

化學工程與生物科技系 實務專題論文

應用基因重組大腸桿菌
生產盤尼西林醯胺酵素



指導老師：陳志義

班級	學號	姓名
四化四乙	BP95064	王文玉
四化四乙	BP95065	郭逸萱
四化四乙	BP95071	詹貴鈞
四化四乙	BP95079	陳品蓉

修平技術學院

中華民國 98 年 12 月 30 日

致謝

歷經了這麼久的努力，我們的專題終於完成。這當中非常感謝我們的指導老師—陳志義老師。這一路走來我們實驗一開始並不是非常樂觀，每當遇到瓶頸，老師總是不厭其煩的幫我們解決疑惑並給我們鼓勵與支持才有今天的成果，非常感謝他。實驗可以順利完成當然也要感謝中興大學的學長姐在實驗上的協助與關心，更特別感謝黃柏霖同學以及王尹鈴同學。他們教導著我們實驗步驟的每個小細節與如何操作儀器和配置藥品須注意之事項等。幫助我們很多。

實驗雖然辛苦，但真的學到不少東西，完成了這份專題實驗也讓我們對自己更有成就感。

沒有學長姐和兩位同學及陳志義老師的幫忙，我們實驗不可能進行得妥當，在此我們致上內心最大的感激以及深深的謝意。

摘要

利用重組之大腸桿菌發酵可以生產出盤尼西林 PGA，主要以大腸桿菌發酵液經過破細胞，上層液即為 PGA 酵素。

本實驗中所使用隻菌種為基因重組大腸桿菌。其帶有 PGL-5 質體可以生產盤尼西林醯胺酵素，為了發酵得到高效率的 PGA，利用菌體的生產總量與產物 PGA 成正比關係，探討各種培養基成分濃度與發酵條件下發酵培養對 PGA 酵素活性之影響，即了解各種培養基成分與培養條件對發酵的影響。

由實驗結果得知，當 Glucose 碳源與 Yeast 氮源增加時，PGA 活性之量也隨之增加；當轉速減少時 PGA 活性之量也減少；當培養溫度升高時，PGA 量則降低。

目錄

前言	6
縮寫簡稱	8
一 實驗內容	9
二 介紹	9
2-1 大腸桿菌系統	9
2-2 抗生素的介紹	11
2-3 盤尼西林醯胺酵素	12
2-4 β -內醯胺類抗生素及用途	13
2-5 盤尼西林介紹	14
2-5-1 盤尼西林頓	15
2-5-2 頭孢子菌素類	15
2-5-3 單環胺基類	16
2-5-4 碳醯胺基類	16
2-6 影響基因重組微生物產率的因子	17
2-6-1 宿主載體系統	17
2-6-2 質體複製數	18
2-6-3 質體穩定性	19

2-6-4 誘導物質濃度	19
2-6-5 生長培養基組成	20
2-7 微生物之營養需求	20
2-7-1 細菌生長繁殖的條件	25
2-7-2 細菌的新陳代謝	26
三 研究方法與材料	27
3-1 菌種與質體	27
3-2 培養基組成	28
3-3 發酵步驟	30
3-3-1 主醱酵液步驟	30
3-3-2 破細胞萃取 PGA 酵素步驟	31
3-4 分析方法	32
3-4-1 蛋白質濃度設定方法	32
3-4-2 PGA 酵素活性分析法	33
3-4-3 PGA 酵素活性	34
3-5 滅菌法	36
3-6 無菌操作基本技	37
3-7 儀器設備及藥品	38
3-7-1 儀器設備	38

3-7-2 藥品.....	39
四 實驗步驟及流程圖	40
4-1-1 測活性步驟	42
4-1-2 測蛋白步驟	42
4-2 實驗流程圖	43
4-2-1 測活性步驟流程圖	48
4-2-2 測蛋白步驟流程圖	50
五 實驗結果	51
六 總結	59
七 參考文獻	60

前言

盤尼西林醯胺酵素 (penicillin G acylase, PGA) 是一重要生化觸媒，使盤尼西林 G (penicillin G, PG) 進行水解反應生成六青黴素酸 (6-aminopenicillanic acid, 6-APA)，它和一些有機物以有機合成反應形成 β -lactam 抗生素。在全球市場，每年有數千噸 β -lactam 抗生素需求量應用於治療方面。因此製備出高活性與穩定性之 PGA 對於 6-APA 生產是很重要。過去對於 6APA 的生產多採用化學水解法，但因製程相當消耗能量且成本偏高，近年來多已改用生物化學轉化法 (Bioconversion)。生物化學轉化 6-APA 是利用 PAC 酵素將青黴素水解取得。PGA 酵素之工業生產製程一般而言是以發酵培養能生產具 PGA 酵素菌體，再經菌體或酵素固定化後，即可用來進行水解盤尼西林。然而基因重組大腸桿菌 (*E. coli*) 為生產 PGA 酵素最常見之菌種，而且製程已經工業化。

傳統上生化製程之研發包含從上游的菌種改良篩選。中游的發酵製程開發至下游的產物純化回收等，在每一個製程上均會影響整體製程的成敗。在這當中發酵製成為生化製程的中游。作用類似化學反應製程的反應器操作，為整個製程的中心項目，所以如果想要成功的開

發一個生化製程，在發酵製程上是否能達成最適化操作為生產成本高低之主因。在發酵製程中若以生產菌體內酵素為最終標定物時，菌體之高密度培養是提高生產效率、降低生產成本之最佳方法。要達到此目標，一般除了進行培養基最適化探討外，還需要系統化的針對其培養基環境進行最適化探討。

高密度細胞發酵培養主要的優點是在於使得單位體積的生產力大幅增加。因細胞濃度高。由細胞所生產的蛋白質或代謝產物濃度會提高，產物分離純化的效率也會提升，相對的發酵培養的次數也會減少，可以降低生產所花費之成本，因此高密度發酵培養在工業上是非常重要的。

縮寫簡稱

PGA: Penicillin G acylase 盤尼西林醯胺酵素

PG: Penicillin G 盤尼西林

E.coli: Escherichia coli 大腸桿菌

DAB: P-dimethylaminobenzaldehyde 二甲氨基甲苯醛

6-APA: 6-aminopenicillanic acid 六青黴素酸

DI Water: deionize water 去離子水

一 實驗內容

1. 應用基因重組大腸桿菌生產盤尼西林醯胺酵素。
2. 探討各種培養基成分濃度與發酵條件下發酵培養對 PGA 酵素活性之影響，即了解各種培養基成分與培養條件對發酵的影響。

二 介紹

2-1 大腸桿菌系統 (Escherichia coli)

大腸桿菌是目前適用最廣泛的系統，具有生長快速、產量高及低成本的優點，但由於為原核生物(prokaryote)，無法進行糖化作用(glycosylation)，而且常常形成不溶性的包涵體。包涵體本身是蛋白質的聚焦體(protein aggregate)，以顆粒狀存在於細胞質(cytoplasm)，而且蛋白質本身不具生物活性，或只有很低的生物活性。因此發酵生產之後，必須要在回收時進行蛋白質在折疊(refolding)，恢復其三度空間結構，才能具有生物活性。而且在折疊的步驟及條件需靠實驗來決定，產率的高低依不同蛋白質的特性及各研究著所掌握的技術而異，並且直接影

響到能否於工業化量產實施的可能性。由於無法進行醣化用，因此無法生產糖蛋白，但若是醣類部分不是生物活性所必須，還是可以選擇大腸桿菌系統。另外其他的後轉譯修飾的功能亦可行，因此也可做為選擇表現系統的考慮因素。

如表 1. 大腸桿菌表現系統的啟動子及誘導方法：

(表 1.)

Promoter	Inducing factor
Lambda PL	Temperature shift, 30°C or 37°C to 42°C
Lac	IPTG* or lactose
Trp	IAA* or tryptophan depletion
Tac	IPTG* or lactose
T7	System IPTG* or lactose

*IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

*IAA: β -indoleacrylic acid

2-2 抗生素的介紹

二十世紀上半，英國細菌學家 Fleming 於 1929 年偶然發現青黴菌(*Penicillium notatum*)之固態培養皿中長出一些綠色黴菌菌體群，且在周圍都沒有葡萄球菌(*staphylococci*)生長。這發現證明 *Penicillium notatum* 所產生的產物，能抑制培養基內葡萄球菌的生長，此項研究成果正式開啟了現代抗生素的紀元。1938 年 Florey 和 Chain 將盤尼西林應用於醫學治療後，開啟抗生素在醫學上的應用。

β -內醯胺(β -lactam)系列的抗生素已成為人類對抗細菌引起疾病最重要的武器，其用量佔全世界抗生素用量之冠。抗生素應具備下列條件：

- (一)對人類或動物毒性低。
- (二)能廣泛地殺死或抑制多種生物。
- (三)經濟價值高、效能高，即低同度的抗生素就足以抑制有害微生物之生長。
- (四)穩定度高，能處於較大的 pH 範圍而不被微生物分泌的酶所分解。
- (五)製成簡單，合乎經濟。

2-3 盤尼西林醯胺酵素(Penicillin G Acylase 簡稱 PGA)

盤尼西林醯胺酵素(Penicillin G Acylase 簡稱 PGA 酵素)，其主要功能為進行 PG 之水解，以生產抗生素原料藥之六青為黴素酸(6-aminopenicillanic acid,6APA)。 PGA 酵素為一重要性之生物觸媒，其功能為進行 PG 水解以生產抗生素原料藥之六青黴素酸。過去對於 6APA 的生產多採用化學水解法，但因製程相當消耗能量且成本偏高，近年來多已改用生物化學轉化法(Bioconversion)來取代。基因重組大腸桿菌(*E.coli*)為生產 PGA 酵素最常見之菌種，生物化學轉化法 6APA 乃利用 PAC 酵素將青黴素水解取得。 PGA 酵素之工業生產製成一般是以發酵培養能生產具 PGA 酵素菌體，再經菌體或酵素固定化後，即可用來進行水解盤尼西林。以 PG 為例， PGA 酵素可將 PG 分解成 6APA 與 phenylacetic acid (PAA)，如圖 1. 所示。

