固定化金屬親和膜固定盤尼西林醯胺酵素之動力學參數研究

曾慧娟[1*]，陳志義[2]

桃園創新技術學院化妝品應用系[1*]

修平科技大學能源與材料科技系[2]

摘要

工業應用將盤尼西林醯胺酵素(penicillin G acylase ；PGA) 固定在生物載體上當作生物觸媒，它與自由 PGA 相比較，具有高活性和高穩定性，於生化反應可長期使用特性。首先利用一連串化學反應，再生纖維膜(the regenerated cellulose membrane; RCM) 與 20 ml 1.4 M NaOH, 5 ml epichlorohydrin (EPI), 於 24 ℃, 150 rpm 反應 14h； 接著， 浸泡在 25 ml 1M iminodiacetic acid (IDA) 於 24 ℃,120 rpm, 反應 12 h；將與 25ml 25mM 銅離子配位鍵結，形成固定化金屬親和膜 (the immobilized metal affinity membrane ; IMAM)。在此最適化條件下，每片金屬親和膜螯合銅離子 75.6 ± 0.3 μmol 與 PGA 活性 1.8 U。經實驗發現固定化 PGA 膜(Immobilized PGA membrane ；IPM)，可容許更寬廣的 pH 值範圍和較高的熱穩定性。此外，經過 40 天儲存 16 次重複使用，仍可保留 99%的殘餘活性；同時，測得固定化 PGA 膜之 V_{max}(9.62 U/g-membrane) 、K_m(16.83 mM) 、活化能 E_a(4.2 kcal/gmol)等動力學參數值。

關鍵詞：盤尼西林醯胺酵素、固定化金屬親和膜、最適化條件、動力學參數。

E-mail:hctseng@tiit.edu.tw Tel:03-4361070#2322 Fax:03-4652040

STUDY THE KINETIC PARAMETERS FOR THE IMMOBILIZATION OF ENZYMES ON THE IMMOBILIZED METAL AFFINITY MEMBRANE

Hui-Chuan Tseng[1], Chih-I Chen[2]

[1] Department of Applied cosmetology, Taoyuan Innovation Institute of Technology, Taiwan.

[2] Department of Energy and Materials Technology, Hsiuping University of Science and Technology

Abstract

The industrial application of penicillin G acylase (PGA) requires efficient methods for immobilizing the enzyme, which yields a biocatalyst with high activity and stability when compared to free PGA. This study constructs the immobilized metal affinity membrane (IMAM) via a series of chemical reactions to sequentially couple 20ml 1.4 M NaOH, 5 ml epichlorohydrin (EPI), 24 ℃, 150 rpm, then immersed in 25ml 1M iminodiacetic acid (IDA), 24 ℃,120 rpm,12 h, and 10ml 100mM copper ions on the regenerated cellulose membrane. The condition of PGA immobilized to IMAM was examined. Under the optimal condition, a copper ion of 75.6 ± 0.3 μmol/disc with a PGA activity of 1.8 U/disc was obtained. The immobilized PGA membrane (IPM) could achieve a broader pH tolerance and higher heat stability. In addition, 99% of the residual activity could be retained via a 16-times repeated use within 40 days of storage. This study also determines the kinetic parameters V_{max}(9.62 U/g-membrane), K_m(16.83 mM), and the energy of activation E_a(4.2 kcal/gmol) for the immobilized PGA membrane.

Keywords: penicillin G acylase; the regenerated cellulose membrane; metal affinity immobilization; chemical reactions; optimum conditions; the kinetic parameters

