

利用生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物為原料以生產

γ -聚麩胺酸

吳芳禎¹ 李偉碩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，它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，因此極受重視。為促進 γ -PGA 的工業化生產與降低生產成本，近年來許多研究探討以工業或農業廢棄物為原料來生產 γ -PGA。本研究探討以生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物（葡萄糖與甘油）作為原料，經苔蘚桿菌 (*Bacillus licheniformis* CCRC 12826) 發酵生產高附加值的 γ -聚麩胺酸 (γ -PGA)。結果發現 *B. licheniformis* CCRC 12826 在含廢葡萄糖與廢甘油之常用培養基 E (medium E) 中可有效生產 γ -PGA，培養基中廢葡萄糖和廢甘油的初始比例會影響麩胺酸和檸檬酸鹽的利用率，並影響 γ -PGA 的生產和分子量。在發酵槽培養中，將 pH 值控制在 6.5 是實現高碳源利用率和 γ -PGA 生產的最佳選擇。在痕量麩胺酸和檸檬酸鹽的存在下，廢葡萄糖和甘油的混合物可以用作細胞生長和 γ -PGA 產生的主要碳源。但是，即使保持最佳 pH 6.5，從培養基中完全去除麩胺酸和檸檬酸鹽則不會有細菌生長和 γ -PGA 之產生。所產生的 γ -PGA 的品質與傳統發酵所獲得的 γ -PGA 樣品相當。

關鍵詞：果聚糖，聚麩胺酸，廢葡萄糖，廢甘油，生物高分子

Production of Poly (γ -glutamic acid) by Utilizing Waste Byproducts of Levan and Biodiesel Production as Raw Materials

FANG-CHEN WU¹, WEI-SOE LEE² 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

In the fields of food, cosmetics, agriculture, and medicine, γ -poly-glutamic acid (γ -PGA) is a promising microbial polymer with wide applicability and environmental protection effects; it is water soluble, biodegradable, edible, and nontoxic toward humans and the environment. Many recent studies have explored the production of γ -PGA using industrial or agricultural waste as raw materials to promote the industrialized production of γ -PGA and reduce production costs. This study investigated the use of waste glycerol and glucose from biodiesel and levan production as feed stock for the production of high-value-added γ -PGA by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. It was found that *B. licheniformis* CCRC 12826 can effectively produce γ -PGA in medium E (a commonly used medium for γ -PGA production) containing waste glucose and waste glycerol. The initial ratio of waste glucose to glycerol in the medium influenced the utilization of both glutamate and citrate and affected the production and molecular weight of γ -PGA. In fermenter cultivation, a pH of 6.5 was optimal for attaining high carbon-source utilization and γ -PGA production. In the presence of trace amounts of glutamate and citrate, the mixture of waste glucose and glycerol could be used as sole carbon sources for cell growth and γ -PGA production. However, the strict exclusion of glutamate and citrate from the medium resulted in the absence of bacterial growth and γ -PGA production even under the optimal pH of 6.5. The quality of γ -PGA produced was comparable with that of an authentic sample obtained from conventional fermentation.

Key Words: Levan, Poly (γ -glutamic acid), Waste glucose, Waste glycerol, Biopolymer

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 [3,39]。 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 [15,27]、手術之止血劑及癒合劑 [21-22, 35-36]、化妝品之保濕劑 [7]、食品之增稠劑 [51]及抗凍劑 [31]、廢水處理之絮凝劑 [6, 41]及重金屬離子與放射性物質之吸附劑 [8, 23, 28-29],也可為強力吸水材料及薄膜材料 [11, 25, 33]。

γ -PGA 的用途廣泛,安全且環保。因此,開發這種生態材料在經濟和環境上都是有價值的。由於在 γ -PGA 具有廣泛之應用潛力,目前許多研究嘗試了各種方法來優化 γ -PGA 的生產同時降低其成本。 γ -PGA 可以通過深層發酵 (Submerge fermentation; SMF) [40, 53]和固態發酵 (Solid state fermentation; SSF) [10,50] 來生產。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,如豬糞尿 [10]、

味精 (Mono sodium glutamate; MSG)生產的工業廢料 [52]、稻草 [46]、糖蜜 [54]和乳製品廢棄物 [49]等農業副產品的適用性已被評估。最近, Anju 等人 [5]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]。

菌果聚糖 (Levan) 是一類含有大量 β - (2,6)-果糖苷鍵主鏈和少量 β - (2,1)-果糖苷鍵支鏈的天然果糖聚合物,它可由很多微生物生產且釋放於培養基中之胞外天然性高分子聚合物。菌果聚糖具有水溶、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,近年來已有開發菌果聚糖及其衍生物於食品、化妝品、醫藥及環保等領域之應用 [3, 4, 43]。近年來,提高微生物生產菌果聚糖的策略已引起了更多關注 [18-19, 30, 34]。市售枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis* (natto) Takahashi) 被證明可以在蔗糖培養基中選擇性和有效地產生 Levan。在批次發酵過程中,通常在 21 小時內積累 30-50 g/L 的菌果聚糖 [42-43]。在這個過程中,果聚醯蔗糖酶 (β -2,6 果聚醯: D-葡萄糖-果糖基轉移酶, EC 2.4.1.10) 是能夠在蔗糖培養基中選擇性地催化進行轉果醯基反應同時釋放葡萄糖以生成 Levan 的關鍵酶 [45]。過程中所產生的廢葡萄糖的重量約為所使用蔗糖基質