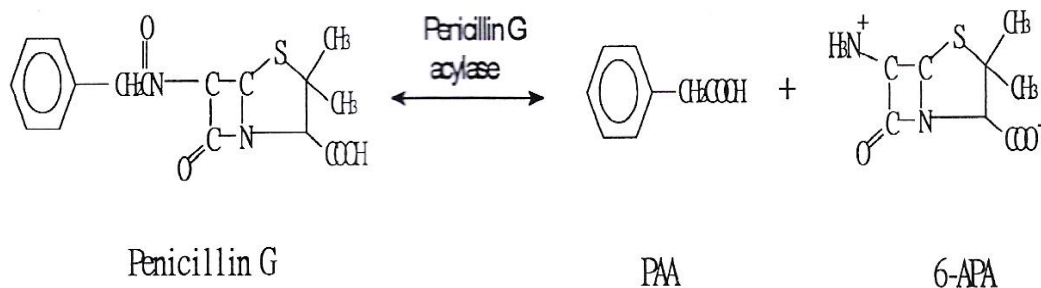


圖 1. 酵素水解法產生 6APA

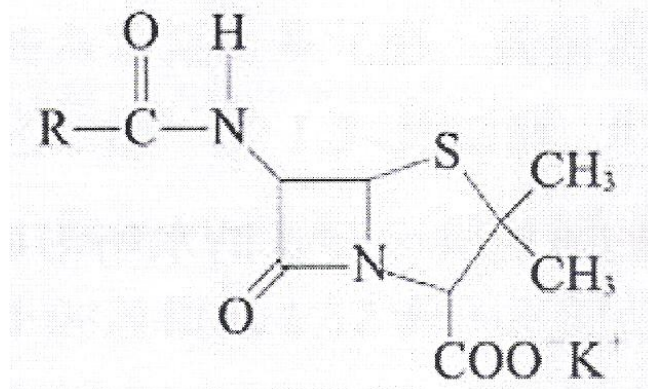
2-4 β -內醯胺類抗生素及用途

自一九二八年，佛萊明發現盤尼西林，至今將近八十年，人類開始試用抗生素以來，常見致病的菌種及感染性病症而死亡的比例有日趨降低，在醫療使上是一個重大的改變。盤尼西林是第一個被發現的抗生素，在分類上屬 β -內醯胺類抗生素。 β -內醯胺類抗生素之作用機制在於抑制細菌細胞壁的合成，此作用是透過乙內醯胺類抗生素與細菌細胞膜上之盤尼西林蛋白 (penicillin-binding protein) 結合，從而抑制其功能獨發生。當青黴素進入菌體後，會與細胞壁合成最終步驟所需的輔酶 (transpeptidase) 結合成 penicilloyl 酵素，致使輔酶失敗，而無法將肽聚糖 (peptidoglycan) 結合至細胞壁上而抑制細胞壁的合成。

盤尼西林醯胺酵素為一個重要的生物觸酶。在各種抗生素的合成過程中，以 6-APA 為中間原料，也就是用來合成盤尼西林醯胺抗生素的前驅物。

2-5 盤尼西林介紹

盤尼西林是第一個被發現之抗生素，在分上類屬於 β -內醯胺類(β -lactam)抗生素。凡是含有 β -內醯胺之四環結構的抗生素，即稱之為 β -內醯胺類抗生素。到目前為止，共有四種 β -內醯胺類抗生素，分別為盤尼西林類(penicillins)、頭孢子菌素類(cephalosporins)、單環胺基類(monobactams)和碳醯胺基類(carbapenems)，是所有抗生素中種類最多及使用最廣泛者之一；也是到目前為止使用最廣泛的抗生素。



盤尼西林之通式，其種類依醯胺所接的烴基(R)不同而異

不同的抗生素對細菌體有不同之作用，有些抗生素可抑制細菌體細胞壁的合成，有些可抑制其蛋白質的合成，有些則破壞其基因物質或阻斷其新陳代謝的過程，因而造成細菌無法繼續生長、繁殖，甚至造成細菌死亡。細菌體的結構與人體細胞的結構有很大的不同，因此我們可以找到各式各樣的化學物質(抗生素)用來抑制細菌的生長或殺死細菌，但卻對我們人體細胞不會造成很大的副作用。

2-5-1 盤尼西林類 (Penicillins)

盤尼西林類抗生素雖然上市有五十年之久，其用途依舊很廣泛。大家最顧慮的是其所引起之過敏性休克反應。大致上，只要盤尼西林皮膚試驗結果正常，則給藥後引起休克之可能性很低。截至目前為止，是臨床上常應用之抗生素。唯一要注意的是，有少數病人，在進行皮膚試驗時即引發過敏性休克。因而，即使只是進行皮膚試驗，急救設備仍須準備。目前臨床常見的 Penicillin 類抗生素有 Penicillin G benzathine、Penicillin G procaine、Penicillin V、Dicloxacillin、Oxacillin、Amoxicillin trihydrate 和 Ampicillin。

2-5-2 頭孢子菌素類 (Cephalosporins)

此類抗生素依發現先後次序及抗菌範圍可分為第一代、第二代、第三代甚至第四代頭孢菌素。愈早之產品其對革蘭氏陽性球菌效過愈好，而愈新之產品則對革蘭氏陰性桿菌更好，尤其是院內感染之菌種，效過愈好。最近，又有所謂第四代頭孢菌素，此類抗生素對某些連第三代頭孢菌素都有抗藥性之革蘭氏陰性桿菌亦可有效抑制。

目前臨床常見的 Cephalosporin 類抗生素有 Cefaclor monohydrate、Cefadroxil monohydrate、Cefuroxime axetil、Cephalothin sodium、Cefazolin sodium 和 Cephalexin monohydrate。

2-5-3 單環胺基類 (monobactams)

第三類乙內醯胺類是單環胺基酸類 (monobactams)。次類抗生素由單一 β -內醯胺環構成。主要是抗菌範圍乃針對試樣性格蘭氏陰性桿菌，其強度趨進第三代頭孢素，惟其中樞神經穿透性不佳，不適用於中樞神經感染。目前市面上此類抗生素以 aztreonam 為主。

2-5-4 碳醯胺基類(carbapenems)

第四類 β -內醯胺類抗生素是碳醯胺基類(carbapenems) 兼有盤尼西林及頭孢素之特點，抗菌範圍廣，只有少數多種抗藥性菌種不適用，是現存最強之抗生素之一。市面上常用者是以 meropenem 為主。最近另一種新藥 meropenem，亦屬於碳醯胺基類。其效果不輸 imienem，甚至更強，且具有中樞神經感染之效果。

2-6 影響基因重組微生物產率的因子

影響基因重組微生物產率(productivity)的因子有：

- (一) 宿主載體系統
- (二) 質體複製數
- (三) 質體穩定性
- (四) 誘導物質濃度
- (五) 生長培養基組成

2-6-1 宿主載體系統

雖然目前許多宿主菌株應用於基因重組的研究，但主要仍是以 *E.coli* 或 *S.cerevisiae* 最多。*E.coli* 最常使用的啟動子(promoter)為 lambda PL、lac、trp、tac 和 T7 聚合，其中 lac、tac 和 T7 聚合均使用 IPTG(isopropylD-thiogalactopyranoside)來誘導，lambda PL 以溫度變化(由 30°C 上升到 37°C 至 42°C)來誘導，trp 則以 IAA(β -indol-3-aceticacid)或斷絕 tryptophan 來誘導。*S.cerevisiae* 較常使用的啟動子有組成啟動子(constitutive promoter)，如 ADHI(alcohol dehydrogenaseI)、GPD(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase)、PGK(phosphoglycerate kinase)、MF α 1(mating factor α 1)；

還有調控啟動子(regulatory promoter) , 如 GAL(galactokinase) 、PH05(acidphosphate) 、SUC2(invertase)等。所使用的啟動子與發酵策略息息相關，進而影響所表現的蛋白質產物產率。以發酵觀點來看，組成啟動子系統不需添加化學物質或改變溫度來誘導產物生成。但是，重組蛋白質的製造會干擾細胞生長，導致重組菌株必比生長速率下降，或甚至引起細胞死亡。

2-6-2 質體複製數

質體複製數是由質體的遺傳和生長條件所掌控，同時也會受到宿主的遺傳和生理所影響。重組蛋白質的產生隨複製數增加而增多，故要增加發酵體積收率的策略就是應用具有高複製數質體的重組菌株。但往往高複製數菌株，並無法提高體積產率，可能影響的原因有：生長速率、培養基、溫度、營養匱乏等。

2-6-3 質體穩定性

基因重組微生物的發酵放大重要因子之一為質體的穩定性。質體的不穩定性分為：分離不穩定性(segregational instability)和結構不穩定性(structural instability)。所謂分離不穩定性就是細胞分裂時分離有缺陷，使得菌珠失去質體。結構不穩定則是因 DNA 的插入、刪除或重新排列改變質體結構，而失去原有基因的功能。質體穩定與否除了由本身的基因所決定外，亦會受到宿主菌株的基因和生理所影響。

2-6-4 誘導物質濃度

重組蛋白質最佳表現所需的誘導物濃度決定於啟動子強度、質體上抑制基因(repressor gene)的存在與否、產物表現的細胞位置、細胞對重組蛋白質表現的反應、目標蛋白質的溶解度和蛋白質本身特性。以 lac 啟動子系統為例，誘導物 IPTG 的濃度可在 0.005 至 5mM，是採用 1mM IPTG。在高密度細胞培養時，細胞總數較批式或搖瓶培養時高出幾次方的同時，抑制基因所需的誘導物濃度也要隨之增加。

2-6-5 生長培養基組成

於基因重組菌株生長，誘導蛋白質產物的過程中，生長培養基的組成會影響蛋白質的表現。通常是以適合培養基(complex media)來提供基因重組微生物生長和表現蛋白質所需胺基酸、維生素和微量元素。另外，在誘導期間補充 casamino acids、peptones 或 yeast extract 可以增進重組蛋白質的表現。

2-7 微生物之營養需求

一切生物中，微生物對營養之需求可謂變化多端。人類與動物均需含碳之複雜化合物做為營養，微生物則否。有些微生物僅需為量無機物做為唯一營養需求即能生長，有些則類似高等生物，需複雜之有機化合物。但所有生物仍具有共同之營養需求如碳、氮和水。水對微生物尤為重要，因多數為生物僅在化學物質溶於水中後，才能吸收養分。

所有生物均需各種化學元素作為營養，以合成細胞組成或維持其功能，才能正常生長。而這些元素乃大量存於天然之化合物中，基本上每一微生物均能利用其自然棲息處所之化合物，當微生物自環境移至實驗室培養時，則須靠培養基提供其生長所需之元素，細胞生長之主要成分包括碳、氮、氧、硫及磷等。

● 碳 (Carbon)

碳乃微生物生長所需最重要化學元素之一，所有生物均需碳化合物。一般而言，有機化合物(organic compound)乃含碳之化合物，碳構成3類主要有機營養，即醣類、脂質與蛋白質，這些化合物供細胞增殖所需之能量，且做為細胞物質之骨架。凡以有機化合物作為其主要碳源之微生物稱為異營菌(heterotroph)，異營菌以吸收方式自環境獲得有機分子，或攝入自營菌及其他異營菌。

二氧化碳被歸類為無機化合物(inorganic compound)，但有些生物可利用二氧化碳做為碳的來源，那些以二氧化碳為主要碳源或唯一碳源之微生物稱為自營菌(autotroph)，自營菌能自環境吸收極簡單之無機分子或離子維生。

● 氮 (Nitrogen)

所有生物也需要氮，此元素乃構成胺基酸之重要成分，並自胺基酸組成蛋白質。細菌對氮之利用更富變化，有些細菌能利用大氣或氣態氮通細胞合成，此反應過程是謂氮之固定(nitrogen fixation)。有些細菌可利用無機氮化合物如硝酸鹽、亞硝酸鹽或銨鹽，有些則有機氮化合物如氨基酸。

● 氫、氧、硫和磷

所有生物所需之元素尚包括氫、氧、硫及磷。氫與氧乃續多有機化合物之成分，硫為合成氨基酸如半胱胺酸(cysteine)、胱胺酸(cystine)及甲硫胺酸(methionine)等所必須，磷乃合成核酸與三磷酸腺核(adenosine triphosphate; ATP)之重要成分，而 ATP 為能量儲存與轉移之重要化合物。

● 其他元素

除上述元素外，尚有許多需要量較少知其它重要元素，例如 Fe^{2+} 為細胞色素(cytochrome)、catalase 和 succinic dehydrogenase 所需之重要元素。此外，不同微生物對這些元素之需求量也不盡相同，例如有嗜鹽菌(halophile)不能生長於低於 15%氯化鈉濃度的環境中。

