

以批次醱酵槽生產聚麩胺酸並探討其化學衍生物 吸水性質之研究

吳芳禎¹ 吳嘉興² 邵亦遠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

聚麩胺酸是經由微生物發酵生產的天然生物性材料，其具有水溶性、生物可分解與可食等特性，且聚麩胺酸本身及其分解物對人體與環境無毒害，目前聚麩胺酸已知可應用於食品、化妝品、醫藥材料、環境保護等領域，因此工業化大量生產聚麩胺酸此一對環境友善之生物性材料相當的重要。本研究以十升發酵槽培養 *Bacillus licheniformis* BCRC 12826 並探討 pH、曝氣量、攪拌速率等因子對菌株生長、聚麩胺酸產量的影響，結果發現 pH 6.5、轉速 200 rpm、曝氣量為 3 L/min 較適合聚麩胺酸的生成，最高達 25.93 g/L。本研究亦探討聚麩胺酸衍生物之吸水性，使用 *B. licheniformis* BCRC 12826 菌株所生產聚麩胺酸，並利用化學方法交聯偶合聚麩胺酸與環氧樹脂以得吸水凝膠，實驗發現 2.5 % 聚麩胺酸溶液於 pH 5.33 與 150 μ l 環氧樹脂進行反應 4 天，所得之凝膠可達到吸水重為乾凝膠重的 50~60 倍，吸水性較其它條件製備之凝膠優越。不同吸水材料之吸水實驗中，發現 *Bacillus subtilis* C1 所生產之聚麩胺酸-甘油複合物於 30 分鐘吸水實驗中，吸水重為乾凝膠重之 26 倍，然而較長時間之吸水，此材料即完全溶解。

關鍵詞：聚麩胺酸，交聯，水凝膠

Microbial Production of γ -Polyglutamic Acid in Fermenter and the Water Absorption Properties of Its Chemical Derivatives

FANG-CHEN WU¹, JIA-SIN WU², YI-YAUN SAU² 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

γ -Polyglutamic acid (γ -PGA) is a naturally occurring biomaterial produced by microbial fermentation. It is water soluble, biodegradable, edible, and nontoxic toward humans and the environment. γ -PGA has potential applications in food, cosmetics, medicine, and environmental protection. The development of this material is both environmentally and economically valuable. In this study, we investigated the effects of pH, aeration, and agitation on γ -PGA production by *Bacillus licheniformis* BCRC 12826 in a 10-L fermenter. The pH value of 6.5, an agitation speed of 200 rpm, and an aeration rate of 3 L/min were found to be the most suitable conditions for γ -PGA production by this strain, with the highest yield of γ -PGA being 25.93 g/L. The water absorption properties of γ -PGA derivatives were also investigated. The γ -PGA derivatives were prepared by coupling the γ -PGA produced by *B. licheniformis* BCRC 12826 (2.5 wt%) with 150 μ L of diglycidyl ether of bisphenol A at pH 5.33 for 4 days. The obtained cross-linked product displayed strong water absorption activity; its specific water content was approximately 50–60. In comparison, the specific water content was approximately 26 for a γ -PGA-glycerol conjugate produced previously by *B. subtilis* C1. However, the γ -PGA-glycerol conjugate dissolved entirely after 30 min in water.

Key Words: γ -polyglutamic acid, crosslinking, hydrogel

一、前言

γ -聚麩氨酸 (γ -Poly (glutamic acid); γ -PGA) 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 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 [2, 22]。 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有極多成果，目前已知其可為抗癌藥物、基因藥物之載體 [14, 8]、手術之止血劑及癒合劑 [9-10, 20-21]、化妝品之保濕劑 [4]、食品之增稠劑 [26] 及抗凍劑 [17, 23]、廢水處理之絮凝劑 [3, 24] 及重金屬離子與放射性物質之吸附劑 [5, 11, 15-16]，且可為強力吸水材料及薄膜材料 [6, 12, 18]。

本實驗室曾以回應曲面法 [1]，探討 *Bacillus licheniformis* BCRC 12826 於搖瓶實驗中培養基之最適化，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（中心混成實驗設計）。以 Medium E 為基礎之探討中，發現 γ -PGA 產量（粗產重）從 5.27 g/L（一階）增至最終之 21 g/L（二階），產量增加了 300%，而麩胺酸、檸檬酸、甘油三碳源之最佳培養基濃度為麩胺酸（65 g/L）、檸檬酸（22 g/L）、甘油（170 g/L），因此以回應曲面法探討 γ -PGA 生產之最適化，確實為有效的方法。以醱酵槽進行

培養與搖瓶培養比較，具有下很多優點-包括可提供因搖瓶培養所缺乏的曝氣，可控制所需的 pH 值，可提供菌體更好的生長環境，進而可大量生產 γ -PGA 以為商業化之應用。因此本研究將延續搖瓶實驗研究，進一步利用醱酵槽來探討曝氣量、攪拌速率、控制 pH 值對 γ -PGA 產量影響。

