

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

利用重組 *Pichia pastoris* 生產 *Candida rugosa* 脂肪  
酶 3 之生產菌株再改良與培養條件最適化

Further strain improvement and optimization of culture  
conditions for *Candida rugosa* lipase 3 production by  
recombinant *Pichia pastoris*

石少岡

Shao-Kang Shih

指導教授：黃健雄 博士

Advisor: Jan-Hsiung Huang, Ph.D.

中華民國九十八年七月

July, 2009

## 謝誌

本論文承蒙恩師 黃健雄博士悉心指導與教誨，在學習的觀念與實驗基礎上給予細心且認真的教導，在研究期間遭遇許多的問題，賦予我獨立思考空間，且不時的指點迷津，突破困境；於論文撰寫過程中更是巨細靡遺的校閱及修正，故謹誌於卷首以謝師恩。

文稿初成，承蒙臺灣大學微生物與生化學研究所所長兼教授 潘子明博士，以及臺灣大學農業化學研究所教授 李敏雄博士對本論文提供寶貴意見，受益匪淺，僅以此表達由衷之感激。

來自許多人的幫忙及鼓勵，讓我的研究能得以順利進行：可以互相討論及權充我小幫手的至宇，與扮演玩樂角色的耀萱，因為你們的加入，伴我度過這孤單且艱辛的一年；感謝 李昆達博士與 李佳音博士提供寶貴的實驗室設備與藥品，而其中智國、黎雯等學弟妹的熱心幫忙，實助益良多；小百科、俊帆、瑋盈、佩真、亭君、培儒、侯董及奇異果等學長姐，提出建言與指導我進行實驗；還有玩樂用的高中死黨們，精心籌辦的社團出遊！要感謝的人太多了，族繁不及備載，再次謝謝你（妳）們的幫助，每每想起總令人感到很溫暖！

感謝我親愛的爸爸、媽媽、弟弟，毫無保留的關懷及支持，與愛犬班吉的陪伴，讓我無後顧之憂可以全心全力的從事研究工作，我愛你們！最終，也是最最心愛的女友臆晴，多虧妳無微不至的照顧，把我養得又肥又胖；即使實驗弄到很晚，或是假日又要來取樣，總是沒有怨言的支持我；想去哪裡走走，總是儘量排空、不辭辛勞的陪我上山下海；在我最低潮時，充當我發洩情緒的垃圾桶；動念想放棄時，為我加油打氣，永遠站在我這邊支持我，作我的後盾，沒有妳的陪伴，我一定沒有勇氣走到現在，謝謝妳，超愛妳！僅以此小小的成果，獻給所有陪伴我的人們，能一同分享這滿心的喜悅。

石少岡

于民國九十八年八月十一日

## 摘要

使用中央研究院植物暨微生物學研究所蕭介夫教授研究室所構築之能外泌 *Candida rugosa* 脂肪酶 3 (CRL3) 的 *Pichia pastoris* GS115/CRL3 菌株，首先進行菌株改良，以 Zeocin 作為篩選標記，逐步提升其濃度以篩選具較佳異源基因表現之轉形株。當 Zeocin 濃度為 1500  $\mu\text{g/mL}$  時，篩得具最高 CRL3 活性之菌株，命名為 *Pichia pastoris* GS115/CRL3/Z1500。利用 500 mL Hinton's 搖瓶，採三因子-三水準 Box-Behnken 設計之反應曲面法 (Response surface methodology, RSM) 探討此新轉形株之最適培養條件，當 FM22 培養基碳氮比為 12、接種量 8.8% 及溫度 15°C，震盪培養 120 小時之 CRL3 活性為 8.47 U/mL。以該條件於五公升醱酵槽內進行批式培養，控制 pH 5.0 條件下培養之酵素活性比未控制者佳，可達 26.77 U/mL。進一步進行饋料批式培養，以 11.25 mL/h 固定流速饋料培養 216 小時，菌體濃度 ( $\text{OD}_{600}$ ) 與酵素活性分別可達 627.6 與 451.7 U/mL，但培養液中有大量甘油累積；改採仿指數饋料模式結果，甘油累積現象可大幅改善，且培養 168 小時即可得到與固定流速饋料模式相當之酵素活性 (423.2 U/mL)，生產力可提高 20%，達 2.52 U/mL/h。

**關鍵字：**畢赤酵母、假絲酵母、脂肪酶、反應曲面法、固定流速饋料、仿指數饋料

## Abstract

*Pichia pastoris* GS115/CRL3, constructed by Prof. Shaw's lab, Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, was used to produce extracellular *Candida rugosa* lipase 3 (CRL3). Production strain was further improved by screening and selection on a series of agar plates in stepwise increase of Zeocin concentrations. The highest-yield strain was finally obtained and named as *Pichia pastoris* GS115/CRL3/Z1500. Using 500-mL Hinton's flasks, response surface methodology (RSM) based on a three-factor three-level Box-Behnken design of experiment was used to optimize the culture conditions for CRL3 production by *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500. The optimal culture conditions were found as follows: C/N ratio in FM22, 12; inoculum size, 8.8%; temperature, 15°C. Under the optimal conditions, CRL3 activity of 8.47 U/mL was achieved after 120 h cultivation. Then, batch cultures were carried out in a 5-L bench-top fermentor under the optimal conditions. It was found that pH controlled at 5 was better than pH uncontrolled during cultivation. And a CRL3 activity of 26.77 U/mL was obtained after 96 h cultivation. Based on the result obtained, fed-batch cultures were further performed in order to attain the high cell density culture. While constant feeding rate at 11.25 mL/h was operated, OD<sub>600</sub> of 627.6 and CRL3 activity of 451.7 U/mL were obtained, respectively after 216 h cultivation. However, a large amount of glycerol was accumulated in culture broth. While pseudo-exponential feeding mode was used instead, glycerol accumulation was minimized and CRL3 activity of 423.2 U/mL was achieved after 168 h cultivation. Productivity of 2.52 U/mL/h was obtained which was 20% higher than that of constant feeding mode.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, *Candida rugosa*, lipase, response surface methodology, constant feeding, pseudo-exponential feeding

## 目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖次.....	VII
表次.....	IX
縮寫表.....	X
第一章 緒論.....	1
1.1 表現系統.....	1
1.2 嗜甲醇酵母菌 <i>Pichia pastoris</i> 表現系統.....	3
1.2.1 <i>P. pastoris</i> 蛋白質表現系統的歷史沿革.....	3
1.2.2 <i>P. pastoris</i> 對甲醇的代謝作用.....	4
1.2.3 <i>P. pastoris</i> 驅動異源蛋白表現之啟動子.....	4
1.2.3.1 酒精氧化酶啟動子 (AOX 啟動子).....	4
1.2.3.2 甘油醛-3-磷酸脫氫酶啟動子 (GAP 啟動子).....	6
1.2.4 <i>P. pastoris</i> 表現生產異源蛋白之優點.....	6
1.2.5 外泌性訊息胜肽.....	9
1.3 來自假絲酵母 <i>Candida rugosa</i> 的脂肪酶.....	9
1.3.1 脂肪酶概述.....	9
1.3.2 <i>Candida rugosa</i> 脂肪酶.....	11
1.3.3 <i>Candida rugosa</i> 脂肪酶 3 (CRL3).....	13
1.4 後轉形載體放大作用 (Posttransformation vector amplification, PTVA).....	15
1.4.1 Zeocin 簡介.....	17
1.5 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM).....	17
1.5.1 反應曲面法簡介.....	17

1.5.2	常用實驗設計類型.....	19
1.5.2.1	二水準因子設計 (two-level factorial design) .....	19
1.5.2.2	Box-Behnken 設計法 .....	20
1.6	重組酵母菌之高細胞密度培養 .....	20
1.7	饋料批式培養之控制原理 .....	21
1.8	研究動機與目的 .....	24
第二章 材料與方法.....		26
2.1	使用菌株 .....	26
2.1.1	宿主與質體構築.....	26
2.1.2	菌株保存方法.....	26
2.2	藥品與試劑 .....	28
2.2.1	一般試藥.....	28
2.2.2	抗生素.....	28
2.2.3	緩衝液.....	28
2.2.4	培養基.....	28
2.3	實驗儀器與設備 .....	31
2.4	逐步提升 Zeocin 濃度馴養 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3 以篩選高脂肪活性表現株.....	32
2.4.1	馴養步驟.....	32
2.4.2	篩選高脂肪酶活性表現株.....	33
2.5	Hinton`s 三角瓶之培養與表現 .....	35
2.5.1	菌種活化、種培養及接種前處理.....	35
2.5.2	培養條件對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體生長及 CRL3 表現之影響 .....	35
2.5.3	Hinton`s 三角瓶培養之反應曲面法實驗設計 .....	37
2.6	醱酵槽生產 .....	40

2.6.1	醱酵槽操作程序.....	40
2.6.2	批式培養 (batch culture).....	41
2.6.2.1	pH 值控制與否對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 生長及 CRL3 活性之影響.....	41
2.6.3	饋料批式培養 (fed-batch culture).....	41
2.6.3.1	固定流速饋料模式 (constant feeding mode).....	42
2.6.3.2	仿指數饋料模式 (pseudo-exponential feeding mode).....	42
2.7	分析方法.....	43
2.7.1	菌體生長量測定 (OD <sub>600</sub> ).....	43
2.7.2	菌體乾重與 OD <sub>600</sub> 之換算.....	43
2.7.3	脂肪酶活性分析.....	43
2.7.4	蛋白質定量法.....	44
2.7.5	蛋白質膠體電泳.....	45
2.7.6	甘油濃度分析.....	47
2.7.6.1	甘油濃度標準曲線製備.....	48
第三章	結果與討論.....	49
3.1	脂肪酶活性分析方法的建立.....	49
3.1.1	最適反應時間的決定.....	49
3.1.2	最適反應基質濃度.....	49
3.2	菌株改良之探討.....	52
3.2.1	建立篩菌方法.....	52
3.2.2	篩菌結果.....	52
3.2.2.1	一次篩菌.....	52
3.2.2.2	透明環半徑/菌落半徑之比值與 CRL3 活性之相關性.....	54
3.2.2.3	二次篩菌.....	54
3.3	Hinton's 三角瓶培養條件之探討.....	57

3.3.1	<i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 於全合成培養基 FM22 之生長 曲線.....	57
3.3.2	培養條件對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體生長及 CRL3 表現之影響.....	57
3.3.2.1	起始 pH 值.....	57
3.3.2.2	培養溫度.....	57
3.3.2.3	培養基碳氮比.....	61
3.3.2.4	接種量.....	61
3.4	以反應曲面法探討 Hinton's 三角瓶培養之最適條件.....	65
3.4.1	反應曲面法數學模式之建立.....	65
3.4.2	反應曲面法之最適條件探討.....	69
3.5	醱酵槽規模之高細胞密度培養.....	74
3.5.1	批式培養 (batch culture).....	74
3.5.2	饋料批式培養 (fed-batch culture).....	76
3.5.2.1	固定流速饋料模式 (constant feeding mode).....	77
3.5.2.2	仿指數饋料模式 (pseudo-exponential feeding mode).....	80
第四章	結論.....	86
第五章	未來展望.....	87
第六章	參考文獻.....	88

## 圖次

圖 1.1 嗜甲醇酵母菌之甲醇代謝路徑.....	5
圖 1.2 嗜甲醇酵母菌之甘油代謝路徑.....	7
圖 1.3 釀酒酵母外泌蛋白路徑.....	10
圖 1.4 <i>Candida rugosa</i> 脂肪酶之立體結構.....	14
圖 1.5 單複製數與雙複製數載體 pPICZB- $\beta$ -lactamase 鑲嵌於 <i>P. pastoris</i> AOX1 啟動子基因座之圖示 .....	16
圖 1.6 Zeocin 結構 .....	18
圖 1.7 本論文之研究架構.....	25
圖 2.1 表現載體 pGAPZ $\alpha$ C-CRL3 .....	27
圖 2.2 逐步提升 Zeocin 濃度馴養 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3 以篩選高脂肪酶活性 表現株之示意圖.....	34
圖 3.1 脂肪酶反應時間與產物 <i>p</i> -nitrophenol 之關係.....	50
圖 3.2 不同 PNPB 濃度之酵素反應速率變化.....	51
圖 3.3 以 YPGTA 平板培養基篩選具脂肪酶活性表現 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3 轉形株之圖示 .....	53
圖 3.4 透明環半徑/菌落半徑之比值與 CRL3 活性之相關性.....	55
圖 3.5 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 之生長曲線.....	58
圖 3.6 不同溫度培養結果之 10% SDS-PAGE 電泳分析 .....	62
圖 3.7 碳氮比、培養溫度與接種量對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖.....	70

圖 3.8 接種量、碳氮比與培養溫度對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖.....	71
圖 3.9 培養溫度、碳氮比與接種量對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖.....	72
圖 3.10 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 最適化培養之生長曲線.....	73
圖 3.11 以 Hinton's 三角瓶培養最適條件進行批式培養.....	75
圖 3.12 固定流速模式之饋料批式培養.....	78
圖 3.13 以 10% SDS-PAGE 電泳分析不同培養時間樣品之結果.....	79
圖 3.14 指數饋料流量模擬圖.....	81
圖 3.15 仿指數模式之饋料批式培養.....	82
圖 3.16 以 10% SDS-PAGE 電泳分析不同饋料模式之樣品.....	84



## 表次

表 1.1 目前常用表現系統之比較.....	2
表 1.2 以 <i>Pichia pastoris</i> 為宿主表現各種異源蛋白的產量 .....	8
表 1.3 重要之商業化脂肪酶.....	12
表 1.4 細菌與酵母菌在各種饋料策略進行高細胞密度醱酵培養結果.....	22
表 2.1 Hinton`s三角瓶培養 Box-Behnken 設計法之三因子-三水準條件 .....	38
表 2.2 Hinton`s三角瓶培養條件之三因子-三水準 Box-Behnken 設計組合 .....	39
表 3.1 比較藉由不同 Zeocin 濃度篩菌對於菌株外泌脂肪酶活性之影響 .....	56
表 3.2 不同起始 pH 值對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源 蛋白 CRL3 活性之影響 .....	59
表 3.3 不同培養溫度對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋 白 CRL3 活性之影響.....	60
表 3.4 不同培養基碳氮比對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異 源蛋白 CRL3 活性之影響.....	63
表 3.5 不同接種量對 <i>P. pastoris</i> GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋 白 CRL3 活性之影響.....	64
表 3.6 Hinton`s三角瓶培養之 Box-Behnken 設計及其實驗結果 .....	66
表 3.7 反應曲面法設計所得 CRL3 酵素活性之變異數分析.....	67
表 3.8 Hinton`s三角瓶培養之 Box-Behnken 設計迴歸分析表 .....	68
表 3.9 不同饋料模式之培養結果比較.....	85

### 縮寫表

SCP	single-cell proteins
AOX	alcohol oxidase
GAP	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PHO1	acid phosphatase
ER	endoplasmic reticulum
SV	secretory vesicles
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipase
Lip	lipase
PTVA	posttransformational vector amplification
DNA	deoxyribonucleic acid
RSM	response surface methodology
BBD	Box-Behnken design
ANOVA	analysis of variance
DCW	dry cell weight
DO	dissolved oxygen
OD	optical density
YPG	yeast extract, peptone, glycerol medium
YPGZ	yeast extract, peptone, glycerol medium with Zeocin
YPGTA	yeast extract, peptone, glycerol medium with trybutyrin and Arabic gum
PBS	phosphate buffer saline
PNPB	<i>p</i> -nitrophenyl butyrate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
BSA	bovine serum albumin
CBR	Coomassie brilliant blue R
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	tetramethylenediamine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography
U	unit
hAFP	Herring antifreeze proteins

# 第一章 緒論

## 1.1 表現系統

隨著生物科技的日新月異，目標蛋白的取得，已由早期耗時耗力的純化分離，演進為利用分子生物技術及異源蛋白表現系統來大量生產重組目標蛋白，廣為被世人所使用，應用於學術及產業應用中。而表現系統一般可分為細菌、真菌、昆蟲細胞與動、植物細胞，各有其應用上的優點 (表 1.1)。在細菌表現系統中，以大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 最常被應用來表現蛋白，其優點為菌體生長快速、蛋白產量高以及成本低廉；但由於其為原核生物，對表現蛋白並不具有轉譯後修飾 (post-translational modification) 的能力，並具有安全上疑慮 (具內毒素)，而當過量表現異源蛋白時，易形成內涵體 (inclusion body)，蛋白無法正確折疊，導致活性不高甚至無活性，必須在回收時進行蛋白質的再折疊，以恢復其正確構形，才具有生物活性，增添時間與成本上的耗費。

而如同大腸桿菌為一常用的原核異源蛋白表現系統，酵母菌在真核表現系統中亦扮演類似角色，且酵母菌的異源蛋白表現系統不僅已被證實能夠有效率且經濟地生產有價值之真核蛋白 (Romanos *et al.*, 1992)，其在培養上也具有如下之優點：

- (1) 生長速度快。
- (2) 培養基簡單。
- (3) 容易培養並可以高密度培養。
- (4) 無產生內毒素的問題。

而更重要的是，酵母菌具備許多真核生物特有的轉譯後蛋白修飾作用，如蛋白質折疊、醣基化作用 (glycosylation)，或形成雙硫鍵等 (Cereghino and Cregg, 2000)。1981 年由 Hitzeman 等人首次提出以釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 表現重組蛋白質干擾素 (interferon)，首開酵母菌異源蛋白表現系統之先河；當時之所以會選擇 *S. cerevisiae* 的原因，在於它具有能大量表現蛋白的強啟動子 (strong promoter)、具營養缺陷株篩選標誌 (auxotrophic markers)、穩定分裂、具有多重複製數 (multiple copy number) 特性的質體等，利於表現異源蛋白。雖然

表 1.1 目前常用表現系統之比較 (Fernandez and Hoeffler, 1999)

Table 1.1 Comparison of different expression systems

Characteristics	Bacteria	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
<b>Cell growth</b>	rapid	rapid	slow	slow
<b>Complexity of growth medium</b>	minimum	minimum	complex	complex
<b>Cost of growth medium</b>	low	low	high	high
<b>Inclusion bodies</b>	yes	no	no	no
<b>Expression level</b>	high	low to high	low to high	low
<b>Extracellular expression</b>	secretion to protoplasm	secretion to protoplasm and medium	secretion to medium	secretion to medium
<b>Protein folding</b>	refolding often required	refolding may be required	proper folding	proper folding
<b>Post-translational modification</b>				
<b>N-linked glycosylation</b>	no	high mannose	simple	complex
<b>O-linked glycosylation</b>	no	yes	yes	yes
<b>Phosphorylation</b>	no	yes	yes	yes
<b>Acetylation</b>	no	yes	yes	yes
<b>Acylation</b>	no	yes	yes	yes
<b>Safety issue</b>	endotoxin	yes	viral clearance	viral clearance

如此，但是以 *S. cerevisiae* 表現蛋白質仍具有如下缺點：

- (1) 異源蛋白產量佔總蛋白比例偏低。
- (2) 利用重組質體來表現外來蛋白質時，會對細胞產生緊迫感 (stress)，使質體的穩定度降低。
- (3) 無法有效將異源蛋白分泌至培養液中。
- (4) 生產異源蛋白時，常會有過度醣基化 (Hyperglycosylation) 的現象，如此將導致蛋白生物活性降低。

由於以上種種限制，故有許多代替性的酵母菌表現系統的研究被提出，針對種種不同用途，發展出多樣的酵母菌表現系統，這些替代酵母表現系統之開發，普遍是由於在工業大規模生產程序上具有穩定的基因型 (genotypes) 與良好生長狀況而受到重視，如本研究所使用之嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* 表現系統。

## 1.2 嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* 表現系統

### 1.2.1 *P. pastoris* 蛋白質表現系統的歷史沿革

嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* 由於利用簡單廉價的培養基即可進行高細胞密度培養，且能利用甲醇作為碳源，故率先於 1960 年代後期應用於單細胞蛋白質 (single-cell proteins, SCP) 之生產。然而，由於石油危機造成培養成本大幅上升，加上替代植物性蛋白質來源如黃豆等產量提高，因此利用甲醇生產單細胞蛋白質的經濟價值與競爭力大幅下滑；即使如此，*P. pastoris* 大規模醱酵方法發展已趨於完備，例 1970 年 Phillips Petroleum Company 利用甲醇進行高細胞密度培養 *P. pastoris*，當時細胞乾重已可超過 130 g/L (Wegner, 1990)。

自 1980 年代起，研究人員嘗試以 *P. pastoris* 作為異源蛋白質表現系統，首先分離出酒精氧化酶 (alcohol oxidase, AOX) 的基因與啟動子，並建立載體、菌株及相關實驗方法，因結合了單細胞蛋白質的高效率醱酵程序與極強的酒精氧化酵素啟動子 (*AOX1* promoter)，加上生物技術的與時俱進，目前已有許多利用

*P. pastoris* 大量表現異源蛋白成功的先例，例如由 Werten 等人 (1999) 指出，重組 *P. pastoris* 在高細胞密度培養下，所誘導表現之異源蛋白-明膠 (gelatin) 可高達 14.8 g/L。

### 1.2.2 *P. pastoris* 對甲醇的代謝作用

*Pichia pastoris* 利用由數種酵素所組成的特殊代謝路徑利用甲醇，代謝路徑如圖 1.1 所示 (Hartner and Glieder, 2006)。酒精氧化酶 AOX 是參與甲醇代謝的第一個酵素，負責將甲醇氧化成甲醛與過氧化氫，由於過氧化氫對細胞具有毒性，因此氧化過程乃於過氧化體 (peroxisome) 內進行，使之與細胞的其他部位隔離。酒精氧化酶表現於過氧化氫體的同時，也會產生過氧化氫酶 (catalase)，將過氧化氫分解成氧和水。而所生成的甲醛離開過氧化體之後，可能經由細胞質中的異化作用 (dissimilation) 產生能量供菌體生長，或者藉同化作用 (assimilation) 來增加生物量 (biomass) (Gellissen, 2000)。

### 1.2.3 *P. pastoris* 驅動異源蛋白表現之啟動子

#### 1.2.3.1 酒精氧化酶啟動子 (AOX 啟動子)

在 *Pichia pastoris* 中，有兩個基因負責酒精氧化酶的蛋白表現，分別是 *AOX1* 及 *AOX2*，其中以 *AOX1* 為主，而 *AOX2* 基因雖然與 *AOX1* 有 97% 的相似性 (Couderc and Baratti, 1980)，但其表現出的酒精氧化酶代謝甲醇產生能量的能力卻比 *AOX1* 差。野生型 (wild type) 之 *AOX1* 與 *AOX2* 均無缺陷，代謝甲醇效率最好，表現型 (phenotype) 為 Mut<sup>+</sup> (methanol utilization plus)。在以甲醇作為唯一碳源之培養基中，甲醇會誘使 *AOX1* 啟動子大量表現，其表現之酒精氧化酶可達細胞內總蛋白含量的 30% (Cregg *et al.*, 1989)，因此可以利用 *AOX1* 啟動子來控制重組基因的表現以生產異源蛋白；但是，當葡萄糖或甘油等其他碳源存在時，則會抑制 *AOX1* 啟動子之表現，必須等到其他碳源消耗殆盡後方能解除此抑制現象 (Ellis *et al.*, 1985)。由於另外一個表現酒精氧化酵素的基因 *AOX2*，與 *AOX1* 相比在代謝甲醇的能力較差，所以若 *AOX1* 有缺陷，僅 *AOX2* 能正常表現酒精氧化酵素的菌株，在以甲醇當作唯一碳源培養時，將因代謝甲醇效率差導致生長較緩慢，故稱之為 Mut<sup>s</sup> (methanol utilization slow)。



### 1.2.3.2 甘油醛-3-磷酸脫氫酶啟動子 (*GAP* 啟動子)

甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 是 *P. pastoris* 在糖解作用中不可或缺的酵素，且不論是甲醇、葡萄糖或甘油的代謝途徑 (圖 1.2)，都會產生甘油醛-3-磷酸，皆可用以驅動 *GAPDH* 啟動子 (簡稱 *GAP* 啟動子)。近年來發展出以 *GAP* 啟動子表現異源蛋白，其本身同 *AOX1* 亦為一強力啟動子，不需以甲醇進行誘導，隨菌體分裂生長可持續表現，故培養過程不需經碳源轉換之過渡期 (transition phase)，就生產的連續性及操作的方便性而言，皆優於 *AOX1*；而其缺點為不適合表現對細胞產生毒害之異源蛋白，細胞將因難以生長而無法表現之 (Cereghino and Cregg, 2000)。

### 1.2.4 *P. pastoris* 表現生產異源蛋白之優點

自嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* 表現異源蛋白技術建立以來，已成功表現多種異源蛋白 (表 1.2)，例如老鼠上皮細胞生長因子 (Cregg *et al.*, 1991)、米根黴脂肪酶 (*Rhizopus oryzae* lipase) (Minning *et al.*, 1998) 等。而利用嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* 表現異源蛋白具有以下優點：

- (1) 培養條件成熟，可利用成本低廉之全合成培養基即可達到高細胞密度。
- (2) 表現真核生物蛋白質時因有轉譯後修飾，例如醣基化、產生雙硫鍵等，故所表現之重組蛋白質與原來構形較接近。
- (3) 表現所使用的表現載體是屬於插入性質體 (integrative plasmid)，藉由此種質體將外來基因插入在其染色體上，可提高基因穩定性，使得大規模培養時不會因為質體的不穩定性而使蛋白表現量降低 (Romanos, 1995)。
- (4) 重組蛋白能接上適當的外泌性訊息 (secretion signal)，可直接外泌出菌體，利於後續之回收純化。

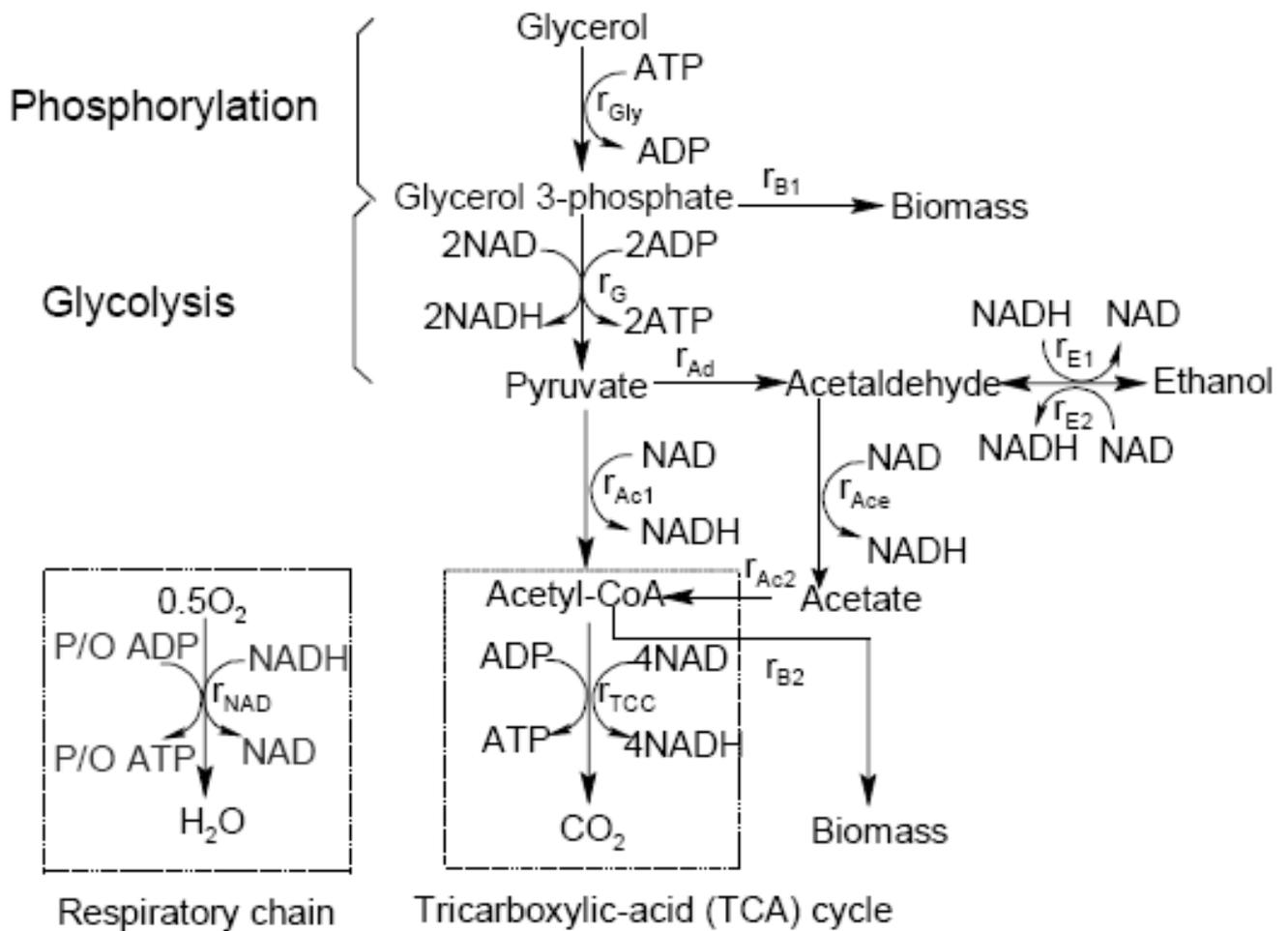


圖 1.2 嗜甲醇酵母菌之甘油代謝路徑 (Ren *et al.*, 2003)

