

以甘油為碳源探討放線菌生產 ϵ -聚離胺酸之研究

吳芳禎¹ 李建德² 施英隆^{2*}

¹大葉大學生物產業科技學系

^{2*}大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*ils@mail.dyu.edu.tw

摘要

ϵ -聚離胺酸 (ϵ -Poly-lysine: ϵ -PL) 是由微生物發酵生產的天然生物性材料。 ϵ -PL 具有水溶、可食及生物可分解等特性且其本身或分解之產物對人體及環境不具毒性。由於具極佳的抑菌活性，水溶性強，熱穩定性高，食用安全，添加微量即能奏效，又不影響風味，因此在食品防腐領域得到廣泛應用。本研究使用我們自己實驗室從野外篩選的一株有潛力生產 ϵ -PL 的菌株 *Streptomyces albulus* DYU 1，實驗證明該菌株可利用甘油為碳源。以甘油為碳源，用二階段式發酵培養 *S. albulus* DYU 1，並以一次一因子之方式探討在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之最適化，結果發現對生產 ϵ -PL 影響最大的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其次是甘油，環境因子部分則是 pH 值具有明顯的影響，目前發現最適培養條件為第一階段培養應選擇 24~36 小時較為適合，而在第二階段培養為甘油 25 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L 和 L-lysine 1.6 g/L，在此條件下 *S. albulus* DYU 1 於 30°C、160 rpm 培養六天後可生產約 1.4 g/L~1.6 g/L 的 ϵ -PL。本研究發現 *S. albulus* DYU 1 可利用甘油生產生物可分解高分子 ϵ -PL，因此將來應有潛力應用至廢甘油之轉換，以提高生質柴油副產物甘油之經濟價值，同時解決廢甘油衍生之環保問題。

關鍵詞： ϵ -聚離胺酸，二階段培養，甘油，放線菌。

Using Glycerol as a Carbon Source for ϵ -Poly-lysine

Production by *Streptomyces albulus*

FANG-CHEN WU¹, JEN-DER LEE² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

^{2*}Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

ϵ -Poly-lysine (ϵ -PL) is a naturally-occurring bio-material produced by microbial fermentation. It is water soluble, biodegradable, edible, and nontoxic to humans and the environment. ϵ -PL shows a wide range of antimicrobial activity, and it is stable at high temperatures. Because it is effective in

trace amounts and has no taste, it is widely used as a food preservative. In this study, we investigated the production of ϵ -PL by *Streptomyces albulus* DYU 1, a strain isolated in our lab and having high potential for ϵ -PL production, by using glycerol as the sole carbon source in two-stage culture fermentation. In our investigation of the effects of carbon and nitrogen sources on ϵ -PL production, we found that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ significantly affected ϵ -PL production; in addition, pH also exhibited a significant effect. We also determined that cultivating the strain for 24–36 h at the first stage and cultivating it in glycerol 25 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L, and L-lysine 1.6 g/L at the second stage represented optimal culture conditions. In this medium, *S. albulus* DYU 1 produced ϵ -PL at 1.4 g/L to 1.6 g/L postincubation at 30 °C and 160 rpm for 6 days at the second stage of cultivation. Our results illustrate that *S. albulus* DYU 1 is capable of converting glycerol into ϵ -PL, a versatile biopolymer. The conversion of glycerol into valuable products not only enhances the value of biodiesel production but may also solve the environmental problem of glycerol waste.

Key Words: ϵ -Poly-lysine, two-stage culture method, glycerol, *Streptomyces albulus*.

一、前言

ϵ -聚離胺酸 (ϵ -Poly-lysine; ϵ -PL) 是為一結構極為特殊, 且由微生物代謝合成而得之一天然聚合物, 其係由離胺酸經由 α -羧基和 ϵ -胺基鏈結聚合而成之高分子聚合物[30-32]。 ϵ -PL 具有水溶、可食及生物可分解等特性且其本身或分解之產物對人體無害[11, 21], 因此近年來已有相當多之研究著重於開發 ϵ -PL 及其衍生物於食品、醫藥及環保等領域之應用且有極多成果[1-2, 9-10, 16, 28-29]。目前已知其可作為抗癌及基因藥物之載體[24-25]、食品防腐劑[10]、殺菌消毒液、食品乳化劑[13]、預防血脂過高與瘦身減肥保健品[16], 且可為強力吸水材料及薄膜材料[17], 其他應用包括生產生物晶片、生物積體電路、免疫分析試劑皆需聚離胺酸為包覆材料。 ϵ -PL 除可為天然食品添加劑外, 其應用領域非常廣泛。此物質可經由微生物發酵而得到, 因此為可再生物質, 開發此生物材料不但具有環境保護且有促進經濟發展等雙重價值。

雖然 ϵ -PL 之發現已有多年, 但是過去研究主要以葡萄糖培養基與 pH 對產量之影響為主, 其次為其抗菌性與安全性之探討, 研究並不完整。以葡萄糖為主要碳源, 並以批次與饋料之兩階段 pH 控制策略生產 ϵ -PL 已有一些成功案例[6, 15, 26-27, 34]。有鑒於 ϵ -PL 之商業發展潛力, 因此以經濟有效方式生產 ϵ -PL, 生產條件之最適化須不斷改進。

