

國立臺灣大學生命科學院生化科技系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

建構 *Geobacillus thermocatenulatus* NTU 03 熱穩定  
性脂肪酶在大腸桿菌細胞表面之表現系統及生產生質

柴油之應用

Cell surface display of *Geobacillus thermocatenulatus*  
NTU 03 thermostable lipase on *Escherichia coli* and its  
applications for biodiesel production

黃岳章

Yueh-Chang Huang

指導教授：潘子明 博士

Advisor: Tzu-Ming Pan, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

中英文對照縮寫表

縮寫	全名	中文
AM	anchoring motif	錨狀結構
AT	autotransporter protein	自運蛋白
ATP	adenosine-5'-triphosphate	三磷酸腺苷
AV	acid value	酸價
CEr03Lip	cytosolic expressed r03Lip	胞內表現 r03Lip
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate	羥乙基瓜秦乙磺酸
CN	cetane number	十六烷值
CP	cloud point	雲點
CSEr03Lip	cell surface expressed r03Lip	細胞表面表現 r03Lip
CTAB	cetyl trimethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化銨
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亞砜
DTT	dithiothreitol	二硫蘇糖醇
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	二乙胺四醋酸
EGFP	enhanced green fluorescence protein	增強型綠螢光蛋白
EtBr	ethidium bromide	溴化乙錠
FACS	fluorescence-activated cell sorting	流式細胞儀
FAME	fatty acid methyl ester	脂肪酸甲酯
FAIPE	fatty acid isopropyl ester	脂肪酸異丙酯
FFA	free fatty acid	游離脂肪酸
FITC	fluorescein isothiocyanate	異硫氰酸螢光素
GFP	green fluorescent protein	綠螢光蛋白
IgA	immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
INP	ice nucleation protein	冰核蛋白
LB	Luria broth	盧亞氏培養基
logP	logarithm of partition coefficient	分配係數的對數值

Lpp	lipoprotein	脂蛋白
OMP	outer membrane protein	外膜蛋白
PAL	peptidoglycan-associated lipoprotein	肽聚糖脂蛋白
PLD	phospholipase D	磷脂酶 D
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride	苯甲硫醯氟
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrophenol	對硝基苯酚
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrophenyl palmitate	對-硝基酚棕櫚酸
POV	peroxide value	過氧化價
r03Lip	recombinant lipase of <i>G. thermocatenulatus</i> NTU 03	重組 NTU 03 脂肪酶
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸鈉
SFA	saturated fatty acid	飽和脂肪酸
TBA	tributyrin agar plate	三丁酸甘油酯瓊脂平板 培養基

## 中文摘要

近年原油價格高漲，替代能源開發備受重視，其中生質柴油 (biodiesel) 為一種可再生性能源，可作為石化柴油的替代品。生產生質柴油之製程，使用全細胞生物觸媒 (whole-cell biocatalyst) 之脂肪酶催化法，可克服鹼催化法之催化劑無法回收和產率不高等缺點，且降低酵素純化與分離過程之成本，然而胞內酵素之全細胞生物觸媒受限於細胞壁和細胞膜之屏障而降低轉化效率，研究以細胞表面表現酵素之系統，應用於全細胞生物之生物轉化為近年研究發展之方向。

本研究使用 Lpp-OmpA 融合方式，建構重組 *Geobacillus thermocatenulatus* NTU 03 脂肪酶 (r03Lip) 之大腸桿菌表面表現系統，表現 Lpp-OmpA-r03Lip 之融合蛋白至大腸桿菌 BL21(DE3) 細胞表面 (cell surface expressed r03Lip, CSEr03Lip)。由西方點墨法、流式細胞儀 (FACS) 和螢光顯微鏡證實 CSEr03Lip 表現於大腸桿菌細胞表面，且不會影響大腸桿菌細胞之生長及外細胞膜結構的穩定性。酵素活性分析證實 CSEr03Lip 具完整之酵素活性，研究結果 CSEr03Lip 之最適反應溫度為 55°C、最適反應 pH 值為 9，熱穩定性和 pH 值穩定性皆與游離態 r03Lip 相似，且部分之金屬離子、界面活性劑和有機溶劑不影響其之活性，顯示 CSEr03Lip 保有高度之活性與穩定性。然而研究發現 CHAPS 提升 CSEr03Lip 活性與穩定性 21.9% 和 28.9%，鎂離子和丙酮 (acetone) 分別降低其活性及穩定性 26.4% 和 55.2%，此現象未見於游離態 r03Lip。

以 CSEr03Lip 與胞內表現 r03Lip (cytosolic expressed r03Lip, CEr03Lip) 作為全細胞生物觸媒進行脂肪酸異丙酯 (FAIPes) 之轉化。兩者之適合轉化條件為油醇莫耳比 1:4、水含量小於 10% (w/w of oil)、反應溫度 55°C 和生物觸媒使用量 10% (w/w of oil) 以上，分別反應 20 和 28 小時轉化率可達 90% 以上。使用油炸廢棄油為原料，油脂中酸價、過氧化價隨高溫烹調時間而增加，但不影響全細胞生物觸媒對 FAIPes 之轉化率，將 CSEr03Lip 與 CEr03Lip 之全細胞生物觸媒回收再利用，兩者使用前 4 次內轉化率達 80% 以上。

本研究使用 CSEr03Lip 之全細胞生物觸媒，相較於 CEr03Lip 系統，結果顯示 CSEr03Lip 確實增加轉化速率並降低生產 FAIPes 之成本，但酵素提升再利用率為未來發展之重點。

關鍵字：Lpp-OmpA、熱穩定性脂肪酶、細胞表面表現系統、生質柴油、全菌體生  
物觸媒、脂肪酸異丙酯



## Abstract

Biodiesel is one of the possible alternative energies to petroleum. Traditional biodiesel processings have disadvantages of low conversion ratio or catalyst consumption. Comparing to that, the whole-cell enzymatic catalysts may have the higher conversion ratio and are reusable. However, the substrates and enzymes are compartmentalized by cell membranes or cell walls. To overcome this problem, we need to elevate the conversion rate of cytosolic enzyme expressed by whole-cell biocatalysts. In recent years, some literatures have shown that using cell-surface expressing system can solve this limitaion.

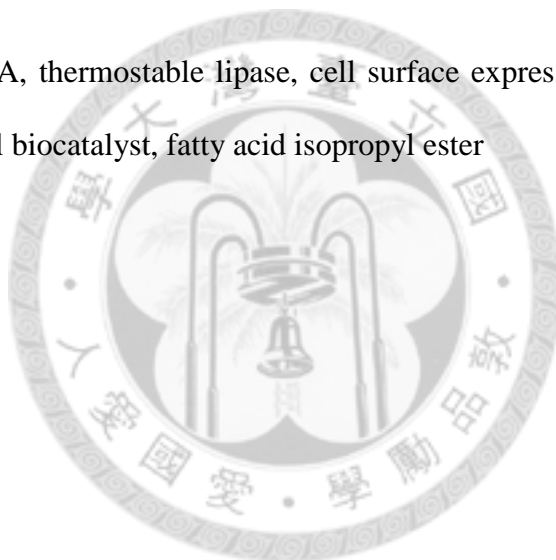
Peptides or proteins can be inserted in a suitable outer membrane protein for displaying on the surface of bacteria. Using Lpp-OmpA as an anchoring motif, we investigated the functional display of *Geobacillus thermocatenulatus* NTU 03 lipase (r03Lip), on the cell surface of *Escherichia coli* (cell surface expressed r03Lip, CSEr03Lip). The fusion protein Lpp-OmpA-r03Lip expressed on the cell surface was found to retain whole-cell lipase activities. The surface localization of r03Lip was further verified by Western blot, fluorescence-activated cell sorting (FACS) flow cytometry and fluorescence microscopy. We did not observe the growth inhibition or changes in the outer membrane integrity upon the induction of the fusion protein synthesis. The enzyme activities of whole-cell CSEr03Lip and free-form r03Lip were similar except the effects of 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS),  $Mg^{2+}$  and acetone: CHPAS enhanced the CSEr03Lip activity and stability by 21.9% and 28.9%;  $Mg^{2+}$  and acetone reduced the CSEr03Lip activity and stability by 26.4% and 55.2%, respectively.

When the lipase-displayed cells were used as the enzyme source, fatty acid isopropyl esters (FAIPes) were efficiently synthesized in the molar ratio of

oil/isopropanol 1:4, 10% (w/w of oil) of water content, and 10% (w/w of oil) of biocatalyst loading at 55°C. We found that the whole-cell CSEr03Lip and CEr03Lip yielded more than 90% conversion ratio after incubation for 20 hrs and 28 hrs, respectively. Using the deep frying oil for FAIPes production, the conversion ratio was not affected by acid and peroxide value and remained above 80% in the first 4 reactions.

These results suggest that the surface-display system may be a useful whole-cell biocatalyst for biodiesel production. However, the recycling of the biocatalyst need to be improved for further industrial application.

Keywords: Lpp-OmpA, thermostable lipase, cell surface expression system, biodiesel, whole-cell biocatalyst, fatty acid isopropyl ester



## 目錄

中英文對照縮寫表 .....	i
中文摘要 .....	iii
Abstract.....	v
目錄 .....	vii
圖目錄 .....	x
表目錄 .....	xii
第一章 研究背景 .....	1
一、脂肪酶.....	1
(一) 脂肪酶簡介.....	1
(二) 脂肪酶結構.....	1
(三) 脂肪酶分類.....	2
(四) 脂肪酶之應用.....	3
二、生質柴油.....	8
(一) 簡介.....	8
(二) 生產製程.....	9
(三) 生質柴油相關議題.....	16
三、細胞表面工程.....	18
(一) 研究源起.....	18
(二) 細胞表面表現系統之組成.....	18
(三) 微生物表面表現系統.....	21



(四) 細胞表面表現系統之應用.....	28
研究目的 .....	31
研究架構 .....	32
第二章 實驗材料及方法 .....	33
一、實驗材料.....	33
(一) 藥品試劑.....	33
(二) 儀器設備.....	33
二、實驗方法.....	34
(一) 建構細胞表面表現脂肪酶系統.....	34
(二) 表現融合蛋白.....	40
(三) 全細胞之生物轉化.....	46
第三章 結果 .....	48
一、建構細胞表面表現脂肪酶系統.....	48
(一) 建構 pETOmpA 與 pETOmpA-r03Lip 質體 .....	48
(二) Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之結構模擬.....	48
二、表現融合蛋白 .....	55
(一) 誘導表現融合蛋白.....	55
(二) 融合蛋白之表現位置.....	55
(三) 大腸桿菌生長曲線和細胞膜穩定性分析.....	58
(四) r03Lip 與 CSEr03Lip 之酵素活性分析 .....	62
三、全細胞之生物轉化.....	74
(一) 探討 FAIPES 之反應條件 .....	74

(二) 以油炸廢棄油生產 FAIPEs .....	80
(三) 全菌體生物觸媒回收再利用 .....	80
討論 .....	85
結論 .....	89
參考文獻 .....	90



## 圖目錄

圖 1 三酸甘油酯與醇類進行轉酯化反應 .....	10
圖 2 傳統酸鹼兩步法生質柴油生產製程 .....	12
圖 3 理論之生質柴油酵素法製程 .....	15
圖 4 Lpp-OmpA- $\beta$ -lactamase 之結構模擬圖 .....	29
圖 5 微生物細胞表面表現系統之應用 .....	30
圖 6 質體 pSD192 圖譜 .....	36
圖 7 以 r03Lip 免疫 Wistar 大鼠與血清收集時間 .....	42
圖 8 質體 pETOmpA-r03Lip 圖譜 .....	49
圖 9 質體 pETOmpA 圖譜 .....	50
圖 10 瓊脂膠體電泳分析 PCR 產物之片段 .....	51
圖 11 轉形株於三丁酸甘油酯瓊脂平板上形成透明圈 .....	52
圖 12 Lpp-OmpA-r03Lip 胺基酸序列 .....	53
圖 13 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之結構模擬圖 .....	54
圖 14 以 SDS-PAGE 分析 r03Lip 融合蛋白之表現位置 .....	56
圖 15 以西方點墨法分析 r03Lip 融合蛋白之表現位置 .....	57
圖 16 以 FACS 觀察 r03Lip 融合蛋白之表現位置 .....	59
圖 17 以螢光顯微鏡觀察 OmpA 和 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之表現位置 .....	60
圖 18 大腸桿菌轉型株之生長動力學 .....	63
圖 19 大腸桿菌轉型株對 EDTA 耐受性測試結果 .....	64
圖 20 大腸桿菌轉型株對 SDS 耐受性測試結果 .....	65

圖 21 r03Lip 之最適反應溫度 .....	66
圖 22 r03Lip 之熱穩定性 .....	67
圖 23 r03Lip 於 pH 4-13 下之最適反應 pH 值 .....	68
圖 24 r03Lip 於 pH 4-13 下之 pH 值穩定性 .....	69
圖 25 反應溫度對 FAIPes 轉化率之影響 .....	75
圖 26 生物觸媒使用量對 FAIPes 轉化率之影響 .....	76
圖 27 油醇莫耳比對 FAIPes 轉化率之影響 .....	77
圖 28 水含量對 FAIPes 轉化率之影響 .....	78
圖 29 反應時間與 FAIPes 轉化率之關係 .....	79
圖 30 以油脂老化測試紙測試油炸油之酸價 .....	81
圖 31 以油炸薯條廢棄油生產 FAIPes .....	82
圖 32 以油炸雞塊廢棄油生產 FAIPes .....	83
圖 33 全菌體生物觸媒再利用之穩定性 .....	84

## 表目錄

表 1 微生物之脂解酵素分類 .....	4
表 2 常見天然油脂之脂肪酸組成 .....	17
表 3 天然油/脂酯化物的雲點 .....	19
表 4 常見之大腸桿菌細胞表面表現系統 .....	24
表 5 實驗中使用之菌株、質體和引子 .....	37
表 6 r03Lip 與 CSEr03Lip 之活性比較 .....	61
表 7 金屬離子與 EDTA 對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性影響之比較 .....	71
表 8 界面活性劑、PMSF 與還原劑對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性之影響 .....	72
表 9 有機溶劑對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性之影響 .....	73
表 10 FAIPes 生產成本影響因子 .....	88

# 第一章 研究背景

## 一、脂肪酶

### (一) 脂肪酶簡介

脂肪酶 (lipase, E.C. 3.1.1.3) 廣泛存在於生物體中，參與生物體之消化、防禦或細胞訊息傳遞等功能。脂肪酶主要進行酯類化合物水解 (hydrolysis)、酯化 (esterification) 與轉酯化 (transesterification) 反應，其具可進行不同之催化反應、不需輔酶參與、反應條件溫和且副產物少等優點 (Jaeger et al., 1999)。脂肪酶為特殊的酯鍵水解酶，在有機相或非均相中（例如油—水界面）具最佳活性表現，稱為界面活化 (interfacial activation) 特性；相較於另一類性質相近之羧酸酯解酶 (carboxylesterase, E.C. 3.1.1.1)，雖同屬於  $\alpha/\beta$  水解酶 ( $\alpha/\beta$ -hydrolase) (Ollis et al., 1992; Verma et al., 2008)，但酯解酶 (esterase) 並無界面活化之特性。

脂肪酶之發現歷史上，動植物體內脂肪酶發現時間較微生物脂肪酶早；1834 年發現兔胰脂肪酶，1854 年發現胃脂肪酶，1871 年發現植物種子之脂肪酶，但微生物脂肪酶卻於 20 世紀初期才被發現。微生物脂肪酶雖發現時間較晚，但因微生物具種類多樣化、生長週期短、生產條件易於人工控制和成本較低等優點而受到重視並廣泛應用。

### (二) 脂肪酶結構

脂肪酶中心之 3 級結構由  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha$ -helices) 和  $\beta$  摺板 ( $\beta$ -sheets) 規則排列組成，與水解酵素之  $\alpha/\beta$  折疊 ( $\alpha/\beta$  hydrolase fold) 結構相似，故歸類為  $\alpha/\beta$  水解酶。脂肪酶之結構具 2 個特點：(1) 含同源序列：His-X-Y-Gly-Z-Ser-W-Gly 或 Y-Gly-His-Ser-W-Gly (X、Y、W 和 Z 為任意之胺基酸)；(2) 催化 3 元體 (catalytic triad)：Ser-Asp-His 組成其催化中心，部分脂肪酶催化 3 元體中的 Asp

以 Gly 取代。

此外大部分脂肪酶具頂蓋 (lid) 之結構，由數段  $\alpha$  螺旋組成並覆蓋於催化中心之上。當脂肪酶於油—水界面時，頂蓋會打開並暴露催化中心，與基質 (substrate) 結合後進行催化反應 (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer and Kazlauskas, 2006)。其反應機制為：基質與催化 3 元體之 Ser 結合形成四面體中間物 (tetrahedral intermediate)，並藉由催化中心 His 及 Asp 等胺基酸穩定此中間物，經電子轉移釋出醇類，形成醯基—酵素複合體。最後親核性物質 (水或酯類) 攻擊再度形成四面體中間物，分解產生酸或酯，釋出游離酵素 (Bornscheuer, 2002)。

脂肪酶分子具有親水和疏水兩區，催化中心包埋於中心疏水區。脂肪酶因結構上差異，產生不同的化學、立體或區位選擇性 (chemo-, region- or stereoselective)。化學選擇性為脂肪酶對於不同基質之選擇，如不同長度之三酸甘油酯 (triacylglyceride)；立體選擇性則是脂肪酶對於立體異構物 (chiral molecular) 具不同選擇性，如鏡像異構物 (enantiomer)；區位選擇性是指脂肪酶對三酸甘油酯 sn-1 (或 sn-3) 和 sn-2 位的酯鍵識別和選擇性水解，如豬胰脂肪酶不具 sn-1 (或 sn-3) 之區位選擇性，而牛奶中脂蛋白脂肪酶會優先水解 sn-1 位酯鍵 (Jaeger et al., 1999)。

### (三) 脂肪酶分類

酵素分類可依基質特異性 (substrate specificity) 和序列比對 (sequence alignment) 為分類依據。然而脂肪酶催化反應相當多樣化，多種催化反應與羧酸酯解酶相似，且兩者結構相近，故脂肪酶之分類相較之下不明確。近年隨蛋白結構生物學之快速發展，脂肪酶和羧酸酯解酶之結晶結構大量解開，加上已發表之基因序列，使得脂肪酶需使用更多資訊來進行分類。Arpigny 和 Jaeger 兩位學者收集 53 個細菌脂肪酶和羧酸酯解酶之基因序列，利用序列相似性為主，酵素生化特性為輔方式，將酵素分為 8 大類 (Arpigny and Jaeger, 1999)。其後 Jaeger

和 Eggert 等學者以原有之分類基礎，將嗜熱菌 *Geobacillus* 屬 (Nazina et al., 2001) 與 *Staphylococcus* 屬之脂肪酶再各自分類 (Jaeger and Eggert, 2002) (表 1)。

脂肪酶 Family I 以 *Pseudomonas* 屬脂肪酶為主，因其為最早研究之脂肪酶，定義為真正脂肪酶 (true lipase)；Family II (Gly-Asp-Ser-Leu family, GDSL family) 脂肪酶之保守序列為 Gly-Asp-Ser-Leu，而非一般 Gly-X-Ser-X-Gly，故以此分類之；Family III 以 *Streptomyces exfoliates* 脂肪酶為分類依據，該類脂肪酶與人類血小板活化因子乙醯水解酶 (PAF-AH) 有 20% 胺基酸序列相似度；Family IV (hormone-sensitive lipase) 與哺乳類賀爾蒙敏感性脂肪酶有高相似度；Family V 與非酯解酶序列有 20-25% 相似度，非酯解酶包含環氧化物水解酶 (epoxide hydrolase)、去鹵酶 (dehalogenases) 和鹵素過氧化酶 (haloperoxidase) 等；分子量最小之酯解酶 (23-26 kDa) 歸類為 Family VI 中，Family VI 酯解酶與真核溶磷酯酶 (lysophospholipase,  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase A2) 序列有 40% 相似度；Family VII 與真核生物之乙醯膽鹼酶 (acetylcholine esterase) 及腸道/肝臟羧酸酯解酶 (intestine/liver carboxylesterase) 序列有 30% 一致性 (identity) 和 40% 相似度；Family VIII 酯解酶與 class C 乙醯胺酶 ( $\beta$ -lactamase) 同樣具有 N 端 Ser-X-X-Lys 之保守序列 (Jaeger and Eggert, 2002)。

#### (四) 脂肪酶之應用

脂肪酶之界面活化特性，使其應用於有機溶劑的反應系統中具有良好穩定性，加上基質特異性、區位選擇性及立體選擇性等優點，脂肪酶於工業用途上具有廣泛的應用 (Jaeger et al., 1999)。

##### 1. 食品之應用

脂肪酶廣泛應用於食品加工及品質改良，例如改良乳製品和黃油之香味；利用區位選擇性催化油脂中酯鍵水解，提高食用油脂營養價值；脂肪酶亦應用於魚類加工，分解魚肉中的脂肪；以脂肪酶催化酯化反應，轉化棕櫚油生成類可可脂；



表 1 微生物之脂解酵素分類

Table 1 Families of lipolytic enzymes

Family	Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession no.	Similarity (%)		Properties
				Family	Subfamily	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA)*	D50587	100		True lipases
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipC)	U75975	51		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35	100	
		<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100	
		<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14	100	
		<i>Serratia morcescens</i>	D13253	15	51	
	4	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)*	M74010	16	100	
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80	
		<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	80	
		<i>Bacillus subtilis</i> (LipB)	C69652	17	74	
	5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785	15	100	
		<i>Geobacillus stearothermophilus</i> P1	AF237623	15	94	
		<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94	
		<i>Geobacillus thermoleovrans</i>	AF134840	14	92	

表 1 微生物之脂解酵素分類 (續前頁)

Table 1 Families of lipolytic enzymes (continued)

Family	Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession no.	Similarity (%)		Properties
				Family	Subfamily	
II (GDSL)	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	100	Phospholipase
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	45	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	44	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	36	
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	14	36	
		<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	36	
	7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	Secreted acyltransferase
		<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14	50	
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		
		<i>Streptomyces scabies*</i>	M57297	36		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		
	III	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28		Secreted esterase Extracellular lipase
		<i>Streptomyces exfoliates*</i>	M86351	100		
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		
		<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		
IV (HSL)		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Esterase Lipase Carboxylesterase
		<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		

表 1 微生物之脂解酵素分類 (續前頁)

Table 1 Families of lipolytic enzymes (continued)

Family	Subfamily	Enzyme-producing strain	Accession no.	Subfamily (%)		Properties
				Family	Subfamily	
V		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Putative lipase
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		Carboxylesterase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		Extracellular esterase 2
		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA-depolymerase
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Putative esterase
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Extracellular esterase
		<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		Extracellular esterase 3
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Esterase
VI		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		Esterase
		<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100		Carboxylesterase
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50		
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	S79600	24		
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20		
VII		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16		
		<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Carbamate hydrolase
		<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		<i>p</i> -Nitrobenzyl esterase
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Putative
						carboxylesterase
VIII		<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100		Stereoselective esterase
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		Cell-bound esterase
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	40		Esterase III

(Jaeger and Eggert, 2002)

Amino acid sequence similarities were determined with the program MEGALIGN (DNASTAR), with the first member of each family (subfamily) arbitrary set at 100%. Abbreviations: OM, outer membrane; PHA, polyhydroxyalkanoate. GDSL: Gly-Asp-Ser-Leu. HSL: hormone-sensitive lipase.

\*Lipolytic enzyme with known 3D structure.

酒精飲品發酵過程加入脂肪酶可改變產品口味；將脂肪酶加入生麵團中，分解三酸甘油酯並增加單酸甘油酯含量可延緩變質，另外單酸甘油酯和雙酸甘油酯亦可改善蛋白氣泡之特性。

## 2. 醫藥之應用

脂肪酶可應用於診斷急性胰腺炎和胰腺損傷、改善放射性治療或腸胃功能障礙引起的營養不良等症狀 (Al-Bahrani and Ammori, 2005)。此外因多元不飽和脂肪酸之保健功能受到重視，脂肪酶亦被應用於多元不飽和脂肪酸的生產。另外脂肪酶之立體選擇性被應用於藥物合成，例如合成癌症治療藥物 Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel) 之前驅物 (Patel, 1998)。

## 3. 清潔劑之應用

衣物中之污垢約四分之三為脂肪污垢，加入脂肪酶可有效分解三酸甘油酯生成易去除之脂肪酸和甘油，故脂肪酶可增加清潔劑之去污效果，另外脂肪酶為生物產品，易被降解且不污染環境。環保意識觀念崛起，使用易於生物降解之清潔劑受到重視，酵素清潔產品已於市面上販售。例如：Lipolase<sup>®</sup>、Lipolase<sup>®</sup> Ultra、Lipo Prime<sup>™</sup> 和 Lipex<sup>®</sup> Novozymes 等。

## 4. 皮革工業之應用

皮革製程中需去除皮毛上的脂肪，相較於傳統石灰去除方式，以脂肪酶分解脂肪生成易去除之脂肪酸和甘油，可提高皮革品質。

## 5. 飼料之應用

脂肪為生物體內重要的能量來源，由於幼禽幼畜之消化機能發育尚未完全，使得內源性消化酶分泌不足而導致消化不完全，無法完全利用飼料中之營養成分而影響生長。Meng 等學者將脂肪酶加入飼料中，研究其對雞隻生長與脂肪消化的影響，然而結果顯示脂肪酶處理過的飼料不影響雞隻之營養攝取 (Meng et al., 2004)。

## 6. 造紙工業之應用

造紙過程中，原料木漿的樹脂常會沈積於乾燥的轉輪上，影響製紙的品質及

效率。利用脂肪酶分解樹脂，相較於傳統化學處理效率明顯提高，且紙張的製成率及其品質均有改善 (Fredrik et al., 1991)。

## 7. 合成生質柴油

替代性能源之一——生質柴油 (biodiesel)，為自然油脂與醇類進行轉酯化反應生成之產物，具有環保、可再生性、可取代石化柴油並且與現行柴油引擎相容等優點，能夠緩解石油枯竭及環境污染問題，為目前各國替代能源研究重點之一。目前已有許多生質柴油製程研究報告 (Akoh et al., 2007; Ranganathan et al., 2008; Hara, 2009)。然而使用化學催化方式等製程，無法滿足環保議題之訴求，且分離副產物困難等問題，生質柴油的製程仍需改進。研究微生物脂肪酶，尤其為嗜熱菌脂肪酶為催化劑，具有溫和的反應條件、催化劑可回收再利用、基質選擇多樣性、反應專一性和副產物回收容易等優點，成為生質柴油製程的新方向。

## 8. 其他應用

脂肪酶其他應用包含：有機合成、水溶液或有機溶劑中之生物轉化 (bioconversion)、區位選擇性之醯化反應 (regioselective acylation) 和油脂工業等。

# 二、生質柴油

## (一) 簡介

生質柴油 (biodiesel) 屬於可再生性能源 (renewable energy)，可作為石化柴油 (fossil diesel) 之替代品。天然生物油脂中的三酸甘油酯與醇類 (甲醇、乙醇或異丙醇) 進行轉酯化 (transesterification) 反應，生成脂肪酸酯類 (fatty acid alkyl esters)，為生質柴油的主要成分。其具有之優點如下：(1) 原料來源為可再生性物質，供應不致匱乏；(2) 與現行柴油引擎系統相容，可直接加入使用；(3) 具良好之潤滑性能，降低引擎磨損率；(4) 具良好之低溫起動性能，可保護引擎；

(5) 環保：燃燒生質柴油排放有毒廢氣量為柴油的 10%，懸浮顆粒物為 20%，一氧化碳為 10%，另外減少硫化物排放量 20%，也減少二氧化碳和溫室氣體之排放量；(6) 安全：生質柴油閃點高，易於運輸及儲存；(7) 具生物可分解性，無毒性 (Bajpai and Tyagi, 2006)。B100 表示含有 100% 之生質柴油，然而考慮經濟成本之因素，現行市售之生質柴油多以與石化柴油混合方式出售，產品為 B1 (1%)、B2 (2%)、B5 (5%) 與 B20 (20%) 等 (Vasudevan and Briggs, 2008)，台灣中油公司出售之超級柴油即為 B2 生質柴油。

## (二) 生產製程

依據相關標準 (中華民國國家標準 CNS 15072、美國國家標準 ASTM D6751 和歐盟標準 EN 14213/14214)，脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl ester, FAME) 為生質柴油之主要成分。現行之生質柴油定義為：以天然生物油脂 (動物脂肪或植物油脂) 中之主要成分三酸甘油酯，與甲醇進行轉酯化反應生成脂肪酸甲酯 (圖 1)，此外其他醇類用以轉化為生質柴油亦為研究議題 (Bajpai and Tyagi, 2006)。轉酯化為一可逆反應 (reversible process) (Parawira, 2009)，1 莫耳之三酸甘油酯與 3 莫耳甲醇反應，生成 3 莫耳脂肪酸和 1 莫耳甘油。以轉酯化反應生產生質柴油之製程，可分為以下方式：

### 1. 均相鹼催化法 (homogeneous alkali catalyzed transesterification)

鹼催化法是以鹼性物質作為催化劑進行轉酯化反應，具有催化活性高、反應速率快、反應溫度低和催化劑成本低等優點，現行全球 99% 以上所販售之生質柴油，生產製程皆是以此方法為基礎 (Ghaly et al., 2010)。鹼催化劑包含無機鹼催化劑 (如甲醇鈉、甲醇鉀、氫氧化鈉和氫氧化鉀等)、有機催化劑 [如有機胺類 (organic amine) 和有機鹼胍類化合物 (alkylguanidine)] 和固體鹼催化劑 (如氧化鈣和氧化鎂) (Ghaly et al., 2010)。

