探討奈米膠體金對親和盤尼西林醯胺酵素膜之轉化效率影響

曾慧娟[1*]，陳志義[2]

[1]南亞技術學院化妝品應用系

[2]修平科技大學能源與材料科技系

摘要

應用奈米膠體金 (nano-Colloidal Gold, CG) 與固定化盤尼西林醯胺酵素膜 (Immobilized Penicillin acylase Membrane, IPM)，測試 IPM-CG 之盤尼西林醯胺酵素(Penicillin G Acylase; PGA)活性，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 IPM 膜、CG/PGA 比例和 pH 值等因素，探討 IPM-CG 之活性對 6-APA 反應轉化效率之影響。實驗結果證實，IPM-CG 可提高 PGA 活性，增加反應生成 6-APA 之轉化效率。其最佳添加條件為：CG (D=31.6nm)/PGA=70/30，在 pH8、37℃條件下，IPM-CG 之轉化效率較 IPM 的增加 2.1 倍。因為之前研究發現 CG 效應為降低 PG 反應的活化能，IPM-CG 提高 PGA 活性，使得生成 6-APA 之轉化效率提高。將 IPM-CG 經重複使用 5 次，仍維持生成 6-APA 之轉化效率效果。

關鍵詞：膠體金，固定化盤尼西林醯胺酵素膜，轉化效率，盤尼西林醯胺酵素。

*Email:hctseng@nanya.edu.tw　Tel:03-4361070#4406　Fax:03-4652040

INVESTIGATION OF THE BIOCONVERSION EFFICIENCY FOR IMMOBILIZED PENICILLIN ACYLASE MEMBRANE WITH NANO-COLLOIDAL GOLD

Hui-Chuan Tseng[1*], Chih-I Chen [2]

[1] Department of Applied cosmetology, Nanya Institute of Technology, Taiwan.

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

Abstract

In this study, we focus on the effect of Immobilized Penicillin acylase Membrane, (IPM) with nano-colloidal gold (CG) that were used to examinated the activity of Penicillin G acylase (PGA) of IPM-CG on the conversion efficiency of PG to 6-APA. Those influential factors under study are various CG particle size, CG/PGA ratio, pH value and IPM-CG stability. From the experimental result, it shows that IPM-CG can increase the activity of PGA and conversion efficiency could be increased 189% with the help of IPM-CG. The optimal conditions are as follows: CG (31.6 nm)/PGA ratio (70/30) to pH 8 PGA solution at 37 ℃. IPM-CG increased the activity of PGA, resulting in a higher conversion efficiency of 6-APA, as the CG effect was found to decrease the activation energy of PG reaction, which made the conversion efficiency to be higher than ever. And IPM-CG would be reusable, which could maintain the conversion efficiency of 6-APA nearly the same even repeated used 5 times.

Key word: colloidal gold (CG), Penicillin G Acylase (PGA), Immobilized Penicillin acylase Membrane (IPM), the conversion efficiency

*Email:hctseng@nanya.edu.tw　Tel:03-4361070#4406　Fax:03-4652040

壹、前言

盤尼西林醯胺酵素(Penicillin G acylase；PGA)是一項重要生物觸媒，可進行盤尼西林(Pencillin G；PG)之水解反應，形成六青黴素酸(6-aminopenicillanic acid；6-APA)，作為抗生素原料藥，如圖 1 所示。因此，如何得到大量，便宜且高純度 PGA，對經濟量產化是很重要[3]。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[4]，即利用 PGA 將 PG 水解而得。因此，如何得到大量，便宜且高純度 PGA，對經濟量產化是很重要。

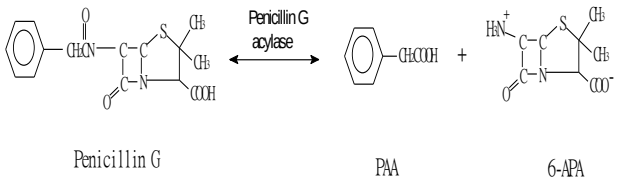


圖 1. 盤尼西林之水解反應

奈米膠體金(Colloidal Gold, CG)為一奈米粒子懸浮液，Hayat et. al.製備係使用還原劑如：檸檬酸（citric acid）、丹寧酸（tannic acid）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 [5,6]，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，增加酵素壽命及穩定性，使用 CG 固定化 horseradish peroxidase 分解 chitosan hydrogel 作用[7,8]。