甘油是利用轉脂化技術轉化植物油或動物油為生質柴油時之主要副產物, 粗甘油約為生質柴油重量之 10% [7]。近來, 全球的生質柴油生產量由 2001 年的 912 million liters

增加至 2008 年的 12,225 million liters, 且預測於 2013 年末則會增加至 23,538 million liters, 這也使得生質甘油的量也隨之大幅增加, 這是再生與可再利用之原料、量多且便宜。近年來探討使用甘油生質發酵生產精密化學產品如 1,3-丙二醇 (1,3-propanediol)、2,3-丁二醇 (2,3-butanediol)、丁二酸又稱琥珀酸 (succinic acid)、乙醇 (ethanol)、丙酸 (3-propionic acid)、檸檬酸 (citric acid)、色素 (pigments)、生物介面活性劑 (biosurfactants)、多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids), 甚至聚羥基烷基酯等已多有報導[8, 19-20, 22-23], 但是以甘油生質發酵生產聚離胺酸較為少見。最近我們實驗室以添加酸性染料 Poly R-478 之培養皿篩選聚離胺酸生產菌, 已篩選到一株可生產鹼性聚合物且該鹼性聚合物可富集酸性染料 Poly R-478, 此菌命名為 *Streptomyces albulus* DYU 1[18], 該菌很可能是 ϵ -PL 生產菌, 因此, 本文係探討放線菌 *S. albulus* DYU 1 以甘油為碳源在二階段式發酵培養生產 ϵ -PL 之研究成果。

二、材料與方法

(一) 菌種

本實驗使用之聚離胺酸生產菌株為, *S. albulus* DYU 1, 由本實驗室自行篩選[18]。

(二) 培養基與培養方法

將菌先培養在 30°C 之含有麥芽萃取液 (malt extract, 10g/L), 酵母萃取液 (yeast extract, 5g/L), 葡萄糖 (glucose, 4g/L) 及洋菜 (agar 15g/L) 之固態培養基 (ISP2 nutrient agar)

中。以白金耳取一些菌體置於不含洋菜之液態培養基 (nutrient broth: 含酵母萃取物 (yeast extract) 5g/L, 蛋白脛 (peptone) 10g/L, NaCl 5g/L) 中, 並於 30°C 培養箱中, 160rpm 震盪作前培養 48 小時。再以 10% (v/v 前培養液置於第一階段生長培養基 (100ml flask) - 甘油 (glycerol, 20g/L)、酵母萃取液 (yeast extract, 5g/L)、硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5g/L)、磷酸鹽 (KH_2PO_4 , 0.13g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.14g/L) 中, 並於 pH 6.8, 30°C 之培養箱中, 以 160rpm 震盪培養 24-36 小時後, 將生長之菌體以 1700rpm; 10 min 離心去除發酵液後植入第二階段生產培養基 (100ml flask) - 甘油 (glycerol, 20g/L)、硫酸銨 ($(NH_4)_2SO_4$, 10g/L)、L-離胺酸 (L-lysine, 1.6g/L) 中, 並於 pH 4.5, 30°C 之培養箱中, 以 160rpm 震盪培養。培養期間不定期取少量培養液並以下述方法分析 ϵ -PL 之濃度, 細菌生長。本研究中之各實驗及分析皆為二重複。

(三) 培養條件之探討

本實驗探討以甘油為碳源在二階段式培養中生產 ϵ -PL, 並探討甘油濃度、氮源、額外添加 L-lysine 濃度、前培養時間、pH 值及溫度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響。

1. 改變甘油濃度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

將第一階段生長培養完成之菌體以清洗後轉接置於 250 mL 三角錐形瓶中, 其內含有不同甘油濃度 (0、5、10、15、20、25 g/L) 之 100 mL 第二階段生產培養基, 並於 30°C, pH 值為 4.5, 160 rpm 下震盪培養。培養期間不定期取少量培養液並以下述方法分析 ϵ -PL 之濃度, 細菌生長以探討 ϵ -PL 生產之變化。

2. 氮源對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

由上述實驗得知, 以 25 g/L 甘油於第二階段生產培養基對生產 ϵ -PL 最合適, 因此將 25 g/L 甘油置於 100 mL 第二階段生產培養基中, 其中分別含有 10 g/L 之不同氮源 (yeast extract、peptone、corn steep solid、 KNO_3 、 $NaNO_3$ 、 NH_4Cl), 再將 *S. albulus* DYU 1 於此第二階段生產培養基中, 在 30°C, pH 值為 4.5, 160 rpm 下震盪培養, 並分析 ϵ -PL 之濃度, 細菌生長以探討 ϵ -PL 生產之變化。

3. 改變硫酸銨濃度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

將 *S. albulus* DYU 1 置於含 25 g/L 甘油及不同硫酸銨濃度 (0、6、8、10、12、14 g/L) 之 100 mL 第二階段生產培養基中, 並在 30°C, pH 值為 4.5, 160 rpm 下震盪培養後

