

臺灣二〇〇四年國際科學展覽會

科 別：微生物學科

作品名稱：耐熱性酵素生產菌 *Bacillus Subtilis* WLA12 之
分離與定性

得獎獎項：微生物學科第一名
候補作品

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：李昱蓉

耐熱性酵素生產菌 *Bacillus Subtilis* WLA12 之分離與定性

Isolation and Analysis of Enzyme-producing Thermophile

Bacillus Subtilis WLA12

摘要

本實驗針對一取自台北縣烏來南勢溪下游之溫泉菌，進行微生物學、生物化學、分子生物學三方面之觀察與實驗，期能得到一可生產特定酵素之菌種，且具耐高溫之抗逆境能力。對其酵素進行定性，並嘗試轉殖出相關基因，使之可大量表現。目前已篩選出一種可生產多種酵素之菌種〔依其採集地點暫稱 WL-A12〕經菌種鑑定為 *Bacillus subtilis* WL-A12。藉由菌落檢測法以及 Zymogram 的方式做酵素分析，並以電導轉形等技術，希望能成功轉至 *E. coli* 上表現。另外，也對該菌種作了一些基本微生物方面的觀察〔如需氧情況、最適生長溫度〕。

Abstract

We isolated enzyme-producing thermophilic bacteria from hot springs near downriver of Nan-shi, Wulai, Taipei (北縣烏來南勢溪). Through microbiological, biochemistry and molecular biological analyses, a multiple enzyme-producing *Bacillus subtilis* strain, designated WLA12, has been isolated. The growth condition of WLA12 was observed.

Using basic colony assay and zymogram analysis (gel electrophoresis) to observe the expressed enzymes, molecular weight and gene size of the enzymes were revealed. With comparison to *E. coli* control strain, the related enzymes were only found in WLA12. To express the *Bacillus* genes in *E. coli*, molecular cloning and gene transformation via electroporation was carried out.

一、前言

(一) 研究動機

不論是環保或者工業生產，在物質分解的方面，微生物都有很大的貢獻。利用一些細菌所生產出的酵素，進而轉變為高價值的工具，是為技術上的一大邁進，且較不具其他人造化學物質所可能產生之環保問題。而若一種微生物能具有多種功能，如抗逆境的能力較高或單一菌種可生產多種不同受質之水解酶，則其應用價值又益發提昇。因此，經由跟教授的討論，我們希望可以找出一種同時具備耐高溫以及酵素生產等能力的菌種，對其做酵素的定性分析並嘗試用基因轉殖的方式將該酵素大量製造。

(二) 研究目的

本實驗針對一取自台北縣烏來南勢溪下游之溫泉菌，進行微生物學、生物化學、分子生物學三方面之觀察與實驗，期能得到一可生產特定酵素之菌種，且具耐高溫之抗逆境能力，對其酵素進行定性，並嘗試轉殖出相關基因，使之可大量表現。目前已篩選出一種可生產多種酵素之菌種，〔實驗中以其取樣地點暫稱 WLA12，經菌種鑑定為 *Bacillus subtilis*〕，藉由菌落檢測法以及 Zymogram 的方式做酵素分析，並以電導轉形等技術，希望能成功轉至 E-coli 上表現。另外，也對該菌種作了一些基本微生物方面的觀察〔如需氧情況、最適生長溫度〕。

(三) 研究問題

針對在台北縣烏來南勢溪下游的溫泉湧出口所採集到的樣本，篩選出一種可生產多種酵素之菌種且具耐高溫特性的菌種，針對以下三方面做研究：

1. 微生物學方面：觀察其需氧程度、最適生長溫度及菌落型態。
2. 生物化學方面：對其生產之酵素作定性分析。
3. 分子生物學方面：嘗試將其酵素以基因轉殖之方式大量生產。

二、研究方法或過程

(一) 研究設計

微生物方面	需氧程度檢測 繪製生長曲線→推知最適生長溫度 →畫菌培養 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> } 得知該菌種最適生長環境以利培養 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> { 菌落型態觀察 進行實驗 </div>
生物化學方面	菌落檢測 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> { 無該酵素活性 有該酵素活性→SDS PAGE 電泳酵素檢測 </div> →整理結果→由電泳結果，推知酵素之蛋白質大小以選取基因
分子生物學方面	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 基因轉殖 抽取菌體 DNA→以限制 切出適當大小之片段 抽取質粒 DNA →→將質粒轉入 <i>E-coli</i> 表現→→檢測是否有該酵素 </div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> } ligation; 將片段接入質粒 </div>
菌種鑑定	抽取 16S rDNA→轉入 T vector→DNA 定序→資料庫比對

(二) 實驗器材

離心機、蛋白質電泳槽、振盪器、定溫培養箱、分光光度計、基質〔skim milk, casein, pectin, CMC, xylan...〕，其他藥品以及實驗室必備的實驗用品。

(三) 研究方法

微生物學方面

〈樣本篩選〉

1. 將 5 個樣本〔自南勢溪下游 5 個採樣點取得的溫泉水各 100ml〕以濾膜過濾，至少兩次以上。
2. 準備 10 個培養皿，內盛含有基質〔Skin milk〕的培養基，將 5 個樣本的濾膜和泉水分別放置在一個培養皿上。
3. 將 10 個培養皿置於 37℃ 下做隔夜培養。
4. 觀察培養基上是否出現酵素水解圈，以了解是否具有欲取得之酵素。

〈菌種的純化與保存〉

1. 以接種環從酵素活性帶挑出細菌。
2. 將之接種至另一培養皿上並編號。
3. 將培養皿放在 37°C 下做隔夜培養。
4. 將長出的菌落做三次的單株分離，並確定沒有其他雜菌，以純化菌種。
5. 將純化過的菌種再做一次蛋白酶活性測定，確定具活性後，接種至 16mm x 160mm 懸蓋玻璃試管 (LB/Agar - 0.1 mM MnCl₂) 中保存。

〈需氧程度檢測〉

1. 以解剖針於 pre-culture 的菌液中取樣。
2. 將解剖針刺入裝有 LA〔固態培養基〕之試管中，於一定溫度下〔本實驗設定為攝氏 50 度〕加蓋做隔夜培養。
3. 觀察，若菌落分布在管底，則為厭氧菌；若在與空氣交界處，則為好氧菌；若無固定分布，則為兼性菌。

〈最適生長溫度〉

1. 對 Pre-culture 之菌液做 200 倍稀釋。
2. 使用分光光度計測 OD₆₀₀〔以 LB 注入玻璃比色管歸零校正〕以推算出菌液中之菌濃度。
3. 分時間點紀錄〔每隔 30 分鐘紀錄一次〕，繪製對數圖。
4. 得出各溫度之生長曲線。
5. 利用圖表求出菌生長之 doubling-time，時間最短者即為此菌種之最適生長溫度。