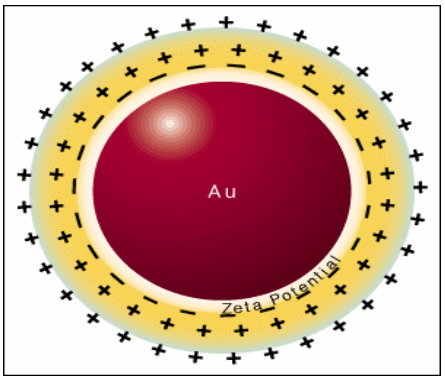


圖 2　CG 組成

固定化酵素方法係利用載體表面接上不同官能基如 iminodiacetic acid (IDA)、

nitrilotriacetic acid (NTA)等，再利用其固定金屬離子，如 Cu^{2+}，Zn^{2+}，Ni^{2+}等，由於此金屬官能基螯合型式極易與 PGA 酵素中之組胺酸(histidine) 、半胱胺酸(cystein)、色胺酸(tryptophan)等胺基酸形成極佳之特異性吸附效應[9,10]，當應用在蛋白質純化時，可得到極佳之純化倍率及回收率[11]。由研究發現藉由固體載體上形成高密度銅離子產生特異性吸附效應，進而達到分離純化 PGA。因此本研究將利用固定化金屬親和酵素薄膜（immobilized penicillin acylase membrane；IPM）[12]與 CG 特性，將粗 PGA 液中分別進行固定化於 CG 與 IPM 上，利用 IPM 作為載體，嘗試吸附 CG 於 IPM 上，依 PGA 活性定義為每分鐘之 PG 轉化 6-APA 生成量，即為轉化效率；因此由膜之活性表現，可知膜之轉化效率。探討 IPM 與 CG 親和吸附步驟順序、pH、CG/PGA 比例與 CG 粒徑等影響因素，進而探討 IPM-CG 轉化效率之影響。

貳、材料及方法

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 2ml, 1% $HAuCl_4$ 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 $HAuCl_4$ 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 30min，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 100ml，並於 9000 rpm、4℃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℃下離心 5 分鐘。收集離心後之上清液，即為粗 PGA 液[12]。

四、IMAM 與 IPM 之製備

取再生纖維薄膜一張，加入 5ml Epichlorohydrin (EPI)與 20ml, 1,4M NaOH，於震盪培養箱中 24℃, 150rpm 下，進行反應 12 小時後，以去離子水清洗兩次，然後將此帶環氧基之薄膜，使用 1M Na_2CO_3 泡製 1M IDA，於 24℃,150rpm 下，進行反應 14 小時，再用去離子水清洗兩次，而後將此膜置於 25ml, 25mM CuSO4 溶液中；於 18℃,150rpm 下反應 1 小時，並以 pH 8, 50ml 磷酸緩衝液(PBS; sodium phosphate buffer)清洗，即製成固定化金屬親和薄膜(immobilized metal affinity membrane; IMAM)。再將 IMAM 置於 25ml, 0.1 U/ml PGA 粗酵素液內吸附 12hr，成為親和吸附酵素膜（immobilized penicillin acylase membrane；IPM），保存於 4℃, pH8, 10mM PBS, 0.1％NaN_3 中，備用存放 [10]。

五、 分析方法

(一) 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 μmol/(min・ml)之量[12]。

(二) 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。

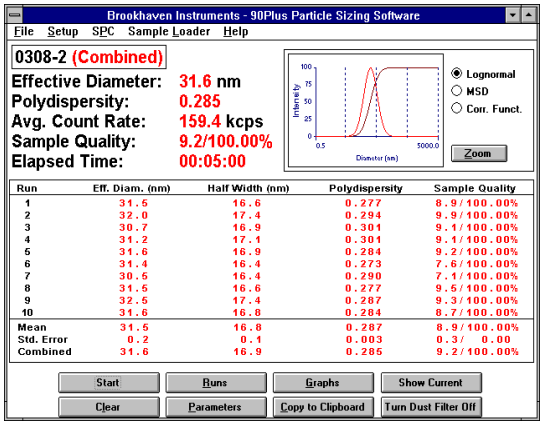
參、結果與討論

一、CG 粒徑分析與粒徑對活性之影響

由 Hayat et al., [3]製備 CG 過程知，使用不同量 1 % trisodium citrate 為還原劑，依步驟二　CG 之製備，還原 $HAuCl_4$ 製備各種 CG 之粒徑。加入 1.87ml, 1% trisodium citrate 作製備 CG solution (約 1.47 x 10^{-4}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。利用上述步驟製得 31.6nm、46.5nm 與 97.0nm 三種 CG 粒徑。將 25ml CG 加入 25ml 粗 PGA 液內，放置 pH=7 buffer、24h x 4℃下，形成 PGA-CG 螯合體，再將 IMAM 膜放入吸附 PGA-CG，形成 IMAM-CG

