

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：木質醋酸菌轉型系統之建立與應用(3/3)

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-265-

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

計畫主持人：台灣大學園藝學系 教授 徐源泰

研究人員：台灣大學園藝學 王秀玲

中文摘要：

木質醋酸菌 (*Acetobacter xylinum*) 為食品工業上之重要菌株，可醱酵果蔬或果蔬汁產生二次代謝產物細菌纖維，在食品業上為市面上常見之食品-那塔 (nata)，但那塔不易染色，所以藉由生物技術之方法增加食品利用上之附加價值。本實驗以 pHY300PLK 和 pUCD2 載體進行木質醋酸菌轉形之測試，電穿孔轉形法為較佳之轉形法，其條件為 25 mF 電容量、329 Ω 電阻、脈衝時間 8.2 微秒及電壓 2.5 kV，其中 pHY300PLK 轉形率為 1.63×10^4 Transformants / mg DNA，而 pUCD2 轉形率為 1.27×10^4 Transformants / mg DNA。選殖纖維素結合蛋白基因 (cbpA) 與類胡蘿蔔素之合成酵素基因群進入 pHY300PLK 載體中。構築重組質體 pWSW8，其包括木質醋酸菌內生質體、pUC18 質體及類胡蘿蔔素之合成酵素基因群，藉由木質醋酸菌內生質體可增加質體於木質醋酸菌中之穩定性及複製能力，利用 lac 啟動子，可供外加基因之啟動。

關鍵詞：木質醋酸菌、轉形、選殖

Abstract

Acetobacter xylinum is widely been used in food industry as it can ferment vegetables and fruits to produce the second metabolite—bacterial cellulose which is called nata in the market. However, nata is not easy for coloring, so it is essential to increase its additional value for foodstuff use. In the first part of this study, *Acetobacter xylinum* was transformed with pHY300PLK and pUCD2 for the finding of optimum transformation efficiency. The result showed that electroporation has the best transformation efficiency, with the conditions of 25 mF capacitance, 329 Ω resistance, pulse lengths of 8.2 ms, and 2.5 kV. pHY300PLK and pUCD2 were found to have efficiency of 1.63×10^4 and 1.27×10^4 transformants / mg DNA, respectively.

Cellulose binding protein gene (cbp A) and carotenoids synthesis gene were later cloned into plasmid pHY300PLK for further expression in *Escherichia coli* BL21 and *Acetobacter xylinum* CCRC14101 and protein activity been detected by Western blotting. Another plasmid pWSW8, is constructed from pUC18, an innate plasmid in *Acetobacter xylinum* and carotenoids synthase gene was later constructed for the increasing of stability and capability of replication, and promoting expression of foreign gene by the lac promoter within pWSW8.

Key Words: *Acetobacter xylinum*, transformation. cloning

緣由與目的：

醋酸菌(*Acetobacter spp.*)很早以來，即為人類所使用於生產食醋，使用蔬果為原料而生產之機能性果蔬醋，近來亦頗為風行。醋酸除可做為食用之食醋外，並有許多重要工業上之應用，如大地工程、冶金、塗料、及醫藥等，因此關於醋酸代謝之相關生理、生化、遺傳、及微生物菌種等方面，都已有相當廣泛之研究 (see review: Adam, 1998; Sievers & Teuber, 1995; Thurner et al., 1997)。近來，一些醋酸菌屬的其它菌種，被發現在生物固氮及生產細菌纖維素方面，深具應用及研究之經濟價值。其中，在生物固氮方面，包括其生理機制及遺傳調控等方面，亦多有研究(Bellone et al., 1997; Caballero-Mellado et al., 1998; Franke et al., 1998; Jimenez-Salgado et al., 1997; Meletzus et al., 1998; Sevilla et al., 1998)。但是，關於生產細菌纖維素之木質醋酸菌的研究則相對較少。

許多微生物產生的多醣體目前已廣泛的應用於不同的生技領域，其中來自於 *Xanthomonas campestris* 的三仙膠(Xanthan gum)和來自 *Sphingomonas paucimobilis* 的凝膠(Gellan)常見於食品中。傳統上纖維素則多來自植物如樹身及棉花等，其缺點為組成複雜及含蠟質，因此近來科學及工業界開始重視來自細菌生產之纖維素(bacterial cellulose)。細菌纖維優於植物纖維之處在於(1)純度高、(2)僅有 1/100 粗細、(3)結晶化度高、重合度高、(4)彈性高、強度大、(5)生體適合性高、生物分解性佳(Embuscado et al., 1996)。除食用外，以醋酸菌生產之纖維素其強度較鋁箔及鈦箔為高，可用作飛機及太空載具之材料。其薄膜產品 BioFill 可用於燒燙傷、慢性皮膚潰瘍之患者做為暫時皮膚代用品，亦可用做陶瓷土和礦石的黏著劑、音響振動板、製紙、香煙濾嘴、及建材等(Sutherland, 1998)。而生產純纖維素的細菌，以木質醋酸菌(*Acetobacter xylinum*)最為常見。

近來，由木質醋酸菌發酵蔬果而成之食用細菌纖維素，漸受世人喜愛。常見之細菌纖維素為利用木質醋酸菌發酵椰水或果汁所產生的二次代謝產物，常添加於市售果凍中或添加於冰淇淋等相關產品中，做為懸浮劑或調稠劑以增加產品的

咀嚼性及保水性、保形性。由於東南亞國家盛產椰子，此等產品最早源於菲律賓、印尼、泰國等家庭式之生產。其產品名稱根據發酵基質的不同而有所不同，若以椰乳或椰水為主要基質則稱 nata de coco (國內一般稱為椰果)，若以鳳梨汁為主要基質則稱 nata de pina。近幾年在世界各國均強調食用性機能性食品下，椰果產品已普遍受到歡迎。日本的研究顯示，以含 5% 椰果飼料餵飼老鼠 19 天，總膽固醇濃度降低而 HDL 的相對比例上昇，故僅在日本一地，1993 年之輸入量即高達 9,800 公噸 (戶田等, 1994)。

一般常稱之細菌纖維素為培養木質醋酸菌於含有機酸及糖類的椰水或果汁中，經發酵後在培養液表面所形成不溶於水、堅韌的凝膠狀，其厚度可達數公分的纖維素。細菌纖維素的水分含量隨發酵基質不同而有差異，但至少都佔 90% 以上 (Guzman, et al., 1982)。Okiyama 等人以 YE 培養液為發酵基質時，木質醋酸菌所產生之細菌纖維素是由 0.9% 纖維素、0.3% 結合水及 98.8% 自由水所構成。細菌纖維素為高密度的微纖維 (microfibrils) 不規則交錯而成的網狀組織，纖維直徑約在 20-100 nm 之間，纖維層中的孔隙直徑則約為 0.5-1.0 mm (Okiyama et al., 1992b)。細菌纖維素與一般植物纖維素間的主要差異，除了前者所吸附的水分重量更大外，亦是純纖維素之組成，不摻雜其他的多醣類 (如半纖維素、木質素) 及蠟質成份，故加工過程較容易 (Embuscado et al., 1994a)。Embuscado 等人 (1996) 以鹼液分離法及機械分離法將細菌纖維素與木質醋酸菌分離，所得細菌纖維素之氮含量為 0.08-0.46%，灰分含量為 0.66-1.46%，whiteness index 為 44.2-30.3。

木質醋酸菌中，細菌纖維合成酵素操縱子 (cellulose synthase operon) 長度為 9,217 bp，是由四個基因 *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* 及 *bcsD* 所組成，所表現之蛋白質分子量分別為 84.4, 85.3, 141.0 及 17.3 kDa，操縱子的第二個基因 (*bcsB*) 與細菌纖維合成酵素的催化次單體 (catalytic subunit) 有關 (Wong, et al., 1990)。木質醋酸菌生成纖維素的過程可分為三個階段，聚合作用 (polymerization)：葡萄糖聚合成

-1,4-glucans，以葡萄糖為單位用 -1,4-glucosidic bond 連接而成直鏈多醣類；結晶作用 (crystallization)：-1,4-glucans 形成微纖維 (cellulose microfibrils)，數個鄰近 -1,4-glucans 經分子鏈內或鏈間的氫鍵作用形成穩定結構；結構作用 (structuralization)：微纖維糾結纏繞成纖維層 (Okiyama et al., 1992a；Ross et al., 1987)。細菌纖維素合成酵素位於細胞膜上，此酵素只有在 cyclic-di-GMP 結合於膜上時才具有合成細菌纖維素的活性，並只有在二價鈣離子存在時 diguanylate cyclase 才具活性，可將二分子的 GTP 環化形成 cyclic-di-GMP。木質醋酸菌的外膜，約有 50-80 個位於 lipopolysaccharide，沿著菌體長軸呈直狀排列的孔隙，孔隙中延伸之葡聚糖鏈 (glucans chain) 聚合而成為直徑約 1.5 nm 之微纖維，數個微纖維聚集成原纖維 (fibrils)，再聚集成纖維束 (cellulose ribbon) (Haigler, 1985)。在電子顯微鏡下，可觀察到木質醋酸菌生成之纖維形態並非單一直線狀，

而是三向分叉狀(three-way branching)構造，故可知木質醋酸菌分裂時，其菌體母細胞的原纖維將微纖維平均分至二個子細胞上，但纖維素的合成仍持續進行，故在原纖維上形成分叉，而此分叉又隨著細胞分裂不斷增加，形成纖維素薄膜(Yamanaka,1989)。

