

投稿類別：生物類

篇名：微小好幫手－麴菌

作者：

張鈞凱。國立桃園農工。畜保科三年甲班

熊柏禹。國立桃園農工。畜保科三年甲班

指導老師：

石嘉雯

## 壹●前言

### 一、研究動機及目的：

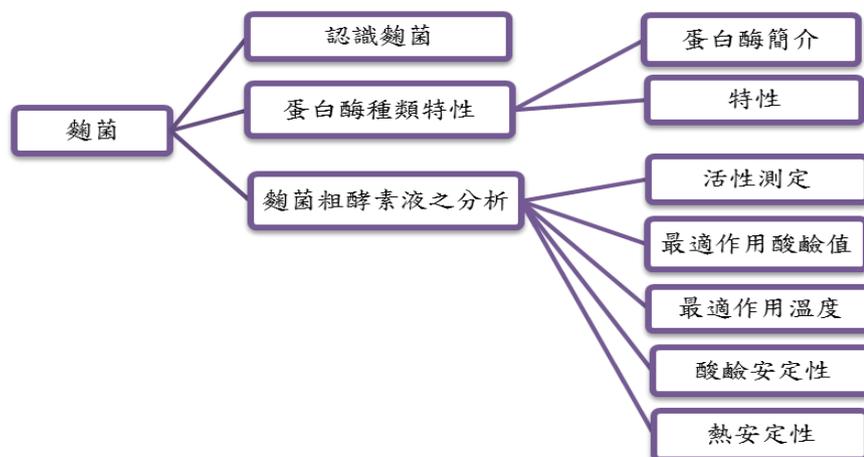
真菌界的麴菌(*Aspergillus*) 是生物技術中重要的微生物之一，因為容易培養，且菌絲體中具有可產生大量分解澱粉、脂肪與蛋白質的酵素及酒精與揮發性物質等，所以被廣泛地應用於釀造醬油、味噌、清酒、紹興酒等食品釀製業中；另外，麴菌並沒有產生黃麴毒素的基因，在發酵過程中不會產生黃麴毒素來危害動物體，故生產出的酵素被美國 FDA 視為安全的材料 (generally regarded as safe, GRAS)；而麴菌在發酵過程中所分泌的酵素是胞外酵素，所以萃取酵素時不必破壞細胞來獲得酵素，因此比其他植物性或動物性酵素取得簡單，而且可利用低成本的發酵基質來進行培養而產生酵素。

在日常生活中，與微生物相關的加工食品隨處可見，其中麴菌的利用最為廣泛，因此引發我們對麴菌的興趣，進而想更加深入了解麴菌及蛋白酶之運用。

### 二、研究方法：

- (一) 詢問科裡老師相關知識
- (二) 查詢相關書籍
- (三) 透過網路及報章雜誌獲取相關知識
- (四) 麴菌培養及其酵素液之分析試驗

### 三、研究架構：



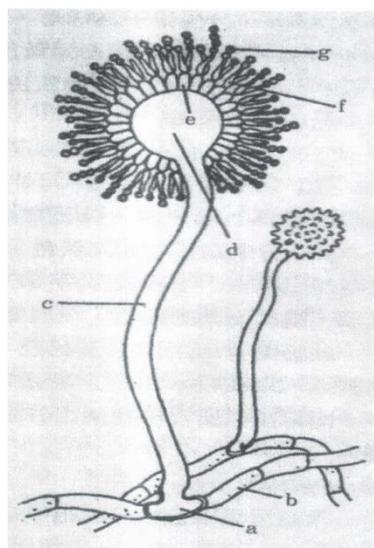
## 貳•正文

### 一、認識麴菌

分類學中屬於真菌界 (*Fungi kingdom*)、無鞭毛菌門 (*Amastigomycota*)、子囊菌綱 (*Ascomycetes*)、不整子囊菌亞綱 (*Plectomycetes*)、散囊菌目 (*Eurotiales*)、散囊菌科 (*Eurotiaceae*)、麴黴屬 (*Aspergillus*) (註一)。