Choi and Kunioka [6] 發現以 γ -輻射線照射聚麩胺酸可形成極具吸水性之水凝膠材料。高吸水材料之特性將可以作為尿布、藥物釋放材料、農業用蓄水材料、保濕劑等之廣泛應用。因此本研究亦同時探討將上述所生產出之 γ -PGA 進一步利用化學方法使其與環氧樹脂交聯以製備吸水凝膠，並探討此水凝膠之吸水特性。

二、材料與方法

（一）培養基與培養方法

1. 搖瓶培養

將菌株 *B. licheniformis* BCRC12826 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），將其置於恆溫培養箱中（37 $^{\circ}$ C）培養一天。以白金耳取一些菌體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 $^{\circ}$ C 培養箱中，150 rpm 震盪作前培養 48 小時。再以 5%（v/v）前培養液置於生產培養基（含麩氨酸



L-glutamic acid 65 g/L、檸檬酸 citric acid 22 g/L、甘油 glycerol 170 g/L、 NH_4Cl 7g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/L、 K_2HPO_4 0.5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/L)，接種後之生產培養基再放置於恆溫震盪培養箱進行恆溫震盪培養（37°C, 150 rpm）。

2. 發酵槽批次培養

使用 10L 發酵槽（type: MAJOR SCIENCE，利政科技，台北）。首先，將 200 mL 液態培育的種子培養液接種至 5 L 上述之最適生產培養基中，然後開始培養。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。使用 2 N NaOH 與 2 N HCl 溶液維持培養液在適當的 pH 值（6.0、6.5、7.0）。攪拌速度使用 PID 控制器維持在 100-300 rpm。曝氣量維持在 2 L/min - 4 L/min。發酵培養於 37°C 培養 96 小時。並每 24 小時採用離線分析測量菌體濃度、碳源濃度及 γ -PGA 產量。

（二）聚麩胺酸之純化

經過 96 小時醱酵培養後，將醱酵 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。

（三）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. 麩胺酸、檸檬酸分析

以高效液相層析儀（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）分析，管柱為 SphereClone™ 5 μm ODS (2) 逆相層析管柱（250 x 4.6 mm）。沖提液為 0.2 M H_3PO_4 /Methanol（比例為 95/5，沖提流速 0.2 ml/min），偵測波長 210 nm），樣品注入體積為 20 μL 。將發酵液做適當的稀釋後注入 HPLC，對照麩胺酸及檸檬酸標準品之檢量線即可得到麩胺酸及檸檬酸之濃度。

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. 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。

5. 核磁共振分析

^1H -NMR 及 ^{13}C -NMR 分析送中興貴儀中心分析。將 γ -PGA 溶解於 D_2O ，再以核磁共振儀（Varian Unity Inova 600 spectrometer）分析。

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 μm ）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 HClO_4 水溶液（pH 2），流速為 0.5 ml/min，樣品注入體積為 20 μl 。

（四）以 γ -PGA 製備水凝膠

將上述所生產之 γ -PGA，純化後溶解於去離子水（15 Ω ）中，濃度為 5%、2.5%、1.25%。將溶液以 6 N NaOH 調至 pH 7.0，再將 100 ml 之 γ -PGA 溶液加入不同量之 Diglycidyl ether of bisphenol A（DGEBA）溶液（1g/1 ml DMSO）150 μl 、300 μl 及 500 μl ，置於往復式震盪水槽（水溫 60°C、轉速 150rpm），進行反應 24、96 小時。將反應後液體以濾紙過濾，並置於烘箱乾燥一天後以下述方法測試凝膠之吸水性。

（五） γ -PGA 水凝膠吸水性之測試

秤取兩張濾紙並使其等重，此時濾紙重為 W_0 ，將上述反應後液體（含凝膠）以濾紙過濾，並置於烘箱乾燥一天後以電子天秤秤取重量，得之數據為 W_1 （濾紙與凝膠之乾重）。將實驗組（凝膠與濾紙）與對照組（濾紙）分別置入尼龍網中，放入含有等量去離子水（15 Ω ）的玻璃



燒杯中，分別於 30 min、60 min、90 min、120 min、180 min、240 min 後，將實驗組與對照組於玻璃燒杯中以鑷子夾取出，並讓水分自然滴瀝 15 min，此時實驗組秤得之重量以 W_2 表示，對照組之重量則以 W_3 表示。計算水凝膠的吸水率=凝膠吸水重 (g) /凝膠乾重 (g)。計算：

$$\text{吸水率} = \frac{\text{凝膠吸水重}}{\text{凝膠乾重}}$$

$$\text{凝膠吸水重} = W_2 - W_3$$

$$\text{凝膠乾重} = W_1 - W_0$$

三、結果與討論

(一) pH 對聚麩胺酸生產之影響

在改變 pH 值的發酵實驗數據中 (圖 1)，發現培養 96 小時在 pH 6.5 時聚麩胺酸產量為 19.43 g/L，pH 7.0 時為 11.20 g/L，而於 pH 6.0 時是完全不會產生聚麩胺酸。在菌生長部份於培養 96 小時，pH 6.0 時之 OD 達到 3，比在 pH 6.5，pH 7.0 時多了一倍，所以在 pH 6.0 下比較利於菌的生長，然而 pH 6.0 之聚麩胺酸產量比 pH 6.5 及 pH 7.0 時來的低，

