

中文摘要

極端微生物(Extremophiles)是一群生長在極端環境中的微生物，例如極冷、極熱、極酸、極鹼、極鹽及極高壓力等，這類細菌為了適應及應付各種極端環境，常會發展出特殊的生理特性。極端微生物如何能在極端環境下存下來，獨特的細胞構造將扮演著重要的角色。嗜熱菌(Thermophiles)是極端微生物中最常見的一群，而細胞膜是維持細胞完整性及生長的重要細胞器官，已知在高溫細菌其細胞膜上的脂肪組成與正常細菌有所不同。台灣地處環西太平洋火山帶上，島上有許多的地熱溫泉區，存在著許多極端環境例如海底溫泉(submarine hydrothermal vents)、鹼性或酸性地熱區的溫泉等，在過去的研究中已發現在這些天然的高溫環境中蘊藏著許多的高溫微生物。

本研究以來自台灣溫泉中所篩選的嗜熱溫泉菌株為研究對象(菌株來源為台灣大學植物學研究所-蔡珊珊教授實驗室)，分別萃取其菌外多醣體及醣脂質進行研究。首先發現本土嗜熱菌在此次的研究菌種(NTU-1085, NTU-407, NTU-1089, NTU-1233)膜外，皆不含多醣體，而國外標準菌株本 DSM-11303 的多醣體主要組成半乳糖，且此多醣體具有刺激細胞激素 TNF- α 分泌的效果。其次以地域性不同來比較本土菌株及外國菌株所萃取的醣脂質種類及極性分佈，以薄層層析法(TLC)鑑定後，發現標準菌株 DSM-11303 含較多的非極性醣脂質，標準菌株 DSM-20539 則在非極性醣脂質方面含量較少，而本土嗜熱菌株則含量相當，但與標準菌株之間仍有些醣脂質成份分佈呈現明顯的不同。另外，在本土嗜熱菌中，經由氣相層析-質譜儀、核磁共振光譜儀、質譜儀的分析鑑定，對 NTU-1233 萃取的醣脂質中，鑑定出含有一類為帶負離子含硫脂質 (sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol) 衍生物的結構，此結構在嗜熱菌中屬於新發現的結構，這也證實並非如先前的文獻中所提及，只存在進行光合作用的高等植物中。最後對於生物活性促進免疫反應之分析結果，本土嗜熱菌的醣脂質萃取物無論在 TNF- α 或 IL-6 皆呈現促進細胞激素分泌的效果。台灣本土存在著許多極端環境，也已發現在這些天然的高溫環境中蘊藏著許多的高溫微生物，由此次研究結果得知，這些本土嗜熱菌蘊藏著無限的研究題材，實在值得我們探討研究。

關鍵字：極端微生物、嗜熱菌、菌外醣脂質、高溫區

ABSTRACT

Extremophiles are organisms that can survive and grow under extreme environments, such as extreme cold, high temperature, extreme acidic or basic and high salinity. Extremophiles can develop novel biochemical or physiological properties, such as specific enzyme system, to adapt various extreme environments. The unique cellular structure or stable macromolecules play important roles for Extremophiles. Thermophiles are the major part of Extremophiles that show extreme tolerance for high temperature. The cell membranes are important in maintaining the integrity of cells within their growth temperature range. The properties of these structures contribute to the ability of microorganisms to grow at high temperatures. According to the previous report, the polar lipid fractions of cell membranes from hyperthermophilic bacteria showed change in composition in response to changes in the growth temperature.

Thermophiles-related isolates used in the studies were recovered from hot spring of Taiwan. Polysaccharides and glycolipids were obtained from these organisms (indigenous strains: NTU-407, NTU-1085, NTU-1089, NTU-1233 and type strain: DSM-11303) and subjected to further analysis to understand whether or not these materials were directly contributed to high temperature resistant property. Polysaccharides were obtained from DSM-11303 strain (type strain) solely among the strain that were investigated, and its compositions were analyzed by GC-Mass. Polysaccharides obtained from DSM-11303 comprise mainly galactose, less N-acetyl-galactosamine was also presented. Massive TNF- α expression in macrophage induced by polysaccharides obtained from DSM-11303 indicates the immuno-modulative activity of the extracts. Comparison and distribution of TLC analysis of glycolipids extracts of type strain bacteria (DSM-11303, DSM-20539) and locally isolated substrains (NTU-407, NTU-1085, NTU-1089, NTU-1233) shows huge diversity. The structures of major glycolipid purified from glycolipid crude extracts from NTU-1233 were determining using TLC, NMR spectroscopy (TOCSY, COSY, HSQC, HMBC), GC-MS and ESI-MS, and chemical analyses. According to the spectroscopic analyses, the structures of glycolipid is elucidated to be sulfolipids sulfoquinovosyl diacylglycerol. Sulfolipids sulfoquinovosyl diacylglycerol, it is the first time been found outside the plant kingdom. Treatment of glycolipids from locally isolated thermophiles-related strains (NTU-407, NTU-1085, NTU-1089, NTU-1233)

stimulates both the TNF-alpha and IL-6 expression of macrophage. Taiwan is a small island locates and diverse extreme environments, are widely distributed in different areas in this island. Several indigenous thermophilic bacteria were isolated from geothermal areas. Results from this study that these local thermophilic bacteria and there are boundless research subjects, we really value in the study.

Key words: **Extremophiles, Thermophiles, Glycolipid, geothermal areas**

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	2
目錄	4
前言	5
研究目的	7
研究方法	8
結果與討論	11
研究成果自評	25
參考文獻	26

一、前言

極端微生物 (extremophiles) 是一群能生存在極端環境，例如在高溫、低溫、乾旱、高鹽、幅射照射或極端酸鹼值生存的微生物。極端微生物包括嗜熱菌 (thermophiles)、嗜冷菌 (psychrophiles)、耐鹽菌 (halophiles)、耐壓菌、耐酸菌 (acidophiles)、耐鹼菌 (alkaliphiles) (Stetter, 1998)。通常這些極端微生物能適應多種逆境的微環境中，顯示在極端環境中生物多樣性的豐富度，由此可看出極端微生物對環境的適應能力，使得他們可以在獨特的生態區域生存 (Kristjansson and Stetter, 1992)、增殖，但是它們如何應用其他微生物所缺乏的獨特能力來對抗這些特殊的環境，其詳細的作用機制還不是很清楚 (Madigan and Mairs, 1997)。

台灣素有美麗寶島之稱，地處環太平洋火山帶上，島上地熱特徵明顯，特別是溫泉的密度相當之高，到民國八十五年止，有命名之溫泉即達127座，其分布包括平原、溪谷、高山或海域，其內涵又可分冷泉、溫泉、高溫泉或白磺、青磺、碳酸泉、鹼性溫泉等。直至2004年為止，已有許多本土性的嗜熱菌陸續被分離鑑定出，例如 *Alterococcus agarolyticus* (Shieh and Jean, 1998)、*Sulfolobus yangmingensis* (Jan *et al.*, 1999)、*Meiothermus taiwanensis*, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* and *Rubrobacter taiwanensis* (Chen *et al.*, 2002a & 2002b; Chen *et al.*, 2004)，許多相關的研究也陸續展開中。在2004年也由烏來溫泉中分離之 *Meiothermus taiwanensis* ATCC BAA-400 中，分離得到極性醣脂質的結構組成一為 $\alpha\text{Galp}(1-6)\text{-}\beta\text{-Galp}(1-6)\text{-}\beta\text{-GalNAcyl}(1-2)\text{-}\alpha\text{Glc}(1,2)\text{-Gro}$ diester，脂肪酸主要為 C17:0 等組成 (Yang *et al.*, 2004)。

有許多國家看準了嗜熱菌此類特異微生物的潛力，將這個領域的研究視為生物技術發展的一個重要環節，投注大量的研究經費及人力來發展此部份的研究，例如歐盟自西元 1993 年起，便有一個以“極端微生物微生物工廠的計畫 (Extremophiles as cell factory)” (Aguilar *et al.*, 1998)。此外，我們的鄰國-日本，除了熟知的泡湯文化外，對於高溫微生物的研究，亦是投注大量的金錢與人力，如日本京都大學的研究群，就分離出一株生存於日本海域 Kodakara 島海底熱泉的嗜熱古生菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (Fujiwara *et al.*, 1996)，先以全基因定序的方式將菌之全基因加以解碼後 (whole genome sequencing)，再以序列

配合功能性基因體 (functional genomics)的方式，選殖出許多熱穩定性之酵素基因，並藉此將許多酵素應用於不同方面，如轉殖熱穩定性的 Ribisco 基因至水稻以增加其對高溫環境的抗性，重組並表現高效率的 DNA polymerase 且加以商業化等，控制菌體代謝途徑使其產生氫氣用於燃料電池等，這些都是嗜熱菌研究的一個良好示範，可以充分說明嗜熱菌在基礎研究與生物技術發展上所具有潛力(Tanak *et al.*, 1999)。

先前中央研究院及國立台灣大學組成團隊的研究中，對綠島朝日海底溫泉為對象，展開極端微生物之研究，因朝日溫泉是世界少有的三座海底溫泉之一，為一高鹽、溫度由50°C ~90 °C 不等之溫泉。從朝日溫泉中取得樣本，經菌種的分離、純化及鑑定後，分離到兩株紅色的革蘭氏陰性桿菌株NTU-1511 及 NTU-1525，分別可存活於60°C 及70°C，經由16SrDNA 序列的分析，其序列相較於*Rhodothermus marinus* 菌標準株 DSM 4252^T，達3%的相異度，再經由型態鑑定，細胞組成及生理生化特性測試，此兩菌株確實有與標準菌株相異之處，應為一新種，故命名為*Rhodothermus taiwanensis*。對其生理、細胞、遺傳等特性作進一步的研究，證實其為台灣新種之嗜熱菌的可能性，在之前研究中，已利用型態鑑定，例如：革蘭氏染色法、穿透式電子顯微鏡觀察，生理特性的測試，例如：生長酸鹼度的測試生長、溫度的測試、耐鹽度測試、生長曲線測定、單一碳源的利用能力、澱粉水解能力測試、蛋白酵素活性測試、酵素活性檢測、脂肪酸組成分析等證實確為台灣新種之嗜熱菌。

