

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第三名

040704

衣魚體內可分解纖維素之微生物研究與應用

學校名稱：臺北市立麗山高級中學

作者： 高二 曾宇霈 高二 韓喬融	指導老師： 張堯卿 張素卿
-------------------------	---------------------

關鍵詞：衣魚體內菌、微生物分解纖維素

摘要

本實驗以衣魚食物多為纖維素的特性探討其腸道內是否有可分解纖維素之微生物。首先利用剛果紅染色原理證明該微生物的存在，並抽取其 DNA 進行聚合酶連鎖反應將結果定序檢驗微生物物種及找尋其功能性基因。其次以不同生化方法測試該微生物反應，並測定其分解纖維素之效率。本實驗已確定衣魚腸道內有 *Bacillus amyloliquefaciens* 以及 *Paenibacillus woosongensis* 兩種菌種，並參考文獻找出 *Bacillus amyloliquefaciens* 以及 *Paenibacillus woosongensis* 的功能性基因引子，兩種細菌的分解纖維素效率分別達 1.786 U/ml 以及 1.682 U/ml，往後將抽取其酵素，改變環境測試其效率，及測試分解不同纖維素物質之效率，例如：稻稈、玉米葉莖、廢紙…等，以應用於分解堆肥及製造纖維酒精。

壹、研究動機

有一日，為了找尋專題課要用的資料，我們去圖書館的舊書區翻了翻陳年破舊的一些科普書籍，打開書時看到有幾隻蟲子在紙張緩緩爬行，我們就好奇，為什麼這種蟲子可以住在書裡面，書裡又沒有易取得的營養源；還是說，牠們吃紙？那麼他們是怎麼消化紙張的？是他們的腸道中有可分解纖維素的酵素，還是有可分解纖維素的微生物存在？更加上先前看過的那篇報導，於是展開了對衣魚腸道與其消化紙張關係的探究。後來我們在應用生物第四單元第三節看到有關生質能的介紹，而後我們找尋相關文獻，科普雜誌有一篇關於纖維酒精製成的報導，纖維酒精製作的第一步驟便是水解製成，當前大部分的水解製程都是以酸分解纖維素，對環境污染大；而我們卻看到有人以細菌取代酸，這種環保的新技術令我們印象深刻，且聯想到衣魚體內的細菌是否可作為此用途，而經文獻查詢發現幾乎沒有人對衣魚進行過研究，衣魚體內的細菌是否可作為此用途因此開始了研究。

而隨著國人日益重視養生，有機農業開始發展興盛，因緣際會下，看到一篇關於有機堆肥產業的紀錄片，我們發現，現下台灣的堆肥製程對於以微生物分解的部分較少發展，因此我們在往後應用也嘗試這方面的發展。

我們查了很多關於衣魚體內消化機制的文獻資料，文獻資料上都顯示衣魚腸道內降解紙張的是微生物，我們就從這個方向開始著手進行研究。

貳、研究目的

- 一、 篩選衣魚體內之微生物
- 二、 利用剛果紅染色原理驗證衣魚體內是否有可降解纖維素之微生物
- 三、 鑑定微生物種類並尋找功能性基因
- 四、 微生物生化測試
- 五、 利用該微生物分解纖維素並測試其分解效率

參、研究設備及器材

一、前製實驗

(一) 抓取

麵粉	馬鈴薯	杯子
----	-----	----

(二) 繁殖

直徑 20 公分、高 40 公分的玻璃缸或魚缸	厚紙板	破爛的碎紙屑和破棉布	80 孔銅紗	澱粉類食材 (麵粉、馬鈴薯、麥片)
-------------------------	-----	------------	--------	-------------------

(三) 微生物培養基配置

CMC	Tryptone	Yeast extract	NaCl	Agar 35g	Glucose
-----	----------	---------------	------	----------	---------

二、主要實驗

(一) 目的 一

剛果紅染劑	蒸餾水	NaCl	pipetment	培養皿
LA plate	SDA plate	研鉢	研鉢棒	90%酒精
鑷子	三角玻棒	震盪機	tip	Tris-EDTA Buffer(ph=8)

(二) 目的 二

CMC plate	培養箱	剛果紅染劑	NaCl
-----------	-----	-------	------

(三) 目的 三

LB	TE buffer	10% SDS	RNase A	proteinase K
NaCl	CTAB/NaCl solution	Eppendorf	1x volume(780ml) phenol/cnloroform/isoamy alcohol 25:24:1	70%EtOH
37°C 恆溫箱	Lysis Buffer	lundaLSEVAG	3M sodium acelate	isopropanol
lundaL EB buffer	lundaL RNase	7.5M ammonium acetate	lundaL isopropanol	100%ethnol
dd H2O	<i>Rolstonia solanacearum</i>			

(四) 目的 四

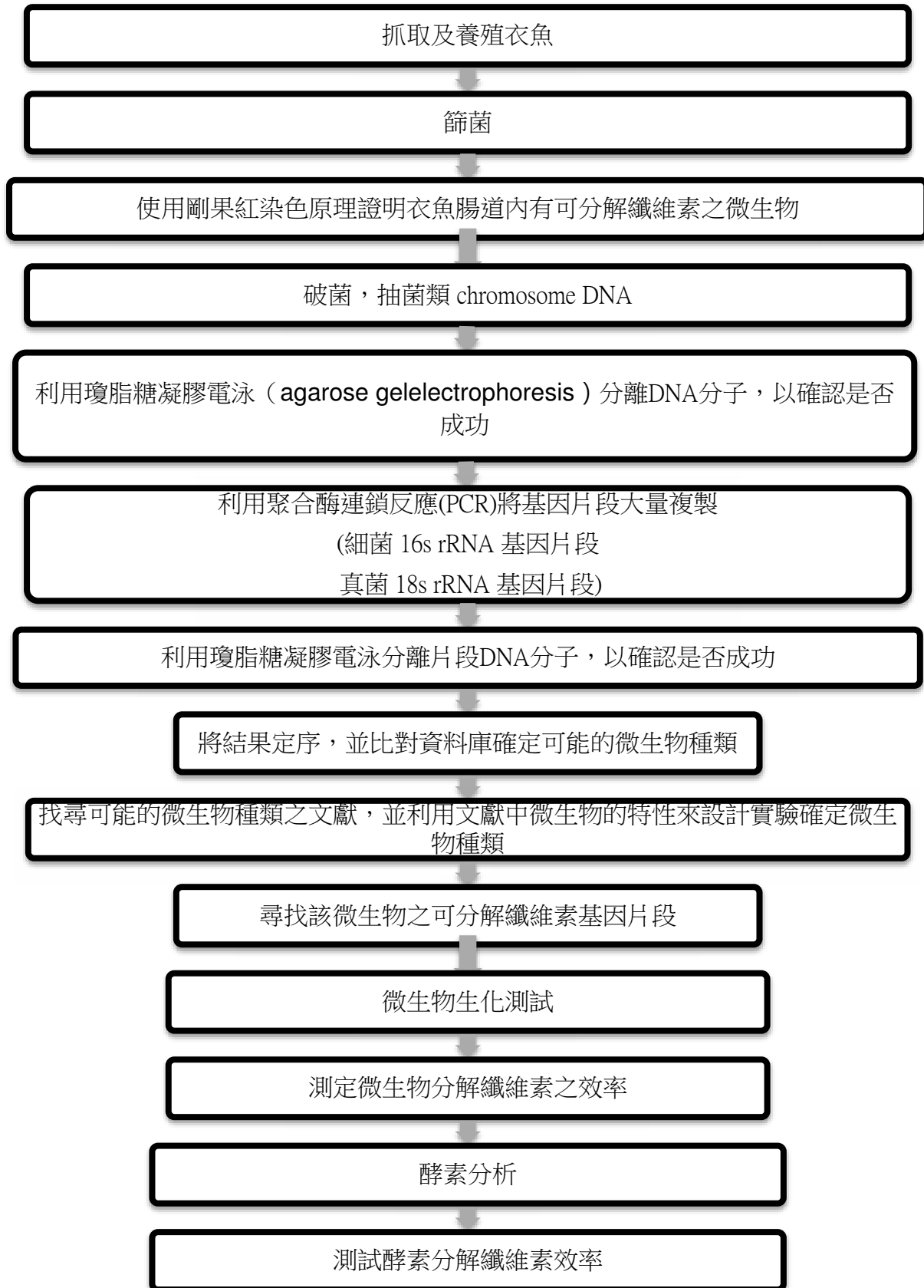
Nitrate Broth	Triple Sugar Iron agar	Nutrient Gelatin	Urea Broth
---------------	------------------------	------------------	------------

