

國立交通大學

理學院 IC 製程化學產業研發碩士專班

碩士論文

透過結構模擬與蛋白質工程重組幾丁聚醣水解酵素
之研究

**Structural simulation and protein engineering of
Bacillus circulans MH-K1 chitosanase**

研究生：留佩君

指導教授：李耀坤 教授

中華民國九十七年十月

透過結構模擬與蛋白質工程重組幾丁聚醣水解酵素之研究

學生：留佩君

指導教授：李耀坤 教授

國立交通大學理學院 IC 製程化學產業研發碩士專班

摘要

本研究是先對*Bacillus circulans* MH-K1 幾丁聚醣水解酵素做出結構模擬，再針對我們所選定的模擬結構在基因的T¹⁸⁵後以AQPPKPS胺基酸片段取代掉原本的FYN片段，希望能改變其催化型態；之後將其建構在本實驗室之前所建立的CBP V5 載體，使其在大腸桿菌JM109 宿主細胞中表現。經過純化後可得約 90%均質度的蛋白質。

我們對此重組蛋白質做了基本的特性研究，並將其結果與野生株相比較，發現雖然在二級結構上兩者十分相似，對溫度的反應活性亦相近，但是野生株酵素的水解產物以幾丁二醣，幾丁三醣為主要，此重組酵素的水解產物卻是以幾丁一醣、幾丁二醣、幾丁三醣所組成的混合物，顯示經過突變後，其活化中心的催化型態有所改變，未來可對結構模擬再做改進，繼續朝蛋白質工程方向改造酵素。

Structural simulation and protein engineering of *Bacillus* *circulans* MH-K1 chitosanase

Student : Pei-Chun Liu

Advisors : Dr. Yaw-Kuen Li

Institute of Industrial Technology R & D Master Program
on IC Chemical Processing
National Chiao Tung University

ABSTRACT

This study focused on structural simulation of *Bacillus circulans* MH-K1 chitosanase first; and we chose the model that makes AQPPKPS peptide to replace with FYN peptide after T¹⁸⁵ originally. We hope this mutant can catalyze chitosan to DP4 be the major product.

As we got the mutant successfully we made the fragment insert into the CBP V5 vector constructed by our group. The recombinant chitosanase can be purified by SP, Q column chromatography and β -chitin gel binding finally.

We compared some basic properties of the recombinant chitosanase with the results of wild type. The most important difference between them was the catalytic product; the major product of WT was DP2 and DP3, but the major product of recombinant chitosanase was mixture of DP1, DP2 and DP3. It's presented that the catalytic mechanism was changed by the mutation even though the result was not ideal.

From the result we got, we can find a better way to make structural simulation in the future.

誌謝

能有這本論文的產生，首先要感謝指導教授 李耀坤博士，謝謝老師在這兩年多來在生物化學領域裡和生活上所給予我的一切指導，學生會永銘於心，由衷感恩。

口試期間亦承蒙 吳東昆博士與 吳淑祿博士抽空審閱及指導本篇論文，讓本篇論文能更臻完備，也讓學生獲益良多，十分感謝。

而能完成這本論文最最最要感謝 岳進學長，謝謝學長總在我碰到瓶頸的時候點亮一盞燈，讓我能夠看到未來的方向，不至在研究的路上迷失，也教了我很多有關實驗上思考的態度與方法，真的非常感謝學長！

在實驗室的時間裡幸運地能有學長姊、學弟妹們的陪伴，謝謝家瑜學長與慧貞學姊在實驗上曾經給予的意見，也謝謝學弟妹們讓實驗室充滿活力；感謝有可欣學長、CUP 學長、勝文學長能一起分享實驗碰到的困境與生活中的娛樂；感謝阿尼和 KK 讓我有練習英文的機會，也讓我 know 很多不一樣的想 法；謝謝惜禾學姊與靜萍學姊在實驗或生活上都不吝地幫忙我；謝謝蟬依，在實驗室裡有可以互相陪伴的妳真的很幸福，希望妳也能順順利利地畢業～

念研究所的這兩年來，要謝謝高中時陪伴到現在的好朋友王小惠，謝謝妳總在我低落的時候幫我打氣，在快樂的時候陪我一起歡呼，

有妳這個好朋友真的就像多了一個姊妹一樣！也謝謝身邊許多朋友聽我發牢騷，大家都辛苦了。

謝謝男友一直一直以來的支持，剛到新竹的一切不適應是因為有你才能變得美好，真的感謝生命中出現了你，謝謝！

最後要感謝我的家人，謝謝我的父母願意無條件地支持我完成學業；謝謝祖父母一直以來的關心與照顧；謝謝姊姊在照顧家庭之餘仍與我分享喜悅；謝謝妹妹總是當我的垃圾桶，替我分擔一切不順心，在此將這小小成就與你們一起分享！



留佩君 謹誌於

國立交通大學理學院

97年10月

目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iii
目錄	v
表目錄	viii
圖目錄	ix
一、緒論	1
1-1 前言	1
1-2 幾丁質/幾丁聚醣 (Chitin/Chitosan)	1
1-2-1 幾丁聚醣之特性	2
1-2-2 幾丁寡醣、幾丁聚醣之應用	3
1-3 幾丁聚醣水解酵素 (Chitosanase)	6
1-3-1 幾丁聚醣水解酵素種類	6
1-3-2 幾丁聚醣水解酵素之分類	7
1-3-3 幾丁聚醣水解酵素之催化性質與反應機制	8
1-4 幾丁聚醣水解酵素之結構模擬與蛋白質工程	11
1-5 幾丁質結合蛋白 (Chitin binding protein)	14

1-6	研究目的	15
二、	實驗方法	16
2-1	藥品與儀器	16
2-2	定點突變 (Site-directed mutagenesis)	18
2-3	CBP21 融合重組幾丁聚醣水解酵素	21
2-4	重組幾丁聚醣水解酵素的表現與純化	22
2-4-1	DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) 酵素活性測試法	22
2-4-2	胞內粗提液的取得	23
2-4-3	HiTrap Sp 與 Q 離子交換樹脂管柱層析	24
2-4-4	與膠狀幾丁質結合純化法	24
2-5	蛋白質濃度測定及分子量測定	26
2-5-1	蛋白質濃度測定	26
2-5-2	質譜儀檢測蛋白質分子量	26
2-6	重組幾丁聚醣酵素的二級結構判讀	27
2-7	重組幾丁聚醣酵素對溫度之穩定度	28
2-8	重組幾丁聚醣酵素對 pH 值之穩定度	28
三、	結果與討論	29
3-1	CBP 融合 T4M12-Csn 的表現與純化	29
3-1-1	定點突變	31

3-1-2	CBP 融合重組酵素	33
3-1-3	CBP-T4M12-Csn 的表現與純化	34
3-2	T4M12-Csn 酵素之相關性質研究	37
3-2-1	蛋白質與葡萄糖胺檢量線之測定	37
3-2-2	以圓二色光譜儀判讀 T4M12-Csn 之二級結構	39
3-2-3	溫度對酵素穩定度的影響	40
3-2-4	pH 值對酵素穩定度之影響	42
3-2-5	T4M12-Csn 水解產物之質譜分析	44
四、	結論	47
五、	未來發展與改進方向	49
六、	參考文獻	50
附錄一	定點突變定序結果	55



表目錄

表 1-1	幾丁聚醣水解酵素家族特性分類	7
表 1-2	幾丁聚醣水解酵素各次種類與基質的作用點	11
表 3-1	純化倍率表	36



圖目錄

圖 1-1 幾丁質與幾丁聚醣構造	3
圖 1-2 幾丁聚醣酵素水解機制	9
圖 1-3 <i>Bacillus circulans</i> MH-K1 Chitosanase 立體結構	12
圖 1-4 醣類水解酵素中內切型與外切型的 3-D 結構比較	13
圖 2-1 定點突變放大流程圖	19
圖 2-2 CBP21 V5 載體示意圖	21
圖 2-3 DNS 反應機制	23
圖 3-1 <i>Hordeum vulgare</i> Chitinase 立體結構	30
圖 3-2 突變後的幾丁聚醣水解酵素模擬立體結構	30
圖 3-3 經 PCR 放大後的基因片段	32
圖 3-4 經限制酶切割後的基因片段	33
圖 3-5 純化結果之 SDS-PAGE	35
圖 3-6 T4M12-Csn 重組酵素以質譜儀測定分子量之結果	37
圖 3-7 蛋白質之標準檢量線	38
圖 3-8 葡萄糖胺之標準檢量線	38
圖 3-9 WT-Csn 之圓二色光譜儀吸收光譜	39
圖 3-10 T4M12-Csn 之圓二色光譜儀吸收光譜	40

圖 3-11 T4M12-Csn 之最佳反應溫度測試	41
圖 3-12 T4M12-Csn 對溫度的穩定度	42
圖 3-13 T4M12-Csn 對 pH 值的反應活性測試	43
圖 3-14 T4M12-Csn 對 pH 值的活性穩定度	44
圖 3-15 T4M12-Csn 對幾丁五醣之水解產物	45
圖 3-16 T4M12-Csn 對幾丁六醣之水解產物	45
圖 3-17 WT-Csn 對幾丁聚醣的水解產物	46



第一章 緒論

1-1 前言

幾丁質命名是由希臘字 chiton 而來，原指信封 (coat of mail) 之意，因為它首次是在 1811 年由 Braconnot 從真菌細胞壁中所發現；1925 年，Children 證實幾丁質為一含氮的化合物；1957 年，Horowitz 等利用鹽酸將幾丁質部分水解，濃縮去除多餘的鹽酸後再利用陽離子交換樹脂分離精製得到幾丁聚醣 (chitosan)，而幾丁聚醣擁有三個可供反應的官能基，分別為在 C-2 位置上的胺基，在 C-3 位置上的一級氫氧基與 C-6 位置上的二級氫氧基，透過對這些官能基的化學修飾，便可衍生出在不同領域中各式材料的廣泛應用。



1-2 幾丁質/幾丁聚醣(chitin/chitosan)

幾丁質 (Chitin) 存在於節肢動物的外骨骼、烏賊軟骨及真菌的細胞壁中，是自然界存在量僅次於纖維素的天然聚合物【1】。

幾丁質是由單體 *N*-乙醯葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine) 以 β -(1,4) 鍵結而成的聚醣 (polysaccharide)，其結構緊密，形成不溶於稀酸、稀鹼或水的特殊結構，且具有保護及支持生物體的功能。而幾丁質去乙醯化後的產物即稱為幾丁聚醣，依其去乙醯化的程度差異可產生不同 DDA (degree of deacetylation) 值的幾丁聚醣，一般去乙醯化程度由 65% 至 99% 不等，其中以 70%~90% 為最常見。

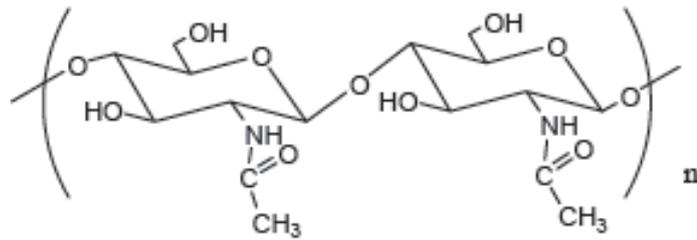
幾丁質與幾丁聚醣是由天然生物中製取得到的生物高分子，與生物體細胞有良好的生物相容性，本身不具有毒性且可以被生物體自行分解；另外具有生物活性，在生理上的調節機能亦獲得重視，包括改善消化吸收機能、降低膽固醇【2】、強化免疫力等。

1-2-1 幾丁聚醣之特性

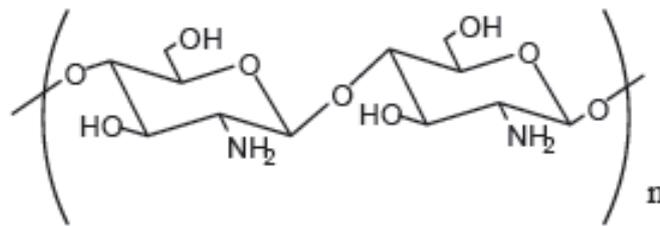
幾丁聚醣可以溶於酸性或是弱酸性的有機酸及無機酸中，其中以甲酸當溶劑為最佳，可溶解約 50% 的幾丁聚醣；若以醋酸當溶劑，則只能溶解 7% 左右。經酸性溶解後的幾丁聚醣具有弱酸性的陽離子電解質（cationic polyelectrolyte）特性，且具有一級胺基（amino group）與一級、二級氫氧基（hydroxyl group），利於化學改質製備各種衍生物。



幾丁聚醣是一易於帶正電的天然高分子，與一般不帶電或帶負電的天然高分子（如澱粉與纖維素）不同。



幾丁質 (Chitin)



幾丁聚醣 (Chitosan)

圖 1-1 幾丁質與幾丁聚醣構造

幾丁聚醣由於價格不高，並具有生物分解性、生物活性、生物相容性、無毒性、抗菌性等特質【3】，常應用於傷口敷料與藥物釋放【4】，而其衍生物可廣泛應用在製藥、食品加工、農業等方面。

1-2-2 幾丁寡醣、幾丁聚醣之應用

幾丁質與幾丁聚醣近年來已發展成新興生物材料，但因其為大分子聚合物，水溶性較差，導致某些應用性上的限制，因此目前多將發展朝向分子量小且水溶性佳的幾丁寡醣【5】。

N-乙醯幾丁寡醣 (*N*-acetyl-chitooligosaccharides) 一般是指由 2~10 個葡萄糖胺以 β -(1,4) 糖苷鍵結形成的低分子醣類；而幾丁寡醣 (chitooligosaccharides) 則是由 2~10 個葡萄糖胺以 β -(1,4) 糖苷鍵結所

形成。幾丁寡醣一般可經由物理分解法、化學水解法、酵素催化法或發酵得到，目前最普遍的方法則是利用幾丁質或幾丁聚醣與酵素作用而得到的水解產物即為幾丁寡醣。

幾丁寡醣的特性與其分子大小息息相關，與幾丁聚醣相比較之下，低分子量的幾丁寡醣在水溶液中擁有較高溶解度，且為可延伸性材料，使在應用上能更多方面地發展。

幾丁寡醣擁有許多生物性功能，最令人感到興趣的是其對鼠科的腫瘤細胞有抑制的作用【6】【7】；另一項重要的生物活性則是可降低膽固醇，此特性使幾丁寡醣能作為肝病、動脈硬化、高血壓的預防藥劑【8】；在其他方面，幾丁寡醣亦可抑制病原菌【9】，使植物自身產生植物干擾素、酚類複合物等抗病原質，達到抵抗病原菌的效果，所以在防治植物病害上也扮演著重要的角色。

