

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

廢棄生鮮茶葉鞣酸胺？之固定化及應用於茶胺酸合成生化反應器之研發

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2214-E-041-001

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：葉東柏

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 九十一 年 十 月 二十九 日

一、中文摘要

本研究係利用來自生鮮茶葉中感染的一種桿菌所有的麴醯胺？應用於茶胺酸的合成。研究成果包括菌種初步鑑定為黃單胞桿菌屬，含胞內及胞外酵素，兩者均具茶胺酸合成能力，但就膠體電泳所呈現的特性兩者顯然不同。胞外酵素經部分純化，顯示分子量約為 68,000，麴醯胺分解能力的最適 pH 為 8.0，但茶胺酸合成能力的最適 pH 却為 11.0。酵素用樹脂(XAD-7)吸附或藉由聚丙醯烯胺膠體電泳包埋達到固定化，置入小型唧筒內作成反應器以生產茶胺酸。

二、英文摘要

In this study, an intra- and an extra-cellular glutaminase were found from an infected bacterium of fresh tea leaves. The self-developed HPLC procedures were modified for assessing these enzymes in hydrolytic and -glutamyl transfer activity. The extra-cellular one was partial purified and further characterized for its molecular weight (about 68,000) and optimal pHs (8.0 and 11.0 for hydrolytic and transfer activity respectively). The enzyme was immobilized either by adsorption on Amberlite XAD-7 gel or by entrapment after PAGE. The insolublized enzyme thus obtained was packed into a small syringe, and used as a reactor for theanine production.

三、緣由與目的

茶中含有茶胺酸合成？(1-2)，因此理論上應可利用新鮮茶葉得到酵素抽出物以合成茶胺酸。然而由於此酵素屬鍵結 類(ligases)，以致在體外反應時，需要 ATP 參與以提供能量，此種特性大大的增加了生產成本。而在 Sasaoka 等人的報告中，確認了此酵素相當不安定，更降低了此酵素的應用性。

除了茶胺酸合成 外，與茶胺酸代謝有關的酵素可能還包括了麴醯胺？(glutaminase)及茶胺酸水解 (theanine hydrolase)兩種。根據 Hartman 的綜合論著(3)，麴醯胺？可能具有水解及(或)轉基 的活性。1993 年，Abelian 等人指出利用固定化上述的假單胞菌能夠催化

麴醯胺與乙基胺間發生轉醯胺化作用(trans-amidation)而形成茶胺酸(4)。1996，Tachiki 等人自該菌純化出麴醯胺？(5)，並進一步在 1998 年證明在高濃度的麴醯胺(0.7M)與乙基胺(1.5M)存在下，於 pH 11 的硼酸緩衝液中，30 反應七小時可合成 0.27M 的茶胺酸(6)。

茶胺酸既然為茶樹中所特有，則與茶胺酸代謝有關酵素的應該相當活躍，只是相關研究卻極為欠缺，文獻有記載的似乎只有來自日本國立茶葉研究所 Tsushida 與 Takeo 所提出的報告而已(7)。該報告由部分純化樣品證明麴醯胺

最適 pH 值都介於 8-9 之間，而前者的活性約為後者的四倍。雖然後者與茶胺酸合成 同樣不安定，但麴醯胺 似乎並無此現象，而且由高最適 pH 值推測應具轉醯胺化作用的能力(7)，可惜著者並未進一步深究。

本研究係利用麴醯胺？(Glutaminase)具有轉移 -glutamyl 的性質，嘗試應用於茶胺酸 (theanine)的合成。原本 Glutaminase 的來源擬由茶樹更新時之廢棄鮮茶葉獲得之萃取液，然而在多次實驗中，卻顯示活性偏低，無法做有效應用。此期間，卻多次發現萃取液在低溫儲存時麴醯胺？的活性會隨時間而明顯增加。經菌種篩選，卻認為菌增生所導致的。因而，本研究乃轉而進行菌種篩選與純種培養，篩得兩種革蘭氏陰性桿菌，本文係就其中一種黃色菌經含麴胺酸之培養基進行液體培養，再進行包括初步的菌種鑑定，酵素活性分析方法的改良，酵素的部分純化，酵素分子與催化特性分析，酵素固定化及茶胺酸合成能力的探討等。

