

產學合作案結案報告書

華食科 103 產學字 002 號

金門酒廠功能性菌種純化、鑑定及專利 保存計畫書

甲方：金門酒廠實業股份有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

食品科學系

計畫主持人：吳思節

目錄

目錄	1
研究計畫摘要	2
研究計畫內容	3
一、背景說明	3
二、計畫目的	4
三、研究方法	5
(一)採樣方式	5
(二)菌種純化	5
(三)菌種鑑定	8
(四)最適生長條件與酵素活性測定	8
(五)申請專利寄存	21
四、結果與討論	22
(一)黴菌	22
(二)酵母菌	34
(三)醋酸菌	37

金門酒廠功能性菌種純化、鑑定及專利保存計畫

一、研究計畫重要性及摘要

- 1、高粱酒定義：以高粱為主原料，加入各種麴類或酵素及酵母，經糖化、酒精發酵、蒸餾、熟成、勾兌、調和且不得使用或添加食用酒精所製成之蒸餾酒，且酒精濃度在 20%(v/v)以上者。金門高粱酒乃遵循古法固態發酵、純糧釀造，每百公斤高粱投入僅能產出 40%—50%產量，完全是純天然的產物。
- 2、傳統高粱酒之製程可概分為「培麴」與「釀酒」兩大部份，一般酒廠都將這兩項技術視為公司最大的資產及營業秘密，因此，如何傳承及在現有基礎上更進一步改進，就成為各酒廠重點研究課題。尤其是製麴工藝，製作高粱酒所使用的麴粉會影響酒的產量和風味物質，麴粉中糖化酶、液化酶和蛋白酶數量和種類的不同的酵素活性造成高粱酒特有的風格，麴粉加入高粱飯後製成的酒麴中，黴菌、酵母菌、細菌中的澱粉分解酶和蛋白質分解酶數量及種類不同會影響高粱酒的產量及品質。由此可得知酒麴中黴菌其糖化和液化酶活性，酒醪中酵母菌發酵力和醋酸菌酯化力高低是影響高粱酒好壞得重要因素。
- 3、本計畫將從釀酒製程中分離純化功能性菌種(包括黴菌、酵母菌、醋酸菌)，並完成菌種鑑定與菌株最適生長條件及酵素活性測定，並將此功能菌株進行專利申請與菌種保存，協助金酒公司完成專屬之功能性菌種建立。
- 4、本計畫主持人多年參與金門酒廠實業股份有限公司委託之研究計畫案之研究人員一職，並實際參與採樣與研究工作，如『金門酒廠釀酒菌種分析鑑定與應用研究計畫』、『金門酒廠麥麴分析方法建立研究計畫』、『金門酒廠功能性菌種分離純化之研究』，為求本計畫之周延，特邀請台灣大學徐源泰教授參加為共同主持人，及曾文聖助理教授、潘俞文研究助

理參與計畫研究人員一職，以上人員也皆曾實際參與採樣與研究工作。計畫主持人、計畫共同主持人及研究人員在菌種分離、鑑定、都已具備相當能力經驗與成果，計畫共同主持人實驗室已有申請菌種保存經驗，此菌種是從台南七股鹽田篩選出一株新的嗜鹽菌(*Virgibacillus chiguensis*)，並申請保存於食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心，其BCRC number 17637，同時計畫主持人於研究設備上需與台灣大學研究團隊共同合作，除一般生化與分生所需之各種設備外，藉由計畫共同主持人提供多項設備，變性梯度膠體電泳(DGGE)、螢光與位相差顯微鏡、聚合酶連鎖反應機器、微量分光光度計、電泳分析裝置、生物樣品冷凍儲存裝置、細胞培養室等有關核酸與細胞研究所需的儀器設備，使本次研究能在完善設備下順利完成。

二、研究計畫內容

1、背景說明：

根據前兩年菌項研究計畫中發現，在製麴過程(研磨→攪和→製麴塊→培麴→堆麴→磨麴→加入高粱發酵)與微生物菌相變化有著密切相關性，同時在後續酒醪發酵過程中各種微生物會行相互作用、混和生長以及分泌不同酵素液(糖化酶、液化酶、蛋白酶)等功能，這些微生物變化都影響著釀酒風味與產酒率。

酒麴，含有許多對釀酒有用之麴菌，麴菌加入高粱攪拌後，利用其本身酵素(糖化酶、液化酶)分解澱粉轉化成葡萄糖，而後供酵母菌用以製造酒精，為了能讓高粱酒順利發酵，製麴是重要步驟，深深影響高粱酒的風味、品質和產量。因此，本計畫將從麴房麴塊與環境中進行黴菌菌株之採集。並在酒醪發酵過程中翻槽後與最高品溫階段進行樣品採集與酵母菌、醋酸菌之分離，同時將分離出之功能性菌株測試其最適生長

條件與酵素活性，由金酒公司決定後進行挑選最具功能性之菌株完成專利寄存。

先前研究計畫簡述其研究內容與成果：

『金門酒廠釀酒菌種分析鑑定與應用研究計畫』本計畫主要是從金門酒廠的製麴環境、釀酒環境、優良的麴塊及酒醅中分離、鑑定其微生物種類，尤其是優勢的功能性菌種，並利用分子分類技術建立這些菌種的分子標記，除了可以了解其間的菌相差異外，未來並可應用於釀酒過程中各階段品管點之監控。

