

國立台東大學 生命科學研究所

碩士學位論文

指導教授：李炎 博士

新種洋菜分解菌 *Alcaligenes* sp. Strain Yen

所產洋菜酶純化與部分特性

Purification and some properties of agarase
from a novel agarolytic bacterium,

Alcaligenes sp. Strain Yen

研究生：謝育峰 撰

中 華 民 國 97年1月24日

新種洋菜分解菌 *Alcaligenes* sp. Strain Yen

所產洋菜酶純化與部分特性

Purification and some properties of agarase
from a novel agarolytic bacterium,
Alcaligenes sp. Strain Yen

研究生：謝育峰

Student：Yu-Fong Sie

指導教授：李炎 博士

Advisor：Yen Lee, Ph.D.

國立台東大學

生命科學研究所

碩士學位論文

Submitted to Department of Institute of Life Science

National Taitung University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master in Life Science

January 2008

Taitung, Taiwan, Republic of China

中 華 民 國 97年1月24日

國立台東大學
學位論文考試委員審定書
系所別：生命科學研究所

本班 謝育峰 君

所提之論文 新種洋菜分解菌 *Alcaligenes* sp. Strain
Yen 所產洋菜酶的純化與部份特性

業經本委員會通過合於 ☒ 碩士學位論文 條件
☐ 博士學位論文

論文學位考試委員會：黃德銓
(學位考試委員會主席)

許振宏

李孝
(指導教授)

論文學位考試日期：97年1月24日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立台東大學 生命科學 所

96 學年度第 1 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：新種洋菜分解菌 *Alcaligenes* sp. Strain Yen 所產洋菜酶純化與部分性

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予下列單位：

同意	不同意	單 位
☒	☐	國家圖書館
☒	☐	本人畢業學校圖書館

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開
	☒		

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鉤選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：謝育峰 (親筆簽名)

研究生簽名：謝育峰 (親筆正楷)

學 號：9400811 (務必填寫)

日 期：中華民國 97 年 1 月 24 日

1. 本授權書 (得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載) 請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2. 依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議: 研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

授權書版本 2005/06/09

致謝

首先誠摯的感謝指導教授李炎博士，老師悉心的教導使我得以一窺碩士以及微生物領域的深奧，不時的討論並指點我正確的方向，使我在這些年中獲益匪淺。老師對學問的嚴謹更是我輩學習的典範。

本論文的完成另外亦得感謝所辦大美女的惠嵐姐大力協助，及農改場蘇得銓教授的支持、輔英科大食營系在硬體支援，以及中華醫事科技大學廖東南教授對我研究上的指教評點。因為有你們的體諒及幫忙，使得本論文能夠更完整而嚴謹。

兩年半裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，學術上的討論、言不及義的閒扯、讓人又愛又怕的宵夜、趕作業的革命情感、因為睡太晚而遮遮掩掩閃進實驗室.....，感謝眾位學長姐、同學、學弟妹的共同砥礪，你/妳們的陪伴讓兩年的研究生活變得絢麗多彩。

感謝尚澄學長、惠春、佳蓮學姐們不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑，也感謝大胖、智翔、玟玲同學的幫忙，恭喜我們順利走過這兩年。實驗室的世慶、世峯、年展、仲欣、信樺學弟、徐于、莉雪學妹們當然也不能忘記，妳的幫忙及搞笑我銘感在心。親密戰友孟慈在背後的默默支持更是我前進的動力，沒有孟慈的體諒、包容，相信這兩年的生活將是很不一樣的光景。最後，謹以此文獻給我摯愛的雙親。

中文摘要

本實驗室於台東市區排水溝中，篩選到一株洋菜分解菌。經實驗發現此菌株為革蘭氏陰性桿菌，不發酵、具運動性、好氧、catalase、oxidase 為正反應，且不產 H_2S 和 Indole。菌株經生化試驗和 16S rDNA 序列比對，將此洋菜分解菌鑑定為 *Alcaligenes* sp. Strain Yen (楊，2007)。

將此菌於 C-10 培養液中振盪培養(35°C、150 rpm) 48 hr，收集離心去除菌體後之培養液以 20~80% 硫酸銨劃分及 Sephadex G-100 膠體過濾層析法進行洋菜酶的分離與純化，獲得洋菜酶。首先，培養液經硫酸銨劃分透析後之比活性為 157.33 U/mg，純化倍數為 2.19 倍，回收率為 54.61 %；再以 Sephadex G-100 膠體管柱純化，分割具有洋菜能力的蛋白質波峰劃分區域，收集後命名為 Yen-agarase，其比活性分別為 406.44 U/mg，純化倍數分別為 5.66 倍，回收率分別為 7.96 %。

Yen-agarase 其最適作用 pH 值為 7.5-8.5，最適作用溫度為 35°C，但是於 55°C 下反應 30 min 活性減少 50 %，其分子量經由 SDS-PAGE 後推估為 110 KDa。以 high-melting-point agarose 為基質時所表現之基質特異性活性最佳，此洋菜酶不能分解 ι -鹿角藻(ι -arrageenan) 和 κ -鹿角藻(κ -arrageenan) 但是卻可以分解藻酸鈉 (sodium alginate)。

使用 agarose 做為酵素反應基質進行水解試驗，並將水解產物以薄層色層分析(TLC) 展開，經由判定水解後所得為新洋菜寡糖類，推測該酵素作用位置為 β -1,4 鍵結，初步推估此酵素為 β 型。

Abstract

The agar-degrading bacterium was isolated from Taitung, Taiwan. After biochemical tests and 16S rDNA sequencing, we found the agar-degrading bacterium was a bacillus, gram-negative, mobile, aerobic, catalase and oxidase positive, didn't produce H₂S and Indole.

This bacterium was identified as *Alcaligenes* sp. strain Yen (AY744384).

Strain Yen was grown at RT for 48 hr in C-10 broth with shaking(150 rpm). After removing the cell debris, crude enzyme was collected, and then proceeded to separation and purification. First step was to concentrate and dialyse the crude enzyme, and to purify it, and yielded a solution with 157.33 U/mg(purified 2.19 fold), and production rate was 54.61%. Then Sephadex G-100 chromatographs was used to final purify Yen-agarase. The results showed its specific activity was 406.44 U/mg(purified 5.66 fold), and 7.96% production rate.

The optimum pH for Yen-agarase I was found to be 7.0-8.0. The optimum temperature for Yen-agarase I was 35°C, but approximately 50% of the enzyme activity was inactivated in 30 minutes under 55°C. Estimation of the molecular mass by SDS-PAGE was 101 kDa. The best substrate specificity activities of Yen-agarase toward high-melting-point agarose were D-galactose. Yen-agarase did not have the capability to degrade ι -carrageenan and κ -carrageenan. The agarose water solution was used to carry on experiments, and solved outcome launched on thin-layer chromatography(TLC). By judging the dissolved carbohydrates produced by neoagarooligosaccharidase, we could realize the enzyme functional position was β -1,4 band, so, the enzyme as β type.

目 錄

中文摘要	i
Abstract	ii
目 錄	iii
圖 目 錄	viii
表 目 錄	xi
壹、前言	1
貳、文獻整理	3
一、洋菜的組成與特性	3
二、洋菜酶生產菌株及其分離來源	4
三、洋菜酶對洋菜水解的作用機制	4
四、洋菜酶作用後之水解產物	5
4.1 作用機制與水解產物	5
4.2 洋菜酶之受質特異性	6
五、洋菜酶之生化特性	7
5.1 溫度和 pH 值	7
5.2 分子量	7
5.3 金屬離子	8
六、洋菜酶之純化	9
6.1 硫酸銨鹽沉澱	9
6.2 離子交換層析法	9
6.3 膠體過濾層析法	10

6.4 親和性管柱層析法	10
七、洋菜水解產物之分析	11
7.1 洋菜水解產物之獲得	11
7.2 薄層層析法(TLC)	11
7.3 高效能液相層析法(HPLC)	11
八、洋菜水解產物之應用	12
8.1 海藻多醣之生理活性	12
8.2 非消化性碳水化合物之生理活性	12
九、洋菜酶的應用	13
9.1 細胞的分離	13
9.2 DNA 或 RNA 分離	13
9.3 藻類原生質體的製作	13
9.4 融合瘤細胞分離	14
9.5 開發海藻寡糖之健康食品	15
參、實驗設計	16
肆、實驗材料與方法	17
一、藥品與耗材	17
二、儀器與設備	17
三、菌種鑑定	18
3.1 菌種生化鑑定	18
3.2 菌種 16S rDNA 分析	18
四、培養基配製與菌株之保存	18
4.1 培養基配製	18

4.1.1 菌株液體生長培養基	18
4.1.2 菌株 S3PY 固體生長培養基	19
4.2 菌株保存	19
五、菌株之活化	19
六、實驗方法	20
6.1 洋菜酶之生產	20
6.2 洋菜酶的活性測定	20
6.2.1 還原糖酵素活性測定酵素活性	20
6.2.2 活性單位定義	20
6.2.3 蛋白質的定量	21
6.3 洋菜酶之分離純化	21
6.3.1 膠體過濾層析(Sephadex G-100)	21
6.4 洋菜酶之生化性質測試	21
6.4.1 分子量的鑑定	21
6.4.2 SDS-PAGE 的材料製備	22
6.4.3 SDS-PAGE 分析操作步驟	23
6.5 Native PAGE 分析	23
6.6 洋菜酶活性染色分析	23
七、基質特異性	23
八、最適作用 pH 值	24
九、pH 值的安定性	24
十、最適作用溫度	24
十一、溫度安定性	25
十二、金屬離子的影響	25

12.1 鈣離子的影響	25
12.2 鈉離子的影響	25
12.3 其他金屬離子耐受度的影響	25
十三、酵素動力學	26
十四、水解產物分析(TLC)	26
14.1 TLC分析水解產物	26
伍、結果與討論	27
一、Yen 菌種鑑定	27
二、酵素的純化	27
1.粗酵素液的製備	27
2.Sephadex G-100 膠體過濾層析	28
三、洋菜酶的生化特性	28
1.分子量	29
2.基質特異性	29
3.最適作用pH值	30
4.pH值的安定性	31
5.最適作用溫度	31
6.溫度安定性	32
7.鈣離子的影響	33
8.鈉離子的影響	34
9.其他金屬離子耐受度的影響	35
四、酵素動力學(K_m 、 V_{max})	35
五、洋菜酶之分解產物的探討	35
陸、結論	38

柒、參考文獻·····	39
附錄·····	69



圖 目 錄

圖一、Yen 在 C-10 培養基上，在室溫下培養2天之菌落形態·····	51
圖二、Yen 在 C-10 固體培養基上，在室溫下培養2天後，利用碘 液來偵測洋菜酶活性·····	52
圖三、Yen 之16S rDNA 序列定序結果·····	53
圖四、Yen 之洋菜酶 SDS-PAGE CBR 染色染·····	54
圖五、Yen 之洋菜酶 Native-PAGE 活性染·····	55
圖六、Yen-agarases 於不同緩衝液中的最適作用 pH 值·····	56
圖七、pH 值對 Yen-agarases 之安定性·····	57
圖八、Yen-agarases 的最適反應溫度·····	58
圖九、Yen-agarases 對溫度穩定性分析·····	59
圖十、氯化鈣濃度對各洋菜酶活性之影響·····	60
圖十一、氯化鈉濃度對各洋菜酶活性之影響·····	61
圖十二、Yen 粗洋菜酶與 high-melting-point agarose 作用之 Lineweaver-Burk 圖·····	62
圖十三、Yen 粗洋菜酶與 Low-melting-point agarose 作用之 Lineweaver-Burk 圖·····	63
圖十四、以 TLC 分析 Yen- agarases 水解洋菜糖之水解產物·····	64

表 目 錄

表一、 <i>Alcaligenes</i> sp. strain Yen 生化特徵表.....	65
表二、 Yen 洋菜酶之純化表.....	66
表三、 Yen-agarases 對九種多糖之基質特異性.....	67
表四、 金屬離子對 Yen-agarases 活性之影響.....	68



壹、前言

洋菜(agar)又名瓊脂，主要是由紅藻綱(Rhodophyceae)的藻類粹取出的生物體分子，海藻細胞壁的多醣是構成洋菜的主成分，目前廣泛地被應用於食品工業與微生物實驗的膠體凝結劑。中性洋菜(agarose)為其主要的凝結成分，其組成為一連串重複的1,4鍵結的3,6-脫水左旋半乳糖(4-O-linked 3,6-anhydro- β -L- galactopyranose)與1,3鍵結的右旋半乳糖(3-O-linked α -D- galactopyranose)。

早在 1902 年，Gran 首先發現會水解洋菜的海洋細菌(顏，2002)，這些菌所分泌出的酵素通稱洋菜酶(agarase)，目前這些洋菜酶可依照對 agarose 作用模式分成兩大類，一為 α -洋菜酶(α -agarase)，另一為 β -洋菜酶(β -agarase)等兩類。 α -agarase 會作用於中性洋菜之 α -(1 $\rightarrow$ 3)鍵結，所產生寡醣產物稱為洋菜寡醣(agarooligosaccharides)， β -agarase 會作用於中性洋菜之 β -(1 $\rightarrow$ 4) 鍵結，作用後所產生寡醣產物稱為新洋菜寡醣(neoagarooligosaccharidase) (Hosoda *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Sugano *et al.*, 1993b)。

經洋菜酶分解洋菜所得新洋菜寡醣具有低熱量、防止澱粉老化及抑制細菌生長等特性(德永和日高，1991)，且新洋菜二糖 (neoagarobiose) 具有吸濕能力以及讓 B16 murine melanoma cells 變白效果(Kobayashi *et al.*, 1997)。另外，新洋菜寡醣亦具不同生理活性，如條斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 之萃取多醣，經 β -agarase 分解後，於體外實驗能刺激巨噬細胞活性(Yoshizawa *et al.*, 1995)。江蘚(*Gracilaria verrucosa*) 水溶性多醣經 β -agarase 降解後，具刺激小鼠巨噬細胞產生

能力(Yoshizawa *et al.*, 1996)。使用 *Arthrobacter* sp. S-22 所產 β -agarase 分解紫菜多醣(porphyran)後，所得新洋菜四糖(neoagarotetraose)、硫化寡糖(sulphated oligosaccharide)、硫化四糖(sulphated tetrasaccharide)、及硫化二糖(sulphated disaccharide)等寡糖具有降低小鼠總膽固醇程度的能力(Osumi *et al.*, 1998)。2001 年 Kong 的報告中認為洋菜寡糖具免疫調節能力，可使老鼠脾臟細胞增生，因此認為添加洋菜寡糖於食品中可以提高人體的免疫活性。此外洋菜酶的應用很廣，如細胞的分離(Carlsson and Malmqvist, 1977; Solursh, 1991)、DNA 的分離(Couto *et al.*, 1989; Kamiuntan, 1995; Osoegawa *et al.*, 1998; She, 2003; Shizuya and Kouros-Mehr, 2001; Singh *et al.*, 2003)、藻類原生質體的製作(Araki *et al.*, 1998a; Chen and Chiang, 1994)、融合瘤細胞分離(Gray *et al.*, 1995)等。

本研究室於台東市區水溝中發現一株具有洋菜分解酶基因質體之洋菜分解菌，且已成功將洋菜分解質體轉殖到 *E. coli* 中表現，基於洋菜酶及其產物在生理活性、免疫調節、食品添加和生物科技應用上，有很大的發展，本研究工作內容為就本實驗室 *Alcaligenes* sp. Strain Yen 所生產洋菜酶純化分離為單一酵素，並瞭解洋菜酶所具有多各種生化特性及其作用產物且利用其作用產物來初步推斷洋菜分解酶的分型，藉著探討其特性進一步了解洋菜酶和產物的發展性。

貳、文獻探討

一、洋菜的組成與特性

藻類是廣泛存在於江、湖、海洋中的水生植物，其含有各種不飽和脂肪酸、維生素，成分會隨產地、季節、種類而有所不同，是水中生物之食物鏈的一環，有些藻類的細胞壁中可萃取得到的物質稱為洋菜(Ha *et al.*, 1997)，海藻根據藻類所含的儲存性及細胞壁多醣可分為三個綱：綠藻(Chlorophyceae)、褐藻(Phaeophyceae)和紅藻(Rhodophyceae)，依照 US Pharmacopoeia 對洋菜的定義，洋菜是從 Rhodophyceae 這個綱的某些海藻中所萃取出親水性膠體，它的顏色由白色到淡黃色，是一種無味或是略有少許的特殊香味及黏性物質。洋菜不溶於冷水，但在 80℃ 以上之熱水中則會膨潤快速溶解，回復至較低的溫度時，由中性洋菜所形成的雙螺旋鏈會聚集在一起而形成結構較為鬆散的束群，而此現象即稱之為 Gel I state。隨後當溫度繼續降低時，這些成束的中性洋菜會繼續與彼此結合形成我們所見的洋菜膠，而此階段即稱為 Gel II state (李，2005)。

洋菜(agar)又名瓊脂，主要是從藻類中萃取得到，海藻細胞壁的多醣是構成洋菜的主成分，在 1902 年，Gran 首先發現會水解洋菜的細菌(顏，2002)，這些菌所分泌出的酵素通稱洋菜酶(agarase)。洋菜是一種多醣類，主要成分為聚半乳糖，其含量大約為70%，而聚半乳糖成分主要為酸性洋菜(agarpectin)和中性洋菜二種構造，中性洋菜形成凝膠的分枝結構，是由1→3鍵結的 β -D-galactose 和1→4鍵結的 3,6-anhydro- α -L-galactose 交互聚合而成的長鏈聚合物(附錄二)，酸性洋

菜為非凝膠部分，它是以中性洋菜做為基本架構，再加上複雜的支鏈如硫酸鹽、葡萄糖醛酸和丙酮酸醛等所構成，但它的詳細結構還沒有被研究出來(Duckworth and Yaphe,1971; Ohta, Y. *et al.*,2004)(附錄二)。

二、洋菜酶生產菌株及其分離來源

Swartz and Gordon 在 1959 年的文獻中指出，早於 1902年 Gran 已分離出具分解洋菜的海洋細菌，經鑑定為 *Bacillus gelaticus*。自此之後，可從文獻中得知越來越多能夠分解洋菜的菌株被發現，如 *Achromobacter*、*Agarbacterium*、*Alteromonas*、*Cytophaga*、*Pseudoalteromonas*、*Pseudoalteromonas*、*Vibrio*(Leon *et al.* 1992; Zhong,Z. *et al.* 2001)。Vera *et al.* 於 1998 年認為由於大分子的洋菜無法進入細胞內，所以這些細菌就分泌出洋菜酶，將洋菜分解成洋菜寡糖、雙糖或單糖做為碳源。這些生產洋菜酶菌株大部分分離自沿岸海水及河口環境，但也有許多是分離自陸上之淡水、廢水及土壤，或其他環境中。目前陳(2006) 將已發表洋菜酶生產菌株種類、所屬洋菜酶種類及分離來源之文獻整理於附錄三。

三、洋菜酶對洋菜水解的作用機制

洋菜酶為可將洋菜分解成寡糖的一種水解酵素，Allouch *et al.* 2003，認為洋菜酶作用形式類似糖苷水解酶(glycoside hydrolases ,GH)(李，2005)。這些洋菜酶可依照對中性洋菜作用模式分成兩大類，一為 α -洋菜酶(α -agarase)，另一為 β -洋菜酶(β -agarase)等兩類。 α -agarase 會作用於中性洋菜之 α -(1 $\rightarrow$ 3) 鍵結，所產生寡糖產物稱為洋菜寡糖，此洋菜寡糖產物在還原端具 3,6-anhydro-L-galactose 殘基

