

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

建構及保存長期水旱田不同施肥處理之土壤基因庫與碳氮磷功能性基因表現之研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2313-B-157 -003 -MY3

執行期間：104 年 8 月 1 日至 105 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中華科技大學生物科技系

計畫主持人：陳煜沛

計畫參與人員：吳岱穎、李珮琪、廖麗玲

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 \_\_\_\_ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 105 年 8 月 5 日

## 中文摘要

全世界酵素需求預估到 2017 年將達到 69 億美元，前三大需求及價值最高之酵素為蛋白酶 (proteases)、糖分解酵素 (carbohydrases) 及脂肪水解酵素 (Lipase)，本研究為強化酵素開發利用，期望篩選出高產量、高活性、高效率及高穩定性的酵素催化活性，能應用於工業上，並取代傳統污染性高的化學方法，因此自台中縣霧峰鄉農業試驗研究所 35 號試驗田採取長期施用有機肥之水稻根圈土壤，利用次世代定序技術 (Next Generation Sequencing, NGS) 分析環境總基因體序列 (Metagenome)，DNA 共分析 502,243,422 條序列，平均讀長 127 個鹼基，全序列約達 63.7Gb，經刪除部分接子或判讀有問題的序列後，最後有效序列為 467,184,214 條，平均讀長 119 個鹼基，總序列長約為 55.6 Gb。Gene Ontology 資料庫進行基因功能性之歸類分析，其中分子功能 (Molecular function) 中催化活性相關基因 (Catalytic activity) 佔所有分類中比例最高，顯示分析環境基因體具有相當之價值性。將組裝的 Contig 序列以 MetaGeneMark 預測開放讀序框架 (open reading frame)，分析單一組裝序列超過 250 個胺基酸之基因約有 14,577 條，進一步針對脂肪水解酵素基因 (lipase) 及尿素水解酵素基因 (urease) 進行探討，結果顯示脂肪水解酵素基因有 10 條基因可被鑑別，其與目前 NCBI 資料庫比對發現相似度最低只有 43.71%，最高與 *Pseudomonas* sp. GM30 的 lipase 達 83.7% 相似，尿素水解基因只有一條新穎性基因被發現，其與 *Arthrobacter* sp. 35W 的 urease 只有 57.68% 的相似度。因此，本研究進一步利用全基因合成技術針對兩個低相似度的 lipase 及一個 urease 新穎性基因進行合成，同時亦根據大腸桿菌的 codon usage 設計出相對應優化後的基因，全部共六條基因選殖至大腸桿菌表現載體 (lipase: L900, L900-opt, L3594, L3594-opt。urease: U4802, U4802-opt)，於大腸桿菌中進行蛋白質表現，結果顯示此六條新穎性基因皆有活性反應，脂肪分解酵素皆隨著受質碳鏈越長，活性表現越差，最適溫度及酸鹼值分別為 30°C 及 pH7，對於有機溶劑皆有相當程度的耐受性，尿素水解酵素之最適活性溫度同樣為 30°C，由於尿素水解酶為金屬酶，當加入鎂、錳及鎳時，其對溫度的耐受性皆有明顯的增加。藉由此方法，本研究了解藉由此環境基因體技術所篩選出之基因特徵表現，所獲得新穎性基因及酵素，將可做為工業上之應用。

關鍵字: 脂肪水解酵素、次世代定序技術、環境總基因體、尿素水解酵素

## 英文摘要

The world enzyme demand forecast that has been increasing to \$6.9 billion by 2017. The top three enzymes for demand are proteases, carbohydrases and lipase. The present study is to strengthen the development of enzymes for obtaining enzymes with high yield, catalytic activity, stability and efficiency. They can be applied to high-polluting industries to replace traditional chemical methods. Therefore, the paddy rhizosphere soil with long-term application of organic fertilizer was harvested from Taiwan Agricultural Research Institute Council of Agriculture in Taichung. The metagenome was analyzed for 502,243,422 reads, an average read length of 127 bp and approximately 63.7 Gb by Next Generation Sequencing, NGS. After deleting the adapter, DNA sequences were carried out with 467,184,214 reads, an average read length of 119 bp, and approximately 55.6 Gb. Gene Ontology database for gene functional analysis indicated that the molecular function in the catalytic activity was accounted for the highest percentage, showing a considerable value in metagenomic analysis. The open reading frames of assembled contig sequence were predicted by MetaGeneMark. The results suggested that the ORFs with over 250 amino acids were about 14,577 genes. There are 10 genes involved in lipase that can be identified. The similarity to the known gene of NCBI database was as low as 43.71%. The highest similarity was 83.7% with *Pseudomonas* sp. GM30. Only one gene was identified to be urea hydrolase. The whole gene synthesis technology will be performed for novel gene synthesis with lipase and urease (lipase: L900, L900-opt, L3594, L3594-opt and urease: U4802, U4802-opt) which then will be cloned into *E. coli* for protein expression. The results indicated that the novel lipases were preferred to short chain lipid and the optimal activity was 30°C and pH7. Moreover, the lipases were tolerant of organic solvents with methanol and ethanol. In addition, the optimal activity of urease was 30°C. Because the urease is metalloenzyme, the thermostability of urease was significantly increased with the addition of magnesium, manganese and nickel. Using the process for exploration of novel genes from metagenome, it is expected to obtain the enzymes of high yield, high activity and high stability for industrial applications.

Keywords: Lipase, Next Generation Sequencing, Metagenome, Urease

## 前言

全球建立各種不同的長期生態研究站包含有農業、海洋、森林、淡水域、陸域及都市等不同的生態系統，進行各種生態環境的研究。農業生態系專注於長期監測現行農耕制度下與生態系統間的交互作用，其中以英國 Rothamsted 試驗農場監測時期長達有 170 年之久(Jones et al., 1989; Parry and Hawkesford, 2012)，此試驗農場長期分析土壤理化性質並定期收藏土壤樣品，以了解人類農耕制度對土壤生態的長期影響。基於農業生態永續發展的觀念，台灣也建立多個長期農業試驗田(劉等，2002; 譚和陳，2011)，主要研究項目包含長期施用有機肥料、化學肥料及耕作制度的探討，如連作及輪作制度。藉由長期試驗田的建立，有助於探討我國本土耕作制度、土壤肥力及土壤生態之間的關係，可提供未來農業永續經營之參考依據。

生物多樣性(biodiversity)意指在生物系統中存在著不同或不相似之個體，具歧異的程度(周昌弘，1995)，包括物種多樣性，是農、林、漁、牧產業經營的對象，也是醫藥發展的必需品。遺傳多樣性，則是農、林、漁、牧品種改良的依據，是遺傳工程的素材。而生態系多樣性是維持物種和基因多樣性的存續，更提供水土及養份等重要的服務。在生物多樣性之保育及利用研究時，微生物是經常被忽略的族群。事實上，微生物之多樣性，是維持地球生態平衡最主要之貢獻者。除在自然界中扮演分解者之重要角色外，亦為人類文明提供重要幫助，如各類工業原料、元素循環、去除汙染、酵素、抗生素、生物農藥、醫藥品、發酵產物及能源發展(Gowen CM and Fong SS, 2010; Garmendia et al., 2012)等，也創造出Diversa及TerraGene等企業的成功，發展各種工業酵素拓展其經濟價值。預估目前我們僅對地球上可能存在的 300 萬種微生物，了解不到 0.5%得物種(Systematics agenda 2000,1994)，以往在研究微生物多樣性方法上，利用傳統的方法在培養基上觀察生態系中微生物的多樣性，但對於無法在培養基上培養生長的微生物就無法進一步的了解，慶幸的是，在以分子生物學為基礎而興盛的現代生物技術，除了造就生命科學之研究外，在其他研究領域中也有驚人的應用。Muyzer等人(1993)首先利用變性梯度電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)方法來描述微生物的族群結構，此方法使我們了解在不同環境下微生物族群之間的族群多樣性，進而發現超過 99 %無法用傳統方法分離培養之微生物。自此衍生各種不同分子生物技術方法探討不同環境間微生物族群的變化性，如 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)(Lin et al., 2012)，Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)(Zhang et al., 2012)及 Single-Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)(Henne et al., 2012)等，根據核醣體DNA序列做為多樣性的指紋，分析土壤微生物中的種類數，這些方法使研究者不必依賴微生物生長菌落即能進一步評估微生物族群的特性，達到快速辨識的目的，但這些方法卻無法有效快速定性及定量分析微生物基因的歧異度。隨著DNA定序技術的快速進步，目前主流的高通量定序(High throughput sequencing)不僅使分析費用降低至先前的百分之一以下，更讓基因體定序分析不再是專屬於特定大型研究機構才能執行，次世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS)使生物學研究領域帶來革命性的發展。目前次世代定序技術主要有美國Applied Biosystems公司的SOLiD定序儀，美國Roche Applied Science公司的 454 定序儀、英美Solexa technology與Illumina公司共同開發的Illumina定序儀，這些技術近年來已被廣泛用於不同物種的基因體定序分析(Cruz-Rivera et al., 2012; Cantu et al., 2011;

Canavez et al., 2012)，此外，次世代定序也被應用微生物生態區位(Niche)的分析，如沼氣發酵槽分析(Jaenicke et al., 2011)、海洋深淵區域(Eloe et al., 2011)及人體腸道菌相基因分析(Qin et al., 2010)。圖四整理出探討微生物基因多樣性culture-independent之方法(Weinstock, 2012)，首先自環境中萃取微生物之總DNA，之後可採取下述兩種策略分析微生物基因多樣性：(1)將所獲得之環境總DNA視為一生物庫，分析相關DNA指紋序列訊息，進行基因比對，了解環境中基因的歧異度。(2)利用PCR增幅放大核糖體RNA (rRNA)，並定序分析真菌、真細菌及古生菌微生物族群組成。此方法可擺脫傳統利用分離培養微生物方式之不足，能掌握環境中微生物多樣性之全貌。

