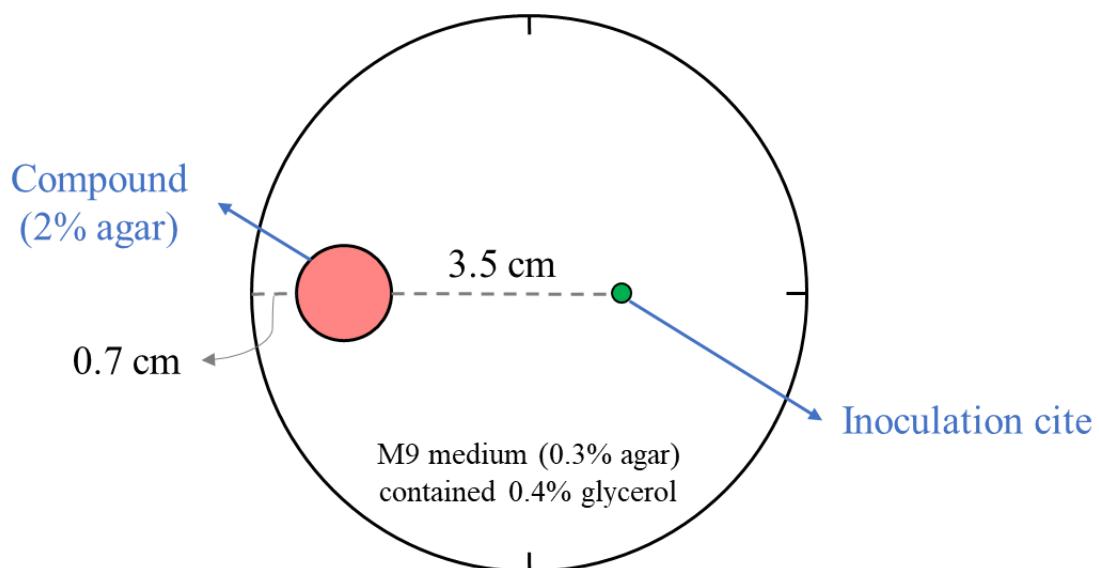
*Organic acid: L-malic acid, citric acid, DL-lactic acid. Organic acid stock solution: pH 4 adjusted using NaOH.

Adjust the pH of all media to 6.6 using HCl or NaOH.



6. 趨化反應培養基

本研究以「單一有機酸」與「混合碳源添加有機酸」作為目標化合物，探討三種有機酸 (L-蘋果酸、檸檬酸、DL-乳酸) 對菌株的趨化反應，以及確認碳源是否具有加乘作用。趨化反應培養基的組成如圖六，直徑為 9 cm 之培養皿，預先印製圖六之紙板，將紙板墊在培養基下方。其配製方法如下，首先配製含有 0.4% 甘油 (glycerol) 的 0.3% 琼脂 1X M9 培養基，以及將單一有機酸化合物 (表四) 或混合碳源添加有機酸之混合物 (表五) 的瓈脂及 RO 水混合後，以高溫高壓滅菌。將醣類、有機酸之 Stock 溶液與滅菌之瓈脂水依照配方配製成含有 2% 琼脂的目標化合物。取 300 μ L 目標化合物至圖六中培養皿所示直徑方位上的位置，待半圓體形狀之目標化合物凝固後，再以移液管取 25 mL 含有 0.4% 甘油的 0.3% 琼脂 1X M9 培養基至培養皿中，M9 培養基需覆蓋目標化合物，靜置 30 分鐘待其凝固。



圖六、趨化反應之培養基。

Figure 6. Chemotaxis response medium.



表四、趨化反應之單一有機酸化合物配方。

Table 4. Formula of single organic acid compound for chemotaxis response.

	1 M Malic acid	1 M Citric acid μL	1 M Lactic acid	Agar g	RO water mL	Total volume
RO water (blank)	-	-	-	0.08	4.00	4
10 mM Malic acid	40	-	-	0.08	3.96	4
10 mM Citric acid	-	40	-	0.08	3.96	4
10 mM Lactic acid	-	-	40	0.08	3.96	4

Organic acid stock solution: pH 4 adjusted using NaOH.



表五、趨化反應之混合碳源添加有機酸之混合物配方。

Table 5. Formula of the mixed carbon source adding organic acid mixture for chemotaxis response.

	20% Glc	20% Fru	20% Suc	1 M Malic acid μL	1 M Citric acid	1 M Lactic acid	Agar g	RO water mL	Total volume mL
RO water (blank)	-	-	-	-	-	-	0.08	4.00	4
*GFS	36	36	68	-	-	-	0.08	3.86	4
GFS + 10 mM Malic acid	36	36	68	40	-	-	0.08	3.82	4
GFS + 10 mM Citric acid	36	36	68	-	40	-	0.08	3.82	4
GFS + 10 mM Lactic acid	36	36	68	-	-	40	0.08	3.82	4

*GFS represents the media were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose.

Organic acid stock solution: pH 4 adjusted using NaOH.

7. 0.1% Crystal violet (結晶紫)

結晶紫溶液需避光，因此配製於棕色血清瓶。精秤 1 g 結晶紫粉末，加入 1 L 二次水，以磁石攪拌至隔夜。配製好的 0.1% crystal violet 於測定生物膜前，取所需用量過濾膜 (0.45 μm filter) 至 50 mL 離心管 (鋁箔紙包覆以避光)。

8. 33%冰醋酸

配製於 50 mL 離心管，於抽風櫃中取 16 mL 醋酸至 32 mL 滅菌水 32 mL 並混合均勻。

9. 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)

其配方如表六，配製並攪拌均勻後滅菌。

表六、PBS 之配方。

Table 6. Formula of PBS.

Material	Content
KH_2PO_4	0.2 g
NaCl	8.01 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.15 g
RO water	1 L

10. 50X TAE buffer

預先配製 0.5M EDTA-2Na，其配方為 9.306 g 之 EDTA-2Na 以 NaOH 溶液溶解，並將 pH 值調整至 8.0，再補 RO 水至總體積為 50 mL，並過 0.45 μm 濾膜。50X TAE buffer 配方為 121.14 g TRIS powder 以部分 RO 水溶解，再依序加入 28.5 mL 醋酸以及 10 mL 0.5M EDTA-2Na (pH 8.0)，混合均勻後，以 500 mL 定量瓶補 RO 水至標線並混合均勻。

11. 0.8X TAE buffer

將 16 mL 的 50X TAE buffer 加入 1 L 的 RO 水，並混合均勻。

12. 0.1% DEPC 水

1 mL Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 加入 1 L RO 水，以磁石攪拌約兩

小時至無氣泡產生，再以 121°C 高壓滅菌。



五、儀器與設備

5. 超純水製造機 (ultra-pure water purifier), PPII-15UV, 由 ELGA Lab Water 公司 (High Wycombe, H.K.) 製造。
6. 加熱磁攪拌器(hotplate stirrer), HTS-1003, 購自 LMS (Leuven, Belgium)。
7. 高壓滅菌釜 (autoclave), TM-328, 購自東明儀器有限公司 (台灣)。
8. 電子天平 (electronic balance), Adventurer ARB120, 精密度 0.01 g, 購自 Ohaus 製造；分析天平 (analytical balance), ER180A, 精密度 0.01 g, 購自 A&D Scientech 公司 (東京, 日本)。
9. 無菌操作台 (laminar flow), Model 4T, 購自燭安儀器有限公司 (台灣)。
10. 恆溫培養箱 (incubator), LE-519; 震蕩培養箱(orbital shaker), TS- 400P/F/T, 購自需環實業有限公司 (台灣)。
11. 震蕩機 (vortex), MS-P2626,MS-NOR, 購自利政科技股份有限公司 (桃園市, 台灣)。
12. 分光光度計 (spectrophotometer), Biomate 3S, 購自 Thermo Fisher Scientific (San Jose, Canada, U.S.A)。
13. 桌上型離心機, Model5804, 購自 Eppendorf (Hamburg, Germany)；高速離心機, Legend Micro 17, 購自 Thermo Fisher Scientific (San Jose, Canada, U.S.A)。
14. 4 °C 冰櫃, KCCO2, TSK；-30 °C 冷凍櫃, MDF-U537, -80 °C 冷凍櫃, MDF-U54V, 均購自三洋電機有限公司 (Osaka, Japan)。
15. 酸鹼度計 (pH meter), Model 6173, 購自任氏電子工業股份有限公司 (台北, 台灣)。
16. 鐵胃均質機, Masticator, 購自今日儀器股份有限公司 (新北市, 台灣)。
17. 均質攪拌器, Imperial 10-Speed Blender, 購自 Osterizer (U.S.A)。
18. 全自動影像分析儀, Symbiosis ProtoCOL3, 購自 Synoptics Ltd. (Cambridge, England)。
19. ELISA reader, Synergy HT, 購自 Biotek (Vermont, U.S.A)。
20. 微量分光光度計, Thermo-NanoDrop 1000, 購自 Thermo Fisher Scientific

(San Jose, Canada, U.S.A.)。

21. PCR 溫度控制器 (PCR thermal cycler) , My cycleTM , 購自 BIO-RAD (California, U.S.A.)。
22. 電泳槽 (electrophoresis system) , Mini-PROTEAN 及 Mupid-2plus 分別購自 BIO-RAD (California, U.S.A.) 及 ADVANCE (Tokyo, Japan)。
23. 紫外線攝影系統 (UV image system) , DGIS-8 , 購自 Digigel (California, U.S.A.)。
24. StepOnePlus™ 即時聚合酶鏈鎖反應儀 (RT-PCR system) , 購自 Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, U.S.A)。

六、套裝軟體

IBM SPSS Statistics 22、Paint.net 4.0.16. (繪圖軟體)、GenScript Bioinformatics Tools (引子設計)

第二節、實驗方法

一、截切小黃瓜之接菌試驗

自冷凍保存管中取 *E. mori* FS08 之碎冰培養於 4 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養隔夜 (約 16 小時)。隔日將菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ 加入 5 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養 1.5 小時進行活化。

將清潔乾淨之刀具、尺、鐵盤及無菌培養皿 (直徑 9 cm) 以 70% 酒精噴拭後，放入無菌操作台中，以 UV 光照 1 小時進行殺菌。將新鮮的完整小黃瓜以 RO 水搓洗 20 秒，以紙巾擦拭乾淨，再以 70% 酒精噴拭後，放入無菌操作台中。將小黃瓜以每 5 mm 的厚度進行截切，每片小黃瓜約 3.5 g，小黃瓜切片平均分配於培養皿中 (來自同一根小黃瓜之切片會平均分配於各個時間點)，將所有小黃瓜切片以 UV 光照 30 分鐘進行殺菌。

活化後的菌液測定其 OD_{600nm} ，將菌液調整至 10^7 CFU/mL (*E. mori* FS08 每 1 OD_{600nm} 相當於 $1.63 \pm 0.45 \times 10^9$ CFU)，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至 1 mL 已滅菌之 0.85% NaCl 溶液。本實驗分為接菌組和對照組，接菌組在每片小黃瓜切片中心點接種 10 μ L 含 10^7 CFU/mL 的 *E. mori* FS08 菌液；對照組則接種 10 μ L 已滅菌的 0.85% NaCl 溶液。小黃瓜切片接種後，於 30 °C 培養

0、4、8、24、48、72 及 96 小時，於各個時間點進行品質指標測定。

二、小黃瓜品質指標測定

1. 小黃瓜外觀變化

於各個時間點使用全自動影像分析儀拍攝接菌組 (接種 *E. mori* FS08) 及對照組 (接種已滅菌之 0.85% NaCl) 之小黃瓜切片接種表面外觀。

2. 總生菌數

將鑷子、含濾網之鐵胃均質袋、封口夾、電子秤以及塑膠圓筒以 70% 酒精噴拭後放入無菌操作台，將鐵胃均質袋套入塑膠圓桶穩固袋子後，置於電子秤上並扣重。於無菌操作台中，將各個時間點接菌組及對照組之小黃瓜切片以鑷子取出，分別取 25 g 至鐵胃均質袋中，並加入已滅菌之 0.85% NaCl 溶液至 250 g，以封口夾確保袋子密封後，使用鐵胃均質機拍打 2 分鐘，將濾液再經過十倍序列稀釋後，取各個稀釋倍數之 100 μ L 菌液塗盤於平板計數培養基 (Plate count agar, PCA)，於 30 °C 倒置培養 1 至 2 天後，計算總生菌數。

3. 小黃瓜樣品前處理

將各個時間點接菌組及對照組之小黃瓜切片以鑷子取出 50 g 至均質攪拌器，再加入同等重量之 95% 酒精，以均質攪拌器攪碎 30 秒後，分裝至 50 mL 離心管並以 5000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液儲存於-30 °C 冰箱，該萃取液供後續化學分析使用。

4. 醣類含量分析

小黃瓜萃取液之醣類以 Sucrose / D-Fructose / D-Glucose Assay Kit 分析，依據廠商說明書進行小黃瓜樣品萃取液之定量，樣品萃取液視情況需稀釋約 20 倍。其原理如下：於 pH 7.6 下，六碳糖激酶 (hexokinase, HK) 會催化 D-葡萄糖產生葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, G-6-P)；D-果糖則被 HK 催化產生果糖-6-磷酸 (fructose-6-phosphate, F-6-P)，F-6-P 可進一步被磷酸葡萄糖異構酶 (phosphoglucose isomerase, PGI) 轉換成 G-6-P。再透過葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6P-DH) 使 G-6-P 與 NADP⁺反應產生葡萄糖酸-6-磷酸 (gluconate-6-phosphate) 及 NADPH。因此於添加 PGI 前，測定 340nm 吸光值定量 NADPH 可以獲得

D-葡萄糖含量；定量添加 PGI 前、後 NADPH 的差值則可以獲得 D-果糖含量。另外，於 pH 4.6 下，蔗糖會被 β 果糖苷酶 (β -fructosidase) 水解成 D-葡萄糖及 D-蔗糖，因此藉由測定 β 果糖苷酶水解前後 D-葡萄糖含量，計算差值可以獲得蔗糖含量。

5. 有機酸含量分析

(1) L-蘋果酸檢測

小黃瓜萃取液之 L-蘋果酸以 L-Malic acid (Liquid Ready Reagents) Assay Kit 分析，依據廠商說明書進行小黃瓜樣品萃取液之定量，樣品萃取液視情況需稀釋約 60 倍。其原理如下：L-蘋果酸脫氫酶 (L-malate dehydrogenase, L-MDH) 催化 L-蘋果酸與 NAD^+ 反應產生草醯乙酸 (oxaloacetate)、 NADH 與 H^+ ，然而上述反應為可逆反應，因此需進一步以麩胺酸-草醯乙酸轉氨酶 (glutamate-oxaloacetate transaminase) 將草醯乙酸和 L-麩胺酸 (L-glutamate) 反應產生 L-天門冬氨酸 (L-aspartate) 與 2-酮戊二酸 (2-oxoglutarate)，防止逆反應發生。最後測定 340 nm 吸光值定量 NADPH 可以獲得 L-蘋果酸含量。

(2) 檸檬酸檢測

小黃瓜萃取液之檸檬酸以 Citric acid Assay Kit 分析，依據廠商說明書進行小黃瓜樣品萃取液之定量，樣品萃取液視情況需稀釋約 10 倍。其原理如下：檸檬酸會被檸檬酸裂解酶 (citrate lyase, CL) 催化產生草醯乙酸及乙酸 (acetate)。草醯乙酸與 NADH 經 L-蘋果酸脫氫酶催化會產生 L-蘋果酸 (L-malate) 與 NAD^+ 。若樣品中存在草醯乙酸脫羧酶 (oxaloacetate decarboxylase)，會使部分草醯乙酸被催化產生丙酮酸 (Pyruvate)，導致檸檬酸含量低估。因此需額外添加 D-乳酸脫氫酶 (D-lactate dehydrogenase, D-LDH)，使丙酮酸與 NADH 完整被消耗產生 D-乳酸 (D-lactate) 及 NAD^+ 。最後測定 NADH 於 340nm 波長下減少之吸光值可以獲得檸檬酸含量。

(3) D-乳酸檢測

小黃瓜萃取液之 D-乳酸以 D-Lactic acid Assay Kit 分析，依據廠商說明書進行小黃瓜樣品萃取液之定量。其原理如下：D-乳酸在 NAD^+

存在下，被 D-乳酸脫氫酶 (D-lactate dehydrogenase, D-LDH) 氧化為丙酮酸並產生 NADH。但上述反應傾向於逆反應，因此需要進一步以 D-谷氨酸-丙酮酸轉氨酶 (D-glutamate-pyruvate transaminase, D-GPT) 使丙酮酸與過量的 D-谷氨酸 (D-glutamate) 轉化為 D-丙氨酸 (D-alanine) 和 2-酮戊二酸。最後測定 NADH 於 340nm 波長下增加之吸光值可以獲得 D-乳酸含量。

(4) L-乳酸檢測

小黃瓜萃取液之 L-乳酸以 L-Lactic acid Assay Kit 分析，此商業套組之步驟與原理皆與 D-乳酸檢測相同，僅 D-乳酸脫氫酶改由 L-乳酸脫氫酶 (L-LDH) 進行反應。

6. pH 值

以 pH 7.0 及 pH 4.0 之校正液校正 pH meter 後，檢測各個時間點接菌組及對照組萃取液之 pH 值，記錄 pH meter 穩定後的數值。

7. 可滴定酸之測定

預先配製 0.05 N 氢氧化鈉溶液與 0.5% 酚酞指示劑 (溶於 95% 乙醇)。每次實驗皆需將 0.05 N 氢氧化鈉溶液標定後使用，其標定方法為精秤 0.05 g 鄰苯二甲酸氫鉀 (KHP) 並加入 50 mL 二次水，再以滴管加入 3 滴 0.5% 酚酞，以氫氧化鈉溶液滴定，記錄滴定至液體呈粉色前、後氫氧化鈉溶液之體積，並計算氫氧化鈉濃度 (N) 與力價 (f)，其公式如下：

$$\text{氫氧化鈉當量濃度}(N) = \frac{\text{KHP 重量}/\text{KHP 克當量}}{\text{滴定達當量點之體積}(L)} ; \text{ 力價}(f) = \frac{\text{氫氧化鈉當量濃度}(N)}{\text{欲配製濃度}(0.05 \text{ N})}$$

樣品可滴定酸檢驗方法為取 10 mL 小黃瓜萃取液於錐形瓶中作為樣品組，而空白組則為 10 mL 95% 乙醇。所有組別皆加入 3 滴 0.5% 酚酞指示劑，以氫氧化鈉溶液滴定至呈粉色為滴定終點，記錄滴定毫升數，計算含量及回收率。計算方式如下：

$$\text{有機酸含量}(\%) = \frac{(A-B) \times 0.1 \times f}{w} \times 100$$

A = 樣品滴定時所消耗之氫氧化鈉體積 (mL)

B = 空白組滴定時所消耗之氫氧化鈉體積 (mL)

f = 0.05 N 氢氧化鈉溶液之力價

O.A=1 mL 0.05N NaOH 溶液相當於多少 g 有機酸含量
(蘋果酸:0.067×0.05=0.00335)

$$W = \text{試驗之重量}(g) [= \frac{10}{100} \times 50 \text{ g}]$$



三、菌株特性分析

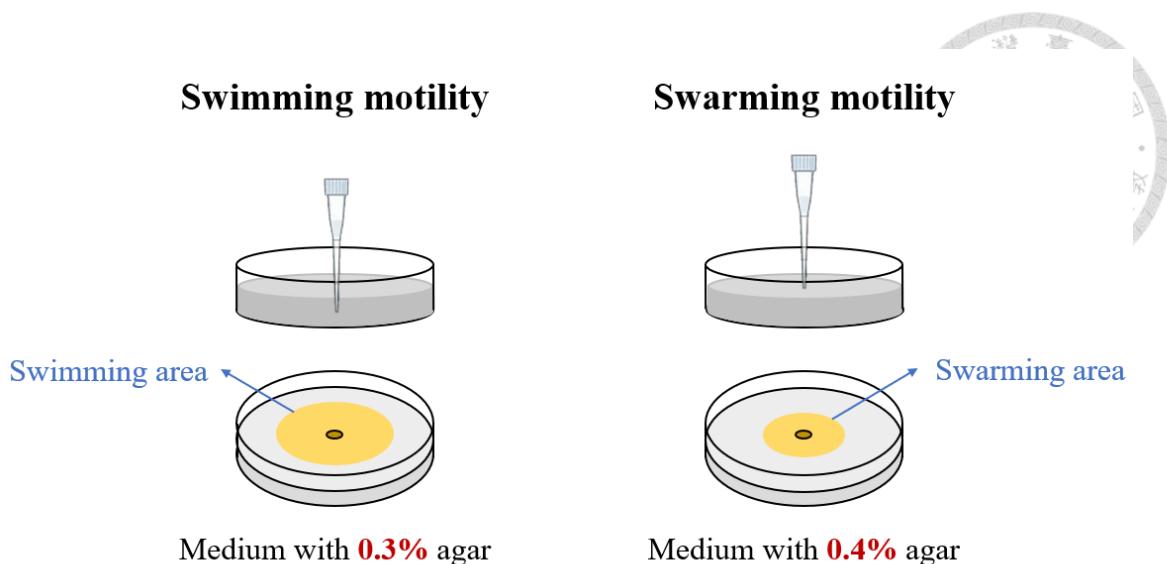
為避免重複論述，所有菌株特性分析之菌液製備與培養條件統一說明如下：自冷凍保存管中取菌培養於 4 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養隔夜 (約 16 小時)。隔日將菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ 加入 5 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養 1.5 小時進行活化，活化後的菌液供後續實驗稀釋使用。

1. 生長曲線

將活化後的菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ ，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至 8 mL 「未添加」或「添加」不同有機酸 (L-蘋果酸、檸檬酸、DL-乳酸) 之混合碳源培養基，測定此時間點 (0 小時) 之 OD_{600nm} 並記錄，菌液持續於 30 °C 或 37 °C 以 200 rpm 培養。接續測定 2、4、6、8、10 以及 24 小時之 OD_{600nm} 。此外，於 0、6 及 24 小時測定活菌數，將菌液十倍序列稀釋後，塗盤於平板計數培養基 (Plate count agar, PCA)，於 30 °C 培養箱倒置培養 1 天後進行計數。

2. 泳動能力 (Swimming motility) 與表面移行能力 (Swarming motility)

泳動能力與表面移行能力試驗差異如圖七所示。添加或不添加有機酸之混合碳源 M9 培養基 (含瓊脂) 需當天滅菌與配製，並且將各個泳動能力或表面移行培養基調整至相同 pH 值後，以移液管吸取 8 mL 培養基至 5.5 cm 培養皿，靜置 30 分鐘待其凝固。將活化後的菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ ，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至 1 mL 滅菌水。其中泳動能力實驗取 1.5 μL 菌液「穿刺接種」於含有 0.3% 瓊脂的培養基「內部」中心點；表面移行能力實驗則是取 1.5 μL 菌液，點在含有 0.4% 瓊脂的培養基「表面」中心點。接菌後於 30 °C 或 37 °C 正置培養 18、24 與 48 小時，其中泳動能力實驗為測量菌落擴散後之圓形直徑；表面移行能力則拍照記錄菌落擴散生長的面積，以 Paint.net 4.0.16 分別框選出菌落及培養皿面積，將菌落面積除以培養皿面積，得到表面移行百分比。

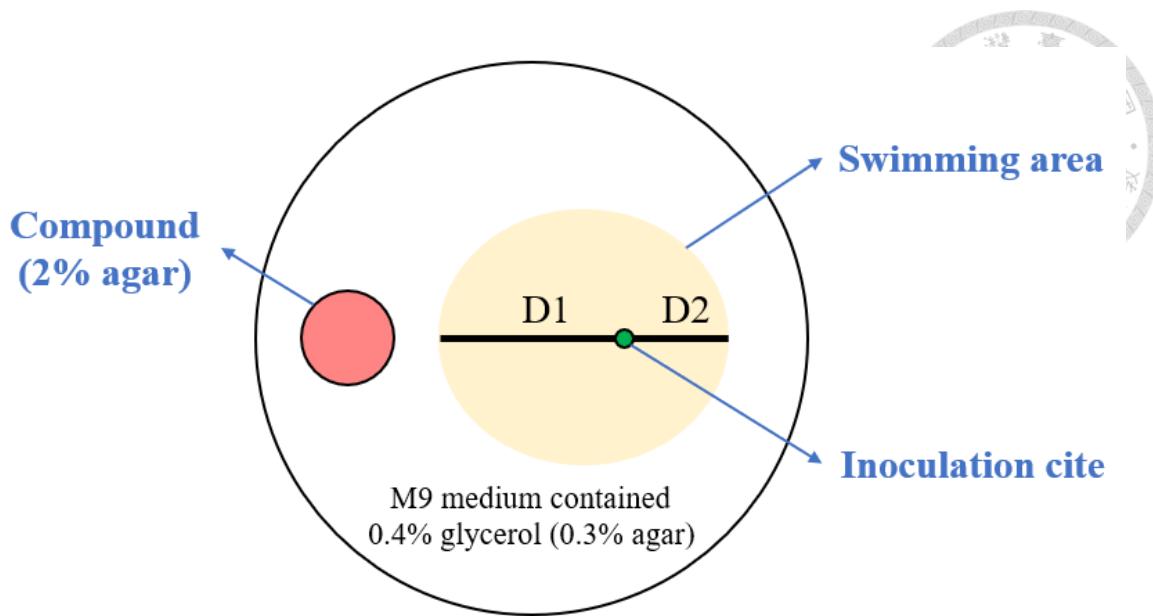


圖七、泳動能力與表面移行能力試驗。

Figure 7. Swimming motility and swarming motility experiments.

3. 趨化反應試驗

趨化反應培養基之目標化合物配置於培養基左側，菌株則接菌於右側。將活化後的菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ ，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至 1 mL 減菌水。預先印製圖六之紙板，將紙板墊在培養基下方，取 1.5 μL 菌液穿刺接種於趨化反應培養基圖六的位置（距離目標化合物 3.5 cm 處），正置培養於 30 °C。培養至 24 及 42 小時，菌株會由接菌位點往外擴散產生泳動菌落（圖八）。測量 D1 及 D2 距離，D1 為從接菌位點至最接近目標化合物的菌落邊緣之距離；D2 為從接種位點到離目標化合物最遠的菌落邊緣之距離。最後，計算反應指數 (RI, response index) 作為判斷引誘劑或趨避劑之依據，其公式如下： $RI = D1 / (D1 + D2)$ ，RI 值大於 0.52 表示存在引誘劑反應，小於 0.48 則視為趨避劑反應 (Guo et al., 2023; Zhang et al., 2019)。



圖八、趨化反應試驗示意圖。

Figure 8. Schematic diagram of chemotaxis response experiment.

4. 生物膜形成能力與浮游態細胞生長狀況

將活化後的菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ ，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至「未添加」或「添加」不同有機酸 (L-蘋果酸、檸檬酸、DL-乳酸) 之混合碳源培養基。於 96 孔盤最外圈皆加入 200 μL 的滅菌水 (可減緩內圈菌液蒸發)，將 130 μL 未接菌之培養基 (blank) 以及 130 μL 回溶至混合碳源添加不同有機酸培養基的菌液，分別加入 96 孔盤中，菌液為三重複並且每一重複會接菌 6 個孔。接完菌後，將 96 孔盤置於 30 $^{\circ}C$ 培養箱，培養 24、48 與 72 小時後，以結晶紫染色法進行生物膜的定量。

以拭鏡紙取出 96 孔盤，注意底部避免碰到指紋。將樣品上層液取出並轉移至新的 96 孔盤，以微量盤分光光度計 (ELISA reader) 測定 OD_{600nm} 讀值，作為浮游態細胞生長狀況之數據。接著將含有生物膜的 96 孔盤外圈滅菌水移除，於每個孔加入 200 μL 已滅菌之 PBS 緩衝溶液，再移除溶液並將 96 孔盤於試鏡紙上倒扣以扣乾液體，將 96 孔盤連帶拭淨紙置於 50 $^{\circ}C$ 烘乾 15 分鐘。確認無液體殘留後，於每個孔加入 150 μL 的 0.1% 結晶紫，避光 5 分鐘。將結晶紫移除後，加入 400 μL 無菌水再移除，總共以無菌水清洗三次，再放入 50 $^{\circ}C$ 烘乾 15 分鐘。加入 200 μL 的 33% 冰醋酸，

以 1000 rpm 震盪 1 分鐘，混均勻後以微量盤分光光度計 (ELISA reader) 測定 OD_{570nm} 讀值，作為生物膜定量之數據。



四、基因表現量分析 (qPCR)

本研究以即時聚合酶連鎖反應 (qPCR) 確認有機酸對 *E. mori* FS08 運動性相關基因表現量之影響。探討的基因如表七所示，針對這些特定基因設計之引子對如表八。各基因之引子組別會與 NCBI 資料庫中 *Enterobacter mori* ACYC.E9L (NCBI Taxonomy ID 539813) 之基因序列進行比對，其結果參照表八。

1. 確認引子效率

進行基因表現量分析前，需先確認引子之專一性及引子效率。首先進行 *E. mori* FS08 的 DNA 萃取，步驟如下：自凍管養菌於 4 mL TSB，培養隔夜後，取 1.5 ml 菌液至離心管，以 13300 rpm 離心 30 秒，倒掉上清液。加入 200 μ L 裂解緩衝液 (lysis buffer) 將細胞沉澱物打散，取適量玻璃珠加入離心管。再加入 200 μ L 的苯酚-氯仿，劇烈震盪 2 分 30 秒 (去除蛋白質)。加入 250 μ l 的無菌水，以 13300 rpm 離心 5 分鐘。取上層液 200 μ L 至新的離心管，加入 1 μ L RNase 頂倒翻覆搖動 (去除 RNA)。放入 37 °C 培養箱 40 分鐘。再加入 200 μ L 苯酚-氯仿，震盪後以 13300 rpm 離心 5 分鐘，取上層液 100 μ L 至新的離心管。加入 2 倍體積 100% 酒精 (200 μ L) 與 0.1 倍體積 3M NaOAc (10 μ L)，置放於-30 °C 冰箱 20 分鐘 (DNA 沉澱)。以 13300 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上層液。以 1 mL 冰 70% 酒精沖洗，以 13300 rpm 離心 1 分鐘，倒掉上層液，再重複沖洗一次 (去除苯酚等試劑)。於 50 °C 烘乾 15 分鐘。加入 30 μ L 無菌水，將 DNA 混勻後，以 Nanodrop 測定 DNA 濃度 (260/280 比值應大於 1.8；260/230 比值落在 1.8~2.2 之間)。

將 *E. mori* FS08 之 DNA 濃度序列稀釋為 10、1、0.1、0.01、0.001 ng/ μ L，再以 qPCR 偵測此五個 DNA 濃度下各個基因的 Ct 值，並製作標準曲線 (Ct 值作為 y 軸；DNA 濃度取 log 值作為 x 軸)，以確認引子效率。



表七、本研究中即時聚合酶連鎖反應使用之基因列表。

Table 7. List of genes used in this study for qPCR.

Genes	Description	Reference
<i>rpoB</i>	Beta-subunit of RNA polymerase	Adékambi et al., 2009
<i>fliC</i>	Flagellar protein	Sun et al., 2022
<i>flgM</i>	Regulator of flagellin synthesis	Meng et al., 2020
<i>motA</i>	Flagellar motor protein	Baker and O'Toole, 2017
<i>motB</i>		
<i>cheA</i>	Chemotaxis protein (histidine protein kinase)	Aroney et al., 2021



表八、本研究中即時聚合酶連鎖反應基因表現量測定設計之引子序列。

Table 8. List of primers used in this study for qPCR gene expression assays.

Genes	Species	Primer sequences (5'-3')		Tm (°C)	Amplicon size (bp)
		Forward	Reverse		
<i>rpoB</i>	<i>E. mori</i> FS08	ACTACGTTATCGCTCAGGCG	ATCAGCACCGCAGAGTTGGAA	56.09 / 54.72	251
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	-----		
<i>fliC</i>	<i>E. mori</i> FS08	GACGGTATCTCTCTGGCACA	GGATACGCGGTCGATTCAG	55.96 / 56.04	174
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	A -----		
<i>flgM</i>	<i>E. mori</i> FS08	GTACAACCTCGCGAAACGAA	CGCTTCAACACAGTTCCATGT	56.03 / 56.55	153
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	-----		
<i>motA</i>	<i>E. mori</i> FS08	TTCGCCAGCTATCCACGTAT	CGTGGGTTTCGATCTCTCG	56.02 / 55.89	136
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	-----		
<i>motB</i>	<i>E. mori</i> FS08	AGCGGTGAGAAGGGATACAG	CTGATACGACGGTTGATGGC	55.93 / 55.94	176
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	-----		
<i>cheA</i>	<i>E. mori</i> FS08	AGCTGATTAACCTCGTCGGT	TGTAACTGACCCATGCTGGT	55.87 / 55.93	115
	<i>E. mori</i> ACYC.E9L	-----	-----		

*灰色部分為與 NCBI 資料庫中的 *Enterobacter mori* (NCBI Taxonomy ID 539813)

2. L-蘋果酸與檸檬酸對 *E. mori* FS08 基因表現量分析

(1) 收樣品

自冷凍保存管中取菌培養於 4 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養隔夜 (約 16 小時)。隔日將菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ 加入 5 mL TSB 培養基，於 30 °C 以 200 rpm 培養 1.5 小時進行活化，將活化後的菌液調整至 $OD_{600nm} = 0.1$ ，離心並去除 TSB 上清液後，回溶至 8 mL 添加或不添加有機酸 (L-蘋果酸或檸檬酸) 的混合碳源 M9 培養基，培養基中 L-蘋果酸濃度為 40 mM，檸檬酸濃度則為 10 mM，並將所有培養基皆調整至 pH 6.6。將菌液於 30 °C 以 200 rpm 培養。收樣之時間點為 0、1.5、3 與 4.5 小時 (約為 *E. mori* FS08 對數生長期之前中後階段)。於各個時間點將菌液轉成 1×10^9 CFU 菌量 (*E. mori* FS08 每 1 OD_{600nm} 相當於 $1.63 \pm 0.45 \times 10^9$ CFU)，換算後取菌液至 1.5 mL 離心管，以 13300 rpm 離心 1 分鐘，並去除上清液。再以 1 mL 無菌水回溶，以 13300 rpm 離心 1 分鐘，並去除上清液，將細胞沉澱物急速冷凍並儲存於 -80 °C。

(2) 萃取 RNA

預先配製含有溶菌酶的細菌裂解緩衝液 (Bacterial lysis buffer containing LysozymeTM)：精秤 10 mg 溶菌酶粉末，再加入 1 mL 細菌裂解緩衝液混合均勻。取出保存於 -80 °C 之細胞沉澱物樣品，加入 100 μ L 含有溶菌酶的細菌裂解緩衝液混合均勻，並劇烈震盪 5 分鐘後，於冰桶上靜置 5 分鐘，接著依照 GenezolTM TriRNA Pure Kit 之步驟萃取 Total RNA。萃取後之 RNA 以 Nanodrop 檢測其吸光度並記錄濃度 (sample type: RNA-40, A260/280: 1.8~2.0, A260/230: close to 2.0)。將樣品急速冷凍並儲存於 -80 °C 冰箱。

(3) 降解 DNA (DNA digestion)

依照表九之比例取 RNA 樣品並加入其他試劑，於 37 °C 反應 30 分鐘後，再加入 1 μ L 50 mM EDTA 於 65 °C 反應 10 分鐘，以終止 Dnase I 反應。



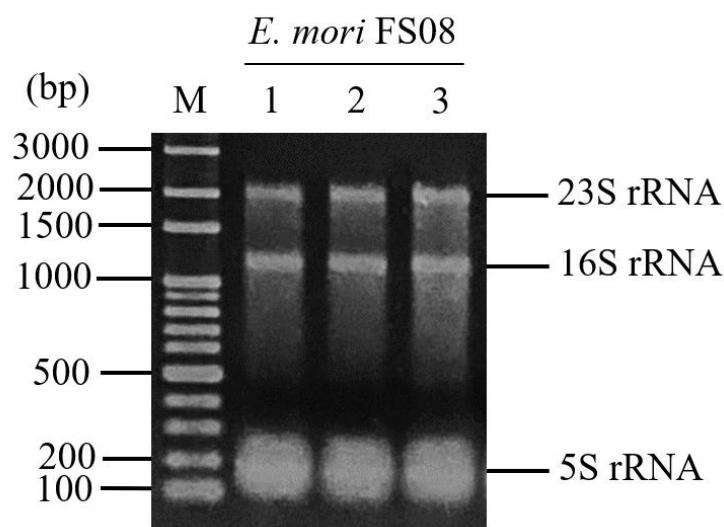
表九、降解 DNA 之試劑反應體積。

Table 9. Reagents reaction volume of DNA digestion.

Reagents	Volume
RNA sample	1000 ng
10X reaction buffer with MgCl ₂	1 μ L
Dnase I (Thermo)	1 μ L
DEPC water	to 10 μ L

(4) 確認 RNA 完整性且不存在 DNA 污染

將製膠盤、齒梳、鑄膠盤皆用 RNase Out 噴霧擦拭，並進行製膠 (膠片配方：1.5% Agarose 加入 DEPC-water 0.8X TAE buffer)，待其凝固。將 8 μ L 2x RNA Loading Dye 加入 8 μ L 已降解 DNA 的 RNA 樣品中並混合均勻，於 70 °C反應 10 分鐘。將 100 bp DNA Ladder 取 3 μ L、樣品取 16 μ L 注入膠片，使用 DEPC-water 0.8X TAE buffer 進行膠體電泳 (Voltage Full, 30 分鐘)。將膠片以 EtBr 染色 10 分鐘並退染 5 分鐘後，以紫外光電泳照膠台檢測 23S、16S 與 5S rRNA 條帶完整性 (圖九)。



圖九、*E. mori* FS08 之 RNA 膠體電泳圖。

Figure 9. 1.5% agarose gel electrophoresis of the total RNA extracted from *E. mori* FS08 of three replicates. M: 100 bp DNA Ladder.

(5) 逆轉錄 (Reverse transcription)

以 Nanodrop 檢測降解 DNA 後之 RNA 樣品濃度。取 4 μ L 的樣品 (約 350 ng 的 RNA)，加入 DEPC-water 使總體積為 9 μ L，再加入 2.5 μ L random hexamer，於 70 °C 反應 3 分鐘。反應後將樣品放入冰桶。接著製備表十之混合試劑 (可依比例放大)，取 8 μ L 至上述樣品中，再加入 0.5 μ L 逆轉錄酶 (Reverse Transcriptase) 混合均勻。隨後的反應條件如下：42°C / 60 分鐘與 70°C / 15 分鐘，反應後之 cDNA 樣品儲存於-30 °C 冰箱。

表十、逆轉錄混合試劑之配製。

Table 10. Master mix for reverse transcription.

