

出國報告（出國類別：其他）

-酵素開發與應用-
參加第七屆工業生物製程國際研討
會出國報告

服務機關：台灣中油股份有限公司

姓名職稱：蔡昌廷 化學工程師

蔡承佳 化學工程監

派赴國家：中國大陸

出國期間：106年5月21日至106年5月25日

報告日期：106年6月7日

摘要

永續性的生質能源為台灣中油公司綠能科技研究所研發重點項目之一，生物科技組負責纖維素乙醇及生質多元酸的生產及醱酵製程開發。本次至江蘇無錫參加第七屆工業生物製程國際研討會並發表論文，除了解生質精煉的研究發展現況及最新發展趨勢，並且和與會學者廠商進行交流洽談合作的可能性。本報告將研討會主要內容分為大會主題演講、專題演講及壁報論文並將資料進行整理及分析。

本次參與研討會的具體成效為：發表兩篇論文並與與會學者交流，其中「Itaconic acid production from glycerol with *Escherichia coli*」獲得 Best paper Award 獎項。

本次參與研討會的心得為：生質化學品逐漸取代生質燃料成為學術界的熱門研究主題，由於低油價及頁岩氣的開發使得各國學者逐漸將研究重心放置於價值較高之生質化學品。中國大陸的學術研究水準已逐漸提高，本次參與會議發現中國大陸的論文品質及研究成果已比上一屆會議時進步許多。

本次參與研討會的建議為：積極參與國際研討會並加強與國際研究單位之交流及合作，與中國大學的研究學者交流可獲得較廣泛主題的生質精煉研究成果而與日本及韓國等國家的生質精煉研究則較為新穎及專精。

目次

頁次

摘要-----	2
1. 目的-----	4
2. 過程-----	5
3. 具體成效-----	6
4. 研討會資料彙整-----	8
5. 心得及建議-----	25
6. 參考資料-----	26

1. 目的

永續性的再生能源為本公司綠能所研發重點項目，生物科技組負責纖維素酒精及生質多元酸發酵生產製程的開發，並嘗試自行研發生產纖維水解酵素替代商業化酵素，以期降低再生能源之生產成本。本次至江蘇無錫舉辦的第七屆工業生物製程國際研討會(7th International Forum on Industrial Bioprocessing, IFIBiop 2017)發表兩篇論文，除了可以宣揚公司於生質精煉及再生能源的研究水準與成果，並可了解國際上生質燃料及生質化學品最新發展近況及工業化趨勢，並且和與會學者廠商建立溝通管道，作為未來雙方共同合作開發，或引進具有潛力之商業技術之開端。

於江蘇無錫舉辦的第七屆工業生物製程國際研討會(7th International Forum on Industrial Bioprocessing, IFIBiop 2017)為一個大型國際研討會，包含工業生物技術、生質能源/燃料、環境生物技術、食品工程技術、生物製程等主題，且本組蔡承佳組長及台灣有多位教授是工業生物製程國際研討會的委員會成員，顯示該研討會是國內學者競相參與的重要會議，也是與國際接軌的重要平台。參與該研討會可以了解國際生質燃料及生質精煉最新發展現況與應用實例，可提升專業知識與能力協助快速建立核心技術，並能與與會國內外學者專家交流，並且可藉此機會引薦參與第六屆會議時所認識國際研究單位學者群予本組組長，製造更大的合作契機及研究機會，使本組的研究能與時俱進、並與國際趨勢接軌。

2. 過程

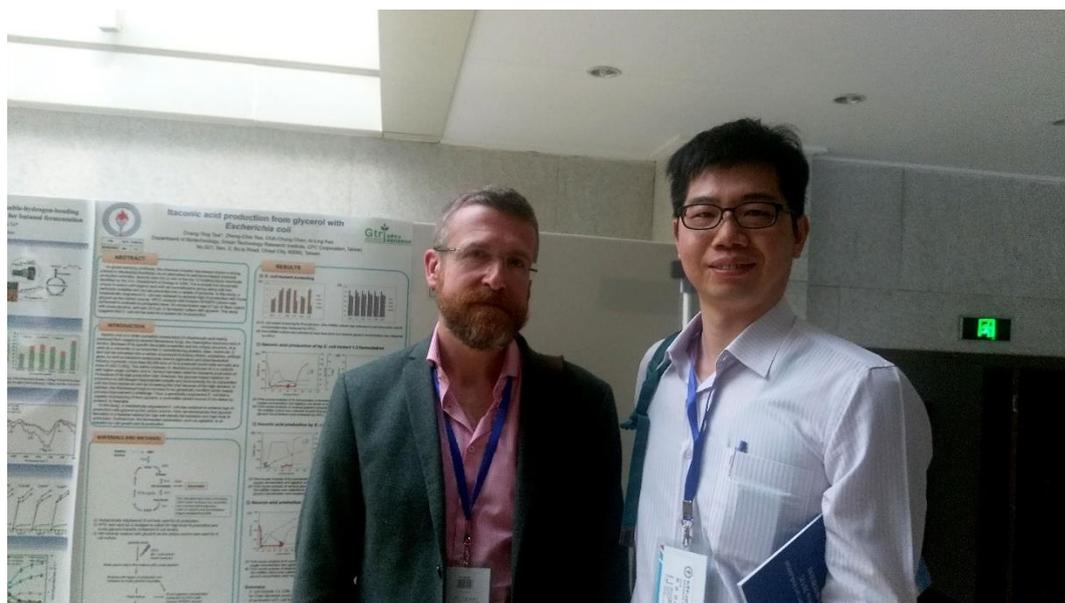
出國行程與時間安排如表一。

表一、出國行程表。

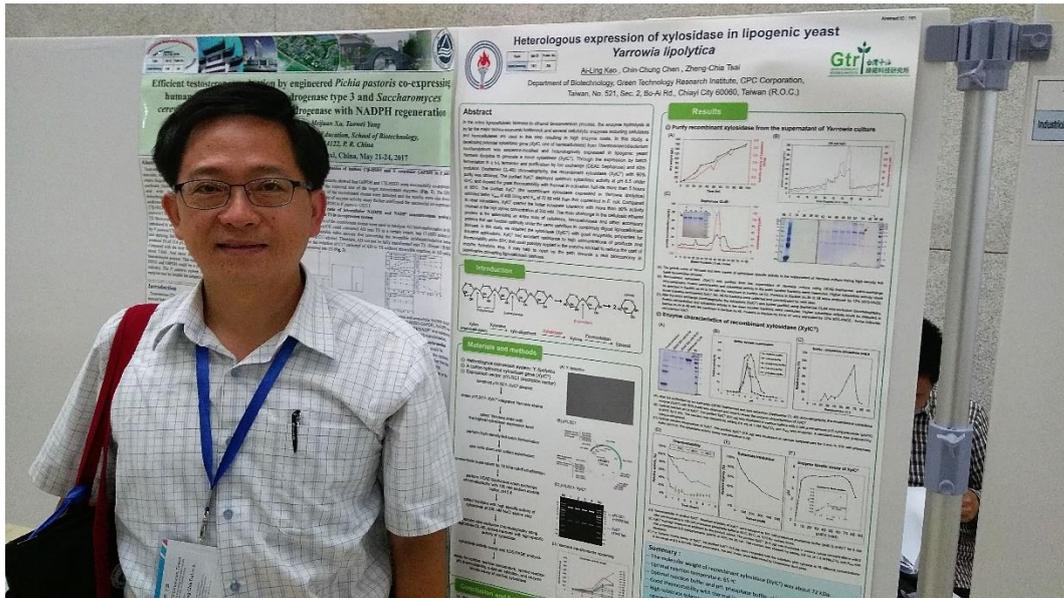
日期	詳細工作內容
106.5.21	啟程 (嘉義-桃園機場-江蘇無錫機場)
106.5.22	參加生物製程國際研討會
106.5.23	參加生物製程國際研討會
106.5.24	參加生物製程國際研討會
106.5.25	返程(江蘇無錫機場-桃園機場-嘉義)