全球工業酵素及特用酵素市場預估於 2017 年將達 69 億美元，加上生質能源的大量投入開發，相關工業酵素呈現大幅度的增長，特用酵素應用於醫療診斷市場上也以每年 8% 成長，因此酵素市場開發相當具有競爭力，纖維分解酵素及脂肪酵素在全球市場上佔有相當高的比例，並且在各種不同工業上之應用亦相當廣泛。纖維分解酵素屬於糖基水解酶 (glycosyl hydrolase) (Cantarel et al., 2009)，其研究已有相當久的歷史，加上近年來擔憂石油的耗盡，因此全球積極投入於纖維分解酵素之研究，用於纖維素乙醇之生產。纖維素轉化成乙醇需三種以上纖維分解酵素之參與，包含內切葡聚糖酶 (endoglucanases,)，外切葡聚糖酶 (exoglucanases) 和  $\beta$  葡糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidases.)。除了纖維素乙醇應用之外，纖維分解酵素在各種工業上之需求亦非常龐大，如造紙和紙漿工業作為漂白劑代替有毒的含氯化學品 (Bajpai 1999)，在動物營養的改善上，摻入木聚糖酶的木質纖維素可以降低動物腸粘度和提高飼料轉化效率 (Murphy et al., 2009)。因此，為了降低工業用途中的成本，纖維分解酵素之穩定性和比活性則陸續被研究 (Yao et al., 2007; Mahadevan et al. 2008)。在過去幾年中，已有相當多的研究針對不同熱穩定性蛋白質，探討其最佳溫度與結構之關聯性，期望藉由結構的解析，能清楚了解熱穩定性之機制 (Haney et al. 1997; Russell et al. 1997)，目前的研究顯示熱穩定蛋白與其肽鏈的緊實度具有高度相關性，此取決於蛋白質各個分子間的相互作用 (Haney et al. 1997; Bogin et al. 1998; Leemhuis et al. 2004; Kim et al. 2008)。

脂肪酵素在世界工業酵素市場中佔有 21% 的比例，僅次於蛋白酶 (proteases) 和糖分解酵素 (carbohydrases) 之後 (Hasan et al., 2006)，其定義為甘油酯水解酶 (glycerol ester hydrolases)，並廣泛存於動物、植物和微生物中 (Turki 2013)。根據水解不同長度酰基甘油的羧基酯能力，脂肪酵素可分成兩大族群，triacylglycerol acylhydrolases (E.C. 3.1.1.3) 和 esterases (E.C. 3.1.1.1) (Arpigny and Jaeger 1999; Messaoudi et al. 2010)。進一步依據 Arpigny 等人 (1999) 的研究顯示，其又分成八個族群，另外，在脂肪酶工程資料庫中 (lipase engineering database, LED)，利用脂肪酵素的穩定催化胺基酸區域，可分為三大類，GGGX，GX 和 Y (Widmann et al. 2010)，這些分類顯示脂肪酵素之多樣性。脂肪酵素應用於各種工業領域中皆可發現，如食品，生物復育，醫藥，清潔劑，能源和廢水處理等 (Bacha et al. 2015; Duarte et al. 2015; Mello Bueno et al. 2015)，因此，大部分研究著重於脂肪酵素的高度生產上。傳統上，藉由隨機突變和篩選可獲得高產量的脂肪酵素 (Sandana Mala et al. 2001; Bisht et al. 2013)，其異源表現也已經成功在大腸桿菌 (*E. coli*)，枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)，裡氏木黴 (*Trichoderma reesei*)，畢赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中高產量生產 (Madan and Mishra 2009; Lu et al. 2010; Fang et al. 2014; Jin et al. 2014)。

尿素水解酶 (Urease) 廣泛存在各種不同的生物中，如細菌、真菌及植物，它同時也是一種金屬酶 (metalloenzyme)，其生化作用可將一莫耳的尿素水解成兩莫耳的氨 (ammonia)，此過程反應會造成酸鹼

度增加，pH 值上升(Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Muynck *et al.*, 2010; Siddique and Chahal, 2011)。因此，各種不同的尿素水解酶抑制劑被研究用於農地施用尿素之後，這些抑制劑通常扮演直接或間接抑制酵素活性，而有些抑制劑則扮演金屬螯合劑，降低尿素水解酶的活性，相關的研究亦已應用於土壤中，減少氨的揮發(Soares *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013)。雖然尿素水解酶在農業上是會造成土壤中含氮量的減少，但此類酵素仍具有抑制真菌及水泥基材料裂縫修補的功能(Becker-Ritt *et al.*, 2007; Muynck *et al.*, 2010; Siddique and Chahal, 2011)，因此相關尿素水解酶的研究亦陸續被報導。

## 研究目的

台灣農業試驗研究所所設立的長期試驗田經由不同耕作制度及施肥處理，已累積數十年重要的研究數據，包含土壤理化性質、土壤酵素活性及微生物族群分布等，然而目前缺乏此試驗田的土壤基因資源資訊，因此本計畫分成三年期研究，第三年將篩選到的脂肪分解酶、尿素酶及植酸酶基因轉殖株進行序列分析與比對，以了解台灣本土基因與現有已知基因(NCBI database)的差異性。進一步將此基因選殖到高表現載體進行蛋白質的大量表現，並分析純化後蛋白質的相關活性特徵。本研究可提供水旱田根圈土壤的基因多樣性及生物多樣性，並有效將台灣本土多樣性基因保存下來，可提供過內學者共同研究本土新穎性基因，從中發掘參與碳、氮及磷循環的相關基因，如脂肪分解酶、尿素酶及植酸酶酵素篩選，強化新穎性酵素的開發，期望能應用於生質能源開發、農畜牧業應用及醫療診斷分析。

## 研究方法

### 1. 土壤 DNA 來源

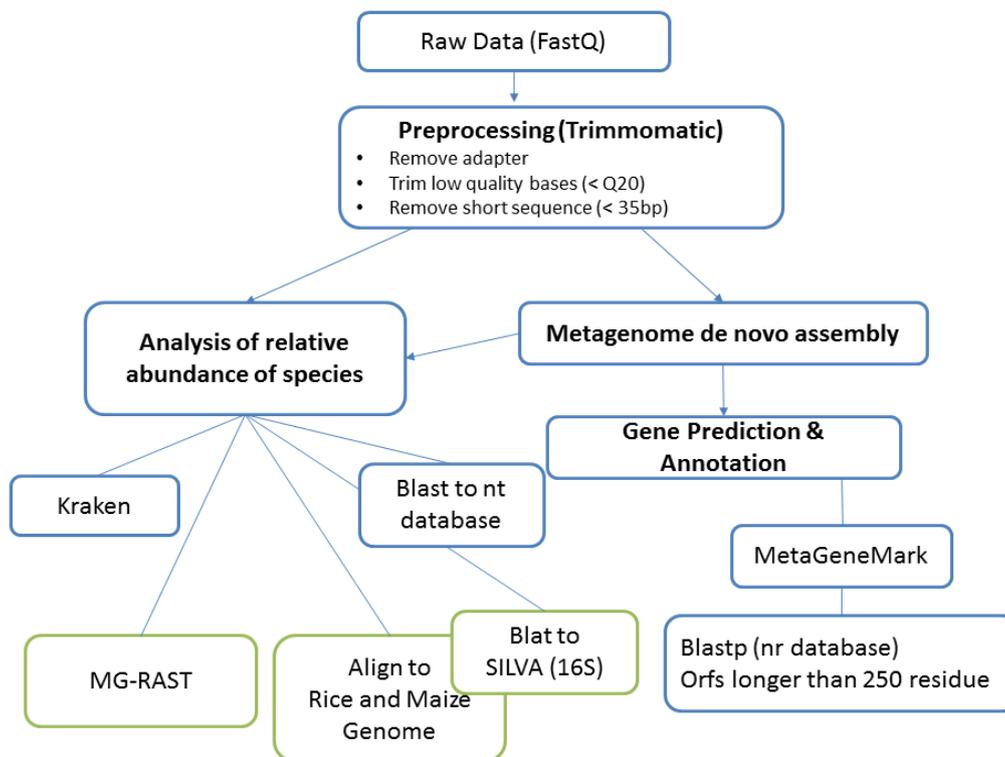
土壤來源為台中縣霧峰縣農業委員會農業試驗所 35 號試驗田，為七塊厝系砂頁岩非石灰性新沖積土，占地面積約為 0.5 公頃，表土質地為壤質土壤。此試驗田自 1995 年 8 月開始進行玉米水稻輪作前期理化性質如下:土壤pH(1:1)為 5.3，陽離子交換容量為 7.4  $\text{cmol kg}^{-1}$ ，交換性鉀、鈣、鎂、鋁、鋅、錳、銅與鐵分別為 74、625、149、0.23、4.3、62、4.6 與 891  $\text{mg kg}^{-1}$ ，Bray 第一法可萃取磷為 14.8  $\text{mg kg}^{-1}$ (鍾，1999 與楊，2002)。35 號試驗田採逢機完全區集設計(RCBD)，四重複，七種不同施肥處理，磷及鉀肥施用相同量，各處理條件如下:1. 對照組，不施用任何肥料。2. 化學氮肥組，根據施肥手冊推薦化學肥料施用尿素、過磷酸鈣及氯化鉀等肥料。3. 有機質氮肥，只施用豬糞堆肥。4 有機質氮肥加 1/3 化學氮肥，施用有機堆肥外，另添加 1/3 量化學氮肥。5 有機質氮肥加 2/3 化學氮肥，施用有機堆肥外，另添加 2/3 量化學氮肥。6 綠肥加 1/3 化學氮肥，施用綠肥田菁或埃及三葉草外，另添加 1/3 量化學氮肥。7 泥炭加 1/3 化學氮肥，施用泥炭外，另添加 1/3 量化學氮肥。玉米及水稻輪作下在不同時期進行土壤採樣，採樣期可分為玉米播種前期，玉米膝高期(播種後約 26 天)，玉米雄穗期(播種後約 63 天)，玉米收穫期(播種後約 126 天)，水稻分蘗盛期(水稻移植後約 63 天)，水稻抽穗期(水稻移植後約 87 天)，水稻收穫期(水稻移植後約 126 天)。

### 2. 水稻根圈土壤 DNA 序列之生物資訊分析

偵測水稻田土壤微生物基因體序列主要運用次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)技術取得大量 DNA 序列(Metagenome)資料，利用 *De novo sequencing* 之概念，再從 National Center for Biotechnology Information(NCBI)獲得已知微生物基因體序列、蛋白質及代謝路徑等資訊進行生物資訊解析，包括資料庫比對、序列比對(alignment)、基因註解(annotation)及相關微生物代謝路徑分析等(圖一)，以獲得水稻田土壤微生物基因體的各種資訊。藉由這些資訊可獲得微生物族群分布及相關功能性基因的探討。