(五) 目的 五

液態纖維素培養基	分光光度計	DNS 試劑	離心機	葡萄糖溶液	CMC
----------	-------	--------	-----	-------	-----

肆、研究方法與過程

一、實驗流程



二、實驗步驟

<前置實驗>

(一) 衣魚養殖

1. 抓取：倒少許麵粉進入約5~7公分高的杯子中，杯子外圍貼上紙或衛生紙，衣魚便會上鉤。或將馬鈴薯削皮，放到確定有衣魚的櫃子或衣服旁邊，過幾天便會見到馬鈴薯中有衣魚。
2. 繁殖：以直徑20公分、高40公分的玻璃缸或魚缸作為他們的巢穴，加厚紙板（箱）在其中固定做為支架，並放入碎紙張、破棉布，即完成衣魚的培養環境。
3. 餵食：觀察玻璃缸底部是否有衣魚取食後排便的痕跡，如果有，便每三到五天餵食少量澱粉。

(二) 微生物培養基配置

1. LA培養基(細菌培養基)：將200g tryptone、yeast extract 100g、NaCl 200g、agar 15g放入燒杯加水至1L配置而成。
2. SDA培養基(真菌培養基)：將10g tryptone、glucose 40g、agar 20g放入燒杯加水至1L配置而成。

(表一)CMC培養基配方

3. CMC培養基：

component	Content(g/l)
羧甲基纖維素(CMC)	10
Peptone	1
Urea	0.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4
KH ₂ PO ₄	2.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.4
MgSO ₄	0.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.014
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.016
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.002
Agar	20

(三) 瓊脂糖凝膠電泳配膠

1. 加0.2g agar和20ml TAE buffer
2. 加熱
3. 加染劑
4. 將液體倒入鑄膠模，插上齒模，放置室溫下約30分鐘凝結
5. 將膠體放入電泳槽，加入TAE buffer後即可開始跑膠

(四) DNS試劑配置

1. 30g potassium sodium tartrate 溶於 80ml 熱水
2. 加入1.6g NaOH，溶解後定量至100ml
3. 用微波爐加熱，加入1g DNS，將溶液放入不透光瓶中

(五) 磷酸鉀緩衝液(50 mM、pH7.0)配置

100ml的蒸餾水加入KH₂PO₄ 2.11ml、K₂HPO₄ 2.89ml，以及CMC 1g

三、主要實驗

(一)篩選衣魚體內之微生物

1. 將兩隻衣魚從培養箱夾出
2. 放入90%酒精中，等至衣魚死後夾出晾乾
3. 將衣魚研磨，滴入Tris-EDTA buffer (pH=8)攪拌
4. 利用pipetment將0.02ml的液體塗於LA與SDA培養基上
5. 將兩個培養基放入28° C的培養箱中培養
6. 待菌株長出後，分別大量培養

(二)利用剛果紅染色原理驗證衣魚腸道內是否有可降解纖維素之微生物

1. 將大量培養後的菌株塗於CMC培養基
2. 將CMC培養基放入28° C的培養箱中培養
3. 利用剛果紅染劑2克+蒸餾水100毫升配置成剛果紅染色液
4. 先將菌種刮離，再將剛果紅染色液分別倒入培養基中
5. 等待反應約10~15分鐘，
6. 將多餘的液體倒出，並用濃度 1 M的NaCl沖洗培養基2-3次。(以NaCl清洗可以讓透明圈更明顯，易辨識)

(三)鑑定微生物種類並尋找功能性基因

1. 分別抽取細菌1.細菌2.細菌3.細菌4的chromosome DNA :

細菌抽取DNA chromosome 步驟：

- (1) 接菌: 沾菌(plate)至LB中→37°C overnight(12~16h)
- (2) Subculture : 菌: 營養液(LB)=1:100=30 μ l:3ml 接兩管(2)2h後收菌，確定濁度(OD600=0.4~0.8)
- (3) 取菌液1.5ml eppendorf，13000rpm/2min，去上清
- (4) 加567 μ l TE buffer(@4°C)以懸浮菌體
- (5) 加30 μ l 10% SDS，RNase A(20°C)，3 μ l proteinase K (@20°C)(20mg/ml)
→invert well(可快速離心→混勻)，水浴37°C，1h
- (6) 加100 μ l 5M NaCl (@大離心管)，mix well(稠狀物產生→沉澱protein)
→8字形混勻至少一百下，至稠狀物消失=>此步驟與DNA質&量有關
- (7) 加80 μ l CTAB/NaCl solution(@65°C水浴)，mix well(輕輕pipet)，水浴65°C /10min
- (8) 戴手套，加1x volume(780 μ l) phenol/chloroform/isoamy alcohol 25:24:1(@4 °C)下層→invert well(無分層)，9000rpm/5min，取上層水溶液至新eppendorf
*若分層不佳，可在離心1min
*若protein量多(中間白色分層)，可在萃取一次"做兩次"(第二次<1x volume)
*若萃取水溶液量不夠，補50 μ l TE buffer再離心後重取
- (9) 戴手套，加1x volume(500 μ l)chloroform/isoamyl alcohol 24:1(@4°C)
→invert well(無分層)，9000rpm/5min，取上層水溶液至新eppendorf做兩次
- (10) 戴手套，加0.6x volume isopropanol(@4°C)，shake back&forth 至DNA沉澱出現(白絲狀)→13000rpm/15min→以pipet沿管壁去除上清液(開65°C hot plate)

