中華民國第 57 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

052001

牛奶如何影響 Ampicillin 作用於 *E.coli*

學校名稱：彰化縣私立精誠高級中學

作者：	指導老師：
高二 董儼漢	陳淑芳
高二 鄭善恩	陳俊杰

關鍵詞：*E.coli*、Ampicillin、牛奶

摘要

本研究主要探討牛奶如何影響藥物作用的能力。我們選用大腸桿菌(*E.coli*)與其對應殺菌藥物—氨苄青黴素(Ampicillin)，作為本次實驗對象進行研究。第一部分我們探討 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的濃度範圍，第二部分探討牛奶濃度是否影響 *E.coli* 的生長。第三部分探究牛奶如何影響 Ampicillin 作用於 *E.coli* 的生長。研究結果顯示，牛奶確實會抑制 Ampicillin 作用於 *E.coli* 的能力，我們發現其原因為：①L-半胱胺酸結構中的硫醇基會影響青黴素類抗生素的氮硫碳雙環活性中心，造成抗生素藥效下降。②Ca^{2+}和 Ampicillin 螯合使其作用能力下降。第四部份，我們實驗證實牛奶抑制 Ampicillin 的藥用能力原因為其成分中含有的 Ca^{2+}與 Cysteine。

壹、研究動機

在我們的日常生活中，我們時常會聽到醫生告誡「吃藥不要配牛奶」，聽到此言，我們心中總不免仍懷疑這句話的真實性如何。為了做進一步的驗證，我們首先查閱藥物相關文獻，找尋哪些物質會影響藥物作用，文獻資料指出，藥物分為細胞內作用型的與細胞外作用型，而人體攝入牛奶後在體內的影響為細胞外部環境，且我們再查詢有關牛奶影響「人體外部環境作用藥物」的文獻，其資料甚少，又藥物和藥物作用目標物質皆為高中不易取得，故我們決定用生科相關領域最常被拿來應用的細菌 *E.coli*，與其對應殺菌藥物 Ampicillin 來探究此現象，藉由各個實驗來探討我們的實驗目的。在研究過程中，我們收集大量文獻，並比對各項文獻資料中的數據與理論，進而設計實驗以及探討我們的實驗結果，希望藉由此研究讓我們對於牛奶中是哪些因子影響藥物，以及 Ampicillin 作用於 *E.coli* 的作用機制會受到什麼因素影響，能有更深入了解。

貳、研究目的

一、探討 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的濃度範圍
二、探討牛奶對 *E.coli* 生長的影響
三、探討牛奶是否會影響 Ampicillin 對 *E.coli* 的作用
四、探討 Ca^{2+}是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素
五、探討 Cysteine 是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素

參、材料與實驗架構

一、 研究材料

(一) 實驗對象：*Escherichia coli (E.coli)* strand：BCRC12238

(二) 實驗器材：

1. Ampicillin：氨苄青黴素(化學結構如圖 1.)，是一種 β-內醯胺類抗生素，可治療多種革蘭氏陽性菌及部份革蘭氏陰性菌感染。本實驗所使用的 Ampicillin 的原管濃度為 50mg/ml (=50000 μg/ml)。

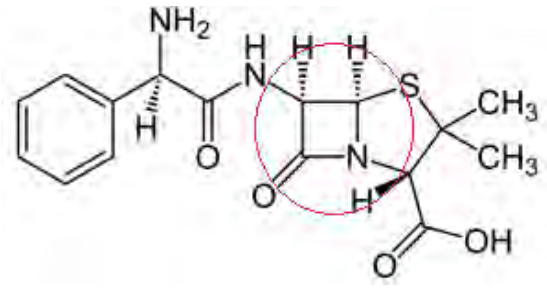


圖 1. Ampicillin 的化學結構，紅色圈圈內為 Ampicillin 的活性中心

2. Cysteine：L-半胱胺酸(化學結構如圖 2.)，是一種含硫的非必需胺基酸。

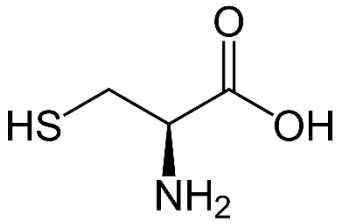


圖 2. Cysteine 化學結構

3. Glycine：甘胺酸，即氨基乙酸(化學結構如圖 3.)，是胺基酸中分子量最小且化學結構**最單純的**。本次研究將其作為對照組，探討 Cysteine 結構上的硫醇基是否會影響 Ampicillin 藥用。

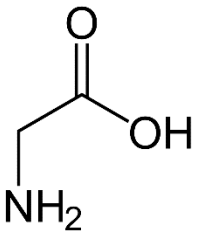


圖 3. Glycine 化學結構

4. 氯化鈣：化學式為 $CaCl_2$，本次實驗的 Ca^{2+}來源。

5. 牛奶(保久乳)：選用光泉全脂保久乳。

圖 4. 光泉全脂保久乳

6. 使用儀器：分光光度計 CT-2000、搖晃培養箱 ITC-600、無菌操作臺、微量吸管……

二、實驗架構

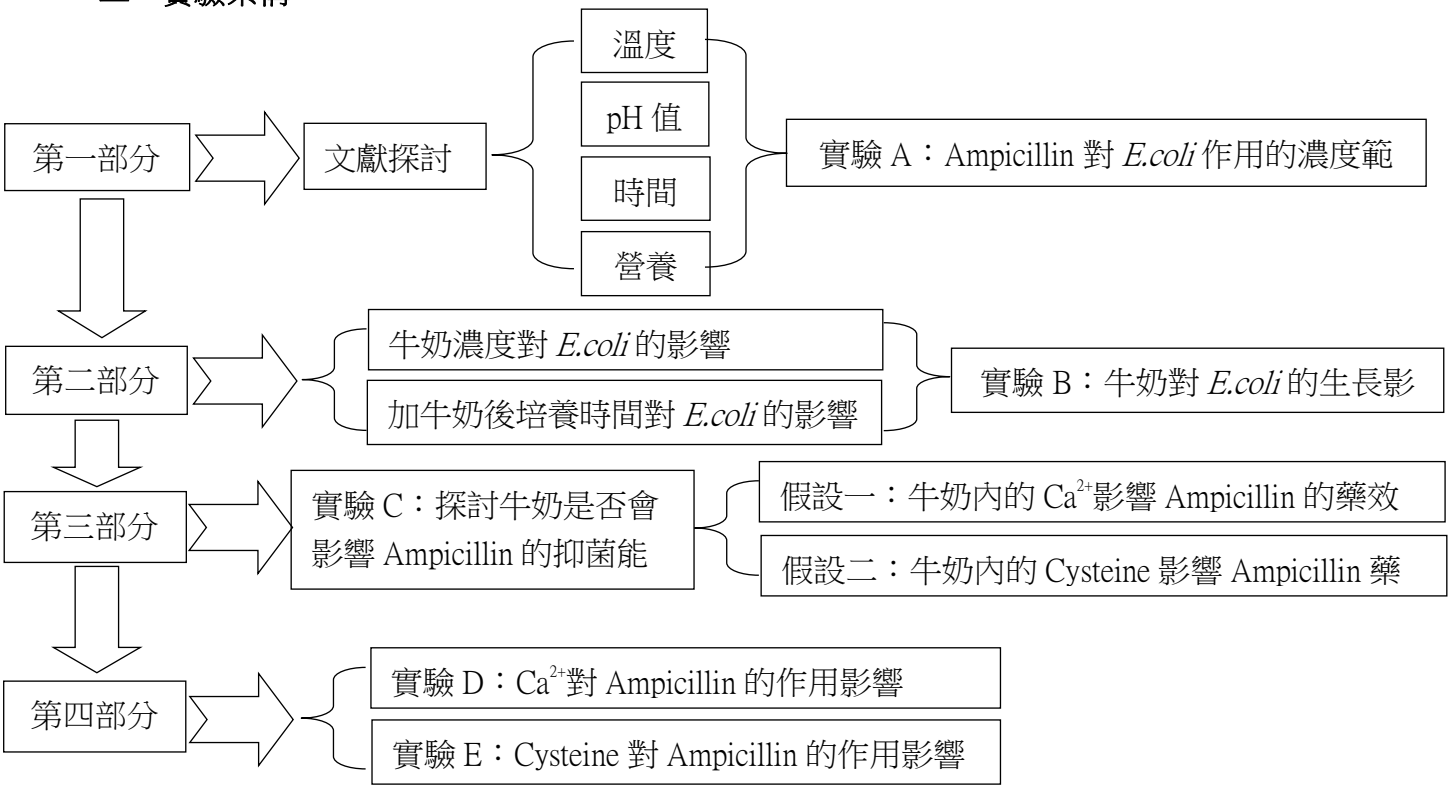


圖 5. 實驗架構圖

肆、研究過程與方法

一、實驗 A：探討 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的濃度範圍

(一) 實驗設計：

由文獻(Sarah M.Don,2009)中可以得知培養 *E.coli* 的環境之最佳的酸鹼環境是 pH=7、生長溫度為 37℃。我們利用實驗室液態培養基(LB)作為 *E.coli* 的生長環境。

為了找出 Ampicillin 作用的最佳劑量範圍，**我們探討 *E.coli* 在不同的 Ampicillin 濃度之下，其生長的菌量數對應時間的變化，繪出 *E.coli* 的生長曲線圖以決定哪個濃度的區間是藥品作用最有效率的劑量**。由文獻(J Clin Microbiol. 2012 May)得知，Ampicillin 的藥效時間小於 60 分鐘，代表 Ampicillin 在最初三個小時內即可發揮藥效。我們使用分光光度計以 600nm 波長的光源去監測樣品中濁度(光學密度=OD)，已知在此波長下，選用實驗室中的標準背景液作為 OD 的基準，其後測得 1ml 的樣品 OD=1，代表樣品管中含有10^8個 *E.coli* 菌體。

為了確保每一樣品之菌數相近，我們稀釋菌體至 1ml 的樣品中 OD=0.1 的作為起始(根據理論說明，OD=0.1 時代表每 1ml 有10^7個 *E.coli* 菌體)，並且接下來的實驗我們都以此濃度為基準進行實驗。

(二) 實驗方法：

1. 配製 1ml，OD=0.1 的菌液，加入不同量的 Ampicillin，分別配製成 Ampicillin 濃度為 12.5、25、 50、100、200 μ g/ml。
2. 將配好的 Ampicillin + *E.coli* 樣品放入培養箱以轉速每分 150 圈、溫度為 37℃的情況下培養，每一個小時測量其 OD 值。

二、實驗 B：探討牛奶對 *E.coli* 的生長影響

(一) 實驗設計：

為了瞭解牛奶是否會影響藥物作用，我們設計在不投藥的情況下，牛奶對於 *E.coli* 會有何影響。由於牛奶本身的濁度過高，我們無法利用測量 OD 的方式去觀測生長結果，因此我們使用塗盤方法觀測菌落的生長變化。我們首先探討牛奶的濃度對 *E.coli* 有何影響，再來觀察塗盤後培養時間的長短對菌落是否有變化，最後探討牛奶對 *E.coli* 的生長影響。

(二) 實驗方法：

1. 配製 4 種不同的牛奶體積濃度(95%、50%、0.1%、零牛奶)，加入菌液，配製成 OD=0.1 的樣品管，放置 30 分鐘。
2. 稀釋至適當倍率後塗盤，將塗好的菌盤分別培養 16 小時及 24 小時，並觀察實驗結果。

三、實驗 C：探討牛奶是否會影響 Ampicillin 對 *E.coli* 的作用

(一)實驗設計：

為了探討牛奶是否會對 Ampicillin 產生影響，進而降低其殺菌效果，我們設計四組樣本，如表 1. 所示，觀察實驗結果並探討牛奶如何影響 Ampicillin 對 *E.coli* 的作用。

表 1. 樣品配製表，共①~④組

		牛奶	
		有	無
Ampicillin	有	①	③
	無	②	④

(二)實驗方法：

1. 根據實驗 A 的結果，我們決定使用濃度為 150 μg/ml 的 Ampicillin，而實驗 B 結果顯示牛奶濃度差異與菌的生長無相關，因此我們使用濃度為 50%的牛奶。
2. 配製各管為 OD=0.1，加入對應的牛奶和 Ampicillin 的量。
3. 稀釋至適當倍率後塗盤，將塗好的菌盤培養 24 小時，並觀察實驗結果。

四、實驗 D：探討 Ca^{2+}是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素

(一)實驗設計：

承接實驗 C，我們欲探討牛奶各成份中真正影響 Ampicillin 的因子，而根據文獻(E.A.Gomma,2014)我們得知牛奶內的 Ca^{2+}會與 Ampicillin 螯合，形成錯合物(Complex)，為此我們選用氯化鈣作為 Ca^{2+}來源，並以牛奶上的 Ca^{2+}濃度(Liquids Health Dis. 2007)作為實驗操作之濃度，加入 Ca^{2+}與 Ampicillin 兩項變因探討 Ca^{2+}是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素。

