

# 以磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵為奈米粒子為載體於鳳梨酵素固定化之研究

陳信豪、?耀國

E-mail: 317674@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以幾丁聚醣與鐵離子結合，產生磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵複合懸浮液，水洗至中性後再加入鳳梨酵素，經由低溫噴霧乾燥方法，製成磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子。產物由電磁鐵收集器(EMC)和靜電集塵器(ESP)分別收集大小顆粒，並以掃描式電子顯微鏡進行觀察。由電磁鐵收集器獲得之顆粒直徑介於 500~2,500 nm 之間，而在靜電集塵器內之顆粒粒徑介於 200~1,000 nm，各粒子表面呈現粗糙特性。以酪蛋白水解法進行酵素活性測定，各配方都有 80% 以上的相對活性，且重覆使用次數可達 10 次以上。各配方隨著幾丁聚醣濃度增加，酵素相對活性提高，以磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵包覆鳳梨酵素，可達到酵素快速回收及重複使用之目的。

關鍵詞：磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子、低溫噴霧乾燥、鳳梨酵素

## 目錄

封面內頁 簽名頁ii 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要v 誌謝vi 目錄vii 圖目錄x 表目錄xii 附錄xiii 1. 緒言1 2. 文獻回顧2 2.1 酵素固定化 2 2.1.1 酵素固定化方法2 2.2 鳳梨酵素之簡介5 2.3 磁性幾丁聚醣複合顆粒製備與應用5 2.3.1 幾丁聚醣顆粒之製備6 2.4 奈米科技6 2.5 磁性材料9 2.5.1 磁性體之種類9 2.5.2 磁性顆粒之應用11 2.6 磁性幾丁幾丁聚醣複合顆粒製備與應用 12 2.7 低溫噴霧乾燥法12 3. 材料與方法20 3.1 實驗架構20 3.2 實驗材料與儀器21 3.2.1 藥品21 3.2.2 儀器設備22 3.2.3 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵懸浮液之製備23 3.2.4 以低溫噴霧乾燥製備幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米子23 3.3 產物分析24 3.3.1 原子吸收光譜儀 (AAS)24 3.3.2 富立葉紅外線光譜測試 (FTIR)24 3.3.3 場發射電子顯微鏡 (FESEM)23 3.4 蛋白質定量分析24 3.4.1 酵素重複釋放量之測定24 3.5 酵素活性測定24 3.5.1 重複使用率之測定29 4. 結果與討論32 4.1 幾丁聚醣/四磁性幾丁聚醣/鳳梨酵素微奈米粒子之製備結果32 4.2 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子FESEM 分析32 4.3 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子 FTIR 分析之結果35 4.4 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子AAS 含鐵量分析47 4.5 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子酵素重複釋放47 4.6 磁性幾丁聚醣/四氧化三鐵/鳳梨酵素微奈米粒子重複使用率測定52 5. 結論58 參考文獻60 附錄64