並進行 ϵ -PL、菌生長之分析。

4. 額外添加 L-lysine 或 D-lysine 及改變濃度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

將 *S. albulus* DYU 1 置於含 25 g/L 甘油及 10 g/L 硫酸銨, 並添加不同 L-lysine 濃度 (0、1.4、1.6、1.8、2 g/L) 或 D-lysine (1 g/L) 之 100 mL 第二階段生產培養基中, 並在 30°C, pH 值為 4.5, 160 rpm 下震盪培養後並進行 ϵ -PL、菌生長之分析。

5. 前培養時間對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

將菌體培養於第一階段生長培養基分別培養 24、36、48、72 小時後將菌體離心收集後, 植入第二階段生產培養基, 並於 30°C 之培養箱中, 以 160rpm 震盪培養 144 小時後分析 ϵ -PL 之濃度, 細菌生長。

6. 溫度與 pH 值對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

將 *S. albulus* DYU 1 置於含 25 g/L 甘油及 10 g/L 硫酸銨, L-離胺酸 (L-lysine, 1.6g/L) 之 100 mL 第二階段生產培養基, 並於 30°C, 不同起始 pH 值 (3.5、4.0、4.5、5.0), 160 rpm 下震盪培養。培養期間不定期取少量培養液並以下述方法分析 ϵ -PL 之濃度, 細菌生長以探討 ϵ -PL 生產之變化。探討溫度影響時實驗之條件相同, 僅改變溫度, 分別在 24、28、30、32、35、40°C, 160 rpm 下, 控制 pH 值為 4.5, 進行搖瓶培養。

(四) 分析條件

1. ϵ -PL 之定量

培養基中 ϵ -PL 濃度之定量係於不定時間取少許培養液並採用 Itzhaki 比色法 [14], 該法具有較高的靈敏度, 而且簡單快速。其原理是過量甲基橙與 ϵ -PL 反應生成沉澱物, 4000rpm 離心 10 分鐘, 取上清液剩餘的甲基橙的測定吸光度, 從而得出參與反應的 ϵ -PL 濃度。

2. 甘油之定量

培養基中甘油濃度之定量係於不定時間取少許培養液並以 HPLC 分析, 並將甘油之波峰面積與由純甘油標準品所建立之檢量線相對照而得。HPLC 系統包含 Hitachi L6200 層析裝置並配 ICE-ORH-801 column (6.5mm x 300mm, Transgenomic, USA) 分析管柱, 使用 0.0025N H_2SO_4 做為洗提液, 流率 0.6 mL/min, 樣品注入體積為 20 μ L, 以 RI 偵測器 (BISCHOFF) 在 65°C 下進行分析。

三、結果與討論

(一) 改變甘油濃度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

圖 1 為不同甘油濃度 (0-50 g/L) 作為基質時對於 *S. albulus* DYU 1 菌體生長與生產 ϵ -PL 產物的影響。結果顯示, 甘油最佳濃度介於 25-30 g/L 時, 甘油消耗量和 ϵ -PL 產量最穩定; 當甘油濃度較低時 (0-10 g/L), 菌體是緩慢生長, 且 ϵ -PL 產量並無明顯的成長。此外, 在生長期間, 培養基中的 pH 值的範圍是介於 4.5-4.75 之間, 變化幅度不大。這表示 *S. albulus* DYU 1 培養於各種甘油基質的培養基中時, 當甘油濃度為 25-30 g/L 之範圍時能夠代謝甘油進行生長。二階段培養 *S. albulus* DYU 1 於含有不同濃度甘油基質生產 ϵ -PL 時, 皆於 144 h 時 ϵ -PL 產量可達到最大, 而當甘油濃度為 20 g/L 則其 ϵ -PL 產量為 0.7-1.0 g/L; 而將甘油濃度提高至 25 g/L 與 30 g/L 時, ϵ -PL 產量能達到 1.1-1.4 g/L; 甘油濃度若提高至 50 g/L, ϵ -PL 產量能達到 0.7-0.9 g/L, 由以上結果可知, 在甘油濃度為 25-30 g/L 範圍時, ϵ -PL 產量隨著甘油濃度的增加而增加, 而濃度為 50 g/L 之 ϵ -PL 產量反而降低, 推測甘油濃度過高會導致菌體受到抑制。由此可知, 二階段培養 *S. albulus* DYU 1 較能於 25-30 g/L 甘油基質濃度下進行合成 ϵ -PL, 故往後實驗其甘油基質濃度以 25 g/L 進行。

(二) 氮源對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

圖 2 為不同氮源作為基質時對於 *S. albulus* DYU 1 菌體生長與生產 ϵ -PL 產物的影響。結果顯示, 當 *S. albulus* DYU 1 培養於 yeast extract 及 peptone 中有利於菌體生長, ϵ -PL 之生產並非最高。在七種不同氮源中, 以 Peptone、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的產物產量較高, 其它氮源之產物產量不大, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 為氮源經 144 h 之發酵後, 產物產量最高。在七種不同氮源中 (yeast extract、peptone、corn steep solid、 KNO_3 、 NaNO_3 、 NH_4Cl 與 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 經 144 h 之發酵後, 甘油消耗量分別為 13.81、11.27、8.92、8.79、8.64、8.54 與 9.58 g/L, ϵ -PL 產量分別為 0.58、0.93、0.74、0.45、0.48、1.22 與 1.35 g/L。此外, 在生長期間, 培養基中的 pH 值的範圍是介於 4.5-5.2 之間。此研究顯示 *S. albulus* DYU 1 培養於各種不同發酵培養基配方中, 皆能有效代謝甘油進行生長。 ϵ -PL 之濃度在達到最高後隨之下降, 可能是產生 ϵ -PL 降解酶, 導致產物濃度下降。本實驗結果與 Hirohara *et al.* [12] 的研究結果相似, 在 Hirohara *et al.* 的文獻中提到, 以二階

