

東海大學

環境科學與工程研究所

碩士論文

Department of Environmental Science and Engineering

Thesis of Master Degree

由環境中篩選真菌菌株之新穎外切型纖維水解酵素

**A novel exo-glucanase explored within fungal strains  
gathered from environments**

指導老師：郭獻文 博士

研究生：曾佳崑

中華民國 104 年 1 月

January 2015



東海大學碩士班研究生  
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系曾佳崑君所提之論文

題目：環境分離之真菌株篩選出一個新穎的外切型纖維水解酵素

A novel exo-glucansase explored within fungal strains gathered  
from environments

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授：鄧獻文 (簽章)

104年1月16日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班曾佳崑君所提之論文

題目：環境分離之真菌株篩選出一個新穎的外切型纖維水解酵素

A novel exo-glucansase explored within fungal strains gathered from environments

---

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 李之敏 (簽章)

委員

何碧涵

鄭獻文

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

中華民國 104年 1月 16日

## 致謝

在求學的過程中，碩士的生涯算雖然是比較短的一段路程，在我覺得是最刻苦銘心而且學到最多最豐富的一個時期，在研究所期間我深深覺得自己是有在成長的，研究過程中難免會遇到碰壁的時候，但越是如此才能發現自己的能力所到之處，經由突破層層的關卡讓我感覺自己是在進步的更肯定了自己的價值。一路以來到要完成論文期間遇到了太多幫助我的貴人，最大的功臣莫過於指導老師郭獻文博士，還有我的口試委員老師黃良銘老師與汪碧涵老師對我研究的指點，讓我的論文不再只是單單的碩士研究成果，而是老師們的肯定，再來是中研院植微所的前輩們，振維學長、玫慧學姐、孟璇學姐還有其他植微所的同仁，感謝教導我實驗上基礎的知識還有在研究設備上大力的提供幫助，讓我能順利完成實驗，其中振維學長更是耐心的教導我、幫助我。感謝東海化學系莊旻傑老師提供實驗上的硬體設備，讓我能更快速的完成實驗，還有莊老師實驗室有趣的朋友們(萃敏、俊慶、心慈、佩茵)容忍我多次的打擾，最後要大力的感謝陪我這碩士兩年半的環工系朋友與學長，本實驗室的布丁大學長教導分生實驗的基礎知識，還有同為環境分生實驗室的同僚(良志、皓偉與至榮)很高興可以跟你們幫忙一起建立起我們的實驗室；謝謝環微的大學長(和藹的小胖、總是穿夾腳拖的三郎哥與瘋瘋癲癲的阿百)及同學(阿翔、少根筋的 YOG、靜悄悄的浩銘、總會提早離開的昆翰與新進來的助理 189)教會我實驗室基本的實驗也解決了許多問題甚至每天還一起吃飯打屁聊天，當然也少不了喜歡逗陣的土壤實驗室的很會揪團的沂侯哥、很盧的穎彰哥、慶錡、德偉、家齊、新進的學弟鈺琮及劉老師實驗室的學弟妹，總是會呷厚道相報，很和睦的相處。最讓我印象深刻的是一起設計與幫忙小胖哥的捕捉小鹿求婚計畫與結婚迎娶當天，我們這些伴郎的搞笑事件。除了研究所同學以外，還要謝謝專題生們，不小

心發福天恩、愛傻笑的易潔最後讓我很 superise 的佩萱與欣宜，在我畢業前夕還送我份禮物，讓我真的蠻感動的。最後謝謝父母的栽培，在我說要考研究所時給予支持，讓我有無後顧之憂得完成學業，也體諒我在研究繁忙時無法回家幫忙的狀況，謝謝你們。



## Abstract

Finding renewable energies and searching related technologies (e.g., converting plant biomass into bioethanol) have been essential policies in the past few decades while the reserves of fossil fuels (e.g., natural gas, petroleum, and coal) have kept reducing. Cellulose, a linear biopolymer of glucose, is a suitable raw material for bioethanol production. Cellulases including endo-glucanases, exo-glucanases, and beta-glucosidases are major enzymes acting on different parts of cellulosic structure to convert cellulose into glucose. This study was aimed to (1) screen potential cellulosic enzymes (especially exo-glucanase) from 106 fungal strains gathered from environments based on cellulosic activity and MUC zymogram screening, (2) determine optimal culturing conditions of potential fungal strains and optimal reaction conditions of the exo-glucanase, (3) identify the potential cellulosic fungal strain and its cellulases, and (4) try to PCR amplify the target gene of exo-glucanase. Results showed that four fungal strains including *Mc-13-5-2-2*, *Pm-13-6-2A*, *Tm-THU4* and *Mc-THU17* had higher avicelase activities (0.1~0.209 U/mL) than other fungal strains gathered from environments which were close to benchmark strain *Trichoderma reesei* (0.326U/mL). Based on sequence comparisons of ITS1-5.8S-ITS2 (~650 bps), four potential fungal strains *Mc-13-5-2-2*, *Pm-13-6-2A*, *Tm-THU4*, and *Mc-THU17* were first matched with *Meyerozyma caribbica* (HG970748.1, 96%), *Penicillium marneffei* (HM595497.1, 90%), *Talaromyces marneffei* (KF183638.1, 94%), and *Meyerozyma caribbica* (KJ705035.1, 84%), respectively. Among which, *Mc-13-5-2-2*, cultured at 25°C and pH 5, had the best avicelase activity and stability while tested at 70°C and pH5. According to amino acid sequencing results from LC-MS/MS, target exo-glucanase CBHI-*Mc* from *Mc-13-5-2-2* had two amino acid fragments which were identical to  $\beta$ -1,4-exo-glucanase. The CBHI-*Mc* had a specific avicelase activity of 0.126 U/mg which was about half of *T. reesei*'s (~0.26 U/mg). In summary, the CBHI-*Mc* harvested from *M.caribbica* (*Mc-13-5-2-2*) might be a novel exo- $\beta$ -1,4-glucanase found in *M.caribbica* and could be a potential cellulosic enzyme for further application.

**Keyword:** Cellulose, bio-ethanol, exo-glucanase, MUC-zymogram

## 中文摘要

目前全球化石燃料資源預估將在數十年後被開採殆盡，因此發展再生能源勢在必行。由葡萄糖以直鏈結構聚合而成的纖維素是非常適合作為生產生質酒精的原料，然而要將纖維素水解為葡萄糖需有外切型纖維水解酵素、內切型纖維解酵素及 Beta-葡萄糖苷酶分別作用於纖維素不同的部分，持續開發新穎且低生產成本的纖維水解酵素(特別是目前種類數量相對較少之外切型纖維水解酵素)仍有其必要性。本研究四項目的包括 (1) 從環境分離出的 106 株真菌中發掘具有潛力的外切型纖維水解菌株並鑑定出其菌種、(2) 測試所篩選的真菌菌株之最佳化培養條件與其酵素的最佳反應條件、(3) 對目標外切型纖維水解酵素進行胺基酸定序分析及 (4) 克隆有潛力真菌之目標外切型纖維水解基因。依據纖維水解酵素活性測試與蛋白質酶譜實驗結果發現，有 4 株較有發展潛力的纖維水解真菌(*Mc-13-5-2-2*、*Pm-13-6-2A*、*Tm-THU4* 及 *Mc-THU17*)其 Avicelase 活性測試結果介於 0.1~0.209 U/mL 接近做為判斷依據的標準菌株 *Trichoderma reesei* Rut C30 的活性測試結果(0.326 U/ml)。利用 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 序列(~650bps)比對結果顯示這 4 株真菌(*Mc-13-5-2-2*、*Pm-13-6-2A*、*Tm-THU4* 及 *Mc-THU17*)分別最相近於 *Meyerozyma caribbica* (HG970748.1, 96%)、*Penicillium marneffei* (HM595497.1, 90%)、*Talaromyces marneffei* (KF183638.1, 94%)與 *Meyerozyma caribbica* (KJ705035.1, 86%)。其中 *Mc-13-5-2-2* 培養在 25°C 與 pH5 的條件下有較佳的酵素活性，並且在 pH5 與 70°C 的反應條件下有最好的 Avicel 的水解活性與穩定性。利用 Native PAGE 結果與 MUC zymogram 的亮帶顯示可以找到目標酵素的位置，將酵素從膠體切下後進行 SDS PAGE 分析後，得知 *Mc-13-5-2-2* 的目標酵素(CBHI-*Mc*)分子量大小約為 70KDa，經由 LC-MS-MS 胺基酸定序結果與基因庫序列比對發現，CBHI-*Mc* 有兩段胺基酸序列屬於 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase。進一步做蛋白質定量後所推算出該 CBHI-*Mc* 之 avicelase 比活性為 0.126 U/mg，約為 *T. reesei* Rut C30 活性(~0.26 U/mg)的一半。總結來說，*Mc-13-5-2-2* 為本研究所篩選出最有發展潛力的纖維水解真菌，其 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase, CBHI-*Mc* 為目前文獻針對 *M. caribbica* 菌株所未提及的新穎外切型纖維水解酵素。

關鍵字: 纖維素、生質酒精、外切型纖維水解酵素。



# 目錄

英文摘要	II
中文摘要	III
第一章、前言	
1.1 研究動機	P1
1.2 研究目的	P3
第二章 文獻回顧	
2.1 能源現況	P4
2.2 生質酒精	P5
2.3 纖維素物質與結構	
2.3.1 纖維素 Cellulose	P7
2.3.2 半纖維素 Hemicellulose	P8
2.3.3 木質素 Lignin	P8
2.4 纖維素水解	
2.4.1 纖維水解酵素介紹	P9
2.4.2 外切型纖維水解酶	P10
2.4.3 內切型纖維水解酶	P10
2.4.4 $\beta$ -葡萄糖苷酶	P10
2.4.5 纖維水解酵素來源	P10
2.5 纖維水解酵素之應用	P17
第三章 材料與方法	
3.1 實驗流程	P18
3.2 儀器設備、培養基與實驗試劑	
3.2.1 儀器設備與型號	P18
3.2.2 使用的培養基與成分	P21
3.2.3 酵素活性分析緩衝溶液與試劑	P22
3.3 菌株培養與純化	
3.3.1 菌株來源	P23
3.3.2 菌株純化	P23
3.3.3 菌株液態培養	P23
3.4 纖維水解酵素活性測試	
3.4.1 CMCase activity (Endo-glucanase)	P25

3.4.2	Avicelase activity (Exo-glucanase)	-----	P25
3.4.3	pNPGase activity ( $\beta$ -glucosidase)	-----	P26
3.5	纖維水解酵素最佳化條件與 4 小時穩定性測試		
3.5.1	最佳化生長與反應條件(溫度與 pH 值)	-----	P26
3.5.2	酵素之 4 小時熱穩定性	-----	P27
3.6.3	酵素之 4 小時 pH 穩定性	-----	P27
3.6	以分生物技術應用於真菌菌種鑑定		
3.6.1	染色體 DNA 萃取	-----	P27
3.6.2	聚合酶連鎖反應 ITS rDNA 片段擴增與鑑定	-----	P28
3.6.3	以定序比對結果繪製親緣關係圖與 bootstrap 計算	-----	P29
3.7	分析蛋白質之操作與相關技術		
3.7.1	粗酵素之預處理	-----	P31
3.7.2	蛋白質濃度測定	-----	P32
3.7.3	Native PAGE、MUC zymogram & SDS PAGE	-----	P33
3.7.4	胺基酸序列分析	-----	P37
<b>第四章 實驗結果</b>			
4.1	分離/篩選具纖維水解潛力之真菌菌株		
4.1.1	粗酵素活性測試	-----	P39
4.1.2	酶譜篩選	-----	P42
4.2	酵素之最佳化培養條件、最佳反應條件與穩定性分析	-----	P46
4.3	根據 ITS rDNA 基因序列鑑定真菌菌種	-----	P52
4.4	目標酵素定量與鑑定		
4.4.1	目標酵素位置與分子大小確認	-----	P56
4.4.2	酵素定量	-----	P59
4.4.3	酵素胺基酸序列定序	-----	P60
4.5	克隆 <i>Mc-13-5-2-2</i> 之 <i>cbhI-Mc</i> 序列		
4.5.1	引子設計	-----	P61
4.5.2	利用 PCR 對 <i>cbhI-Mc</i> 進行序列擴增	-----	P64
<b>第五章 結論與建議</b>			
5.1	結論	-----	P65
5.2	建議	-----	P66
參考文獻			-----P67
附錄			-----P72

## 表目錄

Table 2.1 具有纖維水解能力的微生物-----	P11
Table 2.2 現有已發表具外切型纖維水解能力的真菌-----	P13
Table 2.3 現有已發表具內切型纖維水解能力的真菌-----	P15
Table 2.4 現有已發表具有分泌 $\beta$ -葡萄糖苷酶能力的真菌-----	P15
Table 2.5 目前已發表來源於真菌的纖維水解酵素之最佳溫度、pH 值反應 條件與溫度、pH 值穩定性範圍-----	P16
Table 3.1 Potato dextrose agar 配方-----	P21
Table 3.2 Mandle Reese medium 配方-----	P21
Table 3.3 本研究擴增 ITS rDNA 所採用之引子-----	P30
Table 3.4 Reagent and temperature program in PCR -----	P31
Table 3.5 蛋白質膠體電泳配方-----	P38
Table 3.6 蛋白質追蹤染料之配方-----	P38
Table 3.7 CBR 染色液與脫色液之配方-----	P38
Table 4.1 以 MUC zymogram 作真菌菌株二次篩選-----	P45
Table 4.2 四株候選菌株與已發表文獻的真菌之最佳化反應條件(溫度與 pH 值) 及穩定性(溫度與 pH 值)比較-----	P47
Table 4.3 現有文獻的真菌與 13-5-2-2 對不同基質之最佳化外切型纖維水解 酵素活性之比較-----	P51
Table 4.4 四株纖維水解真菌的 ITS 序列與基因庫比對之結果-----	P54
Table 4.5 現有文獻發表的外切型纖維水解酵素之分子量大小-----	P57
Table 4.6 對 <i>Mc</i> -13-5-2-2 所分泌外切型纖維水解酵素之胺基酸定序結果 -----	P60
Table 4.7 <i>Mc</i> -13-5-2-2 胺基酸定序結果所對應可能的核酸序列-----	P62
Table 4.8 有纖維水解基因記載的序列-----	P63
Table 4.9 Poly T 與最終採用的 18 條引子序列-----	P63

## 圖目錄

Figure 2.1 2008 年年底化石燃料儲備與生產比(R/P)-----	P4
Figure 2.2 大氣中 CO <sub>2</sub> 濃度對全球暖化的影響-----	P5
Figure 2.3 生質酒精與CO <sub>2</sub> 循環系統-----	P6
Figure 2.4 植物中的木質纖維素結構-----	P7
Figure 2.5 纖維素之結構-----	P8
Figure 2.6 纖維水解酵素降解纖維素機制-----	P9
Figure 3.1 Flowchart of experimental design-----	P19
Figure 3.2 Flowchart of optimal conditions assay -----	P20
Figure 3.3 纖維水解酵素預處理步驟示意圖-----	P32
Figure 4.1 106 株纖維水解真菌之酵素活性測試(Benchmark) <i>Trichoderma reesei</i> RUTC30 (A) 13-5-2-2, (B)13-5-3-2, (C)13-6-2A, (D)13-5-1-1, (E)THU4, (F)THU17, (G)30887, (H)33458, (I)306-8I, (J)1306-7I, (K)13-6-3A,(L)13-2-3-2,(M)LF2 -----	P40
Figure 4.2 六株候選菌株於 7 天培養過程之 Avicelase 活性趨勢-----	P42
Figure 4.3 溫度與 pH 值對於 25°C 培養下的四株候選真菌之酵素影響----	P48
Figure 4.4 溫度與 pH 值對於 30°C 培養下的四株候選真菌之酵素影響----	P49
Figure 4.5 四株候選真菌酵素之 4 小時熱穩定性與 pH 值穩定-----	P50
Figure 4.6 以 primer ITS1 與 ITS4 擴增 ITS rDNA 片段-----	P54
Figure 4.7 <i>Pm</i> -13-6-2A 與 <i>Tm</i> -THU4 之 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 親緣分析--	P55
Figure 4.8 <i>Mc</i> -13-5-2-2 與 <i>Mc</i> -THU17 之 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 親緣分析--	P55
Figure 4.9 <i>Mc</i> -13-5-2-2 之目標酵素大小及對應位置-----	P57
Figure 4.10 以不同量的 BSA 定量 <i>Mc</i> -13-5-2-2 之目標酵素-----	P59
Figure 4.11 胺基酸序列所對應的核酸序列圖-----	P62
Figure 4.12 目標基因放大結果與 PCR 擴增時引子黏合溫度條件-----	P64
附錄一、還原糖檢量線-----	P72
附錄二、pNP 檢量線-----	P72
附錄三、蛋白質檢量線-----	P73
附錄四、影像分析 BSA 之檢量線-----	P73
附錄六、胺基酸比對結果與對應位置-----	P74
附錄七、 <i>Mc</i> -13-5-2-2 選取的胺基酸對應可能的核酸序列-----	P75
附錄八、以 Primer T29 對 <i>cbhI-Mc</i> PCR 放大後定序結果-----	P76

# 第一章、前言

## 1.1 研究動機

自工業革命以來，使用化石燃料(煤、石油及天然氣等)加速了工業的發展，使世界經濟得以快速成長，然而石化燃料並非一朝一夕所能生成的，人類對於石化燃料的需求又日與俱增，有報導顯示石化燃料在未來 40~70 年內便會耗盡；再者石化燃料大量的燃燒，已使得二氧化碳之濃度在地球大氣層內有明顯的累積，所引發的溫室效應作用常造成了全球嚴重的氣候變遷以及環境的惡化甚至於對人體健康的危害(Bockris, 2002)；因此，發展可永續使用的再生能源已經成為全球關注的議題，現今人類所開發的再生能源如：太陽能、風能、地熱能、水力能與潮汐能...等，但大部分這類能源容易受區域性的限制，並非全球各地皆可發展的最佳選擇。而生質能源的開發與應用較不局限於地域性因素，其發展關鍵之一取決於原料供應，保護國際協會(Conservation International)的學者認為在下一個世紀以前生質能源將會解決全球 40% 的能源需求量；初期發展生質能源的原料是來自人類糧食，但在這人口數逐年上升的時代，有著與民爭食的負面影響，易造成各地糧食危機，因此，近來原料已逐漸轉向為富含木質纖維素的農、林、牧業廢棄物，台灣每年會產生大量的農業廢棄物(如稻草、稻穀、蔗渣...等)，因此將木質纖維轉換成生質能源是台灣乃至全球所重視的再生能源之一，這種將廢棄物再能源化的方法不但兼具環保更能改善目前能源逐漸短缺的現況。

木質纖維 (Lignocellulose) 是由纖維素 (Cellulose)、半纖維素 (Hemi-cellulose) 相互纏繞並與木質素 (Lignin) 包覆所形成的複雜結構，在生產生質能源的過程中須先以物理或化學方式將木質纖維進行前處理以破壞包覆結構，使纖維水解酵素更有效率將纖維素轉化成可發酵的醣類後，再進一步以酵母菌發酵生產生質酒精。纖維素水解成醣類主要是由內切型

纖維酵素(Endoglucanase)、外切型纖維酵素(Exoglucanase)以及 $\beta$ -葡萄糖苷酵素( $\beta$ -glucosidase)等三類纖維水解酵素作用於纖維素不同的位置(如結晶區Crystalline region 及非結晶區 Amorphous region)。自然界中可以分泌纖維水解酵素的生物，多是在生長過程中需要以纖維素作為碳源，目前已知能分解纖維素做為生長所需之碳源的有細菌、真菌、昆蟲及反芻動物等；但昆蟲及反芻動物是藉由消化系統中共生的微生物所分泌出纖維分解酵素。其中細菌以*Clostridium* sp.、*Cellulomonas* sp.、*Thermomonospora* sp. 被較為廣泛應用與研究，而真菌以*Trichoderma* sp.與 *Aspergillus* sp.為主(Kuhad, Gupta, and Singh, 2011)，此外真菌能分泌相當強的纖維水解酵素到細胞外，因此酵素收取較容易，加上真菌可伸出菌絲穿透纖維產生機械性破壞，同時也對結晶性纖維具有較強的分解能力(Lowe.et al.,1987)。其他生物，如昆蟲和動物的酵素皆存於體內，酵素採收方式較不易，因此除特殊用途外，不適用於一般大量生產。

目前已有許多商業化纖維水解酵素，其中就以真菌*Trichoderma* sp.與 *Aspergillus* sp.為主要生產菌株，早期商業化酵素生產成本偏高，因此酵素的推廣與使用範圍因此較為受限；近代生物技術的快速發展，可利用微生物大量生產具特定功能的酵素，同時以基因工程技術及誘導突變的方式提高其酵素活性為輔，使得纖維素水解酵素的生產成本已大幅的降低，其中以Novozyme及Genencor兩大國際酵素公司所研發的纖維素水解酵素最具有代表性(如Celluclast 1.5 L、Novozyme188、C Tec2.0及C Tec3.0等)，其生產每公升乙醇所需要的成本，已從2000年的40元/公升大幅降低了(陳，2007)。

即便如此，利用這些商業化纖維水解酵素來製作生質酒精汽油的生產成本依舊略高於汽油，因此在開發新穎且低生產成本的纖維水解酵素仍有其必要性，其中如何有效利用生物質或發掘更多有發展潛力的纖維水解酵

素是可能可以突破的關鍵技術，除了現有的商業化酵素外目前還有許多纖維水解酵素相關的文獻，也有不少能夠分泌高活性的纖維水解酵素的真菌被發表，大部分是屬於分泌內切型的纖維水解酵素與 $\beta$ -葡萄糖苷酶，而在文獻有提及到能與商業化酵素的來源菌株(如 *Trichoderma reesei* 及 *Aspergillus sp.*)相互比較的外切型纖維水解真菌及其酵素相對較少，因此發掘有發展潛力的外切型纖維水解酵素是重要的研究方向之一。

## 1.2 研究目的

在這全球能源資源逐年減少的情況下，生質酒精汽油是有發展前景的再生能源之一，而持續開發新穎、高活性、低成本的纖維水解酵素以降低生質酒精汽油的生產成本仍有其必要性，因此，本研究四項主要目的包括：

- (1)從環境分離的真菌(105株)篩選具有發展潛力的纖維水解真菌菌株，其中又以找出能分泌高活性的外切型纖維水解酵素的菌株(以 *Trichoderma reesei* Rut C30作為活性比較標的)，並利用ITS序列探討菌株的分類群。
- (2)對於篩選到具有發展潛力的幾株真菌測試外切型纖維水解酵素之最佳培養(溫度與pH值)、最佳反應(溫度與pH值)與穩定性(溫度、pH值)。
- (3)分析篩選出最具發展潛力菌株的外切型纖維水解酵素之分子大小及比活性，測定其胺基酸序列。
- (4)克隆目標酵素完整的功能基因，以助於日後對該酵素進行量產。

## 第二章、文獻回顧

### 2.1 能源現況

目前人類所仰賴的能源大約有80% 是來自含碳的化石燃料(如煤礦、石油及天然氣等)(Das and Veziroglu, 2001)，而大量的燃燒化石燃料已使得二氧化碳之濃度在地球大氣層內有明顯的累積，所引發的溫室效應作用造成了全球嚴重的氣候變遷以及環境的惡化甚至於對人體健康的危害(Bockris, 2002)。根據政府間氣候變遷專家委員會(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)估計2004年全球大氣CO<sub>2</sub>濃度為385 ppm，並以每年2 ppm的速率增加，預估2050年CO<sub>2</sub>濃度將達550 ppm，可能將使大氣溫度增加3.2~4.0°C (Figure 2-1)。除此之外，化石能源屬耗竭性資源，依據2009年英國石油公司(簡稱BP)統計資料顯示(Figure 2.2)，以目前的開採速度估計，石油尚有42年的可開採年限，天然氣尚有60.4年，煤炭的可開採年限最長為122年。因此為了能源與環境的考量之下，以永續經營為前提發展潔淨的再生能源成了刻不容緩的重要議題(BP, 2009)。

