

以一株不需添加麩胺酸之新篩選菌株生產 γ -聚麩胺酸及產物特性之研究

吳芳禎¹ 吳珮貞² 施英隆^{2*}

¹大葉大學食品暨應用生物科技學系

^{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

γ -聚麩胺酸 (γ -PGA) 是一種極有應用潛力的微生物聚合物，可用在食品、化妝品、醫藥材料、農業和環境保護等領域。但以麩胺酸為原料所生產之 γ -聚麩胺酸成本高，因而限制其大量之應用。篩選能使用較便宜的原料取代麩胺酸來生產 γ -PGA 之菌株是克服此限制的重要關鍵。本論文篩選出一株具有高耐鹽性的 γ -PGA 生產菌株 *Bacillus subtilis* S01，該菌株為不需添加麩胺酸之菌種且具有提高 γ -PGA 產量之潛力，在不存在 L-麩胺酸的情況下會產生 γ -PGA。當 *B. subtilis* S01 於不含麩胺酸之 ME-T 培養基中培養至第 6 天， γ -PGA 達最大產量 (20.4g/L)。胺基酸分析發現該物質僅由單一胺基酸 (麩胺酸) 組成; 膠體滲透層析 (GPC) 分析顯示其平均分子量 (M_n) 為 4.2×10^6 Da; ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 之光譜顯示純化後之 γ -PGA 純度相當高 (>97%); 光學異構物之組成分析顯示 D-麩胺酸/L-麩胺酸比例為 97/3，且比例與添加之 Mn^{2+} 濃度無關。另外結果亦顯示，細胞內之麩胺酸消旋酶參與 L-和 D-麩胺酸的轉化。另外，*B. subtilis* S01 係一株耐鹽性極高之菌株，在 NaCl 濃度高達 5% 時仍能生長與生產 γ -PGA，但 γ -PGA 的分子量隨著鹽濃度的增加而降低，當 NaCl 鹽濃度為 0.05% 和 5% 時，經 6 天培養時間所產生 γ -PGA 之分子量分別為 3.94×10^6 及 0.39×10^6 Da，降低了約 10 倍。除會使用檸檬酸及甘油外，研究結果亦顯示 *B. subtilis* S01 亦可使用葡萄糖與木糖生產 γ -PGA，因此應有利用農產廢棄物之水解液為碳源之潛力。本研究已成功篩選出一株具有高耐鹽性、不需添加麩胺酸且具有高 γ -PGA 生產力之特殊優良菌株，此應對降低 γ -PGA 的生產成本與促進 γ -PGA 工業化生產與應用有很大幫助。

關鍵詞：生物高分子， γ -聚麩胺酸，高耐鹽性，不需添加麩胺酸之菌株，高生產力

High-Level Production and Characterization of Poly- γ -Glutamic Acid by a Newly Isolated Glutamate-Independent Strain

FANG-CHEN WU¹, PE-JEN WU² and ING-LUNG SHIH^{2*}



¹ Department of Food and Applied Biotechnology, 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

γ -Poly-glutamic acid (γ -PGA) is a microbial polymer with promise for use in various fields, including food, cosmetics, agriculture, medicine, and environmental protection. However, using glutamic acid as a raw material to produce γ -PGA is costly, thus limiting its applicability. One approach to overcoming this limitation is to screen bacterial strains to identify a more efficient producer with lower production costs. This study investigated a strain with a high salt tolerance (*Bacillus subtilis* S01) that produces γ -PGA. Because this strain does not require glutamic acid, it has potential use to increase the production of γ -PGA. When *B. subtilis* S01 was cultivated in ME-T medium, a maximum yield of γ -PGA (20.4g / L) was obtained on the sixth day of cultivation. The quality of the produced γ -PGA was comparable to that of an authentic sample obtained from conventional fermentation. An amino acid analysis revealed that the substance consisted of only a single amino acid (glutamic acid). A gel permeation chromatography analysis showed that its average molecular weight (Mn) was 4.2×10^6 Da. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra revealed a high purity level (>97%). A composition analysis of the optical isomers revealed that the ratio of D-glutamic acid to L-glutamic acid was 97:3, and the ratio was independent of the added Mn²⁺ concentration. In addition, the results revealed that intracellular glutamate racemase was the enzyme involved in the conversion of L- and D-glutamic acid. *B. subtilis* S01 has extremely high salt tolerance and can continue to grow and produce γ -PGA with a NaCl concentration of as high as 5%, although the molecular weight of the γ -PGA produced decreases as the salt concentration increases. Because this strain can effectively use glucose and xylose to produce γ -PGA, it has potential to use the hydrolysate in agricultural waste as a carbon source. In this study, a promising strain with high salt tolerance, glutamic acid independence, and high γ -PGA productivity was identified that can greatly reduce the production cost of γ -PGA and increase its industrial production and application.

Key Words: Biopolymer, γ -Poly (glutamic acid), high salt tolerance, glutamate-independent strain, high productivity

一、前言

γ -聚麩胺酸 (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 麩胺酸經由 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, 8, 49]。 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胺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, 36]、手術之止血劑及癒合劑 [25-26, 46-47]、化妝品

之保濕劑 [10]、食品之增稠劑 [59]及抗凍劑 [40, 52]、廢水處理之絮凝劑 [9, 51]及重金屬離子與放射性物質之吸附劑 [11, 27, 38-39]，也可為強力吸水材料及薄膜材料 [14, 33, 41]。

聚麩胺酸最早被發現於 *Bacillus anthracis* 的莢膜中 [29]，另外 Fujii 也發現在納豆（日本的一種傳統發酵食品）的粘液中含有大量聚麩胺酸及聚醣類物質 [19]。自從 Bovarnick (1942) 首次發現 *Bacillus subtilis* 可合成聚麩胺酸並釋放至培養基中，目前已知有多株桿菌株，包括 *Bacillus anthracis*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus*



subtilis，均能代謝生產胞外之 γ -PGA [9, 13, 20, 22, 24, 32, 37, 42, 45, 49, 54, 56]。

雖然 γ -PGA 具有廣泛之應用潛力，但其未來應用的重要關鍵應在 γ -PGA 的工業化生產與生產成本。目前許多研究都試圖提高 γ -PGA 的產量，例如篩選具有高產量，高生產率和高轉化效率的潛在菌株及優化培養條件來提高生產率 [30, 45, 60]，近來亦有研究探討以較便宜的原料取代麩胺酸來生產 γ -PGA，如稻草 [53]，糖蜜 [60] 和乳製品廢棄物 [58] 等農業副產品 [61] 的適用性已被評估。最近，Anju 等人 [4] 亦探討以稻草，甘蔗廢料，甘蔗渣，棉稈和高粱秸稈水解物為原料生產 γ -PGA 的比較。我們實驗室最近也成功的使用甘蔗渣水解液為原料生產 γ -PGA [1]。以上促進 γ -PGA 的工業化生產與生產成本方案的成敗，開發出優良的菌株至關重要。

