行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

一、 中文摘要

本計畫係自茶葉中分離麩醯胺 °，並配合需要發展了麩醯胺分解及茶胺酸合成的分析法，以瞭解該酵素之一般性質及催化特性。由結果顯示，本酵素確具有合成茶胺酸的能力。

二、 英文摘要

In this study, glutaminase was isolated from leaves of fresh tea. HPLC procedures were developed to study the properties and catalytic characteristics of this enzyme in hydrolytic and γ-glutamyl transfer activity. Finally, the theanine production ability of this enzyme was confirmed.

三、緣由與目的

Sasaoka 等人曾利用 ^{14}C-乙基胺為基質由茶之芽葉粗抽出物的試驗，初步確認了茶胺酸係在茶胺酸合成 °(theanine synthetase；即 Glu: $EtNH_2$ ligase；EC 6.3.1.6) 催化及 ATP 的參與下，由麩胺酸與乙基胺脫水而成(1)。只是該酵素相當不安定，因而詳情並未做深入的探討。由於茶胺酸在當作食品添加物及藥物上具有相當的潛力，為了提高茶胺酸產量，除了從田間栽培及加工上著手外(2)，亦有利用 callus 與細胞培養方式以加速茶胺酸的產製(3,4)，只可惜不是產量的提升無法達到預期的目標，就是成本過高，以致尚無法量產。

茶中既然含有茶胺酸合成 °，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麩醯胺 °(glutaminase)及茶胺酸水解 °(theanine hydrolase)兩種。根據 Hartman 的綜合論著(5)，麩醯胺 °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麩醯胺與乙基胺間發生轉醯胺化作用(trans-amidation)而形成茶胺酸(6)。1996，Tachiki 等人自該菌純化出麩醯胺 °(7)，並進一步在 1998 年證明在高濃度的麩醯胺(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(8)。

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(14)。該報告由部分純化樣品證明麩醯胺 °及茶胺酸水解 °的確存在於茶葉中，兩者的最適 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，但麩醯胺 °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(9)，可惜著者並未進一步深究。

四、研究方法

1.茶葉麩醯胺…之製備：將以人工採收之新鮮茶葉(一芽三葉)或以大剪刀修剪之廢棄茶葉置入冰桶內，立刻攜回實驗室以液態氮磨碎後，除部份直接進行酵素萃取外，其餘則儲存於-80℃冰櫃備用。酵素的萃取與濃縮程序大致如下：

1.1 茶葉均質

取 6g tea + 6g PVPP +80mL 萃取液(0.1M K-phosphate buffer, pH 7.0, 含 1%L-ascorbate 1% phenylmethylsulfonylflouride)於冰浴中均質之(均質機為 Heidolph DIAX 9000)

1.2 離心(Sorvall Super T-21, 15,000rpm, 20min)及濃縮(MasterFlex L/S Compact Drive (Cole Parmer) 配合 UFP-3-C-MM 01A 之 Hollow fiber column (3,000 NMWC, 0.5 mm, 26cm^2) (A/G Tech. Corp.)至約 10 mL。

2.酵素活性分析：glutaminase 之水解及轉基活性係以 OPA 反應配合離子對層析法進行，以提高靈敏度(10)。過程如下：

2.1. OPA(o-phthaldehyde)試劑配製：

OPA 10mg 溶於少量酒精，再加入 Borate buffer 2ml 及 β-mercaptoethanol 20 μl。

2.2. Glutaminase 活性測定：

1) Rx mixture:

0.1 M 緩衝液 4 μL
5 mM glutamine 4 μL
20 mM semicarbazide · HCl 2 μL
酵素液(必要時先稀釋)10 μL

2)反應條件: 35℃, 10-120 min 後取反應液 20 μL＋OPA reagent100 μL 反應。

3) HPLC

a.Column: Lichrosphere 100 RP-18e
b.Instruments: Hitachi D-7100, D-7000
c.Mobile phase：10 mM KH_2PO_4 含

CTMAB 及 50% acetonitrile。

d.Flow rate：1.5 mL/min

e.Detector：Spectrofluorometer(ex：335nm，em：425nm)(Hitachi D-7480)

3.DEAE 區分

將茶葉萃取液經硫銨沉澱、透析，或直接濃縮後進行 DEAE (Pharmacia HiPrep 16/10 DEAE FF)層析分離並收集之。

4.最適 pH 值，金屬離子(10mM)與還原劑(1mM)存在的影響

5.電泳與活性檢出

製備電泳膠片(含 7.5% acrylamide 單體)，除部分進行 CBR 藍染或銀染(Bio-Rad Silver Stain Plus kit)外，另外進行活性檢出，其程序如下：

