

# 探討金屬親和樹脂與金屬親和薄膜對盤尼西林醯胺酵素之純化效果

陳志義、姚呈儒

## 摘 要

本研究中，利用 Novagen His-Bind resin 與 RC 膜為固體載體，其帶有高密度螯合基 IDA (iminodiacetic acid)，可螯合銅離子，成為固定化金屬親和樹脂 (immobilized metal affinity resin; IMAR) 與固定化金屬親和膜 (immobilized metal affinity membrane; IMAM)，使用兩者對粗盤尼西林醯胺酵素液 (crude penicillin G Acylase solution; crude PGA) 進行親和吸附，再利用流動式反應器進行純化 PGA。使用 IMAR 純化 PGA 之流程，清洗溶液為 10mM phosphate buffer, 0.02M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ；而沖提溶液為 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20mM imidazol, 10mM phosphate buffer，得到 78.3% 回收率，10.92 倍純化倍率。IMAM 為實驗室自製，使用 IMAM 純化 PGA 之流程，沖提溶液為 1.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM phosphate buffer，得到 97.1% 回收率，21.31 倍純化倍率。由上述結果比較，得知 IMAM 純化效果較 IMAR 佳。

**關鍵詞：**固定化金屬親和樹脂、親和吸附、盤尼西林醯胺酵素、固定化金屬親和薄膜。



# Investigation the effect of purified penicillin G acylase by immobilized metal affinity resin and immobilized metal affinity membrane

Chih-I Chen, Cheng-Ju Yao

## Abstract

This study was compared the purification efficiency of immobilized metal affinity resin (IMAR) and immobilized metal affinity membrane (IMAM). Novagen His-the Bind resin and RC membrane were used as solid carrier, which contains high-density ligands of IDA (iminodiacetic acid) to chelate copper ions to become an IMAR and IMAM. Then, the IMAR and IMAM would be used to purify penicillin G acylase (PGA) form crude PGA solution with flow reactor by the effect of to affinity adsorption. For IMAR purification effect experiments, the washing solution is 10mM phosphate buffer, 0.02M of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and the elution solution is 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20mM imidazol, 10mM phosphate buffer. After washing and elution process, the activity recovery rate is up to 78.3% and purification increases 10.92-fold. The IMAM was laboratory-made and used the elution solution of 1.5 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM phosphate buffer to purify PGA. It was obtained 97.1% the activity recovery and 21.31-fold purification from the IMAM purification effect experiments. Consequently, the results showed the purification efficiency of IMAM is better than that of IMAR.

**Keywords:** immobilized metal affinity resin (IMAR), affinity adsorption, penicillin G acylase (PGA), immobilized metal affinity membrane (IMAM).



## 一、前言

盤尼西林醯胺酵素 (Penicillin G acylase; PGA) 是一項重要生物觸媒，可進行盤尼西林 (Penicillin G; PG) 之水解反應，形成六青黴素酸 (6-aminopenicillanic acid; 6-APA)，作為抗生素原料藥。因此，如何得到大量，便宜且高純度 PGA，對經濟量產化是很重要[1]。

固定化酵素方法係利用在凝膠 (gel) 載體表面接上不同官能基如 iminodiacetic acid (IDA)、nitrilotriacetic acid (NTA) 等，再利用其固定金屬離子，如  $\text{Cu}^{2+}$ ， $\text{Zn}^{2+}$ ， $\text{Ni}^{2+}$  等，由於此金屬官能基螯合型式極易與 PGA 酵素中之組胺酸 (histidine)、半胱胺酸 (cystein)、色胺酸 (tryptophan) 等胺基酸形成極佳之特異性吸附效應[2,3]，當應用在蛋白質純化時，可得到極佳之純化倍率及回收率[4]。由研究發現藉由固體載體上形成高密度銅離子產生特異性吸附效應，進而達到分離純化 PGA。因此本研究將詳細利用商業化樹脂與 RC 膜，探討對 PGA 之純化條件，如洗滌、沖提等步驟，及其純化倍率、回收率與純化效果等研究。