Reagents	Volume
5x First-Strand Buffer	4 μ L
dNTP Mix	2 μ L
100 mM DTT	2 μ L

(6) 即時聚合酶連鎖反應 (qPCR)

將 cDNA 濃度以 DEPC-water 稀釋至 5 ng/ μ L。將表十一試劑依所需比例放大並加入 eppendorf 製備 Master mix。取 15 μ L Master mix 至 RT-PCR tube，再將 Water nuclease-free (blank) 5 μ L 與 cDNA (5 ng/ μ L) 5 μ L 分別加入，最後進行 qPCR，其反應溫度與時間條件如表十二。

表十一、即時聚合酶連鎖反應之混合試劑。

Table 11. Master mix for qPCR.

Reagents	Volume
SYBR green	10 μ l
Primer A (10 μ l)	0.2 μ l
Primer B (10 μ l)	0.2 μ l
Water nuclease-free	4.6 μ l

表十二、即時聚合酶連鎖反應之反應溫度與時間。

Table 12. qPCR reaction temperature and time.

Holding	Cycling *40		Melt curve		
95°C	95°C	60°C	95°C	60°C (0.3°C)	95°C
1:00	00:10	00:30	00:15	1:00	00:15

五、轉錄組分析 (RNA-sequencing, RNA-seq)

本研究進一步透過 RNA-sequencing，了解 L-蘋果酸與檸檬酸如何調控 *E. mori* FS08 的整個轉錄組。根據 qPCR 基因表現量分析結果，選擇在添加或不添加有機酸之混合碳源 M9 培養基中，0 小時之細胞以及於 30 °C / 200 rpm 培養 1.5 小時之細胞進行轉錄組分析。

1. RNA 樣品製備

首先，以下四個步驟同「四、基因表現量分析 (qPCR)」所描述之方法。*E. mori* FS08 經過 (1) 培養、(2) 收樣、(3) 萃取 RNA、(4) 降解 DNA 後，此 RNA 樣品需依照 RNA Cleanup Kit (PR050) 廠商提供之說明書進行 RNA 純化，並以 Nanodrop 測定樣品濃度，確保 RNA 品質 (260/280 與 260/230 ≥ 1.8)。

另外，透過膠體電泳確認純化後的 RNA 完整性且不存在 DNA 污染。

2. 文庫製備 (Library preparation)

文庫製備則是依照 Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit (R3000) 之說明書進行。文庫製備後，以 Nanodrop 測定樣品濃度，並將樣品送至台基盟生科技股份有限公司，協助以微流體電泳分析儀 (Bioanalyzer) 進行文庫質量控制 (QC) 檢測。

微流體電泳分析儀 (Bioanalyzer) 之原理及結果判讀依據如下：樣品通過電泳在微小通道中移動，根據分子大小和電荷不同而分離。分離後之樣品通過激光或紫外光源進行檢測，並生成電泳圖譜，圖譜的 X 軸通常表示片段大小 (以 bp 為單位)，Y 軸表示信號強度 (濃度)。每個峰值代表樣品中的一種片段。峰值的大小反應該片段的濃度。理想的文庫應該有一個明確的主要峰值，代表文庫的主要片段大小。如果存在多個不應有的峰值，可能表示文庫中有污染或非特異性產物。典型的文庫平均片段大小範圍為 250 bp 至 1.5 kb (產量和大小分佈可能會有所不同，具體取決於輸入 RNA 的數量、品質和來源以及 PCR



cycle 的數量)。

3. RNA 定序 (RNA-seq) 與轉錄組分析

通過文庫 QC 後，同樣由台基盟生技股份有限公司進行 RNA 定序。使用 Novaseq 6000 / X Plus (Illumina) 平台對文庫製備物進行定序。獲得序列後，由中央研究院細胞與個體生物學研究所呂在明技師，協助基因註釋 (Gene annotation) 與主成分分析 (Principal components analysis, PCA)，使用 DEseq2 分析兩個樣本之間的差異表達基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs)。並對於 DEGs 進行 GO (Gene Ontology) 與 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 分析。另外，亦採用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 進行分析。以下將詳細說明這些分析方法。

(1) 主成分分析 (Principal components analysis, PCA)

一組轉錄組數據，每一個檢測到的基因都有一個表達量數值，所有基因的表達量都在二維空間中轉化為一組向量。PCA 是一種將這種高維度數據降維和模式識別的統計方法。轉錄組學中，PCA 圖可以幫助我們理解樣本之間的相似性和差異性。PCA 圖中的 X 軸和 Y 軸分別代表第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2)。主成分 (Principal Components, PCs) 是通過對原始數據進行線性變換得到的，這些變換使得數據在新的坐標系中具有最大的變異性。PC1 捕捉到數據中最大的變異性，PC2 捕捉到次大的變異性。圖中每個點代表一個樣本，點之間的距離反映了它們在主要變異方向上的相似性或差異性。距離越近，樣本之間越相似；距離越遠，差異越大。主成分變異數的大小表示每個主成分所解釋的總變異比例。變異數的累積百分比越大，所選主成分就越能代表原始數據的整體變異性。一般來說，PC1 和 PC2 的累積變異數至少應該超過 50% 才能說明這兩個主成分能夠較好地反映數據的主要結構。

(2) 差異表達基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs)

DEGs 的定義為基因表現量的平均倍數變化 (fold change, FC) ≥ 2 或 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ ，且具有統計顯著性 ($p \leq 0.05$) 的基因被認為是差異表現基因 (Kafantaris et al., 2021)。DEGs 可用火山圖表示

(Volcano Plot)，使用軟體 DESeq2 中的統計方法進行顯著性檢驗獲得 p 值，X 軸為 \log_2 fold change，Y 軸為 $-\log_{10}(p)$ 。 $\log_2FC \geq 1$ 的為添加有機酸樣本相對於對照樣本（未加酸樣本）表現量上調（upregulation）的基因， $\log_2FC \leq 1$ 表示下調（downregulation）的基因。而校正後的 p 值越小，表示差異越顯著，對應的 $-\log_{10}(p)$ 數值越大。因此，火山途中右上角和左上角的點分別表示表現差異非常顯著的上調基因和下調基因。

(3) GO 與 KEGG 分析

GO 分析是根據資料庫，對菌種基因功能及其產物屬性進行註釋與描述其標準詞彙的方法，主要將基因分為三大類：(1) 分子功能 (Molecular Function, MF)，描述基因產物的分子級功能，例如酵素活性、結合活性等。(2) 生物過程 (Biological Process, BP)，描述基因產物參與的生物學過程，例如細胞分裂、信號傳導等。(3) 細胞組件 (Cellular Component, CC)，描述基因產物所在的細胞或亞細胞位置，例如細胞膜、細胞核等。而每一大類下又包含更多層級且具體的詞彙。GO 分析用於分析和解釋大規模基因表達數據，幫助識別在特定實驗條件下，哪些生物學過程、分子功能或細胞組件是顯著富集的。KEGG 分析提供了基因與基因產物在生物學途徑中的功能關係圖。KEGG 涵蓋多個資料庫，例如 KEGG Pathway (包括代謝途徑、信號途徑和疾病相關途徑的圖譜)、KEGG Orthology (基於基因和蛋白質的功能分類和注釋) 等。兩者的差異為，GO 分析更適合解析基因產物的功能、參與的生物過程和所在的細胞組件；KEGG 分析更適合解析基因和基因產物在代謝和信號途徑中的作用。

(4) GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 分析

上述的分析方法是透過基因表現差異，並根據設定的閾值，如 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且 $p \leq 0.05$ ，篩選出差異表達基因 (DEGs)，這些基因與功能資料庫比對獲得功能富集 (Functional Enrichment) 的資訊。但此方法會忽略掉一些不在設定閾值範圍內的基因。因此，本研究進一步使用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 的分析方法。



GSEA 是根據整體基因表現量進行分析，可以解決表現量差異不顯著但實際上參與調控的基因被忽略的問題。而 GSEA_KEGG 是指在 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫中進行基因集富集分析。GSEA_KEGG 的主要步驟如下：(1) 根據基因表現量變化 (log2 fold change) 對所有基因進行排序。(2) 根據 KEGG 資料庫，選擇感興趣的基因集 (例如群體感應途徑)。(3) 針對每個基因集計算富集分數 (Enrichment Score, ES)，將上述基因排序列表與特定的基因集比對，若基因存在則 ES 加分，反之減分，以評估這些基因集在排序基因列表中的富集程度。(4) 評估 ES 的統計顯著性。

我們用標準化富集分數 (normalized enrichment score, NES) > 1 或 < -1 且 p 值 < 0.05 作為富集閾值 (enrichment thresholds)，用這些標準來判定哪些基因集是顯著富集的。

第五章、結果與討論

第一節、確認 *E. mori* FS08 與截切小黃瓜腐敗之相關性

一、截切小黃瓜之菌數變化

接菌試驗中，將截切小黃瓜分別接種 $10 \mu\text{L}$ 之 *E. mori* FS08 菌液 (接菌組，菌液濃度為 10^7 CFU/mL ，總接菌量為 10^5 CFU) 或 0.85% 氯化鈉溶液 (對照組) 後，放置於 30°C 儲藏 4 天。 30°C 為 *E. mori* 最適生長條件 (Nyjenje et al., 2013; Zhang et al., 2015)。雖然一般市售截切小黃瓜之儲藏溫度約為 7°C ，但為了加速觀察到菌株對小黃瓜之影響，我們仿效行政院衛生福利部食品藥物管理署公告之食品有效日期的間接評估法：加速試驗研究 (accelerated shelf life studies)。提高儲藏溫度以加速小黃瓜樣品的劣化，縮短評估時間。其原理為依據溫度效應 (Q10 effect)，是指溫度每增加 10°C ，其化學或生化的反應速率會提高兩至三倍。

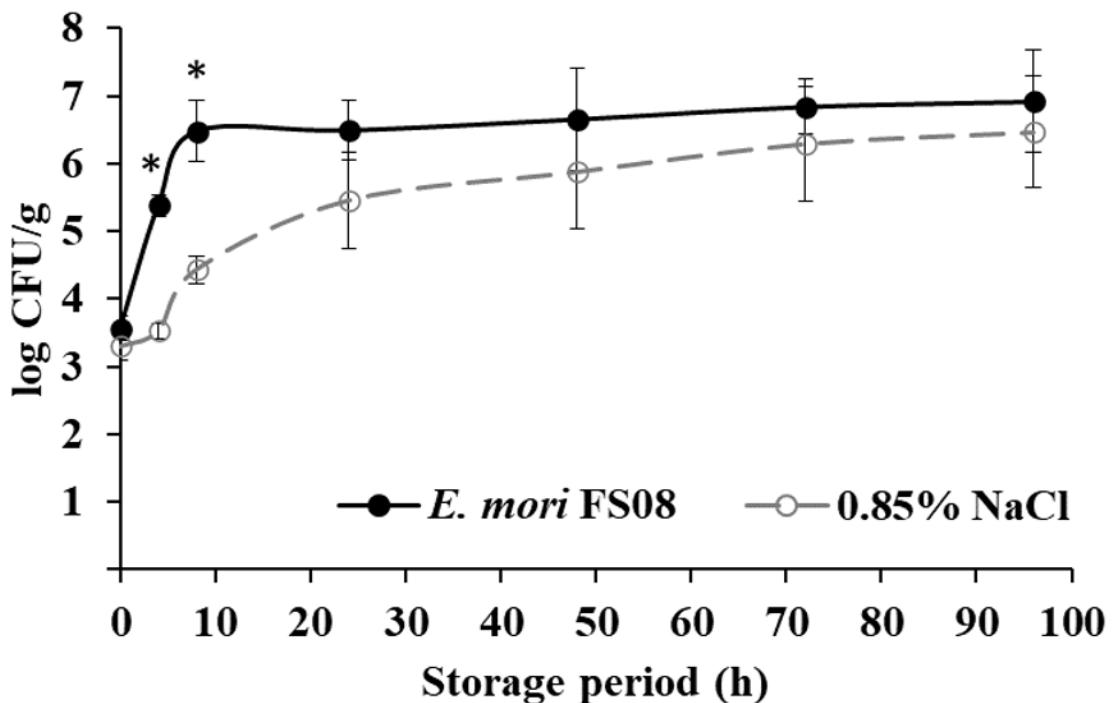
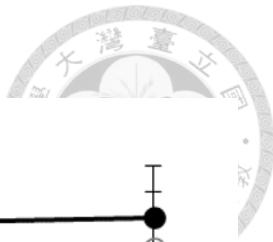
食品中微生物的數量可以顯示食品腐敗的可能性。當總生菌數為 $0 \sim 2 \log \text{CFU/ml}$ 被認為低微生物計數； $3 \sim 4 \log \text{CFU/ml}$ 需輕微關注； $5 \sim 6 \log \text{CFU/ml}$ 已視為高微生物計數；而腐敗的指標為 $7 \log \text{CFU/ml}$ (Fung, 2009)。因此，首先探討隨著儲藏時間截切小黃瓜中總生菌數的變化 (圖十)。接菌組之總生菌數於前 8 小時迅速增加，對照組則於 24 小時前，菌數仍持續增加，此結果顯示接菌組之總生菌數與對照組相比較快達到停滯期 (Stationary phase)，代表接菌組之細菌生長更為迅速。接菌組與對照組之初始 (0 小時) 總生菌分別為 3.56 ± 0.18 與 $3.30 \pm 0.21 \log \text{CFU/g}$ ，兩者的起始菌數不具有顯著差異。而接菌組小黃瓜初始活菌數為 $3.56 \pm 0.18 \log \text{CFU/g}$ 與預期的接菌量相符，其計算過程如下：每片小黃瓜接種 $10^5 \text{ CFU } E. mori$ FS08，一片小黃瓜約 3.5 克，因此 10^5 CFU 除以 3.5 克為 2857 CFU/g ，取 \log 值約為 $3.46 \log \text{CFU/g}$ 。接菌組之總生菌數於 8 小時後逐漸減緩，並於最終 96 小時達到 $6.92 \pm 0.76 \log \text{CFU/g}$ ；而對照組至 24 小時後，菌數才接近飽和，最終則為 $6.47 \pm 0.82 \log \text{CFU/g}$ ，兩者最終總生菌數相近 (附錄二)。至 96 小時，接菌組與對照組的總生菌數皆接近 $7 \log \text{CFU/g}$ ，雖然上述腐敗指標的單位為每毫升的菌量，我們的結果是每克小黃瓜的菌量，不過此菌數已經與腐敗指標相近。此外，接菌組的總生菌數在各時間點都比對照組多，不過統計上兩者僅在 4 小時與 8 小時具有顯著差



異。

另外，接菌組的檢液經過序列稀釋、塗盤並於 30 °C 培養 1 天後，生成之菌落外觀皆為白色、圓形狀，與先前實驗中 *E. mori* FS08 之菌落形態相同；然而，對照組之檢液塗盤後，於 30 °C 培養 1 天僅能觀察到部份微小的菌落，培養 2 天後，所有菌落才生成至能夠辨識的大小。且對照組中涵蓋許多不同外觀之混合菌群，包含不同顏色（白色、黃色、橘色等）、不同菌落形態（圓形、皺褶狀、雲朵狀等）之菌種，這些菌種可能是本來就存在於小黃瓜中，或是從環境中汙染的（附錄三）。接菌組中並未觀察到這類混合菌種，可能原因為 *E. mori* FS08 已成為小黃瓜中的優勢菌株，檢液在較高的稀釋倍數下無法觀察到其他菌種。根據上述總生菌數及菌落外觀的結果，顯示先前從截切小黃瓜中分離之 *E. mori* FS08 在小黃瓜的環境下具有生長優勢。

先前實驗室的截切小黃瓜儲藏性試驗中，於 15 °C 儲藏 11 天。總生菌數隨著時間增加，於第 5 天後開始趨緩，並達到 $8 \log \text{CFU/g}$ 以上（顧，2022）。而本研究之接菌試驗中，最終總生菌數僅達到約 $6.5 \log \text{CFU/g}$ 以上，可能是因為先前之儲藏性試驗是由廠商直接提供在工廠截切之小黃瓜切片；而本研究之接菌試驗中，是購買完整小黃瓜，並自行於實驗室無菌操作台中進行截切。截切小黃瓜之來源不同，且小黃瓜於工廠進行截切、封裝、儲藏至運輸的過程中，受到雜菌汙染的機率較高，也因此先前儲藏性試驗中測得較高之總生菌數，再加上先前實驗室亦對截切小黃瓜之菌相進行分析，發現儲藏至第 11 天，小黃瓜中以乳酸菌為主要菌種（顧，2022）。



圖十、截切小黃瓜接種 *E. coli* FS08 於 30 °C 儲藏之菌數變化。截切小黃瓜接種 *E. coli* FS08 (實線) 或 0.85% NaCl 作為對照組 (虛線)。數據表示為三個獨立實驗的平均值 \pm 標準差。*代表透過 Student's t-test 分析同一個時間點接菌組與對照組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

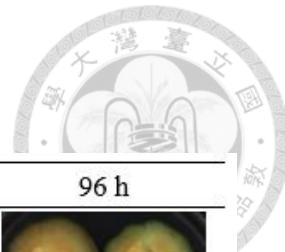
Figure 10. Changes of total plate count in fresh-cut cucumbers inoculated with *E. coli* FS08 and stored at 30 °C. Fresh-cut cucumbers were inoculated with *E. coli* FS08 (solid line) or 0.85% NaCl as a control group (dashed line). Data were presented as means \pm standard deviation of three independent experiments. * Represents significant differences ($p < 0.05$) between different treatment groups at the same time point analyzed by Student's t-test.



二、*E. mori* FS08 使小黃瓜外觀腐敗

截切小黃瓜的外觀變化，可以最直觀的判斷腐敗特徵。鮮切小黃瓜的感官特性包括顏色、形狀、質地和氣味，其標準為新鮮小黃瓜顏色翠綠、質地酥脆、具清新的小黃瓜氣味；腐敗之小黃瓜形狀腐爛、顏色深黃、質地枯萎、有異味 (Sun et al., 2022)。因此，我們在新鮮截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 後，以肉眼觀察其外觀隨著儲藏時間增加的變化。發現至 48 小時後，接菌組的小黃瓜相比對照組具有較快變質、發黃、腐敗的現象 (圖十一)。根據前述結果已知接菌組與對照組之總生菌數除 4 小時及 8 小時外，其餘時間點之總生菌數相近，因此在菌數差異不大的情況下，接菌組的小黃瓜卻腐敗的較為劇烈，代表接菌組之小黃瓜受到 *E. mori* FS08 的影響，導致其外觀和對照組有明顯差異。

而本研究接菌試驗之小黃瓜最終外觀和先前實驗室之儲藏性試驗有所不同。先前儲藏性試驗是將整袋截切小黃瓜放入培養箱於 15 °C 進行儲藏，大量的小黃瓜切片以及低溫儲藏使其水分散失速度較慢，使小黃瓜中之細菌生長良好，最終腐敗之小黃瓜為墨綠色、潮濕、軟爛的外觀；而本研究之接菌試驗是將小黃瓜切片分裝於培養皿，每一片切片獨立擺放後再接菌，並於 30 °C 進行儲藏，導致小黃瓜切片至最後一個時間點已呈現乾燥狀態，僅觀察到外觀發黃、表面凹凸不平的現象。



Treatment	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08							
0.85% NaCl							

圖十一、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之外觀變化。每片小黃瓜切片接種 10 µL 的 *E. mori* FS08 (10^7 CFU/mL) 菌液或 0.85% NaCl (對照組)。

Figure 11. The appearance changes of fresh-cut cucumbers stored at 30 °C. Each cucumber slice was inoculated with 10 µL of *E. mori* FS08 (10^7 CFU/mL) or 0.85% NaCl (control groups).

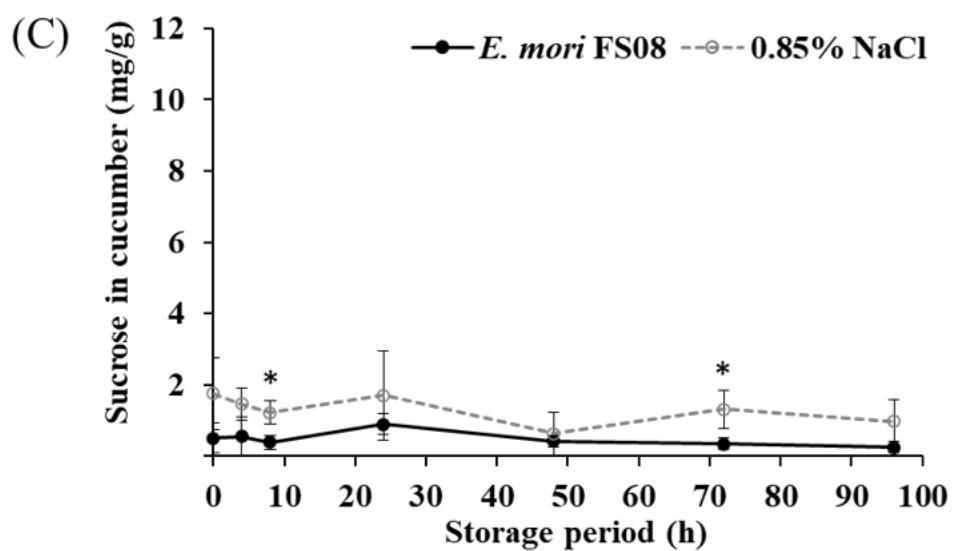
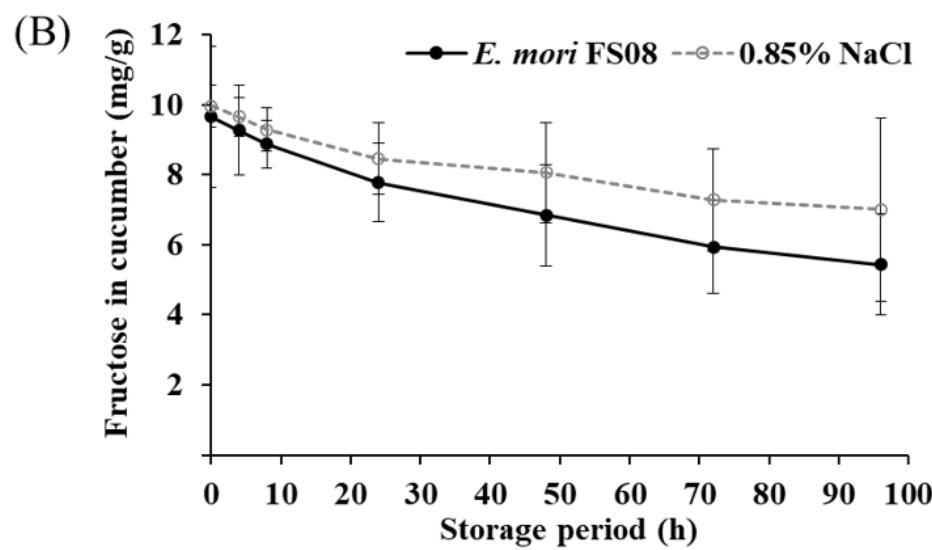
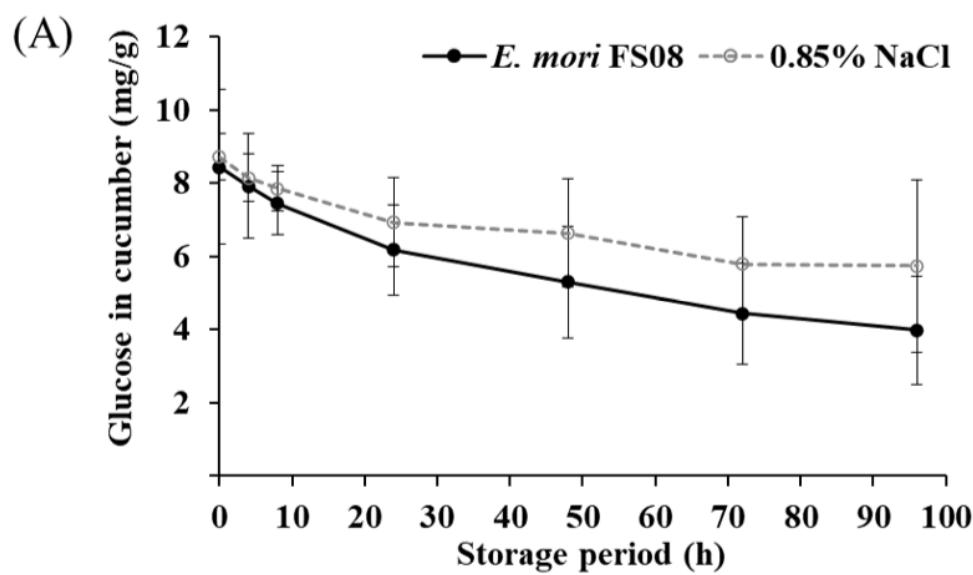
三、*E. mori* FS08 使截切小黃瓜之醣類含量減少

接下來我們想要了解接種在小黃瓜的 *E. mori* FS08 可以使用哪一種醣類當作碳源來維持它的生長。因此我們測量了截切小黃瓜葡萄糖、果糖與蔗糖含量變化。於 0 小時可觀察到小黃瓜中的醣類以果糖含量最高，其次為葡萄糖，蔗糖含量最低（圖十二）。於 0 小時，接菌組與對照組之葡萄糖含量分別為 $8.44 \pm 2.12 \text{ mg/g}$ （相當於 46.86 mM ）與 $8.72 \pm 0.64 \text{ mg/g}$ （相當於 48.43 mM ）；果糖含量分別為 $9.66 \pm 2.01 \text{ mg/g}$ （相當於 53.62 mM ）與 $9.97 \pm 0.60 \text{ mg/g}$ （相當於 55.33 mM ）；蔗糖含量分別為 $0.52 \pm 0.42 \text{ mg/g}$ （相當於 1.51 mM ）與 $1.76 \pm 1.01 \text{ mg/g}$ （相當於 5.14 mM ）（附錄四、附錄五與附錄六）。隨著儲藏時間增加無論是接菌組還是對照組，葡萄糖及果糖的含量皆逐漸下降，代表醣類受到細菌的分解代謝，此現象與先前實驗室之小黃瓜儲藏性試驗之結果相符（顧，2022）。已有許多文獻表明，細菌在生長和繁殖過程中，會利用環境中的醣類作為能量和碳源，通過代謝途徑將醣類分解成較小的分子，並產生 ATP 等能量分子來支持自身的生命活動（Miller and Bassler, 2001; Nyenje et al., 2013）。

另外，接菌組的糖含量在各時間點都比對照組低，代表接菌組的糖消耗量可能較多。然而，接菌組與對照組在各個時間點下，葡萄糖與果糖三重複結果的變異數很大，因此統計上皆不具有顯著差異。推就原因可能是小黃瓜本身品質有所差異。因為本研究中三重複的實驗是以三批不同的小黃瓜分批進行，三批小黃瓜的接菌試驗之間，最終截切小黃瓜的腐敗程度亦有所差異。雖然小黃瓜是購自同個來源，但這三批小黃瓜可能受到種植氣候、採收日期、成熟度、小黃瓜受損程度等因素影響，導致小黃瓜品質有所差異。不過於三次結果中，葡萄糖與果糖在接菌組和對照組中的變化趨勢是相似的，因此仍判斷接菌組中的醣類消耗較多，並且應是醣類受到 *E. mori* FS08 的分解代謝造成的。

此外，雖然可觀察到接菌組的蔗糖含量在各時間點都比未接菌組低，且接菌組與對照組之蔗糖含量於 8 小時與 72 小時具有顯著差異。然而，於 0 小時，接菌組之蔗糖含量已經比對照組低，且隨著儲藏時間增加，並未觀察到蔗糖含量有隨之減少的趨勢。對於此狀況做以下三點解釋：(1) 由於小黃瓜中之蔗糖含量較低，已達到商業套組偵測蔗糖含量的最低極限，無法準確測定小黃瓜中之蔗糖含量。(2) 小黃瓜本身蔗糖含量低的情況下，容易導致不同批小黃瓜測

得之蔗糖含量有所差異，也因此出現 0 小時接菌組之蔗糖含量已比對照組低的狀況。(3) 相較於葡萄糖和果糖，菌株對蔗糖的利用效率較低，主要是因為某些細菌代謝路徑中缺乏高效分解蔗糖的酵素系統 (Jung et al., 2013; Sabri et al., 2016)。因此，接菌試驗中無法觀察到蔗糖含量減少之趨勢。



圖十二、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C儲藏之醣類變化。分別為葡萄糖 (A)、果糖 (B) 與蔗糖 (C)的含量變化。截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 (實線) 或 0.85% NaCl 作為對照組 (虛線)。數據表示為三個獨立實驗的平均值 \pm 標準差。

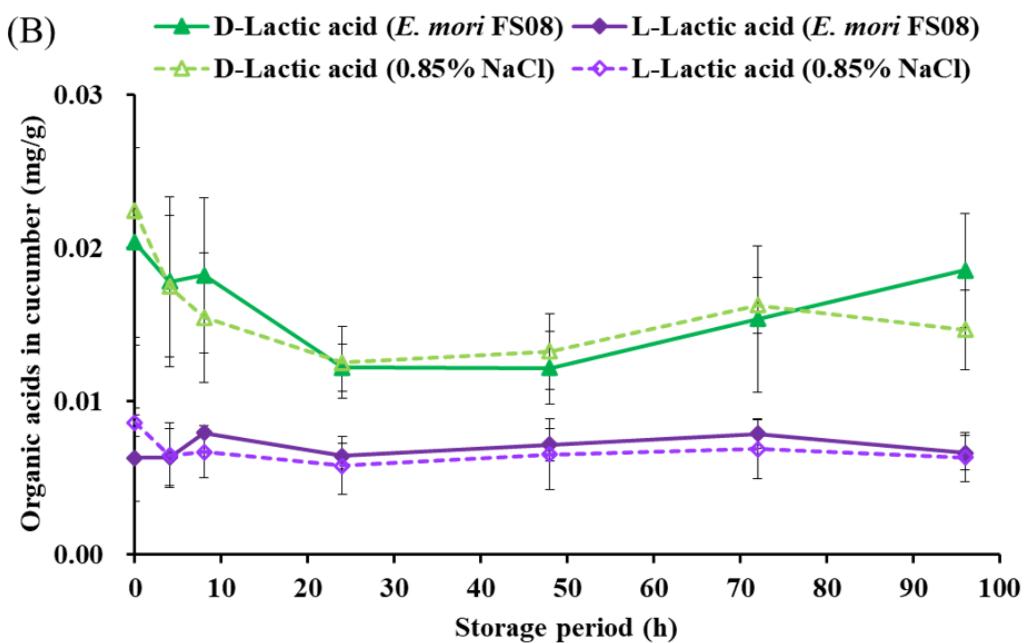
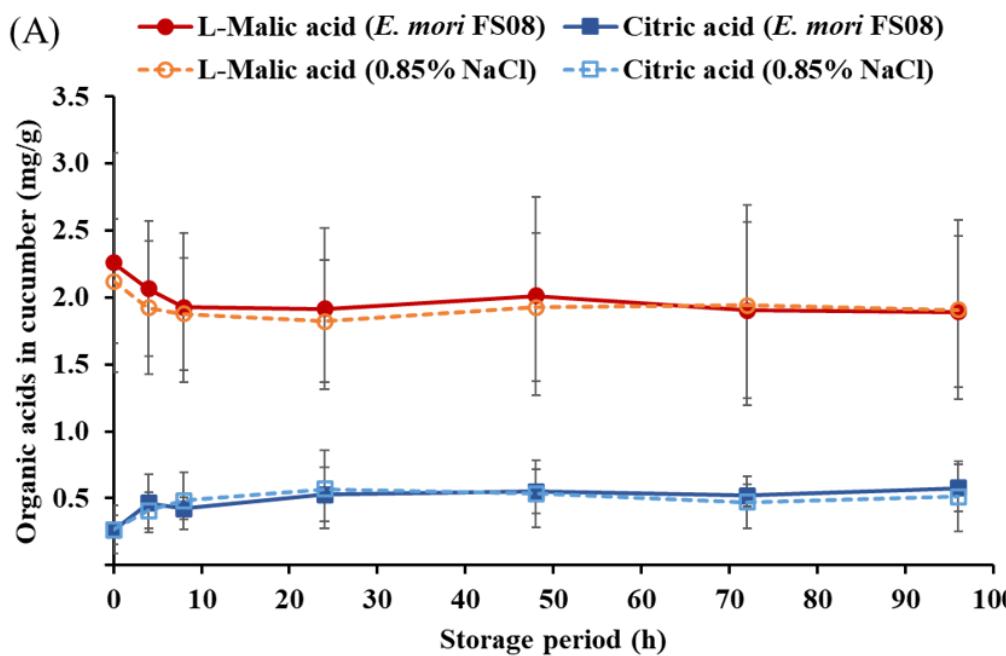
*代表透過 Student's t-test 分析同一個時間點接菌組與對照組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 12. Changes of sugar content in fresh-cut cucumbers inoculated with *E. mori* FS08 and stored at 30 °C. The content changes of glucose (A), fructose (B) and sucrose (C) respectively. Fresh-cut cucumbers were inoculated with *E. mori* FS08 (solid line) or 0.85% NaCl as a control group (dashed line). Data were presented as means \pm standard deviation of three independent experiments. * Represents significant differences ($p < 0.05$) between different treatment groups at the same time point analyzed by Student's t-test.

四、*E. mori* FS08 不影響小黃瓜之有機酸含量變化

接下來我們想要探討 *E. mori* FS08 是否會代謝小黃瓜中的有機酸，包括 L-蘋果酸、檸檬酸、D-form 及 L-form 的乳酸。因此我們測量了截切小黃瓜中有機酸含量變化。可觀察到小黃瓜中 L-蘋果酸含量最高，其次是檸檬酸，而乳酸含量非常低 (圖十三)。於 0 小時，接菌組與對照組之 L-蘋果酸含量分別為 $2.26 \pm 0.82 \text{ mg/g}$ (相當於 16.84 mM) 與 $2.12 \pm 0.46 \text{ mg/g}$ (相當於 15.81 mM)；檸檬酸含量分別為 $0.26 \pm 0.11 \text{ mg/g}$ (相當於 1.24 mM) 與 $0.27 \pm 0.18 \text{ mg/g}$ (相當於 1.27 mM) (附錄七與附錄八)。其中 L-蘋果酸的含量在前 8 小時略為下降，不過統計上各個時間點之間並無顯著差異 (附錄七)。這與先前實驗室儲藏性試驗之結果不同，過去觀察到截切小黃瓜於 15°C 儲藏 11 天，L-蘋果酸的含量會減少 (顧，2022)。不過先前儲藏性試驗的儲藏條件和本研究接菌試驗的條件有所不同，亦觀察到這兩種試驗的總生菌數及菌相有所差異，因此不同的菌群以及不同的生長環境，可能是 L-蘋果酸的含量變化不同的原因。

而過去儲藏性試驗中並未檢測檸檬酸含量變化，考慮到檸檬酸亦為小黃瓜中之主要有機酸 (McFeeeters et al., 1982)，因此接菌試驗將檸檬酸納入品質指標之一。結果顯示，檸檬酸含量只有接菌組於 0 小時至 4 小時有增加的趨勢，其餘時間點皆沒有統計差異 (附錄八)。而 D-乳酸含量在小黃瓜中略高於 L-乳酸，不過這兩者的含量皆已落在商業套組中乳酸檢量線的最低濃度，且 D-form 及 L-form 的乳酸含量皆沒有隨著儲藏時間增加有顯著變化。先前的儲藏性試驗中，觀察到截切小黃瓜於 15°C 儲藏至第 3 天後，D-form 及 L-form 的乳酸皆有上升的趨勢，與本次結果不同，可能是因為儲藏性試驗中，由工廠來的截切小黃瓜存有較多總生菌數及乳酸菌，且菌相分析中截切小黃瓜儲藏至第 11 天占比最高的兩個菌種分別為 *Leuconostoc citreum* 與 *Wessella cibaria*，此類菌屬會自然發酵產生乳酸，因此乳酸的增加應來自於此二菌種 (顧，2022)。



圖十三、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之有機酸變化。分別為 L-蘋果酸、檸檬酸 (A) 與 D-form 和 L-form 乳酸 (B) 的含量變化。截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 (實線) 或 0.85% NaCl 作為對照組 (虛線)。數據表示為三個獨立實驗的平均值 \pm 標準差。並透過 Student's t-test 分析同一個時間點接菌組與對照組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 13. Changes of organic acids in fresh-cut cucumbers inoculated with *E. mori* FS08 and stored at 30 °C. The content changes of L-malic acid, citric acid (A), D-lactic acid and L-lactic acid (B) respectively. Fresh-cut cucumbers were inoculated with *E. mori* FS08 (solid line) or 0.85% NaCl as a control group (dashed line). Data were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Different treatment groups at the same time point were analyzed by Student's t-test.

