

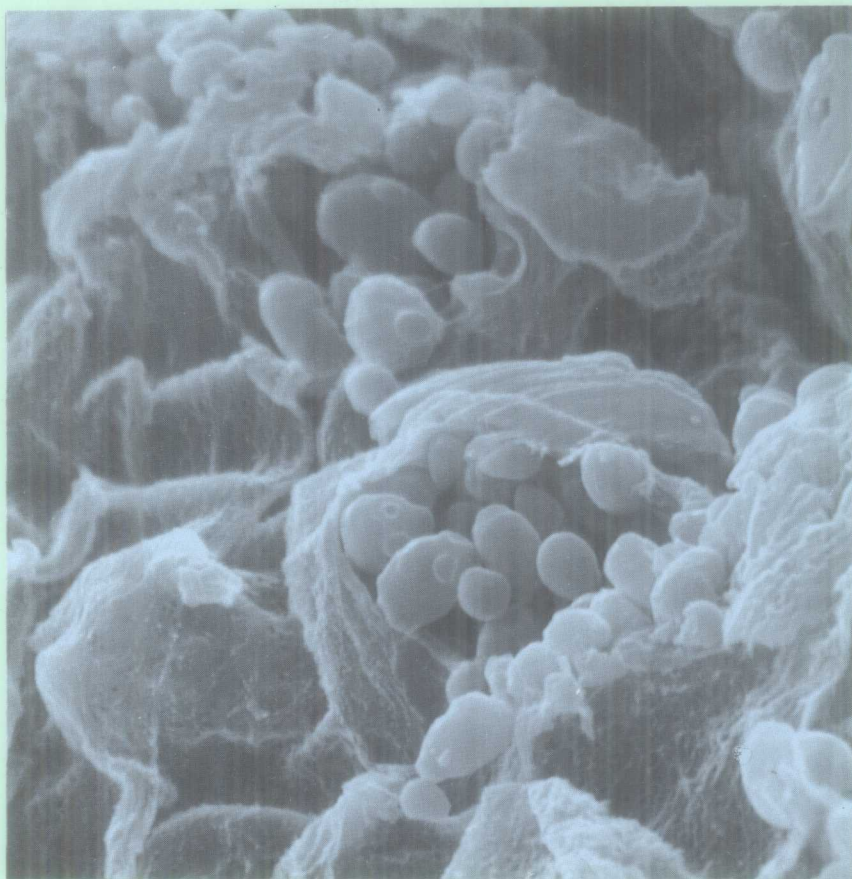
微生物

酵素工程學

Microbial Enzyme Engineering

國立清華大學化工研究所教授

工學博士 陳國誠 編著



藝軒圖書出版社印行

微生物

酵素工程學

Microbial Enzyme Engineering

國立清華大學化工研究所教授

工學博士 陳國誠 編著

藝軒圖書出版社印行

本書任何部份之文字或圖片，如未獲得本社書面同意，
不得以任何方式抄襲、節錄及翻印

新聞局出版事業登記證局版台業字第一六八七號

微生物酵素工程學

(精裝) 特價新臺幣 450 元

編著者：陳 國 誠

發行所：藝軒圖書出版社

發行人：彭 賽 蓮

總公司：台北縣新店市寶高路 7 巷 1 號 5 樓

電話：(02)2918-2288

傳真：(02)2917-2266

網址：www.yihscient.com.tw

E-mail: yihscient@ms17.hinet.net

總經銷：藝軒圖書文具有限公司

台北市羅斯福路三段 316 巷 3 號

(台大校門對面·捷運新店線公館站)

電話：(02)2367-6824

傳真：(02)2365-0346

郵政劃撥：0106292-8

台大醫學院展售處

台北市仁愛路台大醫學院聯教館醫工室 B1

電話：(02)2397-5070

台中門市

台中市北區五常街 178 號

(健行路 445 號宏總加州大樓)

電話：(04)206-8119

傳真：(04)206-8120

大夫書局

高雄市三民區十全一路 107 號

(高雄醫學院正對面)

