

## 生 命 組



**姓名：徐麗芬**

**學歷：**

國立台灣大學農業化學研究所博士(1990)

國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士(1986)

國立台灣海洋大學水產食品科學系學士(1984)

**現職及經歷：**

中央研究院生物農業科學研究所籌備處副研究員  
(2003/3- 迄今)

中央研究院生物農業科學研究所籌備處助研究員  
(1998/2-2003/2)

美國愛荷華州立大學生化與生物物理系博士後研究員  
(1994-1997)

台灣大學農業化學系博士後研究員(1992)

長庚大學生化系博士後研究員(1991)



**著作名稱：**

由基礎研究邁向應用之路：從葡聚糖酵素之  
蛋白質工程研究談起

**中文簡介：**

1,3-1,4- $\beta$ -D-葡聚糖酵素(1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase)屬於半纖維(hemicellulose)水解  
酵素之其中一種。此酵素催化反應的特異性  
在於水解植物細胞壁之 $\beta$ -D-glucans 多醣成

份，而形成三至四個寡糖組成的終產物。此酵素已被廣泛應用在食品加工、動物飼料的添加及釀酒工業上。動物飼料工業使用此類酵素的目的是，是希望利用葡聚糖酵素將動物飼料中的植物來源成份如：大麥、玉米或其他穀類所含的葡聚糖聚合多醣質等分解成寡糖，以克服非反芻類家禽動物（如：雞隻）因腸胃道寄生細菌缺乏可分解此類多醣聚合物所造成的動物吸收困難與消化排泄問題，並相對的增進動物對飼料成分之利用，進而提高其成長率。葡聚糖酵素應用於釀酒工業上則是於釀酒加工(malting or brewing)過程中添加，以增進麥芽汁之過濾率與減少混濁等。目前已有由細菌（以枯草桿菌屬細菌為主）、真菌（如牛胃真菌）或植物（如大麥）組織中鑑定或分離出 1,3-1,4- $\beta$ -D-葡聚糖酵素或其基因，而於工業上使用的此類酵素，大多為由枯草桿菌分離出來的基因，然後利用發酵槽技術大量生產製造供商業上使用。

以工業應用的角度而言，一個酵素必須具備一些條件，例如：高耐熱性、高活性等，才較具有工業利用性、商業價值或競爭性。例如做為動物飼料添加酵素用途時，在飼料加工造粒時有一高溫(75~80°C)處理過程，而如果酵素活性可穩定維持，則提高其價值與利用性。目前台灣大部分的飼料用添加酵素都仰賴進口，因此，如果有優質酵素基因可提供國內生技廠商做進一步開發生產，當可直接或間接幫助台灣之生技產業。

本研究室為配合中研院生農所籌備處，以任務導向研究的目標與要求，並兼具基礎與生技應用研發的研究題材與方向，我們選擇以1,3-1,4- $\beta$ -D-葡聚糖酵素為目標酵素，利用酵素基因本身的改造為研究策略，來改變酵素蛋白質的反應催化活性或耐熱性等，以提高其在工業應用價值。我們將由一已於1989年分離與發表的牛胃寄生細菌 *Fibrobacter succinogenes* 分離之 1,3-1,4- $\beta$ -D-葡聚糖酵素基因，利用蛋白質工程之手段並採傳統「理論設計」(rational design)研究策略（例如：融合基因定點突變、酵素動力學研究、蛋白質摺疊與結構模擬等技術系統），以及近年來發展的「体外分子演化」(Directed evolution)之研究策略，直接於「試管中」進行基因突變與重組之類似天然基因演化過程，進行深入及系統性探討此葡聚糖酵素結構與功能關係的基礎研究。這些包括有酵素催化機



圖：增加催化反應比活性與熱耐受性的截短型 *F. succinogenes* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D 葡聚糖酵素之結構與功能的研究。（徐麗芬與袁小珍博士之合作研究成果）

制的探討，鑑定重要參與酵素催化反應或與酵素蛋白質結構安定有關的重要胺基酸殘基，以及金屬離子在這酵素扮演的角色等。我們已於2001年(*J. Biological Chemistry*, 276; 17895-17901)首度發表參與*F. succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase催化反應與酵素熱安定性的幾個重要胺基酸殘基，包括Glu56，Asp58，Glu60及Gly63，並在此文章中探討酵素的催化作用機制。另外，全面探討此酵素中九個Tryptophan殘基在1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase之結構與功能上扮演的角色，並發現影響催化反應之重要色胺酸殘基，文章則發表於*Biochemistry*, 2002: 41, 8759-8766。

我們利用最簡便的聚合酵素鏈鎖反應技術(PCR)重組野生型*F. succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase基因，在適當的位置截切此酵素蛋白質之後，獲得一株提高催化反應效率與耐熱性之截短型(Truncated form)葡聚糖酵素，此改造後的酵素蛋白質可極有效的於大腸桿菌與酵母菌中表達，這有利於後續之商業生產應用。而純化的酵素於煮沸溫度處理10分鐘後，可回復>80%相對於未處理天然酵素的活性；而相同條件處理30分鐘後，則可回復>60%相對活性。除了對此改良後的酵素之催化機制、蛋白質結構摺疊(structural folding)等已進行深入研究外，我們並已與中央研究院分子生物學研究所研究員袁小珍博士合作，成功的將此截短型*F. succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase酵素之蛋白質三級結構訂出，並發表結果於*J. Molecular Biology* (2003, 330: 607-620)與*Acta Crystallographica Sec-*

*tion D* (2001, D57, 1303-1306)。此改良的截短型葡聚糖酵素，目前正在申請美國與中華民國專利中，而且已經由中研院公共事務組進行技術轉移給國內廠商，著手下游生產的研發工作。

這一系列*F. succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase的研究工作與成果，據理解是在國際間居於領先地位的，不但對葡聚糖酵素在基礎科學層面上首度提供此酵素催化機制、熱穩定性相關重要訊息，並成功改良了酵素的活性與穩定性，實質上增進了1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase在工業使用上之優勢條件與潛在經濟效益；同時，改良的截短型葡聚糖酵素並已提供台灣生技工業之開發與利用，這些成果是理論研究與應用科學相結合之一實際成功的例子。

### 評審簡評：

- (一)徐博士研究 *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase 酵素之動力學，及螢光比色法，及 structural modeling，這些成果發表於 *Biochemistry* 及 *JBC*，且均為通信作者。
- (二)徐博士另發現 truncated glucanase 其活性比野生株高，已經申請到美國專利權，對動物飼料之利用率，及釀酒過程可增加麥芽汁利用率。
- (三)徐博士之學術成就佳，其研究成果具學術價值及應用價值，故極力推薦。