生存於高溫環境的嗜熱菌為了適應環境，常會發展出特異的生理特性與細胞結構，以應付惡劣的生存環境，除有獨特的生理特性與高穩定性的酵素系統，這類菌種細胞膜富含飽和脂肪酸及改變脂肪酸鏈的長度，使膜能在高溫下保持穩定並具功能 (Stetter, 1998; Lamosa *et al.*, 2000)，例如，*Escherichia coli*, *Thermus aquaticus*, *Candida* species、 thermophilic *Bacillus* species 及 *Staphylococcus aureus* 生長在高溫時，其支鏈脂肪酸的比例增加而monoenoic 及 heptanoic fatty acids 比例降低(Shen *et al.*, 1970)。*Thermus* 及 *Meiothermus* 菌在其細胞膜上之極性脂質包含了一些主要的磷脂質(phospholipid)、醣脂質(glycolipid)(Ferreira *et al.*, 1999; Wait *et al.*, 1997)，這些醣脂質通常含有三個六碳糖(hexoses)，一個N-hexosamine

及一個 glycerol (William and da Costa, 1992; Carreto et al., 1996; Donato et al., 1990; Ferraz et al., 1994; Lu et al., 2004; Yang et al., 2004) ; 隨著生長溫度的增加, 在細胞膜上的醣脂質所含比例亦隨之增加 (Prado et al., 1988; Ray et al., 1971)。這些 Thermophilic 及 hyperthermophilic 菌體含 phospho-sugar-related solutes, 例如 di-myo-inositol phosphate (Martins et al., 1996; Scholz et al., 1992)、mannosylglycerate 及 mannosylglyceramide (Martins and Santos, 1995; Silva et al., 1999)、di-myo-inositol phosphate (Martins et al., 1996) 及 galactosyl-5-hydroxylysine (Lamosa et al., 1998) ; 這些特別之結構組成可能是使這些微生物在高溫時能得以適應環境 (Da Costa et al., 1998)。

二、研究目的

近年來對於嗜熱菌的研究可一分成兩個部份, 從基礎科學研究的角度看來, 偏重於嗜熱菌的分類與生態間的關係, 特別是在各種不同的極端環境中去分離、培養及鑑定出新種的嗜熱菌, 來探索微生物所能生存的極限。從科技應用的角度來看, 如何去應用這些高溫的微生物及從嗜熱菌中分離出的熱穩定性酵素, 特別是在一些特別領域上的應用, 如生化有機合成, 生物感應器等, 都是具潛力的發展方向。

由於極端微生物所具有獨特的特性可以提供給生物技術的研究和應用上無限的潛力, 因此嗜熱菌的分離及相關的研究對於生命科學之研究為一個優先且重要之課題。

本研究乃以台灣本土溫泉所篩選得到之嗜熱菌 (NTU-407, NTU-1085, NTU-1089, NTU-1233) 為對象, 進行嗜熱菌外多醣體及醣脂質組成、結構及特性分析, 並與標準菌株 (DSM-11303^T; *Deinococcus murrayi*) 進行比較; 並藉由這些萃取得到之醣脂質進行生物免疫活性分析。期望藉由對本土嗜極微生物的一連串探討後, 對本土嗜熱微生物菌外多醣體及細胞膜上醣脂質性質得到一些資料, 在建立起本土微生物特有的菌外多醣及醣脂質組成資料庫上盡一己微薄之力; 並期望從中找到可增加免疫反應等活性物質, 使本土嗜熱菌充分發揮功能。

三、研究方法

1. 台灣溫泉嗜熱菌胞外多醣體之分析與結構鑑定

1.1 嗜熱菌之培養：使用 *Thermus* 培養液稍作調整。培養方式為 50°C，各菌種培養時間 20-36 小時不等。

1.2 外多醣 (exopolysaccharide, EPS) 之分離：將嗜熱菌接種於 *Thermus* 培養液中，在 50°C 下培養 20-36 小時不等後，離心，取菌體置於二次水中，100°C 煮沸 15 分鐘，冷卻後離心取上層液，以冰丙酮進行析出沉澱，以 9000 rpm 離心後，取沉澱冷凍乾燥。

1.3 外多醣 (EPS) 之純化：每次取約 4mg 粗萃取外多醣體粉末溶於 1ml 二次水中，離心 600xg，3 分鐘後取上清液，經 0.45µm 濾膜過濾，所得之樣品以高效液相層析儀搭配膠體層析管柱(gel filtration)分離，流速 1 ml/min，以折射率偵測器(Refraction index ;RI detector)及紫外線偵測器(UV detector)偵測。

1.4 以氣相-層析質譜儀 (GC-MS)分析外多醣體之單醣組成：純化之多醣體中加入內指示劑(arabitol)，另以混合標準品(含 arabitol、arabinose、rhamnose、xylose、fucose、galactose、glucose、N-acetyl galactosamine、N-acetyl glucosamine、mannose)同時進行樣品處理。接著以氣相層析質譜儀以升溫方式分析樣品及標準品中之結果，以分析軟體分析，由於單醣皆會有 204 或 217、273 之斷裂片段，因此以這些片段來作篩選。

1.5 以氣相-層析質譜儀 (GC-MS)分析外多醣體之單醣醣鍵結：樣品處理步驟如下圖所示，再以氣相層析質譜儀分析，由於不同醣鍵結會造成不同斷裂片段，但大部分仍會有 117、118、190 其中一個片段，因此以這些片段作為篩選。

2. 台灣溫泉嗜熱菌胞外醣脂質分析與結構鑑定

2.1 嗜熱菌之培養：使用 *Thermus* 培養液稍作調整。培養方式為 50°C，各菌種培養時間 20-36 小時不等。

2.2 膜外醣脂質之萃取：以絕對酒精萃取菌種之胞外醣脂質(1:10; w/v)，震盪 2 小時後，離心取上清液濃縮，得胞外醣脂質粗萃物。

2.3 膜上醣脂質之分離與純化：以凝膠管柱(Gel filtration)和矽膠管柱(silica gel) 層析法等步驟分離純化，利用高效能薄層片(HPTLC)配合呈色反應，偵測純化後之分析物。

2.4 化學組成分析：

2.4.1 Methanolysis：分析物於 0.5 M CH₃OH-HCl 在 80°C 中反應 1 小時後，使產生 fatty acid methyl esters (FAMES)，以氣相層析-質譜儀 (GC-MS) 比較標準品脂肪酸之滯留時間，鑑定分析物中脂肪酸組成種類。

2.4.2 Acidic hydrolysis：分析物於 5 M HCl 在 110°C 中反應 20 小時後，水解產物以 NaOH 中和後，以 chiral HPLC 決定 glyceric acid 的絕對組態 (absolute configuration)；而其單醣種類則以 high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)進行分析。

2.5 結構分析與鑑定：

利用 MALDI mass spectroscopy and MS-MS 配合核磁共振光譜儀(NMR)測定。

2.5.1 MALDI 質譜儀：純化之樣品溶於甲醇後，以 MALDI-TOF 質譜儀分析，以 Cyano-4-hydroxycinnamic acid 當作 matrix。

2.5.2 核磁共振光譜儀：欲分析之樣品溶於 CDCl₃:CD₃OD (99:1, vol/vol)中，以 Bruker Avance 400 and 600 spectrometers 測量分析。

3.台灣溫泉嗜熱菌生物活性有效分子之研究

3.1 免疫反應測定：

3.1.1 細胞株之培養：

3.1.1.1 Raw cell line (murine macrophage cell line, ATCC TIB-71): 購至新竹食品工業展研究所菌種保存中心; 培養於 DMEM 培養液中, 外加 10% bovine serum, 1 mM Sodium pyruvate 與適量抗生素 (100 IU/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin), 置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內培養

3.1.2 免疫酵素分析方法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

測定經過成分(由菌中純化所得之粗醣脂質成分)所刺激之細胞的 TNF- α and Interleukines 含量。在 96 well tissue culture plates 上每個 well 中含 2×10^5 Raw cells, 加入不同濃度的由菌中純化所得之粗醣脂質成分, 另以 LPS (1 µg/mL) 刺激細胞, 當作控制組, 培養 24 h 後, 取適量上清液, 利用 ELISA kits (R & D system) 測定 TNF- α 及 interleukine-6 的活性。

3.2 細胞毒性的測試:

以 MTT assay 進行; 上述反應後將上清液去除, 加入 MTT 試劑(0.05 mg/well)及新鮮 DMEM 培養液, 置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內培養 2 h 後, 移除上清液並加入適量的 DMSO, 測 OD_{570 nm}。

3.3 癌細胞毒殺試驗:

3.3.1 癌細胞株之培養

3.3.1.1 MCF7 細胞株: 為人類乳房腺瘤癌細胞 (human breast adenocarcinoma); 以 MEM 培養基培養, 詳細的組成為 Minimum essential medium Eagle 含 2 mM L-glutamine 及 Earle's BSS 以 1.5 g/L sodium bicarbonate 調整 pH 值至 7.2~7.4 後, 加入 10% 胎牛血清 fetal bovine serum 與適量抗生素 (100 IU/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin), 置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內培養。