四、研究方法

1. 菌種篩選與初步鑑定

將以大剪刀修剪之廢棄鮮茶葉置入冰桶內，立刻攜回實驗室以液態氮磨碎後直接取 6g tea, 6g PVPP 及 80mL 萃取液(0.1M K-phosphate buffer, pH 7.0, 含 1% L-ascorbate 及 1% PMSF)於冰浴中進行均質與分離，濃縮至 10 毫升後於冰箱中儲存。一週後自萃取液進行菌種篩選及純種培養，紀錄純菌菌落外觀，再進行鏡檢及革蘭氏染色。

2. 酵素活性分析

本研究所使用的麴醯胺？活性測定法係根據本人研發之氨基酸與 OPA(-phthaldehyde)反應配合離子對(N-cetyl N,N,N- trimethyl ammonium bromide; CTMAB)之高效液相層析法(8)，經改良而加以應用。此項改良包括降低基質用量(反

應液中的最終濃度為 0.5mM)及 OPA 的濃度至 2.5mg/mL。HPLC 的條件如下：

- a.Column: Lichrosphere 100 RP-18e
- b.Instruments: Hitachi D-7100, D-7000
- c.Mobile phase : 10 mM KH₂PO₄ 含 CTMAB 及 50% acetonitrile。
- d.Flow rate : 1.5 mL/min
- e.Detector : Spectrofluorometer(ex : 335nm, em : 425nm)(Hitachi D-7480)

3. 鞣醯胺? 製備

由茶葉萃取液中篩選菌種，共得到菌落呈黃與白色的兩株短桿菌。革蘭氏染色均呈陰性。經純種培養後，本研究首先以黃色菌進行液體培養，培養基為含 1% 鞣胺酸的 NB 液體培養基 150mL，於 37 培養適當時長後，以離心方式將培養液和菌體分開，分別進行鞣醯胺? 的萃取和純化。

3.1. 培養液 (胞外酵素)

將離心得到的培養液濃縮成體積為 10mL，置於 4 環境下透析過夜 (透析液為 10mM pH8.0 KH₂PO₄)。得到胞內酵素粗抽液。

3.2. 菌體 (胞內酵素)

菌體秤其濕重，以每 mg 菌體添加 100 μL 破碎液 (10mM pH8.0 KH₂PO₄ 含 20% 甘油及 5% Triton)，利用超音波將菌體打破，離心去除細胞碎片和未破菌體，取得上層液，即為胞內酵素粗抽液。

3.3. 硫酸銨沈澱

酵素粗抽液進行 30~75% 硫酸銨沈澱，沈澱物以 10mM pH8.0 KH₂PO₄ 溶解，置於 4 冷房中透析過夜 (透析液為 10Mm pH8.0 KH₂PO₄ 含 10% 甘油)。得到的透析液加入 20% 甘油冷凍保存。

3.4. 第一次膠體過濾

將胞外酵素之透析液濃縮至 5mL，以 Sephadex G-100 管柱 (2.5/45) 進行膠過濾純化，流速為 0.5mL/min，移動相為 20mM KH₂PO₄，pH8.0。收集含酵素活性的區間，將體積濃縮成 2mL 並加入 20% 甘油冷凍保存，此為第一次膠過濾酵素液。

3.5. 第二次膠過濾

取第一次膠過濾酵素液用 Sephadex G-200 管柱 (1.6/60) 進行第二次膠過濾，流速為 0.2mL/min，移動相為 20mM KH₂PO₄，pH8.0。收集含酵素活性的區間，將體積濃縮成 1mL 並加入 20% 甘油冷凍保存，此為第二次膠過濾酵素液。

4. 蛋白質定量

利用 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 與蛋白質結合而變色的特性來定量，用 96 well 微平盤反應，並以 ELISA Reader (Bio-Rad Model 550) 讀取吸光值。

