

穀胺酸脫羧?酵素活性分析與工業生產胺基丁酸

張文翰、簡宏堅

E-mail: 321469@mail.dyu.edu.tw

摘要

Glutamate Decarboxylase 3 (GAD 3) 可以將L - Glutamate上的羧基去除，形成GABA。它的受質以及產物皆是人體的神經傳導物質L - Glutamate，以及神經傳導抑制劑GABA (-胺基丁酸， -aminobutyric acid)。L - Glutamate主要為調控神經元突觸的神經衝動訊息傳導，而相對的GABA則會抑制這個衝動。人體若缺乏了GAD則會無法正常產生GABA來抑制神經衝動，而產生過度緊張、癲癲症、躁鬱症、狂躁症、失眠、末端顫抖或甚至帕金森氏症以及老年癡呆症，由此可知GAD扮演的重要角色。而除了神經衝動的抑制外，將成為蛋白質體學時代醫療體系上，不可或缺的一角。本實驗主要分析出GAD 3的酵素特性，其中酸鹼環境、離子需求、受質抑制、產物抑制甚至探討到GAD 3對於其他胺基酸受質的催化性與對於味精催化性，在酵素結構分析以及活性區分析很有幫助，積極推動GABA在發酵槽大量製造，希望能為精神患者有所幫助。利用已經選殖好GAD 3菌種，也再將其plasmid DNA進行Error prone PCR後再次進行基因選殖。然而將突變GAD 3經由小量表現得到的粗酵素進行TNB法表現量篩選，經由篩選後得到活性上差異的菌種進行序列分析及比對，得出L 1、L 24、H 20、H 38、H 1、H 26、H 39、H 46等菌種，序列轉成胺基酸後L 1及L 24為相同突變位(D 296 A)，H 20突變位有兩點(G 297 A and S 491 P)，H 38只有一個突變位(G 297 A)，H 1突變位有兩點(V 78 A and F 271 S)，H 26只有一個突變位(F 271 S)，H 39突變位有5點(R 50 L, V 78 A, F 271 S, I 375 V and G 515 V)，而H 46突變位有6點(T 16 S, V 78 A, D 128 G, F 271 S, S 471 T and W 423 L)。然而D 296 A及S 491 P的突變位符合前人所推估及比較的Active site。GAD 3及其他突變株GAD 3的酵素分子量皆為約56kDa。酵母菌Yarrowia lipolytica的GAD 3基因轉殖株，在誘導期間GAD 3基因轉殖株，酵素的活性持續分泌到培養液，到108 hrs酵素分泌至細胞外達穩定高峰，目前在正積極的與味丹公司方面合作，在小量1.2 L發酵上加入20 μ M Pyridoxal phosphate及20 μ M Ferrous fumarate等輔?在利用HPLC的分析，已精確計算出5 mM MSG消失比率在24 H時為61%，而在穀胺酸轉化生成GABA上的轉換率在24 H時高達85%。而為了要工業化生產GABA使用5 L小型發酵槽前的評估與測試，經由不斷改良後利用HPLC的分析轉換率為100 %、固型物為1.42%，而1000 L的監控條件 pH : 5.4~5.3、Glucose : 0.05~0.018 (%)，近期和味丹公司可產製出10 Kg GABA，可進入保健食品的動物及人體試驗。

