

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

週期式饋料蛋白質復性及其反應動力學最適化研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2214-E-002-032-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：劉懷勝

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 15 日

週期饋料復性法對溶菌 復性行為之研究

高敏展 張哲魁 劉懷勝*

國立台灣大學化學工程研究所

(NSC 91-2214-E-002-032)

一、摘要

本實驗主要在探討週期饋料 (Periodical fed-batch) 復性方法的可行性，藉由實驗觀察溶菌酶再摺疊的可能機制，並嘗試改變操作條件找出最佳操作策略。週期饋料的優點在於其不但能控制失活蛋白質注入復性緩衝液之時間，使其注入之時間間隔能足以供給蛋白質分子達完全摺疊，且亦能將注入失活蛋白質皆保持在低濃度的狀態下復性，故不但大幅降低聚集體的產生亦提升其最終高活性酵素濃度；故根據實驗結果，採以週期饋料復性方法能將最終酵素濃度為 0.45 g/l 時，溶菌 復性程 75%，相較於以饋料式復性所得提效率高出 6-9%。

升

二、前言

利用微生物的培養來生產蛋白質，技術已相當成熟，然而蛋白質大量地被製造出來，容易導致在細胞體內產生內聚體 (inclusion body)。一般而言，欲從內聚體中得到具活性的蛋白質需採三步驟：內聚體之純化，內聚體之溶解以及溶解蛋白質之復性【1】。雖然前二步驟可獲得極高之效率，但復性效率卻易因蛋白質之錯誤摺疊或蛋白質濃度過高所導致聚集體的產生而大幅降低。故如何在高濃度條件下降低聚集體之生成進而提高復性效率是現今重要研究課題。而採以大量的復性溶液以稀釋蛋白質之濃度 (即：批次稀釋法) 是減少聚集體產生的最簡單方法【2、3】；然而，低濃度的回收率仍是首要克服瓶頸之一。

以連續饋料 (Continuous fed-batch) 操作來進行復性，主要是針對批次稀釋法中將失活蛋白質直接注入於復性緩衝液中，容易造成大量聚集體 (aggregate) 之缺點，改由逐漸滴入的方式，來避免產生大量的聚集反應，所以連續饋料與批次稀釋法最大的不同就在於進料的方式，而連續饋料操作是利用一微量幫浦 (micro-feeder pump) 緩緩將失活蛋白質加至復性緩衝液中，在 Katoh 和 Katoh 的連續饋料實驗中【4、5】，發現比批次稀釋法活性高了 10%。同樣地，針對直接稀釋法

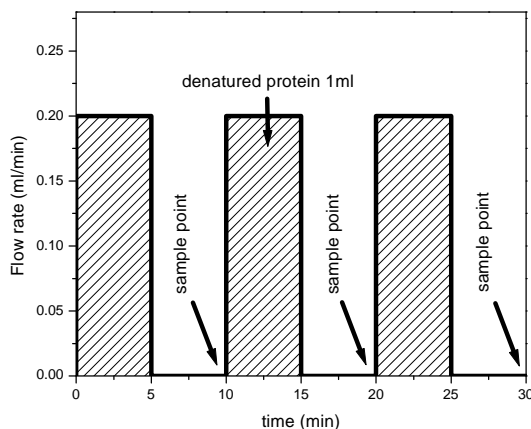
會產生大量的聚集反應的缺失，將其做改良的除了饋料式之外還有間歇法【6】。間歇法所採取的方式也類似饋料式，也是改變進料方式，將失活蛋白質量分次注入，來減少高濃度下所造成的聚集反應，其優點在於可依照蛋白質摺疊特性，控制失活蛋白質注入間隔，藉以提供蛋白質充份的摺疊時間，所以使用間歇法復性間隔時間的多寡就顯得非常重要【7】。

在了解連續饋料和間歇法復性的優劣後，得知連續饋料的優點在於在短時間內就有不錯的回復活性，所以有高產率的回復能力；間歇法具有高活性回收率，但相對地所花的時間就較多，綜合以上兩方法，嘗試著將兩者合而為一，期望能夠同時具有高活性、高產率的方式，所以產生了週期饋料【7】的復性方式，週期饋料是以連續饋料為進料方式，不過待進料滴入一段時間後，改採靜置不再滴入失活蛋白質的方式，就如同間歇法般，一段時間後再次滴入失活蛋白質，其後再靜置，如此反復的滴入與靜置稱之為週期饋料。本實驗就針對流速、間隔時間、滴入頻率的不同來探討其對復性的影響，進一步的找出週期饋料的最佳操作條件。