已知在生產 γ -PGA 之菌株中，可依其對麩胺酸的需求將菌株分為兩類：一是需添加麩胺酸之菌 (*glutamate-dependent strains*)，另一類則是不需添加麩胺酸之菌種 (*glutamate-independent strains*) [9, 37, 45, 49]。上述能使用較便宜的原料取代麩胺酸來生產 γ -PGA 之菌株屬不需添加麩胺酸之菌種 (*glutamate-independent strains*)。一般相信篩選具不需添加麩胺酸之菌種 (*glutamate-independent strains*) 且具有優良發酵特性的菌株仍然是提高 γ -PGA 產量的最可行方法 [4, 60]。我們在篩選具有高耐鹽性的 γ -PGA 生產菌株過程中，分離出了一種以枯草芽孢桿菌為特徵的細菌，該細菌為不需添加麩胺酸之菌種且具有提高 γ -PGA 產量之潛力 [57]。本論文報導該菌株之篩選、生理與生化性質鑑定及碳源，氮源和培養條件對其 γ -PGA 生物合成的影響之詳細研究及結果。

二、材料與方法

(一) 菌株篩選、分離與鑑定

菌株篩選係依照由本實驗室從未經滅菌的醬油麴篩選 γ -PGA 生產菌之方法 [57]，簡述如下：本研究係從在地醬油生產工廠取出第二階段中的醬油麴進行菌株的篩選、分離。此未經滅菌的醬油麴用滅菌水稀釋。稀釋後，將試樣塗抹於固態營養培養基上 (NA, Difco Laboratories Michigan, 美國)，其含洋菜 15 g/L、蛋白朊 1.5 g/L、牛肉萃取物 3 g/L、NaCl 5 g/L，並置於恆溫培養箱中 (37°C、pH 7.4) 培養過 24 小時。隨機選擇發育的菌落，並通過重複稀

釋和在 NA 上培養來純化。收集純菌落並在補充有 0.4% L-麩胺酸和 4% 檸檬酸的 NA 固態營養培養基中進一步培養。在 37°C 培養 24 小時後，收集高度粘液狀菌落，接種到 100 ml 之 F-培養基 (Medium F; ME-F) 中，該 F-培養基含麩胺酸 (65 g/L)，檸檬酸 (22 g/L)，甘油 (170 g/L)，NH₄Cl (7.0 g/L)，MgSO₄ · 7H₂O (0.5 g/L)，FeCl₃ · 6H₂O (0.04 g/L)，K₂HPO₄ (0.5 g/L) 和 CaCl₂ · 7H₂O (0.15 g/L) [50]。選擇了最高產量的 γ -PGA 生產菌株，並將其接種在 100 ml 的 2-XYT 培養基中 (含 1.5% Peptone 胰蛋白、1% Yeast Extract 酵母萃取物，0.5% NaCl)，並在 37°C 下培養 24 小時。通過以 6,000 g 離心 15 分鐘收集細胞，然後將其懸浮在 20ml 的 20% 甘油溶液中。細胞懸液在 -20°C 下保存直至使用。菌株鑑定則是將菌株畫在平板培養基上，交由生物資源保存及研究中心以 16S rDNA 序列分析及微生物脂肪酸鑑定系統進行菌種的鑑定程序。

(二) 菌株培養基與培養方法

1. *B. subtilis* S01 於 ME-F 之培養

首先將上述儲存的懸浮液 (1ml) 接種到 100 ml 的 2-XYT 培養基中，並在 37°C，150rpm 下培養 15h。再將細胞懸液 (0.4 ml) 轉移到上述之 F-培養基 (ME-F) 中 [50]，在 37°C、pH 6.5、150rpm 的有氧條件下培養。將培養基 F 中之甘油、L-麩胺酸及檸檬酸進行濃度變化以探討碳源對 γ -PGA 生產之影響，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及 γ -PGA 之濃度。

2. *B. subtilis* S01 於 ME-8 之培養

由於稻草，甘蔗渣，棉稈和高粱秸稈等農產廢棄物之水解液主要含不同單糖，為探討 *B. subtilis* S01 能否使用農產廢棄物之水解液為碳源以生產 γ -PGA 之可能性，將 *B. subtilis* S01 培養於 ME 8 生產培養基。ME 8 含麩胺酸 (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 [1]。使用之糖類為木糖 (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及 γ -PGA 之濃度。

(三) 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，再將上清液及乙醇以 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。產品可利用苯酚-硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) [18] 證實是否存在任何多醣。 γ -PGA 產品之其他特性透過胺基酸分析、膠體滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 和 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜儀進行鑑定，敘述於下。

(四) 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。菌體生長情形亦可以乾菌重表示，簡述如下：將培養液離心去除上層液，所得菌體以蒸餾水反覆洗滌數次，置於 105°C 烘箱中烘乾至恆重，秤重後減去容器重量即為乾菌重 (Dry cell weight, DCW)。

2. 碳源濃度分析

各種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 μl 。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醣之濃度。麩胺酸亦以 HPLC 分析，管柱為 SphereClone™ 5 μm ODS(2) 逆相層析管柱 (250 x 4.6 mm; Phenomenex USA)。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 220 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 [50, 53, 60]，於不定時間取少許培養液並以上述 GPC 系統進行分析，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。

5. 胺基酸分析與 NMR 光譜分析

胺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 小時後用胺基酸分析儀 (Beckman system 6300E analyzer) 分析胺基酸。NMR 光譜分析係將樣品送至國科會中興貴重儀器中心，高磁場核磁共振分析儀 (VARIAN UNITY INOVA 600 America) 進行分析， γ -PGA 樣品溶解於 D_2O 。

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 110°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 麩胺酸之比例，管柱為 Chiral Daicel CROWNPAK CR (+)，以 UV 偵測器 (Hitachi) 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 。

7. 總醣分析

總醣分析係依照酚-硫酸法 (phenol-sulfuric acid method) [18]。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 $\mu\text{g/ml}$) 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 測量五碳醣、六碳醣的含量。

(五) 酶的製備及麩胺酸消旋酶和 D-胺基酸轉氨酶活性的測定

酶的製備和酶活性的測定遵循文獻的方法並進行小幅的修改 [6]。收集在上述條件下生長的細胞，並用 50ml 的 0.85%NaCl 溶液洗滌兩次。將收穫的細胞懸浮於補充有 1 mM EDTA 和 0.1 mM 苯基甲烷磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride) 的 5 ml 標準緩衝液 (0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 含 1% 2-mercaptoethanol 和 10% 甘油) 中，然後在 4°C 以超音波處理以破壞細胞。為了測量