是食品發酵工業中常見之菌屬，其常用於紹興酒、清酒、味噌及醬油等發酵食品中，是黴菌中最常見者，廣泛地分佈於寒帶至熱帶的土壤、空氣及水源中，常生長於腐敗的植物體上，如：發黴之穀物，其菌落依菌種不同而呈綠色、黑色、黃色及棕色等，菌絲為無色或略帶灰色之匍匐分枝，且具有橫隔，而其分生孢子柄頂端形成頂囊 (vesicle)，表面環生許多瓶狀之第一小梗 (primary sterigmata) 與第二小梗 (secondary sterigmata)，小梗末端有許多呈串球狀或鏈鎖狀之分生孢子 (conidioapore) 環繞 (圖一)，而分生孢子之形狀依菌種也有所不同，大多呈球狀或棒狀 (註二)。

其中 *Aspergillus oryzae* 為最具代表性之麴菌，又稱米麴菌或日本麴黴，其可產生之酵素種類甚多，而其中又以蛋白質分解酵素與糖化酵素分泌量最多，酵素活性最佳，可將發酵基質中的澱粉與蛋白質轉換成有機酸、胺基酸、乙醇及風味物質，促使發酵食品產生良好之風味，且由於此菌株並無產生黃麴毒素 (aflatoxin) 之基因，故被視為非產毒之安全菌種



- a：足細胞 (foot cell)
- b：營養細胞 (vegetative cell)
- c：分生孢子柄 (conidiophores)
- d：頂囊 (vesicle)
- e：第一小梗 (primary sterigma)
- f：第二小梗 (secondary sterigma)
- g：分生孢子 (conidia)

圖一、*Aspergillus* 孢子柄與菌絲。

## 二、蛋白酶之種類及特性分析

### (一) 蛋白酶之簡介

蛋白酶是可將蛋白質 (protein)、聚胜肽 (polypeptide) 的胜肽鍵結 (peptidebond) 加以水解之水解酵素總稱，廣泛存在於自然界中，不同之來源可將其分為動物性、植物性及微生物蛋白酶，而源自動物的蛋白酶有凝乳酶(rennin)、胰蛋白酶 (trypsin) 及胃蛋白酶 (pepsin) 等，源自植物之蛋白酶有木瓜酵素 (papain)、鳳梨酵素 (bromelain) 及無花果酵素 (ficin) 等，而微生物蛋白酶之生產菌種包括了黴菌、放線菌及細菌等。近年來因為微生物發酵技術與微生物遺傳工程技術日新月異，可以低生產成本下產生大量酵素，促使微生物酵素逐漸成為酵素重要之來源，並部分取代生產成本較高之其他來源的酵素 (註三)。

### (二) 蛋白酶之特性

#### 1. 專一性 (specificity)

蛋白酶會選定特定基質進行結合並予以催化，通常蛋白酶與基質的結合部位不只一個，蛋白酶以次部位 (subsite) 和特定基質胺基酸的殘基結合；其結合作用力依不同蛋白酶種類有所不同，包括：氫鍵、疏水鍵及靜電力。

#### 2. 自動催化作用 (autocatalytic activation)

許多蛋白酶的前身是不具活性之酶原 (zymogen)，而已具活性之蛋白酶將對酶原進行限制分解 (limited proteolysis)，把原肽部位切除成為具有活性的成熟蛋白酶 (mature protease)，此過程則被稱作自動催化活化作用或自動活化 (autoactivation)。

