

國立台灣大學生命科學院生化科技學系

博士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation



厭氣性真菌 *Neocallimastix patriciarum* J11 纖維素分解酶

複合體之研究

Studies of anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum* J11

cellulosome system

王惠昌

Hui-Chang Wang

指導教授：許瑞祥 博士

Advisor: Ruey-Shyang Hseu, Ph. D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



摘要

本研究自以結晶性纖維 Avicel 為碳源的厭氣性真菌 *Neocallimastix patriciarum* J11 培養上清液中純化分子量大於 669 kDa 且具纖維素分解酶活性之大分子蛋白聚合物，經變性聚丙烯醯胺膠體電泳及酵素活性染色分析，結果呈現結果呈現 12 條蛋白質，其中 8 條具纖維素分解酶活性、4 條具木聚醣分解酶活性。由此結果顯示，*N. patriciarum* J11 當以結晶性纖維培養時可以誘導類似厭氣性細菌之纖維素分解酶複合體生成。西方雜合分析結果顯示，厭氣性真菌特有之錨固區蛋白質能結合至 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體中分子量約 79 kDa 之蛋白質。因此，該複合體組成份中應包含類似厭氣性細菌纖維素分解酶複合體之支架蛋白質而將各分解酶組合成一複合體。此外，錨固區蛋白質與相對應結合之支架蛋白質的結合作用不需鈣離子參與。點突變錨固區蛋白質結合滴定實驗顯示，*N. patriciarum* J11 之纖維素分解酶複合體系統中，保守性高的 Trp-30 應以疏水性結合與支架蛋白質上相對應的結合區蛋白質結合。碳源誘導纖維素分解酶複合體生成的實驗結果顯示，不同碳源的誘導可影響 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體生成量及其組成份比例。本研究藉由串連式質譜分析鑑定了 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體的 6 個組成份，其包含了內切型(endo-type)、非還原端外切型(exo-type, non-reducing end)及還原端外切型(exo-type, reducing end)三種纖維素分解酶。此三類型分解酶的組合使纖維素分解酶複合體能以有效的協同作用方式分解結晶性纖維。基於上述結果，本研究首度發表了厭氣性真菌纖維素分解酶複合體的相關組成份。

關鍵字：厭氣性真菌、纖維素分解酶、纖維素分解酶複合體、錨固蛋白質、生質酒精

Abstract



In this study, we purified the cellulosome of *Neocallimastix patriciarum* J11 from a broth through cellulose affinity purification. The cellulosome with molecular weight more than 669 kDa, and the cellulase and xylanase activities were detected by polyacrylamide gel electrophoresis and zymogram. The cellulosome is composed of at least 12 comprised proteins, based on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Eight and four of these constituents have demonstrated cellulase and xylanase activities on zymogram analysis, respectively. Western hybridization analysis revealed that the fungal dockerin could bind to the protein with molecular weight of 79 kDa, and did not need calcium ion for mediation. This postulated fungal scaffoldin responded to the gathering of the cellulolytic components. Binding titration revealed that the high conserved Trp30 residue in fungal dockerin could participate in binding with scaffoldin by the hydrophobic interaction. The levels and subunit ratio of the cellulosome from *N. patriciarum* J11 might have been affected by their utilized carbon sources, whereas the components of the cellulosome were consistent. In this study, we identified six components of *N. patriciarum* J11 cellulosome using liquid chromatography/mass spectrometry. The trypsin-digested peptides of six proteins were matched to the sequences of cellulases originating from rumen fungi, based on identification through LC/MS/MS, revealing that at least three types of cellulase, including one endoglucanase and two exoglucanases, could be found in the *N. patriciarum* J11 cellulosome. The cellulolytic subunits could hydrolyze synergistically on both the internal bonds and the reducing and nonreducing ends of cellulose. Based on our research, our findings are the first to depict the composition of the cellulosome produced by *N. patriciarum* J11, and this complex is composed of scaffoldin and three types of cellulase.

Keywords: anaerobic fungi, cellulase, cellulosome, dockerin, bioethanol

目錄

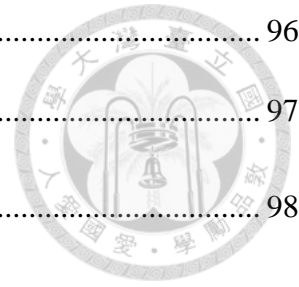


摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	VIII
第一章 前言.....	1
1.1 替代性能源與生質酒精現況.....	1
1.2 纖維素與半纖維素.....	3
1.3 纖維素分解酶與木聚醣分解酶.....	5
1.4 纖維素分解酶與木聚醣分解酶的應用.....	8
1.5 纖維素分解酶與木聚醣分解酶來源.....	11
1.6 纖維素分解酶複合體-Cellulosome.....	13
(1) Cellulosome.....	13
(2) 支架蛋白質-Scaffoldin.....	15
(3) 結合區-Cohesin.....	17
(4) 錨固區-Dockerin.....	19
(5) 結合區與錨固區結合作用-Cohesin-dockerin interaction.....	20
(6) 纖維素分解酶複合體基因群-cellulosome gene clusters.....	22
(7) 重組纖維素分解酶複合體-Cellulosome chimeras.....	23
1.7 厭氣性真菌.....	25
1.8 厭氣性真菌纖維素分解酶系統研究.....	28
(1) 纖維素分解酶.....	28
(2) 纖維素分解酶複合體.....	29

1.9 研究動機.....	30
1.10 實驗架構及流程.....	31
第二章 材料與方法.....	32
2.1 藥品、試劑與儀器.....	32
(1) 藥品與試劑.....	32
(2) 儀器.....	34
2.2 厭氣性真菌培養.....	35
(1) 菌種.....	35
(2) 厭氣基礎培養基.....	35
(3) 各類操作培養基.....	35
(4) 培養方法與生長測試.....	36
2.3 Cellulosme 純化.....	38
2.4 膠體過濾法.....	39
2.5 纖維素分解酶活性分析.....	39
2.6 變性及原態聚丙烯醯胺膠體電泳.....	40
(1) 膠體電泳製備.....	40
(2) 變性聚丙烯醯胺膠體電泳條件.....	40
(3) 原態聚丙烯醯胺膠體電泳條件.....	40
(4) 聚丙烯醯胺膠片染色.....	40
(5) 酵素活性染色 (zymogram).....	41
2.7 錨固區蛋白質表達與純化.....	42
(1) 表達質體建構.....	42
(2) 重組蛋白質表達.....	45
(3) 重組蛋白質純化.....	45
2.8 西方雜合分析.....	46
2.9 支架蛋白質基因鈎取.....	47
(1) cDNA 基因庫免疫篩選法.....	47
(2) 基因組篩選法.....	48
2.10 單一錨固區定點突變.....	49
(1) 引子設計點突變方法.....	49

(2) Kunkel 氏定位突變法	50
2.11 蛋白質結合滴定法	53
(1) Cellulosome 製備液	53
(2) 實驗方法	53
2.12 基因定序與保存	53
2.13 蛋白質定量分析	54
2.14 蛋白質鑑定	54
2.14 蛋白質胺基端定序	54
第三章 結果	55
3.1 <i>N. patriciarum</i> J11 之纖維素分解酶複合體生成	55
(1) 菌體生長與酵素誘導生成	55
(2) <i>N. patriciarum</i> J11 cellulosome 生成	56
(3) <i>N. patricirum</i> J11 scaffoldin 偵測	60
3.2 <i>N. patriciarum</i> J11 支架蛋白質基因鈎取	72
(1) cDNA 基因庫免疫篩選法	72
(2) 基因組篩選	72
3.3 <i>N. patriciarum</i> J11 纖維素分解酶複合體誘導生成	75
(1) 纖維素分解酶複合體誘導生產與純化	75
(2) 纖維素分解酶複合體組成分圖譜	78
3.4 <i>N. patriciarum</i> J11 纖維素分解酶複合體組成蛋白質鑑定	80
(1) LC/MS/MS 蛋白質鑑定	80
(2) 蛋白質胺基端定序	81
(3) <i>N. patriciarum</i> J11 cellulosome 組成份基因選殖	86
第四章 討論	90
4.1 <i>N. patriciarum</i> J11 之纖維素分解酶複合體生成	90
(1) 菌體生長與酵素誘導生成	90
(2) <i>N. patricirum</i> J11 cellulosome 生成	92
(3) <i>N. patricirum</i> J11 scaffoldin 偵測	93
4.2 <i>N. patriciarum</i> J11 支架蛋白質基因鈎取	95

4.3 <i>N. patriciarum</i> J11 纖維素分解酶複合體誘導生成	96
4.4 <i>N. patriciarum</i> J11 纖維素分解酶複合體組成蛋白質鑑定	97
第五章 總結.....	98
第六章 未來展望.....	100
參考文獻.....	101



圖目錄



圖 3-1 不同碳源培養及 CMCASE 活性比較.....	58
圖 3-2 培養上清液純化之纖維素分解酶複合體分析	59
圖 3-3 重組融合蛋白質 DD-B-GST 純化圖	61
圖 3-4 重組融合蛋白質 DD-B-GST 與纖維素分解酶複合體結合作用	62
圖 3-5 重組融合蛋白質 DD-B-GST、GST 與纖維素分解酶複合體支架蛋白質之結合	63
圖 3-6 重組融合蛋白質 D-b-GST 純化圖.....	66
圖 3-7 單一錨固區蛋白質 D-b 與其突變型之結合滴定圖.....	68
圖 3-8 單一錨固區蛋白質 D-b 與其突變型之結合滴定圖.....	70
圖 3-9 菌落分群聚合酶連鎖反應圖.....	74
圖 3-10 不同碳源誘導生成之cellulosome膠體過濾純化.....	76
圖 3-11 不同碳源誘導生成之纖維素分解酶複合體組成分圖譜.....	79
圖 3-12 纖維素分解酶複合體組成分鑑定圖譜.....	82
圖 3-13 J11 Cel5A 與 <i>N. patriciarum</i> CelD 胺基酸序列比對.....	87
圖 3-14 J11 Cel48A 與 <i>Piromyces</i> sp. E2 Cel48A 胺基酸序列比對.....	88
圖 3-15 J11 Cel6C 與 <i>Orpinomyces</i> sp. PC-2 CelH 胺基酸序列比對.....	89
圖 3-16 <i>N. patriciarum</i> J11 纖維素分解酶複合體.....	99

表目錄

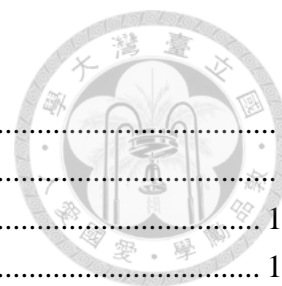


表 1-1 好氣性真菌纖維素分解酶種類與對纖維素之作用模式	7
表 1-2 纖維素分解酶的工業應用	9
表 1-3 木聚醣分解酶的工業應用	10
表 1-4 產生纖維素分解酶複合體之厭氣性微生物	14
表 1-5 厭氣性真菌的分類地位表	26
表 1-6 已知的厭氣性真菌菌株	27
表 2-1 基礎培養基之組成份表	37
表 2-2 雙錨固區域及單一錨固區域 DNA 片段擴增之引子	43
表 2-3 聚合酶連鎖反應試劑成份表	44
表 2-4 聚合酶連鎖的反應條件	44
表 2-5 定點突變使用之引子	51
表 2-6 聚合酶連鎖的反應條件	51
表 2-7 KUNKEL 定位突變法使用之引子	52
表 3-1 單一錨固區蛋白質 D-B 與其突變型之親和能力	71
表 3-2 不同碳源誘導之纖維素分解酶複合體酵素活性	77
表 3-3 纖維素分解酶複合體組成分之蛋白質鑑定	83
表 3-4 纖維素分解酶複合體組成分之蛋白質胺基端定序	85

第一章 前言



1.1 替代性能源與生質酒精現況

隨著人類文明發展，對於有限的化石燃料(fossil fuel)資源，如石油、煤、天然氣的需求亦與日俱增。然而，長期以來這些資源的開採與使用卻也帶給人類後續的問題，例如，溫室氣體(greenhouse gas)的增加、下游加工過程與各類產物對環境造成的衝擊、不平衡的供需關係以及這些不可再生性資源的耗盡。近年來，由於各項因素的影響，使得石油價格持續高漲，近來已達每桶原油約七十美元，而這樣的現象已對高度依賴原油進口的國家形成龐大的壓力。從工業革命開始至今，人類對化石燃料資源的高度開採與使用已使人類必需面對將來這些有限資源的耗盡及其所產生的各項環境污染等問題。此外，2006年2月16日京都議定書(Kyoto protocol)正式生效後，為達到二氧化碳減量，各國的能源政策中，替代性及再生性能源即成為焦點，因此，替代性燃料及再生能源的開發應用亦為當前各國重要議題之一。

各種替代性與再生性能源中，核能發電、風力發電、水力發電和地熱發電的技術發展已屬成熟，但仍面臨技術、安全等諸多問題，其後續開發潛力有限；太陽能發電及燃料電池(fuel cell)其技術仍在不斷更新中，但因應用不易，在實際應用上仍是佔所有能源中極少部分。另一項替代性能源，生物燃料(biofuel)，其包含生質柴油(biodiesel)及生質酒精(bioethanol)，這種再生性能源具有穩定供應、環保、永續等優點，此外，由於這類替代性能源可直接添加或以適當比例添加於現行使用石化柴油、汽油的車輛中，而補充上述各項替代性能源不足處且在應用上較能立即解決現行需求，因此，近年來在此領域已有愈來愈多的研究發展及應用。

生物燃料是指利用生物產生的有機物質，即生質量(biomass)，經過轉換後所獲得之可用燃料，而目前最常使用的生物燃料為生質酒精(56)。相較於汽油的使用，以酒精做為運輸用燃料能具有下列幾項優點：(I)若以純酒精為燃料，其產物為二氧化碳及水，較汽油燃燒產物更為環保；(II)若與汽油混合使用亦可幫助汽油燃燒增進效能；(III)酒精具有較高的辛烷值；(IV)減少臭氧前趨物的產生。此外，由生質酒精的發酵生產及其燃燒過程中所產生的二氧化碳將會再被植物所利用，因此，生質酒精的使用可藉由此種碳循環的方式，減少淨二氧化碳排放至大氣中，減緩大氣中二

氧化碳等溫室氣體的累積。

就全球生產和需而言，目前全世界最大的生質酒精生產及需求國家為巴西，其次為美國。巴西每年可以甘蔗為原料生產約 38 億加侖的酒精，其國內約有 90% 的新車使用純酒精為燃料，其餘的則以 25% 純酒精與 75% 汽油的混合比例做為燃料(108)。1987 年時，美國可以 8.6 公噸的玉米為原料生產 8.5 億加侖的無水酒精做為 10% 酒精汽油混合比的燃料。2004 年，美國從玉米及其它高澱粉含量作物以酵母菌發酵生產方式生產 35 億加侖酒精，此量可滿足美國 1% 車輛的燃料需求。2005 年時，其酒精生產量已達 40 億加侖(24)。美國能源政策法案也要求國內石油工業到 2012 年時需達到添加 75 億加侖的再生性生物燃料於汽油中(56)。現今美國也以玉米所生產的酒精取代四乙基鉛(tetraethyl lead)當做汽油辛烷值增強劑;此外，在美國許多州中，也逐漸以酒精取代 methyl tert-butyl ether (MTBE)做為氧化合物，以減少汽車廢氣排放(24)。除了巴西、美國外，其它原油產量小或非產油國家近年來也都積極投入此領域的研究及生物燃料的推廣。除了巴西主要以甘蔗為原料生產酒精外，其它如美國多以玉米及穀類作為酒精生產的主要原料來源。

現代的生質酒精生產仍有些不利因素需進一步考量，各國為了達到減少石油進口以平衡貿易逆差並且減緩日趨嚴重的全球暖化等目的，其必需增加目前的酒精產量，但其所面對的問題不僅有技術及生產成本等方面，在原料上也是一個重要關鍵，以美國為例，其每年所生產的玉米中，有 14% 是做為酒精生產的原料。對目前所使用的酒精製造原料種類如玉米、甘蔗而言，其並不是取之不盡，而且為了滿足上述供給需求，勢必須再增加這些原料的供給，如此，將來延伸的問題可能是與農業生產及糧食供應發生衝突。為了解決上述問題，近年來研究人員已把研究焦點轉移到木質纖維(lignocellulose)上，木質纖維因取得成本低以及其為地球上存量最大的再生性天然資源，若以農業廢棄物，如麥桿、稻桿和玉米莖幹，以及雜草、木屑等纖維基質為原料生產酒精，則可降低原料成本而使生質酒精更具應用性及競爭力。除了各種農、木業的纖維廢棄物外，都市及工業活動中所產生的纖維廢棄物亦是另一項纖維基質原料來源。隨著石油價格的攀升、以玉米等作物為生質酒精生產原料所帶來的糧食衝突問題以及生質酒精生產技術的進步，就經濟及環境觀點，若以上述各種類的纖維基質為原料，生產生質酒精將是一項極具潛力的替代性能來源。除此之外，近年有關將纖維廢棄物利用生物性轉換生產有機化合物如醇類、烯類等

以作為工業應用原料的研究也愈來愈受重視，這方面的成果將可幫助人類降低對石油的依賴並且以此循環利用這些碳源而達到永續發展(8, 105)。



1.2 纖維素與半纖維素

植物細胞壁的組成包括不可溶性的纖維素(cellulose)、半纖維素(hemicellulose)及木質素(lignin)等結構性多醣，以及可溶性的 β -葡聚醣(β -glucan)及果膠(pectin)(39)。在組成上，纖維素為植物細胞壁的主要組成物質，其外圍藉由木質素及半纖維素的連結及包覆而緊密地堆疊成植物細胞壁的主要結構。每年陸生植物經由光合作用所產生的纖維素約為 10^{11} 噸，為自然界中存在最大量的多醣類與碳源，亦為自然界中最豐富的再生性資源(135)，而半纖維素成分中，最大量者為木聚醣，其佔地球上可再生有機碳的三分之一，是自然界再生資源中含量第二豐富者。

纖維素(cellulose)是由葡萄糖以 β -1,4糖苷鍵(glycosidic bond)鍵結成纖維雙糖(cellobiose)並以此為組成單位形成250~10,000個葡萄糖分子的葡聚醣鏈(glucan chain)聚合物。纖維素藉由葡聚醣鏈以凡得瓦力(Van der Waals forces)及分子間、分子內氫鍵形成結晶性排列，並組成細長的結構單位，超微纖維體(micelle)。10~20個超微纖維體會再堆疊成微纖維絲(microfibril)，微纖維絲整齊排列組成細胞壁的各薄層結構進而成為一緊密堆疊的結晶型(crystalline)纖維結構。這些結晶性的緊密結構使得纖維素在自然界中穩定存在，但也造成纖維素不易溶於水以及被大多數生物所利用的特性(124)。

半纖維素(hemicelluloses)，為五糖或六糖所組成之多醣類的通稱，其包含木聚醣(xylan)、木葡聚醣(xyloglucan)、甘露聚醣(mannan)、聚葡甘露醣(glucomannan)、半乳葡甘露聚醣(galactoglucomannan)和阿拉伯膠聚醣(arabinogalactan)等，其中木聚醣為最主要成分。木聚醣是由木糖(xylose)為組成單位並以 β -1,4方式鍵結構成木聚醣主要骨架。木聚醣支鏈上具有各種修飾基，目前發現的修飾基有glucuronopyranosyl、 α -L-arabino-furanosyl 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl、acetyl、feruloyl或

-coumaroyl。隨著植物種類的差異，其即有不同種類的木聚醣組成。硬木(hardwood)細胞壁中木聚醣含量佔15-30%，軟木(softwood)佔7-10%，一般常

綠植物含量小於 30 %。硬木木聚醣主要為 acetyl-4-*O*-methyl-D-glucuronoxylan，軟木則為 arabino-4-*O*-methyl-D- glucuronoxylan，草類和一些常綠性植物木聚醣為 arabinoxylan(19, 36)。





1.3 纖維素分解酶與木聚糖分解酶

纖維素分解酶(cellulase)為一群可以協同作用(synergism)方式分解纖維素的酵素總稱(70)。以好氣性真菌(aerobic fungi) *Trichoderma* 屬的纖維素分解酶系統為例，將不可溶性的纖維素分解成可溶性的葡萄糖(15)，至少需要三種類型的分解酶以協同作用參與(37)，此三類型包括(I) endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4)或稱為 endoglucanase (EG); (II) exo- β -1,4-glucanase，其又可分為兩類，cellobiohydrolase (CBH) (EC 3.2.1.91)或稱為 exocellulase 以及 glucohydrolase (EC 3.2.1.74)或稱為 exoglucanase; (III) β -glucosidase (BGL) (EC 3.2.1.21)與 cellobiase(22)。其作用機制如表 1-1 所示。第一步為 endo- β -1,4-glucanase 隨機地從纖維素的不定形區域(amorphous regions)切斷糖苷鍵，露出非還原端 (non-reducing end)或還原端 (reducing end)，接著由 exo- β -1,4-glucanase 從非還原端或還原端切除含有兩個或多個葡萄糖分子的聚合物，如纖維雙糖(cellobiose)、cellodextrin，最後由 β -glucosidase 將上述兩種酵素作用之產物分解成單一葡萄糖分子。然而，天然的纖維素除了本身具有高度結晶構造外，其外圍包裹著如木聚糖等半纖維素成份，由此可知，纖維素的分解機制是以更複雜的模式進行(71)。對大多數纖維分解菌而言，其可分泌一套由一種或多種的 CBH、EG 和 BGL 所組成的纖維素分解酶系統，但有些物種其 BGL 是以膜上或胞內的方式存在。好氣性微生物的纖維分解酶系統中，被分泌出的分解酵素游離至環境中，並藉由與基質的結合而進行分解，由於此結合作用是依賴酵素與基質間的碰撞機率，故分解效率低。再者，三大類型酵素亦需共同參與分解作用始能達成協同作用效果，因此，自然界中，此種機制的分解效率應是較試管(*in vitro*)實驗差。

半纖維素分解酶(hemicellulase)為數種可以協同作用方式分解 hemicellulose 的分解酵素統稱。由於 xylan 組成複雜，故其必須有一套完整的木聚糖分解酶(xylanase)系統才能將 xylan 完全分解。作用於 xylan 短鏈的木寡糖 (xylo-oligosaccharide)，再由 β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37) 將木寡糖和雙木糖 (xylobiose) 分解成單糖。支鏈部分則分別由 α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)、 α -D-glucuronosidase (EC 3.2.1.139)、acetylxylan esterase (EC 3.1.1.72)、ferulic acid esterase (EC 3.1.1.73)

和 *p*- coumaric acid esterase (EC 3.1.1.-) 將各種取代基從 xylan 上切除(2)。

目前研究已顯示，cellulase 及 hemicellulase 為結構模組化的酵素(modular enzyme)，其由具酵素催化功能的催化區(catalytic domain)及能與各類碳水化合物結合的碳水化合物結合區(carbohydrate binding module, CBM)組成，現在亦有很多文獻沿用其先前的名稱纖維素結合區(cellulose binding domain, CBD)。這兩種功能區中間通常以一富含絲胺酸(serine, Ser)、蘇胺酸(threonine, Thr)及脯胺酸(proline, Pro)的胜肽鏈連接(55)。以結構模組化的 cellobiohydrolase (CBH)為例，其分解纖維素的過程可包含四個步驟: (I) 吸附(adsorption); (II) 鏈端定位(location of chain end); (III) 酵素-基質複合物的形成; (IV) 糖苷鍵結的水解(11)。

依據酵素的分類，cellulase 及 hemicellulase 屬於水解酶(hydrolase)，而根據催化區胺基酸序列的相似度，這些相關分解酵素可被分類在 133 個糖苷水解酶族群(glycosyl hydrolase families)中(62, 63) (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)。同樣的分析方式，CBD 也可分類成 69 個族群(<http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.htm>)。

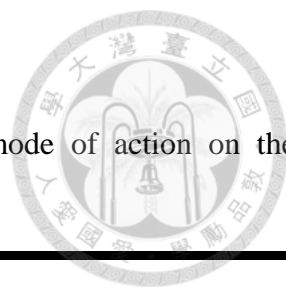


表 1-1 好氣性真菌纖維素分解酶種類與對纖維素之作用模式

Table 1-1 Components of aerobic fungal cellulases and their mode of action on the cellulose chain (22).

Enzyme type	EC number	Synonym	Mode of action
Endo-β-1,4-glucanase	EC 3.2.1.4	Endoglucanase (EG) Endocellulase	--G--G--G--G-- ↑ ↑ Cleaves linkages at random
Exo-β-1,4-glucanase	EC 3.2.1.91	Cellobiohydrolase (CBH) Exocellulase	G--G--G--G--G-- ↑ Release cellobiose neither from reducing or non-reducing end
Exo-β-1,4-glucanase	EC 3.2.1.74	Glucohydrolase Exoglucanase	G--G--G--G--G-- ↑ Release glucose from non-reducing end
β-glucosidase (BGL)	EC 3.2.1.21	Cellobiase	G--G , ↑ G--G--G--G ↑ Release glucose from cellobiose and short chain cello-oligosaccharides



1.4 纖維素分解酶與木聚醣分解酶的應用

Cellulase 為目前廣泛應用的酵素之一，其在工業上的應用如表 1-2 所列(3)。除了在造紙、紡織工業有較多運用外(38, 68)，另一受矚目的應用為當作飼料的添加劑，添加在飼料中的 Cellulase 可提升雞隻生長速率及換肉率、降低糞便排放、提高雞蛋中 Ω -3 脂肪酸的比例等，以達到降低飼養成本、減低雞糞污染與提升產品價值的目標。Cellulase 除了可以單獨使用之外，亦可與其它水解酶合併使用，例如環保用或水產養殖用的微生物製劑中，均含有 cellulase 成份(4)。因此，cellulase 已成為農業及工業上重要的酵素之一。全球工業酵素市場，從 1995 年的十億美金，到 2001 年成長至二十億美金。工業用酵素市場的主要部份為清潔劑、紡織和燃料用酒精等技術工業，飼料與食品業約佔 35%。工業用酵素市場中 75% 為水解酵素，醣水解酵素位居第二，木聚醣分解酶是醣水解酵素中半纖維分解酶的主要酵素，應用範圍非常廣，包含動物飼料添加、食品、紡織與造紙等工業，如表 1-3 所列。目前，日本、芬蘭、德國、愛爾蘭、丹麥、加拿大和美國等國皆有多家公司進行木聚醣酶的工業化大量生產(2)。此外，每年經光合作用所產生的纖維素約為 10^{11} 噸(135)，如何將其水解成葡萄糖，作為低成本葡萄糖來源或轉化成永續性的生物燃料，以取代有限的石油資以及減緩溫室氣體的產生，是目前許多研究單位極欲研究開發的項目，亦是 cellulase 另一項具有潛力的應用。現階段第二代生質酒精生產仍以游離形式之好氣性微生物纖維素分解酶系統為主要分解酶來源，另外，亦藉由不同類型及來源之分解酶以不同比例混合使用。然而，目前對於結晶性木質纖維的分解效率仍是不理想。因此，若要提高其分解效率、降低生產成本以提高其應用的可行性，我們應從自然界其它具潛力的纖維分解族群尋找更高結晶性纖維分解活性之纖維素分解酶基因，或是仿效自然界相關物種之高效率分解機制，如纖維素分解酶複合體，以利此產業的發展。

表 1-2 纖維素分解酶的工業應用

Table 1-2 The applications of cellulases in industries(3).

產業別	作用與效果
紡織、 纖維素加工業	<ol style="list-style-type: none"> 1. 去除羊毛上的植物性物質 2. 幫助面巾及浴巾的生化精鍊(bio-scouring)處理 3. 牛仔布的生化老化(bio-aging)處理 4. 亞麻布的生化軟化(bio-retting)處理
清潔劑工業	分解嵌在衣物纖維素間的食物纖維素粒污垢
農產加工業	<ol style="list-style-type: none"> 1. 降低高濃度纖維素製品的黏度 2. 提升油、香料等植物抽出物的回收量 3. 去除果汁中的混濁纖維素
造紙工業	<ol style="list-style-type: none"> 1. 提升木材漿的散漿性(beatng) 2. 藉部分分解纖維素，脫除廢紙上的油墨、塗料及色料(125)。 3. 去除紙漿中的導管(vessel)，以提升紙張的可印刷性。 4. 提升衛生紙的吸水性 5. 漂白紙漿，減少電力的使用量。 6. 改良紙漿濾水性(filterability)
飼料工業	幫助反芻動物消化纖維素，進而提升動物飼料的可消化性。
果汁工業	分解、去除水果的二級細胞壁(secondary cell wall)。
環保工業	<ol style="list-style-type: none"> 1. 清除排水管 2. 添加在環保用、養殖用水的微生物製劑中。 3. 甲烷發淨化促進劑

表 1-3 木聚醣分解酶的工業應用

Table 1-3 The applications of xylanases in industries(2).