表 2. 樣品配製表，共①~④組

		Ca^{2+}	
		有	無
Ampicillin	有	①	③
	無	②	④

(二)實驗方法：

1. 根據實驗 A 的結果，我們決定使用濃度為 150 μg/ml 的 Ampicillin，又根據牛奶成分標示及文獻得知，Ca^{2+}濃度為 1mg/ml。
2. 將各組菌管加入對應的 Ca^{2+}與 Ampicillin 量配製成 OD=0.1，放置 30 分鐘。
3. 用水稀釋適當倍率後塗盤，培養適當時間後觀察實驗結果。

五、實驗 E：探討 Cysteine 是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素

(一)實驗設計：

承接實驗 C，除了實驗 D 之 Ca^{2+}外，我們亦從其他文獻(S.M.Markowitz,1984)得知 Cysteine 上的硫醇基會去破壞青黴素類藥物的活性中心 β-lactam，而由文獻(Joanne Marie, 2015)得知一杯(236.59 ml)牛奶內 Cysteine 含量為 50mg(約等於 210 μg/ml)。為此我們加入 Cysteine 與 Ampicillin 兩項變因探討 Cysteine 是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素。

由於 Cysteine 的化學結構上有胺基、羧基與硫醇基，若只是加入 Cysteine 難以證明是其結構上的硫醇基破壞 Ampicillin 的活性中心 β-lactam，為此我們選用**只有單純胺基與羧基的 Glycine 作為對照組**，驗證是否確實為 Cysteine 上的硫醇基影響 Ampicillin 藥效。

表 3. 樣品配製表，共①~⑥組

		Glycine	Cysteine	
		有	有	無
Ampicillin	有	①	③	⑤
	無	②	④	⑥

(二)實驗方法：

1. 根據實驗 A 的結果和文獻顯示，我們決定使用濃度為 150 μg/ml 的 Ampicillin 和 210 μg/ml 的 Cysteine。
2. 將各組菌管加入適當的 Cysteine 上與 Ampicillin 配製成 OD=0.1，放置 30 分鐘。
3. 用水稀釋適當倍率後塗盤，培養適當時間並觀察實驗結果。

伍、研究結果與討論

一、實驗 A：探討 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的濃度範圍

(一)文獻探討：

Ampicillin 殺菌環境為 pH=7、溫度 37℃、營養環境為 *E.coli* 專用 LB 時，具有最佳效果。

(二)實驗結果：

我們分析生長比率$\frac{\text{相隔一小時OD差異值}}{\text{原管OD值}}$去推估 *E.coli* 在各濃度 Ampicillin 中的生長狀況。結果發現 *E.coli* 在不同 Ampicillin 濃度作用下生長比率不相同(圖 7 .)，Ampicillin 殺菌能力大致上與其濃度成正相關的趨勢。如圖 7. 所示，未加入 Ampicillin 的原始菌管，其生長比率遠大於加入了不同濃度 Ampicillin 的其他菌管，而在 Ampicillin 濃度為 200 μ g/ml (圖 7. 橘色線)時在最初的第一小時生長比率下降至 0 以下，代表其第一小時的 OD 值小於初始 OD 值，意味著第一小時內大部分 *E.coli* 菌數大副受到 Ampicillin 殺菌影響，而呈現負值生長比率。此結果明顯與其他 Ampicillin 濃度組別不同。

(三)討論：

1. Ampicillin 殺菌之最佳濃度：

我們觀察到在 Ampicillin 濃度為 200 μ g/ml 時，Ampicillin 有最佳的抑菌的能力。圖 7. 的結果顯示 Ampicillin 的抑菌濃度介於 100~200 μ g/ml 之間，於是我們選擇了 Ampicillin 濃度為 150 μ g/ml 作為接下來的實驗的 Ampicillin 濃度，而之後的實驗結果也證明了此濃度具有抑菌能力，但不會將所有 *E.coli* 殺死，有助於探討添加物對 *E.coli* 的生長影響。

2. 本次實驗選用 *E.coli* 作為「呈現」Ampicillin 藥效變化的細菌，原因為 *E.coli* 取得容易且文獻資料豐富。

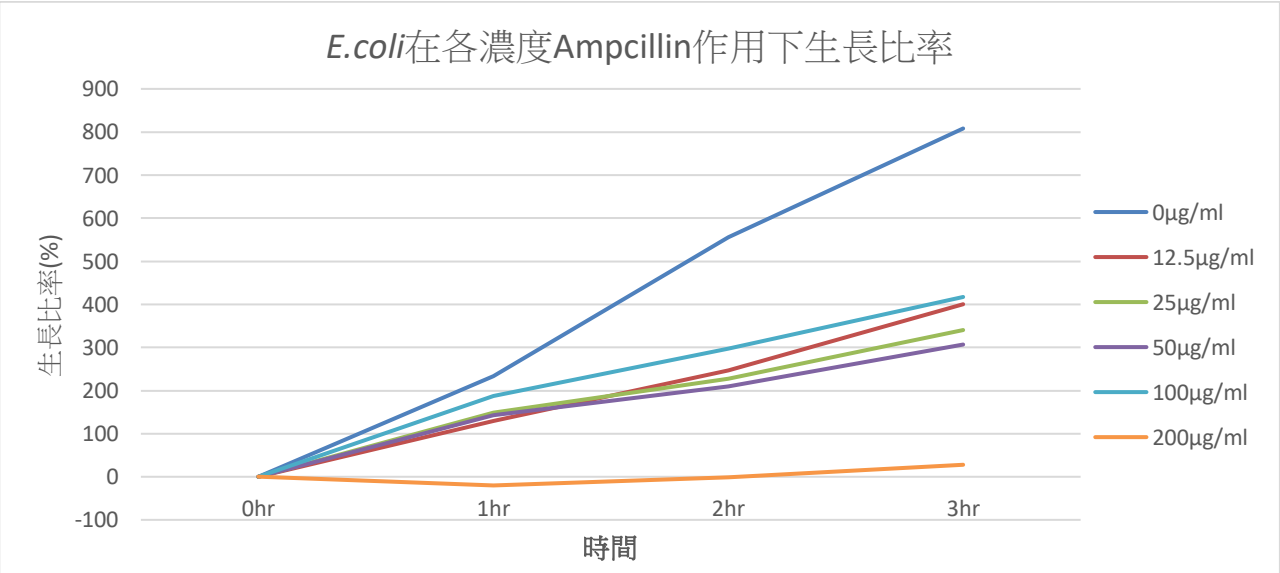


圖 7. 不同的 Ampicillin 濃度下，*E.coli* 的生長比率

二、實驗 B：探討牛奶對 *E.coli* 的生長影響

(一)文獻探討：

根據文獻(E.O.Whitter,1929)得知牛奶中的主要成分含有酪蛋白(α β κ 型)、乳清蛋白、乳脂肪和水。牛奶為膠體溶液，其中懸浮的膠體粒子主要成分為酪蛋白與Ca^{2+}結合的形態存在，懸浮於溶液中。

(二)結果：

1. 牛奶濃度：

我們欲知不同牛奶濃度對 *E.coli* 生長是否有影響(實驗結果如表 4.)，我們以 T-Test 檢驗各項數據的相關性，利用 T-Test 中的雙尾分析法，即 P(Probability value)≧0.05 時虛無假說成立，得出結論兩測驗組別無顯著差異，P<0.05 則反之，兩測驗組別有顯著差異。由表 5. 得知牛奶濃度為 95%、50%、0.1%三組之間兩兩 T-Test 的結果，**P 值**(表中**藍色**數值)**皆大於 0.05，代表這三組無差異。**又此三組分別與無牛奶組別 T-Test 的結果，P 值(表中紅色數值)皆小於 0.05，代表此三組數據與無牛奶相關性甚小。**綜合上述 T-Test 結果，加入 95%、50%和 0.1%牛奶的菌落生長情形無顯著差異。**

表 4. 牛奶對 *E.coli* 生長的影響菌盤圖

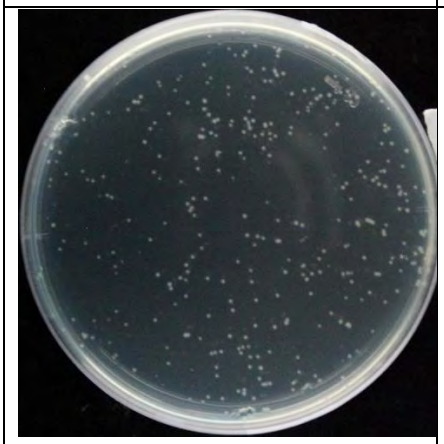
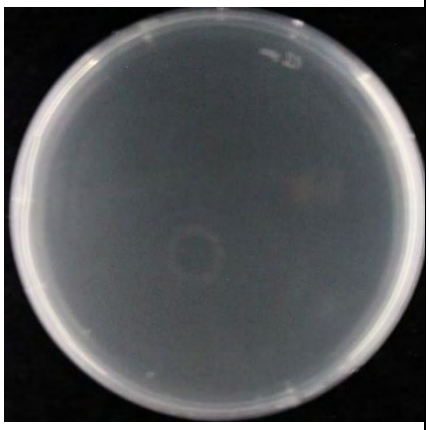
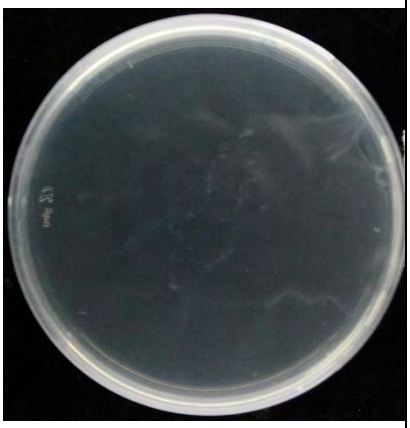
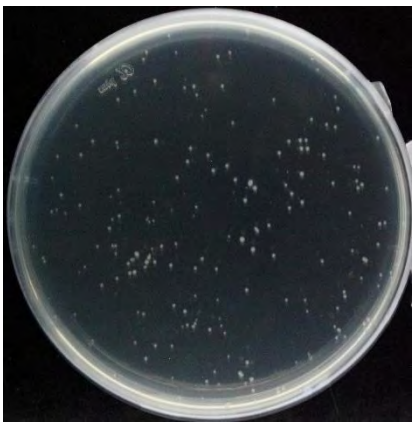
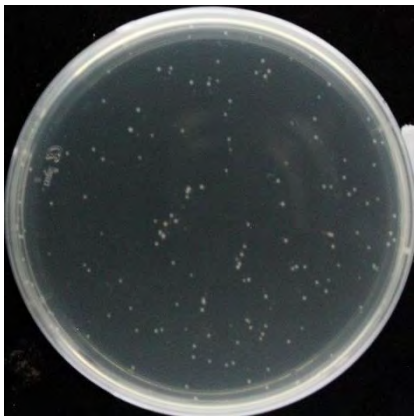
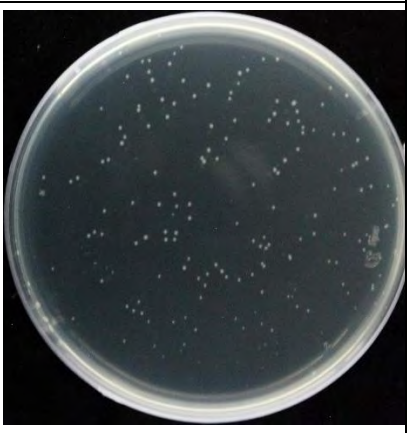
LB+菌	只有 LB	LB+牛奶
		
平均菌落數：195 個	平均菌落數：0 個	平均菌落數：0 個
0.1%牛奶+LB+菌	**50%牛奶+LB+菌**	**95%牛奶+LB+菌**
		
平均菌落數：109 個	平均菌落數：100 個	平均菌落數：100 個

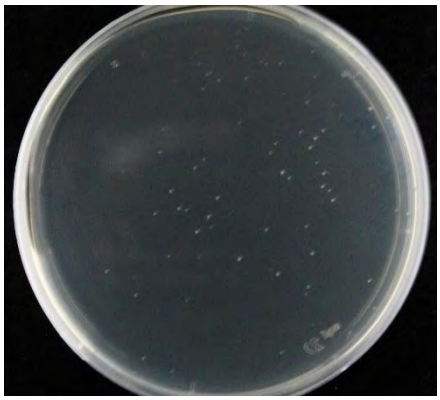
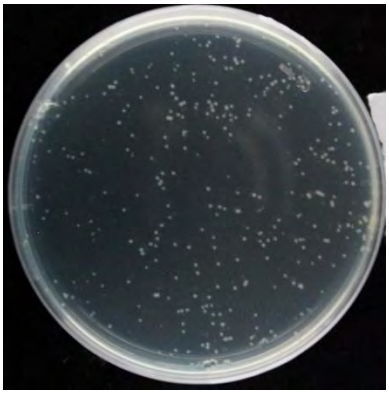
表 5. 各組牛奶濃度相對應 P value

牛奶濃度	95%	50%	0.1%	0%
95%	—	**1.00000**	**0.09048**	**0.00050**
50%	—	—	**0.19889**	**0.00009**
0.1%	—	—	—	**0.00028**

2. 培養時間：

實驗結果如表 6. 所示，16 小時的菌落小且不明顯，延續到 24 小時候菌落較明顯，顯示菌體穩定生長，結果也較容易觀測。

表 6. 16 小時與 24 小時 *E.coli* 生長差異圖

16 小時	24 小時
	

3. 牛奶對 *E.coli* 的生長影響：

原始牛奶和培養基內並無細菌，往後添加牛奶樣品管不用考慮牛奶或 LB 內有其他細菌的可能性。另外我們也發現，**不同濃度的牛奶對 *E.coli* 的生長差異並不明顯。加入牛奶後 *E.coli* 的生長能力下降，推知牛奶可抑制 *E.coli* 的生長。**

