

嗜酸嗜熱細菌之分離及其酯解酵素粗酵素液之性質研究

蔡正國 李銘亮*

國立臺灣師範大學生物學系

摘要

從酸性的溫泉(約 pH 3、55°C)附近分離出數種細菌。依細菌的特性,其中一種分類為 *Bacillus acidocaldarius*, 可生長於 pH 3~4 及 45~65°C 的培養條件下,生長最適 pH 及溫度分別是 pH4 及 55°C。以 *p*-nitrophenyl ester 為受質,可於培養細菌的上清液中偵測到酯解酵素(esterase)的活性。橄欖油的添加雖然可促進細菌生長,但是對於酯解酵素的分泌似乎沒有明顯的影響。此酯解酵素作用之最適 pH 值及溫度分別為中性(pH 7)及 75°C。此酯解酵素可分解長碳鏈的酯質受質(pNPC12~pNPC16),亦具有相當之熱穩定性,於 75°C 之半生期為 30 分鐘,而以 95°C 處理 3 小時後仍保留有 18% 的活性。也測試了一些鹽類、清潔劑及金屬螯合劑 EDTA 對此酵素的影響,尚未找到可以促進該酯解酵素活性的離子;然而,清潔劑及某些離子則對酵素活性具有抑制的作用;另外,EDTA 的添加不對酵素活性有所抑制。

關鍵詞: *Bacillus acidocaldarius*、酯解酵素、熱穩定性

緒言

蛋白欲展現生物活性皆需要在其特定的環境之條件下,包括某個溫度範圍、某個 pH 作用範圍、抑制物質的是否存在、反應時的離子濃度等,由於這些需求上的限制,侷限了某些蛋白的應用價值。例如,於工業方面的應用常需要耐高溫的蛋白;於有機化學合成方面,常需要溶在有機溶劑中還能夠具有活性的狀態;或是為達更好的清潔效果,而將蛋白分解酵素或酯解酵素添加於清潔劑或洗衣粉中,為此就必需選擇具有耐鹼性且不易被清潔劑所變性的酵素。這些要求使得很多蛋白無法應用於實際用途上。

許多科學家已經著手於提高蛋白穩定性方面的研究,一方面利用蛋白工程(protein engineering)的方法或基因突變的方法進行蛋白質的修改;另一方面則從自然界尋找符

合需求的蛋白。後者的作法通常是在自然界的極端棲地中篩選出微生物,再分離微生物所產生之蛋白,所得到的蛋白多具有較高的穩定性(例如,嗜熱菌產生的蛋白具有熱穩定性(thermostability)及,通常在有機溶劑中亦較穩定(Claudia *et al.*, 1996; Mozhaev, 1993; Owusu and Cowan, 1991),故可成為熱穩定酵素的來源。穩定性賦予了這些蛋白在生物技術或工業上較高的應用價值。

有些熱穩定的酯解酵素(thermostable esterases)已被報告,這些可分泌熱穩定酯解酵素的菌種包括 *Bacillus stearothermophilus* (Matsunaga *et al.*, 1974; Owusu and Cowan, 1991; Shao and Wiegel, 1995)、*B. acidocaldarius* (Giuseppe *et al.*, 1994) 及一些 *Bacillus* 屬的細菌(Janssen *et al.*, 1994; Owusu and Cowan, 1991); 在古細菌方面,包括 *Sulfolobus acidocaldarius* (Sobek and

* 通信作者(corresponding author): 李銘亮(Ming-Liang Li); FAX: 886-2-29312904; E-mail: t43010@cc.ntnu.edu.tw

Gorisch, 1988 ; Sobek and Gorisch, 1989)、*S. shibatae* (Huddleston *et al.*, 1995) 及 *Pyrococcus abyssi* (Laurence *et al.*, 1998)、*Pyrococcus furiosus* (Masato and Clark, 1998) 等。

以 *Pyrococcus abyssi* 為例，該菌是自深海的熱水噴出口 (deep-sea hydrothermal vents) 附近分離出來，屬於厭氣的極端嗜熱古細菌，所產生的酯解酵素存在細胞內，其酯解酵素以 99°C 處理需 22 小時或經 120°C 處理 13 分鐘才能去掉一半的活性，另外，以 90°C 處理，於 8.5 小時內皆未見活性損失，是屬於熱穩定性極佳的酯解酵素 (Laurence *et al.*, 1998)。