3.3.1.2 Hep 3B2.1-7 (Hep 3B) 細胞株: 人類肝腫瘤細胞株 (Human hepatocellular carcinoma); 以 MEM 培養基培養, 詳細的組成為 Minimum essential

medium Eagle 含 2 mM L-glutamine 及 Earle's BSS 以 1.5 g/L sodium bicarbonate 調整 pH 值至 7.2~7.4 後，加入 10%胎牛血清 fetal bovine serum 與適量抗生素 (100 IU/mL Penicillin and 100 µg/mL Streptomycin)，置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內培養。

3.4 毒殺試驗：

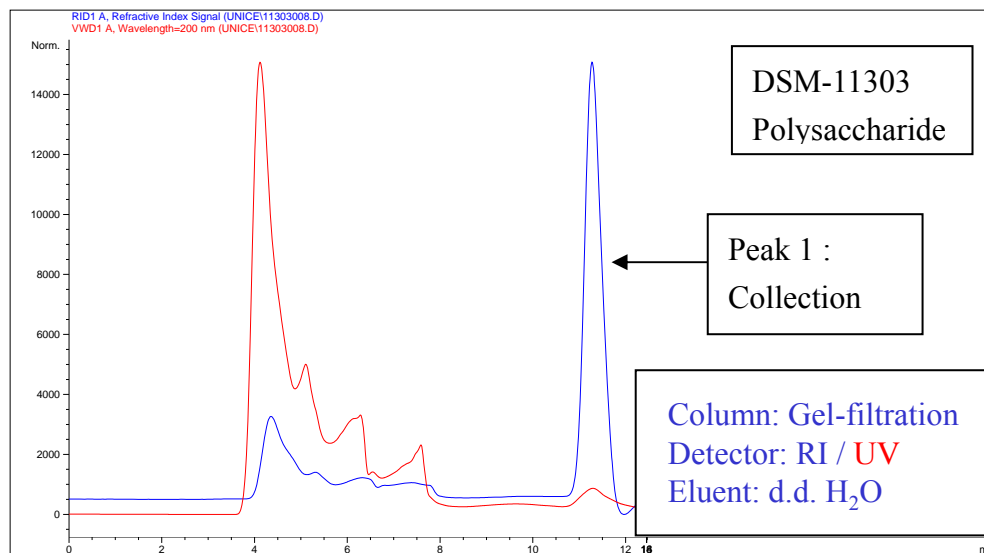
3.4.1 以 MTT assay 進行：在 96 well tissue culture plates 上每個 well 中平均種入含 2×10^4 cells，加入不同濃度的由菌中純化所得之醣脂質成分，另以 LPS (1 µg/mL) 刺激細胞，當作控制組，培養 24 h 後，將上清液去除，加入 MTT 試劑(0.05 mg/well)及新鮮 DMEM 培養液，置於 37°C 與 5% CO₂ 的培養箱內培養 2 h 後，移除上清液並加入適量的 DMSO，測 OD_{570 nm}。

四、結果與討論 (含結論與建議)

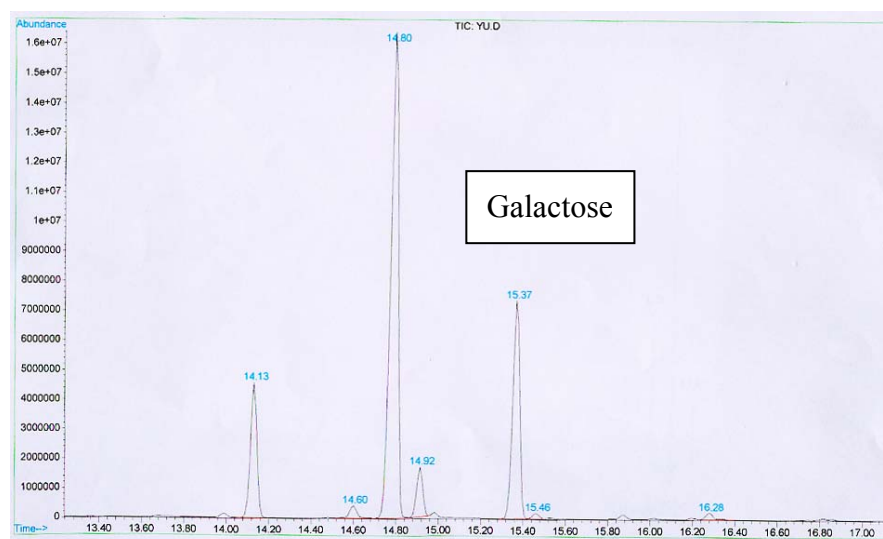
在本研究中，以數株台灣本土溫泉中篩得的高溫菌(NTU-484, NTU-1233, NTU-1085, NTU-1089, NTU-407, Tr: *Truepera radiovitrix*)為研究對象，萃取其細胞膜上的醣脂質、多醣體，對其醣脂質、多醣體的組成、結構、鍵結作分析鑑定，並與標準菌株(DSM-11303, *Deinococcus murrayi*; DSM-20539, *Deinococcus radiodurans*;)作一系列比較，

將各嗜熱菌株進行多醣體的萃取，但是只有標準菌株 DSM-11303 具有多醣體，而在此研究所選擇之三株本土菌株(NTU-407, 1085, 1089)中，經過多次及多種方法之萃取後，皆無法取得多醣體，故僅將此標準菌株 DSM-11303 之多醣體以高效液相層析儀純化(結果如圖一)，分離得到之 peak 1，進一步以氣相層析-質譜儀(GC-MS)鑑定其醣類組成(結果如圖二)，與標準品比較後，發現位於滯留時間 15.37min 之波峰，與標準品半乳糖(galactose)滯留時間相同，經 GC-MS 斷片分析，確定 peak 1 確實含有半乳糖；另外，在此 peak 1 內也含少量的 N-acetyl-galactosamin 及 N-acetyl-glucosamine；由此實驗可知，本土嗜熱菌外多醣體分泌量並不多，與外國標準菌株比較之下，含量不多甚至是零，所以在改變許多萃取方式如改變加熱時間、改變冰丙酮添加量、添加鹽類幫忙萃取等後，仍

無法由本土嗜熱菌中得到多醣體。初步認為，在本土嗜熱菌中，其膜外主要組成並不是由多醣體構成，故我們進一步對構成細胞膜主要的成分脂質/醣脂質做探討。

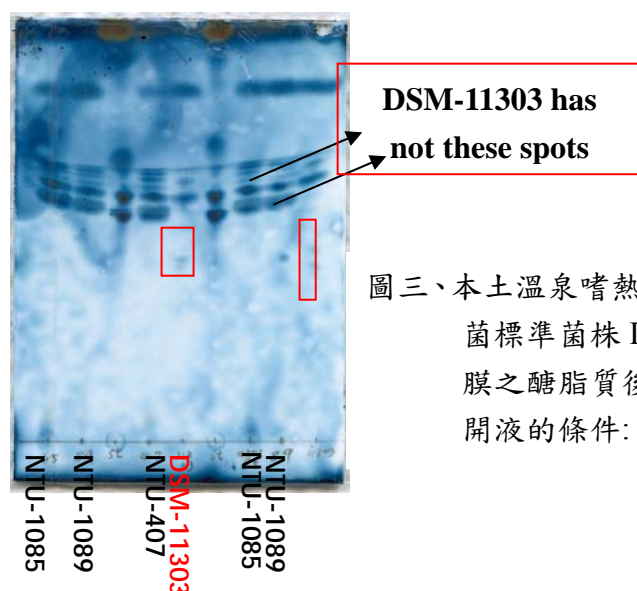


圖一、嗜熱標準菌株 DSM-11303 經萃取多醣體後，以高效液相層析儀(HPLC)搭配凝膠管柱(gel filtration)分離，以 RI 及 UV 偵測器所得之結果



圖二、嗜熱標準菌株 DSM-11303 經萃取之多醣體，以高效液相層析儀搭配凝膠管柱分離得到之 peak 1，再以氣相層析-質譜儀(GC-MS)鑑定其醣類組成

以數株台灣本土溫泉中篩得的嗜熱菌(NTU-484, NTU-1233, NTU-1085, NTU-1089, NTU-407, Tr.)為研究對象，萃取其細胞膜上的醣脂質，對其醣脂質的組成、結構、鍵結作分析鑑定，並與標準菌株(DSM-11303, *Deinococcus murrayi*; DSM-20539, *Deinococcus radiodurans*;)作一系列比較，各菌株在經過絕對酒精初步萃取濃縮後，以 TLC 偵測其細胞膜上的醣脂質之種類，結果如圖三，本土溫泉嗜熱菌 NTU-1085, 407, 1089 與外國奇異球菌標準菌株 DSM-11303 的膜外醣脂質種類差異頗大，圖中紅框中之 spot 為標準菌株 DSM-11303 特有，本土嗜熱菌皆未觀察到這個 spot，另外以箭頭指出的二個 spots 則為本土嗜熱菌特有，而在本土嗜熱菌上，其膜外醣脂質的組成分類較接近，由此圖得知，地域上的不同，使這些嗜熱菌膜外醣脂質皆各有其獨特的組成。



圖三、本土溫泉嗜熱菌 NTU-1085, 407, 1089 與外國奇異球菌標準菌株 DSM-11303，初步以絕對酒精萃取細胞膜之醣脂質後所得之薄層層析(TLC)結果。TLC 展開液的條件: chloroform / methanol 5/1。