膜。由之前研究之結果[1,2]，已可知 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，因此測試 IMAM-CG 膜之活性，結果如圖 3 所示。由圖 3 知，當 CG 粒徑為 31.6nm 時，IMAM-CG 膜活性為原先 IPM 之 54%；隨 CG 粒徑增大為為 97.0nm 時，IMAM-CG 膜活性為原先 IPM 之 42%。由結果顯示隨 CG 粒徑增大時，CG 不易親和吸附於 IMAM 膜上，造成 IMAM-CG 膜活性反而降低。相對下，要進一步探討 IMAM-CG 膜之親和吸附步驟。

表 1 CG 粒徑之結果



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Sample Quality
1	31.5	16.6	0.277	8.9/100.00%
2	32.0	17.4	0.294	9.9/100.00%
3	30.7	16.9	0.301	9.1/100.00%
4	31.2	17.1	0.301	9.1/100.00%
5	31.6	16.9	0.284	9.2/100.00%
6	31.4	16.4	0.273	7.6/100.00%
7	30.5	16.4	0.290	7.1/100.00%
8	31.5	16.6	0.277	9.5/100.00%
9	32.5	17.4	0.287	9.3/100.00%
10	31.6	16.8	0.284	8.7/100.00%
Mean	31.5	16.8	0.287	8.9/100.00%
Std. Error	0.2	0.1	0.003	0.3/ 0.00
Combined	31.6	16.9	0.285	9.2/100.00%

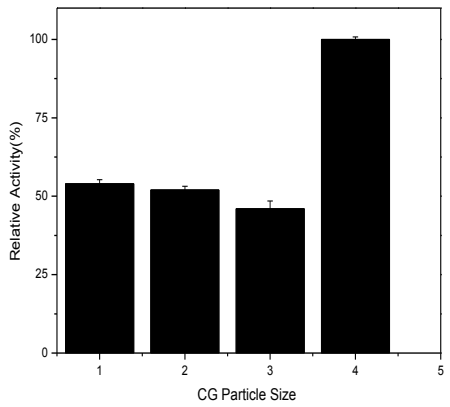


圖 3 IMAM-CG 之活性 (樣品 l: 31.6 nm；2: 46.5nm；3: 97.0nm; 4: IPM 膜)

二、PGA-CG 親和吸附步驟之探討

(一) IMAM 與 IPM 膜之影響

上述不同粒徑 CG 之實驗結果，發現無法 PGA-CG 吸附於 IMAM 之 IDA 官能基上，因此構想在於 PGA-CG 與 IPM 膜之 Cu^{2+}，是否有共同親和吸附 PGA 之現象，因此嘗試 25ml,31.6nm CG 加入 25ml 粗 PGA 液內，放置 pH=7 buffer、24h x 4 ℃下，形成 PGA-CG 螯合體，再將 IPM 膜放入吸附 PGA-CG，形成 IPM-CG 膜，測試 IPM-CG 膜之活性，結果如圖 4 所示。由圖 4 知，當 31.6nm CG 粒徑之 IPM-CG 膜活性為原先 IPM 之 92%，明顯比 IMAM-CG 膜活性 52%高，表示 IPM 膜有共同親和吸附 PGA-CG。

(二) pH 值之影響

由之前研究之結果[13,14]知，pH 值、溫度會影響 IPM 膜之活性，因為 PGA

與 CG 在 pH 弱鹼性中有好的結合作用，Free　PGA 活性在 pH=7.8，IPM 在 pH=8.0 最適化，因此嘗試 25ml,31.6nm CG 加入 25ml 粗 PGA 液內，放置各種 pH buffer、24h x 4℃下，形成 PGA-CG 螯合體，再將 IPM 膜放入吸附 PGA-CG，形成 IPM-CG 膜，測試對 IPM-CG 膜活性之影響，結果如圖 5 所示。由圖 5 知，在 pH7 時 IPM-CG 活性約為 IPM 膜之 92%，當 pH8 下 IPM-CG 活性約 189%最高，隨之 pH 值至 10 時，相對活性下降至 95%；此結果與研究[13]相符，pH 值會影響 IPM-CG 之活性。

