

醋酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* 轉殖類血紅素蛋白基因(*vhb*)對細菌纖維素產量之影響¹

楊祐俊²、洪爭坊³、趙雲鵬⁴

摘 要

本研究的主要目的是希望藉由轉殖類血紅素蛋白基因(*vhb*)，增加醋酸菌株在細菌纖維素的表現量。針對醋酸菌BCRC 12334、12335、14101、14148及14182等菌株，測試各菌株細菌纖維素的產量，以及對於抗生素的抗性等，發現菌株BCRC12334具有較佳的纖維素產量與適合的抗生素敏感性，可供轉殖試驗之用。接著我們建構類血紅素基因表現載體並完成定序分析後，將該表現載體轉型入BCRC 12334醋酸菌株內，得到重組菌株*G. xylinus* Vhb。利用西方墨點法進行蛋白質表現分析，可分別在分子量大小為16.0 kDa處發現預期的蛋白質條帶，進一步測試轉基因醋酸菌在細菌纖維素產量上的變化，結果轉型菌株*G. xylinus* Vhb較野生型菌株BCRC 12334的纖維素產量增加21.7%。

關鍵字：醋酸菌、類血紅素蛋白、細菌纖維素。

前 言

纖維素為自然界中分布最廣，含量最多的多醣體，大多的纖維素來自於植物，且多應用於造紙工業，由於來自植物的纖維素組成複雜且含蠟質，因此近年來科學家及工業界開始重視細菌纖維素應用於不同領域之可行性⁽¹⁾，其中，又以木質醋酸菌*Acetobacter xylinum*為主。1997年時，Yamada氏等利用16S核醣體DNA序列分析，將該菌重新命名為*Gluconacetobacter xylinus*⁽³⁰⁾，*G. xylinus*產生的纖維素具有純度高、彈性強度大、生體適合性高以及生物分解性佳等優點，具有較高的應用價值，已廣泛被應用於生醫材料、造紙及食品等產業^(4,16,26,31)。

*G. xylinus*為絕對好氧菌，在生長環境下若能夠有充足的氧氣提供，對菌體生長有一定程度的幫助，學者也發現當菌株培養在靜止狀態下可誘導大量生產細菌纖維素，一般認為乃因為細菌纖維素的產生可幫助*G. xylinus*浮在醱酵液面，以便獲得足量的氧氣^(5,20)。然而，在靜止的醱酵條件下，溶氧度卻會造成限制因素，因此許多學者改用攪拌槽或搖瓶培養⁽²⁵⁾，認為應可獲得較高的產量，但並非每株醋酸菌皆適合攪拌的生產模式⁽²⁴⁾，也發現在攪拌的過程會

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0707 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場國防訓儲研究助理。

³ 鳳山熱帶園藝試驗分所助理研究員。

⁴ 逢甲大學化學工程學系教授。

導致纖維膜的形態與結構產生變化，如此一來，以*G. xylinus*進行細菌纖維素之大規模醱酵生產將是一項相當大的挑戰，因此本研究主要的目的是希望透過轉殖類血紅素蛋白基因的方式，改善*G. xylinus*的氧氣利用率，以提高細菌纖維的產量。

血紅素蛋白(hemoglobin)是一種普遍存在於各物種的蛋白質，此類蛋白質的特點在於含有可以攜帶鐵離子的血基質(heme)，因此可以作為氧氣的輸送，改善氧氣利用率。1966年Webster等人從停滯的湖泊及腐敗的植物體中發現透明顫菌(*Vitreoscilla sp.*)⁽²⁷⁾，該細菌為長絲狀好氧性細菌(filamentous aerobic bacteria)，在低溶氧條件下，透明顫菌屬細菌內會誘導生成一種可溶性類血紅素蛋白質，稱之為透明顫菌血紅蛋白(VHb)，能有效提昇*Vitreoscilla*屬細菌對氧氣的利用性。VHb的DNA序列是由441個鹼基對所構成，轉譯出146個胺基酸，估算約15.775 kDa^(3,28)，但與其他類血紅蛋白比較，透明顫菌血紅蛋白對於氧氣的親合力較差，但卻具有極佳的氧氣釋放能力，這個特點使得表現透明顫菌血紅蛋白的大腸桿菌細胞內處於極度氧化狀態^(6,15)，是目前最廣為研究的細菌血紅素蛋白。根據前人研究指出，在低溶氧條件(hypoxic condition)的醱酵培養過程下，表現透明顫菌血紅蛋白基因的大腸桿菌細胞可促進其生理代謝速率和增加細胞總質量⁽⁷⁾。另有文獻報導，在低溶氧條件的醱酵培養過程中，生產透明顫菌血紅蛋白的重組型大腸桿菌以及枯草桿菌可以有效地增加細胞本身蛋白質的生成量以及重組型蛋白質產量^(8,9,10)。因此，本研究擬嘗試將*vhb*基因轉型入*G. xylinus*中，希望以基因改造的方式，達到促進*G. xylinus*生長並且增加細菌纖維素產量的目的。

