

第一章 緒論

1-1 半纖維素水解酵素群

地球上最大量的生質資源之一是植物細胞壁中的木質纖維，主要由纖維素、半纖維素和木質素所組成。在這些天然纖維物中纖維素的含量約40~45%，半纖維素約30~40%，其餘則為木質素^(1,2)，可見半纖維素是僅次於纖維素，為自然界中含量第二豐富的有機質。因此，半纖維素水解酵素群在植物生質資源的降解與再利用中成為重要的一部分。傳統能源幾乎都是依賴石化燃料。但隨著石化燃料的消耗量日益增加，這些資源總有一天會枯竭。同時，使用石化燃料也會造成環境污染和溫室效應。因此，如何能應用低污染性的生物技術，有效地將木材及農產廢棄物中的纖維素及半纖維素等多醣分解、轉換成其組成單醣，或是再經過醱酵生成酒精、乙烯等來作為能量的來源是目前很重要也很熱門的研究主題。

半纖維素主要由五種不同的單醣所組成，分別為D-葡萄糖 (D-glucose)、L-阿拉伯糖 (L-arabinose)、D-半乳糖 (D-galactose)、D-木糖 (D-xylose)、D-甘露糖 (D-mannose)⁽³⁾。植物細胞壁中的半纖維素主要是由木聚糖構成其支鏈，藉由木聚糖的水解促進木質素的釋出，以得到木材纖維。傳統上以大量的氯來氧化並打斷木質素與

半纖維素和纖維素之共價鍵來達到目的，但這種方法產生的有毒廢液會對環境造成污染及傷害，若將木聚醣水解酵素應用在造紙工業上，則可以取部分傳統上用來漂白紙漿的氯，減少對環境的傷害。

木聚醣在不同的植物中含量也不同，從樺木中的35%到松樹等裸子植物中的7%不等；將木聚醣分解是幫助纖維素與半纖維素能再度被利用的方法之一，也因此必須了解木聚醣的構造。木聚醣為一種異質性多醣體 (heteropolysaccharides) 主鏈是由木糖單糖以 β -1,4 鍵結方式所形成的多醣。在單元糖上 C-2、C-3 位置常被不同的取代基所取代，例如阿拉伯糖 (L-arabinose)、阿魏酸 (O-acetyl ferulic acid)、葡萄糖醛酸 (4-O-methylglucuronic acid) 及香豆酸 (*p*-coumaric acid)^(4,5)，形成許多不同的支鏈，也因此想要水解木聚醣是需要很多酵素的參與 (表1-1)。阿拉伯木聚醣(支鏈為阿拉伯糖取代之木聚醣)是屬於許多不同支鏈之木聚醣中的其中一種，也是半纖維素主要成份，也因為這樣阿拉伯木聚醣水解酵素更加重要。

表1-1 參與水解木聚醣的酵素列表

Enzymes involved in the hydrolysis of heteroxylans	
Enzyme	Mode of action
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 acetylesther bonds in acetyl xylans
Ferulic acid esterase	Hydrolyzes feruloylesther bonds in xylans
<i>p</i> -Coumaric acid esterase	Hydrolyzes <i>p</i> -coumaryl ester bonds in xylans

不同來源的木聚醣其側鏈的組成與多寡也不同，常見的有硬木木聚醣和軟木木聚醣^(3,6)；由硬木材所得的木聚醣是一種o-acetyl-4-o-methylglucuronoxylan其聚合度(degree of polymerization)大約是150~200個木糖，主鏈上大約每十個單元糖基上有一個甲基葡萄糖醛酸(methylglucuronic acid)的取代，這種木聚醣具有高度的乙醯基化(acetyl)，其位置通常發生在單元糖上第三個碳上，也因為具有高度乙醯基化的影響，所以對水的溶解度不是很好，如圖1-1 所示。