### 3. 全基因合成

根據生物資訊所獲得之新穎性基因序列，委託廠商利用 Applied Biosystems 3900 High Throughput DNA Synthesizer 進行全基因合成，將合成後的基因轉殖入 pET 系列之表現載體中，以作為後續蛋白質活性及特徵分析。



圖一、Metagenomic sequences 分析流程。

### 4. 基因轉殖

將合成後的基因表現質體利用化學法轉殖入大腸桿菌中，在轉殖前先將大腸桿菌製備成剩任細胞，將大腸桿菌培養至OD<sub>600</sub>約 0.4~0.5 時，將菌液至於冰浴中 10 分鐘，在 4 °C 中以 4,000 rpm 離心 10 分鐘以收集細胞。小心把上清液倒掉，將細胞pellet以 1/3 原菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl<sub>2</sub>做懸浮混勻，置於冰浴中 15 分鐘。在 4 °C 中以 4,000 rpm 離心 10 分鐘，以 1/25 菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl<sub>2</sub>懸浮混勻。取適量的基因表現載體與勝任細胞混合置於冰上，再將混合物於 42°C 進行熱休克 1 分鐘，在培養箱中培養 1 小時，塗抹於含抗生素之培養基進行培養。

### 5. 蛋白質純化

構築脂肪分解酶、植酸酶及尿素酶基因表現載體同時接合 His-tag 以利於利用 Ni-column 進行純化。待菌落長出，挑選單一菌落於 LB 培養基中培養過夜，在於新鮮的培養基中培養 O.D.值至 0.4~0.5，加入 isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)以誘導脂肪分解酶、植酸酶及尿素酶蛋白的表現。表現出的蛋白利用 SDS-PAGE 進行分析，確認表現出脂肪分解酶、植酸酶及尿素酶蛋白後以 Ni-column 進行純化。

### 6. 酵素活性分析

將純化的脂肪分解酶、植酸酶及尿素酶蛋白質進行活性特徵分析，純化酵素分別在不同溫度下及不

同 pH 值條件下進行反應，了解在不同溫度及 pH 值下脂肪分解酶、植酸酶及尿素酶活性，反應時間終了隨及將樣品置於沸水中 15 分鐘，藉以終止酵素反應。

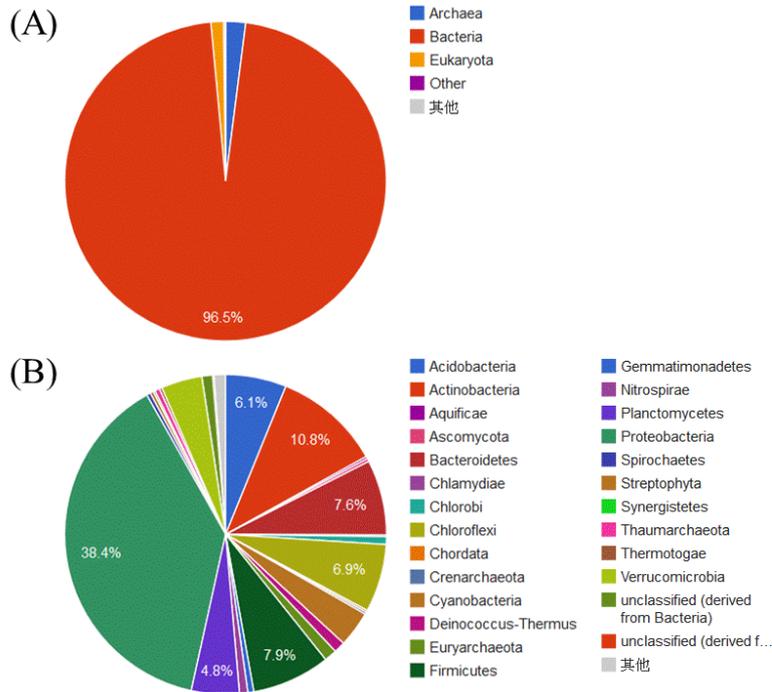
### 結果與討論

台灣農業試驗研究所所設立的長期試驗田經由不同耕作制度及施肥處理，已累積數十年重要的研究數據，包含土壤理化性質、土壤酵素活性及微生物族群分布等，然而目前缺乏此試驗田的土壤基因資源資訊，本研究利用次世代定序技術共分析了五億條序列(表一)，平均讀長 127 個鹼基，序列總數達 63.7 Gb，經刪除部分接子或判讀有問題的序列後，最後有效序列為 4.6 億條，平均讀長 119 個鹼基，總序列長約為 55.6 Gb。

表一、利用次世代定序技術分析水稻根圈土壤 DNA 之資訊。

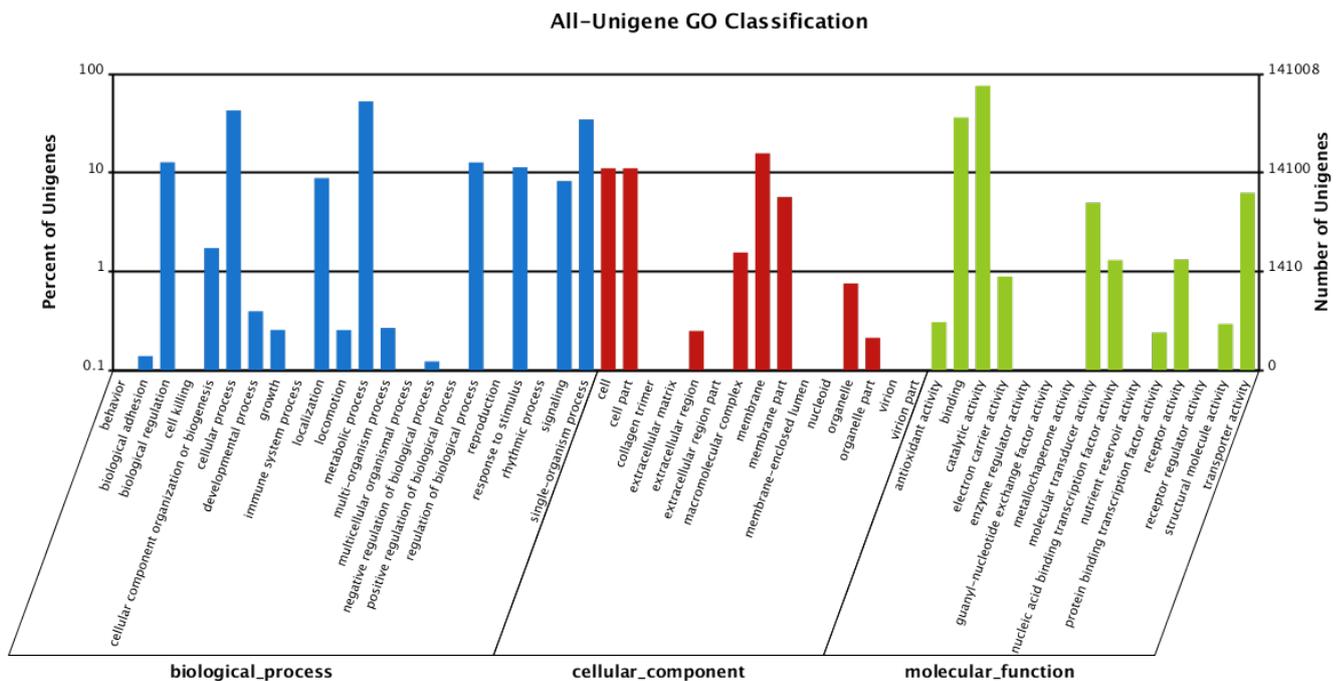
Run	Sample
Total illumina Reads	502,243,422
Read Length (bp)	127
Total Base (bp)	63,773,611,392
Total Reads after QT & removing adapter	467,184,214
Average Length after QT & removing adapter	119
Total Base after QT & removing adapter	55,677,109,678

將分析所得 DNA 序列利用 MG-RAST (the Metagenomics RAST) server 分析平台進行比對分析，其結果如圖二所示，從分布圖中可看出土壤中包含物種如細菌、古生菌、真核生物及病毒等，其中以細菌所占有的比例最高，達 96.5%，其次為 2% 古生菌及 1.3% 真核生物，病毒約只佔 0.1%，根據分類學中的歸類，細菌中以 Proteobacteria 所佔的比例最高，達 38.4%，無法鑑別的序列在總序列中亦佔了 10.8%，此結果符合我們的認知，對於土壤生物的了解尚非十分清楚(Systematics agenda 2000,1994)，此序列將來可進一步研究這些無法鑑別序列，以了解其在土壤中所扮演的角色。



圖二、水稻田 55.6 Gb 經由 MG-RAST (the Metagenomics RAST) server 平台，分析序列於個物種之分布情形。

將水稻田分析完之 55.6 Gb 序列進一步利用 Gene Ontology 資料庫進行基因功能性之歸類(圖三)，結果發現在生物途徑(Biological process，基因所參與的生物路徑)中，以 Cellular process、Metabolic process 及 Single-organism process 所發現到的基因數量最多，細胞組件(Cellular component，基因在細胞內外的位置)中，以 Cell、Cell part 及 Membrane 所發現到的基因數量最多，分子功能(Molecular function，基因的分子活性)中，以 Binding 及 Catalytic activity 所發現到的基因數量最多。



圖三、55.6 Gb 序列中 Gene Ontology 基因功能之分類。

為了能進一步研究這些參與糖基與脂肪之相關基因，此 55.6 Gb 序列進行組裝分析，並以 MetaGeneMark 預測開放讀序框架(open reading frame)，結果發現在組裝序列中可轉譯成蛋白質之 contig 可達 1.79 百萬條(表二)，其中預測超過 250 個胺基酸之基因約有 1.46 萬條，超過 500 個胺基酸之基因有 562 條，超過 1000 個胺基酸之基因則只有 9 條。

表二、組裝序列可轉譯成蛋白質之數量分析。

組裝序列(Contig)之蛋白質預測	蛋白質數量
All	1,787,113
>= 100 aa	381,819
>= 250 aa	14,577
>= 500aa	562
>- 1000aa	9

