

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

藍微藻生產糖或纖維素之研究

Study on the Production of Sugar or Cellulose by Cyanobacteri

計畫編號：992001INER063

受委託機關(構)：輔英科技大學生物技術系

計畫主持人：周德珍

核研所聯絡人員：周聖炘

聯絡電話：07-7811151 轉 7907

E-mail address：dr008@mail.fy.edu.tw

報告日期： 99 年 11 月 20 日

目 錄

目 錄	I
中文摘要	2
英文摘要	3
壹、計畫緣起與目的	5
一、計畫緣起	5
二、計畫目的	5
貳、研究方法與過程	7
一、藻株培養	7
二、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7002 轉殖 PPSBA ::ACSAB 載體	10
三、建構海水微藻 PCC 7002 的 INTEGRATIVE VECTOR	10
四、SYNECHOCOCCUS PCC7942 ICTB 基因轉殖載體建構.....	10
五、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 ICTB 基因轉殖及轉殖株的篩選	11
六、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 共轉殖 ACSAB 與 ICTB 基因及轉 殖株的篩選	12
七、COLONY PCR 檢測轉殖藍綠菌是否具有 ACSAB 及 ICTB 基因	12
八、RNA 萃取與 RT-PCR 分析	12
九、GLUCOSE 含量分析	13
十、生長速率測定	13
十一、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 培養於不同 CO ₂ 濃度的生長 曲線-室內培養瓶	14
十二、葉綠素和胡蘿蔔素含量測定	14
十三、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 培養於不同 CO ₂ 濃度的光合 作用測定	15
十四、BIOSTAT 光合生物反應器栽培.....	15
十五、氣舉式光反應器	18

參、主要發現與結論	19
一、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 轉殖藻株之建構	19
(一) <i>acsAB</i> 基因轉殖載體之建構	20
(二) <i>acsAB</i> 轉殖株之 PCR 及 RT-PCR 分析	21
(三) 建構 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>ictB</i> 轉殖載體	23
(四) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 轉殖 <i>ictB</i> 與共轉殖 <i>ictB</i> 及 <i>acsAB</i>	25
二、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 轉殖藻株之建構	27
(一) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 轉殖 <i>PpsbA::acsAB</i> 載體	27
(二) 建構海水微藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 的 integrative vector	28
三、藍綠菌 <i>ACSAB</i> 轉殖株之纖維素水解與葡萄糖分析	32
(一) <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>PrbcL::acsAB</i> 轉殖株	32
(二) <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 <i>PpsbA::acsAB</i> 轉殖株	33
(三) IPTG 誘導 <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 <i>lacI^q-Ptac::acsAB</i> 轉殖株	34
四、SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 共轉殖 <i>ACSAB</i> 、 <i>ICTB</i> 及轉殖 <i>ACSAB</i> 之生長及葡萄糖含量分析	35
(一) 轉殖株之生長分析	35
(二) 纖維素水解與葡萄糖分析	36
五、CO ₂ 濃度對 SYNECHOCOCCUS SP. PCC7942 <i>ACSAB</i> 轉殖株生長及光合作用的影響	40
(一) 生長 - 室內培養瓶 (500 ml 通氣培養)	40
(二) 光合作用 - 室內培養瓶 (500 ml 通氣培養)	42

六、BIOSTAT 光合生物反應器栽培 — <i>SYNECHOCOCCUS</i> SP. PCC7942.....	44
七、微藻光合反應器培養.....	52
(一) 完成建構適用微藻專用的新式氣舉光罩系統.....	52
(二) 完成評估氣舉式光合反應器波長及光強度最適條件	52
(三) V 型管光反應器系統.....	52
肆、參考文獻.....	55

中文摘要

微藻纖維素或醣可作為生質酒精生產，而如何提高微藻大量培養之效率及增加纖維素或醣為主的生質產量是以微藻生產纖維素或醣的開發關鍵。本研究目的為開發微藻為纖維素及醣類的生產平台。將分別以下列三種方式進行：1).以轉殖纖維素合成酶 *acsAB* 基因方式以微藻生產纖維素及糖；2).將能提高細胞 CO_2 濃度之 *ictB* 基因（來自 *Synechococcus* sp. PCC7942）置入藻類基因組，以增進微藻的光合作用固碳效率，期能有效減少二氧化碳，並轉成生質物（Biomass）。使轉殖藍綠菌生質能增加，而進一步提高之纖維素及糖產量；3). 微藻光反應器培養：利用氣舉式光反應器與 BIOSTAT 光合生物反應器建立 *acsAB* 轉殖微藻之最佳生長條件，再藉由最適化程序來求得最佳連續培養的操作策略，以達到最大量產及品質之提升，並將以光反應器的栽培結果作為改進轉殖藻類的依據。目前已分別獲得藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7942 與 *Anabaena* sp. PCC7120 之 *acsAB* 基因轉殖株，以及 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB* 基因與 *ictB* 基因共轉殖株。轉殖株經 Celluclast 水解後之葡萄糖含量分析結果顯示，*Synechococcus* sp. PCC7942 及 *Anabaena* sp. PCC7120 轉殖 *acsAB* 基因均可提高藻株之纖維素產量 2 至 3 倍。比較轉殖株在 Air 培養狀態下之生長及葡萄糖含量發現，*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖 *acsAB* 基因，及共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，不僅纖維素之產量提高，促進細胞之生長，光合作用亦提高。Air 狀態下，PCC7942 *acsAB* 轉殖株（PrbcL::*acsAB*-6）的光合作用為對照組 Sp^r 載體轉殖株的 3 倍，生長量則為對照組的 2 倍。BIOSTAT 光合生物反應器栽培結果顯示在 1% CO_2 /Air 栽培下的生長量

明顯大於 Air 之栽培，且 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的生長亦優於對照組 Sp^r 載體轉殖株。本研究不僅藉由基因轉殖達到提高微藻光合作用效率與增加微藻纖維素及糖產量的成效，並以光反應器建立 *acsAB* 轉殖藍綠菌之最佳生長條件，此研究結果未來亦可提供微藻生產生質能產業化技術之依據。

Abstract

Cellulose and sugar derived from microalgae are potential raw materials for production of ethanol as a renewable energy resource. The major challenge for producing cellulose and sugar from microalgae is to increase the efficiency of mass production and the yield of cellulose and sugar. The objective of this project is to develop transgenic microalgae for high-yield production of cellulose and sugars through the following three distinct but complementary approaches: 1) the yield of cellulose and sugar will be increased by transgenic expression of cellulose synthase gene *acsAB* from *Acetobacter xylinum* in the target microalgae; 2) the photosynthesis efficiency will be enhanced by overexpressing the *ictB* gene (HCO₃⁻ transporter) in *Synechococcus* sp. PCC7942; 3) the efficiency of mass production of target microalgae will be improved by the use of air lift bioreactors. Currently, we have established three types of transgenic microalgae. First, the *acsAB* gene from *Acetobacter xylinum* was transferred to *Synechococcus* sp. PCC7942 or *Anabaena* sp. PCC7120. Second, the *ictB* gene was transgenically overexpressed in *Synechococcus* sp. PCC7942. And finally, the *acsAB* and *ictB* genes were both transferred into *Synechococcus* sp. PCC7942, resulting in a double transgenic strain.

Cellulose hydrolysis with cellulast demonstrated that glucose yield increased 2-3 folds in *acsAB*-transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 and *Anabaena* sp. PCC7120 in comparison with the controls. Incubation of transgenic microalgae under air significantly enhanced both cell growth and cellulose production up to 3.5 folds for transgenic *Synechococcus* sp. PCC7942 with *acsAB* or *acsAB* and *ictB*. In summary, we established the genetic modifications as well as growth conditions that lead to enhanced photosynthesis efficiency, increased cellulose and sugar yield and improved mass production of metabolically engineered microalgae. The findings from the studies will not only provide a solid basis for potential commercialization of the technology but also open a novel avenue for developing microalgae as a renewable resource for energy.

壹、計畫緣起與目的

一、計畫緣起

藻類作為生質能開發的材料優點為：(1) 具有較高的光子轉換效率 (photon conversion efficiency) (以每一公頃的生物量為比較基準 (biomass yields per hectare)); (2) 全年生長，提供較可靠及全年的供應; (3) 可利用廢水及海水作為生長介質; (4) 可作為 CO₂ 吸收利用，減少溫室效應; (5) 生產的生質能為無毒害及高度可分解的特性; (6) 種類生物多樣性高。第一代生質能所利用的植物多為作物，生質能的利用造成人類糧食及畜牧飼料的排擠。藻類可在不適合作物生長之邊緣地區栽培，對於人類社經衝擊較輕。如開發高效率低成本的纖維素合成酶基因轉殖藍綠藻大規模生產乙醇，所需培養面積僅為玉米種植面積的3.5%，可以減少耕地佔用，緩解森林濫伐壓力。此外這種纖維素合成酶基因 *acsAB* 轉殖藍綠藻的優點還包括：低成本的培養生產方式，因為藍綠藻為光合自營生物，可以行光合作用，利用人類與農作物用不著的廢水進行培養；且藍綠藻光合作用亦能進行空氣中二氧化碳之固定，達到減碳之效果；與由農作物中提取糖分時不同，可省去利用木材生產時所需的加工過程，可以在不影響藍綠藻正常生長的情況下，連續收集所分泌之纖維素與糖類 (Nobles and Brown, 2008)；而有些藍綠藻能固定大氣層中的氮，故生長時無須添加氮肥。

二、計畫目的

微藻纖維素或醣可作為生質酒精生產料源，而如何提高微藻大量培養之效率及增加纖維素或醣為主的生質產量是以微藻生產纖維素或醣

的開發關鍵。本計畫將藉由提高微藻光合作用效率、增加微藻纖維素及糖產量、建立 *acsAB* 轉殖藍綠菌之最佳生長條件以生產大量之轉殖微藻用於生質酒精生產。此計畫研究結果未來亦可提供微藻生產生質能產業化技術之依據。將分別以下列三種方式進行：

1).以轉殖纖維素合成酶 *acsAB* 基因方式提高微藻之纖維素及糖含量

以基因重組技術分別將木醋酸菌 *Acetobacter xylinum* ATCC23769 之纖維素合成酶 *acsAB* 基因 (Kawano et al., 2002) 連接於實驗室建立之微藻轉殖質體上，建構成為微藻之 *acsAB* 基因表達載體，藉由轉形或接合生殖(conjugation)將 *acsAB* 基因表達載體轉入藍綠藻中 (Thiel, 1994)，以提高微藻纖維素及醣類的產量。比較與分析不同藻株纖維素及醣類產量之差異，以作為未來量產纖維素及醣類之材料。此外由於海水微藻具有可利用海水大量培養及不與農作物爭水的產業開發優勢，故本計畫將建構海水藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7002 之纖維素合成酶基因轉殖系統。*Synechococcus* sp. PCC7002 是一生長極為快速之廣鹽性藍綠菌，具有天然轉形能力，為表達外源基因的很好宿主，極具有產業開發及應用價值。本計畫將建構 *Synechococcus* sp. PCC7002 之基因轉殖平台，以期可以海水大量培養生產纖維素及醣類。

2).將能提高細胞 CO₂ 濃度之 *ictB* 基因 (來自 *Synechococcus* sp. PCC7942) 置入藻類基因組，以增進微藻的光合作用固碳效率，期能有效減少二氧化碳，並轉成生質物 (Biomass)。使轉殖藍綠菌生質能增加，而進一步提高之纖維素及糖產量。

3).微藻光反應器培養：建構微藻大量培養之 V 型光反應器系統，並利用氣舉式光反應器，與 BIOSTAT 光合生物反應器栽培建立 *acsAB* 轉殖

微藻之最佳生長條件，再藉由最適化程序來求得最佳連續培養的操作策略，以達到最大量產及品質之提升，並將以光反應器的栽培結果作為改進轉殖藻類的依據。本計畫將藉由提高微藻光合作用效率、增加微藻纖維素及糖產量、建立 *acsAB* 轉殖藍綠菌之最佳生長條件以生產大量之轉殖微藻用於生質酒精生產。此計畫研究結果未來亦可提供微藻生產生質能產業化技術之依據。

貳、研究方法與過程

一、藻株培養

Synechococcus PCC7942 靜置培養於添加 10 mM EPPS 之 BG-11 培養基 (Stainer et al. 1971)，BG-11 培養基配方如表一。*Anabaena* sp. PCC7120 培養於含兩倍濃度 Na_2CO_3 之 BG-11 培養基。*Synechococcus* sp. PCC7002 以 ASNIII 培養基培養 (Table 2)。*Synechococcus* PCC7942、*Anabaena* sp. PCC7120 及 *Synechococcus* sp. PCC7002 皆以 12h 光照/12h 黑暗培養，培養溫度為 28°C。

表一、BG-11 培養基之組成。

Ingredient	g L ⁻¹	mM
NaNO ₃	1.5	17.65
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.04	0.18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	0.30

CaCl ₂ .2H ₂ O	0.036	0.25
Citric acid	0.006	0.03
Ferric ammonium citrate	0.006	0.03
EDTA (disodium magnesium)	0.001	0.003
Na ₂ CO ₃	0.02	0.19
Trace metal mix A5+Co	1 mL	
Deionized water	to 1 L	

pH after autoclaving and cooling: 7.4

Trace metals A5+Co

Ingredient	g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049

表二、 ASNIII 培養基之組成。

Ingredient	g L ⁻¹	mM
NaCl	25.0	427
MgCl ₂ .6H ₂ O	2.0	9.8
KCl	0.5	6.7

NaNO ₃	0.75	8.8
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.02	0.09
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.5	14.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5	3.4
Citric acid	0.003	0.015
Ferric ammonium citrate	0.003	0.015
EDTA (disodium magnesium)	0.0005	0.0015
Na ₂ CO ₃	0.02	0.19
Trace metal mix A5+Co	1 ml	
Deionized water	to 1 l	

pH after autoclaving and cooling: 7.5

Trace metals A5+Co

Ingredient	g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.390
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049