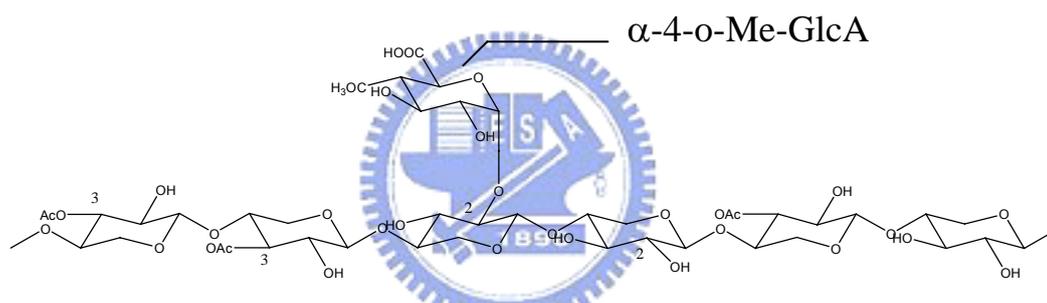


圖 1-1 : o-acetyl-4-o-methylglucuronoxylan (hardwood xylan) 的組成。

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

Ac : Acetyl group ;

另一種由軟木木聚醣是一種 arabino-4-o-methylglucuronoxylans，如圖1-2 所示。比較兩者：軟木的木聚醣中含有較多的甲基葡萄糖醛酸，接在木糖的二號碳位置，主鏈上的取代基沒有乙醯基，取而代之的是阿拉伯呋喃糖(L-arabinofuranose)。木糖單糖：甲基葡

糖醛酸：阿拉伯呋喃糖的比例約是100：20：13，軟木木聚醣鏈長較硬木木聚醣短，聚合度平均為70~130 DP。

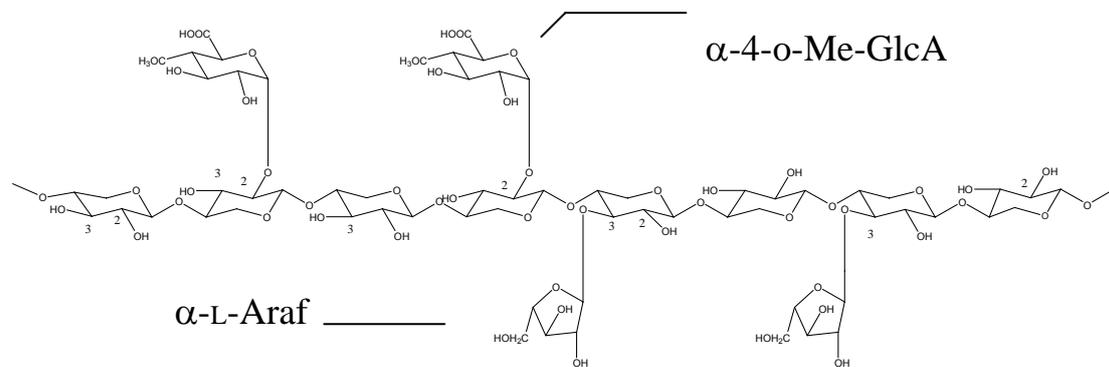


圖 1-2：arabino-4-o-methylglucuronoxylan (softwood xylan)的組成。

$\alpha\text{-4-O-Me-GlcA}$ ： $\alpha\text{-4-O-methylglucuronic acid}$ ；

$\alpha\text{-Araf}$ ： $\alpha\text{-L-arabinofuranoside}$

一些真菌及細菌具有水解木聚醣的能力，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⁽⁷⁾。木聚醣水解酵素群包含：內木聚醣酵素 (endoxylanase；EC 3.2.1.8) 及木糖苷酵素 ($\beta\text{-xylosidase}$ ；EC 3.2.1.37)；還有輔助分解支鏈的酵素：乙醯木聚醣酯化酵素 (acetylxyylan esterase；EC 3.1.1.72)、葡萄糖醛酸酵素 (glucuronidase) 以及本論文的主要酵素阿拉伯呋喃糖苷酵素 ($\alpha\text{-L-arabinofuranosidase}$ ；EC 3.2.1.55)⁽⁴⁾ (圖 1-3、1-4)

