

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣溫泉中好氧性嗜熱細菌之分離及其特性之探討(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2317-B-002-014-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科學研究所

計畫主持人：張文章

共同主持人：蔡珊珊，吳世雄，黃啟裕

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 10 日

農業生物技術國家型科技計劃

成果報告書

計劃名稱：台灣本土溫泉嗜熱菌的調查收集鑑定及其農業上之應用 (2/2)

計劃編號：NSC 91-2317-B-002-014

執行單位：國立台灣大學生化科學研究所

計劃主持人：張文章, 蔡珊珊, 黃啟裕, 吳世雄

聯絡電話：23620261*2071

Fax:2363-5038

電子信箱：bcwchang@ccvax.sinica.edu.tw

中文摘要

- 1. 台灣溫泉中嗜熱菌的分離與種源庫的建立：**本研究已對台灣地區 22 處地熱溫泉區進行樣本的採集與分析，同時進行好氧性嗜熱菌的分離、純化、培養與鑑定，並以低溫冷凍櫃及冷凍乾燥法進行種源之長期保存。截至目前為止，得到分離之本土嗜熱菌株種源庫共計有株 416 株（好氧性 320 株，厭氧性 96 株），分別存於國立台灣大學、中央研究院生物化學研究所慈濟大學等三地。種源庫內菌株經格蘭氏染色，電子顯微鏡觀察、16 S rDNA 分析及酵素分析，已有部分分離株具鑑定結果，分屬格蘭氏陽性的 *Bacillus*、*Geobacillus*、*Rubrobacter*、*Deinococcus*、*Caloramator* 及 *Thermobrachium* 等菌屬；及格蘭氏陰性的細菌，包含 *Thermus*、*Meiothermus*、*Chloroflexus*、*Rhodothermus*、及 *Pseudoxanthomonas* 等屬；以 16 S rDNA 序列分析研判，其中有部份的高溫菌為本土的新屬或新種。
- 2. 具高酵素活性嗜熱菌株之篩選與相關基因選殖：**
對本土嗜熱菌進行酵素活性的分析，發現有 20% 菌株具澱粉水解酶活性，25% 菌株具蛋白酶活性及 38% 菌株具脂質水解酶活性，目前已針對這些具活性菌株進行深入的分析，期能篩選出高活性之菌株。
- 3. 高抗性嗜熱菌分離株的篩選**
發現許多具高紫外線及輻射線的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性及高 γ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407^T，極具作為表現載體的潛力。此外利用高劑量紫外線及 γ -radiation 對溫泉樣品作前處理，分離高抗性菌株，共計得到 87 株分離株（50 °C 計 60 株；60 °C 計 17 株；70 °C 計 10 株），部份經 16S rDNA 序列鑑定後分屬 *Deinococcus sp.*、*Rubrobacter sp.*、*Bacillus sp.*、*Geobacillus sp.*、*Thermus sp.* 等菌屬，其輻射線抗性、生理遺傳特性與酵素活性將為下一步之研究方向。
- 4. 熱穩定性酵素基因的選殖載體構築與表現系統的建立：**
目前已利用快速篩選質體的方式，篩選出 53 株具質體的高溫菌株，並利用當中 NTU-103 菌株質體建構出一個 shuttle vector-p103，未來將以其為基礎，嘗試表現由本土嗜熱菌所選殖出熱穩定酵素的基因，以達到大量表現酵素的目標。