而由於幾丁聚醣易於帶有正電，具有活性官能基以及良好的生物適合性與生物分解性，因此在藥物運送與疾病治療上都可見到有關幾丁聚醣的研究【10】。除了穩定藥物成分、促進藥物吸收、延緩或控制藥物溶解外，目前較多應用在藥物運送系統上，可大致分為以下幾種方式：(1) 微顆粒系統 (microgranulation system)【11】(2) 持續釋放基質 (sustained release matrices)【12】(3) 可浸蝕基質 (erodible matrices) (4) 控制釋放膠體系統 (controlled released gel system)；製成藥劑的

型態可為錠劑 (tablets)【13】、微顆粒 (microparticles)、顆粒 (granules)【14】和脂質體 (liposomes)【15】等形式。

此外，幾丁聚醣還可在製藥工業中扮演錠劑的賦形劑【16】、崩散劑【17】和固定劑，並且具有制酸及抗潰爛的功效，亦可促進口腔與鼻腔黏膜吸收具極性的藥物或疫苗【18】【19】。

在生醫材料上，幾丁聚醣可與生物組織有親和性，且具低抗原性，可應用在手術縫合線、傷口癒合、隱形眼鏡、人工韌帶或是塗覆在人工臟器上增加生物相容性等【20】。



1-3 幾丁聚醣水解酵素(chitosanase)

幾丁聚醣酵素 (EC 3.2.1.132) 為一具有催化長鏈幾丁聚醣成短鏈幾丁聚醣或幾丁寡醣的水解酵素。

幾丁聚醣酵素普遍存在於細菌、霉菌、植物中，大部分霉菌與細菌中所分泌的幾丁聚醣酵素屬於胞外酵素【21】，而存在於植物中的幾丁聚醣酵素皆為胞內酵素【22】，但少數接合菌綱 (zygomycete fungi) 的霉菌所生產出的幾丁聚醣酵素亦屬於胞內酵素【23】。

1-3-1 幾丁聚醣水解酵素種類

一般根據幾丁聚醣水解酵素的作用形式可將酵素分類為外切型幾丁聚醣酵素(exo-chitosanase)及內切型幾丁聚醣酵素(endo-chitosanase)【24】，外切型幾丁聚醣酵素是由醣類非還原端逐步水解而產生單一長度的幾丁聚醣，多為短鏈的一醣或二醣【25】；內切型幾丁聚醣酵素則是在幾丁聚醣鏈之間任意水解產生多種長度的幾丁寡醣；另外，在1999年，Matsumura, S.發現有些外切型- β -葡萄糖胺酵素具有轉醣(transglycosylation)的作用【26】，轉醣是指將幾丁二醣轉接到幾丁四醣或幾丁五醣上，可藉此形成高度聚合的幾丁寡醣類，因此，幾丁聚醣酵素一共可分為三類：外切型、內切型及轉醣型(transglycosylation-catalyzing)。

1-3-2 幾丁聚醣水解酵素之分類

國際生化學會 (International Union of Biochemistry) 根據酵素催化反應類型與對基質的特異性將不同的酵素命名，而醣類水解酵素中再比較其結構與胺基酸序列的不同，進而細分成 112 個家族 (family)。

目前已知幾丁聚醣水解酵素分佈在 5、7、8、46、75、80 家族，各家族的反應機制與其他性質整理於表 1-1。

表 1-1 幾丁聚醣水解酵素家族特性分類

Family	Mechanism	Catalytic Nucleophile / Base	Catalytic Proton donor	3D Structure
5	Retaining	Glu (experimental)	Glu (experimental)	Available Fold(β / α) ₈
7	Retaining	Glu (experimental)	Glu (experimental)	Available Fold β -jelly roll
8	Inverting	Asp (inferred)	Glu (experimental)	Available Fold(α / α) ₆
46	Inverting	Asp (experimental)	Glu (experimental)	Available Fold α / β
75	Inverting	Probably Asp	Probably Glu	Not available
80	Inverting (inferred)	Unknown	Unknown	Not available

資料來源：http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html

1-3-3 幾丁聚醣水解酵素之催化性質與反應機制

幾丁聚醣水解酵素一般透過兩種途徑去水解幾丁聚醣 β -醣甘鍵，一為位向保留的機制 (retention)，另一為位向反轉的機制 (inversion)。

位向反轉的醣類水解酵素之催化機制是由一般酸 (general acid) 和一般鹼 (general base) 共同輔助完成的單一步驟置換反應，其過程是一般鹼先極化水分子，使其形成強親和基進而攻擊 anomeric carbon，同時一般酸則對醣甘鍵上的氧原子進行質子化以加速此反應；而在活化中心裡兩必須胺基酸之間的距離約為 9.5~10.5Å，較大的活化中心可允許水分子進入一般鹼與受質之間，直接被極化並攻擊受質的異構中心，所以產物的位向會從 α -form 變為 β -form 或由 β -form 變為 α -form。另外，位向保留的醣類水解酵素催化機制則是雙步驟的置換反應；在過程中，兩個參與催化反應的胺基酸，一個扮演親和基，另一個則做為一般酸鹼對 (general acid/base)，親和基先攻擊醣甘上的 anomeric carbon，一般酸鹼對則向醣甘鍵上的氧原子進行質子化，促使醣甘鍵斷裂，此步驟稱為酵素醣化反應 (glycosylation)，且會形成共價鍵結的酵素-醣基中間體 (glycosyl-enzyme intermediate)，在第二步驟中，一般鹼極化水分子，使其形成強親和基攻擊異構中心 (anomeric center) 的碳原子，讓酵素-醣基中間體的共價鍵斷裂進而釋放醣甘，此

稱為去醣化反應 (deglycosylation)；活化中心兩胺基酸之間的距離為 5.5~6.5Å，且產物的位向會與反應物位向相似。此外，轉醣作用通常可在位向保留催化機制的酵素發現，但卻尚未在位向反轉催化機制的酵素發現。以上詳細的反應機制如圖 1-2 所示。

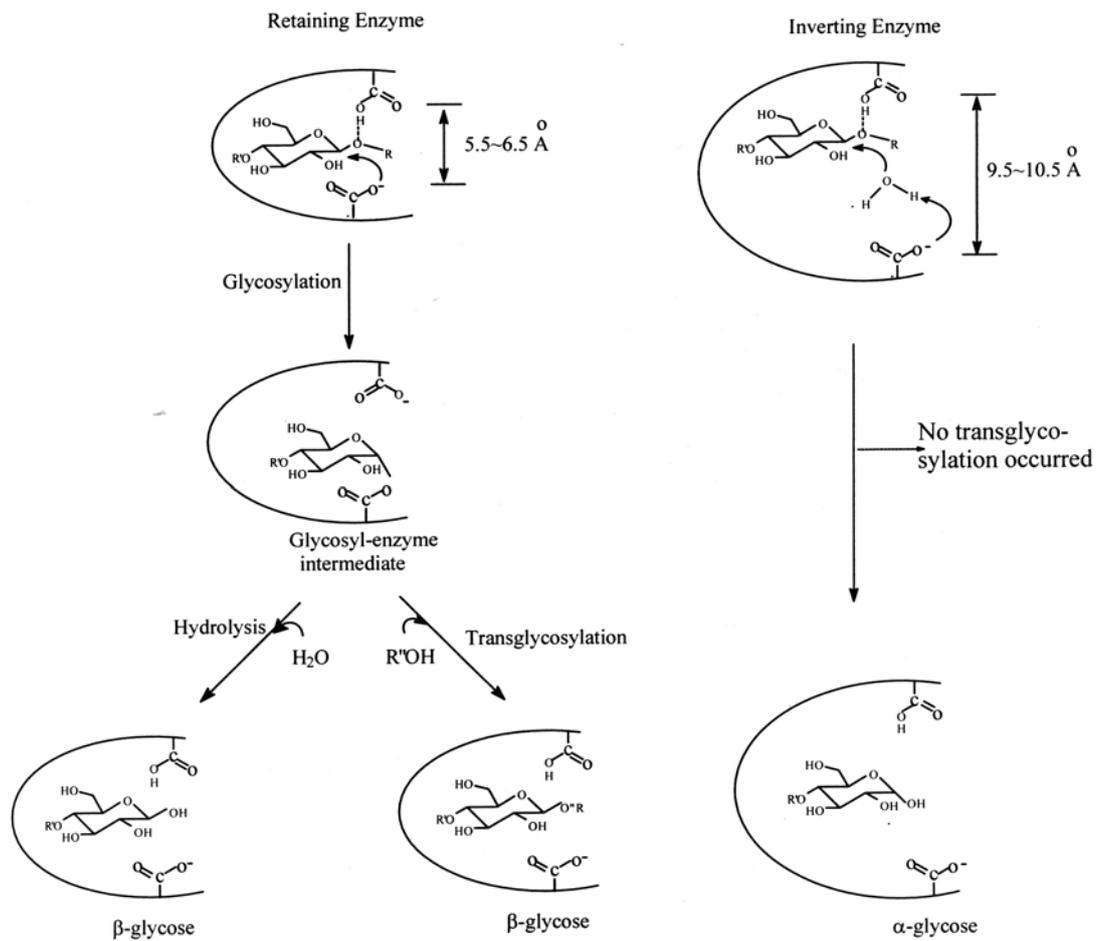


圖 1-2 幾丁聚醣酵素水解機制

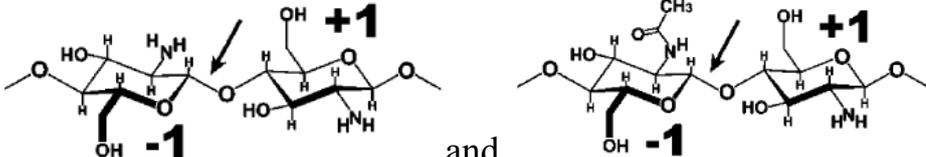
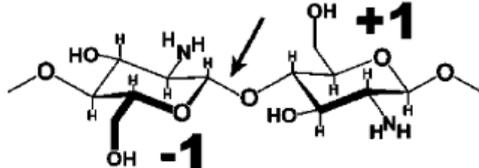
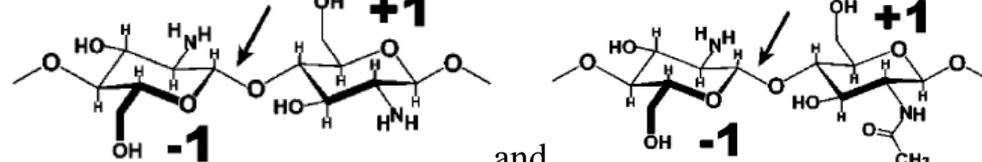
由於近來對於醣類水解酵素的三維立體結構瞭解發展迅速，Davies 等學者在 1997 年即利用酵素與醣類結合的位置作為辨識而加以命名，稱為 subsite 【27】，其中有兩大準則：(1) 所標示出的位置即為醣類水

解斷裂之處；(2) 無論在產物的還原端或非還原端是否有接上新的糖，在命名的標示上並不會改變其次序。一般由-n 至+n 作為標示，-n 表示非還原端，+n 表示還原端，而酵素對糖類水解之處則在-1 與+1 之間。

對內切型幾丁聚糖水解酵素而言，我們以其與幾丁六糖作用所得的水解產物作為命名依據，有兩種主要水解型式：[(-3), (-2), (-1), (+1), (+2), (+3)]及[(-2), (-1), (+1), (+2), (+3), (+4)]【28】，前者為作用在幾丁六糖的中心，且只能得到幾丁三糖為產物；後者則是作用在非還原端的前兩單位糖，可得到幾丁二糖與幾丁四糖為其產物。

另外，根據幾丁聚糖水解酵素與基質作用的特異性又可細分為三個次種類 (subclass)【29】：I 為能水解 GlcN-GlcN 和 GlcNAc-GlcN 之間 β -(1,4)糖苷鍵的幾丁聚糖水解酵素；II 為只能水解 GlcN-GlcN 之間 β -(1,4)糖苷鍵的幾丁聚糖水解酵素；III 為能水解 GlcN-GlcN 和 GlcN-GlcNAc 之間 β -(1,4)糖苷鍵的幾丁聚糖水解酵素。詳細作用圖示如表 1-2 所示。

表 1-2 幾丁聚醣水解酵素各次種類與基質的作用點

Subclass	Substrate specificity
I	
II	
III	

1-4 幾丁聚醣水解酵素之結構模擬與蛋白質工程

由國際生化學會所做的醣類水解酵素分類中，我們可以發現各自在 GH-6, 8, 9, 17, 18, 28, 55 家族裡會同時存在著內切型與外切型酵素，此現象表示，當酵素被分類在同一家族時，儘管是因為擁有類似的胺基酸序列，不過也暗示著相似的胺基酸序列與蛋白質折疊方式決定了酵素的作用型式；對不同酵素而言，其中的差距只在於活化中心結構的差異。因此，我們可針對欲改良酵素的方向去尋找是否有可仿效的例子。

另外，我們已知來自 *Bacillus circulans* MH-K1 的幾丁聚醣水解酵素對幾丁六醣是以內切型水解型式，可生產出幾丁二醣與幾丁三醣

【30】，此酵素屬於 GH 46 家族，共有 259 個胺基酸，由兩球狀區域共同形成一基質結合裂口，其活化中心為 Glu³⁷ 及 Asp⁵⁵，分別作為一般酸

與一般鹼，且為位向反轉作用機制。

本篇論文所使用的野生株菌種是由日本千葉大學佐藤和一教授所提供的 *Bacillus circulans* MH-K1 Chitosanase，且其立體結構已由 X-ray 晶格繞射解出，如圖 1-3；而在 1992 年時本實驗室將其利用 *Nde*I 與 *Xho*I 切位接入 pET22b(+)載體中，在 *E.coli* BL21(DE3) 宿主菌種裡可成功地大量表現，經純化後得到一分子量為 28950 Da 的野生株幾丁聚醣水解酵素【31】。

由於目前的幾丁聚醣酵素無法水解出單一產物，且寡醣類在分離技術上仍無法完全分離，因此希望能夠透過蛋白質工程設計出一能產生單一產物的幾丁聚醣水解酵素。

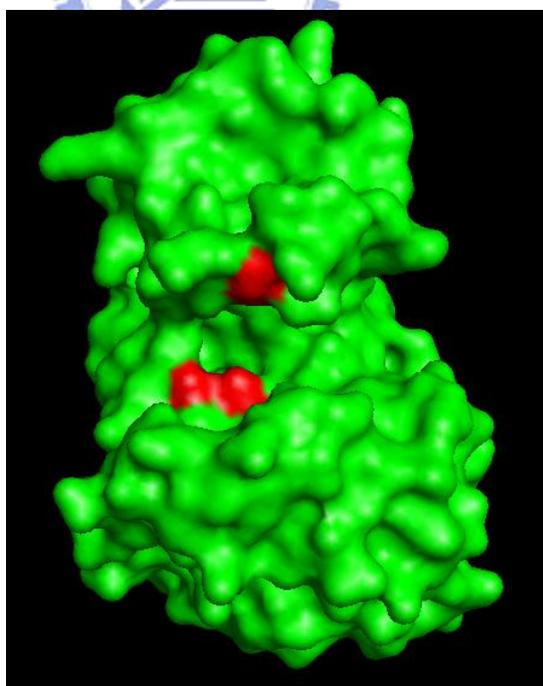


圖 1-3 *Bacillus circulans* MH-K1 Chitosanase 立體結構

(紅色標示為活化位置Glu³⁷及Asp⁵⁵)

