

新型離子交換奈米纖維薄膜應用於溶菌酶之純化程序

Application of New Type Ion Exchange Nanofibrous Membrane in Purification Process of Lysozyme

張煜光^{*1}(30%)、林冠宇¹(30%)、鄭幸宜¹(40%)、李宏哲²、黃政強²、徐啟光³
明志科技大學生化工程技術研發中心¹、鴻隼企業有限公司²、群育科技有限公司³
Y. K. Chang^{*1}、G. Y. Lin¹、H. I. Cheng¹、H. C. Lee²、C. C. Huang²、M. Hsu³
Biochemical Engineering R&D Center, Ming Chi University of Technology¹
Falco Co. Ltd²
Chemist Scientific Corp.³

摘要

本研究利用靜電紡絲製程與表面改質接枝技術，成功製備高密度羧酸基團奈米纖維離子交換薄膜。首先將聚丙烯腈(polyacrylonitrile, PAN)奈米纖維薄膜經過 NaOH 處理(3M, 85°C, 25 min)，以製成弱陽離子交換膜(即 P-COOH)，然後在再經由乙二胺(EDA)和溴乙酸(BrA)反應，成功開發出具有比 P-COOH 膜材更高密度羧酸基團的 P-BrA 膜材。在本研究中，選取雞蛋白溶液中的溶菌酶作為目標酵素，將兩種離子交換薄膜結合自行研發設計的薄膜吸附反應器，利用薄膜層析技術探討不同 pH 值、雞蛋白濃度、操作流率及氯化鈉沖提濃度對溶菌酶吸附及脫附效率之影響。實驗結果顯示，P-COOH 與 P-BRA 二種膜材可從新鮮雞蛋白中直接純化分離出高純度溶菌酶，其整體溶菌酶回收率與蛋白質純化效果分別為 73.60%與提升 20.36 倍及 100.53%與提升 402.39 倍。將純化後所獲得溶液，利用蛋白質電泳 SDS-PAGE 來確認所純化產物，本研究證實利用新型高密度離子交換 P-BrA 薄膜可從雞蛋白溶液中分離純化出高純度的溶菌酶，遠優於 P-COOH 薄膜。最後，試量產設備建構及相關評估亦同時說明。

關鍵字：新型離子交換奈米纖維薄膜、溶菌酶、雞蛋白、純化程序

Abstract

In this study, the highly acidic carboxyl groups on the nanofibrous membrane have been successfully prepared by combining electro-spinning technique and surface modification by grafting technique. The polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membrane was firstly hydrolyzed by alkaline solution (3 M NaOH at 85°C, 25 min). The synthesized weak ion exchange membrane (namely P-COOH) was then functionalized with ethylenediamine (EDA) and bromoacetic acid (BRA), sequentially. This modified ion exchange membrane (namely P-BrA) has more acidic groups as compared to the P-COOH membrane. In this work, lysozyme obtained from the chicken egg white (CEW) was chosen as a target enzyme. The newly designed membrane bioreactor equipped with P-COOH and P-BrA

membranes. The adsorption and elution performances for lysozyme were assessed by measurements of breakthrough curves in membrane chromatography under various conditions (e.g. pH, CEW concentration, flow rate, and NaCl concentration). The experimental results showed that P-COOH membrane exhibited 73.60% of lysozyme activity recovery with a 20.36-fold purification, while P-BRA showed 100.53% of activity recovery with a 402.39-fold purification. The higher purity of lysozyme obtained from CEW by P-BrA membrane chromatography was confirmed by SDS-PAGE analysis, as compared to the P-COOH membrane. Finally, we also introduced the established electrospinning facility for trial production and the evaluation of mass production.

Keywords : New type ion exchange nanofibrous membrane, lysozyme, chicken egg white, purification process

前言

生物技術突飛猛進，日新月異，已被公認為二十一世紀最具發展潛力之科技。而其應用範圍涵蓋醫學、食品、特用化學品、環保、能源等工業，為人類帶來相當多的福祉。近年隨著能源耗竭、糧食短缺等全球趨勢問題，使得生物產業之發展更受重視，而這些醫藥、食品等生物產品在生產製程上，為達到高純度且快速大量生產的目標，分離純化技術的優劣將扮演非常重要的角色，嚴重影響生產成本的高低，因此發展具新穎性分離純化技術的研究備受重視。其中，填充床管柱層析(**packed bed chromatography**)技術最常應用於生物分離程序中，然而操作條件經常受到限制[1-3]，例如：樹脂顆粒孔內擴散孔內擴散速率緩慢或填充管柱樹脂顆粒易受到擠壓變形，而無法繼續操作，尤其是管柱操作在放大規模時。針對填充床管柱技術的缺點，薄膜層析(**membrane chromatography**)技術漸受重視[2-3]。吸附薄膜應具有微孔，使得欲分離蛋白質可以對流方式進入微孔內，再進行吸附作用。且薄膜厚度小，其

