

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

菌種最適培養條件評估及發酵製程放大研究  
纖維酒精之高活性纖維素水解酵素開發

計畫編號：972001INER059

受委託機關(構)：交通大學

計畫主持人：楊裕雄

核研所參與人員：逢筱芳 劉明毅 門立中 黃文松 王嘉寶

聯絡電話：03-5712121 轉 56926

E-mail address：ysyang@faculty.nctu.edu.tw

報告日期：97 年 12 月

# Development of High Activity Cellulases for Cellulosic Ethanol

## Abstract

Global energy shortage has forced us not only to decrease energy consumption but also to pursue renewable energy sources. Cellulose is the most abundant bio-product that can be used as the source of renewable energy. The use of agricultural wastes that consist of high cellulose content as the source of bio-ethanol can avoid the competition with food which is a problem for current commercial bio-ethanol manufacture and help to deal with environmental problem for the treatment of agricultural wastes. Cellulase plays a very critical role and is one of the major costs in the bio-ethanol producing process. A research team that possesses expertise in microbiology, protein chemistry, structural biology and genetics engineering is formed to deal with these problems. We have completed or partially completed the following items aiming to produce suitable cellulose degrading enzymes with high cellulose-hydrolyzing activity and low affinity to cellulase inhibitors that can be used in bio-ethanol manufacture. 1. Screened suitable cellulase host. 2. Determined optimal growth condition of the cellulase host. 3. Cloned cellulase gene from the host. 4. Established cellulase overexpression system. 5. Purified cellulase. 6. Crystallized cellulase. 7. Protein engineered cellulase. Most of the items described above were completed under very limited funding and timing. However, there are some items that require long term and continued efforts.

**Key word:** Cellulase, cellulosic alcohol, renewable energy.

Institute of Nuclear Energy Research

# 纖維酒精之高活性纖維素水解酵素開發

交通大學：楊裕雄、袁俊傑、吳東昆

尾科技大學：羅朝村

東華大學：彭國証

同步輻射中心：陳俊榮

核能研究所：逢筱芳 劉明毅 門立中 黃文松

## 摘要

全球性的能源耗竭迫使人類不僅要節約能源，更要開發新的可持續性能源。纖維素為地球上產量最多的可利用再生能源，利用富含纖維素原料之農業廢棄物為生質酒精原料，不但不與糧食競爭且可協助解決環保問題，是一理想的再生能源。於纖維酒精製程中，纖維素水解酵素活性的高低將影響製程中所需的用量，是為生質酒精生產的關鍵成本。本計畫將針對這些問題，結合微生物學、蛋白質化學、結構生物學及基因工程等等技術，以尋求對纖維素水解酵素活性及抑制物問題的根本解決之道。本計畫完成或部分完成下列各項：1. 篩選高纖維素水解酵素之木黴菌生；2. 木黴菌株最佳纖維素水解酵素之活性之生產條件；3. 木黴菌株中纖維素水解酵素基因選殖；4. 建立纖維素水解酵素的大量表現系統；5. 纖維素水解酵素之分離與純化；6. 纖維素水解酵素作蛋白質晶體及繞射研究；7. 纖維素水解酵素基因與蛋白質工程。本計畫能在極有限的時間與經費支援下，整合六個專長互補之研究團隊，共同完成上述大部分課題，但仍然有許多必須長期研究的項目需持續進行方可達成。

**關鍵字：**纖維素水解酵素，纖維酒精，再生能源。

纖 維 酒 精 專 案

核 能 研 究 所

# 目

# 錄

1 英文摘要.....	II
2 中文摘要.....	III
3 計畫緣起與目的.....	1
4 研究方法與過程.....	3
5 主要發現與結論.....	15
6 參考文獻.....	51

## 附 圖 目 錄

圖 1. 計畫總流程.....	3
圖 2. 菌種挑選實施方法與步驟.....	4
圖 3. 酵素之篩選流程圖.....	5
圖 4. 纖維素水解酵素晶體結構分析.....	7
圖 5. 研究策略.....	8
圖 6. 纖維素水解酵素蛋白質工程.....	12

## 計畫緣起與目的

纖維素是陸地環境中主要之光合作用產物，亦是生物圈中蘊藏最豐富之可再生生物資源[1,2]。由於全球石化能源日益枯竭，加上人類欲求二氧化碳減量之協定，因此世界各國無不全力推動此一生物質能源的開發，以求作為未來替代石油之新能源之一。纖維素傳統來源主要為經由森林砍伐，經酸處理、加熱處理或酵素處理，此種方式或得之纖維素已具備特定之經濟用途為紡織、造紙重要來源[3]；澱粉生質酒精之原料主要為玉米澱粉及稻米澱粉[4,5]，二者皆為主要經濟作物。澱粉為人類主要食物來源，將此重要民生物資用於能源酒精製造，已造成食用物資及民生物資嚴重短缺；而森林砍伐更嚴重影響生態、氣候、最終增加大氣及水中二氧化碳含量。故以農業廢棄物以生成酒精之開發蔚為目前生質酒精主流[6,7,8]。利用富含纖維素原料之農業廢棄物，如稻桿、稻殼、玉米桿、麥桿、蔗渣、廢木塊、林木廢棄物及樹葉等，作為製取生質酒精的原料來源，是目前生質能源開發的一項趨勢。然而，受限於纖維素水解酵素昂貴，且纖維素水解酵素活性無法提升；同時，纖維素水解酵素易受其他抑制物影響，而降低其效能，致使相關生質酒精的生產成本提高。因此開發纖維素水解酵素的大量表現系統，使能大量製造具高酵素活性及高抑制物耐受性的纖維素水解酵素以降低成本，是為生產纖維酒精重要的方向。

利用富含纖維素原料之農業廢棄物，如稻桿、稻殼、玉米桿、麥桿、蔗渣、廢木塊、林木廢棄物及樹葉等，作為製取生質酒精的原料來源，是目前生質能源開發的一項趨勢。生質酒精製程中水解纖維素所用的商業化纖維素水解酵素大部份都來自於木黴菌 (*Trichoderma species*) 與黑霉菌 (*Aspergillus species*) 所生產。目前，商業化的品牌

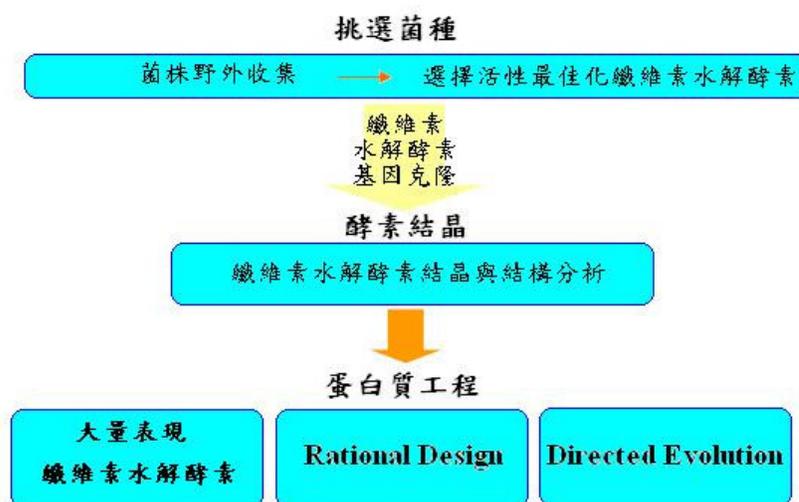
[鍵入文字]

有 Novozyme、Viscozyme、Spenzyme、Genozyme 等等，各家產品的酵素活性均低於 60 FPU (Filter Paper Unit)。由於各不同國家地區的農業廢物種類差異性很大，各公司原本開發時所針對的原物料都不同。臺灣地區最大宗的農業廢物是稻草，自然成為生質酒精生產的主要原料，雖使用各公司所售的纖維素水解酵素亦可行，但唯有開發稻草原料專用的纖維素水解酵素，對於未來稻草纖維素的水解效率才可大幅提昇。同時，在目前使用的製程中，原物料在加入水解酵素作用之前，先經過弱酸的前處理程序，可能產生部份的小分子化學物質，例如某些酚類及一些金屬離子(9)，將會對水解酵素產生抑制作用。未來當原物料的固液比提高後，這些抑制物的濃度亦將大幅提高，藉時為避免因抑制物對水解酵素的影響，只有添加更多量的水解酵素，故如何降低或甚至完全去除抑制物的影響，亦將是一重要關鍵因子。因此本計畫目的為有效蒐集、保存、鑑定本土性之木黴菌，並透過有效率的篩選，選擇出以稻草為基質，可分泌具較高酵素活性的纖維分解酵素的木黴菌菌株，以作為將來量產標的產物之依據；再經由同步輻射 X-光繞射方式得到纖維素水解酵素分子的結晶結構，據此酵素結構特徵進行更進一步必須的基因工程研究，修飾此一本土性菌種纖維素水解酵素基因。最終我們將得一株具高酵素活性，並高抑制物耐受性的纖維素水解酵素分泌菌株；同時大幅度的提高纖維素水解酵素分泌量。

## 研究方法與過程

本研團隊究結合不同專長之研究人員，開發纖維轉化酒精技術中所需之高活性纖維素水解酵素，以基因工程手段，配合蛋白質化學、酵素學、結構生物學及微生物學等等技術，以期解決或改進現有的纖維素水解問題。研究架構如圖一：

圖一、計劃總流程



目標：生產大量、高生產效率且不受抑制劑影響的纖維素水解酵素

虎尾科技大學團隊將篩選具高纖維素水解酵素活性的本土性菌株；東華大學團隊將負責有關篩選菌株生產之纖維素水解酵素的分離純化及相關基因的提取；同步輻射研究中心團隊將以臺灣國內唯一一座的同步輻射 X 光光源對纖維素水解酵素及其相關抑制物覆合物作蛋白質晶體繞射研究，以尋出水解酵素的活性區域結構特徵及其與酵素活性的關係；這將提供有助於新菌種的篩選及相關酵素活性的改良之資訊。交通大學團隊將根據同步輻射研究中心團隊的資料，針對纖維素水解酵素的活性，進行一系列的基因工程研究。以準確的定點突變或導向演化，修飾水解酵素的活性區域結構，以達提昇水解酵素活性

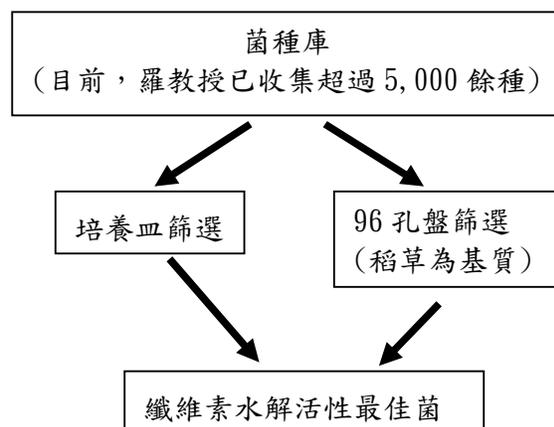
[鍵入文字]

及降低抑制物影響的目的，以提昇纖維轉化酒精製程的效率及酒精產率。

### (一) 最佳的纖維素水解酵素菌種的篩選

虎尾科技大學羅朝村教授團隊以超過十年以上時間，自臺灣國內各種不同區域、不同海拔高度、不同生長環境等等條件，收集各種與纖維素水解有關菌種。這些收集的菌株分別培養於鑑定培養基(主要以麥芽抽出物瓊脂及馬鈴薯葡萄糖瓊脂)上，經適當天數(三至十天)後，依拿大籍的 Bissett 氏及 Gams & Bissett 氏發表之木黴菌分類法[12,16]，觀察記錄各菌株之形態特性。羅團隊目前已收集超過 5,000 餘種木黴菌。羅朝村教授團隊將針對核能研究所纖維酒精專案需求，以此一菌種庫為標的，較短的時間內，篩選出對稻草為原物料時較佳的臺灣本土性木黴菌菌株。同時進行這些菌株的最佳生長與纖維素水解酵素產量之培養基質的研究。此團隊的研究策略如圖二:

圖二、菌種挑選實施方法與步驟



羅教授將以此一菌種庫為基礎進行對稻草為基質反應效率率較高的木黴菌進行篩選，將可其方法有二：(1) 將菌株分別接種於培養皿的

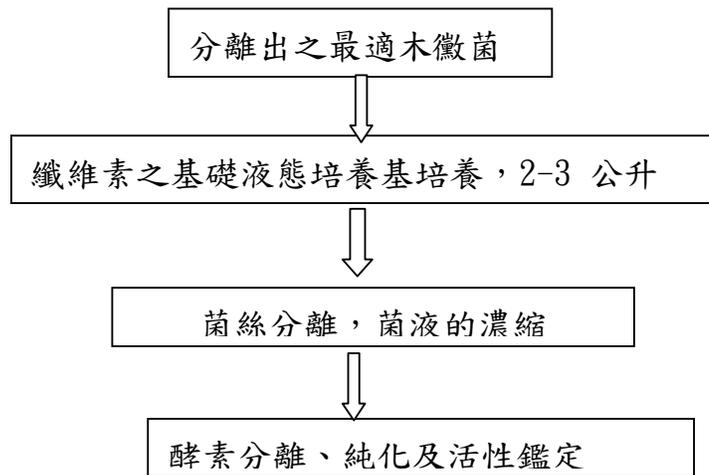
[鍵入文字]

固體培養基，於 50°C 烘箱中 24 小時反應後，加入 0.1% Congo red 染色一小時，利用 1 M NaCl 清洗，觀察紅色區域範圍大小，反應環直徑愈大著即活性愈高；(2) 利用 96 孔盤，以固定量的稻草粉末或 1% 的纖維素作基質，分別接種不同菌株於各孔內，經三天的培養，再加入 DNS 以光譜儀於 595nm 下比較所產生的總糖量，依此量化數字作為活性高低依據。將可以以此兩種方法交叉比較，於最短時間內自菌種庫內快速篩選出最適於稻草作為原物料時的菌株。同時，羅教授團隊將針對篩選出的最適菌株作最適生長條件的研究，以供大量培養時之參考。

## (二) 纖維素水解酵素之分離純化

針對篩選出之最適菌進行放大培養(每批 2-3 公升)，並對其分泌各不同纖維水解酵素(endoglucanases, exoglucanases, 與 glucosidases) 作分離純化，比較各不同纖維水解酵素的活性及產量。其研究策略如圖三：

圖三、酵素之篩選流程圖



菌株的放大培養及酵素的分離純化步驟，將依據以開發之步驟 (9) 稍作修改。培養基成份包括 (gL<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.36; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. H<sub>2</sub>O, 0.5;

[鍵入文字]

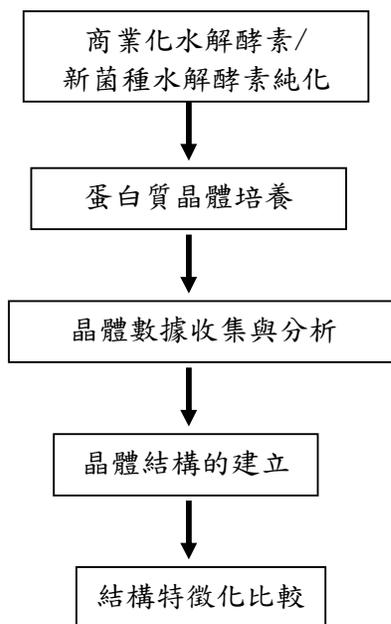
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，0.5；Peptone，1.0；FeCl<sub>3</sub>，0.005；ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O；CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O；CMC，10；在 22°C 下，培養兩天。經過濾分離菌絲後，菌液將以硫酸銨沉澱，或以其它儀器，例如 GE 的 Quicstand 或 Amicon 的 Diaflo 等設備加以濃縮、置換緩衝液，以備下一步驟的酵素分離純化工作。

酵素之分離純化，以 GE 公司所生產的 FPLC 進行，將以不同的離子交換樹脂、分子篩等不同管柱將各內切、外切及葡萄糖苷酶等一一純化，並以電泳膠方式測定酵素的純度及活性。純化後之各個水解酵素再經纖維素水解酵素活性的定性分析，可區別水解酵素的種類，內切、外切及葡萄糖苷酶等。纖維素水解酵素的定量將針對內切、外切及葡萄糖苷酶等不同種類，分別以 CMC、Avicel、Salicin 作為基質分別反應，再加 DNS 以測定還原糖的量為之。

### **(三) 纖維素水解酵素與抑制物複合物的晶體結構分析**

同步輻射研究中心團隊將以同步輻射 X 光對水解酵素及抑制物複合物作蛋白質晶體繞射研究，以尋出這些關鍵酵素的結構特徵及其與酵素活性的關係。初期先針對具潛力之商業纖維素水解酵素進行酵素分離及純化，利用同步輻射 X-光蛋白質結晶學方法解析水解酵素與受質之高解析立體結構。待東華大學彭國証教授團隊完成新菌種新水解酵素純化工作，本團隊亦將分析其結構，對比於其它較高活性的纖維素水解酵素，以作為蛋白質工程修飾的模式。研究策略如圖四：

#### 圖四、纖維素水解酵素晶體結構分析



培養蛋白質晶體：晶體培養的方法，採用懸吊式蒸氣擴散長晶法（Hanging-drop Vapor Diffusion），此種方法的優點在於方便快捷並且所需蛋白量較少，所須蛋白質濃度約 10mg/ml。目前在本實驗室已有自動化長晶設備與新設置的晶體觀察儲存系統，可縮短條件篩選時間與減少人力。

數據收集與處理：X-光繞射分析主要利用同步輻射光源。可以利用國家同步輻射研究中心的兩座蛋白質結晶學專屬光束線，其中一座 (BL13B) 為針對未知蛋白質結構解析用途，其能量是從 6.5 keV 到 19 keV 之 MAD/SAD 光束線；另一條 (BL13C) 為晶體篩選、分子置換計算、藥物設計及高解析度結構分析之用，其能量固定為 13 keV 之單色光束線。兩座實驗站均配有最先進的高效率電荷耦合偵檢器 (CCD) 偵測器、自動化的樣品更換及晶體定位機制、微小晶體所需之微聚焦光束以及快速電腦資料處理分析等。另外，也可使用台灣位於日本 SPring-8 的蛋白質結晶學實驗站，此實驗站亦配備有先進的 CCD detector 以利 X

