

以固態培養 *Aspergillus* 屬真菌生產酸性蛋白酶之研究

陳凱祥¹、田仲源²、*張春生³

南台科技大學生物科技系

¹robertj0415@hotmail.com, ²tien720806@gmail.com, *³cs_chang@mail.stut.edu.tw

摘要

酸性蛋白酶屬於水解酶的一種，廣泛運用在食品、醫藥、皮革工業與飼料添加劑上，由於酸性蛋白酶的耐酸特性可適應腸胃道的酸性條件，能有助於畜禽對蛋白質的吸收。藉由 *Aspergillus* sp. 屬真菌生產酸性蛋白酶，可進一步做為飼料添加劑的使用。在本研究中，我們以麩皮做為固態發酵主要基質生產酸性蛋白酶，溫度與含水量為固態發酵之重要參數，生產酸性蛋白酶之最佳發酵溫度及含水量分別為 30°C 及 120%，同時運用變溫策略可有效提高酸性蛋白酶活性 17%，使活性達 42.04U/g。可藉由飽和硫酸銨濃度 60-100% 沉澱法將經由 *Aspergillus* sp. 屬真菌生產固態發酵物水萃物之酸性蛋白酶沉澱析出，發現可回收 90% 酸性蛋白酶。

關鍵詞：*Aspergillus* sp.、酸性蛋白酶、固態發酵

Production of Acid Protease from the Fungal *Aspergillus* sp. by Solid-state Fermentation

Kai-Hsiang Chen, Chung-Yuan Tien, Chun-Sheng Chang

Department of biotechnology, Southern Taiwan University

Abstract

Acid protease is a kind of hydrolase with wide applications in food processing、medical purpose、leather processing and feeds. Acid protease having stability in acidic and neutral conditions can adapt digestion systems of animals, which can increase the digestion and absorption rate of feed nutrients. The fungal strain *Aspergillus* sp. is capable of producing an acid protease that can be used as a feed additive. In the study, we used wheat bran as the major solid substrate to produce acid protease. The effect of cultivation parameters including temperature and moisture were also the important fermentation parameters for the solid state fermentation. The optimal temperature and moisture of solid fermentation for the production of acid protease were 30 °C and 120%, respectively. The strategy of change temperature during the period of fermentation effectively increases 17% in the activity of acid protease to 42.04U/g. The crude acid protease can be recovery 90% from crude extract liquid by ammonium sulfate fractionation between ammonium sulfate percent saturation concentration from 60% to 100%.

Keywords: *Aspergillus* sp., Acid Protease, Solid-state Fermentation

壹、前言

近幾十年來，由於科技的進步與生活品質不斷的提升，人類對家禽及蛋類的需求也逐年提高，但是能源問題也是近幾年全世界所關注的要點，所以各國都在尋找如何節能減碳與再生能源的開發。在飼料工業中解決能源短缺的方式就是提高飼料的利用率，但同時也要注意家禽的健康生長與提供給人類食用時的安全性，最後也要考量到對環境污染的問題。以台灣為例，家禽所使用的飼料大多為農產品加工後的副產品，但其中所含的粗蛋白與纖維素較難分解，導致消化系統無法充分吸收而排出體外；爲了增加畜禽對飼料的利用率，解決方法之一便是添加外源酵素與消除粗蛋白與纖維素等抗營養因子，來提高飼料中蛋白質的可消化性。但是大多數微生物發酵產酶能力都並不理想，酵素活性到達一個階段後就無法再突破，像是微生物生產蛋白酶爲例，若以液態發酵的方式培養，產酶率遠遠不及固態發酵的方式（袁等，2003）；並且酵素對環境的耐受度也要好，不然酵素活性也會大大降低。

本研究利用 *Aspergillus sp.* 利用農業加工廢棄物進行固態發酵，並以最適化篩選方式生產高活性的酸性蛋白酶，再進行酵素純化分離以及特性探討；經純化所得到的酵素必須對酸有極高的耐受度以適應腸胃道的酸性環境，進而運用在畜牧與飼料工業上，以提升畜禽對飼料的利用率。

一、固態發酵介紹

(一)固態發酵培養方式

固態發酵(Solid State Fermentation, SSF)一詞，早在二千多年前就有中藥神曲的固態發酵生產。廣義上講是指用一些不溶性固態基質來培養微生物的發酵過程，多數情況是指在沒有或幾乎沒有自由水的條件下，在有一定濕度的水不溶性固態基質中，用一種或多種微生物發酵的一個生物反應過程，包括將固態懸浮在液體中的深層（半固態）發酵。依培養方式與微生物的不同，固態發酵可分爲自然固態發酵、強化微生物混合固態發酵、限定微生物混合固態發酵和單菌固態純種發酵。

若根據固態發酵固相的性質，又可把固態發酵分爲兩種類型。一種是以農作物加工後副產品（如麩皮、豆粕等）組成固態培養基，提供微生物生長營養與環境，一般可稱這種發酵爲傳統固態發酵方式。另一種固態發酵方式，則是以惰性固態載體爲基質，這些載體材料有大麻、珍珠巖、聚氨酯泡沫體、蔗糖渣和聚苯乙烯等，並添加液態或是流質性培養基，讓微生物得以利用與生長，這種發酵方式爲惰性載體吸附固態發酵（李，2004）。

(二)影響固態發酵之操作變數

1. 接種量

利用霉進行固態發酵時，接種的孢子太少時會造成發酵生長太慢導致基質發酵不完全，若接種太多孢子，會造成許多孢子未萌芽而導致浪費。

2. 水活性與含水量

水分含量對麴菌生長也是一個重要限制因素(賴，1984; Narahara 等，1982; Narahara 等，1984)，因爲水分會影響微生物對氧氣的利用，不同微生物要求的水活性也不同，如細菌就需要較高的水活性，而真菌與少數酵母菌對水活性的要求較低。有文獻指出(王，1982)，水分活性對麴菌生長的影響，發現水分活性爲 0.90 時，可得到最高菌體量以及酸性蛋白酶，因爲水含量太少使菌體生長不良，而含水量太高會導致氧氣傳遞的能力降低。