『金門酒廠麥麴分析方法建立研究計畫』已建立一套金門酒廠麥麴分析方法標準操作手冊，並導入例行抽檢作業，本計畫主要是以中國大陸名優酒廠的麴塊分析方法作基礎，結合儀器進一步完善其分析方法以提昇檢測效率與數據課觀性，以建立一套完整的標準操作手冊，以及教育訓練金酒員工可自主執行分析作業。本計畫未來除了可以了解每批次、四季間、新舊廠間…麴塊品質之差異外，以後更可將上述分析工作推及到育麴製程中之品管點。此套檢測標準也將用於本年度計畫中純化的菌種作為酵素活性測定用。

『金門酒廠功能性菌種分離純化之研究』主要研究方向，先前已長期追蹤金門酒廠新、舊兩廠的製麴環境、釀酒環境，並採集麴粉、酒醅與酒醅樣品，利用分子分類技術建立酵母、真菌與細菌菌種之分子標記，了解麴粉與酒醅發酵過程中之菌相變化。本計畫將採集、分離純化兩廠1、2號麴塊與酒醅樣品，利用選擇性培養基分離真菌、細菌與酵母菌，並利用分子分類技術鑑定菌種，同時將純化後的菌種進行保存。將篩選出的菌種進一步利用鑑別培養基篩選出具澱粉分解力之優勢菌種，同時結合糖化力與液化力檢測方法，篩選出糖化與液化力較佳之優勢菌種。而後將此優勢菌種進行大量培養與保存，期望未來能將此純化之優勢菌種，

應用在現有育麴製程中，加以發展「強化大麴」及「功能性大麴」，以提高產酒率。

2、計畫目的：

本計畫執行目標將從釀酒製程中分離純化功能性菌種，如從酒麴分離具液化糖化力的黴菌，從酒醪分離具發酵力的酵母菌及具酯化力的醋酸菌，分離後進行菌種鑑定，並測試菌株最適生長條件及酵素活性，並將此功能菌株進行專利申請與菌種保存，協助金酒公司完成建立專屬之功能性菌種建立。

三、研究方法：

1、採樣方式

黴菌：

1 號麴房採樣：上部草蓆、地下草蓆

2 號麴房採樣：板子草蓆、地下草蓆

酵母菌：於酒醪發酵過程中，翻槽後進行樣品採樣。

醋酸菌：於酒醪發酵過程中，最高品溫階段進行樣品採樣

2、菌種純化

採用純菌種分離培養方法，配置各種微生物適用之培養基，醋酸菌使用 *Acetobacter medium*(添加 amphotericin B 抗真菌)，真菌使用 PDA plate(添加 ampicillin 抗細菌)，真菌的部分再根據菌落型態分離黴菌和酵母菌(酒麴的優勢真菌以黴菌為主，酒醪翻堆後的優勢真菌以酵母菌為主)，並將純化出之各個單一菌種利用 DGGE 變性梯度膠體電泳對遺傳物質 DNA 進行分析研究，將具差異之菌株後進行 DNA 萃取，萃取方法必需提供一套經測試並符合酒廠菌種 DNA 純化之方法，利用超微量全波長分光光譜儀 Nanodrop 進行核酸定量確認純度，並將

純化之 DNA 至於-80℃貯存備用。

➤ DNA 純化

DNA 萃取

- (1) 取適量 sample 至 appendorf
- (2) 加 500 μL 之 CTAB extraction buffer，vortex 混合均勻
- (3) 加 100 μL 之 Lysozyme(10 mg/mL)，37 °C 水浴 1 小時
- (4) 加 30 μL 之 20% SDS 及 8 μL proteinase K (20 mg/mL)，vortex 混合均勻，37°C 水浴反應 1 小時
- (5) 以液態氮連續進行 Freeze – Thaw step (反覆三次)
- (6) 14000 xg 離心 1 分鐘，取上清液至新的 appendorf

➤ 分離沉澱

- (1) 加 80 μL 之 CTAB precipitation buffer 與 100 μL 之 5M NaCl，上下翻轉數次混合均勻，65 °C 下反應 30 分鐘
- (2) 加一倍體積之 PCI (Phenol:chloroform:Isoamyl Alcohol，上下翻轉數次混合，14000 離心 5 分鐘，取上清液至新的 appendorf (此步驟重複數次)
- (3) 加入等體積之 CI，翻轉數次， 14000 離心 5 分鐘，取上清液至新的 appendorf 加 1~2 倍的 isopropanol 溶液，上下翻轉混合，置於 4 °C 中沉澱 超過 2 小時(over night 更佳)

➤ DNA 回收

- (1) 14000xg 離心 5 分鐘，去除上清液
- (2) 加 500 μL 之 70%乙醇沖洗 DNA 沉澱物，上下翻轉數次
- (3) 14000xg 離心 5 分鐘，小心去除上清液(step2、3 個重複 1 次)
- (4) 以真空減壓濃縮機離心 15 分鐘
- (5) 加入 30 μL 之無菌水回溶 DNA

(6) -20 °C 貯存備用

➤ DGGE 電泳分析

(1) 垂直電泳

鑄梯度膠時，需以 Dcode 系統中之 Model 475 Gradient Former 進行鑄膠。將 PCR 所得產物混合，取 100 L 並加入 2X Gel Loading Dye，當電泳槽 buffer 溫度到達 60 °C 時，將樣品注入電泳膠片上，以 100 V、3 hr 進行電泳。將電泳膠片取出後以染劑進行染色 15 min，而後進行退染 10 min，再以電泳膠片影像截取系統觀察之。

(2) 水平電泳

鑄梯度膠時，需以 Dcode 系統中之 Model 475 Gradient Former 進行鑄膠，若鑄 CDGE (Constant Denaturing Gel Electrophoresis) 時，則以針筒注入即可。取 PCR 產物 20 L 並加入 2X Gel Loading Dye，當電泳槽溫到達 60 °C 時，將樣品注入電泳膠片上，以 100 V、3 hr 進行電泳。將電泳膠片取出後以染劑進行染色 15 min，而後進行退染 10 min，再以電泳膠片影像截取系統觀察之。