[鍵入文字]

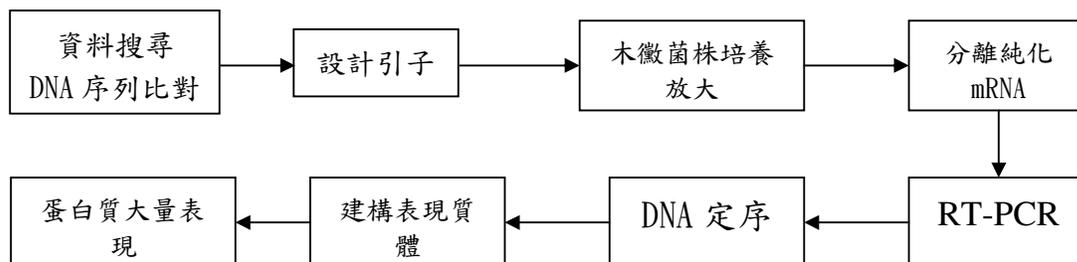
光繞射資料收集。

蛋白質結構建立與精調：X 光繞射數據經結定相位角後，即可得到“清晰”且“連續”的電子密度圖，可進行蛋白質分子結構的建立。在建立蛋白質結構時在電腦上來回進行，依據電子密度圖建構越完整且正確之模型所獲得之計算相位角越準確。如此反覆可得相位改善達到最佳化，進而決定出最正確之蛋白質分子結構。可以利用一些電腦程式可依據初始相位角與高解析電子密度自動進行精準化建構模型，加速結構解析。

結構特徵化與活性高低關係：多個酵素活性較佳的商業化或新菌株水解酵素經酵素結構及酵素與受質共結構的分析後，比較其活性區域結構，將可由對比其氨基酸與受質間交互作用的密切程度與活性高低，來決定那幾個氨基酸與酵素活性有最大關聯。這些結果將影響基因工程團隊修飾基因系列上的目標的決定。

#### (四)纖維素水解酵素大量表現系統

##### a) 研究策略:



##### b) 研究方法:

###### 材料:

本土的木黴菌株 (*Trichoderma koningii* TK23) 由羅朝村教授(虎尾科技大學)贈與，而木黴菌株(*Trichoderma reesei*; BCRC 31640)則由食品工

[鍵入文字]

業研究所購得。馬鈴薯瓊脂培養基（39 g potato dextrose agar, 1000 mL dist. H<sub>2</sub>O）由Merck購得，纖維素由Sigma購得。分生試藥及套組由GIBCO Life Technology 購得，其餘藥品由Sigma購得。

**方法：**

### 1. *Trichoderma* 培養方法

先將 *Trichoderma* 培養在 PDB 中，以 25°C 震盪培養 3 天。以 6000 rpm 離下菌體，加入無菌水沖洗，再度以 6000 rpm 離心，重複三次之後，將菌體放入 basal medium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5%; MgSO<sub>4</sub>, 0.06%; CaCl<sub>2</sub>, 0.06%; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.0005%; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.00016%; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.00014%; CoCl<sub>2</sub>, 0.0002%)+ 2% cellulose 中，以 25°C 震盪培養 24 小時。

(PDB 置備方法: 將 200 g 馬鈴薯切碎，煮沸 30min，去除雜質，加入 20g dextrose, 補水至 1000 ml)

### 2. RNA 抽取

本實驗使用Qiagen公司所生產的 RNeasy Mini Kit。簡略的描述如下，取30mg菌體放入研玻中，加入液態氮磨碎。將磨碎之組織倒入 eppendorf 中，加入450ul Buffer RLC，強烈震盪30秒。將混和完畢之液體置入QIAshredder spin column 中，以13000 rpm 離心2分鐘，取出混和液並加入225 μL ethanol，混和均勻後置入 RNeasy spin column，以10000 rpm 離心15秒。去除下層液體後 加入 700 μL Buffer RW1，以10000 rpm 離心15秒。去除下層液體後 加入 500 μL Buffer RPE，以10000 rpm 離心15秒。重複 Buffer RPE的清洗程序一次。之後以13000 rpm 離心 2分鐘，以去除多餘的酒精。將上層的管柱取出，至於新的 eppendorf 上，加入60 μL 無RNase的H<sub>2</sub>O，以10000 rpm 離心 1分鐘，將RNA沖洗出來。以分光光度記測量RNA的質量，並將抽取出來的RNA置於-80°C冰箱保存。

### 3. RT-PCR

本實驗使用 NEB 公司所生產的 Protoscript First Strand cDNA Synthesis kit 進行反轉錄。簡略的描述如下，取 2 μg RNA 加入 2 μL poly T primer 及 4 ul dNTP mix, 補水至 16 μL, 以 70°C 加熱 5 分鐘。迅速置於冰上，加入 2 μL 10X RT Buffer, 1 μL RNase inhibitor 及 1 μL M-MuLV Reverse Transcriptase, 置於 42°C 中，反應 60 分鐘，接著再置

[鍵入文字]

於 95°C 中，反應 5 分鐘以去除酵素活性。反轉錄完畢之 cDNA 置於 -20°C 冰箱保存。PCR 使用 1  $\mu$ L cDNA; 4 mM dNTP, 3  $\mu$ L; 10X reaction buffer, 5  $\mu$ L; 20 uM primer I, 1  $\mu$ L; 20 uM primer I, 1  $\mu$ L; 4 U DNA polymerase, 0.5  $\mu$ L; 補水至 50  $\mu$ L。

#### 4. 建構質體

利用 NotI 酵素來切開 pGEMT/ $\beta$ -glucosidase 及 pET28a 質體，並藉由瓊脂膠體電泳將  $\beta$ -glucosidase 及 pET28a 質體個別分離並進行膠萃取 (Gel Extraction) 以將 DNA 片段純化回收；本實驗所採行之步驟依照 GeneClean® III 套組, Biol01; Cat#1001-600 之建議進行。cDNA 片段之大小及濃度以 1% 瓊脂膠體電泳確定之。小片段的  $\beta$ -glucosidase (~1.45 kb) 及大片段 (~5 kb) 以莫耳數比 3 : 1 之比例混合，之後以 T4 Ligase 於 16°C 作用 12~16 小時進行接合反應，而後將反應完成之質體 pET28a/ $\beta$ -glucosidase 以轉殖作用送入大腸桿菌 (DH5 $\alpha$ ) 以進行篩選。

#### 5. 轉殖作用 (Transformation)

取出預先置備之勝任細胞 (Competent cell) 待解凍後加入微量之 DNA (約 20 ng)，均勻混合後置於冰上 15 分鐘，將勝任細胞/DNA 混合液以 42 °C 進行熱休克 90 秒，之後將菌液置冰上 5 分鐘使其冷卻後，加入 500~1000  $\mu$ L 的 LB 培養液，並在 37°C 下震盪培養 1 小時。培養後之菌液以 6000 rpm 離心 5 分鐘以分離培養基及菌體，將大部分培養液移除，並保留約 50~100  $\mu$ L 的上清液，重新將上清液與菌體均勻混合後，轉移至平板式固態培養基上，以塗抹棒均勻塗盤，並移到 37 °C 恆溫培養箱培養至菌落生成。本實驗所使用的勝任細胞 DH5  $\alpha$  及 BL21(DE3) 大約於塗盤後培養 12~14 小時即可生成菌落，XL1-Blue 則需等待至 16~18 小時。

#### 6. 大量表現重組蛋白

將已經建構成之 pET28a/ $\beta$ -glucosidase 質體以轉殖作用送入表現宿主大腸桿菌 BL21(DE3)，待確定轉殖成功後取一單株菌落至含 50  $\mu$ g/mL Kanamycin 之 10 mL LB 液態培養液中，經隔夜震盪培養後 (37°C, 200 rpm) 加入 200 mL 新的 LB 培養液以 1000 mL 的錐形瓶，用 200 rpm 的轉速搖至 OD<sub>600</sub> 為 0.6-0.8 後，加入不同濃度的異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖 (isopropyl- $\beta$ -D-thio- galactoside, 以下稱 IPTG) 以刺激蛋白質的表達。於不同溫度下震盪培養 10 小時後，以 6,000 rpm 的速度進行離心，以

[鍵入文字]

收集大腸桿菌。將大腸桿菌均勻的懸浮於 5 mL 磷酸緩衝液 (50 mM potassium phosphate buffer, pH6.8 及 50 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) 中，以超音波振盪 (sonication; 強度 3, 採振 1 秒, 停 1 秒的模式, 一個週期共振 3 分鐘) 將菌體中蛋白質釋出，以 4°C 高速離心 14,000 rpm 10 分鐘，取上清液及蛋白原液來進行蛋白質電泳以測定蛋白質表現狀況。

## 7. 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

### A. 膠體及樣品處理

本實驗所選擇配置的膠體是 10% 的 SDS-PAGE，將定量過之蛋白質溶液與 5 倍樣品緩衝液混合後在 95°C 加熱 3~5 分鐘以破壞蛋白質結構。加熱後將樣品置於冰上 2 分鐘後以 14000 rpm 轉速離心 5 分鐘，取上清液注入樣品槽內，先以 100 伏特進行 30 分鐘電泳，再以 150 伏特進行電泳 2 小時。電泳結束後，拆下玻璃，將膠體移至適當之容器內以待進一步處理。

### B. 染色及褪染

染劑及褪染劑配方如下:

#### --染劑 (Staining Solution)

取 Coomassie Brilliant blue R250 0.5 克 (最終為 0.025% 重量體積比)，加入 800 mL 甲醇 (methanol, 最終濃度 40%)，均勻混合至粉末溶解，再加入 140 mL 冰醋酸 (最終濃度 7%)，加水至 2 L。避光並保存於室溫下。

#### --褪染劑 I (Destaining Solution I)

甲醇 500 mL (最終濃度 50%)，冰醋酸 100 mL (最終濃度為 10%)，加入二次水至 1 L。避光並保存於室溫下。

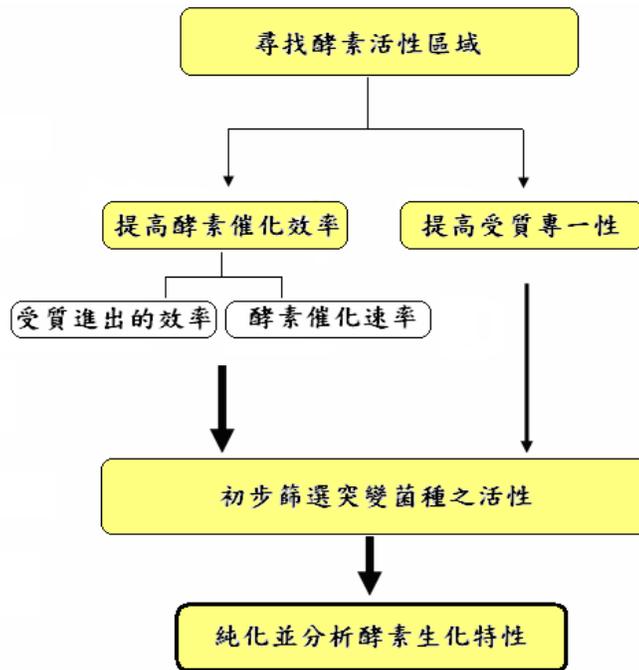
#### --褪染劑 II (Destaining solution II)

甲醇 70 mL (最終濃度為 7%)，冰醋酸 50 mL (最終濃度為 5%)，加入二次水至 1 L。避光並保存於室溫下。

將完成電泳的膠體置於含有染劑的開口方盒子內，輕輕搖晃 30 分鐘，使膠體內蛋白質能均勻地染上顏色，接著以褪染劑 (I) 取代染劑，並在室溫下輕輕搖晃 30 分鐘，再換用褪染劑 (II)，以同樣方式褪染直至膠體呈現最低的背景。之後使用 Image System 或數位相機拍照並使用玻璃紙封膠保存。

### (五)蛋白質工程

本項工作的研究策略為找尋酵素活性區域、提高酵素催化效率、提高受質專一性、提高受質進出的效率、初步篩選突變菌種之活性及純化，生化特性之分析，彼此的關係如圖六：



圖六、纖維素水解酵素蛋白質工程

**找尋酵素活性區域：**根據已知之纖維素水解酵素與其受質及產物的 X 光共晶結構，可以找到與受質或產物可能進行交互作用的胺基酸，並且進一步推測纖維素水解之可能活性區域。

**提高酵素催化效率：**由已解析出來之纖維素水解酵素與其受質或產物之共結晶結構，可分析、推測出在纖維素水解酵素內，參與受質之結合與水解過程中所需要的胺基酸。針對可能參與纖維素水解過程的胺基酸進行生化特性分析，如親疏水性、帶電荷與否等，再藉由胺基酸

[鍵入文字]

定點突變的方式，改變這些胺基酸的生化特性，進而分析這些突變種對纖維素水解效率的影響。

**提高受質專一性：**根據已得到之纖維素水解酵素與其受質之 X 光共結晶結構，可以找到酵素中可能會與受質性產生交互作用之胺基酸，再利用空間結構中受質與其周圍胺基酸的相對位置，透過定點突變的方式，嘗試增加受質與其周圍胺基酸基的交互作用，以期達到提高纖維素水解酵素之受質專一性的目的，最後再利用 X 光蛋白質結晶學方法對突變酵素與受質做出高解析度之立體結構，以及純化出突變酵素並測量其動力學參數，來檢驗纖維素水解酵素上特定位置胺基酸之生化特性對受質專一性及催化效率的影響。

**提高受質進出的效率：**經由突變纖維素水解酵素與受質結合位置的特定胺基酸，使受質更容易進入酵素活性位置與纖維素水解酵素結合產生催化反應。另外利用改變受質經催化產生產物時之產物與酵素結合位置的特定胺基酸位置，使產物生成後能更容易的離開酵素，利用這兩種設計使得酵素易接受受質，並且產物更易離開，使酵素的  $k_m$  下降，達到提高反應速率的目的，意謂提高纖維素水解酵素的活性。

**初步篩選突變菌種之活性：**為了提高酵素催化速率而將纖維素水解酵素基因上的特定胺基酸位置突變後，送回菌種中表現，再測試這些菌種表現纖維素水解酵素的水解能力。經由比較其活性後可知特定胺基酸改變對纖維素水解酵素活性的影響而找出設計後提高酵素催化速率最多的位置。另外在酵素與受質專一性部分，利用在活性測量的同時加入抑制劑，再測試其活性，以了解突變不同位置對其抵抗抑制劑的能力測量。

**純化，生化特性之分析：**將初步篩選出可提高酵素催化效率或是受質

[鍵入文字]

專一性之突變種，進一步將其纖維素水解酵素純化出來；針對各個突變之酵素，測量其動力學參數，分析各突變酵素對酵素動力學參數的影響，進而了解在酵素活性中心內，各胺基酸在纖維素水解酵素催化過程中的角色，以期對提高纖維素水解酵素的催化效率、受質專一性有所助益。

**纖維素水解酵素基因之導向演化篩選：**首先將利用化學藥劑或 error-prone PCR 之方法製備突變基因庫。在化學突變方法中將對纖維素水解酵素基因以致癌化學藥品處理以使其產生突變。而在 error-prone PCR 中將經由調整不同之金屬離子或不同比例之 dNTPs，或經由改變雜交或加長之時間而造成 PCR 反應度之降低。由上述方法所獲得之基因庫將轉殖進入載體中成為突變重組基因庫。此突變重組基因庫將進行最適化酵素篩選。針對熱穩定之突變基因將經由逐步提升反應之溫度，並測試其酵素催化活性是否隨著溫度之上升而增加。針對篩選於常溫下之最佳酵素活性之纖維素水解酶基因，將以定量之纖維素為受質，測定最短時間內能水解最多量之受質以產生產物之纖維素水解酶基因突變株。我們也將利用染劑在不同酸鹼值會呈現不同顏色之特性進行不同酸鹼值最適化之突變株之篩選。

## 主要發現與結論

本計畫完成下列各項：篩選高纖維素水解酵素之木黴菌生；木黴菌株中纖維素水解酵素基因選殖；纖維素水解酵素之分離與純化。本計畫部分完成下列各項：木黴菌株最佳纖維素水解酵素之活性之生產條件；建立纖維素水解酵素的大量表現系統；纖維素水解酵素作蛋白質晶體及繞射研究；纖維素水解酵素基因與蛋白質工程。本計畫能在極有限的時間與經費支援下，整合六個專長互補之研究團隊，共同完成上述大部分課題，已相當不容易。未能全部完成部分之研究的項目，必須長期持續進行方可達成。各項研究成果詳細說明如下：

### 提供適當生產纖維素水解酵素之木黴菌菌種：

本土性之木黴菌菌株蒐集、保存：由於木黴菌屬有其溫度適應性的分佈特性，依據海拔等高線及台灣北中南東為區分，海拔區分如 0-500, 600-1000, 1100-2000 及 2000 公尺以上為採集標高。在台灣北、中、南、東九個縣市地區採集 64 種植物，若以獲得 599 之菌株分析，主要以海拔 500 公尺以下為最多；501 至 1000 公尺及 1001 至 1500 公尺等次之。另外從平地一般作物根與土壤分離之菌株者計有 4850 株。上述經純化培養後之木黴菌菌株，將依各菌系製作成孢子懸浮液，然後將其與無菌之矽膠石(2mm)混合，保存於-20C。另外亦有部分經冷凍乾燥和於-80°C 保存。

