

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣本土溫泉嗜熱菌的調查、收集、鑑定及其農業上的應用  
(III)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-027-

執行期間：92年08月01日至93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，黃啟裕，吳世雄，林光慧

計畫參與人員：張文章 蔡珊珊，黃啟裕，吳世雄，林光慧

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 9 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、鑑定及其農業上的應用(III)

2003/08/01 ~ 2004/07/31

計劃編號：92-2317-B-002-027

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, 林光慧, 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. 台灣嗜熱菌種源庫的建立與應用：**已有六十五座溫泉當中的微生物被調查與研究，其中已有超過一千餘株的嗜熱細菌被分離、純化與培養，並建立起本土台灣嗜熱菌種源庫。所收集菌株包含革蘭氏陽性的 *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Alicyclobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Deinococcus* sp., *Rubrobacter* sp. 及 *Paracraurococcus* sp. 等屬。革蘭氏陰性的分離株則包括 *Thermus* sp., *Meiothermus* sp., *Rhodothermus* sp., *Chloroflexus* sp., *Roseiflexus* sp., *Thermonema* sp. 及 *Pseudoxanthomonas* sp. 等屬 (Chen, 2002)。在這些眾多的嗜熱菌分株中，許多分離株是屬尚未在文獻中發表的新種，如具絲狀細胞的 *Meiothermus taiwanensis* WR-30<sup>T</sup>、具輻射線抗性的 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup>、具高溫脫氮活性的 *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226<sup>T</sup> 等 (Chen *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2002b; Chen *et al.*, 2004)。
- 2. 具高酵素活性嗜熱菌株之篩選與熱穩定性蛋白酶基因之選殖：**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。其中分離株 *Brevibacillus thermoruber* WR-249 的 Lon protease 基因已被選殖出並研究其特性。*B. thermoruber* Lon gene (Bt-lon) 大小為 88-kDa，結構上包含 N-terminal domain、ATPase domain、SSD (sensor- and substrate-discrimination) domain 及 C-terminal protease domain 等四個 domain。Bt-lon 是一個產物具六個單元體的熱誘導性基因，具 chaperone-like 的活性，在 70 °C 相當穩定且最適催化溫度為 50 °C，在細菌的生理調控上扮演相當重要的角色。
- 3. 嗜熱菌熱穩定性轉胺酶菌株之篩選與基因之選殖：**我們選取四種轉胺酶作為研究之對象，這四種轉胺酶包括 aspartate aminotransferase (AspAT)、phenylalanine aminotransferase (PheAT)、branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT) 及 D-amino acids aminotransferase (DAT) 等四種。在初步的研究結果中，抗紫外線與輻射分離株 *Deinococcus taiwanensis* 407<sup>T</sup> 及 *D. taiwanensis* 539 具高 AspAT 及 BCAT 之活性。高溫脫氮菌 *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-225 具高 AspAT 及 PheAT 之活性。
- 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。
- 5. 高抗性菌株之研究與利用：**在研究中本研究群發現許多具高紫外線及輻射線抗性的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性及高 $\gamma$ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup> 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407<sup>T</sup>，極具作為表現載體的潛力。*Deinococcus taiwanensis* NTU 407<sup>T</sup> 及其它分離株除了是從台灣地熱溫泉區中所分離的本土新種菌株外，其最大的特色是耐高溫、抗輻射線及抗紫外線。分離菌株 NTU 407<sup>T</sup> 紫外線抗性達 1500 Jm<sup>-2</sup>，約為 *E. coli* 的 50 倍，而迦瑪輻射線的抗性則達到 15 kGy，約為 *E. coli* 的 200 倍。多樣的生理生化特性，顯示此本土菌株在研究與應用上的高度潛力。

