

甘蔗渣廢棄物為原料以發酵生產 γ -聚麩氨酸之研究

吳芳禎¹ 王政捷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

以微生物發酵生成之高分子具功能性、生物相容與生物可分解性，是一種非石化資源相關之再生材料，使用時對人體是無害且不會對環境造成污染，因此近年來極受重視。結合生質精煉技術與再生性生質原料為基礎以開發生物高分子材料不但可解決環境問題，同時可生產高經濟價值之產品。本研究建立以甘蔗生質為原料並透過生質精煉與發酵過程生產聚胺基酸類之生質材料，結果發現 *Bacillus subtilis* D1 可利用蔗渣水解液生產高分子化合物。*B. subtilis* D1 在蔗渣水解液(含葡萄糖 7.1 g/L 與木糖 2.8 g/L)經 96 h 發酵，可得 γ -PGA 9.1±0.1 g/L，產率為 0.51±0.12 g/g (L-glutamate)。所得之 γ -PGA 經純化後可得純 γ -PGA 7.9 g/L，其平均分子量 (M_n) 為 2×10^6 Da。氨基酸分析與 ¹H-NMR、¹³C-NMR 之光譜分析證明純化後之 γ -PGA 純度相當高 (> 96%)，光學異構物之組成比例 (D-麩氨酸/L-麩氨酸) 比例為 56/44，且比例會隨著培養基中添加之 Mn^{2+} 濃度變化而變化。實驗亦證明本研究之蔗渣水解反應所產生之水解液不會抑制後續之發酵反應，因此極適合作為發酵原料以生產有價值之生化產品。以甘蔗生質為原料並透過生質精煉與發酵過程生產聚胺基酸類之生質材料不但可解決環境問題，又可生產高經濟價值之生化產品，有極高之價值。

關鍵詞：甘蔗渣，生物精煉，水解液，發酵，生物高分子，聚麩氨酸

Biorefinery of Sugarcane Bagasse for γ -Poly (Glutamic Acid) Production

FANG-CHEN WU¹, ZERN-JAI WANG² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

²Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

As fossil fuel supplies dwindle and environmental awareness increases, the biorefinery process has become the most promising method for producing alternatives to fossil fuels and traditionally

oil-based chemicals. In particular, the microbial conversion of biomass for the production of biopolymers is an attractive option because of the high marketing demand for degradable biopolymers and the high quantity of available renewable biomass feedstocks. This study investigated batch cultivation on the production of γ -poly (glutamic acid) (γ -PGA) by *Bacillus subtilis* D1 by using a hydrolysate of bagasse as feedstock. It was observed that *B. subtilis* D1 can effectively employ glucose and xylose for γ -PGA production. When *B. subtilis* D1 was cultivated in bagasse hydrolysate ME9 (containing 7.1 g/L of glucose and 2.8 g/L of xylose), 9.1 ± 0.1 g/L of γ -PGA (yield of 0.51 ± 0.12 g/g L-glutamate) could be obtained. The quality of γ -PGA produced was comparable to an authentic sample obtained from conventional fermentation. Moreover, 7.9 g/L of the purified γ -PGA was obtained, and its average molecular weight (M_n) was 2×10^6 Da. Amino acid analysis and $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra revealed its high purity. The ratio of the optical isomer (D-glutamic acid/L-glutamic acid) was 56/44, and it varied with the concentrations of Mn^{2+} supplemented in the medium. Experiments further confirmed that no or low concentration of harmful inhibitors was present in the bagasse hydrolysate, thereby rendering it a suitable material for the production of valuable bioproducts in the subsequent fermentation. The biorefinery of bagasse into biopolymers is a sustainable process that can not only solve environmental problems, but also produce high value-added bioproducts.

Key Words: Bagasse, biorefinery, hydrolysate, fermentation, biopolymer, γ -poly (glutamic acid)

一、前言

近幾年來由於全球暖化、環保意識抬頭、化石燃料之即將用罄與原油價格日漸提升，使得尋找經濟、有效、能永續之替代能源與可再生利用之生質原料以取代傳統石化原料以為因應，已是追求永續發展與永續經濟之重要課題 [16, 41, 54]。以微生物發酵生成之高分子具功能性、生物相容與生物可分解性、是一種非石化資源相關之再生材料。這些材料之使用對人體無害且不會對環境造成污染，因此近年來極受重視。已知其可用於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用 [1, 46-47]。生物質是一種重要的再生資源，有取之不盡、用之不竭的特性。由於作物的生長可以吸收二氧化碳，減少溫室氣體的累積，且所使用材料多為廢棄物，可降低對環境之衝擊。結合生質精煉技術與再生性生質原料為基礎以開發生物高分子材料不但可解決環境問題，同時可生產高經濟價值之產品，如此對環境友善之綠色製程，值得開發 [5, 11, 18-19, 21-22, 31, 48, 51]。

γ -聚麩氨酸 (γ -Poly (glutamic acid); γ -PGA) 是為一結構極為特殊，且可由微生物代謝合成而得之一天然聚合物，其係由 D 及 L 麩氨酸經由 α -胺基及 γ -羥基鏈結聚合而成，結構異於一般蛋白質之天然高分子 [4, 47]。 γ -PGA 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，因此近年來已有相當多之研究著重於開發聚麩氨酸及其衍生物於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用且已有極多成果。目前已知其可為抗癌藥物、基因藥物之載體 [17, 35]、手術之止血劑及癒合劑 [25-26, 43-44]、化妝品之保溼劑 [9]、食品之增稠劑 [55]及抗凍劑 [38, 50]、廢水處理之絮凝劑 [8, 49]及重金屬離子與放射性物質之吸附劑 [10, 27, 36-37]，也可為強力吸水材料及薄膜材料 [13, 33, 39]。