Fig. 1.2 Glycerol utilization pathway in methylotrophic yeasts

表 1.2 以 *Pichia pastoris* 為宿主表現各種異源蛋白的產量 (www.invitrogen.com)

Table 1.2 Productivity of foreign proteins in *Pichia pastoris*

Protein expressed	Expression Level (mg/L)	Reference
<b>Bacterial proteins</b>		
Tetanus toxin fragment C	12,000	Clare, J.J. <i>et al.</i> (1991) <i>Bio/Technology</i> <b>9</b> : 455–460
$\alpha$ -amylase	2,500	Paifer, E. <i>et al.</i> (1994) <i>Yeast</i> <b>10</b> : 1415–1419
T2A peroxidase	2,470	Thomas, L. <i>et al.</i> (1998) <i>Can. J. Microbiol.</i> <b>44</b> : 364–372
<i>C. botulinum</i> neurotoxin fragment	78	Smith, L.A. (1998) <i>Toxicon</i> <b>36</b> : 1539–1548
<b>Yeast proteins</b>		
Catalase L	2,300	Calera, J.A. <i>et al.</i> (1997) <i>Infect. Immun.</i> <b>65</b> : 4718–4724
Glucoamylase	400	Fierobe, H.-P. <i>et al.</i> (1997) <i>Protein Expr. Purif.</i> <b>9</b> : 159–170
Lipase	60	Minning, S. <i>et al.</i> (1998) <i>J. Biotechnol.</i> <b>66</b> : 147–156
<b>Plant proteins</b>		
Hydroxynitrile lyase	22,000	Hasslacher, M. <i>et al.</i> (1997) <i>Protein Expr. Purif.</i> <b>11</b> : 61–71
Wheat lipid transfer protein	720	Klein, C. <i>et al.</i> (1998) <i>Protein Expr. Purif.</i> <b>13</b> : 73–82
Aeroallergen	60	Huecas, S. <i>et al.</i> (1999) <i>Eur. J. Biochem.</i> <b>261</b> : 539–546.
<b>Invertebrate proteins</b>		
Hirudin	1,500	Rosenfeld, S.A. <i>et al.</i> (1996) <i>Protein Expr. Purif.</i> <b>8</b> : 476–482.
Spider dragline silk protein	663	Fahnestock, S.R. <i>et al.</i> (1997) <i>Appl. Micro. Biotechnol.</i> <b>47</b> : 33–39
Honeybee olfactory protein	200	Danty, E. <i>et al.</i> (1999) <i>J. Neuroscience</i> <b>19</b> : 7468-7475
<b>Mammalian proteins</b>		
Mouse gelatin	14,800	Werten, M.W. <i>et al.</i> (1999) <i>Yeast</i> <b>15</b> : 1087-1096
Porcine carboxypeptidase B	200	Ventura, S. <i>et al.</i> (1999) <i>J. Biol. Chem.</i> <b>274</b> : 19925-33
Human tumor necrosis factor	10,000	Sreekrishna, K. <i>et al.</i> (1989) <i>Biochemistry</i> <b>28</b> : 4117-4125
Human IGF-1	600	Brierley, R.A. (1998) <i>Methods Mol. Biol.</i> <b>103</b> : 149–177
Human CD38	455	Munshi, C.B. (1997) <i>Methods Enzymol.</i> <b>280</b> : 318–330
15N-Interferon $\tau$	10	Johnson, T.M. <i>et al.</i> (1999) <i>J. Interferon Cytokine Res.</i> <b>19</b> : 631-636

### 1.2.5 外泌性訊息胜肽

關於蛋白質如何分泌至胞外，1999 年諾貝爾醫學獎得主-Blobel 與學者 Sabatini 於 1970 年首次提出訊息假說 (signal hypothesis)，其說明外泌性蛋白質前端會有一特殊胺基酸序列作為訊息胜肽 (signal peptide)，其在蛋白質外泌前該片段也將被切除，以免影響蛋白生理功能；利用此方式解釋細胞合成蛋白質何以能正確地送至特定位置，包括細胞膜外與其它胞器如粒腺體、葉綠體或細胞核等 (Nelson and Cox, 2000)。而該假說也廣為被世人所應用於異源蛋白表達系統上，它能使原屬於非分泌性的蛋白質，經添加訊息胜肽在其前端，就可分泌到細胞外，有利於異源蛋白的回收純化。

近年來如 *S. cerevisiae* 的 prepro- $\alpha$ -factor 訊息胜肽，或是 *P. pastoris* 的酸性磷酸酯酶 (acid phosphatase, PHO1) 訊息胜肽被商業開發應用於 *P. pastoris* 異源蛋白表達系統，其作法只需將異源基因正確地 (in frame) 接上訊息胜肽，即可外泌所表現之異源蛋白。而較常見的 *S. cerevisiae* 的 prepro- $\alpha$ -factor 訊息胜肽外泌蛋白方式如圖 1.3 所示，該訊息胜肽由 19 個胺基酸序列 (pre 區域) 與 66 個胺基酸序列 (pro 區域) 組成。訊息胜肽分泌蛋白出胞外時，首先在內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 中將訊息胜肽之 pre 區域以胜肽酶 (peptidase) 移除，接著送到高基氏體 (Golgi) 切除 pro 區域，最後以分泌泡形式 (secretory vesicles, SV) 送出細胞膜 (Ostergaard *et al.*, 2000)。

## 1.3 來自假絲酵母 *Candida rugosa* 的脂肪酶

### 1.3.1 脂肪酶概述

在酵素分類中，脂肪酶 (Lipases, EC 3.1.1.3) 或稱三酸甘油酯水解酶 (triacylglycerol ester hydrolase)，廣泛地存在於動物、植物以及微生物中，能催化脂肪水解，在脂肪的代謝與調節過程中扮演相當重要之角色；其有別於一般的酯酶 (carboxyl esterases, EC 3.1.1.1)，對於三酸甘油酯等帶長鏈脂肪酸分子基團仍具高反應活性。此類酵素可在水相及有機相環境下接受反應基質，其催化反應可分為以下兩大類 (Gandhi, 1997)：

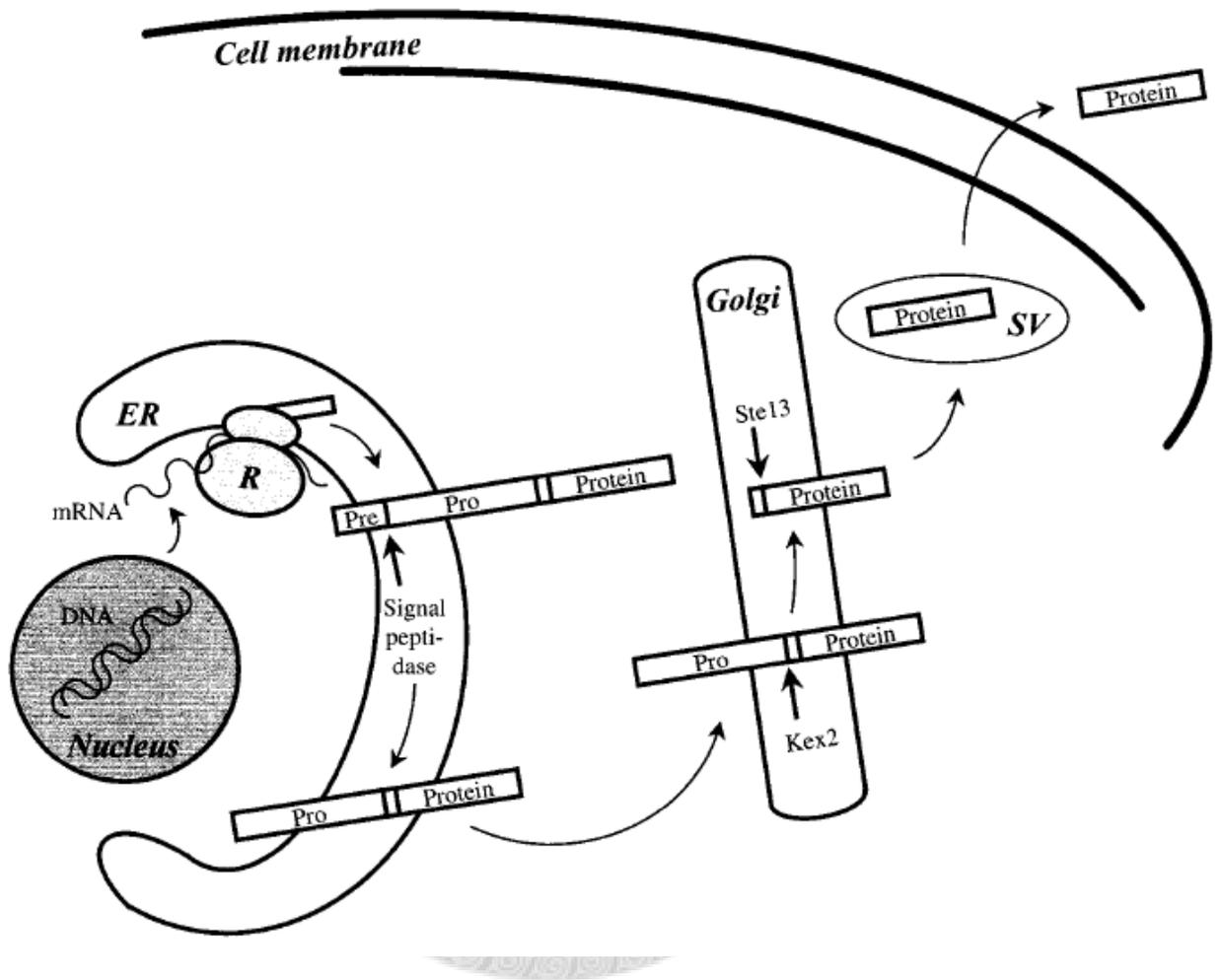
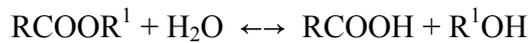


圖 1.3 釀酒酵母外泌蛋白路徑 (Ostergaard *et al.*, 2000)

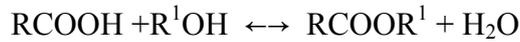
Fig. 1.3 Secretory pathway of proteins in *S. cerevisiae*

(1) 水解 (hydrolysis)



(2) 合成 (synthesis)

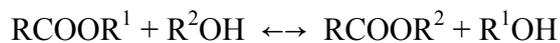
1. 酯化 (esterification)



2. 酯交換 (interesterification)



3. 醇解 (alcoholysis)



4. 酸解 (acidolysis)



脂肪酶的應用範圍極廣，在目前的工業酵素市場上有極大競爭力，包括造紙工業、食品、化學物質合成、石油化學、清潔用品等，表 1.3 簡述市面上重要的商用脂肪分解酵素及其應用範圍 (Schmid and Verger, 1998)。

### 1.3.2 *Candida rugosa* 脂肪酶

假絲酵母 (*Candida rugosa*) 是一種單細胞、不生成孢子 (non-spore-forming)、非致病性的酵母菌，能產生數種不同蛋白質序列類似的脂肪酶 (*Candida rugosa* lipase, CRL)。學者 Veeraragavan 與 Gibbs (1989) 利用色層分析法，首先將 CRL 歸為兩種同功酶 (isozymes)，即 LipA 與 LipB。而截至目前為止，已知 *C. rugosa* 至少有七組基因與產生脂肪酶有關 (*Lip1-Lip7*)，而 LipA、LipB 的分類已不敷使用而逐漸被揚棄 (Domínguez de María *et al.*, 2005)。

由於來自不同基因或經過不同程度轉譯後修飾 (post-translational modification)，如醣基化作用 (glycosylation)、蛋白酶切割 (proteolytic cleave) 等，因此這些不同型的同功脂肪酶，對於受質的專一性及水解位置也有所不同，呈現多樣基質特異性及熱穩定性，有助於微生物適應環境 (Domínguez de María *et al.*,

表 1.3 重要之商業化脂肪酶 (Schmid and Verger, 1998)

Table 1.3 Important commercially available lipases.

Origin	Code <sup>[a]</sup>	<i>M</i> [kDa] (rounded)	Specificity (remarks)	Applications
<b>of mammalian origin</b>				
human pancreatic lipase	HPL	50	<i>sn</i> -1,3	
human gastric lipase	HGL	50	<i>sn</i> -3 (acid-stable)	
porcine pancreatic lipase	PPL	50	<i>sn</i> -1,3	organic synthesis, digestive aid
guinea pig pancreatic lipase	GPL-RP2	48	<i>sn</i> -1,3 (phospholipase A1 activity)	
<b>of fungal origin</b>				
<i>Candida rugosa</i>	CRL	60	nonspecific	organic synthesis
<i>Candida antarctica B</i>	CAL	60	<i>sn</i> -1,3	organic synthesis
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL	60	<i>cis</i> - $\Delta^9$ (unsaturated fatty acids)	oleochemistry
<i>Humicola lanuginosa</i>	HLL	30	nonspecific	detergents
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	30	<i>sn</i> -1,3	cheese manufacturing
<i>Aspergillus oryzae</i>	AOL			cheese manufacturing
<i>Penicillium camembertii</i>	PEL	30	<i>sn</i> -1,3	monoglycerides
<i>Rhizopus delemar</i>	RDL	41	<i>sn</i> -1,3 (phospholipase A1 activity)	oleochemistry
<i>Rhizopus oryzae</i>	ROL	41	<i>sn</i> -1,3 (phospholipase A1 activity)	oleochemistry
<i>Rhizopus arrhizus</i>	RAL	41	<i>sn</i> -1,3 (phospholipase A1 activity)	oleochemistry
<b>of bacterial origin</b>				
<i>Pseudomonas glumae</i>	PGL	33	nonspecific	detergent enzyme, organic synthesis
<i>Burkholderia cepacia</i>	PCL/BCL	33	nonspecific	organic synthesis
<i>Pseudomonas pseudocaligenes</i>	PPL	33	<i>sn</i> -1,3	detergents
<i>Pseudomonas mendocina</i>	PML	33	<i>sn</i> -1,3	detergents
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	33	<i>sn</i> -1,3	organic synthesis
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	BTL-2	43	<i>sn</i> -1,3 (thermoalkalophilic)	
<i>Fusarium solani</i> (hydrolyzes cutin)	FSL	22		detergents

2005)。CRL 其中五種同功脂肪酶 (CRL1-CRL5) 的生化特性已被明確定義，具有下列特點 (Benjamin and Pandey, 1998)：

- (1) 皆含 534 個胺基酸，分子量皆為 57 kDa
- (2) 胺基酸序列的相似性極高，66 % 完全相同
- (3) 具 1 - 3 個糖基化位置，各具不同的 pI 值

在蛋白質的立體結構上，如圖 1.4 所示，屬於  $\alpha/\beta$  水解酵素摺疊 ( $\alpha/\beta$ -hydrolase fold)，也就是以平行  $\beta$  摺片 ( $\beta$ -sheet) 為中心，並且在摺片的兩旁分佈了一些  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha$ -helix)，彼此交錯而構成其主體。而催化水解反應的活性中心，主要是由 Serine 209、Histidine 449 以及 Glutamic acid 341 這三個胺基酸所組成。而由於 *Candida rugosa* 脂肪酶具廣效的受質特異性，故普遍被應用於不同工業上，甚具發展潛力。而近年來隨基因重組蛋白技術的進步，已能個別生產五種同功脂肪酶 (CRL1-CRL5) 以因應不同的工業用途，大幅提升其商業價值。

### 1.3.3 *Candida rugosa* 脂肪酶 3 (CRL3)

*C. rugosa* 會產生多種不同的脂肪酶，本論文所使用之 *Candida rugosa* 脂肪酶 3 (*Candida rugosa* lipase 3, CRL3)，已被證實比起 CRL1 及 CRL2 等其他同功脂肪酶，對於固醇酯類 (steryl esters) 的水解具較佳專一性 (Tenkanen *et al.*, 2002; Brocca *et al.*, 2003)。在造紙工業上，樹脂 (wood resins) 存在會造成紙質變硬且脆，使紙張品質下降；而樹脂的主要成分即三酸甘油酯與固醇酯類等物質，也因 CRL3 兼具有分解三酸甘油酯的脂肪酶功效及特殊的固醇酯類水解能力而深受重視，期待能以 CRL3 去除樹脂以提升紙張品質。而目前若直接使用 *C. rugosa* 生產 CRL3，會具有產量不高 (total CRL=11.2 mg/L)，且需要純化等缺失 (Gordillo *et al.*, 1998)，故本研究將嘗試以 *P. pastoris* 異源蛋白表現系統生產 CRL3。

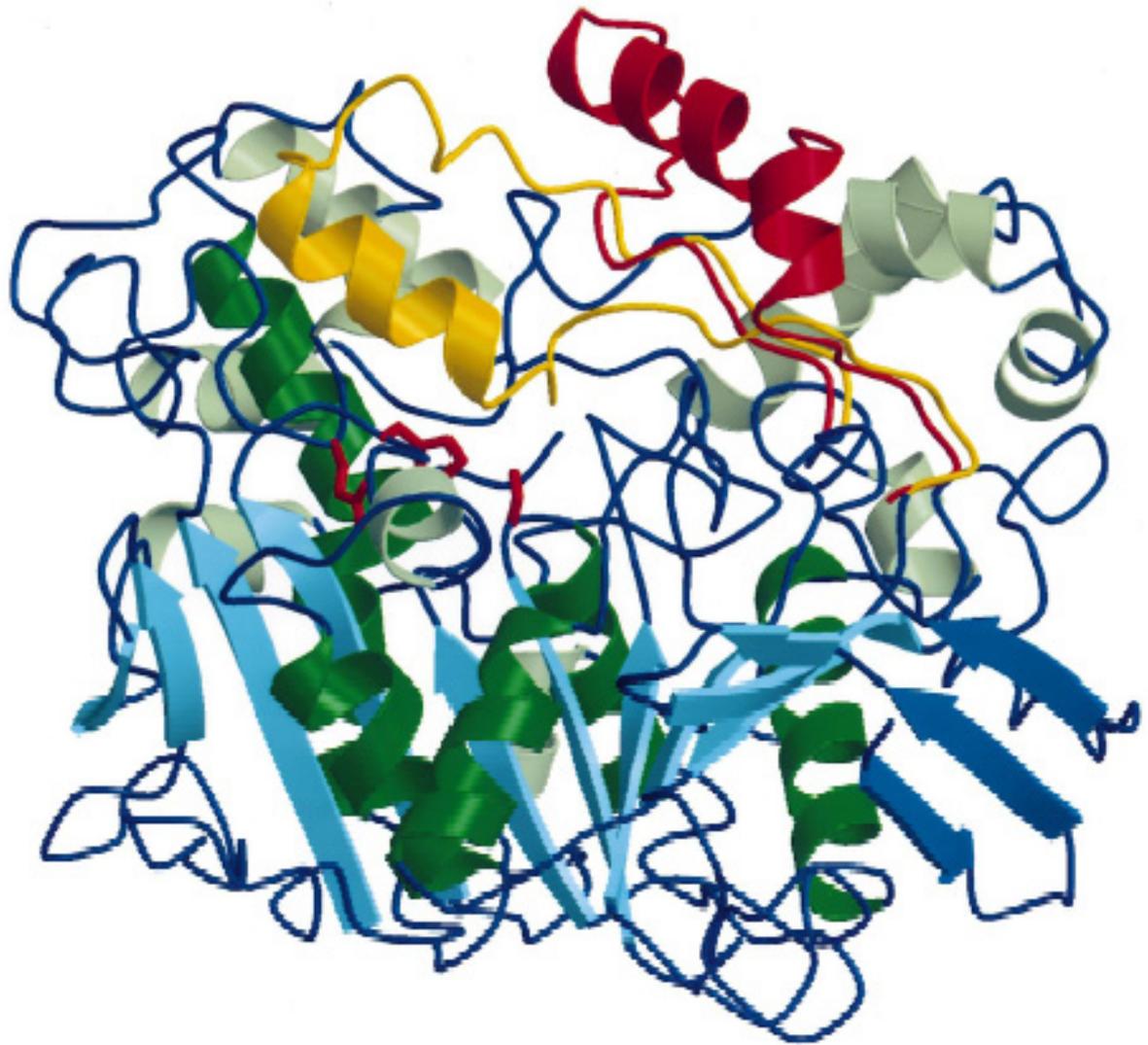


圖 1.4 *Candida rugosa* 脂肪酶之立體結構 (Cygler and Schrag, 1999)

Fig. 1.4 Structure of *Candida rugosa* lipase

## 1.4 後轉形載體放大作用 (Posttransformational vector amplification, PTVA)

酵母菌異源蛋白表現系統已廣為被世人所使用，且具有 *AOXI*、*GAP* 等強啟動子之優勢，但仍無法確保轉形基因都能有高表現量 (high expression level)；而一般會藉由篩選出多重複製數 (multiple copy number) 轉形株，以提升異源基因表現，常見作法有二 (Sunga *et al.*, 2008)：

- (1) 結合兩種以上不同的篩選標記 (selectable marker)，例如營養缺陷 (如 *his4*、*arg4* 等) 或抗生素抗性 (如抗 kanamycin、Zeocin 等)，共同篩選轉形株；儘管此方法值得信賴，但相當費時費工，且可得到的複製數也受限於篩選標記多寡。
- (2) 第二種方法也是一般最常用的，其作法通常是以抗生素抗性作篩選標記，由於複製數愈多，理論上所擁有的抗性愈強，因此以高濃度抗生素篩出的強抗性轉形株，應帶有多重複製數；但大多數經由此法所篩得之菌株，其高抗性是由不明原因所造成，其中僅不到 5% 的高抗性成因是來自於多重複製數，此法效率不佳且耗時。

由 Sunga 等學者 (2008) 提出一種更理想的方法去篩選帶多重複製數之轉形株，即後轉形載體放大作用 (posttransformational vector amplification, PTVA)。以轉形後帶有 Zeocin 抗性載體之第一代轉形株，作為單複製數之單一菌落，之後，在 Zeocin 濃度由低而高之平板培養基上進行菌株篩選，待低濃度下培養長成後，再挑至高濃度下持續培養，藉此馴養步驟，提升其抗性。而實驗結果指出，PTVA 使菌株具有多重頭尾相接的完整載體鑲嵌於基因體 (genome) 中單獨的基因座 (single locus)，而非僅是部分載體片段 (圖 1.5)；且約有 40% 轉形株具有 3-5 倍複製數的增加，而所謂的『jackpot』(指含有超過 10 複製數的表現載體) 約佔篩出菌株的 5-6%，且重組蛋白表現亦隨之增加；且作者認為 PTVA 不僅能運用於抗 Zeocin 篩選標記，同時也證明在 G418/kanamycin 系統中也具有相似結果。

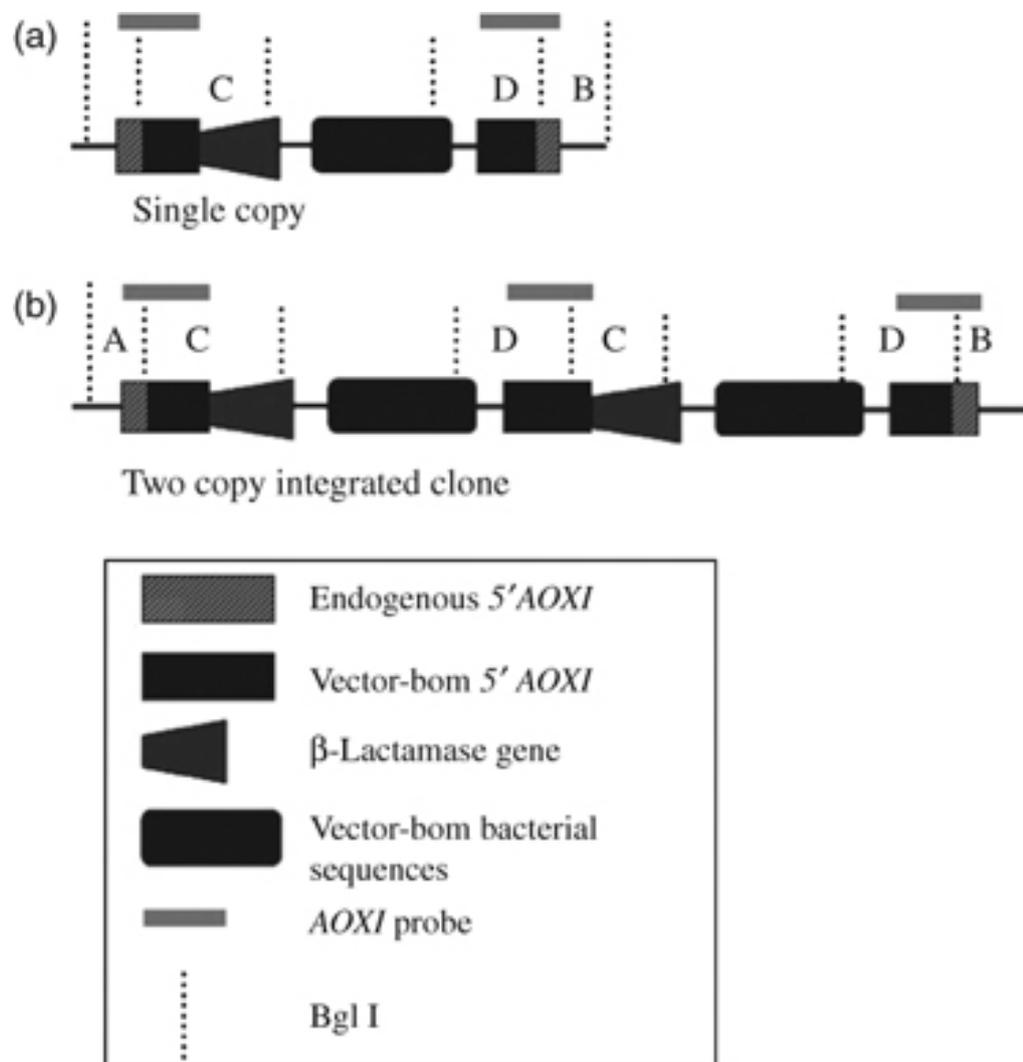


圖 1.5 單複製數與雙複製數載體 pPICZB-β-lactamase 鑲嵌於 *P. pastoris* AOX1 啟動子基因座之圖示 (Sunga *et al.*, 2008)

Fig. 1.5 Diagram of products of integration of one copy (a) or two copies (b) of pPICZB-β-lactamase into the AOX1 promoter locus of the *P. pastoris* genome

雖然 PTVA 誘使載體產生多重複製數的原因，目前仍不得而知，但此法相較於如前所述之傳統方法，是一較為有效且易於操作，能夠得到多重複製數轉形株，進而提升異源蛋白表現的方法；且作者推論 PTVA 可能適用於所有藥物篩選標記系統，如 blasticidin、formaldehyde 等，更增添其應用價值。

#### 1.4.1 Zeocin 簡介 (www.invitrogen.com)

Zeocin 是 bleomycin/phleomycin 系列抗生素中的一種，分離自放線菌 *Streptomyces verticillus*，已被證實不論對細菌、真菌 (含酵母菌)、植物及動物細胞等皆具有強烈毒性，故極具應用價值；美商 Invitrogen 公司依此特性設計帶有 Zeocin 抗性基因-*zeo*<sup>r</sup> 之轉形載體，作為篩選標記以應用於轉形株的篩選，而其毒性作用機制如下所述。

