

酵素在工業製程上嶄新的 應用法

野本正雄 原著
陳國誠 合譯
于寧

新竹黎明書店經銷

酵素在工業製程上嶄新的

應用法

野本正雄 原著

陳國誠 合譯
于寧

新竹黎明書店經銷

版 權 所 有

翻 印 必 究

酵素在工業製造上嶄新的應用法

中華民國七十二年十月 出版

編著者：陳 國 誠
于 寧

發行人：楊 國 藩

發行所：國 興 出 版 社

新竹市西門街 262 號

新聞局局版業字第 0465 號

電話：(035) 223129

總經銷：黎 明 書 店

新竹市中正路 72 號

電話：(035) 229418

郵政劃撥七〇二七三號

定價：75 元

前 言

本文爲野本正雄教授發表於日本「生物と化學」雜誌之報告（1982年，第20卷，第5，6，7號）。文中主要內容以酵素利用爲中心，對近代生物技術做一綜合性之介紹。譬如醱酵工技和酵素技術之應用，遺傳工程技術之最新發展，生物產品之市場展望，以及近年來歐美，日本各先進國家在此一領域上之研究開發動向。文筆簡潔，資料豐富，且在有限的篇幅內能將此一深奧的尖端科技做有系統的整體性介紹，實爲極具參考價值之文章。譯者徵得野本教授之同意，將其譯成中文以供國內的研究人員之參考，期能收拋磚引玉之薄效。

譯文中的生化物質名詞雖盡量求其中文化，唯圖表若用英文表示對於一般讀者可能較爲熟悉、方便。再之考慮結果，譯者決定將日文圖表譯成英文圖表。

最後，譯者對清大化工所 83 級張金全先生在文章謄稿上之幫忙表示感謝之忱。

陳 國 誠

謹識於清華大學化工研究所

1983 年 8 月

1973 年發生的石油震撼引發世界性經濟上的大混亂，使現代產業結構呈露出脆弱的一面，同時也讓人類有機會重新檢討關於未來的資源利用和能源問題。目前完全依賴有限石油資源的產業結構極不穩定，因此必須將現有的工業製程轉變為高效率，省能源的新生產技術。生物技術（biotechnology）的發展即可滿足上述要求而成為次世紀革新技術之一。「生物技術」簡單言之，是將生物體內所營運之精巧的生化反應有效地應用在工業製程上，以生產有用物質的技術體系。其主要的基本技術中的嶄新領域包括(1)高度有效地利用生化觸媒為目的的「酵素工程」。(2)以創造新種生物為目的的「基因工程」。最近，以「酵素模擬」法來研究非生命體系的生化活性物質的「生體機能化學」（biomimetic chemistry）亦巧為生物技術的一部份。

酵素工程的最近發展中，特別引人注目者為高效率活用酵素機能之「固定化生物觸媒程序」（immobilized biocatalytic process）和幼妙地組合酵素反應和化學合成法之優點之「半合成程序」（Chemico-enzymatic process）。它們的實用化在急速地進展中。

1980 年度全世界酵素生產額高達 700 億日圓，應泛地應用在各種領域上，由於篇幅之限制，本稿僅將固定化生物

觸媒程序和半合成程序的工業利用以及基因工程有關連的一些酵素作重點之介紹。最近有關酵素工程之資料並且已有極佳之單行本出版⁽¹⁾。關於生體機能化學⁽²⁾及基因工程^(3~5)亦有參考專論或專輯出版。

目 錄

一、 固定化生物觸媒·····	1
1. 固定化生物觸媒之製備方法·····	1
2. 工業生產上固定化生物觸媒之利用·····	9
3. 固定化生物觸媒利用於非水系之反應·····	13
4. 其他領域上固定化生物觸媒之利用·····	14
二、 利用酵素製造有用物質的嶄新程序·····	16
1. 食品工業上的應用實例·····	16
2. 酒精工業上之應用·····	30
3. 氨基酸工業上之應用·····	35
4. 醫藥品工業上之應用·····	49
5. 化學工業上的應用例·····	58
三、 遺傳工程上酵素之利用·····	63
1. 遺傳工程的工業應用·····	63
2. 利用於基因重組技術中的酵素·····	67
3. 利用在細胞融合之酵素·····	84
四、 生物技術之展望·····	92
五、 註 解·····	99
六、 參考文獻·····	101