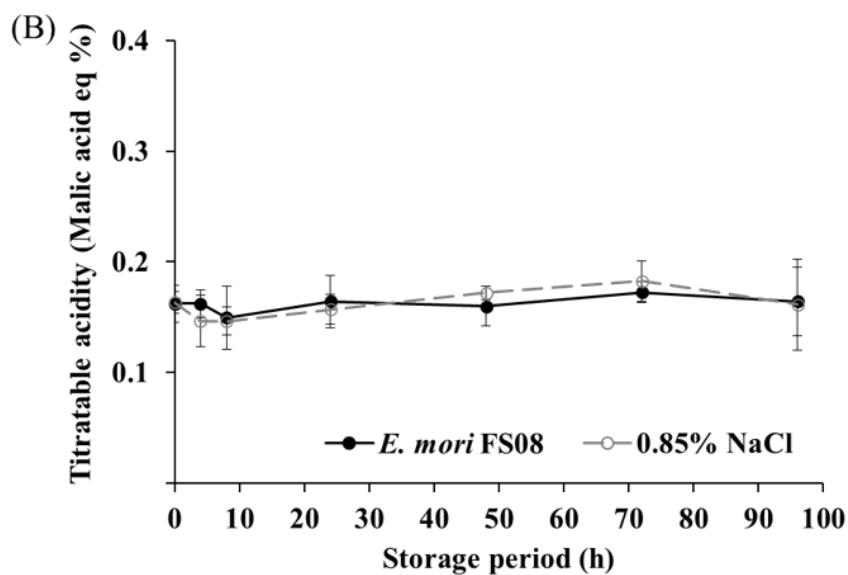
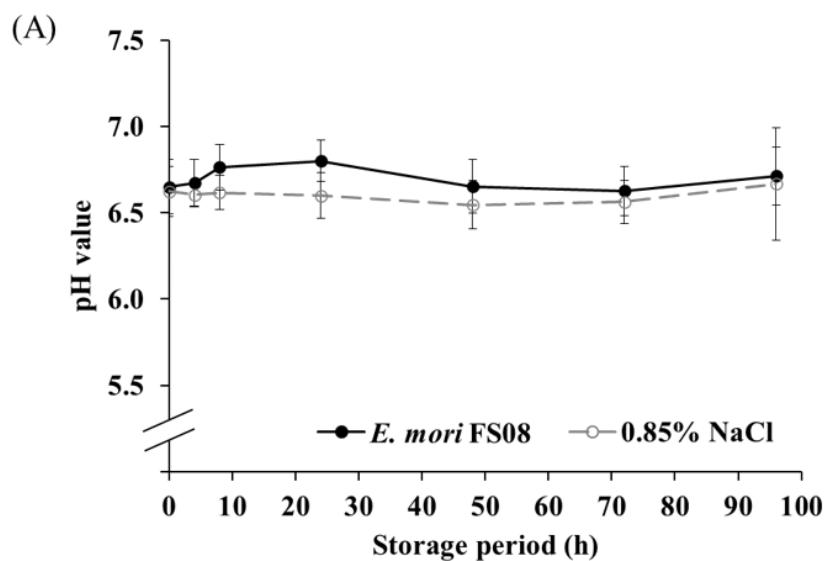
五、*E. mori* FS08 不影響小黃瓜之 pH 值與可滴定酸

若食品中的 pH 值與可滴定酸改變，將影響食品的感官品質。pH 值是溶液中氫離子濃度的負對數，測得的是解離的酸，作為酸鹼度的指標。食品的酸味主要是反映在 pH 值上。而可滴定酸是指溶液中所有酸性物質的總量，包括解離和未解離的酸，更能反映食品中的總酸度，影響風味和穩定性。我們欲了解 *E. mori* FS08 是否會在小黃瓜中產生其他有機酸代謝物，因此測定隨著儲藏時間截切小黃瓜之 pH 值及可滴定酸的變化（圖十四）。結果顯示，接菌組與對照組的小黃瓜初始 pH 值分別為 6.65 ± 0.16 與 6.62 ± 0.14 ，不具有顯著差異。隨著儲藏時間增加，接菌組與對照組的小黃瓜 pH 值皆維持在 6.5 至 6.8 之間，各個儲藏時間點以及兩個組別之間皆沒有顯著差異（附錄十一）。由於前述有機酸含量變化中，已知蘋果酸為小黃瓜中含量最高之有機酸，因此可滴定酸以蘋果酸當量進行換算。然而，可滴定酸亦沒有隨著儲藏時間增加而有所顯著變化（附錄十二）。

接菌試驗結果顯示，雖然接種 *E. mori* FS08 的小黃瓜外觀有較快變質、發黃的現象，但隨著儲藏時間增加，無論是接菌組還是對照組，有機酸的含量、pH 值以及可滴定酸皆沒有明顯變化。推測可能原因如下：葡萄糖之糖解作用的終產物為丙酮酸，而腸桿菌科細菌在代謝丙酮酸時，會分為混合酸發酵 (Mixed acid fermentation) 和丁二醇發酵 (butanediol fermentation)。例如 *Escherichia*、*Salmonella* 和 *Shigella* 屬的菌株是使用混合酸發酵，混合酸發酵產生的終產物包括乳酸鹽、乙酸鹽、琥珀酸鹽、甲酸鹽、乙醇以及氣體 (H_2 和 CO_2)；而丁二醇發酵是 *Enterobacter*、*Serratia* 和 *Erwinia* 屬菌株的典型發酵過程，丁二醇發酵產生較少的酸、更多的氣體和乙醇，尤其是大量的 2,3-丁二醇，這些都是屬於中性產物 (Boumba et al., 2008)。而本研究的 *Enterobacter mori* FS08 是使用丁二醇發酵途徑，這可能是接菌試驗結果中，有機酸含量無顯著變化、pH 維持中性且可滴定酸並未增加的原因。雖然 2,3-丁二醇被認為是食品腐敗的產物，例如有文獻指出 2,3-丁二醇是與腐敗相關的揮發性有機化合物 (Volatile organic compounds, VOC)，作為監測肉類品質的指標，包括空氣儲存牛肉、真空包裝牛肉、氣調包裝 (Modified atmosphere packaging, MAP) 儲存

的鱸魚等 (Kritikos et al., 2020; Mansur et al., 2019; Wang and Wang, 2002)。但是，並未有文獻指出 2,3-丁二醇可以作為截切蔬果的腐敗標記物。

接菌試驗結果中，品質指標變化不明顯的另外兩個原因如下：(1) 由於本研究的接菌方式僅取 $10 \mu\text{L}$ *E. mori* FS08 菌液接種在小黃瓜切片表面的中心點，雖然小黃瓜接菌面明顯腐敗，但是小黃瓜背面外觀卻跟對照組相同 (附錄十三)。而我們進行成分分析時，是將所有小黃瓜切片與 95% 酒精以攪拌機打碎，獲得萃取液後再進行分析。小黃瓜切片厚度為 5 mm，但成分受到影響的可能只有表面，所以萃取液中可能完整的部分較多，導致接菌組和對照組之間成分的差異沒那麼明顯。(2) 本研究之小黃瓜切片在儲藏過程中明顯水分流失，後期小黃瓜片非常乾燥。起初每一片小黃瓜的重量約 3.5 克，進行成分分析時，小黃瓜切片濕重需 50 克才足夠攪碎以獲得小黃瓜萃取液，因此原先預計各個時間點需取約 14 片小黃瓜切片。然而，我們觀察到儲藏至後期，需 16 片小黃瓜切片才能達到 50 克。因此，實際上在儲藏後期進行成分分析的萃取液樣品，是由更多的小黃瓜乾重萃取的，可能高估其成分含量，導致品質指標變化不明顯。



圖十四、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之 pH 值與可滴定酸變化。截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 (實線) 或 0.85% NaCl 作為對照組 (虛線)。數據表示為三個獨立實驗的平均值 \pm 標準差。並透過 Student's t-test 分析同一個時間點接菌組與對照組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 14. Changes of pH value (A) and titratable acidity (B) in fresh-cut cucumbers inoculated with *E. mori* FS08 (solid line) or 0.85% NaCl as control (dashed line) and stored at 30 °C. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent experiments. Different treatment groups at the same time point were analyzed by Student's t-test.

第二節、小黃瓜含有的有機酸成分對菌株特性之影響

接菌試驗結果中觀察到 *E. mori* FS08 使小黃瓜外觀變質以及消耗醣類成分，判定此菌株可能潛在的導致小黃瓜腐敗。另外，小黃瓜中的有機酸成分以 L-蘋果酸含量最高，其次是檸檬酸，而乳酸含量較低。雖然接菌試驗中並未觀察到這些有機酸含量的減少，顯示 *E. mori* FS08 並不會將這些有機酸作為營養成分。但 *E. mori* FS08 是否會利用這些有機酸調節細菌運動性相關行為，促進它的定殖進而導致腐敗尚不清楚。因此本研究欲了解小黃瓜中的有機酸對 *E. mori* FS08 表型的影響。

使用混合碳源培養基 (GFS) 模擬小黃瓜中富含醣類的環境。GFS 培養基為 M9 培養基中額外添加 10 mM 葡萄糖、果糖及蔗糖，並在此基礎上添加有機酸。雖然小黃瓜中葡萄糖與果糖含量約 40~50 mM、蔗糖含量約 1 mM，但是若使用與小黃瓜相同的醣含量，醣類對表型的影響可能會大於有機酸，導致無法清楚觀察有機酸對表型的影響。此外，雖然小黃瓜中蔗糖含量非常低，但實際上蔗糖存在於非常多的食品中，因此仍不能忽略蔗糖作為細菌碳源的重要性。因此，本研究的醣類以 10 mM 為基準。此外，為了排除有機酸改變培養基 pH 值的影響，我們將所有培養基調整至相同的 pH 值。由於接菌試驗中已知小黃瓜的 pH 值落在 6.6 左右，為模擬其的情況，選用 pH 6.6 作為所有培養基的 pH 值。

一、混合碳源培養基添加不同有機酸不影響菌株生長

探討有機酸對 *E. mori* FS08 表型的影響，首先需確認有機酸是否會影響 *E. mori* FS08 的生長。文獻指出 *Enterobacter* 屬的菌株之最適生長溫度為 30 °C ~ 37 °C (Nyenje et al., 2013; Rogers et al., 2016; Zhang et al., 2015)。因此選擇 30 °C 與 37 °C 兩個溫度進行 *E. mori* FS08 生長曲線的測定。圖十五為菌株於混合碳源 M9 培養基分別添加 10 mM L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸，於 30 °C 培養之生長曲線。*E. mori* FS08 為本研究探討之菌株；*E. coli* BCRC 17320 則為負控制組。生長曲線分別以 OD_{600nm} 值與活菌數表示。實驗結果顯示，與負控制組相比，兩者初始 OD_{600nm} 值皆為 0.1，但隨著培養時間增加，*E. mori* FS08 無論在添加哪種有機酸的培養基下，其 OD_{600nm} 值皆比 *E. coli* BCRC 17320 高。另外，可發現菌株於四種培養基的 OD_{600nm} 值在前 6 小時很相近，但在 24 小時，*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 皆為培養於沒有添加有機酸的 GFS 培養基之 OD_{600nm} 值最低，含有檸檬酸的培養基之 OD_{600nm} 值最高。而若是以塗

盤法測定之活菌數表示生長曲線，與負控制組比較，兩者的初始菌量相同，不過隨著培養時間增加，*E. mori* FS08 的活菌數無論在哪種培養基下皆比 *E. coli* BCRC 17320 高，此結果與 OD_{600nm} 值相符。但值得注意的是，上述結果中發現培養至 24 小時，不同種有機酸的添加會顯著改變菌株的 OD_{600nm} 值，但在活菌數的結果中，卻發現無論添加何種有機酸，*E. mori* FS08 的活菌數皆與未添加酸的組別相同，即不具有顯著差異，而 *E. coli* BCRC 17320 亦是如此。

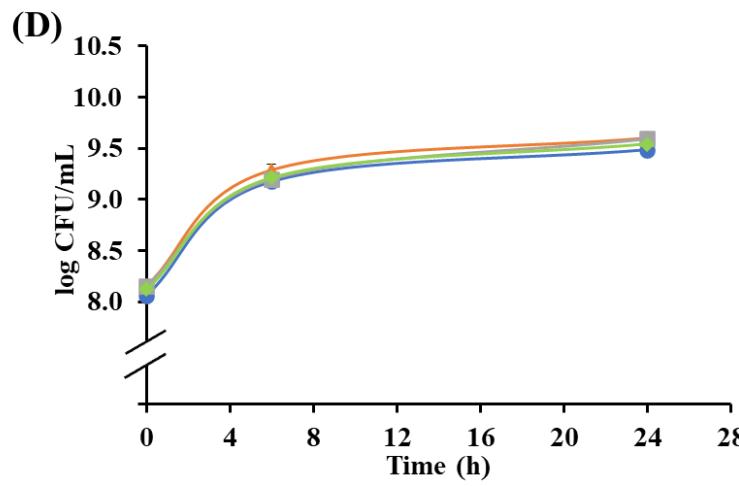
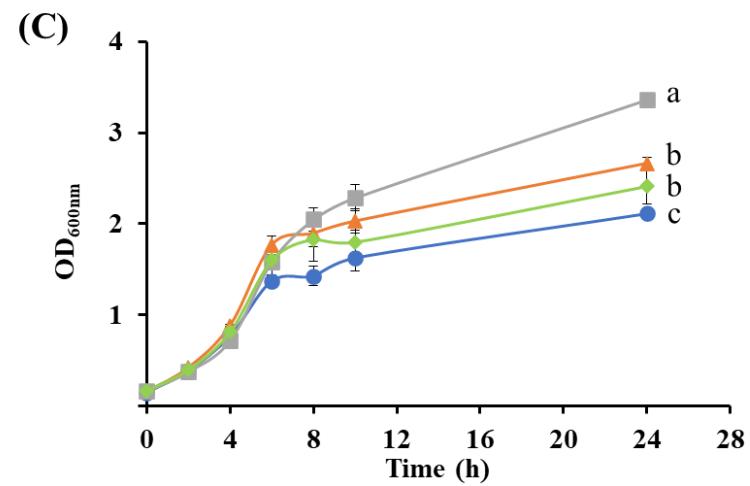
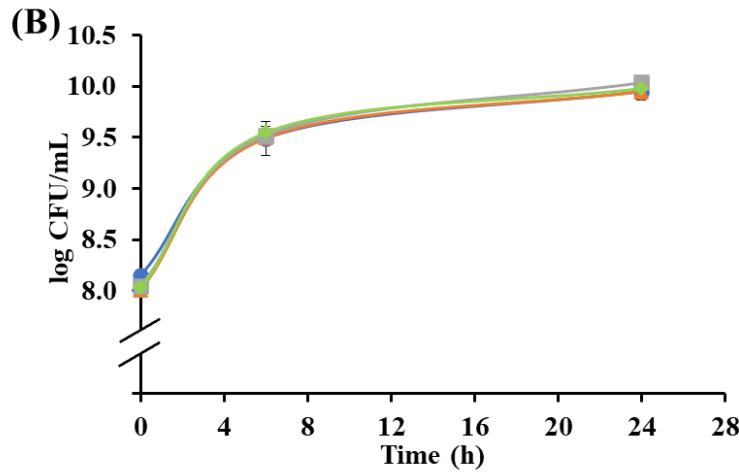
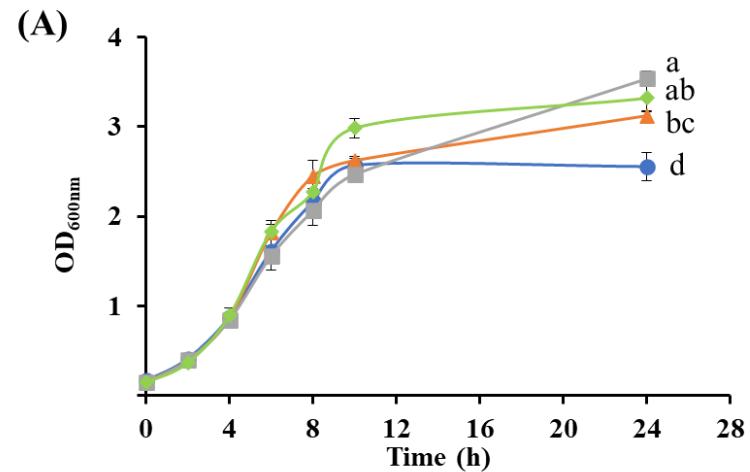
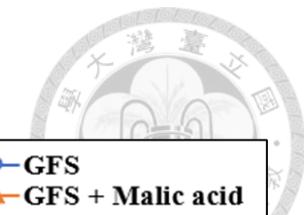
圖十六則為菌株於混合碳源培養基添加不同有機酸，並於 37 °C 培養之生長曲線。結果與 30 °C 培養時相似，*E. mori* FS08 無論在添加哪種有機酸的培養基中， OD_{600nm} 值均高於 *E. coli* BCRC 17320。兩菌株在四種培養基中的 OD_{600nm} 值在前 6 小時相近。但在 24 小時，*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 皆為培養於含有檸檬酸的培養基中 OD_{600nm} 值最高。此外，與 30 °C 培養結果一致，不同有機酸對菌株的活菌數無顯著影響。

若 OD_{600nm} 值在 0.6 至 0.8 之間，表示細菌處於對數生長期 (log phase)；若 OD_{600nm} 值大於 3 表示細菌已經飽和。以本研究中 *E. mori* FS08 在 30 °C 含不同有機酸的混合碳源 M9 培養基中的生長曲線為例，培養 2 小時至 4 小時， OD_{600nm} 值在 0.6 至 0.8 之間，為對數生長期；培養 10 小時後，已進入停滯期 (stationary phase)；於 24 小時，添加有機酸的組別 OD_{600nm} 值皆大於 3，細菌近乎飽和狀態。上述結果發現，有機酸會導致菌株的 OD_{600nm} 值於 24 小時不同，但活菌數卻很接近。可能原因有三：(1) 由於 OD_{600nm} 值僅是透過分光光度計測定細菌培養液的吸光，從而估計細菌的細胞密度，這種方法無法鑑定是活菌還是死菌，僅能代表菌的總數量。且 OD_{600nm} 值是濁度測量，根據比爾-朗伯定律僅適用於低密度的微生物培養物 (Fukuda, 2023)。當 OD_{600nm} 值大於 3 時，培養液中亦存在許多死菌。如果不同有機酸導致的死菌數不同，即使活菌數相同，也會影響吸光度的讀數。(2) 細菌在不同介質中產生的不同代謝物，這些代謝物 (例如色素) 可能會改變培養基的透明度和顏色，干擾 OD_{600nm} 測量，因此與 CFU/mL 出現偏差。(3) 如果微生物在壓力下生長，使細胞大小、形狀等發生顯著變化，導致光散射的差異，會影響 OD_{600nm} 的測量結果 (Stevenson et al., 2016)。

綜合兩個溫度的生長曲線結果，無論在 30 °C 還是 37 °C 培養，調整至相

同 pH 值的培養基中，額外添加的有機酸對菌株的活菌數均無影響。而無論是 *E. mori* FS08 還是 *E. coli* BCRC 17320，皆於 24 小時，30 °C 的活菌數略高於 37 °C 的活菌數。



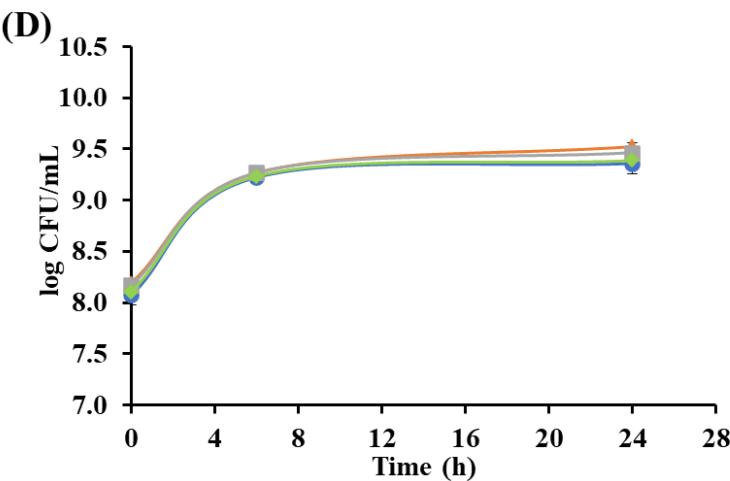
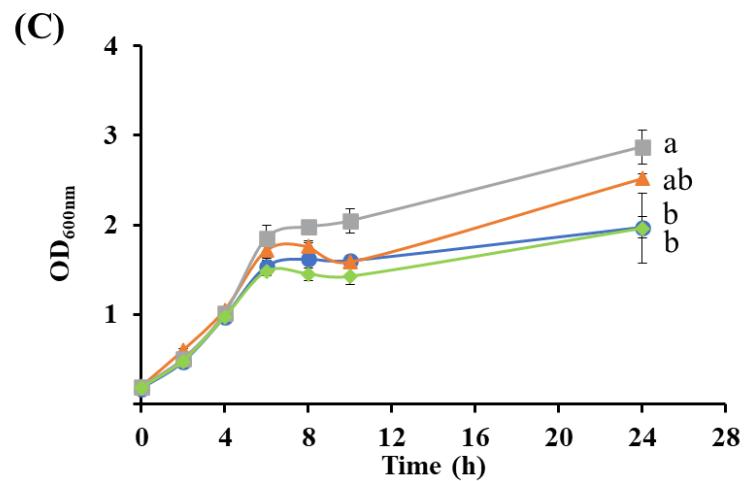
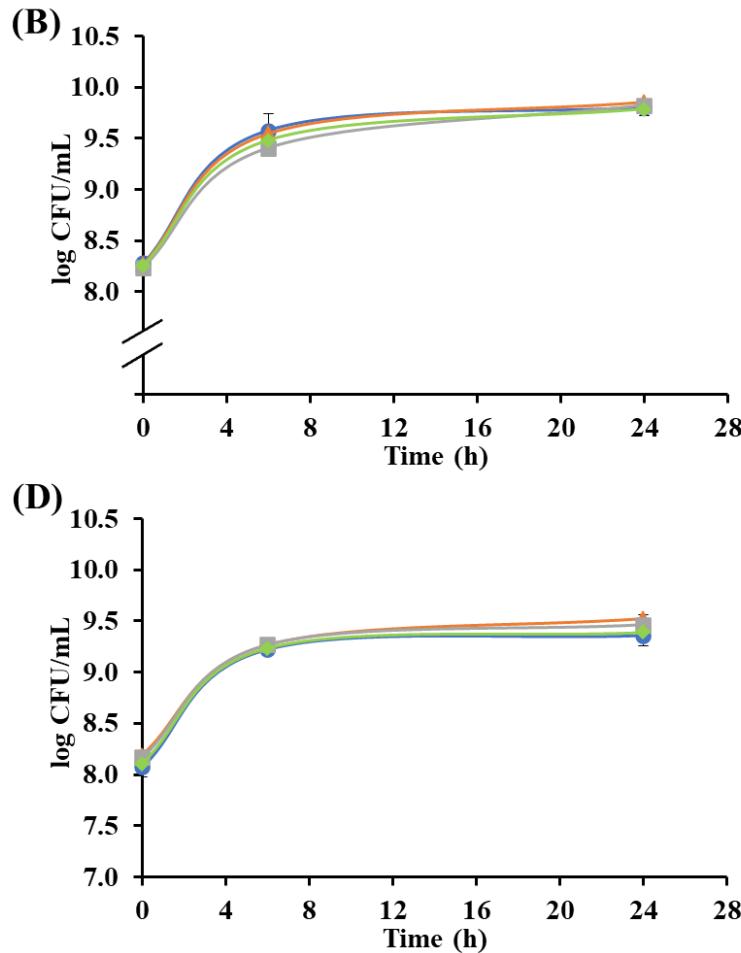
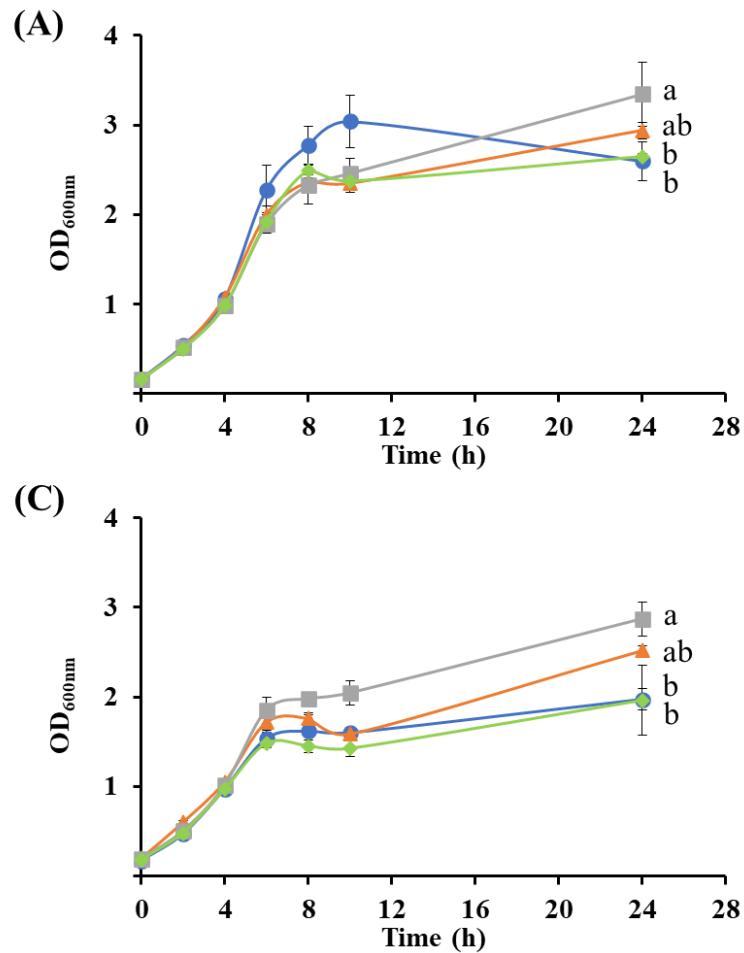


圖十五、在 30 °C 時，*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。GFS 代表培養基中添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。*E. mori* FS08 (A)、(B) 和 *E. coli* BCRC 17320 (C)、(D) 之生長曲線透過 OD_{600nm} 和平板計數測量，以三個重複的平均值 ± 標準差表示，並透過單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同處理組在 24 小時的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 15. Cell growth curves of *E. mori* FS08 (A), (B) and *E. coli* BCRC 17320 (C), (D) in the mixed carbon source M9 media containing 10 mM of different organic acids at 30 °C. GFS represents the medium was added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were measured by OD_{600nm} and plate count which were presented as means ± standard deviation of three replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatment groups at 24 h.



● GFS
● GFS + Malic acid
■ GFS + Citric acid
● GFS + Lactic acid



圖十六、在 37 °C 時，*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。GFS 代表培養基中添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。*E. mori* FS08 (A)、(B) 和 *E. coli* BCRC 17320 (C)、(D) 之生長曲線透過 OD_{600nm} 和平板計數測量，以三個重複的平均值 ± 標準差表示，並透過單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同處理組在 24 小時的顯著差異 ($p < 0.05$)。

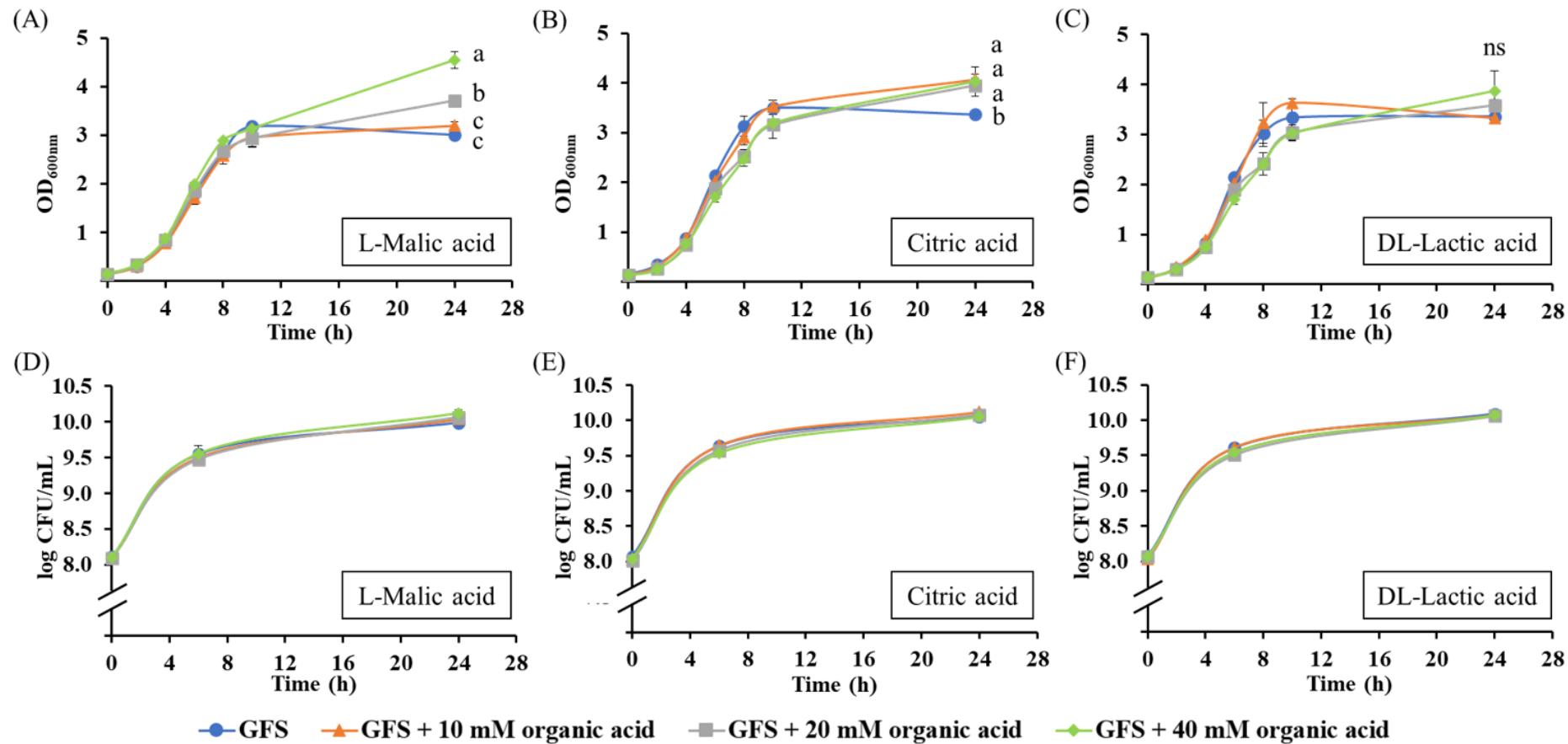
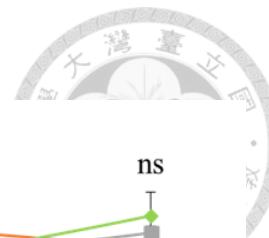
Figure 16. Cell growth curves of *E. mori* FS08 (A), (B) and *E. coli* BCRC 17320 (C), (D) in the mixed carbon source M9 media containing 10 mM of different organic acids at 37 °C. GFS represents the medium was added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were measured by OD_{600nm} and plate count which were presented as means ± standard deviation of three replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatment groups at 24 h.

二、提高有機酸濃度不影響 *E. mori* FS08 之生長

前述結果顯示，在混合碳源培養基中添加 10 mM 的 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸並不會影響 *E. mori* FS08 之生長。根據本研究接菌試驗已知蘋果酸於小黃瓜中之含量可達到約 20 mM；先前儲藏性試驗中，截切小黃瓜儲藏至第 7 天候，D-form 及 L-form 乳酸含量皆會達到 40 mM 以上，因此進一步探討有機酸濃度的提升是否會影響 *E. mori* FS08 之生長。另外，前述結果已知培養於 30 °C 或 37 °C 對菌株之生長影響不大，然而 30 °C 之活菌數略高於 37 °C，因此該部分僅選擇將菌株培養於 30 °C，以探討有機酸之濃度效應。

測定 *E. mori* FS08 於混合碳源培養基添加不同濃度的有機酸，對 OD_{600nm} 值與活菌數的影響。有機酸為 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸，有機酸濃度分別是 10、20 與 40 mM，所有培養基亦調整至 pH 6.6，模擬小黃瓜之 pH 值並排除 pH 值之影響。實驗的結果顯示於圖十七中。前 10 小時三種有機酸在不同濃度下之 OD_{600nm} 值皆相近。而培養至 24 小時，添加 L-蘋果酸的組別，OD_{600nm} 值由高至低分別是添加 40 mM、20 mM、10 mM 的組別，而添加 10 mM L-蘋果酸和未添加酸之組別並沒有顯著差異，此結果顯示，隨著 L-蘋果酸濃度增加，其 OD_{600nm} 值越高；添加檸檬酸的組別，則是三個濃度之間並無顯著差異，但與未添加酸之 GFS 組別相比，添加檸檬酸使 OD_{600nm} 值較高；添加 DL-乳酸的組別，則是三個濃度皆和未添加酸之 GFS 組別不具有顯著差異。

雖然以 OD_{600nm} 值表示之生長曲線有觀察到不同濃度與不同種有機酸對菌株生長情形有差異。但活菌數之結果則顯示，這三種有機酸在不同濃度下並不影響 *E. mori* FS08 之活菌數。由於 OD_{600nm} 值僅代表細菌的濁度或總菌量，無法區分活菌和死菌，該方法仍有其限制，僅適用於細菌密度較低的生長初始階段。因此有機酸濃度對菌株生長曲線的影響，仍以活菌數之結果較具有說服力。



圖十七、*E. mori* FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基之生長曲線。菌株培養於 30 °C。GFS 代表培養基中添加了 10mM 葡萄糖、果糖和蔗糖。添加的有機酸為 L-蘋果酸、檸檬與 DL-乳酸，濃度為 10、20 與 40 mM。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。數據透過 OD_{600nm}(A)、(B)、(C) 和平板計數法 (D)、(E)、(F) 測量，以三個重複的平均值±標準差表示，並透過單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同處理組在 24 小時的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 17. Cell growth curves of *E. mori* FS08 in the mixed carbon source M9 media containing different concentration of organic acids at 30 °C. GFS represents the medium was added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The added organic acids are L-malic acid, citric acid and DL-lactic acid and the concentrations were 10, 20 and 40 mM. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were measured by OD_{600nm} (A), (B), (C) and plate count (D), (E), (F) which were presented as means ± standard deviation of three replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different concentrations of organic acid groups at 24 h.

三、於 30 °C 時，L-蘋果酸促進 *E. mori* FS08 泳動能力、檸檬酸則抑制

前述結果已知混合碳源培養基中添加 10 mM 的 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸不影響菌株之活菌數，接著進一步探討有機酸對其他表型之影響。泳動是菌株在液態環境中的運動行為，使細菌能夠移動至宿主上，促使細菌定殖。食品加工廠的環境中有許多液體，再加上小黃瓜中的水分含量非常高，通常佔其總重量約 95% (USDA Agricultural Research Service)。因此泳動能力很有可能是 *E. mori* FS08 在食品加工廠與小黃瓜中的主要運動行為之一。接下來將探討在混合碳源培養基 (含 0.3% 瓊脂) 添加不同有機酸對菌株泳動能力的影響，所有培養基皆調整 pH 至 6.6 排除 pH 值的影響。

圖十八 (A) 是在 30 °C 下培養，圖十八 (B) 是在 37 °C 培養，皆培養 24 小時後，測量菌株泳動範圍的直徑。於 30 °C 培養時，與未加酸的組別相比，L-蘋果酸顯著促進 *E. mori* FS08 的泳動能力；檸檬酸與 DL-乳酸則是抑制，且檸檬酸特別顯著。於 37 °C 培養時，*E. mori* FS08 的泳動能力僅受到檸檬酸的抑制，L-蘋果酸與 DL-乳酸皆與未加酸的組別不具有顯著差異。負控制組 *E. coli* BCRC 17320 則是在 30 °C 和 37 °C 培養時，三種有機酸皆會抑制泳動能力，且檸檬酸抑制最為顯著，而 DL-乳酸於 30 °C 無顯著差異。

總結來說，*E. mori* FS08 的泳動能力比 *E. coli* BCRC 17320 高。無論在 30 °C 還是 37 °C 下，10 mM 檸檬酸顯著抑制兩株菌的泳動能力，而 DL-乳酸的抑制較弱甚至無影響。L-蘋果酸的影響因溫度而異：在 30 °C 下，L-蘋果酸促進 *E. mori* FS08 的泳動能力，但在 37 °C 下卻無影響；在 30 °C 和 37 °C 下，則都是抑制 *E. coli* BCRC 17320 的泳動能力。此外，有機酸對 *E. mori* FS08 的泳動能力影響於 30 °C 時更明顯，*E. coli* BCRC 17320 的泳動能力則是於 37 °C 時較佳。文獻指出，菌株的泳動能力確實會受溫度影響，以最適生長溫度為基準，相對極端的溫度下，菌株泳動能力越差 (Paksanont et al., 2018)。

關於有機酸對泳動能力的調控，有相關文獻佐證。首先，c-di-GMP 是腸桿菌科中普遍存在的第二信使，負責調節包括運動性、生物膜形成和毒力。c-di-GMP 水平增加時會抑制鞭毛運動同時促進生物膜形成。c-di-GMP 的合成為兩分子 GTP 透過二鳥苷酸環化酶 (DGC) 轉化為 c-di-GMP；而磷酸二酯酶 (PDE) 將 c-di-GMP 降解為 5'-磷酸鳥苷基-(3' -5')-鳥苷或兩分子 GMP (Baker

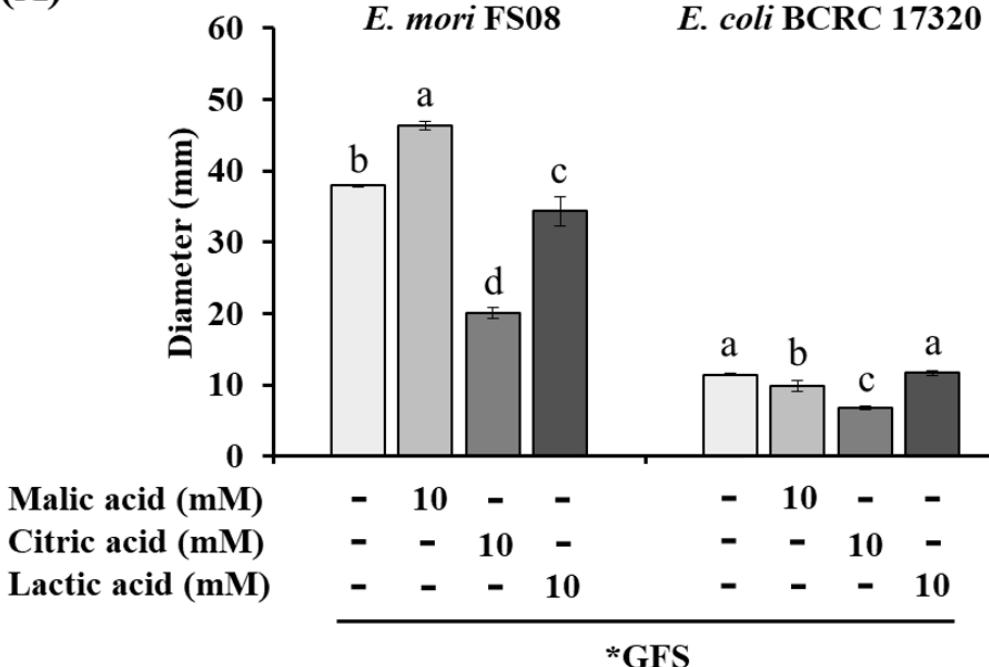
and O'Toole, 2017; Rinaldo et al., 2018; Sisti et al., 2013; Whiteley and Lee, 2015)。

文獻指出，*Dickeya dadantii* 是一種植物病原菌，可引起多種植物軟腐病。突變此菌株中三羧酸循環 (TCA cycle) 的關鍵酵素，例如琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 和延胡索酸酶 (fumarase)，導致細胞內 c-di-GMP 的抑制，因而促進泳動能力；添加外源檸檬酸鹽 (TCA 循環中間體) 則使菌株的 DGC 蛋白質水平增加、PDE 蛋白質水平下降，c-di-GMP 濃度亦顯著增加，而高濃度 c-di-GMP 通常會導致運動性降低 (Yuan et al., 2020)。此文獻可以說明本研究中檸檬酸抑制菌株泳動能力的機制。

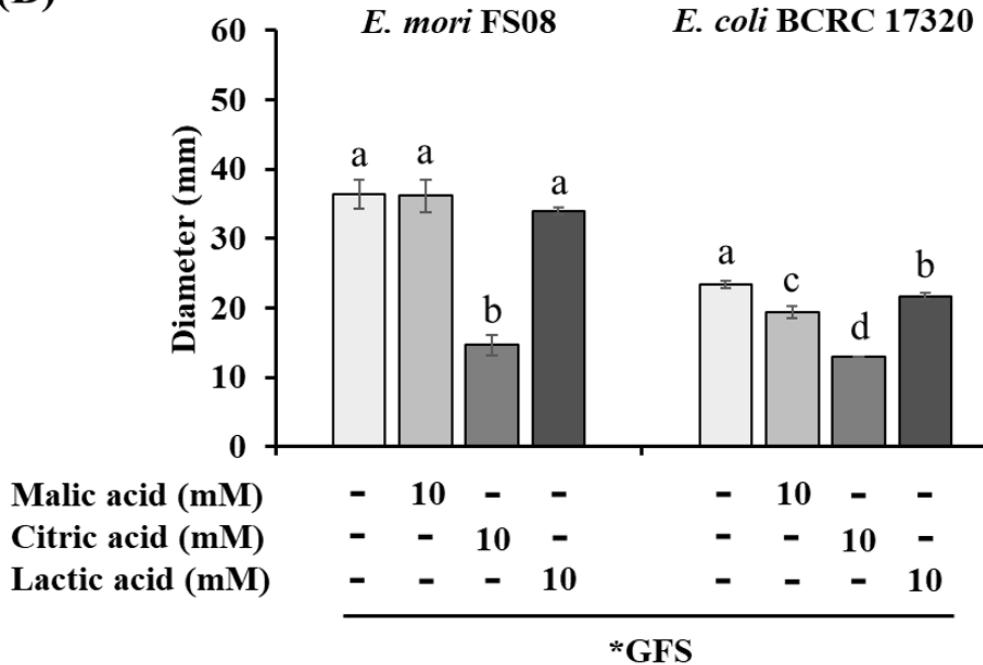
然而，蘋果酸鹽亦為 TCA 循環中間體，在本研究中卻觀察到添加 L-蘋果酸會產生和檸檬酸相反的表型。由於 TCA 循環受許多底物 (substrates) 影響，例如乙酰輔酶 A (Acetyl-CoA)、草醯乙酸 (Oxaloacetate) 等，可能還涉及回饋機制，因此了解哪些 TCA 酵素或中間體負責控制 c-di-GMP 很困難。文獻亦記載外源添加各種 TCA 循環中間體 (包括丙酮酸、乙酸酯、檸檬酸、異檸檬酸、富馬酸和 α -酮戊二酸)，會表現出不同的 c-di-GMP 調控之表型 (Yuan et al., 2020)。因此需要進一步的實驗數據和文獻支持來確認蘋果酸如何改變細菌的代謝環境或能量狀態，使其更有利於運動相關的蛋白質生成。

目前僅查找到蘋果酸會顯著促進植物根系促生細菌 (Plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR) *Bacillus velezensis* B2 的泳動與表面移行能力的相關文獻 (Sharma et al., 2020)。不過，先前實驗室從香瓜篩選之香瓜腐敗菌 *Pantoea vagans* M17，也觀察到 L-蘋果酸會促進此菌株之表面移行能力 (李，2023)。雖然蘋果酸在植株中可以促進 PGPR 的運動性，但我們的研究亦發現會促進腐敗菌的運動性。無論是 PGPR 還是腐敗菌，蘋果酸都是幫助細菌的定殖。此發現的重要性在於 L-蘋果酸是大多數蔬果中含量最多的有機酸種類 (Shi et al., 2022)。因此在蔬果的加工過程中，L-蘋果酸遍佈於環境中，若有腐敗菌存在，會使細菌運動性增強，增加腐敗菌汙染食品的風險。

(A)



(B)



圖十八、*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之泳動能力。分別於 30 °C (A) 或 37 °C (B) 培養 24 小時。*GFS 代表所有組別均添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。數據以三個獨立重複的平均值 ± 標準差表示，並以單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同處理組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 18. Swimming motility of *E. mori* FS08 and *E. coli* BCRC 17320 in the mixed carbon source M9 medium containing 10 mM of different organic acids (0.3% agar). Incubated at 30 °C (A) or 37 °C (B) after 24 h. *GFS represents all groups were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatment groups.

