

# 利用生物技術大量產製瘤胃細菌纖維素分解酵素複合體

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-313

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：徐濟泰 國立台灣大學畜產學系

計畫參與人員：王翰聰 國立台灣大學畜產學系

## 一、中文摘要

本試驗以瘤胃中之纖維分解菌 *F. succinogenes* S85 為纖維素分解酵素及纖維素結合蛋白質(CBP)來源，並利用 *R. albus* 7 之 XynC 基因產物為聚木糖分解酵素(xylanase)來源，測試添加纖維素結合蛋白質後之酵素活性表現。XynC 基因之產物約為 62 kDa，且具有高活性之聚木糖分解酵素活性。來自 *F. succinogenes* S85 之纖維素分解酵素經離子交換法及膠體過濾法純化後可得約 120 及 65 kDa 兩個主要蛋白質，且經活性染色確定其酵素活性。CBP 利用含 10% 纖維二糖之磷酸鹽緩衝液配合 1% CHAPS 進行回收。XynC 基因產物之聚木糖分解酵素與純化後之纖維素分解酵素，在加入 CBP 後可有效提升其酵素作用之特異性 4 至 10 倍，且發現 CBP 可作用於不同菌株而來之分解酵素，提升酵素之效力。

**關鍵詞：**纖維素分解酵素、聚木糖分解酵素、纖維素結合蛋白質、酵素活性。

## Abstract

Attempts were made to examine enzymes activity after addition cellulose binding protein (CBP). Cellulase and CBP were purified from rumen cellulytic bacterium *F. succinogenes* S85, and the gene encoding xylanase C (XynC) of rumen cellulytic bacterium *R. albus* 7 was be the source of xylanase. The gene encoded xylanase was 62 kDa, and detected high xylanase activity. Cellulase from *F. succinogenes* S85, after passing ion exchange and gel filtration columns, present two protein peaks with cellulase activity, and the molecular weight was approximately 120 and 65 kDa, respectively. CBP was eluted with sodium

phosphate buffer containing 10% cellobiose and 1% CHAPS. Enzymes activity were increasing from four to ten times after addition of CBP. The result showed that CBP can effect on both cellulytic and hemicellulytic enzyme from different bacteria species and improve their enzyme activity.  
**Keywords:** cellulase; xylanase; cellulose; binding protein; enzyme activity

## 二、緣由與目的

基於不同種類的植物之細胞壁有不同的纖維成分化學組成，單子葉植物比雙子葉植物有較高的聚木糖(Forsberg et al., 1997)。因此，其所需的纖維分解酵素系統搭配比例，亦可能有所差異。Forsberg et al. (1997)指出許多纖維素分解酵素與半纖維素分解酵素，均含有纖維素結合蛋白質的組成單元，可協助撥離微纖維(microfibril)或纖維素鍊(cellulose chain)，提高纖維分解效率。因此組合出良好纖維分解酵素混合物的同時，也必須將纖維素結合蛋白質一併考慮在內。瘤胃中主要的纖維素分解細菌有 *Fibrobacter succinogenes*、*Ruminococcus flavefaciens* 及 *Ruminococcus albus*，其中 *F. succinogenes* 具有約 120 kDa 之纖維素結合蛋白質，且具有高活性之 endoglucanase。*R. albus* 則具有高活性之 xylanase，但是缺乏纖維素結合蛋白質，因此本試驗將利用 *F. succinogenes* 提供纖維素結合蛋白質及 endoglucanase，另一方面經由利用基因轉殖技巧由 *E. coli* 表現由 *R. albus* 所分泌的 xylanase。藉由分解酵素與結合蛋白質的組合，以了解纖維素結合蛋白質是否能增進酵素對基質之分解能力，同時測試不同菌種來源之分解酵素對於纖維素結合蛋白質的特異性。

### 三、材料與方法

#### 菌種來源及培養條件

本試驗所使用之菌種為 *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC 19169) 及 *Ruminococcus albus* 7 (ATCC 27210)，以含有 0.4% 葡萄糖與 0.1% 纖維二糖之 SD 培養基 (Mitsumori and Minato, 2000) 培養 24 至 36 小時。培養溫度為 39℃，厭氧環境氣體組成為 97% 二氧化碳配合 3% 氫氣。其中 *R. albus* 7 供作聚木糖分解酵素之 XynC 基因來源，*F. succinogenes* S85 則為純化纖維素結合蛋白 (cellulose binding protein, CBP) 及纖維素分解酵素之來源。