麩胺酸消旋酶活性，將包含 20 μmol 的 Tris-HCl (pH 8.0)，20 μmol 的 L-麩胺酸和酶的反應混合液 (0.1ml) 在 37°C 下培養 30 分鐘。加入 8 μl 之 12 M HCl 以終止反應。通過加入 16 μl 的 6 M NaOH 中和混合液。用 2 mM CuSO_4 溶液將混合液稀釋 5 倍後，取出 5 μl 等分試樣，並如上所述使用 Crownpak CR (+) 管柱通過液相層析法測定 D- / L-麩胺酸的組成。D- 胺基酸胺基轉移酶 (D-Amino acid aminotransferase) 之活性分析係根據先前文獻之方法 [6]，透過測定由 10 mM α -酮戊二酸酯 (α -ketoglutarate) 和 25 mM D-丙氨酸 (D-alanine) 所產生的 D-麩胺酸 (D-glutamate) 的量來分析。每單位酵素活性 (U) 定義為每分鐘催化 1 μmol D-麩胺酸 (D-glutamate) 形成所需酶的量。

三、結果與討論

(一) 菌株分離與鑑定

本實驗之菌株 (命名為 *Bacillus subtilis* S01) 係由本實驗室從未經巴氏殺菌的醬油中分離出產生 γ -PGA 的菌株之一 [57]。該菌株革蘭氏染色為陽性，且此菌株具運動性，觸酶、氧化酶反應均為陽性，好氧環境下會生長，會產生內孢子，並使用了檸檬酸鹽。根據形態觀察和生理學特徵，根據 Bergy 的《系統細菌學手冊》中的描述，菌株被鑑定為桿菌株 [57]。經由生物資源保存及研究中心進行菌種的鑑定，以 16S rDNA 序列分析及微生物脂肪酸鑑定系統進行鑑定程序顯示出與枯草芽孢桿菌相似的 97%。此菌株不需要生物素即可生長，此與許多分類為納豆枯草芽孢桿菌的 γ -PGA 生產菌不同。此外，該菌株可以在 12% NaCl 的存在下生長，而市售納豆食品中的枯草芽孢桿菌在 5% NaCl 的存在下即不能生長和生產 γ -PGA。

(二) 碳源和氮源對 *Bacillus subtilis* S01 生長和 γ -PGA 生產的影響

1. *B. subtilis* S01 於 ME-F 之培養

碳源對 *B. subtilis* S01 生長和 γ -PGA 生產的影響結果如表 1 所示，當 *B. subtilis* S01 置於培養基 F (ME-F) 中，在 37°C、150rpm 培養至 96 小時下可生產 γ -PGA 2.22 g/L。為探討個別碳源 (甘油、L-麩胺酸及檸檬酸) 之重要性，將培養基 F 中之甘油、L-麩胺酸及檸檬酸分別省略後，所得培養結果亦示於表 1；當 S01 菌在未添加 L-麩胺酸的培養基中也可生產 γ -PGA，最大產量為 6.12 g/L，且產量高於添加 L-麩胺酸的培養基；在不添加甘油 (Glycerin) 或檸檬酸的培養基中則無 γ -PGA 的產生。以上的結果顯示 S-01 菌不依賴添加 L-麩胺酸即可生產 γ -PGA，是為不需添加麩胺酸之菌種 (glutamate-independent strain)，然而檸檬酸和甘油對於 γ -PGA 的生產至關重要。因此將培養基 F (ME-F) 中之 L-麩胺酸刪除，所得之培養基稱為培養基 T (ME-T) 以進行後續的研究。

2. *B. subtilis* S01 於 ME-T 之培養

(1) 甘油濃度之影響

圖 1 所示為不同甘油濃度對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 中培養對 (A) 菌生長與 (B) 生產 γ -PGA 之影響。當甘油濃度為 0% 時細胞的生長較遲緩且無 γ -PGA 之生產，當甘油濃度為 2-8% 時， γ -PGA 的生產隨細胞生長而增加，直到細胞的生長達到定常期 (stationary phase)， γ -PGA 的生產也趨緩。而當甘油濃度為 17% 時 γ -PGA 的生產隨細胞生長而增加，在第六天的產量達最高 (20.1 g/L)。沉澱所得粗 γ -PGA 產物的含醣量分析 (Data not shown)，發現添加 17% 甘油時之含醣量相當低，第六天時含醣量只有 0.60%，因此 *B. subtilis* S01 所生產之 γ -PGA 產物無多糖副產物。

(2) 檸檬酸濃度之影響

圖 2 所示為不同檸檬酸濃度對 *B. subtilis* S01 於 ME-

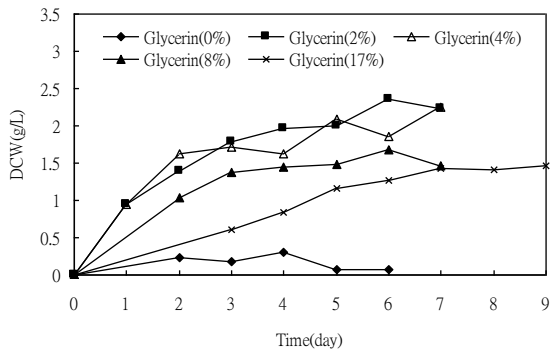
表 1. 不同碳源對 *B. subtilis* S01 生長與 γ -PGA 生產之影響^a

Carbon sources (g/L)			Dry cell weight (g/L)		γ -PGA (g/L)
L-glutamic acid	Citric acid	Glycerol	96h	96h	96h
65	22	170	1.24	2.22	2.22
65	22	0	1.36	ND	ND
65	0	170	1.68	ND	ND
0	22	170	0.83	6.12	6.12

^a 培養條件: 將 *B. subtilis* S01 於 ME-F (Glutamic acid: 6.5%、Citric acid: 2.2%、Glycerin: 17%、 NH_4Cl : 0.7%、 H_2PO_4 : 0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.015%、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.004%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.0140%) 中培養，並分別刪除單一碳源，將培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫 (37°C、pH 6.5、150 rpm) 震盪培養。表中為培養至第 4 天之數據。



(A)



(B)

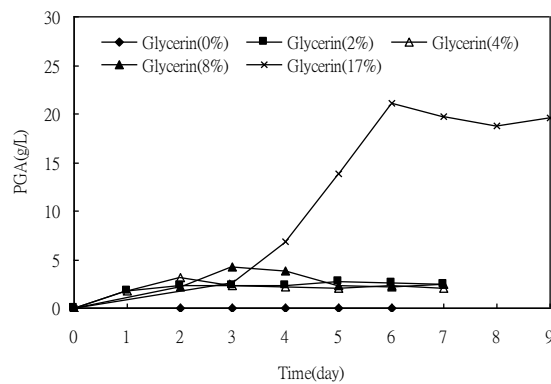


圖 1. 不同甘油濃度對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 中培養對
(A) 菌生長與 (B) 生產 γ -PGA 之影響

