

篩選最適米麴生產麴酸之菌株

摘要

米麴 (*Aspergillus oryzae*) 自古以來用於傳統發酵食品工業上，如：清酒、醬油、味噌等，且以生產相關糖解酶如：澱粉酶 (amylase)、葡萄糖苷酶 (amyloglucosidase)、麥芽糖酶 (maltase) 所顯為人知。近代研究發現，米麴具有生產麴酸及轉換或生產多酚二次代謝物之能力。因此本研究使用購自 BCRC 生物資源保存及研究中心 7 株米麴菌株，觀察不同米麴菌株麴酸生成量，初步篩選最適生產麴酸之菌株，進行後續不同發酵條件探討、添加不同營養物質對於麴酸生成量之影響。結果顯示，7 株購自 BCRC 之菌株以 BCRC 30222 生產麴酸效果最佳，且培養溫度為 30°C、培養時間為 15 天、外源碳源 (glucose) 添加量為 150g/L 及外源氮源 (yeast extract) 添加量為 0.1g/L 時，有最佳提升 BCRC 30222 生產麴酸之效果。

前言

米麴菌分類上為散囊菌綱 (Eurotiomycetes)、髮菌科 (Trichocomaceae)、麴菌屬 (*Aspergillus*)，自古以來時常用於發酵食品工業上，如：清酒、醬油、味噌，因其產生高量的澱粉酶 (amylase)、葡萄糖苷酶 (amyloglucosidase)、麥芽糖酶 (maltase)、蛋白酶 (protease) 等酵素，可提供良好且高效的糖化作用 (saccharify) 及分解蛋白等作用 (Doworschack et al., 1952)。而近代科學發現，米麴菌具有生產大量麴酸 (kojic acid)、多酚 (phenol) 及發酵轉化黃酮類等能力 (Wang and Li., 2017)，能夠抑制酪胺酸酶 (tyrosinase) 之活性 (Kahn et al., 1997) 及抗氧化達到美白功效。本研究希望透過探討不同發酵條件，如：培養天數、添加不同培養基質等，得到最佳發酵條件，並透過最佳發酵條件培養，確立生產系統之建立。

材料與方法

菌株來源

本研究菌株均購自 BCRC 生物資源保存及研究中心，使用之 7 株米麴菌株 (*Aspergillus* sp., 表一) 初步選擇是參考 BCRC 提供相關菌種之前人研究文獻，如菌株得到來源、過去研究此菌株之特性、相關發酵產業研究運用等進行初步之選擇，菌種購買後使用 PDA (potato dextrose agar) 經活化繼代兩次開始進行實驗。

表一、購自 BCRC 生物資源保存及研究中心之實驗菌株列表

| BCRC strains | | | |
|--------------|-------|-------|-------|
| 30118 | 30222 | 30235 | 30428 |
| 31645 | 31653 | 31659 | |

培養條件

中心條件：PDB 添加 100 g/L glucose、5 g/L yeast extract，於 30°C 轉速為 200 rpm 之水浴槽培養 15 天後收取，取上清菌液存放於 -20°C 待後續分析。