#### XynC 基因之取得與表現

*R. albus* 7 之培養菌液以 5000×g，4℃ 離心 20 分鐘後，取菌體利用 DNeasy Tissue Kit (Qiagen) 抽取細菌之 DNA。由 NCBI 之基因資料庫中，選取 *R. albus* 7 之 XynC 基因序列 (AB057589)，利用核酸引子：XynC (+)

5'-ACGGCGGATAGCTCCATCTTC 及 XynC (-)：

5'-CGCGAAGGTGTCCTGAATGCTC

進行 PCR 取得 XynC 基因片段以供表現。PCR 所得之 XynC 片段經電泳後進行回收純化，構築於 pGEM-T easy Vector

(Promega) 後進行轉形，送入 XL-1 Blue *E. coli*，取其有表現之菌落，於 LB 中培養隔夜再抽取質體備用。用於蛋白質表現之載體為 pREST T7 Expression Vector

(Invitrogen)，含有 XynC 基因之質體經限制切割後，與 pREST 表現載體，轉入 BL21(DE3) *E. coli* 進行表現，所收集之細胞經超音波擊碎後利用表現蛋白質所含之 His-tag，經 pREST Purification Kit

(Invitrogen) 進行純化得 XynC 蛋白質。所得蛋白質進行 SDS 電泳以比對其分子

量，同時進行酵素活性測試。

#### 纖維素結合蛋白 (CBP) 之收集

CBP 之取得參考 Mitsumori and Minato (1993) 之方法進行。*F. succinogenes* S85 於 39℃ 進行厭氧培養 24 小時後，以 Tween 20 (1% v/v) 進行處理，再加入結晶性纖維 Avicel PH101 (Fluka) 或濾紙 (Whatman No.1)，於 39℃ 下培養 1 小時後，移至室溫下靜置 30 分鐘以沉澱纖維基質。纖維沉澱部分再以含有 1% CHAPS 之磷酸鹽緩衝液清洗，最後以含 10% 纖維二糖之磷酸鹽緩衝液處理沉澱物，於 39℃ 培養 20 分鐘，離心後回收上清液濃縮備用。所取得之 CBP 進行 SDS 電泳後，以銀染法進行染色比對。

#### 纖維素分解酵素之純化

本試驗以 *F. succinogenes* S85 為纖維素分解酵素來源。取培養 24 小時之菌液，加入已粉碎之濾紙 (Whatman No.1，添加量為 0.2% w/v) 後，再培養 12 小時，以 8000×g 離心後取上清液 (extra cellular fluid, ECF)，沉澱部份以含有 25% 蔗糖之磷酸鹽緩衝液 (pH 6.8) 利用滲透壓衝擊沖洗兩次，離心後取上清液 (sucrose washed supernatant, SWS) 加入 ECF 中以 10 kDa 之透析膜進行濃縮。濃縮液經 8000×g 離心後，取上清液入 Hi-TrapQ 陰離子交換管柱 (Pharmacia) 進行純化，取具有酵素活性之分劃，再以 Superdex 200 管柱利用膠體過濾法進行純化，收集具有 CMC

(carboxymethylcellulose) 分解活性之分劃，測定酵素活性及蛋白質含量並濃縮備用。

#### 酵素活性測試及纖維素結合蛋白添加效果

酵素活性分析方面，endoglucanase 及 xylanase 分別以 CMC 及聚木糖為受質，測定 CMCase 及 Xylanase 之活性。分析方法

為取用 0.5ml 酵素液等體積混合含有 1% (wt/vol) 受質之磷酸鹽緩衝液 (50 mM sodium phosphate, pH 6.8), 於 39 反應後, 依照 Nelson-Somogyi 的方法測定還原糖的生成量, 利用 DNS 進行呈色, 測定 550 nm 之吸光值 (Wood and Bhat, 1988), 以計算所得之酵素活性資料。纖維素結合蛋白添加量以蛋白質含量為單位, 與酵素等量混合後再加入受質進行反應, 作用受質改用 0.1% (w/v) 之濾紙及 Avicel PH101, 測定添加結合蛋白前後之酵素活性表現。

