

國立臺灣大學理學院海洋研究所



碩士論文

Institute of Oceanography

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

弧菌屬分離株所產纖維素分解酶之純化與特性探討

Purification and characterization of cellulase
from a *Vibrio* isolate

鄭世璿

Shih-Shuan Cheng

指導教授：謝文陽 博士

Advisor: Dr. Wung Yang Shieh

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

弧菌屬分離株所產纖維素分解酶之純化與特性探討

Purification and characterization of cellulase
from a *Vibrio* isolate

本論文係 鄭世璿 君 (R99241208) 在國立臺灣大學海洋研究所完成之碩士學位論文，於民國 103 年 7 月 4 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

謝文陽

(簽名)

陳彥霖 (指導教授)

陳彥霖

李宗徽

簡文達

系主任、所長

戴昌鳳

(簽名)

誌謝



謝謝親愛的謝文陽老師，您總是最關心我們的身心狀況，給予我們自由學習的空間，那一句不離不棄的鼓勵猶言在耳：“世璿，加油喔！”每一次都讓我倍感溫馨並且提起勁來做實驗，您不僅是我們的老師，也像是我們的父親，謝謝您。

謝謝思博學長，標準的刀子口豆腐心，是418的台柱，也教過我無數的實驗技巧與知識。謝謝你總是有煮不完的青草茶和說不完的冷笑話，不管什麼問題你都可以回答的淋漓盡致，你是我在學術領域上的巨人。

謝謝韋盛學長，在我爆肝準備口試期間，不厭其煩的盯我唸我，並且給予我口試上的建議，好讓我在口試當天有不錯的表現。

謝謝慶瑜，像學長一樣的學弟，同鄉超級給力，教我許多實驗技巧，也指正我許多錯誤的地方，總是比我心急我的進度，並且不厭其煩的盯我、唸我、酸我，我只要一天不做實驗，就會覺得對不起你。在口試前一起爆肝，吃宵夜，看世足，修離心機，買運彩，再修離心機，及蹲 FPLC 的日子，將是我碩士生涯最珍貴的回憶。

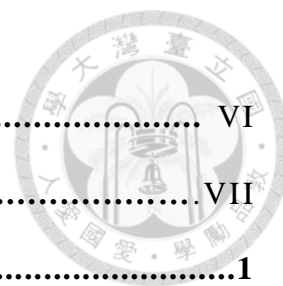
謝謝涵聿，實驗室少了妳的吵鬧和三八，總覺得少了些什麼，懷念一起打lol的夜晚，也謝謝妳總是在盯我的進度以及提供我大量採購零食的管道。

謝謝宇庭，陪我一起老，我先走一步了，你要好好加油喔。謝謝政為，如此帥還來幫忙我口試的預備，如果我腿沒斷我們一定會是堅強的球友。謝謝廖女士，總是提供天龍食品給我們這些市井小民食用，每次都覺得超幸福，也謝謝妳這麼愛睡還起來幫我預備口試，揪甘心。對了，還有芝吟，雖然我不認識妳，但是我謝謝妳。

謝謝418的每一位成員，每一台電腦，每一個儀器，在這舊舊亂亂的空間裡，有著無數的學習與回憶，還要謝謝那張破爛的折疊床，陪我渡過無數個夜晚。

最後祝福每一位，都能有堅實的未來及理想，再會了。

目錄



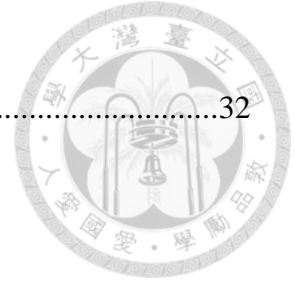
中文摘要.....	VI
Abstract.....	VII
第一章前言.....	1
1.1 纖維素	1
1.2 纖維素分解酶	2
1.3 纖維素分解酶的應用	3
1.4 研究動機	3
第二章材料和方法.....	4
2.1 菌株取得	4
2.2 實驗材料與設備	4
2.3 分離株 16S rRNA 基因序列的取得並與基因資料庫比較	6
2.4 纖維素分解酶的活性測試	11
2.5 纖維素分解酶之培養條件測試	12
2.6 細菌大量培養及誘導酵素產生	13
2.7 粗纖維素分解酶的製備	13
2.8 硫酸銨沈澱和透析	13
2.9 蛋白質定量	14
2.10 纖維素分解酶的純化	14
2.11 蛋白酶的電泳分析	15
2.12 酵素最適反應溫度	16
2.13 酵素之熱穩定性	16
2.14 酵素最適反應pH	16
2.15 酵素在不同 pH 下之穩定性	16
2.16 蛋白抑制劑對酵素活性的影響	17
2.17 界面活性劑對酵素活性的影響	17
2.18 纖維素分解酶之應用測試	17
第三章結果.....	18
3.1 分離株的親緣關係鑑定	18
3.2 纖維素分解酶初步測試	18
3.3 最佳培養條件測試	18
3.4 不同條件下分離株生長情形的比較	19
3.5 纖維素分解酶的純化	19
3.6 纖維素分解酶的分子量分析	20
3.7 纖維素分解酶的特性探討	21
3.8 纖維素分解酶的應用測試	22
第四章討論.....	23
4.1 分離株的鑑定	23
4.2 剛果紅測試	23
4.3 分離株的生長速率及纖維素分解酶的活性	23
4.4 纖維素分解酶的純化	24

4.5 纖維素分解酶的特性	25
4.6 纖維素分解酶的應用測試	26
第五章結論	28
參考文獻	29



表目錄

表1、纖維素分解酶純化表.....	32
-------------------	----





圖目錄


圖1、分離株 131 的親緣關係樹.....	33
圖2、剛果紅染色法.....	34
圖3、分離株 131 與其他菌株的剛果紅染色比較圖.....	35
圖4、DNS 還原糖標準曲線.....	36
圖5、蛋白質濃度標準曲線	37
圖6、分離株在不同溫度培養下的酵素活性	38
圖7、分離株在不同 pH 培養下的酵素活性.....	39
圖8、分離株在不同誘導物濃度培養下的酵素活性.....	40
圖9、分離株在不同體積培養下的酵素活性.....	41
圖10、分離株在不同溫度培養下的生長情形.....	42
圖11、分離株在不同 pH 培養下的生長情形.....	43
圖12、分離株在不同誘導物濃度培養下的生長情形.....	44
圖13、硫酸銨沈澱各分劃的纖維酶活性.....	45
圖14、硫酸銨沈澱各分劃的蛋白質濃度.....	46
圖15、硫酸銨沈澱各分劃的蛋白質總量.....	47
圖16、硫酸銨沈澱各分劃的纖維酶比.....	48
圖17、陰離子交換層析之管柱層析圖.....	49
圖18、SDS-PAGE 及活性染色.....	50
圖19、纖維素分解酶在不同溫度之活性.....	51
圖20、纖維素分解酶在不同溫度之熱穩定性.....	52
圖21、纖維素分解酶在不同 pH 之活性.....	53
圖22、纖維素分解酶在不同 pH 之穩定性.....	54
圖23、蛋白抑制劑對纖維酶的影響.....	55
圖24、界面活性劑對纖維酶的影響.....	56
圖25、纖維酶對甘蔗、微晶纖維素、石蓴和影印紙的分解能力.....	57

附錄目錄

附錄1、纖維素的基本結構.....	58
附錄2、纖維素的結晶型和非結晶型區域.....	59
附錄3、三種不同類型的纖維素分解酶作用方式.....	60
附錄4、分離株的 16s rRNA 核苷酸序列.....	61
附錄5、硫酸銨百分飽和濃度表.....	62
附錄6、最佳產酶培養條件測試.....	63
附錄7、培養基與培養液成分.....	64



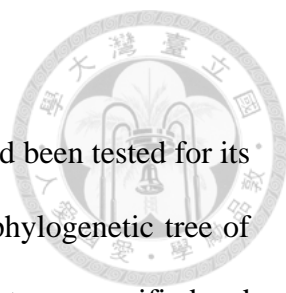
摘要



本研究從新北市瑞芳的磅磅仔附近海水中分離出具有纖維素分解能力之細菌。經 16S rRNA 定序後，建立分離株之親緣關係樹，結果顯示為弧菌屬 (*Vibrio*)。本研究對分離株所產生的纖維素分解酶進行分離、純化並探討該酵素的一般性質，以及評估工業上的應用。結果顯示：分離株使用 250 mL 具凹槽錐形瓶，添加 0.5% CMC、pH 6、培養液 50 mL，在 30 °C 下，震盪培養 72 小時後，纖維素分解酶的活性最佳。粗酵素液經由硫酸銨沉澱、透析、並以陰離子交換管柱層析 (DEAE-FF) 分離出分子量約 60 kDa、36 kDa 及 20 kDa 三種纖維素分解酶。此纖維素分解酶在 pH 6、50 °C 時有最佳活性；在 pH 4~9 以及 4~40 °C 有良好的穩定性。本酵素受界面活性劑的影響，在 1% SDS 及 1% Tween 80 中，活性皆僅剩下約原本的 25 % ；而 1% 的 Tween 20 使其活性降低約 55 %。另一方面，Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 和 phenylmethanesulfonylfluride (PMSF) 等酵素抑制劑皆降低了本酵素活性 30 ~ 40 %，而 2-Mercaptoethanol (β -ME) 幾乎不造成影響。在工業用途評估測試中，本酵素對微晶纖維素、石蓴、紙張和甘蔗渣皆具有分解能力，其中對微晶纖維素的分解能力最好，對石蓴和紙張次之，對甘蔗渣最差。

關鍵字: 纖維素、纖維素分解酶、弧菌屬、酵素抑制劑、界面活性劑、陰離子交換層析。

Abstract



In this study, an isolate from sea water of Rueifang, Xinbei, had been tested for its cellulase activity. After the 16S rRNA was sequenced to establish phylogenetic tree of this isolate, which belonged to the genus *Vibrio*. Cellulase of this isolate was purified and characterized. Optimal cellulase yielding conditions for the culture were determined. For the best cellulase production, the culture was incubated at 30 °C with 50 mL LB broth (pH 6) in 250 mL flask and shaken for 72 hours (75 rpm). CMC (1%) was added as an cellulase inducer in LB broth. The cellulase was purified by ion exchange chromatography after ammonium sulfate precipitation, dialysis, and desalting. The molecular mass of the cellulases determined by SDS-PAGE was approximately 60 kDa, 36 kDa and 20 kDa. The cellulase showed optimum activity at pH 6 and 50 °C, and was stable at pH 4-9 and 4-40°C. When the cellulase was treated with various surfactants, 70 % activity was inhibited by 1% (g/mL) SDS and 1% Tween 80 , and had a lost of 55 percent under the effect of Tween 20. The cellulase was inactivated by 5 mM phenylmethanesulfonylfluride (PMSF) and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), but was not influenced by 2-Mercaptoethanol. Finally, in the industrial application tests, the cellulase showed better ability to decompose microcrystalline cellulose than to *Ulva* and paper, but showed weaker ability to break down sugar cane bagasse than to any others substrates.

Keywords : cellulose, cellulase, *Vibrio*, enzyme inhibitors, surfactants, anionic exchange chromatography.

第一章 前言

碳循環在生物圈中，扮演極重要的角色。藻類和綠色植物等生產者利用光合作用將無機的二氧化碳合成為有機的葡萄糖，作為提供自身能量所需的物質。這些葡萄糖更進一步的被合成纖維素，作為綠色植物和部份藻類的細胞壁成分。估計植物每年可利用太陽能固定 1000 億噸的碳，而這些碳大約一半以上會形成纖維素。如果能有效利用這些纖維素，將其分解、發酵，製成生質酒精，那麼將成為人類找尋替代能源的一大福音 (Ryu and Mandels 1980)。

纖維素分解酶 (cellulase) 是一群可將纖維素 (cellulose) 分解成葡萄糖或其它可溶性醣類的酵素。從 1950 年代開始愈來愈多學者投入對此酵素的研究。1970 至 1980 年代已有許多關於纖維素分解酶的基礎原理和實際應用的研究，目前纖維素分解酶應用在工業上的技術仍未成熟，對此酵素的研究仍然不斷持續進行。然而，纖維素分解酶已有多方面的用途，包括食品加工、畜牧飼料、釀酒、洗衣、造紙、紡織和農業等，並有生產生質能源的發展潛力 (Bhat 2000)。

1.1 纖維素

纖維素大量且廣泛的存在於生物圈當中，是地球上極豐富的資源。纖維素主要的功能是構成植物和部分植物性原生生物細胞壁的主要成分。纖維素是由 100 ~ 10000 個葡萄糖單體聚合而成的直鏈型聚合物，其分子量大小介於 200000 ~ 2000000 之間，而每個葡萄糖單體之間的鍵結方式，是以一個葡萄糖分子上的第一號碳，連接到另一個葡萄糖分子的第四號碳，此鍵結方式稱為 β -1,4 糖苷鍵。在植物組織中，50 ~ 60 個纖維素分子會先以平行方式聚集成直徑約為 5 ~ 12 nm 的微纖維 (microfibrils)，相鄰的微纖維再以氫鍵互相連結，產生規則排列的結晶型結構 (crystalline domain)，其中也有排列不規則的非結晶型結構 (amorphous domain) (Bellamy 1974)。



1.2 纖維素分解酶

纖維素分解酶 (cellulase) 是一群可以將纖維素進行水解的酵素總稱，這些酵素彼此協同作用，可將大分子的纖維素水解成較小分子的可溶性醣類，最終將其分解成葡萄糖。大多數可分泌纖維素分解酶的生物為細菌和真菌，分解纖維素所產生的還原糖，可作為這些生物本身的生長及代謝所需。根據對纖維素的作用方式可將這些酶分為三類，即外切型纖維素分解酶 (exocellulase)、內切型纖維素分解酶 (endocellulase)、以及 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase)。

1.2.1 內切型纖維素分解酶 (endo- β -1,4-D-glucanase)

內切型纖維素分解酶又可稱為 CMCase (carboxymethylcellulase)、CM-cellulase、endocellulase、endoglucanase 或 β -1,4-glucanhydrolase 等。此酵素會隨機尋找纖維素的非結晶結構區域進行水解的作用，將纖維素的 β -1,4 糖苷鍵打斷，水解成纖維糊精 (cellodextrin)、纖維二糖 (cellobiose) 或是葡萄糖。除此之外，此酵素亦可直接分解 CMC (carboxymethylcellulose sodium salt) 等可溶性纖維素衍生物，故常以 CMC 作為基質來測定此酵素的活性。惟無法對纖維素的結晶型構造進行水解，需仰賴與外切型纖維素分解酶的協同作用，才能完整的將纖維素的聚合結構分解。

1.2.2 外切型纖維素分解酶 (exo- β -1,4-glucanase)

外切型纖維素分解酶又可稱為 cellobiohydrazase (CBH) 或 exocellulase，此酵素的作用對象是纖維素的結晶型結構，並以纖維二糖為一個水解單位。此酵素的測定可以微晶纖維素 (avicel) 為基質加以測定。

1.2.3 β -葡萄糖苷酶 (β -1,4-D-glucosidase)

β -葡萄糖苷酶又可稱為 β -1,4-glucohydrolase 或 cellobiase，分子量為 50-410 kDa。此酵素可將纖維二糖及纖維糊精水解為葡萄糖，亦對於一些短鏈的寡醣 (oligosaccharides) 具有分解能力。此酵素與外切型纖維素分解酶及內切型纖維素分

解酶協同作用時，可幫助降低纖維二糖或纖維糊精的濃度，此舉可降低高濃度的纖維二糖或纖維糊精對外切型、內切型纖維素分解酶所產生的抑制作用，換言之， β -葡萄糖苷酶可間接的延續其上游兩大酵素的活性。



1.3 纖維素分解酶的應用

纖維素分解酶目前在工業上的應用，主要於造紙業、紡織業、飼料添加劑、食品工業以及纖維素廢棄物之再生利用等方面。在食品工業，果汁的製造過程中添加纖維素分解酶可提升果汁的澄清度以及增加可溶性纖維及還原糖的含量，增加其營養價值；在造紙業，纖維素分解酶可以有效的縮短紙漿的製造時間，並且增加紙張的張力以及對顏料的吸附程度；在飼料業，可增進飼養動物對飼料中植物纖維成份的利用率 (Tolan and Foody 1999)；在紡織工業，纖維素分解酶可改善布料的質感，增加其柔軟度 (Cavaco 1998)。纖維素分解酶已成為工業上經常使用的酵素之一。

1.4 研究動機

本研究的目的是在於將海水中分離出具有纖維素分解能力的細菌，找出其最佳的產酶培養條件，並且對於纖維素分解酶進行純化與特性分析，以期未來能應用在產業上。

第二章 材料與方法



2.1 菌株取得

本實驗所使用的分離株 131 是由實驗室黃思博學長於 2009 年七月在新北市瑞芳區的磅磅子附近海域水樣分離取得。

2.2 實驗材料與設備

2.2.1 實驗設備

無菌操作台 (High ten, Taipei, Taiwan)

低溫培養箱 (Yih der, Taipei, Taiwan)

恆溫培養箱 (Yih der, Taipei, Taiwan)

低溫高速離心機 (Thermo Legend Mach 1.6R, Delaware, U.S.A)

低溫高速離心機 (HERMLE Z 360 K, Wehingen, Germany)

ELISA reader (ChroMate, Missouri, U.S.A)

SPECTRONIC 20D+ (Thermo, Wisconsin, U.S.A)

超微量全波長分光光譜儀 (Thermo Nanodrop 1000, Delaware U.S.A)

蛋白質液相層析系統 FPLC Ä KTA prime (GE , New Jersey U.S.A)

蛋白質電泳槽 (Bio East, Taipei, Taiwan)

電源供應器 (蛋白質電泳) (Major science, Taipei, Taiwan)

水浴槽 (Chin hsin, Taipei, Taiwan)

乾浴槽 (Genepure Technology, Taipei, Taiwan)

凍乾機 (Yu-Shing Biotech YFD100, Taipei, Taiwan)

2.2.2 實驗藥材

2.2.2.1 菌株培養

Peptone (BD, Maryland, U.S.A)



