

題目：鼠李糖半乳糖醛酸 之純化及選殖

編號：NSC- 88-2313-B-002-058-

主持人：國立台灣大學教授 徐源泰

#### 中文摘要：

在研究計畫工作中,已先後自 *Aspergillus aculeatus* 菌株中,選殖出部份基因片段,定序並轉殖入大腸桿菌中可表現部份酵素活性。先前試驗並已完成此酵素 Rhamnogalacturonase (RGase)在蔬果加工應用之價值評估,包括提高蘋果、葡萄等之果汁榨汁率、色素抽出率、便於過濾提高澄清度、及增加安定性等。研究中並完成純化與部份定性之工作等。

#### 英文摘要

In this study, we have proved the application of rhamnogalacturonase (RGase) in the field of fruits and vegetable processings. Results indicated that RGase can increase the juice yield, color extraction, filterability, clearance, stability of apple and grape juice processing. We also purified and partial characterized this enzyme's properties. RGase gene fragment from *Aspergillus aculeatus* has been cloned, sequenced and expressed in *E. coli*.

#### 計畫緣由與目的

植物的中膠層與細胞壁中主要的多糖間質是由果膠物質組成,並以同質聚半乳糖(homogalactan, smooth region)和異質鼠李糖聚半乳糖(rhamnogalactan, hairy region, 有時此部份直接被定義為原果膠)交替而成為主幹結構,約佔乾重之35%,其餘有約20-30%纖維素,25%半纖維,20%醣蛋白(Hours & Sakai, 1994; Jatikavanich & Juntongjin, 1983; Sakamoto & Sakai 1994; Thomas et al., 1989a,b)。其中smooth region (一般所稱之果膠)是由多達100個半乳糖醛酸(galacturonic acid)殘基的直線鏈結所形成之聚合物;而hairy region部份則由(1-2) linked  $\alpha$ -L-Rhamnose和(1-4) linked  $\alpha$ -D-GalUA殘基交替組成(Sakamoto et al., 1993),此一部份中galacturonic acid約佔7-23%,而rhamnose可佔5-15%。在Rha殘基C-4位置上的OH基則提供支鏈的黏接點,主要可為arabinan、galactan和arabingalactan等糖及少許xylose, glucose, 2-O-methylxylose, 2-O-methylfucose, apiose等糖之結合。另外在GalUA殘基之C-2, C-3位置可以被乙醯酯化(acetyl esterified)或在羧基位置被甲基酯化(methyl esterified)(Renard et al., 1993)合構成一相當複雜的複合體。此部份因不能被一般常見之商業果膠酵素(polygalacturonase, pectin lyases)分解,其結構多僅能依賴不同甲基酯化程度與酸水解後分析其成份來了解。

植物細胞壁果膠物質的分解是一個複雜、牽涉由多種腐生菌、植物病原真菌、細菌及植物本身酵素系統所共同參與之分解的過程。其中,可切斷smooth region的酵素如聚半乳糖醛酸(polygalacturonase, E.C. 3.2.1.15),果膠解離(pectin lyases, E.C. 4.2.2.2)和果膠酯(pectinesterase, E.C. 3.1.1.11)等已被廣範的研究。例如真菌中 *Aspergillus niger*, *A. parasiticus* 等的果膠分解酵素 PGase, pectin lyase, pectin esterase 的基因族群與分子選殖、分子序列與蛋白質結構及功能等都早已有十分

透徹的研究 ( Bussink et al., 1990, 1991; Cary et al., 1995; Harmsen et al., 1990; Khanh et al., 1990 ) , 且市面上亦有大量廉價之商業酵素製備液供果汁加工業、與釀造工業使用, 如 Novo Nordisk 的 Citrozyme 系列, Rohm 的 rohament, rohapect 系列。惟原果膠 hairy region 部份無法被這些酵素分解。