操作壓力遠小於填充管柱的壓力，因而在較高流量下進行操作。

溶菌酶(**lysozyme**)結構組成會因為生物體種類來源的不同而有所差異，其中以雞蛋白含量為最多，約佔有 3.4%。雞蛋白中的溶菌酶是由 129 個胺基酸所組成單條多勝鏈，分子量大約為 14.3 kDa，等電點(**pI 值**)大約為 11 [4-6]。溶菌酶在醫學應用上有抗菌、消腫止痛、抗病毒、加快組織恢復及止血等功能臨床可用於水痘、急慢性咽喉炎、慢性鼻炎等症狀、也可以作為抗菌藥物。溶菌酶在食品應用上有天然防腐劑效果。本研究選用溶菌酶作為作為目標酵素，如何在複雜雞蛋白溶液中快速回收此酵素是值得研究的課題。

依據文獻指出[7-11]，靜電紡絲技術(**electrospinning technology**)能效率且可以連續方式生產高分子奈米纖維。超過百種以上的高分子奈米纖維經由靜電紡絲技術陸續被開發出來。與傳統纖維(直徑多在數十微米)相比，在相同體積與重量的條件下，奈米纖維膜材具有孔徑小、孔洞相連且緻密與孔隙率。此外，電紡奈米纖維膜具有與微過濾膜較相近的特性，可直接

做為微過濾濾材之替代膜材。奈米纖維比表面積(m^2/g)亦為一般纖維的100倍以上，因此在水過濾或純化等相關應用上，奈米纖維膜濾材與傳統薄膜濾材比較，具有高通量、低壓損、低耗能、質傳距離短、高吸附與反應速率快等優點[12-13]。聚丙烯腈(polyacrylonitrile, PAN)奈米薄膜因分子結構擁有較高機械強度、抗化學藥品性強、抗酸鹼性佳、耐日光及成本低廉等特點，因此被廣泛使用於製備微濾膜、超濾膜和中空纖維膜材[7-8]。本研究採用靜電紡絲技術製備PAN-PET-PAN奈米纖維複合膜，其中聚對苯二甲酸乙二酯(polyethylene terephthalate, PET)為支撐層(supporting layer)。運用奈米纖維膜PAN分子鏈上氰基(-CN)經由水解反應製備成具有羧基(-COOH)的離子交換膜材(P-COOH)。P-COOH膜材與乙二胺(ethylenediamine, EDA)及溴乙酸(bromoacetic acid, BrA)經由二階段改質處理，可成功開發出高密度羧基新型離子交換薄膜(P-BrA)。此種膜材具高比表面積、高孔隙率，將其置入自行設計的薄膜反應器中，以連續操作方式從雞蛋白溶液中直接純化分離溶菌酶。並探討在不同操作條件，奈米纖維膜對溶菌酶活性、吸附量及純度之影響，同時了解奈米纖維薄膜之純化效率及其於蛋白質純化應用上之可能性。

新型薄膜吸附反應器之設計與應用

在蛋白質純化程序中，薄膜層析裝置之選用相當重要。一般市售商業化薄膜反應器(例如 Stirred Cell, 單一膜片, Millipore), 採氣體加壓, 使得欲分離蛋白質溶液垂流通過薄膜。或者以堆疊形成所需薄膜厚度, 係以單一膜組串聯數個模組而成, 勢必無法依據目標蛋白質吸附效



圖 1. 新型薄膜生物反應器

Fig. 1. Newly designed membrane bioreactor

率來判斷薄膜所需厚度。目前為止，商業化膜組吸附反應系統無法控制操作溫度，經常造成目標蛋白質活性之流失。

本研究所發展薄膜吸附反應器，如圖1所示，能克服上述缺點，藉以提升目標蛋白質的吸附效率。不僅能依據目標蛋白質的吸附效率決定所需薄膜數量與厚度，同時可依據薄膜堆疊厚度來調節柱塞位置，使得系統滯留體體大幅減少；另外所設計分配盤系統能使流體流動呈現相當穩定狀態，大幅增加目標蛋白吸附效率；並能有效控制系統操作溫度，不致造成蛋白質活性消失。

利用全自動可程式蛋白質液相層析儀(ÄKTA prime, GE Healthcare), 結合奈米薄膜吸附反應器, 可以連續操作方式自雞蛋白溶液中直接純化溶菌酶。研究主要藉由 PAN-BrA 奈米離子交換薄膜, 尋找溶菌酶吸附最適 pH 值、操作流率、雞蛋白濃度和脫附最適條件, 所得結果將進一步直接應用在溶菌酶直接回收程序。

實驗

一、實驗材料

本實驗雞蛋白(chicken egg white)購自勤益蛋品股份有限公司，其它藥品如PAN 高分子粉末、二甲基乙醯胺(dimethylacetamide, DMAc)、Toluidine Blue O (TBO)、2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)、乙二胺(ethylenediamine, EDA)及溴乙酸(bromoacetic acid, BrA)、lysozyme等均購自Sigma (景明化工)。所有實驗藥品均為分析級試藥。

二、電紡PAN奈米纖維薄膜

本研究採用鴻隼企業有限公司所生產的研究型靜電紡絲設備(Model: FES-COL, 如圖2所示)，將PAN溶於DMAc中製備成15%(w/v)高分子溶液，利用靜電紡織設備(操作參數: 幅寬 20 cm、紡嘴21號不鏽鋼



圖 2. 鴻隼企業有限公司研究型靜電紡絲設備圖

Fig. 2. Electrospinning machine from Falco Company

針、距離15.8 cm、電壓26.5 kV、紡絲液吐出量1 mL/hr、左右橫移次數12次/min、收集器轉速24 cm/sec)，製備以PET為基材(上、下二層為PAN)之PAN-PET-PAN奈米纖維薄膜。