接下來將這些粗醣脂質萃取物進行分離，經矽膠(silica gel)及凝膠(LH-20 gel)管柱分離後，再以 TLC 偵測分離結果如圖四，圖四(1)為本土嗜熱菌 NTU-1089 所得結果，圖四(2)為本土嗜熱菌 NTU-407 所得結果，圖四(3)為外國標準菌株 DSM-11303 所得結果，圖四(4)為本土嗜熱菌 NTU-1085 所得結果；醣脂質一直以來皆被認為非常難純化到單一化合物，在本研究中亦遇到相同的難題，經過兩種管柱〔矽膠(silica gel)及凝膠(LH-20 gel)〕的純化，仍無法得到單一化合物，故

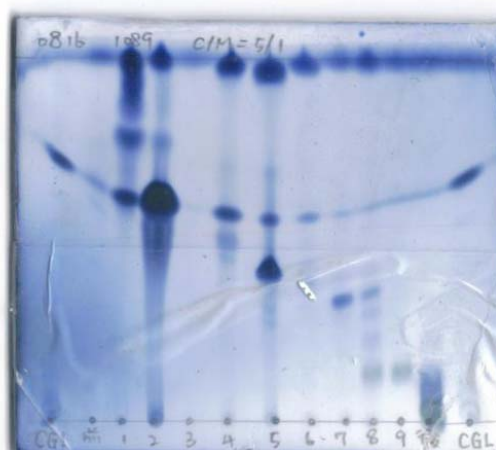
在接下來的氣相層析-質譜儀(GC-MS)研究中，僅就含量較多的化合物進行 TLC 分離後，由層析片上直接萃取的步驟，過程漏失非常多的樣品，使得最後得到的結果並不多。進行醣類組成(composition)及鍵結(linkage)之鑑定後，僅初步證實，在 NTU-1085 的醣脂質之醣類部份含有半乳糖，及一些標準品中不存在的化合物；另外以本土 NTU-1233 進行醣脂質之醣類組成分析(圖五)後，亦得到類似的結果，僅比對到內標準品 arabitol 的滯留時間，另兩支主要的波峰並無法由這些標準品中比對得到。故嘗試進一步以核磁共振光譜儀(NMR)做分析鑑定。

這些實驗結果有幾種可能性：(1)是在實驗進行過程中，以 TLC 片直接萃取醣脂質時，由於步驟較多，過程受到汙染；(2)在以 TLC 片直接萃取醣脂質時，以甲醇將 silica gel 中之化合物溶出時，也將 gel 溶出或部分破壞醣脂質，故在以後的實驗過程中，建議儘量以管柱層析將樣品純化達到高純度，再進行下一步的鑑定；另外，若需以 TLC 片進行進一步的樣品萃取時，建議不要以 100% 甲醇萃取，應添加第二種溶劑降低甲醇對 silica gel 的溶出率，確保樣品的純度。

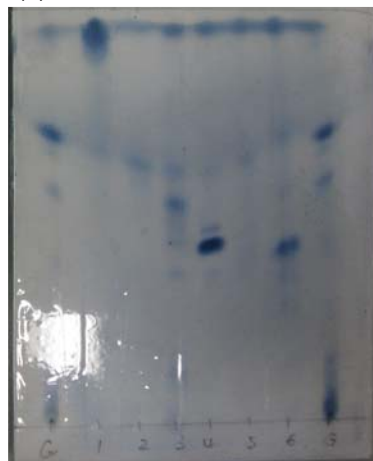
另外，在以單向 TLC 比較本土及外國標準菌株膜外醣脂質之種類結圖如圖六，圖六左圖中之 1 為已知的標準品 PGL1 及 PGL2 (Yang et al. 2006)、2 為標準菌株—DSM-20539(*D. radiodurans.*)、3 為本土篩得之嗜熱菌 NTU-407、4 為本土篩得之嗜熱菌 NTU-1085、5 為本土篩得之嗜熱菌 NTU-1089、6 為外國標準菌株—DSM-11303(*D. murrayi.*)、7 為本土篩得之嗜熱菌 NTU-484、8 為本土篩得之嗜熱菌 NTU-1233、9 為外國嗜熱菌 *T. radiovitrix*。所得知結果；比較各菌種膜外醣脂質之差異性上，本土嗜熱菌 NTU-407 (lane 3)、NTU-1085(lane 4)及 NTU-1089(lane 5)有較相似的醣脂質成份；由外國篩得之標準菌株與本土嗜熱菌有明顯較大的差異性，與本土嗜熱菌比較，DSM-11303 (lane 6)缺少極性醣脂質，DSM-20539 (lane 2)在非極性醣脂質含量較少；而本土嗜熱菌 NTU-1233 (lane 8)則與外國嗜熱菌 *T. radiovitrix* (lane 9)有非常接近的組成及含量，整體而言，台灣本土嗜熱菌膜外醣脂質與外國菌株存在著許多的差異性，雖然在單向 TLC 上的結果顯示本土嗜熱菌 NTU-1233 (lane 8)則與外國嗜熱菌 *T. radiovitrix* (lane 9)有非常接近的組成及含量，但接著以雙向 TLC 展開後發現，本土篩選之嗜熱菌-NTU-1233(圖六中間圖)及標準菌株 *D. radiodurans* (圖六右圖)之醣脂質發現差異

性主要在，NTU-1233 所含之醣脂質較偏向非極性的醣脂質，而標準菌株之醣脂質組成如圖六左圖之單向 TLC 所得結果，DSM-20539 (lane 2)在非極性醣脂質含量較少。