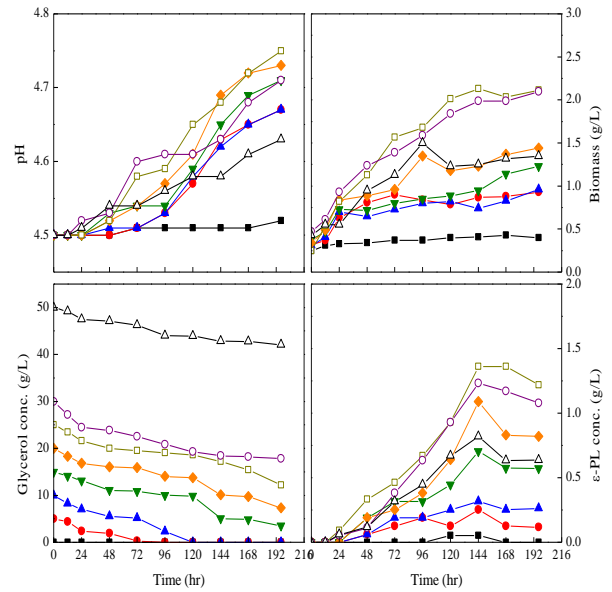


圖 1. 甘油濃度對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

甘油濃度：

- (■) 0 g/L ; (●) 5 g/L ; (▲) 10 g/L ; (▼) 15 g/L ;
(◆) 20 g/L ; (□) 25 g/L ; (○) 30 g/L ; (△) 50 g/L.

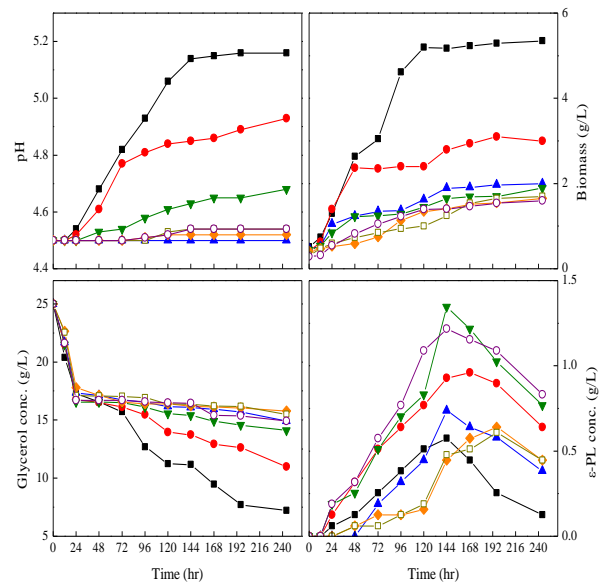


圖 2. 不同氮源對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

氮源種類：

- (■) yeast extract ; (●) peptone ; (▲) corn steep solid ;
(▼) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (◆) KNO_3 ; (□) NaNO_3 ; (○) NH_4Cl .

段方式培養 ϵ -PL 生產菌株 USE-11 和 USE-51，發現氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 對產量有顯著的影響，添加不含有 SO_4^{2-} 之氮源，其生產效率較低，因此驗證得知在生產 ϵ -PL 的過程中 SO_4^{2-} 是必要的。在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中有利於放線菌生產 ϵ -PL，產量則隨 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度而異， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度為 10 g/L 時可得 ϵ -PL 1.3-1.5 g/L，濃度為 0 g/L 可生產 ϵ -PL 0.5 g/L (如圖 3 所示)。

(三) 添加 L-lysine 或 D-lysine 對 *S. albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