本實驗室於之前利用結構模擬設計出一突變酵素，以 endo-1,4-Glucanase和Cellbiohydrolase皆屬於GH-6 家族卻分別是內切型和外切型的水解酵素為例子，由圖 1-4 的比較可看出endo-1,4-Glucanase與Chitosanase的結構相似，因此仿效Cellbiohydrolase的結構在*Bacillus circulans* MH-K1 Chitosanase野生株的D¹¹⁵與T²²²後加上PCLGG及SRTCKP兩段胜肽，這兩段胜肽會在活化中心外側產生雙硫鍵，藉此擋住些微幾丁聚醣與酵素活化中心可結合的區域，使得突變後酵素可生產出幾丁二醣為主要產物，成功地將內切型幾丁聚醣水解酵素轉換成外切型的幾丁聚醣水解酵素。【32】

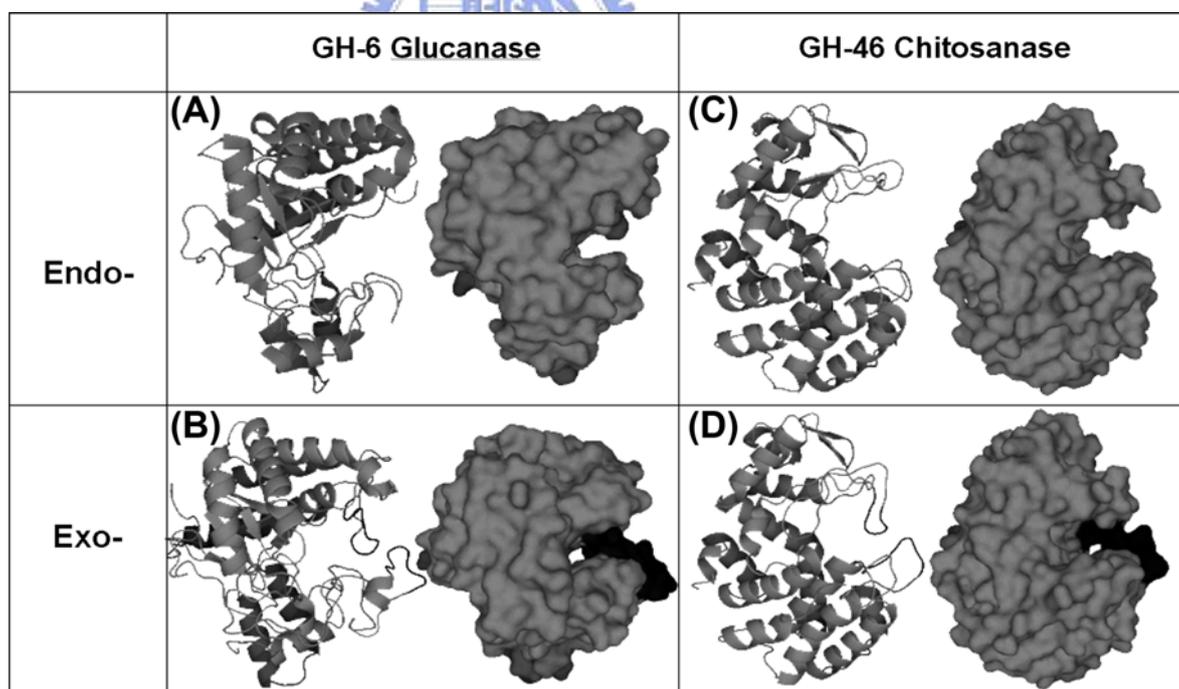


圖 1-4 醣類水解酵素中內切型與外切型的 3-D 結構比較

1-5 幾丁質結合蛋白(Chitin binding protein ; CBP)

幾丁質結合蛋白質或蛋白質中包含幾丁質鍵結區 (chitin binding domains) 已在許多生物體中被發現，而多數含有幾丁質結合區的酵素其結合區具有增加受質親和性 (substrate affinity) 和增強酵素反應效率的作用【33】【34】。

CBP21 是一種幾丁質結合蛋白，分子量為 18.8kDa，分類在 CBMs 家族 33，來自 *Serratia marcescens* 革蘭氏陰性桿菌。其主要作用為與不溶性結晶狀幾丁質結合，導致受質構形的變化進而增加對幾丁質的親和性，使幾丁質水解酵素較容易去分解幾丁質，達到降解的作用，但本身不具有幾丁質水解酵素的催化活性；且 CBP21 被分類為分泌性結合蛋白質 (secreted binding protein)，是該類蛋白質中第一個被確認為能影響非水溶性碳水化合物之降解作用。

另有文獻指出，CBP21 與幾丁質結合作用主要是和表面殘基的保留性、使用的溶劑特性與極性官能基鍵結有關【35】，如 CBP21 在 pH 6-8 左右能與幾丁質擁有最大結合量，但隨著 pH 值的降低，CBP21 與幾丁質的結合量也會隨之遞減；在 CBP21 與幾丁質親和性純化試驗中則發現，當 pH 6.5 時 CBP21 可被洗脫出來。

1-6 研究目的

希望能透過基因工程，將原始的幾丁聚醣水解酵素轉化成為外切型酵素，並且以幾丁四醣為其主要產物，可減少日後應用上需先分離寡醣類的不方便；另外，我們利用 CBP21 的特性將其設計為一融合蛋白，與突變過後的幾丁聚醣水解酵素結合，使用 β -幾丁質為親和性固定相基材，以方便之後的純化程序，未來亦可以固定化來增加其應用性，並大幅降低成本。



第二章 實驗方法

2-1 藥品與儀器

1. 藥品：

菌種培養液（酵母抽出物、洋菜、氨比西林等）藥品購自 Merck、Difco 公司。

試驗用藥品及緩衝液購自 Merck、Aldrich、CONDA、SHOWA。

限制酶及聚合酶購自 NEB。

Gel Elution、plasmid DNA extraction 等各種 Kit 購自

GeneMark、Viogene。



2. 基因：

pRSET_A vector。

Bacillus circulans MH-K1 chitosanase gene。

3. 儀器：

恆溫培養箱（EYELA NDO-450ND, RISEN refrigerated circulators）

搖動培養箱（FIRSTEK SCIENTIFIC B602D, S300R, S302R）

UV 吸收光譜儀（HP 8452A）

高速離心機（KUBOTA 7820）

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-TOF (Micromass)

超音波震盪器

聚合酶連鎖反應器 (GeneAmp PCR system 2400, 9700)

FPLC system (Pharmacia Biotech FPLC)

層析管柱 (HiTrap Desalting column, 5 mL; HiTrap SP column;

HiTrap Q column; Chitin gel)

CD 光譜儀 (Jasco J-715 spectropolarimeter)

分液收集器 (fraction collector) ISCO

垂直式蛋白質電泳槽

DNA 電泳槽 (MP-100) (MAJORSCIENCE)



2-2 定點突變 (Site-directed mutagenesis)

由於我們欲在幾丁聚醣酵素野生株的基因內插入 AQPPKPS 片段，因此根據 PCR 原理，我們設計兩段引子 (primers)，其能將欲突變的位置和整個載體完整放大，利用事先磷酸化引子再 PCR 放大整段基因，最後將所得到的 PCR 產物進行自我黏合 (self-ligation) 即可得到突變後的完整基因。

簡易流程圖如圖 2-1。

而依據蛋白質結構模擬，欲插入的胺基酸片段為 AQPPKPS，因此我們設計了兩段引子如下：

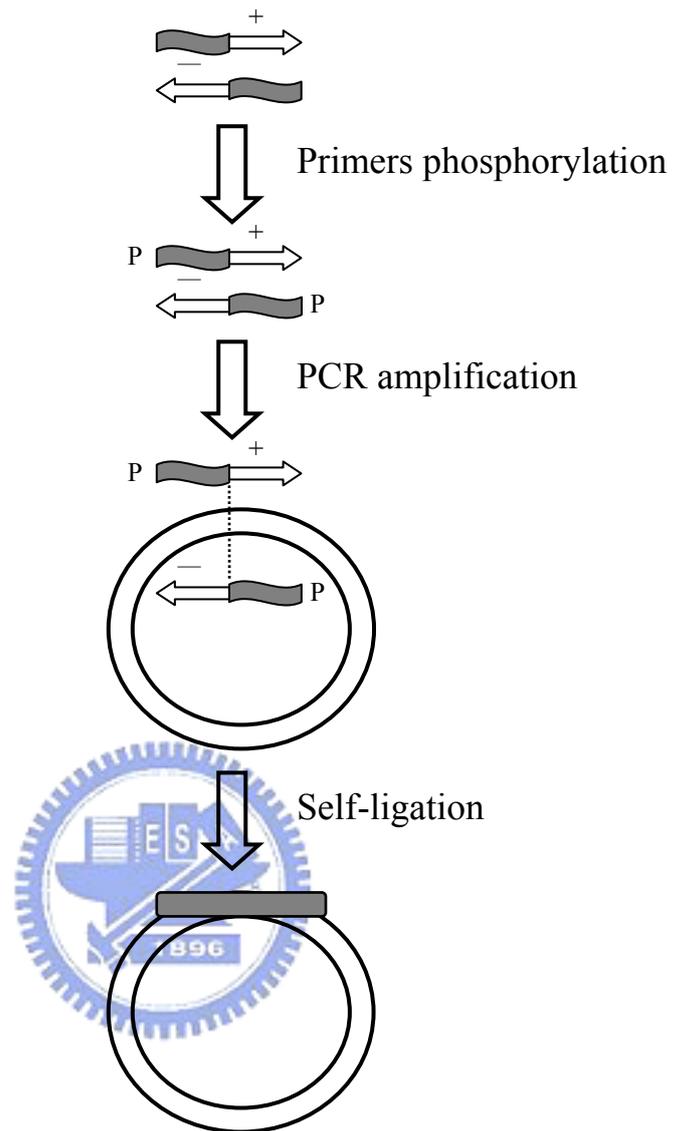
CNS-431(+): 5'-AAACCGTCCGTGTATATCCGGTACAGC-3'

CNS-431(-): 5'-CGGCGGCTGCGCTGTTTCCCACATCGCTTT-3'

再利用 T4 聚合核苷酸激酶 (T4 polynucleotide Kinase) 進行下述反應將兩段引子之 5'端行磷酸化：

CNS-431(+)	10 μ L
CNS-431(-)	10 μ L
PNK buffer	1.3 μ L
γ ATP	1 μ L
T4 polynucleotide Kinase	1 μ L

均勻混合後，置於 37°C 反應 3 小時。

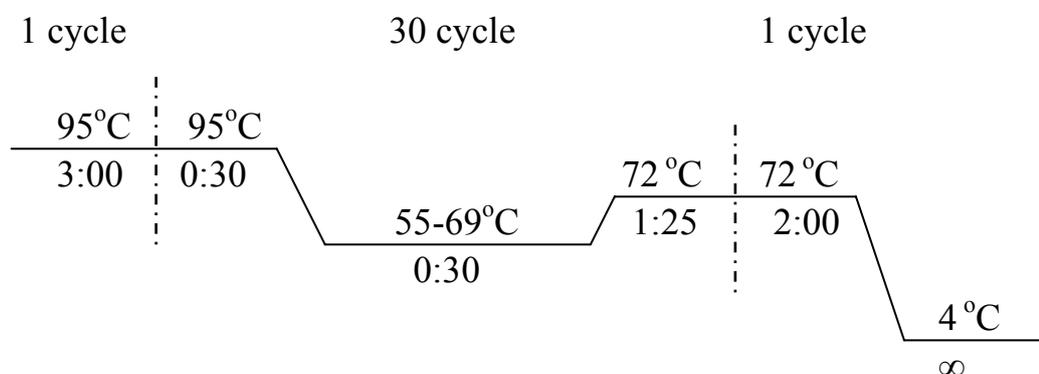


-  : 為欲突變加入的部分 DNA 序列
-  : 為與模版互補的 DNA 序列
-  : 為欲突變加入的完整 DNA 序列

圖 2-1 定點突變放大流程圖

之後，以野生株 DNA 為模版與經過磷酸化後的引子及 *Pfu* 聚合酶

進行 PCR 反應：



反應過後取 2 μ L 以 DNA 電泳確認其放大效果。

將PCR後的產物加入 1 μ L 的DpnI限制酶，置於 37°C overnight，以分解甲基化的母股DNA；隔天，再進行自我接合作用。

接合完成的圓形雙股 DNA 經由轉型作用（transformation）進入 *E.coli* XL-Blue 宿主細胞內，且純化其質體並送定序確認序列正確與否。

2-3 CBP21 融合重組幾丁聚醣酵素

PCR後的產物經由定序確認突變無誤之後，我們將CBP21 V5 載體（如圖 2-2）與經轉型作用後所抽出的質體分別用限制酵素*NdeI*和*XhoI*在 37°C下作用兩小時，進行切割反應。

接著以vector : insert = 1 : 3 的比例將CBP21 V5 載體與T4M12 基因的DNA片段混合在 16°C下作用overnight以進行接合反應。