5. 膠片 PAGE 與活性分析

配製 7.5% 不連續 PAGE 膠片做純度檢測及活性分析，停止電泳後，將膠體分成兩部分，一部分進行銀染，另一部份進行活性分析。

5.1. 銀染方法

使用 Bio-Rad 的銀染套組

5.2. 膠片活性分析步驟

電泳完成後取出膠片，每 2mm 長度切成一小段，依序放入試管中。將膠片壓碎，每試管加入 50 μL 的基質液，於 35 水浴中震盪反應 120 分，再利用 HPLC 進行活性分析。

6. 茶胺酸合成能力測定

6.1. 反應條件 (35, 1 小時至過夜)

反應液中含

0.066M Glutamine	2 μL
20mM Semicarbazide HCl	1 μL
0.1M ethylamine	2 μL
Buffer	5 μL

6.2. 分析方法

HPLC 系統(Hitachi D7000 和 D7100)

UV Detector(Hitachi D7455, 測定波長為 195nm)

Column(Shiseido 7 ODS-3; 4.6 x 250mm)

7. 酵素固定化

酵素液：胞內酵素 (30~75% 硫酸銨沈澱)

固定材質：Sigma Amberlite XAD-7

步驟 1：

7.1. XAD-7 稱取 0.1g，以去離子水洗滌兩次，過濾後，置於 1.5mL 離心管中。

7.2. 加入 130 μL 25 mM 的不同 pH 溶液

(4.5、5:醋酸溶液，6 8:磷酸溶液，9 11:硼酸)於各離心管中。

7.3.各離心管再加入 $130 \mu\text{L}$ 稀釋 5 倍的酵素液，混和均勻。

7.4.於室溫下，震盪吸附 3 小時，測殘留酵素活性。

7.5.收集吸附酵素的樹脂經緩衝液淋洗後收集備用。

步驟 2：

酵素進行一般的 PAGE，自膠體切下有活性的部位，將膠體搗碎備用。

8.固定化酵素合成活性分析

8.1.取固定化酵素 100mg 加入 $100 \mu\text{L}$ 含 glutamine 及 ethylamine 的基質，於 35°C 水浴震盪反應一段時間後取上清液 $20 \mu\text{L}$ ，依第 6 項所敘述的方法進行 HPLC 分析。

8.2.將固定化酵素裝入注射桶或玻璃管柱中，通入含 glutamine 及 ethylamine 的基質，並使之循環一段時間，依第 6 項所敘述的方法進行 HPLC 分析。

麴胺酸？活性測定法的改良

在前報中，我們發展了一套含 N-cetyl N,N,N- trimethyl ammonium bromide(CTMAB)離子對高效液相層析法。重要結論如下

- 利用 Lichrospher RP-18, 4.6x125mm 管柱，麴胺酸-OPA 衍生物之溶出體積約為 $7.5\text{-}10\text{ mL}$ 。相對的，Tris, 麴醯胺(Gln), theanine(The)及氨的 OPA 主要衍生物則都在 5 mL 以內。
- 由於反應物及產物的 OPA 衍生物具螢光，故此法靈敏度高，反應液中只要含 $1\mu\text{M}$ 以上的麴胺酸即可被檢出。
- 由於反應物中高濃度麴醯胺，反應液中含足量的 OPA 試劑相當重要。另一方面，OPA 之螢光衍生物形成快速，但退化亦極迅速。

