

# 目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
謝誌.....	v
目錄.....	vi
表目錄.....	viii
圖目錄.....	viii
第一章 緒論.....	1
1-1 半纖維水解酵素群.....	1
1-2 阿拉伯呔喃糖苷酵素 ( $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase) .....	6
1-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素反應機制的研究.....	9
1-4 研究目的.....	14
第二章 實驗方法.....	15
2-1 定點突變.....	15
2-2 利用電送法將質體送入表現之宿主細胞GS115 ( $\text{His}^-$ ) .....	16
2-2-1 一般敘述.....	16
2-2-2 <i>P. pastoris</i> 之轉型 (transformation) .....	16
2-2-2-1 勝任細胞 (Competent cell) 之製備.....	16
2-2-2-2 利用電送法 (electroporation) 轉型.....	17
2-2-3 利用聚合酶連鎖 (PCR) 反應分析 DNA.....	18
2-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素在 <i>P. pastoris</i> 系統之誘導純化條件.....	19
2-3-1 一般敘述.....	19
2-3-2 阿拉伯呔喃糖苷酵素的誘導條件.....	19

2-3-3 阿拉伯呋喃糖苷酵素的純化.....	20
2-3-4 決定蛋白質分子量與純度.....	20
2-3-5 蛋白質濃度的確定.....	21
2-4 阿拉伯呋喃糖苷酵素反應機制之研究.....	22
2-4-1 一般敘述.....	22
2-4-2 阿拉伯呋喃糖苷酵素野生株與各突變株 $K_m$ 、 $k_{cat}$ 之測定....	22
2-4-3 阿拉伯呋喃糖苷酵素野生株與各突變株和 pH 之關係.....	22
2-4-4 由 CD (circular dichroism) 光譜觀測野生株和突變株酵素之二級結構.....	23
第三章 結果與討論.....	24
3-1 酵素之表現與純化.....	24
3-1-1 single colony PCR 確認電送法轉型.....	25
3-1-2 篩選最佳菌落.....	26
3-1-3 阿拉伯呋喃糖苷酵素的表現.....	26
3-1-4 酵素的純化.....	28
3-2 再確認 D299 在催化反應的角色.....	30
3-3 Wild type 與 E223G 之 pH-profile 的比較.....	31
3-4 E223G 之轉糖研究.....	33
3-5 突變酵素之活性分析.....	35
3-6 E223G/D191G 和 E223G/D299N 之 pH-profile 研究.....	37
3-7 CD 光譜研究.....	39
3-8 阿拉伯呋喃糖苷酵素反應機制的探討.....	41
第四章 結論.....	42
第五章 參考文獻.....	43

附錄.....	45
---------	----

附錄一 不同來源之阿拉伯呋喃糖苷酵素性質比較

附錄二 各突變株所使用之寡核甘酸引子

附錄三 蛋白質濃度的測定

附錄四 *Aspergillus kawachii* IFO4308 與 *Trichoderma koningii* G-39  
 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 蛋白質序列之比對

## 表目錄

表 1-1 參與水解木聚糖的酵素列表.....	2
表 1-2 第二類ABF的次分類 (subclass) .....	8
表 3-1 wild type 及 D299G 之同位素效應結果.....	30
表 3-2 wild type 和各突變株酵素活性之比較.....	36
表 3-3 CD 程式分析二級結構.....	40

## 圖目錄

圖 1-1 o-acetyl-4-o-methylglucuronoxylan (hardwood xylan)的組成.....	3
圖 1-2 arabino-4-o-methylglucuronoxylan (softwood xylan)的組成.....	4
圖 1-3 木聚糖水解酵素群.....	5
圖 1-4 水解木聚寡糖的木糖苷酵素.....	5
圖 1-5 阿拉伯聚糖 (L-arabinan) 主要結構.....	6
圖 1-6 E223G酵素推測之反應機制.....	11
圖 1-7 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase野生株的水解反應機制.....	12

圖 1-8	家族54之ABF部分蛋白質序列比對.....	13
圖 1-9	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase from <i>Aspergillus kawachii</i> IFO4308之 重要胺基酸.....	14
圖 3-1	single colony PCR電泳圖.....	25
圖 3-2	酵素蛋白質電泳圖.....	27
圖 3-3	wild type 及各突變株酵素之 SP 管柱層析圖.....	28
圖 3-4	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase 經管柱層析純化後之蛋白質電泳分 析.....	29
圖 3-5	wild type 酵素在各 pH 值中的活性變化.....	31
圖 3-6	E223G 酵素在各 pH 值中的活性變化.....	32
圖 3-7	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase 分子模擬.....	34
圖 3-8	以雙倒數做圖法求E223G酵素對pNPAF之 $K_m$ 、 $k_{cat}$ .....	36
圖 3-9	E223G /D191G 酵素在各 pH 值中的活性變化.....	37
圖 3-10	E223G /D299N 酵素在各 pH 值中的活性變化.....	38
圖 3-11	wild type 與 D191G/E223G、E223G/D299N 和 E223G 之 CD 光譜.....	39