電話：(07)311-8228

本公司常年法律顧問／魏千峰、邱錦添律師

二〇〇六年十月再刷

ISBN 957-616-015-4

本書如有缺頁、破損或裝訂錯誤，請寄回本公司更換。

讀者訂購諮詢專線：(02) 2367-0122

封面圖 (褐藻膠鈣膠體內之增殖酵母)

摘自：K. C. Chen and C. T. Huang

Enzyme Microb. Technol., 1988

vol. 10, May, P.288

著者簡歷

陳國誠 1972 年 東海大學化工系畢業
 1974 年 公費留學赴日深造
 1981 年 大阪大學醱酵工程系工學博士
 同年八月任職清華大學副教授
 1985 年 清華大學教授
 1986 年 夏威夷大學農工系客座研究
現 在 清華大學化工研究所教授
 (生化工程暨污染防治實驗室)

專 長 醱酵工程、酵素科技、生物技術及工業污染防治技術

主要著書 酵素在工業製程上嶄新的應用法 (黎明書店 1983 年)
 生化工程學 (國立編譯館, 1985 年)
 生物廢水處理概論 (國立編譯館, 出版中)

自序

生物技術 (biotechnology) 一言以蔽之，乃是創造新生物之一種嶄新的工藝技術，或是有效利用生物體、生物細胞的精巧機能，進行合成、轉換等生化反應以生產有用物質之技術體系。生物技術所涵蓋的廣大範疇中，不論是基礎科學研究亦或技術應用層次，或多或少都與酵素 (enzyme) 脫離不了關係。酵素除了被公認為生命活動中不可或缺的生化觸媒外，隨著生物技術日新月異的發展，不論是著眼於生化觸媒之基礎酵素學或以生化反應器 (bioreactor) 為主體之酵素利用技術皆日受矚目，且已確立了以酵素為中心之酵素技術 (enzyme technology) 或酵素工程 (enzyme engineering) 的科技領域。

酵素已廣泛地應用於澱粉、蛋白質、水果蔬菜、釀造等食品工業，以及胺基酸、有機酸、清潔劑、皮革加工、照相、製紙、飼料、化粧品、醫藥品等生物技術相關產業。今後，有效活用酵素所具有的獨特專一機能，將在醫療分析、免疫檢測、酵素藥劑、人工臟器及生化、生醫材料等尖端科技領域上不斷地進展。此外，在廢水處理、有毒金屬化合物及合成高分子廢棄物之生物分解等環境淨化之領域上，酵素利用技術之開發亦為世人所期待之新希望。

雖然，歐美、日本等先進國家，關於酵素科技之專書不勝枚舉；但是，為了便利國內入門學子或研究人員之參考，筆者將返國任教以來，講授「生化工程」、「酵素工程」加上 1986 年客座美國夏威夷大學農工系講授「酵素動力學」等課程講義，參酌近年來筆者實驗室之研究成果，編著成書。本書可作為大專院校化工科系或研究所之「酵素工程」課程教本或「生化工程」、「醱酵工程」及其他生物技術相關課程之參考用書。

本書匆促告成兼以筆者才疏學淺，內容如有未能達意或謬誤之處尚祈海涵，並請學者專家不吝指正。若得拋磚引玉，助益於入門學子或有志深造之讀者，即為所盼，甚幸。全書在研習，抄謄，校閱等過程中承蒙本所生化工程實驗室 (BIOCHEN LAB.) 研究生諸君之鼎力協助，謹此致謝。最後謹將此書獻給親愛的父母，感謝他們耳提面命，諄諄教誨筆者，專心致力研究工作貢獻學術。

陳國誠

Prof. Dr. K.C. Chen

謹識於清華大學化工研究所

戊辰年中秋

目 錄

第一章 酵素

1.1 緒言	1
1.2 酵素命名法	2
1.3 酵素特性	11
1.3.1 酵素活性	11
1.3.2 特異性	13
1.3.3 蛋白質特性	14
1.3.4 穩定性	15
1.3.5 最適溫度	17
1.3.6 最適 pH	17
1.3.7 氧化	19
1.3.8 輔因子	19
1.3.9 寡體酵素	21