產業別	作用與效果
紡織工業	1. 去除植物纖維中的半纖維質，生產打包麻布 (hessian) 或麻布 (linen)。 2. 減少漂白劑使用量，讓木質素不致氧化，避免纖維顏色的變深
紙漿、造紙工業	1. 降低漂白劑使用量，減少廢液處理量。
飼料工業	1. 分解 arabinoxylans，可以降低飼料的黏滯度，提高動物對飼料中營養分的吸收，降低非需要殘餘物排放，進而減少環境汙染。
烘培、飲料及食品工業	1. 木聚醣酶添加於麵粉，可分解半纖維可增加麵糰的體積和吸水度，並改善麵糰的發酵狀況。 2. 改進蔬果的液化、增加果汁的產率和穩定性，並提高香氣與其他營養成分的回收，降低果汁的黏滯度。
製藥與化學用品工業	1. 木聚醣酶配合其他酵素(半纖維質分解酵素和蛋白酶)，可做為消化不良的飲食補充品。 2. 特定水解程度後的低聚合程度木聚醣，可做為藥劑的運送劑或保護劑，或腸道微生物益生劑。 3. 木聚醣完全水解生產木糖，可以繼續轉換成乙醇、有機溶劑和人工的低卡路里甜味劑 (木糖醇, xylitol) 等高經濟價值物質。



1.5 纖維素分解酶與木聚醣分解酶來源

自然界中纖維素被 cellulase 所分解而成為其它生物生長所需之碳源，目前已知具有纖維素分解能力的生物包括細菌、真菌、原生動物與植物。在細菌方面，*Bacillus* 屬細菌、土壤中的放線菌、厭氣性細菌 *Clostridium* 屬及瘤胃厭氣性細菌 (rumen anaerobic bacteria) 中 *Ruminococcus*、*Fibrobacter* 等屬為細菌族群中具較強纖維素分解能力的物種(78, 98, 100, 116)。*Bacillus* 屬細菌的 cellulase 具有較好的耐鹼性(45)，而放線菌所產生的 cellulase 多具有較高的耐熱性及耐鹽性(59)。真菌方面，*Trichoderma*、*Aspergillus* 與 *Penicillium* 等屬是目前常見具有纖維素分解能力的真菌(21, 112, 130)，也是現今 cellulase 的主要工業生產菌株，而其中 *Trichoderma* 屬真菌所產生的 cellulase 最常被使用並受到廣泛的研究，包括 cellulase 基因分離、作用機制與蛋白質結構分析。

自然界中，木聚醣主要為微生物所分解，在含有植物性纖維體累積的環境，即可篩選到分解木聚醣的微生物，如腐生 (saprophytic)、土壤、水中、厭氣性、室溫、高溫、或是生長於瘤胃動物的瘤胃或食用木頭昆蟲的腸道中，都有分解木聚醣的微生物存在(127)。好氣性真菌 *Trichoderma* 和 *Aspergillus* 能分泌高濃度且多樣性的木聚醣分解酶，能將聚合物分解成單糖或是雙糖。一般真菌來源木聚醣分解酶的反應最適 pH 值為偏酸性，小於 pH 5.5，且多含有纖維質分解酶的活性(57)。好氣性細菌木聚醣分解酶一般具有嗜鹼性和熱穩定特性，是工業上耐鹼性木聚醣分解酶的生產來源(66)。

由於目前從好氣性真菌，如 *Trichoderma* 屬所得之較強 cellulase 多屬內切型式的 endoglucanases，其僅能對纖維素中非結晶性 (amorphous) 區域進行水解，但對於具高度結晶的天然纖維素分解效率並不高(78)，此種現象亦為目前許多 cellulase 應用時效果不佳的原因(20)。在 cellulase 研究範疇中，另一項重要課題即為尋找能分解結晶性纖維素的高活性 cellulase 來源，以提升 cellulase 的應用價值。在自然界中，另一個能利用纖維素質並以其作為能量來源的族群為草食動物 (herbivores)。

草食動物雖可食入植物體作為能量來源，但其本身消化道並不能分泌可分解植物結構性多醣的相關酵素，而是依賴生存於其消化道中的微生物產生相關的酵素

將植物殘體分解以供草食動物利用(135)。

在草食性動物中，反芻動物，如偶蹄動物羊、牛的前消化道中除了食道外，還包括四個胃，連接於食道後的第一個胃為瘤胃(rumen)。以牛為例，瘤胃與連接在後的蜂巢胃形成一個體積約為 100~150 公升的發酵腔(fermentation vessel)，且含有高密度的微生物族群(65)。一般瘤胃的酸鹼值會隨著攝食狀況而略有變動，但都可維持在 pH 5.8~6.8 之間；而在溫度方面，因微生物發酵生熱的原因，其溫度會略高於體溫，而且也會隨著飲水與內部物質發酵情況而有變化，一般而言，其溫度會維持在 39°C。由於瘤胃的存在，使得反芻動物吃入草料後能使植物殘體停留於瘤胃約 60~90 小時，相較於一般單胃的草食性動物，如奇蹄動物中的馬，其植物殘體停留在消化道約 30~40 小時的時間更長，因此更能有效分解植物殘體(65)。反芻動物提供一個穩定的場所供微生物生長，而微生物幫助其宿主分解植物殘體，在此種互利共生的狀態下，反芻動物消化道中的微生物演化成對植物結構性多醣具有高效率分解能力的族群，因此，存在於反芻動物消化道中的厭氣性微生物可成為 cellulase 及 hemicelluase 的另一潛力來源(135)。

近年研究顯示，多數瘤胃纖維素分解細菌 *Ruminococcus*、*Butyrivibrio* 屬等和一些環境中的厭氣性纖維素分解細菌如 *Clostridium* 屬在 cellulase 系統類似，這些物種的纖維分解酶多以形成複合體形式並附著或分泌至環境中(78)。這種複合體形式系統也是目前已知自然界存在最具纖維素分解能力的機制(15)。近年研究亦顯示，在其它好氣性微生物如 *Paenibacillus curdlanolyticus* 中可發現類似的纖維分解機制(103)。

1.6 纖維素分解酶複合體-Cellulosome



(1) Cellulosome

1983 年 Lamed 及 Bayer 等人於 *Clostridiales* 屬的纖維素分解細菌中發現其可產生高分子量具有 cellulase 活性的蛋白質(16, 75)，並於培養上清液中發現，這些高分子量的 cellulase 及 hemicellulase 是由多種酵素組成之多次單元複合體，並稱此複合體為纖維素分解酶複合體(cellulosome)(74)。Cellulosome 如同核糖體一樣，像是一個巨分子機器，它能組織、聚集各種次單元體，如 cellulase 和半纖維分解酶，並能以協同作用(synergism)方式有效地分解纖維基質，此亦是厭氣性纖維利用菌有別於好氣性微生物所發展出的特有纖維基質分解機制。Cellulosome 直徑約為 18 nm，其分子量約為 2×10^6 至 6×10^6 Da，由 14 至 50 個分子量約 37 kDa 至 210 kDa 的蛋白質所組成，在某些物種，如 *Clostridium thermocellum* 及 *Acetivibrio cellulolyticus*，其 cellulosomes 可再組成分子量達 5×10^7 至 8×10^7 Da 稱為 supercellulosomes (polycellulosomes)的複合體(17, 18, 75)，其在菌體表面像是一突出細胞表面之胞器。

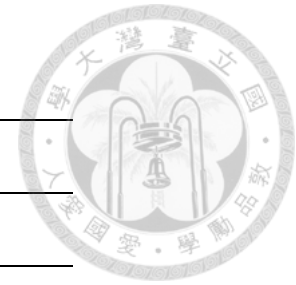
相較於好氣性微生物所產生的 cellulase 系統，雖然此系統可產生包括 exo- β -1,4-glucanase、endo- β -1,4-glucanase 以及 β -glucosidase 等三大類的 cellulase，並以協同作用方式有效地分解纖維素，但因這些酵素都以自由游離(free form)的形式(7)存在於環境中，需靠著各類酵素與基質的碰撞、結合才有機會進行完整的纖維素分解作用。而在厭氣性細菌的 cellulosome 中，與分解纖維素及半纖維素相關的酵素藉由其錨固區(docking domain, **dockerin**)與一稱為支架蛋白質 (scaffolding protein, **scaffoldin**)的非催化性蛋白質中結合區(cohesive domain, **cohesin**)結合而成為一 cellulosome，由於這些分解酶藉此結合機制而聚集一起，故能有效率地獲得並分解各步驟產物。此外，這種複合體藉由支架蛋白質中與纖維基質有強結合力的纖維素結合區 (cellulose binding domain, **CBD**) or carbohydrate-binding module, **CBM**)而與纖維基質結合，故能在動態的環境中存留更久且更有效地分解纖維素(16)，目前已知可產生 cellulosomes 之厭氣性微生物如表 1-4 所示。

表 1- 4 產生纖維素分解酶複合體之厭氣性微生物

Table1-4 Cellulosome-producing anaerobic microorganism(14).

Microorganism	Source
<i>Anaerobic bacteria</i>	
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Sewage
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Sewage
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Rumen
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Soil
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Rumen
<i>Clostridium cellulolyticu</i>	Compost
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Wood fermenter
<i>Clostridium josui</i>	Compost
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Paper mill
<i>Clostridium thermocellum</i>	Sewage soil
<i>Ruminococcus albus</i>	Rumen
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rumen
<i>Anaerobic fungi*</i>	
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Rumen
<i>Orpinomyces joyonii</i>	Rumen
<i>Orpinomyces</i> PC-2	Rumen
<i>Piromyces equi</i>	Rumen
<i>Piromyces</i> E2	Faeces

* 厭氣性真菌其纖維分解酶具有非催化活性之重覆序列，
但到目前為止，其支架蛋白質基因尚未被發表。



(2) 支架蛋白質-Scaffoldin

Scaffoldins 是 cellulosomes 中的骨架，其本身不具酵素活性。*C. cellulovorans* 的 scaffoldin 基因是第一個被定序的支架蛋白質基因，但當時只知此蛋白質對纖維素具有高吸附能力，而對其蛋白質序列上一些重覆性的片段之性質卻不了解(118)。一直到了 *C. thermocellum* scaffoldin (CipA) 的序列及其與各種酵素間的關係被研究後，研究者們才確定了 scaffoldins 在這個龐大的複合體中是扮演骨架的角色(14)。之後在其它厭氣性細菌物種中也陸續發現了各類型的 scaffoldin 基因。就目前發表的 scaffoldins 而言，可依其組成及特性分為兩大群。第一群 scaffoldins 其組成包含了 5 至 9 個數目不等稱為 cohesin 的結合區(即第一型 cohesin)、一個碳水化合物結合區 CBM 及數量不等稱為 X domain 的未知功能區。這些 cohesins 的胺基酸序列具有高同源性(homology)，其可與各類 cellulase 及 hemicellulase 中稱為錨固區的 dockerins (即第一型 dockerin) 結合。目前已知產生此類 scaffoldins 的物種包括嗜溫厭氣性細菌 *C. cellulolyticum*、*C. cellulovorans*、*C. josui* 及 *C. acetobutylicum*。第二群 scaffoldins 可再分為三類。第一類 scaffoldins 的組成如同第一群 scaffoldins 的組成，但多了一個 dockerin (即第二型 dockerin)，一般亦稱此種可結合多個酵素且具有 dockerins 的 scaffoldins 為 primary scaffoldins，但現已有部份文獻也將第一群之 scaffoldins 稱為 primary scaffoldins。第二類 scaffoldins 稱為 anchoring scaffoldins，其組成中的 cohesins (即第二型 cohesin) 有別於 primary scaffoldins 中的第一型 cohesins，其只能與 primary scaffoldins 上的第二型 dockerins 結合，此外，anchoring scaffoldins 的另一特徵為其具有稱為 SLH (S-layer homology) 的區塊，其功能為使 anchoring scaffoldins 與菌體表面結合，而讓 cellulosomes 存在於菌體表面(77, 87)。第三類 scaffoldins 稱為 adaptor scaffoldins，其組成份如同 anchoring scaffoldins，但缺乏 SLH domains，亦即就能產生第二群 scaffoldins 的物種而言，各類纖維素及半 cellulase 組合至 primary scaffoldins 後，這些 primary scaffoldins 會再接至 adaptor scaffoldins，最後再由這些 adaptor scaffoldins 與連接於菌體表面的 anchoring scaffoldins 結合而成為 polycellulosomes。能同時產生 primary 和 anchoring scaffoldins 的物種包括嗜熱厭氣性細菌 *C. thermocellum*、瘤胃厭氣性細菌 *R. flavefaciens*、*B. cellulosolvans* 及 *A. cellulolyticus*，而目前已知物種中，只有 *A. cellulolyticus* 可同時產生三種 scaffoldins(140)。相對於可產生 anchoring scaffolds 而藉由其 SLH domains

作為與菌體表面結合的媒介，嗜溫厭氣性細菌目前為止尚未發現 anchoring scaffolds 的存在，其所產生的 cellulosomes 與菌體間的結合媒介為何，目前仍為此類研究的重點之一，但近年有關 *C. cellulovorans* 的 cellulosome 系統研究發現，其所產生的 cellulosomes 主要藉由 primary scaffoldins 上的 HLD (hydrophilic domain，一種 X domain)及主要酵素 EngE (endoglucanase E)上的 SLH domains 與菌體表面結合(72, 128)。

大部分的糖苷水解酶(glycosyl hydrolase)都含有 CBM，研究顯示，CBMs 的存在能使這些水解酶增加對不可溶性基質的分解能力。CBMs 與糖苷水解酶一樣，依其胺基酸序列相似度可分為 64 個族群 (families)(23) (http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html)，若依其構型摺疊的相似性，則其可分為 7 個 superfamilies;然而就其功能性而言，CBMs 可分為三大類型。Type A CBMs 以位於同一平面上的芳香族胺基酸(Trp, Tyr, His)專一性地與結晶性纖維基質表面結合; type B CBMs 則只與單一條多醣鏈(polysaccharide chain)結合;而 CBMs 中與其相連的催化區具有相同碳水化合物結合專一性者皆稱為 type C CBMs，而此類 CBMs 只能與可溶性的基質結合。就目前已知的各類型 scaffoldins 而言，其組成中的 CBM 則屬於 CBM family-3 或為 type A。Scaffoldins 藉由此種 CBMs 與結晶性纖維基質結合以及其與菌體表面的連結而將菌體帶至基質並分解之(14)。

(3) 結合區-Cohesin

根據 *C. thermocellum* 的 cohesins 胺基酸序列同源性及其與 dockerins 的結合專一性研究顯示，位於 primary scaffoldins 和 anchoring scaffoldins 上的 cohesins 是具有差異性的(76, 113)，並將其分別分類為第一型(type I)和第二型(type II)。然而，當瘤胃細菌 *R. flavefaciens* 的 cohesins 序列及結合特性被研究後，由於其與已知的 cohesin 系統差異大，故將其 primary scaffoldins 以及 anchoring scaffoldins 上的 cohesins 歸類為第三型(type III)。另一個特殊例子為 *B. cellulosolvens*，其 primary scaffoldins 上的 cohesins 與其它物種 anchoring scaffoldins 上的 cohesins 在胺基酸序列上相似度較高，故其 cohesins 的分類上與其它物種相反(43)。*C. thermocellum* 的 scaffoldin CipA 含有九個 cohesins，由胺基端(N-terminal)開始的第 3 至第 8 個位置的 cohesins (cohesin-3 至 cohesin-8)彼此間具有較大的序列相同度，約為 95%。第 2 和第 9 個位置的 cohesins (cohesin-2、cohesion-9)其與第 3 至第 8 個位置的 cohesins 序列相同度較低，只具有 75%相同度，而第 1 個位置(cohesin-1)與第 3 至第 8 個位置的差異度則更大，約只有 63%相同度。這樣的序列差異性普遍存在於同一 scaffoldin 上的 cohesins，如 *C. cellulovorans* 的 scaffoldin CbpA，其 cohesins 間的相同度約介於 42-90%間。就不同菌種間的差異而言，其 cohesins 序列相同度約在 30-50%間;而各物種中，第一型與第二型 cohesins 間的差異更大，只有 15-26%相同度。有關 cohesins 的蛋白質立體結構研究中，目前已有第一型及第二型 cohesins 的立體結構被發表。第一型的例子包括 *C. thermocellum* scaffoldin CipA 上的 cohesin-2 (PDB code 1ANU)(117)和 cohesin-7 (PDB code 1aoh)(129)以及 *C. Cellulolyticum* scaffoldin CipC 上的 cohesin-1 (PDB code 1G1K)(120)，其立體結構構型相似，為一似捲心蛋糕(jelly-roll)構形。以 *C. thermocellum* scaffoldin CipA 上的 cohesin-2 為例，其包含 138 個胺基酸，而由 9 個 β -strands 形成的 β -sandwich 結構;此結構可分為兩部份，其一為由 4 個 strands 形成的 antiparallel β -sheet (β -strand 8,3,6,5)，另一個為由 5 個 strands 形成的 mixed β -sheet (β -strand 9,1,2,7,4)，在結構的中心位置則是由以苯丙胺酸(phenylalanine)為主要組成的疏水性中心。

第二型 cohesin 立體結構研究亦顯示其彼此間具有相似的 jelly-roll 構形，此結果和第一型結構相似，但其間仍存有幾個明顯的差異處。以 *B. cellulosolvens* Bc-cohesin-II (PDB code 1TYJ)(97)為例，這些結構上的差異包括(I) 第二型 cohesin

具有一個 α -helix 插入 β -strand 6 和 7 間; (II) 第二型 cohesin 具有兩個稱為 β -flap 的二級結構，其分別插入 β -strand 4 和 8 中間部份，但這兩個 β -flaps 並不會改變 β -strand 原本在空間中延伸的方向。這兩種差異性也成為胺基酸序列差異外，第一型與第二型 cohesins 最大的鑑別處。另外，在這些結構研究中亦發現 cohesins 在結晶過程中會形成二元體(dimer)。研究顯示，這些二元體間存在著互補性界面 (complementary interface) 關係，靠著其間的作用力，包括鹽橋作用(salt bridge)、氫鍵(hydrogen bond)以及疏水性作用力(hydrophobic interaction)，使其二者結合，而這些作用力主要是發生在 β -strand 8,3,6,5 界面中較保守的胺基酸上。此種二元體在生理功能上的角色仍需進一步探討，目前研究者推測其可能是和 cellulosomes 組裝調節有關。尚未有適當的酵素至結合位置時，scaffoldins 可藉由 cohesins 形成二元體的機制關閉 scaffoldins 與其它酵素的非專一性結合(97, 117)。

(4) 錨固區-Dockerin

參與 cellulosome 的各種 cellulase 及 hemicellulase 都具有一段稱為 dockerin 的錨固區，這些酵素藉由 dockerins 與 scaffoldins 上的 cohesins 結合而組合至 cellulosomes 中。Dockerin 由約 70 胺基酸組成，通常出現在酵素的羧基端(carboxyl terminal)，目前研究亦顯示有些 scaffoldins 也具有 dockerins，而此種 dockerins 的出現也使得不同類型的 scaffoldins 能再組合成 multicellulosome(14)。如同 cohesins 依胺基酸序列同源性及結合專一性所作的分類，dockerins 依胺基酸序列同源性及相對應的 cohesins 結合類型，其亦可分為三型。第一型 dockerins 通常位於各種參與 cellulosome 組合的 cellulase 及 hemicellulase 之羧基端；第二型 dockerins 則是位於 scaffoldins 上；第三型則屬於 *R. flavefaciens* 系統。Dockerins 的胺基酸序列分析及生化特性研究顯示，一個 dockerin 序列中存在兩個高相似度約由 22 胺基酸組成的重覆序列(duplicated sequence)，而在這兩個重覆序列中間的是一段約 9-16 個胺基酸組成的連結區(linker)(101)。經由截切形式的 dockerins 結合實驗結果顯示，只有單一個重覆序列時，重組 dockerins 會失去與 cohesins 結合的能力，若將這兩個序列的順序調換或以同樣序列之重覆式出現，則其與 cohesins 間的親和力並未受到影，由此可知 dockerins 中的兩個重覆序列在與 cohesins 結合作用中扮演著關鍵性的角色(50)。有關 dockerins 序列方面的研究指出，dockerins 每個重覆序列中的前 12 胺基酸，其在序列上與已知的 EF-hand motif 中鈣離子結合環(calcium-binding loop)構形相似，但是其缺少了 E-helix 構形，立體結構與 EF-hand motif 相異(85, 101)。經與 cohesins 胞外(*in vitro*)的結合實驗證實，cohesin-dockerin 的結合作用需有鈣離子的參與(34, 142)，鈣離子的作用為誘使 dockerins 在結合過程改變構形以利與 coehsins 的結合，並穩定此結合複合物的立體結構(6, 86)。

(5) 結合區與錨固區結合作用 -Cohesin-dockerin interaction

以 *C. thermocellum* xylanase 10B (Xyn 10B)之 dockerin 與其 CipA cohesion-2 之結合作用為例，Xyn 10B 的 dockerin 由 3 個 α -helix 組成，這 3 個 helix 以 loop-helix motif 及 helix-loop-helix motif 出現在立體結構中，而 helix-1 和 helix-3 為一般 dockerins 中保守的結構，其位置分別位於 dockerins 的兩個重覆序列中；helix-2 則為 dockerins 中較不保守的結構，並非所有 dockerins 都具有。Dockerins 在溶液中時，其構形是較具彈性的(flexible)，而當 dockerins 和 cohesins 結合時，helix-1 和 helix-3 的位置會比未結合之前更為靠近且整個 dockerin 在結構上也更穩定。若將 dockerins 與 cohesins 在結合及未結合時的構形重疊比較，可看出 dockerins 在未與 cohesins 結合時，其 helix-3 距離 cohesins 較遠而無法有結合作用的產生，因此 dockerins 與 cohesins 結合時，dockerins 需有構形上的改變才能達成結合作用(29)。Xyn 10B dockrein 與 CipA cohesion-2 結合之異質二元體(heterodimer)立體結構中，其 dockerin 主要以 helix-3 與 cohesin 的 8,3,6,5 β -sheet 間的疏水性作用力與分子間氫鍵鍵結進行結合，而 helix-1 與 8,3,6,5 β -sheet 間的作用力則較少。*C. thermocellum* CipA cohesion-7 的定點突變研究顯示，cohesin-7 的 Asp39、Tyr74、Glu86 和 Gly89 在與 dockerin 結合或形成 cohesin 二元體時扮演著關鍵角色(91);而有關 *C. thermocellum*、*C. josui* 及 *C. cellulolyticum* 其 cohesins 與 dockerins 間的結合作用研究顯示，此種蛋白質間親和力其結合常數 $K_A \geq 10^9 \text{ M}^{-1}$ (50, 69)，相當於抗原與抗體間的親和力($K_A 10^7$ - 10^{11} M^{-1})(136)。在 CipA cohesin-2 中，若將其相對應於 cohesin-7 Asp39 的 Asp34 替換成 Asn34，則其與 dockerin 間的親和力會降低 1000 倍(58)。Cohesin-2 相對應於 cohesin-7 的 Asp39、Tyr74 和 Glu86 胺基酸與 cohesin-7 的結合方式相同，這些胺基酸都直接與 dockerin 上的胺基酸進行鍵結，然而，Gly89 則需有一個水分子的調節才能與 dockerin 中的 Arg53 連結。此外，目前研究顯示，*C. thermocellum* 和 *C. cellulolyticum* 的第一型 cohesins 可以和其本身酵素所含的 dockerins 結合，亦即在種內 cohesins 和 dockerins 的結合是非選擇性的(nonselective)(84, 102)。雖然此兩物種的 dockerins 在胺基酸序列上有高同源性，但在與 cohesins 結合上卻有著物種間的差異性，亦即 cohesins 和 dockerins 的結合作用是具有種的專一性(species specificity)(101);而在同一物種內，同一 dockerin 可與同一 scaffoldin 來源的不同 cohesins 結合，但其間的親和力差異可達 10 倍，因此，cellulosomes 在組成過程中，

其 cellulase 及 hemicellulase 可能是以隨機方式結合至 scaffoldins 上的 cohesins(69, 106)。 *C. josui* 和 *C. thermocellum* 亦有相同現象，表示 cohesin-dockerin 的結合作用在 *Clostridium* 屬中普遍存在種的專一性。然而，最近的研究卻顯示，*C. thermocellum* Xyn 11A 可與 *C. josui* 的 cohesin 結合(69)，另外，Xyn 11A 和 Xyn 11B 亦可與 *C. thermocellum* 和 *C. cellulolyticum* 的 cohesins 結合。從序列分析結果顯示，*C. cellulolyticum* 和 *C. josui* 彼此的 cohesins 與 dockerins 具有高相似度，而 *C. thermocellum* Xyn 11A 與 Xyn 11B 能與 *C. cellulolyticum* 的 cohesins 結合，應與 Xyn 11A 能和 *C. josui* cohesin 結合一樣，是一種非典型 (untypical) 的 cohesin-dockerin 結合作用，至於是什麼因素使得 Xyn 11A 與 Xyn 11B 能產生交叉反應(crossreactivity) 現象，目前尚未得到進一步研究探討，這可能是 scaffoldins 中，其 cohesins 專一性結合的多樣化現象，但仍有待更多物種來源的 cohesins 序列被分析、研究進一步證實。經由各物種來源的不同 dockerins 其胺基酸序列分析及定點突變實驗結果顯示，dockerins 的每個重覆序列中，calcium-binding motif 的第 10、11、17、18 及 22 位置和其與 cohesins 專一性結合的辨識有關，(14, 88)，當 *C. thermocellum* CelS 與 *C. cellulolyticum* CelA 的 dockerin 其辨識位置胺基酸互換時，此兩酵素即可與對方的 cohesins 進行結合作用(89)。由 cohesin-dockerin 結合體的結構分析得知，cohesins 中共有 16 個胺基酸參與結合作用，以 *C. thermocellum* CipA 的 cohesin-2 為例，共有 4 個胺基酸藉由水分子與 dockerin 鍵結，5 個氫鍵結以及 7 個疏水性作用力，其中 Ala36、Asn37 及 Glu131 為其辨識位置(29)。*C. thermocellum* CipA 的 8 個 cohesins 中，直接參與 cohesins 和 dockerins 結合作用的氫鍵鍵結胺基酸是相同的，也因此 dockerins 可與同一物種來源之 scaffoldin 上的 cohesins 產生專一性的結合(101)。

(6) 纖維素分解酶複合體基因群-cellulosome gene clusters

Cellulosomes 各組成分基因大部分以基因群(gene cluster)形式存在於物種基因組(genome)中，一般可將其分成兩大類(14)。一類為由兩個或兩個以上的 scaffoldin 基因所組成，稱為多支架蛋白質基因群 (Multiple-scaffoldin gene clusters)，這些 scaffoldins 包含具有第二型 dockerins 的 primary scaffoldins、anchoring scaffoldins 以 adaptor scaffoldins; 另一類則由第一群 scaffoldin(不含第二型 dockerins 之 primary scaffoldins)基因及 cellulosomes 中各種分解酶基因所組成，稱為酵素連結基因群 (Enzyme-linked gene clusters)。對於 *C. thermocellum*、*R. flavefaciens*、*B. cellulosolvans* 及 *A. cellulolyticus* 等具有多支架蛋白質基因群的物種而言，其與纖維基質分解相關分解酶基因大部分也是以基因群的形式存在於基因組中，然而，這些基因群所包含的基因除了屬於 cellulosome 組成者外，亦包含了不屬於 cellulosome 組成的分解酶基因。以 *C. thermocellum* 為例，目前已有包含 *celC-celT*、*cell-cseP*、*celA-orfZ*、*celk-cbhA*、*xynB-xynA* 等基因群被發表，在 *cell-cseP* 和 *celA-orfZ* 基因群中，CellI 及 CelA 因不具有 dockerins，故其不屬於 cellulosome 組成中的分解酶(145)。另外，*celk-cbhA* 及 *xynB-xynA* 基因群，由於各具有兩個相似度高之基因，因此被認為其是由基因複製 (gene duplication)所產生(61)。

(7) 重組纖維素分解酶複合體-Cellulosome chimeras

80 年代開始已有許多屬於 cellulosome 組成的 cellulase 及 hemicellulase 基因被選殖、表達及分析，其中 cellulase 多屬於包含了外切型 (exo-)及內切型(endo-)作用機制的糖苷水解酶第 5、8、9、48 族群。這些分解酶對於水溶性或結構較鬆散的非結晶性或不定型(amorphous)纖維素都具有高分解效率，但對結晶性纖維素的分解效率則非常低;研究顯示，在這些分解酵素中，有些組合可以對結晶性纖維素進行分解，如 *C. cellulolyticum* 的纖維分解酶 Cel48F 及 Cel9G，當其以游離形式(free form)同時存在於纖維分解反應中，其可得到較分解酵素單獨作用時更高的分解效率，而這樣的作用即稱為協同式(synergistical)分解作用。然而，這樣的分解效率仍比天然的 cellulosomes 對結晶性纖維素分解的效率還低 40 倍(48)。自然界中，這些分解酶利用 cellulosome 的機制使得對結晶性纖維素進行分解時能得到最大的協同作用及效率;相對於其它蛋白質複合體(如 proteasome、ribosome)，cellulosmes 的各次單元體在與 scaffoldins 結合時並沒有固定的排列位置，而且這些物種同時分泌出的 cellulosomes 各次單元體在個數比例、組成、排列及大小等複雜性問題都使得對 cellulosome 的整合機制及其協同催化作用的研究產生困難，因此，建立一套簡化、具同質性及已知組成分的重組 cellulosome(cellulosome chimeras)或迷你纖維素分解酶複合體 (minicellulosme)，為此一研究領域的關鍵。目前研究者已經成功地建立多個完整的 scaffoldin chimeras，其組成包含一個 CMB (family-3)及兩個分別來自 *C. thermocellumpux* 及 *C. cellulolyticum* 的 cohesins (type I)，另亦有具兩個 CBMs 或不具 CBM 之 scaffoldin chimeras，其主要設計原理是根據不同種間 cohesin 與 dockerin 的專一性結合特性，以確定能在胞外得到預期的 cellulosome chimears 組合(48, 49)。這樣的 cellulosome chimeras 組合現已被利用於各類型 CBMs、不同分解酵素組合對於結晶性纖維素分解的機制探討以及其在生物體內 (*in vivo*)調控的研究(95)。此外，近年亦有以基因工程改造菌株生產 cellulosome chimera 的相關研究，目的在於使一非纖維利用菌株藉由 cellulosome chimera 的產生，而能以廢棄的纖維基質為碳源以達到降低成本及其它生物技術的應用(107)。

關於 cellulosomes 的研究發展至今已超過二十年，在此範疇中仍有許多方面持續地發展，包括：(I)隨著 *C. thermocellum* 的基因組解碼以及其它物種 cellulosome 相關基因的陸續發表，研究者可獲得愈來愈多的資訊及資源以利探究各物種間

cellulosome 這種纖維素分解機制的調控、多樣性及系統差異; (II) 為了了解 cellulosome 的作用機制及提高其應用性, 建構 cellulosme chimeras 是一可行且便利方法, 而為了能在胞外調控其各次單元體的組成、樣式、結合與分離, 仍需更多各次單元體或功能區塊(domains)在其序列、結合專一性與親和力、立體結構以及其它生化、蛋白質工程方面的研究基礎; (III) 具可調控性的 cellulosome chimeras 不僅可以應用於和纖維基質分解相關的領域中, 其中 scaffoldin chimeras 的概念在蛋白質(或酵素)固定化及多蛋白質(酵素)作用機制的應用亦具發展潛力。

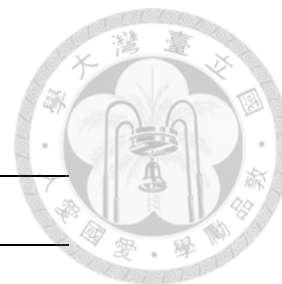


1.7 厭氣性真菌

自然界中，厭氣性真菌 (anaerobic fungi) 目前只被發現分佈於反芻動物與單胃草食性動物的消化道中，故又稱為瘤胃真菌(rumen fungi)或是腸道真菌(gut fungi)，其在瘤胃的族群密度約為 $10^5 \sim 10^6$ /g rumen digesta(9)。第一株厭氣性真菌為 Orpin 於 1975 年自綿羊的瘤胃液中分離出，命名為 *Neocallimastix frontalis* Orpin(99)，到目前為止，共有分屬六個屬的 18 株厭氣性真菌菌種被分離鑑定並且完成命名，由於 *N. frontalis* 與 *N. patricarum* 在形態上不易辨別，另外，環境的改變及生長壓力常造菌株在形態上的變異，不同實驗室對動孢子顯微構造的觀察也不易比較。Ho 等人在認為 *N. patricarum* 應是 *N. frontalis* 的同義株(synonymy)(64)。至目前為止仍有許多研究視這兩株菌為不同物種，因此，在這兩物種在分類上尚有爭議。核糖體基因已廣泛被利用做為分子分類指標，而厭氣性真菌的此分類上，目前只能以內部轉錄區(internal transcribed spacer 1, ITS1)區分 *Neocallimastix* 屬與其它四個屬(26)。厭氣性真菌的分類地位及已知菌種分別整理如表 1-5 與表 1-6(4)。

表 1-5 厭氣性真菌的分類地位表

Table 1-5 The classification of anaerobic fungi(25, 80).