三、實驗 C：探討牛奶是否會影響 Ampicillin 對 *E.coli* 的作用

(一) 文獻探討：

Ampicillin 的作用機制：

我們從文獻得知 *E.coli* 細胞壁會不斷地製造，細胞壁的製造必須有 DD-tranpeptidase 這個酵素的作用去合成細胞壁的主成分肽聚醣中的短肽，而肽聚醣系由短肽和醣鍵結而成，若其中少了此酵素的作用，細胞壁必然無法持續更新，導致細胞無法承受滲透壓，最終菌體死亡。

由於 *E.coli* 無法在沒有細胞壁的情況下生存，**Ampicillin 便是利用其結構上的特殊活性中心，間接破壞細菌細胞壁的合成，達到殺菌的效果。**由於 Ampicillin 是此種 DD-tranpeptidase 酵素受質的非競爭型抑制劑，它會使此酵素的結構改變，使其作用受到極大的影響，造成細胞壁中的肽聚醣因為無法正常合成肽鏈進而缺乏穩定性，最終因結構不穩定而崩解，進而造成細菌的死亡。

(二) 結果：

由表 7. 及圖 8. 的數據中，我們發現加入 Ampicillin 後，菌落數都有明顯的下降，且未加入 Ampicillin 的菌盤加入牛奶後，*E.coli* 的菌落數有下降，與實驗 B 的結論相符。無加入 Ampicillin 的兩組以及加入 Ampicillin 的兩組各自做 T-Test 檢驗後，分別得出 P 值為(無加入 Ampicillin , 加入 Ampicillin)=(0.003545325, 0.000002441)，其數值皆小於 0.05，表示加入牛奶與否在各組間有顯著差異。

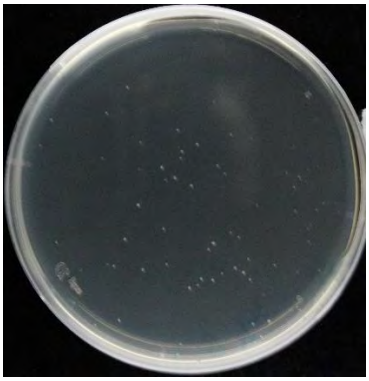
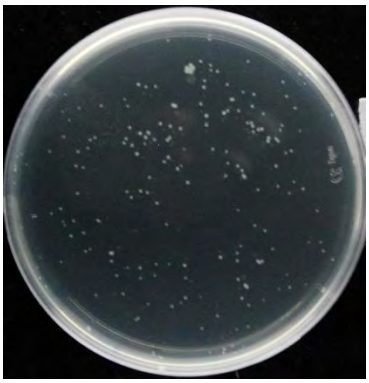
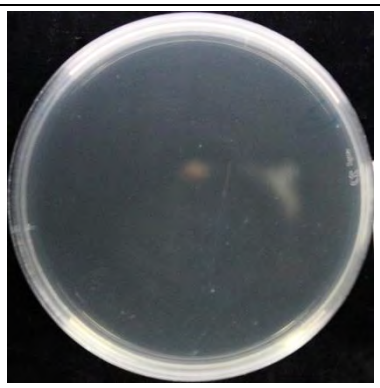
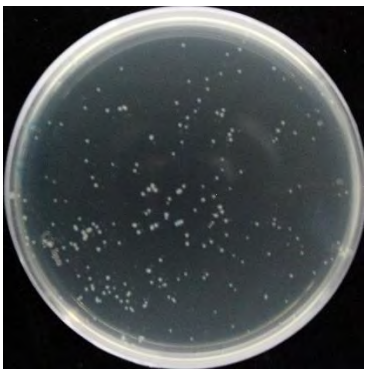
我們定義 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力(the Killing Ability of Ampicillin toward *E.coli* abbr. ，K.A.A.E.)為相同環境下$\frac{\text{未加入Ampicillin之菌落數}-\text{加入Ampicillin之菌落數}}{\text{對照組加入Ampicillin前後的菌落數差值}}$，利用 K.A.A.E.我們可以得到不同環境下 Ampicillin 的殺菌能力相對值。由此分析方式我們可以從圖 9. 看出在沒有加入牛奶的環境下其 K.A.A.E.大於加入牛奶，此結果可說明**牛奶確實可以降低 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力(K.A.A.E.)**。

(三)討論：牛奶為何使 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力(K.A.A.E.)下降

我們推測其原因與 Ampicillin 的作用機制有關。青黴素類的抗生素主要的作用機制是其中心的氮硫碳雙環開環作用，對於細菌的 DD-transpeptidase 有抑制效果。因此我們根據其活性中心 β-lactam 的性質，找出了兩項可能因素：

1. 牛奶內含有的 Ca^{2+}與 Ampicillin 螯合形成錯合物(Complex)，進而造成 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力下降。
2. 牛奶中含有之 L-半胱胺酸結構中的硫醇基，會對青黴素類抗生素的氮硫碳雙環活性中心造成不可逆影響，使抗生素去活化，進而造成 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力下降。

表 7. 牛奶和 Ampicillin 影響菌落之生長情形

Ampicillin / 牛奶	加入 Ampicillin(150 μ g/ml)	未加入 Ampicillin
加入牛奶 (50%)	 平均菌落數：46 個	 平均菌落數：151 個
未加入牛奶	 平均菌落數：4 個	 平均菌落數：176 個

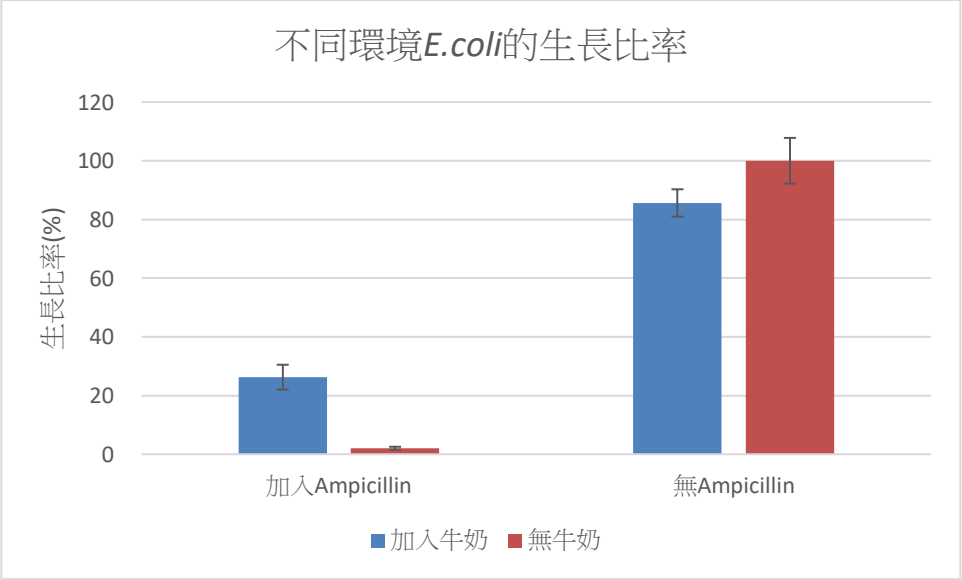


圖 8. 不同環境對於 *E.coli* 的生長比率

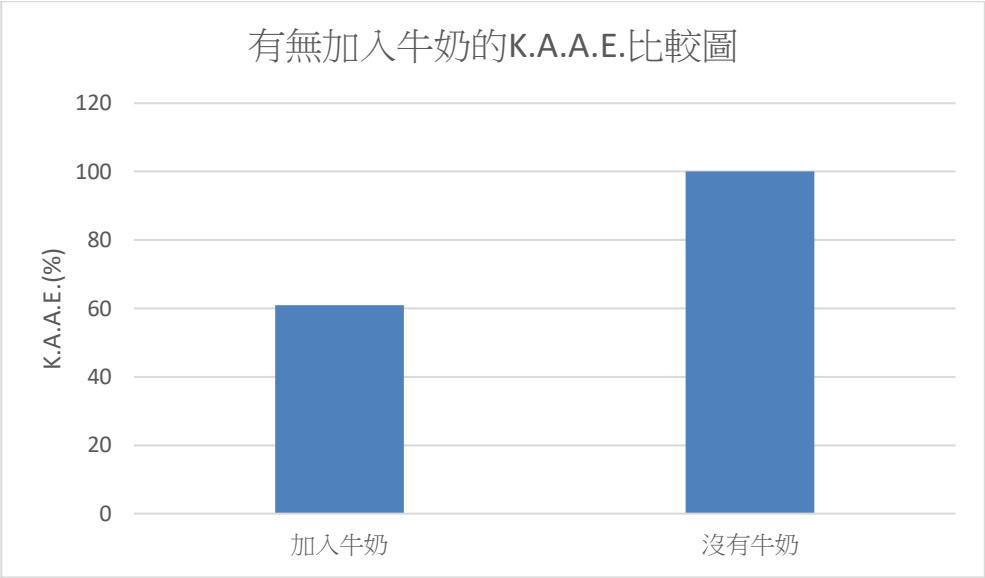


圖 9. 有無加入牛奶中 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力比較圖

四、實驗 D：探討 Ca^{2+}是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素

(一) 文獻探討：

根據文獻(E.A.Gomma,2014)得知，Ampicillin 的分子結構上特定元素(圖 10. 上的標色元素)具有孤電子對(Long Pair)，因此容易與 Ca^{2+}螯合形成錯合物且結構、狀態穩定，不容易與其他物質反應或作用，進而造成 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力下降。

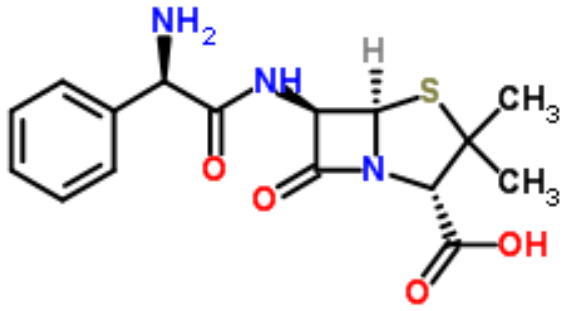
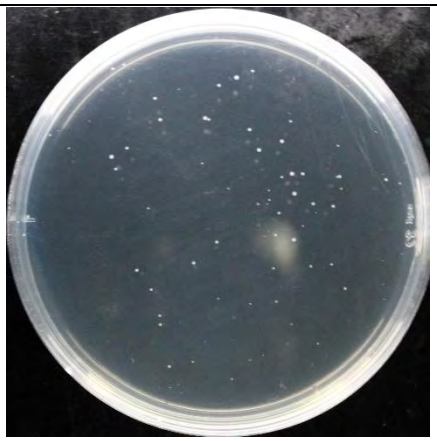
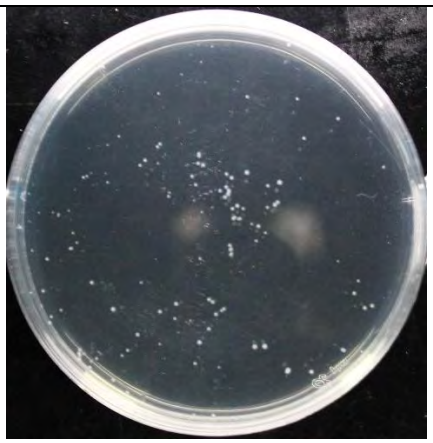
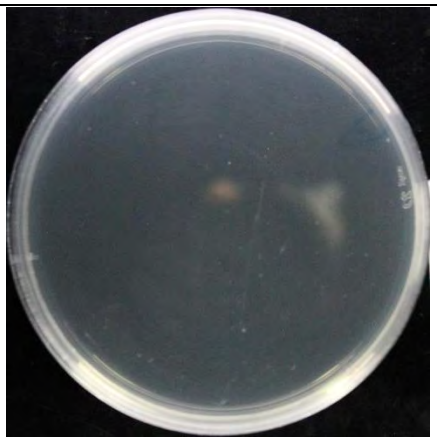
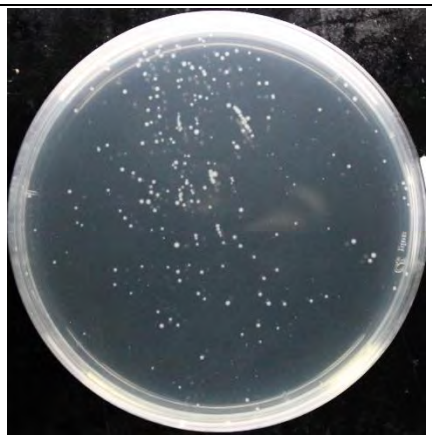