第二章 微生物酵素之工業應用與大規模生產

2.1 緒言	23
2.2 微生物酵素的工業應用	24
2.2.1 澱粉水解酵素	25
2.2.2 葡聚糖分解酶及轉化酶	28
2.2.3 葡萄糖異構酶	30
2.2.4 半乳糖苷酶	30
2.2.5 纖維素水解酵素	32
2.2.6 酯解酶	33
2.2.7 脂肪水解酵素	34
2.2.8 蛋白質水解酵素	35
2.2.9 分析及醫藥用酵素	38

2.2.10 其他酵素	43
2.3 酵素的大規模生產	47
2.3.1 菌種篩選	49
2.3.2 菌種改良	50
2.3.3 培養程序	51

第三章 醱酵工程

3.1 緒言	59
3.2 攪拌與通氣	60
3.2.1 質傳係數	61
3.2.2 不通氣牛頓流體系統之所需動力	63
3.2.3 不通氣非牛頓流體系統之所需動力	67
3.2.4 通氣系統之動力消耗	67
3.2.5 通氣效率之測定	68
3.2.6 擴大規模	76
3.3 微生物之培養操作	79
3.3.1 批式培養	81
3.3.2 進料批式培養	95
3.3.3 連續培養	98
3.4 控制與最適化	105
3.4.1 傳統控制	106
3.4.2 控制參數	110
3.4.3 生化程序之電腦應用	124

第四章 大規模的酵素精製

4.1 緒言	143
4.2 酵素萃取方法	143
4.2.1 酵素萃取的化學方法	144
4.2.2 酵素萃取的物理方法	145
4.3 酵素純化	147
4.3.1 核酸的去除	147

4.3.2	固體的去除	148
4.3.3	利用沈澱進行純化	149
4.3.4	水性兩相分離	149
4.3.5	利用吸附進行純化	150
4.3.6	利用層析程序進行純化	152
4.3.7	大規模層析技術之實際現況	157
4.3.8	超過濾及透析	159
4.3.9	相關的實驗例	160
4.4	有關酵素純化程序設計的生物技術之概況	160
4.4.1	醱酵和回收程序的整合	161
4.4.2	擴大規模	161
4.4.3	連續酵素純化	170
4.4.4	電腦控制	171
4.4.5	作為酵素來源的微生物	172
4.4.6	安全性	174
4.5	未來展望	175

第五章 酵素動力學

5.1	緒言	181
5.2	酵素反應步驟	182
5.3	酵素反應機制	183
5.3.1	基質與酵素的結合	184
5.3.2	構形變化	187
5.3.3	共價鍵之形成與斷裂	188
5.4	反應動力學	191
5.5	酵素反應之反應速率式	198
5.5.1	Michaelis-Menten 動力學 —— 瞬間平衡之解析	200
5.5.2	Briggs-Haldane 動力學 —— 穩定狀態之解析	201
5.5.3	K_m 與 V_m 值之釋義	204
5.5.4	Michaelis 參數之估算	205
5.6	酵素阻害效應	208
5.6.1	競爭性阻害	208

5.6.2	非競爭性阻害	213
5.6.3	不可逆阻害	216
5.6.3	不競爭性阻害	218
5.7	pH效應	222
5.7.1	pH對酵素活性及其穩定性的影響	222
5.7.2	pH對酵素動力學的影響	224
5.8	溫度效應	228
5.9	多基質反應	232
5.9.1	秩序機制	232
5.9.2	隨機機制	233
5.9.3	乒乓機制	235
5.9.4	多基質／單一產物酵素反應之動力學解析	235
5.10	多部位與異位酵素	237
5.10.1	非協同性部位	238
5.10.2	異位酵素——協同性結合	240
5.10.3	簡單順序性交互作用模式	241
5.10.4	Hill 方程式——異位酵素之簡化速率式	244
5.11	快速反應	247
5.11.1	流動技術	247
5.11.2	弛緩技術	250
5.11.3	遠離平衡之過渡狀態動力學	251
5.11.4	趨近平衡系統之動力學	257