## 二、研究材料與方法

### 2-1 藥品:

Fractogel Resin，購於德國 Novagen

公司；4-Dimethylamino-benzaldehyde (DAB)，購於美國 Sigma 公司；Coomassie brilliant blue，購於美國 Bio-Rad Lab 公司；Penicillin G potassium salt (PG)，購於台灣 MDBio 公司；其他藥品均為試藥級以上

### 2-2 粗 PGA 液 (crude PGA) 之製備

將 *E. coli* 醱酵後收集醱酵液，將收集好之醱酵液取 100ml，並於 9000 rpm 4 °C 下離心 5 分鐘。離心後之沉澱物，並用去離子水清洗兩次。取其離心後之沉澱物，再溶於 lysis buffer (0.1M PB, pH 8.0, 0.1 M NaCl) 中。以壓力式打碎菌體，打碎後之菌液於 9000 rpm 4 °C 下離心 5 分鐘。收集離心後之上清液，即為粗 PGA 液。

### 2-3 IMAR 之製備

依據文獻[5]之方法，於層析管 (Polypropylene columns) 中製備 IMAR，將 1.1ml Novagen Fractogel Resin (methacrylate bead matrix, dry weight: 452 mg/ml, Particle size : 40-90  $\mu$  m) 放入 15ml, 100mM  $\text{CuSO}_4$  內吸附後，即製成固定化金屬樹脂 (IMAR)。

### 2-4 IMAR 親和吸附 PGA

將 Fractogel resin- $\text{Cu}^{2+}$  置於 25ml, 0.1 U/ml PGA 粗酵素液吸附 12hr，成為親和



吸附酵素樹脂，保存於 4°C, pH8, 10mM PBS, 0.1%NaN<sub>3</sub> 中，備用存放。

## 2-5 IMAM 之製備

取再生纖維薄膜一張，加入 5ml Epichlorohydrin (EPI) 與 20ml, 1.4M NaOH，於震盪培養箱中 24°C, 150rpm 下，進行反應 12 小時後，以去離子水清洗兩次，然後將此帶環氧基之薄膜，使用 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 泡製 1M IDA，於 24°C, 150rpm 下，進行反應 14 小時，再用去離子水清洗兩次，而後將此膜置於 25ml, 25mM CuSO<sub>4</sub> 溶液中；於 18°C, 150rpm 下反應 1 小時，並以 pH 8, 50ml 磷酸緩衝液(PBS; sodium phosphate buffer)清洗，即製成固定化金屬親和薄膜(IMAM)[6]。再將 IMAM 置於 25ml, 0.1 U/ml PGA 粗酵素液內吸附 12hr，成為親和吸附酵素膜，保存於 4°C, pH8, 10mM PBS, 0.1%NaN<sub>3</sub> 中，備用存放。

## 2-6 應用流動式反應器純化 PGA

依先前實驗之流動式反應器裝置 [7]，取 11ml IMAR 或 10 片固定化金屬親和膜，置於流動式反應器之 cartridge 內，裝 IMAR 之填充器(玻璃材質，Purification Kit 規格為 D: 2cm × H: 30 cm) 或裝 IMAM 之填充器(壓克力材質，規格為:outer D: 6.7 cm × H: 13.4 cm; interior D: 4.6 cm × H: 7.6 cm) (如圖

一)。使用蠕動幫浦控制流速 1ml/min，先使用洗滌液(washing solution)清洗雜蛋白，用沖提溶液提取 PGA，並使用分段收集器，每 3ml 為一區段收集。完成後，進行 PGA 活性與蛋白質含量分析。定義: 純化效率 (Purification fold)= (沖提 PGA 液之比活性)/(負載粗 PGA 液之比活性)\*100%；PGA 回收率 (Recovery)= (沖提 PGA 液之活性量)/(負載粗 PGA 液之總活性量)\*100%。

