

第一章 緒論

1-1 半纖維素水解酵素群

自然界中，碳的循環可說是十分重要的生命現象，據估計，每年經由光合作用約可製造 1.5×10^{11} 公噸的植物生物量 (biomass)，這也是地球上最豐富的可再生利用資源。木質纖維素 (lignocellulose) 為植物細胞壁之主要成分，植物細胞壁主要是由纖維素 (cellulose)、木質素 (lignins) 以及半纖維素 (hemicellulose) 所組成，其中纖維素是由葡萄糖分子以 β -1,4 鍵結而成的纖維狀多醣；木質素則是一複雜的多酚類結構，而半纖維素是泛指許多非纖維素的多醣類，最主要的是木聚醣 (xylan)。因此，對於植物生物量的再生與利用，纖維素水解酵素群與半纖維素水解酵素群，絕對是非常重要的兩大生物轉化酵素系統。如何能應用低污染性的生物技術，有效地將富含於木材及農產廢棄物中的纖維素及半纖維素等多醣分解、轉換成利用價值較高的單醣，或是再經過發酵生成酒精、乙烯等來作為能量的來源是很值得去探討的。

半纖維素含量在自然界中是僅次於纖維素的多醣，大多存在於纖維素或木質素 (lignin) 的表面，為了得到木材纖維⁽¹⁾，在傳統上，以漂白木材的方法來取得，此方法利用劇毒的化學試劑例如：氯或次氯酸，將木質素或這些多醣類去除⁽²⁾，但這種方法不僅造成環境的污染，更造成資源的浪費，因為木聚醣經分解後，可當成食物或燃料的來源，這種可再利用的資源，不應該在木材處理過程中或農產品製造過程中，被當成廢棄物流失，因此如何將木聚醣利用低污染的技術分解成單醣再加以利用，是現今大量處理農產林木所必須的。此外在油氣資源有限的情形下，石油及天然氣將會供不應求，因此以農作物、樹木等有機質為主的有機能源占地球總能源的比例將顯著提高。

木聚寡糖 (xylooligosaccharide) 是由 2~10 個木糖以 β -1,4 糖苷鍵結合而成的低聚糖，一般是以富含木聚糖的植物（如玉米芯、蔗渣和麩皮等）為原料，通過木聚糖水解酶作用後分離精製而得，木聚寡糖的甜味與砂糖類似，甜度是砂糖的 40~60% 左右，因人體無法分解利用食用時不能產生熱量，對於因罹患某些疾病（例如糖尿病）而需控制糖分的病人，以及過度肥胖的民眾是一項福音。

完整分解半纖維素以及纖維素的過程需要有許多酶的參與，由於半纖維素所含的化合物成分不同，分解它的半纖維素酶也各不同，由此給予相應的名稱，如由木糖聚合成的木聚糖類半纖維素，水解它的酶則稱木聚糖酶 (xylanase)，其產物為木糖；由阿拉伯糖 (arabinan) 聚合成的半纖維素，水解它的酶則稱阿拉伯糖酶 (arabinase)，其產物為阿拉伯糖。

想要分解木聚糖，首先必須了解木聚糖的結構，木聚糖是一種異質性多糖 (heteropolysaccharides)，主鏈是由木糖單糖以 β -1,4 鍵所連接，除此之外，在單元糖上的 C-2、C-3 位置常被不同的取代基所取代，例如甲基葡糖醛酸 (methylglucuronic acid)、阿拉伯呋喃糖 (arabinofuranose)、阿魏酸 (ferulic)、香豆酸 (p-coumaric)、葡糖醛酸 (glucuronic acid) 及醋酸 (acetic acid)，形成許多不同的支鏈。單一由木糖單糖所構成的木聚糖在自然界中並不多見，但曾經在某些植物中被發現過，例如：esparto grass⁽³⁾、以及 tobacco stalks⁽⁴⁾。

木聚糖依其來源的不同，而有不同成分的組成，由硬木材 (hardwood) 所得的木聚糖是一種 *o*-acetyl-4-*o*-methylglucuronoxylan，如圖 1-1 所示，它是由 150~200 個單元糖組成一長鏈，平均每十個單元糖基上有一個甲基葡糖醛酸 (methylglucuronic acid) 的取代，這種木聚糖具有高度的乙酰化 (acetylation)，其位置通常發生在單元糖上第三個碳上，也因為具有高度乙酰化的影響，所以對水的溶解度不是很好。