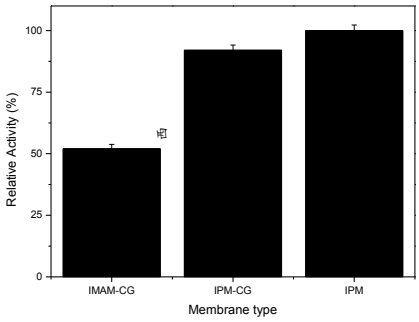


圖 4 IMAM 與 IPM 膜之影響

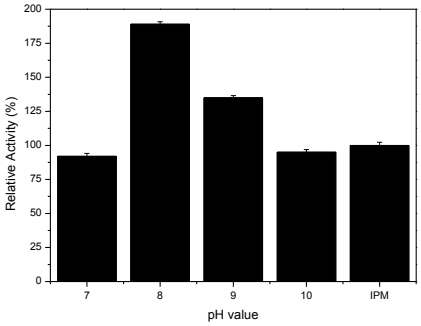


圖 5　pH 值之影響

(三)CG/PGA 比例之影響

由上述實驗結果知 IPM 膜有共同親和吸附 PGA-CG，接續調整 PGA 與 CG 比例對活性之影響探討，嘗試 100ml 內 CG/PGA=40/60、50/50、60/40、70/30、80/20 之比例，放置 pH 8、24h x 4℃下，形成 PGA-CG 螯合體，再將 IPM 膜放入吸附 PGA-CG，形成 IPM-CG 膜，測試對 IPM-CG 膜活性之影響，結果如圖 6 所示。由圖 6 發現，在 CG/PGA 比例由 40/60 ，IPM-CG 膜活性為原先 IPM 之 98%，逐漸比例升高至 70/30，IPM-CG 膜活性升至 210%；當比例升高至 80/20，IPM-CG 膜活性降至 130%。由此可得到 CG/PGA 為 70/30 是最適化比例。探討此程序對 IPM 膜表面狀態之影響，使用掃瞄式電子顯微鏡(Scanning electron microscopy ,SEM)掃描原始 IPM，探討 IPM 膜之表面狀態，其影像檔如圖 7。由圖 7(A)可發現原始 IPM 膜表面有許多 1-10μm 孔洞均勻分佈；但是，由圖 7(B)可發現 IPM 親和吸附 PGA-CG 後，明顯看出表面吸附 CG 粒子。之前研究[2]知，CG 有助於降低 PG 反應的活化能 (降低 11.7%)，使得生成 6-APA 之轉化效率提高，因此當 CG 量越多，整體 IPM-CG 活性越高。

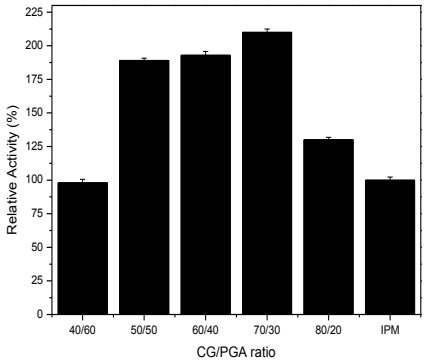
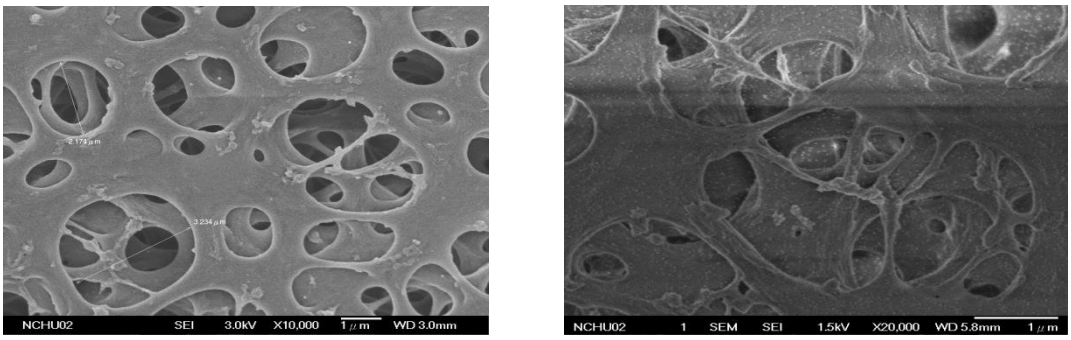