木質醋酸菌單一菌體呈橢圓形至桿狀，大小約為 0.6-0.8 x 1.0-3.0 um，以單一個、成對或鏈狀存在，不具移動性；年輕細胞呈革蘭氏陰性菌染色性質，隨著培養時間增長，菌體則可能為陰性或陽性染色性質。無法將硝酸鹽還原為亞硝酸鹽，可利用葡萄糖、半乳糖、蔗糖、乙炔、乙二醇、甘油、麥芽糖、乳糖及甘露醇等為碳源，但無法利用五碳糖、三碳糖及多醣類(Banzon et al., 1990)。木質醋酸菌一直被認為是絕對好氣菌(strict aerobe)，它產生纖維素的目的是讓細胞可以處在一種好氣的環境；但 Williams 等人(1989)的研究顯示，木質醋酸菌亦可以在微好氣(microaerophilically)的環境下生長，產生纖維素明顯的可以保護木質醋酸菌細胞不被紫外光所傷害。

細菌纖維素之生產方法分為，傳統製法：椰水或果汁經調糖酸後，接入木質醋酸菌，在 28-31°C 靜置培養約二週後，培養液表面可形成 2-3 公分厚的纖維層，在菲律賓 nata de coco 製法中，會添加 0.02% 的冰醋酸及 15% 的蔗糖(Mendoza, 1961)。兩階段發酵法：培養液經接菌後先振盪培養三天，再靜置培養 16 天，可使菌體密度增加，細菌纖維素生成速率大幅提升(Okuyama et al., 1992a)。影響細菌纖維素產成及品質的因子包括菌株種類及其活性(Gallardo et al., 1971)、接種量、溫度、pH 值、培養基成份等(Alaban, 1967; Banzon et al., 1990; Embuscado et al., 1994b; Lapuz et al., 1967; Masaoka et al., 1993; Fontana et al., 1997)。Masaoka 等(1993)認為在發酵初期增加葡萄糖添加量，會因代謝過程中葡萄糖酸之生產而影響產量；Embuscado 等(1994a)研究結果顯示，有機氮比無機氮更適合作為細菌纖維素的外加氮源，Lapuz 等人(1967)認為添加磷酸二氫銨效果最佳，添加 0.12 g/L 即可使纖維素膜厚度增加，若再配合添加 CSL(corn steep liquor)，則產量可有更多改進；Kouda 等人(1997)研究結果顯示培養基氧氣與二氧化碳的濃度比例與細菌纖維素產量有關，氧氣含量高時細菌纖維素產量高，而二氧化碳升高則產量下。由以上結果可知，細菌纖維素的研究，過去多以生產條件及生理為主，或以化學突變方式提高其纖維素產量(Bertocchi et al., 1997)，而較少有關遺傳及分子生物方面之研究。

國內每年產生大量廢棄蔬果及其加工品廢棄物，均是相當好之生質源及發酵糖質原料，可用來生產細菌纖維素供食用或其它工業用途。本研究室近年曾以採收後期的蓮霧為原料，探討以蓮霧汁生產細菌纖維素之可行性及經發酵後培養基質之成分變化。實驗結果顯示，以蓮霧汁生產細菌纖維素的產量約為 31%，經接菌發酵後培養基質中的可滴定酸度由 0.21% 上升為 0.98%，蘋果酸的變化不明

顯，檸檬酸、琥珀酸、葡萄糖酸及醋酸則大都呈上升趨勢，醋酸為木質醋酸菌發酵後產生的另一項二次代謝物，其含量隨著發酵時間的延長先由無增加至 0.37%，而後明顯減少為 0.04%。發酵期間對醣類的利用率約為 7.0%，但轉換率高達 91.3%（楊淑惠碩士論文, 1998）。在改善其加工性質方面，我們也深入探討溫度、pH、鹽度等對其物化性質改變之影響，並提出發展鹹口味細菌纖維素之條件(Chung & Shyu, 1999)，有別於目前椰果（細菌纖維素）全為甜食之市場應用，以豐富蔬果加工產品選擇性。

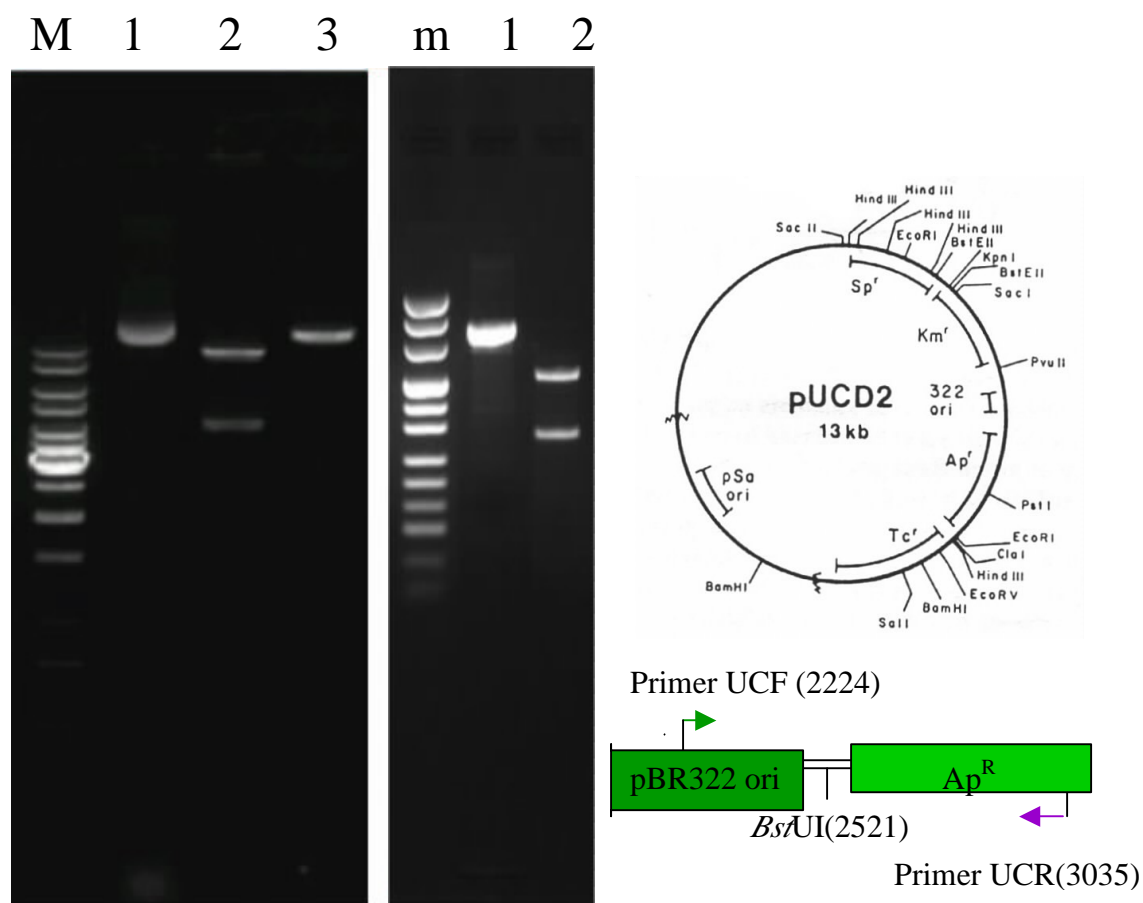
細菌纖維素在加工製造上之嚴重缺點為不易染色，故產品僅乳白色一種，較為單調，因此本研究室近年亦嘗試找尋適當著色方法。以紅麴(*Monascus sp.*)為主之發酵產品是我國民間食用已久之保健食品，其色素亦被廣泛應用於多種食品著色上。近來，紅麴中之抗腐敗菌物質(Monascidin)及紅麴降脂素(Monacolin K)之功能亦為西方醫學所證實，並有純化之商品販售。本研究室近即利用紅麴與醋酸菌共同發酵，開發出機能性食用紅麴椰果。產品除具食用高纖維特性外，亦具有鮮豔之紅麴著色及富含紅麴降脂素。此外，透過不同的培養條件，如碳、氮源之改變及培養時間、酸鹼值、溫度等之變化，可獲得不同色澤之產品，豐富不同加工產品所需之原料（Sheu et al., 2000）。

在探究細菌纖維素不亦著色之主要原因，推測因其為純纖維素且結構緊密，故幾無有用官能機可供做色素結合之用。因此，本研究即擬將纖維素結合蛋白質(cellulose binding protein)與類胡蘿蔔素合成基因群，轉移至木質醋酸菌中，藉由纖維素結合蛋白質先與細菌纖維素結合後，提供蛋白質組成氨基酸的多種官能機，以使類胡蘿蔔素或其它色素能結合而著色。在預備試驗中，我們以小規模分別表現與純化之細菌纖維素、纖維素結合蛋白質、紅麴色素、及類胡蘿蔔素做試驗，發現可顯著增加著色及賦予機能性狀之效果。但過程複雜且效率低，因此擬共同轉移至木質醋酸菌，以達到同步合成及提供官能基與著色之目的。惟木質醋酸菌在國內外，均尚未有高效率之載體與轉型方法可供依循，因此我們擬先發展木質醋酸菌之轉型與表現系統。

結果與討論

本實驗已建立木質醋酸菌之轉形系統及鑑定系統，以 pHY300PLK 和 pUCD2 作為載體，結果顯示 pHY300PLK 及 pUCD2 質體可往返於 *A. xylinum* CCRC14101 及 *E. coli* BL21 中，其轉形率分別為 1.63×10^4