(residue)及非還原端的 D-半乳糖(D-galactose) (Hosoda *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Sugano *et al.*, 1993b; Young *et al.*, 1978)。β-agarase 會作用於中性洋菜之 β-(1→4) 鍵結，作用後所產生寡糖產物稱為新洋菜寡糖，此新洋菜寡糖產物在還原端為 D-galactose 而非還原端為 3,6-anhydro-L- galactose(Hosoda *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Sugano *et al.*, 1993b)。

洋菜酶對洋菜作用具有明顯的特徵，如：使得洋菜膠表面軟化形成凹陷並且有透明圈(clear zone)產生或使洋菜膠完全水解成液體。

四、洋菜酶作用後之水解產物

4.1 作用機制與水解產物

不同的洋菜酶水解洋菜，產生的水解產物不完全相同。洋菜酶水解洋菜主要的產物為新洋菜雙糖、新洋菜四糖及新洋菜六糖(neoagarohexaose)。微生物產生各種洋菜酶是需要被誘導，且洋菜酶對誘導物具有專一性，不同的誘導物可使同一菌株產生不一樣的洋菜酶(Hosoda *et al.*, 2003)。而目前洋菜酶水解洋菜的作用機制，研究較為詳細的作用機製是菌株是 *Pseudoalteromonas atlantica* ATCC19292 及 *Alteromonas agarlyticus* strain GJ1B。

微生物所產洋菜酶以 β-agarase 為主，首先洋菜會誘導 *Pseudomonas atlantica* ATCC 19292 的胞外 β-agarase 作用於洋菜 β-(1→4) 鍵結，產生一系列新洋菜寡糖，而此糖會誘導新洋菜寡糖水解酶(neoagarotetraose hydrolase)產生，最後把寡糖切成新洋菜四糖。接著與細胞連結的第 II 型外切 β-洋菜酶(exo β-agarase II)，可以將新洋菜四糖中間的 β(1，4) 鍵結水解打斷，而產生新洋菜二糖，最後新洋菜

二糖再誘導細胞間質 α 型新洋菜雙糖水解酶(α -neoagarobiose hydrolase)產生，並作用於新洋菜二糖，最後形成 D-galactose 和 3,6-anhydro-L-galactose 等產物給予細胞間的酵素代謝利用(Hosoda *et al.*, 2003)。

Alteromonas agarlyticus strain GJ1B 的作用機制方面，*Alteromonas agarlyticus* strain GJ1B 含有兩種酵素 α -garase 和 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)， α -garase 可將洋菜水解成洋菜寡糖(agar-oligosaccharide)其最小產物為洋菜四糖，而 β -galactosidase 作用於洋菜寡糖的非還原端，最終產物洋菜三糖(agarotriose) (Vera *et al.*, 1998)。微生物會被洋菜誘導產生的各種洋菜酶，陳(2006)將洋菜水解所得知產物整理如附錄四。

4.2 洋菜酶之受質特異性

Alteromonas sp. E-1 的 β 型洋菜酶無法水解 κ 型鹿角藻 (κ -carrageenan)、藻酸鈉 (sodium alginate) (Kirimura *et al.*, 1999)；*Pseudomonas* sp. PT-5 的洋菜酶水解洋菜、鹼處理紫菜(porphyran)、高熔點的洋菜糖、低熔點的洋菜糖等基質 30 分鐘，產生 32-37 % 還原糖，而水解紫菜只有產生 20 % 還原糖，無法水解 κ 型鹿角藻、 λ 型鹿角藻、阿拉伯橡膠 (gum Arabic galactan) (Yamaura *et al.*, 1991)；*Pseudomonas vesicularis* MA103 的洋菜酶 I 水解 0.2 % 洋菜糖、高熔點的洋菜糖、低熔點的洋菜糖等基質，所產生的還原糖量分別為 182、170、67 mmole min/ mg (陳，2006)；*Vibrio* sp. JT0107 的 β 型洋菜酶無法水解 ι 型、 κ 型、 λ 型鹿角藻、藻酸鈣 (Sugano *et al.*, 1993,1995)。由前人研究發現目前已知洋菜酶都無法水解 ι 型、 κ

型、 λ 型鹿角藻、藻酸鈉，但可以水解洋菜糖、高熔點的洋菜糖、低熔點的洋菜糖。

五、洋菜酶之生化特性

5.1 溫度和 pH 值

目前已發表文獻之洋菜酶最適作用溫度及 pH 值之範圍已經於陳 (2006) 整理如附錄五。文獻中微生物所產洋菜酶最適作用溫度分布在 25°C 到 60°C 之間，不同的洋菜酶其最適作用 pH 值不太相同，大部分的洋菜酶之最適 pH 值為 pH 6.5~7.5 之間。

5.2 分子量

Vera *et al.* (1998) 根據文獻中洋菜酶分子量大小，共分成三類。第一類為分子量在 50 kDa 以下，如 *Pseudoalteromonas altantica* ATCC19292 (Morrice *et al.*, 1983a) 和 *Pseudomonas* sp. PT-5 (Yamaura *et al.*, 1991) 所產洋菜酶之分子量皆為 31 kDa，而 *Pseudoalteromonas antarctica* N-1 (Vera *et al.*, 1998) 所產洋菜酶分子量則為 33 kDa。第二類則為分子量介於 50 kDa 與 100 kDa 之間，如 *Alteromonas* sp. C-1 (Leon *et al.*, 1992) 洋菜酶分子量為 52 kDa，而 *Pseudomonas* sp. W7 (Ha *et al.*, 1997) 的洋菜酶分子量為 59 kDa，*Pseudoalteromonas atlantica* T6c (Belas *et al.*, 1988) 則生產分子量為 55 kDa 的洋菜酶。第三類則為分子量大於 100 kDa 的洋菜酶，如 *Vibrio* sp. JT107 (Sugano *et al.*, 1993a) 所產洋菜酶，分子量為 105 kDa。1998 年 Vera *et al.* 指出能生產前兩種洋菜酶分子量之菌株，在固態洋菜培養基上，菌落周圍會呈現軟化及透明狀，這可能與小分子量洋菜酶能夠經洋菜膠體間的孔徑擴

散而出，進而分解洋菜多醣造成菌株周圍形成軟化現象，至於菌落周圍發生液化現象者，則可能為菌株產生大量洋菜酶所致。

5.3 金屬離子

由於大多數產洋菜酶的菌株是海洋性細菌，Ha *et al.* (1997) 認為添加適量的氯化鈉(NaCl)可以增加洋菜酶活性。另外，如添加其他金屬離子和化學藥劑也會對微生物所產洋菜酶有不同的影響，如 *Alteromonas* sp. C-1 所產洋菜酶在鹽濃度低於 0.1 M 時，洋菜酶活性會被抑制，但是於其他 0.1 M 金屬鹽濃度在時，會有更好的洋菜酶活性(Leon *et al.*, 1992)。而 *Pseudomonas* sp. PT-5 所產的洋菜酶被 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Al^{3+} 等金屬離子抑制(Yamaura *et al.*, 1991)。 *Pseudomonas* sp. W7 的 β -agarase 在 0.9 M 氯化鈉下活性會增加，*Pseudomonas atlantic* 的 β -neoagarotetraose hydrolase、neoagarobiose hydrolase 分別在 0.05-0.20 M、0.10 M 鹽濃度下，洋菜酶活性會增加(Ha *et al.*, 1997)。添加 0.002 M 的 CaCl_2 和 0.005 M 的 MgCl_2 可提高活性1.2倍(Morrice *et al.*, 1983a)；1 mM Hg^{2+} 可以完全抑制 *Vibrio* sp. PO-303 的 agarase-a、agarase-b、agarase-c 的活性，1 mM Al^{3+} 及 EDTA 對 *Vibrio* sp. PO-303 的 agarase-c 有強的抑制效果，但對 agarase-a、agarase-b 的活性表現卻無影響(Araki *et al.*, 1998)。添加 2 mM Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Hg^{2+} 可完全抑制 *Alteromonas* sp. E-1 的 β -agarase 的活性(Kirimura *et al.*, 1999)。

六、洋菜酶之純化

6.1 硫酸銨鹽沉澱

鹽析沉澱法可分離出培養液中的蛋白質。蛋白質在水溶液中的溶解度，會因溶液中鹽類濃度的改變而增減，可利用來沉澱蛋白質。硫酸銨的兩價離子，在溶液中搶走附在蛋白質表面的水分子，使得非極性部分相互吸引而聚集沉澱。各種蛋白質，因其表面的非極性區域分佈不同，各在其特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱，常用於蛋白質純化步驟。其硫酸銨沉澱所使用的濃度有 40 ~ 60 % (Yamaura *et al.*, 1991) 、 70 % (Potin *et al.*, 1993 ; Sugano *et al.*, 1994) 、 75 % (Aoki *et al.*, 1990 ; Leon *et al.*, 1992 ; Vera *et al.*, 1998) 、 80 % (Duckworth and Turvey, 1969 ; Araki *et al.*, 1998) 、 60 ~ 80 % (Kirimura *et al.*, 1999) 、 90 % (Morrice *et al.*, 1983a ; Sugano *et al.*, 1993) 。

6.2 離子交換層析法

離子交換層析法的固定相是擔體上的電荷基團，可為正或負電荷；若擔體帶有正電荷，可吸附著負電荷分子，則為陰離子交換法；不帶淨電荷的分子，及陽離子則直接流出，不會被吸附上去。蛋白質通常以離子鍵吸附，因此要流洗出蛋白質時，以提高鹽濃度來達成，大多使用 NaCl ；也可改變緩衝液的 pH 值，使得蛋白質的電荷改變而溶離出來。帶有較高電荷比的蛋白質，與擔體的結合就愈緊密，溶離所需使用的鹽濃度就較高。分離洋菜酶常用的離子交換層膠體如下：DEAE-Toyopearl 650M (Araki *et al.*, 1998 ; Kirimura *et al.*, 1999) 、 Mono Q (Araki *et al.*, 1998 ; Kirimura *et al.*, 1999 ; Potin *et al.*, 1993 ; Sugano *et al.*, 1994) 、 QAE-Toyopearl column (Sugano *et al.*, 1994) 、 DEAE-cellulose (Leon *et al.*,

1992 ; Vera *et al.*, 1998) 、DEAE–Sepharose CL-6B(Morrice *et al.*, 1983a ; Kim *et al.*, 1999) 、 DEAE-Fractogel 650 M(Aoki *et al.*, 1990) 。

6.3 膠體過濾層析法

膠體過濾層析法，以蛋白質分子量大小來分離蛋白質，如樣本的分子量小，則容易進入膠體中，因此會被滯留在膠體中，較慢被溶離出來，可以與分子量較大的樣本分離。分離洋菜酶常用的膠體過濾膠體如下：Sephacryl S-100HR (陳，2006) 、 Superose 12 (Sugano *et al.*, 1994) 、 Superdax 200 (Sugano *et al.*, 1994) 、 Sephadex G-75(Leon *et al.*, 1992 ; Vera *et al.*, 1998) 、 Sephadex G-100 (Morrice *et al.*, 1983a) 、 Sephadex G-200 (Duckworth and Turvey, 1969 ; Malmqvist *et al.*, 1978 ; Sugano *et al.*, 1994 ; Kirimura *et al.*, 1999) 、 Fractogel HW-55 column (Duckworth and Turvey, 1969) 、 Toyopearl-HW 50S (Aoki *et al.*, 1990 、 Yamaura *et al.*, 1991)

6.4 親和性管柱層析法

Sepharose 膠體以洋菜糖為主要材料，所以在分離洋菜酶上，適合作為親和性管柱膠體，分離洋菜酶常用的親和性管柱膠體如下：Sepharose CL-6B (陳，2006 、 Aoki *et al.*, 1990 ; Potin *et al.*, 1993) 、 divinyl sulphone (DVS)-Sepharose 4B (Malmqvist *et al.*, 1978) 、 A-8010G(Hydroxyapatite) (Malmqvist *et al.*, 1978 ; Morrice *et al.*, 1983a. ; Sugano *et al.*, 1994 ; Yamaura *et al.*, 1991)

七、洋菜水解產物之分析

7.1 洋菜水解產物之獲得

洋菜水解產物之獲得，可藉由酸水解、鹼水解、酵素水解而獲得。酸、鹼水解主要是打斷 $\alpha(1,3)$ 鍵結(Araki, 1956)，所以水解產物主要是以 agarobiose 為基本結構的寡糖；酵素水解主要是打斷 $\beta(1,4)$ 鍵結，少部分可以打斷 $\alpha(1,3)$ 鍵結，所以酵素的水解產物主要是以 neoagarobiose 為基本結構的糖，但因為洋菜酶種類繁多，作用機制也不完全相同，所以酵素水解產物比酸和鹼水解產物更為豐富多變化。且因為酵素專一性，可利用不同的洋菜酶生產不同的水解產物，前人研究也發現，有些洋菜酶會切醣類的特定端點，產生特定的產物(Suzuki, H. *et al.*, 2003)。

7.2 薄層層析法(Thin-layer chromatography, TLC) (Ohta *et al.*, 2004)

最常被用來分析洋菜水解產物的方法，此法可以快速方便的分析洋菜水解產生的寡糖類。常見的步驟是把洋菜水解產物，點在薄層層析片上，再放入展開液中，洋菜水解產物會隨著展開液展開，不同的寡多糖因為其本身對液相及固相的親和力不同，因此展開的速度不同，和標準品新洋菜六糖、四糖、雙糖的 R_f 值比較可得知水解產物。

7.3 高效能液相層析法(High performance Liquid Chromatography , HPLC)

HPLC 比 TLC 更靈敏，可偵測到比較微量的水解產物 (Vera *et al.*, 1998)。且HPLC 也可利用波峰的面積，計算出較精準之水解產物量。

八、洋菜水解產物之應用

經洋菜酶分解洋菜所得新洋菜寡糖具有低熱量、防止澱粉老化及抑制細菌生長等特性(德永和日高, 1991), 且 neoagarobiose 具有吸濕能力以及讓 B16 murine melanoma cells 變白效果(Kobayashi *et al.*, 1997)。

8.1 海藻多醣之生理活性

由於海藻中富含硫酸根多醣類與肝素(heparin)類, 具有抗血液凝固、血液淨化及降低血液中的三甘油脂作用(Noda *et al.*, 1989)。褐藻 *Hijikia fusiforme* 的熱水萃取物中多醣類的部分被證實可增進老鼠脾臟細胞的增生反應, 特別是 B cell (Osumi *et al.*, 1998)。研究發現以 *Pseudomonas atlantica* 產生之 β 型洋菜酶水解條斑紫菜得到之寡醣水溶液, 在生物體外進行巨噬細胞培養實驗, 結果發現以 β 型洋菜酶處理之寡醣水溶液具有提高巨噬細胞之免疫能力(Yoshizawa *et al.*, 1995)。紫菜(*Porphra*)經洋菜酶水解所得之水解產物經純化後, 發現具有新洋菜四糖、硫酸寡醣、硫酸四醣、硫酸醣等部分, 經餵食老鼠後發現都具有降低總血清膽固醇之作用 (Osumi *et al.*, 1998)。

8.2 非消化性碳水化合物之生理活性

海藻經由洋菜酶水解後之海藻多醣, 屬於水溶性膳食纖維, 因為人類並無法消化利用, 所以可以加速腸道蠕動、增加糞便體積及排便頻率以及降低血膽固醇 (Vahouny , 1987 ; Roberfroid , 1993)。

九、洋菜酶的應用

9.1 細胞的分離

在組織培養當中，常用洋菜或中性洋菜膠來培養細胞，但是由於培養在中性洋菜膠上的細胞，不易用無菌吸管將活細胞與中性洋菜膠分離，所以需要活細胞來進行下一次的培養，並且不會影響到細胞表面的結構，是非常重要的。Carlsson and Malmqvist (1977) 發展出一種有效的方法，即自中性洋菜膠上分離活細胞，利用經過適當純化及濃縮後的微生物洋菜酶，加入正在培養神經膠質瘤細胞 (glioma cells) 的中性洋菜膠中，純化後的洋菜酶僅會分解中性洋菜膠，故神經膠質瘤細胞即可被完整的分離出來。利用掃描電子顯微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) 來觀察二種不同處理組之表面結構，發現經過洋菜酶的處理後與未經洋菜酶處理者之兩者的表面並無明顯的差異存在。Solursh (1991) 時亦曾利用洋菜酶來分離培養在膠體上的軟骨細胞(chondrocytes)。

9.2 DNA 或 RNA 分離

利用洋菜酶來回收洋菜糖膠體上的 DNA 或 RNA 片段(Potier *et al.*, 1992 ; Gnirke *et al.*, 1993 ; Osoegawa *et al.*, 1998)。

9.3 藻類原生質體的製作

高等植物原生質體的生成與被利用在生理學與細胞學的研究工作上，已經被發展許久了，特別是在穀類基因操作實驗中，但是藻類原生質體的製作則是一個新的領域且遠落後於高等植物的相關研究，故在海藻的細胞融合與基因操作應用上，分離藻類原生質體的製作方法之發展是很重要的(Araki *et al.*, 1998a)。Chen *et al.* 在1994年時，利用產自

Pseudomonas atlantica 的 β -agarase 與其他的酵素如纖維素酶 (Cellulase) R-10、Macerozyme 與 Abalone enzyme 等，對中性洋菜、纖維素(cellulose)、木聚糖 (xylan)、紫菜多醣及藻類細胞壁間質等物質進行分解實驗。發現 *Pseudomonas atlantica* 所產 β -agarase 對紫菜多醣與中性洋菜遠較實驗中其他酵素有較高的酵素活性，而經由 *Pseudomonas atlantica* 所產 β -agarase 處理後所產生的藻類原生質體，與其他酵素處理過後的藻類原生質體相較之下呈現較好的存活率。亦有利用洋菜酶與不同的藻類，如 *Gracilaria* (Araki et al.,1998a)、*Grateloupia* (Chen and Chiang, 1994)等藻屬作用，產生原生質體以利後續基因操作。