Yeast extract (BD, Maryland, U.S.A)
Sodium Chloride (usb, Ohio, U.S.A)
Magnesium Chloride hexahydrate (Showa, Osaka, Japan)
Agar (Amresco, Ohio, U.S.A)
Glucose (Acors, New Jersey, U.S.A)
Tryptone (Sigma, Missouri, U.S.A)
Carboxymethyl cellulose sodium salt (Showa, Osaka, Japan)

2.2.2.2 酵素活性分析

Glucose (Acors, New Jersey, U.S.A)
3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma, Missouri, U.S.A)
Congo red (Sigma, Missouri, U.S.A)

2.2.2.3 蛋白質定量

BCA Protein Assay Reagent (Thermo, Illinois, U.S.A)

2.2.2.4 酵素純化

Ammonium sulfate (Showa, Osaka, Japan)

2.2.2.5 蛋白質電泳分析

Acrylamide-bis (Serva, Heidelberg, Germany)
Ammonium persulfate (Serva, Heidelberg, Germany)
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine (Serva, Heidelberg, Germany)
Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg, Germany)
 β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Germany)
Bromophenol blue (AppliChem, Darmstadt, Germany)
Tris (Amresco, Ohio, U.S.A)
Sodium dodecyl sulfate (Sigma, Missouri, U.S.A)

Glycerol (林純藥工業株式會社, Osaka, Japan)



2.2.3 培養基、液配製

LB agar : 10 g tryptone, 5 yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar 加去離子水至 1000 mL, pH 調至 7。

LB broth: 10 g tryptone, 5 yeast extract, 10 g NaCl 加去離子水至 1000 mL, pH 調至 7。

2.2.4 蛋白質電泳藥品配製

Separating gel buffer (分離膠體): 18.2 g Tris 加去離子水至 100 mL, pH 8.8。

Stacking gel buffer (聚焦膠體): 6.1 g tris 加去離子水至 100 mL, pH 6.8。


Sample buffer 5X (樣品緩衝液): 4 mL 1.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 mL glycerol, 5 mL β -Mercaptoethanol, 2 g sodium dodecyl sulfate, 1 mL 1 % bromophenol blue。

Running buffer 10X (通用電泳緩衝液): 30 g tris, 144 g glycine, 加去離子水至 1000 mL, pH 8.8。附註: 使用前稀釋至 1X (進行 SDS-PAGE 電泳時, 需額外加入 SDS 使成為 0.1% SDS 電泳緩衝液)。

2.3 分離株 16S rRNA 基因序列的取得並與基因資料庫比對

透過基因或基因體的比較, 可初步了解菌株的屬種, 及其於微生物中的親緣及分類關係, 一般而言, 若兩條基因序列的相似度 (similarity) 高, 即它們在親緣關係上較接近 (Pearson 2007), 為了進行這種相似度檢索 (similarity searching), 需先取得菌株的基因序列, 例如細菌的 16S ribosomal RNA 基因序列。

16S rRNA 位於細菌的核糖體 (ribosome), 核糖體是細胞體內的巨分子, 可讀取 mRNA, 合成蛋白質, 核糖體由兩個不同大小的次單位組成, 以其於離心力作用下的沈澱速度命名, 該沈澱速度的單位是 Svedberg (S), S 值愈大, 表示分子大, 沈澱速度快。在細菌中, 核糖體較大的次單位為 50S, 較小次單位為 30S, 這些次單位都是由多條 RNA 及多種蛋白質組成, 於細菌核糖體的 30S 次單位中含



有 16S rRNA (Watson 2008)，這些 rRNA 對於細胞功能十分重要，rRNA 基因序列的突變將影響核糖體的結構和功能，甚至使細胞死亡，在演化上，這些 rRNA 的基因序列不易改變，故取得 rRNA 基因序列可作為菌種鑑定的良好資訊，但仍要注意，利用此種方式進行菌種分類有其限制，rRNA 基因小，如 16S rRNA 基因序列只有約 1500 至 1800 個鹼基對，以其所帶有的資訊可能並不足夠進行相近菌種間的判別 (Munn 2011)。本節敘述菌株 rRNA 基因序列取得的過程，首先進行菌體 genomic DNA 的萃取，然後使用聚合酶連鎖反應，將 16S rRNA 基因片段增幅，利用膠體電泳確認是否有成功增幅，最後將樣品送交基龍米克斯生物科技有限公司進行定序。

得到定序結果後，透過美國國家生技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的線上工具 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. 1990)與基因資料庫 GenBank (Benson 2013) 比對，可檢索出與本實驗分離株 rRNA 基因序列相近的菌種，即可初步了解菌株的分類所屬。

2.3.1 Genomic DNA 萃取

本研究參考 Cheng 與 Jiang (Cheng and Jiang 2006) 進行菌體 genomic DNA 的萃取，該法適用於革蘭氏陰性菌、革蘭氏陽性菌及真菌。吸取 1 ml 培養 2 至 3 天的菌液至 1.5 ml 離心管中，以 8,000 g 離心 2 分鐘，去除上清液後，以 400 μ l STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 清洗菌體兩次，以 8,000 g 離心 2 分鐘，加入 200 μ l TE buffer (10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 及 100 μ l Tris-saturated phenol (pH 8.0)，震盪 1 至 2 分鐘，此過程可使細胞溶解，然後以 13,000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，可觀察到明顯的水層及有機層，抽取 160 μ l 含有 DNA 的水層 (上層) 至新的離心管，加入 40 μ l TE buffer 使體積成 200 μ l，再混合 100 μ l 氯仿 (chloroform)，以 13,000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，此過程可使非 DNA 物質沉澱，可重覆 2 至 3 次以純化 DNA，抽取 160 μ l 上層液至新的離心管，加入 40 μ l TE buffer 及 5 μ l RNase (10 mg / ml) 於 37 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘以去除 RNA，後混合 100 μ l 氯仿以 13,000 g 於 4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘，最後抽取 150 μ l 上層液至新的離心管，該水層所含 DNA 即可用於後續實驗，

或置放於 -20 °C 保存。



2.3.2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

聚合酶連鎖反應可以增幅出 DNA 特定區域片段，把抽取的 DNA 混合 DNA polymerase, oligonucleotide primers 及四種 deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)，並使該混合液經過多個不同溫度的循環，一般進行 30 至 40 個循環後，可使該特定片段增幅 2.5 億倍，使其容易偵測 (Munn 2011)。本實驗中，16S rRNA 基因引子 (primer) 方面，利用廣效型引子 F8 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 及 R1492 (5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTT-3') 分別作為 forward 及 reverse primer (Fell et al. 2000)。調配反應液並置入 PCR 儀器中進行反應，溫度及時間依廠商產品說明 (Zymeset) 設定並調整。

2.3.3 PCR 產物電泳分析及基因定序

為確認 PCR 反應有成功增幅出 16S 基因片段，故進行膠體電泳，因 DNA 帶負電，將其置放於電場中，可使其由負極向正極移動，利用膠體具有空隙的特質，使大分子 DNA 難以通過，移動較慢，小分子則較快，所以膠體電泳可使分子量大小不同的 DNA 互相分離，其後使用可與核酸結合的螢光染劑進行膠體染色，並於 UV 光激發下，觀察 DNA 於膠體的位置分佈，即可知該段 DNA 的大小 (Watson 2008)，同時可了解該 DNA 是否為研究的標的物。

取 0.15 g agarose 於 15 ml 1X TAE buffer 中，加熱溶解後，加入 5 μ l Healthy view 核酸染劑，倒入製膠器中待凝固後即成電泳膠，分別吸取 2 μ l 的 1 kb marker 及 2 μ l PCR 產物注入電泳膠的空格中，於電泳槽內以 100 伏特進行膠體電泳約 20 分鐘，最後將膠體放置於 UV transilluminator 檢視，若能成功偵測到 16S rRNA 基因片段 (約 1500 個鹼基對)，PCR 產物即可進行基因定序，定序部分委由基龍米克斯生物科技有限公司進行，最後可獲得分離株的基因序列報告。

2.3.4 根據分離株 rRNA 基因序列的初步菌種鑑定



取得分離株的 rRNA 基因序列後，可利用軟體 ChromasPro 1.2 去除雜訊，16S rRNA 基因得到長度約 1400 至 1500 的鹼基對 (base pair, bp) 序列，之後利用 BLAST 進行檢索，可得出與本實驗分離株序列相近的菌株，BLAST 給出的結果中以 score 得分高低排列，結果給出的 Max Identity 是指在某個得分高的片段中，完全相同序列的比例，比例愈高序列間越相似，可作參考 (莊順淑，2004)。此時，即可初步判斷本實驗分離株的分類地位。

2.3.5 根據分離株 rRNA 基因序列的親緣分析

親緣分析 (phylogenetic analysis) 的其中一個目的在於建立物種、基因序列或氨基酸序列等所謂操作分類單位 (operational taxonomic units, OTUs) 的演化關係，通常以親緣關係樹的圖像表達不同 OTUs 的相關性，分子微生物學近年多應用 16S rRNA 基因建立親緣關係樹，以了解細菌的分類 (Page and Holmes 1998)，本研究進行親緣分析的目的，在於透過建立親緣樹，了解分離株與已知菌種的親緣關係。

親緣樹是一種圖形化的數學結構，其主要由分支 (branch, edge) 及節點 (node) 組成，位於末端的節點 (或稱葉) 通常是研究者標的之序列，其餘的中間節點 (internal node) 是該分支假設的共同祖先 (Page and Holmes 1998)。本節敘述親緣分析的過程，最後建立起親緣樹，方法主要參考 Douady 與 Nesbo (2007) 所述。

親緣分析一般有四個步驟：取得序列進行序列比對 (alignment)、選定一個適當的序列替代模式 (substitution model)，以計算序列間的親緣距離、建立親緣關係樹圖以及親緣樹的評估。本研究使用軟體 MEGA 6 (Tamura et al. 2011) 進行上述操作，軟體操作的細節可參考 Hall (2013)。



2.3.5.1 取得序列進行序列比對

如前所述，利用 BLAST 初步了解菌株的分類所屬後，即可於 GenBank 中檢索該屬相近標準菌株的 16S rRNA 基因序列，輸入至 MEGA 6，與本實驗分離株 16S rRNA 基因序列進行比對，比對的過程中，因序列的不同，會產生 mismatch 及 gap，MEGA 6 內建 ClustalW 功能，該功能利用啟發式演算法 (heuristic algorithm)，可自動產生 mismatch 及 gap 最少的排列，結果仍需以人工調整，例如調整長短不一的序列，刪除差異過大的序列等。

2.3.5.2 選定一個適當的序列替代模式，以計算親緣距離

測量序列間相似度的不同，可推估它們之間的親緣距離 (Page and Holmes 1998)。計算親緣距離的多種模式被提出，本研究選用 Jukes-and-Cantor 模式 (Jukes and Cantor 1969)，該模式假設任一核苷酸轉變成自身外的核苷酸的機率相等，於數學運算上較簡單。

2.3.5.3 建立親緣關係樹圖

本研究使用 neighbor-joining 方法 (Saitou and Nei 1987) 建立親緣樹圖，其是一種群集演算法 (clustering algorithms)，該演算法的概念是將相似度高的觀測項目進行分群歸類，相同群集中的事物有相同的特性。Neighbor-joining 方法利用統計方式，把輸入的序列兩兩成對進行計算，並畫出總親緣距離最小的親緣樹樹形圖，MEGA 6 亦內建有 maximum likelihood, maximum parsimony, minimum evolution 及 UPGMA 等方法。

親緣樹可用有根 (rooted) 或無根 (unrooted) 的方式表現，有根樹具有根的節點，故在樹形圖中與根愈接近，有演化上比較早出現的意涵，即表現了演化方向(祖先及後代的關係)，而無根樹中因無根的節點，故不能作祖先及後代問題的討論 (Page and Holmes 1998)。因本研究以 rRNA 序列進行親緣分析，不足以其為判定演化方向的證據，故本研究以無根的 additive tree (metric tree, phylogram) 表現樹



形圖，於 additive tree 中，支的長度表示了親緣距離。

2.3.5.4 親緣樹的評估

本研究使用拔靴法 (bootstrapping) (Efron 1979) 進行親緣樹的評估，該法從原始資料中以重覆抽樣的方式，產生新的資料，一般重覆抽樣一千次，例如原本的資料組序列長度為 150 個核苷酸，新的資料組中仍然會是 150 個核苷酸，但可能當中一些位置在新的資料中會重覆多次，另一些位置則被排除，透過此種重覆抽樣，可產生多組親緣樹，這些親緣樹相互對比後，可得到 bootstrap 百分比，例如重覆抽樣所建的親緣樹中，1000 次有 777 次把 A 序列及 B 序列歸於同一分支底下，即可得 bootstrap 百分比為 77.7%，一般標示於分支旁，bootstrap 百分比高於 75 % 時，表示經評估後，該分支較具有可信度。

2.4 纖維素分解酶的活性測試

2.4.1 剛果紅染色法

配置 LB agar 時，加入 5 g 之 CMC，製成含有 0.5% CMC 的 LB agar plate，將所選取具有纖維素分解能力的菌株種入，培養 3 天後，將 1% 之 Congo red 倒入培養基表面，染色 5 分鐘，將殘餘之 Congo red 去除後以 1M 之 NaCl 沖洗數次，每次浸泡 10 分鐘，以利進行脫色。Congo red 會和培養基中所含的 CMC 產生鍵結，以致無法順利脫色，若菌株具有分解 CMC 的能力，其菌落周圍在脫色後會呈現一透明帶。

2.4.2 DNS 還原糖法

以 0.25 g 之 3,5-dinitrosalicylic acid 與 75 g 之酒石酸鉀鈉溶於 50 mL、2 M 之 NaOH 中，再稀釋至 250 mL，製備之二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 試劑。取 0.3ml、已知濃度為 0 mg/mL ~ 1 mg/mL 之葡萄糖溶液，加入 0.1 mL 之二硝基水楊酸試劑中。於 100°C 之乾浴加熱 10 分鐘，靜置至室溫後，使用分光

光度計測量其在波長為 570nm 之光線下之吸光值後，製備測定還原糖濃度之 DNS 檢量線。

依據 DNS 檢量線，取 0.3 mL 之待測物樣品加入 0.1 mL 之 DNS 試劑，將混合液在 100°C 加熱 10 分鐘後放至室溫，測其 570 nm 之吸光值，帶入檢量線公式換算出還原糖濃度。

待測樣品是將 0.1 ml 的酵素液和 0.2 ml 的 1% CMC 均勻混合後，於 37°C 反應一小時，之後加入 0.1 ml 的 DNS 並在 100°C 加熱 10 分鐘，靜置冷卻至室溫並吸取 0.2 ml 至 96 well 孔盤以 ELISA reader 讀取 570 nm 之吸光值。將此吸光值帶回還原糖濃度之 DNS 檢量線的回歸方程式後，可得數值 a (mg/ml)。由於樣本加酵素液的體積為 0.3 ml，故還原糖的含量為 $0.3 \times a$ (mg)，此為每 0.1 ml 的酵素液所能產生的還原糖量。本實驗定義 1 活性單位 (U) 為每 1 ml 的酵素液每分鐘分解 CMC 所產出的還原糖量 (μg)，即： $0.3a \times 10 \times 1000/60$ (U)。比活性定義為每 1 mg 的纖維素分解酶所表現的活性單位 (U)。

2.5 纖維酶之培養條件測試

2.5.1 纖維素分解酶誘導物濃度測試

在 250 mL 具凹槽之錐形瓶中分別加入含 0%、0.5% 和 1%，pH 7 的 LB broth 50 mL。再注入前培養菌液 (於 25 °C 恆溫培養箱培養 48 小時) 1mL，於 25 °C 下，以 75 rpm 震盪培養並每 24 小時測其纖維素分解酶活性，持續 5 天，找出最佳纖維素分解酶誘導物濃度。

2.5.2 培養液體積測試

取前培養菌液 1 mL，分別加入 50 mL、75 mL 及 100 mL 且含有 0.5% CMC、pH 7 的 LB broth 之 250 mL 具凹槽之錐形瓶中，於 25 °C 恆溫培養箱以 75 rpm 的方式震盪培養。而後每 24 小時吸取菌液並測試其纖維素分解酶活性，找出最佳培養體積。



2.5.3 分離株之生長速率及纖維素分解酶活性

取前培養液 200 μ L 至含有 50 mL LB broth、0.5 % CMC 且 pH 7 的 250 mL 具凹槽之錐形瓶中，於 25 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱以 75 rpm 搖瓶培養，每 24 小時測試其細菌生長濃度 (OD₆₀₀)，並且吸取菌液測試其纖維素分解酶活性。

2.5.4 分離株之最佳化培養

經由孫同天院士所提出的一套實驗方法 (Sun 2004)，以三種培養液體積 (50、75、100 mL)、三種纖維素分解酶誘導物 (CMC) 濃度 (0.50、0.75、1.00%)、四種培養液 pH 值 (6、7、8、9) 及三種不同溫度 (25、30、35 $^{\circ}$ C) 下，製成十種不同條件的培養方式 (附錄 5)，並以三重複進行實驗，每 24 小時測試其纖維素分解酶活性。

2.6 細菌大量培養及誘導酵素產生

當測試出最佳酵素培養條件後，取前培養液 1 ml 分別加入 10 個 250 mL 具凹槽之錐形瓶中，瓶中含有最佳的誘導物濃度、pH 值並且置入最佳溫度的恆溫箱中以 75 rpm 搖瓶培養，並且在酵素活性最大的培養天數下取出菌液，以進行下一步的純化。

2.7 粗纖維素分解酶的製備

將大量培養後的菌液以離心 (4700 rpm, 30 分鐘, 4 $^{\circ}$ C) 的方式將菌體離心下來，取出上清液做為纖維素分解酶的粗酵素液，並測試粗酵素液的纖維素分解酶活性、蛋白質濃度及總體積。

2.8 硫酸銨沉澱和透析

參考硫酸銨百分飽和濃度表 (附錄一)，並計算出硫酸銨的添加量。分別收集

在硫酸銨添加量為 0-20%、20-40%、40-60%、60-80% 和 80-100% 飽和濃度下的酵素液，測試不同硫酸銨飽和濃度時的纖維素分解酶活性大小，最後找出最適合的硫酸銨添加量。