一、固定化生物觸媒

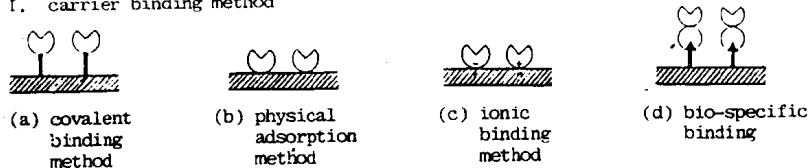
1. 固定化生物觸媒之製備方法

a) 酵素及菌體之固定化

1969 年末期將酵素和不溶性之高分子担體結合形成固定化酵素並在連續反應中操作之嘗試已達到了實用階段。70 年代後，爲了簡化或省略酵素萃取手續及降低生產成本，微生物菌體之固定化也達到實用階段。這些觸媒分別被稱爲固定化酵素 (immobilized enzyme) 或，固定化菌體 (immobilized cells)。後者大抵以使用已死細胞 (丙酮處理細胞等) 及休眠細胞之情況爲多。但是，除了所期望產生的主要反應以外，常共存著其他副反應，所以必須考慮種種前處理法⁽⁶⁾來抑制副反應之進行。除此以外，裸細胞 (protoplast) 及粒線體 (mitochondria) 的固定化研究亦有相當進展。

酵素及菌體的固定化操作上，爲了防止酵素劣化 (deactivation)，必需在溫和的反應條件下進行，到目前爲止，已有很多方法發表於文獻上，如圖 1⁽⁷⁾所示，大抵可分爲担體結合法 (carrier binding method)，架橋法 (cross-

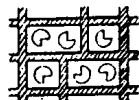
I. carrier binding method



II. cross-linking method



III. entrapping method

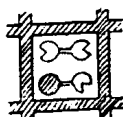


(a) entrapment within a lattice

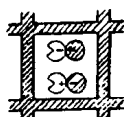


(b) microencapsulation

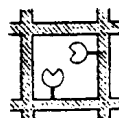
IV. complex method



combined cross-linking and entrapment methods



combined ionic binding and entrapment methods



combined covalent binding and entrapment methods

Y enzyme

● other polymer

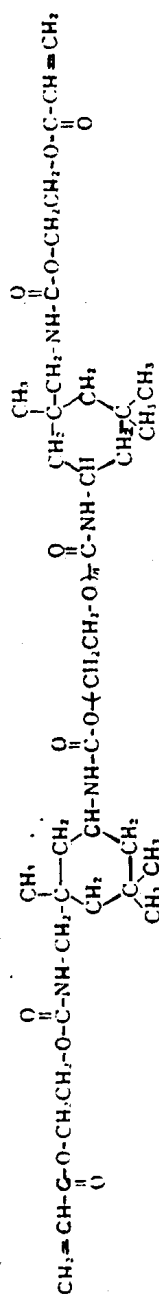
↑ coenzyme and cofactor

Fig. 1 Schematic diagram of enzyme/microbial cell immobilization.