其它還有一些礦物元素，雖然需要量極微，約每公升僅數毫克，但卻也是必須的，例如鋅(Zn^{2+})、銅(Cu^{2+})、錳(Mn^{2+})、鉬(Mo^{2+})及鈷(Co^{2+})，其功能可活化酵素，例如鉬是組成固氮酵素(nitrogenase)所必須的。

微生物能量來源之不同可分成：(1) 利用化合物為能源之微生物稱為化學營養菌(chemotroph) (2) 以放射能(光)為主要能源之微生物則稱為光合營養菌(phototroph)。將其與碳源來源之不同組合，可得下列數種菌群：

- (1) 化學自營菌(chemoautotroph)：以無機化學物質為能源，以二氧化碳為主要碳源之微生物。

- (2) 化學異營菌(chemoheterotroph)：以有機化學物質為能源，以有機為主要碳源之微生物。
- (3) 光合自營菌(photoautotroph)：以光為能源，以二氧化碳為主要碳源之微生物。
- (4) 光何異營菌(photoheterotroph)：以光為能源，以有機物化合物為主要碳源之微生物。

微生物之營養分類及其代表例，如下表所示：

營養組別	碳 源	能 源	舉 例
化學自營菌	二氧化碳	無機化合物	硝化菌、氫細菌、鐵細菌、硫細菌
化學異營菌	有機化合物	有機化合物	多數細菌、黴菌、原蟲、動物
光合自營菌	二氧化碳	光	紫硫菌、綠硫駿、藻類、藍綠藻、植物
光合異營菌	有機化合物	光	紫硫菌、綠硫

2-7-1 細菌生長繁殖的條件

- (1) 營養物質：細菌生長繁殖所需營養物質以如前述。此外，尚需其它一些條件。
- (2) 酸鹼度：大多數細菌最適酸鹼度為 pH7.2~7.6，此時酶活性較強，生長旺盛。個別細菌在鹼性環境中生長良好，如霍亂孤菌。
- (3) 溫度：不同種類的細菌，其最是生長溫度相差較大。多數為嗜溫菌(在 15~40°C 均能生長)。寄生在人體的細菌及乙宿主體溫(37°C)為適宜生長溫度，因此實驗室採用 37°C 培養細菌。
- (4) 氣體：與細菌生長有關的氣體主要是氧氣和二氧化碳。二氧化碳在細菌代謝過程中很重要，它與有機酸結合後生成多一個羧基的酸，對細菌的中間代謝有著重要作用，如丙酮酸羧化為草酰乙酸($\text{CH}_3\text{COCOOH}_2\text{COCOOH}$)，然後參與三羧酸循環，並可進而轉化為胺基酸、嘌呤、嘧啶等。一般細菌在代謝中產生的二氧化碳即可滿足其需要。氧是培養細菌的一個重要因素，但對氧的需要因菌種不同而異。

- 專性需氧菌(Aerobe)：必須再有氧條件下生長，因為它們在進行氧化時，是以分子氧為受氫體，如結核桿菌、霍亂弧菌等。
- 專性厭氧菌(Anaerobe)：不能利用分子氧為受氫體，相反分子氧對它們有明顯的毒性，所以只能生活在無氧環境中，如破傷風桿菌、肉毒桿菌等。
- 兼性厭氧菌(Facultive anaerobe)：在有氧和無氧時都能生活，多數致病菌屬此。

2-7-2 細菌的新陳代謝

細菌結構雖簡單，但它的代謝活動與高等生物相似，也是各種物質的合成和分解過程。這些代謝作用都是由酶控制的一系列生物化學反應，但和其他生物相比，細菌具有代謝活躍和代謝的多樣性等特點。由於細菌個體微小，其表面積較大，因此菌細胞和環境之間的物質交換迅速，吸收與排泄都快，代謝非常活躍，繁殖率很高。

三 研究方法與材料

3-1 菌種與質體

本實驗所使用的菌種為基因改殖過之大腸桿菌(recombinant *E. coli*)，其宿主為 *E. coli* ATCC 9637，帶有 pGL-5 之質體(plasmid)，如表 2. 所示。其中 Hind III 與 Sma I 之間為能表現盤尼西林醯胺基因之染色體 DNA 片段。pGL-5 為一 6.1Kb 之質體，其上接有盤尼西林醯化酵素之基因(pac gene)，並帶有抗氯黴素(choloraphenicol)之標示(marker)基因。

表 2. 大腸桿菌細胞(*E. coli*)的主要元素組成

元素	佔乾物重之百分比	元素	佔乾物重之百分比
C	50	Na	1
O	20	Ca	0.5
N	14	Mg	0.5
H	8	Cl	0.5
P	3	Fe	0.2
S	1	其他	≤0.2

3-2 培養基組成

本實驗所使用的培養基如圖 1-1 所示，培養基經過殺菌後加入抗生素 Chloramphenicol，並調整 pH 值至 7。

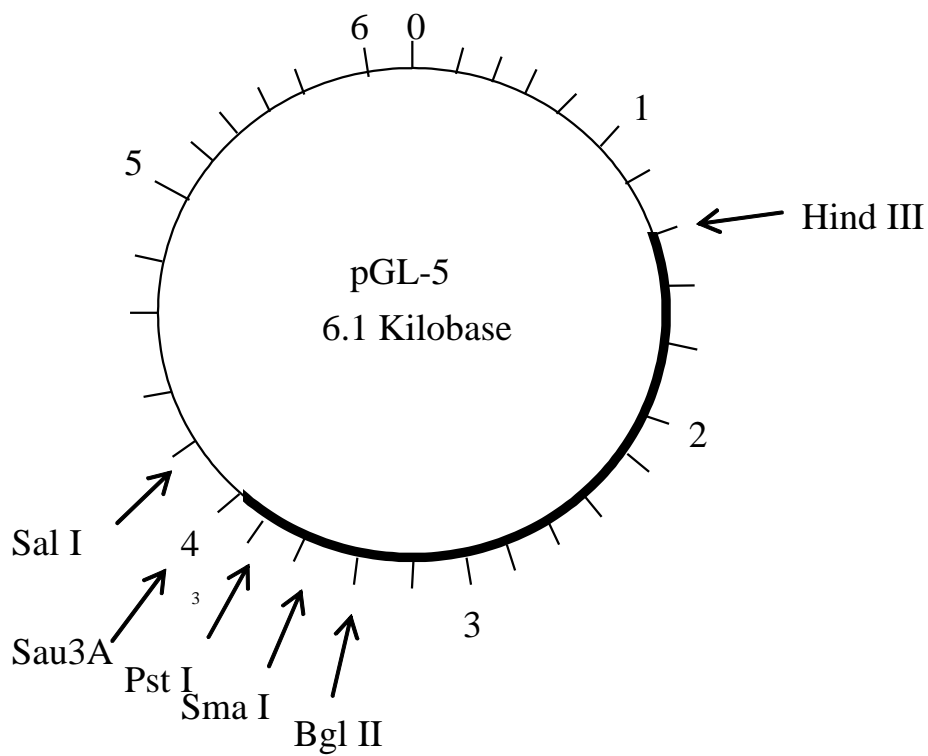


圖 1-1.帶有 pGL5 質體之大腸桿菌 ATCC9637

表 3. 實驗使用之培養基配方

培養基	固態培養	種菌培養 Seed culture	主培養 Main culture
Yeast extract (g/L)	10	5	5
Casein hydrate (g/L)	10	5	5
KH_2PO_4 (g/L)		7	3
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g/L)		0	6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)		1	0.5
NaCl (g/L)	5	0	0.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)		0	5
CaCl_2 (g/L)		0	0.15
Glucose (g/L)		5	50

*註：主培養基中碳源與其餘培養基分開另行殺菌，以防止培養基之褐變。

3-3 發酵步驟

1. 配置種菌培養基 100mL/瓶，並滅菌。(注意：葡萄糖要和其他培養基分開滅菌)。
2. 在無菌操作台內，加入 1mL Microtube 的 *E. coli*。
3. 種菌培養之條件：28°C，200rpm，24 小時。
4. 配置主培養基 200mL/瓶，並滅菌。(注意：葡萄糖要和其他培養基分開滅菌)。
5. 在無菌操作台內，加入 1mL 種菌培養之 *E. coli*。
6. 主培養之條件：28°C，200rpm，24 小時。

* Lysis buffer(per 1000ml DI water)：0.1M, pH8 PBS，0.5M NaCl
NaH₂PO₄ (含水)：6.783g，Na₂HPO₄ (含水)：0.165g，NaCl：5.844g

3-3-1 主發酵液步驟：

1. *E. coli* 主發酵液放入 1000mL 燒杯內置於 4°C 下沈澱 8h 以上。
2. 取出沈澱，將上清液到掉，留沈澱物，離心 9000rpm*15min；

再以 DI 蒸餾水清洗後，再離心一次 9000rpm*15min。

3. 取 5mL lysis buffer 加入，將沈澱物稀釋後倒入燒杯內。
4. 取 1mL 混合液與 9mL DI 蒸餾水混合後，再由當中取出 1mL 稀釋液與 9mL DI 蒸餾水再混合。(即稀釋 100 倍)，測吸光值($\lambda=600\text{nm}$)。
5. 當吸光值 ≈ 0.6 表第 3 項稀釋液濃度合格，將稀釋液倒入小支塑膠管內，存放於 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 內。
6. 若吸光值太高或太低，使用 lysis buffer 調整，使吸光值落於 0.6 區域，以第 5 項方式，保存於 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 內。

3-3-2 破細胞萃取 PGA 酵素步驟：

1. 自 -40°C 取出保粗醱酵液，放入於冰水(4°C)中 2h 溶解，倒出。
2. 取蒸餾水與粗醱酵液=1：1 混合，放置於壓力式破細胞機內進行破細胞步驟，壓力控制在 30psi。
3. 將打破之菌液離心兩次(9000rpm, 15 分鐘)。
4. 收集上清液，即為 PGA 粗酵素液。

3-4 分析方法

3-4-1 蛋白質濃度測定方法

使用 Bradford 方法，Coomassie brilliant blue G-250 與蛋白質結合後，會由紅棕色變成藍色，呈色可在波長 595 nm 下測其吸光值，並以 BSA 為參考蛋白質作檢量線測定之。

- (1) 將 Dye reagent 以 1：4 的比例與去離子水混合，此溶液可以在室溫下保持兩個星期。
- (2) 將 0.56 ml 待測樣品和 1.4 mL 的稀釋 dye 置入試管中(線性範圍 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- (3) 室溫下放置 5 分鐘，使用分光光譜儀在波長 595 nm 下測其吸光值。
- (4) 利用校正曲線求出待量測之蛋白質濃度。