本土性之木黴菌菌株鑑定：依加拿大籍的 Bissett 氏及 Gams & Bissett 氏發表之木黴菌分類法，鑑定顯示：四種木黴菌群在台灣皆可發現；即包括有 *Trichoderma*、*Longibrachiatum*、*Pachybasium* 以及 *Hypocreanum* 等 section。主要種群(species, aggregate)有：*Trichoderma viride*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. polysporum*, *T. virens*, and *Hypocera* spp.。

木黴菌菌株產生纖維素酶之定性與篩選：目前已篩 400 支菌株（大都具有產生纖維分解酶之能力）；若以菌絲生長速度定為 100 而言，約有 38% 菌株低於 50，約有 60% 菌株界於 51-95 及約有 2% 菌株界於 96-200。

較佳菌株之篩選：根據生長速度與分解能力大小等定性篩選，已獲得一株 *Trichoderma koningii* strain TK23 較佳之菌株。並已提供東華大學彭教授作酶蛋白試驗及交通大學團隊從事基因與相關試驗之進行。

結論：木黴菌為一多用途之微生物，除用於病害生物防治與促進作

[鍵入文字]

物生長外，尚可利用其生產多種酵素方面之優點。目前已被大量開發並應用於酒精工業、紡織工業、造紙工業、飼料工業與其他相關產業等，因此實一值得注意與開發的應用微生物。台灣過去對木黴菌之分類，雖亦有其零星記錄，但對其作系統分類，尚屬萌芽階段；如何收集、歸類並作有系統之研究，實值得考慮。另外應用於相關產業，尤其有用基因之開發與其產物之特性等，目前雖已有部份菌株作為植物保護製劑（目前已進入田間試驗階段）；其他應用方面，實值得更進步探討與開發。

### 菌株纖維素水解酵素活性與蛋白質濃度測試

菌株之生長環境於不同生長期對於本土的木黴菌株 *T. koningii* TK32 纖維素水解酵素活性有極大的影響，明確顯示有必要詳細研究木黴菌株最佳之生長條件與所需之養分來源，以得到最佳之纖維素水解酵素之活性。目前限於人力、物力，未能進行完整的測試，最適菌體之培養條件無法於本計畫內完成。但下列分析證實木黴菌株 *T. koningii* TK32 具纖維素水解酵素之活性。

1. 針對 xylanase 與 cellulase 在稻草桿培養基生長三天與四天期間的變化：

菌株培養與蛋白質濃度分析表（蛋白質濃度測定以 BCA method）

		OD570		OD570 平均值	Blank	濃度 (mg/ml)	1X 濃度 (mg/ml)	濃度 平均
	0X	0.1	0.09	0.10	0	0	0	0
第三天	1/10X	0.28	0.3	0.29	0.19	0.41	4.19	4.20
	1/4X	0.62	0.56	0.59	0.49	1.05	4.21	
第四天	1/10X	0.46	0.47	0.46	0.36	0.78	7.84	7.46
	1/4X	0.90	0.96	0.93	0.83	1.77	7.10	

[鍵入文字]

菌株培養與 Xylanase 與 Cellulase 活性分析表

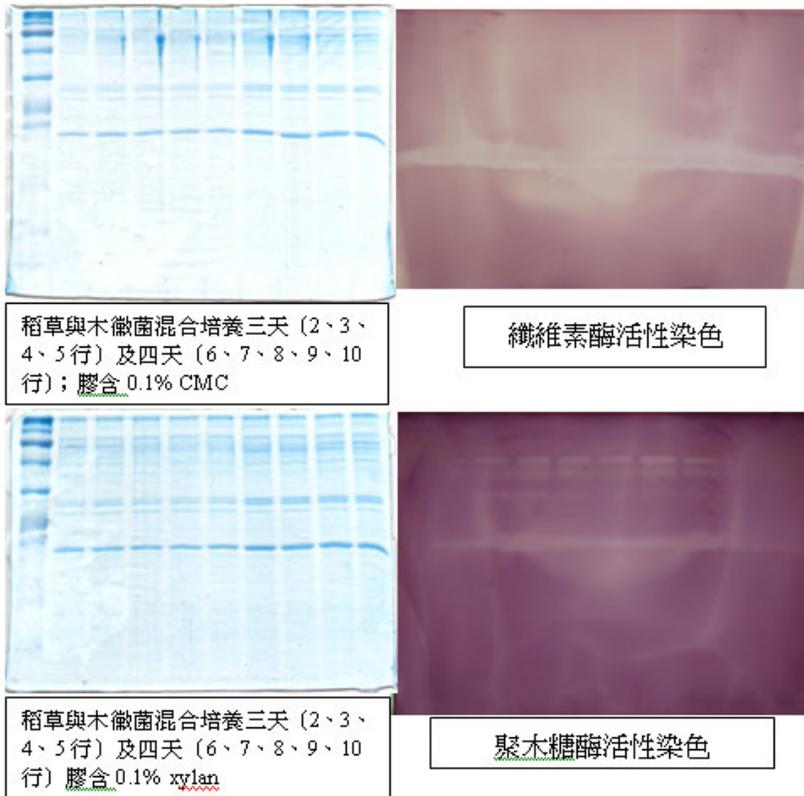
	Xylanase				Cellulase			
	第三天		第四天		第三天		第四天	
稀釋倍率	OD570 Blank	酵素活 性(U/ml)	OD570 Blank	酵素活 性(U/ml)	OD570 Blank	酵素活 性(U/ml)	OD570 Blank	酵素活 性(U/ml)
1X	1.56	30.3	1.74	33.94	0.14	0.087	0.44	0.26
1/2X	1.28	24.8	1.39	27.16	0.06	0.040	0.17	0.10

菌株培養與 Xylanase 與 Cellulase 比活性分析表

下列圖示用來映證上述蛋白質(SDS-PAGE)與水解酵素(染色分析技術)之分析結果

第 三 天			Xylanase		Cellulase	
	稀釋倍率	蛋白質 量(μg)	活性	比活性	活性	比活性
	1X(50 μl)	210	30	0.14	0.26	0.0012
	1/2X(25 μl)	105	24	0.23	0.10	0.0010
第 四 天			Xylanase		Cellulase	
	稀釋倍率	蛋白質 量(μg)	活性	比活性	活性	比活性
	1X(50 μl)	373	33	0.09	0.087	0.00023
	1/2X(25 μl)	186	27	0.14	0.040	0.00021

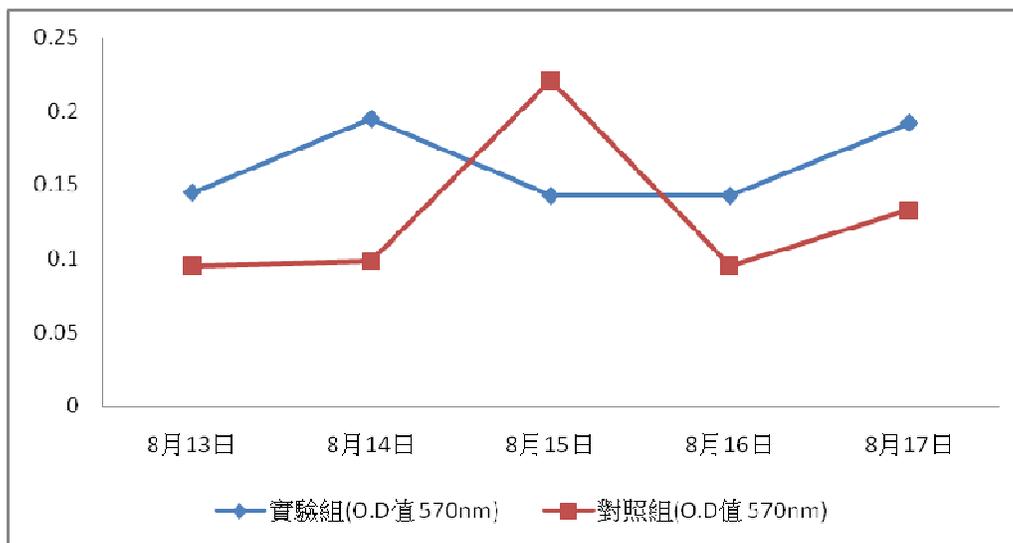
[鍵入文字]



## 2. Koningii 第一到五天(8/13-8/17)的培養液之上清液 CMCase 活性分析

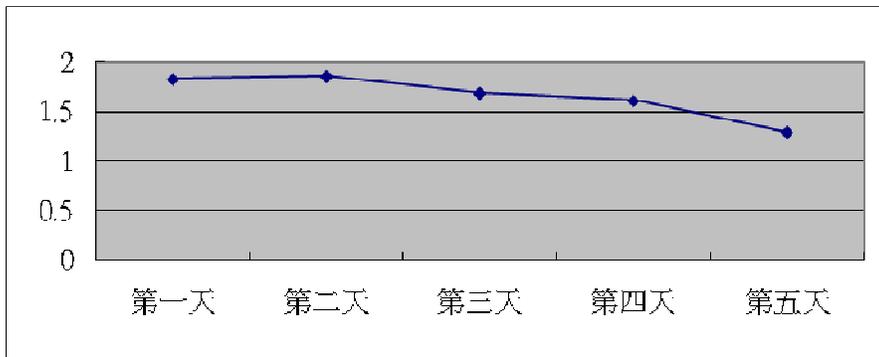
**圖表說明：**正常：沒有經過任何處理，直接將培養液離心取上清液測得之數值；

變性：將培養液離心取上清液後 95°C 加熱十分鐘處理



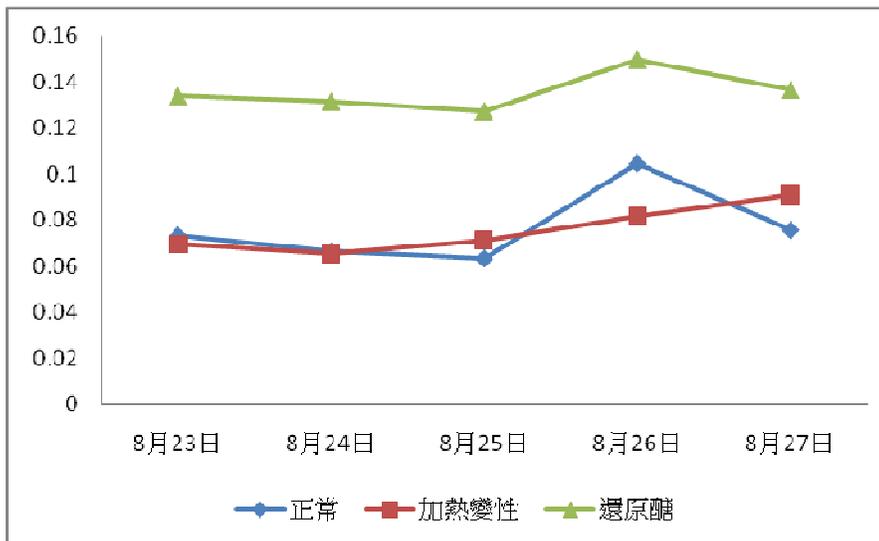
[鍵入文字]

### Koningii 第一到五天(8/13-8/17)的蛋白質分析



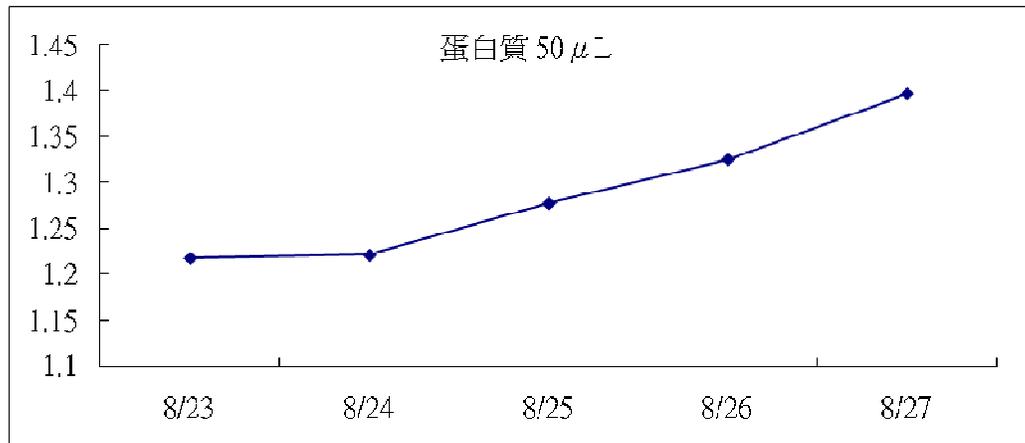
### 3. Koningii 第一到五天(8/23-8/27)的培養液之上清液CMCase活性分析

圖表說明：**正常**：沒有經過任何處理，直接將培養液離心取上清液測得之數值；  
**變性**：將培養液離心取上清液後 95°C 加熱十分鐘處理；  
**還原糖**：將培養液離心取上清液後以 DNS 試劑直接測試



[鍵入文字]

#### Koningii 第一到五天(8/23-8/27)的蛋白質分析



#### 4. Koningii A 和 B 第一天到第五天(8/29-9/2) 的培養液之上清液 CMCCase 活性分析

圖表說明：

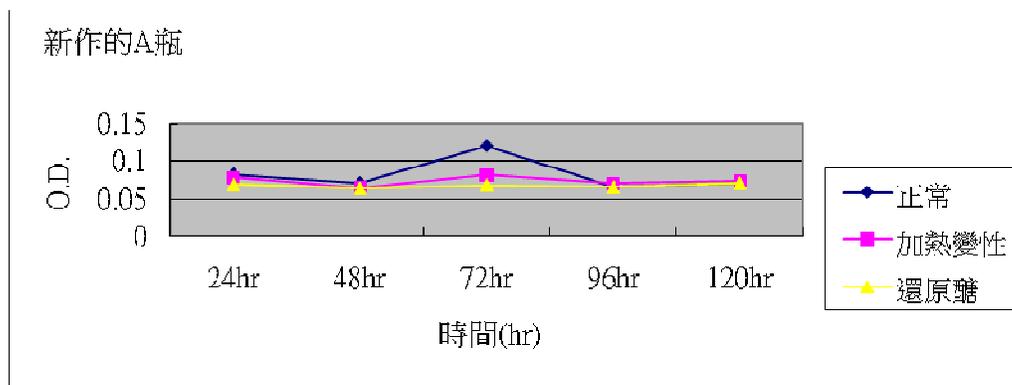
**正常**：沒有經過任何處理，直接將培養液離心取上清液測得之數值

**變性**：將培養液離心取上清液後 95°C 加熱十分鐘處理

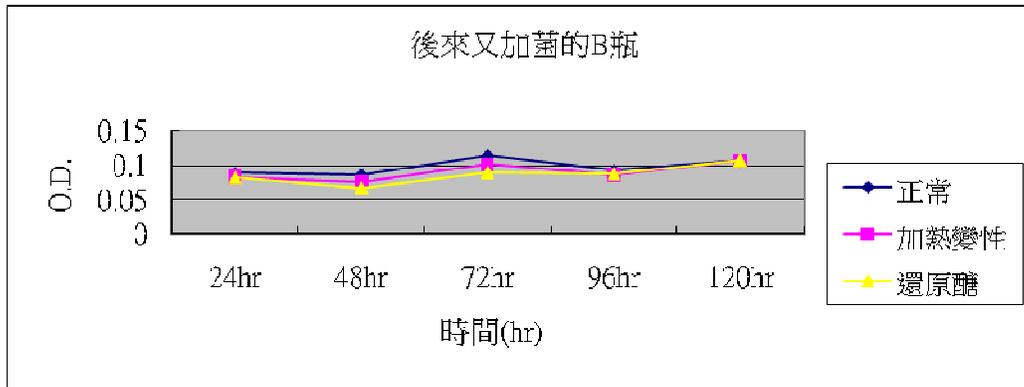
**還原糖**：將培養液離心取上清液後以 DNS 試劑直接測試

A; Koningii 培養第一天到第五天的培養液之上清液 CMCCase 活性分析

B; 之前的 Koningii 培養液滅菌後再加入新的 Koningii 培養第一天到第五天的培養液之上清液 CMCCase 活性分析



[鍵入文字]



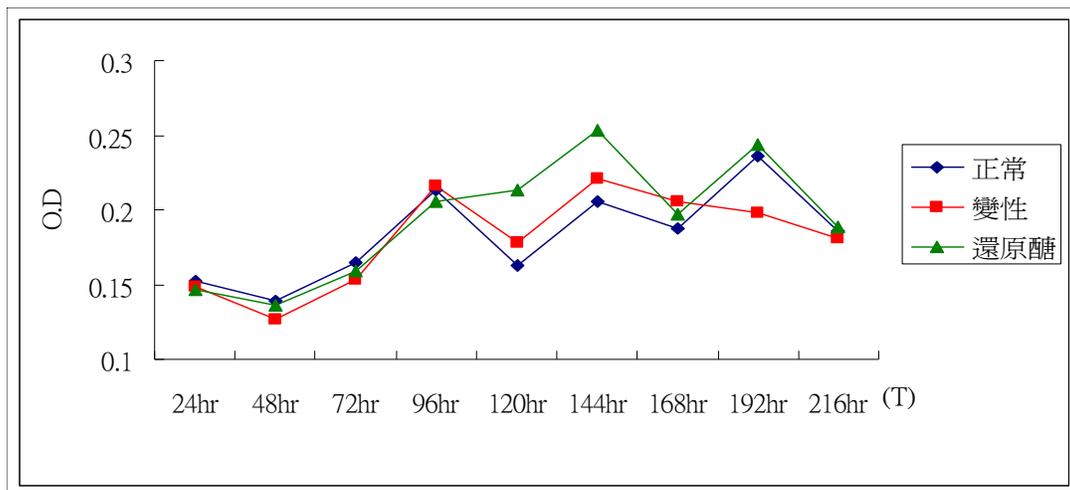
### 5. ETS3-2-3 培養第一天至第九天(9/10-9/18)的培養液之上清液 CMCase 活性分析