材料與方法

供試菌株之篩選與細菌纖維素產量之評估

由財團法人食品工業發展研究所購得*Gluconacetobacter xylinus* subsp. *xylinus* BCRC 12334、BCRC 12335、BCRC 14101、BCRC 14148及BCRC 14182等菌株，於M medium (glucose 10 g; yeast extract 10 g; peptone 7 g; acetic acid 1.5 ml; succinate 0.2 g; agar 15 g; D.W. 1 L; pH=5.0)更新培養兩次後，取各菌株的單一菌落，於28°C下，培養於含有0.1% cellulase的M broth中16 hrs。調整前述各菌株培養液中的細菌濃度，使OD₆₀₀時的吸光值約0.3~0.4，取1 ml加入20 ml的M broth中，於28°C靜置培養7天後，收集細菌纖維，將獲得的纖維以0.1 N的NaOH溶液於80°C煮20分鐘後，以去離子水沖洗數次，並置於80°C烘箱中烘乾8小時後秤重，比較不同醋酸菌株生產細菌纖維之差異，而完成轉殖的醋酸菌株亦利用上述方法進行細菌纖維素產量評估。

轉殖用抗生素之篩選

於M培養基中分別加入kanamycin、ampicillin、tetracycline及chloramphenicol等不同抗生素，使各抗生素於培養基中的最終濃度為50 ppm後，以劃線平板法將*G. xylinus* BCRC 12334、BCRC 12335、BCRC 14101、BCRC 14148及BCRC 14182等菌株懸浮液，分別塗抹於含有不同抗生素的培養基上，每個處理三重複，於室溫(26 ± 1°C)中培養5天後，觀察紀錄不同抗生素對醋酸菌之抑制效果。

轉殖基因之廣寄主型載體建構

建構以*tac*啟動子(*lac*啟動子衍生型)控制*vhb*、*trxA/vhb*基因表現之廣寄主型載體，建構流程如圖二所示，首先利用PCR方法將*vhb*基因增幅生產，純化後之PCR DNA片段和純化後之質體pJF-TrxFus、pJF118EH分別以*SmaI/HindIII*、*EcoRI/HindIII*剪切，接著以T4 DNA (promega)黏接酶將PCR DNA片段和質體黏接在一起，並隨之轉殖入勝任大腸桿菌XL1-Blue中，最後將轉殖細胞塗抹於內含50 ppm ampicillin的LB培養基篩選。選擇其中幾株轉殖菌株以內含50 ppm ampicillin的LB培養液培養，收集細胞後，以質體純化組(Quick plasmid miniprep kit, invitrogen)純化重組載體，並以PCR方法和限制酶剪切後的DNA限制圖譜來確認所建構之載體pJF-TV和pJF-VHb。載體pJF-TV和pJF-VHb以*EcoRV/HindIII*來剪切，純化含有以*tac*啟動子控制、*trxA/vhb*基因表現的DNA片段，再與*EcoRV/HindIII*剪切之廣寄主型質體pBBR1MCS-2黏接在一起，黏接的DNA混合物則隨即轉殖入勝任大腸桿菌XL1-Blue中，最後將轉殖細胞塗抹於內含50 ppm kanamycin的LB培養基篩選。選擇其中幾株轉殖菌株以內含50 ppm kanamycin的LB培養液培養，收集細胞後，以質體純化組純化重組載體，並以PCR方法和限制酶剪切後的DNA限制圖譜來確認所建構之重組載體pBBR-TV1和pBBR-VHb1。為了確認選殖之*trxA/vhb*、*vhb*基因的正確性，我們將所建構得到的重組載體pBBR-TV1和pBBR-VHb1委託國際源資生技公司進行核酸序列分析。

聚丙烯酰胺膠體電泳分析

我們以內含50 ppm kanamycin的LB培養液來培養重組菌株XL1-Blue/pBBR-TV1和XL1-Blue/pBBR-VHb1，並分別以添加及不添加IPTG的方式誘導重組菌株生產蛋白質，醱酵結束後收集並以超音波震盪方式來破碎細胞，接著離心分離細胞萃取液和細胞碎片，取等量的總量蛋白進行12%聚丙烯酰胺膠體電泳，分析重組菌株蛋白質之表現，30 ml的聚丙烯酰胺膠體中，含有3 g sucrose、7.5 ml 4X resolving buffer (1.5 M Tris, pH 8.8)、12 ml 30% acrylamide solution (acrylamide: bisacrylamide = 29.2 : 0.8)、0.3 ml 10% SDS、0.2 ml 10% APS、8.5 ml ddH₂O。

西方墨點免疫分析(Western blot immunoassay)

本實驗中所使用之一次抗體為anti-VHb多株抗體，二次抗體為購自Sigma之goat anti-rabbit IgG conjugated HRP抗體。將跑完SDS電泳膠的蛋白質轉漬至Immobilon-P membrane (Bio-Rad)，使用前先以甲醇潤濕，再以transfer buffer (0.025 M Tris、0.19 M glycine、20% methanol)漂洗，放置於4°C下，使用Bio-Rad蛋白質轉漬系統以固定電流200 mA轉漬1.5小時。轉漬完成後，將Immobilon-P membrane以PBS緩衝液漂洗2分鐘，以去除methanol並轉換成phosphate buffer環境，然後加入blocking solution漂洗過夜。隔天加入一次抗體溶液於室溫(26 ± 1°C)下反應1小時，以PBST buffer漂洗10分鐘三次，接著加入二次抗體溶液於室溫(26 ± 1°C)下反應1小時，再以PBST buffer漂洗10分鐘三次，最後將轉漬膜取出，並稍微滴乾後，置於TMB反應液進行呈色。