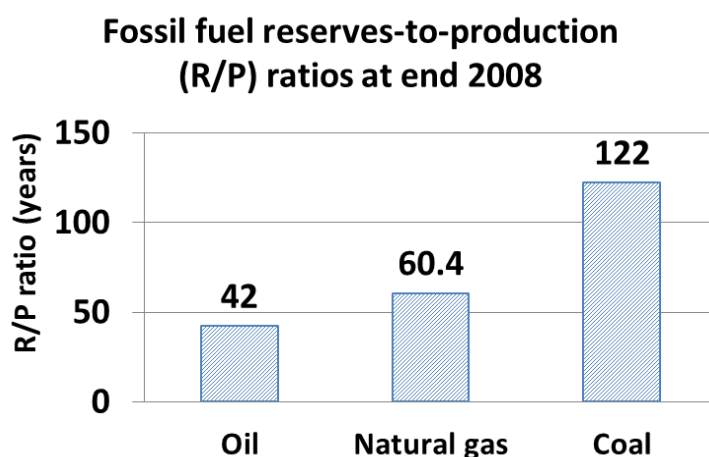


Figure 2.1 2008年年底化石燃料儲備與生產比(R/P) (BP,2009)



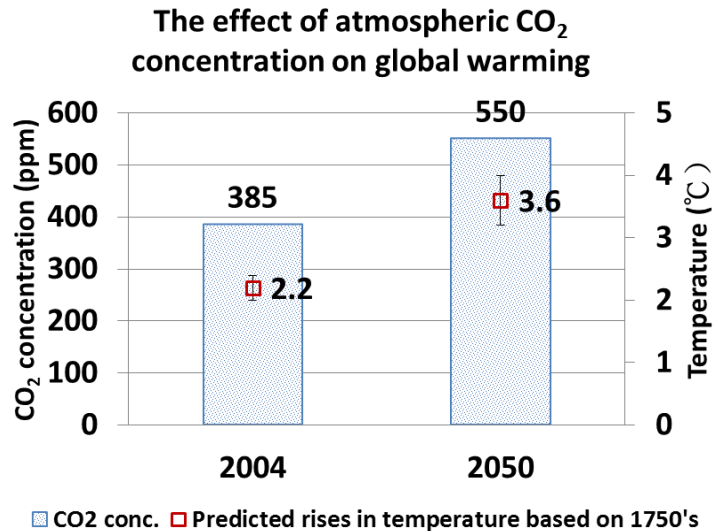


Figure 2.2. 大氣中 CO<sub>2</sub> 濃度對全球暖化的影響 (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007)

根據農業生技(Agricultural Biotechnology, AGBIO)的報導(農業廢棄物資源化趨勢簡析)全台灣每年約產生504.2萬噸農業廢棄物，其中含農產廢棄物218.9萬噸、稻稈166.6萬噸、稻殼33.3萬噸、廢棄菇包19.0萬噸以及果菜殘渣12.7萬噸等(李，2013)，這些都是含有豐富纖維素的資源，倘若直接焚化處理不僅是種浪費，同時也會產生許多二氧化碳，對環境而言更是一種傷害。加上國內每年有90%的能源是仰賴化石燃料，基於以上條件發展生質酒精是適合解決現況問題的再生能源之一。

## 2.2 生質酒精

生質酒精或生物乙醇是利用微生物發酵把生物質 (biomass) 中的醣份轉化後得到的酒精，早在1970 年代石油危機時，巴西、美國就積極投入生質酒精工業的發展，近年來在CO<sub>2</sub>超量排放、全球氣候暖化、國際原油供需不穩定和價格持續上漲等因素影響下，有越來越多的國家投入。2006 年全球的生質酒精產量約4千萬公秉，有90%生產於巴西和美國。部分生質酒精做為汽油的替代燃料，生質酒精通常以5~15%和汽油混合，可在不修改現有汽車引擎的情況下使用，也可以完全替代汽油做為汽車燃料。

添加5%和10%酒精的汽油就分別稱為E5和E10，美國已有E85汽油，也就是含酒精85%和汽油15%的混合燃料。使用生質酒精的汽油辛烷值高且較潔淨。此外，汽車引擎燃燒的酒精是由二氧化碳（CO<sub>2</sub>）經植物光合作用轉化的生質而來，形成封閉系統，在這個系統中循環利用CO<sub>2</sub>，淨排放量是零（如Figure 2.3）。

做為生質酒精原料的作物也包括甘蔗、玉米、大麥、小麥、燕麥、稻米等穀類，還有甜菜、甜高粱，以及木薯、甘藷等，但由於大多提煉自人類糧食，近幾年來與民爭食的問題慢慢浮現，研究重心慢慢轉為以非糧食作物的木質纖維素或纖維質，包括穀類農作物廢棄物如麥稈、稻稈、蔗渣、舊報紙、木屑及廢木材...等。不僅解決廢棄物問題，同時還有環保、節約能源...等多重效益。儘管如此，目前纖維酒精的發展仍有不少障礙，植物的纖維素是由葡萄糖聚合而成的線性長鏈分子，和半纖維素、木質素、果膠質等互相纏繞在一起。除此之外，植物上有表皮組織，上面含有保護的腊質，會阻礙纖維水解酶接觸並使水解效率降低。因此在成本上仍無法和糖質或澱粉質為原料的匹敵。纖維酒精所遭遇到的最大問題，是如何降低纖維素水解反應的成本和提高分解的反應效率。（林、李，2009）

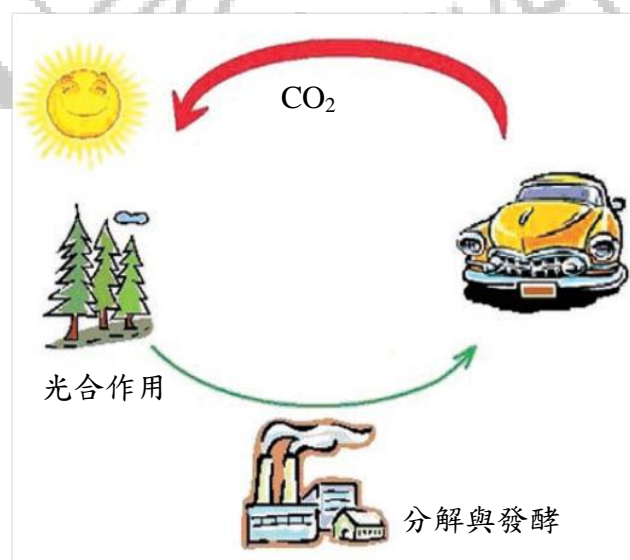


Figure 2.3 生質酒精與CO<sub>2</sub> 循環系統

## 2.3 纖維素物質與結構

纖維素物質(cellulosic materials)是支撐植物主要物質同時也是地球上含量最豐富的含碳化合物(Dashtban et al.,2010)。構成纖維素物質的成分為纖維素(Cellulose)、半纖維素(Hemicellulose)及木質素(Lignin)三種。

### 2.3.1 纖維素(Cellulose)

纖維素主要由葡萄糖分子為單位以  $\beta$ -1,4- glycosidic 鍵結形成直鏈狀的纖維聚合物 (Figure 2.4)。約由 7,000~15,000 個葡萄糖單元構成。纖維素直鏈結構上一端為還原端，因為其 1 號碳上裸露出具有還原能力的醛基；另一端為非還原端，因為 1 號碳上限於  $\beta$ -1,4 鍵結使得醛基無法打開，與澱粉相似，由於此特性使纖維素具有方向性。根據纖維素的構造，有的如結晶體般的構造，稱為結晶區(crystalline region)，而有些部分的分子排列較不規則，結構較鬆散，稱之為非結晶區(Amorphous region, (Figure 2-5))。

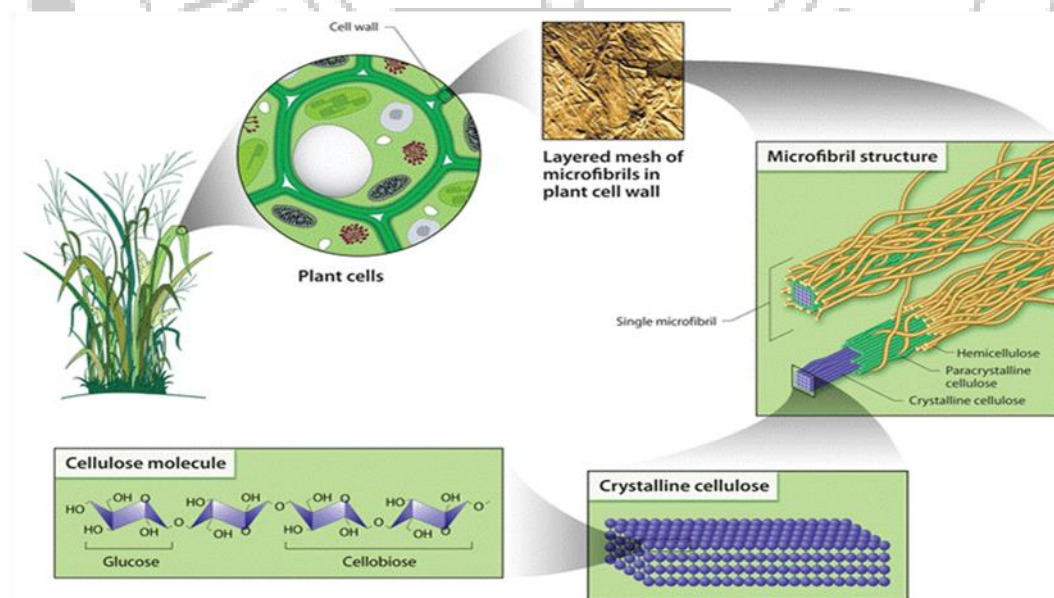


Figure 2.4 植物中的木質纖維素結構 (modified from <http://genomicscience.energy.gov>)

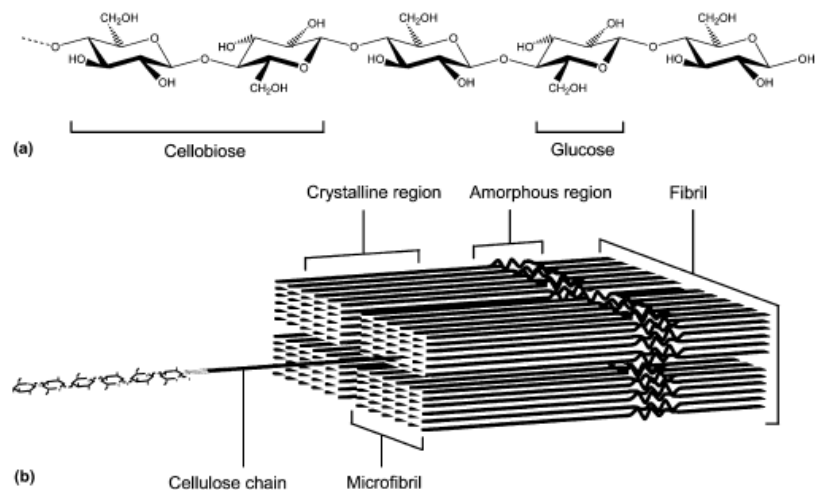


Figure 2.5 纖維素之結構 (A) is the primary structure and in (B) is the structure of a cellulose fibril (Desvaux, 2005)

### 2.3.2 半纖維素(Hemicellulose)

半纖維素是存在於植物細胞壁之中的多醣類，佔細胞約 20~35%，結構不同於纖維素，是以平面狀的結構且具又高度分支及分子鏈短等特性。半纖維素主要由多種醣類聚合而成，包括屬於五碳醣的木醣(D-xylose)、樹膠醛醣(L-arabinose)及屬於六碳醣的半乳糖(galactose)、葡萄糖(glucose)、甘露醣(manose)等，其中又以木醣(D-xylose)所構成的多醣體聚木醣(xylan)為植物細胞壁構成主要成分，可以說聚木醣是自然界第二多的有機碳水化合物(Lee,1999)。

### 2.3.3 木質素(Lignin)

木質素為植物主要成分之一，木本類植物中含有 20~30%，草本類植物中亦有 15~25%。木質素是一種不易受酸鹼分解的非晶體的高分子化合物，同時也極難被生物降解，是具有保護功能的植物聚合體。其存在於木質之植物細胞壁上，為三次元網狀結構，基本構成單體為苯基丙烷(Phenyl propane)。期間以 C-C 結合或 ether 結合而成的複雜物質，並且必含有 Methoxyl group (-OCH<sub>3</sub>)。

## 2.4 纖維水解酵素

### 2.4.1 纖維水解酵素介紹

纖維水解酵素最早被研究的時間是在第二次世界大戰的時候，當時美國陸軍在南太平洋地區，所有的衣服、沙袋和帳棚等纖維物質都受到嚴重耗損，所以包括美國陸軍等數個研究單位來解決其中相關的問題(Bhat, 1997)。生物能水解纖維素並加以利用，其能力靠的是纖維水解酵素，根據作用位置的不同分為三類酵素，分別為第一類，內切型纖維水解酶(Endo-1,4- $\beta$ -glucanase)；第二類，外切型纖維水解酶(Exo-1,4- $\beta$ -glucanase)、第三類， $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)。由三類的纖維水解酵素協同作用在不同纖維素的位置將其裂解，水解過程如 Figure 2.6 所示，(1) 先以內切型纖維水解酵素將巨纖維素隨機斷鏈成較短鏈的纖維素，(2) 再以外切型纖維素水解酵素將短鏈的纖維素水解出纖維雙醣或糊精，(3) 最後用  $\beta$ -葡萄糖苷酶將這些纖維糖水解成葡萄糖。

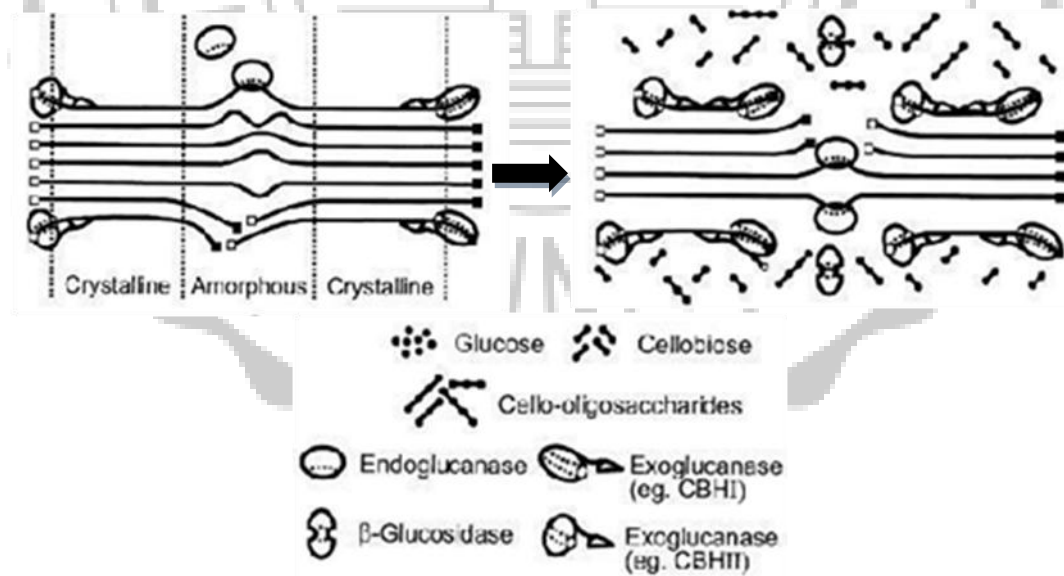


Figure 2.6 纖維水解酵素降解纖維素機制(Lynd et al., 2002)

#### 2.4.2 外切型纖維水解酶( Exo-1,4-β-D-glucanase, E.C.3.2.1.91)

外切型纖維水解酶又為 Avicelase、Cellobiohydrolase、Exocellulase 及 Exo-1,4-β-D-glucanase，這類酵素又可分為 CBHI(從還原端作用)及 CBHII(從非還原端作用) (Miettinen-Oinonen et al.,2005)，主作用於纖維素結晶區尾端，並且逐一將其水解成由兩個單體組成的纖維雙糖(cellobiose)，由作用機制的特性，同時可分解內切型纖維水解酶的產物水解成可溶性的纖維雙糖或纖維糊精(cellodextrin)，也因為如此，外切型纖維水解酵素的活性較其他兩種類的纖維水解酵素低，。

#### 2.4.3 內切型纖維素水解酶 (Endo-1,4-β-D-glucanase, E.C.3.2.1.4)

內切型纖維水解酶又名為 CMCase、endocellulase、endoglucanase 或 β-1,4-glucan glucanhydrolase，主要作用於纖維素分子結構之非結晶區(amorphous region)隨機作用纖維素 β-糖苷鍵(β-1,4-glucosidic bonds)將直鏈結構的纖維素切割成較小的寡糖(cellooligosaccharides) (Lynd et al.,2002)。

#### 2.4.4 β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase, E.C.3.2.1.21)

β-葡萄糖苷酶又名為 Cellobiase (纖維雙糖酶)或 β-1,4-glucohydrolase，主要是將纖維水解產物(纖維雙糖、寡糖)直接水解轉化成葡萄糖，間接地幫助解決 CBH 的抑制物 cellobiose(Beguin and Aubert,1994)

#### 2.4.5 纖維水解酵素來源

根據文獻整理結果，如 Table2.1，可以清楚得知纖維水解菌的來源相當的多，有從昆蟲、土壤、廢棄污泥、腐木、廚餘、反芻動物...等，其中昆蟲及反芻動物以葉子、草為主食，然而消化纖維素主要是腸道內的共生微生物能夠分泌纖維水解酶，有存在纖維素的地方多多少少都能找到纖維

水解菌的蹤跡，其中分泌纖維水解酵素的菌群大部分都來自於細菌、放線菌及真菌。

Table 2.1. 具有纖維水解能力的微生物(Ann N Y Acad Sci.2008 Mar;1125:267-79)

Mesophilic anaerobic bacteria with active cellulolytic systems		Some mesophilic aerobic cellulolytic bacteria	
Microorganism	Habitat	Microorganism	Habitat
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	Sewage sludge	<i>Bacillus megaterium</i>	Soil
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Sewage sludge	<i>Bacillus pumilus</i>	Soil, dead plant
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Bovine rumen	<i>Cellulomonas fimi</i>	Soil
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Soil	<i>Cellulomonas flavigena</i>	Soil, leaf litter
<i>Clostridium aldrichii</i>	Wood digester	<i>Cellulomonas gelida</i>	Soil
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Soil	<i>Cellulomonas iranensis</i>	Forest humus soils
<i>Clostridium cellulofementans</i>	Dairy farm soil	<i>Cellulomonas persica</i>	Forest humus soils
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Decayed grass	<i>Cellulomonas uda</i>	Sugar cane field
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Wood chips	<i>Cellvibrio gilvus</i>	Bovine feces
<i>Clostridium herbicorans</i>	Pig intestine	<i>Cellvibrio mixtus</i>	Soil
<i>Clostridium hungatei</i>	Soil	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soil, water
<i>Clostridium josui</i>	Compost	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Soil
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	Paper mill	<i>Streptomyces cellulolyticus</i>	Soil
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Rumen	<i>Streptomyces lividans</i>	Soil
<i>Ruminococcus albus</i>	Rumen	<i>Streptomyces reticuli</i>	Soil
<i>Ruminococcus flacefaciens</i>	Rumen		

#### Some mesophilic aerobic and anaerobic cellulolytic fungi

<b>Aerobic fungi</b>	<b>Anaerobic Fungi</b>
Habitat: soil, decomposing, wood, agricultural waste	Habitat: rumen and intestinal tract of herbivorous animals
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Anaeromyces mucronatus</i>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Caecomyces communis</i>
<i>Piptoporus betulinus</i>	<i>Cyllamyces aberensis</i>
<i>Pycnoporus ciinnabarinus</i>	<i>Neocallimastix frontalis</i>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Orpinomyces</i> sp.
<i>Serpula lacrymans</i>	<i>Piromyces</i> sp.
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	<i>Piromyces equi</i>
<i>Trichoderma reesei</i> ( <i>Hypocrea jecorina</i> )	<i>Piromyces</i> sp. Strain E2

## 細菌

細菌為一單細胞，由於細菌的體積細小，有十分高的面積／體積比，這樣的特性使牠們能快速的把溶解性的基質吸收至細胞內。因此。相較於其他大型為生物更能稱為優勢族群(Tuomela *et al.*, 2000)。當中以*Bacillus sp.*、*Thermomonospora sp.*、*Pseudomonas sp.*及*Cellulomonas fimi*為目前已知的細菌群中具有較強木質素降解能力的物種。目前研究較為透徹的菌屬為*Cellulomonas fimi* 可以產生多種的內切型纖維水解酶(endo-glucanase)。

## 放線菌

放線菌是一類革蘭氏陽性菌，他們具有分支的纖維和繁殖用的孢子，曾被認為是介於細菌與黴菌之間的物種。它們通常出現在堆肥的高溫和冷卻腐熟期，並且偶爾生長大得能以肉眼於堆肥表面看到。放線菌能降解某些纖維素及可溶性的木質纖維，而且牠們比真菌能忍受更高的溫度及pH。因此，放線菌在堆肥高溫期是重要的纖維木質類有機物降解的貢獻者。目前以*Streptomyces sp.*研究較其他放線菌詳盡，有文獻指出*Streptomyces reticuli*可以分泌出外切型纖維水解酶(Exo-glucanase)與 $\beta$ -glucosidase，可有效分解纖維素(Heupel *et al.*,1993)。

## 真菌

真菌能分泌出纖維水解酶於細胞之外，加上真菌可利用菌絲穿透纖維素產機械力破壞，因此對結晶型纖維素具有相當強的分解能力(Low *et al.*,1987)。在真菌群中以*Aspergillus sp.* 和 *Trichoderma sp.*被研究與運用最為廣泛。



Table 2.2 現有已發表具有外切型纖維水解能力的真菌

Fungi	IFPU (U/mL)	Average	Avicelase (U/mL)	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	0.0055-0.33	0.123	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus flavus</i>	0.117-0.163	0.137	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus niveus</i>	0.287	-	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus terreus</i>	0.069-0.3	0.164	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus fumigates</i>	0.27	-	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.009-0.3	0.188	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus wentill</i>	0.081	-	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Cladosporium</i> sp.	0.052	0.052	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Ahernaria</i> sp.	0-0.205	0.056	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Fusarium</i> sp.	0-0.059	0.023	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Neocallimastix frontalis</i>	0.067 U/mg	-	0.132U/mg	Li et al.,1991
	-	-	0.32	Mountfort et al.,1985
<i>Penicillium janthinellum</i>	0.24-0.55	0.36	-	Adsul, 2004
<i>Pencillium</i> sp.	0-0.139	0.078	-	Jahangeer et al.,2005
	0.973	-	-	Hao et al.,2006
<i>Rhizopus</i> sp.	0-0.222	0.103	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.034	0.034	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.059	0.059	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Trichoderma Pseudokoninigi</i>	0.059	0.059	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Trichoderma reesei</i>	0.66±0.13U/mg	-	0.26±0.025U/mg	Fujii et al.,2009
	-	-	0.39±0.004	Boer et al.,2003
<i>Trichoderma viride</i>	0.28-1	0.63	-	Adsul, 2004
		-	0.016	Beldman, 1984

*Aspergillus* sp. 是 1990 年期間被學者發現能夠生產出高活性的葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase) 也成為近幾十年熱門的研究對象之一 (Gokhale et al.,1991)。  
*Trichoderma* sp. 中 *T.reesei* 因為具有完整的纖維素分解酵素系統包括 EGI 與 EGII 兩種內切型纖維水解酵素 (endo-glucanase) 及 CBHI 與 CBHII 兩種外切型纖維水解酶 (exo-glucanase) 其中 CBH I 的活性約佔整體活性的 60% , CBH II 約 20% , EG I 和 EG II 約各佔 10% , 而  $\beta$ -glucosidase 的活性約只

有 1% (Uusitalo et al., 1991)，因為其具有很高的 CBH 的活性，因此配合上其他的纖維素分解酵素能夠很有效率的分解結晶型纖維。目前有文獻紀錄一部分的真菌物種並確定分泌的酵素是屬於三類纖維水解酵素，其中能被測到活性高並且已被大家廣泛研究或應用高活性的以內切型纖維水解酵素的真菌佔大多數，文獻都利用與非結晶區纖維素結構相似的 Carboxymethyl cellulose (CMC) 作為測試內切型纖維水解酵素的基質，；能生產  $\beta$ -葡萄糖苷酶的真菌菌種數量次之，其中  $\beta$ -葡萄糖苷酶在水解纖維素系統中主要扮演的是降解纖維雙糖的角色，因此文獻多以纖維雙糖或者以人工合成 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) 測試其活性，因為水解 pNPG 後會釋放出與酵素活性成正比的呈色基數量，依照呈色基釋放的多寡會影響反應的顏色深淺，因此可以直接測試吸光值並回推其活性而不用如纖維雙糖一樣，在降解完纖維素後須再多一項還原糖測試才能得知其活性高低；而能夠分泌高活性外切型纖維水解酵素真菌物種相對較稀有，由於每單位外切型纖維水解酵素每次反應只能從纖維素尾端部分切出一單位的纖維雙糖，因此無法像酵素 EG 或 BGL 有較高的反應效率，加上外切型纖維水解酶是在水解結晶型纖維上扮演著重要角色，因此持續發掘能分泌有潛力的外切型纖維水解酵素的真菌，並精進其降解活性是眼前發展纖維酒精重要的一環，至今為止也有許多纖維水解真菌的相關研究並且測試其纖維水解活性，如 Table 2.2。過去文獻使用不可溶的微晶纖維素來測試這類的酵素，微晶纖維素 Avicel PH101 是由植物所取得的  $\alpha$ -纖維素經過特殊處理去除非晶型纖維素後所得到的高度結晶纖維素，其成分有 97% 以上是纖維素 (Yang et al., 2006)，而近期也有部分文獻直接利用  $\alpha$ -cellulose 或者 filter paper 測試活性以作為外切型纖維水解酵素的參考。

