

探討奈米膠體金對盤尼西林醯胺酵素 之轉化效率影響

陳志義、陳品妍

摘 要

本研究應用奈米膠體金 (Colloidal Gold, CG)與盤尼醯林醯胺酵素 (penicillin G acylase, PGA)，進行 PG 生化反應生成 6-APA 之轉化效率影響研究。首先製作不同粒徑之 CG，利用其添加量、pH 值和溫度，探討上述因素對 6-APA 反應轉化效率之影響。實驗結果證實，添加 CG 可提高 PGA 對反應生成 6-APA 之轉化效率。其最佳添加條件為：PGA 加 0.05ml CG 溶液 (D=46.5nm)，在 pH8、37°C 條件下，添加 CG 之轉化效率較未添加 CG 的增加 2.13 倍。另外，實驗發現 CG 效應為降低 PG 反應的活化能 (降低 11.7%)，使得生成 6-APA 之轉化效率提高。將 CG 經重複使用 7 次，仍維持生成 6-APA 之轉化效率效果。

關鍵詞：膠體金、盤尼醯林醯胺酵素、奈米、活化能。



Investigation of nano-colloidal gold to the bioconversion efficiency of penicillin G acylase

Chih-I Chen, Pin-Hsin Chen

Abstract

In this study, we focus on the effect of nano-colloidal gold (CG) on the conversion efficiency of PG to 6-APA. Those influential factors under study are CG particle size, addition amount, pH value and solution temperature. From the experimental result, it shows that conversion efficiency could be increased 2.13 folds with the help of CG. The optimal conditions are as follows: adding 0.05 ml of CG ($D = 46.5$ nm) to pH 8 PGA solution at 37 °C. It was also found that CG could lowering down about 11.7% activation energy of the PG hydrolysis reaction, which made the conversion efficiency to be higher than ever. And CG would be reusable, which could maintain the conversion efficiency of 6-APA nearly the same even repeated used 7 times.

Keywords: colloidal gold (CG), Penicillin G Acylase (PGA), nano, the activation energy.



1. 前言

酵素是促進生物體之生化反應有效率的進行，因此又稱為生化觸媒，本身是蛋白質所構成的。盤尼西林醯胺酵素（penicillin G acylase, PGA），其功能為促進盤尼西林（penicillin G, PG）水解，以生產抗生素原料藥之六青黴素酸（6-aminopenicillanic acid, 6-APA），如圖 1 所示。過去對於 6-APA 的生產多採用化學水解法，但因製程相當消耗能量且成本偏高，近年來多已改用生物化學轉化法（bioconversion）來取代[1-2]，即利用 PGA 將 PG 水解而得。現在工業上生產 6-APA，主要將 PGA 經固定化在擔體上後，進行水解催化反應，並可以重複使用。

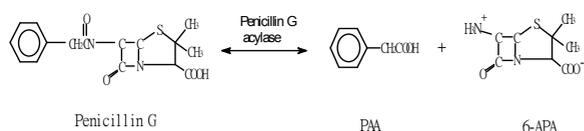


圖 1 盤尼西林之水解反應

奈米膠體金(Colloidal Gold, CG)為一奈米粒子懸浮液，Hayat *et. al.* 製備[3]係使用還原劑如：檸檬酸（citric acid）、丹寧酸（tannic acid）、硼氫化鈉（sodium borohydride）、酒精（alcohol）等還原 HAuCl_4 而成。CG 徑粒主要取決於成核反應（nucleation），CG 組成如圖 2 [4]，其核心由金所構成，外為由界面活性劑以離

子對型式包圍而帶負電；因為粒子帶相同電荷，相互間的斥力會避免粒子互相聚集，並可限制其粒徑大小，因此這些粒子可以穩定地懸浮於溶液中。CG 之徑粒受許多其他因素控制，如還原劑用量、反應體積、攪拌程度、反應溫度等因素。Anand *et. al.* 以膠體金和 Endoglucanase 共協和作用[5]，增加酵素壽命及穩定性[6]，使用 CG 固定化 herseradish peroxidase 分解 chitosan hydrogel 作用。