9.4 融合瘤細胞分離

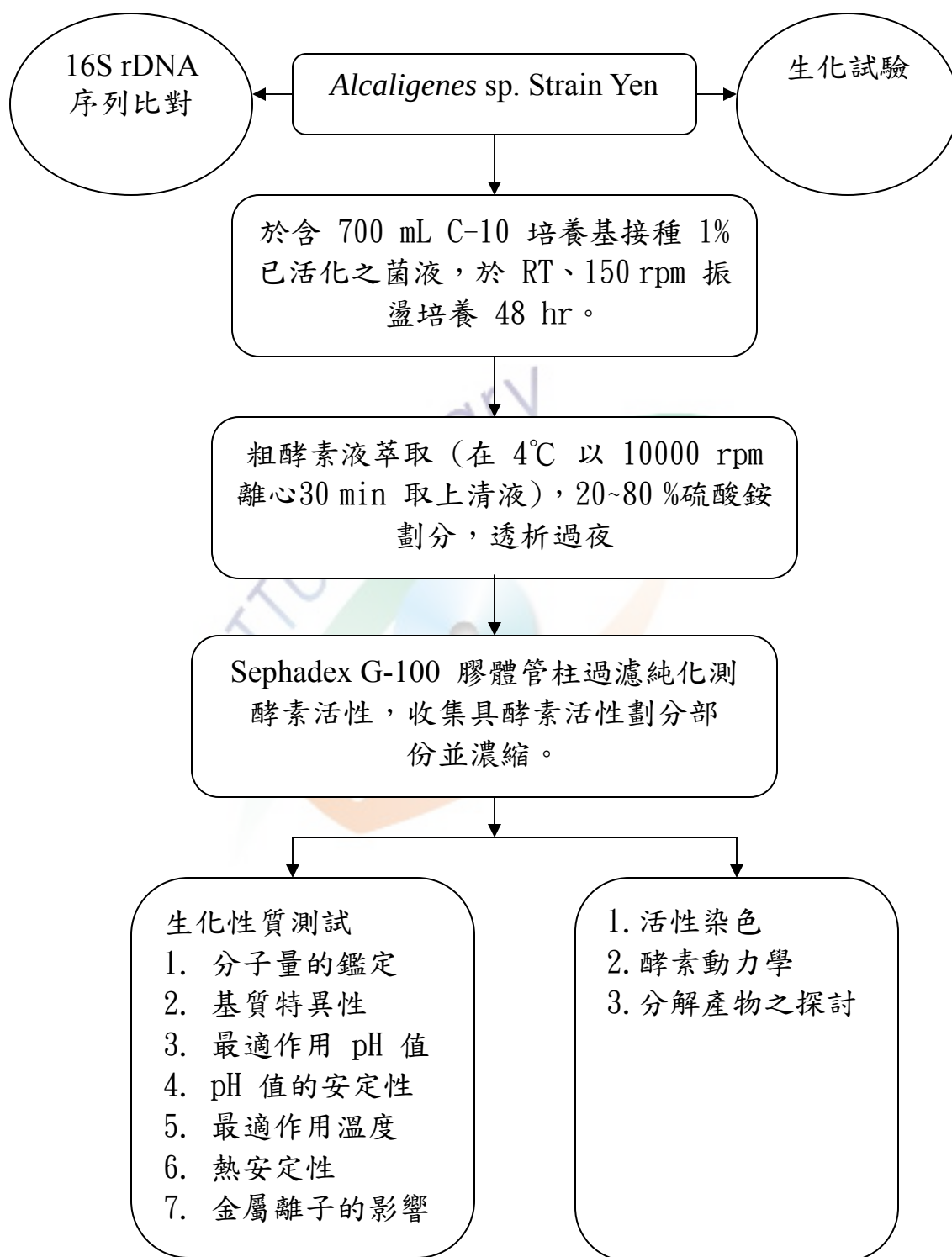
Gray et al. (1995) 指出由於單株抗體的產生與製造是非常依賴專一性，並且在分離一株具有價值的抗體時，是不能存在一些不適當的細胞，而流式細胞儀(flow cytometers) 可用來偵測適當的細胞，但是僅能在其與微粒(microdroplets)結合時才能偵測，而且在融合瘤活細胞所分泌的產物會快速分解，故並無較好的方法偵測融合瘤活細胞所分泌的產物。所以 Gray et al. 在1995年時利用一種技巧，能夠在微環境下捕捉分泌的產物，進一步鑑定與分類單一的融合瘤活細胞，即是使用 secretion capture and reporter web (SCRW) 結合來自活的融合瘤細胞所分泌之免疫球蛋白，接著可並偵測出，藉由中性洋菜微粒與融合瘤細胞形成微膠囊，如此可以引起螢光抗體特異性三明治分析方法。所以使用 flow cytometers 來鑑定及分類融合瘤細胞時，最後可使用洋菜酶分解中性洋菜微粒以獲得所需融合瘤細胞並供培養用。

9.5 開發海藻寡糖之健康食品

研究指出以洋菜酶水解海藻所得之水解產物，發現具有新洋菜四糖、sulfated oligosaccharide、sulfated tetrasaccharide、sulfated disaccharide 等部分，經餵食老鼠後發現都具有降低總血清膽固醇之作用 (Osumi *et al.*, 1998)。且海藻經由洋菜酶水解後之海藻多醣，屬於水溶性膳食纖維，因為人類並無法消化利用，所以可以加速腸道蠕動、增加糞便體積及排便頻率以及降低血膽固醇 (Vahouny, 1987; Roberfroid, 1993)。以不同之洋菜酶水解海藻，可能可以獲得對人體有益的海藻寡糖，有機會開發成健康食品。



參、實驗設計



肆、實驗材料與方法

一、藥品與耗材

Bradford reagent、Protein marker (Bio-Rad Laboratories)

SDS-PAGE(Pierce)

Millipore Amicon Ultra-30(millipore)

Agarose (Bio-Rad Laboratories, Sigma)

Difco™ agar, Granulated (BD, Difco)

Agar A(Bio basic INC.)

Agar power (Osaka)

Standard methods agar (PCA-D, Biomerieux)

Coomassie brilliant blue R-250, CBR (Sigma)

Bromphenol blue sulfone, BPB (Sigma)

Calcium chloride, CaCl₂ (Sigma)

3,5-Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Sigma)

1,3-Dihydroxynaphthalene(Sigma)

D-galactose (Sigma)

Seamless Cellulose Tubing(Wako, Small size 24)

二、儀器與設備

-80℃ 凍藏櫃 (freezer) (Leguci, Revco, U.S.A)

0.2 μm syringe filters (25 mm; Pall Corp., Ann Arbor, MI, U.S.A.; Pall)

分光光度計 (spectrophotometer) (He λ ios- β, Lnicam, Tokyo, Japan;
Shimadzu)

恆溫水浴槽 (general purpose bath) (Firstek, Model-B403L)

恆溫振盪培養箱 (orbital shaking incubator) (S300R, Firstek)

低溫高速離心機 (high-speed refrigerated centrifuge) (Himac CR 229, Hitachi, Tokyo, Japan; Hitachi)

蠕動泵 (peristaltic pump)

凝膠 (gel) (Sephadex G-100, Bio-Rad)

電泳槽 (electrophoretic unit) (Bio-Rad Laboratories)

電源供應器 (power supply) (Bio-Rad Laboratories)

三、菌種鑑定(楊，2007)

3.1 菌種生化鑑定

使用台東署立醫院檢驗科 MicroScan-AS4 微生物自動分析儀器，分析菌種。

3.2 菌種 16S rDNA 分析(楊，2007)

委託新竹食品工業研究所抽取菌株 Yen 之 DNA，進行 PCR 放大菌株 Yen 之 16S rDNA 並進行定序，定序序列結果與美國國家生物科技資訊中心 (NCBI) 資料庫進行比對，找出序列最接近的已知菌種。

四、培養基配製與菌株之保存

4.1 培養基配製

4.1.1 菌株 Yen 液體生長培養基 (C-10 broth) pH 7.5

HEPES(N-2-hydroxyethyl- piperazine-N-2-ethanesulfonic acid) 1.2 g/L

MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L

K₂HPO₄ 0.05 g/L

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.025 g/L
KNO ₃	1.0 g/L
Na ₂ -EDTA (Na ₂ -ethylenediaminetetraacetic acid)	0.01 g/L
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·6H ₂ O	0.004 g/L
agar (Dfco)	2 g/L

4.1.2 菌株 S3PY 固體生長培養基

添加 1.5% 的 agar 於 C-10 broth 並調整其 pH 至 7.5，於 121 °C 中滅菌 15 分鐘。

4.2 菌株保存

採用本實驗室分離之能產洋菜酶的菌株 *Alcaligenes sp.* Strain Yen，菌株 Yen 於固態洋菜培養基上菌落周圍有液化和軟化現象。將 *Alcaligenes sp.* strain Yen 於含 0.2% agar 之 100 mL C-10 broth，在室溫下以 150 rpm 振盪培養，當培養菌液之 OD 600 nm 達 1.0-1.2 時，分別適當培養菌液注入含已滅菌甘油 (glycerol) 保存管中，將菌液與甘油 1:7 混合均勻後，於 4 °C 預冷 2 小時後，再置於 -20 °C 進行預冷 2 小時，最後置於 -80 °C 再進行保存。

五、菌株之活化

由 -80 °C 冰箱取出保存菌種兩管，以 37 °C 回溫，使用 100 mL C-10 broth 在室溫下、150 rpm 振盪培養，培養 48 小時後，再取 2 mL 菌液接種至新的 C-10 培養 24 小時，做為種菌。

六、實驗方法

6.1 洋菜酶之生產

於 500mL 之液體培養基，好氧培養菌株 Yen (室溫，150 rpm)，培養48小時。菌液離心(4 °C，10000 rpm，30 min)收集上清液。上清液以 20~80 % 硫酸銨沉澱，沉澱之蛋白質再溶於50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)中。在以 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)透析24小時後，使用 0.45 μ m syringe filters 過濾不融蛋白質，所得之溶液即為 Yen 粗洋菜酶溶液。

6.2 洋菜酶的活性測定

6.2.1 依還原糖酵素活性測定酵素活性(Miller,1959)

洋菜酶反應基質組成為分別取 0.9 mL 含有0.2 % agarose Sodium phosphate buffer (pH 7.5)，然後置於35°C水浴槽中 5 min，加入稀釋適當量的 100 μ L 粗酵素液振盪混合均勻，立即放入 35°C水浴槽反應30 min，取出立即加入 1.0 mL 的 DNS 溶液 (秤取 10 g 的 3,5-dinitrosalicylic acid、16 g NaOH 及 300 g K-Na tartrate 加熱溶解後，定體積至 1.0 L，儲於不透光的塑膠瓶)，接著在 100°C 沸水浴中靜置 5 min 終止酵素反應，取出冷卻至室溫後，使用分光光度計於546 nm 波長下測定吸光值。以不同濃度的 D-galactose 進行 DNS 呈色反應，以建立 D-galactose 之標準曲線，並將酵素呈色與 D-galactose 標準曲線比較，以量化試驗酵素之活性。

6.2.2 活性單位定義(Leon *et al.*,1992)

活性單位：每一單位(1 unit)的酵素活性為：每分鐘能產生相當

1 μmole 半乳糖的酵素量 1 unit = 1 $\mu\text{mole galactose equivalent/min}$

6.2.3 蛋白質的定量(Bradford, 1976) (適用範圍為 0.05-50 $\mu\text{g} / \text{mL}$)

取適當量之樣品，以二次去離子水定容至 200 μL ，再加入1000 μL 的 Bio-Rad 染劑(dye reagent)，混合均勻反應 5 min，1 hr內測量波長 595 nm 的吸光值，並以牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) 做為標準蛋白質，求得標準曲線，經由標準曲線內插換算出樣品之蛋白質量。

6.3 洋菜酶之分離純化

6.3.1 膠體過濾層析(Sephadex G-100)

修改楊(2007)的膠體過濾層析方法，裝填 1.0 x 60 cm 管柱，以 500 mL 緩衝溶液 Sodium phosphate buffer (pH 7.5)於4°C 冰箱流洗過夜後。接著以 Sodium phosphate buffer (pH 7.5)流洗，流速每分鐘 0.2 mL，每劃分收1.5 mL，收集酵素活性劃分部分，以具有分子量 30 kDa MWCO 之超過濾濃縮離心管進行濃縮及透析。

6.4 洋菜酶之生化性質測試(蘇，2005)

6.4.1 分子量的鑑定

參考楊(2007)的方法，本實驗採用4~20 % SDS 聚丙稀胺膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) 之方法分析。利用 bio-rad SDS-PAGE 標準品進行分子量估算。

6.4.2 SDS-PAGE 的材料製備

5 倍電泳緩衝液(5 X Running buffer)(稀釋時加入 0.1 % SDS)

Tris base	54.5 g/L
EDTA·2Na	144 g/L
Boric acid	6 g/L

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍。

2 倍樣品緩衝液(2 X Sample buffer) (SDS reducing buffer)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.0 mL
Glycerol	2.0 mL
10 % SDS	4.0 mL
2-β-mercaptoethanol	0.4 mL
0.1 % (w / v) Bromophenol blue	1.0 mL
Distilled water	1.6 mL

儲存於4 °C，使用時與蛋白質樣本 1：1混合使用

CBR 染液

將400 mL 的 methanol 加入400 mL 的水，再加入 100 mL acetic acid 混合均勻後，加入 10 g Coomassie blue R250，補水至體積 1L。

退染液

將 dH₂O、ethyl alcohol、acetic acid 以 7：2：1 比例配置。

6.4.3 SDS-PAGE 分析操作步驟

將洋菜酶與 sample buffer 以1：1 混合後，於 100°C加熱 5 min，

冷卻後取 30 μ L 注入樣品槽。以 Tris-Boric acid SDS buffer 做為 running buffer。先以 60 volt 電壓預泳 30 min，再以120 volt 進行電泳 90 min。以 Coomassie brilliant blue R-250 染劑染色1天，再以褪染液褪染 4 hr 並與蛋白質標準品(注入量為10 μ L)比對，以求得其分子量。

6.5 Native PAGE 分析

Native-PAGE 大致與 SDS-PAGE 相同但樣本不經由 SDS 處理，且膠體中也不加入 SDS，除此之外處理蛋白質樣本通常加入 β -mercaptoethanol 處理，但是 Native-PAGE 中不加入此藥劑，也不加熱處理。

6.6 洋菜酶活性染色分析

樣本使用不加 β -mercaptoethanol 與不加熱處理，將跑完SDS-PAGE 或 Native PAGE，使用 Tris-HCl buffer (pH 7.0) 清洗5次，放置平台式振盪器，轉速30 rpm，每次30分鐘。之後將 PAGE 取出倒上 Soft agar (0.5% agarose in Tris-HCl buffer)，放置35 $^{\circ}$ C，培養3小時，取出使用 Iodine reagent (0.05 M I_2 in 0.12 M KI) 染色，約10分鐘後觀察結果。

七、基質特異性(Allouch *et al.*, 2004)

分別將市售實驗級之 high-melting-point agarose、low-melting-point agarose、agar(Agar power,Difco,PCH-D,Agar A)、sodium alginate、 ι -鹿角藻和 κ -鹿角藻等物質，比較各洋菜酶 0.1 mL(10 U/mL) 對不同多醣的基質特異性 0.9 mL，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。

八、最適作用 pH 值(修飾 楊，2007)

測定各酵素之最適作用 pH，所使用的緩衝溶液如下表。測定方法，分別取 0.1 mL(10 U/mL) 之酵素加入含不同 pH 值緩衝溶液之基質中 0.9 mL，接下來依據酵素活性測定方法測定活性。

Buffer (50 mM)	pH Value			
Citrate-Na ₂ HPO ₄ buffer	3.0	4.0	5.0	
Tris-HCl buffer	6.0	6.5	7.0	7.5
Sodium phosphate buffer	7.0	7.5	8.5	
Phosphate buffer	8.0	8.5		
Glycine-NaOH	9.0	10.0		

九、pH 值的安定性 (修飾 楊，2007)

分別取 0.1 mL(10 U/mL) 之各酵素與 50 mM 不同 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0) 0.9 mL 的緩衝溶液混合均勻，於 4°C 下儲存 24 hr 後，取各 pH 值的酵素液，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。

十、最適作用溫度(Suzuki *et al.*, 2003)

將 0.9 mL 0.2% 的 low-melting-point agarose 及 0.2% high-melting-point agarose，分別置於各反應溫度 20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 中預熱 5 min，使其與該溫度平衡後，再加入 0.1 mL(10 U/mL) 之各酵素混合均勻，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。

十一、溫度安定性(蘇，2005)

測 Yen 粗洋菜酶在不同溫度下處理 30分鐘之酵素殘存活性，了解洋菜酶受溫度影響之穩定性。

把 Yen 之粗洋菜酶濃度調整成約 10 U/mL。粗洋菜酶分別在溫度 20、25、30、35、40、45、50、60 下處理 30 分鐘，然後依還原糖酵素活性測定之方法測酵素殘存活性。

十二、金屬離子的影響

12.1 鈣離子的影響(Li *et al.*, 2003)

不同鈣離子濃度 0、0.05、0.1、0.2、0.8、1.0、3.0、5.0、10.0、20.0、100.0 mM 分別加入基質中混合均勻後，加入各酵素 10 U/mL，依活性測定法測活性。

12.2、鈉離子的影響(Li *et al.*, 2003)

不同鈉離子濃度 0、20、50、100、200、400、600、800、1,000 mM 分別加入基質中混合均勻後，加入各酵素10 U/mL，依活性測定法測活性。

12.3 其他金屬離子耐受度的影響(陳，2006)

金屬離子濃度以其在海水中的濃度為基準 (陳，2006)，再比較其濃度降低到 1/10 倍和提高到 10 倍的差異，各離子的基準濃度分別如附錄六，將此不同濃度之金屬離子分別加入 0.2% 基質中 0.9 mL，依活性測定其相對活性。由於以上金屬離子濃度差異大，故以 1 mM 的濃

度下做為比較各金屬離子對洋菜酶的影響，加入各酵素10 U/mL，依活性測定法測活性。

十三、酵素動力學(Michaelis-Menten)(Sugano *et al.*, 1994)

取洋菜酶 0.1 mL(10 U/mL)分別在 0.9 mL 0.2% low-melting-point agarose 及 high-melting-point agarose (基質)濃度為 0.5、1、1.5、2、2.5、3.0 g/L 下反應 30分鐘，然後依吸光度法測定基質濃度與酵素活性的關係，並利用酵素反應速率與基質濃度做成雙倒數圖形，然後由 Michaelis-Menten 方程式求 K_m 及 V_{max} 。

十四、水解產物分析(TLC)

製備的 0.5 mL 0.2 % agarose 與 0.5 mL 10 U/mL 粗洋菜酶或部分純化的洋菜酶反應，分別 30 min、60 min、5 hr、24 hr 測產生還原糖量。

14.1、TLC 分析水解產物(Kirimura *et. al.*, 1999)

材料：

plate 為 silica gel 60

展開劑為 n-butanol-acetic acid- water (2: 1: 1)

呈色劑為 naphthoresorcinol

(0.2g naphthoresorcinol + 100 mL ethanol + 10 mL H_3PO_4)

方法：

將 silica gel 60 裁切成要使用的大小，用鉛筆畫上起始線，點出樣本的位置並在上方劃上終止線，用 TLC 管點上樣本，再進行展開，終止後拿起風乾，使用呈色劑呈色，在拿至110 °C烘箱烘乾10分鐘。

五、結果與討論

一、Yen 菌種鑑定

本實驗室於台東市區水溝中，篩選到一株洋菜分解菌。其在固體培養基上，培養一天會產生針孔狀凹陷菌落，隨著培養時間增加，菌落的凹陷也越來越明顯（圖一），滴上碘液染色菌落週圍可見清楚透明圈（圖二）。

經傳統生理生化測試發現 此洋菜分解菌為革蘭氏陰性桿菌，不發酵、具運動性、好氧、catalase、oxidase 為正反應且不產硫化氫(H_2S)和 Indole。初步鑑定此洋菜分解菌與 *Alcaligenes* sp. 有97.4% 相似性（表一）。

以廣效性引子，進行 PCR 放大菌株 Yen 之 16S rDNA 序列，PCR 產物委託新竹食品工業研究所定序，定序序列結果為圖四，與美國國家生物科技資訊中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)資料庫進行 16S rDNA 序列比對，結果發現跟 *Alcaligenes* sp.ON5 有 100 % 的相似度，NCBI 建議將此菌株命名為 *Alcaligenes* sp. Strain Yen(圖三)。

二、酵素的純化

1. 粗酵素液的製備

將儲存在 $-80^{\circ}C$ 的菌株(*Alcaligenes* sp. Strain Yen)於含100 mL C-10 培養基，接種 0.5 % 已活化菌液，接著在室溫下以 150 rpm 的條件振盪培養 48 hr 後收集發酵菌液，並以 $4^{\circ}C$ 下 10000 rpm 條件離心

30 min 後，收集上層液，在經 20~80% 硫酸銨鹽沉澱後並以適量 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)回溶沉澱物在以 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)透析24小時後，使用 0.45 μ m syringe filters 過濾不溶蛋白質稱為粗酵素液(Yen-agarases)，其倍率純化表如表二所示，其所得體積為 600 mL，總蛋白量為 19.20 mg，總 agarase 活性為 1377.12 U/mL，定為回收率 100%，比活性為 71.73 U/mg，定為純化倍數 1。

2. Sephadex G-100 膠體過濾層析

將粗酵素液濃縮後，進行 Sephadex G-100 膠體過濾層析，以緩衝溶液流洗，流速每分鐘 0.1 mL，每劃分收 0.2 mL，收集有酵素活性之管子。其所得總體積為 5 mL，總蛋白量為 0.27 mg，總 agarase 活性為 109.74 U/mL，比活性為 406.44 U /mg，純化倍數為 5.66 倍，回收率為 7.96 % (如表二)。

