

# 利用二水準部分因子實驗設計法尋求苔蘚桿菌生產聚 $\gamma$ -胺酸之最適化饋料溶液濃度與饋料時間

陳宥瑾、張耀南；吳建一

E-mail: 9417917@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以苔蘚桿菌*Bacillus licheniformis* CCRC 12826為生產菌株，利用二水準部分因子實驗設計法探討苔蘚桿菌生產聚 $\gamma$ -胺酸(poly- $\gamma$ -glutamic acid, PGA)之最適化饋料溶液濃度與饋料時間。實驗結果得知目前饋料溶液中主要組成成分的最適化濃度分別為40 g/L $\gamma$ -胺酸、42 g/L檸檬酸、158 g/L甘油、1 g/L氯化銨，於其最適饋料時間20h時，將其最適饋加體積25 mL之饋料溶液添加原修飾培養基後繼續培養至120 h，可得到PGA產量為27.4 g/L，略低於未添加此饋料溶液之產量(28.3 g/L)；若將25 mL饋料溶液的添加體積濃縮為5 mL，即饋料溶液中主要組成成分濃度分別為200 g/L $\gamma$ -胺酸、210 g/L檸檬酸、790 g/L甘油、5 g/L氯化銨，於相同饋料時間，將5 mL饋料溶液添加原修飾培養基後繼續培養至120 h，PGA產量為31.2 g/L，較未添加此饋料溶液之產量增加10.21%，若繼續培養至144 h時，PGA產量可高達37.7 g/L，較未添加此饋料溶液之產量增加33.25%。由此可知饋料添加程序雖然使得苔蘚桿菌生產高產量PGA所需時間延長，但卻能提高PGA產量，故此饋料溶液的添加程序策略仍然值得深入探討。

關鍵詞：聚 $\gamma$ -胺酸(-PGA)；饋料；苔蘚桿菌

## 目錄

封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 v 誌謝 vi 目錄 viii 圖目錄 x 表目錄 xi 第一章 前言 1 第二章 文獻回顧 4 2.1 聚 $\gamma$ -胺酸(Poly- $\gamma$ -glutamic acid)之生成 4 2.2 苔蘚桿菌( <i>Bacillus licheniformis</i> )生產 $\gamma$ -聚 $\gamma$ -胺酸 8 2.3 $\gamma$ -聚 $\gamma$ -胺酸之應用 13 2.3.1 醫藥應用領域方面 13 2.3.2 食品應用領域方面 14 2.3.3 環境保護應用領域方面 14 2.3.4 化妝品應用領域方面 15 2.4 回應曲面法 15 2.4.1 原理 16 2.4.2 優點 20 第三章 材料與方法 23 3.1 儀器設備 23 3.1.1 儀器 23 3.1.2 材料 23 3.2 培養方法 25 3.3 回應曲面法之設計 27 3.3.1 部分因子之實驗設計 28 3.4 結果與討論 32 3.4.1 部分因子實驗設計 32 3.4.2 菌體生長量之探討 35 3.4.3 pH值變化之探討 35 3.4.4 產量之探討 41 第四章 結論 45 參考文獻 46 圖 目錄 圖2.1 $\gamma$ -聚 $\gamma$ -胺酸之化學結構 5 圖2.2 D-form $\gamma$ -胺酸之化學結構 6 圖2.3 L-form $\gamma$ -胺酸之化學結構 7 圖2.4 桿菌生成聚 $\gamma$ -胺酸之假設途徑 12 圖2.5 二水準因子設計圖 17 圖2.6 回應曲面圖 22 圖3.1 A25與CA5饋料溶液在20h培養時間饋加對苔蘚桿菌菌體生長(OD660)變化之影響37 圖3.2 B15與CB5饋料溶液在30h培養時間饋加對苔蘚桿菌菌體生長(OD660)變化之影響38 圖3.3 A25與CA5饋料溶液在20h培養時間饋加對培養基pH值變化之影響 39 圖3.4 B15與CB5饋料溶液在30h培養時間饋加對培養基pH值變化之影響 40 圖3.5 B15饋料溶液在30h培養時間饋加後苔蘚桿菌菌體生長(OD660)與培養基pH值之變化42 圖3.6 A25與CA5饋料溶液在20h培養時間饋加對聚 $\gamma$ -胺酸產量之影響 43 圖3.7 B15與CB5饋料溶液在30h培養時間饋加對聚 $\gamma$ -胺酸產量之影響 44 表 目錄 表1.1 不同菌株之生產聚 $\gamma$ -胺酸所需成份及產量之比較 2 表3.1 修改培養基E之修飾培養基 24 表3.2 因子設計之中心點饋料溶液組成基質及其濃度 26 表3.3a 26-2因子設計之變數及層階 29 表3.3b 26-2因子設計之變數及層階 30 表3.3c 26-2因子設計之變數及層階 31 表3.4a 26-2因子設計之實驗結果 33 表3.4b 26-2因子設計之實驗結果 34 表3.5 不同饋料溶液的組成成分濃度與饋料體積 36
--