的 50%，可以想像的，它應是可用於 γ -PGA 生產的理想原料。

甘油是植物油和動物脂肪通過酯交換轉化為生物柴油過程中獲得的主要副產物 [14]；所產生的粗製甘油占酯重量的 10% [17, 32]。隨著生物柴油產量的成倍增加，粗甘油的過量供應超過了其需求，這使得它現在被認為是曾經有價值的產品的浪費。為了減少處置成本，顯然有必要採用新穎的方式處置粗製甘油。使用甘油的許多有希望的應用之一是通過微生物發酵將其生物轉化為高附加值的產品。這種生物轉化將為生物柴油行業的生產鏈增加重要價值，從而增強其競爭力 [17, 32]。

本論文報導探討以生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物（葡萄糖與甘油）作為原料，經苔蘚桿菌（*Bacillus licheniformis* CCRC 12826）發酵生產高附加值的 γ -聚麩胺酸（ γ -PGA）之詳細研究及結果。

二、材料與方法

（一）菌株和試劑

本研究使用於生產菌果聚糖（Levan）之菌株為 *Bacillus subtilis* natto，此菌株可自日本高橋祐藏研究所購得。用於 γ -PGA 生產的 *Bacillus licheniformis* CCRC12826（現為 *Bacillus licheniformis* BCRC12826）是為研究 γ -PGA 發酵常被使用之菌株 [40]，此菌株可從生物資源收集和研究中心（台灣新竹 BCRC）獲得。固態營養培養基（NA，Difco Laboratories Michigan，美國），其含洋菜 15 g/L、蛋白胨（peptone）1.5 g/L、牛肉萃取物 3 g/L、NaCl 5 g/L，液態培養基（NB，Difco Laboratories Michigan，美國），其含酵母萃取物 1.5 g/L、牛肉萃取物 15 g/L、NaCl 5 g/L。麩胺酸、檸檬酸、 NH_4Cl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等試藥購自美國 Sigma Chemical。商業甘油購自 Katayama Chemical Inc.（日本），工業廢甘油購自台灣 NJC Corp，台灣嘉義。

（二）生產菌果聚糖及其分離純化

以 *B. subtilis* natto 生產 levan 的發酵和分離係按照先前已發表之方法進行 [42-43]。將 *B. subtilis* natto 菌於固態營養培養基（NA）和液態培養基（NB）中預培養活化後，將 NB 中的菌（10%，v/v）接種到 5 升發酵槽中，內置 2 升含蔗糖（250 g/L）、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （0.5 g/L）、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （3 g/L）、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ （3 g/L）的生產培養基，

此培養基在 pH6.0、37°C、175 rpm 轉速下培養 55 小時。將發酵液以 2400 x g 的速度離心以去除細菌細胞。上清液即可利用實驗型分離膜系統分離出 Levan。通過 Tami 超濾膜系統（截留分子量（MWCO）：5 kDa，加拿大魁北克）過濾濃縮後。濃縮液加入 4 倍體積之 75 體積%冷凍酒精並於 4°C 下靜置 24 小時，再以離心機分離酒精與沉澱物，將沉澱物以去離子水回溶後經冷凍乾燥機凍乾，即可得純化之 Levan。純化的 levan 產物通過 $^1\text{H-NMR}$ ， $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜和膠體滲透層析（GPC）進行特徵鑑定 [43]。糖濃度以高效液相層析儀（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）分析 [43]，分析系統為 Hitachi L6200，配備 Spherclone 5 μ KS-802（300 \times 8.0 mm）層析管柱及折射率（RI）檢測器，樣品注入體積為 20 μ L。通過 Tami 超濾膜系統之濾液（含高含量之葡萄糖 100-125 g/L）[42-43]則用於下述 γ -PGA 發酵之探討。