陳 (2006) 利用濃縮、DE-52 離子樹脂交換層析 *Aeromonas salmonicida* MAEF108，其得到之 agarase 比活性為 1069.46 unit/mg、純化倍率為 1.11 倍、及回收率為 13.32 %。Suzuki *et al.*(2003)利用硫酸銨沉澱法、DEAE-Toyopearl 650S 離子樹脂交換層析(0.13-0.40 M NaCl)、Sephadex G-150 及 Superdex 200 膠體過濾層析純化 *Bacillus sp.* MK03，得到之 β -agarase 其總蛋白量為 0.069 mg、總活性為 0.98 unit、比活性為 14.2 unit/mg、純化倍率為 129 倍、及回收率為 7.0 %。由於本實驗在純化過程以及粗萃取液較少，造成活性及蛋白量不夠純和不夠多，因此酵素活性和純化倍率與回收率與文獻相比均較差。以下就經粗萃取液之 Yen-agarases 探討其生化特性及作用產物之探討。

三、洋菜酶的生化特性

1. 分子量

將 Yen-agarase 4~20 % SDS-PAGE 電泳後經 CBR 染色、及脫色以及活性染色，與標準蛋白質組比對，結果如圖四所示，其分子量初步判定約 101 kDa。Native-PAGE 活性染可以知道酵素液中的酵素組成，由圖五可以看出原態分子量也是約 101 kDa，也可以看出硫銨劃分取 20~80 % 最適當。使用還原態條件的 SDS-PAGE 來決定分子量 (Vera *et al.*, 1998) 用已知分子量大小的蛋白質進行膠體過濾法，計算未知蛋白質的分子量大小，但是使用膠體過濾法來計算蛋白質的分子量大小有時會誤判，因為洋菜酶可能會與膠體相互作用，使洋菜酶延遲洗出而造成分子量的誤判 (Aoki *et al.*, 1990b；陳，2006)。

Vera *et al.* (1998) 根據文獻中洋菜酶分子量大小，共分成三類，第一類為分子量在 50 kDa 以下，第二類則為分子量介於 50 與 100 kDa 之間，第三類則為分子量大於 100 kDa 的洋菜酶。*Vibrio* sp. JT0107 分子量 107 KDa (Sugano *et al.*, 1993a)；*Vibrio* sp. PO-303 enzyme B 分子量 115 KDa (Araki *et al.*, 1998)；*Pseudomonas* sp. enzyme I 分子量 210 KDa (Malmqvist, 1978)；*Alteromonas agarlyticus* GJ1B 分子量 360 KDa (Potin *et al.*, 1993)。均和本實驗所得之洋菜酶屬同類別。

2. 基質特異性

分別以不同的基質測定 Yen-agarases 的基質特異性，其活性結果如表二所示，當基質為 high-melting-point agarose、low-melting-point agarose、aga(Difco、Agar power、Agar A、PCH-D agar)、藻酸鈉時其分

別可產生相當於 51.45、42.60、30.72、24.84、32.68、24.78 及 9.28 μmole D-galactose，而當基質為 ι -carrageenan 和 κ -carrageenan 時均未檢出，顯示 Yen-agarases 不能分解或是分解這些物質的能力低到未能檢出。

Vibrio sp. JT0107 的 β -agarase 0107、 β -agarase 0072 無法水解 κ -、 ι -、 λ -鹿角藻、藻酸鈉(sodium alginate) (Sugano *et al.*, 1993a)；*Alteromonas* sp. E-1 的 β -agarase 無法水解 κ -鹿角藻、藻酸鈉 (Kirimura *et al.*, 1999)。

由文獻發現目前已知洋菜酶都無法水解 κ -鹿角藻、 ι -鹿角藻和藻酸鈉，但可水解 agar、high-melting-point agarose，本實驗與所得之結果略為不同，由於目前文獻所探討的洋菜酶都無法水解藻酸鈉，但是 Yen-agarase 卻有此作用，可以進一步探討他的作用機制以及水解產物。

3. 最適作用 pH 值

分別測定各洋菜酶在不同 pH 值的 50 mM 緩衝液之反應活性大小(citrate- Na_2HPO_4 buffer pH 3.0-5.0；Tris-HCl buffer pH 6.0-7.5；Sodium phosphate buffer 7.5-8.5；phosphate buffer pH 8.0-8.5；glycine-NaOH pH 9.0-10.0)，結果如圖六所示，Yen-agarases 其最適作用條件分別為 Sodium phosphate buffer 7.5-8.5 或 phosphate buffer pH 8.0-8.5。由於各緩衝溶液本身對於洋菜酶會有不同之影響，因此造成最適作用 pH 值未呈現連續值，因此造成活性降低的情況，例如 Sodium phosphate buffer 在 pH 8.5時呈現下降趨勢。

大部分的洋菜酶之最適 pH 值為 pH 6.5~7.5 之間。
Alteromonas agarlyticus GJ1B 的 α -agarase 其最適 pH 值為 7.2 (Potin

et al., 1993) ; *Pseudomonas* sp. W7 的 β -agarase 其最適 pH 值為 7.8 (Ha *et al.*, 1997) ; *Alteromonas* sp. E-1 的 β -agarase 其最適 pH 值為 7.5 (Kirimura *et al.*, 1999) ; *Bacillus cereus* ASK202 的 β -agarase 其最適 pH 值為 7.0 (Kim *et al.*, 1999) ; *Bacillus* sp. MK03 的 β -agarase 其最適 pH 值為 7.6 (Suzuki *et al.*, 2003) 等，本研究結果顯示 Yen-agarase 在略呈鹼性環境下有最適 pH 值，與目前文獻比較最適 pH 值呈現偏鹼情形，所以推論此酵素再偏弱鹼狀態下可存活，可以做進一步的探討。

4. pH 值的安定性

分別取一定量之酵素液與 50 mM 不同 pH 值(3.0-10.0)的緩衝溶液，分別在 Ependoff tube 中混合均勻，於 4°C 下儲存 24 hr 後，取各 pH 值的酵素液測量其活性，比較殘存活性之大小，其結果如圖七所示。Yen-agarase 在 pH 3.0 下殘存活性最高，於 pH 7.5-8.5，都還具有 80 % 以上之相對活性，當 pH 值大於 9.0 以上活性幾乎喪失只剩下約 20 %。在 pH 大於 3 時，活性有下降情形，檢討原因可能 Yen-agarase 純化不足，尚有其他 agarase 存在，以至於最適作用 pH 值不相符合以及 pH 值的安定性圖形有不連續的情形出現。

Vibrio sp. AP-2 在 4°C 儲存 20 hr，其最安定的 pH 值範圍為 4.0-9.0 (Aoki *et al.*, 1990b) ; *Vibrio* sp. PO-303 的 agarase-a、agarase-b、agarase-c 在 4°C 儲存 24 hr 後，最安定的 pH 值範圍分別為 5.0-8.0、4.0-10、及 5-9 (Araki *et al.*, 1998b) ; *P. vesicularis* MA103 的 agarase I 在 4°C 儲存 24 hr 後，其 pH 值小於 7 時，活性逐漸喪失，在 pH 值低於 4.0 時，活性完全喪失。

5. 最適作用溫度

將 pH 值為 7.2 之 0.2% 的 low-melting-point agarose 及 0.2% high-melting-point agarose，分別置於各反應溫度 20℃、25℃、30℃、37℃、45℃、50℃、55℃、60℃ 中預熱 5 min，使其與該溫度平衡後，再加入適量酵素液混合均勻，測量其活性，如圖八所示，Yen-agarases 以 high-melting-point agarose 為基質時之最適作用溫度為 35℃，而以 low-melting-point agarose 為基質時之最適作用溫度為 40℃。

目前所發現的洋菜酶最適作用溫度為 25~60 ℃ 之間，不同菌株產生的洋菜酶最適作用溫度不太相同。*Vibrio* sp. JT0107 最適作用溫度為 30℃ (Sugano *et al.*, 1993a)；*Cytophaga flevensis* 最適作用溫度為 35℃ (van der Meulen and Harder, 1975)；*Vibrio* sp. PO-303 enzyme C (Araki *et al.*, 1998)、*Pseudomonas* sp. enzyme I 最適作用溫度為 38℃ (Malmqvist, 1978)；*Pseudomonas atlantica* (Morrice *et al.*, 1983a)、*Alteromonas* sp. E-1 (Kirimura *et al.*, 1999)、*Bacillus cereus* ASK202 (Kim *et al.*, 1999)、*Vibrio harveyi* FLB-17 最適作用溫度為 40℃ (Fukasawa and Kobayashi, 1987)，其結果均與本實驗結果類似。

6. 溫度安定性

將酵素置於各溫度 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃ 中，分別於 30 min 分鐘後，測定其活性，如圖九所示，Yen-agarases 於 4℃ 下其酵素活性不變，而在 35℃ 以上作用 30 min 會快速喪失 50% 的活性，檢討溫度安定性圖形與最適作用溫度不相符合，原因可能 Yen-agarase 純化不足，尚有其他 agarase 存在，以至於

圖形有不連續的情形出現。

Vibrio sp. AP-2 在 45°C 作用 15 min 仍維持原來的活性，在 60°C 作用 15 min 會喪失 50% 的活性 (Aoki *et al.*, 1990b)；*Alteromonas* sp. C-1 的 β -agarase 在 30°C 以下的溫度作用 1 hr 其酵素活性不變，而在 35°C 作用 20 min 會快速喪失 50% 的活性 (Leon *et al.*, 1992)；*Vibrio* sp. JT0107 的 β -agarase 0107 在 40°C 作用 120 min 的酵素殘存活性為 90%，在 60°C 作用 15 min，完全喪失活性 (Sugano *et al.*, 1993a)；*Vibrio* sp. JT0107 的 α -NASO hydrolase 在 30°C 作用 120 min 不會喪失活性，超過 35°C 作用會逐漸喪失活性，超過 40°C 作用會快速喪失活性 (Sugano *et al.*, 1994)；*Vibrio* sp. PO-303 的 agarase-a、agarase-b、agarase-c 在 60°C 作用 10 min，其相對活性分別為 25、80、3% (Araki *et al.*, 1998b)；*Alteromonas* sp. E-1 的 β -agarase 在 40°C 以下的溫度作用 30 min 酵素比較安定 (Kirimura *et al.*, 1999)；*P. vesicularis* MA103 agarase I 在 40°C 作用 10 分鐘會喪失 55% 的活性，超過 50°C 作用會完全喪失的活性 (陳，2006)。由文獻發現大部份的洋菜酶在高於最適溫度一定時間內會快速喪失酵素活性，本實驗結果與此相符合。

7. 鈣離子的影響

不同鈣離子濃度 0-100 mM 對 *Yen*-agarases 活性的影響其結果如圖十所示，添加鈣離子濃度越高時其活性隨著增加，當鈣離子超過 20 mM 時，活性會快速增加 (6.10%、6.46%、7.00%、8.61%、9.74%、18.67%、33.02%、34.9%、94.78 及 100.00%)，顯示 *Yen*-agarases 在鈣離子含量較高的情況下活性越佳。由此可知，鈣離子可以刺激

Yen-agarases 活性。

0.002 M CaCl_2 會增加 *Pseudomonas atlantica* 的 β -agarase II 20% 活性 (Morrice *et al.*, 1983a)；當缺乏 100 mM NaCl、5 mM CaCl_2 的金屬離子下，會使 *Alteromonas agarlyticus* GJ1B 的 α -agarase 僅存1/2活性 (Potin *et al.*, 1993)。

8. 鈉離子的影響

不同鈉離子濃度 0-1000 mM 對 MAEF108-agarases 活性的影響其結果如圖十一所示，當添加鈉離子濃度越高時其活性隨著降低，分別為 100.00%、80.00%、93.35%、83.46%、87.21%、61.02%、63.83%、37.64%、及 31.23%，顯示Yen-agarases 在鈉離子含量越高的情況下活性越差，且有抑制的現象。

由於大多數產洋菜酶的菌株是海洋性細菌，Ha *et al.* (1997) 認為添加適量的氯化鈉可以增加洋菜酶活性。*Pseudomonas* sp. W7 的 β -agarase 在 0.9 M NaCl 下活性會增加，*Pseudomonas atlantica* 的 β -neoagarotetraose hydrolase、neoagarobiose hydrolase 分別在0.05- 0.20 M、0.10 M 鹽濃度下，洋菜酶活性會增加 (Ha *et al.*, 1997)；在 2 mM KCl、NaCl、EDTA(Ethylenediamine tetraacetic acid) 會使 *Alteromonas* sp. E-1 的 β -agarase 增加一些活性， CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnSO_4 、 CuCl_2 、 FeSO_4 、 ZnCl_2 、 HgCl_2 會抑制其活性， AgNO_3 抑制少部份活性 (Kirimura *et al.*, 1999)與本實驗不太符合，原因可能是本菌株不來自於海洋，以致於鹽類部會提高其活性反而會抑制其活性。

9. 其他金屬離子耐受度的影響

將金屬離子濃度以其在海水中的濃度為基準，再比較其濃度降低到 1/10 倍和提高到 10 倍的差異，將此不同濃度之金屬離子分別加入作用的基質中，測量其活性的變化以推測其對酵素為加強或是抑制效果，由於各金屬離子濃度差異大，故以 1 mM 的濃度下做為比較各金屬離子對洋菜酶的影響，其結果如表四，各離子對 Yen-agarases 都有不同程度的加強或是抑制效果，以同一濃度相比較，含 1 mM MnCl_2 及 ZnCl_2 有較佳增加活性的效果分別為 127.77% 及 111.01%，而高濃度 CoCl_2 會抑制其活性使活性減低為 61.67%。

添加其他金屬離子和化學藥劑會對微生物所產洋菜酶有不同的影響，0.005 M MgCl_2 會增加 *Pseudomonas atlantica* 的 β -agarase II 20% 活性 (Morrice *et al.*, 1983a)；0.1 mM 的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Al^{3+} 等離子會完全抑制 *Pseudomonas* sp. PT-5 agarase 活性 (Yamaura *et al.*, 1991)； Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cs^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等離子對 *P. vesicularis* MA103 的洋菜 agarase I 的活性具有不同程度的抑制作用，但 agarase I 需要有 5 mM 的 Ca^{2+} 存在時才具有活性(陳，2006)。

四、酵素動力學(K_m 、 V_{max})

取 Yen-agarase 分別以 high and low-melting-point agarose 為基質，與催化速率做成雙倒數圖(Lineweaver-Burk plot)，經回歸，由 Michalis-Menten 方程式分別求得以 high-melting-point agarose 為基質時， K_m 為 2.76 g/L， V_{max} 為 $68.03 \mu\text{mole min}^{-1}$ (圖十二)；以 low-melting-point agarose 為基質時， K_m 為 1.54 g/L， V_{max} 為 36.9

$\mu\text{ mole min}^{-1}$ (圖十三)，顯示 Yen-agarase 對 low-melting-point agarose 較 high-melting-point agarose 的基質親和力高。

五、洋菜酶之分解產物的探討

以薄層層析法 TLC 來分析 Yen- agarases 之水解產物(圖十四)。調整各洋菜酶酵素活性為 10 U / mL ，與 0.2% agarose 於 35°C 下，分別作用 0.5、1、2、5、24 小時之水解產物。洋菜酶處理後之多糖液使用毛細管點在 silica gel 60 上，然後進行展開，終止後拿起風乾。使用呈色劑呈色，再拿至 110°C 烘箱烘乾 10 分鐘。

洋菜酶水解洋菜糖之水解產物，皆是隨著作用時間延長，水解產物逐漸趨向較小的寡糖。從結果中發現，Yen-agarase 粗洋菜酶與 agarose 作用後，產生之水解產物主要為新洋菜二糖、新洋菜四糖和半乳糖，其他寡糖次之，由於洋菜酶具有基質特異性，因此不同洋菜酶水解洋菜之水解產物也不完全相同。目前所發現之洋菜酶依其洋菜酶之水解產物來區分。*Arthrobacter* sp. S-22 (Osumi *et al.*, 1998)、*Pseudomonas atlantica* (Groleau and Yaphe, 1977)、*Cytophaga flevensis* (van der Meulen and Harder, 1976)、*Vibrio* sp. AP-2 enzyme (Aoki *et al.*, 1990b)、*Vibrio* sp. AP-2 enzyme B (Aoki *et al.*, 1990a)、*Alteromonas* sp. E-1 (Kirimura *et al.*, 1999)之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為新洋菜雙糖。*Cytophaga flevensis* (van der Meulen and Harder, 1975)、*Vibrio* sp. PO-303 enzyme B (Araki *et al.*, 1998)、*Vibrio* sp. JT0107 (Sugano *et al.*, 1993a)之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為新洋菜四糖及新洋菜雙糖。*Pseudoalteromonas atlantica* N-1 (Vera *et al.*, 1998)、*Vibrio* sp. PO-303 enzyme A (Araki *et al.*, 1998) 之菌株洋菜酶水解洋菜

主要產物為新洋菜六糖及新洋菜四糖。*Alteromonas agarlyticus* GJ1B (Potin et al., 1993) 之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為 agarotetraose 及洋菜三糖(agarotriose)。*Bacillus cereus* ASK202 (Kim et al., 1999) 之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為新洋菜六糖、新洋菜四糖及新洋菜雙糖。*Vibrio* sp. JT0107 (Sugano et al., 1994) 之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為洋菜五糖(agaropentaose)、agarotriose、洋菜雙糖及 D -galactose。

Vibrio sp.PO-303 enzyme C (Araki et al., 1998) 之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為新洋菜八糖(neoagarooctaose) 及新洋菜十糖(neoagarodecaose)。*Cytophaga flevensis* (van der Meulen and Harder, 1975) 、 *Pseudomonas atlantica* (Day and Yaphe, 1975) 之菌株洋菜酶水解洋菜主要產物為 D -galactose 及 3,6-脫水-L型半乳糖(3,6-anhydro-L-galactose)。

由於Potin et al. (1993) 指出如果洋菜酶為切 α -form，並不會產生還原端，所以無法以測還原糖的方法測到活性，但如果含有 β -半乳糖苷酶，會將非還原端切掉，露出還原端使可以偵測到的還原糖量上升。本研究利用這個特點，在酵素中加入 β -半乳糖苷酶偵測到的還原糖量，如果有上升表示洋菜酶為切 α -form 的洋菜酶，如果沒有上升表示洋菜酶為切 β -form 的洋菜酶，結果發現可能含有大部份切 β -form 的洋菜酶。由此可以推測菌株 Yen 可能為 β -agarase。若要更精確知道水解產物及其分型，則需要利用其他儀器如 NMR、HPLC 分析才能確定產物為何，並利用產物判斷其為那種類型的洋菜酶作用模式。

陸、結論

1. 將濃縮透析後之 Yen-agarases 經 Sephadex G-100，比活性分別為 406.44 U/mg，純化倍數分別為 5.66 倍，回收率分別為 7.96 %。
2. Yen-agarases 以 high-melting-point agarose 為基質時活性最佳，且皆不能分解 ι -Carrageenan、 κ -Carrageenan，但是卻可以分解藻酸鈉。
3. Yen-agarase I 其最適作用 pH 值為 7.5-8.5 在偏鹼性環境下有最好之活性作用力，最適作用溫度為 35°C，以 high-melting-point agarose 為基質時， K_m 為 2.76 g/L， V_{max} 為 68.03 $\mu\text{mole min}^{-1}$ ；以 low-melting-point agarose 為基質時， K_m 為 1.54 g/L， V_{max} 為 36.9 $\mu\text{mole min}^{-1}$ ，顯示 Yen-agarase 對 low-melting-point agarose 較 high-melting-point agarose 的基質親和力高。
4. Yen-agarase 當添加鈣離子濃度越高時其活性隨著增加，當添加鈉離子濃度越高時其活性隨著降低，顯示其在鈉離子含量較高的情況下活性越差，有抑制的情形。
5. Agarose 經 Yen-agarases 分解後，主要為新洋菜四糖、新洋菜雙糖和半乳糖，次要為新洋菜寡糖類和 *Pseudomonas atlantica* ATCC 19292 β -agarase 標準菌株之機制所水解糖類類似。
6. 我們推論菌株 Yen 可能為 β -agarase。

柒、參考文獻

李承芳。2005。Alterococcus 洋菜酶之基因選殖與分析。私立東吳大學微生物系碩士論文。

陳姿元。2006。Aeromonas salmonicida MAEF108 菌株所產洋菜酶的純化與性質之探討。國立海洋大學食品科學系碩士論文。

楊惠春。2007。高活性洋菜分解酶基因質體之發現。國立台東大學生命科學所碩士論文。

顏嘉怡。2002。海洋嗜熱洋菜分解細菌與其洋菜酶之定性研究。私立東吳大學微生物系碩士論文。

蘇家彥。2005。Alterococcus agarolyticus S3PY 及 Cellvibrio sp. AG1W 之洋菜酶定性研究。私立東吳大學微生物系碩士論文。

徳永隆久、日高秀昌。1991。寒天才リグ糖の生産と利用。バイオサイエンスとインダストリ。49: 28-32。

Allouch, J., M. Jam., W. Helbert., T. Barbeyron., B. Kloareg., B.