將接合反應完成的產物轉型進入 *E.coli* JM109 宿主細胞內以利之後的大量表現與純化。

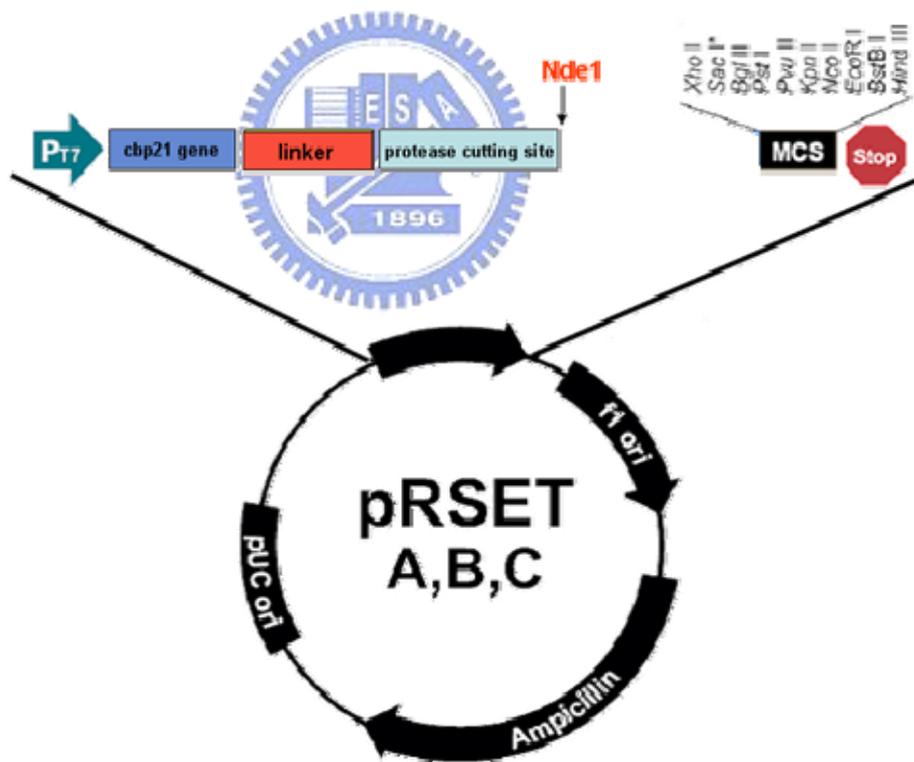


圖 2-2 CBP21 V5 載體示意圖

2-4 重組幾丁聚醣酵素的表現與純化

2-4-1 DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) 酵素活性測試法

(1) 試劑：60% (W/V) 酒石酸鉀鈉溶液

DNS 溶液：0.96% DNS，3.07% 氫氧化鈉

取等量體積的酒石酸鉀鈉溶液與 DNS 溶液混勻即可（需避光），稱為 DNS 試劑。

(2) 酵素活性測定方法：

取 100 μ L 酵素液加入等量 0.5% chitosan，在 37°C 下反應 1 小時，隨即加入 200 μ L 的 DNS 試劑，於 95°C 下加熱 10 分鐘，之後室溫置放 10 分鐘待冷卻後離心，取上清液測定還原醣生成量，同時以未反應的酵素反應液做相同的測定作為空白樣品。

一個酵素活性單位定義為每分鐘可水解受質產生 1 μ mole 還原醣當量的酵素量。

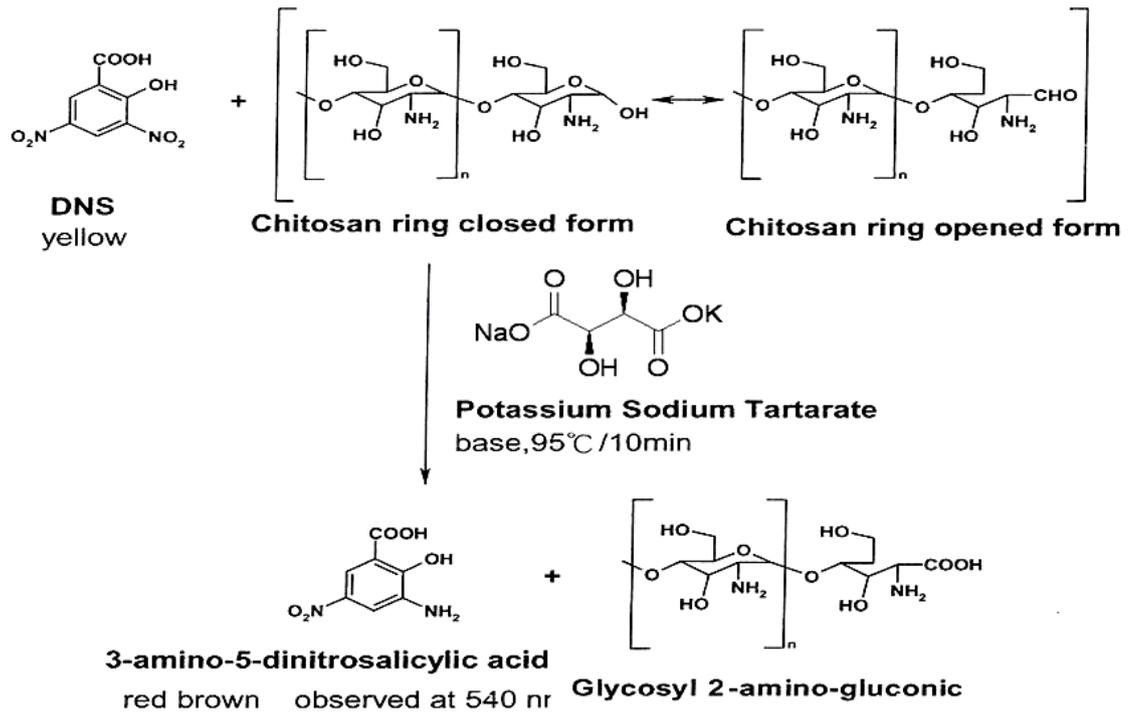


圖 2-3 DNS 反應機制

2-4-2 胞內粗提液的取得

取單一菌落在 5 mL 培養液養 12~16 小時後，接種到 1000 mL LB-Amp (1000x 1 mL) 培養液中，加入 1 mL 的 1 M IPTG 當做誘導劑，以 37°C，轉速 115 rpm 的條件在培養箱中培養 18~24 小時。

開始純化前，我們取 3 mL 菌液以 14000 rpm 離心，捨棄上清液，加入 0.5 mL 磷酸緩衝液溶解沈澱菌體，以超音波震盪 (45W, 60% pulse) 破碎菌體，再以 14000 rpm 離心 1 分鐘，取上層液加入等體積的 0.5% chitosan，在 37°C 下反應 1 小時以測試酵素的活性。

其餘菌液在 4°C 下以 6500 rpm 離心 10 分鐘，留下沈澱菌體加入 10 mL 的磷酸緩衝液 (20 mM, pH 6.5) 溶解，搖晃使其成均勻懸浮；接

著以超音波震盪（45W，60% pulse）破碎菌體，在 4°C 下以 15000 rpm 離心 20 分鐘，將上層液與細胞殘骸分開；此時，上層液即為胞內粗提液。

2-4-3 HiTrap Sp 與 Q 離子交換樹脂管柱層析

將所得之胞內粗提液導入預先以磷酸緩衝溶液（20 mM，pH 6.5）平衡的 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱，進行層析分離。

我們先以流速 2.0 mL/min 的磷酸緩衝液（20 mM，pH 6.5）流洗 30 分鐘，其間每 2 分鐘收集一管沖提液，收集完畢後由試管取樣，加入 0.5% chitosan，在 37°C 下測試活性，並收集活性部分進行再次的層析分離。

接著，將由 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱所流洗出的活性部分沖提液導入同樣預先以磷酸緩衝溶液（20 mM，pH 6.5）平衡的 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱，鹽類梯度由 0 到 1 M，流速 2.0 mL/min 的條件流洗 100 分鐘，其間每 2 分鐘收集一管沖提液，收集完畢後同樣由試管取樣加入 0.5% chitosan 進行活性測試且收集活性部分洗出液。

2-4-4 與膠狀幾丁質結合純化法

我們將經過離子交換樹脂管柱層析後的活性流分利用離心濃縮管，讓體積濃縮至約 10 mL，並使其與預先以 Tris-HCl 緩衝溶液（100 mM，pH 8.5）平衡過後的膠狀幾丁質混合，置於 4°C 中 1~2 個小時，

讓CBP的斷裂片段能充分與膠狀幾丁質做結合。之後，以 3000 rpm 離心 10 分鐘後所得之上層液即為最終的純化產物。最後，利用HiTrap desalting column將蛋白質樣本由Tris-HCl緩衝溶液（100 mM，pH 8.5）系統轉換至磷酸緩衝溶液（20 mM，pH 6.5）中保存，即可進行後續的實驗步驟。



2-5 蛋白質濃度及分子量測定

2-5-1 蛋白質濃度測定

本實驗採用 Bicinic acid (BCA assay) 吸收值方法估計所得蛋白質的量。

方法：

將不同濃度的蛋白質標準試劑與標準測定試劑 (Bicinchoninic acid : Copper sulfate = 50 : 1) 以 1 : 20 體積比混合，個別置於 37°C 反應 30 分鐘後再於室溫冷卻 10 分鐘，隨即測 UV 562 nm 的吸收值，即可繪製出蛋白質濃度的標準檢量線。

之後，將待測蛋白質溶液稀釋至適當濃度，重複上述步驟且利用內差法便可以求出待測濃度。

2-5-2 質譜儀檢測蛋白質分子量

方法：

將 LC-Mass 接上 C-18 管柱，以水 : 乙腈 : 1% 甲酸 = 80 : 10 : 10 之溶液，流速 0.08 mL/min 流洗至平衡，取經純化濃縮後的酵素溶液 10 μ L 注入質譜儀，再以水 : 乙腈 : 1% 甲酸 = 80 : 10 : 10 溶液流洗將蛋白質洗出，最後利用程式將其分子量算出。

2-6 重組幾丁聚醣酵素的二級結構判讀

圓二色光譜儀 (Circular dichroism spectroscopy, 簡稱 CD) 可觀測到活性光學物質對左旋極化光與右旋極化光細微的吸收變化, 但待測樣品需在波長 190-170 nm 有吸收的特性。而圓二色光譜儀對於胜肽、蛋白質或是核酸的二級結構在光譜上各有不同的呈現, 所以當我們對圓二色光譜儀所分析出的數據時, 可對生物性大分子的二級結構有相當可信的資訊。

目前圓二色光譜儀的數據多以橢圓率 (ellipticity, Θ) 表示, 單位為毫度 (millidegrees)。

方法：



將待測的蛋白質樣品稀釋到適當濃度 (150~250 $\mu\text{g/mL}$), 再用 HiTrap desalting column 把待測樣品轉換保存於 5 mM, pH 6.5 的磷酸緩衝溶液中, 以寬度 0.1 cm 的圓形比色槽盛裝樣品進行掃描, 且將 5 mM, pH 6.5 的磷酸緩衝溶液當做空白樣品。

所得數據原為橢圓率, 經下列公式即可轉換為平均殘餘莫耳橢圓率 (mean residues molar ellipticity, $[\Theta]_{\text{MRW}}$)。

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \Theta / (10 * Cr * l) \quad (1)$$

$$Cr = (n * 1000 * c_g) / Mr \quad (2)$$

其中, Cr 為平均殘餘莫耳濃度 (mean residue molar concentration)

； l 為比色槽的寬度，單位為 cm ； n 為肽鍵的數目； c_g 為生物分子的濃度，單位為 g/mL ； M_r 為蛋白質的分子量；而最終 $[\Theta]_{\text{MRW}}$ 的單位以 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{decimale}^{-1}$ 表示。

2-7 重組幾丁聚醣酵素對溫度之穩定度

我們將純化過後的CBP-T4M12-Csn酵素置於 20 mM的磷酸緩衝溶液中，分別在 28~80°C加熱 10 分鐘，個別從中取出 100 μL 的樣品加入等體積的 0.5% chitosan並在 37°C下反應 30 分鐘，之後以DNS方法偵測其還原醣量。

另外，我們直接取純化過後的酵素 100 μL 加入等體積的 0.5% chitosan分別在 28~80°C下反應，每 30 分鐘取出樣品並以DNS方法偵測其還原醣量。



2-8 重組幾丁聚醣酵素對 pH 值之穩定度

我們利用HiTrap desalting column將純化過後的CBP-T4M12-Csn酵素置換於不同pH值（pH 4.0~7.0）的緩衝溶液系統中，分別在室溫下保存 10 分鐘，再個別從中取出 100 μL 的樣品加入等體積的 0.5% chitosan並在 37°C下反應 30 分鐘，之後以DNS方法偵測其還原醣量。

另外，我們分別取置換緩衝溶液系統過後的酵素 100 μL 加入等體積的 0.5% chitosan在 37°C下反應，每 30 分鐘取出樣品並以DNS方法偵測其還原醣量。

第三章 結果與討論

3-1 CBP 融合 T4M12-Csn 的表現與純化

透過圖 1-3 的蛋白質結構我們可知其活化中心與 GH-19 家族的 *Hordeum vulgare* Chitinase 活化中心裂口相似，如圖 3-1，差別在於 *Hordeum vulgare* Chitinase 在活化中心後方多了一段胺基酸序列

(AQPPKPS) 略微擋住出口，且 *Hordeum vulgare* Chitinase 為外切型水解酵素，因此我們假設若在野生株幾丁聚醣水解酵素的相似位置加上同一段胺基酸，應可將其作用形式由內切型轉化為外切型，又根據被擋住後的活化中心大小經軟體計算後約為 21 Å，且幾丁一醣的大小約為 5.3 Å，因此我們可預測突變酵素的水解產物應為幾丁四醣；將經過突變後的幾丁聚醣水解酵素命名為 T4M12-Csn。

利用 SWISS-MODEL 可模擬突變後的幾丁聚醣水解酵素結構，如圖 3-2。

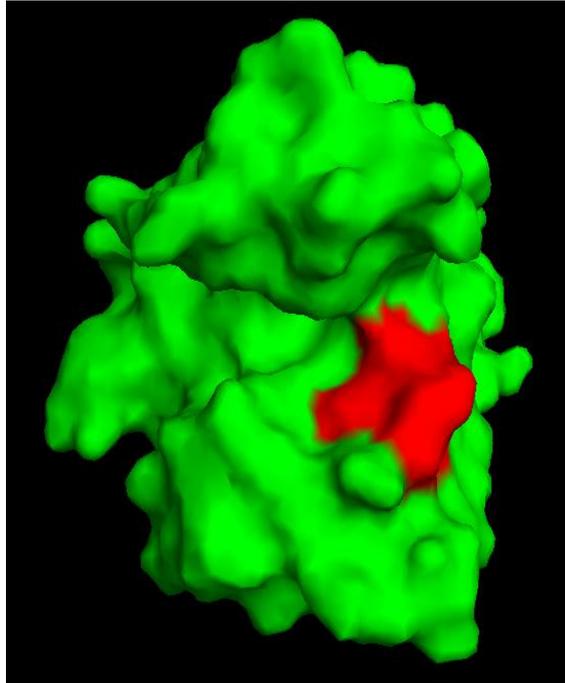


圖 3-1 *Hordeum vulgare* Chitinase 立體結構

(紅色區域為 AQPPKPS 胜肽段)