## 2-7 分析方法

### 2-7-1 蛋白質濃度測定

使用 Bradford 方法[8]，Coomassie brilliant blue G-250 與蛋白質結合後；在波長 595 nm 下，測其吸光值，並以 Bovine serum albumin (BSA) 為參考蛋白質，作檢量線測定。

### 2-7-2 PGA 活性分析

使用 Balasingham 等人[9] 之方法。取 1 ml 待測活性溶液加上 8 ml 之 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液(pH 8)和 1 ml 之 2 % PG 溶液，於 37°C 之恆溫水槽內培養。取樣溶液靜置 15 分鐘後，分別於波長 415 nm，測量吸光值。

### 2-7-3 銅離子鍵結量的量測

根據 Johnson et al. [10] 研究，含銅離子的 EDTA 溶液，在 800 nm 下有吸收值，採用此方法量測銅離子量。



### 三、結果與討論

#### 3-1 載體整合 $\text{Cu}^{2+}$ 量

先前之研究中[11]，已證實可應用改質之 IMAM 膜整合  $\text{Cu}^{2+}$  來純化 PGA 酵素，當以最適操作條件進行 PGA 純化時，回收率達 90.25% 純化倍率可達 9.11 倍。由研究[11]可發現，藉由載體形成高密度銅離子，再以配位鍵結吸附特異性蛋白質進而分離純化 PGA 酵素，因此進行本研究前，依分析步驟 2-7-3 分析載體，整合  $\text{Cu}^{2+}$  量；由分析結果知一片 IMAM 有  $75.2 \pm 0.5 \mu\text{mol}$ ；測試 IMAR (1.1ml) 有  $75.1 \pm 0.3 \mu\text{mol}$ 。兩者吸附相當  $\text{Cu}^{2+}$  量。

#### 3-2 使用 IMAR，純化 PGA 之最適化條件

##### 3-2-1 鹽類濃度的影響

在固定化金屬親和層析，清洗和沖提的緩衝溶液大多使用咪唑(imidazole)及  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，因此本研究嘗試以 imidazole 和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  做為固定化金屬親和樹脂清洗和沖提條件時之緩衝溶液。因此首先探討  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度對沖提效果的影響，結果如表 1。從表 1 得知，使用 0.02M 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  沒有造成 PGA 被沖提出且清洗部份雜蛋白，因此選用 0.02M 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作為清洗(washing)溶液。隨之增加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  濃度至

2.5M 時，PGA 回收率只達 73.9%，且純化倍率降低，可能是高濃度  $\text{NH}_4\text{Cl}$  影響 PGA 活性。由此結果得知，單獨使用  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，無法將 PGA 完全脫附下來。

##### 3-2-2 Imidazol濃度的影響

依文獻[5,7]，嘗試使用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  及 imidazole 兩者不同濃度作為沖提溶液。以流動式反應器實驗比較 IMAR 對 PGA 純化效果，所使用的沖提溶液條件(如表 1、表 2 與表 3)。由表 1 實驗結果發現，純使用不同濃度 (1.5M、2.0M、2.5M) $\text{NH}_4\text{Cl}$  當沖提溶液時，其回收率最高為 73.9%，回收效果差；因此嘗試固定濃度 10 mM imidazol 中添加不同濃度 (0.5M、1.0M、1.5M) $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，由表 2 實驗結果發現，其回收率都不佳(81%-84%)，由此可知使用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  當沖提溶液對 PGA 純化，影響並不大；接著，固定 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，使用不同濃度 imidazol 時，由表 3 實驗結果發現，隨 imidazol 濃度由 5 mM 增至 20mM，可得到 PGA 回收率由 68.6% 增至 96.0%，純化倍率由 7.46 增至 9.30 倍，明顯具純化回收效果。故以此濃度 20mM imidazol、1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作為純化 PGA 之沖提溶液。