將電泳完後的膠片以每 2mm 切一段，置入小 tube 中，用玻棒壓碎，加入 60 μL substrate 在 35℃振盪反應兩小時，經離心後取出 20 μL 上層液加入 OPA 試劑反應後以 HPLC 分析。為確定本程序之可行性，先以大腸菌 glutaminase (Sigma 部分純化之商品)為樣品進行測試。

6.Theanine 合成能力檢測：

反應條件如 2.2 項，反應液含磷酸(pH 8)含 10 mM Glu 或 Gln 及 ethylamine。

HPLC 條件：

a.Mobile phase：

1 mM H_3PO_4 含 6.5 % MeOH

b. Detector：

UV detector (195 nm)(Hitachi D-7455)

五、結果與討論

1.最適實驗條件的建立

1.1.OPA 反應條件之建立

為提高 Glutaminase 活性檢測之靈敏度，本研究比較文獻上的方法，發現 OPA 的濃度與配法、反應時間及偵測方法，對於分析結果都會造成某種程度上的影響，在研究方法中所敘述的程序乃是我們確認最理想的條件。另外本研究也發現 Glutamine 純品中仍含有約 0.1 %的麩胺酸須要去除，以減少麩胺酸殘留可能造成的干擾。

1.2.HPLC 分析條件之建立

利用 OPA-HPLC 法配合螢光檢測器以分析水解後的氨產生量曾被應用於茶葉中麩醯胺 °活性之測定。然而，根據我們研究發現，雖然胺基酸與 OPA 反應會有強螢光衍生物生成，但氨的呈色靈敏度卻很差，而且再現性也不佳。為了克服這個缺點，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。重要結論如下及圖 1-2。

a. 利用 Lichrospher RP-18, 4.6x125mm 管柱，麩胺酸-OPA 衍生物之溶出體積約為 7.5-10 mL。相對的，Tris, 麩醯胺(Gln), theanine(The)及氨的 OPA 主要衍生物則都在 5 mL 以內。

b. 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 1ì M 以上的麩胺酸即可被檢出。

c. 由於反應物中高濃度麩醯胺，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。結果顯示，反應後宜於兩分鐘內進行分析。

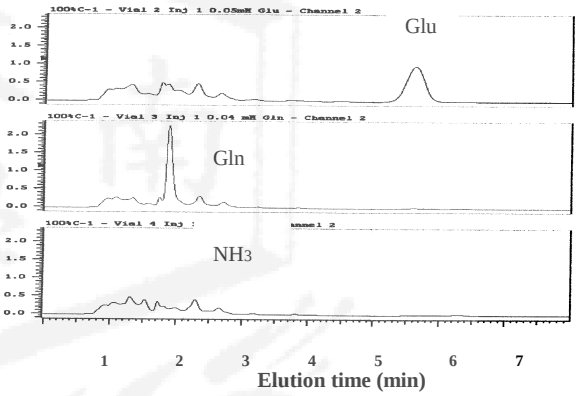
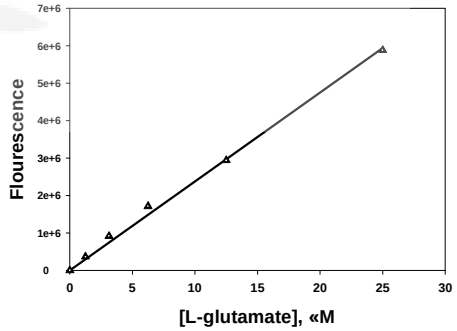


Fig. 1 Fluorescence Formation of Glutamate-OPA Reaction



2 茶葉中 Glutaminase 的萃取與活性測定

以前述的方法萃取茶葉中的 Glutaminase，經濃縮透析後依 OPA 反應配合 HPLC 的方法檢測該酵素的活性。結果如圖 3 及表 1，由結果顯示 OPA 反應配合 HPLC 的檢測方法的確可行。文獻(3)上建議於透析液中添加甘油並不能促進安定性，本研究亦發現添加甘油會影響粗抽液中麩胺酸的析出，進而干擾活性的測定。