生物化學方面

〈Zymogram 之樣本製備〉

1. 取 1 ml 菌液置於空的 Eppendorf 中。
2. 將 Eppendorf 放在 4°C 離心機中以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。
3. 將 Eppendorf 中之上清液以 water pump 吸乾，將菌體懸浮於適量之 Sample Buffer 混勻後置入 4°C 保存。

〈蛋白水解酶菌落檢測法〔依 Sacherer *et al.*, 1994〕〉

1. 將細菌塗在固體培養基〔LA〕上。
2. 將 100 μ l 之菌液稀釋液加入 3.5~5 ml 含 1.5% skim milk 之 1%Bacto-agar 中，混勻後倒在固體培養基上。
3. 將培養皿放在適當的溫度下做隔夜培養。
4. 在乳白色背景中，有酵素活性的菌落周圍會呈現透明之水解圈。

〈多醣類水解酶菌落檢測法〔依 Wood *et al.*, 1988; Dalbøge and Heldt-Hansen 1994〕〉

1. 將細菌塗在固體培養基〔LA〕上。
2. 在培養基表面加 3.5ml 含 1%基質〔xylan for xylase, CMC for endoglucanase, Avicel for cellobiohydrolase〕之 0.7% agarose 倒在固體培養基上。
3. 將培養皿放在適當的溫度下做隔夜培養。
4. 在培養基表面加 10~15ml 之 0.1% congo red 溶液。
5. 作用約 10~15 分鐘後，倒去多餘之溶液，以 10~15 ml 之 1M NaCl 沖洗兩次。
6. 在紅色背景中，有酵素活性的菌落周圍會呈現白色或粉紅色。

〈蛋白質水解酶、多醣類水解酶 SDS-PAGE 檢測法〔Zymogram, 依 Blanco *et al.*, 1998〕〉

※方式：基質配製於電泳膠體中，當分析之樣本電泳完成後直接進行染色。

1. SDS-PAGE 依一般方式配製，唯在 separation gel(10% acrylamide) 中加入 0.1~0.2%之基質。
2. 將酵素以 SDS-PAGE 電泳分離。
3. 將膠體以適當之緩衝液 (50mM PBS, pH7.0)洗滌 30 分鐘。
4. 將膠體以 2.5% Triton X-100 浸泡 overnight, 並振盪之。
5. 將膠體以適當之緩衝液 (50mM PBS, pH7.0)洗滌 30 分鐘。
6. 將膠體浸入 0.1%congo red 中染色 30 分鐘。(此步驟適用於多醣類水解酶之測定，蛋白水解酶之測定直接跳至步驟 9)
7. 以 1M NaCl 溶液洗滌膠體二至三次，每次 10~20 分鐘，直至酵素活性帶能以目視察覺。
8. 以 5% acetic acid 浸泡膠體始背景轉為深藍色。(多醣類水解酶之測定到此步驟止)
9. 膠體以 Coomassie Brilliant Blue R-250 染色觀察。

註：(a) xylan、pectin 等與 Congo red 親和力低的多醣若使用 Congo red 染色會有較不明顯的結果，可改用其他染劑，如 pectin、starch 可用 Iodine 溶液染色。

(b)如果將 agarose 酸化（如，以 10~15 ml 的 5% acetic acid 洗幾次），背景會轉成深藍色。

分子生物學方面

〈菌體染色體 DNA 之抽取〉

• 材料：Buffers (for 30 ml bacterial culture)

	A	B	C*	Conc.
H ₂ O	43.75ml	5ml	1	
1 M Tris, pH 8.0	1.25ml	125 μ l	125 μ l	50mM
0.5 M EDTA, pH 7.6	2 ml	400 μ l	400 μ l	40mM
5 M NaCl	1.25 ml	100 μ l	100 μ l	100mM
Lysozyme (powder)	-	2.5mg	-	0.5mg/ml

RNase Solution	-	10 μ l**	-	0.2mg/ml
10% SDS	-	-	1ml	2%
Proteinase K (powder)	-	-	0.1 mg	20 μ g/ml
Total	50ml	5ml	5.0ml	

*Buffer C：使用前，在 37°C 中保溫 1-2 小時。

**RNase Solution：10 mg/ml H₂O ,以 100°C 加熱一分鐘，冷凍備用。

1. 將培養的菌亦以 10000rpm，4°C 離心 10 分鐘。
2. 加入 2.5ml 的 Buffer A，搖勻後離心。
3. 加入 2.5ml 的 Buffer B 並混勻。
4. 將混合液靜置於 37°C 下至少 30 分鐘待其作用。
5. 加入 5ml 的 Buffer C 並混勻。
6. 靜置於 37°C 0.5~2 小時直到混合液呈現澄清。
7. 加入 5ml 的 liquefied phenol 並混合數次使均勻。
8. 加入 5ml 的 chloroform 並混合數次使均勻。
9. 將混合液以 6000rpm，室溫離心 5~10 分鐘。
10. 倒掉上清液，加入 10ml 的 chloroform 混勻，此步驟重複兩次。
11. 加至 EtOH 中使 DNA 沉澱，用乾淨的玻棒將 DNA 取出，待其乾燥。
12. 將取出的 DNA 溶於 5~10ml 的 TE Buffer 中。

〈DNA 濃度測定〉

1. 在測定前 30 分鐘，將 UV 分光光譜儀（UV Spectrophotometer）啟動暖機，待燈光固定後再行測量。
2. 以無菌水 500 μ l 注入石英比色管歸零校正。
3. 以無菌水將試樣稀釋 20 倍後，取 500 μ l 進行測定，Vis260nm 的讀值即代表中的 DNA 濃度〔 μ g/ μ l〕。

〈質粒 DNA 之抽取〉

1. 將含質粒的菌養在適宜的液態培養基〔含選定的抗生素〕中，體積約 1~5ml，做隔夜培養〔約 12~16 小時〕。
2. 離心 1~2 分鐘，用 water pump 抽掉上清液，僅留下菌體。
3. 加入 250 μ l 的 MX1 Buffer，混合均勻。
4. 加入 250 μ l 的 MX2 Buffer，輕輕的搖晃〔約 4~6 次〕使其均勻的作用直到混合液呈現澄清。
5. 在室溫下放置 1~5 分鐘。