E-mail:hctseng@tiit.edu.tw Tel:03-4361070#2322 Fax:03-4652040

壹、前言

盤尼西林醯胺酵素(PGA)是生物催化劑，是能夠水解盤尼西林 G (penicillin G ; Pen G)產生 6 -六青黴素酸（6-aminopenicillanic acid ; 6-APA），此為形成半合成 β-內胺類抗生素 (β- lactam antibiotics)的重要中間體。由於 PGA 獨特的結構特性，其具有高特異性，和盤尼西林形成線性醯胺鍵 (linear amide bond)[1]。使用固定金屬親和層析法(immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 於純化酵素和基因重組蛋白質是很成熟技術。由 IMAC 知良好親和吸附劑，固體載體必需鍵結官能基(ligands)，進而牢固吸附固定目標蛋白質，且不會損傷目標蛋白質。目前許多學者嘗試使用 IMAM 系統固定酵素、白蛋白(albumins) 等目標蛋白質，進行分離或純化等工作。本實驗室已成功架構 IMAM，其製備之最適化反應條件: 一片 RC 膜浸泡於 20 ml，1.4 M NaOH，5 ml EPI 溶液，以 24 °C、150 rpm 下，反應 14 h；接著使用 DI water 清洗後，將膜加入 25 ml， 1.0 M IDA，在 120 rpm、24°C 下，反應 12 h，完成 IMAM 膜製備。製備完成之 IMAM 膜有高吸附 1.8 U PGA/disc 之量，這些值高於相關文獻[2-7]之研究結果。固定過程中，它不需特殊純化技術，IMAM 能夠直接固定化蛋白質[8-13]。

在實驗室構建 IMAM 以進行 PGA 純化程序時，有趣地發現到最佳條件下建構 IMAM 膜，它具有顯著 PGA 親和力，這可能是 IMAM 能牢固定 PGA 的原因[11,12]。因為應用一般商業化 IMAC 之結果，會發現使用 IMAC 固定 PGA 效果不令人滿意。另外，在文獻中[9,10]，沒有研究提到關於使用 IMAC 來成功地固定酵素，可能顧慮 IMAC 和蛋白質之間的配位鍵，沒有強大到足以使酵素牢固地結合，進而為長期應用程序。為此問題，我們試圖建構 IMAM 膜，具有較高的金屬離子(Cu^{2+})量，以提供足夠親和力，將 PGA 固定於 IMAM 膜。

因此，本研究將探討 PGA 直接固定在 IMAM 之可行性，固定化 PGA 膜(IPM)的重覆使用性、pH 值範圍和熱穩定性等一系列性質，最佳水解條件和動力參數(V_{max} 和 K_m)也一併研究探討。

貳、材料及方法

一、材料及設備

RCM 膜直徑 47 mm，平均孔徑 0.45 μm，厚度 160μm，面積 17.32 cm^2/disc，

淨重 153 mg/disc（購自 Sartorius，Germany），penicillin G（購自 MDBio，台灣），6-aminopenicillanic acid(6-APA);p-Dimethylaminobenzaldehyde(DAB); Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA) ，epichlorohydrin (EPI)，從 Tedia 公司（購自 Fairfield，OH，USA）; iminodiacetic acid (IDA)（購自 Geel，Belgium）。其他試劑均為分析等級，購自本地供應商。

高速離心機(Z323K，Hermle, Germany）；往覆式恆溫培養箱（SB303, Firstek, Taiwan）；迴轉式恆溫培養箱（OS1500R, Firstek, Taiwan）；UV-VIS 分光光譜儀 (SP-830, Metertek, Taiwan）壓力式破細胞機（one shot, Constant, England）等設備。

二、粗 PGA 酵素液的製備

Escherichia coli 菌株發酵培養，經由 14000×g 離心 20 min(離心機 Z323K，Hermle, Germany），獲得 100ml 粗醱酵 PGA 液。沉澱物用去離子水(D. I. water) 清洗兩次；然後，懸浮液在 lysis buffer（0.1M KH_2PO_4, pH 8.0），超音波處理 12min。再將溶液離心 18000×g 、20min，收集上澄液 [10,14] ，得到粗 PGA 酵素液。

三、 IMAM 製備

RCM 膜先經由一系列化學反應連續將 EPI，IDA 和銅離子耦合修正在膜的表面 [12-16]，被修改的所有的反應在 200 毫升的玻璃瓶中進行。將圓盤形 RC 膜沉浸在包含 10 ml D. I. water，10 ml 1.4 M NaOH, 5 ml EPI，並控制在 24 °C、150 rpm、14h 震盪反應之後，用 D. I. water 潤濕 RCM 膜兩次；接著，放置在 1M IDA（溶在 1M 碳酸鈉溶液），於 24°C、12 h 震盪反應。25ml 、 25mM 硫酸銅溶液反應 1h，螯合 Cu2+，然後利用上述緩衝液（10 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 8.0）潤濕兩次，去除未結合 Cu2+， IMAM 之製備方法如圖 1。