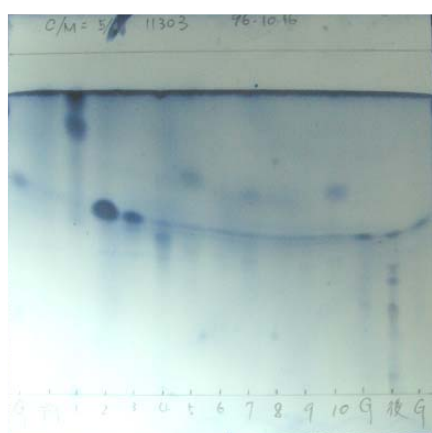
(1) NTU-1089



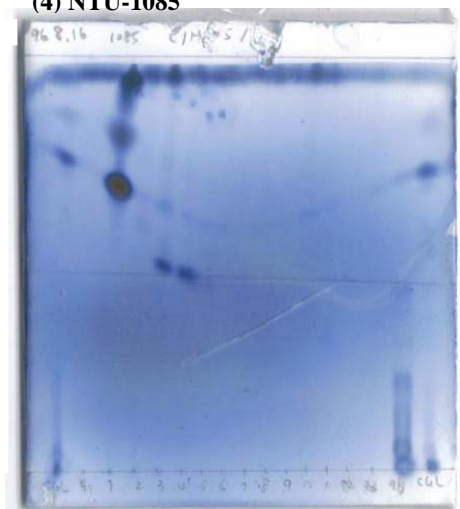
(2) NTU-407



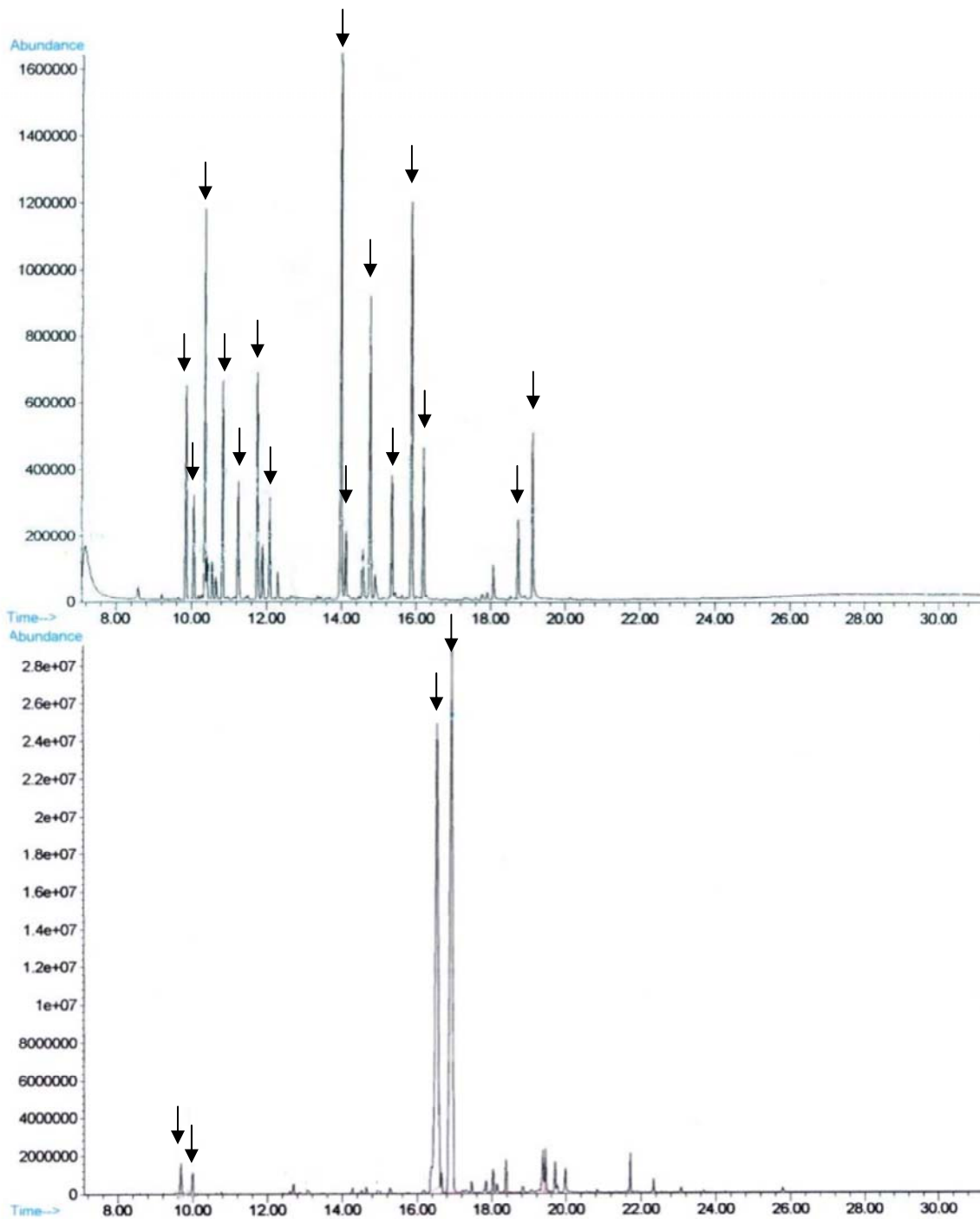
(3) DSM-11303



(4) NTU-1085

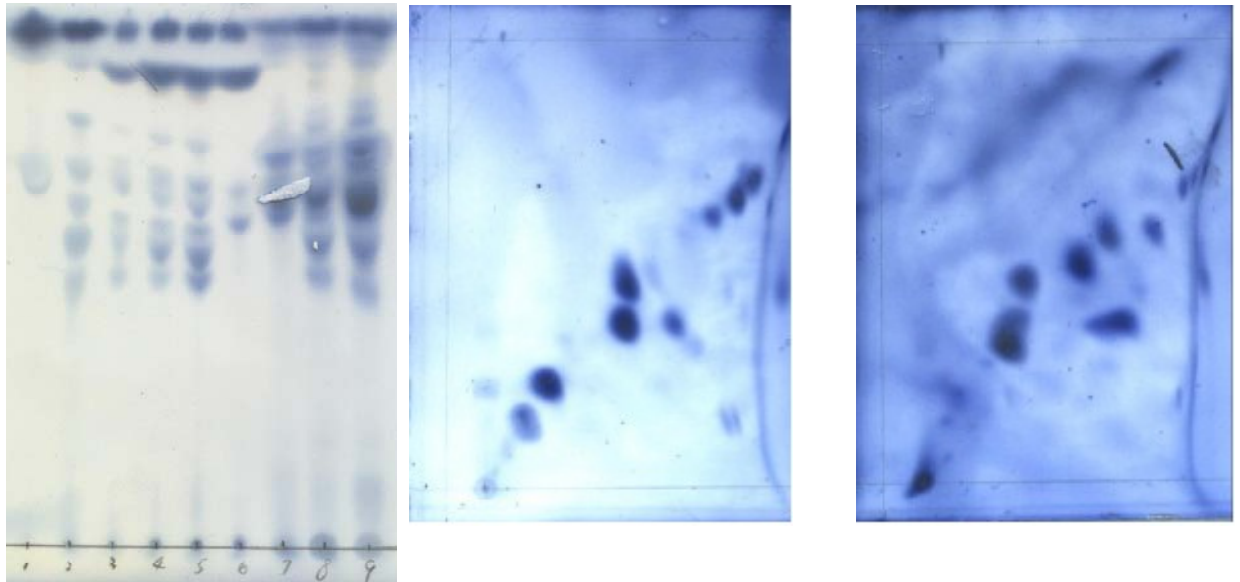


圖四、(1)為本土嗜熱菌 NTU-1089、(2)為本土嗜熱菌 NTU-407、(3)為外國標準菌株 DSM-11303，分別進行膜外醣脂質萃取後，經矽膠(silica gel)及凝膠(LH-20 gel)管柱分離後，再以 TLC 偵測分離結果。TLC 展開液的條件: chloroform / methanol 5/1。



圖五、氣相層析-質譜儀圖譜。上圖為標準品之結果圖譜；下圖為本土嗜熱菌 NTU-1233 分析圖譜。上圖之標準品依滯留時間(分鐘)出現的波峰(以箭頭指出)分別如下：arabitol 1, 9.82 分; arabitol 2, 10.01 分; rhanose 10.36 分; fucose 1, 10.81 分; fucose 2, 11.34 分; xylose 1, 11.82 分; xylose 2, 12.10 分; mannose, 13.99 分; galactose 1, 14.58 分; galactose 2, 14.72 分; galactose 3, 15.36 分; glucose 1, 15.88 分; glucose 2, 16.20 分; N-acetyl-galactose, 18.78

分; N-acetyl-glucose, 19.12 分。下圖中四個箭頭分別是內標準品 arabitol 的滯留時間 9.82 分及 10.01 分，而 16.39 分及 16.98 分(未知物)。



圖六、(左圖)以薄層層析法分析本土篩選之嗜熱菌及二株標準菌株之醣脂質圖譜。1: 已知的標準品 PGL1 及 PGL2 (Yang et al. 2006); 2, DSM-20539: *D. radiodurans.*; 3, NTU-407; 4, NTU-1085; 5, NTU-1089; 6, DSM-11303: *D. murrayi.*; 7, NTU-484; 8, NTU-1233; 9, *T. radiovitrix.* TLC 展開液的條件: chloroform / Ether / methanol / 28% ammonia : 55/10/30/5 ; 以雙向薄層層析法(2D-TLC)分析本土篩選之嗜熱菌- NTU-1233(中間圖)及標準菌株 *D. radiodurans* (右圖)之醣脂質圖，第一向 TLC 展開液的條件: chloroform / methanol / 28% ammonia 65/25/5 ; 第二向 TLC 展開液的條件 chloroform / acetone / methanol / acetic acid /water 32/8/5/4/1.6.

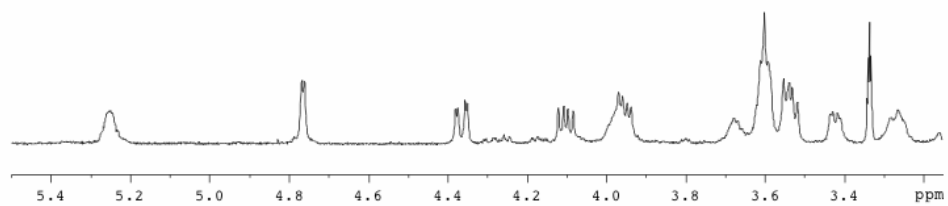
進一步將 NTU-1233 菌株純化之醣脂質進行核磁共振光譜儀及質譜儀測定，所得結果如表一及圖七~圖十一；在圖七($^1\text{H-NMR}$)中 3.2 至 5.4 ppm 間為醣類的訊號，而在 0.8 至 2.3 ppm 間為脂肪酸的訊號，再以 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜、COSY 光譜及 HSQC 光譜等測定，初步鑑定此化合物的結構應為 diacyl-glycerol 衍生

物 6-deoxy- α -glucopyranose-6-sulfonic acid，此結構在之前已在紅藻植物中被發現 (Araki et al., 1989)。

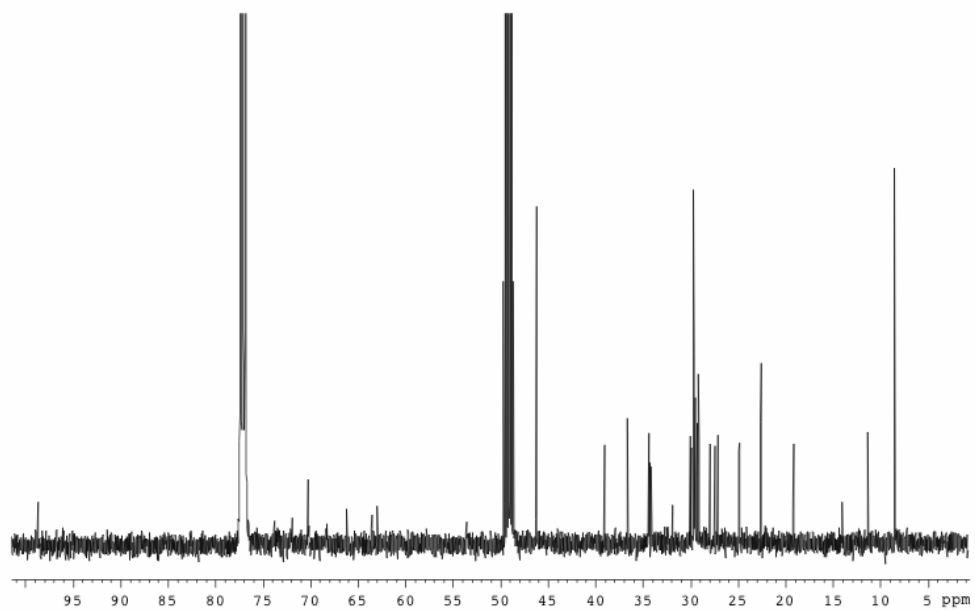
進一步以電子噴灑離子質譜分析光譜儀 (electrospray ionization mass spectrometry on negative mode) 分析此化合物的分子量 (如圖十一)；測得 sulfoquinovosyl dihexadecanoyl glycerol 主要的分子量落在 793 m/z，由此推斷此化合物之分子式為 $C_{41}H_{77}O_{12}S^-$ 。由以上結果得到此化合物之結構如圖十二所示。