鹼催化法製程中，控制因子包含溫度、油醇比、催化劑用量和攪拌速率等。常見之條件為：反應溫度 60°C、原料油 (油菜籽油或大豆油) 與甲醇莫耳比 1：

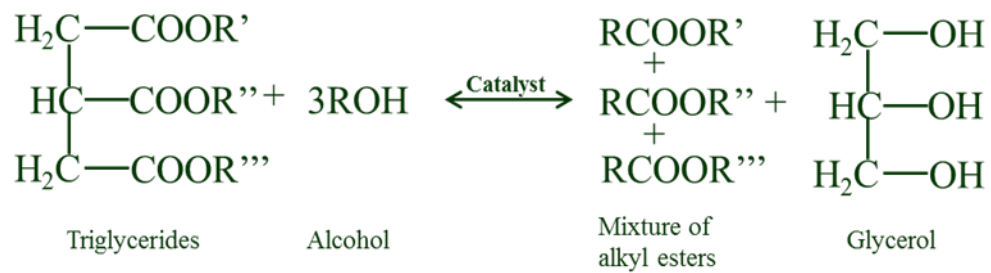


圖 1 三酸甘油酯與醇類進行轉酯化反應

Figure 1 Transesterification of triglycerides with alcohol



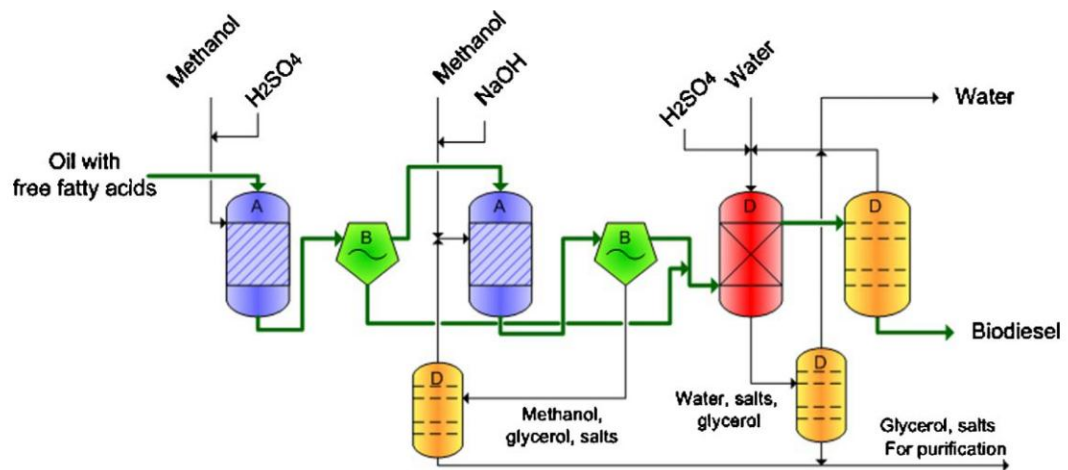
6、鹼催化劑用量 1% (相對於原料油之重量百分比)，轉化率達 90% 以上 (Bajpai and Tyagi, 2006)。Alcantara 等學者使用甲醇鈉作為催化劑，於反應溫度 60°C、油醇莫耳比 7.5:1、催化劑用量 1% 進行反應，轉化率近 100% (Alcantara et al., 2000)。Tsai 等學者以廢棄食用油為原料，氫氧化鈉為催化劑，於反應溫度 60°C 下調整不同比例之油醇比，轉化率近 100% (Tsai et al., 2005)。Foidl 等學者採用兩步鹼催化法，轉化率可達 92% (Foidl et al., 1996)。

鹼催化法之反應系統中，原料油之游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 及水含量影響反應甚劇：游離脂肪酸與氫氧化鈉發生皂化反應 (saponification)，而反應系統中含水量過多則引起酯水解，生成更多游離脂肪酸進而加速皂化反應發生，造成後續產物 (甘油與脂肪酸甲酯) 難以分離，降低轉化效率。因此欲使用鹼催化法生產生質柴油，必須嚴格控制原料中游離脂肪酸和水含量，如以氫氧化鈉、氫氧化鉀或甲醇鉀等為催化劑時，原料油之酸價 (acid value, AV) 需小於 1 毫克氫氧化鉀/克油重 (mg KOH/g of oil)，水分含量需小於 0.06%。故一般高含量 FFA 和水分之原料油，則需採用結合酸、鹼催化法之兩步反應系統 (圖 2) (Fjerbaek et al., 2009)。另外 Canakci 和 van Gerpen 兩位學者以酸催化劑將原料油預先酯化，再以鹼催化法進行轉酯化反應，使用 FFA 高含量 (9%-40%) 之原料油生產生質柴油，轉化率可達 90% 以上 (Canakci and van Gerpen, 2003)。

## 2. 均相酸催化法 (homogeneous acidic catalyzed transesterification)

酸催化法是以酸性物質作為催化劑進行轉酯化反應，常見之催化劑為濃硫酸、鹽酸和苯磺酸等 (Fjerbaek et al., 2009)，其中濃硫酸因價格便宜和資源豐富等因素，為最常見之酸催化劑。相較於鹼催化法，酸催化法優點為不受原料油中 FFA 及水含量之限制，其可進行 FFA 酯化反應，再經轉酯化反應生成脂肪酸酯，故酸催化法適用於 FFA 及水含量高之原料油製備生質柴油。然而酸催化法具反應速率慢、反應時間長、反應溫度高、能源消耗大、甲醇用量大、轉化率低和易腐蝕設備等問題，故現行工業上鮮少單獨採用，而是結合酸催化法與鹼催化法之兩步反應：以酸催化法酯化油脂中的 FFA，以減少 FFA 對下一步鹼催化法之影響





(Fjerbaek et al., 2009)

圖 2 傳統酸鹼兩步法生質柴油生產製程

A：反應器；B：分離器（離心機或靜置槽）；D：產品純化與醇類回收

Figure 2 Traditional biodiesel process with an acidic pretreatment step followed by alkaline catalysis. A: reactor; B: separation (centrifuge or decanter); D: production purification and alcohol recovery

並增加脂肪酸酯產量，如此得以使用高酸價油脂原料（如廢棄炸油或動物油脂）。常見之酸催化法反應條件為：反應溫度 90°C、棕櫚油與甲醇之莫耳比 1：40、催化劑（濃硫酸）用量 5% 和反應時間 9 小時，轉化率達 97%，但反應溫度降至 80°C 時，卻需 24 小時方可達到同樣轉化率（Grabbe et al., 2001）。Zullaikah 等學者以濃硫酸為催化劑，FFA 含量 49.18% 之米糠油為原料，以兩步反應方式製備生質柴油，經兩步酸催化反應後，其脂肪酸甲酯含量達 97%，研究發現 FFA 含量、儲存溫度、時間和濕度彼此相關，且 FFA 含量高時，使用兩步反應法之轉化率較高（Zullaikah et al., 2005）。Freedman 等學者以大豆油為原料，大豆油與丁醇（butanol）莫耳比 1：30，濃硫酸為催化劑（1%），反應溫度 117°C 反應 3 小時後，脂肪酸丁酯之轉化率達 99%，但反應溫度降至 65°C 時，需 50 小時方可達到同樣轉化率（Freedman et al., 1986）。

### 3. 異相酸鹼催化法 (heterogeneous acidic-/alkali catalyzed transesterification)

採用均相酸催化法或均相鹼催化法，由於催化劑與反應系統或產物屬同相，催化劑不易與產物分離，必須以中和與水洗方式去除，而此方式生產大量污水和催化劑無法重複使用，增加以均相催化法生產之成本。為克服催化劑與產物分離問題，近年研究發展聚焦於使用固體酸、鹼催化劑，如樹脂、黏土、分子篩、硫酸鹽、碳酸鹽和複合氧化物等。Gryglewicz 等學者以油菜籽油為原料，比較氧化鈣、甲醇鈣和氫氧化鋇等鹼土金屬化合物之催化活性，研究發現此類催化劑皆有較高之活性，於反應溫度 64.5°C、油醇莫耳比 1：4.5 反應 2.5 小時後，轉化率達 90% 以上（Gryglewicz, 1999）。此外，Cd、Mn、Pb、Zn 金屬羧酸鹽類、 $\text{WO}_3/\text{ZrO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SO}_4/\text{SnO}_2$ 、 $\text{SO}_4/\text{ZrO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{TiO}_2\text{-SO}_4^{2-}$ 、 $\text{ZrO}_2\text{-SO}_4^{2-}$  之固體強酸及鎂鋁複合氧化物等，亦為固體催化劑之研究主題（Satoshi et al., 2004; Di Serio et al., 2005; Yusuf et al., 2011）。

### 4. 酵素催化法 (enzymatic catalyzed transesterification)

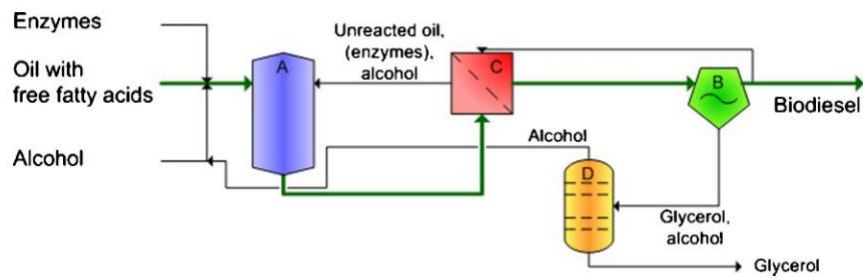
傳統之酸、鹼催化法等化學方式製備生質柴油，具製程複雜、醇消耗量大、產物回收困難、環境污染和腐蝕設備等問題，因而研究發展趨於尋找可取代酸、

鹼物質之催化劑，使用酵素催化方式製備生質柴油，稱為酵素催化法。酵素催化法由於反應條件溫和、醇用量少、催化劑可回收再利用、產物分離容易等優點，成為生質柴油發展研究重點之一（圖 3）。然而酵素催化法仍有問題待克服，如：(1) 短鏈醇對脂肪酶具毒性，降低脂肪酶活性、脂肪酶使用壽命和轉化率；(2) 脂肪酶價格昂貴：現行市售之脂肪酶 Novozyme-435，其價格約為 1,000 USD/kg (Fjerbaek et al., 2009)；(3) 脂肪酶於非極性之有機溶劑中易聚集 (aggregation) 而降低轉化率；(4) 副產物甘油易黏附於酵素表面，影響基質傳遞 (mass transfer)。上述酵素催化法之問題，限制其應用於工業規模生產生質柴油。

近年之研究發現，酵素固定化 (immobilization) 技術可增加脂肪酶的穩定性和再使用率。Iso 等學者比較固定化脂肪酶與游離態脂肪酶之催化效率，前者反應速率為後者之 2.5 倍 (Iso et al., 2001)。另外於反應系統中分批加入甲醇，可降低甲醇對脂肪酶的傷害 (Gao et al., 2009)，或以有機溶劑清洗固定化脂肪酶，可去除黏附於表面之甘油，以增加催化活性和穩定性 (Huang et al., 2010)。此外全細胞催化劑 (whole-cell biocatalyst) 為近年新興之研究主題，使用全細胞作為催化劑，可有效減少酵素純化、分離與固定化等步驟之生產成本。Tamalampudi 等學者比較固定化全細胞催化劑與固定化酵素 Novozyme-435 之轉化效果，研究發現兩者具相近之催化效率，且前者之生產成本低於後者 (Tamalampudi et al., 2008)。其他研究還包含：尋找熱穩定性與耐有機溶劑之新脂肪酶；或以基因工程等方式改造現有脂肪酶之特性 (Fukuda et al., 2008; Parawira, 2009; Vyas et al., 2010; Ebrahimpour et al., 2011)。

## 5. 其他方法

其他方法如超臨界流體法 (supercritical and subcritical alcohol transesterification) (He et al., 2007)、微波輔助轉酯法 (microwave assisted transesterification) (Azcan and Danisman, 2007) 和超音波輔助轉酯法 (ultrasound assisted transesterification) (Singh et al., 2007) 等。然而這些技術於耗能、成本及生產規模等方面，尚需更多研究以符合市場考量。



(Fjerbaek et al., 2009)

圖 3 理論之生質柴油酵素法製程

A：反應器；B：分離器（離心機或靜置槽）；C：過濾器；D：產品純化與醇類回收

Figure 3 Ideal process design for enzymatic biodiesel production. A: reactor; B: separation (centrifuge or decanter); C: filter; D: production purification and alcohol recovery

### (三) 生質柴油相關議題

雖然生質柴油具有許多優點，但仍有部分議題尚待發展與突破。其中生產成本為生質柴油之最大考驗，研究如何降低生產成本仍為現今之研究重點。生質柴油之成本來源為原料油和製程。原料油佔生質柴油之總成本 70%，常見生產生質柴油之原料油，分別為大豆油（美國）、油菜籽油（歐盟為主）、廢食用油（日本）、橄欖油、葵花油和棉籽油等，但使用精製食用油因價格昂貴，大幅增加生質柴油之生產成本（Kemp, 2006）。故適合於生產生質柴油之原料油，需有低價格和高產量等特性，且其價格不受糧食或醫藥應用之影響，如麻風樹籽油（jatropha oil）、棕櫚油（palm oil）、桐油（tung oil）、米糠油、廢食用油或動物脂（tallow 和 grease）等。其中廢食用油品質不一，需經前處理（如去除 FFA）或使用酸鹼兩步反應方可轉化為生質柴油，卻增加其製程之成本。研究發現雖然廢食用油成本為新鮮食用油之 20%，但因製程成本增加而致最終產品價格僅減少 50%（Huang and Wu, 2008）。目前我國以廢食用油為原料，年產量約  $8 \times 10^8$  公升（Huang and Wu, 2008），為柴油年需求量之 10%。

生質柴油另一項討論問題為低溫性質（low-temperature properties）（Smith et al., 2010）。石化柴油低於特定溫度時，因其所含之石蠟（paraffin wax）結晶並產生霧狀現象，進而堵塞引擎油路，該溫度稱為雲點（cloud point, CP）。一般柴油之 CP 為  $-16^{\circ}\text{C}$ ，而 FAME 生質柴油（B100）之 CP 為  $0^{\circ}\text{C}$ 。低溫性質限制生質柴油使用於高緯度或高海拔等低溫地區，亦為目前生質柴油/柴油混合比例鮮少高於 B20 的原因之一。飽和脂肪酸（saturated fatty acid, SFA）含量為影響 CP 之主要因素。除可可油（coconut oil）和棕櫚油外，一般食用植物油之 SFA 含量大多低於 20%（表 2），但經由高溫烹調後油脂中 SAF 含量增加，導致 CP 值上升（Smith et al., 2010）。改善低溫條件方法有：(1) 使用添加劑，如 Tween 80、dihydroxy fatty acid (DHFA)、acrylated polyester prepolymer (APP)、palm-based polyol (PP) 和 DHFA 與 ethylhexanol 之混合物等；(2) 低溫處理原料油或生質

表 2 常見天然油脂之脂肪酸組成

Table 2 Fatty acid compositions of naturally occurring fats and oils

Fat or oil	Fatty acid (%)														Saturated	Unsaturated
	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1	(%)	(%)
Canola						3.9	0.2	1.9	64.1	18.7	9.2	0.6	0.2		6.6	92.2
Coconut	0.5	8.0	6.4	48.5	17.6	8.4		2.5	6.5	1.5		0.1			92.0	8.0
Corn						12.2	0.1	2.2	27.5	57.0	0.9	0.1			14.5	85.5
Olive						13.7	1.2	2.5	71.1	10.0	0.6	0.9			17.1	82.9
Palm				0.3	1.1	45.1	0.1	4.7	38.5	9.4	0.3	0.2			51.4	48.3
Rapeseed					0.1	2.8	0.2	1.3	21.8	14.6	7.3	0.7	0.4	34.8	5.3	78.7
Soybean					0.1	10.9	0.1	4.2	25.0	52.7	6.2	0.3	0.1		15.6	84.0
Sunflower				0.5	0.2	6.8	0.1	4.7	18.6	68.2	0.5	0.4			12.6	87.4
Beef tallow			0.1	0.1	3.3	25.5	3.4	21.6	38.7	2.2	0.6	0.1			50.7	44.9

(Smith et al., 2010)

柴油產品；(3) 有機溶劑萃取；(4) 使用長鏈（碳數 3-8）或支鏈醇（branched chain）取代甲醇（表 3）(Smith et al., 2010)。其中使用長鏈或支鏈醇方式，可不需修正現有生質柴油的製程，且可增加生質柴油之十六烷值（cetane number, CN），彌補生質柴油點火延緩時間（ignition delay time）不足的問題，然而長/支鏈醇價格偏高，是其面臨的問題。

### 三、細胞表面工程

#### （一）研究源起

細胞生理反應與蛋白分子間之交互作用息息相關，細胞表面存在多種蛋白分子參與其生理反應，例如：訊息傳遞（signal transduction）、細胞表面吸附作用（surface adhesion）、細胞間之辨識作用（cell-cell recognition）、參與免疫反應（immunoreactions）和控制離子通道（ion channels）等。研究細胞表面蛋白之結構與功能可以分子層次觀察細胞之生理機制，隨著基因工程技術大幅進展，研究進一步以細胞表面蛋白分子為載體，表現具功能之異源蛋白至細胞表面，可直接與胞外接觸，增加異源蛋白之利用效率。利用細胞表面蛋白之特性，加上分子生物與蛋白質工程技術，建構表現異源蛋白至細胞表面的系統，稱為細胞表面工程技術。

#### （二）細胞表面表現系統之組成

細胞表面工程技術之基礎，是利用細胞表面蛋白的 anchoring motifs (AM) 作為載體蛋白（carrier protein），與欲研究之目標蛋白（passenger protein）融合（fusion）後，透過細胞之蛋白運輸系統（transport system）攜帶目標蛋白至細胞表面。根據載體蛋白與目標蛋白之融合方式，可分為三類：N 端融合（N-terminal fusion）、C 端融合（C-terminal fusion）和三明治融合（sandwich fusion）。

表 3 天然油/脂酯化物的雲點

Table 3 Cloud point of esters of fats/oils

Oil or fat	Ester	Cloud point (°C)
Canola	Methyl	1
	Ethyl	-1
	Isopropyl	7
	<i>n</i> -Butyl	-6
Coconut	Ethyl	5
Corn	Methyl	-3
Olive	Methyl	-2
Palm	Methyl	13
	Ethyl	8
Sunflower	Methyl	2
	Ethyl	-1
Soybean	Methyl	0
	Ethyl	1
	Isopropyl	-9
	<i>n</i> -Butyl	-3
	2-Butyl	-12
Beef tallow	Methyl	17
	Ethyl	15
	<i>n</i> -propyl	12
	Isopropyl	8
	<i>n</i> -Butyl	9
	Isobutyl	8

(Smith et al., 2010)



欲建構成功的細胞表面表現系統，需詳細選擇適合之載體蛋白、目標蛋白和宿主細胞：

## 1. 載體蛋白

自 1990 年代研究至今，已發表各種載體蛋白可應用於細胞表面表現系統，但宿主表現載體蛋白至細胞表面，可能會影響宿主細胞之生理作用 (Georgiou et al., 1996; Georgiou et al., 1997)。欲選擇適合於細胞表面表現之載體蛋白，需包含下列因素：(1) 帶有訊息序列，可正確運輸至胞膜間區 (periplasm) 或胞外；(2) 具有堅定的 AM 結構，不易自細胞膜上脫落；(3) 蛋白結構穩定和具蛋白酶 (protease) 耐受性。除選擇適合之載體蛋白外，尚需考量載體蛋白之特性是否有其特殊應用領域，例如細菌線毛 (fimbriae)、S-layer 蛋白、冰核蛋白 (ice nucleation protein, INP) 和部分外膜蛋白 (例如 *Escherichia coli* TraT) 可特別應用於刺激免疫反應以生產疫苗 (Lee et al, 2000; Chang et al, 1999; Chang and Lo, 2000)。

另外，研究需詳細確認載體蛋白和目標蛋白之融合方式及位置。目標蛋白與載體蛋白融合之相對位置，會影響目標蛋白固定化效率、穩定性、活性和後轉譯修飾 (post-translational modification) 等。Stentebjerg-Olesen 等學者將 cholera toxin B chain 的抗原決定位置 (epitope)，分別插入線毛次單元 (fimbrial subunit) 蛋白 FimA 中的 4 個胺基酸位置 (第 25、45、80 和 105 胺基酸)，發現其中 3 個胺基酸位置 (第 25、45、和 80 胺基酸) 可成功融合，但其中 1 個胺基酸位置卻無法成功融合 (Stentebjerg-Olesen et al, 1997)。此外，研究需確認目標蛋白與載體蛋白之融合位置，是否將目標蛋白表現於細胞外。常見之確認方法有：預測同源胺基酸序列及蛋白結構 (Xu and Lee, 1999)、計算載體蛋白的親水區域 (Suzuki et al, 1995) 和隨機插入等方式。

## 2. 目標蛋白

研究選擇欲應用之目標蛋白，需注意目標蛋白本身是否具毒性、影響宿主生長和影響目標蛋白之表現位置。Stathopoulos 等學者使用不同的目標蛋白，分別

與相同之載體蛋白融合，並且表現於相同宿主細胞中，研究發現其表現位置並非完全相同 (Stathopoulos et al, 1996)。另外，目標蛋白在胞膜間區的折疊構造 (例如雙硫鍵) (Maurer et al, 1997; Jose et al, 1996) 和插入之胺基酸的帶電性或疏水性 (Nguyen et al, 1995) 亦會影響蛋白分泌或表現位置。

### 3. 宿主細胞

選擇適合之細胞表面表現宿主，需有易培養、可與表面蛋白共存且不會造成細胞溶解 (lysis) 和細胞壁可耐蛋白酶之特性。格蘭氏陽性菌由於有堅硬之細胞壁結構，適合應用於全細胞轉化和全細胞吸附，常見使用菌株有芽孢桿菌 (*Bacillus*) 和葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 等。格蘭氏陰性菌，例如大腸桿菌，雖然外膜結構較脆弱，但因大腸桿菌有豐富的基因資料庫、大量表現異源蛋白和轉形效率高等優點，為目前理想用來細胞表面表現的菌株。

### (三) 微生物表面表現系統

1980 年代中期，Smith 學者融合胜肽 (peptide) 與 pIII 蛋白，表現於嗜菌體表面，為最早使用細胞表面工程技術之表現系統 (Smith, 1985)。自此，研究發展許多嗜菌體的表面表現系統以表現各種異源蛋白，然而受限於嗜菌體個體大小，無法表現大分子量之異源蛋白質 (Li, 2000)。因此，研究發展趨於使用微生物細胞作為宿主，以解決分子量限制問題。

#### 1. 格蘭氏陰性菌之細胞表面表現系統

格蘭氏陰性菌具有較複雜的細胞質膜結構 (cell envelope structure)，包含內膜 (cytoplasmic membrane)、胞膜間區和外膜 (outer membrane)，因此進行細胞表面表現時，載體蛋白和目標蛋白需穿過細胞質膜結構，運輸至外膜上。目前已知多種基因融合方式，可成功將目標蛋白表現於格蘭氏陰性菌之細胞表面。利用 N 端融合方式，融合目標蛋白與載體蛋白之 C 端 AM，可運送至細胞表面，例如：peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) (Dhillon et al, 1999)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 蛋白酶家族 (Jose et al, 1996)、大腸桿菌黏附蛋白 (*E.*

*coli* adhesion protein) AIDA-I (Liljeqvist et al., 1997; Maurer et al., 1997; Jose et al., 2002) 和志賀氏桿菌 (*Shigella*) VirG 蛋白 (Suzuki et al., 1995) 等。另外，許多外膜蛋白之 N 端具有訊息序列，可利用 C 端融合方式將目標蛋白運送至細胞表面，例如 Lpp-OmpA (Francisco et al., 1992; Richins et al., 1997; Bae et al., 2000; Samuelson et al., 2002; Yang et al., 2008a & b)、冰核蛋白 (ice nucleation protein, INP) (Jung et al., 1998a & b; Jeong et al., 2001; Cho et al., 2002) 和支鏈澱粉酶 (pullulanase) (Kornacker and Pugsley, 1990) 等。三明治融合方式則有：外膜蛋白 (Georgiou et al., 1997; Xu and Lee, 1999)、大腸桿菌運輸蛋白 LamB (Martineau et al., 1991; Sousa et al., 1998)、大腸桿菌 TraT 蛋白 (Taylor et al., 1990)、大腸桿菌鞭毛 (flagella) 和線毛 (fimbriae) 的次體蛋白 (subunit protein) (Westerlund-Wikstrom et al., 1997; Stentebjerg-Olesen et al., 1997) 和 S-layer 蛋白 (Bingle et al., 1997)。

## 2. 格蘭氏陽性菌之細胞表面表現系統

許多格蘭氏陽性菌表面蛋白以共價鍵結合在細胞壁上，且大部分 C 端含有 32-38 個胺基酸組成的訊息序列，訊息序列由一段 LPXTG (胺基酸單字母縮寫，X 表示為任一胺基酸) 序列加上約 23 個疏水性胺基酸，再加上 C 端 6-7 個正電胺基酸所組成 (Schneewind et al., 1993)。LPXTG 為一段鑲嵌於細胞壁上的保留序列 (conserved sequence)，轉肽酶 (sortase) SrtA 可作用於 threonine 和 glycine 之間，經由 LPTXG 序列將蛋白鑲嵌至細胞壁上；疏水性胺基酸為一段穿膜區序列；C 端的正電胺基酸可避免肽鏈分泌至胞外培養基中，利用 LPXTG 序列和穿膜區序列可表現蛋白於格蘭氏陽性菌表面上。

除了 LPXTG 序列外，格蘭氏陽性菌亦有多種載體蛋白可運用於細胞表面表現。例如：*Staphylococcus aureus* protein A 作為 AM 已成功的將外源蛋白表現於 *S. xylosus*、*S. carnosus* 與 *Lactococcus lactis* 細胞表面；M6 蛋白具有 N 端訊息肽和 C 端分揀訊息 (sorting signal) 特徵，亦可作為載體蛋白 (Wernérus and Ståhl, 2004)。另外，格蘭氏陽性菌中有許多約 50 個胺基酸的表面蛋白，稱

為 S-layer homology motifs，可與次生細胞壁 (secondary cell wall) 之肽聚醣層 (peptidoglycan layer) 共價鍵結合，表現於細胞表面。如 *Bacillus anthracis* 的 S-layer 蛋白 EA1 已成功表現 tetanus toxin fragment C 至細胞表面 (Mesnage, et al., 1999)。

### 3. 大腸桿菌之細胞表面表現系統

大腸桿菌具有生長快速、異源蛋白產率高和基因操作方便等優點，為常用之細胞表面表現系統的宿主。總觀大腸桿菌之細胞表面表現系統，常見之載體蛋白如表 4 所示，根據使用之載體蛋白種類，可分為：

#### (1) 外膜蛋白系統

$\beta$ -barrel 外膜蛋白為常見之外膜蛋白系統，其結構是以反向排列 (antiparallel) 之  $\beta$  摺板鑲嵌於外膜上，形成桶狀 (barrel-like) 之構造，例如 LamB、FhuA、OmpA、OmpC 和 OmpX (Samuelson et al., 2002; Rice and Daugherty, 2008; Baek et al., 2009; Verhoeven et al., 2009)。

以基因工程方式將目標蛋白插入外膜蛋白的一段胺基酸序列中，使目標蛋白表現於細胞表面，然而若插入之目標蛋白分子量過大，會降低外膜蛋白結構的穩定性。外膜蛋白表現系統受到目標蛋白分子量之限制，為了解決此問題，enhanced circularly permuted OmpX 系統將目標蛋白與 OmpX 之 N 端或 C 端融合，成功表現大分子量之目標蛋白至細胞表面 (He et al., 2008; Baek et al., 2009)。此外，將 *Bacillus subtilis* 蛋白 PgsA 異源表現至大腸桿菌，可作為載體蛋白並成功表現  $\alpha$  澱粉酶 ( $\alpha$ -amylase) (77 kDa) 與脂肪酶 B (lipase B) (34 kDa) 至細胞表面 (Narita et al., 2006)。

#### (2) 表面附屬絲系統

細菌表面生長數目不等之蛋白質絲狀物，如鞭毛 (flagella)、纖毛 (pili) 或線毛 (fimbriae)，稱為表面附屬絲 (surface appendages)，可作為細胞表面表現系統之載體蛋白。例如：將目標胜肽插入鞭毛組成蛋白 FliC 和 FliD (Samuelson et

表 4 常見之大腸桿菌細胞表面表現系統

Table 4 Typical surface display systems for *E. coli*

Scaffold	Type of fusion	Passenger size (kDa)	Application	Reference
<b>Outer membrane proteins</b>				
eCPX derived from OmpX	Biterminal	0.8-1.6	Peptide library screening	Rice and Daugherty, 2008
FhuA	Insertional	1.1-3.3	Peptide library screening	Samuelson et al., 2002
LamB	Insertional	1.2-25.5	Bioremediation, peptide library screening, vaccine development	Samuelson et al., 2002
Omp1	C-terminal	56	Biocatalysis	He et al., 2008
OmpA	Insertional	1-50	Peptide library screening, peptide display, vaccine development	Verhoeven et al., 2009, Samuelson et al., 2002, Daugherty, 2007 and Hall, 2007
OmpC	Insertional, C-terminal	18-52	Bioremediation, biocatalysis	Baek et al., 2009
OmpT		35	Directed evolution, substrate profiling	Varadarajan et al., 2009
OprF	C-terminal	50	Biocatalysis	Lee et al., 2005
PgsA	C-terminal	34-77	Biocatalysis	Narita et al, 2006
Wza-omp orf1/OmpU/Omp26La	C-terminal	27-50	Translocation studies	Yang et al., 2008c
<b>Surface appendages</b>				
F pillin	Insertional	1.6	Peptide antigen display	Samuelson et al., 2002
Fimbriae (FimH and FimA)	Insertional	1-4	Peptide library screening, immunogenic peptide display, bioremediation	Lee et al., 2003

表 4 續前頁

Table 4 Continued

Scaffold	Type of fusion	Passenger size (kDa)	Application	Reference
Flagellin (FliC and FliD)	Insertional	1.2-33	Peptide display, peptide library screening, vaccines, bioremediation, exploring protein-protein interactions	Samuelson et al., 2002 and Majander et al., 2005
<b>Lipoproteins</b>				
INP	C-terminal	7-119	Epitope mapping, biocatalysis, vaccines, protein library screening	Samuelson et al., 2002, Yim et al., 2010 and Kang et al., 2003
Lpp-OmpA	C-terminal	27-74	Bioremediation, biocatalysis, antibody library screening	Samuelson et al., 2002, Yang et al., 2008a and Yang et al., 2008b
PAL	N-terminal	29	Display antibody fragments, bioremediation	Samuelson et al., 2002
Tat-dependent lipoprotein	C-terminal	27	Translocation studies	Shruthi et al., 2010
TraT	Insertional, C-terminal	1.2-11	Antigen display	Samuelson et al., 2002
<b>Virulence factors</b>				
AIDA-I	N-terminal	12-65	Biocatalysis, protein library screening, vaccine development	Jose and Meyer, 2007, Li et al., 2008 and Binder et al., 2010
EaeA	C-terminal	3.9-31.6	Translocation studies	Lee et al., 2003 and Becker et al., 2005
EspP	N-terminal	20	Protein library screening	Jose and Meyer, 2007 and Binder et al., 2010
EstA	N-terminal	38-60	Biocatalysis, protein library screening	Jose and Meyer, 2007, Becker et al., 2005, Yang et al., 2010 and Wilhelm et al., 2007
Invasin	C-terminal	1.1	Peptide library screening	Lee et al., 2003
MSP1a	N-terminal	4.6	Immunogenic peptide display	Canales et al., 2008