四、分析程序

(一)銅離子分析

IMAM 膜上固定化 Cu^{2+}密度測量，先用 10ml 0.1 M EDTA 溶液清洗 1 h。收集洗滌液，利用分光光度計（Metertek SP-830，Metertech)，在 800 nm 處測定 Cu^{2+} 濃度[11]。

(二)蛋白質濃度測定

利用 Bradford 蛋白檢測方法，用牛血清白蛋白(Bovine serum albumin; BSA)當標準蛋白濃度估計[17]。

(三)酵素活性測定

PGA 活性測定採用 Balasingham *et al* 使用比色法[18]。酵素的活性單位（IU）定義為每分鐘於 37 ℃，pH 值 8.0，生產 1 μmol 6-APA 所需的酵素量。

五、固定化 PGA 之 pH 值和熱穩定性測定

探討固定化 PGA 之 pH 值穩定性，是將固定化 PGA 膜置於 25 ℃、不同 pH 值（3-10）緩衝液 1h 下，然後求得固定化 PGA 活性之最適化 pH 值。殘餘活性是將測試後固定化 PGA 的活性除以最適化反應 pH 值的固定化 PGA 活性，即殘餘活性(%)=(測試後固定化PGA的活性)/ (最適化反應pH值的固定化PGA活性)*100%，並繪製成圖。 固定化 PGA 之熱穩定測試，將固定化 PGA 膜置於不同溫度（18-70 ℃），並求得固定化 PGA 活性之最佳反應溫度及活性。相對活性計算如上述，並繪製對溫度之圖。

參、結果與討論

一、 IMAM 之 Cu^{2+}量對 IPM 的影響

依第貳之三步驟，研究 IMAM 攜帶各種 Cu^{2+}量之 IPM 效果，對 IPM 之活性進行測試，結果如圖 2 顯示。IPM 之活性，隨著 Cu^{2+}量由 23.5 到 59.3 μmol/disc 時，IPM 之活性由 0.6 U/disc 遞增至 1.1 U/disc，當 Cu^{2+}量為 75.0μmol/disc，IPM 達到 1.8 U/disc(圖 2 黑色■之曲線部份)。另外，測試重複使用 8 次之 IPM 殘餘活性效果(如圖 2 紅色●之曲線部份)，由圖 2 之紅色曲線知，IPM 殘餘活性由 14%遞增至 65%。但當 Cu^{2+}量達到 75.0μmol/disc，此時縱使重複使用 8 次，IPM 活性殘餘活性約 100% (仍維持在 1.8 U/disc)。由此知，若 Cu^{2+}量較高時，表示 IMAM 上螯合更多 Cu^{2+}和 PGA 形成較強的親和力鍵，使 PGA 穩定在 IMAM 膜。即當 Cu^{2+}量達到 75.0 μmol/disc，Cu^{2+}會穩定和 PGA 形成強力親和鍵結在 IMAM 上。

二、 pH 值和溫度對 IPM 的影響

進行 pH 值對 IPM 活性影響效應之研究，將溶液 pH 值改變從 3 到 10，實驗

結果如圖 3。由圖 3 發現 IPM 和自由 PGA，兩者具有相同的最適化 pH 值為 pH 8。一般來說，載體固定化酵素後[18]，最適化 pH 值結果，偶爾會改變，如 Cetyl trimethyl ammonium bromide[19]、PEI/SiO_2[20]和 Magnetic microspheres[21] 固定化 PGA，pH 值對 IPM 活性影響效應之曲線，都有稍許改變情形。同樣，在這實驗中，pH 值對 IPM 和自由 PGA 活性影響效應之曲線，出現一些轉變，顯示 IPM 活性降低受 pH 值影響較小。接著探討自由 PGA 和 IPM 之活性對溫度依賴性實驗，結果如圖 4。由圖 4 發現顯示，自由 PGA 和 IPM 不會改變 PGA 的最佳反應溫度（ ≦40℃），但當溫度 ＞40℃，在相同的溫度(50℃、60℃、70℃)下，IPM 活性比自由 PGA 活性更高，而且自由 PGA 活性下降幅度較 IPM 快。因此由 IPM 之溫度曲線，顯示 IPM 比自由 PGA 之活性降低，IPM 受溫度影響較小。