根據一些學者推測， ϵ -PL 是由 L-lysine 聚合酶催化單體 lysine 聚合而成， ϵ -PL 的代謝途徑可能經 L-lysine 合成途徑，最後由聚合酶催化合成[3]。在 Hirohara *et al.* [12] 的文獻中提到部分菌株在代謝過程中無法自行合成 L-lysine 並將其聚合成 ϵ -PL。若額外添加適當濃度的 L-lysine 可有助於菌株合成 ϵ -PL，因此本實驗探討在生產培養基中額外添加 L-lysine 或 D-lysine 對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響。如圖 4 得知，本實驗額外添加 L-lysine 為培養基成分之一，在 72 h~168 h 之間其 Biomass 介於 0.5~1.7 g/L 之間，*S. albulus* DYU 1 擁有生產 ϵ -PL 活性，當 L-lysine 濃度為 1.6 g/L 時，在第 144 h 時 ϵ -PL 產物產量為最高 (1.6 g/L)。其次是 L-lysine 濃度為 1.4 g/L， ϵ -PL 產物產量為 1.3 g/L。當 L-lysine 濃度提高至 2 g/L 時， ϵ -PL 產物產量明顯降低且 Biomass 生長緩慢，其甘油消耗與添加其他 L-lysine 濃度差異不大。而在添加 D-lysine 的部分，其發酵過程中 biomass 生長緩慢且甘油消耗不多；在第 144 h 時 ϵ -PL 產物產量為 0.6 g/L。D-lysine 對 *S. albulus* sp. DYU 1 會表現出較強的抑制作用。在 Hirohara *et al.* [12] 的文獻中亦提到 D-lysine 對 *S. albulus* sp. USE-11 及 USE-51 會表現出較強的抑制作用。很顯然在二階段培養 *S. albulus* DYU 1 在添加 L-lysine 濃度為 1.4-1.6 g/L 有利於進行合成 ϵ -PL。

(四) 前培養時間對 *S. albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

本實驗使用 *S. albulus* DYU 1 在 100 ml 之第一階段生長培養基中，進行搖瓶培養，觀察不同培養時間對於菌之生長 (Biomass)，再接至第二階段生產培養基中，觀察 ϵ -PL 產量及甘油消耗量之影響。如圖 5 得知，*S. albulus* DYU 1 在第一階段生長培養基培養 24~36 h 為該菌株的對數生長期，48 h 以後為菌株的穩定期。將第一階段不同培養時間之菌體

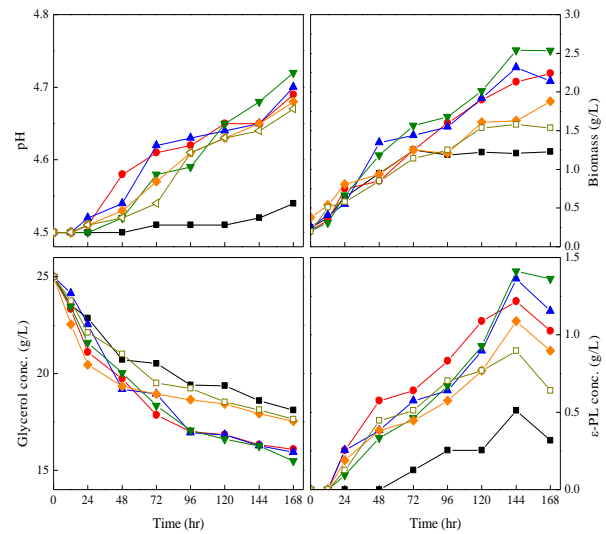


圖 3. 硫酸銨濃度對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

硫酸銨濃度：

- (■) 0 g/L ; (●) 6 g/L ; (▲) 8 g/L ; (▼) 10 g/L ;
(◆) 12 g/L ; (□) 14 g/L.

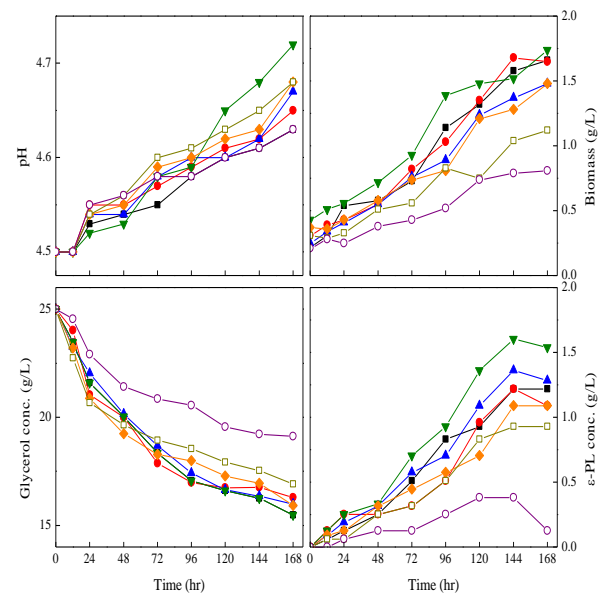


圖 4. 添加 L-lysine 或 D-lysine 及改變濃度對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

L-lysine 濃度：

- (■) 0 g/L ; (●) 1 g/L ; (▲) 1.4 g/L ; (▼) 1.6 g/L ;
(◆) 1.8 g/L ; (□) 2 g/L.

D-lysine 濃度：(○) 1 g/L.