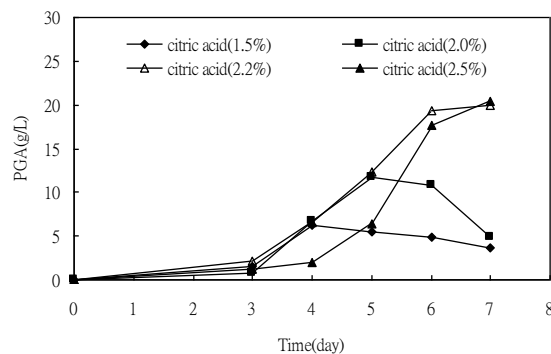


圖 2. 不同檸檬酸濃度對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 中培養生
產 γ -PGA 之影響

T 中培養對生產 γ -PGA 之影響。當不添加檸檬酸則無任何 γ -PGA 之產生，而隨著檸檬酸濃度增加， γ -PGA 最大產量的產生時間愈向後延遲。培養基中檸檬酸添加 1.5%、2.0%、2.2% 及 2.5% 時， γ -PGA 之最高產量分別為 5.1g/L(4d)、10.3 g/L(5d)、20.0 g/L(6d)、20.3 g/L(7d)。

(3) 氮源之影響

表 2 所示為各種無機與有機氮源對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 中培養對生產 γ -PGA 之影響。結果顯現氯化銨 (NH_4Cl) 最適合菌株 S01 生產聚合物，當氯化銨的添加量為 0.7%， γ -PGA 在培養 6 天的產量可達最高，20.14 g/L。硫酸銨 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 為氮源時，發現沉澱產物主要為硫酸銨，必須再利用其他的粹取純化步驟才能將聚麩胺酸粹出，且產量極低。以硝酸銨為氮源時，聚麩胺酸產量低，且會產生 7~30% 的多醣類副產物 (Data not shown)。有機氮源如酵母粹取物 (Yeast extract)、麥芽粹取物 (Malt extract) 及蛋白鍊 (Peptone) 對菌株的生長亦或是聚麩胺酸的產生均不理想，且所產生的多醣類副產物隨著有機氮的含量增加而增加。

(4) 培養時間之影響

由上碳、氮源之探討之結果，可知培養基 T (ME-T) 由檸檬酸 (22g/L (甘油 (170g/L)、 NH_4Cl (7.0g/L)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g/L)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.04g/L)、 K_2HPO_4 (0.5g/L) 及 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.15g/L) 組成) 為 *B. subtilis* S01 生產 γ -PGA 之較適培養基。如圖 3 所示，於此培養基中培養至第 6 天， γ -PGA 達最大產量 (20.4g/L)。

(5) 以糖為碳源對 *B. subtilis* S01 生產 γ -PGA 之影響

為探討 *B. subtilis* S01 能否使用農產廢棄物之水解液為碳源以生產 γ -PGA 之可能性，因此先探討菌株能否使用不同糖為碳源以生產 γ -PGA。將 *B. subtilis* S01 菌株培養於含木糖、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 3 所示。結果顯示不添加糖類碳源，菌體生

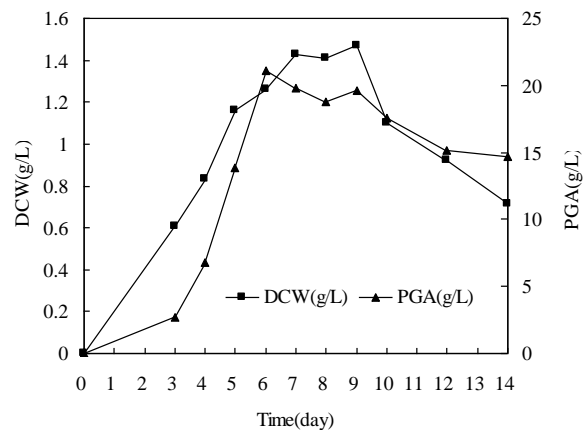


圖 3. *B. subtilis* S01 於 ME-T 中培養之菌生長與 γ -PGA 生
產



長非常低且幾乎無 γ -PGA 之生產，當添加葡萄糖、木糖時 4.53 g/L 及 3.88 g/L。當添加麥芽糖、半乳糖時菌體生長及菌體生長及 γ -PGA 之生產較高， γ -PGA 之最高濃度分別為 γ -PGA 之生產相對較低， γ -PGA 之最高濃度分別為 1.11 g/L

表 2. 不同氮源對 *B. subtilis* S01 生長與 γ -PGA 生產之影響^a

Nitrogen source	Concentration (%)	DCW (g/L)	γ -PGA (g/L)
NH ₄ Cl	0.3	0.14	2.03
	0.5	1.70	5.16
	0.7	1.06	20.14
	1.0	1.02	9.67
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3	0.73	--- ^b
	0.5	0.74	--- ^b
	0.7	0.76	--- ^b
	1.0	1.01	--- ^b
KNO ₃	0.3	1.31	0.53
	0.5	0.98	1.14
	0.7	0.96	0.36
	1.0	1.55	0.94
Yeast Extract	0.3	1.26	1.62
	0.7	1.02	2.52
	1.0	1.02	1.84
Malt Extract	0.3	0.31	4.17
	0.7	0.65	2.84
	1.0	0.65	4.11
Peptone	0.3	1.02	4.82
	0.7	1.01	1.27
	1.0	1.19	1.55

^a 培養條件: 將 *B. subtilis* S01 於 ME-T (Citric acid : 2.2%、Glycerin : 17%、NH₄Cl : 0.7%、H₂PO₄ : 0.05%、MgSO₄ · 7H₂O : 0.05%、CaCl₂ · 2H₂O : 0.015%、FeCl₃ · 6H₂O : 0.004%、MnSO₄ · 4~6 H₂O : 0.0140%) 中培養，並使用不同種類與濃度之氮源，將培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫 (37°C、pH 6.5、150 rpm) 震盪培養。表中為培養至第 6 天之數據。

^b 硫酸銨 (NH₄)₂SO₄ 為氮源時，發現沉澱產物主要為硫酸銨，必須再利用其他的粹取純化步驟才能將聚麩胺酸粹出，且產量極低。

表 3. 不同醣碳源對 *Bacillus subtilis* S01 生長與 γ -PGA 生產之影響^a

Sugar source	Concentration (%)	DCW (g/L)	γ -PGA (g/L)
none	none	0.02	Not detectable
Glucose	1	0.78	4.24
	2	0.89	4.44
	3	0.83	4.53
Lactose	1	0.72	3.60
	2	0.74	3.73
	3	0.77	3.88
Maltose	1	0.21	1.06
	2	0.49	1.11
	3	0.51	1.10
Galactose	1	0.31	1.76
	2	0.59	1.81
	3	0.62	1.79
Glucose+ Xylose	1+1	1.16	4.97

^a 將 *B. subtilis* S01 培養於 ME 8 生產培養基: 含麩胺酸 (L-glutamic acid) 20 g/L 及不同醣類碳源 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。使用之醣類為木糖 (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) 96h。