3.具體成效

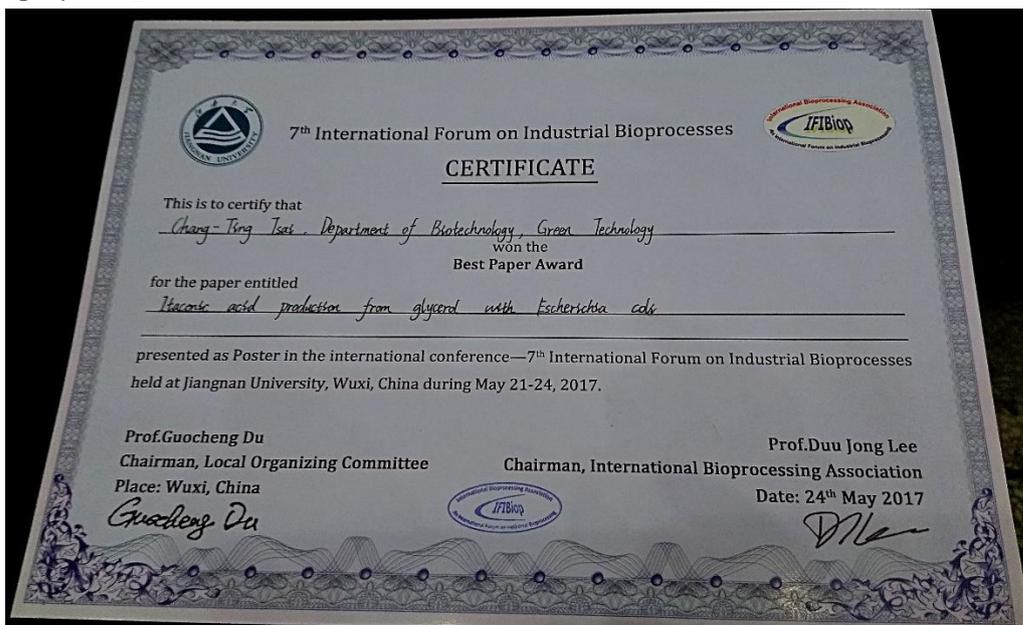
本次會議發表兩篇論文宣揚公司於生質精煉及再生能源的研究水準與成果，並與與會學者交流洽談合作之機會，論文題目為「Itaconic acid production from glycerol with *Escherichia coli*」及「Heterologous expression of xylosidase in lipogenic yeast *Yarrowia lipolytica*」，內容探討利用基因工程改變大腸桿菌的三羧酸循環代謝途徑使其可以生產衣康酸並利用 NTG 突變使大腸桿菌可以利用生質柴油的副產物粗甘油為碳源，在搖瓶培養時衣康酸產量可達 8.7 g/L 利用發酵槽培養可使衣康酸的產量達 23.5 g/L；以及利用耶氏酵母菌表現系統大量表現木寡醣分解酵素，並以兩步驟純化即可得純度 90% 以上之高受質耐受性木寡醣分解酵素，酵素活性約 2.8 U / mL，酵素動力學測定結果 V_{max} 為 400 U/mg·Km 為 22.88 mM，生化性質測定結果最適作用條件為 65°C pH 6.5。此外，Xyl CY 其耐熱性佳，於 65°C 反應 5 小時後，活性可維持 50%。最大特點為 Xyl CY 受質耐受度佳，在 250 mM xylose 存在下，其活性可維持 50% 以上。其中「Itaconic acid production from glycerol with *Escherichia coli*」獲得大會頒發 Best paper Award 獎項。



圖一、發表論文「Itaconic acid production from glycerol with *Escherichia coli*」並與與會學者進行討論。



圖二、發表論文「Heterologous expression of xylanase in lipogenic yeast *Yarrowia lipolytica*」。



圖三、論文「Itaconic acid production from glycerol with *Escherichia coli*」獲得 Best paper Award 獎項。

4.研討會資料彙整

工業生物製程國際研討會(International Forum on Industrial Bioprocessing, 簡稱 IFIBiop) 為全世界最大工業生物技術研討會之一, 主題包含工業生物技術、生質能源/燃料、環境生物技術、食品工程技術、生物製程等, 該研討會於 2004 年在法國克萊蒙費朗發起, 此後每兩年舉辦一次。迄今已在法國、希臘、印度、巴西、台灣和法國成功舉辦了 6 屆。目前 IFIBiop 參會人員來自 20 餘個國家, 已成為生物/生化工程領域學者和工程技術人員的重要國際交流平台。本屆研討會是首次在中國大陸召開, 由國際生物製程協會(International Bioprocessing Association)主辦和江南大學生物工程學院承辦, 由工業生物技術教育部重點實驗室、糧食發酵工藝與技術國家工程實驗室、食品科學與技術國家重點實驗室和江蘇省微生物學會協辦, 旨在於促進工業生物技術領域的有效交流與合作。參與該研討會可以了解國際生質燃料及生質精煉最新發展現況與應用實例, 可提升專業知識與能力, 協助快速建立核心技術。本次大會的委員會邀請國際知名專家報告, 包括日本 Kobe University 的 Prof. Akihiko Kondo, BT 主編、印度 CIAB 的 Prof. Ashok Pandey 等。同時, 會議還將遴選部分高質量論文, 在國際期刊 Food Technology and Biotechnology (IF 1.179)以及 Bioresource Technology (IF 4.917)上出版專刊。下一屆研討會將在馬來西亞的 Universiti Teknologi PETRONAS (UTP, 國油大學)舉行。



圖四、工業生物製程國際研討會(IFIBiop 2017), 舉辦地點: 無錫江南大學的文浩科學館, 全部與會者於文浩科學館前合影。

3.2 會議與主題演講資料

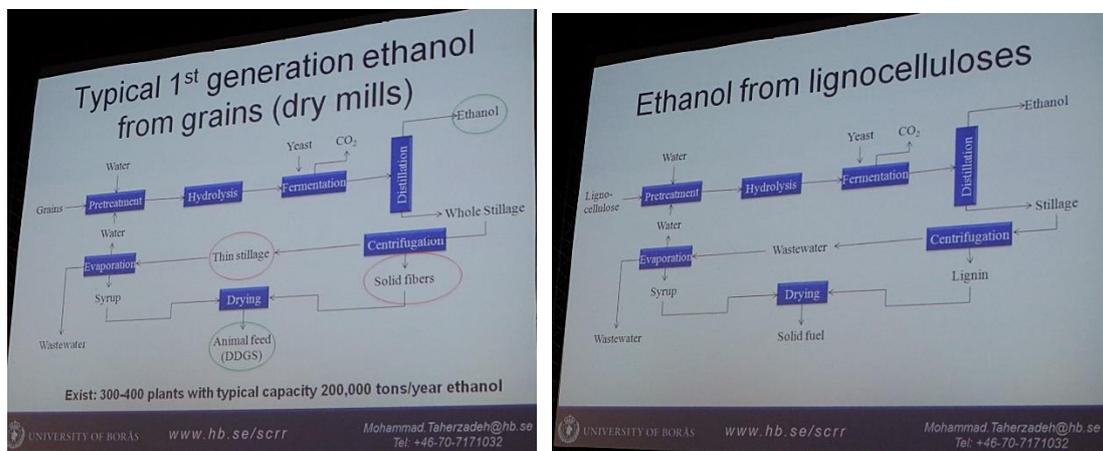
3.2.1 Integration of 1st and 2nd generation ethanol plants using filamentous fungi

- Prf. Mohammad J. Taherzadeh,

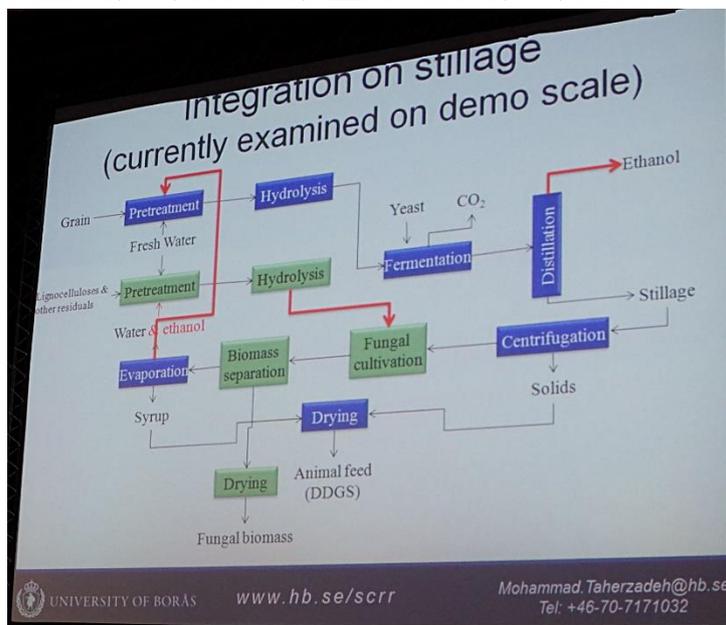
- Swedish Centre of Resource Recovery, University of Borås, Sweden

至 2015 年為止生質乙醇為目前最大宗的生質燃料, 目前第一代生質乙醇的生產已從糖轉換為以澱粉為最主要原料, 玉米澱粉即是最大宗的生質乙醇原料來源。在第一代生質乙醇的製程中, 1 kg 的玉米、1/3 kg 可以轉換為乙醇、1/3 kg 成為玉米酒粕(DDGS)而剩下的 1/3 kg 的 CO₂ 則在製程中散逸, DDGS (Distiller's Dried Grains with Solubles) 是玉米經乾式碾磨(dry milling)生產生質酒精的副產

物，乾式碾磨製程將玉米粉碎後以酵母菌和酵素將玉米的澱粉發酵產生乙醇和 CO₂，酒精被蒸餾取出後剩下酒粕和一些可溶物，含可溶物的液體被分離出來，經過蒸發濃縮後再按比例與固形物混合乾燥就是 DDGS，DDGS 含有未分解完的澱粉、酵母菌及酵素等蛋白質、脂肪及纖維等可以做為優質的動物飼料，故 DDGS 是第一代生質乙醇工廠極具經濟價值的副產品。第二代生質乙醇廠的製程則以非糧食的玉米稈、麥稈及稻稈等廢棄物做為原料，然而其副產物僅有一些固態燃料等缺乏有價值對的副產品，因此無法達到可支撐第二代生質乙醇廠商業運轉的經濟規模。Taherzadeh 教授提出一個解決辦法，將木質纖維廢棄物併入已商轉第一代生質乙醇廠，並利用可食用絲狀真菌如接合菌綱及子囊菌綱的 *Neurospora intermedia* 代謝玉米酒粕及木質纖維素等廢棄物再次生產乙醇及有價值的 DDGS，此製程正在瑞典的商業運轉乙醇廠進行示範工廠規模的測試。