三、P-BrA高密度羧酸型離子交換奈米纖維薄膜製備

P-BrA離子交換膜製備說明如下:(1)將PAN奈米纖維薄膜(3.14 cm²)以5 mL 3 M NaOH溶液，在85°C下反應25分鐘，再以去離子水沖洗，加入0.1 M HCl溶液浸泡，再以去離子水沖洗數次，即可製備羧酸型離子交換奈米纖維膜材(P-COOH)。(2)取1.952 g MES溶於100 mL去離子水，調整pH值至4.75，並加入0.01 g EDA與0.01 g EDC。(3)將PAN薄膜置於樣品瓶中，加入5 mL MES混合溶液，置於震盪器(100 rpm) 25°C下反應3小時，反應結束後以去離子水洗淨。(4)配製100 mL 1 M NaOH溶液加入0.25 g BrA及4.20 g NaHCO₃，配製成BrA溶液。(5)將改質後薄膜加入5 mL BrA溶液在60°C下反應3小時，反應結束後以去離子水沖洗，即可製得P-BrA高密度羧酸型離子交換奈米纖維薄膜。PAN纖維改質過程反應反應方程式，如圖3所示。

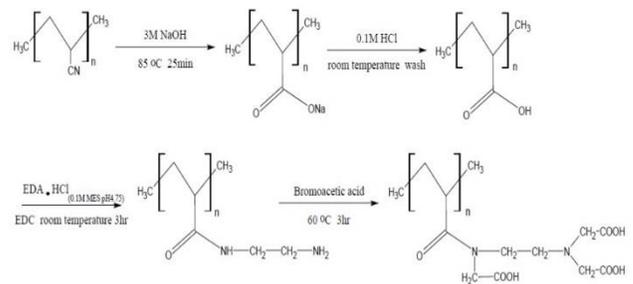


圖 3. P-BrA 奈米纖維薄膜之合成

Fig. 3. Synthesis of P-BrA nanofibrous membrane

四、奈米纖維膜材之物/化性檢測

改質接枝前後之奈米纖維薄膜的表面結構形態與孔洞大小及分佈等，可藉由掃描式電子顯微鏡(SEM)來觀察。利用紅外線光譜儀(FTIR)來判斷PAN分子鏈上官能基團之改質是否成功。另外，利用TBO染劑可決定 P-BrA膜材表面的羧基含量[14]。

五、總量蛋白定量分析[15]

取1 mL Coomassie Brilliant Blue G-250與20 μ l 樣品均勻混合，然後靜置10分鐘，置入UV-Vis分光光譜儀中，以OD₅₉₅測量其吸收度，利用已知BSA濃度與595 nm之吸收度作檢量線，作為蛋白溶液中總量蛋白質濃度(mg/mL)定量之標準。

六、溶菌酶活性分析[16]

取200 μ l溶菌酶待測液置入石英管中，並加入1,000 μ l 0.25 mg/mL溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* (25 °C、pH 6.24)混合均勻後置入紫外線分光光譜儀中，以波長450 nm在60 sec內測定每2 sec的吸光度變化值。一單位溶菌酶活性(U)係指每分鐘能溶解菌體使吸光值下降0.001之酵素量。溶菌酶活性計算如下：

$$\text{Lysozyme}(U / \text{mL}) = \frac{\Delta OD_{450/\text{min}}}{0.001 \times V_{\text{lysozyme}}} \times DF$$

其中， V_{lysozyme} 為溶菌酶試樣溶液之體積(mL)， DF 為稀釋倍率。

七、連續式薄膜層析分離純化系統之應用

本研究與群育有限公司合作，共同開發可商品化的奈米纖維薄膜蛋白質分離純化層析裝置(如圖1)。利用全自動程式蛋白質液相層析儀(ÄKTA prime)，結合奈米薄膜吸附反應器，將P-BrA奈米纖維膜，置於薄膜反應器中，以流體流動方式

進行吸附反應，從雞蛋白溶液中分離純化溶菌酶。實驗選用20 mM緩衝溶液在微鹼性環境下操作(pH 9-11) (glycine-NaOH, pH 9-10；碳酸鹽緩衝溶液, pH 11)，並配製成10%(v/v)新鮮雞蛋白溶液，然後以導入吸附反應器中，與P-BrA離子交換薄膜進行連續吸附反應(直徑2 cm，面積約為3.14 cm²，重量約為0.02 g)，並以固定體積收集濾液。藉以尋找離子交換薄膜最適吸附pH值。所收集流出溶液在UV-Vis分光光譜儀中，以UV在450 nm測定溶菌酶活性(U/mL)以及在595 nm測定總量蛋白(mg/mL)，最後由吸附前後總量蛋白質濃度或溶菌酶活性之變化，計算P-BrA薄膜每單位重量對總量蛋白質吸附量(mg/g-M)或溶菌酶吸附量(U/g-M)。進一步探討不同的雞蛋白稀釋倍率(2-10倍)、吸附流率(0.1-1.0 mL/min)與NaCl脫附濃度(0.2-1.0 M)以獲得最適純化分離條件。最後並利用蛋白質電泳(SDS-PAGE)來確認純化產物之分子量是否為溶菌酶(14.4 kD)，且與市售之標準品(Sigma)來做比較。