因此本研究擬建立以甘蔗生質為原料並透過生質精煉與發酵過程生產聚胺基酸類之生質材料。

二、材料與方法

(一) 菌種

本研究所使用之聚麩氨酸生產菌株為 *Bacillus subtilis* D1 係由大葉大學聚麩氨酸研究團隊由味精廢水篩選之菌株 [3]。*Bacillus licheniformis* CCRC12826 (現為 *Bacillus licheniformis* BCRC12826) 為研究 γ -PGA 發酵常被使用之菌株 [47-50]，因此在本研究中亦一併探討以與 *B. subtilis* D1 進行比較。

(二) 甘蔗渣水解方法

蔗渣水解採用已知之水解方法 [2]。蔗渣經 0.25 N 硫

酸、131°C、20 min、固液比 1:50 處理後接入 1%纖維水解酵素、pH 4.5，在 50°C，100 rpm 進行水解反應。

(三) 菌株培養基與培養方法

將菌株 *B. subtilis* D1 以劃線培養的方式接種於固態培養基（含洋菜 15 g/L、酵母萃取物 1.5 g/L、牛肉萃取物 15 g/L、NaCl 5 g/L）上，置於恆溫培養箱中（37°C、pH 7.4）培養過夜。以白金耳取一些菌體並置於不含洋菜之液態培養基（含酵母萃取物 1.5 g/L、牛肉萃取物 15 g/L、NaCl 5 g/L）中，並於 37°C 培養箱中，150 rpm 震盪作前培養 48 小時。以 5% (v/v) 前培養液置入於下述之生產培養基，再將接種後之生產培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養（37°C、pH 6.5、150 rpm）[48]。培養期間不定時取少量培養液並以下述方法分析菌體濃度、碳源濃度及 γ -PGA 之濃度。

(四) 碳源種類對聚麩氨酸生產之影響

為探討菌株能否使用其他生質水解液為碳源，因此先探討 *B. licheniformis* CCRC12826（現為 *B. licheniformis* BCRC12826）及 *B. subtilis* D1 菌株能否使用不同單糖為碳源以生產聚麩氨酸。將聚麩氨酸生產菌培養於上述固態培養基與液態培養基，活化後再接種於 ME 8（Medium 8 培養基）之生產培養基。ME 8 含麩氨酸（L-glutamic acid）20 g/L 及不同糖類碳源 20 g/L、NH₄Cl 7 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeCl₃·6H₂O 0.04 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、CaCl₂·2H₂O 0.15 g/L 及 MnSO₄·H₂O 0.04 g/L。使用之糖類碳源可為蔗糖（sucrose）、木糖（xylose）、葡萄糖（glucose）、麥芽糖（maltose）及半乳糖（galactose）。將生產培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養（37°C、pH 6.5、150 rpm），培養期間不定時取少量培養液並以下述方法分析菌體濃度、碳源濃度及 γ -PGA 之濃度。

(五) *Bacillus subtilis* D1 以蔗渣水解液為碳源生產聚麩氨酸

將 *B. subtilis* D1 菌培養於上述固態培養基與液態培養基，活化後再接種於 ME 9（Medium 9 培養基）之生產培養基。ME 9 係以蔗渣水解液（含葡萄糖 7.1 g/L 與木糖 2.8 g/L，並添加麩氨酸 20 g/L、NH₄Cl 7 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeCl₃·6H₂O 0.04 g/L、K₂HPO₄ 0.5 g/L、CaCl₂·2H₂O 0.15 g/L 及 MnSO₄·H₂O 0.04 g/L。將生產培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養（37°C、pH 6.5、150 rpm），培養期間不定時取少量培養液並以下述方法分析菌體濃度、碳源濃度及 γ -PGA 之濃度。

(六) γ -PGA 之純化

發酵培養後，將發酵液 pH 值調為 2.0 後在 4°C、10,000 rpm 離心 30 min，將上清液 pH 值調至 6.5，將上清液及乙醇以 1:4 比例混合後離心（6,000 rpm、4°C、20 min），將白色沈澱物取出，置於室溫下 24 小時後稱重，即為粗 γ -PGA。將粗 γ -PGA 溶於去離子水，放入透析膜中（cut off Mw = 12000~14000）進行透析，取出透析膜內之溶液進行冷凍乾燥即可得到純化後之 γ -PGA。

(七) 分析條件

1. 菌體濃度測定

菌液經過適當稀釋使之測定值介於 0.2~1.0 (ABS) 之間，以分光光度計 (Hach DR-5000, USA) 於波長 660 nm 下測其吸光值，將吸光值乘上稀釋倍數，即為菌液原始吸光值，以光學密度 (optical density, OD) 表示菌體生長情形。