而根據本年的實驗經驗發現 OPA 濃度過高較會引起副反應而造成干擾，故將 OPA 濃度減半，配合此項改變同時亦降低了基質(麴醯胺)的用量。

2 菌種鑑定

經篩選與純種培養得到兩種優生菌種，分別為

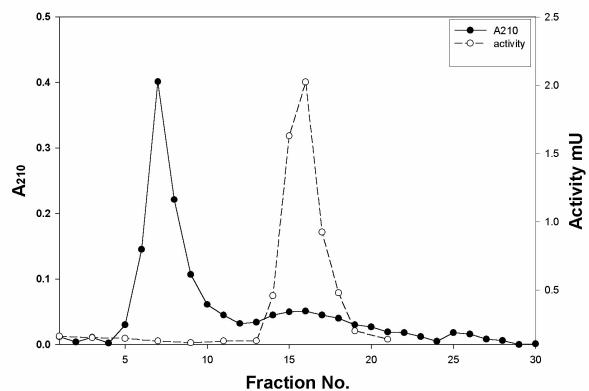
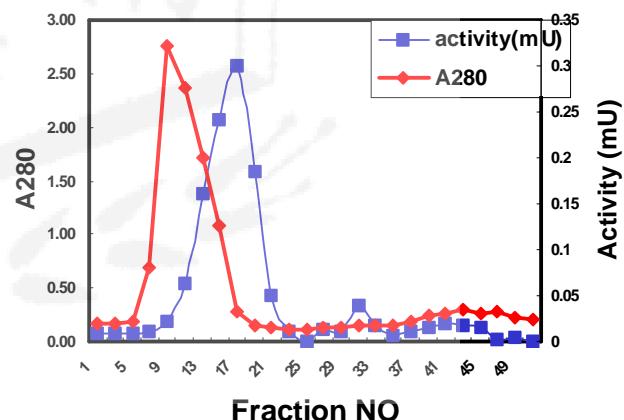
黃色與白色。鏡檢兩者呈短桿狀，革蘭氏染色均為陰性。圖一為本研究所使用的黃色菌在 NB 培養基中生長所呈現的菌落情形。根據黃色菌的特徵及來源，推測可能是黃色單胞菌 (*Xanthomonas*) 屬，詳情正進一步探討中。



圖一、黃色菌體生長之菌落

3.硫酸胺沉澱與膠過濾分離

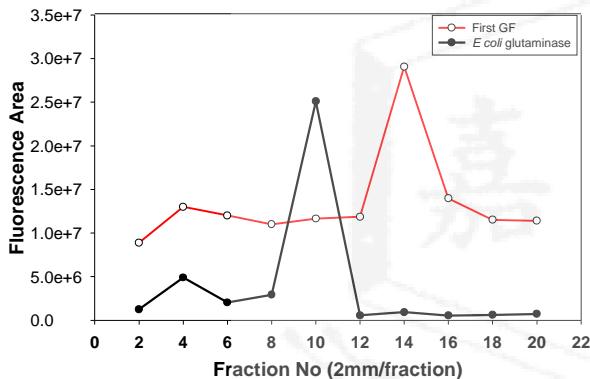
胞外酵素經 75% 飽和液沉澱之透析液。透析後濃縮至 5mL 再進行膠過濾層析分離之。利用 Sephadex G-100 管柱 ($2.5/45$ 及 Sephacryl S-200 管柱 ($1.6/60$) 進行兩次膠過濾的結果如圖二及三所示。



5.膠電泳與活性檢出

製備電泳膠片(含 7.5% acrylamide 單體)，除

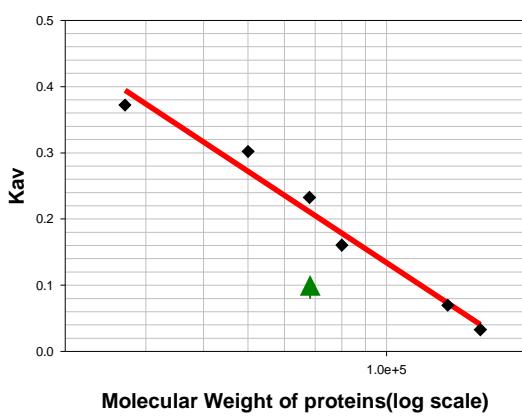
部分進行銀染(Bio-Rad Silver Stain Plus kit)外，另外進行活性檢出，並與大腸菌 glutaminase (Sigma 部分純化之商品)樣品比較。其結果如圖四及五，由圖顯示本研究所得之 glutaminase 的分子特性與大腸菌不相似。