將收集來的粗酵素液依上述所測出最佳的硫酸銨飽和濃度將硫酸銨加到粗酵素液中，以離心 (7000 rpm, 25 min, 4°C) 的方式得到析出的蛋白質，再以磷酸緩衝液 (50 mM, pH 7) 回溶這些蛋白，並置入透析袋中，以去離子水作為透析液進行透析 24-48 小時，每 24 小時換一次透析液。透析完成後將酵素液從透析袋中取出，測試並記錄所得粗酵素液的纖維素分解酶活性、蛋白質濃度及總體積，全程於 4 °C 進行。最後吸取 5 mL 酵素液分裝於 15 mL 離心管進行冷凍乾燥保存。

2.9 蛋白質定量

本研究所使用之 BCA 定量法是藉由蛋白質會將二價銅離子還原為一價的銅離子，而一價的銅離子會與 BCA 螯合而呈色的特性，其在 OD₅₇₀ 處有很強的吸光值 (Smith et al. 1985)。

首先將 BCA protein assay kit 中的 Reagent A 和 Reagent B 以 50 : 1 比例均勻混和，並製作 BSA 標準曲線 (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ug/mL) 每個濃度取 20 uL 以二重複加入 96 孔盤中，並在每槽加 200 uL 之上敘混和 Reagent，在 37 °C 下反應 30 分鐘等待呈色，並以 ELISA reader 測其吸光值 (OD₅₇₀)，並作圖畫出標準曲線，作為未知蛋白的濃度的換算標準。

2.10 纖維素分解酶純化 (離子交換層析)

先以不含氯化鈉的磷酸緩衝液 (50 mM, pH7) 沖洗管柱，沖洗至 280 nm 之吸光值為零或達到平衡後，將酵素液(約 2 mL) 注入管柱，並以不含鹽的 Tris 緩衝液 (50 mM, pH 7) 將未吸附的蛋白質沖提出來，並設定流速為每分鐘 1 mL，以 4 mL 為一劃分並分裝，當 280 nm 之吸光值為零或平衡時，再慢慢升高磷酸緩衝液的鹽濃度梯度 (0 M - 1 M NaCl) 將被吸附在管柱內的蛋白質沖提出來，全程於

冰箱中 (4°C) 以蛋白質液相層析系統 (FPLC) 進行。之後以濃縮離心管離心的方式 (9900 rpm, 20 分鐘) 進行濃縮與去鹽，重複數次直到酵素液體積縮小至適當大小 (約 1 mL)，最後測試纖維素分解酶的活性、蛋白質濃度及酵素液體積，並以 SDS-PAGE 進行分析，觀察是否有達到純化的效果。附註：以上使用之管柱為 Hitrap DEAE-FF (弱陰離子交換樹脂)。

2.11 蛋白質之電泳分析

2.11.1 SDS-PAGE 蛋白質染色

本實驗使用的 SDS-PAGE 是以 10% 的分離膠體及 5% 的焦集膠體所配製的。首先取 20 μ L 的蛋白質樣本加上四分之一的五倍樣本緩衝液，混合均勻後於 100 °C 中加熱 5 分鐘，接著離心 30 秒，利用微量滴管注入樣本槽。以 80 伏特的電壓泳動 10 分鐘使蛋白質從焦集膠體進入分離膠體，再以 110 伏特的電壓泳動 80-100 分鐘，待追蹤染劑離膠體邊緣一公分時即可停止電泳。電泳結束後以 CBR (0.75g Coomassie brilliant blue R 250 加入 250 mL 甲醇和 250 mL ddH₂O 以及 50 mL 醋酸) 染劑進行染色 30 分鐘，再以脫色液 (Distilled deionized water : Methanol : Acetic acid = 7 : 2 : 1 溶液) 進行脫色。(SDS-PAGE 蛋白質電泳主要用來測定纖維素分解酶的分子量並評估此蛋白是否有次單元的存在 (Laemmli 1970))。

2.11.2 SDS-PAGE 活性染色

本實驗使用的 SDS-PAGE 是以 10% 的分離膠體及 5% 的焦集膠體所配製。首先取 20 μ L 的蛋白質樣本加上四分之一的五倍樣本緩衝液，混合均勻後離心 30 秒，利用微量滴管注入樣本槽，以 80 伏特的電壓泳動 10 分鐘使蛋白質聚在焦集膠體下緣，再以 110 伏特的電壓泳動 80-100 分鐘，待追蹤染劑離膠體邊緣一公分時即可停止電泳。電泳結束後將 SDS-PAGE 膠片浸泡於 2.5% 的 Triton X-100 (溶於 50 mM 之 pH 7 的磷酸緩衝液) 在室溫下於震盪儀上以 50 rpm 的速度將膠片上的 SDS 清洗掉，本步驟需進行兩次各 15 分鐘，接著以 50 mM、pH 7 的磷酸緩衝液將殘留在膠片上的 Triton X-100 洗去，接著再將膠片浸泡於 1% CMC 基質液，

於 37 °C 恆溫培養箱靜置一小時使 CMC 滲入膠片與纖維素分解酶反應，一小時過後移除 CMC 基質液，並以 50 mM 之 pH 7 的磷酸緩衝液清洗殘留在膠片上未滲入膠片的 CMC 基質液，再以 1% congo red 染色 10 分鐘，最後以 1M NaCl 脫色數次 (Laemmli 1970) (Jain et al. 2012)。



2.12 酵素最適反應溫度

取純化過的酵素液且經過適當的稀釋，分別置於不同的溫度下 (4、10、20、30、40、50、60 和 70 °C) 與基質反應 1 小時，測試在不同溫度下，酵素的活性大小，以活性最大時的溫度作為 100%，推算酵素在不同溫度時的相對活性。

2.13 酵素之熱穩定性

取純化過的酵素液且經過適當的稀釋，分別置於不同的溫度下 (4、10、20、30、30、40、50、60 和 70 °C) 30 分鐘，之後再加入基質液與之反應，並在 37 °C 的環境下反應 1 小時，測試酵素的活性，以活性最大時的溫度作為 100%，推算酵素在不同溫度時的相對穩定性。

2.14 酵素最適 pH 的測定

將酵素液與不同 pH 值(4、5、6、7、8、9 和 10) 的基質液(CMC) 稀釋混和(1:1)，在 37 °C 下反應 1 小時。最後經由不同 pH 值環境下酵素的活性大小，以活性最大時的 pH 值作為 100%，推算酵素在不同 pH 值的相對活性(%) (Balqis and Rosma 2011)。

2.15 酵素在不同 pH 下之穩定性

將酵素液與不同 pH 值(4、5、6、7、8、9 和 10) 的緩衝液 (附錄 3) 稀釋混和(1:1) 於室溫下靜置 30 分鐘，再與基質液於 37 °C 下反應一小時，並測其纖維素分解酶活性，以活性最大時的 pH 值做為 100%，依此計算酵素於不同 pH 值下

之相對穩定性 (%) (Balqis and Rosma 2011)。



2.16 抑制劑對酵素活性的影響

將純化後的酵素液和含有 5 mM 抑制劑 (β -ME、PMSF 和 EDTA) 的 50 mM 磷酸緩衝液混合，於室溫下靜置 30 分鐘，然後加入基質液並置於 37 °C 環境下反應 1 小時。測試酵素活性，且以未添加抑制劑時的活性當作 100%，計算酵素在添加不同抑制劑後的相對活性 (%) (Yan et al. 2009)。

2.17 界面活性劑對酵素活性的影響

將純化後的酵素液分別與 1.0 % (v/v) 之界面活性劑(SDS、Triton X-100 和 Tween 20) 混合於室溫下靜置 30 分鐘後，之後再與基質液於 37 °C 下反應一小時，並測其纖維素分解酶之活性。以未加任何界面活性劑之酵素活性定為 100%，依此分析酵素在界面活性劑下之相對活性 (%)。

2.18 纖維素分解酶之應用測試

將 100 ml 酵素液分別加入含有 0.1 g 的甘蔗渣、石蓴乾、影印紙以及微晶纖維素之 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7) 中，置於 37°C 中反應，並以加入 100 ml 之去離子水作為對照組，每 12 小時測一次還原糖總量，測試酵素是否對於以上纖維素來源具有水解之作用，以評估其未來在工業上之應用之潛力。

第三章 結果



3.1 分離株的親緣關係鑑定

經定序後，分離株的 rRNA 長度為 1398 bp (附錄 4)，經過 BLAST，顯示 95% 以上相似度的標準株共有五株，分別為 *Vibrio fluvialis*、*Vibrio furnissii*、*Vibrio nereis*、*Vibrio tubiashi* 以及 *Vibrio probioticus*，其中以 *Vibrio furnissii* 和分離株的親緣關係最為接近 (圖 1)。

3.2 纖維素分解酶初步測試

經剛果紅測試後，可發現分離株之菌落外圍具有一明顯的透明帶，顯示其具有纖維素的分解能力 (圖 2)。

將分離株與其他具有纖維素分解能力的菌株進行剛果紅法測試，並比對結果可發現分離株之透明帶明顯較大，具有較良好的纖維素分解能力 (圖 3)。

3.3 最佳培養條件測試

根據葡萄糖標準濃度 (0 ~ 1 mg/ml)，製作出 DNS 還原糖標準曲線 (圖 4)，作為本研究之纖維素分解酶活性換算標準。

根據 BSA 蛋白質標準濃度 (0~2000 µg/ml)，製作出蛋白質濃度標準曲線 (圖 5)，作為本研究之蛋白質質量換算標準。

3.3.1 不同溫度測試

結果顯示，分離株在 30°C 培養條件下，有最佳纖維素分解酶活性 (圖 6)。

3.3.2 不同 pH 測試

結果顯示，分離株在 pH 6 的培養條件下，有最佳纖維素分解酶活性 (圖 7)。



3.3.3 不同誘導物濃度測試

結果顯示，分離株在誘導物濃度為 1% 的培養條件下，有最佳纖維素分解酶活性 (圖 8)。

3.3.4 不同培養體積測試

實驗結果顯示，分離株在體積為 50 ml 的培養條件下，有最好的纖維素分解酶活性 (圖 9)。

3.4 不同條件下分離株生長速率的比較

3.4.1 不同溫度

實驗結果顯示，分離株在溫度為 30 °C 的培養條件下，有最好的生長情形；而在 25 °C 時生長情況最差 (圖 10)。

3.4.2 不同 pH

實驗結果顯示，分離株在 pH 6 的培養條件下，有最好的生長情形；而在 pH 9 時生長情況最差 (圖 11)。

3.4.3 不同誘導物濃度

實驗結果顯示，分離株在誘導物濃度為 1% 的培養條件下，有最好的生長情形；而在 0.5% 時生長情況最差 (圖 12)。

3.5 纖維素分解酶的純化

3.5.1 粗酵素液

根據上述結果，以最佳產酶培養條件 (30 °C、pH 6、1% CMC 及 50 ml 培養體積) 培養 2~3 天後，此時分離株所產生之纖維素分解酶之活性應為最高。故在此時收集菌液並離心得粗酵素液，經測量後得：體積 250 ml、蛋白質濃度 8.86 (mg/ml)、總蛋白量 2214.44 mg、活性 123.94 (U/ml)、總活性 30985 (U) 以及比活



性 13.99 (U/mg) (表 1)。

3.5.2 硫酸銨沈澱劃分

參考硫酸銨百分飽和濃度表 (附錄 5) 將粗萃取的酵素液以不同飽和濃度的硫酸銨 (0-20%、20-40%、40-60%、60-80% 及 80-100%) 進行沉澱及劃分，並測試不同硫酸銨添加量下的纖維素分解酶活性，其中以 60-80% 的酵素活性為最佳 (圖 13-16)。

3.5.3 硫酸銨沉澱及透析

經推算後，加入 60%-80% 飽和濃度的硫酸銨量使蛋白質析出，以離心 (7000 rpm, 4 °C, 30 分鐘) 的方式去除上清液，並利用磷酸緩衝溶液 (50 mM, pH 7) 將底部的蛋白質沉澱物回溶且倒入透析袋內，最後置入磷酸緩衝溶液中進行透析。經透析後得到的酵素液體積為 8 mL，總蛋白量為 19.4 mg，酵素總活性為 1878 U，比活性為 96.86 (U/mg) (表 1)

3.5.4 管柱層析

利用 DEAE-FF (陰離子交換管柱) 進行纖維素分解酶的純化，注入樣本後，以鹽度為 0 M 的 50 mM，pH 7 的磷酸緩衝液沖洗，此時收集被沖洗出的蛋白，經測定後確認其無分解 CMC 之活性。之後開始拉鹽度梯度，從 0 M 拉至 1 M，流速設定為 1 ml，結果依續出現 5 個 peak (圖 17)，分別收集後先以濃縮離心管進行去鹽及提高蛋白濃度，然後測其纖維酶的活性，發現在 peak 2 和 peak 3 有明顯的纖維素分解酶活性，經測定後其體積為 4 ml、總蛋白量 1.81 mg、總活性 782.78 U、比活性為 431.68 (U/mg) (表 1)。



3.6 纖維素分解酶分子量分析

3.6.1 SDS-PAGE 蛋白質染色

以 10% 的分離膠體及 5% 的焦集膠體對分離株所產生的纖維素分解酶進行分析，配合標準蛋白所呈現的 Lane 得知 (圖 18)，在分子量約為 60 kDa 及 36 kDa 及 20 kDa 處染出分離株所產之纖維素分解酶，並進一步對所染出的纖維素分解酶進行活性染色分析。

3.6.2 SDS-PAGE 活性染色

經由 5.0% 及 10% 的 SDS-PAGE 膠片結果顯示 (圖 18)，在膠片上可明顯看到約有三個不同分子量的纖維素分解酶具有活性，分別位於 60 kDa、36 kDa、及 20 kDa 的位置。

3.7 纖維素分解酶的特性探討

3.7.1 酵素最佳反應溫度及熱穩定性

將純化過的酵素分別置於不同溫度條件下 (4、10、20、30、40、50、60、70 和 80 °C)，經酵素活性測試後，此纖維素分解酶的最適反應溫度在 50 °C 左右 (圖 19)，而熱穩定性的部分，可以發現此纖維素分解酶在 50 °C 的環境下，仍有不錯的熱穩定性，一旦超過 50 °C 後，熱穩定性大幅下降 (圖 20)。

3.7.2 酵素最佳反應 pH 值及其穩定性

將纖維素分解酶置於不同 pH 值的環境下 (4、5、6、7、8、9 和 10)，經酵素活性的分析後，纖維素分解酶的最佳反應 pH 是在 pH 6 時活性最佳 (圖 21)，另外，在 pH 6 的環境下纖維素分解酶亦有最好的穩定性 (圖 22)。



3.7.3 蛋白抑制劑對酵素活性的影響

測試不同酵素抑制劑對分離株所產纖維素分解酶的影響，結果發現 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) 對此纖維素分解酶造成活性降低的影響最大，其次是 phenylmethanesulfonylfluride (PMSF)，而 β -mecaptoenthol 對纖維素分解酶的活性無顯著的影響 (圖 23)。

3.7.5 界面活性劑對酵素活性的影響

在界面活性劑的影響方面，纖維素分解酶對 Triton X-100 的耐受性較高，仍具有 75% 的活性，而纖維素分解酶在有 SDS 和 Tween 80 的環境下，活性降低到只剩下約 25%。而 Tween 20 則使纖維素分解酶的活性約降低一半 (圖 24)。

3.8 粗酵素液的實際應用測試

實測結果顯示，分離株所產之纖維素分解酶可分解甘蔗渣、石蓴、影印紙和微晶纖維素，其中對微晶纖維素的分解能力最佳，其次是石蓴、影印紙，而對甘蔗渣的水解能力最差 (圖 25)。

第四章 討論



4.1 親緣關係鑑定

分離株經 16S rRNA 核苷酸序列進行親緣關係鑑定後，共有 5 標準株之序列相似度為 95% 以上，更有一株之序列相似度高達 97%，此皆為 *Vibrio* 屬之細菌；故可判斷分離株為 *Vibrio* 屬之成員。*Vibrio* 屬為常見的海洋細菌，其生長必須仰賴 NaCl 的刺激，故為需鹽性的細菌。某些 *Vibrio* 屬的細菌會感染人類，入侵人類的腸胃道，例如有名的 *Vibrio cholerae* 即為常見的感染源。此外與本實驗之分離株親緣關係最相近是兩株標準株 *Vibrio furnissii* 和 *Vibrio fluvia* 也是會感染人類的病原體 (圖 1)。

4.2 剛果紅測試

剛果紅會和多醣類產生紅色複合物，卻不會和纖維二糖或葡萄糖產生鍵結，故當脫色液加入之後，多醣被酵素水解的區域也會隨之脫色，而呈現出透明帶 (圖 2)。由實測結果可看出分離株相較於其他具纖維素分解能力的菌株，在剛果紅測試下，其菌落周圍的透明帶明顯較大 (圖 3)，由此可初步判斷分離株較其他菌株有更好的纖維素分解活性，故以分離株作為本研究的酵素純化對象。

4.3 分離株的生長速率與纖維素分解酶的活性

4.3.1 分離株生長曲線

分離株在 30°C 時具有最好的生長情形，其次為 35°C，而 25°C 的生長情形最差。並且在 pH 6 的環境下具有最好的生長能力，大幅超越 pH 7 的環境，並在 pH 愈大的情況下生長情形愈差。以上述兩點可以假設分離株喜好生長的環境應在岸邊或河口地帶相對較酸、熱的環境。誘導物濃度方面，添加 1% CMC 的組別具有最好的生長情形，可能是分離株可以利用 CMC 作為碳源來促進生長所致；而另人意外的是，添加 0.5% CMC 的組別分離株的生長情形最差，還低於沒有添加任

何 CMC 的組別，這有可能是其未達到可以促進分離株生長的濃度，亦有可能是人為操作的誤差，在種菌時就接種入較少的細菌。



4.3.2 分離株的纖維素分解酶活性

分離株無論在不同 pH、溫度、CMC 濃度或培養體積下，皆在培養 48 hr 時可測得最佳的纖維素分解酶活性，故大量培養時即以 48 hr 作為最佳培養時間。在不同的 pH 下，可發現 pH 6 和 pH 7 兩者皆具有很好的活性。在誘導物濃度方面，加入 1 % CMC 時分離株具有最好的纖維酶活性，在大量培養時誘導物以 1 % CMC 為最佳培養條件。此外，在不同的培養體積下，分離株也展現不同的酵素活性，以 50 ml 為培養體積時有最好的酵素活性，推測應為含 CMC 之培養液較濃稠，而體積少的組別培養液會有較好的流動率以及透氣率。