Kingdom	Fungi
Phylum	Chytridiomycota
Class	Chytridomycetes
Order	Neocallimastigales
Family	Neocallimastigaceae
Genus	<i>Neocallimastix</i> 、 <i>Piromyces</i> <i>Caecomyces</i> 、 <i>Orpinomyces</i> <i>Anaeromyces</i> 、 <i>Cyllamyces</i>

表 1- 6 已知的厭氣性真菌菌株

Table 1-6 The known species of anaerobic fungi(4, 32).

Genera	Species	Host
<i>Neocallimastix</i>	<i>N. frontalis</i>	Sheep
	= <i>N. variabilis</i>	
	<i>N. patricarum</i>	
	<i>N. hurleyensis</i>	Sheep
<i>Piromyces</i>	<i>P. communis</i>	Sheep
	<i>P. mae</i>	Horse
	<i>P. dombonica</i>	Elephant
	<i>P. spiralis</i>	Katjang goat
	<i>P. minutus</i>	Sika deer
	<i>P. citronii</i>	Pony
	<i>P. rhizinflatus</i>	Saharian ass
	<i>P. polycephalus</i>	Water buffalo
<i>Orpinomyces</i>	<i>O. joyonii</i>	Sheep
	= <i>O. bovis</i>	
	= <i>N. joyonii</i>	
	<i>O. interalaris</i>	Water buffalo
<i>Anaeromyces</i>	<i>A. elegans</i>	Cow
	<i>A. mucronatus</i>	Sheep
<i>Caecomyces</i> (<i>Sphaeromonas</i>)	<i>C. communis</i>	Sheep
	<i>C. equi</i>	Horse
	<i>C. sympodialis</i>	Cow
<i>Cyllamyces</i>	<i>C. aberensis</i>	Cow





1.8 厭氣性真菌纖維素分解酶系統研究

(1) 纖維素分解酶

自 1975 年瘤胃厭氣性真菌被發現後，已有許多厭氣性真菌的分離鑑定、其在瘤胃纖維素分解上所扮演的角色及其所產生的 cellulase 的相關研究(9, 25, 79, 82, 110, 132, 137)。一般纖維素分解菌如 *Trichoderma* 與 *Clostridium* 屬被認為對纖維素具有較強的分解能力(130)，而 *Trichoderma* 屬中的 *T. reesei* 與 *T. viride* 對於纖維素不定形區域有高的水解能力，但對於結晶性部份則是非常低(20)。根據目前的研究顯示，厭氣性真菌 cellulase 對於結晶性纖維素的分解能力高於已受到廣泛研究的 *Trichoderma* 與 *Clostridium* 屬來源 cellulase(40)。由於分子生物學的進展，已有許多厭氣性真菌來源的 cellulase 基因被選殖(cloning)、轉形(transformation)至原核生物中表達(expression)與進行酵素特性分析(10, 30, 31, 35, 40, 44)。在厭氣性真菌 cellulase 基因選殖方面，目前已有 79 條與分解纖維素相關的酵素基因登錄在基因資料庫中，其分屬糖苷水水解酶族群 1、3、5、6、9、45、48 族群中，這些基因序列在組成上具有兩個特色，第一、大多數厭氣性真菌 cellulase 基因並不存在插入子(intron)(144)，第二、厭氣性真菌 cellulase 基因的 G+C 百分比低於 20%，遠低於其它真菌(28, 110)。


以胺基酸序列的結構組成而言，好氣性真菌 cellulase 的一級結構中除了催化區域(catalytic domain)外，其還包含了用以與催化基質(substrate)結合的纖維素結合區域(CBD)(55)，文獻報告中將這種組合形式的分解酶歸類為游離形式(free form) cellulase。目前有少數被選殖與表達的厭氣性真菌 cellulase 具有 CBD，所以厭氣性真菌 cellulase 系統亦類似好氣性纖維分解微生物，具有游離式的系統(30, 35, 40)。然而，更多的研究報告指出，厭氣性真菌的 cellulase 及 hemicellulase 的一級結構為催化區域與錨固區域的組合，此與厭氣性細菌如 *Clostridium* 屬與 *Ruminococcus* 屬等 cellulase 一級結構的組成類似，因此，一般推測厭氣性真菌的纖維素分解系統應該還具有與厭氣性細菌類似的複合形式的系統，cellulosome(46, 52, 122)。



(2) 纖維素分解酶複合體

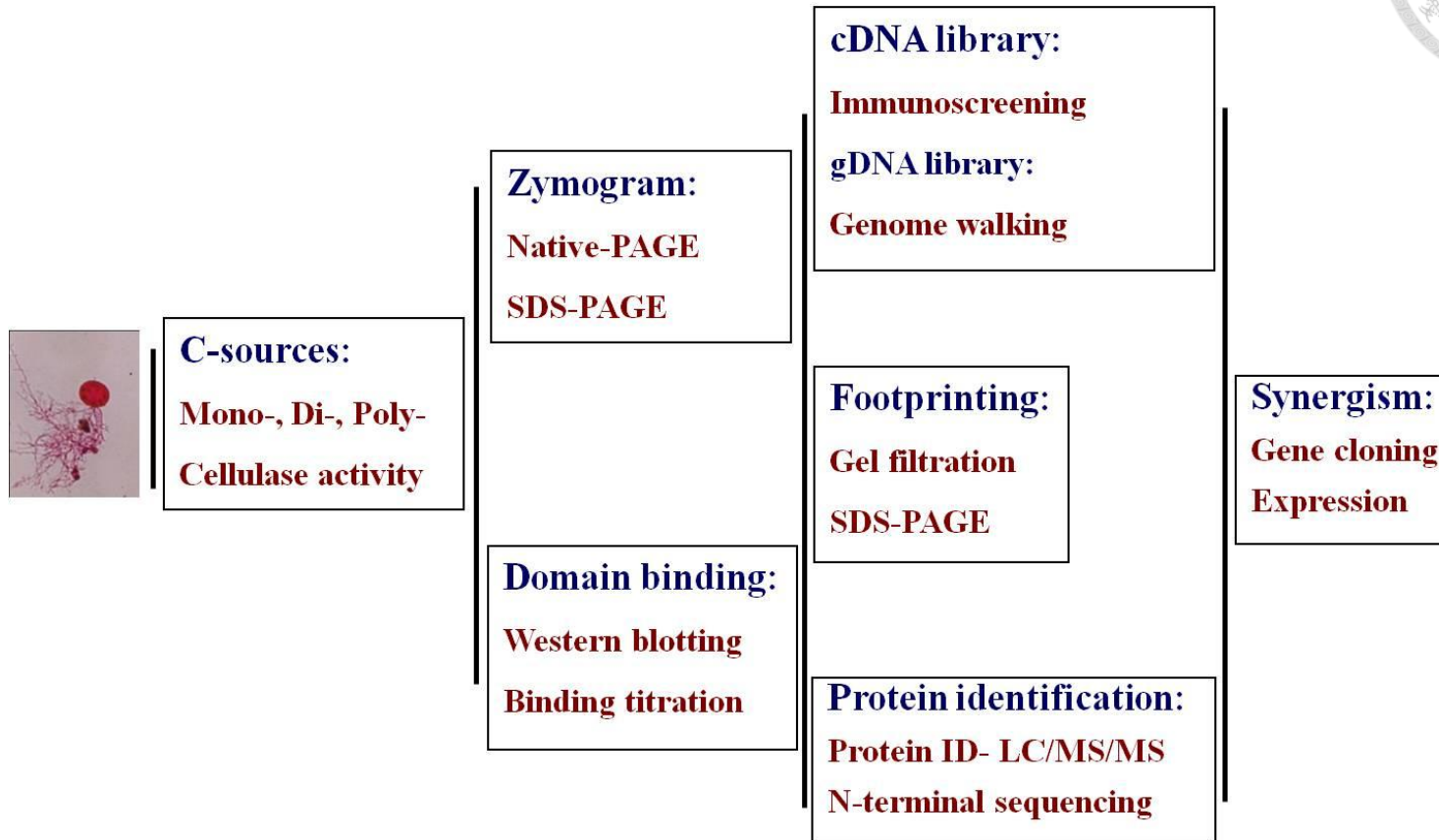
在厭氣性真菌的 cellulase 系統中，除了可產生與好氣性微生物相同的游離式分解酵素外，其也具有與厭氣性細菌相似的大分子 cellulosome 系統。早期研究顯示，在厭氣性真菌 *Neocallimastix*、*Orpinomyces* 和 *Piromyces* 屬中可發現能產生類似 cellulosome 系統的菌種(7, 42, 46, 131, 138)，以 *Piromyces* sp. E2 為例，Teunissen 等人從此菌培養上清液純化 endoxylanase 的過程中發現一個分子量約 1200 kDa 且具有木聚糖酶活性的蛋白質複合體，後來 Dijkerman 等人對此複合體的研究發現，其亦具有 avicelase、endoglucanase、 β -glucosidase 的活性，經過界面活性劑處理後，發現其至少由 10 個多肽鏈組成。類似的情形亦在 *P. equi* 的研究中被發現，其複合體的分子量約 670 kDa，由至少 10 個分子量從 50 至 190 kDa 的多肽鏈組成，這些多肽鏈中包含了 endoglucanase、xylanase 及 mannanase 的活性。Wilson 等人比較 *N. frontalis*、*C. thermocellum* 的 cellulosome 及 *T. reesei* 的纖維素分解系統對結晶性棉花纖維的分解能力結果顯示，*C. thermocellum* cellulosome 對此基質的分解能力遠優於 *T. reesei* cellulase 系統，約有 5 倍差異，而 *N. frontalis* cellulosome 則又優於 *C. thermocellum* cellulosome 的分解能力，因此，厭氣性真菌的 cellulosome 系統為一具潛力的 cellulase 系統來源。1995 年，Fanutti 等人從 *Piromyces* xylanase A、mannanase A 以及其它厭氣性真菌 cellulase 及 hemicellulase 的一級結構分析，發現其組成除了催化區外，另具有高相似度、約 40 個胺基酸組成的重覆序列，且其不能與纖維素結合。此外，這兩個酵素分別可與來自 *Piromyces* 和 *N. patriciarum* 複合體中分子量約 97 及 116 kDa 的組成分結合(46)。這些重覆性序列出現在大部份已發表之厭氣性真菌 cellulase 及 hemicellulase 中，且實驗證實其與基質結合無關，因此，相關研究者認為此重覆序列的功能與厭氣性細菌分解酶中的 dockerins 相似，這些研究結果也更進一步對厭氣性真菌存在著 cellulosome 系統提供佐證。然而，截至目前為止，有關厭氣性真菌纖維素複合體中假定的 scaffoldin 基因仍未被發表。2011 年 3 月美國能源部(U. S. Department of Energy, DOE)所屬的基因組研究中心，DOE Joint Genome Institute (DOE JGI)已經完成厭氣性真菌 *Piromyces* sp. 的基因組草圖(<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects/>)，未來此基因組序列資訊可為厭氣性真菌 cellulosome 系統的研究提供更有利的研究基礎。

1.9 研究動機



cellulase 於應用時效果不佳的原因主要在於纖維素具有高度結晶性、鍵結組成多樣且其外層有各種半纖維素的包覆。因此對纖維素要有效分解，除了需要具有高結晶性纖維素分解能力的酵素外，亦需要其它不同型式的 cellulase 及 hemicellulase 互相配合。具高結晶性纖維分解能力的厭氣性細菌 cellulosome 系統，其相關研究仍持續在發展，目前已有許多研究探討其調控機制以及 minicellulosome 合成與應用方面。然而，關於另一具高結晶性纖維分解能力的厭氣性真菌系統研究卻相對不足，目前研究範疇仍以相關基因的選殖及異源表達為主。對於該系統組成分生成、調控以及其與細菌系統的比較仍相當缺乏。本研究以厭氣性真菌 *N. patriciarum* J11 為對象，探討其 cellulosome 系統誘導生成、相關組成分鑑定與基因選殖，並試圖探究此 cellulosome 系統在分解結晶性纖維時，其關鍵組成份的類型。期望相關成果能做為未來厭氣性真菌 cellulosome 系統調控機制研究與應用之基礎。

1.10 實驗架構及流程



第二章 材料與方法



2.1 藥品、試劑與儀器

(1) 藥品與試劑

Ethanol absolute (Sigma, 32221)

Liquid nitrogen

PCI (Phenol: chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1)

(Amresco, K169)

Ethidium bromide (200 μ g/ml)(Sigma, E8751)

Formamide (Sigma, F9037)

Isopropanol (Sigma, 33539)

Phenol (Merck, 100206)

Chloroform (Sigma, C5312)

Glycogen (Sigma, G1508)

Mineral oil (Sigma, M8410)

Formaldehyde (Sigma, F8775)

Agarose (Amresco, J234)

Ampicillin (MDBio, GB1046)

Tetracycline (Sigma, T3258)

Kanamycin (Sigma, K1377)

Chloramphenicol (Sigma, S-0378)

Streptomycin (Sigma, S-9137)

Penicillin-G (Sigma, PEN-NA)

IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) (Sigma, I6758)



10 ×PCR buffer (Protech, PTM526)
dNTP (2.5mM each, Protech, PTM526)
MgCl₂ (50mM, Protech, PTM526)
Super-Taq DNA polymerase (Protech, P5a)
Taq DNA polymerase (Protech, PTM526)
Restriction enzyme: *Bam*H I (NEB)
Avicel (Merck, 102330)
Carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma, C4359)
Barley β-glucan (Megazyme, 10401)
Oat-xylan (Sigma, X0627)
Lichenan (Sigma, L6133)
Laminarin (Sigma, L9634)
Pachyman (Megazyme, 71001)
10× Formaldehyde gel-loading buffer (Ambion, 8552)
10×MOPS electrophoresis buffer (Ambion, 8671)
Agarose gel containing 2.2 M formaldehyde (Sigma, F8775)
TRIZOL[®] Reagent (GIBCO BRL, 15596-026)
20×SSC buffer (Amresco, 0918S-2-20XPTM2L)
10× lambda dilution buffer:
1M NaCl, 0.1M MgSO₄ · 7H₂O, 0.35 M Tris-HCl (pH7.5).
1× lambda dilution buffer:
100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 35 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01% (w/v) gelatin.
Britton and Robinson's universal buffer:
50 mM phosphoric acid, 50 mM boric acid, 50 mM acetic acid.
DNS (dinitrosalicylic acid) solution:
1%(w/v) DNS, 0.2%(w/v) pheno, 0.05%(w/v) sodium sulfate, 20%(w/v) Rochelle salt, 1%(w/v) NaOH.

Low molecular weight protein marker (LMW) (Pharmacia Biotech, 17-0446-01)

Prestained molecular weight marker (MBI, SM0441)

PolyATtract mRNA Isolation Systems Kit (Promega, Z5300)

SMART[™] cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences, K1051-1)

Gigapack[®] III plus Packaging Extract kit (Stratagene, 200204)

QIAGEN PCR purification kit (QIAGEN, 28106)

Gel-extraction kit (QIAGEN, 28706)

pGEM[®] -T vector (Promega, A3600)

pET21a vector (Novagen, 69740-3)

B-PER[®] Bacterial Protein Extraction Reagent (PIERCE, 78266)

BCA Protein Assay Kit (PIERCE, 23221)

T7-Tag Affinity Purification Kit (Novagen, 69025-3)

Ni-NTA agarose (QIAGEN, 1018244)

Amicon Ultra-15 (Millipore, UFC9 010 08)



(2) 儀器

PE Biosystems DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)

核酸計算儀 GeneQuant II (Pharmacia Biotech)

ELISA 光度計 VERSA max microplate reader (Molecular Devices)

高效液相層析儀 AKTA purifier 100 (GE Healthcare Life Sciences)

2.2 厭氣性真菌培養



(1) 菌種

瘤胃厭氣性真菌 *Neocallimastix patriciarum* J11 為本研究室陳又嘉博士從陽明山擎天崗水牛糞便中分離，並以稻桿為繼代培養之碳源(1)。

(2) 厭氣基礎培養基

本實驗之厭氣操作技術及厭氣基礎培養基主要依據本實驗室原有之技術進行(1)。不含碳源之基礎培養基，其組成份如表 2-1 所示(4)，之後再添加不同碳源作為各式不同實驗時所需之培養基。將配製完成之培養基裝入血清瓶(100、500 ml, Schott, Germany)後加入碳源，並以矽膠塞密封，經由二氧化碳曝氣後以高溫高壓蒸氣滅菌 (121°C, 20 min)。在接種前於培養基加入抗生素抑制細菌生長，抗生素組成為 0.06% (w/v) chloramphenicol、0.265% (w/v) streptomycin 及 1.2% (w/v) penicillin-G(4)。

(3) 各類操作培養基

(A) 菌種繼代保存: Hungate tubes (8×12.5 mm, Bellco Inc. USA) 盛裝 6 ml 基礎培養基並以稻桿為碳源。

(B) 不同碳源生長測試: 以 100 ml 血清瓶裝 50 ml 基礎培養基並以 0.5% (w/v) 葡萄糖、木糖(xylose)、果糖(fructose)、蔗糖(sucrose)、麥芽糖(maltose)、cellobiose、Avicel、CMC、稻桿、xylan 為碳源。

(C) Cellulosme 純化與 RNA 抽取: 以 500 ml 血清瓶裝 250 ml 基礎培養基並以 0.5% (w/v) 結晶性纖維素 Avicel、羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose, CMC)、木聚醣(xylan)、稻桿、纖維雙糖(cellobiose)、葡萄糖為碳源。

(D) DNA 抽取與 library 建構: 以 500 ml 血清瓶裝 250 ml 基礎培養基並以 0.5% (w/v) 葡萄糖為碳源。



(4) 培養方法與生長測試

本研究中菌體培養接種方式為使用注射針筒，種菌來源為 0.5% 葡萄糖為碳源之三天振盪培養液及菌體，接種量為 1/12.5(v/v)。生長測試實驗中，以兩支 50 毫升針筒及三向閥組合裝置檢測培養瓶中總產氣量並以此為評估標準。培養條件為 $39\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、靜置培養(47)。

表 2- 1 基礎培養基之組成份表

Table 2-1 The composition of basal medium(4).

Components	Amount
Solution I ,K ₂ HPO ₄ (3g/L)	150 ml
Solution II *	150 ml
Rumen fluid**	150 ml
NaHCO ₃	6 g
Resazurine	10 ml
Yeast extract	1 g
Trypticase peptone	1 g
Cystein-HCl	0.9 g
Hemin solution (1mg/ml)	10 ml

*Solution II：每公升組成為 KH₂PO₄ 3 g、(NH₄)₂SO₄ 3 g、NaCl 6 g、MgSO₄-7H₂O 0.6 g、CaCl₂-2H₂O 0.6 g

**Rumen fluid: 取自台大動物科學技術學系荷仕登乳牛(Hostein cow)，經 10,000 g 離心後上清液再過五層紗布即得實驗用之瘤胃液。



2.3 Cellulosme 純化



將瘤胃厭氣性真菌 *N. patriciarum* J11 接種至 250 ml 含 0.5% 葡萄糖之基礎培養基中，置於 40 °C 培養箱震盪培養(200 rpm)四天。之後接種種菌至總體為 1500 ml 含 0.5% 結晶性纖維 Avicel (102330, Merck)之基礎培養基中，置於 40 °C 培養箱靜置培養五天。

本實驗步驟參考 Steenbakkers 等人(122, 123)之純化方式並做適當之修改。以細鐵篩過濾分離培養五天之瘤胃真菌培養上清液、菌絲和固態基質(Avicel)。將培養上清液於 4°C 下離心(6000 g)20 分鐘後取其上清液部分並將其以超濃縮過濾(50 kDa cut-off)方式將 1500 ml 之培養上清液濃縮並置換緩衝液為 100 mM 磷酸氫鉀緩衝液(P-buffer, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5)。將上述所得之 200 ml 濃縮液再經攪拌式超濃縮過濾裝置(30 kDa cut-off, 8050 Stirred cell, Millipore)濃縮至 40 ml。利用 cellulosomes 與結晶性纖維的親和性結合能力，於上述步驟所得之濃縮液中將入 Avicel (4%)並置於 4°C 下緩慢攪拌 2 小時。離心(3500 g)15 分鐘後掉倒上清液並以 100 mM P-buffer 洗滌，重覆此步驟三次。最後再以 25 mM P-buffer 洗滌一次，並加入 10 ml 蒸餾水於 Avicel 中於室溫下震盪(250 rpm)30 分鐘後離心(3500 g)15 分鐘，收集上清液，重覆此步驟三次。將上述中所得上清液以攪拌式超濃縮過濾裝置(5 kDa cut-off, 8050 Stirred cell, Millipore)濃縮至 5 ml，加入檸檬酸鈉緩衝液(sodium citrate buffer, pH 6.2)至最後濃度為 50 mM，此即為 cellulosome 製備液。

2.4 膠體過濾法



本實驗使用膠體為 Sephacryl S-300 HR，管柱空管為直徑 1.6 公分、100 公分之玻璃管柱(GE healthcare)，填裝體積約 180 毫升。本實驗使用之儀器為 AKTA-FPLC (Pump P920, Mixer M-925, Monitor UPC-900)。管柱填充平衡條件為 50 mM 檸檬酸鈉緩衝液(0.2 M NaCl)平衡 12 小時，流速為 1.0 ml/min。以同樣緩衝溶液流洗出蛋白質，流速為 1.0 ml/min，每 5 毫升收集為一管。

2.5 纖維素分解酶活性分析

本實驗以 DNS (dinitrosalicylic acid)呈色法及以葡萄糖為標準品，偵測還原糖量定量 cellulase 活性。將各種纖維素基質分別溶於 pH 6.2、50 mM citrate buffer，配製成 0.5% 基質溶液。取經適當稀釋的粗酶液 50 μ l 與 450 μ l 基質溶液混勻，於 40°C 反應 60 分鐘，之後加入 DNS 並於 100°C 反應 5 分鐘，以 ELISA 光度計偵測 540 nm 吸光值，實驗對照組為 50 μ l citrate buffer 與 450 μ l 基質溶液，酵性活性單位 1U 定義為每毫升粗酵素液每分鐘可產生 1 μ mol 還原糖，比活 (specific activity)單位定義為每毫克全蛋白質中所含酵素活性 (U/mg protein)。

2.6 變性及原態聚丙烯醯胺膠體電泳



(1) 膠體電泳製備

本實驗所用之各項反應試劑依照 Sambrook 等人(114)所述配製。其中，原態聚丙烯醯胺膠體電泳(Native-polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE)、變性聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及其活性染色(zymogram)實驗分別使用 6%、8% 聚丙烯醯胺分離膠體，且 SDS 使用濃度增為兩倍。SDS-PAGE 硝酸銀染色則使用 10% 聚丙烯醯胺分離膠體。重組蛋白質實驗中，SDS-PAGE 使用 13% 聚丙烯醯胺分離膠體。活性染色實驗所用之膠體分別含有 0.25% barley β -glucan (10401, Megazyme)及 0.5% oat spelts-xylan (X0627, Sigma)。

(2) 變性聚丙烯醯胺膠體電泳條件

取適量樣品與追蹤染劑混合後，於 100°C 加熱 10 分鐘(重組蛋白質實驗則為 100°C 煮 5 分鐘)，冰浴冷卻後離心 30 秒，以微量針管注入樣品槽，連接電源以 150 V 進行電泳，待追蹤染料跑出膠片外關閉電源，取出膠片以 CBR (Coomassie Brilliant Blue R250)染色液染色 30 分鐘後，以 CBR 脫色液進行脫色，脫色完畢的膠片乾燥保存。本實驗中，硝酸銀染色方法參照使用手冊(Silver SNAP stain kitII, PIERCE)。

(3) 原態聚丙烯醯胺膠體電泳條件

操作方法如(B)，但樣品及原態樣品緩衝液混合後不經100°C加熱步驟。

(4) 聚丙烯醯胺膠片染色

(A) Coomassie Brilliant Blue R250 (CBR)方法。

染色液:

0.75 g 用 250 ml 100 % methanol 溶解後，加入 250 ml 二次水 50 ml acetic acid。

CBR 脫色液:

10 % acetic acid 與 20 % methanol 的水溶液

(B) 硝酸銀染色方法。

參照Pierce Silver Stain Kit及Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry手冊
(Thermo)



(5) 酵素活性染色 (zymogram)

將完成電泳之變性聚丙烯醯胺膠體置於含有 10 mM DTT (dithiothreitol) 之 25 mM citrate buffer 復性 3 小時，並於每小時置換一次緩衝液，之後將膠體置於 50 ml 25 mM citrate buffer 中，於 37°C 下進行酵素反應 30 分鐘，再分別以 0.5% 剛果紅(Congo red) 溶液及 1M NaCl 溶液進行染色與退染。原態聚丙烯醯胺膠體則不經復性作用，直接進行酵素反應及染色。

2.7 錨固區蛋白質表達與純化



(1) 表達質體建構

雙錨固區及單一錨固區蛋白質的 DNA 片段擴增是以基因資料庫(NCBI, National Center for Biotechnology Information)瘤胃真菌之纖維及半纖維分解酶 DNA 序列設計含有 *Bam*H I 及 *Not* I 限制酶切位之引子(primer), 如表 2-2 所示。聚合酶連鎖反應所使用之模板(template) DNA 為 *N. patriciarum* J11 基因組 DNA (genomic DNA), PCR 反應條件如表 2-3 及 2-4 所示。將純化後之 PCR 產物以及 yT&A 選殖載體試劑組(益生生技公司)嵌入 yT&A 載體中並轉形至 *E. coli* JM109 或 *E. coli* TOP-10, 轉形株經定序確認序列後, 以 Viogene mini-M™ plasmid DNA Extraction System (富聯生物科公司)萃取質體, 此質體經限制酶 *Bam*H I 及 *Not* I 截切作用後以 gel extraction system (Qiagen)純化截切產物, 將此產物以 T4 DNA 接合酶(ligase) (益生生技公司)接合至 pGEX 4T-1 (27-4580-01, Pharmacia)載體而得各種類之表達質體。

表 2-2 雙錨固區域及單一錨固區域 DNA 片段擴增之引子

單一底線標示處表示 *Bam*H I 限制酶切位而雙底線標示 *Not* I 限制酶切位；
虛線為停止密碼子。

Table 2-2 The primers used for double and single dockerin sequences. The underlines and double underlines indicate the restriction sites of *Bam*H I and *Not* I, respectively, and the dotted lines indicate the stop codons.



Double dockerin primers	
DDa-F	5'- <u>GGGATCC</u> GGTGAACGTTTTGGTC-3'
DDa-R	5'- <u>GCGGCCGCTCA</u> AAATACCACACCAT-3'
DDb-F	5'- <u>GGATCC</u> GACAGCTTTATTAAG-3'
DDb-R	5'- <u>GCGGCCGCTC</u> AGATAAGACACCAGT-3'
DDe-F	5'- <u>GGATCC</u> GAAGGTGAACGTTTT-3'
DDe-R	5'- <u>GCGGCCGCTCA</u> AAATACCACACCAA-3'
Single dockerin primers	
DDa-F	5'- <u>GGGATCC</u> GGTGAACGTTTTGGTC-3'
Da-R	5'- <u>GCGGCCGCTC</u> ATTCAGTGTATTTA-3'
DDb-F	5'- <u>GGATCC</u> GACAGCTTTATTAAG-3'
Db-R	5'- <u>GCGGCCGCTC</u> AAGCGCCCTT-3'
DDe-F	5'- <u>GGATCC</u> GAAGGTGAACGTTTT-3'
De-R	5'- <u>GCGGCCGCTC</u> AACGAGAAGTGTT-3'

表 2- 3 聚合酶連鎖反應試劑成份表

Table 2-3 Polymerase chain reaction reagents.

試劑	體積	最終濃度
10×PCR buffer	10 μ l	1×
dNTP 2.5 mM	8 μ l	0.2 mM
Primers 10 μ M each	2 μ l/each	0.2 μ M /each
<i>Pfu</i> DNA polymerase (3U/ μ l)	1 μ l	0.03 U/ μ l
Deionized dH ₂ O	37 μ l	
Template	40 μ l	

表 2- 4 聚合酶連鎖的反應條件

Table 2-4 Polymerase chain reaction condition.