（三）搖瓶培養中的細胞生長和 γ -PGA 產生

E-培養基（Medium E; ME）含麩胺酸 L-glutamic acid 20 g/L、檸檬酸 citric acid 12 g/L、甘油 glycerol 80 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）是許多研究人員研究芽孢桿菌屬（*Bacillus subtilis*）生產聚 γ -麩胺酸（ γ -PGA）最常選用之培養基。為了研究 *Bacillus licheniformis* BCRC12826 以生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物（葡萄糖與甘油）作為原料發酵生產 γ -PGA，將生物柴油生產中的粗甘油代替了 Medium E 中甘油，所得之培養基稱為 ME1。另外，以上述生產果聚糖之濾液（含葡萄糖）用於完全或部分替代 ME1 中的粗甘油，所得培養基稱為 ME2 至 ME5（表 1）。將菌株 *B. licheniformis* BCRC12826 以劃線培養的方式接種於 NA 並過夜培養（37°C，pH 7.4）後，將平板上出現的高度粘液樣菌落收集（1cm²），並在 30 mL 試管中接種到 5 mL NB（pH 7.4）中，然後在 37°C、150 rpm 搖動培養 48 小時。在 500 mL 燒瓶中，將 5%（v/v）的活化菌接種到 100 mL 之培養基（表 1 中所示 ME2 至 ME5）中，並在 37°C、pH 6.5 和 150 rpm 搖動培養 108 h [40]，培養期間不定時取少量培養液並以下述方法分析細胞生長、檸檬酸、麩胺酸、葡萄糖、甘油和 γ -PGA 的濃度。培養後，獲得粘性培養液，將其以 20,000 \times g 離心以分離細胞。粘性物質以下描述的程序進一步純化。

（四）發酵槽培養中的細胞生長和 γ -PGA 產生

本實驗使用 10L 發酵槽（type: MAJOR SCIENCE,



表1. 改良培養基E中不同碳源組成對*B. licheniformis* CCRC12826生產 γ -PGA產量與分子量之影響

Medium	Carbon source components and concentrations (g l ⁻¹)				γ -PGA yield ^d (g l ⁻¹)	Molecular weight ^d (x10 ⁶ Da)
	Glucose ^b	Glycerol ^c	[L]-Glutamic acid	Citric acid		
ME1	0.0	80.0	20.0	12.0	5.0±0.5	1.31±0.07
ME2	20.0	60.0	20.0	12.0	10.5±0.3	1.43±0.05
ME3	40.0	40.0	20.0	12.0	19.2±1.0	1.81±0.10
ME4	60.0	20.0	20.0	12.0	13.3±0.6	2.02±0.03
ME5	80.0	0.0	20.0	12.0	10.1±0.8	2.20±0.05

^aOther non-carbon components in the medium were identical for all of these media and are given in the Materials and Methods section.

^bWaste glucose byproduct obtained from levan production

^cWaste glycerol byproduct obtained from biodiesel production

^dThe γ -PGA yield and molecular weight were measured after *B. licheniformis* CCRC12826 was incubated at 37°C, pH 6.5 with shaking at 150 rpm for 108h.

利政科技, 台北) 中進行培養。簡而言之, 將 100 mL 液態培育的種子培養液接種至 3 L 之 ME3 生產培養基中, 並在 37°C、300 rpm 和 3 vvm 的曝氣下培養 108 h。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)。並不定期採用離線分析測量菌體濃度、碳源濃度及 γ -PGA 產量。除了 ME3 外, 亦將 ME3 進行調整, 即將 ME3 中之麩胺酸和檸檬酸刻意刪除或減量, 調整後的 ME3 分別命名為 ME6 和 ME7 並以之作為生產培養基 (表 3 中所示為 ME3、ME6 和 ME7)。

(五) 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。產品可利用苯酚-硫酸法 [16] 分析其多醣含量。 γ -PGA 產品之其他特性透過氨基酸分析、膠體滲透層析 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 和 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 光譜儀進行鑑定, 敘述於下。

(六) 分析條件

1. 碳源濃度分析

檸檬酸、麩胺酸、葡萄糖、甘油係根據先前描述的方測定 [40]。簡而言之, 麩胺酸與檸檬酸以高效液相層析儀

(High Performance Liquid Chromatograph, HPLC, 配備 Hitachi L6200A 溶劑傳輸系統和 Hitachi 4250 UV 檢測器) 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。葡萄糖和甘油的濃度係以酵素法測定, 使用購自 Boehringer Mannheim Biochemicals 的分析試劑組並按照供應商提供的詳細步驟進行分析。

2. 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 [2]。

3. γ -PGA 之定量

培養基中 γ -PGA 濃度之定量係依照已知之方法 [2,46, 54], 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。

4. 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。



三、結果與討論

(一) 以搖瓶培養探討苔蘚桿菌在改良培養基 E 中生產 γ -PGA

培養基 E (ME) 是許多研究以苔蘚桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 生產 γ -PGA 之優選培養基。先前已有以 *Bacillus licheniformis* CCRC12826 在 ME 中培養生產 γ -PGA 的報導 [40]， γ -PGA 的產量為 5.27g/L，而以膠體滲透層析 (GPC) 分析其數均分子量 (Mn) 為 2×10^6 Da。為了確定使用生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物 (葡萄糖與甘油) 作為原料生產 γ -PGA 的潛力，首先探討使用此廢棄副產物替代了培養基 E 中的甘油，所得組成如表 1 所示。結果顯示在改良培養基 (ME1 至 ME5) 中分別可生產了不同產量的 γ -PGA，這表明廢葡萄糖和甘油為合適替代品，可取代培養基 E (ME) 中之純甘油以生產 γ -PGA。隨著培養基配方中甘油的濃度從 0 增加到 40 g/L，培養 108 小時後的 γ -PGA 濃度從 10.1 ± 0.8 增加到 19.2 ± 1.0 g/L。若甘油濃度從 40 g/L 進一步增加則到 80 g/L 會導致 γ -PGA 濃度降低 (降至 5.0 ± 0.5 g/L)。