ABSTRACT

- 1. Isolation of thermophilic bacteria and construction of strain library:** We have surveyed 22 hot springs in Taiwan to collect and analyze the bacteria contained therein. The bacterial strains were isolated, purified, cultured and identified. Up to date we have obtained 416 strains including 320 aerobic and 96 anaerobic bacterial strains. These are deposited in Academia Sinica, National Taiwan University and Tzu-Chi University. These bacteria were identified by Gram stain, electron microscopy and 16S rDNA sequencing and enzymatic analysis. They found to belong to *Bacillus*, *Geobacillus*, *Rubrobacter*, *Deinococcus*, *Caloramator*, *Thermobrachium*; *Thermus*, *Meiothermus*, *Chloroflexus*, *Rhodothermus* and *Pseudoxanthomonas*.
- 2. Analyses of the enzymatic properties revealed that 20 % of the thermophilic strains contain amylase activity, 25 % contain protease activity and 38 % contain lipase activity. These strains are being analyzed in order to find bacteria with higher enzymatic activity.**
- 3. We have isolated several new strains with remarkable resistance to UV and gamma-radiation, such as *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T and *Deinococcus taiwanensis* WR-407^T.** By using high dose of UV and gamma-radiation to treat the thermophilic bacteria we also found 87 strains of thermophilic and radiation-resistant bacteria, which can grow at temperatures from 50~70 °C. By 16S rDNA sequencing we found some of these bacteria to belong to *Deinococcus sp.*, *Rubrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Geobacillus sp.*, *Thermus sp.*
- 4. Gene cloning of thermophilic enzymes and construction of a shuttle vector**
We have screened 53 bacterial strains which contain plasmids and constructed a shuttle vector by using the plasmid existing in NTU-103. This shuttle vector will be useful for the construction of expression vector for the large-scale expression of thermophilic enzymes.

計劃緣起及目的

1. 嗜熱細菌的背景介紹

嗜熱細菌之發現對於生命科學之研究為一重要之里程碑(Rothschild & Mancinelli, 2001)。此種細菌為了應付及適應高溫之極端環境，常會發展出特異的生理特性，特別是不同酵素的系統。加上這些極端的環境，如溫泉、火山口等，皆是屬於個別差異大及穩定程度高的微小環境，當中的微生物相具地理區隔，在同種微生物中常會出現不同生理品系的現象。

由於嗜熱菌可忍受極高溫之環境，其細胞之生理結構及功能必須與生長在一般所謂”正常環境”下之微生物有所不同，因此近幾十年來高溫菌已引起各種領域之科學家的興趣。自從1969年 Brock 和 Freeze 由黃石公園溫泉中分離出 *Thermus aquaticus* 之後(Brock & Freeze, 1969)，這類高溫菌在世界各地之 50-90°C 中性或鹼性水域中陸續被分離得到。由於嗜熱菌之酵素系統在極端環境下仍保有活性，高溫菌的蛋白結構具有異於一般蛋白的穩定性；其中以 Taq DNA polymerase 在 PCR 上的應用最廣為人知(Chien, *et al.*, 1976)。

臺灣地理環境的特殊性

台灣素有美麗寶島之稱，地處環太平洋火山帶上，島上地熱特徵明顯，特別是溫泉的密度相當之高，到民國八十五年止，有命名之溫泉即達 127 座(張寶堂 1995)，其分布包括平原、溪谷、高山或海域，其內涵又可分冷泉、溫泉、高溫泉或白磺、青磺、碳酸泉、鹼性溫泉等(楊麗芳、林俊宏 2000)。當中所得之微生物資源應具相當規模。但是到目前為止，除了少部分零星的報導(Lin, *et al.*, 1994; Lin, *et al.*, 1996; Lin, *et al.*, 1998)，並無對特殊環境微生物作有系統的調查，更遑論進一步的研究與應用。