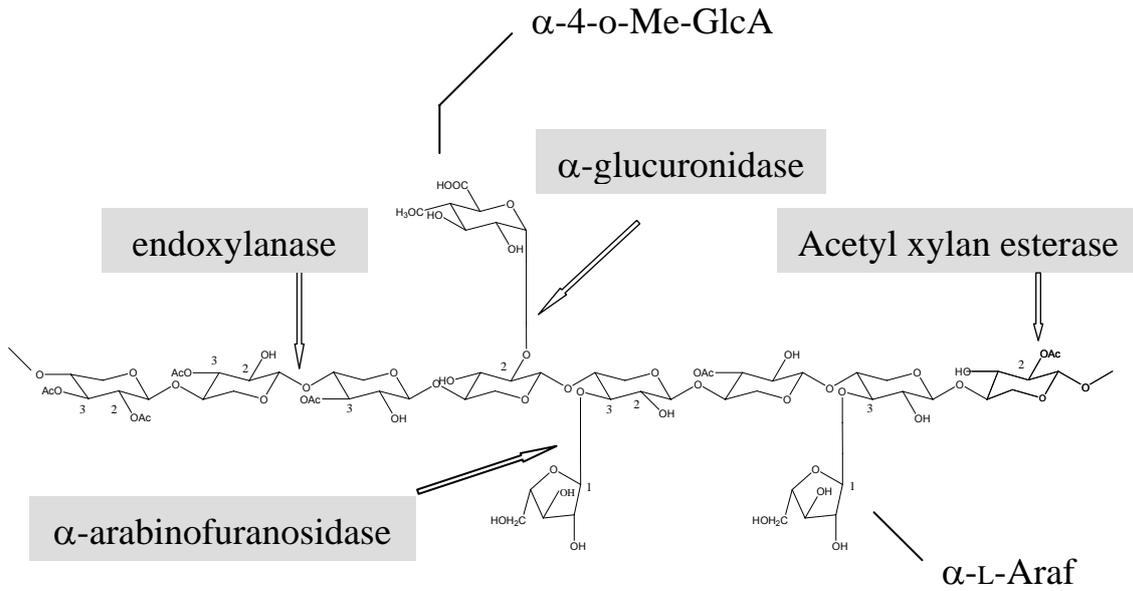


圖1-3：木聚醣水解酵素群，Ac：Acetyl group；

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

α -Araf： α -L-arabinofuranoside

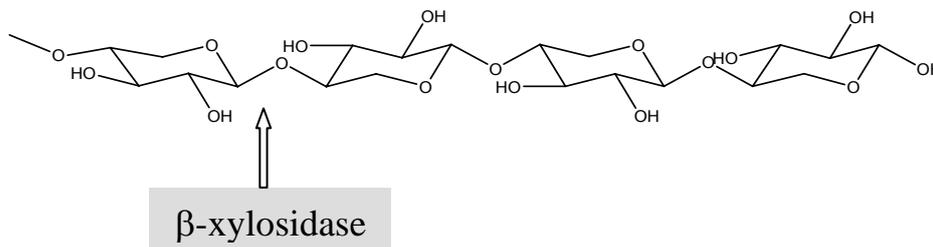


圖1-4：水解木聚寡糖的木糖苷酵素

1-2 阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-Arabinofuranosidase)

阿拉伯呋喃糖苷酶 (α -L-arabinofuranosidase; EC 3.2.1.55)

多從細菌、真菌和植物中發現並純化出來，大部分為外切型 (exo) 酵素，也有一些內切型 (endo) 酵素的例子。可以水解阿拉伯木聚糖中的阿拉伯糖支鏈的鍵結，也可以水解阿拉伯聚糖 (L-arabinan) 內的 α -1,3、 α -1,5 糖苷鍵結 (圖1-5)。