木質醋酸菌電穿孔轉殖方法

將活化的醋酸菌菌液2 ml接種於含有0.1% cellulase的M培養液30 ml中，並在170 rpm、28.5°C培養箱中振盪培養直至OD₆₀₀介於0.3~0.4。接著收集菌液於離心管中，6,000 rpm、4°C離心5分鐘，倒掉上清液收集菌體，利用25 ml事先預冷的1 mM HEPES Buffer pH 7.0重覆清洗2次，菌體再以700 µl冰冷的15% glycerol懸浮，菌液每200 µl分裝成一管，此即為勝任細胞。利用電壓(V)為2.5 kV時間常數設定為4.7 ms之條件進行電穿孔轉殖，電擊完畢立即將勝任細胞加入含有0.1% cellulase及35 ppm kanamycin的M培養液800 µl中，混合均勻後吸出勝任細胞懸浮液至試管中，於28.5°C振盪隔夜培養。挑選可以在35 ppm kanamycin培養基生長之醋酸菌，並且利用PCR方法以及限制酶剪切後的DNA限制圖譜確認。

結 果

醋酸菌對抗生素敏感性分析及細菌纖維素產量分析

將*G. xylinus* BCRC12334、12335、14101、14148及14182等五個醋酸菌株分別培養於含有50 ppm kanamycin、ampicillin、tetracycline及chloramphenicol等不同抗生素的M培養基中，五天後觀察各菌株在培養基生長之狀況，結果各菌株呈現出不同的抗抗生素能力(表一)，其中BCRC14182以及BCRC12334在大多數抗生素的培養基中均無法生長，具有較高的抗生素敏感性，而各種抗生素中又以50 ppm tetracycline對醋酸菌株的生長抑制效果最好，其次則為50 ppm的ampicillin。此外，比較不同醋酸菌株生產細菌纖維之差異，其中以BCRC 14148與BCRC 12334菌株的纖維產量較高，約100 mg，而BCRC 14101的纖維產量則最低，僅約30 mg (圖一)。

表一、各醋酸菌株對於不同抗生素之反應

Table 1. Responses of *Gluconacetobacter xylinus* to different antibiotics on M medium for five days

Antibiotic	Response ¹					
	12334	12335	14101	14148	14158	14182
Ampicillin	- ²	-	-	-	++	-
Chloramphenicol	+ ³	+++	++	++	+++	-
Kanamycin	-	+++	+++	++	-(+)	-
Tetracycline	-	-	-	-	-	-

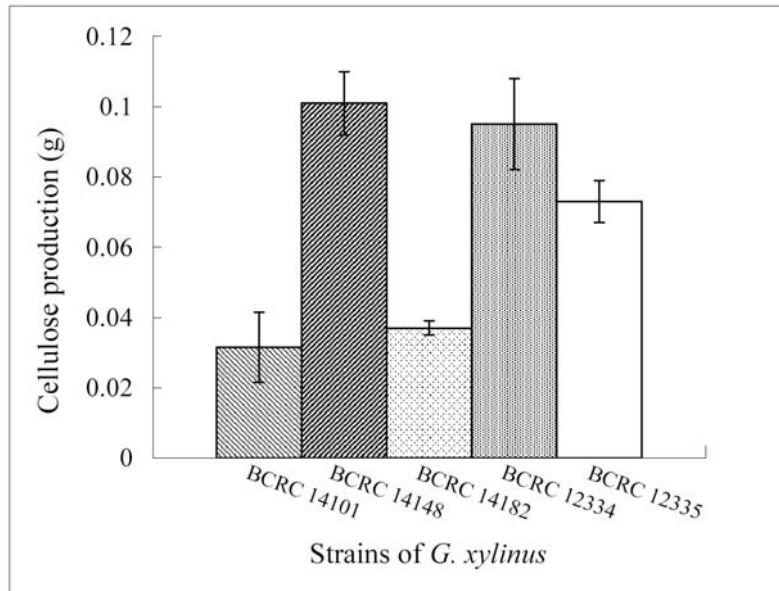
¹Each treatment has three replicates and each replicate has one plate of culture medium.

²'-'symbol means the strain can not grow on the culture medium with the antibiotic.

³'+'symbol means the strain can not grow on the culture medium with the antibiotic.

VHb表現載體之建構與確效

本實驗中選擇了廣寄主型載體pBBR1MCS-2為醋酸菌表現載體，以tac啟動子(lac啟動子衍生型)控制vhb與trxA/vhb基因表現，建構流程如圖二，插入的vhb與trxA/vhb開讀股架分別為441鹼基對以及813鹼基對，以PCR方法和限制酶剪切後的DNA限制圖譜來確認所建構之表現載體pBBR-VHb1和pBBR-TV1，最後完成核酸定序分析，確認該基因之序列正確無誤(圖三)，



圖一、醋酸菌不同菌株纖維素產量分析。

Fig. 1. Comparison of cellulose production of different strains of *G. xylinus*.