當 Zeocin 進入細胞內，其中的  $\text{Cu}^{2+}$  會被還原成  $\text{Cu}^+$  (圖 1.6)，而轉為活性型 (active form)，並與去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 結合造成細胞死亡。而本研究使用之表現載體 pGAPZaC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 因帶有 Zeocin 抗性基因-*zeo*<sup>r</sup>，依此特性選擇 Zeocin 作為 PTVA 菌株馴養之篩選標記，用於後續菌株改良工作。

## 1.5 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

### 1.5.1 反應曲面法簡介

實驗設計 (design of experiment) 是一門主要以統計學為基礎，並綜合其他各種不同領域科學的知識；其功用在於能夠有效地策劃與安排實驗，將所得之實驗數據作有系統之分析，能在最短的時間內，產生最佳實驗效能。不僅適用於小型試驗研究外，也可應用在大規模生產之業界，以加速產品之開發、降低開發成本，以及提供解決製造程序上各種問題的功能。

一次探討一個變數 (one-variable-at a time) 是以往常用的實驗方法，但此法不僅耗費時間，且無法了解反應變數間之交互影響 (interaction) 及尋求最佳條件，為了改進上述之缺點，反應曲面法因而應運而生。

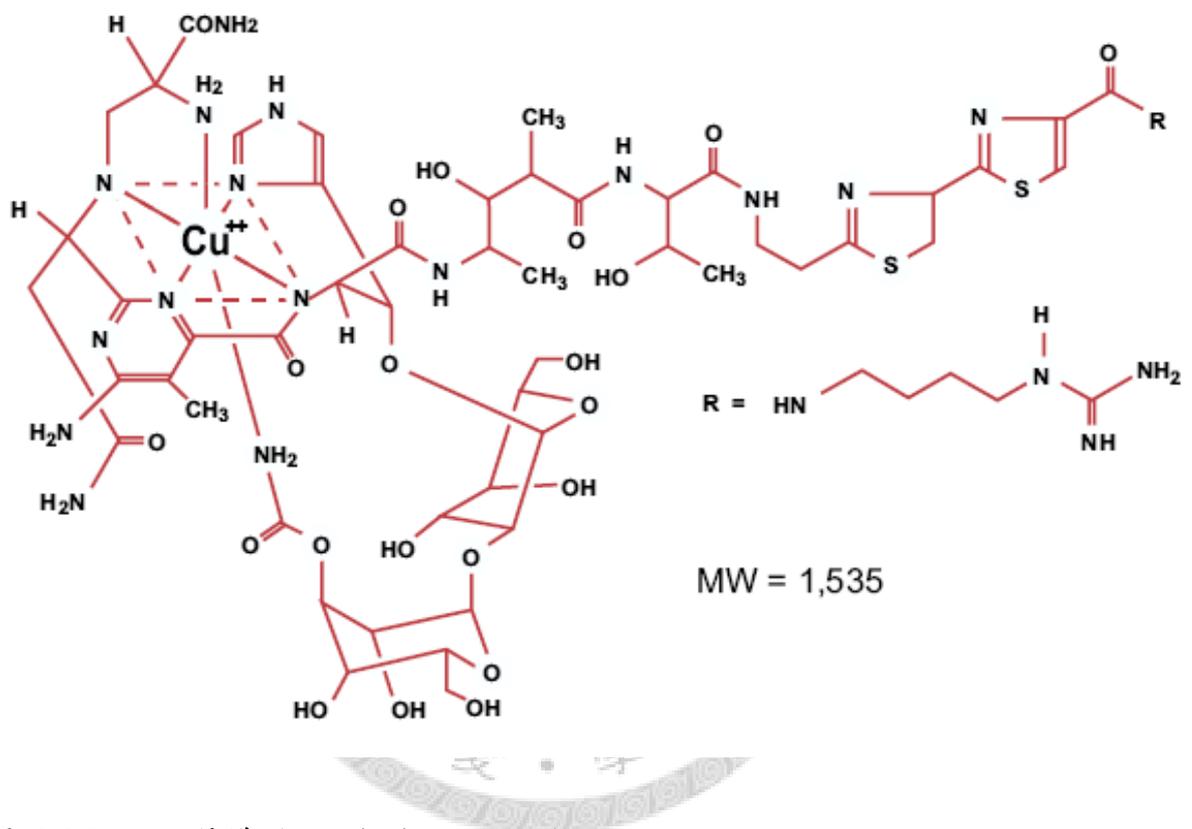


圖 1.6 Zeocin 結構 (www.invitrogen.com)

Fig. 1.6 Structure of Zeocin

反應曲面法乃一結合數學及統計之技術，可將一問題予以模式化及分析，於實際應用上具下列之優點 (Montgomery, 1997)：

- (1) 經由反應曲面法分析所得的統計資料和迴歸方程式，可真正求出變數因子 (factor) 對系統反應值 (response) 的影響以及因子間彼此交互影響之貢獻程度。
- (2) 可同時處理多個因子並可採取部分因子設計，能減少實驗成本及時間。
- (3) 依實驗數據所得之迴歸方程式可被描繪成等高線圖 (contour plot) 和可看出三度空間的立體曲面圖，可以有效且快速地找出最佳化的條件位置；而迴歸式經微分步驟，可產生一最佳化條件並預測其極值點。

## 1.5.2 常用實驗設計類型 (Anderson and Whitcomb, 2005)

### 1.5.2.1 二水準因子設計 (two-level factorial design)

二水準因子設計是反應曲面設計法中最單純的一種，由於各成份因子的嘗試範圍不盡相同，為方便設計，乃將之單純簡化成 +1 與 -1 的正規化水準 (coded level)，以此求得不同因子對目標函數之反應值。依二水準因子設計法則，若有  $k$  個受測因子，則必須進行  $2^k$  個實驗，且中心點需重複至少四次，以提供資料可靠度。此設計法不僅設計簡單，且實驗點間彼此對稱，故實驗上所產生之變異 (variation) 可以相互抵銷亦是其一大優點。

二水準因子設計法則，若有  $k$  個受測因子，則必須進行  $2^k$  個實驗，實驗個數將隨因子數目增加而呈倍數成長。當受測因子過多時，不但實驗個數相當多，且統計分析工作也將益形繁重。在此情況下，主要有兩種方法可以用來減輕實驗上的負擔：

- (1) 刪減不重要因子，只對主要影響因子作測試。
- (2) 利用部份因子設計法 (fractional factorial design) 來取代，即取完整因子設計的部份點來進行實驗與統計分析；在因子個數較多的系統中部份因子設計的實驗點數目，已足夠提供研究者進行因子效應分析。

### 1.5.2.2 Box-Behnken 設計法

由於前述之因子設計只有兩個測試水準，為了彌補測試水準之不足，以得到足夠的數據來進行二次多項式之理論契合，以便更詳細地描述反應曲面的立體變化。可依 Box-Behnken 設計法 (Box-Behnken design, BBD) 來進行。此法由 Box 與 Behnken 提出 (1960)，將二水準因子設計與部分因子設計結合，所提出的三水準因子設計法，也就是說將各因子轉化為 -1、0 及 +1 的正規化水準，它不像二水準因子設計將實驗點取在立方體的頂點上，而是位於中心點等距 (半徑  $\sqrt{2}$ ) 的球體上。Box-Behnken 設計主要用於估算因子的二次項影響及各因子間的交互作用，將實驗結果利用統計軟體，以迴歸技巧找出最適宜描繪因子對於系統反應值之二次多項式，並以該式描述反應曲面的變化 (Thompson, 1982)。

## 1.6 重組酵母菌之高細胞密度培養

前文已提及有多種表現系統可用以生產異源蛋白，而相較於動、植物，微生物表現系統具有生長快速、培養基成本較低，以及培養方式較為簡便等優點，故較常被世人所使用。在一般微生物醱酵培養中，當限制細胞生長的因素存在，例如營養源匱乏、溶氧不足以及抑制性的代謝廢物堆積等，使細胞難以生長以致無法達到較高的細胞濃度；因此如何改善以上限制因子，使細胞能處於適宜環境下作高細胞密度培養 (high cell density cultivation)，即細胞乾重 (dry cell weight, DCW) 可大於 100 g/L，對工業上生產應用相當重要。而高細胞密度培養最主要的好處在於，醱酵槽單位體積的生產力 (productivity) 可大幅提高，因細胞濃度高，由細胞生產的蛋白質以及代謝產物濃度也會提高，因此可以減少醱酵的次數及醱酵廢液的產生；且產物濃度高代表可以使用較小的醱酵槽體積，如此將減少在設備上的投資以降低成本。而一般使用醱酵槽培養微生物的培養方式可分為以下三種：

- (1) 批式培養 (batch culture)：微生物被接種到固定體積的培養基，待醱酵終了，菌體消耗完營養源後，取出培養液回收所要的產物；由於不再外加生長所需之營養源，通常無法達到高細胞密度培養的目標。

(2) 連續培養 (continuous culture)：將批式培養至某一階段，在醱酵槽中以一定的流量補入新培養基，同時以相同流量排出培養液，菌體不僅可獲得養分的補充，有害代謝物也會被稀釋，進而達到一種恆定化的培養狀態。理想狀態下，菌體將能以一定的比生長速率成長。

(3) 饋料批式培養 (fed-batch culture)：於醱酵過程中，當限制性營養源消耗殆盡，再添加高濃度的營養源饋料入醱酵槽，使微生物持續生長，可達高細胞密度培養，產物於醱酵完畢後回收。

其中饋料批式培養，具有如提高產量 (yield) 與生產力，及減少生產體積，降低成本等優點，故為工業醱酵生產常用之方法。表 1.4 介紹各種菌種的高細胞密度培養培養基及饋料模式的例子，並且說明可以達到最高的菌體濃度。

## 1.7 饋料批式培養之控制原理

饋料批式培養程序可分為批式和饋料批式兩階段，其中的饋料方式 (饋料液組成、濃度與饋料速率) 是高細胞密度培養成功與否之重要關鍵，不僅會影響到細胞生長，對於代謝產物的生合成也會造成影響。饋料批式之饋料策略可分為兩類 (Lee, 1996)，如下所述：

### (一) 回饋控制 (feedback control)

藉由直接的方式監控菌體生長過程中基質濃度變化或間接的監控菌體生長過程中環境參數的變化，作為饋料的依據 (Riesenber and Guthke, 1999)，例如使用線上偵測葡萄糖偵測儀控制其濃度的直接回饋控制，以及 pH 或溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 的變化作間接回饋控制。

### (二) 預設饋料模式 (Pre-determined feeding profile)

以理論公式推導或實驗經驗在醱酵培養前已經決定了饋料的時機與多寡，依饋料方式不同又可分為固定流速饋料、漸增流速饋料、指數增加流速饋料。

表 1.4 細菌與酵母菌在各種饋料策略進行高細胞密度醱酵培養結果 (李等, 2001)

Table 1.4 Various feeding strategies to High cell density fermentation on bacteria, archaea and yeast

Microorganism	Medium <sup>a</sup>	Culture method/ feeding mode	Culture time (hr)	Final cell mass (g-DCW/L)	Ref.
<b>Bacteria</b> <i>Lactococcus lactis</i>	Complex	Intermittent feeding and filtering at high average dilution rate	238	141	Suzuki, 1996
<i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB 11599	Defined	Fed-batch, no ammonia limitation	50	184	Lee, 1994
<i>Methylobacterium</i> <i>extorquens</i>	Defined (methanol)	Fed-batch with controls for methanol, DO and C/N ratio	170	233	Suzuki, 1986
<i>Bacillus subtilis</i>	Defined	pH-stat	28	184	Park., 1992
<i>Pseudomonas putida</i> BM01	Defined	pH-stat	30	100	Kim, 1996
<i>Streptomyces laurentii</i>	Defined	pH-stat	220	157	Suzuki, 1987
<b>Archaea</b> <i>Marinococcus M52</i>	Complex	Dialysis Fed-batch	72	132	Krahe, 1996
<b>Yeast</b> <i>Candida brassicae</i>	Defined	DO-stat	28	268	Yano, 1985
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Complex	Continuous feed with cell retention	77	208	Lee, 1994
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Defined	Exponential feeding	-	130	van Haek, 2000
<i>Pichia pastoris</i>	Defined	DO stat	46-130	>100	Stratton, 1998
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Semi-defined	One-step feeding	50	100	Kim, 2000

(1) 固定流速饋料方式 (constant feeding)

高濃度的營養源以預先決定好的固定流速饋入醱酵槽，隨細胞濃度的增加，比生長速率會持續下降而使得細胞濃度增加的程度會逐漸趨緩。

(2) 流速漸增饋料方式 (increased feeding)

以階梯式 (stepwise) 或線性 (linear) 方式逐步增加高濃度的營養源饋料速率，營養源供給能隨細胞的成長而增加，可改善固定流速饋料所造成比生長速率降低的缺失。

(3) 指數饋料方式 (exponential feeding)

指數饋料方式也是一種漸增饋料方式，饋料量以指數形式增加，通常此饋料方式是依據一簡單質量平衡式，並假設菌體轉換率  $Y_{x/s}$  為定值計算而得 (Cheng *et al.*, 2002)：

$$F_{(t)} \times S_0 = (\mu X_0 V_0 \times \text{Exp } \mu t) / Y_{x/s} \dots \dots \dots (\text{式 } 1.1)$$

$F_{(t)}$  : feeding rate (L/h)

$S_{(0)}$  : substrate concentration (g/L)

$\mu$  : specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )

$X_{(0)}$  : initial biomass (g dry cell weight/L)

$V_{(0)}$  : initial volume (L)

t : process time (h)

$Y_{x/s}$  : biomass yield on substrate (g dry cell weight/g substrate)

選定一固定的細胞比生長速率，但不超過其最大比生長速率，以式 1.1 求出  $F_{(t)}$ ，於此饋料模式下，控制細胞比生長速率恆定 (Riesenber *et al.*, 1991)。

## 1.8 研究動機與目的

本研究所使用之 *C. rugosa* 脂肪酶第三型 (CRL3)，相較於其他 CRL 中所分離出來的同功酶，具有較強之水解專一性，可應用於造紙工業中樹脂的去除以提升紙張品質，具有極高之經濟應用價值。

本研究乃利用中央研究院植物暨微生物學研究所蕭介夫教授實驗室所建構之 *Pichia pastoris* GS115/CRL3 從事重組蛋白 CRL3 醱酵生產。首先，在分析方法上，參考文獻(Gilham and Lehner, 2005; Kouker and Jaeger, 1987; Roh and Villatte, 2008) 建立簡便、精確之脂肪酶活性測定法。以 Sunga 等學者 (2008) 所提出的後轉形載體放大作用，重新篩選具高脂肪酶活性表現之菌株，並藉反應曲面法在三角瓶層級尋求醱酵最適培養條件，進而將其應用於醱酵槽層級的放大培養生產，探討饋料批式醱酵技術之高細胞密度培養在此應用之可行性，以達到降低成本、提高異源蛋白 CRL3 活性表現之目的。

本研究的具體目標如下：

- 一、建構脂肪酶活性分析方法，包含定性的透明環法 (clear zone method)，以及定量的分光光度法 (spectrophotometric method)。
- 二、利用後轉形載體放大作用法，選殖具高脂肪酶活性表現之轉形株。
- 三、在三角瓶層級進行培養，以反應曲面法尋求 CRL3 生產之最適條件。
- 四、將三角瓶層級所尋求之最適條件，應用至醱酵槽層級放大培養生產，並著手改善饋料條件。

本論文之研究架構如圖 1.7 所示。

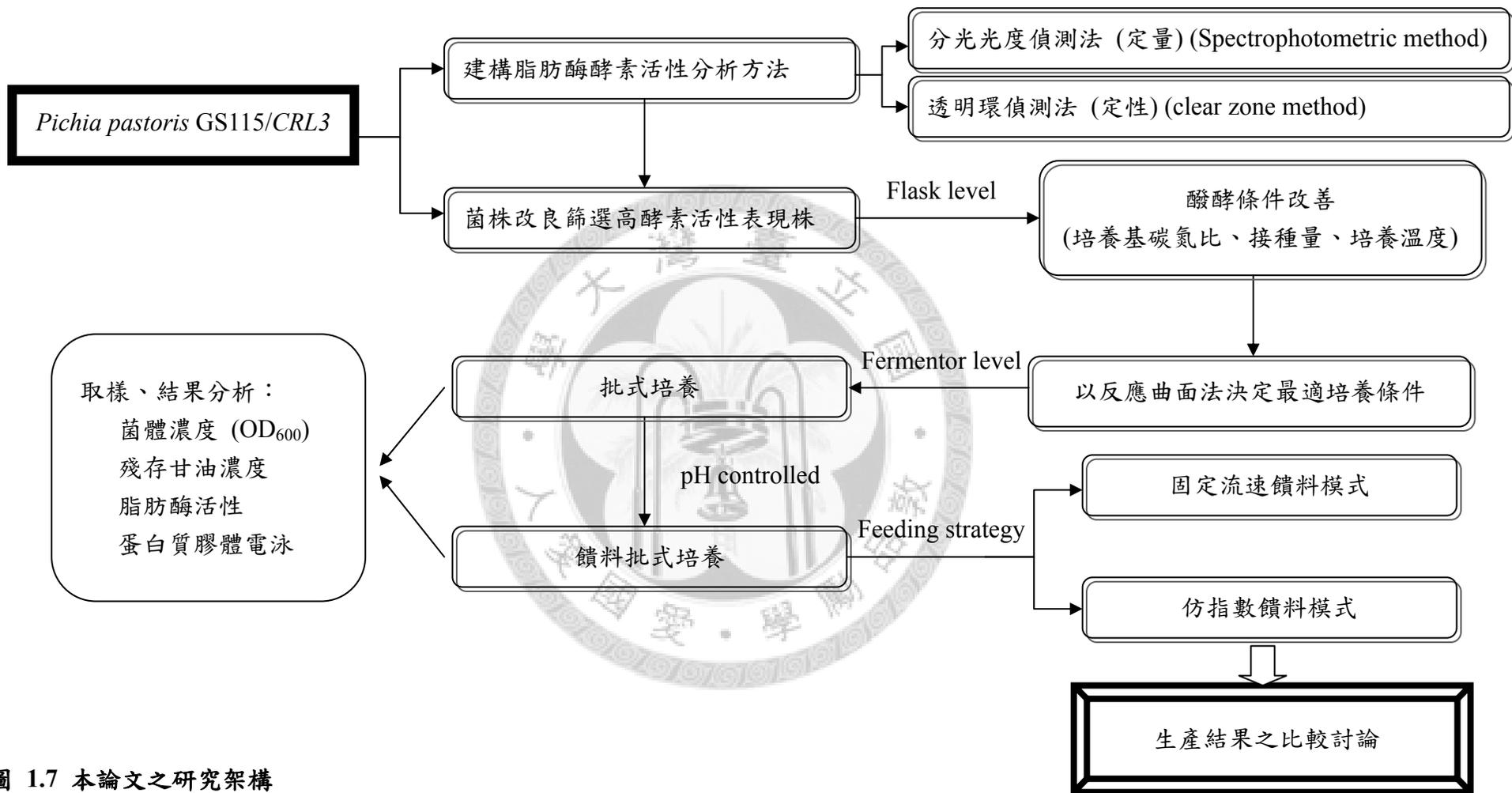


圖 1.7 本論文之研究架構

Fig. 1.7 Schematic framework of this study

## 第二章 材料與方法

### 2.1 使用菌株

#### 2.1.1 宿主與質體構築

本研究生產脂肪酶第三型所使用之異源蛋白表現宿主為 *Pichia pastoris* GS115，乃 histidine 的營養缺陷株，具甲醇代謝能力正常之性質 (Mut<sup>+</sup>, methanol utilization plus)。質體由中央研究院植物暨微生物學所蕭介夫教授研究室所構築，於表現質體 pGAPZαC 之 GAP 啟動子下游接上 CRL3 基因 (圖 2.1)，此質體帶有 *zeo*<sup>r</sup>，可利用對抗生素 Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 的抗藥性作為篩選標記 (selection marker)；將該質體轉形至 *Pichia pastoris* GS115 中，命名為 *Pichia pastoris* GS115/CRL3。

將 *Pichia pastoris* GS115/CRL3，經由後轉形載體放大作用馴養 (見 2.4)，篩選脂肪酶活性表現最佳者進行菌種保存，命名為 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 作為本研究所使用之菌株。

#### 2.1.2 菌株保存方法

為避免在平板培養基中不斷重複轉接 (transfer) 菌株，造成實驗再現性不佳，故以甘油保存同一批菌株，做為每次實驗的種菌。

將菌株在 YPG 平板培養基上劃線分離，於 30°C 下培養一天，以接種環挑選單一菌落接種至內含 10 mL YPG 培養基之 50 mL Hinton's 三角瓶中，Zeocin 添加濃度為 100 µg/mL，於 30°C，125 rpm 振盪培養至對數生長期中期 (mid-log phase)，此時 OD<sub>600</sub> 約 10 左右，取 0.5 mL 培養液分裝至無菌之菌種保存管，每管加入等體積之 80% 甘油，待混合均勻後保存於 -80 °C 冰箱中備用，每次實驗取出一管作為種菌活化之用。

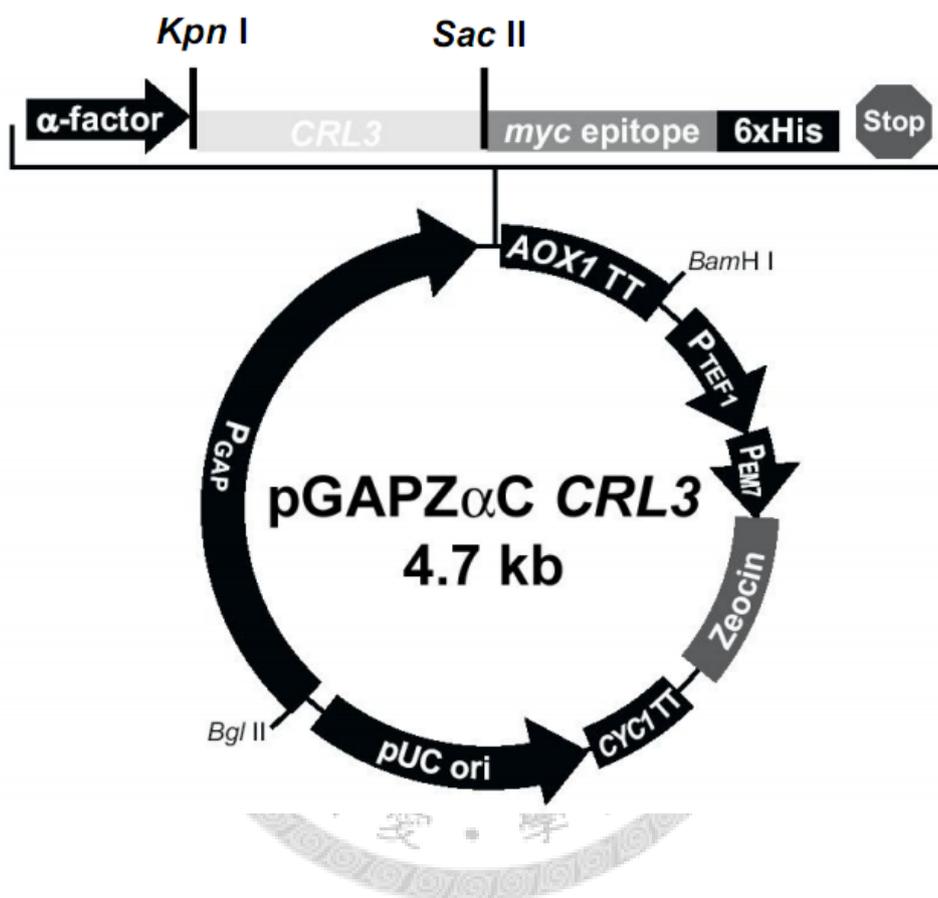


圖 2.1 表現載體 pGAPZ $\alpha$ C-CRL3

Fig. 2.1 Expression vector pGAPZ $\alpha$ C-CRL3.

## 2.2 藥品與試劑

### 2.2.1 一般試藥

本研究中所使用藥品或溶劑購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)、Hayashi (Osaka, Japan)、Shimakyu (Osaka, Japan)、Katayama (Osaka, Japan)、Nacalai (Kyoto, Japan) 及 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) 等公司。一般培養基成份購自 Difco (Detroit, MI, USA) 與 Bioman (Taipei, Taiwan)。蛋白質分析試劑與蛋白質電泳分子量標準品購自 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 與 Bioman (Taipei, Taiwan)。

### 2.2.2 抗生素

**Zeocin stock solution** (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

100 mg/mL, -30°C 避光保存。

### 2.2.3 緩衝液

**PBS (phosphate buffer saline)** (Unge *et al.*, 1999)

Components	concentration (g/L)
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24

以 6 M HCl 調整 pH 至 7.3，滅菌後，於室溫保存。

### 2.2.4 培養基

**YPG 種瓶培養基** (侯, 2006)

Components	concentration (g/L)
Yeast extract	10
Peptone	20
Glycerol	20

滅菌後，如有需要，於使用前加入 Zeocin 至最終濃度 100 µg/mL。

### YPGZ 平板培養基

Components	concentration (g/L)
Yeast extract	10
Peptone	20
Glycerol	20
Agar	15

於滅菌後，於培養基溫度冷卻至 50°C 以下尚未凝固前，加入 Zeocin 至最終濃度 100 µg/mL，再倒入培養皿使其冷卻凝膠，於 4°C 下保存。

### 10% 阿拉伯膠溶液 (Arabic gum)

取 10 g 阿拉伯膠，以去離子水定量至 100 mL，保存於 4°C。

### YPGTA 脂肪酶活性測試平板培養基

取 10 mL trybutyrin (Sigma T-8626) 加入 10% 阿拉伯膠溶液 100 mL，以攪拌器設定功率 4，攪拌 2 分鐘，加入 700 mL 去離子水以及 10 g yeast extract、20 g peptone、20 g glycerol、15 g agar，攪拌均勻後定量至 1 L。滅菌後，待培養基尚未凝固前，倒入培養皿使其冷卻凝膠，於 4°C 下保存。

### FM22 培養基 (Higgins and Cregg, 1998)

Components	concentration (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	42.9
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14.3
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	11.7
CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0
Glycerol	40.0

1. 三角瓶：以 KOH 調整 pH 至 5.3 左右，待滅菌後，pH 約降至 5.0 左右，培養前每升需添加 PTM<sub>4</sub> 微量金屬元素溶液 1 mL。
2. 醱酵槽：以 KOH 調整 pH 至 4.5 左右，待滅菌後，以鹼幫浦饋 28% 氨水以調整 pH 至 5.0，培養前每升需添加 PTM<sub>4</sub> 微量金屬元素溶液 1 mL。

### 調整後 FM22 培養基

Components	concentration (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	42.9
$\text{K}_2\text{SO}_4$	14.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.7
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.15
Glycerol	40.0

1. 三角瓶：以 KOH 調整 pH 至 5.3 左右，待滅菌後，pH 約降至 5.0 左右，培養前每升需添加 PTM<sub>4</sub> 微量金屬元素溶液 1 mL。
2. 醱酵槽：以 KOH 調整 pH 至 4.5 左右，待滅菌後，以鹼幫浦饋 28% 氨水以調整 pH 至 5.0，培養前每升需添加 PTM<sub>4</sub> 微量金屬元素溶液 1 mL。

### PTM<sub>4</sub> Trace Elements Solution (Higgins and Cregg, 1998) ,

Components	concentration (g/L)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.0
NaI	0.08
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.02
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CoCl}_2$	0.5
$\text{ZnCl}_2$	7.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.0
biotin	0.2

每升添加  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95%) 1.0 mL，並通過 0.20  $\mu\text{m}$  針頭式濾器以除菌，於 4°C 保存。

### FM22 培養基饋料液 (Higgins and Cregg, 1998) ,

Components	concentration (g/L)
Glycerol	500

滅菌後，每升添加 12 mL PTM<sub>4</sub> trace elements solution 及 12 mL 500X biotin stock solution。

**500X biotin solution (0.02%, w/v)** (Higgins and Cregg, 1998) ,

Components	concentration (g/L)
D-biotin (Sigma B-4501)	0.2

通過 0.20  $\mu$ m 針頭式濾器除菌之，於 4°C 保存。

### 2.3 實驗儀器與設備

分光光度計 (U-2000 spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan)

