

# 利用變異技術提昇CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM生產色胺酸之研究

李明貞、涂瑞澤、洪淑嫻

E-mail: 9126185@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、小麥等主要糧食與飼料作物中含量均低，其製備法有下列四種，分別為：蛋白質水解法、化學合成法、酵素轉換法及發酵法，其中發酵法是利用廉價之碳源與氮源等物質，直接進行發酵反應，符合低生產成本，故本研究中所用的方法為發酵法。本實驗先以CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM -UM CCRC 12511，進行搖瓶培養，但並無生產L-色胺酸之跡象，因此決定以人工突變方式改良菌株。再配合適當之篩選策略篩選出可能具生產力之菌株，然而CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 12511經過一連串試驗後發現無法達成改良菌種之目的，即變異株仍無顯著的跡象能生產L-色胺酸。因而改用CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631，進行搖瓶培養，但其無生產L-色胺酸之跡象，故亦對CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631進行突變，再經篩選出可能具生產力之變異株NO.195。以CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631所篩選出可能具有生產L-色胺酸潛力之變異株NO.195，利用實驗設計法進行探討此菌株在不同培養條件對菌體濃度與L-色胺酸濃度的影響，培養條件包括：葡萄糖初始濃度、有機氮源種類及培養時間。實驗結果經變異數分析 (ANALYSIS OF VARIANCE, ANOVA)得知，葡萄糖初始濃度、有機氮源種類及培養時間對菌體濃度皆有影響。葡萄糖初始濃度與有機氮源種類對L-色胺酸濃度有影響，而培養時間對L-色胺酸濃度並無影響。根據實驗結果所得之最適培養條件 葡萄糖初始濃度為40 G/L、有機氮源種類為玉米浸泡液及培養時間為72 H。再以變異株NO.195於30℃，150 RPM振盪培養72 H，其發酵液中L-色胺酸濃度累積達8.374 MG/L。再以3 L發酵槽進行L-色胺酸生產發酵培養試驗，其操作條件為：接種量2%，培養溫度30℃，攪拌速率250 RPM，PH 7.0，裝液量2 L，總糖濃度為4%，L-色胺酸產量可達13.5 MG/L。

關鍵詞：L-色胺酸、變異、發酵、CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

## 目錄

第一章 緒論	--P1
第二章 參考文獻	--P3
2.1 色胺酸簡介	--P3
2.2 色胺酸之生產方法	--P6
2.2.1 蛋白質水解法	--P6
2.2.2 化學合成法	--P10
2.2.3 酵素轉換法	--P10
2.2.4 發酵法	--P12
2.3 菌株之變異	--P12
2.3.1 變異株之種類	--P15
2.3.2 變異株之應用	--P15
2.4 菌種之篩選與改良策略	--P15
2.4.1 菌株生理及遺傳特性	--P17
2.4.2 傳統色胺酸生產菌之育種	--P19
第三章 材料與方法	--P25
3.1 實驗材料	--P25
3.1.1 菌株	--P25
3.1.2 藥品	--P25
3.1.3 培養基組成	--P26
3.2 實驗設備	--P26
3.3 實驗方法	--P28
3.3.1 培養方法	--P28
3.3.1.1 菌種之保存	--P28
3.3.1.2 菌種之活化	--P29
3.3.1.3 預培養	--P29
3.3.1.4 二次培養	--P29
3.3.1.5 搖瓶培養	--P29
3.3.1.6 發酵槽培養	--P29
3.3.2 變異株之誘導與分離	--P31
3.3.2.1 NTG處理	--P31
3.3.2.2 致死曲線	--P33
3.3.2.3 抗生素濃縮	--P33
3.3.2.4 菌株營養要求性之鑑定	--P35
3.3.3 分析方法	--P35
3.3.3.1 菌體濃度分析	--P35
3.3.3.2 葡萄糖之定量	--P37
3.3.3.3 L-色胺酸之定量	--P37
第四章 結果與討論	--P38
4.1 前言	--P38
4.2 以CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 12511生產L-色胺酸	--P38
4.3 CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 12511之變異	--P41
4.3.1 CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 12511NTG之處理	--P41
4.3.2 篩選菌株	--P44
4.4 以CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631生產L-色胺酸	--P44
4.5 CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631之變異	--P50
4.5.1 CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 11631NTG之處理	--P50
4.5.2 L-色胺酸生產菌株之分離	--P53
4.6 最適培養條件之探討	--P60
4.7 變異株NO.195發酵培養	--P67
第五章 結論與未來展望	--P71
5.1 結論	--P71
5.2 展望	--P72
參考文獻	--P74
附錄一 葡萄糖標準曲線	--P77
附錄二 色胺酸標準曲線	--P78
附錄三 CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM CCRC 12511之變異株L-色胺酸生產試驗	--P79