結果與討論

一、奈米纖維膜物化性分析

透過SEM觀察PAN與P-BrA奈米薄膜的表面結構形態(如圖4)，可看出PAN薄膜之纖維間孔徑分佈較為不均且結構鬆散，但經過一系列改質接枝反應後，P-BrA薄膜之纖維雖有部分融合在一起，但纖維間的孔洞孔徑分佈較為一致而均勻，且整體纖維3-D結構形態更加緻密，密度明顯提升，使得蛋白質溶液通過薄膜時，更有利於吸附反應。圖5所示為紅外線光譜圖，不同的官能基在不同的波長會各有吸收。在波長3384.61 cm⁻¹與1690.00 cm⁻¹分別代

表是-OH官能基與-C=O官能基，此結果顯示PAN薄膜被成功改質成P-BrA。此外，波長1229.11 和2934.06 cm^{-1} 是-CH₂官能基，波長2241.75 cm^{-1} 是-C≡N官能基，改質前後都發生有吸收情形，結果顯示不管是

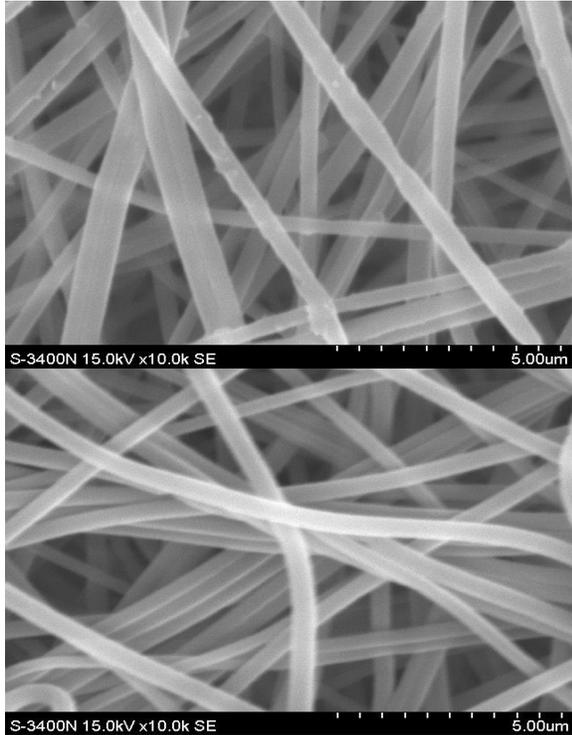


圖 4. PAN(上)與 P-BrA(下)奈米纖維膜 SEM 圖

Fig. 4. SEM images of PAN (top) and P-BrA (bottom) nanofibrous membrane

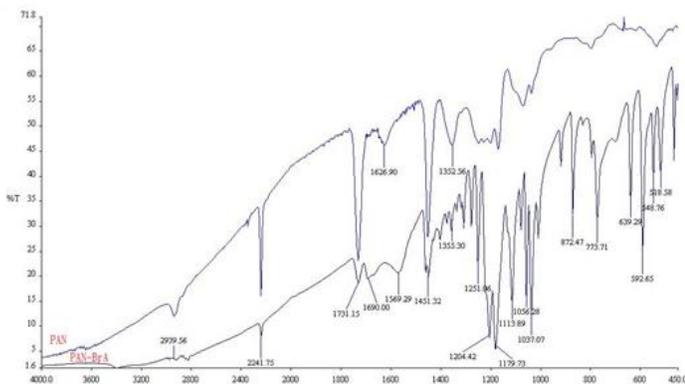


圖 5. PAN (上)and P-BrA(下)奈米纖維膜 FTIR 圖

Fig.5 FTIR images of PAN and P-BrA nanofibrous membrane

何種奈米纖維膜，其碳的主鏈並沒有被破壞，表示PAN經過3 M NaOH鹼化與BrA接枝反應，奈米纖維薄膜僅表面改質成為-COOH，其內部主要結構仍保有-C≡N。

利用TBO染劑可定量出每單位重量不同奈米纖維膜上之-COOH官能基團的密度($\mu\text{mol/g-M}$)，結果顯示，-COOH官能基密度大小為P-COOH < P-BrA，其中，P-COOH與P-BrA具有羧基平均值分別為284與909 $\mu\text{mol/g-M}$ 。結果顯示P-BrA膜單位重量羧基值為P-COOH膜3.2倍左右，數據證實，本研究將P-COOH單一羧酸基團進一步接枝，將使羧酸官能基團密度大幅提升，成功開發出P-BrA高密度羧酸型離子交換奈米纖維薄膜。

二、高密度離子交換奈米纖維膜與溶菌酶吸附效率之測試

(1) pH值效應

依雞蛋白結構組成中蛋白質，大部分的等電點介於4至9之間，溶菌酶之等電點pI值為11 [4-6]。採用pH 9、10、11作為吸附條件之選擇，乃因此環境下雞蛋白溶液中，大部分雜蛋白攜帶負電荷(pI < pH 9)，將與P-BrA(攜帶負電荷)產生排斥；然而溶菌酶攜帶正電荷(pI > pH 9)。在此操作pH值，對陽離子交換薄膜而言，有利於溶菌酶的吸附，反而對雜蛋白不利。本實驗採用全自動可程式蛋白質液相層析儀(ÄKTA prime)選出最佳吸附之pH值條件。利用調控環境pH值改變蛋白質的帶電性，藉以達到減少雜蛋白吸附的目的。