可能在 pH 6.0 之環境不利產生聚合酶。在基質消耗的部份，於 pH 6.0 下基質之消耗 (不管聚麩胺酸或檸檬酸) 皆較 pH 6.5，pH 7.0 時低，此時基質之消耗可能只提供菌生長，而非合成聚麩胺酸之原料。在 pH 6.5 時，檸檬酸之利用率最高 (96 h, 50%)，已知檸檬酸可經由 TCA cycle 轉化為聚麩胺酸，此可合理解釋在 pH 6.5 時，聚麩胺酸之產量最高。由聚麩胺酸之消耗曲線知聚麩胺酸之最終消耗量在 pH 6.5 及 pH 7.0 時較 pH 6.0 多，而 pH 6.0 之菌量數較 pH 6.5 及 pH 7.0 多，因此在 pH 6.5，pH 7.0 時部份聚麩胺酸參與聚麩胺酸之生成。而聚麩胺酸在此扮演的角色並不像 Kunioka (1994) [13] 所述是作為一活化因子，它可能也參與了 γ -PGA 的生成，而在聚麩胺酸的消耗曲線圖中我們可以發現聚麩胺酸會反覆的上升與下降，推斷下降的部份是因參與了 γ -PGA 的生成；上升的部份，有研究指出當聚合物產生時，*B. licheniformis* 會產生去聚合酶 (depolymerase)，所以聚麩胺酸又被分解成為單體聚麩胺酸。Cromwich and Gross (1995) [7] 探討 pH 對於 *B. licheniformis* ATCC 9945A 生產聚麩胺酸之影響，研究顯示在 pH 6.5 時 γ -PGA 的產量最高 (14.2 g/L)，而在 pH 8.25，7.4，5.5 下則分別只有 4.22 g/L，6.92 g/L，9.92 g/L。

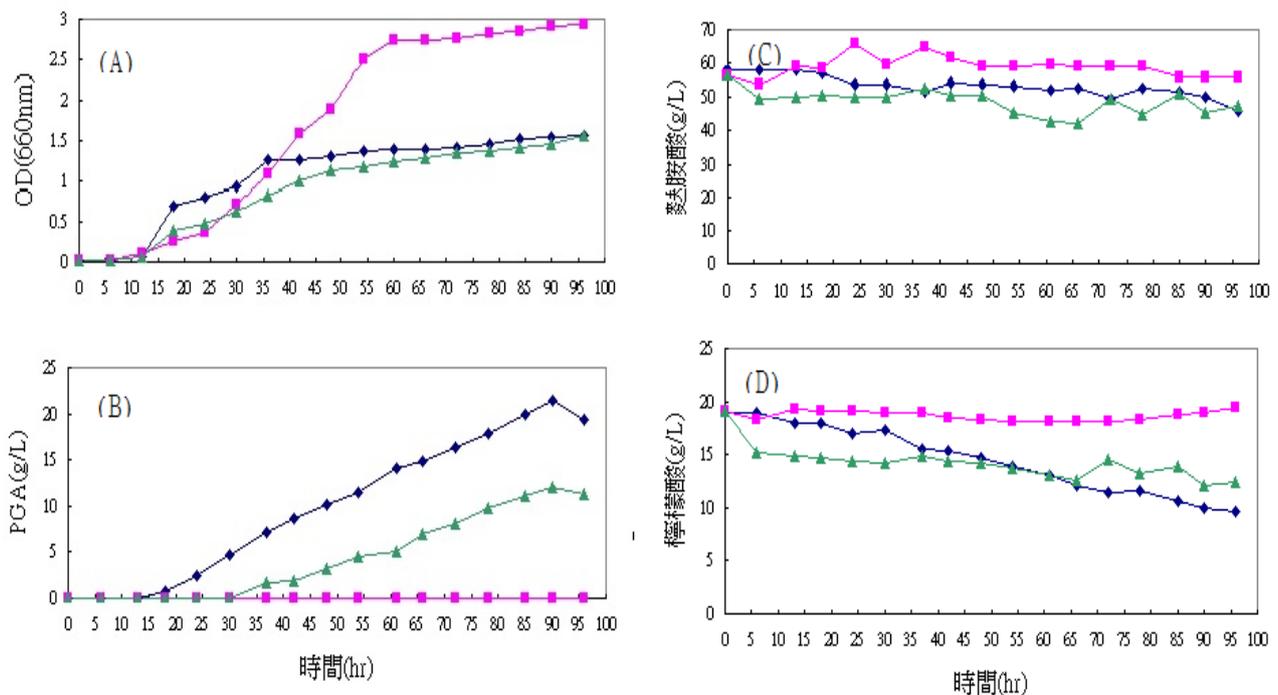


圖 1. pH 對聚麩胺酸生產之影響：(A) 菌生長曲線、(B) 聚麩胺酸產量曲線、(C) 聚麩胺酸消耗曲線、(D) 檸檬酸消耗曲線

Symbol：(◆) pH 6.5；(■) pH 6.0；(▲) pH 7.0.