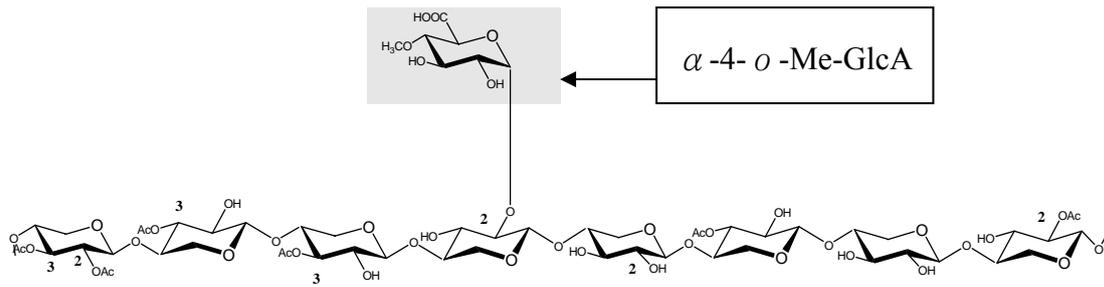


圖 1-1、*o*-acetyl-4-*o*-methylglucuronoxylan (hardwood xylan)的組成。

阿拉伯數字表示取代基在單元糖上所取代的位置。

α -4-*o*-Me-GlcA： α -4-*o*-methylglucuronic acid

Ac：Acetyl group；

此外軟木 (softwood) 的木聚糖是一種 arabino-4-*o*-methylglucuronoxylans，如圖 1-2 所示。比起硬木，軟木的木聚糖中含有較多的甲基葡萄糖酸 (4-*o*-methylglucuronic acid)，主鏈上的取代基沒有乙醯基 (acetyl group)，取而代之的是阿拉伯呋喃糖 (*L*-arabinofuranose)，就軟木整體而言，木糖單糖：甲基葡萄糖酸：阿拉伯呋喃糖的比例約是 100：20：13，其鏈長比硬木木聚糖短，平均為 70~130 DP (degree of polymerization)。

為了要分解此種複雜的聚合物，就必需要有一個完全的水解系統。通常能水解木聚糖的腐生性微生物包括真菌及細菌等，隨著誘導源的差異，這些微生物會分泌不同功能的水解酵素，用以分解主鏈，例如內木聚糖酵素 (endoxylanase；EC 3.2.1.8) 及木糖苷酵素 (β -xylosidase；EC 3.2.1.37)；在分解支鏈上，則有例如乙醯木聚酯皂化酵素 (acetylxylan esterase；EC 3.1.1.72)、阿拉伯呋喃糖苷酵素 (α -*L*-arabinofuranosidase；EC 3.2.1.55)，及葡萄糖醛酸酵素 (glucuronidase) (見圖 1-3)^(5、6)。其中內木聚糖酵素是切斷單元糖間的 β -1,4 糖苷鍵，以形成寡糖或雙糖，而木糖苷酵素再進一步地將寡糖或雙糖分解成單元糖，表 1 列出水解木聚糖的相