表 4. 目前一些生產 γ -聚麩胺酸菌株之生長條件及產品產量與分子量之比較

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> S01	Citric acid Glycerol NH ₄ Cl	22 170 7	37°C 4 days	20.4 (4.2 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)	[15, 56] Cromwick, et al., (1996) Troy (1973)
<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] Kubota, et al., (1993)
<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] Kunioka and Goto (1994)
<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)	[13] Cheng, et al., (1989)
<i>Bacillus subtilis</i> TAM-4	Fructose NH ₄ Cl	75 18	30°C 4 days	20 (6.0x10 ⁵ -1.6x10 ⁶)	[28] Ito, et al., (1996)
<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)	[50] Shih, et al., (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> (chungkookjang)	Glutamic acid Sucrose (NH ₄) ₂ SO ₄	20 50 20	30°C 5 days	13.5 (1.0x10 ⁴ -1.0x10 ⁶)	[6] Ashiuchi, et al., (2001)
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	Maltose Soy sauce Glutamate	60 70 30	40°C 3-4 days	35 (分子量未定)	[44] Ogawa, et al., (1997)
<i>B. subtilis</i> NX-2	Glutamate (NH ₄) ₂ SO ₄ rice straw hydrolysate	50 5 ^a X ³⁰ G ⁵⁰ ^b (X ³⁰ G ⁵⁰)	7.5-L bioreactor, 400 rpm 1.2 vvm, initial pH 7.0, 32 °C	59.3 (73.0) (分子量未定)	[53] Tang B, et al., 2015
<i>B. subtilis</i> NX-2	^c Cane molasses (initial sugar concentration) ^d MGWL (NH ₄) ₂ SO ₄	60 40 5	7.5-L bioreactor, 400 rpm 1.2 vvm, pH 7.0 32 °C	52.1 (分子量未定)	[60] Zhang et al., 2012
<i>B. subtilis</i> HB-1	Glutamate, yeast extract, ^e CFH	40 10 70	37°C 44 h 200 rpm initial pH 6.5	24.9 (6.03 x10 ⁴)	[61] Zhu F, et al.2014

^aX³⁰G⁵⁰: 上標之數字代表發酵時所加入稻草水解液之糖濃度 (g/L); 水解液含木糖 (X) 和葡萄糖 (G); 批次方式加入。

^b(X³⁰G⁵⁰): 定義如上但為連續方式加入

^cCane molasses: The initial sugar concentration was 60 g L⁻¹, contained 37.9 g L⁻¹ sucrose, 7.9 g L⁻¹ glucose and 14.2 g L⁻¹ fructose. 批次方式加入。

^dMGWL (monosodium glutamate waste liquor): MGWL consisted of 2.0% glutamate (about 20 g L⁻¹). The initial glutamate concentration for fermentation was adjusted to 40 g L⁻¹ by adding 20 g L⁻¹ glutamate to medium containing MGWL.

^eCFH (corn cob fibers hydrolysate): contained 31.2 g L⁻¹ glucose and 37.8 g L⁻¹ fructose; 批次方式加入。

及 1.81 g/L。由於葡萄糖與木糖之添加對 *B. subtilis* S01 菌體生長及 γ -PGA 之生產較有利，又由於蔗渣水解液主要含葡萄糖與木糖，因此 *B. subtilis* S01 應有利用農產廢棄物之水解液為碳源之潛力。但相較於上述之以檸檬酸及甘油為碳源， γ -PGA 之產量相對較低。因此本論文將主要著重於探討 *B. subtilis* S01 於培養基 T (ME-T) 中生產 γ -PGA。至於 *B.*

subtilis S01 利用農產廢棄物之水解液為碳源以生產 γ -PGA 之最適條件將於後續研究再予以探討。已知有多株可生產 γ -PGA 之桿菌株 (*Bacillus* species) 已被篩選，其生產所需之碳、氮源與發酵條件已被探討，表 4 所列為本研究 *B. subtilis* S01 與這些菌株之較適生產條件與最高產量之比較。

(三) *B. subtilis* S01 生產聚麩胺酸之物化特性



聚麩胺酸為胞外聚合物 (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胺酸，再經透析、冷凍乾燥即可得到純 γ -PGA。純化後之 γ -PGA 透過胺基酸分析，膠體滲透層析法 (GPC) 和 NMR 光譜分析進行特徵分析。胺基酸分析發現該物質僅由單一胺基酸 (麩胺酸) 組成；膠體滲透層析 (GPC) 分析顯示其平均分子量 (M_n) 為 4.2×10^6 Da (圖 4)； $^1\text{H-NMR}$ 之光譜在 D_2O 為 1.8-2.1 ppm (m, β , 2H)，2.3-2.4 ppm (b, γ , 2H)，4.1-4.2 ppm (b, α , 1H)，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) (圖 5)。這些結果可證明純化後之 γ -PGA 純度相當高 (>97%)，微生物所生產 γ -PGA 之分子量多數在 $10^6 - 8 \times 10^6$ ，多分散性 (polydispersity) 則多在 2-5。本研究獲得 γ -PGA 之分子量與文獻記載之其他生產菌株所獲得 γ -PGA 之分子量一致 (參見表 4)。

(四) *B. subtilis* S01 生產聚麩胺酸的立體化學組成

將純化之 γ -PGA 水解並分析其光學異構物之組成比例，發現聚麩胺酸的光學異構物 (D-麩胺酸/L-麩胺酸) 比例為 97/3 (如圖 6 所示)，顯示 *B. subtilis* S01 所生產 γ -PGA 主要組成大部分為 D-麩胺酸 (D-glutamic acid) 形式。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，*B. anthracis* [21] 與 *Planococcus halophilus* [31] 所生產 γ -PGA 僅含 D-麩胺酸。*Bacillus halodurans* [5]、

Natronococcus occultus [43] 與 *Natrialba aegyptiaca* [23] 所生產 γ -PGA 僅含 L-麩胺酸。多株 *Bacillus subtilis* 所生產 γ -PGA 則含不同 D-麩胺酸/L-麩胺酸之比例，*Bacillus subtilis* (natto) [32] 所生產 γ -PGA 含 50-80% D-麩胺酸與 50-20% L-麩胺酸。*Bacillus subtilis* (chungkoojang) [6] 所生產 γ -PGA 含 60-70% D-麩胺酸與 40-30% L-麩胺酸。*Bacillus licheniformis* [48] 所生產 γ -PGA 含 10-100% D-麩氨酸。*Bacillus megaterium* [55] 所生產 γ -PGA 含 20-50% D-麩氨酸。

(五) Mn^{2+} 濃度對 *B. subtilis* S01 生產聚麩胺酸之光學異構物之組成比例之影響

聚麩胺酸之光學異構物 (D/L 麩胺酸之比例) 一直是探討聚麩胺酸合成的重要課題，在過去的研究中均發現錳離子的濃度會影響聚麩胺酸的光學異構物比例組成 [12, 16, 35, 48]，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-麩胺酸的百分比會從 60% 降至 10% [16]。針對 *Bacillus 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-麩胺酸也會隨之增加 [48]。本研究添加不同濃度的錳離子於培養基中，發現對於 *B. subtilis* S01 菌株所生產的聚麩胺酸之光學異構物比例並沒有影響，其 D-麩胺酸維持在 97%。此結果與 Mn^{2+} 濃度對與許多 γ -PGA 生產菌，如 *B. licheniformis* ATCC 9945A [16] 及 *B. licheniformis* NCIMB 11709 [48] 之影響不同。