#### 3-3 使用金屬親和薄膜 (IMAM)，純化 PGA 酵素之最適化條件

利用單片固定化 PGA 酵素膜，探討



NH<sub>4</sub>Cl 濃度對沖提效果的影響，結果如表 4。從表 4 得知，使用 0.02M NH<sub>4</sub>Cl 濃度時，並無 PGA 被沖提出來，只有一些雜蛋白被沖提出來，因此選用此濃度來清洗雜蛋白；

表 1 各種 NH<sub>4</sub>Cl 濃度對 IMAR 之 PGA 之純化回收效果

NH <sub>4</sub> Cl (M)	PGA (U/ml)	Protein (μg/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
0.01	0	10.1 ±0.3	0	0	0
0.02	0	11.0 ±0.7	0	0	0
0.03	0.03	11.5 ±1.1	2.43	2.64	12.1
0.04	±0.03	±1.1			
0.06	0.04 ±0.02	13.4 ±1.3	2.76	2.99	16.0
1.5	0.10 ±0.01	14.2 ±2.0	7.15	7.75	44.0
2.0	0.14 ±0.03	17.6 ±1.8	7.92	8.59	64.6
2.5	0.17 ±0.01	26.8 ±0.9	6.24	6.77	73.9

Loading buffer: 10mM phosphate, pH 6, shake for 12h at 18°C

Loading protein 6.25ml, 0.483mg/ml ; activity:0.445 IU/ml; specific activity 0.922 IU/mg

Elution buffer: 10mM phosphate, pH 6.5, shake for 1h at 4°C

表 2 以 IMAR 進行各種 NH<sub>4</sub>Cl 濃度純化 PGA 之效果

NH <sub>4</sub> Cl (M)	PGA (IU/ml)	Protein (μg/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
0.5	0.14 ±0.01	17.9 ±1.7	8.04	8.72	82.3
1.0	0.15 ±0.02	17.4 ±0.8	8.55	8.68	81.3
1.5	0.17 ±0.01	19.7 ±2.3	8.49	9.21	84.1

Loading buffer: 10mM phosphate, pH 6, shake for 12h at 18°C

Loading protein 6.25ml, 0.483mg/ml ; activity:0.445 IU/ml; specific activity 0.922 IU/mg

Elution buffer: 10mM imidazol, 10mM phosphate, pH 6.5, shake for 1h at 4°C

表 3 以 IMAR 進行各種 imidazol 濃度純化 PGA 之效果

Imidazol (mM)	PGA (U/ml)	Protein (μg/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Recovery (%)
5	0.13 ±0.02	18.5 ±2.5	6.78	7.46	68.6
10	0.13 ±0.06	19.5 ±1.4	6.67	7.35	73.1
13	0.17 ±0.12	20.5 ±0.5	8.16	8.99	86.9
17	0.19 ±0.08	21.1 ±1.2	8.81	9.70	90.8
20	0.20 ±0.15	23.5 ±0.1	8.44	9.30	96.0

Loading buffer: 10mM phosphate, pH 6, shake for 12h at 18°C

Loading protein 6.25ml, 0.439mg/ml ; activity:0.3988 IU/ml; specific activity 0.908 IU/mg

Elution buffer: 1M NH<sub>4</sub>Cl, 10mM phosphate, pH 6.5, shake for 1h at 24°C





而在 1.5M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  時，可得到 PGA 回收率為 98.9%，此回收率與文獻[12]相近，且純化倍率為 10.23 倍，故作為最後沖提 PGA 之濃度。