關酵素及其作用的模式。

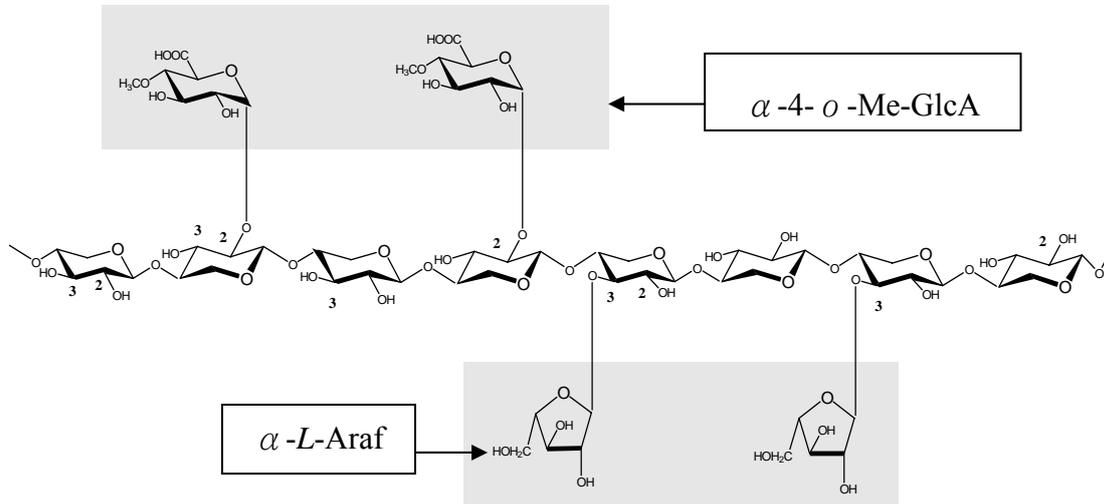


圖 1-2、arabino-4-*o*-methylglucuronoxylan (softwood xylan)的組成。

阿拉伯數字表示取代基在單元糖上所取代的位置。

α -4-*O*-Me-GlcA : α -4-*O*-methylglucuronic acid ;