嗜熱細菌的應用潛力

目前工業上所常利用的酵素，例如澱粉水解酶 (amylases)，幾丁質水解酶 (chitinases)，果膠水解酶 (pectinases)，纖維素水解酶 (cellulases)，蛋白酶 (proteases)，脂質水解酶 (lipases) 等，都已有高產能的菌株被分離出，用途非常廣泛。例如：澱粉水解酶會將澱粉分解產生葡萄糖和麥芽糖，可當作甜味劑或糖精的材料(Lin *et al.*, 1996)。木聚醣水解酶(xylanases)主要分解木材中的木聚醣(xylan)及木質素(ligin)的部分，常使用於製紙業上紙質的漂白，以增加明亮度；也可應用在動物飼料和果汁果醬的製造上(Breccia *et al.*, 1998；Sunna *et al.*, 1997；Viikari *et al.*, 1994)。而蛋白質及脂肪水解酵素可應用的範圍更廣，前者已廣泛的應用於家用清潔劑及動物飼料的添加，隱形眼鏡的清洗液，人工甜味料阿斯巴甜的合成，肉質軟化劑，啤酒消泡劑，毛料加工處理.....，而後者則已廣泛的應用於家用清潔劑及洗髮精的添加，生產具有光學活性異構物的藥品，分解廢紙上的油墨，去除紙漿中的樹脂，生產高價位的特殊油脂.....。嗜熱菌產生的各種耐熱酵素，理論上應具有異於一般蛋白的穩定性，能延長酵素的使用壽命；此外，這種穩定的蛋白結構，也有利於將酵素共價鍵結於一些固態支撐物上，簡化產物的純化回收步驟和提升酵素的再利用率。

除熱穩定的酵素外，嗜熱菌對環境的逆境如高輻射線、鹽類、酸鹼度變化、滲透壓變化、水勢能變化等亦有相當程度的抗性，本身相當適合供生物技術表現作平台之用。此外，嗜熱菌在極端環境下仍保有活性，因此亦可應用其於處理工業界所排放的廢水（高溫、強酸鹼性或高鹽濃度）及農業廢棄物，降解其中之生物可分解性廢棄物，減少環境污染。

2. 計劃目的

在過去數年在國科會支持的個人計劃中，發現台灣地熱溫泉區內的微生物資源相當豐富，但缺乏系統性的研究與應用，實為可惜，而這兩年由農業國家型計劃所支持的整合型研究，更凸顯出溫泉區高溫微生物除了在學術上具高研究價值外，其特異的生理特性更是在生物技術應用上具極高的開發潛力。

本整合型研究計劃的目的有四：一、調查、收集、鑑定與保存本土嗜熱菌資源，建立可供利用的本土性嗜熱菌種源庫；二、研究嗜熱菌的生理特性，篩選具高酵素活性或高抗性的基因及菌株，建立嗜熱菌耐熱酵素表現系統，三、將高活性菌株或酵素，應用於解決農業問題，特別是探討農業廢棄物的處理與資源化上，四、提供學術性研究的新方向，期待更多的研究者投入相關的研究中。

台灣本土的溫泉嗜熱菌，是一個上天所賜的資源，相當的珍貴且極具開發潛力，過去尚未有計畫對此類微生物進行一系統性的收集與保存，加上近年來國人泡湯習慣漸漸興盛，造成溫泉區過度開發，終使棲地消失而溫泉嗜熱菌嚴重流失。相較於世界各國如歐盟對這此領域的重視與發展（Alfredo *et al.*, 1998），臺灣在此方面幸運地有許多的珍貴資源可供我們迎頭趕上，因此執行本整合型計劃，系統性收集、保存及鑑定台灣本土的溫泉嗜熱菌，並利用嗜熱菌應用於農業廢棄物處理與資源化上外，有其獨特發展性與急迫性。

結果與討論

1. **台灣溫泉中嗜熱菌的分離與種源庫的建立**：本研究截至目前為止已對台灣地區 22 處地熱溫泉區進行樣本的採集與分析，除溫泉水樣外，對於其地理資訊與地質資料亦同時進行收集，同時進行好氧性嗜熱菌的分離、純化、培養與鑑定，並於最後以低溫冷凍櫃及冷凍乾燥法進行種源之長期保存。截至目前為止，得到分離之本土嗜熱菌株種源庫共計有株 416 株（好氧性 320 株，厭氧性 96 株），分別存於國立台灣大學、中央研究院生物化學研究所慈濟大學等三地。種源庫內菌株經格蘭氏染色，電子顯微鏡觀察、16 S rDNA 分析及酵素分析，已有部分分離株具鑑定結果，分屬格蘭氏陽性的 *Bacillus*、*Geobacillus*、*Rubrobacter*、*Deinococcus*、*Caloramator* 及 *Thermobrachium* 等菌屬；及格蘭氏陰性的細菌，包含 *Thermus*、*Meiothermus*、*Chloroflexus*、*Rhodothermus*、及 *Pseudoxanthomonas* 等屬；以 16 S rDNA 序列分析研判，其中有部份的高溫菌為本土的新屬或新種。部分菌種已寄存於國內外各大菌種中心內。初步研究成果如下：

