

饋料式酵素復性之研究

計劃編號：NSC 90-2214-E-002-002

執行期限：自民國 90 年 8 月 1 日起至民國 91 年 7 月 31 日

主持人：劉懷勝教授 國立台灣大學化學工程研究所

計劃參與人員：張哲魁

計畫摘要：

在蛋白質復性(Renaturation)過程中，高酵素濃度下所產生聚集效應，是導致復性效率降低的最主要原因，而大幅降低酵素濃度是減少聚集體產生最直接方法。但欲獲得高活性回收率，往往需使用大量復性緩衝液，此法將造成操作成本之浪費以及增添產品在後續回收程序之困難。而饋料式復性法即利用一微量幫浦(micro-feeder pump)將失活蛋白質緩慢滴入復性緩衝液進行復性，因失活蛋白質滴入復性緩衝液後，除了稀釋變性劑濃度使蛋白質開始進行摺疊(Refolding)外,亦降低蛋白質在復性緩衝液內之濃度，避免蛋白質易在高濃度復性所發生聚集效應，故最終能提升其最終活性酵素濃度。因此饋料式復性法具有操作簡單且無須大量復性溶液及冗長操作時間即可達到高活性，高濃度回收率產品，可謂最符合經濟效益之方法。故本研究及利用此復性方式，找出其最適化之操作策略，以達到高活性、高濃度及高產率之目標。

計畫目的與背景：

隨著生物科技的進步，基因技術的發展，可以把基因重組至微生物宿主上，讓微生物大量繁殖，再將其分離純化，可以大量的生產我們所需的蛋白質，來取代早期由特定生物中分離相關蛋白質的方法。但當蛋白質在微生物體內進行複製時，則可能因蛋白質過度表現之結果，導致在細胞內形成了不具活性的內聚體(inclusion body)，或是在細胞外形成聚集體(agggregation)。此時所得到的蛋白質並不具有活性。為恢復蛋白質原有之活性，必須先將內聚體自宿主細胞分離出來，再以變性劑加以溶解。變性劑雖能將內聚體溶解，但其亦會破壞蛋白質的完整結構，致使原本大部份隱藏在分子內部且主要穩定三級結構之疏水性區域大量暴露於溶液中，使之成為缺乏生物活性且無特定立體結構(random coil)之多胜? 鏈，此過程稱之為「變性」。但為使蛋白質恢復其應有之活性，我們可將變性劑的濃度降低或移除變性劑，致使破壞分子間作用力之力量消失，蛋白質

即開始重新摺疊回來，而把這些變性劑移除或降低濃度以恢復蛋白質活性的方法，我們稱之為「復性」。

在復性過程中，若蛋白質濃度過高，則容易因不同多胜? 鏈間疏水性區域之相互作用而產生聚集體 (aggregates) 或錯誤的摺疊 (misfolding)【Hevehan et al.,1997】，故採以大量的復性溶液以稀釋蛋白質之濃度是減少聚集體產生的最簡單方法【Batas and Chaudhuri , 1996 ; Thatcher and Hitchcock , 1994】。但大量復性溶液的使用不但不符合經濟成本，且對於產品後續之回收與純化仍需有待克服與解決。因此，如何減少復性溶液用量以節省操作成本並提高蛋白質操作濃度以達到高活性，高濃度回收率之目標是近年來多位研究家致力研究之課題【Hagen et al.,1990 ; Maeda et al.,1995 ; West et al.,1998】。但如果能以最有效率且最符合經濟成本之復性程序達到上述之成果並進而發展至大規模製程上，此將會是復性技術上之一大進步。

饋料式復性法是將失活蛋白質緩慢滴入於復性液中復性，因此在復性過程中可保持在低酵素濃度下進行復性，故可能減低聚集體之生成，且提供足夠時間讓蛋白質分子自行摺疊，因此不但易得到高活性回收率及高濃度之產品外，又可減少復性劑所需體積及成本。根據 Katoh 等人【1997】以稀釋法復性所得實驗結果發現，於失活蛋白質中加入未失活蛋白質，其並未影響失活蛋白質之復性結果。由此可知，未失活或已完成摺疊蛋白質由於其疏水性區域未裸露在外，故不會與正在進行摺疊蛋白質分子發生聚集反應。因此，使用低流速條件下之饋料法復性可妥善處理每滴入復性緩衝液之失活蛋白質。所以，此方法復性不但可大幅減少聚集體產生，亦不需使用大量復性緩衝液即可得到高活性回收率之產物，且實驗裝置及操作方法較其他復性方式來的便宜、簡單許多，可謂是最符合經濟效益之方法。