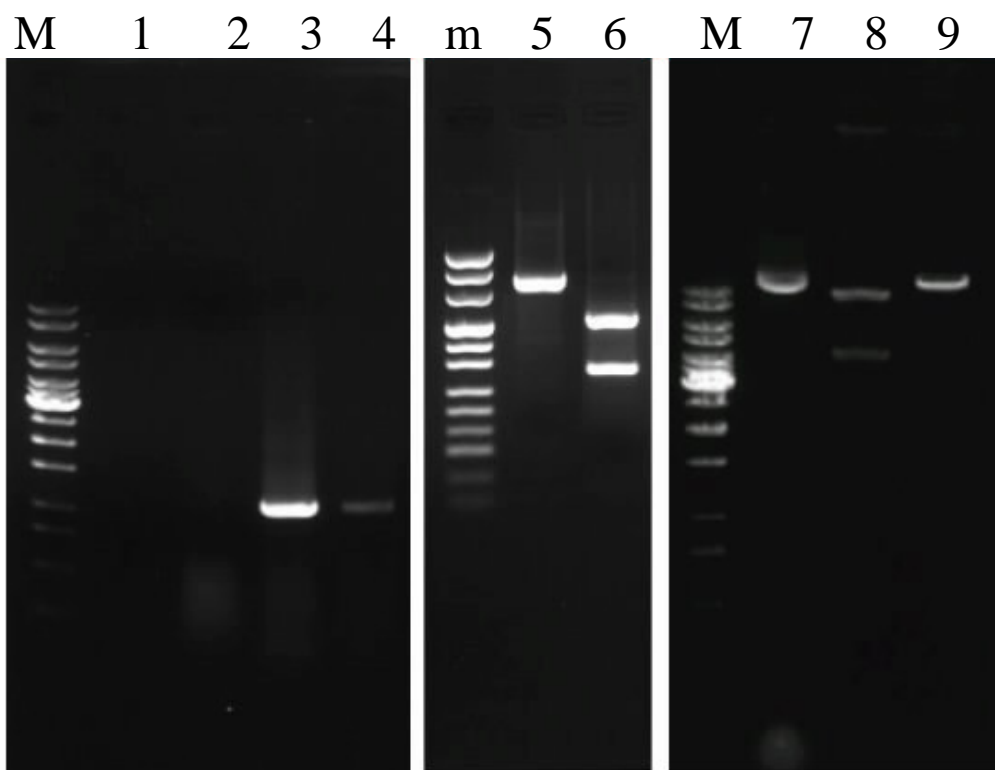
和 1.27×10^4 Transformants/ μg DNA。木質醋酸菌轉形上，以氯化鈣轉形法和電穿孔轉形法測試，結果顯示以電穿孔轉形法為可行之方法，其最佳條件為電容量 $25 \mu\text{F}$ 、電阻 329Ω 、脈衝時間 8.2 微秒及電壓 2.5 kV 。分別以 *E. herbicola* Eho13 之類胡蘿蔔素合成酵素基因和 *C. cellulovorans* 之纖維素結合蛋白質基因轉殖入 pHY300PLK 質體中，構築成 pSY313 及 pWS8 質體，結果顯示兩重組質體在 *E. coli* 中皆表現良好。利用 pUC18 質體接入 *A. xylinum* IFFO3288 之質體及 *E. herbicola* Eho13 之類胡蘿蔔素合成酵素基因，構築成重組質體 pWSW8 質體，以 pWSW8 質體轉形於木質醋酸菌中，結果顯示其能往返於 *A. xylinum* CCRC14101 及 *E. coli* BL21 中並有部份表現。限於篇幅，僅摘錄重要成果數據圖表於後。



- M. 1kb DNA Ladder -10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb
- m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp
- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. pUCD2 uncut | 13 kb |
| 2. pUCD2 + <i>EcoR</i> I | 4 kb + 9 kb |
| 3. pUCD2 + <i>EcoR</i> V | 13 kb |
| 4. pUCD2 PCR product | 811 bp |
| 5. pUCD2 PCR product + <i>Bst</i> AI | 297 bp + 514 bp |

圖十、pUCD2 質體及 PCR 產物限制酵素分析。

Fig. 10. Restriction enzyme analysis of pUCD2 plasmid and PCR product.



M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb

m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

A. PCR product analysis of pUCD2

1、H₂O

2、*A. xylinum*

3、pUCD2 811 bp

4、pUCD2 in *A. xylinum* 811 bp

B. Restriction enzyme analysis of PCR product of pUCD2 in *A. xylinum*

5、uncut 811 bp

6、*Bsu*I 297 bp + 514 bp

C. Restriction enzyme analysis of pUCD2 in *E. coli* back-transformant

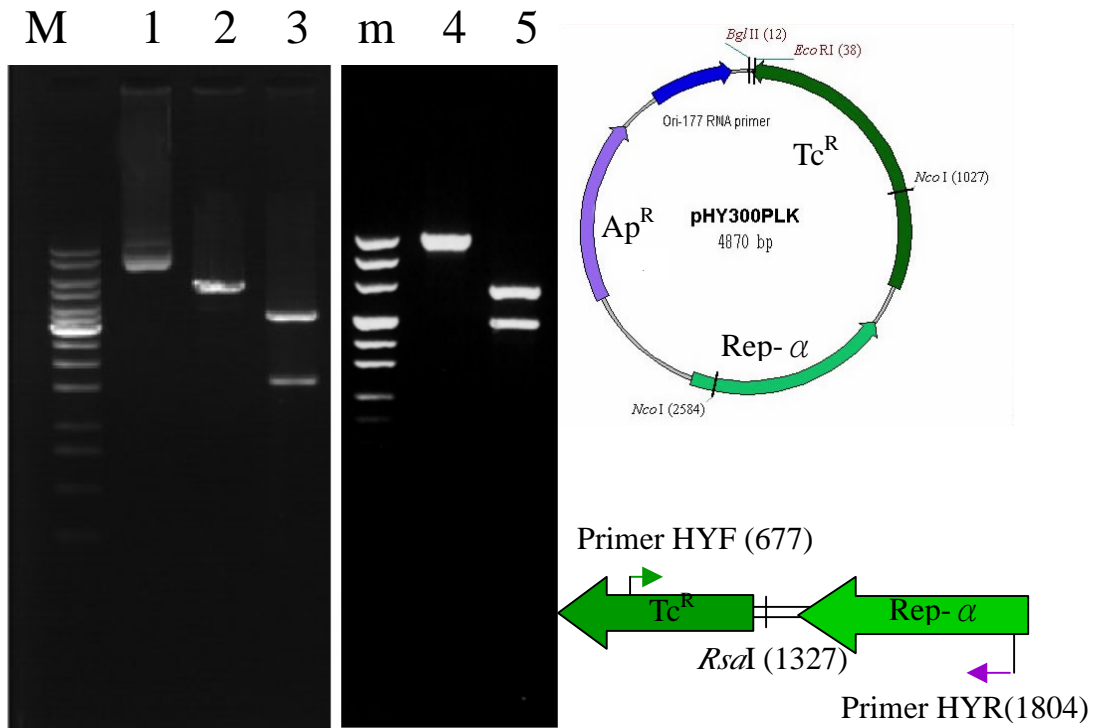
7、pUCD2 uncut 13 kb

8、pUCD2 + *Eco*R V 13 kb

9、pUCD2 + *Eco*R I 4 kb, 9 kb

圖十一、pUCD2 質體轉形於木質醋酸菌之鑑定。

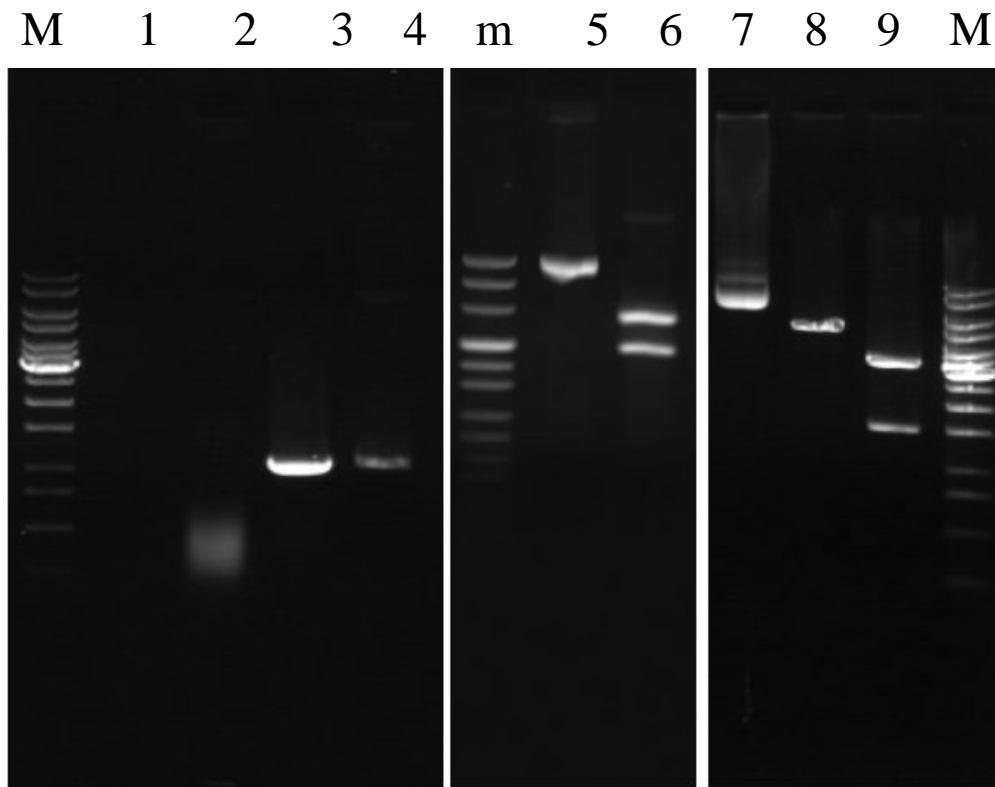
Fig. 11. Identification of pUCD2 plasmid in *A. xylinum*



- M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb
- m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp
- | | |
|---|---------------------|
| 1. pHY300PLK uncut | 4,870 bp |
| 2. pHY300PLK + <i>EcoR</i> I | 4,870 bp |
| 3. pHY300PLK + <i>Nco</i> I | 1,500 bp + 3,370 bp |
| 4. pHY300PLK PCR product | 1,127 bp |
| 5. pHY300PLK PCR product + <i>Rsa</i> I | 4,77 bp + 650 bp |

圖十二、pHY300PLK 質體及 PCR 產物限制酵素分析。

Fig. 12. Restriction enzyme analysis of pHY300PLK plasmid and PCR product.