DGGE 分析結果分別跑出兩個條帶，將此兩條帶切膠純化後進行定序分析。

➤ DNA 定序

PCR 擴增之基因產物委託台灣明欣生物科技有限公司進行核酸序列分析。其 DNA 定序利用自動定序儀 (ABI PRISM 377-96 DNA- Sequencer, Perkin-Elmer, CA, USA)，以試劑 (ABI PRISM BigDye, Terminator cyclor sequencing ready reaction kit, PE Applied Biosystem, USA) 進行標定分析。

3、菌種鑑定

須提供完整菌相序列分析結果，利用 Primerprimer5.0 軟體設計出能針對黴菌、酵母菌、醋酸菌擴增並具差異之引子，所設計引子須證實具有準確能自本廠環境與樣品中有效區隔鑑別之能力，才將純化的單一菌株以 PCR (polymerase chain reaction) 聚合鏈鎖反應進行特定片段擴增，擴增後之基因產物進行核酸序列分析，並將結果進行資料庫比對分析。

4、最適生長條件與酵素活性測定

(1) 麴室分離之黴菌菌株：

分離方法如下，將酒麴先以 Potato dextrose broth 增殖黴菌，再以適當稀釋倍數塗至 Potato dextrose agar plate(加入抗細菌抗生素 ampicillin)，分離不同型態的單一菌落，將其培養於 30℃ 培養箱，之後進行鑑定，並對單一菌種進行糖化、液化能力分析。

真菌培養基配方如下：

PDA medium	
	g/L
Potato starch	4
Dextrose	20
Agar	15-20

(2) 酒醪分離純化之酵母菌株：

分離方法如下，將酒醪先以 Potato Dextrose Broth 增殖酵母菌，再以適當稀釋倍數塗至 Potato Dextrose agar plate(加入抗細菌抗生素 ampicillin)，分離不同型態的單一菌落，將其培養於 30℃ 培養箱，之後進行鑑定，並對單一菌種進行發酵能力分析。

(3) 酒醪分離純化之醋酸菌：

分離方法如下，將酒醪先以 Acetobacter medium Broth 增殖醋酸菌，

再以適當稀釋倍數塗至 Acetobacter medium agar plate(加入抗真菌抗生素 amphotericin B)，分離不同型態的單一菌落，將其培養於 25-30℃ 培養箱，之後進行鑑定，並對單一菌種進行酯化能力分析。

醋酸菌培養基配方如下：

Acetobacterium medium	
	g/L
Glucose	10
Yeast extract	10
Calcium carbonate	10
Agar	15
pH adjust 6.8	

(4)糖化力分析：

固體麴中糖化酶（包括 α -澱粉酶和 β -澱粉酶）能將澱粉水解為葡萄糖，微生物利用葡萄糖當作碳源，進行發酵，生成酒精。糖化酶活性高，澱粉利用率就高。可溶性澱粉經糖化酶催化水解產生葡萄糖，使用斐林快速法測定。糖化酶活性定義：1 g 乾麴在 35℃、pH 4.6 條件下，反應 1 小時，能將可溶性澱粉分解為 1 mg 葡萄糖稱為 1 個酶活性單位（U/g）。

(4-1)工具、儀器及設備(以下為四種樣品，各進行三重複所需之數量)

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1. 精密電子秤 1 台 | 13. 200 mL 定量瓶 1 個 |
| 2. pH meter 1 台 | 14. 250 mL 定量瓶 3 個 |
| 3. 水浴機 1 台 | 15. 500 mL 定量瓶 2 個 |
| 4. 電磁攪拌加熱器 1 台 | 16. 250 mL 燒杯 13 個 |
| 5. 試管震盪混合器 1 台 | 17. 10 mL 量筒 1 個 |
| 6. 迷你離心機小烏龜 1 台 | 18. 100 mL 量筒 1 個 |
| 7. 微量盤分光光譜儀 1 台 | 19. 定性濾紙 12 張 |
| 8. 加熱鋁塊、溫度控制器 1 台 | 20. 玻璃試管 22 支 |

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 9. 100 mL 血清瓶 1 個 | 21. 1.5 mL 微量離心管 22 個 |
| 10. 250 mL 血清瓶 4 個 | 22. 防爆夾 22 個 |
| 11. 500 mL 血清瓶 2 個 | 23. 96 孔微量盤 1 個 |
| 12. 100 mL 定量瓶 1 個 | |

(4-2) 藥品

中文名稱	英文名稱	化學式	分子量	消耗量
可溶性澱粉	Soluble starch	$(C_6H_{10}O_5)_n$		4 g
無水葡萄糖	Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.15	2.5 g
硫酸銅	Copper sulfate	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	250	7.5 g
亞甲基藍	Methylene blue	$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot H_2O$	319.86	0.025 g
酒石酸鉀鈉	Potassium sodium tartrate	$C_4O_6H_4KNa$	282.23	25 g
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	NaOH	40	31 g
亞鐵氰化鉀	Potassium ferrocyanide	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	422.39	2 g
冰乙酸	Acetic acid	CH_3COOH	60.05	29.5 mL
乙酸钠	Sodium acetate	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	136.08	68 g

(4-3) 試劑配法

1. 20 g/L 可溶性澱粉溶液

秤取 4 g(準確至 0.001 g) 絕乾之可溶性澱粉，置於 250 mL 燒杯中，加 100 mL 去離子水，以微火煮透明，冷卻後用去離子水定容至 200 mL，當天配製使用。