第六章 固定化酵素與固定化菌體

6.1	緒言	263
6.2	酵素和菌體的固定化	264
6.2.1	酵素的固定化	264
6.2.2	完整菌體的固定化	267
6.3	利用固定化增加酵素之穩定性	280
6.4	固定化酵素與菌體的特性	283
6.4.1	微環境效應	284
6.4.2	擴散限制	287

6.4.3	溫度效應	297
6.4.4	基質和產物抑制作用的疏解	298
6.4.5	固定化多酵素系統的動力學	301
6.5	固定化酵素之操作穩定性	302
6.5.1	質傳阻力效應	302
6.5.2	基質保護效應	306
6.6	結語	312

第七章 生化觸媒反應器

7.1	緒言	317
7.2	固定化酵素、固定化菌體生化反應器	317
7.2.1	固定化活菌體生化反應器（不使用擔體的情況）	318
7.2.2	固定化活菌體生化反應器（使用擔體的情況）	320
7.2.3	反應器解析	321
7.3	中空纖維反應器	336
7.3.1	熱交換器型非對稱膜反應器	337
7.3.2	熱交換器型對稱膜反應器	339
7.3.3	攪拌槽均質膜反應器	340
7.4	附設吸附分離裝置之固定化酵素反應器系統	342
7.4.1	異構化糖漿	343
7.4.2	固定床吸附分離法	343
7.4.3	擬似移動床吸附分離法	345
7.4.4	組合酵素反應器之擬似移動床吸附分離法	347
7.5	薄膜反應器	348
7.6	酵素反應器之最適化	350
7.6.1	最大原理	351
7.6.2	伴隨酵素活性劣化的反應操作之最適化	353

第一章

酵素

ENZYMES

1.1 緒 言 (Introduction)

酵素是生物體爲了使其體內生化反應得以有效率地進行而生產的生化觸媒，且幾乎無任何例外的，它的本體爲蛋白質所構成。酵素分子的一部份有時和醣類結合，即成醣蛋白質，也可和脂質結合成脂蛋白。這些複雜的高分子物質，到底是基於何種分子結構及反應機制來表現，其具有高度基質特異性的觸媒作用，至今仍未全然知曉，如將酵素視爲一種特殊觸媒的話，實是頗爲耐人尋味的問題。另外，在生命現象的探究與解析方面，基本上可將生物體視爲各色各樣，無數的生化反應交織組合而成的有機體，而且若無酵素的的存在，這些生化反應即無從進行。也就是說，酵素是直接擔當生命活動的要角之一。因此，酵素學研究便一直被視爲生物化學的核心部份，其相關學門涵蓋著廣泛的生命科學領域；特別是，動植物生理學、病理學及微生物學、農學、醫學等的基礎部門。另外，如將其視爲特殊觸媒來看，與物理化學也有著相當密切的關係。在應用方面，它也是釀造工業、微生物工業、生物科技應用工業的基礎。

雖然，人類在確知酵素之存在及其作用之前，早已利用它來釀酒，或製造乳酪。然而，真正的酵素研究可說始於 Buchner 兄弟（1895 年），他們發現用砂石磨碎破壞酵母菌體，將其過濾後所得榨汁中，雖不含活細胞，但仍具有將糖發酵生成二氧化碳和酒精之能力的現象。當然，證實榨汁中將糖變換成二氧化碳和酒精的物質是酵素的的存在使然，則是以後的事。“enzyme”的希臘語原意爲“in yeast”，思及此一科學史實，不禁令人趣味盎然。此後，1950 年，Harden 和 Young 證明榨汁中，參與酒精釀酵的酵素不是單一的，而是多種形式之酵素共存下綜合作用的結果。20 世紀以降，抱著酵素本身可能就是