2. 碳源濃度分析

各種單糖以高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC, Hitachi L6200A, Japan) 分析，管柱為 Transgenomic ICsep ICE-ORH-801 (6.5 mm×300 mm)，以 RI 偵測器 (BISCHOFF)，在 65°C 下進行分析。沖提液為 0.0025 N 硫酸水溶液，流速為 0.6 ml/min，樣品注入體積為 20 μ l。將發酵液做適當的稀釋後注入 HPLC，對照糖類標準品之檢量線即可得到各種單糖之濃度。麩胺酸亦以 HPLC 分析，管柱為 SphereClone™ 5 μ m ODS (2) 逆相層析管柱 (250 x 4.6 mm; Phenomenex USA) 沖提液為 0.2 M H₃PO₄/Methanol (比例為 95/5，沖提流速 0.2 ml/min)，偵測波長 220 nm，樣品注入體積為 20 μ l。將發酵液做適當的稀釋後注入 HPLC，對照麩胺酸標準品之檢量線即可得到麩胺酸之濃度。

3. γ -PGA 分子量之測定

以膠體滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 分析，使用管柱為 (TOSOH TSK-GEL G5000PWXL, G4000PWXL)，以 RI 偵測器 (BISCHOFF)，在 50°C 下進行分析。沖提液為純水，沖提流速 0.5 ml/min。用糊精標準品 (phenomenex Dextran standard, 分子量: 7,200、16,230、35,600、74,300、2,754,000) 來製備分子量的檢量線。

4. γ -PGA 之定量

培養基中 γ -PGA 濃度之定量係依照已知之方法[48]，於不定時間取少許培養液並以上述 GPC 方法分析，並將 γ

-PGA 之波峰面積與由純 γ -PGA 標準品所建立之檢量線相對照而得。每次實驗均處理重複三次，實驗結果之數值以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) 表示。

5. 氨基酸分析

氨基酸分析送台大貴儀中心分析，將 γ -PGA 溶在 6N HCl，在 110°C 水解 24 小時後用氨基酸分析儀 (Beckman system 6300E analyzer) 分析氨基酸。

6. 聚麩胺酸之光學異構物分析

將 γ -PGA 樣品溶於去離子水中，再放入透析膜中 (cut off Mw = 12000 ~ 14000) 進行透析，取出透析膜內之溶液進行冷凍乾燥。取乾燥的樣品溶於 6 M HCl，在 150°C 進行水解 24 小時，再將水解液以玻璃纖維 (MFS-0.45 μ m) 過濾，以 HPLC 分析其 D/L 麩氨酸之比例，管柱為 Chiral Daicel CROWNPAK CR (+)，以 RI 偵測器 (BISCHOF) 在波長 200 nm 下進行分析。沖提液為 50 mM HClO₄ 水溶液 (pH 2)，流速為 0.5 ml/min，樣品注入體積為 20 μ l。

7. 總糖分析

總糖分析係依照酚-硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) [20]。以葡萄糖為標準品，將粗 γ -PGA 樣品溶液與葡萄糖樣品 (濃度約在 0-100 μ g/ml) 分別取 2 ml 加入 1 ml 5% (v/v) 的酚試劑，再加入 5 ml (36 N) 的濃硫酸，反應完全後再以分光光度計在波長 480 nm 及 490 nm 測量五碳糖、六碳糖的含量。

三、結果與討論

(一) 甘蔗渣水解

將蔗渣經 0.25 N 硫酸、131°C、20 min、固液比 1:50 處理後接入 1% 纖維水解酵素、pH 4.5，在 50°C，100 rpm 進行水解反應，結果顯示經過三小時後最終之葡萄糖與木糖之濃度 (百分率) 分別為葡萄糖 7.1 g/L (35.5%)、木糖 2.8 g/L (14.0%)，此佔蔗渣總糖之 77.3% [2]，此水解液可作為後續發酵原料以生產 γ -PGA。

(二) 碳源種類對聚麩氨酸生產之影響

為探討研究菌株能否使用生質水解液為碳源以生產 γ -PGA，因此先探討菌株能否使用不同單糖為碳源以生產 γ -PGA。將 *B. licheniformis* CCRC12826 菌株培養於含蔗糖、木糖、葡萄糖、麥芽糖、半乳糖之 ME8 培養基中並於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養 (37°C、pH 6.5、150 rpm)，所得結果顯示菌體生長及 γ -PGA 生產皆非常低 (Data

not shown)。因此改以將 *B. subtilis* D1 菌株培養於含蔗糖、木糖、葡萄糖、麥芽糖、半乳糖之 ME8 培養基中，於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養 (37°C、pH 6.5、150 rpm)，所得結果如表 1 所示。結果顯示不添加糖類碳源，菌體生長非常低且幾乎無 γ -PGA 之生產，添加糖類碳源可促進菌體生長及 γ -PGA 之生產，當添加葡萄糖、木糖與蔗糖時菌體生長及 γ -PGA 之生產較高， γ -PGA 之濃度分別為 13.4 \pm 0.2 g/L、11.5 \pm 0.3 g/L 及 9.2 \pm 0.3 g/L。當添加麥芽糖、半乳糖時菌體生長及 γ -PGA 之生產相當低， γ -PGA 之濃度分別為 3.1 \pm 0.1 g/L 及 1.9 \pm 0.1 g/L。由於葡萄糖與木糖之添加對 *B. subtilis* D1 菌體生長及 γ -PGA 之生產非常有利，又由於蔗渣水解液主要含葡萄糖與木糖，因此應可作為 *B. subtilis* D1 生產 γ -PGA 之有效碳源。若將 *B. subtilis* D1 在含木糖與葡萄糖各 10 g/L 之 ME8 培養基培養，則菌體生長及 γ -PGA 之生產相當較高， γ -PGA 之濃度為 14.4 \pm 0.2 g/L。