三、實驗與方法

1. 週期饋料復性法：

藉由微量 pump 將自裝有變性蛋白質之載盛器中抽取出已完全變性之蛋白質，以低流速條件下 (0.2, 0.1 及 0.05ml/min) 緩慢滴入復性緩衝液中 (3mM GSH、0.3mM GSSG、1mM EDTA 之 0.1M, pH8.2, tris-HCl) 進行復性反應，待進料滴入一段時間後，改採靜置不再滴入失活蛋白質，此進料的滴入與靜置反覆進行。其操作方式如圖一所示。舉流速 0.2 ml/min 為例，斜線面積下為所滴入失活蛋白質的量，總量為 3ml，所以每一週期共滴入 1ml，之後靜置一段時間，靜置的時間隨實驗需要而改變，圖中為每週期靜置 5 分鐘，並在每週期的結束前取樣



圖一、週期式饋料復性，流速為 0.2ml/min，以 10 分鐘為一週期，共有三個週期，週期的前 5 分鐘滴入失活蛋白質，後 5 分鐘靜置。

為了簡明描述其操作方法，我們採符號之方式 (如下所示) 以描述其流速、進料滴入時間、靜置時間與週期數。

$$[\underset{\text{velocity}}{0.2 \text{ ml/min}} \times \underset{\text{feeding time}}{5 \text{ min}} - \underset{\text{stand}}{0 \text{ ml/min}} \times \underset{\text{standing time}}{5 \text{ min}}] \times \underset{\text{number of period}}{3 \text{ cycle}}$$

2. 蛋白質變性程序：取適量的的蛋白質，置入於含 8M 尿素、0.01M DTT 及 1mM EDTA 之 0.1M, pH8.6, tris-HCl 變性緩衝液中。靜置在室溫下 24 小時。

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 450 nm 下測吸收值，其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。

四、結果與討論

1. 在相同操作時間下，改變實驗的週期對復性的影響

以流速 0.05ml/min 為例，在總滴入時間與總靜置時間相等的情形下，利用不同的週期數 (圖二) 來比較最終的回復活性實驗中，發現大致上低週期數和高週期數的復性效果皆不佳 (圖三)，以週期數三的結果比較好 (流速 0.2, 0.1ml/min 亦有此相同之結果)。其原因在於，在低週期數下，每週期滴入的蛋白質量過多，濃度太高形成聚集反應的機率大增；反觀在高週期數下因靜置時間較短，並不足以讓它摺疊至穩定的狀態，在尚未完全摺疊之前下個週期的失活蛋白質又繼續滴入，如此會造成大量的聚集反應，由此可觀察出高週期數的週期饋料操作因靜置時間極短，和連續饋料操作具有相同的缺點也使得復性效果不佳，所以往後的實驗基本上以三週期的操作為主。

2. 在相同靜置時間條件下，比較不同流速對週期饋料復性的影響

以靜置時間在 30 分鐘為例，流速為 0.2, 0.1ml/min 下，復性曲線趨勢皆趨於平緩 (圖四)，但流速為 0.05ml/min 時其復性曲線仍有往上昇的趨勢，由此可證明蛋白質的摺疊速度和流速有關；即在高流速下，蛋白質的摺疊速度較低流速來的快，故在靜置時間較短的情形下趨勢趨於平緩。而低流速需較長的靜置時間才能讓蛋白質摺疊完全。此外，雖然在相同靜置時間條件下，不同的流速對於其復性趨勢具有很大的影響，但其最終的回復活性卻相同 (在相同操作時間下)。顯然在不同流速下欲達到較穩定的摺疊結構，其所需要的靜置時間亦會有所不同。對於高流速所需的靜置時間較短，推測可能在實驗中滴入失活蛋白質時，因流速較快，每次所滴入的失活蛋白質一接觸復性緩衝液時即開始進行摺疊，並和原本在復性緩衝液