離心收集後，分別植入第二階段生產培養基進行培養。由圖 6 可得知，當菌在第一階段生長培養基培養 24~36 h（對數生長期）時有利於在二階段生產 ϵ -PL，在第二階段培養基培養時間達到 144 hr 後，產量可達到 1.3~1.6 g/L，並且發現甘油消耗約 15 g/L。當第一階段培養時間 48~72 h 時，第二階段 ϵ -PL 產物產量明顯降低，在 144 h 時 ϵ -PL 產物產量為 0.4~0.6 g/L。本實驗結果與 Hirohara *et al.* [12] 的結果類似。該文獻中提到，*S. albulus* sp. USE-51 會因前培養時間的不同進而影響 ϵ -PL 產物產量的高低，其最佳前培養時間為 25 小時，而 USE-11 則不受影響。推測 *S. albulus* DYU 1 處於對數生長期時，將菌體植入第二階段生產培養基有利於 ϵ -PL 之合成。由此可知，*S. albulus* DYU 1 受培養時間的不同而影響 ϵ -PL 產量，而在第一階段培養應選擇 24~36 小時較為適合。

(五) pH 值對 *S. albulus* DYU1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

圖 7 為不同初始 pH 值對 *S. albulus* DYU 1 於甘油基質中生產 ϵ -PL 之影響。結果顯示經過 0 到 168 小時培養之間，發現其發酵液之 pH 值會隨著菌體的生長而緩慢上升。當培養基中 pH 值過高 (pH 5) 或過低 (pH 3.5) 時，會抑制 *S. albulus* DYU 1 菌體之活性。在培養基初始 pH 為 4.5 時，其 Biomass 量最高可達 1.36 g/L，其次初始 pH 為 5，Biomass 量可達 0.95 g/L。甘油消耗部分，皆能有效代謝甘油進行生長。在產量部分，以初始 pH 4~4.5 之 ϵ -PL 生產效果較佳，其 ϵ -PL 產物產量可達 1.11~1.5 g/L；而初始 pH 5 之 ϵ -PL 產物產量為 0.714 g/L 較其它初始 pH 值所生產之 ϵ -PL 產物產量低。由此可知，在二階段生產培養基培養 *S. albulus* DYU 1 較能於初始 pH 值為 4.5 之含甘油培養基下進行合成 ϵ -PL。推測初始 pH 5 時之所以產量低，是因為在高 pH 值狀況下菌株會分泌 ϵ -PL 降解酶，導致 ϵ -PL 被降解。文獻中[5, 33] 曾提到，發酵液的 pH 值對於 ϵ -PL 的合成與分解具有重要的作用，當 pH 值為 4.0 時，*S. albulus* 可迅速聚合與分泌 ϵ -PL，但當 pH 值為 5.0~8.0 時，會產生可將 ϵ -PL 迅速降解之 ϵ -PL 降解酶。

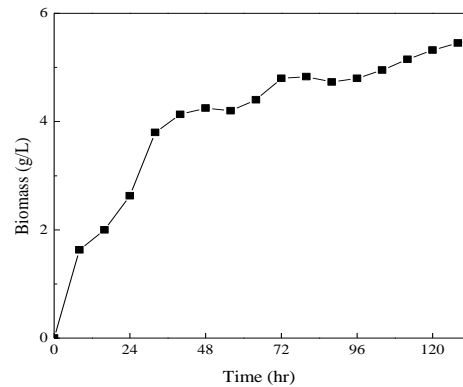


圖 5. *Streptomyces albulus* DYU 1 在第一階段生長培養基之生長情形

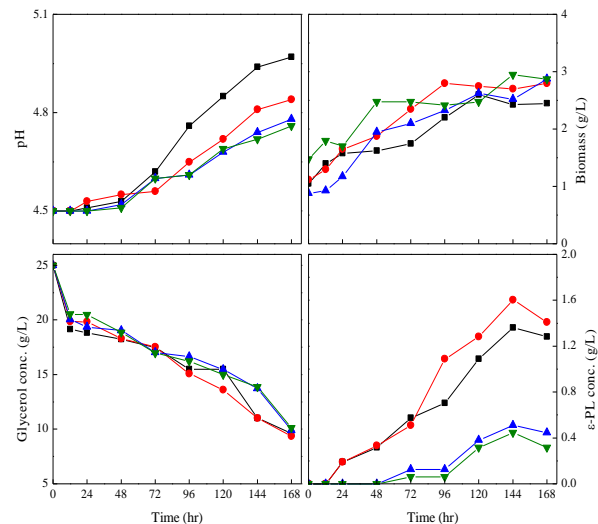


圖 6. 不同前培養時間對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

第一階段培養時間：

(■) 24hr ; (●) 36hr ; (▲) 48hr ; (▼) 72hr

(六) 溫度對 *S. albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

溫度在發酵過程會影響蛋白質的性質和各種酶類反應的速率溫度，亦會影響基質和氧在發酵液的溶氧和傳遞速率及某些基質的分解吸收速度、生物合成方向等。因此本實驗探討菌株在第二階段生產培養基不同培養溫度對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響。實驗結果如圖 8 所示，在培養 168 小時內其 pH 值皆介於 4.5~4.65 之間，其中以 28 及 30°C 時 pH 值上升幅度最大。在 24、28、30、32 及 35°C 時，Biomass 皆有明顯增加，分別為 0.56、0.76、0.97、0.63 及 0.67 g/L，