(三) *Bacillus subtilis* D1 以蔗渣水解液為碳源生產聚麩氨酸

由以上實驗結果顯示以葡萄糖與木糖之混合液為碳源之添加對 *B. subtilis* D1 菌體生長及 γ -PGA 之生產非常有利，又前述蔗渣經水解反應，所得之水解液主要含葡萄糖 7.1 g/L (35.5%) 與木糖 2.8 g/L (14.0%)，佔蔗渣總糖之 77.3%，因此以此水解液配製成 ME9。將 *B. subtilis* D1 於 ME9 培養之結果如圖 1 所示，葡萄糖之消耗速率較木糖為快，葡萄糖濃度從第 12 小時起快速下降，而木糖濃度則從第 36 小時起開始下降，經 96 h 發酵後，葡萄糖完全消耗完畢，而木糖濃度則剩餘 0.1 g/L，同時麩氨酸濃度從起始之 20 g/L 降至 2.0 g/L，菌體生長隨著碳源下降而上升至 48 h 達到平穩期，而此時 γ -PGA 之濃度則快速累積，*B. subtilis* D1 在蔗渣水解液 (含葡萄糖 7.1 g/L 與木糖 2.8 g/L) 經 96 h 發酵，可得 γ -PGA 9.1 \pm 0.1 g/L，產率為 0.51 \pm 0.12 g /g (L-glutamate)。

(四) 添加 HMF 對 *Bacillus subtilis* D1 利用蔗渣水解液生產 γ -PGA 之影響

文獻曾記載以稀酸水解法水解的操作過程中會產生若干副產物如醋酸 (acetic acid)、呋喃甲醛 (furfural) 及 5-羥甲基糠醛 (5-hydroxymethyl-furfural, HMF)，其對於後續發酵程序產生抑制作用 [30]。由上述實驗結果發現蔗渣水解液可作為 *B. subtilis* D1 生產 γ -PGA 之有效碳源。經 96 h 發酵後，葡萄糖與木糖幾乎完全消耗完畢，同時麩氨酸濃度

從起始之 20 g/L 降至 2.0 g/L，可得 γ -PGA 9.1±0.1 g/L。此結果可能是本研究之蔗渣水解反應不會產生有抑制作用之有害副產物，亦有可能是 *B. subtilis* D1 對有害副產物有高忍受力。因此刻意將 ME9 培養基添加不同濃度之 HMF，再以 *B. subtilis* D1 發酵生產 γ -PGA，結果如表 2 所示，發現 HMF 之添加濃度對 *B. subtilis* D1 生產 γ -PGA 有抑制作用，

當 HMF 添加濃度為 0.25 g/L，已有 14.3% 之 γ -PGA 生產被抑制，當 HMF 添加濃度超過為 1.00 g/L，則有超過 93.4% 之 γ -PGA 生產被抑制，因此可證明本研究之蔗渣水解反應不會產生有抑制作用之有害副產物或產生之濃度極低，而 *B. subtilis* D1 對 HMF 之抑制忍受力不高。

表1. 不同糖類對*Bacillus subtilis* D1菌體生長與 γ -PGA生產之影響

Carbon source (Conc. g l ⁻¹)	γ -PGA yield (g l ⁻¹) ^a	OD ₆₆₀ ^b
None	-----	0.2
Sucrose (20 g l ⁻¹)	9.2±0.3	2.0
Xylose (20 g l ⁻¹)	11.5±0.3	1.8
Glucose (20 g l ⁻¹)	13.4±0.2	2.4
Maltose (20 g l ⁻¹)	3.1±0.1	0.6
Galactose (20 g l ⁻¹)	1.9±0.1	0.3
Glucose+ Xylose (10+10 g l ⁻¹)	14.4±0.2	2.5

^aThe γ -PGA yield was measured after *B. subtilis* D1 was incubated at 37°C, pH 6.5 and 150 rpm for 96h.

^bBacterial growth was measured by measuring the optical density at 660 nm (OD₆₆₀)

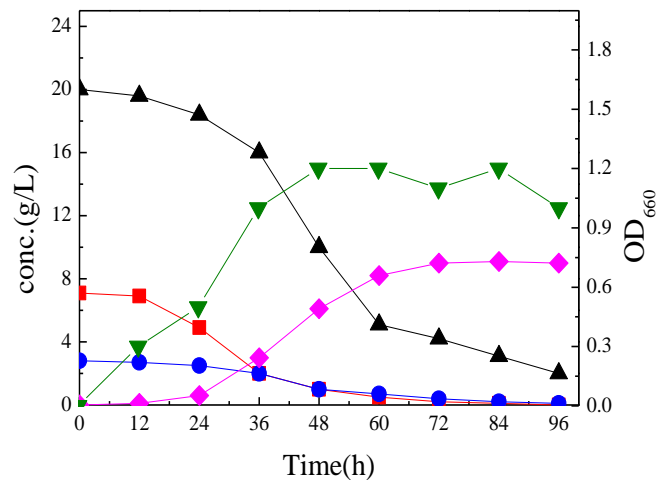


圖 1. *Bacillus subtilis* D1 以蔗渣水解液為碳源生產聚麩氨酸

Symbol : ▲ Glutamate ■ Glucose ● Xylose ◆ r-PGA ▼ OD₆₆₀

表2. 添加HMF對*Bacillus subtilis* D1利用蔗渣水解液生產 γ -PGA之影響

Added HMF Production (g/L)	Total Sugar Consumption %	Glutamate Consumption (g/L)	γ -PGA Production (g/L)	Inhibition of γ -PGA %
0	100	18.0	9.1	0
0.25	95	17.2	7.8	14.3
0.50	75	6.5	3.1	65.9
1.00	35	1.5	0.6	93.4
1.50	2	0.0	0.0	100

