

奈米膠體金粒徑對酵素之生化轉化效率探討

曾慧娟¹, 陳志義²

¹ 桃園創新技術學院化妝品應用系
桃園縣中壢市中山東路三段 414 號

² 修平科技大學能源與材料科技系
台中市大里區工業路 11 號

摘要

本研究製作奈米膠體金(Colloidal Gold, CG), 探討nano-CG各種粒徑進行PG (penicillin G; 盤尼西林醯胺)生成6-APA之生化反應轉化效率影響研究。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。其最佳條件為0.05ml CG溶液(D = 46.5 nm), 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。

關鍵詞: 膠體金, 盤尼西林醯胺, 奈米, 生化反應

Investigation of nano-colloidal gold to the bioconversion efficiency by enzyme

HUI-CHUAN TSENG¹, CHIH-I CHEN²

¹ Department of Applied Cosmetology, Taoyuan Innovation Institute of Technology

No. 414, Sec.3, Zhongshan E. Rd., Zhongli City, Taoyuan County 32091 Taiwan(R.O.C.)

² Department of Energy and Materials Technology, Hsiuping University of Science and Technology

No. 11 Gongye Rd, Dali Dist., Taichung City 41280, Taiwan, R.O.C

ABSTRACT

In this study, we focus on the effect of CG (nano-colloidal gold) on the conversion efficiency of PG (penicillin G) 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. And CG would be reusable, which could maintain the conversion efficiency of 6-APA nearly the same even repeated used 7 times.

Key Words: CG (colloidal gold), PG (penicillin G), nano, bioconversion efficiency

一、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。

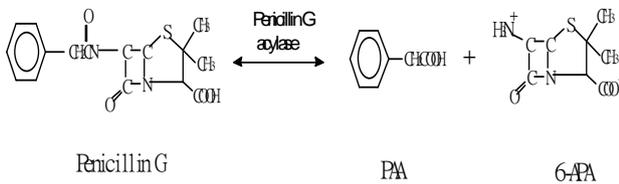


圖 1. 盤尼西林之水解反應

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 粒徑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 之粒徑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。

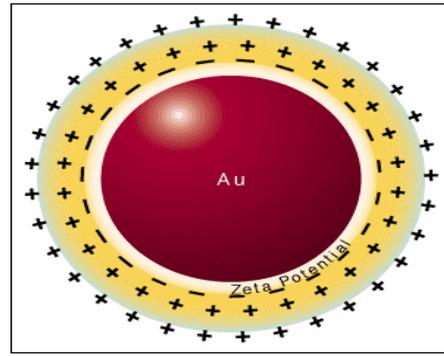


圖 2. CG 組成 [4]

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。

二、材料與方法

(一) 藥品:

HAuCl_4 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。

(二) CG 之製備

取 1% HAuCl_4 2 ml 加入蒸餾水，體積至 200 ml，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 HAuCl_4 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 30 min，待冷卻後加入 0.2M K_2CO_3 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。

(三) 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 100 ml，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 (0.1 M 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]。

(四)分析方法

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

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。

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。

三、結果與討論

(一) 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(二) 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 31.6 nm，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 31.6 nm、46.5 nm 與 97 nm 三種 CG 粒徑。將 0.2 ml 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 0.94 U/ml，即 20 min 內生成 18.8 μmol 6-APA /ml; 使用 D = 31.6 nm 之 PGA-CG，20 min

內生成 20.4 μmol 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 nm 之 PGA-CG 下，20 min 內生成 21.8 μmol 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 nm 之 PGA-CG 下，20 min 內生成 14.8 μmol 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 46.5 nm 之 CG 為後續研究。

(二) 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 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，結果如圖 5。由圖 5 顯示，發現 CG 添加量由 0 ml、0.05 ml、

表 1. 分析儀測試 CG 粒徑之結果

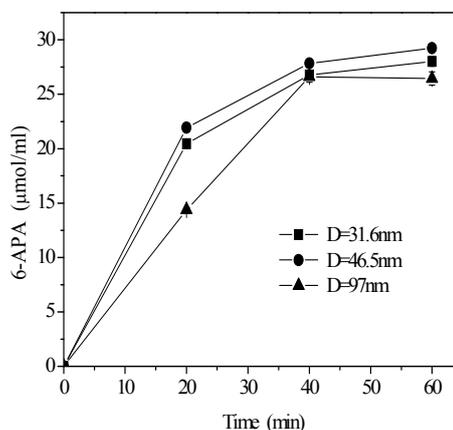
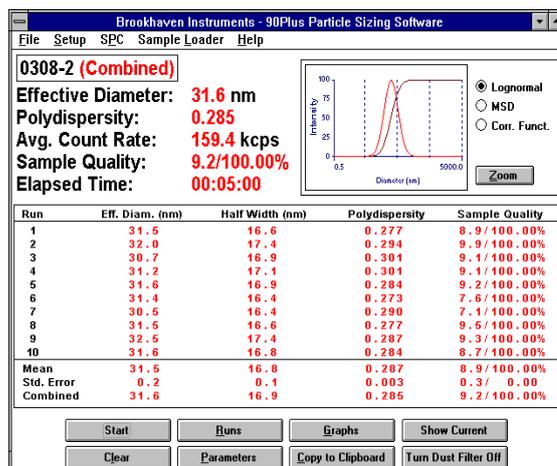


圖 3. CG 粒徑對生化反應之影響

Loading Crude PGA activity: 0.94 U/ml

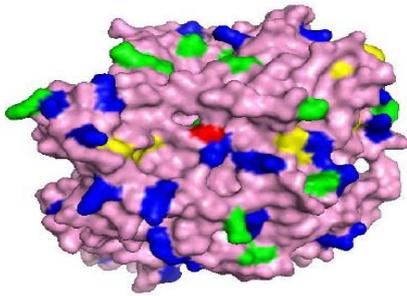


圖4. 3D structure of PGA[7].