高壓蒸氣滅菌鍋 (Tomy SS-325, Tomy Seiko Institute, Tokyo, Japan)

連續波長分析儀 ELISA Reader (Power Wave HT 340, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)

循環式冷卻水浴槽 (Eyela Cool Ace CA-1110, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)

分光光度計 (Spectrophotometer, U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan)

恆溫振盪培養箱 (Shaker incubator 707R, Hotech, Taipei, Taiwan, 振幅 7 cm)

恆溫水浴槽 (Model 903, Hotech, Taipei, Taiwan)

五公升醱酵槽 (Biostat B., B. Braun, Melsungen, Germany)

溶氧電極 (InPro 6100/320/S/P, Mettler-Toledo Ingold, Bedford, MA, USA)

溶氧電極 (InPro 6800/12/320, Mettler-Toledo Ingold, Bedford, MA, USA)

pH 電極 (InPro 3030/325, Mettler-Toledo Ingold, Bedford, MA, USA)

氣體混合器 (Gas Mix Unit, B. Braun, Melsungen, Germany)

自動記錄器 (MFCS/win IFB RS-422, B. Braun, Melsungen, Germany)

控制軟體 MFCS (Multi-Fermentor Control System, B. Braun, Melsungen, Germany)

空氣壓縮機 (Hiblow SPP-15GA, Washington, NJ, USA)

0.20  $\mu$ m 空氣濾膜 (Advantec, Tokyo, Japan)

中型離心機 (Eppendorf centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg, Germany)

微量離心機 (Himac centrifuge SCT15B, Hitachi, Tokyo, Japan)

蛋白質電泳槽 (Hoefer SE-250, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ., USA)  
鑄膠套件含電泳玻片、氧化鋁、0.75 mm 間隔條、10 well 樣本梳 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)  
電源供應器 (EPS500/400, Pharmacia, Lorton, VA, USA)  
數位相機 (CoolPix 5000, Nikon, Tokyo, Japan)  
攪拌器 (Seven-Speed Blender, Waring Laboratory, Torrington, CT, USA)  
離心濃縮管 (Vivaspin 6 10,000 MWCO, Sartorius, Goettingen, Germany)  
0.45  $\mu\text{m}$  針頭式濾器 (25 mm Acrodisc® Syringe Filters, Pall, Ann Arbor, MI, USA)  
0.20  $\mu\text{m}$  針頭式濾器 (25 mm Acrodisc® Syringe Filters, Pall, Ann Arbor, MI, USA)  
HPLC 分析儀 (LC-3A HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan)  
HPLC 管柱 (ICSep ICE-COREGEL 87H3 column, Transgenomic, Omaha, NE, USA)  
HPLC 偵測器 (Refractive index detector, RI2000, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef, Germany)  
HPLC 數據擷取系統 (PEAK-ABC Chromatography Data Handling System, E-Chrom Tech, Taipei, Taiwan)

## 2.4 逐步提升 Zeocin 濃度馴養 *P. pastoris* GS115/CRL3 以篩選高脂肪酶活性表現株

### 2.4.1 馴養步驟

取 200  $\mu\text{L}$  保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  下之 *P. pastoris* GS115/CRL3 甘油保存菌液，接種於內含 10 mL YPG 種瓶培養基之 50 mL Hinton's 三角瓶中，Zeocin 添加濃度為 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ， $30^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 振盪培養兩天，命其為 G1 世代，並取 100  $\mu\text{L}$  G1 世代菌液，同樣接種於內含 10 mL YPG 培養基之 50 mL Hinton's 三角瓶中，但 Zeocin 添加濃度調整為 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ， $30^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 振盪培養兩天，命其為 G2 世代。

重複上述步驟，但 Zeocin 添加濃度為隨世代數增加而提高，共計 15 個世代，Zeocin 添加濃度分別為 100、300、500、700、900、1100、1300、1500、1700、

2000、2300、2600、2900、3200 以及 3500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 2.4.2 篩選高脂肪酶活性表現株

每一世代培養完後，除了進行接續更高 Zeocin 濃度馴養外，尚須以透明環偵測法（定性分析）針對脂肪酶活性作一次篩菌；挑選活性較明顯者作液態醱酵培養，並以分光光度法定量分析其活性，即二次篩菌，作法如下。

將每一世代菌液於 YPGTA 平板培養基作四區劃線， $30^{\circ}\text{C}$  恆溫下培養三天，由於菌體所分泌之 CRL3 會分解 trybutyrin 產生透明環 (clear zone)，挑選出透明環半徑：菌落半徑之比值 (ratio) 較高之數個單一菌落，此為一次篩菌，將其接種於內含 3 mL YPG 培養基之 15 mL 旋蓋試管， $30^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 振盪培養一天，作為醱酵培養前之種培養。

將種培養之菌液以 2% 接種量，接種於內含 100 mL FM22 培養基之 500 mL Hinton's 三角瓶中， $25^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 振盪培養五天，以脂肪酶活性分光光度偵測法定量比較各菌株間酵素活性，此為二次篩菌。

以上實驗步驟之示意圖如圖 2.2 所示。

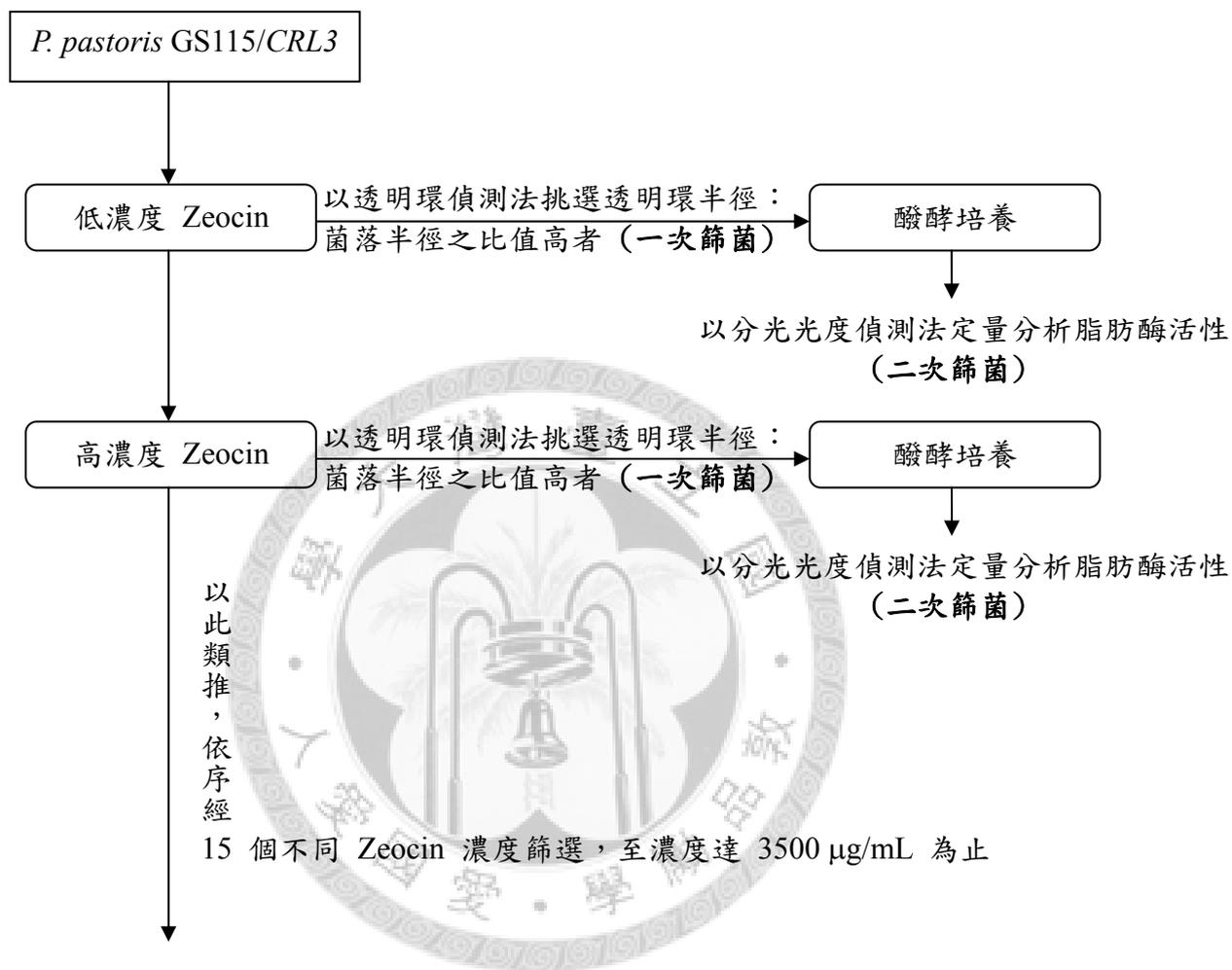


圖 2.2 逐步提升 Zeocin 濃度馴養 *P. pastoris* GS115/CRL3 以篩選高脂肪酶活性表現株之示意圖

Fig. 2.2 Diagram of screening high lipase activity expression *P. pastoris* GS115/CRL3 by Zeocin

## 2.5 Hinton's 三角瓶之培養與表現

### 2.5.1 菌種活化、種培養及接種前處理

由於種菌保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  下，生理代謝呈休止狀態，為獲得較佳的菌體生長及蛋白表現，故接種前必須先進行活化以及種培養，步驟如下所述。

取  $200\ \mu\text{L}$  *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 甘油保存菌液，接種於內含  $10\ \text{mL}$  YPG 種瓶培養基之  $50\ \text{mL}$  Hinton's 三角瓶中， $30^{\circ}\text{C}$ 、 $125\ \text{rpm}$  振盪培養一天，此為種菌活化 (activation)；取  $1\ \text{mL}$  之活化菌液，接種至內含  $100\ \text{mL}$  YPG 種瓶培養基之  $500\ \text{mL}$  Hinton's 三角瓶，Zeocin 添加濃度為  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ， $30^{\circ}\text{C}$ 、 $125\ \text{rpm}$  震盪培養一天 ( $\text{OD}_{600}$  約為 30)，作為種培養 (seed culture)。

由於 YPG 種瓶培養基為複合培養基，而醱酵培養基 FM22 乃合成培養基，故必須注意接種前需去除原種培養之培養基部分，以避免干擾。處理方法為：將種培養菌液以轉速  $1500 \times g$  離心 10 分鐘後，去除培養上清液，並記錄其體積，接著以 PBS 緩衝液沖洗菌體，再以同樣條件離心以去除上清液，並添加等體積之 PBS 緩衝液，均勻懸浮菌體後再行接種。

### 2.5.2 培養條件對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體生長及 CRL3 表現之影響

#### (1) 起始 pH 值

酵母菌可生長之 pH 範圍約介於 3-7 之間，而最適生長 pH 值約在 4.5-5.5 左右 (李，2002)，由於本研究使用之 FM22 培養基具使用上限制，即約當 pH 值高於 5.5 時，會產生大量磷酸鈣、鎂沈澱，影響實驗；故起始培養 pH 值選擇由 5 往下遞減，分別探討 pH 3、4、5。

#### (2) 培養溫度

酵母菌一般生長溫度約在  $20\sim 37^{\circ}\text{C}$  左右，而實驗室前人以  $25^{\circ}\text{C}$  進行培養 (侯，2006)，故在培養溫度的選擇上，由  $25^{\circ}\text{C}$  作中心點接續，上下加減  $5^{\circ}\text{C}$ ，分別以  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$  以及  $30^{\circ}\text{C}$  進行培養溫度之探討。

### (3) 培養基碳氮比

碳源於微生物生長上，主要用以菌體生合成以及能量產生，而氮源則是細胞用來生合成胺基酸、核酸、酵素輔因子 (enzyme cofactor) 等物質不可或缺之營養因子。而碳氮比 (C/N ratio) 不僅會影響菌體生長，對於產物的生合成亦相當重要 (Li *et al.*, 2000)。而由於本研究主題為表現異源蛋白，添加更多之氮源或許能有助於合成表現，因此，本研究將固定選擇甘油作為碳源，氮源選擇則為硫酸銨，利用甘油搭配不同濃度的硫酸銨以達到不同碳氮比的目的。FM22 培養基之碳氮比為 15 (Higgins and Cregg, 1998)，故以此作為中心，上下加減 5，以碳氮比 5、15 以及 25 進行探討。

碳氮比之計算：

碳源固定為甘油添加量 40 g/L，乘上甘油分子式 ( $C_3H_8O_3$ ) 中碳分子總量佔甘油分子量之比例，即  $40 \times (36/92)$  計算求得碳含量；而氮含量計算如下，以添加 2.95 g/L 硫酸銨為例，將 2.95 乘上硫酸銨分子式 ( $(NH_4)_2SO_4$ ) 中氮分子總量佔硫酸銨分子量之比例，即  $2.95 \times (28/132)$  計算求得氮含量；如此在一公升培養基體積中添加 40 g 甘油與 2.95 g 硫酸銨，則其碳氮比將為  $40 \times (36/92) : 2.95 \times (28/132)$ ，等於 25 : 1。

### (4) 接種量

接種量的高低非但會影響微生物生長情形，也會影響蛋白表現，一般接種量太低時，菌體生長停滯期 (lag phase) 拉長，所得菌體濃度偏低；而提高接種量可以得到較高的生長速率與菌體濃度，但未必有助於提升代謝物或異源蛋白產量，例如以 *Pichia anomala* 生產植酸酶 (phytase)，隨接種量提升，植酸酶產量反而下降 (Vohra and Satyanarayana, 2001)；而 Gargova 與 Sariyska (2003) 發現以高接種量進行培養，反而造成產物量減少，推論可能與高接種量時，菌體生長較快，營養物質多耗費在菌體細胞的生長上所致；而 Papagianni and Moo-Young (2002) 則指出，高接種量會造成胞外蛋白酶的明顯增加，不利於外泌蛋白的生產。

一般在微生物學常用接種量約為培養基總體積之 5-10% (Gomez and Goma, 1986)，實驗室前人 (侯, 2006) 使用之接種量為 1%，故將接種量分別設為 1、5 與 10% 進行接種量之探討。

### 2.5.3 Hinton's 三角瓶培養之反應曲面法實驗設計

由 3.3.2 實驗結果，起始 pH 5 培養結果最佳，而考量到起始 pH 值大於 5.5 時會生成大量磷酸鈣、鎂沈澱，而無法在 pH 5.5 以上進行培養條件探討，故選擇固定起始 pH 5，而以反應曲面法探討培養基碳氮比、接種量與培養溫度三者間關係，以了解三者對於表現異源蛋白 CRL3 酵素活性的影響。

反應曲面法能用來研究最佳化培養條件之有效統計方法，可有效率地將實驗次數及時間縮減，以求出最佳培養條件。而本研究所根據的實驗設計模式為 Box 和 Bohnken 兩人於 1960 年所提出的 Box-Behnken 設計法 (Box-Behnken design, BBD)，將各因子轉化為 -1、0 及 +1 的正規化水準，且因應本實驗之因子數採用三因子-三水準 BBD 設計 (three-factor-three-level Box-Behnken design)。

本三因子-三水準 BBD 設計之中心點選擇如下：原始全合成培養基 FM22 之碳氮比為 15，故以其作為中心點，-1 與 +1 水準則設為碳氮比 5 及 25；培養溫度的選擇則由先前不同培養溫度試驗中所決定，由於以低溫培養可能有助提升酵素活性，故將中心點由 25°C 改設為 20°C，-1 與 +1 水準則設為 15 及 25°C；至於接種量方面，一般搖瓶培養接菌量多介於 5-10%，而因為配合水準設計，以 5% 為中心點，-1 與 +1 水準則設為 1 及 9%，整理如表 2.1 所示。

本反應曲面實驗設計經 15 個組合實驗試驗後 (表 2.2)，分析各組 CRL3 脂肪酶活性，所得結果再以 Microsoft office excel 2007 電腦套裝軟體中資料統計程式進行迴歸分析，以碳氮比 (X1)、接種量 (X2) 與培養溫度 (X3) 作為變數因子 (factor)，並以 CRL3 脂肪酶活性 (Y1) 作為系統反應值 (response)，求出如下之三變數二次多項式：

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

(a 表示各項之係數)

表 2.1 Hinton`s 三角瓶培養 Box-Behnken 設計法之三因子-三水準條件

Table 2.1 Factors and levels of Hinton`s flask cultivation in the three-factor-three-level Box-Behnken design

Independent variable	Symbol	Coded level		
		-1	0	1
C/N ratio	X1	5	15	25
Inoculum size (%)	X2	1	5	9
Temperature(°C)	X3	15	20	25

表 2.2 Hinton's 三角瓶培養條件之三因子-三水準 Box-Behnken 設計組合

Table 2.2 Three-factor-three-level Box-Behnken design arrangement of Hinton's flask cultivation

No.	Response value			Coded value		
	C/N ratio	Inoculum size (%)	Temperature (°C)	X1	X2	X3
1	25	9	20	1	1	0
2	25	1	20	1	-1	0
3	5	9	20	-1	1	0
4	5	1	20	-1	-1	0
5	25	5	25	1	0	1
6	25	5	15	1	0	-1
7	5	5	25	-1	0	1
8	5	5	15	-1	0	-1
9	15	9	25	0	1	1
10	15	9	15	0	1	-1
11	15	1	25	0	-1	1
12	15	1	15	0	-1	-1
13	15	5	20	0	0	0
14	15	5	20	0	0	0
15	15	5	20	0	0	0

為觀察該迴歸方程式描繪實驗結果的適切程度，可利用變異數分析 (ANOVA) 中的檢定 p 值 (p-value) 來檢驗各因子之迴歸係數是否為顯著，並以複判定係數 ( $R^2$ ) 確認所獲得的複迴歸方程式解釋反應曲面模式之可靠性；再將求得之迴歸方程式利用 Microsoft office excel 2007 與 Sigma Plot 10.0 計算與繪圖軟體繪出反應曲面圖與等高線圖，以探討最適培養條件。

## 2.6 醱酵槽生產

### 2.6.1 醱酵槽操作程序

本研究使用 5-L BIOSTAT B jar fermentor (B. Braun, Melsungen, Germany)，並以 MFCS 軟體監控醱酵過程。操作程序如下：

1. 將體積 1.5 L 之培養基置入醱酵槽，之後安裝醱酵槽槽蓋及槽體周邊管線，進氣口管線需加裝孔徑 0.20  $\mu\text{m}$  之空氣濾膜，將各管線出口端以鐵夾夾住以避免污染，槽體僅留下排氣口與外界相連，但須以鋁箔紙包覆，避免高溫高壓滅菌過程造成槽內氣壓升高無處宣洩，待滅菌完成後才以鐵夾夾住排氣口管線。
2. 待各管線安裝完成後，接上包括溫度、pH 及溶氧等電極，其中 pH 電極在滅菌前校正，溶氧電極則於滅菌後校正。將醱酵槽置入滅菌釜 (autoclave) 中殺菌；而為了避免槽內熱氣冷凝造成氣體倒抽導致污染，待降至常溫時才取出槽體，安裝管線及電極訊號線，以待培養進行。注意：打開主電源開始極化溶氧電極，至少需 6 小時以上方可使用。
3. 接菌前開啟溫度控制，以外接循環式冷卻水浴槽 (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) 控制醱酵槽溫控系統，使槽內溫度穩定在設定值；同時調整設定轉速，通入無菌空氣，使溶氧值達飽和不再增加。通氣方面，以空氣幫浦供應空氣，輔以氣體混和控制器控制純氧的添加。當培養過程溶氧低於設定點時，自動切換開啟純氧添加。
4. 通氣及攪拌約 30 分鐘，待系統穩定後，進行接菌。接菌後立刻開啟記錄裝

置，以監測控制器感測電極訊號，於電腦繪圖得知各培養參數的變化。菌體生長旺盛會生成大量泡沫，而為了控制泡沫，培養過程中可酌量使用消泡劑 (Sigma, A-4567)。

5. 結束醱酵槽操作後，將整個槽體進行滅菌，需注意溶氧與 pH 電極皆會受高溫氧化而逐漸耗損，故收槽後不伴隨殺菌，而以 70% 酒精及去離子水重複清洗並擦拭乾淨，而 pH 電極可浸泡於 0.1 M HCl 溶液浸泡 30 分鐘，除去表面蛋白附著物。清洗槽體時需注意槽體死角以及管線內部。

## 2.6.2 批式培養 (batch culture)

依 Hinton's 三角瓶培養之最適條件 (FM22 培養基碳氮比為 12、接種量 8.8% 及培養溫度 15°C) 於醱酵槽內進行批式培養，種培養及接菌前處理如 2.5.1 所述，醱酵過程之通氣量及攪拌速率分別控制在 2 vvm 及 1000 rpm。

### 2.6.2.1 pH 值控制與否對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 生長及 CRL3 活性之影響

起始 pH 值皆設為  $5.0 \pm 0.1$ ，完全不控制醱酵槽內 pH 變化者作控制組；當 pH 值因菌體代謝碳源產生有機酸，降至 4.90 以下，便啟動幫浦添加 28% 氨水，使 pH 值以回升，作為操作組，於固定時間取樣分析菌體濃度與 CRL3 酵素活性，以探討 pH 值控制與否對於菌體生長及 CRL3 活性的影響。

## 2.6.3 饋料批式培養 (fed-batch culture)

由於批式培養 (batch culture) 中，微生物被接種到固定體積的培養基，當菌體消耗完營養源後，並不再提供其所需要養分，使菌體無法再生長，更遑論進行高密度細胞培養。而饋料批式所需設備簡單，為工業上最常採用高密度微生物醱酵培養方式，其醱酵分為批式及饋料培養兩階段。當菌體生長進入對數期 (log phase)，菌體濃度開始快速上升，同時由於菌體迅速代謝碳源，使對氧需求大增，醱酵液中的溶氧濃度迅速下降；而當培養基碳源耗盡時，溶氧值會有回升之趨勢，故可以此作為開啟批式饋料之依據，並以 HPLC 分析各取樣點之殘存甘油濃度。

### 2.6.3.1 固定流速饋料模式 (constant feeding mode)

欲達高密度菌體濃度時，必須在培養時持續饋料以補充菌體生長的營養源，而饋料方式有多種，為求操作簡單，本研究首先以固定流速饋料模式 (constant feeding) 進行饋料批式培養，將高濃度的營養源以預先決定好的固定流速饋入醱酵槽。培養條件與醱酵槽設定同 2.6.2.1，並以氨水控制 pH 值；饋料液組成如 2.2.4 所示，饋料流速參考 *Pichia* Protocols (Humana Press, Totowa, NJ, USA)，固定流速為 11.25 mL/h，於固定時間取樣分析菌體濃度與 CRL3 酵素活性。

### 2.6.3.2 仿指數饋料模式 (pseudo-exponential feeding mode)

雖然固定流速饋料模式簡單且易於操作，但不論菌體濃度多寡，皆固定同一供給速率，會造成在菌量少時甘油堆積，造成培養成本浪費；而菌體濃度高時，甘油供給量不足，碳源變成受限制基質，造成菌體生長遲滯，對異源蛋白表現造成不利影響。而指數饋料，充分利用批式培養所得之結果，設定一個固定的比生長速率，且此比生長速率必須小於批式培養的最大比生長速率。

比生長速率計算方法 (Berney *et al.*, 2006)：

$$\mu = \Delta \ln OD_{600} / \Delta t \dots \dots \dots (式 2.1)$$

$\Delta t$  : process time (h)

將設定之比生長速率及其他培養參數，代入式 1.1 之指數饋料公式，以求出饋料流速  $F(t)$ ；而因為饋料流速  $F(t)$  隨時間變化而改變，但人工無法做到每時每刻變換饋料流速，故根據指數饋料原理，參考林 (2004) 作法，設計仿指數饋料模式，於饋料前期，每 12 小時改變饋料流速；之後，改為每 6 小時即變動流速一次，於固定時間取樣分析菌體濃度與 CRL3 酵素活性，直到槽內培養基體積接近滿載時，中止培養。

## 2.7 分析方法

### 2.7.1 菌體生長量測定 (OD<sub>600</sub>)

菌體濃度以吸光密度 (optical density) 表示，取樣之樣品直接或經過適當稀釋後，以分光光度計測定 600 nm 波長之吸光，使測定值介於 0.2~0.5 間，回乘稀釋倍率，扣除空白組之背景值後，作為該樣本吸光值。

### 2.7.2 菌體乾重與 OD<sub>600</sub> 之換算

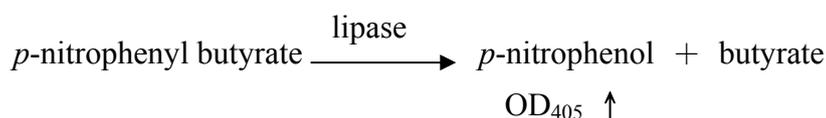
取 3 mL 菌液，進行系列稀釋後，分別測量其 OD<sub>600</sub> 與所對應之菌體乾重，將菌液以 1500 × g 轉速離心 10 分鐘後，去除上清液，加入 PBS 緩衝液沖洗菌體，以同樣離心條件再次離心並除去上清，送至 90 °C 烘箱烘乾至恆重之後，扣除容器重量即為菌體乾重；經換算 OD<sub>600</sub> 為 1 時，相當於每升 0.211 克菌體乾重。

### 2.7.3 脂肪酶活性分析

本論文選用短碳鏈的 *p*-nitrophenyl butyrate (PNPB) 作為酵素反應基質來進行脂肪酶之酵素活性分析，主要是因為較短鏈的脂肪酸在水中較為穩定，並且可以省去長鏈脂肪酸所必須經過的繁瑣乳化的步驟，操作較為簡單方便 (Jaeger *et al.*, 1994)。PNPB 經酵素分解後產生黃色的 *p*-nitrophenol，利用波長 405 nm 之吸光值變化計算酵素活性 (Ferrer *et al.*, 2004; Gilham and Lehner, 2005)。

#### (a) 酵素反應原理

本研究以 *p*-nitrophenyl butyrate 作為測定脂肪酶活性的基質，其在脂肪酶作用下，會分解產生 *p*-nitrophenol，造成 OD<sub>405</sub> 讀值增加。



脂肪酶的一酵素活性單位 (unit) 定義為在 37°C、pH 9.0 的條件，每分鐘催化生成 1 μmol *p*-nitrophenol 所需之酵素量。

## (b) 酵素活性測定步驟

由於本研究所表現之異源蛋白 CRL3 為外泌酵素，故取菌液離心去除菌體，直接以上清液偵測酵素活性。首先取 10  $\mu\text{L}$  適當稀釋的酵素液加入 96 孔盤中，作為測試組；而由於 PNPB 本身會自行裂解，故需注意扣除空白組隨時間增加而上升之吸光值 ( $\text{OD}_{405}$ )，因此另取 10  $\mu\text{L}$  二次去離子水加入 96 孔盤作為空白組。接著每個孔洞中添入 220  $\mu\text{L}$  酵素反應緩衝液，於 ELISA reader 內以 37°C 預溫 10 分鐘，接著以八爪 pipet 加入 20  $\mu\text{L}$  酵素反應基質液，反應時間 10 分鐘後測量吸光值 ( $\text{OD}_{405}$ )。將測試組減去空白組之讀值，測定反應液中 *p*-nitrophenol 產量即可換算出酵素活性值。

## (c) 使用試劑

### (1) 酵素反應緩衝液

Tris (Sigma T-1503)	12.11 g/L
NaCl	8.77 g/L
Arabic gum	1 g/L

以 6 N HCl 滴定至 pH 9.0 後定量至 1 升。

### (2) 酵素反應基質液 (10 mL)

取 14.1  $\mu\text{L}$  *p*-nitrophenyl butyrate (Sigma N-9876) 溶於異丙酮 (isopropanol)，定量至 10 mL，使濃度為 8 mM。

## (d) *p*-nitrophenol 濃度標準曲線製備

取 0.00695 g *p*-nitrophenol (Sigma 1048) 溶於 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) 中，定量至 100 mL，此時濃度為 0.5 mM。接續以相同緩衝液作兩倍系列稀釋後，取不同濃度的 *p*-nitrophenol 測各別的  $\text{OD}_{405}$  吸光值，繪製標準曲線。

## 2.7.4 蛋白質定量法

本實驗使用 Bradford 蛋白質定量法，參考莊 (2006) 作法作適度修改。首先將 Coomassie Blue dye (Bio-Rad 500-0006) 以 Tris 緩衝液 (50 mM Tris, pH 7.4) 稀釋 4 倍，作為反應呈色劑。之後將牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)