## 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, 國立台灣大學農業化學研究所, 碩士論文。
- 3.黃伯超與游素玲 (1992) 營養學精要, P. 148 - 152, P. 720, 健康文化事業, 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.張為憲 (1984) 高等食品化學, P. 67 - 103, 華香園出版社, 台北。
- 6.張雪華、黃種金、徐敬衡及華傑 (1994) 胺基酸產業趨勢分析, P.5, 食品工業研究所, 新竹。
- 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。
- 8.蘇遠志與黃世佑 (1994) 微生物化學工程, P. 243 - 256, 華香園出版社, 台北。
- 9.ADELBERG, E. A., AND J. W. MEYERS (1953) MODIFICATION OF THE PENICILLIN

TECHNIQUE FOR THE SELECTION OF AUXOTROPHIC BACTERIA, J. BACTERIOL., 65:348 - 353. 10.GISH, K., AND C. YANOFSKY ( 1993 ) INHIBITION OF EXPRESSION OF THE TRYPTOPHANASE OPERON ON ESCHERICHIA COLI BY EXTRACHROMOSOMAL COPIES OF THE TNA LEADER REGION, J. BACTERIOL., 175(11):3380 - 3387. 11.HAGINO, H., AND K. NAKAOYMA ( 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.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. 13.IKEDA, M., K. NAKANISHI, K. KINO AND R. KATSUMATA ( 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. 14.IKEDA, M., AND R. KATSUMATA ( 1995 ) TRYPTOPHAN PRODUCTION BY TRANSPORT MUTANTS OF CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM, BIOSCI. BIOTECH. BIOCHEM., 59(8):1600 - 1602. 15.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. 16.MARTIN, J. F., R. SANTAMARIA, H. SANDOVAL, G. DEL REAL, L. M. MATEOS AND J. A. AGUILAR (1985) CLONING SYSTEMS IN AMINO ACID-PRODUCING CORYNEBACTERIA, BIO/TECHNOLOGY, 5(7) :137 - 146. 17.MATHEWS, C.K. AND K.E. VAN HOLDE (1990) BIOCHEMISTRY, P. 716-726, THE BENJAMIN/CUMMINGS PUBLISHING, REDWOOD CITY, CA. 18.SHIIO, I., H. SATO AND M. NAKAGAWA ( 1972 ) L-TRYPTOPHAN PRODUCTION BY 5-METHYL-TRYPTOPHAN-RESISTANT MUTANT OF GLUTAMATE-PRODUCING BACTERIA, AGRI. BIO. CHEM., 36 ( 13 ) :2315 - 2322. 19.SHIIO, I., S. I. SUGIMOTO AND M. NAKAGAWA ( 1975 ) PRODUCTION OF L-TRYPTOPHAN BY MUTANT BREVIBACTERIUM FLAVUM RESISTANT TO BOTH TRYPTOPHAN AND PHENYLALANINE ANALOGUES, AGRIC. BIOL. CHEM., 39 ( 3 ) :627 - 635. 20.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 ENZYME S IN ITS BIOSYNTHESIS, AGRI. BIO. CHEM., 52 ( 9 ) :2247 - 2253. 21.SU, Y. C., AND K. YAMADA (1960) STUDIES ON L-GLUTAMIC ACID PRODUCING STRAIN AND ITS TAXONOMIC STUDIES, BULL. AGRIC. CHEM. SOC. JPN., 24(1):69 - 74. 22.SUGIMOTO, S. I., AND I. SHIIO ( 1977 ) ENZYMES OF THE TRYPTOPHAN SYNTHETIC PATHWAY IN BREVIBACTERIUM FLAVUM, J. BIOCHEM., 81:823 - 833. 23.WINDHOLZ, M. (1983) THE MERCK INDEX-AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS AND DRUGS, 10TH ED., P. 9601, MERCK, NJ. 24.YOKOTA, A. AND S. TAKAO (1984) CONVERSION OF PYRUVIC-ACID FERMENTATION TO TRYPTOPHAN PRODUCTION BY THE COMBINATION OF PYRUVIC-ACID PRODUCING MICROORGANISMS AND ENTEROBACTER AEROGENE HAVING HIGH TRYPTOPHAN ACTIVITY, AGRIC. BIOL. CHEM., 48(11):2663 - 2668.