3-4-2 PGA 酵素活性分析法

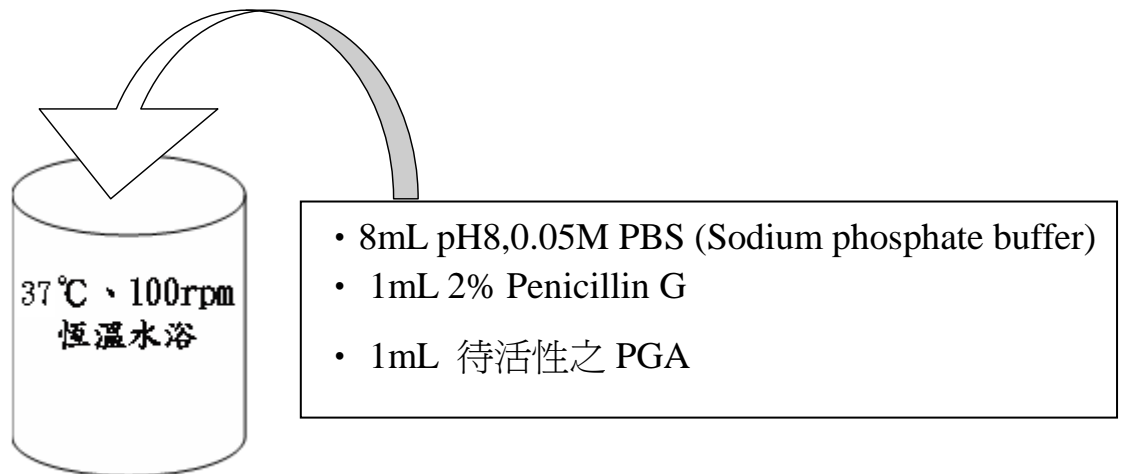
酵素之活性定義為：1 單位活性(IU)為在 37°C，pH 8 之條件下，每分鐘與 PG 反應生成 1 μmole 之 6-APA。

酵素液活性測試

- (1) 配製 2 % 之 PG 溶液，溶於 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液(pH 8)中。
- (2) 取 5mL 待測活性溶液加上 4 ml 之 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液(pH 8)和 1mL 之 2 % PG 溶液，於 37°C 之恆溫水槽內培養。
- (3) 於反應 0 分鐘與 10 分鐘各取樣 0.5mL。
- (4) 再分別配製 20 % CH_3COOH 、0.05 M NaOH 和 0.5 % DAB(溶於 MeOH)。將 2mL, 20 % CH_3COOH 、1ml, 0.05 M NaOH 和 0.5mL, 0.5 % DAB 均勻混合於試管中，即為呈色劑。
- (5) 分別將 0 和 10 分鐘取樣之溶液加入事先混合的呈色劑中，並於室溫下靜置 15 分鐘。
- (6) 取樣溶液靜置 15 分鐘後分別於波長 415 nm 量測其吸光值，將 10 分鐘所測得之吸光值減去 0 分鐘所量得之吸光值，即為 10 分鐘內反應之量。

- (7) 將相減之吸光值代入 6-APA 標準品之校正曲線，可換算成 6-APA 之重量百分濃度，再換算為莫耳，可得單位酵素液體積之酵素活性(IU/mL)。
- (8) 再將(7)所算出之酵素活性除以單位體積之蛋白質濃度(mg/mL)便可得單位蛋白質重之酵素活性(IU/mg)，即比活性(Specific activity)。

3-4-3 PGA 酵素活性



→ 分別取 0min、10min 反應液 0.5mL 加入 **呈色劑**

→ 室溫靜置 15min，波長 415nm 測吸光值

呈色劑

2mL 20%醋酸(CH_3COOH)

1mL 0.05M 氫氧化鈉(NaOH)

0.5mL 0.5%之 DAB(p-Dimethylaminobenzaldehyde)溶於甲醇
(CH_3OH)中

2% Penicillin G

2g PG 溶於 pH8, 0.05M, PBS buffer(Sodium phosphate buffered)

3-5 滅菌法

一般滅菌的方法有五種：

1. 溼熱滅菌法：以高溫（或加以高壓）使細胞致死，且溼熱滅菌較乾熱滅菌效果好。使用範圍廣泛，如含液體之培養基和試劑、塑膠製品、不耐高溫的器具及培養基等。

2. 乾熱滅菌法：適用粉類或油類物品，利用熱度傳導，無腐蝕性，對環境無毒性。滅菌時間長（6~24 小時），穿透物品較慢且分佈不平均，滅菌溫度高。

3. 化學方法：消毒劑或殺菌劑等化學藥劑，其原理是將菌體結構破壞，常見的殺菌劑有含氯的化合物（漂白水）、福馬林或是酒精（70% 最佳）等藥劑。通常培養基並不考慮化學法滅菌。

4. 過濾法：用於氣體或液體的滅菌，一般而言多用於空氣之菌，其原理是將菌體除去，而並未將其殺死。

5. 放射線法：常用之法有 γ 射線或紫外光照射法兩種，其原理是將菌體長期暴露在射線下，以破壞菌體內的去氧糖核酸(DNA)

※通常以第 1 項為最常使用之滅菌法。

3-6 無菌操作基本技術

1. 實驗進行前，無菌室及無菌操作台（laminar flow）以紫外燈照射 30-60 分鐘滅菌，以 70% ethanol 擦拭無菌操作抬面，並開啟無菌操作台風扇運轉 10 分鐘後，才開始實驗操作。每次操作只處理一株細胞株，且即使培養基相同亦不共用培養基，以免失誤混淆或細胞間污染。實驗完畢後，將實驗物品帶出工作台，以 70% ethanol 擦拭無菌操作抬面。操作間隔應讓無菌操作台運轉 10 分鐘以上後，再進行下一個細胞株之操作。
2. 無菌操作工作區域應保持清潔及寬敞，必要物品，例如試管架、吸管吸取器或吸管盒等可暫時放置，其他實驗用品用完應移出，以利於空氣流通。實驗用品以 70% ethanol 擦拭後才帶入無菌操作台內。操作應在抬面之中央無菌區域，勿在非無菌區域操作。
3. 小心取用無菌之實驗物品，避免造成污染。勿碰觸吸管尖頭部或是容器瓶口，亦不要在打開之容器正上方操作實驗。容器打開後，以手夾住瓶蓋並握住瓶身，傾斜約 45°角取用，儘量勿將瓶蓋蓋口朝上放置桌面。
4. 定期檢測無菌操作台內之 airflow 壓力，更換紫外線燈管及 HEPA 過濾膜。

3-7 實驗儀器設備及藥品

3-7-1 儀器設備

- (1) UV-Vis 分光光譜儀：sp-830，Metertek，Taiwan。
- (2) 迴轉式恆溫培養箱：OS1500R，Firstek，Taiwan。
- (3) 壓力式破細胞機：one shot，Contant，England。
- (4) 震盪恆溫水槽：SB303。
- (5) 冷凍離心機：Z323K。
- (6) 快速高壓消毒器：TM328。
- (7) 震盪器：VM-2000。
- (8) 超音波洗淨器：LC30H。

3-7-2 藥品

- (1) Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) : 純度 99.5% 購於歐洲 Scharlau 公司。
- (2) Yeast extract (酵母) : 購於 ADSA 公司。
- (3) Disodium hydrogenphosphate 12water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) : 純度 99.0% 購於日本 SHOW 公司。
- (4) Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) : 純度 99.5% 購於日本 SHOW 公司。
- (5) Sodium chloride (NaCl) : 純度 99.5% 購於日本 SHOW 公司。
- (6) Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) : 純度 96.0% 購於台灣六福化學公司。
- (7) Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) : 純度 99.0% 購於日本 SHOW 公司。
- (8) Casein hydrolysate (酪蛋白) : 購於美國 SIGMA 公司。
- (9) Calcium Chloride (CaCl_2) : 純度 99.0% 購於台灣聯工公司。
- (10) P-dimethylaminobenzaldehyde (DAB) : 純度 98% 購於美國 SIG 公司。
- (11) Penicillin G 盤尼西林 (PG) ; 純度 99.5% 購於 MDBio 公司。
- (12) Dye : Protein Assay Dye Reagent Concentrate 購於美國 Bio-Rad。

四 實驗步驟及流程圖

(一)種菌培養步驟：

① 配置種菌培養基：

Yeast extract 0.5g, Casein hydrate 0.5g, KH_2PO_4 0.7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, Glucose 0.5g, 蒸餾水 100mL(培養基 75mL+葡萄糖 25mL), 並滅菌, 配置 2 瓶。(注意: 葡萄糖要和其他培養基分開滅菌)。

② 冷卻後在無菌操作台內, 種菌培養基中加入 1mL Microtube 的 *E.coli* 燒瓶口後, 放置培養箱。(種菌培養之條件: 28°C , 200rpm, 24hr)

③ 配置主培養基：

Casein hydrate 5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6g, NaCl 0.5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, CaCl_2 0.15g, Glucose 50g, 蒸餾水 1000mL(培養基 750mL+葡萄糖 250mL), 並滅菌, 配置 5 瓶。(注意: 葡萄糖要和其他培養基分開滅菌)。

(二)大量培養步驟：

主培養基加入 50mL 葡萄糖水溶液+20mL **種菌培養基**溶液，放置培養箱培養。(主培養之條件：28°C，200rpm，24hr)。

(三)沉澱、分離步驟：

將 5 瓶主培養瓶倒入桶子內，封口、冰入冰箱，待沉澱。

(四) *E. coli* 菌收集與貯存步驟：

將液體倒掉 1/2，攪拌後稱重、離心，離心後取沉澱物在加入蒸餾水離心一次，離心後取沉澱物加入 Lysis 控制吸光值。(酵素吸光值約為 0.617，波長為 600)。裝入小試管，至冰箱冷凍。

※(調整吸光值時，要將酵素液稀釋 100 倍)

(五)萃取步驟：

冷凍取出，解凍後破細胞(3mL 蒸餾水+3mL 菌)、稱重、離心。離心後取液體，測活性跟蛋白質。

(高壓破細胞機用酒精清洗後再用蒸餾水沖洗兩次)

4-1-1 測活性步驟：

備 1 支大試管，2 小支試管。大試管內加入 8mL PB、1mL PG，當加入酵素液時再開始計時(將大試管放置於恆溫水浴槽內，水溫 37°C，轉速 100 rpm)，開始計時後從大試管取 0.5mL 至小試管①(小試管內已加入 0.5 DAB、3mL 醋酸)，靜置 15min 後測活性。約 8min 時小試管②加入 0.5 mL DAB(試管內已有 3 mL 醋酸)，約 10min 後從大試管取 0.5mL 至小試管②中，靜置 15min 後測 PGA 活性。