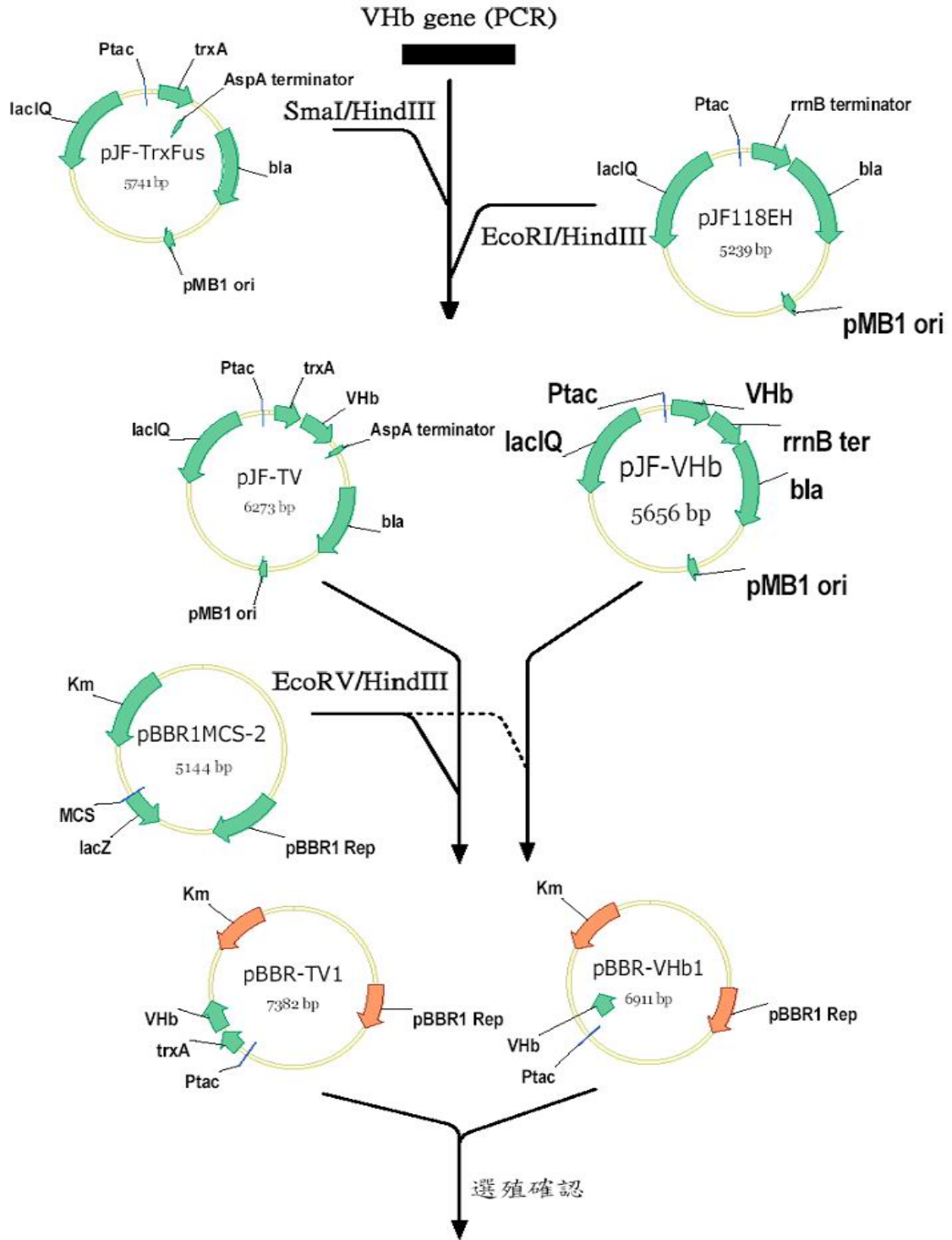
預期分別可轉錄出146個胺基酸以及270個胺基酸殘基(residues)。經過誘導後的大腸桿菌菌株如期生產可溶性的TrxA/VHb、VHb，發現經由IPTG誘導的菌株有較高的TrxA/VHb、VHb蛋白質表現量(圖四)。此外，離心回收的重組菌株，以肉眼可觀察到呈桃紅色，這也顯示菌株所生產之VHb具有相當程度之生物活性。確認VHb表現載體正確無誤後，將該表現載體利用電穿孔轉型入醋酸菌*G. xylinus* BCRC 12334醋酸菌內，並分別命名為*G. xylinus* VHb與*G. xylinus* TV1轉殖醋酸菌株。

轉型醋酸菌VHB蛋白質表現量測試

分別將*G. xylinus* BCRC12334與完成轉殖的*G. xylinus* VHb及TV1醋酸菌株接種於含有0.1% cellulase的M培養液30 ml中，並在170 rpm、28.5°C培養箱中振盪培養直至OD₆₀₀=0.3-0.4，取1 ml離心加入lysis buffer，取上清液10 μl進行SDS蛋白質電泳，並利用西方墨點法針對VHb蛋白質進行表現狀態分析，相較於未轉殖的*G. xylinus* BCRC 12334菌株，轉殖醋酸菌*G. xylinus* VHb與TV1菌株分別在預期的16.0與29.7 kDa分子量大小有明顯的呈色訊號(圖五)，證實我們所建構的表現載體已成功的轉型入醋酸菌中，並且能夠表現出如同預期大小的VHb以及Trx/VHb蛋白質。