二、*Synechococcus sp.* PCC7002轉殖PpsbA::acsAB載體

測試以 *Anabaena sp.* PCC7120 *acsAB* 轉殖載體 PpsbA::acsAB 載體用於 *Synechococcus sp.* PCC 7002 轉形的可行性。將 *acsAB* 轉殖載體藉由接合生殖(conjugation)轉殖 *Synechococcus sp.* PCC7002 細胞，分別以含 neomycin (25 ug/ml)及 ampicilline (10 ug/ml)之 ASN-III 之固體培養基進行轉殖藻篩選。

三、建構海水微藻 PCC 7002 的 integrative vector

根據基因庫 *Synechococcus sp.* PCC7002 之 *desB* 基因序列，分別設計 *desB1* (*desB* 基因 5' 端片段)與 *desB2* 片段 (*desB* 基因 3'端片段)專一 primer。利用 PCR 方法以萃取自 *Synechococcus* PCC002 之 chromosomal DNA 為模板，依照設計之引子、擴增 *desB1* 與 *desB2* 片段。利用 TA Cloning 將擴增之基因片段插入 T vector 中。以電穿孔方式把 ligation 的 DNA 轉入 *E. coli*，經定序確認 *desB1* 與 *desB2* 片段基因片段後。分別將 *desB1* 片段及 *desB2* 片段置於 pAM1303 之 *NheI* site 及 *SacI* site，建構為 *Synechococcus sp.* PCC 7002 的 integrative vector。質體的抽取、酶切、DNA 片段回收、DNA 片段連接、大腸桿菌轉形等實驗均參照文獻 (Sambrook et al., 1989)。

四、*Synechococcus* PCC7942 *ictB* 基因轉殖載體建構

Synechococcus PCC7942 的 *ictB*基因已由本計畫共同主持人中山大學李澤民教授研究室clone取得，放在pGEM vector。本計畫擬分別建構*Synechococcus sp.* PCC7942具有兩種不同啟動子之*ictB*基因轉殖載

體，*rbcL* promoter vector PrbcL::*ictB*轉殖載體，及可以IPTG induced *ictB*表現之Tac promoter vector lacI^q-Ptac::*ictB*載體。將*rbcL* promoter與lacI^q-Ptac promoter基因分別置放於pAM1573-*ictB* 載體*ictB*上游，建構為*Synechococcus* PCC7942的*ictB*轉殖載體1573- lacI^q-Ptac – *ictB*與1573-PrbcL-*ictB*。並進行藍綠菌PCC7942轉形，以獲得提高HCO₃⁻ transport活性及光合作用效率的轉殖株，藉由光合作用效率及biomass之提高，增加轉殖株之纖維素產量。

五、*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB* 基因轉殖及轉殖株的篩選

將*ictB*轉殖載體pAM1573 (Tac promoter - *ictB*)藉由轉形轉殖於*Synechococcus* sp. PCC7942 wild type細胞，以Chloramphenicol抗生素進行轉殖藻篩選。離心收集10 mL *Synechococcus* sp. PCC7942細胞，去除培養液後，加入5 mL 10 mM NaCl solution，混合均勻後，以3980 rpm離心10分鐘後，去除上清液，再以1 mL 添加10Mm EPPS之BG-11液體培養基懸浮藻細胞，並加入1.5 µg之plasmid DNA，置於 28°C 黑暗震盪培養過夜後，隔日照光培養6小時後，以14000rpm 離心 2分鐘收集藻細胞，再以300 µL添加10 m MEPPS之BG-11液體培養基懸浮藻細胞後，進行連續10倍稀釋，各取100 µL塗於添加10 mM EPPS及含Chloramphenicol (7.5 µg mL⁻¹) 之BG-11固體培養基，置於28°C，照光培養，直到藻colonies生長。將固體培養基上長出之colonies以無菌牙籤挑選至添加10 M EPPS及含Spectinomycin (2 µg mL⁻¹) 之BG-11固體培養基上，照光培養後，將生長較好之藻株培養至添加chlorophenicol (7.5 µg mL⁻¹) 之液體培養基培養後，進行Colony PCR與Reverse transcription

PCR檢測藻株中是否帶有*ictB*基因並表現。

六、*Synechococcus sp.* PCC7942 共轉殖 *acsAB* 與 *ictB* 基因及轉殖株的篩選

將*ictB*轉殖載體藉由轉形轉殖於*Synechococcus sp.* PCC7942之*acsAB*轉殖藻細胞(pTac::*acsAB*)，並以抗生素chlorophenicol及spectinomycin進行共轉殖藻篩選。

七、Colony PCR 檢測轉殖藍綠菌是否具有 *acsAB* 及 *ictB* 基因

培養轉殖株於含抗生素之培養基。刮取約一個 loop 或 1.5 mL 的藍綠藻量，先以 colony PCR 檢測具藍綠藻是否具有 *acsAB* 及 *ictB* 的基因。取藻 pellet 以 TE-triton solution (TE, pH 8.0 + 1% Triton X-100) 懸浮細胞後，以 95°C 處理 3.5 min，再以 chloroform 萃取兩次後，取上清液並以 *acsAB* forward、reverse 引子，或 *acsAB* 及 *ictB* reverse 引子進行 PCR 反應，檢測轉基因藍綠藻是否具有 *ictB* 或 *acsAB* 的基因。

八、RNA 萃取與 RT-PCR 分析

離心收集培養兩星期的藻細胞 15 ml，打破細胞後，以 GENEMARK plant total RNA miniprep purification kit (cat#:TR02) 萃取 RNA。取 2.5 µl 萃取的 RNA，以 GENEMARK One-step RT PCR KIT (cat#:PR01-50) 進行 RT PCR。

九、Glucose 含量分析

以 OD750 測量藻濃度後，離心後將 pellet 以 1 ml buffer (50 mM sodium acetate, pH 5) 回溶，分成兩管，其中一管加纖維素水解酶 celluclast 1.5L 及 Novozyme188 水解，另外一管不加 celluclast 1.5 L 作為對照組 (Nobles and Brown, 2008)。

兩管分別加入 0.2 g 海砂，以 minibead beater 打破細胞後，實驗組加入 24 μ l celluclast 與 4 μ l 188 (以 0.22 μ m filter 過濾)，對照組則加入 28 μ l buffer，置於 50°C 反應 48 小時。加入 1 ml 80% 的酒精在 65°C 下反應 3 小時萃取糖分，以 14800 rpm 離心 2 分鐘，將上清液移至新的 tube，pellet 以 0.3 ml 80% 的酒精在 65°C 下反應半小時，再以 14800 離心 2 分鐘，結合兩次的上清液置於 80°C 半小時。取 20 μ l 酒精萃取液至 96 well plate，加入 150 μ l PG.O 試劑 (50 mM HEPES, 3 mg/ml p-hydroxybenzoic acid, 0.1 mg/ml 4-aminoantipyrine, 0.5 units peroxidase, and 1.5 units glucose oxidase, pH 7.0) 反應 15 分鐘，測量 OD₄₉₀。以序列稀釋後不同濃度的 glucose 作為 standard curve (Ou-Lee and Setter, 1985; Cheng, 1994)。

十、生長速率測定

細胞以分光光度計測定其生長情形。取 1 mL 藻液以分光光度計 (HITACHI U-2001, Japan) A₇₅₀ 測量藍綠藻 PCC7120 及 *Synechococcus* sp. PCC7942 之吸光值，為細胞量。

十一、*Synechococcus* sp. PCC7942培養於不同CO₂濃度的生長曲線

-室內培養瓶

取14 mL靜置培養約5週之PCC7942-1303 (Sp^r)及7942-1303-rbcL-acsAB-6藻液分別接種於含spectinomycin (2 µg/ml)的500 ml BG11+EPPS培養液。以四種含不同CO₂濃度的空氣: Air, 1% CO₂/Air, 5% CO₂/Air, 與10% CO₂/Air過濾氣體培養，通氣速度為32.4 mL/min，培養溫度為28°C，光強度4000 lux，以12hL/12hD光照週期培養。以新鮮的BG-11培養液作為空白對照，每日定時用紫外可見分光光度計(HITACHI U-2001, Japan)測定培養液在波長750 nm的OD值。根據OD₇₅₀吸光值，由藻類乾重對應吸光值之檢量線計算藻體乾重。繪製*Synechococcus* sp. PCC7942生長於不同CO₂濃度培養條件下的生長曲線。

十二、葉綠素和胡蘿蔔素含量測定

葉綠素含量的測定是取1 mL的藻液，在4°C，以12,000×g離心5分鐘，倒掉上清液，取下層pellet以1 mL的80% acetone萃取overnight (in the dark)，於隔天在4°C，以12,000×g離心5分鐘，取上清液測波長480、663、645 nm之吸光值。以下列公式求得葉綠素*a* (chlorophyll *a*, Chl *a*) 及胡蘿蔔素 (Carotenoid) 含量(mg/mL)。

$$\text{Chl } a \text{ (mg/mL)} = 12.7(A_{663}) - 2.69(A_{645})$$

$$\text{Carotenoid (mg/mL)} = (A_{480}) + 0.114(A_{663}) - 0.638(A_{645})$$

十三、*Synechococcus* sp. PCC7942培養於不同CO₂濃度的光合作用測定

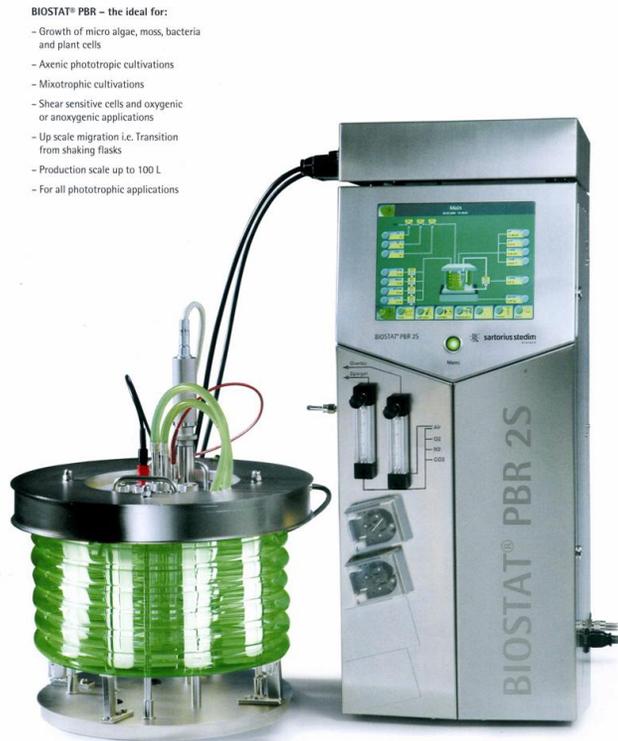
取 50 mL 靜置培養 5 週之 PCC7942-1303 (Sp^r)及 7942-1303-rbcL-acsAB-6 藻液，5000 xg 離心 5 min 後，去除上清液，沉澱之藻細胞以 10 mL 50 mM HEPES buffer (pH 7.5)懸浮藻細胞，即可倒入氧電極 (Hansatech, DW 3, English)，此為測定水中溶氧含量而設計的一種極譜電極 (polarographic electrode)。本研究使用的是薄膜氧電極 (Clark 電極)，由鑲嵌在絕緣材料上的銀極 (陽極) 和鉑極 (陰極) 構成，電極表面覆蓋一層厚約 20 -25 μm 的聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethene, PTFE) 或聚己烯薄膜 (polyethylene, PE)，電極和薄膜之間以飽和 KCl 溶液作為電解質。由於水中溶氧能透過薄膜而電解質 (離子) 不能透過，因而排除了被測溶液中各種離子電極反應的干擾，成為測定溶解氧的專用電極。

測定光合作用，取 20 mL 藻液離心 (轉速 3220xg, 25 °C, 5 分鐘)，去除上清液，以 10 mL HEPES buffer (pH=8) 懸浮，再加入 DW3 chamber 開始測定，以恆溫水槽控制 DW3 水溫為 28°C，光度以金屬鹵素燈 (Halogen Deko-Lampen, SYLVANIA, Tokyo Japan) 控制為 100 μE m⁻² s⁻¹，轉速為 50，先行光合作用 15 分鐘，將燈源遮蔽再測呼吸作用 10 分鐘，光合作用表示為單位時間水中氧氣含量，以 O₂ nmol/h/mL 及 O₂ nmol/h/mg Chl_a 表示之。

十四、BIOSTAT 光合生物反應器栽培

利用 Sartorius stedim 的 BIOSTAT PBR 2S 光合生物反應器進行微藻生長最佳條件測試，BIOSTAT PBR 2S 光合生物反應器總體積為 3.7L，