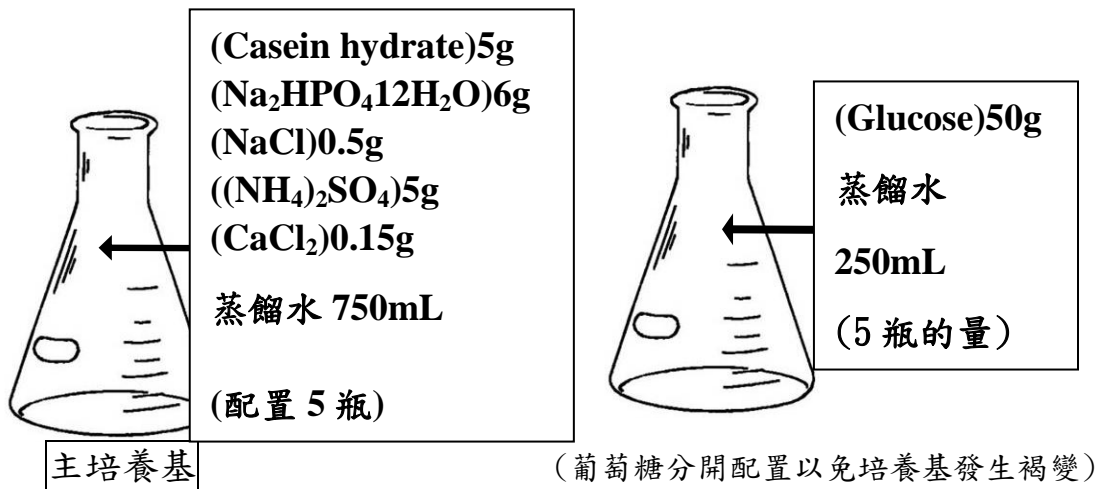
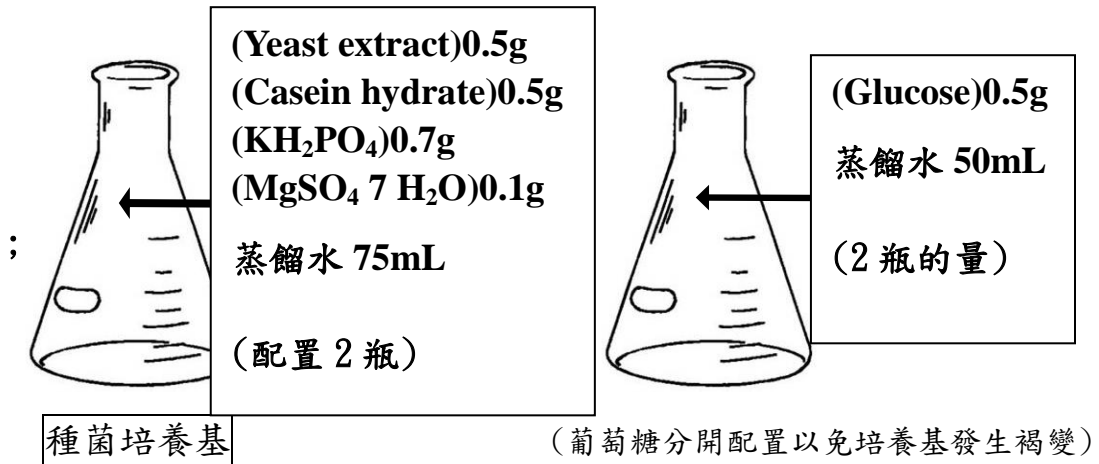
4-1-2 測蛋白質步驟：

藥品：蒸餾水、測試液、Dye0.5%

準備 2 支小試管，小試管①加入 0.504mL 蒸餾水、0.056mL 測試液(此時稀釋成 10 倍)，混合後再小試管②加入 1.4mL Dye、0.504mL 蒸餾水和 0.056mL 小試管①混合液(此時已稀釋 100 倍)，靜置 5min 後測蛋白質。

4-2 實驗流程圖

(一) 種菌培養步驟：

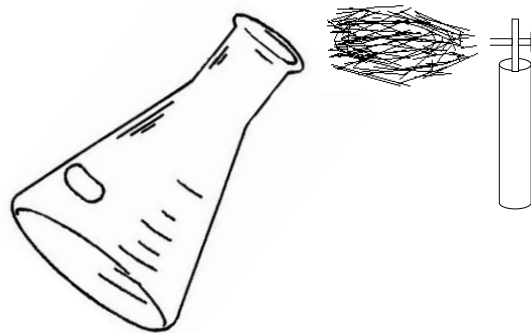
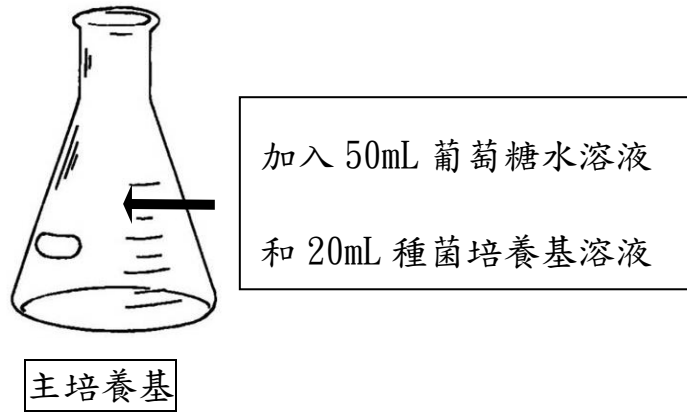


↓
滅菌

冷卻後種菌培養基加入 1mL *E.coli* 後燒瓶口

↓
放置培養箱培養 (培養之條件：28°C，200rpm，24hr)。

(二)大量培養步驟：

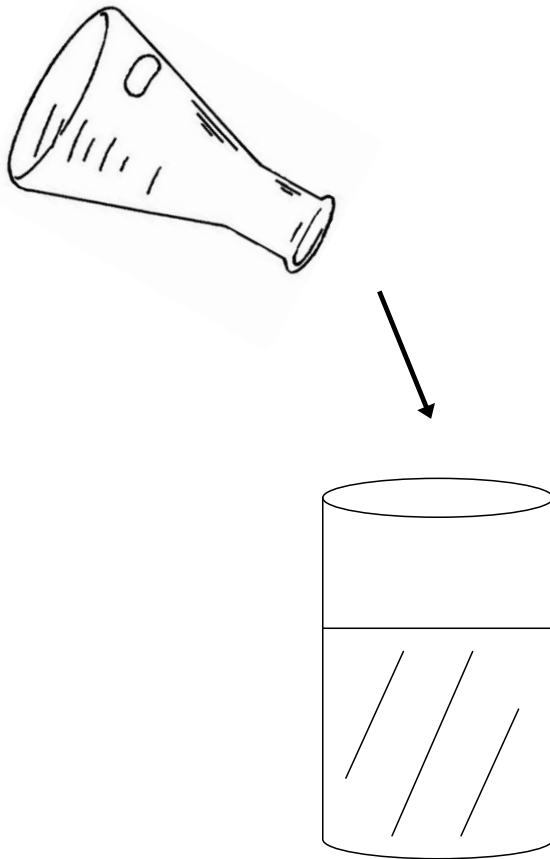


燒瓶口(滅掉其它細菌)