Table 2.3 現有已發表具有內切型纖維水解能力的真菌

Fungi	CMCase(U/mL)	Average	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	0.005-0.415	0.193	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus flavus</i>	0.049-0.075	0.06	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus niveus</i>	0.276	-	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus tereus</i>	0.031-0.337	0.14	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.108	-	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.042-0.367	0.16	Jahamgeer et al.,2005
<i>Aspergillus wentill</i>	ND	-	Jahamgeer et al.,2005
<i>Bacillus sp. KSM N252</i>	1.9	-	Weber et al.,2005
<i>Neocallimastix frontalis</i>	7.76 U/mg	-	Li et al.,1991
<i>Penicillium janthinellum</i>	5.7-21.5	8.4	Adsul, 2004
<i>Pencillium sp.</i>	0-0.075	0.045	Jahamgeer et al.,2005
	0.853	-	Hao et al.,2006
<i>Ahernaria sp.</i>	0-0.382	0.106	Jahamgeer et al.,2005
<i>Fusarium sp.</i>	0-0.084	0.059	Jahamgeer et al.,2005
<i>Rhizopus sp.</i>	0-0.234	0.141	Jahamgeer et al.,2005
<i>Steptomyces drodowiczii</i>	0.595 U/mg	-	de Lima, 2005
<i>Trichoderma reesei</i>	4.52±1.32U/mg	-	Fujii et al.,2009
<i>Trichoderma viride</i>	13.1 U/mg	-	Beldman, 1985
	4.2-33.8	12.23	Adsul, 2004

Table 2.4 現有已發表具有分泌β-葡萄糖苷酶能力的真菌

Fungi	pNPGase (U/mL)	Average	Cellubiosase (U/mL)	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	25	Pandey, 1999
<i>Neocallimastix frontalis</i>	3.3	-	-	Li et al.,1991
	0.35 U/mg	-	-	Mountfort et al.,1985
<i>Neurospora crassa</i>	0.58	-	-	Romero, 1999
<i>Penicillium janthinellum</i>	2.31 U/mg	-	-	Adsul, 2004
<i>Penicillium sp.</i>	0.1-4.1	-	-	Hao, 2006
<i>Trichoderma reesei</i>	1.2±0.2 U/mg	-	-	Funjii et al.,2009
<i>Trichoderma viride</i>	0.4 U/mg	-	0.19 U/mg	Beldman, 1984
	0.06-0.33	0.22	-	Adsul, 2004

從生物所獲取到纖維水解酵素都有其最佳的反應條件，以真菌為例，如 Table2.3，大多數的菌株所分泌的纖維水解酵素最佳反應條件約介於 pH4~6 之間，皆屬於適合在偏酸性的環境下反應；溫度位於中溫( $\geq 20^{\circ}\text{C}$ )與高溫( $\geq 45^{\circ}\text{C}$ )的條件範圍。在商業化纖維水解酵素中為了能夠充分地降解纖維素，會加入其他種類的纖維水解酵素進行協同作用，並測試出最佳的酵素配比。因此參入酵素的最佳化條件必須互相吻合才有辦法充分發揮酵素本身的降解能力，除了最佳化條件外，pH 值穩定性與溫度穩定性也是決定一株真菌是否有發展潛力的因素之一，在考量反應時間的對於酵素的影響下，一個酵素在長時間反應下是否能夠保有一定水平的活性並持續作用更是一個在實際應用上不可忽略的因素之一。

Table2.5 目前已發表來源於真菌的纖維水解酵素之最佳溫度、pH 值反應條件與溫度與 pH 值穩定性範圍

Fungi	pH	pH stability	Temp ( $^{\circ}\text{C}$ )	Thermo-stability	Reference
<i>Aspergillus</i> sp.	5.00	-	70	-	Howard et al.,2003
	4.00	-	55	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Aspergillus nidulans</i>	5.0	-	45	-	Howard et al.,2003
<i>Achlya bisexualis</i>	6.0	-	30	-	Howard et al.,2003
<i>Orpinomyces</i> sp.	5.8	-	45	-	Howard et al.,2003
<i>Penicillium brefeldianum</i>	4.2	-	50	-	Howard et al.,2003
<i>Penicillium decumbens</i>	4.0	-	50	-	Gao et al.,2012
	4.2	-	50	-	Howard et al.,2003
<i>Sclerotium rolfsii</i>	2.9-3.3	-	72-74	-	Howard et al.,2003
<i>Trichoderma reesei</i>	5.0	-	55	-	Howard et al.,2003
	4.0-5.0	-	55	-	Montenecourt et al.,1979
	5	3.5-5.6	65	62 $\pm$ 2	Boer et al.,2003
<i>Trichoderma viride</i>	5.5	5.5-6.5	40	20-40	Irfan et al., 2012
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	3.5	-	50	-	Howard et al.,2003
	6	6	55	55	Howard et al.,2003

## 2.5 纖維水解酵素之應用

纖維水解酵素除了在生質能方面有貢獻外，在其他方面的運用也是相當重要的角色。在食品加工上，(1)可將食品中纖維素水解改進口感；(2)將纖維素材料進一步醱化作為發酵的碳源 (3)部分食品原料包覆在纖維素內不易被利用時，可藉由纖維素纖維分解酵素之先處理再加以利用，可以得到較高的果汁榨汁率與種子抽油率；(4)在豆類發酵方面，醬油或味增製造時可以利用纖維素纖維分解酵素來去除豆類外皮；(5)纖維素纖維分解酵素還可以將食品原料中纖維素的移除，使香味、酵素等成分亦釋出；(6)可以有效率的將澱粉從穀類或甜蕃茄中萃取出來。(Mandels, 1985)。在動物飼料方面，可以提高寵物對植物纖維成分的利用，減低纖維本身抗營養因子(Jackson,2004)，改善動物對於粗料或含高纖維穀類如大麥、燕麥的利用率(Hesselman, 1986)。在紙業及織品上，外切型纖維素纖維分解酵素具有不改變纖維張力的特性，可用來做特殊的纖維修飾或表面處理，使得材質柔軟或較為光亮(Beguin, 1993)。纖維素纖維分解酵素處理還可以去除胚布表面絨毛，提升布料防起毛球的特性及改善布料吸水等功能。利用耐高溫及耐鹼性的cellulase 來使棉質衣物更加柔軟光亮(Ando,2002)。

## 第三章、材料與方法

### 3.1 實驗流程

本研究架構主要分成四個階段，如 Figure 3.1 所示，首先第一階段是以 *Trichoderma reesei* Rut C30 作為標準並利用酵素活性測試與蛋白質酶譜篩選到有發展潛力的真菌菌株；第二階段要知道該真菌是屬於什麼真菌菌種與對於酵素生產的最佳化的條件(包括最佳化培養條件、最佳化反應條件及穩定性)，詳細步驟流程如 Figure 3.2；第三階段要利用蛋白質電泳與 MUC zymogram 對目標酵素進行蛋白質分析並鑑定其胺基酸序列以便於進一步與菌種基因庫比對是屬於哪種纖維水解酵素；第四階段要根據胺基酸定序結果設計核酸引子以 PCR 嘗試找到目標酵素的基因序列。

### 3.2 儀器設備、培養基與實驗試劑

#### 3.2.1 儀器設備與型號

落地型低溫離心機: Hitachi High-speed Refrigerated Centrifuge CR22G2

恆溫震盪培養箱: YIH-DER LM570R

外校型微量天平: UWE NJW-3000

多孔式微量分光光譜儀: Spectra MAX M5e

恆溫水浴槽: BFT-10

冷凍真空濃縮機: KINGMECH FD2-6P

真空泵: Vacuumer VOP-100

PCR 反應器: GeneAmp PCR system 2700, Applied biosystem, USA

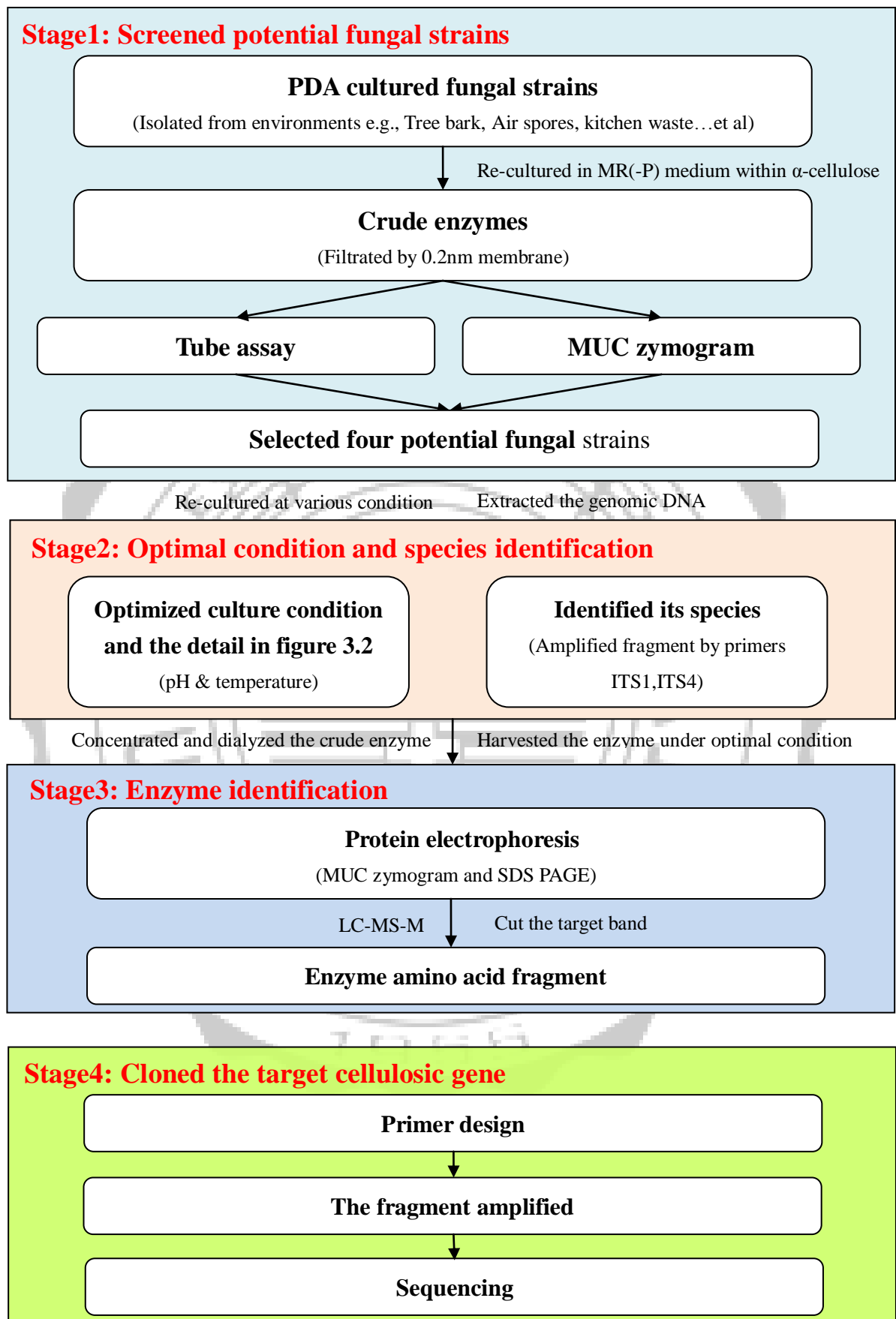


Figure 3.1 Flowchart of experimental design

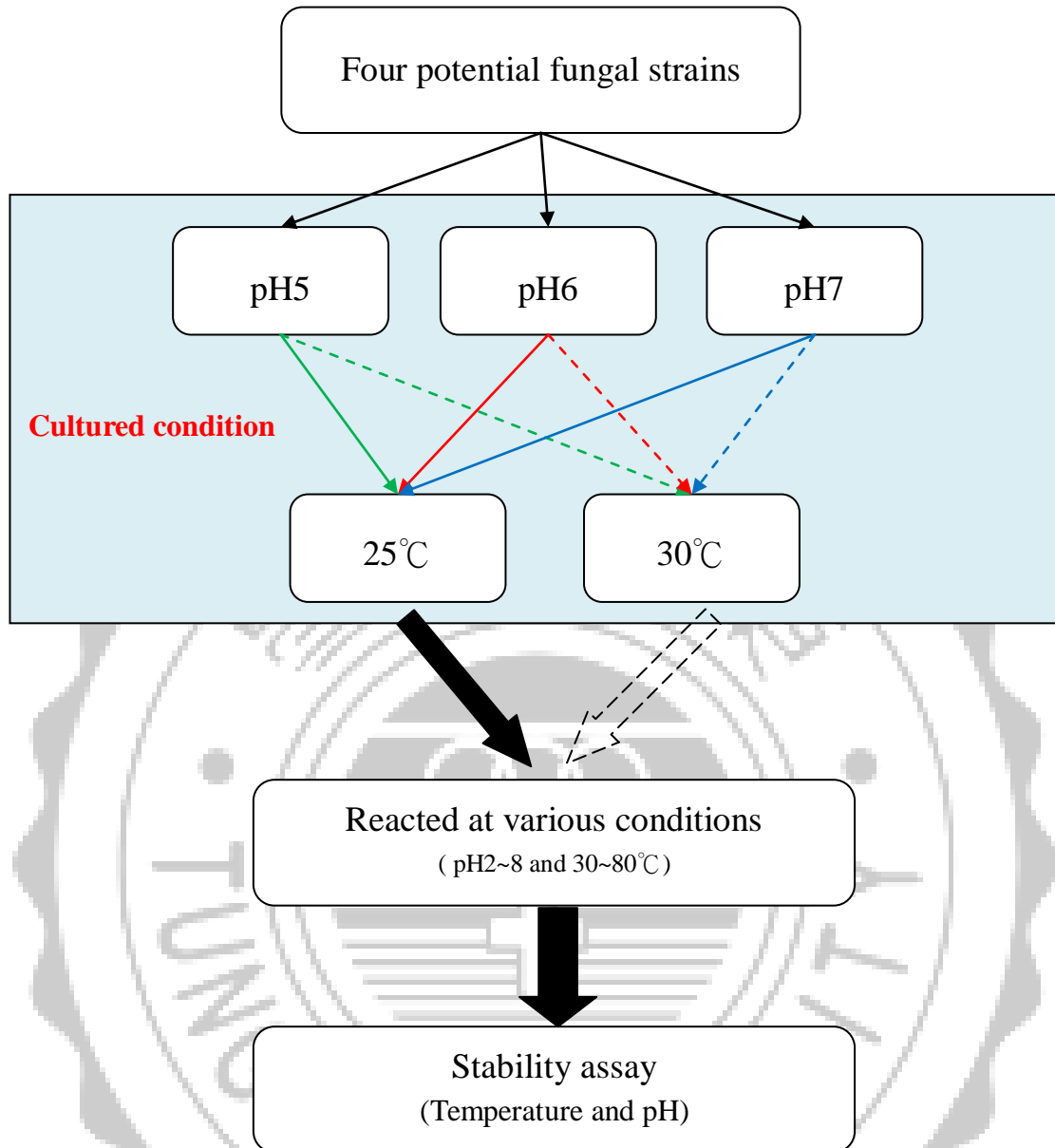


Figure 3.2 Flowchart of optimal conditions assay



### 3.2.2 使用的培養基與成分

本實驗採用 PDA(potato dextrose agar)固態培養基作為樣本初步培養的營養物質，成分包括 0.4% Potato Starch、2% Dextrose 與 1.5% Agar，如 Table3.1 所示，後序利用添加 2% Agar 與 2%  $\alpha$ -cellulose 所配製成的固態 MR (Mandle reese medium)培養基進行確認是否會利用纖維素作為營養源，成分如 Table3.2 所示，最後以液態的 MR 培養基對分離完成的真菌作液態的培養，以上培養基溶於水中，以高溫高壓滅菌即可到入培養皿待冷卻凝固或儲備待用，MR medium 中的 Urea 需要以 0.2mm 濾膜過濾作為前處理，待 MR medium 滅菌完成並冷卻後於無菌操作台內再加入，而 MR medium + $\alpha$ -cellulose 固態培養基需冷卻至 60°C 以下方可加入 Urea，由於  $\alpha$ -cellulose 為不可溶的纖維素，因此需在凝固之前的每次到入培養皿時事先搖晃均勻以免  $\alpha$ -cellulose 在固定於培養基前沉澱至培養皿底部。

Table 3.1 Potato dextrose agar 配方

成分組成	濃度 (g/L)
Potato starch	4.0
Dextrose	20.0
Agar	15

Table 3.2 Mandle Reese medium 配方

成分組成	濃度 (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4
6M Urea	800 $\mu$ L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
CaCl <sub>2</sub>	0.34
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.3
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.00005
MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.000016
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.000014
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.00002

### 3.2.3 酵素活性分析緩衝液與試劑

本研究對於酵素活性的測試中會將特定(CMC、Avicel 及 pNPG)基質溶於 pH 值調整好的緩衝溶液裡以達到控制反應 pH 值，而在最佳化 pH 值反應實驗中會需要多種 pH 值的條件，然而每個緩衝溶液都有本身適合的 pH 調整範圍，因此在配製不同 pH 值基質的溶液時是需要挑選不同的 pH 值範圍所對應的緩衝溶液。在本研究中所使用的緩衝溶液有醋酸鈉緩衝溶液、磷酸鈉緩衝溶液與 Tris-HCl 緩衝溶液。

**醋酸鈉緩衝溶液**適合調整的 pH 範圍是 pH 4-5，配製時需要預先準備的儲備溶液為 0.2 M Solution A ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 27.22 g/L)、0.2 M Solution B  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 。配置 1L pH4 醋酸緩衝溶液時 Solution A : Solution B 為 180:820 (v/v)；配置 1L pH5 醋酸緩衝溶液時 Solution A : Solution B 為 700:300 (v/v)。

**磷酸鈉緩衝液**適合調整的 pH 範圍是 pH 6-7，配製時需要預先準備的儲備溶液為 0.2 M Solution A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 27.6 g/L)與 0.2 M Solution B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 28.4g/L)。配置 1L pH6 磷酸緩衝溶液 Solution A : Solution B 為 877:123 (v/v)；配置 1L pH7 磷酸緩衝溶液 Solution A : Solution B 為 390:610 (v/v)。

**Tris-HCl 緩衝溶液**適合調整的 pH 範圍是 pH 8-9，取 12.114 g 的 Tris 溶於 ddH<sub>2</sub>O 配製成 0.1M Tris buffer 再以 HCl 滴定至 pH 8 或 9。

而在酵素活性測中，還原糖實驗是酵素與基質反應後產物的檢測方法，當中的 **DNS 反應試劑**在還原糖定量上扮演了重要角色，欲配置 1L DNS 反應試劑須將 10g 3,5-Dinitrosalicylic acid、300g K-Na-tartrate、16g NaOH 溶於 ddH<sub>2</sub>O 中，由於 3,5-Dinitrosalicylic acid 難溶於水，因此須利用磁石攪拌器長時間攪拌並且要避開光線照射，建議配製完後置於黑暗處 1 星期後再使用。

### 3.3 菌株培養與純化

#### 3.3.1 菌株來源

本研究所採用的真菌菌株多數來自於東海大學生命科學系真菌實驗室保存的氣生真菌菌株，與部分從廚餘、落葉堆肥、廢水等環境中分離出較為優勢真菌菌株；為了便於判別有無發展潛力的真菌，因此從中央研究院植物與微生物研究所取得的 *Trichoderma reesei* Rut C30 作為標的，同時為批次培養與活性測試的菌株之一，共 106 株真菌菌株。

#### 3.3.2 菌株純化

本研究以 PDA (potato dextrose agar) 固態培養基作為初步培養，主要目的是要使樣本中大部分的真菌群在培養基上呈現出來，再利用經過火烤過的無菌接種環或者經過滅菌釜滅菌完成的牙籤挑出單一種真菌菌絲或真菌孢子再轉殖至 PDA 作菌株分離 (註:倘若長出並非單一種真菌，須再次執行此步驟)，或轉殖至 MR(-P)+acellulose 固態培養基，根據菌落大小初步判斷該菌株是否會利用纖維素當作碳源，以推測有沒有纖維水解能力。根據本研究的經驗，生長周期較短或者生長環境屬於營養物質比較缺乏的真菌(例如:氣生真菌)，其孢子在真菌轉殖的實驗過程中容易有逸散置空氣中，常常會造成其他培養樣本的污染，為了降低空氣中真菌孢子的污染，在轉殖過程確實靠近地火源並將轉殖所用的工具都經過 75% 酒精消毒與火焰上燒烤完成後續消毒動作，同時在實驗完成後操作台還需以 75% 酒精擦拭過及紫外光消毒以確保無真菌孢子殘留導致。

#### 3.3.3 菌株液態培養

在三角錐型瓶內加入最後總體積 2% 的  $\alpha$ -cellulose 並以鋁箔紙封住瓶

口，利用高溫高壓滅菌除去微生物的污染。在無菌操作台內將純化後培養在固態培養基的真菌以鑽孔器在培養基鑽出約 5~6 顆的菌體，轉殖至滅菌完的三角錐型瓶內，最後倒入 100mL 的液態 MR(-P) medium，在室溫下置於平台式震盪器以 150rpm 下進行震盪培養。在培養期間每天須在固定時間抽取培養基作為樣品，每瓶樣品取 1.5mL 後以 10000rpm 進行離心並取上清液保存在 4°C 低溫，作為後續活性測試的粗酵素。

註：鑽孔器對每單一種真菌使用完後需以 75% 酒精與在火焰上烤過進行兩道步驟消毒以確保無污染之虞。

### 3.4 纖維水解酵素之活性測試

藥品：Dinitrosalicylic acid Reagent (DNS)、Carboxymethyl cellulose(CMC)、Avicel PH -101、4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside(pNPG)、醋酸緩衝液。

原理：

內切型與外切型纖維素水解酵素水解受質後會從還原端與非還原端產生還原糖，DNS 與還原糖結合後顏色會發生變化，從原來的淡黃色變成暗紅色，依還原糖濃度越高顏色越深。利用 Spectra Max M5e 測量波長 550nm 下的讀值為有效範圍內的讀值，可使用葡萄糖作為標準品定量多少葡萄糖濃度為多少吸光值，作標準曲線計算出酵素的活性 (Miller,1959)。對於 beta-glucanase，採用的基質是 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG)，經由酵素水解後會釋放出呈色的官能基，此官能基在波長 405nm 下的讀值為有效讀值，對應經由不同濃度 pNP 測出的檢量線可該酵素的相對活性。

### 3.4.1 CMCase activity (Endo-glucanase)

取粗酵素 200  $\mu\text{l}$  與 200  $\mu\text{l}$  pH5 2% Carboxymethyl cellulose(CMC) Buffer 等體積混和，最終 CMC 反應濃度為 1%，置於 55°C 下反應 10 分鐘，加入等體積 400  $\mu\text{l}$  的 DNS Reagent 於 100°C 反應 10 分鐘後以水浴冷卻並離心取上清液 200  $\mu\text{l}$  加入 96 孔盤，利用 Spectra Max M5e 以波長 550nm 讀取吸光值。由於 DNS 會與還原糖進行反應呈色影響吸光讀值，因此須扣除酵素液本身含有的背景值，需做一組控制組。控制組做法與實驗組無異，差別在於須將粗酵素預先以 100°C 加熱使其失活即為控制組。將實驗組於 550 nm 波長下的讀值扣除控制組於 550 nm 波長下的讀值，對照由不同濃度的葡萄糖為標準品所配製減量線(附錄一)得到該產物濃度，經公式(3-1)換算得到數值單位為 U/mL 表示。