溫度 (°C)	時間 (秒)	循環數
95	120	1
95	45	30
56	45	
72	60	
72	600	1

(2) 重組蛋白質表達

挑取單一轉型株菌落接種於含100 µg/ml ampicillin的LB液態培養基，於37°C 震盪（250 rpm）培養16小時，作為種菌來源。以1:50（v/v）將種菌接至總體積為900 ml含100 µg/ml ampicillin的LB液態培養基，於37°C 震盪培養（250 rpm）至OD₆₀₀吸光值為0.6至0.9後，以最終濃度為0.5 mM的IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)，於28°C下誘導16小時，最後離心（3,500 g，15分鐘）收集菌體進行純化。

(3) 重組蛋白質純化

將所收集之菌體以30 ml PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3)緩衝液進行菌體懸浮，以超音波震盪法 (sonication)破菌後以10000 g離心，取上清液並以0.45 µm孔徑濾膜過濾作為之後親和性純化步驟之樣品溶液。以10倍膠體體積的 PBS緩衝液流洗 Glutathione Sepharose 4B (17-0756-01, Amersham Biosciences)管柱，加入樣品後，再以10倍膠體體積的 PBS 緩衝液流洗出非專一性吸附的雜蛋白質，最後加入10倍膠體體積的提洗(50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8) 緩衝液將目標蛋白質提洗出來，並收集前5 ml以Amicon Ultra-15 (UFC901008, Millipore)進行濃縮並將緩衝液置換成PBST (0.13 M NaCl, 0.05 % (v/v) Tween-20, 5 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂PO₄, pH 7.4) 緩衝液。

2.8 西方雜合分析



取適量樣本液經SDS-PAGE進行分離後經蛋白質復性步驟(如酵素活性染色部分所述)，取分離膠體部分浸泡於TGSM緩衝液(15% methanol, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 25 mM Tris, pH 8.3)中。同時取6張濾紙與PVDF (polyvinylidene difluoride) 轉印膜 (Immobilon-P, Millipore)以TGSM緩衝液潤濕，依照三明治排列法依序將3張濾紙、轉印膜、電泳膠體、3張濾紙疊至半乾式電泳轉印槽。以100 mA轉印40分鐘，取出轉印膜置於Urea-PBST (6M Urea, 0.13 M NaCl, 0.05%(v/v) Tween-20, 5 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂PO₄, pH 7.4) 緩衝液浸泡16小時。經尿素浸泡過之轉印膜以PBST緩衝液洗3次，每次各10分鐘。接著將轉印膜浸泡於gelatin-NET (0.25% gelatin, 0.15 M NaCl, 5 M EDTA, 0.05% Tween-20, 50 mM Tris, pH 8.0) 溶液中反應1小時後，更換含各重組錨固區蛋白質(最終濃度為32 μ l/ml)之gelatin-NET溶液於室溫下反應1小時(實驗上若添加螯合劑EDTA，其使用濃度為10 mM)，再以PBST緩衝液清洗轉印膜三次，每次10分鐘。更換含有goat anti-GST (27457701v, Pharmacia)一次抗體之gelatin-NET溶液於室溫下反應1小時，之後以PBST緩衝液清洗轉印膜三次，每次10分鐘。更換含有rabbit anti-goat IgG-AP(A4185-.5, Sigma)二次抗體的gelatin-NET，於室溫下反應1小時，隨後以PBST緩衝液洗三次，每次10分鐘，再以Alkaline phosphatase buffer (100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris, pH 9.5) 反應10分鐘。將轉印膜置於適量的NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium and bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NEL937, PerkinElmer)基質溶液中，於暗處下反應，直到藍紫色條帶出現時，將膜放置於無菌水中浸漬5分鐘，以終止反應。

2.9 支架蛋白質基因鈎取



(1) cDNA 基因庫免疫篩選法

依先前研究所使用之方法建立基因資料庫(cDNA library)(5)。取cDNA library之上清液，經適當系列稀釋後取 $1\ \mu\text{l}$ 並與 $100\ \mu\text{l}$ 含有*E. coli* XL1-blue的 $1\times$ lambda dilution buffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO_4 , 35 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.01% (w/v) gelatin)混合，於 37°C 反應15分鐘，之後與6 ml約 50°C 融熔態的LB/ MgSO_4 soft agar (10 mM MgSO_4 LB, 0.7% agar)小心混合，迅速倒入已經 37°C 預熱的15 cm LB agar培養皿(含10 mM MgSO_4 , 1.5% agar)，置於 37°C 培養16小時。剪裁適當大小之nitrocellulose membrane (Protran, Perkin Elmer)浸泡於10 mM IPTG溶液中，風乾後貼附於(A)之培養皿上並以燒熱之針頭於膜上作記號，置於 37°C 培養4小時。取出轉印膜置於適當大小的容器中，以PBST緩衝液洗3次，每次各10分鐘之後置於gelatin-NET溶液中反應1小時。將轉印膜浸泡於含重組雙錨固區蛋白質($96\ \mu\text{g/ml}$)之gelatin-NET溶液於室溫下反應1小時，再以PBST緩衝液清洗轉印膜三次，每次10分鐘。將轉印膜浸泡於含有goat anti-GST (27457701v, Pharmacia)一次抗體之gelatin-NET溶液，於室溫下反應1小時，之後以PBST緩衝液清洗轉印膜三次，每次10分鐘。將轉印膜浸泡於含有rabbit anti-goat IgG-AP (A4185-.5, Sigma) 二次抗體的gelatin-NET，於室溫下反應1小時，隨後以PBST緩衝液洗三次，每次10分鐘加入Alkaline phosphatase buffer反應10分鐘。將轉印膜置於適量的NBT/BCIP基質溶液中，於暗處下反應，直到藍紫色條帶出現時，將膜放置於無菌水中浸漬5分鐘，以終止反應。藉由對照轉印膜上相對位置，以試管尖(tip)挑出具有正反應之溶菌斑於 $200\ \mu\text{l}$ $1\times$ lambda dilution buffer，震盪後即得重組噬菌體溶液，可置於 4°C 保存待用。將上述所得之重組噬菌體溶液進行體內切除(*in vivo excision*)步驟，最後將所得之轉形株送定序。



(2) 基因組篩選法

- (A) 以基因組DNA純化試劑組(DP021E-50, 禾鑫生技公司)萃取*N. patriciarum* J11基因組DNA。
- (B) DNA library建構方法參照操作手冊指示(CopyControl™ Fosmid Library Production kit and MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts, Epicentre)。
- (C) 將菌落分成大群組(每60個菌落為一大群組), 並以三組錨固區序列引子進行菌落聚合酶連鎖反應(colony-PCR), 方法如2.7所述。將此次有正反應之群組菌落再次分成小群組(每20個菌落為一小群組), 再依前述方式進行colony-PCR。之後所得之正反應組篩選程序依次類推直到單一正反應菌落被挑出。最後針對各正反應菌落以CopyControl™ Fosmid Library Production kit載體上的sequencing序列為引子進行大片段DNA篩選以做為後續定序之候選序列。

2.10 單一錨固區定點突變



(1) 引子設計點突變方法

設計含有 *Bam*H I 及 *Not* I 限制酶切位之引子(primer)，如表2-5所示。聚合酶連鎖反應(PCR, Polymerase chain reaction)所使用之模板DNA為野生型(wild type)單一錨固蛋白質表達質體pGEX-D-b，PCR反應條件如表2-3及2-6所示。將純化後之PCR產物以及yT&A選殖載體試劑組(益生生技公司)嵌入yT&A載體中並轉形至 *E. coli* JM109或 *E. coli* TOP-10，轉形株經定序確認序列後，以Viogene mini-MTM plasmid DNA Extraction System(富聯生物科公司)萃取質體，此質體經限制酶 *Bam*H I 及 *Not* I 截切作用後以gel extraction system(Qiagen)純化截切產物，將此產物以T4 DNA 接合酶(ligase)(益生生技公司)接合至pGEX 4T-1 (27-4580-01, Pharmacia)載體而得各種類之單一錨固區域突變蛋白質表達質體(pGEX-D-b mutants)。成功之突變株質體經轉形至 *E. coli* Rosetta origami B (DE3) (71136-3, Novagen)後進行蛋白質表達及純化。

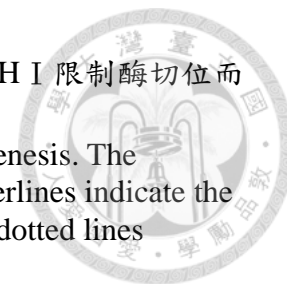
(2) Kunkel 氏定位突變法

本方法參考Kunkel等人提出之DNA突變操作(73)。於PCR專用之200 μ L薄壁離心管中加入50 ng 野生型單一錨固區域蛋白質表達質體pGEX-D-b、dNTP(dATP、dATP、dCTP及dGTP；最終濃度皆為360 μ M)、5 μ L 10X reaction buffer、最終濃度各為300 nM的forward及reverse之欲突變引子(primer)如表2-7所示、0.75 μ L (3.75 units) *Pfu* DNA polymerase (M774B, Promega)，最後加入蒸餾水定量至50 μ L，經短暫離心後放入PCR機器 (Robocycler GRADIENT 96, Stratagene)中，設定條件為95 $^{\circ}$ C，2分鐘，再進行20個循環之95 $^{\circ}$ C、45秒；54 $^{\circ}$ C、45秒；72 $^{\circ}$ C、10.5分鐘，接著是72 $^{\circ}$ C、10分鐘一次循環，最後降溫於4 $^{\circ}$ C即完成。取出PCR產物20 μ L加入1 μ L *Dpn* I 限制酵素(R0176S, New England BioLabs)進行含甲基化之模板股質體截切，於37 $^{\circ}$ C下作用1小時後再於65 $^{\circ}$ C反應10分鐘。取2 μ L質體轉形至*E. coli* JM109或*E. coli* TOP-10，經定序結果比對挑選出突變成功之突變株質體轉形至*E. coli* Rosetta origami B (DE3) (71136-3, Novagen)進行蛋白質表達及純化。

表 2-5 定點突變使用之引子

反白標示處表示突變之密碼子。單一底線標示處表示 *Bam*H I 限制酶切位而雙底線標示 *Not* I 限制酶切位;虛線為停止密碼子。

Table 2-5 The primers used for rapid and efficient site-specific mutagenesis. The mutated codons are shaded. The underlines and double underlines indicate the restriction sites of *Bam*H I and *Not* I ,respectively, and the dotted lines indicate stop codons.



Db-F	5'-<u>GGATCC</u>GACAGCTTTATTAAGGAAAATC-3'
W30K-R	5'-<u>GCGGCCGCTCA</u><u>AAGCGCCCTTACCACAACCACACTTTTGG</u>-3'
W30G-R	5'-<u>GCGGCCGCTCA</u><u>AAGCGCCCTTACCACAACCACAGCC</u>TTGG-3'
W30Q-R	5'-<u>GCGGCCGCTCA</u><u>AAGCGCCCTTACCACAACCACACTGT</u>TTGG-3'
W30S-R	5'-<u>GCGGCCGCTCA</u><u>AAGCGCCCTTACCACAACCACAGGAT</u>TTGG-3'

表 2-6 聚合酶連鎖的反應條件

Table 2-6 Polymerase chain reaction condition.

溫度 (°C)	時間 (秒)	循環數
95	120	1
95	45	30
52	45	
72	60	
72	600	1

表 2-7 Kunkel 定位突變法使用之引子
反白標示處表示突變之密碼子。

Table 2-7 The primers used for rapid and efficient site-specific mutagenesis. The
mutated codons are shaded.



W30A-F 5'-GGTTGAAAACAACCAAGCGTGTGGTTGTGGTAAGG-3'

W30A-R 5'-CCTTACCACAACCACACGCTTGGTTGTTTTCAACC-3'

W30E-F 5'-TTGGGGGGTTGAAAACAACCAAGAATGTGGTTGTGGTAAGG-3'

W30E-R 5'-CCTTACCACAACCACATTCCTTGGTTGTTTTCAACCCCCCAA-3'

2.11 蛋白質結合滴定法



(1) Cellulosome 製備液

以2.3的方法所得為cellulosome製備液(cellulosome preparation)。

(2) 實驗方法

本實驗方法修改自Raghothama等人之研究方法。將cellulosme製備液以被覆緩衝液(coating buffer, 150 mM Na₂CO₃, 350 mM NaHCO₃, 30 mM NaN₃, pH 9.6)稀釋至適當濃度，並滴加至96孔微量盤(Immunomaxi-Thestplatten 96 flach, TPP)，每孔滴加100 μ l，置於4°C反應16小時。每孔滴加200 μ l PBST (3.8 mM NaH₂PO₄, 16.2 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween-20, pH 7.4)緩衝液洗滌，重覆3次。之後，每孔滴加200 μ l blocking buffer (PBST, 0.25% gelatin)並置於室溫下反應1.5小時。將以blocking buffer系列稀釋成各適當濃度(1 μ g/ μ l至150 μ g/ μ l)的各種GST-單一錨固區融合蛋白質(GST-Db and GST-Db mutants)依序滴加100 μ l上述稀釋之蛋白質於96孔微量盤並置於4°C下反應1小時。之後，每孔滴加200 μ l PBST buffer洗滌，重覆3次。再以blocking buffer適當稀釋一次抗體(goat anti-GST antibodies)，每孔滴加100 μ l，置於4°C下反應1小時。接著每孔滴加200 μ l PBST buffer洗滌，重覆3次。以blocking buffer適當稀釋二次抗體rabbit anti-goat IgG-HRP (A5420-1ML)，每孔滴加100 μ l，置於4°C下反應1小時。每孔滴加200 μ l PBST buffer洗滌，重覆3次。每孔滴加100 μ l HRP基質(TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, BioFX)，置於室溫下反應5分鐘。最後，每孔滴加50 μ l 1M H₂SO₄終止反應並偵測A₄₅₀吸收值。

2.12 基因定序與保存

聚合酶連鎖反應之產物嵌入yT&A載體中並轉形至*E. coli* JM109或*E. coli* TOP-10中作為基因保存。*E. coli* JM109或*E. coli* TOP-10轉形株委託明欣生物科技

公司以載體yT&A的T7 promoter序列或載體pGEX 4T-1的pGEX5'及pGEX3'序列為引子進行基因定序。



2.13 蛋白質定量分析

本實驗以BCA Protein Assay Kit進行蛋白質定量分析。取經適當稀釋過的樣本液10 μ l與200 μ l已混合之A、B試劑，並以BSA (bovine serum albumin)為標準品，於37°C反應1小時，以ELISA光度計(VERSA max microplate reader, Molecular Devices)偵測562 nm 吸光值。

2.14 蛋白質鑑定

本實驗樣本來源為經 SDS-PAGE 及硝酸銀染色後之膠片(參照 2-5-(4))，將目標片段切下後委託鎡陞科技公司進行膠內酶切(in gel digestion, trypsin)及 LC/MS/MS，分析使用之軟體為 MASCOT。

2.14 蛋白質胺基端定序

將樣品經 SDS-PAGE 分析後，轉印至 PVDF 膜(Millipore)，轉印條件視選取之目標蛋白質特性調整。本實驗轉印使用之緩衝溶液為含有 10% 甲醇的 10 mM 2-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid (CAPS)。轉印後之 PVDF 膜以 CBR 染色，所做用之 CBR 量為一般五分之一，染色後將目標片段標記，之後再以 50% 甲醇退染。切下目標片段後委託明欣生物科技公司進行蛋白質胺基端定序。

第三章 結果



3.1 *N. patriciarum* J11 之纖維素分解酶複合體生成

此部分實驗以不同類型的糖類為*N. patriciarum* J11之培養碳源探討其外泌纖維素分解酶系統之差異性，並以聚丙烯醯胺膠片及酵素活性染色分析方法進一步證明*N. patriciarum* J11 可生成胞外cellulosome。

(1) 菌體生長與酵素誘導生成

本研究改良自Fedorak等人以針筒測定菌體產氣之方法(47)，以針筒及三向閥組裝的簡單器具測定厭氣性真菌生長所產生之總氣體體積。培養菌體時以濃度0.5% (w/v)的三種單糖、雙糖及四種多醣為碳源，於 $39\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下靜置培養*N. patriciarum* J11，並以其生長時所產生的總氣體量為生長速率指標進行生長狀況評估。

當以三種單糖為碳源培養時，*N. patriciarum* J11對於葡萄糖利用率較其它兩者高，且於接種96小時後可達到生長停止期(stationary phase)，而以木糖及果糖為碳源時，於接種144小時後才達到，圖3-1A。另外，結果也顯示*N. patriciarum* J11生長較偏好六碳糖做為碳源，此結果與*Neocallimastix* sp. L2相似(41)。然而，以葡萄糖為碳源時，其誘導產生的胞外cellulases對於基質CMC的活性(CMCase)卻低於其它兩者，圖3-1B。

以蔗糖、麥芽糖以及纖維雙糖為碳源時，*N. patriciarum* J11對纖維雙糖與蔗糖的利用率較高，生長較快，於接種96小時後可至stationary phase，而對麥芽糖的利用率相對較差，在接種144小時達到stationary phase，且培養的前48小時生長速率明顯比前兩者差，此現象可能是*N. patriciarum* J11對於麥芽糖使用的適應性較為不理想所致，如圖3-1C。纖維雙糖與蔗糖所誘導產生的CMCase隨著菌體生長而增加且較麥芽糖所誘導者高(圖3-1D)。當以纖維雙糖為碳源時，在其生

長48小時所測的CMCase活性確明顯低於其它兩者。推測這結果可能是由於測定活性時酵素樣本(培養上清液)內仍含有較高濃度的纖維雙糖，而纖維雙糖對cellulase系統中的cellobiohydrolase及endoglucanase具有產物迴饋抑制作用所造成(119, 139)。

N. patriciarum J11對四種多醣類的利用實驗結果顯示，Avicel、稻桿及木聚醣對*N. patriciarum* J11的生長及CMCase產生都明顯高於CMC (圖3-1E、F)。由於多醣類不能像單糖及雙糖可直接被菌體吸收利用，因此*N. patriciarum* J11對這三種基質的利用上，在前48小時的生長速率較單糖及雙糖來源者差，其可能需要一段適應期以合成其它相關分解酶進行後續分解反應。

(2) *N. patriciarum* J11 cellulosome 生成

從培養五天的*N. patriciarum* J11培養上清液中分離cellulosomes，所採行之純化策略為藉由cellulosome和結晶性纖維在高離子強度時的高親和性與在低離子強度或在水環境時低親和性特性進行純化。若此菌株具有類似cellulosome之機制，則可由原態(組合狀態)、變性(分離狀態)聚丙烯醯胺膠體電泳及其酵素活性染色之圖譜得到一項證據。圖3-2A顯示從培養上清液純化所得之結果，於原態聚丙烯醯胺膠體電泳及酵素活性染色分析中顯示，於原態分子量約大於669 kDa處具有 β -glucanase活性;而變性聚丙烯醯胺膠體電泳及其酵素活性染色分析對照結果顯示(圖3-2B)，此複合體存在約12條蛋白質，其中8條具有 β -glucanase活性，而在相同反應條件下則有4條蛋白質具有xylanase活性。由於變性後再複性之條件對每一蛋白質的影響不同以及部分蛋白質分子量接近等因素，故無法在電泳圖上所呈現出真實的活性圖譜，因此，實際上具有 β -glucanase或xylanase活性之蛋白質數應大於上述數目。目前為止，在此部分的研究中已可分離出大分子量且具 β -glucanase活性之複合體，此複合體經變性、復性處理及酵素活性染色分析後，結果顯示其由多條具 β -glucanase及xylanase活性之蛋白質組成，因此推測*N. patriciarum* J11應具有類似厭氣性細菌系統之cellulosome。

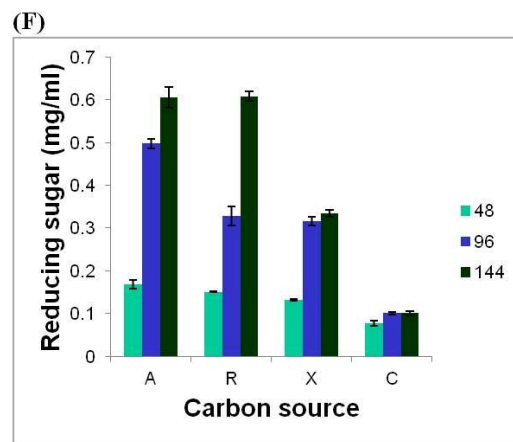
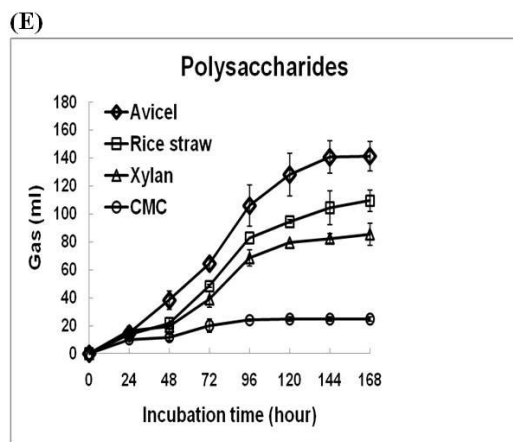
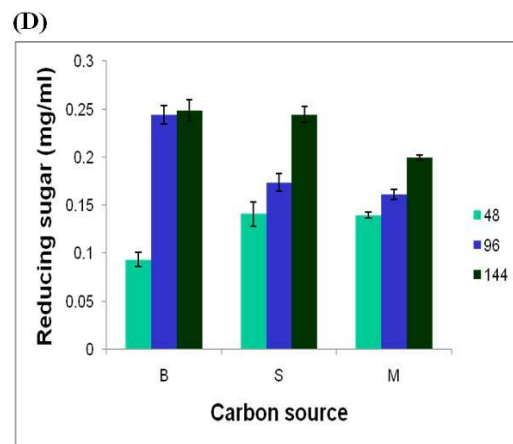
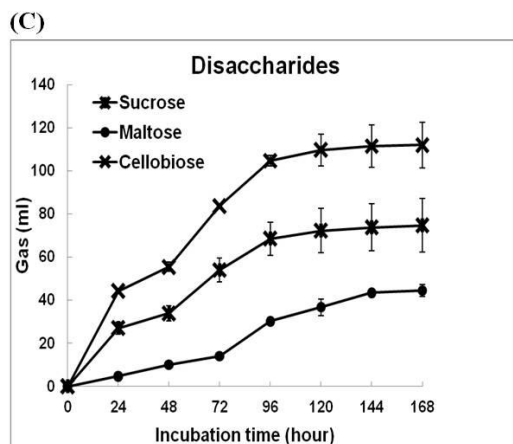
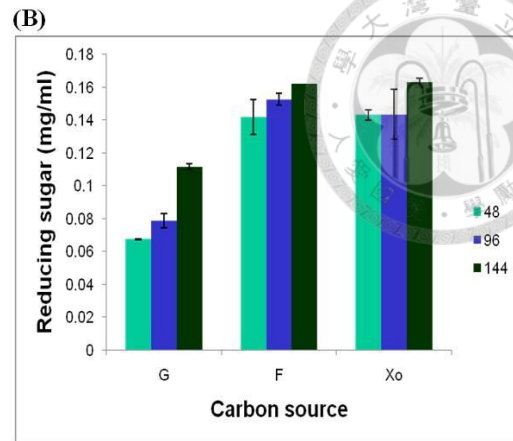
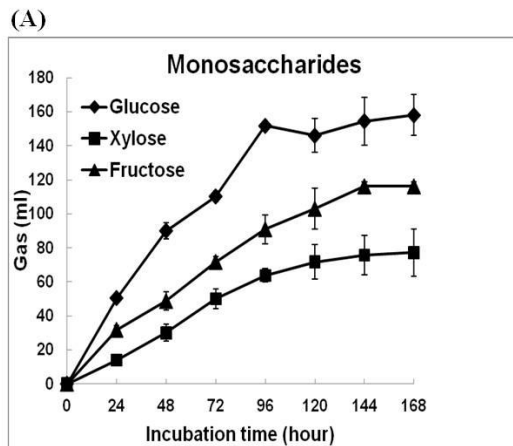




圖 3-1 不同碳源培養及 CMCase 活性比較

(A)以葡萄糖、木糖及果糖為碳源的生長比較及不同時期誘導產生之CMCase活性(B)。(C)以蔗糖、麥芽糖及纖維雙糖為碳源的生長比較及不同時期誘導產生之CMCase活性(D)。(E)以Avicel、稻桿、木聚醣及CMC為碳源的生長比較及不同時期誘導產生之CMCase活性(F)。G:葡萄糖;F:果糖;Xo:木糖;B:纖維雙糖;S:蔗糖;M:麥芽糖;A: Avicel; R:稻桿; X:木聚醣; C: CMC。

Figure 3-1 Growth and CMCase activity of *N. patriciarum* J11 with various carbon sources.

(A) Growth of *N. patriciarum* J11 with monosaccharide and CMCase activity (B). (C) Growth of *N. patriciarum* J11 with disaccharide and CMCase activity (D). (E) Growth of *N. patriciarum* J11 with polysaccharide and CMCase activity (F). G: glucose, F: fructose, Xo: xylose, B: cellobiose, S: sucrose, M: maltose, A: Avicel, R: rice straw, X: xylan, C: CMC.

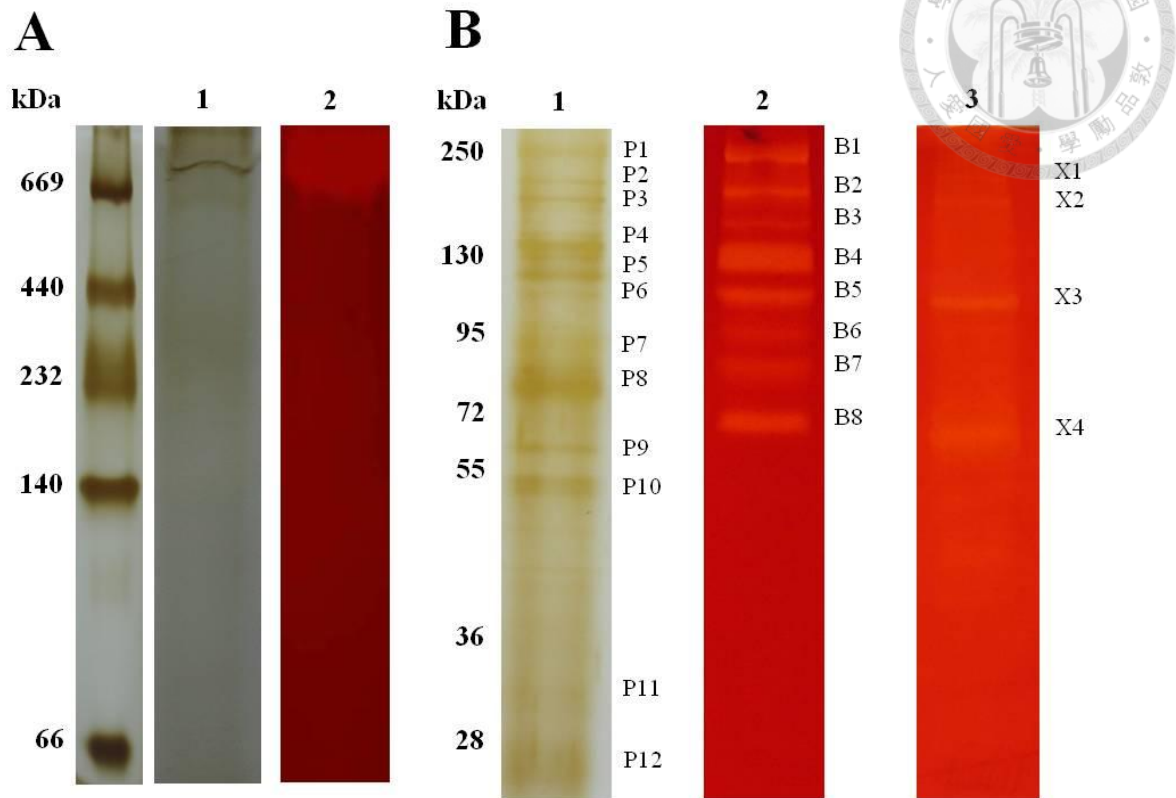


圖 3-2 培養上清液純化之纖維素分解酶複合體分析

(A)原態聚丙烯醯胺膠體電泳圖(1)與酵素活性染色(2)(基質為 β -glucan); (B)變性聚丙烯醯胺膠體電泳圖(1)與酵素活性染色(2)(基質為 β -glucan)、(3)基質為 xylan)。

Figure 3-2 Analysis of cellulosome purified from culture supernatant. (A) Native-PAGE (lane 1) and zymogram using β -glucan as substrate (lane 2); (B) SDS-PAGE (lane 1), zymogram using β -glucan (lane 2) and xylan (lane 3) as substrates.

(3) *N. patricirum* J11 scaffoldin 偵測

此方法利用 *N. patriciarum* J11 之 cellulase 或 hemicellulase 所具有的 dockerins 與 glutathione S-transferase (GST) 融合之重組蛋白質 dockerin-GST 能與 scaffoldins 中的 cohesin 結合的特性，之後再以 GST 的一次抗體與其二次抗體進行西方氏雜合分析。西方雜合分析所產生的訊號代表 cellulosome 製備液中含有可與 dockerin 結合的蛋白質即推測中的厭氣性真菌支架蛋白質 scaffoldin。

(A) Dockerin-GST 與 scaffoldin 之結合:

本研究方法以西方雜合分析為基礎，根據基因資料庫 (NCBI, National Center for Biotechnology Information) 中，厭氣性真菌 cellulase 及 hemicellulase 之基因序列 (*N. frontalis celA*, AAC63094; *N. patriciarum bna3*, AAB69092; *N. patriciarum engB*, CAA83238) 設計三組專一性引子選殖出包含連接催化區與錨固區的連結區 (linker) 及兩錨固區在內的片段 (雙錨固區, double dockerin)，此種 dockerins 為厭氣性真菌最常被發現之形式，其片段大小分別為 DD-A 363 bp (*celA*); DD-b 336 bp (*bna3*); DD-e 408 bp (*engB*)。此種 double dockerin 分子量約為 12 kDa，與 GST 融合後之重組融合蛋白質分子量約為 41 kDa，如圖 3-3 所示。當樣品經 SDS-PAGE 分析後再經蛋白質復性及轉印 (blotting) 處理，接著以重組融合蛋白質 dockerin-GST (DD-GST) 與在轉印膜上的蛋白質結合，最後再分別以一次及二次抗體反應、呈色。當胞外結合作用不添加鈣離子且在製備樣品中添加金屬螯合劑 EDTA 時，西方雜合分析結果顯示 DD-b-GST 可與培養上清液及經膠體過濾管柱純化部分等樣品結合產生訊號，如圖 3-4A 所示。在含有 10 mM 鈣離子的結合反應條件下，其結果與鈣離子存在時相同，如圖 3-4B 所示。這些結果顯示在 *N. patriciarum* J11 系統中，其 dockerin 與 scaffoldin 結合時不需要鈣離子參與。以蛋白質分子製作蛋白質泳動及分子量標準曲線可得知，其結合訊號之蛋白質分子量約為 79 kDa，如圖 3-5 所示。西方雜合分析方法除了證實重組 double dockerin 與 cellulosome 的結合現象外，其訊號亦代表著 *N. patriciarum* J11 cellulosome 組成份中 scaffoldin 所處的位置。

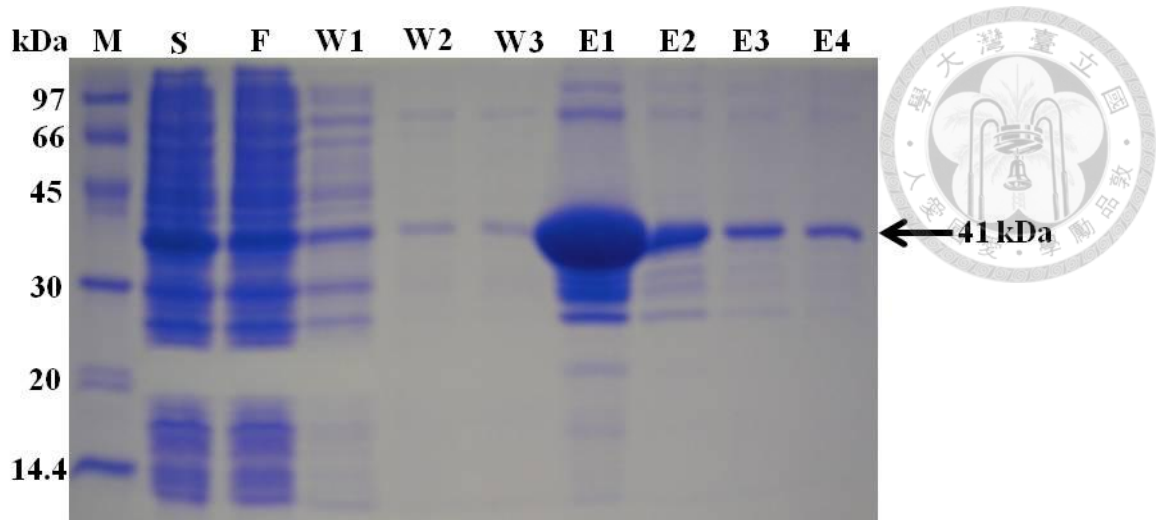


圖 3-3 重組融合蛋白質 DD-b-GST 純化圖

M:蛋白質分子量標準品(kDa); S:粗酵液; F:樣品流出液; W:緩衝液洗出液; E:洗提液。

Figure 3-3. SDS-PAGE of recombinant fusion protein DD-b-GST. M: protein marker (kDa); S: sample; F: sample flow; W: washing fraction; E: elution fraction.