分析組裝序列中(>250 胺基酸)參與糖基水解基因(glycoside hydrolase)，結果發現有 29 條相關基因可被鑑別(表三)，其與目前 NCBI 資料庫比對發現相似度最低只有 24.26%，最高則與 alpha proteobacterium 達 99.71%相似，序列組裝中最長約有 535 個胺基酸。分析參與脂肪酵素基因(Lipase)，結果發現有 10 條相關基因可被鑑別(表四)，其與目前 NCBI 資料庫比對發現相似度最低只有 43.71%，最高與 *Pseudomonas* sp. GM30 的 lipase 達 83.7%相似，481 個胺基酸為序列組裝中最長，與 *Bradyrhizobium* sp. STM 3843 具 47.59%相似。分析參與尿素水解酵素基因(urease)，結果發現有 1 條相關基因可被鑑別(表五)，其與目前 NCBI 資料庫比對發現與 *Arthrobacter* sp. 35W 菌種中的 urea amidolyase 相似度為 57.68%。分析參與植酸酵素基因(phytase)，結果發現有 1 條相關基因可被鑑別(表六)，其與目前 NCBI 資料庫比對發現與 *Mycobacterium triplex* 菌種中的 3-phytase 相似度高達 86.9%，由於植酸酶與目前已知基因具有較高的相似度，因此後續不再合成此基因進行酵素表現及分析。

表三、水稻田中糖基水解基因。

gene	Closed sequence	Family	Amino acid length	Identity (%)	Coverage (%)
G195	glycoside hydrolase [alpha proteobacterium LLX12A]		348	99.71	100
G560	glycoside hydrolase sugar binding [Ktedonobacter racemifer]	2	262	53.78	96
G991	glycoside hydrolase protein [Phlebiopsis gigantea 11061_1 CR5-6]	31	535	37.5	9
G1136	glycoside hydrolase, partial [Fimbriimonas ginsengisoli]	2	296	43.67	100
G1147	endoglucanase F precursor [Fibrobacter succinogenes]		255	31.19	77
G1198	glycoside hydrolase [Gemmatimonadetes bacterium KBS708]	31	252	53.97	99
G1466	glycoside hydrolase [Flavobacterium sp.]	9	277	72.56	100

	Fl]				
G1508	glycoside hydrolase [ <i>Niastella koreensis</i> ]		252	52.19	99
G1690	glycoside hydrolase [ <i>Niabella soli</i> DSM 19437]	2	270	62.73	100
G2047	Cellulase [ <i>Ruminococcus champanellensis</i> ]	5	257	48.64	100
G2266	glycoside hydrolase [ <i>Acidobacteriaceae bacterium</i> TAA166]	2	375	29.65	94
G2299	glycoside hydrolase, partial [ <i>Colwellia piezophila</i> ]	27	374	52.69	92
G2537	Glycosyl hydrolases [ <i>Chthonomonas calidirosea</i> ]	101	263	49.46	68
G3056	glycoside hydrolase [ <i>Acaryochloris</i> sp. CCMEE 5410] (glycosyl transferase family 1)		268	40.6	99
G3079	glycosyl hydrolase [ <i>Thermaerobacter subterraneus</i> ]	33/58	286	25.84	98
G3217	glycoside hydrolase [bacterium Ellin514]	76	308	55.02	100
G3266	Glycoside hydrolase [archaeon GW2011_AR15]	25	264	41.06	77
G3489	glycosyl hydrolase [ <i>Terriglobus saanensis</i> ]		313	42.53	98
G3540	cellulase [uncultured bacterium]	5	277	29.92	45
G3597	glycosyl hydrolase [ <i>Bacillus niacini</i> ]	88	278	87.88	95
G3654	Glycoside hydrolase [ <i>Nitrolancea hollandica</i> Lb]	5	253	59.35	85
G4041	beta-glucosidase-like glycosyl hydrolase [ <i>Pyrinomonas methylaliphatogenes</i> ]	3	335	50.15	99
G4256	Glycosyl hydrolases C-terminal domain protein [uncultured bacterium]	38	308	56.23	96
G4392	glycoside hydrolase [ <i>Paludibacter propionicigenes</i> WB4]	43	341	55.03	99
G4529	glycoside hydrolase [ <i>Paenibacillus</i> sp. HGF5]	38	494	43.73	100
G4554	cellulase, partial [ <i>Aphelenchoides fragariae</i> ]	5	267	24.26	92
G4681	glycosyl hydrolase [ <i>Saprospira grandis</i> ]		435	32.16	94
G4829	secreted glycosyl hydrolase [bacterium Ellin514]	11/43	256	55.02	96
G5136	glycosyl hydrolase, partial [ <i>Aequorivita sublithincola</i> ]		366	58.82	98

表四、水稻田中脂肪水解酵素基因。

gene	Closed sequence	Amino acid length	Identity (%)	Coverage (%)
L529	lipase [ <i>Pseudomonas</i> sp. GM30]	276	83.7	100
L900	putative Lipase [ <i>Bradyrhizobium</i> sp. STM 3843]	481	47.59	93
L1145	esterase/lipase [ <i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375]	288	67.94	99
L1620	lipase [ <i>Tsukamurella paurometabola</i> ]	280	75.44	100
L1699	lysophospholipase [ <i>Pyrinomonas methylaliphatogenes</i> ]	300	63.45	66
L2145	phospholipase C [Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> ]	253	72.44	100
L2830	phospholipase [Methylocystis sp. SB2]	281	71.74	98
L3207	phospholipase C [Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> ]	284	52.45	99
L3594	esterase/lipase [uncultured bacterium]	308	43.71	87
L3766	phospholipase [Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> ]	277	65.83	100

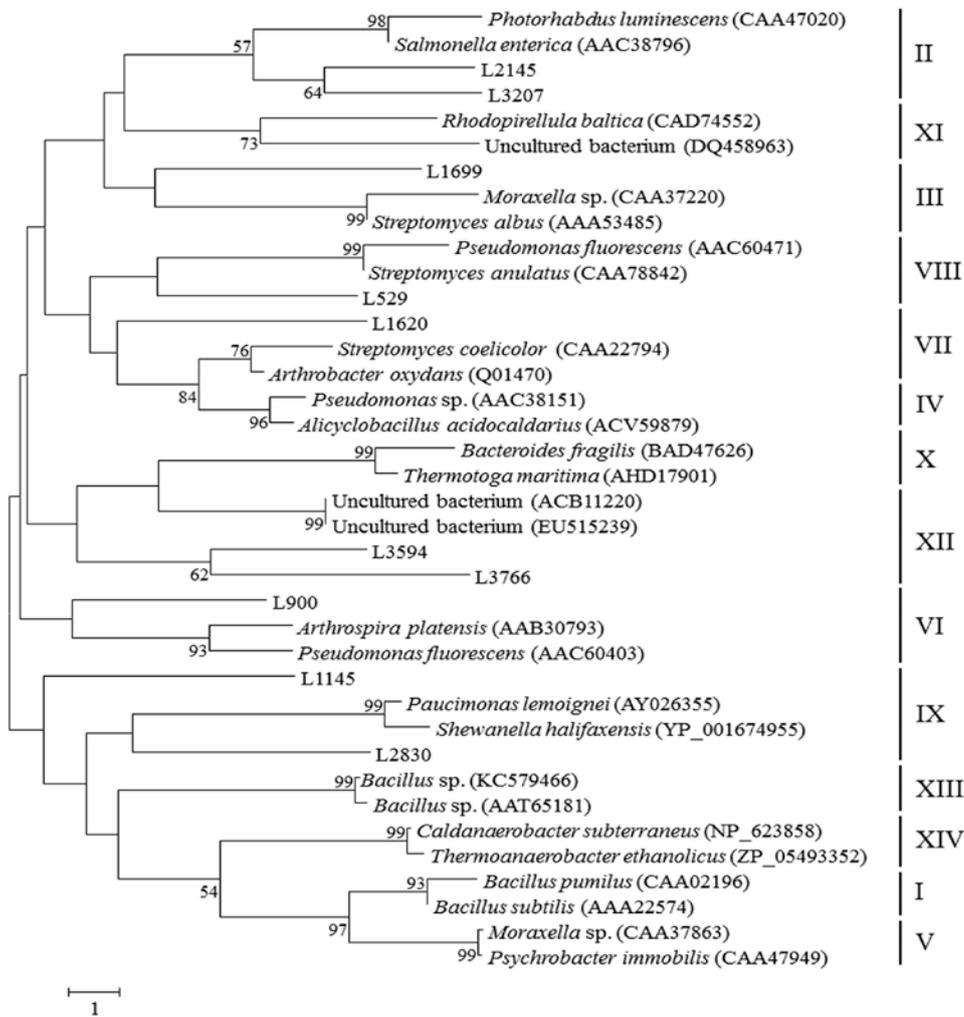
表五、水稻田中尿素水解酵素基因。

gene	Closed sequence	Amino acid length	Identity (%)	Coverage (%)
U4802	urea amidolyase [ <i>Arthrobacter</i> sp. 35W]	267	57.68	100