M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb
 m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

A. PCR product analysis of pHY300PLK

1. dH₂O
2. *A. xylinum*
3. pHY300PLK 1,127 bp
4. pHY300PLK in *A. xylinum* 1,127 bp

B. Restriction enzyme analysis of PCR product of pHY300PLK in *A. xylinum*

5. uncut 1,127 bp
6. *Rsa* I 477 bp + 650 bp

C. Restriction enzyme analysis of pHY300PLK in *E. coli* back-transformant

7. pHY300PLK uncut 4,870 bp
8. pHY300PLK + *EcoR* I 4,870 bp
9. pHY300PLK + *Nco* I 1,500 bp + 3,370 bp

圖十三、pHY300PLK 質體轉形於木質醋酸菌之鑑定。

Fig. 13. Identification of pHY300PLK plasmid in *A. xylinum*

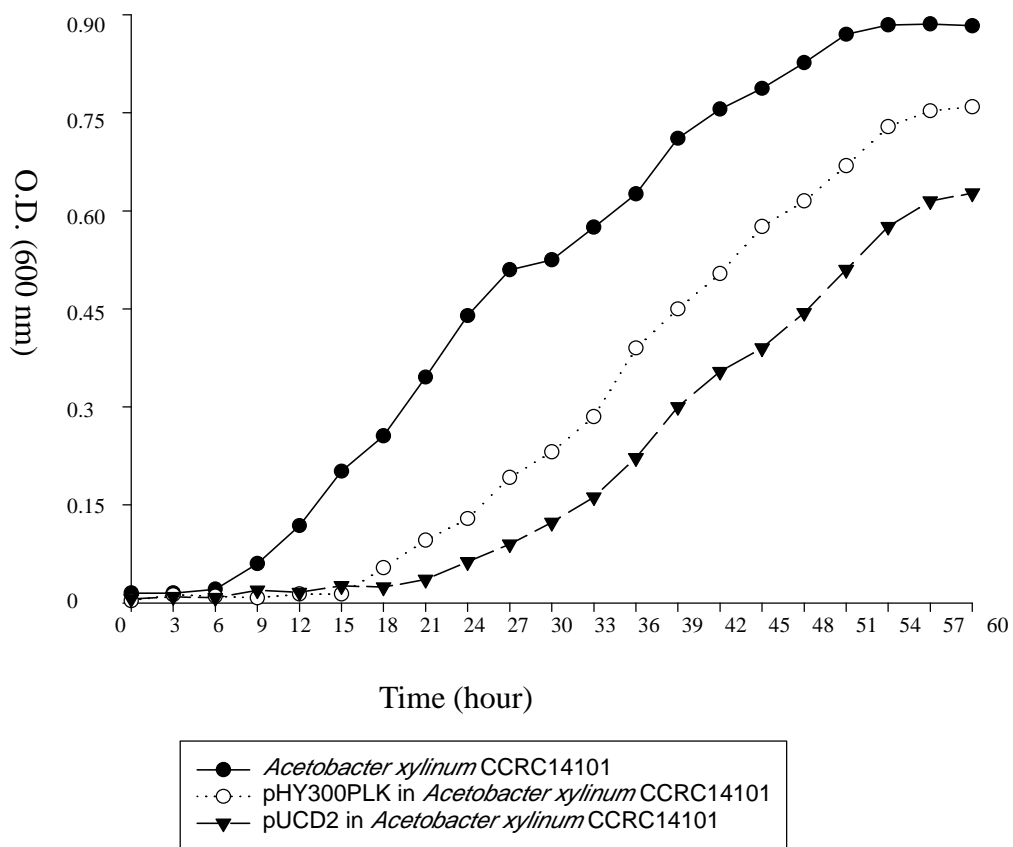
表一、pHY300PLK 和 pUCD2 兩質體對於木質醋酸菌之氯化鈣轉形

率及電穿孔轉型率。

Table 1. Electroporation and CaCl₂ transformative efficiency of *Acetobacter xylinum* CCRC14101 with pHY300PLK and pUCD2 plasmid

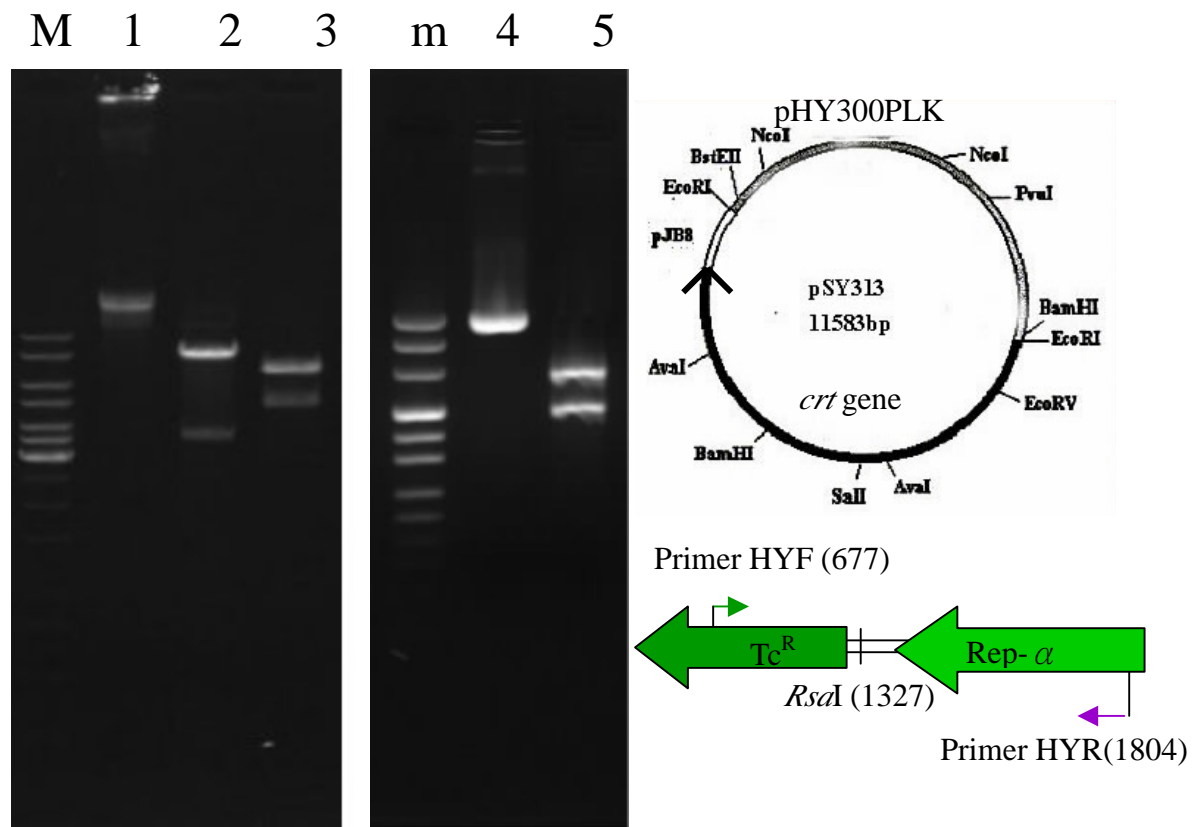
	Transformants (CFU/ ml)	Survivors (CFU/ ml)	Efficiency (Transformants/ μg DNA)
pHY300PLK			
CaCl ₂ 轉形法	0	1.45 x 10 ⁸	0
電壓(Voltage)			
0	0	2.88 x 10 ⁸	0
500	6.0 x 10 ¹	1.23 x 10 ⁸	3.0 x 10 ²
1000	8.0 x 10 ²	1.59 x 10 ⁸	4.0 x 10 ²
1500	1.2 x 10 ²	7.10 x 10 ⁷	6 x 10 ²
2000	2.4 x 10 ²	5.50 x 10 ⁷	1.2 x 10 ³
2500	3.26 x 10 ³	2.30 x 10 ⁷	1.63 x 10 ⁴
3000	4 x 10 ¹	8.70 x 10 ⁶	2.0 x 10 ²
pUCD2			
CaCl ₂ 轉形法	0	1.87 x 10 ⁸	0
電壓(Voltage)			
0	0	2.56 x 10 ⁸	0
500	4.0 x 10 ¹	2.21 x 10 ⁸	2.0 x 10 ²
1000	7.0 x 10 ²	1.63 x 10 ⁸	3.5 x 10 ³
1500	1.8 x 10 ²	2.66 x 10 ⁸	9 x 10 ²
2000	8.2 x 10 ²	6.50 x 10 ⁷	4.1 x 10 ³
2500	2.54 x 10 ³	7.80 x 10 ⁷	1.27 x 10 ⁴
3000	5.0 x 10 ¹	9.80 x 10 ⁵	2.5 x 10 ²