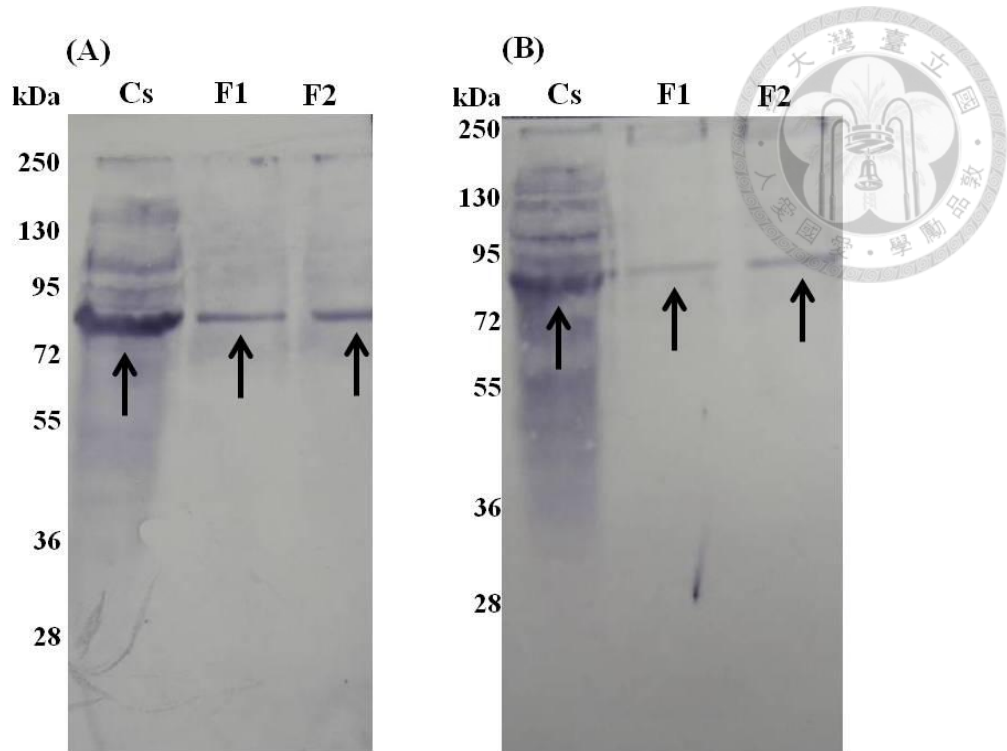


圖 3-4 重組融合蛋白質 DD-b-GST 與纖維素分解酶複合體結合作用

西方雜合分析，結合反應溶液未含 10 mM CaCl_2 且樣本含 10 mM EDTA (A); 結合反應溶液含 10 mM CaCl_2 (B)。Cs: 濃縮之培養上清液; F: 經膠體過濾所得具 cellulase 活性部分。箭頭所指為厭氣性真菌支架蛋白質。

Figure 3-4 Analysis of the interaction between DD-b-GST and cellulosome. The buffer used in Western blotting does not contain 10 mM CaCl_2 and the sample contains 10 mM EDTA (A). The buffer contains 10 mM CaCl_2 (B). M: protein marker; Cs: concentrated culture supernatant; F: fraction with cellulase activity from gel filtration. Arrow indicates the anaerobic scaffoldin.

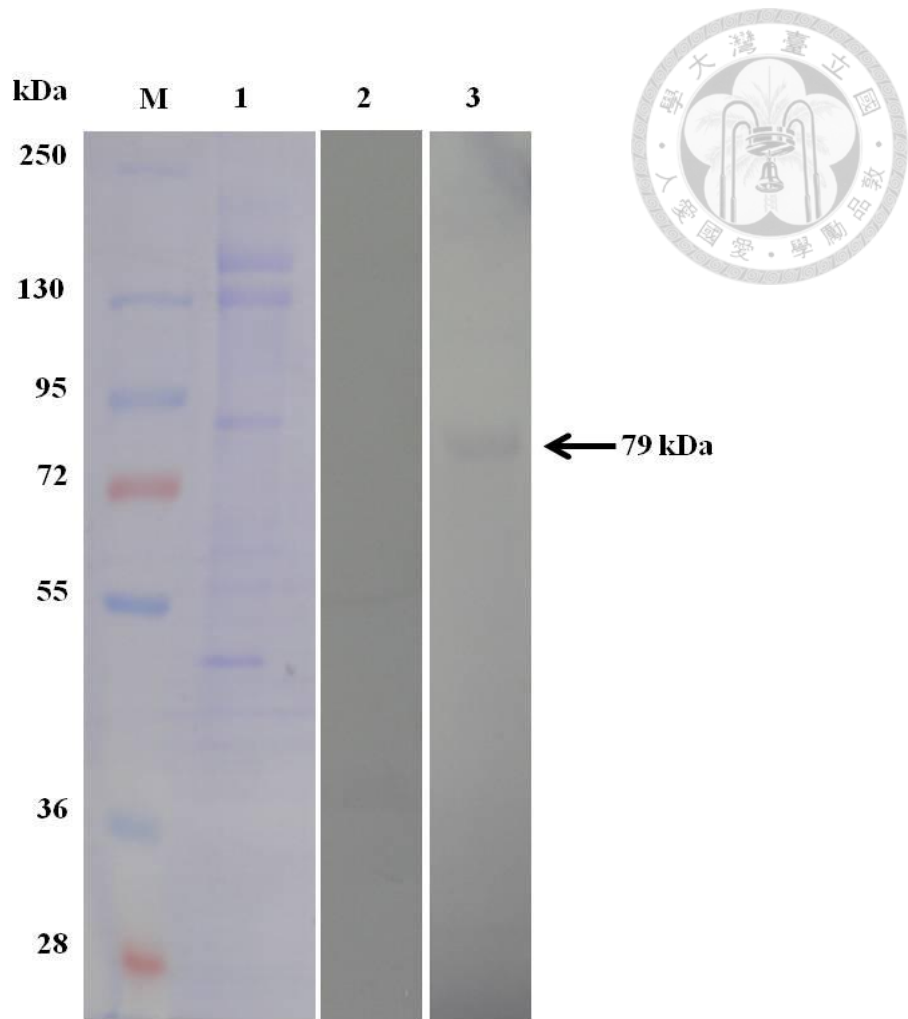


圖 3-5 重組融合蛋白質 DD-b-GST、GST 與纖維素分解酶複合體支架蛋白質之結合 (1)變性聚丙烯醯胺膠體電泳圖。(2)西方雜合分析，GST 與纖維素分解酶複合體結合反應。(3)西方雜合分析，DD-b-GST 與纖維素分解酶複合體結合反應。M: 質分子量標準品(kDa)。箭頭所指為推測之真菌支架蛋白質。

Figure 3-5 Docking of the DD-b-GST and GST with the fungal scaffoldin of the cellulosome from *N.patriciarum* J11. Lane 1, SDS-PAGE. Western blots were probed with the DD-b-GST fusion protein(lane 3) or with GST alone (lane 2). M, protein marker (kDa). Arrow indicates the fungal scaffoldin.

(B) 重組融合蛋白質dockerin-GST之結合作用:

為了進一步證明來自厭氣性真菌的dockerin可與cellulosome製備液中的cohesin結合並且了解厭氣性真菌dockerin與cohesin在結合過程，影響其結合及親和力之胺基酸為何，本研究採取蛋白質結合滴定法(protein binding titration)分析其結合性質。經由比較野生型(wild type, D-b)與各突變型(mutant)結合圖譜的差異，除了可證明dockerin確實扮演與cellulosome製備液中的支架蛋白質結合的角色外，也可驗證其與結合作用相關之胺基酸是否同為含芳香族基團的胺基酸。其基本原理為在同一反應條件下，野生型dockerin中某一胺基酸若與結合作用有關，則該突變型與野生型dockerin的結合能力經酵素連結免疫吸附分析(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)後，其吸光值的差異即可反應出結合作用增強、減弱或消失的現象。本研究所選殖、建構及表現之重組融合單一錨固蛋白質分子量約37 kDa，如圖3-6所示。

經由*N. patriciarum* Bna3與EngB、*N. frontalis* CelA、*P. equi* Cel5A與Cel45A以及*Orpinomyces* sp. PC-2 XynA與ManA之dockerins胺基酸序列比對，本實驗選出四個高保守性之胺基酸，酪胺酸(tyrosine) Tyr-5、Tyr-16及色胺酸(tryptophan, Trp) Trp-23、Trp-30，將其以具有芳香環之苯丙胺酸(phenylalanine, Phe)取代，其結合滴定結果如圖3-7所示。當Tyr-16與Trp-23以Phe取代時，其與cellulosome親和能力增加，而Trp-30以Phe取代時則呈現降低現象。此四種突變單一錨固蛋白質與cellulosome結合之親和能力如表3-1所列。此結果指出Trp-30可能是*N. patriciarum* J11錨固蛋白質與cellulosome結合之關鍵位置。其它兩個位置Tyr-16與Trp-23改變成Phe時，能提高其結合能力。此結果可能代表Phe在第16號及第23號位置時其芳香環能提供更有利之疏水中心(hydrophobic core)參與蛋白質的結合。關於此點可再以其它胺基酸取代的實驗得到更進一步證實。Raghothama等人曾對*P. equi* endoglucanase Cel45A之dockerin進行多位點之突變並研究其結合能力特性，結果也顯示了較保守的胺基酸Asp-23、Trp-23與Trp-30對於結合能力的影響較為明顯(111)。

當以非極性之丙胺酸(alanine, Ala)、具最小立體空間的甘胺酸(glycin, Gly)、以及極性的麩醯胺酸(glutamine, Gln)與絲胺酸(serine, Ser)取代Trp-30時，其野生型與突變型的結合圖譜亦具明顯差異，如圖3-8及表3-1所示。Trp-30位點的

改變明顯地降低了*N. patriciarum* J11錨固蛋白質之結合能力。此結果顯示，Trp-30為參與dockerin與cellulosome結合作用的一個關鍵胺基酸，且其與cellulosome中相對應之結合胺基酸應以疏水性作用力為其間的鍵結。



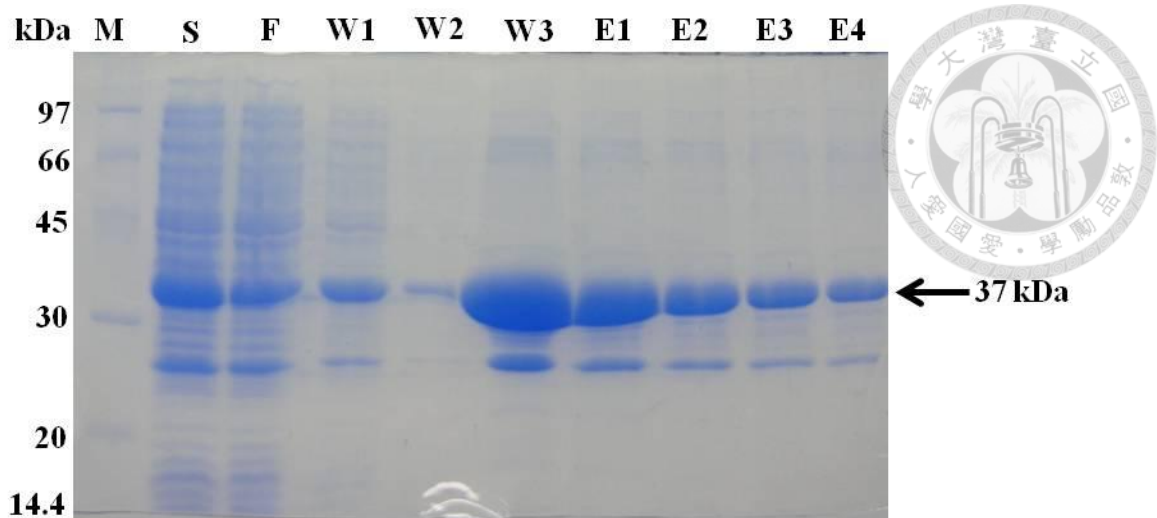
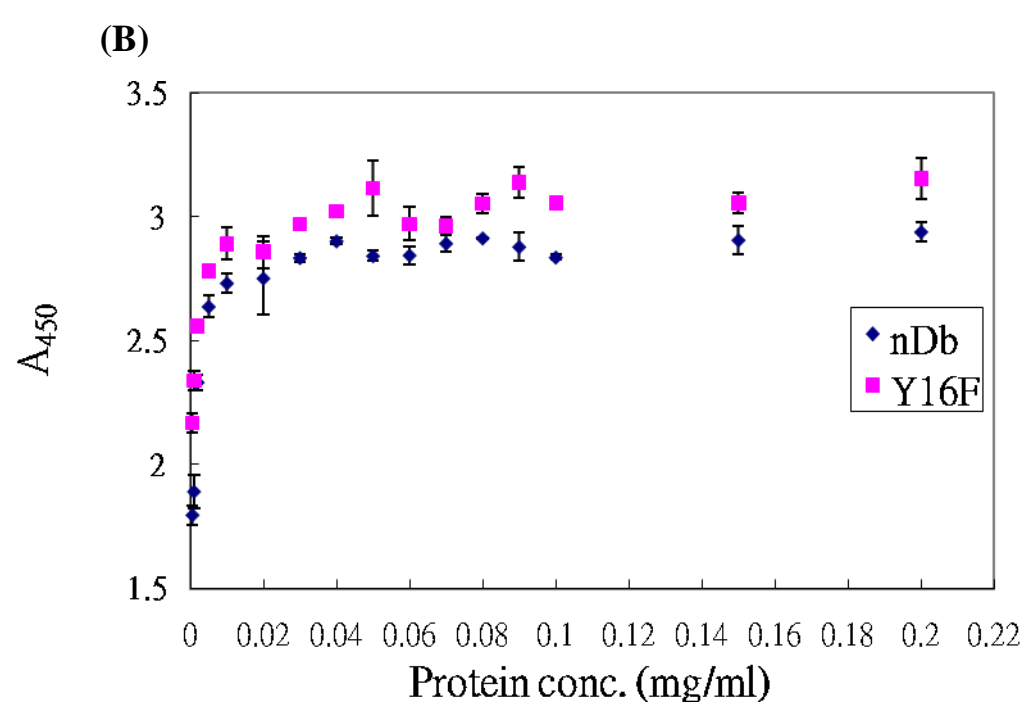
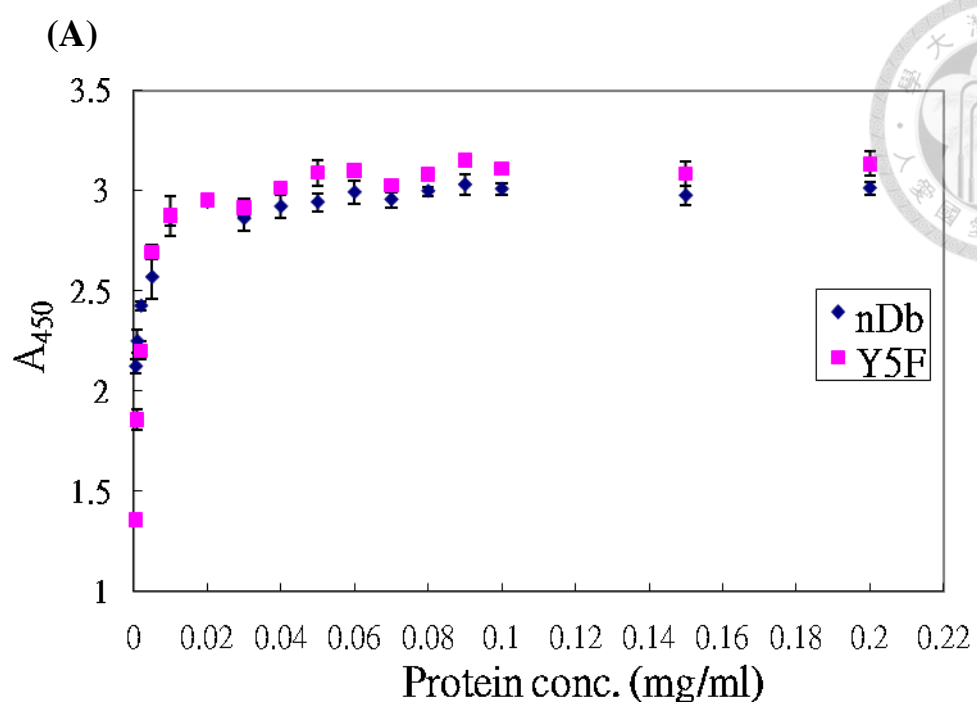
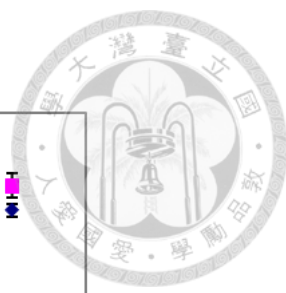


圖 3-6 重組融合蛋白質 D-b-GST 純化圖

M:蛋白質分子量標準品(kDa); S:粗酵液; F:樣品流出液; W:緩衝液洗出液; E:洗提液。

Figure 3-6. SDS-PAGE of recombinant fusion protein D-b-GST. M: protein marker (kDa); S: sample; F: sample flow; W: washing fraction; E: elution fraction.



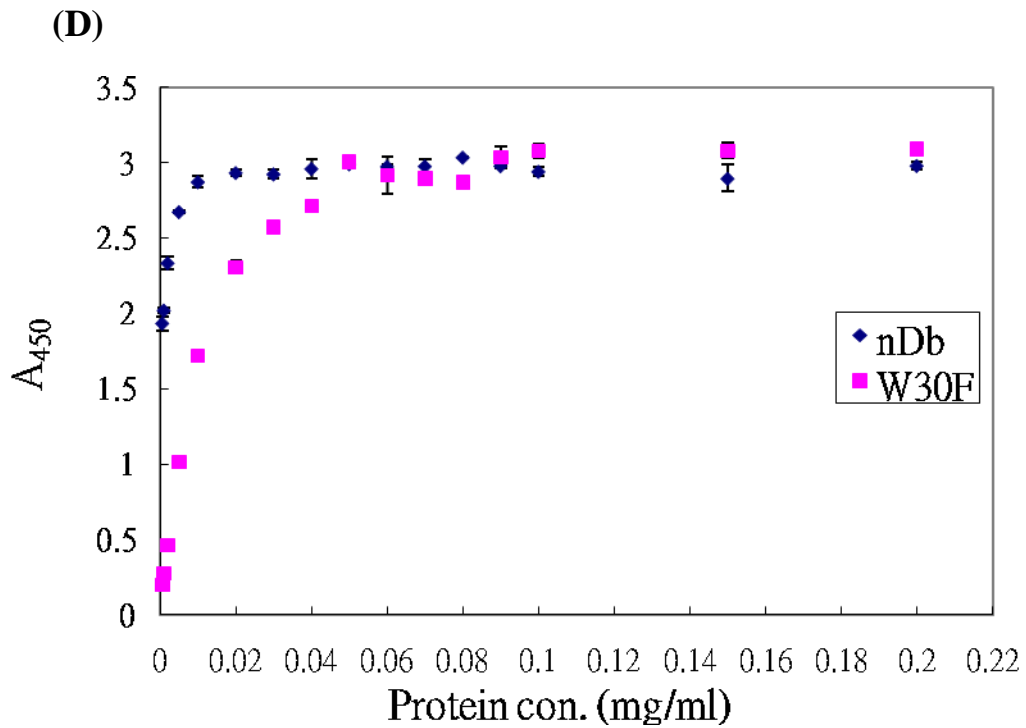
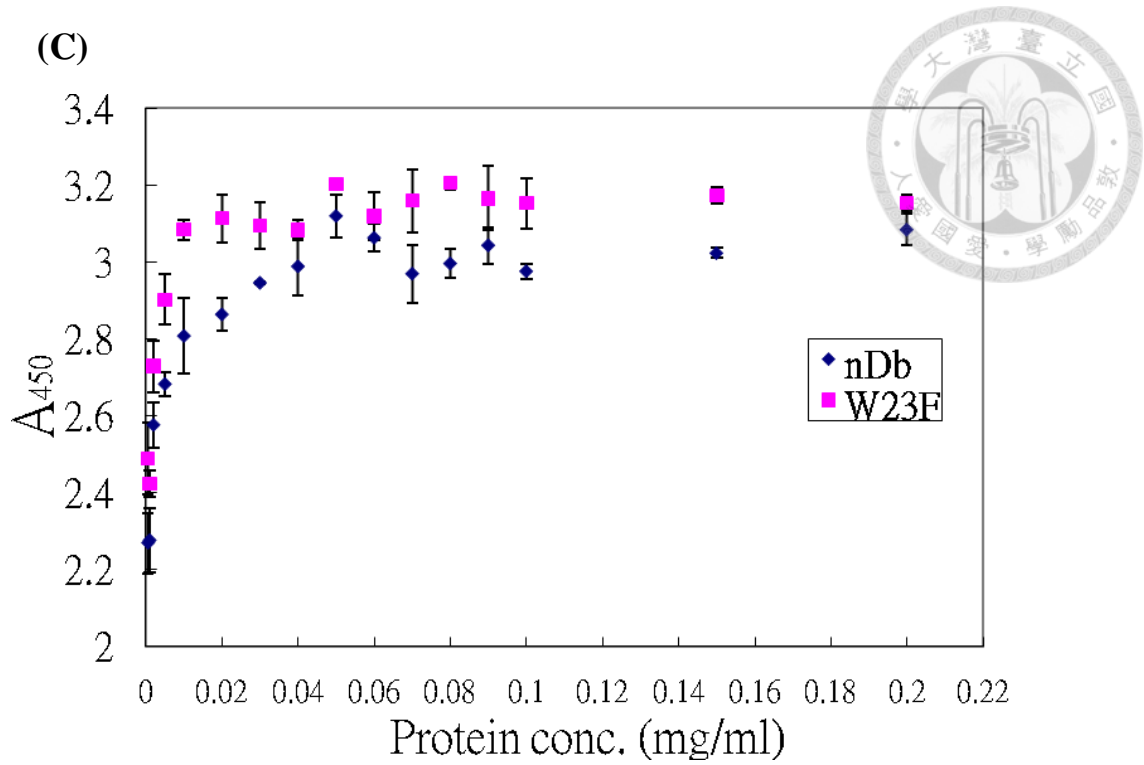
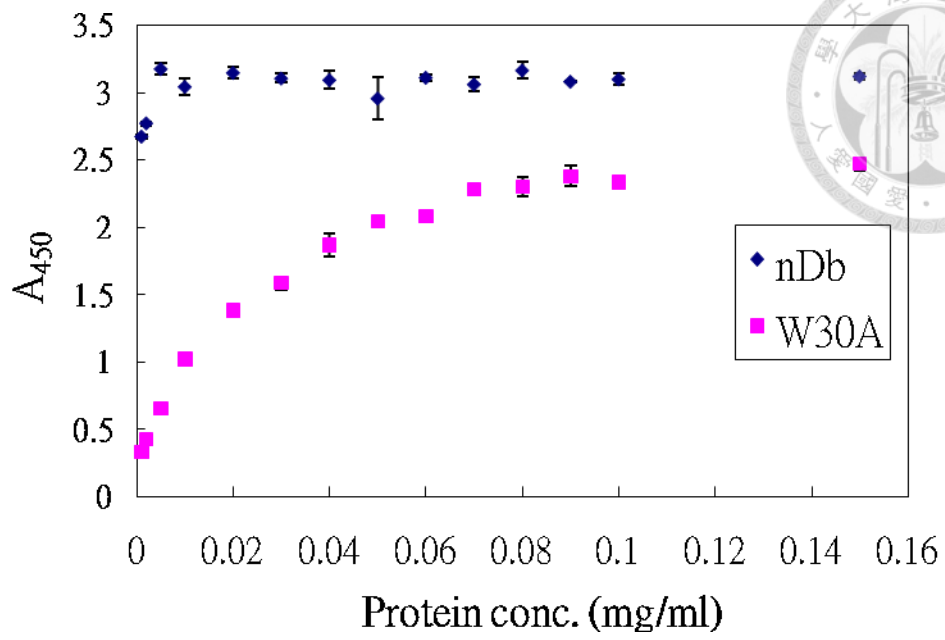


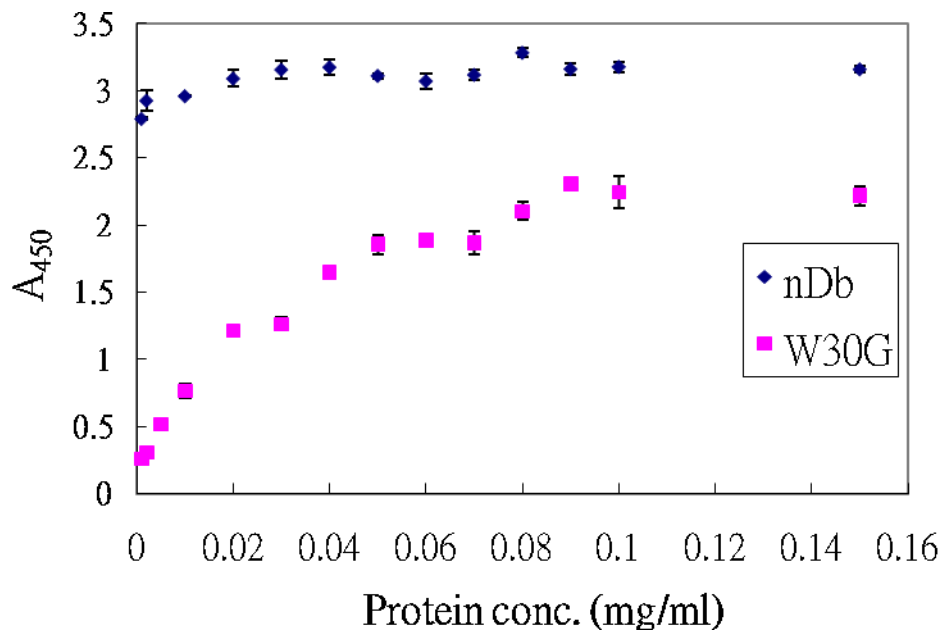
圖 3-7 單一錨固區蛋白質 D-b 與其突變型之結合滴定圖
 菱形:野生型; 方形:突變型。

Figure 3-7 Binding titrations of single-dockerin and the mutants from D-b.
 Diamond and square represent the wild type and the mutants, respectively.

(A)



(B)



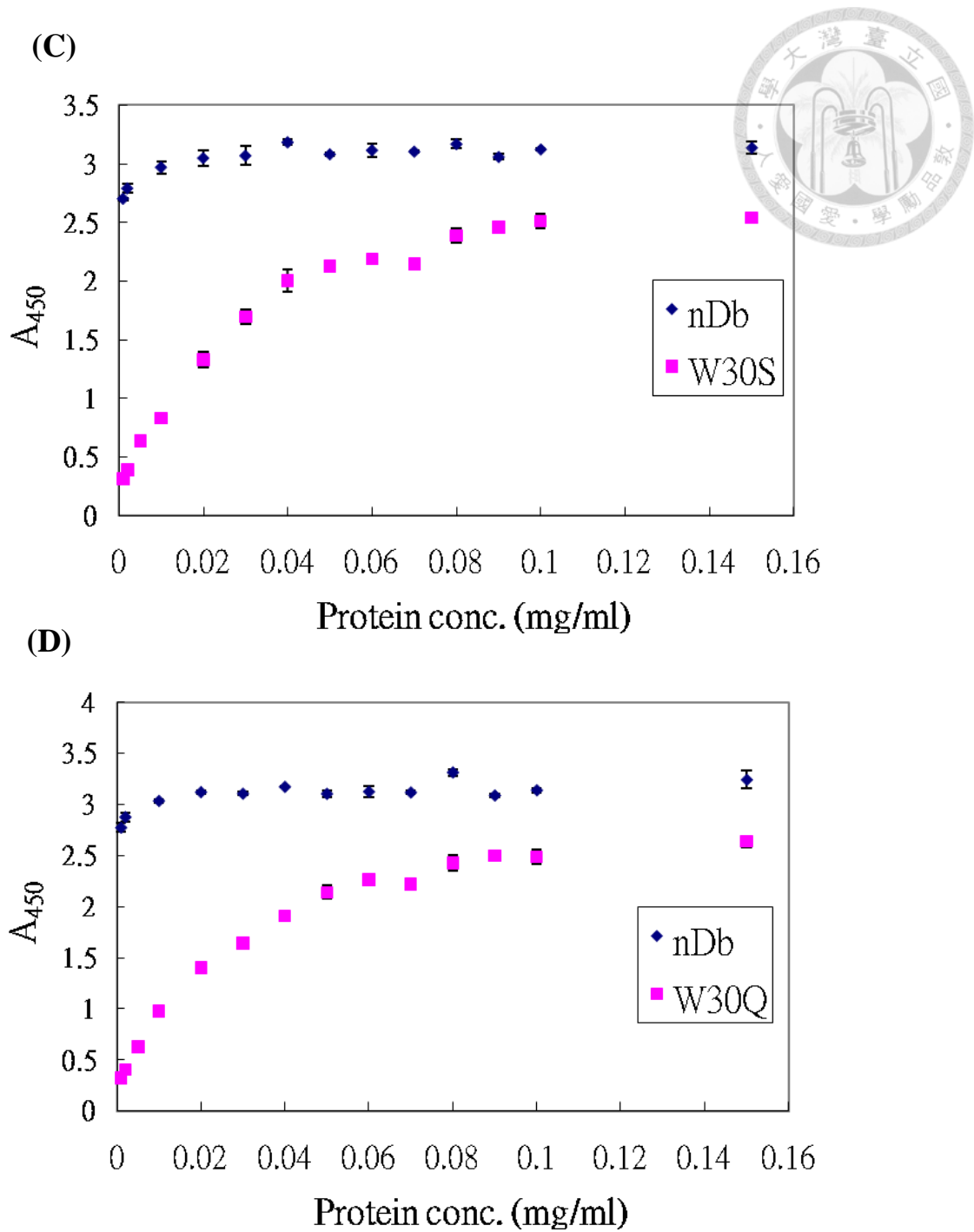


圖 3-8 單一錨固區蛋白質 D-b 與其突變型之結合滴定圖
 菱形:野生型; 方形:突變型。

Figure 3-8 Binding titrations of single-dockerin and the mutants from D-b.
 Diamond and square represent the wild type and the mutants, respectively.