圖 10. Ampicillin 的化學結構

(二) 討論：

由表 9. 和圖 11. 可看出加入 Ampicillin 後菌落數皆有明顯的下降，且 Ca^{2+}在未加入 Ampicillin 之組別會影響 *E.coli* 的生長，此結果與文獻(T. Onoda, 1999)吻合。無加入 Ampicillin 的兩組以及加入 Ampicillin 的兩組各自做 T-Test 檢驗後，分別得出 P 值為(0.00145 ,0.00012)，其數值皆小於 0.05，表示各組間差異明顯。從圖 12. 可以看出在沒有加入 Ca^{2+}的環境下其 K.A.A.E.大於加入 Ca^{2+}，此結果可說明 Ca^{2+}確實可以降低 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力。

表 9. Ca^{2+}和 Ampicillin 影響菌落之生長情形

Ampicillin / Ca^{2+}	加入 Ampicillin(150 μ g/ml)	未加入 Ampicillin
加入 Ca^{2+} (1mg/ml)	 平均菌落數：20 個	 平均菌落數：113 個
未加入 Ca^{2+}	 平均菌落數：4 個	 平均菌落數：133 個

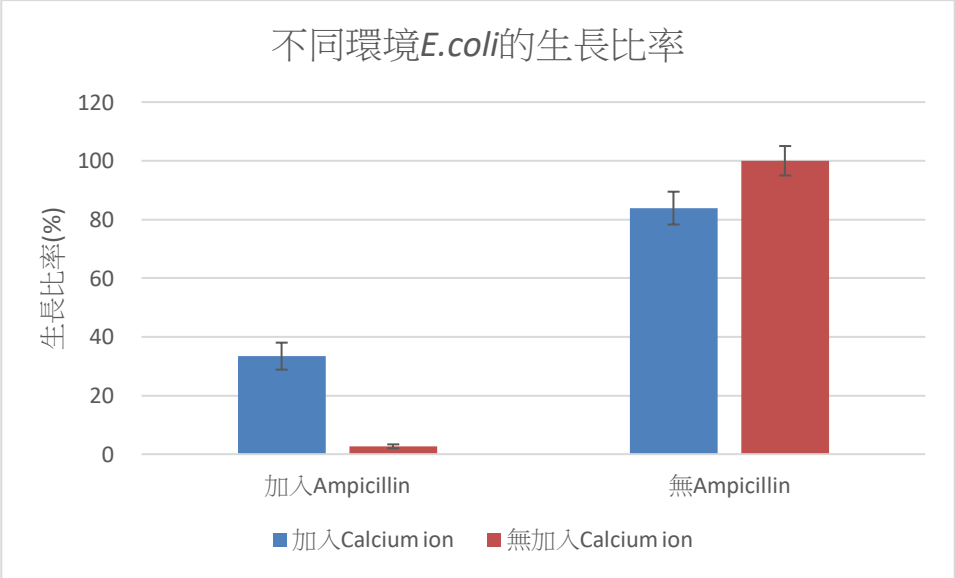


圖 11. 不同環境對於 *E.coli* 的生長比率

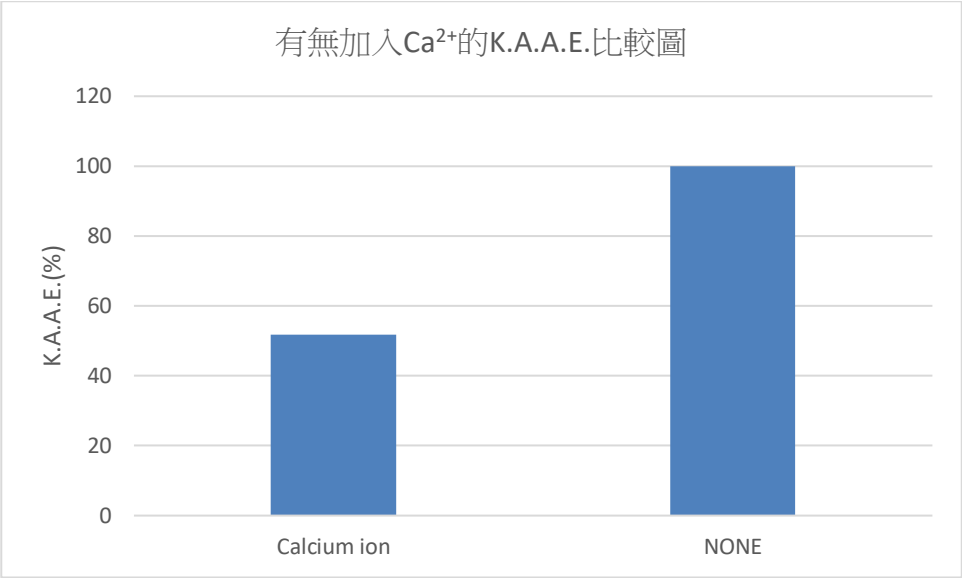


圖 12. 有無加入 Ca^{2+}的 K.A.A.E.比較圖

五、實驗 E：探討 Cysteine 是否為牛奶影響 Ampicillin 對 *E.coli* 作用的因素

(一)文獻探討：牛奶中的 L-半胱胺酸(L-Cysteine)影響 Ampicillin

除了 Ca^{2+}之外，我們推測牛奶中的 Cysteine 可能影響 Ampicillin 的作用。根據前人研究(Joanne Marie,2015)，牛奶中含有 Cysteine，且文獻(S.M.Markowitz,1984)指出胺基酸中的 Cysteine 結構中的硫醇基會影響青黴素類抗生素的氮硫碳雙環活性中心(如圖 13.)，造成抗生素去活化，藥效喪失。為了驗證此假說，我們使用甘胺酸(Glycine)作為對照組和 L-半胱胺酸(L-Cysteine)進行實驗，證明破壞 Ampicillin 的是硫醇基而非其他的官能基。

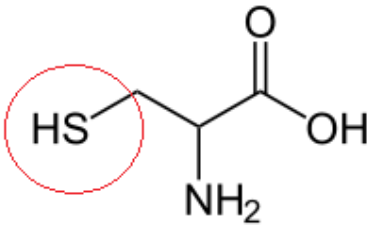


圖 13. Cysteine 的化學結構，紅色圈圈內為硫醇基

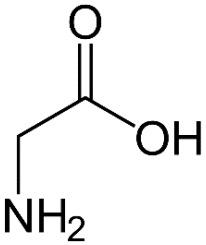


圖 14. Glycine 的化學結構

(二)結果：

由表 10. 和圖 15. 可看出加入 Ampicillin 後，菌落數皆有明顯的下降，而 Glycine 則可促進 *E.coli* 的生長，與文獻(Han L, et al, J Biotechnol, 2002)相符，而 Cysteine 則是抑制菌的生長，此結果與文獻(C. Kari, 1971)相符。由表 11. 和表 12. 可以看出各組之間 T-Test 檢驗後的結果，P 值皆小於 0.05，代表各組之間差異明顯。

從圖 15. 可以看出在沒有加入 Cysteine 和 Glycine 的組別其 K.A.A.E.大於加入 Cysteine 的 K.A.A.E.，此結果表示 **Cysteine 確實可以降低 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力**。

表 10. Cysteine、Glycine 和 Ampicillin 影響菌落之生長情形

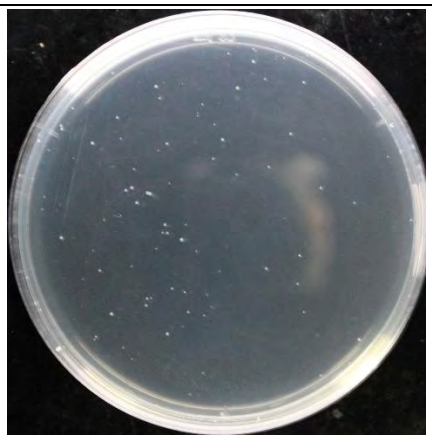
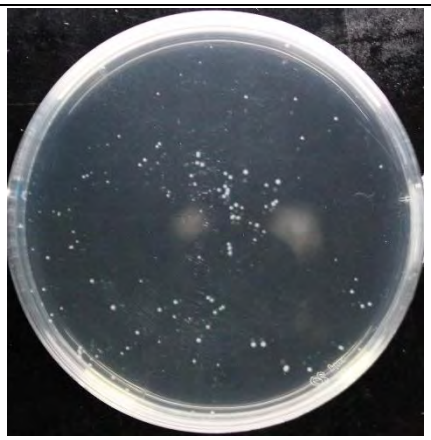
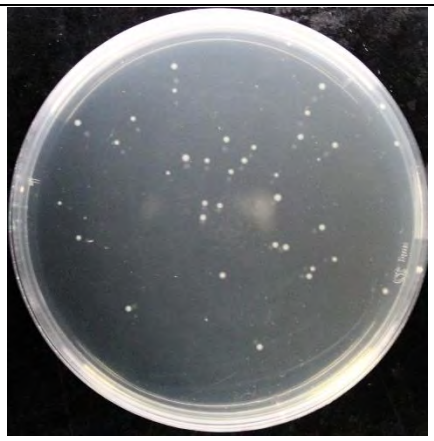
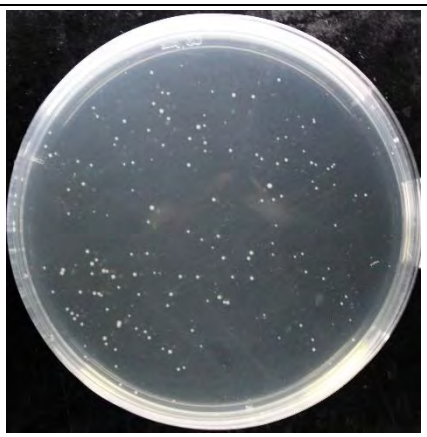
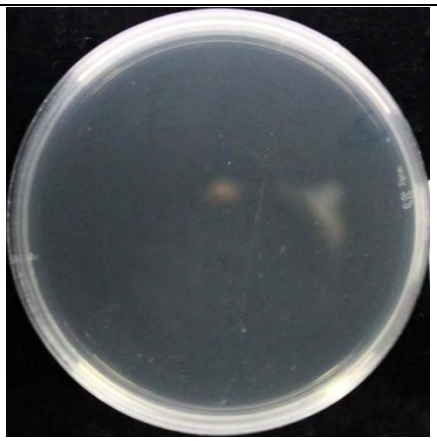
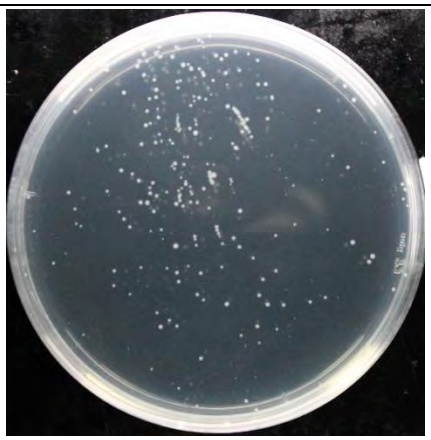
Ampicillin	加入 Ampicillin(150 μ g/ml)	未加入 Ampicillin
加入 Cysteine	 平均菌落數：35 個	 平均菌落數：99 個
加入 Glycine	 平均菌落數：20 個	 平均菌落數：148 個
未加入 Cysteine 與 Glycine	 平均菌落數：4 個	 平均菌落數：133 個

表 11. 無加入 Ampicillin 時各組相對應 P value

	加入 Glycine	未加入 Cysteine 與 Glycine
加入 Cysteine	0.00007	0.00119
加入 Glycine	—	0.01535

表 12. 加入 Ampicillin 時各組相對應 P value

	加入 Glycine	未加入 Cysteine 與 Glycine
加入 Cysteine	0.02679	0.00050
加入 Glycine	—	0.00021

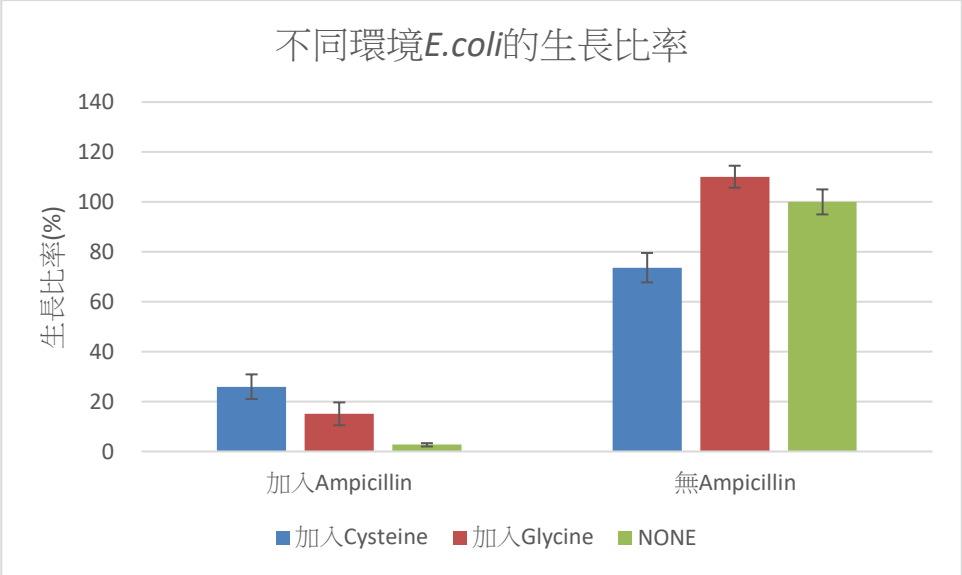


圖 15. 不同環境對於 *E.coli* 的生長比率

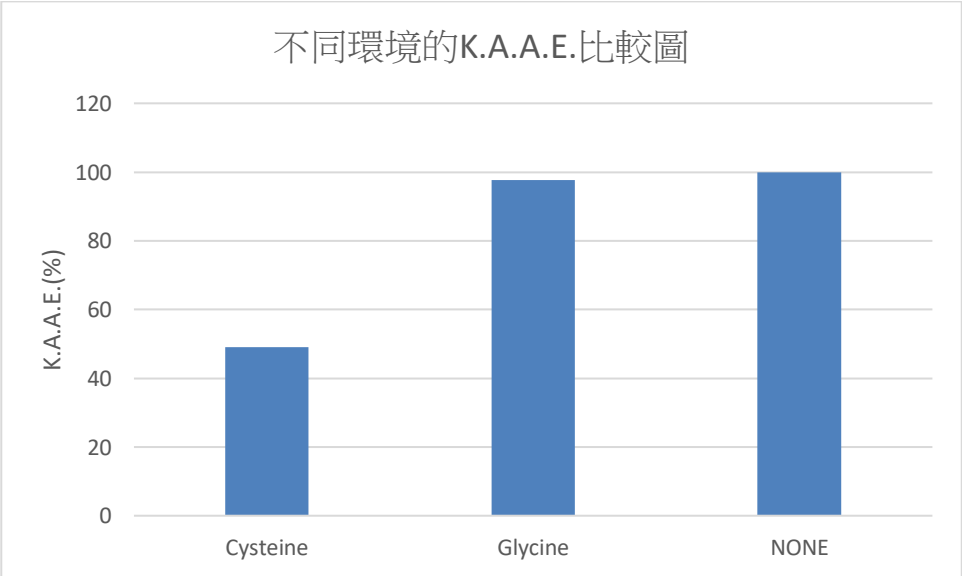


圖 16. 不同環境因子的 K.A.A.E.比較圖

(三) 討論：是否為 Cysteine 上的硫醇基影響 K.A.A.E.