圖6為P-BrA於不同吸附pH值下之總量蛋白及溶菌酶活性吸附突破曲線之比較。

A/A_o 表示溶菌酶流出濃度與進料濃度之比值。 C/C_o 表示總量蛋白流出濃度與進料濃度之比值。

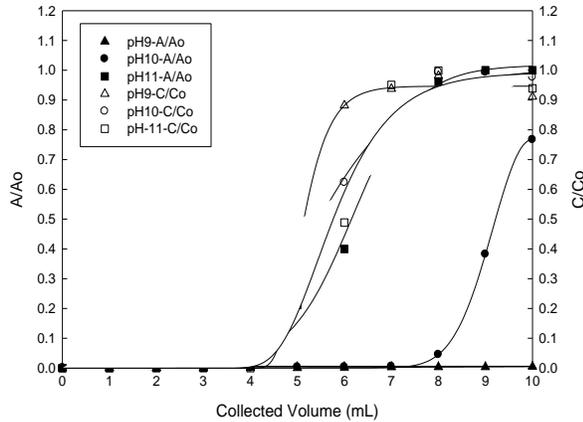


圖 6.操作 pH 對溶菌酶吸附效率之影響

Fig. 6. The effects of pH on adsorption performance of lysozyme

度之比值。突破曲線上方面積所代表的意義為總量蛋白或溶菌酶吸附量，反之曲線下方為其流失量。藉由突破曲線上方面積大小可決定總量蛋白或溶菌酶吸附量。在流率0.1 mL/min下，發現總量蛋白於pH 9有最高流失率，然而對溶菌酶有最高的吸附率(接近100%)。若以溶菌酶吸附量作為最適吸附pH參考指標，吸附量大小依序為pH 9 > pH 10 > pH 11。因此P-BrA奈米離子膜溶菌酶最適吸附值為pH 9；P-BrA之溶菌酶吸附效率遠優於P-COOH (data not shown)。假若能提高奈米纖維膜之羧基量，溶菌酶之鍵結數目會增加，使吸附效率提高。

(2) 雞蛋白濃度效應

本實驗將新鮮雞蛋白溶液稀釋成2% (1 in 2)、6% (1 in 6)或10% (1 in 10) 作為進料溶液(10 mL)，藉以選擇最適進料濃度之條件。實驗流率選擇為1.0 mL/min，

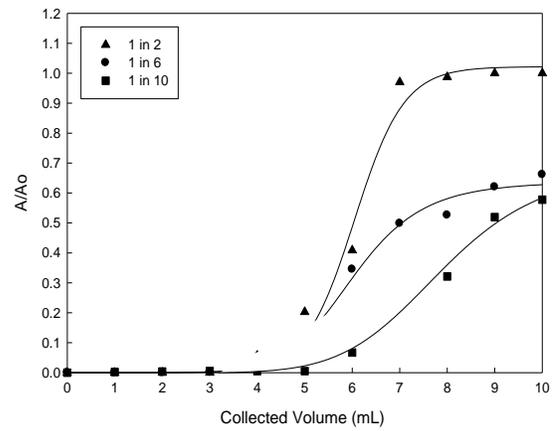


圖 7.雞蛋白濃度對溶菌酶吸附效率之影響

Fig. 7. The effects of CEW concentration on adsorption performance of lysozyme

藉由濃度變化來觀察P-BrA離子交換薄膜對蛋白溶液中總量雞蛋白和溶菌酶吸附突破曲線之差異性。

圖7所示為離子交換薄膜對蛋白溶液總蛋白及溶菌酶吸附突破曲線。結果顯示，雞蛋白溶液中總量蛋白與溶菌酶穿透薄膜的流失率，隨著雞蛋白進料濃度之增加而增加。故以低濃度10%雞蛋白作為進料溶液應是較佳之選擇。

(3) 操作流率效應

本實驗以10 mL 10%雞蛋白作為進料溶液，選擇改變進料流率(0.1-1.0 mL/min)作為操作條件，藉以選擇最佳操作流率。藉由流率變化來觀察離子交換薄膜對雞蛋白溶液中雞蛋白和溶菌酶吸附突破曲線之差異性。由圖8得知，P-BrA奈米離子膜於流率0.1 mL/min時，溶菌酶吸附率(95.62%)高於流率1.0 mL/min (80.53%)且總量蛋白流失率亦隨操作流率的增加而增加。有此可知，操作在高流率時，進料溶液與奈米離子薄膜間在吸附反應器相互接觸的時間較短，因此吸附效率較低。若以溶菌酶吸附效率作為最適吸附參考指標，選擇以流率0.1 mL/min作為操作條件。