操作體積為3L(含外部單層玻璃螺旋管)，材料：(1).玻璃槽質矽硼酸玻璃,(2).與培養液接觸之不銹鋼材料採用高抗腐蝕材料,(3).O-ring採用耐高溫、耐腐蝕之EPDM (ethylene propylene rubber)材料。玻璃槽設計：(1).水循環夾套溫度控制(夾套佔槽體50%以上),(2).不鏽鋼上部含19mm、12mm與6mm孔徑,(3).含進氣與尾氣無菌過濾膜(PTFE材質;孔徑0.2 μ m;過濾面積為20cm²),(4).氣體曝氣方式採微曝氣管(micro sparger;20 μ m),(5).尾氣冷凝管含冷卻恆溫水進出快速接頭,(6).一個四向饋料接頭可同時饋料。溫度控制:(1).採用水循環夾套設計,(2).溫度控制為8-80 $^{\circ}$ C,(3).溫度偵測為0-150 $^{\circ}$ C,(4).溫度偵測方式為感測器(Pt100)直接接觸培養液。電極:(1).pH電極,(2).濁度電極,(3).氧化還原電位電極,(4).溫度電極(Pt100)



圖一、BIOSTAT 光合生物反應器

栽培之前置處理：

1. 清洗

零件及設備清洗包括：管子、主槽、外迴圈、不鏽鋼偵測蓋和冷卻循環水槽。除了外迴圈以外，其它清洗部份皆可單獨拆除清洗。外迴圈以 2% H₂O₂：利用幫浦抽入循環清洗約 1 小時，浸泡 1 小時，接著用自來水沖洗三次，最後再以 R0 水潤洗三次。

2. 偵測器校正：pH 和 redox，光度以光度計測量

3. 滅菌

4. 組裝

5. 開始栽培

6. 收藻離心

7. 冷凍乾燥

8. 稱重

由周德珍老師實驗室提供 *Synechococcus* sp. PCC7942 1303 (Sp^f, control) 及和 *Synechococcus* sp. PCC7942-acsAB 轉殖株，7942-1303-rbcL-acsAB-6之母瓶藻液，藻液離心後接入經高溫高壓(20分鐘，121°C，1.2 kg/cm²) 蒸氣滅菌之2.8L BG-11培養液 (含20 mM HEPES, pH=8)，另加入抗生素(spectinomycin) stock (10 mg/mL)，最終濃度為 (2 µg/mL)。以起始OD₇₅₀ =0.2開始栽培。培養條件為28°C，光照強度控制在100 µE m⁻² s⁻¹ (全日照)，氣體流速為每分鐘 50 c.c. (ccm, cubic centimeter per minute)，以不同二氧化碳濃度之通氣培養，二氧化碳濃度為0.03%(air)和1%，測量栽培時(第0天和第5天)之瓶照、OD值、葉綠

素、氧電極和PAM。栽培五天後進行收穫。

收穫及稱重方式以500 mL離心 (18900×g, HITACHI CR22GIII Tokyo, Japan) 5分鐘 (25°C) 收穫藻細胞沉澱並冷凍乾燥 (EYELA, FUD-1200, Tokyo, Japan) 至水分完全去除為止(-50°C)，此為沉澱細胞之乾重。上清液另以玻璃纖維 (glass microfibre filter) 過濾膜 (Whatman, GF/C, 7.0 cm i.d., Maidstone, England) 過濾。將過濾後之玻璃纖維過濾膜冷凍乾燥。進行過濾之前，將玻璃纖維過濾膜烘乾 (50°C, 4 hr)，放入真空抽氣櫃冷卻後秤重得過濾膜重量。上清液過濾後之過濾膜經冷凍乾燥後之重量為過濾膜加上清液藻細胞重量，與過濾膜重量相減即為上清液藻細胞重量。上清液藻細胞重量加沉澱細胞之乾重為此次栽培之總細胞重量。

十五、氣舉式光反應器

氣舉式光反應器的優點是：造價低、易操作、實用性強，可長期運轉；占地面積小，光能利用效率和產量高；結構簡潔，可防止藻類附壁、纏繞和形成死角，有利於長期培養；循環混合溫和均勻，剪切力小，不損傷藻類，迴圈速度高並形成湍流，提高光能利用效率，可實現高密度培養；以及培養液無氧飽和，溫度不會異常升高，不需要附加去氧裝置，不需要採用附加的降溫裝置和措施。以氣舉式醱酵槽結合光罩系統，開發改良式藻類光合反應器進行微藻醱酵試驗，以取得微藻所適生長條件如：光、溫度、pH、生長周期等條件，再依試驗狀況進行試驗條件改良，以得最適之生長條件。

參、主要發現與結論

一、*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖藻株之建構

目前已獲得的 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖株 Control: Sp^r 轉殖株、*acsAB* 轉殖株、*acsAB* + *ictB* 共轉殖株、*ictB* 轉殖株正進行轉殖篩選中。實驗中所用的 PCC7942 轉殖藻株示意圖如圖一。

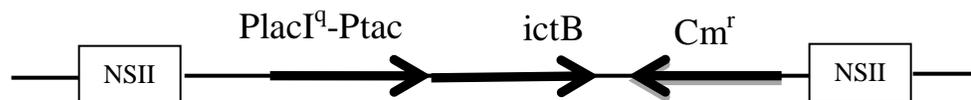
Control: Sp^r 轉殖株



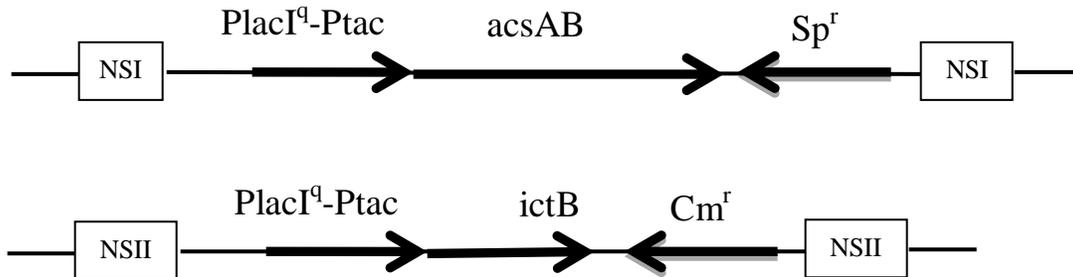
acsAB 轉殖株: Sp^r + *acsAB*



ictB 轉殖株: Cm^r + *ictB*



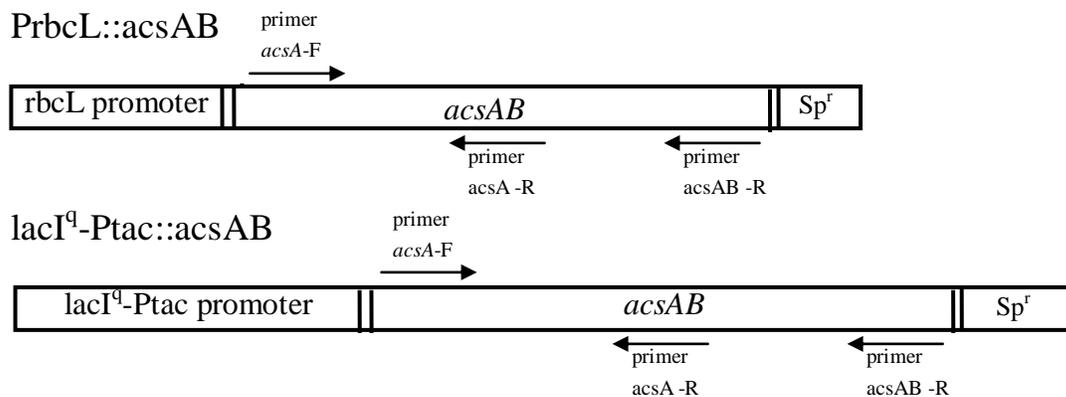
acsAB + ictB 共轉殖株: Sp^r + acsAB + Cm^r + ictB



圖一、實驗中所用的 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖藻株示意圖

(一)、*acsAB* 基因轉殖載體之建構

目前已建構完成藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7942 具有兩種不同啟動子之 *acsAB* 基因轉殖載體，*rbcL* promoter vector PrbcL::*acsAB*，可以 IPTG induced *acsAB* 表現之 Tac promoter vector lacI^q-Ptac::*acsAB* 載體 (圖二)。

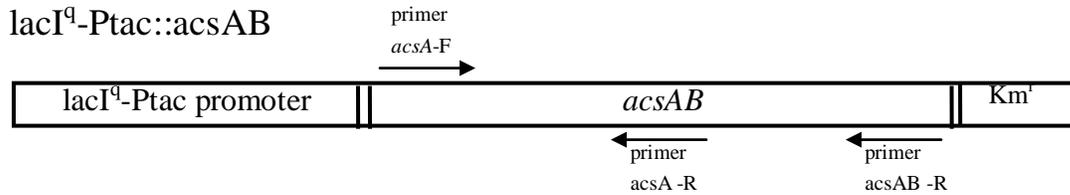


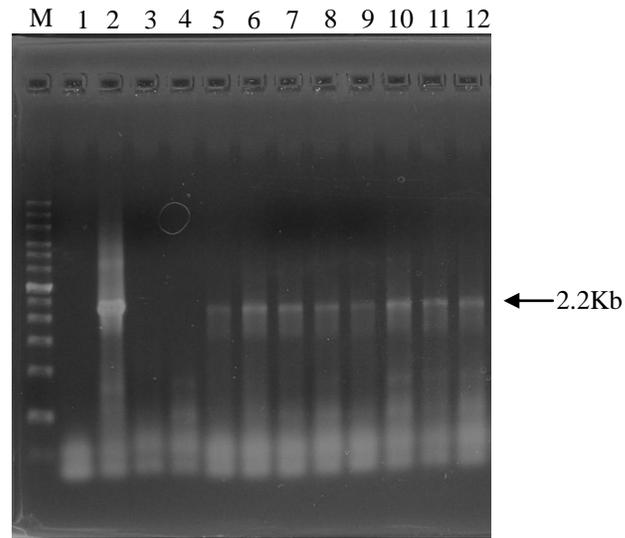
圖二、藍綠菌 *Synechococcus* sp. PCC7942 之 *acsAB* 基因轉殖載體

(二)、*acsAB* 轉殖株之 PCR 及 RT-PCR 分析

目前已獲得多株 *Synechococcus* sp. PCC7942 纖維素合成酶基因 *acsAB* 轉殖株，PCC7942 之 *PrbcL-acsAB* 轉殖株及 *lacI^q-Ptac::acsAB* 轉殖株，且選殖株皆能存活於 2μg/ml Spectinomycin 抗生素中。

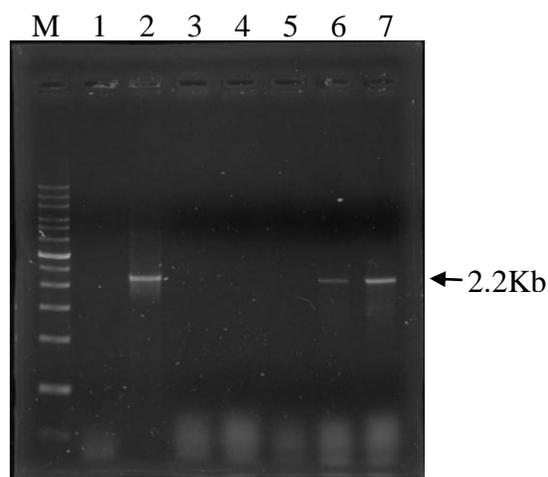
Colony PCR 分析結果檢測出 *PrbcL-acsAB* 轉殖株具有 *acsAB* 基因 (圖三)。抽取 RNA，利用 *acsA-F* 及 *acsA-R* 引子對進行 RT-PCR 分析，分別獲得片段大小分別為 2.2 kb，與預期相同，RT-PCR 分析結果顯示 *Synechococcus* sp. PCC7942 *PrbcL-acsAB* 轉殖株 *acsAB* 轉殖株表現 *acsAB* 基因 (圖四)。





圖三、Colony PCR 檢測 *Synechococcus* sp. PCC7942 之 PrbcL::acsAB 轉殖藻株

- M. marker,
- 1 Negative control. (d.H₂O)
- 2. positive control (PpsbA::acsAB plasmid)
- 3. *Synechococcus* sp. PCC7942 未轉殖株
- 4. *Synechococcus* sp. PCC7942 Nm^r vector
- 5. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 1
- 6. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 2
- 7. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 3
- 8. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 4
- 9. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 5
- 10. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 6
- 11. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 7
- 12. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 8



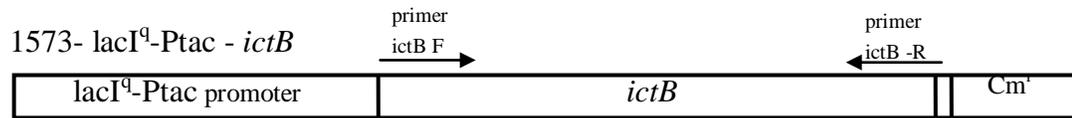
圖四、RT-PCR 檢測 *Synechococcus* sp. PCC7942 之 PrbcL::acsAB 轉殖藻株

- M. marker
- 1 Negative control. (d.H₂O)
- 2. positive control (PpsbA::acsAB plasmid)
- 3. *Synechococcus* sp. PCC7942 未轉殖株
- 4. *Synechococcus* sp. PCC7942 Nm^r vector
- 5. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 2
- 6. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 6
- 7. PrbcL::acsAB 轉殖藻株 8

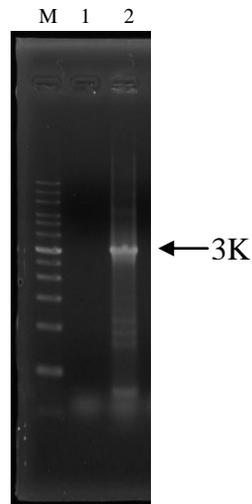
(三)、建構 *Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB* 轉殖載體