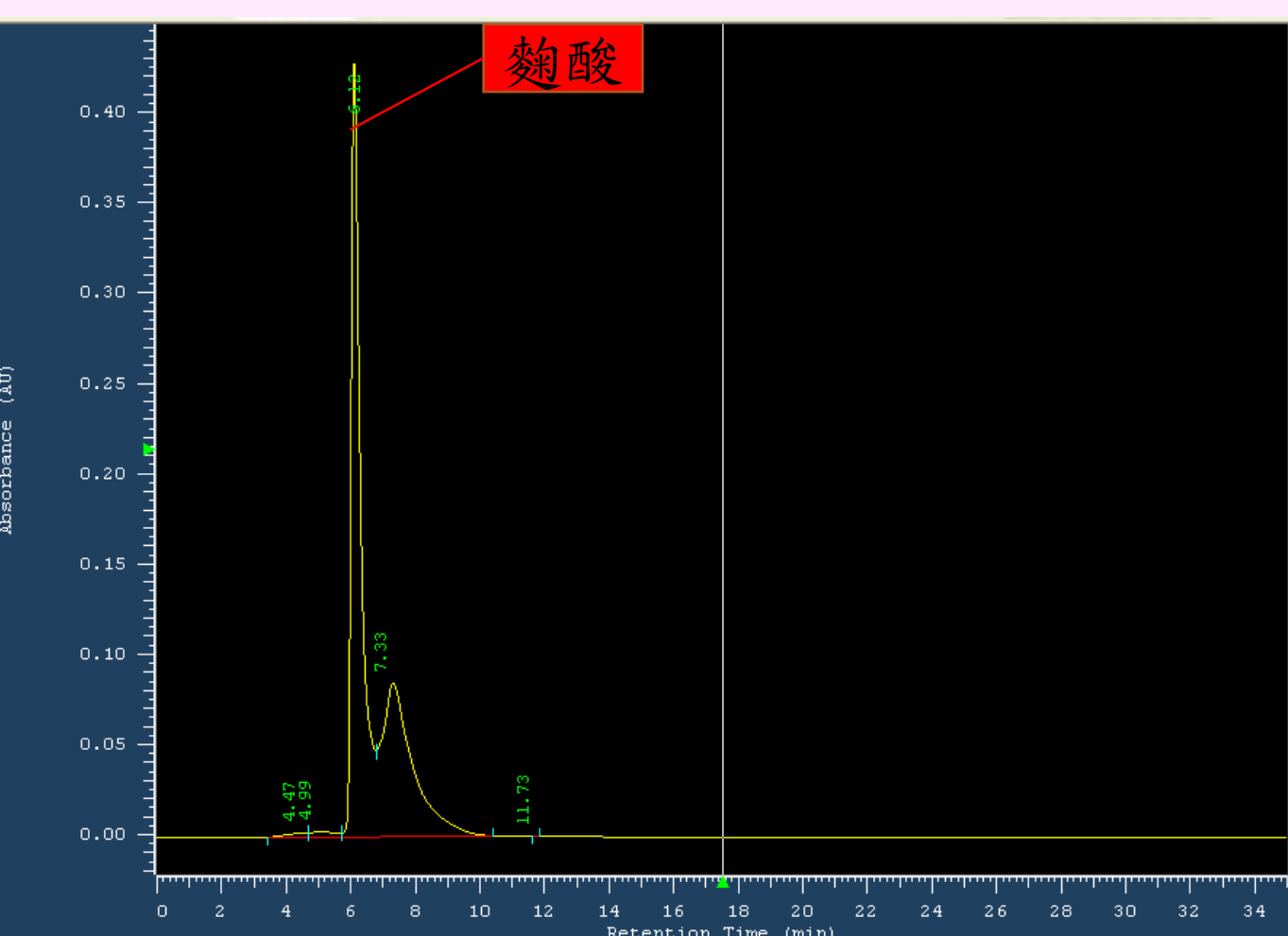
探討培養條件：

- ✓ 7 株購自 BCRC 菌株生產麴酸之能力
- ✓ 培養時間探討
- ✓ 培養溫度探討
- ✓ 添加外源碳源 (glucose) 對於最適菌株生產麴酸能力之影響
- ✓ 添加外源氮源 (yeast extract) 對於最適菌株生產麴酸能力之影響
- ✓ 添加鹽類 (KH₂PO₄、NaH₂PO₄·H₂O、深層海水) 對於最適菌株生產麴酸能力之影響