6. 加入 350 μ l 的 MX3 Buffer 後立即混勻。
7. 離心 5~10 分鐘，將混合液取到 Mini-M™ Column 中。
8. 離心 0.5~1 分鐘，倒掉 Column 之濾液。
9. 加入 0.5 ml 的 WF Buffer，離心 0.5~1 分鐘後倒掉濾液。
10. 加入 0.7 ml 的 WS Buffer，離心 0.5~1 分鐘後倒掉濾液。再離心 3 分鐘使其完全濾淨。
11. 將 column 置入 ependorf 中，在 column 的濾膜上加 50 μ l 的 Elution Buffer。
12. 靜置 1~2 分鐘待其作用後，離心 1~2 分鐘，所得濾液即為欲取得之質粒 DNA。

〈DNA 黏合反應〉

1. 將 6 μ l 純化好的 DNA 片段與 2 μ l 適當的載體（以相同限制酶處理或是可相互黏合的限制片段，如：Sau3A 對 BanH1）充分混合均勻。
2. 加入 1 μ l 的 10x ligation buffer、1 μ l 的 T4 DNA ligase (1 Unit)，在 14°C 中作用 16 小時（視 DNA 濃度而定）以上。

〈大腸桿菌 [*E. coli*] 菌株之電導轉型〉

1. 將 competent cell 緩緩解凍。
2. 取 1~2 μ l DNA，加入至裝有 40 μ l competent cell 之 microfuge tube 中，溫和地混勻後置於冰上約 1 min。
3. 將電導器 electroporator [Gene Pulser II apparatus, Bio-Rad cat. 165-2105] 設定電容為 25 μ FD、電壓為 2.5kV，控制器 [Pulse Controller] 設定電阻為 200 Ω 。
4. 將細胞和 DNA 混液放入預冷之 0.2cm 電導沖槽，並振盪使之落入沖槽底部。
5. 將沖槽置入電導器中。
6. 讓電導沖槽通電 [通電時間約為 4.5sec] 後，立刻加入 1 ml SOB 培養液，將菌液懸浮。
7. 把菌液換入 17X 100mm PP-塑膠管中，置於 37°C 下以 225 rpm 振盪培養 1 hr。
8. 把菌液作適當稀釋塗於篩選培養基上，觀察是否轉殖成功 [轉殖成功者因帶有抗抗生素的基因而可以產生菌落]。

〈菌種鑑定〉

1. 預先接種 30ml 菌液做隔夜培養，之後以適當方式抽取 DNA。
2. 將抽出之 DNA 以 PCR 的方式放大。PCR 的進行，依下表一的比例添加反應試劑，再依下表二的加溫程式在 PCR machine 中反應，使用之引子則分別為 primer 27f (序列為 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3') 和 primer 1522r (序列為 5'-AAG GAG GTG ATC CA(AG) CCG CA-3')。

表一 PCR 反應試劑

Compound	Original concentration	Final concentration
DNA sample	-	3 μ l
Primer 1522r	2 μ M	0.2 μ M
Primer 27f	2 μ M	0.2 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	5U/50 μ l	2.5U/50 μ l
10x reaction buffer	-	5.0 μ l
dNTP mixture	2400 μ M	240 μ M
d.d water	-	26.5 μ l
Total volume	-	50 μ l

表二 PCR 之加溫程式

Procedure	Temperature	Reaction time (minute)	Cycle
Initial denaturation	95°C	10	1
Denaturation	95°C	1	30
Annealing	54.5°C	1.5	30
Extending	72	2	30
Final extending	72	7	1

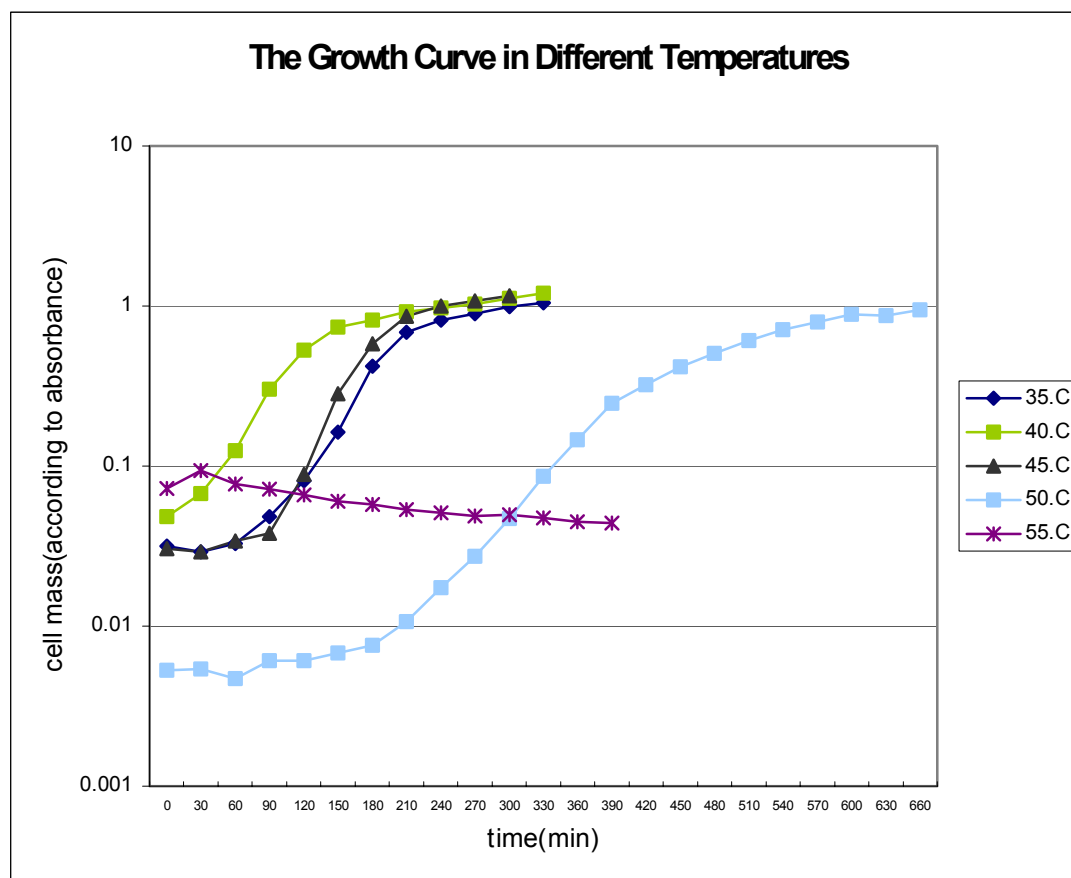
- 將所得樣本送去定序，再以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Standard nucleotide-nucleotide BLAST[blastn] 進行比對。

三、研究結果與討論

(一) 研究結果

微生物學方面

1. 由生長曲線的繪製結果中，我們可計算出該菌種之最適生長溫度，其中以在 45°C 時，增倍時間〔doubling time〕為 21 分鐘最短，故以 45°C 為最適生長溫度。