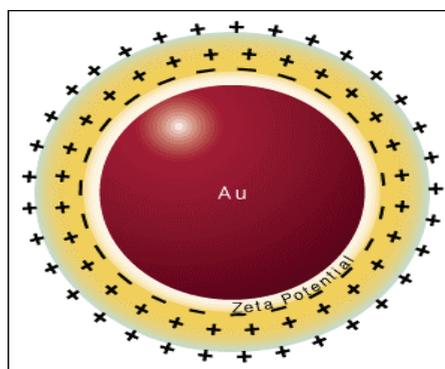


圖 2 CG 組成[4]

因此本研究嘗試使用 CG 加至 PGA 形成 PGA-CG，探討對 PG 水解反應生成 6-APA 量之變化影響，如 CG 之粒徑、添加量、PGA-CG 液之溫度和 pH 值、純化後 PGA 與粗 PGA 液等因素。探討這些因素對 PG 反應後，6-APA 生成量之影響，以期進一步瞭解 CG 應用於 PG 水解反應之效果，及開發 CG 於其他生化反應應用可行性。



2. 材料與方法

2.1 藥品

H₂AuCl₄ 購自 Sigma (G4022), 4-Dimethylamino-benzaldehyde (DAB), 購於美國 Sigma 公司; Coomassie brilliant blue, 購於美國 Bio-Rad Lab 公司; Penicillin G potassium salt (PG), 購於台灣 MDBio 公司; 其他藥品均為試藥級以上。

2-2 CG 之製備

取 2ml, 1% H₂AuCl₄ 加入蒸餾水, 體積至 200ml, 使其終濃度為 0.005%, 加熱至沸騰, 再加入適量 1% 檸檬酸三鈉 (trisodium citrate) 後, 再持續加熱沸騰; 當 H₂AuCl₄ 減少時, 膠體金溶液顏色由透明轉變為灰色至黑色, 再轉變為淡紫色, 經 1~3 分鐘轉為紅色。持續迴流 30min, 待冷卻後加入 0.2M K₂CO₃ 調至 pH 8.2。

粒徑小的膠體金會使溶液呈橘紅色, 粒徑大的則使溶液呈淡紫色。

2-3 粗 PGA 酵素液之製備

將 *E. coli* 醱酵後收集醱酵液, 將收集好之醱酵液取 100ml, 並於 9000 rpm、4 °C 下離心 5 分鐘。離心後之沉澱物, 並用去離子水清洗兩次。取其離心後之沉澱物, 再溶於 lysis buffer (0.1M PB, pH 8.0, 0.1 M NaCl) 中。以壓力式打碎菌體, 打碎後之菌液於 9000 rpm 4°C 下離心 5 分

鐘。收集離心後之上清液, 即為粗 PGA 液[7]。

2-4 分析方法

2-4-1 6-APA 生成量與 PGA 活性分析

取 1 ml 待測活性溶液加上 8 ml 之 50 mM 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 8) 和 1 ml 之 2% PG 溶液, 於 37°C 之恆溫水槽內培養。取樣溶液靜置 15 分鐘後, 分別於波長 415 nm, 測量吸光值, 依檢量線求得生成 6-APA $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$ 之量[8]。

PGA 活性 1U/ml 定義為 1 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$ 之 6-APA 生成量。

2-4-2 奈米膠體金 (CG) 粒徑分析

利用光散射粒徑分析儀 90 Plus Particle size analyzer BIC, 以 90 Plus Particle Sizing Software Version 2.31 測量膠體金顆粒粒徑。將待測膠體金溶液裝於石英管中, 將石英管置於黑色之 holder 中並加蓋, 再將石英管置入光散射粒徑分析儀, 計算 10 次取平均值為其有效粒徑。