2. 10 mg/mL 葡萄糖標準溶液

秤取預先在 100~105°C 烘乾的無水葡萄糖 2.5 g(準確至 0.0002 g)，溶解於水，用去離子水定容至 250 mL。

3. 斐林試劑

- a. 甲液：秤取 7.5 g 硫酸銅及 0.025 g 亞甲基藍，加去離子水定容至 500 mL。
- b. 乙液：秤取 25 g 酒石酸鉀鈉、27 g 氫氧化鈉及 2 g 亞鐵氰化鉀，加去離子水定容至 500 mL。

✧ 使用前再將甲、乙液等體積混合

4. pH 4.6 乙酸-乙酸鈉緩衝溶液

- a. 2 mol/L 冰乙酸溶液：取 29.5 mL 冰乙酸，加去離子水定容至 250 mL。
- b. 2 mol/L 乙酸鈉溶液：秤取 68 g 乙酸鈉，加去離子水定容至 250 mL。

✧ 將 a、b 液等體積混合，即為 pH 4.6 乙酸-乙酸鈉緩衝溶液

5. 1 mol/L 氫氧化鈉溶液

秤取 4 g 氫氧化鈉，加去離子水定容至 100 mL

(4-4)測定步驟

5%酶液製備：

1. 秤取 5 g 麥麴，置於 250 mL 燒杯中
2. 加入 $(90 - 5 \times \text{水分}\%)$ mL 去離子水及 10 mL pH 4.6 乙酸-乙酸鈉緩衝溶液
3. 置於 30°C 水浴機中浸泡 1 小時，每隔 15 min 攪拌一次
4. 用定性濾紙過濾，此濾液即酶浸出濾液

糖化液製備：

5. 在玻璃試管中，加入 5 mL 20 g/L 可溶性澱粉溶液，置於 35°C 水浴中保溫 20min

6. 加入 1 mL 酶浸出液，混合均勻後立即計時
7. 35°C 水浴中保溫 1 小時
8. 立刻加入 0.3 mL 1 mol/L 氫氧化鈉溶液，震盪混合均勻以停止反應
9. 冷卻至室溫後，加去離子水定容至 10 mL，此時溶液應呈鹼性

空白液製備:

10. 在玻璃試管中，加入 5 mL 20 g/L 可溶性澱粉溶液
11. 先加入 0.3 mL 1 mol/L 氫氧化鈉溶液，混合均勻後再加酶浸出液 1 mL
12. 最後用去離子水定容至 10 mL，混合均勻，即為空白液

測定:

13. 於 1.5 mL 微量離心管中，加入 0.6 mL 糖化液與 0.4 mL 斐林試劑(甲、乙液各 0.2 mL)，震盪混合均勻
14. 使用迷你離心機小烏龜，將微量離心管上部貼附的液體離心下來
15. 將微量離心管(夾防爆夾)置於 99°C 的加熱鋁塊中，加熱 15 min
16. 使用迷你離心機小烏龜離心 5 min
17. 於 96 孔微量盤中加入 200 μ L 上清液
18. 使用微量盤分光光譜儀測定 OD₄₆₅ 之吸光值，空白液作為空白組

標準曲線建立:

19. 配製葡萄糖標準溶液，分別為 5、6、7、8、9、10 mg/mL。
20. 於 1.5 mL 微量離心管中，加入 0.6 mL 葡萄糖標準溶液與 0.4 mL 斐林試劑(甲、乙液各 0.2 mL)，震盪混合均勻
21. 使用迷你離心機小烏龜，將微量離心管上部貼附的液體離心下來
22. 將微量離心管(夾防爆夾)置於 99°C 的加熱鋁塊中，加熱 15 min
23. 使用迷你離心機小烏龜離心 5 min
24. 於 96 孔微量盤中加入 200 μ L 上清液
25. 使用微量盤分光光譜儀測定 OD₄₆₅ 之吸光值

計算：

$$\text{糖化酶活性(U/g)} = C \times \frac{10}{0.6} \times \frac{100}{1} \times \frac{1}{A}$$

式子中 C — 吸光值換算出的含糖濃度，mg/mL

0.6 — 測糖時吸取糖化液體積，mL

10 — 糖化液體積，mL

附註：測定過程中的酶浸出液修改成菌液。

(5) 液化力分析：

液化型澱粉酶俗稱 α -澱粉酶，能將澱粉中 α -1,4 葡萄糖苷鍵隨機切斷成分子鏈長短不一的糊精、少量麥芽糖和葡萄糖而迅速液化，並失去與碘生成藍紫色的特性，呈紅棕色。液化酶活性定義：1 g 乾麴在 60°C、pH 6 條件下，能在 1 小時液化 1 g 可溶性澱粉稱為 1 個酶活性單位 (U/g)。

(5-1) 工具、儀器及設備(以下為四種樣品，各進行三重複所需之數量)

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1. pH meter 1 台 | 10. 50 mL 定量瓶 1 個 |
| 2. 精密電子秤 1 台 | 11. 100 mL 定量瓶 1 個 |
| 3. 烘箱 1 台 | 12. 200 mL 定量瓶 1 個 |
| 4. 電磁攪拌加熱器 1 台 | 13. 1 L 定量瓶 1 個 |
| 5. 水浴機 1 台 | 14. 250 mL 燒杯 25 個 |
| 6. 試管震盪混合器 1 台 | 15. 定性濾紙 12 張 |
| 7. 100 mL 血清瓶 2 個 | 16. 玻璃試管 12 支 |
| 8. 250 mL 血清瓶 1 個 | 17. 96 孔微量盤 1 個 |
| 9. 1 L 血清瓶 1 個 | |

