

生物合成聚離胺酸之研究

沈名豪、施英隆

E-mail: 9314402@mail.dyu.edu.tw

摘要

-聚離胺酸(-PL)是經由微生物發酵生產的天然生物性材料。聚離胺酸具有水溶性、生物可分解以及可食用，並且對於人類和環境不具毒性。-PL是 α 鍵連結在L-離胺酸的 α -羧基和 β -胺基之間的均質聚合胺基酸。-PL顯示出寬廣範圍的抗微生物活性而且在高溫以及在酸性和鹼性條件下很穩定。-PL具有抗菌活性能對抗大多數革蘭氏陽性和陰性細菌、真菌和一些種類的病毒。在日本，-PL廣泛使用於食物防腐劑。-PL吸引人的性質是具有抗菌以及陽離子，這些不同特徵可應用在藥物、環保、殺蟲劑和電子材料設計等不同領域。本研究是以培養基M3G做為Streptomyces albulus IFO 14147生產聚離胺酸之基礎培養基，使用回應曲面法探討培養基M3G中之酵母萃取物、葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 對聚離胺酸產量的影響，並藉此改進培養基M3G組成，然後以小型發酵槽(5 L)，進行批次發酵培養。Streptomyces albulus IFO 14147於聚離胺酸生產常用之培養基M3G中，以30、160 rpm培養三天後可生產聚離胺酸0.75 g/L。在培養基M3G中碳、氮源對生產聚離胺酸影響的探討上，發現對生產聚離胺酸影響最大的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其次為葡萄糖，酵母萃取物則對菌體生長具有明顯的影響。實驗結果亦表示培養基中需同時存在酵母萃取物、葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。進一步以回應曲面法探討最佳產量，從一階回應曲面實驗設計、陡升路徑實驗設計到二階回應曲面實驗設計(中心混成)，聚離胺酸產量從0.75 g/L增至最終之8.1258 g/L(脊分析)，產量增加超過10倍。脊分析所得的最佳設計點組成濃度為酵母萃取物2.867 g/L、葡萄糖23.8 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.14 g/L。使用小型發酵槽進行pH值控制的批次發酵培養，發酵期間區分為二個控制階段。在第一階段，維持pH值在6.8的條件下，使細胞生長加速。在第二階段，維持pH值在4以增加-PL生產。在第二階段中，為了避免pH值因為葡萄糖消耗的結果而增加，以及維持細胞之持續生長，因此供給葡萄糖以維持葡萄糖濃度在10 g/L左右。在控制pH值饋料培養下，可以提高-PL產量從1.4468 g/L到5.16 g/L，提高將近3.6倍。經由本研究的完成，能更有效提高聚離胺酸的產量，並為工業化生產聚離胺酸奠定基礎。

關鍵詞：聚離胺酸；發酵槽；回應曲面法；批次培養

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	vii
英文摘要.....	vii
目錄.....	ix
圖目錄.....	x
表目錄.....	xv
第一章 緒論.....	xvii
第二章 文獻回顧.....	5
2.1 聚離胺酸簡介.....	5
2.2 聚離胺酸之生合成.....	6
2.3 聚離胺酸的物理化學特性.....	7
2.4 酵素催化 -PL降解.....	8
2.5 生物合成和分子遺傳.....	10
2.6 聚離胺酸的抗微生物與抗噬菌體活性.....	11
2.7 聚離胺酸之應用.....	14
2.7.1 天然食品防腐劑.....	14
2.7.2 殺菌消毒液.....	14
2.7.3 聚離胺酸在抗癌藥物或基因藥物載體的應用.....	16
2.7.4 聚離胺酸在吸水凝膠的應用.....	17
2.7.5 聚離胺酸之其他的應用.....	17
2.8 回應曲面法.....	25
2.8.1 二水準因子設計實驗.....	26
2.8.2 陡升路徑法.....	27
2.8.3 中心混成設計.....	27
2.8.4 變異數分析法.....	27
2.9 發酵工程概述.....	31
2.9.1 批次發酵.....	31
2.9.2 饋料發酵.....	34
第三章 生產聚離胺酸之培養基組成探討.....	35
3.1 前言.....	35
3.2 實驗材料.....	35
3.2.1 菌株.....	36
3.2.2 藥品.....	36
3.2.3 培養基組成.....	36
3.3 實驗設備.....	38
3.4 實驗方法.....	38
3.4.1 培養方法.....	38
3.4.2 氨基酸鑑定.....	39
3.4.3 聚離胺酸之定量.....	39
3.5 結果與討論.....	40
3.5.1 聚離胺酸之純化.....	40
3.5.2 培養基組成探討.....	42
3.6 結論與建議.....	43
第四章 以回應曲面法探討生產聚離胺酸之最佳培養基組成.....	49
4.1 前言.....	49
4.2 材料與方法.....	49
4.2.1 實驗材料.....	50
4.2.2 培養方法.....	50
4.2.3 聚離胺酸之純	