4.4 纖維素分解酶的純化

以最佳產酶培養條件培養分離株 48 小時後，收集菌液並以離心方式去除菌體，所得到的上清液即為纖維素分解酶的粗酵素液。此階段先檢測粗酵素液的蛋白量、活性，以求得酵素的比活性。

接著進行硫酸銨沈澱，此方式是利用蛋白質表面具有疏水性部位程度不同的性質，在不同鹽濃度下會被鹽析出來，全程在冰浴中進行，以固定水溶液的硫酸銨飽和濃度，降低誤差的產生。第一次的硫酸銨分劃需收集每個濃度範圍被鹽析出來的蛋白質，透析後測量每個分劃的酵素比活性（圖 16），在 60~80% 的分劃中，其總活性遠超出其他分劃，但是比活性卻和其他分劃相差不遠，這顯示了此分劃有大量非纖維素分解酶的蛋白存在，推估大部份應為原先加入培養液中的 tryptone。

進行管柱層析時，本實驗使用的是 DEAE-FF（陰離子交換層析），待純化的 sample 須先經過 0.2 μm 的濾膜，以防止管柱發生堵塞情形。在無鹽濃度的沖洗下，首先有大量的蛋白被析出，以其面積來看，應為培養液中的 tryptone 和一些其他的蛋白質，幸運的是，這堆蛋白質中沒有測出纖維素分解酶的活性。開始拉鹽度梯度後，以 1ml/min 的流速在 50 ml 內從 0 M NaCl 提升至 1M，共得到 5 個分離良好的 peaks（圖），檢測其活性發現 peak2 和 peak3 有較好的纖維素分解酶活性。

隨後進行 SDS-PAGE 和活性染色以確認其分子量，發現分離株至少可以產生三種不同分子量的纖維素分解酶，其分子量分別為 60 kDa、36 kDa 和 20 kDa。將硫酸銨沈澱後得到的蛋白和經 DEAE-FF 管柱層析後得到的蛋白進行膠體電泳後比較，發現都同樣產生 60 kDa、36 kDa 和 20 kDa 三條明顯的 band，而硫酸銨的 lane 較雜，DEAE-FF 管柱層析後的 lane 非常澄清，顯示雜蛋白已去除，具有良好的純化效果，可惜的是，經 DEAE 管柱層析後的 SDS-PAGE 活性染色的結果非常不明顯，可能是收集的蛋白量不足所致，這亦是日後繼續研究的目標。

從純化表將三次不同階段所收集到的酵素來看，粗酵素液的比活性為 13.99(U/mg)，經硫酸銨沈澱後比活性提升為 96.86 (U/mg) 而經過管柱層析後的比活性為 431.68 (U/mg)，純化倍率為 30.85，代表纖維素分解酶的純度有得到相當的提升；然而回收率僅 0.08%，原因一方面是在純化過程中流失許多蛋白，亦可能是培養液中仍有許多的蛋白質未被細菌所利用；另一方面，在純化過程中也遺失了不少纖維素分解酶，總活性比為 2.53%，大部分應流失在硫酸銨沈澱的其他分劃中。

4.5 纖維素分解酶的特性

4.5.1 最適反應溫度和熱穩定性

分離株所產之纖維素分解酶在 4-40 °C 皆有不錯的熱穩定性，其中以 4°C 最為良好，50°C 以上其熱穩定性會驟減；反應溫度則在 50°C 時有最好的活性。一般而言，酵素在 40°C 時熱穩定性就會下降許多，本研究所純化的纖維素分解酶在 40°C 仍維持不錯的穩定性，這方面的特性或許可以利用在工業用途上，例如紡織業或造紙業。

4.5.2 最適反應 pH 值和耐受性

本實驗純化之纖維素分解酶在 pH 6 時表現出最佳活性，而在 pH 5-9 之間皆維持不錯的酵素活性；而穩定性方面，在 pH 4-8 之間皆有良好的穩定性，pH 超過 8 以後其穩定性會驟降。顯示本纖維素分解酶的活性作用範圍較廣，從 pH 5-8 皆有不錯的活定和穩定性，從弱鹼到弱酸皆可維持其一定的活性，這方面的特性具有可作為開發工業用途的潛力。



4.5.3 酵素抑制劑對纖維素分解酶的影響

在酵素抑制劑方面，添加 β -mercaptoethanol 對本纖維素分解酶幾乎沒有抑制作用，推測酵素的蛋白結構中沒有雙硫鍵；而添加 EDTA 和 PMSF，則會使活性剩下大約 60%。PMSF 是絲胺酸型酵素的抑制劑，推測分離株所分泌的纖維素分解酶其活性中心應具有絲胺酸的成分。EDTA 是藉由與金屬離子結合來抑制蛋白的活性，故推測此纖維素分解酶為金屬型蛋白質。

4.5.4 界面活性劑對纖維素分解酶的影響

在各種界面活性劑當中，SDS 幾乎完全抑制了纖維素分解酶的活性；tween 80 則使其剩下約 20% 的活性，tween 20 及 triton X-100 分別讓酵素剩下約 40% 和 60% 的活性。SDS 會使反應環境帶有電荷，而 Tween 20、Tween 80 及 Triton X-100 會使反應環境的親水疏水平衡值 (Hydrophile-Lipophile Balance) 改變 (Griffin, 1949)。本研究在進行 SDS-PAGE 活性染色時，即先將酵素與 SDS 作用，完成泳動後，再以 Triton X-100 洗去 SDS，最後再以清水洗去 Triton X-100，恢復酵素活性以進行活性染色。由於此兩種界面活性劑皆對纖維素分解酶具有活性抑制的效果，故多少會影響活性染色，尤其是在酵素的蛋白量不足的時候。

4.6 纖維素分解酶的應用測試

實測的結果顯示，相較於其他基質，本酵素對微晶纖維素有良好的分解能力，可以推測分離株所產的各種纖維素分解酶當中，應有內切型纖維素分解酶的存在，故對於結晶型的纖維結構具有水解的能力，而活性高於其他組別的原因可能是基質的純度較純，而且已呈粉末狀，大大的提升了酵素的作用面積所致。

另一方面，本纖維酶對石蓴亦有不錯的水解能力，值得一提的是，對石蓴的水解活性在第 12 小時非常低，直到第 36 小時大幅增加，可能是因為石蓴最外層的膠質層尚未被破壞，然而破壞後，纖維素一旦裸露出來，纖維素的作用就大量提升。

影印紙在這四種基質的測試中，酵素表現出的活性名列第三，值得注意的是，在第 12 小時其還原糖量相對較高，這可能是因為紙漿本身就是經過工廠處理，其

纖維結構屬於短鏈狀態，而且分佈很均勻，酵素的活性也和時間呈線性關係。

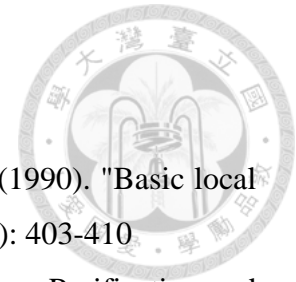
四種待測物當中，以甘蔗渣組別的酵素活性最不彰顯，甘蔗渣的纖維結構非常堅實，在前處理時就感覺得到，不僅纖維很長，又不易剪斷，故纖維素分解酶要將其分解亦困難許多。

第五章 結論

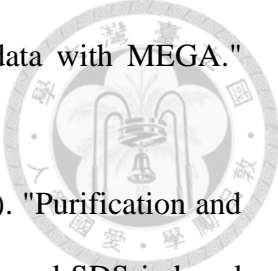


- 一、分離株經鑑定後為弧菌屬(*Vibrio*)。
- 二、經硫酸銨沈澱及陰離子交換層析後，本酵素的純化倍率為 30.85，回收率為 0.08%。
- 三、經 SDS-PAGE 電泳後，本酵素包含三種纖維素分解酶，其分子量分別為 60 kDa、36 kDa 及 20 kDa。
- 四、本酵素最適反應溫度為 50°C，最適 pH 為 6。
- 五、本酵素在 4-40°C 以及 pH4-9 相對有良好的穩定性。
- 六、本酵素會被 PMSF 及 EDTA 等蛋白抑制劑所抑制，可能為絲胺酸型或金屬型蛋白質。
- 七、本酵素在 1% SDS 或 1% Tween 80 的作用下僅剩下約 25% 的活性，在 1% Tween 20 的環境下會降低 55% 的活性，而在 1% Triton X-100 的作用下仍維持 75% 的活性。
- 八、本酵素對於微晶纖維素具有分解能力，故其中包含外切型纖維素分解酶；對 CMC 具有分解能力，故其中包含內切型纖維素分解酶。
- 九、本酵素對石蓴及紙張皆有分解能力，具有工業發展的潛力。

參考文獻



- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of molecular biology* **215**(3): 403-410
- Balqis, Z. S. and A. Rosma (2011). "Artocarpus integer leaf protease: Purification and characterisation." *Food chemistry* **129**(4): 1523.
- Bellamy, W. D. (1974). "Biotechnology report: single cell proteins from cellulosic wastes." *Biotechnol bioeng* **16**(7): 869-880.
- Benson, D. A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell and E. W. Sayers (2013). "GenBank." *Nucleic acids research* **41**(Database issue): D36-42.
- Bhat, M. K. (2000). "Cellulases and related enzymes in biotechnology." *Biotechnol advance* **18**(5): 355-383.
- Cavaco, P. (1998). "Mechanism of cellulase action in textile processes." *Carbohydrate polymer* **37**: 273-277.
- Cheng, H. R. and N. Jiang (2006). "Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts." *Biotechnology letters* **28**(1): 55-59.
- Douady, C. J. and C. L. Nesbo (2007). "Reconstructing and interpreting evolutionary relationships." *Methods for general and molecular microbiology* C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak et al., ASM Press.
- Efron, B. (1979). "1977 Rietz lecture - Bootstrap methods - Another look at the Jackknife." *Annals of statistics* **7**(1): 1-26.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Statzell-Tallman (2000). "Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **50**(pt3): 1351-1371.

- 
- Hall, B. G. (2013). "Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA." *Molecular biology and evolution* **30**(5): 1229-1235.
- Jain, D., I. Pancha, S. K. Mishra, A. Shrivastav and S. Mishra (2012). "Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents." *Bioresource technology* **115**: 228-236.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor (1969). "Evolution of protein molecules." *Mammalian protein metabolism* H. N. Munro and J. B. Allison, Academic Press.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Munn, C. B. (2011). *Marine microbiology: ecology and applications* (2 ed.: Garland Science).
- Page, R. D. M. and E. C. Holmes (1998). *Molecular evolution: a phylogenetic approach* Blackwell Science.
- Pearson, W. R. (2007). "Characterization of bacterial genome sequences by similarity searching." *Methods for general and molecular microbiology*.
- Ryu, D. D. Y. and M. Mandels (1980). "Cellulase: biosynthesis and application." *Enzyme microbiology and technology* **2**: 92-102.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular biology and evolution* **4**(4): 406-425.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* **150**(1): 76-85.
- Sun, T. T. (2004). "Excessive trust in authorities and its influence on experimental

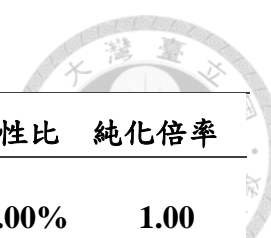
design." *Nature reviews molecular cell Biology* **5(7)**: 785-799.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." *Molecular biology and evolution* **28(10)**: 2731-2739.

Tolan, J. S. and B. Foody (1999). "Cellulase from submerged fermentation." *Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology* **65**(41-67).

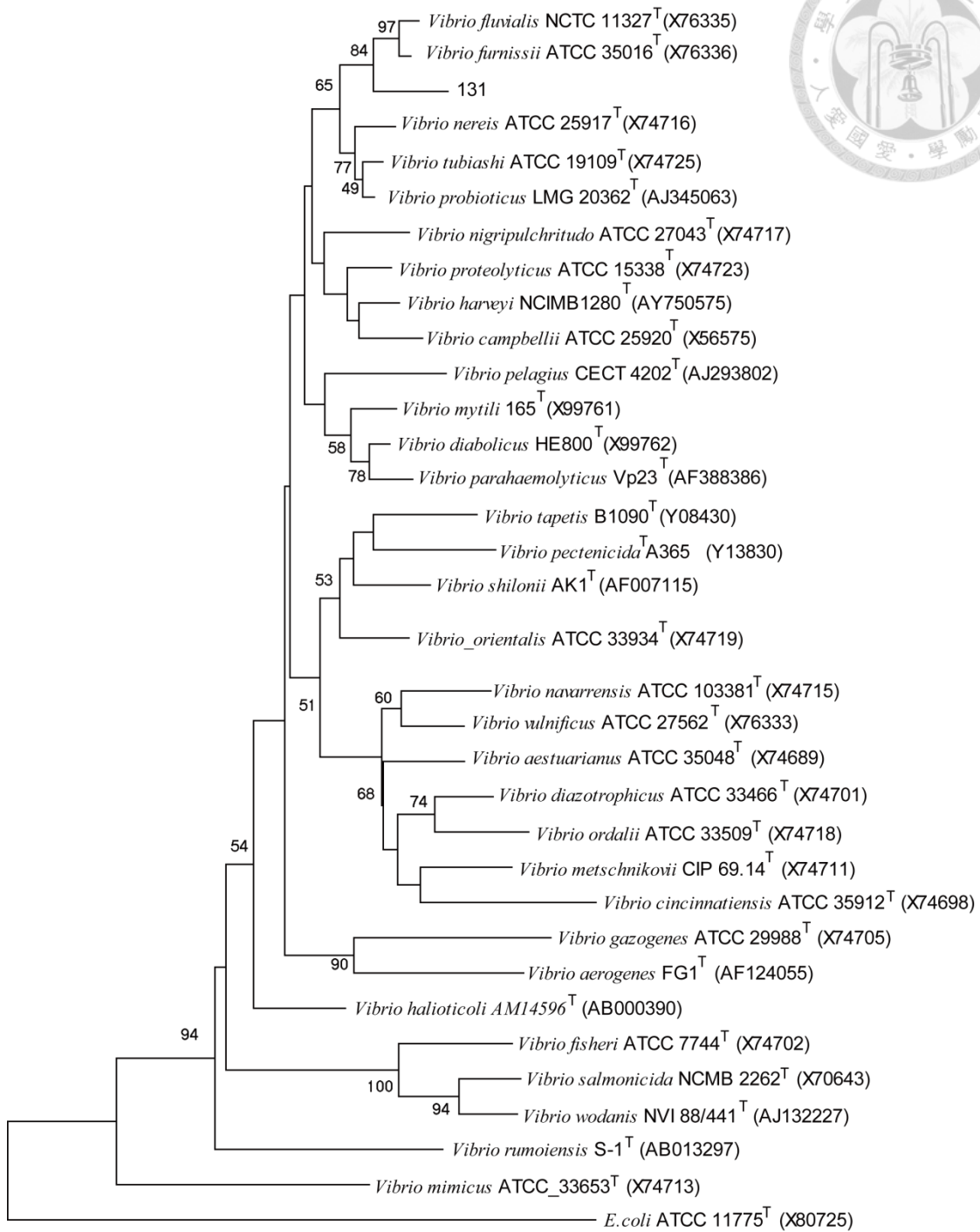
Watson, J. D. (2008). *Molecular biology of the gene* 6th ed.:Pearson/Benjamin Cummings.

Yan, B. Q., X. L. Chen, X. Y. Hou, H. L. He, B. C. Zhou and Y. Z. Zhang (2009). "Molecular analysis of the gene encoding a cold-adapted halophilic subtilase from deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp SM9913: Cloning, expression, characterization and function analysis of the C-terminal PPC domains." *Extremophiles* **13(4)**: 725-733.