(van Boois et al., 2011)

al., 2002; Majander et al., 2005)、線毛次單元 FimH 和 FimA (Lee et al., 2003) 和纖毛次單元 (pili subunit) F pilin (Samuelson et al., 2002) 中，可表現至細胞表面。另外，商品化之 FliTrx 亦是以鞭毛為載體蛋白之細胞表面表現系統，應用於研究蛋白與蛋白間之交互作用 (protein-protein interaction) (Samuelson et al., 2002)。

### (3) 脂蛋白系統

脂蛋白 (lipoprotein, Lpp) 於 N 端經脂質修飾 (lipid-modified) 並鑲嵌在外膜上，屬於另一類之外膜蛋白。目前已有兩種 Lpp 可作為載體蛋白，分別為 TraT 和 PAL (Taylor et al., 1990; Fuchs et al., 1991; Dhillon et al., 1999)。此外 Lpp (Braun's lipoprotein) 屬大腸桿菌主要表現之脂蛋白，將 Lpp 之訊息肽與 OmpA 部分胺基酸片段融合 (Lpp-OmpA) 作為載體蛋白，可成功表現大分子量之目標蛋白至細胞表面，如乙醯胺酶 ( $\beta$ -lactamase) (30 kDa)、綠螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) (27 kDa) 和甲基巴拉松水解酶 (methyl parathion hydrolase) 與綠螢光蛋白之融合蛋白 (60 kDa) (Francisco et al., 1992; Yang et al., 2008a & b)。

### (4) 致病因子系統

病原菌會表現大量致病因子 (virulence factor) 於細胞表面，致病因子於感染和致病過程中扮演重要角色。目前已知兩種致病因子可應用於細胞表面表現系統：侵襲素 (invasion) 和 intimin 蛋白 EaeA。侵襲素為分子量 106 kDa 之致病因子，存在於假結核耶爾森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 之外膜上，將侵襲素和外膜蛋白 DppE 或細胞壁蛋白 CwbA 融合可作為載體蛋白，可成功表現抗原於細胞表面 (Acheson et al., 1997)；病原性大腸桿菌利用細胞表面之 EaeA 蛋白附著於腸道壁上，EaeA 為大小 102 kDa 之膜蛋白，將目標蛋白以 C 端融合方式與 EaeA 融合，可成功表現至細胞表面 (Wentzel et al., 2001; Adams et al., 2005)。此外立克次體邊蟲 (*Anaplasma marginale*) 發現之表面蛋白 1a，亦為有效之表面載體蛋白 (Canales et al., 2008)。

#### (5) Tat 運輸系統

大腸桿菌之胞膜間區蛋白 (periplasmic protein) 或外膜蛋白，是透過內膜上的 Sec 通道 (Sec-translocon) 負責其蛋白折疊 (folding) 及運輸 (Driessen and Nouwen, 2008)，故大部分之大腸桿菌細胞表面表現系統皆透過 Sec 系統運輸至細胞表面，但 Sec 系統運輸之蛋白需進一步透過胞膜間區的折疊調節蛋白 (folding modulator) 修飾，方能形成正確結構與功能 (Baneyx and Mujacic, 2004)。然而大腸桿菌運輸系統—雙精氨酸轉位 (twin-arginine translocation, Tat) 系統為另一已知之蛋白運輸系統，其負責運輸已正確折疊蛋白至胞膜間區 (Lee et al., 2006)，以及參與外膜蛋白或脂蛋白之合成 (Ferrandez and Condemine, 2008; Shruthi et al., 2010; Thompson et al., 2010) 等，可應用於細胞表面表現系統。研究融合 Tat 訊息胜肽、脂蛋白之修飾訊息胜肽和增強型綠螢光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP)，證實其為有效的大腸桿菌細胞表面表現系統 (Shruthi et al., 2010)。

#### (6) Autotransporter 系統

自運蛋白 (autotransporter protein, AT) 系統為格蘭氏陰性菌特有之運輸系統，其運輸目標蛋白至胞外過程中，除了藉由 Sec 系統跨越內膜至胞膜間區外，不需其他蛋白參與運輸過程，因此稱為自運蛋白系統。AT 包含兩部分：轉位蛋白 (translocator) 和目標胜肽，AT 藉由 Sec 系統運輸至胞膜間區，轉位蛋白鑲嵌於外膜上後釋出目標胜肽至胞外，但運送至胞外的目標胜肽片段大小如何取決，目前機制尚未確定 (Nishimura et al., 2010)。最早研究之 AT 為 IgA1 蛋白酶。Klauser 等學者取代 IgA1 之目標胜肽，成功表現霍亂毒素 B (cholera toxin B, CTB) 至細胞表面 (Klauser et al., 1990)；大腸桿菌黏附素 (adhesin) AIDA-I 為廣泛使用之 AT，已成功表現有機磷水解酶 (organophosphorus hydrolase)、綠色螢光蛋白 (Li et al., 2008)、山梨醇脫氫酶 (sorbitol dehydrogenase) (Jose and von Schwichow, 2004)、乙醯胺酶 (Lattemann et al., 2000) 和脂解酶 (esterase) ApeE (Schultheiss et al., 2008) 至細胞表面；另外，綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)



的 AT EstA 可表現脂肪酶至細胞表面 (Becker et al., 2005)。

#### (7) Lpp-OmpA 系統

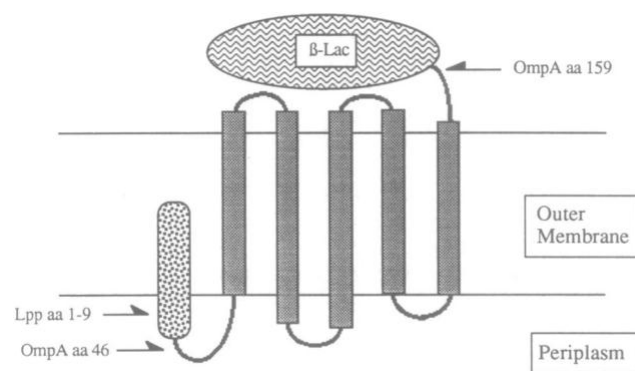
Lpp-OmpA 為有效之大腸桿菌表面表現系統，於 1992 年由 Francisco 等學者建構，可表現乙醯胺酶至大腸桿菌表面 (Francisco et al., 1992)，後續研究其可成功表現多種異源蛋白，如纖維素酶 (cellulose) (Francisco et al., 1993)、single chain Fv (scFv) 抗體 (Daugherty et al., 1998)、環狀糊精葡萄糖苷轉移酶 (cyclodextrin glucanotransferase) (Wan et al., 2002) 和幾丁質結合蛋白區 (chitin-binding domain) (Wang and Chao, 2006) 等。

Lpp-OmpA 系統架構包含 3 部分：(a) 脂蛋白前 9 個胺基酸 (a.a. 1-9) 序列：為 Lpp-OmpA 系統之訊息胜肽，與 Lpp 融合之蛋白將於 N 端進行脂質修飾並運送至胞膜間區 (Gennity and Inouye, 1991)，利用其 N 端脂溶性鑲嵌於外膜上 (Kornacker and Pugsley, 1990)；(b) OmpA 之胺基酸 46-159 片段：為 OmpA 之主要穿膜區片段 (transmembrane domain) (B3-B7)，鑲嵌於外膜上。由拓撲模型 (topological model) 預測，目標蛋白與 OmpA 之 C 端融合會位於細胞表面上 (圖 4) (Vogel and Jähnig, 1986)；(c) 目標蛋白：乙醯胺酶。

相較於格蘭氏陰性菌大部分之表面表現系統，Lpp-OmpA 系統具應用層面廣、系統穩定及目標蛋白分子量限制小等優點 (表 4)，為本研究所使用之表現系統。

#### (四) 細胞表面表現系統之應用

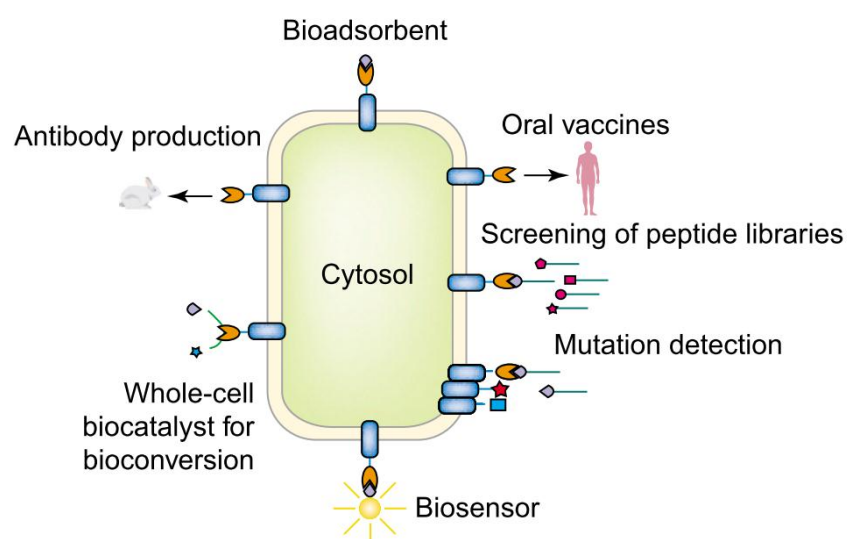
微生物為主之細胞表面工程技術，迄今各種細胞表面表現系統發展快速，已廣泛運用於各領域。包含應用微生物學、免疫學、生物醫藥 (biomedicine)、生物轉化 (bioconversion) 及生物感測工程技術 (biosensor technology) 等。目前研究的重點包含建構全細胞生物轉化觸媒 (whole-cell biocatalyst for bioconversion)、開發疫苗載體 (vaccines vehicles)、生物感測器 (biosensor)、蛋白篩選 (protein library screening) 和生物吸附劑 (environmental bioadsorbent) 等 (圖 5)。



(Francisco et al., 1992)

圖 4 Lpp-OmpA-β-lactamase 之結構模擬圖

Figure 4 Schematic of the expected structure of the Lpp-OmpA-β-lactamase fusion in the outer membrane



(Lee et al., 2003)

圖 5 微生物細胞表面表現系統之應用

Figure 5 Applications of microbial cell surface display

## 研究目的

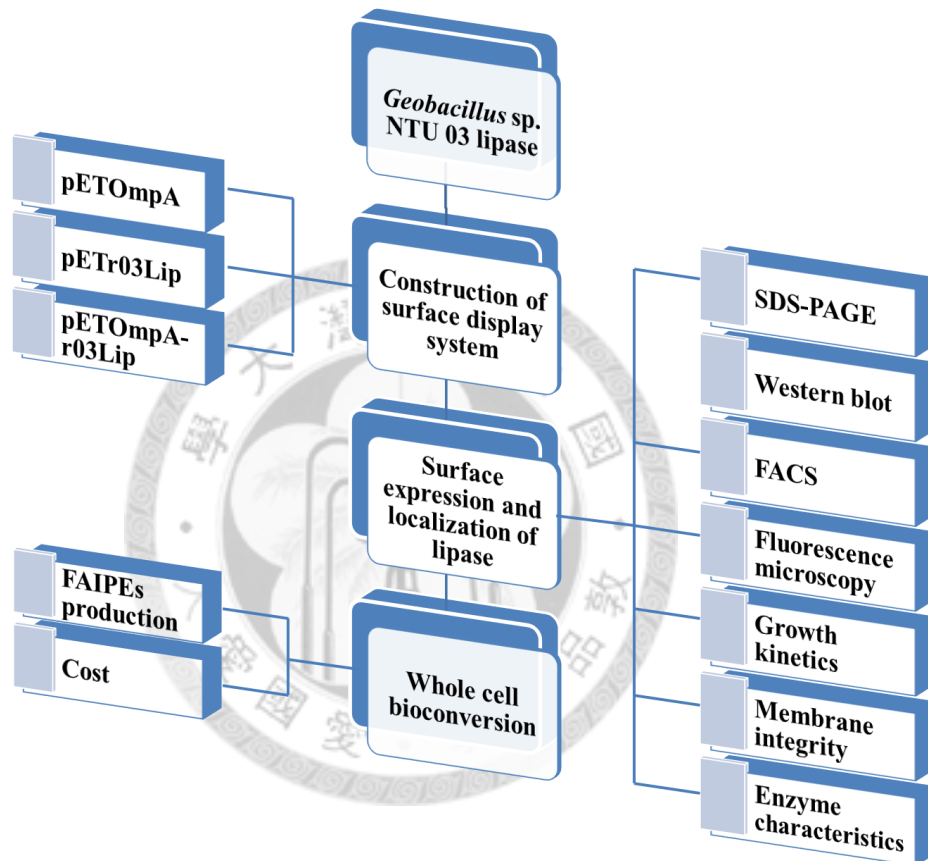
近年來由於原油價格高漲，替代能源開發備受重視，其中生質柴油 (biodiesel) 為一種可再生性能源，可作為石化柴油的替代品，其優點有具可再生性、與現行柴油引擎相容及減少 CO<sub>2</sub>、CO、溫室氣體、硫化物和懸浮顆粒的排放等。生質柴油定義為天然生物油脂中的三酸甘油酯 (triglycerides)，與醇類 (甲醇、乙醇或異丙醇) 進行轉酯化反應，生成脂肪酸酯類 (fatty acid alkyl esters)，為生質柴油的主要成分。

目前常見生質柴油之催化方式為：鹼催化法、酸催化法和酵素催化法。工業製造生質柴油以鹼催化法為主，具有反應溫度低、反應速率快及成本低等優點，但缺點為反應易受游離脂肪酸和水分影響、產物回收繁複、催化劑無法回收和產率不高等；酵素催化法因反應條件溫和、產物回收容易和催化劑可再利用而受到重視，但酵素成本昂貴為目前發展限制的原因。傳統使用游離態酵素或進一步固定化 (immobilized) 酵素為催化劑，無論純化或固定化酵素步驟皆會增加生產成本。使用全菌體生物觸媒 (whole-cell biocatalyst) 為近年發展之新概念，可大幅降低生產成本，但受限於細胞壁和細胞膜之屏障，胞內表現酵素之生物觸媒可能大幅降低其轉化效率。

隨著細胞表面工程技術之發展，將酵素表現至細胞表面亦應用於全菌體生物轉化，並可突破胞內酵素生物觸媒之限制。本研究以 Lpp-OmpA 系統，表現嗜熱菌 *Geobacillus thermocatenulatus* NTU 03 脂肪酶 (r03Lip) 至大腸桿菌細胞表面，以解決胞內表現 r03Lip (cytosolic expressed r03Lip, CEr03Lip) 之生物觸媒轉化速率慢之問題，並進一步探討應用於生產生質柴油之效率，發展可降低成本之生質柴油酵素製程。

## 研究架構

本研究欲建構嗜熱菌 *Geobacillus* NTU 03 脂肪酶 (r03Lip) 之大腸桿菌細胞表面表現系統，作為全菌體生物觸媒並應用於生產脂肪酸異丙酯 (FAIPes)，以解決胞內表現 r03Lip 之生物觸媒轉化速率慢之問題，發展可降低成本之生質柴油酵素製程，其研究架構如下：



## 第二章 實驗材料及方法

### 一、實驗材料

#### (一) 藥品試劑

1. 本研究所使用之藥品試劑，除特別註明者外，皆購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。
2. Luria broth (LB)、瓊脂 (agar 或 agarose)、溶菌酶 (lysozyme)、isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)、大腸桿菌 BL21(DE3) 勝任細胞和蛋白分子量標準品 (protein ladder marker) 購自慧眾生物科技有限公司 (Bioman, Taipei, Taiwan)。
3. 基因操作及表現之質體 pET-29a(+) 購自 Novagen (Madison, WI, USA)。
4. 限制酶 (restriction enzyme)、T4 DNA 接合酶 (ligase)、*Taq* DNA 聚合酶 (polymerase)、dNTP、100 bp DNA 分子量標準品 (DNA ladder marker) 和 DNA loading dye 購自伯昂興業有限公司 (Bertec, Taipei, Taiwan)。

#### (二) 儀器設備

1. 分光光度計 (Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
2. 恆溫振盪培養箱 (Model 717, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
3. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
4. PCR 反應器 (PCR Express, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
5. 無菌操作台 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
6. 超音波破碎機 (Misonix XL-2020, Farmingdale, NY, USA)
7. 快速蛋白質液相層析系統 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)

8. 親和性管柱 HisTrap<sup>TM</sup> HP 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)
9. 劃分收集器 (Model Frac-900, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)
10. 濃縮管 (Amicon<sup>®</sup> Ultra-15, 30 kDa cutoff, Millipore, Billerica, MA, USA)
11. 照相系統 UVP AutoChemi image system (UVP Inc., Upland, CA, USA)
12. ELISA reader (SpectraMax<sup>®</sup>, Kelowna International Scientific Inc., Taipei, Taiwan)
13. pH meter (Model 6071, Jenco Co., San Diego, CA, USA)
14. 滅菌釜 (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
15. 超音波振盪器 (Model 690D, ETL testing laboratories Inc., Cortland, NY, USA)
16. 流式細胞儀 (FACSScan-LSR, Becton-Dickinson Lmmunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)
17. 高解析度細胞影像分析系統 (DeltaVision Core, Applied Precision, Inc., WA, USA)
18. 冷凍乾燥機 (Bench Top3R, Virtis Co., Tokyo, Japan)
19. 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑過濾膜 (Millipore, Billerica, MA, USA)
20. 高效液相層析儀幫浦 (PU2089 plus, Jasco Co., Tokyo, Japan)
21. HPLC 樣本注入器 (7725i, Rheodyne Co., Robert Park, CA, USA)
22. HPLC UV/ VIS 偵測器 (UV-2075, Jasco Co., Tokyo, Japan)
23. 層析管柱 Luna<sup>®</sup> C18 (30 mm x 2 mm, i.d. 3  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

## 二、實驗方法

### (一) 建構細胞表面表現脂肪酶系統

#### 1. 菌株、培養基和質體

本研究基因操作及表現菌株為大腸桿菌 BL21(DE3)，質體保存菌株為大腸桿菌 DH5 $\alpha$ 。

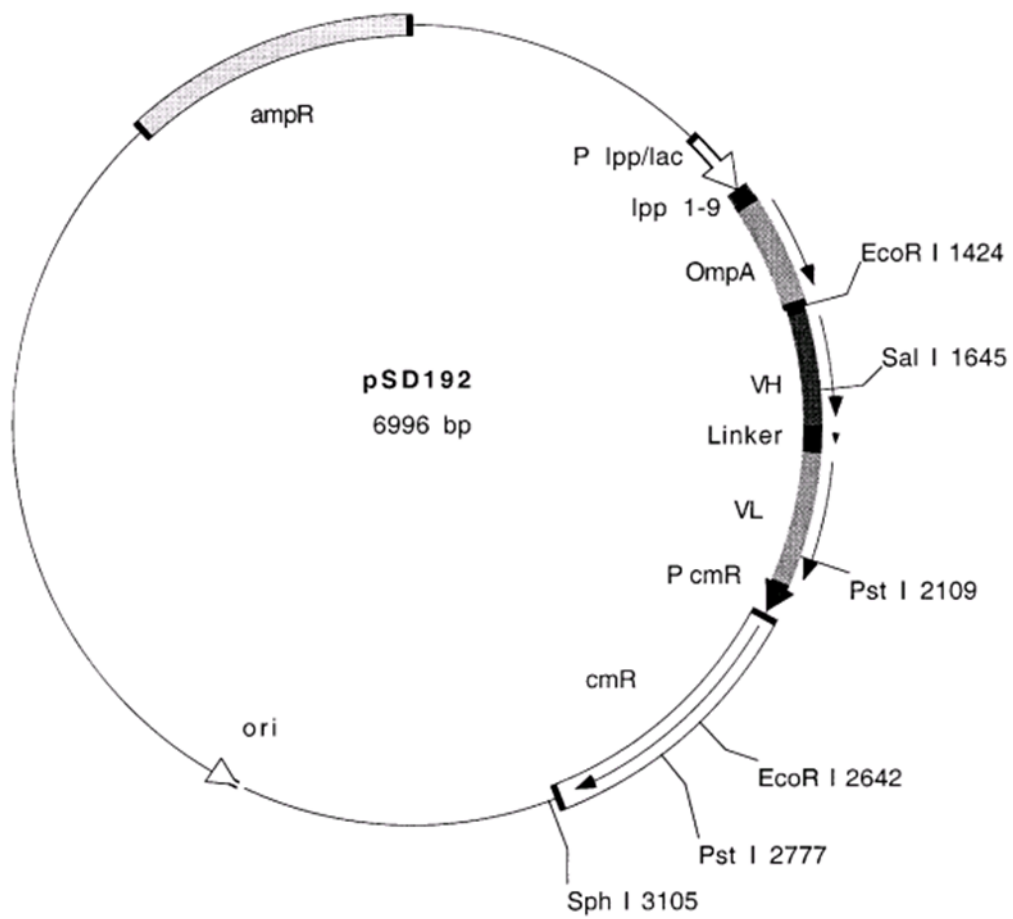
本研究使用的脂肪酶基因，為潘子明教授研究室選殖自嗜熱菌株 *Geobacillus thermocatenulatus* NTU 03 之熱穩定性脂肪酶 (r03Lip)，表現質體為 pETr03Lip，可異源表現 r03Lip 於大腸桿菌 BL21(DE3) (GenBank: FJ774007.1) (Shih and Pan, 2010)。Lpp-OmpA 基因來源為質體 pSD192，其帶有 Lpp-OmpA-scFv 基因，分別為脂蛋白 (lipoprotein, Lpp) 之前 9 個胺基酸 (aa 1-9)、外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA) 之第 46-159 胺基酸 (aa 46-159) 與 single chain Fv (scFv) 抗體基因，可將 scFv 表現於大腸桿菌 JM109 細胞表面 (圖 6)(表 5) (Daugherty et al., 1998)。

大腸桿菌培養於含 30  $\mu$ g/L kanamycin 的 Luria broth (kam-LB) 中。脂肪酶活性篩選用的培養基—三丁酸甘油酯瓊脂平板 (tributylin agar plate, TBA)，為上述 kam-LB 另添加 1% (v/v) tributyrin (TB)、1.5% 瓊脂 (agar)、1% 阿拉伯膠 (gum arabic)、0.5% Tween 80 和 10 mM CaCl<sub>2</sub> (Lawrence et al., 1967)。具適當脂肪酶活性之轉形株，於 TBA 篩選平板上會形成透明圈 (Samad et al., 1989; Sharma et al., 2001)。

## 2. 聚合酶鏈連鎖反應產物純化與回收

使用 Bioman 公司 PCR/gel extraction kit (Bioman, Taipei, Taiwan)，實驗方法皆依照使用說明書，詳細步驟如下：取適量 PCR 產物至微量離心管，加入 5 倍體積 PG 緩衝液混合均勻。將 PG 管柱置於 2 mL 收集管，取上述之混合液至 PG 管柱，13,000 x g 離心 30 秒，移除收集管中液體並置回 PG 管柱，加入 600  $\mu$ L 清洗緩衝液 (wash buffer) 於 PG 管柱中，13,000 x g 離心 30 秒，移除收集管中液體並置回 PD 管柱，再以 13,000 x g 離心 3 分鐘乾燥吸附膜，轉移 PG 管柱至乾淨微量離心管，加入 50  $\mu$ L 溶離緩衝液 (elution buffer) 並置於室溫下 2 分鐘直至吸附膜完全吸收緩衝液後，13,000 x g 離心 2 分鐘，以 2% 瓊脂膠體電泳分析結果，PCR 產物保存於 -20°C 冰箱。





(Daugherty et al., 1998)

圖 6 質體 pSD192 圖譜

Figure 6 The surface display vector pSD192

表 5 實驗中使用之菌株、質體和引子

Table 5 Strains, plasmids and oligonucleotides

Materials	Characteristics	Source and reference
<i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal λ(DE3[<i>lacI ind1 sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>])</i>	Novagen
DH5α	F'( <i>φ80 dlac Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 lambda-thi-l gyrA96 relA1</i> )	Bioman
Plasmid		
pET29a (+)	P <sub>T7</sub> :: <i>gst::6x his</i> , Km <sup>R</sup>	Novagen
pETr03Lip	P <sub>T7</sub> :: <i>gst::r03Lip::6x his</i> , Km <sup>R</sup>	Shih and Pan, 2010
pETOmpA	P <sub>T7</sub> :: <i>Lpp-OmpA::6x his</i> , Km <sup>R</sup>	This study
pETOmpA-r03Lip	P <sub>T7</sub> :: <i>Lpp-OmpA::r03Lip::6x his</i> , Km <sup>R</sup>	This study
pSD192	P <sub>lpp-lac</sub> :: <i>Lpp-OmpA::scFv(dig)</i> , Am <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Daugherty et al., 1998
Oligonucleotides		
Lpp-OmpA-F	5'-ATTACATATGAAAGCTACTAAACTGGTAC-3'	Wang and Chao, 2006
Lpp-OmpA-R	5'-CATGGATCCCCATGGGTGTCCGACGAGTGC-3'	Wang and Chao, 2006
T7 promoter primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Wallace et al., 1981
T7 terminator primer	5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Wallace et al., 1981

### 3. 瓊脂膠體電泳分析

取所需量之瓊脂 (agarose)，以 TAE 緩衝液 [50 mM Tris-HCl、50 mM 醋酸 (acetic acid) 和 1 mM EDTA，pH 8.0] 混合，經微波爐加熱溶解後放置於室溫，稍冷後倒至鑄膠盤上，並插入齒梳 (comb)。待凝結後取瓊脂膠至電泳槽中，以 TAE 緩衝液覆滿。取欲電泳之 DNA 加入染液 (DNA loading dye)，混合後加入瓊脂凹槽中，同時注入 DNA 分子量標準品，以 100 V 進行電泳約 30 分鐘。電泳結束後取出膠片以 0.5  $\mu\text{g/mL}$  溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染色 10 分鐘，於水中脫色 10 分鐘後置於紫外光下觀察色帶，與 DNA 標準分子量比較並推算相對分子量。

### 4. 大腸桿菌質體 DNA 抽取

使用 Bioman 公司 plasmid DNA miniprep kit (Bioman, Taipei, Taiwan)，實驗方法皆依照使用說明書，詳細步驟如下：挑含有質體之大腸桿菌單一菌落，接種至 10 mL LB 培養液並加入適量抗生素，於 37°C 培養 12-16 小時，取 1.5 mL 菌液至微量離心管，13,000 x g 離心 1 分鐘，移除上清液後加入 200  $\mu\text{L}$  PD1 緩衝液重新懸浮菌體，加入 200  $\mu\text{L}$  PD2 緩衝液翻轉微量離心管數次，置於室溫 2 分鐘待菌液呈透明，加入 300  $\mu\text{L}$  PD3 緩衝液迅速翻轉微量離心管數次，13,000 x g 離心 2 分鐘。將 PD 管柱置於 2 mL 收集管，取上述之上清液至 PD 管柱，13,000 x g 離心 30 秒，移除收集管中液體並置回 PD 管柱，加入 400  $\mu\text{L}$  W1 緩衝液於 PD 管柱中，13,000 x g 離心 30 秒，移除收集管中液體並置回 PD 管柱，加入 600  $\mu\text{L}$  清洗緩衝液於 PD 管柱中，13,000 x g 離心 30 秒，移除收集管中液體並置回 PD 管柱，再以 13,000 x g 離心 3 分鐘乾燥吸附膜，轉移 PD 管柱至乾淨微量離心管，加入 50  $\mu\text{L}$  溶離緩衝液並置於室溫下 2 分鐘直至吸附膜完全吸收緩衝液後，13,000 x g 離心 2 分鐘，以 1.2% 瓊脂膠體電泳分析結果，質體 DNA 保存於 -20°C 冰箱。

### 5. 建構質體 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip

參考 Wang and Chao 之研究 (Wang and Chao, 2006)，設計引子對

Lpp-OmpA-F: 5'-ATTACATATGAAAGCTACTAAACTGGTAC-3' 和  
Lpp-OmpA-R: 5'-CATGGATCCCCATGGGTGTCCGGACGAGTGC-3', 以質體  
pSD192 為模板進行 PCR 增殖, 條件為: 94°C 反應 5 分鐘, 再以 94°C 反應  
30 秒、60°C 反應 30 秒和 72°C 反應 1 分鐘, 重複 30 個循環, 最後 72°C 反  
應 20 分鐘。PCR 放大之 Lpp-OmpA 基因片段, 經限制酶 *NdeI*-*BamHI* 於  
37°C 作用 16 小時後, 以 T4 DNA 接合酶於 16°C 反應 1 小時接合至相同限  
制酶作用之質體 pET29a (+) 和 pETr03Lip, 得到質體 pETOmpA 和  
pETOmpA-r03Lip, 轉形至大腸桿菌 BL21(DE3), 可表現表面蛋白 OmpA 與  
Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白。

#### 6. 大腸桿菌勝任細胞製備與轉形作用

使用商業化大腸桿菌 BL21(DE3) 勝任細胞 (HIT-21 Value  $10^7$ ) 或自行製備, 詳細方法如下: 取出貯存之大腸桿菌菌種, 以劃單一菌落方式接種至 SOB 固體培養基 [含 2% 胰蛋白胨 (tryptone)、0.5% 酵母菌萃取物 (yeast extract)、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.5% 瓊脂 (agar) 和 10 mM  $Mg^{2+}$ ], 37°C 培養 16-20 小時。取單一菌落接種至 40 mL SOB 液態培養基 (含 2% 胰蛋白胨、0.5% 酵母菌萃取物、10 mM NaCl、2.5 mM KCl 和 10 mM  $Mg^{2+}$ ), 37°C 培養至細胞數為  $4-7 \times 10^7$ /mL。收集菌液於離心管中, 置冰浴上 10 分鐘, 1,000 x g 低溫離心 (4°C) 15 分鐘, 移除上清並加入 13 mL 冰冷 0.1 M  $CaCl_2$  混合均勻, 置冰浴上 10 分鐘。重複上述步驟 2-3 次, 1,000 x g 低溫離心 (4°C) 15 分鐘, 移除上清並加入 1.5 mL 冰冷 0.1 M  $CaCl_2$  混合均勻, 每 100  $\mu$ L 分裝至微量離心管, 未使用之勝任細胞以液態氮冷凍後保存於 -70°C 冰箱。取預冷過質體 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip (<10  $\mu$ L) 加入勝任細胞中混合均勻, 置冰浴上 20-40 分鐘, 42°C 處理 90 秒, 置冰浴上 2 分鐘後加入 800  $\mu$ L SOC (上述 SOB 液態培養基中加入 20 mM 葡萄糖), 37°C 培養 30-60 分鐘, 將轉形液塗佈於含適量抗生素之 LB 或 TBA 培養基, 培養 16-20 小時。挑選具有活性的單一菌落, 以 T7 promoter 引子和 T7 terminator 引子進行 colony PCR, 確認轉殖基因片段大小後,