以往 hairy region 的酵素水解只受到有限的注意, 但是近年來, 漸漸發現一些在果汁製造過程中產生的問題是由 rhamnogalacturonan-rich 的 hairy region 所產生的 ( Schols et al., 1994)。例如: 由於 hairy region 的存在使果膠分解酵素受阻礙而未能分解完全, 造成果汁有在儲存時容易有混濁 ( haze ) 現象生成而影響商品價值; 或在製造澄清果汁使用 UF ( ultra-filtration ) 過濾時, 易使過濾膜有污濁阻塞現象發生 ( Schols & Voragen, 1994 ) 而嚴重影響加工效率。因此近來開始有較多 hairy region 分解方面的研究。在原果膠的分解酵素方面 Sakai & Okushima ( 1978 ) 首先報告其存在。其後自 *Bacillus subtilis* IFO 12113, 3134 , *Trametes sanguinea* IFO 6490 等陸續發現一些原果膠分解酵素 protopectinase-B ( Sakai et al., 1989 ) , protopectinase-C ( Sakai & Sakamoto, 1990; Sakamoto et al, 1993 ) , protopectinase-T ( rhamnogalacturonase, Sakamoto & Sakai, 1994 ) 等, 各有其不同作用機制。其中, 鼠李糖 聚半乳糖 rhamnogalacturonase ( RGase ) 較受重視, 因其可以催化 hairy region 中的 GalUA a(1-2)Rha 之水解, 將 Rha 留在產物之非還原端 ( Schols et al., 1994 )。因此, 開發與大量廉價有效地的供應 rhamnogalacturonase, 日為食品工業界所需求與重視 ( Faigh, 1995 )。以目前生物技術之進展與能力, 這些工作如在獲得 rhamnogalacturonase 基因後, 其實施應能較為簡單。

本研究室前曾對多種巨分子碳水化合物分解酵素進行研究, 前年在執行經濟部科專委託計劃篩選本土高木質素分解能力之白腐真菌時, 自本校溪頭實驗林原始林班中, 亦分離到多株具強原果膠分解能力之菌株。其中一株經初步鑑定為 *Aspergillus* 屬 ( YS8433 ) 之真菌具相當 rhamnogalacturonase 之活性。在前半年的研究中, 我們亦已證實 RGase 在果汁工業之應用價值, 及完成純化與部份定性之工作。本延續計劃於是擬針對此酵素進行基因選殖之工作, 此工作之完成將可為日後提供進一步了解原果膠分解作用機制, 或在本研究室先前改良之微生物表現系統中 ( He et al., 1992 ) 大量表現以提供在蔬果加工業應用之基礎。

## 結果與討論

完成自 *Aspergillus aculeatus* 選殖 rhamnogalacturobase 基因片段。方法為先製備核酸。將菌體裝入離心管中, 加入 5 mL GT 緩衝液 ( 7.5 M guanidium-HCl, 0.5 % Lauryl sarcosinate, 25 mM 檸檬酸鈉, pH 7.0, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ) , 置冰浴中以 polytron 均質, 再加入 0.5 mL 檸檬酸鈉 ( 4 M, pH 4.2 ) 及 5 mL phenol:chloroform:isoamy alcohol = 25:24:1 ( v/v/v ) 混合均勻, 置冰浴 20 分鐘後, 於 4 °C, 10,000 xg 離心 20 分鐘。取上清液至另一離心管中, 加入等量體積的 isopropanol 置於 -70 °C, 30 分鐘後, 於 4 °C, 10,000 xg 離心 20 分鐘, 移去上清液, 再加入 70 % 酒精將沈澱物清洗兩次, 離心 5 分鐘後, 加入 1% DEPC ( diethyl pyrocarbonate ) 水, 將沈澱物溶之, 取少量稀釋測  $A_{230}$ 、 $A_{260}$ 、 $A_{280}$  吸光值, 並以電泳觀察之。所得之 RNA 經電泳分析, 均能明顯看見 28s rRNA 與 18s rRNA, 且  $A_{260} / A_{280}$  分別為 1.90 至 1.96 之間。

接著, 再利用 RT-PCR 方式, 製備獲得 cDNA。再以比對序列資料庫所設計之 primers 進行 PCR 選殖。試驗中曾設計多組引子, 最後結果顯示最佳組合化之設

計為：ATATATGCGTGGTCTTTTCC 與 GTCGACAAGTCAATGATCTC。可得到一段 sharp and clear band，其長度約 1.5 kb。再以 TA-cloning 策略，轉接入 pCRII 質體，命名 pSC1，全部流程及電泳膠片如圖一所示。再轉殖大腸桿菌進行活性表現與定序。其結果序列如下，與大多已知 rhamnogalacturonase 相似度約 50-65%，顯示可能有酵素活性或受質特異性之差別存在於彼此間。因尚未做最佳化表現組合，因此雖在大腸桿菌中可測得此外來基因之表現活性但遠不若原生產菌 *Aspergillus aculeatus* 為高。至於酵素之分離純化與活性測定之方法，已於實驗初期建立，並引述於下供參考。

!!NA\_SEQUENCE 1.0

rh.seq Length: 1388 October 29, 1999 14:12 Type: N Check: 8363 ..