## ABSTRACT

- 1. Isolation of thermophilic bacteria and construction of strain library:** We have surveyed 65 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 over 1000 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 were found to belong to *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Alicyclobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Deinococcus* sp., *Rubrobacter* sp., *Paracraurococcus* sp., *Thermus* sp., *Meiothermus* sp., *Rhodothermus* sp., *Chloroflexus* sp., *Roseiflexus* sp., *Thermonema* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp.
- 2. Enzymatic assay:** 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. Thermostable aminotransferases: Four aminotransferases were selected for study, including** aminotransferase (AspAT), phenylalanine aminotransferase (PheAT), branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT) and D-amino acids aminotransferase (DAT). In preliminary studies, *Deinococcus taiwanensis* 407<sup>T</sup> and *D. taiwanensis* 539 with highly enzymatic activities of AspAT and BCAT. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-225 has highly enzymatic activities of AspAT and PheAT.
- 4. We have isolated several new strains with remarkable resistance to UV and gamma-radiation, such as** *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup> and *Deinococcus taiwanensis* WR-407<sup>T</sup>. 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.
- 5. 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. **台灣嗜熱菌種源庫的建立與應用**：在本年度計劃中，已對台灣地熱溫泉區的嗜熱微生物，進行系統性得調查與研究，在數年的努力下，至民國 93 年七月止，已有六十五座溫泉當中的微生物被調查與研究，其中已有超過一千餘株的嗜熱細菌被分離、純化與培養，並建立起本土台灣嗜熱菌種源庫。在台灣嗜熱菌種源庫中被分離培養的菌株，可依革蘭氏染色分成革蘭氏陽性的 *Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Alicyclobacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Deinococcus* sp., *Rubrobacter* sp. 及 *Paracraurococcus* sp. 等屬。革蘭氏陰性的分離株則包括 *Thermus* sp., *Meiothermus* sp., *Rhodothermus* sp., *Chloroflexus* sp., *Roseiflexus* sp., *Thermonema* sp. 及 *Pseudoxanthomonas* sp. 等屬 (Chen, 2002)。在這些眾多的嗜熱菌分株中，許多分離株是屬尚未在文獻中發表的新種，如具絲狀細胞的 *Meiothermus taiwanensis* WR-30<sup>T</sup>、具輻射線抗性的 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup>、具高溫脫氮活性的 *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226<sup>T</sup> 等 (Chen *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2002b; Chen *et al.*, 2004)。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 N<sub>2</sub>O-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.* 54: 1849-1855.

### 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

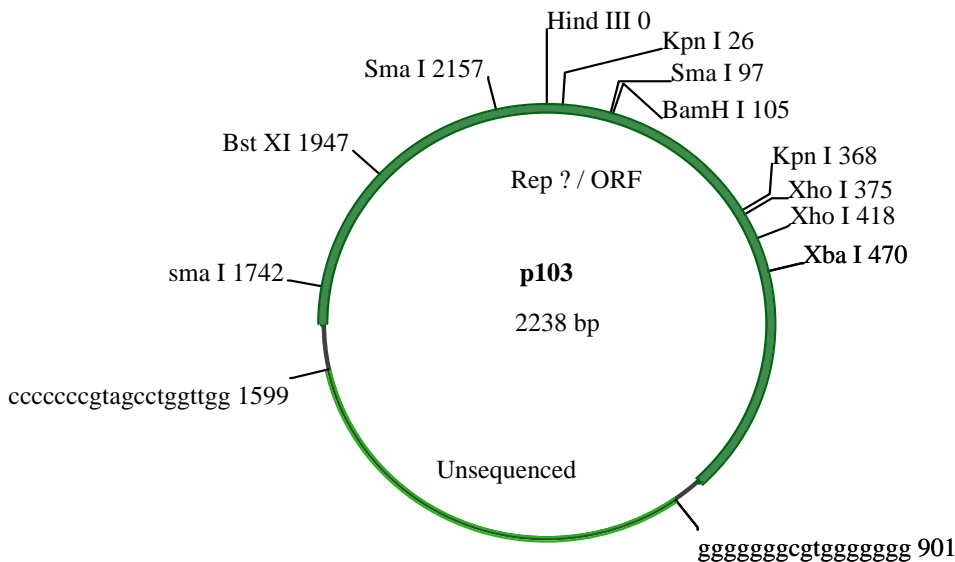
- (1) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Meiothermus taiwanensis* WR-30<sup>T</sup> = ATCC BAA-399<sup>T</sup> (=CCRC 17170<sup>T</sup>=DSM 14542<sup>T</sup>).
  - (2) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Meiothermus taiwanensis* WR-220 = ATCC BAA-400 (=CCRC-17171=DSM 14543).
  - (3) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-226<sup>T</sup> = ATCC BAA-404<sup>T</sup> and CCRC-17172<sup>T</sup>.
  - (4) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup> = ATCC BAA-406<sup>T</sup> (=CCRC 17173<sup>T</sup>).
  - (5) Chen, M. Y., G. H. Lin, Y. T. Lin, and S. S. Tsay, 2002. *Rubrobacter taiwanensis* LS-286 = ATCC BAA-452 (=CCRC 17198).
2. 具高酵素活性嗜熱菌株之篩選與熱穩定性蛋白酶基因之選殖：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。其中分離株 *Brevibacillus thermoruber* WR-249 的 Lon protease 基因已被選殖出並研究其特性。*B. thermoruber* Lon gene (Bt-lon) 大小為 88-kDa，結構上包含 N-terminal domain、ATPase domain、SSD (sensor- and substrate-discrimination) domain 及 C-terminal protease domain 等四個 domain。Bt-lon 是一個產物具六個單元體的熱誘導性基因，具 chaperone-like 的活性，在 70 °C 相當穩定且最適催化溫度為 50 °C。Bt-lon 在細菌 *B. thermoruber* WR-249 的生理調控上應扮演相當重要的角色，藉由此蛋白酶基因的選殖、重組與表現讓我們學習到嗜熱菌一些酵素在基因選殖與表現上所需注意的地方 (Lee *et al.*, 2004)。
3. 嗜熱菌熱穩定性轉胺酶菌株之篩選與基因之選殖：我們選取四種轉胺酶作為研究之對象，這四種轉胺轉胺酶包括 aspartate aminotransferase (AspAT)、phenylalanine aminotransferase (PheAT)、branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT) 及 D-amino acids aminotransferase (DAT) 等四種。在初步的研究結果中，抗紫外線與輻射分離株 *Deinococcus taiwanensis* 407<sup>T</sup> 及 *D. taiwanensis* 539 具高 AspAT 及 BCAT 之活性。高溫脫氮菌 *Pseudoxanthomonas taiwanensis* CB-225 具高 AspAT 及 PheAT 之活性。部份菌株轉胺酶的活性測試結果如下表：