3. 溫度與通氣

在發酵初期階段，發酵基質各部位的溫度都會一樣，但隨著發酵的進行會產生出代謝熱，而固態基質缺少水分當流動向，導致熱量傳遞困難，所以基質顆粒大小及給予適度的通氣是影響發酵的關鍵(Mahanta 等，2008)，顆粒太小會造成基質過於緊密影響氧氣及熱量的傳導，顆粒太大會使發酵表面機減少；發酵時通氣不足會造成孢子無法萌芽，通氣過多則導致含水量流失，而培養溫度太高，會使分生孢子不能萌芽(Raimbault and Alazard, 1980)，太低造成發酵不良，所以控制適當的基質顆粒、通氣及溫度是

影響發酵的重要因素。

二、麴菌屬分類及應用

麴菌屬（也叫曲霉）(*Aspergillus*)，在 1729 年由 Micheli 所發表的植物新屬被提及，Micheli 提出了真菌的分屬檢索表，命名的屬名包含 *Aspergillus*、*Clathrus*、*Geaster*、*Mucor*、*Polyporus* 和 *Tuber* 等（邵等，1984）。*Aspergillus* 為真菌界(Myceteae)、無鞭毛菌門(*Amastigomycota*)、子囊菌亞門(*Ascomycotina*)、子囊菌綱 (*Ascomycetes*)、不整子囊菌亞綱(*Plectomycetes*)、散囊菌目 (*Eurotiales*)、散囊菌科 (*Eurotiaceae*)、麴菌屬(*Aspergillus*)（陳，1975）。

麴(koji)，即是把菌繁殖於生長基質的表面，利用菌體本身分泌所需的酵素（如：蛋白酶 protease、澱粉酶 amylase 等），將基質分解成小分子物質來提供菌體生長。麴霉(*Aspergillus*)是發酵工業和食品加工業的重要菌種，已被利用的近 60 種。2000 多年前，我國就用於製醬，也是釀酒、製醋曲的主要菌種。現代工業利用曲霉生產各種酵素（澱粉酶、蛋白酶、果膠酶等）、有機酸（檸檬酸、葡萄糖酸、五倍子酸等），農業上用作糖化飼料菌種，例如黑曲霉、米曲霉等。

曲霉分布廣泛，幾乎在任何空間均可能發現其分生孢子。他和人類關係密切。由於曲霉的活性大，我國自古以來均用它做發酵食品，如用黑曲霉的糖化能力製酒，用黃曲霉的一些菌系作將，利用曲霉生產檸檬酸、葡萄糖酸等。但也有些曲霉會生產毒素，如黃曲霉的產毒菌株在一定條件下，能產生黃曲霉毒素，能使試驗動物發生肝癌。煙曲霉能引起人、鳥和其他脊椎動物發生肺結核式病症，煙曲霉和土曲霉能引起人的耳曲病。此外，曲霉也常引起食物、工業產品、布匹和飼料等霉變。

三、飼用添加劑的功用與發展

飼料添加劑的研發始於上世紀初。到 20 世紀 60 年代初，各種添加劑在國外養殖業中已有較為廣泛的應用。我國飼料添加劑的研究和應用推廣起步較晚，但隨著飼料工業和養殖業的迅速興起及所起的巨大作用而得到了較快發展。與此同時，使用一些添加劑帶來的一系列現實問題，如三致（致癌症、致畸形、致突變）、抗藥性、因殘留而引起的某些中毒現象與畜牧生產過程中對環境造成的污染等均與此有關（王，2008）。而且長期使用這些添加劑也可使畜產品的風味、品質下降。鑒於此，許多國家對抗生素、化學合成藥品的使用、淘汰、畜產品中的藥物殘留作了非常嚴格的限定，並致力於開發和推廣無害的綠色（純天然）飼料添加劑，以生產出安全可靠的食物——“綠色畜產品”，來滿足人們的需求，以提高畜產品質量、節約成本和為人類提供全天然、無殘留、營養價值高的畜產品。綠色安全添加劑包括天然原料（天然植物提取物、微生物等）、生物合成原料（微量元素氨基酸螯合物、小肽蛋白質等）以及化學合成原料等。目前，國內外許多飼料業相關研究單位對綠色安全添加劑應用進行了長期深入的研究，研發出了許多飼料添加劑的生物技術產品。現就當前綠色添加劑種類、發展現狀和應用前景作以簡要闡述，以期引起人們對此問題的關注和足夠重視。

1975 年美國飼料工業首次將微生物酵素作為添加劑應用於配合飼料中，20 世紀 80 年代國外配合飼料中已普遍使用酶製劑，90 年代初開始引入我國。酶製劑是由微生物產生的生物製品，使用酶製劑的基本目的在於提高飼料吸收率，改善動物生產性能。隨著抗菌素在飼料中的限制使用，抗菌素的促生長將有可能由酶製劑取代。酶製劑作為生物添加劑，其使用效果受到動物種類、年齡、生理狀態、飼料原料組成及其配方、酶製劑的種類及其活性和添加量、飼料加工儲藏條件等諸多因素的影響，所以有關酶製劑使用效果的報導常常不一致。

四、酸性蛋白酶簡介

（一）一般生化特性

酸性蛋白酶含有較少量的鹼性胺基酸(basic amino acid)，故具有較低的等電點(pI)，而最適活性pH 值約在2.0-5.0，即在酸性環境下具有高穩定的酵素活性，但在高pH下則很快地喪失活性，此類酵素應用在食品工業上非常普遍，原因便是其反應的低pH環境可抑制微生物生長。其最適酵素作用溫度介於50-70°C

(王等, 1992)'; 而酵素熱穩定性則會因菌株的不同而有所差異。

(二) 分子量

酸性蛋白酶的分子量在32-40 kDa之間(Davidson 等, 1975; 王等, 1992; Eneyskaya 等, 1999), 較大的則為42-60 kDa(Tsujita and Endo, 1976)等。

(三) 金屬離子及抑制劑

研究指出二價的金屬離子, 如 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 及 Zn^{2+} 等, 可以提高酸性蛋白酶的熱穩定性(Sawada, 1964); 而 Hg^{2+} 和 Fe^{2+} 金屬離子對蛋白酶的活性有抑制作用(Fukumoto 等, 1967; Sawada, 1964)。可以被 pepstatin A 抑制所抑制的酸性蛋白酶, 屬於天門冬胺酸蛋白酶(Vicente 等, 1996)。

(四) 運用與市場前景

胃蛋白酶型的此類酵素, 在東方國家以黴菌從事大豆及稻米等穀物的發酵, 釀製成醬油、豆醬和味噌(miso)等, 在食品工業上扮演著重要角色。而似凝乳酶的酸性蛋白酶經研究結果與牛的凝乳酶作用相似, 目前已取代牛的凝乳酶, 與牛奶的酪蛋白作用而形成凝乳現象, 應用在乳酪的製造。