四、有機酸對 *E. mori* FS08 的泳動能力呈濃度效應

由於前述結果顯示，L-蘋果酸僅於 30 °C 時，明顯增加 *E. mori* FS08 的泳動能力，因此後續實驗皆以 30 °C 進行。此外，小黃瓜在食品加工廠經過截切、包裝和流通至市場的整個過程中，很有可能處於 30 °C 的溫度。以下是一些具體情況：(1) 在倉儲時，特別是沒有空調設施或冷藏設備故障的情況。(2) 在高溫季節或運輸設備不完善時，若冷鏈運輸未能持續保持，運輸車輛內部溫度可能會上升。(3) 小黃瓜於市場或超市銷售展示，特別是在戶外市場或沒有適當空調系統的區域。這些情況皆使截切小黃瓜有可能暴露在 30 °C 的環境中。因此，此溫度有助於我們理解腐敗菌在截切小黃瓜加工過程中可能的表型變化。

由於我們發現 L-蘋果酸促進 *E. mori* FS08 的泳動能力；檸檬酸顯著抑制；DL-乳酸的抑制較弱。因此我們進一步確認提高有機酸濃度是否會加強對泳動能力的影響。混合碳源培養基（含 0.3 % 瓊脂）分別添加 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸，有機酸濃度分別是 10、20 或 40 mM，所有培養基亦調整至 pH 6.6 模擬小黃瓜之 pH 值並排除 pH 值之影響。結果顯示，隨著 L-蘋果酸的濃度增加，*E. mori* FS08 的泳動能力亦隨之增強（圖十九）。而檸檬酸的組別在 10 mM 下，泳動能力最低，隨著檸檬酸濃度增加至 40 mM，其抑制效果反而降低。而 DL-乳酸則顯示濃度由 10 mM 增加至 20 mM 時，其抑制泳動能力的效果增強，但 20 mM 與 40 mM 之間即不再有顯著差異。

本研究一開始的實驗設計為了排除酸鹼度對細菌行為的影響，因此將所有實驗中的培養基皆調整至相同的 pH 值（pH 6.6）。然而，在測定有機酸對泳動能力是否具有濃度效應時，隨著有機酸濃度增加，調整培養基 pH 值需添加的 HCl 或 NaOH 的量亦增加。而細菌的運動性也會由氫離子與鈉離子在細胞內外的離子梯度推動鞭毛馬達旋轉（Baker and O'Toole, 2017）。因此添加越多 HCl 或 NaOH 可能會影響運動性。再加上大多數文獻在進行有機酸對菌株運動性測試時，並不會調整培養基之 pH 值（Feng et al., 2022; Sharma et al., 2020）。因此我們也測定 *E. mori* FS08 在混合碳源培養基添加有機酸之初始 pH 值（附錄十四），即「沒有調整 pH 值至 6.6」的泳動培養基之泳動能力（圖二十）。結果顯示，L-蘋果酸的結果與有調整 pH 值之培養基截然不同。L-蘋果酸於 10

mM 時，菌株有最強的泳動能力，然而隨著 L-蘋果酸濃度增加至 20 mM 與 40 mM，雖然與未添加酸的組別相比仍是促進泳動能力，但促進的效果隨著濃度增加而下降。而檸檬酸的組別仍是在 10 mM 時對菌株泳動能力的抑制效果最明顯。DL-乳酸則隨著濃度增加泳動能力隨之下降。添加檸檬酸與 DL-乳酸的泳動培養基無論是否有調整 pH 值，結果皆有相似的趨勢。只有添加 L-蘋果酸的泳動培養基，有無調整 pH 值，顯示出不同的表型。

細菌利用鞭毛在液體和表面上移動，而鑲嵌在膜上的鞭毛馬達驅動鞭毛旋轉。定子複合體 (stator complex) 是鞭毛馬達上氫離子通道。每個定子複合物均由蛋白質亞基 MotA 和 MotB 組成。質子通過 MotAB 複合物離子通道，使 MotA 和 FliG 蛋白 (鞭毛馬達上的轉子蛋白) 之間產生靜電相互作用，形成鞭毛動力旋轉所需的扭矩 (Baker and O'Toole, 2017)。文獻指出，當大腸桿菌和沙門氏菌的細胞內 pH 值降低時，質子驅動的鞭毛馬達最大旋轉速率會降低 (Nakamura and Minamino, 2019)。當外部 pH 值從 7.0 降低至 5.0 時，大腸桿菌細胞的泳動速度顯著降低；亦觀察到 pH 值從 7.0 降低至 5.5 時，沙門氏菌細胞的泳動速度和旋轉速率也顯著降低。可能是細胞內質子濃度的增加會幹擾扭力產生單元釋放質子，導致鞭毛馬達減速或停止 (Minamino et al., 2003)。

本研究中未調整 pH 時，添加 10 mM L-蘋果酸的 pH 為 6.85 (附錄十四)，可能是 L-蘋果酸在 pH 值越接近中性時，促進細菌泳動能力的效果越顯著。隨著 L-蘋果酸濃度增加培養基 pH 值越低。較低的 pH 值可能抑制了菌株的泳動能力，但 L-蘋果酸具有促進泳動能力的效果，兩者互相抗衡，因此培養基添加 40 mM 之 L-蘋果酸雖然仍有促進泳動能力的效果，但不如添加 10 mM 之 L-蘋果酸的組別。若將所有培養基調整至相同 pH 時，因菌株不受酸鹼度的影響，更能反應出有機酸的濃度效應。而檸檬酸和 DL-乳酸原本就會抑制細菌運動性，而 pH 值降低也是使運動性下降。所以含有檸檬酸和 DL-乳酸的培養基有無調整 pH 值，對細菌的泳動能力的影響趨勢相同。

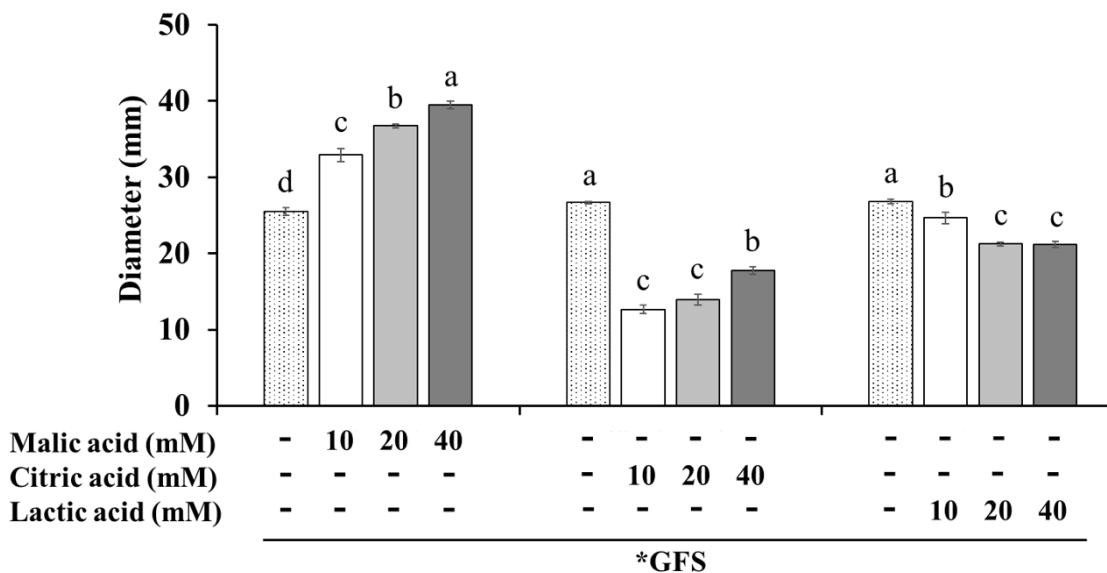
此外，本研究並未測定未調 pH 值的混合碳源培養基添加不同有機酸的生長曲線，因此不確定是否會影響菌株生長。但先前實驗室有測過 *E. mori* FS08 在 TSB 培養基中培養，不同 pH 值 (pH 3.5、4.5、5.5、6.5 與 7.4) 對其生長的影響。確實觀察到，培養至 16 小時，菌株於 pH 低於 4.5 的 TSB 培養基中便

無法生長；而 pH 5.5 亦使菌株的生長較差；pH 6.5 與 pH 7.4 生長最佳 (顧, 2022)。因此在未調整 pH 的泳動培養基中，有機酸濃度增加，培養基 pH 值較低，可能也使菌株生長較差導致泳動能力下降。

前述結果已知提高這三種有機酸的濃度並不影響 *E. mori* FS08 之活菌數，代表 L-蘋果酸並不促進菌株的生長，而檸檬酸與 DL-乳酸也不抑制菌株的生長。因此 L-蘋果酸促進泳動的濃度效應，並不是因為 L-蘋果酸作為菌株的營養源所導致，而是有其他調控機制。目前直接針對 L-蘋果酸促進泳動能力的文獻較少，無法深入探討其原因，但這顯示我們的發現突顯了 L-蘋果酸對腐敗菌的獨特性。L-蘋果酸對菌株的泳動能力調控可能與趨化性有關。多篇文獻通過毛細管化學趨性測定 (capillary chemotaxis assay) 證實，L-蘋果酸作為誘導劑，會調控趨化反應，吸引菌株靠近泳動 (Martín-Mora et al., 2018; Rudrappa et al., 2008; Wang et al., 2023)。

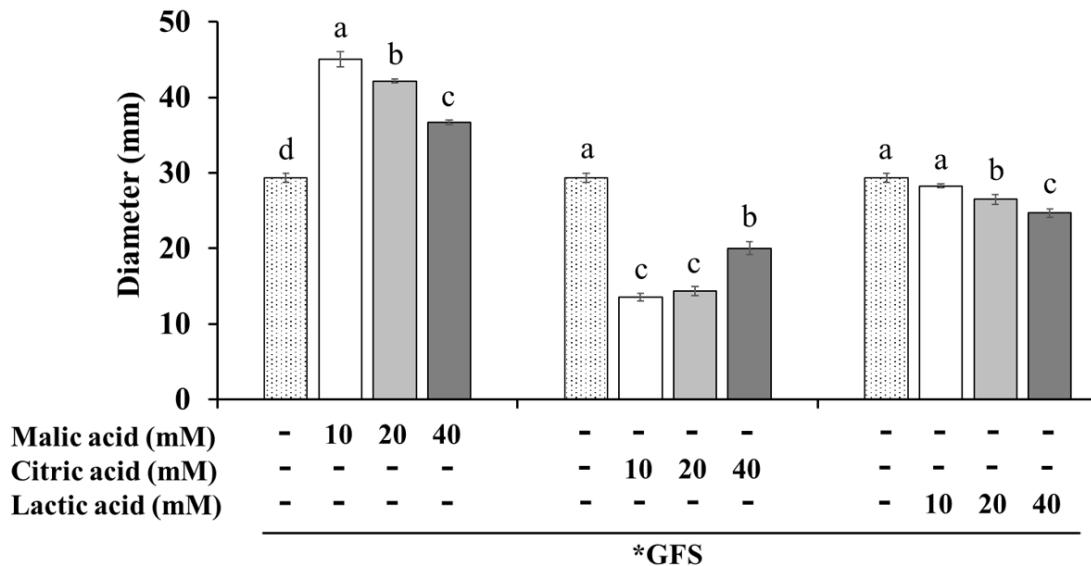
檸檬酸濃度增加反而泳動抑制能力變差的可能原因為：破壞 TCA 循環關鍵酵素，細菌會產生低水平的 c-di-GMP，進而促進泳動能力；外源添加檸檬酸鹽，因提高 TCA 循環中間產物，則提高 c-di-GMP 水平，而抑制細菌運動性 (Yuan et al., 2020)。然而，檸檬酸是 TCA 循環的中間產物，高濃度的檸檬酸會導致 TCA 循環中檸檬酸及其下游中間產物的積累，通過負回饋機制抑 TCA 循環的關鍵酵素，從而降低 TCA 循環的整體速率，導致 ATP 的生成減少。細菌運動需要能量，能量不足會抑制其運動能力 (Larsen et al., 1974; Li et al., 2023; Sudarshan et al., 2021)。且因為破壞 TCA 循環的平衡，可能因此降低 c-di-GMP 水平，使其抑制泳動能力的效果變差。

另外，隨著 DL-乳酸濃度增加，更顯著地觀察到其抑制 *E. mori* FS08 的泳動能力。文獻顯示，乳酸可以抑制 *Pseudomonas aeruginosa* 的泳動和表面移行能力，以及抑制群體感應相關基因的表達，群體感應在細菌運動、生物膜形成和其他毒力因子的調節中發揮作用 (Feng et al., 2022; Kiymaci et al., 2018)。也有文獻在泳動和表面移行能力試驗中表明，較高濃度的乳酸會降低大腸桿菌和沙門氏菌的運動性 (Amrutha et al., 2017)。這些文獻結果與本研究相符。



圖十九、*E. mori* FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基（調整 pH 值至 6.6）之泳動能力。*GFS 代表培養基中添加了 10mM 葡萄糖、果糖和蔗糖。添加的有機酸為 L-蘋果酸、檸檬與 DL-乳酸，濃度為 10、20 與 40 mM。於 30 °C 培養 18 小時後測量泳動直徑 (mm)。數據以三個獨立重複的平均值 \pm 標準差表示，並以單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。不同英文字母表示同一種有機酸中，不同有機酸濃度的組別之間有顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 19. Swimming motility of *E. mori* FS08 in the mix of carbon sources M9 medium (0.3% agar) supplemented with different concentrations of organic acids (media were adjusted to pH 6.6). *GFS represents all groups were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The added organic acids are L-malic acid, citric acid and DL-lactic acid and the concentrations were 10, 20 and 40 mM. After incubation at 30°C for 18 h, the swimming diameters (mm) were measured. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different concentrations of organic acid groups.



圖二十、*E. mori* FS08 於含有不同濃度有機酸的混合碳源 M9 培養基（未調整 pH 值）之泳動能力。*GFS 代表培養基中添加了 10mM 葡萄糖、果糖和蔗糖。添加的有機酸為 L-蘋果酸、檸檬與 DL-乳酸，濃度為 10、20 與 40 mM。於 30 °C 培養 18 小時後測量泳動直徑 (mm)。數據以三個獨立重複的平均值 \pm 標準差表示，並以單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。不同英文字母表示同一種有機酸中，不同有機酸濃度的組別之間有顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 20. Swimming motility of *E. mori* FS08 in the mix of carbon sources M9 medium (0.3% agar) supplemented with different concentration of organic acids (unadjusted media pH value). *GFS represents all groups were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The added organic acids are L-malic acid, citric acid and DL-lactic acid and the concentrations were 10, 20 and 40 mM. After incubation at 30°C for 18 h, the swimming diameters (mm) were measured. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different concentrations of organic acid groups.

五、僅 L-蘋果酸對 *E. mori* FS08 具吸引之趨化反應

細菌的泳動能力會受趨化系統的調控。趨化性是指細菌向引誘劑跟營養豐富的區域移動或遠離趨避劑跟有害區域的過程，這使細菌可以朝有利於生長的環境聚集 (Wadhams and Armitage, 2004)。前述結果觀察到 L-蘋果酸會促進 *E. mori* FS08 泳動能力，而檸檬酸與 DL-乳酸皆抑制泳動能力，且檸檬酸抑制更為顯著。因此接下來探討這三種有機酸對菌株趨化性的影響。

表十三為 *E. mori* FS08 對單一有機酸的趨化反應，單一有機酸分別是 10 mM 的 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸，這些化合物配製在泳動培養基的左端，而菌株則是皆種在右側。D1 為從接菌位點至最接近目標化合物的菌落邊緣之距離；D2 為從接種位點到離目標化合物最遠的菌落邊緣之距離；RI (反應指數) 為 D1 距離和 D1 加 D2 總距離的比值，作為判斷引誘劑或趨避劑之依據，RI 值大於 0.52 表示存在引誘劑反應 (Guo et al., 2023; Zhang et al., 2019)。結果顯示，當於 30 °C 培養 42 小時，只有 L-蘋果酸的 RI 值大於 0.52 並且和其他化合物的 RI 值具有顯著差異，代表這三種有機酸中只有 L-蘋果酸是引誘劑。

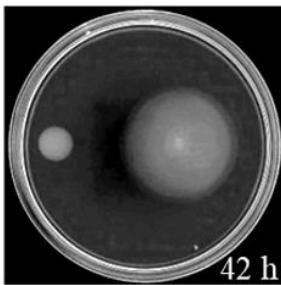
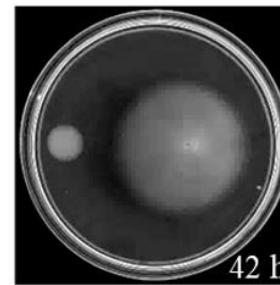
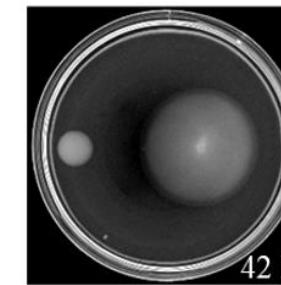
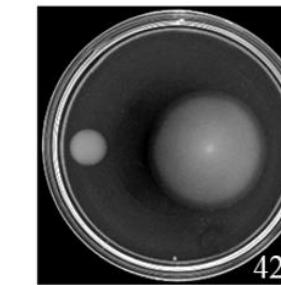
已經有多篇文獻證實蘋果酸是引誘劑。趨化性是引導細菌在引誘劑和驅避劑梯度中運動的能力，在根際細菌定殖的過程中發揮重要作用。細菌對根系分泌物的趨化性，引發植物根系促生細菌 (PGPR) 的招募。根系分泌物包括胺基酸、有機酸、醣類和次級代謝物 (Feng et al., 2021; Wang et al., 2023)。其中蘋果酸是根部主要有機酸分泌物之一，在有益細菌向植物根際趨化方面發揮重要作用。例如：Rekha 等人 (2018) 從水稻根際分離的植物根系促生細菌 *Bacillus subtilis* RR4，在毛細管趨化測定中，觀察到蘋果酸對此菌株具有很強的吸引力；Tan 等人 (2013) 分析番茄根系分泌物中的有機酸成分包含蘋果酸、檸檬酸、琥珀酸和富馬酸，其中蘋果酸在這些有機酸中，誘導 *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 最大的趨化反應；Yuan 等人 (2015) 對香蕉根分泌物進行分析，結果顯示分泌物含有草酸、蘋果酸和富馬酸等有機酸，蘋果酸對 *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 表現出最大的趨化反應；Hida 等人 (2015) 對於植物病原細菌 *Ralstonia pseudosolanacearum* 的研究中，證實番茄根分泌的 L-蘋果酸的趨化性是受 McpM 介導，且對於感染過程至關重要。

蘋果酸誘導趨化反應的可能機制如下：趨化反應的關鍵組成部分是由甲基接受趨化蛋白 (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)、組胺酸激酶 (CheA) 和偶聯蛋白 (CheW) 形成的三元複合物。蘋果酸作為引誘劑 (attractant) 與 MCP 的配體結合域 (ligand binding domain, LBD) 相互作用，LBD 通常位於胞外。兩者結合後，刺激跨膜轉導，調節 CheA 自激酶活性，使反應調節因子 (CheY) 磷酸化。趨化反應是受 CheY 與 CheY-P 比率的調節，只有後者能夠與鞭毛馬達 (FliM) 相互作用，最終引起趨化性 (Feng et al., 2021)。



表十三、*E. mori* FS08 對單一有機酸化合物的趨化反應。

Table 13. Chemotaxis response of *E. mori* FS08 to sole organic acids after 42 h of incubation at 30 °C.

Compound	Water (blank)	10 mM Malic acid	10 mM Citric acid	10 mM Lactic acid
D1 ^a (cm)	2.02 ± 0.03 ^D	2.58 ± 0.03 ^A	2.10 ± 0.05 ^C	2.18 ± 0.06 ^B
D2 ^b (cm)	2.00 ± 0.05 ^B	2.20 ± 0.05 ^A	2.10 ± 0.01 ^{AB}	2.13 ± 0.06 ^A
RI ^c (response index)	0.502 ± 0.01 ^B	0.540 ± 0.00* ^A	0.500 ± 0.01 ^B	0.506 ± 0.00 ^B
image	   			

^a D1 is the distance measured from the site of inoculation to the colony edge closest to the compound. ^b D2 is the distance from the site of inoculation to the colony edge furthest from the compound. ^c RI (Response index) = D1 / (D1 + D2). *RI values greater than 0.52 indicate an attractant response (Zhang et al., 2019). Data were presented as means ± standard deviation of three replicates. The values with different capital letters were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different compounds ($p < 0.05$).

六、混合碳源添加 L-蘋果酸對 *E. mori* FS08 之趨化反應具加乘效果

先前的研究中，已知小黃瓜汁對 *E. mori* FS08 是很強的引誘劑 (顧, 2022)。

由於小黃瓜中的成分同時含有醣類及有機酸，因此進一步研究菌株對混合物的趨性行為，觀察是否會達到跟小黃瓜汁相同程度的趨化性。

表十四是 *E. mori* FS08 對混合碳源添加不同有機酸的趨化反應，包括 L-蘋果酸、檸檬酸或 DL-乳酸。結果顯示，培養至 42 小時，所有組別 RI 值皆大於 0.52，代表所有組別皆顯示引誘劑反應。不過，只有混合碳源添加 L-蘋果酸的組別和其他組別具有顯著差異，代表添加檸檬酸和 DL-乳酸的組別，他們的趨化性是受到混合碳源的吸引並非有機酸。實驗結果顯示，在混合碳源添加 L-蘋果酸對 *E. mori* FS08 的趨化性具有加乘的效果。

不過，和先前小黃瓜汁 (濃度為 25%) 的趨化性試驗相比，*E. mori* FS08 的趨性菌落型態有些不同，*E. mori* FS08 對小黃瓜汁有較明顯的整個群落遷移現象，明顯觀察到所有菌落均朝小黃瓜汁的方向扇形擴散，且培養至 35 小時菌落已圍繞在目標物四周 (顧, 2022)。而本研究的結果則是橢圓形的擴散，並至 42 小時，菌落才直接接觸到目標化合物。由於目標化合物配製在培養皿中，會產生圓形擴散出去的濃度梯度，而菌株起初的泳動能力亦是從接菌位點開始大範圍擴散出去，所以當菌株感知到引誘劑時，會同樣的以大範圍游動而靠近目標化合物，因此形成橢圓狀的菌落型態，此結果與其他文獻結果相似 (Pham and Parkinson, 2011)。先前小黃瓜汁趨化性研究之所以觀察到扇形菌落，可能是因為小黃瓜中除了醣類、有機酸外，還有許多其他成分，這些成分中可能有其他引誘劑，因此小黃瓜汁顯現對 *E. mori* FS08 非常強的吸引力，導致菌株一感知到小黃瓜汁便趨動很強的趨化反應，使所有菌落明顯朝小黃瓜汁移動。

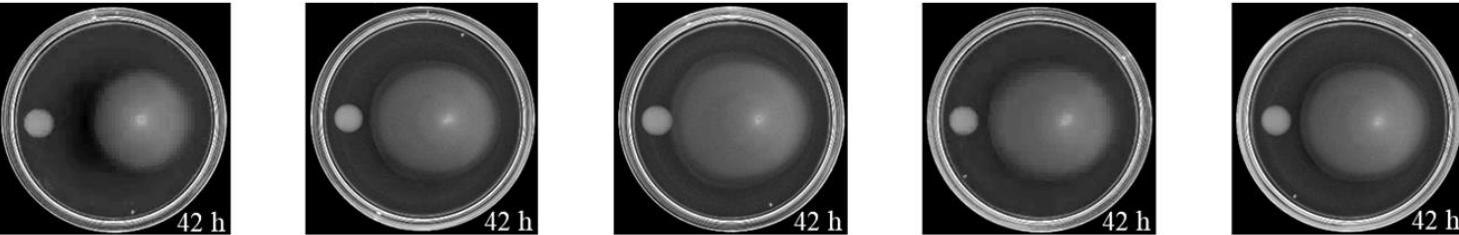
雖然前述結果顯示檸檬酸非常顯著的抑制泳動能力，但單一有機酸與混合碳源添加有機酸作為化合物的結果，皆顯示檸檬酸並不是趨避劑。雖然未查到直接的文獻說明此原因，不過文獻提及檸檬酸抑制泳動能力是因為影響 c-di-GMP 的水平 (Yuan et al., 2020)，而趨化性是配體 (引誘劑或趨避劑) 和甲基接受趨化蛋白結合後，引發的鞭毛旋轉調節反應 (Wadhams and Armitage, 2004)。可能是因為調節機制的不同，檸檬酸在 *E. mori* FS08 中並不會被甲基

接受趨化蛋白辨識，因此並未產生趨化反應。有趣的是，代表若食品中含有檸檬酸，並不會影響細菌向食品靠近。此外，結果顯示，菌株對混合碳源添加蘋果酸的趨性行為，並未達到跟小黃瓜汁相同程度的趨化性。代表小黃瓜汁中除了醣類、蘋果酸外，還有其他成分是引誘劑，需要進一步的實驗數據和文獻來確認。



表十四、*E. mori* FS08 對混合碳源添加有機酸的趨化反應。

Table 14. Chemotaxis response of *E. mori* FS08 to the mixed carbon sources supplemented with different organic acids after 42 h of incubation at 30 °C.

Compound	Water (blank)	GFS	GFS + Malic acid	GFS + Citric acid	GFS + Lactic acid
D1 ^a (cm)	2.18 ± 0.03 ^C	3.27 ± 0.18 ^B	3.67 ± 0.06 ^A	3.33 ± 0.12 ^B	3.40 ± 0.20 ^B
D2 ^b (cm)	2.22 ± 0.03 ^A	2.22 ± 0.03 ^A	2.25 ± 0.05 ^C	2.32 ± 0.08 ^A	2.45 ± 0.25 ^A
RI ^c (response index)	0.496 ± 0.01 ^C	0.596 ± 0.01* ^B	0.620 ± 0.01* ^A	0.590 ± 0.01* ^B	0.581 ± 0.01* ^B
image					

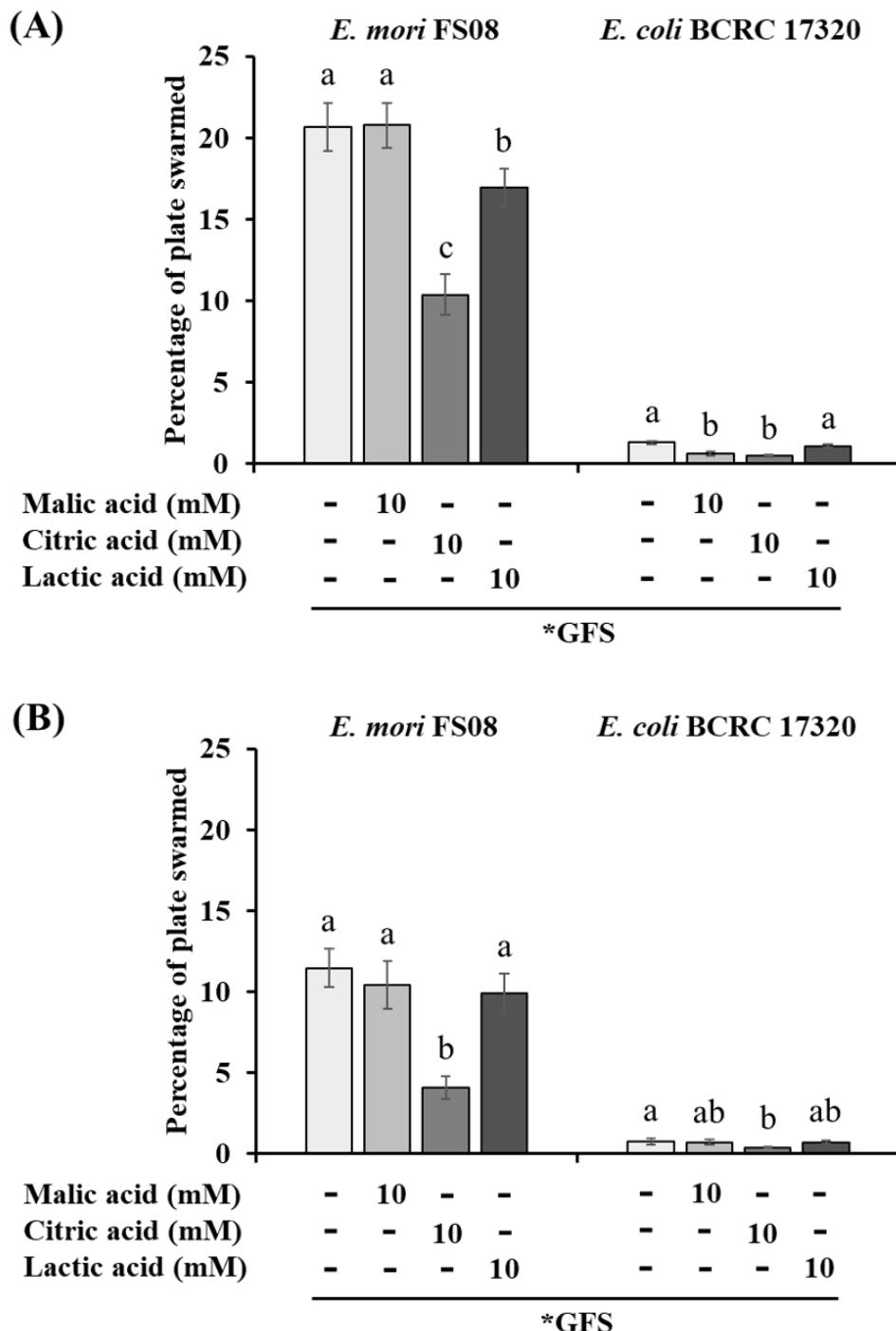
^a D1 is the distance measured from the site of inoculation to the colony edge closest to the compound. ^b D2 is the distance from the site of inoculation to the colony edge furthest from the compound. ^c RI (Response index) = D1 / (D1 + D2). *RI values greater than 0.52 indicate an attractant response (Zhang et al., 2019). GFS represents all groups were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. Data were presented as means ± standard deviation of three replicates. The values with different capital letters were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different compounds ($p < 0.05$).

七、L-蘋果酸不影響表面移行能力，檸檬酸與 DL-乳酸則抑制

細菌運動性包括泳動能力與表面移行能力。前述結果發現有機酸對菌株泳動能力的特殊調控，而表面移行能力是否受到相同的影響仍未知。因此進一步探討在混合碳源培養基 (0.4%瓊脂) 添加有機酸對菌株表面移行能力的影響。圖二十一 (A) 結果顯示，於 30 °C 培養 48 小時，添加 10 mM L-蘋果酸的組別與未加酸的組別相比，*E. mori* FS08 的表面移行能力不具有顯著差異；不過添加 10 mM 檸檬酸的組別，其表面移行能力與未加酸的組別相比，降低了將近 10%；DL-乳酸的添加也會抑制表面移行能力，但不如檸檬酸強烈。圖二十一 (B) 為培養於 37 °C 的結果，則是只有檸檬酸顯著降低 *E. mori* FS08 的表面移行能力，L-蘋果酸與 DL-乳酸皆不具有顯著差異。負控制組 *E. coli* BCRC 17320 無論在 30 °C 還是 37 °C 下，其表面移行能力皆非常差，不過統計上仍可觀察到於 30 °C 時，L-蘋果酸與檸檬酸皆抑制 *E. coli* BCRC 17320 的表面移行能力。

此結果並未觀察到 L-蘋果酸促進表面移行能力，可能跟細菌泳動和表面移行能力的調控系統不同有關。有鞭毛的細菌主要運動方式是泳動，由液體中大量的單一細胞在趨化系統的指導下進行。表面移行同樣是由鞭毛驅動的運動模式。然而，與泳動不同的是，表面移行是密集的細菌群組織成多細胞筏，在表面上的群體運動，很大程度上取決於鞭毛和細胞密度，趨化性本身並不是必要的 (Partridge, 2022)。並且表面移行是依賴於細菌群體的協同行為和群體感應調控 (Kearns, D. B., 2010)。

因此，L-蘋果酸是引誘劑，會驅動趨化反應系統連帶促進泳動能力。但 L-蘋果酸在 *E. mori* FS08 中可能沒有改變表面移行能力的調控機制。雖然表面移行能力的結果與泳動能力的結果有些不同，但整體上可以觀察到 *E. mori* FS08 在 30 °C 下，細菌運動性較好。檸檬酸與 DL-乳酸皆會抑制細菌運動性，且檸檬酸抑制效果特別顯著；L-蘋果酸僅於 30 °C 下促進泳動能力。



圖二十一、*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之表面移行能力。分別於 30 °C (A) 或 37 °C (B) 培養 48 小時。
 *GFS 代表所有組別均添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。數據以三個獨立重複的平均值 ± 標準差表示，並以單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同處理組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 21. Swarming motility of *E. mori* FS08 and *E. coli* BCRC 17320 in the mixed carbon source M9 medium containing 10 mM of different organic acids (0.4% agar). Incubated at 30 °C (A) or 37 °C (B) after 48 h. *GFS represents all groups were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatment groups.