純化階段	體積	蛋白濃度(mg/ml)	總蛋白(mg)	活性(U/ml)	總活性(U)	比活性(U/mg)	蛋白純化比	總活性比	純化倍率
粗酵素液	250	8.86	2214.44	123.94	30985.00	13.99	100.00%	100.00%	1.00
硫酸銨沈澱	8	2.42	19.40	234.83	1878.67	96.86	0.88%	6.06%	6.92
管柱層析	4	0.45	1.81	195.69	782.78	431.68	0.08%	2.53%	30.85

表 1、纖維素分解酶的純化表。將粗酵素液經由硫酸銨沈澱後，再以陰離子管柱加以層析，每個階段測量其蛋白質濃度以及纖維酶活性，製作成此純化表。比活性從 13.99 提高至 431.68，蛋白純化比為 0.8%，而純化倍率為 30.85。



0.01

圖 1、分離株 131 的 16S rDNA 親緣關係演化樹。

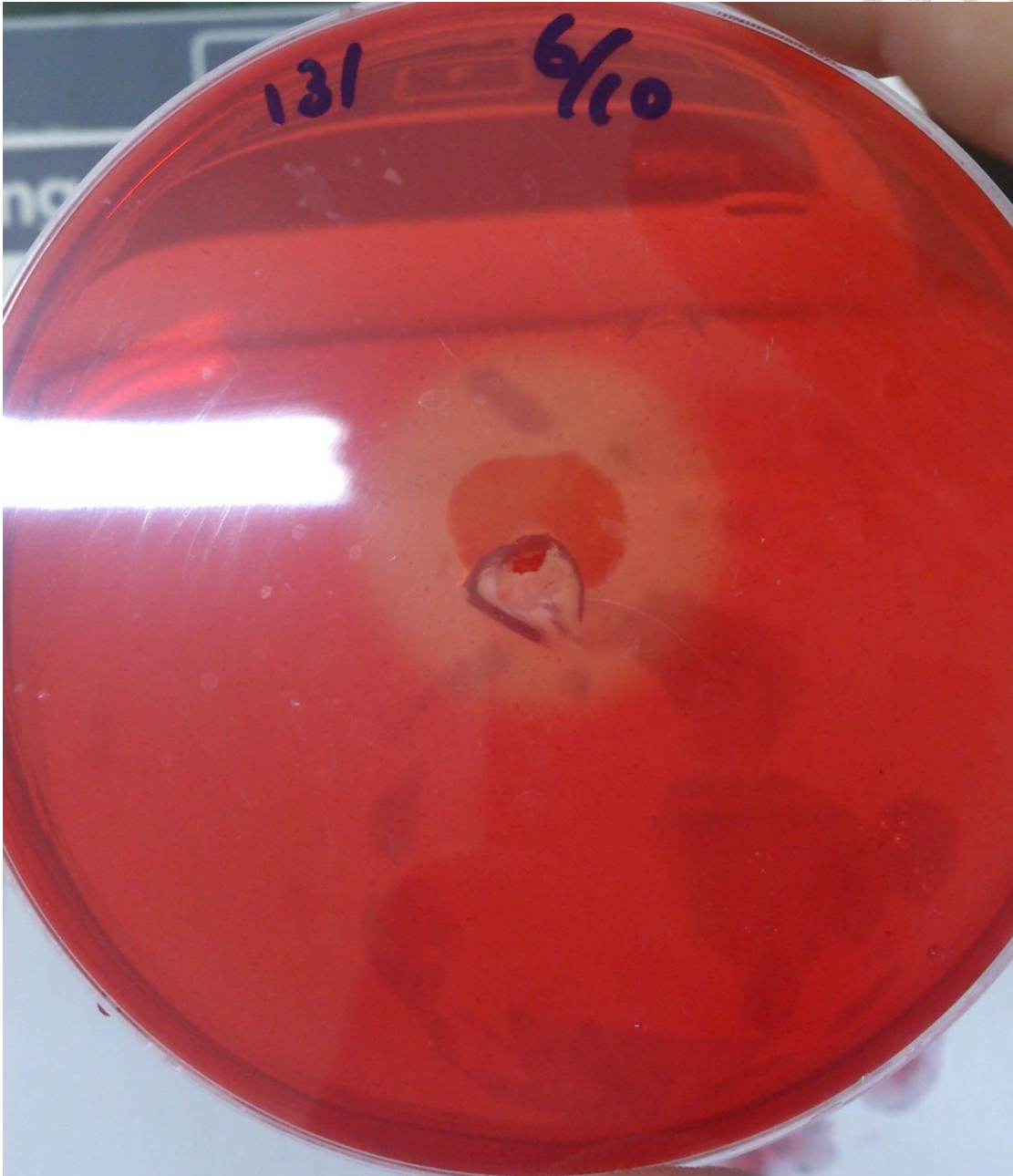


圖 2、剛果紅染色法，中心為分離株 131 之菌落，經剛果紅染色，並以 1 M NaCl 脫色，其周圍顯示出透明帶，表示具有分解纖維素之能力。

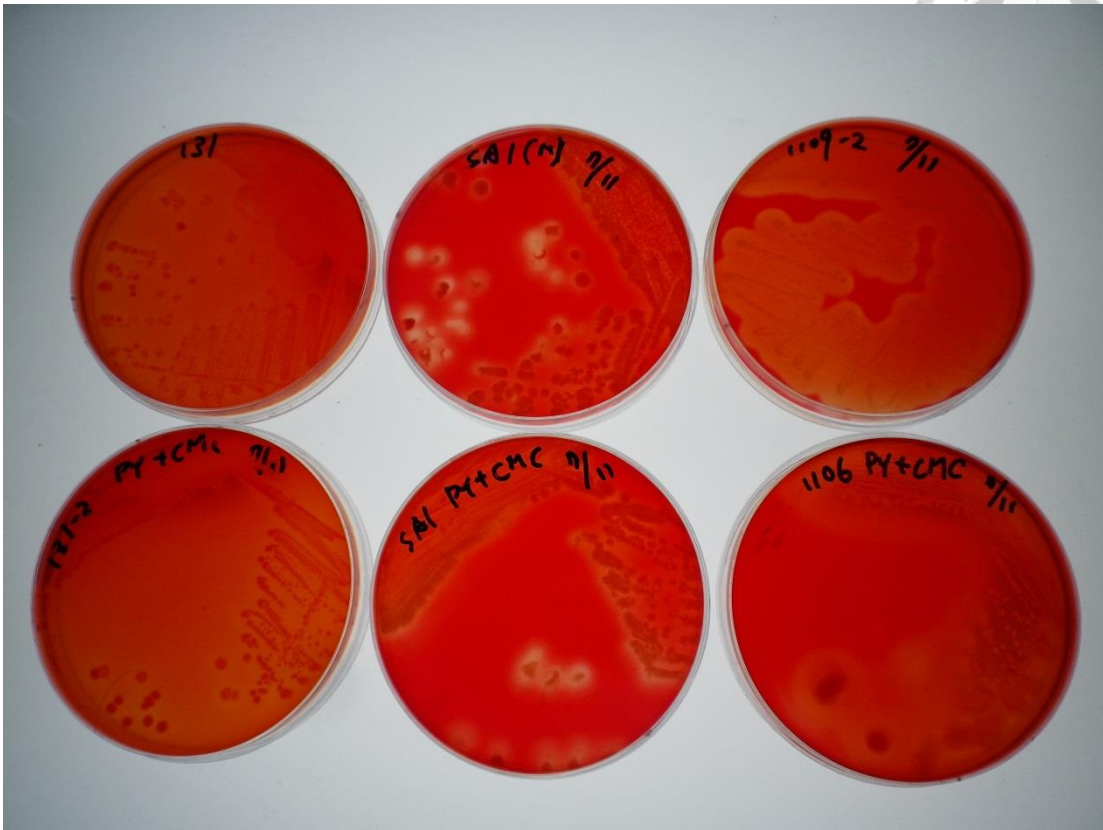


圖 3、分離株 131 與其他菌株的剛果紅染色比較圖。左上和左下為分離株 131，可看出其整片培養基已呈現半透明狀，明顯比其他菌株更具有纖維素分解能力。

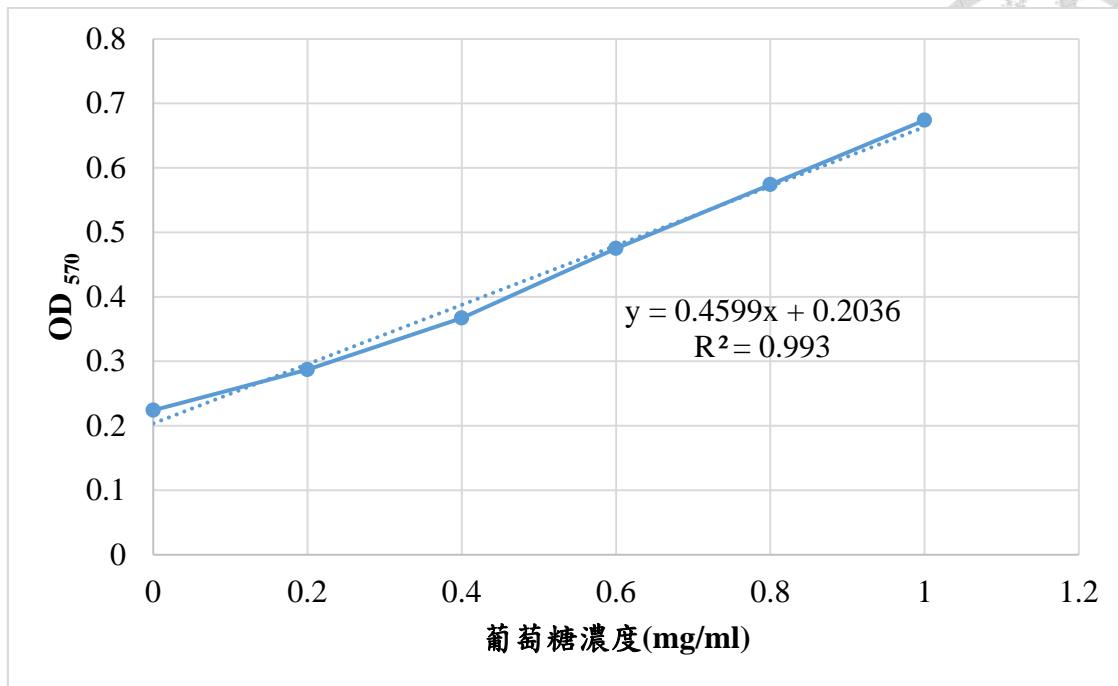


圖 4、DNS 法的還原糖標準曲線。配置葡不同濃度的葡萄糖標準溶液後，以 DNS 法檢測之，並製作出標準曲線。待測樣品可利用此標準曲線回推出其所含的還原糖濃度。

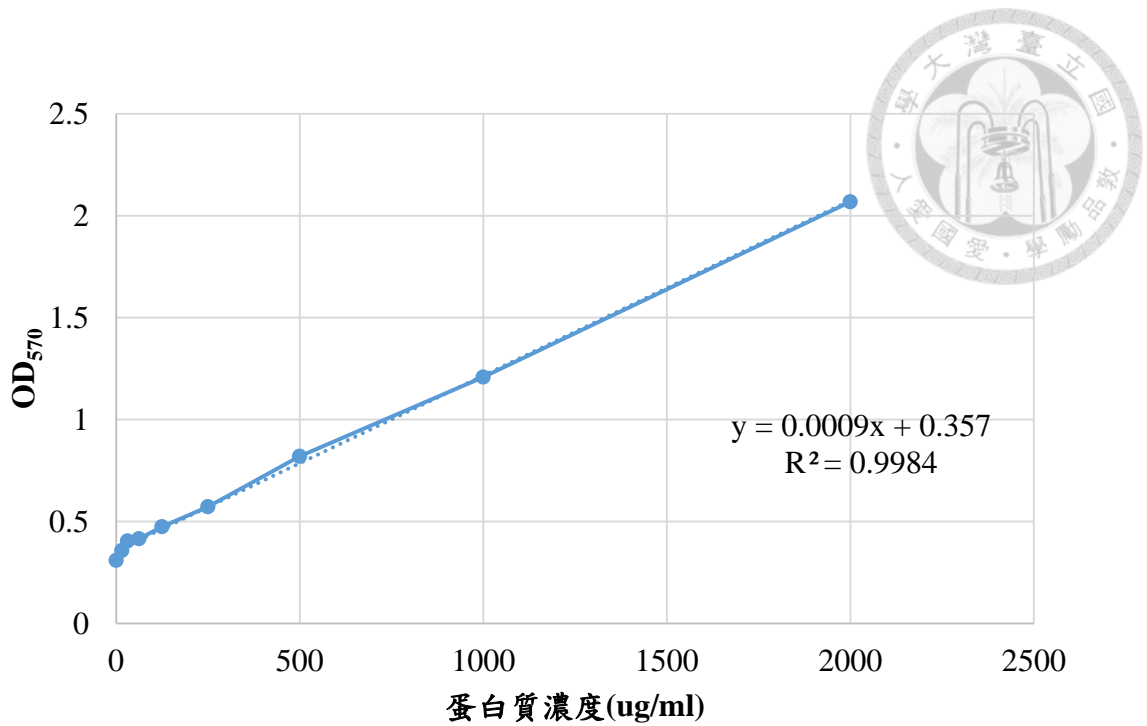


圖 5、蛋白質濃度標準曲線。利用牛乳清蛋白配置不同濃度的蛋白質，並利用 BCA 法製作蛋白質濃度標準曲線。待測樣品可利用同樣的方法測出對應的吸光值，並回推出樣品內所含的蛋白質濃度。

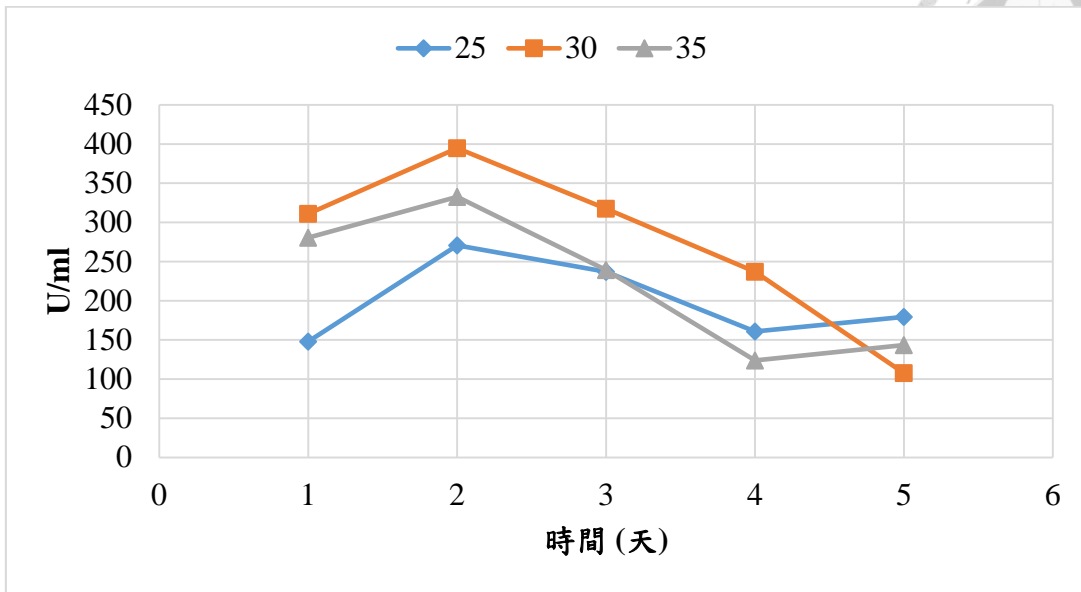


圖 6、分離株在不同溫度 (°C) 培養下的酵素活性。將分離株分別培養在 25°C、30°C 和 35°C 的培養液中，每 24 小時測其纖維酶活性。結果顯示，在 30°C、培養 2 天的條件下，具有最佳活性。

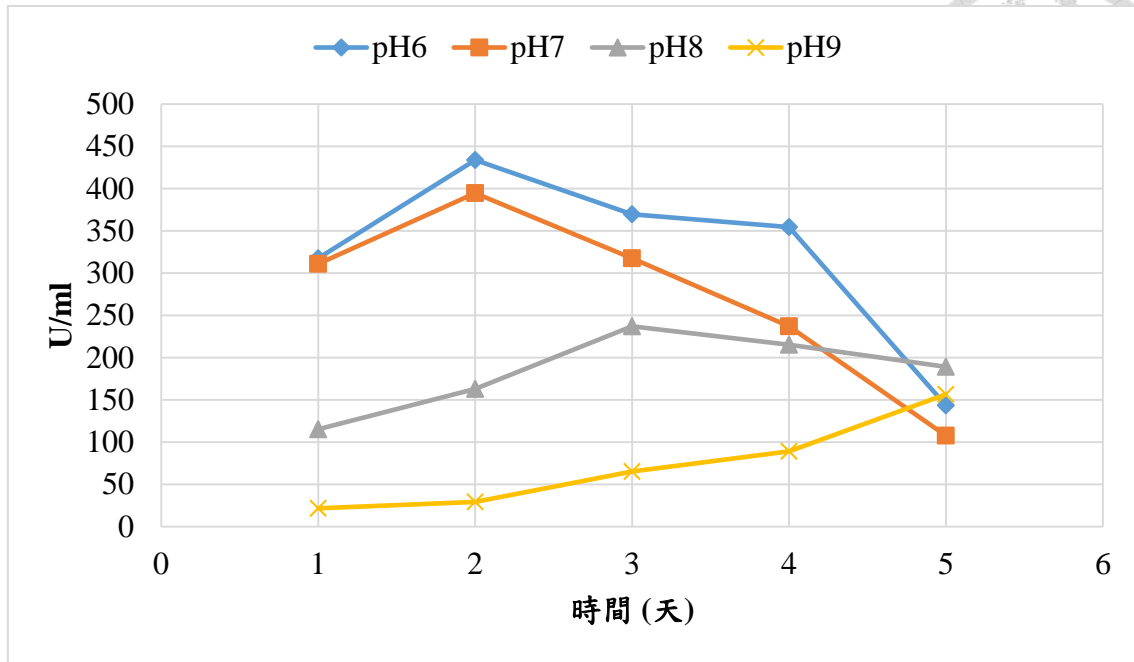


圖 7、分離株在不同 pH 培養下的酵素活性。將分離株分別培養在不同 pH 的培養液中，並每 24 小時測其纖維酶活性。結果顯示，在 pH6、培養 2 天的條件下，具有最佳活性。

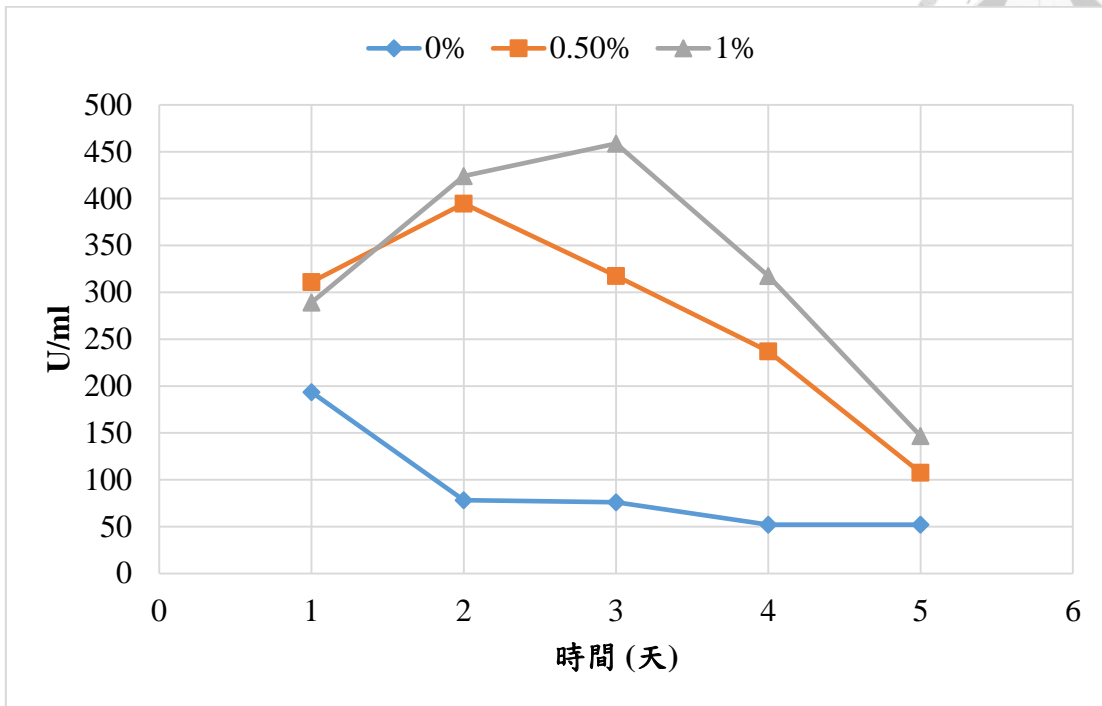


圖 8、分離株在不同誘導物濃度 (CMC) 培養下的酵素活性。將分離株分別培養在含有 0%、0.5%、1% CMC 的培養液中，每 24 小時測其纖維酶活性。結果顯示，在含有 1% CMC、培養 3 天的條件下，具有最佳活性。