若將溫度往上提升至 40°C 可發現菌體並沒有增加，而 ϵ -PL 產物產量分別為 0.31、1.03、1.4、0.75、0.07 及 0.07 g/L，而甘油剩餘濃度分別為 3.38、8.08、10.49、6.34、3.26 及 2.85 g/L。由圖 8 可得知，*S. albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基隨著溫度上升至 30°C， ϵ -PL 產物產量會逐漸提升，但再將溫度提升至 40°C 時，菌體生長、甘油消耗及 ϵ -PL 產物產量迅速減少。很顯然在第二階段生產培養基於 30°C 下培養有利於 *S. albulus* DYU 1 合成 ϵ -PL。本實驗結果與張海濤的結果類似 [4]，該文獻中以自行篩選之 *S. albulus* 在不同溫度下進行搖瓶培養，發現 30°C 時菌體及 ϵ -PL 產量表現最佳，將溫度提升至 36°C 時，菌體的生長趨於緩慢，也不會生產 ϵ -PL。

四、結論

本研究使用我們自己實驗室從野外篩選的一株有潛力生產 ϵ -PL 的菌株 *S. albulus* DYU 1，實驗證明該菌株可利用甘油為碳源。以甘油為碳源，用二階段式發酵培養 *S. albulus* DYU 1，並以一次一因子之方式探討在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之最適化，結果發現對生產 ϵ -PL 影響最大的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，其次是甘油，環境因子部分則是 pH 值具有明顯的影響，目前發現最適培養條件為第一階段培養應選擇 24~36 小時較為適合，而在第二階段培養為甘油 25 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L 和 L-lysine 1.6 g/L，在此條件下 *S. albulus* DYU 1 於 30°C、160 rpm 培養六天後可生產約 1.4 g/L ~ 1.6 g/L 的 ϵ -PL。過去以葡萄糖為主要碳源，並以批次與饋料之方式生產 ϵ -PL 已有成功之研究，但是以甘油生質發酵生產聚離胺酸較為少見。本研究發現 *S. albulus* DYU 1 可利用甘油生產生物可分解高分子 ϵ -PL，因此將來應有潛力應用至廢甘油之轉換，以提高生質柴油副產物甘油之經濟價值，同時解決廢甘油衍生之環保問題。

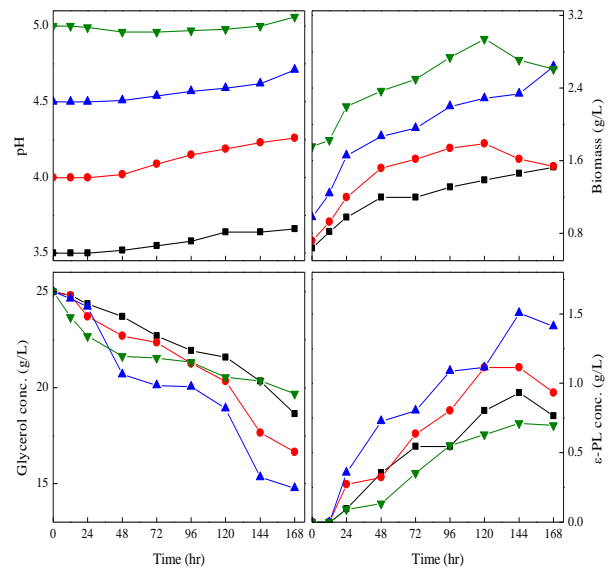


圖 7. 不同初始 pH 值對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

Symbol :

(■) pH 3.5 ; (●) pH 4 ; (▲) pH 4.5 ; (▼) pH 5 .

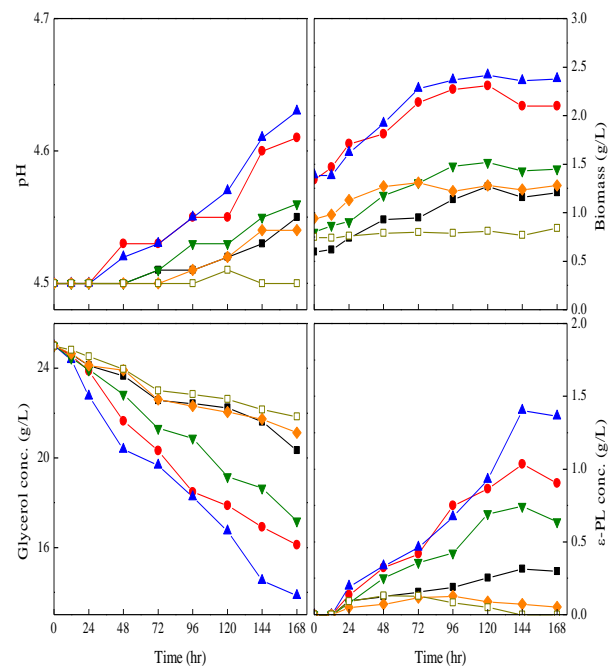


圖 8. 不同溫度對 *Streptomyces albulus* DYU 1 在第二階段生產培養基生產 ϵ -PL 之影響

溫度 :

(■) 24°C ; (●) 28°C ; (▲) 30°C ; (▼) 32°C ;

(◆) 35°C ; (□) 40°C .

