

以發酵槽培養探討放線菌利用甘油為碳源生產 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。*Streptomyces albulus* DYU 1 為本實驗室自行篩選並可利用甘油為碳源以生產 ϵ -PL 之菌株，本研究進行以發酵槽放大培養，並使用 pH 值控制及饋料策略以提高 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之產量，結果顯示採用二階段方式培養（即第一階段在 pH 值 6.8 之生長培養基培養 36 小時，待菌體生長完成再將其離心轉接至含有生產培養基之發酵槽內進行第二階段培養，並將 pH 值控制在 4 的條件下）可增加 ϵ -PL 的產量（由 1.46 g/L 增加至 2.10 g/L）。另外在經一次饋料後，發現 ϵ -PL 之產量可提高至 2.81 g/L（為未饋料之 1.3 倍），且為搖瓶培養之 1.75 倍。

關鍵詞： ϵ -聚離胺酸，發酵槽培養，二階段控制培養，饋料培養。

Investigation of ϵ -Poly-lysine Production by *Streptomyces albulus* in Fermenter Using Glycerol as Carbon Source

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

¹Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

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

No.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 biomaterial produced by microbial fermentation.

It is water soluble, biodegradable, edible, nontoxic to humans, and environmentally safe. ϵ -PL shows a wide range of antimicrobial activity. Because it is stable at high temperatures and safe to eat, it is widely used as a food preservative; a trace amounts of ϵ -PL added to food can effectively preserve the food without altering its flavor. Our lab previously isolated *Streptomyces albulus* DYU 1, a bacterial strain capable of using glycerol as a carbon source for ϵ -PL production. In the present study, batch culture of *S. albulus* DYU 1 was conducted with a two-stage fermentation method in a 10-L jar fermentor; the bacteria were first cultivated in shake flask at pH 6.8 for 36 hours. The bacteria were then isolated and transferred into three media samples with pH levels controlled at 3.5, 4.0, and 4.5. After 10 days of incubation, glycerol consumption levels were 13.55, 17.38, and 19.47 g/L, and the ϵ -PL concentrations were 1.17, 2.10, and 1.78 g/L for media with pH levels of 3.5, 4.0, and 4.5, respectively. To optimize ϵ -PL production, back-feeding of glycerol was applied whenever the glycerol concentration was below 10 g/L. The final ϵ -PL concentration increased from 2.10 to 2.81 g/L (1.3-fold increase) after one feeding. This study provides a foundation for the future industrial production of this valuable biomaterial.

Key Words: ϵ -Poly-Lysine, two-stage culture method, jar fermentor, feed-back cultivation.

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 [31-33]。 ϵ -聚離胺酸具有水溶、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 [10, 22], 因此近年來已有相當多之研究著重於開發 ϵ -聚離胺酸及其衍生物於食品、醫藥及環保等領域之應用且有極多成果 [2-3, 11-12, 17, 28-29]。 目前已知其可作為抗癌及基因藥物之載體 [26-27]、食品防腐劑 [12]、殺菌消毒液、食品乳化劑 [14]、預防血脂過高與瘦身減肥之保健食品 [17], 且可為強力吸水材料及薄膜材料 [18], 其他應用包括生產生物晶片、生物積體電路、免疫分析試劑等皆需聚離胺酸為包覆材料。 ϵ -聚離胺酸 (ϵ -poly lysine) 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 已被發現了將近 25 年, 然而其合成途徑, 合成作用機制, 甚至最適生產條件則仍不十分清楚。 Shima 等 [33-34] 利用 14 C-L-Lysine 之併入實驗, 初步證實了 ϵ -PL 的合成是以離胺酸作為前驅物的。因此 ϵ -PL 的合成可能是以離胺酸為基質, 最後經聚合酶催化生成。依此推測 [9] ϵ -PL 的合成可能經離胺酸合成代謝途徑, 由 TCA 循環中之