已有學者將某些耐高溫的酯解酵素定序，欲比較耐高溫的酯解酵素與其他不耐高溫的酯解酵素於蛋白質一次結構上之不同，也將其基因放入大腸桿菌中，並成功地表現出有活性的耐高溫酯解酵素 (Giuseppe *et al.*, 1998 ; Masato and Clark, 1998)。亦有學者試著推算出耐熱酯解酵素的三度空間立體構造，探討對於酵素熱穩定性較為重要的結構及序列 (Giuseppe *et al.*, 1999)。

我們也以臺灣北部的陽明山溫泉為取菌來源，由該高溫酸性的極端棲地中，嘗試是否可以分離培養出耐高溫的細菌，若可分離出耐高溫的細菌，則以其分泌的蛋白擇一(酯解酵素) 為研究對象，測試其在各種條件下的穩定性。

材 料 與 方 法

菌種來源

菌種從環境樣本中篩選取得 (主要來源是陽明山幾處溫泉的水樣與土樣)，數個採樣

地區溫度約為 45 到 65°C，水樣的 pH 值約為 3。

菌種篩選

將由環境取得之樣本加入橄欖油 (經孔徑 0.20 μm minipore 濾膜過濾滅菌)，於 55°C 水浴槽中 150 rpm 震盪培養數日後，以接種環取少量經橄欖油培養後的樣本，劃線於含丁酸甘油酯 (tributyrin) 的 pH 4 固體 LB 培養基 (成分為 tryptone 10 g/L、yeast extract 5 g/L，及 sodium chloride 10 g/L) 上，55°C 培養數日，若是細菌可以分泌酯解酵素，會將培養基中的丁酸甘油酯水解成甘油及脂肪酸，使菌落周邊形成透明區域 (Kugimiya *et al.*, 1986)。

純系培養

取單一菌落劃線於含丁酸甘油酯的 pH 4 固體 LB 培養基上，於 55°C 培養，待菌落形成後，再取單一菌落劃線於相同成分的固體培養基上，如此過程反覆數次，直到單一菌落以革蘭氏染色法觀察無雜菌後，即取得純系。

菌種特性

測試此株細菌於不同培養溫度及不同 pH 值之下的生長情形，也檢視革蘭氏染色 (Gram's stain)、內孢子染色 (Endospore stain)、活動能力測試 (Motility test)、水解澱粉的能力 (Starch hydrolysis)、水解酪蛋白的能力 (Casein hydrolysis)、catalase 試驗等結果 (王孟群，1983)。

酯解酵素活性膠體電泳

將菌株接種於 pH 4 的 LB 液體培養基中，於 55°C 中 150 rpm 震盪培養數天，收集

菌液離心，將細菌沈澱後，取上清液以冰丙酮濃縮約 30 倍，最後溶於磷酸緩衝液 (100 mM, pH 7) 中。將蛋白質樣本與 loading buffer 等體積混勻後，載入膠體，即以約 100 V 電泳，電泳結束後便進行酯解酵素的膠體活性染色，將膠體浸泡於 50 ml 的磷酸緩衝液 (100 mM, pH 7) 中，並加入 50 mg 的 Fast Blue RR salt dye，攪拌均勻後，加入 3 ml 之 1% alpha-naphthyl acetate (溶於 acetone)，避光輕搖，直至有黑色沈澱出現，最後以一次水清洗膠體 (Bott, 1971; Giuseppe *et al.*, 1994; Torossian and Bell, 1991)。

酯解酵素活性測定

將 *p*-nitrophenyl ester 溶於磷酸鹽溶液 (100 mM, pH 7, 含 1% triton X-100) 中，配成 3 mM 的濃度，60°C 攪拌溫熱數分鐘後，置於室溫中降溫，待受質溶液澄清後即可使用。若未特別標明，則是使用 *p*-nitrophenyl myristate (pNPC14) 為受質。取培養數日之菌液，經離心沈澱細菌後，即以其上清液為酵素溶液。酵素活性分析的標準條件則是取受質溶液 350 μ l，加入 50 μ l 的酵素溶液，置於 45°C 的恆溫箱中，以 150 rpm 速度震盪，反應適當時間後，測 410 nm 吸光值。空白組是以 pH 4 LB 取代酵素溶液。酵素的活性以一分鐘釋出 1 μ mole *p*-nitrophenol 定義為一個單位 (1 unit)。

p-nitrophenol 的標準曲線則是將 pH 4 LB 與磷酸鹽溶液 (pH 7, 含 1% triton X-100) 以一比七的比例混合成為溶劑，再將 *p*-nitrophenol 溶於此溶劑中，配成不同濃度的標準溶液 (0.005 mM、0.01 mM、0.015 mM、0.02 mM、0.025 mM、0.03 mM、0.04 mM、0.05 mM、0.1 mM)，測其 410 nm 的吸光值，作成 OD₄₁₀ 對 *p*-nitrophenol 濃度的標