關鍵詞：躁鬱症 酵母菌 癡呆症 分子量 穀胺酸 穀胺酸脫羧?酵素 穀胺酸 胺基丁酸 活性分析 工業生產

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要vi 誌謝viii 目錄ix 圖目錄xii 表目錄xviii 1. 前言及目的與研究動機1 1.1前言1 1.2目的2 1.3研究動機4 2. 材料與方法6 2.1材料6 2.1.1 菌種與質體6 2.1.2 藥品6 2.1.3 酵素6 2.1.4 引子7 2.1.5 培養液8 2.1.6 其他緩衝液及試劑10 2.2 實驗方法16 2.2.1 絲狀真菌染色體DNA 的抽取16 2.2.2 PCR17 2.2.3 隨機突變之PCR方法19 2.2.4 DNA 電泳分析20 2.2.5 DNA片段的回收及純化21 2.2.6 GAD 3 基因表現載體的構築22 2.2.7 酵素剪切22 2.2.8 DNA 黏接22 2.2.9 Competent cell的製備23 2.2.10 轉殖入Escherichia coli23 2.2.11 轉殖入Yarrowia lipolytica24 2.2.12 Plasmid DNA之抽取24 2.2.13快速質體抽取套組25 2.2.14 隨機突變GAD 3之E. coli小量菌體活性篩選26 2.2.15 DNA 定序30 2.2.16 GAD 3 E. coli胞內表現及破菌處理30 2.2.17 Yarrowia lipolytica基因表現及透析31 2.2.18 Ni-NTA column純化GAD 332 2.2.19 SDS-PAGE33 2.2.20酵素反應在Bromocresol green顯色34 2.2.21 GAD 3最適pH測定法34 2.2.22 GAD 3最適催化溫度測定法35 2.2.23 GAD 3離子需求35 2.2.24 GAD 3基質選擇性36 2.2.25 GAD 3活性測定36 2.2.26 GAD 3 之生長曲線測定36 2.2.27 SC - GAD 3之生長期間GAD 3表現量與活性測定37 2.2.28 SC - GAD 3之酵素表現期間GAD 3表現量與活性測定38 2.2.29 SC - GAD 3 培養於YPD with L - Glutamate、65 mM pH 6.6 phosphate buffer液態培養基中之酵素表現週 期GAD 3表現量與活性測定。39 2.2.30 GAD 3針對不同廠牌Monosodium L-Glutamate (味精 MSG) 活性比較39 2.2.31 不同濃度味全MSG對酵素活性影響40 2.2.32 GAD 3產物抑制性40 2.2.33 SC-GAD 3 1.2L搖瓶培養與活性測定41 2.2.34 SC-GAD 3 5L發酵槽培養與生產條件42 2.2.35 受質與產物之螢光HPLC分析43 3. 結果44 3.1 絲狀真菌染色體DNA 的抽取44 3.2 PCR產物44 3.3 回收DNA45 3.4 轉殖質體製備檢查45 3.5 Random mutation GAD 3之E. coli小量菌體活性篩選46 3.6 GAD 3定序基因分析46 3.7 SC - GAD3 生長曲線47 3.8 GAD 3少量基因表現48 3.9 酵素反應溴甲酚綠顯色48 3.10 GABA與OPA反應線性回歸標準曲線48 3.11 SC - GAD3 生長期間GAD 3之表現量與活性測定49 3.12 SC - GAD3 酵素表現期間GAD 3之表現量測定49 3.13 GAD 3的純化與回收50 3.14 GAD 3最適酸鹼環境50 3.15 GAD 3最適催化溫度51 3.16 GAD 3離子需求51 3.17 GAD 3基質選擇性51 3.18 GAD 3與不同廠牌MSG反應比較52 3.19 不同濃度味全MSG對GAD 3的受質抑制測定53 3.20 GAD 3產物抑制作用測定53 3.21 Wild type以及突變GAD 3的活性分析54 3.22 SC - GAD 3 1.2L搖瓶培養與活性測定57 3.23 SC - GAD 3 5L發酵槽培養與生產條件58 3.24 受質與產物之螢光HPLC分析59 4. 結論61 參考文獻148 附錄152 圖目錄 圖 1 L-Glutamic acid structure