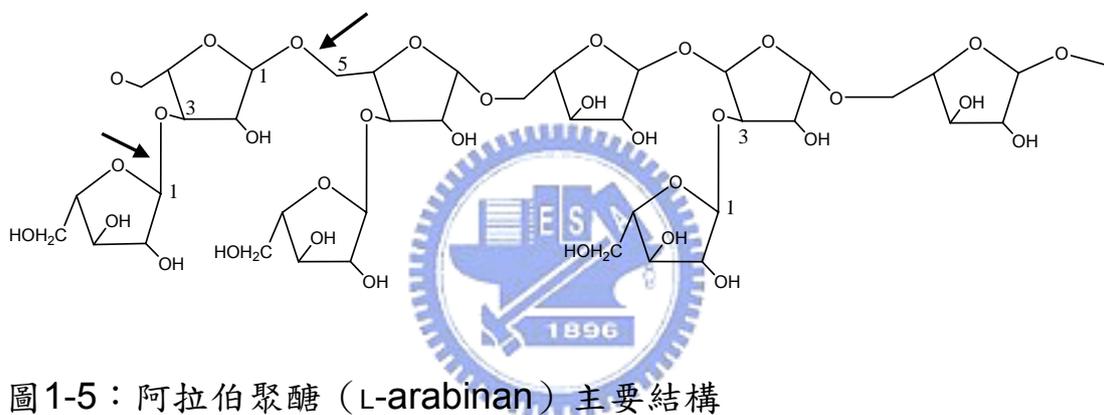


圖1-5：阿拉伯聚糖 (L-arabinan) 主要結構

目前阿拉伯呋喃糖苷水解酵素根據胺基酸序列的相似度已被分類成四個家族 (家族43、51、54 和62)，其中家族43是以反轉機制 (inversion mechanism) 的方式水解糖苷鍵，家族51和54是以構型保留 (retention of the anomeric configuration) 的方式水解糖苷鍵。而家族62的催化方式至今尚未被確認。^(10,11)

在1997年Beldman等人根據 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 對於受質的專一性及水解酵素模式總結分類為三種⁽³⁾：第一種的ABF

會優先將 α -1,5- L-arabinofurano-oligosaccharides水解為阿拉伯糖單糖，但對聚糖中含有的阿拉伯糖苷鍵沒有活性，第二種ABF會分解阿拉伯聚糖或阿拉伯木聚糖的側鏈中的阿拉伯糖殘基；前兩種ABF大多都對合成的受質 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNPAF) 有活性；第三種是arabinoxylan arabinofuranohydrolase，分解以燕麥、小麥和大麥為來源的阿拉伯木聚糖之阿拉伯糖苷鍵；從 *Aspergillus niger* 純化得到的上述三種酵素依序屬於GH51、GH54和GH62。

到了2006年Mondher Th.則重新整理這些分類，並提出上述Beldman等人分類中第二類的次分類 (subclass)⁽²⁾：(1) AXH-d3：從 *Bifidobacterium adolescentis* 得到之 arabinoxylan arabinofuranohydrolase (2) AXH-m23：從 *Bifidobacterium adolescentis* 得到之 arabinoxylan arabinofuranohydrolase (3) AXH-md23：從麥芽得到之arabinoxylan arabinofuranohydrolase。

西元2000年Badal C. Saha⁽³⁾將阿拉伯呋喃糖苷酵素依不同來源及其性質作了整理 (附錄一)。近年來關於阿拉伯呋喃糖苷酵素的研究越來越多^(1,2)，其原因是阿拉伯呋喃糖苷酵素有許多生物科技上的應用^(1,2,8,9)，例如在酒類芳香味的提升、使果汁澄清、加在動物飼料中使其較易被消化和增進麵包的品質；另一重要的應用則是，在促使纖維能源再利用方面提供一些幫助。也因為阿拉伯呋喃糖苷酵素在