發酵槽培養條件：*B. licheniformis* BCRC 12826 接種至 5 L 之最適生產培養基中，固定曝氣量(2L/min)及攪拌速度(200rpm)，於 37°C 培養 96 小時。



(二) 攪拌速率對聚麩胺酸生產之影響

在醱酵槽中，增加攪拌速率不只是能提高菌體對基質的利用率，及提供菌體的生長速率，更能增加氧氣傳遞速率。在本實驗中，培養基溫度與上節相同，pH 控制在 6.5，曝氣量控制在 2.0 L/min，攪拌速率則分別控制在 100，200，300 rpm，實驗結果示於圖 2。在改變轉速的醱酵實驗數據中，我們可以發現在轉速 100，300 rpm 時菌體生長較 200 rpm 時緩慢。在 γ -PGA 的產量方面，以轉速 200 rpm 時的產量最高 (96 h, 19.43 g/L)。在轉速 100 rpm 時產量最少，可能是菌量生長的不夠多，再加上基質的質傳遞速率慢 (轉速慢) 之故。在轉速 300 rpm 時，雖然菌量較在 200 rpm 時多出兩倍，但是產量沒有預期的高。在基質消耗方面，如預期的，轉速高時基質利用率也比較高。Ogawa 等人 (1997) [19] 對 *B. subtilis* 菌株所作的研究指出，在轉速達 450 rpm 時，會降低 γ -PGA 產量。

(三) 曝氣量對聚麩胺酸生產之影響

對於一耗氧菌而言，氧氣的供應是很重要的，它能使菌體生長的更快速。在 Cromwich and Gross (1995) [7] 的研究

中顯示，對於 *B. licheniformis* 9945A 而言，如果曝氣量從 0.5 L/min 至 2 L/min 則 γ -PGA 的產量會增加，因同是 *B. licheniformis*，故本研究將曝氣量再提高以觀察 γ -PGA 的產量是否能再增加。實驗培養基之溫度與前節相同，pH 控制在 6.5，攪拌速率控制在 200 rpm，曝氣量則分別控制在 2 L/min，3 L/min，4 L/min。實驗結果示於圖 3。在改變曝氣量的醱酵實驗數據中，我們可以發現曝氣量為 3 L/min 時，菌之生長上升較慢，所以溶氧的消耗時間亦較其他兩者慢；在 γ -PGA 產量部份，因為曝氣量在 4 L/min 時會於 20 小時後，產生大量的氣泡而造成醱酵液溢出的現象，而其後因醱酵液越來越黏稠，而導致更多的醱酵液溢出，所以在 55 小時後 γ -PGA 的產量呈現下降的現象，所以只能比較曝氣量 2 L/min 及 3 L/min。根據結果顯示，在將曝氣量提高，其 γ -PGA 的產量上升了 33% (從 19.43 g/L 在 2 L/min 至 25.93 g/L 在 3 L/min)；而在基質 (麩胺酸及檸檬酸) 消耗部份，因曝氣量 4 L/min 時溢出的關係，所以其基質下降的比較多，而在另外兩個曝氣量時，則基質變化相差無太大。