#### 3. 自體分解 (autolysis)

蛋白酶會被作用環境中的酸鹼值和溫度等影響，自體結構開始局部解開 (local unfolding)，造成蛋白酶失去活性且是不可逆的。

#### 4. 分子間抑制作用 (intermolecular inhibition)

許多特定的抑制劑可對蛋白酶的活性部位進行結合，而使其活性部位不能與基質結合並催化，且特定抑制劑的抑制作用也常作為判定蛋白質類型的依據。

## 5. 分子內抑制作用 (intramolecular inhibition)

真核生物的脂蛋白酶會先以酶原的形式分泌，如：胃蛋白酶原 (pepsinogen)、胰蛋白酶原 (trypsinogen)；而原核生物於胞內合成的酶原不具活性，這些酶原的原肽部位可抑制附近之蛋白酶活性。

### 三、麴菌粗酵素液之分析試驗

#### (一) 實驗材料及方法：

##### 1. 麴菌之培養：

將麴菌株在馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar) 中進行兩次活化，再將已活化的麴菌接種在 pH 7.0 的液態培養基中，用 120 rpm 在 30 °C 下振盪培養 5 天，再以高速均質機，均質 1 分鐘作為固態發酵菌液備用。

##### 2. 蛋白酶活性測定：

分別取麴菌固態發酵後 0、12、24、36、48、60、72、84 及 96 小時之產物，萃取粗酵素液操作蛋白酶活性測定。

##### 3. 蛋白質含量測定：

取麴菌發酵 0、12、24、36、48、60、72、84 及 96 小時後之產物，經萃取後所得之粗酵素液測定其總蛋白質含量。

##### 4. 比活性測定：

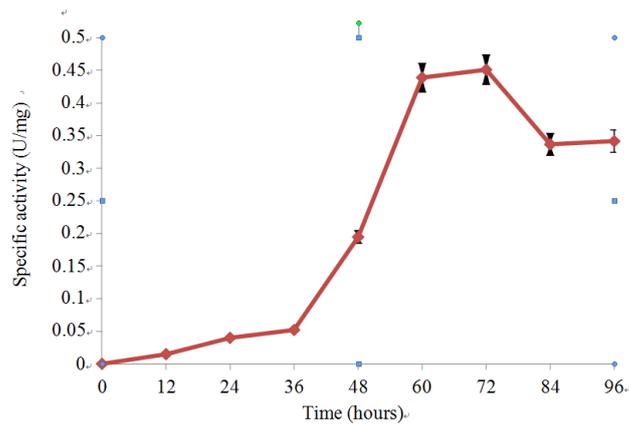
將所測得之蛋白質濃度與蛋白酶活性依以下列公式進行計算：

比活性 (U/mg) = 蛋白酶活性/蛋白質濃度

#### (二) 麴菌粗酵素液之比活性測定

由圖二顯示，麴菌粗酵素液的比活性於培養初期緩慢增加，而於培養第 36 小時後其比活性明顯地增加，然而於培養第 60 小時之活性則有上升較減緩趨勢，並於培養第 72 小時其活性可達最高峰 0.45 U/mg，隨後比活性隨培養時間增加而遞減。