圖表說明：

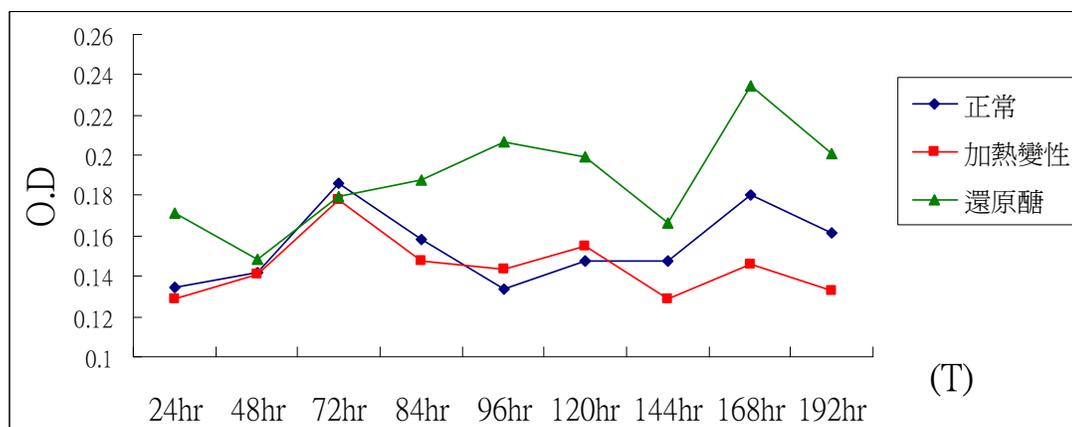
**正常**：沒有經過任何處理，直接將培養液離心取上清液測得之數值

**變性**：將培養液離心取上清液後 95°C 加熱十分鐘處理

**還原糖**：將培養液離心取上清液後以 DNS 試劑直接測試



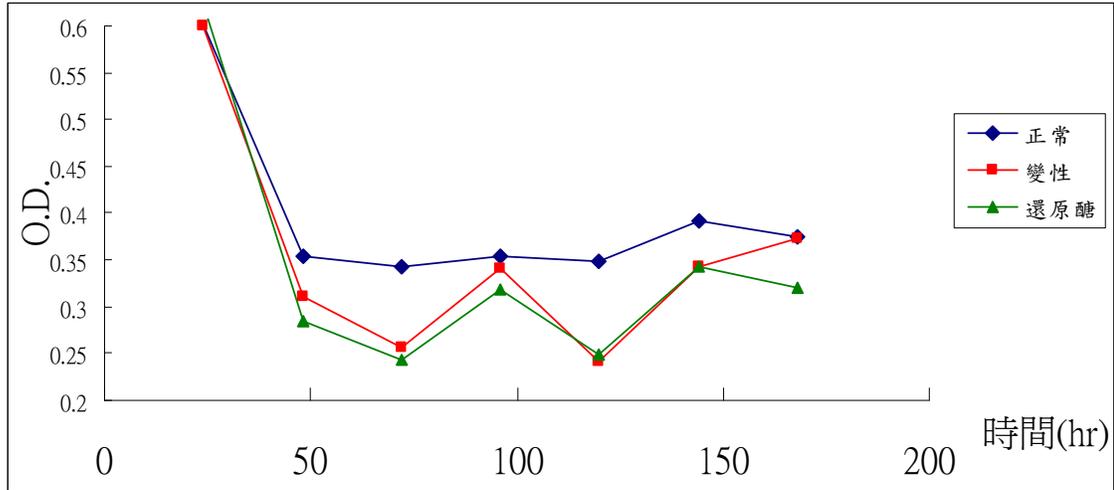
### Koningii 第一天到第八天(9/11-9/18)的培養液之上清液 CMCase 活性分



[鍵入文字]

析

6. 另一批(新配方)Koningii 第 1 到 7 天(9/14-9/20) 的培養液之上清液  
CMCase 活性分析



7. Koningii(K) 第一天到第八天(10/12-10/19)的培養液之上清液  
CMCase 活性分析

圖表說明：

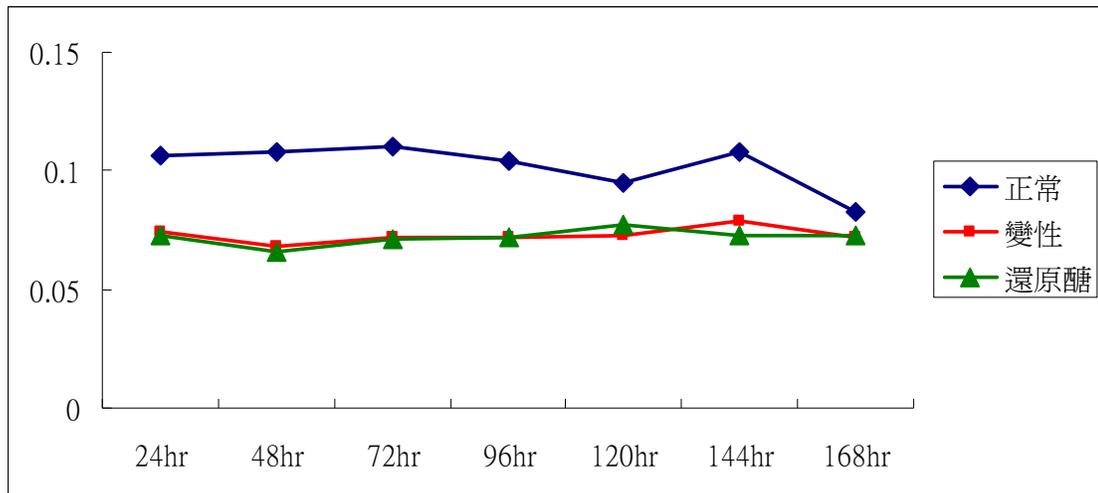
**正常**：沒有經過任何處理，直接將培養液離心取上清液測得之數值

**變性**：將培養液離心取上清液後 95°C 加熱十分鐘處理

**還原醣**：將培養液離心取上清液後以 DNS 試劑直接測試

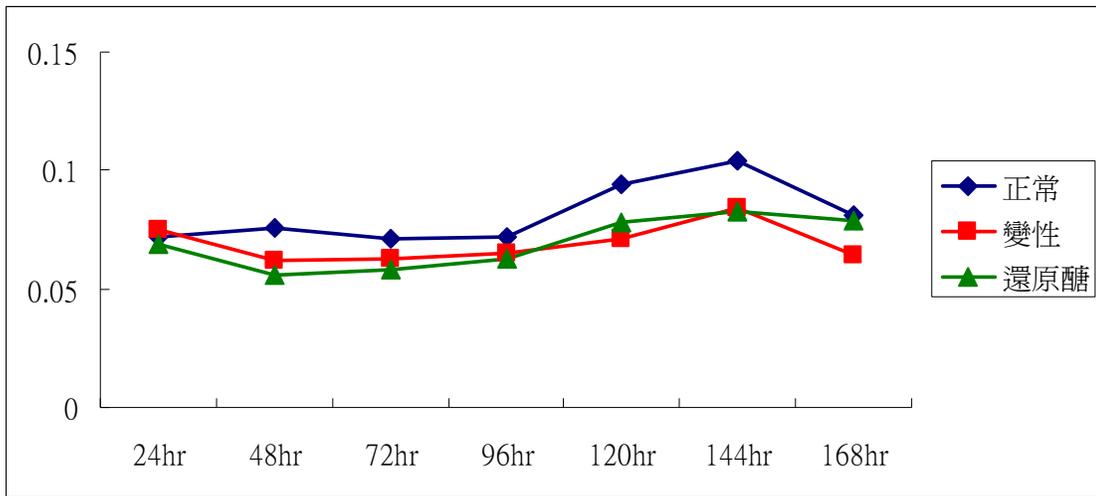
**Koningii(K)**:跟平常一樣.養在 250ml 的錐形瓶中

**Tea Koningii(TK)**:養在泡茶的裝置中(把稻草關起來,目的:避免菌絲被切斷)

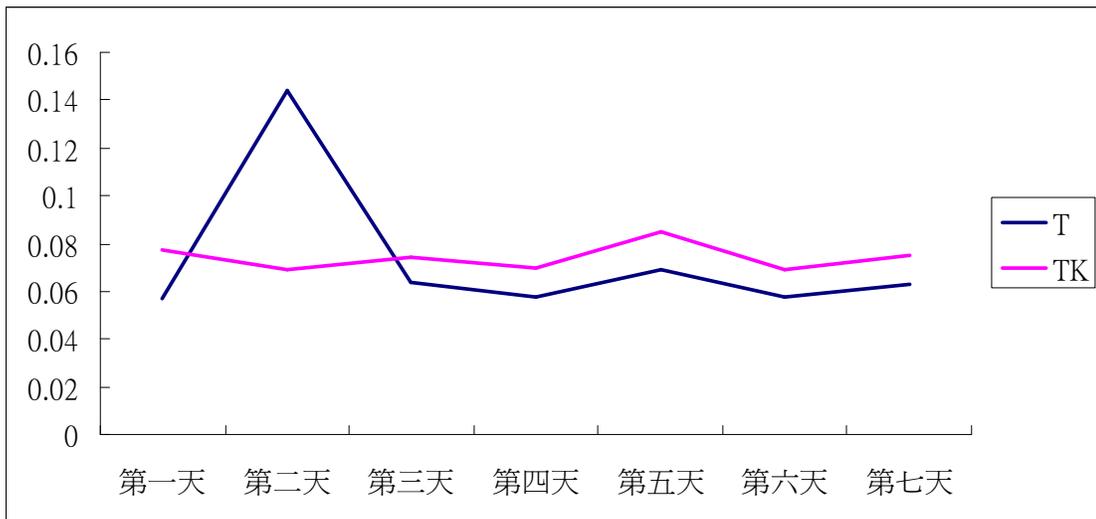


[鍵入文字]

### Tea Koningii(TK)第一天到第八天(10/12-10/19)的培養液之上清液 CMCase 活性分析



### T 和 TK Filter paper activity (FPA)



## 開發纖維素水解酵素大量表現系統

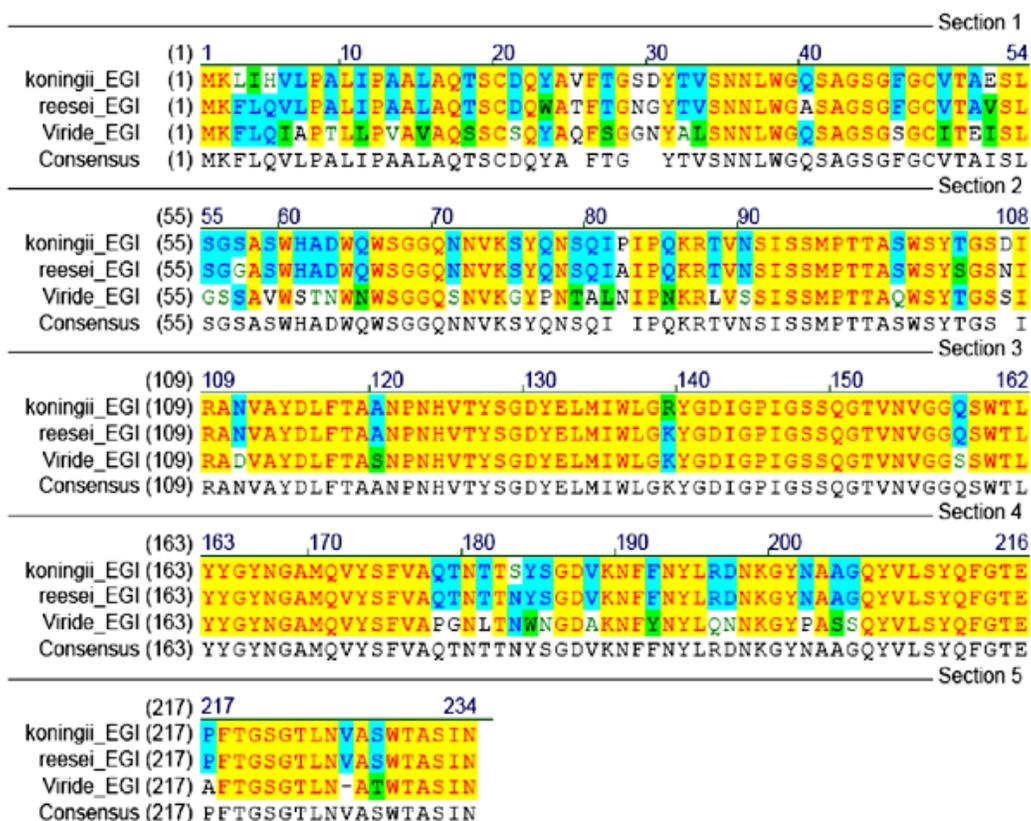
我們以本土的木黴菌株 *T. koningii* TK32 中選殖出 $\beta$ -1,4-glucosidase 類似基因，從 *T. reesei* 中選殖出 Cellobiohydrolase II 等兩類基因，並經進一步以 DNA 定序確定無誤。我們將應用 InFusion 套組，從 *T. reesei* 中選殖出 Cellobiohydrolase I 及 Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 等剩下的兩類基因。 $\beta$ -1,4-glucosidase 及 Cellobiohydrolase II 等兩類基因在 pET28a 上的表現質體(pET28/glucosidas 及 pET28/CBH-II)已建構完成。我們已嘗試將 *T. koningii* TK32 中選殖出之 $\beta$ -1,4-glucosidase 在大腸桿菌中表現。我們分別在 37 °C, 28 °C 及 22 °C 等溫度下，以 250 或 500  $\mu$ g/mL 之 IPTG 刺激下震盪培養 10 小時，然而我們發現  $\beta$ -glucosidase 可在大腸桿菌中表現，但是卻形成了包涵體(inclusion body)。

### (1)、纖維素水解酵素蛋白序列比對

纖維素水解酵素基因如， $\beta$ -1,4-glucosidase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase [1, 2]及 cellobiohydrolase [3]等已在木黴菌株(*Trichoderma reesei*)中發現並選殖出，因此我們希望利用已知的基因序列來設計 PCR 引子，希望藉此從本土的木黴菌株 (*Trichoderma koningii* TK23) 中選殖出 endo- $\beta$ -1,4-glucanase, cellobiohydrolase 及  $\beta$ -1,4-glucosidase 的類似基因。

我們首先將在  $\beta$ -1,4-glucosidase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase 及 cellobiohydrolase I 在 *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. reesei* 及 *T. viride* 等菌種中的蛋白質序列加以進行比對，並希望利用比對之結果來設計 DNA 引子，以用於後續之 PCR 基因放大反應。其結果如圖一至三所示：

[鍵入文字]



圖一、Endo-β-1,4-glucanase 在 *T. reesei*、*T. koningii* 及 *T. viride* 等菌種中的蛋白質序列比對結果。

比對的結果顯示 endo-β-1,4-glucanase 在 *T. reesei* 及 *T. koningii* 中的蛋白質序列有約 96% 的相似度。而 *T. koningii* 與 *T. viride* 中的 endo-β-1,4-glucanase 則在蛋白質序列上只有約 84% 的相似度。

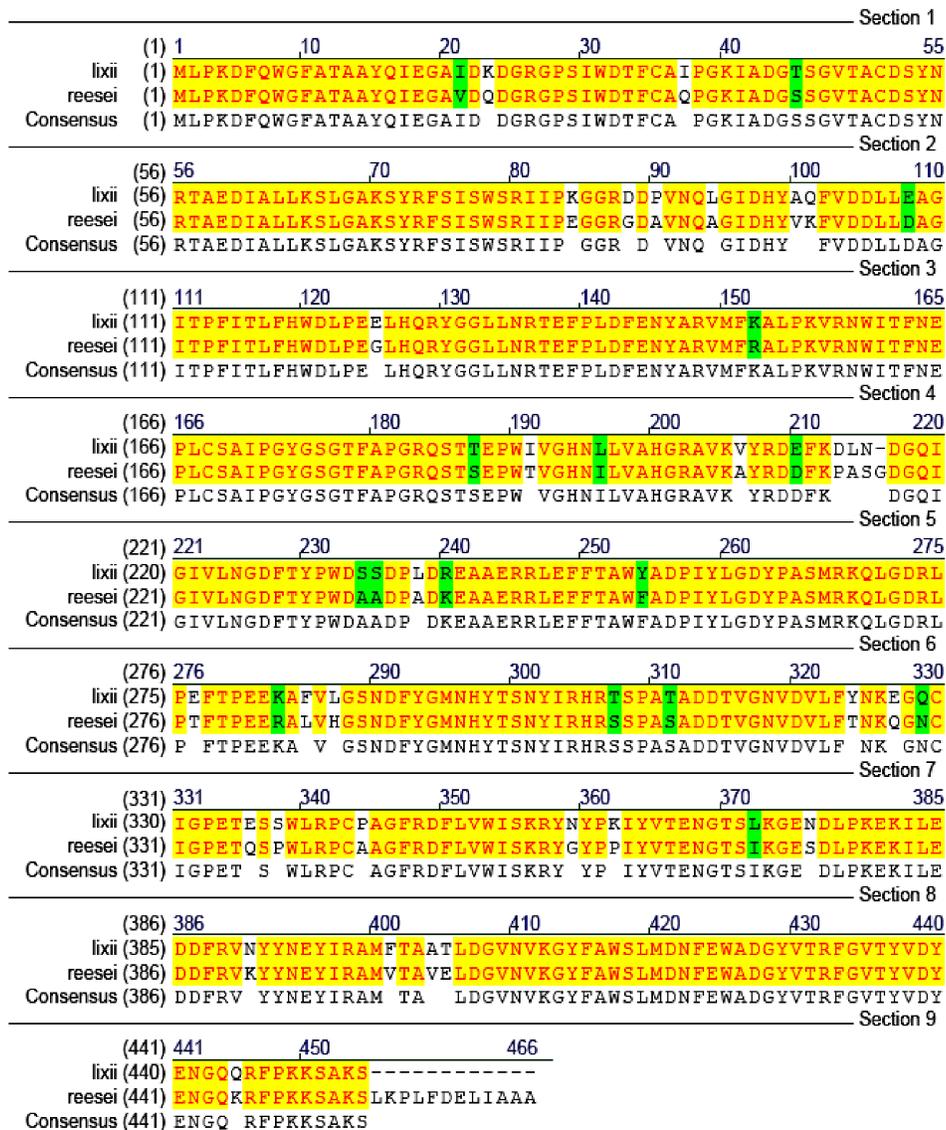
[鍵入文字]