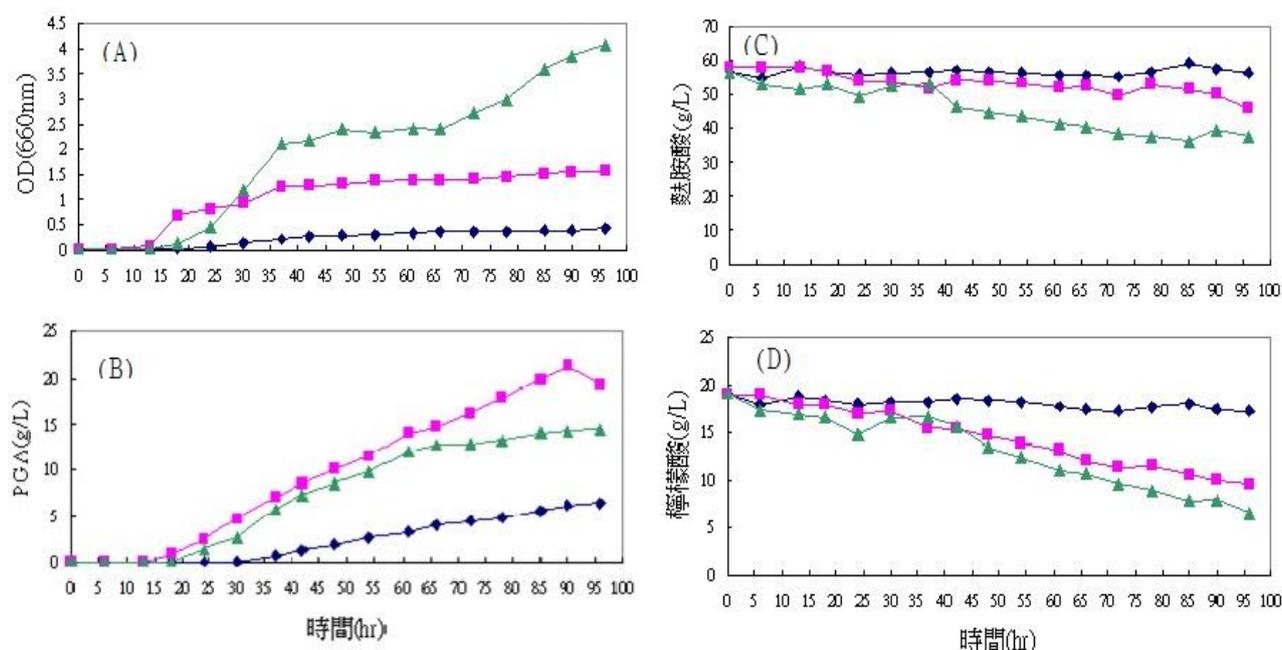


圖 2. 攪拌速率對聚麩胺酸生產之影響：(A) 菌生長曲線、(B) 聚麩胺酸產量曲線、(C) 麩胺酸消耗曲線、(D) 檸檬酸消耗曲線

Symbol : (◆) 100 rpm ; (■) 200 rpm ; (▲) 300 rpm

發酵槽培養條件：*B. licheniformis* BCRC 12826 接種至 5 L 之最適生產培養基中，固定曝氣量 (2L/min) 及 pH (6.5)，於 37°C 培養 96 小時。