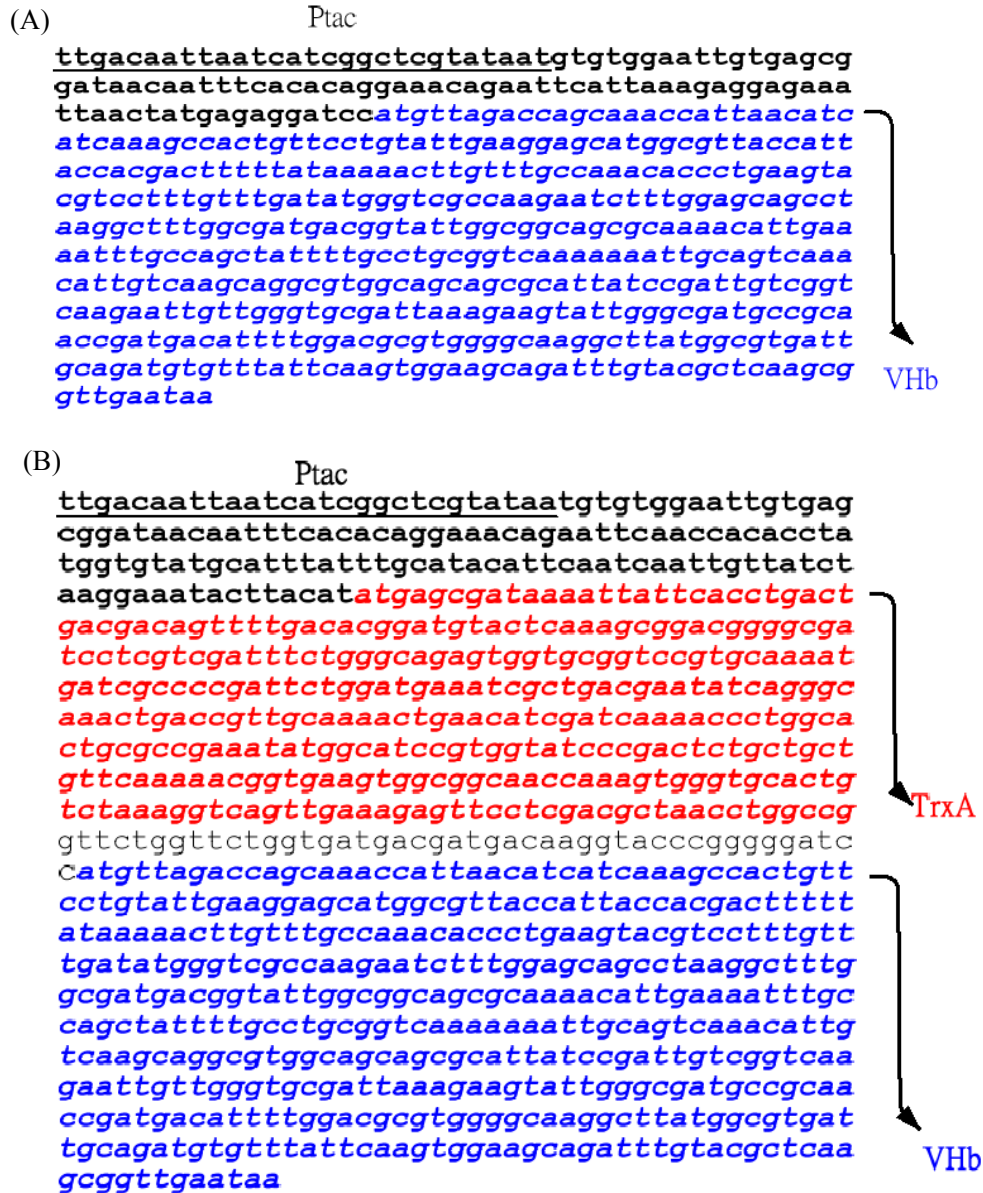
VHb轉型醋酸菌纖維素產量測試

為了解轉殖*vhb*基因對醋酸菌產生纖維素產量的影響，分別將*G. xylinus* BCRC 12334、*G. xylinus* VHb與*G. xylinus* TV1菌株於28.5°C下靜置培養七天後，利用先前描述的方法收集其產生之纖維膜。結果*G. xylinus* BCRC 12334、*G. xylinus* VHb與*G. xylinus* TV1菌株平均纖維素產量分別為92 mg、112 mg及97 mg (圖六)，證實*G. xylinus* VHb菌株的纖維素生產能力較*G. xylinus* BCRC 12334增加幅度約21.7%。

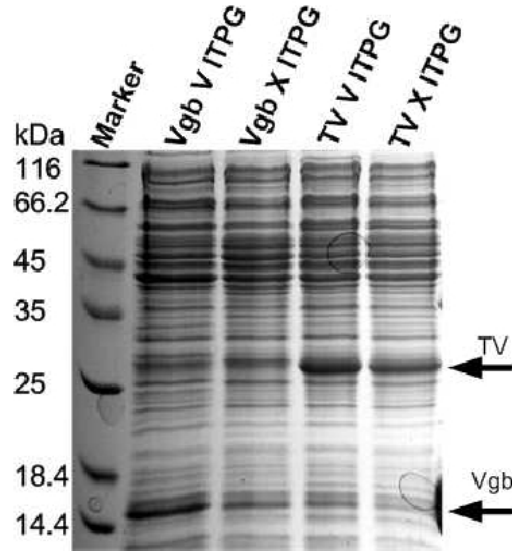


圖二、Vhb表現載體建構流程圖。

Fig. 2. Flow chart of construction of *vhb* expression plasmid.