另一方面，表 1 中還顯示，甘油濃度從 80 g/L 降低至 0 g/L，經培養 108 小時， γ -PGA 分子量從 $1.31 \pm 0.07 \times 10^6$ Da 顯著增加至 $2.20 \pm 0.05 \times 10^6$ Da。文獻曾報導改變甘油濃度可調節 *Bacillus subtilis* NX-2 及 *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a 之 γ -PGA 生產量和 γ -PGA 分子量，此些報導與本研究之結果相符 [24, 48]。目前已知 γ -PGA 的分子量一般介在 10^5 到 2×10^6 Da 之間，具體取決於細菌種類，培養基組成和用於其生產的培養條件 [39]。已知幾種營養物質和操作因子會影響 γ -PGA 的分子量。例如，*B. licheniformis* 9945a 的 γ -PGA 分子量可以通過培養基離子強度 (NaCl 濃度) 和攪拌速度來調節 [9, 44]。另外，在 *B. subtilis* IFO3335 的生產培養基中添加硫酸銨對於獲得高分子量的 γ -PGA 很重要 [26]。此研究使用改變甘油的濃度來有效地調節 γ -PGA 分子量以滿足 γ -PGA 在各種不同應用之規格，是非常方便的選擇。

(二) 在各種改良培養基 E 進行發酵時甘油和葡萄糖的利用

圖 1 (A) 所顯示為 *B. licheniformis* CCRC12826 於各種改良培養基 E 中發酵生產 γ -PGA 時甘油和葡萄糖的利用情形。由圖中顯示可看出，葡萄糖易於代謝，並且其利用速度

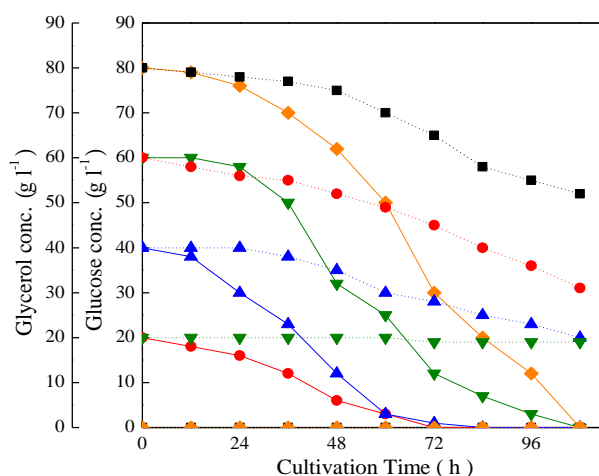


圖 1. (A) Variation of glucose (—) and glycerol (----) concentration during shake flask culture in various media (ME1 to ME5)

Symbol : (■) ME1 (Glucose/Glycerol, 0/80 g/L) ;
 (●) ME2 (Glucose/Glycerol, 20/60 g/L) ;
 (▲) ME3 (Glucose/Glycerol, 40/40 g/L) ;
 (▼) ME4 (Glucose/Glycerol, 60/20 g/L) ;
 (◆) ME5 (Glucose/Glycerol, 80/0 g/L) .

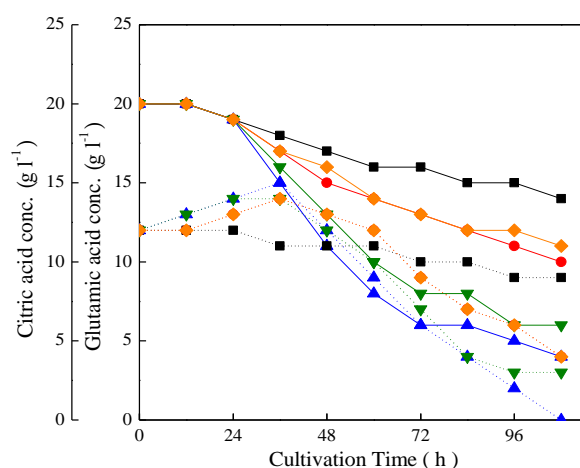


圖 1. (B) Variation of glutamic acid (—) and citric acid (----) concentration during shake flask culture in various media (ME1 to ME5 containing glutamate/citrate, 20/12 g/L)