本研究利用 *Aspergillus sp.* 利用農業加工廢棄物進行固態發酵, 並以最適化篩選方式生產高活性的酸性蛋白酶, 再進行酵素純化分離以及特性探討; 經純化所得到的酵素必須對酸有極高的耐受度以適應腸胃道的酸性環境, 進而運用在畜牧與飼料工業上, 以提升畜禽對飼料的利用率。

貳、材料與方法

一、菌種活化與保存

本實驗菌株為 *Aspergillus sp.*, 分別培養在 PDA、YMA 與 MEA 盤中, 觀測菌體在盤中的生長狀況, 挑選出最適菌體生長的培養基。接著對 26、30 與 37°C 三種溫度做篩選, 觀察最適產孢生長條件, 再鉤取黑色孢子接菌至斜面培養基中。

將菌種活化至最佳產孢平板培養基中(第一代), 生長 7 天後把黑色孢子接到最適產孢斜面培養基中進行培養(第二代), 直到斜面佈滿黑色孢子後用將孢子液洗下, 用血球計數器做孢子數定量, 再用 80% 甘油與孢子液混合(最終為 50% 甘油)後保存 -80°C 冰箱, 作為往後固態培養之孢子種液。

將孢子種液稀釋成 2×10^7 個/ml 孢子, 接種到固態基礎培養基中, 在 30°C 培養至少五天, 讓固態基質上佈滿黑色孢子, 再用將孢子液洗下後用血球計數器做孢子數計數, 將孢子液與甘油混和成 50% 後保存到 -80°C 冰箱, 作為往後固態發酵之種液。

二、建立酸性蛋白酶測定法

(一) 酪胺酸檢量線製作

將酪胺酸標準品用 RO 水稀釋, 配製成 0.01-0.06 mg/ml 的六種酪胺酸濃度。酪胺酸稀釋液與 Na_2CO_3 5ml 混合, 在 37°C 下預熱 5 分鐘。加入福林試劑 1ml 呈色 20 分鐘, 測 660 nm 吸光值。繪製酪胺酸檢量線。

(二) 酸性蛋白酶活性測定(吳, 2005)

用酸性蛋白酶標準品來建立活性測定方法, 用做將來固態發酵生產酸性蛋白酶活性高低的檢測與比對, 其測定方法如下:

將酵素液 0.25 ml 與 1.75 ml 的 casein solution (pH 3.0) 在 37°C 下反應 30 分鐘, 加入 0.4M 的 TCA 2 ml 終止反應, 於 37°C 靜置 20 分鐘後以 9000 rpm 離心 10 分鐘。取上清液 1 ml 與 Na_2CO_3 5 ml 於 37°C 試管中預熱 5 分鐘, 再加入福林試劑 1 ml 呈色 20 分鐘, 測 660 nm 吸光值, 代入酪胺酸檢量線。對照酪胺酸檢量線後可以得到酪胺酸釋放量, 再依照活性定義可推得酵素活性, 其定義為在溫度 37°C 下, 1ml 酵素液每分鐘水解酪蛋白產生 1 μ mole 酪胺酸定義為一個蛋白酶活性單位(U)。對照組: 酵素液先加入 TCA 2ml 反應 20 分鐘後再加入 casein 1.75ml。

三、固態發酵

(一)粗酵素液的製備

麩皮與 RO 水混合，添加基質總重 120% 的含水量至固態基質中，使基質總重達 22g。將基質均勻攪拌後滅菌。將孢子液用 RO 水稀釋成 2×10^7 個/ml 孢子後接到固態基質中（此時基質含水量為 120%），在 37°C 下培養 60 小時，當發酵結束時，以 80 ml RO 水萃取酵素一小時，再用抽氣過濾的方式取得粗酵素液，並將酵素液冰至 4°C 中待測活性。

(二)探討不同固態發酵條件對酸性蛋白酶生產之影響

1. *Aspergillus sp.* 酸性蛋白酶生成曲線

依照基礎固態培養基的配方進行固態發酵，在 30°C 下培養 32 小時到 80 小時，找出 *Aspergillus sp.* 生產酸性蛋白酶最佳收菌時間。

2. 不同溫度對酸性蛋白酶生產之影響

依照基礎固態發酵培養基組成進行固態發酵，分別在 26°C、30°C、34°C 與 37°C 下培養 60 小時，找出生產酸性蛋白酶最適培養溫度。

3. 不同基質含水量對酸性蛋白酶生產之影響

依照基礎固態發酵培養基配製，添加基質含水量為基質總重的 60%~160%，在 30°C 下培養 60 小時後收菌，測定酸性蛋白酶活性。

四、酸性蛋白酶純化

(一)硫酸銨沉澱法

先把硫酸銨磨碎後平鋪放置 60°C 烘箱內 30 分鐘，去除水分。發酵液 100ml 放置冰浴中，添加 50% 飽和度之硫酸銨溶液，靜置 20 分鐘，離心 9000 rpm 20 分鐘，取上清液與沉澱物。上清液繼續做硫酸銨分劃，每次增加 10% 硫酸銨飽和度進行沉澱離心，逐步提高硫酸銨飽和度到 100%，取上清液與沉澱物。將沉澱物溶於檸檬酸緩衝液 (pH 3.5) 中，並測量酸性蛋白酶活性。

(二)SDS-PAGE 分子量測定 (SDS - Polyacrylamide gel electrophoresis; SDS - PAGE) 法

蛋白質或酵素以 sodium dodecylsulfate (SDS) 處理後則與 SDS 結合而帶負電荷，若為寡體蛋白質（酵素），與 SDS 結合後寡體解離為次單元。將 SDS 處理之蛋白質（酵素）於聚丙烯醯胺膠片進行 SDS-PAGE，則蛋白質（酵素）依其分子量之大小而移動，分子量愈小者移動愈快，分子量愈大者移動愈慢。利用分子量對數值和移動度成比例的關係可測定蛋白質（酵素）或其次單元之分子量。