### 3-4. 流動式反應之純化效果

對一個親和吸附劑，載體上配位基 (ligand)，必需牢固且密度高的  $\text{Cu}^{2+}$ ，才能緊密吸附特異目標酵素(PGA)；吸附現象為利用載體表面  $\text{Cu}^{2+}$  之配位鍵吸附固定 PGA[13]。使用 11ml IMAR 進行流動式反應器測試，實驗結果如圖 2。由圖 2 得知，PGA 回收率為 78.3%，純化倍率為 10.92 倍；另外，使用 10 片 IMAM 進行流動式反應測試時，實驗結果如圖 3。由圖 3 得知，PGA 回收率為 97%，純化倍率為 21.31 倍。由兩者比較回收率，可發現 IMAM 較 IMAR 佳，由兩者沖提緩衝溶液濃度差異判斷，其原因可能是 IMAR 立體吸附 PGA 鍵結強，造成脫附 PGA 比活性少。另外，IMAM 純化倍率與回收率，皆較 Fitton *et al.* [4]使用  $\text{Cu}^{2+}$  螯合的 Sepharose 之填充管柱 (回收率 97%結果相近、但純化倍率 12.36 倍)結果佳。

## 四、結論

本研究以 Novagen His-Bind Fractogel resin 與 RC 膜為固體載體，利用

具有高密度螯合基 IDA，螯合銅離子，製備成 IMAR 與 IMAM，進行純化 PGA。使用 IMAR，銅離子螯合量為  $75.1 \pm 0.3 \mu\text{mole/ml}$ ，固定 PGA 活性為 1.25 U/ml，沖提步驟中洗滌溶液為 10mM phosphate buffer(含 0.02M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )，沖提溶液為 10mM phosphate buffer(含 20mM imidazol、1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )；依此條件沖提結果，得到 PGA 回收率為 96.0%，純化倍率為 9.3 倍。將 IMAR 以流動式反應器進行純化 PGA，得到回收率為 78.3%，純化倍率為 10.92 倍。另外使用 IMAM，銅離子吸附量可達  $75.0 \pm 0.5 \mu\text{mol/disc}$ ；洗滌溶液為 10mM phosphate buffer(含 0.02M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )，沖提溶液為 10mM phosphate buffer(含 1.5M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )；將 10 片 IMAM 置於流動式反應器進行純化 PGA，PGA 之回收率則可達 97.1%，純化倍率為 21.31 倍。由兩者純化 PGA 效率比較，可發現 IMAM 較 IMAR 佳。

## 五、誌謝

感謝中興大學化工系劉永銓教授與實驗室同學之協助，使得本實驗得以順利進行，在此一併感謝。



表 4 以 IMAM 進行 NH<sub>4</sub>Cl 濃度純化  
PGA 之效果

NH <sub>4</sub> Cl (M)	PGA (U/ml)	Protein (µg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
0.01	0	3.8 ±0.8	0	0	0
0.02	0	7.0 ±0.7	0	0	0
0.04	0.09 ±0.01	7.6 ±1.1	1.182	1.64	4.7
0.06	0.12 ±0.01	8.3 ±1.5	1.448	2.01	6.4
0.08	0.15 ±0.01	8.4 ±1.0	1.779	2.47	7.9
0.1	0.22 ±0.01	9.9 ±1.9	2.228	3.09	11.6
0.3	0.43 ±0.01	10.6 ±2.1	4.076	5.65	22.6
0.5	0.93 ±0.03	15.4 ±2.0	6.047	8.39	49.7
0.7	1.30 ±0.02	19.4 ±1.5	6.697	9.29	68.8
1.0	1.62 ±0.03	22.9 ±1.8	7.062	9.79	84.4
1.5	1.89 ±0.03	25.6 ±2.6	7.377	10.23	98.9
2.0	1.88 ±0.03	27.0 ±2.4	6.958	9.65	98.9

Loading buffer: 10mM phosphate, pH 6, 12h at 18°C, 100rpm

Loading PGA: 25ml, 0.19mg/ml, activity: 0.137IU/ml, specific activity 0.721IU/mg

Elution buffer: various concentrations of NH<sub>4</sub>Cl, 10mM phosphate (pH 6.5), shake for 1h at 24°C.

Ranges denote the standard deviations of three tests.