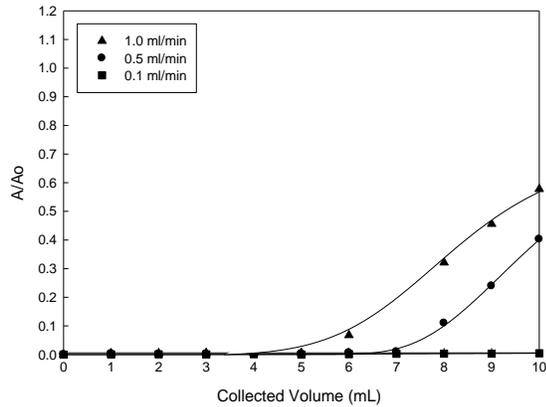


圖 8.操作流率對溶菌酶吸附效率之影響

Fig. 8. The effects of flow rate on adsorption performance of lysozyme

(4)溶菌酶脫附條件之選擇

實驗以10 mL 10% 雞蛋白作為進料溶液。沖提液議選用0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 M NaCl (20 mM glycine-NaOH, pH 9)。流率選擇為1.0 mL/min, 藉由NaCl 濃度變化來觀察P-BrA離子交換薄膜上所吸附溶菌酶脫附之最佳沖提液濃度。圖9為P-BrA離子交換薄膜對蛋白溶液總量蛋白及溶菌酶脫附效率圖。每階段沖提體積為10 mL, 第一階段0.2 M NaCl 總量蛋白與溶菌酶沖提率分別為20.98%及95.44% ; 第二階段0.4 M NaCl 總量蛋白與溶菌酶沖提率分別3.616%及2.60% 第三階段0.6 M NaCl 總量蛋白與溶菌酶沖提率分別0.30%及1.05% ; 第四、五階段沖提率分別0.00%及0.062%。實驗結果得知整個脫附程序溶菌酶回收率達99.10%。因此, 溶菌酶沖提回收程序選用0.6 M NaCl作為第一階段沖提液; 1.0 M NaCl作為第二階段沖提液並將同時再生P-BrA薄膜, 膜片可多次重複使用。

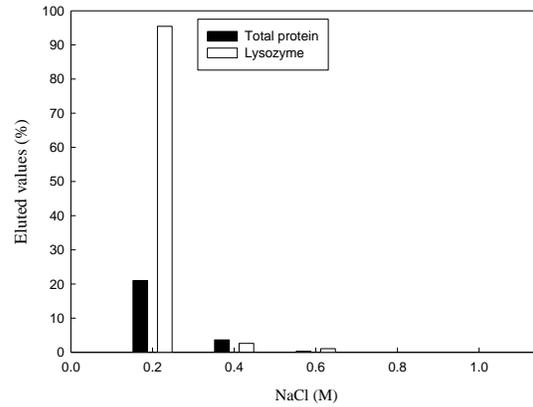


圖9. 不同鹽類濃度對溶菌酶沖提效率

Fig. 9. Elution efficiency of adsorbed lysozyme at various NaCl concentrations

三、連續式奈米纖維膜純化系統直接從雞蛋白中純化溶菌酶

綜合上述所有實驗之最適條件, 以10 mL 10% (v/v)雞蛋白溶液稀作為進料溶液, 操作流率為0.1 mL/min; 洗滌10 mL, 流率1.0 mL/min pH9, 用以洗去多餘總量蛋白; 脫附過程採用10 mL 0.6 M及1.0 M NaCl (pH 9)二階段沖提, 流率為0.1 mL/min, 藉以觀察離子交換薄膜對蛋白溶液中雜蛋白和溶菌酶脫附之產率。圖10所示為吸附、洗滌、沖提程序三階段操作過程, 流出物濃度與進料濃度比值之關係圖。其結果由表一所示, P-BrA對溶菌酶吸附率高達99.43%, 而總量蛋白之流失率也高達82.66%。第一沖提段選用0.6 M NaCl, 顯示僅有9.55%沖提效率, 然而在第二沖提段選用1.0 M NaCl, 有高達90.98%沖提效率, 且溶菌酶純度提升高達402.39倍。以SDS-PAGE(圖11)觀察純化效果。Lane 1標準溶菌酶, 分子量約為14.4 kDa; Lane 2為進料雞蛋白溶液樣品; Lane 3為純化程序吸附過程樣品; Lane 4為純化程序洗滌過程樣品; Lane 5為純化程序沖提過程, 顯示存在高純度溶菌酶。

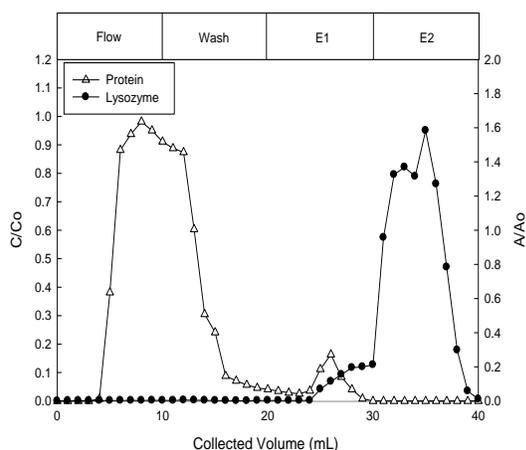


圖10. P-BrA奈米纖維薄膜應用在溶菌酶純化程序過程圖

Fig. 10. Lysozyme purification processes by P-BrA nanofibrous membrane

表一、P-BrA奈米纖維薄膜對溶菌酶純化程序彙整表

Purification step	Applied volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor (Folds)	Recovery yield (%)
CEW	10.0	52.80	1.33x10 ⁵	2.51x10 ³	1.0	100
Adsorption	10.0	26.67	3.52x10 ⁵	-	-	-
Wash	10.0	16.97	4.04x10 ⁵	-	-	-
Elution (I)	10.0	2.16	1.27x10 ⁵	5.87x10 ³	2.32	9.55
Elution (II)	10.0	0.12	1.21x10 ⁵	1.01x10 ⁶	402.39	90.98
Total Recovery (%)	86.97	101.10				100.53