委託明欣生物有限公司 (Missionbiotech, Taipei, Taiwan) 定序。以電腦軟體 Vector NTI advance 10 (Invitrogen Co., NY, USA) 分析基因序列，與已知的 OmpA 和 r03Lip 序列比對，確認基因序列無誤且沒有發生突變後，進行後續實驗。

## (二) 表現融合蛋白

### 1. 培養方式

取出貯存之大腸桿菌 BL21(DE3)、大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip]、大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] 和大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip]，接種至 10 mL 含適量抗生素的 LB 液態培養基，37°C 培養隔夜，取 1% 菌液重新接種至 100 mL 含適量抗生素的 LB 液態培養基，37°C 培養至 0.6 OD<sub>600nm</sub>，加入 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 後於 25°C 培養 24 小時，誘導表現 r03Lip、OmpA 與融合蛋白 Lpp-OmpA-r03Lip，未轉形之大腸桿菌 BL21(DE3) 為負控制組別。

### 2. 細胞膜分離

參考 Francisco 等人之研究 (Francisco et al., 1992)，分離細胞膜方式為：取上述表現蛋白的菌液，8,000 x g 離心 10 分鐘收集菌體，加入 1/10 倍菌液體積 PBS 緩衝液 [含 1 mM EDTA 和 10  $\mu$ g/mL 溶菌酶 (lysozyme)] 回溶菌體，以超音波破碎機於冰上處理 2 分鐘，條件為：功率 85.5-95 W，處理時間 10 秒 (pulse on time 10 sec)，停滯時間 10 秒 (pulse off time 10 sec)。8,000 x g 離心 10 分鐘移除細胞殘骸，取上清液以 170,000 x g 超高速離心 1.5 小時後，收集上清液至微量離心管，為可溶蛋白劃分 (soluble fraction)；取 PBS 緩衝液 (含 0.01 mM MgCl<sub>2</sub> 和 2% Triton X-100) 回溶沉澱，於 4°C 反應隔夜後，20,000 x g 離心 1.5 小時，收集上清液至微量離心管，為細胞膜劃分 (membrane fraction)。

### 3. r03Lip 分離與純化

取大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip]，依上述培養方式誘導 r03Lip 大量表

現，經細胞膜分離後，將可溶蛋白劃分以快速蛋白質液相層析系統 (fast protein liquid chromatography, FPLC) 純化，管柱為 HisTrap<sup>TM</sup> HP 1 mL。使用之緩衝液為：緩衝液 A：50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 300 mM NaCl，pH 8.0 和緩衝液 B：50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM NaCl 和 500 mM imidazole，pH 8.0。將樣本以濃縮管置換為緩衝液 A (含 10 mM imidazole)，再經過 0.22  $\mu$ m 孔徑濾膜過濾。樣本注入體積 500  $\mu$ L，流速 1 mL/min，分析條件為：98% A + 2% B (10 mM imidazole) 平衡 20 倍管柱體積 (column volume, CV)，注入樣本，96% A + 4% B (20 mM imidazole) 流洗 10 倍管柱體積，最後以梯度變換方式，於 10%-100% B (50 mM-500 mM imidazole) 區間，每 10% 為間隔流洗 5 倍管柱體積，溶離之樣本以劃分收集器 (fraction collector) 收集。樣本偵測光波長為 280 nm，並以脂肪酶水解活性分析確認結果。

#### 4. r03Lip 多株抗體製備

多株抗體製備方式是參考 Wakayama 等學者之研究 (Wakayama et al., 2006)。使用 10 週齡之 Wistar 大鼠為免疫處理實驗動物。抗原製備方式依上述 r03Lip 分離與純化，收集具脂肪酶活性的劃分，以濃縮管 (Millipore) 置換為 PBS 緩衝液並濃縮後，取 200  $\mu$ g r03Lip 與佐劑 (ImmunoFast<sup>TM</sup> adjuvant, Visual Protein Co., Taipei, Taiwan) 以三向閥 (3-way stopcocks) 混合均勻後，於背部皮下注射至大鼠體內，詳細免疫與血清收集時間如圖 7 所示。於第 0 週注射佐劑乳化疫苗，第 2 週追加疫苗 (booster)，期間於第 2 週和第 3 週以眼窩採血方式收集血液，取得之血液放置於室溫 1 小時，再於 4°C 下放置隔夜。待血液凝固後，13,000 x g 離心 30 分鐘，小心取出血清。血清中含有針對 r03Lip 之特异性抗體，可運用於西方點墨法、流式細胞儀 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和免疫染色實驗。

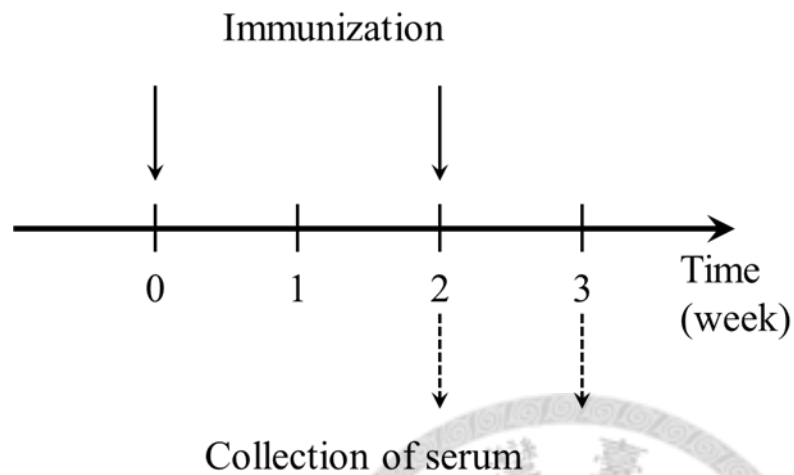


圖 7 以 r03Lip 免疫 Wistar 大鼠與血清收集時間

免疫時間為第 0 週和第 2 週，注射 r03Lip 佐劑乳化疫苗，期間於第 2 週和第 3 週以眼窩採血方式收集血清

Figure 7 Immunization method. The initial immunization was performed at 0 week followed by the booster after 2 weeks. Serum were collected at 2 and 3 weeks after the initial immunization

## 5. SDS-PAGE 和西方點墨法

使用奇異公司 (GE Healthcare) 10% Amersham™ ECL™ gel 和 1x Amersham™ ECL™ gel running buffer，電泳設備為 Amersham ECL gel box (GE Healthcare)。實驗方法皆依照使用說明書，詳細步驟如下：取 180 mL 1x gel running buffer 加入 gel box 凹槽中，拆掉 10% 膠體包裝並置於 gel box 上，覆蓋 2 mL 1x gel running buffer 於樣本槽上。取同體積的 2x SDS-PAGE 樣本溶液 (250 mM Tris base、4 mM EDTA、4% SDS 和 10%  $\beta$ -mercaptoethanol) 和 2x 追蹤染劑 (tracking dye) 加入蛋白質樣本，混合均勻後於 100°C 加熱 5 分鐘，短暫離心後注入樣本槽，同時注入蛋白分子量標準品 (protein ladder marker)，以 160 V 進行電泳 1 小時。電泳結束取出膠片置於方盒中，加入適量 CBR 染色液 (0.13% coomassie brilliant blue R-250、45% 甲醇和 9% 醋酸)，置於旋轉平台 50 rpm 慢速搖盪 15 分鐘，倒掉 CBR 染色液後加入適量脫色液 (20% 甲醇和 10% 醋酸) 脫色 1 小時，掃描膠片儲存之，與標準分子量比較並推算分子量大小。西方點墨法則不進行 CBR 染色，電泳結束後，取出膠片浸泡於轉印緩衝液 (25 mM Tris base 和 0.192 M glycine, pH 8.3) 20-30 分鐘，剪下適當大小聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 轉印膜以甲醇浸溼後，浸泡於轉印緩衝液 10 分鐘。取出轉印槽，依序鋪上海綿、濾紙、聚偏二氟乙烯轉印膜、膠片、濾紙和海綿，加入轉印緩衝液潤濕並驅趕氣泡，蓋上電源蓋以 400 mA 轉印 40 分鐘。轉印結束後，小心取出轉印膜浸洗於 PBST (1x PBS 緩衝液加入 0.5% Tween 20) 3 次，每次 10 分鐘，倒去 PBST 後加入 blocking 緩衝液 (5% 脫脂奶粉溶於 PBST)，置於旋轉平台 50 rpm 慢速搖盪 1 小時，倒去 blocking 緩衝液後以 PBST 浸洗 3 次，加入一次抗體 (1:500-10000) 浸洗 1 小時，PBST 浸洗 3 次，加入二次抗體 (1:500-10000) 浸洗 1 小時，PBST 浸洗 3 次。加入 enhanced chemiluminescence (ECL) (WesternBright™ ECL-spray, Advansta Inc., CA, USA) 反應劑反應 1 分鐘，以 UVP AutoChemi image system 呈色照相。



## 6. FACS 和螢光顯微鏡

取上述表現蛋白的菌液，8,000 x g 離心 10 分鐘收集菌體，以 PBS 緩衝液清洗數次，重新懸浮菌體於 PBS 緩衝液 (含 1% BSA) 並稀釋至 0.5 OD<sub>600nm</sub>。加入一次抗體 (1:1000-10000)，30°C 反應 2 小時，PBS 清洗 3 次，加入 fluorescein isothiocyanate (FITC) 標定之二次抗體 (1:100)，30°C 反應 1.5 小時，PBS 清洗 5 次，加入 500 µL PBS 重新懸浮菌體，以流式細胞儀 (flow cytometer) 和高解析度細胞影像分析系統 (The fluorescent live-cell microscopy) 觀察並照相。

## 7. 脂肪酶之水解活性分析

脂肪酶水解活性分析法是參考 Kordel 等人所建立，利用對-硝基酚棕櫚酸 (*p*-nitrophenyl plamitate, *p*NPP) 為酵素基質的分析方法 (Kordel et al., 1991)。*p*NPP 經脂肪酶分解後，產生對-硝基酚 (*p*-nitrophenol, *p*NP)，可以 ELISA reader 測量 OD<sub>405nm</sub> 進行定量。此分析條件下測得之 *p*NP 消光係數為  $1.5 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$ 。酵素活性單位定義為：1 分鐘內產生 1 µmole 的 *p*NP 所需之酵素量。使用之反應溶液為：溶液 A：16.5 mM *p*NPP 溶於異丙醇、溶液 B：50 mM Tris-HCl、0.4% (v/v) Triton X-100 和 0.1% (w/v) 阿拉伯膠，pH 8.0 和溶液 C：取 1 mL 溶液 A 加入 9 mL 溶液 B，振盪混合 10 分鐘後備用。以 PCR 反應器 (PCR thermocycler) 為溫度控制器，測試脂肪酶水解活性。

取表現融合蛋白的菌液，8,000 x g 離心 10 分鐘收集菌體，以 PBS 緩衝液清洗 3 次後稀釋至 1.0 OD<sub>600nm</sub>。取 10 µL 純化過之脂肪酶溶液 (胞內大量表現之脂肪酶) 或菌液，與 90 µL 溶液 C 混合均勻後加入 PCR 專用之 96 孔盤，置於 PCR 反應器反應 5 分鐘後，以 ELISA reader 測量 OD<sub>405nm</sub> 進行定量。

最適反應溫度之測定：於溫度 25°C 到 80°C 間，每間隔 5°C 測量脂肪酶之相對活性；熱穩定性之測定是將樣本置於各溫度下處理 30 分鐘後，與未處理的樣本於 55°C 反應 5 分鐘後，測量其殘餘活性。最適反應 pH 之測定：使用 50 mM 之醋酸緩衝液 (acetate buffer) (pH 4-6)、磷酸鉀緩衝液 (potassium

phosphate buffer) (pH 6-8)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8-9)、甘胺酸-氫氧化鈉緩衝液 (glycine-NaOH buffer) (pH 9-11)、磷酸氫二鈉-氫氧化鈉緩衝液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$  buffer) (pH 11-12) 和氯化鉀-氫氧化鉀緩衝液 (KCl/KOH buffer) (pH 12-13)。將樣本置於各 pH 之緩衝溶液中，於 55°C 反應 5 分鐘後，測量其活性；pH 穩定性是將樣本置於各 pH 值處理 30 分鐘後，與未處理的樣本於 55°C 反應 5 分鐘後，測量其殘餘活性。

探討不同金屬離子 (10 mM)、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (10 mM)、界面活性劑 (detergent) (10%)、還原劑 (reducants) (10 mM) 與 phenylmethane sulfonylfluoride (PMSF) (1 mM) 對酵素活性的影響，是將上述各成分加入溶液 C 後，加入各樣本於 55°C 反應 5 分鐘後，測量其活性。探討有機溶劑對酵素活性的影響，是以 50% (v/w) 有機溶劑與樣本混合，55°C 反應 5 分鐘後，測量其活性；穩定性測試是將上述樣本於 25°C 下，100 rpm 攪拌處理 30 分鐘，與未處理的樣本於 55°C 反應 5 分鐘後，測量其殘餘活性。

## 8. 大腸桿菌生長曲線和細胞膜穩定性分析

研究指出表現異源蛋白至細胞表面，可能會破壞細胞膜穩定性或抑制宿主生長 (Georgiou et al., 1996; Georgiou et al., 1997)，本實驗探討 r03Lip 表現於大腸桿菌細胞表面對宿主之影響。實驗方法如下：依上述培養方式，於不同時間點以分光光度計測量  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ；CFU (colony forming unit) 之計算是將菌液序列稀釋後，塗布於含 30  $\mu\text{g/mL}$  kanamycin 的 LB 瓊脂膠平板上，37°C 培養 16 小時後計算菌落數量。細胞膜穩定性分析：取上述表現蛋白的菌液，8,000 x g 離心 10 分鐘收集菌體，以 PBS 緩衝液清洗數次，重新懸浮菌體於 PBS 緩衝液並稀釋至 1.0  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ，加入 0.1% SDS 或 2 mM EDTA 處理 5 小時，每小時取適量菌液以分光光度計測量  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 。

### (三) 全細胞之生物轉化

#### 1. 大腸桿菌全菌體生物觸媒製備

培養大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] 和大腸桿菌 BL21(DE3) [pETompA-r03Lip] 細胞於 100 mL 含適量抗生素的 LB 培養基中，加入 1 mM IPTG 誘導，於 25°C 培養 24 小時後收集菌體，以 PBS 緩衝液清洗 3 次並凍乾備用。

#### 2. 探討 FAIPEs 之反應條件

生質柴油產率受到油醇莫耳比、反應溫度、水含量與催化劑使用量等因子影響。本實驗探討上述因子對脂肪酸異丙酯 (fatty acid isopropyl esters, FAIPEs) 生產之影響。使用之精緻大豆沙拉油購自本地超市，脂肪酸組成：棕櫚酸 (palmitic acid) 11.4%、硬脂酸 (stearic acid) 4.4%、油酸 (oleic acid) 20.8%、亞油酸 (linoleic acid) 53.8%、亞麻油酸 ( $\alpha$ -linolenic acid) 9.3% 和花生酸 (arachidic acid) 0.3%。使用之有機溶劑皆為層析級或更高等級，使用前以分子篩 (molecular sieves, nominal pore diameter 4Å) 去除水分。反應系統中分別加入不同量的油和醇、水含量 (v/w) (相對於油重) 或生物觸媒使用量 (w/w) (相對於油重)，溶於 4 倍體積之 n-hexane (相對於油重)，於 50°C、55°C 和 60°C 下以 180 rpm 攪拌速率反應 24 小時，再以下述 FAIPEs 分析方法分析其轉化率。

#### 3. 以油炸廢棄油生產 FAIPEs

油炸廢棄油分為炸薯條油與炸雞塊油，精緻大豆油、薯條與雞塊皆購自本地超市。製備過程如下：取 1 L 精緻大豆油，緩慢加熱至 180°C，加入 10% (w/v) (相對於油體積) 薯條或雞塊烹調 3 分鐘後，取出油炸品並加入下一批油炸品，間隔時間以油脂老化試紙 (3M<sup>TM</sup> oil quality test strips, 3M Co., Taipei, Taiwan) 測試酸價並取樣，直至油脂達更換標準 (酸價值  $\geq 2.0$  mg KOH/g oil) 時結束。靜置油炸樣本，冷卻至室溫後，依照中華民國國家標準 (Chinese national standards, CNS) 分析酸價、過氧化價和碘價，並依上述 FAIPEs 之反應條件測量全菌體生

物觸媒對 FAIPEs 的轉化率，條件為：油醇莫耳比 1:4、水含量 10% (v/w) (相對於油重) 與生物觸媒使用量 10% (w/w) (相對於油重)，於 55°C 下反應 20 小時，再以下述 FAIPEs 分析方法分析其轉化率。

#### 4. 全菌體生物觸媒回收再利用

取精緻大豆油、炸薯條廢棄油與炸雞塊廢棄油為原料，依上述 FAIPEs 之反應條件測量全菌體生物觸媒對 FAIPEs 的轉化率。反應結束後過濾之，回收全菌體生物觸媒，以異丙醇清洗後風乾，應用於下一次反應。

#### 5. FAIPEs 分析

FAIPEs 分析方法是參考 Holčapek 等人之研究 (Holčapek et al., 1999)，以高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析生質柴油並加以調整。使用之移動相為：移動相 A：100% acetonitrile、移動相 B：isopropanol-hexane (5:4, v/v) 和移動相 C：去離子水，移動相皆經過 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾與超音波振盪除氣。待樣本反應完成，取定量體積之樣本以移動相 B 稀釋並經過 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑濾膜過濾，注入體積為 10  $\mu\text{L}$ ，流速為 1 mL/min，管柱溫度 40°C。移動相梯度設定為：70% A + 30% C 流洗 30 分鐘，再於 30 分鐘內 (program 30-60 min) 以梯度變換切換至 100% A，再於 10 分鐘內 (program 60-70 min) 以梯度變換切換至 50% A + 50% B 後流洗 5 分鐘 (program 70-75 min)。樣本偵測光波長為 205 nm，FAIPE 之成分是以脂肪酸異丙酯標準品的留滯時間確認。

### 第三章 結果

#### 一、建構細胞表面表現脂肪酶系統

##### (一) 建構 pETOmpA 與 pETOmpA-r03Lip 質體

本研究欲建立嗜熱菌 *Geobacillus* sp. NTU 03 lipase (r03Lip) 之大腸桿菌細胞表面表現系統。質體 pETOmpA-r03Lip 可大量表現 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白至大腸桿菌 BL21(DE3) 細胞表面 (圖 8); pETOmpA 為控制組別, 可單獨表現 Lpp-OmpA 至細胞表面 (圖 9)。使用 pSD192 為模板, 進行 PCR 增殖 *Lpp-OmpA* 基因片段, 約 438 bp (圖 10), 經 *NdeI*-*BamHI* 作用後接合至質體 pET29a (+) 和 pETr03Lip, 得到質體 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip。以熱衝擊法轉形至大腸桿菌 BL21(DE3) 中, 塗布於含 30  $\mu\text{g/mL}$  kanamycin 之 TBA 篩選平板, 挑選具透明圈之菌落 (圖 11), 進行 colony PCR 確認片段大小 (圖 10) 並委託明欣生物有限公司定序, 與已發表之 OmpA (GenBank: V00307.1) 和 r03Lip (GenBank: FJ774007.1) 序列比對, 確認無誤後進行後續實驗。

##### (二) Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之結構模擬

Lpp-OmpA-r03Lip 之胺基酸序列如圖 12 所示, 利用已知 OmpA (PDB ID: 1qjp) 和 *Geobacillus stearothermophilus* L1 脂肪酶 (PDB ID: 1ku0\_A) 之結晶結構為模板, 以電腦軟體 PyMOL (Schrödinger Co., New York, NY, USA) 模擬 Lpp-OmpA-r03Lip 之結構。由圖 13 所示, OmpA (第 46-159 胺基酸) 由 5 個  $\beta$  摺板 ( $\beta$ -sheet) 構成之穿膜蛋白, 其鑲嵌於大腸桿菌之外膜上, N 端位於胞膜區間且帶有 Lpp 訊息胜肽 (圖 13 紅色所示), C 端之胺基酸則穿越外膜裸露於細胞外 (圖 4)。OmpA 為 Lpp-OmpA 表現系統之 anchoring motif (AM) 主體, 可固定目標蛋白至細胞表面。另外, 本研究之目標蛋白—r03Lip, 其 N 端與

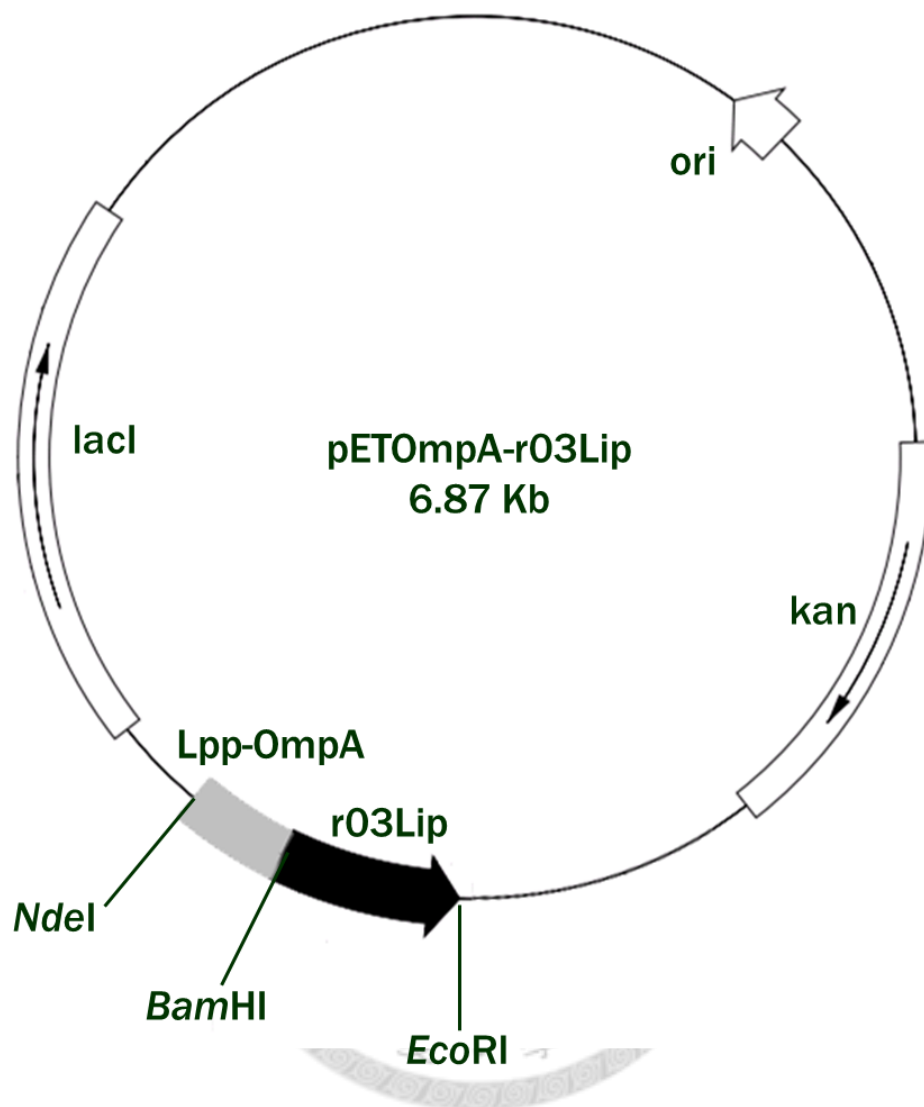


圖 8 質體 pETOMP A-r03Lip 圖譜

*lpp*：大腸桿菌脂蛋白前 9 個胺基酸之訊息序列；*ompA*：外膜蛋白 A 之第 46-159 個胺基酸片段；*r03Lip*：NTU03 脂肪酶基因；*lacI*：乳糖抑制子；

*Kan*：kanamycin 耐受基因；*ori*：複製起始點

Figure 8 Diagram of pETOMP A-r03Lip. *lpp*, the signal sequence and first nine N-terminal amino acids of the *E. coli* major outer membrane lipoprotein; *ompA*, amino acid 46-159 of outer membrane protein A; *r03Lip*, the mature NTU03 lipase protein; *lacI*, the lactose repressor; *Kan*, kanamycin-resistance gene; *ori*, the origin of replication

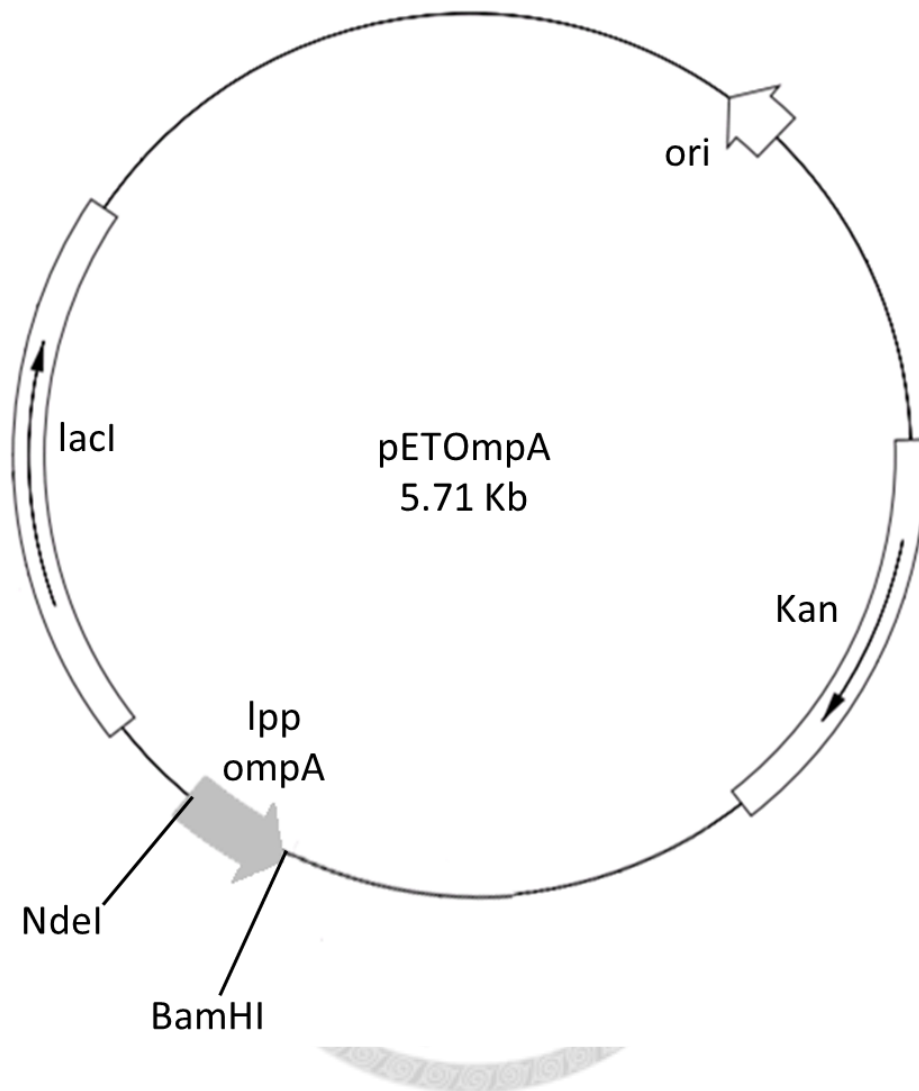


圖 9 質體 pETompA 圖譜

*lpp*：大腸桿菌脂蛋白前 9 個胺基酸之訊息序列；*ompA*：外膜蛋白 A 之第 46-159 個胺基酸片段；*lacI*：乳糖抑制子；*Kan*：kanamycin 耐受基因；*ori*：複製起始點

Figure 9 Diagram of pETompA. *lpp*, the signal sequence and first nine N-terminal amino acids of the *E. coli* major outer membrane lipoprotein; *ompA*, amino acid 46-159 of outer membrane protein A; *lacI*, the lactose repressor; *Kan*, kanamycin-resistance gene; *ori*, the origin of replication

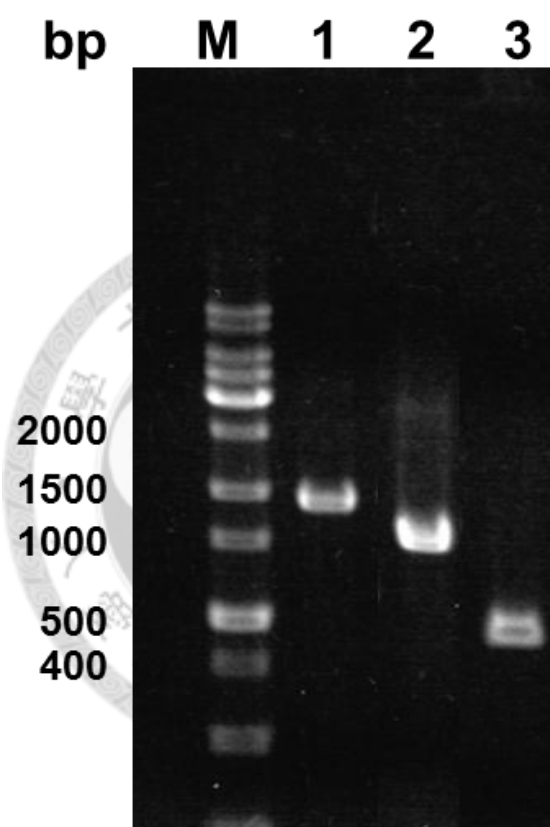


圖 10 瓊脂膠體電泳分析 PCR 產物之片段

1 : Lpp-OmpA-r03Lip ; 2 : r03Lip ; 3 : Lpp-OmpA

Figure 10 The PCR products analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 1: Lpp-OmpA-r03Lip; lane 2: r03Lip; lane 3: Lpp-OmpA