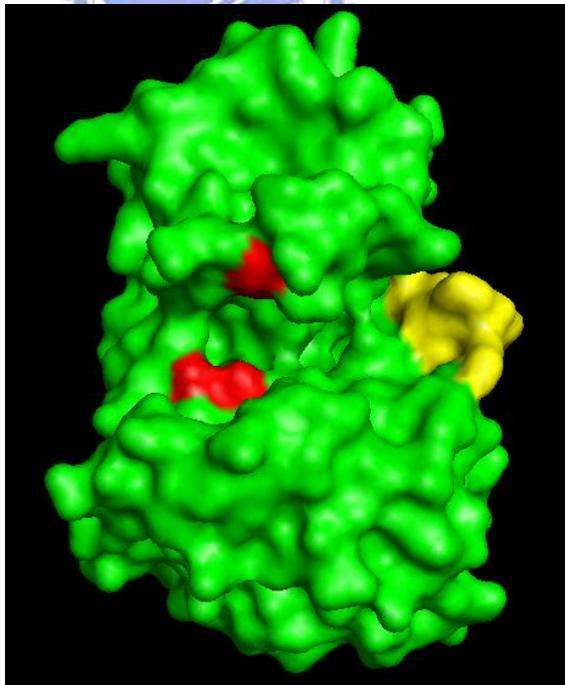


圖 3-2 突變後的幾丁聚糖水解酵素模擬立體結構

(紅色標示為活化位置Glu³⁷及Asp⁵⁵；黃色區域為AQPPKPS胜肽段)

3-1-1 定點突變

本研究所選定的幾丁聚醣酵素野生株為由日本千葉大學安藤昭一 (Akikazu Ando) 教授所提供的 *Bacillus circulans* MH-K1 幾丁聚醣水解酵素基因，經過本實驗室將其建構在 pET22b(+)載體上，命名為 WT-Csn。

由文獻得知，*Bacillus circulans* MH-K1 幾丁聚醣水解酵素為內切型酵素，可隨機式地將長鏈的幾丁聚醣水解成為短鏈的幾丁寡醣。一般而言，能被水解的醣類需具有一定長度才能被酵素所作用，所以反應最終都會留下不定長度的寡醣混合體，但不同長度的寡醣在純化尚無法達到全然分離，在應用上也有所限制，因此，我們希望能透過蛋白質工程改變其酵素構型，使其能生產出以幾丁四醣為單一產物的外切型酵素。

透過結構模擬，我們設計在WT-Csn的T¹⁸⁵後以AQPPKPS胺基酸片段取代原始的FYN胺基酸片段，預期加入此片段能擋住部分活化中心與醣類結合的空間，進而改變其產物型態。

而為了取得我們欲表現的突變酵素基因，故先對幾丁聚醣酵素的野生株進行定點突變，為其所設計的引子（primers）序列如下：

CNS-431(+): 5'-AAACCGTCCGTGTATATCCGGTACAGC-3'

K P S

CNS-431(-): 5'-CGGCGGCTGCGCTGTTTCCCACATCGCTTT-3'

P P Q A

又為了方便之後欲進行的自我接合作用，會先行將兩段引子之5'端磷酸化。

而後，我們以野生株質體做為模版，利用*Pfu*聚合酶在黏合溫度（annealing）55-69 °C 下進行PCR反應，即可將經突變過的基因片段放大。所需基因片段經放大後，可見到大小約 6000 bp的DNA產物（如圖3-3），經過自我接合作用，再送定序比對後確認序列無誤（如附錄一），命名為T4M12_pET22b(+）。

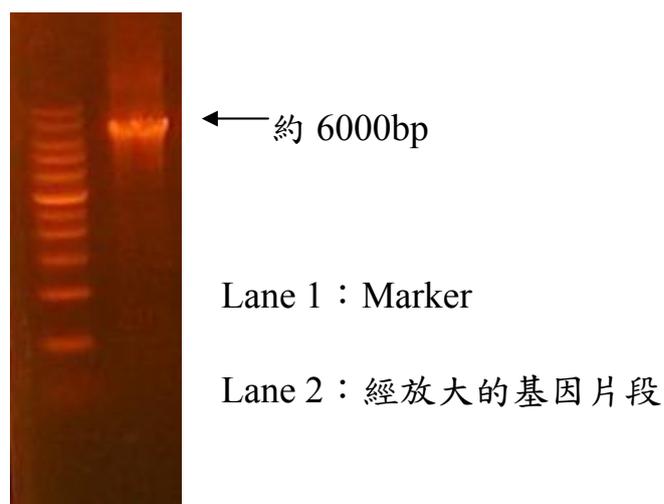


圖 3-3 經 PCR 放大後的基因片段

3-1-2 CBP 融合重組酵素

之前於本實驗室已將 CBP21 建構在 pRSET_A vector 上，命名為 CBP21 V5 載體，所以我們可利用其載體上的 *NdeI* 與 *XhoI* 限制酶切位將定點突變後放大的基因片段接進 CBP21 V5 載體內，轉型至 *E.coli* XL-Blue 宿主細胞內抽取質體並利用上述限制酶行切割反應，利用片段大小以確定接合作用是否正確完成（如圖 3-4），並命名為 CBP-T4M12-Csn。

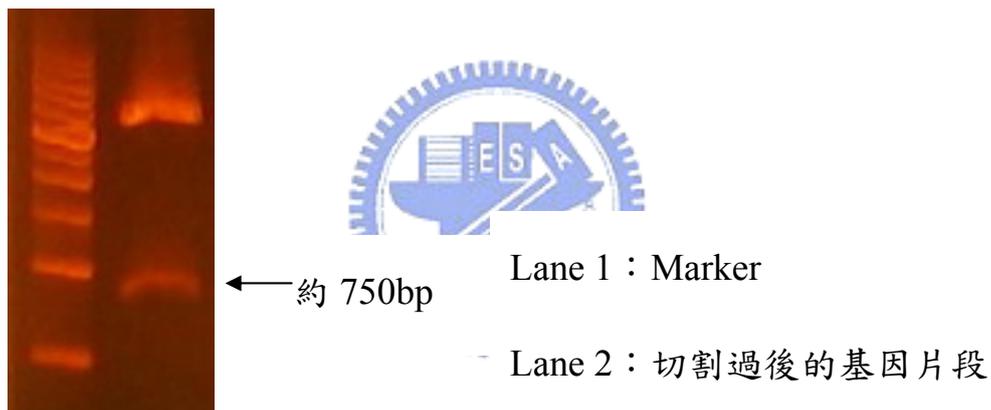


圖 3-4 經限制酶切割後的基因片段

之後將質體轉型至 *E.coli* JM109 宿主細胞內以利之後的表現與純化。

3-1-3 CBP-T4M12-Csn 的表現與純化

在誘導表現階段，我們嘗試過不同加入 IPTG 的誘導時間，經過 SDS-page 確認發現於培養初期（約 4 小時後）或與接種菌液時一起加入，對於蛋白質的表現量並無顯著差異，因此為了方便程序，我們在接種菌液至 1 L LB-Amp 時便一併加入 IPTG。

而在純化過程中，WT-Csn 的純化條件是利用 SP 陽離子交換樹脂管柱層析在 pH 7.0 時，在 200~400 mM 的 NaCl 濃度下即可得到具有活性且乾淨的蛋白質流份；但經過突變並融合上 CBP 標記蛋白後的 CBP-T4M12-Csn 卻是在 pH 6.5 時同時經過 SP 陽離子交換樹脂管柱與 Q 陰離子交換樹脂管柱，且皆是在無鹽緩衝溶液流洗時所得到活性流份，表示在此條件下蛋白質在陽離子與陰離子交換樹脂管柱裡皆無法 binding，亦顯示其表面電荷的分佈可能已經與 WT-Csn 有所不同，所以在管柱層析分離上有顯著的差異性。

經過初次的管柱層析分離之後，我們發現原先融合上蛋白質的標記蛋白 CBP 在 pH 6.5 條件下已斷裂脫離 T4M12-Csn，因此先將管柱層析後的活性流份經濃縮過後，使其與膠狀幾丁質在 pH 8.5 的環境下混合，透過 CBP 蛋白會與膠狀幾丁質結合的特性，所以只要經過離心即可將 T4M12-Csn 流洗下來，進而得到乾淨的蛋白質，經 SDS-PAGE 分析其純度（如圖 3-5），其均質度可達 90%，分子量約為 29KDa。同時

結合蛋白質濃度的測定與還原糖定量，可整理出此重組蛋白質的純化倍率及回收率（如表 3-1）。

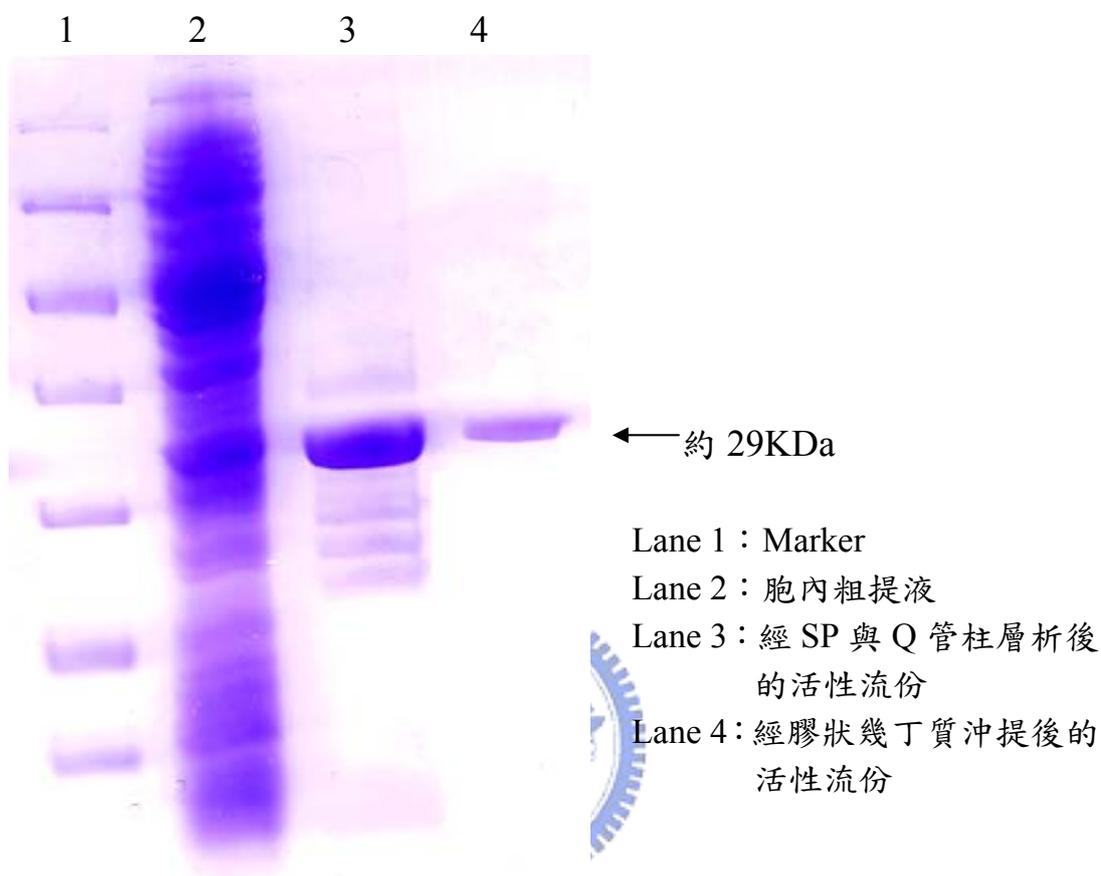


圖 3-5 純化結果之 SDS-PAGE

表 3-1 純化倍率表 (unit 定義：1 μ mole/min)

Step	Total Protein(mg)	Total activity(unit)	Specific activity(unit/mg)	Purification fold	Enzyme Recovery Yield(%)
Crude Extract	190.56	1820.18	9.55	1	100
HiTrap SP+Q(pH 6.5)	40.61	1516.06	37.33	3.9	83.29
Chitin gel	9.27	907.69	97.88	10.25	49.88

經過純化後的蛋白質每毫克可產生 97.88 單位的還原糖，而 WT-Csn 每毫克可產生 300.1 單位的還原糖，因此可知 T4M12-Csn 的催化能力約只有 WT-Csn 的 32.62%。

另外，我們也利用質譜儀來測定純化過後酵素的分子量。

如圖 3-6，我們可看到有一 m/z 為 28491 的質譜峰，預測較我們原先預定的重組蛋白質少了 MASPDDNF 胺基酸片段，推測是當 pH 值保持在 6~7 之間時，CBP V5 載體上的 linker 與 protease 切位會斷裂，可能帶走部分重組蛋白質的片段，且此測定所得到的質譜峰與理論值約有 2 amu 的誤差。

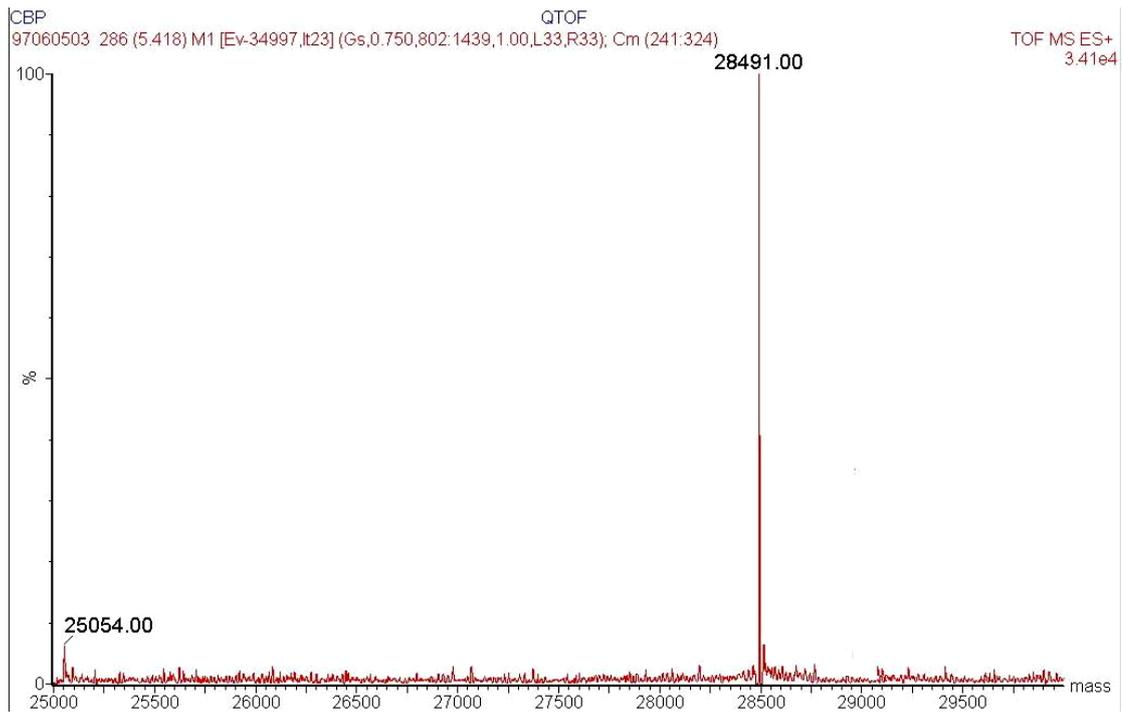


圖 3-6 T4M12-Csn 重組酵素以質譜儀測定分子量之結果

3-2 T4M12-Csn 酵素之相關性質研究

3-2-1 蛋白質與葡萄糖胺檢量線之測定

本研究使用 Bicinic Acid Assay (BCA) 方法，利用不同濃度的蛋白質標準品在 BCA 方法作用後在波長 562 nm 的吸收值作圖，即可得到一標準檢量線（如圖 3-7），之後便可利用此檢量線計算出蛋白質的濃度。