三 、IPM 活性之長期穩定性

探討 PGA 在各種 pH 值和溫度，放置 1 h 後穩定性；設 PGA 活性最高為 100％，測試自由和 IPM 之 PGA 殘餘活性的變化，pH 值影響結果如圖 5。由圖 5 顯示， IPM 之 PGA 在 pH 值 7 和 9 之間穩定，而自由 PGA 只在 pH 值 7 和 8 之間。這顯示 IPM 大大提高 PGA 在鹼性區間穩定性。同樣，溫度影響如圖 6。由圖 6 顯示自由 PGA 和 IPM 之間的熱穩定性差異；在溫度<40℃時，自由 PGA 和 IPM 仍然保持全活性。然而，使用較高的溫度(>40℃)處理，PGA 會發生失活情形。在 50℃時，IPM 殘餘活性保持在 86％，而自由 PGA 只有 71％，這意味著 IPM 具有提高 PGA 活性的熱穩定性。

四、IPM 重複使用性和儲存安定性

儲存 IPM 在 4℃，經過 40 天之儲存安定性實驗，結果如圖 7。由圖 7 顯示 IPM 之殘留活性保留 99％的初始 PGA 活性，這顯示之固定化程序，IPM 儲存具相當高的安定性。另外，對批次或連續式反應器中而言，若固定化酵素具重複使用性，則更具有迫切需求性。進行 IPM 水解反應，測試其重複使用性穩定效果，實驗結果如圖 8。由圖 8 顯示 IPM 經 16 次重複使用後，仍保有 99％初始活性。由實驗結果，IPM 具顯著高穩定儲存和重複使用性，它在工業應用方面，深具可用性。

五、水解動力學

使用不同初始 PG 濃度作為基質，進行自由 PGA 和 IPM 水解反應之間 Michaelis–Menten 動力學研究，實驗結果如表 1。利用 Michaelis–Menten 公式，從雙倒數作圖求得，常數 K_m 和最大反應速度 V_{max}。 IPM 之 V_{max} 值(9.62 U/mg-protein)比自由 PGA (1.23 U/mg-protein)高得多。此 V_{max} 值高，係使用

IMAM 作為支撐材料，執行同一程序內之純化和固定化的效果。這將提供一個非常具體的固定酵素之特異高選擇性。另外，IPM 之 K_m 值(16.83 mM)是自由 PGA (3.71 mM)約 4.5 倍，這表明 IPM 之 PGA 對基質的親和力較低。 K_m 值增加，可能是在固定化程序引起 PGA 結構變化；或者，當基質接近 PGA 活性區時，影響較低[20,21]。PGA 鍵結 IMAM 的活化能（Ea）利用 Arrhenius 方程式求得，如表 1 所列。IPM 之 Ea (4.2 kcal/gmol)是遠低於自由 PGA 的 Ea (7.5 kcal/gmol)，顯示 IPM 進行水解反應時，其能量障礙比自由 PGA 低得多。探討相關研究報告[22,23]，其使用各種載體、載體表面進行官能基(ligands)交聯方法。可發現研究方法，皆採用純 PGA 進行固定化。然而，在本實驗室研究中，由於 IMAM 的特性，粗 PGA 酵素可直接固定化使用，不需經純化步驟處理。同時，那些研究的使用方法，有添加交聯試劑，使載體和 PGA 之間的共價鍵形成，而我們的研究中，連接是由載體和 PGA 之間的配位鏈，沒有額外的試劑，需要在這種情況下。建構 IMAM 方法，有望大規模應用在固定 PGA 產業上。

肆、結論

在此篇研究中，製備 IMAM 讓 PGA 固定化使用。 PGA 活性吸附在 IMAM 為 1.8 U/disc。固定化 PGA 和自由 PGA 相比，其最適化 pH 值和溫度，由圖顯示，固定化 PGA 有較高 pH 值和溫度耐受性。為 IPM 的動力學常數 V_{max} 和 K_m 分別為 9.62 U/mg-protein 和 16.83 mM。而 IPM 的 V_{max} 顯著增強，可能是固定化過程中，IMAM 高選擇性的效果。此外，IPM 進行水解反應之活化能（Ea= 4.2 kcal / gmol）比自由 PGA 低得多，可在同一程序中，利用這種固定方法進行純化和固定化。從本研究結果顯示，IMAM 是一個很有前途的技術。由於 IMAM 易加工和高特異選擇性，這種方法有望成為一個有前途性、替代性，大規模應用在固定 PGA 產業上。