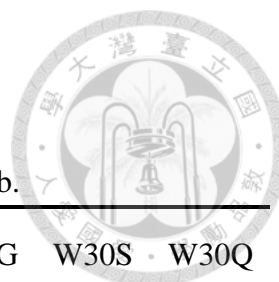


表3- 1單一錨固區蛋白質D-b與其突變型之親和能力

Table 3-1 Binding affinity of single-dockerin and the mutants from D-b.

	D-b	Y5F	Y16F	W23F	W30F	W30A	W30G	W30S	W30Q
K_a^* ($10^{-8}M$)	1.62	1.68	0.73	0.85	24.76	14.66	33.18	28.77	28.2

*單一錨固區蛋白質分子量為37 kDa，其每1 mg/ml之莫耳濃度為27.03 μM 。Ka以 A_{280} 吸收值與單一錨固區蛋白質濃度之雙倒數函數推算。

3.2 *N. patriciarum* J11 支架蛋白質基因鈎取



本研究所採用之策略為以免疫篩選法(immunoscreening)及genome walking方式分別對*N. patriciarum* J11之互補DNA基因庫(cDNA library)與DNA庫(DNA library)鈎取支架蛋白質基因。

(1) cDNA 基因庫免疫篩選法

本研究所建構之cDNA基因庫(cDNA library)價數(titer)為 2×10^5 pfu/ml。此部份實驗使用三種重組融合蛋白質 dockerin-GST (DD-A-GST、DD-b-GST、DD-e-GST)為蛋白質鈎杆,在與結合特性實驗相同條件下進行與scaffoldin之結合反應。經兩次初篩選操作後,其6個疑似正反應之轉形株經二次篩選後確定為偽陽性。實驗結果亦發現轉印膜上的溶菌斑(plaques)呈現淡紫色的偽陽性反應顏色而形成嚴重之背景雜訊,此可能是重組融合dockerins對被 λ -phage感染之大腸桿菌(*E. coli* XL1-blue)胞內物質(lysate)具有非專一性結合,或是所使用之多株抗體(goat anti-GST)同樣對此胞內物質的非專一性結合所致。

(2) 基因組篩選

由於以免疫篩選法可能遭遇到蛋白質間非專一性結合、反應靈敏度及蛋白質本身特性等問題干擾,本研究亦以核酸層次的策略進行scaffoldin基因鈎取。此方法所利用之原理為假設厭氣性真菌cellulase相關基因和厭氣性細菌系統相似,其纖維素分解酵素相關基因是以基因群(gene clusters)形式存在於基因組中,因此可利用某一基因群中cellulase或hemicellulase之dockerin DNA片段為核酸探針(probe)進行雜合偵測,之後對正反應轉形株所攜帶之DNA片段定序,若這些片段中與現有基因資料庫中已發表之cellulase及hemicellulase基因序列不具同源性且有重複性序列出現者即可能為scaffoldin之基因序列。

本實驗所建構的*N. patriciarum* J11 DNA library價數約為 7×10^3 cfu/ml,遠低於CopyControl™ Fosmid Library Production kit套組建議的成功價數 1×10^7

cfu/ml。本論文使用之三種dockerin DNA序列為探針，經菌落雜交(colony hybridization)實驗，結果並無正反應轉形株出現。另外，本研究同時也以轉形菌落分群並利用colony PCR方式先篩選出具有dockerin DNA序列的選殖株(clones)，再由這些clones以PCR方式篩選具長片段(大於10 kb)DNA插入的clones做為後續定序之候選clones。最後實驗結果，81群菌落分群中(每群菌落數約30~50不等)中，共有4個分群在預期位置具有DD-b序列(約336 bp)擴增訊號，再經兩次分群PCR及DNA大片段篩選PCR擴增後，僅可得一條長約5.5 kb的DNA片段，如圖3-9。經分段定序後，此片段包含一段與*Bacillus topoisomerase* DNA序列相同度為38%的序列。

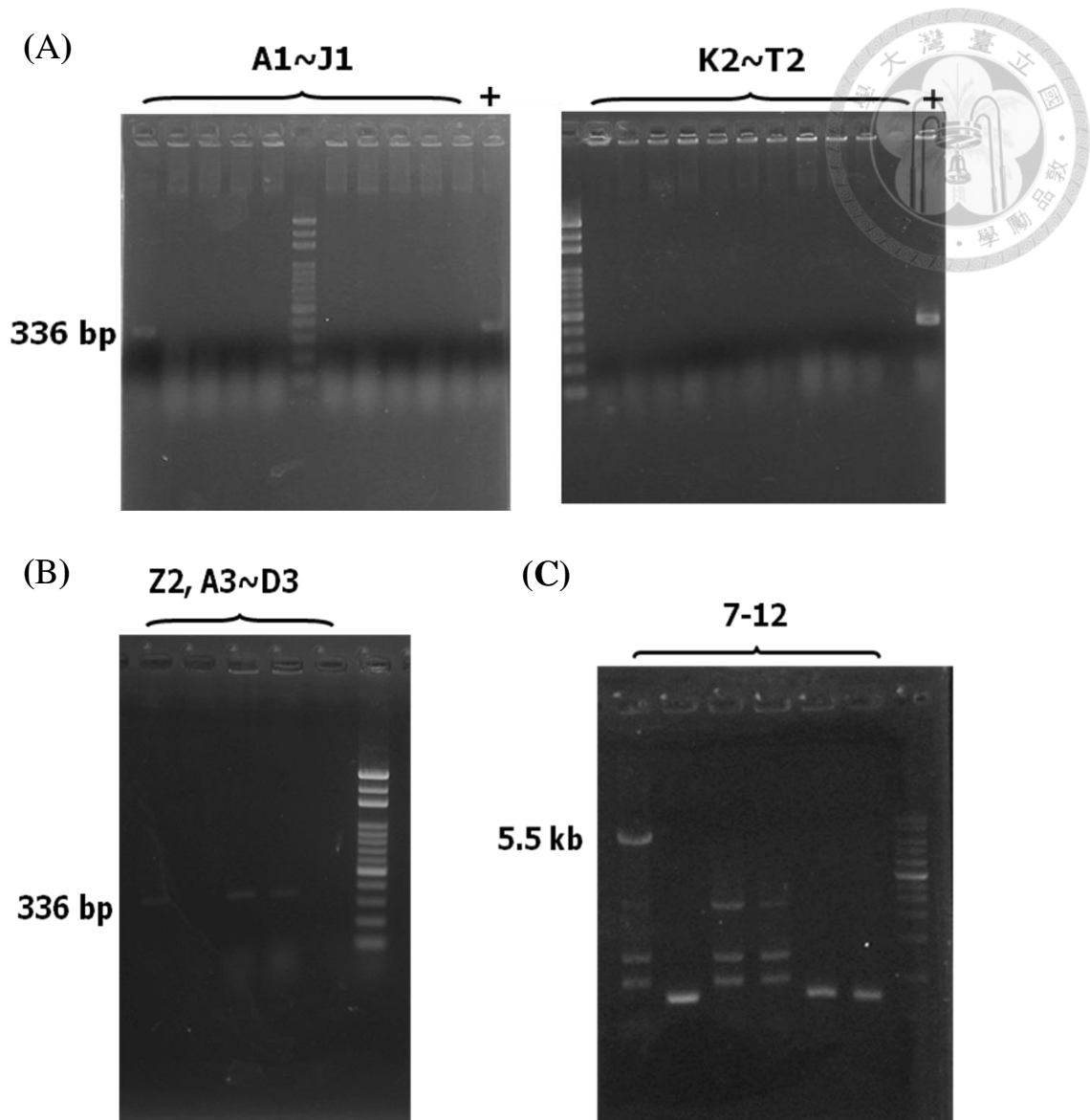


圖 3-9 菌落分群聚合酶連鎖反應圖

(A)、(B) 第一次菌落分群具有DD-b DNA序列之菌落群。(C) 插入片段大小篩選PCR所得結果。+:含有DD-b表達載體之菌落。

Figure 3-9 Colony grouping PCR. (A, B) First PCR with DD-b primer set. (C) Size selection PCR with pCC1FOS sequencing primer set.

3.3 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體誘導生成



關於厭氣性真菌培養及對於不同類型的碳源利用已有很多相關研究，而其培養上清液可測得cellulase和hemicellulase活性。本研究目的為探討*N. patriciarum* J11於不同碳源培養時，對於其cellulosome系統的誘導生成及其相關組成分的差異性，進而鑑定主要組成酵素以供未來應用的基礎。

(1) 纖維素分解酶複合體誘導生產與純化

本研究以葡萄糖、纖維雙糖、可溶性多醣CMC、結晶性纖維Avicel、天然纖維基質稻桿以及木聚醣做為cellulosome誘導生成之碳源。培養所得之6公升上清液經濃縮後以cellulosome與纖維素具親和性結合能力的原理，將胞外能與Avicel結合之蛋白質收集純化，再經一次濃縮後，進一步以分子篩方式使用膠體過濾純化分子量大的cellulosome減少胞外含有CBD之游離式cellulase干擾。結果如圖3-10所示。各類碳源培養之樣品經膠體過濾管柱純化後，於約75毫升之提洗液中皆可得A₂₈₀之蛋白質吸收峰，其分子量大於且接近669 kDa，此結果與原態聚丙烯醯胺膠體電泳結果相符；而各樣品在120毫升至160毫升間都有第二個蛋白質吸收峰。因此，我們可推測目前所使用之各種碳源皆可誘導其產生cellulosomes，其中，結晶性纖維Avicel、稻桿及木聚醣為最有效的誘導碳源。將第一個吸收峰的蛋白質收集並且濃縮後進行Avicelase及CMCase活性測試，結果如表3-2。以結晶性纖維Avicel、稻桿及木聚醣為碳源者，皆可得較明顯之Avicelase活性。六種基質誘導生產的cellulosome皆具CMCase活性，其中以Avicel、稻桿及木聚醣培養來源者比活性明顯高於其餘三者。上述Avicelase及CMCase分析結果的差異可能是因為cellulosome在組成上的差異造成，若其exoglucanase或cellobiohydase的組成較少甚至無法被合成，則其對結晶性纖維的分解能力將明顯受影響，而endoglucanase組成差異則是影響對CMC的分解能力。這些cellulosome都具有CMCase活性，表示部分endoglucanase可能在各種碳源存在下都是處於持續生成的。這部分推測有待繼續分析各cellulosome組成份及其各別表現是否受碳源誘導控制才能進一步釐清。

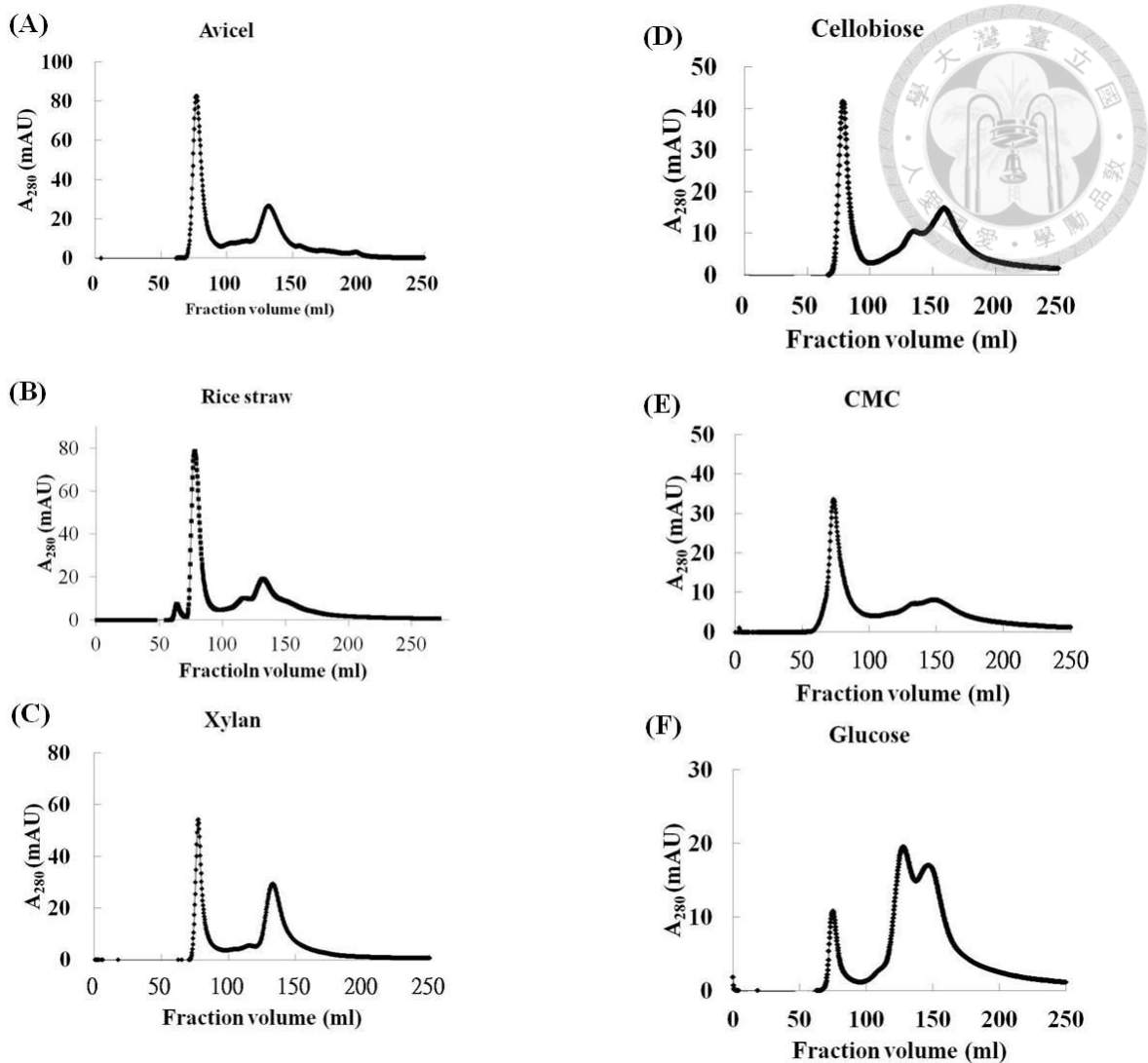


圖3- 10不同碳源誘導生成之cellulosome膠體過濾純化

(A)-(F) 以Avicel、稻桿、木聚醣、纖維雙糖、CMC及葡萄糖為碳源生成之純化樣品。膠體為Sephacryl S-300，純化流速為每分鐘1毫升，每5毫升收集為一管，流洗液為含0.2 M NaCl之50 mM Na-citrate緩衝液(pH 6.2)。

Figure 3-10 Cellulosome purification by Gel filtration-FPLC. Samples prepared from cultures with different carbon sources. (A) Avicel, (B) rice straw, (C) xylan, (D) cellobiose, (E) CMC, (F) glucose. Sample was applied to a Sephacryl S-300 column that was equilibrated and eluted with 50 mM Na-citrate buffer (pH 6.2) containing 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.5 ml/min. The collected fraction volume was 5 ml.

表 3-2 不同碳源誘導之纖維素分解酶複合體酵素活性

Table 3-2 The Avicelase and CMCase activities of cellulosems from cultures with various carbon sources.

Carbon source	Avicelase (IU mg ⁻¹)*	CMCase (IU mg ⁻¹)*
Rice straw	2.73	70.76
Avicel	3.71	93.61
Xylan	1.75	47.90
CMC	ND**	7.34
Cellobiose	0.24	14.46
Glucose	ND	10.90

* One international unit (IU) of activity was expressed as the amount of enzyme that released 1 umol of reducing sugar per hour.

** not detecte





(2) 纖維素分解酶複合體組成分圖譜

此部分實驗以先前研究所使用的六種基質為碳源，所得培養上清液經前述方式純化後，以大分子量吸收峰之cellulosomes為分析對象，結果如圖3-11所示。SDS-PAGE分析所使用之各蛋白質量為5 μg ，結果顯示此六種碳源所誘導生成之cellulosome組成份有相似之圖譜。其中，Avicel、稻桿及木聚糖為碳源者，其組成分圖譜中分子量95 kDa以上者在量上相對其它三類都較高。然而，在葡萄糖、CMC及纖維雙糖誘導之cellulosome組成分圖譜中，分子量約55 kDa者比例較其它3種碳源來源者多。由目前結果可推測，*N. patriciarum* J11所生成之cellulosome組成份相似，但各組成份之比例會隨誘導碳源的不同而有差異。前述錨固區結合特性實驗結果顯示，重組錨固區蛋白質能與上清液及cellulosome製備液中分子量約79 kDa對組成分結合，對照圖3-11，其是否為厭氣性真菌之支架蛋白質亦是本研究後續探討項目。

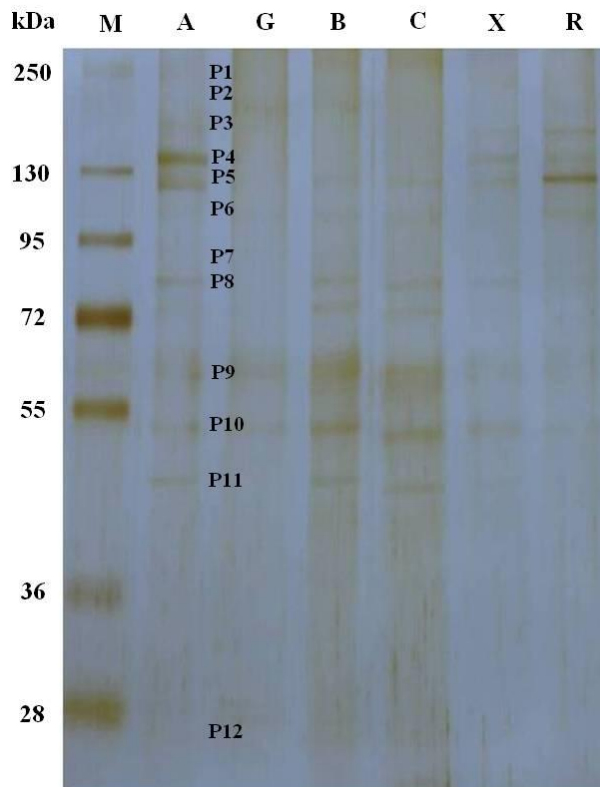


圖 3- 11 不同碳源誘導生成之纖維素分解酶複合體組成分圖譜

變性聚丙烯醯胺膠體電泳後經硝酸銀染色。A: Avicel; G: 葡萄糖; B: 纖維雙糖; C: CMC; X: 木聚醣; R: 稻桿。

Figure 3-11 Composition patterns of cellulosomal enzymes from cultures with various carbon sources. SDS-PAGE using silver stain. Lane A: Avicel, lane G: glucose, lane B: cellobios, lane C: CMCe, lane X: xylan, lane R: rice straw.

3.4 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體組成蛋白質鑑定



本研究探討 *N. patriciarum* J11 於結晶性纖維為碳源培養時，其誘導生成之 cellulosome 組成份的差異性，進而鑑定主要組成酵素以供未來相關研究應用。

(1) LC/MS/MS 蛋白質鑑定

比較 Avicel、稻桿與木聚糖誘導來源 cellulosomes 組成成分圖譜，三者圖譜相似，本實驗將主要組成成分分為 12 類，編號 P1 至 P12。木聚糖來源之 cellulosome 缺乏 P6 之成分，而稻桿來源者則缺乏 P8 成分。另外，Avicel 誘導之 cellulosome 具有分子量 28 kDa (P12) 左右之組成成分，而其它二類都缺乏此組成成分。目前以 Avicel 來源者之 cellulosome 組成成分做為鑑定目標，經 LC/MS/MS 分析後，結果整理如表 3-3 所示，六個樣品可比對到 *Neocallimastix*、*Piromyces* 及 *Orpinomyces* 來源的 cellulase (圖 3-12 圖)。雖然質譜圖譜比對會隨著相關序列在比對資料庫的豐富性、對蛋白質磷酸化、糖基化修飾等參數的設定條件以及實際胰蛋白酶(trypsin)作用結果與預測值間的差異而有所變異，且目前所得之序列覆蓋率多未超過 10%，但目前依據每一預測結果中 significant protein score 相對都大於資料庫中其它可能結果，且可能隨機命中機率皆小於 5% ($p < 0.05$)。編號 P4、P5、P7、P8、P10 及 P11 組成份可比對到 GH5、GH6 和 GH48 糖苷水解酶，此三類亦是厭氣性真菌來源之 cellulase 主要的類型。比對結果顯示，編號 P4 和 P5 與 *N. patriciarum* CelD 及 *N. frontalis* cellulase 具同源性；而 P7 及 P8 則與 *P. equi* Cel48A 及 *Piromyces* sp. E2 Cel48A 具同源性。然而，P10 和 P11 雖與 *Orpinomyces* sp. PC-2 CelH 皆具同源性，但其可能因為不同的轉譯後修飾或互為異構酶而造成其在分子量上有所差異。P1、P2、P3、P6、P9 及 P12 在資料庫中無法比對到肽圖譜。因此，後續以蛋白質 N 端定序方式獲得 N 端部分序列再經 genome walking 方法求其部分 DNA 序列作為鑑定依據。本研究另將以這些 GenBank 已知之序列設計引子並從 *N. patriciarum* J11 基因組及 cDNA 中擴增並轉殖這些序列以做為未來開發應用之基礎。

(2) 蛋白質胺基端定序

將轉印至 PVDF 膜上編號 P1、P3、P6、P12 的蛋白質進行 N 端定序，所得結果整理如表 3-4。目前所得之結果，胜肽長度為 4 至 9 個胺基酸，然而 P2 與 P9 在圖譜中因蛋白質量比例過低且與 P1、P3 又 P10 鄰近，因此在轉印過程無法得到高純度之 P2 與 P9 而且也無法達到符合 N 端定序所要求之蛋白質量，故暫無法進行 N 端定序實驗。經資料庫比對結果，3 條胜肽無法對應到目前已知的相關蛋白質序列。此結果可能表示，這 3 個蛋白質可能是未被發表的基因產物，但此仍需經後續部分序列的選殖定序才能確定。P6 蛋白質 N 端定序結果，其 7 個胺基酸胜肽符合 GH 38 family 中的 alpha-mannosidase，此酵素主要是參與甘露聚糖(mannon)的分解。由於轉印至膜上之蛋白質量無法準確推算，因此易造成樣品量偏低而無法在定序時有效延續循環反應。另外，在 N 端或其附近的胺基酸可能因不同修飾基團的障礙而阻斷反應進行，因此常造成所胜肽過短或無法進行 N 端定序。

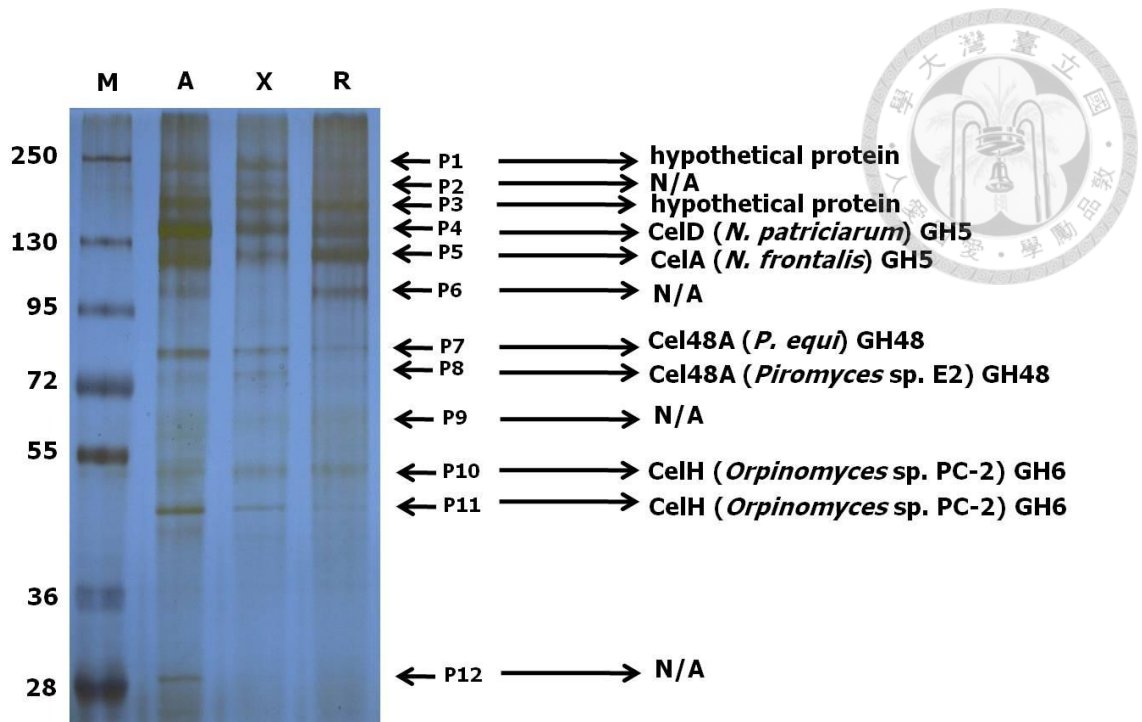


圖 3- 12 纖維素分解酶複合體組成分鑑定圖譜

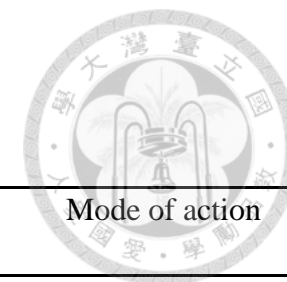
A: Avicel; X: 木聚醣; R: 稻桿。N/A: 未比對到之蛋白質。

Figure 3-12 Candidates of cellulosomal enzymes for protein identification.

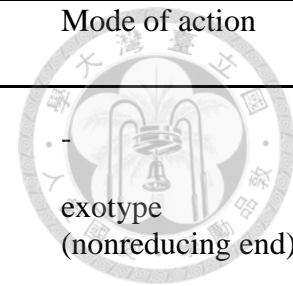
A: Avicel, X: xylan, R: rice straw. N/A, non available protein.

表 3-3 纖維素分解酶複合體組成分之蛋白質鑑定

Table 3-2 Protein identifications of cellosomal compositions.



Protein name	Significant protein score	Sequence coverage	Significant protein name	Modular architecture ^a	Mode of action
P1	48	0%	gi 145602830 hypothetical protein MGG_13754 <i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	-	-
P2	N/A	-	-	-	-
P3	48	0%	gi 145602830 hypothetical protein MGG_13754 <i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	-	-
P4	428	13%	gi 2981484 cellulase CelD, <i>Neocallimastix patriciarum</i>	GH5-GH5-GH5-Doc-Doc	endotype
P5	77	3%	gi 3712668 cellulase, <i>Neocallimastix frontalis</i>	GH5-Doc-Doc	endotype
P6	N/A	-	-	-	-
P7	136	3%	gi 25990957 cellulase Cel48A precursor, <i>Piromyces equi</i>	GH48-Doc-Doc	exotype (reducing end)
P8	108	5%	gi 25990955 cellulase Cel48A precursor, <i>Piromyces</i> sp. E2	GH48-Doc-Doc	exotype (reducing end)



Protein name	Significant protein score	Sequence coverage	Significant protein name	Modular architecture ^a	Mode of action
P9	N/A	-	-	-	-
P10	155	7%	gi 15529294 cellobiohydrolase II-like cellulase CelH, <i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	Doc-Doc-GH6	exotype (nonreducing end)
P11	93	4%	gi 15529294 cellobiohydrolase II-like cellulase CelH, <i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	Doc-Doc-GH6	exotype (nonreducing end)

^a The modular architectures were predicted by the Conserved Domain Database (CDD) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). GH, glycosyl hydrolase family; Doc, fungal dockin.

表 3-4 纖維素分解酶複合體組成分之蛋白質胺基端定序

Table 3-4 N-terminal sequencing of cellulosomal compositions.