草醯乙酸與氨形成天門冬胺酸, 天門冬胺酸轉化為二胺基庚二酸, 通過二胺基庚二酸途徑合成離胺酸, 最後經聚合酶作用而生成。天門冬胺酸激酶 (Aspartokinase, ASK) 是離胺酸生物合成的關鍵酶, 會受到終產物離胺酸之調控及回饋抑制。因此根據此機制, 研究者曾設法進行調控並成功增加 ϵ -PL 產量; 例如研究顯示篩選高活性天門冬胺酸激酶的突變菌株, 可以明顯提高 ϵ -PL 產量 [35]。其他研究也發現 *S. albulus* 菌株中天門冬胺酸激酶 (Aspartokinase, ASK) 對終產物離胺酸或蘇胺酸並不敏感, 在 *S. albulus* 菌株中植入一個含天門冬胺酸激酶基因的表達載體能顯著提高 ϵ -PL 產量 [9]。另外, 選用離胺酸的結構類似物 S-(2-胺乙基)-L-半胱胺酸 (AEC) 作為抗性篩選標記可以消除離胺酸的回饋抑制, Hiraki 等 [13] 以誘變篩選具 S-(2-胺乙基)-L-半胱胺酸和甘胺酸抗性之突變菌株, 結果發現 90% 以上變異株表現高產量之 ϵ -PL。

為促進生產, 目前研究主要著重於探討發酵培養條件。例如 Shima 等人 [33-34] 使用野生型的 *Streptomyces albulus* 346 於含葡萄糖之生產培養基中, 並在 30°C, pH 6.8 培養 48 小時, ϵ -PL 在培養液裡累積的濃度是 0.5 g/L。最近 Hiraki 等 [13] 以化學藥劑對 *S. albulus* 346 之野生菌進行突變並篩選出一株對 AEC 與甘胺酸雙重抗性的突變菌株, 將此突變菌於 M3G 培養基培養, 所得最大 ϵ -PL 的生產量是 2.11 g/L, 高於 *S. albulus* 346 之野生菌株 4 倍。 Shima 等人亦曾採用兩

階段培養方式，將 *S. albulus* 346，在 30°C 培養 8-9 天可獲得 4-5 g/L 的 ϵ -PL。過去研究主要以葡萄糖培養基與 pH 對產量之影響為主。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, 16, 30-31, 36]。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 2013 年的 24.7 Bln liters，且預測於 2023 年則會增加至 40 Bln liters [23]，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 (Etahnol)、丙酸 (3-propioic 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)，甚至聚羧基烷酸酯等已有報導 [8, 20-21, 24-25]，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 ϵ -PL 生產菌並命名為 *Streptomyces albulus* DYU 1，初步研究已顯示此菌株可使用葡萄糖與甘油為碳源以生產 ϵ -PL[19]。為提高產量，本文探討 *S. albulus* DYU 1 以甘油生質為碳源在發酵槽中進行批次培養研究，並使用二階段 pH 值控制策略與饋料培養以增加 ϵ -PL 產量之研究成果。

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 [19]。

(二) 培養基與培養方法

將前述篩選之菌先培養在 30°C 之含有麥芽萃取液 (Malt extract, 10 g/L)，酵母萃取液 (Yeast extract, 5 g/L)，葡萄糖 (Glucose, 4 g/L) 及洋菜 (Agar, 15 g/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 5 g/L，蛋白胨 (peptone) 10 g/L，NaCl 5 g/L) 中，並於 30°C 培養箱中，以 160 rpm 震盪進行前培養 48 小時。再以 10% (v/v)

前培養液置於第一階段生長培養基-甘油 (Glycerol, 25 g/L)、酵母萃取液 (Yeast extract, 5 g/L)、硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/L)、磷酸鹽 (KH_2PO_4 , 0.13 g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.14 g/L) 中，並於 pH 6.8, 30°C 之培養箱中，以 160 rpm 震盪培養 24-36 小時後，將生長之菌體以 1700 rpm 離心 10 min，並以相同體積之食鹽水清洗菌體後接種於第二階段最適生產培養基-甘油 (Glycerol, 25 g/L)、硫酸銨 ($(NH_4)_2SO_4$, 10 g/L)、L-離胺酸 (L-lysine, 1.6 g/L) 中培養。