Symbol : (■) ME1 ; (●) ME2 ; (▲) ME3 ; (▼) ME4 ;
 (◆) ME5

比甘油快，培養 108 小時後，無論初始葡萄糖/甘油比為何，葡萄糖最終都接近耗盡。相反，甘油的使用量要少得多，在



高濃度葡萄糖存在下，甘油幾乎不被使用，如圖 1 (B) 所示，初始葡萄糖/甘油比對麩胺酸和檸檬酸鹽的消耗都有影響，此二物質為生產 γ -PGA 之前趨物。當甘油取代葡萄糖量從 0 增加到 40 g/L 時，培養 108 h 後麩胺酸和檸檬酸鹽的利用逐漸增加；當甘油濃度分別為 0、20 和 40 g/L 時，麩胺酸消耗分別為 9、14 和 16 g/L，檸檬酸鹽消耗分別為 8、9 和 12 g/L。然而，進一步增加甘油含量超過 40 g/L 則未能進一步刺激麩胺酸和檸檬酸鹽的利用。當甘油濃度為 60、80 g/L 時，麩胺酸的利用分別為 10 g/L 和 6 g/L，檸檬酸鹽的利用分別為 8 g/L 和 3 g/L。葡萄糖/甘油比例對麩胺酸和檸檬酸鹽利用的影響結果與表 1 所示甘油含量影響 γ -PGA 生成趨勢一致，即當培養基配方中的甘油含量從 0 增加到 40 g/L，培養 108 小時後 γ -PGA 的濃度隨甘油濃度的增加而增加，但是當甘油濃度進一步增加超過 40 g/L 時， γ -PGA 生成含量降低。先前發現甘油的添加大大增強了聚麩胺酸合成酶的活性，該酶是 *B. licheniformis* 9945 的酶複合物，負責激活，消旋和聚合麩胺酸 [47]，此事實可解釋上述甘油增強 γ -PGA 生產的現象。由上述結果，可得結論是，培養基配方中用於替代葡萄糖的最佳甘油濃度為 40 g/L，這種替代導致麩胺酸和檸檬酸鹽的利用率提高，從而導致 γ -PGA 產量增加。如圖 2 所示為碳源消耗，細胞生長和 γ -PGA 產生隨時間之變化圖。在培養過程中，以 40 g/L 供給的葡萄糖迅速減少，並在 72 小時內幾乎消耗掉，同時細胞生長增加並達到平穩期的高原。同時，隨著檸檬酸鹽、麩胺酸和甘油的消耗伴隨著 γ -PGA 的產生。在 108 h 的培養結束時，以 12 g/L 供給的檸檬酸完全耗盡，而以 20 g/L 和 40 g/L 供給的麩胺酸和甘油分別降至 4.0 g/L 和 20.0 g/L，而 γ -PGA 濃度則達到 19.0 g/L。

(三) 發酵槽培養中的細胞生長和 γ -PGA 產生

1. pH 對 γ -PGA 生產的影響

pH 控制對碳源高效轉化與提高微生物生產生物聚合物產量的重要性已在文獻中有記載 [38]。為了確定 pH 對 γ -PGA 生產的影響，將 *B. licheniformis* CCRC12826 在含 ME3 培養基並自動 pH 控制的發酵槽中培養，pH 分別控制保持在 5.5、6.5、7.5 和 8.5。表 2 所示為隨培養基 pH 和培養時間的變化時之細胞生長、 γ -PGA 生產和碳源利用。可以看出，在 pH 6.5 時，可用碳源的利用較快，這導致相對較高的 γ -PGA 之生產，pH 6.5 時的產量要比其他測試 pH 值 (pH 5.5、7.5 和 8.5) 下的產量高；pH 分別為 5.5、6.5、7.5 和 8.5

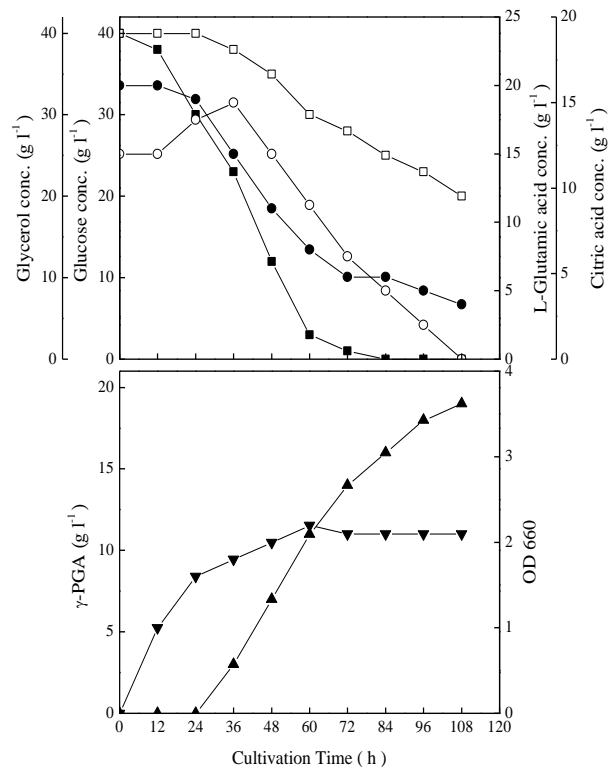


圖2. The time course of carbon source utilization, cell growth and γ -PGA production during shake flask culture in ME3.

Symbol : (■) Glucose ; (□) Glycerol ; (●) Glutamic acid ; (○) Citric acid ; (▲) γ -PGA ; (▼) cell growth (OD₆₆₀) .