		Section 1					
	(1)	10	20	30	40	50	
Harzianumgi_CBHI	(1)	MYRKLAVISAFLAARRAQVCTQQAETHPPLTWQKCTASG-CTPQQGSVV					
Koningiigi_CBHI	(1)	MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVV					
Viridegi_CBHI	(1)	MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVV					
Consensus	(1)	MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVV					
		Section 2					
	(51)	51	60	70	80	90	100
Harzianumgi_CBHI	(50)	LDANWRWTHDTRKSTTNCYDGNWSSSTLCPDDATCAKNCCLDGAAYSGTYG					
Koningiigi_CBHI	(51)	LDANWRWTHATNSSTNCYDGNWSSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYG					
Viridegi_CBHI	(51)	LDANWRWTHATNSSTNCYDGNWSSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYG					
Consensus	(51)	IDANWRWTHATNSSTNCYDGNWSSSTLCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYG					
		Section 3					
	(101)	101	110	120	130	140	150
Harzianumgi_CBHI	(100)	VTTSGDALTLQFVTAS---NVGSRLLYLMANDSTYQEFLLSGNEFSPDQDV					
Koningiigi_CBHI	(101)	VTTSGNSLSIGFVTQSAQKNVGARLYLMASDITYQEFLLSGNEFSPDQDV					
Viridegi_CBHI	(101)	VTTSGNSLSIGFVTQSAQKNVGARLYLMASDITYQEFLLSGNEFSPDQDV					
Consensus	(101)	VTTSGNSLSIGFVTQSAQKNVGARLYLMASDITYQEFLLSGNEFSPDQDV					
		Section 4					
	(151)	151	160	170	180	190	200
Harzianumgi_CBHI	(147)	SQLPCGLNGALYFVSMADGGQSKYFGNAAGARYGTGYCDSQCPRDLKFI					
Koningiigi_CBHI	(151)	SQLPCGLNGALYFVSMADGGVSKYFTNTAGARYGTGYCDSQCPRDLKFI					
Viridegi_CBHI	(151)	SQLPCGLNGALYFVSMADGGVSKYFTNTAGARYGTGYCDSQCPRDLKFI					
Consensus	(151)	SQLPCGLNGALYFVSMADGGVSKYFTNTAGARYGTGYCDSQCPRDLKFI					
		Section 5					
	(201)	201	210	220	230	240	250
Harzianumgi_CBHI	(197)	NGQANVEGWEPSSNNANTGVGGHGCCSEMDIWEANSISEALTPHPCTTV					
Koningiigi_CBHI	(201)	NGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGCCSEMDIWEANSISEALTPHPCTTV					
Viridegi_CBHI	(201)	NGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGCCSEMDIWEANSISEALTPHPCTTV					
Consensus	(201)	NGQANVEGWEPSSNNANTGIGGHGCCSEMDIWEANSISEALTPHPCTTV					
		Section 6					
	(251)	251	260	270	280	290	300
Harzianumgi_CBHI	(247)	GQETICSGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLD					
Koningiigi_CBHI	(251)	GQETICEGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLD					
Viridegi_CBHI	(251)	GQETICEGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLD					
Consensus	(251)	GQETICEGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLD					
		Section 7					
	(301)	301	310	320	330	340	350
Harzianumgi_CBHI	(297)	TTKRLTVVTFATDGSISRYYVQNGVKFOQPNACVGSYSGNLNDYCTA					
Koningiigi_CBHI	(301)	TTKRLTVVTFETSGAINRYYVQNGVTFQQPNALGYSYGNLNDYCTA					
Viridegi_CBHI	(301)	TTKRLTVVTFETSGAINRYYVQNGVTFQQPNALGYSYGNLNDYCTA					
Consensus	(301)	TTKRLTVVTFETSGAINRYYVQNGVTFQQPNALGYSYGNLNDYCTA					
		Section 8					
	(351)	351	360	370	380	390	400
Harzianumgi_CBHI	(347)	EETAFGGTSFTDRGGLAQINKAFQGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPT					
Koningiigi_CBHI	(351)	EETAFGGSSFSDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPT					
Viridegi_CBHI	(351)	EETAFGGSSFSDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPT					
Consensus	(351)	EETAFGGSSFSDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPT					
		Section 9					
	(401)	401	410	420	430	440	450
Harzianumgi_CBHI	(397)	NATASTPGAARGSCSTSSGVPAQVEAQSPNSKVIYVSNIRFGPIGSTGNT					
Koningiigi_CBHI	(401)	NETSSTPGAARGSCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFVSNIKFGPIGSTGNS					
Viridegi_CBHI	(401)	NETSSTPGAARGSCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFVSNIKFGPIGSTGNS					
Consensus	(401)	NETSSTPGAARGSCSTSSGVPAQVESQSPNAKVTFVSNIKFGPIGSTGNS					
		Section 10					
	(451)	451	460	470	480	490	500
Harzianumgi_CBHI	(447)	GSNPPG-----TSTRAPSSSTGSSPTATQTHYGQCGGTGWTGPTRCASG					
Koningiigi_CBHI	(451)	GGNPPGGNR-GTTITRRPATTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG					
Viridegi_CBHI	(451)	GGNPPGGNPPGTTITRRPATTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG					
Consensus	(451)	GGNPPGGN GTTITRRPATTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG					
		Section 11					
	(501)	501	514				

圖二、Cellobiohydrolase I 在 *T. harzianumgi*、*T. koningii* 及 *T. viride* 等菌種中的蛋白質序列比對結果。

	<i>T. harzianum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viide</i>
<i>T. harzianum</i>	100	81	80
<i>T. koningii</i>		100	99
<i>T. viide</i>			100

比對的結果顯示 Cellobiohydrolase I 在 *T. harzianum* 及 *T. koningii* 中的蛋白質序列有約 81% 的相似度。而 *T. koningii* 與 *T. viride* 中的 Cellobiohydrolase I 則在蛋白質序列上只有約 99% 的相似度(表一)。



圖三、β-1,4-glucosidase 在 *T. lixii* 及 *T. reesei* 等菌種中的蛋白質序列比對結果。

[鍵入文字]

比對的結果顯示 $\beta$ -1,4-glucosidase 在 *T. reesei* 及 *T. lixii* 中的蛋白質序列有約 87.1% 的相似度。目前則尚無 *T. koningii* 之  $\beta$ -1,4-glucosidase 蛋白質序列報導。

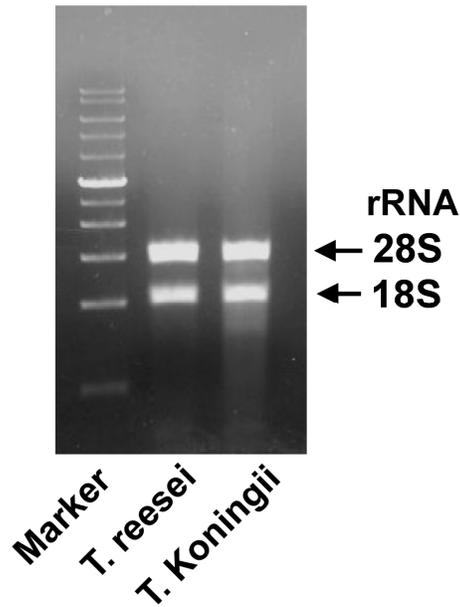
## (2)、PCR 引子(Primer)設計

Gene	Species	Primer
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase	<i>T. reesei</i>	Forward primer : 5'-TCTGAATTCATGAAGTTCCTTCAAGTCCTCCC-3' Reverse primer : 5'-GCGAAGCTTTTAGTTGATAGATGCGGTCCAGG-3'
	<i>T. koningii</i>	
Cellobio-hydrolase I	<i>T. reesei</i>	Forward primer : 5'-GCGGAATTCATGTATCGGAAGTTGGCCG-3' Reverse primer : 5'-GCGAAGCTTTTACAGGCACTGAGAGTAGTAAGGG-3'
	<i>T. koningii</i>	Forward primer : 5'-GCGGAATTCATGTATCGGAAGTTGGCCG-3' Reverse primer : 5'-GCGAAGCTTTTACAGGCACTGAGAGTAGTAAGGG-3'
$\beta$ -1,4-glucosidase	<i>T. reesei</i>	Forward primer : 5'-GCTGAATTCATGTTGCCCAAGGACTTTCAG-3' Reverse primer : 5'-TATAAGCTTTCACGCCGCCGCAATC-3'
	<i>T. koningii</i>	Forward primer : 5'-GCTGAATTCATGTTGCCCAAGGACTTTCAG-3' Reverse primer : 5'-TATAAGCTTTCACGCCGCCGCAATC-3'

在引子的 5'-端各加了一組限制酵素切位，即 EcoR I 切位(Forward primer)和 Hind III 切位(Reverse primer)

[鍵入文字]

(3)、從 *T. reesei* 及 *T. koningii* 中選殖  $\beta$ -1,4-glucosidase、  
cellobiohydrolase I 及 endoglucanase 之  
基因



圖四、RNA 瓊酯膠電泳示意

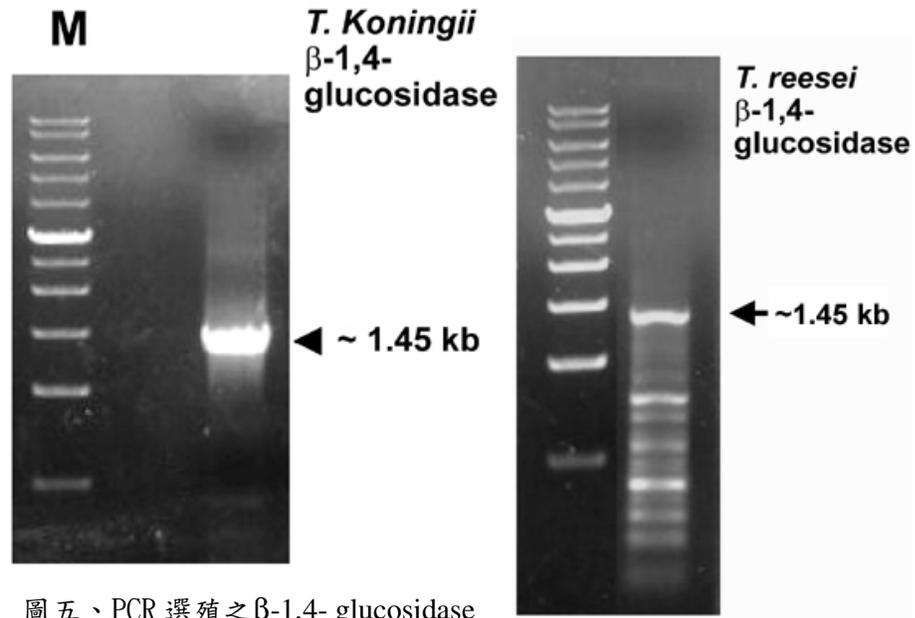
首先由 *T. reesei* 及 *T. koningii* 中抽取純化之 RNA 其純度及完整性驗證如圖四所示。另外以 *T. reesei* 及 *T. koningii* 所抽取之 RNA 以所設計之  $\beta$ -1,4-glucosidase 引子經 PCR 放大反應後各得到一約 1.5 kb 之 DNA 片段 (圖五), 經進一步 DNA 定序後確定其為  $\beta$ -1,4-glucosidase 全基因片段。

*T. reesei* RNA 以 Cellobiohydrolase I 引子經 PCR 放大反應後得一約 1.7 kb 之 DNA 片段 (圖六), 經 DNA 定序後發現確為 *T. reesei* 之

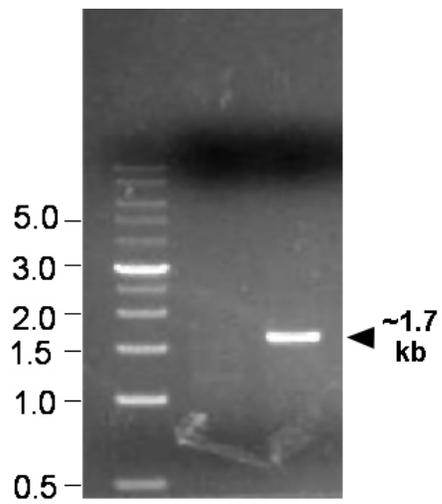
Cellobiohydrolase I 基因 (如圖七所示), 但發現其 DNA 片段中尚夾有兩小段之 intron。此一發現證明所設計之引子沒問題, 但問題可能是所抽取之

RNA 中 Cellobiohydrolase I 之 mRNA 含量太少的緣故。

[鍵入文字]



圖五、PCR 選殖之 $\beta$ -1,4- glucosidase DNA 片段。



圖六、Cellobiohydrolase II 基因之 PCR 產物。

[鍵入文字]

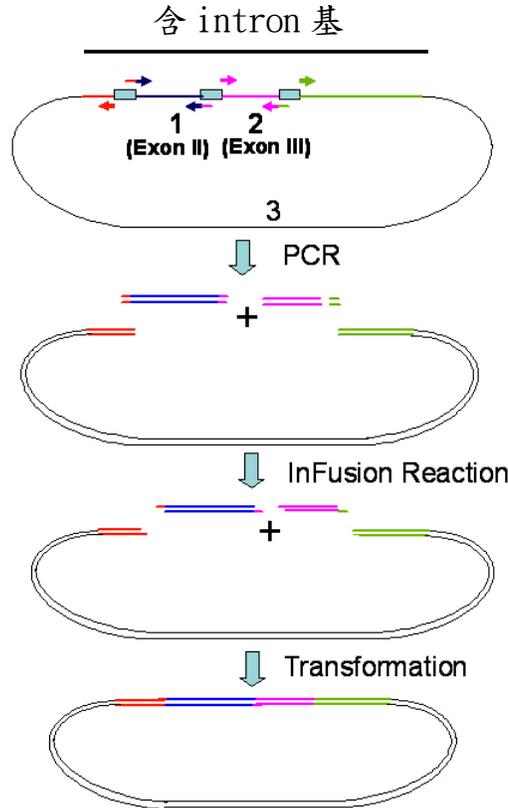
		Section 1				
Reesei_CBHI_no2	(1) 1	10	20	30	40	50
koningii_CBHI	(1)	ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGC				
Viride_CBHI	(1)	ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGC				
Consensus	(1)	ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGC				
		Section 2				
Reesei_CBHI_no2	(51) 51	60	70	80	90	100
koningii_CBHI	(51)	TCAGTCGGCCTGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCTCTGACATGGC				
Viride_CBHI	(51)	TCAGTCGGCCTGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCTCTGACATGGC				
Consensus	(51)	TCAGTCGGCCTGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCTCTGACATGGC				
		Section 3				
Reesei_CBHI_no2	(101) 101	110	120	130	140	150
koningii_CBHI	(101)	AGAAATGCTCGTCTGGTGGCACGTGCACTCAACAGACAGGCTCCGTGGTC				
Viride_CBHI	(101)	AGAAATGCTCGTCTGGTGGCACGTGCACTCAACAGACAGGCTCCGTGGTC				
Consensus	(101)	AGAAATGCTCGTCTGGTGGCACGTGCACTCAACAGACAGGCTCCGTGGTC				
		Section 4				
Reesei_CBHI_no2	(151) 151	160	170	180	190	200
koningii_CBHI	(151)	ATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCTACGAACAGCAGCACGAACTG				
Viride_CBHI	(151)	ATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCTACGAACAGCAGCACGAACTG				
Consensus	(151)	ATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCTACGAACAGCAGCACGAACTG				
		Section 5				
Reesei_CBHI_no2	(201) 201	210	220	230	240	250
koningii_CBHI	(201)	CTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCCTGACAACGAGACCT				
Viride_CBHI	(201)	CTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCCTGACAACGAGACCT				
Consensus	(201)	CTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCCTGACAACGAGACCT				
		Section 6				
Reesei_CBHI_no2	(251) 251	260	270	280	290	300
koningii_CBHI	(251)	GCGCGAAGAAGCTGCTGTCTGGACGGTGCCGCCTACGCGTCCACGTACGGA				
Viride_CBHI	(251)	GCGCGAAGAAGCTGCTGTCTGGACGGTGCCGCCTACGCGTCCACGTACGGA				
Consensus	(251)	GCGCGAAGAAGCTGCTGTCTGGACGGTGCCGCCTACGCGTCCACGTACGGA				
		Section 7				
Reesei_CBHI_no2	(301) 301	310	320	330	340	350
koningii_CBHI	(301)	GTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCACCCAGTCTGC				
Viride_CBHI	(301)	GTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCACCCAGTCTGC				
Consensus	(301)	GTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCACCCAGTCTGC				
		Section 8				
Reesei_CBHI_no2	(351) 351	360	370	380	390	400
koningii_CBHI	(351)	GCAGAAGAAGCTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCT				
Viride_CBHI	(351)	GCAGAAGAAGCTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCT				
Consensus	(351)	GCAGAAGAAGCTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCT				

圖七、選殖出之 *T. reesei* Cellobiohydrolase I 基因序列

要增加 RNA 中 Cellobiohydrolase I 之 mRNA 含量，可藉由 *Trichoderma* 培養方法的改良加以改善，如在 RNA 抽取前先將 *Trichoderma* 培養於含 2% cellulose 的基本培養基中 48~72 小時中，可能大量引發 cellulase 相關基因的大量表現。然而經過我們反復測試皆無法有效的以 PCR 選殖出所需之 Cellobiohydrolase I 基因片段，因此我們推論 Cellobiohydrolase I 的 mRNA 並不穩定，導致在抽取 RNA 的過程中便已經破損斷裂，無法反轉錄成完整的 cDNA。而此一現象亦發生於 endoglucanase 基因的選殖過程中。另一可能的狀況為