(5-2)藥品

中文名稱	英文名稱	化學式	分子量	消耗量
碘	Iodine	I ₂	126.9	1.1 g
碘化鉀	Potassium iodide	KI	166.01	6.2 g
可溶性澱粉	Soluble starch	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		4 g
磷酸氫二鈉	Disodium hydrogen phosphate	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	358.14	45.23 g
檸檬酸	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O	210.13	8.07 g

(5-3)試劑配法

1. 碘液

a、原碘液：秤取 1.1 g 碘以及 2.2 g 碘化鉀，加入適量去離子水，溶解後加去離子水定容至 50 mL，貯於棕色瓶中。

b、稀碘液：吸取 0.4 mL 原碘液以及碘化鉀 4 g，加去離子水定容至 100 mL，貯於棕色瓶中。

2. 20 g/L 可溶性澱粉溶液

秤取 4 g (準確至 0.001 g) 絕乾之可溶性澱粉，置於 250 mL 燒杯中，加 100 mL 去離子水，用電磁攪拌加熱器加熱至液體呈現透明，冷卻後用去離子水定容至 200 mL，當天配製使用。

3. pH 6.0 磷酸氫二鈉－檸檬酸緩衝液

秤取 45.23 g 磷酸氫二鈉以及 8.07 g 檸檬酸，先加入少量去離子水，待溶解後調整 pH 值至 pH 6.0，最後再用去離子水定容至 1 L。

◇ 試劑 pH 值調整:若 pH 值遠高於目標值，則使用濃度較高的 HCl，將其滴定至目標 pH 值，但若 pH 值些微高於目標值，則使用濃度較低的 HCl；若 pH 值遠低於目標值則使用濃度較高的 NaOH，將其滴定至目標 pH 值，但若 pH 值些微低於目標值，則使用濃度較

低的 NaOH

(5-4)測定步驟

5%酶液製備:

1. 秤取 5 g (準確至 0.01g) 麥麴，置於 250 mL 燒杯中
2. 加入 100 mL 已預熱至 40°C 之 pH6.0 磷酸氫二鈉—檸檬酸緩衝液
3. 置於 40°C 水浴機中浸泡 1 小時，每隔 15 min 攪拌一次
4. 用定性濾紙過濾，此濾液即酶浸出濾液

測定:

5. 玻璃試管中，加入 5 mL 20 g/L 可溶性澱粉和 1.25 mL pH6.0 之磷酸氫二鈉—檸檬酸緩衝液
6. 置於 60°C 水浴機中預熱 10 min
7. 加入 0.25 mL 酶浸出液，震盪混合均勻(反應液)
8. 置於 60°C 水浴機中繼續保溫並立即計時 5min
9. 於 96 孔微量盤中加入 200 μ L 稀碘液和 40 μ L 反應液
10. 使用微量盤分光光譜儀測定 OD₆₆₀ 之吸光值，取 200 μ L 稀碘液加 40 μ L 去離子水當做空白組
11. 根據吸光值查表得測試酶液之濃度

計算:

$$\text{液化型澱粉酶活性(U/g)} = C \times 100 \times \frac{1}{A} \times \frac{60}{5}$$

式子中 c — 酶液濃度，U/mL

100 — 酶浸出液體積，mL

A — 乾麴質量 = 5 g 麥麴粉 $\times$ (1—水分含量%)，g

5 — 反應時間，min；

60 — 換算為小時的係數

附註:測定過程中的酶浸出液修改成菌液

(6)發酵能力分析：

麴粉是一種糖化、發酵劑，其中所含的酵母菌能使酒醅中還原糖發酵，生成酒精和二氧化碳。測定發酵過程中生成的二氧化碳量，以評估麴粉的發酵能力。

(6-1) 工具、儀器及設備(以下為四種樣品，各進行三重複所需之數量)

- | | |
|-------------------|---------------------|
| 1. 精密電子秤 1 台 | 7. 100 mL 量筒 1 個 |
| 2. 水浴機 1 台 | 8. 紗布 12 塊 |
| 3. 滅菌釜 1 台 | 9. 250 mL 量筒 1 個 |
| 4. 100 mL 血清瓶 2 個 | 10. 250 mL 錐形瓶 12 個 |
| 5. 100 mL 定量瓶 2 個 | 11. 發酵栓 12 個 |
| 6. 500 mL 燒杯 12 個 | 12. 10 mL 量筒 1 個 |

(6-2)藥品

中文名稱	英文名稱	化學式	分子量	消耗量
98%硫酸	Sulfuric acid	H ₂ SO ₄	98	13.3 mL
碘	Iodine	I ₂	126.9	1.27 g
碘化鉀	Potassium iodide	KI	166.01	4 g
玉米澱粉	Corn starch			600 g

(6-3)試劑配法

1.2.5 mol/L 硫酸溶液

取 13.3 mL 98%硫酸，攪拌下緩慢加入到 50 mL 水中，用去離子水稀釋定容至 100 mL

2.0.05 mol/L I₂ 溶液

秤取 1.27 g 碘、4 g 碘化鉀，加少量去離子水溶解後，用去離子水稀釋定容至 100 mL

(6-4) 測定步驟

糖化液製備:

1. 取 50 g 玉米澱粉原料，置於 500 mL 燒杯中，加入 250 mL 去離子水，混合均勻
2. 蒸煮 1~2 小時使呈現糊狀(每半小時攪拌一次)，冷卻至 60°C
3. 加入原料量 15%(約 7.5 g)的大麴或小麴粉
4. 再加 50mL 預熱到 60°C 的去離子水，攪拌均勻
5. 於 60°C 水浴中糖化 3~4 小時，直至取出一滴與碘反應不是藍色為止
6. 加熱到 90°C，用紗布過濾，濾液備用

滅菌:

7. 取 150 mL 糖化液於 250 mL 錐形瓶中
8. 發酵栓塞入錐形瓶瓶口，發酵栓口用鋁箔紙包覆
9. 放入滅菌釜滅菌 15 min

發酵、測定:

10. 滅菌後，糖化液冷卻至 25°C 左右，於無菌條件下加入 1 g 麴粉
11. 發酵栓中加入 6 mL 2.5 mol/L 硫酸溶液
12. 用石蠟膜密封發酵瓶，擦乾瓶外壁，於精密電子秤上秤重
13. 置於 25°C 保溫箱中發酵 48 小時
14. 取出發酵瓶，輕輕搖動，使二氧化碳全部逸出，在同一天平上再秤重

計算:

$$\text{發酵力 (以 CO}_2 \text{ 計, g/100g)} = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

式子中 m_1 — 發酵前發酵瓶加內容物質量, g

m_2 — 發酵後發酵瓶加內容物質量, g

m — 麵樣質量, g

附註:測定過程中麵粉修改成菌液

乾菌粉製備

1. 將 400 mL 的 PDB 接種少量分生孢子, 置於 30°C 生長箱中, 以 150rpm 震盪, 持續 5 天。
2. 以抽氣過濾將 PDB 濾除, 剩餘菌絲體裝入 50 mL 離心管中, 保存於-80 °C 冰櫃中 1 天。
3. 將樣品放入冷凍乾燥機, 持續 3 天。約可收集乾重 0.5~1.0 g 的菌絲體。
4. 以研鉢將乾燥菌絲體磨至粉末狀, 參考麵粉實驗流程, 測定單一菌株的糖化、液化能力。

(7)酯化力分析：

酯化酶是脂肪酶和酯酶的統稱。白酒香味是以酯類為主的複合體，白酒釀造過程中酯酶的作用是使一個酸元和一個醇元結合、脫水而生成酯。酯化是一可逆反應，酯酶既能產酯，也能使酯分解。特別在不適宜的酯化條件下（如溫度、pH、空氣量等），會將已生成的酯迅速分解。因而要選育產酯能力強，酯分解能力相對較弱的菌株，才能使白酒中留存較多的酯類。酯化力定義 1 g 乾麵在 30~32°C 反應 100 小時所產生的乙酸乙酯的毫克（mg）數表示。

(7-1)工具、儀器及設備(以下為四種樣品，各進行三重複所需之數量)

1. 精密電子秤 1 台
2. 水浴機 1 台
3. 100 mL 血清瓶 1 個
4. 500 mL 血清瓶 2 個
5. 1 L 血清瓶 1 個
6. 500 mL 定量瓶 2 個
7. 1 L 定量瓶 1 個
8. 100 mL 定量瓶 1 個
9. 250 mL 錐形瓶 12 個
10. 100 mL 量筒 1 個
11. 自動滴定管 1 組
12. 冷凝管 12 個
13. 蒸餾燒瓶 24 個

(7-2)藥品

中文名稱	英文名稱	化學式	分子量	消耗量
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	NaOH	40	2 g
98%硫酸	Sulfuric acid	H ₂ SO ₄	98	1.33 mL
冰乙酸	Acetic acid	CH ₃ COOH	60.05	10 mL
20%乙醇	Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	1 L
75%乙醇	Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	100 mL
酚酞	Phenolphthalein	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318.33	0.5 g

(7-3)試劑配法

1. 0.1 mol/L 氫氧化鈉標準溶液

秤取 2 g 氫氧化鈉，加去離子水定容至 500 mL。

2. 0.05 mol/L 硫酸標準溶液

取 1.33 mL 98%硫酸，攪拌下緩慢加入到 50 mL 水中，用去離子水稀釋定容至 500 mL。

3. 1%冰乙酸的 20%（體積分數）乙醇溶液

吸取 10 mL 冰乙酸於 1 L 定量瓶中，用 20%（體積百分比）乙醇

稀釋至刻度。

4. 5 g/L 酚酞指示劑

秤取 0.5 g 酚酞，溶於 100 mL 75% 的乙醇中。

(7-4) 測定步驟

酯化液製備：

1. 秤取 5 g 麴粉於 250 mL 錐形瓶中
2. 加入 100 mL 1% 乙酸乙醇溶液，加橡皮塞
3. 置於 30~32°C 水浴中酯化 100 小時
4. 加入去離子水 50 mL（將錐形瓶中殘留物沖洗乾淨）
5. 加熱蒸餾，接收蒸出液 100 mL

酯含量測定：

6. 取 50 mL 餾出液，加 2 滴 5 g/L 酚酞指示劑
7. 用 0.1N 氫氧化鈉標準溶液滴定至微紅（計算消耗的氫氧化鈉溶液體積）
8. 加入 25 mL 0.1 N 氫氧化鈉標準溶液
9. 沸水浴中回流皂化 30 min
10. 冷卻後用 0.1N 硫酸標準溶液滴定到酚酞粉紅色消失為終點（計算消耗的硫酸溶液體積）

計算：

$$\text{酯化力 (mg/g)} = (c_1 V_1 - c_2 V_2) \times 88.11 \times \frac{100}{50} \times \frac{1}{m}$$