(三) 發酵槽批次培養

使用 10 L 發酵槽 (type: MAJOR SCIENCE, 利政科技, 台北)。首先，將前述液態培育的種子培養液 200 mL 接種至 5 L 上述之第二階段最適生產培養基中，然後進行培養。在培養期間 pH 值變化以附在 PID 控制器 (type: CS-787, CHEN SHEN) 上的 pH 電極 (type: InPro 3030, METTLER TOLEDO) 偵測。攪拌速度使用 PID 控制器維持在 300 rpm。使用 2 N NaOH 與 2 N HCl 溶液維持培養液在適當的 pH 值。發酵培養溫度維持在 30°C，發酵槽開始的 pH 值是 6.8。

1. 批次發酵培養

批次發酵培養，乃不額外添加培養基的情況下，所進行之菌體培養。先進行液態搖瓶培養 36 小時後，將 200 mL 菌液植入已滅菌之 5 L 培養基中 (上述之第二階段最適生產培養基)。發酵培養條件為 30°C，轉速 300 rpm，通氣量 3 L/min (將空氣當作 100%)。利用 pH 控制器及 DO 控制器，線上偵測 pH、DO 值，培養期間每 24 小時採用離線分析測量菌體濃度、碳源濃度及 ϵ -聚離胺酸產量。

2. 饋料發酵培養

液態搖瓶培養 36 小時後，將 200 mL 菌液植入已滅菌之 5 L 培養基中，饋料組成為甘油 50 g/L、硫酸銨 10 g/L 並混合置於 1 L 血清瓶中加熱攪拌使其溶解，瓶外須插通氣濾片，饋料馬達設定轉速為 32 mL/min。當培養液裡的甘油濃度低於 10 g/L 的時候，開始饋料培養。使用蠕動幫浦，將饋料溶液輸入發酵槽內。於培養期間內一直重複這個程序，提供發酵槽適當的甘油濃度。

(四) 分析條件

1. ϵ -聚離胺酸之定量

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 [15]，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，再以 4000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液以測定剩餘的甲基橙吸光度，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 (6.5 mm x 300 mm, Transgenomic USA) 分析管柱，使用 0.0025 N H_2SO_4 做為衝提液，流速為 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) *S. albulus* DYU 1 在最適培養基及無 pH 控制之培養

由我們實驗室先前以一次一因子及回應曲面設計實驗發現 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之最適培養基為甘油濃度 25 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L 及 L-lysine 1.6 g/L，因此以此培養基進行發酵槽培養之探討[19]。將活化完之 *S. albulus* DYU 1 發酵液以 1700 rpm 離心 10 分鐘，並以相同體積之食鹽水清洗菌體後接種於上述最適生產培養基中，並培養於 30°C、曝氣量 3 vvm，初始 pH 值為 6.8，轉速為 160 rpm 之條件下。

其結果如圖 1 所示，經過 0 到 240 小時培養之間，發現發酵液 pH 值會隨著菌體的生長而緩慢下降，但下降不多。Biomass 經 10 天培養成長不佳，甘油消耗 4.63 g/L，而 ϵ -PL 最大產量於培養 144 小時僅為 0.73 g/L。結果顯示，如以一階段培養方式 (即菌培養及 ϵ -PL 生產在同一培養基培養)，*S. albulus* DYU 1 之生長及 ϵ -PL 之生產皆不理想，此結果與沈等研究者之結果相似[1, 31]。