### 3.4.2 Avicelase activity (Exo-glucanase)

取粗酵素 200  $\mu\text{l}$  與 200  $\mu\text{l}$  2% avicel Buffer(調製 pH5)等體積混和，最終 avicel 反應濃度為 1%，置於 55°C 下反應 60 分鐘，離心後取上清液 200 $\mu\text{l}$  加入等體積 200  $\mu\text{l}$  的 DNS Reagent 於 100°C 反應 10 分鐘後以水浴冷卻並離心取上清液 200  $\mu\text{l}$  加入 96 孔盤，利用 Spectra Max M5e 以波長 550nm 讀取吸光值。由於 DNS 會與還原糖進行反應呈色影響吸光讀值，因此須扣除酵素液本身含有的背景值，需做一組控制組。控制組做法同上。將實驗組於 550 nm 波長下的讀值扣除控制組於 550 nm 波長下的讀值，對照由不同濃度的葡萄糖為標準品所配製檢量線(附錄一)得到該產物濃度，經公式(3-2)換算得到數值單位為 U/mL 表示。

註：Avicel 為不可溶的結晶型纖維素，因此再使用前須搖晃均勻方可使用。

### 3.4.3 pNPGase activity (Beta-glucosidase)

取粗酵素 200  $\mu\text{l}$  與 200  $\mu\text{l}$  pH5 10mM 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) Buffer 等體積混和，最終 pNPG 反應濃度為 5mM，置於 55 $^{\circ}\text{C}$  下反應 5 分鐘，取上清液 200  $\mu\text{l}$  加入 96 孔盤，利用 Spectra Max M5e 以波長 405nm 讀取吸光值。由於 pNPG 經水解後會產生呈色基，因此須扣除酵素液本身含有的背景值，需做一組控制組。控制組做法同上。將實驗組於 405nm 波長下的讀值扣除控制組於 405 nm 波長下的讀值，對照由不同濃度的 pNP 為標準品所配製檢量線(附錄二)得到該產物濃度，經公式(3-3)換算得到數值單位為 U/mL 表示。

( $\text{OD}_r$ :反應完所測得讀值，  $\text{OD}_b$ :空白組)

$$\text{CMCase 蛋白活性} = (\text{OD}_r - \text{OD}_b) / 0.0025 / 180 \times 1000 \times 0.004 / 10 / 0.2 \quad (3-1)$$

$$\text{Avicelase 蛋白活性} = (\text{OD}_r - \text{OD}_b) / 0.0025 / 180 \times 1000 \times 0.004 / 60 / 0.2 \quad (3-2)$$

$$\text{pNPGase 蛋白活性} = (\text{OD}_r - \text{OD}_b) / 4.59963 \times 1000 \times 0.004 / 60 / 0.2 \quad (3-3)$$

## 3.5 纖維水解酵素之最佳化條件與 4 小時穩定性測試

### 3.5.1 最佳化生長與反應條件(溫度與 pH 值)

本研究主要對外切型纖維水解酵素進行最佳化條件測試，最佳化條件是針對該真菌如何分泌出最好的纖維水解酵素，探討從生長條件(溫度及 pH 值)到反應條件(溫度及 pH 值)等各項影響因子，並找出該條件使其能產出活性較高的纖維水解酵素。以 pH 5、6、7 的 MR(-P) medium 添加 2%  $\alpha$ -cellulose 做為碳源在溫度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$  下進行培養。收取該酵素需用 4 $^{\circ}\text{C}$  低溫離心機以 1000rpm 10 分鐘離心後取上清液，再以孔徑 0.2 $\mu\text{m}$  濾膜過濾以去除多餘的雜質與微生物得到該真菌的粗酵素，最後再以 4 $^{\circ}\text{C}$  低溫保存。取 pH 2、3、4、5、6、7、8、9 的 Avicel Buffer 200  $\mu\text{l}$  分別加入各

200  $\mu$ l 的粗酵素並在特定溫度下反應(30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C)1 小時，最後測試各條件反應下的還原醣濃度。

### 3.5.2 酵素之 4 小時熱穩定性

取經過最佳化條件(培養及反應)試驗所得到相對較高活性的粗酵素定量至 10 mg/L 蛋白濃度，各放置於 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 的環境下 4 小時後，與 2% Avicel buffer 以 1:1 與樣本混和並在最佳反應條件下反應利用 DNS 還原醣測定法求得 550 nm 的吸光度讀值，依據公式換算結果，得知不同溫度下酵素的熱穩定度。(詳細步驟請參考 3.3.2)

### 3.5.3 酵素之 4 小時 pH 穩定性

取經過最佳化條件(培養、反應)試驗所得到相對較高活性的粗酵素定量至 10 mg/L 蛋白濃度，各放置於 pH 2、3、4、5、6、7、8、9 的環境下 4 小時後，與 2% Avicel buffer 以 1:1 與樣本混和並在最佳反應條件下反應利用 DNS 還原醣測定法求得 550 nm 的吸光度讀值，依據公式換算結果，得知不同溫度下酵素的熱穩定度。(詳細步驟請參考 3.3.2 Avicel activity)

## 3.6 以分子生物技術應用於真菌菌種鑑定

### 3.6.1 染色體 DNA 萃取

本研究萃取 DNA 是採用 Genomic DNA Extraction Kit (Fast ID)，首先須收取由液態培養後的液體約 1~1.5 mL，以 10000 rpm 離心 10 分鐘後到去上清液，倒入些許的小玻璃珠或小鋼珠並加入 1000 $\mu$ l 的 Genomic Lyse Buffer 與 10  $\mu$ l 的 proteinase K solution(濃度為 10mg/ml)，Vortex 震盪 5~10 分鐘，以物理破碎使細胞的 DNA 釋放出來，再放入 65°C 水浴槽反應 10~30

分鐘使 Genomic Lyse Buffer 與 proteinase K solution 充分作用，讓 DNA 更容易完全的逸散至 Solution 中。以 10000 rpm 離心 5 分鐘並取上清液 500  $\mu$ L 至新的 2 ml 的離心管中，加入等量的 Genomic Bind Buffer 輕微震盪(短時間內有成色變化以 HCl 調整至 pH 5~6)使逸散於 Solution 的蛋白質變性，以 10000 rpm 離心 5 分鐘將變性的蛋白質與質體殘留的碎片沉澱，後將上清液加入 DNA binding column 以離心方式過濾。用 600  $\mu$ l 的 Genomic wash buffer 以離心方式沖洗(須有 collect tube 盛裝)，以 800  $\mu$ l 的 75%酒精以離心方式沖洗(須有 collect tube 盛裝)，需操作 3 次帶完全洗去 wash buffer。再經過 10000 rpm 離心 5 分鐘後確定久經完全揮發，將 DNA binding column 接上 1.5 ml collection tube 並加入 100  $\mu$ l 的 1 $\times$ TE buffer 在 65 $^{\circ}$ C 5~10 分鐘使 DNA 回溶，最後以 10000 rpm 離心約 30 秒，DNA solution 即在 1.5 ml collection tube 中。

### 3.6.2 利用聚合酶連鎖反應對 ITS rDNA 片斷擴增與鑑定

(Polymerase Chain Reaction, PCR)

取得染色體 DNA 並以之為模板，利用 PCR 放大真核生物之 ITS rDNA 區間，此區間於不同種類的真核生物有著許多不同的 gap，因此具有高度鑑別性。利用在此區間序列的 Forward primer ITS1 與 Reverse primer ITS4(如表 Table 3.3)對真菌的染色體 DNA 進行 PCR 放大，其引子主要擴增的 rDNA 位於 ITS1 rDNA 與 ITS2 rDNA 區間，製備好 PCR 混合藥劑配合加溫程式進行片斷擴增(Table 3.3)。以 0.3 mg 的 agarose 與 20 mL 的 1X TAE buffer 於微波爐微坡加熱至 agarose 完全溶解於 1X TAE buffer 中，加入 0.6~1 $\mu$ L ETB 'OUT' 的外染劑並到入鑄膠膜組內，待冷卻凝固完成配製 1.5% 洋菜膠體(agarose gel)後，將 PCR 反應後產物進行電泳分析確認擴增位置與配合 Marker(Smartgene, 100 bp DNA ladder)亮度推測 PCR 產物濃度



是否足夠定序。本研究 DNA 定序是委託明新生物科技公司進行，將定序得到的序列結果進行與 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 的資料庫進行比對分析及鑑定菌種種類。

### 3.6.3 以定序比對結果繪製親緣關係圖與 bootstrap 計算

此方法是根據東海大學生科系真菌實驗室所使用的分析方法。

#### -繪製樹狀圖

首先將定序的結果與 NCBI 資料庫比對，再從 NCBI 資料庫選取與比對結果親緣關係相近的真菌之序列(以 Type sequence 為主)與比對結果以 Fasta 格式整理於 txt 檔，再以 **Clustal X** 軟體進行 Alignment 動作，出現 **XX.aln** 檔(用記事本開啟檔案，再次整理將 sequence 頭尾切齊再儲存)，再以 **Clustal X** 軟體讀取整理後的 **XX.aln** 檔並於再 Alignment 選項下 Output format options 勾選 Phylip，再次進行 Alignment 後會出現 **XX.phy** 檔，把 **XX.phy** 檔放在 **Phylip** 軟體下，開啟 **DNASIST.exe** 程式並輸入檔名 **XX.phy** 後 Enter，使用 Maximum Likelihood 係數或選擇 Jakes-Cantor，按 D 再按 enter，直至選項出現，再輸入 Y 後 Enter 完成設定，會在 **Phylip** 下出現 outfile 再更改檔名 如 **XX.dis**，開啟 **NEIGHBOR.exe** 程式並輸入檔名 **XX.dis** 後 Enter，輸入 O 後 Enter 可指定 outgroup (根據 txt 檔序列順序輸入數字，如 11 Enter)，再輸入 Y 後 Enter 完成設定，會在 **Phylip** 下出現 treefile 再更改檔名 如 **XX.tre**，以 WORD 檔開啟，確認出現之數值為正值 如為負則樹狀圖會倒著劃，因此要將數值改為正值，再存檔，將 **XX.tre** 檔以 **Treeview** 軟體開啟即得到親緣分析結果。

-計算親緣樹圖之 bootstrap

1. 首先將 **XX.phy** 檔放在 **Phylip** 軟體下，開啟 **SEQBOOT.exe** 程式並輸入檔名 **XX.phy** 後 Enter，輸入係數 99 後 enter，輸入 R 後 enter 再輸入數值 1000 enter -即 Boot 作 1000 次，同意設定則按 Y enter (會進行一小段時間)，會在 **Phylip** 下出現 outfile 再更改檔名 如 **XX.bot**，開啟 **DNASIST.exe** 程式並輸入檔名 **XX.bot** 後 Enter，使用 Maximum Likelihood 係數或選擇 Jakes-Cantor，按 D 再按 enter，直至選項出現，按 M analyze multiple data sets 再輸入 1000 enter (將 no 改成 yes)，同意設定則按 Y enter (會進行一小段時間)，會在 **Phylip** 下出現 outfile 再更改檔名 如 **XXbot.dis**，開啟 **NEIGHBOR.exe** 程式並輸入檔名 **XXbot.dis** 後 Enter，可選擇選擇 Neighbor-joining 或 UPGMA 分析模式後 enter，輸入 O 後 Enter 可指定 outgroup (根據 txt 檔序列順序輸入數字，如 11 Enter)，按 M analyze multiple data sets 再輸入 1000 enter (將 no 改成 yes)，再輸入 Y 後 Enter 完成設定，會在 **Phylip** 下出現 treefile 再更改檔名 如 **XXbot.tre**，開啟 **CONSENSE.exe** 程式並輸入檔名 **XXbot.tre** 後 Enter，同意設定則按 Y enter，結果會在 **Phylip** 下出現 outfile 再更改檔名 如 **xxcon.out**，以 WORD 檔開啟，可看見樹狀圖上之 bootstrap 數值，但此樹狀圖之相對距離不準，僅可參考數值而已。

Table 3.3 本研究擴增 ITS rDNA 所採用之引子

Primer	Sequence(5'-3')
Forward- ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
Reverse- ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Table 3.4 Reagent and temperature program in PCR

Components		Volume ( $\mu\text{L}$ )		Source	
Master mix		12.5		TaKaRa	
10mM Primer F (ITS1)		1		Scientific Biotech	
10mM Primer R (ITS4)		1		Scientific Biotech	
dH <sub>2</sub> O		8.5		TaKaRa	
Template DNA		2		-	
Reaction	Activation	Denaturation	Annealing	Extension	final
Temp.( $^{\circ}\text{C}$ )	94	94	50	72	72
Cycle		35			
Time(min)	5	1	1	1	10

### 3.7 分析蛋白質之操作與相關技術

#### 3.7.1 粗酵素之預處理

由於在批次培養或最佳化培養所收取下來的酵素濃度偏低加上收取的樣本包含培養真菌的培養基，其中含有些許的金屬鹽類會造成一定程度的干擾，因此須將樣本進行前處理去除干擾物質的動作，如 Figure 3.3。

##### A. 蛋白質冷凍減壓濃縮

欲用冷凍乾燥機(如 Figure 3.3)進行冷凍乾燥濃縮，須將樣本一直保持在低溫-40 $^{\circ}\text{C}$ 的冷凍狀態方可上機濃縮，由於過程都以真空狀態降低真氣壓以提高水分的去除效率，因此上機瞬間會因負壓的關係產生吸力，為了避免樣本會被這吸力影響而被吸出容器外，本研究將 1mL 酵素樣本取至 1.5mL 離心管中再以封口膜(Parafilm)封住管口，再以針頭在封口膜上作出數個小洞，不但可以避免上機時瞬間的吸力將固態的樣本吸出 1.5mL 離心管外，還可以保持濃縮步驟的進行，最後放置於冷凍櫃中直到樣本溫度達約-70 $^{\circ}\text{C}$ 。將以結成冰的樣本迅速裝入濃縮用的模組裡並組裝置是先調整至-40 $^{\circ}\text{C}$ 、0 大氣壓的減壓濃縮機，操作時間的長短須視濃縮情況而定。

## B.粗酵素透析

經過濃縮過的酵素濃縮液，不僅將蛋白質濃度提高，同時也將培養真菌的培養基濃縮，培養基內含有許多金屬鹽類會對往後的實驗造成干擾，因此需要將這些金屬鹽類去除。透析原理是利用 3500 MWCO 透析膜 (SnakeSkin Dialysis Tubing, Thermo) 作為一種對物質通透性的障礙，來達到分離物質的目的，截留住較大分子例如蛋白質。首先裁剪一段長度適當的透析膜並利用夾子夾住一側，注入濃縮酵素於透析膜內且盡量避免產生氣泡，夾住另一側透析膜開口使濃縮酵素不會滲漏，放置 4°C 下於緩衝溶液下不停地攪拌，每隔一小時換一次緩衝溶液，須換 3 次。

### 3.7.2 蛋白質濃度測定

酵素主要是蛋白質的結構，為了定量粗酵素與濃縮後的酵素濃度，利用市售蛋白質分析套件 (Bio-Rad Protein Assay) 進行分析，套件中的試劑含有 Coomassie Brilliant Blue G250，能與蛋白質結合時由紅褐色轉為藍色。取濃縮後的酵素與分析試劑以 1:4(v/v) 比例均勻混合，在室溫下靜置 5 分鐘等待呈色完全，若呈色過深須將濃縮酵素重新稀釋再加入試劑，最後以多孔式微量分光光譜儀在 595nm 波長下測其吸光度。對照以牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 作為標準品所配製的檢量線 (附錄三)，帶入公式得到該蛋白質濃度。

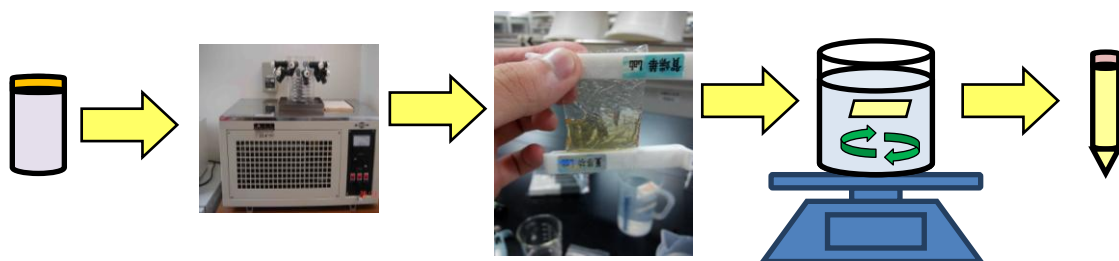


Figure 3.3 纖維水解酵素預處理步驟示意圖

### 3.7.3 Native PAGE 、MUC zymogram & SDS PAGE

材料：

Polyacrylamide Gel Electrophoresis Stock Solution (Filter all solution)

Note: The pH of the solution is adjusted with concentrated HCl

#### 4 X Running Gel Buffer (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8)

36.3 g Tris (FW 121.1)

Add 150 ml H<sub>2</sub>O

Adjust to pH 8.8 with HCl

H<sub>2</sub>O to 200 ml

Store up to 3 months at 4°C in the dark.

#### 4 X Stacking Gel Buffer (0.5 M Tris-Cl, pH 6.8)

3.0 g Tris (FW 121.1)

Add 40 ml H<sub>2</sub>O

Adjust to pH 6.8 with HCl

H<sub>2</sub>O to 50 ml

Store up to 3 months at 4°C in the dark.

#### 10 % SDS

10 g SDS

H<sub>2</sub>O to 100 ml

Store up to 6 month at room temperature.

#### 10 % Ammonium Persulfate (Initiator)

0.1 g ammonium persulfate

H<sub>2</sub>O to 1.0 ml

Use fresh; do not store

**2 X Treatment Buffer (0.125 M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % v/v Glycerol, 0.2 M DTT,**

0.02 % Bromopheno Blue, pH 6.8)

2.5 ml 4 X stacking gel buffer

4.0 ml 10 % SDS

2.0 ml glycerol

2.0 mg bromopheno blue

0.31 g dithiothreitol (DTT; FW 154.2)

H<sub>2</sub>O to 10.0 ml

Store 0.5 ml aliquots at -20°C for up to 6 months.

**5X Treatment Buffer (-Mercaptoethonal)**

10 ml Glycerol

2g SDS

5.12 ml -Mercaptoethonal

4.26 ml 0.5M Tris -HCl pH 6.8

10 mg Bromophenol blue

**Staining Solution (0.025 % Coomassie Brilliant blue R 250, 40 % methanol,**

**7 % acetic acid)**

0.5 g Coomassie Brilliant blue R 250

800 ml methanol

Until dissolved, Then add:

140 ml acetic acid

H<sub>2</sub>O to 2 L

**10 X Tank Buffer (0.025M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3)**

30.28 g Tris (FW 121.1)

144.13 g glycine

10 g SDS

H<sub>2</sub>O to 1 L

**Destaining Solution (40 % methanol, 7 % acetic acid)**

400 ml methanol

70 ml acetic acid

H<sub>2</sub>O to 1 L

原理：SDS-PAGE 是利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate) 附著於蛋白質疏水區表面，由 SDS 所帶之負電荷引導泳動。由於蛋白本身所帶電荷遠小於 SDS 所帶之電荷，因此蛋白質本身的電荷對於泳動較無影響，泳動率決定於蛋白質分子量，故 SDS-PAGE 適合用來分辨蛋白質分子量大小。處理過程中，利用加熱破壞蛋白質的三級及四級結構，使蛋白質分子內部的疏水區暴露而與 SDS 結合；同時還加入  $\beta$ -mercaptoethanol(還原劑) 來破壞蛋白質分子內的雙硫鍵，使得蛋白質 unfolding，排除不同 folding 形式對於泳動的影響。相反的 Native PAGE 在未加 SDS 的情況下能在電泳中保持其形狀與電荷，根據蛋白質遷移率以及凝膠的分子篩的作用可得到明顯的分辨率，在電泳分離後能保持原有的大小與活性，可以做為蛋白鑑定的重要依據。

鑄膠方法：

(1)鑄下層膠(Running Gel)：

將鑄膠模組組裝好後，先用 ddH<sub>2</sub>O 水注滿試車確認模組組裝完整，確認後將水倒出並且利用紙巾稍微將模組內部多餘的水吸乾。依照 Table 3.5 中藥品比例混合，並選擇樣品適合的膠體濃度。在配置膠體溶液時，TEMED 溶液必須最後加入並混合均勻，以避免膠體濃度還未平均時就開始凝固，在注入模組時膠體高度約佔玻片的 3/4 高，加完後立即於膠體液面上方加入 95% 乙醇，以去除在混合過程中產生的氣泡及壓平膠體液面。約靜置約 1 小時待凝膠完成後倒出上層的 95% 乙醇，並用 ddH<sub>2</sub>O 潤洗，即完成下層膠之製作。

(2)鑄上層膠(Stacking Gel)：

依照 Table 3.5 中藥品比例混合均勻且避免產生氣泡，並選擇所需之齒

梳於注膠後立即插入，約靜置半小時後凝膠完成，即完成上層膠之製作。

註: Native PAGE 的上層膠與下層膠不需要加入 10% SDS。

### (3) 進行凝膠電泳分析:

取蛋白質樣本溶液，加入適量追蹤染料(配方如 Table 3.6)，混勻後於 100°C 加熱 10 分鐘。由於加熱會使水氣蒸散置微量離心管上蓋，因此加熱後需離心。依序將蛋白質樣本注入後，裝上電源蓋以 90~110 伏特進行電泳。通電後兩極附近會立刻產生無數細微氣泡，是辨別是否有通電的依據。  
註: Native PAGE 的追蹤染劑不須加入 SDS 也無需加熱以保持酵素原有的蛋白質活性。

### (4) MUC zymogram

將完成 Native PAGE 分析的膠片先行浸泡於該酵素最佳反應 pH 的緩衝溶液中以使膠片調整至酵素最佳反應的條件，再將膠片於相同 pH 並溶有 MUC (4-methylumbellifery-1- $\beta$ -D-cellobioside) 的緩衝溶液並置於最佳反應溫度中以 15~20 rpm 輕微震盪，待 15~20 分鐘後將膠片取出放在 UV 光下觀察目標蛋白群在蛋白質酶譜的結果。倘若使用 SDS PAGE 進行 MUC zymogram 實驗，酵素在凝膠電泳分析時會先利用 SDS 使酵素變性失去活性，因此膠片在浸泡 MUC 緩衝溶液反應前須以 1% Triton-X-100/50 mM Tris-HCl 的 Renature buffer 進行復性處理以洗去酵素上的 SDS，為了使酵素復性完全需要在固定時間更換 Renature buffer，但由於不同的酵素復性所需的時間長短不一，待更換至第三次時可放置到隔天更可以確保酵素有足夠的時間完成復性處理步驟。



### (5) SDS-PAGE 染色及脫色

將 SDS-PAGE 浸入 CBR (Coomassie Brilliant Blue R-250) 染色液中，CBR 可與蛋白質結合而變色的特性來定量，若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBR 也多，因而呈色較深。染色液(配方 Table 3.7)高度只需覆蓋過膠片即可，蓋上蓋子避免有機溶劑揮發，置於 Shaker 上染色 30 分鐘。倒掉染色液，膠片先用 RO 水沖洗後加入 CBR 脫色液(配方如表十八)；約 10 分鐘換一次脫色液，直到背景清澈透明為止。若蛋白質濃度較低，染色時間可加長增加敏感度。

### 3.7.5 胺基酸序列分析

將經過前處理的酵素於最佳化反應條件下進行 Native PAGE 與 MUC zymogram 分析並找到目標蛋白群大約的位置，將目標蛋白群切下後與前處理後的粗酵素再進行一次 SDS PAGE 分析可以更確定蛋白質明確位置與分子大小，將目標酵素從 SDS PAGE 上切下後送往中央研究院蛋白質體核心研究實驗室 (Proteomics Core Laboratory, Agricultural Biotechnology Center, Academia Sinica) 進行 LC/MS/MS 胺基酸定序。

Table 3.5 蛋白質膠體電泳配方

<b>Running gel</b>				
Final Gel Concentration( 10 mL ; for two gels; 0.75mm thick)				
	7%	8%	10%	12%
30% Monomer Solution	2.3 ml	2.8 ml	3.3 ml	3.96 ml
4X Running Gel Buffer(pH8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml	4.7 ml	4 ml	3.44 ml
Ammonium Persulfate	70 ul	70 ul	70 ul	71 ul
TEMED	5 ul	5 ul	5ul	6ul
<b>Stacking Gel Solution (for two gels)</b>				
Gel thickness	0.75mm		1.5mm	
30% Monomer Solution	0.44 ml		0.88 ml	
4X Running Gel Buffer(pH8.8)	0.83 ml		1.66 ml	
10% SDS	33 ul		66 ul	
H <sub>2</sub> O	2.03 ml		4.06 ml	
Ammonium Persulfate	30 ul		60 ul	
TEMED	4 ul		8 ul	