圖五、第一代穀物澱粉生質乙醇與第二代木質纖維素生質乙醇製程的差異。



圖六、合併第一代及第二代生質乙醇製程並利用絲狀真菌分解乙醇發酵廢棄物再次生產乙醇、DDGS 及可食用的菌體。

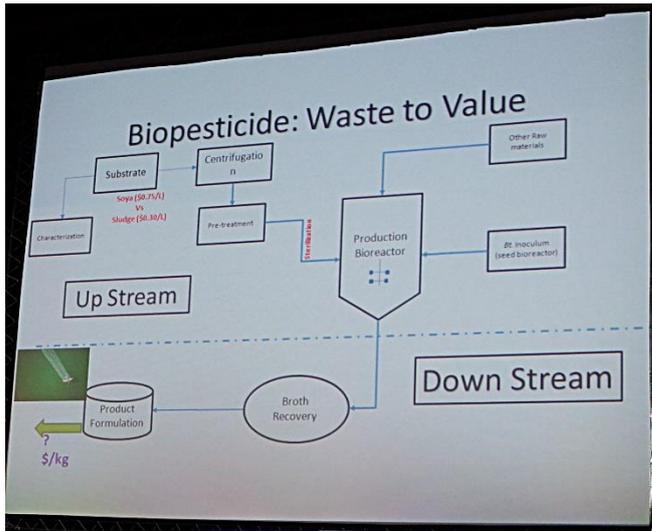
3.2.2 Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using industrial wastewater as a raw material

- Dr. Rajeshwar D Tyagi

- INRS-ETE, University of Québec 490 Rue de la Couronne Québec, G1K 9A9
Canada

昆蟲危害造成全球農業作物和林業植物產量的損失，對害蟲的防治多使用合成殺蟲劑，長時間使用合成殺蟲劑會導致昆蟲抗藥性並造成人類及環境的危害。目前最廣泛使用的生物殺蟲劑是 *Bacillus thuringiensis* (Bt) (蘇力菌)，蘇力菌屬於一種昆蟲病原細菌，屬好氣性革蘭氏陽性桿菌，在營養缺乏或環境不良的時候，會進入不分裂的半靜止期，產生休眠性的孢子(endospores)，除了孢子外在孢子的旁邊同時形成殺蟲結晶蛋白(cry 蛋白，或稱 δ -內毒素)，對昆蟲具有毒殺能力，其殺蟲結晶毒蛋白的殺蟲範圍，與昆蟲腸內上皮細胞結合受器(receptor)的專一性有關，不同的殺蟲結晶蛋白，會辨識不同的結合位置，因此殺蟲之對象亦不同。目前主要應用在防治鱗翅目(Lepidoptera)、雙翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)等昆蟲。其殺蟲機制為，殺蟲結晶蛋白在中腸高鹼性下溶解和蛋白酶(protease)的作用，使具有活性片段(active fragment)和構造片段(structured fragment) 130-140 kDa 的前毒素(pro-toxin)，活化成 60-70 kDa 的毒素(toxin)。經活化後的毒素與中腸上皮細胞刷邊緣膜之高親和性接受器結合。隨後毒素插入質膜，造成孔洞(cation pore)，導致滲透壓失調(osmotic imbalance)，細胞腫脹、解離，中毒的昆蟲進食減緩，終至死亡。

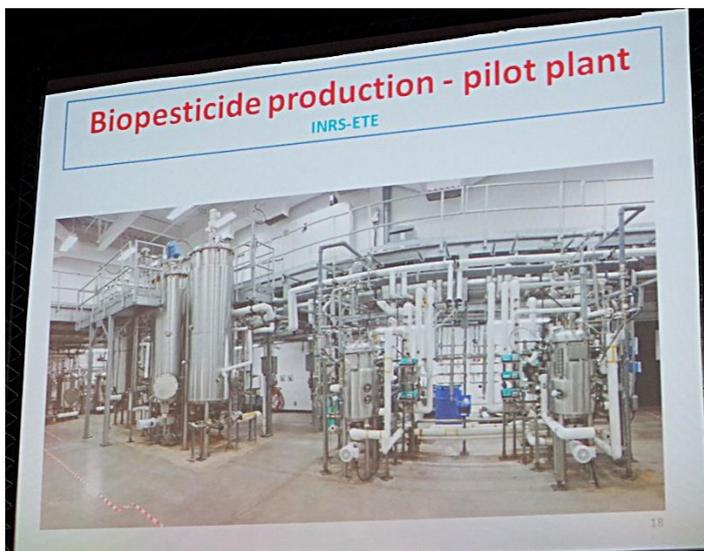
由於蘇力菌的生產成本較高，大部分成本(40-60%)集中在蘇力菌培養時的原料成本，因此使用低成本的替代原料非可有效降低生產成本，Tyagi 博士主要的研究目標是利用如廢水汙泥、農業及食品業廢水、澱粉工業廢水等工業廢水生產高效率低成本的 Bt 基生物殺蟲劑，用於控制對加拿大雲杉森林的破壞嚴重的雲杉芽蟲。在使用工業廢水作為 Btk HD-1 蘇力菌的培養基原料，與其他廢棄物原料相比，工業廢水可以直接使用而無需任何預處理，而且毒殺性較使用合成培養基高且此種發酵液在殺蟲劑配方製作上更優勢。Tyagi 博士更研究發現：由 Btk HD-1 產生的 δ -內毒素的濃度與發酵時間有關；在澱粉工業廢水中添加如黃豆培養基等營養物質可提高 δ -內毒素及孢子的量而增加昆蟲毒殺性，這些研究成果已在實驗室規模及試驗工廠規模 (2000L 發酵槽) 進行驗證。



圖七、利用工業廢水生產生物殺蟲劑。



圖八、改變澱粉工業廢水(Starch industry wastewater, SIW)的營養成分可以提高蘇力菌的毒殺效果。



圖九、於試驗工廠規模生產生物殺蟲劑。

3.2.3 Strategies for Enhancing Extracellular Expression of Recombinant Enzymes

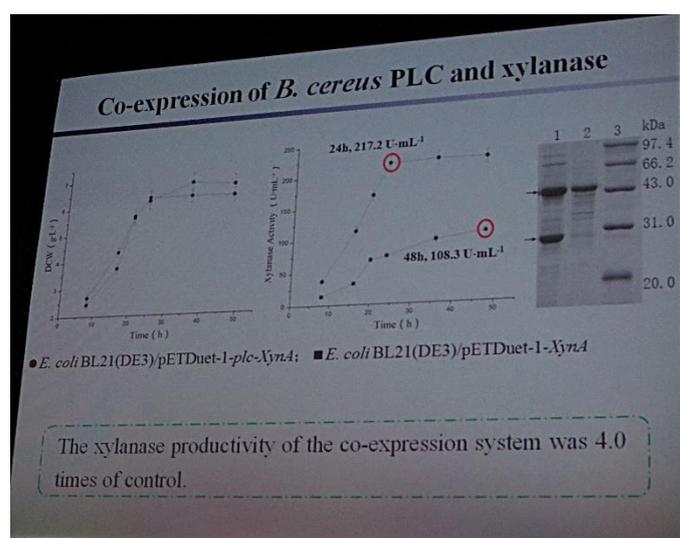
- Prf. Jing Wu,

- State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, China

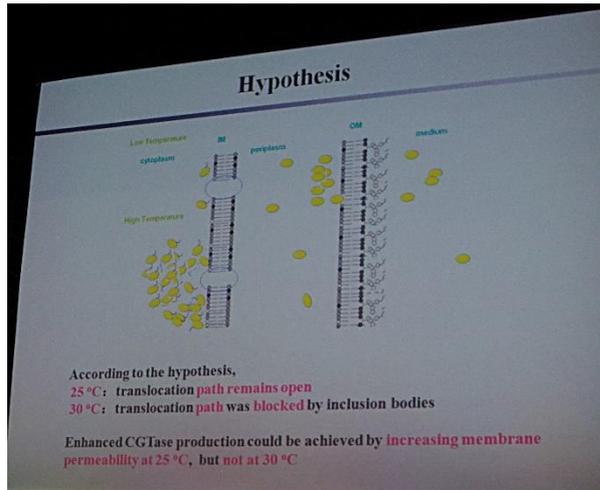
對工業用酵素而言，將重組蛋白質的胞外表現極為重要，因外泌的重組酵素更易進行大量純化及製備，且較少雜蛋白的汙染。蛋白質的外泌通常是重組蛋白質生產的關鍵步驟，在吳教授的研究中開發了幾種策略來提高蛋白質通過細胞膜的效率。

其一是在大腸桿菌中共表現磷脂酶(phospholipase)與目標酵素，磷脂酶可以催化細胞膜中磷脂的水解，導致細胞膜的通透性增強，而使目標酵素更易釋放至細胞外。例如，外泌型蛋白質 *Streptomyces* sp. FA1 木聚醣酶經使用共表現策略的表現量比單獨表現時提高 4.0 倍，此外胞外表現細胞質的谷氨酸脫羧酶的其活性可達 26.7U / mL，為總活性的 88.3%。