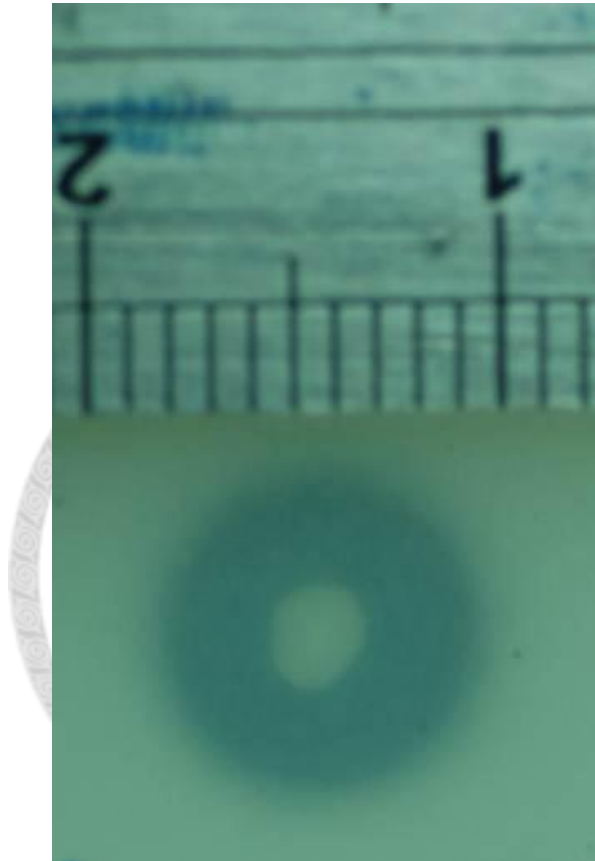


圖 11 轉形株於三丁酸甘油酯瓊脂平板上形成透明圈

Figure 11 The transformants create a clear zone on tributyrin agar plate

1	MKATKLVLGA	VILGSTLLAG	CSSNAKIDQG	INPYVGFEMG	YDWLGRMPYK
51	GSVENGAYKA	QGVQLTAKLG	YPITDDLDIY	TRLGGMVWRA	DTKSNVYGKN
101	HDTGVSPVFA	GGVEYAITPE	IATRLEYQWT	NNIGDAHTIG	TRPDNFWGSA
151	SPRANDAPIV	LLHGFTGWGR	EEMLGFKYWG	GVRGDIEQWL	NDNGYRTYTL
201	AVGPLSSNWD	RACEAYAQLV	GGTVDYGAH	AAKHGHARFG	RTYPGLLPEL
251	KRGGRIHIIA	HSQGGQTARM	LVSLLENGSQ	EEREYAKEHN	VLSPLFEGG
301	HRFVLSVTTI	ATPHDGTTLV	NMVDFTDRFF	DLQKAVLEAA	AVASNAPYTS
351	EIYDFKLDQW	GLRREPGESF	DHYFERLKRS	PVWTSTDAR	YDLSVPGAET
401	LNRWVKASPN	TYYLSFSTER	TYRGALTGNY	YPELGMNAFS	AIVCAPFLGS
451	YRNAALGIDS	HWLGNDGIVN	TISMNGPKRG	SNDRIVPYDG	TLKKGWVNDM
501	GTYNVDHLEV	IGVDPNPSFN	IRAFYLRRLAE	QLASLRPSSN	SSSVDKLAAA
551	LEHHHHHH				

圖 12 Lpp-OmpA-r03Lip 胺基酸序列

Lpp-OmpA : a. a. 1-149 ; r03Lip : a. a. 150-537 ; linker : a. a. 538-552 ; His-tag :

a. a. 553-558

Figure 12 The amino acids sequence of Lpp-OmpA-r03Lip

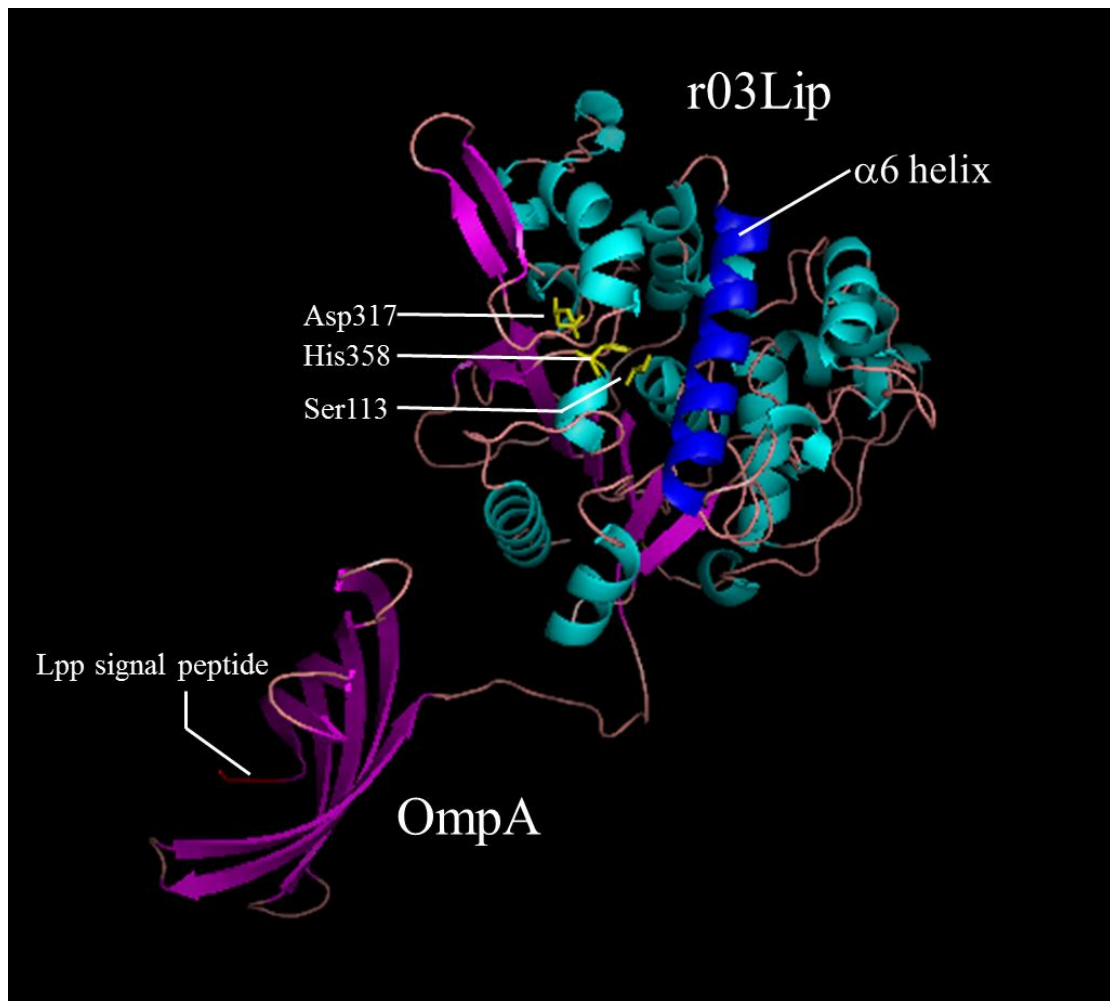


圖 13 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之結構模擬圖

$\alpha$  螺旋、 $\beta$  摺板和環分別以青綠色、紫色和褐色表示

Figure 13 Structure of Lpp-OmpA-r03Lip fusion protein.  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets and loops are shown in cyan, purple and brown

OmpA 之 C 端胺基酸融合，表現於細胞外並藉由胜肽鍵作用固定至細胞表面。r03Lip 之頂蓋 (lid) 由  $\alpha$ 6-helices 組成 (圖 13 藍色所示)，由結構模擬圖可見 r03Lip 之頂蓋面向細胞外，且催化中心含有催化 3 元體，分別為 Ser113、Asp317 和 His358 (圖 13 黃色所示)。

## 二、表現融合蛋白

### (一) 誘導表現融合蛋白

大腸桿菌 BL21(DE3)、大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip]、大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] 和大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] 經培養和誘導後，進行細胞膜分離，以 SDS-PAGE 分析蛋白表現情形，結果如圖 14 所示。pETr03Lip 於總蛋白 (total protein, T) 可見蛋白色帶 (band) (箭頭所指之處)，證實其大量表現 r03Lip，分子量為 43 kDa。表現之 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白包含 3 部分：Lpp-OmpA 片段 (16 kDa)、r03Lip (43 kDa) 和 His-tag (含連接之胺基酸片段) (2.2 kDa) (圖 12)，故推測分子量應為 61.2 kDa。然而 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 組未見明顯蛋白色帶變化，顯示 OmpA 及 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白表現量不高，無法由 SDS-PAGE 觀察。進一步以 His-tag 和 r03Lip 抗體進行西方點墨法，發現於 pETr03Lip 和 pETOmpA-r03Lip 組之總蛋白的 43 kDa 及 61.2 kDa 位置有蛋白色帶，顯示 r03Lip 與 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白成功表現。

### (二) 融合蛋白之表現位置

由 SDS-PAGE 和西方點墨法結果 (圖 15)，pETr03Lip 於總蛋白和可溶蛋白劃分 (soluble fraction, SF) 具明顯蛋白色帶 (圖 14 和圖 15)。由圖 15 發現 pETOmpA-r03Lip 於總蛋白和細胞膜劃分 (membrane fraction, MF) 具蛋白色帶，

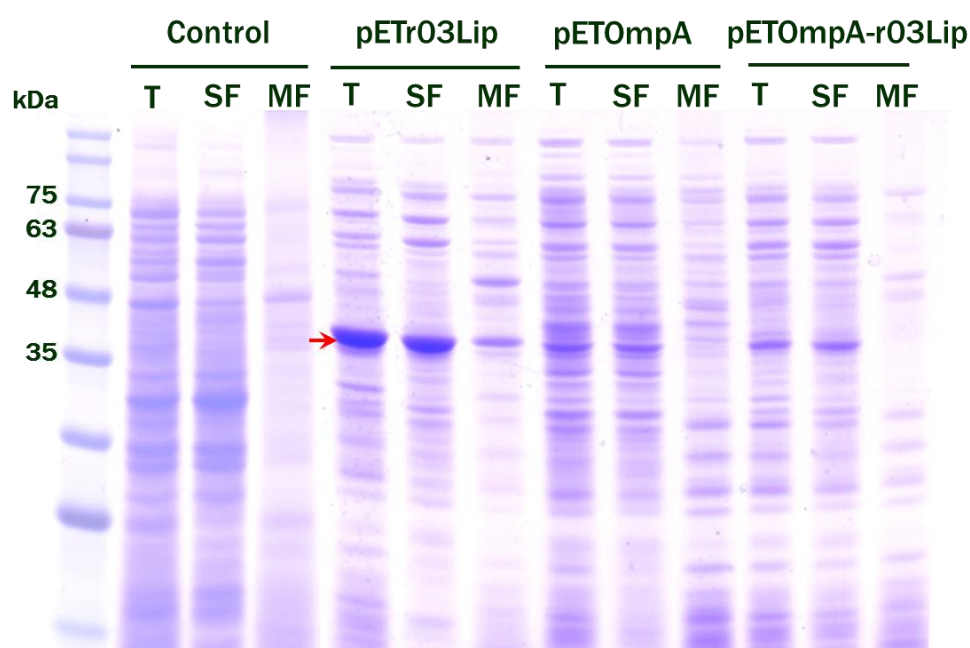


圖 14 以 SDS-PAGE 分析 r03Lip 融合蛋白之表現位置

T：總蛋白；SF：可溶蛋白劃分；MF：細胞膜劃分

Figure 14 Expression of r03Lip fusions analyzed by 10% SDS-PAGE. T, total protein;

SF, soluble fraction and MF, membrane fraction

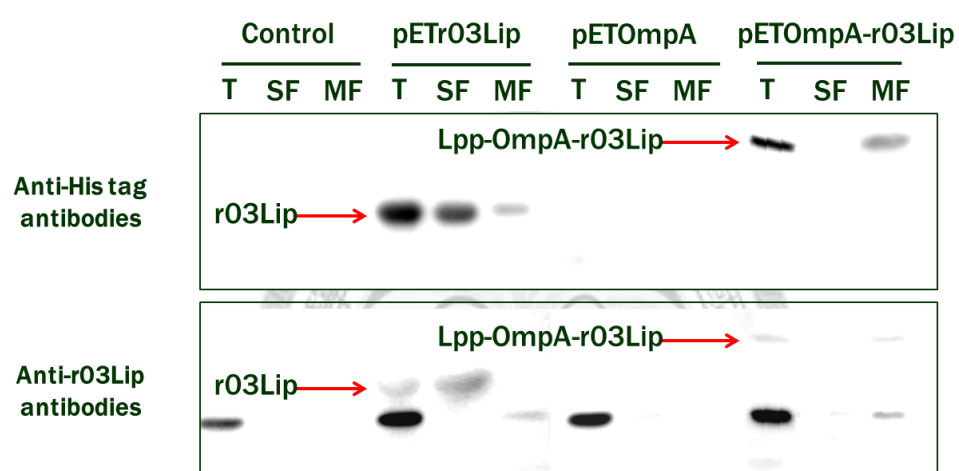


圖 15 以西方點墨法分析 r03Lip 融合蛋白之表現位置

T：總蛋白；SF：可溶蛋白劃分；MF：細胞膜劃分

Figure 15 Expression of r03Lip fusions analyzed by Western blot. T, total protein; SF, soluble fraction and MF, membrane fraction

而可溶蛋白劃分未觀察到。

進一步以螢光顯微鏡和流式細胞儀觀察蛋白表現位置。經誘導之大腸桿菌細胞，分別處理 His-tag、r03Lip 和 OmpA 一次抗體和帶有 fluorescein isothiocyanate (FITC) 之二次抗體後，以螢光顯微鏡和流式細胞儀觀察之，細胞表面若帶有上述抗體辨認之抗原，於細胞表面將會偵測到 FITC 放出之綠色螢光。由 FACS 之結果，pETOmpA 之細胞表面具 His-tag 和 OmpA 抗原，pETOmpA-r03Lip 之細胞表面具 His-tag、r03Lip 和 OmpA 抗原，然而 pETr03 和負控制組之細胞表面未觀察到 His-tag 和 r03Lip 抗原。OmpA 普遍存在於大腸桿菌之細胞表面 (Henning et al., 1979)，相較於 His-tag 和 r03Lip 抗體處理之組別，以 OmpA 抗體處理之大腸桿菌細胞皆有螢光表現，且 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 轉形株可誘導額外 OmpA 表現，故螢光強度增加 (圖 16)。另外由螢光顯微鏡結果發現，pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 可被 His-tag 抗體辨認，於細胞周圍具綠色螢光，而未轉形之大腸桿菌細胞則未見此現象 (圖 17)。以上結果顯示，pETr03Lip 大量表現 r03Lip 於細胞質內 (cytosolic expressed r03Lip, CEr03Lip)；pETOmpA 可單獨表現 OmpA 至細胞表面；將 r03Lip 與 Lpp-OmpA 融合之轉形株 pETOmpA-r03Lip，可表現融合蛋白 Lpp-OmpA-r03Lip 至細胞表面 (cell surface expressed r03Lip, CSEr03Lip)。

另外測量不同細胞劃分之脂肪酶活性，結果如表 6 所示。CSEr03Lip 於細胞膜劃分或以全菌體作為催化酵素時有較高之活性，分別為 r03Lip 之 2.3 和 1.2 倍，證實 CSEr03Lip 成功表現於細胞表面並具酵素活性；但測量總蛋白中的 CSEr03Lip 和 r03Lip 活性，發現 CSEr03Lip 為 CEr03Lip 之 0.1 倍，此結果顯示 CSEr03Lip 之表現量明顯低於 r03Lip (表 6)。

### (三) 大腸桿菌生長曲線和細胞膜穩定性分析

使用經修飾之細胞表面蛋白系統，表現之載體蛋白或目標蛋白運送至細胞表面上，可能抑制宿主細胞生長或破壞細胞膜結構之穩定性，造成細胞溶解 (cell

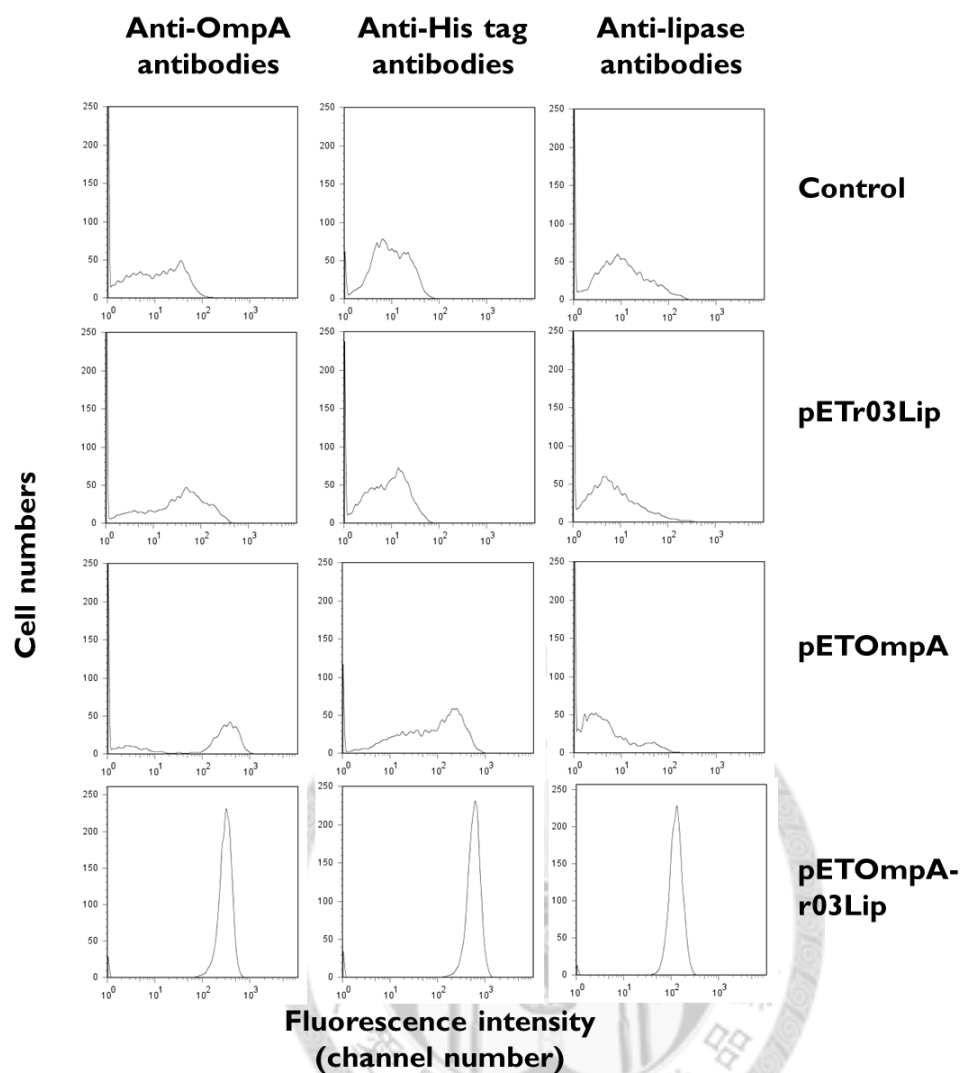


圖 16 以 FACS 觀察 r03Lip 融合蛋白之表現位置

經培養與誘導之大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] 和大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip]，分別處理 His-tag、r03Lip 和 OmpA 之一次抗體與 FITC 之二次抗體進行免疫染色，以流式細胞儀觀察結果。FACS：流式細胞儀；FITC：異硫氰酸螢光素

Figure 16 FACS histograms of recombinant *E. coli* BL21(DE3) cells to determine surface localization of r03Lip. Cells were treated with anti-His tag, anti-r03Lip and anti-OmpA antibody, followed by FITC-conjugated antibody. Antibodies used are shown at the top and plasmids are at the right side of the figure. FACS: fluorescence-activated cell sorting; FITC: fluorescein isothiocyanate



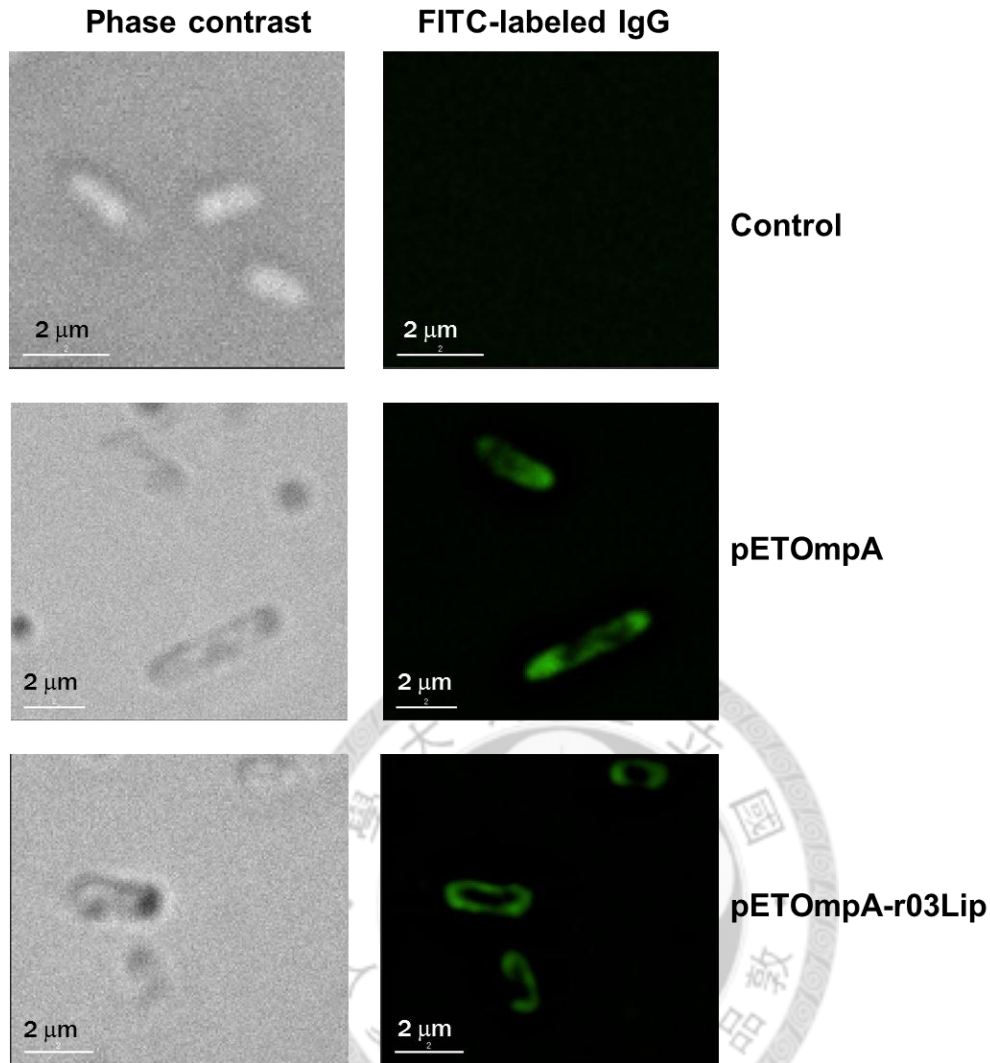


圖 17 以螢光顯微鏡觀察 OmpA 和 Lpp-OmpA-r03Lip 融合蛋白之表現位置  
經培養與誘導之大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] 和大腸桿菌 BL21(DE3)  
[pETOmpA-r03Lip]，以 His-tag 一次抗體和 FITC 之二次抗體進行免疫染  
色，於可見光和綠色螢光濾鏡下觀察結果。FITC：異硫氰酸螢光素

Figure 17 Microscopic observation of *E. coli* BL21(DE3) cells expressing Lpp-OmpA and Lpp-OmpA-r03Lip fusion protein. Cells were treated with anti-His-tag antibody, followed by goat anti-mouse FITC-conjugated antibody. Panels show phase contrast microscopy and fluorescence microscopy using green emission filters. FITC: fluorescein isothiocyanate

表 6 r03Lip 與 CSEr03Lip 之活性比較

Table 6 The cell fraction and whole-cell enzyme activity of r03Lip and CSEr03Lip

Fraction/cell	Specific activity		Total protein/cells		Total activity (U)	
	r03Lip	CSEr03Lip	r03Lip	CSEr03Lip	r03Lip	CSEr03Lip
Cell lysate	5282 U/mg	651 U/mg	3.27 mg	3.35 mg	17273	2181
Soluble fraction	6210 U/mg	209 U/mg	2.30 mg	2.06 mg	14285	431
Membrane fraction	163 U/mg	371 U/mg	4.19 mg	4.16 mg	683	1546
Cell	3529 U/OD <sub>600nm</sub>	4228 U/OD <sub>600nm</sub>	2.27 OD <sub>600nm</sub>	2.24 OD <sub>600nm</sub>	8016	9470
Freeze-dried cell	2137 U/mg	2435 U/mg	2.70 mg	2.43 mg	5769	5925

lysis) (Georgiou et al., 1996; Georgiou et al., 1997)。本實驗欲研究細胞表面蛋白 OmpA 和 CSEr03Lip 是否影響宿主細胞之生長及細胞膜穩定性。測量經培養與誘導之大腸桿菌生長曲線，由圖 18 結果顯示，pETOmpA 與 pETOmpA-r03Lip 可表現 OmpA 和 CSEr03Lip 至細胞表面，其生長情形與負控制組和 pETr03Lip 相似，於 10 小時生長至靜止期 (stationary phase) (圖 18)。

低濃度之界面活性劑可能會造成細胞溶解並改變細胞膜之通透性 (Georgiou et al., 1988)，以及部分細胞膜蛋白若發生突變，將會增加細胞對 EDTA 之敏感度，造成細胞溶解 (Sukupolvi and Vaara, 1989)。將培養與誘導之大腸桿菌細胞，分別處理 2 mM EDTA 和 0.1% SDS 後，測量其相對 OD<sub>600nm</sub> 值。圖 19 結果顯示，pETOmpA 與 pETOmpA-r03Lip 經 EDTA 處理 5 小時後，相對 OD<sub>600nm</sub> 為 97% 和 99%，與負控制組和 pETr03Lip 相似，顯示 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 轉形株未改變對 EDTA 之敏感度 (圖 19)。由圖 20 結果得知，大腸桿菌細胞經 SDS 處理 1 小時後，負控制組、pETr03Lip、pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 之相對 OD<sub>600nm</sub> 分別為 54%、39%、47% 和 45%，顯示 4 個組別皆有細胞溶解之現象，且 pETOmpA 和 pETOmpA-r03Lip 轉形株對 SDS 之耐受性較負控制組低，但相較於 pETr03Lip 卻具有較高之 SDS 耐受性 (圖 20)。

#### (四) r03Lip 與 CSEr03Lip 之酵素活性分析

本實驗欲探討 CSEr03Lip 之酵素活性是否改變。使用大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] 之全細胞酵素與游離態 r03Lip 進行脂肪酶活性分析。研究結果顯示，兩者之最適反應溫度為 55°C (圖 21)；經不同溫度處理 30 分鐘後，r03Lip 在 55°C 有 80% 之活性，而 CSEr03Lip 有 89% 之活性 (圖 22)。於 55°C 下兩者最適反應 pH 值為 9，且在鹼性 pH 值有較高活性 (圖 23)；經不同 pH 值處理 30 分鐘後，在 pH 5-12 範圍內兩者皆保持良好活性 (圖 24)。

於 55°C 下，不同金屬離子及 EDTA 對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定

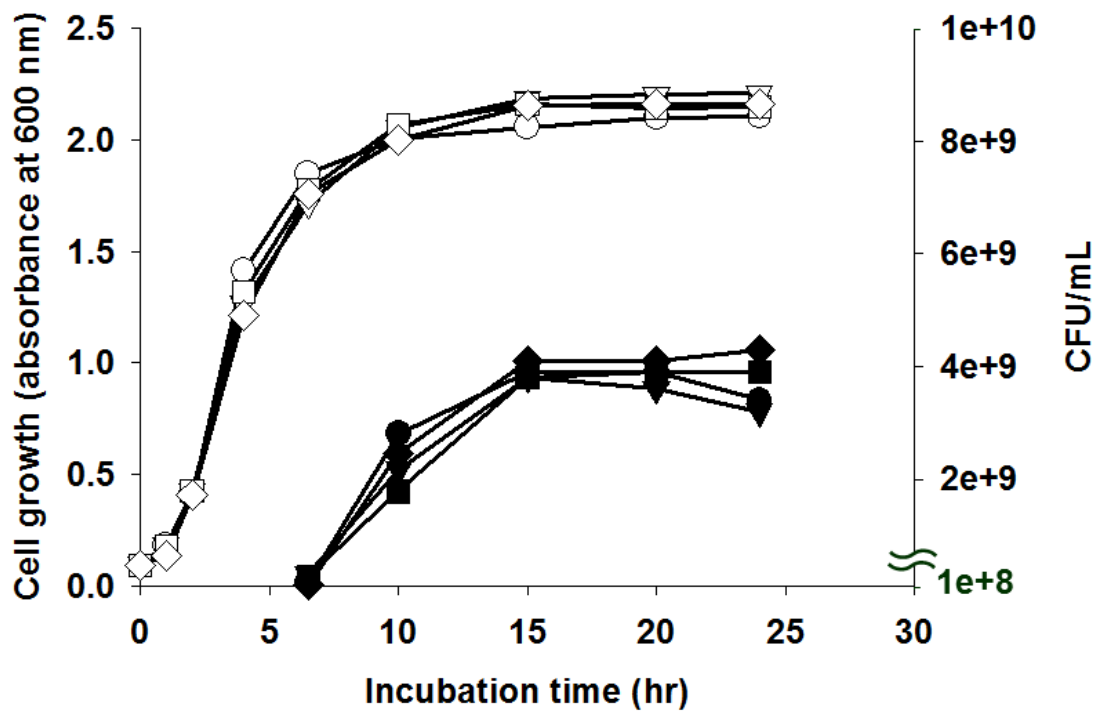


圖 18 大腸桿菌轉型株之生長動力學

大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] (□)、[pETOmpA-r03Lip] (◇)、[pETr03Lip] (▽) 和負控制組 (○) 經誘導並培養於 25°C 下 24 小時，間隔時間測量其 OD<sub>600nm</sub> 和菌落形成單位 (CFU/mL) (黑色圖形)

Figure 18 Growth kinetics of *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA (□), pETOmpA-r03Lip (◇), and pETr03Lip (▽) and control cells (○) growth in LB at 25°C and induced for 24 hours. Viable cells (closed symbols) are shown in colony forming units per mL of culture broth (CFU/mL)