Acetobacter xylinum CCRC14101 生長曲線



圖十四、木質醋酸菌和 pHY300PLK 和 pUCD2 轉形株之生長曲線

Fig. 14. Growth curves of pHY300PLK and pUCD2 plasmid in *A. xylinum* CCRC14101



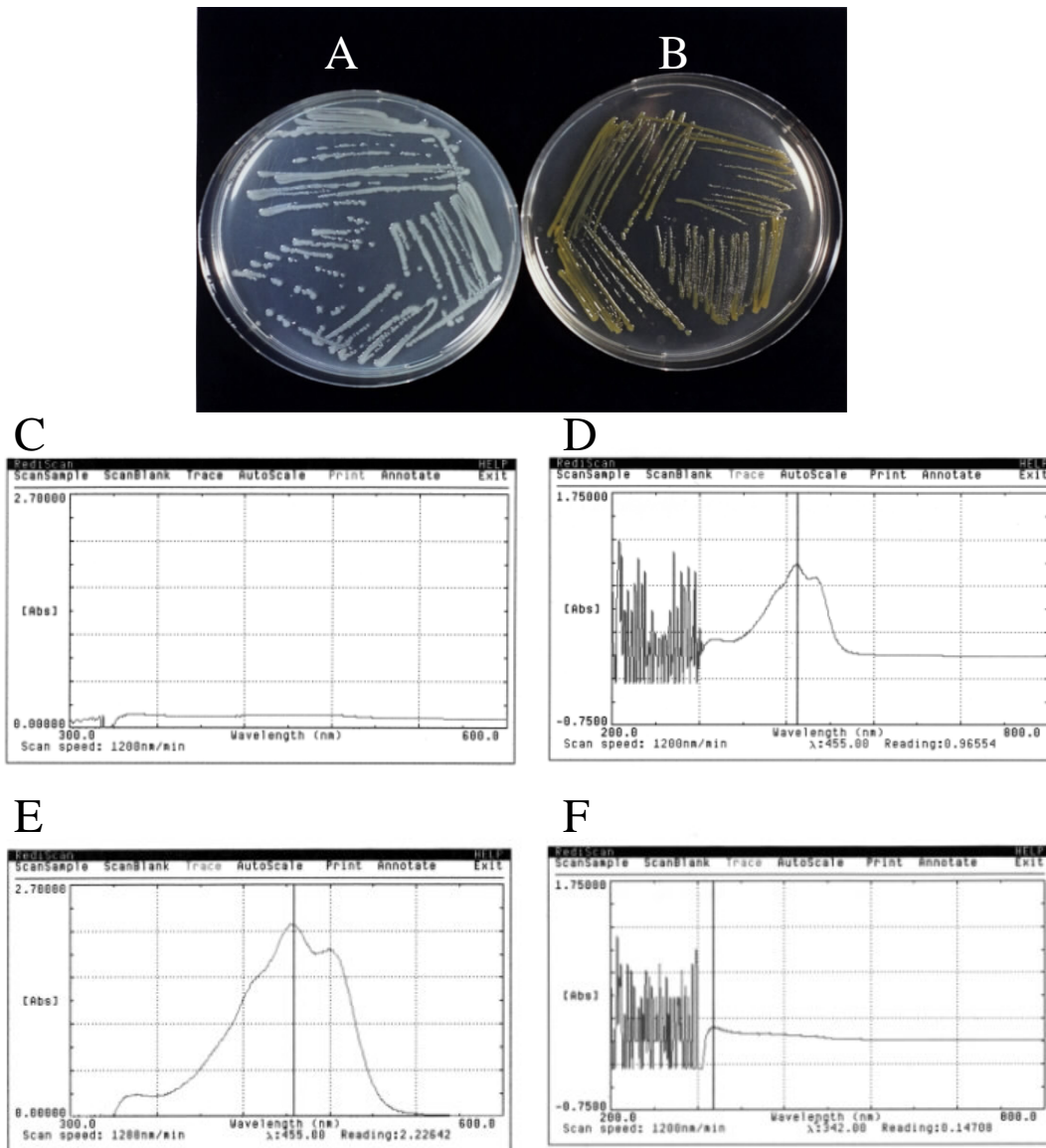
M. 1kb DNA Ladder -10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb

m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. pSY313 uncut | 11.5 kb |
| 2. pSY313 + <i>Bam</i> HI | 3.7 kb + 7.8 kb |
| 3. pSY313 + <i>Eco</i> R I | 4.8 kb + 6.7 kb |
| 4. pSY313 PCR product | 1,127 bp |
| 5. pSY313 PCR product + <i>Rsa</i> I | 477 bp + 650 bp |

圖十五、pSY313 質體及 PCR 產物限制酵素分析。

Fig. 15. Restriction enzyme analysis of pSY313 plasmid and PCR product.



A. *E. coli* BL21

B. pSY313 in *E. coli* BL21

C. Spectrometry of β -Carotene in *E. coli* BL21

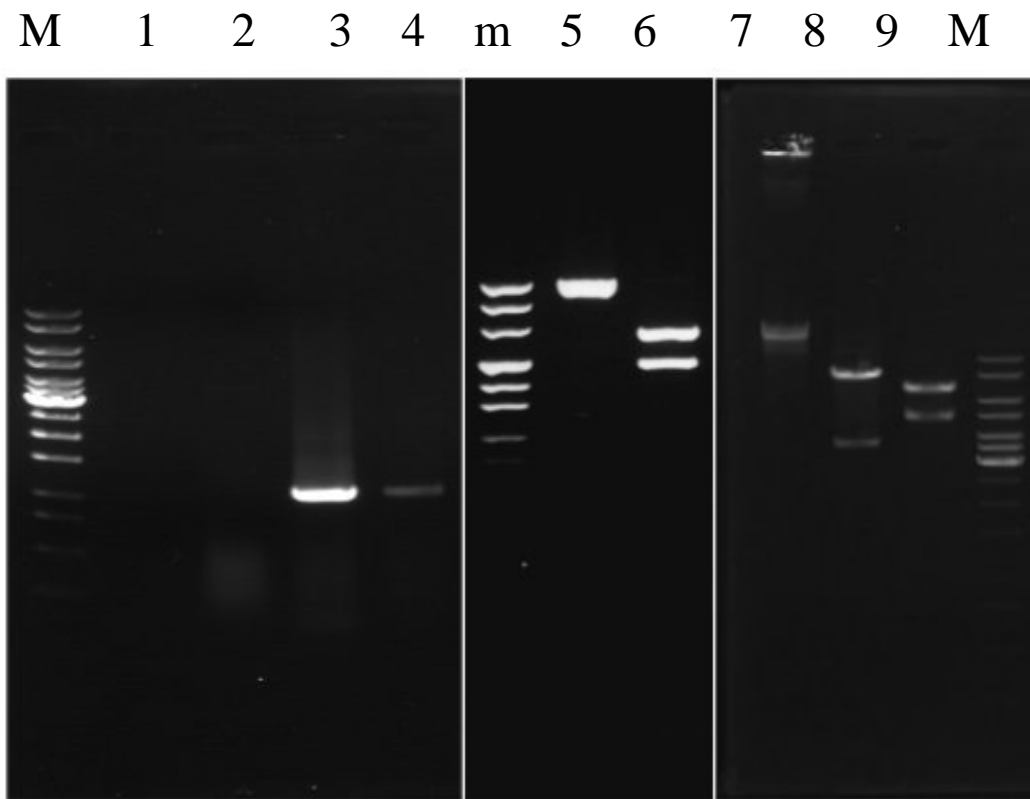
D. Spectrometry of β -Carotene of pSL525 plasmid in *E. coli* BL21

E. Spectrometry of β -Carotene of pSY313 in *E. coli* BL21

F. Spectrometry of β -Carotene of pSY313 in *A. xylinum*

圖十六、pSY313 轉形株類胡蘿蔔素之表現及光譜之分析

Fig.16. Expression and Spectrum analysis of β -Carotene in pSY313 transformants.



M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb
 m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

A. PCR product analysis of pSY313 plasmid

- | | |
|--------------------------------|----------|
| 1. H ₂ O | |
| 2. <i>A. xylinum</i> | |
| 3. pSY313 | 1,127 bp |
| 4. pSY313 in <i>A. xylinum</i> | 1,127 bp |