標準品 (Sigma P-7656) 稀釋成 0、20、40、60、80、100、150 與 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  等濃度。取 50  $\mu\text{L}$  不同稀釋濃度之 BSA 加入 96 孔微量滴定盤中。於每槽加入 200  $\mu\text{L}$  呈色劑，靜置室溫十分鐘後以 ELISA reader 測波長 570 nm 之吸光值，繪製標準曲線，以此決定未知樣本蛋白濃度。

## 2.7.5 蛋白質膠體電泳

### (a) Tricine SDS-PAGE

本研究使用 10% Tricine SDS-PAGE 之電泳系統，利用 Coomassie Brilliant Blue R (Sigma B-0630) 將膠體上的蛋白質染色，可作為蛋白質的定性分析，參考莊 (2006) 作法作適度修改，如下所述。

取 10  $\mu\text{L}$  適量樣品，加入同體積之 SDS-PAGE 樣品溶液，加入 2  $\mu\text{L}$  之追蹤染料，混合均勻後，置於 100°C 沸水 3 分鐘，以固定電壓 150 V 進行電泳，待追蹤染劑跑出膠片外即停止電泳，取下膠片進行染色。膠片浸於 CBR 染色液 30 分鐘後，以脫色液將未與蛋白質結合的染色液去除 (於染色缸中放入一張擦手紙，可加速脫色過程)，退染時間約 60 分鐘。

註：若樣品濃度過稀，可進行濃縮，作法乃取 6 mL 培養上清液裝入離心濃縮管中，以 4000  $\times g$  離心 30 分鐘，將濃縮液經脫鹽步驟後，以 Bradford 蛋白定量法測定其蛋白濃度。於電泳分析前，以去離子水調整至所需蛋白濃度，作為電泳樣品。

### (b) 使用試劑

#### (1) A 液 (T 30%, C 2.6%)

Acrylamide (Bio-Rad 161-0107)	14.6 g
Bis (Bio-Rad 161-0201)	0.4 g

以二次去離子水溶解並定量至 50 mL，若不易溶解可加熱助溶，保存於 4°C。

注意：Acrylamide 為有毒性物質，操作時要特別小心。

(2) B 液 (分離膠體緩衝液)

Tris (Sigma T-1503)	18.2 g
TEMED (Sigma T-8133)	0.36 mL

溶於 30 mL 二次去離子水中，以 6 N HCl 調至 pH 8.8，再定量至 50 mL，保存於 4°C。

(3) C 液 (聚焦膠體緩衝液)

Tris (Sigma T-1503)	0.6 g
TEMED (Sigma T-8133)	40 $\mu$ L

溶於 8 mL 二次去離子水中，以 6 N HCl 調至 pH 6.8，再定量至 10 mL，保存於 4°C。

(4) 過硫酸銨溶液 (APS, 10%)

Ammonium persulfate	0.1 g
---------------------	-------

溶於 1 mL 二次去離子水中，使用前新鮮配製。

(5) 5X 通用電泳緩衝液

Tris (Sigma T-1503)	54.5 g
EDTA 2Na (Sigma E-4884)	4.7 g
Boric acid (Nacalai 05214-15)	24.8 g

溶於 800 mL 二次去離子水中，以 6N NaOH 調至 pH 8.4，定量至 1 L。使用時稀釋 5 倍，置於室溫保存。

(6) Tricine-SDS PAGE 膠體配方 (10% T)

Components	Separating Gel		Stacking Gel	
A 液	3.33	mL	0.66	mL
B 液	2.50	mL	-	
C 液	-		1.24	mL
10% SDS	0.10	mL	0.05	mL

double distilled water	4.15	mL	3.00	mL
APS	0.05	mL	0.10	mL

(7) CBR 脫色液：10% 醋酸與 20% 甲醇溶於去離子水中。

(8) CBR 染色液

Coomassie Brilliant Blue R (Sigma B-0630)	1.5	g
Methanol	250	mL
Acetic acid	50	mL
double distilled water	250	mL

以 250 mL 甲醇溶解，加入 250 mL 二次去離子水及 50 mL 醋酸，混合均勻使用。

(9) 2X SDS-PAGE sample buffer

Tris (Sigma T-1503)	3.0	g
SDS	4.0	g
$\beta$ -mercaptoethanol	10	mL

加 80 mL 二次去離子水溶解，調 pH 至 6.8，再定量至 100 mL。

### 2.7.6 甘油濃度分析

取樣上清需經 0.45 $\mu$ m 針頭式濾器過濾後，方能以高效能液相層析法 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 作定量分析。分析條件依層析管柱製造商使用指南 ([www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)) 作部分修改，整理如下：

- 1、Column：ICSep ICE-COREGEL 87H3 column (Transgenomic Inc, NE, USA)
- 2、Detector：折射率偵測器 refractive index detector, RI2000 (Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef, Germany)
- 3、Mobile phase：8 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 4、Flow rate of mobile phase：0.6 mL/min

5、Injection volume：50  $\mu$ L

6、Temperature：50°C

7、數據擷取系統：PEAK-ABC Chromatography Data Handling System (E-Chrom Tech, Taipei, Taiwan)

#### 2.7.6.1 甘油濃度標準曲線製備

將甘油標準品 (Katayama G-0075) 稀釋成濃度個別為 25、20、12.5、5、2.5、1.25、1、及 0.625 g/L 之溶液，以 HPLC 測定其對應波峰面積以繪製甘油濃度標準曲線。



## 第三章 結果與討論

### 3.1 脂肪酶活性分析方法的建立

#### 3.1.1 最適反應時間的決定

最適反應時間選擇之實驗結果如圖 3.1 所示，於反應初期，反應時間與產物生成量之間關係大致呈線性。當反應超過 10 分鐘後趨於緩和，表示所測得之活性逐漸下降，已遠離反應的初速率 ( $V_0$ )。由於考量反應基質 PNPB 會自行水解，若反應時間太短，在操作上片刻時間的延遲，會使人為誤差的影響增大，故選擇仍在線性內的 10 分鐘作催化反應時間。

#### 3.1.2 最適反應基質濃度

依據酵素動力學 (Nelson and Cox, 2000)，在基質 (substrate) 濃度低時，催化速率會隨基質濃度上升而增高 (一級反應)。在高基質濃度時，基質濃度即不影響速率 (零級反應)，因此，反應基質需過量以確保酵素反應是以最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 作用，不僅不會低估所計算之活性，且反應速率將與反應液中所含酵素量成正比，二者間呈線性關係。

以不同濃度的反應受質 PNPB，對 0.32 mg/mL 之 *Candida rugosa* lipase (CRL) 標準品 (Sigma L-1754)，於 pH 9.0、37°C 恆溫條件下進行脂肪酶活性測試，探討固定酵素濃度對不同 PNPB 濃度之酵素反應速率變化，結果如圖 3.2 所示，當 PNPB 濃度達到 8 mM，酵素對受質的反應速率趨於一致，不會隨著基質濃度增高而上升，為零級反應，故選擇以 8 mM PNPB 作本實驗所使用之基質濃度。

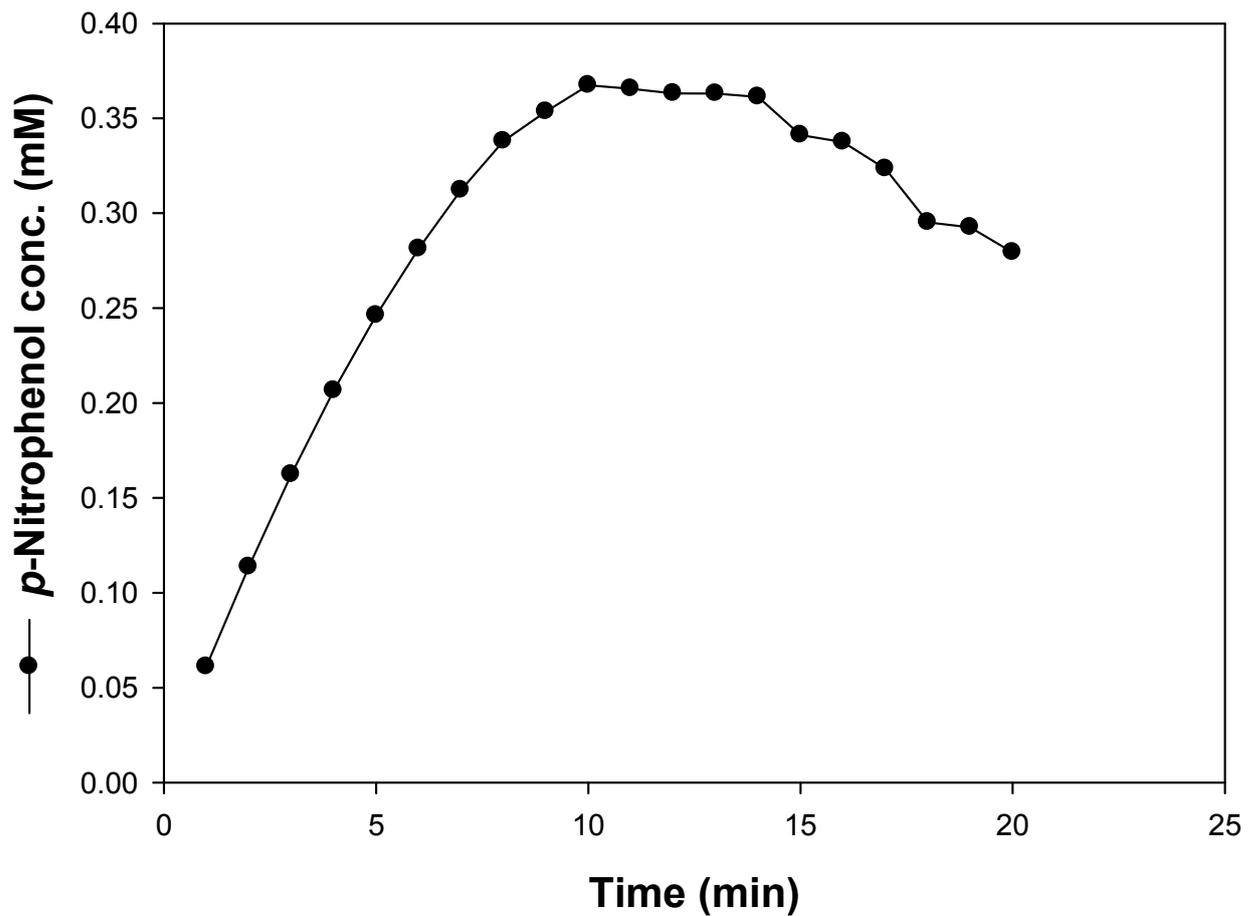


圖 3.1 脂肪酶反應時間與產物 *p*-nitrophenol 之關係

**Fig. 3.1 Relation between lipase reaction time and its product *p*-nitrophenol**

操作條件：濃度 8 mM 之受質 PNPB 對 0.32 mg/mL CRL 標準品 (Sigma L-1754) 於 37°C、pH 9.0 下反應 20 分鐘，每分鐘記錄並計算其產物濃度。

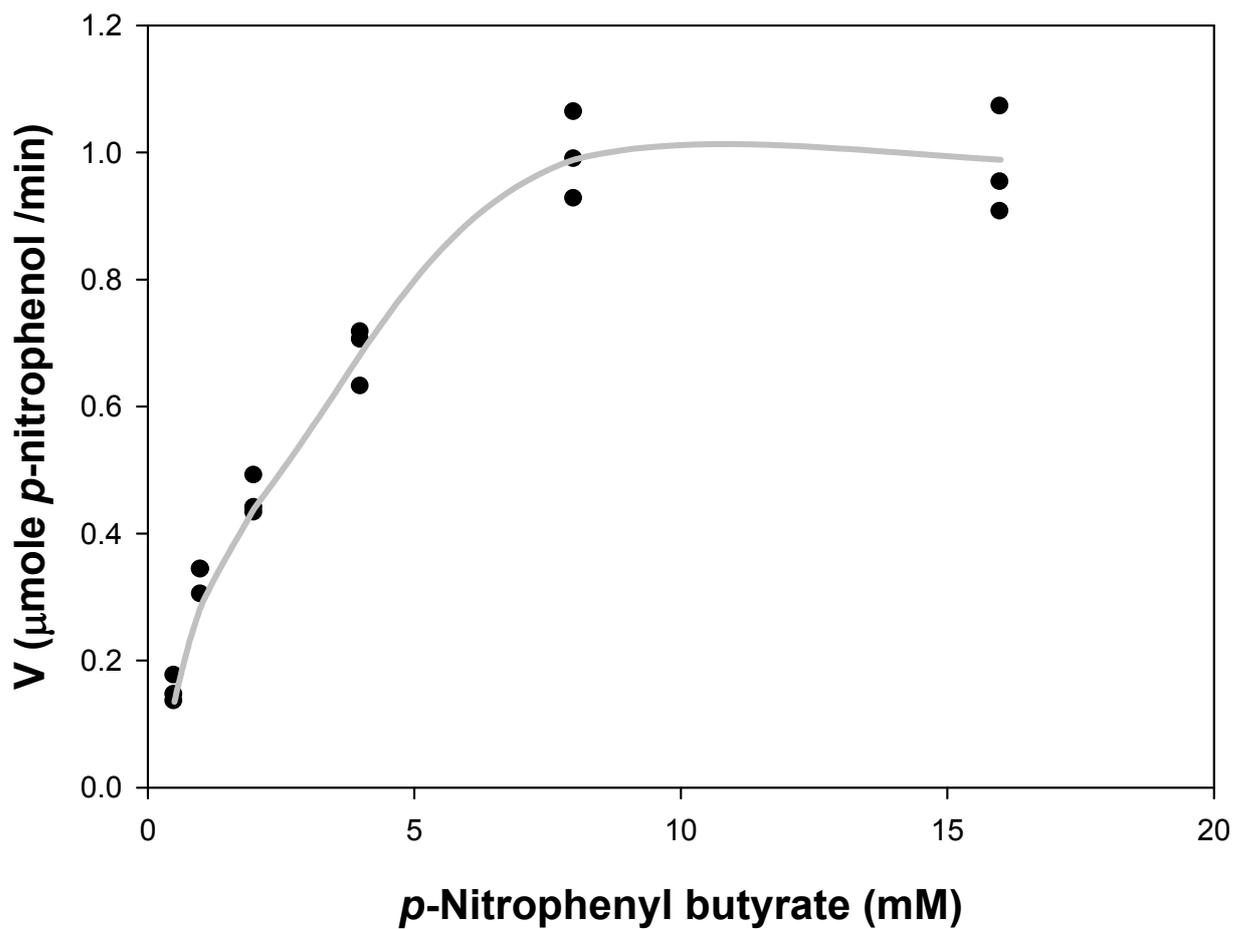


圖 3.2 不同 PNPB 濃度之酵素反應速率變化

Fig. 3.2 Enzyme reaction rate at various PNPB concentrations

操作條件：濃度 0、1、2、4、8、16 mM 之受質 PNPB 對 0.32 mg/mL CRL 標準品 (Sigma L-1754) 於 37°C、pH 9.0 下反應 10 分鐘。

## 3.2 菌株改良之探討

### 3.2.1 建立篩菌方法

以濃度由低至高的 Zeocin 濃度處理 *P. pastoris* GS115/CRL3 以期望得到具有高脂肪酶活性的轉形株。篩菌的過程分為兩個部分，分別為一次篩菌（活性定性分析）與二次篩菌（活性定量分析）。定性分析原理就是脂肪酶可水解受質 trybutyrin，以此特性設計篩菌方法；將 *P. pastoris* GS115/CRL3 於 YPGTA 平板培養基上進行四區劃菌，因菌株外泌異源蛋白 CRL3 分解 trybutyrin，而於菌落周圍生成透明環，而理論上，脂肪酶活性越高，透明環理應越大。而在量測透明環大小時，也會將菌落大小涵蓋進去，但每個單一菌落生長情形不一，若直接以透明環大小作為指標，可能會影響篩菌結果的判斷，故改採透明環半徑：菌落半徑之比值，作一次篩菌之指標。

為彌補透明環方法僅能定性而無法定量之不足，將進行二次篩菌，二次篩菌改採分光光度法作脂肪酶活性定量分析，探討一次篩菌所得之透明環半徑：菌落半徑之比值，與進行醱酵培養後酵素活性之相關性，以確定該比值大小是否與活性具正相關。分析方法利用受質 PNPB 被脂肪酶水解放出 *p*-nitrophenol，造成吸光度 OD<sub>405</sub> 讀值增加之原理設計之。

### 3.2.2 篩菌結果

#### 3.2.2.1 一次篩菌

於 YPG 種瓶培養基內逐步提升 Zeocin 濃度，馴養菌株 *P. pastoris* GS115/CRL3，在 YPGTA 平板培養基上四區劃菌，結果如圖 3.3 所示，當 Zeocin 濃度小於 1500 µg/mL，可看見許多菌落周遭帶有明顯透明環；但當 Zeocin 濃度提高至超過 1700 µg/mL 時，菌體雖仍可生長，但已能看出菌落周圍的透明環大幅萎縮，緩步提升 Zeocin 濃度，透明環依舊相當微小，濃度提高至 3500 µg/mL，該現象仍持續存在。雖然目前已知以高抗生素濃度篩選具高拷貝數之轉形株，未必能奏效 (Cereghino and

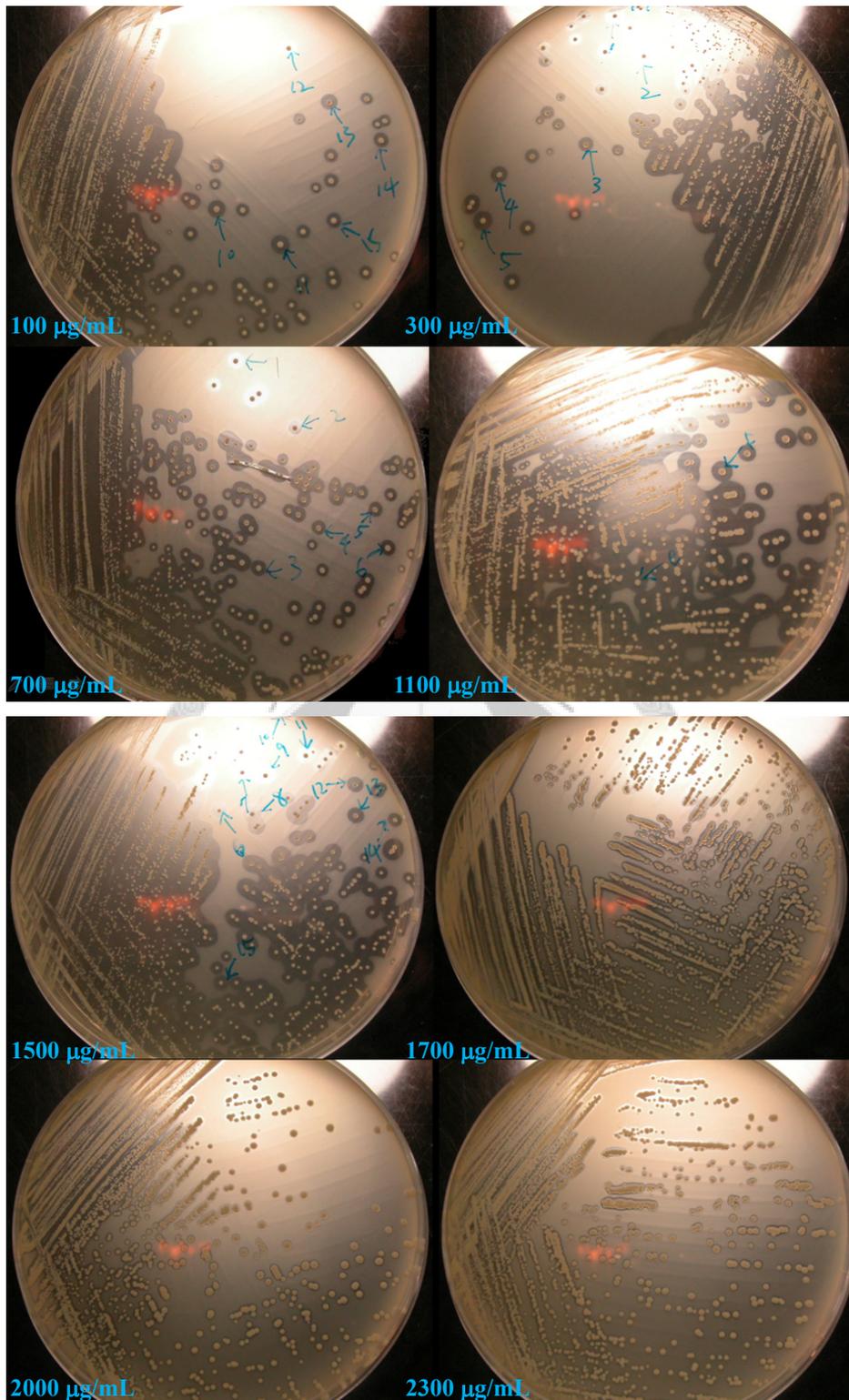


圖 3.3 以 YPGTA 平板培養基篩選具脂肪酶活性表現 *P. pastoris* GS115/CRL3 轉形株之圖示

**Fig. 3.3** Photographs of *P. pastoris* GS115/CRL3 screening with YPGTA plate

操作條件：依不同 Zeocin 濃度依序進行 YPG 種瓶培養，於 YPGTA 平板培養基上，以四區劃線法篩選脂肪酶活性株。培養 72 小時。

Cregg, 2000)，但本研究在提高抗生素到一定程度後，反而出現透明環大小不增反減的現象，但該成因為何目前尚無從得知。

### 3.2.2.2 透明環半徑/菌落半徑之比值與 CRL3 活性之相關性

不同 Zeocin 濃度篩選之轉形株所產生之透明環半徑：菌落半徑之比值大小並不相同 (圖 3.3)，以游標卡尺量出各篩選濃度中比值較佳者，挑選進入二次篩菌，實驗方法依 2.4.2 所述，以 FM22 培養基進行醱酵培養，定量比較脂肪酶活性與比值間的關連性，結果整理如圖 3.4 所示。以 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之 Zeocin 濃度篩選所得的比值最大，三組比值皆介於 2.6-2.7 之間，酵素活性也最高，平均達 0.98 U/mL；但是，以其餘濃度所篩出之菌株，在比值與酵素活性二者間之規律性並不明顯，可能原因與透明環法本身靈敏度不佳，以及菌落本身較小，以游標卡尺在測量上易出現人為誤差，故僅能以此作為一次篩菌之依據。

### 3.2.2.3 二次篩菌

將 Zeocin 濃度 100、300、500、700、1100、1500、1700、3600 共八個濃度於一次篩菌所挑出之 *P. pastoris* GS115/CRL3 菌株，自 YPGTA 平板培養基上取下，依 2.4.2 方法所述，分析以 FM22 培養基醱酵培養所得之脂肪酶活性，以同樣方法重複三次試驗，以驗證數據再現性。結果如表 3.1，以 Zeocin 濃度 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  所篩選之菌株，酵素活性可達 1.06 U/mL，明顯優於其他組，比控制組提升 96%，因此選擇其作為日後醱酵培養探討之使用菌株，命名為 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500。

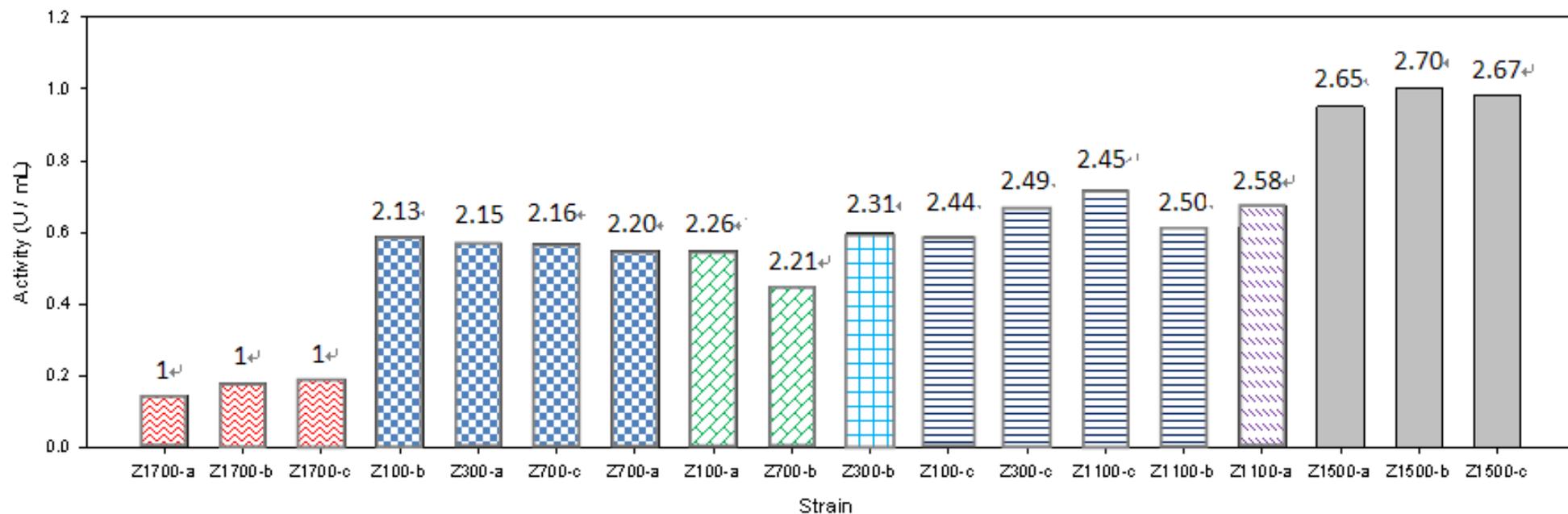


圖 3.4 透明環半徑/菌落半徑之比值與脂肪酶活性之關係

Fig. 3.4 Relation between clear zone diameter/colony diameter ratios and lipase activities

- 1.00-1.10
- 2.11-2.20
- 2.21-2.30
- 2.31-2.40
- 2.41-2.50
- 2.51-2.60
- 2.61-2.70

表 3.1 比較藉由不同 Zeocin 濃度篩菌對於菌株外泌脂肪酶活性之影響

Table 3.1 Comparison of CRL3 activities at various Zeocin concentration screening

No.	Lipase activity (U/mL)	OD <sub>600</sub>	Final pH
Z100	0.54 ± 0.06	50.06 ± 3.97	2.90 ± 0.02
Z300	0.61 ± 0.05	52.09 ± 2.79	2.91 ± 0.05
Z500	0.58 ± 0.04	49.62 ± 3.82	3.00 ± 0.05
Z700	0.54 ± 0.03	46.80 ± 0.69	3.02 ± 0.08
Z1100	0.82 ± 0.05	42.39 ± 1.74	3.20 ± 0.05
Z1500	1.06 ± 0.01	56.09 ± 1.30	2.94 ± 0.02
Z1700	0.16 ± 0.02	52.59 ± 0.81	2.91 ± 0.02
Z3500	0.03 ± 0.01	49.32 ± 0.21	2.98 ± 0.01

### 3.3 Hinton's 三角瓶培養條件之探討

#### 3.3.1 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 於全合成培養基 FM22 之生長曲線

將 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500，經 2.5.1 所述之活化與種培養步驟，以 1% 接種量接於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，於轉速 125 rpm、25°C 恆溫震盪培養 120 小時，結果如圖 3.5 所示。菌體生長約於第 72 小時進入穩定期 (stationary phase)，此時 OD<sub>600</sub> 約 45；而 CRL3 酵素活性自培養 24 小時起逐漸提高，96 小時後趨緩，120 小時之酵素活性約 1.76 U/mL，故本研究之培養時間將固定設為培養 120 小時。

#### 3.3.2 培養條件對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體生長及 CRL3 表現之影響

##### 3.3.2.1 起始 pH 值

如表 3.2 所示，以 pH 5 效果最佳，酵素活性可達 1.75 U/mL，OD<sub>600</sub> 達 50 左右；在 pH3 培養下，菌體幾不生長，OD<sub>600</sub> 約僅有 2.5，酵素活性亦極低；因此，接續將選擇以起始 pH 5 條件作培養探討；而起始 pH 值不再往上進行探討之主因在於 FM22 培養基在 pH>5.5 時，會產生大量磷酸鈣、鎂沈澱而影響實驗進行。