2-4-3 蛋白質濃度測定

使用 Bradford 方法[9], Coomassie brilliant blue G-250 與蛋白質結合後; 在波長 595 nm 下, 測其吸光值, 並以 Bovine serum albumin (BSA) 為參考蛋白質, 作檢量線測定。



3. 結果與討論

3-1 CG 粒徑分析與粒徑之影響

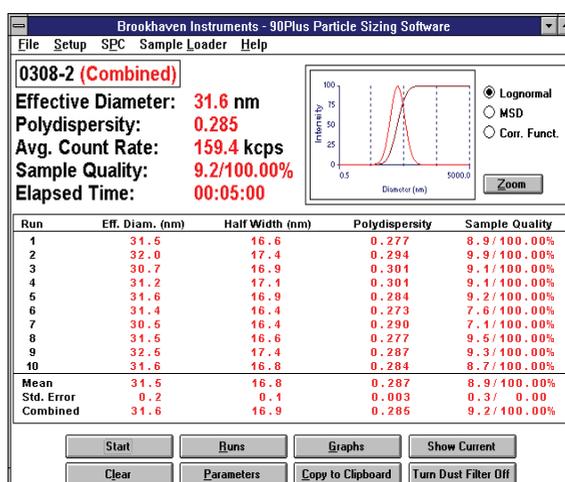
使用不同量 1 % 檸檬酸三鈉 (trisodium citrate) 作為還原劑，經上述步驟 2-2 CG 之製備，還原 HAuCl_4 製備各種 CG 粒徑。加入 1.865ml, 1% trisodium citrate 作製備 CG solution (約 $1.47 \times 10^{-4} \text{M}$ HAuCl_4)，所得之溶液由粒徑分析儀所測結果，如下表 1 所示；由表 1 得知，所製備的膠體金顆粒之粒徑為 31.6nm，分散率為 0.285，可知其為均勻之奈米級粒子。由 Hayat *et al.*, [3] 製備 CG 過程知，加入不同量 1 % trisodium citrate 會形成不同 CG 粒徑，因此製得 31.6nm、46.5nm 與 97nm 三種 CG 粒徑。將 0.2ml CG 加入粗 PGA 液內，形成 PGA-CG 整合體。若 PGA-CG 會增加 PG 生化反應之水解速率，增加 6-APA 生成量，則顯示 CG 具有在生化反應之應用價值。因此首先嘗試加各種 CG 粒徑於 PGA 粗酵素液，形成 PGA-CG，接著探討 PGA-CG 對 PG 轉化 6-APA 生成量之變化影響，實驗結果如圖 3。由圖 3 發現，未加 CG 之 PGA 活性為 0.94U/ml，即 20min 內生成 $18.8 \mu \text{mol}$ 6-APA /ml；使用 $D=31.6 \text{nm}$ 之 PGA-CG，20min 內生成 $20.4 \mu \text{mol}$ 6-APA /ml；即 PGA 活性變為 1.02 U/ml，表示增加 8.5% 水解速率。在 $D=46.5 \text{nm}$ 之

PGA-CG 下，20min 內生成 $21.8 \mu \text{mol}$ 6-APA /ml，即 PGA 活性為 1.09 U/ml；增加 16.0% 水解速率；但使用 $D=97 \text{nm}$ 之 PGA-CG 下，20min 內生成 $14.8 \mu \text{mol}$ 6-APA /ml，即 PGA 活性 0.74 U/ml；降低 21.3% 水解速率。由上實驗結果顯示，使用適當粒徑 CG 形成 PGA-CG，能有效提高 PG 生化反應之效率。故後續實驗探討，選擇使用粒徑 46.5nm 之 CG 為後續研究。

3-2 CG 添加量之影響

先前研究[7]，由 Pymol software 繪畫出 PGA 之 3D 結構圖(如圖 4)，活性區位於較內側。PGA 與 CG 整合穩定懸浮於溶液，CG 量過多是否會影響 PG 水解反應生成