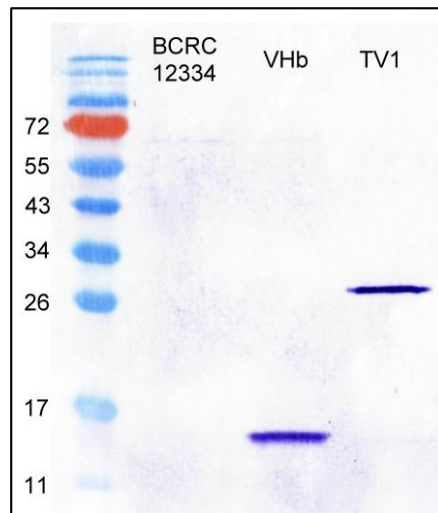


圖三、表現載體 pBBR-VHb 與 pBBR-TV1 序列分析。(A) pBBR-VHb (B) pBBR-TV1。
 Fig. 3. Sequence analysis of two expression plasmids. (A) pBBR-VHb (B) pBBR-TV1.



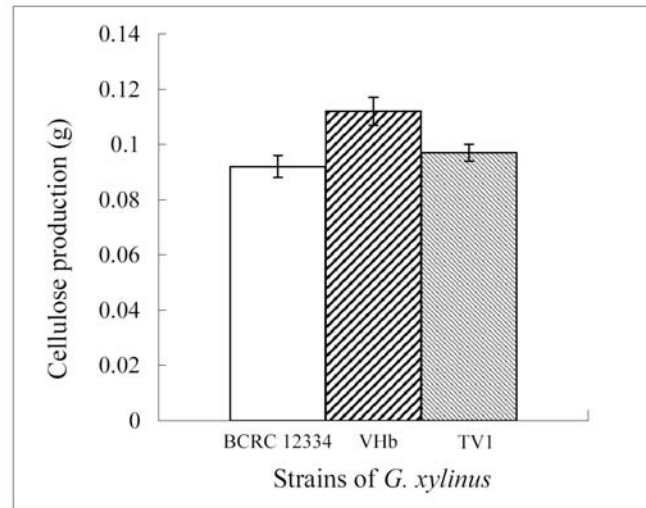
圖四、重組大腸桿菌培養後誘導生產之 Vhb (Vgb)與 TrxA/Vhb (TV)如圖中箭頭所示。Lane 1：蛋白質標準品；Lane 2：經誘導生產 Vhb 菌株；Lane 3：未經誘導生產 Vhb 菌株；Lane 4：經誘導生產 TrxA/Vhb 菌株；Lane 5：未經誘導生產 TrxA/Vhb 菌株。

Fig. 4. Analysis of recombinant Vhb (Vgb) and TrxA/Vhb (TV) proteins (arrowed) produced by recombinant *E. coli*. Lane 1: protein marker; Lane 2: recombinant Vhb protein was induced with IPTG; Lane 3: recombinant Vhb protein was not induced with IPTG; Lane 4: recombinant TrxA/Vhb protein was induced with IPTG; Lane 5: recombinant TrxA/Vhb protein was not induced with IPTG.



圖五、利用西方墨點法分析重組醋酸菌之蛋白質。Lane 1：蛋白質標準品；Lane 2：BCRC 12334；Lane 3：*G. xylinus* Vhb 菌株；Lane 4：*G. xylinus* TV1 菌株。

Fig. 5. Western blotting analysis of recombinant *G. xylinus* and *G. xylinus*. Lane 1: protein marker; Lane 2: *G. xylinus* BCRC 12334; Lane 3: *G. xylinus* Vhb strain; Lane 4: *G. xylinus* TV1 strain.



圖六、醋酸菌野生型菌株 *G. xylinus* BCRC 12334 與重組醋酸菌株 *G. xylinus* Vhb 及 TV1 之細菌纖維素產量比較。

Fig. 6. Comparison of bacterial cellulose production between transformed *G. xylinus* Vhb and TV1 strains and *G. xylinus* BCRC 12334 wild type strain.

討 論

影響醋酸菌產生纖維素有許多的因素，例如營養素來源、醱酵條件等，本研究的目的是希望以基因工程的方式增進細菌纖維合成的效能。目前已有許多參與醋酸菌合成纖維的基因被發現，包含 *acsAB*、*acsC*、*acsD*、*bcsA*、*bcsB*、*bcsC* 以及 *bcsD* 等^(21,22,29)。其中纖維合成酵素 (cellulose synthase, BcsA) 參與聚合作用 (polymerization)，將葡萄糖 (UDP-glucose) 聚合成直鏈葡萄糖鏈⁽¹¹⁾，BcsC 和 BcsD 參與結晶作用 (crystallization) 與結構作用 (structuralization) 將直鏈葡萄糖鏈聚合成緊密的纖維層^(11,22)，而 BcsB 目前則認為是纖維合成酵素的次單體，與控制其活性相關⁽¹¹⁾，此酵素在有 cyclic-di-GMP 結合時具有較高的合成細菌纖維素活性^(17,18)，因此控制 cyclic-di-GMP 的濃度則成為醋酸菌調節纖維素合成效能的關鍵因子。Rony 氏等 (1998) 指出，在 *A. xylinum* 中，調控 cyclic-di-GMP 濃度的酵素主要為 DGC (diguanylate cyclase) 與 PDEA (phosphodiesterase A)⁽¹⁹⁾。DGC 可將兩個 GTP 分子環化成一分子的 cyclic-di-GMP，PDEA 則具有分解 cyclic-di-GMP 的功能，透過兩者的合作可以調節 cyclic-di-GMP 在醋酸菌體內的濃度，進而改變纖維合成酵素的活性。其中，在 DGC 與 PDEA 蛋白質的 N 端被預測出一段可感受氧氣狀態的 PAS 區域 (domain)，功能可能相類似於 NifL 與 FixL 蛋白質的氧氣感受區域，透過這個區域感受環境中的氧氣狀態，相互協調彼此的活性^(13,14)，控制 cyclic-di-GMP 的濃度，這也合理的解釋了為何醱酵條件中氧氣與二氧化碳的濃度比例與細菌纖維素的產量有相當大的關係⁽²³⁾。