式中 c_1 ， V_1 — 氫氧化鈉標準溶液濃度，mol/L，與加入體積，mL

c_2 ， V_2 — 硫酸標準溶液的濃度，mol/L，與消耗體積，mL

88.11 — 消耗 1 mL 1 mol/L 氫氧化鈉標準溶液相當於乙酸乙酯的質量，mg/mmol

50 — 吸取餾出液體積，mL

100 — 餾出液體積，mL

m — 乾麴質量 = 5 g 麥麴粉 $\times$ (1 - 水分含量%)，g

附註:測定過程中的麴粉修改成菌液

以上測試菌株最適培養基與生長條件並可提供後續寄存菌種資料

5、申請專利寄存

將分離之功能性菌株協助金門酒廠於食工所生資中心進行專利寄存。寄存之生物材料(黴菌、酵母菌、醋酸菌)，須具備申請書、生物材料之基本資料、必要數量之生物材料與規費(必要數量規定應寄存六管，且各管應有存活試驗必要量，寄存費用為每件新臺幣三萬八千四百元，寄存機構開具存活試驗報告每件新台幣二千四百元)，此部分寄存費用不編列於研究經費中(此經費另由金酒支付)，本次生物材料寄存將以冷凍方式(冷凍管規格，以旋蓋方式並為抗冷凍之材質，高度在 4 至 5 公分，口徑 1.1 公分以下)進行寄存，並協助完成菌株活化，根據生資中心提供方法如下，將冷凍管從保存環境中取出，置於 37°C 水浴槽中，約 2 分鐘，確保菌液完全解凍後，用無菌微量吸管將菌液置入指定培養基(如黴菌及酵母菌加入 Potato dextrose agar plate，醋酸菌加入 Acetobacter medium agar plate)，以塗盤或劃線法接種，將接種好的培養基置於指定溫度的培養箱中培養(黴菌及酵母菌為 30°C；醋酸菌為 25-30°C)。

四、結果與討論

第一年度結果

一、 分離純化兩廠麴房中最具功能性之黴菌。

以特定培養基篩選功能性菌株，再配置各種微生物適用之培養基。如：黴菌先經澱粉培養液(YS broth)培養後，具有澱粉分解酵素菌株會大量增殖，再經選擇性培養基(PDA plate)將真菌菌株分離，之後挑選單一菌落至澱粉培養基(YSA plate)培養，並加入 lugol solution(碘液)測其澱粉分解力強弱(碘液與澱粉反應呈藍紫色，若澱粉被分解，則碘液與澱粉被分解培養基反應會呈透明黃褐色)，而直徑透明環越大的菌株，表示澱粉分解力越強。

真菌使用 PDA plate(添加抗細菌抗生素 ampicillin)，再根據菌落型態分離黴菌和酵母菌。分離純化單一菌株進行 DNA 萃取，並利用具有準確有效區隔鑑別酒廠 樣品中菌相之能力之引子，將純化的單一菌株進行特定片段擴增。經定序比對後結果如表 1，菌株型態如圖 1。

表 1、具澱粉分解能力的菌株編號與學名對照表

編號	學名
F1	<i>Aspergillus nidulans</i> (KKL3.001)
F2	<i>Aspergillus oryzae</i> (KKL3.002)
F3	<i>Aspergillus flavus</i>
F4	<i>Aspergillus niger</i>
F5	<i>Ganoderma lucidum</i>
F6	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
F7	<i>Polyporus arcularius</i>
F8	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
F9	<i>Fusarium oxysporum</i>

F10	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
F11	<i>Paecilomyces variotii</i>
F12	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>
F13	<i>Pichia kurdiavzevii</i>
F14	<i>Diaporthe sp.</i>
F15	<i>Ganoderma sp.</i>
F16	<i>Exophiala dermatitidis</i>
F17	<i>Polyporus grammacephalus</i>

二、糖化力分析結果

以 1g 乾麴在 35°C、pH 4.6 條件下，反應 1 小時，能將可溶性澱粉分解為 1 mg 葡萄糖稱為 1 個酶活性單位 (U/g)。測定結果數值如表 2，由圖 1 糖化能力分析可得知糖化能力較好的為 *Aspergillus nidulans*、*Diaporthe sp.*、*Paecilomyces variotii*，其次依序為表 3 所示。

表 2、各菌株糖化力測定結果

編號	OD 465			濃度 (glucose mg/mL)
	一重複	二重複	平均值	
F1	1.491	1.538	1.515	11.089
F2	1.251	1.295	1.273	9.613
F3	1.329	1.356	1.343	10.038
F4	0.875	0.959	0.917	7.437
F5	1.185	1.267	1.226	9.326
F6	0.573	0.735	0.654	5.829
F7	1.001	1.056	1.029	8.119
F8	0.681	0.722	0.702	6.12

F9	0.552	0.568	0.56	5.255
F10	1.463	1.405	1.434	10.597
F11	1.454	1.463	1.459	10.747
F12	0.652	0.628	0.64	5.744
F13	0.173	0.171	0.172	2.883
F14	1.454	1.463	1.459	10.747
F15	0.709	0.713	0.711	6.178
F16	0.887	0.97	0.929	7.507
F17	1.643	1.69	1.667	12.018