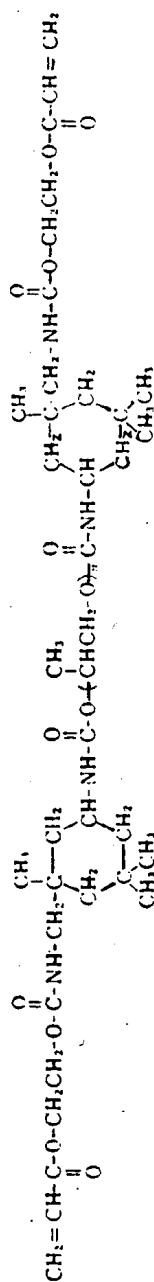
-linking method) 及膠體包裹法 (gel entrapped method) 三大類。最近將這三種基本方法混合利用之實驗例子極多。這些方法各有其優點和缺點，因此必須配合使用目的而選擇適當的方法。

在担體結合法上，常使用的固定化担體材料為含活性官能基的纖維素 (cellulose)，洋菜 (agar)，葡聚糖 (dextran)，幾丁質 (chitin)，多孔質玻璃或離子交換樹脂。最近開發出的新材料如 κ -carrageenan^(1,8)，橘子皮果膠 (pectin)⁽¹⁰⁾，polyvinyl alcohol⁽¹¹⁾，光架橋性樹脂預聚物 (prepolymer)^(1,12)，Urethane polymer^(1,12)等皆為非常優秀且實用性極高之担體材料。

光架橋性樹脂的預聚物為數種不同構造之物，其代表例如圖 2 所示，將感光劑及酵素水溶液或菌體懸浮液，以光照射數分鐘後即可製得親水性的固定化生化觸媒。以 ENT_P 為例，將 ENT_P 及感光劑溶解在有機溶劑中，加入酵素或菌體溶液後以光照射即可得到固定化酵素。將 ENT 和 ENT_P 以適當比例混合使用，可製得各種不同親水或疏水程度的膠體。圖 3 表示 Urethane prepolymer 的分子構造，改變分子中的 polyethylene glycol 含量即可任意調整所合成膠體的親水性及疏水性的程度。且由於這兩種新材料可使用於非水反應系的生化觸媒反應，期待今後能有更進一步的發展。此外，特殊的包裹法，如，以放射線進行低溫放射聚合法，也正在



ENT(hydrophilic)



ENPT(hydrophobic)

Fig. 2 Structures of photo-crosslinkable resin prepolymers.

開發中⁽¹³⁾。

(b) 共軛酵素反應系之固定化

需要 NAD 或 ATP 之酵素反應系的固定化需要特殊之技巧以防止這些高價的低分子化合物的流失，並使其能再生而達到反覆使用的目的。譬如考慮插入適當的 spacer 使 NAD 及 ATP 和水溶性高分子（如葡聚糖等）結合而形成聚合分子。同時將目標反應的酵素系及將 NAD 或 ATP 再生的酵素系包裹在膠體內，而使用於超過濾膜反應器中⁽¹⁴⁾。

關於 ATP 再生酵素系之研究很多，譬如將酵母細胞加以固定化，利用其體內的醣解作為 ATP 再生的系統可能是實用價值極高的方法⁽¹⁵⁾。而且，固定化高溫性細菌 Bacillus stearothermophilus 所生產的 acetate kinase (ADP → ATP) 應用於 ATP 再生的方法亦在開發之中⁽¹⁶⁾，這種酵素極為穩定可連續使用一個月以上。圖 4 為這些 ATP 再生共軛酵素反應系連續製造法的例子。同時從這株高溫性細菌亦分離出耐熱性 adenylate kinase (AMP → ADP)，合併使用這兩種酵素的 AMP → ATP 轉換的固定化法也在開發中⁽¹⁷⁾。另外，藉著基因增幅效果 (gene dosage effect) 可將大腸菌的 phosphofructokinase 活性增大 7 倍，也有人利用這種乾燥菌體而成功地完成 AMP → ATP 轉換⁽¹⁸⁾。

ATP 的主要功能為生物體內的能量供給，為了擴大生物觸媒的適用範圍，高實用性再生系統的開發為當務之急。

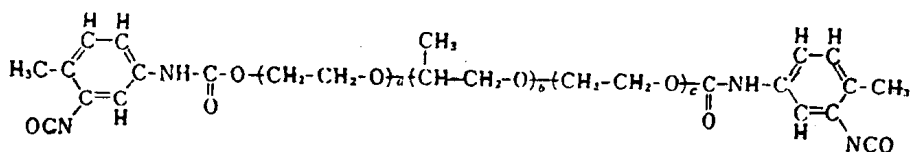


Fig. 3 Structure of the urethane prepolymer.