準曲線 (Claudia *et al.*, 1994; Claudia *et al.*, 1996; Giuseppe *et al.*, 1994; Huddleston *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; Owusu and Cowan, 1991; Winkler and Stuckmann, 1979)。

酯解酵素的性質

測量酯解酵素於不同溫度及 pH 值下的活性及穩定性。活性 (activity) 測試方面，將酵素溶液加入受質溶液後，分置於不同的溫度或 pH 處理條件，作用適當時間後，測量分析液之 OD₄₁₀，分別與 45°C 所得之吸光值比較其相對活性。穩定度 (stability) 測試方面，將酵素溶液置於不同處理中 (溫度方面，酵素於各種溫度下處理 30 分鐘；pH 方面，將酵素溶液加於不同 pH 值的緩衝溶液中，pH 4~5, 100 mM acetate buffer；pH 6~8, 100 mM phosphate buffer；pH 9~11, 100 mM Tris-HCl buffer，於 4°C 處理 24 小時)，再取出以標準條件分析酵素殘餘活性

另外，也測試酵素經高溫處理 (75°C 或 95°C) 不同時間後之殘餘活性，及測試酵素對長鏈酯質受質的分解能力，與檢視各種添加物質 (幾種鹽類、清潔劑、金屬螯合劑) 對酵素活性之干擾。

結 果

菌種來源與篩選

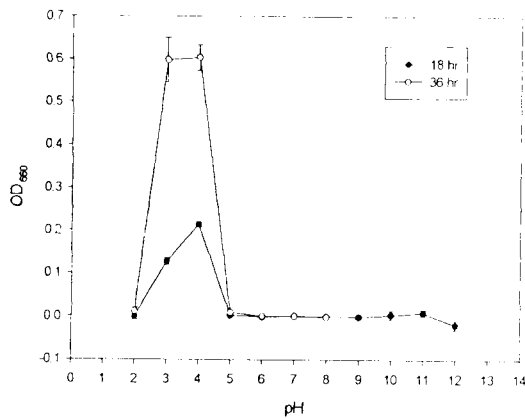
由溫泉口下游附近所取得之土樣及水樣，依菌落形態及革蘭氏染色之結果來看，可以篩選到數種分泌酯解酵素的細菌，於含有丁酸甘油酯之 pH 4 LB 固體培養基上生長可產生類似乳酪製品的氣味。選取一株純培養 (pure culture) 並可以分泌酯解酵素的細菌繼續下面的研究。

細菌培養於不同 pH 值培養液的生長情形

該菌於 pH 3 及 pH 4 的 LB 液體培養基中生長最為良好，中性或其餘 pH 的液體培養基於 36 小時內皆無法見到細菌生長，故此菌有嗜酸之性質（圖一）。

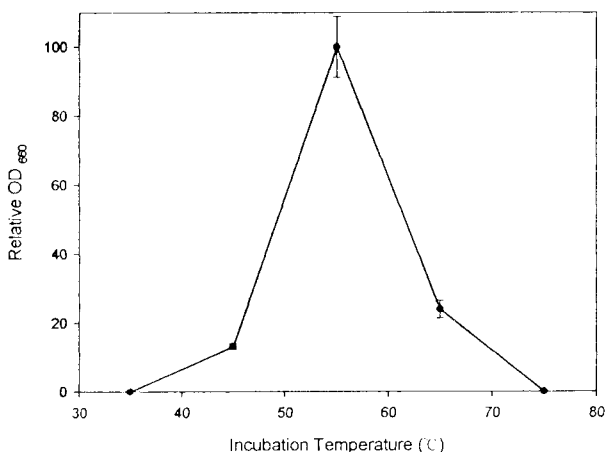
細菌培養於不同溫度的相對生長情形

細菌於 55°C 生長情況較好（pH 4），45°C 及 65°C 等溫度亦可緩慢生長，但是於 35°C 及 75°C 則皆未見其生長，故此菌具有嗜熱之性質（圖二）。



圖一、細菌於不同 pH 值培養液中的生長情形。

Figure 1. Growth of *Bacillus acidocaldarius* in different pH LB media at 55°C.



圖二、細菌培養於不同溫度的相對生長情形。

Figure 2. Growth of *Bacillus acidocaldarius* at different incubation temperatures in pH 4 LB medium.