Table 3.6 蛋白質追蹤染料之配方

成分組成	濃度
Bromophenol blue	1 mg
100% glycerol	5 mL
SDS	1 g
ddH <sub>2</sub> O	5 mL

Table 3.7 CBR 染色液與脫色液之配方

成分組成	CBR 染色液	CBR 脫色液
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	1.5 g	—
Methanol	250 mL	200 mL
Acetic acid	50 mL	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	250 mL	700 mL

## 第四章、 結果與討論

### 4.1 分離/篩選具纖維水解潛力之真菌菌株

本研究總共對 106 株真菌進行纖維水解能力(活性)之篩選，菌株主要取自東海大學生命科學系真菌實驗室從空氣環境中採集之真菌孢子，此外，少數真菌菌株是由腐木、堆肥、廚餘與造紙廢水等環境中所分離的單一菌株。將單一真菌菌株從固態培養基(PDA)轉殖至 MR (-P+ $\alpha$ -cellulose)液態培養基培養持續一星期，每天抽取粗酵素進行纖維水解活性測試及蛋白質酶譜活性分析作為篩選的依據，其中一株真菌 *Trichoderma reesei* Rut C30 是已經被廣泛研究且用來生產商業化纖維水解酵素(C1.5L)的來源菌株，因此做為菌株篩選之活性比較標準。

#### 4.1.1 粗酵素活性測試

在纖維水解酵素活性測試實驗中，根據酵素水解纖維素的作用機制(詳細內容在 2.4 章節)，分別以 Avicel、CMC 及 pNPG 作為測試 Exo-glucanase、Endo-glucanase 及  $\beta$ -glucosidase 的基質。測試結果顯示 *Trichoderma reesei* 在與其他菌株相同反應條件下(pH=5、temp=55°C)所測得的 Avicelase 活性為 0.326U/mL (Figure 4.1)，接近目前已發表的文獻所測得的數值(0.2 ~ 0.39 $\pm$ 0.004U/mL, Boer et al, 2003)其它菌株的活行測試結果與 *T. reesei* 活性比較顯示，有 7 株(13-5-2-2、13-5-3-2、13-6-2A、13-5-1-1、THU4、THU17 與 T-08)真菌具有較高 Avicelase 活性(0.209、0.15、0.131、0.142、0.1024、0.0996 與 0.3181 U/mL)，較接近 *Trichoderma reesei* 所測試的結果，因此初步判斷此 7 株真菌相較其他 99 株真菌是有較高的發展潛力。

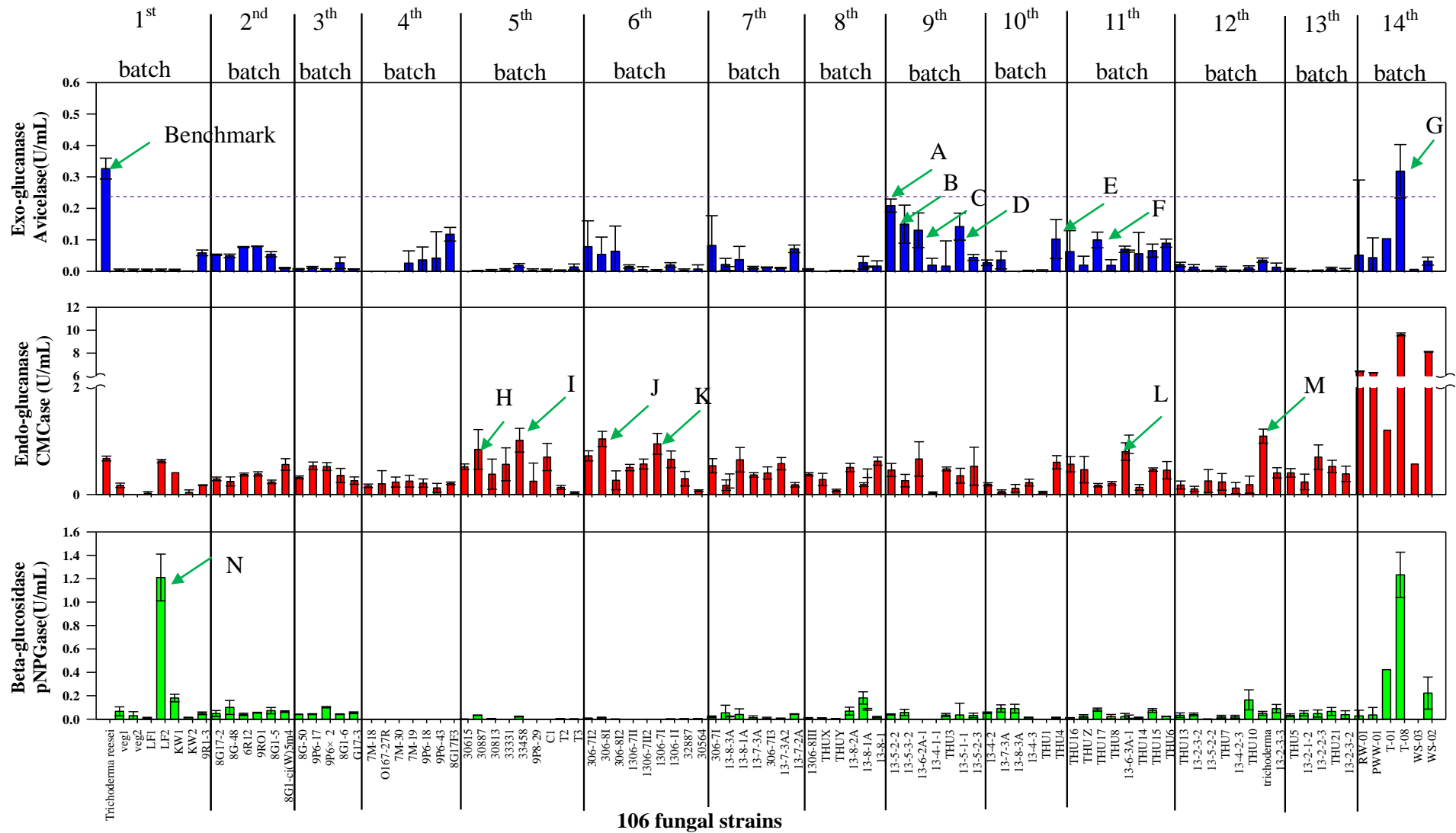


Figure 4.1 106 株纖維水解真菌之酵素活性測試(Benchmark) *Trichoderma reesei* Rut C30, (A) 13-5-2-2,(B)13-5-3-2, (C) 13-6-2A,(D)13-5-1-1,(E)THU4,(F)THU17,(G)T-08,(H)30887,(I)33458,(J)306-8I,(K)1306-7I,(L)13-6-3A,(M)13-2-3-2,(N)LF2

另外有 6 株(30887、33458、306-8I、1306-7I、13-6-3A 與 13-2-3-2)可分泌較佳活性的非結晶纖維水解酵素(CMCCase 活性分別為 0.841、1.012、1.036、0.945、0.937、1.088 U/mL)。Avicelase 的活性普遍比 CMCCase 低是因為酵素的作用方式不同，Avicelase 主要從結構緊密的結晶纖維素尾端逐一降解出纖維雙糖，因此作用效率較低；CMCase 則是從結構較鬆散非結晶纖維素的中間以一分為二的方式作用，其效率遠比 Avicelase 來的高，因此在還原糖測試中，內切型纖維水解酵素反應所測得的還原糖量會高於外切型纖維水解酵素的反應。即使如此，仍然有菌株在 CMCCase 活性測試結果較低甚至幾乎測不到的情況，因為有些菌株只能生產一種至兩種纖維水解酵素，加上地域上環境的差異(例如:生長環境無遮蔽物以至於陽光照射時間較長、長時間生長在高營養物質充裕的地方等)而產生異變導致降解纖維素的能力的不同。

在  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性測試實驗中，僅有 LF2 與 T-08 真菌菌株的粗酵素測出較高的 pNPGase 活性(1.211 與 1.1233 U/mL)。目前市售的酵素中，有些常被用來發展商業化  $\beta$ -glucosidases 酵素的真菌菌株 如 *Aspergillus* sp. 或 *Penicillium* sp. ....等，而在現有文獻中指出 *Penicillium* sp.對 pNPGase 活性測試得知介於在 0.1~4.1 U/mL 範圍 (Hao et al, 2006)，本研究中的 LF2 與 T-08 粗酵素活性測試結果相較於文獻所顯示仍然偏低。由每株真菌並不是都有完整的纖維水解酵素系統(能分泌 EG、CBH 與 BGL)，加上外切型纖維水解酵素從還原端水解纖維素的特性，不但能水解結晶型的纖維素外，還能水解部分的纖維雙糖(還原糖)，因此本研究以篩選外切型纖維水解酵素為主要目標。

本研究第 14 批纖維水解酵素活性測試的真菌是近期(2014 年 11 月份)才由大學部專題生協助從腐木、樹皮與紙漿廢水樣本分離的菌株，其中真

菌 T-08 的粗酵素在 Avicelase、CMCase 與 pNPGase 活性測試都有較高的結果，由於先前已完成對其它六株後選真菌所有的實驗，加上第 14 批所測試的內切型纖維水解酵素結果與其他批次培養的酵素有明顯差異，尚需要再次作一次測試確認，因此本研究後續的最佳培養條件、反應條件、穩定度、及外切型纖維水解酵素鑑定測試不包括第 14 批次的真菌菌株。

#### 4.1.2 酶譜篩選

本研究主要目標是要發掘具發展潛力的外切型纖維水解酵素，因此選取 Avicelase 活性較高的 13-5-2-2、13-5-3-2、13-6-2A、13-5-1-1、THU4 與 THU17 等六株真菌作進一步的酶譜篩選。如 Figure 4.2 所示，可以清楚的觀察出真菌每天所分泌粗酵素的活性趨勢，從結果中顯示出這六株候選真菌在第六~七天培養下能測到該菌最高的 Avicelase 粗酵素活性，因此對於後續的分析與試驗皆採用於第六天培養下的粗酵素。粗酵素定量後進行 MUC zymogram (4-methylumbellifery- 1- $\beta$ -D-cellobioside, MUC) 的蛋白活性電泳分析以呈現酵素概略的比活性，並配合 4.1.1 章節酵素測試結果進一步篩選最佳的真菌菌株。

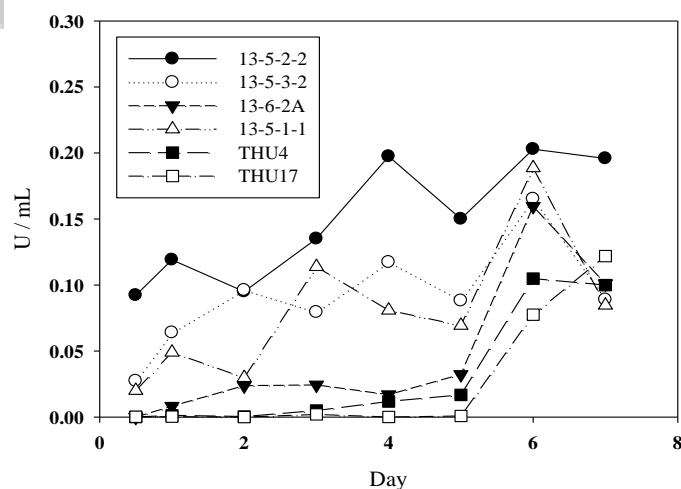


Figure 4.2 六株候選菌株於 7 天培養過程之 Avicelase 活性趨勢

MUC zymogram 結果整理如 Table 4.1，初步測試是使用沒有經過前處理步驟的粗酵素為樣本所作的 Zymogram 實驗，無論是利用 Native PAGE 或者酵素有經過變性(de-natured)後的 SDS PAGE，將膠片浸置在 MUC 緩衝溶液下反應後除了真菌 THU4 所分泌粗的酵素在蛋白質酶譜上有微量亮帶呈現，其於並未發現有外切型纖維水解酵素的反應(Table 4.1)，由於本研究在此階段還未得知各個菌株的最佳培養條件(溫度與 pH 值)與酵素的最好反應條件(溫度與 pH 值)，因此收取下來的粗酵素並不是在最佳化培養條件下所分泌的且固定在蛋白質電泳裡的酵素與 MUC 反應時也未在最佳化反應條件，酵素無法在活性最佳的狀況下進行實驗，導致蛋白質酶譜的測試結果不顯著。另一方面，蛋白質酶譜所採用粗酵素的濃度高低會影響結果顯示，要在 Zymogram 上呈現明顯的結果，酵素每單位的量要足夠(約  $\geq 20\text{mg/L}$ )或者本身是比活性高的蛋白質。根據以上因子影響，導致本研究真菌所分泌的外切型纖維水解酵素在蛋白質酶譜的呈現較為不明顯。


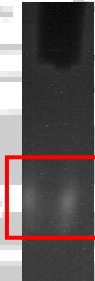
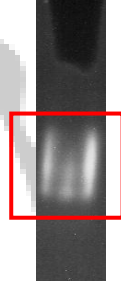
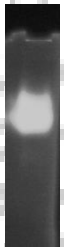

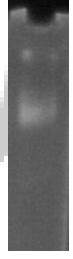

在未得知最佳化培養與反應條件且活性無法變動的情況下，酶譜篩選實驗中採取冷凍乾燥的前處理方法以濃縮纖維水解酵素(提高每單位體積的酵素量)，並從蛋白質定量試驗的過程得知濃縮後的蛋白質濃度，濃縮前 13-5-2-2、13-5-3-2、13-6-2A、13-5-1-1、THU4 與 THU17 的蛋白質濃度分別為 11.967、11.96、13.55、14.868、12.36 及 16.31 mg/mL，經過了冷凍乾燥濃縮步驟後濃度提升為 22.26、17.2、17.84、26.5、22.6 及 30.1 mg/mL，大約濃縮 2 倍，冷凍乾燥濃縮步驟後的酵素以未定量的情況下在 Native PAGE/MUC zymogram 得知 13-6-2A 與 THU17 呈現出明顯的亮帶，表示該株真菌能產生蛋白量較多或活性較高的外切型纖維水解真菌。因此本研究在活性測試與蛋白質酶譜的結果考慮下，最終選取 13-5-2-2、13-6-2A、THU4、THU17 作為後續實驗的樣本。

在最佳培養及反應條件測試後(結果與討論 4.2 節)，收取 13-5-2-2、

13-6-2A、THU4、THU17 四株真菌在最佳培養條件所分泌的粗酵素，其分泌的酵素濃度為 34.42、14.27、20.87、32.24 mg/mL，其結果可以證實最佳化培養條件(溫度、pH 值)對於生產的粗酵素蛋白濃度是有影響的，特別是真菌 13-5-2-2 與 THU17。將上述四種粗酵素進行冷凍乾燥濃縮後，其濃度分別提高為 56.26、15.95、43.67、52.9 mg/mL，在經過濃縮後的酵素濃度大部分都獲得了提升，唯獨 13-6-2A 的粗酵素濃縮效益特別不顯著，是因為冷凍乾燥濃縮需將樣本預先於-70°C 進行冷凍在行真空濃縮，而 13-6-2A 所分泌的酵素在-70°C 的環境會破壞了大部分的蛋白質導致酵素的失活，因此該酵素不適用於冷凍乾燥相關技術的濃縮處理。將四株真菌的濃縮酵素稀釋至濃度為 15 mg/mL 後，以等量的酵素於各樣本的最佳反應條件下進行 Native PAGE/MUC zymogram(Table 4.1)，結果顯示 13-5-2-2、THU4 與 THU17 皆可明顯看出表示活性強弱程度的亮帶，特別是 13-5-2-2 的結果最明顯，也吻合 13-5-2-2 於酵素活性測試之數值最高的結果。將最佳化反應(溫度、pH 值)下的 Zymogram 結果對照初步所作的蛋白質酶譜，可以證實有沒有在最佳化條件(溫度、pH 值)下反應是影響酵素活性在蛋白質酶譜呈現最主要原因，根據亮帶的明亮程度，本研究選擇了 13-5-2-2 與 THU17 作後續的蛋白質分析試驗，並利用 Dialysis Tubing(3,500MWCO, Thermo) 進行透析樣本的預處理，去除鹽類與 3.5KDa 以下的分子的背景值干擾，以便於後續切膠作業。經過透析與定量後進行的蛋白質酶譜測試結果顯示，樣本 13-5-2-2 的 MUC zymogram 結果更為清晰乾淨並說明透析後的樣本是除去大部分的干擾物也有助於蛋白質酶譜結果的呈現(Table 4.1);但是樣本 THU17 不但沒有呈現更高的結果，相反地還讓活性亮帶消失了，代表 THU17 在蛋白質酶譜實驗過程的環節中，有其他的未考慮到的因素而導致酵素失去活性，詳細討論於 4.4.1 節作描述與探討。



Table 4.1 以 MUC zymogram 作真菌菌株二次篩選

Strain	13-5-2-2	13-5-3-2	13-6-2A	13-5-1-1	THU4	THU17
(U/mL)	0.209	0.15	0.131	0.142	0.062	0.025
<b>Native PAGE</b>						
/	X	X	X	X	X	X
<b>MUC zymogram</b>						
<b>SDS PAGE</b>						
/	X	X	X	X		X
<b>MUC zymogram</b>						
<b>FD</b>						
<b>Native PAGE</b>	X	X		X	X	
/						
<b>MUC zymogram</b>						
<b>Decision</b>	O		O		O	O
<b>FD, OP</b>						
<b>Native PAGE</b>						
/		-	X	-		
<b>MUC zymogram</b> (at chapter 4.4)						
<b>FD, OP, Di</b>						
<b>Native PAGE</b>						
/		-	-	-	-	X
<b>MUC zymogram</b> (at chapter 4.4)						
<b>Final decision</b>	O					

X: Not-detected, FD:Freeze drying, OP: react at optimal condition, Di: Dialysis

## 4.2 酵素之最佳化培養條件、最佳反應條件與穩定性分析

將四株候選真菌在 25°C 與 30°C 的溫度下培養於 pH5, 6, 7 的培養基中，收取其第六天培養的粗酵素後，分別與 Avicel 基質溶液於 pH2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 及 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 組合(共 48 個)的條件下反應。在最佳培養溫度上，四株候選真菌菌株在 25°C 培養下所分泌的纖維水解酵素之活性明顯高於在 30°C 培養下所生產的纖維水解酵素，由於本研究中所取得的真菌菌株多為自然界中分離出的環境樣本，在最佳培養條件結果中顯示 30°C 中溫環境下進行培養反而對於真菌分泌的酵素與活性沒有實質的幫助，相反地 25°C 對於該四株真菌是較為適合生產纖維水解酵素的溫度。

最佳化條件實驗中 13-5-2-2 在 pH5 下培養並於 pH6 與 70°C 反應能測得最多的 Avicel 水解產物(還原糖) (Figure 4.3 與 4.4)；13-6-2A 培養於 pH7 下 並在 pH7 與 50°C 的反應條件能呈現該真菌較高的 Avicelase 活性；THU4 與 THU17 都於 pH6 環境下培養能產出最有活性的酵素，各別在 50°C 與 70°C 下於 pH7 條件下更有最佳的降解 Avicel 的效率，四株真菌都是在常溫與弱酸環境培養並且於偏高溫與弱酸條件有最佳反應效率。

在 4 小時的熱穩定性與 pH 穩定性測試結果如 Figure 4.5 所顯示，13-5-2-2、13-6-2A、THU4 與 THU17 最佳反應溫度範圍分別為 60~70°C、50°C、40~70°C、60~70°C，但是 13-6-2A 與 THU4 在 4 小時的熱穩定測試後，其相對活性已損失了  $\geq 40\%$ ，因此 13-6-2A 與 THU4 所生產的酵素較不適用於長時間於高溫下持續反應；在 pH 值方面，13-5-2-2 在 pH6 活性是最好的，但是經過 4 小時後呈現不穩定的結果，相對於次之最佳化反應的條件，於 pH5 經過 4 小時後能保有 80% 的相對活性，因此其最適 pH 反應範圍是 pH 4~5；THU17 在 pH7 條件下有最佳活性，但是經過 4 小時後的活性測試中呈現 pH7 並不是對於該酵素穩定的條件，相反的在 pH3~5 能

保留較高於其他 pH 條件的相對活性(>60%)，加上 THU17 在最佳活性測試結果中為平穩的趨勢，縱使 pH3~5 並不是最佳的反應條件卻是酵素長時間作用最理想的條件選擇。至於 13-6-2A 與 THU4 所生產的酵素未能於本研究找出最適 pH 反應範圍，而從穩定性測試結果呈現可以發現，酵素在長時間反應下，pH 值與溫度的穩定性皆是影響活性關鍵因素。

根據整體最佳化及穩定性測試結果與文獻比較，如 Table 4.2，測試結果與文獻顯示的條件範圍相近，都是處在弱酸環境與中溫條件下反應有最佳的結晶型纖維素降解效率，對於往後欲與其他纖維水解酵素混合作協同作用時，不會因為反應條件差異度過大而難以找到適合搭配的酵素。在研究中的 13-5-2-2 與 THU17 反應條件分佈相對較廣，測得活性較佳且在 4 小時對於 pH 與溫度的穩定性測試中能保留 60% 以上的相對活性，故選取此兩株真菌經前處理的酵素作為後續蛋白質分析與鑑定。

Table 4.2 四株候選菌株與已發表文獻的真菌之最佳化條件(溫度與 pH 值)及穩定性(溫度與 pH 值)比較

Fungi	pH	pH stability	Temp (°C)	Thermo-stability	Reference
<i>Aspergillus</i> sp.	5.00	-	70	-	Howard et al.,2003
	4.00	-	55	-	Jahangeer et al.,2005
<i>Achlya bisexualis</i>	6.0	-	30	-	Howard et al.,2003
<i>Penicillium brefeldianum</i>	4.2	-	50	-	Howard et al.,2003
<i>Penicillium decumbens</i>	4.0	-	50	-	Gao et al.,2012
<i>Trichoderma reesei</i>	5.0	-	55	-	Howard et al.,2003
	4.0-5.0	-	55	-	Montenecourt et al.,1979
	5	3.5-5.6	65	62±2	Boer et al.,2003
<i>Trichoderma viride</i>	5.5	5.5-6.5	40	20-40	Irfan et al., 2012
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	6	6	55	55	Howard et al.,2003
<b>13-5-2-2</b>	5	4-5	70	60-70	This study
<b>13-6-2A</b>	4	4	50	50	This study
<b>THU4</b>	5	3-6	50	40-70	This study
<b>THU17</b>	5	3-5	70	60-70	This study