表 1 分析儀測試 CG 粒徑之結果



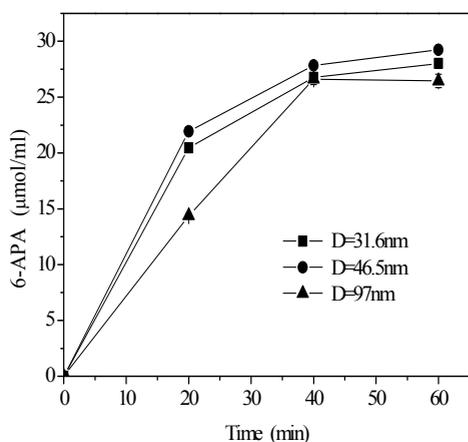


圖 3 CG 粒徑對生化反應之影響

Loading Crude PGA activity: 0.94 U/ml

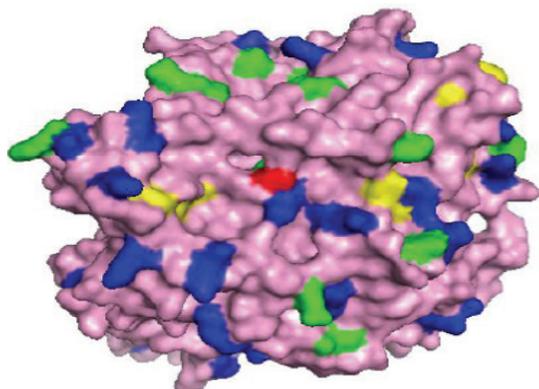


圖 4 3D structure of PGA[7].

The graph is obtained by using Pymol software simulation, where red color represents the location of active site, yellow color is histidine, green color is glutamic acid and blue color is lysine.

6-APA，當溶液內 CG 添加量增多，CG 會配位鍵結於 PGA 表面，造成 PGA 活性位置顯現影響，進而影響 6-APA 之生成量，因此接續探討 CG 添加量與

6-APA 生成量之影響，結果如圖 5。由圖 5 顯示，發現 CG 添加量由 0ml、0.05ml、0.2ml 逐漸增加，在 20min 時，6-APA 生成量為 6.48、14.42、18.68 逐漸增加；但使用 0.4ml CG 添加量，6-APA 生成量卻降至 13.62 $\mu\text{mol/ml}$ 。由結果顯示，適量增加 CG 添加量，有增加 6-APA 生成量；當添加 0.2ml CG 時，較未添加 CG，6-APA 之生成量增加 2.9 倍；顯示過多 CG 添加，會影響 PGA 活性位置顯現，造成 6-APA 之生成量反而下降。因實驗經費短缺，所以我們選擇添加 0.05ml CG 為後續實驗之添加量。

3-3 CG 溶液之 pH 值影響

由 Gole *et al.*, 知 CG 是粒子懸浮液 [5]，pH 值會影響 CG 穩定性，另外 pH 也會影響 PGA 穩定性 [7]，溶液內 pH 值會影響 CG 穩定性，相對影響 CG 配位鍵結於 PGA 表面之穩定性與 PGA 活性表現性，進而影響 6-APA 之生成量。所以固定 0.05ml CG (D=46.5nm)，接續探討 pH 值對 6-APA 生成量影響，實驗結果顯示於圖 6。由圖 6 知，當 pH=5、8、10 下，在 20min 時，生成 6-APA 量為 11.28、14.85、11.39 $\mu\text{mol/ml}$ 。其結果顯示在 pH=8 下，6-APA 有高生成量效果。另外，chen *et al.*, 研究 [7]，得知，在 pH=8 下，PGA 活性之穩定性最好，隨 pH 值升高 (> pH 8)，PGA 穩定性會快速降低，故