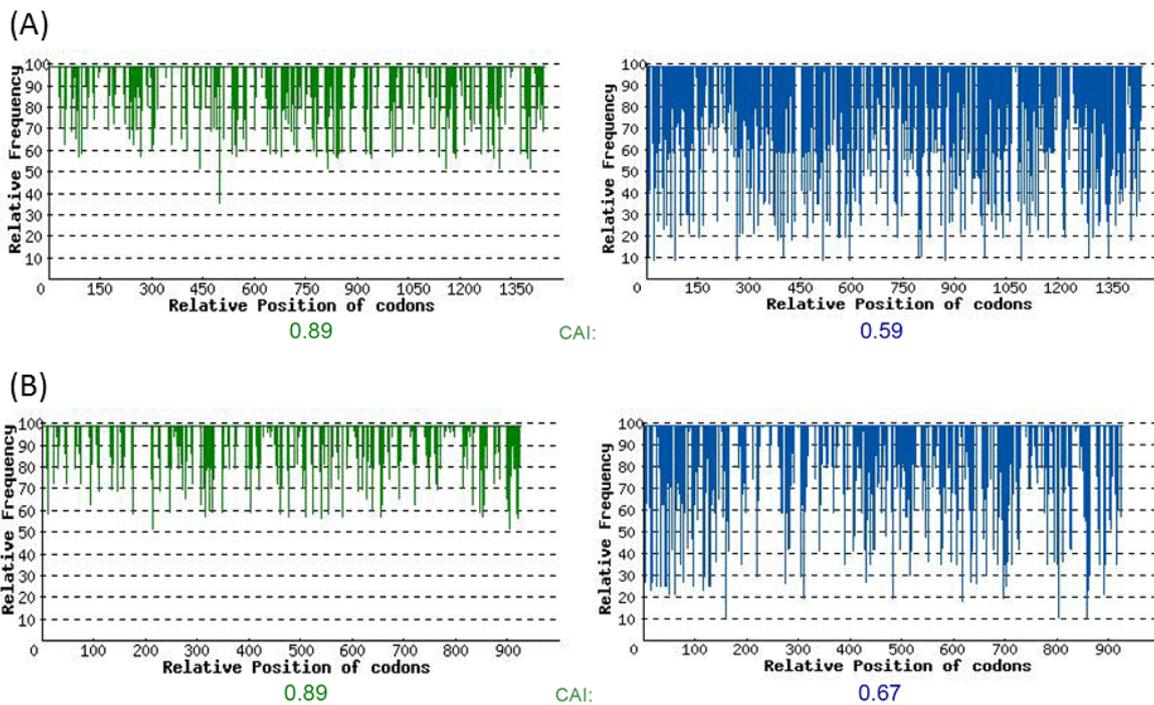
表六、水稻田中植酸酵素基因。

gene	Closed sequence	Amino acid length	Identity (%)	Coverage (%)
P1088	3-phytase [ <i>Mycobacterium triplex</i> ]	290	86.9	100

目前脂肪酵素基因根據序列之差異性可區分成 14 個群組，將水稻田中所組裝的 10 個 lipase 基因與已知的群組進行演化樹分析(圖四)，根據演化樹結果，此 10 個基因可分成 6 個群組，顯示脂肪酵素基因在環境中之分布具有其多樣性。依據以上之相關結果，進一步利用全基因合成技術選擇 L900 及 L3594 兩個新穎性基因(相似度與目前已知基因低於 50%)，選殖至 pET 系列之表現載體，再轉殖入大腸桿菌，以了解經由 Metagenome 所組裝獲得之新穎性基因之酵素活性特徵。為確保基因能在大腸桿菌中正常表現，分別針對基因的 Codon usage 分析(圖五)，再合成適當的 DNA 序列。

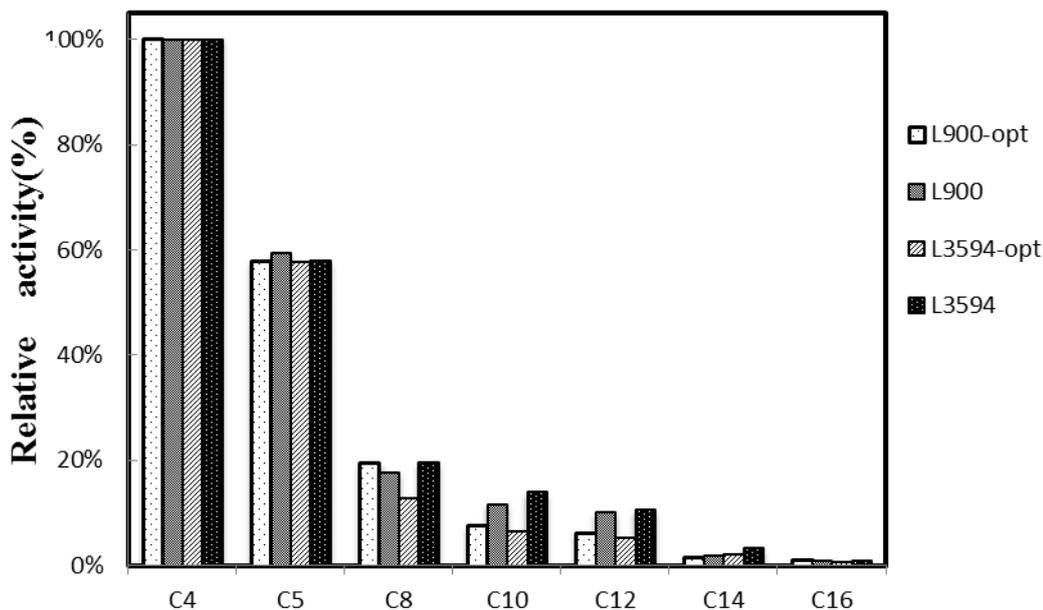


圖四、水稻田中脂肪酵素基因與已知 14 個群組之演化樹分析。



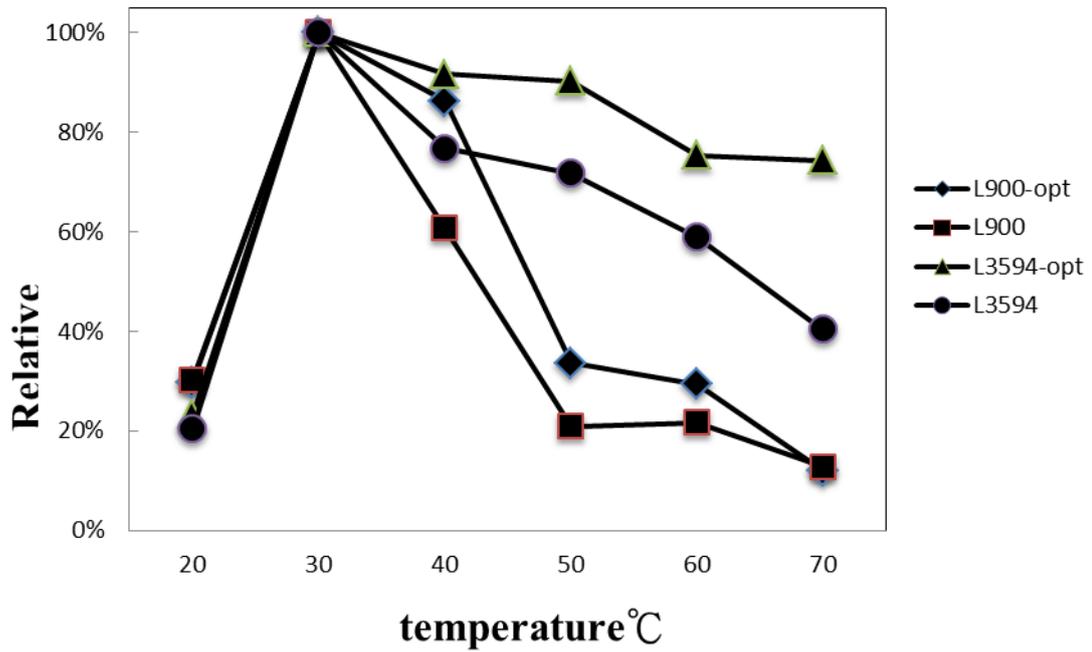
圖五、L900(A)及 L3594(B)兩個新穎性基因經 codon usage 分析後，(A)(B)左圖經優化後所得之結果。

將合成於pET表現載體之基因轉殖入大腸桿菌，並純化出脂肪分解酵素，以了解其生化特性。以7種不同碳鏈長短之脂肪酸作為活性測試，包含 4-nitrophenyl butyrate、4-nitrophenyl valerate、4-nitrophenyl octanoate、4-nitrophenyl decanoate、4-nitrophenyl laurate、4-nitrophenyl myristate及nitrophenol palmitate，將純化的蛋白質與受質混合於 30°C反應 10 分鐘，並利用分光光度計於OD405 偵測，結果指出L900、L3594 及經過優化後的基因皆顯示對 4-nitrophenyl butyrate(C4)具有最高的催化活性，而 4-Nitrophenyl valerate(C5)尚有 60%的活性，4-nitrophenyl octanoate(C8)即降至 20%左右，並且隨著碳鏈越長其活性亦越差。

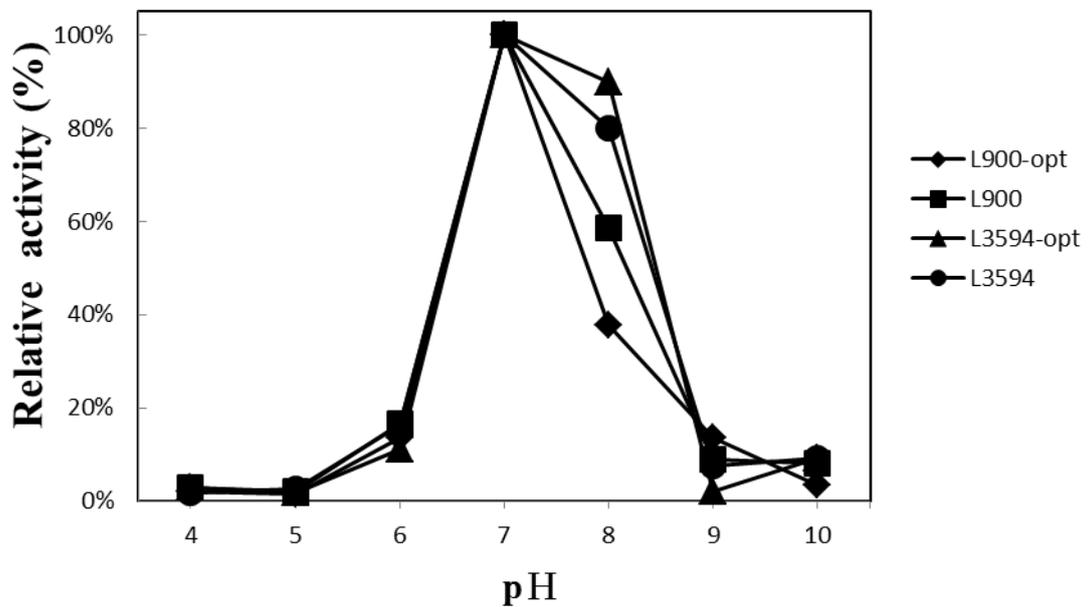


圖六、不同碳鏈脂肪酸與 L900、L3594 及經過優化後的酵素(L900-opt 及 L3594-opt)進行活性反應測試。

L900、L3594 及經過優化後的酵素(L900-opt及L3594-opt)與 4-nitrophenyl butyrate進行混合後，於不同溫度及酸鹼值進行活性反應，結果顯示四種酵素在 30°C時皆達最佳活性(圖七)，20°C時活性則只有 20%-30%左右，隨著溫度增高，L3594 及L3594-opt具有較高的耐受活性，L3594-opt於 70°C時仍具有 74%的活性，L900 及L900-opt在 70°C時則降至 12%-13%。針對不同酸鹼值分析，結果顯示四種酵素在pH7 時皆達最佳活性(圖八)，pH6 時皆低於 20%，L3594 及L3594-opt在pH8 時之活性皆高於L900 及 L900-opt，此結果指出L3594 對於鹼性具有較高的耐受性，然而當酸鹼值高至pH9 時，其活性接瞬間降低，pH10 則四種酵素活性皆低於 10%。