化.....	51	4.2.4氨基酸鑑定.....	51	4.2.5聚離胺酸之定量.....	51
.....	51	4.3回應區面之實驗設計.....	52	4.3.1二水準因子之實驗設計.....	52
4.3.2陡升路徑之實驗設計.....	53	4.3.3中心混成之實驗設計.....	53	4.3.4回應曲面之模式適切性之統計檢驗.....	54
.....	54	4.4結果與討論.....	54	4.4.1二水準因子設計實驗.....	54
.....	54	4.4.2一階回應曲面模式適切性之統計檢驗.....	55	4.4.3陡升實驗設計.....	56
4.4.4中心混成設計實驗.....	56	4.4.5二階回應曲面法之參數優化.....	58	第五章 發酵槽批次培養	84
.....	84	5.1前言.....	84	5.1.1實驗材料.....	84
.....	84	5.2材料與方法.....	84	5.2.1實驗材料.....	84
.....	85	5.2.2培養方法.....	85	5.2.3聚離胺酸之純化.....	85
86	5.2.4氨基酸鑑定.....	87	5.2.5葡萄糖含量測定.....	87	5.2.6 硫酸銨含量測定.....
.....	88	5.3發酵培養.....	89	5.3.1電腦監控系統.....	89
.....	89	5.3.2發酵槽操作步驟.....	89	5.3.3批次發酵培養.....	90
.....	90	5.3.4饋料發酵培養.....	91	5.4批次培養結果和討論.....	91
.....	91	5.4.1 pH 值控制對生產 -PL 的影響.....	94	5.6二階段pH值控制的饋料培養結果.....	96
.....	94	5.6二階段pH值控制的饋料培養結果.....	96	第六章 結論與建議.....	101
.....	98	參考文獻.....	101	圖目錄	101
.....	101	圖目錄	101	圖1.1 實驗架構.....	4
.....	5	圖2-1 - 聚離胺酸結構.....	4	圖2-2 回應曲面圖.....	5
.....	5	圖2-2 回應曲面圖.....	29	圖2.3 回應曲面進行步驟流程圖.....	29
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖3-2 不同酵母萃取物含量造成菌量與聚離胺酸產量的改變.....	45
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖3-3 不同葡萄糖含量造成菌量與聚離胺酸產量的改變.....	46
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖3-4 不同(NH ₄) ₂ SO ₄ 含量造成菌量與聚離胺酸產量的改變.....	47
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖3-5 Streptomyces albus IFO 14147所生產之 -PL純化後之 氨基酸分析.....	48
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-1 沿著最陡上升路徑各步階之聚離胺酸產量圖.....	67
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-2 酵母萃取物與葡萄糖對聚離胺酸產量之一階回應曲面圖 與等高線圖.....	73
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-3 酵母萃取物與(NH ₄) ₂ SO ₄ 對生產聚離胺酸產量之一階回 應曲面圖與等高線圖.....	74
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-4 酵母萃取物與pH值對生產聚離胺酸產量之一階回 應曲面圖與等高線圖.....	75
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-5 葡萄糖與(NH ₄) ₂ SO ₄ 對生產聚離胺酸產量之一階回 應曲面圖與等高線圖.....	76
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-6 葡萄糖與pH值對生產聚離胺酸產量之一階回 應曲面圖 與等高線圖.....	77
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-7 (NH ₄) ₂ SO ₄ 與pH值對生產聚離胺酸產量之一階回 應曲面 圖與等高線圖.....	78
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-8 一階RSM實驗聚離胺酸產量的觀測值與預測值之比較...79	79
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-9 一階RSM實驗聚離胺酸產量之期望值與殘差值之常態 機率圖.....	79
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-10 酵母萃取物與葡萄糖對聚離胺酸產量之二階回 應曲面 圖與等高線圖.....	80
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-11 酵母萃取物與(NH ₄) ₂ SO ₄ 對生產聚離胺酸產量之二階 回應曲面圖與等高線圖.....	81
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-12 葡萄糖與(NH ₄) ₂ SO ₄ 對生產聚離胺酸產量之二階回 應曲面圖與等高線圖.....	82
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-13 二階RSM實驗聚離胺酸產量的觀測值與預測值之比較.....	83
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖4-14 二階RSM實驗聚離胺酸產量之期望值與殘差值之常 態機率圖.....	83
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖5-1 不控制pH值的批次培養之時間描繪 (使用M3G培養 基).....	92
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖5-2 不控制pH值的批次培養之時間描繪 (使用二階培養 基).....	93
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖5-3 維持不同pH值的批次培養之時間描繪.....	95
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	圖5-4 使用二階段pH值控制策略的 -PL 生產時間時間描繪.....	97
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表目錄 頁次 表2-1 -PL的抗菌活性.....	13
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表3-1 各種培養基組成.....	37
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表3-2 改變酵母萃取物對生產聚離胺酸之影響.....	45
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表3-3 改變葡萄糖對生產聚離胺酸之影響.....	46
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表3-4 改變(NH ₄) ₂ SO ₄ 對生產聚離胺酸之影響.....	47
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-1 24因子設計之濃度與層階.....	60
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-2 陡升路徑實驗設計.....	61
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-3 中心混成實驗設計之濃度及層階.....	62
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-4 24因子設計之結果.....	63
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-5 24因子設計結果之複迴歸分析表.....	64
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-6 24因子設計結果之變異數分析表.....	65
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-7 一階RSM實驗設計之實際值與經由迴歸分析所得預測 值之比較.....	66
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-8 陡升路徑實驗設計之結果.....	67
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-9 中心混成實驗設計之結果.....	68
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-10 中心混成實驗之複迴歸分析表.....	69
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-11 中心混成實驗之變異數分析表.....	70
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-12 二階RSM實驗設計之實際值與經由迴歸分析所得預 測值之比較.....	71
.....	30	圖3-1 聚離胺酸純化程序.....	41	表4-13 PL產量之脊分析.....	72