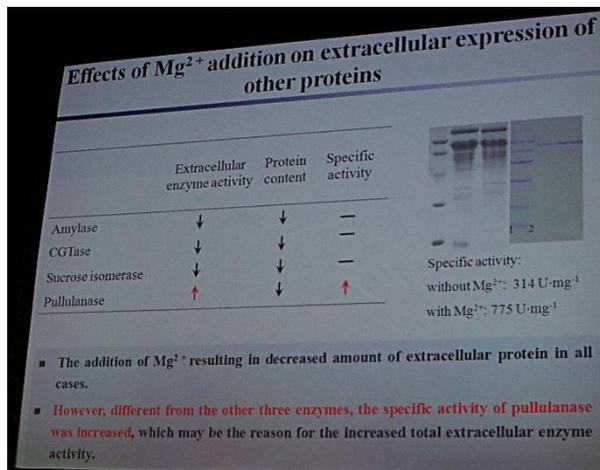
其二，蛋白質前驅物的合成及摺疊、截切等轉譯後修飾速率的最適化對於重組酵素的胞外表現也是非常重要的。在大腸桿菌中表現 *Paenibacillus macerans* 的環糊精糖基轉移酶 (cyclodextrin glycosyltransferase)，在高表現量下蛋白質前驅物不容易轉移穿過細胞膜並會在內膜的內側附近聚集而形成內涵體(inclusion bodies)，最終阻斷蛋白質前驅物的轉移通道並隨後阻礙進一步的蛋白質外泌；若降低蛋白質表現量，則蛋白質轉移通道可以保持通暢並獲得 20 倍以上的重組酵素產量。例如，*Bacillus deramificans* 的支鏈澱粉酶(pullulanase)在 *Brevibacillus choshinensis* 異源表現，培養基在未加入鎂離子時，蛋白質前驅物的表現量較高而導致蛋白質摺疊不正確，產生熱穩定性不佳和無活性的支鏈澱粉酶，若加入鎂離子抑制支鏈澱粉酶的基因的轉錄，導致較慢的蛋白質生成速率可得到熱穩定性佳和具有活性的支鏈澱粉酶，其活性可提高 4.5 倍。



圖十、共表現磷脂酶(phospholipase, PLC)可以提高酵素產量。



圖十一、在低溫培養實蛋白質表現量較低則蛋白質轉移通道可以保持通暢有利蛋白質生產。



圖十二、鎂離子的存在可使支鏈澱粉酶具有較佳熱穩定性佳和活性。

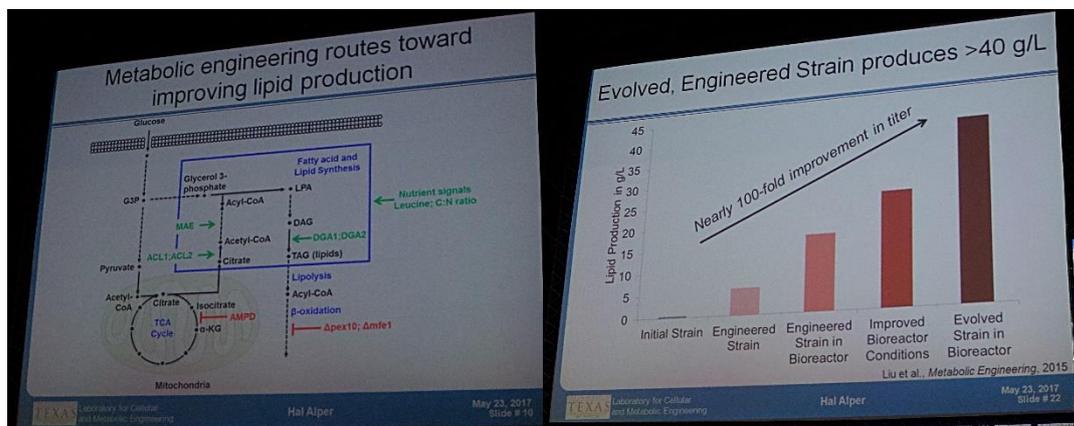
3.2.4 Metabolic Engineering of *Yarrowia lipolytica* for fuels and chemicals Production

- Prf. Hal Alper

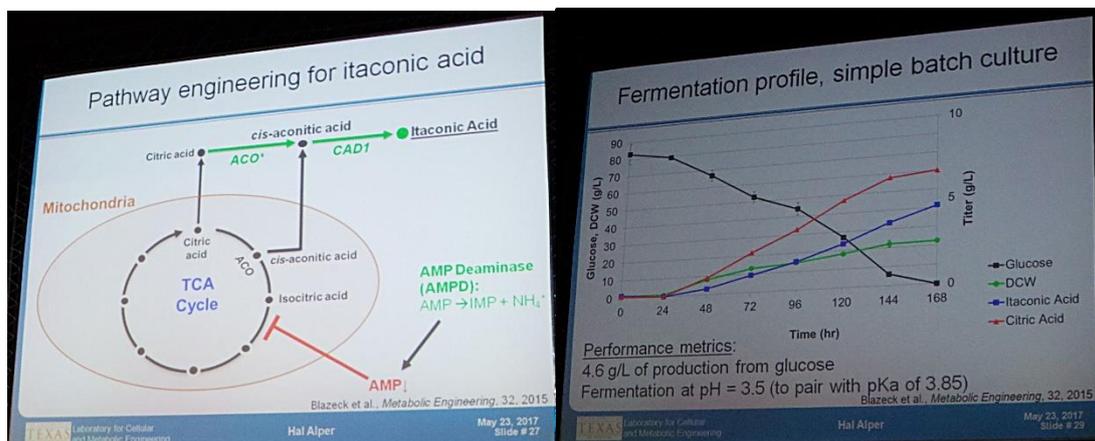
- The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA

耶氏酵母菌(*Yarrowia lipolytica*)是生產生質燃料和生質化學品的優良平台。然而由於基因工程和代謝工程的研究不足使其可用性受限制，無法有效的利用耶氏酵母生產特殊的生質化學品。在這裡，Alper 教授先以基因工程技術改造耶氏酵母菌的啟動子得到強力的雜合啟動子，使得 mRNA 的量可以提高 400 倍；再利用基因剔除及基因過表現及定向演化等分子生物學工具改造的代謝途徑。所得到的成果如下，利用代謝工程改造耶氏酵母菌產油的生合成途徑並透過發酵槽調控使得油脂的產量可達 40 g/L 較原始菌種提高 100 倍；利用代謝調控耶氏酵母菌的三羧酸循環：提高 ACO 及 CAD1 的基因表現量使得檸檬酸及順烏頭酸可以轉化為衣康酸，並以單磷酸腺苷脫氨酶漸少單磷酸腺苷的量而阻止異檸檬酸進續

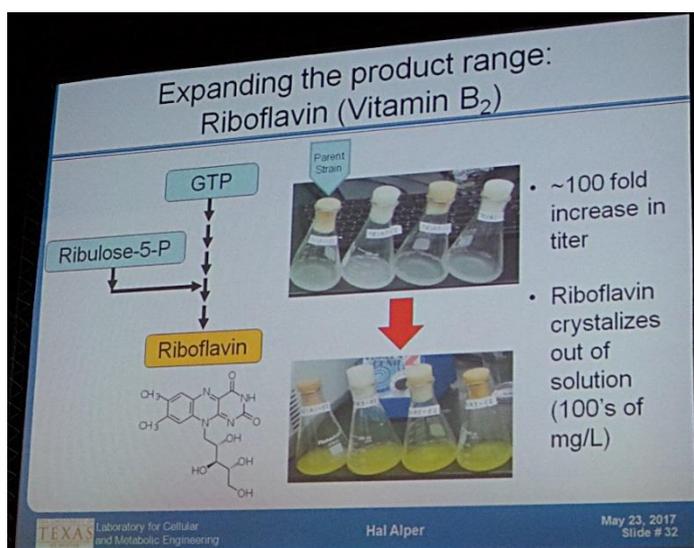
代謝為 α -酮戊二酸，使得代謝途徑可以往衣康酸的方向進行，以代謝工程及發酵槽調控可使衣康酸的產量達到 4.6 g/L；利用代謝工程使得三磷酸鳥苷及 5-磷酸核糖轉變核黃素。