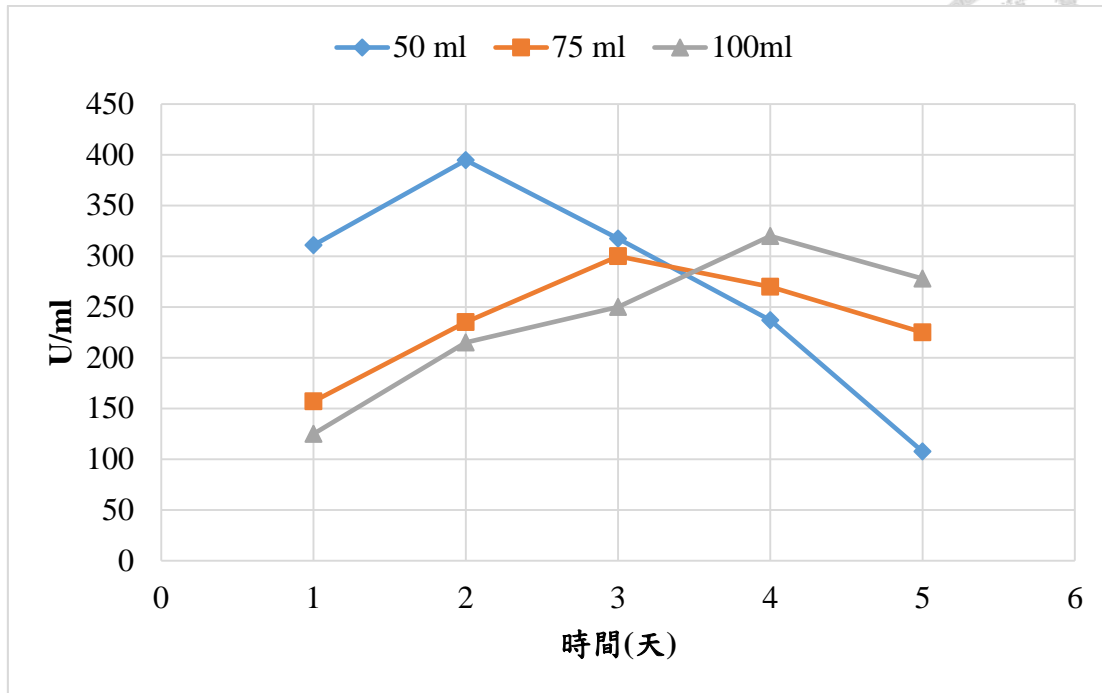


圖 9、分離株在不同培養體積下的酵素活性。將分離株分別培養在 50 ml、75 ml、100 ml 的培養液中搖瓶培養，每 24 小時測量其纖維酶活性。結果顯示，在 50 ml 培養 2 天的條件下，具有最大活性。

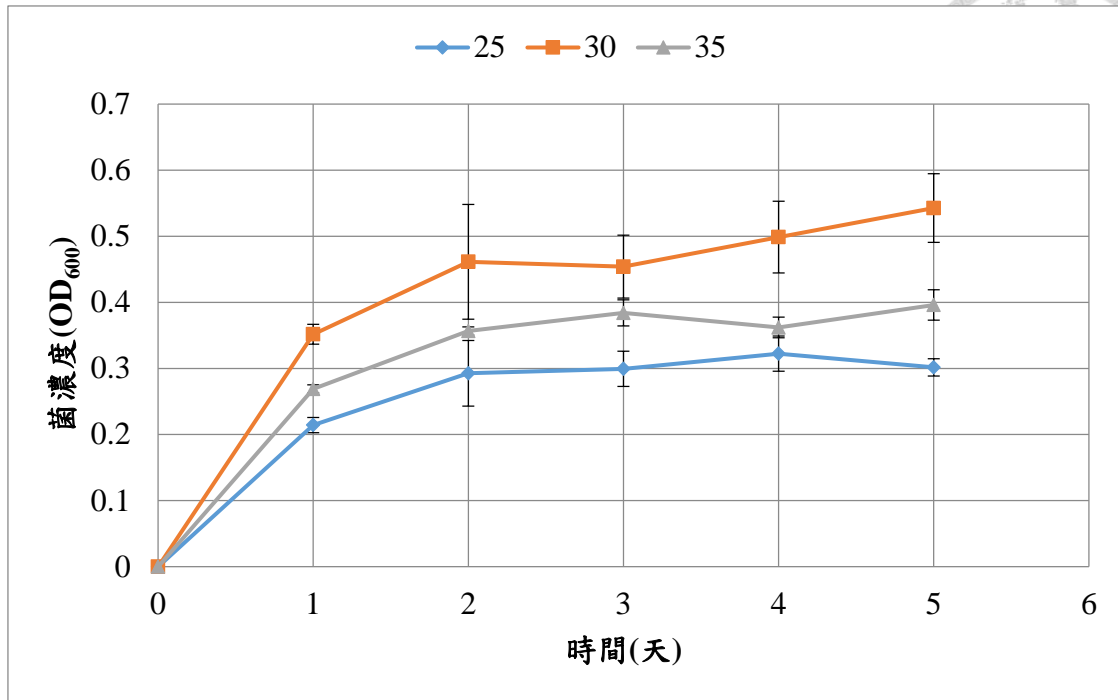


圖 10、分離株在不同溫度 (°C) 下的生長情形。將分離株培養在不同的恆溫培養箱中，每 24 小時測其菌濃度 (OD₆₀₀)，結果顯示，在 30°C 的培養條件下，有最佳的生長情形。

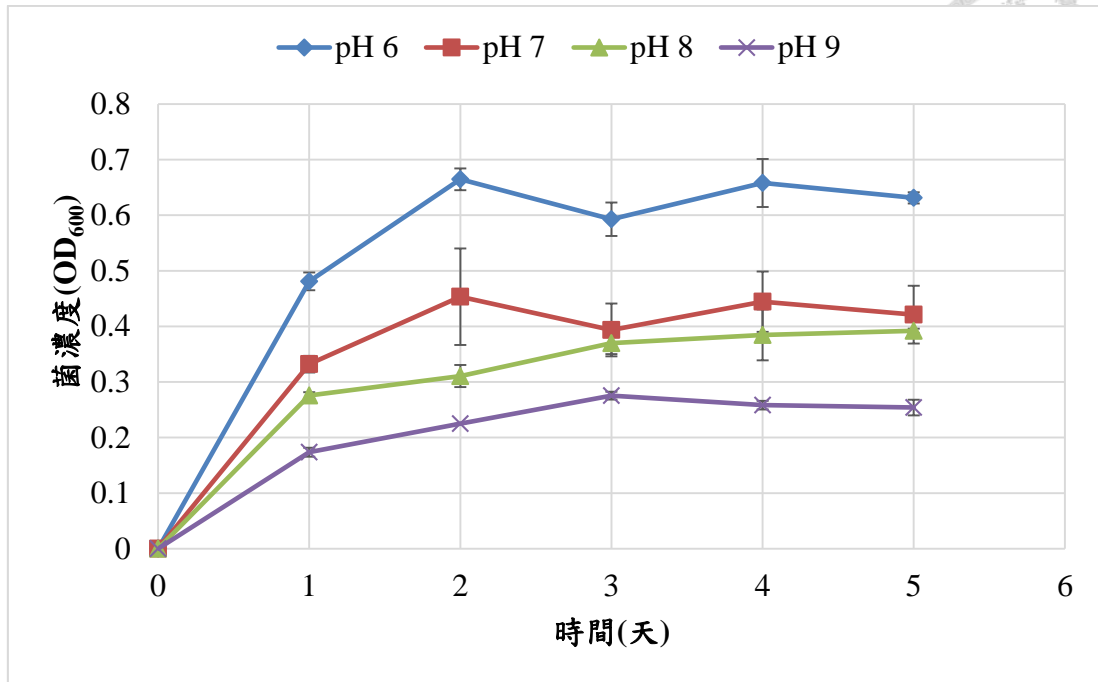


圖 11、分離株在不同 pH 下的生長情形。將分離株分別培養在不同 pH 的培養液中，每 24 小時測其菌濃度 (OD₆₀₀)。結果顯示，在 pH 6 的條件下，有最好的生長情形。

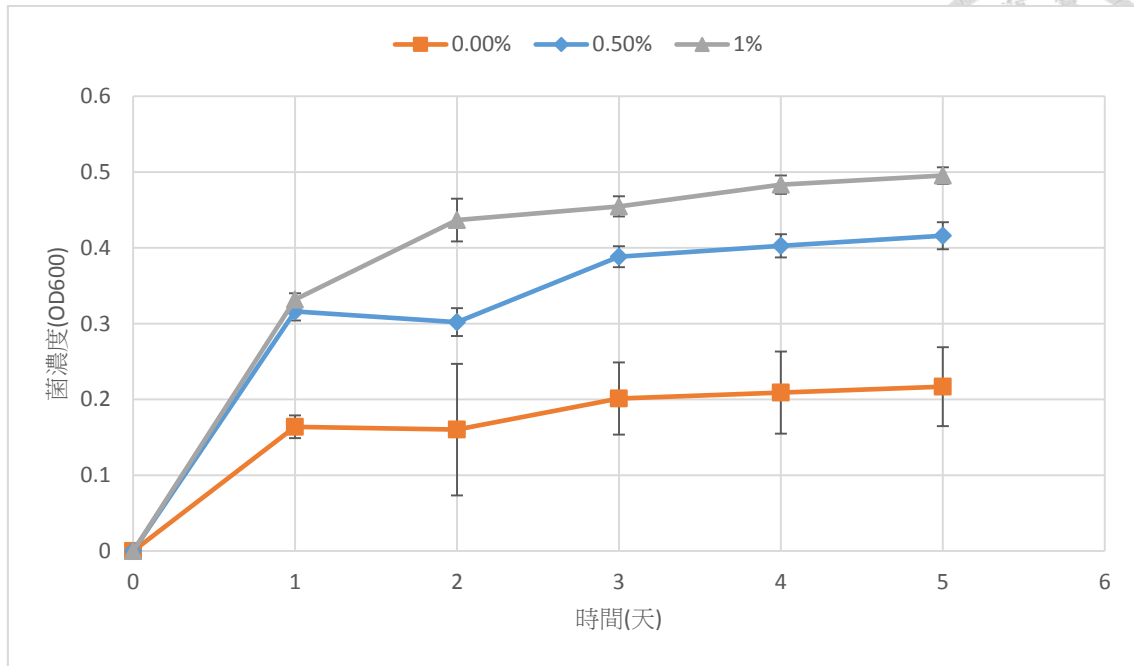


圖 12、分離株在不同溫度誘導物 (CMC) 濃度下的生長情形。將分離株分別培養在含有不同 CMC 濃度的培養液中，每 24 小時紀錄其菌濃度。結果顯示，含 1 % CMC 的組別具有最佳的酵素活性 (濃度大於 1 % CMC 的培養液太過濃稠不易進行實驗)。

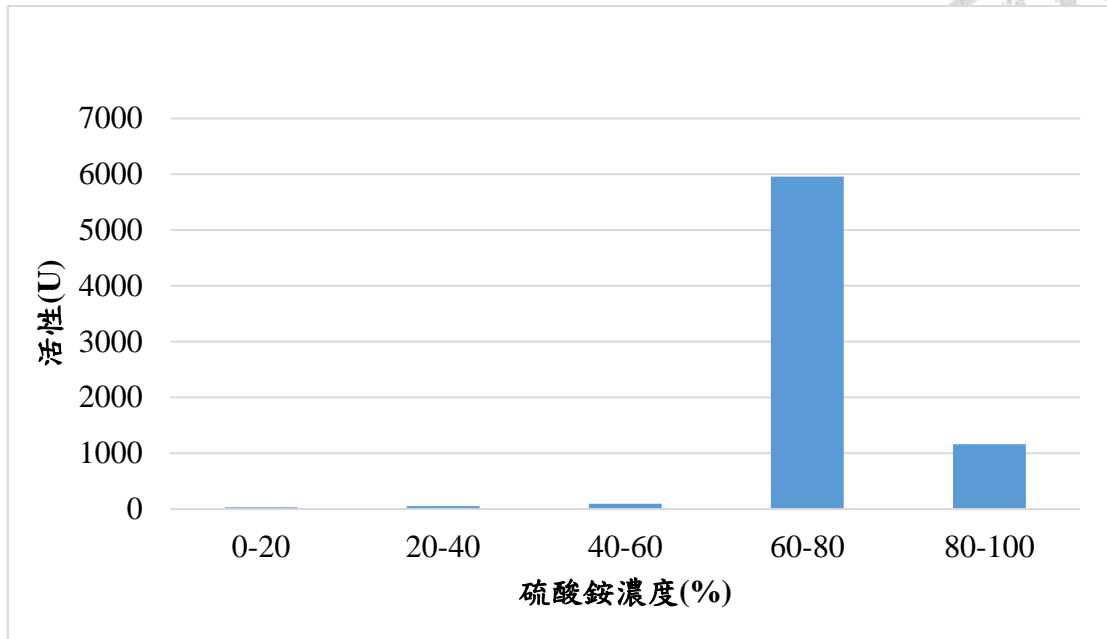


圖 13、硫酸銨沈澱各分劃的纖維素分解酶總活性。利用硫酸銨沈澱法初步分離粗酵素液中的蛋白質，以每 20% 的飽和濃度作為一個分劃，共得到 5 個分劃，並將各分劃經由沈澱、透析、冷凍乾燥、回溶等步驟得到蛋白質，並測其纖維酶活性。結果顯示，大部分的纖維酶活性集中在 60-80% 的分劃，故以此區間作為日後純化纖維酶的目標區間。