參考文獻

- Bogdanov Jr. A. A., Martin C., Bogdanova A.V., Brady T. J., Weissleder R., (1996) Biocon jugate chem., 7:144.
- Box G. E. P. and K. B. Wilson (1951) Experimental attainment of optimum conditions, Journal of the Royal Statistical Society, 13:1-45.
- Champney K., Levy H. B., Lerner, A. M., (1976) Clin Res., 24:451
- Choi J. S., Joo D. K., Kum K., Park J. S. J., (2000) Am. Chem. Soc., 122:474.
- Choi Y. H., Liu F.,

Park, J. S., Kim S. W., Bioconjugate Chem. 1998, 9:708. 6. Engvall E., Perlmann P., (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA quantitative assay immunoglobulin G. Immunochemistry, 8:871-876. 7. Hiraki J., (1995) Basic and applied studies on ϵ -polylysine., J. Antibact. Antifungal Agents, 23:349-354. 8. Hiraki J., (1995) ϵ -polylysine, its development and utilization., Fine Chem., 29:28-25. 9. Hiraki J., Ichikawa T., Ninomiya S. I., Seki H., Uohama K., Seki H., Kimura S., Yanagimoto Y., Barnett, J. W. (2003) Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food., Regulatory Toxicol. Pharm., 37:328-340. 10. Hiraki J., Masakazu H., Hiroshi M., Yoshikazu I., (1998) Improved poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistane mutant of Streptomyces albulus., Seibutsukogaku, 76:487-493. 11. Itzhaki R. F., (1972) Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine., Anal Biochem., 50:569—574. 12. Kito M., Onji Y., Yoshida T., Nagasawa T., (2002a) Occurrence of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme in ϵ -poly-L-lysine- tolerant Sphingobacterium multivorum OJ10: purification and characterization., FEMS Microbiol. Lett., 207:147—151. 13. Kito M., Takimoto R., Yoshida T., Nagasawa T., (2002b) Purification and characterization of an ϵ -poly-L-lysine- degrading enzyme from an ϵ -poly-L-lysine-producing strain of Streptomyces albulus., Arch. Microbiol., 178:325-330. 14. Kunioka M., (1997) Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms., Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:469-475. 15. Kurary Co., (2001) Water swelling polymer gel and its production method., JP patent, 278984. 16. Kushwaha D. R. S., Mathur K. E. (1980) Poly(ϵ -L-Lysine): Synthesis and Conformation., Biopolymers, 19:219-229. 17. Kunioka M., (1995) Hydrolytic degradation and biodegradation of hydrogel prepared from microbial poly(ϵ -Lysine)., Seni. gakkaiishi., 51:137-142. 18. Kunioka M., Choi H. J., (1995) Properties of biodegradable hydrogel prepared by γ -irradiation of microbial (ϵ -Lysine) aqueous solution., J. Appl. Polym. Sci., 58:801-806. 