Henrissat., M. Czjzek.(2003).The three-dimensional structures of two β -agarases. J. Biol. Chem. 278 : 47171–47180.

Aoki, T., T. Araki., and M. Kitamikado.(1990a). Purification and characterization of novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. Eur. J. Biochem.187 : 461-465.

- Aoki, T., T. Araki and M. Kitamikado.**(1990b). Isolation and identification of a porphyrin-degrading bacterium. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56 : 819-823.
- Aoki, T., T. Araki and M. Kitamikado.**(1990c).Purification and characterization of α -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(5) : 825-830.
- Araki, C.** (1956).Structure of the agarose constituent of agar-agar. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 29 : 543-544.63
- Araki, T., M. Hayakawa., Z. Lu., S. Karita., and T. Morishita.** (1998). Purification and characterization of agarase from marine bacterium, *Vibrio* sp. PO-303. *J. Mar. Biotechnol.* 6 : 260-265.
- Barbeyron, T., S. L'Haridon., E. Corre., B. Kloareg., and P. Potin.** (2001).*Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. Nov., a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) reichenbach 1989 ab *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. Nov. *Int. J. syst . Evol. Microbiol.* 51 : g85-97.
- Belas, R.** (1989). Sequence analysis of the *agrA* gene encoding β -agarase from *Pseudomonas atlantica*. *J Bacteriol.* 171 : 602-605.
- Belas, R., D. Barlent, and M. Silverman.** (1988). Cloning and gene replacement mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* agarase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 30-37.

- Bibb, M. J., G. H. Jones., R. Joseph., M. J. Buttner., and J. M. Ward.**
(1987).The agarase gene (*dag A*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) :
Affinity purification and characterization of the clone gene product. J.
Gen. Microbiol. 133 : 2089-2096.
- Bradford, M. M.**(1976).A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
binding. Biochemistry 72 : 248-254.
- Carlsson, J., and M. Malmqvist.**(1977).Effects of bacterial agarase on
agarose gel in cell culture. *In Vitro*. 13 : 417-422.
- Chen, L. C.-M., J. S. Craigie, and Z. K. Xie.** (1994). Protoplast production
from *Porphyra linearis* using a simplified agarase procedure capable of
commercial application. J. Appl. Phycol. 6 : 35-39.
- Chen, Y.-C., and Y.-M. Chiang.** (1994).Development of protoplasts from
Grateloupia sparsa and *G. filicina* (Halymeniaceae, Phodophyta) .
Botanica Marina. 37 : 361-366.
- Dong, J.,Y. Tamaru,T. Araki.**(2007).A unique β -agarase, AgaA, from a
marine bacterium,. *Vibrio* sp. Strain PO-303. Appl.Microbiol.
Biotechnol. 74 : 1248-1255.
- Day, D. F. and W. Yaphe.** (1975). Enzymatic hydrolysis of agar:
Purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and
p-nitrophenyl α -galactoside hydrolase. Can. J. Microbio.21 : 1512-1518.

Duckworth, M., and J. R. Turvey.(1969). An extracellular agarase from a *Cytophaga* species. Biochem. J. 113 : 139-142.

Duckworth, M., and W. Yaphe. (1971). The structure of agar : part I. Fraction of a complex mixture of polysaccharides. Carboglydr. Res. 16 : 189-197.

Doudoroff, M. and N. J. Palleroni.(1974). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. Addendum IV. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn, pp. 241–242. Edited by R. E. Buchanan & N. E. Gibbons. Baltimore : Williams & Wilkins.

Ekborg, N. A., Taylor, L. E., Longmire, A. G., Henrissat, B., Weiner, R. M., Hutcheson, S. W. (2006). Genomic and Proteomic Analyses of the Agarolytic System Expressed by *Saccharophagus degradans* 2-40. Appl. Environ. Microbiol. 72 : 3396-3405.

Fukasawa, S. and H. Kobayashi.(1987). Properties of agarase from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi*. Agriculture and Biological Chemistry. 51 : 269-270.

Gnirke, A., C. Huxley, K. Peterson, and M. V. Olson. (1993). Microinjection of intact 200-to-500-kb fragments of YAC DNA into mammalian cells. Genomics 15 : 659-667.

Gray, F., J. S. Kenney, and J. F. Dunne. (1995). Secretion capture and report web: Use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. J. Immunol. Methods 182 : 155-163.

Groleau, D. and W. Yaphe.(1977).Enzyme hydrolysis of agar: Purification and characterization of β -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. Can. J. Microbiol. 23 : 672-679.

Ha, J. C., G. T. Kim, S. K. Kim, T. K. Oh, J. H. Yu and I. S. Kong.
(1997). β -Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: Purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. Biotech. Appl. Biochem. 26 : 1-6.

Hassair, I., R. B. Amar., M. Nonus., and B. B. Gupta.(2001). Production and separation of α -agarase from *Altermonas agarlyticus* strain GJ1B.Bioresoutce Technology. 79 : 47-51.

Hosoda, A., M. Sakai, and S. Kanazawa. (2003). Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of Spinach. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 : 1048-1055.

Hosoda A, Sakai M.(2006).Isolation of *Asticcacaulis* sp. SA7, a novel agar-degrading alphaproteobacterium.Biosci Biotechnol. Biochem. 70 : 722-725.

Jinhua,D,H. Shinnosuke,K. Takafumi,T. Yutaka ,A.Toshiyoshi.(2006). Cloning of the Novel Gene Encoding β -agarase C from a Marine Bacterium,*Vibrio* sp.strain PO-303,and characterization of the gene product.Appl. Microbiol. Biotechnol.72 : 6399-6401.

Kang, N. Y., Y. L. Choi, Y. S. Cho, B. K. Kim, B. S. Jeon, J. Y. Cha, C. H. Kim, and Y. C. Lee. (2003). Cloning, expression and of a β -agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK.38. Biotechnol. Lett. 25 : 1165-1170.

Kobayashi, R., M. Takimasa, T. Suzuki, K. Kirimura, and S. Usami. (1997). Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61 : 162-163.

Kong, J. Y., Hwang, S. H., Kim, B. J., Bae, S. K., and Kim, J. D. (1997). Cloning and expression of an agarase gene from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. W7. Biotechnol. Lett., 19 : 23–26.

Kong, J. Y. (2001). Production and functional properties of agarooligosaccharides. Proceedings of Symposium on Scientific Study and Industrialization of Health Food, Health Food Society of Taiwan, Taipei. pp. 60-81.

Kim B J, Kim H J, Ha S D, Hwang S H, Byun D S, Lee T H, Kong J Y. (1999). Purification and characterization of beta-agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. Biotechnol Lett., 21 : 1011–1015.

Kirimura, K., N. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nakagawa, R. Kobayashi and S. Usami. (1999). Purification and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. J. of Biosci. Bioeng. 87 : 436-441.

Leon, O., L. Quintana., G. Peruzzo., and J. C. Slebe. (1992). Purification

and properties of extracellular agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 4060-4063.

Li, X., X. Dong, C. Zhao, Z. Chen, and F. Chen.(2003).Isolation and some properties of cellulose-degrading *Vibrio* sp. LX-3 with agar-liquefying ability from soil. World J. Microbiol. Biotechnol. 19 : 375-379.

Morrice, J. M., M. W. McLean, W. F. Long, and F. B. Williamson. (1983a).Porphyran primary structure: An investigation using β -agarase I from *Pseudomonas atlantica* and C-NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem.133 : 673-684.

Macián, M. C., W. Ludwig., K. H. Schleifer., M. J. Pujalte., and E. Garay.(2001). *Vibrio agarivorans* sp. Nov., a novel agarolytic marine bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 : 2031- 2036.

Malmqvist, M. (1978). Purification and characterization of two different agarose-degrading enzymes. Biochimica et Biophysica Acta. 537 : 31-43.

Meskiene, R.,V. Casaite ,L. Marcinkeviciene,I. Bachmatova , and R. Meskys . (2003).Cloning and analysis of agarase-encoding gene from *Paenibacillus* sp. Biologija (Vilnius) 1 : 55-57.

Morrice, L. M., M. W. McLean., Williamson, F. B., and Long, W. F. (1983a). β -Agaeases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties . Eur. J. Biochem. 135 : 553-558.

- Morrice, L. M., McLean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B.**
(1983b). β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Substrate specificities. Eur. J. Biochem. 137 : 149-154.
- Nikolaeva, E. V., A. I. Usov and A. H. Tambiev.** (1999). Study on the marine agarolytic bacterium-infusorium association. Marine Biology. 135 : 407-410.
- Noda, H., Amano, H., Arashima, H., Hashimoto, S. and Nisizawa, K.**
(1989). Antitumour activity of polysaccharide and lipids from marine algae. Nippon Suisan Kogyo Gakkaishi. 55 : 1265-1271.
- Noda, H.** (1993). Health benefits and nutritional properties of nori. J. Appl. Phycol.. 5 : 255-285.
- Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito, and K. Horikoshi.** (2004). Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 β -agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66 : 266-275.
- Ohta, Y., Y. Hatada., Y. Nogi., M. Miyazaki., Z. LI., M. Akita., Y. Hidaka., S. Goda., S. Ito., K. Horikoshi.** (2004). Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. Appl Microbiol Biotechnol. 64 : 505-514.
- Ohta, Y., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi.** (2004). Enzymatic properties and nucleotide and amino acid

sequence of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 : 1073-1081.

Osoegawa, K., P. Y. Woon, B. Zhao, E. Frengen, M. Tateno, J. J. Catanese, and P. J. de Jong.(1998). An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. Genomics 52 : 1-8.

Osumi, Y., M. Kawai., H. Amano., and H. Noda.(1998). Purification and structure of oligosaccharides from *porphyran* degraded by enzymes from *Arthrobacter* sp. S-22. Nippon Suisan Gakkaishi. 64 : 87-88.

Potier, M.-C., W. L. Kuo, A. Dutriaux, J. Gray, and M. Goedert. (1992). Construcion and characterization of a yeast artificial chromosome library containing 1.5 equivalents of human chromosome 21. Genomics 14 : 481-483.

Potin, P., Richard, C., Rochas, C., and Kloareg, B.(1993). Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarolyticus* (Cataldi) comb. Nov., strain GJ1B. Eur. J. Biochem. 214 : 599-607.

Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber, inuline, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33 : 103-148.

Shieh, W. Y., and W. D. Jean. (1998). *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a haloophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. Can. J. Microbiol. 44 : 637-645.

Solursh, M. (1991). Formation of cartilage tissue *in vitro*. J. Cell. Biochem. 45 : 258-260.

Stanier, R. Y. (1942). Agar-decomposing strains of the *actinomyces coelicolor* species-group . J. Bacteriol. 44 : 555-570.

Sugano Y, Terada I, Arita M, Noma M, Matsumoto T.(1993a). Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. Appl. Environ. Microbiol. ,59(5) : 1549–1554.

Sugano, Y., T. Matsumoto, H. Kodama and M. Noma. (1993b). Cloning and sequencing of *agaA*, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3750-3756.

Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazaki and M. Noma. (1994). Purification and characterization of a novel enzyme, (α -NAOS hydrolase) α -neoagarooligosaccharide hydrolase, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. J. Bacteriol . 176 : 6812-6818.

Sugano, Y., H. Nagae., K. Inagaki., T. Yamamoto., I. Terada., and Y. Yamazaki. (1995). Production and characteristic of some new β -agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107. J. of fermentation and bioengineering. 79 : 549-554.

Swartz, N. M., and N. Gordon. (1959). Agarase from an agar-digesting bacterium. J. Bacteriol. 77 : 403-409.

- Suzuki, H., Y. Sawai., T. Suzuki. and K. Kawai.** (2003). Purification and Characterization of an Extracellular β -Agarase from *Bacillus* sp. MK03. J. of Bioscience and bioengineering. 95 : 328-334.
- Vahouny G.V., Khalafi, R., Satchithanandam, S., Watkins, D.W.,Story, J.A., Cassidy, M.M., and Kritchevsky, D.** (1987). Dietary fiber supplementation and fecal bile acids, neutral steroids and divalent cation in rats. J. of Nutritional and Environmental Medicine, 117 : 2009-2015.
- Van der Meulen, H. J. and W. Harder.**(1975). Production and characterization of the agarase of *Cytophaga flevensis*. Antonie vanLeeuwenhoek 41 : 431-447.
- van der Meulen, H. J. and W. Harder.**(1976).Characterization of the neoagarotetrase and neoagarobiase of *Cytophaga flevensis*. Antonie van Leeuwenhoek. 42 : 81-94.
- Vera, J., R. Alvarez., E. Murano., J. C. Slebe., and O. Leon.**(1998). Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. Appl. Environ.Microbiol. 64 : 4378-4383.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns., D. A. Pelletier., and D. J. Lane.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol.173 : 697-703.
- Yamaura, I., Matsumoto, T., Funatsu, M., Shigeiri, H., and Shibata,**

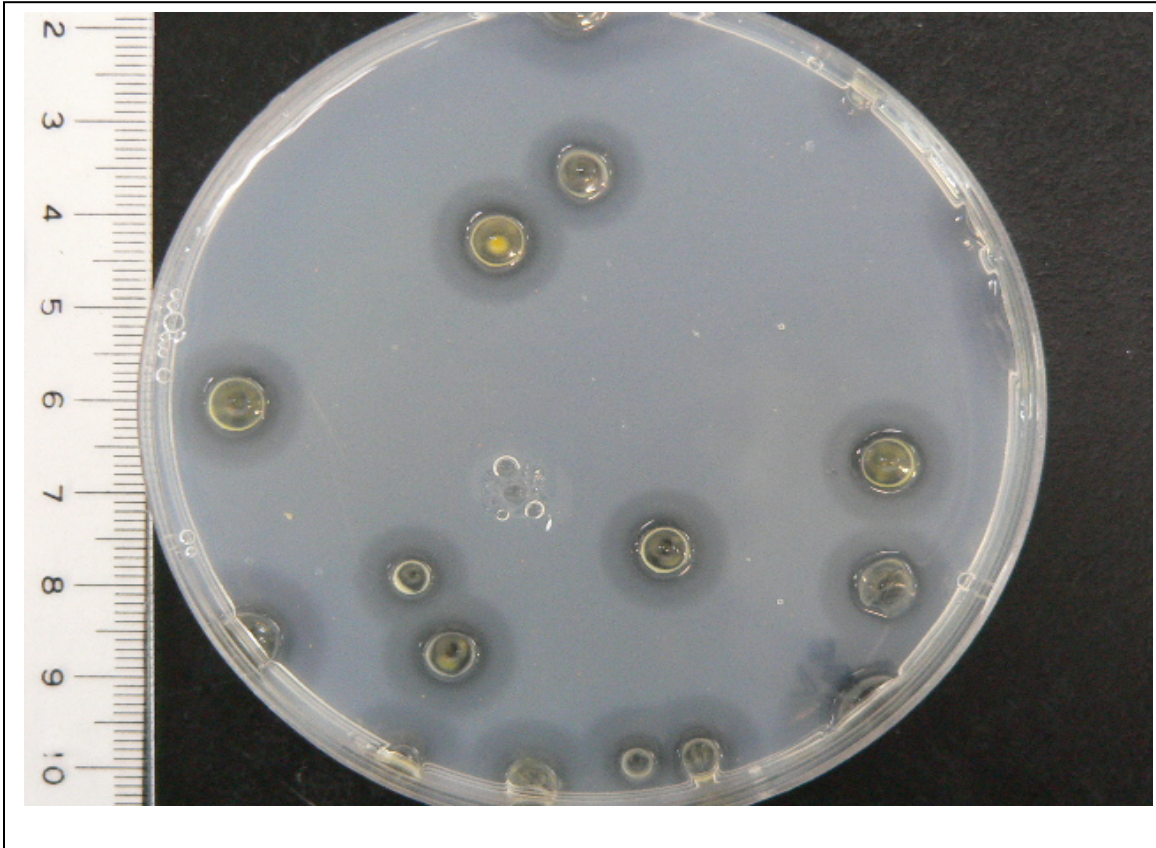
T.(1991). Purification and some properties of agarase from
Pseudomonas sp. PT-5. Agric. Biol. Chem. 55 : 2531-2536.

Yoshizawa, Y., J. Tsunehiro., , K. Nomura., M. Itoh., F. Fufui., A. Ametani. and S. Kaminogawa. (1995). Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction a marine alga(*Porphyra yezoensis*) :Structure-function relationships and improved solubility. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 59 : 1933-1937.

Yoshizawa, Y., J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui, A. Ametani, and S. Kaminogawa.(1996).In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 60 : 1667-1671.

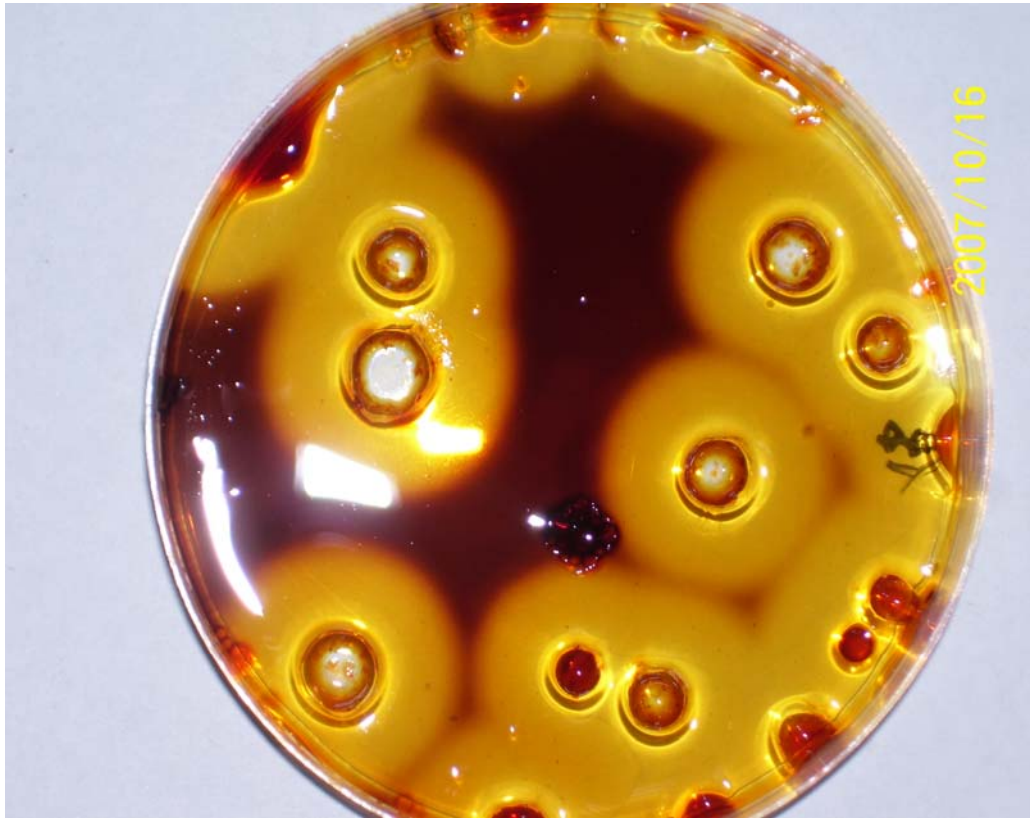
Young, K.S., S. S. Battacharjee, and W. Yaphe. (1978). Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. Carbohydr.Res. 66 : 207-212.