圖 6 CG/PGA 比例之影響



(A)　　(B)

圖 7 掃瞄式電子顯微鏡分析(A)原始 IPM 膜表面(B) CG/PGA=70/30 親和吸附後之 IPM 膜表面

三、IPM-CG 之穩定性探討

PGA 酵素為特異性蛋白質，很容易失活，尤其受週圍環境如微生物、pH、溶質與緩衝液濃度等因素之影響。因此，探討 IPM-CG 膜經 PG 水解反應後之穩定性，實驗結果如圖 8。由圖 8 發現 IPM-CG 存放在 PB buffer (10mM, pH8, 0.1% NaN_3) 每天進行相同活性測試，經 5 次測試， IPM-CG 膜之活性均維持穩定。

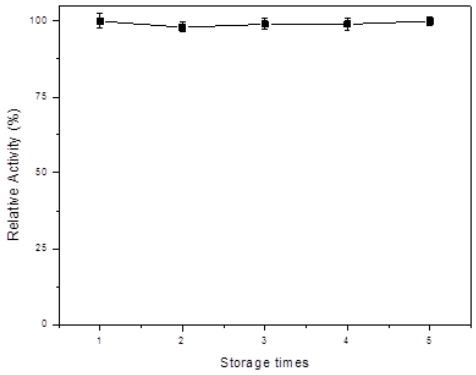


圖 8 IPM-CG 之穩定性

肆、結論

本研究乃添加 CG(PGA) 於 IPM 確實可以增強 PG 於水解生化反應，促使 6-APA 之生成量增加。CG 使用最適條件為：添加 35ml CG (D=32.2nm)與 15ml PGA 結合、pH8、37 ℃下的狀態，IPM-CG 膜之活性為未添加 CG 的 IPM 膜的 2.1 倍。由此可知 CG 效應為降低 PG 反應的活化能，IPM-CG 提高 PGA 活性，使得生成 6-APA 之轉化效率提高。將 IPM-CG 經重複使用 5 次，仍維持生成 6-APA 之轉化效率效果。因此應用 PGA-CG 混合液添加於生化反應，相當具有開發潛力。

伍、致謝

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] 陳志義、姚呈儒, 2013,”探討金屬親和樹脂與金屬親和薄膜對盤尼西林醯胺酵素之純化效果”, 修平學報第 26 期, P.55-64。

[2] 陳志義、陳品妍, 2013,” 探討奈米膠體金對盤尼西林醯胺酵素之轉化效率影響”, 修平學報第 27 期, P1-10。

[3] Kotha, A., et al., 1991,"Adsorption and expression of penicillin G acylase immobilized onto methacrylate polymers generated with varying pore generating

solvent volume", Appl Biochem Biotechnol, 30(3): p. 297-302.

[4] He, J., et al., 2000, "A new support for the immobilization of penicillin acylase", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11(1): p. 45-53.

[5] Boyde, A. and M.A. Hayat, 1991, " Colloidal Gold. Principles", Methods and Application. J Anat. , 176: p. p. 215-216.

[6] Chandler, J., T. Gurmin, and N. Robinson, 2000,"The place of gold in rapid tests", IVD Technology, 6(2): p. p. 37-49.

[7] Gole, A., et al., 2002, " Studies on the formation of bioconjugates of Endoglucanase with colloidal gold". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 25(2): p. P. 129-138.

[8] Luo, X.L., et al., 2005, "Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly". Biosensors and Bioelectronics,. 21(1): p. P.190-196.

[9] C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, E. Cortes, J.L. Garcia, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports, Biotechnology and Bioengineering 76 (2001) 269-276.

[10] R.D. Johnson, R.J. Todd, F.H. Arnold, Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c, Journal of Chromatography A 725 (1996) 225-235.

[11] V. Fitton, X. Santarelli, Evaluation of immobilized metal affinity chromatography for purification of penicillin acylase, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 754 (2001) 135-140.

[12] Chen, C.-I., et al., 2011," Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane". J. Memb. Sci.,. 380: p. P.34-40.

[13] Yi-Miao Ke, Chih-I Chen, et al., 2010,, “Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies”, Pro. Biochem. 45(4), p.500-506

[14] Chih-I Chen, et al., 2012, “Development of the reversible PGA immobilization by using the immobilized metal ion affinity membrane”, J. Membr. Sci. 401– 402, p.33– 39.