圖十三、以代謝工程改造耶氏酵母菌的產油生成途徑並透過發酵槽調控使得油脂的產量可達 40 g/L。



圖十四、以代謝工程及發酵槽調控使耶氏酵母菌的衣康酸產量達 4.6 g/L。

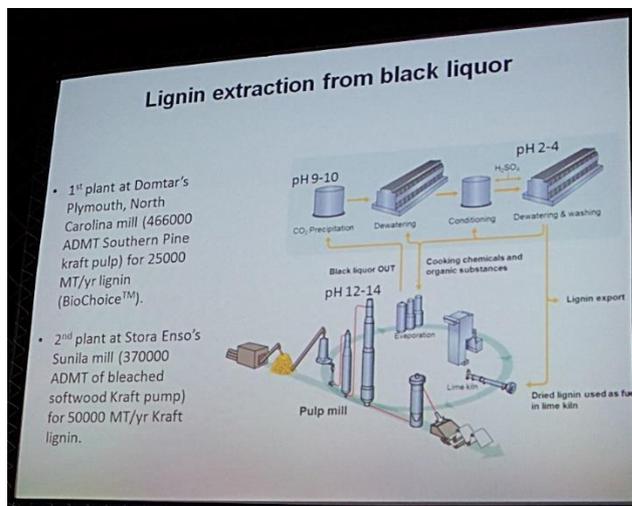


圖十五、利用代謝工程使得三磷酸鳥苷及 5-磷酸核糖轉變核黃素。

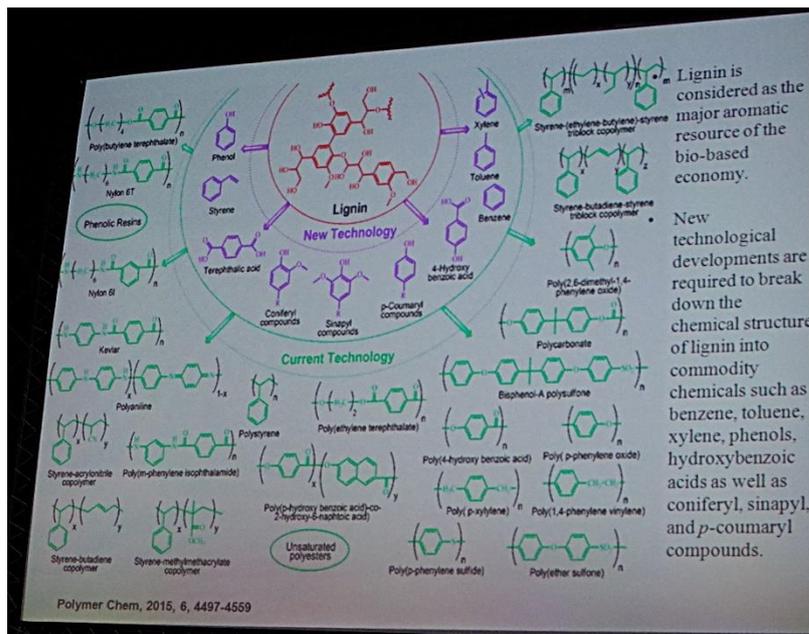
3.2.5 The use of lignin as renewable resources

- 李篤中教授
- 國立台灣大學化學工程學系, 台北, 台灣

木質素是地球上第二豐富的自然聚合物。木質素是一種難以生物降解的具有立體結構的複雜多酚類化合物。由於頁岩氣及頁岩油的開發成功及大量開採，使得低碳數(C2-C5)的生質化學品價格無法與利用頁岩氣進料的化工製程 C2-C5 化學品競爭，然 C6 以上如苯環類的成分在頁岩氣內較少，李教授提出利用木質素生產苯環類的生質化學品，在造紙工業的燒鹼法和硫酸鹽法製漿工藝產生的廢水呈黑褐色故稱作黑液，含有大量的木質素，由於造紙工業中木質素為廢棄物一般僅用於燃燒，不需要大量的運輸成本且在製漿製程中被高度濃縮，以木質素生產苯環類生質化學品極具價格競爭的優勢。



圖十六、造紙工業中木質素的產量。

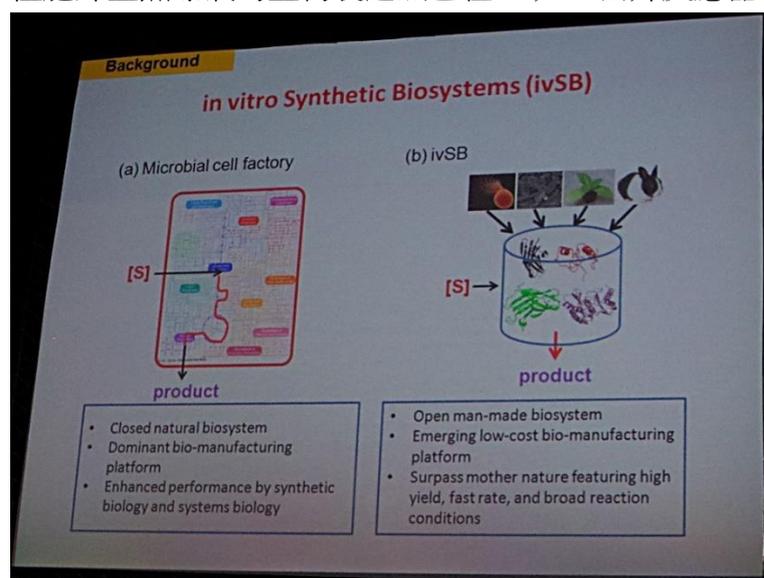


圖十七、木質素的應用。

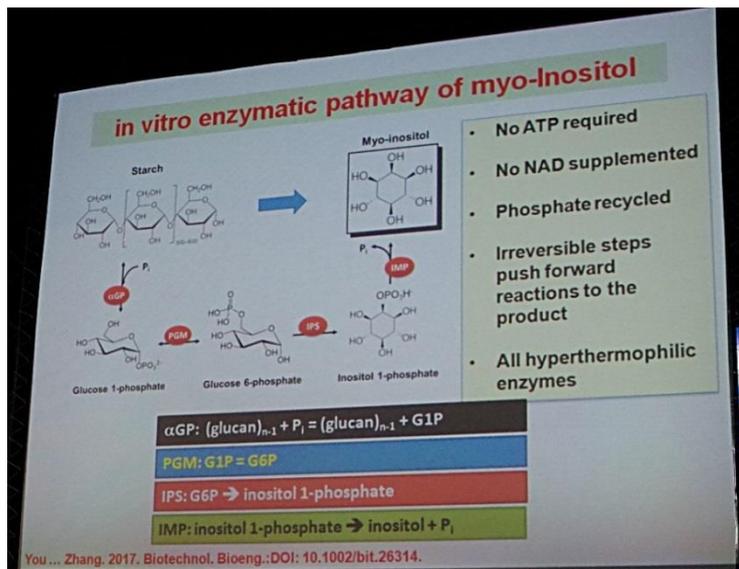
3.2.6 An in vitro synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch

-Prf. Yi Heng Percival Zhang, *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, China*

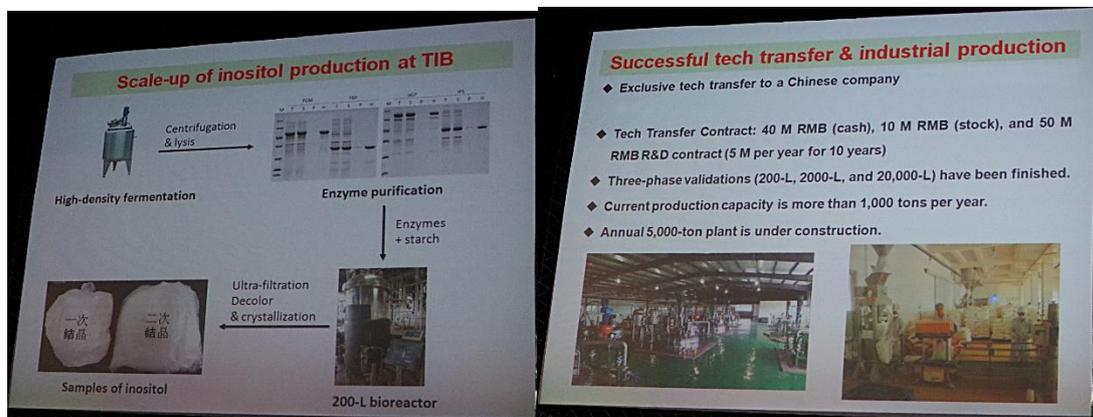
肌醇(維生素 B8)廣泛應用於藥物、化妝品、食品和飼料等行業，例如：肌醇可被廣泛地添加到保健食品，低端軟性飲料和動物飼料中，並可轉化為其他高價值的生質化學品(如葡糖二酸鹽)。傳統肌醇的生產為利用微生物為工廠將澱粉反應為肌醇，張教授提出一種新的方式：胞外合成生物系統 *in vitro synthetic biosystems (ivSB)*，透過不含 ATP 和 NAD 的四種酵素的作用在一個容器中將澱粉轉化為肌醇。這四種酵素來自嗜熱微生物來自 *thermotoga maritima*(海棲熱袍菌)的 α -葡聚醣磷酸化酶、極端嗜熱古生菌 *Thermococcus kodakaraensis* 的磷酸葡萄糖變位酶、嗜超高溫古生菌 *Archaeoglobus fulgidus* 的肌醇 1-磷酸合成酶及海棲熱袍菌的肌醇單磷酸酶。這些酵素利用大腸桿菌 BL21(DE3)進行異源表現，並以高細胞密度發酵培養提高表現量，並簡易的純化。再補充來自 *Thermococcus litoralis* 的 4- α -葡聚醣轉移酶和耐酸耐高溫古生菌 *Sulfolobus tokodaii* 的異澱粉酶，可將支鍊或線狀澱粉皆轉化為肌醇，達成 $98.9 \pm 1.8\%$ wt/wt 的高的產物產率。此種胞外且無曝氣的生物製造法已在 20,000 公升反應器規模試驗成功。