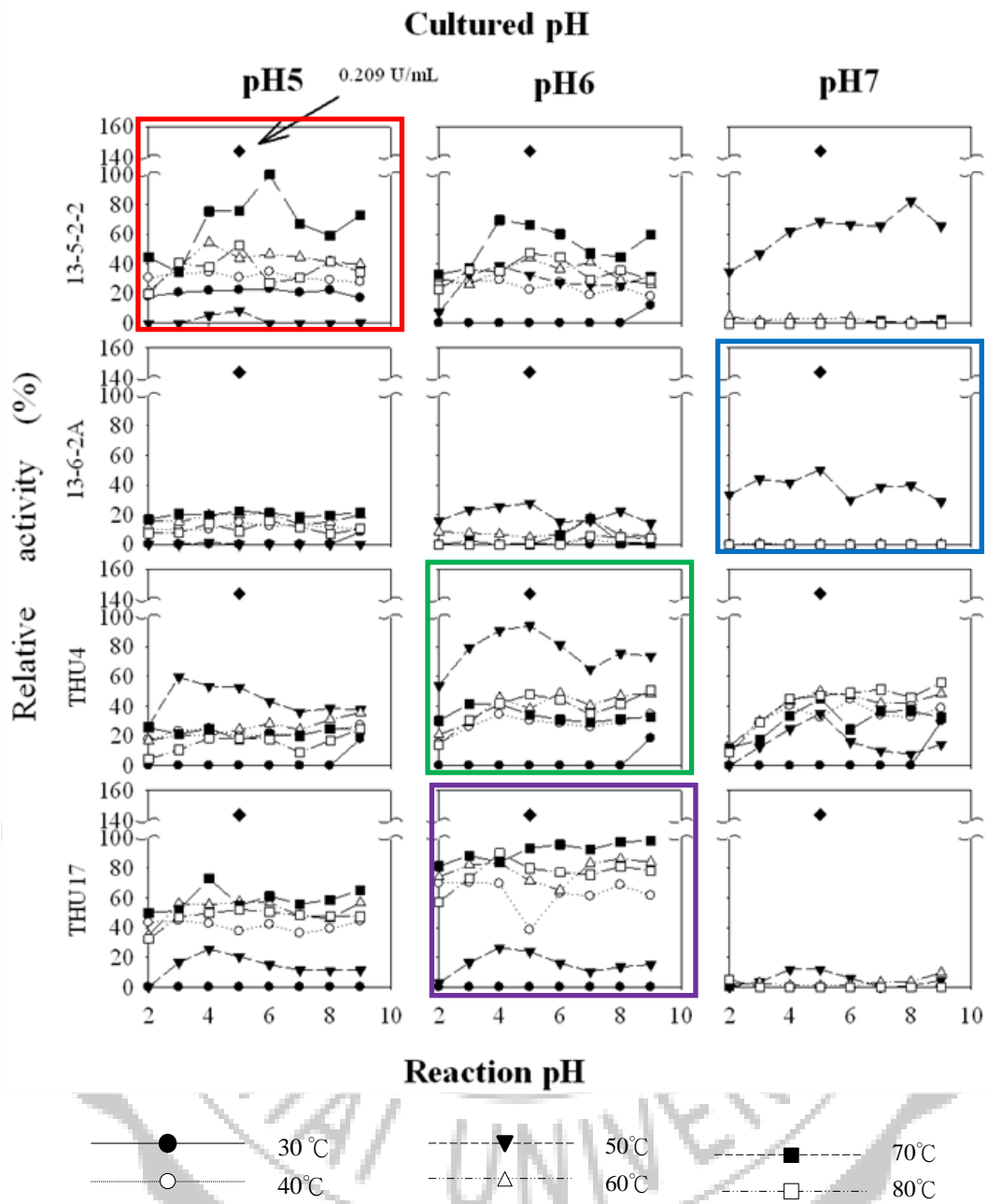


Figure 4.3 溫度與 pH 值對於 25°C 培養下的四株候選真菌之酵素影響

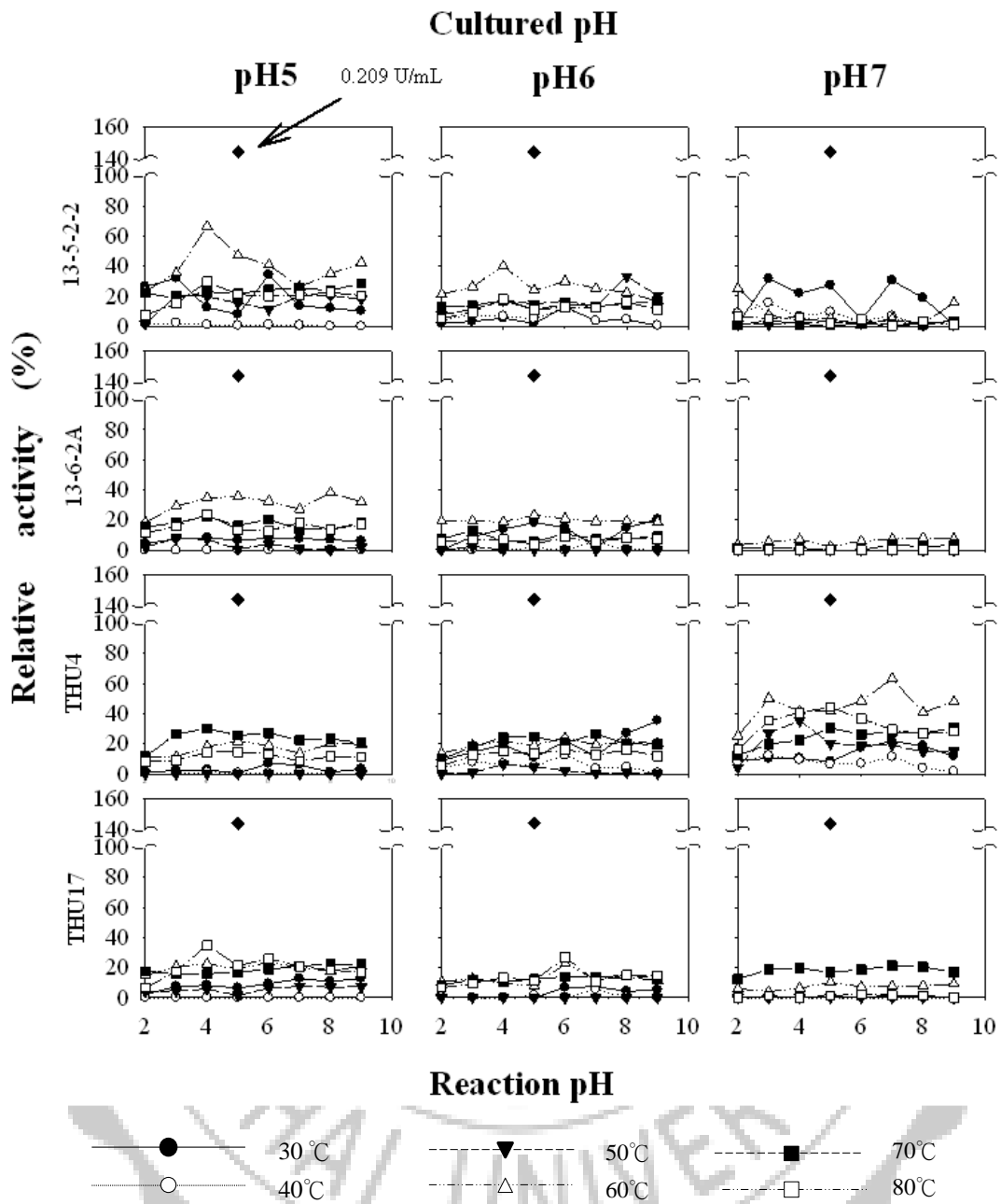


Figure 4.4 溫度與 pH 值對於 30°C 培養下的四株候選真菌之酵素影響

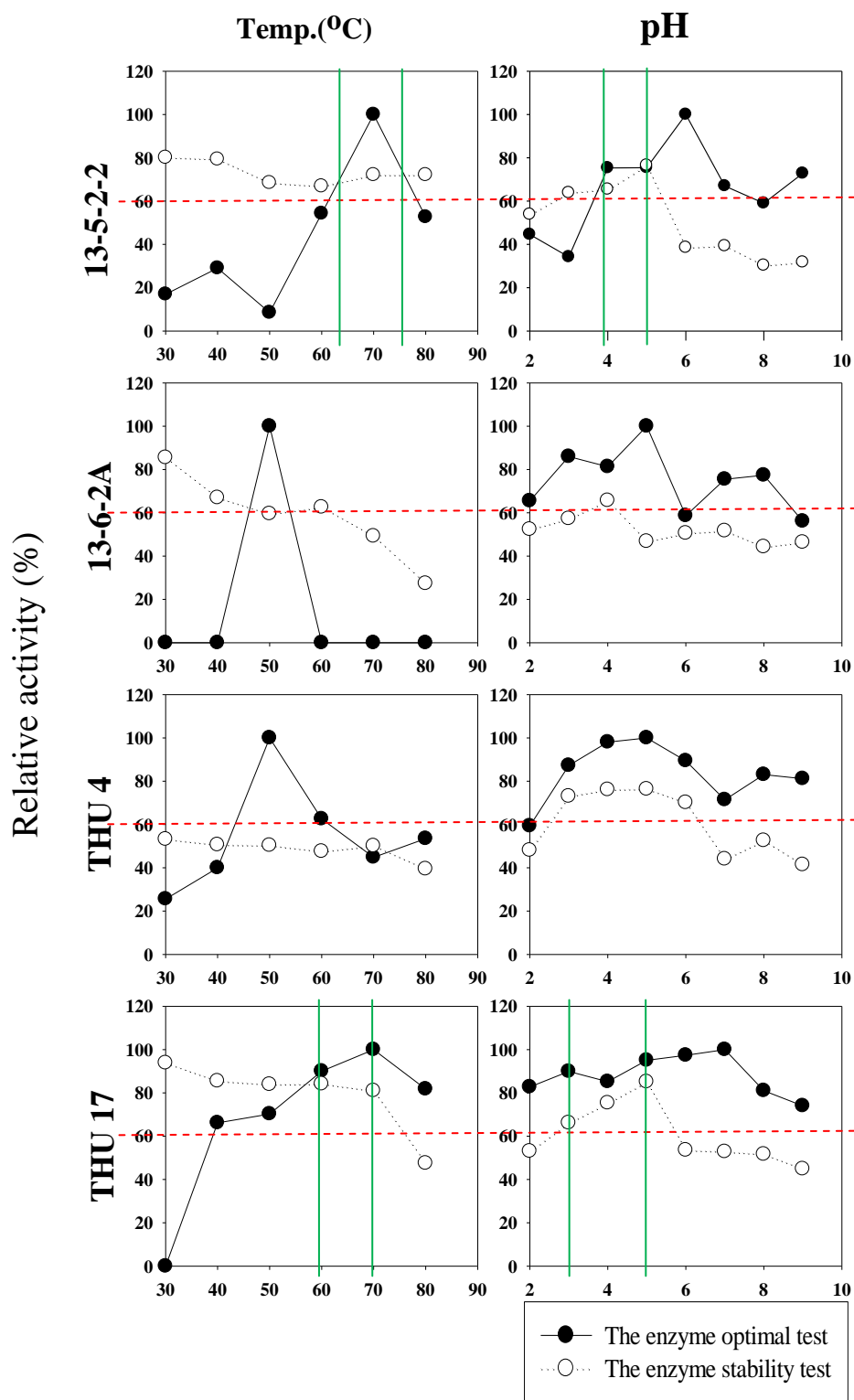


Figure 4.5 四株候選真菌酵素之 4 小時熱穩定性與 pH 值穩定性

Table 4.3 現有文獻的真菌與 13-5-2-2 對不同基質之最佳化外切型纖維水解  
 酵素活性之比較

Fungi	IFPU (U/mL)	Avge	Avicelase (U/mL)	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	0.0055-0.33	0.123	-	Jahangeer et al, 2005
<i>Aspergillus flavus</i>	0.117-0.163	0.137	-	
<i>Aspergillus terreus</i>	0.069-0.3	0.164	-	
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.009-0.3	0.188	-	
<i>Cladosporium sp.</i>	0.052	0.052	-	
<i>Ahernaria sp.</i>	0-0.205	0.056	-	
<i>Fusarium sp.</i>	0-0.059	0.023	-	
<i>Neocallimastix frontalis</i>	0.067 U/mg	-	0.132 U/mg	Li. et al, 1991
	-	-	0.32	Mountfort et al, 1985
<i>Penicillium janthinellum</i>	0.24-0.55	0.36	-	Adsul, 2004
<i>Penicillium sp.</i>	0-0.139	0.078	-	Jahangeer et al, 2012
	0.973	-	-	Hao et al, 2006
<i>Rhizopus sp.</i>	0-0.222	0.103	-	Jahangeer et al, 2005
<i>Trichoderma harzianum</i>	0.034	0.034	-	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.059	0.059	-	
<i>Trichoderma reesei</i>	0.66±0.13 U/mg	-	0.26±0.02 U/mg	Fujii et al,2009
	-	-	0.39±0.004	Boer et al.,2003
<i>Trichoderma viride</i>	0.28-1	0.63	-	Adsul, 2004
	-	-	0.016 U/mg	Beldman, 1984
<b>13-5-2-2</b>	<b>0.376</b> <b>0.179 U/mg</b>	-	<b>0.209</b>	This study

在現有文獻記載中，除了利用 Avicel(微晶型纖維素)來當作測試外切型纖維水解酵素活性外，還有利用濾紙對纖維水解酵素所作的 FPase 活性測試，因此本研究後續選擇活性測試實驗結果最好的 13-5-2-2 作了相同的 FPase 活性測實驗，並與現有紀錄真菌之 FPase 活性比較作為判斷 13-5-2-2 是否有競爭力的依據，根據 Table 4.3 整理結果顯示，13-5-2-2 在最佳化培養條件所生產的酵素於最佳反應條件進行的 FPase 活性測試結果為 0.376

U/mL, 比活性約為 0.179 U/mg (詳細比活性換算所需的酵素蛋白質量於 4.4 章), 與文獻相比並不遜色甚至比有些真菌的 FPase 活性高出許多, 因此可說明 13-5-2-2 是一株具有競爭力與發展潛力的真菌。

### 4.3 根據 ITS rDNA 基因序列鑑定真菌菌種

本研究以 Fast ID Genomic DNA Extraction Kit 萃取真菌 13-5-2-2、13-6-2A、THU4、THU17 的菌株 DNA, 再進一步利用 primer ITS1 與 ITS4 以特定加溫程序進行聚合酶連鎖反應擴增 ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer, ITS) 序列, 根據文獻研究指出, ITS rDNA 區間在真菌的基因中是一個變異較大的區域, 此區中對於不同真菌有不同數量的 gap 存在於不同的位置, 因此有著菌種的高辨別特性 (Martin et al, 2005)。故此利用 PCR 放大真菌 ITS 區間的片段以定序, 可以獲取菌種鑑定詳細的基因訊息。經 PCR 放大後的產物再以 1.5% 洋菜膠核酸電泳找到 PCR 產物片段大小如 Figure 4.6, 對應 Marker 得知目標片段大小位於 500~700 bps 之間, 最後送交定序公司 (明欣公司, 台灣) 進行核酸序列分析, 將結果與 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因庫比對, 得到結果都屬於子囊菌門 (Ascomycota) 依 13-5-2-2、13-6-2A、THU4、THU17 順序分別為 *Meyerozyma caribbica*、*Penicillium marneffeii*、*Talaromyces marneffeii* 與 *Meyerozyma caribbica*, 詳細結果如 Table 4.4, 其中 13-5-2-2 與 THU17 被鑑定出來為同樣真菌菌種。

目前 *Penicillium* spp. 是一群已經被學者廣被研究的真菌, 特別是在水解纖維素的領域當中, 有些菌種以被完成全基因可以從菌種基因庫中找到該菌的全基因序列。在本研究中 13-6-2A (*Pm*-13-6-2A) 最有可能是屬於 *Penicillium marneffeii* (馬爾尼菲青黴菌), *P. marneffeii* 於西元 1956 年在越南於竹鼠 (bamboo rat) 身上被發現, 馬內菲氏青黴菌在免疫功能不全的病患,



尤其是後天免疫缺乏症候群的患者，例如對於愛滋病患者比較有高度的感染機率(Yuen et al.,2003)，會引起真菌血症、皮膚感染、淋巴腫大、肺部感染以及全身性瀰漫型感染。

真菌 THU4(*Tm*-THU4)被鑑定最有可能是屬於 *Talaromyces marneffeii*，有報導利用野生的 *Talaromyces* 真菌作定點突變改變其基因的方式以增加 CBH I, CBH II, EG 的分泌量與活性，並對成功培育且結果理想的菌株提出專利申請( patent application number: 202114797)；目前也有生技公司提供 *Talaromyces marneffeii* 生產的纖維水解酵素商品販售服務(GenScript)。同時將 *Talaromyces marneffeii* 與其他真菌作 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 親緣分析後，顯示 *Talaromyces* sp. 是與 *Penicillium* sp. 有著相近的親緣關係，如 Figure 4.7，代表著這些真菌的 ITS rDNA 基因序列有著較高的相似度。

真菌 13-5-2-2(*Mc*-13-5-2-2)與 THU17(*Mc*-THU17)比對結果最有機會是屬於 *Meyerozyma caribbica*，根據文獻指出，在橄欖油製造裡的廢棄的橄欖渣中或者在萃取出油相中均有分離出屬於 *Meyerozyma caribbica* 的真菌，由於橄欖渣裡含有豐富木質纖維素因此可以判斷該真菌可以利用纖維素作為其營養來源，更可以初步得知 *Meyerozyma caribbica* 是會分泌纖維水解酵素的真菌；在 NCBI 菌種基因庫裡也發現 *Meyerozyma caribbica* 是會生產 exo-beta-1,3-glucanase (Ntougias et al, 2013)，但尚未有資料報導有關 *Meyerozyma caribbica* 所分泌的 exo-beta-1,4-glucanase 外切型纖維水解酵素。根據 Figure 4.7 與 Figure 4.8 親緣樹圖顯示，*Penicillium* sp. 與 *Talaromyces* sp. 的親緣關係較為接近的是由於一個為無性世代，另一為有性世代，因此 *Pm*-13-6-2 與 *Tm*-THU4 的親緣關係才較為接近，而 *Meyerozyma caribbica* 則是與酵母菌的親緣關係較為接近。

根據以上資訊可以得知在本研究所篩選到的 4 株候選真菌都是能產外切型纖維水解酵素，其中 *Penicillium* sp. 是現今已被廣泛探討與利用的纖

維水解真菌，市面上也已經有該菌的商業酵素進行販售，甚至有學者嘗試以突變的方式進行品種改良已找到更有潛力的菌種；而 *Talaromyces marneffei* 是已被發掘能分泌並生產出商業性纖維水解酵素的真菌菌株，同時也已經被商業化，因此本研究主要對鑑定為 *Meyerozyma caribbica* 的 13-5-2-2 與 THU17 進一步作外切型纖維水解酵素鑑定及比活性分析。

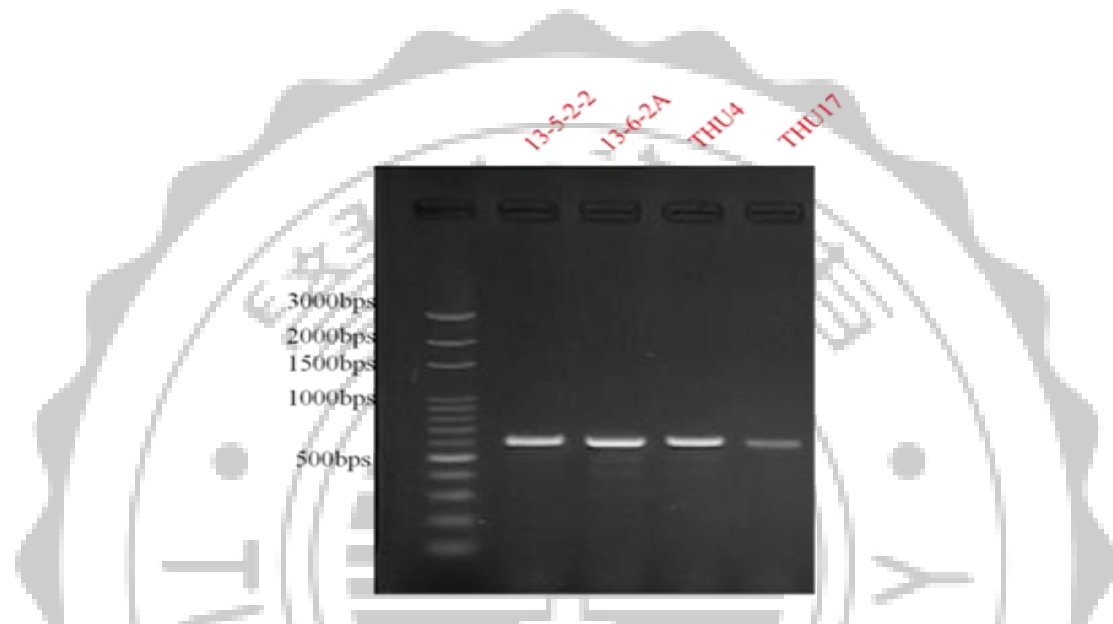


Figure 4.6 以 primer ITS1 與 ITS4 擴增 ITS rDNA 片段

Table 4.4 四株纖維水解真菌 ITS 序列與基因庫比對之結果

Fungi	13-5-2-2	13-6-2A	THU4	THU17
Phylum	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
Class	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Saccharomycetes</i>
Order	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Saccharomycetales</i>
Family	<i>Debaryomycetaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Debaryomycetaceae</i>
Genus	<i>Meyerozyma</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>Meyerozyma</i>
Accession	HG970748.1	HM595497.1	KF183638.1	KJ705035.1
Similarity	96%	90%	94%	86%

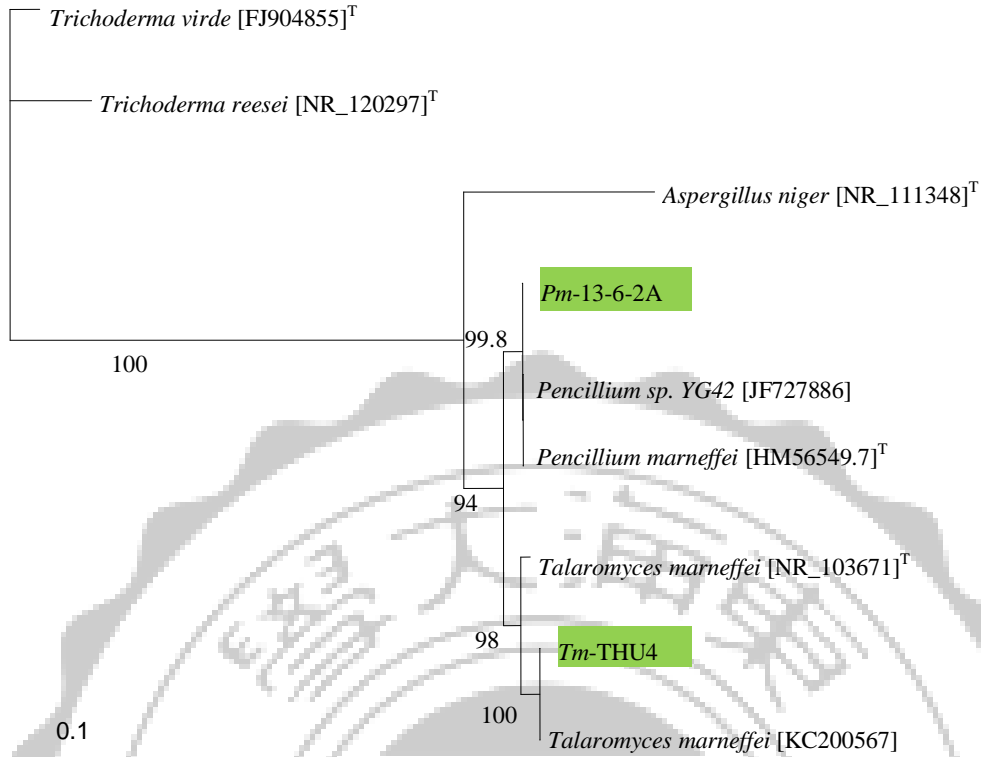


Figure 4.7 *Pm-13-6-2A* 與 *Tm-THU4* 之 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 親緣分析

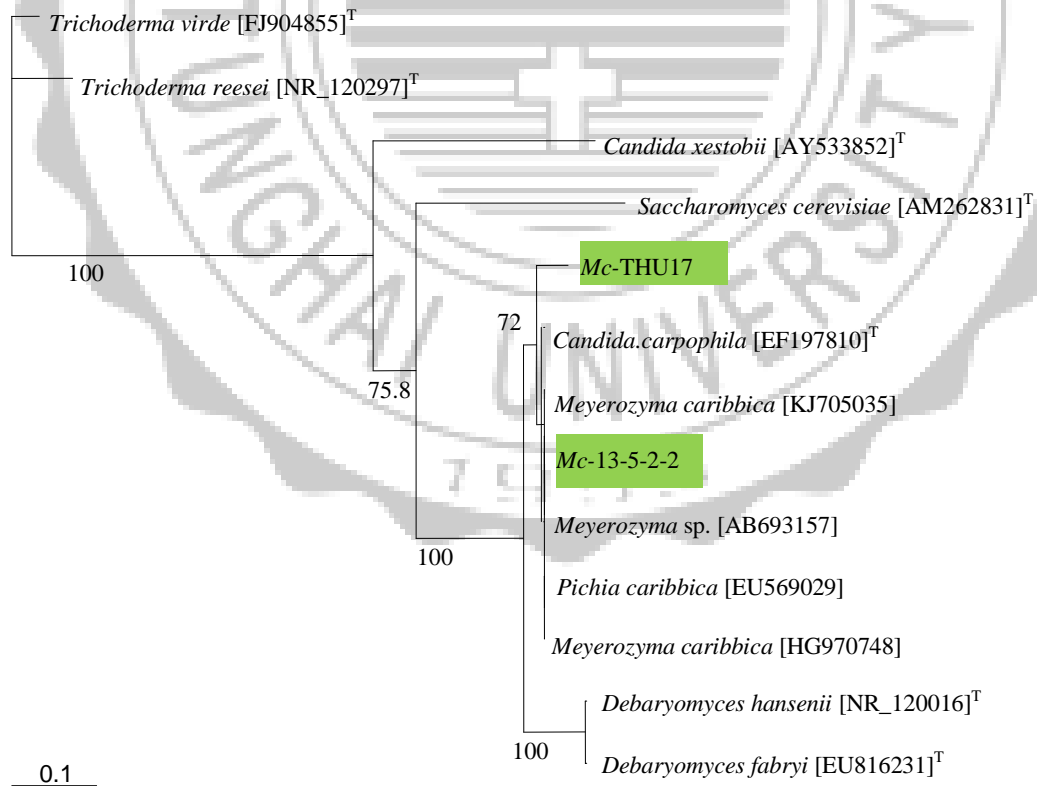


Figure 4.8 *Mc-13-5-2-2* 與 *Mc-THU17* 之 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 親緣分析