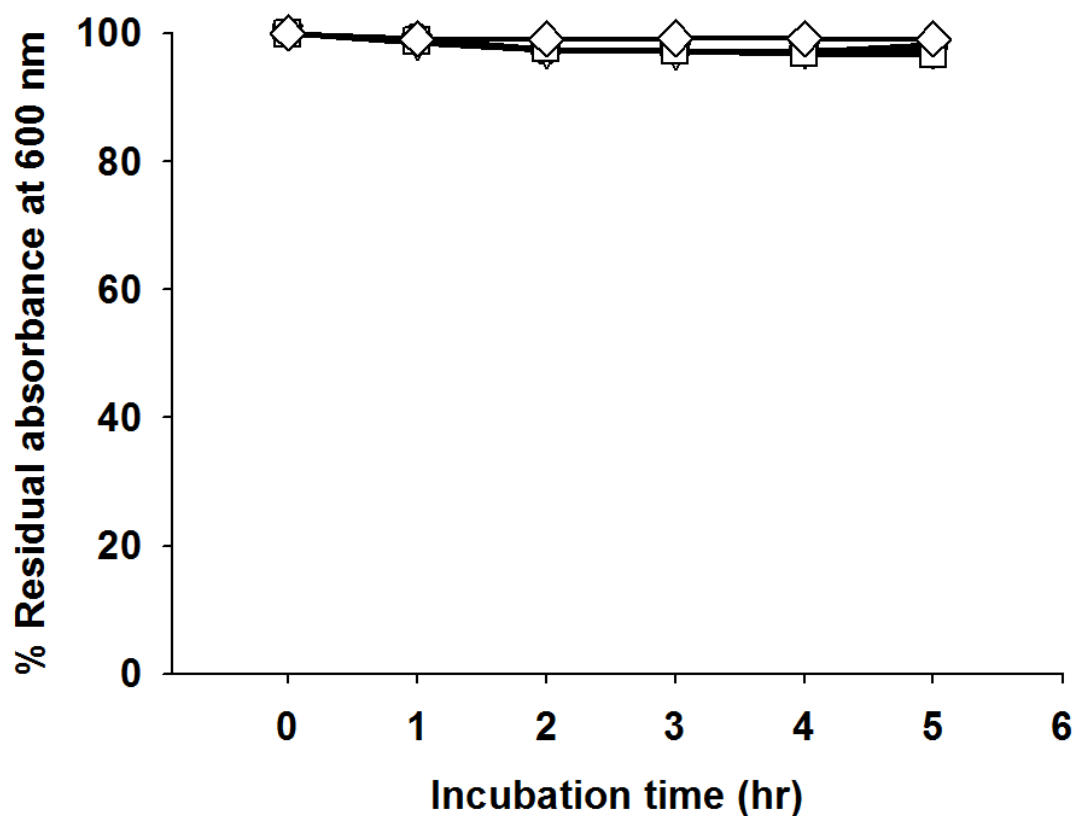


圖 19 大腸桿菌轉型株對 EDTA 耐受性測試結果

大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA] (□)、[pETOmpA-r03Lip] (◇)、[pETr03Lip] (▽) 和負控制組 (○) 經誘導並培養於 25°C 下 24 小時，以 PBS 緩衝液重新懸浮菌體並加入 2 mM EDTA，測量其相對 OD<sub>600nm</sub>

Figure 19 EDTA sensitivity assays for *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA (□), pETOmpA-r03Lip (◇), and pETr03Lip (▽) and control cells (○). Cells growth in LB at 25°C and induced for 24 hours. Cells resuspended in PBS buffer, pH 7.4, were incubated with 2 mM EDTA. Results are presented as the percentage of OD<sub>600nm</sub> prior to addition of the tested agent

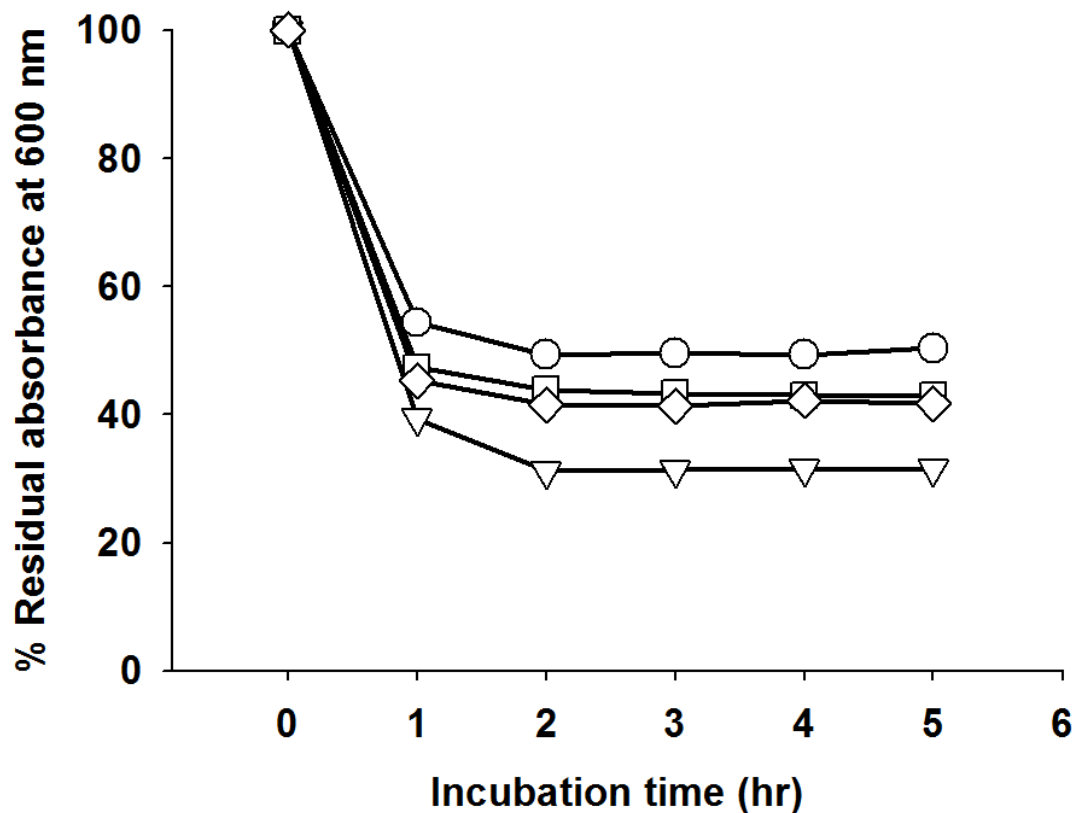


圖 20 大腸桿菌轉型株對 SDS 耐受性測試結果

大腸桿菌 BL21(DE3) [pETompA] (□)、[pETompA-r03Lip] (◇)、[pETr03Lip] (▽) 和負控制組 (○) 經誘導並培養於 25°C 下 24 小時，以 PBS 緩衝液重新懸浮菌體並加入 0.1% SDS，測量其相對 OD<sub>600nm</sub>

Figure 20 SDS sensitivity assays for *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETompA (□), pETompA-r03Lip (◇), and pETr03Lip (▽) and control cells (○). Cells growth in LB at 25°C and induced for 24 hours. Cells resuspended in PBS buffer, pH 7.4, were incubated with 0.1% SDS. Results are presented as the percentage of OD<sub>600nm</sub> prior to addition of the tested agent

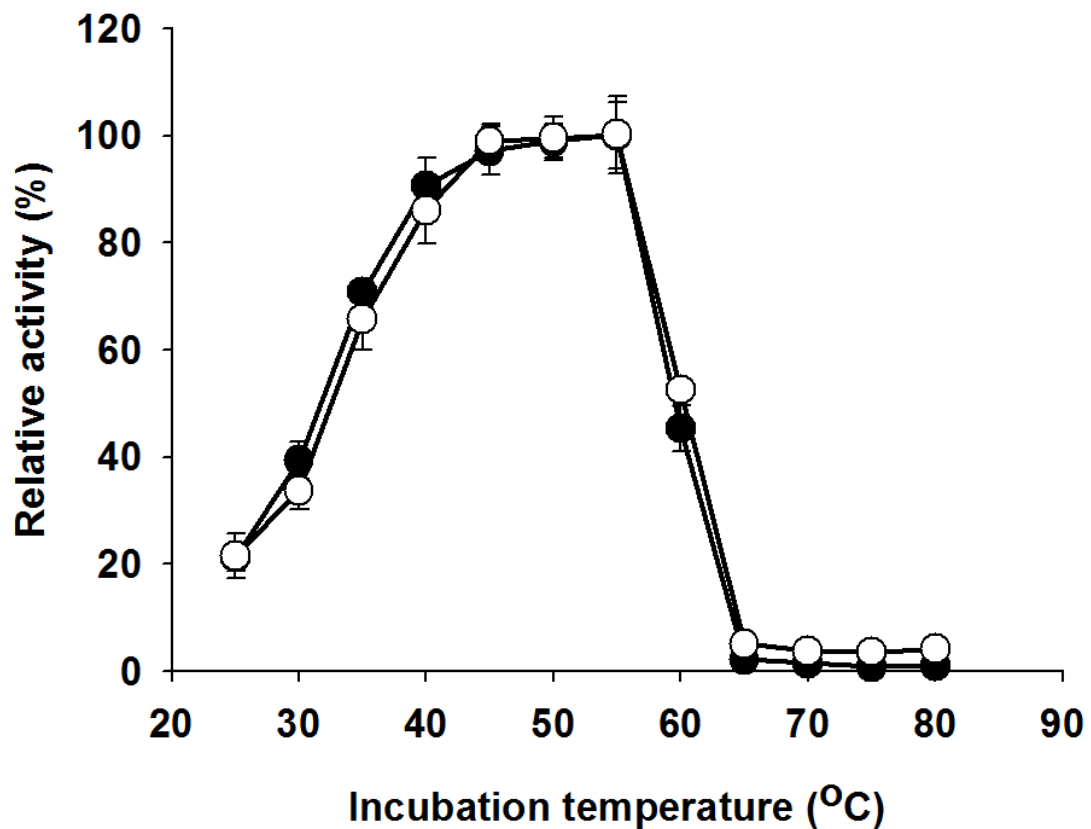


圖 21 r03Lip 之最適反應溫度

經純化之游離態 r03Lip (黑色圖形) 與大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] (白色圖形)，依酵素活性分析方法於不同溫度下測量其相對活性

Figure 21 Enzyme characteristics of optimal reaction temperature. The purified r03Lip (closed symbols) and *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA-r03Lip (opened symbols) were measured the relative activity at various temperature by standard activity assay

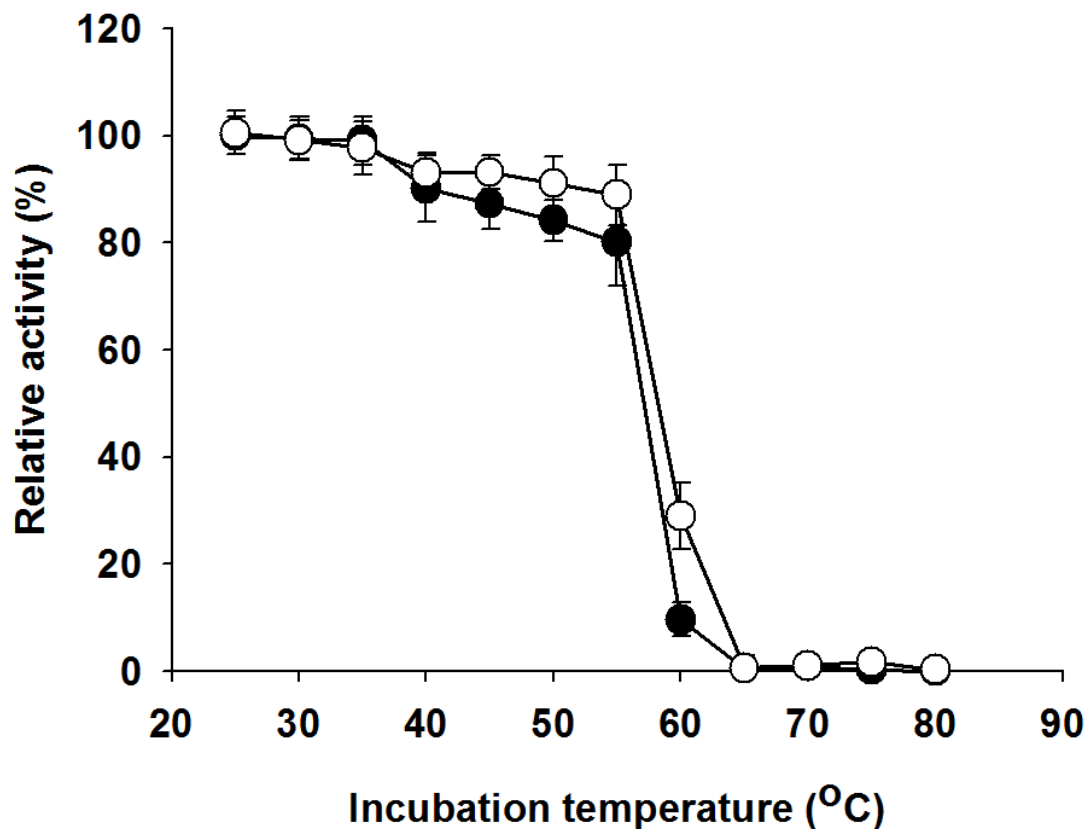


圖 22 r03Lip 之熱穩定性

經純化之游離態 r03Lip (黑色圓形) 與大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] (白色圓形)，於不同溫度下處理 30 分鐘後，依酵素活性分析方法測量其殘餘活性

Figure 22 Enzyme characteristics of thermostability. The purified r03Lip (closed symbols) and *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA-r03Lip (opened symbols) the enzyme/cells were incubated at various temperatures for 30 min and then measured the relative activity after by standard activity assay



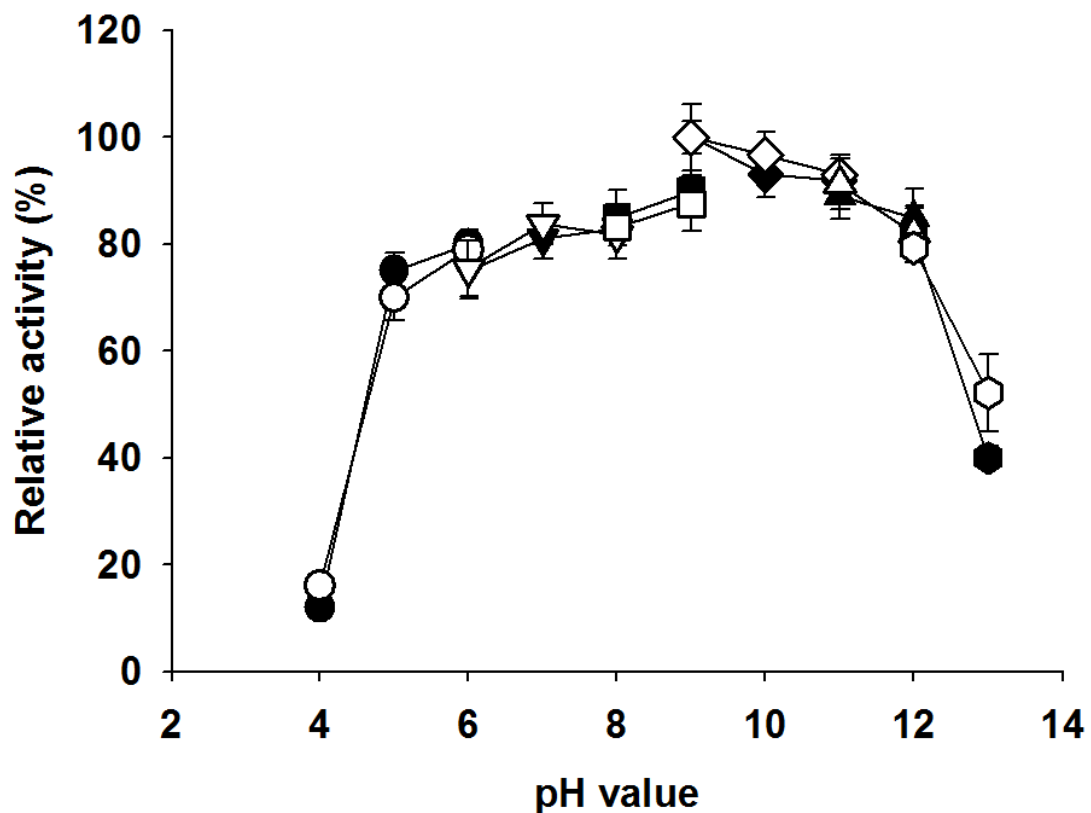


圖 23 r03Lip 於 pH 4-13 下之最適反應 pH 值

經純化之游離態 r03Lip (黑色圖形) 與大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] (白色圖形), 依酵素活性分析方法於醋酸緩衝液 (○)、磷酸鉀緩衝液 (▽)、Tris-HCl 緩衝液 (□)、甘胺酸-氫氧化鈉緩衝液 (◇)、磷酸氫二鈉-氫氧化鈉緩衝液 (△) 和氯化鉀-氫氧化鉀緩衝液 (◇) 中測量其相對活性

Figure 23 Effects of pH value between pH 4-13 on enzyme activity. The purified r03Lip (closed symbols) and *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA-r03Lip (opened symbols) were measured the relative activity in acetate buffer (○), potassium phosphate buffer (▽), Tris-HCl buffer (□), glycine-NaOH buffer (◇), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH buffer (△) and KCl/KOH buffer (◇) by standard activity assay

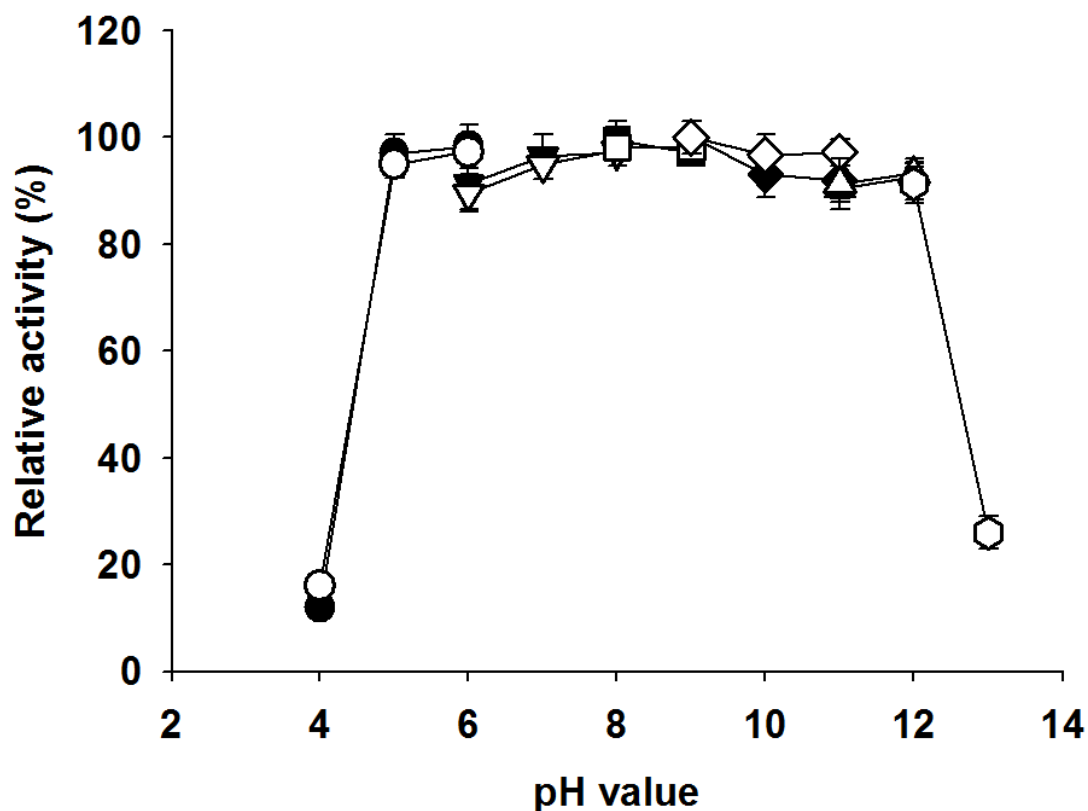


圖 24 r03Lip 於 pH 4-13 下之 pH 值穩定性

經純化之游離態 r03Lip (黑色圖形) 與大腸桿菌 BL21(DE3) [pETOmpA-r03Lip] (白色圖形), 於醋酸緩衝液 (○)、磷酸鉀緩衝液 (▽)、Tris-HCl 緩衝液 (□)、甘氨酸-氫氧化鈉緩衝液 (◇)、磷酸氫二鈉-氫氧化鈉緩衝液 (△) 和氯化鉀-氫氧化鉀緩衝液 (◇) 中處理 30 分鐘後, 依酵素活性分析方法測量其殘餘活性

Figure 24 Effects of pH value between pH 4-13 on enzyme stability. The purified r03Lip (closed symbols) and *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETOmpA-r03Lip (opened symbols) were incubated with acetate buffer (○), potassium phosphate buffer (▽), Tris-HCl buffer (□), glycine-NaOH buffer (◇), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH buffer (△) and KCl/KOH buffer (◇) for 30 min and then measured the relative activity by standard activity assay

性影響之比較如表 7 所示。鈉離子、鉀離子和鈣離子對兩者之活性及穩定性無明顯影響；以鎂離子處理 r03Lip 與 CSEr03Lip 30 分鐘後，分別降低穩定性 26.7% 和 25.8%，且鎂離子降低 CSEr03Lip 活性 26.4%，而 r03Lip 未見此現象；而鋅離子和 EDTA 對兩者之活性與穩定性具抑制效果（表 7）。

界面活性劑、還原劑及 PMSF 於 55°C 下對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性影響之比較如表 8 所示。SDS 和 Triton X-100 對兩者活性及穩定性具抑制效果；3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS) 提升 CSEr03Lip 之活性及穩定性 21% 與 28%，但 r03Lip 未見此現象；cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)、Tween 20、Tween 80、PMSF、dithiothreitol (DTT) 和  $\beta$ -mercaptoethanol 對兩者之活性及穩定性無明顯影響（表 8）。

以 50% 之有機溶劑處理 r03Lip 與 CSEr03Lip 後，分析有機溶劑對兩者之影響，結果如表 9 所示。Logarithm of partition coefficient ( $\log P$ ) 表示各溶劑之極性 (solvent polarity)，以此為各溶劑對 r03Lip 影響的參考指標 (Laane et al., 1987; Stampfer et al., 2003; Luo et al., 2003; Salah et al., 2007)。結果顯示兩者受有機溶劑之影響相似：直鏈醇 (1-propanol 和 butanol) 對酵素之負面影響大於支鏈醇 (isopropanol 和 *tert*-butanol)；直鏈醇對酵素之負面影響隨鏈長增加而降低；dimethyl sulfoxide (DMSO) 和  $\log P$  值較大之有機溶劑對酵素無負面影響或有提升現象，如 chloroform、toluene、pentane、xylene、hexane、heptane、octane、isooctane 和 hexadecane，其中 hexane 對 r03Lip 與 CSEr03Lip 皆具最佳提升效果，增加活性及穩定性各約為 90% 和 70%。然而結果發現 acetone 降低 CSEr03Lip 之穩定性 55.2%，而 r03Lip 未見此現象（表 9）。

表 7 金屬離子與 EDTA 對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性影響之比較

Table 7 Effect of metal ions and EDTA on activity and stability of r03Lip and CSEr03Lip

Test group (10 mM)	Relative activity (%)									
	Activity					Stability				
	r03Lip			CSEr03Lip		r03Lip			CSEr03Lip	
Control	100.0	±	3.2	100.0	±	7.3	100.0	±	5.9	100.0 ± 3.1
K	100.7	±	7.8	99.1	±	9.5	102.1	±	10.0	106.6 ± 2.0
Na	110.5	±	10.0	105.6	±	3.9	107.8	±	11.9	101.0 ± 9.7
Ca	101.5	±	10.3	97.3	±	5.7	96.4	±	3.5	96.7 ± 0.6
Mg	95.7	±	10.8	73.6	±	2.0	69.0	±	1.4	67.8 ± 3.3
Zn	30.6	±	2.6	22.4	±	10.2	30.2	±	2.4	28.2 ± 0.8
EDTA	23.9	±	2.4	22.7	±	0.9	22.2	±	1.2	23.2 ± 0.7

表 8 界面活性劑、PMSF 與還原劑對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性之影響

Table 8 Effect of various detergents, PMSF and reductants on activity and stability of r03Lip and CSEr03Lip

Reagent	Concentration	Relative activity (%)									
		Activity					Stability				
		r03Lip		CSEr03Lip			r03Lip		CSEr03Lip		
Control	-	100.0	± 1.7	100.0	± 2.9		100.0	± 5.0	100.0	± 0.1	
SDS	10%	0.6	± 0.1	4.4	± 1.6		0.4	± 0.9	6.8	± 6.4	
CTAB	10%	105.4	± 0.6	118.3	± 6.1		107.6	± 10.7	112.8	± 4.9	
CHAPS	10%	89.2	± 1.1	121.9	± 1.3		87.2	± 3.9	128.9	± 3.2	
Tween 20	10%	97.0	± 1.3	98.6	± 5.0		90.6	± 2.3	96.0	± 1.0	
Tween 80	10%	96.7	± 0.6	95.2	± 0.1		92.5	± 1.7	95.6	± 2.8	
Triton X-100	10%	20.5	± 1.7	14.4	± 2.5		2.8	± 0.7	8.7	± 3.0	
PMSF	1 mM	113.0	± 3.7	135.8	± 7.0		111.2	± 0.7	128.3	± 2.9	
DTT	10 mM	122.7	± 7.0	106.1	± 3.3		104.6	± 0.7	105.2	± 6.8	
β-mercaptoethanol	10%	103.0	± 4.0	103.3	± 3.3		92.8	± 2.7	90.5	± 6.2	

SDS: sodium dodecyl sulfate; CTAB: cetyl trimethylammonium bromide; CHAPS: 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate; PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride; DTT: dithiothreitol

表 9 有機溶劑對 r03Lip 與 CSEr03Lip 活性及穩定性之影響

Table 9 Effect of organic solvents on activity and stability of r03Lip and CSEr03Lip

Organic solvent	Relative activity (%)										Log <i>P</i>
	Activity					Stability					
	r03Lip		CSEr03Lip			r03Lip		CSEr03Lip			
Control	100.0	± 0.9	100.0	± 10.2		100.0	± 8.9	100.0	± 2.5		
Dimethyl sulfoxide	119.8	± 1.1	101.3	± 2.5		111.6	± 3.1	98.1	± 2.5		-1.30 <sup>a</sup>
Methanol	49.9	± 1.3	44.8	± 2.8		46.1	± 0.8	42.6	± 1.4		-0.76 <sup>a</sup>
Acetonitrile	44.5	± 0.7	51.6	± 2.4		33.2	± 1.0	34.7	± 2.7		-0.33 <sup>a</sup>
Ethanol	71.9	± 5.3	60.2	± 1.7		59.6	± 2.9	49.0	± 3.6		-0.24 <sup>a</sup>
Acetone	106.0	± 2.4	108.8	± 6.2		101.0	± 16.2	53.6	± 2.9		-0.23 <sup>a</sup>
1-propanol	42.4	± 2.1	40.6	± 2.8		32.1	± 2.0	39.0	± 0.3		0.28 <sup>a</sup>
Isopropanol	52.2	± 1.1	51.5	± 1.9		41.6	± 2.3	37.9	± 2.6		0.28 <sup>b</sup>
<i>tert</i> -butanol	79.2	± 0.6	72.2	± 0.3		69.2	± 1.4	74.3	± 1.5		0.40 <sup>c</sup>
Ethylacetate	40.1	± 11.8	55.7	± 6.4		15.2	± 2.3	17.8	± 1.9		0.68 <sup>a</sup>
Butanol	68.8	± 1.0	67.0	± 4.2		54.3	± 1.4	63.1	± 2.6		0.80 <sup>a</sup>
Chloroform	153.4	± 13.6	132.1	± 19.8		145.9	± 3.8	181.4	± 12.0		2.00 <sup>a</sup>
Toluene	155.4	± 12.0	101.2	± 14.5		176.5	± 16.5	102.7	± 10.4		2.50 <sup>a</sup>
Pentane	180.5	± 16.4	183.7	± 17.0		172.3	± 3.3	129.5	± 13.5		3.00 <sup>a</sup>
Xylene	169.3	± 5.3	129.1	± 19.4		91.4	± 8.7	94.4	± 8.5		3.10 <sup>a</sup>
Hexane	196.9	± 13.8	193.0	± 12.6		177.5	± 10.4	178.4	± 16.5		3.50 <sup>a</sup>
Heptane	131.9	± 2.5	127.9	± 14.0		74.4	± 5.3	183.7	± 13.9		4.00 <sup>a</sup>
Octane	169.4	± 21.0	132.2	± 12.1		161.1	± 12.2	90.2	± 10.8		4.50 <sup>a</sup>
Isooctane	177.6	± 12.6	128.4	± 19.6		156.1	± 13.2	137.1	± 9.9		4.70 <sup>d</sup>
Hexadacane	100.3	± 2.4	128.4	± 8.6		135.9	± 6.1	134.6	± 10.2		8.80 <sup>a</sup>

Log*P*: the logarithm of partition coefficient (log *P*). The log *P* is taken as an indicator of solvent polarity (Laane et al., 1987)

a: Laane et al., 1987; b: Stampfer et al., 2003; c: Salah et al., 2007; d: Luo et al., 2003

### 三、全細胞之生物轉化

#### (一) 探討 FAIPEs 之反應條件

生質柴油產率受到油醇莫耳比、反應溫度、水含量與催化劑使用量等因子影響。探討上述因子對脂肪酸異丙酯 (fatty acid isopropyl esters, FAIPEs) 生產之影響結果，大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] 和大腸桿菌 BL21(DE3) [pETompA-r03Lip] 經培養和誘導後，分別表現胞內 r03Lip (cytosolic expressed r03Lip, CEr03Lip) 與 CSEr03Lip，全菌體酵素之活性如表 6 所示。使用全菌體作為生物觸媒生產 FAIPEs，反應溫度對 FAIPEs 轉化率之影響結果如圖 25 所示，CEr03Lip 和 CSEr03Lip 於反應溫度 55°C 下轉化率可達 98% (圖 25)；生物觸媒使用量大於 10% 時，兩者轉化率可達 95% 以上 (圖 26)；油醇莫耳比為 1:2、1:3、1:4 和 1:5 時，兩者轉化率皆達 80% 以上，其中 1:4 之轉化率最佳，為 98% (圖 27)；含水量 10% 以下時，兩者轉化率仍有 90% 以上 (圖 28)。以上結果顯示 CEr03Lip 和 CSEr03Lip 生物觸媒對於 FAIPEs 之反應條件相似。