圖一 WLA12 的生長曲線。由圖中可知其在 45°C 時的生長速度最快〔由斜率〕。

2. 需氧程度檢測的方面，由試管培養結果可知其為一好氧菌。

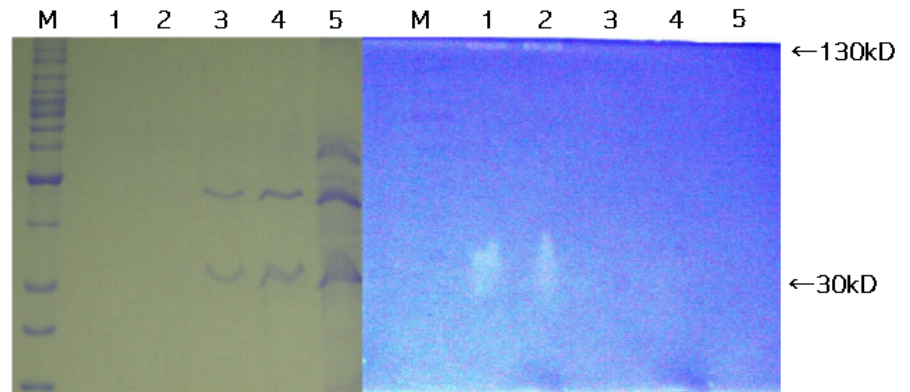
生物化學方面

1. 蛋白質水解酶的活性，在菌落檢測法和 SDS-PAGE 檢測中都可以看到明顯的水解圈，且在很短的時間內就有很明顯的活性表現〔菌落檢測中 overnight 可水解 2/3 的基質〕，可見該菌種生產的蛋白酶活性很強。由 SDS-PAGE 檢測可看到兩個活性帶，蛋白



質大小分別為 130kD 與 30kD。

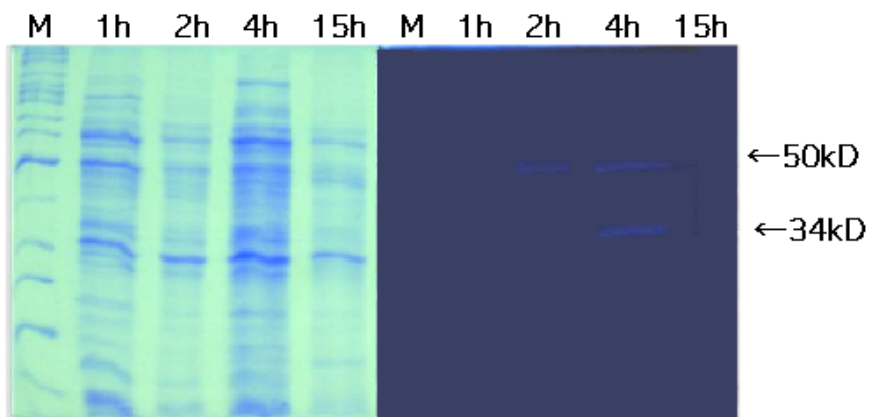
圖二 蛋白酶的菌落檢測。由上而下分別劃有 WLA12〔實驗組〕、*E. coli*〔對照組〕，可看出 WLA12 的活性很強，但 *E. coli* 卻沒有活性。



圖三 蛋白酶的 SDS-PAGE 檢測。圖中 1、2 為菌液離心之上清液，3、4、5 為菌體懸浮液，可看到酵素活性帶，另外，該酵素應為分泌型〔因上清液中含有較多〕。

2. CMC 水解酶的活性可在兩種檢測中明顯表現，由 SDS-PAGE 檢測中可觀察到兩個有活性的酵素蛋白質片段，其大小約為 34kD 和 50kD。

圖四 CMCase 的菌落檢測。由上而下分別劃有 WLA12〔實驗組〕、BL11〔實驗室的另一菌種，與本實驗無關〕、*E. coli*〔對照組〕，可看出 WLA12 的活性很強，但 *E. coli* 卻沒有活性。

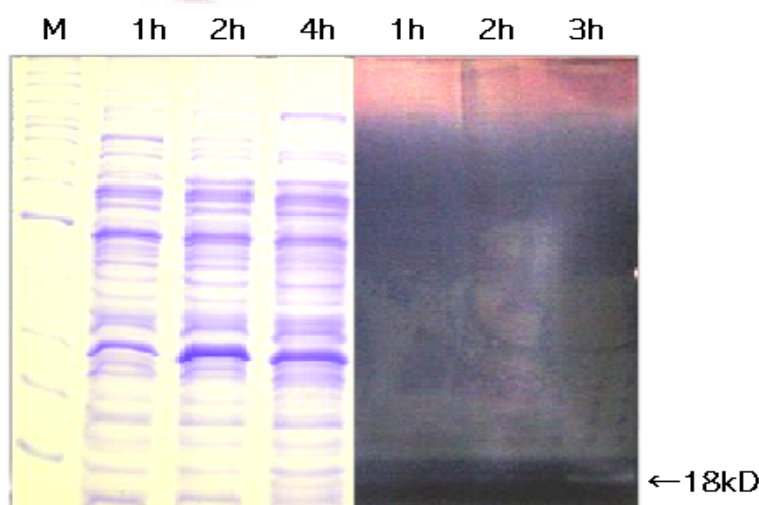


圖五 CMCase 的 SDS-PAGE 檢測。由圖中可看到兩個活性帶，大小約為 50kD 和 34kD。圖中標示之時間為回復活性的時間〔即浸泡緩衝溶液的時分〕。

3. Xylan 水解酶的活性在兩種檢測中皆有表現，但沒有 CMCase 明顯，由 SDS-PAGE 檢測中可觀察到一個活性位置，其酵素蛋白質大小約為 18kD。



圖六 Xylanase 的菌落檢測。由上而下分別劃有 WLA12〔實驗組〕、BL11〔實驗室的另一菌種，與本實驗無關〕、*E. coli*〔對照組〕，可看出 WLA12 有活性表現，但 *E. coli* 卻沒有活性。



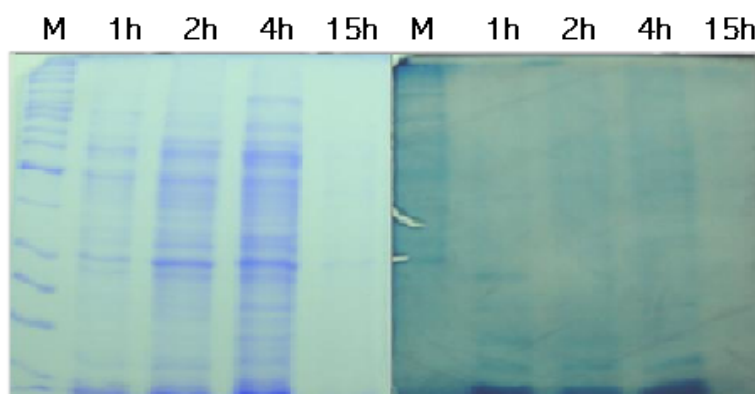
圖七 Xylanase 的 SDS-PAGE 檢測。由圖中可看到一個活性帶，大小約為 18kD。