## 微小好幫手—麴菌



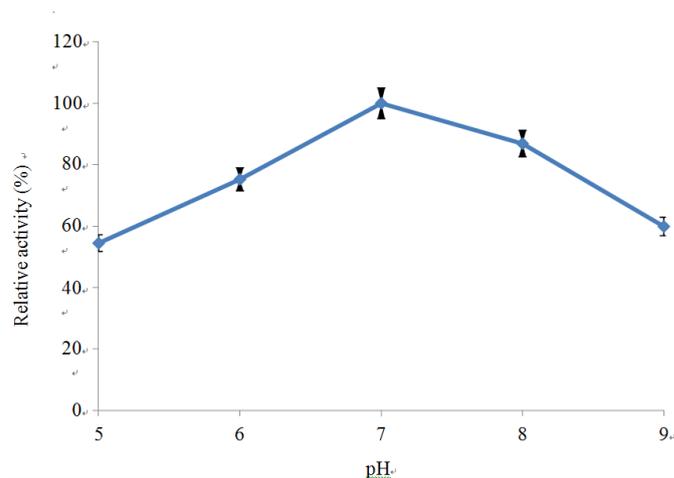
圖二、麴菌於 30 °C 下培養期間粗酵素液中蛋白酶比活性之變化。

### (二) 麴菌粗酵素液之最適作用酸鹼值測定

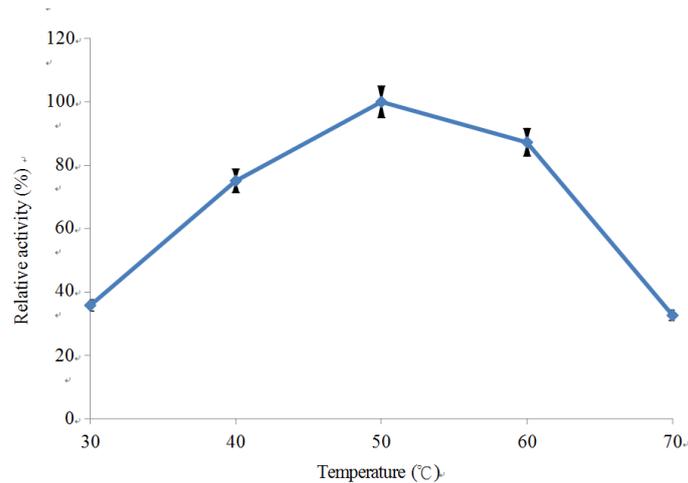
圖三是麴菌粗酵素液在不同酸鹼值的基質溶液中反應的蛋白酶活性，由圖中顯示，麴菌粗酵素液在 pH 7 的基質溶液中反應具有最佳的活性，隨著酸鹼值偏離 pH 7，其相對活性則遞減；由這項分析項目可得知本試驗麴菌發酵所產生的蛋白酶呈中性，中性蛋白酶常被使用於食品加工業中，因在中性環境中可水解食品中的疏水性胺基酸鍵結，減少蛋白酶作用時產生苦味胜肽。