製備 Discontinuous Polyacrylamide Gels: 配製適量之 Resolving Gel，脫氣 (degas) 約 15 min，加入適量之 10% APS (fresh) 與 TEMED，混合均勻，立即將膠倒入電泳玻璃槽內，避免氣泡產生，緩慢加入一層覆蓋液 (2D 水或 0.1% 之 SDS)，避免擾亂 Resolving Gel，靜置約 45 min 至 1 小時使其成膠，再將覆蓋液倒掉，以 2D 水清洗 gel，準備適量的 Stacking Gel—此步驟可於 step 完成後隨即進行以節省時間。脫氣 (degas) 約 15 min，加入適量之 10% APS (fresh) 與 TEMED，混合均勻，立即將膠倒入電泳玻璃槽內（此刻已有 Resolving Gel 於下層），避免氣泡產生，馬上將 Comb 插入 Stacking Gel 中，靜置 30-45min 使之成膠。最後小心的將 Comb 移除，以 2D 水清洗 Well。將 SDS Gels 拿下裝至電泳槽，加入約 150 ml 之 1X Running Buffer 約略於長玻璃與短玻璃中間（必須蓋過 Well），加入約 200 ml 1X Running Buffer 於外槽中（必須高於膠的底部）。先以 100Volts 的電壓跑 5-10 min，樣品與 2X (Laemmli) Sample Buffer 以 1:1 混合，於 55°C 溫熱約 3-5 分鐘，將樣品注入 Well 中，將電極接上，以 100 volts 跑膠約一小時，先將 Stacking Gel 移除，再將 Separating Gel 轉移至塑膠盒中，加入 Fixing Solution (Gel 必須完全浸入 solution)，於室溫下搖晃約 15min。以 Staining Solution 染 Gel 至少 2 小時 (通常染 overnight)，將 Gel 置於 Fixing/Destaining Solution 中去染，直到可以清楚的看到條紋，Gel 以 2D 水清洗兩次，將 Gel 置於 2D 水以阻止去染。

叁、結果與討論

一、不同培養方式對產孢之影響

將菌種培養在 26°C、30°C 與 37°C 三種溫度下，可以發現培養在 37°C 時，菌體會產較多孢子，且孢子顏色較深，孢子成熟狀況較佳；培養在 30°C 時，菌體生長最快，但是產孢少，孢子顏色也比較淺；培養在 26°C 時，菌體生長最慢，幾乎不產孢，所以種盤培養溫度選定 37°C 下培養。

將 *Aspergillus sp.* 菌種於 37°C 下，分別培養在 PDA、YMA 與 MEA 中，其生長外觀型態皆有差異，菌體在 YMA 培養基中菌絲生長快，但產孢狀況較少，大部分都是菌絲體為主；在 MEA 培養基中，菌體生長較慢且孢子顏色較淺，可能是產孢狀況不好所造成；在 PDA 盤中雖然菌體並不是生長最快速，但表面幾乎佈滿黑色孢子，在 PDA 與 MEA 斜面培養基下，於 37°C 中培養 10 天後將孢子洗出；固態發酵培養在 30°C 下 5 天後將孢子洗下。顯示比較適合做為斜面接菌用孢子種盤，如圖 1 所示。

與 MEA 種盤分別勾取黑色孢子塗在 PDA 與 MEA 斜面上，在 37°C 培養 10 天，洗下孢子液用血球計數器定數，可以發現培養在 PDA 中可以得到較高的孢子數（約 5×10^7 個/ml 孢子），以此作為往後固態發酵接菌之孢子種液，如圖 2 所示。

比較斜面培養與固態發酵培養在產孢之能力，如圖 3 所示，將 PDA 斜面孢子液稀釋成 2×10^7 個/ml 孢子後接到基礎固態發酵基質中，在 30°C 中培養五天後，基質上已經佈滿深黑色孢子，將孢子液洗下，此時的孢子液數量可高於 PDA 斜面孢子液 4 倍以上。往後若無另外說明，皆以此方式所得之孢子液做固態發酵產酸性蛋白酶之種液。

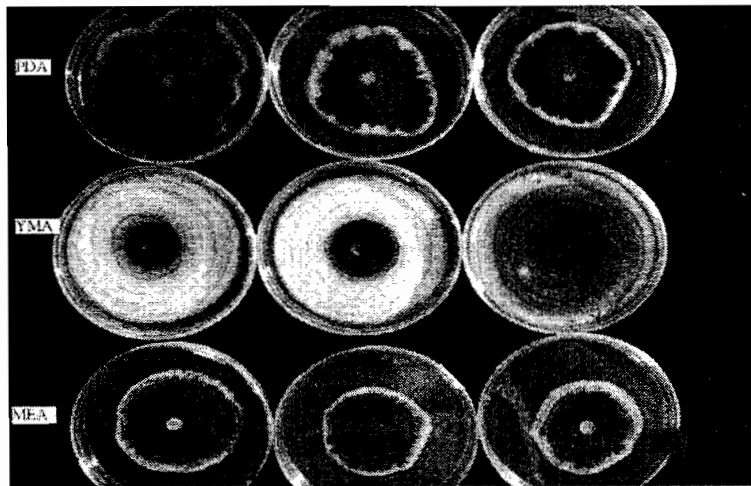


圖 1 *Aspergillus sp.* 在三種培養基中培養 6 天的外觀；上排為 PDA 盤；中排為 YMA 盤；下排為 MEA 盤。

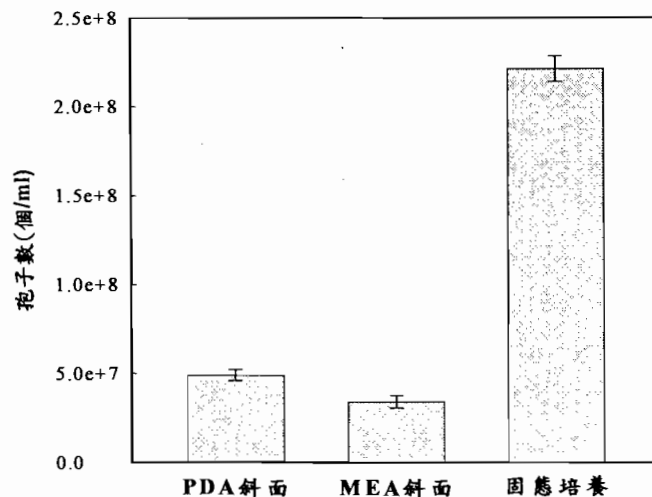


圖 2 比較斜面培養與固態發酵培養在產孢之能力。

二、固態發酵生產酸性蛋白酶之生成曲線

(一)不同透氣材質對酸性蛋白酶生成的影響

麴菌在不同物理環境下其生理狀況會有改變，在此改善固態發酵時的氧氣通透性，像是使用透氣塞或是透氧性較佳的牛皮紙來封瓶口，讓蘭花瓶中的基質可以獲得較多的氧氣。本實驗中的蘭花瓶在培養時，若以鋁箔紙來封口，發酵基質在培養過程不會有產孢的現象，只會有白色的菌絲體佈滿其中，所測得的酸性蛋白酶活性極低，在最佳酵素生成時間裡，酸性蛋白酶活性最高也不會超過 3U/g。