蛋白質之想法的學者佔絕大多數。直到 1926 年，J.B. Sumner 把尿素酶 (urease) 以蛋白質的形式將其結晶分離出來後，才首先從本質上證實此事。爾後，陸陸續續地從各種生物體分離所得的酵素不勝枚舉。目前，發表於文獻上者大約超過 1500 種，其中，以晶體精製純化者已不下數十種了。

1.2 酵素命名法 (Nomenclature of Enzymes)

隨著酵素種類的逐日增多，為數眾多的酵素研究者與酵素利用者之間，為了避免於對同一酵素彼此使用不同名稱而造成混淆；而且，便於相互間能夠正確地交流溝通起見，國際間通用的，酵素命名法實在是不可或缺的。為此，國際生物化學聯盟 (International Union of Biochemistry) 設有酵素委員會 (Enzyme Commission)，有系統地制定了酵素的分類和命名法，同時對酵素活性表示法，反應速率參數等研究項目也都有正式的規定。關於它的詳細內容有興趣的讀者可參閱 I.U.B. 所出版的專書 “ Enzyme Nomenclature 1978 ”，Academic Press, New York (1979)。

I.U.B 所公佈的 EC (Enzyme Commission) 分類命名法的要點和特徵有三：

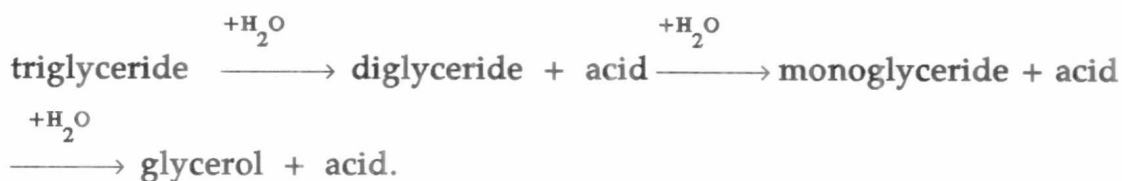
(一) 不依酵素之性質與結構，而是依酵素所催化的反應種類來作酵素分類，將酵素反應分成六類 (class)，每一類底下分成四到十三個組 (group)，再細分為若干亞組 (sub-group)。

(二) 酵素名稱由二部份組成，開始的部份是表示反應物的基質名稱，後面部份則是表示其所催化反應之種類，而以 ase 結尾。例如：



催化此一反應之酵素系統名即定為 L - Asparagine amino - hydrolase (常用名為 asparaginase)。

(三) 每一酵素都具有由四個數字組成的系統號碼 (EC number)。例如：
Glycerol - ester hydrolase (Lipase, Esterase) (EC 3.1.1.3)



“ 3 ”表示第 3 類的加水分解酵素 (hydrolase)。

“ 1 ”表示作用於 ester 結合的第 1 組 (group)。

“ 1 ”表示作用於 carboxylester 之加水分解的第 1 亞組 (sub-group)。

“ 3 ”最後一個數字表示由前面三個數字分類所得之小組內酵素的序列號碼。此處之“ 3 ”即指 glycerol ester hydrolase；意即將 triglyceride 加水分解成 glycerol 和脂肪酸之酵素。

此一分類命名法雖是相當精確嚴密，但實際上使用起來由於名字冗長，頗為麻煩。因此，EC 命名法除了上述學術上所使用的“系統名”(systematic name)外，為方便起見，“常用名”在很多場合也都被允許使用。因此，最好是兩種名稱都知曉。常用名除了有一些例外，大抵仍以“-ase”結尾。

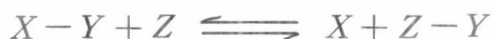
以下簡單介紹屬於 EC 號碼第一個數字的六大類酵素：

(1) 氧化還原酵素 (Oxidoreductase)

所有催化生化氧化還原反應之酵素，皆屬此類，被氧化的基質稱為氫授與者 (hydrogen donor)，其系統名是基於 donor : acceptor oxidoreductase 而定。此類酵素包含生物代謝之呼吸 (respiration) 和醱酵 (fermentation) 程序上的相關酵素，如以 NAD 或 NADH 作為反應輔因子 (cofactor) 的 dehydrogenase 及 oxidase。例如，alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) 和 glucose oxidase (EC 1.1.3.4)。此外也包括了以 H₂O₂ 為氧化劑 (oxidant) 的 peroxidase，如 Catalase (EC 1.11.1.6)；和將氧分子導入基質中雙鍵結構的 oxygenase，如 Catechol oxygenase (EC 1.13.1.1)。