α -Araf : α -*L*-arabinofuranoside

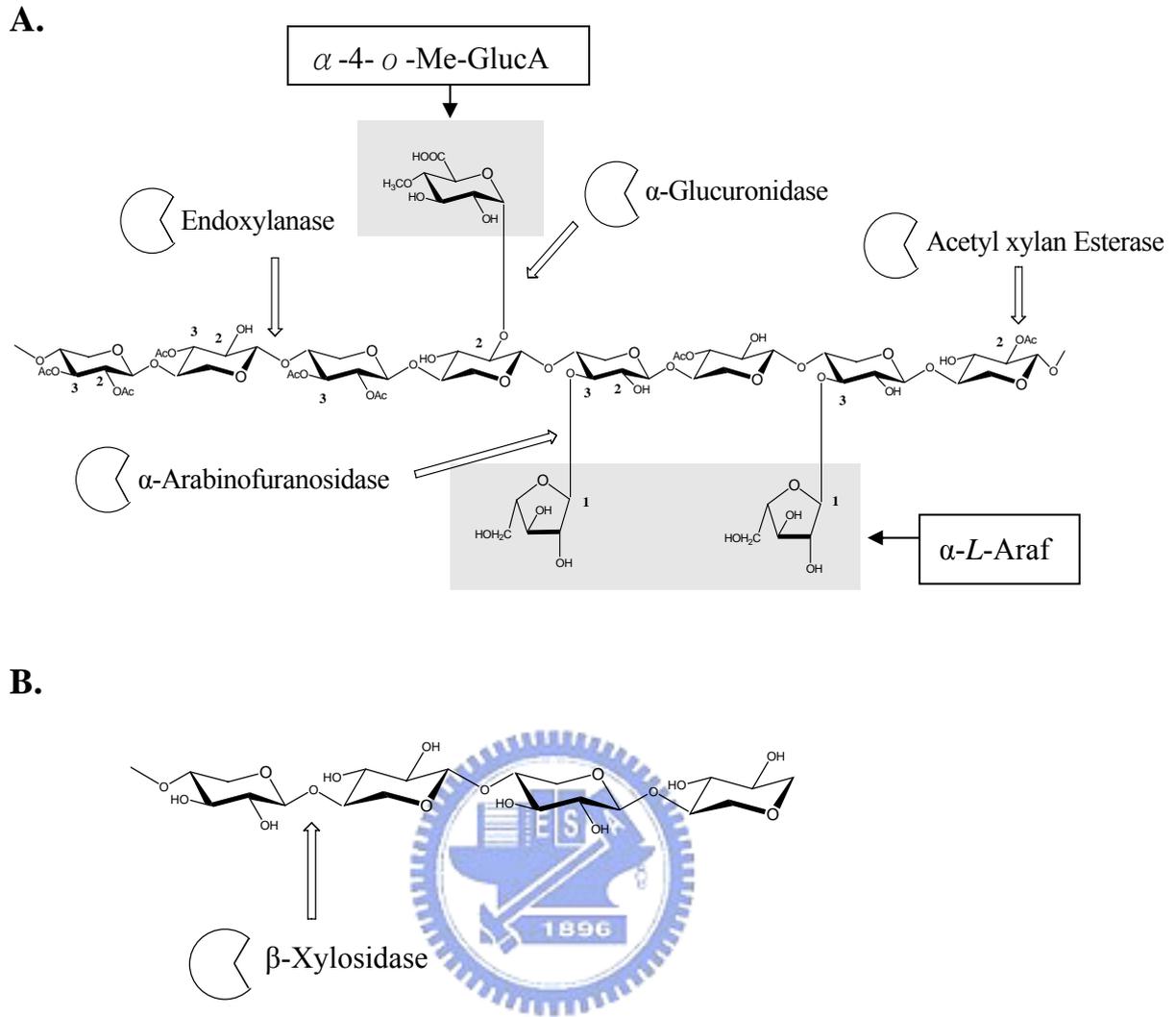


圖 1-3、(A)木聚醣水解酵素群，Ac： Acetyl group；

α -4-*o*-Me-GlcA： α -4-*o*-methylglucuronic acid；

α -Araf： α -L-arabinofuranoside

(B)水解木聚寡糖的木糖苷酵素。

表 1、與異質性木聚糖水解相關之酵素

酵素	作用方式
Endo-xylanase	Hydrolyzes mainly interior β -1,4-xylose linkages of the xylan backbone
Exo-xylanase	Hydrolyzes β -1,4-xylose linkages releasing xylobiose
β -Xylosidase	Releases xylose from xylobiose and short chain xylooligosaccharides
α -Arabinofuranosidase	Hydrolyzes terminal nonreducing α -arabinofuranose from arabinoxylans
α -Glucuronidase	Releases glucuronic acid from glucuronoxylans
Acetylxylan esterase	Hydrolyzes acetyléster bonds in acetyl xylans
Ferulic acid esterase	Hydrolyzes feruloyléster bonds in xylans
p-Coumaric acid esterase	Hydrolyzes p-coumaryl ester bonds in xylans



1-2 阿拉伯呋喃糖苷酵素(α -L-arabinofuranosidase)

阿拉伯呋喃糖苷酵素 (α -L-arabinofuranosidase ; EC 3.2.1.55) 是一種外切型 (exo) 酵素，可以水解含阿拉伯糖多醣類的非還原端殘基，該酵素能水解阿拉伯聚糖 (arabinan) 內的 α -1,3、 α -1,5 糖苷鍵結 (見圖 1-4)。