分別建構具有兩種不同啟動子之 *Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB* 基因轉殖載體，可以 IPTG induced *ictB* 表現之 1573- lacI^q-Ptac - *ictB* 與 1573-PrbcL-*ictB* (圖五)。目前已完成 PCC7942 之轉殖載體 1573-lacI^q-Ptac - *ictB*。而 1573-PrbcL-*ictB* 轉殖載體部份，已篩選出 clones，正進行 PCR 及限制酶切圖譜分析中。以 lacI^q-Ptac-F、*ictB*-R 引子進行 PCR 分析，PCR 獲得片段大小為 3kb 與預期相同 (圖六)，且 1573-lacI^q-Ptac promoter- *ictB* 轉殖載體以限制酶切圖譜分析結果，EcoRI

酶切分別為 8.3 kb、1.5 kb、1.2 kb；EcoRV 酶切為 9.7 kb、0.9 kb，及 0.9 kb 亦與預期相符合(圖七)。

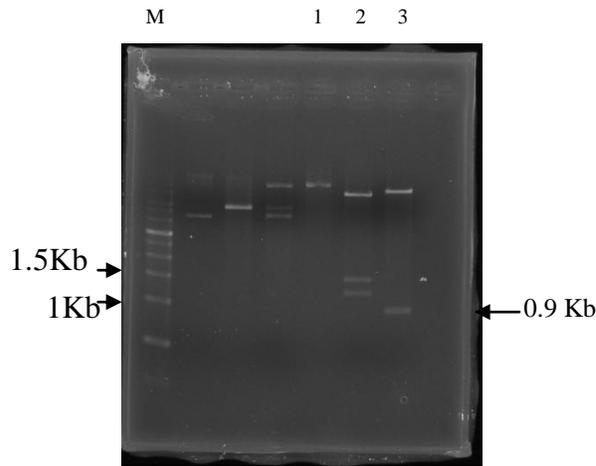


圖五、PCC7942 *ictB* 基因表達載體圖



圖六、PCC7942 轉殖載體 lacI^q-Ptac - *ictB* 之 PCR 分析

Primer: lacIQ-Ptac-F、*ictB*-R。 1. Negative control 2. pAM1573-lacI^q-Ptac-*ictB* 選殖株 1 號。



圖七、PCC7942lacI^q-Ptac-*ictB* 轉殖載體之限制酶切圖譜
1. *uncut* 2. *EcoRI* 切 3. *EcoRV* 切。

(四)、*Synechococcus* sp. PCC7942轉殖*ictB*與共轉殖*ictB*及*acsAB*

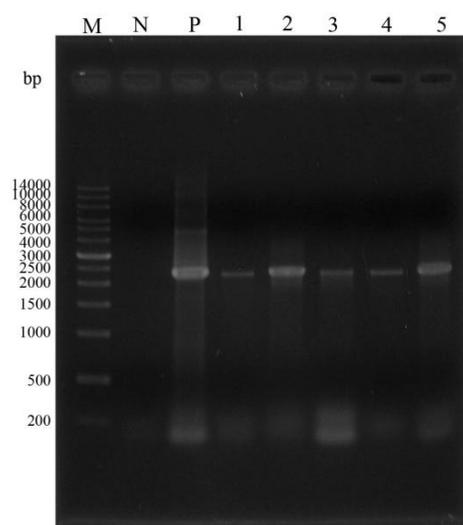
1. 轉殖 *ictB* 與共轉殖 *ictB* 及 *acsAB*

Synechococcus sp. PCC7942 之 *ictB* 與 *acsAB* 共轉殖是以篩選出之 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB* 轉殖株(轉殖 lacI^q-Ptac::*acsAB* 載體),用於轉殖 *ictB* 載體(lacI^q-Ptac::*ictB* 載體),目前已獲得 *Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB* 及 *acsAB* 之共轉殖藻株。*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖 *ictB* 是以 *Synechococcus* sp. PCC7942 wild type 轉殖 *ictB* 載體 (lacI^q-Ptac::*ictB* 載體),目前正進行轉殖後之篩選

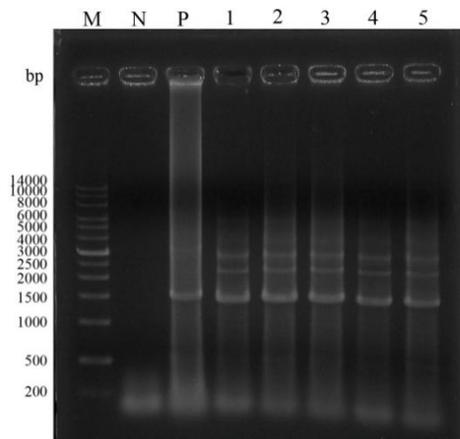
2. *ictB* 及 *acsAB* 共轉殖株之 PCR 分析

Colony PCR 檢測 5 株 *Synechococcus* sp. PCC7942 之 *ictB* 與 *acsAB* 共轉殖株 (lacI^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-1、lacI^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-2、lacI^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-3、lacI^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-4、

lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-5)，5株共轉殖藻株以 acsAB primers (primers: acsAB-For、acsA-Rev)。進行 PCR 後，獲得片段大小約為 2.2 kb 與預期相同(圖八)。以 ictB primer (primers: ictB-For、ictB-Rev)進行 PCR 後，獲得片段大小約為 1.5 kb 與預期相同(圖九)，且轉殖株皆能穩定存活於含 2 μg/ml Spectinomycin 與 7.5 μg/ml Chloramphenicol 抗生素的培養基中。



圖八、Colony PCR檢測*Synechococcus* sp. PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*acsAB*基因。Primers: acsAB-For、acsA-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H₂O)，P. positive control (PpsbA::acsAB plasmid)，1.轉殖株 lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-1，2. 轉殖株 lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-2，3. 轉殖株 lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-3，4. 轉殖株 lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-4，5. 轉殖株 lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-5。



圖九、Colony PCR檢測*Synechococcus sp.* PCC7942 *ictB*與*acsAB*共轉殖株之*ictB*基因。

Primers: *ictB*-For、*ictB*-Rev。M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control (d.H₂O)，P. positive control (pGEM-T-*ictB* plasmid)，1. 轉殖株 *lacI*^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-1，2. 轉殖株 *lacI*^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-2，3. 轉殖株 *lacI*^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-3，4. 轉殖株 *lacI*^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-4，5. 轉殖株 *lacI*^q-Ptac-*acsAB*-*ictB*-5。

二、*Synechococcus sp.* PCC7002的轉殖載體建構與轉殖

(一)、*Synechococcus sp.* PCC7002轉殖PpsbA::*acsAB*載體

Dai 等人的報導以衍生自 pDU1 replicon 的 pRL489 建構之人類表皮因子(hEGF)表達載體 pRL-hEGF 可以於 *Synechococcus sp.* PCC 7002 表現 hEGF，但由於 pDU1 replicon 無法於 *Synechococcus sp.* PCC 7002 中複製繁殖，是以整合到 PCC 7002 染色體上進行表達 hEGF (Dai et al. 2001)。故本年度計畫將先測試以建構完成之 *Anabaena sp.* PCC7120 *acsAB* 轉殖載體 PpsbA::*acsAB* 載體 (具有 pDU1 replicon) 用於 *Synechococcus sp.* PCC 7002 轉形的可行性。轉殖培養後，*Synechococcus sp.* PCC7002 細胞無法穩定生長於含 neomycin (25

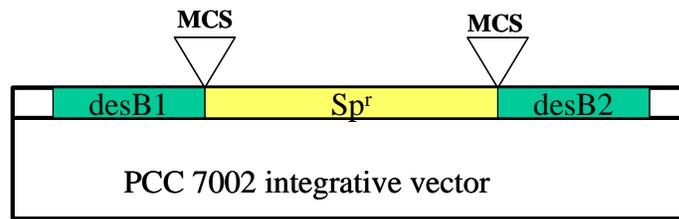
ug/ml)及 ampicilline (10 ug/ml)之 ASN-III 之固體培養基， *Anabaena* sp. PCC7120 *acsAB* 轉殖載體 PpsbA ::*acsAB* 的 pDU1 replicon 可能不適用於 *Synechococcus* sp. PCC7002 細胞內複製，故後續進行 *Synechococcus* sp. PCC7002 的 *desB* 基因選殖，以建構 *Synechococcus* sp. PCC7002 integrative vector。

(二)、建構海水微藻 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的 integrative vector

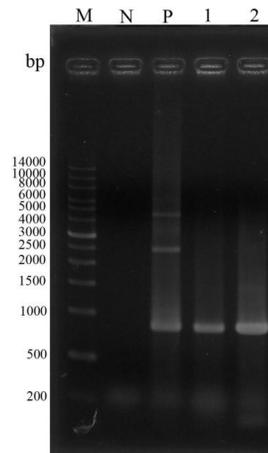
已選殖 *Synechococcus* sp. PCC7002 之 *desB* 基因之 *desB1* (*desB* 基因 5' 端片段)與 *desB2* 片段 (*desB* 基因 3' 端片段)。分別將 *desB1* 片段及 *desB2* 片段置於 pAM1303 之 *NheI* site 及 *SacI* site，建構為 *Synechococcus* sp. PCC 7002 的 integrative vector。先將 *desB1* 片段置於 pAM1303 之 *NheI* site，建構為質體 pAM1303-*desB1*。再將 *desB2* 片段置於質體 pAM1303-*desB1* 之 *SacI* site，建構為包含 *desB1* 與 *desB2* 片段的 *Synechococcus* sp. PCC 7002 integrative vector (圖十)。

目前已完成質體 pAM1303-*desB1* 的建構與確認。以 primer *desB1-f* 與 *desB1-r* 經 PCR 檢測獲得片段 0.8 kb (圖十一)，而質體 pAM1303-*desB1* 全長約 6.5 kb，以限制酵素 *EcoRV* 進行酶切後獲得 6.2kb 與 0.3 kb 片段，而以限制酵素 *EcoRV* 與 *BamHI* 進行酶切後，獲得片段分別為 4.2 kb、2 kb、0.3 kb (圖十二)，皆與預期片段相符合。Colony PCR 篩選出多株 pAM1303-*desB1-B2* 選殖株，以 primer *desB2-f* 與 *desB2-r* 經 PCR 檢測獲得片段 0.8 kb (圖十三)，以 primer *desB1-f* 與 *desB2-f* 經 PCR 檢測獲得片段 3.8 kb (圖十四)，質體 pAM1303-*desB1-B2* 全長約 7.3 kb，

以限制酵素 *Bst*XI 進行酶切後獲得 4.7.kb 與 2.6 kb 片段，而以限制酵素 *Sac*I 進行酶切後，獲得片段分別為 6.6 kb、0.8kb (圖十五)，皆與預期片段相符合。目前正以 integrative vector pAM1303- desB1-B2 進行 *Synechococcus* sp. PCC 7002 轉形測試中。

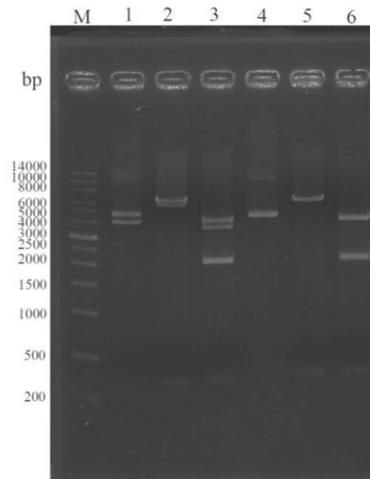


圖十、PCC7002 的 integrative vector 示意圖。



圖十一、pAM 1303-desB1 之PCR檢測。

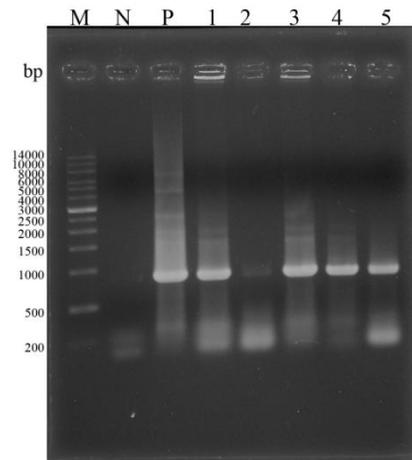
M. DNA Marker (0.2~14kb)，N. Negative control. (d.H₂O)，P. positive control (yT&A -desB1 plasmid)，1. 選殖株 pAM1303-desB1-1，2. 選殖株 pAM1303-desB1 -2。Primer: desB1-For、desB1-Rev，預估片段: 0.8 kb。



圖十二、質體pAM 1303-desB1選殖株 之限制酶切分析。

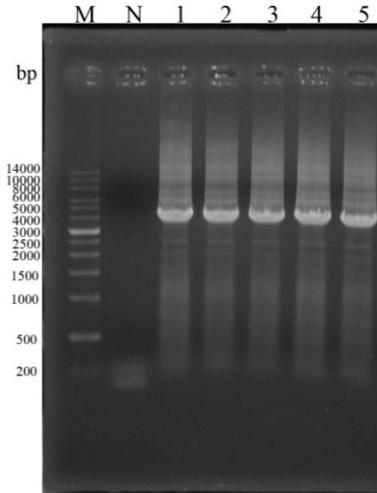
M. DNA Marker (0.2~14kb) 。

1. 選殖株pAM1303-desB1-1 uncut 。
2. 選殖株pAM1303-desB1-1 EcoRV切 。
3. 選殖株pAM1303-desB1-1 EcoRV + BamHI切 。
4. 選殖株pAM1303-desB1-2 uncut 。
5. 選殖株pAM1303-desB1-2 EcoRV切 。
6. 選殖株pAM1303-desB1-2 EcoRV + BamHI切 。