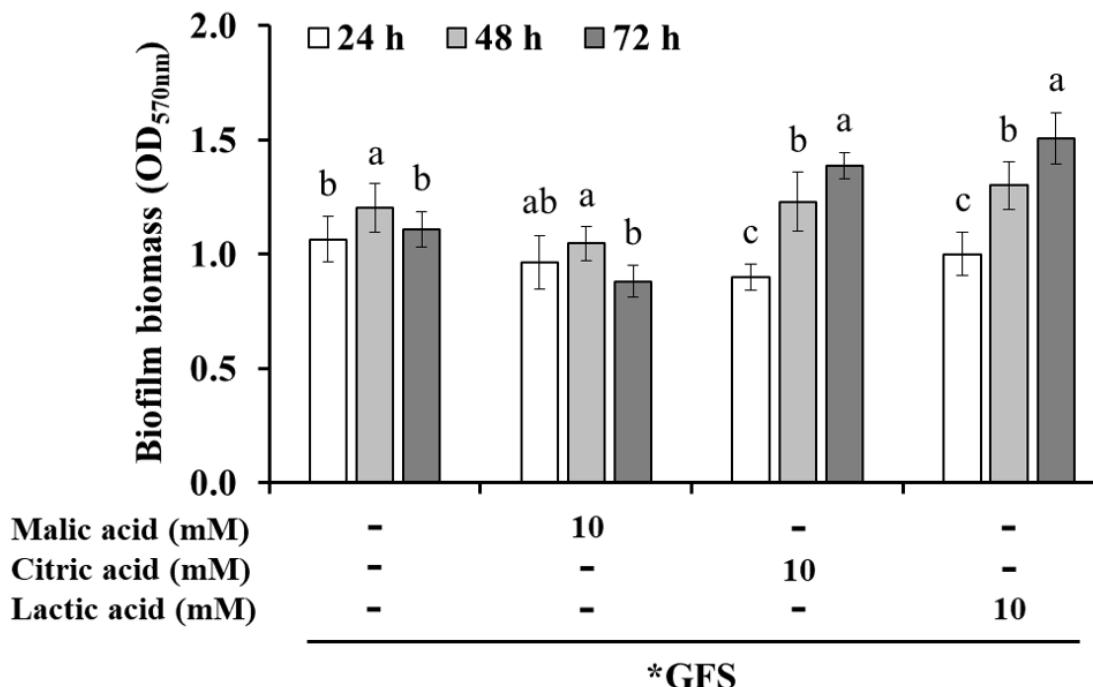
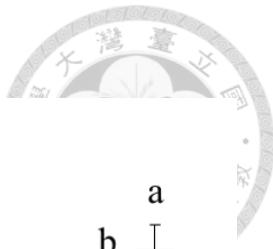
八、L-蘋果酸使生物膜形成減少，檸檬酸與 DL-乳酸則促進生物膜的形成

微生物形成的生物膜是導致食品腐敗的重要因子 (Carrascosa et al., 2021; Liu et al., 2023)。因此探討有機酸對生物膜的形成，在小黃瓜腐敗的研究中是需要被重視的。生物膜形成的過程為一個循環，並且和細菌運動性有關聯 (Sauer et al., 2022)。因此可藉由測定多個時間點觀察生物膜的循環。文獻顯示通常於三天內可觀察到生物膜增長的趨勢 (Pérez-Giménez et al., 2009; Simões et al., 2007; Wang et al., 2023)。因此本研究總共測定 24、48 與 72 小時三個時間點。

圖二十二為混合碳源培養基添加 10 mM 不同有機酸對 *E. mori* FS08 生物膜形成的影響。從生物膜形成的循環可觀察到，L-蘋果酸使生物膜形成有先升後減的現象，此趨勢與未添加酸的組別相似；檸檬酸與 DL-乳酸皆導致生物膜的形成隨著時間持續增加。若是將同個時間點的生物膜進行統計分析，於 24 小時，添加檸檬酸的組別產生的生物膜量最少；48 小時，則變成添加 L-蘋果酸的組別生物膜量最少，其他組別之間則不具有顯著差異；至 72 小時，和未加酸的組別相比，添加 L-蘋果酸的組別生物膜量仍最少，添加檸檬酸與 DL-乳酸的組別產生的生物膜皆比未加酸的組別多，尤其添加 DL-乳酸的組別產生的生物膜最多 (附錄十七)。而浮游態細胞的變化，每個組別皆顯示 OD_{600nm} 值隨著時間先升後減，但在統計上只有未加酸的組別和添加 DL-乳酸的組別於 48 小時有顯著差異。浮游態細胞在 24 小時，各個組別之間不具有顯著差異；48 小時，只有添加 DL-乳酸的組別顯著低於未加酸的組別；72 小時，則是只有添加 L-蘋果酸的組別顯著高於未加酸的組別 (附錄十八)。

總結來說，本研究之菌株特性分析發現非常有趣的現象，這三種有機酸在相同 pH 值下不影響 *E. mori* FS08 的活菌數，但 L-蘋果酸會促進泳動能力，並且是引誘劑，可是會產生較少的生物膜；檸檬酸與 DL-乳酸都會抑制細菌運動性，且檸檬酸的抑制更顯著，此外兩者都使菌株產生較多的生物膜。實驗結果顯示，運動性和生物膜的形成有相反的調節機制，與許多文獻相符 (Caiazza et al., 2007; Guttenplan and Kearns, 2013)。另有文獻結果顯示，蘋果酸誘導 *Bacillus amyloliquefaciens* 最大的趨化反應和表面移行能力，不過對生物膜形成無顯著影響 (Si et al., 2022; Tan et al., 2013; Yuan et al., 2015)。本研究則是觀察到 L-

蘋果酸對 *E. mori* FS08 具正向趨化反應和很強的泳動能力，但於 72 小時，明顯生物膜形成較少。與文獻結果相似的地方是，代表很強的細菌運動性，並不會因為與表面接觸率增加而產生較多的生物膜。然而，也有文獻顯示，一種由蘋果酸、檸檬酸、甘氨酸和馬尿酸組成的新型蘋果酸組合 (malic acid combination, MAC)，在 *Pseudomonas aeruginosa* 的生物膜測定中，包括結晶紫染色法 (偵測 OD_{570nm} 吸光值) 與掃描式電子顯微鏡 (SEM)，皆顯示 MAC 可以減少生物膜的形成，且該研究亦觀察到運動性相關基因表現量下調 (Song et al., 2023)。即細菌運動性和生物膜之間，在不同菌種以及不同的有機酸或濃度處理下，似乎沒有很一致的調控關係，仍需更多的研究與文獻來確定兩者的關聯。



圖二十二、*E. mori* FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生物膜形成。菌株培養於 30°C。*GFS 代表所有組別均添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。數據以三個獨立重複的平均值 \pm 標準差表示，並以單向變異數分析之 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示不同時間點之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

Figure 22. Biofilm biomass (OD_{570nm}) of *E. mori* FS08 in the mixed carbon sources M9 media containing 10 mM different organic acids at 30 °C. *GFS represents the media were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different time points.

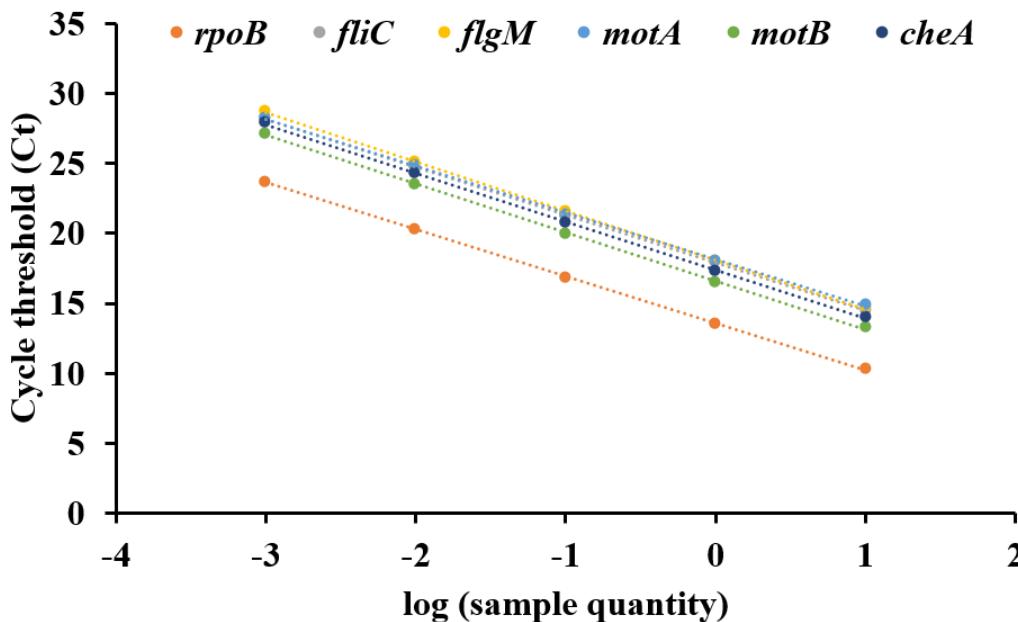
第三節、L-蘋果酸與檸檬酸對 *E. mori* FS08 運動性相關基因之影響

在前述結果中，L-蘋果酸與檸檬酸對 *E. mori* FS08 的運動性有明顯相反的影響，前者顯著促進運動性，後者則抑制。進一步將有機酸濃度提高，觀察到隨著蘋果酸的濃度增加，泳動能力越強。檸檬酸則仍是在 10 mM 時泳動能力最低。接著我們想分析有機酸對運動性相關基因表現量的影響，為了觀察到明顯的表現量差異，我們選擇泳動能力最強與最弱的兩種培養基進行，分別是混合碳源添加 40 mM 蘋果酸與添加 10 mM 檸檬酸的培養基。

一、引子效率

用於分析運動性相關基因表現量的目標基因分別是 *fliC* (鞭毛蛋白基因)、*flgM* (合成鞭毛蛋白的調節因子之相關基因)、*motA* (鞭毛馬達蛋白基因)、*motB* (鞭毛馬達蛋白基因) 以及 *cheA* (趨化反應系統蛋白之基因)。*rpoB* 則是管家基因 (Housekeeping gene)，此基因負責編碼 RNA 聚合酶的 β 亞基。管家基因通常參與細胞的基本代謝活動和維持細胞基本功能，因此常被用作基因表現中的內參考基因，以標準化實驗數據，它們的表現水平在不同樣本之間相對穩定。

在進行基因表現量測定前，需要先透過標準曲線確認引子的設計。首先，將 *E. mori* FS08 之 DNA 以十倍序列稀釋成五個標準濃度的樣品，作為檢量點，以製作針對各個基因設計之引子的標準曲線 (圖二十三)。而表十五為各個引子對根據標準曲線獲得的引子擴增效率、 R^2 、斜率以及代表引子專一性之熔解曲線 (Melt curve) 所對應之 T_m 值。引子擴增效率落在 90 至 110% 為可接受的範圍，而本研究設計之管家基因以及五個目標基因之引子的擴增效率皆落在 90 至 100%，代表各個檢量點之間是呈現穩定並準確的擴增倍率。另外，每個引子對都獲得單一的熔解曲線，表示在 qPCR 的過程中，僅一個特定的產物被擴增，無其他非特異性產物存在。結果顯示，本研究設計之引子皆具有專一性、準確性以及良好的擴增效率。



圖二十三、管家基因和目標基因之引子標準曲線。X 軸為 gDNA 數量的對數值；Y 軸為 Ct 值。基因列表：*rpoB* 為 RNA 聚合酶 β 亞基；*flic* 為鞭毛蛋白；*flgM* 為鞭毛蛋白合成調節劑；*motA* 與 *motB* 皆為鞭毛運動蛋白；*cheA* 為趨化蛋白（組胺酸蛋白激酶）。

Figure 23. Primers standard curve of housekeeping gene (*rpoB*) and target genes. The X-axis is the logarithm of gDNA quantity; the Y-axis is the Ct value. Gene list: *rpoB*, beta-subunit of RNA polymerase; *flic*, flagellar protein; *flgM*, regulator of flagellin synthesis; *motA* and *motB*, flagellar motor protein; *cheA*, chemotaxis protein (histidine protein kinase).



表十五、管家基因和目標基因之引子效率。

Table 15. Primer efficiency of housekeeping gene (*rpoB*) and target genes.

Genes	Efficiency (%)	R ²	slope	Tm (°C)
<i>rpoB</i>	98.46	0.9998	-3.361	86.44
<i>fliC</i>	96.17	0.9999	-3.417	83.15
<i>flgM</i>	92.89	0.9997	-3.506	86.14
<i>motA</i>	99.47	0.9996	-3.336	83
<i>motB</i>	94.41	0.9996	-3.465	89.42
<i>cheA</i>	94.06	0.9998	-3.473	89.28

Amplification efficiency was calculated according to the equation $E (\%) = 10^{(-1 / \text{slope})}$.

二、L-蘋果酸使 *E. mori* FS08 運動性相關基因表現量上升

接下來我們分析了 *E. mori* FS08 在添加 L-蘋果酸與檸檬酸的培養基中，運動性相關基因表現量的變化。許多文獻皆在對數生長期 (log phase) 時 (OD_{600nm} 值約 0.3 ~ 0.4)，收集細胞進行細菌運動性的基因表現譜研究 (Kafantaris et al., 2021; Liu et al., 2019; Meng et al., 2020; Parker et al., 2019)。而本研究中，依據 *E. mori* FS08 的生長曲線 (圖十五與圖十七)，觀察到 2 小時後菌株開始進入對數生長期 (log phase)。因此我們選擇菌株培養至 0、1.5、3 與 4.5 小時的細胞進行基因表現量測定。這幾個時間點分別為 (1) 正準備進入對數生長期前半小時；(2) 進入對數生長期一小時後；(3) 對數生長期中期。不同時間點之菌液 OD_{600nm} 值如附錄二十。期望在對數生長期前後的不同階段觀察到基因表現量的變化。

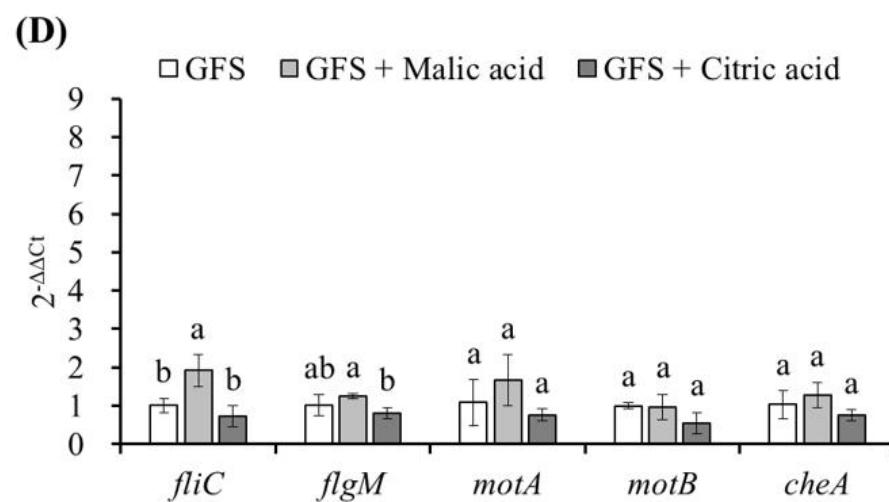
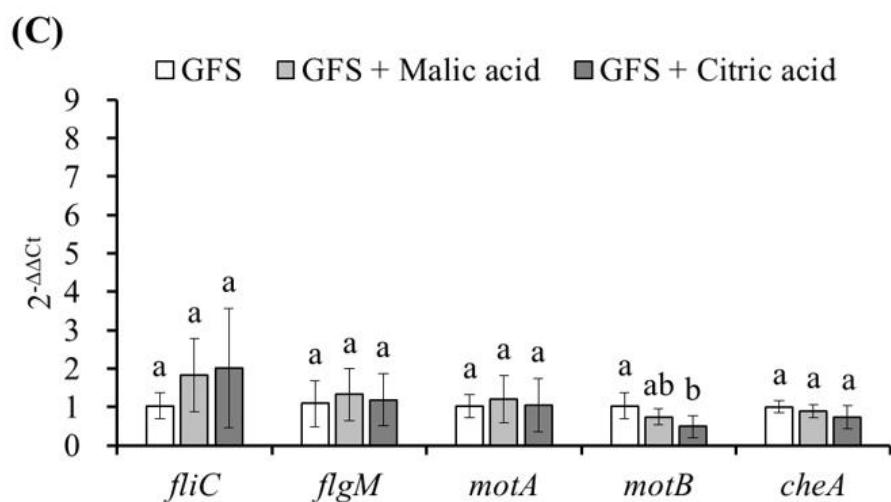
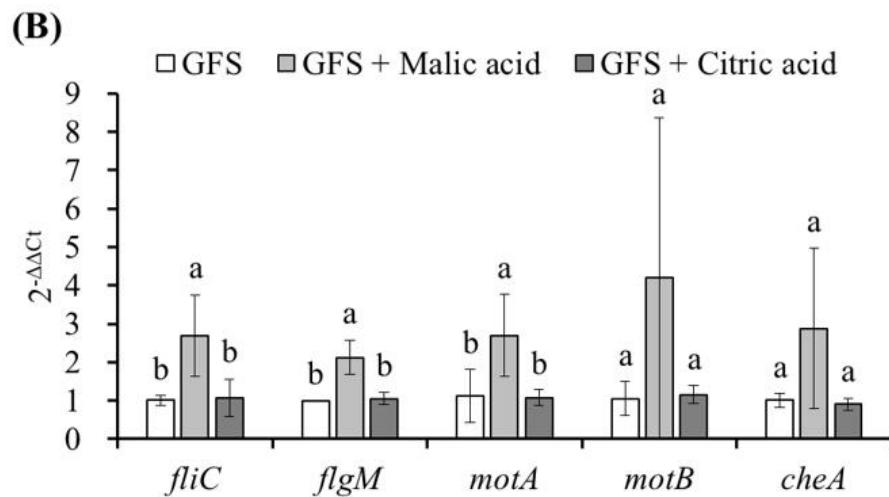
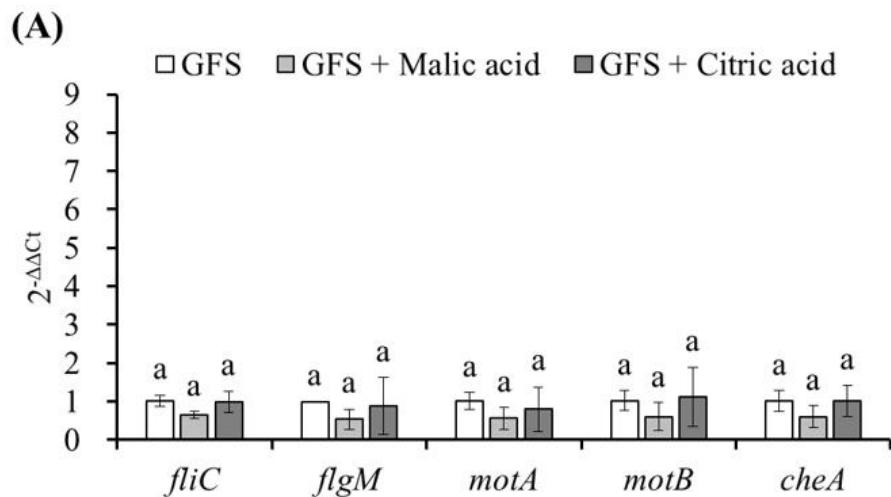
圖二十四為 *E. mori* FS08 於混含碳源培養基 (GFS) 添加 L-蘋果酸或檸檬酸，且所有培養基皆調整至 pH 6.6，在各個時間點下之運動性相關基因表現量。我們採用相對定量法以更精確的評估基因表現量變化。基因表現量以倍數變化 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示，使用管家基因 (*rpoB*) 進行標準化 (normalization)，並以各時間點之 GFS 作為校準品 (calibrator)。結果顯示，於 0 小時無論添加 L-蘋果酸或檸檬酸的組別和 GFS 比較，本研究挑選的運動性相關基因於三個組別之間並無顯著差異。但是至 1.5 小時，添加 L-蘋果酸的組別中，這些基因與 GFS 的表現量倍數變化皆大於 2，且 *fliC*、*flgM* 與 *motA* 這三個基因和 GFS 以及添加檸檬酸的組別相比具有顯著差異。然而 *motB* 與 *cheA* 因為三重複中變異數較大，在統計上和另外兩個組別不具有顯著差異。而添加檸檬酸的組別在 1.5 小時，各個基因和 GFS 的表現量倍數變化均無顯著差異。值得注意的是，添加 L-蘋果酸的組別培養至 3 小時與 4.5 小時，各個基因與 GFS 的表現量倍數變化均下降，且大多數都與 GFS 組別不具有顯著差異。於 3 小時，僅有 *motB* 在添加檸檬酸的組別中顯著低於 GFS 的組別；於 4.5 小時，則是只有 *fliC* 在添加 L-蘋果酸的組別中其基因表現量倍數變化顯著高於另外兩個組別，*flgM* 則是在添加 L-蘋果酸的組別顯著高於添加檸檬酸的組別，其餘基因均沒有明顯差異。

本研究菌株特性分析結果中，發現 L-蘋果酸會促進 *E. mori* FS08 的泳動能力，在基因表現量中亦觀察到運動性相關基因表現量上升，此結果與前述結果相呼應。然而前述結果亦發現檸檬酸顯著抑制 *E. mori* FS08 的泳動與表面移行能力，但並未觀察到運動性相關基因表現量降低。可能是因為細菌運動性受到許多系統調節，包括 c-di-GMP、趨化系統、群體感應等 (Gmiter and Kaca, 2022; Rinaldo et al., 2018; Wadhams and Armitage, 2004)。在我們所挑選的基因中，可能未涉及到顯著受到檸檬酸抑制的運動性相關基因，因此並未觀察到這些基因下調。此外，也有可能是因為細菌運動性是在含有瓊脂的半固體培養基測定，但基因表現譜的細胞是從液態培養基中取得。有文獻表示，菌株在半固體培養基中表面移行，培養基中間的細胞與菌落邊緣細胞以及液態培養之細胞，這三種狀態下的細菌運動性相關基因的表現量有所差異 (Su et al., 2023)。因此在液態環境中培養，可能無法明顯觀察到檸檬酸抑制細菌的運動性基因表現量。

此外，實驗結果觀察到添加 L-蘋果酸的組別相對於未加酸的組別，這些基因表現量的倍數差異在 1.5 小時最高，但隨後的時間點皆下降且與對照組沒有顯著差異。可能是因為細菌基因表現的變化速度相對較快，通常在數分鐘至數小時內就能觀察到對環境做出顯著的變化。例如，趨化性是細胞根據感知的化學梯度改變其運動方向的行為，主要是透過蛋白質磷酸化來調控，蛋白質磷酸化是一種重要的轉譯後修飾，涉及蛋白激酶添加磷酸基團到蛋白質上，從而改變蛋白質的結構和功能。因此細菌的趨化作用是快速的，不需要 *de novo* 基因誘導 (指的是在細胞透過外部刺激或內部調控機制，促使原本不表達或極少表達的基因開始轉錄和轉譯的過程)，因為他是基於蛋白質修飾和蛋白質-蛋白質之間的相互作用。因此，趨化基因表現平均大約 30 分鐘到幾個小時就能在測定中顯示足夠的訊號 (Roggo et al., 2019 ;Wadhams and Armitage, 2004)。也有文獻指出，當鞭毛相關基因表現量增加時，意謂開始轉錄轉譯出鞭毛蛋白。當鞭毛蛋白質水平達到一定數量後，這些蛋白質或其衍生產物可能會透過負回饋循環來控制轉錄調節因子的表達，抑制鞭毛基因的表現量，減少 mRNA 的生成 (Aldridge et al., 2002)。代表運動性相關基因表現可能在數分鐘內發生，然而，當基因表現並轉錄、轉譯成所需的蛋白質後，基因表現量恢復到正常水

平或許只需要幾個小時。因此在本研究中觀察到 3 小時後，運動性相關基因表現量下降。





圖二十四、*E. mori* FS08 於混含碳源培養基添加不同有機酸在各個時間點下之運動性相關基因表現量。菌株培養 0 小時 (A)、1.5 小時 (B)、3 小時 (C) 與 4.5 小時 (D) 後測量基因表現。基因表現量以倍數變化 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 表示，以管家基因 *rpoB* 的表現量進行標準化，並將各個時間點 GFS 的表現量作為校準品。數據以三個重複的平均值 \pm 標準差表示，並透過單向變異數分析和鄧肯多重範圍測試進行分析，比較不同處理組之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

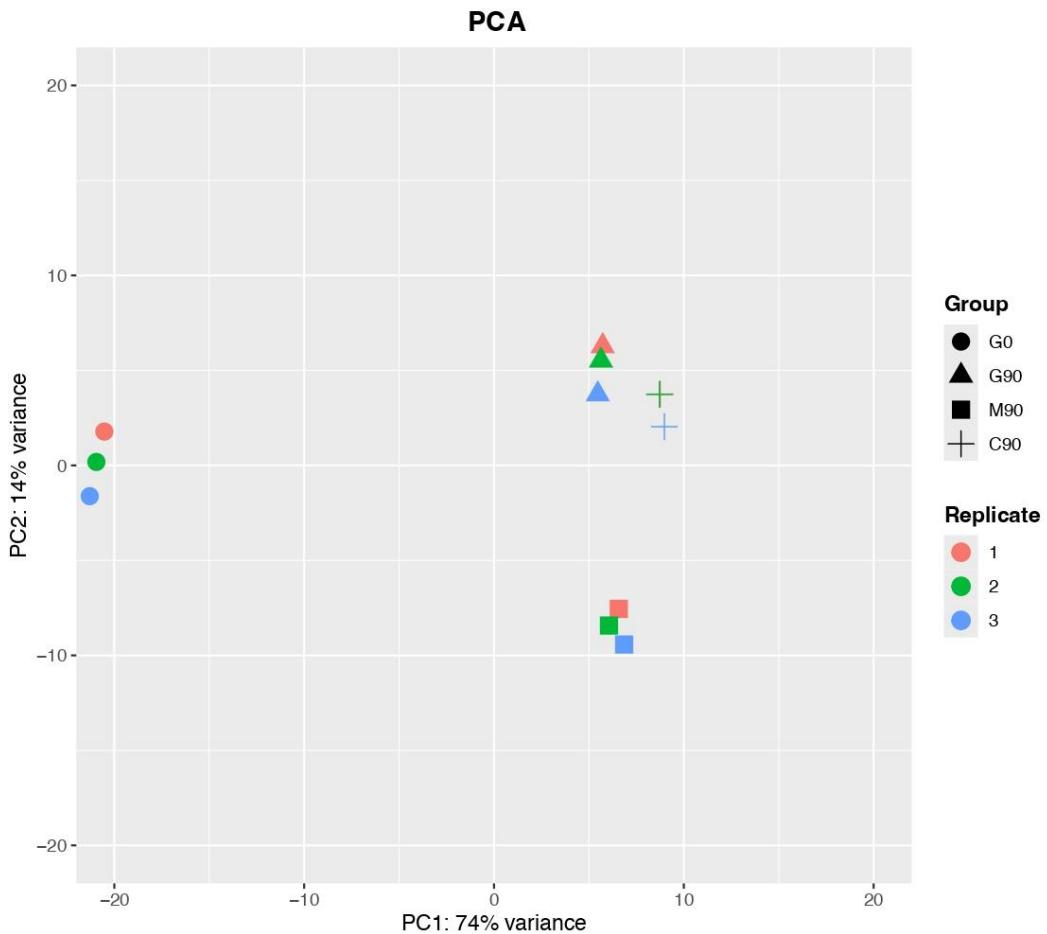
Figure 24. Gene expression of motility-related genes of *E. mori* FS08 in the mixed carbon source medium supplemented with different organic acids at various time points. Gene expression were measured after incubation for 0 h (A), 1.5 h (B), 3 h (C), 4.5 h (D). Fold changes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were normalized to the expression of the housekeeping gene *rpoB* and expression of GFS at each time point was used as a calibrator. Data were presented as means \pm standard deviation of three replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different treatment groups ($p < 0.05$).

第四節、L-蘋果酸與檸檬酸對 *E. mori* FS08 轉錄組之影響

在 qPCR 測試中，我們僅探討特定的幾個運動性相關基因，但實際上調控運動性的基因非常多，可能有其他受有機酸影響的基因並未被我們挑選到。為了幫助我們全面性的了解有機酸調控的所有基因，我們以 RNA-seq 的方式進一步分析菌株在添加有機酸後轉錄組的變化，以提供更多的資訊。基於個別基因表現量的測試結果，僅選擇明顯觀察到表現量有差異的時間點，即 1.5 小時 (90 分鐘) 的細胞做轉錄組分析。為方便撰述，不同處理的樣品組別將以代號表示，分別如下：G0 為菌株培養於混合碳源培養基 (GFS) 0 小時的轉錄組；G90 為菌株培養於 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；M90 為菌株培養於添加 L-蘋果酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；C90 為菌株培養於添加檸檬酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組。

一、主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)

進行轉錄組比對前，所有樣品先進行主成分分析 (圖二十五)。PCA 分析結果顯示，各個組別的三重複結果相近。PC1 顯示有 74% 的變異；PC2 顯示有 14% 的變異。PC1 與 PC2 累積解釋了 88% 的變異，變異數的累積百分比大於 50%，足夠代表原始數據的整體變異性。可以觀察到 G0 和其他組別的差距最大，推測是因為在培養菌株時，起初是在 TSB 中活化，活化後重新將細胞回溶至 GFS 培養基中，便立刻收下細胞作為 G0 的樣品，因此 G0 樣品可能主要仍表現在 TSB 培養基中的轉錄組變化，還未完全適應成 GFS 培養基的狀態。TSB 為滋養培養基 (Enriched media)，成分包含胰蛋白胨、大豆蛋白胨、葡萄糖、氯化鈉與磷酸二鉀，提供許多氮源 (胺基酸) 和碳源，並且能夠維持滲透壓與 pH 值穩定，以及含有其他礦物質和微量元素 (如鐵、鎂等)。反之 GFS M9 培養基僅含有醣類與無機鹽類，且只有氯化銨 (NH_4Cl) 為氮源。因此，細菌在這兩種培養基中會有相當不同的代謝差異。由於 TSB 培養基營養豐富，支持細菌快速生長，使細菌能夠迅速進行蛋白質合成、糖代謝、礦物質利用和其他生物化學反應；GFS 培養基的組成相對簡單，其生長代謝較受到營養的限制。這可能是導致 G0 樣品的整個轉錄組結果和培養 90 分鐘的樣品結果明顯不同的原因。而在 G90、M90 與 C90 三者中，G90 與 C90 的樣本之間較為相似，M90 則與這兩組樣本有所差異。這提供了 L-蘋果酸的處理對 *E. mori* FS08 基因表現產生影響的證據。



圖二十五、*E. mori* FS08 在不同有機酸處理下之轉錄組主成分分析。G0 為菌株培養於混合碳源培養基 (GFS) 0 小時的轉錄組；G90 為菌株培養於 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；M90 為菌株培養於添加 L-蘋果酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；C90 為菌株培養於添加檸檬酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組。

Figure 25. Principal component analysis (PCA) of the transcriptome of *E. mori* FS08 under different organic acid treatments. G0 is the transcriptome of the strain cultured in the mixed carbon source medium (GFS) for 0 h; G90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 90 min; M90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium supplemented with L-malic acid for 90 min; C90 is the transcriptome of strain cultured in GFS medium supplemented with citric acid for 90 min.

二、差異表達基因 (differentially expressed genes, DEGs)

差異表達基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的定義為基因表現量的平均倍數變化 (fold change, FC) ≥ 2 或 $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ ，且具有統計顯著性 ($p \leq 0.05$) 的基因 (Kafantaris et al., 2021)。我們分別以 G0 或 G90 作為未添加有機酸的對照組，進行有加酸和未加酸樣品的轉錄組比較。我們在 G90 vs G0 轉錄組的比對中，鑑定了 221 個差異表達基因 (DEGs)，其中包括 132 個上調基因和 89 個下調基因 (附錄二十二)。M90 vs G0 鑑定了 279 個差異表達基因 (DEGs)，其中包括 169 個上調基因和 110 個下調基因 (附錄二十三)。C90 vs G0 鑑定了 240 個差異表達基因 (DEGs)，其中包括 153 個上調基因和 87 個下調基因 (附錄二十四)。M90 vs G90 轉錄組的比對中，鑑定了 38 個差異表達基因 (DEGs)，其中包括 26 個上調基因和 12 個下調基因 (圖二十六)。而 C90 vs G90 鑑定了 19 個差異表達基因 (DEGs)，其中包括 12 個上調基因和 7 個下調基因 (圖二十七)。

可以發現與 G0 進行比對的組別 DEGs 較多，與 G90 進行比對的組別 DEGs 較少。前述 PCA 圖亦觀察到 G0 的整個轉錄組和其他樣品明顯不同，前述推測是因為在 0 小時菌株活化前後使用的培養基不同，G0 樣品的轉錄組仍處於營養豐富的培養基中的狀態，而 G90 樣品的轉錄組則已適應為轉變後的 GFS 培養基中的狀態。因此，為了更精確的說明有機酸對轉錄組的影響，考慮以 G90 的樣品作為對照組，更符合細菌在 GFS 培養基中的情況，後續特別探討 M90 vs G90 與 C90 vs G90 這兩個組別轉錄組的差異。

三、L-蘋果酸和檸檬酸處理與對照組相比有許多調控相似的 DEGs

M90 vs G90 與 C90 vs G90 的 DEGs 中，有 12 個相同的基因，且這些基因在兩個比較組別中，基因的調控變化類似 (附錄二十五)。根據 GO 分析註釋的詞彙，將這些相同的基因做以下描述，分別是 7 個上調的基因：*tsaC* (tRNA A37 羰甲基腺苷合成酶，參與 tRNA 修飾和代謝、雙股 RNA 結合、ATP 結合)、*pEBP* [未表徵的保守蛋白，屬於磷脂醇胺結合蛋白 (PEBP) 家族，此類蛋白在多種生物中參與信號傳導和細胞增殖]、*sodB* (超氧化物歧化酶，參與超氧化物代謝過程、金屬離子結合以及細胞抗氧化防禦，間接影響細菌存活和適應性)、*AINJHM_02370* (Tn7 轉座蛋白 B，與基因轉座有關)、*tauD* (牛磺酸代

謝雙加氧酶，參與牛磺酸的分解代謝)、*leuD* (3-異丙基蘋果酸脫水酶，參與支鏈氨基酸的生物合成)、*zinT* (金屬結合蛋白，參與鋅離子結合)。以及 5 個下調的基因：*ariR* (雙組份系統連接蛋白 AriR，參與信號傳導)、*gsiB* (一般應激蛋白 *YciG*，含有串聯 KGG 結構域)、*hemS* (擬似血紅素降解蛋白)、*ycgZ* (調節蛋白 *YcgZ*)、*blp2* (Ig-like 重複蛋白，可能涉及細胞表面結合)。

其中和抑制細菌運動性、促進生物膜形成相關的基因表現量下降，包括：*ariR*、*ycgZ* 與 *blp2*。許多文獻皆表示 *ariR* (雙組份系統連接蛋白 AriR，參與信號傳導) 與 *ycgZ* (調節蛋白 *YcgZ*) 在調節生物膜以及細菌運動性中的重要作用，並且這兩個基因參與調節 RcsB/C 系統。文獻指出，當 RcsB 磷酸化水平高，會抑制細菌的運動性並促進生物膜的形成；Rcs 系統受抑制時，會活化趨化行為和鞭毛合成 (Meng et al., 2020; Meng et al., 2021)。在 *E. coli* 的研究中，激活 *ycgZ* - *yngABC* 操縱子 (operon) 會誘導 *rcsCDB* 編碼的磷酸中繼系統，從而抑制細菌的捲曲纖維和生物膜的形成 (Kettles et al., 2019; Tschowri et al., 2012)。另外，*E. coli* 基因簇 *yngABC* 在生物膜發育和穩定性中發揮作用，其中 *YmgB* 蛋白質已被重新命名為 AriR。在含有葡萄糖的豐富培養基中 AriR 會降低細胞運動性，並保護細胞免受酸侵害 (Lee et al., 2007; Wood et al., 2009)。De Gregorio 等人 (2015) 的研究則說明致病菌 *Acinetobacter baumannii* ST1 AYE 的一種巨型生物膜相關蛋白 (biofilm-associated protein, BAP)，在生物膜形成和與宿主細胞的黏附中發揮重要作用，這類蛋白大多數具有免疫球蛋白樣 (Ig 樣) 基序。而剔除此菌株 *blp2* 基因，嚴重影響了生物膜的生物量和厚度以及對上皮細胞的黏附 (De Gregorio et al., 2015)。

本研究結果中，添加 L-蘋果酸或檸檬酸的組別均使 *airR*、*ycgZ* 基因下調，代表 Rcs 系統可能受到抑制，進而促進細菌運動性、活化趨化行為並抑制生物膜形成 (Meng et al., 2020; Meng et al., 2021)。而 *blp2* 基因下調，則意味著生物膜形成受到抑制。與前述菌株特性分析中 L-蘋果酸促進泳動能力與趨化性，並在生物膜後期抑制其形成的結果相符。然而，檸檬酸亦觀察到這些基因下調。菌株特性分析中，觀察到生物膜的形成在 24 小時受到檸檬酸抑制，至 72 小時才出現檸檬酸促進生物膜的現象。因此這些基因的下調可能與生物膜前期受檸檬酸的抑制有關。

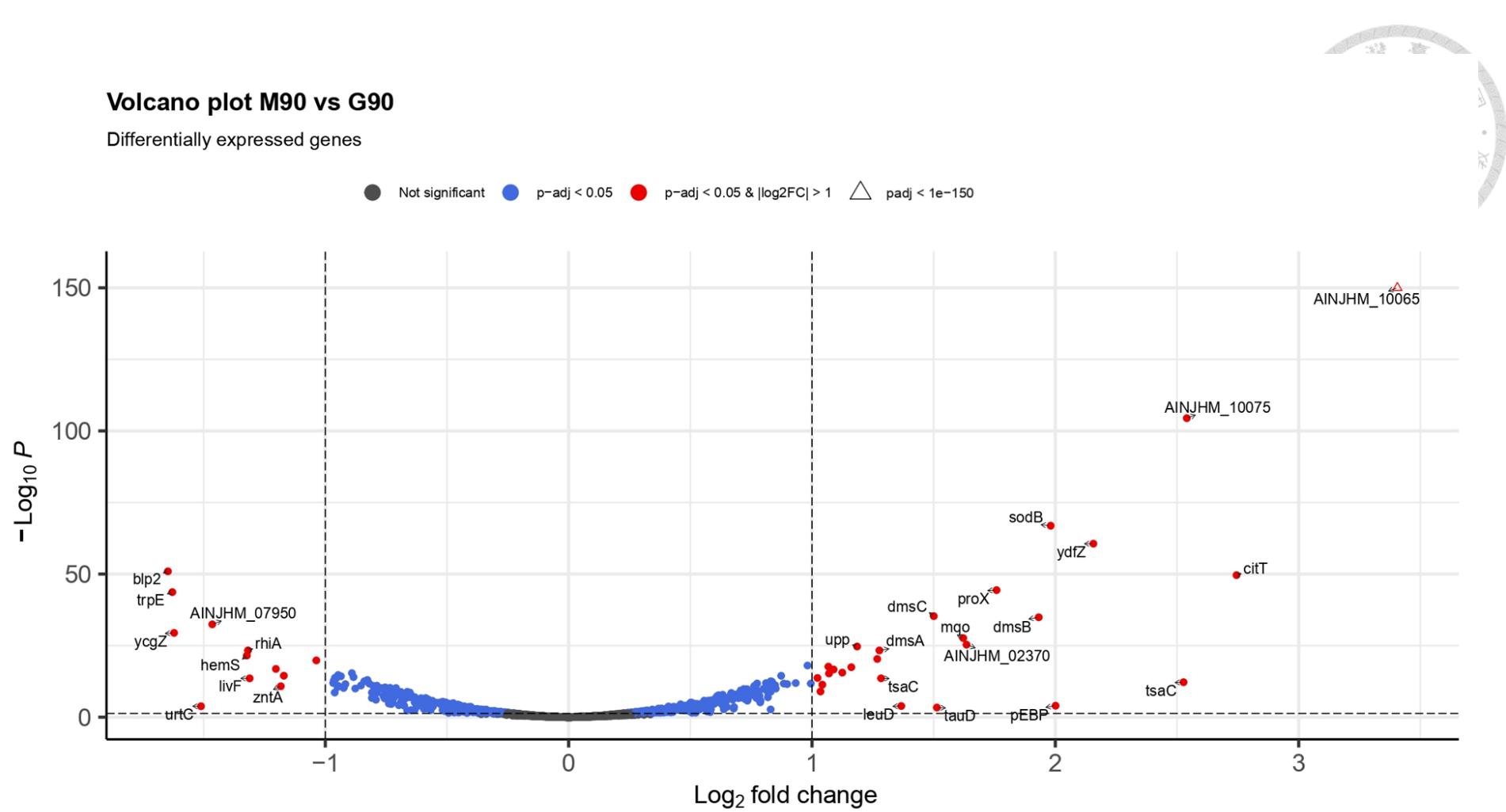
四、L-蘋果酸使能量產生、促進運動性和抑制生物膜形成相關的基因上調

其他在 M90 vs G90 組別上調的 DEGs 中 (附錄二十六)，差異倍數變化最大的為 AINJHM_10065，資料庫中未註釋到對應基因，推測為編碼細胞色素 c (flavocytochrome c) 的基因，此蛋白主要負責電子傳遞，對於細菌的能量生產很重要。另外，與 TCA 循環相關的基因包括：*citT*(二羧酸和三羧酸反向轉運蛋白， $\log_{2}FC = 2.74$)，此基因編碼的是一種類膜蛋白，負責將 TCA 循環的中間代謝物 (二羧酸和三羧酸分子) 輸送進出細胞或細胞內的不同區域，從而支持細胞的能量代謝和生長。*AINJHM_10075* (Fumarate hydratase class I，延胡索酸水合酶， $\log_{2}FC = 2.54$) 與 *mqa* (malate dehydrogenase，蘋果酸脫氫酶， $\log_{2}FC = 1.62$)，分別是 TCA 循環中催化延胡索酸轉化為蘋果酸，以及催化蘋果酸轉化為草酰乙酸，並將電子傳遞給輔酶 Q (quinone) 的酵素基因。這兩個基因直接參與 TCA 循環中有關蘋果酸的化學反應，對細胞的能量產生和代謝調節起到重要作用。C90 vs G90 並未觀察到類似的基因變化，此結果顯示 L-蘋果酸的處理使細菌產生更多的能量。