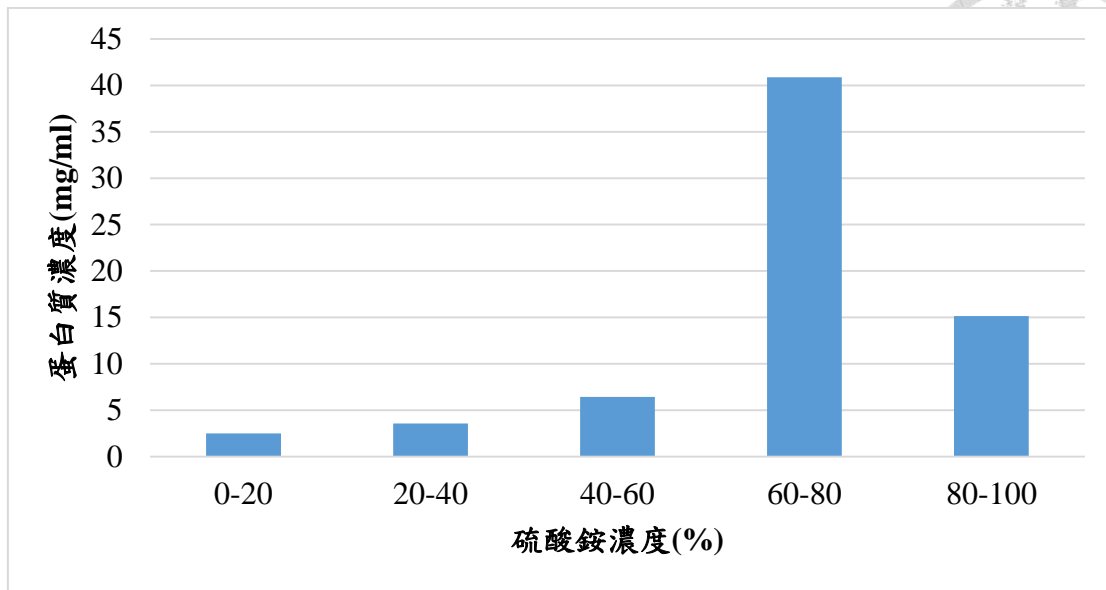


圖 14、硫酸銨沈澱各分割的蛋白質濃度。利用 BCA 法測量各分割的蛋白質濃度，結果顯示在 60-80 % 的區間收集到濃度最高的蛋白質液。

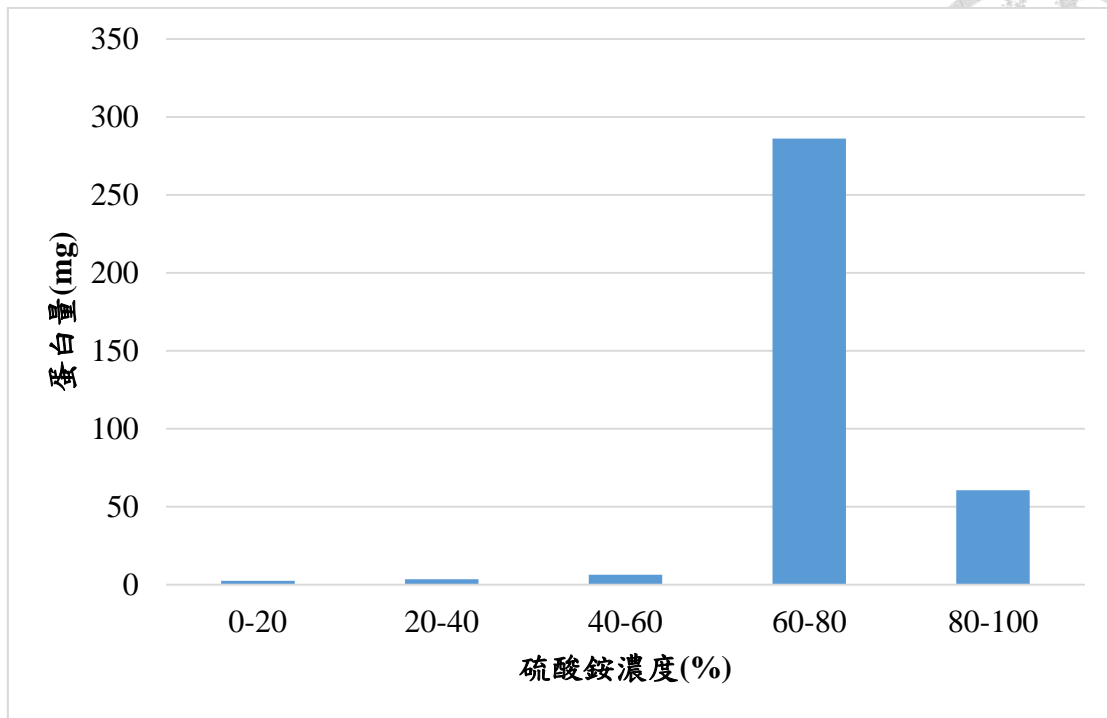


圖 15、硫酸銨沈澱各分割的總蛋白量。將各分割所測得的蛋白質濃度乘以收集到的體積，計算出其蛋白量。結果顯示，在 60-80 % 的區間收集到最多的蛋白質。

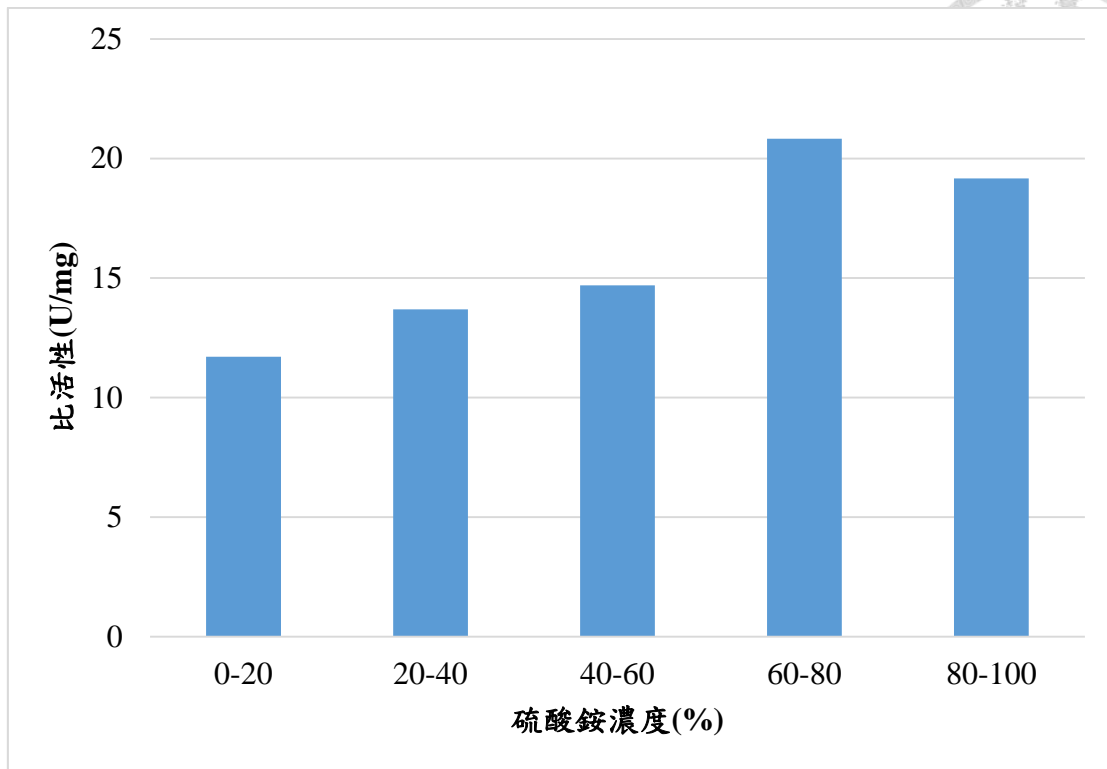


圖 16、硫酸銨沈澱各分劃的纖維素分解酶比活性。比活性為單位質量的酵素活性，結果顯示在 60-80 % 區間之纖維酶具有最高的比活性。

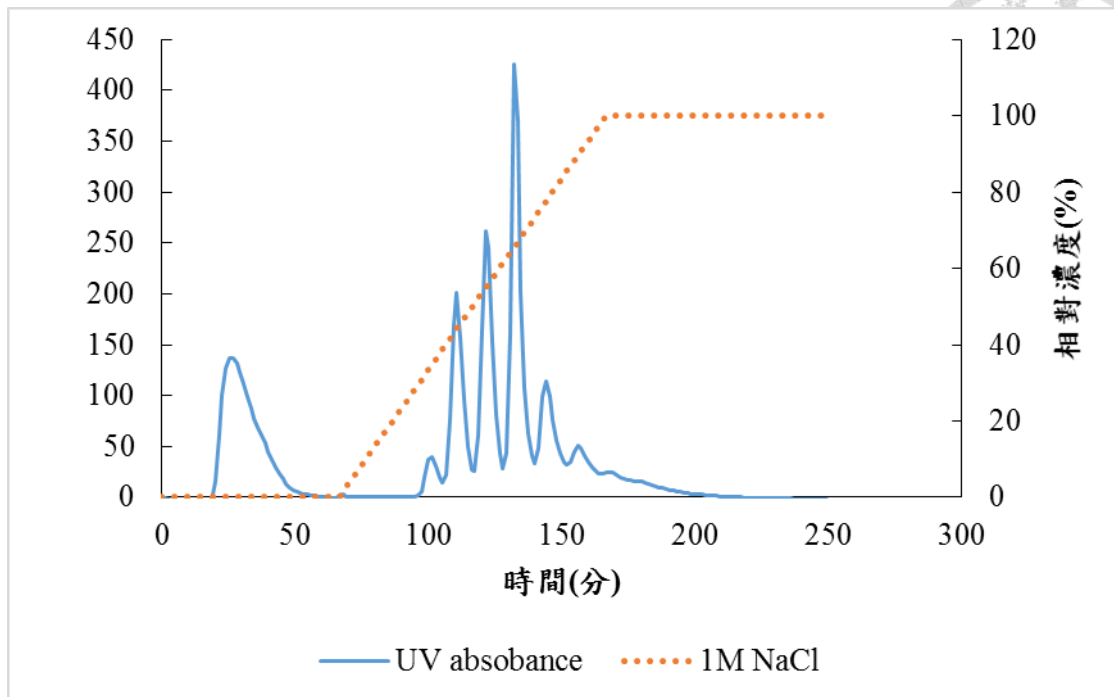


圖 17、陰離子交換層析 (DEAE) 之管柱層析圖。0-70 分鐘使用 0% NaCl PBS buffer 將不吸附的蛋白沖提出來;70-200 分鐘將 NaCl 的濃度緩緩升高至 1% , 過程中共出現 6 個 peak, 將這些分離的蛋白質分別收集並經過濃縮離心管去鹽並提高蛋白濃度後, 測量其纖維酶活性及蛋白質濃度。

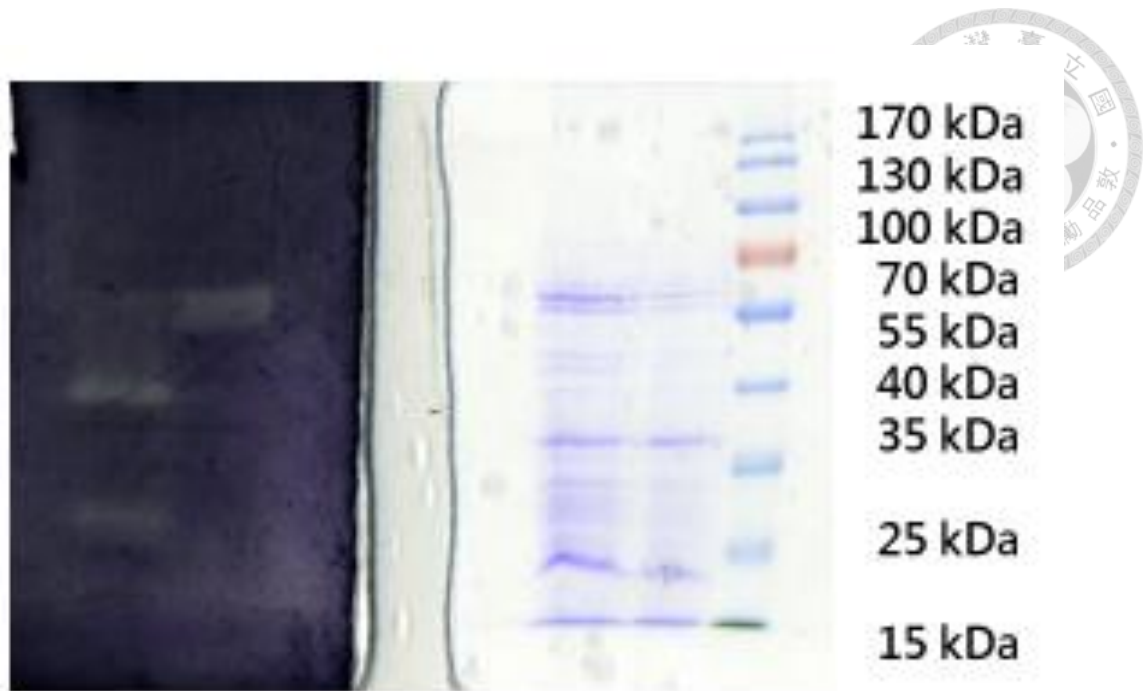


圖 18、SDS - PAGE 蛋白質電泳圖及活性染色。將同一批收集到的纖維酶同時進行 SDS-PAGE 及活性染色，即可比較出具活性之蛋白所對應的分子量。左圖為利用剛果紅染色法染出之纖維酶（顏色較淡之 band），右圖為進行 SDS-PAGE 後的蛋白質分離情形，經比較後可提測本纖維酶具有三個活性分子，分子量分別為 60 kDa、36 kDa 及 20 kDa。

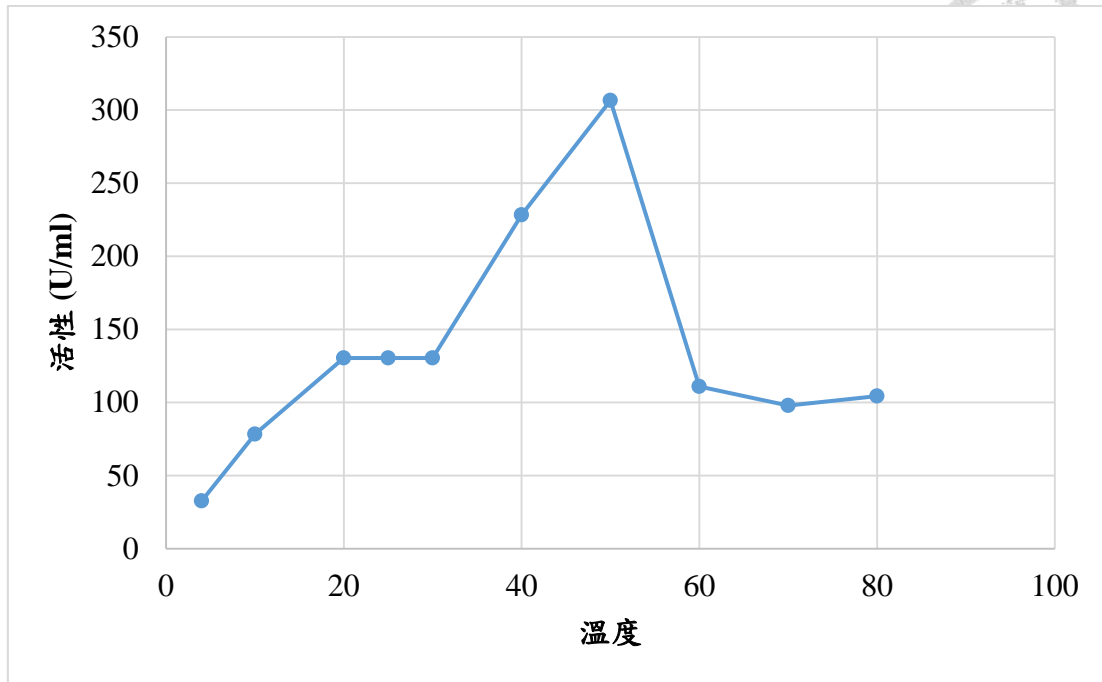


圖 19、纖維素分解酶在不同溫度 (°C) 之活性。將純化之纖維酶置於不同溫度中和基質反應。結果顯示，在 50°C 時擁有最大的活性，其次為 40°C，而在 4°C 時活性最低。

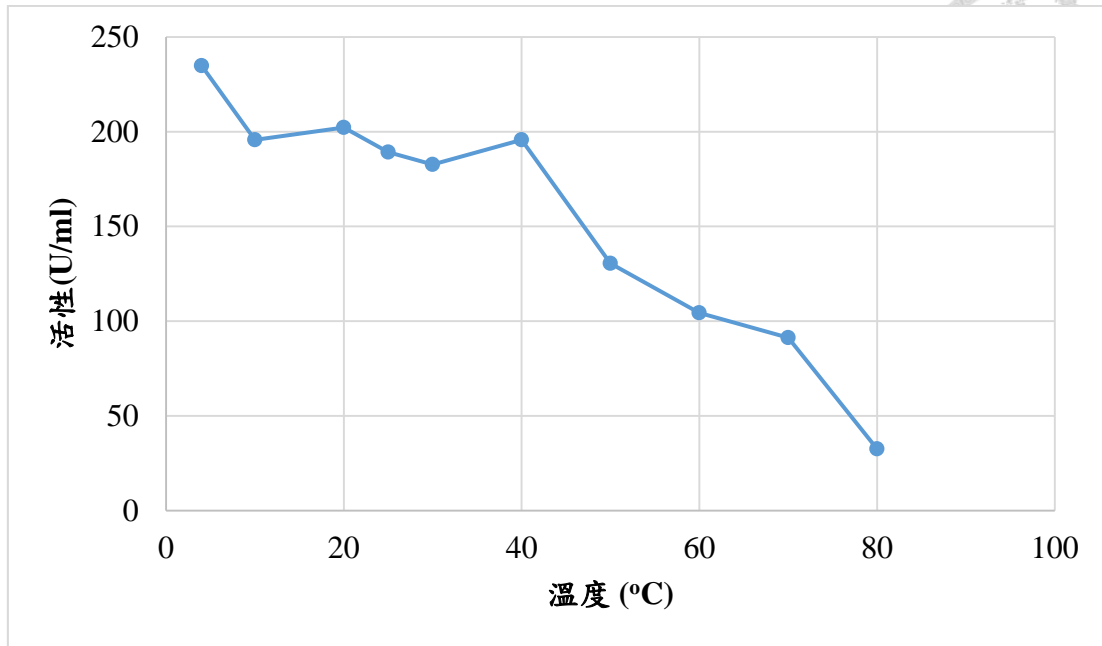


圖 20、纖維素分解酶在不同溫度 (°C) 之熱穩定性。將纖維酶先置於各溫度下 30 分鐘，再與基質反應，測其活性。結果顯示，在 4°C 有最佳的穩定性，而超過 50°C 後，酵素活性驟減。

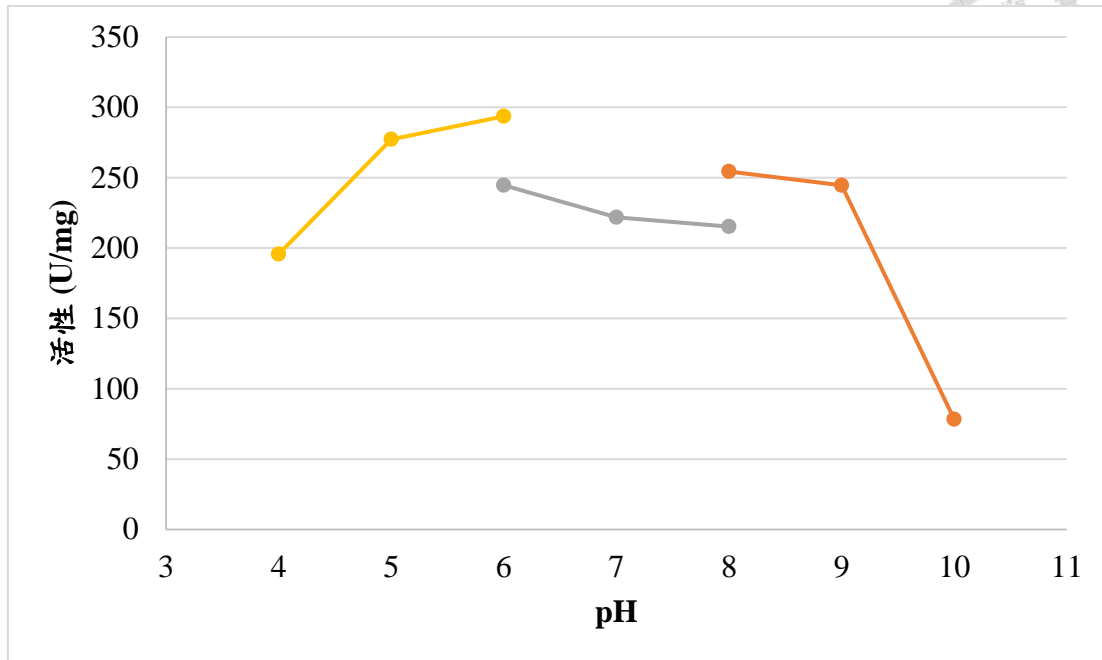


圖 21、纖維素分解酶在不同 pH 下之活性。在不同 pH 下測量纖維酶活性，結果顯示，酵素在 pH 5-9 環境中皆有良好活性，而在 pH 6 的環境中，酵素具有最佳活性（圖中曲線分為三段是因為在三種不同緩衝液中測量的結果）。