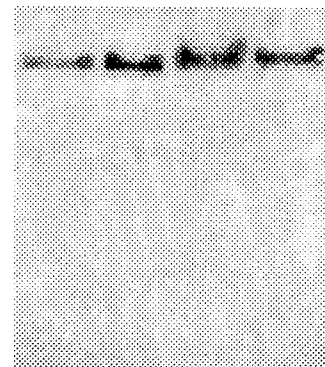
菌種特性（表一）

表一、菌種的特性。

Table 1. Microbiological characteristics of thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius*.

Characteristics	Results
Morphology	Rods
Gram staining	Positive
Endospore	Positive
Growth pH	3~4
Growth temperature	45~65°C
Motility test	Negative
Enzyme activity of catalase	Positive
Enzyme activity of esterase	Positive
Starch	Not hydrolysed
Casein	Hydrolysed

酯解酵素活性膠體電泳（圖三）



圖三、酯解酵素活性膠體電泳。將此株細菌培養於四種不同成分的培養基中（1：二分之一倍 LB 濃度培養基；2：含 1% 橄欖油的二分之一倍 LB 濃度培養基；3：一倍 LB 濃度培養基；4：含 1% 橄欖油的一倍 LB 濃度培養基），進行蛋白質活性膠體電泳，再染色酯解酵素（esterase），得知在四種不同成分的培養基中，皆可偵測到酯解酵素的的存在（黑色沈澱部分）。

Figure 3. The esterase-stained nondenaturing polyacrylamide gel. This bacteria were incubated in four different media (1: 1/2x LB; 2: 1/2xLB with 1% olive oil; 3: 1x LB; 4: 1x LB with 1% olive oil). After native gel electrophoresis and esterase staining, esterase activity could be detected.

酯解酵素於不同 pH 值的活性與穩定性

此酯解酵素於中性 (pH 7) 的活性最高，而在酸性條件下似乎不太穩定 (圖四)。

酯解酵素於不同溫度的活性與穩定性

此酯解酵素於 75°C 的活性最高。在穩定性測試方面，此酯解酵素則隨著溫度的提高而越來越不穩定 (在活性測試方面，由於 *p*-nitrophenyl myristate 於高溫較不穩定，故 65°C 以上用另一種受質 *p*-nitrophenyl laurate 測量酯解酵素的活性)。活性於 55°C 時略有下降，可能是實驗上的誤差所造成 (圖五)。

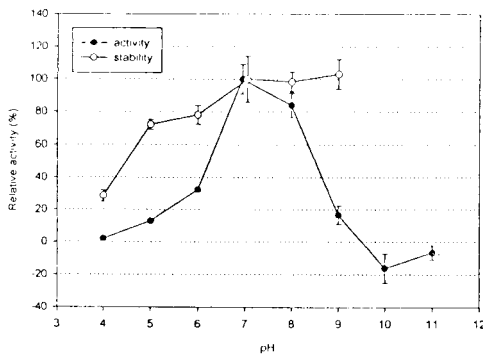
高溫處理不同時間後酯解酵素之殘餘活性

將酵素以 75°C 或 95°C 水浴處理，再置於

標準分析條件下測量經高溫處理後所殘餘之酯解酵素活性。此酯解酵素經 75°C 處理半小時後，殘留有一半的活性，經 95°C 處理半小時後，約有 36% 的活性；經處理一小時後，分別具有 28% 及 21% 的活性；處理三小時後，仍殘存 20% 與 18% 的活性 (圖六)。

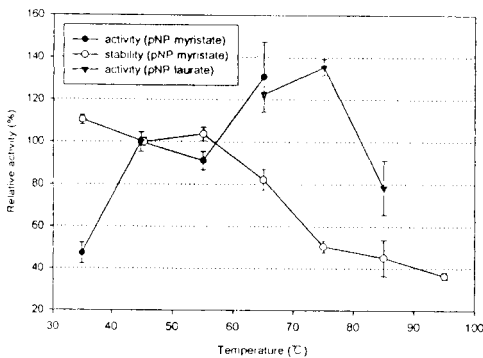
酯解酵素對長鏈受質的分解能力

酯解酵素對碳鏈越長的酯質受質，分解的能力越弱。對 *p*-nitrophenyl laurate (pNPC12) 的分解能力是 *p*-nitrophenyl myristate (pNPC14) 的兩倍以上；對 *p*-nitrophenyl palmitate (pNPC16) 的分解能力更低，為對 *p*-nitrophenyl myristate (pNPC14) 分解能力的五分之一倍左右 (圖七)。



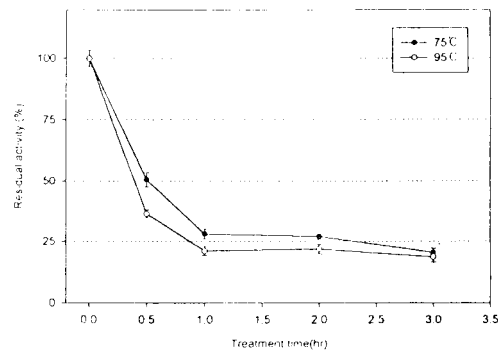
圖四、酯解酵素於不同 pH 值的活性與穩定性。

Figure 4. Effects of pH on the esterase activity (—●—) and stability (—○—).