[鍵入文字]

Cellobiohydrolase I 及 endoglucanase 基因在 *T. reesei* 及 *T. koningii* 中 RNA 剪接(RNA splicing)作用發生問題。



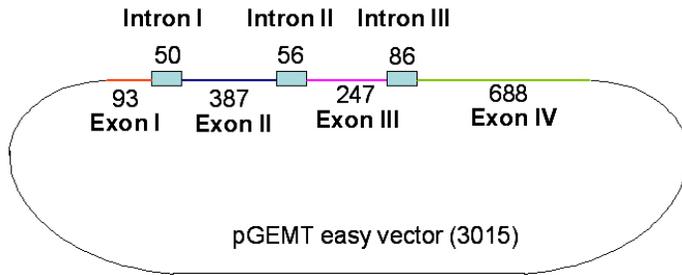
圖八、去除全長基因中 introns 的步驟示意圖。

為解決此一問題，我們決定利用分生套組 InFusion 來移除上述的全長基因中的 introns。

1. 首先將帶有 introns 的全長基因置入一轉移質體中，本研究中採用 pGEMT easy vector (3015 bp) 作為轉移質體(圖八)。
2. 接著設計 Exon II(藍色箭號)及 Exon III(粉紅箭號)的引子，同時所設計 Exon II 的正向引子(forward primer)的 5' -端帶有 Exon I 片段 3' -端 15 個鹼基的序列，而反向引子(reverse primer)的 5' -端帶有 Exon III 片段 3' -端 15 個鹼基的序列。相對的，所設計 Exon III 的正向引子(forward primer)的 5' -端帶有 Exon II 片段 3' -端 15 個鹼基的序列，而反向引子(reverse primer)的 5' -端帶有 Exon IV 片段 3' -端 15 個鹼基的序列。

[鍵入文字]

3. 以 PCR 放大基因中的 Exon II 及 Exon III。
4. 以核酸外切酶將 PCR 放大後的基因片段的 3' 一端部份序列，使之產生黏性末端(sticky end)。
5. 將黏合好的質體轉殖入大腸桿菌 DH5 勝任細胞中，以挑選帶有質體的細菌菌落，並進一步抽取質體做 DNA 定序確認無突變發生。

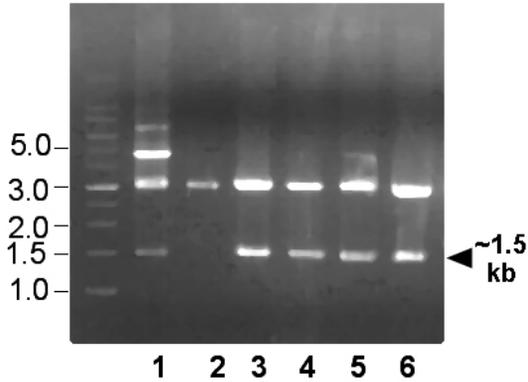


圖九、帶有 Cellobiohydrolase II 全長基因片段的 pGEMT easv vector。

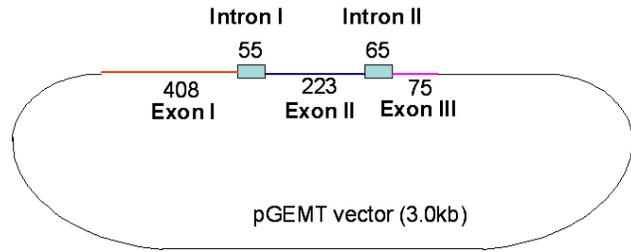
### **剔除 *T. reesei* Cellobiohydrolase II 基因之 introns**

應用 InFusion 套組，我們將 *T. reesei* Cellobiohydrolase II 基因(圖九)中之三組 introns 剔除，成功的得到一長度有~1.5 kb 的基因片段(圖十)。我們總共選取六株單一菌株進行檢試，發現其中四株菌株成功帶有剔除 introns 後的 Cellobiohydrolase II 完整 cDNA。其後經 DNA 定序確認 DNA 序列無誤並無突變發生。

[鍵入文字]



圖十、移除 intron 後之  
Cellobiohydrolase II 基因

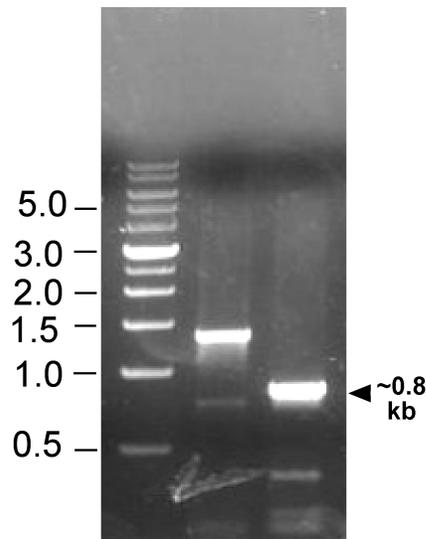


圖十一、帶有 Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 全長  
基因片段的 pGEMT easy vector。

### 剔除 *T. reesei* Cellobiohydrolase I 及 Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 基因 之 introns

*T. reesei* Cellobiohydrolase I 基因為前述 Cellobiohydrolase II 基因的異形體(Isoform)，全長 RNA 中亦帶有三組 introns，我們會利用上述技術加以剔除，以得到可用來大量表現的完整 cDNA。

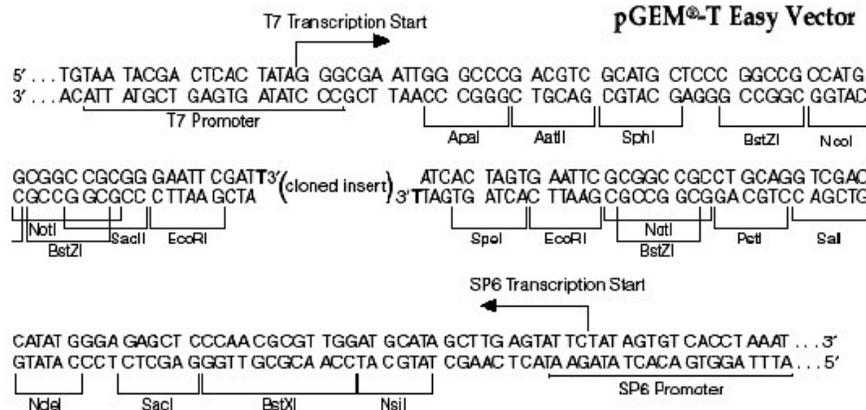
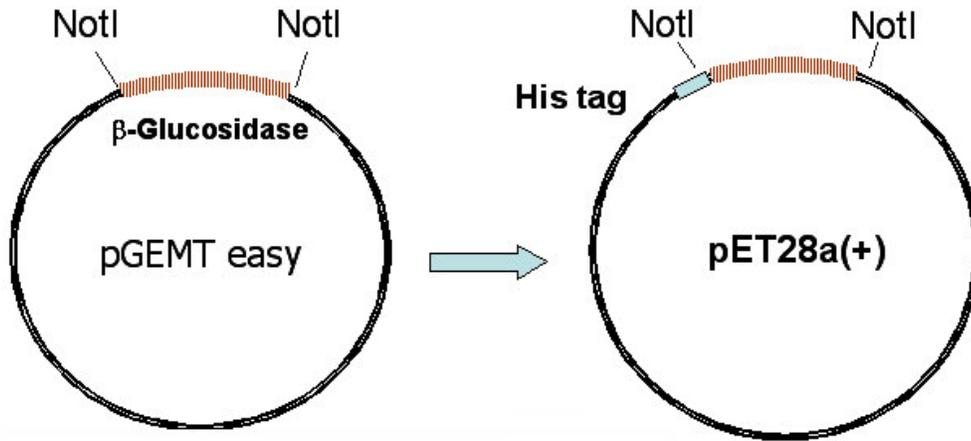
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 基因的選殖過程亦如 Cellobiohydrolase 基因選殖般並不順利，因此我們也嘗試應用 InFusion 套組，將 *T. reesei* Endo- $\beta$ -1,4-glucanase 基因(圖十一)中之二組 introns 剔除。目前已將帶有二組 introns 的全長基因片段(約 0.8 kb)置入 pGEMT easy vector 中(圖十二)。此基因已經 DNA 定序確認 DNA 序列無誤，將進行後續 InFusion 作用以剔除 introns。



圖十二、從 *T. reesei* 總  
RNA 庫中以 PCR 放大所得到  
之含 introns 全長基因片  
段(約 0.8 kb; 右一行)。  
(左一行)DNA 梯度標準標  
記。

#### (4)、建構表現質體

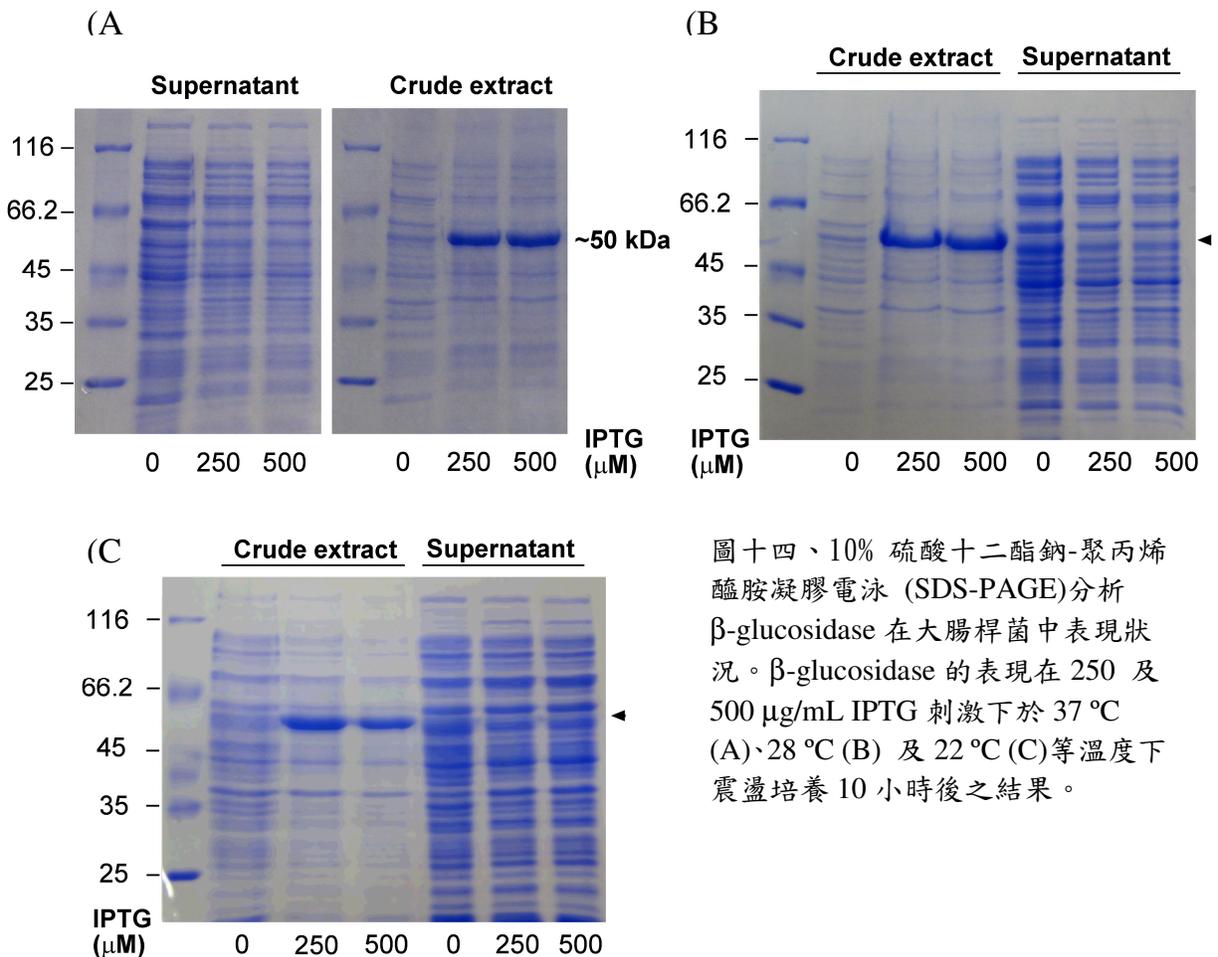
為讓目標基因(如:endo- $\beta$ -1,4-glucanase, cellobiohydrolase 及  $\beta$ -1,4-glucosidase)在大腸桿菌中能大量表現,我們採用常見的表現質體 pET28a 為架構,將目標基因殖入。首先我們將建構在 pGEMT easy vector 上的目標基因(如 endo- $\beta$ -1,4-glucanase, cellobiohydrolase 及  $\beta$ -1,4-glucosidase)以限制酵素 NotI 截下,並直接接入 pET28a 質體中 NotI 的切點內(圖十三)。目前 *T. reesei* Cellobiohydrolase II 基因的 pET28a 表現質體亦已建構完成。



圖十三、建構 $\beta$ -glucosidase 的於 pET28a 表現質體上。

### (5)、大腸桿菌大量表現

我們將已經建構成之 pET28a/ $\beta$ -glucosidase 質體以轉殖作用送入表現宿主大腸桿菌 BL21(DE3)中，並以 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 IPTG 以刺激蛋白質的表達。第一次嘗試是在 37  $^{\circ}\text{C}$  下進行震盪培養 10 小時，結果發現 $\beta$ -glucosidase 可在大腸桿菌中表現，但是形成了包涵體 (inclusion) (圖十四-A)。為進一步試驗溫度對 $\beta$ -glucosidase 形成包涵體的可能性，我們分別將大腸桿菌 BL21(DE3)在 28  $^{\circ}\text{C}$  (圖十四-B) 及 22  $^{\circ}\text{C}$  (圖十四-C) 震盪培養 10 小時，結果發現大部份 $\beta$ -glucosidase 仍然形成包涵體。我們將進一步測試在 16  $^{\circ}\text{C}$  下 $\beta$ -glucosidase 表現的狀況，如果仍然無效，下一步可能是將 $\beta$ -glucosidase 基因換到不同的表現質體上，以達到大量表現的目的地。



圖十四、10% 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 分析  $\beta$ -glucosidase 在大腸桿菌中表現狀況。 $\beta$ -glucosidase 的表現在 250 及 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IPTG 刺激下於 37  $^{\circ}\text{C}$  (A)、28  $^{\circ}\text{C}$  (B) 及 22  $^{\circ}\text{C}$  (C) 等溫度下震盪培養 10 小時後之結果。

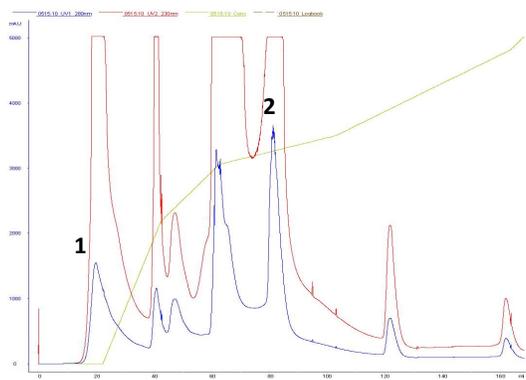
## 纖維素水解酵素之分離與純化

### 1. 分離純化商業化水解酵素：

下表中 Fraction 1-5 的蛋白質(Novozyme 188)已經利用不同條件的 Q-column 純化出，根據受質專一性測試 這些蛋白均有 exoglucanase 及 beta-glucosidase 的酵素活性。

fraction	molecular weight (kDa)	enzyme	protein content (mg/ml)	total volume (ml)
1	less than 10	endoglucanase exoglucanase	1.2	12
2	55	beta-glucosidase exoglucanase	2.8	12
3	170	beta-glucosidase exoglucanase	1.1	12
4	less than 10	exoglucanase beta-glucosidase	1.2	12
5	55	exoglucanase beta-glucosidase	1.2	12

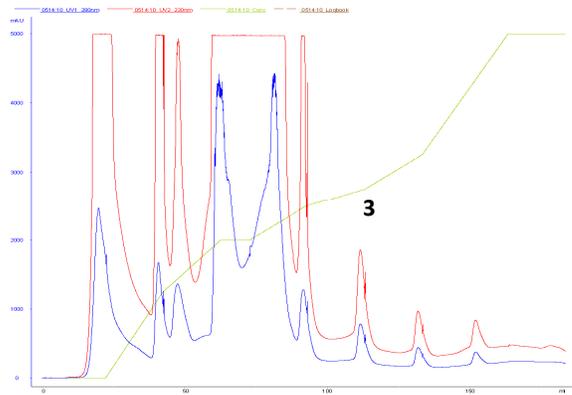
各酵素之純化結果如下列各圖所示：



利用離子交換層析在不同鹽梯度沖提下，可得到兩個純的蛋白質，分別命名為 fraction 1 及 fraction 2

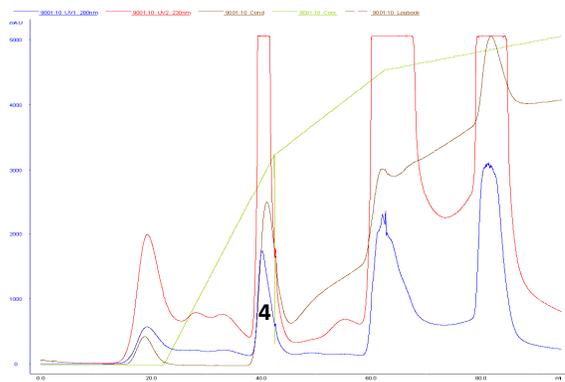
Ion-exchange chromatography with Q column

[鍵入文字]