##### 3.3.2.2 培養溫度

如表 3.3 所示，以 20°C 培養之酵素活性最高，達 2.46 U/mL；而 25°C 培養之菌體濃度最高，但酵素活性約僅為 20°C 組的 65%；而值得注意的是，以最高溫 30°C 進行培養者，活性僅 0.17 U/mL，約為 20°C 組之 7%，但兩者間在菌體濃度上差異不大，故並非菌株在 30°C 培養下無法生長所致，而因為本研究利用 *GAP* 啟動子作外源基因表現，其優點在於不需誘導，異源蛋白之生合成隨菌體分裂生長而表現，但卻出現菌量相當，酵素活性僅因培養溫度的不同而造成大幅差異。

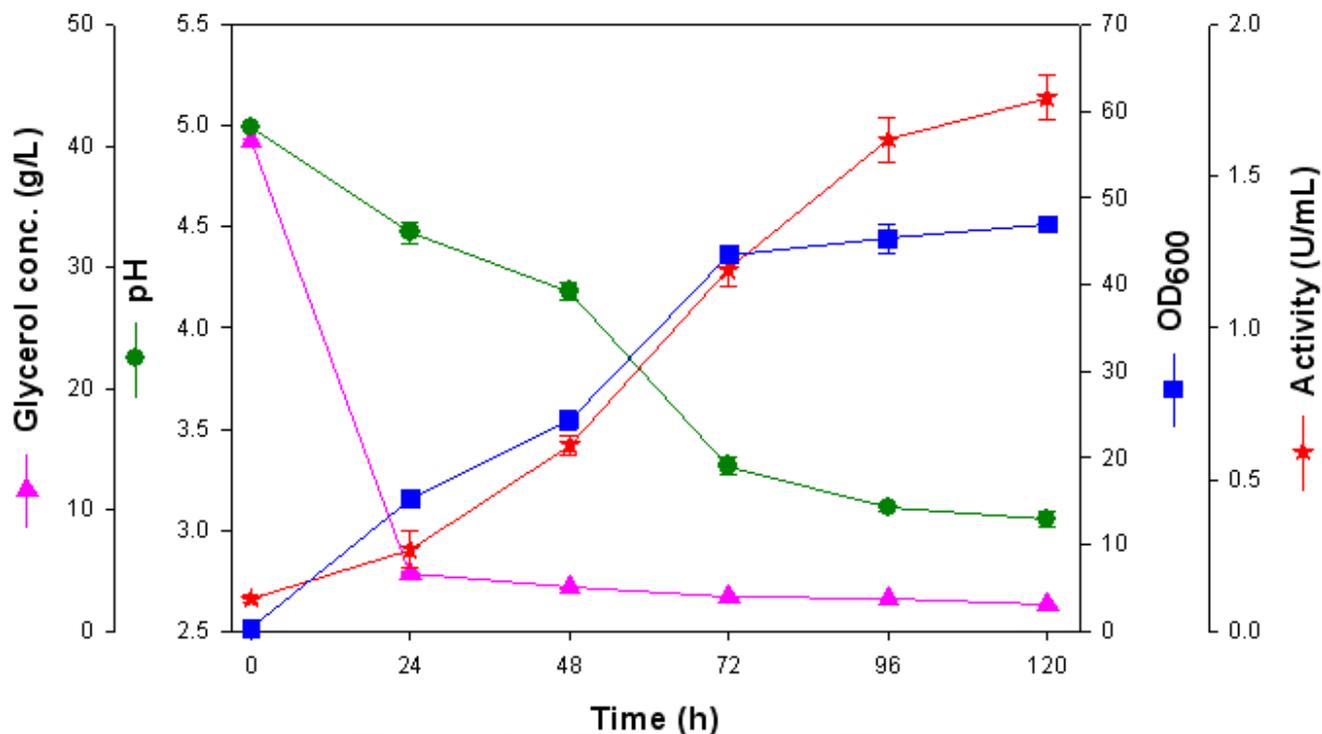


圖 3.5 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 之生長曲線

Fig. 3.5 Growth curve of *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500

操作條件：配製 FM22 全合成培養基，以 KOH 調整 pH 至 5.3 左右，待高溫高壓滅菌 (121 °C、15 min) 後，pH 約降至 5.0 左右。依 2.5.1 所述之方法去除 YPG 種培養液後，以 PBS 緩衝液懸浮的菌液，取 1 mL 接種於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，於 25°C、125 rpm 的條件下培養 120 小時。

表 3.2 不同起始 pH 值對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋白 CRL3 活性之影響

Table 3.2 The cell density and CRL3 activity at various initial pH values

pH value	CRL3 activity (U/mL)	OD <sub>600</sub>
3	0.14 ± 0.01	2.57 ± 0.42
4	1.19 ± 0.03	36.66 ± 1.32
5	1.75 ± 0.09	46.70 ± 2.20

操作條件：配製 FM22 全合成培養基，以 KOH 調整 pH 至 5.3、4.2、3.0 左右，待高溫高壓滅菌 (121 °C、15 min) 後，pH 個別降至約 5.0、4.0、3.0。依 2.5.1 所述之方法去除 YPG 種培養液，並以 PBS 緩衝液懸浮的菌液，取 1 mL 接種於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，於 25°C、125 rpm 下恆溫震盪培養，三重複之，120 小時後進行分析。

表 3.3 不同培養溫度對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋白 CRL3 活性之影響

Table 3.3 The cell density and CRL3 activity at various culture temperatures

Temperature (°C)	CRL3 activity (U/mL)	OD <sub>600</sub>
20	2.46 ± 0.08	35.69 ± 1.83
25	1.61 ± 0.06	42.72 ± 2.13
30	0.17 ± 0.02	39.02 ± 1.49

操作條件：配製 FM22 全合成培養基，以 KOH 調整 pH 至 5.3 左右，待高溫高壓滅菌 (121 °C、15 min) 後，pH 約降至 5.0 左右。依 2.5.1 所述之方法去除 YPG 種培養液，並以 PBS 緩衝液懸浮的菌液，取 1 mL 接種於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，分別於 20、25 以及 30°C 下，以轉速 125 rpm 恆溫震盪培養，三重複之，120 小時後進行分析。

不同溫度培養上清液濃縮後之電泳圖如圖 3.6 所示，30°C 培養之上清濃縮 (lane 3)，與 20、25°C 培養者 (lane 1、2)，同樣在分子量 55 至 72 kD 間都出現 CRL3 的色帶；也就是說，在 30°C 培養下，菌體同樣也能外泌 CRL3，並非在此溫度下不表現。Vasina 與 Baneyx (1997) 指出，降低培養溫度將減緩蛋白質的生合成速率，有助於蛋白質折疊構形正確；而 Li 等人 (2001) 以 *Pichia pastoris* 為宿主表現異源蛋白 Herring antifreeze proteins (hAFP)，在 23°C 下培養之 hAFP 活性為 30°C 下的 10 倍，與本研究結果類似。綜合以上結果，將以培養溫度 20°C 接續培養條件探討。

### 3.3.2.3 培養基碳氮比

如表 3.4 所示，本研究所探討之不同碳氮比對菌體量之生成幾無差異；但在酵素活性上，碳氮比 25 之酵素活性明顯低於其他組，這可能與培養基中的氮源較為不足，以致異源蛋白表現受阻有關，而隨著碳氮比遞減，在酵素活性上有遞增的趨勢，以碳氮比 5 能得到最高酵素活性 2.51 U/mL，但與碳氮比 15 相比，兩組間差異並不明顯。

### 3.3.2.4 接種量

如表 3.5 所示，以 1% 接種量進行培養，無論在菌體量與酵素活性表現上明顯不若 5%、10% 兩組；接種量 5% 時，能得到最高酵素活性 5.80 U/mL，但接種 10% 並無法再提升其活性。

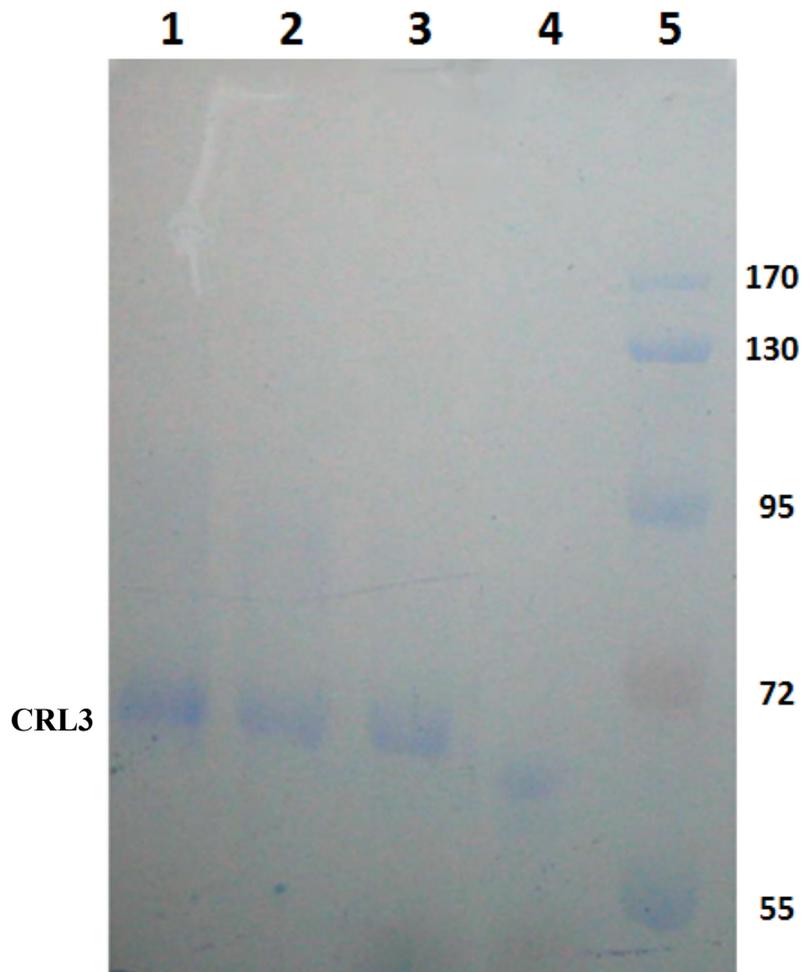


圖 3.6 不同溫度培養結果之 10% SDS-PAGE 電泳分析

Fig. 3.6 10% SDS-PAGE analysis of various temperature culture samples

操作條件：

1% 接種量於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，以轉速 125 rpm 分別於 20、25 以及 30°C，恆溫培養 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 120 小時之電泳分析。

Loading samples：

培養液上清蛋白經濃縮後，濃度統一定為 0.15 mg/mL。

Lane 1：20°C 下之上清濃縮

Lane 2：25°C 下之上清濃縮

Lane 3：30°C 下之上清濃縮

Lane 4：CRL 蛋白質標準品 (Sigma L-1754)

Lane 5：蛋白質分子量 marker

表 3.4 不同培養基碳氮比對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋白 CRL3 活性之影響

Table 3.4 The cell density and CRL3 activity at various C/N ratios

C/N ratio	CRL3 activity (U/mL)	OD <sub>600</sub>
5	2.51 ± 0.12	33.70 ± 0.95
15	2.39 ± 0.09	33.94 ± 1.69
25	1.78 ± 0.06	31.51 ± 1.43

操作條件：依不同碳氮比所需之  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  配製 modified FM22 全合成培養基，以 KOH 調整 pH 至 5.3 左右，待高溫高壓滅菌 (121 °C、15 min) 後，pH 約降至 5.0 左右。依 2.5.1 所述方法去除 YPG 種培養液，並以 PBS 緩衝液懸浮的菌液，取 1 mL 接種於 100 mL modified FM22/500 mL Hinton's flask，於 20°C、125 rpm 下恆溫震盪培養，三重複之，120 小時後進行分析。

表 3.5 不同接種量對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 菌體濃度及表現異源蛋白 CRL3 活性之影響

Table 3.5 The cell density and CRL3 activity at various inoculum sizes

Inoculum size (%)	CRL3 activity (U/mL)	OD <sub>600</sub>
1	2.21 ± 0.06	38.28 ± 1.76
5	5.80 ± 0.23	64.17 ± 2.48
10	5.65 ± 0.11	63.36 ± 2.63

操作條件：配製 FM22 全合成培養基，以 KOH<sub>(s)</sub> 調整 pH 至 5.3 左右，待高溫高壓滅菌 (121 °C、15 min) 後，pH 約降至 5.0 左右。依 2.5.1 所述之方法去除 YPG 種培養液，並以 PBS 緩衝液懸浮的菌液，各取 1、5、10 mL 接種於 100 mL FM22/500 mL Hinton's flask，於 20°C、125 rpm 下恆溫震盪培養，三重複之，120 小時後進行分析。

### 3.4 以反應曲面法探討 Hinton's 三角瓶培養之最適條件

依 3.3.2.1 實驗結果，起始 pH 值以 5.0 培養所得之效果最佳，而考量 pH 大於 5.5 時，將會產生大量磷酸鈣、鎂等沈澱物，故無法在此 pH 值以上探討培養條件；加上 FM22 培養基之 pH 值，在高溫高壓滅菌前後並不一致，故難以控制最適起始 pH 值。綜合以上原因，在進行反應曲面法探討時，將起始 pH 值皆固定為 5.0。

本反應曲面法試驗採三因子-三水準 BBD 設計，由 3.3.2 各條件的實驗結果，探討培養基碳氮比、接種量與培養溫度三者間之關係，以了解三者對表現異源蛋白 CRL3 酵素活性的影響。而中心點選擇如 2.5.3 所述。

#### 3.4.1 反應曲面數學模式之建立

以三因子-三水準 BBD 設計探討反應曲面法最適培養條件，三因子分別為培養基碳氮比、接種量與培養溫度，其各因子水準與對應濃度如表 2.1、2.2 所示，結果如表 3.6 所示，將數據以 Microsoft office excel 2007 電腦套裝軟體中的資料分析程式，進行迴歸分析，以碳氮比 (X<sub>1</sub>)、接種量 (X<sub>2</sub>) 與培養溫度 (X<sub>3</sub>) 作為條件變數因子，以 CRL3 酵素活性作為對應 Y 值，以此求得下列之三因子二次多項式：

$$Y = 6.627777 - 0.5061X_1 + 1.685422X_2 - 1.9208X_3 - 0.07251X_1X_2 + 0.300894X_1X_3 - 1.49374X_2X_3 - 0.89848X_1^2 - 1.67828X_2^2 - 1.48263X_3^2$$

變異數分析 (ANOVA) 結果如表 3.7 所示，一個極小的檢定 p 值 (p-value=0.0008) 及合適的複判定係數 (R<sup>2</sup>=0.9503)，表示此二次多項式約可大致呈現反應值 (CRL3 酵素活性) 與各條件變數因子間之關係。

以迴歸分析表中各對應係數之檢定 p 值檢驗該係數是否顯著 (表 3.8)，發現碳氮比 (X<sub>1</sub>) × 接種量 (X<sub>2</sub>)，以及碳氮比 (X<sub>1</sub>) × 培養溫度 (X<sub>3</sub>) 此二組之一次項，對 CRL3 酵素活性 (Y) 未能達到顯著水準 (即 p>0.05)，予以剔除後，可得如下之方程式：

表 3.6 Hinton's 三角瓶培養之 Box-Behnken 設計及其實驗結果

Table 3.6 Box-Behnken design and its results of Hinton's flask experiments

No.	C/N ratio	Inoculum size (%)	Temperature (°C)	CRL3 activity (U/mL)
1	25	9	20	5.62
2	25	1	20	1.71
3	5	9	20	6.54
4	5	1	20	2.33
5	25	5	25	1.77
6	25	5	15	5.47
7	5	5	25	2.42
8	5	5	15	7.32
9	15	9	25	1.62
10	15	9	15	7.99
11	15	1	25	1.93
12	15	1	15	2.32
13	15	5	20	6.62
14	15	5	20	6.59
15	15	5	20	6.68

表 3.7 反應曲面法設計所得 CRL3 酵素活性之變異數分析

Table 3.7 Analysis of variances (ANOVA) of CRL3 activity from the response surface methodology

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	<i>F</i> value	Prob> <i>F</i>
Regression	9	82.49221	9.165801	30.7322	0.000748
Residual	5	1.49123	0.298247		
Total	14	83.98344			

$R^2=0.9503$

表 3.8 Hinton`s三角瓶培養之 Box-Behnken 設計迴歸分析表

Table 3.8 Results of the regression analysis of the Box-Behnke design at Hinton`s flask experiments

Parameter	Parameter estimate	Standard error	t ratio	Probability
Intercept	6.627777 *	0.315303	21.02036	4.51E-06
$X_1$	-0.5061 *	0.193083	-2.62113	0.047034
$X_2$	1.685422 *	0.193083	8.729017	0.000327
$X_3$	-1.9208 *	0.193083	-9.94806	0.000175
$X_1 \times X_2$	-0.07251	0.27306	-0.26553	0.801202
$X_1 \times X_3$	0.300894	0.27306	1.101931	0.320686
$X_2 \times X_3$	-1.49374 *	0.27306	-5.47038	0.00278
$X_1^2$	-0.89848 *	0.28421	-3.16133	0.025058
$X_2^2$	-1.67828 *	0.28421	-5.90506	0.001982
$X_3^2$	-1.48263 *	0.28421	-5.21666	0.003419

\* :  $p < 0.05$

$$\text{CRL3 activity (U/mL)} = 6.627777 - 0.5061X_1 + 1.685422X_2 - 1.9208X_3 - 1.49374X_2X_3 - 0.89848X_1^2 - 1.67828X_2^2 - 1.48263X_3^2 \dots\dots\dots(\text{式 } 3.1)$$

根據預測模式固定其中一個條件變數因子如接種量 1、5 或 9% 為常數，變動其餘二因子依式 3.1 繪製出一系列的立體曲面圖與等高線圖 (Contour plots)，用以解釋研究結果，瞭解條件變數因子與反應值之間的關係 (圖 3.7-3.9)。

由以上結果得知，培養溫度與接種量是最主要影響 CRL3 酵素活性的因子，培養溫度降低能提升酵素活性，可能與低溫下，有助於蛋白質構形正確折疊有關；而接種量的多寡，會影響菌體生長與最終菌體濃度，因為本研究使用之 *GAP* 啟動子表現與菌體生長息息相關，因而可能間接影響異源蛋白 CRL3 表現。

### 3.4.2 反應曲面法之最適條件探討

將迴歸式 (式 3.1)，經由一次微分後，分別對因子  $X_1$ 、 $X_2$  與  $X_3$  解三元一次方程式，求出解 3.1：

$$X_1 = -0.28, X_2 = 1.02, X_3 = -1.16 \dots\dots\dots(\text{解 } 3.1)$$

而理論最大 CRL3 酵素活性可達 8.67 U/mL；有鑑於  $X_2$  與  $X_3$  其值雖接近 -1，但並未落在本實驗之水準內 (-1 ~ 1)；因此將水準侷限在 -1 與 1 間，可由迴歸式求出解 3.2：

$$X_1 = -0.30, X_2 = 0.95, X_3 = -1.00 \dots\dots\dots(\text{解 } 3.2)$$

解 3.2 估計所求得之 CRL3 酵素活性可達 8.64 U/mL，十分接近最適解 (解 3.1) 所預測的理論最大值 8.67 U/mL；故選擇以本研究預測模式為基礎，將解 3.2 之水準值 (coded value) 轉為對應值 (response value)，得解 3.3：

$$\text{培養基碳氮比 } 12, \text{ 接種量 } 8.8\%, \text{ 培養溫度 } 15^\circ\text{C} \dots\dots\dots(\text{解 } 3.3)$$

將解 3.3 進行三重複實驗驗證之，結果如圖 3.10 所示，培養 120 小時之 CRL3 酵素活性為 8.47 U/mL，與預測值相當接近；因此，進一步將此條件應用至醱酵槽生產培養。

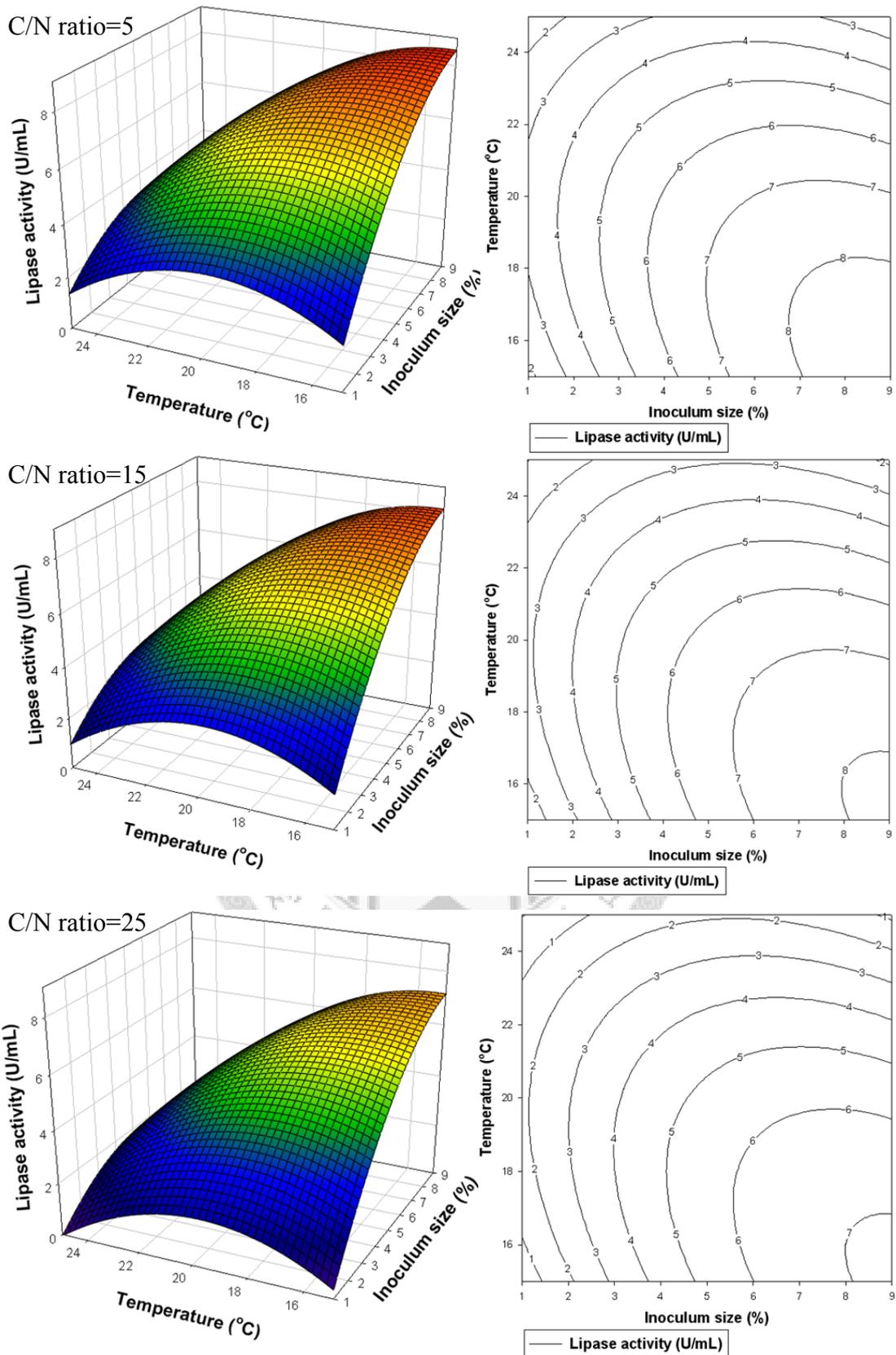
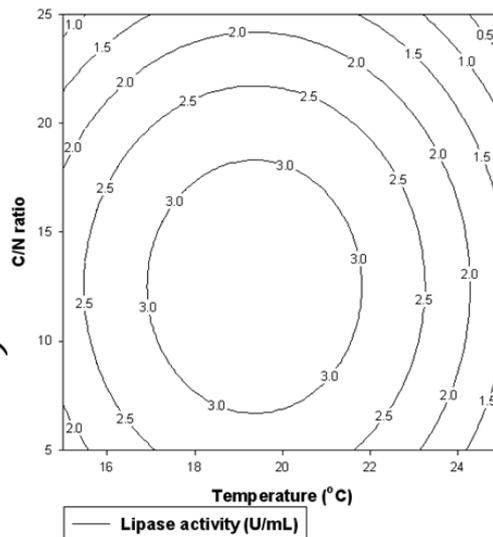
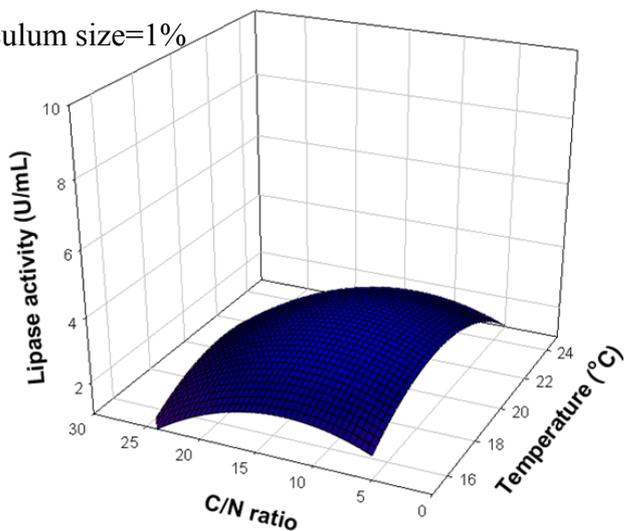


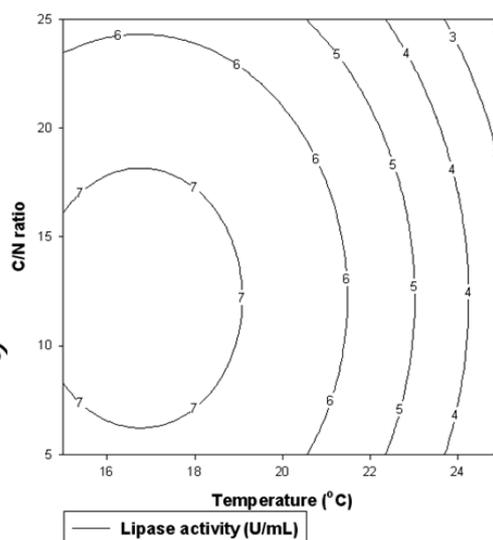
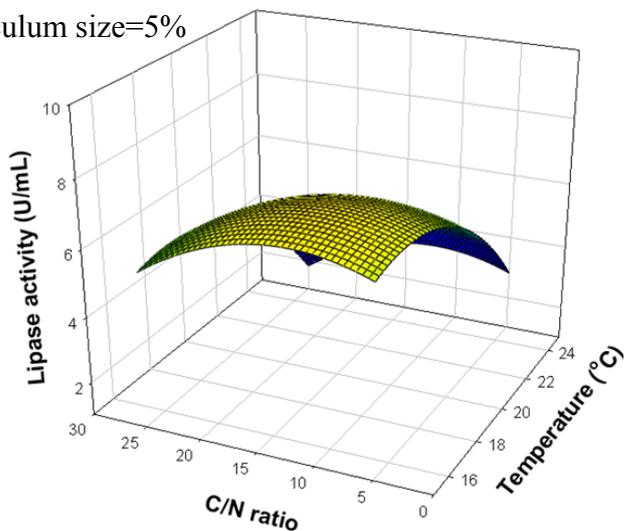
圖 3.7 碳氮比、培養溫度與接種量對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖

Fig. 3.7 The response surface and contour plot for the CRL3 activity at various C/N ratios、culture temperatures and inoculums sizes