比較用鋁箔紙封口與牛皮紙封口的差異，二者皆用 PDA 孢子液接菌，在 30°C 中培養 2-5 天的時間，觀察其酵素活性在不同時間內的變化量；結果發現使用鋁箔紙的方式進行培養，在第三天時酵素活性達最高峰，但此時酵素活性最高不超過 3U/g；而採用用牛皮紙封口的方式進行培養，酵素活性於第二天可達到最高值，培養到第三天時酵素活性開始下降，而第五天活性已經明顯下降，所以應縮短培養時間，找出產酶最高之時間點，二者結果如圖 3 表示。

(二)比較斜面培養與固態發酵所得孢子液對固態發酵生產酸性蛋白酶之生成曲線

利用 *Aspergillus sp.* 進行固態發酵，於 30°C 下培養 80 小時，在初始的 24 小時只有生長些微的白色菌絲，到第 36 小時白色的菌絲已經佈滿在固態培養基質，此時開始有白色的孢子形成，然後孢子顏色慢慢變深；在第 50 小時以後基質上層已經被黑色孢子所覆蓋，此時的酵素活性也到達高峰，由圖 5 可以得知，酸性蛋白酶的活性在培養 32 小時後，開始快速增加，到了第 50 小時左右酵素活性增加的趨勢開始減慢，至第 65 小時後活性開始下降，培養 80 小時後酵素活性約只剩下產酶最高峰的一半。實驗結果如圖 4 顯示，利用 *Aspergillus sp.* 經由固態發酵所產酸性蛋白酶最佳培養時間約在 50~65 小時之間，所以將往後實驗收菌時間訂在 60 小時。同時比較斜面培養與固態發酵所得孢子液，在相同孢子數接菌的情況下，固態發酵所取得的孢子液可以生產較高的蛋白酶活性，而且在發酵期間酵素維持在高峰期的時間也比較長，因此後續實驗，將以固態發酵之孢子液作為接菌種液。

(三)不同培養溫度對生產酸性蛋白酶的影響

固態培養過程中，菌體在生長的同時會有代謝熱的產生，而基質又缺少水份的流動來傳遞熱量，所以給與適度的氧氣通透可維持發酵溫度的穩定。固態發酵產酸性蛋白酶的研究上，因菌種與培養方式的不同，最適的培養溫度也會有所不同，但是大多培養溫度介在 28-36°C 左右為較佳的溫度，如黑曲霉 HU53 利用麩皮與豆粕進行固態發酵，在最適培養溫度 28°C 下，酸性蛋白酶活性可達 93.8U/g (本篇活性定義與此相同) (袁等, 2003)；*Pseudomonas aeruginosa* PseA 利用麻瘋樹種子做為固態發酵基質，在 30°C 下培養 72 小時，可產蛋白酶達 1818U/g (換算本實驗活性定義約為 10U/g) (Mahanta 等, 2008)；也有培養溫度在 40°C 為最適培養溫度，如青霉 P-1007 在 40°C 下進行固態發酵，可得到最高酸性蛋白酶活性達，1670U/g (換算本實驗活性定義約為 9.22U/g) (戚等, 2006)。

本篇實驗中以牛皮紙對蘭花瓶封口的的方式進行固態發酵，因氧氣通透性的增加，可大幅提升酸性蛋白酶的生成，但是也直接影響了培養溫度與含水量等條件；牛皮紙增加了瓶內氧氣的流通，也伴隨著基質水分容易散失的隱憂，導致發酵不良；使用牛皮紙封口時，培養溫度太高也會加速水分的蒸散，所以適度的培養溫度與起始含水量也是相當的重要。如圖 5 所示，比較不同培養溫度對 *Aspergillus sp.* 生產酸性蛋白酶的影響，進行固態培養 60 小時所測得酸性蛋白酶活性，發現以 30°C 培養可獲得最高之酸性蛋白酶活性，培養溫度為 34°C 與 37°C 時，基質水分散失太快，導致產生基質變乾的現象，較不利於酸性蛋白酶的生成；培養在 26°C 時，水份殘留太多，導致氧氣傳遞不佳而降低酸性蛋白酶的生成，故於 30°C 培養時，配合牛皮紙的使用，為最適生產酸性蛋白酶的條件。