(2) 轉移酵素 (Transferase)

係指催化將 methyl, carboxyl, aldehyde, keto 等含單一碳原子之官能基，含氮、磷、硫之原子團從某一化合物移轉到另一化合物之酵素。其系統名是基於 donor : acceptor grouptransferase 而定。例如：酵素反應



係將 Y 基從 X 化合物移轉到 Z 化合物上，即導入 Z 來斷裂 X-Y 鍵結。如 Z 為 phosphate 或 arsenate 的話，此一程序便稱為 phosphorolysis 或 arsenolysis，基於這反應型式便有一些酵素被命名為 phosphorylase。

Methyltransferases (one-carbon transferase) (2.1)

(2.1.1) 亞組的酵素，是催化甲烷基 (methyl group) 轉移的生化甲基化反應 (biological methylation)。還有生化合成上相當主要的 carboxylation 即催化轉移 carboxyl 或 carbamoyl 基的酵素群 (2.1.3)。

Transaldolase and transketolase (2.2.1)

Transketolase 轉移 dihydroxyacetone, transaldolase 轉移 glycoaldehyde, 這些反應涉及 aldehyde-aldehyde combination 及 alcohol-aldehyde combination。在光合成及 pentose phosphate 的氧化系統上相當重要。

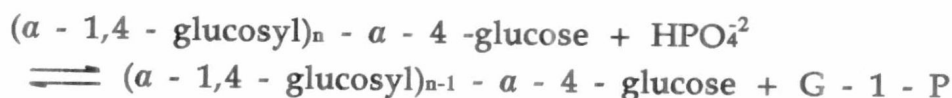
Acyltransferase (2.3.1)

催化從輔酵素 A (coenzyme A) 中把 acyl基移轉到另一化合物的酵素。例如 choline acetylase (EC 2.3.1.6) 和 phosphate acetyltransferase (EC 2,3.1.8)。

Glycosyltransferases (2.4)

轉移糖殘基到其他各種接受體上，特別是含 -OH基之其他糖類，磷酸分子或含氮的雜環。

- Phosphorylase (EC 2.4.1.1)

**Alkyltransferases (2.5)**

轉移 R_3C 基之酵素，在各種 isoprenoid 如 Steroids, terpenoids, carotenoids, ubiquinone 等化合物的生化合成路徑上扮演重要角色。

- Methionine activating enzyme (EC 2.5.1.6)

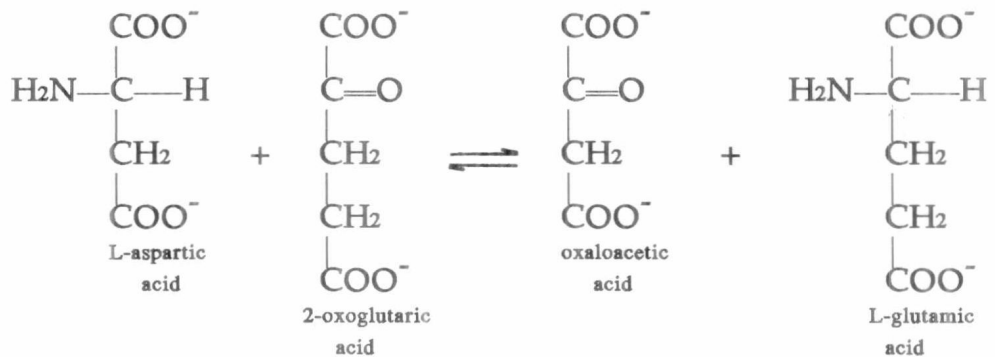
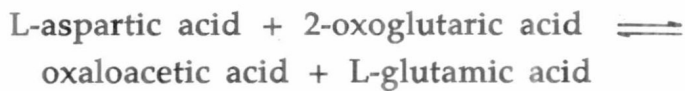