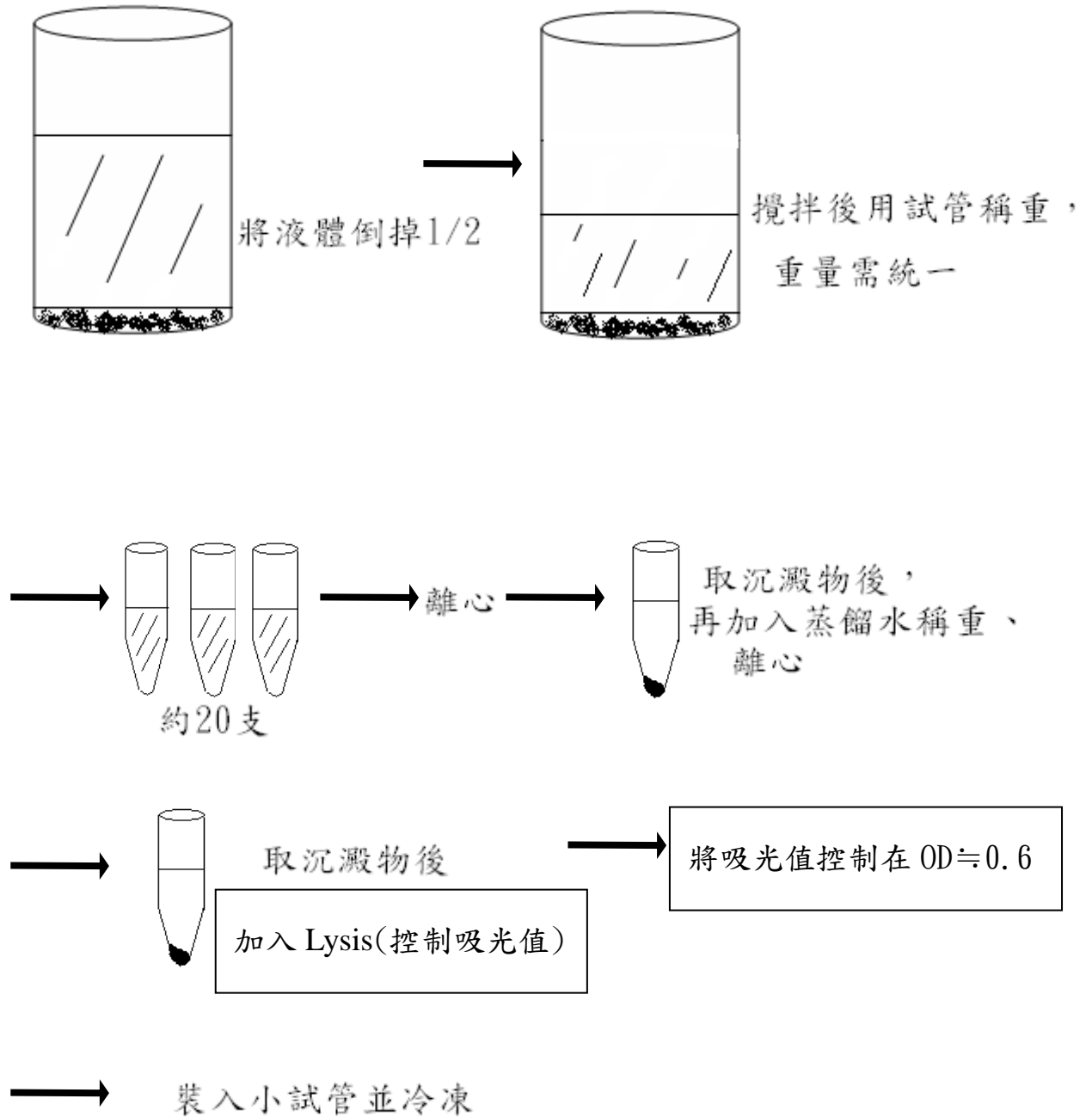
放置培養箱培養 (培養之條件：28°C，200rpm，24hr)。

(三)沉澱、分離步驟：

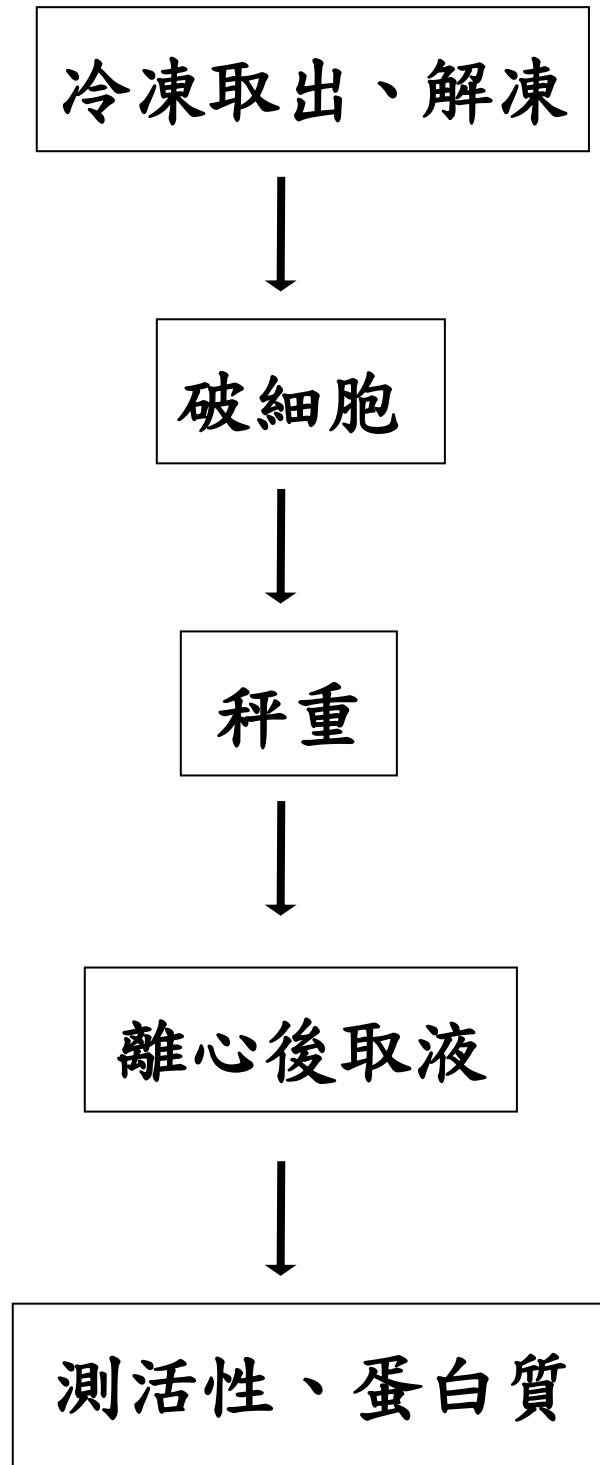


將 5 瓶主培養瓶倒入桶子內，封口、冰入冰箱，待沉澱

(四) *E. coli* 菌收集與貯藏步驟：



(六) 萃取步驟：



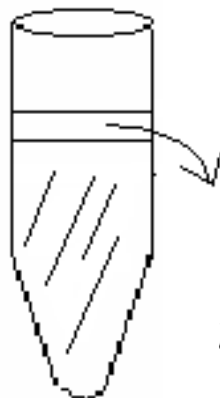
4-2-1 測活性步驟流程圖



大試管內加入

8mL pH8 PB buffer、1mL 2%PG

準備 1 支大試管，2 支小試管，並將大試管放於恆溫水槽內，水溫設置 37°C 轉速 100rpm



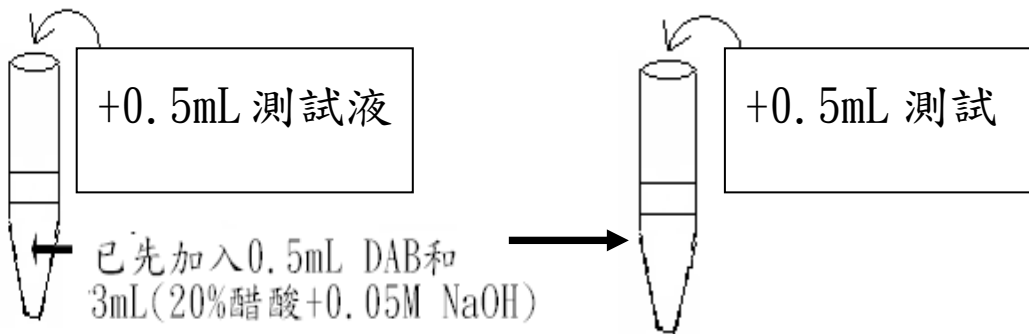
再加入酵素液 1mL，並計時開始，

開始時 $t = 0\text{min}$ 吸取 0.5ml 到小試管①



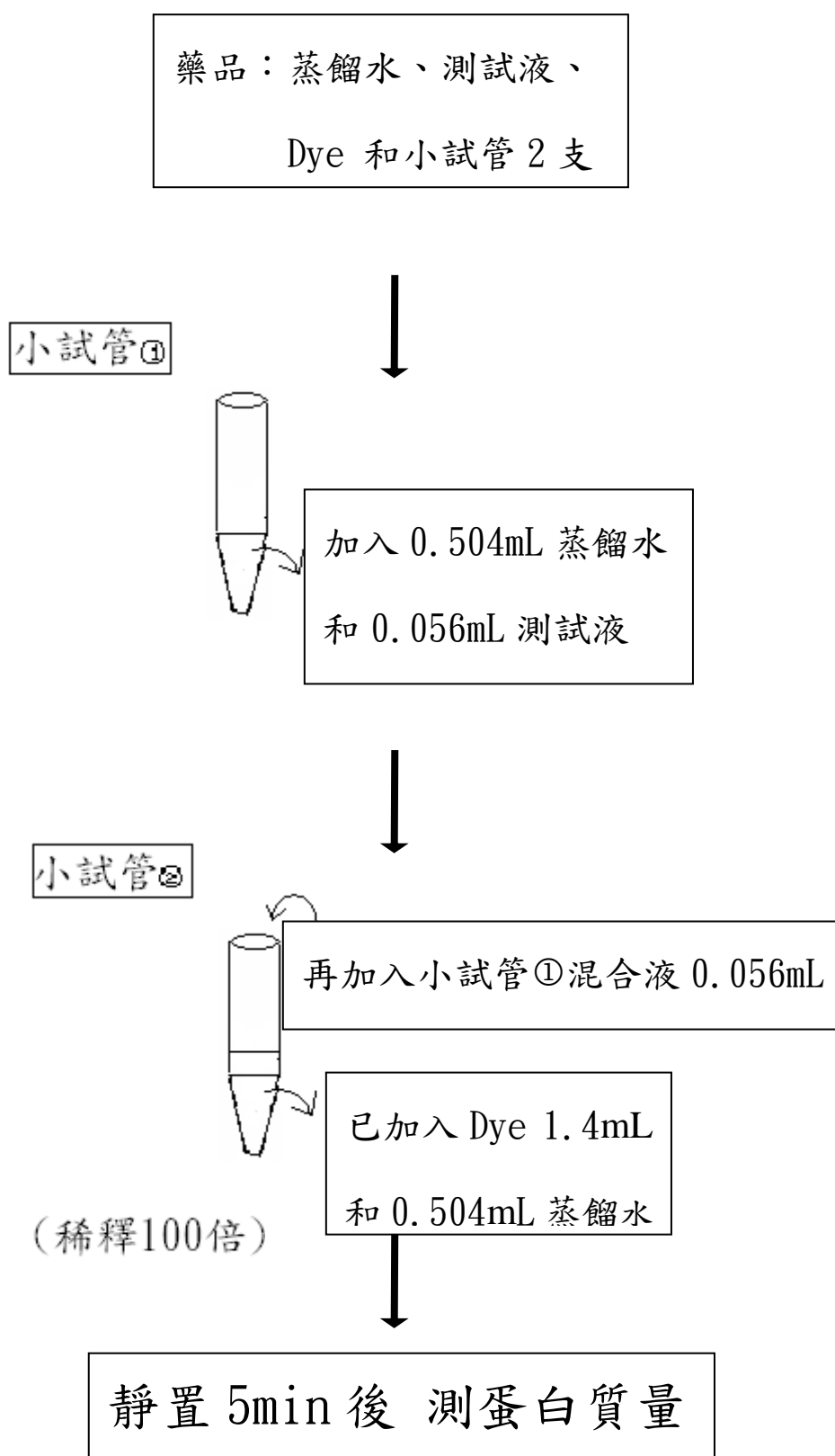
0 min 時

10 min 時



各靜置15min後
測活性

4-2-2 測蛋白質步驟流程圖



五 實驗結果

(一) 氮源量之影響：

依原先發酵條件，調整添加氮源量，由 0.5g 至 0.7g 測試氮源量添加之影響。實驗結果如表 5-1 與圖 5-1(a)(b)(c)所示：

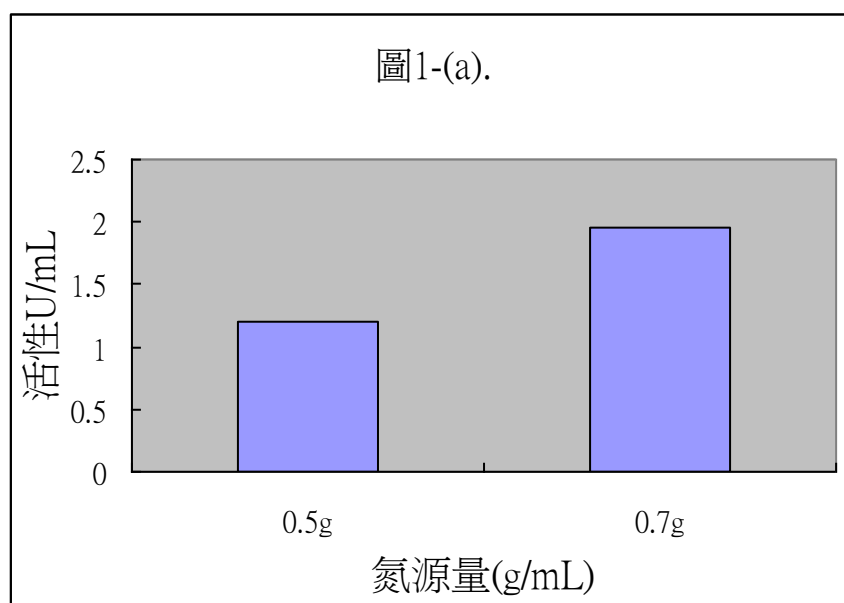


圖 5-1(a). 發酵液的 PGA 活性變化

表 5-1 yeast 量之影響

氮源量 g/mL	吸光值	活性 U/mL	蛋白質 μ g/mL	濃度 mg/mL	比活性 U/mg
0.5	0.617	1.2057	0.975	71.703	0.01682
0.7	0.603	1.9615	1.061	79.722	0.0246