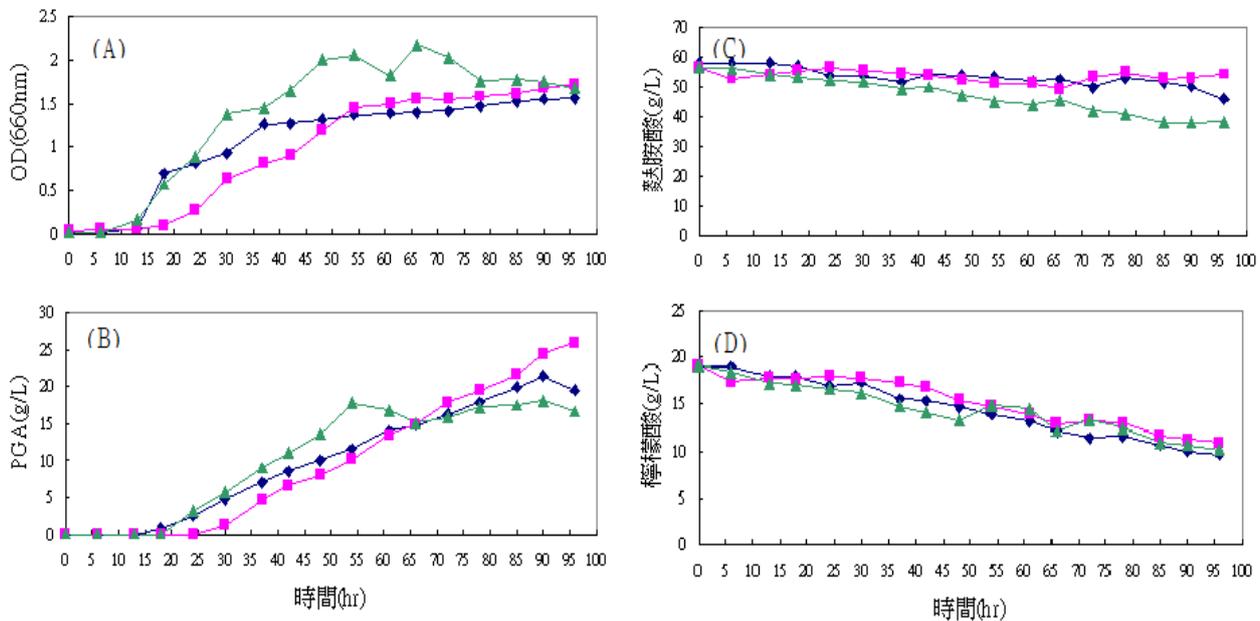
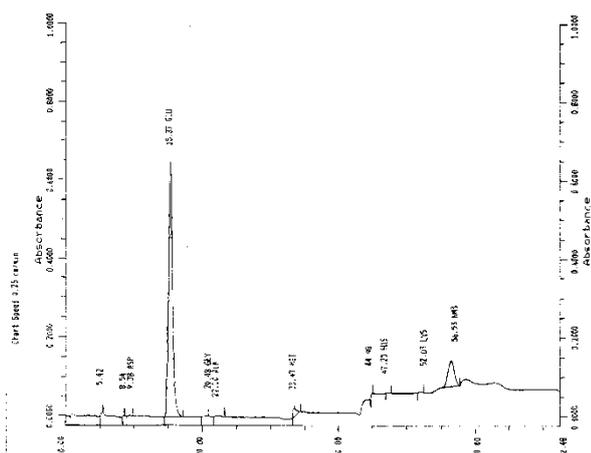
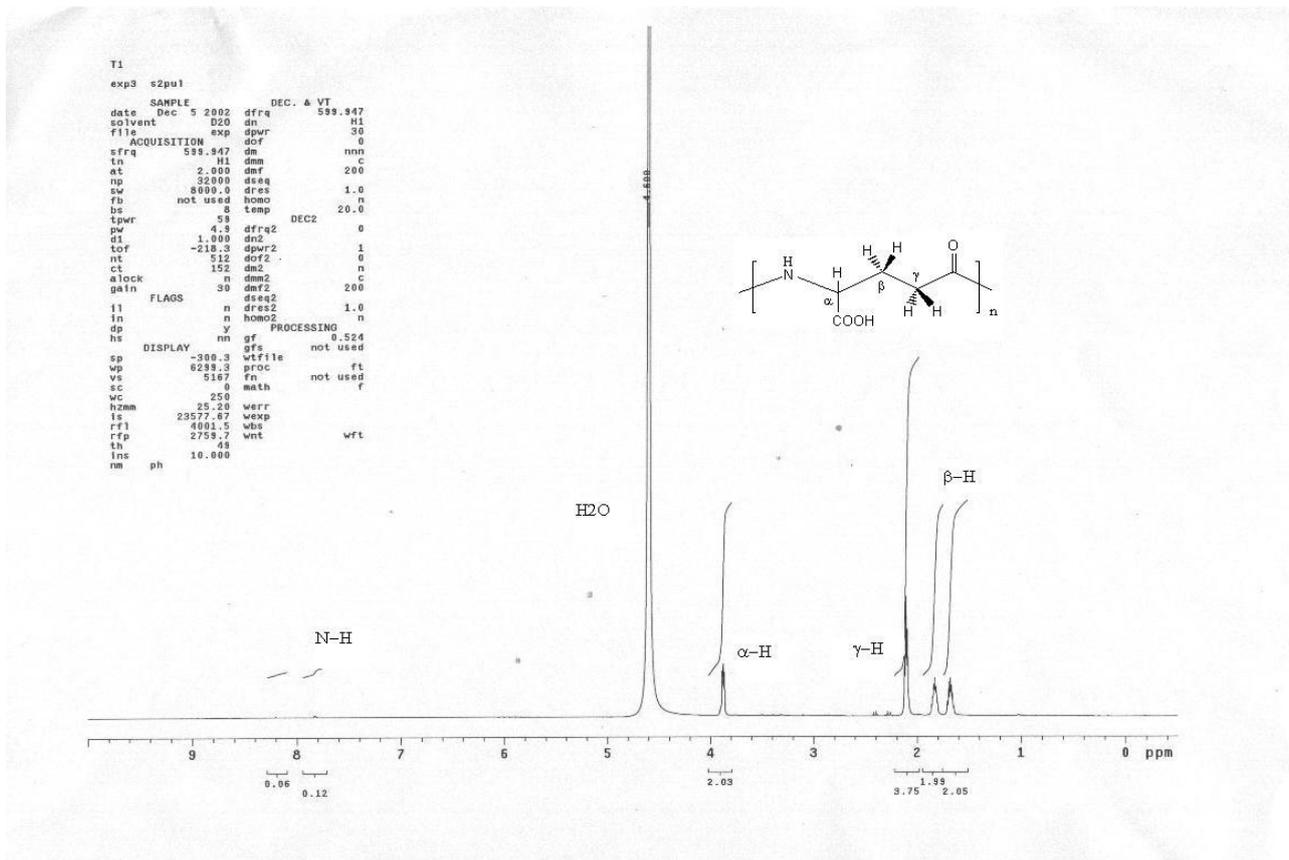
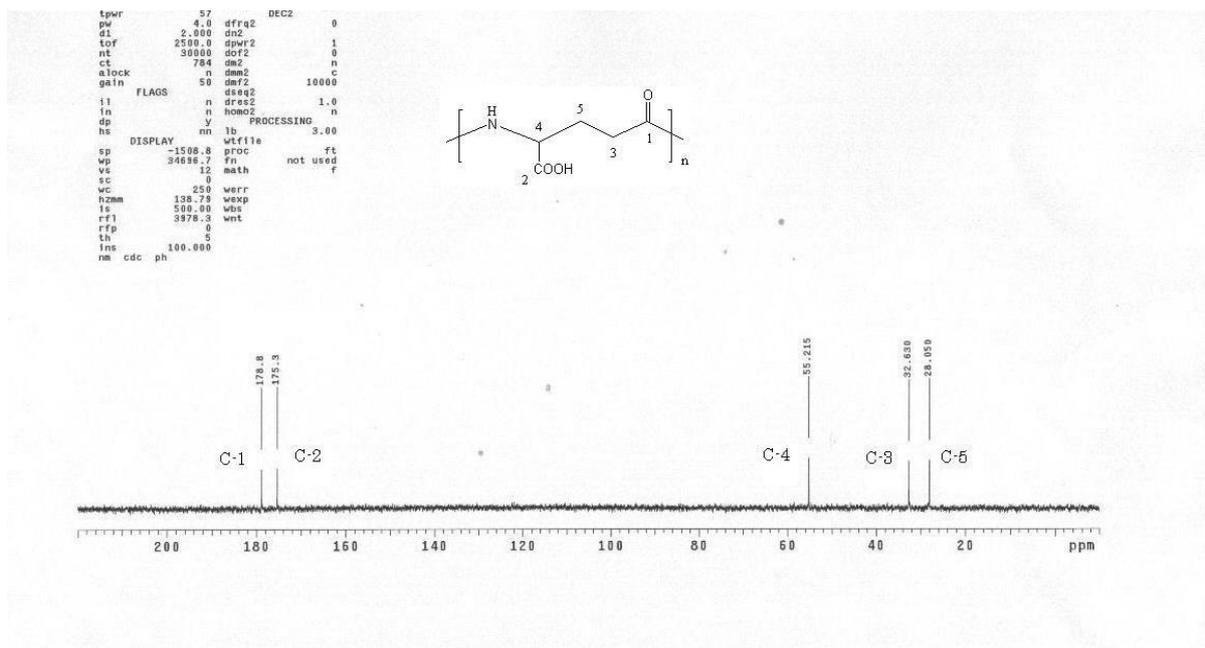