Inoculum size=1%



Inoculum size=5%



Inoculum size=9%

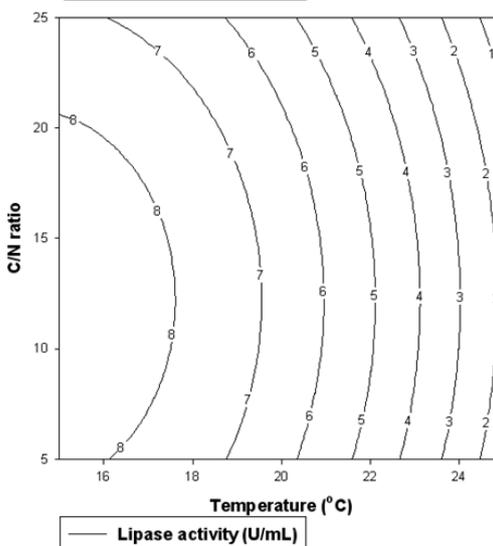
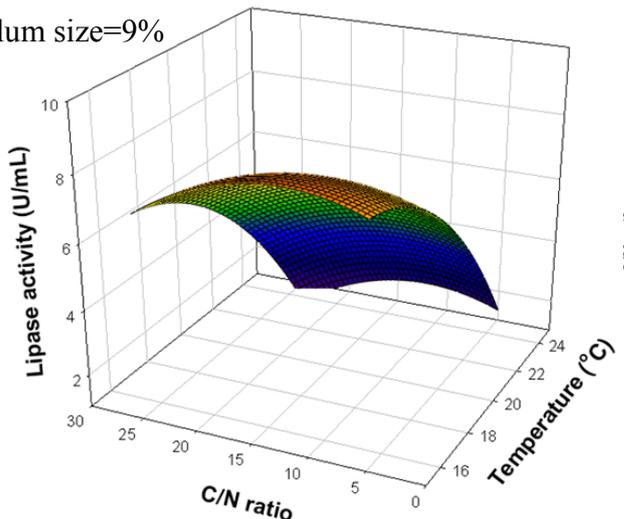
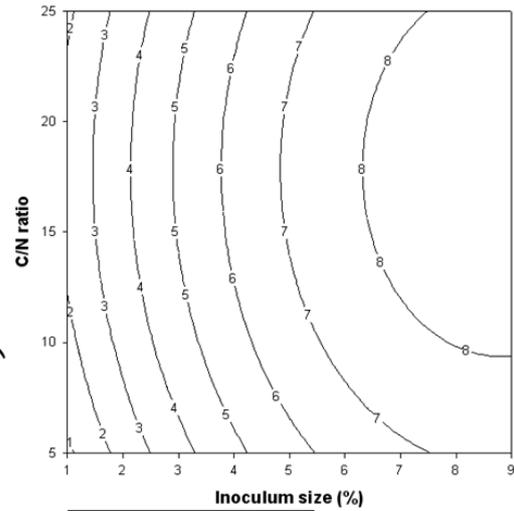
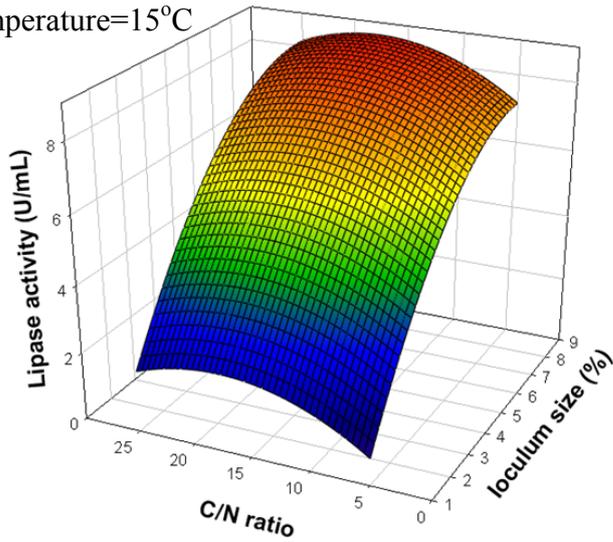


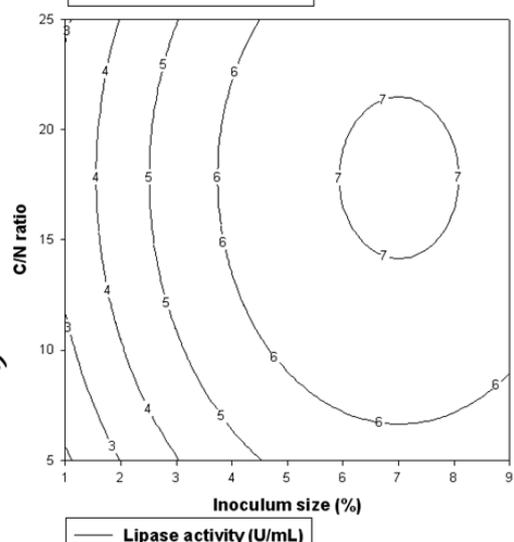
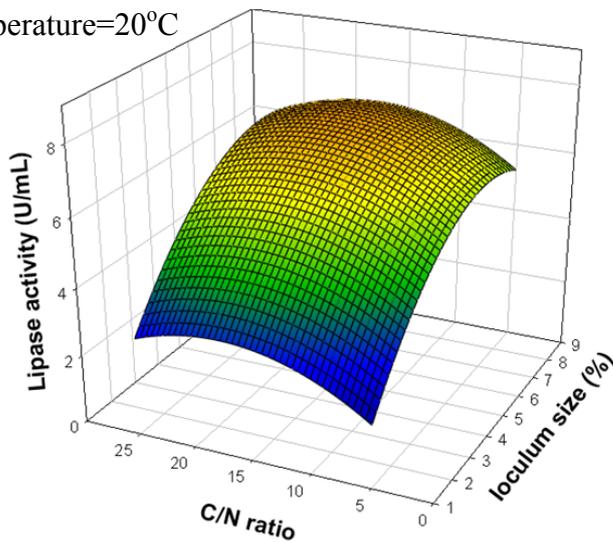
圖 3.8 接種量、碳氮比與培養溫度對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖

Fig. 3.8 The response surface and contour plot for the CRL3 activity at various inoculums sizes、C/N ratios and culture temperatures

Temperature=15°C



Temperature=20°C



Temperature=25°C

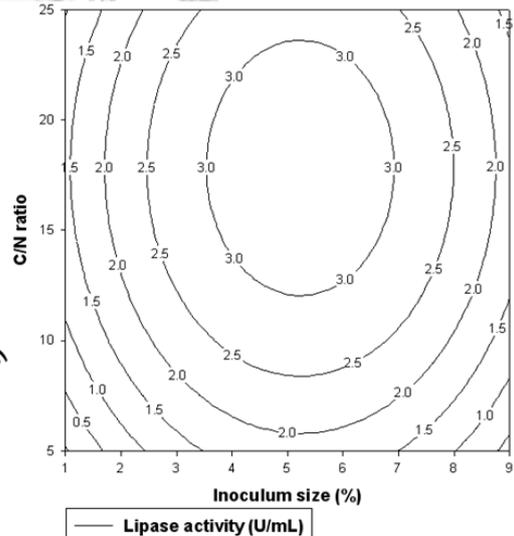
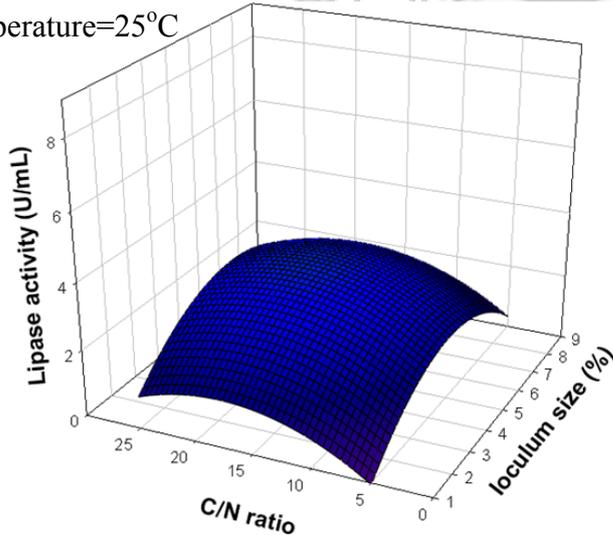


圖 3.9 培養溫度、碳氮比與接種量對 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 表現 CRL3 活性之反應曲面圖與等高線圖

Fig. 3.9 The response surface and contour plot for the CRL3 activity at various culture temperatures、C/N ratios and inoculums sizes

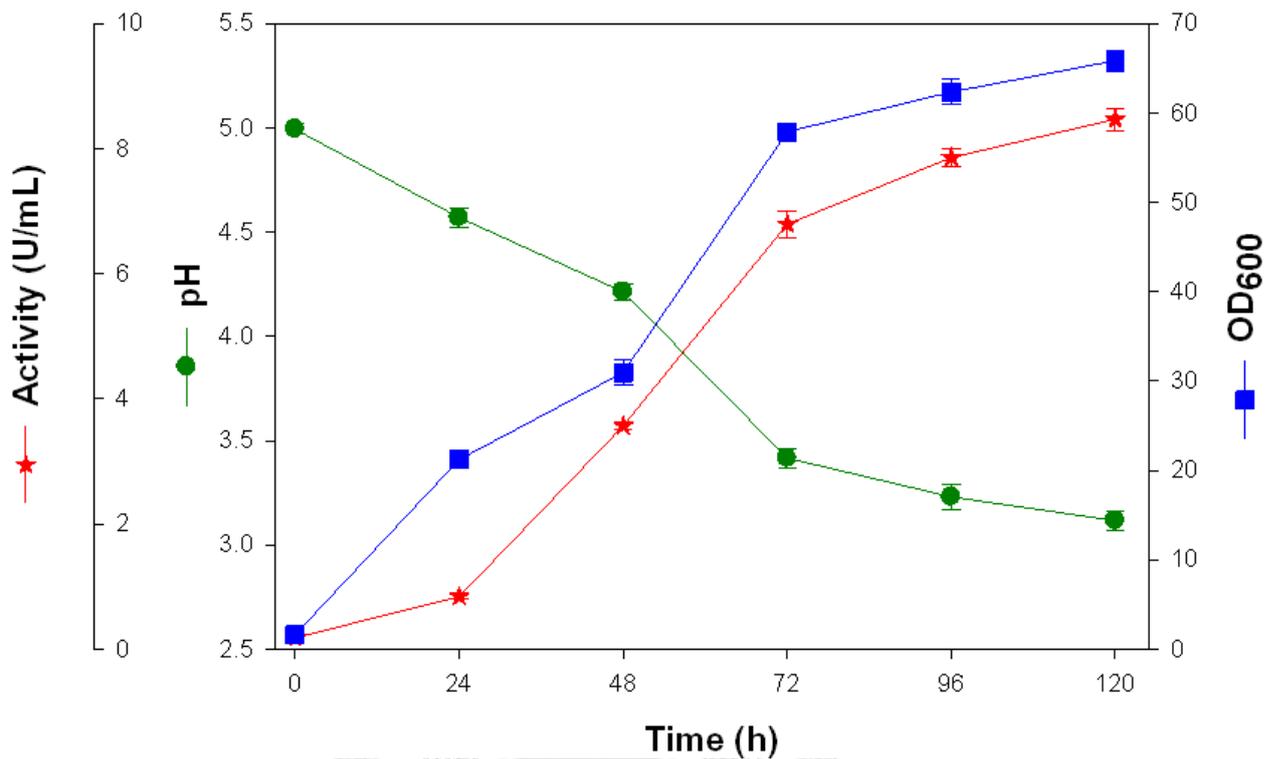


圖 3.10 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 最適化培養之生長曲線

Fig. 3.10 Growth curve of *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 in optimal culture conditions

操作條件：以最適化培養條件（調整後之 FM22 培養基碳氮比 12、接種量 8.8%、培養溫度 15°C），轉速 125 rpm，100 mL 培養基於 500 mL Hinton's 三角瓶恆溫培養 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500，培養期 120 小時。

### 3.5 醱酵槽規模之高細胞密度培養

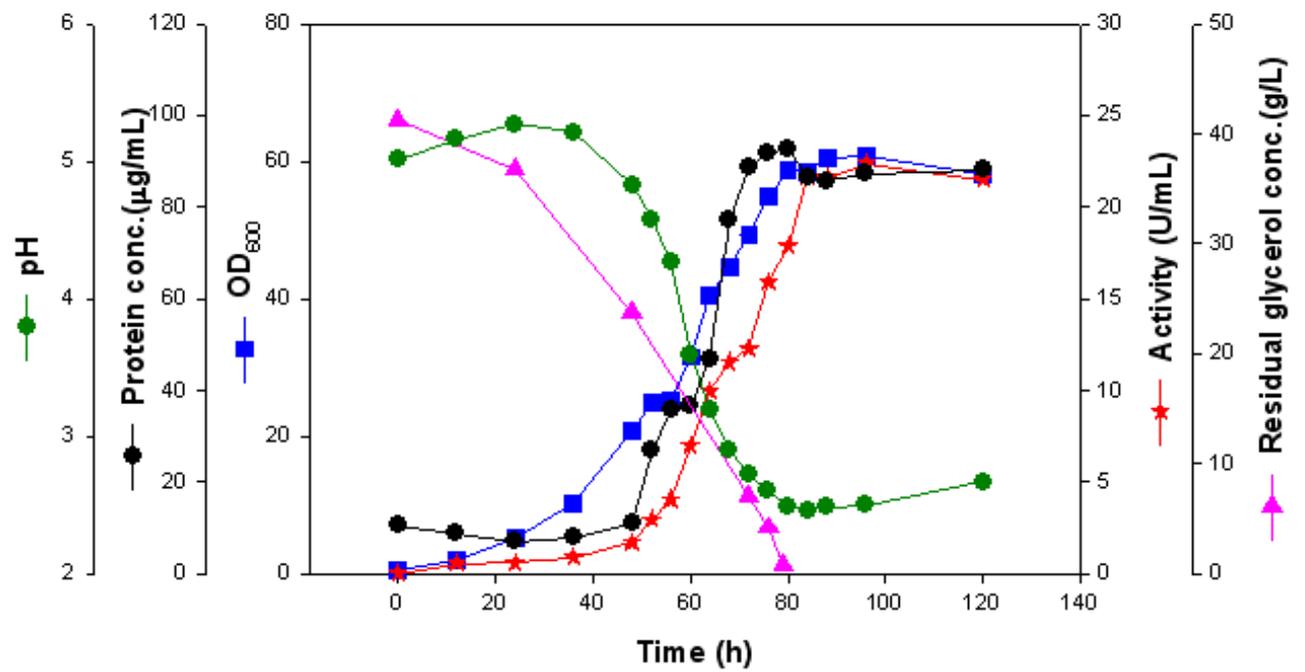
利用異源蛋白表現轉形菌株生產酵素時，可把每一細胞視為一工廠，在固定時間內想獲得較高的總產量，除了讓每一細胞能在適當條件下培養外，理論上增加單位體積菌體濃度，總酵素量應能相對提昇。因此，如何利用高細胞密度培養轉形株生產異源蛋白是一相當重要的課題。

#### 3.5.1 批式培養 (batch culture)

以 Hinton's 三角瓶培養之最適條件 (碳氮比 12 之調整後 FM22 培養基、接種量 8.8%、培養溫度 15°C)，於五公升醱酵槽內，放大培養 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500，攪拌速率為 1000 rpm，溶氧值設定為 30%，通氣量設定為 2 vvm；在 pH 值方面，分別探討兩組，起始 pH 值皆設為  $5.0 \pm 0.1$ ，完全不控制醱酵槽內 pH 變化者作控制組；而因菌體生長會代謝碳源產生有機酸，當 pH 值因此降低至 4.90 以下，便啟動幫浦添加 28% 氨水，使 pH 值得以回升，作為操作組。

菌體於醱酵槽內之生長情形如圖 3.11，其中 (A) 作控制組 (不額外添加氨水控制 pH 值)，(B) 為操作組 (添加氨水控制 pH 值)，菌體約於培養後 48 小時才開始進入生長對數期 (log phase)，此時菌體濃度快速增加，且不論酵素活性或上清蛋白量，與菌體生長趨勢一致，皆於此時期迅速累積；而甘油於前 24 小時少被利用，之後伴隨菌量提升，甘油濃度快速減少，控制組約在培養 79 小時甘油用盡，此時 OD<sub>600</sub> 約 58；而操作組菌體生長較快速，甘油耗盡約當於 76 小時，此時 OD<sub>600</sub> 已達 67；而實驗室前人 (余, 2007)，以 25°C 進行培養，起始甘油濃度同樣為 40 g/L，甘油約於 36 小時左右耗盡；而由於本研究設定培養溫度為 15°C，低於一般酵母菌培養溫度 (20-37°C)，而低溫環境也使得菌體生長較為緩慢。酵素活性約自培養 48 小時開始大幅提升，活性最高值出現在 96 小時，其中操作組培養之活性 26.77 U/mL，約比控制組 22.39 U/mL 提升 20%，而造成酵素活性在控制 pH 值下培養，比起不控制 pH 值進行培養者為高，可能原因有二：

(A)



(B)

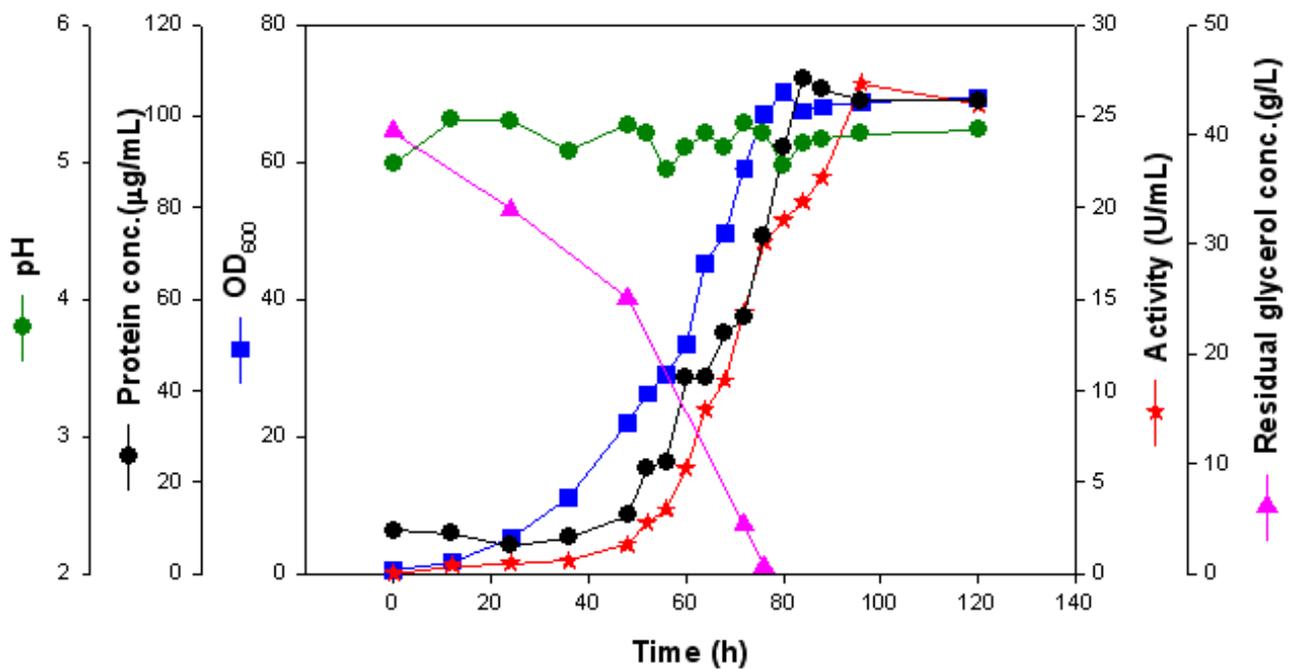


圖 3.11 以 Hinton's 三角瓶培養最適條件進行批式培養

Fig. 3.11 Batch culture by optimal culture conditions of Hinton's flask

Culture conditions : 1.5 L modified FM22 medium (CN ratio=12), inoculum size 8.8%, temperature 15°C, initial pH 5.0 ± 0.1, 2 vvm, 1000 rpm and DO 30%.

(A) pH not controlled (B) pH controlled by 28% ammonia water

一、本研究之異源蛋白表現系統被 *GAP* 啟動子所操控，為一連續表現之啟動子，在以甘油作為碳源之培養基中，代謝甘油產生之甘油醛-3-磷酸可誘導異源基因表現，因此異源蛋白產量應與菌體濃度間呈正相關。在 Hinton's 三角瓶培養結果發現，菌體濃度有隨起始 pH 值增加而上升的趨勢，而且以起始 pH 3 培養 120 小時，菌體濃度 OD<sub>600</sub> 約僅有 2.5，生長不佳 (表 3.2)；而控制組在培養 68 小時後，pH 值已降至 3 以下，推測將不利於菌體生長，間接降低異源蛋白表現。

二、在異源蛋白表現上，氮源除了用於菌體自身成長所需之外，尚須用來合成異源蛋白，故氮源充足與否相當重要。而在控制組醱酵培養中，利用添加氨水控制 pH 值，而氨水本身除了能調整 pH 值，亦可以作為氮源的額外補充，可能有助於異源蛋白的表現。

根據 *Pichia* Protocols (Higgins and Cregg, 1998)，FM22 培養基起始甘油濃度為 40 g/L，預期批式培養之菌體濃度 OD<sub>600</sub> 約可達 60-70；而本實驗結果證實確能達到此預期值。由於以醱酵槽進行培養，相比於三角瓶培養，溶氧值與 pH 值都能予以控制，使菌體生長環境較為良好，故在 CRL3 酵素活性上，操作組僅需培養 96 小時即可得到活性 26.77 U/mL，相較於 Hinton's 三角瓶最適化培養 120 小時所得之活性 8.47 U/mL (見 3.4.4)，提升約 215%。但由於批式培養在碳源利用完畢後，不外加饋料，菌體生長受到阻礙，無法達高細胞密度培養，加上 *GAP* 啟動子表現又與菌體濃度連動；故為了提高菌量達高細胞密度培養，進一步提升酵素活性與產量，將進行饋料批式培養，並根據本實驗結果，將外加氨水以調控 pH 值。

### 3.5.2 饋料批式培養 (fed-batch culture)

高細胞密度培養常用的方式是在醱酵槽培養過程中，以饋料批式 (fed-batch) 模式持續添加營養源，使菌體在養分充足環境下可不斷增殖，本研究將利用固定流速饋料與仿指數饋料兩種模式進行饋料批式培養，探討對菌體生長及異源蛋白 CRL3 酵素活性之影響。

### 3.5.2.1 固定流速饋料模式 (constant feeding mode)

饋料批式培養具有多種饋料添加模式，選擇固定流速饋料 (constant feeding) 的原因在於其操作方法簡單，易於上手，且不需複雜儀器即可使用等優點。實驗結果如圖 3.12 所示，於培養 75 小時溶氧值開始上升，輔以 HPLC 分析甘油濃度僅存 0.9 g/L，菌體濃度 OD<sub>600</sub> 約為 60，於此時啟動饋料，饋料液組成如 2.2.2 所述，固定流速為 11.25 mL/h (Higgins and Cregg, 1998)，從培養 75 至 216 小時，共持續饋料 141 小時。

使用此饋料方法醱酵，菌體濃度可達 OD<sub>600</sub> 630，換算菌體乾重約為 130 g/L；培養 216 小時，CRL3 酵素活性可大幅提升達 451.7 U/mL，相較於批式培養所得之 26.8 U/mL 提升約 17 倍。活性顯著提升可能是培養過程中異源蛋白 CRL3 持續累積所致；由培養液上清之不同時間蛋白質電泳圖看出 (圖 3.13)，Lane 1 為 *P. pastoris* GS115 野生株培養液上清，可明顯看出介於分子量 55 至 72 之間，並未見到 CRL3 色帶，作為對照組；而隨培養時間延長，電泳圖中異源蛋白 CRL3 色帶越深，顯示 CRL3 濃度持續累積。

培養過程分析中甘油濃度隨培養時間之變化如圖 3.12，發現於培養 96 小時處，甘油濃度竟高達 61.9 g/L，代表該期間菌體濃度尚低，甘油供給大於需求，造成甘油累積；而隨著菌體持續生長，菌體濃度提升造成對甘油的需求增加，培養至 120 小時，甘油濃度降至 37.9 g/L，之後菌體濃度大幅增加，造成此固定饋料速率已不敷使用，至 132 小時，甘油濃度已大幅降至 1.5 g/L，且自此之後，甘油濃度皆不超過 1 g/L。

雖然固定流速饋料模式原理簡單，且易於操作；但不論菌體濃度多寡，皆固定同一流速，會造成在菌量少時甘油堆積，造成浪費，而菌體濃度高時，甘油供給量不足，碳源變成受限制基質，進而使菌體生長遲滯，培養天期拉長，增加成本。有鑑於此，有必要著手改良饋料方式。

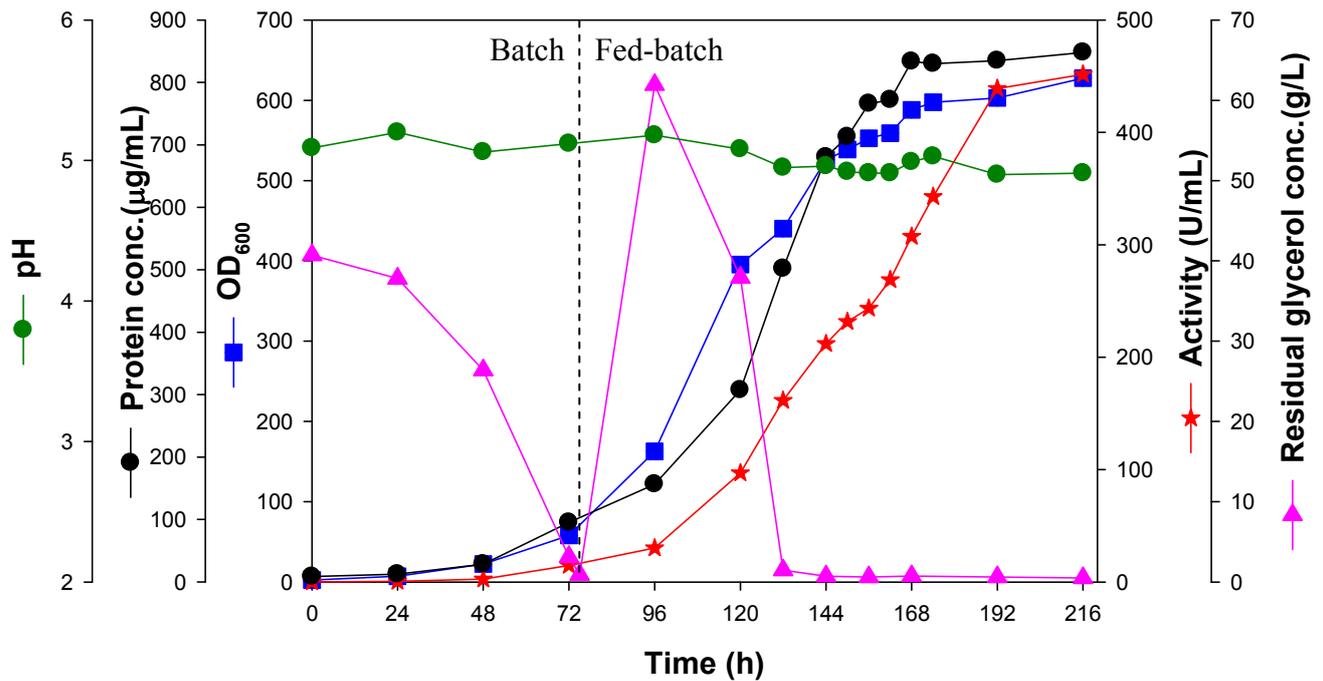


圖 3.12 固定流速模式之饋料批式培養

Fig. 3.12 Constant feeding mode of fed-batch culture

Culture conditions :

1.5 L modified FM22 medium (CN ratio=12), inoculum size 8.8%, temperature 15°C, initial pH 5.0 ± 0.1, 2 vvm, 1000 rpm and DO 30%.