1 ACATATGCGT GGTCTTTTCC CGGTGCTGTG CTTCAGCTTC  
TGTGCTTGAT

51 GCATGCTGCN CTCTAAATAT CTCCTCTACA TCGTACTTCT  
GCCAAGTCGA

101 GCATGATCTC TGTCGCACGG TGGTGCCCAG GACAAACATA  
CTCAGACATC

151 TGTGNATGCT GCATACGGAC CTGACCTTAA TTCTTTATTC  
ATANGTCAGC

201 AGCTTCGTCT GACATGGAAG TCTGTTGGTT TTAATGTCAC  
GATGATCGAC

251 NCTCGGCCGA GTGTACATAT TTCAGCCCCC GCTATACACC  
ATTACGCGAC

301 ACGTCTCCAA TGTAGCGCCC GGGAGACTAG ATGACCTGTC  
TTTCGCCGNT

351 TACATACCAC AGGTGGCCAT GATTCTTGAA TAAAAAGGGT  
TTAAAGAGGG

401 CGTGACCATA TCATTGTGCN ANATTGGAGA CCACCAGCTG  
TGAGAATAAA

451 CAGATGCGGA TACCCCGCTC AGGCGAGTTG GANGACGTAA  
TGATGATTAC

501 TGCCCACGTA CACCGACTTG AGACAGAAGG GAAATGGCTC  
ATACTGCGAT

551 GTGGGACTGG CTAATCGTCA GGAGCCCCGG GGGGGTGTTC  
TTGATCGCAG

601 CGTGTTTACC GACATTATTG AGTCGACTGT TACTGACGTG  
CGCCCCTTGG

651 TGAACCTTGC CATACCGCCG AAAAACGGGA GGGCGCAGTT  
TTATAAGTCG

701 ACTACGAGTA GACTCAGGGG GAATCAGGCC TGTAAGTCAA  
GGATGGATTC

751 TAAGTTAAAA AAGGCAAAT CGTTGCTCTG GAGAAAAGA  
CAGCTCCCCT

801 ACCGAATAAT GAATCTAAGA GGAACAAG GGCCGATAGG  
TCGTCTTTCC

851 TACGTAGATT TCACCNAGGT CGCTTTACGA CGGGAGAACT  
TTTGGAAATCC

901 AGGCCAGCCA TCATANGAAT ACACCGATCT AGATCTCCAG  
ACGTCATGAT

951 GGAATCACA GTGCATCACA TGGTGGCTAT AGGAGCCGCA  
GAATAGATGT

1001 GTGCTTAGGA GCCAGAGTTA ATTATCTTGG ACCTGGAGAA  
GAGAGTTAGA

1051 TAGCAGGGAG AAAGTATATT GGCGACCCAC  
TATCCACAG .TAGGTAGTG

1101 CTACATAGCG CTTTTTCTCT CCCCAAACGA TATTTTCGAG  
CCATGAAGGT

1151 TCGGACGCTT CATGACGGCG TGAAAACATT TAACGAGCAA  
TAGGCGGAGT

1201 AGATTAGCAT AAGAAGGTTT CGCGGTGAAG TAAAAATATT  
CTCCAAAGGA

1251 GAACTATATT TCAGTGTGAC CTTTCCGGCT CATTTGTCGA  
AGATATTGAT

1301 CGGGATGTCG ACGCGNATCT TCCAAAGTAG GGGGATCAGG  
TGCCCTATAA

1351 CTAAGTATA AACCNCCCCA CCGGAGAGAA AGCAAAGG

將20 L 培養液過濾後，以30 kDa-MWCF之CarboSep裝置進行膜過濾濃縮40倍。由於此時工作體積仍很大，故先以Pharmacia傳統LC System設備兩階段純化，即分別以DEAE-Sephadex A-50 (100 g/L), 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) with 0-500 mM sodium chloride與Superose 12, 100 mM sodium acetate buffer (pH 6.0) with 100 mM sodium chloride進行。所得RGase活性fraction，已無明顯可測之PE, PG活性，此即做為前述果汁加工試驗之粗純化液材料（因再往下進行完全純化之收率太少）；完全純化則再改以Bio-Rad Econo System，分別以Econo-Pac Q Cartridge及hydroxapatite Cartridge以10-250 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 做最後純化。膠體電泳顯示單一分子量約65 kD之RGase。全部純化之最後收率為1.8%，純化倍數約30倍。