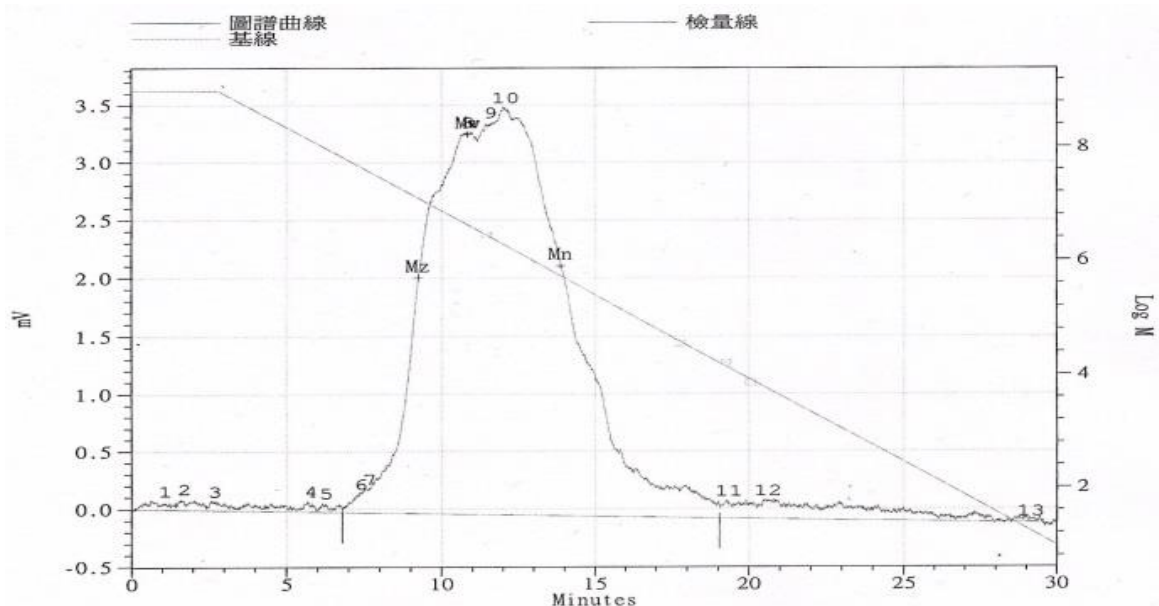
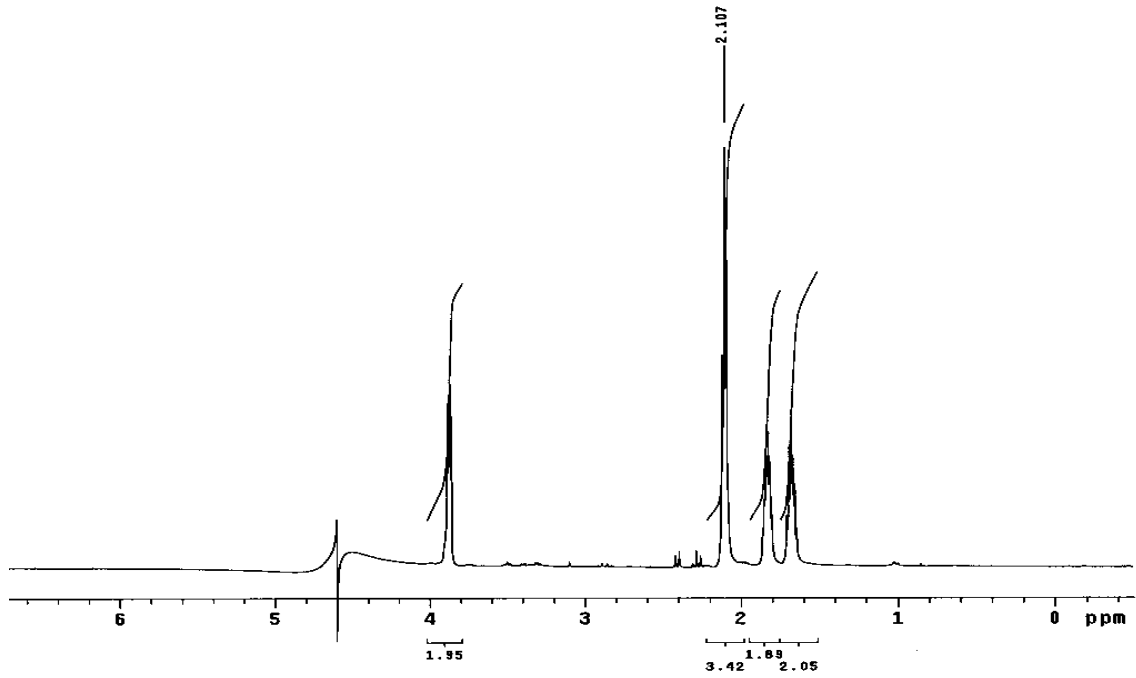


圖 4. *B. subtilis* S01 所生產 γ -PGA 之膠體滲透層析圖



(A)



(B)