參考文獻

1. 施英隆、沈名豪 (民 92), 以微生物生產聚離氨酸及其應用, 生物資源生物技術, 5(1), 4-11。
2. 施英隆 (民 95), 微生物生產生物高分子及其應用, 化學, 64(1), 105-118。
3. 張東榮、王正剛、毛忠貴 (民 94), 聚離氨酸的研究進展, 氨基酸和生物資源, 27(2), 48-51。
4. 張海濤 (民 97), 天然食品防腐劑 ϵ -聚離氨酸的微生物合成及其純化, 上海海洋大學碩士學位論文, 上海。
5. 劉蔚、秦芸樺、周濤 (民 96), ϵ -聚離氨酸生物合成機理的研究進展, 食品科學, 28(8), 549-553。
6. Bankar, S. B., and R. S. (2010) Singhal optimization of poly- ϵ -lysine production by *Streptomyces noursei* NRRL 5126. *Bioresource Technology*, 101(21), 8370-8375.
7. Da Silva, G. P., M. Mack and J. Contiero (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30-39.
8. González-Pajuelo, M., J. C. Andrade and I. Vasconcelos (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 442-446.
9. Hiraki, J. (1995) Basic and applied studies on ϵ -polylysine. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 23, 349-354.
10. Hiraki, J. (2000) ϵ -Polylysine, its development and utilization. *Fine chemicals*, 29(1), 28-25.
11. Hiraki, J., T. Ichikawa, S. I. Ninomiya, H. Seki, K. Uohama, H. Seki, S. Kimura, Y. Yanagimoto and J. W. Barnett (2003) Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 328-340.
12. Hirohara, H., M. Takehara, M. Saimura, A. Masayuki and M. Miyamoto (2006) Biosynthesis of poly(ϵ -L-lysine)s in two newly isolated strains of *Streptomyces* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 321-331.
13. Ho, Y. T., S. Ishizaki and M. Tanaka (2000) Improving emulsifying activity of ϵ -polylysine by conjugation with dextran through the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 68(4), 449-455.
14. Itzhaki, F. R. (1972) Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50(2), 569-574.
15. Kahar P., T. Iwata, J. Hiraki, Y. E. Park and M. Okabe (2001) Enhancement ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 190-194.
16. Kido, Y., S. Hiramoto, M. Murao, Y. Horio, T. Miyazaki, T. Kodama and Y. Nakabou (2003) ϵ -Polylysine inhibits pancreatic lipase activity and suppresses postprandial hypertriglyceridemia in rats. *Journal of Nutrition*, 133(6), 1887-1891.
17. Kunioka, M. and H. J. Choi (1995) Properties of biodegradable hydrogels prepared by γ -irradiation of microbial (ϵ -Lysine) aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 58(4), 801-806.
18. Lee J. D. (2013) Using glycerol as carbon source for ϵ -poly-lysine production by *Streptomyces albulus*. Master thesis, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.
19. Lee, P.C., S.Y. Lee and H. N. Chang (2010) Kinetic study on succinic acid and acetic acid formation during continuous cultures of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* grown on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(4), 456-471.
20. Mothes, G., C. Schnorpfel and J. U. Ackermann (2007) Production of PHB from crude glycerol. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 475-479.
21. Neda, K., T. Sakurai, M. Stakahashi, M. Shiichi and M. Ohgushi (1999) Two-generation reproduction study with teratology test of ϵ -poly-L-lysine by dietary administration in rats. *Japanese Pharmacology and Therapy*, 27(7), 1139-1159.
22. Petrov, K., and P. Petrova (2009) High production of 2, 3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 659-665.
23. Raj S.M., C. Rathnasingh, J. E. Jo and S. Park (2008) Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Process Biochemistry*, 43(12), 1440-1446.
24. Shen, W. C. and H. J. P. Ryser (1978) Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75(4), 1876-1978.
25. Shen, W. C. and H. J. P. Ryser (1981) Poly (L-lysine) has

- different membrane transport and drug-carrier properties when complexed with heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78 (12) , 7580–7593.
26. Shih I. L. and M. H. Shen (2006) Optimization of cell growth and poly (ϵ -lysine) production in batch and fed-batch cultures by *Streptomyces albulus* IFO14147. *Process Biochemistry*, 41(7), 1644-1649.
27. Shih I.L. and M. H. Shen (2006) Application of response surface methodology to optimize production of poly (ϵ -lysine) by *Streptomyces albulus* IFO14147. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 15-21.
28. Shih, I. L., M. H. Shen and Y. T. Van, (2006) Microbial synthesis of poly (ϵ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 97(9), 1148-1159.
29. Shih, I. L., Y. T. Van and M. H. Shen (2004) Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine). *Mini Review in Medicinal Chemistry*, 4(2),179-188.
30. Shima, S. and H. Sakai (1977) Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(9), 1807-1809.
31. Shima, S. and H. Sakai (1981) Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2497-2502.
32. Shima, S. and H. Sakai (1981). Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2503-2508.
33. Yoshida, T., T. Nagasawa (2003) ϵ -Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 21-26.
34. Zhang, Y., X. H. Feng, H. Xu, Z. Yao and P. K. Ouyang (2010) ϵ -Poly-L-lysine production by immobilized cells of *Kitasatospora* sp. MY 5-36 in repeated fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(14), 5523-5527.

收件：104.08.27 修正：104.09.21 接受：104.10.20