4. Pectin 水解酶的活性在菌落檢測法中表現很明顯，但在電泳檢測中卻無明顯結果，可能因活性回復的時間不夠或使用染劑不當。



圖八 Pectinase 的菌落檢測。由上而下分別劃有 WLA12〔實驗組〕、BL11〔實驗室的另一菌種，與本實驗無關〕、*E. coli*〔對照組〕，可看出 WLA12 的活性很強，但 *E. coli* 卻沒有活性。

圖九 Pectinase 的 SDS-PAGE 檢測。圖中看不出明顯結果，可能是回復時間不夠或使用染劑不當所致。圖中標示時間為回復時間。



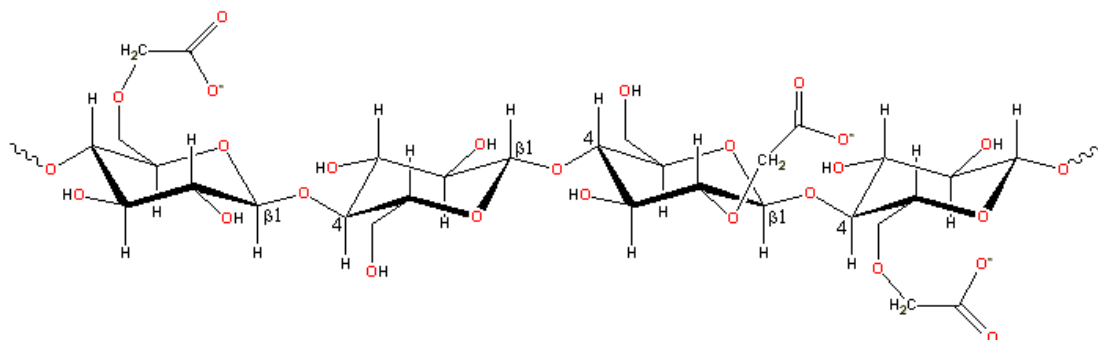
分子生物學方面

1. 菌種鑑定的部分，目前已確定該菌為 *Bacillus subtilis*。
2. 基因轉殖方面，目前已獲得幾個轉殖株，其活性表現尚待進一步實驗。

(二) 討論

1. **實驗菌種的純化** 本實驗是於九十一年七月，在台北縣南勢溪下游尋找溫泉湧出口，共取五個樣本點〔約相距 100 公尺〕進行採樣，再將樣本帶回實驗室，用以 skin milk 為 substrate 的培養基進行初步篩選。篩選結果中，只有其中一處所採集到為我們所需，因此之後的實驗中所用的菌，都是由同一地點取得的單一菌種培養而得。
2. **耐熱性** 在實驗中，我們發現其最適生長溫度為 45°C，而取樣地點水溫約為 70°C，基本上為耐熱的菌種〔耐熱菌生長溫度範圍 45~65°C〕，耐熱但卻不一定好熱。對照文獻可知，*Bacillus subtilis* 可生產內孢子，因此對熱的耐受力高亦是可預期的。又，文獻上指出該菌種的最高生長溫度為 54°C，亦可解釋為何實驗中到 55°C 時生長曲線便呈現向下的趨勢，但這也引發該菌究竟屬於嗜熱菌或嗜溫菌的疑義〔嗜溫菌的生長溫度可低至 15~20°C，最適生長溫度可為 20~45°C〕。惟本實驗是以未知樣本做篩檢，該取樣地點的環境完全符合一般文獻上對嗜熱菌生活環境特色的描述，故為典型的嗜熱菌採樣點，實驗方法上來說是正確的，誤取到土壤菌的機率亦低〔採樣處溫泉湧出口幾為人造環境〕。
3. **未知菌基本微生物檢測** 本實驗是由一未知菌之樣本著手，故只能從一些基本的微生物檢驗開始著手，舉凡最適生長溫度之測試、需氧程度檢測、菌落型態觀察、生產酵素之能力皆有進行。再與菌種鑑定的結果兩相比較，結果相差亦不遠。以生長曲線為例，在本實驗中，40°C 時的增倍時間約為 27 分鐘，而在文獻上看到的數據則為 25.8 分鐘，誤差率 4.6%，這可能是因為取平均值所造成的誤差，亦可能是因為生活環境的差異所造成的結果。
4. **酵素生產能力** 本實驗最初目標，是希望鎖定蛋白酶的生產菌，但在後來的實驗過程中，又對多種基質做了測試，因此才發現其生產酵素種類的多樣性。其中多種酵素如多醣類水解酶，在農業、工業上都有很高的利用價值；另外，此種同時具有多種水解酶的現象，也值得注意，由該菌種的 sequencing 結果，可看到與所得之酵素對應的序列，而在同一屬〔*Bacillus*〕的其他菌種之基因序列中，有些亦帶有類似的序列，但表現是否明顯、酵素活性和生產能力如何則有待進一步研究。且探討 *Bacillus subtilis* 的酵素生產多能性的文獻並不常見，之所以未被提及或發展是否是因環境不同而有不同程度的表現亦可繼續探討。
5. **水解酵素特性** 該菌生產之酵素〔蛋白酶、纖維水解酶〕應為分泌型，即該蛋白質來源位於細胞膜上而非細菌體內。因為在 SDS-PAGE 檢測中可發現，以由隔夜培養

菌液中所分離出的上清液和菌體懸浮液做比較，上清液中的酵素含量較多，菌體中則僅含微量。由文獻可知，微生物吸收養分的方式仍需要將大分子養分水解成小分子氮原、碳原，才易於吸收。以 CMCase 為例，該菌水解酶打斷 C1,4 鍵結，使分解為葡萄糖，亦可在文獻中得到對照。