由於醋酸菌是好氧菌，在醱酵的過程中需要充份的氧氣，菌體才能夠有良好的生長，但許多研究指出，醋酸菌在微氧的狀態下為獲取較多氧氣，會產生較多的細菌纖維素。因此，

想要增加醋酸菌的纖維素產量，如何讓醋酸菌處於微氧的狀態下同時擁有良好的生長狀況，增加在微氧下的氧氣利用率是其中的方式之一，而轉殖類血紅素基因剛好符合了這樣的目的。因此，本研究共建構了兩個與呼吸代謝作用有關的轉殖載體，其中一個為單獨的*vhb*，另一個則是硫氧化還原蛋白(thioredoxin; TrxA)與類血紅素蛋白的融合基因*trx/vhb*。研究指出硫氧化還原蛋白可促進大腸桿菌細胞內的還原狀態，增加蛋白質的溶解度^(12, 32)，將兩個基因融合在一起，是希望藉由相互的氧化還原作用，更能加強醋酸菌的氧氣利用率。本研究分別將兩載體轉型入BCRC 12334醋酸菌，在利用西方墨點法進行蛋白質表現狀態分析時發現，無論添加或不添加IPTG的狀態下，皆可在分子量大小分別為16.0與29.7 KDa處發現有預期的蛋白質表現，代表我們所獲得的兩株轉殖醋酸菌皆是類血紅素蛋白持續性表現型。我們也發現轉型醋酸菌的菌落與對照組有些微偏紅的狀況，表示外源蛋白的表現在醋酸菌內應具有相當程度的活性。此外，在纖維素產量分析的實驗證實，轉殖*vhb*基因的醋酸菌株生產細菌纖維素的能力相較野生型醋酸菌株BCRC 12334增加了21.7%，說明了轉殖*vhb*基因確實能提升細菌纖維素的產量。但此一結果是否代表轉殖*vhb*基因會影響DGC與PDEA的活性，促進了醋酸菌體內cyclic-di-GMP濃度累積，進而增進了纖維素的生產，由於本研究並未進行PDEA及DGC蛋白質活性的測定，因此無法對此下定論。不過，Chien氏等(2006)的研究指出轉殖*vhb*基因能增加細菌生長速度，此點則與其他研究相符，是否因此而間接導致細菌纖維素的產量增加，亦須進一步研究證實。

然而，本研究中的轉殖株*G. xylinus* VHb相較於野生型菌株的纖維素產量增幅為21.7%，這卻與Chien氏等(2006)提出1倍提升有相當程度的落差⁽²⁾，推測的原因可能與醱酵的條件有關，例如不同的醱酵容器造成的表面積差異，或是醱酵時培養液種類與體積不同，這些都可能影響醱酵時菌體代謝所造成的空氣組成比例，而導致結果有所差異。該篇內容也說明在微氧的條件下轉殖*vhb*基因的效果較為明顯，在如此的條件下才能達到1倍的增加幅度，這顯然也與我們本研究的條件有所不同。而且，在該篇研究中比較了醋酸菌不同醱酵起始濃度對於纖維產量的影響，結果顯示在充氧的條件下，雖然起始濃度在 $OD_{600}=0.05$ 時比 $OD_{600}=0.01$ 時六天後有較高的纖維素產量，但有趣的是，此條件下轉殖醋酸菌與非轉殖醋酸菌生產纖維膜的增加幅度卻也從92%降為40%，這也就表示接種的起始濃度會影響到轉殖株纖維素增加的幅度，而相較於我們起始濃度在 $OD_{600}=0.3-0.4$ 之間有著相當大的落差，這或許也是造成差異的原因。不過，更令人意外的是，原本預期本研究所建構的另一株*trx-vhb*轉殖醋酸菌會有較佳的效果，但結果卻發現相較於未轉殖BCRC12334在纖維素的表現上沒有太大的差異，這是否也與醱酵的條件有關，或是其它原因，種種問題皆須要我們進一步的研究探討。

參考文獻

1. Czaja, W. K., D. J. Young, M. Kawecki and R. M. Brown. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*. 8(1):1-12.