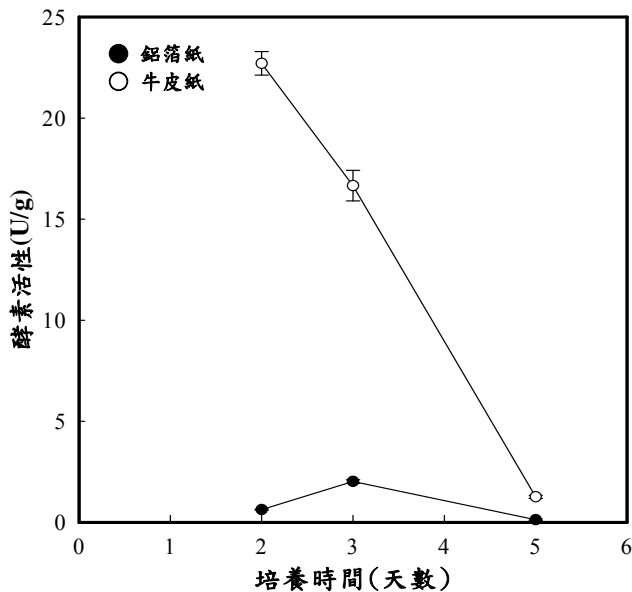


圖 3 在不同培養時間下，比較鋁箔紙封口與牛皮紙封口對酵素活性的影響；

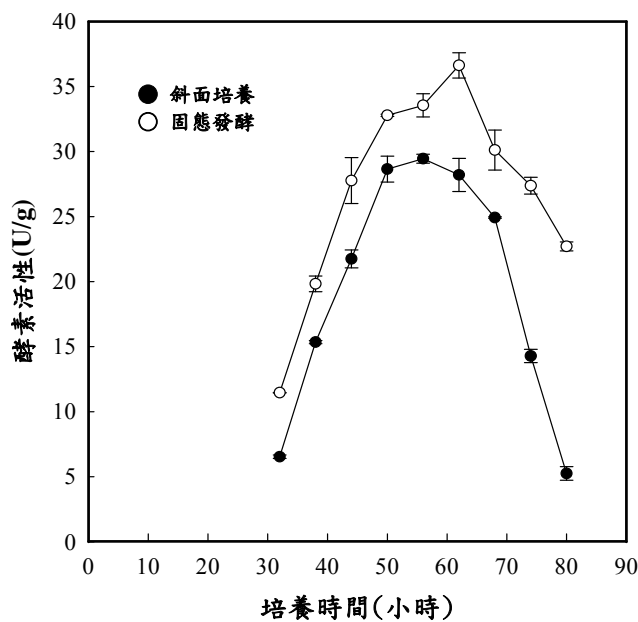


圖 4 比較斜面培養與固態發酵所得孢子液對固態發酵生產酸性蛋白酶之生成曲線。

三、基質含水量探討

許多文獻指出，水分含量對麴菌生長也是一個重要限制因素，通常最適水份含量與基質與水的結合能力有關。*A. oryzae* 在白米中製麴，發現水分在35%時， α -amylase 活性最高(Narahara, 1984)。黃正財探討以不同初含水量對*Aspergillus sp.*在米與麩皮上生長時，發現水分過多，降低了O₂ 的傳送，也易引起污染；但水分太少，會導致基質過乾而影響菌體生長（黃，1983）。研究青霉P-1007對麩皮及黃豆粉等基質進行固態發酵，在添加基質乾重106%的含水量時，可生成酸性蛋白酶活性達1594U/g（換算本實驗酵素活性定義約為8.8U/g）（戚等，2006）；利用黑曲霉HU53進行固態發酵，在基質組成爲麩皮38.8%、豆粕9.7%及硝酸銨1.5%的條件下，添加基質乾重100%的含水量，可生產最高的酸性蛋白酶活性98.3U/g（袁等，2003）。



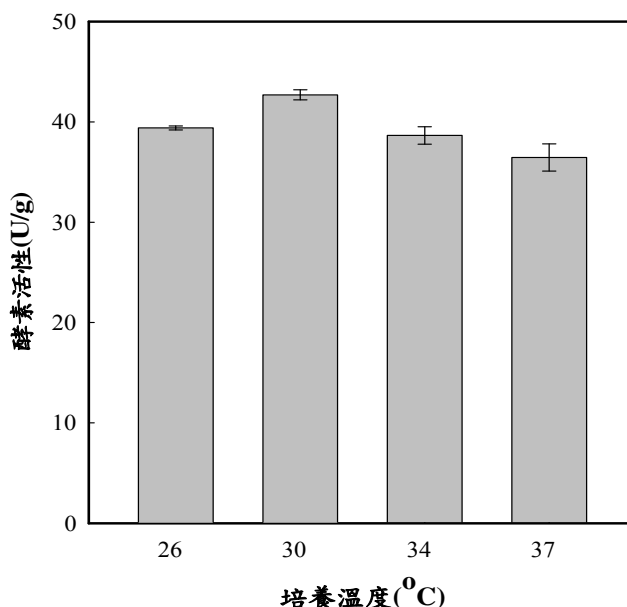


圖 5 比較不同培養溫度對 *Aspergillus sp.* 生產酸性蛋白酶的影響。

實驗結果如圖6顯示，若將基質含水量控制在100~160%時，進行固態培養60小時檢測酸性蛋白酶活性，酸性蛋白酶的產量都可以達到很高的水準，但最佳含水量在120%；若含水量低於80%時會導致基質太乾，不利於菌體生長且酵素活性很低，往後的實驗則以含水量120%最為主。

四、不同飽和度之硫酸銨對回收酸性蛋白酶的影響

依照前人所提供之硫酸銨沉澱法中，在靜置的時間上有提到不同的做法，大致有二十分鐘（蘇，2006）、二小時（周，2004）與十二小時之不同靜置時間，但實驗結果得知靜置時間上的不同對硫酸銨分劃的結果是沒有太大的差異，靜置時間久，並不會增加酵素活性的回收率，為了確保蛋白質能沉澱完全，但又不需浪費太多時間，所以在此選用沉澱靜置時間二小時的方式。

粗酵素液經由硫酸銨沉澱法做出初步的純化，發現硫酸銨飽和度 50~100%可回收約 85%的原始酵素活性，其中又以飽和度 70%沉澱到 80%的回收率最高，回收原始酵素活性約 50%；由表 1 可以看出，在飽和度硫酸銨 60%以前所沉澱的蛋白質，其酸性蛋白酶的活性並不高，主要的酸性蛋白酶最適的飽和度範圍介在 60~100%之間。

將發酵液進行飽和度硫酸銨 60%的沉澱，去除沉澱物後再做飽和度硫酸銨 90%的沉澱，可回收原始酵素活性約 80%，以此方式做為硫酸銨分劃的依據有兩點，第一是可以減少飽和度 60~90%所沉澱的步驟，節省時間上的浪費，第二是發酵液進行透析去除硫酸銨時，硫酸銨的多寡會影響到透析的效果，而飽和度 90~100 之間所回收的原始酵素活性不到 6%，若做到飽和度 100%，透析所花的時間便會加長，所以飽和度 90%~100%沉澱並符合時間成本與經濟效益，最佳的硫酸銨飽和度沉澱，應介在 60~90%之間。結果如表 1。

五、以 SDS-PAGE 測定酸性蛋白酶分子量

依Laemmli (1970) 方法，將上述具有活性部分的純化之酸性蛋白酶，分別取一定量進行SDS-PAGE電泳分析，其分離膠體丙烯醯胺濃度為10%，聚焦膠體濃度則為5%。酸性蛋白酶的分子量在32 - 40 kDa之間(Davidson 等, 1975; 王等, 1992; Vicente 等, 1996; Eneyskaya 等, 1999)，有些較大的則為42-60 kDa (Tsujita and Endo, 1976) 等。經由初步硫酸銨沉澱所純化的酸性蛋白酶與酸性蛋白酶標準品所表現的區域是相同的，如圖7所示；在SDS-PAGE還可以發現一個現象，依不同硫酸銨飽和分劃所得之酵素液，所回收的原始酵素活性百分比越高，則band的表現量也越大，二者之間呈現正相關。進一步可經由標準蛋白質分子量檢量線，如圖8所示，推算出酸性蛋白酶的分子量，藉由其分子量對數值與其Rf 值（相對移動速率）作比較，可得純化之酸性蛋白酶分子量約為 50kDa。