本土分離新種（已發表）

1. Chen, M. Y., S. S. Tsay, K. Y. Chen, Y. T. Lin and G. H. Lin. 2002. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a new thermophilic N₂O-producing isolate from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2155-2161.
2. Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay. 2002. *Meiothermus taiwanensis* sp. nov., a novel filamentous thermophilic species isolated from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1647-1654.
3. Lin, G. H., M. Y. Chen, and S. S. Tsay. 2001/05. Thermophilic microorganisms in Taiwan. American Society of Microbiology Meeting. USA. (poster)

4. Chen, M. Y., W. C. Chang, S. H. Wu, G. H. Lin, C. P. Lu, Y. T. Lin, J. C. Fan, S. S. Tsay. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a new thermophilic radiation resistant isolate from Taiwan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (submitted)。

2. 由本土溫泉篩選，經鑑定後儲存到國內外菌種中心之嗜熱菌新種

- (1) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Meiothermus taiwanensis* WR-30^T = ATCC BAA-399^T (=CCRC 17170^T=DSM 14542^T).
- (2) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Meiothermus taiwanensis* WR-220 = ATCC BAA-400 (=CCRC-17171=DSM 14543).
- (3) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226^T = ATCC BAA-404^T and CCRC-17172^T.
- (4) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T = ATCC BAA-406^T (=CCRC 17173^T).
- (5) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Rubrobacter taiwanensis* LS-286 = ATCC BAA-452 (=CCRC 17198).

3. 具高酵素活性嗜熱菌株之篩選與相關基因選殖：

除上述以台灣本土嗜熱菌種源庫所為基礎的本土新種外，更分離出許多具特殊生理活性的嗜熱菌株對本土嗜熱菌所作進行酵素活性的分析結果中，發現有 20% 菌株具澱粉水解酶活性，25% 菌株具蛋白酶活性及 38% 菌株具脂質水解酶活性，目前已針對這些具活性菌株進行深入的分析，期能篩選出高活性之菌株。此外對於較少見之酵素，已篩選出具有纖維素、半纖維素或木質素分解能力之高溫菌株共計 94 株（好氧性 20 株，厭氧性 74 株）。在各種本土分離株中目前發現，已有數株具高度農業應用之潛力，如 *Geobacillus* 屬分離株 NTU-249 及 *Brevibacillus* 屬分離株 NTU-232 具高蛋白酵素活性，*Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226^T 具高溫脫氮活性等，其中針對具高外泌蛋白酶活性的 *Geobacillus* sp. NTU-249 菌株，已著手開始進行其蛋白酵素的純化與定性，而目前已知其分子量約為 65 kD，且銅離子會加強其酵素活性。而 *Brevibacillus* 屬分離株 NTU-232 的蛋白酶則已完成基因的選殖，此部份成果如下：

- (1) 陶光恆、蔡珊珊，2002/12，台灣嗜熱細菌 *Thermus taiwanensis* WL-219 含錳超氧歧化酶之篩選與表現，中華民國微生物學會第三十六次會員大會。（壁報）
- (2) 林詠婷、陳灝平、陳懋彥、蔡珊珊，2000/12，台灣烏來溫泉嗜熱細菌 *Bacillus thermocatenulatus* WL65 之篩選與蛋白酶的分析，中華民國微生物學會第三十四次會員大會
- (3) Lee, A. Y. L., S. S. Tsay, M. Y. Chen, C. Y. Huang and S. H. Wu. 2003. Molecular cloning and characterization of Lon Protease from thermophilic *Brevibacillus thermoruber* WR-249 with thermostability and chaperone-like activity. *J. Bacteriol.* Submitted.