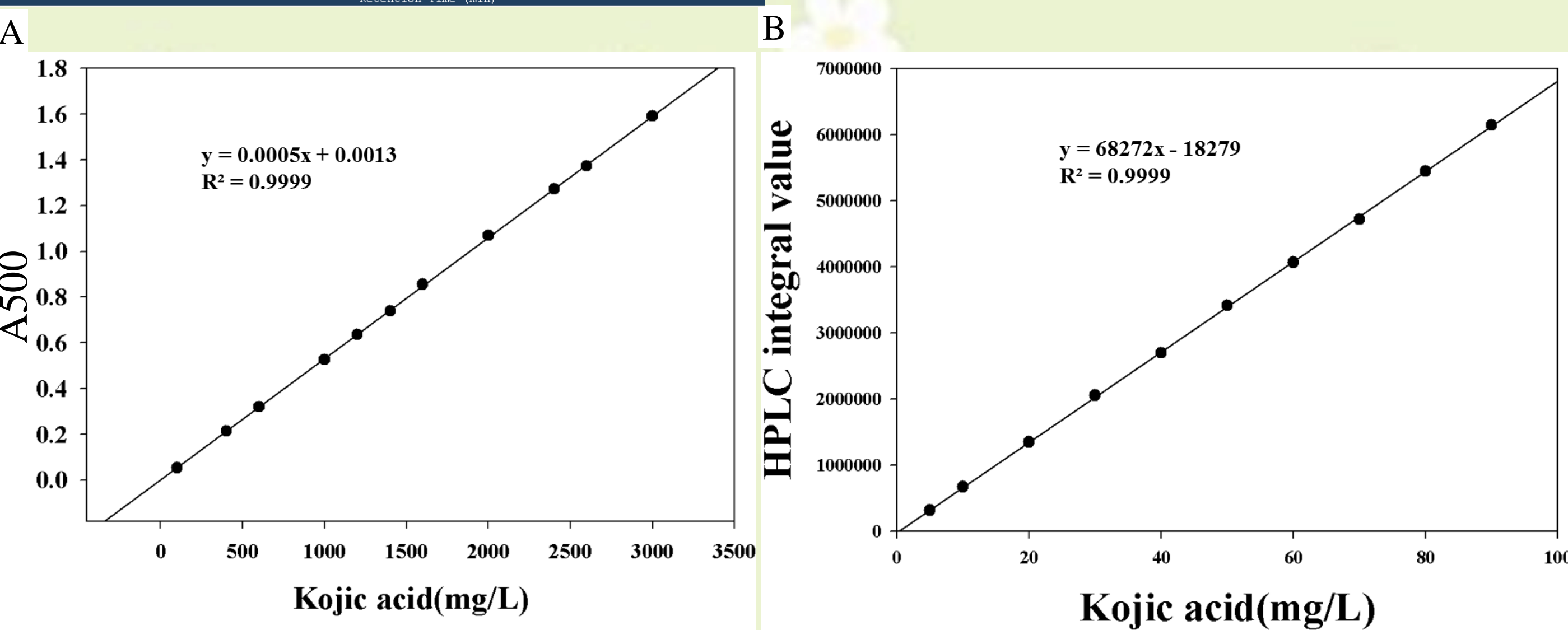
分析方法

✓ 麴酸

1. 氯化鐵比色法，會與菌液在微量多孔盤中反應呈現深紅色，取菌液 20 μL 及 2% 氯化鐵溶液在室溫下混合反應，背景值為 500nm 測定其吸光度。(結果如圖一)
 2. HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 進行分析，使用 C18 之管柱及 90% 水 (加入 0.01% TFA, Trifluoroacetic acid) 10% 乙腈 (Acetonitrile) 流洗 25 分鐘。(結果如圖一、)
- 圖一為以 HPLC 沖提麴酸之結果，表二為兩者分析方法之比較。



圖一、以 HPLC 沖提麴酸吸收波峰與時間之關係圖。麴酸在 6 分鐘開始被沖提出，6.3 分達到波峰，6.5 分時結束。



圖二、麴酸分析方法之標準曲線 (A) 為氯化鐵比色法，使用標準品最高濃度為 3000 mg/L。(B) 為使用 HPLC 分析之積分值與麴酸濃度換算比較之標準曲線。

表二、兩種麴酸分析方法：HPLC 及氯化鐵比色法測定麴酸稀釋標準品之比較

| Kojic acid conc. (mg/L) | HPLC analysis | | FeCl ₃ colorimetric method | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| | Kojic acid conc. (mg/L) | deviation percent (%) | Kojic acid conc. (mg/L) | deviation percent (%) |
| 2000 | 1936.4 | 3.2 | 2183.4 | 9.5 |
| 1500 | 1460.9 | 2.6 | 1586.4 | 5.8 |
| 1000 | 946.4 | 5.4 | 1074.0 | 7.4 |
| 500 | 489.6 | 2.1 | 535.4 | 7.1 |
| 50 | 49.9 | 0.3 | 52.6 | 5.3 |