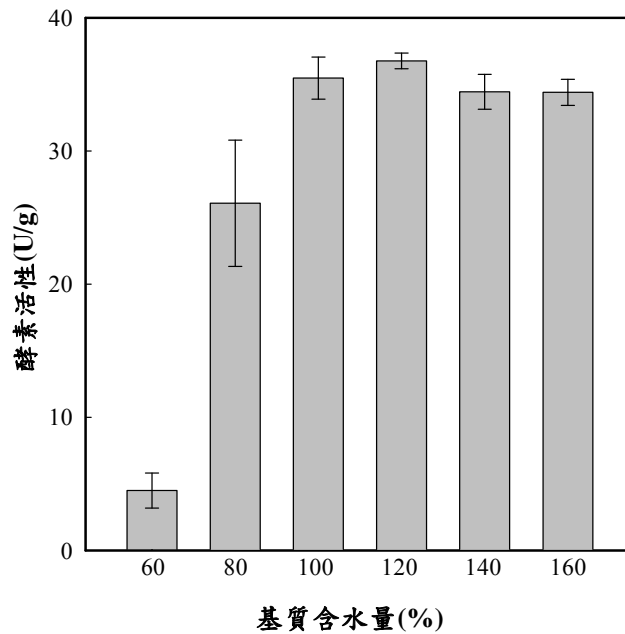


圖 6 不同基質含水量對酵素活性的影響。

表 1 不同飽和度硫酸銨沉澱方式之初酵素液回收率

飽和度硫酸銨沉澱範圍(%)	原始初酵素液之回收率(%)	飽和度硫酸銨沉澱範圍(%)	原始初酵素液之回收率(%)
0-50	1.2	0-60	3.8
50-60	1		
60-70	13.7	60-90	80.53
70-80	53.18		
80-90	10.8		
90-100	5.97	90-100	5.97

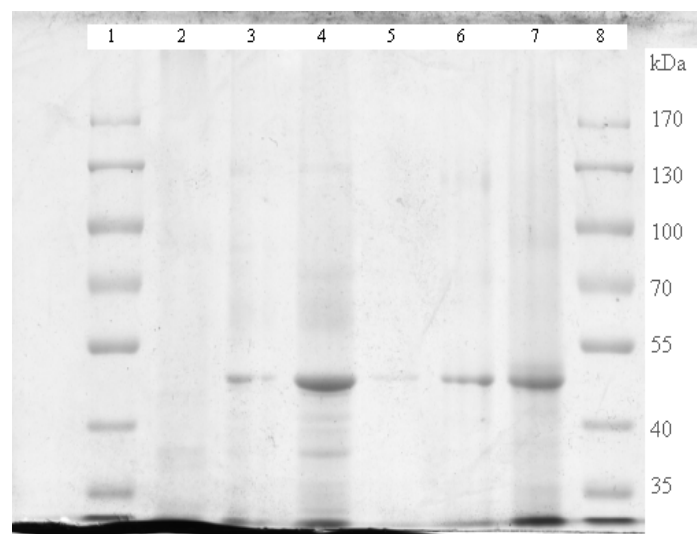


圖 7 純化 *Aspergillus sp.* 酸性蛋白酶之 SDS 電泳圖。band 1 與 band 8 是蛋白質 marker；band 2 是原始粗酵素液；band 3 硫酸銨飽和度 70% 沉澱；band 4 硫酸銨飽和度 80% 沉澱；band 5 經硫酸銨飽和度 90% 沉澱；band 6 經硫酸銨飽和度 100% 沉澱，band 7 為酸性蛋白酶標準品。



六、探討變溫培養對酸性蛋白酶生產之影響

在實驗中觀察到，培養溫度對菌體生長速度有所影響，培養溫度高時菌絲體生長快速而達到產孢時間；培養溫度越低，菌體生長速度越緩慢，而酸性蛋白酶產量與產孢時間有相對應之關係。因此探討變溫培養對 *Aspergillus sp.* 產酸性蛋白酶之影響。如圖 8 所示，初始溫度為 30 °C 時，菌絲體生長快速，培養至 30 小時時降低培養溫度，使產孢時間拉長。變溫 26 °C 時，培養至 72 小時活性最高達 32.58 ± 1.45 U/g 與對照組在 60 小時活性 32.07 ± 0.68 U/g，並沒有明顯提高活性；如圖 9 所示，而變溫 24 °C 時，在 72 小時活性最高可達 42.04 ± 1.14 U/g 與對照組在 60 小時活性 36.58 ± 0.68 U/g，結果顯示變溫培養具有提高活性之潛力。