19. Maeda S., Kunimoto K. K., Sasaki C., Kuwae A., Hanai K., (2003) Characterization of microbial poly (ϵ -Lysine) by FT-IR, Raman and solid stste ^{13}C NMR spectroscopies., J. of Molecular Structure, 655:149-155. 20. Neda K., Sakurai T., Stakashi M., Shiychi M., Ohgushi M., (1999) Two-generation reproduction study with teratology test of ϵ -Poly-L-Lysine by dietary administration in rats., Jpn. Pharmacol. Ther., 27:1139-1159. 21. Nishikawa M., Ogawa K., (2002) Distribution of Microbes Producing Antimicrobial ϵ -Poly-L-Lysine Polymers in Soil Microflora Determined by a Novel Method., Appl. environ. microbiol., 68:3575-3581. 22. North Americam Brain Tumor Consortium, (2002) <http://www.nabtc.org> 23. Saimura M., Ikezaki A., Takahara M., Hirohara H., (2002) Structures of ϵ -polylysine produced by several actinomycetes and their classification on the basis of productivity of ϵ -polylysine., Annu. Meet. Soc. Biosci. Biotechnol. Biochem. Jpn., 2002:54. 24. Shih I. L., Van Y. T., Chang Y. N., (2002) Application of statistical experimental method to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by Bacillus licheniformis CCRC 12826., Enzyme and Microbial Technology, 31:213-220. 25. Shih I. L., Van Y. T., Shen M. H., (2004) Biomedical Applications of Chemically and Microbiologically Synthesized Poly(glutamic acid) and Poly(lysine)., Mini-Rev. Med. Chem., 4:179-188. 26. Shen W. C., Ryser H. J. P., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75:1872. 27. Shen W.C., Ryser H. J. P., Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., (1981) 49:642. 28. Shima S., Sakai H., (1977) Polylysine produced by Streptomyces., Agric. Biol. Chem., 41:1807-1809. 29. Shima S., Sakai H., (1981a) Poly-L-lysine produced by Streptomyces. Part II. Taxonomy and fermentation studies., Agric. Biol. Chem., 45:2497—2502. 30. Shima S., Sakai H., (1981b) Poly-L-lysine produced by Streptomyces. Part III. Chemical studies., Agric. Biol. Chem., 45:2503—2508. 31. Shima S., Fukuhara Y., Sakai H., (1982) Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-L-lysine produced by Streptomyces., Agric. Biol. Chem., 46:1917—1919. 32. Shima S., Oshima S., Sakai H., (1983) Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine by washed mycelium of Streptomyces albulus No-346., Nippon Nogeikagaku Kaishi, 57:221-226. (in Japanese) 33. Shima S., Matsuoka H., Iwamoto T., Sakai H. (1984) Antimicrobial action of ϵ -poly-L- lysine., J. Antibiot., 37:1449-1455. 34. Szokan G., M. Almas, K. Krizsan, A. R. Khlafulla, E. Tyihak, and B. Szende, (1997) Structure determination and synthesis of lysine isopeptides influencing on cell proliferation., Biopolymers, 42:305-318. 