圖十八、胞外合成生物系統示意圖。



圖十九、以胞外合成生物系統生產肌醇示意圖。



圖二十、以胞外合成生物系統生產肌醇成功案例。

3.3 專題演講資料

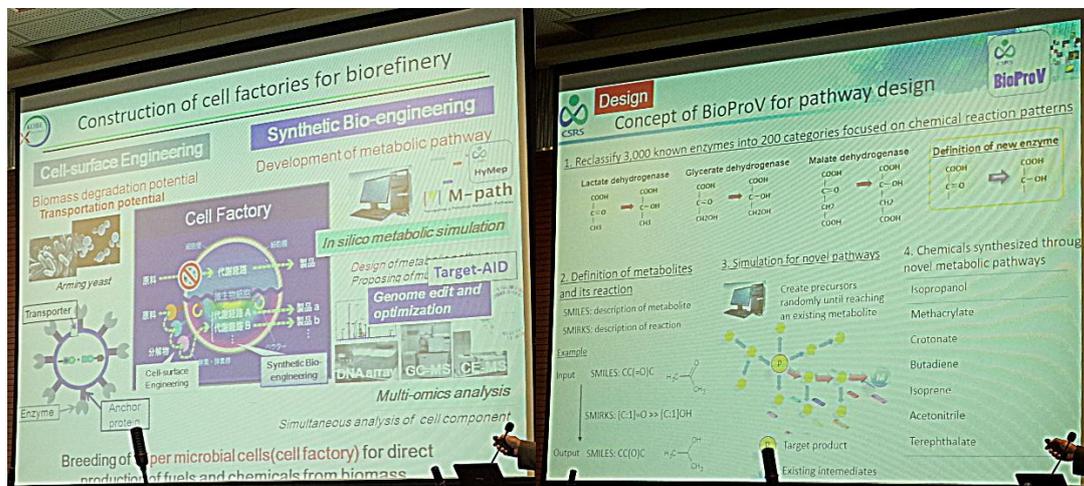
3.3.1 Development of microbial cell factories for consolidated bioprocessing by synthetic bioengineering platform

-Prf. Akihiko Kondo(近藤昭彥教授)

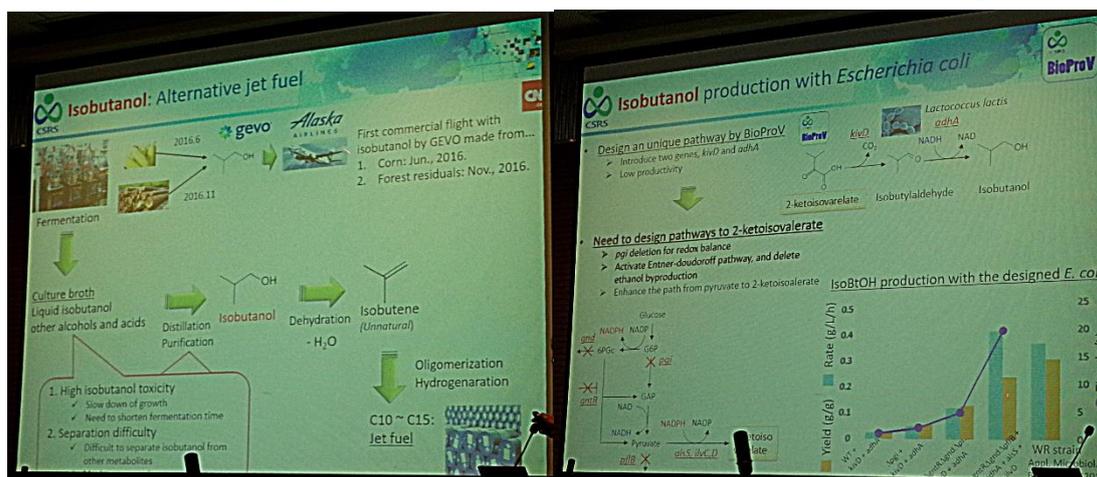
-Department of Chemical Science and Engineering, Kobe University Rokkodai, Nada, Kobe, Japan

為了減少碳排放和建設可持續發展的社會，利用生物質經由生物精鍊發展可再生的生物燃料非常重要。將酶生產、糖化和發酵整合到單一製程中的整合生物製程(Consolidated bioprocessing, CBP)是生物精鍊的有效策略。開發 CBP 微生物細胞工廠的關鍵技術之一是細胞表面工程，如在細胞表面上表現各類酵素，在釀酒酵母表面表現纖維素分解酶可使酵母菌直接生產纖維素乙醇。其次合成生物工程平台也是另一種關鍵技術，通過結合電腦輔助設計系統 (包含 *in silico* Hybrid Metabolic flux Prediction model, HyMeP 及 BioProV)，大型基因群合成系統，maloti-omics 分析系統(如 DNA 晶片、高通量定序儀、GC-MS 及 CE-MS 等)，快

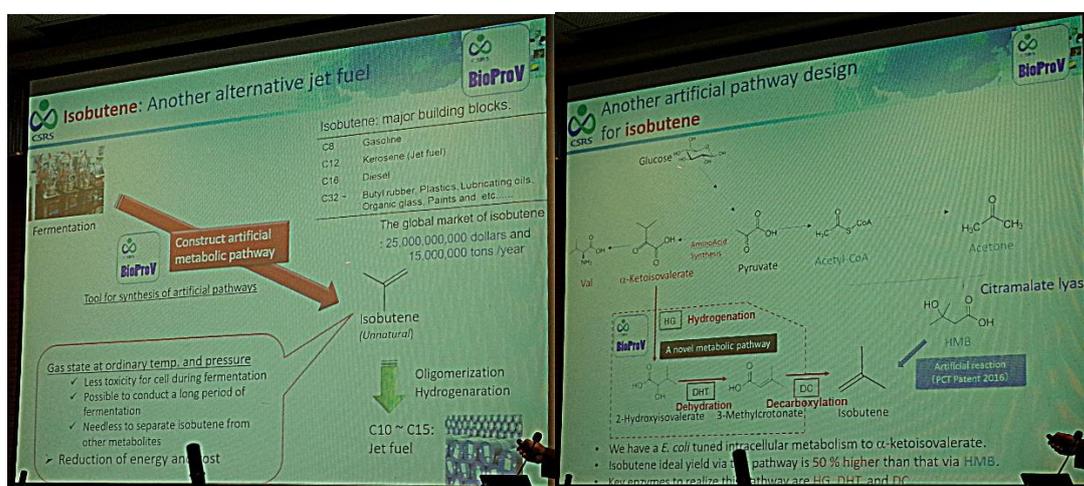
速構建適合目標化學品生產的新型代謝途。細胞表面展示酶和細胞內代謝工程的組合是開發具有工業應用的新型發酵能力的細胞的非常有效的方法。可用於生產 isobutanol 及 isobutene。



圖二十一、整合生物製程、電腦輔助設計及 multi-omics 分析系統示意圖。



圖二十二、以整合生物製程生產異丁醇。



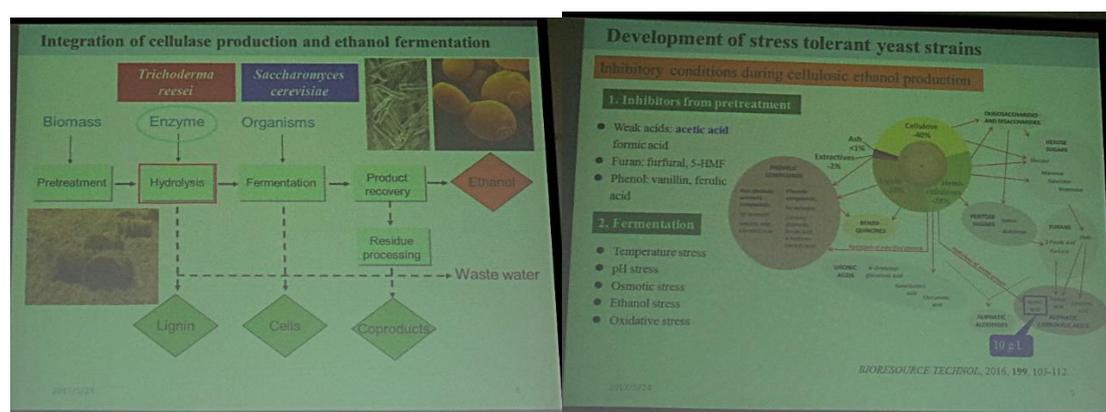
圖二十三、以整合生物製程生產異丁烯。

3.3.2 Metabolic engineering of yeast and *Trichoderma reesei* for biofuel production

-Prf. Xinqing Zhao

-School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

木質纖維素乙醇的生產過程包括生物質前處理，酵素水解和微生物發酵等關鍵步驟。開發有效的微生物細胞工廠可提高木質纖維素乙醇生產的關鍵。在趙教授的研究中，絲狀真菌里氏木黴菌常被用於生產高活性的纖維素水解酵素，利用人工鋅指狀結構(artificial zinc finger)蛋白質構建新里氏木黴菌 Rut C30 菌株可以改善纖維素酶的活性。由於木質纖維素前處理製程中釋放的抑制性化合物(如弱酸，酚類化合物和糠醛)對釀酒酵母細胞生長和乙醇發酵產生嚴重的抑制作用。因此耐受性菌株的開發極為重要。趙教授的研究發現大量表現參與鋅回應機制的關鍵蛋白質在存在抑制物的環境中可提高乙醇的生產。為了進一步了解此機制，在含有抑制物的情況下及在培養基中含有鋅及不含鋅的釀酒酵母 SPSC01 菌株以轉錄體學和蛋白質體學進行分析並發現新的功能性基因可用於提高工業釀酒酵母菌株的耐受性。