Zhong, Z., Toukdarian, A., Helinski, D., Knauf, V., Sykes, S., Wilkinson, J. E., O'Bryne, C., Shea, T., DeLoughery, C., Caspi, R. (2001).Sequence Analysis of a 101-Kilobase Plasmid Required for Agar Degradation by a *Microscilla* Isolate. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 5771-5779



圖一、Yen 在 C-10 固體培養基上，在室溫下培養2天之菌落形態

Fig. 1. Colony morphology of Yen, followed by incubation 2 days at RT in C-10 plate.



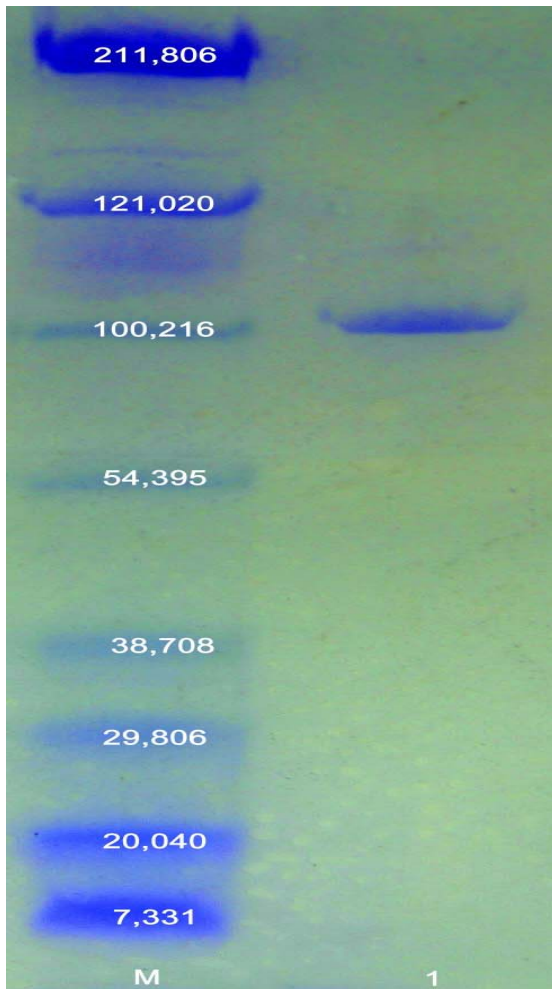
圖二、Yen 在 C-10 固體培養基上，在室溫下培養2天後，利用碘液來偵測洋菜酶活性

Fig. 2. Assay of agarase activity by iodine reagent, followed by incubation 2 days at RT in C-10 plate.

CTGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCCTTACACATGCAAGTCGAACG
GCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGA
ACGTGCCCAGTAGCGGGGGATAACTACGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCATAACGC
CCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTATTGGAGCGGCCGATAT
CGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGT
TTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGC
GTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTGTGTAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTC
GCGGGTTAATACCCCGCGGAAGTACGGTACCTGCAGAATAAGCACCGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG
GCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTA
ACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGAGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTGGAA
TTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGG
CAGCCTCCTGGGATAAACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCT
TCGGGCCTTGGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTAYCTACCCTTGACATGTCTGGAATT
CCGAAGAGATTTGGAAGTGCTCGCAAGAGAACCGGAACACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGTCATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACAC
GTCATACAATGGTCGGGACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCC
AGAAACCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTAGTTAGCCTAACCG
TAAGGGGGGCGATTACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG
TAGCCGTATCGGAAGGTGTGGCTGGATCA

圖三、Yen 之16S rDNA 序列定序結果(楊，2006)

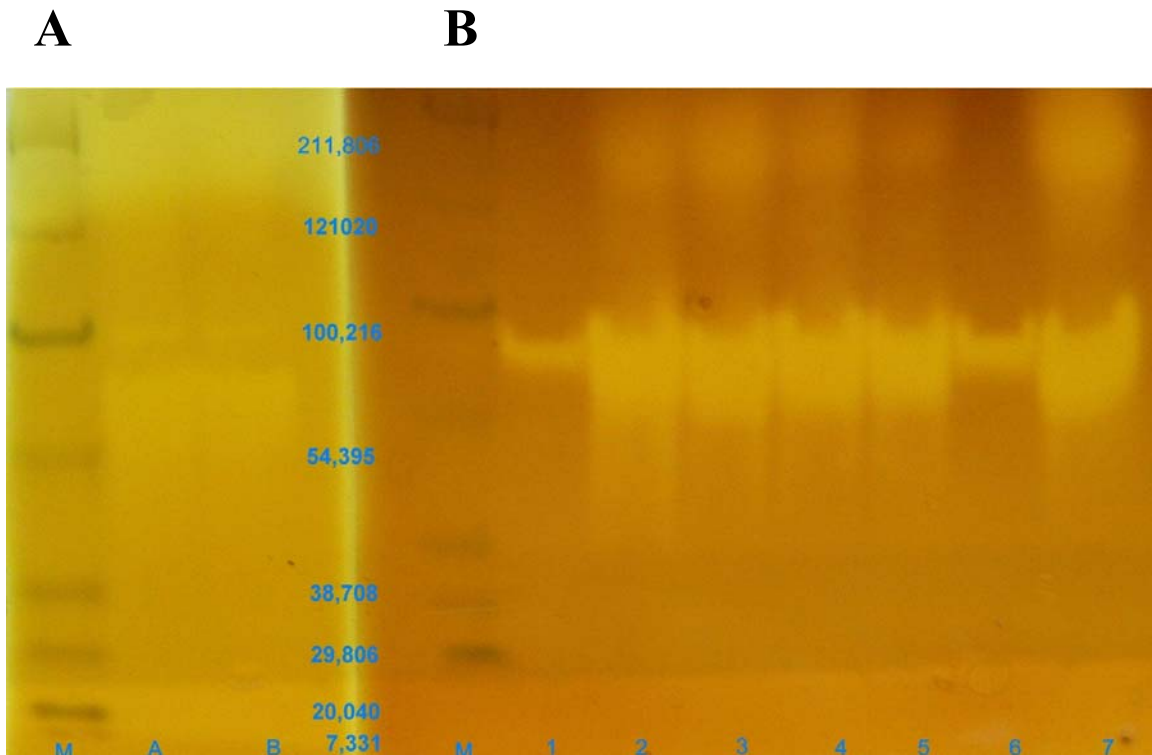
Fig. 3. 16S rDNA sequence of Yen



圖四、Yen 之洋菜酶 CBR 染色

Fig. 4. SDS-PAGE CBR staining of agarase fromYen.

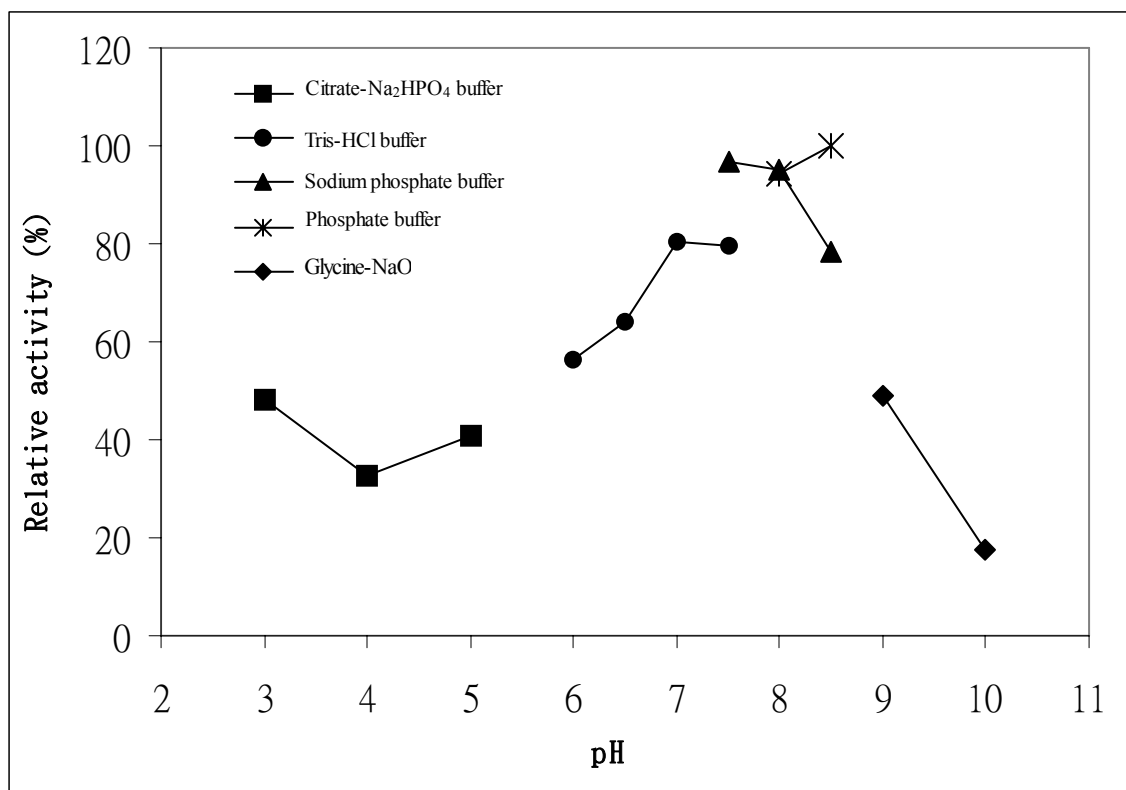
(Yen 之洋菜酶，每個 Lane 加 30 μ L 粗酵素液，以 120 V 電壓進行 4~20 % SDS-PAGE 電泳，以 Coomassie brilliant blue R-250 染劑染色 1 天，再以褪染液褪染 4 hr 並與蛋白質標準品(注入量為 10 μ L)比對，M:mark；Lane 1:Sephadex G-100 膠體管柱過濾純化)



圖五、Yen 之洋菜酶 Native-PAGE 活性染

Fig. 5. Native-PAGE activity staining of agarase fromYen.

(Yen 之粗洋菜酶，每個 Lane 加 30 μ L 粗酵素液，以 120 V 電壓進行 4~20 % SDS-PAGE 及 Native page電泳，電泳膠片以緩衝液洗過後，在膠片上倒上 5% soft agar，35 $^{\circ}$ C 反應3 小時後以碘液進行活性染。上圖為 SDS-PAGE CBR 染色；圖A，M: standards；Lane A、B:Sephadex G-100 膠體管柱過濾純化；圖B，M: standards；Lane 1~:0~20 %；Lane 1~:0~20 %；Lane 2~:20~40 %；Lane 3~:40~60 %；Lane 4~:60~80 %；Lane 5~:80~100 % 硫酸銨分
化；Lane 6、7:Sephadex G-100 膠體管柱過濾純化)



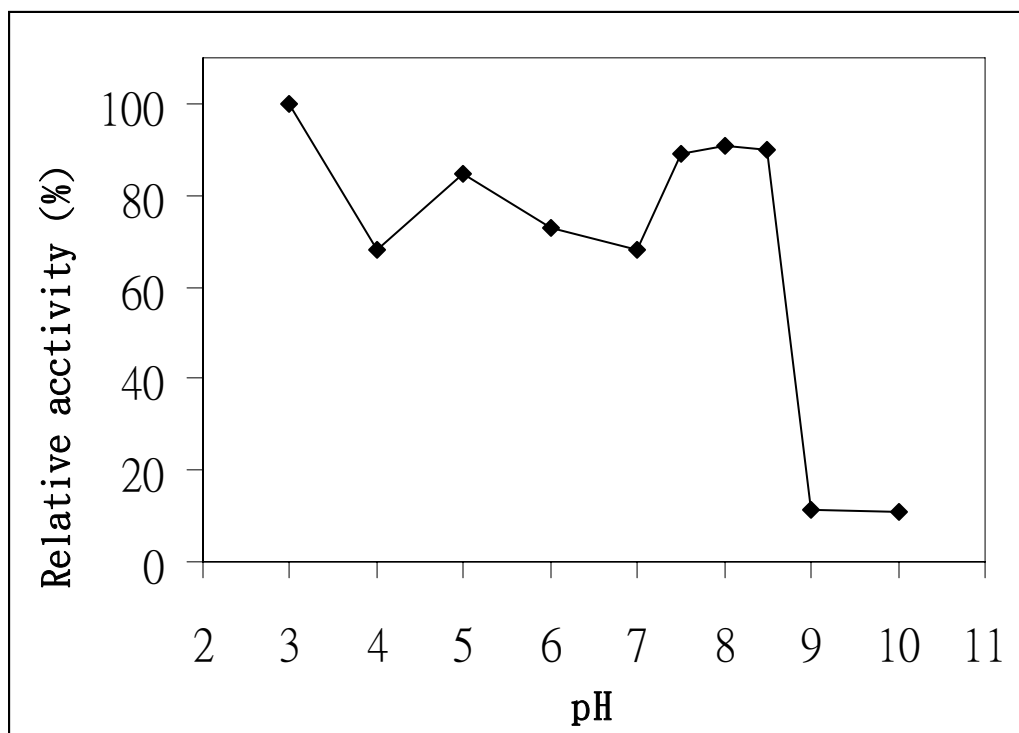
圖六、Yen-agarases 於不同緩衝液中的最適作用 pH 值。

Fig. 6. Optimum pH of Yen-agarases in various buffer solutions.

(分別取 5U/mL 之酵素加入含不同 pH 值緩衝溶液之基質中，50 mM citrate-Na₂HPO₄ buffer, pH 3.0-5.0; 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.0-7.5; 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7.5-8.5; 50 mM phosphate buffer, pH 8.0-8.5; 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 9.0-10.0，在35°C 反應下 30 min後，依據還原糖酵素活性測定之方法測還原糖變化量。)

Each point represents the average of three experiments.

Activity at zero time was taken as 100% activity.



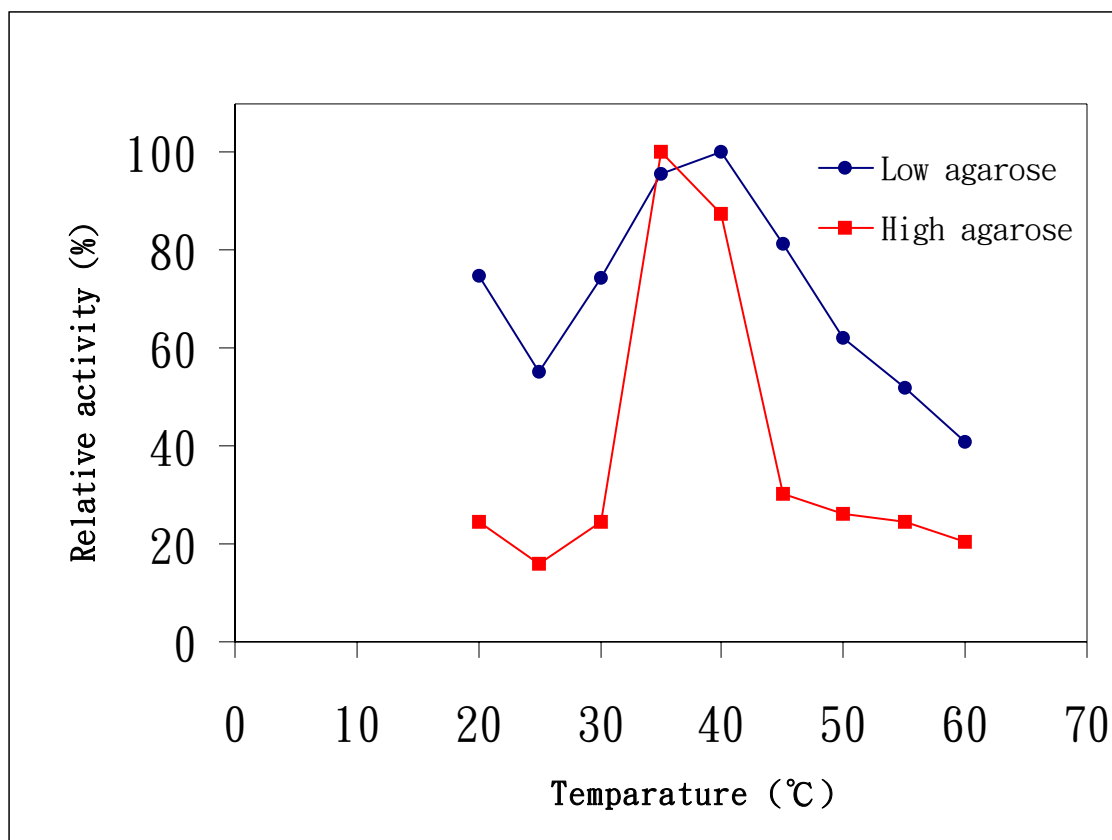
圖七、pH 值對 Yen-agarases 之安定性。

Fig. 7. Effect of pH on the stability of Yen-agarases.

(分別取 5U/mL 之各酵素與 50 mM 不同 pH 值 citrate- Na_2HPO_4 buffer, pH 3.0-5.0; Tris-HCl buffer, pH 6.0-7.5; Sodium phosphate buffer pH 7.5-8.0; phosphate buffer, pH 8.5; glycine-NaOH buffer, pH 9.0-10.0 溶液混合均勻，於 4°C 下儲存 24 hr 後，取各 pH 值的酵素液與 0.2% 基質在 35°C 反應下 30 min 後，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。)

Each point represents the average of three experiments.

Activity at zero time was taken as 100% activity.



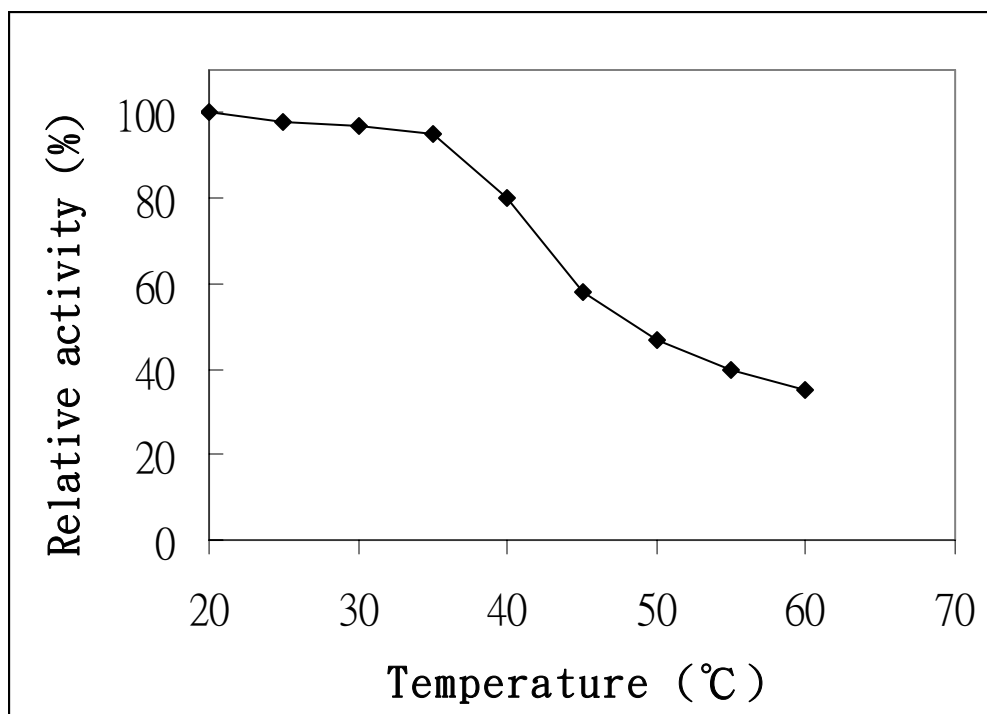
圖八、Yen-agarases 的最適反應溫度。

Fig. 8. Optimum temperature of Yen-agarases.