由圖 16. 可看出 Cysteine 會抑制 K.A.A.E.但 Glycine 幾乎不會，又 Glycine 在本次實驗當作探討胺基與羧基的影響，結果顯示這兩個官能基不會影響 K.A.A.E.，我們可以合理推論，擁有硫醇基的 Cysteine，正是因為其結構上的硫醇基進而降低 Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力。

六、為何牛奶 K.A.A.E.大於單純 Ca^{2+}和單純 Cysteine 的 K.A.A.E.(Ampicillin 殺 *E.coli* 的能力)：

由圖 17. 我們得知加入牛奶的 K.A.A.E.大於單純 Ca^{2+}與單純 Cysteine 的 K.A.A.E.，照理來說若牛奶內無其他的雜質因子干擾，其 K.A.A.E.應略等同於加入 Ca^{2+}與 Cysteine 的 K.A.A.E.，但是其數值明顯高於其他組，但仍小於未加入任何變因的對照組。

本次研究試將我們所推論之牛奶內會影響 K.A.A.E.的物質(Ca^{2+}與 Cysteine)兩者純化後並單獨實驗，然後探討其是否會影響 K.A.A.E.，這種純化後實驗的方式，過程中並無背景干擾因子，因此效用理當大於牛奶的環境，實驗結果合理。因此我們推測是牛奶內的其他雜質影響了 Ca^{2+}與 Cysteine 各自降低 K.A.A.E.之能力，例如在牛奶內 Ca^{2+}會與酪蛋白(Casein)結合，抑或是 L-半胱胺酸兩兩聚合成胱胺酸，這都可能是牛奶的 K.A.A.E.比起兩者還要高的因素之一。

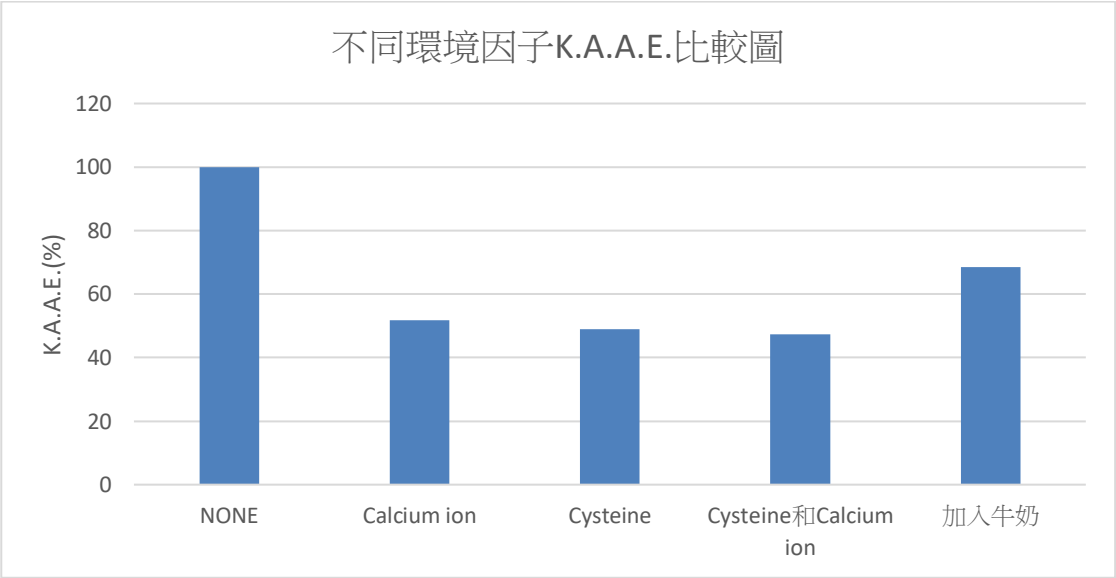


圖 17. 不同環境因子 K.A.A.E.比較圖

七、選擇保久乳的原因：

本實驗選擇保久乳的理由是保久乳經過高溫高壓滅菌，因此可以排除鮮奶內細菌的干擾，以下我們比較生乳、保久乳、奶粉、鮮奶的各項優缺點，以作出最好的選擇。根據表13.，我們比較了其他乳製品，最後決定選用保久乳。除了好保存之外，我們也考慮到 Ca^{2+}的濃度，Ca^{2+}的濃度亦可能影響 Ampicillin 的作用。為了使這個可能性所造成的影響最小化，我們選用市面上標示 Ca^{2+}濃度最低的光泉全脂保久乳。

表 13. 各類乳製品優缺點

	定義	優點	缺點
生乳	直接由母牛榨取，未經殺菌	營養成分未經變動	完全沒有殺菌使我們難以進行實驗，沒有標示成分
鮮乳	由母牛榨取後經過巴士德殺菌	營養成分只有少量變動，且可以保留風味，有標示成分	巴士德殺菌無法完全無菌，仍可能影響實驗
保久乳	由母牛榨取後經過高溫高壓完全殺菌	營養成分簡單，完全殺菌好進行實驗，可以室溫保存，有標示成分	β乳球蛋白因熱摺疊變性
奶粉	將生乳乾燥成水分 5%以下的粉末後殺菌	完全殺菌好進行實驗，可以室溫保存，有標示成分	乾燥時可能使蛋白質結晶或斷裂造成得不到我們預期的結果

陸、結論

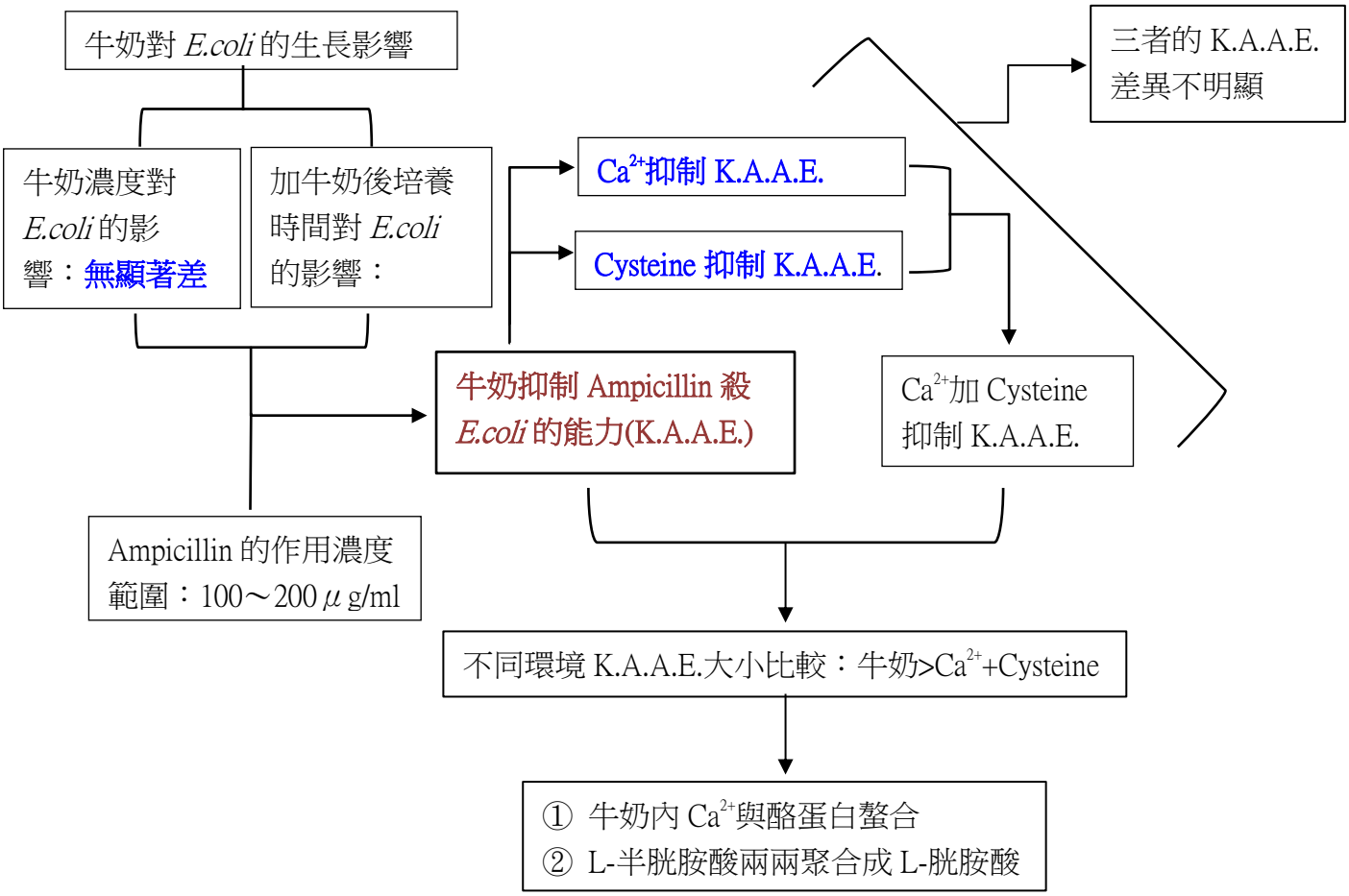


圖 18. 本研究結果推論圖

1. *E.coli* 在各濃度 Ampicillin 作用下生長比率不相同，Ampicillin 殺菌能力大致上與其濃度成正相關的趨勢。在濃度為 200 μ g/ml 時，第一小時的 OD 值小於初始 OD 值表示 Ampicillin 在此濃度下殺菌能力明顯，因此我們得知 Ampicillin 最佳作用濃度區間介於 100～200 μ g/ml。
2. 牛奶濃度在所設計的濃度區間內對於菌的生長影響無顯著差異，並且我們發現到添加牛奶培養 16 個小時後觀察，菌落的生長不明顯，培養 24 小時候菌體才有明顯生長。加入牛奶後 *E.coli* 的生長能力有下降的趨勢，推知牛奶可抑制 *E.coli* 的生長。
3. 在實驗 C 結果顯示，牛奶會抑制 Ampicillin 作用於 *E.coli* 的能力。
4. 由實驗 D、E 的結果，我們得知牛奶抑制 Ampicillin 作用於 *E.coli* 的原因為：
   ① Ampicillin 與 Ca^{2+}螯合在一起，形成錯合物(complex)，造成加入牛奶後 Ampicillin 藥用能力下降。
   ② L-半胱胺酸結構中的硫醇基會影響青黴素類抗生素的氮硫碳雙環活性中心造成不可逆影響，使抗生素被去活化，喪失藥效。
5. 比較加入單純 Ca^{2+}、單純 Cysteine、Ca^{2+}和 Cysteine 三個組別的 K.A.A.E.並無顯著差異，因此我們推測 Cysteine 可作為配位子，與 Ca^{2+}螯合形成錯合物。

6. 比較牛奶環境的 K.A.A.E.及加入 Ca^{2+}和 Cysteine 環境的 K.A.A.E.，我們推論：
   ① 牛奶內 Ca^{2+}與酪蛋白(Casein)螯合，減小 Ca^{2+}抑制 K.A.A.E.。
   ② L-半胱胺酸兩兩聚合成 L-胱胺酸，減小 L-半胱胺酸抑制 K.A.A.E.。