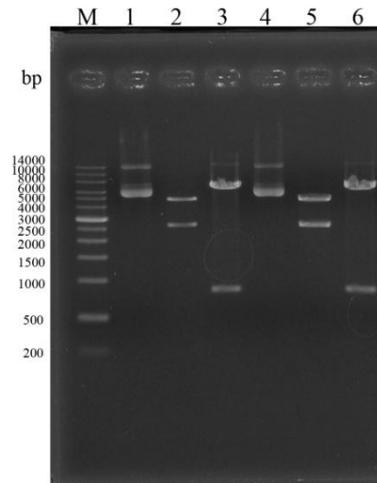
圖十三、pAM 1303-desB1-B2 之PCR檢測。

M. DNA Marker (0.2~14kb) , N. Negative control. (d.H₂O) , P. positive control (yT&A -desB2 plasmid) , 1. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-1 , 2. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-2 , 3. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-3 , 4. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-4 , 5. 選殖株pAM1303-desB1-B2-5 。Primer: desB2-For、desB2-Rev , 預估片段: 0.8 kb 。



圖十四、pAM 1303-desB1-B2 之PCR檢測。

M. DNA Marker (0.2~14kb) , N. Negative control. (d.H₂O) , 1. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-1 , 2. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-2 , 3. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-3 , 4. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-4 , 5. 選殖株 pAM1303-desB1-B2-5 。Primer: desB1-For、desB2-For , 預估片段: 3.8 kb。



圖十五、質體pAM 1303-desB1-B2選殖株之限制酶切分析。

M. DNA Marker (0.2~14kb) 。

1. 選殖株pAM1303-desB1-B2-1 uncut 。
2. 選殖株pAM1303-desB1-B2-1 BstXI切 。
3. 選殖株pAM1303-desB1-B2-1 SacI切 。
4. 選殖株pAM1303-desB1-B2-2 uncut 。
5. 選殖株pAM1303-desB1-B2-2 BstXI切 。
6. 選殖株pAM1303-desB1-B2-2 SacI切 。

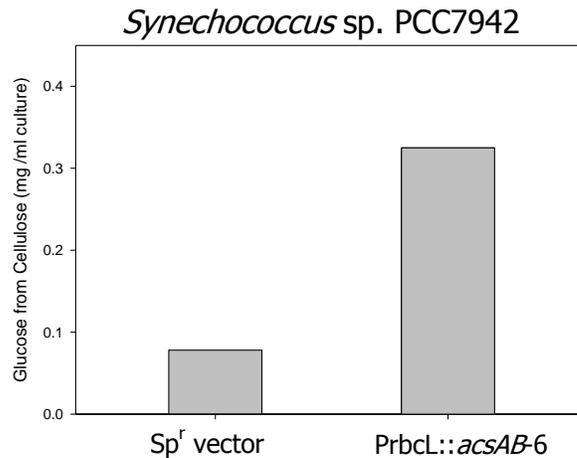
三、藍綠菌 *acsAB* 轉殖株之纖維素水解與葡萄糖分析

(一)、*Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::*acsAB* 轉殖株

離心收取以通氣培養，OD₇₅₀ 約為 1.061 之藻。離心後將 pellet 以 1 ml buffer (50 mM sodium acetate, pH 5) 回溶，分成兩管，分別以 minibeat beater 打破細胞，其中一管加 clluclast 1.5L 及 Novozyme188 水解，另外一管不加 celluclast 1.5 L 作為對照組，於 50°C 反應 48 小時後，利用葡萄糖氧化酵素-過氧化酵素連結反應法 (glucose oxidase-peroxidase coupled reaction method) 分析葡萄糖含量。將樣本加入 clluclast 1.5L 水解的所測之葡萄糖含量扣除其不加 celluclast 1.5 L 之葡萄糖含量，為 glucose from cellulose。

由圖十六 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::*acsAB* 轉殖株

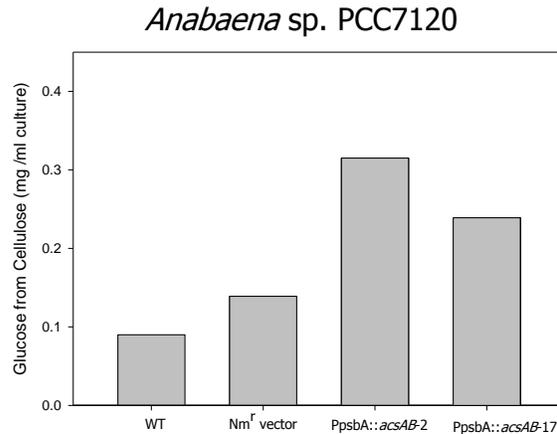
(PrbcL::*acsAB*-6) 及 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖 Sp^r vector 藻株與之葡萄糖含量分析結果，轉殖株 *acsAB*-6 來自 cellulose 水解之葡萄糖含量為 0.325 mg mL⁻¹，明顯高於 control, *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖 Sp^r vector 之 0.078 mg mL⁻¹，顯示轉殖 *acsAB* 基因後，*Synechococcus* sp. PCC7942 藻株的纖維素之產量提高了 3 倍左右。



圖十六、*Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB 轉殖株之葡萄糖含量分析。

(二)、*Anabaena* sp. PCC7120 PpsbA::acsAB 轉殖株

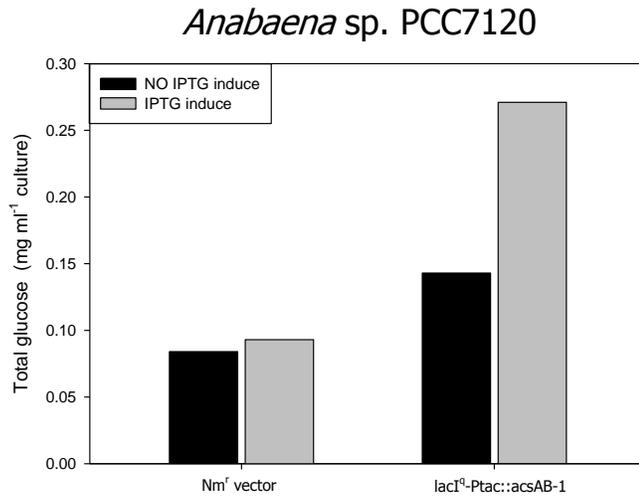
取靜置培養，OD₇₅₀ 約為 0.47 之 *Anabaena* sp. PCC7120 wild type 與 *Anabaena* sp. PCC7120 PpsbA::acsAB 轉殖株藻。Celluclast 水解處理與葡萄糖分析法同前。由圖十七 *Anabaena* sp. PCC7120 wild type 與 *Anabaena* sp. PCC7120 PpsbA::acsAB 轉殖株之葡萄糖含量分析結果，轉殖株 *acsAB-2* 與 *acsAB-17* 來自 cellulose 水解之葡萄糖含量分別為 0.315 mg mL⁻¹ 與 0.239 mg mL⁻¹，皆明顯高於 *Anabaena* sp. PCC7120 WT 之 0.090 mg mL⁻¹ 及 *Anabaena* sp. PCC7120 轉殖 Nm^r vector 之 0.139 mg mL⁻¹，顯示轉殖 *acsAB* 基因後，*Anabaena* sp. PCC7120 藻株纖維素之產量提高了約 2 至 3 倍左右。



圖十七、*Anabaena* sp. PCC7120 PpsbA::acsAB 轉殖株之葡萄糖含量分析

(三)、IPTG 誘導 *Anabaena* sp. PCC7120 lacI^q-Ptac::acsAB 轉殖株

取 20 mL 靜置培養 *Anabaena* sp. PCC7120 lacI^q-Ptac::acsAB 轉殖株，及不含 *acsAB* gene 之對照組 *Anabaena* sp. PCC7120 Nm^r 轉殖株，分別添加 1 mM IPTG 誘導與未經誘導處理後，離心收取藻體，以 minibead beater 打破細胞。Celluclast 水解處理與葡萄糖分析法同前。由圖十八轉殖株經 Celluclast 水解後之葡萄糖含量分析結果顯示，*Anabaena* sp. PCC7120 lacI^q-Ptac::acsAB 轉殖株經 IPTG 誘導後葡萄糖含量為未誘導的 1.9 倍。與 IPTG 誘導後對照組 PCC7120 轉殖 Nm^r vector 轉殖株的葡萄糖含量相比，則多了 3 倍。對照組 PCC7120 轉殖 Nm^r vector 經 Celluclast 水解後之總葡萄糖含量則不受 IPTG 誘導的影響。



圖十八、 *Anabaena* sp. PCC7120 轉植株經 IPTG 誘導及 Celluclast 水解後之葡萄糖含量分析

四、 *Synechococcus* sp. PCC7942 共轉殖 *acsAB*、 *ictB* 及轉殖 *acsAB* 之生長及葡萄糖含量分析

(一)、轉植株之生長分析

Synechococcus sp. PCC7942 *acsAB*轉植株PrbcL-*acsAB*-6、Plac-Ptac-*acsAB*， *acsAB*、 *ictB*共轉植株lacIq-Ptac-*acsAB*-*ictB*，及 control PCC7942 Sp^r分別接種於含抗生素的BG-11 pH 8.0 (Spectinomycin 2 µg/ml、chlamphenicol 7.5 µg/ml) 80ml 培養液各兩管，以於光照度4500 Lux，28°C，通空氣培養，通氣速率為32.6 ml/min。每天測量OD₇₅₀，繪製轉植株的生長曲線，於培養第4天，*Synechococcus* sp. PCC7942 lac-Ptac-*acsAB*轉植株，與*acsAB*、 *ictB*共轉植株(lacIq-Ptac-*acsAB*-*ictB*)培養液分別取其中一管加入100 µM IPTG (+ IPTG)，另一管不加IPTG (- IPTG)，比較以IPTG誘導*acsAB*、 *ictB*

表現對轉殖株生長的影响。

由圖十九、二十，培養於 Air 狀態下，PCC7942 轉殖 *acsAB* 基因及共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，轉殖株的細胞生長均可被促進。於培養第 10 天，PCC7942 *PrbcL::acsAB-6* 轉殖株的生長約為對照組 Sp^f 載體轉殖株的 3.5 倍（圖十九 A）。*Synechococcus* sp. PCC7942 *lac-Ptac-acsAB* 轉殖株的生長亦明顯較對照組 Sp^f 載體轉殖株為高，且以 IPTG 誘導 *acsAB* 表現，於培養第 10 天，生長為不加 IPTG 誘導的 1.5 倍（圖十九 B）。PCC7942 共轉殖 *acsAB* 及 *ictB* 基因後，轉殖株的細胞生長為對照組 Sp^f 轉殖株的 1.8 倍，共轉殖株經 IPTG 誘導後，生長量（ OD_{750} ）約提高 1.7 倍（圖十九 C）。

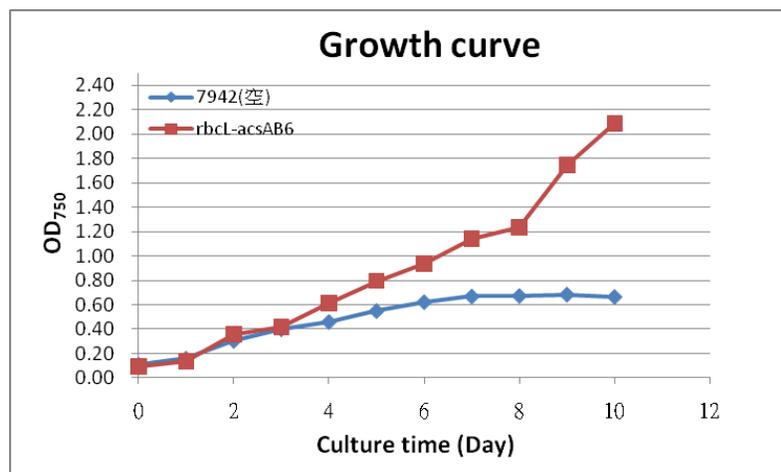
（二）、纖維素水解與葡萄糖分析

Synechococcus sp. PCC7942 *acsAB* 轉殖株 *PrbcL-acsAB-6*、*Plac-Ptac-acsAB*，*acsAB*、*ictB* 共轉殖株 *lacIq-Ptac-acsAB-ictB*，及 control PCC7942 Sp^f 分別培養於含抗生素的 BG-11 pH 8.0（Spectinomycin 2 $\mu\text{g/ml}$ 、chlamphenicol 7.5 $\mu\text{g/ml}$ ）100ml 培養液，以於光照度 4500 Lux，28°C，通空氣培養，通氣速率為 32.6 ml/min。每天測量 OD_{750} ，於培養第 4 天，*Synechococcus* sp. PCC7942 *lac-Ptac-acsAB*，與 *acsAB*、*ictB* 共轉殖株 *lacIq-Ptac-acsAB-ictB* 於通氣培養 10 天（100 μM IPTG 誘導四天），離心收取藻細胞，進行 Celluclast 水解及葡萄糖含量分析。