工業上的多種應用性，以致於有很多種不同來源的阿拉伯呔喃糖苷酵素，被發現、純化並進一步研究。本論文研究之ABF為Beldman等人分類中第一類（exo-type）。

表1-2 第二類ABF的次分類（subclass）^(2,14-16)

subclass	對pNPAF反應	水解對象
AXH-d3	無活性	阿拉伯木聚醣有阿拉伯呔喃糖側鏈雙取代（1-2及1-3）（水解其中C-3位置的阿拉伯呔喃糖）
AXH-m23	無活性	阿拉伯木聚醣有阿拉伯呔喃糖側鏈單取代（1-2或1-3）（水解其中 C-2或C-3位置的阿拉伯呔喃糖）
AXH-md23	可水解pNPAF	阿拉伯木聚醣有阿拉伯呔喃糖側鏈雙或單取代（1-2及1-3、1-2或1-3）

1-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素反應機制的研究

無論是反轉機制或是構形保留，這兩種機制都需要兩個羧基擔任一般酸鹼對。⁽²¹⁾ 其中反轉機制的水解過程是單取代反應：利用一羧基作為一般酸提供質子 (proton donor) 給糖苷鍵上的氧，使糖苷鍵部分分離，同時，另一個羧基作為一般鹼將水去質子化(deprotonation)活化水分子上的氧，使其快速從離去基反向取代碳一位置，如圖1-6。而保留機制的水解過程是兩步驟雙取代反應：利用一羧基作為親核基 (nucleophile)，另一羧基作為一般酸鹼對，親核基先攻擊糖異位性中心(anomeric center)，同時一般酸提供質子活化離去基促進離去，進而形成糖與酵素鍵結中間體，接下來一般鹼將水去質子化，使水解反應完成^(12,13)，見圖1-7。

本論文進行的對象是由酵母菌 *Pichia pastoris* 表現系統將 *Trichoderma koningii* G-39之 α -L-arabinofuranosidase (abf) 基因大量表現之酵素 (家族54)。在較早的研究中⁽¹⁷⁻¹⁹⁾，我們針對此酵素設計不同受質及突變株以進行一般性的研究以及相關探討，並利用NMR光譜及動力學了解酵素反應途徑，結果顯示此酵素是屬於構形保留之催化機制 (圖1-7)，其催化是經由先行成arabinosyl-enzyme中間體，再經去糖基化兩步驟的雙取代反應而完成。由動力學的結果推測其重要胺基酸為D299 (一般酸/鹼對) 與E223 (親核基)。原型

酵素 (wild-type) 及D299G所測得的Brønsted constant (β_{1g}) 分別為-0.18和-1.3，顯示在原型酵素之催化反應中，去阿拉伯糖基化 (dearabinylation step) 為速率決定步驟，而D299G之反應速率決定步驟則為糖基化反應 (arabinylation)。此結果亦證實D299在催化反應中扮演著一般酸/鹼基之角色。

除上述實驗的結果，我們亦利用胺基酸序列比對，結果顯示如圖1-8，我們的酵素之重要胺基酸為D299 (一般酸/鹼對)，與E223 (親核基) 是高度被保留著，這符合在2004年Akimasa Miyanaga *et. al.* 從 *Aspergillus kawachii* IFO4308 得到 α -L-arabinofuranosidase 酵素⁽²⁰⁾ (屬於家族54)，之結晶作結構分析，其中重要胺基酸為D297及E221，分別扮演一般酸/鹼基和親核基之角色。