柒、未來展望

本次研究對於牛奶內的成分如何影響 Ampicillin 做了初步的探討，我們試思考其應用價值，發現可提供「吃藥不要配牛奶」這項論點多元面向的強力佐證，並且 *E.coli* 以及青黴素類藥物皆為生科領域常見，這使本研究成果更具價值性。本報告其中之一的實驗結果為牛奶濃度與菌落生長兩者間無關連，為此我們樂見在未來有人可以對此作深入的探討。我們亦希望有儀器可以驗證 Ampicillin 會和 Cysteine 反應形成我們所推導的化合物，驗證我們的反應機構合理性。醫學應用方面，為避免民眾仍有可能粗心而誤搭配牛奶服用藥物，我們希望在未來能找出在牛奶等易影響藥物作用的環境下，如何使藥物正常發揮藥效，並且希望可以尋找替代藥物減輕民眾需刻意留心藥物與牛奶不可搭配服用的負擔。

捌、參考資料

1. Ampicillin
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/

2. Andrew T. Schilling , The Effect of pH on Bacterium *E.coli*,2008
http：//cssf.usc.edu//History/2008/Projects/J1429.pdf

3. Sarah M. Don, Optimal Conditions for the Growth of *E coli*, 2009
https：//zh.scribd.com/doc/11337868/Optimal-Conditions-for-the-Growth-of-E-Coli

4. K. Lawrence, The Effects of Ampicillin on the Growth of *Escherichia coli* , 2013
http：//www.mbio.ncsu.edu/MB360/papers2013/Khadija&Michelle.pdf

5. Sheldon M. Markowitz , Effect of L-Cysteine on the Activity of Penicillin Antibiotics Against Clostridium difficile , 1984
https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176289/

6. E. A. Gomma , Conductance Studies on Complex Formation between CaCl_2 and Ampicillin as Ligand Water and In Methanol Solvent at Different Temperatures, 2014
https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176289/

7. Colin J. Henehan ，Identification of Cysteine Ligands in Metalloproteins using Optical and NMR Spectroscopy, 1993

8. Catherine A. White, In Vitro Evaluation of the Determinants of Bactericidal Activity of Ampicillin Dosing Regimens against Escherichia coli,1898

【評語】052001

本研究探討牛奶對青黴素(Ampicillin)對抗菌之影響，結果顯示牛奶中之牛乳中之 DL-半胱胺酸之結構與鈣離子有抑制 Ampicillin 之抗菌作用。研究內容撰寫完整，實驗設計也富有邏輯層次，也有參考文獻來支持實驗主軸，但鈣離子影響藥物作用的論點已被提出多時，創新性略嫌不足。如能求得牛奶於腸胃中之濃度是否可抑制 Ampicillin 之活性，則更佳。雖證明鈣離子和半胱胺酸會影響 Ampicillin 的作用，若能從牛奶移除此兩者，評估 Ampicillin 效用，可更加證明牛奶影響藥物作用的機制。

作品海報

壹、摘要

本研究主要探討牛奶如何影響藥物作用的能力。我們選用大腸桿菌(*E.coli*)與其對應殺菌藥物—氨苄青黴素(Ampicillin)，作為本次實驗對象進行研究。第一部分我們探討Ampicillin對*E.coli*作用的濃度範圍，第二部分探討牛奶濃度是否影響*E.coli*的生長。第三部分探究牛奶如何影響Ampicillin作用於*E.coli*的生長。研究結果顯示，牛奶確實會抑制Ampicillin作用於*E.coli*的能力，我們發現其原因為：① L-半胱胺酸結構中的硫醇基會影響青黴素類抗生素的氮硫碳雙環活性中心，造成抗生素藥效下降。② Ca^{2+}和Ampicillin螯合使其作用能力下降。第四部份，我們實驗證實牛奶抑制Ampicillin的藥用能力原因為其成分中含有的Ca^{2+}與Cysteine。

貳、研究動機

在我們的日常生活中，我們時常會聽到醫生告誡「吃藥不要配牛奶」，聽到此言，我們心中總不免仍懷疑這句話的真實性如何。為了做進一步的驗證，我們首先查閱藥物相關文獻，找尋哪些物質會影響藥物作用，文獻資料指出，藥物分為細胞內作用型的與細胞外作用型，而人體攝入牛奶後在體內的影響為細胞外部環境，且我們再查詢有關牛奶影響「人體外部環境作用藥物」的文獻，其資料甚少，又藥物和藥物作用目標物質皆為高中不易取得，故我們決定用生科相關領域最常被拿來應用的細菌*E.coli*，與其對應殺菌藥物Ampicillin來探究此現象，藉由各個實驗來探討我們的實驗目的。在研究過程中，我們收集大量文獻，並比對各項文獻資料中的數據與理論，進而設計實驗以及探討我們的實驗結果，希望藉由此研究讓我們對於牛奶中是哪些因子影響藥物，以及Ampicillin作用於*E.coli*的作用機制會受到什麼因素影響，能有更深入了解。

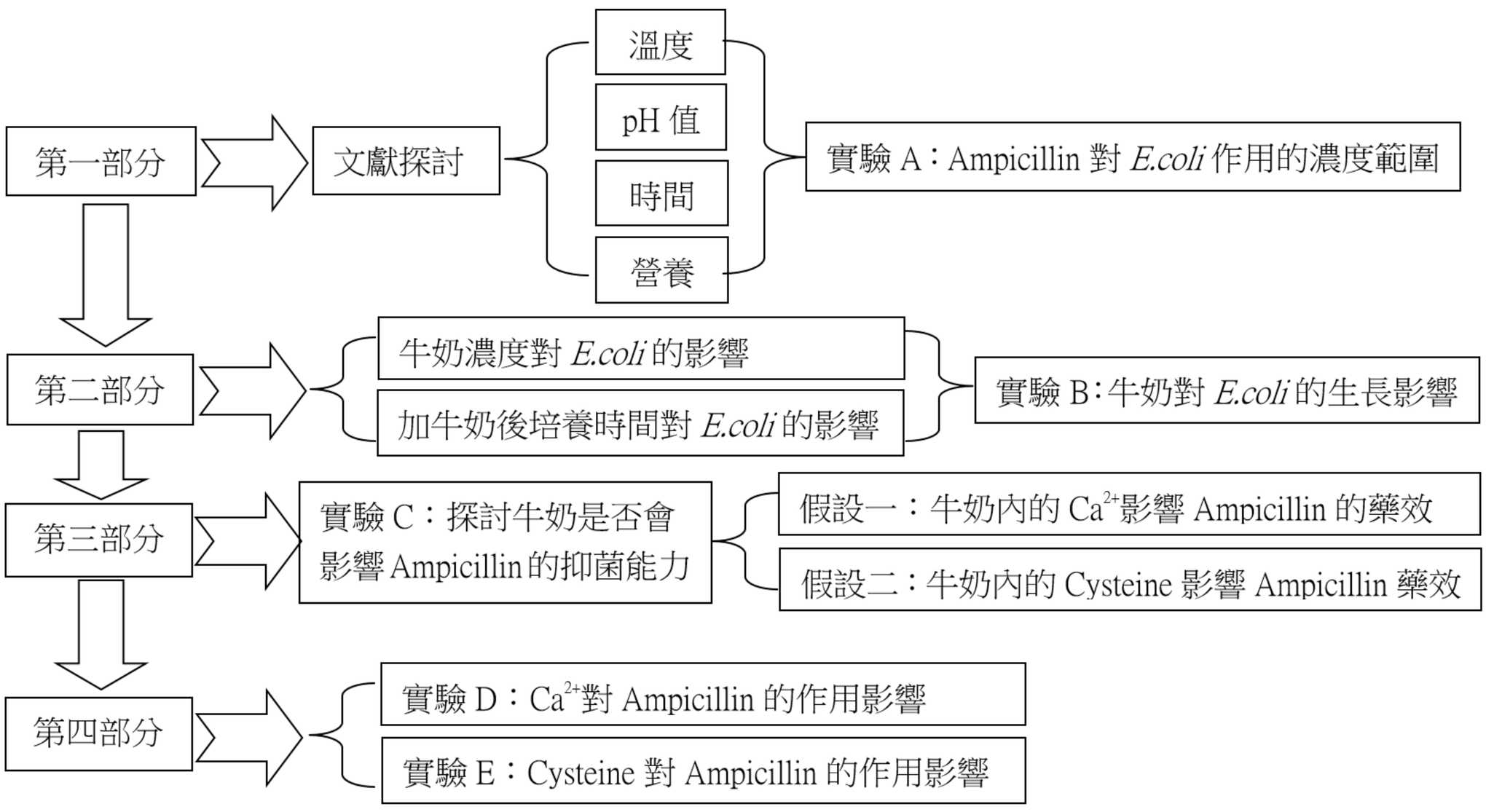
參、研究目的

一、探討Ampicillin對*E.coli*作用的濃度範圍。
二、探討牛奶對*E.coli*生長的影響。
三、探討牛奶是否會影響Ampicillin對*E.coli*的作用。
四、探討Ca^{2+}是否為牛奶影響Ampicillin對*E.coli*作用的因素。
五、探討Cysteine是否為牛奶影響Ampicillin對*E.coli*作用的因素。

肆、研究材料

一、實驗對象：*Escherichia coli* strand：BCRC12238
二、實驗器材：Ampicillin、分光光度計、搖晃培養箱、微量吸管、無菌操作台、培養皿

伍、實驗架構



陸、研究結果與討論

一、實驗A：Ampicillin 對*E.coli*的作用

1. 由圖1. 結果得知Ampicillin的抑菌濃度介於100~200 μ g/ml。
2. 實驗取抑菌濃度之中間值150 μ g/ml 來探討添加物對*E.coli*的生長影響。

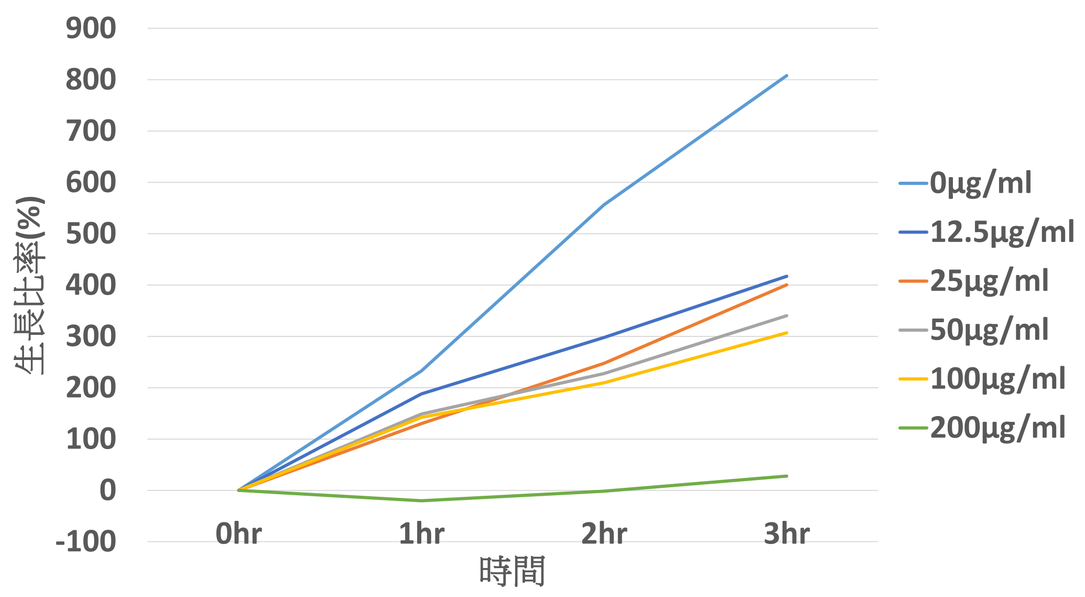


圖1. *E.coli*在各濃度Ampicillin作用下生長比率

二、實驗B：牛奶對*E.coli*的生長影響

1. 根據T-Test結果，加入95%、50%和0.1%牛奶的菌落生長情形無顯著差異(P≧0.05)。
2. 培養16小時的菌落小且不明顯，延續到24小時候菌落較明顯且容易觀測(如表1.)。
3. 加入牛奶後*E.coli*的生長能力下降，推知牛奶可抑制*E.coli*的生長(如表2.)。