時，發酵 108 h 後的 γ -PGA 濃度分別為 19.2、26.6、5.4 和 2.5 g/L。在弱酸性環境中能得到較高 γ -PGA 產量的現象與以前的報導一致，即在 pH 值低於 7.0 的情況下，*B. licheniformis* 9945a 可以提高 γ -PGA 的產量[12]。由於 γ -PGA 的生物合成途徑涉及三羧酸循環 (TCA 循環) [39]，因此可預見的是 γ -PGA 的前趨物-麩胺酸和檸檬酸的利用率增加，將導致 γ -PGA 的產量提高。此外，還可預期碳源 (葡萄糖) 在支持細胞生長和 γ -PGA 生物合成中應該具有重要作用，因為它不僅可以用作耗能的 γ -PGA 生物合成的能源，而且還可以通過以下方式轉化為 γ -PGA，即經糖酵解成乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)，並通過 TCA 循環代謝，形成直接的麩氨酸之前趨物 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate)。這種預期與實驗結果相吻合，即在 pH 6.5 下快速利用葡萄糖、麩胺酸和檸檬酸會導致高 γ -PGA 產生。在表 2 中還觀察到，在 pH 6.5 時，葡萄糖的使用量比甘油的使用量大得多，這與在上節討論的搖瓶實驗 (pH 不受控制) 中觀察到的結果一致。另還應注意的是在測試的 pH 範圍內， γ -PGA 的分子量和 D/L 立體



表2. *B. licheniformis* CCRC12826在發酵槽中培養時隨培養基pH和培養時間的變化時之細胞生長、 γ -PGA生產和碳源利用

Carbon sources	Cultivation time (h)										
	pH	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
Glycerol (g l ⁻¹)	5.5	40	40	40	38	35	30	28	25	23	20
	6.5	40	40	38	34	28	24	20	18	17	17
	7.5	40	40	40	38	36	33	30	28	28	28
	8.5	40	40	40	38	36	34	30	29	29	29
Glucose (g l ⁻¹)	5.5	40	38	30	23	12	3	1	0	0	0
	6.5	40	24	11	7	2	1	0	0	0	0
	7.5	40	38	33	29	26	15	7	3	0	0
	8.5	40	38	35	33	28	18	15	3	0	0
Citrate (g l ⁻¹)	5.5	12	13	14	15	12	9	6	4	2	0
	6.5	12	14	16	12	7	2	0	0	0	0
	7.5	12	12	13	12	11	10	10	8	7	6
	8.5	12	12	12	11	11	11	11	10	9	7
Glutamate (g l ⁻¹)	5.5	20	20	19	15	11	8	6	4	2	0
	6.5	20	18	15	13	10	6	3	1	0	0
	7.5	20	20	19	16	15	11	10	10	8	6
	8.5	20	20	20	19	17	15	13	13	12	10
Cell growth and γ -PGA	Cultivation time (h)										
	pH	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
OD ₆₆₀	5.5	0.2	0.4	1.0	1.6	1.8	2.0	2.2	2.1	2.1	2.1
	6.5	0.2	0.6	1.2	1.8	2.4	2.8	3.6	3.2	3.0	3.0
	7.5	0.2	0.4	0.4	0.7	0.9	1.2	1.4	1.6	1.7	1.7
	8.5	0.2	0.2	0.2	0.3	0.6	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4
γ -PGA ^b (g l ⁻¹)	5.5	0	0	0	3	7	11	14	16	18	19.2
	6.5	0	0	1	5	10	16	21	24	25	26.6
	7.5	0	0	0	0	1	2	2	3	4	5.4
	8.5	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2.5

^a The cultivation was carried out in ME3 at 37 °C, 300 rpm and aeration rate 3 vvm for 108 h in a 5-liter fermenter.

^b The γ -PGA data present were rounded to the nearest whole number except those at 108 h cultivation.

表3. ME3培養基中不同碳源組成對*B. licheniformis* CCRC12826於發酵槽中培養時的細胞生長和 γ -PGA生產

Medium	Carbon source components and concentrations (g l ⁻¹)				[L]-Glutamic acid (g l ⁻¹)	OD ₆₆₀ ^d
	Glucose ^a	Glycerol ^b	[L]-Glutamic acid	[L]-Glutamic acid		
ME3	40.0	40.0	20.0	12.0	26.6	3.0
ME6	40.0	40.0	0	0	0.0	0.3
ME7	40.0	40.0	0.5	0.5	16.2	2.4

^aWaste glucose byproduct obtained from levan production

^bWaste glycerol byproduct obtained from biodiesel production

^cThe γ -PGA yield was measured after *B. licheniformis* CCRC12826 was incubated at 37°C, pH 6.5, 300 rpm and 3vvm for 108h.