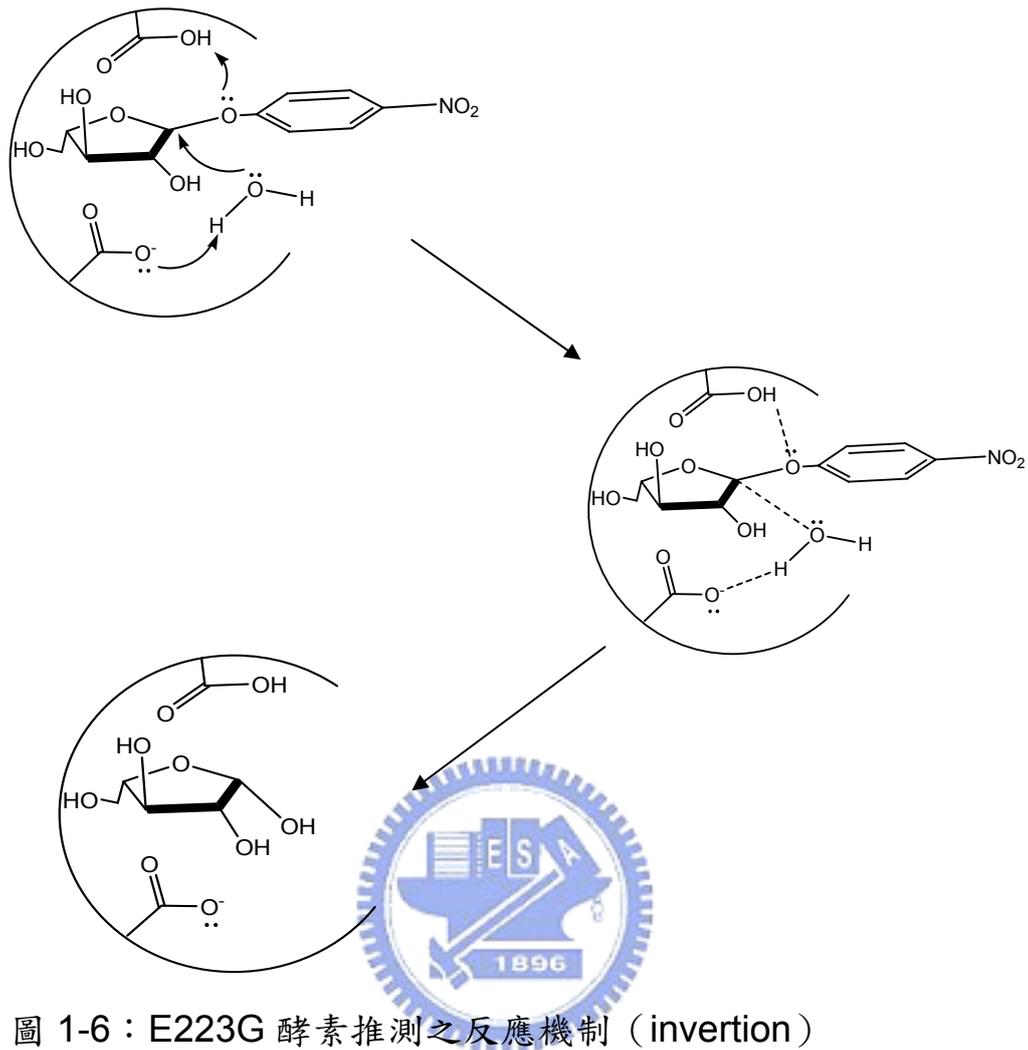


圖 1-6 : E223G 酵素推測之反應機制 (inversion)