Fig. 3 Progresive Curve of Glutaminase Assay

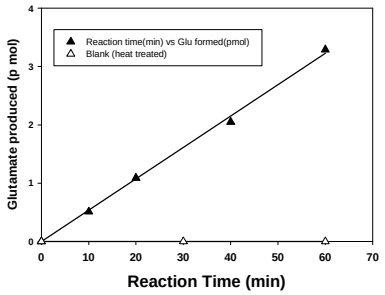
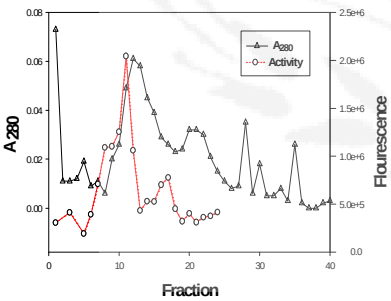


表 1、酵素在不同甘油濃度下透析的相對活性

透析液中甘油含量(%)	相對活性(%)	相對活性(%)(一週後)
0	100	176
2.5	93	160
5	77	135
10	141	149

3.硫酸胺沉澱與 DEAE 層析分離

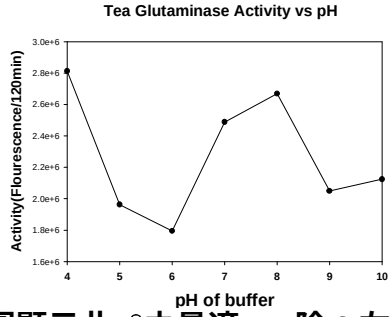
本酵素可經 75%飽和液沉澱。透析後會有凝聚現象，須藉由乳化劑(如 triton 或 Tween 等)溶解之，才能進行層析分離及膠體電泳(PAGE)。而由 DEAE 分離茶葉 glutaminase 顯示至少有兩個區分(約在 0.1 及 0.2M NaCl 的位置)，可惜這些部分純化的樣品卻不甚安定，造成後續的純化工作並不能如預期順利。



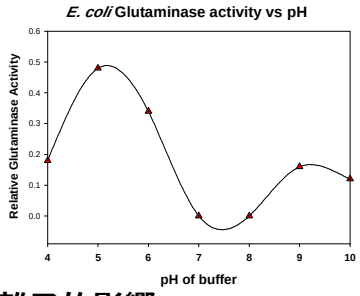
DEAE 操作方法：

1. Pre-equil.(100ml) and washing(120ml)：10mM K- PO_4 buffer (pH 8.0)
2. Elution (gradient, 200 mL)：
   A 液：10mM K-PO_4 buffer (pH 8.0)
   B 液：10mM K-PO_4 buffer (pH 8.0)含 1M NaCl
   A 液 100% (0 min)→50%A (40 min)

4.Optimal pH



由上圖顯示此 °之最適 pH 除 8 左右外，pH 4 所呈現的活性亦極顯著，這種雙峰現象與來自大腸菌的 glutaminase 有些類似(見下圖)。



5.金屬離子的影響

表 2、酵素活性與金屬離子的關係

金屬離子(20mM)	相對活性(%)
None	100.0
NaCl	131.9
$CaCl_2$	90.9
$MgCl_2$	99.0
$CuCl_2$	29.4
$MnCl_2$	84.6
$FeCl_3$	22.8

由上表顯示金屬會影響酵素的活性，其中鈉離子有促進作用，而 Cu^{2+}及 Fe^{3+}卻有明顯的抑制作用。

6.還原劑的影響

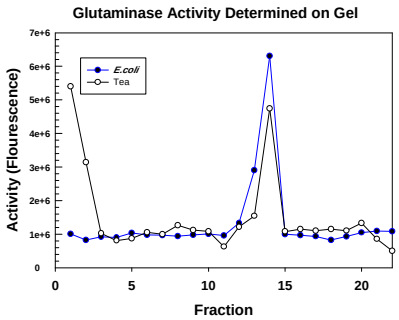
表 3、酵素活性與還原劑(1 mM)的關係

還原劑(1mM)	相對活性(%)
None	100
Vit C	97.7
Cysteine	100.3
Dithiothreitol (DTT)	131.1
β-mercaptoethanol	120.2
GSH	21.1
酵素經加熱者	5.3

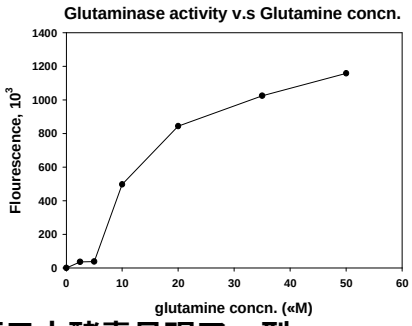
由表 3 顯示 DTT 及 β-mercaptoethanol 有相當程度的促進作用，而 GSH 卻有很強的抑制效果，其原因與 GSH 為含 glutamyl 之・⋮有關。而酵素經加熱後，活性幾乎完全消失。