圖十 CMC 的化學結構。酵素打斷 C1,4 間的鍵結，使分解為葡萄糖單體。

6. **細菌細胞傳訊** 在實驗之初，曾觀察該菌種之酵素生產是否受到 cell-to-cell communication 的影響，但經實驗證明其酵素生產並未出現因菌量增加，相互刺激而增加產量的情形，故認為並未受到上述情況的影響。
7. **酵素圖〔zymogram〕** 在進行 zymogram 酵素圖檢測時，曾討論過以下幾種方式：
 - (1) 先依一般方式製備 SDS-PAGE 做蛋白質電泳，並另外製備內含基質的 agarose。待跑完電泳後，再以 PBS 浸泡膠體使蛋白質恢復活性。將含基質的 agarose 覆蓋至電泳膠體上靜置，一段時間後將 agarose 和原電泳膠分別染色，觀察是否有活性帶〔染色後呈透明處〕地產生，若有則與原電泳膠相互對照以推知酵素大小。
 - (2) 同時做兩片 SDS-PAGE，其中一片電泳膠在製備時就直接加入基質，另一片則依一般方式配製。跑完電泳後，將兩片電泳膠分別染色，直接將酵素活性帶與另一片的蛋白質大小做對照，以推知酵素大小。若為加入基質後可直接觀察不須染色者〔如 Skim milk〕，則可只跑一片電泳〔電泳膠直接加入基質配製〕，並使用可直接觀察的 marker。

又，經過實驗後發現，採用將基質直接加入電泳膠中的方式，不論直接對照膠上的 marker 或跟對照組〔未加基質於電泳膠中者〕做對照來判斷蛋白質大小，都是較方便省時的方式。

四、結論與應用

本實驗由一取自台北縣烏來南勢溪下游之未知溫泉樣本中，篩選出一種可生產多種酵素且具備耐熱能力的菌種，以採集地暫稱 WLA12，經菌種鑑定已知該菌為 *Bacillus subtilis*。在實驗中，進行了微生物學、生物化學和分子生物學三方面的測試，在微生物方面，可由實驗得知 WLA12 為一好氧菌，已知可耐高溫至 70°C，最適生長溫度為 45°C，在該溫度下菌生長之 doubling-time 為 21 分鐘，可知其耐熱但不一定好熱。生物化學方面，藉由不同方式的 zymogram 酵素檢測，已知 WLA12 具備 skim milk(protein)、casein(protein)、CMC(cellulose)、pectin、xylan 等酵素活性，其中 skim milk、CMC、xylan 的水解酶在經過蛋白質電泳後仍可表現其活性，因此可得知其酵素的大小，Protease 約為 130kD 和 30kD，CMCase 約為 50kD 和 34kD，xylanase 則約為 18kD。會有兩條活性帶產生的原因，可能其酵素為不只一個蛋白質所構成。分子生物學方面，除已確定其菌種外，在基因轉殖的部分，已得到幾個轉殖株(clone)，尚在對其活性進行確認。而此菌種生產酵素種類的多樣性，若加以發揮則能有很好的應用，其中多種酵素如多醣類水解酶，在農業、工業上都有很高的利用價值；另外，此種同時具有多種水解酶的現象，也值得注意。

五、參考文獻

1. 何季庭, 2000. 9: 土壤菌 *Bacillus* 之分離與木聚糖水解酶及纖維素水解酶活性分析
2. 鄧澤民, 2000. 11: 脂酶活性土壤菌 *Bacillus* 之分離鑑定與分析
3. 柯勇: 現代微生物學, 藝軒, 2003. 2
4. Bonnie L. Bassler: Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria
5. Margarita Ajuilera, Mercedes Monteoliva-Sánchez, Antonio Suárez, Victor Guerra, Catherine Lizama, Antonio Bennasar, Alberto Ramos-Cormenzana: *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater
6. Marilyn S. Lantz, Pawel Ciborowski: Zymographic Techniques for Detection and Characterization of Microbial Proteases
7. Philipp P. Bosshard, Reinhard Zbinden, Martin Altwegg: *Paenibacillus turicensis* sp. nov., a novel bacterium harbouring heterogeneities between 16S rDNA genes
8. S. Pajmohan, C.E.R. Dodd, W.M. Waites: Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage
9. Xiaodong Zhang, Favienne Beuron, Paul S. Freemont: Machinery of protein folding and unfolding
10. Arabinoxylan, <http://www.sbu.ac.uk/water/hyara.html>
11. Carboxymethylcellulose, <http://www.sbu.ac.uk/water/hycmc.html>
12. Casein Micelle Structure, <http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.html>

六、 附錄

(一) 實驗材料之配製

1. LA 之配製

※固態培養基 LA，用於細菌之培養

Tryptone peptone	10 g/l
Yeast extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto-agar	15 g/l (hard agar)
	7.5 g/l (soft agar)
(substrate)	

2. Sample Buffer 之配製

※sample buffer 用於 Zymogram 之樣本製備

[Working Buffer]	5x
Tris (pH6.8)	250 Mm
2-Mercaptoethanol	12.5%
SDS	10%
Bromophenol	0.5%
Glycerol	50%

3. SDS PAGE gel 之配製〔參考《Molecular Coning》〕

下層膠	
10%	5 ml
H ₂ O	1.9 ml
30% acylamide mix	1.7 ml
1.5M Tris (pH8.8)	1.3 ml
10% SDS	0.05 ml
10% ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.002 ml
[substrate]	0.002 ml

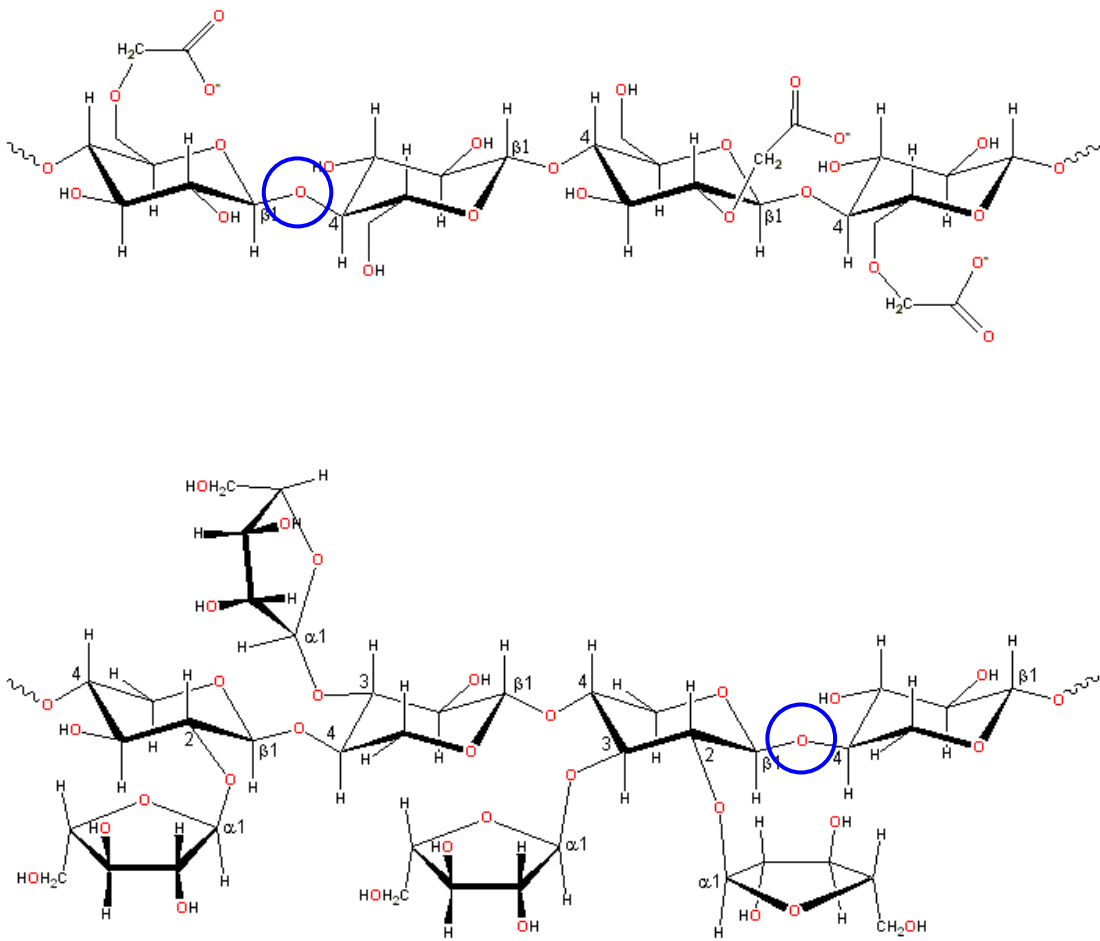
上層膠	
2 ml	
H ₂ O	1.4 ml
30% acylamide mix	0.33 ml
1.5M Tris (pH6.8)	0.25 ml
10% SDS	0.02 ml
10% ammonium persulfate	0.02 ml
TEMED	0.02 ml