B. Restriction enzyme analysis of PCR product of pSY313 plasmid in *A. xylinum*

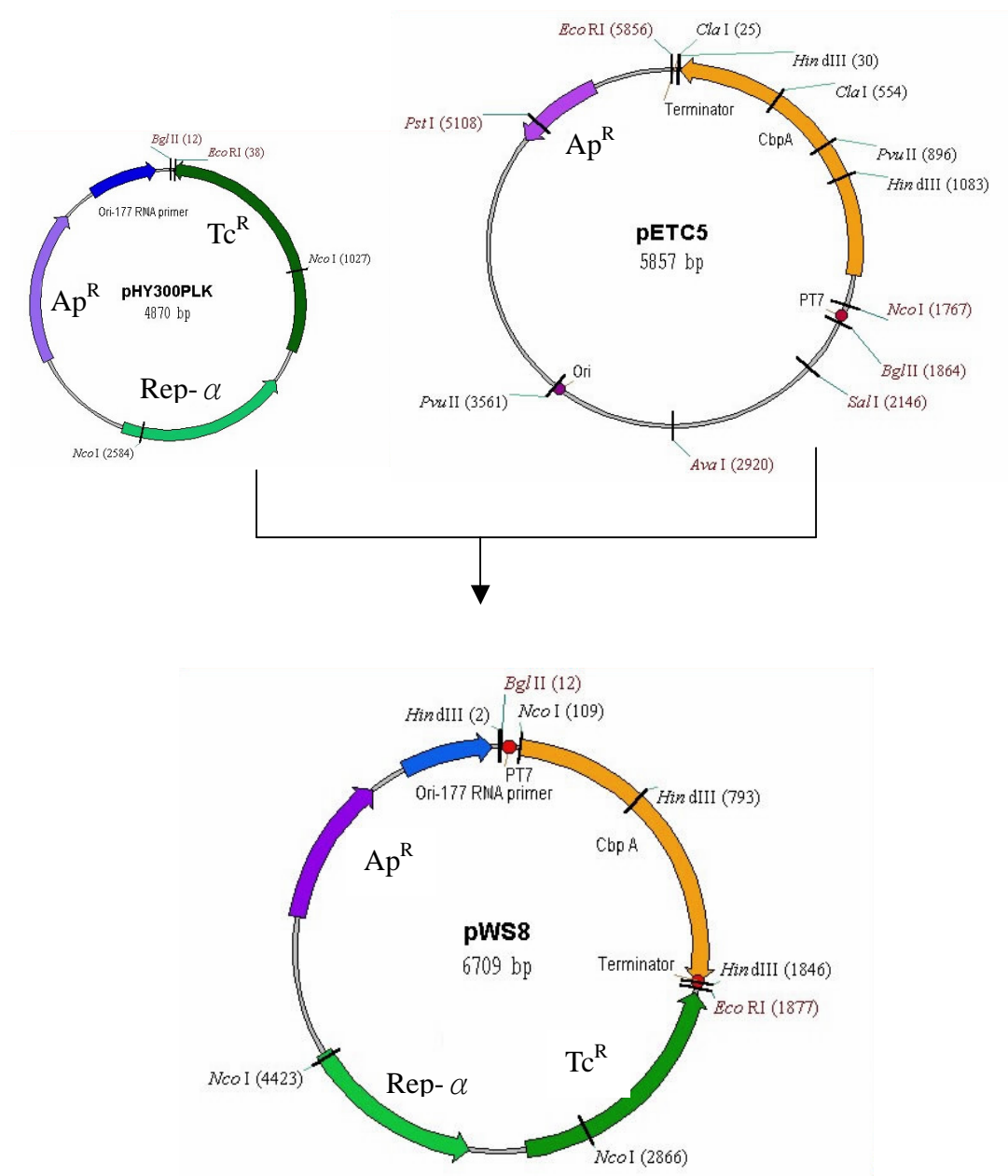
- | | |
|-----------------|----------------|
| 5. uncut | 1,127 bp |
| 6. <i>Rsa</i> I | 477 bp, 650 bp |

C. Restriction enzyme analysis of pSY313 plasmid in *E. coli* back-transformant

- | | |
|----------------------------|-----------------|
| 7. pSY313 Plasmid | 11.5kb |
| 8. pSY313 + <i>Bam</i> HI | 3.7 kb + 7.8 kb |
| 9. pSY313 + <i>Eco</i> R I | 4.8 kb + 6.7 kb |

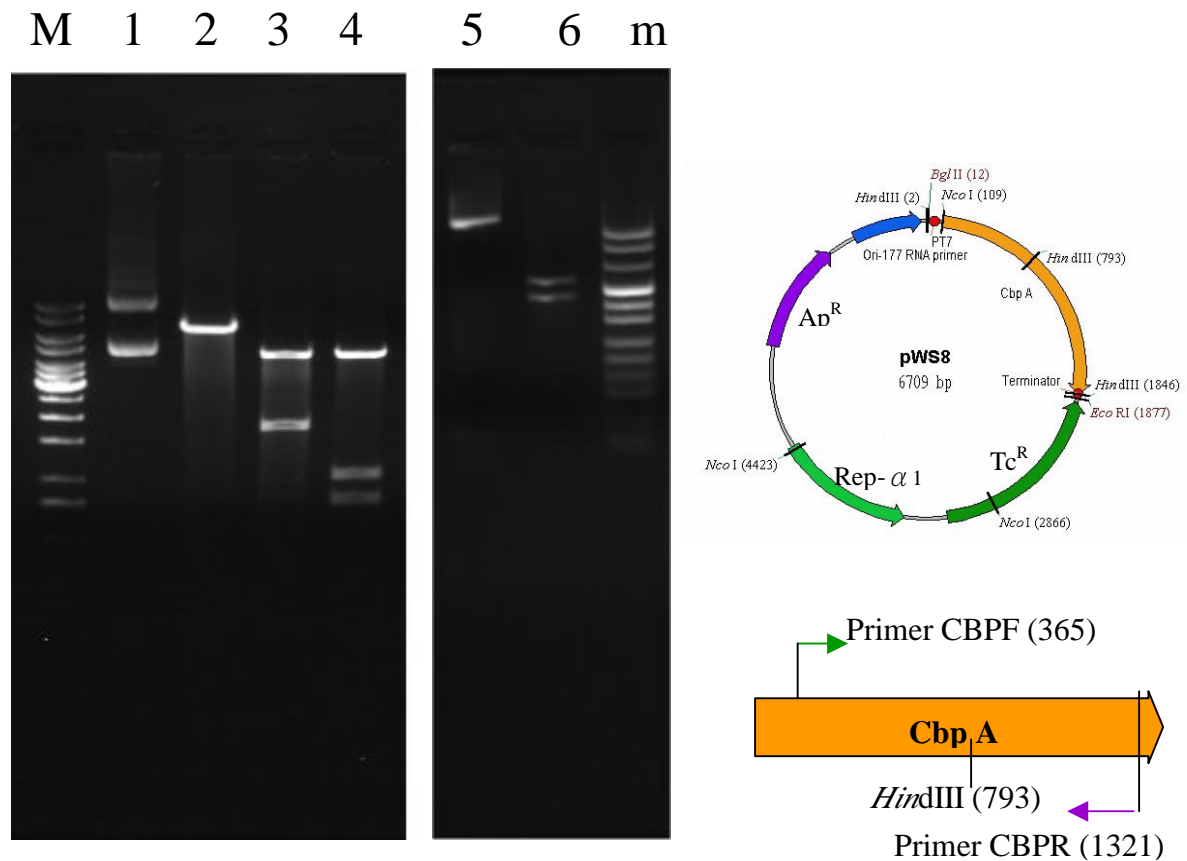
圖十七、pSY313 質體轉形於木質醋酸菌之鑑定。

Fig. 17. Identification of pSY313 plasmid in *A. xylinum*



圖十九、構築 pWS8 流程圖

Fig.19. Construction of pWS8 plasmid



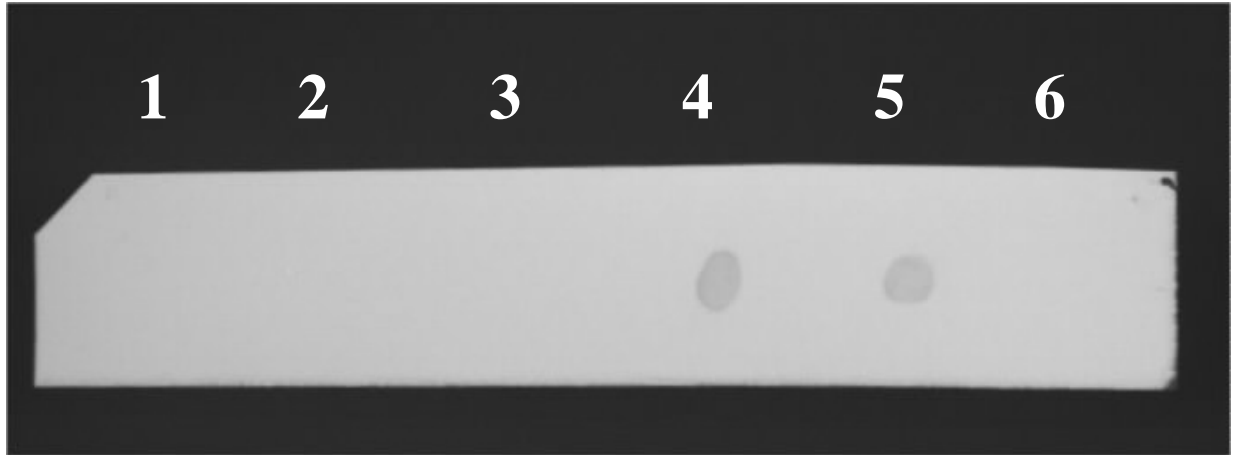
M : 1kb DNA Ladder -10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb

m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

1、pWS8	6,709 bp
2、pWS8 + <i>EcoR</i> I	6,709 bp
3、pWS8 + <i>Bgl</i> II + <i>EcoR</i> I	1,865 bp + 4,844 bp
4、pWS8 + <i>Hind</i> III	791 bp + 1,053 bp + 4865 bp
5、pWS8 PCR product	956 bp
6、pWS8 PCR product + <i>Hind</i> III	428 bp + 528 bp