而促進細菌運動性、抑制生物膜形成相關的基因表現量上升，這些 DEGs 如下：*fis* (DNA 結合轉錄調節因子 Fis, $\log_{2}FC = 1.03$)、*ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase subunit C, $\log_{2}FC = 1.07$) 與 *narK* (硝酸鹽/亞硝酸鹽轉運蛋白 NarK, $\log_{2}FC = 1.04$)。其中轉錄調節因子 Fis 參與水稻根腐病的病原菌 *Dickeya ziae* 產生玉米胺 (一種植物毒素)。Fis 可調節各種毒力特徵，包括胞外酶和胞外多醣的產生、趨化泳動、表面移行能力、生物膜形成、細胞聚集以及群體感應系統。*fis* 基因主要是通過調控鞭毛基因和趨化基因的表達來促進細菌的運動性和趨化反應 (Lv et al., 2018)。AhpC 是烷基氫過氧化物還原酶的亞基，主要參與氧化還原平衡和抵抗氧化應激，而細菌對壓力的抵抗力可能會顯著影響生物膜的形成。研究發現剔除 *ahpC* 基因使細菌運動性會略微降低，但生物膜的形成顯著增加，或是透過增加胞外多醣的產生和相關的基因表現來促進早期生物膜形成。*ahpC* 突變體在豐富的培養基中內源性過氧化氫產量的增加增強了生物膜的形成。這些研究證明了 AhpC 能夠對抗氧化壓力，並調節細菌運動性與減少生物膜形成 (Jang et al., 2016; Oh and Jeon, 2014)。硝酸鹽可作為電子受體以支持細菌的呼吸作用，與細菌的代謝和生理活動密切相關。硝酸鹽/亞

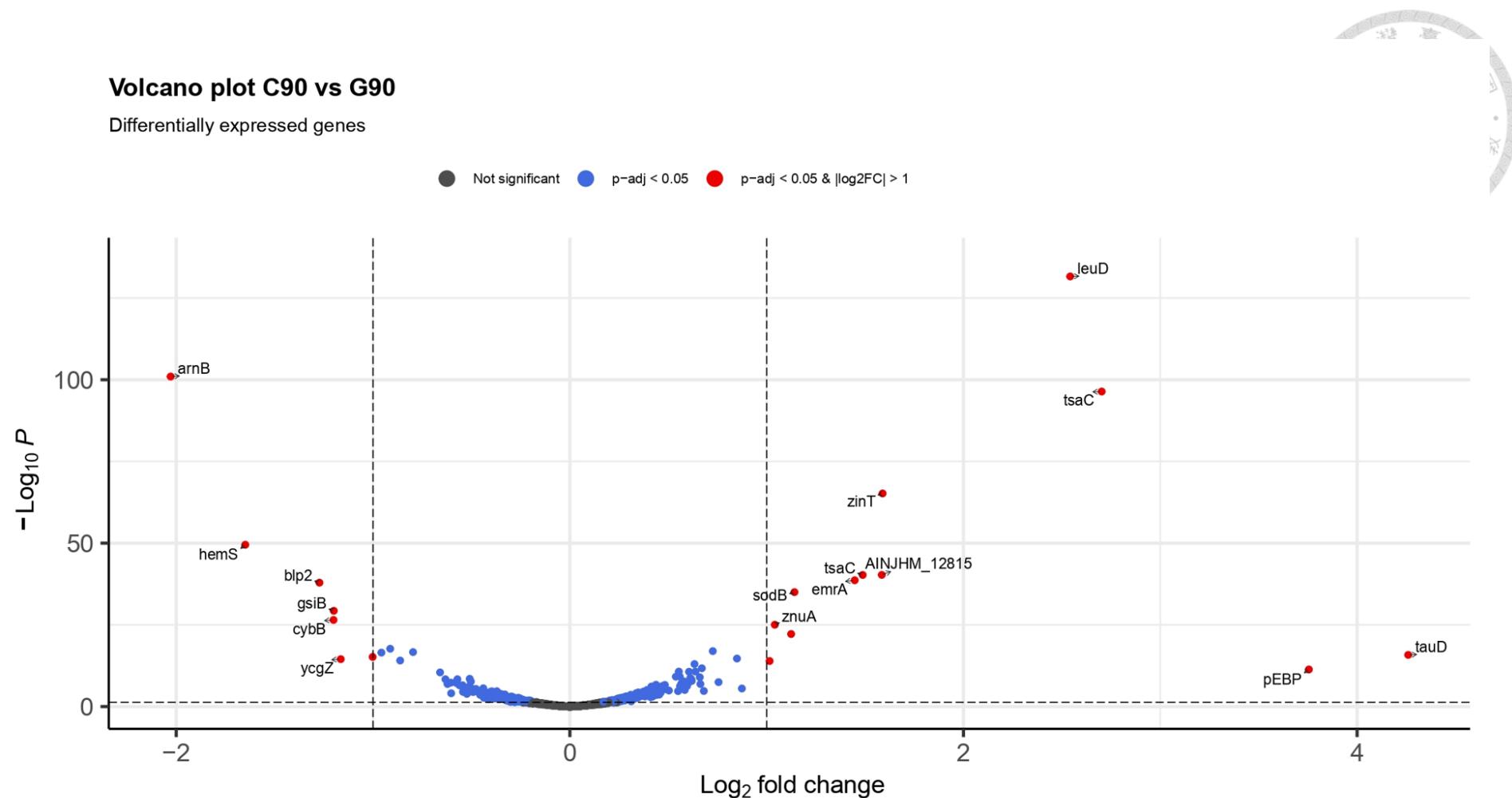
硝酸鹽轉運蛋白 NarK 有助於硝酸鹽的攝取，文獻指出硝酸鹽會降低 c-di-GMP 而抑制生物膜形成 (Mangalea et al., 2017; Shukla et al., 2021)。

總結來說，與 G90 相比，添加 L-蘋果酸的組別皆使抑制運動性、促進生物膜形成的相關基因 (*ariR*, *ycgZ*, *blp2*) 表現量下降，這些基因下調顯示細菌運動性的增加與生物膜的減少。然而，添加 L-蘋果酸的組別同時有其他促進運動性和抑制生物膜形成的相關基因 (*fis*, *ahpC*, *nark*) 表現量上升，這些基因上調皆與菌株特性分析中，L-蘋果酸調控的表型相符。此外，L-蘋果酸還誘導許多和能量產生相關的基因上調，包括電子傳遞與 TCA 循環。由於電子傳遞的過程中會造成活性氧 (ROS) 的增加，也因此觀察到氧化壓力相關基因 (*sodB*, *ahpC*) 上調。



圖二十六、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理與未加酸組別相比的 DEGs 之火山圖。M90 為菌株培養於添加 L-蘋果酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；G90 為菌株培養於 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組。橫軸為 \log_2 倍數變化。縱軸則為 $-\log_{10}(P)$ 代表顯著差異。灰點表示基因無顯著差異，藍點表示顯著差異基因 ($p\text{-adj} < 0.05$)，紅點表示差異表達基因 (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$)。

Figure 26. Volcano plot for DEGs of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment compared with the group without adding acid. M90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium supplemented with L-malic acid for 90 min; G90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 90 min. The horizontal axis represented the \log_2 (fold change) value. The vertical axis was $-\log_{10}(P)$, which represented the significant difference. Gray dots indicate no significant difference in genes, blue dots indicate significant difference genes ($p\text{-adj} < 0.05$), red dots indicate differentially expressed genes (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$).



圖二十七、*E. mori* FS08 於檸檬酸處理與未加酸組別相比的 DEGs 之火山圖。C90 為菌株培養於添加檸檬酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；G90 為菌株培養於 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組。橫軸為 \log_2 倍數變化。縱軸則為 $-\log_{10}(P)$ 代表顯著差異。灰點表示基因無顯著差異，藍點表示顯著差異基因 ($p\text{-adj} < 0.05$)，紅點表示差異表達基因 (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$)。

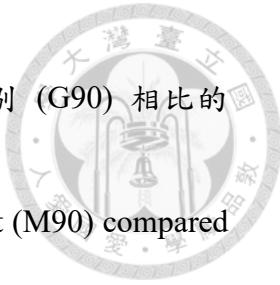
Figure 27. Volcano plot for DEGs of *E. mori* FS08 in citric acid treatment compared with the group without adding acid. C90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium supplemented with citric acid for 90 min; G90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 90 min. The horizontal axis represented the \log_2 (fold change) value. The vertical axis was $-\log_{10}(P)$, which represented the significant difference. Gray dots indicate no significant difference in genes, blue dots indicate significant difference genes ($p\text{-adj} < 0.05$), red dots indicate differentially expressed genes (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$).



五、KEGG 分析顯示 L-蘋果酸使群體感應受到抑制

以 KEGG 資料庫做進一步分析發現在 M90 vs G90 的比較組別發現群體感應相關基因下調，這些 DEGs 包括 *rhiA*、*trpE*、*livF*、*blp2* (表十六)。*rhiA* 在文獻中被證實參與根瘤菌的信號傳遞和共生形成，其位於三基因 *rhiABC* 操縱子中，受到 *rhiR* 基因的調控，*rhiR* 基因編碼群體感應中 LuxR 型調節因子，並且某些群體感應訊號分子 AHLs 會誘導 *rhiA* 的表現 (Gould et al., 2007; Rodelas et al., 1999)。*trpE* 參與色氨酸的合成，*Pseudomonas aeruginosa* 與 *E. coli* 的研究表明，色氨酸衍生的吲哚可以作為群體感應訊號分子的一部分，並且吲哚會抑制調控生物膜形成的 *ymgABC* 操縱子 (Chugani and Greenberg, 2010; Lee and Lee, 2010; Wood et al., 2009)。在 KEGG 資料庫中說明 *livF* (ABC-type branched-chain amino acid transport system, ATPase component LivF) 為 *E. mori* 群體感應系統中協助運輸自誘導劑 (Autoinducer, AI) 的 ABC (ATP-binding cassette) 轉運蛋白。而 *blp* 基因簇則是在 *Streptococcus thermophilus* 中負責調控群體感應 (Fontaine et al., 2007)。

另外，使用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 的分析方法與 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫進行基因集富集分析。亦分析出添加 L-蘋果酸的組別相較於未加酸的組別，有 19 個群體感應途徑之相關基因表現量下降 (表十七)。這些群體感應基因在添加 L-蘋果酸的組別中下調，顯示 L-蘋果酸使群體感應受到抑制，可能導致生物膜形成減少，再次證實與菌株特性分析之結果吻合。



表十六、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的
KEGG 分析。

Table 16. KEGG analysis of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment (M90) compared
with the group without adding acid (G90).

enriched KEGG	p value	p.adjust (FDR)	DEGs
Quorum sensing	5.64E-05	4.51E-04	<i>rhiA, trpE, livF, blp2</i>



表十七、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的 GSEA_KEGG 富集分析。

Table 17. GSEA_KEGG enrichment analysis of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment (M90) compared with the group without adding acid (G90).

GSEA_KEGG	Normalized Enrichment Score (NES)	pvalue	p.adjust (FDR)	core_genes_count
Quorum_sensing	-2.02	9.68E-06	2.81E-04	19

六、GSEA 分析顯示檸檬酸使鞭毛組裝相關基因表現量下降

而 C90 vs G90 的 DEGs (附錄二十七) 大部分都是和 M90 vs G90 相同的。生長代謝或轉譯調節相關基因。我們在菌株特性分析中，觀察到檸檬酸顯著抑制細菌運動性並促進生物膜形成。但在 C90 vs G90 的 DEGs 中，沒有看到運動性相關基因表現量下降。推測是運動性相關基因的抑制為立即反應，影響了細菌的轉錄與轉譯，而後續是受蛋白質-蛋白質的相互作用調控 (例如磷酸化)。另外，檸檬酸促進生物膜形成是在 72 小時才觀察到的，而我們是分析 1.5 小時的轉錄組，可能是生物膜形成的相關基因還未被誘導，因此在轉錄組中並未發現相關基因表現量上升。反倒是觀察到促進生物膜形成的基因 (*ariR*, *ycgZ*, *blp2*) 表現量下降。可能和菌株特性分析中，檸檬酸在 24 小時，會抑制生物膜的結果相符。

不過，進一步使用 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 的分析方法與 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 資料庫進行基因集富集分析。雖然 C90 vs G90 並未分析出任何基因集顯著富集，然而，在 C90 與 G0 (G0 為菌株培養於混合碳源培養基 0 小時的轉錄組) 的比較組別中，GSEAKEGG 分析出 6 個與鞭毛組裝 (Flagellar_assembly) 相關基因的表現量下降 (表十八)。無論是泳動能力還是表面移行能力都是利用鞭毛的旋轉來移動 (Partridge, 2022; Wadhwa and Berg, 2022)。因此，鞭毛對於細菌運動性是不可或缺的。而我們觀察到檸檬酸會降低鞭毛組裝相關基因的表現，與我們的菌株特性分析中，檸檬酸抑制運動性的結果相符。

雖然 C90 須與最初始的狀態 (G0) 相比才分析出鞭毛組裝相關基因的變化，如主成分分析 (PCA) 結果顯示 (圖二十五)，最初始的狀態 (G0) 與其他組別差異較大，而 C90 與 G90 的轉錄組較為接近，也因此與 G0 相比更容易分析出一些在與 G90 比較時無法觀察到的基因表現量變化。但是在 G90 vs G0 以及 M90 vs G0 皆未分析到與鞭毛相關基因的改變，意味著檸檬酸的處理確實在鞭毛合成的抑制中扮演重要的角色。



表十八、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比的 GSEA_KEGG 富集分析。

Table 18. GSEA_KEGG enrichment analysis of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment (M90) compared with the group without adding acid (G90).

GSEA_KEGG	Normalized Enrichment Score (NES)	pvalue	p.adjust (FDR)	core_genes_count
Flagellar_assembly	-1.96	5.30E-04	6.25E-03	6

第六章、結論與展望



本研究實驗結果顯示，*Enterobacter mori* FS08 會導致截切小黃瓜外觀發黃、變質，並且消耗小黃瓜中的醣類，因此判定此菌株為腐敗菌。並觀察到以富含醣類的培養基為基底下，添加 L-蘋果酸使 *E. mori* FS08 的泳動能力增強、引誘劑效果更顯著；添加檸檬酸會抑制細菌運動性，但是並不影響菌株的正向趨性行為。而基因表現量與轉錄組分析的結果證實 L-蘋果酸使運動性相關基因表現量上升，突顯 L-蘋果酸在腐敗菌的運動性上具有重要作用。小黃瓜中同時含有這些成分，若腐敗菌存在於食品加工過程的環境中，很可能受到醣類與 L-蘋果酸的吸引而污染小黃瓜。此外，我們觀察到檸檬酸使菌株的生物膜隨著時間增加，並且在 72 小時顯著多於未加酸的組別。生物膜是導致食品腐敗的重要因素之一，腐敗菌定殖於截切小黃瓜後，若檸檬酸促進其生物膜的形成，可能導致嚴重的細菌汙染。

然而，我們觀察到 L-蘋果酸與檸檬酸對細菌運動性和生物膜形成有相反的調控。未來的研究可以探討在混合碳源中同時添加這兩種有機酸對菌株特性的影響，如此更能說明菌株在小黃瓜中的狀況，也能了解這兩種有機酸對菌株行為的影響是否會互相拮抗。而 c-di-GMP 同時調節細菌運動性與生物膜形成，未來可以透過測定 c-di-GMP 濃度，為有機酸對這幾個表型的影響做更進一步的解釋。此外，蘋果酸與檸檬酸皆為 TCA 循環的代謝產物，但外源添加這兩種有機酸卻對菌株運動性有完全相反的影響，是否有正負回饋的機制或是衍生的其他代謝物影響菌株表型仍有待釐清，或許可以透過代謝體學 (Metabolomics) 或是分析 TCA 循環中間體在外源有機酸後的變化來確認。未來若要將細菌運動性、生物膜形成和食品腐敗的關聯性建立起來，最好的方式是將本研究轉錄組分析觀察到的相關基因從 *E. mori* FS08 中剔除，建構運動性或生物膜缺陷的突變體，並測定相關表型的變化以及將突變株接種回截切小黃瓜中觀察品質指標變化。

儘管本研究尚未直接證明細菌運動性與生物膜形成對食品腐敗的作用，但本研究的數據有助於深入了解食品中的成分對細菌定殖的潛在調控機制，這可以為理解腐敗菌引起的嚴重食品細菌汙染事件提供一些見解。未來開發防治微生物方法時可以有這些理論依據，期望對開發抑菌方法，減少食品腐敗、食物浪費與糧食缺乏的問題有所幫助。

第七章、參考文獻



- 李奕慧, 碳源對 *Pantoea vagans* M17 表面移行及生物膜形成的影響. 國立台灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文. 台北, 台灣, 2023.
- 顧子欣, 分離自截切小黃瓜之菌株 *Enterobacter* sp. FS08 特性分析. 國立台灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所碩士論文. 台北, 台灣, 2022.
- Adékambi, T.; Drancourt, M.; Raoult, D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* **2009**, *17* (1), 37-45.
- Aldridge, P.; Hughes, K. T. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* **2002**, *5* (2), 160-5.
- Alegbeleye, O.; Odeyemi, O. A.; Strateva, M.; Stratev, D. Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research* **2022**, *2* (1), 100122.
- Amrutha, B.; Sundar, K.; Shetty, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microb Pathog* **2017**, *111*, 156-162.
- Aroney, S. T. N.; Poole, P. S.; Sánchez-Cañizares, C. Rhizobial chemotaxis and motility systems at work in the soil. *Front Plant Sci* **2021**, *12*, 725338.
- Baker, A. E.; O'Toole, G. A. Bacteria, Rev your engines: stator dynamics regulate flagellar motility. *J Bacteriol* **2017**, *199* (12).
- Boumba, V. A.; Ziavrou, K. S.; Vougiouklakis, T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Sci Int* **2008**, *174* (2-3), 133-51.
- Caiazza, N. C.; Merritt, J. H.; Brothers, K. M.; O'Toole, G. A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **2007**, *189* (9), 3603-12.
- Cao, P.; Li, C.; Tan, K.; Liu, C.; Xu, X.; Zhang, S.; Wang, X.; Zhao, J.; Xiang, W. Characterization, phylogenetic analyses, and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on rice seedlings in Heilongjiang Province, China. *Plant Dis* **2020**, *104* (6), 1601-1609.
- Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Saraiva, A.; Raposo, A. Microbial biofilms in the food industry-A Comprehensive Review. *Int J Environ Res Public Health* **2021**, *18* (4).

Chitlapilly Dass, S.; Wang, R. Biofilm through the looking glass: a microbial food safety perspective. *Pathogens* **2022**, *11* (3).

Chugani, S.; Greenberg, E. P. LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (23), 10673-8.

Colin, R.; Ni, B.; Laganenka, L.; Sourjik, V. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiol Rev* **2021**, *45* (6).

Cooney, S.; O'Brien, S.; Iversen, C.; Fanning, S. Bacteria: other pathogenic Enterobacteriaceae – *Enterobacter* and other genera. In *Encyclopedia of Food Safety*, 2014; pp 433-441.

D'Agostino, M.; Cook, N. Foodborne pathogens. *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**, pp 83-86.

Davin-Regli, A.; Lavigne, J. P.; Pages, J. M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **2019**, *32* (4).

Davin-Regli, A.; Pagès, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* **2015**, *6*, 392.

De Gregorio, E.; Del Franco, M.; Martinucci, M.; Roscetto, E.; Zarrilli, R.; Di Nocera, P. P. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 933.

Di Martino, P. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol* **2018**, *4* (2), 274-288.

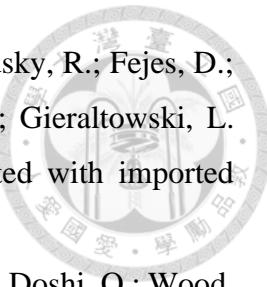
Dong, X.; Tu, C.; Liu, Y.; Zhang, R.; Liu, Y. Identification of the core c-di-GMP turnover proteins responsible for root colonization of *Bacillus velezensis*. *iScience* **2022**, *25* (11), 105294.

Feng, H.; Fu, R.; Hou, X.; Lv, Y.; Zhang, N.; Liu, Y.; Xu, Z.; Miao, Y.; Krell, T.; Shen, Q.; Zhang, R. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root-microbe rhizosphere interactions. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (13).

Feng, L.; Xu, M.; Zeng, W.; Zhang, X.; Wang, S.; Yao, Z.; Zhou, T.; Shi, S.; Cao, J.; Chen, L. Evaluation of the antibacterial, antibiofilm, and anti-virulence effects of acetic acid and the related mechanisms on colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **2022**, *22* (1), 306.

- Fontaine, L.; Boutry, C.; Guédon, E.; Guillot, A.; Ibrahim, M.; Grossiord, B.; Hols, P. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **2007**, *189* (20), 7195-205.
- Fukuda, N. Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. *Sci Rep* **2023**, *13* (1), 1513.
- Fung, D. Y. C. Food spoilage, preservation and quality control. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Schaechter, M., Ed. Academic Press: Oxford. **2009**, pp 54-79.
- Galié, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E. M.; Villar, C. J.; Lombó, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Front Microbiol* **2018**, *9*, 898.
- Gmíter, D.; Kaca, W. Into the understanding the multicellular lifestyle of *Proteus mirabilis* on solid surfaces. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *12*, 864305.
- Gould, P.; Maguire, M.; Lund, P. A. Distinct mechanisms regulate expression of the two major *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum*. *Arch Microbiol* **2007**, *187* (1), 1-14.
- Grand View Research. Fresh Fruits Market Size & Share | Industry Report, 2028. 2023.
- Guo, L.; Wang, Y. H.; Cui, R.; Huang, Z.; Hong, Y.; Qian, J. W.; Ni, B.; Xu, A. M.; Jiang, C. Y.; Zhulin, I. B.; Liu, S. J.; Li, D. F. Attractant and repellent induce opposing changes in the four-helix bundle ligand-binding domain of a bacterial chemoreceptor. *PLoS Biol* **2023**, *21* (12), e3002429.
- Guttenplan, S. B.; Kearns, D. B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **2013**, *37* (6), 849-71.
- Halkman, H. B. D.; Halkman, A. K. Indicator organisms. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, **2014**, pp 358-363.
- Hartl, R.; Kerschner, H.; Gattringer, R.; Lepuschitz, S.; Allerberger, F.; Sorschag, S.; Ruppitsch, W.; Apfalter, P. Whole-genome analysis of a human *Enterobacter mori* isolate carrying a *bla*(IMI-2) carbapenemase in Austria. *Microb Drug Resist* **2019**, *25* (1), 94-96.
- Hida, A.; Oku, S.; Kawasaki, T.; Nakashimada, Y.; Tajima, T.; Kato, J. Identification of the *mcpA* and *mcpM* genes, encoding methyl-accepting proteins involved in amino acid and l-malate chemotaxis, and involvement of McpM-mediated chemotaxis in plant infection by *Ralstonia pseudosolanacearum* (formerly

- Ralstonia solanacearum* phylotypes I and III). *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81* (21), 7420-30.
- Jang, I. A.; Kim, J.; Park, W. Endogenous hydrogen peroxide increases biofilm formation by inducing exopolysaccharide production in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21121.
- Jung, J.; Schaffner, D. W. Quantification of survival and transfer of *Salmonella* on fresh cucumbers during waxing. *J Food Prot* **2021**, *84* (3), 456-462.
- Jung, M. Y.; Park, B. S.; Lee, J.; Oh, M. K. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. *Bioresour Technol* **2013**, *139*, 21-7.
- Kafantaris, I.; Tsadila, C.; Nikolaidis, M.; Tsavva, E.; Dimitriou, T. G.; Iliopoulos, I.; Amoutzias, G. D.; Mossialos, D. Transcriptomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* response to pine honey via RNA sequencing indicates multiple mechanisms of antibacterial activity. *Foods* **2021**, *10* (5).
- Kearns, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8* (9), 634-44.
- Kettles, R. A.; Tschowri, N.; Lyons, K. J.; Sharma, P.; Hengge, R.; Webber, M. A.; Grainger, D. C. The *Escherichia coli* MarA protein regulates the *ycaZ-ymgABC* operon to inhibit biofilm formation. *Mol Microbiol* **2019**, *112* (5), 1609-1625.
- Kiymaci, M. E.; Altanlar, N.; Gumustas, M.; Ozkan, S. A.; Akin, A. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microb Pathog* **2018**, *121*, 190-197.
- Korkeala, H.; Alanko, T.; Mäkelä, P.; Lindroth, S. Lactic acid and pH as indicators of spoilage for vacuum-packed cooked ring sausages. *Int J Food Microbiol* **1990**, *10* (3-4), 245-53.
- Kritikos, A.; Aska, I.; Ekonomou, S.; Mallouchos, A.; Parlapani, F. F.; Haroutounian, S. A.; Boziaris, I. S. Volatilome of chill-stored European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) slices under modified atmosphere packaging. *Molecules* **2020**, *25* (8).
- Larsen, S. H.; Adler, J.; Gargus, J. J.; Hogg, R. W. Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**, *71* (4), 1239-43.



- Laughlin, M.; Bottichio, L.; Weiss, J.; Higa, J.; McDonald, E.; Sowadsky, R.; Fejes, D.; Saupe, A.; Provo, G.; Seelman, S.; Concepción-Acevedo, J.; Gieraltowski, L. Multistate outbreak of *Salmonella* Poona infections associated with imported cucumbers, 2015-2016. *Epidemiol Infect* **2019**, *147*, e270.
- Lee, J.; Page, R.; García-Contreras, R.; Palermino, J. M.; Zhang, X. S.; Doshi, O.; Wood, T. K.; Peti, W. Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *J Mol Biol* **2007**, *373* (1), 11-26.
- Lee, J. H.; Lee, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **2010**, *34* (4), 426-44.
- Li, X. S.; Xue, J. Z.; Qi, Y.; Muhammad, I.; Wang, H.; Li, X. Y.; Luo, Y. J.; Zhu, D. M.; Gao, Y. H.; Kong, L. C.; Ma, H. X. Citric acid confers broad antibiotic tolerance through alteration of bacterial metabolism and oxidative stress. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (10).
- Liu, X.; Yan, Y.; Wu, H.; Zhou, C.; Wang, X. Biological and transcriptomic studies reveal *hfq* is required for swimming, biofilm formation and stress response in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *BMC Microbiol* **2019**, *19* (1), 103.
- Liu, X.; Yao, H.; Zhao, X.; Ge, C. Biofilm formation and control of foodborne pathogenic bacteria. *Molecules* **2023**, *28* (6).
- Lv, M.; Chen, Y.; Liao, L.; Liang, Z.; Shi, Z.; Tang, Y.; Ye, S.; Zhou, J.; Zhang, L. *Fis* is a global regulator critical for modulation of virulence factor production and pathogenicity of *Dickeya zeae*. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 341.
- Mangalea, M. R.; Plumley, B. A.; Borlee, B. R. Nitrate sensing and metabolism inhibit biofilm formation in the opportunistic pathogen *Burkholderia pseudomallei* by reducing the intracellular concentration of c-di-GMP. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1353.
- Mansur, A. R.; Seo, D.-H.; Song, E.-J.; Song, N.-E.; Hwang, S. H.; Yoo, M.; Nam, T. G. Identifying potential spoilage markers in beef stored in chilled air or vacuum packaging by HS-SPME-GC-TOF/MS coupled with multivariate analysis. *Lwt* **2019**, *112*.
- Martín-Mora, D.; Ortega, Á.; Pérez-Maldonado, F. J.; Krell, T.; Matilla, M. A. The activity of the C4-dicarboxylic acid chemoreceptor of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by chemoattractants and antagonists. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 2102.

McFeeters, R.F.; Fleming, H.P.; Thompson, R.L. Malic and citric acids in pickling Cucumbers. *Journal of Food Science* **1982**, *47*: 1859-1861.

Meng, J.; Bai, J.; Chen, J. Transcriptomic analysis reveals the role of RcsB in suppressing bacterial chemotaxis, flagellar assembly and infection in *Yersinia enterocolitica*. *Curr Genet* **2020**, *66* (5), 971-988.

Meng, J.; Young, G.; Chen, J. The Rcs system in Enterobacteriaceae: envelope stress responses and virulence regulation. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 627104.

Miller, M. B.; Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **2001**, *55*, 165-99.

Minamino, T.; Imae, Y.; Oosawa, F.; Kobayashi, Y.; Oosawa, K. Effect of intracellular pH on rotational speed of bacterial flagellar motors. *J Bacteriol* **2003**, *185* (4), 1190-4.

Mulchandani, R.; Brehmer, C.; Butt, S.; Vishram, B.; Harrison, M.; Marchant, E.; Ferris, S.; Jorgensen, F.; Smith, R.; Godbole, G.; Jenkins, C.; Dallman, T. J.; Verlander, N. Q.; Phin, N.; Todkill, D.; Gharbia, S.; Hawker, J. Outbreak of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* O157 linked with consumption of a fast-food product containing imported cucumbers, United Kingdom, August 2020. *Int J Infect Dis* **2021**, *110 Suppl 1*, S62-s68.

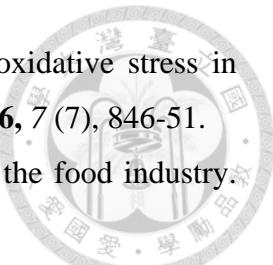
Mustafa, A.; Ibrahim, M.; Rasheed, M. A.; Kanwal, S.; Hussain, A.; Sami, A.; Ahmed, R.; Bo, Z. Genome-wide analysis of four *Enterobacter cloacae* complex type strains: insights into virulence and niche adaptation. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 8150.

Nakamura, S.; Minamino, T. Flagella-driven motility of bacteria. *Biomolecules* **2019**, *9* (7).

Nyenje, M. E.; Green, E.; Ndip, R. N. Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9582-93.

Nyenje, M. E.; Odadjare, C. E.; Tanih, N. F.; Green, E.; Ndip, R. N. Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. *Int J Environ Res Public Health* **2012**, *9* (8), 2608-19.

Oh, E.; Jeon, B. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* **2014**, *9* (1), e87312.

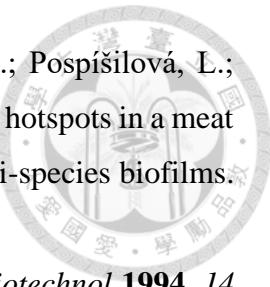


- Oh, E.; Kim, J. C.; Jeon, B. Stimulation of biofilm formation by oxidative stress in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Virulence* **2016**, *7* (7), 846-51.
- Olanbiwoninu, A. A.; Popoola, B. M. Biofilms and their impact on the food industry. *Saudi J Biol Sci* **2023**, *30* (2), 103523.
- Paksanont, S.; Sintiprungrat, K.; Yimthin, T.; Pumirat, P.; Peacock, S. J.; Chantratita, N. Effect of temperature on *Burkholderia pseudomallei* growth, proteomic changes, motility and resistance to stress environments. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 9167.
- Papenfort, K.; Bassler, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14* (9), 576-88.
- Parker, D. J.; Demetci, P.; Li, G. W. Rapid accumulation of motility-activating mutations in resting liquid culture of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **2019**, *201* (19).
- Partridge, J. D. Surveying a swarm: experimental techniques to establish and examine bacterial collective motion. *Appl Environ Microbiol* **2022**, *88* (3), e0185321.
- Pérez-Giménez, J.; Mongiardini, E. J.; Althabegoiti, M. J.; Covelli, J.; Quelas, J. I.; López-García, S. L.; Lodeiro, A. R. Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants. *Int J Microbiol* **2009**, *2009*, 719367.
- Pfeifer, V.; Beier, S.; Alirezaeizanjan, Z.; Beta, C. Role of the two flagellar stators in swimming motility of *Pseudomonas putida*. *mBio* **2022**, *13* (6), e0218222.
- Pham, H. T.; Parkinson, J. S. Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *J Bacteriol* **2011**, *193* (23), 6597-604.
- Qadri, O. S.; Yousuf, B.; Srivastava, A. K.; Yildiz, F. Fresh-cut fruits and vegetables: critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks—A review. *Cogent Food & Agriculture* **2015**, *1* (1).
- Raffo, A.; Paoletti, F. Fresh-cut vegetables processing: environmental sustainability and food safety issues in a comprehensive perspective. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **2022**, *5*.
- Rekha, K.; Baskar, B.; Srinath, S.; Usha, B. Plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* RR4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. *Can J Microbiol* **2018**, *64* (1), 20-27.
- Rinaldo, S.; Giardina, G.; Mantoni, F.; Paone, A.; Cutruzzolà, F. Beyond nitrogen metabolism: nitric oxide, cyclic-di-GMP and bacterial biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **2018**, *365* (6).

- Rodelas, B.; Lithgow, J. K.; Wisniewski-Dye, F.; Hardman, A.; Wilkinson, A.; Economou, A.; Williams, P.; Downie, J. A. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* **1999**, *181* (12), 3816-23.
- Rogers, L.; Power, K.; Gaora, P. Ó.; Fanning, S. *Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: occurrence and detection. In *Encyclopedia of Food and Health*, **2016**, pp 545-551.
- Roggo, C.; Carraro, N.; van der Meer, J. R. Probing chemotaxis activity in *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 3845.
- Rudrappa, T.; Czymbek, K. J.; Paré, P. W.; Bais, H. P. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol* **2008**, *148* (3), 1547-56.
- Rutherford, S. T.; Bassler, B. L., Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2* (11).
- Sabri, S.; Nielsen, L. K.; Vickers, C. E. Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain. *Appl Environ Microbiol* **2013**, *79* (2), 478-87.
- Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D. M.; Hall-Stoodley, L.; Burmølle, M.; Stewart, P. S.; Bjarnsholt, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* **2022**, *20* (10), 608-620.
- Schroeder, B. K.; Waters, T. D.; du Toit, L. J. Evaluation of onion cultivars for resistance to *Enterobacter cloacae* in storage. *Plant Dis* **2010**, *94* (2), 236-243.
- Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* **2016**, *121* (2), 309-19.
- Sharma, M.; Saleh, D.; Charron, J. B.; Jabaji, S., A Crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 575578.
- Shi, Y.; Pu, D.; Zhou, X.; Zhang, Y. Recent progress in the study of taste characteristics and the nutrition and health properties of organic acids in foods. *Foods* **2022**, *11* (21).
- Shrout, J. D.; Chopp, D. L.; Just, C. L.; Hentzer, M.; Givskov, M.; Parsek, M. R. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa*

- biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **2006**, *62* (5), 1264-77.
- Shukla, S. K.; Khan, A.; Rao, T. S. Chapter 22 - Microbial fouling in water treatment plants. In *Microbial and Natural Macromolecules*, Das, S.; Dash, H. R., Eds. Academic Press: **2021**, pp 589-622.
- Si, P.; Shao, W.; Yu, H.; Xu, G.; Du, G. Differences in microbial communities stimulated by malic acid have the potential to improve nutrient absorption and fruit quality of grapes. *Front Microbiol* **2022**, *13*, 850807.
- Simões, L. C.; Simões, M.; Vieira, M. J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73* (19), 6192-200.
- Sisti, F.; Ha, D. G.; O'Toole, G. A.; Hozbor, D.; Fernández, J. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology (Reading)* **2013**, *159* (Pt 5), 869-879.
- Song, K.; Chen, L.; Suo, N.; Kong, X.; Li, J.; Wang, T.; Song, L.; Cheng, M.; Guo, X.; Huang, Z.; Huang, Z.; Yang, Y.; Tian, X.; Choo, S. W. Whole-transcriptome analysis reveals mechanisms underlying antibacterial activity and biofilm inhibition by a malic acid combination (MAC) in *Pseudomonas aeruginosa*. *PeerJ* **2023**, *11*, e16476.
- Stevenson, K.; McVey, A. F.; Clark, I. B. N.; Swain, P. S.; Pilizota, T. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep* **2016**, *6*, 38828.
- Su, Y.; Alter, T.; Gölz, G. Motility related gene expression of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 derived from high viscous media. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* **2023**, *13* (1), 15-23.
- Sudarshan, S.; Hogins, J.; Ambagaspitiye, S.; Zimmern, P.; Reitzer, L. The nutrient and energy pathway requirements for surface motility of nonpathogenic and uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **2021**, *203* (11).
- Sun, Y.; Ma, Y.; Guan, H.; Liang, H.; Zhao, X.; Wang, D. Adhesion mechanism and biofilm formation of *Escherichia coli* O157:H7 in infected cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Food Microbiol* **2022**, *105*, 103885.
- Sun, Y.; Tian, L.; Chang, J.; Shi, S.; Zhang, J.; Xie, H.; Cai, Y.; Chen, D.; Kuramae, E. E.; van Veen, J. A.; Li, W.; Tran, L.-S. P.; Tian, C. Rice domestication influences

- the composition and function of the rhizosphere bacterial chemotaxis systems. *Plant and Soil* **2021**, *466* (1-2), 81-99.
- Sun, Y.; Wang, D.; Ma, Y.; Guan, H.; Liang, H.; Zhao, X. Elucidating *Escherichia coli* O157:H7 colonization and internalization in cucumbers using an inverted fluorescence microscope and hyperspectral microscopy. *Microorganisms* **2019**, *7* (11).
- Sun, Y.; Zhao, X.; Ma, Y.; Guan, H.; Liang, H.; Wang, D. Inhibitory effect of modified atmosphere packaging on *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut cucumbers (*Cucumis sativus* L.) and effectively maintain quality during storage. *Food Chem* **2022**, *369*, 130969.
- Tan, S.; Yang, C.; Mei, X.; Shen, S.; Raza, W.; Shen, Q.; Xu, Y. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology* **2013**, *64*, 15-22.
- Tarrach, F.; Herrmann, K. Organic acids of various kinds of vegetables. IV. Changes in the acids and sugar in tomatoes, sweet peppers and cucumbers during development and ripening. *Z Lebensm Unters Forsch* **1986**, *183* (6), 410-5.
- Tran, T. T.; Hadinoto, K. A Potential quorum-sensing inhibitor for bronchiectasis therapy: quercetin-chitosan nanoparticle complex exhibiting superior inhibition of biofilm formation and swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa* to the native quercetin. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (4).
- Tschowri, N.; Lindenberg, S.; Hengge, R. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2012**, *85* (5), 893-906.
- USDA Agricultural Research Service. FoodData Central, FDC ID: 1103352. Cucumber, with peel, raw. (accessed July 11, 2024).
- Verstraeten, N.; Braeken, K.; Debkumari, B.; Fauvert, M.; Fransaer, J.; Vermant, J.; Michiels, J. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **2008**, *16* (10), 496-506.
- Wadhams, G. H.; Armitage, J. P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5* (12), 1024-37.
- Wadhwa, N.; Berg, H. C. Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nat Rev Microbiol* **2022**, *20* (3), 161-173.