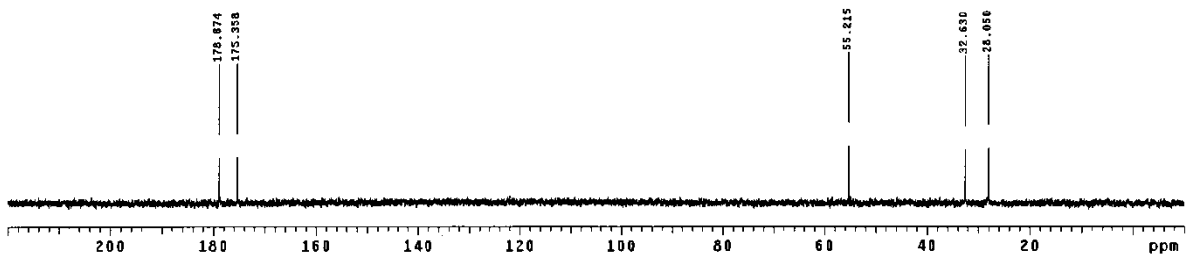


圖 5. *B. subtilis* S01 所生產 γ -PGA 之 NMR 分析 (A) ¹H-NMR 之光譜圖 (B) ¹³C-NMR 之光譜圖

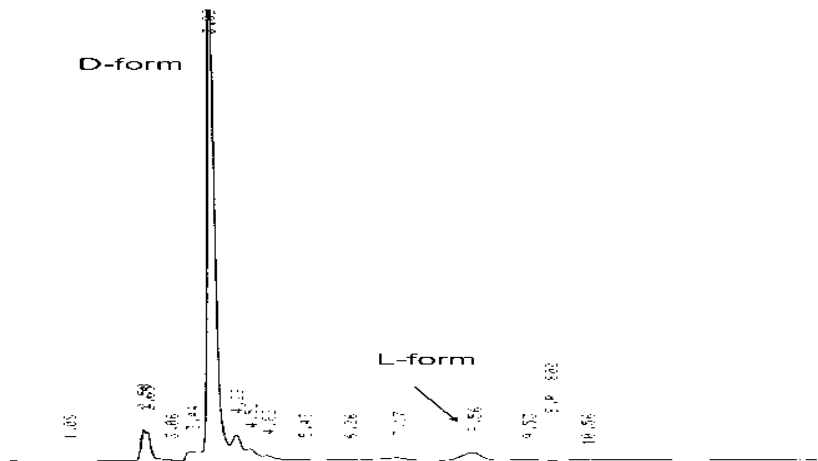


圖 6. 純化後之 γ -PGA 的光學異構物 (D-麩胺酸/L-麩胺酸) 比例



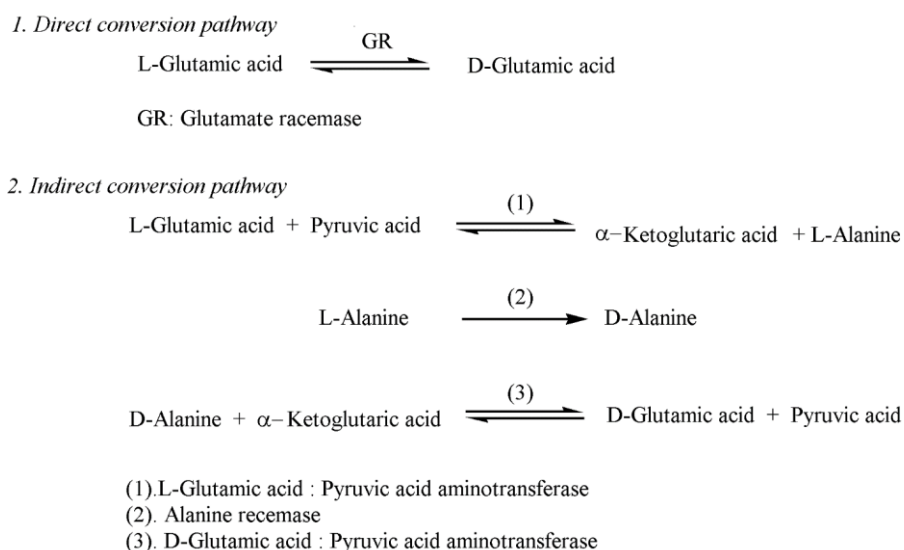


圖 7. 兩種將 L-麩氨酸轉化為 D-麩氨酸之不同的途徑；(1) 直接轉化途徑 (2) 間接轉化途徑

表 5. *B. subtilis* S01 之 D-胺基酸胺基轉移酶與麩胺酸消旋酶之活性

Incubation Time (Day)	Specific Activities (mU/mg)	
	D-amino acid aminotransferase	glutamate racemase
0	148	20
5	5	37

目前已知有兩種不同的途徑能將 L-麩氨酸轉化為 D-麩氨酸 [6, 49]，一種稱為直接轉化途徑，涉及麩胺酸消旋酶 (glutamate racemase)，另一稱為間接轉化途徑，涉及 D-胺基酸胺基轉移酶 (D-amino acid amino-transferase) 或稱 D-麩胺酸:丙酮酸胺基轉移酶 (D-glutamic acid: pyruvic acid amino-transferase) (圖 7)。

為了探討關於 *B. subtilis* S01 菌株之 D-麩氨酸的可能合成途徑，在生物聚合物生產之前和期間，測量了細胞中 D-amino acid amino-transferase 與 glutamate racemase 的活性。結果顯示，在 γ -PGA 生產過程中，胺基轉移酶活性顯著降低 (從 148 降低至 5 mU mg⁻¹) (表 5)。相反，消旋酶活性有所增加 (從 20 到 37 mU mg⁻¹)。該結果顯示，D-amino acid amino-transferase 不參與 L-和 D-麩氨酸的轉化，這一事實與許多 γ -PGA 生產者 (*B. Subtilis chungkookjang*) [6] 和 *B. Subtilis* (natto) IFO 3336 [7] 一致。

(六) 鹽對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 之培養的影響

為探討鹽濃度對 *B. subtilis* S01 於 ME-T 培養基中培養之 γ -PGA 的產率和分子量的影響，於 ME-T 培養基中將 NaCl 鹽濃度調整至 0.05、0.1、0.2、0.5、3.0 和 5% (w/v) 的最

終濃度，結果如表 6 所示。結果顯示 γ -PGA 的產率與培養基中的鹽濃度成反比。另外， γ -PGA 的分子量隨著鹽濃度的增加而降低，在高鹽度條件下分子量較低的 γ -PGA 之生產較佔優勢。當 NaCl 鹽濃度為 0.05% 和 5% 時，經 6 天培養時間所產生 γ -PGA 之分子量分別為 3.94×10⁶ 及 0.39×10⁶Da，降低了約 10 倍。該結果與鹽對 *B. subtilis* (*chungkookjang*) 產生的 γ -PGA 分子量的影響是一致 [6]，但與對 *B. licheniformis* ATCC 9945a 的影響則相反 [12]。在含 *B. licheniformis* ATCC 9945a 的培養基中添加高達 4% 的 NaCl 來改變培養基離子強度，會導致形成相對較高分子量的 γ -PGA。相反，*B. subtilis* (*chungkookjang*) 在含有高濃度 NaCl 的培養基中產生了分子量較低的 γ -PGA。雖然有學者試圖以鹽濃度對 γ -PGA 聚合酶及 γ -PGA 降解酶活性之影響來解釋鹽濃度對 γ -PGA 分子量影響，但皆為臆測，並沒有明確證據 [3]，因此仍待後續之研究。表 6 亦顯示 γ -PGA 的產量隨著鹽濃度的增加而降低，雖然產量較低，但 *B. subtilis* S01 在 NaCl 濃度高達 5% 時仍能生長與生產 γ -PGA，可知 *B. subtilis* S01 之耐鹽性極高，此是其他 γ -PGA 生產菌較少見的。



表 6. 不同氯化鈉濃度對 *B. subtilis* S01 之 γ -PGA 生產及其分子量之影響^a

NaCl Concentration (% w/v)	Volumetric Yield (g/L)	Molecular Weight ($\times 10^6$) Da
0.05	16.8	3.94
0.10	14.7	3.24
0.20	12.1	3.10
0.50	9.20	2.63
3.00	6.21	1.36
5.00	3.10	0.39