圖 3. 曝氣量對聚麩胺酸生產之影響：(A) 菌生長曲線、(B) 聚麩胺酸產量曲線、(C) 麩胺酸消耗曲線、(D) 檸檬酸消耗曲線

Symbol : (◆) 2 L/min ; (■) 3 L/min ; (▲) 4 L/min

發酵槽培養條件： *B. licheniformis* BCRC 12826 接種至 5 L 之最適生產培養基中，固定攪拌速度 (200rpm) 及 pH (6.5)，於 37°C 培養 96 小時。



圖 5. 以醱酵槽培養 *B. licheniformis* BCRC 12826 所生產 γ -PGA 之 $^1\text{H-NMR}$ 分析圖圖 6. 以醱酵槽培養 *B. licheniformis* BCRC 12826 所生產 γ -PGA 之 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析圖

，聚麩胺酸溶液濃度低時所製備之凝膠，其吸水率較低；(3) 在相同條件下，環氧樹脂濃度較高時，所製備之凝膠之吸水率較低；環氧樹脂濃度較低時，所製備之凝膠之吸水率較高；(4) 相同濃度聚麩胺酸溶液與環氧樹脂會因為反應時間的不同，凝膠吸水率具有明顯的差異，數據也顯示出交聯反應 4 天的凝膠，其吸水率平均皆高於交聯反應 1 天的凝膠。

將上述方法所製備之吸水凝膠與 3 種 γ -PGA 衍生物進行吸水試驗比較，吸水時間 (30 min) 後，紀錄並比較凝膠之吸水率，結果如表 2 所示。表 2 中 C1-T1 (A) 及 C1-T1 (B) 分別代表我們實驗室以 *B. subtilis* C1 於發酵槽培養所生產之特殊聚麩胺酸-甘油複合物[25]經純化與未純化之產物、材料 1 為味丹公司所生產之 PGA 吸水凝膠 (PGA HYDROGEL)。此三種材料雖然具有吸水能力，

但是超過吸水 30 分鐘後極易溶解於水中，溶解性由強至弱程度為材料 1 > C1-T1 (A) > C1-T1 (B)，因此只比較吸水材料於吸水 30 分鐘的數據。如表 2 所示各項吸水材料於吸水 30 分鐘後，C1-T1 (B) 於 30 分鐘吸水率最高、吸水最迅速，吸水重量可達凝膠乾重的 26 倍之多，PGA-gel (7) (2.5 % PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33) 於 30 分鐘之吸水率次之、其幾與 C1-T1 (A) 和市售水凝膠 (材料 1) 之吸水率相當，其吸水重量約可達凝膠乾重 11 倍之多。本研究以 *B. licheniformis* BCRC12826 所生產之 γ -PGA 經以不同環氧樹脂濃度、聚麩胺酸溶液濃度在不同 pH 值交聯反應不同時間所得之各凝膠，除 PGA-gel (7) 外，30 分鐘吸水率幾乎皆小於 C1-T1 (B)、C1-T1 (A) 與材料 1。

表 1. 在不同製備條件下所生產之 γ -PGA 與環氧樹脂交聯產物之吸水率測試

吸水性應用測試 反應 1 天 pH=5.33 rpm150 Temp=60°C										
藥品濃度	吸水時間 (min)									
	30	60	90	120	180	240	1080	2520	3960	
2.5% PGA+150 μ l DGEBA	6.02	9.74	11.02	11.00	12.05	12.63	13.66	17.36	24.80	
2.5% PGA+300 μ l DGEBA	3.24	3.14	3.09	3.03	3.31	3.38	3.36	3.89	3.92	
2.5% PGA+500 μ l DGEBA	1.53	1.52	1.42	1.60	1.69	1.87	1.66	1.21	1.24	
1.25% PGA+150 μ l DGEBA	5.01	9.04	10.03	12.85	12.75	12.98	12.83	15.77	18.43	
1.25% PGA+300 μ l DGEBA	1.78	2.59	2.64	2.55	2.26	2.62	3.09	2.84	2.49	
1.25% PGA+500 μ l DGEBA	0.58	0.61	0.59	0.83	1.11	1.07	0.81	0.46	0.36	