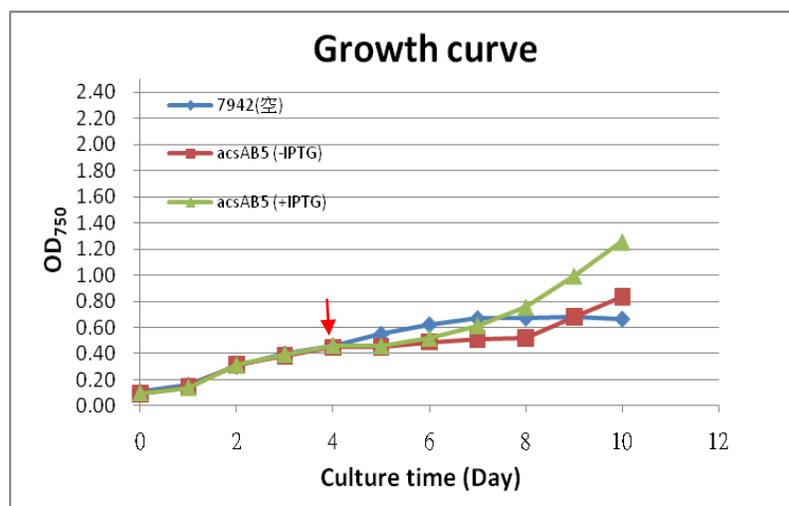
由圖二十一 *Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖株的葡萄糖含量分析結果，*acsAB* 轉殖株（*PrbcL-acsAB-6* 及 *Plac-Ptac-acsAB*）之 cellulose

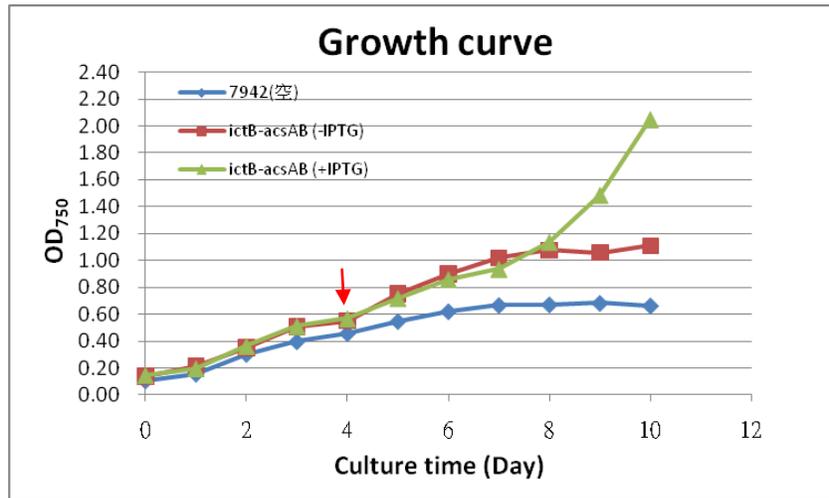
水解之葡萄糖含量約為對照組 Sp^r vector 轉殖株的 1.4 倍，而 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB*、*ictB* 共轉殖株 (*lacIq*-*Ptac*-*acsAB*-*ictB*) 來自 cellulose 水解之葡萄糖含量則為對照組 Sp^r vector 轉殖株的 3.5 倍，顯示 *Synechococcus* sp. PCC7942 共轉殖 *acsAB*、*ictB* 基因後，不僅促進生長，其纖維素亦明顯提高。

A



B

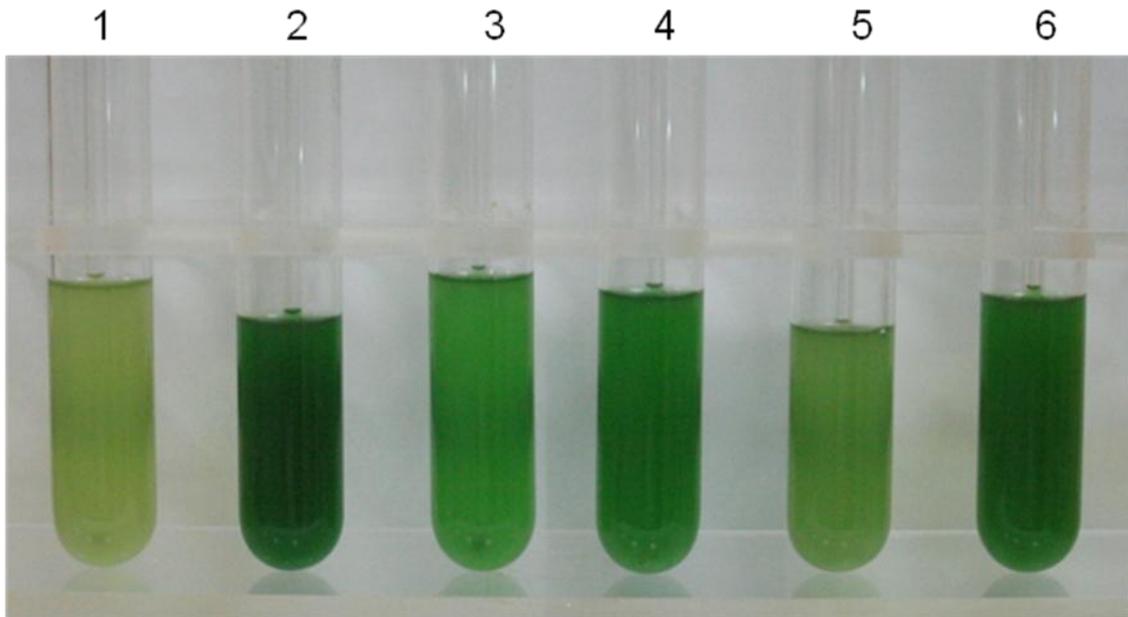




C

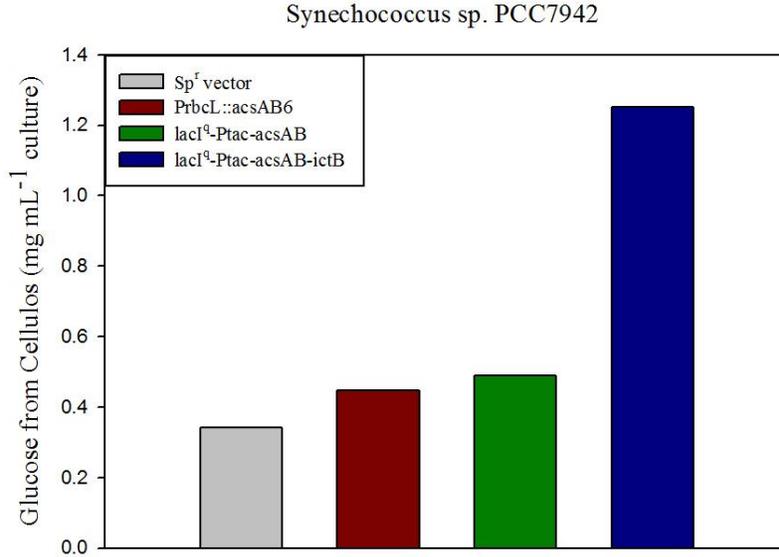
箭頭處為 IPTG 加入之時間

圖十九、*Synechococcus* sp. PCC7942 Sp^r vector 轉殖株 (control) 與 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB、*Synechococcus* sp. PCC7942::lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-1 轉殖株培養之生長曲線。



1. PCC7942-Sp^r
2. PCC7942-PrbcL::acsAB
3. PCC7942-PlacI^q-Ptac::acsAB (- IPTG)
4. PCC7942-PlacI^q-Ptac::acsAB (+ IPTG)
5. PCC7942-PlacI^q-Ptac::acsAB-ictB (- IPTG)
6. PCC7942-PlacI^q-Ptac::acsAB-ictB (+ IPTG)

圖二十、*Synechococcus* sp. PCC7942 Sp^r vector 轉殖株 (control) 與 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB、*Synechococcus* sp. PCC7942::lacI^q-Ptac-acsAB-ictB-1 轉殖株培養圖。



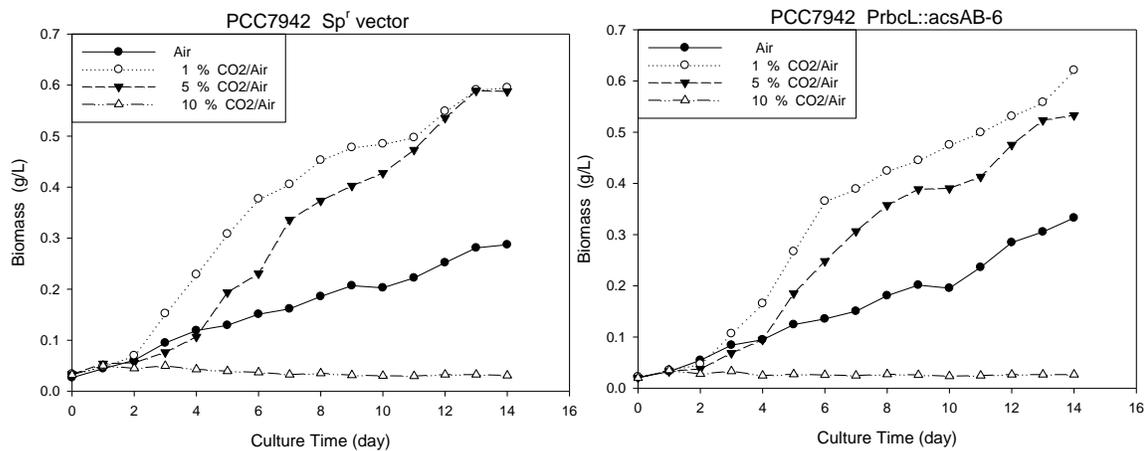
圖二十一、*Synechococcus* sp. PCC7942 轉殖株通氣培養後經 Celluclast 水解後的葡萄糖含量分析

五、CO₂ 濃度對 *Synechococcus* sp. PCC7942 *acsAB* 轉殖株生長及光合作用的影響

(一)、生長 - 室內培養瓶 (500 ml 通氣培養)

PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::acsAB-6) 及對照組Sp^r載體轉殖株分別接種於500 ml含spectinomycin (2 μg/ml)與10 mM EPPS的500 ml BG11培養液。以含不同CO₂濃度的過濾氣體: Air, 1% CO₂/Air, 5% CO₂/Air, 與10% CO₂/Air, 培養於12h光照/12h黑暗, 28°C條件下, 每日定時用紫外可見分光光度計測定培養液在波長750 nm的OD值。根據OD₇₅₀吸光值, 由藻類乾重對應吸光值之檢量線計算藻體乾重。繪製 *Synechococcus* sp. PCC7942生長於不同CO₂濃度下的生長曲線。由圖二十二, PrbcL::acsAB轉殖株與Sp^r vector轉殖株 (control)培養於不同CO₂

濃度通氣培養，以1% CO₂生長最好，5% CO₂其次，培養14天的細胞密度約0.6 g dry wt/L，當CO₂含量為10%時，轉殖藻PrbcL::acsAB轉殖株與Sp^r vector轉殖株皆無法生長。不同CO₂濃度培養的生長曲線結果，適當的提高CO₂濃度對轉殖藻的培養有利，能促進轉殖藻的生長，及縮短生長週期，但CO₂濃度過高（10% CO₂/Air）使培養液pH下降，抑制*Synechococcus* sp. PCC7942轉殖藻的生長。此外光照亦為培養的關鍵因素，轉殖藻以1% CO₂/Air培養8天的細胞密度可達0.45 g dry wt/L，而培養14天的生長趨緩，細胞密度約0.6 g dry wt/L，可能因藻細胞濃度升高後，造成遮光，光強度不能滿足藻的生長需求。



圖二十二、*Synechococcus* sp. PCC7942 Sp^r vector 轉殖株 (control) 與 *Synechococcus* sp. PCC7942 PrbcL::acsAB 轉殖株培養於不同 CO₂ 濃度之生長曲線

(二)、光合作用 - 室內培養瓶 (500 ml 通氣培養)

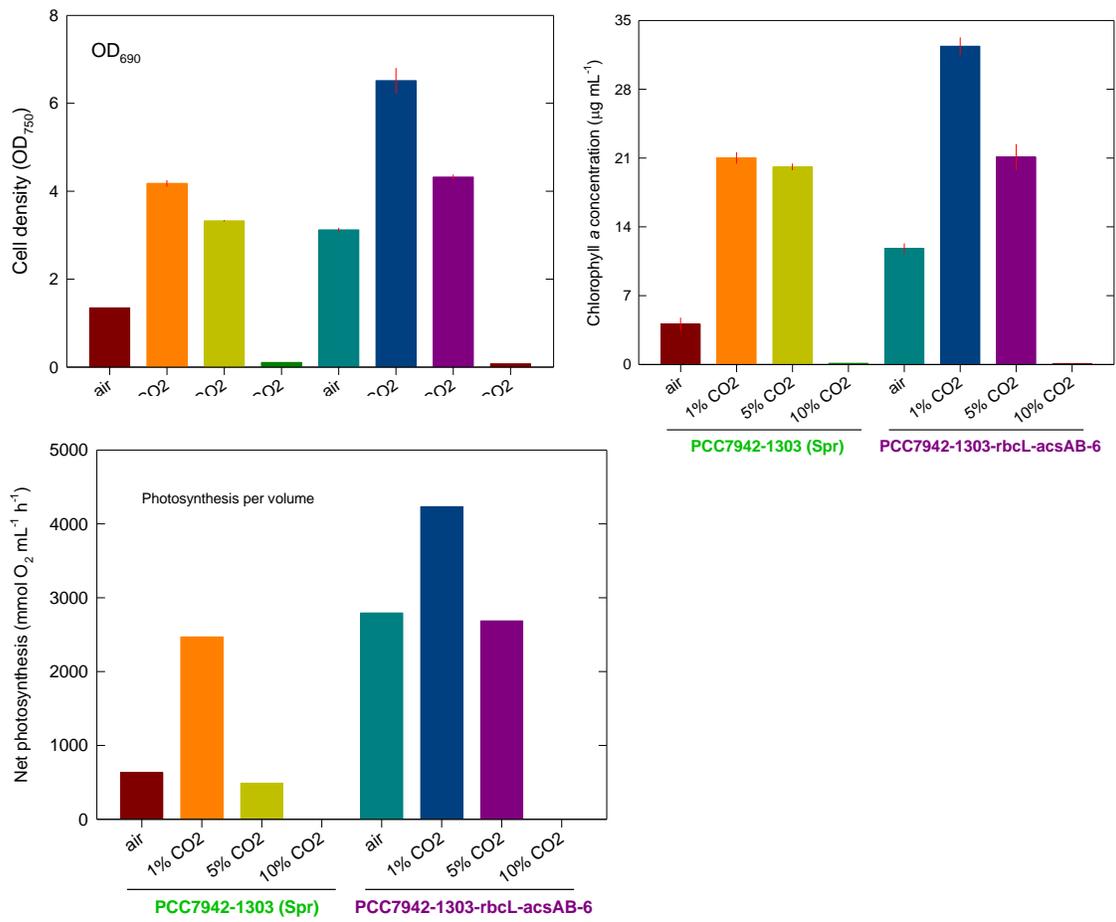
PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 及對照組 Sp^r 載體轉殖株分別以 Air, 1% CO₂/Air, 5% CO₂/Air, 與 10% CO₂/Air 通氣培養, 於通氣培養第 15 天, 進行光合作用速率的分析。