表一、本土嗜熱菌 NTU-1233 的 1H , 及 ^{13}C NMR 化學位移數據

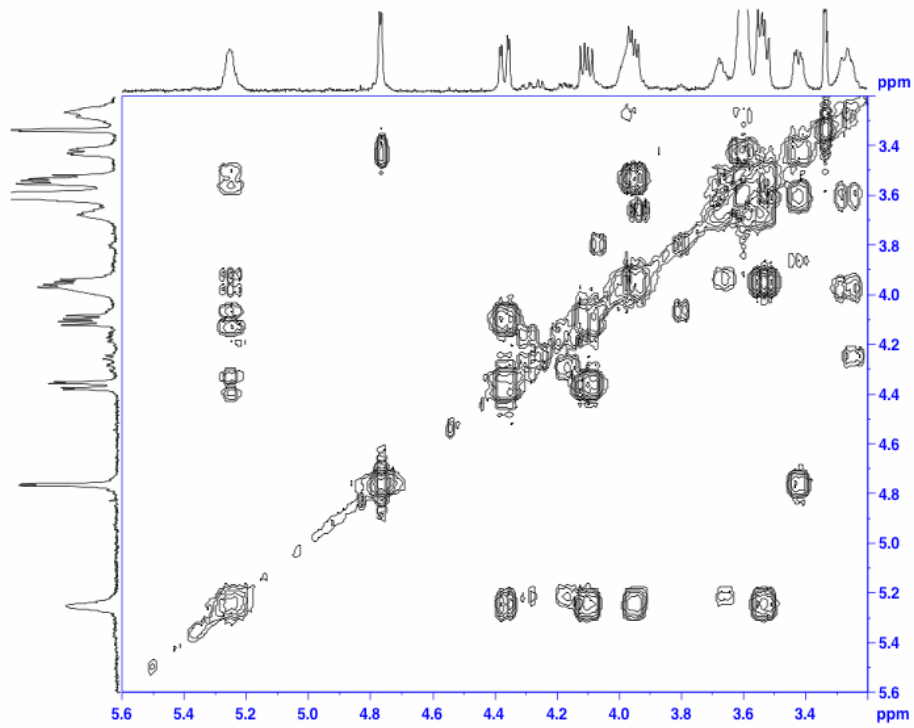
Position	δ_H	δ_C
Fatty acid		
<i>iso</i> -CH ₃	0.81, d (6.7)	22.8
<i>anteiso</i> -CH ₃	0.81, d (6.7)	11.4, 19.2
<i>iso</i> -CH	1.09, m	36.6
<i>anteiso</i> -CH	1.03, m	39.2
<i>normal</i> -CH ₃	0.79, m	14.1
-(CH ₂) _n -	1.14-1.28, m	29.1-30.2
-CH ₂ CO-	2.27, q (7.2)	34.4
-CO-		N/A
α -Sulfoquinovose		
1'-CH	4.76	98.9
2'-CH	3.42	72.2
3'-CH	3.60	70.2
4'-CH	3.53	63.7
5'-CH	3.94	66.2
6'-CH ₂	3.26	73.7
	3.25	
Glycerol		
1-CH ₂ O	4.37	62.9
	4.10	
2-CHO	5.25	70.2
3-CH ₂ O	3.96	66.2
	3.53	



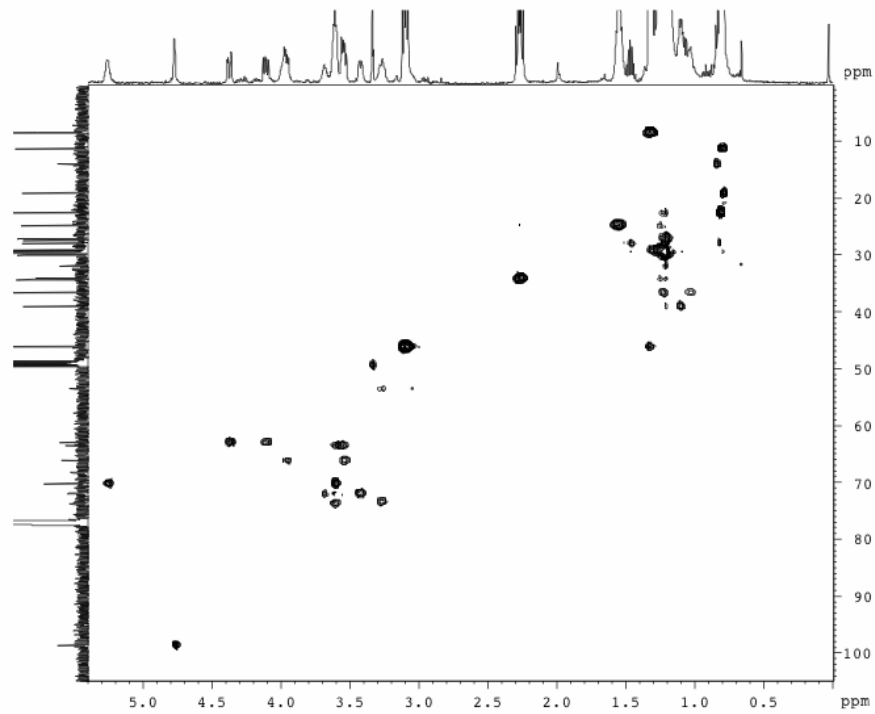
圖七、NTU-1233 純化醣脂質之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜 (zoom in)。



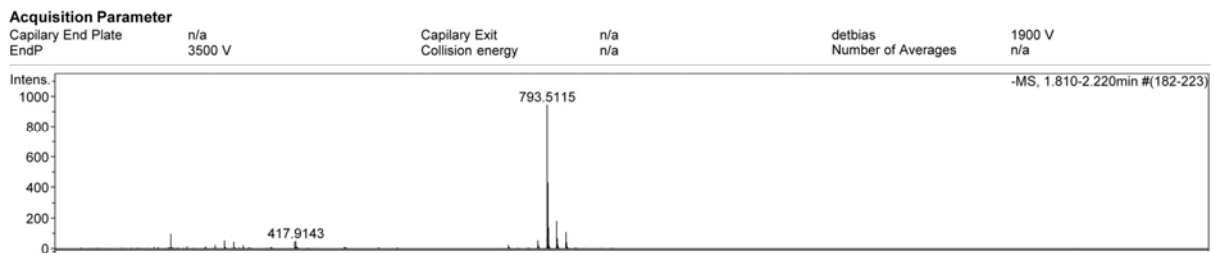
圖八、NTU-1233 純化醣脂質之 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜



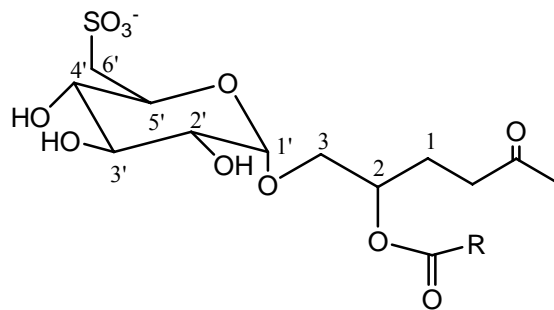
圖九、NTU-1233 純化醣脂質之 COSY 光譜(zoom in)



圖十、NTU-1233 純化醣脂質之 HSQC 光譜(zoom in)



圖十一、NTU-1233 純化醣脂質之負離子質譜儀測定光譜

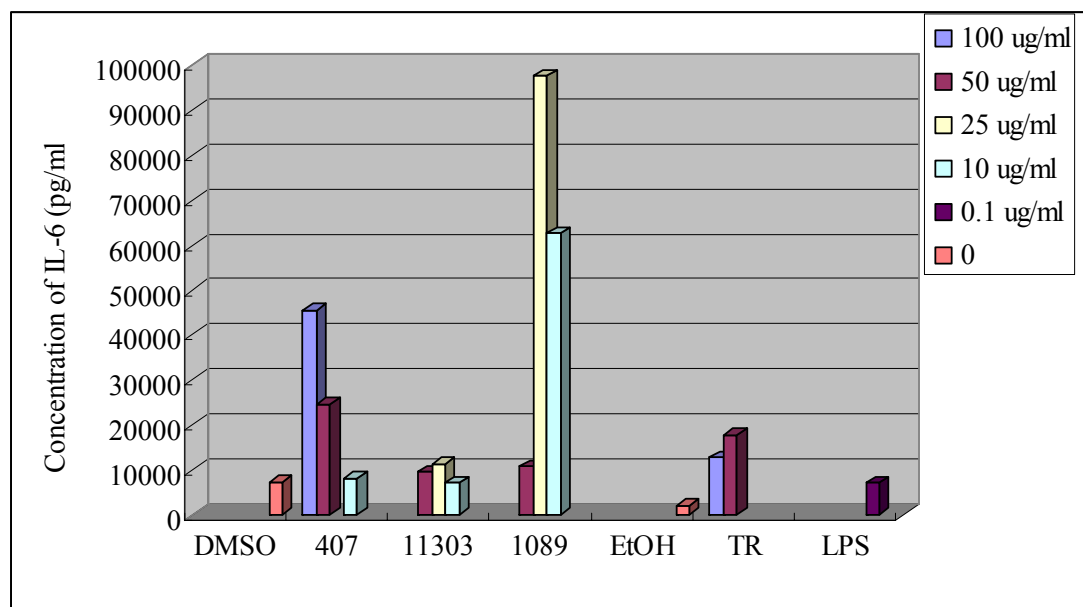


圖十二、由 NTU-1233 萃取得之到醣脂質的結構；Sulfolipids sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG), R = alkyl chain