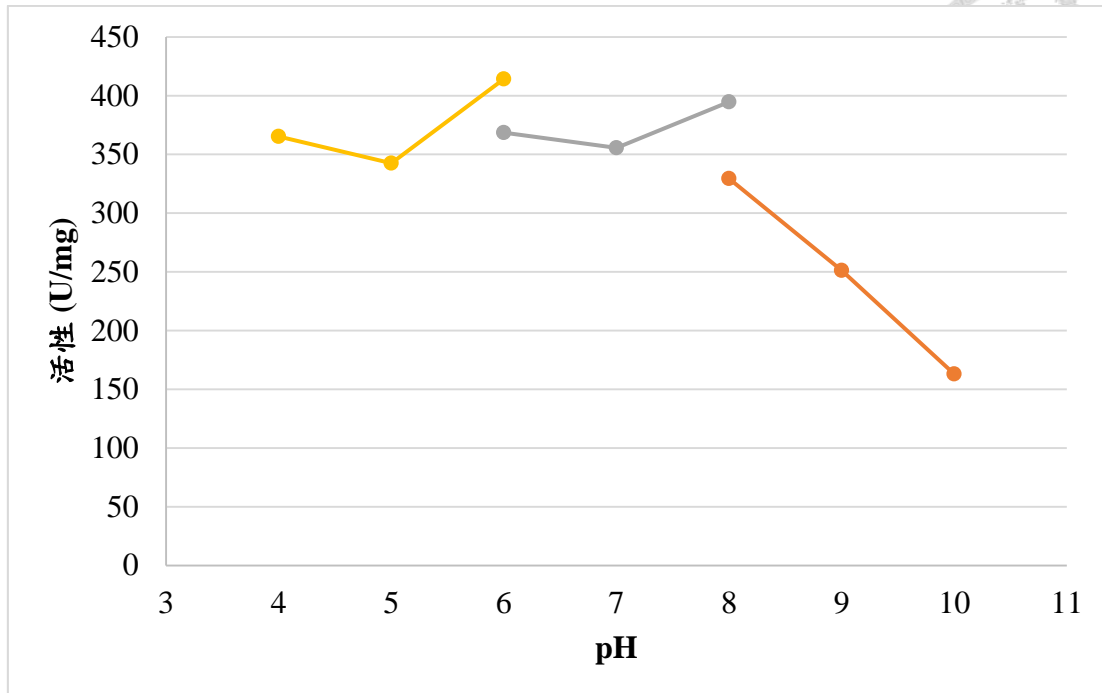


圖 22、纖維素分解酶在不同 pH 下之穩定性。將纖維酶置於不同 pH 緩衝液中 30 分鐘，再與基質反應。結果顯示，酵素在 pH 6-8 有良好穩定性，且在 pH 6 具有最佳活性。

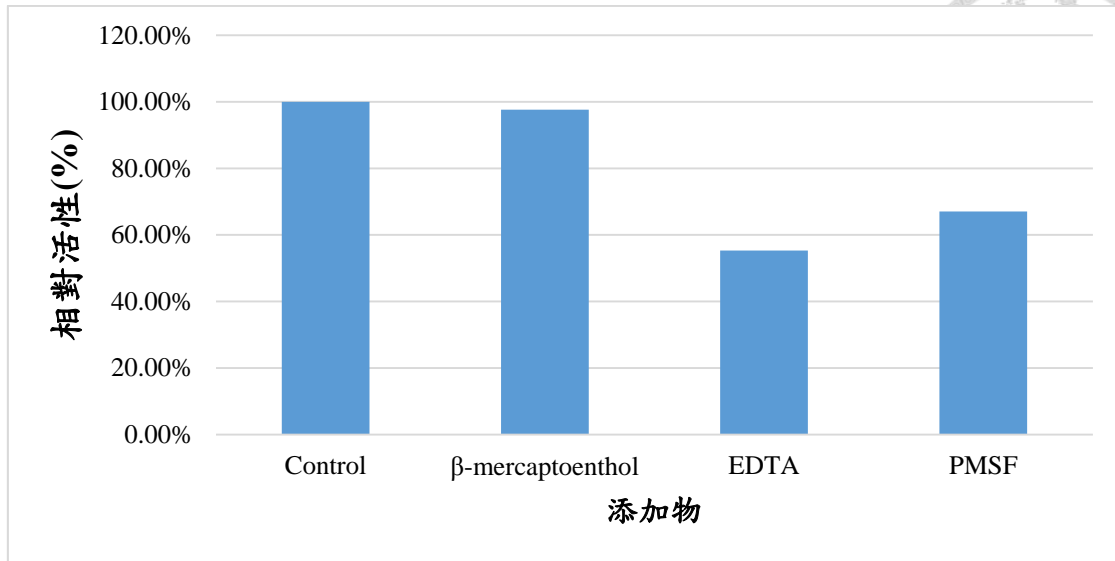


圖 23、蛋白抑制劑對酵素的影響。將纖維酶加入 1% 之不同的蛋白抑制劑，並測其活性。結果顯示，βME 幾乎不造成影響，而 PMSF 使活性降低 35%，EDTA 使活性降低 45%。

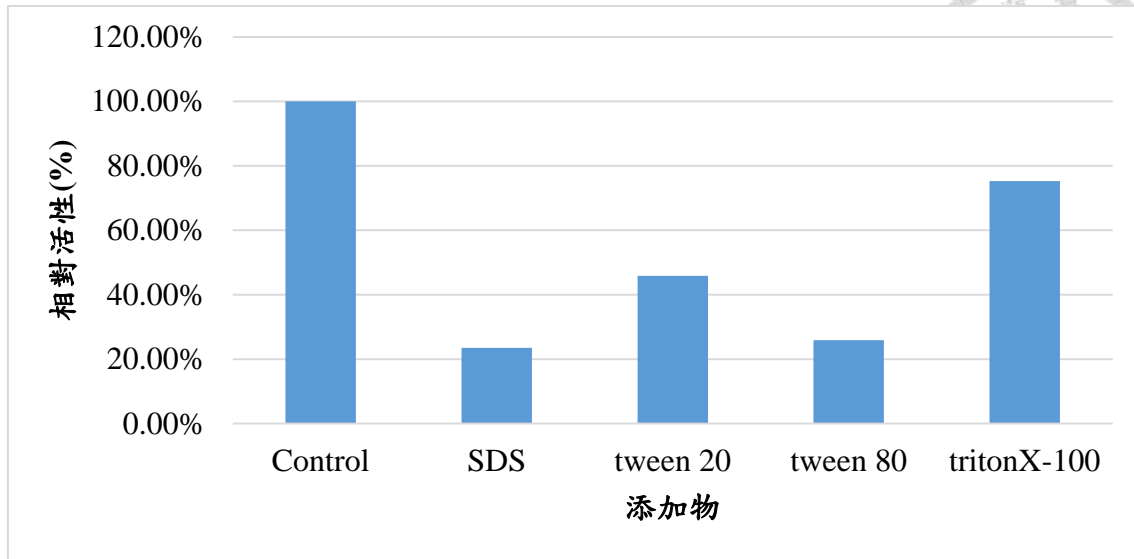


圖 24、界面活性劑對酵素的影響。將纖維酶加入 1% 不同的界面活性劑，並測量其活性。結果顯示，tritonX-100 使活性降低 25%，tween 20 使活性降低 55%，tween 80 使活性降低 75%，而 SDS 則使活性降低 78%。

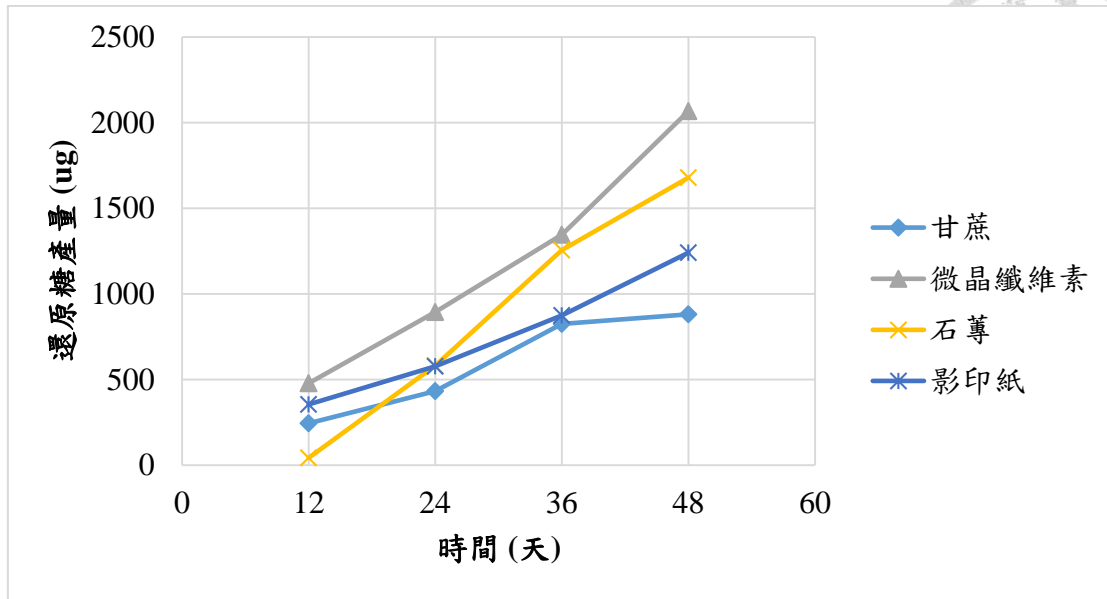
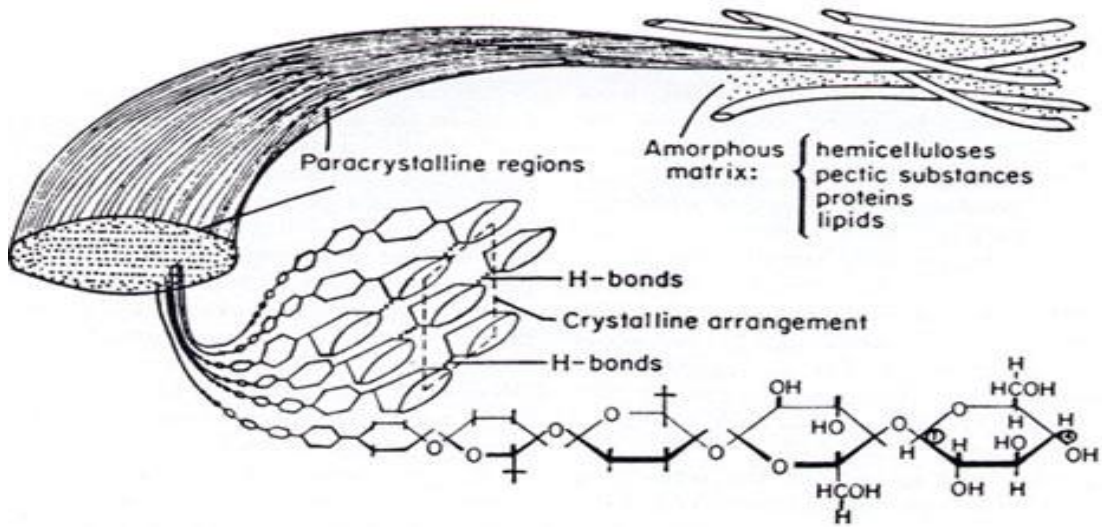
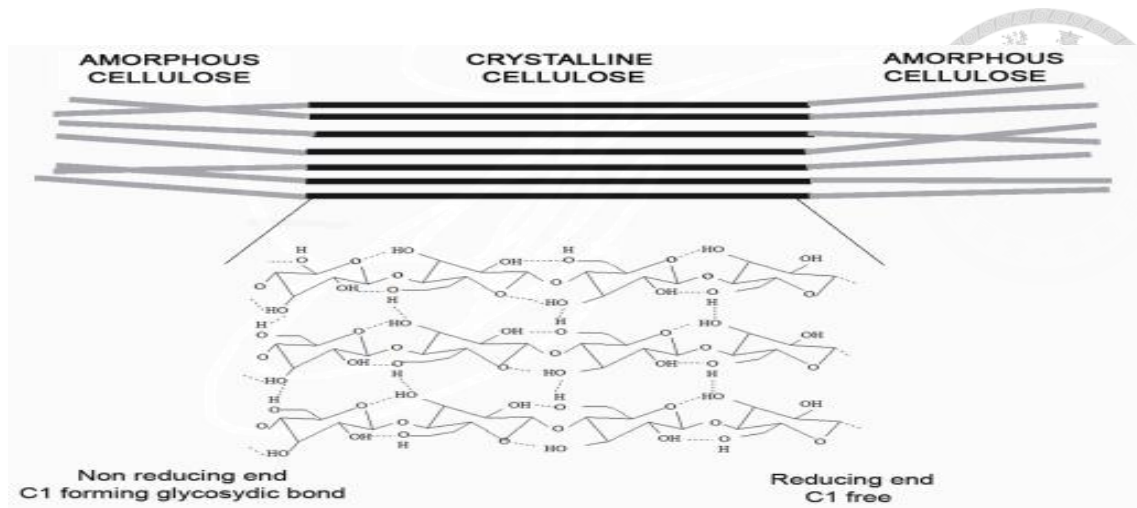


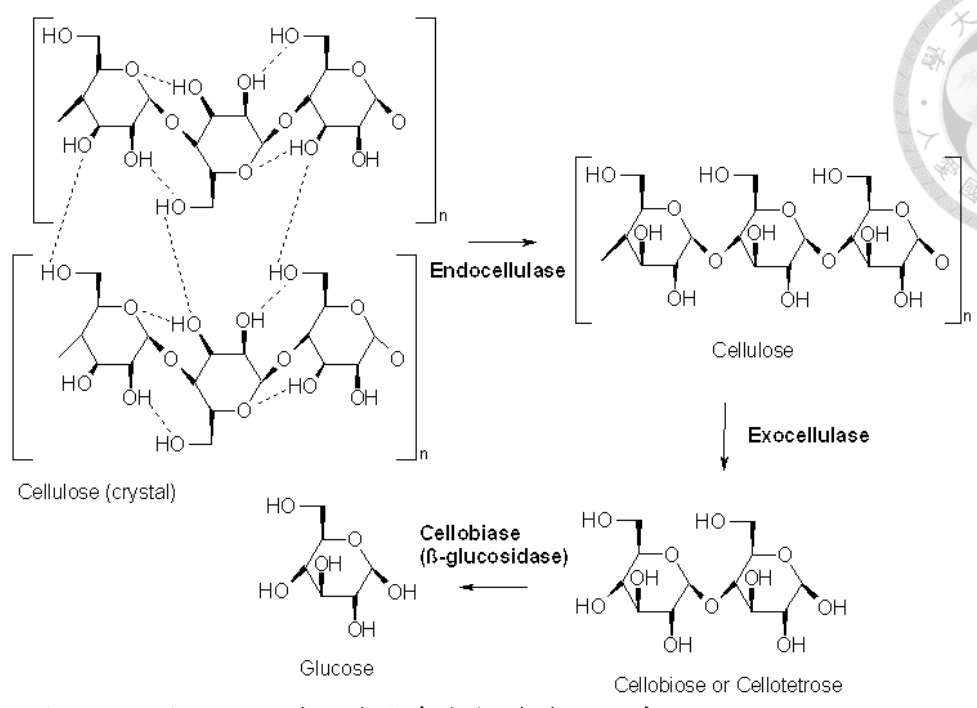
圖 25、纖維素分解酶對甘蔗、微晶纖維素、石蓴和印影紙的分解能力。將四種基質滅菌並烘乾後，各取 1 g 與纖維酶反應，每 24 小時紀錄一還原糖量。結果顯示，酵素對微晶纖維素的分解能力最好，其次是石蓴及影印紙，對甘蔗渣的分解能力最差。



附錄 1、纖維素的基本結構



附錄 2、纖維素的結晶型和非結晶型區域。



附錄 3、三種不同類型的纖維素分解酶作用方式。



>

TGCA-

GTCGAGCGGCAGCGACATAAACAAACCTTCGGGGGCGTTTATGGGCGGGCGA
GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAAC
CATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTACGGCTTAAAGAGGGGGGA
CCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
CCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGCGGATGTGTTA
ATAGCGCATTCGTTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCATGCAGGTGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTTA
ACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTA
GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGG
-CGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCA-GATGCGAAA-
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC-
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCG
TGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAA
GATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA
ACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACT
GCCGGTGATAAACCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAAC-TTGCAAAAGTG-
AGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGA

附錄 4、分離株的 16S rRNA 核苷酸序列



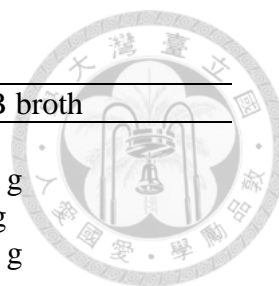
	最終硫酸銨百分飽和濃度														
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	603	697
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	469	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	436	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	402	488
35				0	29	57	87	118	151	184	218	254	291	369	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	335	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	302	383
50							0	30	60	92	125	159	194	268	348
55								0	30	61	93	127	161	235	313
60									0	31	62	95	129	201	279
65										0	31	63	97	168	244
70											0	32	65	134	209
75												0	32	101	174
80													0	34	139
90														0	70
100															0

附錄 5、硫酸銨百分飽和濃度表



	temperature (°C)			pH				CMC (%)			volumn (ml)		
	25	30	35	6	7	8	9	0	0.5	1	50	75	100
1	*				*				*		*		
2		*			*				*		*		
3			*		*				*		*		
4		*		*					*		*		
5		*				*			*		*		
6		*					*		*		*		
7		*			*			*			*		
8		*			*					*	*		
9		*			*				*			*	
10		*			*				*				*
11		*			*				*		*		
12		*			*				*		*		

附錄 6、最佳產酶培養條件的測試



Component	PY agar	PY broth	LB broth
Peptone	3 g	3 g	-
Trypton	-	-	10 g
Yeast extract	1 g	1 g	5 g
NaCl	25 g	25 g	10 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 g	2 g	-
Agar	15 g	-	-
H ₂ O	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7.8	7.8	7.8

附錄 7、培養基與培養液成分