選擇 CG 溶液為 pH8，進行後續研究之條件。

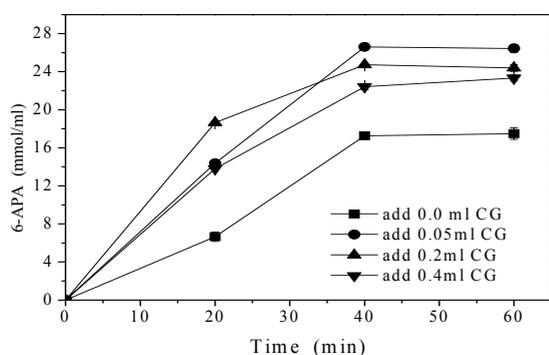


圖 5 CG 添加量之影響

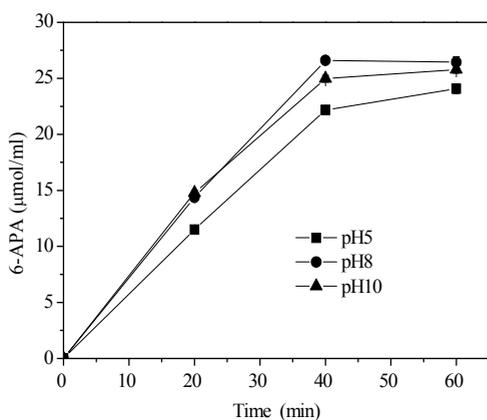


圖 6 pH 值之影響

3-4 溫度之影響

溶液溫度會加速 PGA 進行生化水解，反應生成 6-APA [10]，但溶液溫度太高易引發 PGA 蛋白質失活問題[11]，因此固定 pH 8、0.05ml CG (D=46.5nm)下，嘗試溫度對 PGA 活性影響，結果顯示於圖 7。由圖 7 知，當溫度逐漸由 4°C 增至 50 °C，PGA 活性由 0.16 U/ml 升高為 1.21

U/ml，活性隨溫度升高而增加；但由 Chen *et al.*，研究得知[7]，PGA 酵素液放置在 50°C x1h 後，對 PGA 活性快速下降約 50%，即逐漸失活現象。以長期實驗考慮下，故選擇 37 °C 為後續研究之條件。

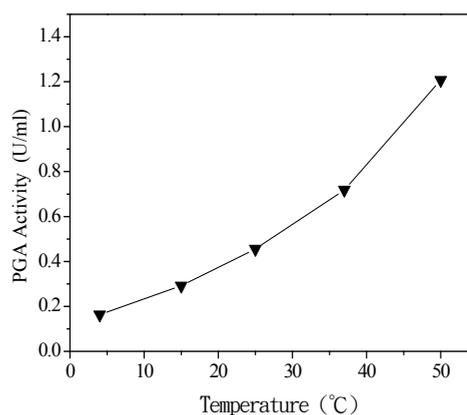


圖 7 溫度之影響

3-5 CG 對活化能之影響

由 Hu *et al.* [12]知，水溶液之熱傳效率受內含物顆粒影響，接著利用鹽析法，在 PGA 液中，加入中性鹽 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，使大分子雜蛋白沉澱析出。鹽析法在蛋白質領域應用廣泛，其優點是成本低，不需要特別昂貴的設備；操作簡單、安全；對活性蛋白質具穩定作用，因此首先利用鹽析與透析之純化步驟，進行 PGA 純化，減少粗 PGA 液中的雜蛋白，減少雜蛋白對 CG 的吸附，純化結果如表 2，以 60-80%鹽析濃度下，得到 PGA 比活性(specific PGA activity; SA) 0.436 U/mg 最高。固定 pH=8、37°C 下，使用