圖二十四、以基因工程改進里氏木黴菌的酵素及釀酒酵母菌的耐受性。

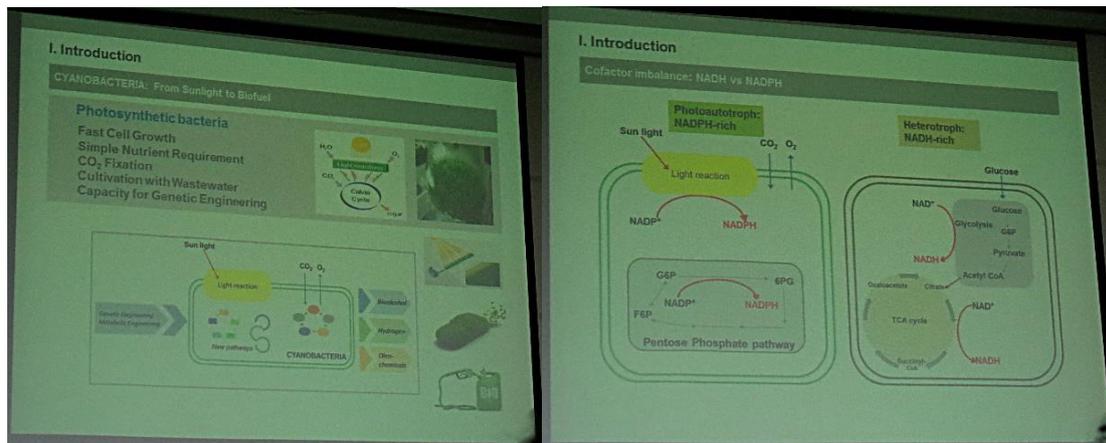
3.3.3 Co-factor engineering of Cyanobacteria for enhancing ethanol production

-Prf. Jong Moon Park (朴鍾汶教授)

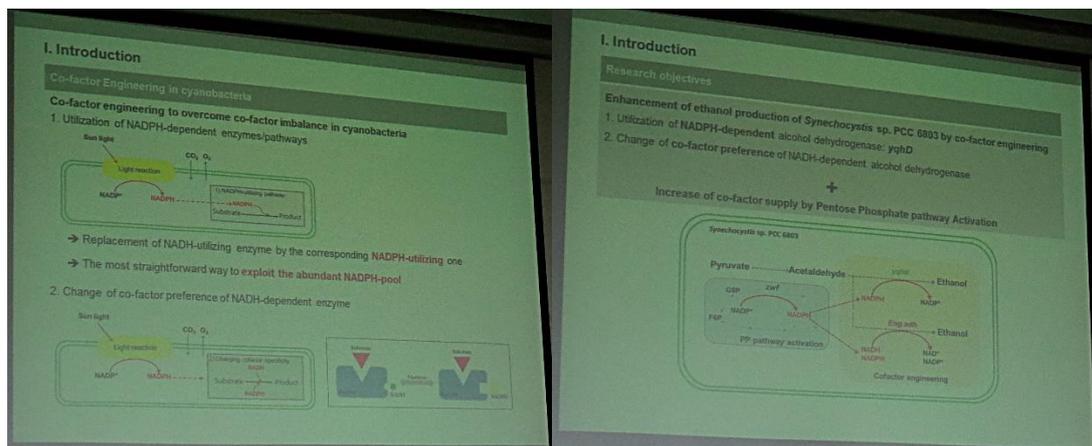
-Dept. of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang, KOREA

利用基因工程改造藍綠藻(Cyanobacteria)使其可通過光合作用將光能和二氧化碳轉化為生質燃料和高價值的生質化學品。然而，在光自營性生物中常用的輔酶(Co-factor)為 NADPH 而異營性生物則是利用 NADH 作為輔酶，為能使藍綠藻利用光合作用生產乙醇，故在在光自營性的藍綠藻內表現異營性酵母菌的酒精脫氫酶(alcohol dehydrogenase, ADH)時會產生 ADH 酵素所需的輔酶 NADH 供應不足而使得乙醇產量無法提升的情形。為能克服此問題朴教授提出兩種策略：其一，尋找並使用以 NADPH 為輔酶的酒精脫氫酶 yqhD；其二，利用蛋白質工程改造酒精脫氫酶 ADH 的輔酶結合位置使其可以改以 NADPH 作為輔酶；其三，以五碳糖磷酸途徑(Pentose Phosphate Pathway, PP pathway)增加輔酶的量；大量表現

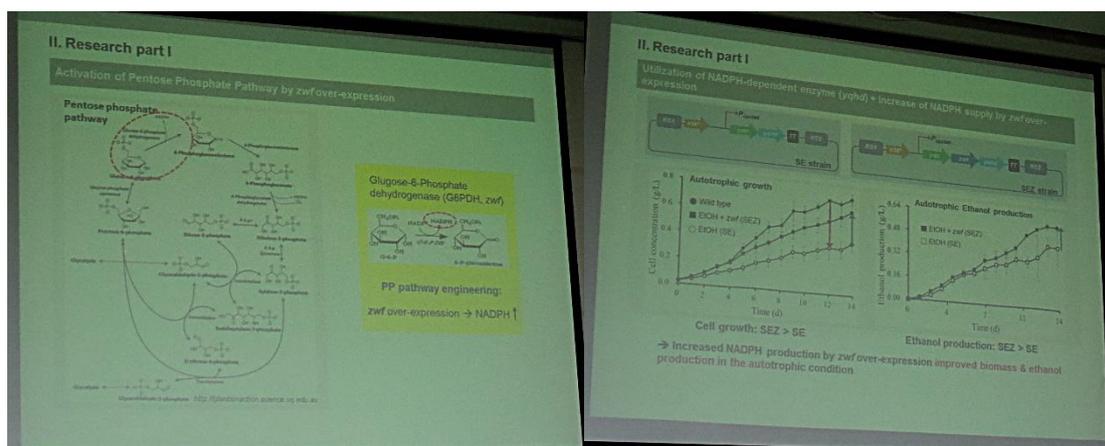
葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase) (G6PDH, zwf)使 NADPH 的量提高。



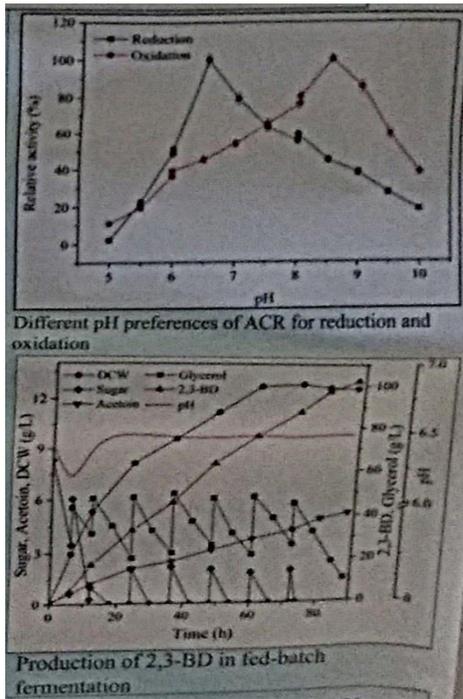
圖二十五、以藍綠藻生產生質燃料及生質化學品示意圖。光自營性生物的代謝示意圖及輔酶，異營性生物的代謝示意圖及輔酶。