## 4.4 目標酵素定量與鑑定

### 4.4.1 目標酵素位置與分子大小確認

本研究進行酵素定量與鑑定所用的酵素樣品是採集在最佳培養條件之真菌釋放至培養基中的胞外酵素，因此樣品本身含有許多非本研究目標的雜蛋白群與培養基中的營養鹽類，為了降低這些干擾物的影響，在進行蛋白質定量實驗前會利用冷凍乾燥濃縮提高酵素濃度並以透析薄膜進行透析以去除粗酵素液中的小分子酵素(<3.5kDa)與金屬鹽類的干擾物最為酵素樣本的前處理步驟；欲確認目標酵素於 PAGE 上的位置與大小，首先將酵素定量至 56 $\mu$ g 後使用 Native PAGE 進行蛋白質的分析，並利用對 Exo-glucanase 活性靈敏的 MUC 基質與蛋白質分析完成的電泳膠片進行反應以確認目標蛋白(外切型纖維水解酵素)，將目標蛋白切下後再以 SDS PAGE 分離，以確認目標蛋白的大小與位置。根據 Figure 4.9 顯示，Mc-13-5-2-2 的酵素於 MUC zymogram 所顯示之活性與定量後的商業型酵素 C1.5L 最為接近，經切膠後進行 SDS PAGE 分析可發現本研究所要發掘的目標酵素在 Mc-13-5-2-2 生產的酵素中是主要的蛋白群之一，並可確定目標酵素分子量大小約為 70 KDa，因此本實驗選取 Mc-13-5-2-2 真菌菌株的酵素進行序的蛋白質鑑定。

根據目前文獻所示(Table4.5)，大多數的外切型纖維水解酵素的分子量大概介於 50-65KDa，舉例來說，有學者研究報告指出 *Penicillium janthinellum* 所分泌的 CBHI 在酶譜與 SDS 電泳的對應下其分子大小為 57kDa (Wang ,2000)；另有學者分離出一株屬於擔子菌門的 *Agaricus arvensis*，SDS PAGE 對此真菌將其產出的 CBH 進行試驗並得知該酵素大小約為 65kDa (Lee et al.,2011)；對於真菌 *Trichoderma reesei* 也有文獻顯示，*T. reesei* 所產的 CBH 分子量為 65 kDa，是對於可溶性的基質或是不可溶的 Avicel 有著活躍活性的完整蛋白質的大小 (Chen , et al,1993)。

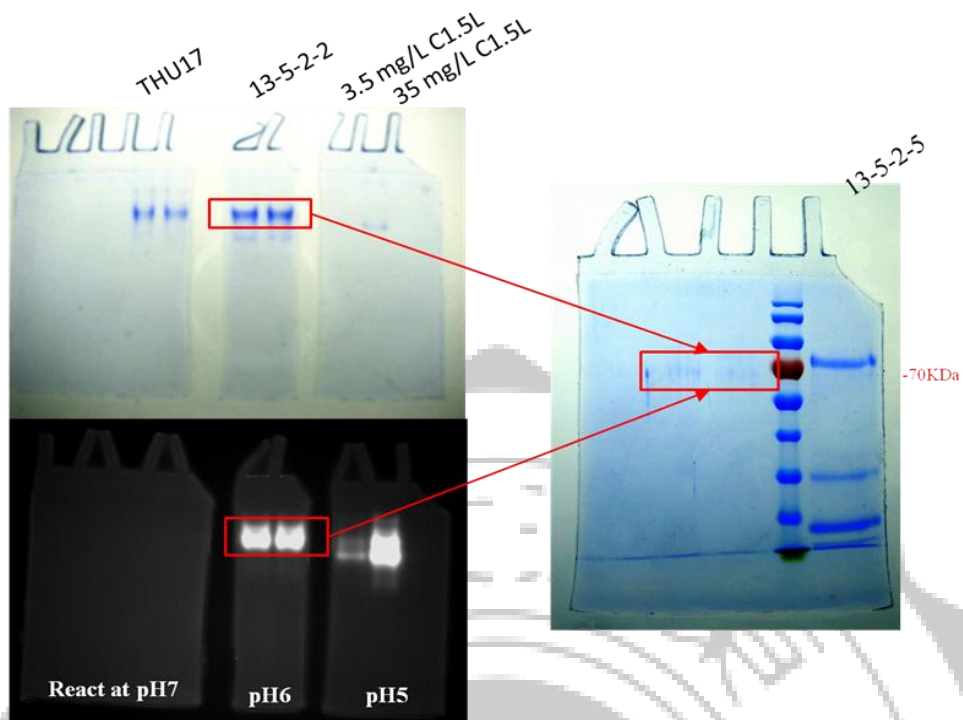


Figure 4.9 *Mc*-13-5-2-2 之目標酵素大小及對應位置。

Table 4.5 現有文獻發表的外切型纖維水解酵素之分子量大小

Strains	CBH	Size	Source
<i>Agaricus arvensis</i>	-	65KDa	Lee et al.,2010
<i>Penicillium janthinellum</i>	I	57KDa	Wang et al.,
<i>Trichoderma reesei</i>	I	61KDa	Jager et al.,2010
	II	54KDa	Jager et al.,2010
<i>Chrysosporium lucknowense</i>	I	65KDa	Bukhtojarov et al.,2004
	II	42KDa	Bukhtojarov et al.,2004
<b><i>Mc</i>-13-5-2-2</b>	-	70KDa	This study

因此本研究所分離的 *Mc-13-5-2-2* 之 CBH 分子量略大於一般外切型纖維水解酵素，同時變性後的蛋白質也相較其他外切型纖維水解酵素有著更難以回復的特性，此性質也會導致 4.1.2 酶譜篩選 SDS PAGE/Zymogram 的實驗上比較不容易呈現出明顯的結果原因之一。

在 MUC zymogram 酶譜試驗中，將 *Mc-THU17* 的酵素於最佳反應條件(pH7)下的環境完成透析之預處理步驟並立刻銜接蛋白質電泳與在 MUC 溶液反應(pH7)的酶譜分析，結果顯示 *Mc-THU17* 的酵素在透析前與透析後的差別甚大(結果可參考 Table4.1)，是因為 *Mc-THU17* 酵素雖然在 pH7 的環境下反應擁有最好的活性，但是在 4 小時的 pH 穩定性實驗證明該酵素在 pH7 的環境下並不穩定，而完成 SDS PAGE 與 MUC Zymogram 的時間介於 2~3 個小時，在實驗的過程中酵素活性正在逐漸降低甚至完全失活，加上 *Mc-THU17* 的酵素裡並不是全部為本研究的目標蛋白群(exo-glucanase)，基於以上兩點不利的因素影響下，*Mc-THU17* 的酵素在蛋白質酶譜呈現上比較不容易。

濃縮後但未經過最佳化之 *Mc-13-5-2-2* 的酵素於蛋白質酶譜實驗的結果並未能呈現出肉眼可辨識的亮帶；相反地，經過最佳化與濃縮之 *Mc-13-5-2-2* 的酵素在蛋白質酶譜上顯示出明顯的外切型纖維水解活性反應，推測是本研究在初步實驗(篩選有發展潛力真菌的階段)採用了對照組(商業化酵素 C1.5L)之最佳反應條件 (pH5,55°C)，但此反應條件並未符合 *Mc-13-5-2-2* 最佳反應條件，因此無法完整顯示 *Mc-13-5-2-2* 的酵素活性；相反地，在酵素分析階段的實驗已完成並採用 *Mc-13-5-2-2* 的最佳反應條件(pH5,70°C)且控制於穩定性最好的環境下，所以在酵素定量實驗中的酶譜呈現結果與在篩選階段的酶譜有明顯的差別。

#### 4.4.2 酵素定量

將完成前處理步驟的酵素定量至 36 $\mu$ g 與牛血清蛋白(Bovine serum albumin,BSA)利用 SDA PAGE 將帶有不同負電量的蛋白群分離，BSA 在蛋白質電泳顯示上有一主要且明顯的蛋白群，因此非常適合作為定量的對照組，以 BSA 此特性進行目標酵素與不同量的 BSA 對照並估算出 *Mc-13-5-2-2* 目標外切型纖維水解酵素的量。根據 Figure 4.10 結果，以目視顏色深淺判斷目標酵素量約介於 0.5 $\mu$ g 到 1 $\mu$ g，但還需要考慮顏色深淺之虞與 band 的大小粗細程度，因此採用了 Image J 影像分析軟體作為最後的判讀參考。以 Image J 針對不同定量的 BSA 在 SDS PAGE 上呈現的 band 所分析得到的結果繪製成標準曲線，將 *Mc-13-5-2-2* 之目標酵素經影像分析所測定的數值帶入檢量線之公式，計算出目標酵素為 1.3 $\mu$ g(約佔總蛋白質的 3.6%)，進一步推算比活性約為 0.126U/mg。根據學者研究，利用 Avicel 作為基質以測試 *Trichoderma reesei* 活性，其 Avicelase 為 0.26 $\pm$ 0.02 U/mg (Fang, 2009)，與本研究 *Mc-13-5-2-2* 所測得的數值相近，因此 *Mc-13-5-2-2* 可視為一株具有發展潛力且能與其他發表過之纖維水解真菌一同競爭的真菌。

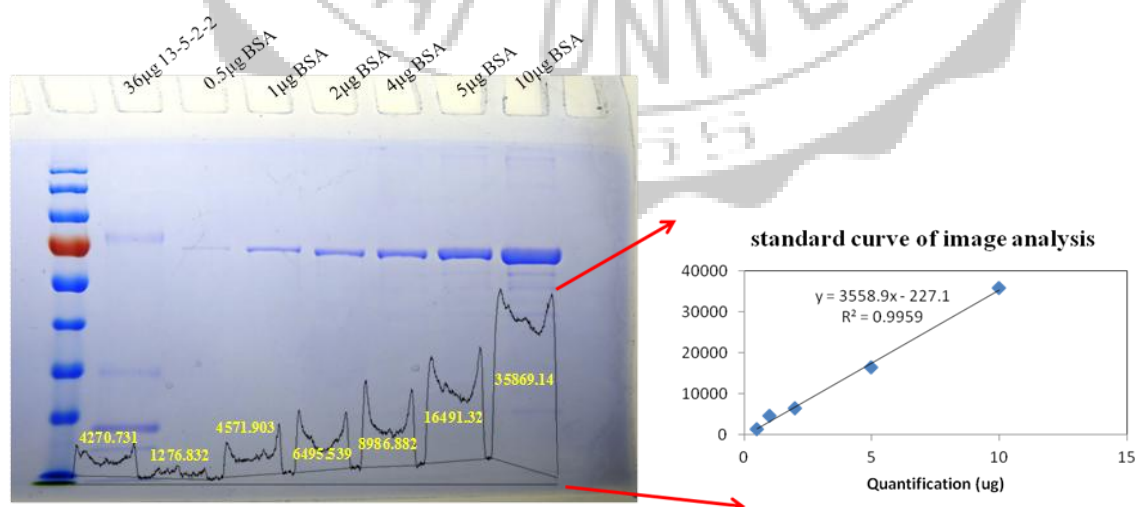


Figure 4.10 以不同量的 BSA 定量 *Mc-13-5-2-2* 之目標酵素

#### 4.4.3 酵素胺基酸序列定序

將 Figure 4.10 所得到的目標酵素從膠片切下一小部份送往定序中心進行 LC-MS/MS 胺基酸定序作業。本研究蛋白質定序是委託中央研究院蛋白質體核心研究實驗室 (Proteomics Core Laboratory, Agricultural Biotechnology Center, Academia Sinica) 進行胺基酸定序，LC-MS/MS 分析結果如附錄五，將結果與基因庫 (NCBI) 比對，其中有兩條胺基酸序列被確定與 *Aspergillus aculeatus* 所分泌  $\beta$ -1,4 exo-glucanase 部分胺基酸序列相吻合並屬於從還原端作用的 **CBHI**，如 Table 4.6；而其比對的資料庫如附錄六。根據文獻指出，在 1988 年已有學者確認 *Aspergillus aculeatus* 能夠分泌 CBHI 並且利用分子生物技術嘗試 Clone 其基因 (Takada, 1988)。雖然在 NCBI 菌種基因庫裡發現 *Meyerozyma caribbica* 生產 exo-beta-1,3-glucanase (Ntougias et al, 2013) 相關的記載，但並沒有提及會分泌  $\beta$  1-4 exo-glucanase 然而木質纖維素多以  $\beta$ -1,4 鍵結的聚合物要降解纖維素須以  $\beta$ -1,4 鍵結的酵素進行作用。在本研究 Mc-13-5-2-2 所分泌出的外切型纖維水解酵素 (是還未被提及發表的新穎的纖維水解酵素，因此將此酵素命名為 *CBHI-M.c*，其外切型纖維水解基因為 *cbhI-Mc*。

Table 4.6 對 Mc-13-5-2-2 所分泌外切型纖維水解酵素之胺基酸定序結果

Protein	Sequence	RT (min)
1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase	YSGTCDPDGCDFNPYR	20.40
1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase	AGAKYGTGYCDSQCPR	23.20

註:RT 值須配合附錄五對照其位置



## 4.5 克隆 *Mc-13-5-2-2* 之 *cbhI-Mc* 序列

為了能將本研究的最具發展潛力的真菌菌株 *Mc-13-5-2-2* 其外切型纖維水解酵素推向商業化量產的水平，需要利用分子生物技術將其纖維水解基因置入大腸桿菌內進行表現，方能達到大量生產的目的並且可以降低成本，因此第一步驟就是必須要得知其 *cbhI-Mc* 序列，本研究利用下列一連串步驟的方法以確定 *Mc-13-5-2-2* 的 *cbhI-M.c* 的序列。

### 4.5.1 引子設計

為了得知真菌 *Mc-13-5-2-2* 的 *cbhI-M.c* 基因，本研究從胺基酸定序所得到的胺基酸序列回推核酸序列以便於設計引子來進一步放大目標的 rDNA 片段，根據 Figure 4.11 可以得知每個胺基酸會對應到 3 個核酸序列，而第三碼正是決定胺基酸重要的的辨識碼，*Mc-13-5-2-2* 胺基酸序列回推結果如 Table 4.7 所示。引子設計除了須有一定的序列長度外，另一方面為了有效率地設計出符合 *cbhI-Mc* 的引子，盡可能選擇核酸排列組合比較少的胺基酸片段，因此本研究選擇 DGCDFNYR 的胺基酸序列作為引子設計的依據。根據附錄七所示，在保留最後兩個辨識碼的情況下有 64 種組合的可性，在菌種基因庫(NCBI)的比對下，有符合纖維水解功能基因的有 25 筆，如 Table 4.8 所示，其中有 18 筆是已經確定，如 Table 4.9 所示。將這 18 條有較高可能性的序列作為 PCR 放大真菌 *Mc-13-5-2-2* 之 *cbhI-M.c* 序列的 Forward 端的引子；在一個成熟的真核細胞的 mRNA 的結構上，3'端部分會帶有一 RNA 腺嘌呤鹼基(稱為 Poly A)，轉譯成蛋白質時這段 Poly A 也包括在其中，因此本研究選取對應 Poly A 的 Poly T 作為 Reverse 端的引子，並設計適合的長度因應 Forward 引子黏合溫度。

Table 4.7 Mc-13-5-2-2 胺基酸定序結果所對應可能的核酸序列

Y	S	G	T	C	D	P	D	G	C	D	F	N	Y	R	P
tat	agc	ggc	acc	tgc	gat	ccg	gat	ggc	tgc	gat	ttt	aac	ccg	tat	cgc
c	t	a	a	t	c	a	c	a	t	c	c	t	a	c	a
		t	t			t		t					t		t
		g	g			c		g					c		g
tct															
	g														
-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	a														
A	G	A	K	Y	G	T	G	Y	C	D	S	Q	C	P	R
gcg	ggc	ggc	aaa	tat	ggc	acc	ggc	tat	tgc	gat	agc	cag	tgc	cgc	tat
a	a	a	g	c	a	a	a	c	t	c	t	a	t	a	c
t	t	t			t	t	t							t	
c	g	c			g	g	g							g	
											tct				
											g				
											c				
											a				

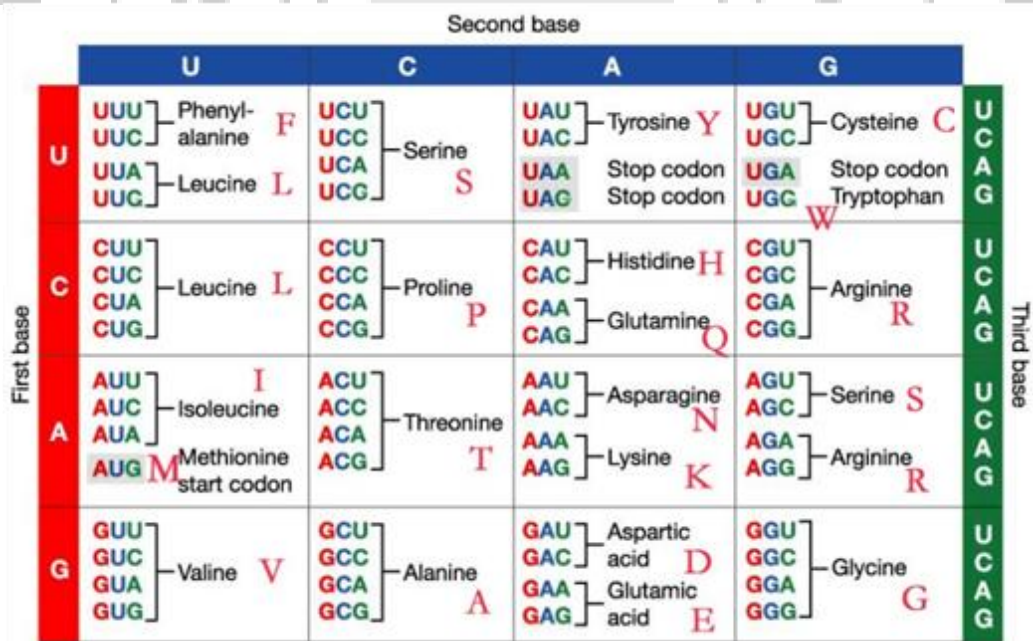


Figure 4.11 胺基酸序列所對應的核酸序列圖 (BioGem, , 2010)

**Table 4.8** 有纖維水解酵素基因記載的序列

Primer	Sequence	Source	Accession
T1	GATGGATGTGACTTCAAYCCN	<i>Penicillium funiculosum</i> -CBHI	HQ615690.1
T3	GATGGATGTGATTTCAAYCCN	<i>Penicillium chrysogenum</i> -CBHI	AY790330.2
T5	GATGGATGCGACTTCAAYCCN	<i>Marssonina brunnea</i> f. sp	XM_007294198.1
T7	GATGGATGCGATTTCAAYCCN	<i>Aspergillus aculeatus</i> -CBHI	AB002821.1
T9	GATGGTTGTGACTTCAAYCCN	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 CBH B	XM_001727829.2
T11	GATGGTTGTGATTTCAAYCCN	<i>Aspergillus clavatus</i> - cellobiohydrolase D	XM_001272621.1
T12	GATGGTTGTGATTTTAAAYCCN	<i>Penicillium granulatum</i> -CBHI	KF032028.1
T14	GATGGTTGCGACTTTAAAYCCN	<i>Alternaria japonica</i> CBHI	KF032027.1
T15	GATGGTTGCGATTTCAAYCCN	<i>Auricularia delicata</i> - Exocellobiohydrolase	XM_007338758.1
T17	GATGGGTGTGACTTCAAYCCN	<i>Penicillium oxalicum</i> - CBHI	HQ843504.1
T25	GATGGCTGTGACTTCAAYCCN	<i>Aspergillus fumigatus</i> - cellobiohydrolase celD	XM_745507.1
T27	GATGGCTGTGATTTCAAYCCN	<i>Penicillium janthinellum</i> - CBHI	XS9054.1
T29	GATGGCTGCGACTTCAAYCCN	<i>Penicillium decumbens</i> - EXO-glucanase	EF397602.2
T30	GATGGCTGCGACTTTAAAYCCN	<i>Pleurotus giganteus</i> - CBHI	JQ717250.1
C1	GACGGATGTGACTTCAAYCCN	<i>Penicillium purpurogenum</i> - cellobiohydrolase	JN180488.1
C3	GACGGATGTGATTTCAAYCCN	<i>Talaromyces stipitatus</i> - 1,4-beta-D-glucan-cellobiohydrolase	XM_002484794.1
C5	GACGGATGCGACTTCAAYCCN	<i>Trametes versicolor</i> - cellobiohydrolase I	XM_008041440.1
C9	GACGGTTGTGACTTCAAYCCN	<i>Leptosphaeria maculans</i> - CBHI	XM_003843671.1
C11	GACGGTTGTGATTTCAAYCCN	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> - exoglucanase	XM_006463762.1
C13	GACGGTTGCGACTTCAAYCCN	<i>Aspergillus flavus</i> - 1,4-beta-D-glucan-cellobiohydrolase	XM_002380273.1
C15	GACGGTTGCGATTTCAAYCCN	<i>Fusarium poae</i> exoglucanase type C	AY706934.1
C25	GACGGCTGTGACTTCAAYCCN	<i>Talaromyces emersonii</i> cellobiohydrolase I	AY081766.1
C29	GACGGCTGCGACTTCAAYCCN	<i>Penicillium oxalicum</i> - cellobiohydrolase I	KF233748.1
C30	GACGGCTGCGACTTTAAAYCCN	<i>Phytophthora infestans</i> T30-4 exoglucanase I	XM_002902681.1

**Table 4.9** Poly T 與最終採用的 18 條引子序列

Primer	Sequence	Match	Bonding temp(°C)
Forward			
T1	GATGGATGTGACTTCAAYCCN	2	59.5
T3	GATGGATGTGATTTCAAYCCN	7	57.5
T5	GATGGATGCGACTTCAAYCCN	6	59.5
T7	GATGGATGCGATTTCAAYCCN	1	57.5
T12	GATGGTTGTGATTTTAAAYCCN	6	55.4
T14	GATGGTTGCGACTTTAAAYCCN	3	59.5
T15	GATGGTTGCGATTTCAAYCCN	2	59.5
T17	GATGGGTGTGACTTCAAYCCN	4	59.5
T25	GATGGCTGTGACTTCAAYCCN	5	63.2
T27	GATGGCTGTGATTTCAAYCCN	1	59.5
T29	GATGGCTGCGACTTCAAYCCN	7	65.3
C1	GACGGATGTGACTTCAAYCCN	4	63.2
C3	GACGGATGTGATTTCAAYCCN	1	59.5
C11	GACGGTTGTGATTTCAAYCCN	1	59.5
C13	GACGGTTGCGACTTCAAYCCN	3	63.2
C25	GACGGCTGTGACTTCAAYCCN	2	63.2
C29	GACGGCTGCGACTTCAAYCCN	10	65.3
C30	GACGGCTGCGACTTTAAAYCCN	1	63.2
Reverse			
Poly T	TT		55

#### 4.5.2 利用 PCR 對 *cbhI-Mc* 進行序列擴增

利用 18 條 Forward 引子與 PolyT 作為 Reverse 引子嘗試將 *Mc-13-5-2-2* 的纖維水解基因(*cbhI-Mc*)擴增出來，為了使基因片段可以更容易與引子黏合，因此使用比較低的黏合溫度(55°C, 50°C)，經過 PCR 放大結果，如 Figure 4.12，在 Agarose 膠片顯示大部分的 Forward 引子與 PolyT 無法對 *Mc-13-5-2-2* 的 DNA 成功擴增，唯有利用引子 T29 進行 PCR 時能與部分 *Mc-13-5-2-2* 的 DNA 作黏合，本實驗選取 T29 引子與 PolyT 對 *Mc-13-5-2-2* 的 DNA 進行 PCR 放大後的產物進行純化與定序，嘗試得知 *cbhI-Mc* 部分序列。定序結果如附錄所呈現的，由於沒有明顯對應的核酸訊號，因此無法完整呈現 *cbhI-Mc* 序列。