表1. 不同時間對菌的生長影響

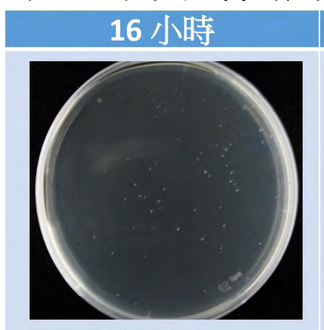
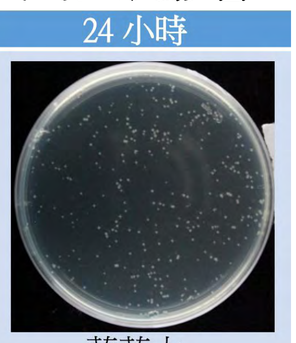
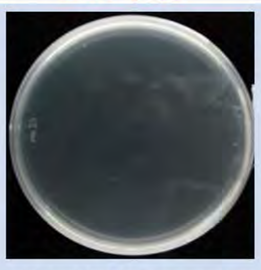
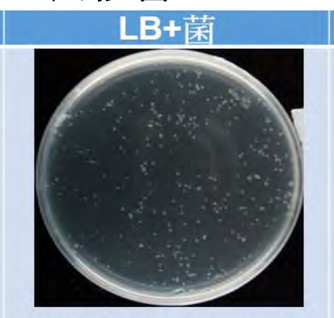
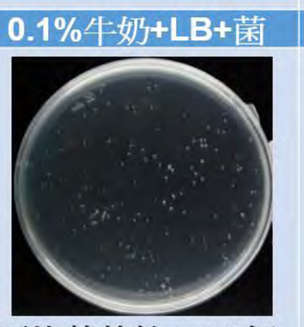
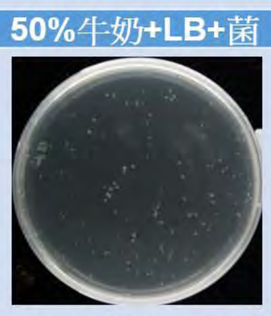
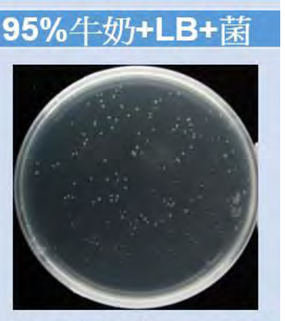
16 小時	24 小時
	
菌落小	菌落大

表2. 牛奶對菌的生長影響

LB+牛奶	LB+菌	只有LB
		
平均菌落數：0個	平均菌落數：195個	平均菌落數：0個
0.1%牛奶+LB+菌	**50%牛奶+LB+菌**	**95%牛奶+LB+菌**
		
平均菌落數：109個	平均菌落數：100個	平均菌落數：100個

三、實驗C：牛奶影響Ampicillin對*E.coli*的作用

1. 加入Ampicillin或加入牛奶後，*E.coli*的菌落數皆有下降(如表3. 及圖2.)。
2. 無加入Ampicillin的兩組以及加入Ampicillin的兩組各自採T-Test檢驗後，顯示加入牛奶與否在各組間有顯著差異。
3. 在沒有加入牛奶的環境下其K.A.A.E.大於加入牛奶(如圖8.)，此結果可說明牛奶確實可以降低Ampicillin殺*E.coli*的能力(K.A.A.E.)。

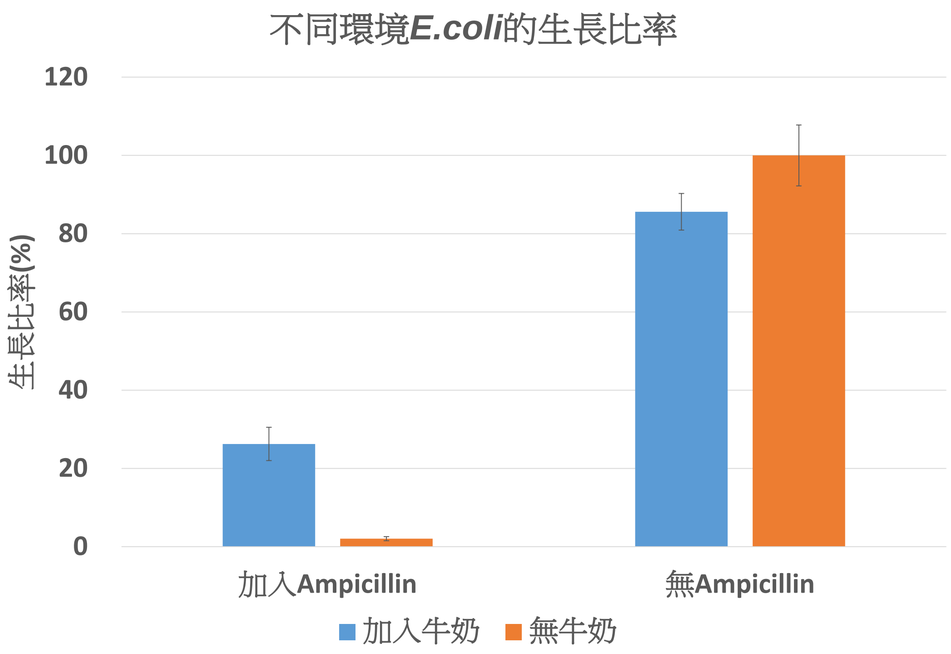
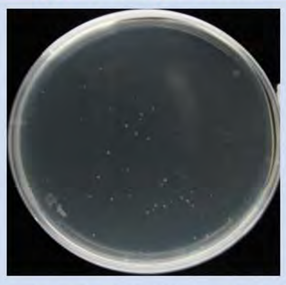
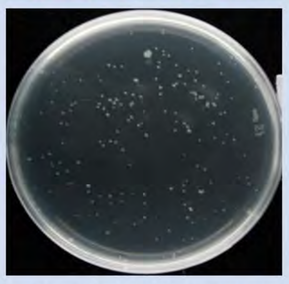
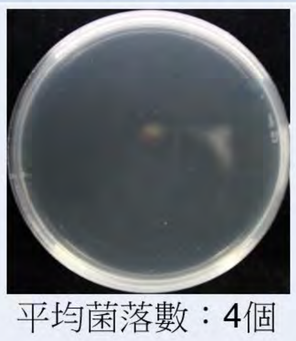
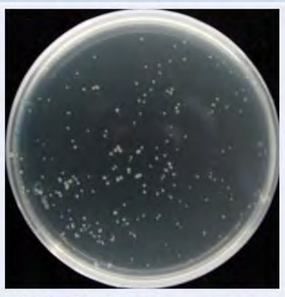


圖2. 不同環境對於*E.coli*的生長比率

表3. 牛奶對菌的生長影響

	加入Ampicillin	未加入Ampicillin
加入牛奶(50%)	 平均菌落數：46個	 平均菌落數：151個
未加入牛奶	 平均菌落數：4個	 平均菌落數：176個

四、實驗D：探討Ca^{2+}是否為牛奶影響Ampicillin對*E.coli* 作用的因素

1. 加入Ampicillin後菌落數皆有明顯的下降，且Ca^{2+}在未加入Ampicillin之組別會抑制*E.coli*的生長(如表4. 和圖3.)。
2. 無Ampicillin的兩組以及加入Ampicillin的兩組各自採T-Test檢驗後顯示各組間有顯著差異。
3. 在無Ca^{2+}的環境下其K.A.A.E.大於加入Ca^{2+}，此結果可說明Ca^{2+}確實可以降低Ampicillin殺*E.coli*的能力(如圖8.)。

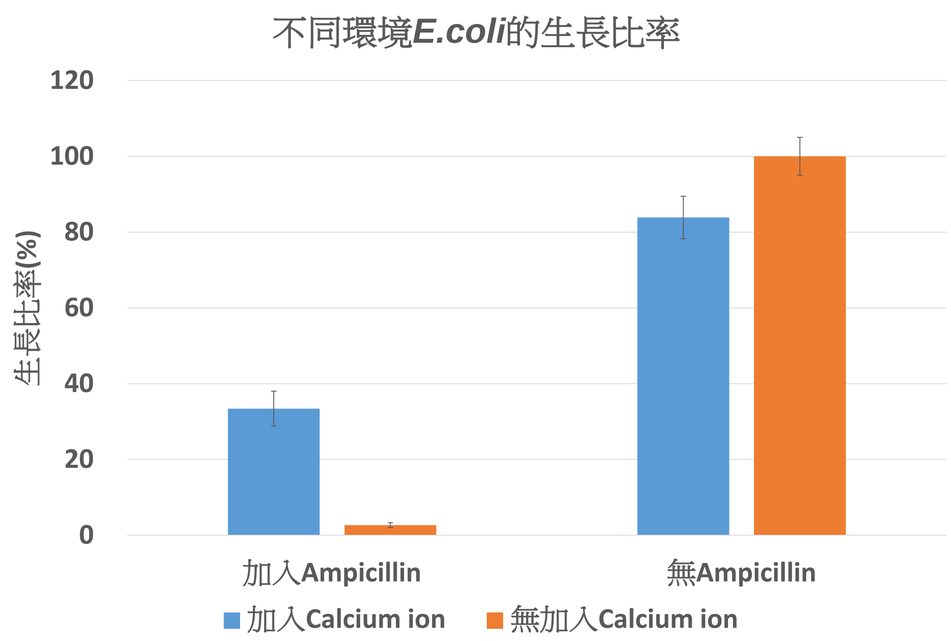
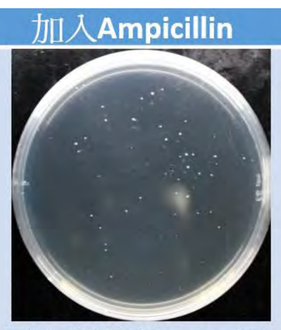
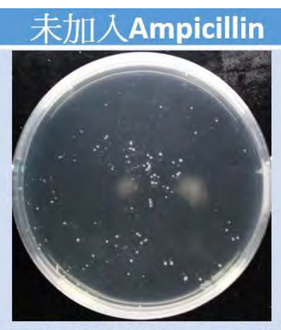
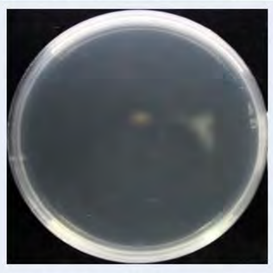
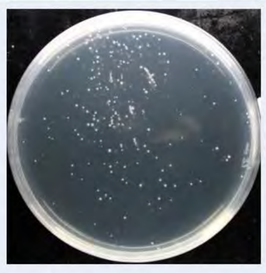


圖3. 不同環境對於*E.coli*的生長比率

表4. Ca^{2+}對菌的生長影響

	加入Ampicillin	未加入Ampicillin
加入Ca^{2+}(1mg/ml)	 平均菌落數：20個	 平均菌落數：113個
未加入Ca^{2+}	 平均菌落數：4個	 平均菌落數：133個

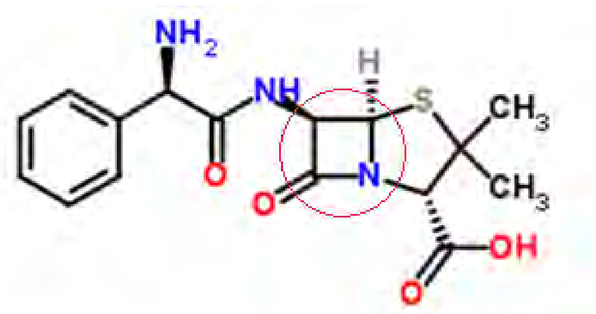


圖4. Ampicillin的化學結構圖，紅色圈內為藥用活性中心。標色元素為含孤電子對元素，可與Ca^{2+}螯合形成錯合物。

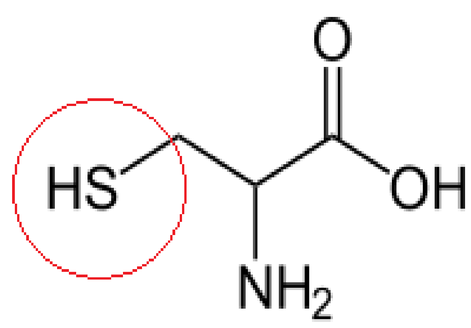


圖5. Cysteine化學結構圖，紅色圈內為硫醇基

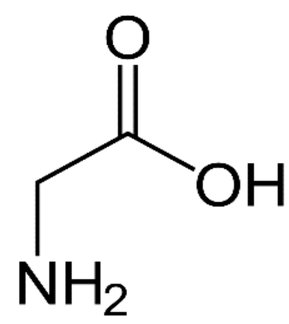


圖6. Glycine化學結構圖

五、實驗E：探討Cysteine是否為牛奶影響Ampicillin對*E.coli* 作用的因素

1. 加入Ampicillin後，菌落數皆有明顯的下降，而Glycine可促進*E.coli*的生長，反之Cysteine則是抑制菌的生長(如表5. 和圖7.)。
2. 無Ampicillin的三組以及加入Ampicillin的三組各自採T-Test檢驗後顯示各組之間有顯著差異。
3. 在無Cysteine和Glycine的組別其K.A.A.E.大於加入Cysteine的K.A.A.E.，此結果表示Cysteine確實可以降低Ampicillin殺*E.coli*的能力(如圖8.)。