培養條件：將 *B. subtilis* D1 菌活化後再接種於含蔗渣水解液之生產培養基 ME 9 (Medium 9 培養基)，並添加不同濃度之 HMF (0 到 1.50 g/L)，將培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養 (37°C、pH 6.5、150 rpm)。

(五) *Bacillus subtilis* D1 以蔗渣水解液為碳源生產聚麩氨酸之純化及物化特性

聚麩氨酸為胞外聚合物 (extracellular polymer)，在發酵生產時，發酵液呈黏稠狀。若將發酵液以高速離心去菌體之後，取上清液加入乙醇溶液中則可得呈現棉花狀之粗聚麩氨酸 8.6 g/L，再經透析、冷凍乾燥即可得到純 γ -PGA 7.9 g/L，其平均分子量 (M_n) 以膠體滲透層析 (GPC) 分析為 2×10^6 Da。微生物所生產 γ -PGA 之分子量多數在 $10^6 - 8 \times 10^6$ (參見表 3)，多分散性 (polydispersity) 則多在 2 - 5。本研究以蔗渣水解液經 *B. subtilis* D1 發酵所獲得 γ -PGA 之分子量與文獻記載之其他生產菌株與生產條件所獲得 γ -PGA 之分子量一致。醣類分析發現並無任何多醣之副產物產生，氨基酸分析僅得麩氨酸一種氨基酸。純化後 γ -PGA 之 $^1\text{H-NMR}$ 之光譜在 D_2O 為 1.8-2.1 ppm ($m, \beta, 2\text{H}$)，2.3-2.4 ppm ($b, \gamma, 2\text{H}$)，4.1-4.2 ppm ($b, \alpha, 1\text{H}$)，7.8 ppm (N-H)； $^{13}\text{C-NMR}$ 之光譜在 D_2O 為 178 ppm (COOH)，174 ppm (CO)，55.0 ppm (C_α)，33 ppm (C_β)，28.0 ppm (C_γ)， $^{13}\text{C-NMR}$ 之光譜圖如圖 2 所示。這些結果可證明純化後之 γ -PGA 純度相當高 (>96%)。將純化之 γ -PGA 水解並分析其光學異構物之組成比例，發現聚麩氨酸的光學異構物 (D-麩氨酸/L-麩氨酸) 比例為 56/44 (如圖 3 所示)，顯示 D-麩氨酸 (D-glutamate) 之比例較高一些。文獻上已報導不同菌屬所生產之 γ -PGA 的光學異構物比例差異很大 (表 4)，*B. anthracis* [23] 與 *Planococcus halophilus* [29] 所生產 γ -PGA 僅含 D-麩氨酸。*Bacillus halodurans* [6]、*Natronococcus occultus* [40] 與 *Natrialba aegyptiaca* [24] 所生產 γ -PGA 僅含 L-麩氨酸。多株 *B. subtilis* 所生產 γ -PGA 則含不同 D-麩氨酸/L-麩氨酸之比例，*B. subtilis* (natto) [32] 所生產 γ -PGA 含 50-80% D-麩氨酸與 50-20% L-麩氨酸。*B. subtilis* (chungkoojang) [7] 所生產 γ -PGA 含 60-70% D-麩氨酸與 40-30% L-麩氨酸。*B. licheniformis* [45] 所生產 γ -PGA 含 10-100% D-麩氨酸。*Bacillus megaterium* [52] 所生產 γ -PGA 含 20-50% D-麩氨酸。

(六) Mn^{2+} 濃度對 *Bacillus subtilis* D1 以蔗渣水解液為碳源生產聚麩氨酸之光學異構物之組成比例之影響

文獻曾報導有一些菌株所生產 γ -PGA 的光學異構物比例會隨著培養基中添加之 Mn^{2+} 濃度變化而有不同。研究發現當 Mn^{2+} 濃度從 0 到 $615 \mu\text{M}$ 時，ATCC 9945A 這株菌

所產 γ -PGA 中的 L-麩氨酸的百分比會從 60% 降至 10% [15]。針對 *B. licheniformis* NCIMB 11709 這株菌所做的結果也顯示當 MnSO_4 濃度增加，其 γ -PGA 中的 D-麩氨酸也會隨之增加 [45]。所以本實驗將添加不同 MnSO_4 濃度來得到不同 D/L 比例之聚麩氨酸。將 Mn^{2+} 濃度 (0 to $1230 \mu\text{M}$) 添加至前述蔗渣水解液所配製成之培養基 (ME9) 以探討其對 *B. subtilis* D1 所生產之 γ -PGA 產物之光學異構物的組成比例，結果如表 5 所示。實驗結果顯示對 *B. subtilis* D1 這株菌， Mn^{2+} 濃度確實會影響變化，也會改變其 γ -PGA 之 D/L-麩氨酸的比例。當 Mn^{2+} 濃度從 $0 \mu\text{M}$ 變化至 $1230 \mu\text{M}$ 時其 D-麩氨酸所佔比例從 39.6% 變化至 69.8%，L-麩氨酸所佔比例隨 Mn^{2+} 濃度增加而減少，此結果與 Mn^{2+} 濃度對 *B. licheniformis* ATCC 9945A [15] 及 *B. licheniformis* NCIMB 11709 [45] 之影響一致。