- (11) 沿管壁緩緩加入300 μ l 70%EtOH(@4°C , 13000rpm/5min) →以pipet沿管壁去除上清液重複兩次
- (12) Dry DNA pellet 65°C/10min(@hot plate)
- (13) 以50 μ l TE buffer 回溶DNA→量少:兩管各先以25 μ l回溶後，再均勻在同一管 輕輕抽吸100下混勻並置入37°C 恆溫箱(~10min)

2. 進行 PCR

(表二)細菌 PCR 配方

ddH ₂ O	73 μ l
5x taq buffer	20 μ l
10mM dNTP	2 μ l
16s-F primer	2 μ l
16s-R primer	2 μ l
Template	2 μ l
Taq phusion	1 μ l

3. 將結果送定序
4. 比對線上資料庫確定可能菌種
5. 查詢文獻找尋可能菌種之特性並利用其特性設計實驗：

細菌 1：

(1)文獻顯示能防治病原菌 *Rolstonia solanacearum*

- (a) 將病原菌 *Rolstonia solanacearum* 塗 LA plate
- (b) 放置 30 ° C 培養箱培養一天
- (c) 將細菌一塗於有病原菌 *Rolstonia solanacearum* 的 plate 上
- (d) 放置 30 ° C 培養箱經過兩三天並觀察結果

(2)文獻顯示 *gyrA* 基因片段引子能辨識是否為可能菌種

Bacillus amyloliquefaciens

- (a) 向基龍米克斯生物科技股份有限公司訂做 *gyrA* 引子
- (b) 將細菌一基因加入下列配方，見(表三)

(表三) *gyrA* PCR 配方

ddH ₂ O	73 μ l
5x taq buffer	20 μ l
10mM dNTP	2 μ l
F-A primer	2 μ l
R-A primer	2 μ l
Template	2 μ l
Taq phusion	1 μ l

- (c) 進行 PCR，溫度為 48 ° C 以及 52 ° C
- (d) 電泳跑膠
- (e) 定序
- (f) 比對線上資料庫

細菌 2：

(1)文獻顯示可能菌種 *Paenibacillus woosongensis*

可降解木糖素 *xylc* 基因片段

- (a) 將整段基因片段的頭和尾 Sequence(5' to 3') 設計成引子，送基隆米克斯生物科技股份有限公司訂做引子

(表四) *xylc* PCR 配方

ddH ₂ O	73 μ l
5x taq buffer	20 μ l
10mM dNTP	2 μ l
F- <i>xylc</i> primer	2 μ l
R- <i>xylc</i> primer	2 μ l
Template	2 μ l
Taq phusion	1 μ l

- (b) 將細菌一基因加入上列配方，見(表四)
(c) PCR，溫度為 46 ° C 以及 48 ° C
(d) 電泳跑膠以確認 PCR 是否成功
(e) 定序
(f) 比對線上資料庫

(四)微生物生化測試

1. 配置檢測醣類發酵能力培養基 ddH₂O 150ml，加入 Triple Sugar Iron agar 3.25g
2. 配置檢測分解明膠能力培養基 ddH₂O 50ml，加入 Nutrient Gelatin 6.4g
3. 將兩個培養基培養一~三天

(五)微生物分解纖維素效率測試

1. 配置纖維素液態培養基，見(表五)
2. 將細菌 1、細菌 2 培養在 CMC 液態培養基中(37 ° C) 72hr，每 6hr 檢測一次細菌生長量，並離心(12000xg 20min at 4 ° C)分別保存菌及上清液
3. 配置各不同濃度的葡萄糖溶液，見(表六)
4. 加入 333 μ l DNS 試劑，混和均勻
5. 於 95 ° C 加熱 5 min
6. 以分光光度計測定在波長 550nm 下的吸光值，製作標準曲線
將保存每六小時的上清液加入 500 μ l 加入磷酸鉀緩衝液，於 37 ° C 反應 15min
7. 加入 333 μ l DNS 試劑，混和均勻
8. 於 95 ° C 加熱 5 min
9. 以分光光度計測定在波長 550nm 下的吸光值
10. 將吸光度的值帶入標準曲線方程式得出還原糖濃度
11. 將分解纖維素酵素活性的單位訂為 U/ml (U 為 1min 酵素作用後釋放 1 μ mol 的還原糖量)
12. 將數據經單位換算，製作圖表

(表五)液態纖維素培養基

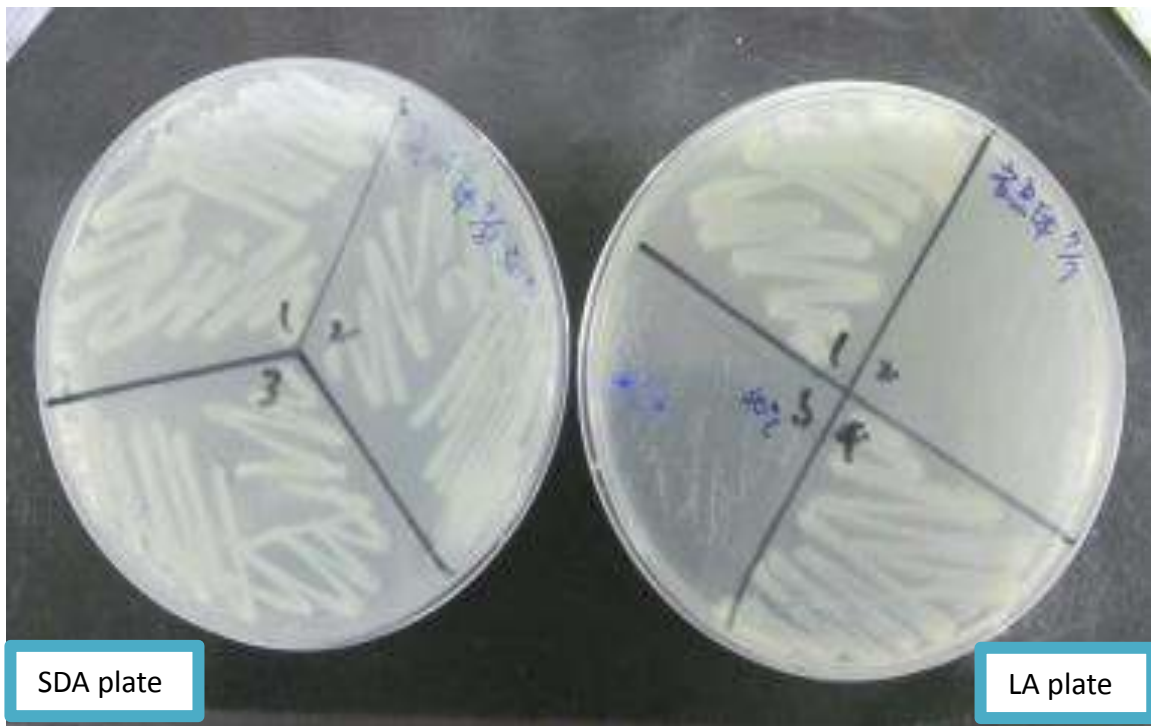
component	Content(g/l)
CMC	10
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄	0.1
NH ₄ NO ₃	1
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.05
CaCl ₂	0.02
Yeast extract	5