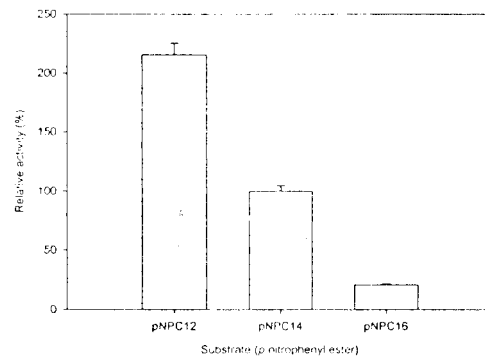
圖五、酯解酵素於不同溫度的活性及穩定性。

Figure 5. Effects of temperature on the esterase activity (—●— and —▼—) and stability (—○—).



圖六、酯解酵素經高溫處理不同時間後之殘餘活性。

Figure 6. The stability of the esterase at 70°C and 95°C.



圖七、酯解酵素對長鏈受質的分解能力。

Figure 7. Relative hydrolysis of three long-chain *p*-nitrophenyl esters by the esterase.

離子、清潔劑，及 EDTA 的添加對酯解酵素活性的影響

各離子對酯解酵素的影響各有不同，但酯解酵素的活性可被清潔劑 (NP-40、SDS、Triton X-100) 明顯地抑制，因為配製受質溶液時所添加的 Triton X-100 濃度已為 1%，故在測試中便以 2% 的濃度觀察其效果；EDTA 的添加對酯解酵素的活性沒有顯著的影響 (表二)。

討 論

由溫泉口下游附近所取得之土樣及水樣，經過 enrichment 增生的方法，於含有丁酸甘油脂之 pH4 LB 固體培養基上生長，依菌落形態及革蘭氏染色之結果來看，可以篩選到數種分泌酯解酵素的細菌，其中幾種經過 enrichment 增生後較為優勢；然而，這次實驗所研究的對象並非那幾種較為優勢的菌種，而是採用最先達到純菌 (pure culture) 的細菌為研究材料，故實驗結果不能代表該採集地點細菌的主要性質。未來除了可以針對較優勢的菌種再作研究外，亦可再以溫泉口附近的其他地點為細菌來源，再行探討該棲地之細菌的特性。

在極端環境的物種分歧度一般很少，目前將又熱又酸棲地所分離出且無法於中性環境下生長的 *Bacillus* 屬僅歸於一種 *Bacillus acidocaldarius* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Peter *et al.*, 1986)，近期亦有學者將之更名為 *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Giuseppe *et al.*, 1999))；故本研究所分離的 *Bacillus* 菌株暫將之分類為該菌種。至於未來是否將該種極端棲地所分離出來的 *Bacillus* 屬細菌細分為不同種，需賴國際細菌系統分

表二、各種添加物對酯解酵素活性的影響。

Table 2. Effects of metal ions, detergents, and chelating agent on the esterase.

Reagent	Concentration	Relative activity (%)	Standard deviation
None		100.0	
NaCl	1mM	99.0	±2.3
MgSO ₄	1mM	91.0	±1.9
CaCl ₂	1mM	93.2	±0.6
CuCl ₂	1mM	55.8	±7.5
MnCl ₂	1mM	79.6	±13.3
HgCl ₂	1mM	67.0	±9.5
NP-40	1% (v/v)	13.6	±2.7
SDS	1% (v/v)	-7.0	±3.7
Triton X-100	2% (v/v)	48.2	±4.1
EDTA	1mM	98.7	±1.8