35. Suye S. I., Kumon Y., Ishigaki A., Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, 27:245. 36. Takagi H., Hoshino Y., Nakamori S., Inoue S., (2000) Isolation and Sequence Analysis of Plasmid pNO33 in the ϵ -Poly-L-Lysine-Producing Actinomycete Streptomyces albulus IFO 14147., J. Biosci. Bioeng., 89:94-96. 37. Ting H. Y., Ishizaki S., Tanaka M., (1997) Effect of the Maillard Reaction on the bactericidal activity of ϵ -Polylysine., Journal of Tokyo University of Fisheries, 84:25-30. 38. Yoshida T., Nagasawa T., (2003) ϵ -Poly-L-Lysine: microbial production, biodegradation and application potential., Appl. Microbiol. Biotechnol., 62:21-26. 39. Wang W., Tetley L., Uchegbu I. F. (2000) A new Class of Amphiphilic Poly-L-lysine Based Polymers Forms Nanoparicles on Probe Sonication in Aqueous Media. Langmuir, 16:7859-7866. 40. Wilson JM, Chowdnury NR, Ggrossman M, Wajzman R, Epstein AA, Mulligan RC, Chowdhu RY., (1990) Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. PNAS, 87:8437-8441. 41. 大眾醫藥網, <http://www.windrug.com/>. 42. 中國血脂網, <http://www.chinalipid.com/>. 43. 中國澱粉網, 2003. <http://www.ex-starch.com/>. 44. 生物晶片資訊站, <http://home.pchome.com.tw/discover/biochipmaster/>. 45. 向明 (1998) 生物技術的發展與應用(田蔚城編彙), 九州圖書, 台北, 151-164. 46. 朱詩國、呂紅斌、向娟娟、唐珂、張必成、周鳴、譚琛、李桂源 (2002) 一種新型的非病毒DNA傳遞載體:多聚離胺酸-矽納米顆粒, 科學通報, 47:193-197 47. 沈章英 (2001) 生物晶片簡介, 交銀通訊, 11:30-33. 48. 沈曉復 (2000) 生物分解性塑膠之發展及認識, 塑膠資訊, 49:20-32. 49. 何志煌 (1998) 生物技術的發展與應用(田蔚城編彙), 九州圖書, 台北, 207-212. 50. 吳易凡 (2001) 生物分解性塑膠之發展動向, 塑膠資訊, 50: 41-49. 51. 林碧洲 (1996) 分解性塑膠的回顧與展望, 產業透析, 34-39. 52. 施英隆、沈名豪 (2003) 以微生物生產聚離胺酸及其應用, 生物資源·生物技術, 5:4-11. 53. 洪世淇 (2001) 生物分解性塑膠的技術與市場展望, 化工資訊, 61-65. 54. 柯志強 (1997) 生物分解性塑膠之發展及認識, 塑膠資訊, 12:59-71. 55. 徐惠美 (2000) 生物分解性塑膠, 化工資訊, 81-84. 徐炳森、邵健忠 (2000) 幾種新型生物晶片研究進展, 生物化學與生物物理學進展, 27:251-254. 56. 黃建銘 (2001) 生物可分解塑膠對環境的益處與未來發展趨勢, 環保月刊, 2(1):176-181. 57. 黃泰銘 (1997) 纖維材料之環保新意識-生物分解性高分子, 紡織速報, 9(5): 18-23. 58. 項春生、Yidong Chen、Jiang Yuan、Gerald C. Gooden、Michael L. Bittner (1999) cDNA晶片技術和病毒感染的基因表達, 科學通報, 44:193-197 59. 梅樂和 (1999) 生化生產工藝學, 科學出版社

，北京。60. 楊長青、王吉耀，溫守明、劉建軍，郭津生 (2000)不同載體和不同導入途徑對外源基因肝臟靶嚮導入效果的比較，中華肝臟病雜誌，8:227-229。61. 楊建俊 (1996)生物分解性高分子之發展及應用，生物產業，7(2):123-127。62. 葉怡成 (2001)實驗設計法 製程與產品最佳化，初版，五南圖書出版社，台北。63. 顏聰榮 (2001)生物晶片概述，<http://bioteach.ttu.edu.tw/biotech/new11.htm>。64. 劉世忠 (2000)生物可分解性塑膠業，華銀月刊，595:34-38。65. 鄭瑞洲 (1999)可分解性塑膠，科技博物，5(3):96-100。66. 蘇遠志、黃世佑 (1997)微生物化學工程學，第二版，華香園出版社，台北。67. 龔建華 (2001) 走進奈米世界...21世紀一場震撼全球的技術革命，廣東經濟出版社。