Protein name	Peptide sequence
P 1	S-L-F-V
P 3	【G, T】-K-E-Y-F-P
P 6	S-A-D-D-Y-A-【Q, N】-R-A
P 12	D-P-Y-Q-I-K



(3) *N. patriciarum* J11 cellulosome 組成份基因選殖

本實驗以蛋白質鑑定結果所得之序列為依據，自GenBank資料庫比對序列並且設計專一性引子自cDNA及genome中擴增、選殖出三條cellulase基因，分別為J11 Cel5A、J11 Cel48A及J11 Cel6C。此三條基因之胺基酸序列與GenBank資料庫已發表序列比對分別如圖3-13、3-14及3-15所示。J11 Cel5A與基因資料庫中*N. patriciarum* CelD (AAC06321)之胺基酸序列有100%相同度(identity)(141)。J11 Cel48A與基因資料庫中*Piromyces* sp. E2 Cel48A (AAN76734)之胺基酸序列有80.8%相同度(121)。J11 Cel6C與基因資料庫中*Orpinomyces* sp. PC-2 CelH (AAL01211)之胺基酸序列有93.6%相同度(122)。由於此三條cellulase結構組成上皆具一催化區及錨固區，因此再確認了此三條cellulase為*N. patriciarum* J11 cellulosome之組成份。

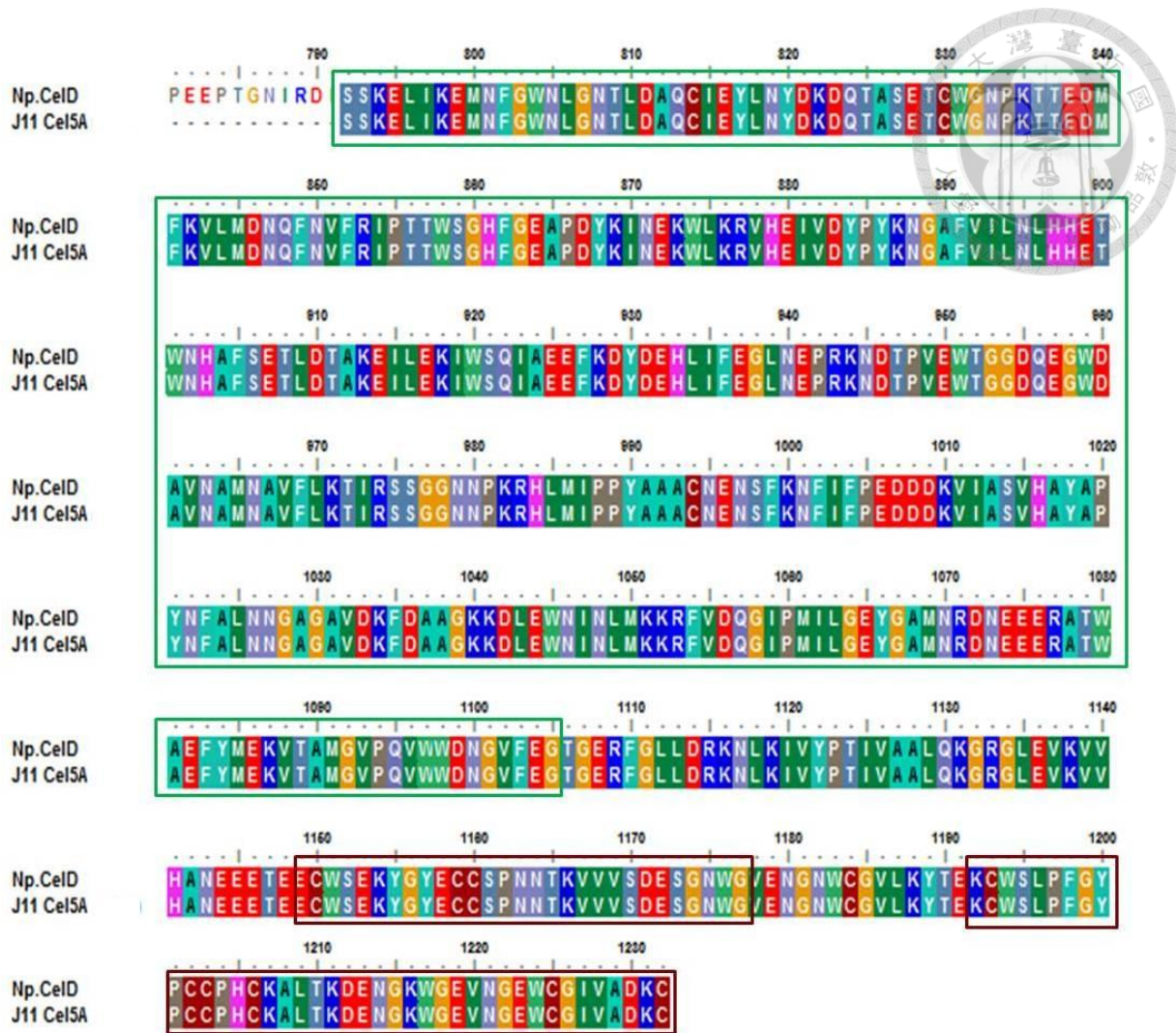


圖 3-13 J11 Cel5A 與 *N. patriciarum* CelD 胺基酸序列比對。

綠色框線為催化區，棕色框線為錨固區。

Figure 3-13 The alignment of the amino acid sequences of J11 Cel5A and *N. patriciarum* CelD. The conserved residues are shaded, and the catalytic domain and the docking domain are boxed with green line and brown line, respectively.

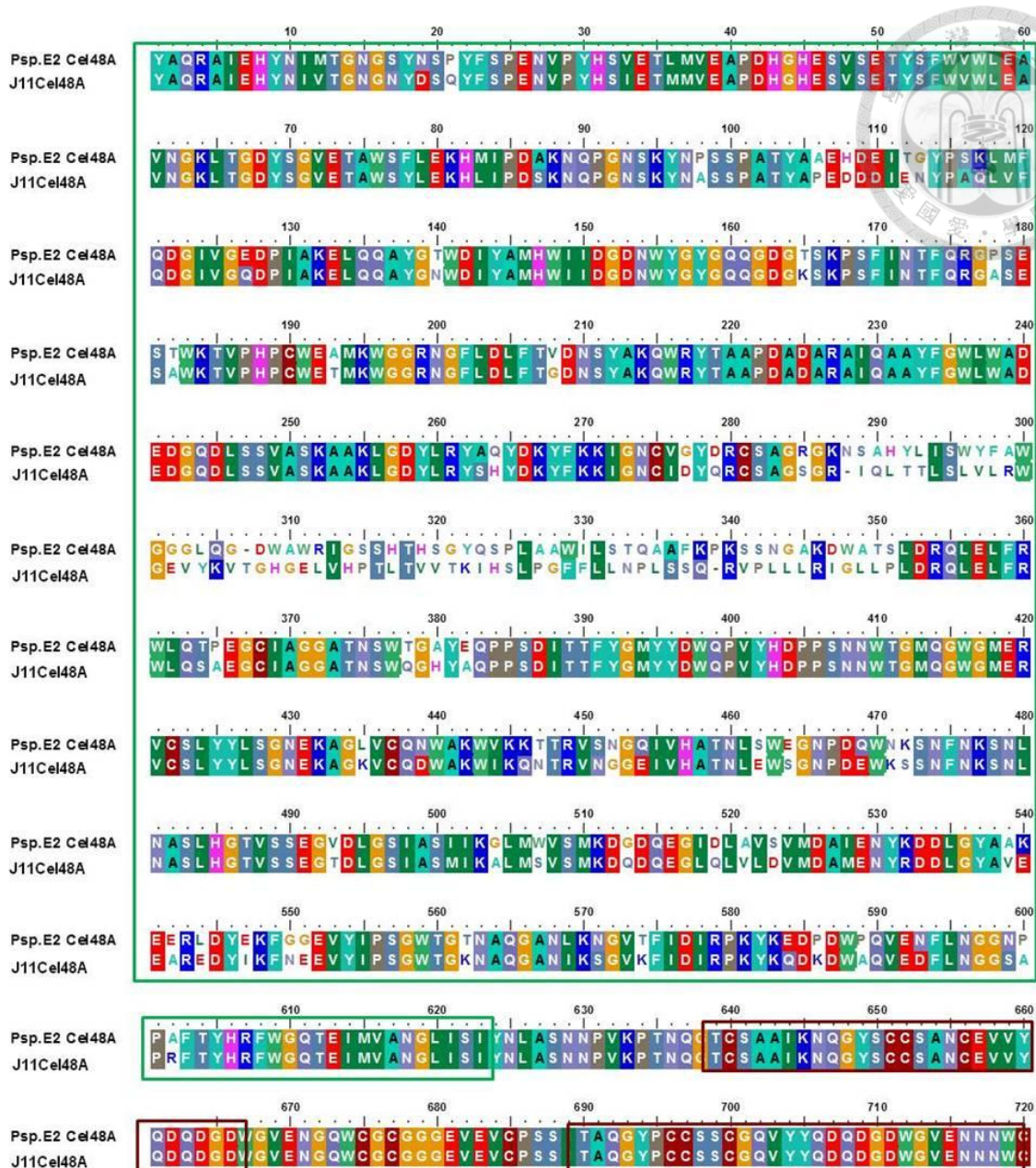


圖 3-14 J11 Cel48A 與 *Piromyces* sp. E2 Cel48A 胺基酸序列比對。

綠色框線為催化區，棕色框線為錨固區。

Figure 3-14 The alignment of the amino acid sequences of J11 Cel48A and *Piromyces* sp. E2 Cel48A. The conserved residues are shaded, and the catalytic domain and the docking domain are boxed with green line and brown line, respectively.

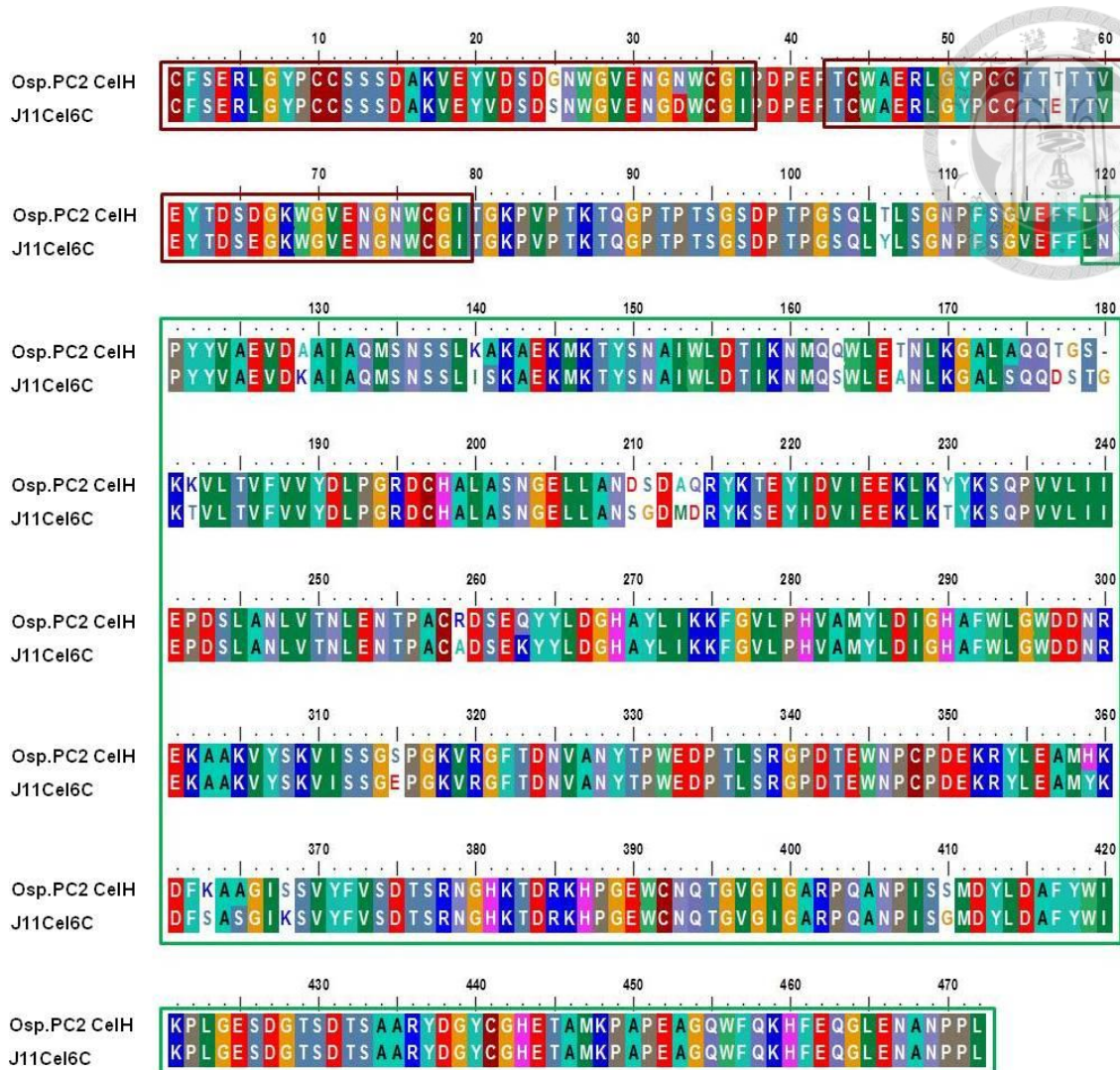


圖 3-15 J11 Cel6C 與 *Piromyces* sp. PC-2 CelH 胺基酸序列比對。

綠色框線為催化區，棕色框線為錨固區。

Figure 3-15 The alignment of the amino acid sequences of J11 Cel6C and *Piromyces* sp. PC-2 CelH. The conserved residues are shaded, and the catalytic domain and the docking domain are boxed with green line and brown line, respectively.

第四章 討論



4.1 *N. patriciarum* J11 之纖維素分解酶複合體生成

(1) 菌體生長與酵素誘導生成

由於真菌生長的偵測無法像細菌以血球計數器或是 OD₆₀₀ 吸光值及活菌計數方式進行，因此，過去研究採取培養基中碳源基質減少量、菌體乾重或是培養基中特定發酵產物量做為真菌生長偵測依據(81, 92)。然而，這些方法除了使用上不方便外亦無法即時偵測反應其生長情況。在厭氣性真菌培養、發酵的相關研究中已知厭氣性真菌在培養生長時會因生長環境、菌株以及是否與細菌共生等條件差異而使其發酵產物有所變異(13, 82, 83, 133)。相關研究顯示，二氧化碳、氫氣、乳酸、甲酸與乙酸等都隨著菌體生質量增加、碳源基質減少而增加，因此，這些現象也逐漸發展成做為厭氣性真菌生長偵測研究的指標(94, 104)。由於氣態的代謝產物在密閉的培養瓶中會隨著菌體生長而持續累積在密閉空間中，因此，以偵測氣相組成、累積量等參數成為研究人員做為菌體生長的評估指標。Theodorou 等人使用壓力傳導器(pressure transducer)測定厭氣性真菌的生長，其直接偵測培養瓶內的氣體壓力並推算氣態代謝產物的體積做為生長指標(134)。Nielsen 等人也利用此方法做各種厭氣性真菌分離株生長動力學(growth kinetics)的一項指標(96)，然而，這方法雖然具有快速、即時偵測的優點，但仍需依據菌株、培養條件等差異性做出不同之參考曲線，故其仍未廣泛地使用。

在以單糖為碳源的生長比較中，葡萄糖是此菌體生長時相對好利用的碳源，對 *N. patriciarum* J11 而言，其無需耗費更多資源去合成相關 cellulase 進行分解以維持其生長所需的碳源。然而，xylose 和 fructose 在其自然界的生長環境中多為木質纖維外部組成份半纖維素的組成單元，因此，厭氣性真菌偵測到 xylose 和 fructose 的存在時，其應會啟動調控機制，生成更多相關分解酵素以利其生長。另外，好氣性真菌 *Trichoderma*、*Aspergillus* 與 *Penicillium* 等 cellulase 系統的研究也指出，當

纖維雙糖濃度低時，其可誘導 cellulase 的生成，而高濃度時則是抑制 cellulase 的合成(33, 67, 90)。因此，從結果可推測，當 *N. patriciarum* J11 處於較高濃度纖維雙糖的生長前期時，其 cellulase 表現量可能受到和好氣性真菌相似的抑制調控，而使 CMCase 表現量較低。

Mountfort 等人(94)曾探討降解產物調控機制(catabolite regulatory mechanisms)對 *N. frontalis* PN-1 利用各類單糖及雙糖的影響，並以氫氣產量為生長指標，此菌株在不同種類單糖及雙糖碳源同時存在時，其對各種類糖的利用率分析結果顯示，此菌株偏好葡萄糖程度大於果糖與木糖，雙糖類也大於單糖類，此現象與本研究在單糖類培養所得之結果類似，然而對於雙糖的利用結果卻是相反，*N. patriciarum* J11 在最初 24 小時及到達生長停止期，其以雙糖為碳源時的生長較以單糖為碳源時差。先前研究顯示，厭氣性真菌可以廣泛地利用各種糖類為其生長碳源，然而，可能因分離源的差異，而使不同菌株間，即使是同物種，其對相同糖類的利用率亦有所差異(9)。以 *N. frontalis* PN-1 及 *N. frontalis* PN-2 為例，其分別從羊及牛的瘤胃中分離培養，當以纖維素為碳源時，其生長及所產生之 CMCase 的差異可達 2 倍(93)。由此亦可看出，厭氣性真菌在不同的環境中已演化出各菌株自己能適應的營養方式。

當以多醣類，特別是不可溶的纖維素為碳源時，菌體一開始所產生的 cellulases 能將這些較不易分解的多醣基質分解成可溶性的寡醣、雙單或單糖，之後再藉由這些小分子扮演誘導物的角色進而大量生產分解所需的相關分解酶(115, 126, 143)。*N. patriciarum* J11 在以 CMC 培養時，其生長情況是所有測試的碳源中最差者，如同先前研究顯示，多數厭氣性真菌對於 CMC 的利用率普遍都不理想，甚至無法以其為碳源生長(9)。CMC 為一經羧基甲基化的纖維素，一般只有 endoglucanase 能有效分解這類基質。主要原因為 endoglucanase 催化區的立體結構呈現裂口狀(cleft)，它可以隨機或演進式地(processive)分解葡聚醣鏈(glucan chain)而不易受羧基甲基團的干擾，而 exoglucanase 或 cellobiohydrolase 其立體結構呈現為一長形通道口(tunnel)，此類酵素多以演進式連續地從還原端或非還原端切出 cellobiose、glucose 或 cello-oligosaccharide，而當其遇到羧基甲基團時，演進式會受阻因而較難分解 CMC(105);因此，CMC 已廣泛地被研究人員作為偵 endoglucanase 活性時所使用的基質。

比較單糖、雙糖與多醣對 CMCcase 的誘導表現，Avicel、稻桿及木聚醣對 *N.*

patriciarum J11而言是較好的誘導基質。自然界中，微生物無法直接吸收這些巨大的分子亦不可能以此為一誘導分子，因此，如同上述，菌體本身應該具有一套或少數持續表現的(constitutive)纖維分解酶，當大分子基質出現時，其能先將大分子分解以產生少量的小分子(單糖、雙糖或纖維寡糖)，再藉由這些小分子進入菌體誘導相關基因表現。對於環境中已存在濃度較高且可直接吸收利用的碳源時，菌體本身的調控機制會使其降低分解酵素的生成(115)。但是，對於何種糖類為其分解酵素生成調控關鍵因素，仍需對厭氣性真菌在分子層次上更進一步研究。此部分結果顯示出*N. patriciarum* J11應具有可持續生成並維持基本生長所需之cellulase系統，然而，此系統中是否包含cellulosome乃是本研究需進一步探討的範疇。

目前已發表的厭氣性真菌分泌至胞外的游離形式cellulaes皆為外切形式的exoglucanase或cellobiohydrolase，因此，其CMCase活性主要可能為cellulosome所貢獻。然而，在這些誘導培養條件下，cellulosome除了在生成量可能具有差異性外，其組成分是否也會因碳源不同而有所差異亦是目前厭氣性真菌cellulosome研究值得探討的範疇。

(2) *N. patricirum* J11 cellulosome 生成

先前研究顯示，相較於半纖維分解酶對基質的專一性，在一些產生cellulase物種中，其cellulase為多功能性(multi-function)分解酶。一般在好氣性微生物中，此類分解酶多具有兩種以上不同基質水解特性的催化區(54);在厭氣性真菌中，其多功能催化特性來自於同一催化區，即使是具有兩個催化區或以上者，其催化區亦是具高同源性及相同催化特性(44, 110, 141)，因此上述之蛋白質亦可能包含同時具有 β -glucanase與xylanase活性之多功能cellulase。由於複合體的形成可能是因各組成份間的非專一性結合而聚集，因此若要符合在厭氣性細菌系統中對cellulosome之定義，我們仍需要進一步證明厭氣性真菌scaffoldin存在於此複合體中。此外，上述純化方式所得之cellulosome可能並非只有單一固定組成之複合體，因此上述所得之各種活性蛋白質可能是來自於不同的複合體;若要從蛋白質層次得知厭氣性真菌此複合體之活性組成分，則需再進一步以其它蛋白質純化策略先將不同組合之複合體純化再進行上述分析。

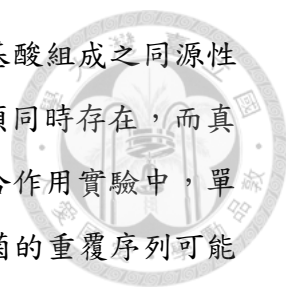


(3) *N. patricirum* J11 scaffoldin 偵測

目前結果顯示，*N. patricirum* J11來源的重組dockerin融合蛋白質能和其cellulosome中分子量約79 kDa之蛋白質結合。與其它相關研究結果比較，*Orpinomyces* sp. PC-2其scaffoldins大小約66、94及116 kDa (122);而*Piromyces* sp.約為97 kDa，且其木聚醣酶XylA之dockerin可與不同屬之*N. patriciarum* scaffoldin結合，其大小約為116 kDa (46)。此結果亦顯現厭氣性真菌cellulosome系統能因不同物種產生不同大小之scaffoldin進而組成具多樣性的厭氣性真菌cellulosome。厭氣性細菌系統中，scaffoldin所含之cohesin與cellulase及hemicellulase之dockerin結合時需有鈣離子參與調控(34, 142)以穩定構形。然而，由厭氣性真菌來源之dockerin二級結構預測、*P. equi* Cel45A dockerin立體結構及相關結合實驗結果顯示，厭氣性真菌之dockerins不具有類似EF-hand motif中鈣離子結合環(calcium-binding loop)的構形，且主要二級結構組成 β -strands，且鎂離子、鈣離子以及EDTA、EDGA並不影響其結合能力(111)，所以在厭氣性真菌系統中，其可能是以一種非離子參與的方式結合。由此可推論dockerin和scaffoldin結合作用不需金屬離子參與應是普遍存在且異於厭氣性真菌系統的特性。

本研究在此部分所使用之dockerin專一性引子是根據*N. frontalis*及*N. patriciarum*之cellulase序列所設計，而從*N. patriciarum* J11基因組DNA皆可選殖出目標DNA片段，其中DD-A及DD-b與已發表之序列完全相同，而DD-e之胺基酸序列與已發表序列亦有96%相同度，此再次顯示厭氣性真菌cellulases和hemicellulases核酸及胺基酸序列在演化上的保守性;先前研究也發現厭氣性真菌*Piromyces* sp.木聚醣酶XylA之dockerin可與不同屬之*N. patriciarum* scaffoldin結合(46)。就厭氣性真菌而言，dockerin胺基酸序列在不同物種間具有很高之同源性，且其dockerin與scaffoldin的結合作用是不具種間甚至是屬間的專一性的。這些結果顯示出厭氣性真菌的dockerin-scaffoldin結合系統與具有種專一性的*Clostridium*系統間的差異性。

有關厭氣性真菌cellulase和hemicellulase研究中已發現同一多肽鏈中具有三個胺基酸序列相同度高的dockerin (44, 123)，此可能代表著厭氣性真菌與細菌系統間，dockerin和scaffoldin結合作用的另一項差異。厭氣性細菌系統中，其cellulase和hemicellulase之dockerin都是以單一個數存在，而一個dockerin中存在著約22個胺基



酸之同源性重覆序列;對照厭氣性真菌系統，其為兩個由約40胺基酸組成之同源性重覆區塊(51)，但在結合時，細菌dockerin的兩個重覆序列都必須同時存在，而真菌之dockerin在自然界中存在兩個及三個重覆區塊，而在胞外結合作用實驗中，單一個dockerin亦能具結合能力(111)。因此，真菌的重覆區塊與細菌的重覆序列可能是代表著不同之結合機制。然而，結合滴定法研究結果指出，*N. patriciarum* J11來源的重組dockerin，其Trp-30胺基酸有存在與scaffoldin結合具有重要關係，若與厭氣性細菌系統比較，其結合作用可能是以疏水性作用力結合(29)。未來，我們仍可對Tyr-5、Tyr-16與Trp-23進行相同實驗以進一步確認其結合作用力。

目前經由西方雜合分析與蛋白質結合滴定法進行dockerin結合特性的研究結果顯示，*N. patriciarum* J11與其它厭氣性真菌*Orpinomyces* sp. PC-2、*N. patriciarum*、*Piromyces equi*及*Piromyces* sp. E2相似，其cellulases和hemicellulases所具有的dockerins能夠與胞外所純化之厭氣性真菌cellulosome結合，此系統應該具有和厭氣性纖維分解菌系統類似的scaffoldin。至於厭氣或真菌系統dockerin與scaffoldin的結合機制和特性以及其scaffoldin是否也有與細菌系統類似之cohesin，仍有待其scaffoldin基因的發現並表達、純化後才能以胞外(*in vitro*)結合實驗得到進一步的證實。

4.2 *N. patriciarum* J11 支架蛋白質基因鈎取



於免疫篩選法中，本研究所建立之cDNA library為原核生物表現系統，因此，對於厭氣性真菌而言，若其scaffoldin在自然界若需有糖基化(glycosylation)等轉譯後修飾(posttranslational modification)作用才能具有正確的結合構形，則此種以蛋白質間結合原理之免疫cDNA基因庫篩選法即不適用。目前已有研究指出，厭氣性真菌其分解酵素基因在演化上除了與好氣性真菌有同源關係外，仍有部份基因與厭氣性細菌基因具同源演化關係(53)。未來若能純化足夠量之cellulosome並以此為抗原從而誘發生產cellulosome各組成份之抗體，我們將可利用此抗體再進行免疫篩選法鈎取scaffoldin基因。

根據Harhangi等人分析*Piromyces* sp. E2 DNA library結果顯示，相同或相似的cellulase和hemicellulase基因是聚集在基因組中的一段區域，各基因間約有2 kb以上的序列間隔(60)。此結果也提供了厭氣性真菌纖維素分解相關基因具有基因群組織特性的佐證。因此，若以基因群為基礎，欲從DNA library篩選含有scaffoldin基因，則需建構較高品質(大於40 kb的DNA插入片段)的選殖株。至目前為止，此部分實驗仍未得到大於5.5 kb長的片段。其原因可能為建構DNA library時，由於厭氣性真菌核酸特性，使得較難以獲得大分子量、高品質的DNA 做為起始材料。

由於*Neocallimastix*屬於單中心體的厭氣性真菌，其核酸只存在孢子囊中，其絲狀假根並無核酸存在，因此，單位重量的生物質(biomass)中，其核酸含量低於一般絲狀真菌。厭氣性真菌DNA組成中，G+C%低於20%較其它物種低(28)，其氫鍵鍵結較其它物種弱，故較容易降解。另外，這些物種富含類糖原(glycogenlike)的儲存性多醣，使得從厭氣性真菌萃取多量且高品質的DNA更為困難(109)。上述因素皆影響了*Neocallimastix*屬genome或全RNA萃取之品質及效率。雖然有關真菌全DNA萃取方式已有很多的研究，但適用於不同厭氣性真菌的方法研究目前仍屬缺乏(27)，因此，這方面的實驗還需開發改進以利往後的相關研究。

4.3 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體誘導生成



不同碳源培養厭氣性真菌 *N. patriciarum* J11 時，除了對其生長速率影響外，對於該菌株所產胞外 CMCase 活性也有顯著差異。Barichievich 等人曾對 *N. frontalis* EB188 於不同碳源培養條件下探討其培養上清液中具 cellulase 活性的蛋白質差異性(12)。從六種碳源誘導生成之 cellulosome 對 Avicel 及 CMC 分解活性結果觀察，*N. patriciarum* J11 在有為碳源條件下，其仍能生成基礎數量之 cellulosome，而當單糖及雙糖等易吸收利用之碳源受限時或者只有結晶性纖維為碳源時，此物種可能啟動另一誘導機制而生成較多量之 cellulosome 以利有效分解結晶性碳源。如圖 3-1 所示，在以結晶性纖維為碳源時，*N. patriciarum* J11 於前 48 小時之生長速率較於葡萄糖與纖維雙糖慢，此可能是因為種菌的葡萄糖碳源轉換為結晶性纖維碳源，故其需一段生長適應期。因此，這段適應期亦可能是其誘導調控大量或更具分解效率組合之 cellulosome 生成時期。研究指出，Avicel、稻桿為較難分解及複雜之基質，因此，其所需之分解酵素應屬較多樣或高活性者(14)。此部份實驗中，Avicel、稻桿及木聚糖為碳源所純化之 cellulosome 其高分子量組成分在蛋白質量比例上都高於其它三類，故這些組成份應具有對結晶性纖維較高分解活性或其它輔助功能等特性。

就厭氣性真菌 cellulosome 系統研究發展而言，要更深入認識這種自然界中具高分解效率的機制，我們除了對於哪些種類 cellulase 扮演持續性表現的角色、哪些為可誘導的以及其組成分之誘導機制需有基礎的研究外，對於 cellulosome 組成份中，是否也包含一些不具分解活性但具其它輔助分解功能之蛋白質亦是一值得探討的範疇。

4.4 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體組成蛋白質鑑定



N. patriciarum J11 cellulosome 組成份經LC/MS/MS分析後，其各個被鑑定之 cellulase 的預測結構上皆具有 dockerin，顯示目前所分離之組成份確實為可組裝成 cellulosome 中之組成份。六條被鑑定的蛋白質分屬糖苷水解酶GH 5、GH 6及GH 48，根據 cellulase 的水解機制GH 6和GH 48屬於外切型(exotype)，且其分別從非還原端(nonreducing end)及還原端(reducing end)進行纖維素的分解。GH 5 則屬內切型(endotype)，其可隨機水解纖維素中葡聚糖鏈(glucan chain)的糖苷鍵結。因此，根據 cellulase 對纖維素的分解機制，這三類型 cellulase 能以高效率的協同作用進行結晶性纖維的分解(11)。

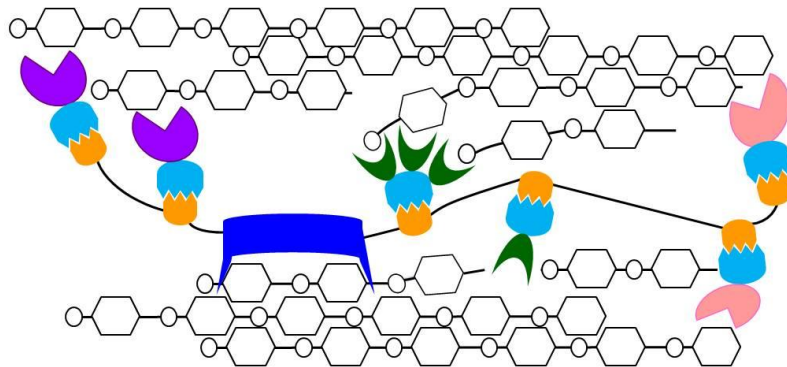
N. patriciarum J11 cellulosome 組成份P1與P3皆被鑑定為未知功能的 hypothetical protein 且其分子量大於130 kDa。由於目前已發表的厭氣性真菌 cellulase 和各類型 hemicellulase 中，最大分子量者為 *N. patriciarum* CelD，且其由至少三個胺基酸序列相同度達99%至100%的催化區組成(141)，因此，P1與P3可能屬於多催化區型的 cellulase。多催化區型的酵素提高了催化效率，若此多催化區是由不同種類活性之催化區組成，則更能提供該物種生存的競爭優勢。厭氣性真菌之 scaffoldin 及 cellulosome 分子量小於厭氣性細菌系統，而其對棉花來源的結晶性纖維分解效率優於細菌系統(138)，則厭氣性真菌之 cellulosome 組成份可能包含多功能性、多催化區類型的 cellulase 及 hemicellulase。

本研究於 *N. patriciarum* J11 cDNA 庫選殖到 J11 Cel5A、J11 48A 及 J11 Cel6C 三條 cellulase 基因。由胺基酸序列與資料庫比對結果可知此三條蛋白質皆具錨固區，故其應為 *N. patriciarum* J11 cellulosome 組成份。此結果亦印證 *N. patriciarum* J11 cellulosome 組成份蛋白質鑑定結果，在 *N. patriciarum* J11 cellulosome 組成份確實存在三類型之 cellulase。另外，*N. patriciarum* J11 所選殖的三條 cellulase 基因與 *Piromyces* 屬及 *Orpinomyces* 屬的 cellulase 基因具高度同源性，此亦顯現厭氣性真菌在功能性基因序列的演化上呈現了趨同演化。厭氣性真菌 cellulase 基因趨同演化的結果可使其保有高度的相似性質，如高分解活性等特性，而使得厭氣性真菌在的自然界中保有其競爭優勢。

第五章 總結



本研究以生化方法驗證*N. patriciarum* J11具有類似厭氣性細菌之cellulosome機制，其具cellulase活性之大分子量蛋白質，是由多個具cellulase及hemicellulase活性之蛋白質組成之複合體且其能與結晶性纖維結合。重組融合雙錨固區蛋白質在無鈣離子參與下可與分子量約79 kDa的未知蛋白質結合，此結果與厭氣性細菌系統相異。經由蛋白質結合滴定法實驗，可已知單一錨固區蛋白質中，Trp-30為參與和scaffoldin結合時的一個關鍵的胺基酸，此結果則與厭氣性細菌系統的相似。由上述可推論*N. patriciarum* J11cellulosome組合機制應是透過類似厭氣性細菌系統中scaffoldin為媒介而組合。以不同碳源培養*N. patriciarum* J11，其對不同碳源的利用率有所差異，且分泌至胞外的cellulase活性亦有所不同，其中以結晶性纖維及木聚醣為較佳的cellulase誘導基質。由不同碳源培養基的培養上清液皆能純化*N. patriciarum* J11的cellulosome，但Avicel、稻桿及木聚醣誘導生成的量高明顯高於其它碳源，且其各種誘導來源cellulosomes之組成分上亦有差異。此顯示，不同碳源的誘導可影響*N. patriciarum* J11纖維素分解酶複合體生成量及其組成份比例。在厭氣性真菌中，不同物種具有不同的cellulosome系統，但都以類似的機制誘導生成及結合。為了探究厭氣性真菌cellulosome組成分類型，本研究以*N. patriciarum* J11為對象，並藉由LC/MS/MS鑑定參與分解結晶性纖維的cellulosome組成分，以了解參與分解作用的cellulase種類。目前已鑑定6條cellulase中，兩條為內切型cellulase、兩條為從還原端分解之外切型cellulase、兩條為從非還原端分解之外切型cellulase。本研究首次發表了厭氣性真菌分解結晶性纖維時其cellulosome的組成份類型包含了內切型(endo-type)、非還原端外切型(exo-type, non-reducing end)及還原端外切型(exo-type, reducing end)纖維素分解酶，如圖3-16所示，其中，內切型包含了具三個串聯型催化區之纖維素分解酶，而此三類型分解酶三組合應是纖維素分解酶複合體對結晶性纖維具高分解活性的關鍵之一。









-  : cellulose binding domain (CBD)  : GH5, endo-glucanase
-  : fungal cohesin  : GH6, exo-glucanase, non-reducing end
-  : fungal dockerin  : GH48, exo-glucanase, reducing end

圖 3- 16 *N. patriciarum* J11 纖維素分解酶複合體

Figure 3-16 Simplified schematic representation of multienzyme complexes from *N. patriciarum* J11.

