

發酵培養生產色胺酸之研究=studies on production of l-tryptophan by fermentative cultivation

黃淑貞、涂瑞澤；洪淑嫻

E-mail: 9115134@mail.dyu.edu.tw

摘要

色胺酸在自然界中的含量並不多，其主要存在於肉類、蛋、奶等動物性食品中；植物性食品除馬鈴薯外，在禾穀類如稻米、小麥等主要糧食及飼料作物中含量均低，其製備法可分為下列四種，分別為：蛋白質水解法、化學合成法、酵素轉換法及發酵法，而本研究中所用的方法為發酵法。影響L-tryptophan產率的因素主要有培養基組成與培養條件。培養基組成包括碳源種類、天然氮源種類和無機氮源種類，而培養條件包括 pH對生產L-tryptophan的影響，以及利用非連續饋料培養對生產L-tryptophan之影響。本研究先以Corynebacterium glutamicum 21334 (CCRC 12511)為生產菌株，但是此菌株在培養過程中並無L-tryptophan的生產，因此決定以人工突變方式改良菌株。在突變改良過程中，先以化學突變劑NTG處理，再配合適當之篩選策略篩選出可能具生產力之菌株，然而經過一連串試驗後發現無法達成改良菌種之目的，亦即，變異株仍無顯著的跡象能生產L-tryptophan。因此，決定更換菌株，改用Brevibacterium flavum ATCC 21427(CCRC 12509)，經生產培養基測試後該菌株確定有L-tryptophan的產生，因此，以此菌株進行培養基的配方與培養條件的探討，而培養基配方包括碳源的種類(葡萄糖、果糖及蔗糖)、天然氮源的種類(酵母萃出物與蛋白胨)以及無機氮源的種類(硫酸銨與氯化銨)，培養條件包括 pH對生產L-tryptophan的影響，以及利用非連續饋料培養對生產L-tryptophan之影響。培養基配方實驗結果顯示，碳源與天然氮源對菌體與L-tryptophan之生長均有顯著影響。使用葡萄糖與酵母萃出物時可得最佳L-tryptophan之產量；而使用蔗糖時，菌體量雖可達最高，但是L-tryptophan偏低，而無機氮源對菌體生長與L-tryptophan之產量則無顯著差異。利用30 mL之培養基裝液量，於30 °C，150 rpm下振盪培養96 h後，其發酵液中累積0.01 g/L之L-色胺酸。此外，本研究並探討pH與生產L-tryptophan之關係，分別將pH控制在6.0、7.0和8.0進行培養，結果顯示，當pH值控制在7.0時為最佳。以3 L之發酵槽進行非連續批式培養法進行L-色胺酸生產試驗，其操作條件為：接種量2%，培養溫度30 °C，攪拌速率250 rpm，pH 7.0，裝液量2 L，總糖濃度約為4%，在此條件培養約35 h，L-色胺酸產量可達0.02 g/L。因此，以葡萄糖為追加液時，可使碳源濃度維持固定濃度，使菌體在碳源充足且不至於引起抑制效果的狀態下生長，因此利用非連續饋料批式培養法，可得較高之L-tryptophan產量。 關鍵詞：L-tryptophan、變異、發酵、非連續饋料批式培養