(表六) 不同濃度之葡萄糖溶液配置

3.2mg/ml 標準葡萄糖溶液	磷酸鉀緩衝液
500 ul	500 ul
250ul	750 ul
125 ul	875ul
62.5 ul	937.5 ul
31.25 ul	968.75 ul
15.625 ul	984.375ul
7.8125 ul	992.1875ul

伍、研究結果

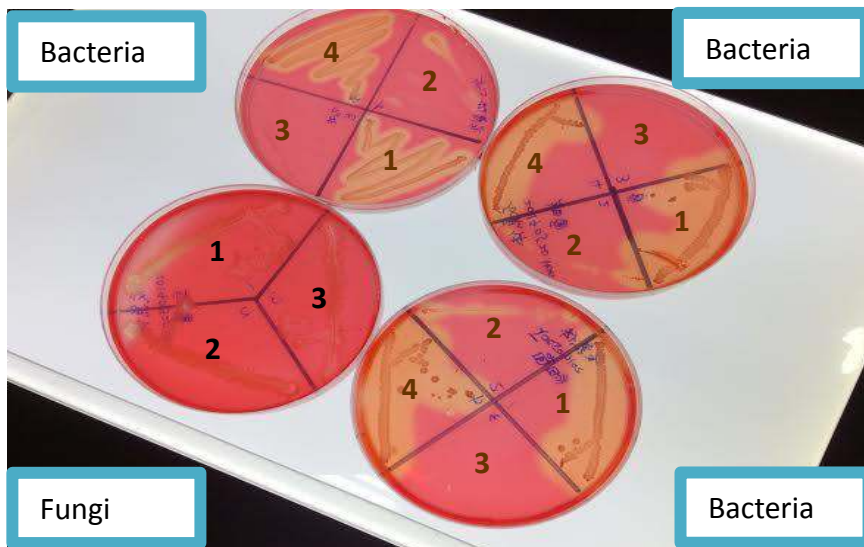
一、篩選衣魚體內之微生物



(圖一)衣魚腸道內微生物培養基

將衣魚磨碎塗盤後真菌長出三株菌株，細菌長出四株菌株，因此我們將菌株塗盤，大量培養，如(圖一)

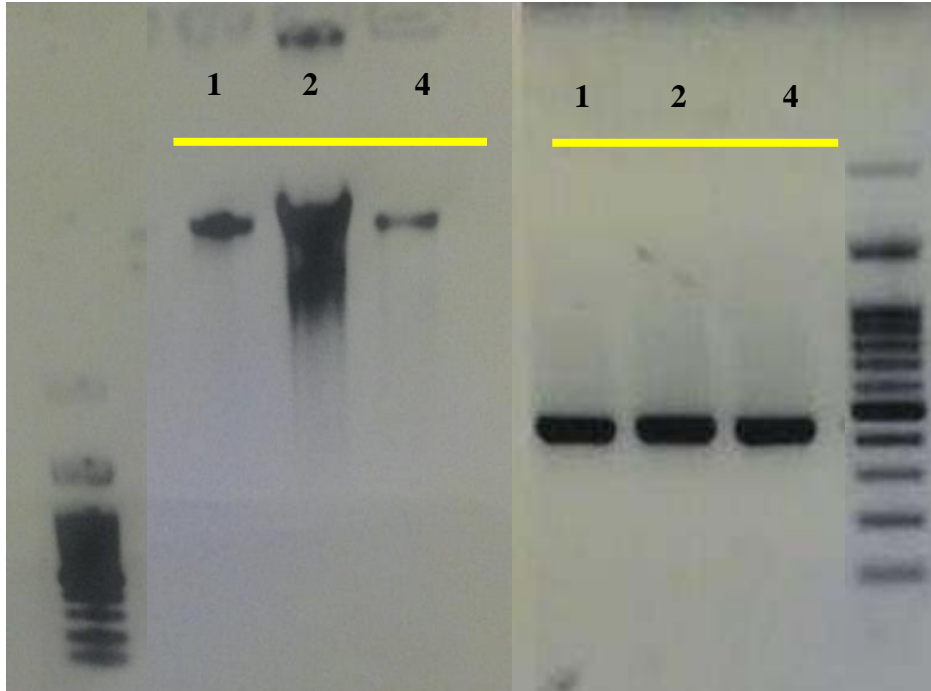
二、利用剛果紅染色原理驗證衣魚腸道內是否有可降解纖維素之微生物



(圖二)CMC 培養基經剛果紅染色結果，左下為真菌其餘為細菌

剛果紅可於多糖（如纖維素）合成紅色複合物，卻不與纖維素水解後產物發生這步反應。通過向含纖維素的培養基加入剛果紅，若存在纖維素分解細菌，則在以這個細菌為中心出現透明圈，即細菌分解了纖維素，使之無法與剛果紅合成紅色複合物。如(圖二)，經剛果紅染色，可以看到全部都有產生透明圈，細菌 3 和真菌的部分較不明顯，因此我們將以細菌 1,2,4 作為主要的研究對象。

三、鑑定微生物種類

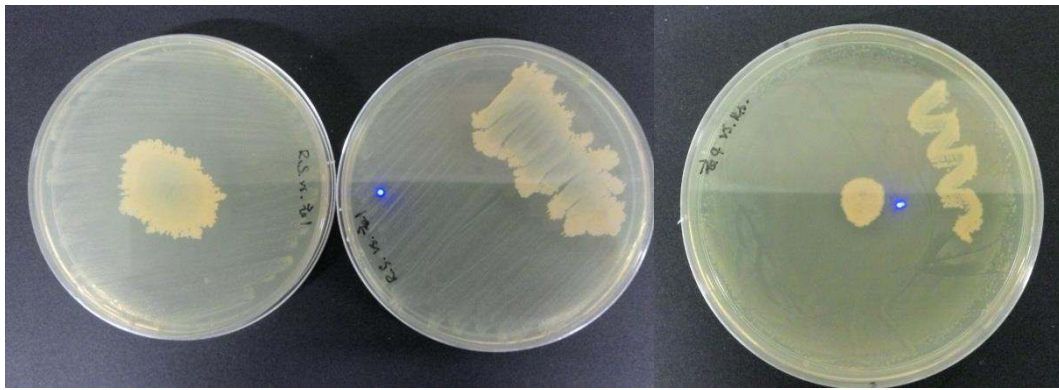


(圖三)左為細菌 DNA chromosome ;右為基因片段(16s rRNA)電泳圖
抽取 DNA chromosome 及利用 16s rRNA 進行 PCR，進行瓊脂糖凝膠電泳，可看出細菌及真菌都有成功抽取到 DNA chromosome 以及定序用的基因片段，如(圖三)。