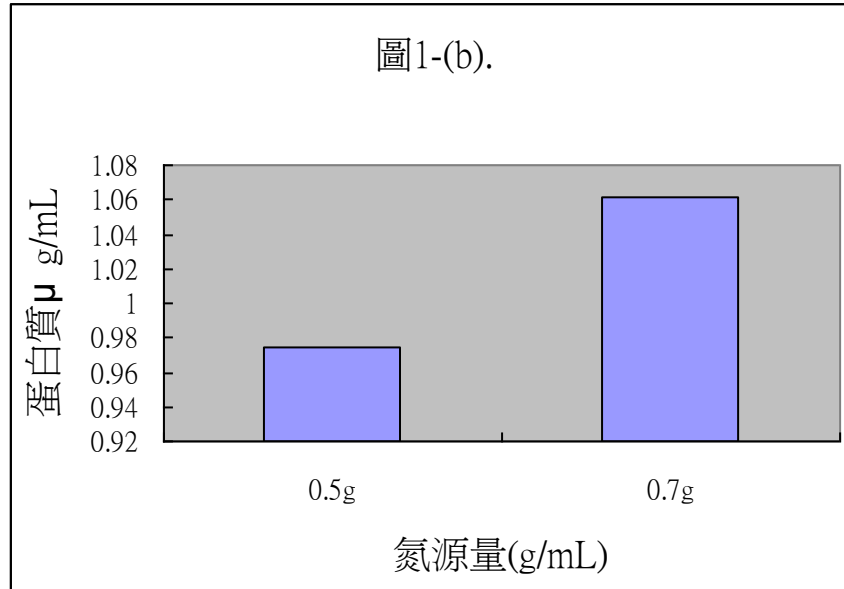


圖 5-1(b). 發酵液內蛋白質變化

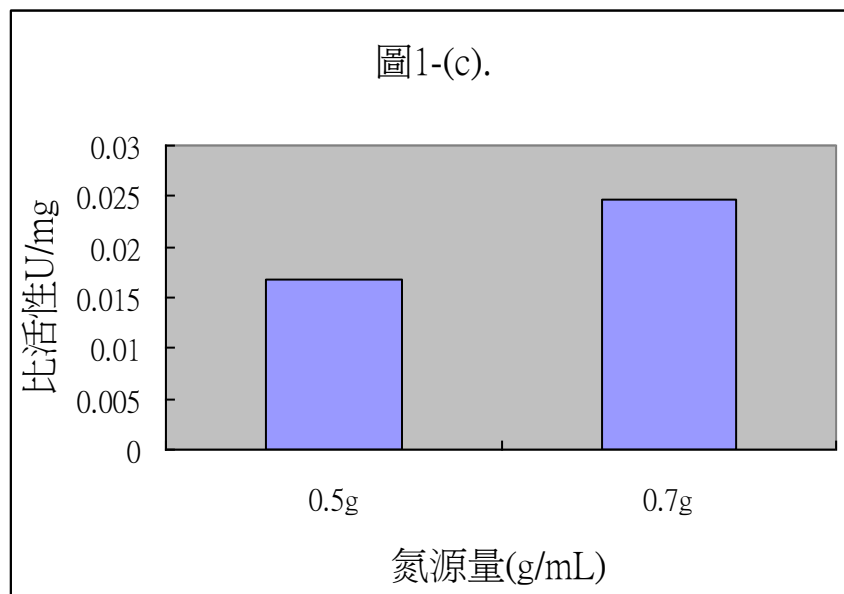


圖 5-1(c). 發酵液內比活性變化

氮源為培養基主要營養劑之一，氮源主要用來構成菌體細胞物質（胺基酸、蛋白質、核酸）和含氮代謝產物（如抗生素）等。由實驗得知當氮源增加時產量 PGA 活性會增加。

(二) 發酵培養條件之轉速影響：

依原先發酵條件轉速 200rpm 調整至 100rpm，測試轉速改變之影響。實驗結果如表 5-2 與圖 5-2(a)(b)(c)所示：

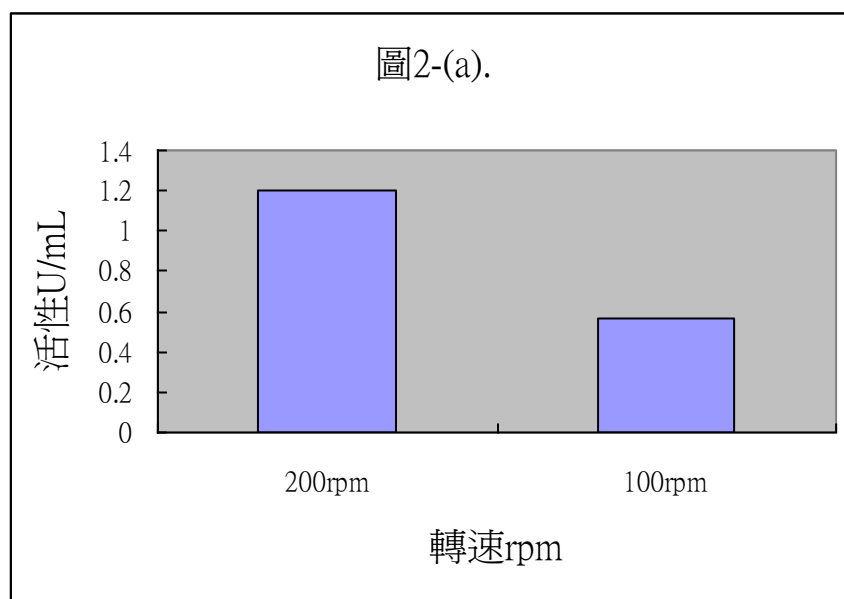


圖 5-2(a). 發酵液內 PGA 活性變化

表 5-2 發酵培養條件之轉速影響

轉速條件 (rpm)	吸光值	活性 U/mL	蛋白質 μ μ g/mL	濃度 mg/mL	比活性 U/mg
200rpm	0.617	1.2057	0.975	71.703	0.01682
100rpm	0.602	0.5611	0.986	72.723	0.00771

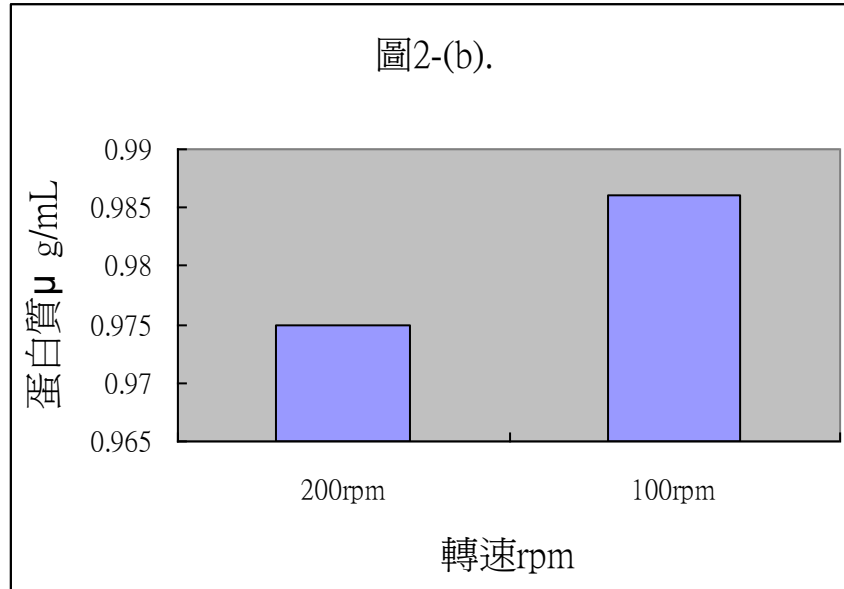


圖 5-2(b). 發酵液內蛋白質變化

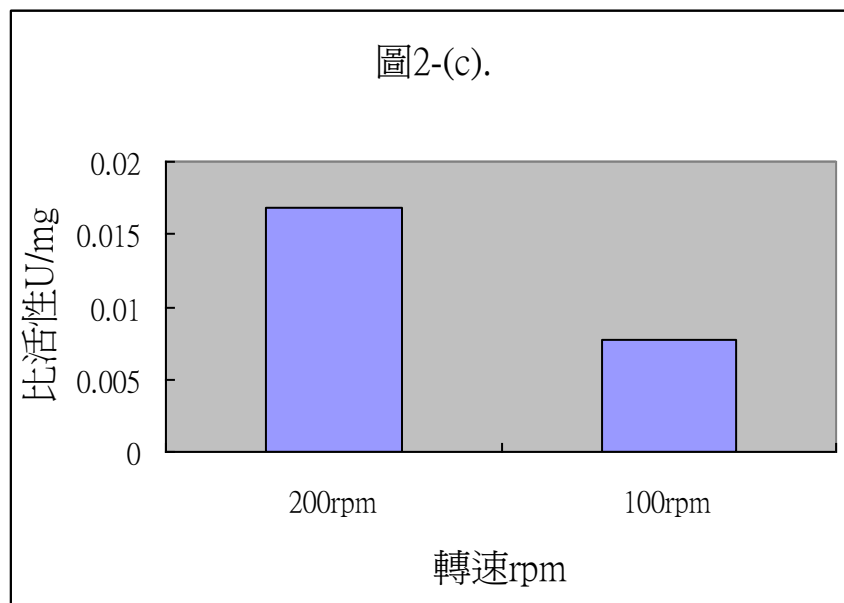


圖 5-2(c). 發酵液內比活性變化

轉速為物理影響因素，影響菌體與 O_2 、營養素接觸碰撞機率。

由實驗結果得知，轉速越低，PGA 活性與比活性越低。

(三) 碳源(葡萄糖)添加量之影響：

依原先發酵條件，將碳源量 50g 改至 10g，測試碳源量改變之影響。

實驗結果如圖 5-3(a)(b)(c)所示：

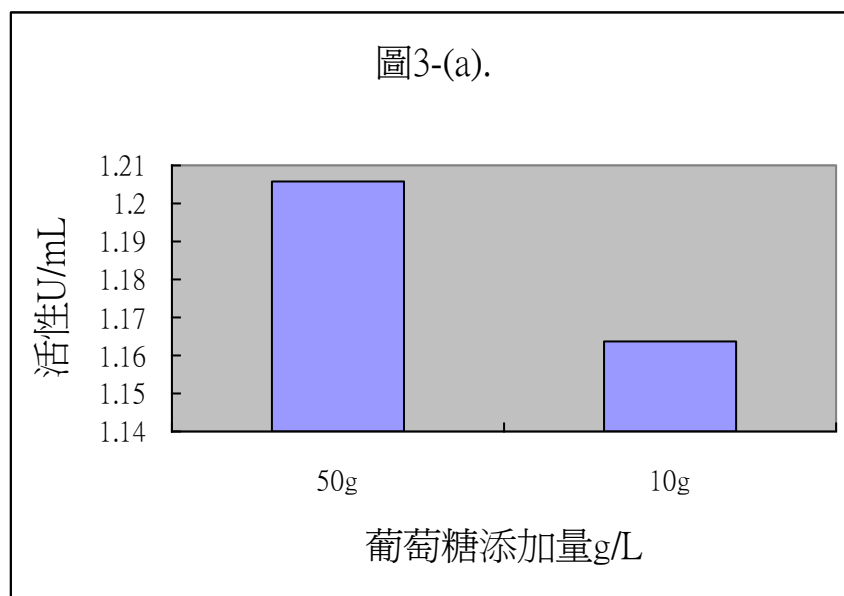


圖 5-3(a). 發酵液內 PGA 活性變化

表 5-3 葡萄糖添加量之影響

葡萄糖添加量 (g/L)	吸光值	活性 U/mL	蛋白質 μ g/mL	濃度 mg/mL	比活性 U/mg
50g	0.617	1.2075	0.975	71.703	0.01682
10g	0.614	1.1639	0.769	52.494	0.02217