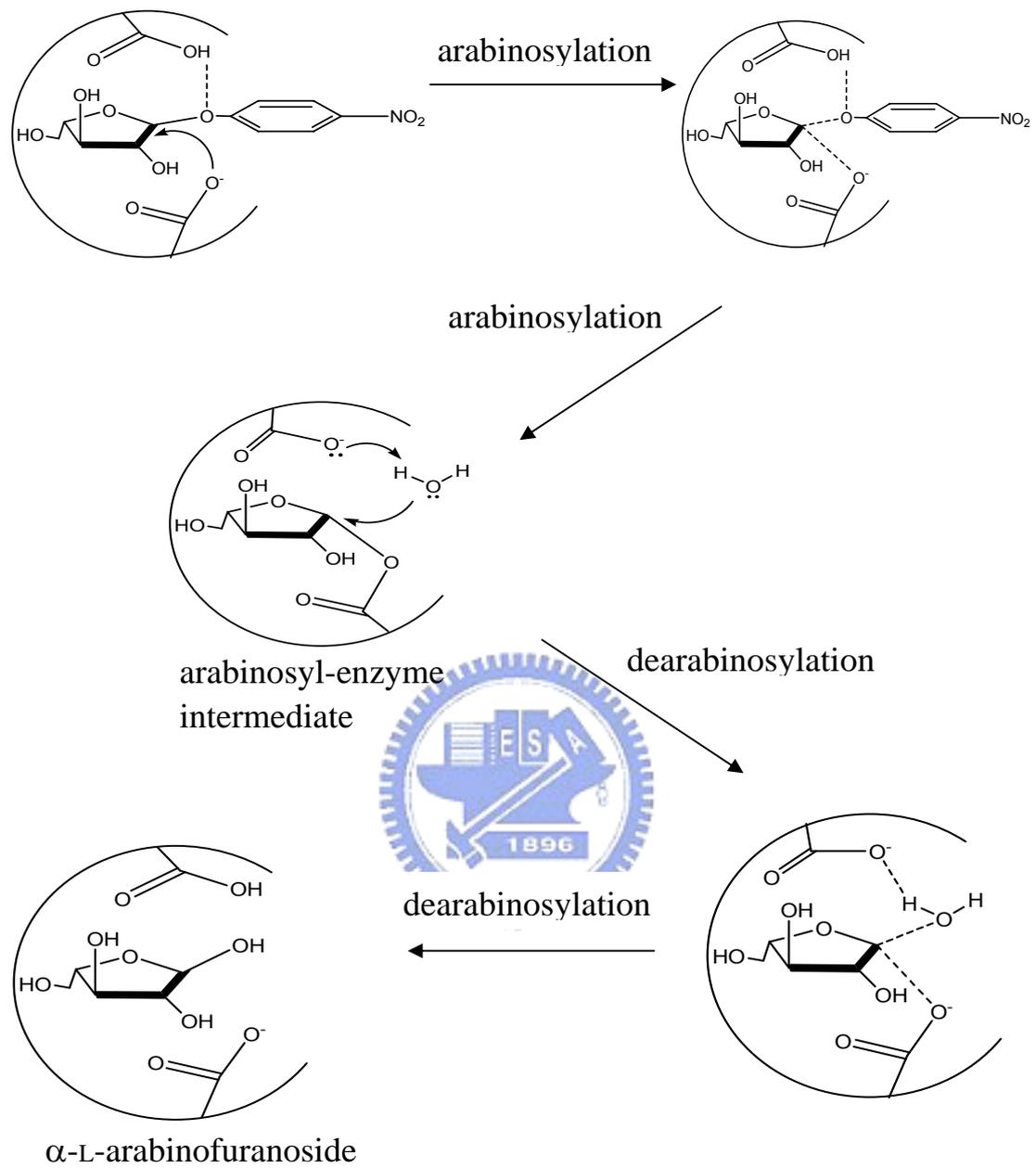


圖 1-7： α -L-arabinofuranosidase 野生株的水解反應機制 (retaining)