關鍵詞：L-tryptophan；非連續饋料批式培養；發酵；變異

目錄

目錄封面內頁	頁次	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	英文摘要	vi	誌謝	ix	目錄	x	圖目錄	xiii	表目錄	xv																																																				
第一章	緒論	1	第二章	文獻回顧	3	2.1	色胺酸之簡介	3	2.2	色胺酸之功能及特性	4	2.3	色胺酸之生產方法	10	2.3.1	蛋白質水解法	10	2.3.2	化學合成法	10	2.3.3	酵素轉換法	10	2.3.4	發酵法	11	2.4	L-Tryptophan與細胞能量之需求	13	2.5	菌種之變異	21	2.5.1	變異株之種類及分離法	21	2.5.2	變異株的應用與改良策略	22	2.5.2.1	抗生素生產菌之改良	22	2.5.2.2	胺基酸或核酸關連物質生產菌之改良	24	2.6	基因工程	24	2.7	L-色胺酸生產菌之培育	27																		
第三章	材料與方法	28	3.1	實驗材料	28	3.1.1	菌株	28	3.1.2	器材	28	3.1.3	藥品	29	3.1.4	培養基組成	30	3.2	培養方法	30	3.2.1	活化培養	32	3.2.2	繼代培養	32	3.2.3	試管培養法	32	3.2.4	預培養	33	3.2.5	搖瓶培養	33	3.2.6	發酵槽之操作步驟	33	3.2.7	發酵培養	34	3.2.8	變異程序	34	3.2.9	致死曲線	35	3.3	分析方法	37	3.3.1	菌體量分析	37	3.3.2	葡萄糖之定量	39	3.3.3	L-色胺酸之定量	39									
第四章	結果與討論	41	4.1	前言	41	4.2	以Corynebacterium glutamicum 21334為生產菌株	42	4.2.1	菌體生長與L-色胺酸生產	42	4.3	Corynebacterium glutamicum 21334之變異	46	4.3.1	變異之致死曲線與結果	46	4.3.2	篩選菌株之結果	49	4.4	最適培養基之探討	53	4.4.1	培養基測試結果	53	4.4.2	利用變異數分析法探討培養基配方與產量之關係	55	4.5	pH對Brevibacterium flavum發酵之影響	59	4.6	饋料批式發酵培養法	60	4.7	結論	64																														
第五章	結論與未來展望	68	5.1	結論	66	5.2	未來展望	67	參考文獻	71	圖目錄	圖2.1	色胺酸分子之構造	3	圖2.2	色胺酸轉換成??乙酸 (IAA) 之生合成路徑	6	圖2.3	色胺酸轉換成serotonin之生合成路徑	6	圖2.4	色胺酸合成酵素將??和L-絲胺酸轉換成L-色胺酸	11	圖2.5	色胺酸酵素作用機制	12	圖2.6	酵素轉換半合成法之作用機制及其受氧化作用產生之副產物	15	圖2.7	細菌體內芳香族胺基酸之生合成路徑	16	圖2.8	大腸桿菌 K-12生合成芳香族胺基酸之代謝調節作用	17	圖2.9	Brevibacterium flavum生合成芳香族胺基酸之代謝調節作用	18	圖2.10	Corynebacterium glutamicum生合成L-色胺酸之代謝調節作用	19	圖3.1	變異流程圖	36	圖3.2	樣品分析流程圖	38	圖4.1	發酵過程中菌體濃度、L-色胺酸產量、pH及葡萄糖濃度隨時間變化之關係圖	43	圖4.2	發酵過程中菌體濃度、L-色胺酸產量、pH及葡萄糖濃度隨時間變化之關係圖	45	圖4.3	致死曲線及篩菌流程圖	47	圖4.4	變異後所得之致死曲線	48	圖4.5	菌株No.7以發酵槽培養之發酵過程中菌體對L-色胺酸隨時間變化之關係圖	52	圖4.6	pH值為6.0培養時，發酵過程中菌體濃度、葡萄糖濃度及L-色胺酸濃度隨時間變化之關係圖	61	圖4.7	pH值為7.0培養時，發酵過程中菌體濃度、葡萄糖濃度	

及L-色胺酸濃度隨時間變化之關係圖 62 圖4.8 pH 值為8.0培養時，發酵過程中菌體濃度、葡萄糖濃度及L-色胺酸濃度隨時間變化之關係圖 63 圖 4.9 饋料葡萄糖溶液的批式發酵下菌體濃度、葡萄糖濃度及L-色胺酸濃度隨時間變化之關係圖 65 表目錄表2.1 日本企業界發展色胺酸生產之狀況 8 表2.2 L-色胺酸生產菌 14 表2.3 微生物變異株之種類 22 表3.1 培養基組成 31 表3.2 NTG 變異後所得之致死率及存活率 表3.3 L-色胺酸生產之測試 表4.1變異後所得之致死率與存活率 48 表4.2 L-色胺酸生產之測試 50 表4.3以各種不同培養基培養*B. flavum* ATCC 21427 所得的菌體與L-色胺酸之濃度 54 表4.4三因子變異表分析公式 56 表4.5 不同培養基配方對菌體濃度之ANOVA分析 58 表4.6不同培養基配方對L-色胺酸濃度之ANOVA分析 58