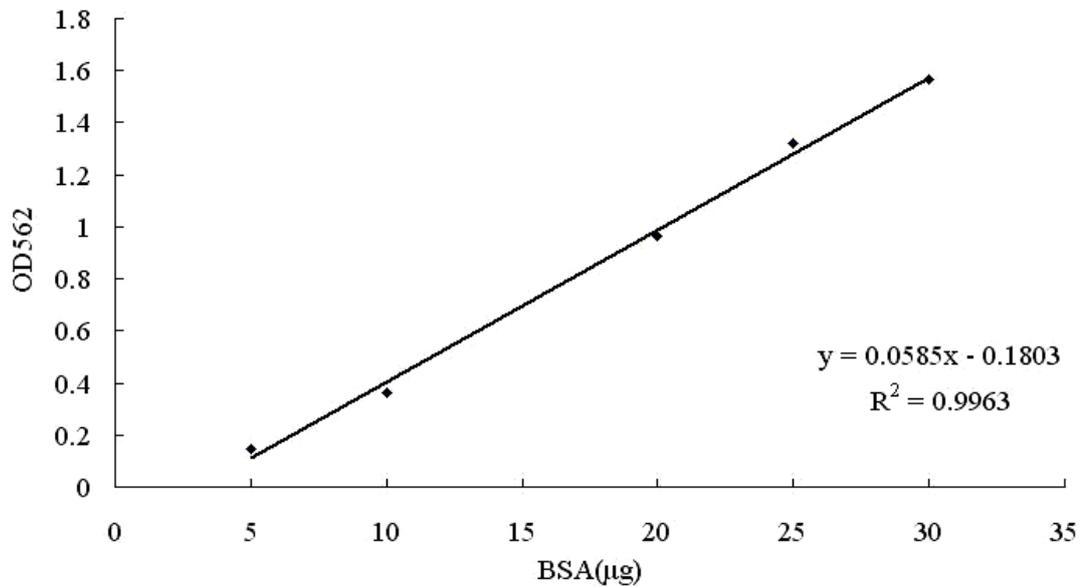


圖 3-7 蛋白質之標準檢量線

另外，為了定量酵素的催化活性，我們利用葡萄糖胺建立其標準檢量線，即可以此決定幾丁聚醣酵素水解幾丁聚醣所產生的還原醣量，而還原醣的測定以 DNS 方式測知（如圖 3-8）。

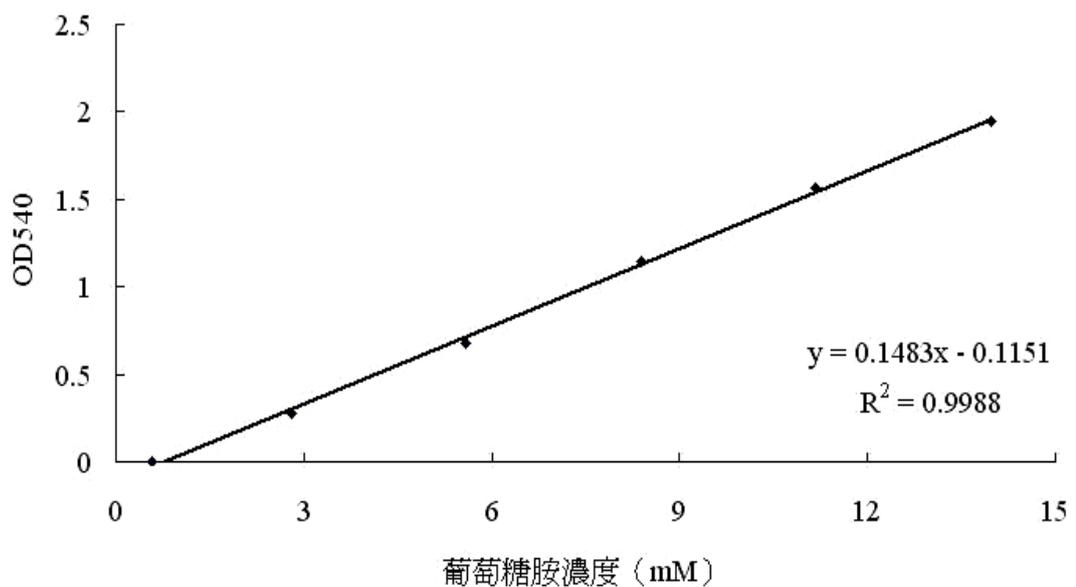


圖 3-8 葡萄糖胺之標準檢量線

3-2-2 以圓二色光譜儀判讀 T4M12-Csn 之二級結構

由於此重組酵素的純化程序與 WT-Csn 有顯著差異，所以猜測是為受到其結構改變之因素所影響，因此我們希望能透過圓二色光譜儀去檢視此重組酵素與 WT-Csn 在二級結構上的差異。

我們同時將 WT-Csn 及 T4M12-Csn 純化後的酵素稀釋到適當濃度，以 5 mM，pH 6.5 的磷酸緩衝溶液當做空白樣品進行量測，再經過公式 (1)、(2) 的換算即可得到以下圖表 (圖 3-9、圖 3-10)。

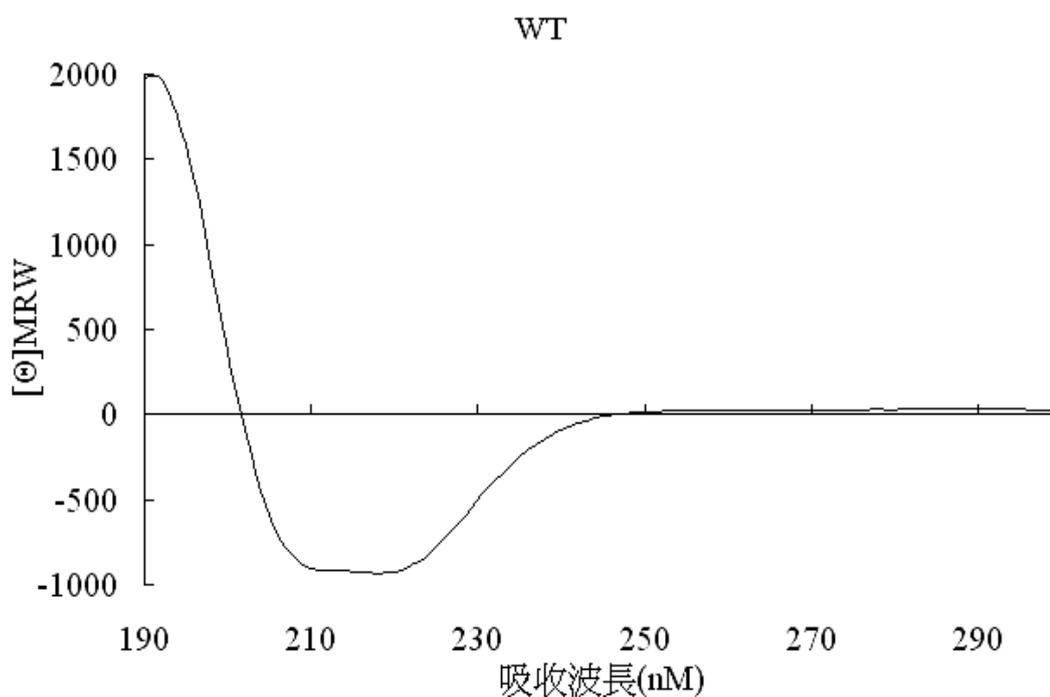


圖 3-9 WT-Csn 之圓二色光譜儀吸收光譜

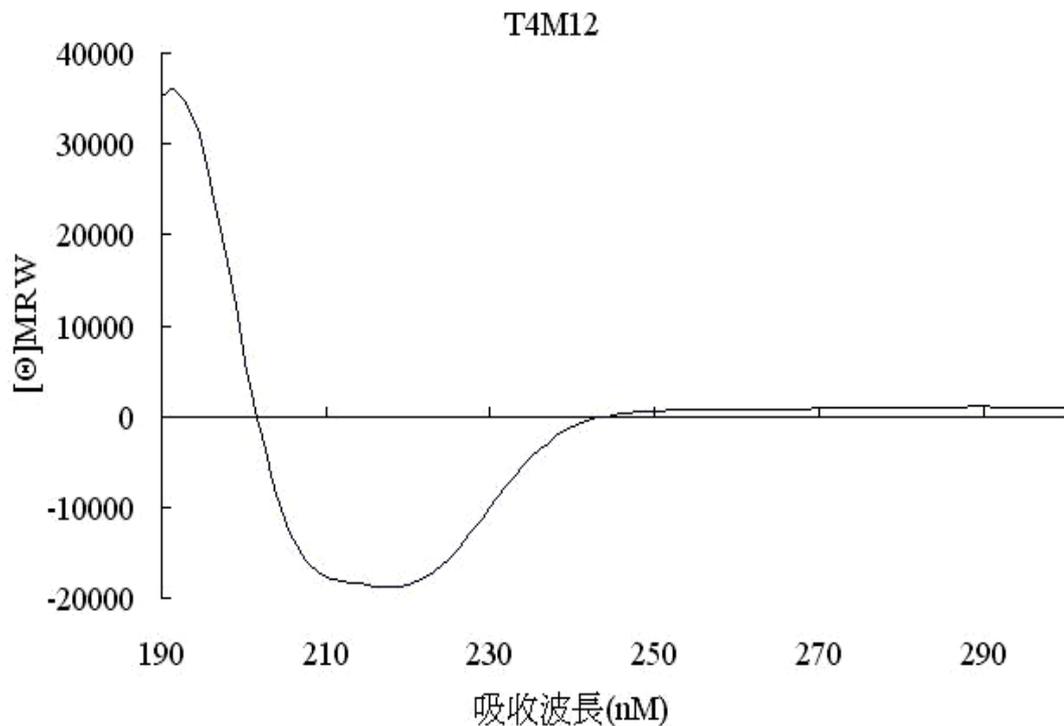


圖 3-10 T4M12-Csn 之圓二色光譜儀吸收光譜

透過以上圖表的對照，可看出 WT-Csn 和 T4M12-Csn 在二級結構上並沒有顯著差異，但圓二色光譜儀只能判讀出蛋白質二級結構中 α -helix 和 β -sheet 的數量，無法對其在結構的改變顯示出差異，因此我們僅能確定 T4M12-Csn 在二級結構上與 WT-Csn 無明顯改變。

3-2-3 溫度對酵素穩定度的影響

一般而言，溫度對酵素的反應活性有很大的影響力，為了瞭解溫度對 T4M12-Csn 的效應，我們取酵素與幾丁聚糖在 pH 6.5，28°C~80°C 間的條件下反應 1 小時，以 DNS 方式測還原糖的含量以決定其反應活性（如圖 3-11）。

我們定義酵素在各溫度下加熱 10 分鐘後與幾丁聚醣反應 1 小時後所測得的反應活性為 100%。

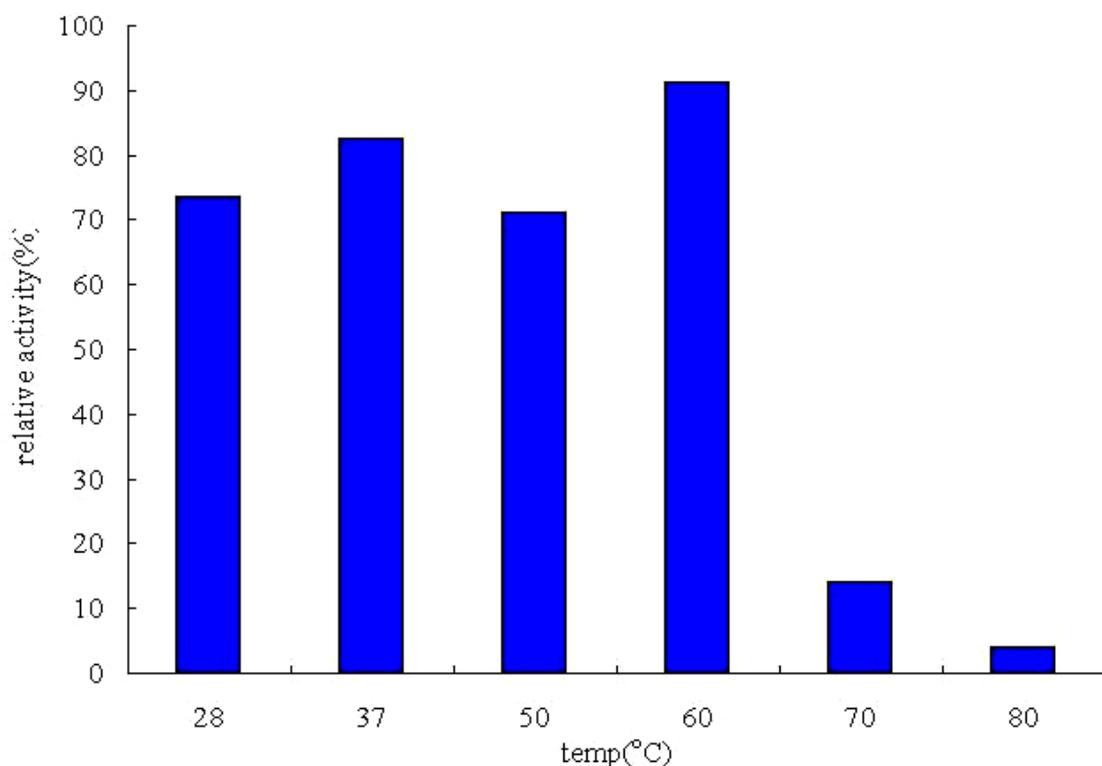


圖 3-11 T4M12-Csn 之最佳反應溫度測試

此酵素的最佳反應溫度出現在 60 °C，而 28 °C~60 °C 之間也有良好的反應性，推測是因為在高溫時，幾丁聚醣在水溶液中易轉換成可供反應的結構，在可供反應有效濃度增加的條件之下，反應活性亦隨之增加。當溫度升高至 70 °C 以上時，酵素便因為高溫而失活，所以活性驟減；而 WT-Csn 的最佳反應溫度出現在 50 °C，與此重組酵素的性質相近。