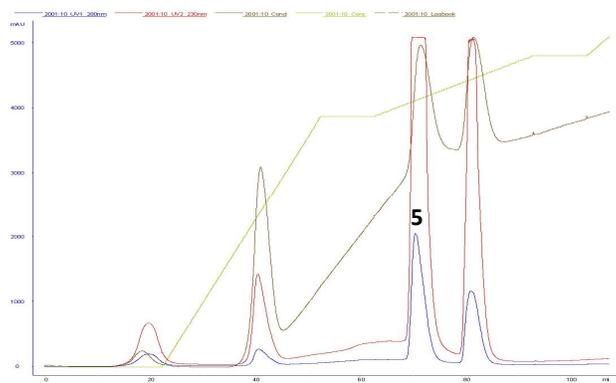


同樣利用離子交換層析，改變鹽梯度，可得到另一純的蛋白質，將它命名為 fraction 3

Ion-exchange chromatography with Q column



利用離子交換層析，改變鹽梯度，可得到另一純的蛋白質 fraction 4

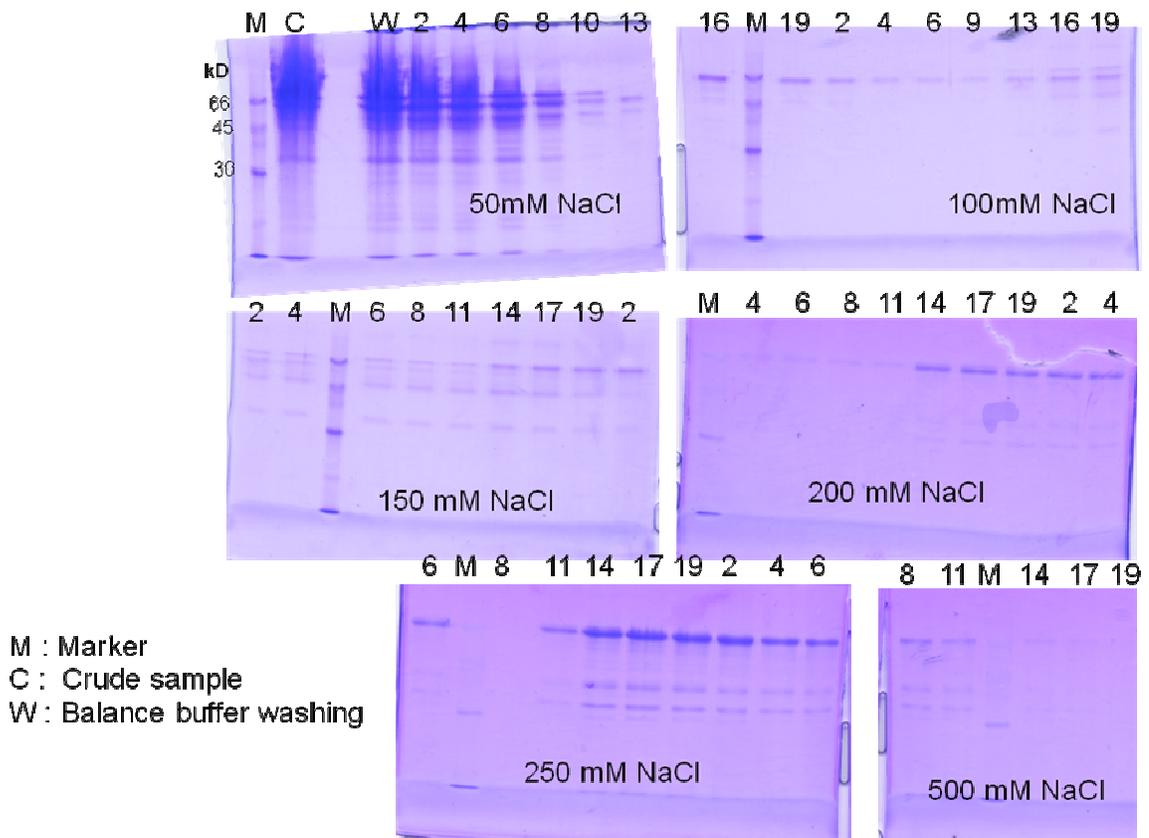


利用離子交換層析，改變鹽梯度，可得到另一純的蛋白質 fraction 5

[鍵入文字]

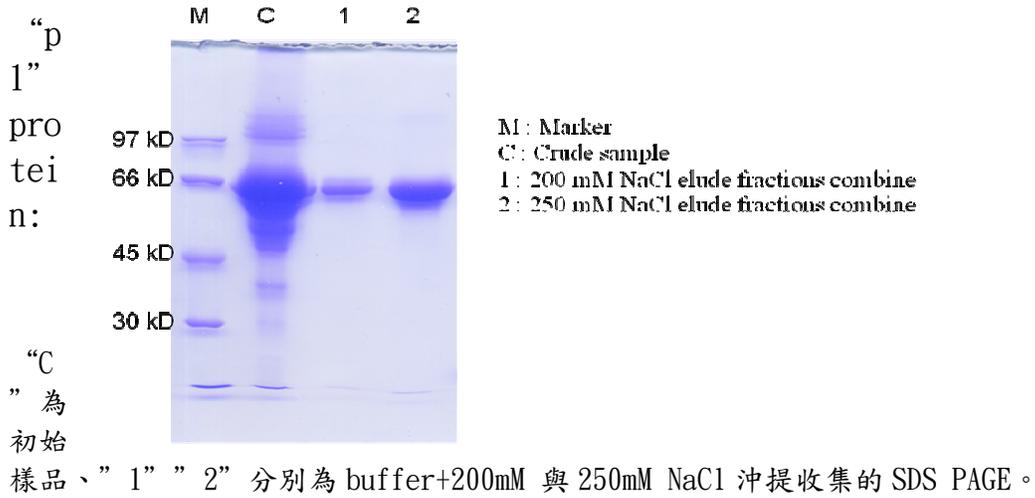
## 2. 纖維水解酵素的純化與活性測試:

(a) 利用 Q-sepharose 以不同的鹽(NaCl)梯度純化出一個主要的蛋白質 (p1)



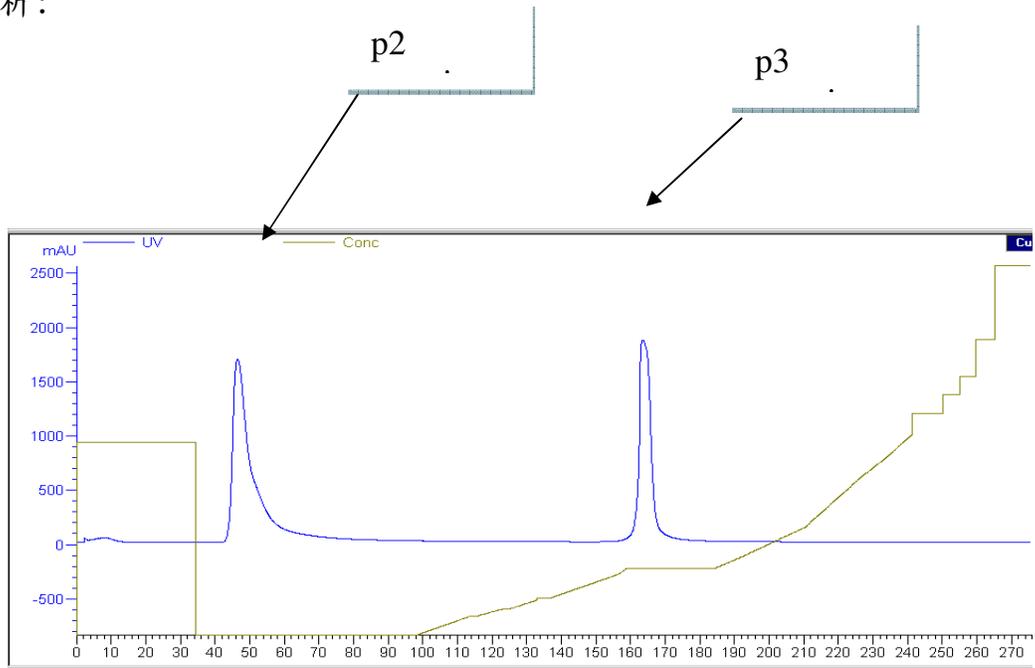
在 200 mM 和 250 mM NaCl 鹽濃度可以得到一個主要的蛋白質,收集較純的 fractions 和濃縮後,可看到分子量大約 65kD 的蛋白質,如下圖:

[鍵入文字]

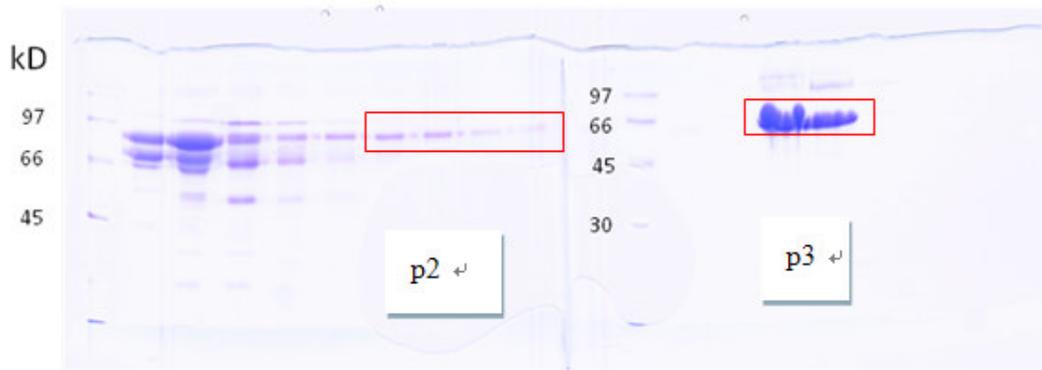


純化到的單一蛋白將進行活性測試。

(b) 收取(a)的 flowthrough, 利用 FPLC 做 Heparin sepharose 管柱層析:



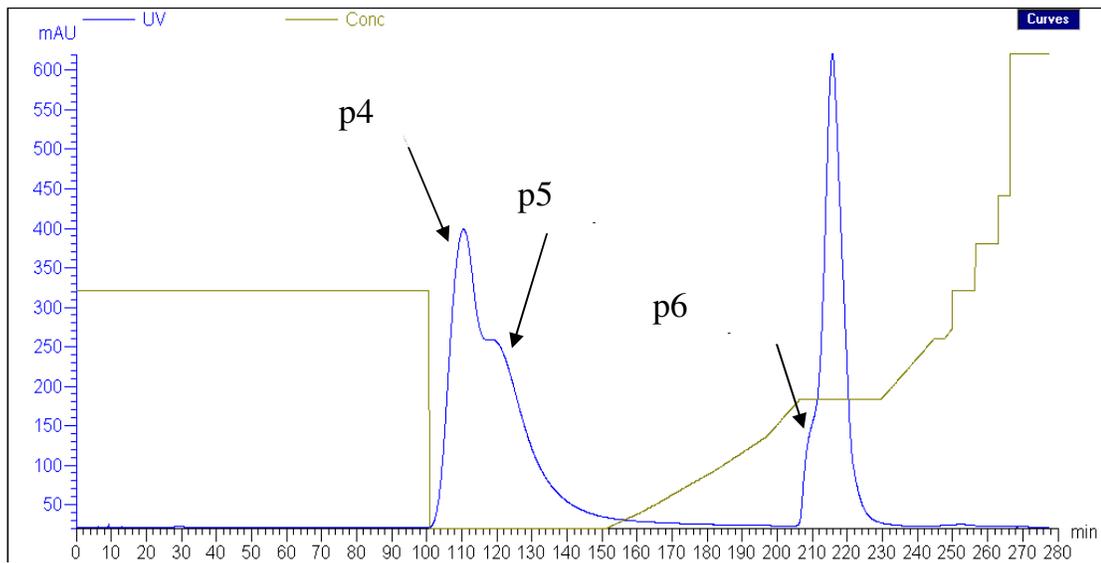
[鍵入文字]



出現 peaks 的 fractions 跑 SDS PAGE:

可以看到有兩個較純的蛋白 p2 與 p3 蛋白, 未來將測定其活性與大量純化以利養晶。

(c) 收取(b)的 flowthrough, 利用 FPLC 作 DEAE separose 管柱層析:



[鍵入文字]

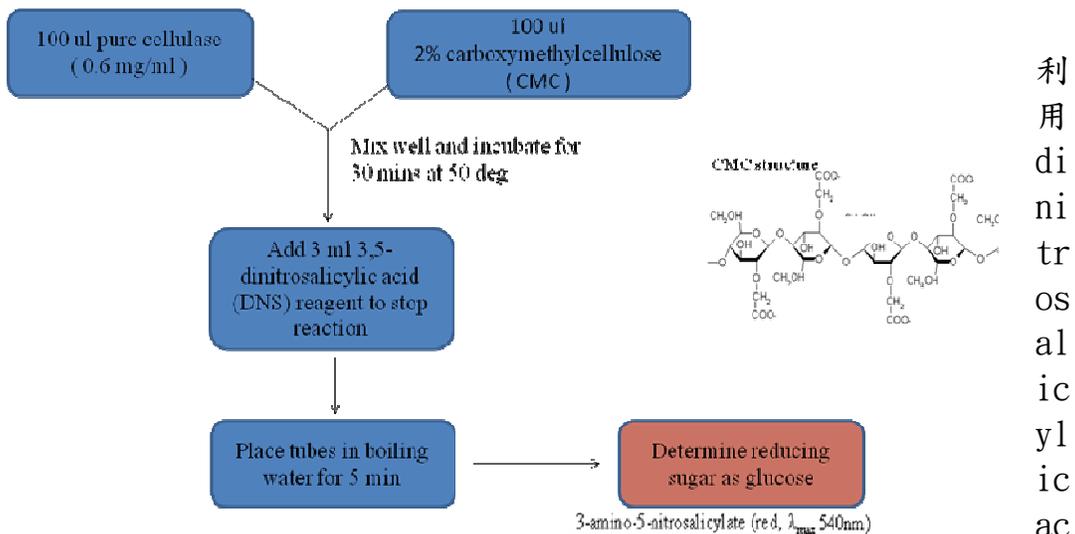
出現 peaks 的 fractions 跑 SDS PAGE:



p4 與 p5 蛋白將利用其他性質的管柱層析(ex: phenyl sepharose)進一步純化,p6 蛋白將大量純化並測定其活性。

2. (A) p1 蛋白的活性測試:

(a)利用 2% carboxymethylcellulose(CMC)為受質去測量此 p1 蛋白是否有內切酶酵素活性,活性測試方法如下:

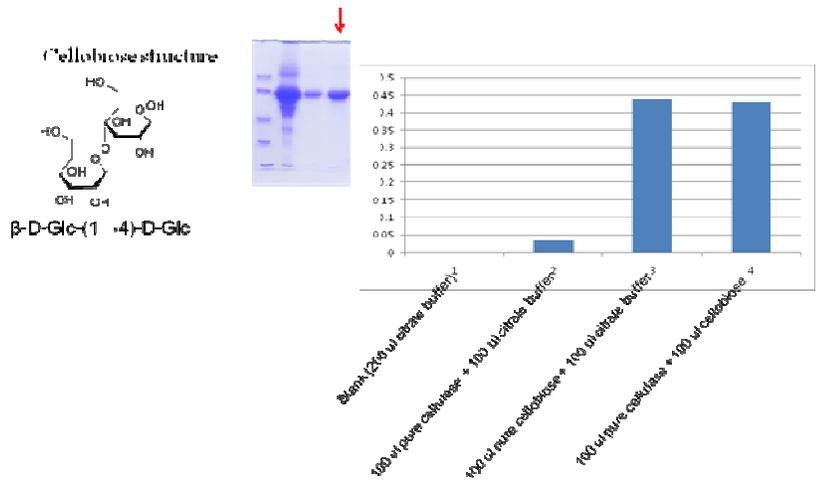


id (DNS)可與還原糖反應在 540nm 有吸收質測得 cellulase 活性,吸收質 data 如下:

CMC 活性測試結果得知,p1 蛋白具有內切酶活性



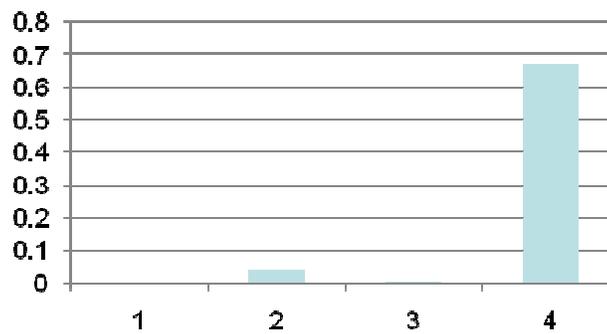
[鍵入文字]



(B) p3 蛋白的活性測試:

(a) 利用 2%

carboxymethylcellulose(CMC)為受質去測量此 p3 蛋白是否有內切酶酵素活性:



Substrate : CMC

1.200 ul Tris buffer

2.100 ul buffer + 100 ul substrate

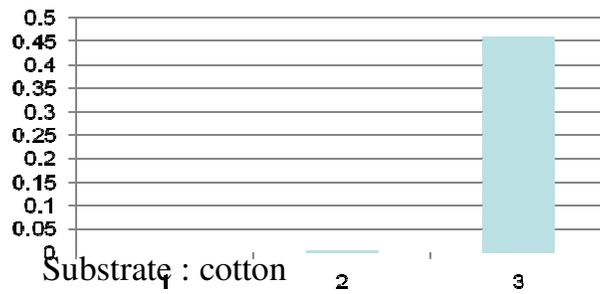
3.100 ul buffer + 100 ul protein

4.100 ul substrate + 100 ul protein

CMC 活性測試結果得知, p3 蛋白具有內切酶活性

(b) 利用 cotton 為受質去測量此 p3 蛋白是否有外切酶酵素活性, 活性測試方法同(a):