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

化學含量不受 pH 的影響 (數據未顯示)。由於 pH 6.5 呈現高碳源利用率和生產 γ -PGA 的最佳選擇，因此在進行以下的實驗時，皆將 pH 值控制在 6.5。

2. 於 ME3 改良培養基中培養時的細胞生長和 γ -PGA 產生
為了探討使用上述廢棄副產物 (葡萄糖與甘油) 作為 γ -

PGA 生產的碳源，已嘗試從 ME3 中刪除 γ -PGA 前趨物-麩胺酸和檸檬酸鹽。所得的改良培養基示於表 3，*B. licheniformis* CCRC12826 培養 108 小時後的細菌生長和 γ -PGA 產量亦同時顯示於表 3。結果顯示，即使將培養基的最佳 pH 維持在 6.5，但當在 ME3 中完全排除麩胺酸和檸檬酸



鹽，即於 ME6 中則沒有觀察到細菌的生長和 γ -PGA 的產生。這與先前研究的發現一致，即僅葡萄糖-甘油為碳源之培養基不足以支持 *B. licheniformis* 9945a 和 *B. subtilis* IFO 3335 的細菌生長和 γ -PGA 生產 [24, 26]。另外，數據亦顯示僅添加痕量的麩胺酸和檸檬酸鹽就可以刺激細菌的生長和 γ -PGA 的產生。先前文獻曾指出，添加的痕量麩胺酸和檸檬酸鹽的作用可能是它們可作為 γ -PGA 合成途徑中合成酶的活化劑，而不是作為 γ -PGA 的前驅物，或者可能原因是它們可能阻止在細胞生長和產物生產中必不可少之營養鹽的沉澱 [24, 26]。由 *B. licheniformis* CCRC12826 在 ME7 培養基（內含 0.5 g/L 麩胺酸和檸檬酸鹽）中培養可得高細菌生長和高 γ -PGA 產量（16.2 g/L）的事實，進一步證實了麩胺酸與檸檬酸鹽的重要作用。表 3 提供的數據有力地顯示，只要存在痕量的麩胺酸和檸檬酸鹽活化劑，廢葡萄糖和甘油的混合物是該細菌細胞生長和 γ -PGA 生產的良好原料。

3. Mn^{+2} 濃度對 γ -PGA 立體化學組成的影響

γ -PGA 生產菌株已知可生產各種立體化學組成的 γ -PGA，如 *B. anthracis* 僅生產由 D-麩胺酸組成的 γ -PGA [20]，*B. licheniformis* 在存在不同金屬離子（尤其是 Mn^{+2} ）存在的情況下會產生具有各種立體化學組成的 γ -PGA（D-麩胺酸含量：10-100 %）[13]。表 4 所示為 Mn^{+2} 濃度（0 至 1230 μ M 的範圍內變化）對 *B. licheniformis* CCRC 12826 在 ME7 中培養所生產 γ -PGA 之立體化學組成的影響。結果顯示，*B. licheniformis* CCRC 12826 所生產 γ -PGA 之立體化學組成確實受 Mn^{+2} 濃度的影響。 γ -PGA 中存在的 L-麩胺酸異構體含量與 Mn^{+2} 濃度成反比。該結果與先前關於 *B. licheniformis* ATCC 9945A 和 *B. licheniformis* NCIMB 11709 受 Mn^{+2} 濃的影響的報導一致 [13, 37]。此外， Mn^{+2} 濃度也對 γ -PGA 產量亦有影響，在所測試的 Mn^{+2} 濃度範圍內，其 γ -PGA 產量從 5.2 增至 28.7 g/L。

表 4. Mn^{+2} 濃度對 *B. licheniformis* CCRC 12826 所生產 γ -PGA 之立體化學組成與產量的影響

Mn^{+2} concentration (μ M)	D-glutamate percentage (%)	γ -PGA yield (g l ⁻¹)
0	45	5.2
6.2	47	6.1
16	54	10.6
61.5	64	16.2
61.5	80	26.6
1230	82	28.7

^a*B. licheniformis* CCRC 12826 was cultivated in a 500-ml flask containing ME7 (at 37°C, pH 6.5 with shaking at 150 rpm for 108h)

(四) *B. licheniformis* CCRC12826 培養於含廢棄葡萄糖與甘油培養基所生產聚麩氨酸之特性分析

B. licheniformis CCRC12826 於 ME7 培養所生產聚麩氨酸，純化後之 γ -PGA 經膠體滲透層析 (GPC) 分析顯示其平均分子量 (M_n) 為 1.81×10^6 Da，此與該菌於 ME3 培養所生產聚麩氨酸之平均分子量一致。很顯然 γ -PGA 平均分子量與培養基存在之麩氨酸與檸檬酸鹽濃度無關。產品利用苯酚-硫酸法 [16] 證實多醣含量不超過 1% (w/w)，氨基酸分析發現該物質僅由單一胺基酸（麩胺酸）組成。NMR 光譜特徵分析顯示 ¹H-NMR 之光譜在 D₂O 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)；¹³C-NMR 之光譜在 D₂O 為 178 ppm (COOH)，174 ppm (CO)，55.0 ppm (C _{α})，33 ppm (C _{β})，28.0 ppm (C _{γ})。本文提供的數據顯示，使用廢葡萄糖和甘油作為碳源所生產的 γ -PGA 的品質與使用傳統純培養基 E 生產的 γ -PGA 的品質一致。