(表七)衣魚-細菌可能菌種及其特性

菌株	可能菌種	已知文獻記載特性
1	<i>Bacillus subtilis</i>	cellulose lignin
	<i>Bacillus axarguiensis</i>	分離於西班牙南部河口沉積物
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	cellulose degrading 防治病原菌 <i>Rolstonia solanacearum</i>
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	降解氯苯、丹寧
2	<i>Paenibacillus woosongensis</i>	Xylanolytic
	<i>Paenibacillus favisporus</i>	Xylanolytic
3	<i>Paenibacillus sp.</i>	cellulose degrading
	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	resistance to high temperature
	<i>Bacillus acidicola</i>	cellulose degrading, ph value 3.5~7.0
	<i>Bacillus oleronius</i>	白蟻腸道菌
	<i>Bacillus endophyticus</i>	cellulose degrading, 分離於棉花內部組織
4	<i>Bacillus subtilis</i>	cellulose lignin
	<i>Bacillus axarguiensis</i>	分離於西班牙南部河口沉積物 病原菌 <i>Rolstonia solanacearum</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	cellulose degrading
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	降解氯苯、丹寧

細菌利用 16s rRNA 引子進行 PCR 定序後對比線上資料庫可能菌種之結果，經查詢文獻後將各菌種特性整理成表格。細菌 1 和細菌 4 的可能結果一樣，我們假設 1 和 4 可能為同種菌種，如(表七)。



(圖四)防治病原菌 *Rolstonia solanacearum* 測試，右一為細菌四，左二為細菌一



(圖五)防治病原菌 *Rolstonia solanacearum* 測試(對照組)

對應可能菌種及其特性，我們先利用細菌 1 及細菌 4 可能菌種 *Bacillus amyloliquefaciens* 防治病原菌 *Rolstonia solanacearum* 的特性實驗。如(圖四)培養基中較濃的部分唯衣魚腸道菌，而腸道菌周圍有明顯透明圈證實此菌能防治病原菌 *Rolstonia solanacearum*，因此假設此菌為 *Bacillus amyloliquefaciens*。細菌 2.3 周圍都沒有明顯透明圈代表無法防治病原菌 *Rolstonia solanacearum*，如圖(五)。

細菌	Oligo title	Sequence(5' to 3')	PCR TM
1	<i>gyrA-F</i>	ATGAAACGGTCAATTTCTATTTT	46.4°C
	<i>gyrA-R</i>	CTAATTGGGTCTGTCCCAAAT	51.7°C
2	<i>Xylc-F</i>	TGTCTGTATGCACCGGATGT	51.8°C
	<i>Xylc-R</i>	TGATTCCATGGCAGTCAAAA	47.7°C

(表八)檢測微生物種類引子

為更精確地確定菌種，我們在文獻中找到細菌 1 可能菌種 *Bacillus amyloliquefaciens* 可分解纖維素基因片段引子，以及細菌 2 可能菌種 *Paenibacillus woosongensis* 可分解木糖素基因片段引子，如(表八)。

(圖六)細菌 1 *gyrA* 定序結果

```

AAGTATGTGTTTATTGATTGCGGTATTGACAATGGGCGCTTCCCGGTTTCGCGGGCATCTGCAGCAGGGACAAAAACGCCAGTAGCCAAGAATGGTCA
GCTTAGCATAAAAAGGTACACAACCTCGTAAACCGAGACGGTAAAGCGGTACAGTTGAAAGGGATCAGTTCACATGGATTGCAATGGTATGGCGATTTTCG
TCAATAAAGACAGCTTAAATGGCTGAGAGACGATTGGGGCATCACCGTTTTCCGCGCGGCAATGTATACGGCAGATGGCGGTTATATTGACAACCCGT
CCGTGAAAAATAAAGTAAAAGAAGCGGTTGAAGCGGCAAAAGAACTTTGGGATATATGTCATCATTGACTGGCATATCTAAATGACGGCAACCCAAAC
CAAAATAAAGAGAAGGCAAAAGAATTTTTCAAGGAGATGTCAAGTCTTACGGAAACACGCCAAACGTCATTTATGAAATTGCAAAACGAACCAACCGG
TGACGTGAAGTGAAGCGGTGATATTAACCGTATGCAGAAGAAGTATTCGGTTATCCGCAAAAATGATCCAGACAACATCATCATTGTGGAAACCCG
TACGTGGAGCCAGGATGTGAATGATGCTGCAGATGATCAGCTAAAAGATGCAAAACGTCATGTACGCGCTTCATTTTTATGCCGGCACACACGGCCAATC
TTTACGGGATAAAGCAAACACTACGCACTCAGCAAAGGAGCGCTATTTTCTGTGACGGAATGGGGAACAAGCGATGCGCTGGAATGGCGGTGATTCC
TTGGCCAGTCGCAATAGCTTTCTTGATGATATAATGTGATTTTTTTCGTTGTTTTAAACGTAATTTGATTGGAAAAAGGAATAATCGCCGCTTTGTGCATAA
TTGCTCCAGTCATCATTGTGAAGACGAAGCTGAATATCCCTGTGCTTCTCCCGTGACAGCGTTCCTGTTTTAAACCCAGTCCAGATAGGTATCTGC
ACCTTGCTTAGGTTTATGCAGCGTCACAAATTTGGGGTCAAGATTGCCATCCAATCTGCAGTAGTCACAGTCAAAGTTTTGGCCCTTTGTTTTTCGCGT
TATACCAGTAACGGGCAAGTACATCTTTTAAATCCACCGTCGCATTGCCGTTATTTTTATGTGAAGCTGCGGGCGGATTGATTGCTGTTACACAGCCCA
TCCCCTGCTTTGATTGTACAGAAATGCCTTTTTCTGTGTGGGTTATCTTGTGCTGGCGTTTCAGGGCGTTCTTTCGTTGAATCTTTGTAGCCGCGAAT
GTTTTCTTACGAATGTTCTGAAGCAGTTAAATCTGTAAAGCGGCCAGCCGCTTTTAGATGCTCCCGGCTTAAAGCCGAGGATGATTCCTGCTTAT
CAGAAAGATTCCAGTTCACCCAGCTGATTTTCTGTGTCGAGATAATTCAGCCATTCGCGGACTGGCCAAAGGAATACACCCGCAATTCAGACGCATC
GCTTGTTCCTCCATTCCGTCACGAAATAGGCGCTCTTTGCTGAGTGCAGTATTTGCTTTATCCCGTAAAGATTGGCCGTGTGTGCCGGCATAAAAATGA
AGCGCGTACATGACGTTTGCATCTTTAGCTGATCATCTGCAGCATCATTACATCCTGGCTCCAGTACCGGTTCCGACAATGATGATGTTGTCTGGATC
ATTTTTGCGGATAACGGAATCACTTCTTCTGCATACGTTTTAATATCACGCTTCCAGTTCACGTCACCGTTTGTTGTTGCAATTTTCATAAATGACGTT
TGGCGTGTTCGTAAGACTTGACATCTCCTGAAAATCTTTTGCCTTCTCGGGAATGGCTGAATTATCTGCAGCAAGAAAATCAGCTGGGTGAAC
TGAATCTTTCTGATAAGCAGGAATCATCCTCGGCTTAAAGCCGGGAGCATCTAAAACAGCGCGGCTGGCCGCTTACAGATTTAACTGCTTCAGGAACA
TTCGTAAGAGAAAACATTCGCGGCTACAAAGATTCAACGAAAGACGCCCTGAAACGCCAGCACAGATACCCACACAGAAAAGCAATTTCTGTACATAC
AAGCATATCTGTGCTGGGTTTCAGGGGCTTCTTTCGTTGAATCTTTGTAGCCGCAATGTTTTCTTACGAATGTTCTGAAGCAGTTAAATCTGTAA
GCGGCCAGCCGCTTTTTAGATGCTCCCGGCTTAAAGCCGAGGATGATTCCTGCTTATCAGAAAGATTCCAGTTCACCCAGCTGATTTTCTTCTGCTGTC
GAGATAATTCAGCCATTCGCGGACTGGCCAAGGAATACACCCGCAATTCAGACGCATCGCTTGTCCCATTCGCTCACGAAAATAGGCGCTCTTTG
CTGAGTGCAGTATTTGCTTATCCCGTAAAGATTGGCGGTGTGTGCCGCATAAAAATGAAGCGCGTACATGACGTTTGCATCTTTAGCTGATCATCTG
CAGCATCATTACATCCTGGTCCACGTACCGGTTCCGACAATGATGATGTTGCTGGATCATTTTTGCGGATAACGGAATCACTTCTTCTGCATACGGT
TTAATATCACGCTTCAGTTCAGTCCAGTCCGTTGGTTCGTTGCAATTTTCATAAATGACGTTGGCGTGTTCGTAAGACTTGACATCTCCTTGAAAATC
TTTTGCTTCTCT