中摺疊尚未完全的蛋白質相互碰撞，所以在瞬間就造成聚集反應，故扣除已聚集的蛋白質，在復性緩衝液中進行摺疊蛋白質濃度較低，因此在靜置期間，部份摺疊的蛋白質 (partially refolded protein) 相互碰撞的機會降低，摺疊速率較快，故所需的靜置時間較短；反之，在低流速時，失活蛋白質並不會立即就形成聚集體，故在靜置期間部份摺疊蛋白質濃度較高，相互碰撞的機會也就因此增高，所以就需有更多的時間來讓部份摺疊蛋白質摺疊至正確的立體構形，且由最終的回復活性來看高低流速復性的結果差距並不大，可知低流速在開始時雖然聚集的現象並不多，但在摺疊的過程中因部份摺疊蛋白質的相互碰撞形成的聚結體，也損失不少蛋白質，導致最終活性沒有太大差別。所以在本節中發現高流速和低流速導致蛋白質聚集的機制並不相同，高流速的聚集反應在失活蛋白質滴入時發生，低流速發生在靜置期間，蛋白質進行摺疊所造成。

3. 在相同流速下，不同靜置時間對復性的影響

在上節中，利用相同的靜置時間比較不同流速下的復性結果，得知靜置時間對蛋白質的摺疊有極大的影響；期望能更進一步了解靜置時間和流速間的關係，所以在固定流速的情形下，藉由改變每週期的靜置時間，以觀察其復性的結果。由實驗結果可知 (data not shown)，不同流速下欲達較穩定摺疊所需之靜置時間分別為：流速 0.2 ml/min，每週期靜置 20 分鐘；流速 0.1 ml/min 每週期靜置 30 分鐘；流速 0.05 ml/min 每週期靜置 60 分鐘。

4. 週期饋料最佳化操作

針對最終酵素濃度為 0.45 g/l，可依照其靜置時間來設計，其概念為高流速所需的靜置時間短；低流速的靜置時間長，所以在實驗中，如圖五所示：第一週期以低流速 0.05 ml/min 進行；第二週期以流速 0.1 ml/min；第三週期改以流速 0.2 ml/min，

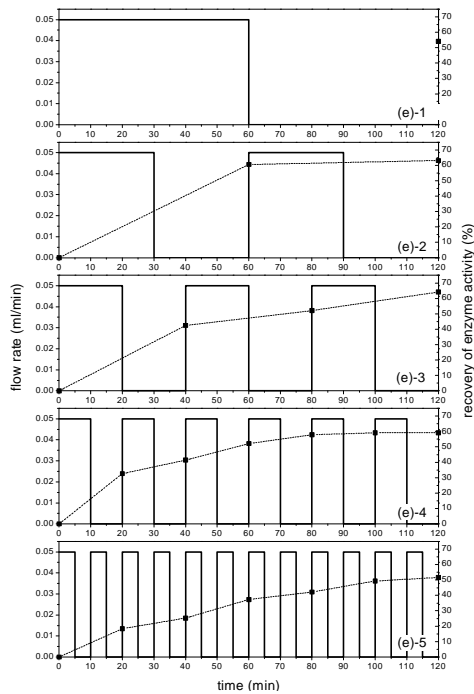
依此操作的結果回復活性有 75% (圖五)，相較於靜置時間為 30 分鐘，操作三週期的結果最終活性高出 6~9% (0.2 ml/min 操作下活性 69%；0.1 ml/min 操作下活性 67%；0.05 ml/min 操作下活性 65%)。

五，結論

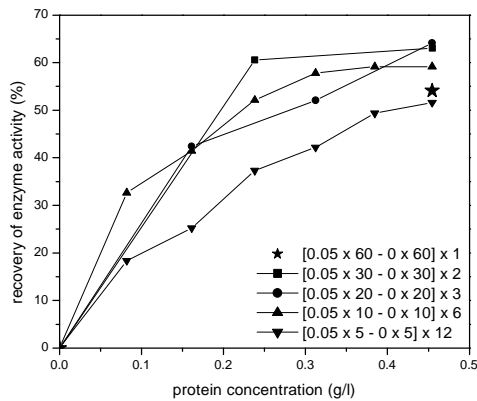
在本研究中，由於週期式饋料復性法能將注入蛋白質分子維持在低酵素濃度環境下行摺疊反應，故減少聚集反應之發生，且適當的提供靜置時間使蛋白質分子產生有效之摺疊。因此在某種程度上已有效的達到高活性回收率之結果，解決部分因濃度效應所產生聚集之問題。