#### 四、結果與討論

##### *R. albus* 7 之 XynC 基因表現

經 PCR 所得之片段約為 1.8 k bp, 構築於 pGEM-T easy Vector 後利用 T7 及 SP6 之引子進行序列鑑定, 得到全長為 1826 bp, 且經比對後確認為 XynC 基因, 位於序列之 1185 至 3010 之間。基因再構築於 pREST 載體 (2.9 k bp) 後 (圖 1 A、B), 送入轉入 BI21(DE3) *E. coli* 進行表現, 得到具有分解聚木糖能力之 XynC 蛋白質。經 SDS 電泳可見其分子量約為 62 kDa (圖 1 C), 其活性約為 210 ÷ g xylose/mg/min。

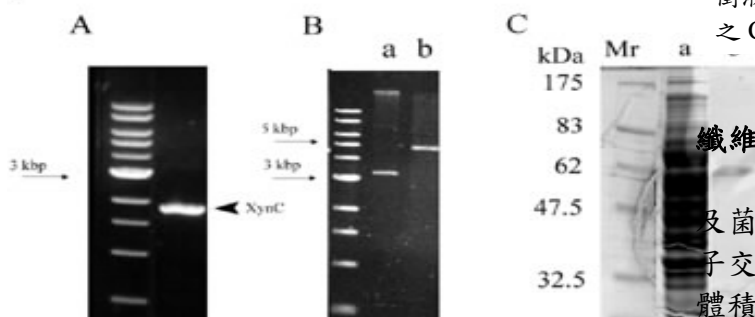


圖 1. *R. albus* 7 之 XynC 基因表現

(A) 經 PCR 產生之 XynC 基因片段; (B) 接上 pGEM-T 後(a)及接上表現載體後(b)之核酸電泳圖; (C) 未純化前(a)及經 His-tag 純化後(b)之蛋白質電泳圖。

##### 纖維素結合蛋白 (CBP) 之取得

利用 Tween 20 對細菌進行溶裂, 並提供纖維作為 CBP 之吸附基質, 使放出之 CBP 附著在纖維基質上。由於 CBP 對纖維之結合能力很強, 試驗中亦嘗試利用 2% 之 SDS 及 1% 之 CMC 進行處理以分離出 CBP, 均有優於 10% 纖維二糖處理的表現。但是由於 SDS 處理會影響蛋白質之活性, 而 CMC 因黏滯度過高而不易去除, 均不適用於分離 CBP 供測試, 因此為後續試驗進行, 採用 10% 纖維二糖所分離出之蛋白質為測試用 CBP。在纖維基質方面, 利用結晶性纖維為吸附基質, 對於分離 CBP 效果較佳 (圖 2), 而以濾紙為基質時, 即使利用 2% SDS 進行分離, 亦無法完全沖洗出 CBP。原因可能是 CBP 對濾紙之吸附性較結晶性纖維更高, 因此不易溶離出來。

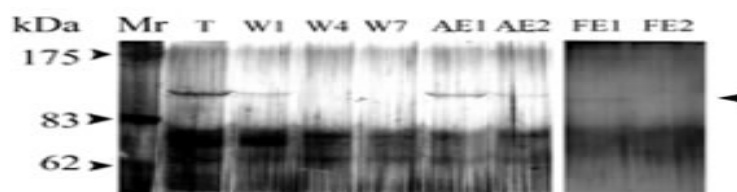


圖 2. CBP 之純化 SDS 電泳圖

T 為 Tween 20 沖洗之細胞蛋白質; W 為利用緩衝液洗出之上清液; AE 為利用 Avicel 進行附著之 CBP; FE 為利用濾紙進行附著之 CBP

##### 纖維素分解酵素之純化

*F. succinogenes* S85 之粗萃液 (ECF) 及菌體沖洗後之 SWS, 經濃縮後先入陰離子交換樹脂進行純化, 鹽梯度於 5 倍管柱體積內以連續梯度拉至 1M NaCl, 結果如圖 3A。經酵素活性測定後, NaCl 濃度在 0.5 - 0.6 M 間所分離出的蛋白質具有最高之 CMCase 活性。收取最高活性區域, 濃縮後再以 Superdex 200 管柱進行純化 (圖 3B), 收集蛋白質高之分劃進行活性測試及電泳, 發現於 a 及 b 之蛋白質波峰具有 CMCase 之活性, 且其分子量分別約為 120 kDa 與 65 kDa, 相近於文獻中所發表之 EG1 與 EG2 (McGavin and Forsberg, 1988)。以含有 CMC 之膠片進行原態電泳後, 利用