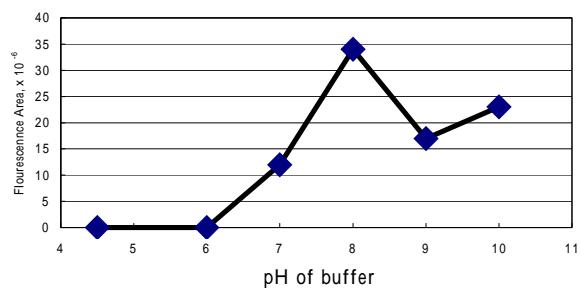
圖四、A、C 分別為第一、二次膠過濾活性液，B 為 *E. coli*，箭頭所指為具活性的條帶。圖五、Glutaminase 活性分佈圖

4. 分子量與最適 pH 值

利用 Sephadryl S-200 管柱(1.6/60)膠過濾進行 glutaminase 分子量測定，以下列蛋白質為標準品。alkaline phosphatase(160,000)、BSA (monomer66,000;dimer132,000)、penecillinase (50,000)、chymotrypsinogen(27,000)，結果如下：



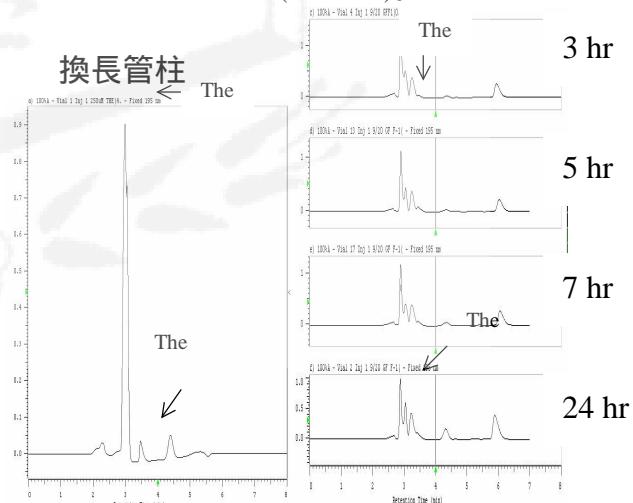
由上圖推估，本酵素之分子量約為 68,000。



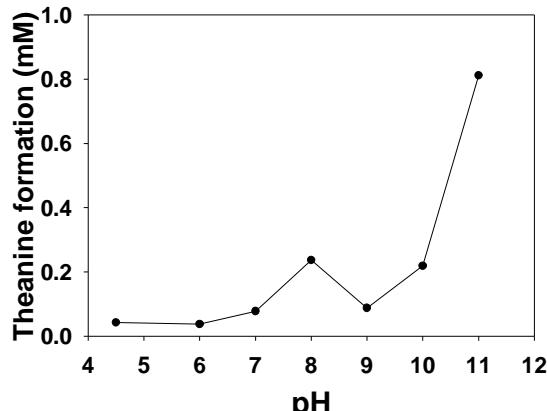
由上圖知，本酵素水解數醯胺能力之最適 pH 值為 8。

5. Theanine 合成試驗

在前報中，我們發展了一套高效液相層析法用於檢測 glutamases 是否能催化 theanine 合成。該方法簡單而快速，但靈敏度較低，且因使用短管柱，致 theanine 的溶出體積只有 1.5 mL，較容易受到酵素液內容物的干擾。在今年的實驗中，已改用 25cm 管柱(Shiseido Inertsil 7 ODS-3)，因而層析效果有明顯改善(如下圖)。



Theanine 合成之最適 pH 值高達 11(下圖)

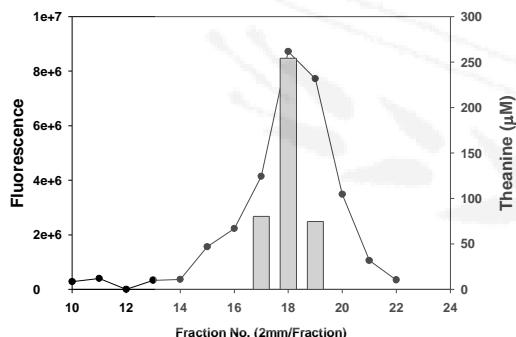


酵素來源(菌種)	酵素用量	Theanine 合成量
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	0.5U/mL	270mM(7hr)
<i>E.coli</i>	0.4U/mL	0.80mM(24hr)
本實驗菌種	0.5mU/mL	0.38mM(7hr) 0.80mM(24hr)