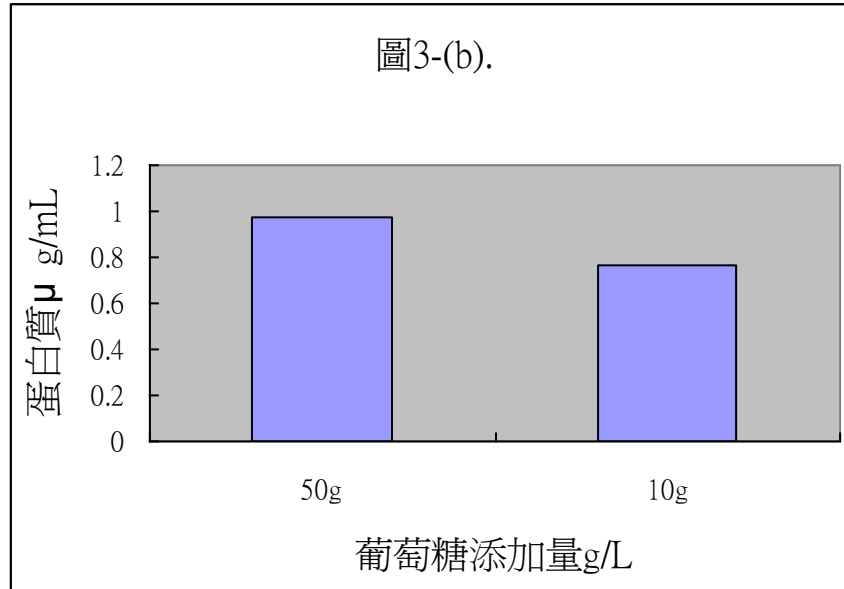


圖 5-3(b). 發酵液內蛋白質變化

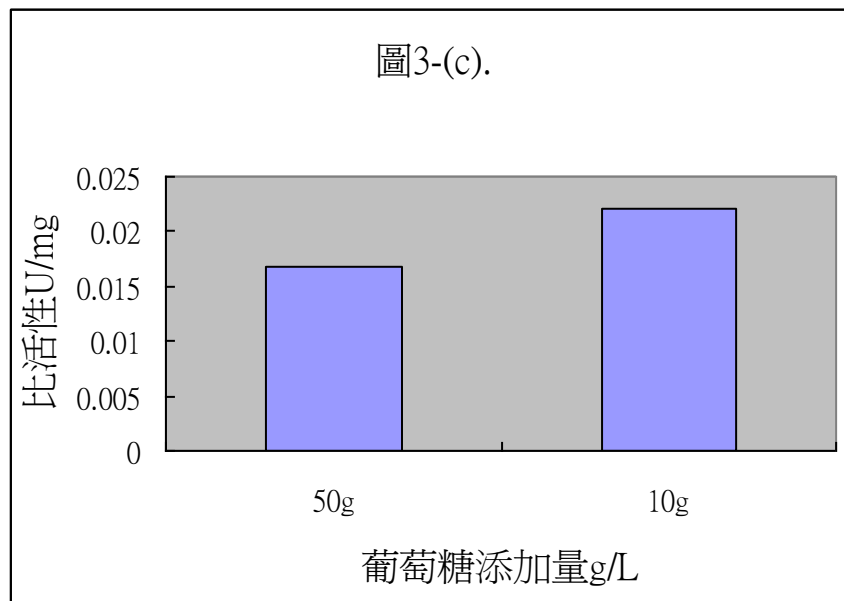


圖 5-3(c). 發酵液內比活性變化

菌體在葡萄糖不足或缺氧的條件下會產生“葡萄糖效應”影響菌重組的生長。由實驗得知，將碳源減少，菌體之生長隨之減少，產物活性隨之減少。

(四) 發酵培養條件之溫度影響：

依原先發酵條件溫度 28°C 提高至 40°C，測試溫度改變之影響。

實驗結果如圖 5-4(a)(b)(c)所示：

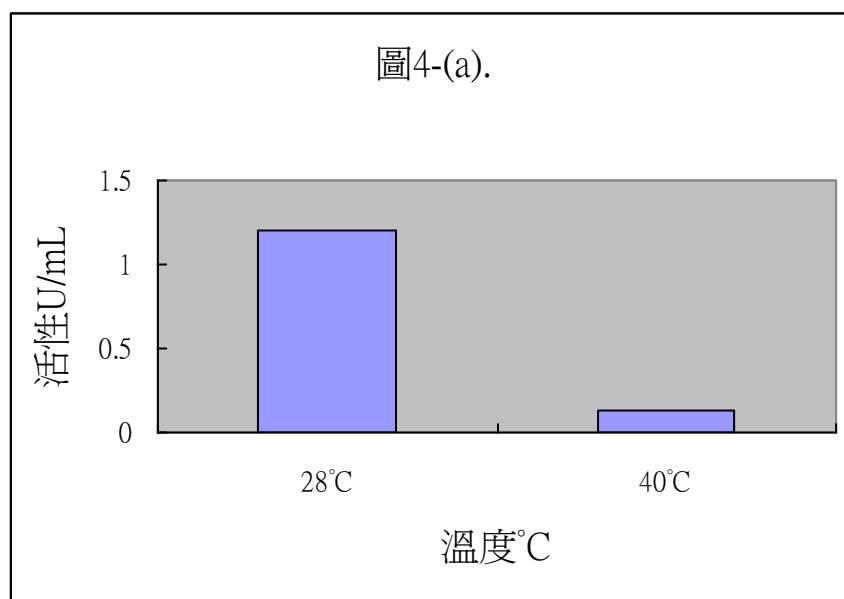


圖 5-4(a). 發酵液內 PGA 活性變化

表 5-4 發酵培養條件之溫度影響

溫度條件°C	吸光值	活性 U/ml	蛋白質 $\mu\text{g/ml}$	濃度 mg/ml	比活性 U/mg
28°C	0.617	1.2057	0.975	71.703	0.01682
40°C	0.605	0.1257	0.783	58.4	0.00228

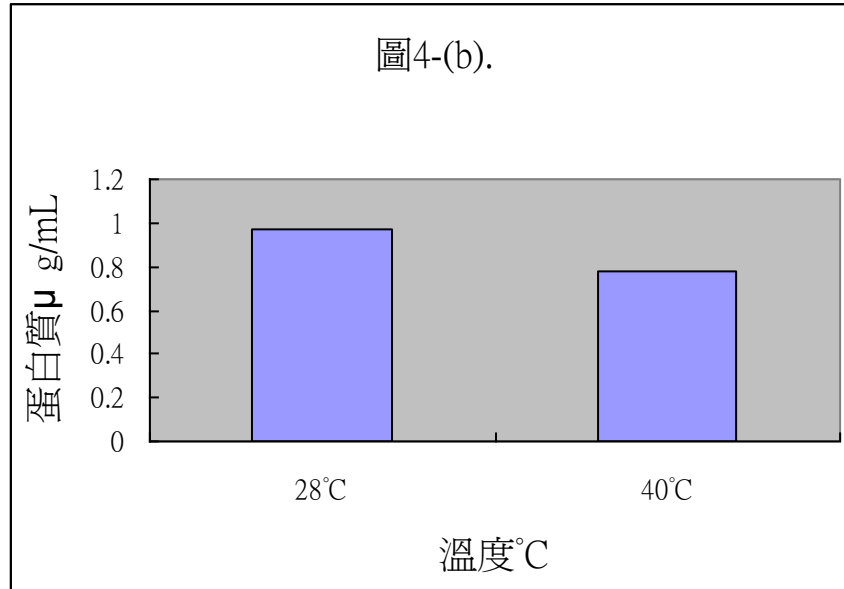


圖 5-4(b). 發酵液內蛋白質變化

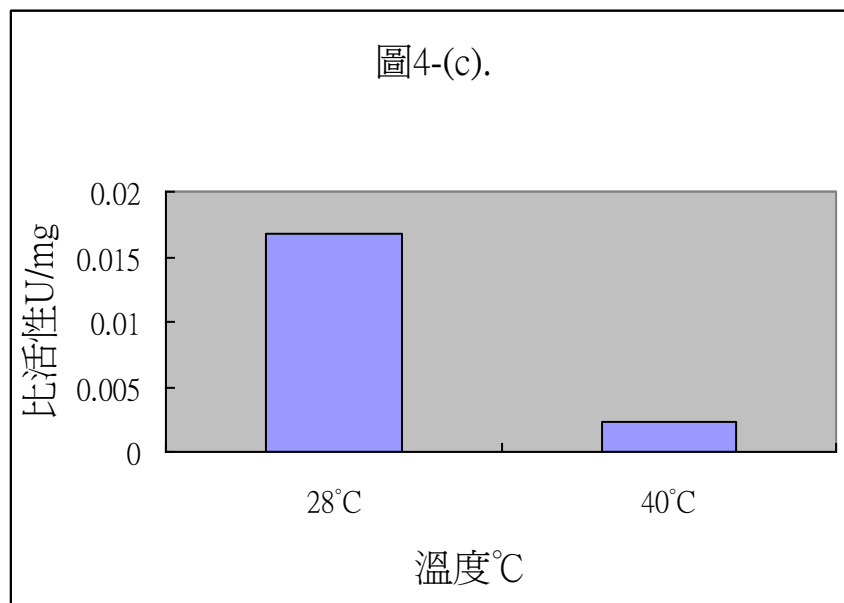


圖 5-4(c). 發酵液內比活性變化

菌體代謝、生長受溫度影響很大，溫度過高，會造成菌死亡。由實驗得知，溫度越高，活性越小。

六 總結

本實驗利用測試發酵液內 PGA 活性、蛋白質濃度與比活性等值變化,探討改變培養營養成分與發酵培養條件對 *E.coli* 發酵液之影響。

由實驗結果得知:

1. 氮源(Yeast)增加時,活性及產量都增加。
2. 轉速減少時,活性則是會降低。
3. 碳源(葡萄糖)減少時,菌體產量隨之減少。
4. 溫度越高,活性越小。

七 參考文獻

1. J. G. Shewale, B. S. Deshpande, V. K. Sudhankaran and S. S. Ambedkar, "Penicillin Acylases Application and Potentials", *Process Biochemistry*, vol.25, pp.90-103,1990.
2. Dever LA, Dermody TS, "Mechanism of bacterial resistance to antibiotics", *Arch Inter Med*. 1991; 151:886-95.
3. J. G. Shewale and H. Sivaramam, "Penicillin Acylase Enzyme Production and Its Application in the Manufacture of 6-APA", *Process Biochemusty*, 24, pp 1462-254,1989.
4. C. C. Chou and Y. T. Liu, "The function of promoter and Spacer sequence of pac gene from ATCC9637 ", Master thesis, 1992.
5. C. W. Lee, M. B. Gu and H. N. Chang, "High-Density Culture of Escherichia-Coli Carrying Recombinant Plasmid in a Membrane Cell Recycle Fermenter", *Enzyme and Mcrbialol Technology*, vol.11, pp.49-54, 1989.
6. A. Kotha, L. S., CR. Rajan, S. Ponrathnam, K. K. Kumar, G. R. Ambekar and J. G. Shewale, "Adsorption and expression of penicillin G acylase immobilized onto meth-acrylate polymers Generated with varying pore generating solvent volume", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30(3), 297-302(1991).
7. Li Xiaofen, H.J.MaRunyu,DuanXue, Zhu Yuexiang,"Immobilization of Penicillin Acylase ", *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1145-53(2000)

8. Frens G., "Controlled nucleation for the regulation of the particlen size monodisperse gold solution", *Nature Phys. Sci.* 241, 20(1973)
9. Hayat M. A., "Colloidal Gold, Principle, Methods and application", San Diego: Academic Press, (1991)
10. Hayes J. D., Wolf C. R., "Molecular mechanisms of drug resistance", *Biochem J.* 1990; 272, 281-95
11. Balasingham K, W. D., Dunnill P., Lilly MD, "The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*", *Biochem Biophys Acta.*, 476(1), 250-256(1972).
12. G. A. Mirkin, "Programming the assembly of two and three-Dimensional Architectures with DNA and Nanoscale Inorganic Building Blocks", *Inorg. Chem.* 39, 2258-2272 (2000).
13. 陳光宇, 民 87" 大腸桿菌發酵生產盤尼西林 G 醃胺酵素代謝工程之研究" 中興大學, 化學工程學系, 碩士論文.
14. 黃宏彰, 民 90" 應用基應重組大腸桿菌生產盤尼西林醃胺酵素之發酵條件探討", 中興大學, 化學工程系, 碩士論文.
15. 蘇志遠, "微生物系統" 第 10 章, *IMB Academia Sinica Bioinformatics.*
16. 馮皓翔, 民 98" 硼酸官能基薄膜之製備及其在純化盤尼西林醃胺酵素上之應用" 國立中興大學, 化學工程學系, 碩士論文.