(c) 增殖菌體之固定化

上面所提到的固定化菌體，只是要利用已死或休眠的微生物菌體內的酵素活性。相對而言，將增殖狀態的活細胞加以固定化，讓其中穩定而精巧的生化機能更容易地被利用此稱為固定化增殖菌體（immobilized growing cells）。一般的膠體包裹法和其所使用的材料大抵多能適用於增殖菌體的固定化。

培養已固定在膠體內的微生物時，擴散阻力的存在，使得膠體內部會造成氧及養分的濃度梯度（concentration gradient）。如此，好氣性微生物為例，氧氣濃度分佈成了菌體增殖的制限因子。並因此造成膠體內菌體之不公平分佈。測量膠體內增殖酵母的呼吸活性，可以明顯地看出在粒子表面菌體內的呼吸活性非常的高而在粒子內部則急劇地下降。（圖5）⁽¹⁹⁾

如由另一角度，我們可以利用上述的擴散知識，來固定嫌氣性細胞，即利用包裹法使膠體內的微生物避免接觸到氧

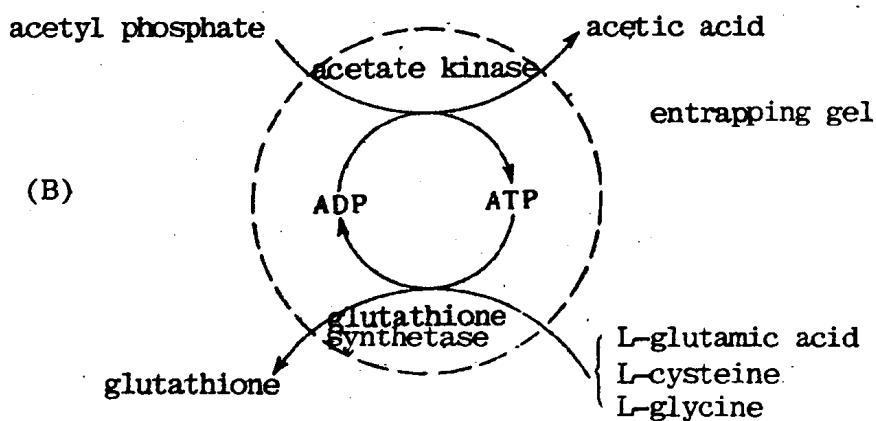
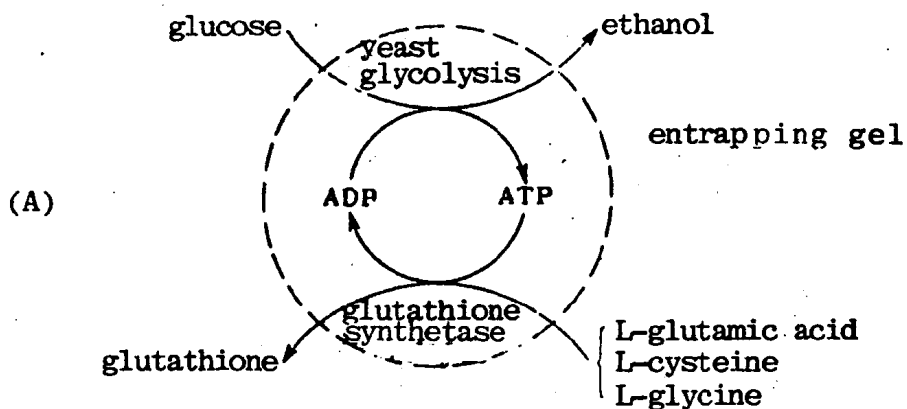


Fig. 4 The ATP regeneration system and the conjugated continuous production of glutathione.