在定量方面，由於RGase發現的歷史尚短，故目前學界或工業界尚無一致的活性分析方法與單位定義。目前被使用的分析方法主要為：成色反應後測吸光值之變化，及以儀器（HPLC-ECD或GC/MS）分析定量分解產物等兩類方法。我們分別比較了其優缺點。在成色反應方面，我們比較了兩種受質，一是AZCL (azurine dyed and cross-linked)-potato galactan (由荷蘭Gist Brocades公司提供，詳如上年度計畫書內)，另一是以2% sodium hexametaphosphate自檸檬皮溶出並洗去可與carbozole/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>反應之部份為受質原料，反應後測620nm吸光值，每一活性單位定義為1小時內分解釋出相當於每一 $\mu\text{mol}$  D-galacturonic acid量。實驗顯示兩種受質所測得結果相近。在儀器分析產物方法方面，先以商用果膠分解酵素0.05% (w/w) Ultrzyme, 4 h, 45<sup>o</sup> 處理20 kg磨碎蘋果泥，再以10,000 gX，離心20分鐘後，以分子量篩30,000膜（Amiprep-30, Milipore-Amicon Co.）濃縮後，冷凍乾燥，此受質一般稱為modified hairy regions (MHR)。偵測酵素活性時，以5 ml反應體積中含0.1% (w/v) MHR in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5)及20  $\mu\text{l}$ 酵素溶液，在45<sup>o</sup> 反應2小時。取30  $\mu\text{l}$ 反應液，以Aminex HPX ion exchange column (Jasco LC-800, PU-980 pump, RI-830, 50 min, 0.5 ml/min)偵測分析產物及定量；或以80%酒精自柑橘洗出聚半乳糖醛酸（polygalacturonic acid），反應體積1 ml內含2.5% polygalacturonic acid in 200 mM sodium acetate (pH 4.0), 1,000 U rhamnosidase（本實驗室另項計畫所純化）及待測酵素溶液，反應45<sup>o</sup>，30 min。加熱煮沸10分鐘後，以80%酒精溶出rhamnose並做alditol acetate衍生化後以GC/MS (HP-5890 GC, HP-5971 MS, HP-5860 Autosampler)分析。活性單位定義為one  $\mu\text{mol}$  *t*-rhamnosyl residues released per min。試驗結果發現以儀器分析分解產物方法，雖顯示極佳之靈敏度且可經由質譜非常精確鑑定產物以找出代謝路，但其重複性、再現性及可定量性均極差且過程相當複雜，是以較適合做為果膠化學或碳水化合物結構之基礎研究用。在本計畫中及果汁工業應用上，仍是以分光光度計或ELISA Reader (Bio-Rad 3550-UV)測成色反應即可。

在定性方面，試驗結果發現：在0.1M sodium citrate/trisodium phosphate buffer中，此酵素在pH 2.5-7.5，溫度10-55<sup>o</sup> 中均穩定；在0.1M sodium acetate buffer中，最適當pH及溫度分別為4.3及 45<sup>o</sup>。由於現階段不易自野生YS8433菌株得到大量完全純化之RGase，故在選殖此酵素基因時仍沿用商業菌做為比較。

計畫成果自評：符合預期進度

#### 參考文獻

- Bussink-H.J., Kester-H.C., Visser-J. 1990 Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding prepro-polygalacturonase II of *Aspergillus niger*. FEBS Lett. 273 (1-2):127-130.
- Bussink,-H.J., Buxton-F.P. and Visser-J. 1991 Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubigensis* genes encoding polygalacturonase II. Curr. Genet. 19 (6):467-474.
- Cary-J.W., Brown-R., Cleveland-T.E., Whitehead-M., Dean-R.A. 1995 Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *Aspergillus*