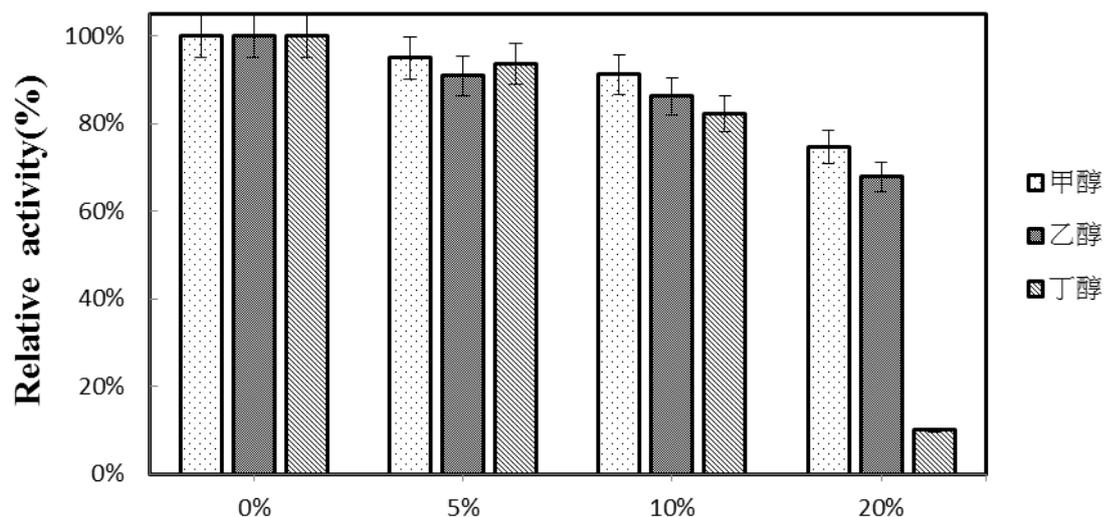


圖七、L900、L3594 及經過優化後的酵素(L900-opt 及 L3594-opt)於不同溫度之活性反應。

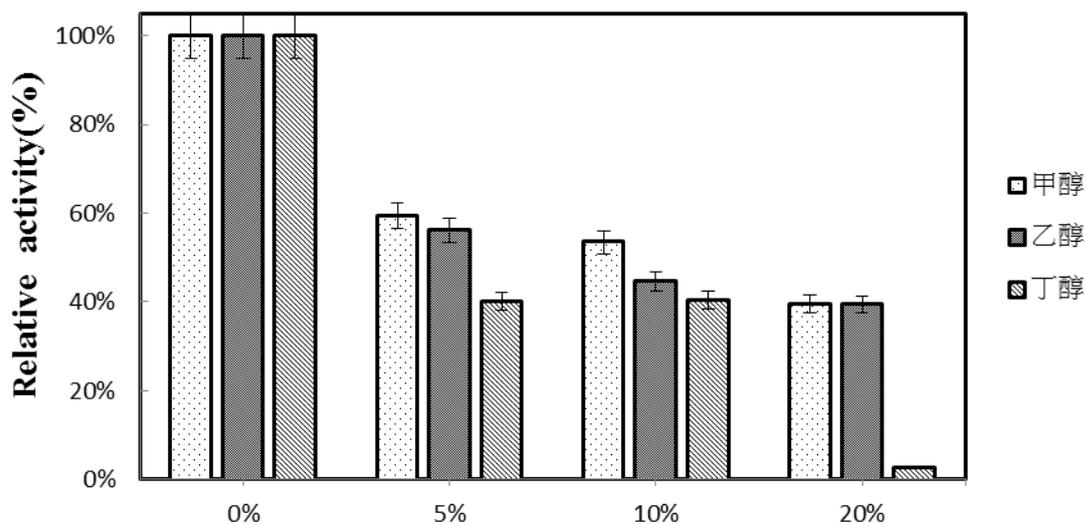


圖八、L900、L3594 及經過優化後的酵素(L900-opt 及 L3594-opt)於不同酸鹼值之活性反應。

L900、L3594 及經過優化後的酵素(L900-opt 及 L3594-opt)與 4-nitrophenyl butyrate 進行混合後，在加入不同濃度的有機溶劑，包含甲醇、乙醇及丁醇，以了解不同醇類對於脂肪分解酵素之影響，結果顯示 L900 在 10% 的甲醇、乙醇及丁醇環境下(圖九)，仍具有 82%-91% 的高活性，在 20% 的甲醇及乙醇環境下，其活性仍維持 68%-75%，但 20% 的丁醇則嚴重影響酵素的活性。L900-opt 在 10% 的甲醇、乙醇及丁醇環境下(圖十)，其活性則不如 L900，降至 40%-53%，在 20% 的甲醇及乙醇環境下，其活性只有 39%-40%，丁醇的影響性更高，L900-opt 活性只剩 3%。

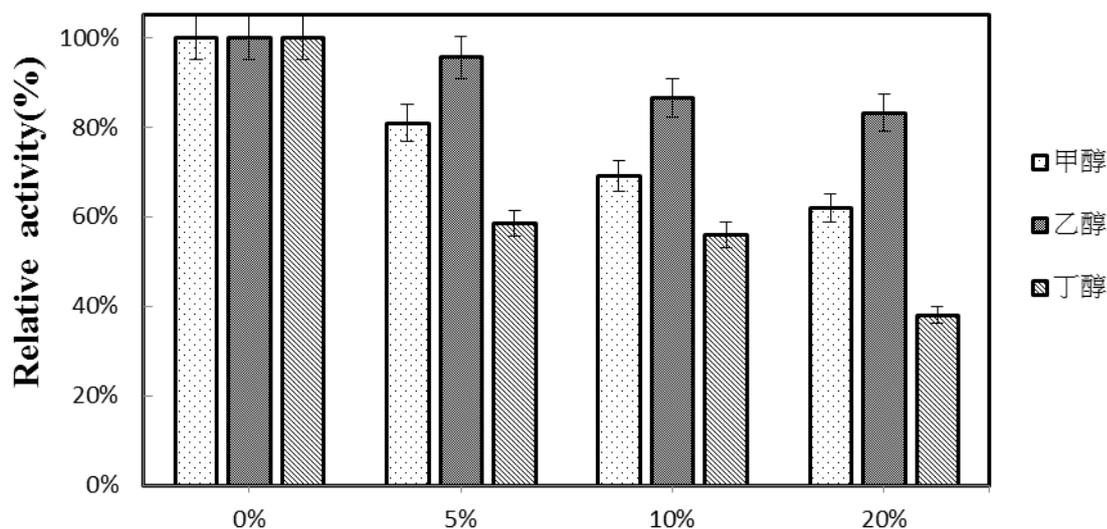


圖九、L900 於 pH7 及 30°C 下與不同有機溶劑混合後，進行活性反應測試。

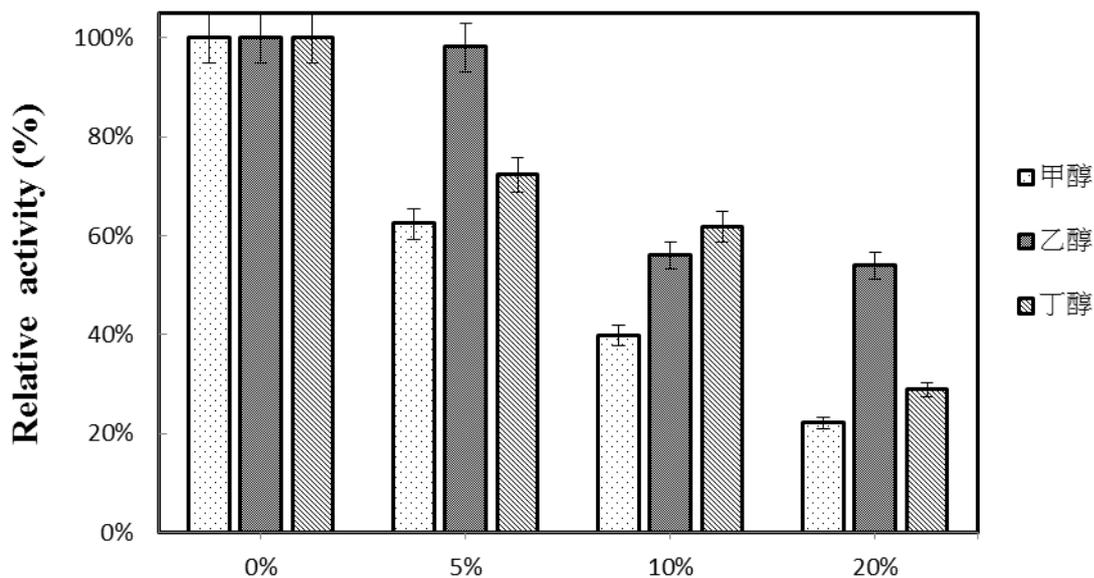


圖十、L900-opt 於 pH7 及 30°C 下與不同有機溶劑混合後，進行活性反應測試。

L3594 在 10% 的甲醇、乙醇及丁醇環境下(圖十一)，具有 56%-86% 的高活性，其對於乙醇的耐受性較甲醇及丁醇高，在 20% 的甲醇及乙醇環境下，其活性仍高達 62%-83%，20% 的丁醇影響酵素的活性如同 L900 酵素，其活性降低至 38%。L3594-opt 在 5% 的乙醇環境下，其活性如同 L3594，影響性不大，然而當甲醇、乙醇及丁醇有機溶劑增加至 10% (圖十二)，活性降低至 40%-62%，在 20% 的乙醇影響下，L3594-opt 活性仍維持有 54%，然而在 20% 的甲醇及丁醇環境下，其活性只有 22%-29%，此結果顯示高濃度的丁醇對於脂肪酵素具有較高的活性抑制效果。