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

0.2 ml 逐漸增加，在 20 min 時，6-APA 生成量為 6.48、14.42、18.68 逐漸增加；但使用 0.4 ml CG 添加量，6-APA 生成量降至 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 0.2 ml 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。

(三) 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 0.05 ml CG ($D = 46.5 \text{ nm}$)，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 20 min 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 值昇高 (> pH 8)，PGA 穩定性會快速降低，故選擇 CG 溶液為 pH 8，進行後續研究之條件。

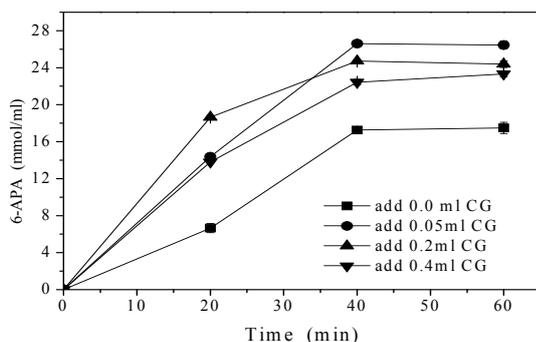


圖 5. CG 添加量之影響

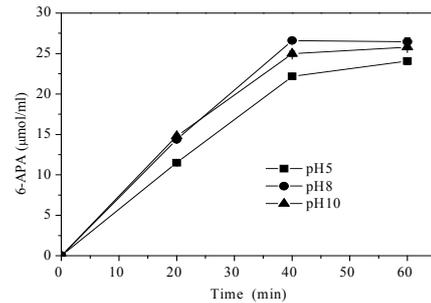


圖 6. pH 值之影響

(四) 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 ($SA = 0.436 \text{ U/mg}$) 與 0.05 ml CG ($D = 46.5 \text{ nm}$) 下，固定 pH = 8、37 $^{\circ}\text{C}$ 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 ($SA = 0.436 \text{ U/mg}$) 離心與回收 CG，再將回收 CG 加入新的高比活性值之 PGA ($SA = 0.436 \text{ U/mg}$) 中，測試 6-APA 生成量；接續，依步驟(四)-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 7。由圖 7 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。

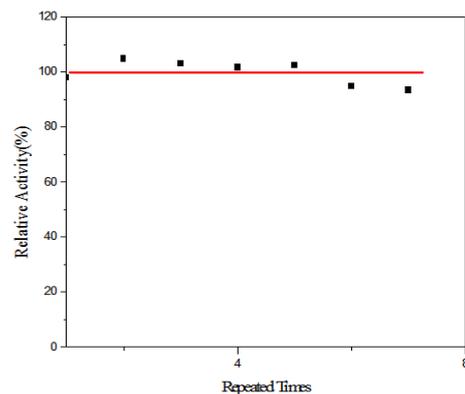


圖 7. CG 之重複使用性

四、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 0.05 ml CG ($D = 46.5 \text{ nm}$)、pH 8、37 $^{\circ}\text{C}$ 時下，6-APA 之生成量較未添加 CG 的活性增加 2.13 倍。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。

參考文獻:

1. Kotha, A., L. Selvaraj, C. R. Rajan, S. Ponrathnam, K. K. Kumar, G. R. Ambekar, and J. G. Shewale (1991) Adsorption and expression of penicillin G acylase immobilized onto methacrylate polymers generated with varying pore generating solvent volume, *Appl Biochem Biotechnol*, **30**, 297-302.
2. He, Jing, Xiaofen Li, D. G. Evans, Xue Duan and Chengyue Li (2000) A new support for the immobilization of penicillin acylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 45-53.
3. Boyde, A. and M. A. Hayat (1991) Colloidal Gold. Principles, Methods and Application, *J Anat.* **176**, 215-216.
4. Chandler, J., T. Gurmin, and N. Robinson (2000) The place of gold in rapid tests, *IVD Technology* **6**, 37-49.
5. Gole, Anand, Santosh Vyas, Sumant Phadtare, Anil Lachke, and Murali Sastry (2002) Studies on the formation of bioconjugates of Endoglucanase with colloidal gold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **25**, 129-138.
6. Luo, Xi-Liang, Jing-Juan Xu, Qing Zhang, Gong-Jun Yang, and Hong-Yuan Chen (2005) Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 190-196.
7. Chena, Chih-I, Yi-Miao Ko, Chwen-Jen Shieh, and Yung-Chuan Liu (2011) Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane. *J. Memb. Sci.* **380**, 34-40.
8. Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, M. D. and Lilly (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 250-256.
9. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.