將 methionine 轉換成 active methyl group 之反應的酵素分布於肝及酵母。

Enzymes transferring nitrogenous groups (2.6)

transaminases (2.6.1) 在胺基酸代謝上相當重要；催化從 primary amine 轉移 NH_3 到 oxo 化合物之酵素。

- Aspartate aminotransferase, Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) ; (EC 2.6.1.1)



Enzymes transferring phosphate groups (2.7)

經由 ATP 進行 transphosphorylation 之反應亦即一般所謂的 kinases，如 hexokinase (EC 2.7.1.1)



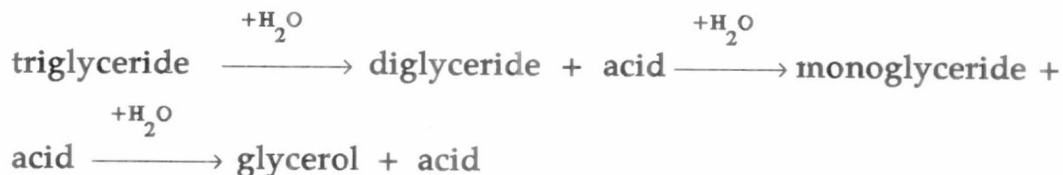
可見於動植物及微生物之代謝路徑。

(3) 加水分解酵素 (Hydrolase)

此類酵素包括加水分解酯鍵 (ester bond)、glucoside 及 peptide ($-\text{CO}-\text{NH}_2-$) 結合鍵之酵素。

Esterase

- lipase (EC 3.1.1.3)

**Glycosidases**

水解 glucoside (3.2.1)，N-glucosyl 化合物 (3.2.2)，S-glycosyl 化合物 (3.2.3) 之酵素。

- α - amylase (EC 3.2.1.1)



從長鏈多糖之中央內部的 glucoside 結合將糖加水分解之酵素，又稱為 glycan glycanohydrolase (endo-polysaccharidase)。

- β - amylase (EC 3.2.1.2)



從非還原性末端分離出 maltose 而加水分解澱粉之酵素，為一種 exo-pol-yase。

Phosphatase

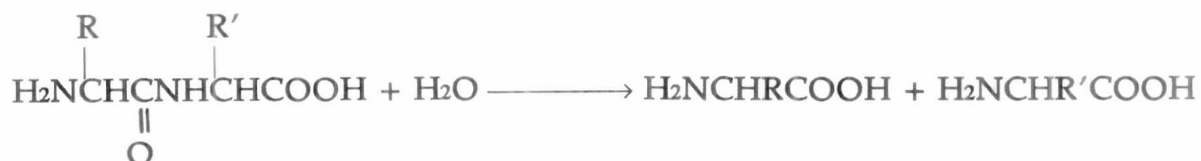
- Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1)



從 RNA 及 DNA 之 3' 或 5' 末端加水分解磷酸雙酯鍵結合。

Peptidases (3.4)

- Amino peptidase [amino - acyl - oligo peptide hydrolase] (EC 3.4.11.2)



- Carboxypeptidase A (EC 3.4.12.2)

從 carboxyl 末端遊離 L - amino acid 之酵素，對 lysine、arginine、proline 則不起作用。

- Pepsin (EC 3.4.23.1)

加水分解胜肽，尤其是分解芳香基及 carboxyl amino acid 殘基鄰近之結合。

- Urease (EC 3.5.1.5)



(4) 脫離酵素 (Lyase)

作用於基質而去除羧基、醛基、水、氨等原子團之酵素，但不依加水分解方式而直接切斷並留下雙鍵結構，或相反地加成雙鍵結合之反應。有些此類酵素在生化合成上扮演重要角色，故又稱為 synthase。

Decarboxylase

- Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1)

酵母酒精醱酵程序之碳水化合物，在生物碳水化合物代謝上相當重要。