2. Chien, L. J., H. T. Chen, R. F. Yang and C. K. Lee. 2006. Enhancement of cellulose pellicle production by constitutively expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in *Acetobacter xylinum*. *Biotechnol. Prog.* 22(6):1598-1603.
3. Dikshit, K. L. and D. A. Webster. 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene.* 70(2):377-386.
4. Gisela, H., H. Backdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm and B. Risberg. 2006. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J. Biomed. Mater. Res.* 76(2):431-438.
5. Hestrin, S. and M. Schramm. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.* 58(2):345-352.
6. Kallio, P. T., J. P. Kim, P. S. Tsai and J. E. Bailey. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.* 219:201-208.
7. Khosla, C. and J. E. Bailey. 1988. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature.* 331:633-635.
8. Khosla, C., J. E. Curtis, J. DeModena, U. Rinas and J. E. Bailey. 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology.* 8:849-853.
9. Khosravi, M., D. A. Webster and B. C. Stark. 1990. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid.* 24:190-194.
10. Kallo, P. T. and J. E. Bailey. 1996. Intracellular expression of *Viteroscilla* hemoglobin (VHb) enhances total protein secretion and improves the production of alpha-amylase and neutral protease in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 12(1):31-39.
11. Lin, F. C., R. M. Jr. Brown, R. R. Jr. Drake and B. E. Haley. 1990. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J. Biol. Chem.* 265(9):4782-4784.
12. LaVallie, E. R., E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel and J. M. McCoy. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology.* 11(2):187-193.
13. Merrick, M., S. Hill, H. Hennecke, M. Hahn, R. Dixon and C. Kennedy. 1982. Repressor properties of the *nifL* gene product of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 185:75-81.
14. Monson, E. K., M. Weinstein, G. S. Ditta and D. R. Helinski. 1992. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygensensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(10):4280-4284.

15. Orii, Y. and D. A. Webster. 1986. Photodissociation of oxygenated cytochrome o(s) (*Vitreoscilla*) and kinetic studies of reassociation. *J. Biol. Chem.* 261(8):3544-3547.
16. Ross, P., R. Mayer and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* 55(1):35-58.
17. Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom and M. Benziman. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* 325(6101):279-281.
18. Ross, P., R. Mayer, H. Weinhouse, D. Amikam, Y. Huggirat, M. Benziman, E. de Vroom, A. Fidder, P. de Paus and L. A. Sliedregt. 1990. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *J. Biol. Chem.* 265(31):18933-18943.
19. Rony, T., H. C. Wong, R. Calhoon, D. Gelfand, A. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana and M. Benziman. 1998. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* 180(17):4416-4425.
20. Schramm, M. and S. Hestrin. 1954. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J. Gen. Microbiol.* 11:123-129.
21. Saxena, I. M., F. C. Lin and R. M. Jr. Brown. 1990. Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol. Biol.* 15(5):673-683.
22. Saxena, I. M., K. Kudlicka, K. Okuda and R. M. Jr. Brown. 1994. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol.* 176(18):5735-5752.
23. Tohru, K., T. Naritomi, H. Yano and F. Yoshinaga. 1997. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. *J. Ferment. Bioeng.* 84(2):124-127.
24. Toyosaki, H., T. Nacitomi, A. Seto, M. Matsuokam, T. Tsuchida and F. Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(8):1498-1502.
25. Tsuchida, T. and F. Yoshinaga. 1997. Production of bacterial cellulose by agitation culture systems. *Pure Appl. Chem.* 69:2453-2458.
26. Watanabe, K., M. Tabuchi, Y. Morinaga and F. Yoshinaga. 1998. Structural feature and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose.* 5:187-200.
27. Webster, D. A. and D. P. Hackett. 1966. The purification and properties of cytochrome o from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* 241(14):3308-3315.

28. Wakabayashi, S., H. Matsubara and D. A. Webster. 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*. 322(6078):481-483.
29. Wong, H. C., A. L. Fear, R. D. Calhoon, G. H. Eichinger, R. Mayer, D. Amikam, M. Benziman, D. H. Gelfand, J. H. Meade and A. W. Emerick. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(20):8130-8134.
30. Yamada, Y., K. Hoshino and T. Ishikawa. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1244-1251.
31. Yoshinaga, F., N. Tonouchi and K. Watanabe. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:219-224.
32. Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto and S. Ishii. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 270(43):25328-25331.

Effect of Transformation of *vhb* Gene on Bacterial Cellulose Production of *Gluconacetobacter xylinus*¹

Yu-Chun Yang², Cheng-Fang Hong³ and Yun-Peng Chao⁴

ABSTRACT

This study is aimed to increase the cellulose production of *Gluconacetobacter xylinus*. *G. xylinus* strains BCRC12334, BCRC12335, BCRC 14101, BCRC 14148 and BCRC14182 were screened for their capability of cellulose production and antibiotic sensitivity. As a result, *G. xylinus* BCRC12334 was chosen for gene manipulation. Plasmid containing *vhb* under the control of the *tac* promoter was constructed and transformed into *G. xylinus* BCRC 12334. The recombinant strain was able to produce the encoding protein with the expected molecular weight of 16.0 kDa as analyzed by Western blotting. Consequently, we have found that the cellulose production of recombinant *G. xylinus* VHB was about 21.7% higher than that of wild type.

Key words: *Gluconacetobacter*, *Vitreoscilla* hemoglobin, bacterial cellulose.

¹Contribution No. 0707 from Taichung DARES, COA.

²DIRDS Research Assistant of Taichung DARES, COA.

³Assistant Researcher of Fengshan Tropical Horticultural Experimental Station, COA.

⁴Professor of Department of Chemical Engineering, Feng Chia University.