研究方法：

1. 饋料式復性法實驗裝置：

本實驗所採用之蛋白質復性裝置如圖一所示。此系統是藉由微量之 HPLC 幫浦（最大輸送量為 10 ml/min）將自裝有失活蛋白質之載盛器中抽取出已完全失活之蛋白質，以低流速條件下緩慢滴入復性緩衝液中進行復性反應。

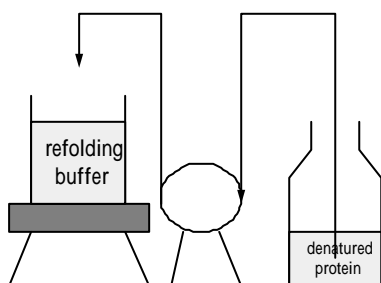


Fig.1 饋料式實驗裝置簡圖

2. 實驗步驟：

(1) 蛋白質變性程序：取適量蛋白質，置入於含 8M 尿素 0.01M DTT 及 1mM EDTA 之 0.1M, pH8.6, tris-HCl 緩

衝液中變性。靜置室溫下 24 小時。

- (2) 蛋白質復性程序：將完全失活蛋白質，依實驗之設計，以不同流速逐漸滴入於 3mM GSH、0.3mM GSSG (reduced and oxidized glutathione) 及 1mM EDTA 之 0.1M, pH8.2, tris-HCl 復性緩衝液 30ml 中，持續 60 分鐘 每 10 分鐘取樣測復性程度。
- (3) 活性測定方式：將基質配置於磷酸緩衝液(pH 6.2)中，取 40 μ l 酵素液置入 2.5ml 基質液中，在可見光 450nm 下測吸收值，其單位活性為每單位時間吸收值的下降量。
- (4) 蛋白質濃度校正：使用紫外光 280 nm(UV280)測其酵素濃度。

結果與討論

1. 低失活酵素濃度下，進料流速對溶菌？復性之影響

為了先單純探討流速對溶菌？復性效率的影響，且避免高濃度而產生聚集效應。故先以低酵素濃度 0.5mg/ml 進行實驗。Fig.2 表示不同流速下，所導致不同復行結果。由圖中可知，較高流速 0.3 或 0.5 ml/min 並無法有效提升其復性結果，且滴入時間至 20 分鐘後，復性效率有明顯下滑之趨勢，唯在 0.1 或 0.05 ml/min 低流速下，才有較穩定且高活性回收率之復性結果。其主要原因在於高流速下，已失活之蛋白質並無法在有效時間內摺疊至原本立體之結構，部分裸露的疏水性區域即與下一滴所含失活蛋白質之疏水性區域發生聚集反應，但在低流速下，有較充裕之時間提供失活蛋白質摺疊至原有之構型，故有較佳的復性表現。

2. 低失活酵素濃度下，復性緩衝液所含尿素濃度對復性行為之影響

在復性緩衝液中配置 1.5 M 及 2.0M 不等之尿素濃度，並在不同流速下 (0.05, 0.1 ml/min), 分別探討不同尿素濃度對復性效率

所造成的影響。實驗結果如 Fig.3 (a), Fig.3 (b) 所示。由結果顯示，無論以高流速或低流速條件下復性，其活性回收率皆會隨著復性緩衝液中所含尿素濃度之增加而降低。由此可知，在低溶菌? 濃度下復性，低濃度變性劑雖然可防止聚集體產生，但其亦會破壞失活溶菌? 重新摺疊。因此，低濃度變性劑雖然具有防止聚集體產生之能力，但在低酵素濃度下復性時，由於聚集效應不明顯，故反而突顯變性劑破壞酵素結構之能力。