圖二十六、利用藍綠藻生產乙醇的策略。



圖二十七、以五碳糖磷酸途徑增加輔酶的量及使用以 NADPH 為輔酶的酒精脫氫酶 *yqhD* 可提升藍綠藻的乙醇產量。

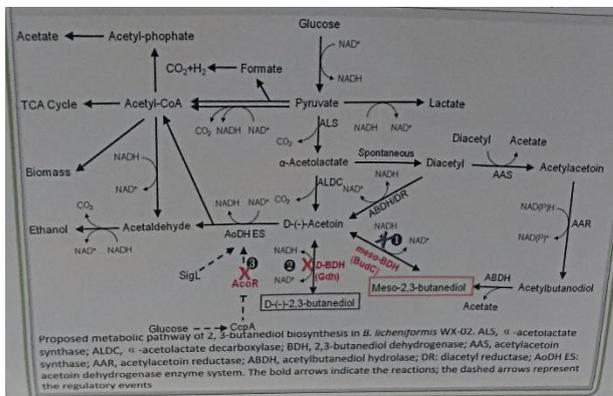


圖三十、以發酵調控提高 2,3-BDO 的產量。

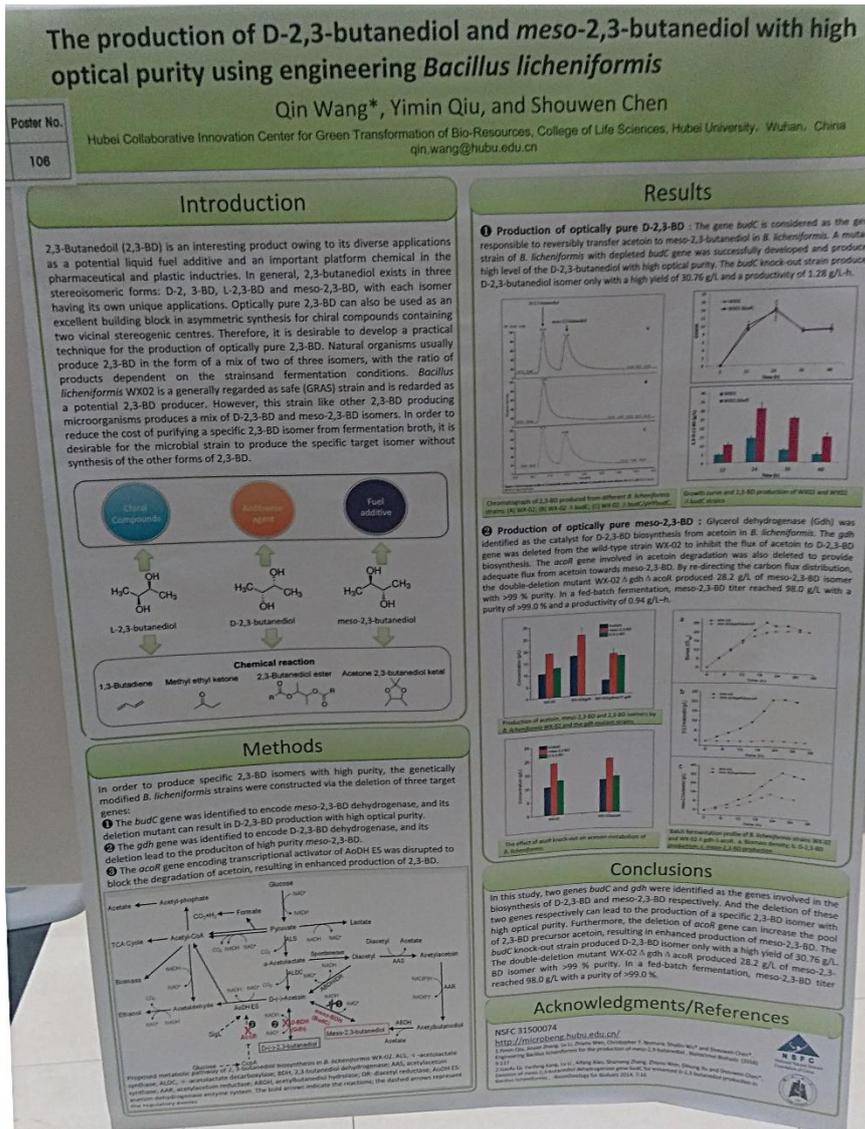
3.4.2 The production of D-2,3-butanediol and meso-2,3-butanediol with high optical purity in engineered *Bacillus licheniformis* WX02 p200

-Dr. Qin Wang, Hubei University

本篇論文發現 *budC* 基因可將 *B. licheniformis* 的 acetoin 專一的轉化為內消旋-2,3-丁二醇 (*meso*-2,3-BDO)，若將 *budC* 基因剔除的 *B. licheniformis* WX-02 菌株，可抑制 *meso*-2,3-BDO 的生成而得到高光學純度的 *D*-2,3-BDO。此外，甘油脫氫酶(*Gdh*)為 *B. licheniformis* *D*-2,3-BDO 的生合成酵素，因此 *gdh* 基因剔除可以生成高純度的 *meso*-2,3-BDO。此外，acetoin 降解的 *acoR* 基因被剔除時會增加前驅物 acetoin 的量。雙基因剔除的突變株 WX-02 Δ *gdh* Δ *acoR* 在搖瓶培養時可生產 28.2 g / L 的大於 99%純度的 *meso*-2,3-BDO。利用饋料批次培養的發酵策略，WX-2 Δ *gdh* Δ *acoR* 菌株可生產高達 98.0 g / L 的 *meso*-2,3-BDO。



圖三十一、以代謝工程改良 *B. licheniformis* 的 2,3-BDO 代謝途徑示意圖。



圖三十二、meso-2,3-BDO 的搖瓶及發酵槽產量。

3.4.3 Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for high-efficient succinate production at low pH value p86

-A. Zhiyong Cui, B. Cuijuan Gao, C. Jiaojiao Li, D. Qingsheng Qi
 -State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, China

本篇論文利用耶氏酵母菌生產琥珀酸。耶氏酵母菌具有積累檸檬酸循環中間體和對極端 pH 值環境的耐受性的優勢。過去該實驗室建構琥珀酸脫氫酶缺陷株 PGC01003，然而副產物的過度積累和 pH 調節的附加程序限制其生產規模。作者發現醋酸鹽積累是 SDH 缺陷株生產琥珀酸的限制因子，故以代謝工程技術改善菌株的琥珀酸生產。乙醯輔酶 A 水解酶 (acetyl-CoA hydrolase, ACHyI) 剔除的 PGC11505 菌株可去除乙酸鹽的積累，證實乙醯輔酶 A 的 CoA 轉移反應與醋酸的累積有關而非丙酮酸脫羧反應。經由分別大量表現氧化型三羧酸循環、還原性羧化(carboxylation)反應和乙醛酸循環(Glyoxylate cycle)分支的關鍵酵素，以解決

4.心得及建議

4.1 心得

-由本次大會的主題演講及專題演講為例，生質化學品逐漸取代生質燃料成為學術界的熱門研究主題

參與本次的 IFIBiop2017 國際研討會，大會的各種演講中可以發現由於低油價對於生質能源的衝擊使得研究人員及學者的研究方向更多朝向較高價的生質化學品進行。在生質乙醇的研究上也可發現第二代纖維素乙醇難以商業運轉的問題，包括木質纖維素廢棄物的回收成本過高及無其他副產物而無法支撐第二代乙醇工廠的商轉，因而傾向結合第一代及第二代的生質乙醇工廠將木質纖維素發酵後的產物也轉化為高價值的副產物。此外因廉價且大量的頁岩氣開採，而壓縮生質化學品的空間，如台灣大學的李篤中教授即提出因 C2-C5 的生質化學品將可能無法與頁岩氣生產的低價石化產品競爭，故改以頁岩氣無法生產之 C6 以上生質化學品為主力，並從造紙及紙漿工業的木質素廢棄物進行轉化，除了有價格優勢外也無須再耗費運輸回收的費用。另外城市的廢棄物處理及廢水處理也是大會討論的重點之一，將城市的廚餘及有機物垃圾以厭氧發酵可以得到生質甲烷可以做為燃料及發電使用。

-中國大陸的學術研究水準已逐漸提高

本次 IFIBiop2017 國際研討會於江蘇無錫召開吸引許多中國大陸的學者參與，會中可發現許多研究學者皆有傑出表現，如北京清華大學化工系的邢新會教授開發的以常溫氫氣等離子作為生物誘變的技術已經授權與廠商並開發出第一代及第二代的誘變儀，中國科學院的 Yi-Heng Percival Zhang 教授提出的胞外合成生物系統 *in vitro synthetic biosystems (ivSB)* 可以在細胞外直接以酵素反應合成高價值的肌醇，並技轉至公司進行商業開發及販售。在專題演講上，上海交通大學的趙心清教授在里氏木酶纖維素酶及釀酒酵母菌耐受性的研究獲得許多高點數國際期刊的刊登，而會場也有數篇高產量的琥珀酸及 2,3-丁二醇的壁報論文發表，觀察其論文的品質及研究成果皆較 2014 年於法國的 IFIBiop 研討會上所見有長足的進步。

4.2 建議

-積極參與國際研討會並加強與國際研究單位之交流及合作

本次參與國際研討會，除了瞭解國際上生質燃料及生質精煉領域的最新趨勢、發展方向及研究成果，並可由各類型演講及論文發表得到新的研究構想。由於幅員遼闊、人口及市場龐大、對能源的需求量高及研究經費充足等因素，各種類型的生質燃料及生質精煉研究正於中國大陸的蓬勃發展，許多大專院校及研究單位皆在以代謝工程及基因工程技術改良微生物，因此增加與中國大陸學術界的交流可以得到多類型及不同市場應用的生質燃料及生質精煉相關資訊。此外日本與韓國的生質燃料及生質精煉研究雖然沒有廣泛的主題但是對於個別的項目有較為專精及先進的研究，如近藤昭彥教授開發的合成生物工程平台可以依據個別

需求設計新的微生物代謝途徑，以及朴鍾汶教授對於藍綠藻的深入研究。因此定期參加國際研討會並與與會的國際學者交流，得到第一手的研發資料及了解各國的先進的生質燃料及生質精煉研究趨勢對於國內生質燃料及生質精煉產業的發展將有莫大的幫助。由於大型會議主題豐富，只派一名研究員參與較無法全面的吸收新知及並與更多學者交流，未來計畫編列時若具有較大的彈性，有較多的經費及較多人員一同參加大型會議可以獲得更多的資訊及合作機會。

5.參考資料

- (1) Bioresource technology, 2016, 199, 103-112
- (2) Park et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21, 1208-1214
- (3) 郭雪、曾經洲，作物非農藥管理技術手冊-蘇力菌及其應用，
www.tactri.gov.tw/wSite/public/Attachment/fl380527766947.pdf
- (4) 陳淵國，乾燥玉米酒粕-畜產試驗所新竹分所，
<http://www.tlrihc.gov.tw/dgek/%E9%85%AA%E8%BE%B2%E5%A4%A9%E5%9C%B0/dhi74/dhi74P32.htm>