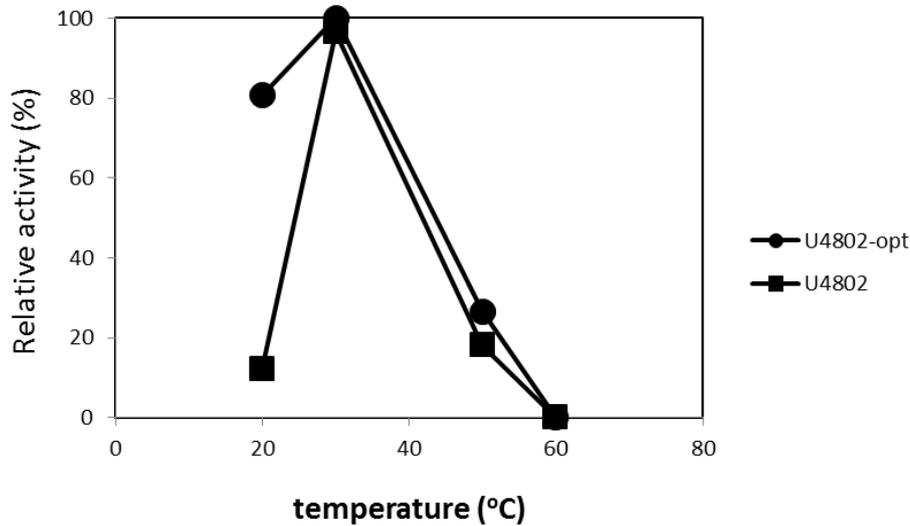


圖十一、L3594 於 pH7 及 30°C 下與不同有機溶劑混合後，進行活性反應測試。



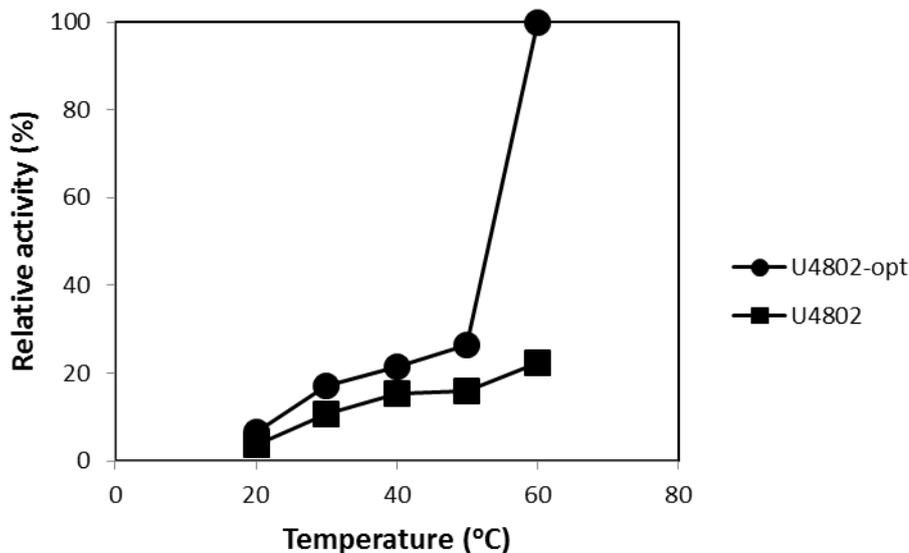
圖十二、L3594-opt 於 pH7 及 30°C 下與不同有機溶劑混合後，進行活性反應測試。

將合成於pET表現載體之基因轉殖入大腸桿菌，並純化出尿素分解酵素，以了解其生化特性。以尿素及phenol-red試劑作為活性測試，將純化的蛋白質與尿素混合於不同溫度反應 2 小時，並利用分光光度計於OD550 偵測，結果指出U4802及經過優化後的基因U4802-opt皆顯示在30°C時擁有最高的活性(圖十三)，U4802-opt在 20°C時仍保有 80%的活性，當溫度增加時，活性則逐漸降低。



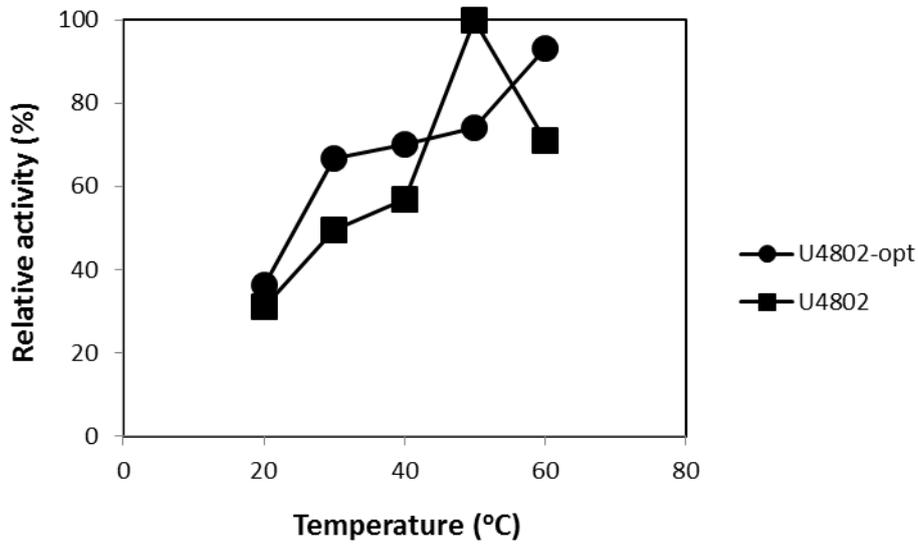
圖十三、U4802 及經過優化後的酵素(U4802-opt)於不同溫度之活性反應。

尿素水解酶為一種金屬酶，因此為了解不同金屬對U4802及U4802-opt酵素之影響，分別加入 8 mM 的硫酸鎂、硫酸錳及硫酸鎳，於不同溫度探討其活性變化，結果顯示當加入硫酸鎂時(圖十四)，隨著溫度升高U4802及U4802-opt酵素活性皆有明顯增加的現象，經過優化後的U4802-opt酵素於 60°C則是瞬間增加活性，顯示硫酸鎂可增加U4802-opt酵素對溫度的耐受性。



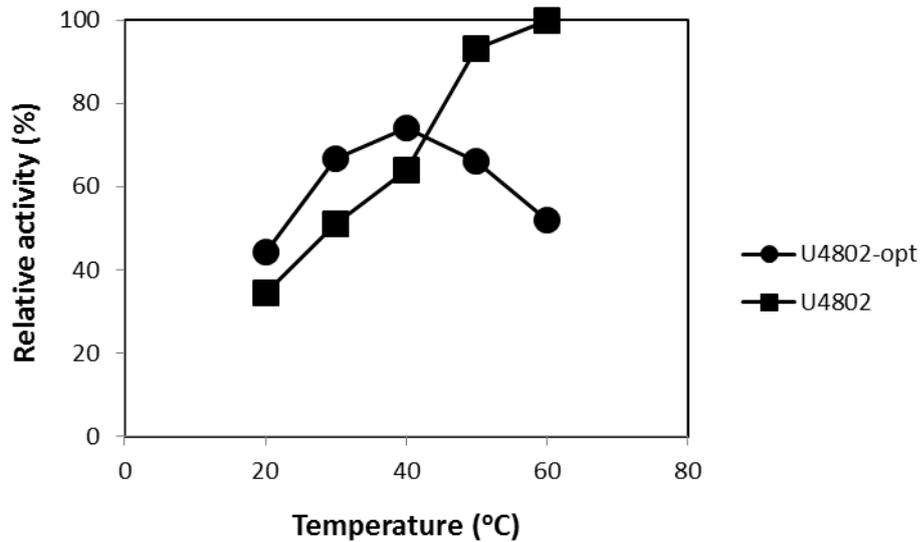
圖十四、U4802 及經過優化後的酵素(U4802-opt)於不同溫度加入 8 mM 硫酸鎂之活性反應。

U4802 及U4802-opt當分別加入硫酸錳時(圖十五)，隨著溫度升高U4802 及U4802-opt酵素活性皆有明顯增加的現象，U4802 於 50°C時達最高活性，60°C則明顯降低至 71%，經過優化後的U4802-opt 酵素於 60°C時活性達 93%，此結果顯示硫酸錳可增加U4802 及U4802-opt酵素對溫度的耐受性。



圖十五、U4802 及經過優化後的酵素(U4802-opt)於不同溫度加入 8 mM 硫酸錳之活性反應。

U4802 及U4802-opt當分別加入硫酸鎳時(圖十六)，隨著溫度升高U4802 酵素活性明顯增加的現象，經過優化後的U4802-opt酵素於 40°C達最高活性 74%，U4802 於 60°C時達最高活性，U4802-opt酵素於 60°C時則降低至 52%，此結果顯示硫酸鎳可增加U4802 酵素對溫度的耐受性。



圖十六、U4802 及經過優化後的酵素(U4802-opt)於不同溫度加入 8 mM 硫酸錳之活性反應。

## 結論

由於我們對於微生物物種多樣性的評估了解不到 0.5%(Systematics agenda 2000,1994)，尚有許多新穎性的微生物及基因無法觀察到，所以利用傳統微生物篩選已經無法滿足我們對微生物多樣性的了解，因此隨著環境基因體(Metagenome)研究的興盛，目前篩選環境中新穎性基因的方式多以基因庫(Library)建構方式將環境 DNA 以大腸桿菌轉殖株進行構築，之後再逐一根據所要研究的酵素目標，利用此大量的轉殖株基因庫進行分析篩選(Ferrer et al., 2005)，依照此技術方法已有多篇的研究報導發現不同的新穎性基因，如  $\beta$ -lactamase， $\beta$ -xylosidase， $\beta$ -glucosidase 等(Cao et al., 2015; Jordan et al., 2016; López-López et al., 2015)。然而基因庫建立的品質將會決定後續功能性基因的篩選，基因庫歧異度過低可能會造成無法成功篩選出具有活性的酵素，篩選出具有活性的轉殖株亦未必是新穎性基因，所以利用此方法存在著許多的變因。