	170	181	186	191	221	223	289	299	310
U38661	166: YAVLDGTHYGACCFDYGNAETNSRDTGN	194	215: GPWIMADLENGL	226	286: MSKEGAILLGIGGDNSNGGQTFYEGV				
AB085904	164: YAVLDGTHYNDACCFDYGNAETSSTDGTGA	192	213: GPWIMVDMENNL	224	284: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
Z69252	166: YAVLDGTHYGACCFDYGNAETNSRDTGN	194	215: GPWIMADLENGL	226	286: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
AF367026	172: YAVLDGTHYNDACCFDYGNAETSSTDGTGN	200	221: GPWVMDLENGL	232	292: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
AB073861	172: YAVLDGTHYSACCFDYGNAEVSNTDTGN	200	221: GPWIMADLENGL	232	292: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
AB073860	172: YAVLDGTHYSACCFDYGNAEVSNTDTGN	200	221: GPWIMADLENGL	232	292: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
L23502	164: YAVLDGTHYNDACCFDYGNAETSSTDGTGA	192	213: GPWIMVDMENNL	224	284: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
U39942	164: YAVLDGTHYNDACCFDYGNWQTSSTDGTGA	192	213: GPWLMVDMENNL	224	284: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
Y13759	170: YAVLDGTHYNDGCCFDYGNAETSSTDGTGN	198	219: GPWIMADLENGL	230	291: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGA				
AY495375	166: YAVLDGTHYNDACCFDYGNAEISNTDTGN	194	215: GPWLMADLENGL	226	286: MSLEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
AJ310126	166: YAVLDGTHYGACCFDYGNAETSSTDGTGN	194	215: GPWIMADLENGL	226	285: MKKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFYEGV				
AF306764	167: YAVLDGTHYNGCCFDYGNAETNNLDTGN	195	216: GPWVMDLENGL	227	287: MSKEGAILLGIGGDNSNGAQGTFTEGA				

圖 1-8：家族 54 之 ABF 部分蛋白質序列比對

U38661 from *Hypocrea koningii* G-39, AB085904 from *A. kawachii* IFO4308, Z69252 from *Hypocrea jecorina* ButC-30, AF367026 from *Penicillium purpurogenum*, AB073861 from *Aspergillus oryzae* RIB40, AB073860 from *Aspergillus oryzae* HL15, L23502 from *Aspergillus niger*, U39942 from *Aspergillus niger*, Y13759 from *Emericella nidulans argB2*, AY495375 from *Aureobasidium pullans*, AJ310126 from *fusarium oxysporumf. sp. Dianthi*, AF306764 from *Cochliobolus carbonum*.



1-4 研究目的

在尋找 α -L-arabinofuranosidase的重要胺基酸過程中，我們發現將重要胺基酸殘基E223從glutamate突變為glycine (即E223G)之後仍保有明顯的活性，這使我們感到意外，因為E223是ABF催化反應之重要殘基，任何突變應嚴重影響催化能力，如E223Q則完全喪失活性。然而E223G卻仍具備可觀之催化功能。經仔細檢視*Aspergillus kawachii* 之ABF蛋白質三維結構，我們發現在親核基為E221，其旁存在D189，且與受質之向位與距離 (見圖1-9) 有機會替代E221成為催化反應之重要殘基。本研究即針對*Trichoderma koningii* 之E223G突變酵素的催化反應與重要的胺基酸進行研究。

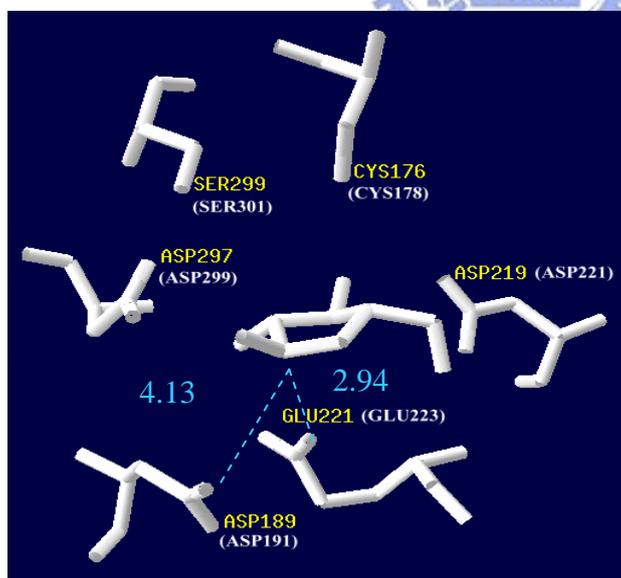


圖1-9： α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus kawachii* IFO4308

之重要胺基酸，(括號內之胺基酸是*Trichoderma koningii* G-39之ABF的編號)