- Wagner, E. M.; Pracser, N.; Thalguter, S.; Fischel, K.; Rammer, N.; Pospíšilová, L.; Alispahic, M.; Wagner, M.; Rychli, K. Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. *Int J Food Microbiol* **2020**, *328*, 108668.
- Walker, G. M. The roles of magnesium in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **1994**, *14* (4), 311-54.
- Wang, P.; Ma, L.; Ge, J.; Feng, F.; Wan, Q.; Zeng, D.; Yu, X. Colonization mechanism of endophytic *Enterobacter cloacae* TMX-6 on rice seedlings mediated by organic acids exudated from roots. *J Agric Food Chem* **2023**, *71* (12), 4802-4809.
- Wang, Z.; Hu, Y.; Dong, Y.; Shi, L.; Jiang, Y. Enhancing electrical outputs of the fuel cells with *Geobacter sulfurreducens* by overexpressing nanowire proteins. *Microb Biotechnol* **2023**, *16* (3), 534-545.
- Wang, J.-C.; Wang, H.-H. Fermentation products and carbon balance of spoilage *Bacillus cereus*. *Journal of Food and Drug Analysis* **2002**, Vol. 10, No. 1, Pages 64-68.
- Whiteley, C. G.; Lee, D. J. Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol Adv* **2015**, *33* (1), 124-141.
- Wood, T. K. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* **2009**, *11* (1), 1-15.
- Wood, T. K.; González Barrios, A. F.; Herzberg, M.; Lee, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72* (2), 361-7.
- Worlitzer, V. M.; Jose, A.; Grinberg, I.; Bär, M.; Heidenreich, S.; Eldar, A.; Ariel, G.; Be'er, A. Biophysical aspects underlying the swarm to biofilm transition. *Sci Adv* **2022**, *8* (24), eabn8152.
- Yousuf, B.; Deshi, V.; Ozturk, B.; Siddiqui, M. W. Fresh-cut fruits and vegetables: quality issues and safety concerns. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*, 2020; pp 1-15.
- Yu, J.; Tseng, Y.; Pham, K.; Liu, M.; Beckles, D. M. Starch and sugars as determinants of postharvest shelf life and quality: some new and surprising roles. *Current Opinion in Biotechnology* **2022**, *78*, 102844.
- Yuan, J.; Zhang, N.; Huang, Q.; Raza, W.; Li, R.; Vivanco, J. M.; Shen, Q. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci Rep* **2015**, *5*, 13438.

Yuan, X.; Zeng, Q.; Xu, J.; Severin, G. B.; Zhou, X.; Waters, C. M.; Sundin, G. W.; Ibekwe, A. M.; Liu, F.; Yang, C. H. Tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes and intermediates modulate intracellular cyclic di-GMP levels and the production of plant cell wall-degrading enzymes in soft rot pathogen *Dickeya dadantii*. *Mol Plant Microbe Interact* **2020**, *33* (2), 296-307.

Zhang, F.; Su, S.; Yu, G.; Zheng, B.; Shu, F.; Wang, Z.; Xiang, T.; Dong, H.; Zhang, Z.; Hou, D.; She, Y. High quality genome sequence and description of *Enterobacter mori* strain 5-4, isolated from a mixture of formation water and crude-oil. *Stand Genomic Sci* **2015**, *10*, 9.

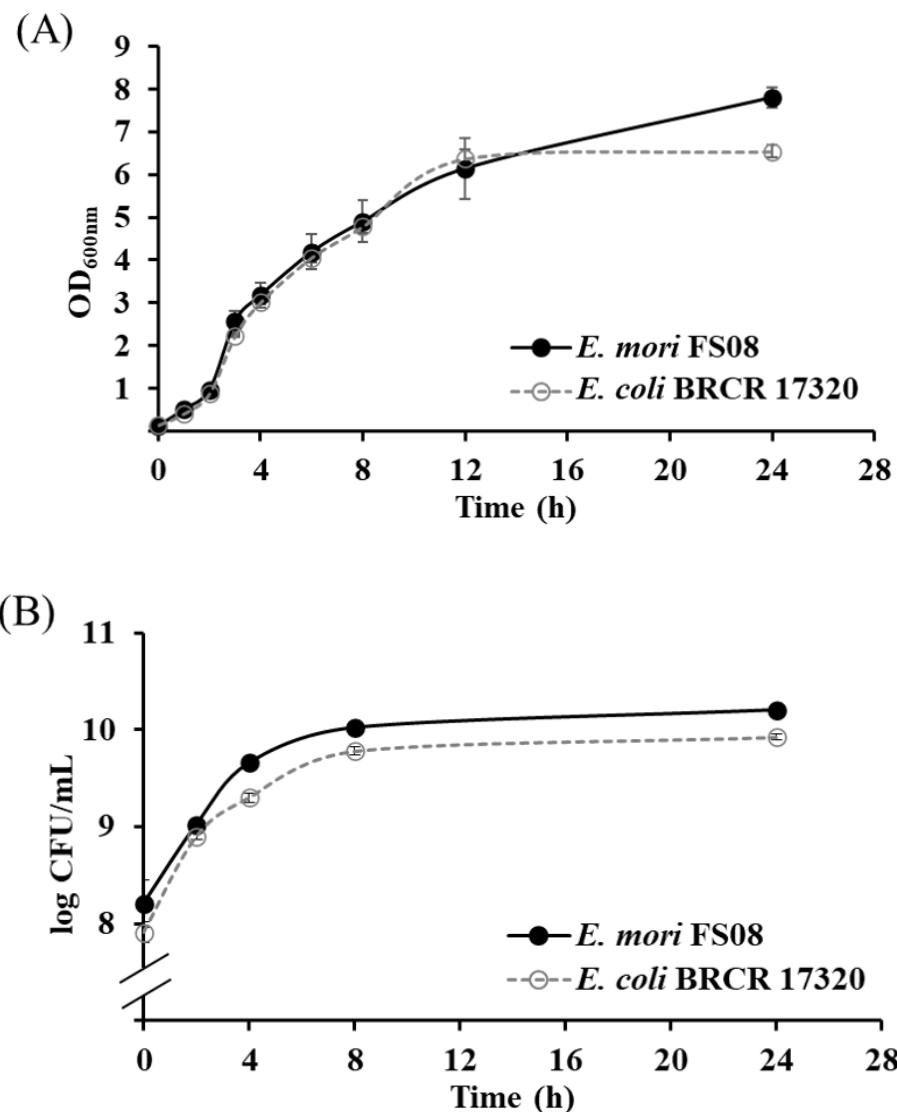
Zhang, M.; Zhang, Y.; Han, X.; Wang, J.; Yang, Y.; Ren, B.; Xia, M.; Li, G.; Fang, R.; He, H.; Jia, Y. Whole genome sequencing of *Enterobacter mori*, an emerging pathogen of kiwifruit and the potential genetic adaptation to pathogenic lifestyle. *AMB Express* **2021**, *11* (1), 129.

Zhang, X.; Hughes, J. G.; Subuyuj, G. A.; Ditty, J. L.; Parales, R. E. Chemotaxis of *Pseudomonas putida* F1 to alcohols is mediated by the carboxylic acid receptor McfP. *Appl Environ Microbiol* **2019**, *85* (22).

Zhu, B.; Lou, M. M.; Xie, G. L.; Wang, G. F.; Zhou, Q.; Wang, F.; Fang, Y.; Su, T.; Li, B.; Duan, Y. P. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **2011**, *61* (Pt 11), 2769-2774.

Zhu, B.; Zhang, G. Q.; Lou, M. M.; Tian, W. X.; Li, B.; Zhou, X. P.; Wang, G. F.; Liu, H.; Xie, G. L.; Jin, G. L., Genome sequence of the *Enterobacter mori* type strain, LMG 25706, a pathogenic bacterium of *Morus alba* L. *J Bacteriol* **2011**, *193* (14), 3670-1.

第八章、附錄



附錄一、*E. mori* FS08 與 *E. coli* BRCR 17320 在 TSB 培養基中於 30 °C 培養之生長曲線。數據透過 OD_{600nm} (A) 和平板計數 (B) 測量，以三個重複的平均值 ± 標準差表示。

Appendix 1. Cell growth curves of *E. mori* FS08 and *E. coli* BRCR 17320 in the TSB medium at 30 °C. Data were measured by OD_{600nm} (A) and plate count (B) which were presented as means ± standard deviation of three replicates.



附錄二、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 或 0.85% NaCl 於 30 °C 儲藏之菌數變化。

Appendix 2. Changes of total plate count in fresh-cut cucumbers stored at 30 °C. Each cucumber slice was inoculated with 10 μ L of *Enterobacter mori* FS08 (10^7 CFU/mL) or 0.85% NaCl (control groups).

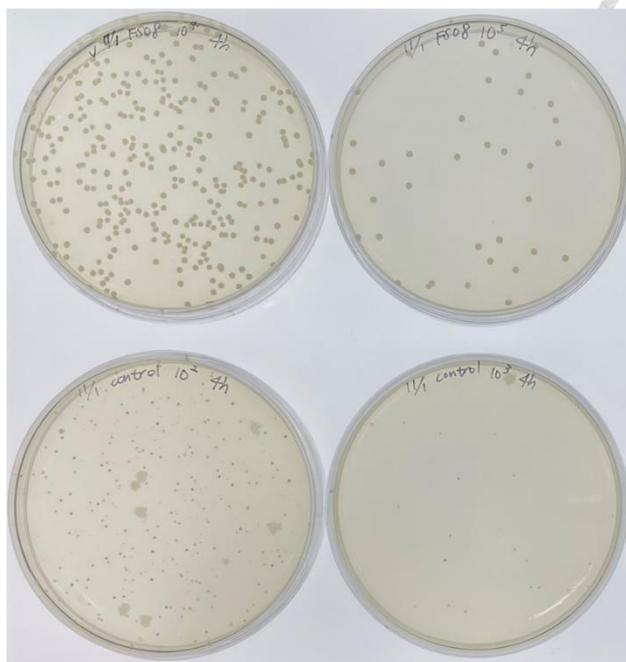
Treatment	Total plate count (log CFU/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	3.56 ± 0.18 ^{Ca}	5.38 ± 0.16 ^{Ba}	6.48 ± 0.46 ^{ABa}	6.49 ± 0.45 ^{ABa}	6.66 ± 0.76 ^{ABa}	6.84 ± 0.41 ^{Aa}	6.92 ± 0.76 ^{Aa}
0.85% NaCl	3.30 ± 0.21 ^{Ca}	3.53 ± 0.11 ^{Cb}	4.43 ± 0.20 ^{BCb}	5.46 ± 0.71 ^{ABa}	5.88 ± 0.85 ^{ABa}	6.30 ± 0.84 ^{Aa}	6.47 ± 0.82 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).



(A)

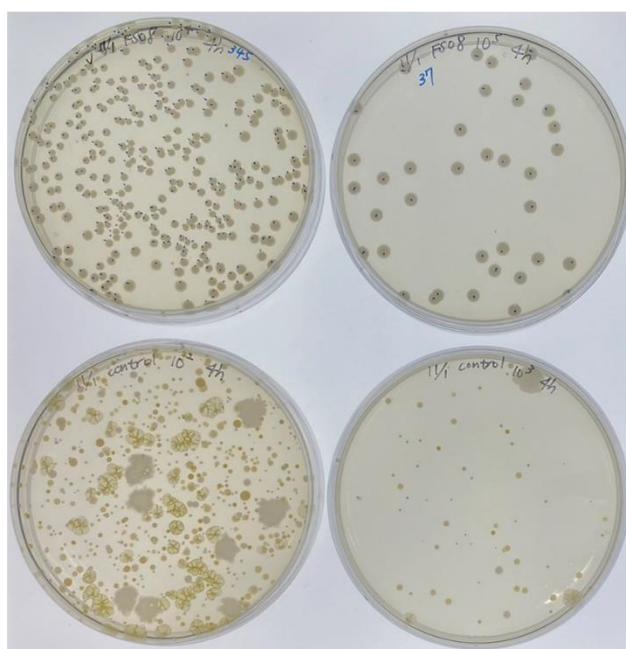
E. mori
FS08



(B)

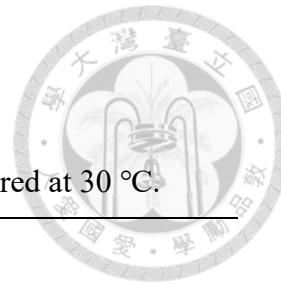
E. mori
FS08

0.85%
NaCl



附錄三、小黃瓜接菌試驗中，接菌組與對照組以塗盤法培養後之菌落形態。PCA 培養基在 30°C 下培養一天 (A) 和兩天 (B)。

Appendix 3. In the cucumber inoculation test, the colony morphology of the inoculated group and the control group. PCA plate were incubated at 30 °C for one day (A) and two days (B).

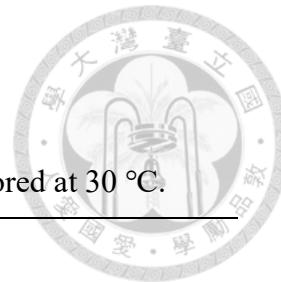


附錄四、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之葡萄糖變化。

Appendix 4. Changes of glucose in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	Glucose concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	8.44 ± 2.12 ^{Aa}	7.93 ± 1.42 ^{ABa}	7.44 ± 0.86 ^{ABa}	6.17 ± 1.23 ^{ABa}	5.30 ± 1.52 ^{ABa}	4.44 ± 1.38 ^{ABa}	3.99 ± 1.48 ^{Ba}
0.85% NaCl	8.72 ± 0.64 ^{Aa}	8.15 ± 0.64 ^{Aa}	7.86 ± 0.62 ^{Aa}	6.93 ± 1.22 ^{Aa}	6.63 ± 1.47 ^{Aa}	5.80 ± 1.29 ^{Aa}	5.74 ± 2.34 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

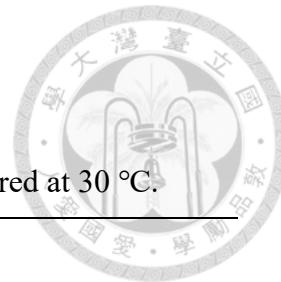


附錄五、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之果糖變化。

Appendix 5. Changes of fructose in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	Fructose concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	9.66 ± 2.01 ^{Aa}	9.27 ± 1.28 ^{ABa}	8.88 ± 0.68 ^{ABa}	7.78 ± 1.12 ^{ABa}	6.85 ± 1.44 ^{ABa}	5.94 ± 1.33 ^{ABa}	5.43 ± 1.45 ^{Ba}
0.85% NaCl	9.97 ± 0.60 ^{Aa}	9.65 ± 0.55 ^{Aa}	9.29 ± 0.61 ^{Aa}	8.46 ± 1.02 ^{Aa}	8.07 ± 1.43 ^{Aa}	7.28 ± 1.47 ^{Aa}	7.00 ± 2.60 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

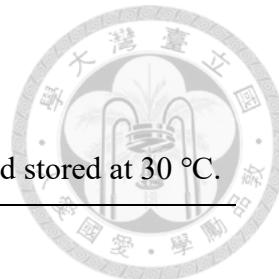


附錄六、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之蔗糖變化。

Appendix 6. Changes of sucrose in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	Sucrose concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	0.52 ± 0.42 ^{Aa}	0.56 ± 0.53 ^{Aa}	0.39 ± 0.19 ^{Ab}	0.91 ± 0.30 ^{Aa}	0.42 ± 0.16 ^{Aa}	0.35 ± 0.16 ^{Ab}	0.26 ± 0.16 ^{Aa}
0.85% NaCl	1.76 ± 1.01 ^{Aa}	1.47 ± 0.45 ^{Aa}	1.23 ± 0.32 ^{Aa}	1.71 ± 1.24 ^{Aa}	0.64 ± 0.61 ^{Aa}	1.32 ± 0.53 ^{Aa}	0.98 ± 0.62 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

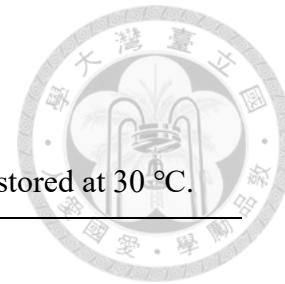


附錄七、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之蘋果酸變化。

Appendix 7. Changes of L-malic acid in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	L-Malic acid concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	2.26 ± 0.82 ^{Aa}	2.06 ± 0.50 ^{Aa}	1.93 ± 0.56 ^{Aa}	1.91 ± 0.60 ^{Aa}	2.01 ± 0.74 ^{Aa}	1.90 ± 0.66 ^{Aa}	1.89 ± 0.56 ^{Aa}
0.85% NaCl	2.12 ± 0.46 ^{Aa}	1.92 ± 0.50 ^{Aa}	1.88 ± 0.42 ^{Aa}	1.82 ± 0.45 ^{Aa}	1.92 ± 0.55 ^{Aa}	1.94 ± 0.75 ^{Aa}	1.91 ± 0.67 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

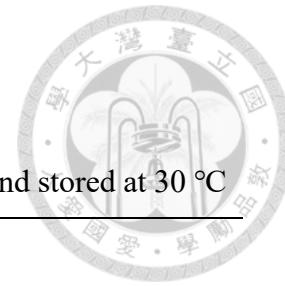


附錄八、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之檸檬酸變化。

Appendix 8. Changes of citric acid in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	Citric acid concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	0.26 ± 0.11 ^{Ba}	0.46 ± 0.22 ^{ABa}	0.42 ± 0.08 ^{ABa}	0.53 ± 0.20 ^{ABa}	0.55 ± 0.16 ^{ABa}	0.52 ± 0.08 ^{ABa}	0.58 ± 0.18 ^{Aa}
0.85% NaCl	0.27 ± 0.18 ^{Aa}	0.41 ± 0.13 ^{Aa}	0.48 ± 0.21 ^{Aa}	0.57 ± 0.29 ^{Aa}	0.53 ± 0.25 ^{Aa}	0.47 ± 0.19 ^{Aa}	0.51 ± 0.26 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

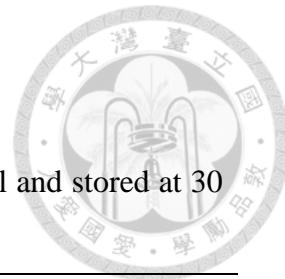


附錄九、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之 D-乳酸變化。

Appendix 9. Changes of D-Lactic acid in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C

Treatment	D-Lactic acid concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	0.020 ± 0.006 ^{Aa}	0.018 ± 0.006 ^{Aa}	0.018 ± 0.005 ^{Aa}	0.012 ± 0.002 ^{Aa}	0.012 ± 0.002 ^{Aa}	0.015 ± 0.005 ^{Aa}	0.019 ± 0.004 ^{Aa}
0.85% NaCl	0.022 ± 0.009 ^{Aa}	0.017 ± 0.005 ^{Aa}	0.015 ± 0.004 ^{Aa}	0.013 ± 0.002 ^{Aa}	0.013 ± 0.002 ^{Aa}	0.016 ± 0.002 ^{Aa}	0.015 ± 0.003 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

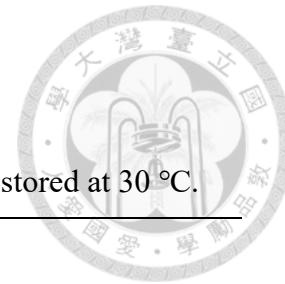


附錄十、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之 L-乳酸變化。

Appendix 10. Changes of L-Lactic acid in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	L-Lactic acid concentration in cucumber (mg/g)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	0.006 ± 0.003 ^{Aa}	0.006 ± 0.002 ^{Aa}	0.008 ± 0.000 ^{Aa}	0.006 ± 0.001 ^{Aa}	0.007 ± 0.001 ^{Aa}	0.008 ± 0.001 ^{Aa}	0.007 ± 0.001 ^{Aa}
0.85% NaCl	0.009 ± 0.001 ^{Aa}	0.006 ± 0.002 ^{Aa}	0.007 ± 0.002 ^{Aa}	0.006 ± 0.002 ^{Aa}	0.007 ± 0.002 ^{Aa}	0.007 ± 0.002 ^{Aa}	0.006 ± 0.002 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

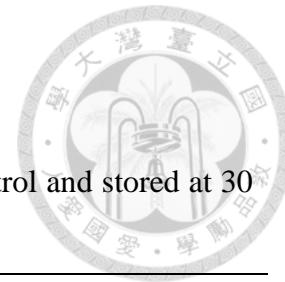


附錄十一、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之 pH 值變化。

Appendix 11. Changes of pH value in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	pH value						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	6.65 ± 0.16 ^{Aa}	6.67 ± 0.14 ^{Aa}	6.76 ± 0.13 ^{Aa}	6.80 ± 0.12 ^{Aa}	6.65 ± 0.15 ^{Aa}	6.63 ± 0.14 ^{Aa}	6.71 ± 0.17 ^{Aa}
0.85% NaCl	6.62 ± 0.14 ^{Aa}	6.60 ± 0.07 ^{Aa}	6.62 ± 0.10 ^{Aa}	6.60 ± 0.13 ^{Aa}	6.55 ± 0.15 ^{Aa}	6.56 ± 0.13 ^{Aa}	6.67 ± 0.32 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).

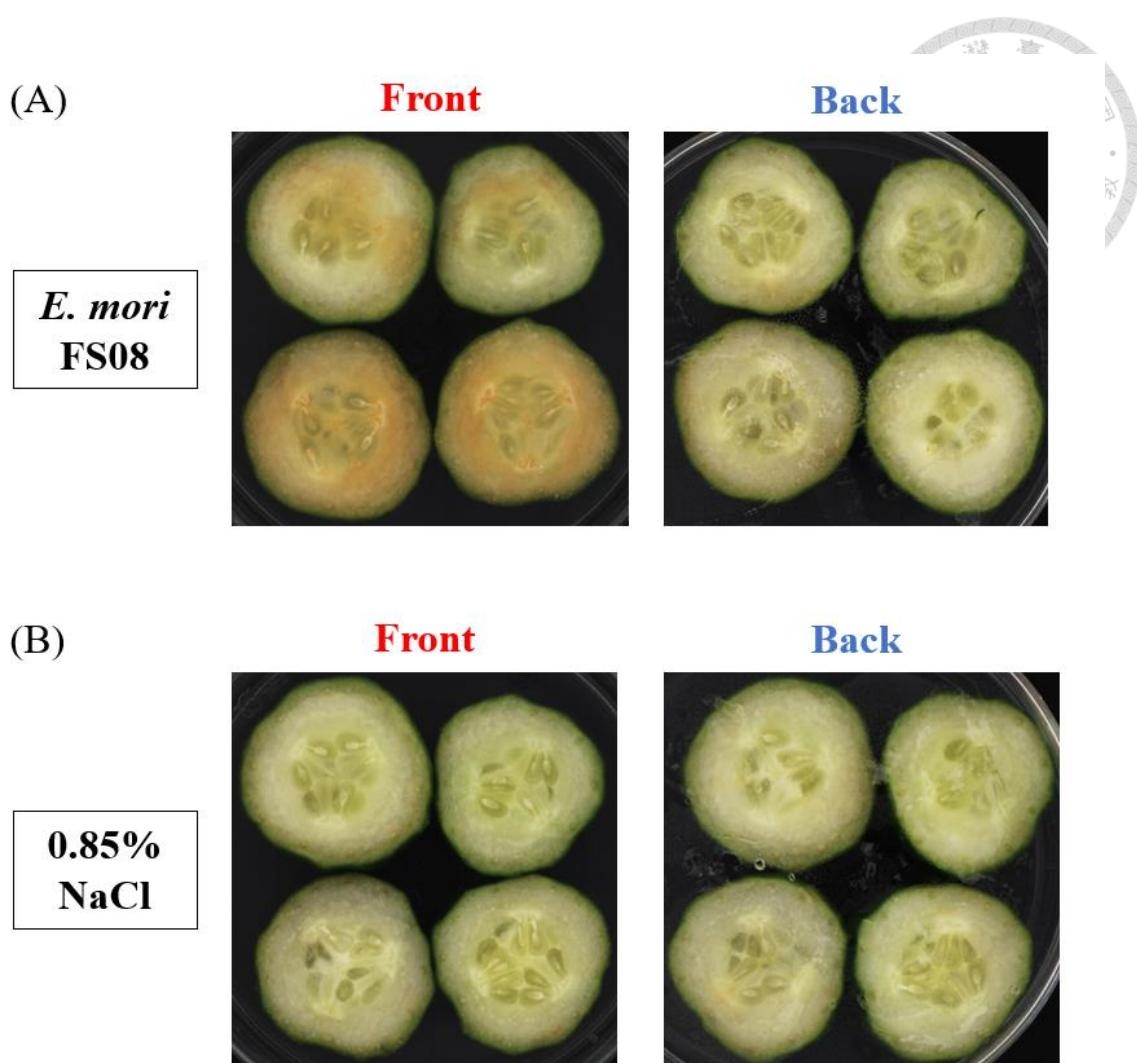


附錄十二、截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 於 30 °C 儲藏之可滴定酸變化。

Appendix 12. Changes of titratable acidity in fresh-cut cucumber inoculated with *E. mori* FS08 or 0.85% NaCl as control and stored at 30 °C.

Treatment	Titratable acidity (Malic acid eq %)						
	0 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>E. mori</i> FS08	0.162 ± 0.016 ^{Aa}	0.162 ± 0.012 ^{Aa}	0.150 ± 0.029 ^{Aa}	0.164 ± 0.024 ^{Aa}	0.160 ± 0.018 ^{Aa}	0.172 ± 0.010 ^{Aa}	0.164 ± 0.031 ^{Aa}
0.85% NaCl	0.163 ± 0.010 ^{Aa}	0.146 ± 0.023 ^{Aa}	0.146 ± 0.013 ^{Aa}	0.157 ± 0.013 ^{Aa}	0.172 ± 0.006 ^{Aa}	0.182 ± 0.018 ^{Aa}	0.161 ± 0.041 ^{Aa}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among storage time, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treated groups at the same time point ($p < 0.05$).



附錄十三、截切小黃瓜於 30 °C 儲藏 72 小時的正面（接菌面）與背面外觀變化。截切小黃瓜接種 *E. mori* FS08 (A) 或 0.85% NaCl 作為對照組 (B)。小黃瓜切片厚度為 5 mm。

Appendix 13. The appearance changes of the front (inoculated side) and back of fresh-cut cucumbers stored at 30 °C for 72 h. Fresh-cut cucumbers were inoculated with *E. mori* FS08 (A) or 0.85% NaCl as a control group (B). The thickness of the cucumber slices is 5 mm.



附錄十四、含有不同濃度有機酸之混合碳源 M9 培養基的原始 pH 值。

Appendix 14. Original pH value of the mixed carbon source M9 medium containing different concentrations of organic acids.

Organic acids	Acid concentration (mM)			
	0	10	20	40
L-Malic acid	7.14	6.85	6.62	6.10
Citric acid	7.14	6.71	6.34	5.74
DL-Lactic acid	7.14	6.99	6.93	6.81



附錄十五、*E. mori* FS08 對單一有機酸化合物的趨化反應。

Appendix 15. Chemotaxis response of *E. mori* FS08 to sole organic acids after 24 h and 42 h of incubation at 30 °C.

Compound	24 h			42 h		
	D1 ^a (cm)	D2 ^b (cm)	RI ^c	D1 ^a (cm)	D2 ^b (cm)	RI ^c
Water (blank)	1.05 ± 0.05 ^B	1.03 ± 0.03 ^A	0.504 ± 0.007 ^B	2.02 ± 0.03 ^D	2.00 ± 0.05 ^B	0.502 ± 0.007 ^B
10 mM Malic acid	1.23 ± 0.03 ^A	1.10 ± 0.05 ^A	0.529 ± 0.007* ^A	2.58 ± 0.03 ^A	2.20 ± 0.05 ^A	0.540 ± 0.004* ^A
10 mM Citric acid	1.08 ± 0.08 ^B	1.05 ± 0.05 ^A	0.508 ± 0.007 ^B	2.10 ± 0.05 ^C	2.10 ± 0.01 ^{AB}	0.500 ± 0.006 ^B
10 mM Lactic acid	1.10 ± 0.05 ^B	1.07 ± 0.08 ^A	0.508 ± 0.014 ^B	2.18 ± 0.06 ^B	2.13 ± 0.06 ^A	0.506 ± 0.000 ^B

^a D1 is the distance measured from the site of inoculation to the colony edge closest to the compound. ^b D2 is the distance from the site of inoculation to the colony edge furthest from the compound. ^c RI (Response index) = D1 / (D1 + D2). *RI values greater than 0.52 indicate an attractant response (Zhang et al., 2019). Data were presented as means ± standard deviation of three replicates. The values with different capital letters were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different compounds ($p < 0.05$).

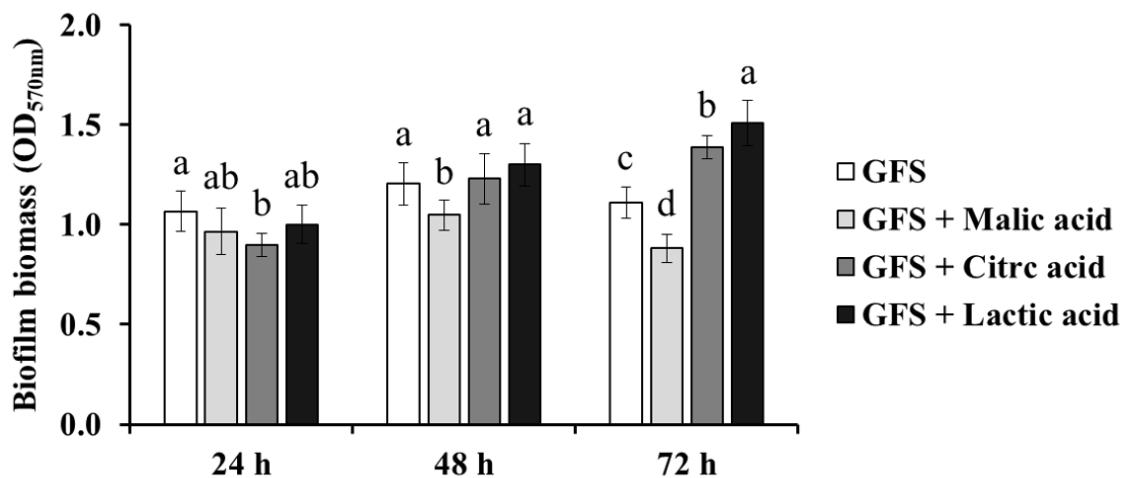


附錄十六、*E. mori* FS08 對混合碳源添加有機酸的趨化反應。

Appendix 16. Chemotaxis response of *E. mori* FS08 to the mixed carbon sources supplemented with different organic acids after 24 h and 42 h of incubation at 30 °C.

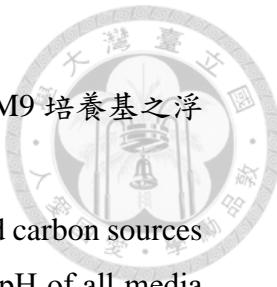
Compound	24 h			42 h		
	D1 ^a (cm)	D2 ^b (cm)	RI ^c	D1 ^a (cm)	D2 ^b (cm)	RI ^c
Water (blank)	1.00 ± 0.00 ^C	1.03 ± 0.03 ^B	0.492 ± 0.007 ^C	2.18 ± 0.03 ^C	2.22 ± 0.03 ^A	0.496 ± 0.007 ^C
GFS	1.48 ± 0.03 ^B	1.10 ± 0.00 ^A	0.574 ± 0.005* ^B	3.27 ± 0.18 ^B	2.22 ± 0.03 ^A	0.596 ± 0.013* ^B
GFS + Malic acid	1.65 ± 0.05 ^A	1.13 ± 0.03 ^A	0.593 ± 0.004* ^A	3.67 ± 0.06 ^A	2.25 ± 0.05 ^A	0.620 ± 0.006* ^A
GFS + Citric acid	1.50 ± 0.09 ^B	1.10 ± 0.00 ^A	0.577 ± 0.014* ^{AB}	3.33 ± 0.12 ^B	2.32 ± 0.08 ^A	0.590 ± 0.006* ^B
GFS + Lactic acid	1.58 ± 0.08 ^{AB}	1.12 ± 0.03 ^A	0.586 ± 0.008* ^{AB}	3.40 ± 0.20 ^B	2.45 ± 0.25 ^A	0.581 ± 0.011* ^B

^a D1 is the distance measured from the site of inoculation to the colony edge closest to the compound. ^b D2 is the distance from the site of inoculation to the colony edge furthest from the compound. ^c RI (Response index) = D1 / (D1 + D2). *RI values greater than 0.52 indicate an attractant response (Zhang et al., 2019). Data were presented as means ± standard deviation of three replicates. The values with different capital letters were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different compounds ($p < 0.05$).



附錄十七、*E. mori* FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之生物膜形成。GFS 代表培養基中添加了 10 mM 的葡萄糖、果糖和蔗糖。所有培養基的 pH 值皆調整至 6.6。數據以三個獨立重複的平均值 \pm 標準差表示，並以單向變異數分析和 Tukey 多重範圍檢定進行分析。小寫英文字母表示同一時間點不同處理組之間有顯著差異 ($p < 0.05$)。

Appendix 17. Biofilm biomass (OD_{570nm}) of *E. mori* FS08 in the mixed carbon sources M9 media containing 10 mM different organic acids at 30 °C. GFS represents the media were added 10 mM glucose, fructose, and sucrose. The pH of all media were adjusted to 6.6. Data were presented as means \pm standard deviation of three independent replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. The values with different letters indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatment groups at the same time point.

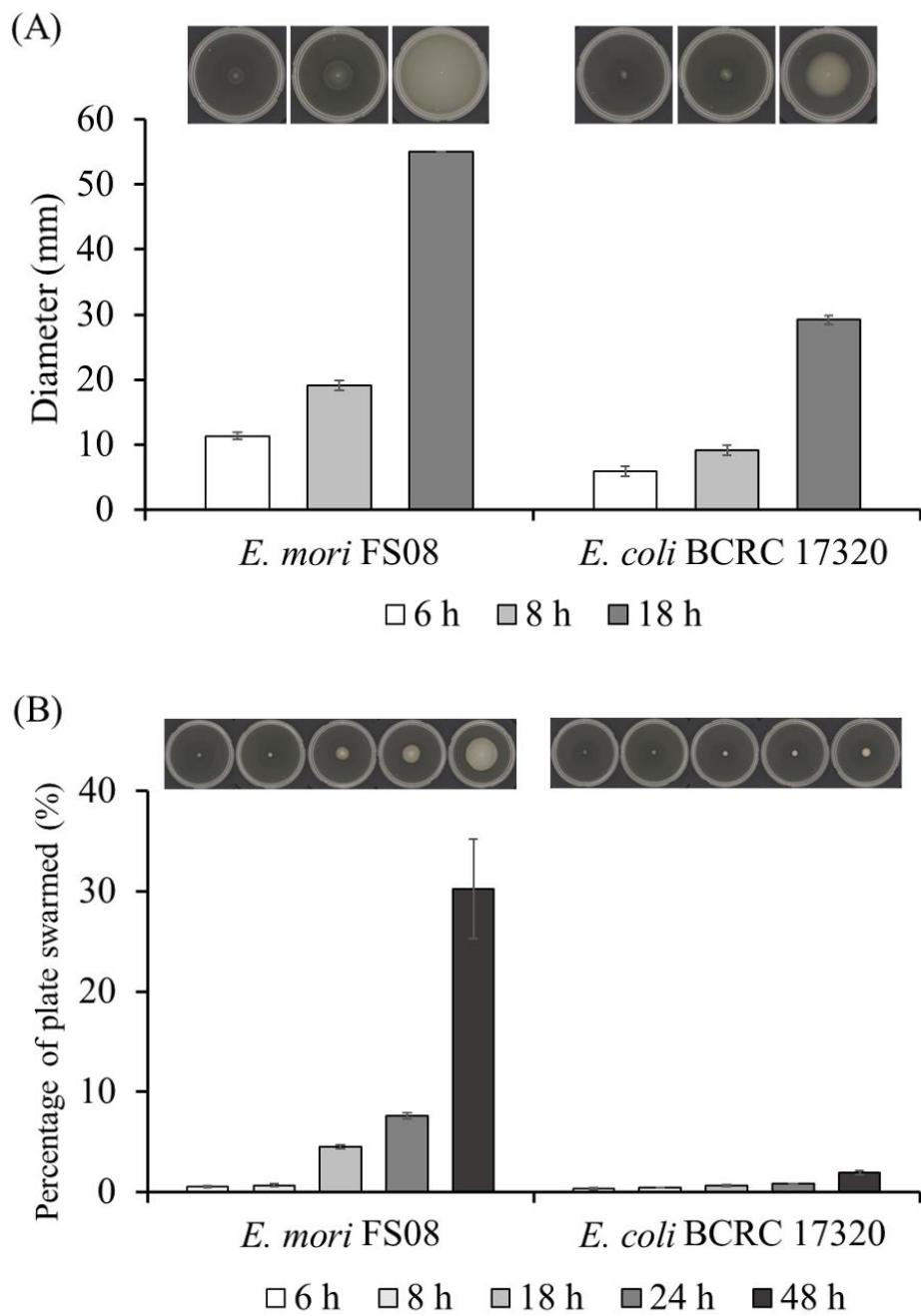
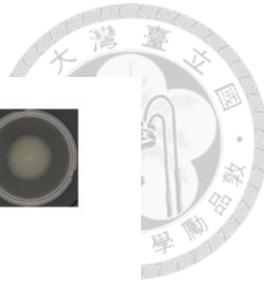


附錄十八、*E. mori* FS08 於含有 10 mM 不同有機酸的混合碳源 M9 培養基之浮游態細胞。

Appendix 18. Planktonic cell (OD_{600nm}) of *E. mori* FS08 in the mixed carbon sources M9 media containing 10 mM different organic acids at 30 °C. The pH of all media were adjusted to 6.6.