四、結論

本研究已經成功地證明可利用生產果聚糖及生物柴油之廢棄副產物（葡萄糖與甘油）作為原料，經苔蘚桿菌（*Bacillus licheniformis* CCRC 12826）發酵可生產高附加值的 γ -PGA。所生產之 γ -PGA 之品質與真實樣品一致。將廢甘油和葡萄糖生物轉化為高附加值的 γ -PGA 產品，不僅可以減輕環境污染，還可以減少廢物的處理成本，提高生物柴油和菌果聚糖的生產競爭力，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. 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 聚麩胺酸之研究，科學與工程技術期刊，13 (1)，35-45。
2. 吳芳禎、吳珮貞、施英隆 (民110)，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，科學與工程技術期刊，17 (1)，15-29。
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. 廖國森 (民96)，納豆菌生產果聚糖聚合物之研究，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Chen, X., S. Chen, M. Sun and Z. Yu (2005) High yield of poly-gammaglutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. *Bioresource Technology*, 96(17), 1872-1879.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. da Silva G P, M. Mack and J. Contiero (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advance*, 27(1), 30-39.
15. 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.
16. 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.
17. González-Pajuelo M, J. C. Andrade and I. Vasconcelos I. (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology*, 31(9), 442-446.
18. Gu, Y., J. Zheng, J. Feng, M. Cao, W. Gao, Y. Quan, Y. Dang, Y. Wang, S. Wang and C. Song (2017) Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4163-4174.
19. Hamid, K. R. A., E. A. Elsayed, H. A. E. Enshasy, M. Esawy and R. A. Malek (2018) Bioprocess optimization for levan production by *Bacillus subtilis* B58. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 77(7), 386-393.
20. Hanby, W. and H. Rydon (1946) The capsular substance of *Bacillus anthracis*. *Biochemistry*, 40(2), 297-307.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Ko, Y. H. and R. A. Gross (1998) Effects of glucose and glycerol on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(4), 430-437.
 25. Kunioka M. (2004) Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acids). *Macromolecular Bioscience*, 4(3), 324-329.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Melo, I. R., M. F. Pimentel, C. E. Lopes and G. M. Y. Calazans (2007) Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazil Journal of Microbiology*, 38(1), 45-51.
 31. Mitsuiki, M., A. Mizuno, H. Tanimoto and M. Motoki (1998) Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acids). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 891-895.
 32. Mu Y, H. Teng, D. J. Zhang, W. Wang, Z. L. Xiu (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnology Letters*, 28 (21), 1755-1759.
 33. 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.
 34. Muro, A. C., E. Rodríguez, C. M. Abate and F. Siñeriz (2000) Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnology Letters*, 22(20): 1639-1642.
 35. Otani, Y., Y. Tabata and Y. Ikada (1996a) A new biological glue from gelatin and poly(L-glutamic acid). *Journal of Biomedical Material Research*, 31(2), 157-166.
 36. Otani, Y., Y. Tabata and Y. Ikada (1996b) Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). *Biomaterials*, 17(14), 1387-1391.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Shih I. L., L. D. Chen, T. C. Wang, J. Y. Wu and K. S. Liaw (2010) Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chemistry*, 12, 1242-1247.
 43. Shih I. L., Y. T. Yu, C. J. Shieh and C. Y. Hsieh (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(21), 8211-8215.
 44. Sung, M. H., C. Park, C. J. Kim, H. Poo, K. Soda and M. Ashiuchi (2005) Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: synthesis, production, and applications. *The Chemical Record*, 5(6), 352-366.
 45. Tanaka T., O. Susumu and T. Yamamoto (1979) Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *Journal of*



- Biochemistry*, 85(1), 287-293.
46. 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.
 47. 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.
 48. Wu Q, H. Xu, J. Liang and J. Yao (2010) Contribution of glycerol on production of poly(γ -Glutamic Acid) in *Bacillus subtilis* NX-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (2), 386-392.
 49. 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.
 50. Xu, J., S. Chen and Z. Yu (2005) Optimization of process parameters for poly-glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. *Process Biochemistry*, 40(9), 3075-3081.
 51. Yamanaka, S. (1991) New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent 3047087.
 52. Yong, X., W. Raza, G. Yu, W. Ran, Q. Shen and X. Yang (2011) Optimization of the production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* C1 in solid-state fermentation using dairy manure compost and monosodium glutamate production residues as basic substrates. *Bioresource Technology*, 102(16), 7548-7554.
 53. Yoon, S. H., J. H. Do, S. Y. Lee and H. N. Chang (2000) Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 22, 585-588.
 54. Zhang, D. X. Feng, Z. Zhou, Y. Zhang and H. Xu (2012) Economical production of poly(γ -glutamic acid) using untreated cane molasses and monosodium glutamate waste liquor by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource Technology*, 114, 583-588.
- 收件：110.03.19 修正：110.06.24 接受：110.08.19