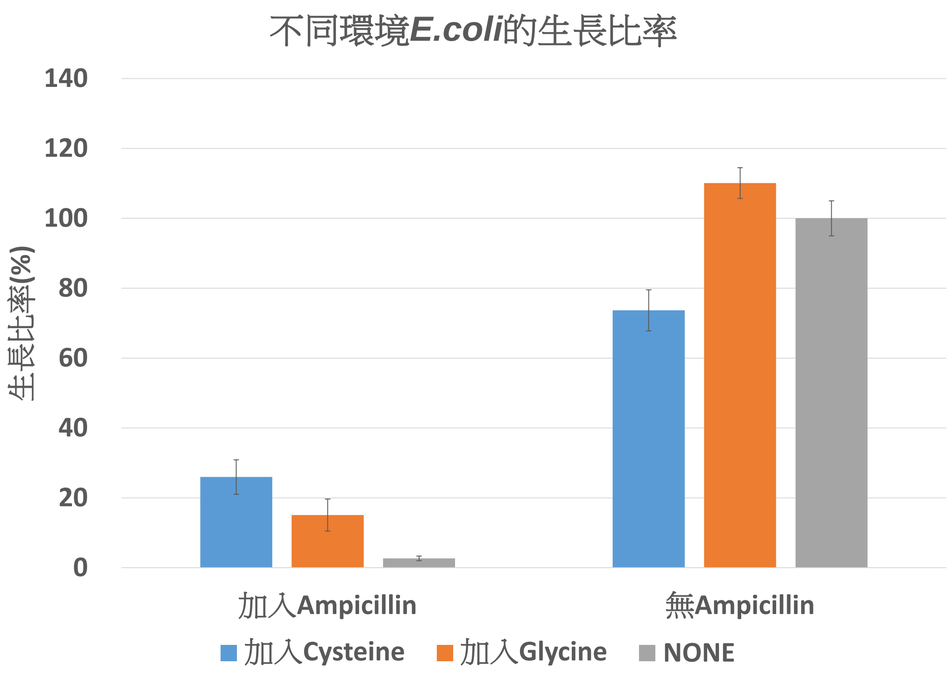
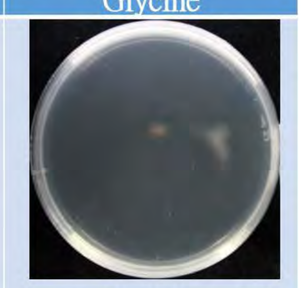
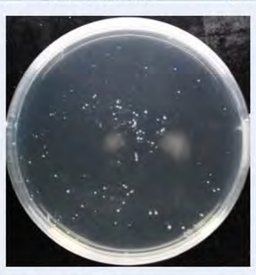
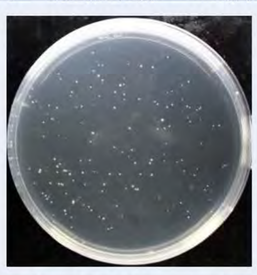
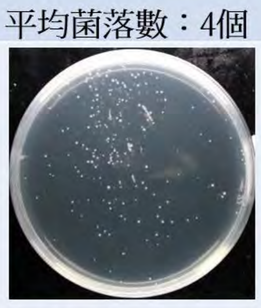


圖7. 不同環境對於*E.coli*的生長比率

表5. Cysteine、Glycine對菌的生長影響

	加入Cysteine	加入Glycine	未加入Cysteine與Glycine
加入Ampicillin	平均菌落數：35個	平均菌落數：20個	 平均菌落數：4個
未加入Ampicillin	 平均菌落數：99個	 平均菌落數：148個	 平均菌落數：133個

六、是否為Cysteine上的硫醇基影響K.A.A.E.

由圖8. 可得知，Cysteine會抑制K.A.A.E.，但Glycine幾乎不會，又Glycine在本次實驗當作探討胺基與羧基的影響，結果顯示這兩個官能基不會影響K.A.A.E.，我們可以合理推論，擁有硫醇基的Cysteine，正是因為其結構上的硫醇基進而降低Ampicillin殺*E.coli*的能力。

七、探討牛奶K.A.A.E.大於單純Ca^{2+}和單純Cysteine的K.A.A.E.

1. 本次研究試將Ca^{2+}與Cysteine兩者純化後並單獨實驗，過程中並無背景干擾因子，因此其效用大於牛奶的環境。
2. 我們推測是牛奶內的其他雜質影響了Ca^{2+}與Cysteine各自降低K.A.A.E.之能力。
3. 在牛奶內Ca^{2+}會與酪蛋白(Casein)結合，抑或是L-半胱胺酸兩兩聚合成胱胺酸，這可能是牛奶的K.A.A.E.比起兩者還要高的因素之一。

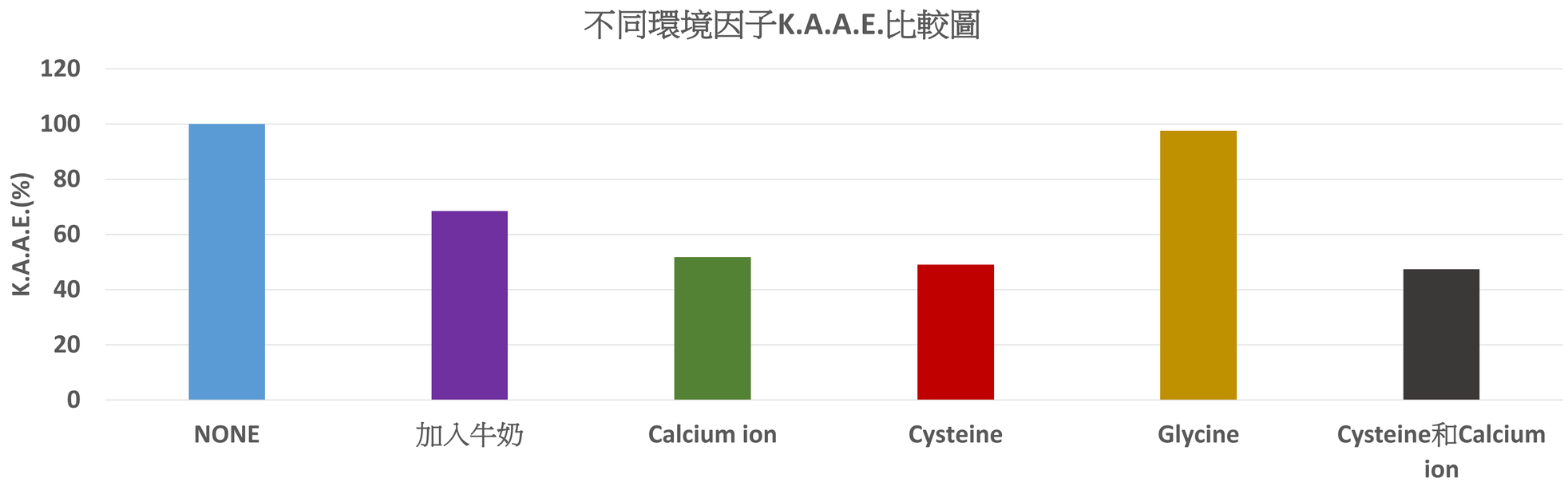


圖8. 不同環境因子K.A.A.E.比較圖

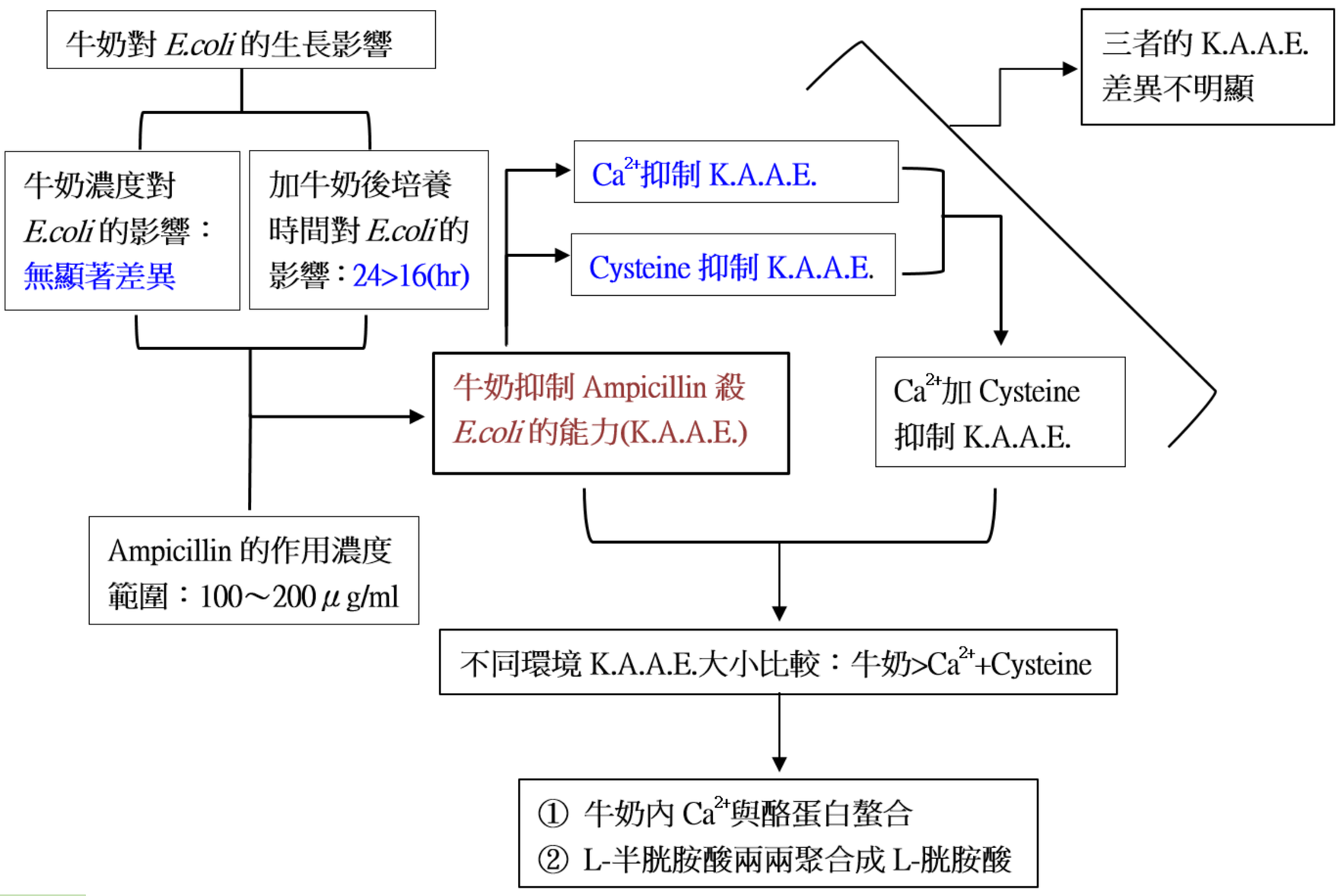
八、選擇保久乳的原因

本實驗選擇保久乳的理由是保久乳經過高溫高壓滅菌，因此可以排除鮮奶內細菌的干擾，以下我們比較生乳、保久乳、奶粉、鮮奶的各項優缺點，以選出最佳的實驗添加物。根據表6.，保久乳除了好保存之外，我們也考慮到Ca^{2+}的濃度可能影響Ampicillin的作用，為了使這個可能性所造成的影響最小化，我們選用市面上標示Ca^{2+}濃度最低的光泉全脂保久乳。

表6. 各乳製品的優缺點

	定義	優點	缺點
生乳	直接由母牛榨取，未經殺菌	營養成分未經變動	完全沒有殺菌使我們難以進行實驗，沒有標示成分
鮮乳	由母牛榨取後經過巴士德殺菌	營養成分只有少量變動，且可以保留風味，有標示成分	巴士德殺菌無法完全無菌，仍可能影響實驗
保久乳	由母牛榨取後經過高溫高壓完全殺菌	營養成分簡單，完全殺菌好進行實驗，可以室溫保存，有標示成分	β乳球蛋白因熱摺疊變性
奶粉	將生乳乾燥成水分5%以下的粉末後殺菌	完全殺菌好進行實驗，可以室溫保存，有標示成分	乾燥時可能使蛋白質結晶或斷裂造成得不到我們預期的結果

柒、結論



捌、未來展望

本次研究對於牛奶內的成分如何影響Ampicillin做了初步的探討，發現其可提供「吃藥不要配牛奶」這項論點多面向之佐證，且*E.coli*以及青黴素類藥物皆為生科領域常見，這使本研究成果更具價值性。本報告其一的實驗結果為牛奶濃度與菌落生長兩著間無關連，為此在未來可以對此一現象作深入的探討，亦希望有儀器可以驗證Ampicillin會和Cysteine反應形成我們所推導的化合物，驗證我們的反應機構合理性。醫學應用方面，為避免民眾仍有可能誤搭配牛奶服用藥物，我們希望在未來能找出在牛奶等易影響藥物作用的環境下，如何使藥物正常發揮藥效，並且希望可以尋找替代藥物減輕民眾需刻意留心藥物與牛奶不可搭配服用的負擔。

玖、參考文獻

1. Ampicillin
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/
2. Andrew T. Schilling , The Effect of pH on Bacterium *E.coli*,2008
http：//cssf.usc.edu//History/2008/Projects/J1429.pdf
3. Sarah M. Don, Optimal Conditions for the Growth of *E coli*, 2009
https：//zh.scribd.com/doc/11337868/Optimal-Conditions-for-the-Growth-of-E-Coli
4. K. Lawrence, The Effects of Ampicillin on the Growth of *Escherichia coli* , 2013
http：//www.mbio.ncsu.edu/MB360/papers2013/Khadija&Michelle.pdf
5. Sheldon M. Markowitz , Effect of L-Cysteine on the Activity of Penicillin Antibiotics Against Clostridium difficile , 1984
https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176289/
6. E. A. Gomma , Conductance Studies on Complex Formation between CaCl_2 and Ampicillin as Ligand Water and In Methanol Solvent at Different Temperatures, 2014
https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176289/
7. Colin J. Henehan ，Identification of Cysteine Ligands in Metalloproteins using Optical and NMR Spectroscopy, 1993
8. Catherine A. White, In Vitro Evaluation of the Determinants of Bactericidal Activity of Ampicillin Dosing Regimens against Escherichia coli,1898