第六章 未來展望



在自然環境下，厭氣性真菌的主要碳源來自於構造及組成相當複雜的木質纖維基質，因此可推測當厭氣性真菌利用這些物質時，其所生成的cellulosome組成應是非常多樣性的。另外，厭氣性真菌cellulosome的研究相對於厭氣性細菌而言仍處於初期的探索階段，對於此兩系統的差異比較，如scaffoldin的相關研究各組成份生成調控機制仍是相當缺乏的。本研究已從結晶性纖維誘導培養條件下成功純化*N. patriciarum* J11 cellulosome，且利用LC/MS/MS鑑定參與分解結晶性纖維的cellulosome組成分。在此條件下，*N. patriciarum* J11 cellulosome組成份至少已包含了內切型(endo-type)、非還原端外切型(exo-type, non-reducing end)及還原端外切型(exo-type, reducing end)纖維素分解酶。由於目前基因資料庫中，厭氣性真菌相關的分解酶相對於厭氣性細菌及好氣性微生物顯得不足，因此若只以蛋白質鑑定為工具，則將造成許多目標蛋白質無法被鑑定。相關領域研究中，其基礎的基因庫建立、相關基因鈎取以及厭氣性真菌基因組解碼仍是必要且關鍵的環節。本研究中對於厭氣性真菌dockerin與scaffoldin的結合關係已有了初步的探討，未來，隨著基因資料庫中厭氣性真菌相關的分解酶序列的增加，我們仍可藉由蛋白質工程技術進一步研究並控制dockerin與scaffoldin或厭氣性真菌cohesin間的結合作用以提高其未來應用之潛力。近年隨著研究工具日新月異及相關技術的精進，未來在厭氣性真菌cellulosome的基礎研究上，除了scaffoldin基因及相關基因的鈎取與研究外，另可以即時聚合酶鏈式反應(real time PCR)、轉錄體學(transcriptome)方法探究厭氣性真菌cellulosome各組成份在核酸及蛋白質層次上的調控機制，進而了解在自然環境中厭氣性真菌為了生存其所演化、發展出的高效率分解機制。這些相關的研究基可提供研究人員在第二代生質酒精生產或其它應用上的基礎。

參考文獻



1. 陳又嘉。1997。絕對厭氣性真菌的分離培養與纖維分解能力之探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
2. 黃雅惠。2005。厭氣性真菌 *Neocallimastix frontalis* 木聚醣酶基因之選殖、表現與重組蛋白酵素特性分析。國立台灣大學微生物與生化學研究所博士論文。
3. 王正仁，陳孟伶，林畢修平。1999。水解酵素在工業上的利用。生物產業。10:1-11。
4. 陳又嘉。2002。台灣地區反芻動物瘤胃真菌分離培養、鑑定與纖維分解酵素基因選殖之研究。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。
5. 王惠昌。2003。厭氣性真菌纖維分解酶之胺基酸序列與催化基質種類間相關性探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
6. Adams, J. J., B. A. Webb, H. L. Spencer, and S. P. Smith. 2005. Structural characterization of type II dockerin module from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: calcium-induced effects on conformation and target recognition. *Biochemistry* 44:2173-2182.
7. Ali, B. R., L. Zhou, F. M. Graves, R. B. Freedman, G. W. Black, H. J. Gilbert, and G. P. Hazelwood. 1995. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol Lett* 125:15-21.
8. Angenent, L. T., K. Karim, M. H. Al-Dahhan, B. A. Wrenn, and R. Domiguez-Espinosa. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol* 22:477-485.
9. Anthony, P. J. T., D. R. Davies, K. Guii, M. I. Lawrence, B. B. Nielsen, A. Rickers, and M. K. Theodorou. 1994. Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol Res* 98:129-152.
10. Aylward, J. H., K. S. Gobius, G. P. Xue, G. D. Simpson, and B. P. Dalrymple. 1999. The *Neocallimastix patriciarum* cellulase, CelD, contains three almost identical catalytic domains with high specific activities on Avicel. *Enzyme Microb Tech* 24:609-614.
11. Bansal, P., M. Hall, M. J. Realff, J. H. Lee, and A. S. Bommarius. 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol Adv* 27:833-848.
12. Barichievich, E. M., and R. E. Calza. 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Appl Environ Microbiol* 56:43-48.
13. Bauchop, T., and D. O. Mountfort. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl Environ Microbiol* 42:1103-1110.
14. Bayer, E. A., J. P. Belaich, Y. Shoham, and R. Lamed. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 58:521-554.
15. Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* 8:548-557.
16. Bayer, E. A., R. Kenig, and R. Lamed. 1983. Adherence of *Clostridium*

- thermocellum* to cellulose. J Bacteriol 156:818-827.
17. Bayer, E. A., and R. Lamed. 1986. Ultrastructure of the cell surface cellulosome of *Clostridium thermocellum* and its interaction with cellulose. J Bacteriol 167:828-836.
 18. Bayer, E. A., E. Setter, and R. Lamed. 1985. Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. J Bacteriol 163:552-559.
 19. Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G. S. Hoondal. . 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol 56:326-338.
 20. Beldman, G., M. F. Searle-Van Leeuwen, F. M. Rombouts, and F. G. Voragen. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases. Eur J Biochem 146:301-308.
 21. Belghith, H., S. Ellouz-Chaabouni, and A. Gargouri. 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. J Biotechnol 89:257-262.
 22. Bhat, M. K., and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol Adv 15:583-620.
 23. Boraston, A. B., D. N. Bolam, H. J. Gilbert, and G. J. Davies. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J 382:769-781.
 24. Bothast, R. J., and M. A. Schlicher. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. Appl Microbiol Biotechnol 67:19-25.
 25. Bowman, B. H., J. W. Taylor, A. G. Brownlee, J. Lee, S. D. Lu, and T. J. White. 1992. Molecular evolution of the fungi: relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. Mol Biol Evol 9:285-296.
 26. Brookman, J. L., G. Mennim, A. P. Trinci, M. K. Theodorou, and D. S. Tuckwell. 2000. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. Microbiology 146 (Pt 2):393-403.
 27. Brownlee, A. G. 1988. A rapid DNA isolation procedure applicable to many refractory filamentous fungi. Fungal Genet Newslett 35:8-9.
 28. Brownlee, A. G. 1989. Remarkably AT-rich genomic DNA from the anaerobic fungus *Neocallimastix*. Nucleic Acids Res. 17:1327-1335.
 29. Carvalho, A. L., F. M. Dias, J. A. Prates, T. Nagy, H. J. Gilbert, G. J. Davies, L. M. Ferreira, M. J. Romao, and C. M. Fontes. 2003. Cellulosome assembly revealed by the crystal structure of the cohesin-dockerin complex. Proc Natl Acad Sci U S A 100:13809-13814.
 30. Chen, H., X. L. Li, D. L. Blum, E. A. Ximenes, and L. G. Ljungdahl. 2003. CelF of *Orpinomyces PC-2* has an intron and encodes a cellulase (CelF) containing a carbohydrate-binding module. Appl Biochem Biotechnol 105 -108:775-785.
 31. Chen, H., X. L. Li, and L. G. Ljungdahl. 1997. Sequencing of a 1,3-1,4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. J Bacteriol 179:6028-6034.
 32. Chen, Y. C., S. D. Tsai, H. L. Cheng, C. Y. Chien, C. Y. Hu, and T. Y. Cheng. 2007. *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*. Mycologia 99:125-130.
 33. Chikamatsu, G., K. Shirai, M. Kato, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi. 1999. Structure and expression properties of the endo-beta-1,4-glucanase A gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett 175:239-245.
 34. Choi, S. K., and L. G. Ljungdahl. 1996. Structural role of calcium for the

- organization of the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry* 35:4906-4910.
35. Chu, C. Y., C. W. Tseng, P. Y. Yueh, C. H. Duan, and J. R. Liu. 2011. Molecular cloning and characterization of a beta-glucanase from *Piromyces rhizinflatus*. *J Biosci Bioeng* 111:541-546.
 36. Collins, T., C. Gerday, and G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29:3-23.
 37. Coughlan, M. P. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. Academic Press, London.
 38. Csiszar, E., A. Losonczy, G. Szakacs, I. Rusznak, L. Bezur, and J. Reicher. 2001. Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment. *J Biotechnol* 89:271-279.
 39. Delmer, D. P., and Y. Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7:987-1000.
 40. Denman, S., G. P. Xue, and B. Patel. 1996. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (celA) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Appl Environ Microbiol* 62:1889-1896.
 41. Dijkerman, R., J. Ledebor, H. J. M. Op den Camp, R. A. Prins, and C. van der Drift. 1997. The Anaerobic Fungus *Neocallimastix* sp. Strain L2: Growth and production of (hemi)cellulolytic enzymes on a range of carbohydrate substrates. *Curr Microbiol* 34:91-96.
 42. Dijkerman, R., H. J. Op den Camp, C. Van der Drift, and G. D. Vogels. 1997. The role of the cellulolytic high molecular mass (HMM) complex of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Arch Microbiol* 167:137-142.
 43. Ding, S. Y., E. A. Bayer, D. Steiner, Y. Shoham, and R. Lamed. 2000. A scaffoldin of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome that contains 11 type II cohesins. *J Bacteriol* 182:4915-4925.
 44. Eberhardt, R. Y., H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 2000. Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Microbiology* 146 (Pt 8):1999-2008.
 45. Endo, K., Y. Hakamada, S. Takizawa, H. Kubota, N. Sumitomo, T. Kobayashi, and S. Ito. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:109-116.
 46. Fanutti, C., T. Ponyi, G. W. Black, G. P. Hazlewood, and H. J. Gilbert. 1995. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J Biol Chem* 270:29314-29322.
 47. Fedorak, P. M., and S. E. Hrudey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environ Technol Lett.* 4:425-432.
 48. Fierobe, H. P., E. A. Bayer, C. Tardif, M. Czjzek, A. Mechaly, A. Belaich, R. Lamed, Y. Shoham, and J. P. Belaich. 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J Biol Chem* 277:49621-49630.
 49. Fierobe, H. P., A. Mechaly, C. Tardif, A. Belaich, R. Lamed, Y. Shoham, J. P. Belaich, and E. A. Bayer. 2001. Design and production of active cellulosome chimeras. Selective incorporation of dockerin-containing enzymes into defined functional complexes. *J Biol Chem* 276:21257-21261.
 50. Fierobe, H. P., S. Pages, A. Belaich, S. Champ, D. Lexa, and J. P. Belaich. 1999. Cellulosome from *Clostridium cellulolyticum*: molecular study of the

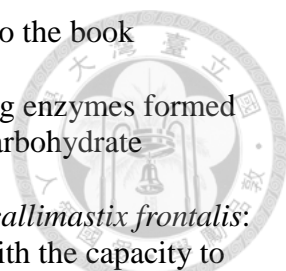
- Dockerin/Cohesin interaction. *Biochemistry* 38:12822-12832.
51. Fleury, D., P. Domaingue, C. Gillard, R. Touitou, and P. Mollat. 2007. Expression, purification, characterization and crystallization of a recombinant human cytosolic beta-glucosidase produced in insect cells. *Protein Expr Purif* 52:96-103.
 52. Fujino, Y., K. Ogata, T. Nagamine, and K. Ushida. 1998. Cloning, sequencing, and expression of an endoglucanase gene from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:1795-1798.
 53. Garcia-Vallve, S., A. Romeu, and J. Palau. 2000. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Mol Biol Evol* 17:352-361.
 54. Gibbs, M. D., R. A. Reeves, G. K. Farrington, P. Anderson, D. P. Williams, and P. L. Bergquist. 2000. Multidomain and multifunctional glycosyl hydrolases from the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor* isolate Tok7B.1. *Curr Microbiol* 40:333-340.
 55. Glikes, N. R., B. Henrissat, D. G. Kilburn, R. C. Miller, and R. A. J. Warren. 1991. Domains in microbial beta-1,4-glycanase: sequence conservation function and enzyme families. *Microbiol Rev* 55:303-315.
 56. Gray, K. A., L. Zhao, and M. Emptage. 2006. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol* 10:141-146.
 57. Haltrich, D., B. Nidetzky, D. K. Kulbe, W. Steiner, and S. Zupancic. 1996. Production of fungal xylanases. *Bioresour Technol* 58.
 58. Handelsman, T., Y. Barak, D. Nakar, A. Mechaly, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 2004. Cohesin-dockerin interaction in cellulosome assembly: a single Asp-to-Asn mutation disrupts high-affinity cohesin-dockerin binding. *FEBS Lett* 572:195-200.
 59. Harchand, R. K., and S. Singh. 1997. Extracellular cellulase system of a thermotolerant streptomycete: *Streptomyces albaduncus*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 44:229-239.
 60. Harhangi, H. R., A. Akhmanova, P. J. Steenbakkers, M. S. Jetten, C. van der Drift, and H. J. Op den Camp. 2003. Genomic DNA analysis of genes encoding (hemi-)cellulolytic enzymes of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Gene* 314:73-80.
 61. Hayashi, H., M. Takehara, T. Hattori, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya. 1999. Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes xynA and xynB and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:348-357.
 62. Henrissat, B., M. Claeysens, P. Tomme, L. Lemesle, and J. P. Mornon. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81:83-95.
 63. Henrissat, B., Y. Popineau, and J. C. Kader. 1988. Hydrophobic-cluster analysis of plant protein sequences. A domain homology between storage and lipid-transfer proteins. *Biochem J* 255:901-905.
 64. Ho, Y. W., and D. J. Barr. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia* 87:655-677.
 65. Hobson, P. N., and R. J. Wallace. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: part 1. *Crit Rev Microbiol* 9:165-225.
 66. Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:735-750.
 67. Ilmen, M., A. Saloheimo, M. L. Onnela, and M. E. Penttila. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 63:1298-1306.
 68. Imai, T., C. Boisset, M. Samejima, K. Igarashi, and J. Sugiyama. 1998.

- Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on Valonia cellulose microcrystals. FEBS Lett 432:113-116.
69. Jindou, S., A. Soda, S. Karita, T. Kajino, P. Beguin, J. H. Wu, M. Inagaki, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2004. Cohesin-dockerin interactions within and between *Clostridium josui* and *Clostridium thermocellum*: binding selectivity between cognate dockerin and cohesin domains and species specificity. J Biol Chem 279:9867-9874.
 70. Kennedy, J. F. 1988. Carbohydrate Chemistry. Oxford University.
 71. Klyosov, A. A. 1990. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry 29:10577-10585.
 72. Kosugi, A., K. Murashima, Y. Tamaru, and R. H. Doi. 2002. Cell-surface-anchoring role of N-terminal surface layer homology domains of *Clostridium cellulovorans* EngE. J Bacteriol 184:884-888.
 73. Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotype selection. Proc Natl Acad Sci U S A 82:488-492.
 74. Lamed, R., and E. A. Bayer. 1988. The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. Adv Appl Microbiol 33:1-46.
 75. Lamed, R., E. Setter, and E. A. Bayer. 1983. The cellulosome - a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. Biotechnol Bioeng Symp 13:163-181.
 76. Leibovitz, E., and P. Beguin. 1996. A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. J Bacteriol 178:3077-3084.
 77. Lemaire, M., H. Ohayon, P. Gounon, T. Fujino, and P. B éguin. 1995. OlpB, a new outer layer protein of *Clostridium thermocellum*, and binding of its S-layer-like domains to components of the cell envelope. J Bacteriol 177:2451-2459.
 78. Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. Annu Rev Microbiol 49:399-426.
 79. Li, J., B. Heath, and L. Packer. 1992. The phylogenetic relationships of anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimastigaceae) and the Chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. Canad J Bot 70:1738-1740.
 80. Li, J., B. Heath, and L. Packer. 1992. The phylogenetic relationships of anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimastigaceae) and the Chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. Canad J Bot 70:1738-1740.
 81. Lowe, S. E., M. K. Theodorou, A. P. J. Trinci, and R. B. Hespell. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. J Gene Microbiol 131:2225-2229.
 82. Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. Trinci. 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. Appl Environ Microbiol 53:1216-1223.
 83. Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. Trinci. 1987. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. Appl Environ Microbiol 53:1210-1215.
 84. Lytle, B., C. Myers, K. Kruus, and J. H. Wu. 1996. Interactions of the CelS binding ligand with various receptor domains of the *Clostridium thermocellum* cellulosomal scaffolding protein, CipA. J Bacteriol 178:1200-1203.
 85. Lytle, B. L., B. F. Volkman, W. M. Westler, M. P. Heckman, and J. H. Wu. 2001. Solution structure of a type I dockerin domain, a novel prokaryotic, extracellular calcium-binding domain. J Mol Biol 307:745-753.

86. Lytle, B. L., B. F. Volkman, W. M. Westler, and J. H. Wu. 2000. Secondary structure and calcium-induced folding of the *Clostridium thermocellum* dockerin domain determined by NMR spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 379:237-244.
87. Margit, S. a. U. B. S. 2000. S-Layer Proteins. *J. Bacteriol.* 182:859-868.
88. Mechaly, A., H. P. Fierobe, A. Belaich, J. P. Belaich, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 2001. Cohesin-dockerin interaction in cellulosome assembly: a single hydroxyl group of a dockerin domain distinguishes between nonrecognition and high affinity recognition. *J Biol Chem* 276:9883-9888.
89. Mechaly, A., S. Yaron, R. Lamed, H. P. Fierobe, A. Belaich, J. P. Belaich, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 2000. Cohesin-dockerin recognition in cellulosome assembly: experiment versus hypothesis. *Proteins* 39:170-177.
90. Mernitz, G., A. Koch, B. Henrissat, and G. Schulz. 1996. Endoglucanase II (EGII) of *Penicillium janthinellum*: cDNA sequence, heterologous expression and promotor analysis. *Curr Genet* 29:490-495.
91. Miras, I., F. Schaeffer, P. Beguin, and P. M. Alzari. 2002. Mapping by site-directed mutagenesis of the region responsible for cohesin-dockerin interaction on the surface of the seventh cohesin domain of *Clostridium thermocellum* CipA. *Biochemistry* 41:2115-2119.
92. Mountfort, D. O., and C. G. Opim. 1994. *Anaerobic fungi*. Marcel Dekker, Inc., New York.
93. Mountfort, D. O., and R. A. Asher. 1985. Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol* 49:1314-1322.
94. Mountfort, D. O., and R. A. Asher. 1983. Role of catabolite regulatory mechanisms in control of carbohydrate utilization by the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol* 46:1331-1338.
95. Murashima, K., C. L. Chen, A. Kosugi, Y. Tamaru, R. H. Doi, and S. L. Wong. 2002. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J Bacteriol* 184:76-81.
96. Nielsen, B. B., W. Y. Zhu, M. S. Dhanoa, A. P. J. Trinci, and M. K. Theodorou. 2002. Comparison of the growth kinetics of anaerobic gut fungi on wheat straw in batch culture. *Aanerobe* 8:216-222.
97. Noach, I., F. Frolov, H. Jakoby, S. Rosenheck, L. W. Shimon, R. Lamed, and E. A. Bayer. 2005. Crystal structure of a type-II cohesin module from the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome reveals novel and distinctive secondary structural elements. *J Mol Biol* 348:1-12.
98. Ohara, H., J. Noguchi, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000. Sequence of egV and properties of EgV, a *Ruminococcus albus* endoglucanase containing a dockerin domain. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:80-88.
99. Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J Gen Microbiol* 91:249-262.
100. Ozcan, N., C. Cunningham, and W. J. Harris. 1996. Cloning of a cellulase gene from the rumen anaerobe *Fibrobacter succinogenes* SD35 and partial characterization of the gene product. *Lett Appl Microbiol* 22:85-89.
101. Pages, S., A. Belaich, J. P. Belaich, E. Morag, R. Lamed, Y. Shoham, and E. A. Bayer. 1997. Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins* 29:517-527.
102. Pages, S., A. Belaich, C. Tardif, C. Reverbel-Leroy, C. Gaudin, and J. P. Belaich.

1996. Interaction between the endoglucanase CelA and the scaffolding protein CipC of the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. *J Bacteriol* 178:2279-2286.
103. Pason, P., A. Kosugi, R. Waeonukul, C. Tachaapaikoon, K. Ratanakhanokchai, T. Arai, Y. Murata, J. Nakajima, and Y. Mori. 2010. Purification and characterization of a multienzyme complex produced by *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:573-580.
104. Pearce, P. D., and T. Bauchop. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl Environ Microbiol* 49:1265-1269.
105. Percival Zhang, Y. H., M. E. Himmel, and J. R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24:452-481.
106. Perret, S., A. Belaich, H. P. Fierobe, J. P. Belaich, and C. Tardif. 2004. Towards designer cellulosomes in *Clostridia*: mannanase enrichment of the cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*. *J Bacteriol* 186:6544-6552.
107. Perret, S., L. Casalot, H. P. Fierobe, C. Tardif, F. Sabathe, J. P. Belaich, and A. Belaich. 2004. Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* 186:253-257.
108. Pessoa, A. J., I. C. Roberto, M. Menossi, R. R. Dos Santos, S. O. Filho, and T. C. V. Penna. 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124:59-70.
109. Phillips, M. W., and G. L. Gordon. 1989. Growth characteristics on cellobiose of three different anaerobic fungi isolated from the ovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 55:1695-1702.
110. Qiu, X., B. Selinger, L. Yanke, and K. Cheng. 2000. Isolation and analysis of two cellulase cDNAs from *Orpinomyces joyonii*. *Gene* 245:119-126.
111. Raghothama, S., R. Y. Eberhardt, P. Simpson, D. Wigelsworth, P. White, G. P. Hazlewood, T. Nagy, H. J. Gilbert, and M. P. Williamson. 2001. Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nat Struct Biol* 8:775-778.
112. Sakamoto, S., G. Tamura, K. Ito, T. Ishikawa, K. Iwano, and N. Nishiya. 1995. Cloning and sequencing of cellulase cDNA from *Aspergillus kawachii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 27:435-439.
113. Salami, S., K. Tokatlidis, P. Beguin, and J. p. Aubert. 1992. Involvement of separate domains of the cellulosomal protein S1 of *Clostridium thermocellum* in binding to cellulose and in anchoring of catalytic subunits to the cellulosome. *FEBS Lett* 304:89-92.
114. Sambrook, J., D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, third ed. Cold Spring Harbor, New York.
115. Schmoll, M., and C. P. Kubicek. 2003. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50:125-145.
116. Schwarz, W. H. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:634-649.
117. Shimon, L. J., E. A. Bayer, E. Morag, R. Lamed, S. Yaron, Y. Shoham, and F. Frolova. 1997. A cohesin domain from *Clostridium thermocellum*: the crystal structure provides new insights into cellulosome assembly. *Structure* 5:381-390.
118. Shoseyov, O., M. Takagi, M. A. Goldstein, and R. H. Doi. 1992. Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3483-3487.
119. Singh, A., and K. Hayashi. 1995. Microbial cellulases: protein architecture,

- molecular properties, and biosynthesis. *Adv Appl Microbiol* 40:1-44.
120. Spinelli, S., H. P. Fierobe, A. Belaich, J. P. Belaich, B. Henrissat, and C. Cambillau. 2000. Crystal structure of a cohesin module from *Clostridium cellulolyticum*: implications for dockerin recognition. *J Mol Biol* 304:189-200.
 121. Steenbakkers, P. J., A. Freelove, B. Van Cranenbroek, B. M. Sweegers, H. R. Harhangi, G. D. Vogels, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert, and H. J. Op den Camp. 2002. The major component of the cellulosomes of anaerobic fungi from the genus *Piromyces* is a family 48 glycoside hydrolase. *DNA Seq* 13:313-320.
 122. Steenbakkers, P. J., X. L. Li, E. A. Ximenes, J. G. Arts, H. Chen, L. G. Ljungdahl, and H. J. Op Den Camp. 2001. Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. *J Bacteriol* 183:5325-5333.
 123. Steenbakkers, P. J., W. Ubhayasekera, H. J. Goossen, E. M. Van Lierop, C. Van Der Drift, G. D. Vogels, S. L. Mowbray, and H. J. Op Den Camp. 2002. An intron-containing glycoside hydrolase family 9 cellulase gene encodes the dominant 90 kDa component of the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Biochem J* 365:193-204.
 124. Stoddart, J. F. 1971. Stereochemistry of carbohydrates. Wiley-Interscience, New York.
 125. Stoner, M. R., D. A. Dale, P. J. Gualfetti, T. Becker, and T. W. Randolph. 2006. Surfactant-induced unfolding of cellulase: kinetic studies. *Biotechnol Prog* 22:225-232.
 126. Stricker, A. R., R. L. Mach, and L. H. de Graaff. 2008. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol* 78:211-220.
 127. Sunna, A., and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17:39-67. 17:39-67.
 128. Tamaru, Y., and R. H. Doi. 1999. Three surface layer homology domains at the N terminus of the *Clostridium cellulovorans* major cellulosomal subunit EngE. *J Bacteriol* 181:3270-3276.
 129. Tavares, G. A., P. Beguin, and P. M. Alzari. 1997. The crystal structure of a type I cohesin domain at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* 273:701-713.
 130. Teeri, T. T., A. Koivula, M. Linder, G. Wohlfahrt, C. Divne, and T. A. Jones. 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochem Soc Trans* 26:173-178.
 131. Teunissen, M. J., J. M. H. Hermans, J. H. J. Huis in't Veld, and G. D. Vogels. 1993. Purification and characterization of a complex-bound and a free b-1,4-endoxylanase from the culture fluid of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Arch Microbiol* 159:265-271.
 132. Teunissen, M. J., and H. J. Op den Camp. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63:63-76.
 133. Teunissen, M. J., H. J. Op den Camp, C. G. Orpin, J. H. Huis in 't Veld, and G. D. Vogels. 1991. Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. *J Gen Microbiol* 137:1401-1408.
 134. Theodorou, M. K., D. R. Davies, B. B. Nielsen, M. I. G. Lawrence, and A. P. J. Trinci. 1995. Determination of the growth of anaerobic fungi on soluble and cellulosic substrates using a pressure transducer. *Microbiology* 141:671-678.
 135. Theodorou, M. K., G. Mennim, D. R. Davies, W. Y. Zhu, A. P. Trinci, and J. L. Brookman. 1996. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proc Nutr Soc* 55:913-926.

- 
136. Wilchek, M., and E. A. Bayer. 1999. Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol engin* 16:1-4.
137. Williams, A. G., and C. G. Orpin. 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Can J Microbiol* 33:418-426.
138. Wilson, C. A., and T. M. Wood. 1992. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:125-129.
139. Wood, T. M. 1992. Fungal cellulases. *Biochem Soc Trans* 20:46-53.
140. Xu, Q., W. Gao, S. Y. Ding, R. Kenig, Y. Shoham, E. A. Bayer, and R. Lamed. 2003. The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J Bacteriol* 185:4548-4557.
141. Xue, G. P., K. S. Gobius, and C. G. Orpin. 1992. A novel polysaccharide hydrolase cDNA (*celD*) from *Neocallimastix patriciarum* encoding three multi-functional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities. *J Gen Microbiol* 138 (Pt 11):2397-2403.
142. Yaron, S., E. Morag, E. A. Bayer, R. Lamed, and Y. Shoham. 1995. Expression, purification and subunit-binding properties of cohesins 2 and 3 of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *FEBS Lett* 360:121-124.
143. Zeng, L., and R. A. Burne. 2009. Transcriptional regulation of the cellobiose operon of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 191:2153-2162.
144. Zhou, L., G. P. Xue, C. G. Orpin, G. W. Black, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 1994. Intronless *celB* from the anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum* encodes a modular family A endoglucanase. *Biochem J* 297 (Pt 2):359-364.
145. Zverlov, V. V., G. A. Velikodvorskaya, and W. H. Schwarz. 2003. Two new cellulosome components encoded downstream of *celI* in the genome of *Clostridium thermocellum*: the non-processive endoglucanase *CelN* and the possibly structural protein *CseP*. *Microbiology* 149:515-524.