依上述之最適條件探討反應時間與 FAIPEs 轉化率之關係，如圖 29 所示。CSEr03Lip 和 CEr03Lip 於反應時間 16 和 20 小時轉化率有顯著差異，且若轉化率欲達 90% 以上，CSEr03Lip 需反應 20 小時，而 CEr03Lip 需反應 28 小時後方可達成，CSEr03Lip 之轉化速率為 CEr03Lip 之 1.4 倍，但兩者反應時間 24 小時後轉化率無顯著差異 (圖 29)。由此合理推測以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETompA-r03Lip] 為生物觸媒時，其反應速率大於大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip]，於較短時間內可完成反應。

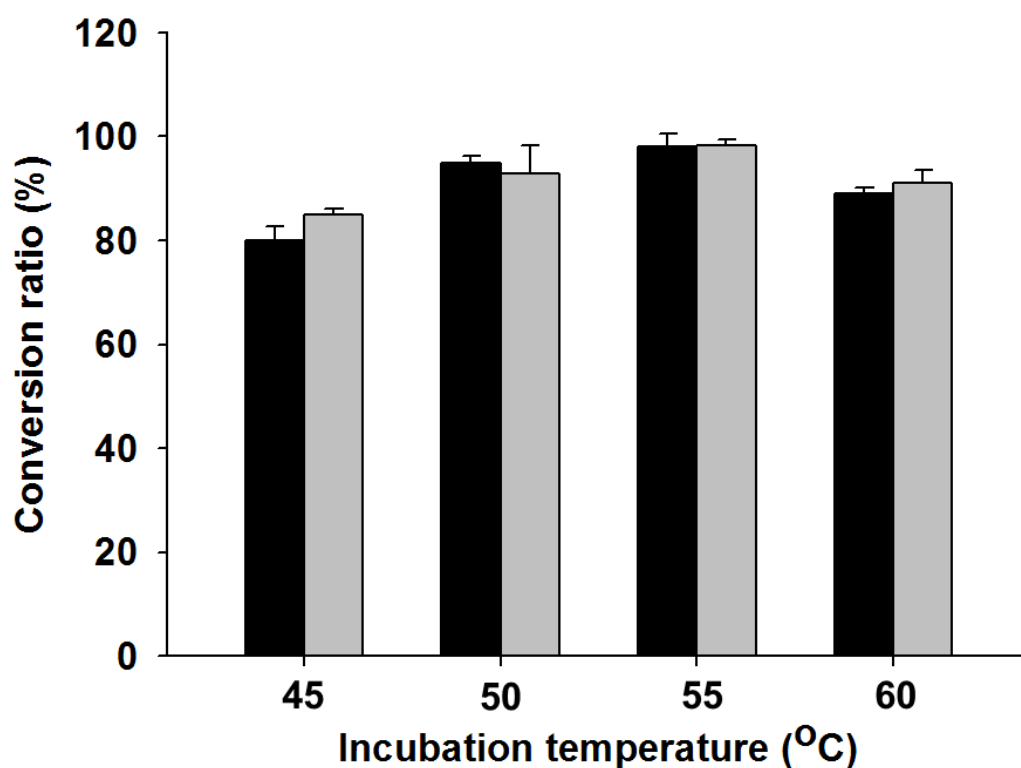


圖 25 反應溫度對 FAIPes 轉化率之影響

以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (灰色) 為全細胞生物觸媒，反應條件為：油醇莫耳比 1:4、含水量 10% (w/w of oil) 和生物觸媒使用量 10% (w/w of oil)，於不同溫度下反應 24 小時後，以 HPLC 分析 FAIPes 之轉化率

Figure 25 Effect of reaction temperature in conversion ratio of FAIPes. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black bar) and pETompA-r03Lip (grey bar) as biocatalysts for FAIPes production. The biocatalysts (10% w/w of oil) were incubated in the molar ratio of oil/isopropanol 1:4 and 10% (w/w of oil) of water content at various temperatures for 24 hours. The conversion ratio was measured by HPLC



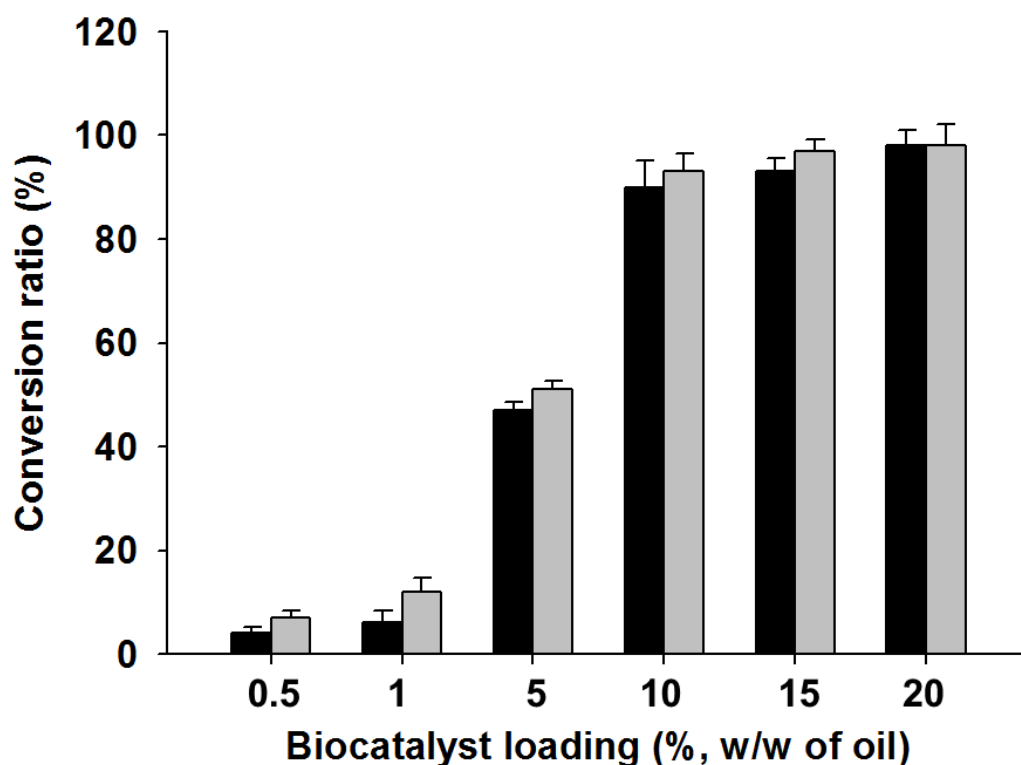


圖 26 生物觸媒使用量對 FAIPes 轉化率之影響

使用不同量之大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETOMP A-r03Lip] (灰色) 為全細胞生物觸媒，反應條件為：油醇莫耳比 1:4 和含水量 10% (w/w of oil)，於 55°C 下反應 24 小時後，以 HPLC 分析 FAIPes 之轉化率

Figure 26 Effect of biocatalyst loading in conversion ratio of FAIPes. Using various weight of *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black bar) and pETOMP A-r03Lip (grey bar) as biocatalysts for FAIPes production. The biocatalysts were incubated in the molar ratio of oil/isopropanol 1:4 and 10% (w/w of oil) of water content at 55°C for 24 hours. The conversion ratio was measured by HPLC

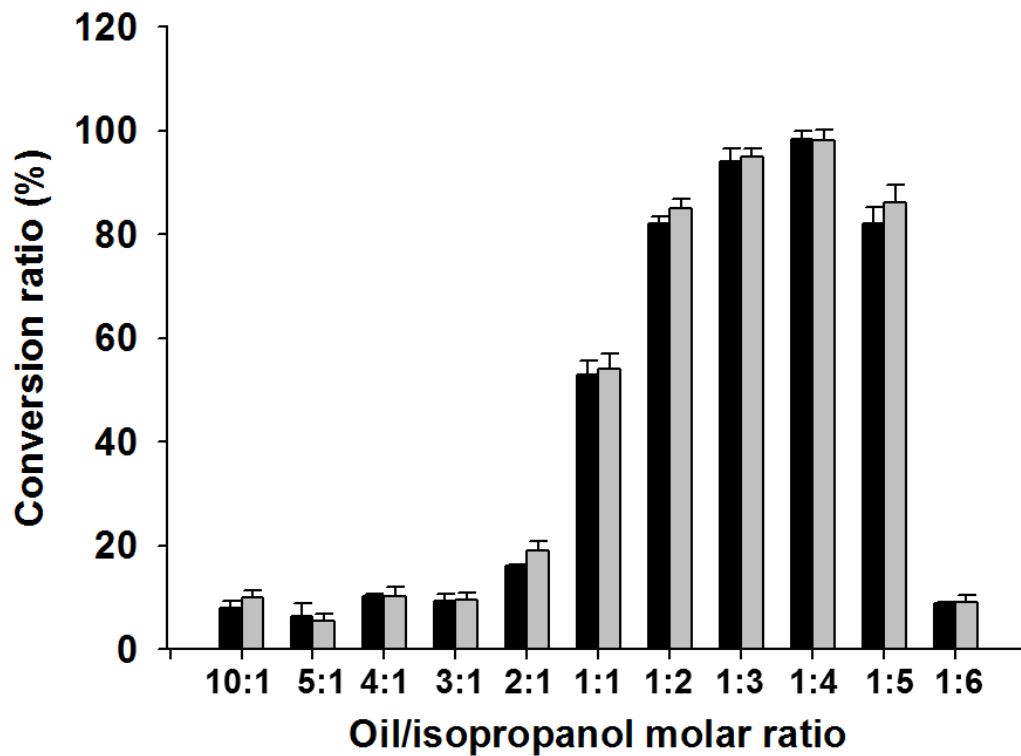


圖 27 油醇莫耳比對 FAIPEs 轉化率之影響

以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (灰色) 為全細胞生物觸媒，反應系統中加入不同莫耳比例之大豆沙拉油和異丙醇，反應條件為：含水量 10% (w/w of oil) 和生物觸媒使用量 10% (w/w of oil)，於 55°C 下反應 24 小時後，以 HPLC 分析 FAIPEs 之轉化率

Figure 27 Effect of oil/isopropanol molar ratio in conversion ratio of FAIPEs. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black bar) and pETompA-r03Lip (grey bar) as biocatalysts for FAIPEs production. The biocatalysts (10% w/w of oil) were incubated in various molar ratio of oil/isopropanol and 10% (w/w of oil) of water content at 55°C for 24 hours. The conversion ratio was measured by HPLC

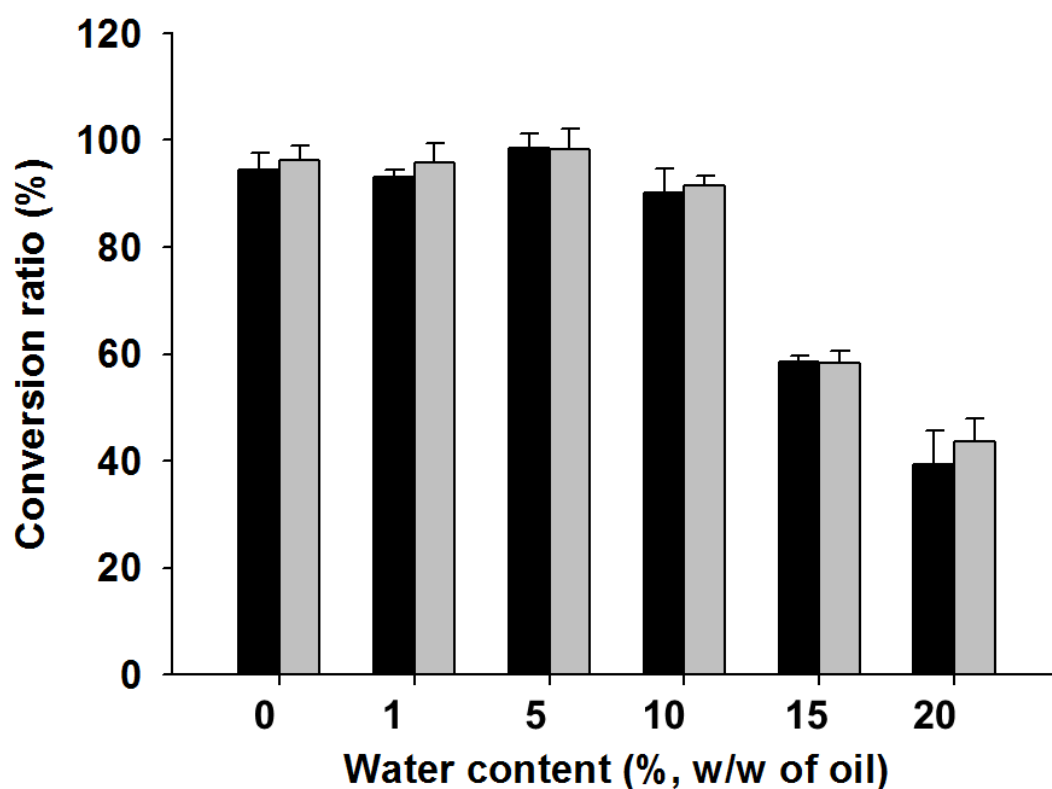


圖 28 水含量對 FAIPEs 轉化率之影響

以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (灰色) 為全細胞生物觸媒，反應系統中加入不同含量之水，反應條件為：油醇莫耳比 1:4 和生物觸媒使用量 10% (w/w of oil)，於 55°C 下反應 24 小時後，以 HPLC 分析 FAIPEs 之轉化率

Figure 28 Effect of water content in conversion ratio of FAIPEs. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black bar) and pETompA-r03Lip (grey bar) as biocatalysts for FAIPEs production. The biocatalysts (10% w/w of oil) were incubated in the molar ratio of oil/isopropanol 1:4 and various content of water at 55°C for 24 hours. The conversion ratio was measured by HPLC

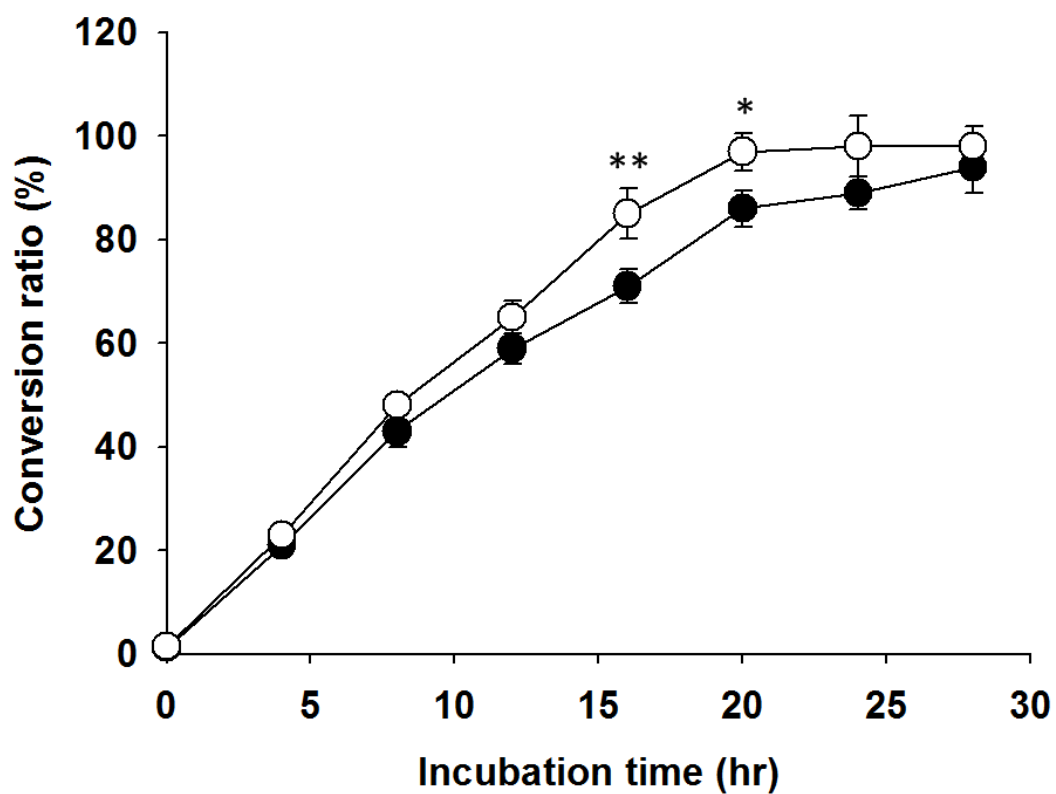


圖 29 反應時間與 FAIPEs 轉化率之關係

以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (白色) 為全細胞生物觸媒，於不同時間以 HPLC 分析 FAIPEs 之轉化率。\*： $p < 0.05$ ；\*\*： $p < 0.01$

Figure 29 Time course of producing FAIPEs. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black) and pETompA-r03Lip (white) as biocatalysts for FAIPEs production. Cells were incubated with substrate at 55°C and measured the conversion ratio by HPLC. \*:  $p < 0.05$  ; \*\*:  $p < 0.01$

## (二) 以油炸廢棄油生產 FAIPes

本實驗模仿速食餐廳之用油方式，使用大豆沙拉油油炸薯條和雞塊，並使用油脂老化測試紙判定換油時間點（圖 30），探討現行油炸廢棄油對 FAIPes 轉化率之影響。圖 31 和圖 32 顯示大豆沙拉油經高溫烹調後，酸價、碘價、過氧化價和 FAIPes 轉化率之變化。炸薯條油與炸雞塊油分別經油炸處理 6 小時和 3 小時後，酸價值達 2 mg KOH/g oil；過氧化價隨油炸時間而上升；碘價則無明顯變化。分別以大腸桿菌 CEr03Lip 和 CSEr03Lip 為生物觸媒，取油炸薯條和雞塊廢棄油生產 FAIPes，轉化率皆可達 80% 以上（圖 31 和圖 32）。

上述結果顯示，炸雞塊油之酸敗速率約為炸薯條油之 2 倍，經高溫油炸之廢棄油酸價和過氧化價會增加，但不影響 FAIPes 之轉化率。

## (三) 全菌體生物觸媒回收再利用

以大腸桿菌 CEr03Lip 和 CSEr03Lip 為生物觸媒生產 FAIPes，反應完成以過濾方式回收菌體，再以異丙醇清洗並風乾，應用於下一次反應。以新鮮大豆沙拉油和油炸廢棄油為原料進行生產，前 4 次之轉化率皆達 80% 以上，第 5 次起活性明顯下降，新鮮大豆沙拉油與油炸廢棄油之轉化率分別約為 70% 和 50%。比較 CEr03Lip 與 CSEr03Lip 分別在使用次數 1-8 次下的轉化率，兩者之間皆無顯著差異，證實兩者之轉化率及再使用次數相似（圖 33）。



圖 30 以油脂老化測試紙測試油炸油之酸價

將測試紙置於高溫油炸油中 2-3 秒後，至於室溫 30 秒待色帶變色，最下方之色帶變為黃色代表油脂之酸價約為 2 mg KOH/g oil。a：未變質之油炸油；b：達更換標準之酸敗油炸油

Figure 30 Using the oil quality test strips for testing frying oil. Dip the test strip in hot (operating temperature) oil for 2-3 second and read the test strip after 30 second wait. The acid value of oil was 2 mg KOH/g oil while the color of first band (the bottom) changed to yellow. a: the fresh oil; b: the deep frying oil

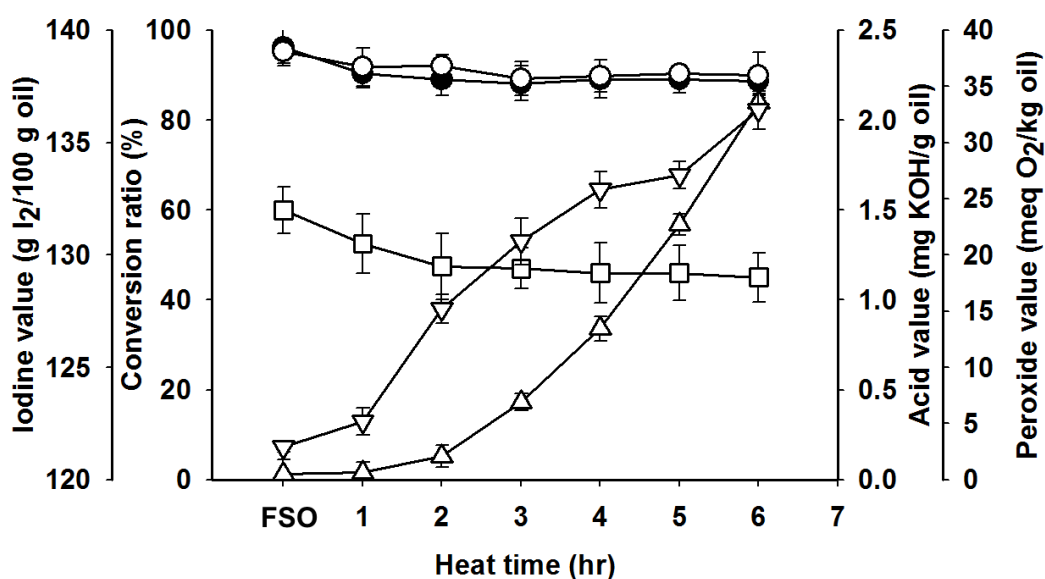


圖 31 以油炸薯條廢棄油生產 FAIPEs

以大豆沙拉油油炸薯條，分析其酸價 ( $\Delta$ )、過氧化價 ( $\nabla$ ) 和碘價 ( $\square$ )，  
且以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (白色)  
為全細胞生物觸媒，分析其對 FAIPEs 之轉化率 ( $\circ$ )

Figure 31 Using waste frying oil of French fries for FAIPEs production. The acid value ( $\Delta$ ), peroxide value ( $\nabla$ ), and iodine value ( $\square$ ) were measured by Chinese National Standards. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black) and pETompA-r03Lip (white) as biocatalysts for FAIPEs production, and the conversion ratio ( $\circ$ ) was measured by HPLC

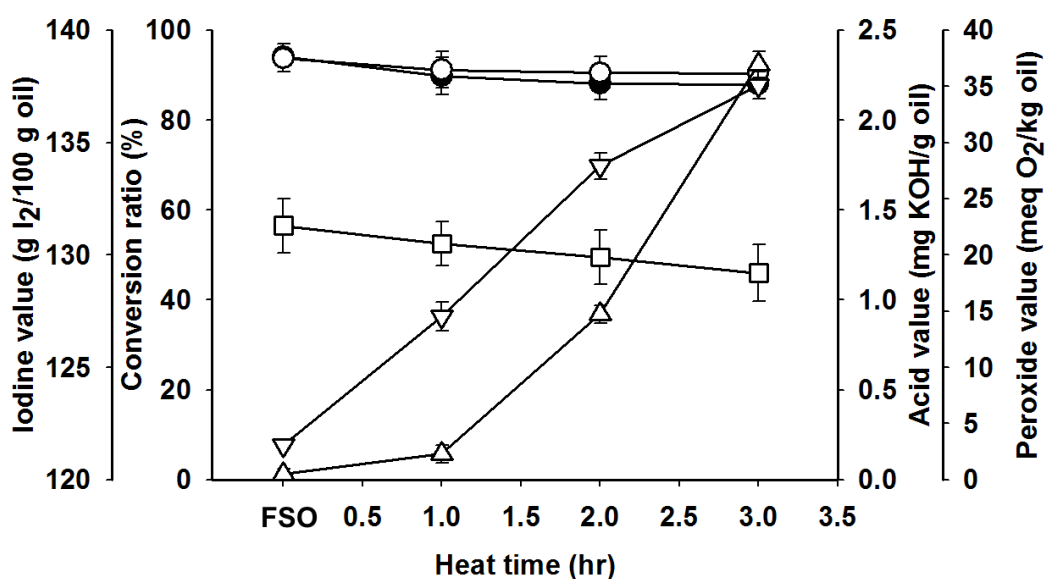


圖 32 以油炸雞塊廢棄油生產 FAIPEs

以大豆沙拉油油炸雞塊，分析其酸價 ( $\triangle$ )、過氧化價 ( $\nabla$ ) 和碘價 ( $\square$ )，  
且以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (黑色) 和 [pETompA-r03Lip] (白色)  
為全細胞生物觸媒，分析其對 FAIPEs 之轉化率 ( $\circ$ )

Figure 32 Using waste frying oil of chicken nuggets for FAIPEs production. The acid value ( $\triangle$ ), peroxide value ( $\nabla$ ), and iodine value ( $\square$ ) were measured by Chinese National Standards. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (black) and pETompA-r03Lip (white) as biocatalysts for FAIPEs production, and the conversion ratio ( $\circ$ ) was measured by HPLC



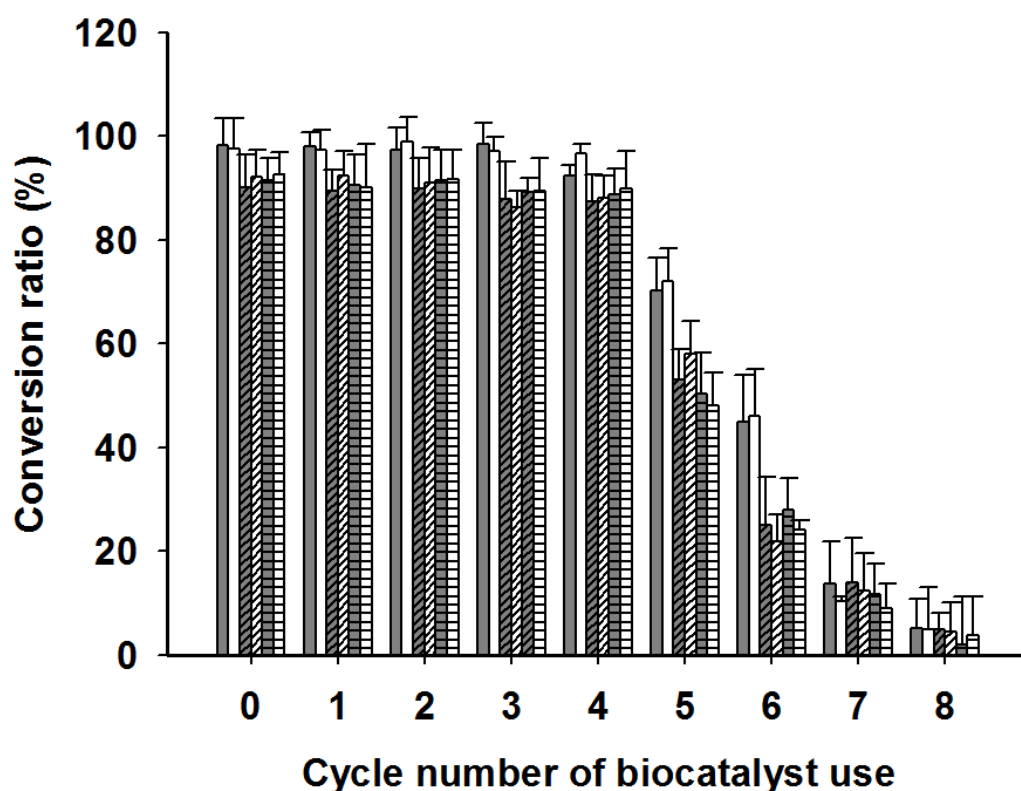


圖 33 全菌體生物觸媒再利用之穩定性

以大腸桿菌 BL21(DE3) [pETr03Lip] (灰色) 和 [pETompA-r03Lip] (白色) 為全細胞生物觸媒，並且以大豆沙拉油 (無線條)、炸薯條廢棄油 (斜線) 和炸雞塊廢棄油 (橫線) 為原料生產 FAIPEs。反應完成後以異丙醇清洗全細胞生物觸媒並風乾，進行下一次反應。FAIPEs 之轉化率是以 HPLC 分析

Figure 33 Recycled stability of whole-cell biocatalyst. Using *E. coli* BL21(DE3) cells containing pETr03Lip (grey bar) and pETompA-r03Lip (white bar) as biocatalysts and soybean oil (blank space), waste frying oil of French fries (slash) and waste frying oil of chicken nuggets (horizontal line) as substrate for FAIPEs production. The cells were washed by isopropanol and dried for next reaction. The conversion ratio was measured by HPL

## 討論

本研究欲建構嗜熱菌 NTU 03 脂肪酶 (r03Lip) 之大腸桿菌細胞表面表現系統，表現 r03Lip 至大腸桿菌 BL21(DE3) 細胞表面 (cell surface expressed r03Lip, CSEr03Lip)，作為全菌體生物觸媒並應用於生產 FAIPEs，以解決胞內表現 r03Lip (cytosolic expressed r03Lip, CEr03Lip) 之生物觸媒轉化速率慢之問題，發展可降低成本之生質柴油酵素製程。本研究成功將 r03Lip 表現至大腸桿菌之細胞表面，且不會影響宿主之生長和細胞膜穩定性，另外與游離態 r03Lip 之活性比較，CSEr03Lip 之最適反應溫度、熱穩定性、最適反應 pH 值、pH 值穩定性皆相似，且部分之金屬離子、界面活性劑和有機溶劑不影響其之活性，顯示 CSEr03Lip 保有高度之活性與穩定性。CHAPS 之添加可提升 CSEr03Lip 活性與穩定性 21.9% 和 28.9% (表 8)，而鎂離子和丙酮 (acetone) 分別降低其活性及穩定性 26.4% 和 55.2% (表 7 和表 9)，此現象未見於游離態 r03Lip。以全菌體 CSEr03Lip 和 CEr03Lip 之生物觸媒生產 FAIPEs，結果顯示兩者轉化條件和再使用次數相似，但 CSEr03Lip 系統之轉化速率較快，為 CEr03Lip 之 1.4 倍 (CSEr03Lip 和 CEr03Lip 分別需反應 20 和 28 小時後轉化率達 90% 以上)(圖 29)。