4. 高抗性嗜熱菌分離株的篩選

在研究中已發現許多具高紫外線及輻射線的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性

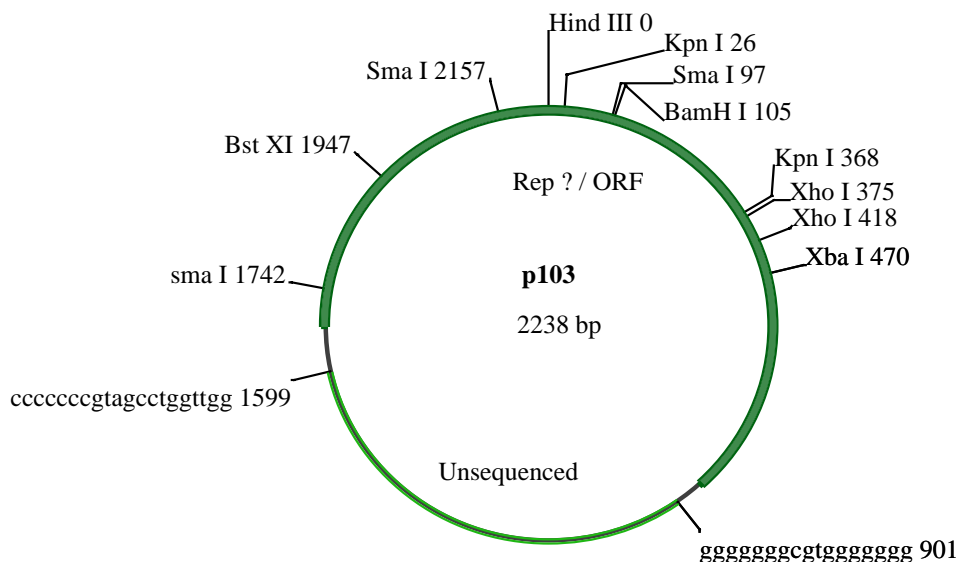
γ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407^T，極具作為表現載體的潛力。此外利用高劑量紫外線及 γ -radiation 對溫泉樣品作前處理，分離高抗性菌株，共計得到 87 株分離株（50 °C 計 60 株；60 °C 計 17 株；70 °C 計 10 株），部份經 16S rDNA 序列鑑定後分屬 *Deinococcus sp.*、*Rubrobacter sp.*、*Bacillus sp.*、*Geobacillus sp.*、*Thermus sp.* 等菌屬，其輻射線抗性、生理遺傳特性與酵素活性將為下一步之研究方向。

5. 利用嗜熱菌於農業廢棄物處理與資源化的評估

此部份為尚起始之研究階段，目前已完成設備的建構及菌株的篩選，將利用先前已篩選出具有纖維素、半纖維素或木質素分解能力之高溫菌株共計 94 株（好氧性 20 株，厭氧性 74 株），及具其它酵素活性（蛋白酶、澱粉酶等）的菌株，以單獨菌種或混合菌種培養的方式，添加至農業廢棄物中，觀察其處理效果及優缺點，及探討處理系統的最佳條件，以其達到能實用於農業廢棄物處理與資源化之目的。

6. 熱穩定性酵素基因的選殖載體構築與表現系統的建立：

目前已利用快速篩選質體的方式，篩選出 53 株具質體的高溫菌株，並利用當中 NTU-103 菌株質體建構出一個 shuttle vector-p103，未來將以其為基礎，嘗試表現由本土嗜熱菌所選殖出熱穩定酵素的基因，以達到大量表現酵素的目標。除表現載體外，在研究中本研究群亦發現許多具高紫外線及輻射線的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性及高 γ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407^T，極具作為表現載體的潛力。