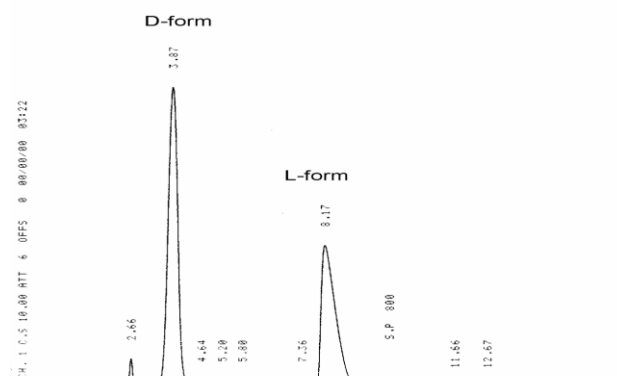


圖 2. 純化後之 γ -PGA 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 圖譜。

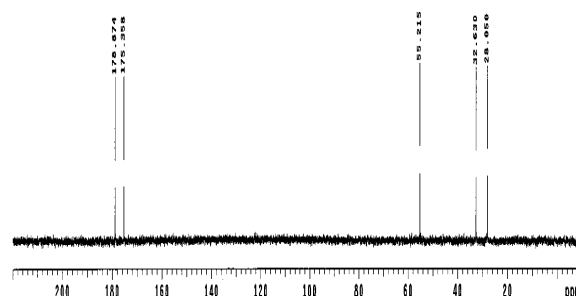


圖 3. 純化後之 γ -PGA 的光學異構物 (D-麩氨酸/L-麩氨酸) 比例。

表 3. 目前生產聚麩氨酸之菌株及碳、氮源比較

菌株	營養源		培養條件	γ -PGA 產量(g/l) 及 分子量(Da)	參考資料
	組成分	(g/l)			
<i>Bacillus subtilis</i> D1	Glutamic acid Glucose Xylose	20 10 10	37°C 4 days	14.4±0.2 (2 x 10 ⁶ Da)	This study
<i>Bacillus subtilis</i> D1	Glutamic acid Bagasse hrdolysate	20	37°C 4 days	9.1±0.1 g/L (2 x 10 ⁶ Da)	This study
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945	Glutamic acid Glycerol Citric acid NH ₄ Cl	20 80 12 7	37°C 4 days	17-23 (1.4x10 ⁵ -9.8 x 10 ⁵)	[14, 53]
<i>Bacillus subtilis</i> F02-1	Glutamic acid Glucose Veal infusion broth	70 1 20	37°C 2-3 days	45.5 (1.20x10 ⁶)	[32]
<i>Bacillus subtilis</i> IFO3335	Glutamic acid Citric acid (NH ₄) ₂ SO ₄	30 20 5	37°C 2 days	10-20 (1.0x10 ⁵ -2.0x10 ⁶)	[34]
<i>Bacillus licheniformis</i> A35	Glucose NH ₄ Cl	75 18	30°C 3-5 days	8-12 (3.0 x10 ⁵ -5.0x10 ⁵)	[12]
<i>Bacillus subtilis</i> TAM-4	Fructose NH ₄ Cl	75 18	30°C 4 days	20 (6.0x10 ⁵ -1.6x10 ⁶)	[28]
<i>Bacillus licheniformis</i> CCRC12826	Glutamic acid Glycerol Citric acid NH ₄ Cl	65 170 22 7	37°C 4 days	21 (4.0 x10 ⁶ -6.0x10 ⁶)	[48]
<i>Bacillus subtilis</i> (chungkookjang)	Glutamic acid Sucrose, (NH ₄) ₂ SO ₄	20 50 20	30°C 5 days	13.5 (10-1,000kDa)	[7]
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	Maltose Soy sauce Glutamate	60 70 30	40°C 3-4 days	35 (分子量未定)	[42]

表 4. 不同菌株所生產 γ -PGA 之光學異構物 (D-麩氨酸/L-麩氨酸) 比例

Organisms	Content (%)		References
	D-glutamate	L-glutamate	
<i>Bacillus anthracis</i>	100	0	[23]
<i>Planococcus halophilus</i>	100	0	[29]
<i>Bacillus halodurans</i>	0	100	[6]
<i>Natrialba aegyptiaca</i>	0	100	[24]
<i>Natronococcus occultus</i>	0	100	[40]
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	50-80	50-20	[32]
<i>Bacillus subtilis</i> (chungkoojang)	60-70	40-30	[7]
<i>Bacillus licheniformis</i>	10-100	90-0	[45]
<i>Bacillus megaterium</i>	20-50	80-50	[52]
<i>Bacillus subtilis</i> D1	56	44	This Study

表 5. Mn^{2+} 濃度對 *Bacillus subtilis* D1 生產聚麩氨酸之光學異構物組成比例之影響

Mn^{2+} 濃度	D-form 占的比例 (%)
0 μ M	40.3
0.615 μ M	39.6
6.15 μ M	40.4
16 μ M	58.7
61.5 μ M	62.1
615 μ M	65.3
1230 μ M	69.8

培養條件：將 *B. subtilis* D1 菌活化後再接種於含蔗渣水解液之生產培養基 ME 9 (Medium 9 培養基)，並添加 Mn^{2+} 濃度 (0 to 1230 μ M)，將培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養 (37 $^{\circ}$ C、pH 6.5、150 rpm)。