(二)生長曲線測定數值

Time(min)	35.C	40.C	45.C	50.C	55.C
0	0.0315	0.0484	0.0306	0.0053	0.0723
30	0.0292	0.0672	0.0290	0.0054	0.0938
60	0.0329	0.1248	0.0340	0.0047	0.0776
90	0.0484	0.3028	0.0380	0.0061	0.0719
120	0.0807	0.5310	0.0890	0.0061	0.0663
150	0.1624	0.7388	0.2830	0.0068	0.0605
180	0.4214	0.8203	0.5800	0.0076	0.0576
210	0.6878	0.9201	0.8650	0.0107	0.0534
240	0.8140	0.9740	0.9960	0.0174	0.0509
270	0.8970	1.0262	1.0810	0.0273	0.0487
300	0.9884	1.1181	1.1550	0.0470	0.0496
330	1.0469	1.2045		0.0863	0.0474
360				0.1464	0.0448
390				0.2463	0.0440
420				0.3221	
450				0.4160	
480				0.5055	
510				0.6097	
540				0.7100	
570				0.7960	
600				0.8910	
630				0.8710	
660				0.9420	
Date	2002.8.16	2002.8.15	2002.7.29	2002.7.31	202.8.14

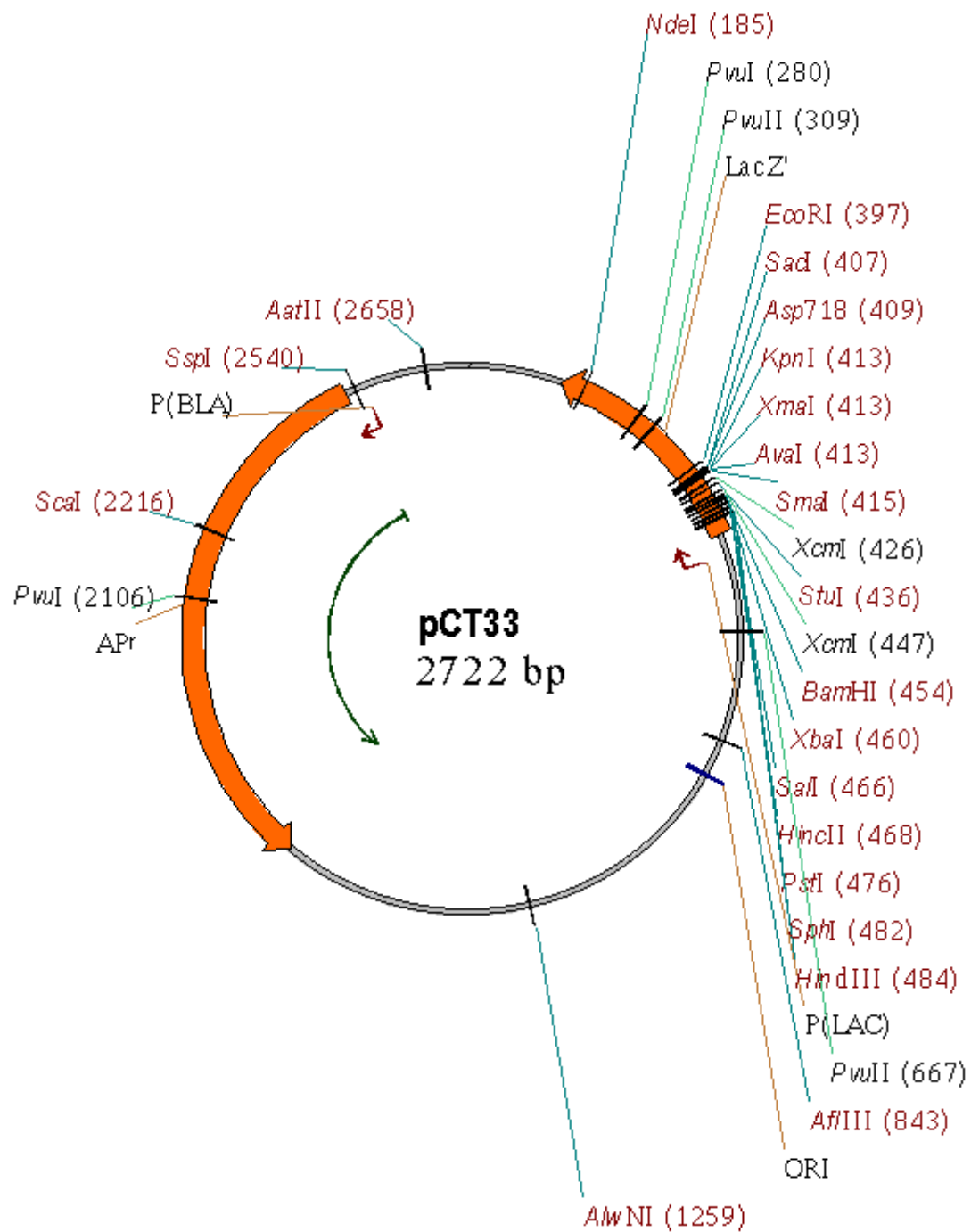
註：Date 為實驗進行的日期，Time 為每次觀察的時間與開始的時間差，單位為分鐘(min)；O.D.600 為分光儀設定值，藉透光率的改變來測定菌量。