7. 具高酵素活性嗜熱菌株之篩選與相關基因選殖：除上述以台灣本土嗜熱菌種源庫所為基礎的本土新種外，更分離出許多具特殊生理活性的嗜熱菌株對本土嗜熱菌所作進行酵素活性的分析結果中，發現有 20% 菌株具澱粉水解酶活性，25% 菌株具蛋白酶活性及 38% 菌株具脂質水解酶活性，目前已針對這些具活性菌株進行深入的分析，期能篩選出高活性之菌株。此外對於較少見之酵素，已篩選出具有纖維素、半纖維素或木質素分解能力之高溫菌株共

計 94 株（好氧性 20 株，厭氧性 74 株）。在各種本土分離株中目前發現，已有數株具高度農業應用之潛力，如 *Geobacillus* 屬之分離株 NTU-249 具高外泌蛋白酵素活性及 *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226^T 具高溫脫氮活性等，其中針對具高外泌蛋白酵素活性的 *Geobacillus* sp. NTU-249 菌株，已著手開始進行其蛋白酵素的純化與定性，目前已知其分子量約為 65 kD，且銅離子會加強其酵素活性，其於的性質研究，近期內將會有部份結果出爐。

8. **熱穩定性酵素基因的選殖載體構築與表現系統的建立：**目前在嗜熱菌的應用方面缺乏良好的轉殖載體與表現系統一直是相關研究者的問題所在，本研究群在研究初期已發現此項問題所可能帶來的影響，開始研究如何建立高溫菌的轉殖載體與表現系統。目前已利用快速篩選質體的方式，篩選出 53 株具質體的高溫菌株，並利用當中 NTU-103 菌株質體建構出一個 shuttle vector-p103，未來將以其為基礎，嘗試表現由本土嗜熱菌所選殖出熱穩定酵素的基因，以達到大量表現酵素的目標。除表現載體外，在研究中本研究群亦發現許多具高紫外線及輻射線的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性及高 γ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293^T 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407^T，極具作為表現載體的潛力。
9. **研究系統整合與運轉：**在過去的研究中，已成功整合包含台灣大學（植物所、生化所）、中央研究院（生化所）、東海大學（環科系）及慈濟大學（醫學系微生物學科）的研究人力與資源，這些整合包含嗜熱菌分離培養系統的建立、嗜熱性種源庫的建立與備援系統的建立、人員的訓練及成果的發表等，其中有許多成果，如協助食工所菌種中心（BCRC）建立嗜熱菌分離與培養技術，法國巴斯德研究所（Pasteur Institute）主動要求寄存菌株等，都顯示出整合研究所帶來的益處與研究計劃的初步表現成績。

成果自評

1. 已達到預定進度
2. 本研究具有學術價值，其中有幾項已經發表於學術期刊。另有一些正在整理資料準備發表。
3. 有些特殊菌株，如具高度抗輻射的菌株，正準備申請專利。

參考資料

1. Chen, M. Y., S. S. Tsay, K. Y. Chen, Y. T. Lin and G. H. Lin. 2002. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a new thermophilic N₂O-producing isolate from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2155-2161.
2. Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay. 2002. *Meiothermus taiwanensis* sp. nov., a novel filamentous thermophilic species isolated from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1647-1654.
3. Lin, G. H., M. Y. Chen, and S. S. Tsay. 2001/05. Thermophilic microorganisms in Taiwan. American Society of Microbiology Meeting. USA. (poster)
4. 陶光恆、蔡珊珊，2002/12，台灣嗜熱細菌 *Thermus taiwanensis* WL-219 含錳超氧歧化酶之篩選與表現，中華民國微生物學會第三十六次會員大會。(壁報)
5. 林詠婷、陳灝平、陳懋彥、蔡珊珊，2000/12，台灣烏來溫泉嗜熱細菌 *Bacillus thermocatenuatus* WL65 之篩選與蛋白酶的分析，中華民國微生物學會第三十四次會員大會
6. Lee, A. Y. L., S. S. Tsay, M. Y. Chen, C. Y. Huang and S. H. Wu. 2003. Molecular cloning and characterization of Lon Protease from thermophilic *Brevibacillus thermoruber* WR-249 with thermostability and chaperone-like activity. *J. Bacteriol.* Submitted.