## 參考文獻

- 1.洪哲穎。1998。回應曲面品質工程技術。工業局八十八年度人才培訓計畫研習班。私立義守大學。高雄縣大樹鄉。
- 2.洪哲穎、陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用。化工。39(2):3-18。
- 3.范宜淙。2001。以苔蘚桿菌生產聚 $\gamma$ -胺酸之研究。大葉大學環境工程學系碩士班論文。彰化縣大村鄉。
- 4.徐敬衡。1994。生物分解性微生物塑膠之開發。食品工業。26(7):30-35。
- 5.黎中正。1998。實驗設計與分析。高立圖書有限公司，台北市。
- 6.Birrer, G. A., Cromwick, A. M. and Gross, R. A. 1994.  $\gamma$ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a : physiological and biochemical studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 16(5):265-275.
- 7.Bovarnick, M. 1942. The formation of extracellular D(-)-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 145:415-424.
- 8.Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B Metho.* 13:1-45.
- 9.Cheng, C., Asada, Y. and Aida, T. 1989. Production of  $\gamma$ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.* 53(9):2369-2375.
- 10.Cromwick, A. M., and Gross, R. A. 1995a. Effect of manganese( ) on *Bacillus licheniformis* ATCC9945a physiology and  $\gamma$ -poly(glutamic acid) formation. *Int. J. Biol. Macromol.* 17:259-267.
- 11.Cromwick, A. M., and Gross, R. A. 1995b. Investigation by NMR of metabolic routes to bacterial  $\gamma$ -poly(glutamic acid) using  $^{13}\text{C}$  labeled citrate and glutamate as media carbon source. *Can. J. Microbiol.* 41:902-909.
- 12.Cromwick, M., Birrer, G. A. and Gross, R. A. 1996. Effects of pH and aeration on  $\gamma$ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch

fermentor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 50:222-227. 13. Fujii, H. 1963. On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part Chemical constitutions of mucilage in natto. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* (in Japanese). 37:474-477. 14. Goto, A., and Kunioka, M. 1994. Biosynthesis of poly(L-glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:867-872. 15. Ivanovics, G. and Erdos, L. 1937. Ein Beitrag zum Wesen der Kapsel-substanz des Mil. *Z. Immunitatsforsch Exp. Ther.* 90:5-19. 16. Ivanovics, G. and Bruckner, V. 1937. Chemische und immunologische Studien uber den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunitat; die chemische Struktur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des *Bacillus mesentericus*. *Z. Immunitatsforsch Exp. Ther.* 90:304-318. 17. Ito, Y., Tanaka, T., Ohmachi, T. and Asada, Y. 1996. Glutamic acid independent production of poly(L-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(8):1239-1242. 18. Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T. and Taniguchi, M. 1993. Production of poly(L-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1212 – 1213. 19. Kunioka, M. 1997. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acids) from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:469-475. 20. Ko, Y. H. and Gross, R. A. 1998. Effects of glucose and glycerol on poly(L-glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC9945a. *Biotechnol. Bioeng.* 57:430-437. 21. Leonard, C. G., Housewright, R. D. and Thorne, C. B. 1958a. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 76:499-503. 22. Leonard, C. G., Housewright, R. D. and Thorne, C. B. 1958b. Effect of metal ions on the optical specificity of glutamine synthetase and glutamyl transferase of *Bacillus licheniformis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 62:432-434. 23. Murao, S. 1969. On the polyglutamic acid fermentation. *Kobunshi.* 16:1204-1212. 24. Ontni, Y., Tabata, Y. and Ikada, Y. 1996. Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). *Biomater.* 17:1381-1391. 25. Perez-Camero, G., Congregado, F., Bou, J. J. and Munoz-Guerra, S. 1999. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(L-glutamic acid). *Biotechnol. Bioeng.* 63:110-115. 26. Sawamura, S. 1913. On *Bacillus natto*. *J. Coll. Agric.* 5:189-191. 27. Shih, I. L. and Van, Y. T. 2001. The production of poly(L-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Biores. Technol.* 79:207-225. 28. Thorne, C. B., Gomez, C. G., Blind, G. R. and Housewright, R. D. 1953. Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis*. Factors affecting peptide production in synthetic liquid media. *J. Bacteriol.* 65:472-478. 29. Thorne, C. B., Gomez, C. G., Noyes, H. E. and Housewright, R. D. 1954. Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 68:307-315. 30. Troy, F. A. 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly(L-D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *J. Biol. Chem.* 248:305-315. 31. Ward, R. M., Anderson, R. F. and Dean, F. K. 1963. Poly(L-glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 grown on wheat gluten. *Biotechnol. Bioeng.* 5:41-48. 32. Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1995. Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. *J. Ferment. Bioeng.* 79:378-380. 33. Yokoi, H., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of poly(L-glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 82:84-87.