六，參考文獻

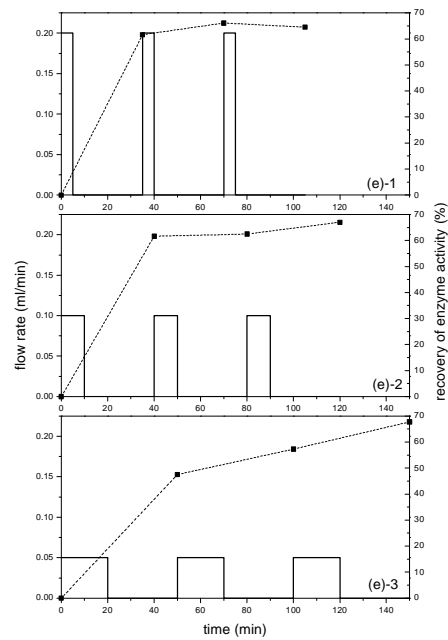
1. Clark E. D. B. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 202-207, (2001)
2. Batas, B.; Chaudhuri, J. B., *Biotech. Bioeng.* 50, 16-23, (1996)
3. Thatcher, D. R.; Hitchcock, A. *In Mechanism of Protein Folding*; Pain, R. H., Ed.; IRL Press: Oxford, U. K., 229-261, (1994)
4. Katoh S, Terashima M, Kishida H, Yagi H. J. *Chem. Eng. Jpn.* 30, 964-966, (1997).
5. Katoh S, Sezai Y, Yamaguchi T, Katoh Y, Yagi H, Nohara D. *Process Biochem.* 34, 297-300, (1999)
6. Fischer, B., Perry, B., Sumner, I., Goodenough, P. *Protein eng.* 5, 593-596.
7. 張哲魁 “饋料式與間歇式復性法對溶菌 復性行為之研究” 台灣大學碩士論文 (2001)



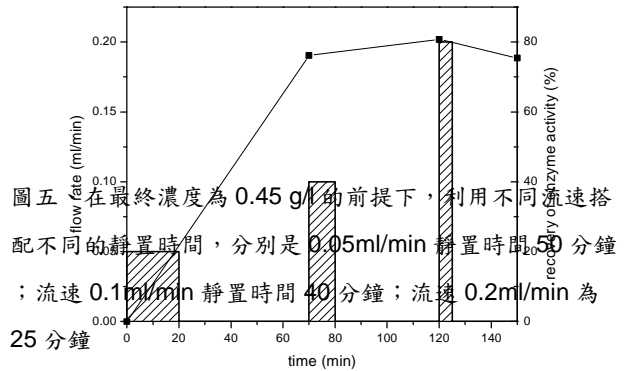
圖二、週期饋料之操作方式。(e)-1 $[0.05 \times 60 - 0 \times 60] \times 1$;
 (e)-2 $[0.05 \times 30 - 0 \times 30] \times 2$; (e)-3 $[0.05 \times 20 - 0 \times 20] \times 3$;
 (e)-4 $[0.05 \times 10 - 0 \times 10] \times 6$; (e)-5 $[0.05 \times 5 - 0 \times 5] \times 12$ 。



圖三、以週期饋料來進行復性，操作方式在流速同為 0.05ml/min、操作時間為 120 分鐘下，比較不同週期數對復性的影響。



圖四、以週期饋料法，在相同靜置時間 20 分鐘下比較不同週期數對復性的影響。操作方式分別為 (e)-1 $[0.2 \times 5 - 0 \times 20] \times 3$ (e)-2 $[0.1 \times 10 - 0 \times 20] \times 3$ (e)-3 $[0.05 \times 20 - 0 \times 20] \times 3$



圖五、在最終濃度為 0.45 g/l 的前提下，利用不同流速搭配不同的靜置時間，分別是 0.05ml/min 靜置時間 50 分鐘；流速 0.1ml/min 靜置時間 40 分鐘；流速 0.2ml/min 為 25 分鐘

Operation method	Operation time (min)	Recovery of enzyme activity (%)
Flow rate profile A	150	75
$[0.2 \times 5 - 0 \times 30] \times 3$	105	69
$[0.1 \times 10 - 0 \times 30] \times 3$	120	67
$[0.05 \times 20 - 0 \times 30] \times 3$	150	65

表一、在最終濃度為 0.45g/l 下（總量 3ml、5g/l 的失活蛋白質加入 30ml 的包含 1.5M 尿素的復性緩衝液中），比較不同週期饋料操作的實驗結果。