```

(表九) 細菌一 *gyrA* 定序結果與線上資料庫比對結果

strain	similarity	Nucleotide divergences/compared
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	98%	9/1049
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. plantarum NAU-B3	98%	15/1046
<i>Bacillus subtilis</i> BEST7003 DNA	98%	16/1045
Bacillus sp. JS	96%	34/1041
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	96%	40/1043

細菌 1 定序序列如(圖六)，將定序結果比對 NCBI 線上資料庫，如(表九)大部分顯示結果都為 *Bacillus amyloliquefaciens*，且相似度極高，因此我們確定此菌為 *Bacillus amyloliquefaciens*。

```

CCATGCTCGGACTGATGGACGGTACTATCTGTAATGATGTCCTAGATAAGGTTCCCATTTGTTTCGGTTGCCG
TCTGTGACTCTCCAGCTGGTGAATATGAGTTCTATGGCTATGTGAGATATTCGGATGGAACACGTCTAGG
AGAAAGACAGGGCGATGAGCCTCAATTTGATCCTGGCTGCTGACAGAAGGGGAATTCACCTTATCTGTA
TACCGGCTTTTGTGCCATCGGGGACAAATCAAGAAAAGGGGCCATGGCCACGGTGTCTCGGCCGGGATAT
GCTCACCATCGTGAAGAACCAGGTGTTTGTGCGCAAGTGAACCATACAGCAAGGGCAGCGGATTTG
AAGGACATGAGTTTTTTCGAGGCGCCATCCATCAGGAAGCGAGGGCATACTATTATCTGATCTATTCTTC
GGTCGTCATGCATGAGTTGTGTTATGCGACCAGCCATTTCCGACAAGGGGCTTTACATATCAGGGAGTC
ATTGTAAGCAATAATGATCTTCATATTGATTCTTATAAACCGGCTGACAAACCGATGTATTACGGAGGCAA
TAACCATGGCGGTGCAGTGGAAATTCAGGGGCAATGGTACATTTTCTATCACAGACATACCAATGGTACT
GCTTTTAGCCGACAGGGCTGTATCGAGCCATTTTCATCCGGGAGGACGGAACGATCCCTCAGGTGGAG
ATGACCTCCTGTGGCCCGAACCGAGGGCCGCTTGCCGGGCGCGGCGAATATCCTGCATATTTGGCATGC
AACCTGTTTTGTAAAGACGAAGAGCTGTATACAGGAGGATTTGGCGCTACCGGGGCATGGATGGACAGC
CGGTTTCCGAAAATAACCCAGGATGGAAAAGACGGGGATGAGGAGATGGGATACATCGCCAATATGAC
AGATTCGGCTACGGCGGGATTCAAGTATTTTACTGCCATGGACACTTTTGGATCGCCGTAGCCGATCTG
TCATATTGGCGATGTATCCCATCTCCTCATCCCGTCTTTTCCATCCTGGGTATTTTTCGAAAACCGGCTGT
CCATCCATGCCCGGTAGCGCCAAATCCTCCTGTATACAGCTCTTCGTCTTTACAAAACAGGTTGCATGC
CAAATATGCAGGATATTCGCCCGCCCGCAAGCGGCCCTCCGTTTCGGGCCACAGGAGGTCTCTCCAC
CTGAGGGATCGTTCCCGTCTCCCGAATGAAATGGGCTCGATACAGCCCTGTCCGGTAAAAGCAGTACC
ATTGGTATGTCTGTGATAGAAAATGTACCATTGCCCTGAATTTCCACTGCACCGCCATGGTTATTGCCTC
CGTAATACATCGGTTTGTGACCCGTTTATAAGAATCAATATGAAGATCATTATTGCTTACAATGACTCCC
TGATATGTAAAGCCCCTGTGCGGAAATGGGCTGGTCGCATAACACAACACTCATGCATGACGACCGAAGAA
TAGATCAGATAATACGTATCGCCTCGCTTCCTGATGGATGGCGCCTCGAAAAACTCATGTCTTCAAATC
CGCTGCCCTTGCTGTATGGTTCACCTGGCGCAACAAAACACCGGTTCTTCCACGATGGTGAGCATATCCC
GCCGAGCACCGTGGCCATGGCCCTTTTCTTGATTTGTCCCCGATGGCACAAAAGCCGGTATACAGATA
AGTGAATTCCTTCTGTGTCAGCACGGCAGGATCAAATTGAGGCTCATCGCCCTGTCTTCTCCTAGACGT
GTTCCATCCGAATATCTCACATAGCCATAGAACTCATATTCACCAGCTGGAGAGTCACAGACGGCAACCG
AAACAATGGGAACCTTATCTAGGACATAGTACAGATAGTACCGTCCATCAGTCCCACGGTGACATCCGGT
GCATAAG

```

(圖七)細菌二 *xylc* 定序結果

(表十) 細菌二 *xylc* 定序結果與線上資料庫比對結果

strain	similarity	Nucleotide divergences/compared
<i>Paenibacillus woosongensis</i>	97%	28/935
<i>Paenibacillus sp.</i>	77%	215/930

細菌 2 定序序列如(圖七)，將定序結果比對 NCBI 線上資料庫，表中大部分顯示結果都為 *Paenibacillus woosongensis*，且相似度極高，因此我們確定此菌為 *Paenibacillus woosongensis*