Strain	Specific activity (mU/mg)	AspAT	PheAT	BCAT	DAT
#249 <sup>T</sup>	<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	329.4	15.4	-9.0	25.6
#232A	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	690.7	38.8	46.4	149.4
#239	<i>Thermus thermophilus</i>	-18.1	3.4	77.8	5.7

#539	<i>Deinococcus taiwanensis</i>	910.1	137.6	325.3	-36.9
#20539	<i>Deinococcus radiodurans</i>	1153.8	8.4	729.8	9.7
#407 <sup>T</sup>	<i>Deinococcus taiwanensis</i>	571.3	277.0	419.5	-3.2
#225	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	766.5	856.6	163.8	80.7
	CB-225				
#241	<i>Meiothermus ruber</i>	-62.5	14.8	351.0	

\*Aminotransferase Activity Assay Results of thermophilic bacterial isolates

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的目的。



5. **高抗性菌株之研究**：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抗性的菌株，如具多樣酵素活性與高紫外線抗性及高 $\gamma$ -radiation 抗性的新種菌株 *Rubrobacter taiwanensis* LS-293<sup>T</sup> 及 *Deinococcus taiwanensis* WR-407<sup>T</sup>，極具作為表現載體的潛力。*Deinococcus taiwanensis* NTU 407<sup>T</sup> 及其它分離株除了是從台灣地熱溫泉區中所分離的本土新種菌株外，其最大的特色是耐高溫、抗輻射線及抗紫外線。分離菌株 NTU 407<sup>T</sup> 紫外線抗性達 1500 Jm<sup>-2</sup>，約為 *E. coli* 的 50 倍，而伽瑪輻射線的抗性則達到 15 kGy，約為 *E. coli* 的 200 倍。顯示我們的奇異球菌分離菌株具有相當強的紫外線抗性。此外分離菌株 NTU 407<sup>T</sup> 除具有較佳的紫外線抗性外，對於輻射抗性與 *D. radiodurans* R1 相近，當伽瑪射線劑量達 15 kGy 時，NTU 407 尚有 10<sup>-6</sup> 的存活率，顯示 NTU 407<sup>T</sup> 具有高劑量伽瑪射線之抗性。此外 *Deinococcus taiwanensis* NTU 407<sup>T</sup> 生長溫度介於 25 ~ 60 °C 之間，最適生長溫度為 50 °C；生長酸鹼度介於 pH 7 ~ 10 之間，最適生長酸鹼度為 pH 8；耐鹽度最高可到 3 % NaCl。可利用的碳源包括 D-fructose、D-galactose、D-cellobiose、D-melibiose、D-trehalose、D-raffinose、lactose、citrate 和 L-arginine。具 catalase 和 oxidase 活性，可水解澱粉、白明膠和酪蛋白。具有 alkaline phosphatase、esterase、esterase lipase、



leucine arylamidase、 $\alpha$ -chymotrypsin、acid phosphatase、naphthol-*AS-BI*-phosphohydrolase、 $\alpha$ -galactosidase、 $\beta$ -galactosidase、 $\alpha$ -glucosidase、 $\beta$ -glucosidase 等多樣酵素活性，而上述多樣的生理生化特性，不但優於中溫菌 *Deinococcus radiodurans* R1，亦優於高溫菌分離株 *D. xylanophilus* 及 *D. murrayi*，顯示此本土菌株在研究與應用上的高度潛力。未來也將以 *Deinococcus taiwanensis* NTU 407<sup>T</sup> 作為研究的主要材料。