(二) CMC 和 Xylan 的化學結構



圖十一 CMC 和 Xylan 的結構。上圖為 CMC，下圖為 Xylan，藍色線圈起來的地方是可能打斷的鍵結，以分解成小分子葡萄糖或葡萄糖—果糖。

(三) 載體 pCT33



(四) 文獻探討

1. 耐熱菌／嗜熱菌〔thermophiles〕

微生物對環境因子的耐受性，隨種類而有所不同。而假如一特殊微生物能夠在一特別的棲所生長和繁殖，則該棲所可能是最適合該微生物生長或含有某些該微生物生長所需的物質。一些存在於大部分微生物都無法生長的極端環境，如高溫、高鹽者，我們稱之為極端微生物〔extreme microorganism〕，如嗜熱菌〔thermophiles〕就是其中一種。

嗜熱菌包含放射菌和芽孢桿菌〔*Bacillus*〕等好熱的菌種，其廣泛分布於火山地、地熱區、海底火山附近、溫泉、煤炭堆、廐肥或溼熱的草堆等地，而有些人為的高溫環境，如熱水管裝置和人造熱源等處，亦為其生長的良好環境。嗜熱菌能在溫度高於 55℃ 生長，最低生長溫度通常在 45℃ 左右，而最適生長溫度在 55~65℃；一般來說，其生長溫度為 45~65℃ 或以上，其特徵有代謝快速、觸反應溫度高及增代時間〔doubling time〕短等，在農業廢棄物處理和工業上都有很高的利用價值。

與嗜溫性〔Mesophiles〕比較，嗜溫菌之最適生長溫度為 20~45℃，最低生長溫度為 15~20℃。一般土壤、植物、溫血動物及人體中的微生物皆屬此類。

2. 枯草桿菌〔*Bacillus subtilis*〕

枯草桿菌〔*Bacillus subtilis*〕為格蘭氏陽性菌，好氧，容易培養，因能生產內孢子〔endospore〕故可在不適宜的環境中生存。其最高生長溫度約為 54℃。

芽孢桿菌屬〔*Bacillus*〕的微生物，其對於溫度的耐受性都頗高，接近廣溫菌，如 *Bacillus stearothermophilus* 的生長溫度範圍就從 30℃ 到 75℃。*Bacillus* 多為土壤微生物或耐熱、耐鹼性的微生物，如蘇力菌(*B. thuringiensis*)、枯草桿菌(*B. subtilis*)及名躁一時的炭疽菌(*B. anthracis*)等。

3. 微生物的營養與水解酶之作用形式

微生物對養分的吸收方式，有簡易擴散、便利性擴散、主動運輸、基團移位等四種，其所需的營養物質種類極多，環境中的眾多物質皆可被微生物所利用。其中，生長所需的碳原和氮原亦是不可或缺的。

碳能供給微生物生長時的碳素或含碳骨架，微生物能利用的碳原從簡單的無機含碳化合物到複雜的有機含碳化合物、有機碳化合物都有，依微生物之種類而定。但對於多數異營微生物，最好的碳原多為葡萄糖、果糖、蔗糖和麥芽糖等，尤其是葡萄糖，其次為有機酸、醇和脂肪酸。

氮是在微生物細胞中，需要量僅次於碳的物質。氮是構成微生物細胞組成成分或代謝產物的原料，在環境中可被利用的氮原從分子態氮到複雜的有機含氮化合物都有，銨鹽、無機氮化物和有機氮化物為主要氮原。實驗室及工業生產常用之有機氮化物有牛肉汁抽出液、

peptone、尿素、yeast、casein 等，通常須經過水解後才能吸收利用。

4. 酵素圖〔Zymogram〕

酵素圖〔Zymogram〕是一種酵素活性檢測的方法，結合了酵素活性的表現和蛋白質分子量大小的量測，zymogram 是一個較為簡易的方法。以 SDS-PAGE 電泳的方式，我們可以將樣本中的各個蛋白質分開，使之依分子量大小做排列，藉以得知蛋白質的大小。而 zymogram 則是更進一步，將欲檢測知基質加入 SDS-PAGE 的電泳膠中，使蛋白質〔酵素〕與之直接反應，則一方面可得知酵素活性，一方面可量測蛋白質大小，總而觀之可得知該酵素的大小，在細菌中更可推出該酵素所對應之基因序列長度。

以 SDS-PAGE 的方式亦有其風險，該酵素的活性可能因為界面活性劑 SDS 的作用，在跑電泳時遭到破壞。此時可利用一些緩衝溶液的作用，使蛋白質的活性回復；而在此步驟中時間亦扮演重要角色，可藉延長緩衝溶液作用的時間，使酵素活性近於原貌。

Zymogram 後看到的電泳膠，可在特定大小的地方看到一個明顯的 band，因基質被水解而呈現透明貌，與周圍基質經染色後的部分有所對比。實驗中可和同一片電泳膠中判別大小的 marker 直接做比照，亦可將一般的 SDS-PAGE 檢測結果與 zymogram 結果兩相比較，以獲得較清楚的結果。

5. 菌種鑑定：16S rRNA 的遺傳鑑定

微生物的分類與鑑定可由許多特徵或特性著手，除傳統的特徵外，亦可由分子的特性來進行分析。傳統的特徵含：個體型態特徵〔形狀、結構、染色反應〕、群體型態特徵〔菌落型態、顏色〕、生理特徵〔生長條件、營養需求〕、生化特徵〔代謝產物、生成酵素〕、生態特徵〔呼吸類型、環境耐受力〕、抗原特徵〔抗體反應〕、遺傳分析〔染色體積因互換的研究〕等，可根據其做基本的分類。而以分子特徵為依據的分類，則可由核酸鹼基組成、核酸雜交和核酸定序分析〔Nucleic acid sequencing〕進行。

在細菌的核糖體中分離出的 rRNA 是研究微生物演化的理想材料，尤其是 16S rRNA，因為其一級結構極為保守卻又同時具有可變區段，因此適於研究微生物間之親緣關係；其大小約為 1500bp，儲存的訊息量大且易分析，一般的分類學家接受度較高，是個較客觀、可信度也較高的菌種鑑定方式。

評語及建議事項

本研究由烏來溫泉附件取得一株抗熱性細菌，並從其中分析四種水解酵素分別作進一步的探討，實驗設計相當嚴謹，所得的結果有學術與應用價值。