四、微生物生化測試

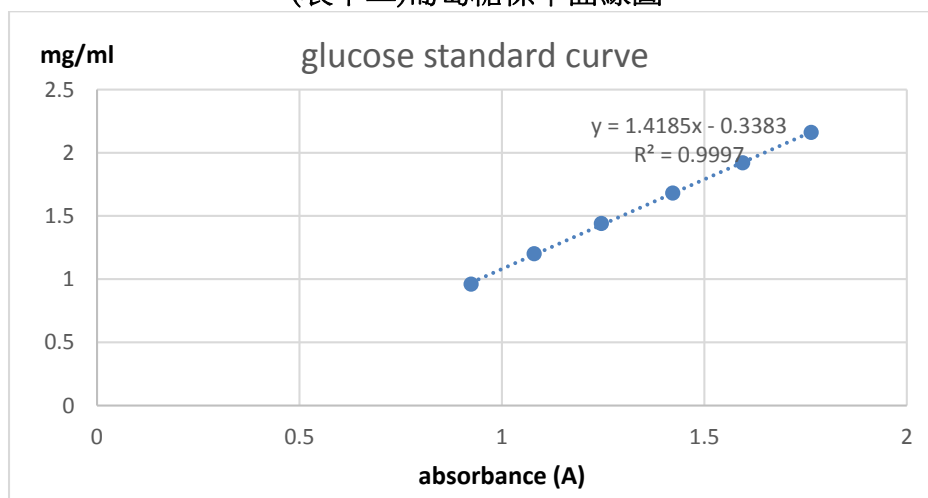
(表十一)細菌生化測試結果

	細菌一	細菌二	註
引朵測試	-	-	表示無法產生色胺酸酵素
MR test(甲基紅測試)	-(黃色 pH6)	+(橘色:產物大約 pH5) (*其正反應定義為:紅色, 負為黃色)	表示細菌在氧化葡萄糖的過程中可或否產生高濃度的酸性產物
VP test(伏-普二氏測試)	-	-	表示無法在代謝葡萄糖的過程中, 衍生非酸或中性的產物
Citrate utilization (檸檬酸利用測試)	-	-	表示無法以檸檬酸做為碳源(營養源)
Nitrate reductase (硝酸鹽還原測試)	+	+	表示此細菌可產生硝酸還原酵素, 並可將硝酸還原成亞硝酸鹽
TSI test (醣類發酵能力檢測)	+(red slant ,yellow bottom) (可發生葡萄糖發酵)	+(yellow slant, yellow bottom) (可發生乳糖或蔗糖發酵)	(表示皆可發生醣類的發酵)
Gelatin liquefaction ability test	+	-	表示可以發生明膠分解或否

*+為正反應(表可利用或可還原)-為負反應(表不可利用或不可還原)

五、利用該微生物分解纖維素並測試其分解效率

(表十二)葡萄糖標準曲線圖

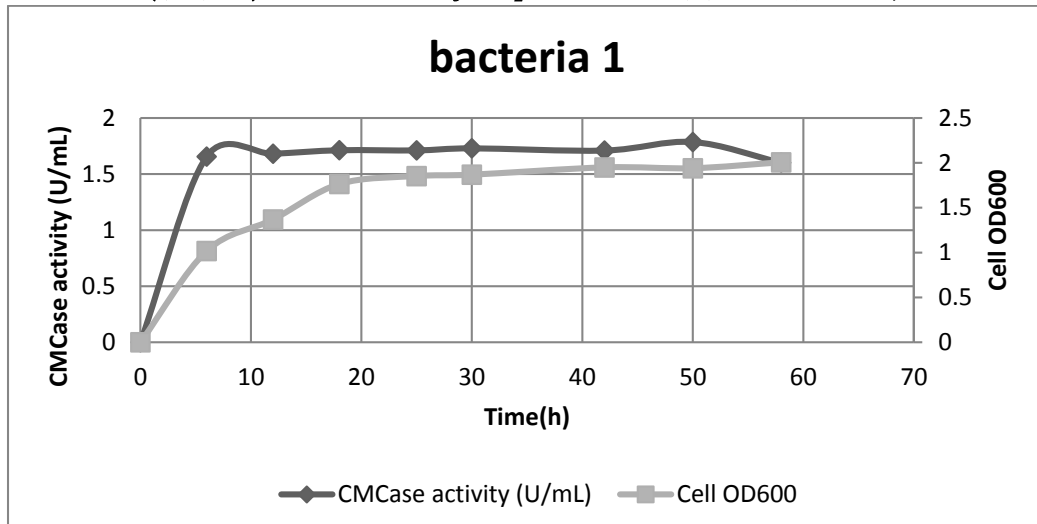


將每六小時 CMC 培養基加入 DNS 試劑後吸光度的值帶入(表十二)葡萄糖標準曲線方程式中，可知道每六小時細菌釋放了多少還原糖，也就是將纖維素分解成還原糖濃度，再依據 CMCase activity 的公式求出分解纖維素酵素之活性

$$(CMC \text{ glucose } OD * 0.3171 - 0.1024) / 180.16 * 1000 / 30 / 0.1 = CMCase \text{ activity (U/ml)}$$

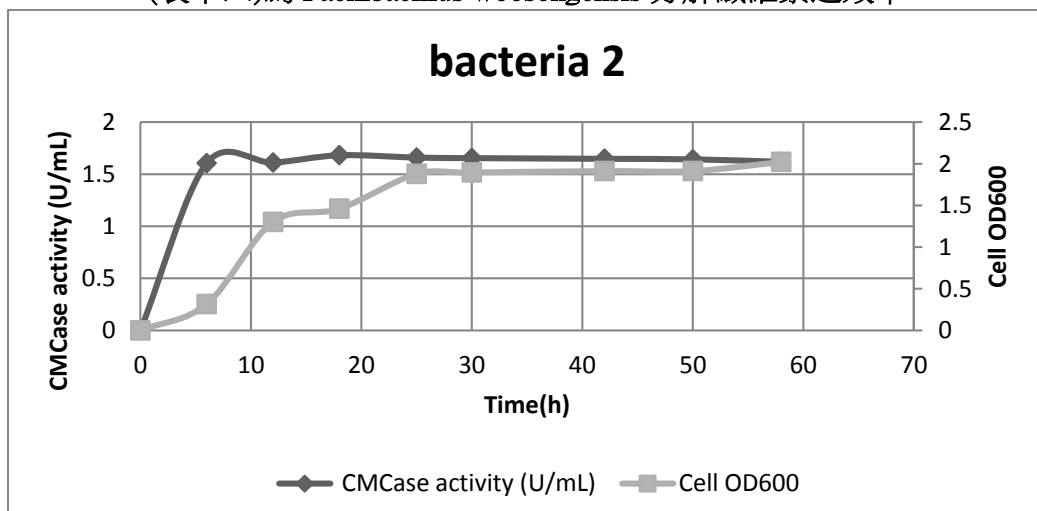
U: 一分鐘內酵素作用釋放 $1 \mu\text{mol}$ 的還原糖

(表十三)為 *Bacillus amyloliquefaciens* 分解纖維素之效率



如(表十三)可知 *Bacillus amyloliquefaciens* 在約 12 小時達到較高的分解效率，在 50 小時達到最高的分解效率 1.786U/ml。