這個在本土嗜熱菌中發現的化合物—sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol 第一次被發現是在 30 年前，這種帶有負離子的含硫脂質在一些綠色植物中非常常見，以知其與光合作用機制有關；一般而言，此種帶負離子的含硫脂質通常被發現在一些進行光合作用的植物高等植物上，如苔(mosses)、羊齒類植物(ferns)、海藻類(algae) (Benson and Daniel,1959; Benning 1998; Frentzen 2004)，而在非光合作用生物則在根瘤菌 *Rhizobium meliloti* (Cedergren and Hollingsworth, 1994)上也 被發現帶負離子的含硫脂質，這打破此類化合物只存在光合生物中的說法，證明非光合生物也存在此類化合物；另外，有更多的研究利用不同分析技術發現在多種的生物體內存在著帶負離子的含硫脂質，如 gram-positive, G(+) 的菌 *Alicyclobacillus*、極端嗜熱酸性(extreme thermoacidophilic) (Langworthy et al., 1976)

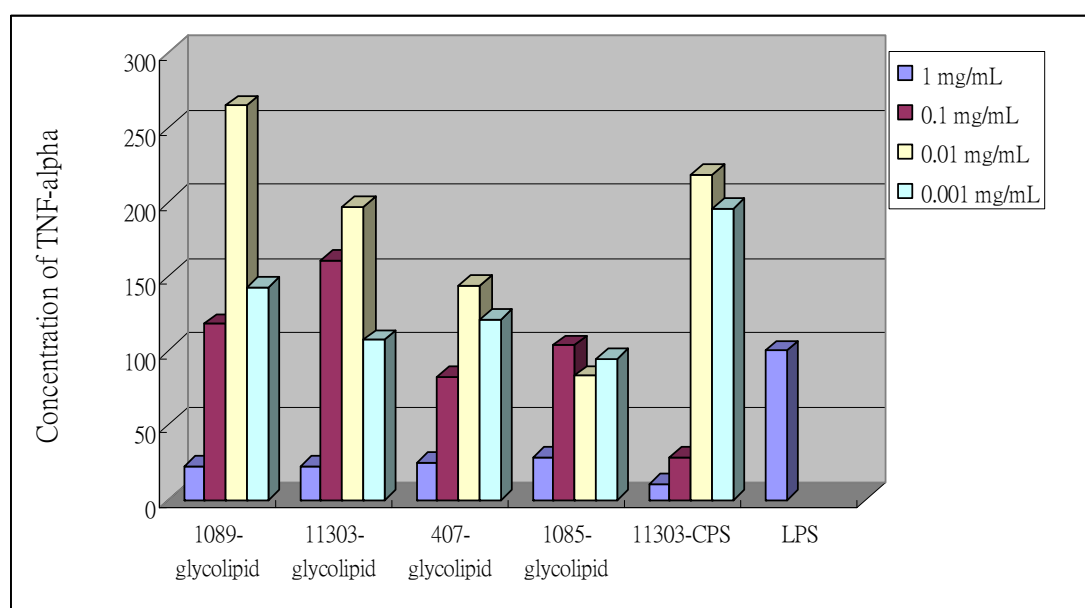
及海膽(sea urchin) (Isono et al., 1967)中。另外，在本研究中亦從本土極端嗜熱菌中鑑定出此類化合物，由此可知，這類帶負離子含硫脂質化合物並不是只存在光合高等植物中，亦存在一些極端非光合作用微生物中。當然有更多的研究需要繼續努力支持此論點。

以本土嗜熱菌萃取之醣脂質(glycolipid)及純化自標準菌株 DSM-11303 的多醣體(CPS)進行細胞激素刺激之生物活性實驗；本實驗以酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA)分析，結果如圖十三~十五；圖十三乃以本土嗜熱菌純化不同添加量(10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之醣脂質萃取物進行刺激細胞激素—IL-6 實驗，以購買自 *E. coli* 純化之內毒素(LPS: lipopolysaccharide)當作控制組，結果顯示，本土嗜熱菌 NTU-407 及 NTU-1089 之醣脂質所引起細胞分泌細胞激素 IL-6 之分泌量最多，在這之中以國外標準菌株所刺激的 IL-6 之分泌量最小，顯示本土嗜熱菌株所含之醣脂質具有刺激免疫細胞產生細胞激素—IL-6 的效果。

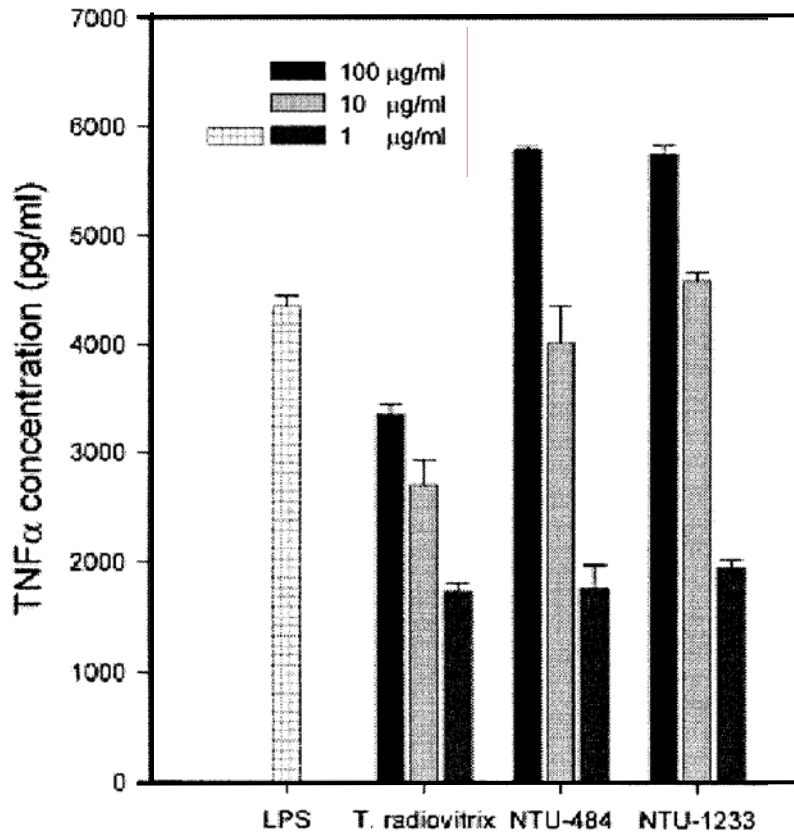


圖十三、以酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA)分析本土嗜熱菌純化之醣脂質 (glycolipid)萃取物不同添加量對刺激細胞激素—IL-6 實驗結果。DMSO:分析物中添加助醣脂質溶解之溶劑，407:本土嗜熱菌株 NTU-407，11303:標準菌株 DSM-407，1089:本土嗜熱菌株 NTU-1089，LPS:為內毒素，控制組。

另以相似方法測定本土嗜熱菌 (NTU-1089, NTU-407, NTU-1085, NTU-1233, NTU-484) 純化之醣脂質 (glycolipid) 萃取物及標準菌株 DSM-11303(CPS) 純化之多醣體進行刺激細胞激素—TNF- α 分泌，結果如圖十四及十五；外國標準菌株 DSM-11303 之菌外多醣體(11303-CPS)對於刺激免疫細胞產生 TNF- α 的效果非常好，在每毫升 0.001mg 時即有非常好的效果，可見在這些嗜熱菌膜外若有多醣體的存在時，這些多醣體可成為很好的研究對象，尤其這類微生物並非病原菌，若可大量培養純化，增強細胞免疫反應，將可成為很好的保健成分。另外，本土菌株之醣脂質 (1089-glycolipid, 407-glycolipid, 1085-glycolipid) 的免疫反應刺激效果與控制組比較，亦呈現很好的效果；且刺激細胞激素 TNF- α 分泌的效果是 1089-glycolipid > 407-glycolipid > 1085-glycolipid；而外國標準菌株 11303-glycolipid 的刺激效果則介於本土菌株的中間，較 1089-glycolipid 差而比 407-glycolipid 及 1085-glycolipid 佳。



圖十四、以酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 分析不同添加量之本土嗜熱菌 (NTU-1089, NTU-407, NTU-1085) 純化之醣脂質 (glycolipid) 萃取物及標準菌株 DSM-11303(CPS) 純化之多醣體進行刺激細胞激素—TNF- α 之實驗結果。LPS: 為內毒素，控制組。



圖十五、以酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA)分析不同添加量之本土嗜熱菌 (NTU-1233, NTU-484)純化之醣脂質(glycolipid)萃取出進行刺激細胞激素—TNF- α 之實驗結果。LPS:為內毒素，控制組。

另外，在進行癌細胞毒殺試驗之結果，不論是多醣體或是醣脂質，對癌細胞〔MCF7 細胞株：為人類乳房腺瘤癌細胞(human breast adenocarcinoma); Hep 3B2.1-7 (Hep 3B) 細胞株：人類肝腫瘤細胞株(Human hepatocellular carcinoma)〕皆無毒殺的效果，顯示由嗜熱菌中純化所得的多醣體及醣脂質對癌細胞並無殺滅或抑制的效果。

以往在研究嗜熱菌的文獻中，大都專注在研究膜外結構及組成方面，對於探討其生物活性者較少，若有報導多認為這些物質並無生物活性，本次結果說明，在這些嗜熱菌外的多醣體及醣脂質的確存在著增進免疫反應的功用，在這方面，則可繼續延伸，往更多種的免疫反應進行實驗，期待將有更完整的結果呈現。