和 Chemical structure of Gamma - aminobutyric acid.而 GAD 3 酵素可將L - Glutamic Acid 上的羧基去除轉變成為GABA.68 圖 2 Monosodium L - Glutamate 的化學結構.69 圖 3 了解Glutamate和GABA與神經元之關係70 圖 4 實驗流程設計71 圖 5 將GAD 3基因轉殖入pQE 30的表現載體72 圖 6 Aspergillus oryzae 的染色體抽出後, 酵素切BamH I 73 圖 7 GAD 3 基因利用PCR增幅後產物74 圖 8 酵素切 BamH I 和 Sal I 回收後之結果75 圖 9 將轉殖好的菌體抽質體 DNA76 圖 10 將抽出後的質體 DNA 使用酵素切 BamHI 和Sall後的 結果77 圖 11 GAD 3的 DNA 和胺基酸的序列78 圖 12 使用胺基酸分析軟體, 分析 GAD 3 酵素之基礎79 圖 13 SDS - PAGE小量酵素電泳分析80 圖 14 SDS - PAGE分析GAD 3酵素81 圖 15 SDS - PAGE分析GAD 3酵素82 圖 16 SDS - PAGE分析GAD 3酵素83 圖 17 OPA法之GAD 3 活性分析方法84 圖 18 使用OPA法測定GAD 3 酵素或性之最適波長85 圖 19 GABA 之 Standard Curve86 圖 20 利用TNB法測定GAD 3酵素活性最適波長87 圖 21 初試TNB 法之活性分析測定88 圖 22 篩出活性較低之L 1 - D 296 A, 其DNA 和胺基酸序列 及回收酵素之SDS - PAGE89 圖 23 篩出 活性較高之H 20 - G 297 A and S 491 P, 其DNA 和胺基酸序列及回收酵素之SDS - PAGE90 圖 24 篩出活性較高之H 38 - G 297 A, 其DNA和胺基酸序 列及回收酵素之SDS - PAGE91 圖 25 篩出活性較高之H 1 - V 78 A and F 271 S, 其DNA 和 胺基酸序列及回收酵素之SDS - PAGE92 圖 26 篩出活性較高之H 26 - F 271 S, 其 DNA 和胺基酸序列 及回收酵素之SDS - PAGE93 圖 27 篩出活性較高之H 39 - L 50L、 V 78 A、 F 271 S、 I 375 V and G 515 V, 其 DNA 和胺基酸序列及回收酵素 之 SDS - PAGE94 圖 28 篩出活性較高之H 46 - T 16 S、 V 78 A、 D128 G、 F 271 S和W 423 L其 DNA 和胺基酸序列及回收 酵素之 SDS - PAGE95 圖 29 為酵素動力學分析前GABA Standard Curve96 圖 30 GAD 3和隨機突變株之酵素動力學分析98 圖 31 將各種GAD酵素作胺基酸分析比對99 圖 32 與文獻比對後得知活性區域, 並了解GAD 3酵素之作用機制100 圖 33 模 擬GAD 3酵素之3D立體結構, 標示出活性中心與 各突變株之位置101 圖 34 溴甲酚綠顯色法, L - Glutamate102 圖 35 溴 甲酚綠顯色法, L - Glutamate 與熱失活之酵素反應103 圖 36 溴甲酚綠顯色法, L - Glutamate 與酵素反應104 圖 37 溴甲 酚綠顯色法, L - Glutamate 與兩倍酵素反應105 圖 38 溴甲酚綠顯色法未與任何物質反應106 圖 39 各種溴甲酚綠顯色法進 行趨勢比較107 圖 40 測定GAD 3酵素最適pH108 圖 41 測定GAD 3酵素最適溫度109 圖 42 測定金屬離子對GAD 3酵素之影 響110 圖 43 使用GAD 3酵素與L - Tyronly再做 OPA化反應111 圖 44 使用GAD 3酵素與D - Tyronly再做 OPA化反應112 圖 45 使用GAD 3酵素與Phelalanine再做 OPA化反應113 圖 46 使用GAD 3酵素與Tryptophan再做 OPA化反應114 圖 47 使 用GAD 3酵素與Lysine再做 OPA化反應.115 圖 48 使用GAD 3酵素與para - Hydroxybenzoate再做OPA化反 應116 圖 49 使 用GAD 3酵素與Leucine再做 OPA化反應117 圖 50 使用GAD 3酵素與Glycine再做 OPA化反應118 圖 51 使用GAD 3酵素 與MSG再做 OPA化反應119 圖 52 比較各種MSG與GAD 3酵素之反應120 圖 53 味全 MSG 測酵素活性抑制121 圖 54 GAD 3 酵素測產物抑制122 圖 55 載體pYLSC 1之圖譜123 圖 56 PLP 和 B6 之輔?124 圖 57 增幅GAD 3之基因.125 圖 58 增幅GAD 3 之基因後並增加KpnR之酵素切位.126 圖 59 回收已增加KpnR之GAD 3基因127 圖 60 將轉殖好的GAD 3抽質體DNA128 圖 61 將抽好的質體DNA 酵素切Kpn I 和Sfi I129 圖 62 SC - GAD 3 DNA和胺基酸序列130 圖 63 SDS - PAGE分析 SC - GAD 3酵素分泌至胞外結果131 圖 64 SC - GAD 3與po1g之生長情形132 圖 65 SC - GAD 3與po1g之誘導情形133 圖 66 SC - GAD 3與po1g在生長期間偵測酵素分泌至胞外 情況134 圖 67 1.2 L培養及誘導流程設計135 圖 68 1.2 L培養及誘導三重複之 情形136 圖 69 1.2 L培養與誘導pH值之變化137 圖 70 連續添加受質對於pH之影響138 圖 71 HPLC分析與計算出消失率與轉 換率139 圖 72 5 L發酵槽之酵素活性與pH值測定140 圖 73 消泡劑對於GABA與酵素活性之影響141 圖 74 利用5 L發酵槽做 初步生產與模擬1,000L發酵槽之生 產情況142 圖 75 在發酵槽內葡萄糖之消耗情形143 圖 76 利用監控條件產製並利 用HPLC分析144 圖 77 產物溶液與固型物百分比測定 145 圖 78 A組加入 (1 : 1) 與 (1 : 2) 付型劑之HPLC 分析146 圖 79 B 組加入 (1 : 1) 與 (1 : 2) 付型劑之HPLC分析147 表目錄 表 1 突變 GAD 3 之測小量活性方法 27 表 2 突變GAD 3 之測小量 活性第一組結果27 表 3 突變GAD 3 之測小量活性第二組結果28 表 4 突變GAD 3 之測小量活性第三組結果29 表 5 突 變GAD 3 酵素動力學之分析結果 56 表 6 突變GAD 3 酵素動力學之分析統整後做差異56