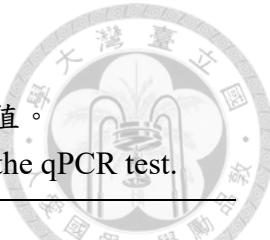
medium	Planktonic cell (OD _{600 nm})		
	24 h	48 h	72 h
GFS	0.425 ± 0.011 ^{Ba}	0.494 ± 0.022 ^{Aa}	0.418 ± 0.010 ^{Bb}
GFS + Malic acid	0.454 ± 0.014 ^{Aa}	0.479 ± 0.020 ^{Aab}	0.448 ± 0.004 ^{Aa}
GFS + Citric acid	0.411 ± 0.036 ^{Aa}	0.462 ± 0.002 ^{Aab}	0.421 ± 0.001 ^{Ab}
GFS + Lactic acid	0.411 ± 0.014 ^{Ba}	0.448 ± 0.009 ^{Ab}	0.417 ± 0.011 ^{Bb}

Data were presented as means ± standard deviation of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test and Student's t-test. The values with different capital letters (A, B, or C) represented significant differences among different time points, lowercase letters (a or b) indicated significant differences among different treatment groups at the same time point ($p < 0.05$).



附錄十九、*E. mori* FS08 與 *E. coli* BCRC 17320 在 TSB 培養基於 30 °C 培養的泳動與表面移行能力。

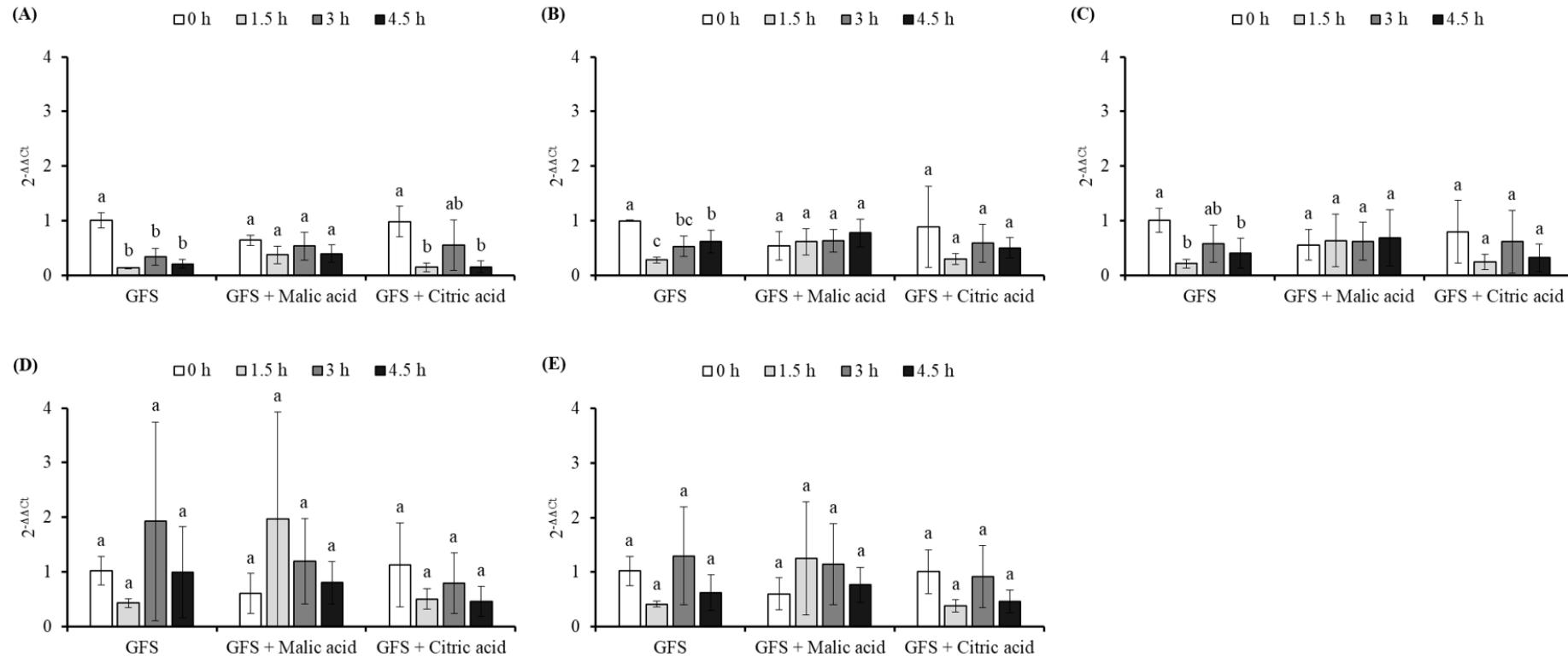
Appendix 19. Swimming motility (A) and swarming motility (B) of *E. mori* FS08 and *E. coli* BCRC 17320 in TSB medium at 30 °C.



附錄二十、*E. mori* FS08 於 qPCR 測試中四個時間點之 OD_{600nm} 值。

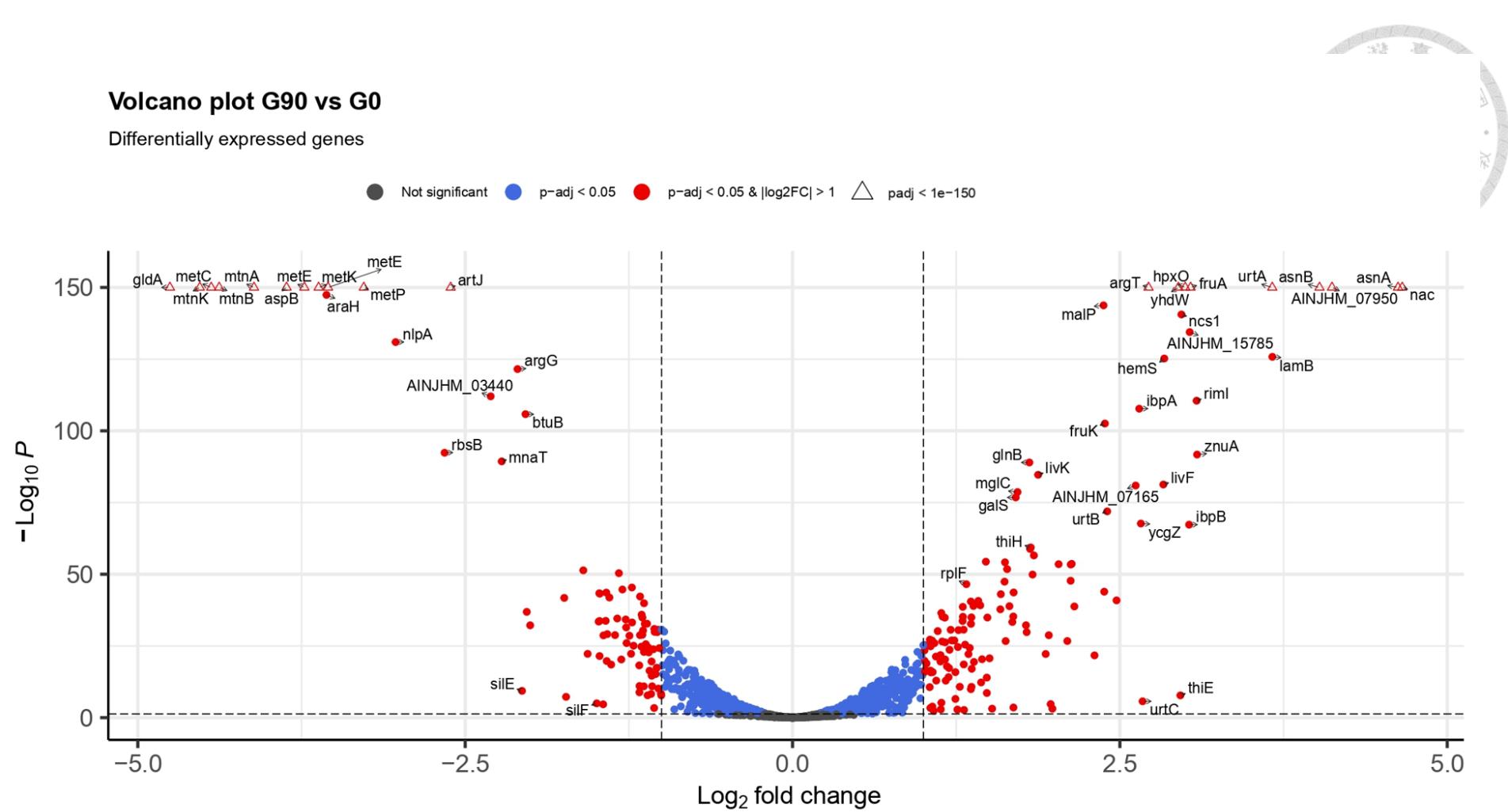
Appendix 20. OD_{600nm} values of *E. mori* FS08 at four time points in the qPCR test.

medium	OD _{600nm} value			
	0 h	1.5 h	3 h	4.5 h
GFS	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.64 ± 0.01	1.44 ± 0.09
GFS + 40 mM Malic acid	0.13 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.59 ± 0.05	1.45 ± 0.06
GFS + 10 mM Citric acid	0.12 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.65 ± 0.06	1.39 ± 0.08



附錄二十一、*E. coli* FS08 於混含碳源培養基添加不同有機酸之運動性相關基因表現量隨著時間的變化。目標基因包括 *fliC* (A)、*flgM* (B)、*motA* (C)、*motB* (D)、*cheA* (E)。將倍數變化 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 以管家基因 *rpoB* 的表現量標準化，並使用 0 小時 GFS 的基因表現作為校準品。數據以三個重複的平均值 \pm 標準差表示，並透過單向變異數分析和鄧肯多範圍測試進行分析，比較相同處理組不同時間點之間的顯著差異 ($p < 0.05$)。

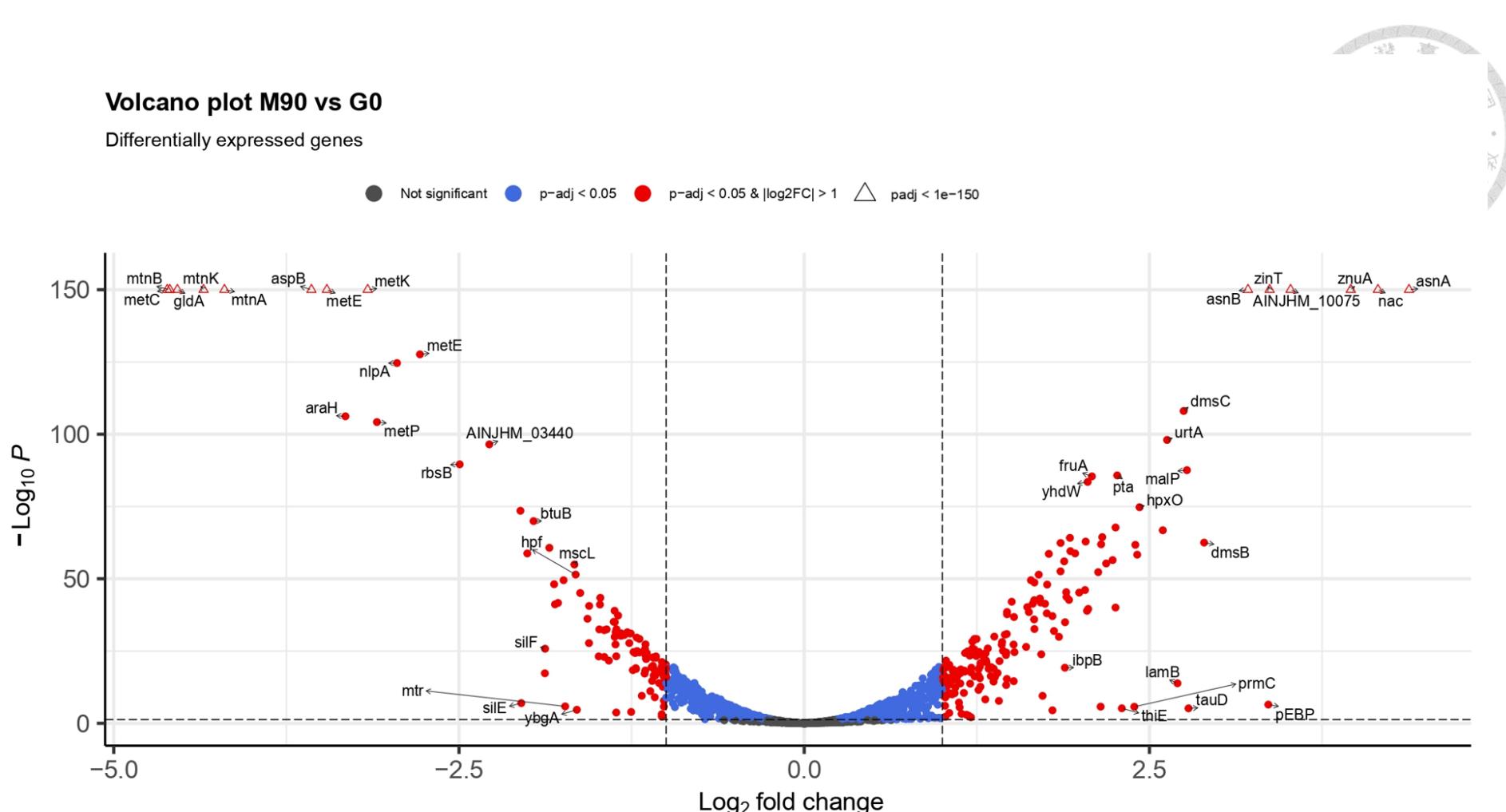
Appendix 21. Changes in the expression of motility-related genes of *E. mori* FS08 in the mixed carbon source medium supplemented with different organic acids over time. Target genes include *fliC* (A), *flgM* (B), *motA* (C), *motB* (D), *cheA* (E). Fold changes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were normalized to the expression of the housekeeping gene *rpoB* and expression of GFS at 0 h was used as a calibrator. Data were presented as means \pm standard deviation of three replicates and analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests to make comparisons among different time points in the same treatment group ($p < 0.05$).



附錄二十二、*E. mori* FS08 於混合碳源培養 90 分鐘與初始相比的 DEGs 之火山圖。G90 為菌株培養於 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；G0 為菌株培養於混合碳源培養基 (GFS) 0 小時的轉錄組。橫軸為 \log_2 倍數變化。縱軸則為 $-\log_{10}(P)$ 代表顯著差異。灰點表示基因無顯著差異，藍點表示顯著差異基因 ($p\text{-adj} < 0.05$)，紅點表示差異表達基因 (DEGs : $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$)。

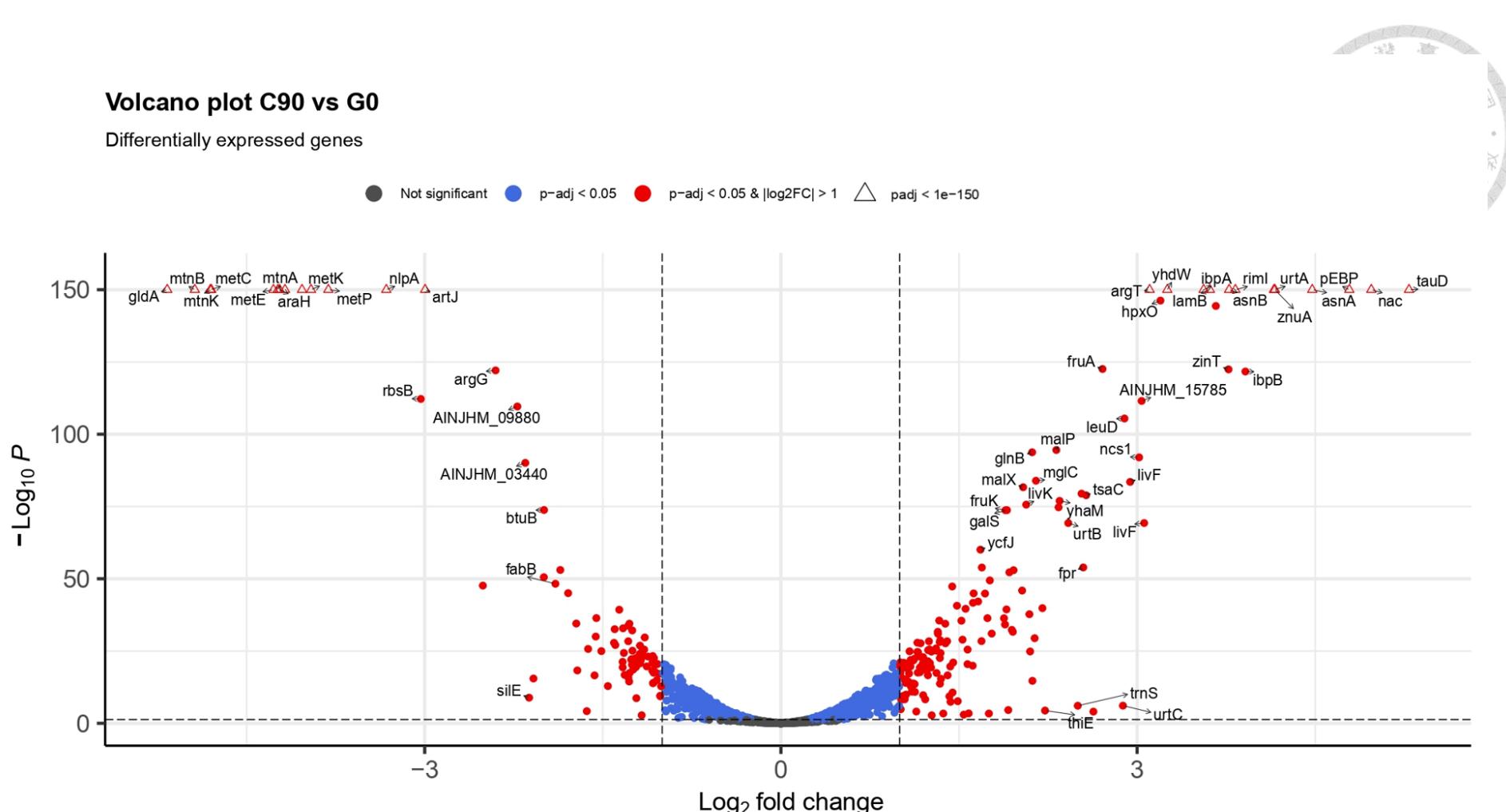
Appendix 22. Volcano plot for DEGs of *E. mori* FS08 cultured in the mixed carbon source (GFS) for 90 min compared with the initial stage. G90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 90 min; G0 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 0 h. The horizontal axis represented the \log_2 (fold change) value. The vertical axis was $-\log_{10}(P)$, which represented the significant difference. Gray dots indicate no significant difference in genes, blue dots indicate significant difference genes ($p\text{-adj} < 0.05$), red dots indicate differentially expressed genes (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$).





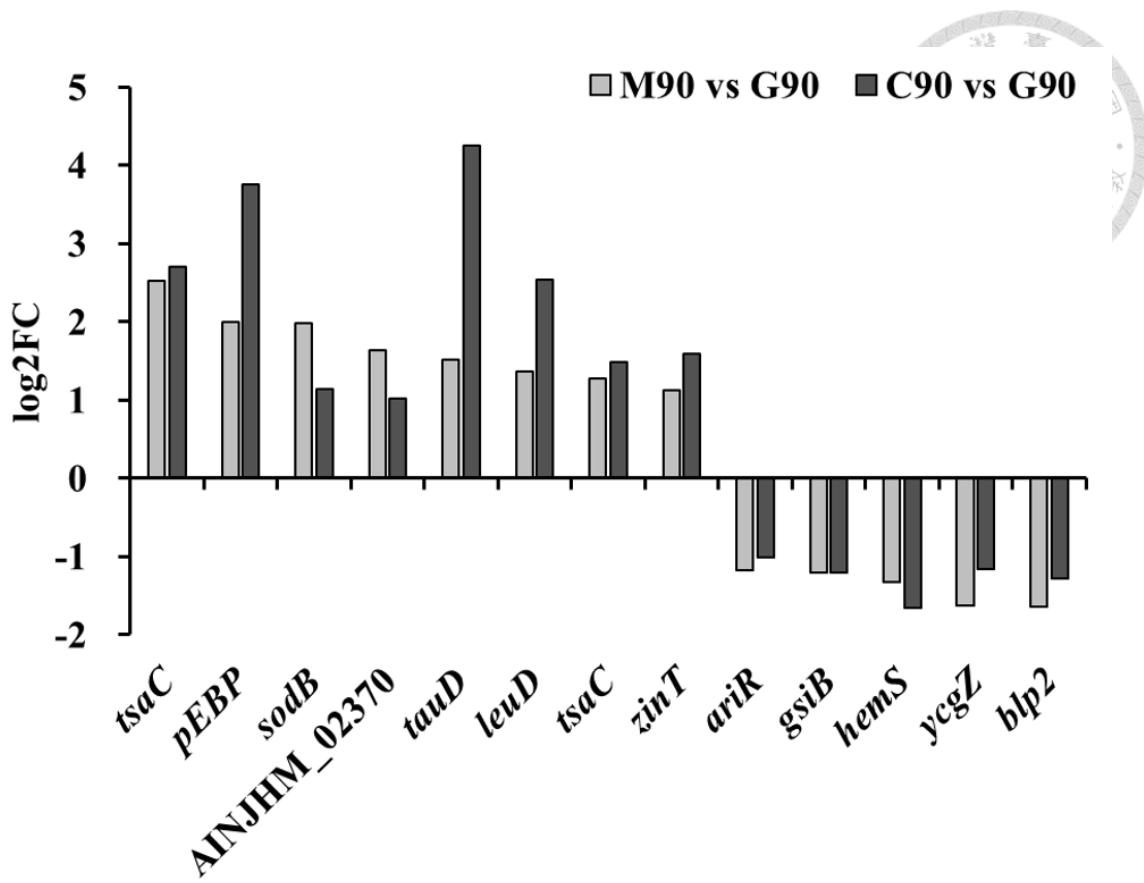
附錄二十三、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理與初始相比的 DEGs 之火山圖。M90 為菌株培養於添加 L-蘋果酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；G0 為菌株培養於混合碳源培養基 (GFS) 0 小時的轉錄組。橫軸為 \log_2 倍數變化。縱軸則為 $-\log_{10}(P)$ 代表顯著差異。灰點表示基因無顯著差異，藍點表示顯著差異基因 ($p\text{-adj} < 0.05$)，紅點表示差異表達基因 (DEGs : $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$)。

Appendix 23. Volcano plot for DEGs of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment compared with the initial stage. M90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium supplemented with L-malic acid for 90 min; G0 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 0 h. The horizontal axis represented the \log_2 (fold change) value. The vertical axis was $-\log_{10}(P)$, which represented the significant difference. Gray dots indicate no significant difference in genes, blue dots indicate significant difference genes ($p\text{-adj} < 0.05$), red dots indicate differentially expressed genes (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$).



附錄二十四、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理與初始相比的 DEGs 之火山圖。C90 為菌株培養於添加檸檬酸之 GFS 培養基 90 分鐘的轉錄組；G0 為菌株培養於混合碳源培養基 (GFS) 0 小時的轉錄組。橫軸為 \log_2 倍數變化。縱軸則為 $-\log_{10}(P)$ 代表顯著差異。灰點表示基因無顯著差異，藍點表示顯著差異基因 ($p\text{-adj} < 0.05$)，紅點表示差異表達基因 (DEGs : $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$)。

Appendix 24. Volcano plot for DEGs of *E. mori* FS08 in citric acid treatment compared with the initial stage. C90 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium supplemented with citric acid for 90 min; G0 is the transcriptome of the strain cultured in GFS medium for 0 h. The horizontal axis represented the \log_2 (fold change) value. The vertical axis was $-\log_{10}(P)$, which represented the significant difference. Gray dots indicate no significant difference in genes, blue dots indicate significant difference genes ($p\text{-adj} < 0.05$), red dots indicate differentially expressed genes (DEGs: $p\text{-adj} < 0.05 \& |\log_2\text{FC}| \geq 1$).



附錄二十五、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸或檸檬酸處理與對照組相比相同的 DEGs。

Appendix 25. The same DEGs in *E. mori* FS08 treated with L-malic acid or citric acid compared with the control group.

附錄二十六、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比所有的 DEGs。

Appendix 26. All of the DEGs of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment compared with the group without adding acid (M90 vs G90).

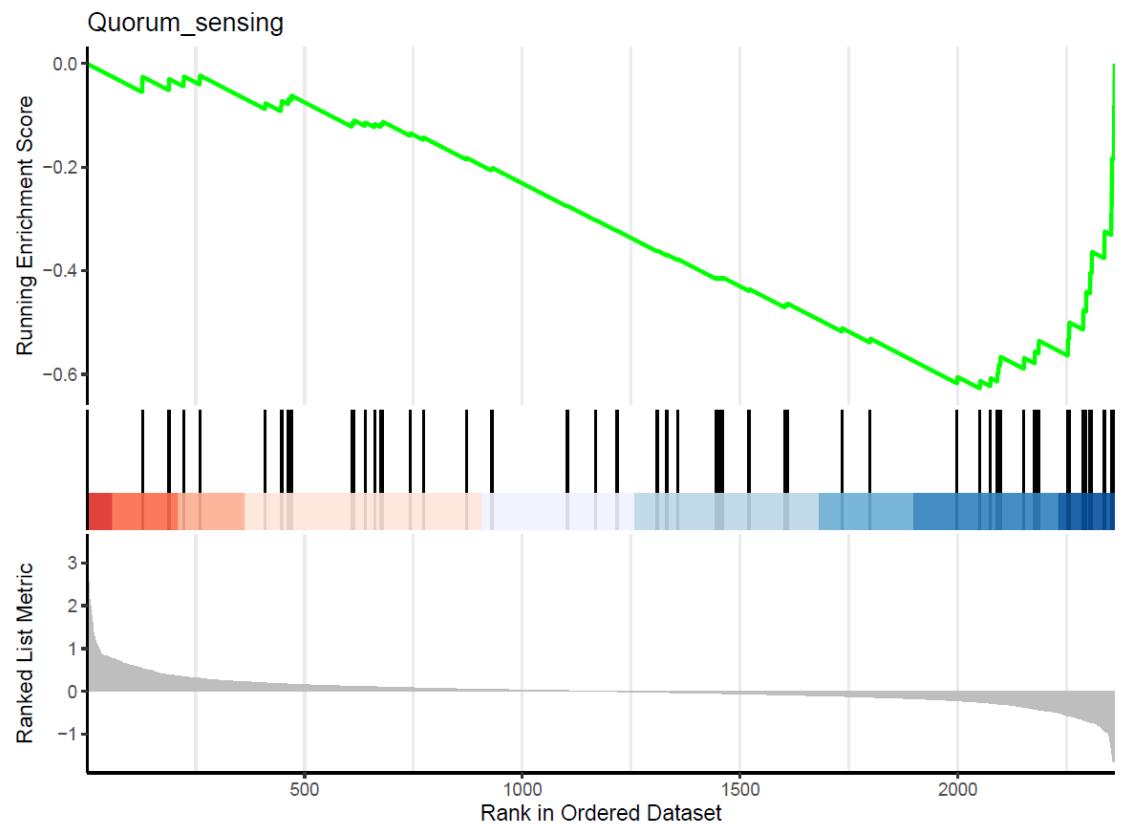
Gene	Gene_model_ID	Gene_description	log2FC	pvalue	padj
flavocytochrome c	AINJHM_10065	flavocytochrome c	3.41	2.22E-162	5.24E-159
<i>citT</i>	AINJHM_10070	Di- and tricarboxylate antiporter	2.74	6.19E-53	2.44E-50
Fumarate hydratase class I	AINJHM_10075	Fumarate hydratase class I, anaerobic	2.54	2.96E-108	3.49E-105
<i>tsaC</i>	AINJHM_12835	tRNA A37 threonylcarbamoyladenine synthetase subunit TsaC/SUA5/YrdC	2.53	1.15E-14	6.18E-13
<i>ydfZ</i>	AINJHM_04940	Selenium-binding protein YdfZ	2.16	4.22E-64	2.49E-61
<i>pEBP</i>	AINJHM_12830	Uncharacterized conserved protein, phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) family	2.00	1.03E-05	9.97E-05
<i>sodB</i>	AINJHM_06210	superoxide dismutase [Fe]	1.98	1.64E-70	1.29E-67
<i>dmsB</i>	AINJHM_16570	DMSO/selenate family reductase complex B subunit	1.93	5.45E-38	1.29E-35
<i>proX</i>	AINJHM_13020	glycine betaine/L-proline ABC transporter substrate-binding protein ProX	1.76	1.24E-47	4.16E-45
Tn7 transposition protein B	AINJHM_02370	Tn7 transposition protein B	1.64	2.81E-28	4.74E-26
<i>mgo</i>	AINJHM_11075	malate dehydrogenase (quinone)	1.62	1.33E-30	2.41E-28
<i>tauD</i>	AINJHM_12800	Taurine catabolism dioxygenase TauD	1.51	5.27E-05	4.38E-04
<i>dmsC</i>	AINJHM_16565	DMSO reductase anchor subunit DmsC	1.50	1.94E-38	5.08E-36
<i>leuD</i>	AINJHM_12805	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	1.37	1.35E-05	1.29E-04
<i>tsaC</i>	AINJHM_12840	tRNA A37 threonylcarbamoyladenine synthetase subunit TsaC/SUA5/YrdC	1.28	4.15E-16	2.72E-14
<i>dmsA</i>	AINJHM_16575	dimethylsulfoxide reductase subunit A	1.28	3.36E-26	4.78E-24
hypothetical protein	AINJHM_02380	hypothetical protein	1.27	3.80E-23	4.72E-21
<i>upp</i>	AINJHM_11995	uracil phosphoribosyltransferase	1.19	1.33E-27	2.09E-25

<i>relE</i>	AINJHM_18105	mRNA-degrading endonuclease RelE, toxin component of the RelBE toxin-antitoxin system	1.16	3.41E-20	3.50E-18
<i>zinT</i>	AINJHM_06875	metal-binding protein ZinT	1.12	2.96E-18	2.69E-16
<i>dusB</i>	AINJHM_01125	tRNA dihydrouridine synthase DusB	1.09	2.37E-19	2.24E-17
<i>rplK</i>	AINJHM_04265	50S ribosomal protein L11	1.07	6.37E-18	5.37E-16
<i>ahpC</i>	AINJHM_18015	alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1.07	2.05E-20	2.19E-18
<i>narK</i>	AINJHM_04185	Nitrate/nitrite transporter NarK	1.04	1.02E-13	4.46E-12
<i>fis</i>	AINJHM_01130	DNA-binding transcriptional regulator Fis	1.03	4.13E-11	1.08E-09
Lipoprotein	AINJHM_10670	Lipoprotein	1.02	3.08E-16	2.07E-14
<i>fruK</i>	AINJHM_10945	1-phosphofructokinase	-1.04	1.27E-22	1.49E-20
<i>ariR</i>	AINJHM_06460	Two-component-system connector protein AriR	-1.17	4.11E-17	3.23E-15
<i>zntA</i>	AINJHM_02020	Zn(II)/Cd(II)/Pb(II) translocating P-type ATPase ZntA	-1.18	4.22E-13	1.58E-11
<i>gsiB</i>	AINJHM_13930	General stress protein YciG, contains tandem KGG domains	-1.20	1.44E-19	1.41E-17
<i>livF</i>	AINJHM_09725	ABC-type branched-chain amino acid transport system, ATPase component LivF	-1.31	4.32E-16	2.76E-14
<i>rhiA</i>	AINJHM_06275	protein RhiA	-1.32	3.44E-26	4.78E-24
<i>hemS</i>	AINJHM_06570	Putative heme degradation protein	-1.32	2.27E-24	2.98E-22
DUF4432 domain-containing protein	AINJHM_07950	DUF4432 domain-containing protein	-1.46	1.73E-35	3.72E-33
<i>urtC</i>	AINJHM_06860	urea ABC transporter permease subunit UrtC	-1.51	1.63E-05	1.54E-04
<i>ycgZ</i>	AINJHM_06455	regulatory protein YcgZ	-1.62	1.84E-32	3.63E-30
<i>trpE</i>	AINJHM_08250	anthranilate synthase component 1	-1.63	7.00E-47	2.06E-44
<i>blp2</i>	AINJHM_12860	Ig-like repeat protein Blp2	-1.65	2.39E-54	1.13E-51

附錄二十七、*E. mori* FS08 於檸檬酸處理 (C90) 與未加酸組別 (G90) 相比所有的 DEGs。

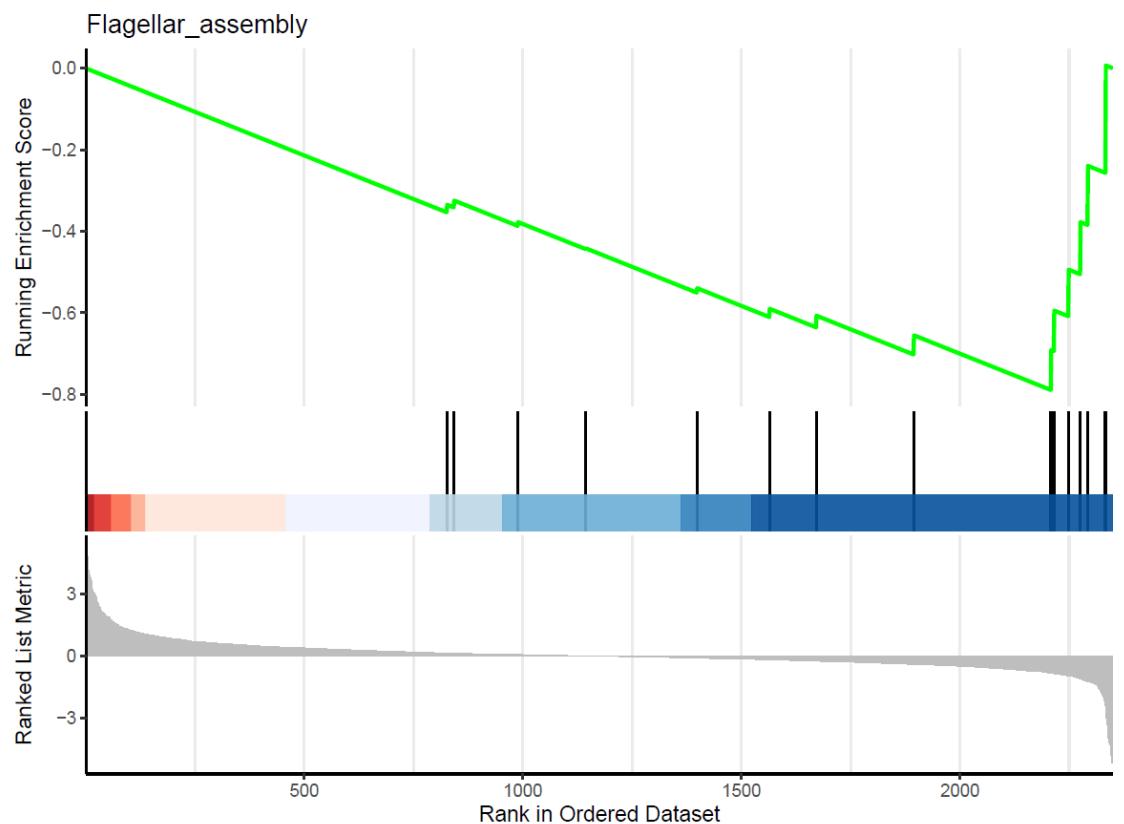
Appendix 27. All of the DEGs of *E. mori* FS08 in citric acid treatment compared with the group without adding acid (C90 vs G90).

Gene	Gene_model_ID	Gene_description	log2FC	pvalue	padj
tauD	AINJHM_12800	Taurine catabolism dioxygenase TauD	4.26	1.51E-18	1.59E-16
pEBP	AINJHM_12830	Uncharacterized conserved protein, phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) family	3.75	6.10E-14	4.50E-12
tsaC	AINJHM_12835	tRNA A37 threonylcarbamoyladenosine synthetase subunit TsaC/SUA5/YrdC	2.70	6.17E-100	4.10E-97
leuD	AINJHM_12805	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	2.54	1.23E-135	2.45E-132
zinT	AINJHM_06875	metal-binding protein ZinT	1.59	1.25E-68	6.23E-66
MFS transporter	AINJHM_12815	MFS transporter	1.58	1.54E-43	5.12E-41
tsaC	AINJHM_12840	tRNA A37 threonylcarbamoyladenosine synthetase subunit TsaC/SUA5/YrdC	1.49	1.90E-43	5.41E-41
emrA	AINJHM_12825	Multidrug resistance efflux pump EmrA	1.45	9.19E-42	2.29E-39
sodB	AINJHM_06210	superoxide dismutase [Fe]	1.14	4.86E-38	9.67E-36
ypfM	AINJHM_11890	Protein YpfM	1.12	4.49E-25	6.39E-23
znuA	AINJHM_13130	ABC-type Zn uptake system ZnuABC, Zn-binding component ZnuA	1.04	6.04E-28	9.26E-26
Tn7 transposition protein B	AINJHM_02370	Tn7 transposition protein B	1.02	1.40E-16	1.16E-14
ariR	AINJHM_06460	Two-component-system connector protein AriR	-1.00	6.61E-18	6.58E-16
ycgZ	AINJHM_06455	regulatory protein YcgZ	-1.16	3.48E-17	3.15E-15
gsiB	AINJHM_13930	General stress protein YciG, contains tandem KGG domains	-1.20	2.80E-32	5.07E-30
cybB	AINJHM_15655	cytochrome b561	-1.20	1.92E-29	3.19E-27
blp2	AINJHM_12860	Ig-like repeat protein Blp2	-1.27	5.62E-41	1.24E-38
hemS	AINJHM_06570	Putative heme degradation protein	-1.65	7.76E-53	3.09E-50
arnB	AINJHM_02180	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose aminotransferase	-2.03	1.05E-104	1.05E-101



附錄二十八、*E. mori* FS08 於 L-蘋果酸處理 (M90) 與未加酸組別 (G90) 相比群體感應的 GSEA 富集圖。

Appendix 28. GSEA enrichment plot for quorum sensing of *E. mori* FS08 in L-malic acid treatment compared with the group without adding acid (M90 vs G90).



附錄二十九、*E. mori* FS08 於檸檬酸處理 (C90) 與未加酸組別 (G0) 相比鞭毛組裝的 GSEA 富集圖。

Appendix 29. GSEA enrichment plot for flagellar assembly of *E. mori* FS08 in citric acid treatment compared with the group without adding acid (C90 vs G0).