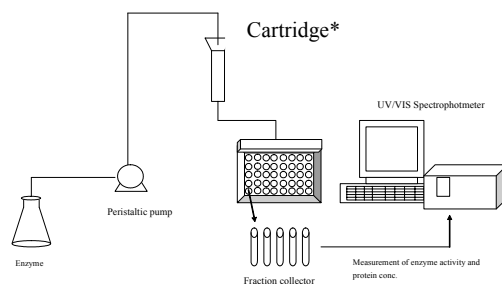


圖 1. 流動式反應器之裝置圖

\* For IMAM :outer D: 6.7 cm × H: 13.4 cm; interior D: 4.6 cm × H: 7.6 cm.

\* For IMAR: Purification Kit size D: 2cm × H: 30 cm.

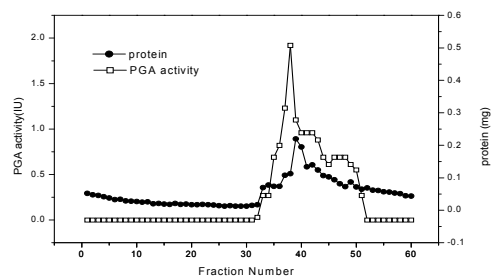


圖 2. 使用 IMAR 在流動式反應器，純化 PGA 之結果

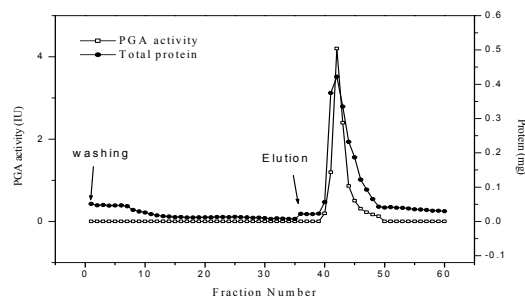


圖 3 使用 10 片 IMAM 在流動式反應器，純化 PGA 之結果





## 參考文獻

- [1] D. Rindfleisch, B. Syska, Z. Lazarova, K. Schugerl, Integrated membrane extraction, enzymic conversion and electro dialysis for the synthesis of ampicillin from penicillin G, *Process Biochemistry* 32 (1997) 605-616.
- [2] C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, E. Cortes, J.L. Garcia, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports, *Biotechnology and Bioengineering* 76 (2001) 269-276.
- [3] R.D. Johnson, R.J. Todd, F.H. Arnold, Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c, *Journal of Chromatography A* 725 (1996) 225-235.
- [4] V. Fitton, X. Santarelli, Evaluation of immobilized metal affinity chromatography for purification of penicillin acylase, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 754 (2001) 135-140.
- [5] C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, B.C.C. Pessela, A. Vian, A.V. Carrascosa, J.L. Garcia, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes new dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions, *Journal of Chromatography A* 915 (2001) 97-106.
- [6] Chih-I Chen, Yi-Miao Ko, Chwen-Jen Shieh, Y.-C. Liu\*, Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane, *J. Membr. Sci.* 380 (2011) 34- 40.
- [7] Y.-C. Liu, C.-C. ChangChien, S.-Y. Suen, Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes, *Journal of Chromatography B* 794 (2003) 67-76.
- [8] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry* 72 (1976) 248.
- [9] K. Balasingham, D. Warburton, P. Dunnill, M.D. Lilly, The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta.* 276 (1972) 250.



- [10] R.D. Johnson, R.J. Todd, F.H. Arnold, Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 225-235.
- [11] Y.-C. Liu, Changchien, C.-C., and Suen, S.-Y., Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes, *Journal of Chromatography B*. 794 (2003) 67-76.
- [12] Y.-C. Liu, S.-Y. Suen, C.-W. Huang, C.-C. ChangChien, Effects of spacer arm on penicillin G acylase purification using immobilized metal affinity membranes, *Journal of Membrane Science* 251 (2005) 201-207.
- [13] Yi-Miao Ke, Chih-I Chen, Po-Min Kao, Hua-Bing Chen, Hung-Chang Huang, C.-J. Yao, Y.-C. Liu\*, Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies, *Pro. Biochem.* 45 (2010) 500-506.