由於過去研究[1]發現採二階段培養方式，即將菌在生長培養基中及較高 pH 值 (pH 6.8) 下培養，菌可快速生長，將菌離心分離後再以生產培養基及較低 pH 值 (pH 4.5) 下培養，可生產較高產量之 ϵ -PL，因此本研究後續發酵槽實驗，皆採二階段 (菌生長及 ϵ -PL 分開培養) 之方式進行探討。即將菌於第一階段生長培養基中培養後，再將菌離心分離，並將其轉接至生產培養基 (甘油濃度 25 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L 及 L-lysine 1.6 g/L)，並於 30°C、曝氣量 3 vvm，初始 pH 值為 4.5，轉速為 160 rpm 之條件下進行第二階段培養，結果如圖 2 所示。經過 0 到 240 小時培養之間，發現發酵液之 pH 值會隨著菌體的生長而上升。甘油消耗 13.81 g/L，而 ϵ -PL 最大產量於培養 144 小時為 1.95 g/L。比較圖 1 與圖 2，顯然 *S. albulus* DYU 1 採二階段培養方式可有較佳之 Biomass 及 ϵ -PL 之生產。

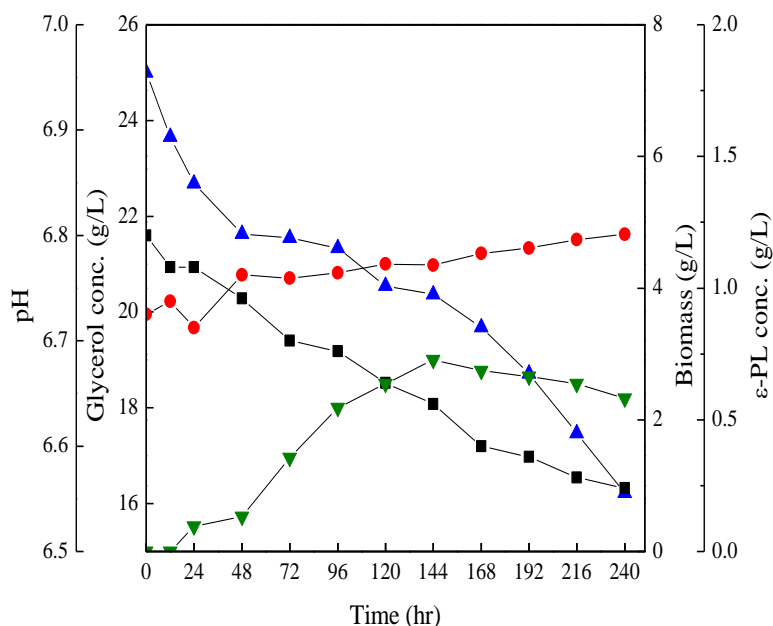


圖 1. 不控制 pH 值並以一階段方式發酵生產 ϵ -PL 之結果

Symbol: (■) pH; (●) Biomass; (▲) 甘油濃度; (▼) ϵ -PL 濃度。

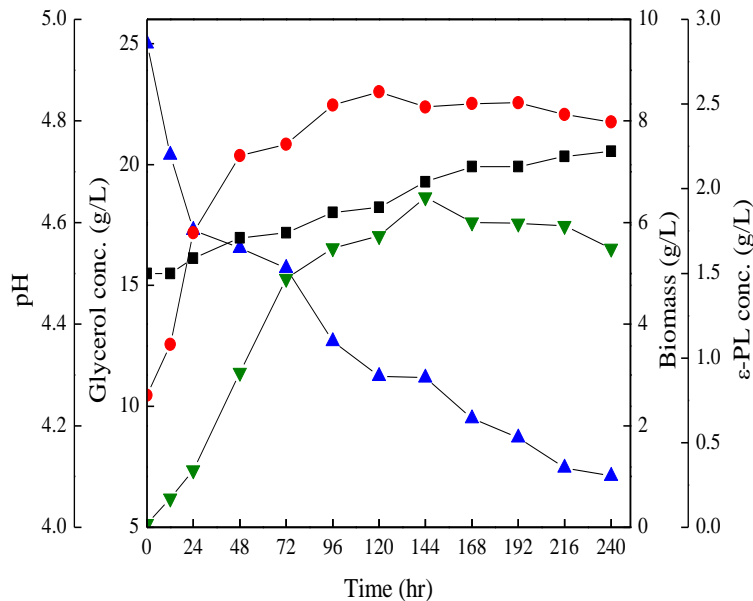


圖 2. 不控制 pH 值並以二階段方式發酵生產 ϵ -PL 之結果

Symbol : (■) pH; (●) Biomass; (▲) 甘油濃度; (▼) ϵ -PL 濃度。

(二) 控制 pH 值對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

為了要探討維持 pH 值對 ϵ -PL 生產的影響，因此本實驗控制第二階段生產培養基之 pH 值在 3.5、4 及 4.5 以了解 pH 值對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響。本實驗將活化後之 *S. albulus* DYU 1 接種於第一階段之生長培養基中，並在 30°C，pH 6.8，轉速 160 rpm 之條件下培養 36 小時，菌體經離心分離後接種於上述之第二階段生產培養基，並於 30°C，轉速 160 rpm，曝氣量 3 vvm 發酵培養，並將 pH 分別控制在 3.5、4 及 4.5。實驗結果如圖 3 所示，當 pH 控制在 3.5、4 及 4.5，培養發現甘油消耗量分別為 13.55 g/L、17.38 g/L 和 19.47 g/L，而最高 ϵ -PL 之濃度分別為 1.17 g/L、2.10 g/L 和 1.78 g/L，顯示 ϵ -PL 產量與發酵培養基之 pH 值控制有關。