圖二十三顯示 Air 狀態下, PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的光合作用明顯增加, 為對照組 Sp^r 載體轉殖株的 3 倍(O₂ nmol/h/mL), 生長量 (OD 及 Chla) 則提高為對照組 Sp^r 載體轉殖株的 2 倍。

在 CO₂ 濃度為 1% 的狀態下, PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 及對照組 Sp^r 載體轉殖株細胞生長均可被促進, 以 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的效果明顯較高。PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 及對照組 Sp^r 載體轉殖株, 單位體積的光合作用(O₂ nmol/h/mL) 均可被促進, 也是以 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的效果明顯較高。

CO₂ 濃度為 1% 為比較對象, CO₂ 濃度提高到 2% 的處理反而造成生長及光合作用(O₂ nmol/h/mL) 較低 (雖然高於 Air 對照組), CO₂ 濃度提高到 10% 的處理完全抑制生長及光合作用。

所以, PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的生長及光合作用, 對於 CO₂ 濃度介於 air-1% 之濃度, 可能具有直線增高的效果。

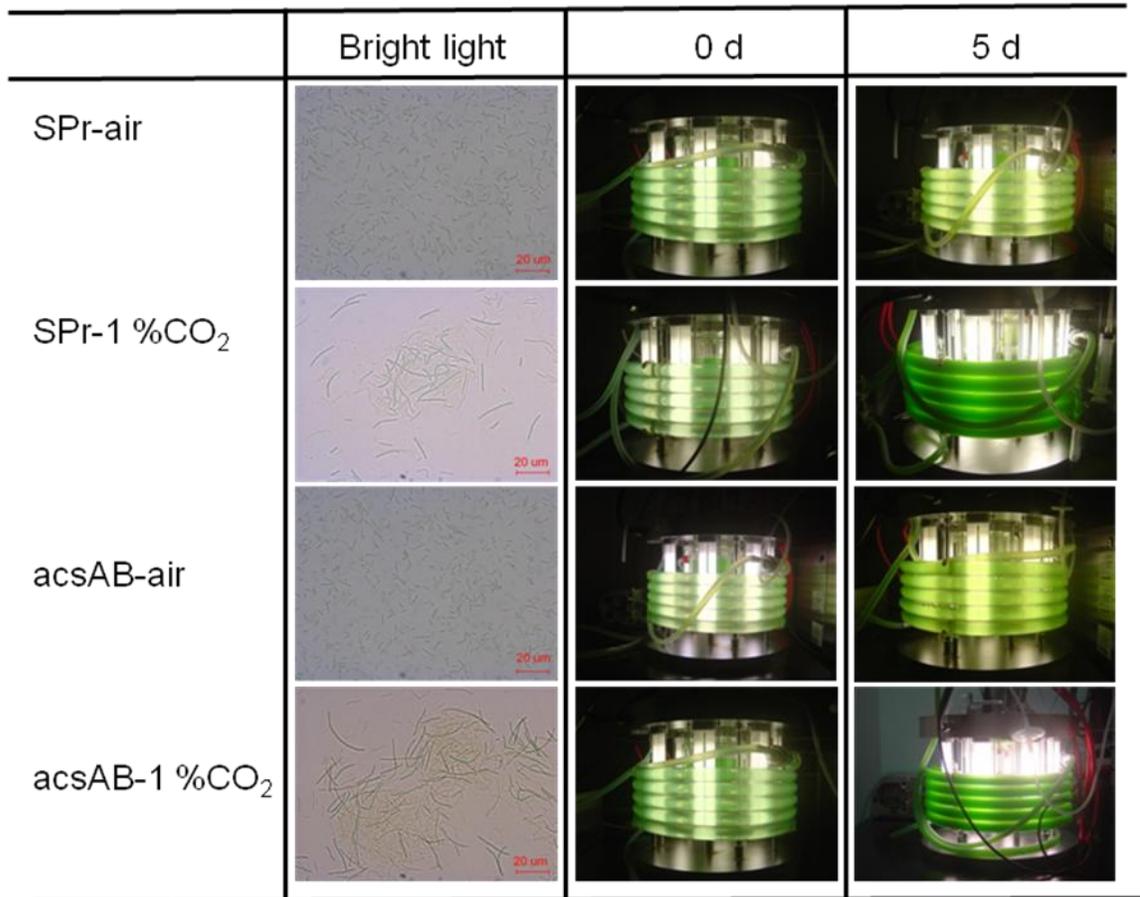


圖二十三、*Synechococcus sp.* PCC7942 轉殖株培養於不同 CO₂ 濃度之生長及光合作率

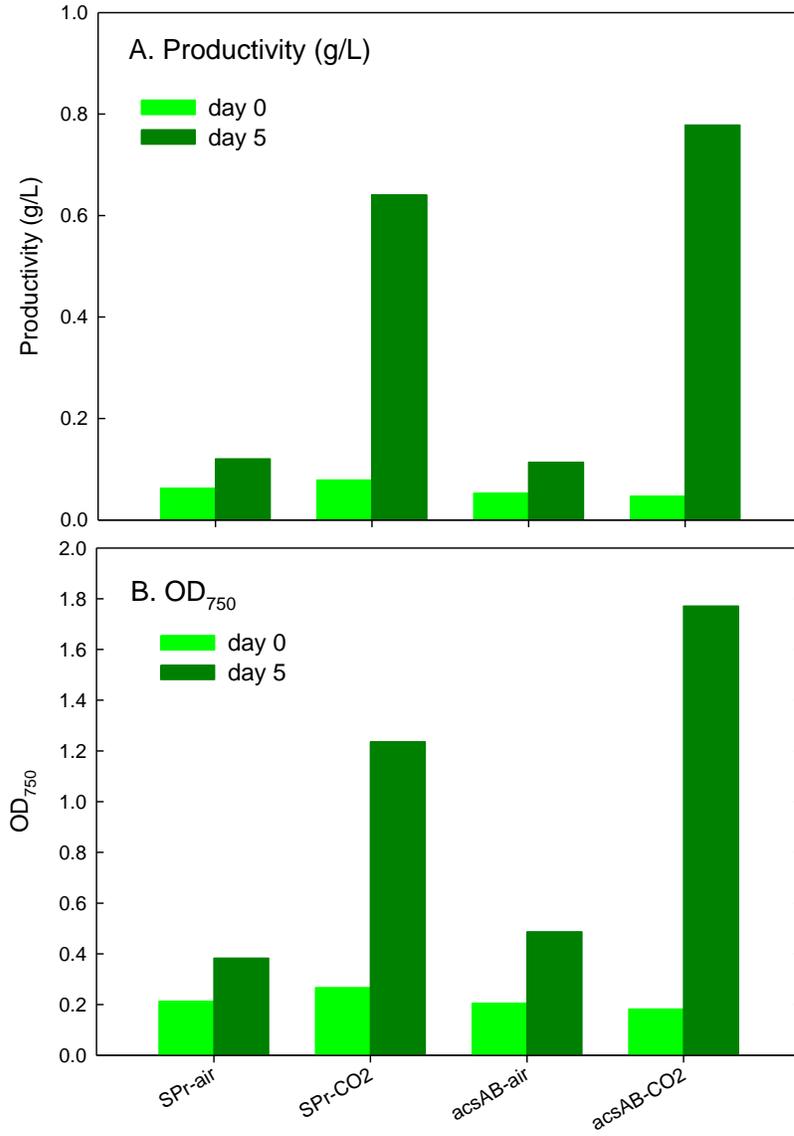
六、BIOSTAT 光合生物反應器栽培 — *Synechococcus* sp. PCC7942

將對照組 Sp^r 載體轉殖株及 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6)，於管柱型BIOSTAT光合生物反應器進行栽培，分別以Air, 1% CO₂/Air通氣培養，測量栽培時(第0天和第5天)的瓶照、OD值、葉綠素、氧電極和葉綠素螢光，並於通氣培養第5天收取藻重。

圖二十二顯示 Air 處理狀態下，對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 的細胞型態皆比通以 1% CO₂/Air 栽培下之細胞還短，*acsAB* 轉殖株有明顯的白色懸浮物(圖二十四)。以 OD 值表示生長量，在 1% CO₂/Air 栽培下的生長量明顯大於 Air 之栽培，對照組 Sp^r 載體轉殖株生長量增加約 5-6 倍，*acsAB* 轉殖株增加 8 倍生長量，顯示 *acsAB* 轉殖株的生長優於對照組 Sp^r 載體轉殖株(圖二十五)。