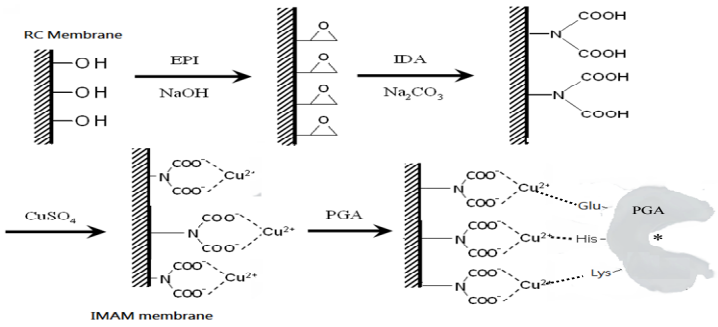

圖 1. 圖示說明 IMAM 的製備及 PGA 固定化,“*” 表示為活化基區域

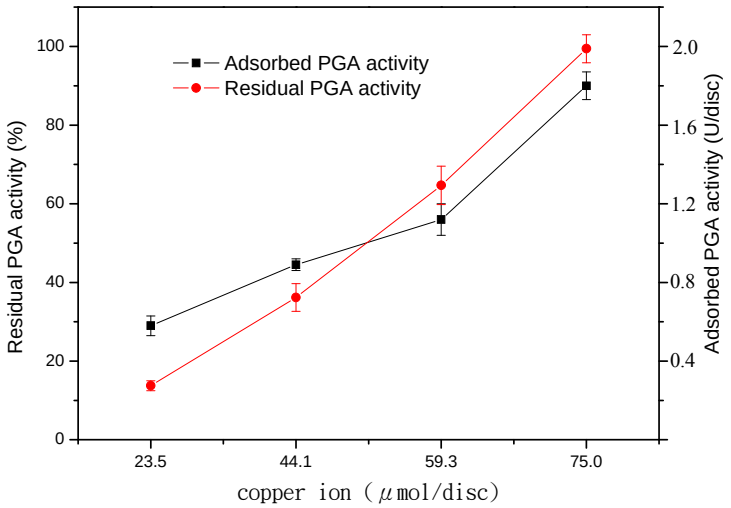

圖 2.螯合不同濃度銅離子之 IPM，重覆 8 次使用的效應

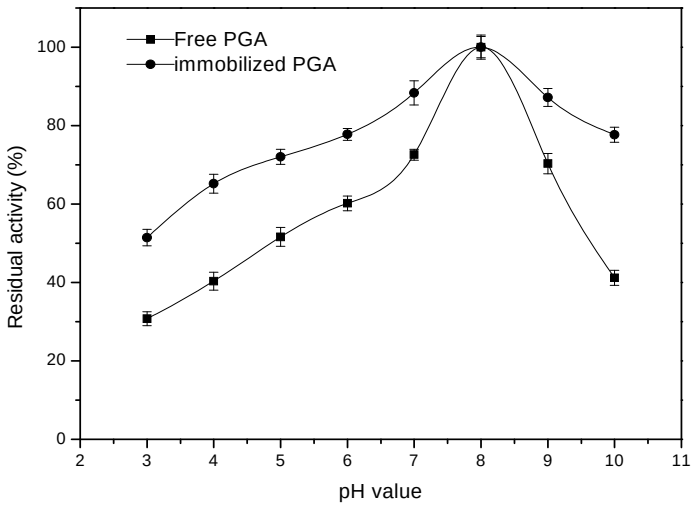

圖 3. pH 對 PGA 活性的影響

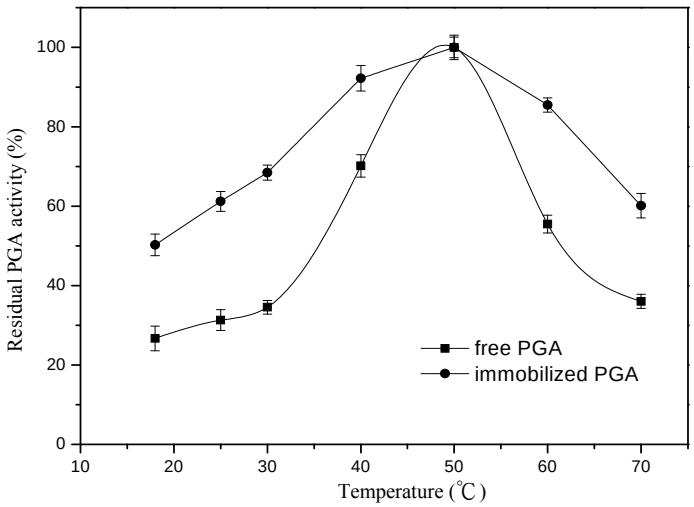

圖 4. 溫度對 PGA 活性的影響

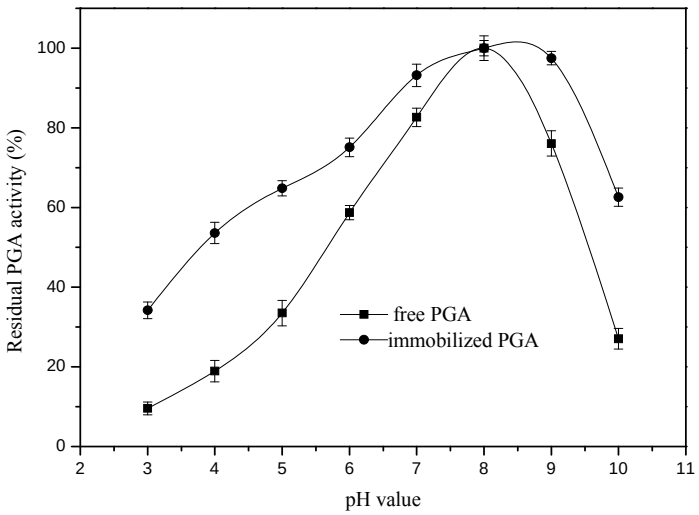

圖 5. pH 穩定性測試.