五、研究成果自評

本研究乃以本土溫泉嗜熱菌為主要研究對象，與原本申請的新穎性海洋嗜熱菌 *Rhodothermus taiwanesis* 不同，最主要的原因是在進行海洋菌培養時，培養不易，所得的菌量實在不多，進行形態鑑定方面是足夠，但若要大量培養實在不容易，故變更研究對象，同樣以本土菌種為主，以台灣各地篩選之溫泉嗜熱菌為主要對象，在進行大量培養時，所得之菌量即夠進行組成及結構分析，但研究中的國外標準菌株的菌量亦屬於較少的一種，所以培養的次數相對得提高許多。雖然研究菌種改變，但主軸(台灣本土極端微生物研究)並為因此而改變，整個計畫流程仍如申請之計畫步驟進行。針對此研究最終的結果包括：1. 發現本土嗜熱菌外(NTU-1085, NTU-407, NTU-1089, NTU-1233)在此次的研究菌種中，皆不含多醣體，但在國外標準菌株本DSM-11303存在著以半乳糖為主要組成的多醣體，且此多醣體具有刺激細胞激素TNF- α 分泌的效果；2. 在本土嗜熱菌(NTU-1233)中，經由氣相層析-質譜儀、核磁共振光譜儀、質譜儀的分析鑑定，確定了由NTU-1233萃取的醣脂質中，含有一類為帶負離子含硫脂質 (sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol) 衍生物的結構，此結構再次經由存在此菌種中，證實並非如先前的文獻中所提及，只存在行光合作用的高等植物中；3. 由於地域性的差異，由本土菌株及外國菌株所萃取的醣脂質，經由薄層層析法(TLC)鑑定後，得知在一些極性及非極性醣脂質的分布上，存在著明顯的差異，標準菌株DSM-11303含較多的非極性醣脂質，而DSM-20539在非極性醣脂質方面含量較少，而本土嗜熱菌株則含量相當，但與標準菌株之間仍有些分佈呈現明顯的不同；4. 對於生物活性促進免疫反應之分析結果，本土嗜熱菌之醣脂質萃取物，無論在TNF- α 或IL-6皆呈現促進細胞激素分泌的效果。由此計畫最終結果，可知本土溫泉嗜熱菌外醣脂質實為台灣的寶庫，無論是此次新發現的結構或是促進免疫活性方面，皆有很好的結果；值得本國研究學者投入大量心力去研究。而此研究結果目前正在整理資料，預備發表在相關領域的國際學術期刊中。

參考文獻

- Aguilar, A., Ingemansson, T. and Magnien, E. (1998).** Extremophile microorganisms as cell factories: support from the European Union. *Extremophiles* **2**, 367-373.
- Benning, C. (1998).** "Biosynthesis and Function of the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 53-75.
- Benson, A. A., Daniel, H. and Wiser, R. (1959).** "A Sulfolipid in Plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**: 1582-7.
- Carreto, L., Wait, R., Nobre, M. F., and da Costa, M. S. (1996)** Determination of the structure of a novel glycolipid from *Thermus aquaticus* 15004 and demonstration that hydroxy fatty acids are amide linked to glycolipids in *Thermus* spp. *J Bacteriol* **178**, 6479- 6486.
- Cedergren, R. A. and Hollingsworth, R. I. (1994).** "Occurrence of sulfoquinovosyl diacylglycerol in some members of the family Rhizobiaceae." *J Lipid Res* **35**: 1452-61.
- Chen, M. Y., Lin, G. H., Lin, Y. T. & Tsay, S. S. (2002a).** *Meiothermus taiwanensis* sp. nov. A novel filamentous thermophilic species isolated in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**, 1647-1654.
- Chen, M. Y., Tsay, S. S., Chen, K. Y., Shi, Y. C., Lin, Y. T. & Lin, G. H. (2002b).** *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2155-2161.
- Chen, M. Y., Wu, S. H., Lin, G. H., Lu, C. P., Lin, Y. T., Chang, W. C. & Tsay, S. S. (2004).** *Rubrobacter taiwanensis* sp. a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1849-1855.
- Da Costa, M. S., Santos, H. and Galinski, E. A. (1998)** An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-153.
- Donato, M. M., Seleiro, E. A., and da Costa, M. S. (1990)** Polar lipid and fatty acid

- composition of strains of the genus *Thermus*. *Sys Appl Microbiol* **13**, 234-239.
- Ferraz, A. S., Carreto, L., Tenreiro, S., Nobre, M. F. and da Costa, M. S. (1994)**
Polar lipids and fatty acid composition of *Thermus* strains from New Zealand.
Antonie Van Leeuwenhoek **66**, 357-363.
- Ferreira, A. M., Wait, R., Nobre, M. F., and da Costa, M. S. (1999)**
Characterization of glycolipids from *Meiothermus* spp. *Microbiology* **145**,
1191-1199.
- Frentzen, M. (2004).** "Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol:
anionic membrane lipids and phosphate regulation." *Curr Opin Plant Biol* **7**:
270-6.
- Fujiwara, S., Okuyama, S. and Imanaka, T. (1996)** The world of archaea: genome
analysis, evolution and thermostable enzymes. *Gene* **179**, 165-170.
- Isono, Y. Mohri, H. and Nagai, Y. (1967).** "Effect of egg sulpholipid on respiration
of sea urchin spermatozoa." *Nature* **214**: 1336-8.
- Jan, R. L., Wu, J., Chaw, S. M., Tsai, C. W. and Tsen, S. D. (1999)** A novel species
of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. Nov. *Int J Syst
Bacteriol* **49** Pt 4, 1809-1816.
- Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O. (1992).** Thermophilic bacteria. In
Thermophilic bacteria, pp. 1-18. Edited by J. K. Kristjansson. Boca Raton:
CRC Press.
- Lamosa, P., Martins, L. O., da Costa, M. S., and Santos, H. (1998)** Effect of
temperature, salinity, and medium composition on compatible solute
accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3591-3598.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M. Y., Silva, G.,
Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., and Santos, H. (2000)**
Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible
solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ
Microbiol* **66**, 1974-1979.
- Langworthy, T. A., Mayberry, W. R. and Smith P. F. (1976).** "A sulfonolipid and
novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile *Bacillus*

acidocaldarius." *Biochim Biophys Acta* **431**(3): 550-69.

- Langworthy, T. A., and Pond, J. L. (1986)** Membranes and lipids of thermophiles, pp. 107-135. In *Thermophiles: general, molecular and applied biology* (Brock T D ed). John Wiley & Sons, Inc., New York
- Lu, T. L., Chen, C. S., Yang, F. L., Fung, J. M., Chen, M. Y., Tsay, S. S., Li, J., Zou, W. and Wu, S. H. (2004)** Structure of a major glycolipid from *Thermus oshimai* NTU-063. *Carbohydr Res* **339**, 2593-2598.
- Madigan, M. T. and Marrs, B. L. (1997).** Extremophiles. *Sci Amn* **276**, 82-87.
- Martins, L. O., and Santos, H. (1995)** Accumulation of mannosylglycerate and di-myo- inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3299-3303
- Martins, L. O., Carreto, L. S., da Costa, M. S., and Santos, H. (1996)** Novel compatible solutes related to di-myo-inositol-phosphate in the order *Thermotogales*. *J Bacteriol* **178**, 5644-5651.
- Prado, A., da Costa, M. S. and Madeira, V. M. C. (1988)** Effect of growth temperature on the lipid composition of two strains of *Thermus* sp. *J Gen Microbiol* **134**, 1653-1660.
- Ray, P. H., White, D. C., and Brock, T. D. (1971)** Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **108**, 227-235.
- Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schäfer, W., and Hensel, R. (1992)** Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett.* **306**, 239-242.
- Shen, P. Y., Coles, E., Foote, J. L., and Stenesh, J. (1970)** Fatty acid distribution in mesophilic and thermophilic strains of the genus *Bacillus*. *J Bacteriol* **103**, 479-481.
- Shieh, W. Y. and Jean, W. D. (1998).** *Alterococcus agarolyticus*, gen.nov., sp.nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Can J Microbiol* **44**, 637-645.
- Silva, Z., Borges, N., Martins, L. O., Wait. R., da Costa, M. S., and Santos, H.**

- (1999) Combined effect of the growth temperature and salinity of the medium on the accumulation of compatible solutes by *Rhodothermus marinus* and *Rhodothermus obamensis*. *Extremophiles* **3**, 163-172.
- Stetter, K. O. (1998).** In *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. New York: Wiley-Liss.
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M. & Imanaka, T. (1999).** A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5338-5344.
- Wait, R., Carreto, L., Nobre, M. F., Ferreira, A. M., and da Costa, M. S. (1997)** Characterization of novel long-chain 1,2-diols in *Thermus* species and demonstration that *Thermus* strains contain both glycerol-linked and diol-linked glycolipids. *J Bacteriol* **179**, 6154-6162.
- William, R. A. D., and da Costa, M. S. (1992)** The genus *Thermus* and related microorganisms, pp. 3745-3753. In *The Prokaryotes* (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. eds), 2nd edition. Springer, New York.
- Yang, F. L., Lu, C. P., Chen, C. S., Chen, M. Y., Hsiao, H. L., Su, Y., Tsay, S. S., Zou, W. and Wu, S. H. (2004)** Structural determination of the polar glycolipids from thermophilic bacteria *Meiothermus taiwanensis*. *Eur J Biochem* **271**, 4545-4551.
- Yang, Y. L., Yang, F.L., Jao, S.C., Chen, M. Y., Tsay, S. ., Zou, W. and Wu, S. H. (2006).** "Structural elucidation of phosphoglycolipids from strains of the bacterial thermophiles *Thermus* and *Meiothermus*." *J Lipid Res* **47**: 1823-32.