### (三) 麴菌粗酵素液之最適作用溫度測定

由圖四中可發現，麴菌粗酵素液在 50 °C 的溫度下進行反應具有最佳的相對活性，當作用溫度提升或下降時，相對活性會隨之下降。



圖三、酸鹼值對麴菌粗酵素液活性之影響。



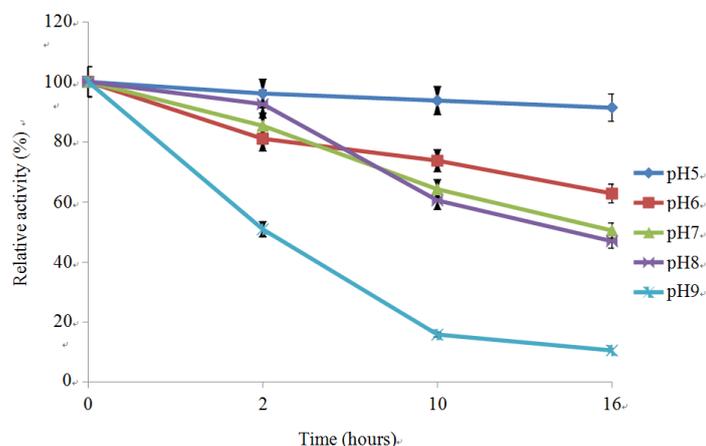
圖四、溫度對麴菌粗酵素液活性的影響。

#### (四) 麴菌粗酵素液之酸鹼安定性

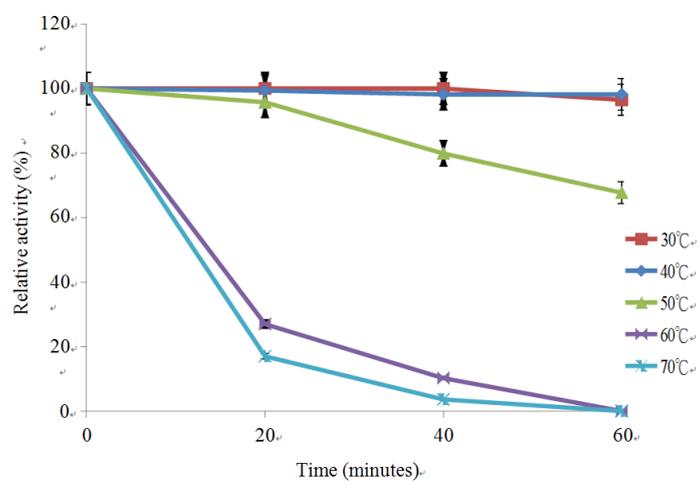
由圖五可得知麴菌粗酵素液在鹼性環境下較易失去活性；麴菌粗酵素液在中性環境下，相對活性隨著放置時間增加也會逐漸下降，不過即使放置 16 個小時，相對活性仍具有 50.46 %；另外，如果將麴菌粗酵素液放在酸性環境下，其穩定性較佳，在 pH 6 之環境境下放置 16 小時仍具有 62.77 % 之相對活性。

#### (五) 麴菌粗酵素液之熱安定性

由圖六可發現，麴菌粗酵素液在 60°C 與 70°C 之溫度下穩定度不佳，在此環境下放置 20 分鐘，其相對活性迅速下降至 26.98% 與 16.99 %，且時間拉長至 60 分鐘後，兩者之相對活性皆降至 0 %；酵素液放置於 50°C 下，其相對活性隨放置時間增加而逐漸下降，但下降幅度較 60°C 與 70°C 緩慢；另將麴菌粗酵素液放置於 30°C 與 40°C 下維持 60 分鐘後，兩者皆具有 95% 以上之相對活性，由此可發現麴菌粗酵素液之相對活性在 30°C 與 40°C 下穩定度佳。



圖五、溫度對麴菌粗酵素液活性之影響。



圖六、溫度對麴菌粗酵素液活性之影響。

## 參●結論

麴菌粗酵素液特性分析：

1. 把麴菌接種於固態培養基中進行發酵，在發酵 72 小時產生的蛋白質濃度、蛋白酶活性及蛋白酶比活性最高。
2. 在最適作用的酸鹼值與溫度試驗中可知道，麴菌粗酵素液在酸鹼值中性與 50 °C 時具有最佳的活性。
3. 麴菌粗酵素液的活性較易受鹼性及較高溫影響，而在 pH 5-6 的酸性環境，相對活性較中性與鹼性環境穩定，且在溫度 30-40 °C 下放置 60 分鐘後相對活性仍維持約 100 %。

藉由上述這些資訊，我們了解麴菌在何種酸鹼值、溫度可以培養的最好，而在未來如果我們能投入食品釀造加工業，我們可以運用我們所知的，在最適合的環境下培養麴菌，將其成功地應用於食品加工上。

## 肆●引註資料

註 1：陳勝和。1975。醬油。天然出版社。

註 2：劉英俊，汪金追。1982。微生物應用工業。中央圖書出版社。

註 3：陳明造。1995。畜產加工。東大圖書股份有限公司。

圖一：蘇遠志，黃世佑。1999。微生物化學工程學。華香園出版社。

圖二：Battaglino, R. A., M. Huergo, A. M. R. Pilosof and G. B. Bartholomai. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 35: 292-296.

圖三：Sandhya, C., A. Sumantha, G. Szakacs and A. Pandey. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry 40: 2689-2694.

圖四、圖五、圖六：Vishwanatha, K.S., A.G. Rao and S. A. Singh. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chemistry 114:402 -407.

García-Gómez, M. J., S. Huerta-Ochoa, O. Loera-Corral and L. A. Prado-Barragán. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chemistry 112: 604-608.