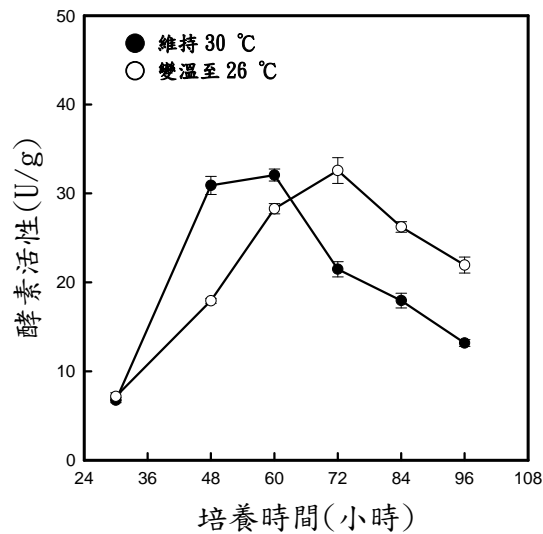


圖 8 變溫培養對 *Aspergillus sp.* 產酸性蛋白酶活性之影響。初始溫度為 30 °C，培養至 30 小時進行變溫。

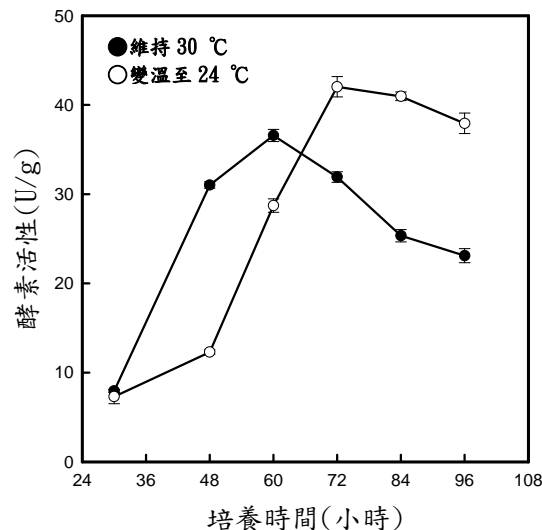


圖 9 變溫培養對 *Aspergillus sp.* 產酸性蛋白酶活性之影響。初始溫度為 30 °C，培養至 30 小時變溫。



肆、結論

本研究利用 *Aspergillus sp.* 進行固態發酵生產酸性蛋白酶，選用固態培養所產之孢子液做為生產酸性蛋白酶之種液，在使用牛皮紙封口進行培養的條件下，最佳的培養條件為，以 10 g 紅麴皮做為固態基質，使總含水量達 120%，在 30°C 下培養 60 小時。最佳硫酸銨沉澱飽和度範圍在 60~90% 之間，可回收原始酵素液活性約 80%，再藉由 SDS-PAGE 的方式可測得酸性蛋白酶分子量約為 50 kDa。

產孢時間對於酵素活性的關係有確切的影響。固態發酵時，溫度越高菌體生長速度越快，產孢時間短；溫度低時，菌體生長速度慢，產孢時間也較長。若菌體初始培養時溫度高，使菌絲體生長速度快，而到產孢時降低培養溫度，以拉長產孢時間，經由變溫培養可提高酸性蛋白酶活性 17%，以 Folin 法可測得最高酸性蛋白酶活性為 42.04 ± 1.14 U/g。變溫培養對於酸性蛋白酶活性具有提升之潛力，未來可以更深入探討其他溫度對於變溫培養的最佳條件。

在實驗過程中發現，有許多的未知結果與現象是有待研究的，像是培養過程之溼度控制或是接菌量對生產酸性蛋白酶的影響等。經由硫酸銨沉澱初步的純化之後，將來可做更深入的酵素純化策略，如膠體過濾及管柱層析等，分離出更具有經濟價值的純酵素。

參考文獻

- [1] A. Löffler, 1986, Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol*, 40 (12): 63-70.
- [2] C. G. Kumar, and H. Takagi, 1999, Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv*, 17, 561-594.
- [3] E.V. Eneyslaya, K.K. Kulminskaya, A.N. Savelev, K. A. Shabalin and K. N. Neustroev, 1999, Acid protease from *Trichoderma reesei*: limited proteolysis of fungal carbohydrases. *Appl. microbiol. Biotechnol*, 52, 226-231.
- [4] H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda and H. Taguchi, 1982, Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol*, 60, 311-319.
- [5] H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, A. Poonsuk, and H. Taguchi, 1984, Control of water content in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol*. 62, 453-459.
- [6] J. Fukamoto, D. Tsuru and T. Yamamoto, 1967, Studies on mold protease part I. purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. *Agr. Biol. Chem*, 31, 710-717.
- [7] J. Sawada, 1964, Studies on the acid-protease of *Paecilomyces varioti* bainier TPR-220. *Agr. Biol. Chem*. 28, 348-355.
- [8] J. I. Vicente, D. D. Arriaga, P. D. Valle, J. Soler, and A. P. Eslava, 1996, Purification and characterization of an extracellular aspartate protease from *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genetics and Biology*. 20, 115-124.
- [9] M. Raimbault and D. Alazard, 1980, Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *E. J. Appl. Micro*. 9, 199-209.
- [10] N. Mahanta, A. Gupta and S.K. Khare, 2008, Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol*. 99,1729-1735.
- [11] R. Davidson, A. Gertler, T. Hofmann, 1975, *Aspergillus oryzae* acid proteinase. *Biochem. J*. 147, 45-53.
- [12] U. K. Laemmli, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.



- [13] Y. Tsujita and A. Endo, 1976, Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid protease. *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 194-204.
- [14] 王永奇、劉文華及劉鎖成，2008，綠色安全飼料添加劑的開發與運用現狀，西北大學學報。
- [15] 王聰麟，1982，ATP 分析法於花雕酒種麴製造上之應用，國立臺灣大學農業化學研究所碩士學位論文，台北。
- [16] 王瓊德、張鴻民及游若菽，1992，*Rhizopus oryzae* 酸型蛋白酶純化與生化特性之研究，*食品科學*，19，524-532。
- [17] 李林輝，2004，固態培養(發酵)裝置的類型、應用及問題，西華師範大學學報。
- [18] 周雅惠，2004，*Aspergillus oryzae* 酸性蛋白酶之純化與生化特性，國立臺灣海洋大學食品科學系碩士學位論文，基隆。
- [19] 黃正財，1983，酒類釀造講座：麴，製酒科技專論彙編，5：145-160
- [20] 袁康培、鄭春麗及馮明光，2003，黑曲霉HU53菌株產酸性蛋白酶的條件和酶學性質，浙江大學生命科學院。
- [21] 俞俊裳等編著，2003，新編生物工藝學，化學工業出版社，北京。
- [22] 姚躍飛與曾柏全，2005，現代固態發酵技術在食品加工業中的應用，*食品與機械*，21(60), 89-92。
- [23] 陳勝和，1975，醬油，天然出版社，台北。
- [24] 戚淑威及黃遵錫，2006，青霉P-1007產酸性蛋白酶的條件和酶學性質，雲南師範大學生物工程學院。
- [25] 蔣咏梅、章文賢、謝必峰及施巧琴，2002，黑曲霉黃色變株A-2580產耐溫酸性蛋白酶發酵條件的優化，福建師範大學生物工程學院。
- [26] 賴敏男，1984，以熱傳模式探討高粱酒固態醱酵之研究，國立臺灣大學農業化學研究所碩士學位論文，台北。
- [27] 蘇睿綺，2006，枯草菌屬角蛋白酶之純化與性質研究，靜宜大學食品營養學系碩士學位論文，台中。
- [28] 吳欣庭，2005，多重分解酵素生產菌種之篩選、鑑定與基本性質研究，朝陽科技大學應用化學系碩士學位論文，台中。