本實驗室過去自台中縣霧峰鄉農業試驗研究所 35 號試驗田採取長期施用有機肥之水稻根圈土壤，利用次世代定序技術(Next Generation Sequencing, NGS)分析環境總基因體序列(Metagenome)，DNA 共分析 502,243,422 條序列，平均讀長 127 個鹼基，全序列約達 63.7 Gb，經刪除部分接子或判讀有問題的序列後，最後有效序列為 467,184,214 條，平均讀長 119 個鹼基，總序列長約為 55.6 Gb。進一步針對脂肪水解酵素基因(lipase)及尿素水解酵素(urease)進行探討，結果發現有 10 條脂肪水解酵素基因可被鑑別，其與目前 NCBI 資料庫比對發現相似度最低只有 43.71%，最高與 *Pseudomonas* sp. GM30 的 lipase 達 83.7%相似，將 L900 及 L3594 基因進行人工合成後再轉殖至 pET30 表現載體，並於大腸桿菌中大量表現蛋白質並分析其活性特徵，結果發現利用此策略所表現出的蛋白質酵素明顯具有活性表現，L900 及 L3594 基因針對短片段受質 *p*-NP butyrate (C4)及 *p*-NP valerate (C5)的酵素活性高於其他長片段的酯類化合物，同樣地利用此方法套用於尿素水解酵素，同樣可發現到新穎性基因 U4802，將其於大腸桿菌中進行大量表現及蛋白活性分析，亦可獲得具有尿素水解之功能。本研究先期成果顯示根據基因體資訊進而合成相關新穎性基因，能有效且快速發現具功能性蛋白質，可做為未來快速找尋新穎性酵素的技術流程。

## 參考文獻

- 鍾仁賜、王鍾和、王俊文、王銀波。1999。不同施肥下水稻之生長及氮素吸收與分佈。土壤與環境。2:65-76。
- 楊秋忠。2002。農業土壤生態品質及生產力研討會論文集。p.1-217。
- Arpigny JL and Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343: 177-183
- Bacha AB, Moubayed NM and Al-Assaf A (2015) An organic solvent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* ALA1 strain with potential for use as an industrial biocatalyst. *Biotechnol Appl Biochem* ( doi: 10.1002/bab.1381.).
- Bajpai, P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* **15**, 147-157.
- Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, Vainstein MH, Oliveira JT, Fiuza LM, Pasquali G and Carlini CR (2007) Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*. 50: 971-983.
- Bisht D, Yadav SK and Darmwal NS (2013) Computation of interactive effects and optimization of process parameters for alkaline lipase production by mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. *Braz J Microbiol* 44: 245-252
- Bogin O, Peretz M, Hacham Y, Korkhin Y, Frolov F, Kalb AJ, Burstein Y (1998) Enhanced thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residues with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase. *Protein Sci* 7, 1156-1163.
- Canavez FC, Luche DD, Stothard P, Leite KR, Sousa-Canavez JM, Plastow G, Meidanis J, Souza MA, Feijao P, Moore SS, Camara-Lopes LH. (2012) Genome sequence and assembly of *Bos indicus*. *J Hered*. 103:342-348.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37, D233-238.
- Cantu D, Govindarajulu M, Kozik A, Wang M, Chen X, Kojima KK, Jurka J, Michelmore RW, Dubcovsky J. (2011) Next generation sequencing provides rapid access to the genome of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust. *PLoS One*. 6:e24230.
- Cao LC, Wang ZJ, Ren GH, Kong W, Li L, Xie W, Liu YH (2015) Engineering a novel glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. *Biotechnol Biofuels*. 8:202.
- Cruz-Rivera M, Carpio-Pedroza JC, Escobar-Gutiérrez A, Lozano D, Vergara-Castaneda A, Rivera-Osorio P, Martinez-Guarneros A, Chacon CA, Fonseca-Coronado S, Vaughan G. (2012) Rapid hepatitis C virus divergence among chronically infected individuals. *J Clin Microbiol*. 51:629-632
- Duarte SH, Hernandez GLD, Canet A, Benaiges MD, Maugeri F and Valero F (2015) Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. *Bioresource Technol* 183: 175-180
- Eloe EA, Fadrosch DW, Novotny M. (2011) Going deeper: metagenome of a hadopelagic microbial community. *PLoS One*. 6:e20388.
- Fang Z, Xu L, Pan D, Jiao L, Liu Z and Yan Y (2014) Enhanced production of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* via genetic and fermentation strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:

- Ferrer M, Martínez-Abarca F, Golyshin PN (2005) Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol.* 16:588-593
- Haney P, Konisky J, Koretke KK, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG (1997) Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus *Methanococcus*. *Proteins* 28, 117-130.
- Hasan F, Shah AA and Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech* 39: 235-251
- Jaenicke S, Ander C, Bekel T. (2011) Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One.* 6:e14519.
- Jin Z, Zhang K, Zhang L, Zheng SP, Han SY and Lin Y (2014) Quantification analysis of yeast-displayed lipase. *Anal Biochem* 450: 46-48
- Jordan DB, Braker JD, Wagschal K, Stoller JR, Lee CC (2016) Isolation and divalent-metal activation of a  $\beta$ -xylosidase, RUM630-BX. *Enzyme Microb Technol.* 82:158-163.
- Kim MS, Weaver JD, Lei XG (2008) Assembly of mutations for improving thermostability of *Escherichia coli* AppA2 phytase. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 751-758.
- Leemhuis H, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2004) Improved thermostability of *Bacillus circulans* cyclodextrin glycosyltransferase by the introduction of a salt bridge. *Proteins* 54, 128-134.
- López-López O, Knapik K, Cerdán ME, González-Siso MI (2015) Metagenomics of an Alkaline Hot Spring in Galicia (Spain): Microbial Diversity Analysis and Screening for Novel Lipolytic Enzymes. *Front Microbiol.* 6:1291.
- Lu Y, Lin Q, Wang J, Wu Y, Bao W, Lv F and Lu Z (2010) Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37: 919-925
- Madan B and Mishra P (2009) Overexpression, purification and characterization of organic solvent stable lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17: 118-123
- Mahadevan SA, Wi SG, Lee DS, Bae HJ (2008) Site-directed mutagenesis and CBM engineering of Cel5A (*Thermotoga maritima*). *FEMS Microbiol Lett* 287, 205-211.
- Mello Bueno PR, de Oliveira TF, Castiglioni GL, Soares Junior MS and Ulhoa CJ (2015) Application of lipase from *Burkholderia cepacia* in the degradation of agro-industrial effluent. *Water Sci Technol* 71: 957-964
- Messaoudi A, Belguith H, Gram I and Ben Hamida J (2010) Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis. *Afr J Biotechnol* 9: 8243-8247
- Murphy, TC, McCracken, JK, McCann, ME, George, J and Bedford, MR (2009) Broiler performance and in vivo viscosity as influenced by a range of xylanases, varying in ability to effect wheat in vitro viscosity. *Br Poult Sci* **50**, 716-724.
- Muynck WD, Belie ND and Verstraete W (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecol. Eng.* 36: 118-136.
- Qin J, Li R, Raes J et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464:59-65.
- Russell RJ, Ferguson JM, Hough DW, Danson MJ, Taylor GL (1997) The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 36,

9983-9994.

- Sandana Mala JG, Kamini NR and Puvanakrishnan R (2001) Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *J Gen Appl Microbiol* 47: 181-186
- Siddique R and Chahal NK (2011) Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Constr. Build. Mater.* 25: 3791–3801.
- Singh, J, Kunhikrishnan A, Bolan NS and Saggarr S. (2013) Impact of urease inhibitor on ammonia and nitrous oxide emissions from temperate pasture soil cores receiving urea fertilizer and cattle urine. *Sci. Tot. Environ.* 465: 56-63.
- Soares JR, Cantarella H and Menegale MLdC (2012) Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. *Soil Biol. Biochem.* 52: 82-89.
- Stocks-Fischer S, Galinat JK and Bang SS (1999) Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil. Biol. Biochem.* 31: 1563-1571.
- Systematics Agenda 2000. (1994) Systematics Agenda 2000: Charting the biosphere. Technical Report. Society of Systematic Biologists, American Society of Plant Taxonomists, Willi Hennig Society, Association of Systematics Collections, New York.
- Turki S (2013) Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases. *Biotechnol Lett* 35: 1551-1560
- Weinstock GM. (2012) Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 489:250-256.
- Widmann M, Juhl PB and Pleiss J (2010) Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *Bmc Genomics* 11: 123
- Yao Q, Sun T, Chen G, Liu W (2007) Heterologous expression and site-directed mutagenesis of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Lett* 29, 1243-1247.

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：(以 200 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以 500 字為限）

本研究自台中縣霧峰鄉農業試驗研究所 35 號試驗田採取水稻根圈土壤，利用不需培養之次世代定序分析方法，獲得大量的生物基因資訊，研究結果發現許多新穎性的基因序列，參與脂肪水解酵素基因(Lipase)有 10 條相關基因可被鑑別(>250 個胺基酸)，其中有 3 條基因與目前已知基因之相似度低於 60% 以下，尿素水解酵素基因(Urease)則有 1 條條相關基因可被鑑別，且其與目前已知基因之相似度低於 60% 以下，此新穎性基因進一步利用全基因合成方式構築於大腸桿菌表現載體上，皆可發現具有活性存在，部分可耐受高濃度有機溶劑或高溫環境，利用此強化新穎性酵素的開發方法，期望開發出之新穎性酵素能應用於生質能源開發、農畜牧業應用及醫療領域上。

#### 4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關\_\_\_\_\_

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：(以 150 字為限)

本研究利用基因體研究技術自土壤環境中發現多種新穎性基因，包含有脂肪分解基因及尿素分解基因等，進一步將此基因轉殖入大腸桿菌中進行表現，亦都具有活性功能，顯示藉由本研究方法策略具有開發其他新穎性功能酵素之潛能，作為工業性發展之用途。