圖二十、pWS8 質體及 PCR 產物限制酵素分析。

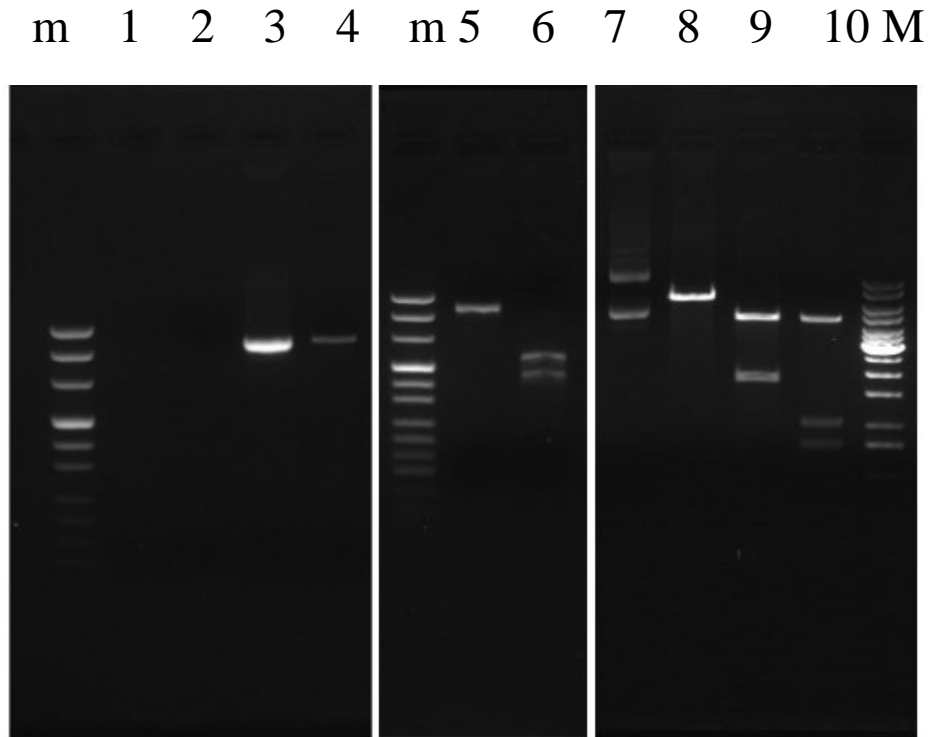
Fig. 20. The restriction enzyme analysis of pWS8 plasmid and PCR product



- | | |
|------------------------|---------------------------------|
| 1、 H ₂ O | 4、 pETC5 in <i>E. coli</i> BL21 |
| 2、 <i>E. coli</i> BL21 | 5、 pWS8 in <i>E. coli</i> BL21 |
| 3、 <i>A. xylinum</i> | 6、 pWS8 in <i>A. xylinum</i> |

圖二十一、纖維吸附蛋白質基因利用墨點法測試其表現情形

Fig. 21. Expression test of cellulose binding protein gene with dot blotting.



M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb
 m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

A. PCR product analysis of pWS8 plasmid

- 1、dH₂O
- 2、*A. xylinum* plasmid
- 3、pWS8 plasmid 956 bp
- 4、pWS8 plasmid in *A. xylinum* 956 bp

B. Restriction enzyme analysis of PCR product of pWS8 plasmid in *A. xylinum*

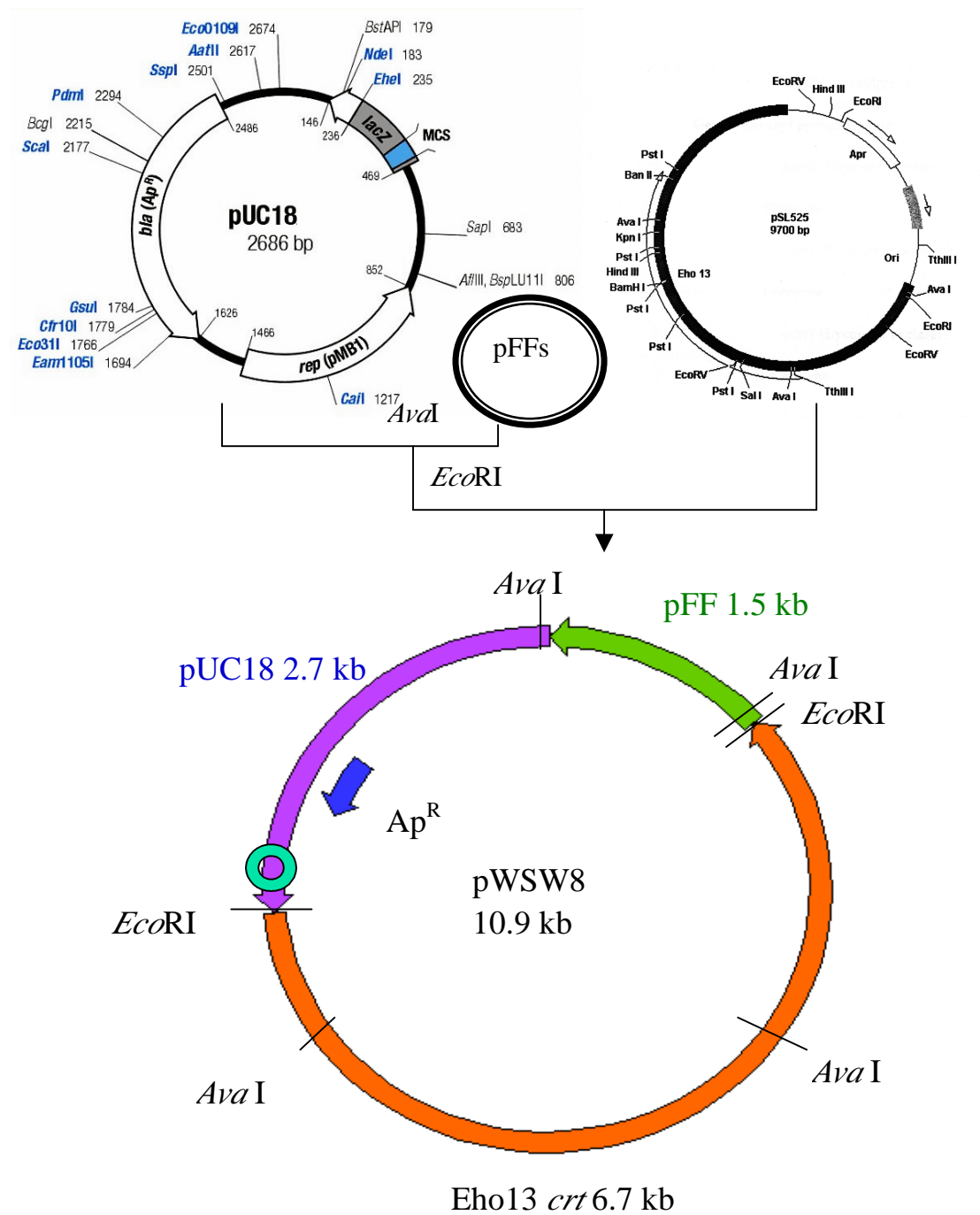
- 5、Uncut 956 bp
- 6、*Hind*III 428 bp + 528 bp

C. Restriction enzyme analysis of pWS8 plasmid in *E. coli* back-transformant

- 7、pWS8 6,709 bp
- 8、pWS8 + *Eco*R I 6,709 bp
- 9、pWS8 + *Bgl*II + *Eco*R I 1,865 bp + 4,844 bp
- 10 pWS8+ *Hind*III 791 bp + 1,053 bp + 4,865 bp