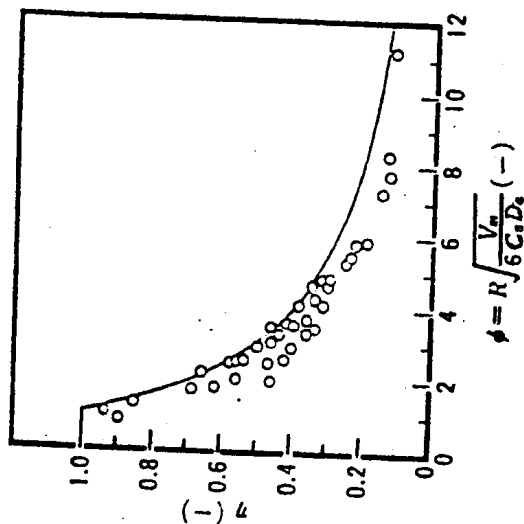


Fig. 5 Effectiveness factor and the distribution of respiration activity in the immobilized cell pellets

- ϕ : modified thiele modulus, η : effectiveness factor
 R : radius of pellet, C_s : dissolved oxygen concentration in bulk
 D_e : effective diffusion coefficient

氣，不致死亡或降低活性。例如，絕對嫌氣性的甲烷生產菌在好氣條件下會急速地喪失活性，但如將此菌體包裹在膠體內，則在空氣中亦能維持其活性⁽²⁰⁾。又如有人曾嘗試將絲狀菌的孢子固定後，使其發芽而製備成固定化絲狀菌體⁽²¹⁾。但是由於切斷的菌絲體固定化後未能充分繁殖，此一實驗因而終止，但是，此獨創之固定化菌體構想却獲得極高評價。固定化增殖菌體兼具兩種特殊意義，即(1)是一種複合生物觸媒之高度應用及(2)是一種利用高濃度菌體的迅速醱酵程序，其發展有待於今後應用於多樣性的工業中。

2 工業生產上固定化生物觸媒之利用

酵素工程中最先進的實用技術為利用固定化生物觸媒於生物反應器中，及以此為中樞的高效率生產體系。比起傳統的分批式酵素法，它的優點有：(1)增加酵素的穩定性，耐用性及長期間連續使用性而降低酵素成本。(2)縮短反應時間，提高反應效率。(3)由於反應程序系統化，容易達到控制和管理之自動化。而且，比起一般的化學合成法其優點有。(4)在常溫常壓進行反應，可大幅地降低能源之消耗。(5)生物觸媒獨具的反應特異性，確保沒有副產物之生成。(6)精製容易。(7)反應裝置可以縮小而減少設備費用。(8)在資源開發，產業廢物處理及防止公害上，比傳統式有利之點甚多。

Table 1 Industrial application of immobilized biocatalysts

objective substance	enzymes or microorganisms used	immobilization method	starting material	Date of Industrialization
L-amino acid	amino acylase	carrier binding	acyl-DL-amino acid	1969
high fructose corn syrup	glucose isomerase *1 or microbial cells	carrier binding cross-linking	glucose	1973
6-aminopenicillanic acid	penicillin amidase	carrier binding	penicillin G	1973
L-aspartic acid	microbial cells *2 containing aspartase	entrapment complex	fumaric acid	1973
L-malic acid	microbial cells *3 containing fumarase	entrapment	fumaric acid	1974
low lactose milk	β -galactosidase	carrier binding	milk	1977
cheese	alkaline protease	carrier binding	milk	research
dried egg	glucose oxidase, catalase	entrapment	egg white	"
juice	naringinase	carrier binding	orange juice	"
beer	papain	carrier binding entrapment	fresh beer	"
plant butter	lipase	entrapment	plant oil	"
lipid acid	lipase	carrier binding	plant oil	"
steroid	microbial cells *4 containing dehydrogenase, hydroxylase	entrapment	steroid precursor	"

— to be continued —