$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 鹽析去除粗酵素液之雜蛋白，得到高比活性值之 PGA，嘗試應用 CG 於高比活性 PGA，測試對 6-APA 生成量變化影響，結果如圖 8。由圖 8 知，發現未使用 CG 之 PGA ($\text{SA} = 0.043 \text{ U/mg}$)，在 20 min 內生成 $6.6 \mu\text{mol}$ 6-APA /ml；應用於高比活性值之 PGA ($\text{SA} = 0.436 \text{ U/mg}$) 在 20min 內生成 $23.4 \mu\text{mol}$ 6-APA /ml；而使用 0.05ml CG，於高比活性值之 PGA ($\text{SA} = 0.436 \text{ U/mg}$) 在 20min 內生成 $24.2 \mu\text{mol}$ 6-APA /ml，即升高 3% 活性效率。由此可知 CG 可提高 PGA，在 PG 生化反應之生成 6-APA 效率。

PGA 促使 PG 生化反應，生成 6-APA，由上述結果知，CG 對純化後 PGA ($\text{SA} = 0.436 \text{ U/mg}$) 有提昇效果。所以接續探討 CG 對生化反應之影響。在各種溫度下，固定時間內 6-APA 生成量，計算求得反應速率 $-r_A = \Delta[6\text{-APA}]/\Delta t$ ；依反應溫度(T)與反應速率($-r_A$) 之關係，利用 Arrhenius eq.作圖，結果如圖 9。由圖 9 發現未使用 CG，PG 生化反應之活化能 $E_a = 8665.7 \text{ kcal/T}$ ；使用 0.05ml CG，活化能 $E_a = 7649.2 \text{ kcal/T}$ 。由上述結果知，CG 具有降低 PG 水解生成 6-APA，生化反應的活化能 E_a 功用(降低 11.7%)，提昇整體 PG 水解生化反應。

表 2 PGA 鹽析的結果

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Protein (mg/ml)	PGA activity (U/ml)	specific PGA activity (U/mg)
20>	3.548	0.263	0.074
20-40	9.633	0.591	0.061
40-60	6.493	2.834	0.436
60-80	16.200	2.916	0.180
80-90	4.918	0.452	0.092

Load Crude broth contains protein 8.815 mg /ml, PGA activity 0.378 U/ml, and specific PGA activity 0.043 U/mg.

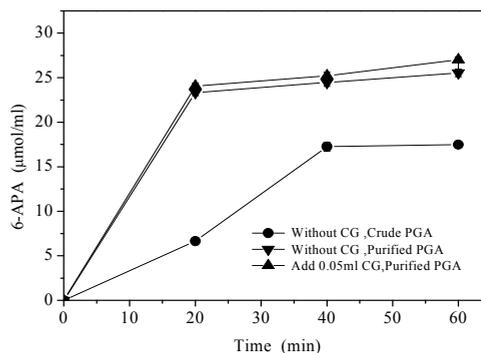


圖 8 高比活性值之 PGA 之影響

3-6 CG 重覆使用性

若 CG 在生化反應具重覆使用性，一方面降低 PG 水解反應之生產費用，另一方面增加 CG 應用價值。因此，使用 PGA ($\text{SA} = 0.436 \text{ U/mg}$) 與 0.05ml CG ($D = 46.5 \text{ nm}$) 下，固定 $\text{pH} = 8$ 、 37°C 下，進行 6-APA 生成量變化測試；接著，每次反應後，將高比活性值之 PGA ($\text{SA} =$



0.436 U/mg)離心與回收 CG，再將回收 CG 加入新的高比活性值之 PGA (SA = 0.436 U/mg)中，測試 6-APA 生成量；接續，依步驟 2-4-1 轉換算出 PGA 活性；定義：相對活性(relative activity)=(重覆測試後 PGA 活性)/(初 PGA 活性)*100%，測試重覆使用 CG 在 PG 生化反應之生成 6-APA 效率影響，實驗結果如圖 10。由圖 10 發現，CG 重複回收使用，擴均維持約 100%穩定 6-APA 生成量，顯示 CG 在生化反應中，具重覆使用性與實用性價值。