7.電泳與活性檢出

由下圖顯示在膠體上進行活性檢測的確可行，而茶葉中 glutaminase 的分子特性與大腸菌的頗為近似，不過有凝聚成大分子的現象，故有一條額外的活性帶出現在接近頂端處。



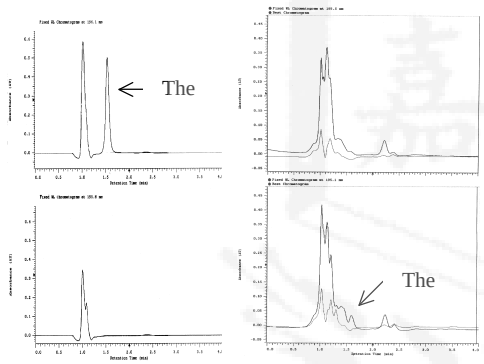
8.反應動力學

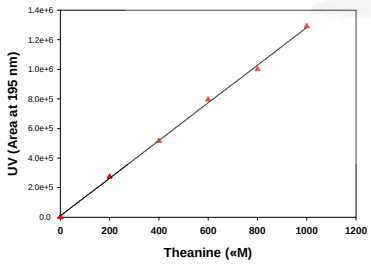


由上圖顯示本酵素呈現了 S 型 kinetics 的特徵

9.Theanine 合成試驗

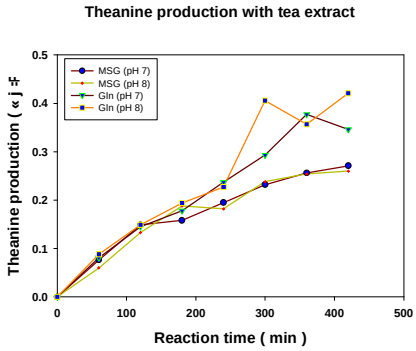
本研究的一個重要目的在於探討，glutamases 是否能催化 theanine 合成。下圖顯示以 HPLC 方法分離 theanine 的結果，具醯胺鍵的 theanine 在 195nm 處有特異性吸收，濃度與吸光值間有很好的直線關係，且與原料中之 Glu 及 Gln 可完全分離，而另一個反應物-ethylamine 則因在此區域沒有吸收故也不會造成干擾。





上述方法簡單而快速，但靈敏度較低，且因 theanine 的溶出體積只有 1.5 mL，故較容易受到酵素液內容物的干擾。上圖右便是一個例子，雖然 theanine 的合成應可確定，只是也會受到其它成分的干，改用 25cm 管柱會有改善。

以目前的結果(如下圖)顯示 Glutamic acid (MSG)及 glutamine 均可以當作 glutamyl 基的提供者，也就是說此酵素具有催化 glutaminase 逆反應及轉胺基作用的雙重能力，只是此酵素的催化活性不算很強，能否提高其催化能力將影響到本酵素的應用價值，也是本研究努力的方向。



六、自評

本計畫之執行在酵素萃取、活性分析及一般性質鑑定上業已完成，同時也確認本酵素具有水解與轉胺基之雙重作用。不過因為本研究在分析方法(包括水溶液與膠體中醯····水解 °活性及茶····酸合成等)上的研發所需時程超過預期，且因本酵素¿係來自富含 flavonoids 的茶葉材料，À有凝聚致易形成沈澱，Á經 DEAE 部分純化後會更不安定，Â由動力學的數據顯示此 °應屬於異位酵素，但調節劑為何尚需進一步探討，以致在酵素的純化上卻略有落後。雖然已了解還原劑有部分保護與活化作用，及乳化劑(包括 triton 及 Tween 等)可部分克服凝聚與沈澱現象，不過如何得到完全可溶且安定的酵素以便進行純化工作，目前正繼續探討中。

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. Matsuura,T. and Kakuda,T. Agric. Biol. Chem..54:2283-2286, 1990.
4. Matsuura,T. et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 56(8): 1179-1181,1992.
5. Hartman,S.C., in “The Enzymes” Vol.4, 79-100,1971.
6. Abelian,V., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem.,57(3):481-483,1993.
7. Tachiki,T., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem.,60(7):1160-1164,1996.
8. Taushida,T. and Takeo,T. J.Agr.Chem.Soc. Japan, 59:787-792,1985.
9. Tachiki,T., et al, Biosci. Biotechnol. Biochem.,62(7):1279-1283,1998.
10. 林婉婷等，中華民國食品科技學會年會論文，彰化。PD-11,2000.

嘉南大學