Arabinan

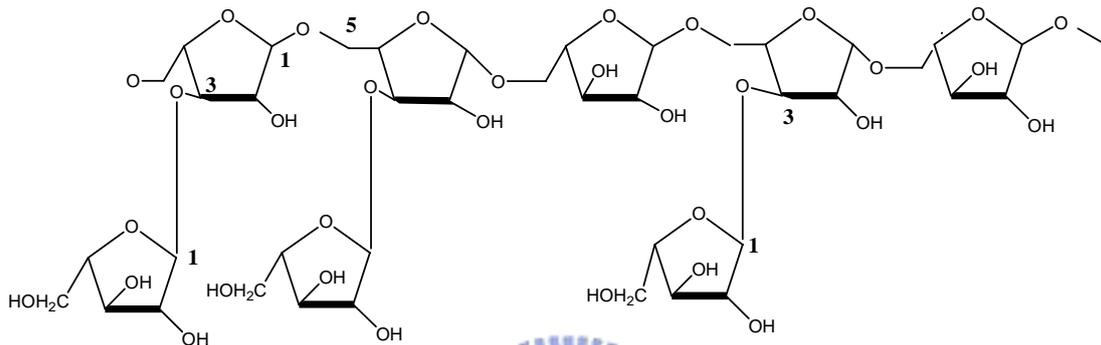


圖 1-4、阿拉伯聚醣主要結構

某些阿拉伯呋喃糖苷酵素亦具有水解阿拉伯木聚醣的功能⁽⁷⁾，除此之外還有一種酵素能夠以內切 (endo) 的方式水解阿拉伯聚醣，稱之為 endo-1,5- α -L-arabinase (1,5- α -L-arabinan 1,5- α -L-arabinohydrolase ; (EC 3.2.1.99)。根據胺基酸序列的相似度，目前阿拉伯呋喃糖苷酵素已被分類成四個家族 (家族 43、51、54 和 62)⁽⁸⁾，其中家族 51 和 54 對於含有阿拉伯糖的多醣類具有不同受質的專一性，以構型保留 (retention of the anomeric configuration) 之方式水解糖苷鍵。而家族 43 則以反轉機制 (inversion mechanism) 的方式水解糖苷鍵，然而家族 62 的催化方式尚未被確認。Beldman⁽⁹⁾ 等人根據受質的專一性總結 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 分類：(1) ABF 對聚合物沒有活性，(2) ABF 對聚合物有活性，(3) Arabinofuranohydrolase 對阿拉伯木聚醣非常專一。

1-3 阿拉伯呋喃糖苷酵素反應機制的研究

Glycosidic bond 是自然界中最穩定的鍵結，其半生期超過 5 百萬年，但有醣水解酵素存在下可以增加超過 10^{17} 倍的分解速度⁽¹⁰⁾，這是現在人們所知最有效率的催化劑之一。

水解 Glycosidic bond 通常有兩種主要的方式⁽¹⁰⁾，一是構型保留機制 (retention of the anomeric configuration)，另一是反轉機制 (inversion of the anomeric configuration)。在醣類水解酵素家族中，不論是在何種機制下水解的過程通常都需要兩個羧基。反轉機制為單取代機制 (single displacement mechanism)，只利用一個當作 general base 的羧基對水進行去質子化 (deprotonation)，讓水從反方向去進行對醣異位性中心 (anomeric center) 作親核性攻擊之水解，而另一個羧基當作 general acid / base，藉由質子化 (protonation) 催化離去基。而構型保留機制水解 glycosidic bond 經由兩步驟的雙取代機制 (two-step double-displacement) 以圖 1-5 表示之；反應的第一個步驟 glycosylation 酸-鹼側鏈 (residue) 當作 general acid 質子化醣分子上的氧原子並穩定離去基，親核性的側鏈攻擊異位性中心，生成共價鍵產生一與原本受質相反異位性中心的醣-酵素中間產物 (glycosyl-enzyme intermediate)，第二步驟 deglycosylation 酸-鹼側鏈再當作 general base，活化水分子使之攻擊醣-酵素中間產物的異位性中心，生成與原本受質異位性中心相同的醣分子，進而釋放出。

本論文進行的對象是由酵母菌 *P.pastoris* 表現系統將 *T.Koningii* G-39 之 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 基因大量表現之酵素，在較早的研究中，我們已經針對此酵素進行一般性的研究、及有關抑制作用方面的一些探討⁽¹¹⁾。而本論文主要是更進一步經由合成一系列不同取代基的芳香類 α -L-阿拉伯呋喃糖苷化合物進行催化反應，探討其催化功能，進行動力學方面之研究，以其更了解此酵素之催化機制。

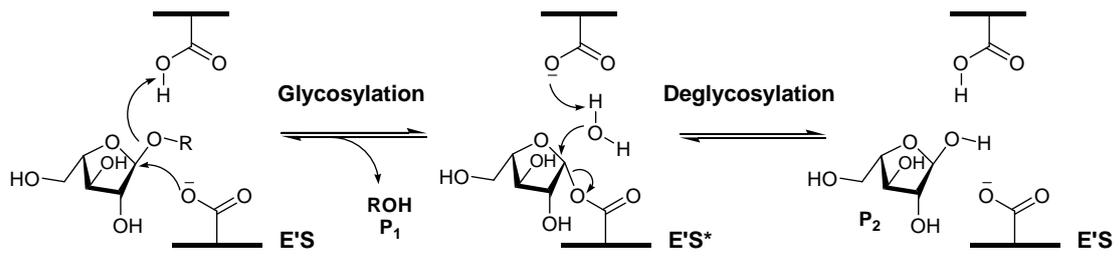


圖 1-5、家族 54 α -L-arabinofuranosidase 推測的反應機制途徑