若以P-COOH離子交換膜以相同操作條件應用在溶菌酶純化程序，顯示沖提效率達73.31%，溶菌酶純度提升達20.36倍。結果顯示，P-BrA對溶菌酶吸附率遠高於P-COOH，故經由實驗證明當羧基(-COOH)的含量越多時，能有效提高溶菌酶之吸附率，進而達到純化效率之提升。

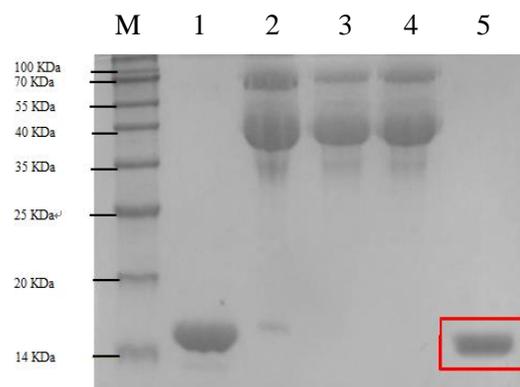


圖11. SDS-PAGE 蛋白質電泳圖

Fig. 11. SDS-PAGE for each purification step

Lysozyme: Mw 14.4 kDa M: Protein marker

Lane 1 : Standard Lysozyme

Lane 1 : Crude feedstock sample

Lane 2 : Flow sample

Lane 3 : Washing sample

Lane 4 : Eluted lysozyme

結論

本研究使用 PAN 奈米纖維薄膜是採用鴻準公司研型奈米靜電紡絲機所製備而成。此膜材具高比表面積、高孔隙率的特性，並搭配快速鹼化水解官能基化技術製備成 P-COOH 離子交換薄膜。再藉由二階段胺化及溴乙酸反應，製備成具 3D 奈米結構之 P-BrA 高密度羧酸型離子交換奈米纖維薄膜。藉由自行開發薄膜生物吸附反應器，並結合全自動可程式蛋白質液相層析儀 (ÄKTA prime) 尋找出溶菌酶最佳純化條件。結果顯示，P-BrA 對溶菌酶具高吸附率 99.43%，對總量蛋白高流失率 82.66%，而溶菌酶之總回收率高達 100% 左右。而 P-COOH 對溶菌酶吸附率達 89.96%，總量蛋白流失率 86.32%，溶

菌酶之總回收率僅達 83.91%。兩者純化率比較 P-BrA 遠優於 P-COOH。故經由實驗證明羧基官能基 (-COOH) 含量越多時，能提高溶菌酶之吸附效率，進而達到純化效率之提升。PAN 改質過程中，CN 官能基轉化為 COOH 轉化率僅達 1.5%，主要是因為改質反應僅在纖維表面發生。然而 P-COOH 藉由乙二胺連結反應轉化為 P-BrA 轉化率高達 95% 以上。

在產業應用性和可行性上，目前國際上僅少數幾家公司掌握離子交換纖維工業化生產核心技術。國內廠商以熔噴法為技術手段，纖維膜纖維細度約 5-10 μm ，但仍無廠商結合奈米纖維(直徑約 <200 nm) 製程開發高密度離子型奈米纖維吸附分離膜。為考量業界量產實際需求，本研究與鴻隼公司合作，以既有之研究型靜電紡絲設備為基礎，協助開發出雛量型奈米纖維生產設備，對於奈米纖維膜的量產及均勻度均可大幅提高。同時，更與群育科技有限公司合作，將奈米纖維薄膜與吸附反應器模組化，整合成一套純化高效能設備。實驗證明本研究所開發之高密度弱酸型離子交換吸附分離膜可有效自雞蛋白溶液中純化出溶菌酶，比傳統離子交換樹脂純化方式更能減少後續處理步驟，縮短整體純化時間，降低吸附分離純化之成本。因此，本研究所開發之弱酸型 P-COOH 與 P-BRA 離子交換膜，應用在蛋白質純化系統上具有廣泛的商業價值。最後，透過三方的互助與實質合作，所節省的成本可直接反應在高密度羧酸型離子交換奈米纖維產品與模組化系統的售價上，可使得未來產品更有產業價值與競爭力。

業界合作模式及其衍生效益

本研究合作案為明志科技大學與鴻隼企業有限公司和群育科技有限公司，透過產學合作的方式來進行。合作模式以本研究團隊負責奈米纖維膜材的改質、接枝技

術與蛋白質分離純化最適製程之開發。同時鴻隼公司委派李宏哲與黃政強經理負責本案雛量型靜電紡絲設備開發與建立量產生產技術。群育科技有限公司則委派徐啟光經理負責將專利化薄膜吸附反應裝置製成商品化產品。將奈米纖維膜導入連續式薄膜吸附反應裝置，並協助相關專業模具開發工作與最後系統整合和銷售。三方由計畫主持人明志科技大學生化工程技術研發中心主任張煜光教授配合指導相關應用聯結與技術導入溝通平台，在產品開發與量產領域進行實質之合作與研究，縮短產品開發時程，與合作企業共同將資源集中在具有「利基」之產品項目上。且每月定期召開技術研討與市場資訊交流會議，使彼此共同參與研發工作及成果分享，不僅同學能實際參與深度研習，從奈米纖維原料生產、改質接枝技術、設備單元模組化/系統化、最後應有機會導入生技產業上實際應用在純化分離製程等一貫化作業，擴大與國內業界接軌，同時也學會發揮整合應用與工程能力。最後，由實驗測試與成品驗證結果確認此新型高密度羧酸型離子交換奈米纖維薄膜極具產業應用性及可行性。