- parasiticus*. Gene 153 (1):129-133.
- Chenchik-A., Moqadam-F., Siebert-PD 1995 Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full-length cDNAs. Clontech. 10(1):5-8.
- Faigh-JG 1995 Enzyme formulations for optimizing juice yields. Food Tech. 49(9):79-83.
- Harmsen-J.A., Kusters-van Someren-M.A., Visser-J. 1990 Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (pelA): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. Curr. Genet. 18 (2):161-166.
- He-X.S; Shyu-YT; Nathoo-S; Wong-SL; Doi-RH 1992 Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 646:69-77.
- Hours-RA; Sakai-T 1994 Protopectinase production in solid state culture of *Aspergillus awamori*. Biotech. Lett. 16 (7):721-726.
- Jatikavanich-S; Juntongjin-K 1983 Protopectin-solubilizing enzyme (protopectinase): isolation and optimization of the protopectinase-producing microorganisms. Thai J. Agri. Sci. 16 (3):185-196.
- Khanh-N.Q., Albrecht-H., Rutkowski-E., Loffle-F., Gottschalk-M., Jany-K.D. 1990 Nucleotide and derived amino acid sequence of a pectinesterase cDNA isolated from *Aspergillus niger* strain RH 5344. Nucleic Acids Res. 18 (14): 4262
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Renard-CMGC; Thibault-JF; Voragen-AGJ; Broek-LAM-van-den; Pilnik-W 1993 Studies on apple protopectin. VI. Extraction of pectins from apple cellwalls. Carbohydr. Polym. 22 (3): 203-210.
- Sakai-T., Okushima-M 1978 Protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. Agri. Biol. Chem. 42:2427-2429.
- Sakai-T., Ikemoto-K., Ozaki-Y. 1989 Purification and characterization of a novel protopectinase from *Bacillus subtilis*. Agri. Biol. Chem. 53:1213-1223.
- Sakai-T., Sakamoto-T 1990 Purification and some properties of a protopectin-solubilizing enzyme that has potent activity on sugar beat protopectin. Agric. Biol. Chem. 54:879-889.
- Sakamoto-T; Hours-RA; Sakai-T 1995 Enzymic pectin extraction from protopectins using microbial protopectinases. Process Biochem.30 (5): 403-409.
- Sakamoto-T. Sakai-T. 1994 Protopectinase-T:a rhamnolacturonase able to

- solubilize protopectin from sugar beet. *Carbohydr. Res.* 259:77-91.
- Sakamoto-T. Sakai-T. 1995 Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochem.* 39(4):821-823.
- Sakamoto-T; Yoshinaga-J; Shogaki-T; Sakai-T 1993 Studies on protopectinase-C mode of action: analysis of the chemical structure of the specific substrate in sugar beet protopectin and characterization of the enzyme activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (11):1832-1837.
- Sambrook-J., Fritsch-E.F., Maniatis-T 1989 *Molecular Cloning*, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schols-HA; Voragen-AGJ 1994 Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydr. Res.* 256 (1): 83-95.
- Schols-HA., Voragen-AGJ., Colquhoun-IJ 1994 Isolation and characterization of rhamnogalacturonan oligomers, liberated during degradation of pectic hairy regions by rhamnogalacturonase *Carbohydr. Res.* 256(1):97-111
- Schols-HA., Mutter-M., Voragen-AGJ., Niessen-WMA., Van Der Hoeven-RAM., Van Der Greef-J., Bruggink-C. 1994 The use of combined high-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass spectrometry in the structural analysis of pectic oligosaccharides *Carbohydr. Res.* 261(2):335-342
- Thomas-JR; Darvill-AG; Albersheim-P 1989a Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from walls of suspension-cultured rice cells. *Carbohydrate Res.* 185 (2):261-277.
- Thomas-JR; Darvill-AG; Albersheim-P 1989b Rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide that is a component of monocot [maize and rice] cell-walls. *Carbohydr. Res.* 185 (2):279-305.
- Voragen-AGJ 1992 Rhamnogalacturonan acetyltransferase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of