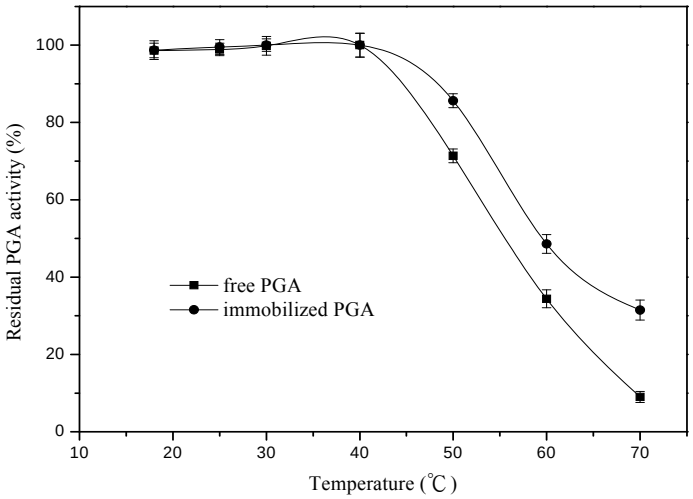

圖 6. 熱穩定性測試

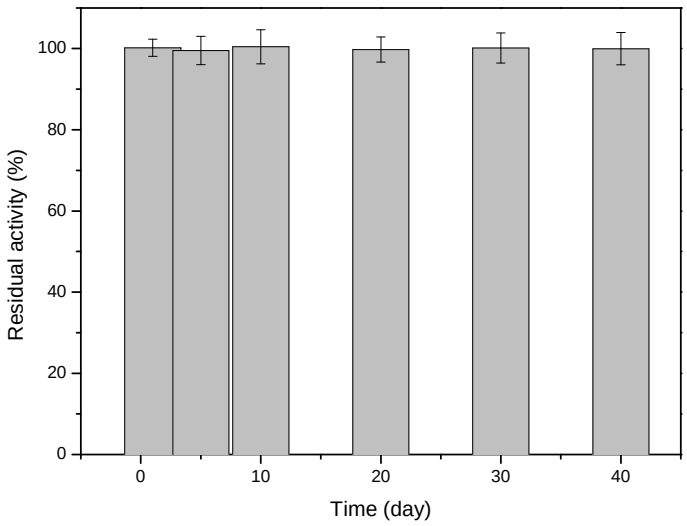

圖 7. IPM 之儲存穩定性測試

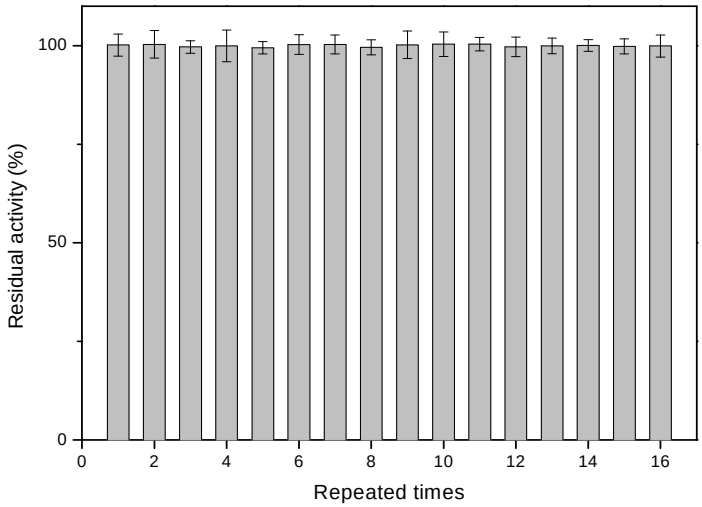

圖 8. IPM 之重複使用穩定性測試

表 1 自由 PGA 和 IPM 之活化能 (E_a) 、 動力學常數(K_m and V_{max})

型態	E_a (Kcal/gmol)	V_{max} (U/mg-protein)	K_m (mM)
自由 PGA	7.5	1.23	3.71
IPM	4.2	9.62	16.83

參考文獻

[1] G. Duan, J.Y. Chen,1996 , “Kinetic analysis of the effects of products removal on the hydrolysis of penicillin G by immobilised penicillin acylase”, Process Biochem 31 , 27–30.

[2] E.J. Vandamme,1983,” Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology”, Enzyme Microb. Technol 5, 403-415.

[3] L.R.B. Gonçalves, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, R.L.C. Giordano,2000,” A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose”, Appl. Biochem. Biotechnol. 84, 931-945.

[4] C. Mateo et al,2000,” Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. the promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkag”e, Biomacromolecules 1 , 739-745.

[5] S. Vancan, et al,2002,” IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems”, Process Biochem 37, 573-579.

[6] S. Gisele, et al,2005,” Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody”, J Chromatogr B 816, 259–268.

[7] C. Mateo, et al,2005, “Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins”, Enzyme Microb. Technol. 37 , 456-462.

[8] R.D. Johnson, et al,1996," Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes", J Chromatogr A 725, 225-235.

[9] C. Mateo, et al,2001, "One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-his-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports", Biotechnol Bioeng 76, 269-276.

[10] V. Fitton, et al,2001," Penicillin acylase purification with the aid of pseudo-affinity chromatography", J Biochem Biophys Methods 49, 553-560.