(將 0.2% 的 low-melting-point agarose 和 high-melting-point agarose，分別置於各反應溫度 20°C、25°C、30°C、37°C、45°C、50°C、55°C、60°C 中，再加入 5U/mL 酵素液混合均勻，反應 30 min 後，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。)

Each point represents the average of three experiments.

Activity at zero time was taken as 100% activity.



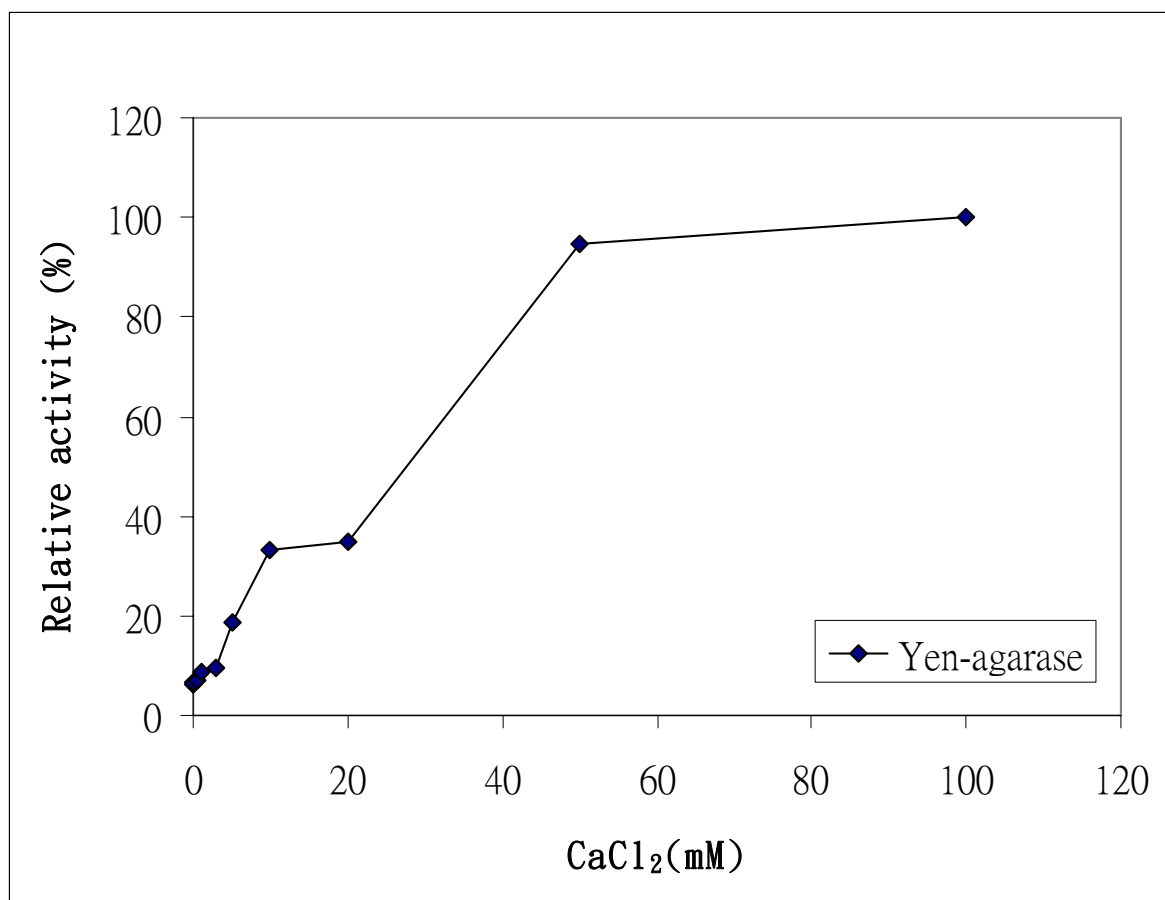
圖九、Yen-agarases 對溫度穩定性分析

Fig. 9. Thermostability of Yen-agarases.

(將 Yen-agarases 粗洋菜酶在不同溫度下處理 30min 之酵素殘存活性，把 Yen-agarases 粗洋菜酶濃度調整成約 5U/mL，在溫度 20、25、30、35、40、45、50、55、60°C 下處理 30 min，然後依還原糖酵素活性測定之方法測酵素殘存活性。)

Each point represents the average of three experiments.

Activity at zero time was taken as 100% activity.



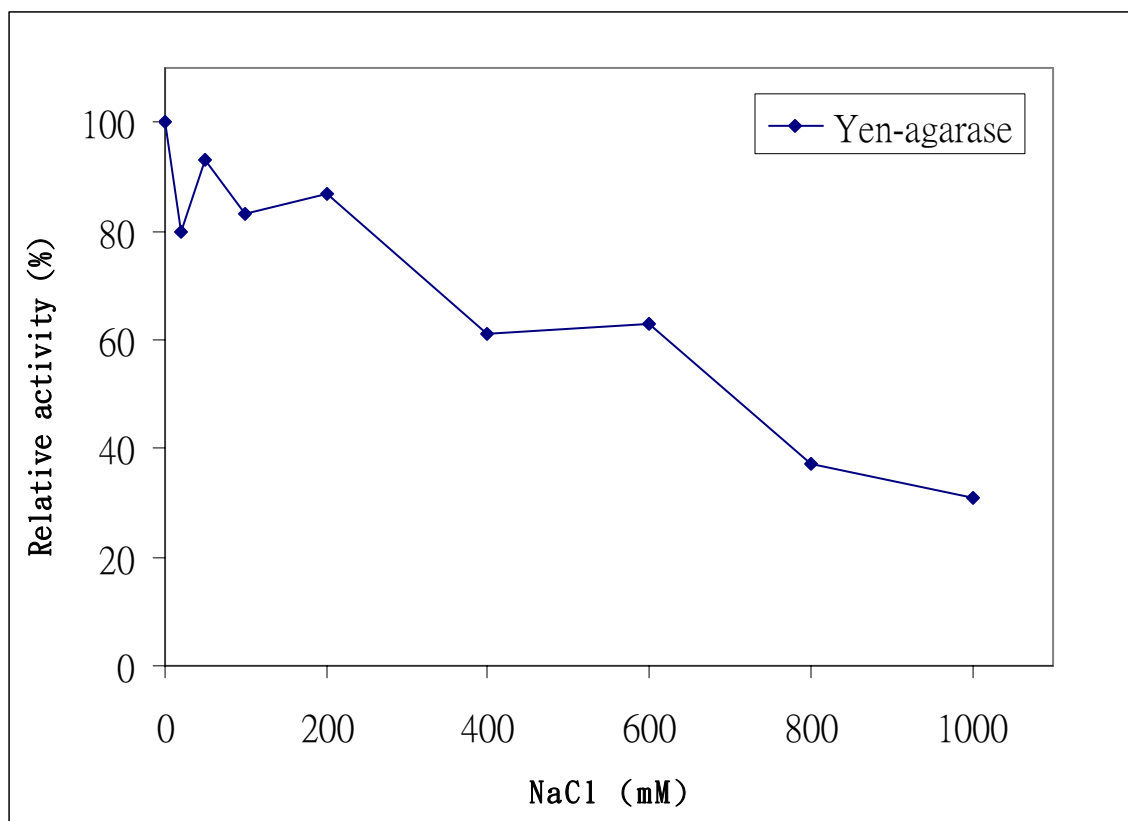
圖十、氯化鈣濃度對洋菜酶活性之影響。

Fig. 10. Effect of CaCl₂ concentration to Yen-agarases on their activities.

(不同鈣離子濃度0-100 mM分別加入 0.2% 基質中混合均勻後，加入各酵素 5U/mL 與基質在 35°C 反應下 30 min 後，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。)

Each point represents the average of three experiments.

Activity at zero time was taken as 100% activity.



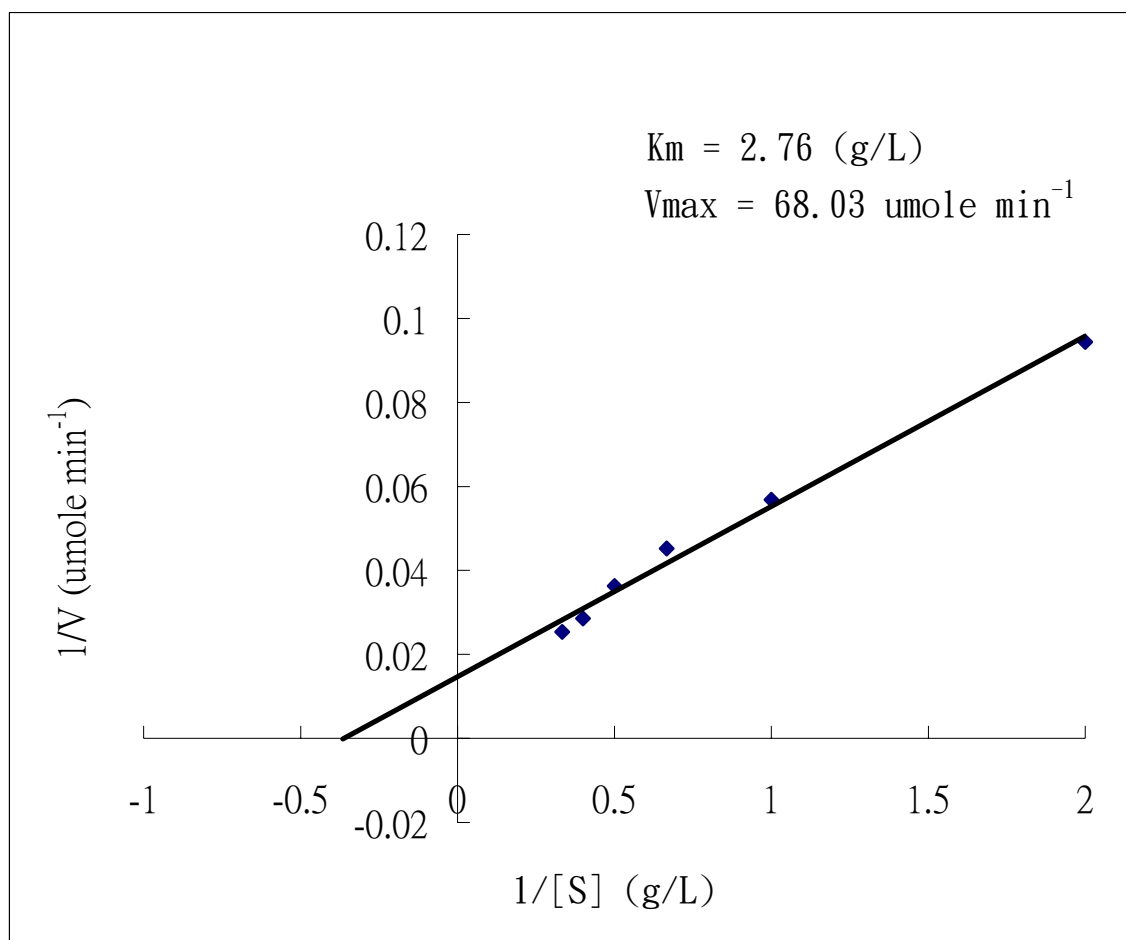
圖十一、 氯化鈉濃度對洋菜酶活性之影響。

Fig. 11. Effect of NaCl concentration on Yen-agarases on their activities.

(不同鈉離子濃度 0、20、50、100、200、400、600、800、1,000 mM 分別加入 0.2% 基質中混合均勻後，加入各酵素 5U/mL 在 35°C 反應下 30 min 後，依還原糖酵素活性測定之方法測酵素活性。)

Each point represents the average of three experiments.

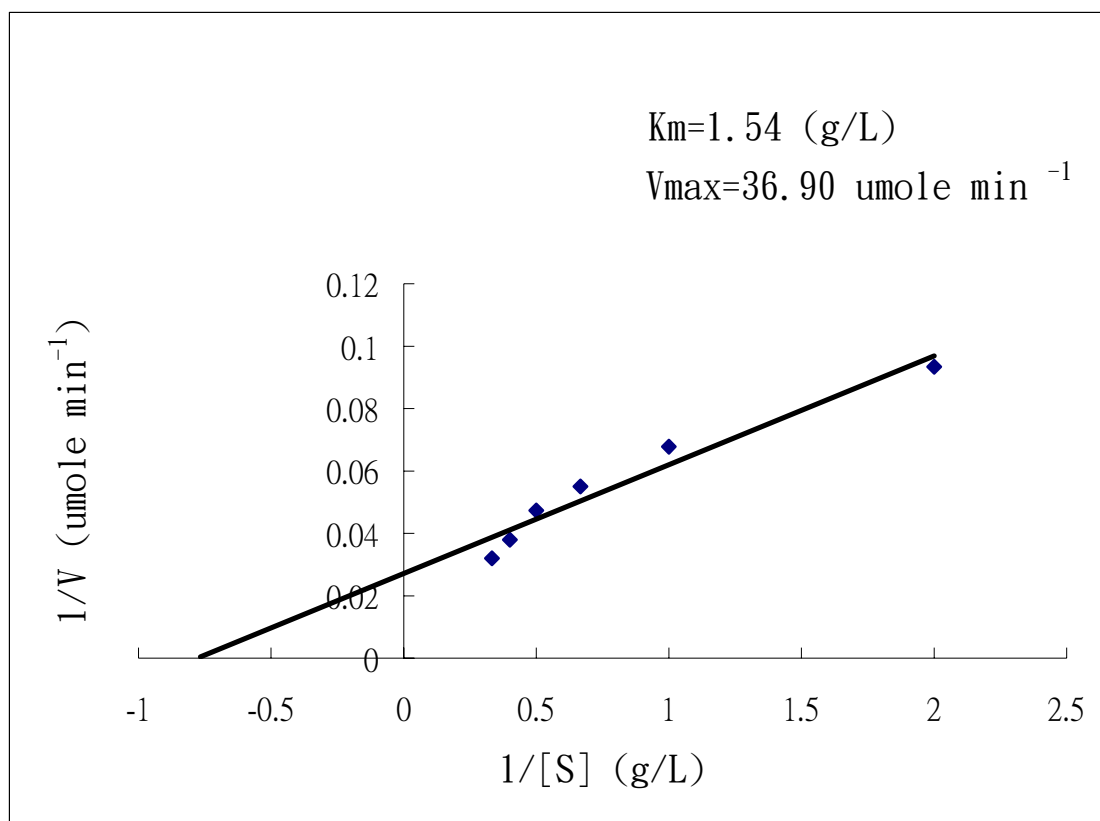
Activity at zero time was taken as 100% activity.



圖十二、Yen 洋菜酶與 high-melting-point agarose 作用之
Lineweaver-Burk 圖

Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of Yen- agarases using high-melting-point agarose as substrate.

(Yen- agarases 濃度調整成約 10 U/mL 。各洋菜酶分別在洋菜 (受質)濃度 0.5、1 、1.5、 2、 2.5 g/L 下反應30分鐘，然後依還原糖酵素活性測定之方法測還原糖產生量，以受質濃度及反應速率倒數作圖求 K_m 和 V_{max} 值。(單位為 g/L；速率(V) 單位為 $\mu\text{mole min}^{-1}$ 。)

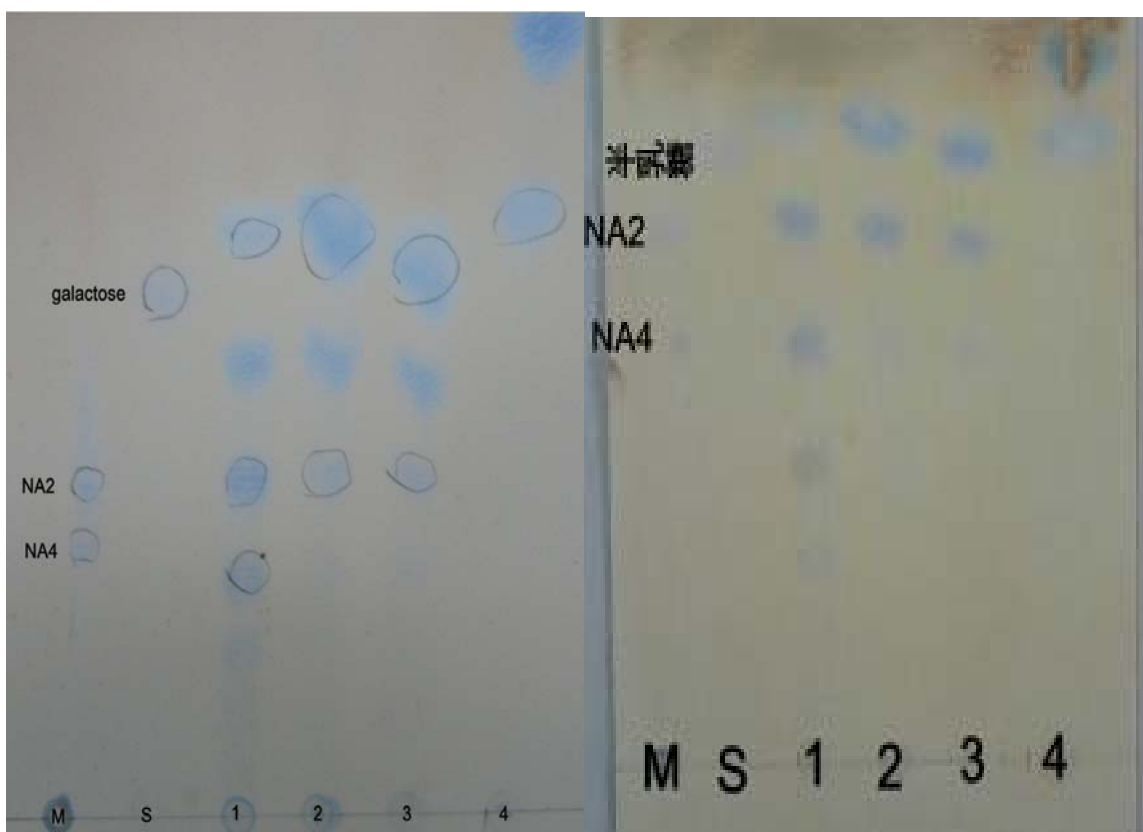


圖十三、Yen 洋菜酶與 low-melting-point agarose 作用之

Lineweaver-Burk 圖

Fig. 13. Lineweaver-Burk plot of Yen- agarases using low-melting-point agarose as substrate.