吸水性應用測試 反應 4 天 pH=5.33 150 rpm Temp=60°C										
藥品濃度	吸水時間 (min)									
	30	60	90	120	180	240	1080	2520	3960	
2.5% PGA+150 μ l DGEBA	11.30	23.85	34.75	44.19	47.24	58.21	67.00	58.40	50.26	
2.5% PGA+300 μ l DGEBA	3.45	6.92	8.08	8.60	9.78	8.60	6.97	2.45	2.67	
2.5% PGA+500 μ l DGEBA	0.76	0.99	1.05	1.39	1.45	1.41	1.84	1.77	1.14	
1.25% PGA+150 μ l DGEBA	2.12	6.32	7.69	8.71	8.51	8.37	8.29	9.35	10.28	
1.25% PGA+300 μ l DGEBA	0.58	0.43	0.48	0.64	0.98	1.21	3.60	2.61	2.52	
1.25% PGA+500 μ l DGEBA	0.29	1.35	1.40	1.48	1.31	1.12	1.47	1.25	1.23	

註：吸水率=(凝膠吸水重(g)/凝膠乾重(g))；使用之 γ -PGA 為 *B. licheniformis* BCRC 12826 所生產；實驗數據為二重複之平均值。



表 2. 在不同製備條件下所生產之各類 γ -PGA 衍生物吸水 30 分鐘之吸水率比較

實驗條件與名稱	30min 吸水率 (g/g)
C1-T1 (A) : <i>B. subtilis</i> C1 於發酵槽生產之聚麩胺酸-甘油複合物 (未純化)	11.01
C1-T1 (B) : <i>B. subtilis</i> C1 於發酵槽生產之聚麩胺酸-甘油複合物 (經純化)	26.25
PGA-gel (1) : 2.5% PGA+150 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	6.02
PGA-gel (2) : 2.5% PGA+300 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	3.24
PGA-gel (3) : 2.5% PGA+500 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	1.53
PGA-gel (4) : 1.25% PGA+150 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	5.01
PGA-gel (5) : 1.25% PGA+300 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	1.78
PGA-gel (6) : 1.25% PGA+500 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=5.33	0.58
PGA-gel (7) : 2.5% PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	11.30
PGA-gel (8) : 2.5% PGA+300 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	3.45
PGA-gel (9) : 2.5% PGA+500 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	0.76
PGA-gel (10) : 1.25% PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	2.12
PGA-gel (11) : 1.25% PGA+300 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	0.58
PGA-gel (12) : 1.25% PGA+500 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33	0.29
PGA-gel (13) : 2.5% PGA+150 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	3.49
PGA-gel (14) : 2.5% PGA+300 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	2.22
PGA-gel (15) : 2.5% PGA+500 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	1.57
PGA-gel (16) : 1.25% PGA+150 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	1.61
PGA-gel (17) : 1.25% PGA+300 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	1.12
PGA-gel (18) : 1.25% PGA+500 μ l DGEBA 反應 1 天 pH=7.00	0.78
PGA-gel (19) : 2.5% PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	4.04
PGA-gel (20) : 2.5% PGA+300 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	3.06
PGA-gel (21) : 2.5% PGA+500 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	2.73
PGA-gel (22) : 1.25% PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	1.79
PGA-gel (23) : 1.25% PGA+300 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	1.25
PGA-gel (24) : 1.25% PGA+500 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=7.00	0.45
材料 1 : 市售 PGA HYDROGEL- (台灣味丹公司)	10.91

註：吸水率=(凝膠吸水重(g)/凝膠乾重(g))；實驗數據為二重複之平均值；除標示為 C1-T1 及材料 1 外，所使用之 γ -PGA 為 *B. licheniformis* BCRC 12826 所生產。

四、結論

本研究以十升發酵槽培養 *B. licheniformis* BCRC 12826 並探討 pH、曝氣量、攪拌速率等因子對菌株生長、 γ -PGA 產量的影響，結果發現 pH 6.5、轉速 200 rpm、曝氣量為 3 L/min 較適合 γ -PGA 的生合成，最高達 25.93 g/L。在探討探討聚麩胺酸衍生物之吸水性方面，使用 *B. licheniformis* BCRC 12826 菌株所生產聚麩胺酸 2.5% 溶液，在 pH 值為 5.33，環氧樹脂濃度為 150 μ l 之條件進行反應 4 天，所得凝膠之吸水重可為乾凝膠重約 50~60 倍。將交聯之 γ -PGA 水凝膠與 3 種 γ -PGA 衍生物進行吸水試

驗比較，發現 *B. subtilis* C1 所生產之聚麩胺酸-甘油複合物於 30 分鐘吸水實驗中，吸水重為乾凝膠重之 26 倍，然而較長時間之吸水，此材料即完全溶解。PGA-gel (7) (2.5 % PGA+150 μ l DGEBA 反應 4 天 pH=5.33) 於 30 分鐘之吸水率幾與市售水凝膠 (材料 1) 之吸水率相當，其吸水重量約可達凝膠乾重 11 倍之多。

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. 范宜琮 (民 90)，以苔蘚桿菌生產聚麩胺酸之研究，大葉大學環境工程學系碩士論文。
2. 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。
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Kunioka M. (2004) Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s. *Macromolecular Bioscience*, 4(3), 324-329.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.



-
23. 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.
24. 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.
25. Shih, I. L., J. Y. Wu, P. J. Wu and M. H. Shen (2005) An unusual bioconjugate of glycerol and poly (γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis* C1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15 (5), 919-923.
26. Yamanaka, S. (1991) New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent 3047087.

收件：106.01.23 修正：106.03.28 接受：106.05.04