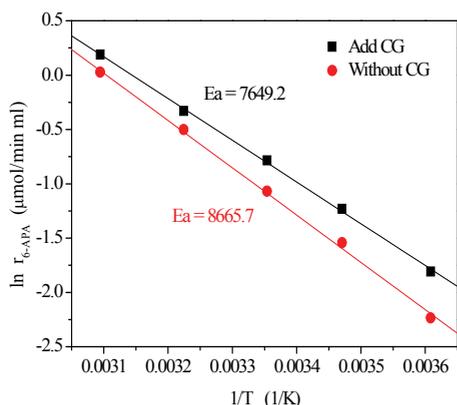


圖 9 PG 生化反應之活化能影響

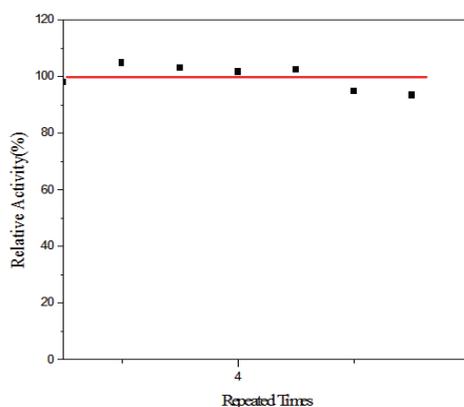


圖 10 CG 之重複使用性

4. 結論

CG 可增強 PG 於水解生化反應，促成 6-APA 之生成量增加。CG 使用最適條件為：添加 0.05ml CG (D=46.5nm)、pH8、37 °C 時下，6-APA 之生成量較未添加 CG 的活性增加 2.13 倍。另實驗發現 0.05 ml CG 量仍可促進 6-APA 之生成量增加，在於 CG 降低 PG 水解生化反應之活化能 (降低 11.7%)，所以 6-APA 之生成量增加。另外，將 CG 重複使用性測試，經 7 次重複使用後，6-APA 之生成量維持穩定。由上可知，應用 CG 於生化反應，深具開發潛力。

五、誌謝

感謝中興大學化工系劉永銓教授與實驗室同學之協助，使得本實驗得以順利進行，在此一併感謝。



參考文獻:

1. Kotha, A., et al., *Adsorption and expression of penicillin G acylase immobilized onto methacrylate polymers generated with varying pore generating solvent volume* Appl Biochem Biotechnol, 1991. 30(3): p. 297-302.
2. He, J., et al., *A new support for the immobilization of penicillin acylase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000. 11(1): p. 45-53.
3. Boyde, A. and M.A. Hayat, *Colloidal Gold. Principles, Methods and Application*. J Anat. , 1991. 176: p. p. 215-216.
4. Chandler, J., T. Gurmin, and N. Robinson, *The place of gold in rapid tests*. IVD Technology, 2000. 6(2): p. p. 37-49.
5. Gole, A., et al., *Studies on the formation of bioconjugates of Endoglucanase with colloidal gold*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. 25(2): p. P. 129-138.
6. Luo, X.L., et al., *Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. 21(1): p. P.190-196.
7. Chen, C.-I., et al., *Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane*. J. Memb. Sci., 2011. 380: p. P.34-40.
8. Balasingham, K., et al., *The isolation and kinetics of penicillin amidase from escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 1972. 276: p. 250-256.
9. Bradford, M.M. and *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. 72: p. 248-254.
10. Robas, N., et al., *Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of Escherichia coli ATCC 11105*. Biotechnol Bioeng., 1993. 41: p. p.14-24.
11. Chen, C.-I., et al., *Development of the reversible PGA immobilization by using the immobilized metal ion affinity membrane*. J. Memb. Sci. , 2012. 401-402: p. P.33-39.
12. Hu, M. and G.V. Hartland, *Heat Dissipation for Au Particles in Aqueous Solution: Relaxation Time versus Size*. J. Phys. Chem. B 2002. 106(28): p. p.7029-7033.