(Yen- agarases 濃度調整成約 10 U/mL 。各洋菜酶分別在洋菜 (受質)濃度 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 下反應30分鐘，然後依還原糖酵素活性測定之方法測還原糖產生量，以受質濃度及反應速率倒數作圖求 K_m 和 V_{max} 值。(單位為 g/L；速率(V) 單位為 $\mu\text{mole min}^{-1}$ 。)



圖十四、以 TLC 分析 Yen- agarases 水解洋菜糖之水解產物

Fig. 14. Thin layer chromatography of the products of agarose hydrolysis by Yen-agarases

(NA2 : neoagarobiose ; NA6 : neoagarohexaose ; G : galactose .

lane 2 ~ 5 為濃度 5U/mL 的 Yen-agarases 與 0.2 % agarose 於 35 °C 下 , 分別作用 0.5 、 1 、 5 、 24 小時之水解產物 。

M : mark ; S : galactose ; Lane 1 : 0.5 hr ; Lane 2 : 1 hr ; Lane 3 : 5 hr ; Lane 4 : 24 hr)

表一、*Alcaligenes* sp. strain Yen 生化特徵表

Table 1. Biochemical characterization of *Alcaligenes* sp. strain Yen.

Characteristic tested	Result	Characteristic tested	Result
Motility	m	Ornithine	-
Glucose	-	Tryptophan Deaminase	-
Sucrose	-	Esculin	-
Sorbitol	-	Voges-Proskauer	-
Raffinose	-	Citrate	+
Rhamnose	-	Malonate	+
Arabinose	-	o-Nitrophenyl-beta-D-Galactopyranoside	-
Inositol	-	Tartrate	+
Adonitol	-	Acetamide	+
Melibiose	-	Cetrimide	+
Oxidase	+	OF Glucose	-
Urea	-	Penicillin	S
Hydrogen Sulfide	-	Kanamycin	S
Indole	-	Colistin	R
Lysine	-	Nitrofurantoin	S
Arginine	-	Tobramycin	S
		Nitrate	+

Symbols: +,positive reaction ; -,negative reaction; m,motile; S:susceptible; R:resistible

表二、 Yen 洋菜酶之純化表

Table 2. Summary of the purification of Yen-agarases

Procedure	Volume (mL)	Total Protein (mg)	Total Activity (U/mL ¹)	Specific Activity (U /mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Supernatant	600	19.20	1377.12	71.73	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (0~80% saturation)	50	14.90	890.35	59.75	0.83	64.62
dialysis	20	4.78	752.05	157.33	2.19	54.61
0.45 μ m filtration	15	2.64	358.12	136.65	1.91	26.20
Sephadex G-100 gel filtration	5	0.27	109.74	406.44	5.66	7.96

¹: 1 unit (U)/mL = 1 μ mole D-galactose equivalent /min/mL.

表三、Yen-agarases 對九種多糖之基質特異性

Table 2. Substrate specificity of Yen-agarases against nine polysaccharides

Substrate	Yen-agarases
High-melting-point agarose	51.45 ¹
Low-melting-point agarose	42.60
Difco agar	30.72
Agar power	24.84
Agar A	32.68
PCH-D agar	24.78
Sodium alginate	9.28
ι -Carrageenan	--- ²
κ -Carrageenan	---

¹: μ mole D-galactose equivalent/min/mL.

²: Could not be determined.

表四、金屬離子對 Yen-agarases 耐受性之影響

Table 3. Effect of metal ions on the tolerance of Yen-agarases

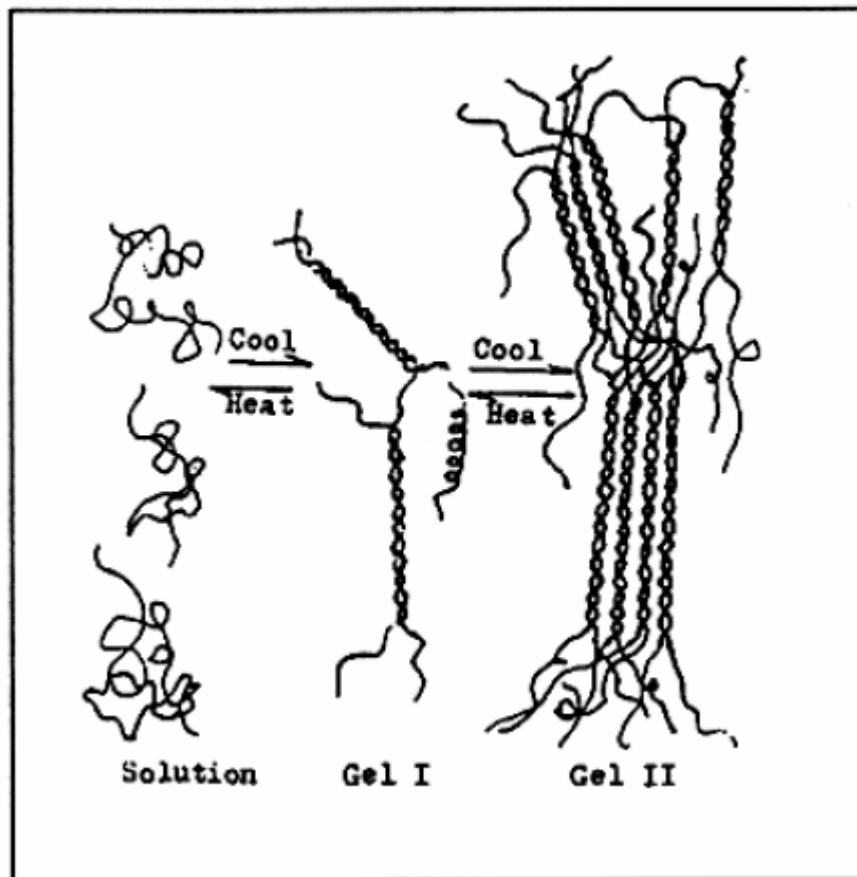
Metal ions	0.1 X¹	1 X	10 X	1 mM
None	100	100	100	100
KCl	120.24	101.02	82.43	127.72
MgCl₂	89.06	98.87	110.12	99.05
SrCl₂	106.37	106.73	105.88	102.97
MnCl₂	120.01	127.77	122.52	151.13
ZnCl₂	100.17	111.02	130.65	128.95
CoCl₂	110.46	112.86	85.83	61.67
CuCl₂	95.07	120.20	27.72	118.20
HgCl₂	100.20	110.20	112.45	96.06
FeCl₃	98.97	115.25	121.47	112.02

¹: X = KCl: 10.00 mM; MgCl₂: 4.90 mM; SrCl₂: 0.09 mM; MnCl₂:

1.60 mM; ZnCl₂: 0.45 mM; CuCl₂: 4.00 mM; HgCl₂: 6.00 pM; CoCl₂: 16.00 pM; FeCl₃: 1.30 mM.

The activity was measured using 10 U/mL of the enzyme to the 0.2% substrate which containing prior metal ions at 35°C for 30 min. Each point represents the average of three experiments.

Activity without added metal ions was taken as 100% activity.



附錄一、中性洋菜凝膠機制

Appendix 1. The gelling mechanism of agarose (李,2005)

附錄三、 Agarases 的生產微生物、種類及分離來源 (陳，2006)

Appendix 3. The list of agarase-producing microorganisms, agarases types and their isolation sources

Bacterium	Strain Number	Enzyme types	Isolation source	Reference
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Aga06, Aga08, MAEF108	Agarase ¹	marine environments	吳，1999
<i>Alterococcus agarolyticus</i>	ADT1 - 5	agarase	hot spring	Shieh and Jean, 1998
<i>Alteromonas agarlyticus</i>	GJ1B	α -agarase	marine environments	Potin <i>et al.</i> , 1993; Hassairi <i>et al.</i> , 2001
<i>Alteromonas</i> sp.	E-1	β -agarase	soil	Kirimura <i>et al.</i> , 1999
<i>Alteromonas</i> sp.	BR6/3	agarase	soil	Shome <i>et al.</i> , 2000
<i>Alteromonas</i> sp.	C-1	β -agarase	marine environments	Leon <i>et al.</i> , 1992
<i>Arthrobacter</i> sp.	S-22	agarase	seaweed	Osumi <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus cereus</i>	ASK202	β -agarase	marine environments	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus</i> sp.	MK03	α -NAOS hydrolase	soil	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus</i> sp.	MK03	β -agarase	soil	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
<i>Cytophaga</i>	NCMB1327	β -agarase	marine environments	Duckworth and Turvey, 1969
<i>Cytophaga diffluens</i>		agarase	seaweed	Nikolaeva <i>et al.</i> , 1999
<i>Cytophaga flevensis</i>		β -agarase	freshwater lakes	van der Meulen and Harder, 1975
<i>Cytophaga flevensis</i>		NABase NATase	freshwater lakes	van der Meulen and Harder, 1976
<i>Microbulbifer degradans</i>	2-40	α -agarase, β -agarase	seaweed	Whitehead <i>et al.</i> , 2001
<i>Microscilla</i> sp.	PRE1	agarase	marine sediment	Zhong <i>et al.</i> , 2001; Ensor <i>et al.</i> , 1999
<i>Microscilla</i> sp.	SB1-4	agarase	marine sediment	Naganuma <i>et al.</i> , 1993
<i>Paenibacillus</i>		agarase	soil	Hosoda <i>et al.</i> , 2003

Appendix 3. (Continued)

<i>Pasteurella pneumotropica</i>	SCC21	agarase	marine environments	吳 , 1999
<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	N-1	β -agarase	marine environments	Vera <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	KMM157, 188, 280, 327	agarase	mussels	Ivanova <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudoalteromonas gracilis</i>	B9	β -agarase	seaweed	Schroeder <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas atlantica</i>		β -NAT hydrolase	marine environments	Groleau and Yaphe, 1977
<i>Pseudomonas atlantica</i>		β -agarase	marine environments	Morrice <i>et al.</i> , 1983a
<i>Pseudomonas atlantica</i>		NAB Hydrolase	marine environments	Day and Yaphe, 1975
<i>Pseudomonas kytensis</i>		β -agarase	seaweed	Araki and Arai, 1954
<i>Pseudomonas</i> sp.		β -agarase	wastewater laboratories	Malmqvist, 1978
<i>Pseudomonas</i> sp.	PT-5	agarase	seaweed	Yamaura <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas</i> sp.	SK38	β -agarase	seaweed	Kang <i>et al.</i> , 2003; Ryu, <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas</i> sp.	W7	β -agarase	marine environments	Ha <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	B05, B10, MA103, MAEF103, YBC12	agarase	marine environments	吳 , 1999
<i>Shewanella japonica</i> sp. nov.	KMM3299, KM3300	agarase	sea water	Ivanova <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i>	A3(2)	β -agarase	marine environments	Hodgson and Chater, 1981
<i>Streptomyces coelicolor</i>	NB3443	agarase	marine environments	Stanier, 1942

Appendix 3. (Continued)

<i>Streptomyces toxytricini</i>	KS3-5	agarase	marine environments	Wu and Chen, 1995
<i>Vibrio agarliquefaciens</i>		β -agarase	seaweed	Ishimatsu, 1953
<i>Vibrio harvryi</i>	FLB-17	agarase	marine environments	Fukasawa and Kobayashi, 1987
<i>Vibrio</i> sp.	AP-2	β -agarase	marine environments	Aoki <i>et al.</i> , 1990a, b
<i>Vibrio</i> sp.	LX-3	agarase	soil	Li <i>et al.</i> , 2003
<i>Vibrio</i> sp.	PO-303	agarase	marine environments	Araki <i>et al.</i> , 1998
<i>Vibrio</i> sp.	JT0107	α -NAOS hydrolase	seaweed	Sugano <i>et al.</i> , 1994
<i>Vibrio</i> sp.	JT0107	β -agarase	seaweed	Sugano <i>et al.</i> , 1993a
<i>Zobellia galactanivorans</i> Dsij		β -agarase		Allouch <i>et al.</i> , 2003

1: Agarase: means still not purification and characterization; NABase: neoagaro-biase; NAB hydrolase: neoagaro-biose hydrolase; NATase: neoagaro-tetraase; β -NAT hydrolase: β -neoagaro-tetraose hydrolase; α -NAOS hydrolase: α -neoagaroooligosaccharide hydrolase.

附錄四、微生物所產洋菜酶分解洋菜之產物 (陳，2006)

Appendix 4. The oligosaccharides derived from various substrates by the degradation of microbial agarases

Bacterium	Enzyme	Substances	Products	Reference
<i>Arthrobacter</i> sp. S-22	Agarase ¹	Neo-agarotetraose	neoagarobiose	Osumi <i>et al.</i> , 1997
<i>Alteromonas Agarlyticus</i> (GJ1B)	α -agarase	Agarooligo-saccharides	agarotetraose or agarotriose	Potin <i>et al.</i> , 1993
<i>Alteromonas</i> sp. E-1	β -agarase	agarose and neoagarooligo-saccharides	neoagarobiose	Kirimura <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus cereus</i> ASK202	β -agarase	agarose	neoagarohexaose, neoagarotetraose and neoagarobiose	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus</i> sp. MK03	α -NAOS hydrolase	Neo-agarohexaose	agaropentaose and D-galactose	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
		Neo-agarotetraose	agarotriose and D-galactose	
		neoagarobiose	D-galactose and 3,6-anhydro-Lgalactose	
<i>Bacillus</i> sp. MK03	β -agarase	agarose	neoagarohexaose, neoagarotetraose and neoagarobiose	Suzuki <i>et al.</i> , 2003
		Neo-agarohexaose	neoagarotetraose and neoagarobiose	
<i>Cytophaga flevensis</i>	β -agarase	agarose	neoagarotetraose and neoagarobiose	van der Meulen and Harder, 1975
<i>Cytophaga flevensis</i>	NAB	Neo-agarotetraose	neoagarobiose	van der Meulen and Harder, 1976
<i>Cytophaga flevensis</i>	NAT	neoagarobiose	D-galactose and 3,6-anhydro-Lgalactose	van der Meulen and Harder, 1976
<i>P. Antarctica</i> strain N-1	β -agarase	agar	Neoagarohexaose, neoagarotetraose	Vera <i>et al.</i> , 1998

Appendix 4. (Continued)

<i>Pseudomonas atlantica</i>	NAB hydrolase	neoagarobiose	D-galactose and 3,6-anhydro-Lgalactose	Day and Yaphe, 1975
<i>Pseudomonas atlantica</i>	β -NAT hydrolase	neoagarotetraose, neoagarohexaose, neoagaroctaose	neoagarobiose	Groleau and Yaphe, 1977
<i>Pseudomonas atlantica</i>	β -agarase I	neoagarohexaose	neoagarotetraose, neoagarobiose	Morrice <i>et al.</i> , 1983c
		neoagarotetraose	neoagarobiose	
	β -agarase II	neoagarohexaose, neoagarotetraose	neoagarobiose	
<i>Pseudomonas</i> sp.	β -agarase I	neoagaroctaose	neoagarotetraose	Malmqvist, 1978
		neoagarotetraose	neoagarobiose	
	β -agarase Ib	neoagaroctaose	neoagarotetraose	
<i>Vibrio</i> sp. AP-2	β -agarase	neoagarooligosaccharides and neoagarotetraose	neoagarobiose	Aoki <i>et al.</i> , 1990a
<i>Vibrio</i> sp. AP-2	β -agarase-a	Neoagaro-oligosaccharides	neoagarotetraose	Aoki <i>et al.</i> , 1990b
	β -agarase-b	Neoagaro-oligosaccharides	neoagarobiose	
	β -agarase-c	Neoagaro-oligosaccharides	neoagarotetraose	
<i>Vibrio</i> sp. PO-303	agarase-a	agarose	neoagarohexaose and neoagarotetraose	Araki <i>et al.</i> , 1998b
	agarase-b		neoagarotetraose and neoagarobiose	
	agarase-c		neoagaroctaose and neoagarodecaose	

Appendix 4. (Continued)

<i>Vibrio</i> sp. strain JT0107	β -agarase	agarose	neoagarotetraose and neoagarobiose	Sugano <i>et al.</i> , 1993a
<i>Vibrio</i> sp. strain JT0107	α -NAOS hydrolase	Agaro- oligosaccharides	agaropentaose, agarotriose, agarobiose and D-galactose	Sugano <i>et al.</i> , 1994

¹: Refer to Appendix 2.



附錄五、 洋菜酶的生化特性 (陳，2006)

Appendix 5. The biochemical properties of agarases

Enzyme types	Bacterium	Molecular weight		Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Reference
Agarase ¹	<i>Arthrobacter</i> sp. S-22	I	28 kDa	6.0	60	Osumi <i>et al.</i> , 1997
		II	42 kDa	5.0	50	
	<i>Cytophaga diffluens</i>		---	7.2	28	Nikolaeva <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pseudomonas vesicularis</i> MA103		42.7 kDa	6.0 - 6.2	26	梁，1999
	<i>Vibrio harvryi</i> FLB-17		50 kDa	6.0	40	Fukasawa and Kobayashi, 1987
α -agarase	<i>Alteromonas agarlyticus</i> GJ1B		360 kDa	7.2	45	Potin <i>et al.</i> , 1993
α -NAOS hydrolase	<i>Bacillus</i> sp. MK03		320 kDa	6.1	30	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
	<i>Vibrio</i> sp. strain JT0107		84 kDa	7.7	30	Suzuki <i>et al.</i> , 1994
β -agarase	<i>Alteromonas</i> sp. E-1		82 kDa	7.5	40	Kirimura <i>et al.</i> , 1999
	<i>Alteromonas</i> sp. strain C-1		52 kDa	6.5	40	Leon <i>et al.</i> , 1992
	<i>Bacillus cereus</i> ASK202		90 kDa	7.0	40	Kim <i>et al.</i> , 1999
	<i>Bacillus</i> sp. MK03		92 kDa	7.6	40	Suzuki <i>et al.</i> , 2003

Appendix 5. (Continued)

β -agarase	<i>Cytophaga</i> NCMB 1327		---	7.2	---	Duckworth and Turvey, 1969
	<i>Pseudo- alteromonas antarctica</i>		33 kDa	7.0	30	Vera <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pseudomonas atlantica</i>		31 kDa	7.0	40	Morrice <i>et al.</i> , 1983a
	<i>Pseudomonas kytoensis</i>		---	5.0	40	Araki and Arai, 1954
	<i>Pseudomonas</i> sp. PT-5	Iib	63 kDa	6.7	43	Yamaura <i>et al.</i> , 1991
	<i>Pseudomonas</i> sp. PT-5		31 kDa	6.5	30	Yamaura <i>et al.</i> , 1991
	<i>Pseudomonas</i> sp. W7		59 kDa	7.8	20-40	Ha <i>et al.</i> , 1997
	<i>Vibrio</i> sp. AP-2	a	34 kDa	6.5	45	Aoki <i>et al.</i> , 1990a
		b	20 kDa	5.5	45	
		c	18 kDa	7.0	45	
	<i>Vibrio</i> sp. AP-2		20 kDa	5.5	45	Aoki <i>et al.</i> , 1990b
	<i>Vibrio</i> sp. strain JT0107		107 kDa	8.0	30	Sugano <i>et al.</i> , 1993a
	<i>Vibrio</i> sp. PO-303	a	87.5 kDa	6.0	45	Araki <i>et al.</i> , 1998b
		b	115 kDa	6.5	55	
		c	57 kDa	8.0	38	
NABase	<i>Cytophaga flevensis</i>		---	6.7	25	van der Meulen and Harder, 1976
NAB hydrolase	<i>Pseudomonas atlantica</i>		10 kDa	8.0	---	Day and Yaphe, 1975
NATase	<i>Cytophaga flevensis</i>		---	7.0	25	van der Meulen and Harder, 1976
β -NAT hydrolase	<i>Pseudomonas atlantica</i>		---	8.0	---	Groleau and Yaphe, 1977

¹: Refer to Appendix 2.

附錄六、海水中各離子基準濃度表(陳，2006)

Metal Ion Type	Conc.	Metal Ion Type	Conc.
K^+	10 mM	Cs^+	64 μ M
Mg^{2+}	4.9 mM	Sr^{2+}	0.09 mM
Mn^{2+}	1.6 mM	Zn^{2+}	0.45 mM
Cu^{2+}	4 mM	Hg^{2+}	6 pM
Co^{2+}	16 pM	Fe^{3+}	1.30 mM