0.1%之剛果紅染色，確定其具有 CMCase 之活性，且亦能分解濾紙。

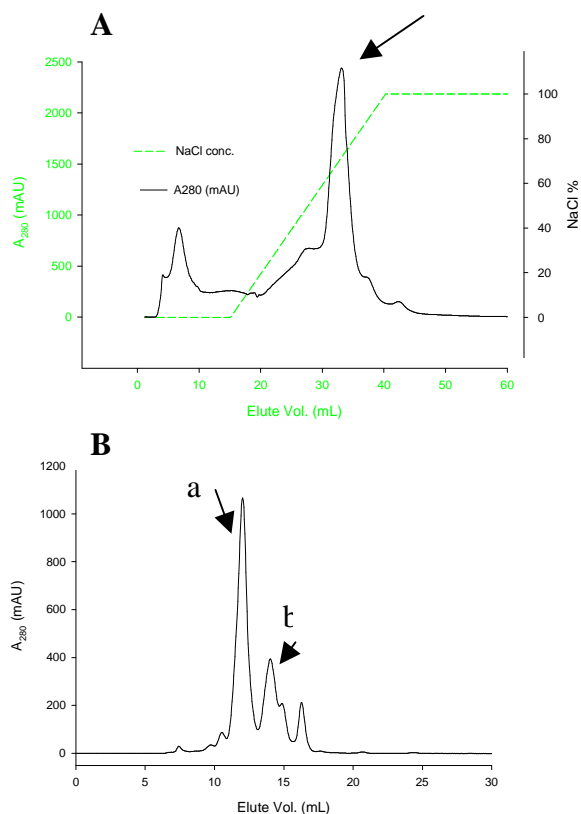


圖 3. 纖維素分解酵素之純化

(A) S85 之 ECF 經陰離子交換樹脂進行純化之蛋白質含量圖；(B) 經陰離子交換樹脂後之樣品再入膠體管柱之層析圖。

### 酵素活性測試及纖維素結合蛋白添加效果

酵素活性測試及添加結合蛋白質之結果如表 1 所示。由 *F. succinogenes* S85 而來的纖維素分解酵素與來自 XynC 基因的產物 (Xylanase C)，加入 CBP 後，分別以濾紙、CMC 及聚木糖為基質，檢測其酵素活性，結果發現添加 CBP 之後，*F. succinogenes* S85 之纖維分解酵素的特異性增加 7-9 倍，而來自 *R. albus* 7 的 XynC 產物特異性則上升為 4 倍。可見添加 CBP 能有效提升酵素之利用效果，且其作用在不同種細菌間亦能共用。另外發現在 XynC 產物與 CBP 同時存在時，對於濾紙的分解效率相當高，可能與 CBP 上仍帶有部分纖維素分解酵素，與分解半纖維素的酵素 (xylanase) 共同作用而達成。因此纖維成分的分解若配合兩種酵素共同進行，應可獲較佳之分解效果。

### 五、計畫結果自評

本試驗成功利用來自瘤胃中之纖維分解菌，利用生物技術方法取得纖維分解酵素與纖維素結合蛋白質。經實驗結果證明纖維素結合蛋白質確實可有效增加纖維分解酵素之特異性及作用效果，且在不同種細菌酵素間亦能共用，實驗成果已達預期目標。

表 1 纖維素結合蛋白質添加對酵素活性之影響

酵素及基質*	酵素對基質特異性 ( $\mu\text{g sugar/mg/min}$ )	提升倍數
S85 FP	11.3	
S85 CMC	10.9	
Albus7 Xyl	210.4	
添加 CBP		
S85 FP	82.7	7.3
S85 CMC	104.1	9.5
Albus7 Xyl	917.9	4.4
Albus7 FP	1300.1	

\*作用基質：

FP = 濾紙；CMC = carboxymethylcellulose；

Xyl = xylan。

### 六、參考文獻

- Forsberg, C. W., K.-J. Cheng, and B. A. White. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: R. A. Mackie and B. A. White (ed.) *Gastrointestinal Microbiology*. Vol. 1 *Gastrointestinal Ecosystems and Fermentation*. Pp.319-379. International Thomson Publishing, New York, NY..
- McGavin, M. and C. W. Forsberg. 1988. Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* 170:2914-2922.
- Mitsumori, M. and H. Minato. 2000. Identification of the cellulose-binding domain of *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 99-103.
- Mitsumori, M. and H. Minato. 1993. Purification of cellulose-binding proteins 1 and 2 from cell lysate of *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 39:361-369.
- Wood, T. M. and M. Bhat. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *in: Methods in Enzymology*, Willis, A. W, and S. T. Kellogg eds. Academic Press. vol. 160. pp:87-143.