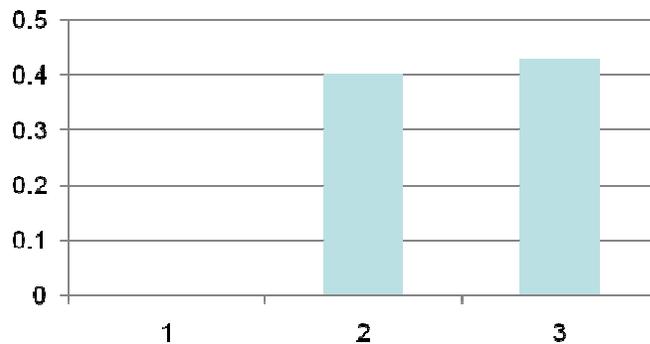
[鍵入文字]



Substrate : cotton  
1. 200 ul Tris buffer  
2. 100 ul buffer + 1 mg substrate  
3. 1 mg substrate + 100 ul protein

Cotton 活性測試結果得知， p3 蛋白具有外切酶活性

(c) 利用雙糖 cellobiose 為受質去測量此 p3 蛋白是否有可水解纖維雙糖的酵素活性, 活性測試方法同(a):



Substrate : cellobios  
1. 200 ul Tris buffer  
2. 100 ul buffer + 100 ul substrate  
3. 100 ul substrate + 100 ul protein

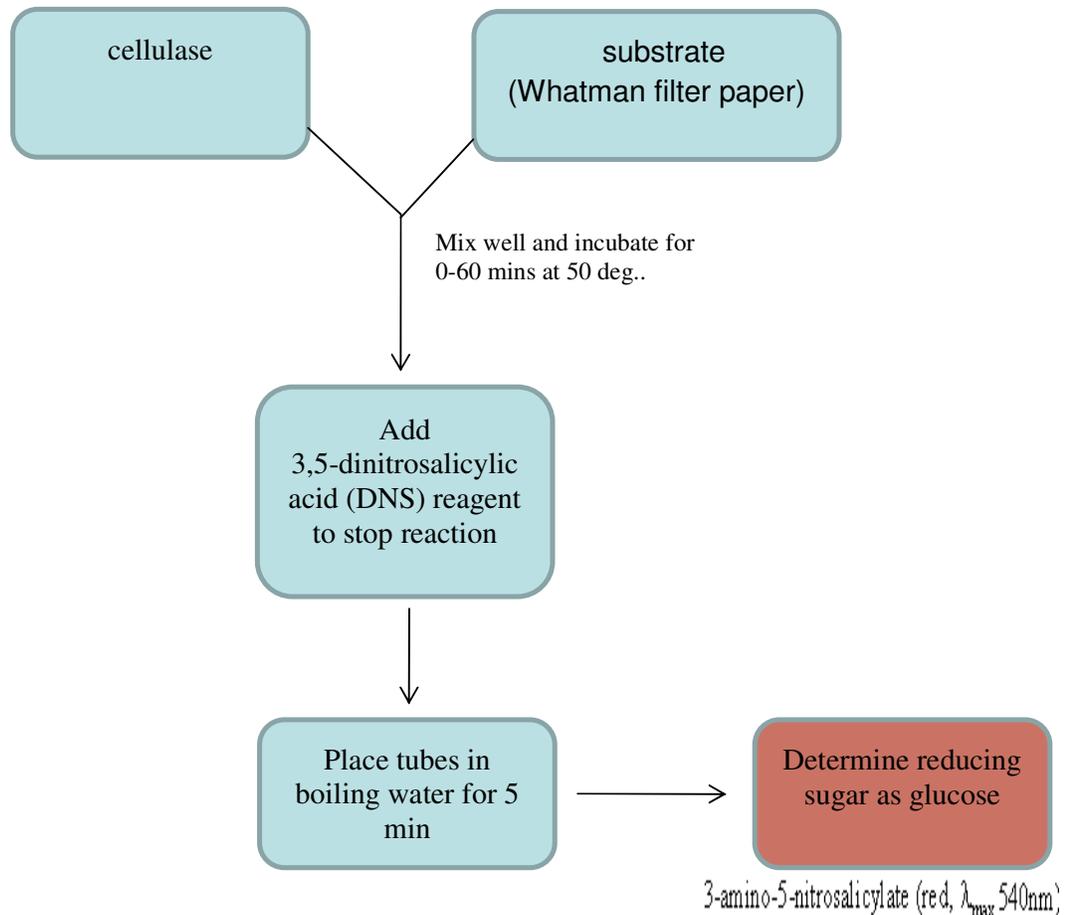
受質 cellobiose 加入 p3 酵素反應後所測得的吸收質與受質加入 p3 酵素的吸收質無差異, 故 p3 蛋白無水解纖維雙糖的活性

\*\* 在此, 我們成功的從 Novazyme crude enzyme 分離出 p1 與 p3 protein, 並已大量純化, 得到 約 15mg, 20 mg 的蛋白, 濃縮至 12mg/ml(p1), 22mg/ml(p3)各 1ml 左右, 目前已塞選各種條件培養蛋白質晶體中.

[鍵入文字]

3. 增加 Novazyme cellulose mix crude protein 中 p3 protein 的濃度，希望增加水解 cellulose 的速度：

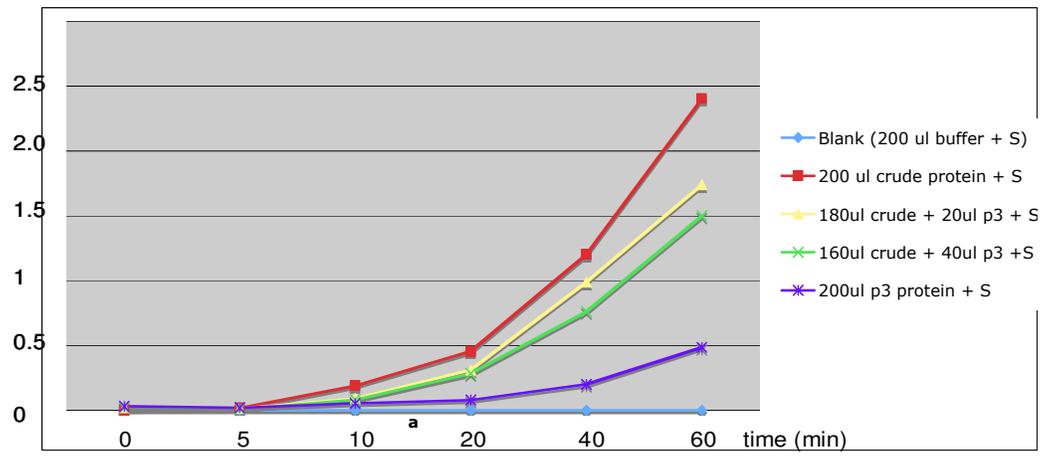
- (a) 先利用 BCA 定量 Novazyme cellulose mix crude protein and p3 protein 的蛋白濃度，之後將兩種樣品都調成 2 mg/ml 的蛋白濃度。
- (b) 以 Whatman filter paper 作為 substrate, 固定 mix 的蛋白量, 提高 p3 protein 的濃度，每 5 分鐘測一次活性，測量一個小時，觀察是否有效果。



The protein concentration of “crude protein” and “p3” are all 2 mg/ml.  
“S” is substrate (Whatman filter paper, every S weight are the same).  
“Buffer” is 20 mM Tris, pH 6.8

[鍵入文字]

此圖我們觀察到, 當 mix protein 中增加 p3 protein 濃度時, 並不會增加水解 cellulose 的速度。



### 國際期刊論文發表

預計結案後將可發表之資料收集完成及數據整理後即提出相關論文發表。

[鍵入文字]

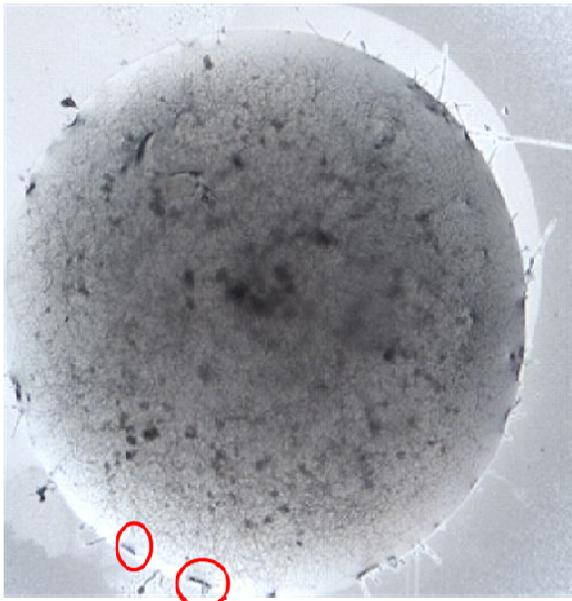
### 纖維素水解酵素晶體培養：

上述純化後之纖維素水解酵素已進行長晶，結果如下列各圖：



The image of salt crystal.

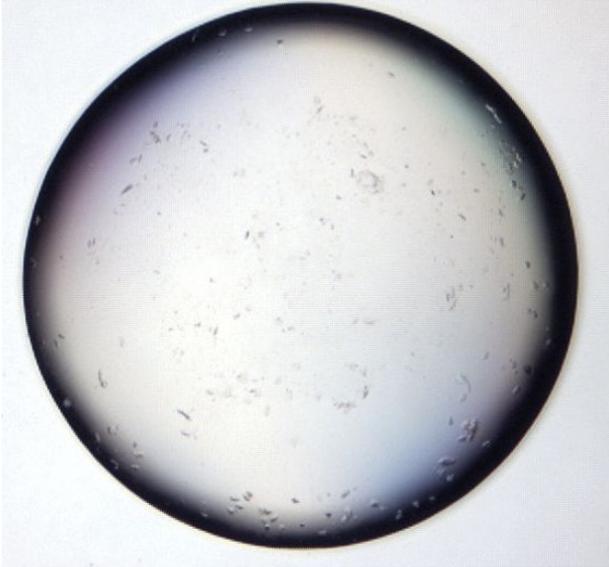
使用的條件為:0.2 M sodium fluoride, 20% (w/v) PEG3350



The image of salt crystal.

條件的條件為: 0.2 M di-ammouinm hydrogen citrate, 20% (w/v)PEG3350.

[鍵入文字]



The image of salt crystal.

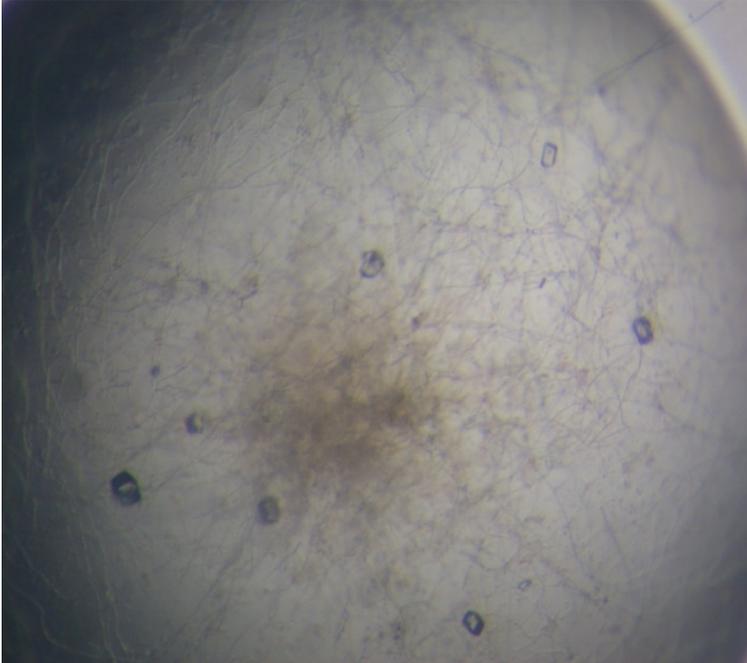
使用的條件爲: 0.1 M sodium/potassium phosphate, pH 6.2 ,  
0.2 M sodium chloride, 20% (w/v) PEG1000.



The image of salt crystal.

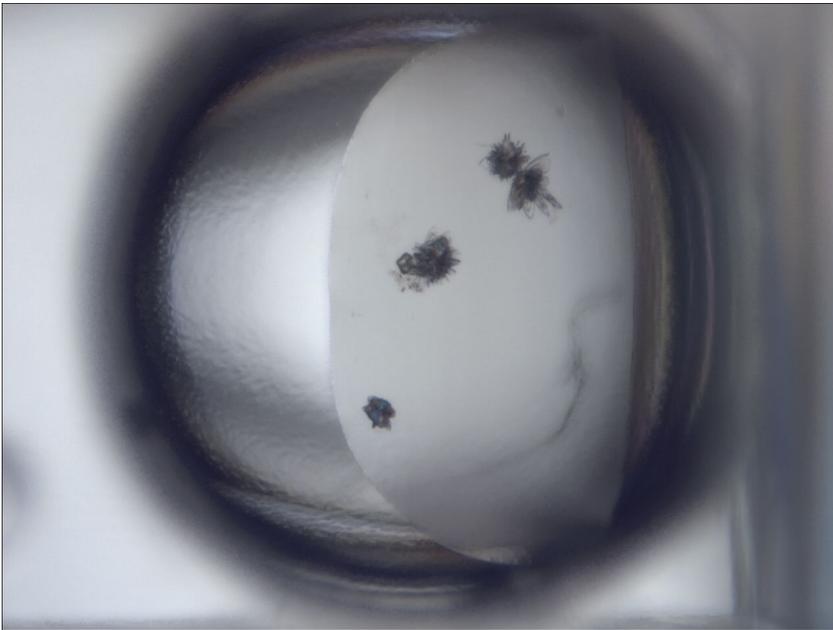
使用的條件爲: 0.1 M imidazole, pH 8.0, 35% (v/v) 2-  
ethoxyethanol, 0.05 M calcium acetate hydrate.

[鍵入文字]



The image of salt crystal.

使用的條件爲 : 0.1 M HEPES, pH7.3, 0.2 M CaCl<sub>2</sub>, 5% PEG8000.



The image of protein crystal.

使用的條件爲 : 0.1 M sodium acetate trihydrate,  
1.0 M sodium formate, pH 4.6.

## 參考文獻

1. Jarvis, M. (2003). Chemistry—cellulose stacks up. *Nature* **426**:611–612
2. Zhang, Y.-H. P., Lynd, L. R. (2004). Kinetics and Relative Importance of Phosphorolytic and Hydrolytic Cleavage of Cellodextrins and Cellobiose in Cell Extracts of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1563-1569
3. Munteer, A. H., R. O. Pereira, et al. (2007). "Advanced oxidation of bleached eucalypt kraft pulp mill effluent." *Water Sci Technol* **55**(6): 109-16
4. Gnansounou, E., A. Dauriat, et al. (2005). "Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China." *Bioresour Technol* **96**(9): 985-1002
6. Chen, Y., R. R. Sharma-Shivappa, et al. (2007). "Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production." *Appl Biochem Biotechnol* **142**(3): 276-90.
5. Jamaï, L., K. Ettayebi, et al. (2007). "Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of alpha-amylase." *Bioresour Technol* **98**(14): 2765-70
7. Chen, Y., R. R. Sharma-Shivappa, et al. (2007). "Ensiling agricultural residues for bioethanol production." *Appl Biochem Biotechnol* **143**(1): 80-92
8. Börjesson, P. and M. B. (2008). "Biogas as a resource-efficient vehicle fuel." *Trends Biotechnol.* **26**(1): 7-13
9. 詹華景 (2005) 國立東華大學生物技術研究所碩士論文，「木黴菌纖維素酶之純化與分析」
10. Bissett, J. (1991). "A revision of the genus *Trichoderma*. II.

- Infrageneric classification" *Can J Bot* **69**: 2357-2372
11. Gams, W, Bissett, J (1998) "Morphology and identification of *Trichoderma*" In: Kubicek, CP, Harman, GE eds. , *Trichoderma and Gliocladium*, vol 1, *Taylor & Francis*, London, pp 3-34
  12. Lee, S.-C., Guan, H.-H., Wang, C.-H., Huang, W.-N., Chen, C.-J., Wu, W. (2005) Structural basis of venom citrate-dependent heparan sulfate-mediated cell surface retention of cobra cardiotoxin A3, *J. Biol. Chem.* **280**: 9567-9577.
  13. Yang, M.-C., Guan, H.-H., Liu, M.-Y., Lin, Y.-H., Yang, J.-M., Chen, W.-L., Chen, C.-J., Mao, S.J.T. (2007) Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk  $\beta$ -lactoglobulin, *Proteins*, Nov. 14, Epub ahead of print.
  14. Lu, L.-Y., Hsieh, Y.-C., Liu, M.-Y., Lin, Y.-H., Chen, C.-J. Yang, Y.-S. (2007) Identification and characterization of two amino acids critical for the substrate inhibition of Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase, *Mol. Pharmacol.* Nov. 27, Epub ahead of print.
  15. Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., et al. (1997). cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **249**:584–591
  16. Ward, M., Wu, S., et al. (1993). Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*. In: Suominen, P., Reinikainen, T. (Eds.), *Proceedings of the Second Tricel Symposium on Trichoderma Cellulases and Other Hydrolases*, Espoo, vol. 8, *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research*, Helsinki, Finland, pp. 153–158
  17. Teeri, T., Lehtovaara, P., et al. (1987). Homologous domains in

[鍵入文字]

- Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* **51**: 43–52
18. Yan-Hong, L.I., Rui, G.U.O., et al. (2005), Purification and Characterization of Two Endo-b-1,4-glucanases from Mollusca, *Ampullaria crosseana*. *Acta Biochim. Biophys. Sin* **37**:702-708
- 19, Bhikhabhai, R., Johansson, G., et al. (1984). Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414. *J. Appl. Biochem.* **6**:336–345
20. Cândida, T., Tomaz, João A., Queiroz, (2004). Fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-Sepharose. *Biotechnol. Lett.* **26**: 223–227.