另外，T4M12-Csn 在 pH 6.5，20 mM 的磷酸緩衝溶液中，28 °C~80 °C 之間的活性穩定度結果如圖 3-12。

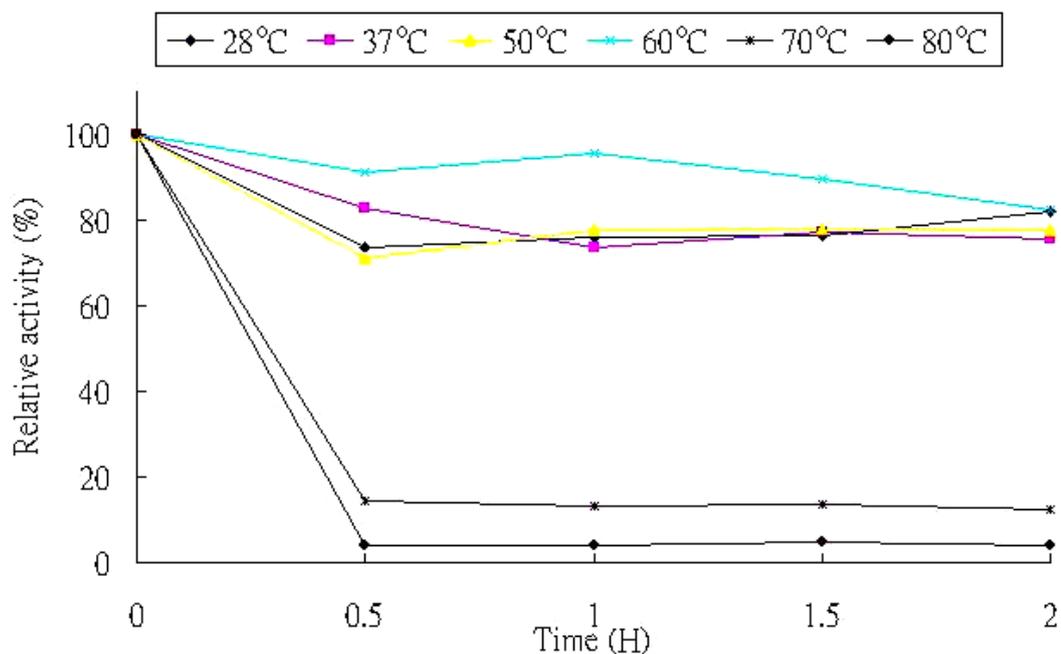


圖 3-12 T4M12-Csn 對溫度的穩定度

當溫度在 50°C 以下時所取樣的酵素活性並沒有明顯變化，表示酵素保存在此區間溫度之下具有良好的穩定性，但溫度超過 70°C 後，酵素的活性隨即下降許多，無法再保持其活性。

3-2-4 pH 值對酵素穩定度之影響

由於幾丁聚糖的溶解度在 pH 8.0 以上便會驟降，無法確定有效的反應濃度，所以我們選擇在 pH 4.0~pH 7.0 之間測試其對酵素活性的影響。

同樣地，我們取酵素與幾丁聚糖在 37°C，pH 4.0~pH 7.0 的條件下反應 1 小時，以 DNS 方式測還原糖的含量以決定其反應活性（如圖 3-13）。

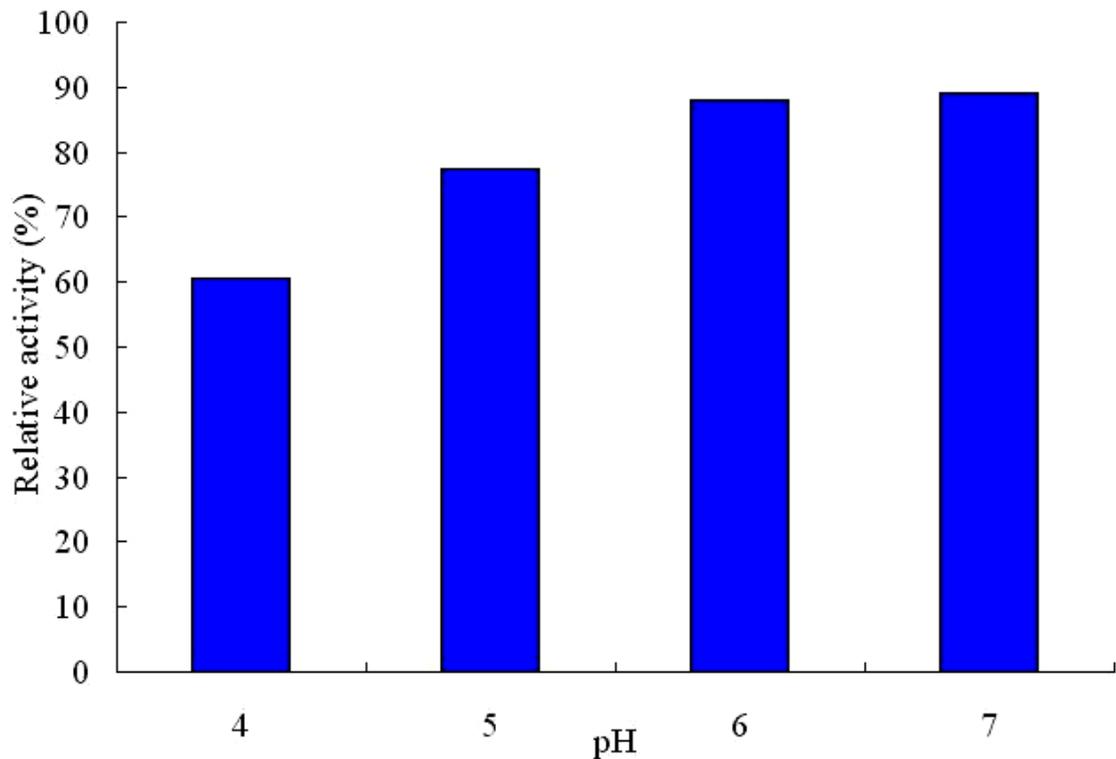


圖 3-13 T4M12-Csn 對 pH 值的反應活性測試

由上圖可看出，雖然幾丁聚醣在酸性環境下的溶解度較高，使得其有效反應濃度也提高，但是酵素在中性環境中較為穩定，所以在 pH 6~7 之間的反應活性仍優於酸性環境。

另外，T4M12-Csn 在 37°C，pH 4.0~pH 7.0 環境下的活性穩定度結果如圖 3-14。

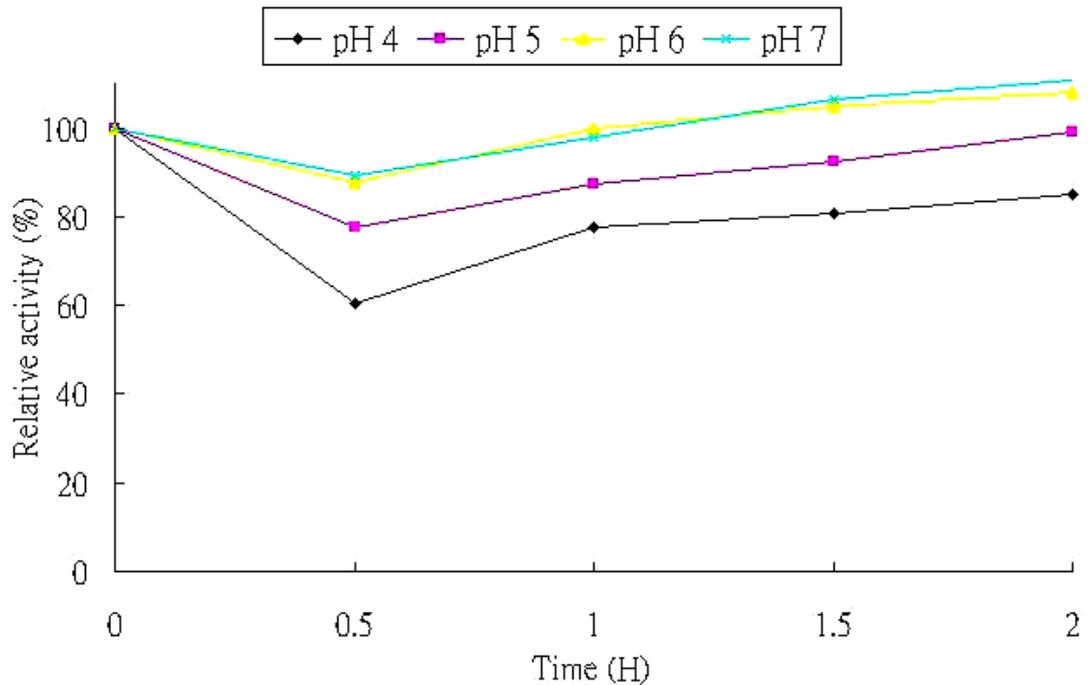


圖 3-14 T4M12-Csn 對 pH 值的活性穩定度

由上圖可知，隨著反應時間加長，在 pH 4.0~pH 7.0 之間酵素反應性皆隨之提高，表示此酵素即使在酸性環境中，亦能保留良好活性，但仍以在 pH 6.0 的條件下的反應活性最為穩定。

3-2-5 T4M12-Csn 水解產物之質譜分析

為了瞭解此重組酵素水解後的產物是否能符合當初設計所預期，因此，我們利用幾丁五醣與幾丁六醣的標準品與酵素反應 overnight，使用質譜儀來偵測反應結束後的水解產物（如圖 3-15，3-16），同時將其產物與 WT-Csn 的水解產物（如圖 3-17）做比較。

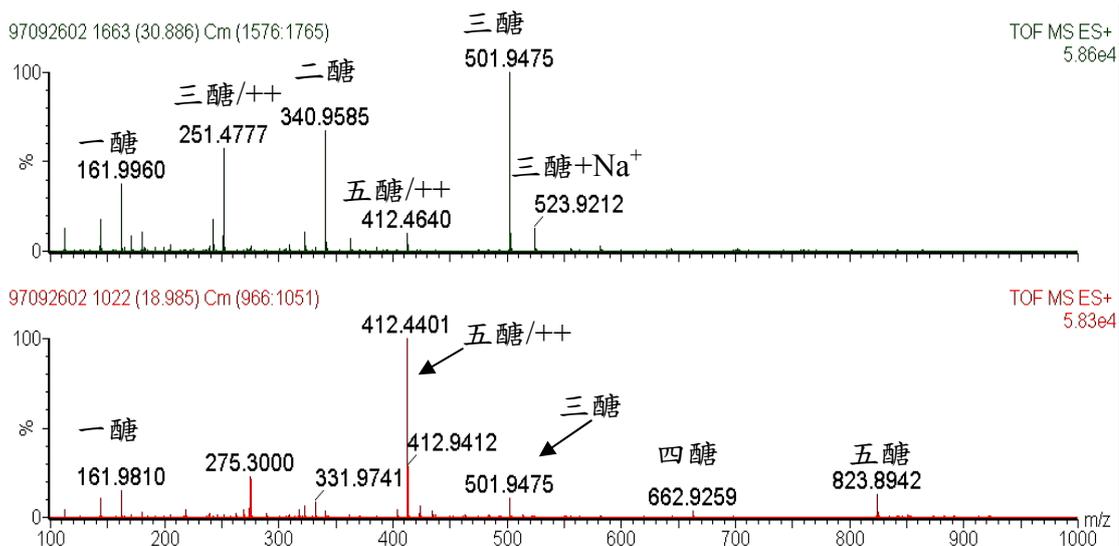


圖 3-15 T4M12-Csn 對幾丁五糖之水解產物（上圖為最終反應產物，下圖為幾丁五糖標準品）

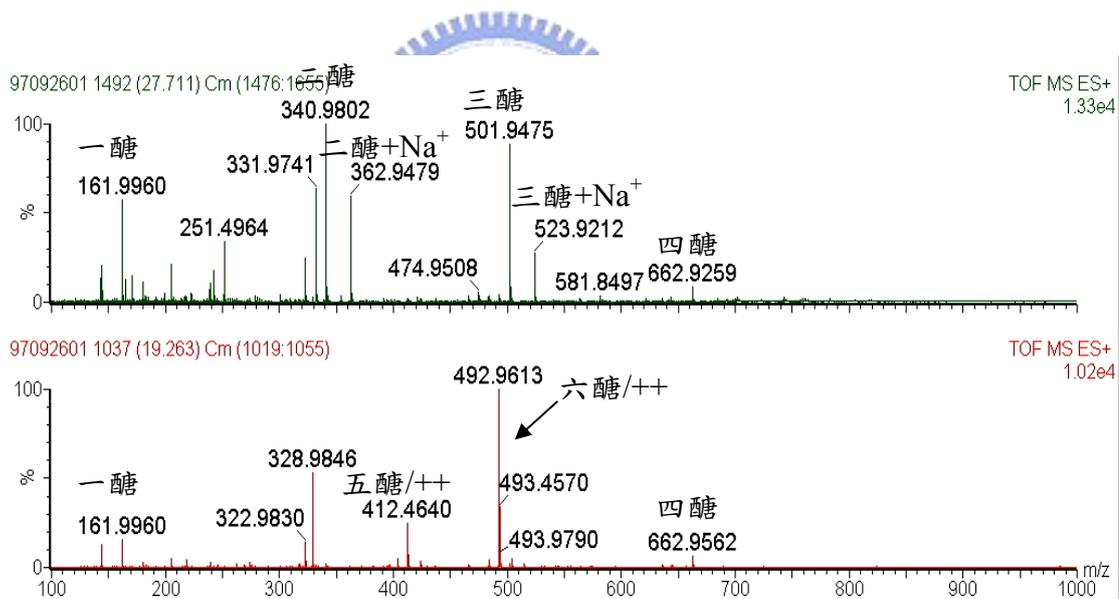


圖 3-16 T4M12-Csn 對幾丁六糖之水解產物（上圖為最終反應產物，下圖為幾丁六糖標準品）

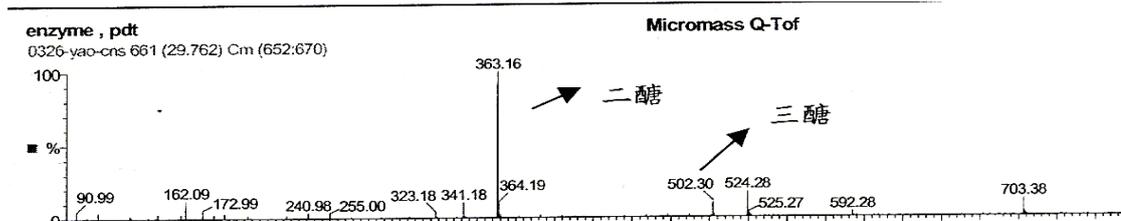


圖 3-17 WT-Csn 對幾丁聚醣的水解產物

由圖 3-15 及圖 3-16 可看出，T4M12-Csn 將幾丁五醣與幾丁六醣水解後皆產生以一醣、二醣、三醣為主的混合物；在與幾丁五醣作用後，以三醣為主要產物；而與幾丁六醣作用後，以二醣、三醣為主要產物；而在反應初期時，酵素不管是與幾丁五醣或幾丁六醣反應，皆會先出現三醣與二醣，隨著反應時間拉長才陸續出現一醣，表示此重組酵素雖然經過突變後使其結構有些許不同，但可能仍為內切型幾丁聚醣水解酵素，水解產物也較 WT-Csn 的水解產物以幾丁二醣、幾丁三醣為主要有所不同。