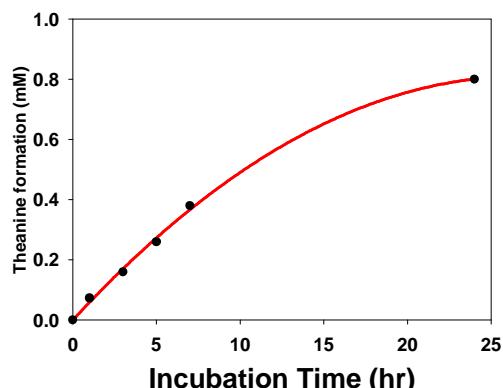
由前述結果(如上圖)顯示 glutamine 確實可以當作 glutamyl 基的提供者，也就是說此酵素具有催化轉胺基作用的能力。由表一的比較，本酵素對於後者的催化活性較 *E.coli* 來的強，與文獻上報告(*P.nitroreducens*)的近似。

6. 酵素固定化與反應器裝置效果

本研究進而將酵素用 Amberlite XAD-7 固定化，結果發現最適 pH 稍降(9-10)，但吸附約只有 20%，而合成 Theanine 的能力亦不理想。接著乃嘗試用製備式 PAGE 的方法將第二次膠過濾所得之酵素液以較大量注入，電泳後，分析膠體中分解 Glutamine 與合成 Theanine 能力。由下圖顯示兩者完全一致。



進而取具活性隻膠體區研碎後裝入注射管柱中，作成反應器裝置，通入 3 毫升反應液，於室溫下循環反應至 24 小時，結果如下圖所示



由以上結果顯示，本酵素可藉由簡單的膠體電泳的程序，達到同時純化與固定化的目的。由此所得到的含酵素膠體可直接用於反應器的建構與應用。不過，能否真正應用於工業上，還需要更大量的酵素，做更深入的探討，也是本研究繼續努力的方向。

六、自評

本計畫原本 Glutaminase 的來源擬由茶樹更新時之廢棄鮮茶葉獲得之萃取液，然而在多次實驗中，卻顯示活性偏低，無法做有效應用。此期間，卻多次發現萃取液在低溫儲存時麴醯胺？的活性會隨時間而明顯增加。經菌種篩選，卻認為菌增生所導致的。因而，本研究乃轉而進行菌種篩選與純種培養，改由微生物抽取麴醯胺，並進行包括初步的菌種鑑定，酵素活性分析方法的改良，確認除菌體內酵素外胞外亦存在，酵素的部分純化，酵素分子與催化特性分析，酵素固定化及茶胺酸合成能力的探討等。由於本計畫在執行時酵素來源有所改變，雖然菌種的初步鑑定、酵素萃取、部份純化、活性分析改良及電泳特性等方面業已完成，同時也確認本酵素具有水解與轉胺基之雙重作用。在酵素固定化上亦有初步的結果，不過在反應器的建構與應用及菌體內酵素的純化與定性等工作，仍有待繼續探討。

七、參考文獻

1. Sasaoka, K. and Kite, M.. Agric. Biol. Chem.. 28: 313-318, 1964.
2. Konishi, S and Takahashi, E. Plant Cell Physiol., 7:171-175, 1966.
3. Hartman, S.C., in "The Enzymes" Vol.4, 79-100, 1971.
4. Abelian, V., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 57(3):481-483, 1993.
5. Tachiki, T., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 60(7):1160-1164, 1996.
6. Tachiki, T., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(7):1279-1283, 1998.
7. Taushida, T. and Takeo, T. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 59:787-792, 1985.
8. 林婉婷等，中華民國食品科技學會年會論文，彰化。PD-11, 2000.