3. 高失活酵素濃度下，復性緩衝液所含尿素濃度對溶菌? 復性之影響

鑒於低進料流速操作有助於溶菌? 復性效率的提升。故後續探討皆以低流速 0.05 ml/min 進行實驗，並將失活溶菌? 之初始濃度由原本 0.05mg/ml 提高至 5 mg/ml 及 10 mg/ml，以探討濃度效應對復性效率之影響。並以此高酵素濃度下，探討復性劑中尿素濃度 (0 M, 1.5 M) 對復性效率之影響。所測得酵素活性對時間關係如 Fig.4 所示。實驗結果發現，失活溶菌? 濃度為 0.5 mg/ml 時，因為濃度效應不明顯，故以低流速為操作條件時，可降低聚集反應發生，因此有較佳復性表現；但復性效率會隨著初始濃度之增加而降低，即活性回收率由初始濃度為 5 mg/ml 所表現出約 50 % 下降至初始濃度為 10 mg/ml 之 20 %；但經 24 小時後，5 mg/ml 之復性效率由原本 50 % 提升至 102 %，而 0.5 mg/ml 之復性效率由原本 70 % 亦提升至 93 %，此結果可證明以饋料式復性的確降低可能因濃度效應所產生聚集效應。

此外，由 Fig. 4 結果可觀察到，復性劑中含有低濃度尿素有助於高濃度溶菌? 復性效率提升，不含尿素會促使聚集體生成。將此結果與先前曾探討以饋料式在低溶菌? 濃度下，尿素濃度對復性效率之影響互相比較，發現復性緩衝液中的尿素於不同高低酵素濃度下，有相反的表現。其主要原因在於低酵素濃度下，聚集效應並不明顯，尿素對

酵素分子結構所產生破壞效應遠大於聚集效應，因此尿素存在不利於復性；相反地，在高酵素濃度下，由於濃度效應明顯，可突顯尿素破壞多肽鏈間疏水性作用力互相作用，因此可減少聚集體生成而提高其復性效率。綜觀上述結果，我們將對於低酵素濃度之復性，採取不加任何尿素為手段；但在高酵素濃度下復性，則在復性緩衝液中加入低濃度尿素以提高其復性結果。

4. 高失活酵素濃度下，饋料式與稀釋復性法對復性效率之比較

Fig. 5 表示在相同最終酵素濃度下，分別以饋料式及批次法復性所得活性回收率之比較。由圖中結果可明顯觀察到以饋料式復性比傳統稀釋法之復性效率高出許多。由此可知，饋料式已能有效解決傳統批次法中復性不佳之問題。

結論

在本研究中，由於低流速條件下之饋料式復性法能將注入蛋白質分子維持在低酵素濃度環境下行摺疊反應，故減少聚集反應之發生，且提供足夠之時間使蛋白質分子產生有效之摺疊，故在某種程度上已有效的達到高活性回收率之結果，的確解決了一般復性方法中，大量復性緩衝液之使用造成操作成本上之浪費以及復性程序之繁瑣與成本昂貴等問題。