類委員會決定之。

由上述之實驗結果可以得知，此株細菌分離後，可生長於 pH 3~4、45°C~65°C 的條件之下，這與來源棲地的環境 (pH 3、55°C) 頗為符合，且以 pH 4 及 55°C 較適合生長。雖然此株細菌是生長於高溫酸性的環境中，但是其酯解酵素的活性卻於中性 (pH 7) 為最佳，溫度方面則於 75°C 表現最高的活性。學者之前對某 *Bacillus acidocaldarius* 分離株的研究結果中指出 (Giuseppe *et al.*, 1994)，酯解酵素的最佳活性是表現於 70°C、pH 8 的條件，酵素反應的最佳 pH 值亦不是在酸性範圍內，此外，該分離株的酯解酵素的活性亦不受 EDTA (1mM) 的影響；在酵素的熱穩定性方面，以 75°C、70°C 及 65°C 處理 90 分鐘後，分別殘餘 25%、35% 及 70% 的活性，若以 80°C 及 90°C 處理相同時間，則幾乎失去所有活性。由於同種細菌的各分離株其酯解酵素性質可能不盡相同，且因粗酵素一般都比純化酵素具有較佳之熱穩定性，故待本實驗中的酯解酵素純化後，即可與同種細菌的其他分離株之酯解酵素作熱穩定性上的比較。

從 *Bacillus* 屬的其他研究中也可以得到更為耐熱的酯解酵素，例如：Owusu 及 Cowan 於 1991 所發表的文章 (Owusu and Cowan, 1991)，該株 *Bacillus* 細菌所分泌的酯解酵素 (G18A7 esterase) 於 105°C 處理 150 分鐘後仍可保有 90% 的活性，於 85°C 似乎不會有活性損失；不過該酯解酵素作用的最適 pH 值則是屬於鹼性的範圍 (pH 9.5)。

根據酯解酵素之膠體活性染色 (esterase gel stain) 的實驗結果，不管是 1/2 倍 LB 濃度或 1 倍 LB 濃度的培養條件，或是橄欖油的添加與否，取其上清液濃縮後電泳，皆只能染出一個暗帶 (band) (圖六)，雖然以活性膠體的方式電泳，蛋白質於膠體中的移動性受分子大小、分子電價等多種因子的影響，以致於膠體同一位置上可能含有多種移動性相近之蛋白，但是推測多種酯解酵素移動至同一位置的機率不大，故認為此菌於前述四種培養條件下僅能分泌出一種酯解酵素，橄欖油之添加並未如預期般地誘導出新的酯解酵素分泌。

有些學者認為，esterase (EC 3.1.1.1) 對於脂肪酸碳數為 2~4 的酯質受質 (*p*-nitrophenyl ester) 有較高的分解能力，若酯質受質的脂肪酸長度增到碳數 8 (pNPC8, *p*-nitrophenyl caprylate)，則應為 esterase 酵素作用之最大極限；而 lipase (EC 3.1.1.3) 則對脂肪酸碳數 16~18 的酯質受質有較高的分解能力 (Kademi *et al.*, 1999)。由此可知，esterase 的作用對象是碳鏈較短、親水性較高的受質，而 lipase 則是作用於碳鏈較長、斥水性較高的受質，故有些學者的確是使用 *p*-nitrophenyl palmitate (pNPC16) 長碳鏈的 *p*-nitrophenyl ester 來偵測 lipase 酵素的活性 (Winkler and Stuckmann, 1979)；另外，對 *Pyrococcus abyssi* 之酯解酵素

(esterase) 的研究，亦支持上述之說法，雖然自 *Pyrococcus abyssi* 所取得的酯解酵素耐熱性很高 (如貳、文獻探討所提到的)，但是其酯解酵素只能對脂肪酸碳數 2~8 的酯質受質發生作用 (Laurence *et al.*, 1998)。而此次研究所發現之酯解酵素優於前者的是，此酵素亦可分解長碳鏈之 *p*-nitrophenyl ester 受質，不過確實的酵素受質特異性應待酵素純化後再進行比較。

使用 *p*-nitrophenyl ester 來測量酯解酵素的活性雖然頗為便利，但是有些使用上的限制，這種受質於鹼性溶液中不穩定 (Lin *et al.*, 1996)，容易自行水解，而且高溫反應下更會加速這種水解的反應；另外，在酸性溶液中也不易分解 (Huddleston *et al.*, 1995)，這些缺點皆對酵素活性的測量造成干擾。欲減少這些干擾，於各種分析酵素活性的實驗中皆需置入一組對照組，測量不含酵素的情況下 (改加入滅菌後的酸性培養液)，受質自行水解的程度，最後並以此對照組為測量吸光值時之空白組 (blank)，再測量其他含有酵素之受質溶液的吸光值。在鹼性溶液中，酯解酵素的活性可使用 cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) 或滴定法 (Jinichi *et al.*, 1998; Juan *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1993) 測量。

雖然橄欖油為一些油脂類的混合物，但主要的成分還是以 triolein 為主，此類三酸甘油酯常用於誘導細菌分泌 lipase 酵素，但用於酯解酵素 (esterase) 的誘導分泌似乎並不適宜，故或可再使用其他油類 (如 Tween) 進行誘導酯解酵素分泌的實驗。