Feeding solution (1.0 L) :

50% glycerol with 12 mL PTM<sub>4</sub> trace element solution and 12 mL 500X biotin solution

Feeding rate : 11.25 mL h<sup>-1</sup>

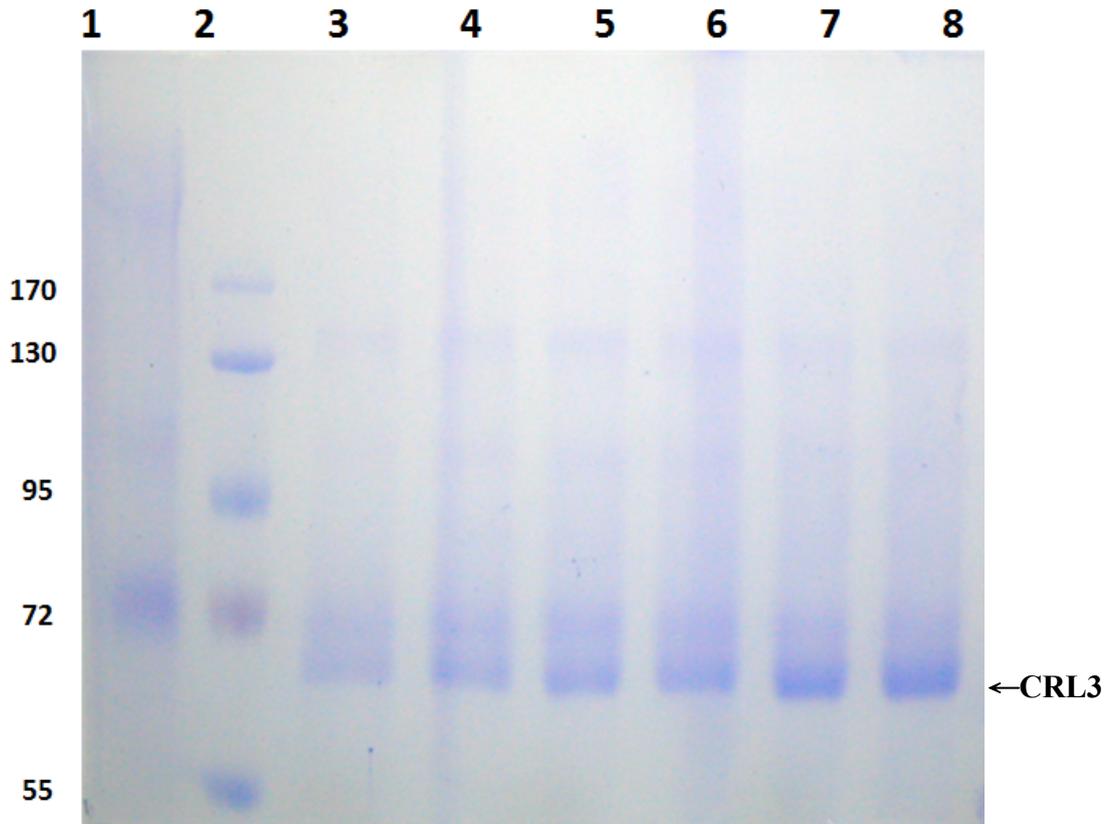


圖 3.13 以 10% SDS-PAGE 電泳分析不同培養時間樣品之結果

Fig. 3.13 10% SDS-PAGE analysis of samples at various culture times

操作條件：固定流速饋料培養結果，醱酵槽設定如下：

1.5 L modified FM22 medium (CN ratio=12), inoculum size 8.8%, temperature 15°C, initial pH 5.0 ± 0.1, 2 vvm, 1000 rpm and DO 30%.

Lane 1：以 YPG 種瓶培養基進行 *P. pastoris* GS115 野生株搖瓶培養第 120 小時之上清濃縮 (0.8 mg/mL)

Lane 2：蛋白質分子量 marker

Lane 3：固定流速饋料培養第 132 小時之上清

Lane 4：固定流速饋料培養第 144 小時之上清

Lane 5：固定流速饋料培養第 156 小時之上清

Lane 6：固定流速饋料培養第 168 小時之上清

Lane 7：固定流速饋料培養第 192 小時之上清

Lane 8：固定流速饋料培養第 216 小時之上清

### 3.5.2.2 仿指數饋料模式 (pseudo-exponential feeding mode)

細胞的增殖是以指數函數增加，因此，若要維持細胞的生長速率為一定值，則饋料流速也需為指數函數。若設備受限，單憑人力難以每時每刻變更饋料流速，故指數函數饋料之模擬常以分段階梯式進行 (Li *et al.*, 1998)；因此，本研究根據指數饋料原理，每隔一段時間間隔，採階梯式變化更改一次饋料速度的作法，模擬指數饋料，並於固定時間取樣分析菌體濃度與 CRL3 酵素活性。作法充分利用批式培養所得之結果，求得批式培養之最大比生長速率 ( $\mu_{\max}$ )，設定一個固定的比生長速率進行饋料，且必須小於前述之  $\mu_{\max}$ 。

取批式培養之對數期，依  $\mu = \Delta \ln OD_{600} / \Delta t$  (式 2.1) 計算最大比生長速率，得平均  $\mu_{\max} = 0.0397 \text{ h}^{-1}$ ；而設定之比生長速率必須不大於  $\mu_{\max}$ ，故選擇以  $\mu = 0.035 \text{ h}^{-1}$  進行仿指數饋料。

依指數饋料公式  $F_{(t)} \times S_0 = (\mu X_0 V_0 \times \text{Exp } \mu t) / Y_{x/s}$  (式 1.1)，將下列參數： $S_{(0)} = 500 \text{ g/L}$ 、 $X_{(0)} = 12.9 \text{ g dry cell weight/L}$ 、 $V_{(0)} = 1.5 \text{ L}$ 、 $\mu = 0.035 \text{ h}^{-1}$  及  $Y_{x/s} = 0.34 \text{ g dry cell weight/g substrate}$ ，代入該式化簡可得：

$$F_{(t)} = 3.985 \times \text{Exp}(0.035t) \dots\dots\dots t: \text{饋料時間} \dots\dots\dots \text{(式 3.2)}$$

圖 3.14 為依據式 3.2 所描繪出，隨時間變化而饋料流速改變的指數函數圖形，而其中階梯式圖形，則是本研究模擬之仿指數饋料模式。參考林 (2004) 作法，於開始執行饋料後，以醱酵槽內建 profile 功能預先寫入各時點依式 3.2 計算所需之饋料流速，流速變更時點為饋料前期 (饋料 48 小時內)，每 12 小時改變；48 小時之後，改為每 6 小時即變動一次，直到槽內培養基體積接近滿載時 (168 小時)，中止培養。

仿指數饋料批式培養之菌體生長與酵素活性變化如圖 3.15 所示，經甘油濃度分析後，發現菌液中並無明顯的甘油累積，而固定流速饋料中甘油濃度累積最高達  $61.9 \text{ g/L}$  (96 小時)，而在仿指數饋料培養過程中，甘油濃度最高也僅有  $2.93 \text{ g/L}$  (84 小時)，大幅改善溢給甘油所造成之甘油累積，於第 168 小時中止

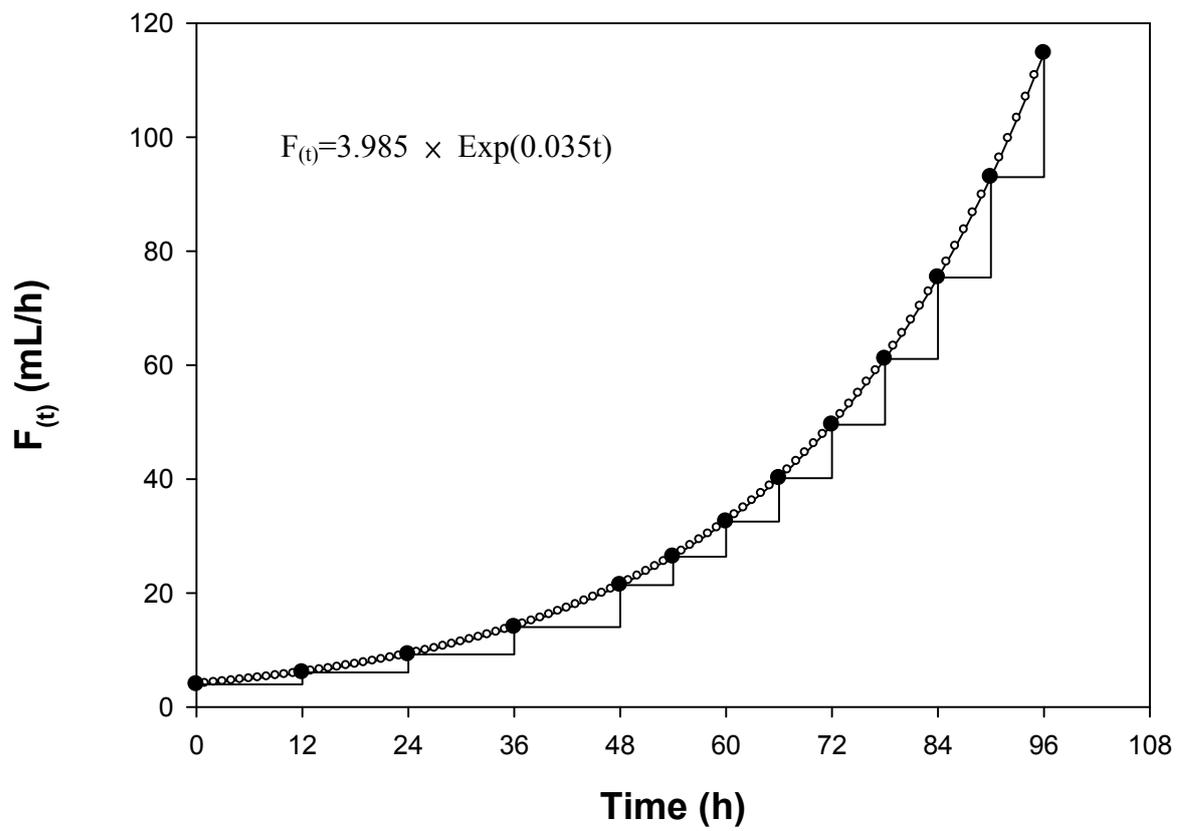


圖 3.14 指數饋料流量模擬圖

Fig. 3.14 Simulation figure of exponential feeding

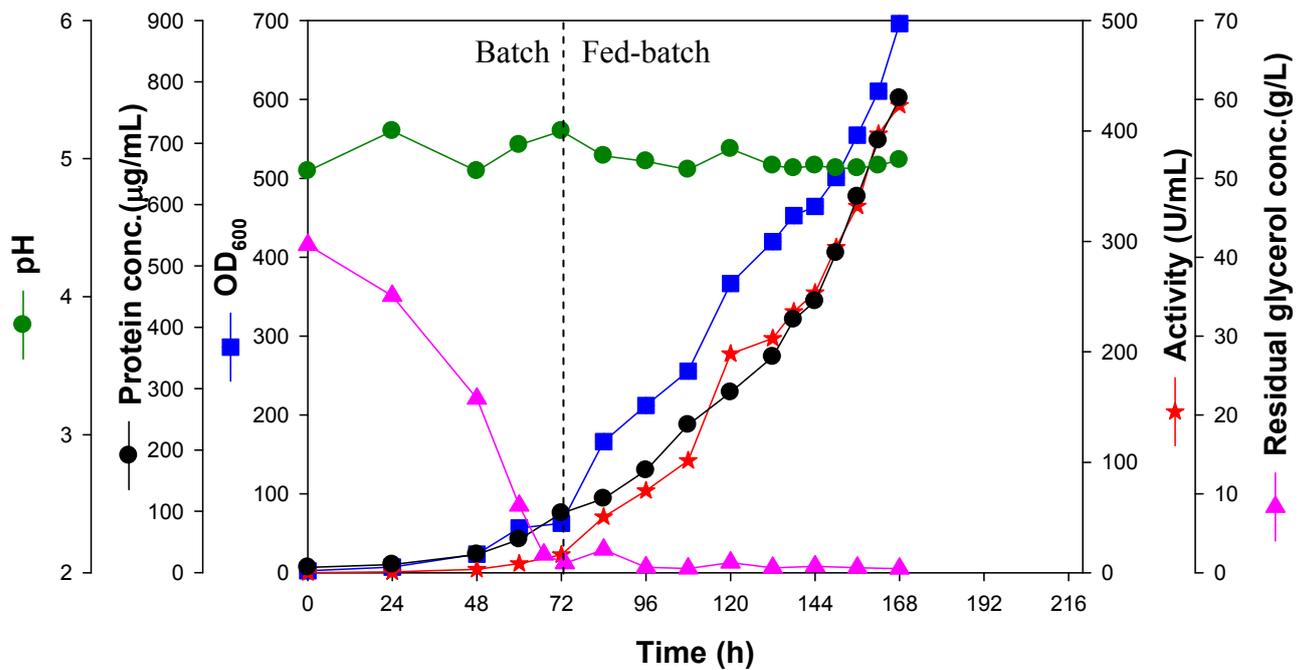


圖 3.15 仿指數模式之饋料批式培養

Fig. 3.15 Pseudo-exponential feeding mode of fed-batch culture

Culture conditions :

1.5 L modified FM22 medium (CN ratio=12), inoculum size 8.8%, temperature 15°C, initial pH 5.0 ± 0.1, 2 vvm, 1000 rpm and DO 30%.

Feeding solution (1.0 L) :

50% glycerol with 12 mL PTM<sub>4</sub> trace element solution and 12 mL 500X biotin solution

Feeding rate was calculated by equation 3.1 :  $F(t) = 3.985 \times \text{Exp}(0.035t)$

醱酵程序，可得菌體乾重約 147 g/L，CRL3 酵素活性為 423.2 U/mL，雖低於固定流速饋料批式培養所得之 451.7 U/mL (216 小時)，蛋白質電泳分析亦是以固定流速饋料的 CRL3 色帶較明顯 (圖 3.16)；但卻能有效縮短醱酵培養時間達 48 小時，生產力為 2.52 (U/mL/h)，比固定流速饋料提升 20% (表 3.9)。生產力的提升可能與隨培養過程中，仿指數饋料能隨菌體的生長改變饋料流速，更能及時提供足夠的碳源，提供菌體生長所需能源；而本研究用以表現異源蛋白的 *GAP* 啟動子，又具有隨菌體生長代謝碳源，即可受誘導表現的特性，因此菌體生長越旺盛，越有助於異源基因的表現。



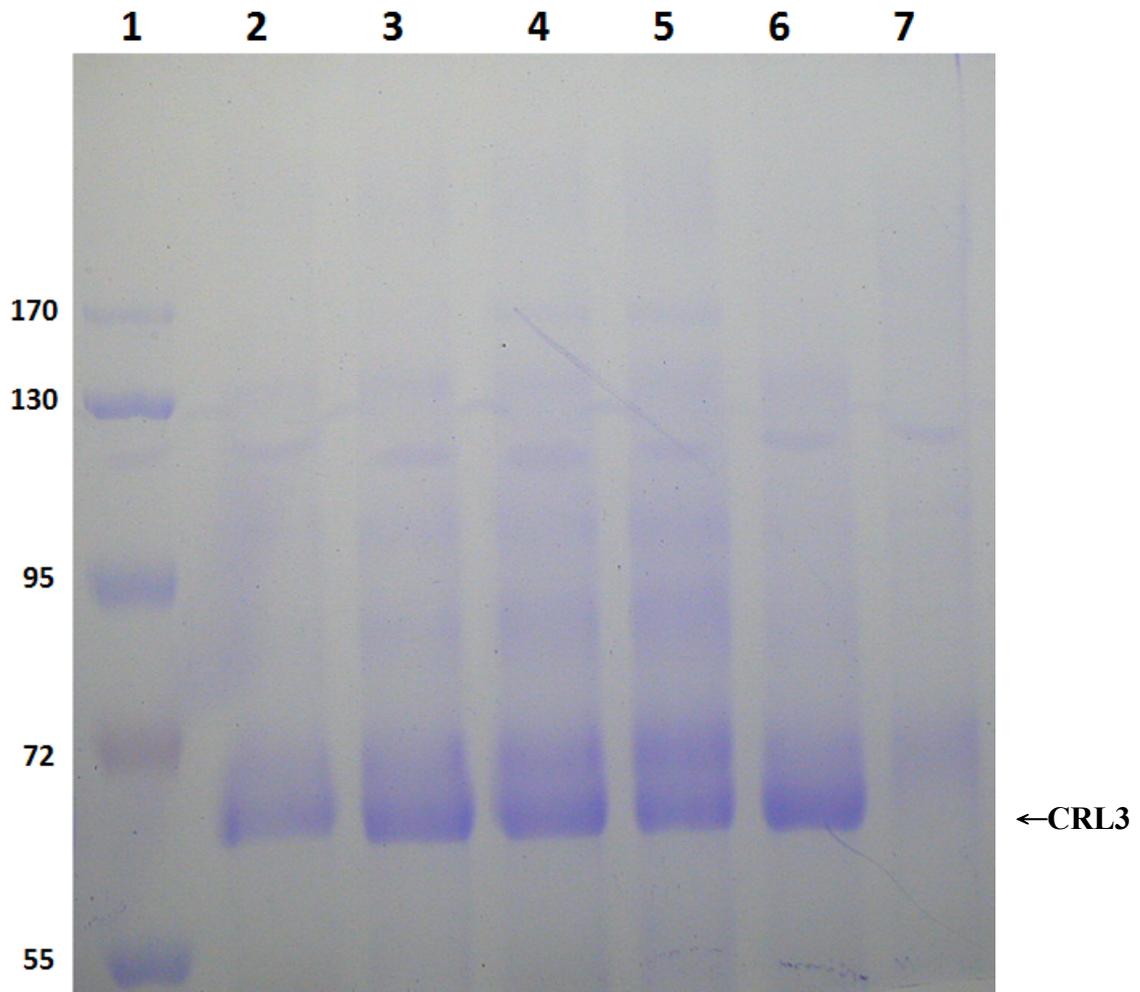


圖 3.16 以 10% SDS-PAGE 電泳分析不同饋料模式之樣品

Fig. 3.16 10% SDS-PAGE analysis of culture samples at different feeding mode

操作條件：不同饋料模式之結果比較，醱酵槽設定如下：

1.5 L modified FM22 medium (CN ratio=12), inoculum size 8.8%, temperature 15°C, initial pH  $5.0 \pm 0.1$ , 2 vvm, 1000 rpm and DO 30%.

Lane 1：蛋白質分子量 marker

Lane 2-5：仿指數饋料模式 (培養第 120、144、156、168 小時)

Lane 6：固定流速饋料模式 (饋料流速 11.25 mL/h 培養第 216 小時)

Lane 7：以 YPG 種瓶培養基進行 *P. pastoris* GS115 野生株搖瓶培養第 120 小時之上清濃縮 (0.8 mg/mL)

表 3.9 不同饋料模式之培養結果比較

Table 3.9 Comparison of different feeding modes

Feeding mode	Incubation time (h)	DCW (g/L)	Lipase activity (U/mL)	Productivity (U/mL/h)
constant	216	132	451.7	2.09
pseudo-exponential	168	147	423.2	2.52

## 第四章 結論

自本研究成果可得下述結論：

1. 以不同 Zeocin 濃度逐步馴養篩選具高脂肪酶活性表現之轉形株，最終經 1500  $\mu\text{g/mL}$  的 Zeocin 濃度所篩出者，其酵素活性最高，達 1.06 U/mL，比未經馴養之控制組提升 96%，命名為 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500。
2. 以反應曲面法探討 *P. pastoris* GS115/CRL3/Z1500 之 Hinton's 三角瓶培養之最適條件，所得條件為 FM22 培養基碳氮比 12、接種量 8.8% 與培養溫度 15°C，震盪培養 120 小時可得 CRL3 活性 8.47 U/mL。
3. 將如上之最適條件應用於醱酵槽培養，採固定流速饋料 (11.25 mL/h) 進行饋料批式培養，於培養 144 小時可得菌體乾重 111 g/L，達高細胞密度；而培養 216 小時 CRL3 活性大幅提昇至 451.7 U/mL，活性顯著提升應與培養過程中，異源蛋白 CRL3 的持續累積有關。
4. 固定流速饋料存在培養天期過長與甘油供給不均等缺失，改以仿指數饋料取代之，培養 168 小時即可得相當之酵素活性 (423.2 U/mL)，且培養時間減短 48 小時，生產力達 2.52 U/mL/h，相較前者可提高 20%，具降低培養成本的優勢，而因甘油供給不均所造成之甘油大量累積現象亦不復見。

## 第五章 未來展望

本研究成功以 PTVA 方法提升異源蛋白 CRL3 酵素活性，於三角瓶層級以反應曲面法尋求最適培養條件，並將該條件用於醱酵槽行饋料批式培養，而改採仿指數饋料取代固定流速饋料可提高生產力，未來可針對下述方向作進一步探討：

### 1. 兩階段培養溫度控制策略

由實驗結果得知降低培養溫度有助於 CRL3 活性表現，但溫度偏低，菌體生長越慢，培養時間拉長，不利於醱酵生產；故設計於批式培養階段，設定溫度提升至 25°C，甚至 30°C，以較高溫度培養來縮短培養時間，待啟動饋料後，再調降至最佳條件之 15°C 以助於活性表現，期待以此策略縮短培養時間，提升生產力。

### 2. 間接回饋控制饋料策略探討

本研究以固定流速饋料與仿指數饋料進行饋料批式培養，而不同的饋料策略所得結果也大不相同，接續可嘗試以 pH-stat 或 DO-stat 等間接回饋控制饋料方式，探討對 CRL3 活性表現之影響。

### 3. 建構雙啟動子轉形株

本研究係以組成性啟動子-*GAP* 表現異源蛋白，而目前已有先例以基因重組技術融合 *GAP* 與誘導性啟動子-*AOX1* 共同表現之，如此在醱酵槽培養前期，*GAP* 啟動子於菌體生長時可持續表現 CRL3；待菌體濃度提高至高細胞密度水平，再以誘導物-甲醇誘使 *AOX1* 啟動子表現，期待在雙啟動子的助益下獲得更高的 CRL3 產量。

## 第六章 參考文獻

李振綱、吳志明、蔡有葵。2001。高密度微生物細胞發酵培養。化工技術第九卷第二期二月號: 163-175.

李銘亮。2002。微生物生理學。藝軒圖書出版社，臺北。

余忠佑。2007。以全合成培養基饋料批次培養 *Pichia pastoris* 生產 *Candida rugosa* 脂肪酶三。國立臺灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。

林自威。2004。 *S. cerevisiae* 與 *P. pastoris* 高密度發酵生產葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase) 及其酵素特性比較。國立臺灣科技大學化學工程研究所碩士論文。

林家群。2002。結合利用 *GAP* 及 *AOX1* 啟動子以嗜甲基酵母菌 *Pichia pastoris* 表現 hGM-CSF。國立臺灣科技大學化學工程研究所碩士論文。

侯廷鉞。2006。利用 *Pichia pastoris* 生產 *Candida rugosa* 脂肪酶第三型。國立臺灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。

莊榮輝。2006。酵素化學實驗。國立臺灣大學生化科技學系暨微生物與生化學研究所。臺北。

**Anderson, M. J. and Whitcomb, P. J.** 2005. *RSM Simplified: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiments*. Productivity Press, New York, USA.

**Benjamin, S. and Pandey, A.** 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14: 1069–1087.

**Berney, M., Weilenmann, H. U., Ihssen, J., Bassin, C. and Egli, T.** 2006. Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar

disinfection. *Appl Environ Microbiol* 72: 2586–2593.

**Box, G. E. P. and Behnken, D. W.** 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455-475.

**Bretthauer, R. K. and Castellino, F. J.** 1999. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnol Appl Biochem* 30: 193-200.

**Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G. and Lotti, M.** 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci* 12:2312-2319.

**Cereghino, J. L. and J. M. Cregg.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24: 45-66.

**Cheng, L. C., Wu, J. Y. and Chen, T. L.** 2002. A pseudo-exponential feeding method for control of specific growth rate in fed-batch cultures. *Biochem Eng J* 10: 227-232.

**Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K. and Henwood, C. A.** 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205–212.

**Couderc, R. and Baratti, J.** 1980. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase. *Agric Biol Chem* 44: 2279-2289.

**Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A.** 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 3: 1316-1323.

**Cyglar, M. and Schrag, J. D.** 1999. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase, *Biochim Biophys Acta* 1441: 205-214.

**Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. and Alcántara,**

**A. R.** 2005. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol Adv* 24:180-96.

**Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M. and Gingeras, T. R.** 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 5:1111-1121.

**Fernandez, J. M. and Hoeffler, J. P.** 1999. *Gene expression system*. Academic Press, California, USA.

**Ferrer, M., Chernikova, T. N., Timmis, K. N., and Golyshin, P. N.** 2004. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* 70: 4499–4504.

**Gandhi, N. N.** 1997. Application of lipase. *J Am Oil Chem Soc* 74: 621-634.

**Gargova, S. and Sariyska, M.** 2003. Effect of culture conditions on biosynthesis of *A. niger* phytase and Acid phosphatase. *Enzyme Microb Tech* 32: 231-235.

**Gellissen, G.** 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54: 741-750.

**Gilham, D. and Lehner, R.** 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 36: 139–147.

**Gomez, J. and Goma, G.** 1986. Effect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. *Biotechnol Lett* 11: 779-784.

**Gordillo, M. A., Sanz, A., Sa´nchez, A., Valero, F., Montesinos, J. L., Lafuente, J. and Sola, C.** 1998. Enhancement of *Candida rugosa* Lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotech and Bioeng.* 60:156-168.

**Hartner, F. S. and Glieder, A.** 2006. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories* 5: 39.

**Higgins, D. R. and Cregg, J. M.** 1998. *Pichia* Protocols. Humana Press, New Jersey, USA.

**Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. V. and Misset, O.** 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 29-63.

**Kouker, G. and Jaeger, K. E.** 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53: 211–213.

**Li, Y., Chen, J., Liang, D. F. and Lun, S. Y.** 2000. Effect of nitrogen sources and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *J Biotechnol* 81: 27-34.

**Li, Y., Chen, J., Mao, Y. Y., Lun, S. Y. and Koo, Y. M.** 1998. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem* 33: 709-714.

**Li, Z. J., Xiong, F., Lin, Q. S., d'Anjou, M., Daugulis, A.J., Yang, D. S. and Hew, C. L.** 2001. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 21: 438–445.

**Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., Fusetti, F., Brocca, S., Pizzi, E. and Alberghina, L.** 1994. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein Eng* 7: 531–537.

**Minning, S., Schmidt-Dannert, C. and Schmid, R. D.** 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J Biotechnol* 66: 147–156.

**Montgomery, D. C.** 1997. *Design and analysis of experiments* (4th ed.). Wiley & Sons Inc., New York, USA.

**Nelson, D. L. and Cox, M. M.** 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed.) Worth publishers, New York, USA.

- Ostergaard, S., Olsson, L. and Nielsen, J.** 2000. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:34–50.
- Papagianni, M. and Moo-Young, M.** 2002. Protease secretion in glucoamylase producer *A. niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochem* 37: 1271-1278.
- Ren, H. T., Yuan, J. Q. and Bellgardt, K. H.** 2003. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J Biotechnol* 106: 53-68.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schumann, K., Veith, G., Zuber, G. and Knorre, W.** 1991. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J Biotechnol* 20: 17-27
- Riesenberg, D. and Guthke, R.** 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51:422-430.
- Roh, C. and Villatte, F.** 2008. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. *J Appl Microbiol* 105: 116–123.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J.** 1992. Foreign gene expression in yeast:a review. *Yeast* 8: 423-488.
- Romanos, M. A.** 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol* 6: 527-533.
- Schmid, R.D. and Verger, R.** 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 37: 1608-1633.
- Sunga, A.J., Tolstorukov, I. and Cregg, J. M.** 2008. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res* 8: 870–876.
- Tenkanen, M., Kontkanen, H., Isoniemi, R., Spetz, P. and Holmbom, B.** 2002.

Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 120-127.

**Thompson, D.** 1982. Response surface experimentation. *J Food Process Pres.* 6: 155-188.

**Uge, A., Tombolini, R., Molbak, L. and Jansson, J. K.** 1999. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Appl Environ Microbiol* 65: 813–821.

**Vasina, J. A. and Baneyx, F.** 1997. Expression of aggregation prone recombinant proteins at low temperatures: A comparative study of the *Escherichia coli cspA* and *tac* promoter systems. *Protein Express Purif* 9: 211–221.

**Vedvick, T., Buckholz, R. G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R. S. and Thill, G. P.** 1991. High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichiapastoris*. *J Ind Microbiol* 7: 197–201.

**Veeraragavan, K. and Gibbs, B. F.** 1989. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol Lett* 5: 345-348.

**Vohra, A. and Satyanarayana, T.** 2001. Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters* 23: 551-554.

**Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. and Cregg, J. M.** 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186:37-44.

**Wegner, G.** 1990. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 7: 279-283.

**Werten, M. W. T., Van Den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H. and De Wolf, F. A.** 1999. High-yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15: 1087-1096.