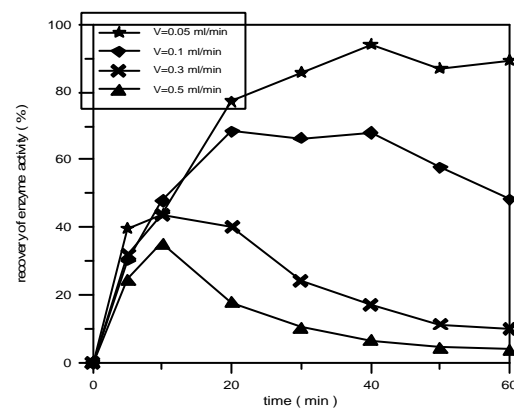


Fig.2 在低酵素濃度下 (0.5 mg/ml)，不同流速對溶菌? 復性結果之影響

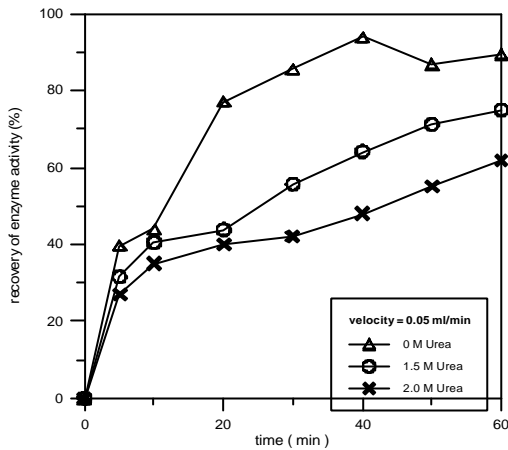


Fig. 3 (a) 初始酵素濃度為 0.5mg/ml，流速為 0.05ml/min 下，不同尿素濃度對復性效率之影響

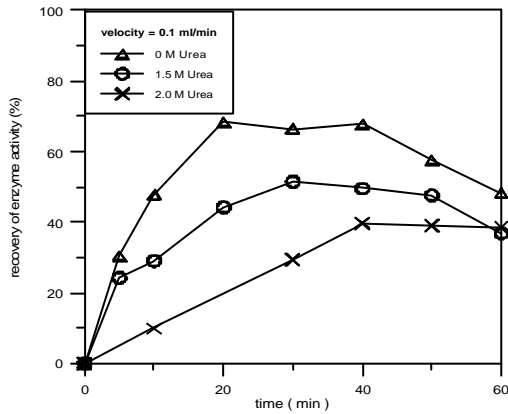


Fig. 3 (b) 初始酵素濃度為 0.5mg/ml，流速為 0.1ml/min 下，不同尿素濃度對復性效率之影響

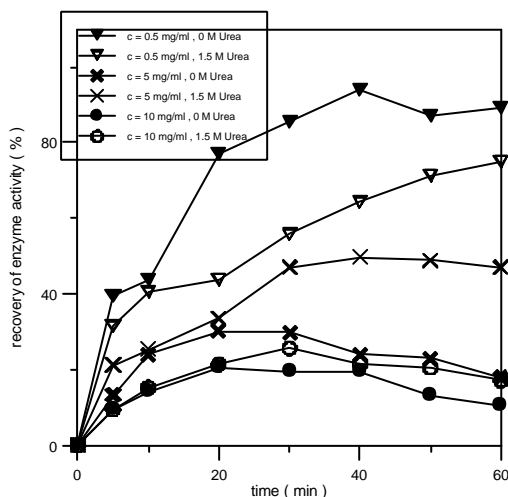


Fig. 4 以饋料式復性法，探討在流速 0.05ml/min 下，酵素濃度及尿素濃度對復性回收率之影響

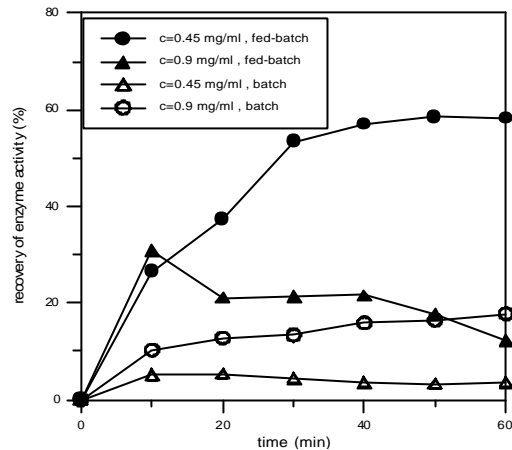


Fig. 5 饋料式與稀釋法在不同最終酵素濃度下 (0.45, 0.9 mg/ml) 所得復性效率之比較。

參考文獻：

- [1] Batas, B., Chaudhuri, J. B., *Biotechnol. Bioeng.*,50,16-23, (1996)
- [2] Fischer, B., Perry, B., Sumner, I., Goodenough, P., *Protein Eng.*,5,593-596 (1992)
- [3] Hagen, A. J., Hatton, T. A., Wang, D. I. C., *Biotechnol. Bioeng.*,35,955-965 (1990)
- [4] Hevenhan, D. L., Clark, E. D. B., *Biotechnol. Bioeng.*,54,221-230 (1997)
- [5] Katoh, S., Sezai, Y., Yamaguchi, T., Katoh, Y., Nohara, D., *Process Biochemistry*,35,297-300, (1999)
- [5] Katoh, S., Terashima, M., Kishida H., Yagi H., *J. Chem. Eng. Jpn.*,30,964-966 (1997)
- [6] Maeda, Y., Koga, H., Ueda, T., Imoto, T., *Protein Eng.*,9, 461-465 (1996)
- [7] Maeda, Y., Koga, H., Ueda, T., Imoto, T., *Protein Eng.*,8, 201-205 (1995)
- [8] West, S.M., Chaudhri, J. B., Howell, J. A., *Biotechnol. Bioeng.*,57,590-599, (1998)