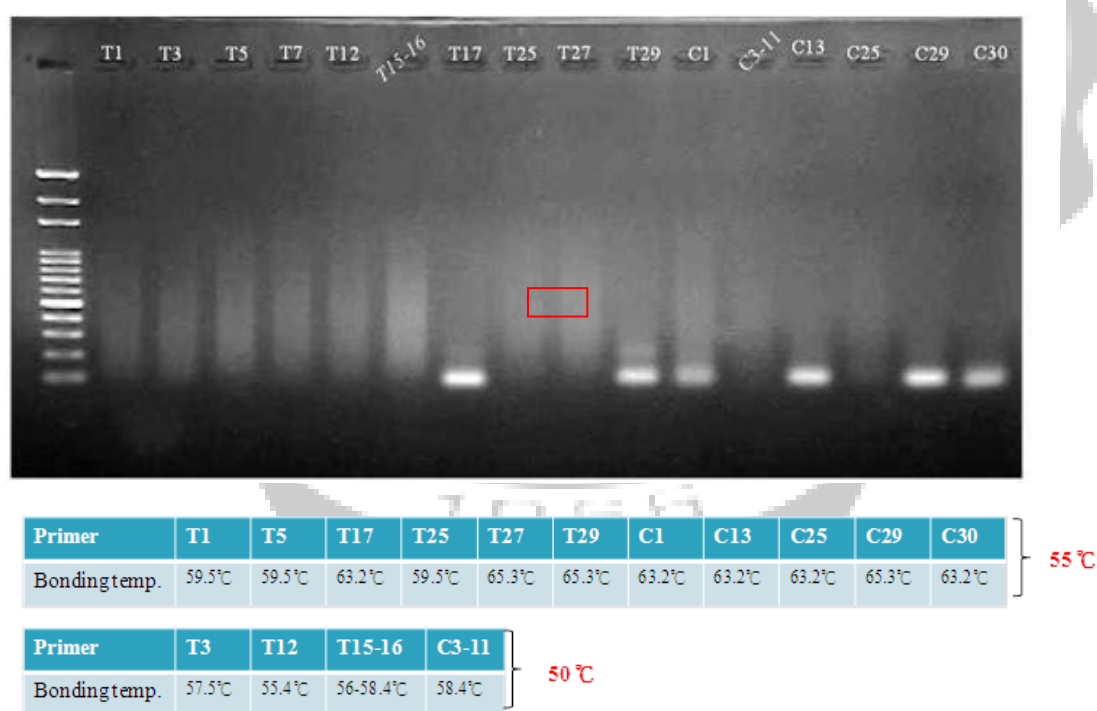


Figure 4.12 *cbhI-Mc* 放大結果與 PCR 擴增時引子黏合溫度條件

## 第五章、結論與建議

### 5.1 結論

(1) 本研究根據活性測試與蛋白質酶譜實驗結果，先從環境分離的 106 株真菌株中篩選出 4 株具有發展潛力的真菌，分別為 *Mc-13-5-2-2*、*Pm-13-6-2A*、*Tm-THU4* 及 *Mc-THU17*；利用對真菌 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 的序列與菌種基因庫 (NCBI) 比對結果，分別最相似於 *Meyerozyma caribbica*、*Penicillium marneffeii*、*Talaromyces marneffeii* 及 *Meyerozyma caribbica*；根據本研究對於 4 株具有發展潛力的真菌的研究結果。

(2) 本研究之真菌 (*Mc-13-5-2-2*、*Pm-13-6-2A*、*Tm-THU4* 及 *Mc-THU17*) 培養在 25°C 溫度及分別於 pH 5、7、6、6 條件下培養有最佳 avicelase 活性；其粗酵素分別在反應 pH 5、4、5、5 與反應溫度 70、50、50、70°C 條件下為最佳化反應條件。在穩定性測試結果中，唯有 *Mc-13-5-2-2* 與 *THU17* 有較長時間的 pH 穩定性 (pH4-5, pH3-5) 與溫度穩定性 (60-70°C, 60-70°C)。可以斷定在篩選的 106 株纖維水解真菌中，*Mc-13-5-2-2* 與 *Mc-THU17* 兩株真菌是較具發展潛力的，其中又以 13-5-2-2 最佳。

(3) 經過前處理之 *Mc-13-5-2-2* 的酵素，在蛋白質電泳與 MUC zymogram 分析結果，得知 *Mc-13-5-2-2* 所分泌的 CBHI-*Mc* (~70KDa) 根據定序的胺基酸序列與菌種基因庫比對結果，顯示其胺基酸序列與 *Aspergillus aculeatus* (O59843, NCBI) 部分纖維水解功能基因之序列相吻合，並且 *Mc-13-5-2-2* 的外切型纖維水解酵素是屬於 Exo- $\beta$ -1,4-glucanase 是尚未被文獻提及新穎的酵素。此外，CBHI-*Mc* 約佔總蛋白質的 3.6%，並推算出外切型纖維水解酵素之比活性為 0.126 U/mg，約為 *T. reesei* Rut C30 活性 (~0.26 U/mg) 的一半。

(4)本研究利用胺基酸定序後的結果為基礎，設計 18 條可能與 *cbhI-Mc* 相符合的引子，但經由 PCR 放大後的結果所示並不理想，因此這部分需要持續作嘗試。

## 5.2 建議

(1)實驗中大多以人為加工後的基質  $\alpha$ -cellulose 作為碳原，沒有對天然的纖維性基質進行深入探討，由於天然基質結構上的特性會讓酵素更難以接觸纖維素，並且會降低水解纖維素的產率，之後可以針對前處理後富含天然木質纖維的基質(例如、蔗渣、狼尾草...等)進行試驗。

(2)嘗試以宏基因定序的方式對 *Mc-13-5-2-2* 的 DNA 序列進行序列分析，從定序結果中找出屬於目標纖維水解基因 *cbhI-Mc* 的片段並進一步從序列中設計合適的引子，再利用 PCR 擴增 *cbhI-Mc* 完整的序列以助於將來以 *E-coli* 進行基因表現與對外切型纖維水解酵素 *CBHI-Mc* 的大量生產。

## 參考文獻

**Adsul M.G., Ghule J.E., Singh R., Shaikh H., Bastawdea K.B., Gokhale D.V. & Varma A.J. (2004)** Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production, *Carbohydr Polymers*. 57(1):67-72.

**Ando S., Ishida H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002)** Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*. *Applied Environment and Microbiology*. 68:430-433.

**Béguin P. and Aubert J.P. (1994)** The biological degradation of cellulose. *Federation of European Microbiological Societies. Review*. 13(1):25-58.

**Beldman G., Leeuwen M.J.S.V, Rombouts F.M. and Voragen F.G.J. (1985)** The cellulase of *Trichoderma viride*, *European Journal of Biochemistry*. 146(2):301 -308.

**Bhat M.K. And Bhat S. (1997)** Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15(3-4):583-620.

**Bockris J. (2002)** The origin of ideas on a Hydrogen Economy and its solution to the decay of the environment, *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(7-8):731-740.

**Boer H. and Koivula A. (2003)** The relationship between thermal stability and pH optimum studied with wild-type and mutant *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A. *European Journal of Biochemistry*. 207(5):841-848.

**BP, BP Statistical (2009)** Review of World Energy:.

**Chen H., Hayn M., Esterbauer H. (1993)** Three forms of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*, *Biochemistry and Molecular Biology International*. 30(5):901-10.

**Dashtban M., Maki M., Leung K. T., Mao C. and Qin W. (2010)** Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(4):302-309.

**Das D. and Veziroglu T.N. (2001)** Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1):13-28.

**de Lima ALG., do Nascimento RP., Bon EPD., Coelho RRR. (2005)** *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:272-277.

**Desvaux M. (2005)** *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiology Reviews*. 741-764.

**Fujii T., Fang X., Inoue H., Murak K. and Sawayama S. (2009)** Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*. 2:24.

**Gao L., Gao F., Wang L., Geng C., Chi L., Zhao J., Qu Y. (2012)** N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and synergism of non hydrolytic glycoform in cellulose degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 287(19):15906-15915.

**Gokhale D.V., Patil S.G., Bastawade K.B. (1991)** Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 30(1):99-109.

**Hao J.J., Tian X.J., Song F.Q., HE X.B., Zhang Z.J. and Zhang P. (2006)** Involvement of Lignocellulolytic Enzymes in the Decomposition of Leaf Litter in a Subtropical Forest. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53(3):193-198.

**Heupel C., Schlochtermeier A., Schrempf H. (1993)** Characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces reticuli*. *Enzyme Microbial Technology*. 15(2):127-132.

**Hesselman K. and Aman P. (1986)** The effect of  $\beta$ -glucanase on the utilization of starch and nitrogen by broiler chicken fed on barley of low or high viscosity. *Animal Feed Science and Technology*. 15(2):83-93.



**Howard R.L, Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L and Howard S. (2003).** Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology. 2(12):602-619.

**Irfan M. and Syed Q. (2012)** Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF, International Journal of Applied Research in Natural Products. 5(1):7-11.

**Jackson M. E., Geronian K., Knox A., McNab J. and McCartney E. (2004)** A dose-response study with the feed enzyme beta-mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoters, Poultry Science. 83(12):1992-1996.

**Jahangeer S., Khan N., Sohail M., Shahzad S., Ahmad A. and Khan SA. (2005)** Screening and characterization of fungal cellulase isolated from the native environmental source. Pakistan Journal of Botany. 37(3):739-748.

**Kumar R, Singh S and Singh OV. (2008)** Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 35(5):377-91.

**Kuhad R. C., Gupta R., and Singh A.(2011)** Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research, Article ID 280696, doi:10.4061/280696

**Lee, R. L., Charles, E. W., Tillman, U. G. (1999).** Biocommodity engineering Biotechnol. Prog. 15:777-793.

**Lee K.M., Moon H.J., Kalyani D., Kim I.W., Jeya M., Lee J.K. (2011)** Characterization of cellobiohydrolase from newly isolated strain of *Agaricus arvensis*, Journal of Microbiology and Biotechnology. 21(7):711-718.

**Li X.L. and Calza R.E. (1991)** Fractionation of cellulases from the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. Applied and Environmental Microbiology. 57(11): 3331-3336

**Linder, M. and Teeri, T.T. (1996)** The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93(22):12251-12255.

**Lynd, L. R., Weimer, P.J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002)** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66(3):506-77.

**Lowe S.E., Theodorou M.K. and Trinci A. P. (1987)** Cellulase and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan.. Applied and Environmental Microbiology. 53(6):1216-1223.

**Mandels, M. (1985).** Application of cellulases. Biochemical Society Trans 13:414-415.

**Miettinen O. Paloheimo M., Lantto R. and Suominen P. (2005)** Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. Journal of Biotechnology. 116(3)305-317.

**Miller G.L. (1959)** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry. 31(3):426-428

**Marina M.H., Ballester A.R., Beatriz F., Eleonora H., Jose F. M., Luis G.C., Toni G., (2012)** Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BioMed Central. 13:646.

**Montenecourt B.S, Eveleigh D.E, (1979)** Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. Department of Biochemistry and Microbiology. 14:289-301.

**Mountfort D.O, Asher R.A.,(1985)** Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Applied and Environmental Microbiology. 49(5): 1314-1322.

**Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P. (1999)** Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science. 77:149-162

**Romero M.D, Aguado J, Gonzalez L. and Ladero M. (1999)** Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5) 244-250.

**Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itavaara M. (2000)** Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*.72:169-183

**Wang J., Gao P. (2000)** In vitro expression of *Penicillium janthinellum* cellobiohydrolase I gene in a coupled transcription-translation system, *Journal of Biotechnology*. 81(2-3) 205-209.

**Weber D.J., Saviateer S.M., Rutala W.A., Thomann C.A. (1988)** In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents, *Antimicrob Agents Chemother*. 32(5): 642-645.

**Unsitalo J.M., Nevalainen K.M., Harkki A.M., Knowles, J.K.C. and Penttila M.E., (1991)** Enzyme production by recombinant *Trichoderma reesei* strains. *Journal of Biotechnology*. 17(1)35-50.

**Yang B., Willies D.M., Wyman CE. (2006)** Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion, *Biotechnology and Bioengineering*. 94(6): 1122-112.

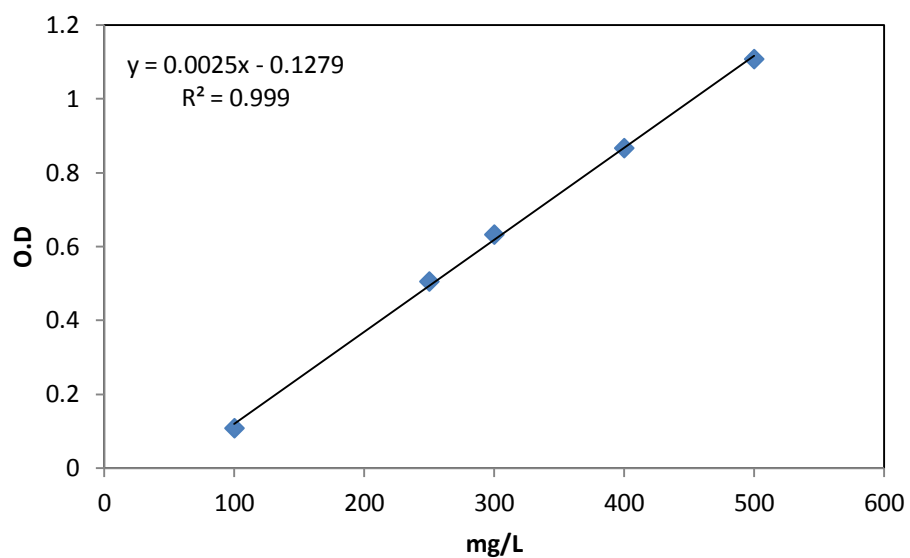
李秉璋，農業廢棄物資源化趨勢簡析，台灣經濟研究院生物科技產業研究中心，2013

林祐生、李文乾，生質酒精，科學發展 433 期，2009 年

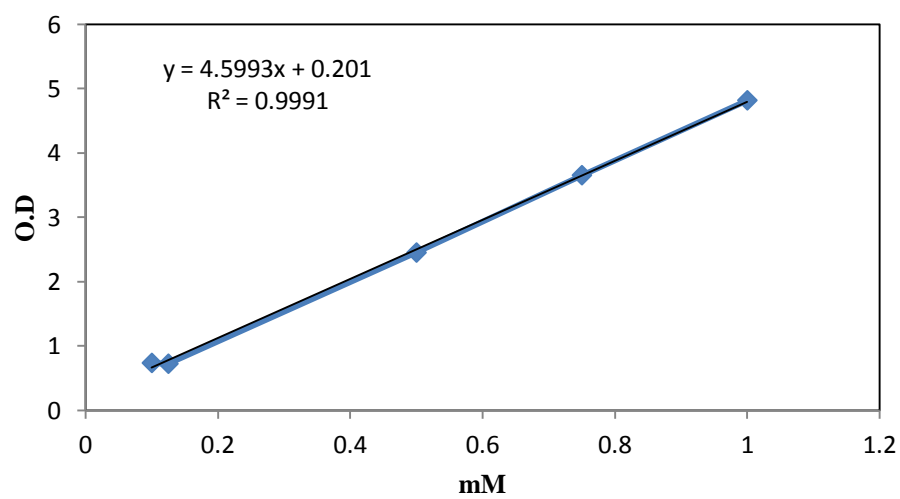
陳文恆、郭家倫、黃文松、王嘉寶，纖維酒精之技術發展，農業生技產業季刊，2007

# 附錄

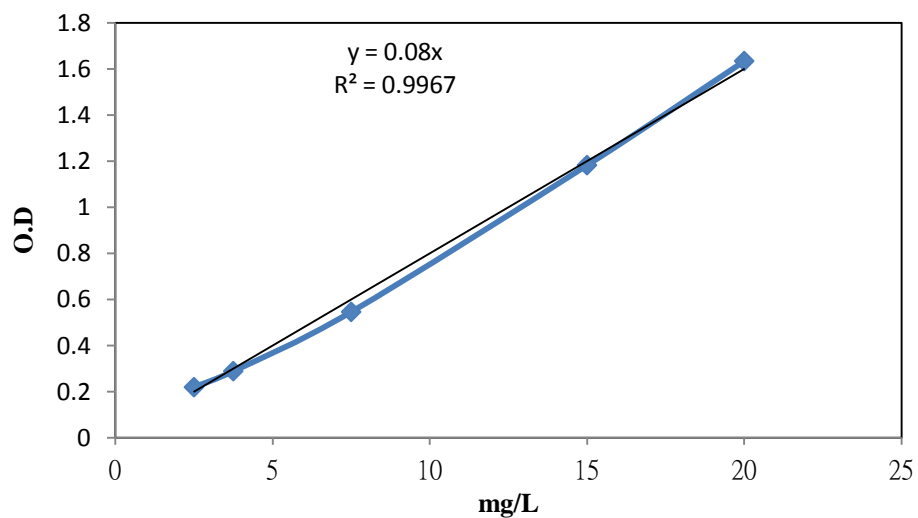
## 附錄一、還原糖檢量線



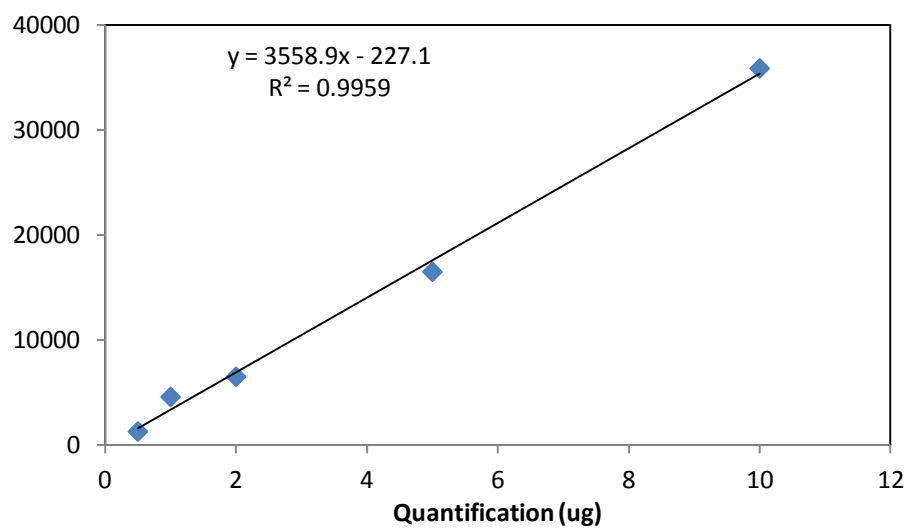
## 附錄二、pNP 檢量線



附錄三、蛋白質檢量線

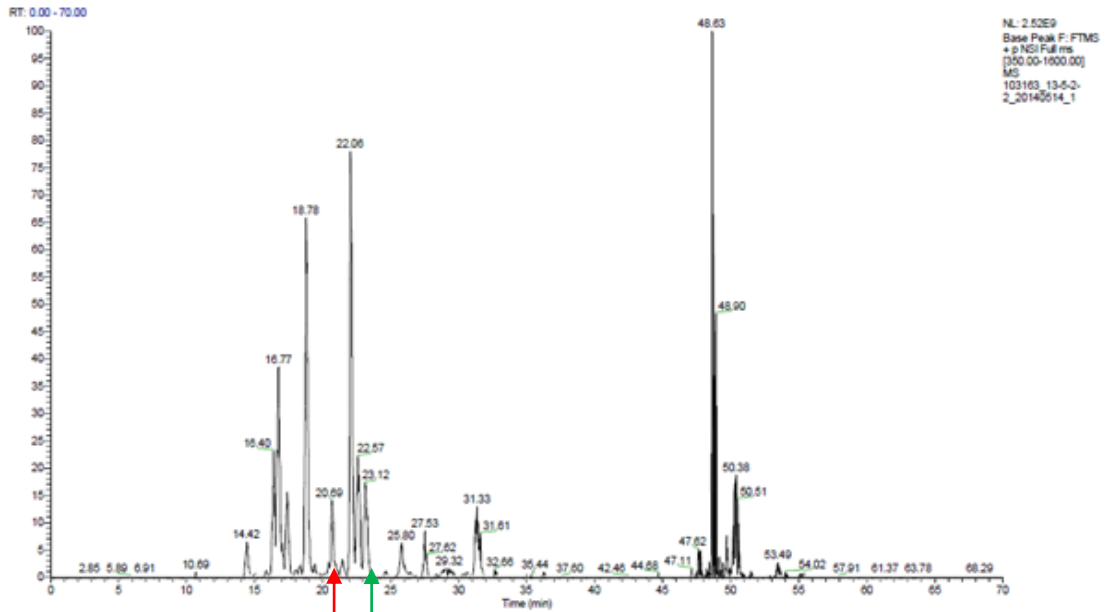


附錄四、影像分析 BSA 之檢量線



附錄五、胺基酸分析結果

103163



附錄六、胺基酸比對結果與對應位置(Accession:O59843, NCBI)

```

1  mvdsfsiykt allslmlats naqqvgtyta ethpsltwqt csgsgscttt sgsvidanw
61  rrwhevgyt ncysgntwds sicstdttca secalegaty estygvttsg sslrlnfvt
121 asqknigsrl ylladdstye tfklfnreft fdvdvsnlpc glngalyfvs mdadggvsrf
181 ptnkagakyg tgycdsqcpr dlkfidgqan iegwepsstd vnagtgnhgs cpemdiwea
241 nsissaftah pcdsvqqtmc tgdtcggty dttdysgtc dpdgcdfnpy rfgntnfygp
301 gktvdnskipf tvvtqfithd gtdtgtltei rrllyvqngvv igngpstyta asgnsitesf
361 ckaektlfgd tnvfethggl samgdalgdg mvlvlsldd haadmlwlds dypttscass
421 pgvargtcpt ttgnatyvea nypnsyvtys nikfgtlnst ysgtssggss ssstlttka
481 ststtsktt tttststts ssstnvaqly gqcgggwtg pttcasgtct kqndyysqcl
    
```

附錄七、Mc-13-5-2-2 選取的胺基酸對應可能的核酸序列

D	G	C	D	F	N	P
GAT-						GAC-
GATGGATGTGACTTCAAYCCN						GACGGATGTGACTTCAAYCCN
GATGGATGTGACTTTAAYCCN						GACGGATGTGACTTTAAYCCN
GATGGATGTGATTTCAAYCCN						GACGGATGTGATTTCAAYCCN
GATGGATGTGATTTAAYCCN						GACGGATGTGATTTAAYCCN
GATGGATGCGACTTCAAYCCN						GACGGATGCGACTTCAAYCCN
GATGGATGCGACTTTAAYCCN						GACGGATGCGACTTTAAYCCN
GATGGATGCGATTTCAAYCCN						GACGGATGCGATTTCAAYCCN
GATGGATGCGATTTAAYCCN						GACGGATGCGATTTAAYCCN
GATGGTTGTGACTTCAAYCCN						GACGGTTGTGACTTCAAYCCN
GATGGTTGTGACTTTAAYCCN						GACGGTTGTGACTTTAAYCCN
GATGGTTGTGATTTCAAYCCN						GACGGTTGTGATTTCAAYCCN
GATGGTTGTGATTTAAYCCN						GACGGTTGTGATTTAAYCCN
GATGGTTGCGACTTCAAYCCN						GACGGTTGCGACTTCAAYCCN
GATGGTTGCGACTTTAAYCCN						GACGGTTGCGACTTTAAYCCN
GATGGTTGCGATTTCAAYCCN						GACGGTTGCGATTTCAAYCCN
GATGGTTGCGATTTAAYCCN						GACGGTTGCGATTTAAYCCN
GATGGGTGTGACTTCAAYCCN						GACGGGTGTGACTTCAAYCCN
GATGGGTGTGACTTTAAYCCN						GACGGGTGTGACTTTAAYCCN
GATGGGTGTGATTTCAAYCCN						GACGGGTGTGATTTCAAYCCN
GATGGGTGTGATTTAAYCCN						GACGGGTGTGATTTAAYCCN
GATGGGTGCGACTTCAAYCCN						GACGGGTGCGACTTCAAYCCN
GATGGGTGCGACTTTAAYCCN						GACGGGTGCGACTTTAAYCCN
GATGGGTGCGATTTCAAYCCN						GACGGGTGCGATTTCAAYCCN
GATGGGTGCGATTTAAYCCN						GACGGGTGCGATTTAAYCCN
GATGGCTGTGACTTCAAYCCN						GACGGCTGTGACTTCAAYCCN
GATGGCTGTGACTTTAAYCCN						GACGGCTGTGACTTTAAYCCN
GATGGCTGTGATTTCAAYCCN						GACGGCTGTGATTTCAAYCCN
GATGGCTGTGATTTAAYCCN						GACGGCTGTGATTTAAYCCN
GATGGCTGCGACTTCAAYCCN						GACGGCTGCGACTTCAAYCCN
GATGGCTGCGACTTTAAYCCN						GACGGCTGCGACTTTAAYCCN
GATGGCTGCGATTTCAAYCCN						GACGGCTGCGATTTCAAYCCN
GATGGCTGCGATTTAAYCCN						GACGGCTGCGATTTAAYCCN

### 附錄八、以 Primer T29 對 *cbhI-Mc* PCR 放大後定序結果