圖二十四. 對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 栽培情形

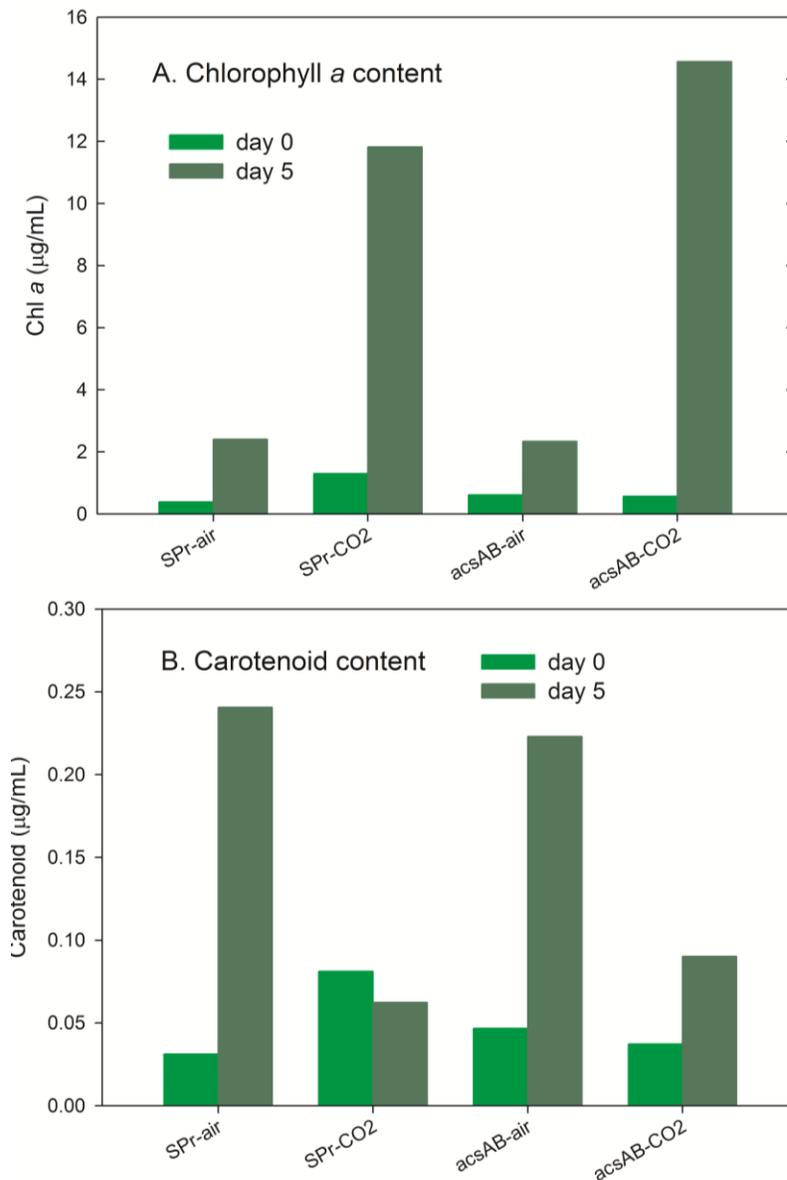


圖二十五. 對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::acsAB-6) 栽培情形

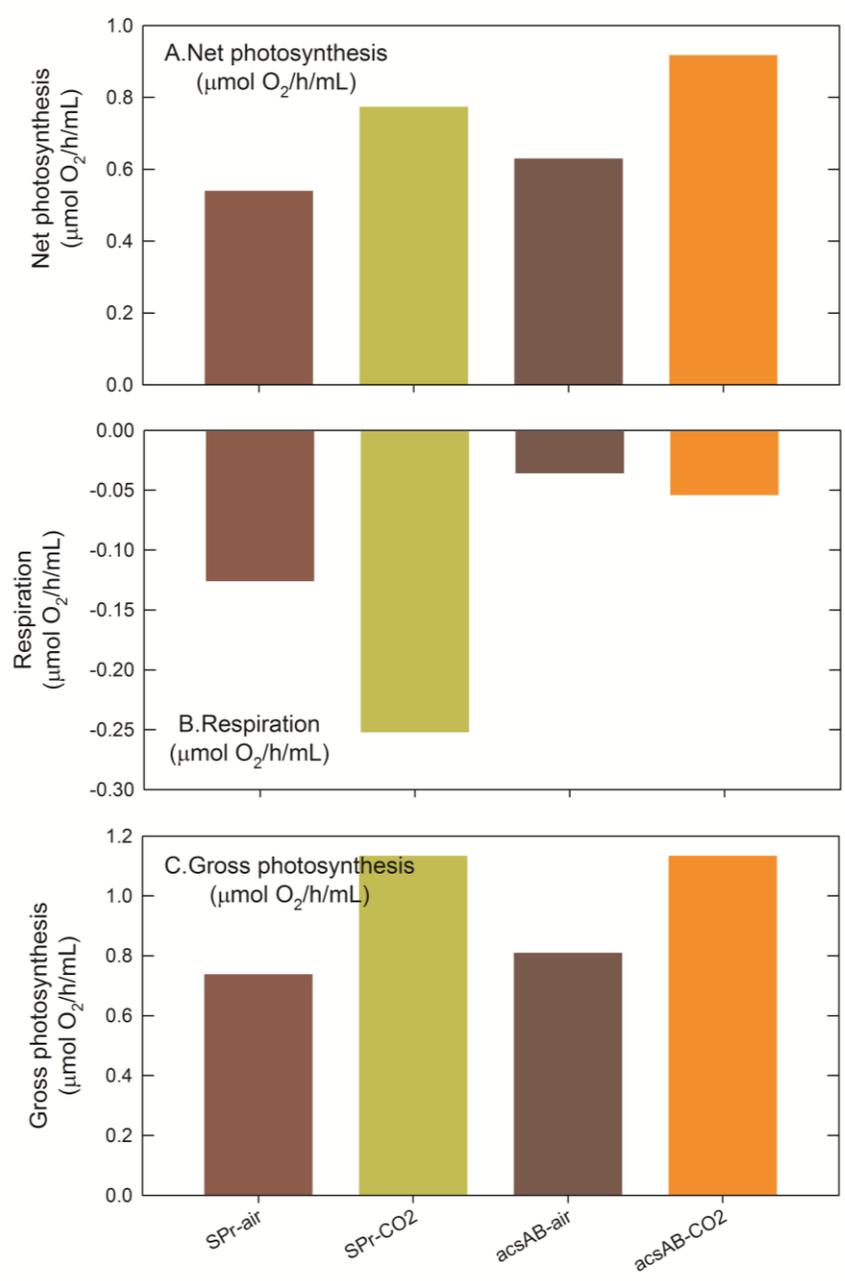
由圖二十六顯示 Chlorophyll *a* 濃度在對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6)，通入 1% CO₂/Air 處理比通入 Air 處理都有較高的趨勢；然而胡蘿蔔素濃度，Air 處理高於 1% CO₂/Air 處理。

以單位體積 (mL) 表示光合作用速率(圖二十七)，總光合作用速率是 1% CO₂/Air 處理都高於通入 Air 處理，同時對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 在 1% CO₂/Air 處理下之總光合作用速率相等。淨光合作用速率在 1% CO₂/Air 處理 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 較高。呼吸作用速率在 1% CO₂/Air 處理及 Air 處理之 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 皆明顯偏低，以 PCC 7942 Sp^r 載體轉殖株通入 1% CO₂/Air 處理為最高。

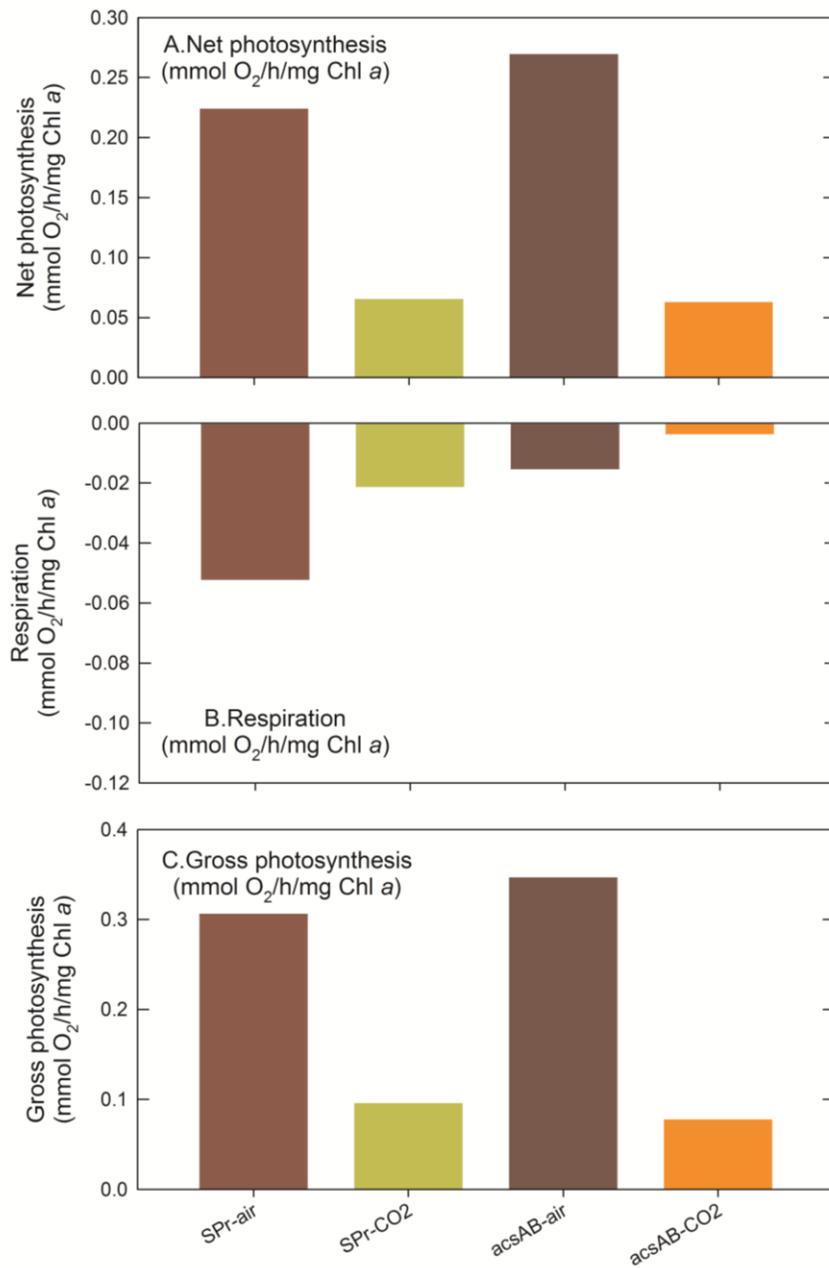
以單位葉綠素含量表示光合作用速率時(圖二十八)，總光合作用速率是通入 Air 處理皆高於通入 1% CO₂/Air 處理，對照組 Sp^r 載體轉殖株與 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 在 1% CO₂/Air 處理下之總光合作用速率相等。淨光合作用速率在通入 Air 處理皆高於 1% CO₂/Air 處理，以 1% CO₂/Air 處理 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 最高。呼吸作用速率在 PCC7942 *acsAB* 轉殖株 (PrbcL::*acsAB*-6) 皆偏低，以 PCC 7942 Sp^r 載體轉殖株通入 Air 處理為最高。



圖二十六 .PCC 7942 BIOSTAT 光合生物反應器栽培後葉綠素及胡蘿蔔素含量變化。



圖二十七 . PCC 7942 BIOSTAT 光合生物反應器栽培之光合作用比較。



圖二十八 . PCC 7942 BIOSTAT 光合生物反應器栽培之光合作用比較 (葉綠素為基礎之光合作用速率)。

表三 單位體積之葉綠素比值(1%CO₂/Air ratio)及
光合作用速率比值(Air/1%CO₂ ratio)

	1%CO ₂ /Air ratio	Air/1%CO ₂ ratio
	Chl <i>a</i> (µg/mL)	mmol O ₂ /h/mg Chl <i>a</i>
SP ^r	4.9	3.4
acsAB	6.2	4.3

以生長量 (OD 及收穫藻類重量)而言，均以通入 1% CO₂/Air 處理之生長較高於 Air 處理，同時又以在 1% CO₂/Air 處理之 PCC7942 *acsAB* 轉植株 (PrbcL::*acsAB*-6) 高於對照組 Sp^r 載體轉植株，所以我們認為 PCC7942 在提高 CO₂ 濃度的情形下，確實有較高之生長速率，而且 *acsAB* 轉殖造成 PCC7942 對於高 CO₂ 的利用效率明顯高於對照組在高 CO₂ 的利用效率。

由於生長速率一般是正比於光合作用效率，所以我們認為 CO₂ 下生長之對照組及 *acsAB* 轉植株應有較高之光合作用效率，以致又較高之生長速率。然而，實驗結果卻告訴我們以葉綠素為分母之光合作用速率在 CO₂ 處理下是明顯較低的，與我們的預測相反。我們的解釋是 CO₂ 處理下的細胞生長較快，以至於單位體積之細胞密度高於 air 處理，因而造成明顯之遮光效應，所以單位葉綠素或單位細胞數之光合作用速率進行馴化調整而降低其光合作用速率。因此我們認為若能改進高密度環境之照光效率，則可提升光合作用速率而明顯增加生長量。未來將改進高密度下之照光或是提高光照來改進光合作用速率，有利更高生長量之獲得。

七、微藻光合反應器培養

(一) 完成建構適用微藻專用的新式氣舉光罩系統



圖二十九、氣舉式光反應器與微藻專用的新式氣舉光罩系統

(二) 完成評估氣舉式光合反應器波長及光強度最適條件

Synechococcus sp. PCC7942 在氣舉式反應器最適條件為：溫度 29°C、pH7.4、通氣量 1vvm、氣流壓力 1.5kg/cm²，光照系統在不同波長及光強度條件下，評估結果顯示紅光在光強度 1200 lux 條件下，*Synechococcus* sp. PCC7942 在生長時間第七天時，生長速率可提升至 7.5 倍以上，藻濃度可達到 0.547g dry wt/L。然而其他光源白光與藍光，以及對照組日光對 *Synechococcus* sp. PCC7942 之生長速率無明顯正面影響。

(三)、V 型管光反應器系統

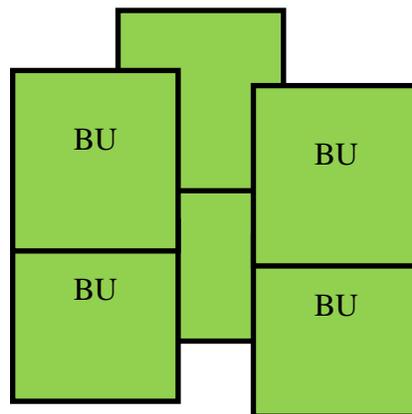
已完成 V 型管光反應器系統建構 (圖三十)，即將藻類培養測試。此一架構可將養殖空間做最佳的利用。與一般開放式養殖池不同的

地方是：一般養殖池的深度不能太深(30~50cm)，以免陽光無法照射到底部，且需耗費大量的電力進行攪拌。而將藻類養殖池以藻架懸掛方式取代可以避免此一問題。因此可將空間做一最大化的利用。以目前實驗室等級的設置，可以在長寬高各 1x1x1m 的空間中至少可以有 350 公升的養殖體積。

此一立方體空間為本系統之基本單元空間(basic unit BU)，每 BU 可依需求進行橫向或縱向的擴充與連結。若搭配日光聚集導引系統與光纖設置，將光源導引至適當位置，則可將 BU 做向上堆疊擴充，使得整體空間利用率大幅提升，如圖三十一所示。依估計，以此懸掛塑膠袋養殖系統，搭配日光聚集導引系統與光纖設置，將光源導引至袋內適當位置，可使 S/V ratio 達到 $1500 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ，比一般密閉系統高出約 20 倍，更比開放式系統高出千倍以上。



圖三十、V 型管光反應器系統



圖三十一

肆、參考文獻

1. Cheng, C.Y. 1994. Role of Carbohydrate Supply and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid in Kernel Abortion of Maize (*Zea mays*). Master Thesis. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
2. Dai, Wei, Shi, D.J., Zhang, H., Zhong, H., Ran, L., Peng, G.H., Gan, R.B., Chen, S.J., Lian, M.L. (2001) Expression of human epidermal growth factor gene in cyanobacteria. *Acta Botanica Sinica* 43(1) 1260-1264.
3. Kawano S, Tajima K, Uemori Y, Yamashita H, Erata T, Munekata M. and Takai M. (2002) Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: Comparison of cellulose synthetic ability between strains. *DNA Research* 9: 149–156.
4. Nobles DR, Brown RM Jr (2008) Transgenic expression of *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53582 cellulose synthase genes in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* strain UTCC 100. *Cellulose* 15: 691-701.
5. Ou-Lee, T.M. and T.L. Setter. 1985. Enzyme activities of starch and sucrose pathways and growth of apical and basal maize kernels. *Plant Physiol* 79: 848-851.
6. Sambrook, J, Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Now York: Cold Spring harbor Laboratory Press, (2nd).
7. Stainer, R.Y, R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bact. Rev.* 35: 171-205.

8. Thiel, T. (1994) Genetic analysis of cyanobacteria, p. 581-611. *In* D.A. Bryant 9ed., The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.