此菌除了分泌 esterase (EC 3.1.1.1) 之外，似乎還可分泌 lipase (triacylglycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3)，因為 lipase 具有一種獨特的性質，就是酵素活性發生於油水介面

(Blow, 1991; Brockman, 1984; Derewenda *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994; Torossian and Bell, 1991), 而 esterase 則是需在水溶液中才能具有酵素活性 (Huddleston *et al.*, 1995; Torossian and Bell, 1991), 在養菌的過程當中, 原本澄清懸浮於培養液中的橄欖油會漸漸變成白色不透明, 橄欖油油滴外表似乎包裹上一層物質, 這可能是此菌分泌出 lipase 而附著於橄欖油油滴與液體培養液的介面; 另外, 所偵測到的 esterase 酵素, 其溫度與 pH 的活性範圍與此菌的生長環境不甚相同, 這可能是此菌於該棲地中並非以 esterase 為分解外界酯質的主要酯解酵素; 再加上菌液若加入橄欖油後, 可以促進其生長 (OD₆₆₀ 的上升), 但是卻沒有偵測到 esterase 活性的上升, 這可能是此菌分泌了 lipase, 將橄欖油分解後用於生長; 並且以橄欖油為受質, 經過 pH titration method (Jinichi *et al.*, 1998; Juan *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1993) 的初步測試, 亦可偵測到酵素活性; 以上這些現象似乎皆暗示著此菌亦可分泌 lipase。由於 lipase 有著 esterase 無法取代的應用價值, 且耐熱的 lipase 應用更為廣泛 (Andree *et al.*, 1980; Claudia *et al.*, 1994; Harwood *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1996; Marcrae *et al.*, 1985), 故測試此菌是否可以分泌 lipase 亦為另一個值得研究的題目。

如上述, 此株細菌雖可能有 lipase 的分泌而以長碳鏈酯質受質 (*p*-nitrophenyl palmitate, pNPC16) 卻似乎無法偵測到, 可能的原因推測如下: 將橄欖油加入培養基的時候, 所分泌出的 lipase 多聚集於橄欖油油滴與液體培養基的油水介面間, 在取上清液作酵素溶液時, 並沒有取到存在油水介面的 lipase, 故未取到 lipase 的酵素溶液在加入 *p*-nitrophenyl ester 受質溶液後, 並無法分解

長碳鏈酯質受質; 而在後續培養細菌時, 皆是以不添加橄欖油的條件培養, 在該條件下, 或許 lipase 便無法被誘導分泌, 亦無法於後續的實驗中偵測到, 所以此菌分泌的 lipase 可能是屬於誘導方式的調控, 不同於 esterase 的持續表現。另外, 也有可能是此菌分泌的 lipase 不對 *p*-nitrophenyl palmitate 發生作用, 或許需要碳鏈更長的酯質受質或三酸甘油酯為受質才能測到其活性。

此外, 將此菌培養於含有牛奶的培養基上, 亦可偵測到蛋白分解酵素的活性, 所以此菌應可分泌蛋白分解酵素於胞外, 外泌之蛋白分解酵素 (protease) 在耐熱及耐酸性質方面也是個值得研究的題材。

參考文獻

- Andree, H., W. R. Muller, and R. D. Schmid. 1980. Lipases as detergent components. *J. Appl. Biochem.* 2: 218-229.
- Blow, D. 1991. Enzymology. Lipases reach the surface. *Nature* (England) 351: 444-445.
- Bott, K. F. 1971. Acrylamide gel electrophoresis of intracellular proteins during early stages of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 108: 720-732.
- Brockman, H. L. 1984. in "Lipases," ed. By Borgstorm B. and Brockman, H. L., Elsevier, Amsterdam, pp. 3-4.
- Claudia, S. D., S. Helena, S. Walter, M. Ulrich, and D. S. Rolf. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214: 43-53.