表三、兩種麴酸分析方法：HPLC 及氯化鐵比色法測定發酵菌液樣品對於麴酸數值之比較

| BCRC 30222 fermentation broth | HPLC analysis | | FeCl ₃ colorimetric method | | Deviation | |
|-------------------------------|---------------|--------------|---------------------------------------|--------------|--------------|-----------------------|
| | value (mg/L) | value (mg/L) | value (mg/L) | value (mg/L) | value (mg/L) | deviation percent (%) |
| Sample 1 | 1452.4 | 1340.1 | 112.3 | 8.04 | | |
| Sample 2 | 1215.4 | 1216.5 | 1.1 | 0.09 | | |
| Sample 3 | 1785.9 | 1697.7 | 88.2 | 5.06 | | |
| Sample 4 | 1752.2 | 1731.1 | 21.1 | 1.12 | | |
| Sample 5 | 1978.5 | 2016.9 | 38.4 | 1.92 | | |

由表二、及表三、結果顯示，使用 HPLC 之分析方法均較於氯化鐵比色法穩定，但為了後續研究進行，因此皆使用氯化鐵比色法，減少測定時間及成本。

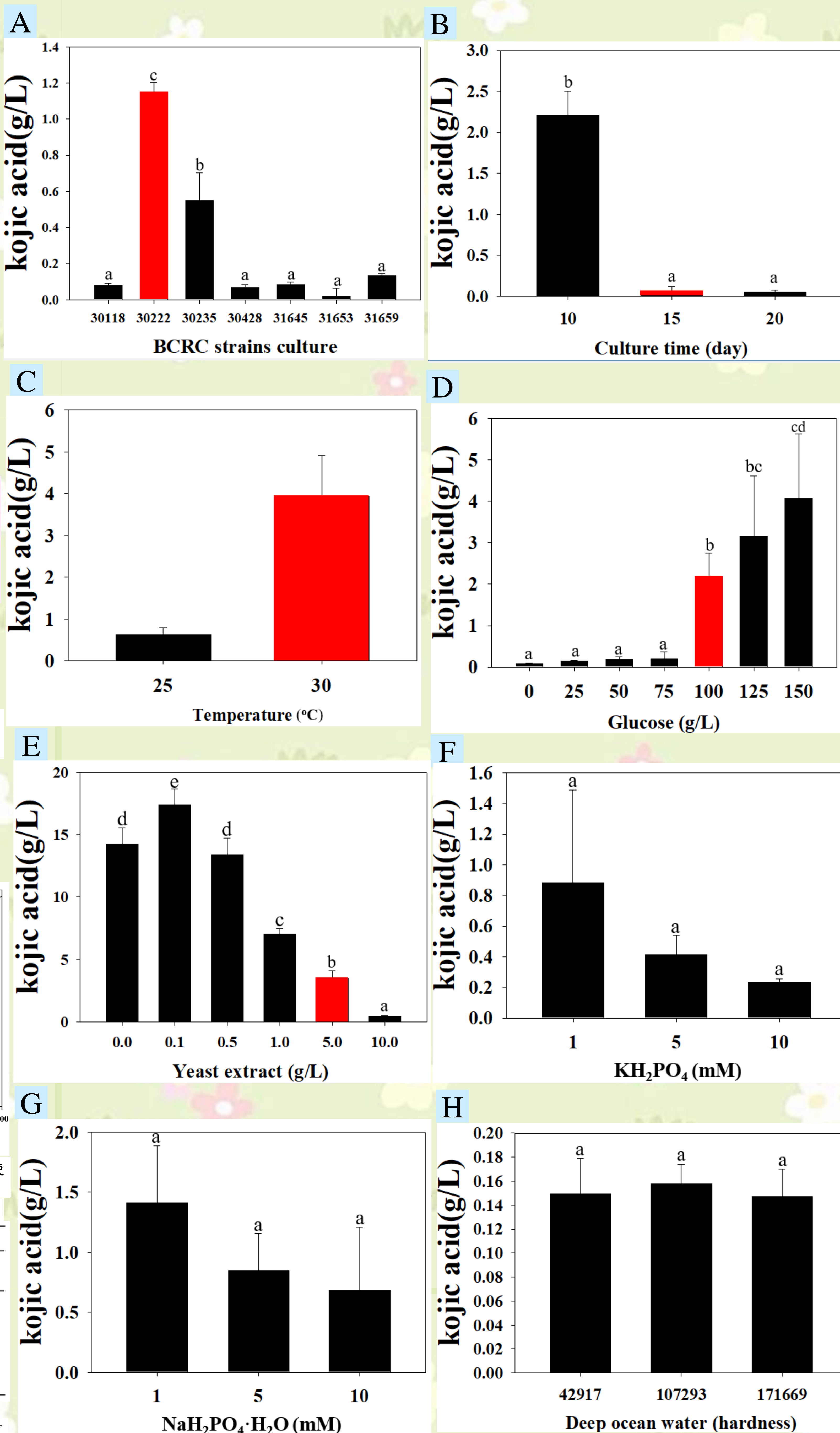
統計分析

實驗結果均以平均值 ± 標準誤差 (mean ± SD) 表示，利用 SPSS 系統之單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 進行統計處理，再以 Duncan's Multiple Range Test 作組間的差異性比較， $p < 0.05$ 表示具有顯著性差異。