參考文獻

參考文獻 1.王文憲 (1991) 生物化學要論, p.299合記圖書出版社,台北. 2.李宛儒 (1996) 利用*Brevibacterium divaricatum* 營養要求性變異株發酵生產色胺酸之研究.國立台灣農業化學研究所碩士論文. 3.黃伯超, 游素玲 (1992) 營養學精要, p.148-152,p.720. 健康文化事業股份有限公司, 台北. 4.黃清龍 (1998) 生物技術的發展與應用, p.52-63,九州圖書文物有限公司, 台北. 5.郭坤地, 張天鴻 (1989) 胺基酸產業市場調查, 財團法人生物技術開發中心. 6.張為憲 (1984) 高等食品化學, p.67-103.華香園出版社, 台北. 7.劉英俊 (1996) 最新微生物應用工業, p.81-82.中央圖書出版社, 台北. 10.Gish, K., and C. Yanofsky (1993) Inhibition of expression of the tryptophanase operon on *Escherichia coli*. Byextrachromosomal copies of the *trnA* leared region. *J. Bacteriol.* 175:623-627. 11.Hagino, H., and K. Nakaoyama (1975) L-tryptophan production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine and tyrosine double auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agri. Bio. Chem.*, 39 (2) :343-349. 12.Hirahara, T., S. Suzuki, S. Horinouchi and T. Beppu (1992) Cloning, nucleotide sequences, and overexpression in *Escherichia coli* of tandem copies of a tryptophanase gene in an obligately symbiotic thermophile, *symbiobacterium thermophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (8) :2633-2642. 13.Hwang, S. O., G. H. Gil, Y. J. Choi, K. R. Ksng, J. K. Lee and J. C. Bae (1985) The fermentation process for L-phenylalanine production on using an auxotrophic regulatory mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22:108-113. 15.Ikeda, M., K. Nakanishi, K. Kino and R. Kasumata (1994) Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 (4) :674-678. 16.Ikeda, M., and R. Katsumata, (1995) Tryptophan Production by Transport Mutants of *Corynebacterium glutamicum* *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 (8) :1600-1602. 17.Ishiwata, K., N. Fukuhara, M. Shimada, N. Makiguchi and K. Soda (1990) Enzymatic production of L-tryptophan from DL-serine and indole by a coupled reaction of tryptophan synthase and amino acid racemase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12 (2) :141-149. 18.Kupfer, D., and D. E. Atkinson (1964) Quantitative method for determination of indole, tryptophan and anthranilic acid in the same aliquot. *Anal. Biochem.*, 8:82-94. 19.Methews, C. K., and K. E. van Holde (1990) *Biochemistry*, p.716-726. The Benjamm/Cummings Publishing. 20.Sano, K., K. Yokozeki, C. Eguchi, T. Kagaw, I. Noda and K. Mitsugi (1977) Enzymatic production of L-tryptophan from L- and DL-5-indolymethylhydation by newly isolated bacterium. *Agri. Bio. Chem.*, 41 (5) :819-825. 21.Shiio, I., H. Sato and M. Nakagawa (1972) L-tryptophan production by 5-methyltryptophan-resistant mutant of glutamate-producing bacteria. *Agri. Bio. Chem.*, 36 (13) :2315-2322. 22.Shiio, I., S. I. Sugimoto and M. Nakagawa (1975) Production of L-tryptophan by mutants *Brevibacterium flavum* resistant to both tryptophan and phenylalanine analogues. *Agri. Bio. Chem.*, 39 (3) :627-635. 23.Shiio, I., S. I. Sugimoto and M. Nakagawa (1982) Production of L-tryptophan by azaserine-resostant mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agri. Bio. Chem.*, 46 (7) :1849-1854. 24.Shiio, I., S. I. Sugimoto and K. Kavamura (1988) Breeding of phenylalanine-producing *Brevibacterium flavum* strains by removing feedback regulation of both the two key enzymes in its biosynthesis. *Agri. Bio. Chem.*, 52 (9) :2247-2253. 25.Sugimoto, S. I., and I. Shiio (1977) Enzymes of the tryptophan synthetic pathway in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.*, 81:823-833. 26.Su, Y. C., and K. Yamada (1960) Studies on L-glutamic acid-producing strain and its taxonomical studies. *Bull. Agri. Chem. Soc. Jpn.*, 24 (1):69-74. 27.Terasawa, M., M. Inui, Y. Uchida, M. Kobayashi, Y. Kurusu and H. Yukawa (1991) Application of the tryptophanase promoter to high expression of the tryptophan synthase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34:623-627. 28.Udenfriend, S., and R. E. Peterson (1957) *Methods of Enzymology* (Colowick, S. P., and N. O. Kaplan), 4:613-614. Academic Press, New York. 29.Windholz, M. (1983) *The Merck Index an Encyclopedia of chemicals and drugs*.10th Ed., p. 9601. Merck, NJ.