參考文獻

參考文獻 1. 方于芃. 改良式發酵對普洱茶機能性成分之影響. 國立中興大學食品科技學系碩士論文. 2004. 2. 簡崇倫. 來自麴菌一種嶄 新的羧酸脫羧基?:在大腸桿菌中執行分子基因選殖與酵素活性分析. 大葉大學分子生物科技學系專題. 2008. 3. 王志傑. 紅麴菌二級 代謝物之生產與應用之研究. 國立台灣大學微生物與生化學研究所博士論文. 2003. 4. 吳奕韻. 富含 -胺基丁酸乳酸發酵糙米奶之研 製. 國立嘉義大學食品科技學系碩士論文. 2003. 5. Andres M, LozanoandSuneil K. Kalia.帕金森新解答.2005.科學人雜誌. 42:46-53. 6. Bio-Rad Laboratories. Bio-Rad Protein Assay, Bulletin No. 600-0005, Bio- Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany. 1994. 7. Cartherine P. S. T., Owen R. V. C., Michael ang Barry J. S. , Regulation of -aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability .1999. Physiologia Plantarum. 106:363-369. 8. Das s. k. and Ray P. K. , Ontogeny of GABA pathway in human fetal brains.1996. Biochem Biophys Res commmum. 228:544-548. 9. Daniele Marra de Freitas Silva, Vany P.Ferraz and Angela Maria Ribeiro:Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. Journal of Neuroscience Methods.177:289-293. 2009. 10. Guido Capitani, Daniela De Biase, Caterina Aurizi, Heinz Gut, Francesco Bossa, and Markus G.Gruutter, Crystal structure and functional analysis of Escherichia coli glutamate decarboxylase, The EMBO Journal, 22(16): 4027-4037. 2003. 11. Gustavo Fenalti, Ruby H P Law, Ashley M Buckle, Christopher Langendorf, Kellie Tuck,Carlos J Rosado, Noel G Faux, Khalid Mahmood, Christiane S Hampe, J Paul Banga, Matthew Wilce,Jason Schmidberger, Jamie Rossjohn, Ossama El-Kabbani, Robert N Pike, A Ian Smith and Ian R Mackay. GABA production by glutamic acid

decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*. 14 (4):280~286. 2007. 12. Guido Capitai, Daniela De Biase, Heinz Gut, Shaheen Ahmed, Markus G. Griitter: Structural Model of Human GAD 65. Prediction and Interpretation of Biochemical and Immunogenic Features. *Structure, Function, and Bioinformatics*. 59:7-14. 2005. 13. Hayakawa K, Ueno. Y. Kawamura, S., Taniguchi R. Oda K., Production of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Seibutsu Kogaku*. 75:239-244. 1997. 14. Il Lae Jung and In Gyu Kim: Polymines and Glutamate Decarboxylase-based Acid Resistance in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 22846-22852. 2003. 15. Jacobs, W.A. o-Phthaldehyde-sulfite deriviation of primary amines for liquid chromatography-electrochemistry. *J. Chromatogr.* 392:435-441. 1987. 16. Kohama K., Isolation and identification of hyposensitive principle in red mold rice. *Chem Pharm Bull*. 25, 2484-2489. 1987. 17. Komatsuzaki N., Shima J and Hayakawa, K., Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol*. 22: 497-504. 2005. 18. Konol, Himeno K., Changes in γ -aminobutyric acid content during beni-kiji making. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64(3), 617-619. 2000. 19. Kazuhito Akama and Fumio Takaiwa. C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *Journal of Experimental Botany*. 58(10), 2699-2707. 2007. 20. Leventhal A. g., Wang Y., Pu. M., Zhou. Y., Ma, Y.. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*. 300:812-815. 2003. 21. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 1970. 22. W. Lowry Caudill, Gregory P. Houck and R. Mark Wightman, Determination of γ -Aminobutyric acid by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. 227:331-339. 1982. 23. Madzak C., Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R and Gaillardin, C., Functional analysis of upstream regulating regions from the *Yarrowia lipolytica* XPR2 promoter; *Microbiology* 145: 75 – 87. 1999. 24. Madzak C, Treton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*; *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2(2):207-16. 2000. 25. Narahara, H., Kohi-mold and its product koji. *J Brew Soc Japan*. 889: 873-881. 1994. 26. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., and Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18: 61-69. 1990. 27. Okada, Y., Taniguchi, H., and Schimada, C.. High Concentration of GABA and high Glutamate Decarboxylase Activity in Rat Pancreatic Islets and Human Insulinoma. *Science*, 194(4265): 620-622. 1976. 28. Pritchard L., Corne D., Kella D., Rowland J., Winson M. A general model of error-prone PCR. *Journal of Theoretical Biology* 234: 497-509. 2005. 29. Romain Chevrot, Ran Rosen, Elise Haudecoeur, Amel Cirou, Barry J. Shelp, Eliora Ron, and Denis Faur., GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*, *PNAS*, 10319:7460 – 746. 2006. 30. Struzynska L. and Sulkowski G.. Relationships between glutamine, glutamate, and GABA in nerve endings under Pb-toxic condition. *J. Inorg. Biochem*. 98: 951-958. 2004. 31. Santosh K., Narayan S. p., The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol Res*. 101:403-409. 1997. 32. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. 1988. 33. Sambrook J. and Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*, third edition. Cold spring harbor laboratory press, New York. 2001. 34. Ueno Y., Hayakawa K., Taksahashi S., Oda K., Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotech Biochem*. 614: 1168-1171. 1997. 35. Yokoyama S., Hiramatsu J. I and Hayakawa K. b, Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *J Biosci Bioeng*. 93(1): 95-97. 2002. 36. Yuki Kato, Yoko Kato, Keiji Furukawa, Shodo Hara. Cloning and Nucleotide Sequence of the Glutamate Decarboxylase-encoding Gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*. *JSBA, Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(12): 2600-2605. 2002.