先前研究已發現鎂離子可藉由改變細胞膜脂質之物理性質，進而提升粒線體 ATP 水解酶活性 (黃有國等, 1994)，另外鎂離子對重組細胞色素 c (cytochrome c) 及豬腎外髓質 ATP 水解酶等重組蛋白亦有提升效果。本研究發現鎂離子降低 CSEr03Lip 的活性，卻不影響游離態 r03Lip，此結果與 Wang 等學者研究相符 (Wang et al., 1991)：10 mM 鎂離子降低細胞膜結合之 phospholipase D (PLD) 的活性 55%，但不影響細胞質內 PLD (Wang et al., 1991)。細胞膜脂質之物理性質改變是否影響膜蛋白之功能，至今尚有不同之見解，黃有國等學者之研究發現，鎂離子可增加細胞膜脂質之流動性 (fluidity)，使內嵌之 ATP 水解酶形成適當之構形而增加活性 (黃有國等, 1994)。由上述結果發現，CSEr03Lip 與 PLD 並非鑲嵌於細胞膜上，因此細胞膜流動性影響其活性並非源自構形改變，但細胞膜之流動性增加可能造成 CSEr03Lip 翻轉 (flip flop)，改變其頂蓋位置之裸露方向，減少與基質結合效率而降低活性。

CHAPS 為非離子性之界面活性劑，已廣泛使用於蛋白質純化和二維蛋白膠體電泳 (2-dimensional gel electrophoresis)。研究發現 CHAPS 對於多種疏水性蛋白或

細胞膜結合蛋白具良好之溶解度 (Yoda et al., 1984; Helmke and Howard, 1987; Schurholz et al., 1992; Klein and Fahrenholz, 1994)，故推測 CHPAS 有助於 CSEr03Lip 與反應基質間之乳化作用，降低因細胞膜引起之疏水效應，增加兩者結合效率而增加活性。另外，丙酮可有效沉澱水溶性之蛋白質 (Srivastava and Srivastava, 1998)，其原理為稀釋水溶液中的水濃度而降低水活性 (water activity)，蛋白上之親水性區域因水合度下降而開始聚集，產生沉澱。因此推測以 50% (v/v) 之丙酮處理游離態 r03Lip 與 CSEr03Lip 時，游離態 r03Lip 可藉由蛋白間親水性區域之聚集而形成穩定構形，但 CSEr03Lip 受限於細胞表面，無法有效進行蛋白間聚集作用，進而裸露疏水性之催化中心，降低酵素之穩定性。上述之 CHPAS、鎂離子和丙酮對 CSEr03Lip 之影響，說明欲發展全細胞表面酵素進行生物轉化時，需考量反應系統中是否含有二價金屬離子或有機溶劑而影響酵素活性，此觀點至今尚未有研究報告詳細佐證，關於二價金屬離子或有機溶劑影響細胞表面酵素之機制，是未來可研究之方向之一。

先前研究指出欲實行生質柴油商業化，生產成本為重要之影響因子 (Ghaly et al., 2010; Wang et al., 2011; Tufvesson et al., 2011)。影響 FAIPEs 生產成本主要因子為異丙醇和催化劑之價格。鹼催化法、固定化酵素 Novozyme-435 和本研究之 CSEr03Lip 全菌體生物觸媒製程的成本影響分析如表 10 所示。鹼催化法製程需較高之油醇莫耳比 (1:20)，故成本大幅增加。使用酵素催化法雖可減少異丙醇之使用量，但酵素成本高昂卻抵銷其優勢，其中固定化酵素由於載體 (carrier materials) 昂貴，其成本又高於全菌體生物觸媒。酵素催化法製程另一優勢為觸媒可再回收利用，使用固定化載體可增加酵素之穩定性，增加再利用次數而降低成本，然而固定化載體價格昂貴為其所面臨之問題，因此使用其他便宜之固定化載體，如 silica gel、celite 或 kaolinite 等為其必要條件 (Robles-Medina et al., 2009)。使用全菌體生物觸媒可有效降低固定化酵素之成本，包含固定化載體及酵素分離過程所需之成本 (Tufvesson et al., 2011)，但研究顯示細胞膜對油脂及醇類之通透性 (permeability) 較低 (Robles-Medina et al., 2009)，導致細胞內表現之酵素無法有效與外界之基質結合，而降低全菌體生物觸媒之效率。對此本研究建構之 CSEr03Lip 系統並作為全菌體生物觸媒，研究發現此系統之轉化速率大於 CEr03Lip 之全菌體生物觸媒 (圖 29)，證實 Robles-Medina 等學者提出觀點。由生產 FAIPEs 之成

本分析，相對於 CEr03Lip 全菌體生物觸媒，CSEr03Lip 反應速率的增加可減少成本 28.4% (表 10)。然而 CSEr03Lip 受限於細胞膜面積與宿主之生理功能，無法有效且大量表現酵素至細胞表面上，雖具較高之轉化效率，但表現量仍低於 CEr03Lip (表 6)。對此，研究以外泌表現系統生產 r03Lip，如 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Pichia pastoris* 等表現系統，大量表現 r03Lip 並分泌至培養基中，除可免去酵素純化步驟和成本外，亦可解決 CSEr03Lip 表現量不足之問題。另外，使用大規模培養方式探討 CSEr03Lip 之最佳表現條件，如誘導時間、IPTG 添加濃度、培養溫度和培養時間等，或許可進一步提升 CSEr03Lip 於細胞膜上的表現量。

本研究建構之 CSEr03Lip 系統，確實能提升全細胞生物觸媒之轉化速率並降低 FAIPEs 之生產成本，使用低價和高穩定性之固定化載體以提升再利用率為未來發展之重點。另外，使用較低成本之原料，如藻類生產油脂和以基因工程方式修改微生物之代謝系統以生產長鏈油脂等，或使用較便宜之蛋白調控系統，如 arabinose 以取代 IPTG，可進一步降低更多之製程成本。

表 10 FAIPEs 生產成本影響因子

Table 10 The factors effect on the cost of production FAIPEs<sup>a</sup>

	Alkaline <sup>b</sup>	Novozyme-435 <sup>c</sup>	Whole-cell biocatalyst		
			Cytosolic lipase	Cell surface expressed lipase	Immobilized <sup>d</sup>
Oil/isopropanol molar ratio	1:20	1:4		1:4	
Isopropanol cost (\$)	24	4.8		4.8	
Catalyst loading	3% potassium methyleate	10% (10,000 U/g)		10% (2,000 U/mg)	15% (1,000 U/g)
Catalyst reused cycle		12	4	4	3
<b>Catalyst cost (\$)</b>					
Virgin catalyst	0.132	100	10	10	40
Reused catalyst	-	8.3	2.5	2.5	13.3
Yield	71.1%	93.4%	98.3%	94.0%	90.3%
<b>Batch cost (\$)</b>					
Virgin catalyst	33.9	112.2	15.1	15.1	49.6
Reused catalyst	-	14.0	7.4	7.4	20.1
<b>Cost that calculate involving reaction time (\$)</b>					
Reaction time (hr)	8	8	28	20	24
Virgin catalyst	9.7	32.1	10.8	12.6	42.5
Reused catalyst	-	4.0	7.4	5.3	17.2

a: The reference prices of isopropanol (contract price of the first season of 2012), potassium methyleate (contract price of the first season of 2012), Novozyme-435 (Fjerbaek et al., 2009) were \$1.2/kg, \$4.4/kg and \$1,000/kg. The cost of whole-cell biocatalyst in this study was \$100/kg that was according to Tufvesson et al., 2011. All the cost was calculated that based on using one kg soybean oil as substrate.

b: The alkaline transesterification process was according to Wang et al., 2005

c: The enzymatic transesterification process was according to Modi et al., 2006

d: The cost of immobilized whole-cell biocatalyst was calculated that based on the free one and added a cost of carrier for immobilization. The used cost of carrier was according to the Tufvesson et al., 2011

## 結論

本研究以大腸桿菌細胞表面表現系統生產嗜熱菌 *Geobacillus* sp. NTU 03 重組脂肪酶 (r03Lip)，作為全菌體生物觸媒並應用於生產 FAIPEs，以解決 CEr03Lip 之生物觸媒轉化速率慢的問題，發展可降低成本之生質柴油酵素製程。本研究成功利用細胞表面工程技術融合 Lpp-OmpA 蛋白與 r03Lip 並成功表現至大腸桿菌細胞表面，且不影響大腸桿菌細胞之生長和細胞膜穩定性。CSEr03Lip 具完整酵素活性與穩定性，但會受到 CHAPS、鎂離子和丙酮影響活性。此結果顯示，CSEr03Lip 受二價金屬離子和有機溶劑影響，其機制需進一步進行探討。本研究中以全菌體 CSEr03Lip 和 CEr03Lip 作為生物觸媒生產 FAIPEs 的結果顯示兩者轉化特性相似，惟 CSEr03Lip 系統之轉化速率較 CEr03Lip 系統快，當使用油炸廢棄油為原料生產 FAIPEs 時，可降低成本 28.4%。

本研究證實 CSEr03Lip 系統可解決 CEr03Lip 因細胞壁或細胞膜通透性不佳而致轉化速率慢之問題，且可有效降低製程成本，然而全細胞 CSEr03Lip 生物觸媒之再使用率和表現量仍有提升之空間。除了應用於生質柴油製程，CSEr03Lip 於傳統脂肪酶應用之領域，亦有發展之空間與價值。

## 參考文獻

- 黃有國、劉志梅和楊福愉。1994。Mg<sup>2+</sup> 促進線粒體 H<sup>+</sup>-ATP 酶的重建機理——H<sup>+</sup>-ATP 酶複合體亞基水平的研究。生物物理學報，第四期，573-579 頁。
- Acheson, D. W. K., Sonenshein, A. L., Leong, J. M. and Keusch, G. T. 1997. Heat-stable spore-based vaccines: surface expression of invasins-cell wall fusion proteins in *Bacillus subtilis*. In: Brown, F., Burton, D., Doherty, P., Mekalanos, J. and Norrby, E. Eds. *Vaccines 97*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY. 179-184.
- Adams, T. M., Wentzel, A. and Kolmar, H. 2005. Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation. *J. Bacteriol.* 187: 522-533.
- Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C. and Shaw, J. F. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8995-9005.
- Al-Bahrani, A. Z. and Ammori, B. J. 2005. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. *Clin. Chim. Acta.* 362: 26-48.
- Alcantara, R., Amores, J., Canoira, L., Fidalgo, E., Franco, M. J. and Navarro, A. 2000. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass. Bioenerg.* 18: 515-527.
- Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Azcan, N. and Danisman, A. 2007. Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation. *Fuel* 86: 2639-2644.
- Bae, W., Chen, W., Mulchandani, A. and Mehra, R. K. 2000. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 518-524.
- Baek, J. H., Han, M. J., Lee, S. H. and Lee, S. Y. 2009. Enhanced display of lipase on the *Escherichia coli* cell surface, based on transcriptome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 971-973.
- Bajpai, D. and Tyagi, V. K. 2006. Biodiesel: source, production, composition properties and its benefits. *J. Oleo. Sci.* 55: 487-502.
- Baneyx, F. and Mujacic, M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22: 1399-1408.

- Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. and Kolmar, H. 2005. A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett.* 579: 1177-1182.
- Binder, U., Matschiner, G., Theobald, I. and Skerra, A. 2010. High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. *J. Mol. Biol.* 400: 783-802.
- Bingle, W. H., Nomellini, J. F. and Smit, J. 1997. Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 26: 277-288.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 73-81.
- Bornscheuer, U. T. and Kazlauskas, R. J. 2006. Hydrolases in organic synthesis: region- and stereoselective biotransformations. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken, NJ, USA. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- Canakci, M. and van Gerpen, J. 2003. A pilot plant to produce biodiesel from high free fatty acid feedstocks. *Trans. Am. Soc. Agri. Engin.* 46: 945-954.
- Canales, M., Almazán, C., Pérez de la Lastra, J. M. and de la Fuente, J. 2008. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a directs cell surface display of tick BM95 immunogenic peptides on *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 135: 326-332.
- Chang, H. H. and Lo, S. L. 2000. Modification with a phosphorylation tag of PKA in the TraT-based display vector of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 78: 115-122.
- Chang, H. J., Sheu, S. Y. and Lo, S. J. 1999. Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein TraT. *J. Biomed. Sci.* 6: 64-70.
- Cho, C. M., Mulchandani, A. and Chen, W. 2002. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selection screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2026-2030.
- Daugherty, P. S. 2007. Protein engineering with bacterial display. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 474-480.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Olsen, M. J., Iverson, B. L. and Georgiou, G. 1998. Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11: 825-832.
- Dhillon, J. K., Drew, P. D. and Porter, A. J. 1999. Bacterial surface display of an



- anti-pollutant antibody fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 350-354.
- Di Serio, M., Tesser, R. and Dimiccoli, M. 2005. Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 239: 111-115.
- Driessen, A. J. and Nouwen, N. 2008. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 643-667.
- Ebrahimpour, A., Rahman, R. N., Basri, M. and Salleh, A. B. 2011. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresour. Technol.* Doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.083.
- Ferrandez, Y. and Condemine, G. 2008. Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 69: 1349-1357.
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V. and Norddahl, B. 2009. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1298-1315.
- Foidl, N., Foidl, G. and Sanchez, M. 1996. *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresour. Technol.* 58: 77-82.
- Francisco, J. A., Earhart, C. F. and Georgiou, G. 1992. Transport and anchoring of  $\beta$ -lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2713-2717.
- Francisco, J. A., Stathopoulos, C., Warren, R. A. J., Kilburn, D. G. and Georgiou, G. 1993. Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulose or cellulose binding domain. *Bio/Technology* 11: 491-495.
- Fredrik, B., Sven E. G. and Ole, K. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9: 360-363.
- Freedman, B., Butterfield, R. O. and Pryde, E. H. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 1375-1380.
- Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T. and Little, M. 1991. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*: fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Biotechnology* 9: 1369-1372.
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S. and Noda, H. 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotech.* 26: 668-673.
- Gao, B., Su, E. H., Lin, J. P., Jiang, Z. B., Ma, Y. H. and Weim, D. Z. 2009.

- Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *J. Biotechnol.* 139: 169-175.
- Gennity, J. M. and Inouye, M. 1991. The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity. *J. Biol. Chem.* 266: 16458-16464.
- Georgiou, G., Shuler, M. L. and Wilson, D. B. 1988. Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of  $\beta$ -lactamase over-production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 741-748.
- Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P. S., Nayak, A. R., Iverson, B. L. and Curtiss, R. III. 1997. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* 15: 29-34.
- Georgiou, G., Stephens, D. L., Stathopoulos, C., Poetschle, H. L., Mendenhall, J. and Earhart, C. F. 1996. Display of  $\beta$ -lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'- $\beta$ -lactamase fusions. *Protein Eng.* 9: 239-247.
- Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S. and Budge, S. 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 6: 54-76.
- Grabbe, E., Nolasco-Hipolito, C. and Kobayashi, G. 2001. Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. *Process Biochem.* 37: 65-71.
- Gryglewicz, S. 1999. Rapeseed oil esters preparation using heterogeneous catalysts. *Bioresour. Technol.* 70: 249-253.
- Hall, S. S., Mitragotri, S. and Daugherty, P. S. 2007. Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes. *Biotechnol. Prog.* 23: 749-754.
- Hara, M. 2009. Environmentally benign production of biodiesel using heterogeneous catalysts. *ChemSusChem* 2: 129-135.
- He, H. Y., Sun, S. Y., Wang, T. and Zhu, S. L. 2007. Transesterification kinetics of soybean oil for production of biodiesel in supercritical methanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84: 399-404.
- He, M. X., Feng, H. and Zhang, Y. Z. 2008. Construction of a novel cell-surface

- display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif. *Biotechnol. Lett.* 30: 2111-2117.
- Helmke, S. M. and Howard, B. D. 1987. Fractionation and reconstitution of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump solubilized and stabilized by Chaps/lipid micelles. *Memhil: Biochem.* 7: 1-22.
- Henning, U., Royer, H. D., Teather, R. M., Hindennach, I. and Hollenberg, C. P. 1979. Cloning of the structural gene (ompA) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4360-4364.
- Holčápek, M., Jandera, P., Fischer, J. and Prokeš, B. 1999. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high performance liquid chromatography with various detection methods. *J. Chroma. A.* 858: 13-31.
- Huang, Y. H. and Wu, J. H. 2008. Analysis of biodiesel promotion in Taiwan. *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 12: 1176-1186.
- Huang, Y., Zheng, H. and Yan, Y. J. 2010. Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 504-515.
- Iso, M., Chen, B. and Eguchi, M. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 16: 53-58.
- Jaeger, K. E. and Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jeong, H., Yoo, S. and Kim, E. 2001. Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28: 155-160.
- Jose, J. and Meyer, T. F. 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 600-619.
- Jose, J. and von Schwichow, S. 2004. Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem.* 5: 491-499.
- Jose, J., Bernhardt, R. and Hannemann, F. 2002. Cellular surface display of dimeric Adx

- and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J. Biotechnol.* 95: 257-268.
- Jose, J., Krämer, J., Klauser, T., Pohlner, J. and Meyer, T. F. 1996. Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Igaß autotransporter pathway. *Gene* 178: 107-110.
- Jung, H. C., Lebeault, J. M. and Pan, J. G. 1998a. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* 16: 576-580.
- Jung, H. C., Park, J. H., Park, S. H., Lebeault, J. M. and Pan, J. G. 1998b. Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22: 348-354.
- Kang, S. M., Rhee, J. K., Kim, E. J., Han, K. H. and Oh, J. W. 2003. Bacterial cell surface display for epitope mapping of hepatitis C virus core antigen. *FEMS Microbiol. Lett.* 226: 347-353.
- Kemp, W. H. 2006. Biodiesel basics and beyond. A comprehensive guide to production and use for the home and farm. Ontario, Canada, Aztext Press.
- Klauser, T., Pohlner, J. and Meyer, T. F. 1990. Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J.* 9: 1991-1999.
- Klein, U. and Fahrenholz, F. 1994. Reconstitution of the myometrial oxytocin into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 220: 559-567.
- Kordel, M., Hofmann, B., Schomburg, D. and Schmid, R. D. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC-21808, purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* 173: 4836-4841.
- Kornacker, M. G. and Pugsley, A. P. 1990. Molecular characterization of pulA and its product, pullulanase, a secreted enzyme of *Klebsiella pneumoniae* UNF5023. *Mol. Microbiol.* 4: 73-85.
- Kornacker, M. G. and Pugsley, A. P. 1990. The normally periplasmic enzyme  $\beta$ -lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol.*

*Microbiol.* 4: 1101-1109.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 81-87.
- Lattemann, C. T., Maurer, J., Gerland, E. and Meyer, T. F. 2000. Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* 182: 3726-3733.
- Lawerence, R. C., Fryer, T. F. and Reiter, B. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 213: 1264-1265.
- Lee, J. S., Shin, K. S., Pan, J. G. and Kim, C. J. 2000. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat. Biotechnol.* 18: 645-648.
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. and Georgiou, G. 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 373-395.
- Lee, S. H., Choi, J. I., Han, M. J., Choi, J. H. and Lee, S. Y. 2005. Display of lipase on the cell surface of *Escherichia coli* using OprF as an anchor and its application to enantioselective resolution in organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.* 90: 223-230.
- Lee, S. Y., Choi, J. H. and Xu, Z. 2003. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* 21: 45-52.
- Li, C., Zhu, Y., Benz, I., Schmidt, M. A., Chen, W., Mulchandani, A. and Qiao, C. 2008. Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter pathway. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 485-490.
- Li, M. 2000. Applications of display technology in protein analysis. *Nat. Biotechnol.* 18: 1251-1256.
- Liljeqvist, S., Samuelson, P., Hansson, M., Nguyen, T. N., Binz, H. and Ståhl, S. 1997. Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2481-2488.
- Luo, D. H., Zong, M. H. and Xu, J. H. 2003. Biocatalytic synthesis of (-)-1-trimethylsilylethanol by asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS2.2241. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 24-25: 83-88.
- Majander, K., Korhonen, T. K. and Westerlund-Wikström, B. 2005. Simultaneous display of multiple foreign peptides in the FliD capping and FliC filament proteins of the *Escherichia coli* flagellum. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4263-4268.
- Martineau, P., Charbit, A., Leclerc, C., Werts, C., O'Callaghan, D. and Hofnung, M.

1991. A genetic system to elicit and monitor anti-peptide antibodies without peptide synthesis. *Biotechnology* 9: 170-172.
- Maurer, J., Jose, J. and Meyer, T. F. 1997. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 794-804.
- Meng, X., Slominski, B. A. and Guenter, W. 2004. The effect of fat type, carbohydrase, and lipase addition on growth performance and nutrient utilization of young broilers fed wheat-based diets. *Poult Sci.* 83: 1718-1727.
- Mesnager, S., Weber-Levy, M., Haustant, M., Mock, M. and Fouet, A. 1999. Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant *Bacillus anthracis* protects against tetanus toxin. *Infect. Immun.* 67: 4847-4850.
- Modi, M. K., Reddy, J. R., Rao, B. V. and Prasad, R. B. 2006. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnol. Lett.* 28: 637-640.
- Narita, J., Okano, K., Tateno, T., Tanino, T., Sewaki, T., Sung, M. H., Fukuda, H. and Kondo, A. 2006. Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 564-572.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. and Ivanov, M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 433-446.
- Nguyen, T. N., Gourdon, M. H., Hansson, M., Robert, A., Samuelson, P., Libon, C., Andréoni, C., Nygren, P. A., Binz, H., Uhlén, M. and Stefan, S. 1995. Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *J. Biotechnol.* 42: 207-219.

- Nishimura, K., Tajima, N., Yoon, Y. H., Park, S. Y. and Tame, J. R. 2010. Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *J. Mol. Med.* 88: 451-458.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Koen, H. G. V. and Adrian, G. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197-211.
- Parawira, W. 2009. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29: 82-93.
- Patel, R. N. 1998. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 361-395.
- Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L. and Muthukumar, K. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99: 288-296.
- Rice, J. J. and Daugherty, P. S. 2008. Directed evolution of a biterminal bacterial display scaffold enhances the display of diverse peptides. *Protein Eng. Des. Sel.* 21: 435-442.
- Richins, R. D., Kaneva, I., Mulchandani, A. and Chen, W. 1997. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat. Biotechnol.* 15: 984-987.
- Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L. and Molina-Grima, E. 2009. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.* 27: 398-408.
- Salah, R. B., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H. and Gargouri, Y. 2007. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. *J. Biosci. Bioeng.* 103: 368-372.
- Samad, M. Y. A., Razak, C., Salleh, A. B., Yunus, W. M., Ampon, K. and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Methods* 9: 51-56.
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P. A. and Ståhl, S. 2002. Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.* 96: 129-154.
- Satoshi, F., Matsushashi, H. and Arata, K. 2004. Biodiesel fuel production with solid superacid catalysis in fixed bed reactor under atmospheric pressure. *Cata. Comm.* 5: 721-723.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D. and Model, P. 1993. Cell wall sorting signals in

- surface proteins of Gram-positive bacteria. *EMBO J.* 12: 4803-4811.
- Schultheiss, E., Weiss, S., Winterer, E., Maas, R., Heinzle, E. and Jose, J. 2008. Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4782-4791.
- Schurholz, T., Kehne, J., Gieselmann, A. and Newmann, E. 1992. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor by Chaps dialysis depends on the concentration of salt, lipid and protein. *Biochemistry* 31: 5067-5077.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Shih, T. W. and Pan, T. M. 2010. Substitution of Asp189 residue alters the activity and thermostability of *Geobacillus* sp. NTU 03 lipase. *Biotechnol. Lett.* 33: 1841-1846.
- Shruthi, H., Anand, P., Murugan, V. and Sankaran, K. 2010. Twin arginine translocase pathway and fast-folding lipoprotein biosynthesis in *E. coli*: interesting implications and applications. *Mol. Biosyst.* 6: 999-1007.
- Singh, A. K., Fernando, S. D. and Hernandez, R. 2007. Base-catalyzed fast transesterification of soybean oil using ultrasonication. *Energ. Fuels* 21: 1161-1164.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
- Smith, P. C., Ngothai, Y., Nguyen, Q. D. and O'Neill, B. K. 2010. Improving the low-temperature properties of biodiesel: Methods and consequences. *Renew. Energ.* 35: 1145-1151.
- Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T., Cebolla, A. and De Lorenzo, V. 1998. Metalloadsorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* 180: 2280-2284.
- Srivastava, O. P. and Srivastava, K. 1998. Purification of gamma-crystallin from human lenses by acetone precipitation method. *Curr. Eye Res.* 17: 1074-1081.
- Stampfer, W., Kosjek, B., Kroutil, W. and Faber, K. 2003. On the organic solvent and thermostability of the biocatalytic redox system of *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 865-869.
- Stathopoulos, C., Georgiou, G. and Earhart, C. F. 1996. Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp-OmpA (46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer



- membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 112-119.
- Stentebjerg-Olesen, B., Pallesen, L., Jensen, L. B., Christiansen, G. and Klemm, P. 1997. Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. *Microbiology* 143: 2027-2038.
- Sukupolvi, S. and Vaara, M. 1989. *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* mutants with increased outer membrane permeability to hydrophobic compounds. *Biochim. Biophys. Acta.* 988: 377-387.
- Suzuki, T., Lett, M. C. and Sasakawa, C. 1995. Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J. Biol. Chem.* 270: 30874-30880.
- Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2008. Enzymatic production of biodiesel from jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochem. Engineer. J.* 39: 185-189.
- Taylor, I. M., Harrison, J. L., Timmis, K. N. and O'Connor, C. D. 1990. The TraT lipoprotein as a vehicle for the transport of foreign antigenic determinants to the cell surface of *Escherichia coli* K12: structure-function relationships in the TraT protein. *Mol. Microbiol.* 4: 1259-1268.
- Thompson, B. J., Widdick, D. A., Hicks, M. G., Chandra, G., Sutcliffe, I. C., Palmer, T. and Hutchings, M. I. 2010. Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 4: 943-957.
- Tsai, W. T., Lin, C. C. and Yeh, C. W. 2005. An analysis of biodiesel fuel from waste oil in Taiwan. *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 77: 1-22.
- Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M. and Woodley, J. M. 2011. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org. Process. Res. Dev.* 15: 266-274.
- van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H. and Fraaije, M. W. 2011. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 29 :79-86.
- Varadarajan, N., Cantor, J. R., Georgiou, G. and Iverson, B. L. 2009. Construction and flow cytometric screening of targeted enzyme libraries. *Nat. Protoc.* 4: 893-901.
- Vasudevan, P. T. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* 35: 421-430.
- Verhoeven, G. S., Alexeeva, S., Dogterom, M. and Blaauwen, T. 2009. Differential

- bacterial surface display of peptides by the transmembrane domain of OmpA. *PLoS One* 4, e6739.
- Verma, M. L., Azmi, W. and Kanwar, S. S. 2008. Microbial lipases: at the interface of aqueous and non-aqueous media. A review. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 55: 265-294.
- Vogel, H. and Jähnig, F. 1986. Models for the structure of outer-membrane proteins of *Escherichia coli* derived from Raman spectroscopy and prediction methods. *J. Mol. Biol.* 190: 191-199.
- Vyas, A. P., Verma, J. and Subrahmanyam, N. 2010. A review on FAME production processes. *Fuel* 89: 1-9.
- Wakayama, T., Kato, Y., Utsumi, R., Tsuji, A. and Iseki, S. 2006. A time- and cost-saving method of producing rat polyclonal antibodies. *Acta. Histochem. Cytochem.* 39: 79-87.
- Wallace, R. B., Johnson, M. J., Suggs, S. V., Miyoshi, K., Bhatt, R. and Itakura, K. 1981. A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* 16: 21-26.
- Wan, H. M., Chang, B. Y. and Lin, S. C. 2002. Anchorage of cyclodextrin glucanotransferase on the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 79: 457-464.
- Wang, J. Y. and Chao, Y. P. 2006. Immobilization of cells with surface-displayed chitin-binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 927-931.
- Wang, P. S., Tat, M. E. and van Gerpen, J. 2005. The production of fatty acid isopropyl esters and their use as a diesel engine fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82: 845-849.
- Wang, P. S., Thompson, J. and van Gerpen, J. 2011. Minimizing the cost of biodiesel blends for specified cloud points. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 563-572.
- Wang, P., Anthes, J. C., Siegel, M. I., Egan, R. W. and Billah, M. M. 1991. Existence of cytosolic phospholipase D. Identification and comparison with membrane-bound enzyme. *J. Biol. Chem.* 266: 14877-14880.
- Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. and Kolmar, H. 2001. Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J. Bacteriol.* 183: 7273-7284.
- Wernéus, H. and Ståhl, S. 2004. Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40: 209-228.

- Westerlund-Wikström, B., Tanskanen, J., Virkola, R., Hacker, J., Lindberg, M., Skurnik, M. and Korhonen, T. K. 1997. Functional expression of adhesive peptides as fusions to *Escherichia coli* flagellin. *Protein Eng.* 10: 1319-1326.
- Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. and Jaeger, K. E. 2007. Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem.* 8: 55-60.
- Xu, Z. and Lee, S. Y. 1999. Display of polyhistidine peptides on the *Escherichia coli* cell surface by using outer membrane protein C as an anchoring motif. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5142-5147.
- Yang, C., Zhao, Q., Liu, Z., Li, Q., Qiao, C., Mulchandani, A. and Chen, W. 2008a. Cell surface display of functional macromolecule fusions on *Escherichia coli* for development of an autofluorescent whole-cell biocatalyst. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6105-6110.
- Yang, C., Zhu, Y., Yang, J., Liu, Z., Qiao, C., Mulchandani, A. and Chen, W. 2008b. Development of an autofluorescent whole-cell biocatalyst by displaying dual functional moieties on *Escherichia coli* cell surfaces and construction of a coculture with organophosphate-mineralizing activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7733-7739.
- Yang, T. H., Kwon, M. A., Song, J. K., Pan, J. G. and Rhee, J. S. 2010. Functional display of *Pseudomonas* and *Burkholderia* lipases using a translocator domain of EstA autotransporter on the cell surface of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 146: 126-129.
- Yang, Z., Liu, Q., Wang, Q. and Zhang, Y. 2008c. Novel bacterial surface display systems based on outer membrane anchoring elements from the marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4359-4365.
- Yim, S. K., Kim, D. H., Jung, H. C., Pan, J. G., Kang, H. S., Ahn, T. and Yun, C. H. 2010. Surface display of heme- and diflavin-containing cytochrome P450 BM3 in *Escherichia coli*: a whole cell biocatalyst for oxidation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 712-717.
- Yoda, A., Clark, A. W. and Yoda, S. 1984. Reconstitution of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase proteoliposomes having the same turnover rate as the membraneous enzyme. *Bioclim. Biophys. Actu.* 778: 332-340.
- Yusuf, N., Kamarudin, S. K. and Yaakub, Z. 2011. Overview on the current trends in

biodiesel production. *Energ. Conver. Manag.* 52: 2741-2751.

Zullaikah, S., Lai, C. C., Vali, S. R. and Ju, Y. H. 2005. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. *Bioresour. Technol.* 96: 1889-1896.