研究結果顯示生產 ϵ -PL 之最佳 pH 值為 4，而菌體生長最佳的 pH 值則是高於 4。同時也得知，若培養基 pH 值維持高於 4，在培養期間甘油消耗量會比維持在 pH 值 4 較多，並且造成菌體持續生長。由此可知，在將第二階段生產培養基之 pH 值維持於 4 有利於 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL。本實驗結果與陳旭升 [4] 的結果類似，陳等以 *S. albulus* Z-18 接種於 M3G 培養基發酵並控制 pH 值，發現當 pH 值低於 4 菌體生長會受到抑制，並且產生自溶的現象；隨著 pH 值的升高，菌體增長的趨勢也會明顯的加快。進而得知 pH 值是影響菌體生長的關鍵因素。Hiraki 等人[13]在

研究 *S. albulus* 合成 ϵ -聚離胺酸的代謝途徑時，在 *S. albulus* 細胞膜上分離到 ϵ -聚離胺酸降解酶。研究發現，該降解酶在 pH 值 7 活性最強，可將 ϵ -聚離胺酸水解成離胺酸單體，從而使得 ϵ -聚離胺酸在發酵液中不能累積。因此第二階段生產培養控制在較低之 pH 值將有利於 ϵ -PL 之生產。

(三) 饋料培養對 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

如同前述之實驗，本實驗將活化後之 *S. albulus* DYU 1 接種於第一階段生長培養基中，並於 30°C，pH 6.8，轉速 160 rpm 之條件下培養 36 小時，離心後再接種於第二階段生產培養基，並於 30°C，轉速 160 rpm，曝氣量 3 vvm 下培養，並將 pH 控制在 4。當甘油剩餘濃度降到 10 g/L 以下開始饋料（於發酵培養 120 小時後），其中饋料組成為甘油濃度 50 g/L 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L。實驗結果如圖 4 所示，在培養 240 小時內，將 pH 值皆維持在 4。菌體在培養至 48 小時生長受到抑制，並產生自溶的現象，培養至 120 小時甘油剩餘濃度為 10.25 g/L 並開始饋料。饋料後，菌體生長及甘油消耗量較饋料前緩慢，到發酵結束（240 小時）時， ϵ -PL 產量為 2.81 g/L，雖尚未達到最大值，但增長趨勢已減緩。由此可知，使用 pH 值控制策略與饋料發酵培養可提升 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL。沈名豪 [1] 曾以 M3G 做為培養基，並且控制 pH 值及饋料來生產 ϵ -PL，發現饋料發酵培養 *S. albulus* IFO14147 所獲得 ϵ -PL 產量比批次發酵培養所獲得的