討論

圖三 (A) 結果顯示，購自 BCRC 生物資源保存及研究中心之 7 株菌株，BCRC 30222 具有顯著生產麴酸之現象，故後續研究選用 BCRC 30222，作為主要篩選最適發酵條件之菌株。(B) 結果顯示，最佳 BCRC 30222 生產麴酸之天數為 15 天。麴酸無法被米麴自身利用，為外泌防禦性物質，具有輕微抗菌之效果，能抵抗其他微生物之生長，其培養時間較長造成培養基中麴酸濃度下降，可能為物質降解造成之影響。由 (D)、(E) 結果顯示，對於 BCRC 30222 生產麴酸添加外源碳源最佳濃度為 150 g/L，添加外源氮源最佳濃度為 0.1 g/L。但由 (D) 結果發現，碳氮比為 30:1 培養基之組成，最高麴酸培養濃度為 4.1 g/L，而由 (E) 結果發現，碳氮比為 1000:1 培養基之組成，最高麴酸培養濃度為 17.4 g/L，(D) 最高外源碳源之結果組尚有麴酸產量成長之潛力，受限於溶解度上限無法增加外源碳源之濃度，故推測 BCRC 30222 最適培養基碳氮比組成為 1000:1，且氮原濃度為 0.1 g/L。由 (F)、(G) 結果顯示，培養基中添加磷酸鹽類無法增加培養液中麴酸產量，因其促進麴酸外泌之能力有限。(H) 結果顯示，添加深層海水對於 BCRC 30222 生產麴酸並無顯著影響。深層海水富含礦物質，可參與菌體生長及代謝等多項功能，在過去研究中皆發現鹽類對於麴酸生長之影響，但在本研究中發現並無顯著差異。

結果



圖三、初步篩選最適 BCRC 生產麴酸之菌株及相關培養條件探討，紅色標示為培養條件之中心條件。(A) 購自 BCRC 7 株米麴菌株麴酸生產能力探討。(B) BCRC 30222 培養時間之探討。(C) BCRC 30222 培養溫度之探討，37 °C 結果未顯示，因菌體無生長。(D) BCRC 30222 對於添加外源碳源 (glucose) 麴酸生產能力之影響。(E) BCRC 30222 對於添加外源氮源 (yeast extract) 麴酸生產能力之影響。(F) BCRC 30222 對於添加磷酸二氫鉀麴酸生產能力之影響。(G) BCRC 30222 對於添加磷酸二氫鈉二水麴酸生產能力之影響。(H) BCRC 30222 對於添加深層海水麴酸生產能力之影響。

- ❖ 由 (A) 結果顯示，最適麴酸生產菌株為 **BCRC 30222**，而進行後續發酵條件之探討。
- ❖ 由 (B) 結果顯示，最適 BCRC 30222 生產麴酸之培養天數為 **15 天**。
- ❖ 由 (C) 結果顯示，最適 BCRC 30222 生產麴酸之培養溫度為 **30 °C**，37 °C 結果未顯示，菌體於培養時無生長。
- ❖ 由 (D) 結果顯示，**添加外源碳源 (glucose) 對於 BCRC 30222 生產麴酸最佳濃度為 150g/L**。
- ❖ 由 (E) 結果顯示，**添加外源氮源 (yeast extract) 對於 BCRC 30222 生產麴酸最佳濃度為 0.1g/L**。
- ❖ 由 (F) 結果顯示，添加磷酸二氫鉀對於 BCRC 30222 生產麴酸並無顯著影響。
- ❖ 由 (G) 結果顯示，添加磷酸二氫鈉二水對於 BCRC 30222 生產麴酸並無顯著影響。
- ❖ 由 (H) 結果顯示，添加深層海水對於 BCRC 30222 生產麴酸並無顯著影響。