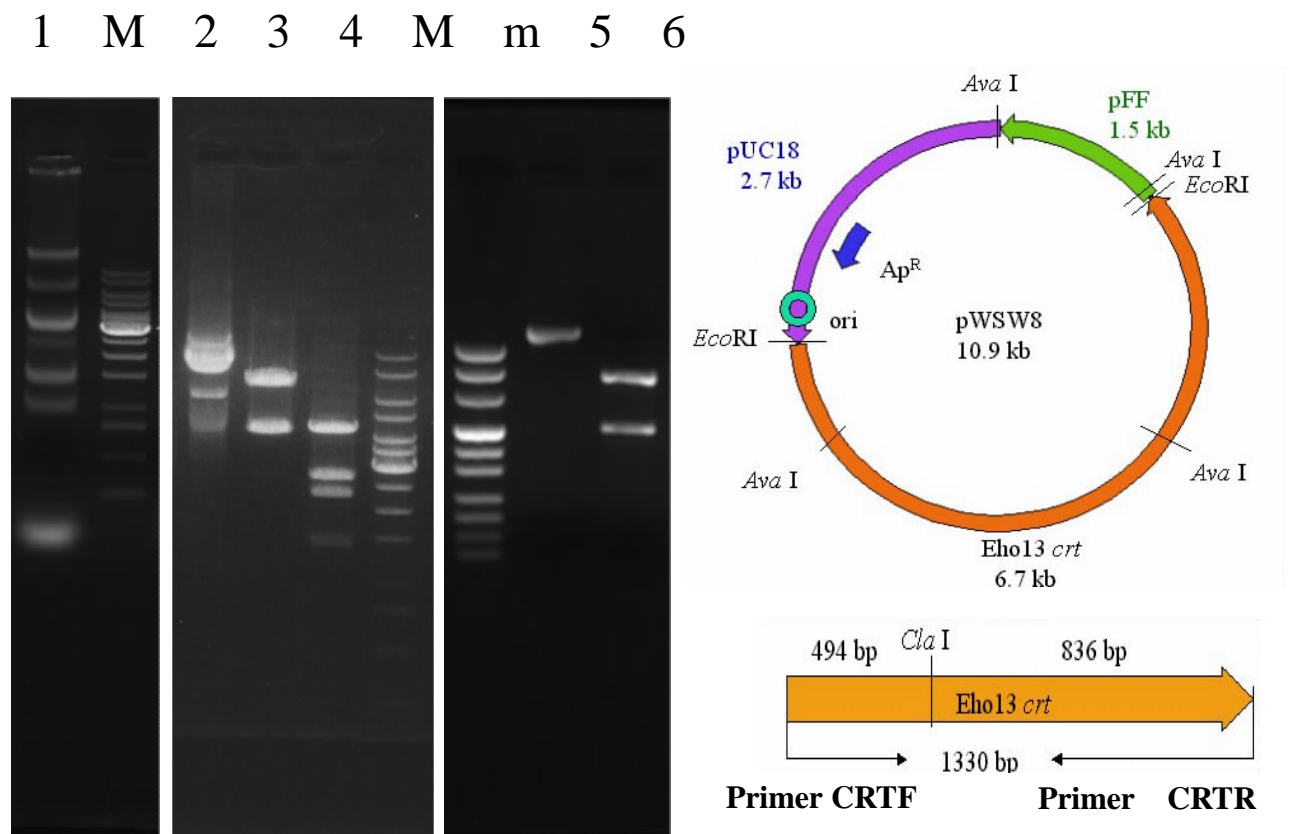
圖二十二、pWS8 質體轉形於木質醋酸菌之鑑定。

Fig. 22. Identification of pWS8 plasmid in *A. xylinum*



圖二十三、構築 pWSW8 流程圖

Fig.23. Construction of pWSW8 plasmid



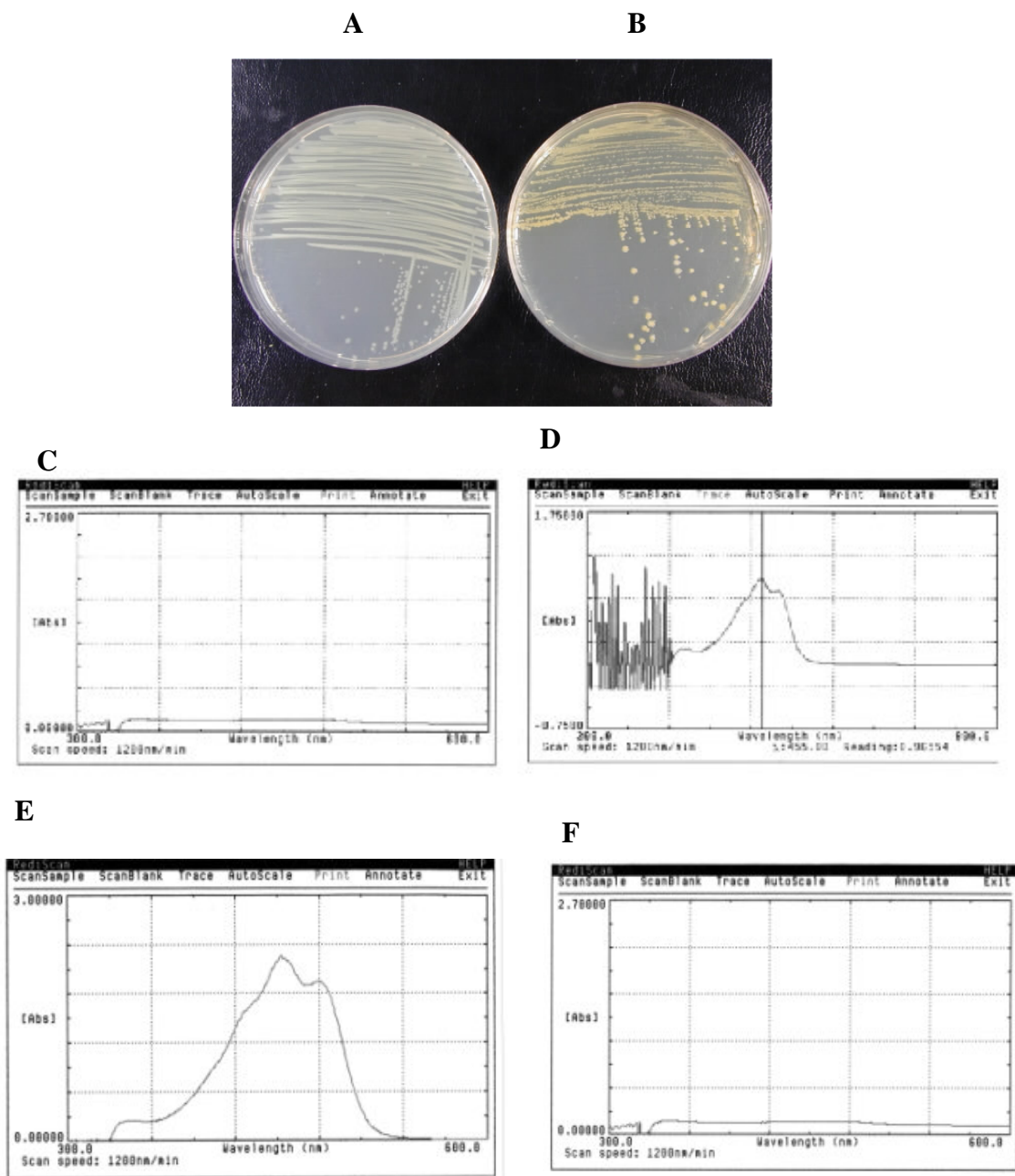
M : 1kb DNA Ladder -10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb

m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501*, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. <i>A. xylinum</i> IFFO3288 | 13 + 8 + 3.5 + 2.5 + 1.5 + 1 kb |
| 2. pWSW8 uncut | 10.9 kb |
| 3. pWSW8 + <i>EcoRI</i> | 4.2 kb + 6.7 kb |
| 4. pWSW8 + <i>AvaI</i> | 1.5 kb + 2.2 kb + 2.7 kb + 4.5 kb |
| 5. pWSW8 PCR product | 1,330 bp |
| 6. pWSW8 PCR product + <i>ClaI</i> | 494 bp + 836 bp |

圖二十四、pWSW8 質體及 PCR 產物限制酵素分析。

Fig. 24. The restriction enzyme analysis of pWSW8 plasmid and PCR product



A. *E. coli* BL21

B. pWSW8 plasmid in *E. coli* BL21

C. Spectrometry of β -Carotene in *E. coli* BL21

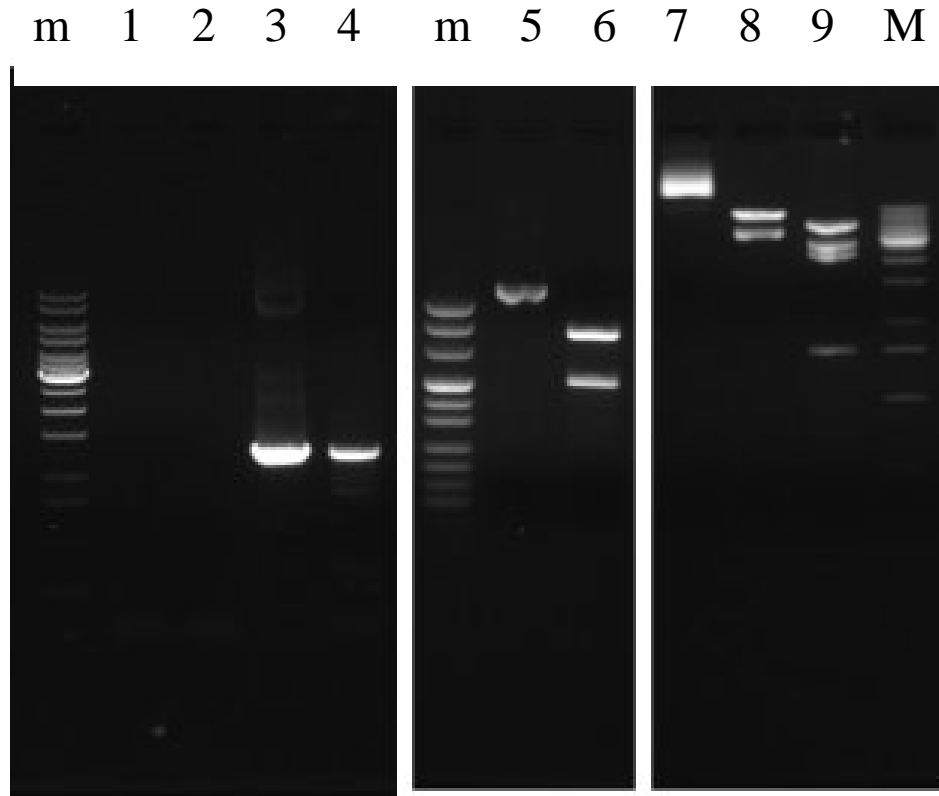
D. Spectrometry of β -Carotene of pWSW8 plasmid in *E. coli* BL21

E. Spectrometry of β -Carotene of pWSW8 plasmid in *E. coli* BL21

F. Spectrometry of β -Carotene of pWSW8 plasmid in *A. xylinum*

圖二十五、pWSW8 轉形株類胡蘿蔔素之表現及光譜之分析

Fig.25. Expression and Spectrum analysis of β -Carotene in pWSW8 transformants.



M. 1kb DNA Ladder-10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3*, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25 kb

m. pUC Mix Marker -1116, 883, 692, 501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67bp

A. PCR product analysis of pWSW8 plasmid

1. dH₂O

2. *A. xylinum* plasmid

3. pWSW8 plasmid 1330 bp

4. pWSW8 plasmid in *A. xylinum* 1330 bp

B. Restriction enzyme analysis of PCR product of pWSW8 plasmid in *A. xylinum*

5. uncut 1330 bp

6. *Cla*I 494 bp, 836 bp

C. Restriction enzyme analysis of pWSW8 plasmid in *E. coli* back-transformant

7. pWSW8 uncut 10.9 kb

8. pWSW8 + *Eco*RI 4.2 kb, 6.7 kb

9. pWSW8 + *Ava*I 1.5 kb, 2.2 kb, 2.7 kb, 4.5 kb

圖二十六、pWSW8 質體轉形於木質醋酸菌之鑑定。

Fig. 26. Identification of pWSW8 plasmid in *A. xylinum*