四、結論

本研究建立以甘蔗生質為原料並透過生質精煉與發酵過程生產聚胺基酸類之生態材料，結果發現 *B. subtilis* D1 可利用木糖與葡萄糖。*B. subtilis* D1 在含木糖與葡萄糖各 10 g/L 之 ME8 培養基培養，菌體生長及 γ -PGA 之生產相當較高， γ -PGA 之濃度為 14.4 \pm 0.2 g/L。*B. subtilis* D1 亦可利用蔗渣水解液生產高分子化合物，其在蔗渣水解液 (含葡萄糖 7.1 g/L 與木糖 2.8 g/L) 經 96 h 發酵，可得 γ -PGA 9.1 \pm 0.1 g/L，產率為 0.51 \pm 0.12 g/g (L-glutamate)。所得 γ -PGA 經純化後可得純 γ -PGA 7.9 g/L，平均分子量 (M_n) 為 2×10^6 Da，氨基酸分析與 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 之光譜分析證明純化後之 γ -PGA 純度相當高 (>96%)。光學異構物之組成比例分析發現聚麩氨酸的光學異構物(D-麩氨酸/L-麩氨酸)比例為 56/44，且比例會隨著培養基中添加之 Mn^{2+} 濃度變化而變化，實驗亦證明本研究之蔗渣水解反應所產生之水解液不會抑制後續之發酵反應，因此極適合作為發酵原料以生產有價值之生化產品。以甘蔗生質為原料並透過生質精煉與發酵過程生產聚胺基酸類之生態材料不但可解決廢棄物之環境問題，又可生產高經濟價值之生化產品，有極高之價值。

誌謝

本研究誠摯感謝科技部計畫提供相關經費支援(計畫編號：MOST 103-2313-B-212 -002 -MY3)，使得本研究得以順利進行，謹此致謝。

參考文獻

1. 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。
2. 施英隆、吳芳禎、王政捷 (民104)，以生物精煉法生產生物性高分子之研究(1/3)，行政院科技部專題研究計畫期中進度報告(MOST 103-2313-B-212-002-MY3)，台北。
3. 施英隆、吳芳禎、王政捷 (民105)，以生物精煉法生產生物性高分子之研究(2/3)，行政院科技部專題研究計畫期中進度報告(MOST 103-2313-B-212-002-MY3)，台北。
4. 施英隆、范宜琮 (民 90)，以微生物生產聚麩氨酸及其應用，生物資源生物技術，3，17-26。
5. 張光偉 (民 102)，從綠色材料到藍色革命，工業材料雜誌，323，70。
6. Aono, R. (1987) Characterization of structural component of cell walls of alkalophilic strain of *Bacillus sp.* C-125. Preparation of poly(γ - L-glutamate) from cell wall component. *Biochemical Journal*, 245(2), 467-472.
7. Ashiuchi, M., T. Kamei, D. H. Baek, S. Y. Shin, M. H. Sung, K. Soda, T. Yagi and H. Misono (2001) Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5), 764-769.
8. Bajaj, I. B. and R. S. Singhal (2011) Flocculation properties of poly (γ -glutamic acid) produced from *Bacillus subtilis* isolate. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 745-752.
9. Ben-Zur, N. and D. M. Goldman (2007) γ -Poly glutamic acid: a novel peptide for skin care. *Cosmetics and Toiletries Magazine*, 122 (4), 64-72.
10. Bhattacharyya, D., J. A. Hestekin, P. Brushaber, L. Cullen, L. G. Bachas and S. K. Sikdar (1998) Novel polyglutamic acid functionalized microfiltration membranes for sorption of heavy metals at high capacity. *Journal of Membrane Science*, 141 (1), 121-135.
11. Cavalheiro, J. M. B. T., M. C. M. D. de Almeida, C. Grandfils, and M. M. R. da Fonseca (2009) Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5),