## 參考文獻

1. 李玉寶、顧寧、魏于全。2006。奈米生醫材料。五南圖書出版公司。
2. 徐世昌。2001。生物高分子-幾丁質與幾丁聚醣之介紹與應用。化工資訊 15 (2):36-45。
3. 郭竹芳。2004。Invertase 固定於 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性奈米載體及其在磁穩性填充床 (MSFBR) 之研究。國雲林科技大學化學工程學系碩士論文:14-16。
4. 傅昭銘。2003。奈米磁顆粒之放射性標化及應用簡介。物理雙月刊25 (3):1-4。
5. 楊謝樂。2006。磁性奈米粒子於生物醫學上之應用。物理雙月刊28 (4):692-697。
6. 莊景光。2004。離子鍵結型奈米微粒製備與其對小腸上皮細胞滲透能力之探討。國立清華大學化學工程學系碩士論文:1-50。
7. 黃世宏。2003。氧化鐵磁性奈米粒子在酵素固定化及分離上之應用。國立成功大學化學工程研究所碩士論文:12-15。
8. 黃新義、?耀國。2009。中華民國專利局。磁性奈米粉未製造及收集設備之結構改良。新型第 M 353785 號。
9. 劉伊郎、陳恭。2000。氧化鐵 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 薄膜與超晶格。物理雙月刊22 (6):592-605。
10. 鄭宇書。2008。低溫奈米噴霧乾燥設備開發及應用。大葉大學生物產業科技系碩士論文。
11. Berry, C. C., and Curtis, A. S. G. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physic. 36: 198-206.
12. Carpenter, E. E. 2001. Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. Journal of Magnetism and magnetic materials. 255: 17-20.
13. Denkbaz, E. B., Kilicay, E., Birlikseven, C., and Ozturk, E. 2002. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. Reactive & Functional Polymers. 50: 225-232.
14. Desai, K. G. H., and Park, H. J. 2005. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. Drug Development Research. 64: 114-128.
15. Harrach, T., Eckert, K., Schulze-Forster K., Nuck R., Grunow D., and Maurer H. R. 1995. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem. Journal of Protein Chemistry 14: 41-52.
16. Huang, S. Y., Shieh, Y. T., Shih, C. M., and Twu, Y. K. 2010. Magnetic chitosan/iron (II, III) oxide nanoparticles prepared by spray-drying. Carbohydrate Polymers 81: 906-910.
17. Huber, D. L. 2005. Synthesis properties and applications of iron nanoparticle. Small. 5: 482-501.
18. Hong, J., Gong, P., Xu, D., Dong, L., and Yao, S. 2007. Stabilization of -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. Journal of Biotechnology. 128: 597-605.
19. Jeong, J. R., Shin, C. S., Lee, S. J., and Kim, J. D. 2005. Magnetic properties of superparamagnetic -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles prepared by coprecipitation technique. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 286: 5-9.
20. Kim, E. H., Ahn, Y., and Lee, H. S. 2007. Biomedical applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated within chitosan. Journal of Alloys and Compounds. 434/435: 633-636.

21. Lin, Y. H., Mi, F. L., Chen, C. T., Chang, W. C., Peng, S. H., Liang, H. F. and Sung, H. W. 2007. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules* 8: 146-152.
22. Nguyen, T. T. B., Hein, S., Ng, C. H., and Stevens, W. F. 2007. Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions. *Journal of Applied Polymer Science*. 107: 2588-2593.
23. Okuyama, K., Noguchi, K., Kanenari, M., Egawa T., Osawa, K., and Ogawa, K. 2000. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr. Polymers*. 41: 237-247.
24. Rowan, A. D, Buttle D. J, and Barrett, A. J. 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemistry*: 266: 869-875.
25. Sun, K. Y., Ma, M., Zhang, Y., and Gu, N. 2004. Synthesis of nanometer- size maghemite particles from magnetite. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 245: 15-19.
26. Wang, Z. L., Finlay, W. H., Pepler, M. S., and Sweeney, L. G. 2006. Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technology* 170: 45-52.
27. White, R. R., Crawley, F. E., Vellini, M., and Rovati L. A. 1988. Bioavailability of 125I bromelain after oral administration to rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 9: 397-403.
28. Wu, Y., Guo, J., Yang, W., Wang, C., and Fu, S. 2006. Preparation and characterization of chitosan-poly (acrylic acid) polymer magnetic microspheres. *Polymer*. 47: 5287-5294.
29. Xiaoyan, A., Jun, Y., Min, W., Haiyue, Z., Li, C., Kangde, Y., and Fanglian, Y. 2008. Preparation of chitosan-gelatin scaffold containing terandrine-loaded nano-aggregates and its controlled release behavior. *International Journal of Pharmaceutics* 350: 257-264.
30. Yan, G. P., Robinson, L., and Hogg, P. 2007. Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspectives. *Radiography*. 13: 5-19.
31. Yu, Z., Rogers, T. L., Hu, J., Johnston, K. P., and Williams, R. O. 2002. Preparation and characterization of microparticles containing peptide produced by a novel process: spray freezing into liquid. *European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics*. 54: 221-228.
32. Zhou, H. Y., Chen, X. G., Meng, X. H., Lin, C. G., Yu, L. J. 2006. Release characteristics of three model drugs from chitosan/cellulose acetate multimicrosphere. *Biochemical Engineering Journal* 31: 228-233.
33. Zhu, A., Yuan, L. and Liao, T. 2008. Suspension of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *International Journal of Pharmaceutics*. 350: 361-368.