- Claudia, S. D., M. L. Rua, A. Haruyuki, and D. S. Rolf. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatemulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1301: 105-114.
- Derewenda, U., A. M. Brzozowski, D. M. Lawson, and Z. Derewenda. 1992. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* (Washington) 31: 1532-1541.
- Giuseppe, M., D. G. Spartaco, D. R. Mario, and R. Mose. 1994. Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* 221: 965-972.
- Giuseppe, M., A. Elena, F. M. Pisani, O. Gianluca, C. Giacomo, and R. Mose. 1998. Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 332: 203-212.
- Giuseppe, M., Ferdinando., A. Elena, and R. Mose. 1999. Homology modeling and active-site residues probing of the thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* esterase 2. *Protein Science* 8: 1789-1796.
- Harwood, J. 1989. The versatility of lipase for industrial uses. *Trends Biochem. Sci.* 14: 125-126.
- Huddleston, S., C. A. Yallo, and B. M. Charalambous. 1995. The identification and partial characterization of a novel inducible extracellular thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus shibatae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 495-500.
- Janssen, P. H., C. R. Monk, and H. W. Morgan. 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microb. Lett.* 120: 195-200.
- Jinichi, T., A. Yukihiro, K. Kimio, F. Mikio, and S. Junichi. 1998. Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 759-763.
- Juan, A., B. R. A. Leandro, and N. German. 1993. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from and *Aeromonas hydrophila* Human isolate. *Appl. Environ. Microb.* 59: 2411-2417.
- Kademi, A., A. A. Nadra, F. Loubna, and J. C. Baratti. 1999. A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 332-338.
- Kim, H. K., M. H. Sung, H. M. Kim, and T. K. Oh. 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 961-962.
- Kugimiya, W., Y. Otani, Y. Hashimoto, and Y. Takagi. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 185-190.

- Kwon, D. Y. and J. S. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63 : 89-92.
- Laurence, C., R. Jerome, R. J. Luc, D. Jacques, and B. Georges. 1998. Thermostable esterase screened on hyperthermophilic archaeal and bacterial strains isolated from deep-sea hydrothermal vents: Characterization of esterase activity of a hyperthermophilic archaeum, *Pyrococcus abyssi*. *J. Marine Biotech.* 6: 104-110.
- Lin, S. F., C. M. Chiou, C. M. Yeh, and Y. C. Tasi. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microb.* 62: 1093-1095.
- Masato, I. and D. S. Clark. 1998. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* 57: 624-629.
- Marcrae, A. R. and R. C. Hammond. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3: 193-217.
- Matsunaga, A., N. Koyama, and Y. Nosoh. 1974. Purification and properties of an esterase from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 504-513.
- Mozhaev, V. V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol.* 11: 88-95.
- Owusu, R. K. and D. A. Cowan. 1991. Isolation and partial characterization of a novel thermostable carboxylesterase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 158-163.
- Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, M. E. Sharpe, and G. H. John. 1986. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 2., by Bunchanan R. E. and Gibbon N. E., Williams and Wilkins Co., Baltimore: pp. 1104-1139.
- Shao, W. and J. Wiegel. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from thermoanaerobacterium sp. strain JW/SL-YS485. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 729-733.
- Sobek, H. and H. Gorisch. 1988. Purification and characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochem. J.* 250: 453-458.
- Sobek, H. and H. Gorisch. 1989. Further kinetic and molecular characterization of a heat-stable esterase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfo lobus acidocaldarius*. *Biochem. J.* 261: 993-998.
- Torossian, K. and A. W. Bell. 1991. Purification and characterization of an acid-resistant triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. *Biotech. Appl. Biochem.* 13: 205-211.
- Winkler, U. K. and M. Stuckmann. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138: 663-670.
- Young, P. L., H. C. Guk, and S. R. Joon. 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim.*

Biophys. Acta 1169: 156-164.

(接受日期: 2000.6.20)

王孟群 1983. 實用微生物學實驗。九州圖書
公司 pp. 60-124.

Partial Characterization of a Novel Extracellular Thermostable Esterase from Newly Isolated Thermoacidophile

Zhang-Guoa Tasi and Ming-Liang Li*

Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Several moderate thermophilic bacterial strains were isolated from hot acid spring about pH 3 and 55 °C by enrichment methods. One of those was identified as *Bacillus acidocaldarius*. This strain grew under a narrow pH (pH 3~4) and moderate high temperature (45~65°C) condition and was optimal at pH 4 and 55°C. A thermostable esterase activity was detected in the culture medium supernatant when assayed using the *p*-nitrophenyl ester. Adding olive oil to culture medium promoted bacterial growth, but had no effects on the esterase activity. The pH and temperature optima for the esterase activity were pH 7 and 75°C, respectively. This crude esterase activity was found capable of hydrolyzing long-chain fatty acid esters (pNPC 12 to pNPC 16) and exhibited thermal stability. It showed a half-life of 30 min at 75°C, and after 3 h incubation at 95°C, 18% of the activity still remained. The effects of several kinds of salts, detergent, and chelating agent, EDTA were also examined. No ions used could promote the esterase activity, however, some detergents and ions had inhibitory effects on the enzyme, and EDTA had no inhibitory effect on it.

Keywords: *Bacillus acidocaldarius*, Esterase, Thermostable