產量多 3.6 倍。而陳雄等人 [5]以批次培養及饋料批次培養對 *S. albus* 生物合成 ϵ -PL 進行了初步研究，發現在批次培養中，利用 pH 值控制策略， ϵ -PL 產量可從 0.6 g/L 提高

到 2.4 g/L。在饋料批次培養中，利用 pH 值控制策略可使菌體大量生長， ϵ -PL 產量亦可提高至批次培養的 7 倍[5]。

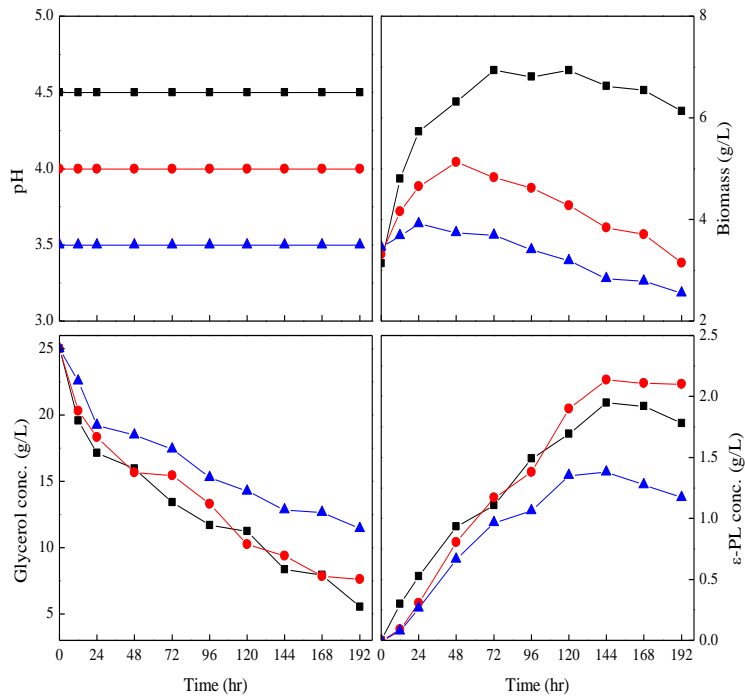


圖 3. 控制 pH 值對 *S. albus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之影響

Symbol : (■) pH 4.5; (●) pH 4; (▲) pH 3.5。

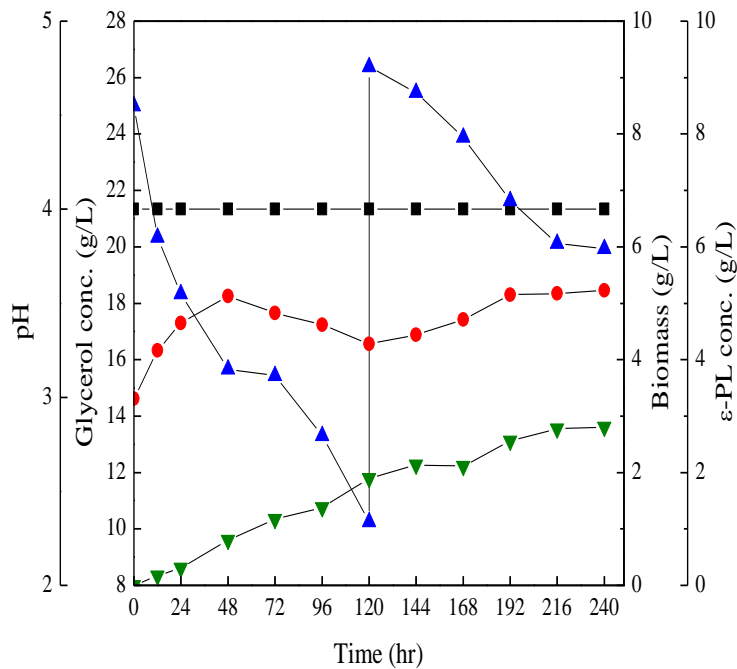


圖 4. 饋料培養對 *S. albus* DYU 1 生產 ϵ -PL 之結果

Symbol : (■) pH; (●) Biomass; (▲) 甘油濃度; (▼) ϵ -PL 濃度

四、結論

本研究探討以發酵槽進行 *S. albulus* DYU 1 放大培養，並使用 pH 值控制策略及饋料以提高 *S. albulus* DYU 1 生產 ϵ -PL，結果顯示採用二階段方式培養（即第一階段在 pH 值 6.8 之生長培養基培養 36 小時，待菌體生長完成再將其離心轉接至含有生產培養基之發酵槽內進行第二階段培養，並將 pH 值控制在 4 的條件下）可增加 ϵ -PL 的產量（由 1.46 g/L 增加至 2.10 g/L）。另外在經一次饋料後，發現 ϵ -P 之產量可提高至 2.81 g/L（為未饋料之 1.3 倍），且為搖瓶培養之 1.75 倍。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，因此將來可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。

參考文獻

1. 沈名豪 (民 93)，生物合成聚離胺酸之研究，大葉大學環境工程學系碩士論文。
2. 施英隆、沈名豪 (民 92)，以微生物生產聚離胺酸及其應用，生物資源生物技術，5 (1)，4-11。
3. 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。
4. 陳旭升 (民 97)， ϵ -聚離胺酸高產菌株選育與發酵過程優化，江南大學生物工程學院碩士論文。
5. 陳雄、章瑩、袁金鳳、王實玉、王金華 (民 96)，聚- ϵ -離胺酸補料發酵的初步研究，工業微生物，37 (4)，20-22。
6. Bankar, S. B. and R. S. Singhal (2010) 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. Hamano, Y., I. Nicchu, T. Shimizu, Y. Onji, J. Hiraki and H. Takagi (2007) ϵ -Poly-L-lysine producer, *Streptomyces albulus*, has feedback-inhibition resistant aspartokinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 873-882.
10. 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.
11. Hiraki, J. (1995) Basic and applied studies on ϵ -polylysine. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 23, 349-354.
12. Hiraki, J. (2000) ϵ -Polylysine, its development and utilization. *Fine chemicals*, 29(1), 28-25.
13. Hiraki, J., H. Masakazu, M. Hiroshi and I. Yoshikazu (1998) Improved poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistance mutant of *Streptomyces albulus*. *Seibutsukogaku*, 76, 487-493 (in Japanese).