此重組酵素的水解作用雖然與我們所預期以幾丁四醣為主要產物不符合，但其對受質的選擇性較 WT-Csn 有彈性，而對於可得幾丁四醣為主要水解產物的水解酵素改造仍有待進一步的研究。

第四章 結論

1. 本研究利用結構模擬，成功地在 *Bacillus circulans* MH-K1 幾丁聚醣水解酵素的 T¹⁸⁵ 後以 AQPPKPS 胺基酸片段取代掉原本的 FYN 片段，且將基因移至 CBP V5 載體上，並在大腸桿菌 JM109 宿主細胞中表現。
2. 此重組酵素在大腸桿菌中表現出來的蛋白質為胞內酵素，同時具有水解幾丁聚醣活性。利用 HiTrap SP 與 HiTrap Q 離子交換樹脂管柱在 pH 6.5 下先行層析，再利用 β -膠狀幾丁質做進一步的純化，最後可得到均質度約 90% 的重組幾丁聚醣酵素，其分子量約 28.5KDa，其活性約為野生株的 33%。
3. 此酵素的純化程序與野生株有明顯差異，因此欲透過圓二色光譜儀檢測其二級結構，雖然在結果上兩者的二級結構相似，但推測可能在三級結構上和表面電荷造成改變故影響其純化程序上的差別。
4. 以溫度對酵素的活性穩定度測試結果而言，此重組酵素與野生株性質相似，皆在 50°C~60°C 之間擁有最佳反應溫度，足見此人為之變種酵素並未造成結構的影響。
5. 以 pH 值對酵素的活性穩定度測試結果而言，此重組酵素在酸性環境下仍能保持活性，但以在 pH 6~7 之間最適合其反應。
6. 此重組酵素最終的水解產物是以幾丁三醣、幾丁二醣、幾丁一醣皆

有的混合物，與野生株以幾丁二醣、幾丁三醣為最終產物有所不同，
表示經過突變已局部改變其反應型態。



第五章 未來發展與改進方向

由於本實驗室之前已成功地將 *Bacillus circulans* MH-K1 幾丁聚醣水解酵素野生株經過蛋白質工程轉化成為外切型水解酵素，並以幾丁二醣為主要產物，表示此方式是可以被達成的【32】。

在本研究中，可能在結構模擬上考慮的因素尚不周詳，所以醣類與酵素的結合仍有多種可能，未來若要接續結構模擬方向的研究，可循文獻【32】的設計，除了在活化中心後方設計胺基酸片段擋住外，亦需設置雙硫鍵擋住活化中心的側向開口，如此才能確定醣類與酵素結合的位向與其所需的空間大小。

如能透過蛋白質工程成功地將幾丁聚醣水解酵素轉化成為以生產幾丁四醣為主要產物的外切型水解酵素，在寡醣類的應用上便能省去純化之繁瑣步驟。

第六章 參考文獻

1. Jeon, Y.-J., F. Shahidi, and S.-K. Kim, *Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods*. Food Reviews International, 2000. **16**(2): p. 159-176.
2. Allan, G.G., J.R. Fox, and N. Kong. *Chitin and Chitosan, Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan*. in MIT Sea Grant Program, Cambridge, Mass. 1979.
3. Rhoades, J. and S. Roller, *Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**: p. 80-86.
4. Vodna, L., S. Bubeníková, and D.a. Bakos, *Chitosan Based Hydrogel Microspheres as Drug Carriers*. Macromolecular Bioscience, 2007. **7**: p. 629-634.
5. Soto-Gil, R.W. and J.W. Zyskind, *Chitin, chitosan, and related enzymes*, ed. J.P. Zikakis. 1984: Academic Press Orlando, FL.
6. Suzuki, K., et al., *Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose*. Carbohydrate research, 1986. **151**: p. 403-408.
7. Zhang, H., et al., *Preparation of Chitooligosaccharides from Chitosan by a Complex Enzyme*. Carbohydrate research, 1999. **320**: p. 257-260.
8. Se-Jae, K., et al., *Effects of Chitooligosaccharides on Liver Function in the Mouse*. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL., 1998. **30**(3): p. 693-696.
9. Bong-Kyu, C., et al., *In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans* International Journal

- of Antimicrobial Agents, 2001. **18**(6): p. 553-557.
10. O. Felt, P. Buri, and R. Gurny, *Chitosan : A unique polysaccharide for drug delivery*. Drug development and industrial pharmacy, 1998. **24**: p. 979-993.
11. Tokumitsu, H., et al., *Preparation of Gadopentetic Acid-Loaded Chitosan Microparticles for Gadolinium Neutron-Capture Therapy of Cancer by a Novel Emulsion-Droplet Coalescence Technique*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1999. **47**: p. 838-842.
12. Ruel-Gariepy, E., et al., *Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules*. Journal of Controlled Release, 2002. **82**: p. 373-383.
13. Jing, S.B., et al., *Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure*. . Journal of Pharm Pharmacol, 1997. **49**: p. 721-723.
14. Wei-Min, H., et al., *Sustained release of indomethacin from chitosan granules*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1985. **33**: p. 3986-3992.
15. Weiner, A.L., et al., *Liposome-collagen gel matrix: a novel sustained drug delivery system*. Journal of pharmaceutical sciences, 1985. **74**: p. 922-925.
16. Illum, L., *Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient* Pharm. Pharmaceutical Research, 1998. **15**: p. 1326-1331.
17. Ritthidej, G.C., et al., *Chitin and chitosan as disintegrants in paracetamol tablets*. Drug development and industrial pharmacy, 1994. **20**: p. 2109-2134.
18. Mohamed, M.I., K.-H. Magnus, and A. Per, *Chitosan and the mucosal*

- delivery of biotechnology drugs* Drug Discovery Today: Technologies, 2005. **2**(1): p. 1-6.
19. Shalaby, S.W. and J.L.B. Karen, *Absorbable and Biodegradable Polymers*. 2003: CRC Press LLC. 81-83.
20. Hirano, S., et al., *Chitin, Chitosan, and Related Enzyme*. Several novel attempts for the use of the potential functions of chitin and chitosan., ed. J.P. Zikakis. 1984: Academic Press Inc. London. 77-95.
21. Grenier, J., N. Benhamou, and A. Aaaelin, *Colloidal gold-complexed chitosanase : a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi*. Journal of general microbiology 1991. **137**: p. 2007-2015.
22. Shimosaka, M., et al., *Chitosanase from the plant pathogenic fungus, Fusarium solani f. sp. phaseoli : purification and some properties*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1993. **57**: p. 231-235.
23. Alfonso, C., M.J. Martinez, and F. Reyes, *Purification and properties of two endochitosanases from Mucor rouxii implicated in its cell wall degradation*. FEMS microbiology letters 1992. **95**: p. 187-194.
24. Robbins, P.W., C. Albaright, and B. Benfield, *Cloning and expression of a Streptomyces plicatus chitinase (chitinase-63) in Escherichia coli*. The Journal of biological chemistry 1988. **263**: p. 443-447.
25. Nanjo, F., R. Katsumi, and K. Sakai, *Purification and characterization of an exo- beta -D-glucosaminidase, a novel type of enzyme, from Nocardia orientalis* . Journal of Biological Chemistry 1990. **265**: p. 10088-10094.
26. Matsumura, S., E. Yao, and K. Toshima, *One-step preparation of alkyl beta-d-glucosaminide by the transglycosylation of chitosan and alcohol using purified exo-beta-d-glucosaminidase*. Biotechnology Letters, 1999.

- 21:** p. 451-456.
27. Davies, G.J., K.S. Wilson, and B. Henrissat, *Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases*. *The Biochemical Journal* 1997. **132:** p. 557-559.
28. Fukamizo, T., *Chitinolytic Enzymes Catalysis, Substrate Binding, and their Application* Current Protein and Peptide Science, 2000. **1:** p. 105-124.
29. Adachi, W., et al., *Crystal Structure of Family GH-8 Chitosanase with Subclass II Specificity from Bacillus sp. K17*. *Journal of Molecular Biology*, 2004. **343(2):** p. 785-795.
30. Fukamizo, T., et al., *Bacillus circulans MH-K1 Chitosanase: Amino Acid Residues Responsible for Substrate Binding* *The Journal of Biochemistry*, 2005. **138(5):** p. 563-569.
31. 姚月雲, 以巨型桿菌及大腸桿菌系統表現幾丁聚醣酵素及其化學修飾後的催化性質之研究, in 應用化學研究所. 1992, 國立交通大學.
32. Yao, Y.-Y., et al., *Structural simulation and protein engineering to convert an endo-chitosanase to an exo-chitosanase*. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2008. **21:** p. 561-566.
33. Hashimoto, M., et al., *Expression and Characterization of the Chitin-Binding Domain of Chitinase A1 from Bacillus circulans WL-12* *Journal of Bacteriology*, 2000. **182:** p. 3045-3054.
34. Suetake, T., et al., *Chitin-binding Proteins in Invertebrates and Plants Comprise a Common Chitin-binding Structural Motif*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275(24):** p. 17929-17932.
35. Watanabe, T., et al., *Aromatic residues within the substrate-binding*

cleft of Bacillus circulans chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. Biochemical Journal, 2003. 376: p. 237-244.

36. 范家瑛, 幾丁質結合蛋白的應用, in 應用科技學程. 2008, 國立交通大學.

37. 張筑涵, 突變研究與探討煙麴菌幾丁聚醣酵素之催化必要殘基, in 應用化學研究所. 2004, 國立交通大學.



附錄一 定點突變定序結果

CNS_5-4 GCTTCTCCTGACGACAATTTCTCCCCAGAAACCTGCAATTTCTTCGCAATAATACGGGG
CNS_T4_M12 GCTTCTCCTGACGACAATTTCTCCCCAGAAACCTGCAATTTCTTCGCAATAATACGGGG

CNS_5-4 CTCGATGGCGAGCAGTGGAACAACATCATGAAGCTCATCAATAAACCGGAGCAGGATGAT
CNS_T4_M12 CTCGATGGCGAGCAGTGGAACAACATCATGAAGCTCATCAATAAACCGGAGCAGGATGAT

CNS_5-4 TTGAACTGGATCAAATACTACGGGTATTGTGAAGACATTGAAGATGAGCGCGGGTATACG
CNS_T4_M12 TTGAACTGGATCAAATACTACGGGTATTGTGAAGACATTGAAGATGAGCGCGGGTATACG

CNS_5-4 ATCGGTCTTTTCGGTGCTACTACAGGCGGCTCCAGAGATACCCATCCCGATGGCCCGGAC
CNS_T4_M12 ATCGGTCTTTTCGGTGCTACTACAGGCGGCTCCAGAGATACCCATCCCGATGGCCCGGAC

CNS_5-4 CTCTCAAAGCCTATGACGCCGCAAAGGAGCCAGCAACCCGTCGGCTGATGGCGCATTG
CNS_T4_M12 CTCTCAAAGCCTATGACGCCGCAAAGGAGCCAGCAACCCGTCGGCTGATGGCGCATTG

CNS_5-4 AAGGCCTTGGCATTAAACGGAAAAATGAAAGGCTCGATTCTGGAAATTAAGGATAGCGAA
CNS_T4_M12 AAGGCCTTGGCATTAAACGGAAAAATGAAAGGCTCGATTCTGGAAATTAAGGATAGCGAA

CNS_5-4 AAGGTGTTCTGCGGCAAGATTA AAAAGCTTCAAACGATGCGGCTTGGAGAAAAGCGATG
CNS_T4_M12 AAGGTGTTCTGCGGCAAGATTA AAAAGCTTCAAACGATGCGGCTTGGAGAAAAGCGATG

CNS_5-4 TGGGAAACAGCGCAGCCGCCGAAACCGTCCGTGTATATCCGGTACAGCGTCGAACAAGCG
CNS_T4_M12 TGGGAAACAGCGCAGCCGCCGAAACCGTCCGTGTATATCCGGTACAGCGTCGAACAAGCG

CNS_5-4 CG CCAGCGCGGTTTTACCAGCGCGGTGACGATCGGATCGTTTGTGCGATACGGCGCTGAAT

CNS_T4_M12 CGCCAGCGCGGTTTTACCAGCGCGGTGACGATCGGATCGTTTGTGCGATACGGCGCTGAAT

CNS_5-4 CAAGGCGCTACCGGCGGCTCAGATACGCTTCAAGGCTTGCTAGCCCGTTCTGGCAGCAGC

CNS_T4_M12 CAAGGCGCTACCGGCGGCTCAGATACGCTTCAAGGCTTGCTAGCCCGTTCTGGCAGCAGC

CNS_5-4 TCGAACGAGAAAACCTTTATGAAGAATTTCCATGCCAAACGTACCTTGGTTGTGGATACC

CNS_T4_M12 TCGAACGAGAAAACCTTTATGAAGAATTTCCATGCCAAACGTACCTTGGTTGTGGATACC

CNS_5-4 AACAAATACAACAAGCCACCTAACGGTAAAAACCGTGAAAAACAATGGGACACTCTCGTG

CNS_T4_M12 AACAAATACAACAAGCCACCTAACGGTAAAAACCGTGAAAAACAATGGGACACTCTCGTG

CNS_5-4 GACATGGGGAAAATGAATCTGAAGAACGTCGATTCCGAGATTGCTCAAGTCACGGACTGG

CNS_T4_M12 GACATGGGGAAAATGAATCTGAAGAACGTCGATTCCGAGATTGCTCAAGTCACGGACTGG

CNS_5-4 GAAATGAAGTAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC

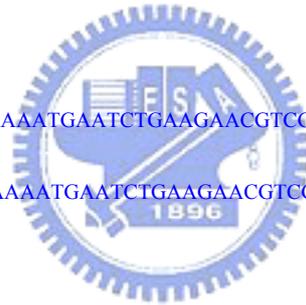
CNS_T4_M12 GAAATGAAGTAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC

CNS_5-4 CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG

CNS_T4_M12 CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG

CNS_5-4 GCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGCTGAAAGGAGGACTATATCCGGAT-GGCGAT

CNS_T4_M12 GCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGCTGAAAGGAGGACTATATCCGGATTGGCGAA



*標示紅字為欲突變之序列