- 509-515.
12. Cheng, C., Y. Asada and T. Aaida (1989) Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(9), 2369-2375.
 13. Choi, H. J. and M. Kunioka (1995) Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly (γ -glutamic acid). *Radiation Physics and Chemistry*, 46(2), 175-179.
 14. Cromwick, A. M., G. A. Birrer and R. A. Gross (1996) Effects of pH and aeration on γ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(2), 222-227.
 15. Cromwick, A. M. and R. A. Gross (1995). Effect of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC9945A physiology and γ -poly (glutamic acid) formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(5), 259-267.
 16. De Jong, E., A. Higson, P. Walsh and M. Wellisch (2012) Product developments in the bio-based chemicals arena. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 6(6), 606-624.
 17. Dekie, L., V. Toncheva, P. Dubruel, E. H. Schacht, L. Barrett and L. W. Seymour (2000) Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy. *Journal of Control Release*, 65(1-2), 187-202.
 18. De Oliveira, M. R., R. S. S. F. da Silva, J. B. Buzato and M. A. P. C. Celligoi (2007) Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2), 177-183.
 19. Du, C., J. Sabirova, W. Soetaert, C. Ki and S. Lin (2012) Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14-25.
 20. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
 21. Gobina, E. (2013) Biorefinery Technologies: Global Markets. BCC Research report EGY054B, ISBN: 1-56965-626-6. See more at <http://www.bccresearch.com/market-research/energy-and-resources/biorefinery-global-markets-egy054b.html>
 22. Han, Y. W. and M. A. Watson (1992) Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3), 257-260.
 23. Hanby, W. and H. Rydon (1946) The capsular substance of *Bacillus anthracis*. *Biochemistry*, 40(2), 297-307.
 24. Hezayen, F. F., B. H. Rehm, B. J. Tindall, A. Steinbüchel and R. Eberhardt (2001) Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1133-1142.
 25. Hsu, F. Y., Y. Y. Cheng, S. W. Tsai and W. B. Tsai (2010) Fabrication and evaluation of a biodegradable cohesive plug based on reconstituted collagen/ γ -polyglutamic acid. *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterial*, 95(1), 29-35.
 26. Hsu, S. H. and C. H. Lin (2007) The properties of gelatin-poly (γ -glutamic acid) hydrogels as biological glues. *Biorheology*, 44(1), 17-28.
 27. Inbaraj B. S., T. H. Kao, T. Y. Tsai, C. P. Chiu, R. Kumar and B. H. Chen (2011) The synthesis and characterization of poly (γ -glutamic acid) -coated magnetite nanoparticles and their effects on antibacterial activity and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 22(7), 1-9.
 28. Ito, Y., T. Tanaka, T. Ohmachi and Y. Asada (1996) Glutamic acid independent production of Poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(8), 1239-1242.
 29. Kandler, O., H. König, J. Wiegel and D. Claus (1983) Occurrence of poly- γ -D-glutamic acid and poly- α -L-glutamine in the genera *Xanthobacter*, *Flexithrix*, *Sporosarcina* and *Planococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(1), 34-41.
 30. Klinke, H. B., A. B. Thomsen and B. K. Ahring (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10-26.

31. Koller, M., R. Bona, G. Braunegg, C. Hermann, P. Horvat, M. Kroutil, J. Martinz, J. Neto, L. Pereira and P. Varila (2005) Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), 561-565.
32. Kubota, H., T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka and M. Tanguchi (1993) Production of Poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57(7), 1212-1213.
33. Kunioka M. (2004) Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly (amino acid) s. *Macromolecular Bioscience*, 4(3), 324-329.
34. Kunioka, M. and A. Goto (1994) Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 867-872.
35. Li, C., D. F. Yu, A. Newman, F. Cabral, C. Stephens, N. Hunter, L. Milas and S. Wallace (1998) Complete regression of well-established tumors using novel water-soluble poly (L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Research*, 58(11), 2404-2409.
36. Mark S. S., Y. C. Crusberg, C. M. DaCunha and A. A. Iorio (2006) A heavy metal biotrap for wastewater remediation using poly- γ -glutamic acid. *Biotechnology Progress*, 22(2), 523-531.
37. McLean, R. J., D. Beauchemin, L. Clapham and T. J. Beveridge (1990) Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3671-3677.
38. Mitsuiki, M., A. Mizuno, H. Tanimoto and M. Motoki (1998) Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly (glutamic acid) s. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 891-895.
39. Murakami, S. and N. Aoki (2006) Bio-based hydrogels prepared by cross-linking of microbial poly (γ -glutamic acid) with various saccharides. *Biomacromolecules*, 7(7), 2122-2127.
40. Niemetz, R., U. Kärcher, O. Kandlera, B. J. Tindall and H. König (1997) The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *The FEBS Journal*, 249(3), 905-911.
41. Nigam, P. S. and A. Singh (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52-68.
42. Ogawa, Y., F. Yamaguchi, K. Yuasa and Y. Tahara (1997) Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus Subtilis* (natto) in jar fermenters. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61(10), 1684-1687.
43. Otani, Y., Y. Tabata and Y. Ikada (1996) A new biological glue from gelatin and poly (L-glutamic acid). *Journal of Biomedical Material Research*, 31(2), 157-166.
44. Otani, Y., Y. Tabata and Y. Ikada (1996) Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly (L-glutamic acid). *Biomaterials*, 17(14), 1387-1391.
45. Pérez-Camero, G., F. Congregado, J.J. Bou and S. Muñoz-Guerra (1999) Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly (γ -glutamic acid) . *Biotechnology and Bioengineering*, 63(1), 110-115.
46. 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.
47. Shih, I. L. and Y. T. Van (2001) The production of poly- (γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, 79(3), 207-225.
48. Shih, I. L., Y. T. Van and Y. N. Chang (2002) Application of statistical experimental methods to optimize production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 213-220.
49. Shih, I. L., Y. T. Van, L. C. Yeh, H. G. Lin and Y.N. Chang (2001) Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource Technology*, 78(3), 267-272.
50. Shih, I. L., Y. T. Van and Y. Y. Sau (2003) Antifreeze activities of poly (γ -glutamic acid) produced by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 25(20), 1709-1712.
51. Silva, L., M. Taciro, R. M. Michelin, J. Carter, J. Pradella and J. Gomez (2004) Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 245-254.
52. Torii, M. (1956) Optical isomers of glutamic acid comprising bacterial glutamyl polypeptides. *Medical Journal of Osaka University*, 6, 1043-1046.
53. Troy, F. A. (1973) Chemistry and biosynthesis of the poly

-
- (γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. I. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 248(1), 305-315.
54. Werpy T and G. Petersen, Ed. (2004) *Top Value Added Chemicals From Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. (The US DOE Office of Energy Efficiency and Renewable Energy). Oak Ridge, TN, USA
55. Yamanaka, S. (1991) New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent 3047087.
- 收件：105.07.11 修正：105.10.05 接受：105.11.23