[11] C.I. Chen, et al,2007," Simultaneous purification and immobilization of penicillin G acylase using bifunctional membrane", J Memb Sci 298, 24-29.

[12] Y.-M. Ke, et al,2010, "Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies", Process Biochem 45, 500-506.

[13] H.L. Hu, et al,2006,":Purification of VP3 protein of infectious bursal disease virus using nickel ion-immobilized regenerated cellulose-based membranes", J Chromatogr B 840, 76-84.

[14] J. Sanchez, et al,2001, "Efficient two-step chromatographic purification of penicillin acylase from clarified Escherichia coli ultrasonic homogenate", J Chromatogr B 753, 45-50.

[15] N. Kubota, et al,1996," Recovery of serum proteins using cellulosic affinity membrane modified by Immobilization of Cu2+ Ion", J Appl Polym Sci Symp 62 , 1153-1160.

[16] Y.C. Liu, et al,2003," Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes", J Chromatogr B 794, 67-76.

[17] M.M. Bradford, et al,1976 ," A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal Biochem 72, 248-254.

[18] K. Balasingham, et al,1972," The isolation and kinetics of penicillin amidase from Escherichia coli", Biochim Biophys Acta 276, 250-256.

[19] S. Cheng, et al,2006," Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from alcaligenes faecalis using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde", Biotechnol. Lett., 28, 1129-1133.

[20] B. Gao, X. Wang, Y. Shen,2006," Studies on characters of immobilizing penicillin G acylase on a novel composite support PEI/SiO2", Biochem. Eng. J., 28, 140-147.

[21] J. Huang, et al,2008," Immobilization of penicillin G acylase on poly[(glycidyl methacrylate)-co-(glycerol monomethacrylate)]-grafted magnetic microspheres", Macromol. Biosci., 8