(表十四)為 *Paenibacillus woosongensis* 分解纖維素之效率



如(表十四)*Paenibacillus woosongensis* 在約 8 小時達到較高的分解效率，在 18 小時達到最高的分解效率約 1.682U/ml。

陸、討論

1. 據文獻(J. Fukumoto, 1943)顯示, *Bacillus amyloliquefaciens* 最早發現於土壤中是一種可以生產澱粉酶的菌種, 由於細菌在不同環境生長會有不同的特性, 因此我們依其存在在衣魚體中可分解纖維素之特性測試其分解效率, 最高的分解效率 1.786U/ml
2. 據文獻(Jae-Chan lee, Ki-Hong Yoon, 2008) *Paenibacillus woosongensis* 最早發現於森林土壤中是一種可以分解木糖素的菌種, 而我們發現存在在衣魚體內的 *Paenibacillus woosongensis* 有分解纖維素之功能, 最高的分解效率約 1.682U/ml
3. 關於同菌種分解纖維素效率, 一篇文獻(Shuchi Singh, Vijayanand S. Moholkar, and Arun Goyal, 2013)中顯示在犀牛胃中也發現 *Bacillus amyloliquefaciens*, 經過探討文獻顯示此菌的分解效率最高達 0.1U/ml, 而從衣魚體內篩選出的 *Bacillus amyloliquefaciens* 分解效率最高達 1.786U/ml, 為犀牛胃中 *Bacillus amyloliquefaciens* 分解纖維素效率的 17 倍
4. 關於不同昆蟲體內分解纖維素菌種分解纖維素效率, 文獻(HUUB J. GIJZEN, CHRIS VAN DER DRIFT, 2MARTIN BARUGAHARE, HUUB J. M., 1994)研究美洲蟑螂 *Periplaneta americana* 分解纖維素效率最高達 0.89 + 0.24
5. 由上述可知, 衣魚體內可分解纖維素之微生物在效率方面有很高的發展性, 我們假設抽取其可分解纖維素之酵素或基因轉殖大量表現, 可以提高其分解纖維素效率, 因此往後將往兩方面進行研究

柒、結論

- 一、已證明衣魚腸道內有可分解纖維素之微生物
- 二、已確定其中兩個可分解纖維素的菌種為 *Bacillus amyloliquefaciens* 以及 *Paenibacillus woosongensis*。
- 三、已確定 *Bacillus amyloliquefaciens* 以及 *Paenibacillus woosongensis* 的功能性基因片段。
- 四、*Bacillus amyloliquefaciens* 經生化測試, 可產生硝酸還原酵素; 可將硝酸還原成亞硝酸鹽; 可發生葡萄糖發酵; 可以發生明膠分解。
- 五、*Paenibacillus woosongensis* 經生化測試, 細菌在氧化葡萄糖的過程中可或否產生高濃度的酸性產物; 可將硝酸還原成亞硝酸鹽; 可發生乳糖或蔗糖發酵。
- 六、
 1. *Bacillus amyloliquefaciens* 最高的分解效率 1.786U/ml
 2. *Paenibacillus woosongensis* 最高的分解效率約 1.682U/ml。

捌、後續實驗及未來展望

我們的實驗已完成前五項, 目前正在進行目的六, 酵素分析並測試其分解纖維素效率, 我們已經成功的萃取出細菌分泌的酵素, 並利用 SDS page 進行酶譜分析得知分解纖維素酶大小, 接著我們將改變環境, 測試分解纖維素酵素活性, 找到最適環境, 測試分解稻稈、米糠、廢紙…等纖維素物質, 測試其分解纖維素效率。最後希望未來能夠將微生物或其酵素應用在酒精製程中的水解製程, 分解漂流木、廢紙…等以纖維素組成之廢棄物, 製造纖維酒精並應用於堆肥製成, 增加堆肥製成效率。

玖、參考文獻

1. Archana Sharma, T Satyanarayana (2010) High maltose-forming, Ca²⁺-independent and acid stable α -amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola*. *Biotechnology Letters*, 32, 1503
2. Encarna Velázquez, Trinidad de Miguel, Margarita Poza, Raúl Rivas,
3. HUUB J. GIJZEN, CHRIS VAN DER DRIFT, MARTIN BARUGAHARE, HUUB J. M. (1994) Effect of Host Diet and Hindgut Microbial Composition on Cellulolytic Activity in the Hindgut of the American Cockroach, *Periplaneta Americana*, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1822-1826
4. Jae-Chan Lee, Ki-Hong Yoon (2008) *Paenibacillus woosongensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 612
5. J. Fukumoto (1943). "Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution". *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* (in Japanese) 19: 487 – 503.
6. J.H. Wong, J. Hao, Z. Cao, M. Qiao, H. Xu, Y. Bai, T.B. Ng (2008) An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 105, pp1888-1892
7. Oleg N. Reva, Valerie V. Smirnov, Bertil Pettersson, Fergus G. Priest (2002) *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, pp101-102
8. N O'Reilly, Menezes N, Kavanagh K (2012) Positive correlation between serum immunoreactivity to Demodex-associated *Bacillus* proteins and erythematotelangiectatic rosacea. *British Association of Dermatologists*, 167, pp1032
9. Richard A. Albert, Julieta Archambault, Ramón Rosselló-Mora, Brian J. Tindall, Mike Matheny (2005) *Bacillus acidicola* sp. nov., a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic Sphagnum peat bogs in Wisconsin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 2125
10. Ramón Rosselló-Mora, Tomás G. Villa (2004) *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 54, pp59-60
11. TEN Leonid N., IM Wan-Taek, BAEK Sang-Hoon, LEE Jung-Sook, OH Hee-Mock, LEE Sung-Taik (2006) *Bacillus ginsengihumi* sp. nov., a novel species isolated from soil of a ginseng field in pocheon province, South Korea
12. Shuchi Singh, Vijayanand S. Moholkar, and Arun Goyal (2013) Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from Rhinoceros Dung Available from Hindawi Publishing Corporation ISRN Microbiology (Article ID728134)
13. Silvina Ghio, Gonzalo Sabarís Di Lorenzo, Verónica Lia, Paola Talia, Angel Cataldi, Daniel Grasso, Eleonora Campos (2012) Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4), 352
14. Xian Niu, Cheng Ding, Jin Long Yan, Bai Ren Yang (2013) Screening of the Bacterium for Chlorobenzene Degradation and Its Enzymatic Properties. *Advanced Materials Research Vols 610 – 613*, 404
15. You-Jung Lee, Bo-Kyung Kim, Bo-Hwa Lee, Kang-Ik Jo, Nam-Kyu Lee, Chung-Han Chung, Jin-Woo Lee (2008) Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour Technol* 99, pp378-386

【評語】 040704

雖然以往有類似作品，本作品在方法上有所改進，並鑑定出菌種及萃取分泌之可能分解纖維素之酵素，然數據分析上缺少標準差，酵素活性效率不甚明顯，可再加強及重覆確認，使作品更加完整，具發展潛力。