^a 培養條件: 將 *B. subtilis* S01 於 ME-T (Citric acid : 2.2%、Glycerin : 17%、NH₄Cl : 0.7%、H₂PO₄ : 0.05%、MgSO₄ · 7H₂O : 0.05%、CaCl₂ · 2H₂O : 0.015%、FeCl₃ · 6H₂O : 0.004%、MnSO₄ · 4~6 H₂O : 0.0140%) 中培養, 並添加不同濃度之 NaCl, 將培養基置於恆溫震盪培養箱進行恆溫 (37°C、pH 6.5、150 rpm) 震盪培養。表中為培養至第 6 天之數據。

四、結論

本研究已成功篩選出一株具有高耐鹽性、不需添加麩胺酸且具有高 γ -PGA 生產力之特殊優良菌株 (*B. subtilis* S01), 該菌株在含檸檬酸及甘油之 ME-T 培養基中培養 6 天, γ -PGA 達最大產量 (20.4g/L)。所得 γ -PGA 平均分子量 (M_n) 為 4.2×10^6 Da, 胺基酸分析與 ¹H-NMR、¹³C-NMR 之光譜分析證明純化後之 γ -PGA 純度相當高 (>97%)。; 光學異構物之組成分析顯示 D-麩胺酸/L-麩胺酸比例為 97/3, 且比例與添加之 Mn²⁺ 濃度無關。另外結果亦顯示, 細胞內之麩胺酸消旋酶參與 L-和 D-麩胺酸的轉化。*B. subtilis* S01 亦可有效使用葡萄糖與木糖生產 γ -PGA, 因此有利用農產廢棄物之水解液為碳源之潛力, 但其生產產量仍待後續優化。此不需添加麩胺酸且具有高 γ -PGA 生產力之特殊優良菌株 (*B. subtilis* S01), 將對降低 γ -PGA 的生產成本與促進 γ -PGA 工業化生產與應用有很大幫助。

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

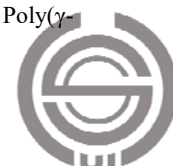
1. 吳芳禎、王政捷、施英隆 (民 106), 甘蔗渣廢棄物為原料以發酵生產 γ 聚麩氨酸之研究, 科學與工程技術期刊, 13(1), 35-45。
2. 施英隆、范宜琮 (民 90), 以微生物生產聚麩氨酸及其應用, 生物資源生物技術, 3, 17-26。
3. Abe, K., Y. Ito, T. Ohmachi and Y. Asada (1997) Purification and properties of two isozymes of γ -

glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM-4. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 61(10), 1621-1625.

4. Anju, A.J., P. Bnod and A. Pandey (2017) Production and characterization of PGA from renewable resources. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55, 405-410.
5. 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.
6. 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.
7. Ashiuchi, M., K. Tani, K. Soda and H. Misono (1998) Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly- γ -glutamate synthesis. *Journal of Biochemistry*, 123(6), 1156-1163.
8. Bajaj, I. and Singhal, R. (2011) Poly (glutamic acid)-an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 102(10), 5551-5561.
9. 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.
10. 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.
11. 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.



12. Birrer, G.A, A.M. Cromwick and R.A. Gross (1994) γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis*: physiological and biochemical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(5), 265-275.
13. Cheng, C., Y. Asada and T. Aida (1989) Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(9), 2369-2375.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
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. 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.
19. Fujii, H. (1963) On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part III. Chemical constitutions of mucilage in natto (1). *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **37**, 407-411.
20. Goto, A. and M., Kunioka (1992) Biosynthesis and hydrolysis of Poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56(7), 1031-1035.
21. Hanby, W.E. and H.N. Rydon (1946) The capsule substance of *Bacillus anthracis*. *Biochemical Journal*, 40(2), 297-309.
22. Hara T. and S. Ueda (1982) Regulation of poly glutamate production in *Bacillus subtilis* (natto): transformation of high pga productivity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(9), 2275-2281.
23. 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.
24. Housewright, R.D. (1962) The biosynthesis of homopolymeric peptides. In *The Bacteria*. Ed. by I.C. Gunsalus and R. Y. Stanier, vol. 3, p. 389. New York and London: Academic Press.
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 (gamma-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. Ivánovics, G. and L. Erdős (1937) Ein Beitrag zum Wesen der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus. *Z Immunitätsforsch*, **90**, 5-19.
30. Jeong, J.H., J.N. Kim, Y.J. Wee and H.W. Ryu (2010) The statistically optimized production of poly (γ - glutamic acid) by batch fermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3. *Bioresource Technology*, 101(12), 4533-4539.
31. 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.
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. Leonard, C.G., R.D. Housewright and C.B. Thorne (1958) Effect of metal ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 76(5), 499-503.
 36. 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.
 37. Luo, Z., Y. Guo, J. Liu, H. Qiu, M. Zhao, W. Zou, W. and S. Li (2016). Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels* 9, 134.
 38. 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.
 39. 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.
 40. Mitsui, 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.
 41. 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.
 42. Murao, S. (1969) On the polyglutamic acid fermentation. *Kobunshi* 16, 1204-1212.
 43. Niemetz, R., U. Kärcher, O. Kandler, 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.
 44. 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.
 45. Ogunleye, A., A. Bhat, V. U. Irorere, D. Hill, C. Williams and I. Radecka (2015) Poly- γ -glutamic acid: Production, properties and applications. *Microbiology*, 161(1), 1-17.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Shih, I.L. and Y.T. Van (2001) The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, 79(3), 207 - 225.
 50. 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.
 51. 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.
 52. 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.
 53. Tang, B., P. Lei, Z. Xu, Y. Jiang, Z. Xu, J. Liang, X. Feng and H. Xu (2015) Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource Technology*, 193, 370-376.
 54. Thorne, C.B., C.G. Gómez, H.E. Noyes and R.D. Housewright (1954) Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 68(3), 307-315
 55. Torii, M. (1956) Optical isomers of glutamic acid comprising bacterial glutamyl polypeptides. *Medical Journal of Osaka University*, 6, 1043-1046.



-
56. 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.
57. Wu, P. J. (2004). Production of γ -poly-glutamic acid by microorganism isolated from soy sauce. Master thesis, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.
58. Xiong, C. C. Shouwen, S. Ming and Y. Ziniu (2005) Medium optimization by response surface methodology for poly- γ -glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), 390-396.
59. Yamanaka, S. (1991) New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent 3047087.
60. Zhang, D. X. Feng, Z. Zhou, Y. Zhang and H. Xu (2012) Economical production of poly(cglutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource Technology*, 114, 583-588.
61. Zhu F, J. Cai, Q. Zheng, X. Zhu, P. Cen and Z. Xu (2014) A novel approach for poly-gamma-glutamic acid production using xylose and corncob fibres hydrolysate in *Bacillus subtilis* HB-1. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(4), 616-622.

收件：109.04.22 修正：109.10.06 接受：109.12.16