14. 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.
15. Itzhaki, F. R. (1972) Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50(2), 569-574.
16. 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.
17. 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 hypertriacylglyceridemia in rats. *Journal of Nutrition*, 133(6), 1887-1891.
18. 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.
19. Lee, J. D. (2013) Using glycerol as carbon source for ϵ -poly-lysine production by *Streptomyces albulus*. Master thesis, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.
20. Lee, P. C., S. Y. Lee and H. N. Chang (2010) Kinetic study on succinic acid and acetic acid formation during

- continuous cultures of *Anaerobospirillum succiniciproducens* grown on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(4), 456-471.
21. Mothes, G., C. Schnorpfeil and J. U. Ackermann (2007) Production of PHB from crude glycerol. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 475-479.
22. Neda, K., T. Sakurai, M. Stakahashi, M. Shiychi 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.
23. OECD/FAO (2014) *Agricultural Outlook 2014-2023: Biofuels*, OECD-FAO, Rome.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Shima, S. and H. Sakai (1977) Polylysine produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(9), 1807-1809.
33. 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.
34. Shima, S. and H. Sakai (1981) Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part III. Chemical studies. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2503-2508.
35. Shima S., S. Oshima and H. Sakai (1983) Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine by washed mycelium of *Streptomyces albulus* No-346. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 57, 221-226 (in Japanese).
36. 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：104.12.23 修正：105.03.16 接受：105.06.01