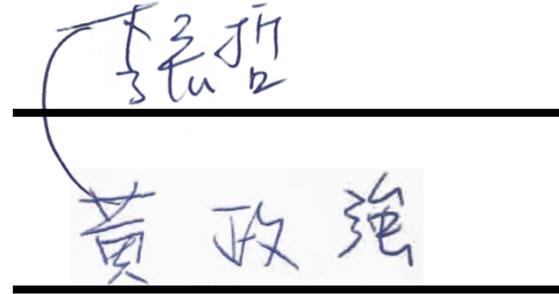
目前本研究已進入第二期的雛量奈米纖維膜試量產，從產業效益分析來看，德國 Sartorius 公司利用相轉換法製程開發強/弱酸型、強/弱鹼型離子交換膜材，其售價約 NT\$9,000-10,000/ m^2 ，而本案奈米纖維材料之離子基團密度為市售品的 3-7 倍，而開發成本約為售價的 1/10 以下，NT\$800-1,200/ m^2 ，極具價格競爭優勢。若以北美離子交換樹脂市場 20 億美元年需求之 3% 為初期目標，將約有 18 億台幣之年產值。另外，2010 全球蛋白質醫藥市場銷售金額超過 600 億美元(台灣約 20 億)，產品附加價值高，產業需開發更有效率及更精密的分離純化製程。本研究採用的雞蛋白約 NT\$55/kg，其中雞蛋白占全蛋的 60%，約含有 40 種以上的蛋

白質，溶菌酶僅佔雞蛋白的 3.4%，經由分離純化後，溶菌酶售價可達 NT\$32,000/公斤，價差可達約 580 倍以上。

鴻隼公司為國內專業且最大的靜電紡絲設備廠商，商業化靜電紡絲技術平台已成功推廣國內產、學、研界使用，包含台灣大學、明志科技大學、交通大學、清華大學、台北科技大學、台灣科大學、工研院、Angstrom materials (USA)等。本研究初期採用鴻隼企業有限公司的研究型靜電紡絲設備，後期由於業界需求，鴻隼公司以既有之實驗型設備為基礎，自行開發出雛量型奈米纖維生產設備，對於奈米纖維膜的量產及均勻度均可大幅提高，目前已建立穩定生產幅寬 40 cm，噴發量 5 g/min、與生產速度(1m/min)的奈米纖維不織布設備，建構台灣在電紡技術上自主的能力，並可逐步輔導國內紡織產業界進入跨領域產品應用開發，包含過濾、生技、醫療、電子、能源、防護、環境等，有效協助紡織產業跨大市場範圍，並大大提升產業技術水準與產品附加價值。透過三方的互助與實質合作，這些節省下的成本可直接反應在高密度羧酸型離子交換奈米纖維產品與模組化系統的售價上，使得未來產品更有產業價值與競爭力。

業界代表簽名確認欄：

鴻隼企業有限公司



黃政強

群育科技有限公司



徐啟光

參考文獻

1. Ghosh, R., Cui, Z. F., J of Membrane Science, 139, 17-28 (1998).
2. Kumar A., Gurian P.L. Bucciarelli-Tieger R.H., Journal/American Water Works Association, 100, 151-164 (2008).
3. Chiu H.T., Lin J.M., Cheng T.H., Chou S.Y. eXpress Polymer Letters, 5, 308-317 (2011)
4. Awade A.C., Efstathiou T. Journal of Chromatography B, 723, 69-74 (1999).
5. Wright P.R., Muzzio F.J., Glasser B.J. Biotechnology Progress, 14 913-921 (1998).
6. Lasanta C., Roldán A., Caro I., Pérez L., Palacios V. Food Control, 21, 1442-1447 (2010)
7. Clark, M. W., Bansal, A., Soritakke, M., Ma, Y. H. Journal of Membrane Science, 55, 21-38 (1991).

8. Devereux, N., Hoare, M. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 422-431(1986).
9. Park S.A., Park K., Yoon H., Son J.G., Min T., Kim G.H. *Polymer International*, 56, 1361-1366 (2007).
10. Barhate R.S., Ramakrishna S. *Journal of Membrane Science*, 296, 1-8 (2007).
11. Ma Z., Ramakrishna S. *Journal of Membrane Science*, 319, 23-28 (2008).
12. Dhanalakshmi M., Jog J.P. *eXPRESS Polymer Letters*, 2, 540-545 (2008).
13. Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V., Tamura H. *Biotechnology Advances*, 28, 142-150 (2010).
14. Sano, S., Kato, K., Ikada, K. *Biomaterials*, 11, 817-822 (1993).
15. Aune, K., Tanford, C. *Biochemistry*, 8, 4579-4585 (1969).
16. Shugar, D. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 302-309 (1952).

領域歸屬

研發與應用類 服務與設計類

聯絡人：

林冠宇

taya20081@gmail.com