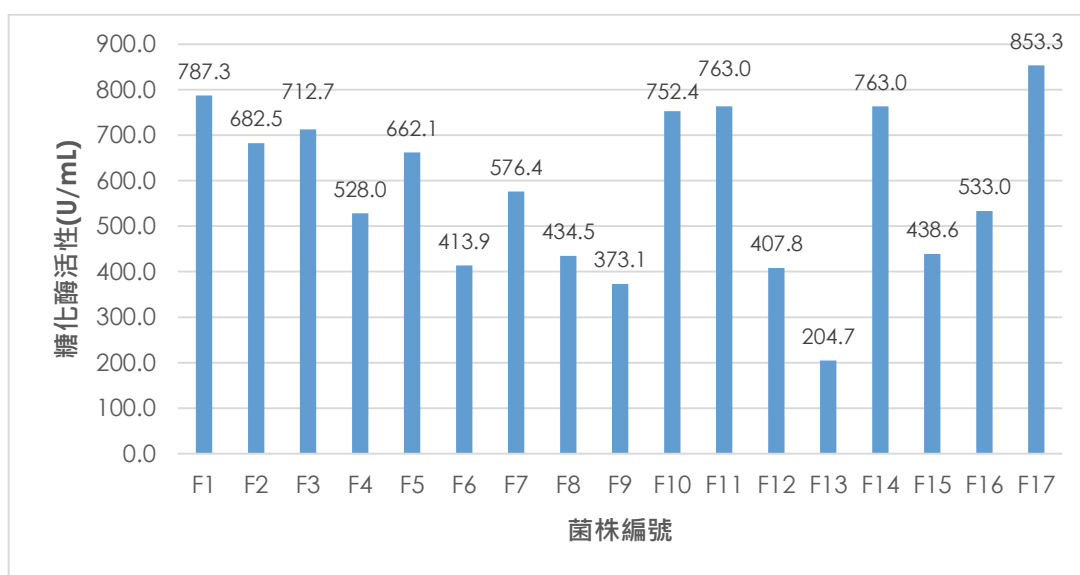


圖 1、糖化能力分析

表 3、各菌株糖化能力排序

編號	F17	F1	F11	F14	F10	F3	F2	F5	F7	F16	F4	F15	F8
濃度 (mg/mL)	12.02	11.09	10.747	10.747	10.597	10.038	9.613	9.326	8.119	7.507	7.437	6.178	6.12

編號	F6	F12	F9	F13
濃度 (mg/mL)	5.829	5.744	5.255	2.883

二、液化力分析結果

以 1g 乾麴在 35°C、pH 4.6 條件下，反應 1 小時，能將可溶性澱粉分解為 1

1 mg 葡萄糖稱為 1 個酶活性單位 (U/g)。測定結果數值如表 4，由圖 2 糖化能力分析可得知糖化能力較好的為 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus flavus*，其次依序為表 5 所示。

表 4、各菌株液化力試驗結果

編號	OD 660			酵素活性(g/mL)
	一重複	二重複	平均值	
F1	0.665	0.631	0.648	2.18
F2	0.596	0.508	0.552	1.93
F3	0.594	0.583	0.589	1.87
F4	0.602	0.595	0.599	1.87
F5	0.609	0.603	0.606	1.82
F6	0.612	0.61	0.611	1.78
F7	0.618	0.62	0.619	1.73
F8	0.654	0.662	0.658	1.73
F9	0.658	0.661	0.66	1.65
F10	0.674	0.654	0.664	1.53
F11	0.699	0.705	0.702	1.46
F12	0.609	0.586	0.598	1.45
F13	0.619	0.619	0.619	1.42
F14	0.699	0.705	0.702	1.48
F15	0.620	0.639	0.630	1.16
F16	0.652	0.657	0.655	1.16
F17	0.503	0.519	0.511	2.47

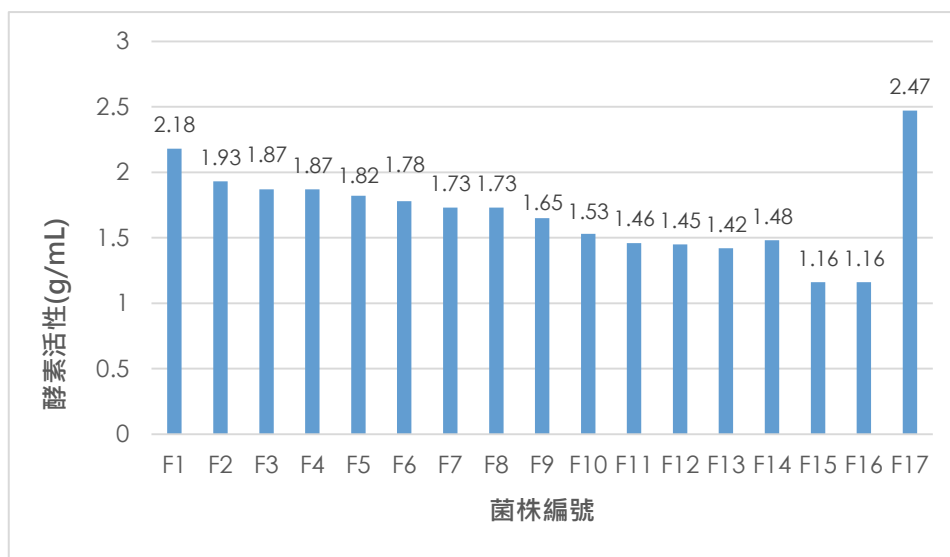


圖 2、液化能力分析

表 5、各菌株液化能力排序

編號	F17	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F14	F11	F12
酵素活性 (g/mL)	2.41	2.18	1.93	1.87	1.87	1.78	1.73	1.73	1.73	1.65	1.53	1.48	1.46	1.45

編號	F13	F15	F16
酵素活性 (g/mL)	1.42	1.16	1.16

三、 寄存菌種特性分析與分子序列資料

(一) *Aspergillus nidulans* 分類學性質(KKL3.001)

1. 形態特徵：於 PDA 上，初期分生孢子為黃色，後轉為深綠色
2. 16S rDNA 序列比對，其與 *Aspergillus nidulans* 之相似度最高

CATGACCTCGCGGCTCCTTGGTGATTTCATAATACTTAACGAATCGCATGGCCTT
GCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATA
GTGGCCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGA
GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATT
ACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACGGGGCTCTTT
TGGGTCTCGTAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTG
GAGGGCAAGTCGGAGGCCAGCAAGGT

微生物培養保存條件

1. 培養基配方：

Medium title:	Potato Dextrose Agar	
Composition:	Potato Starch	4.0 g
	Dextrose	20.0 g

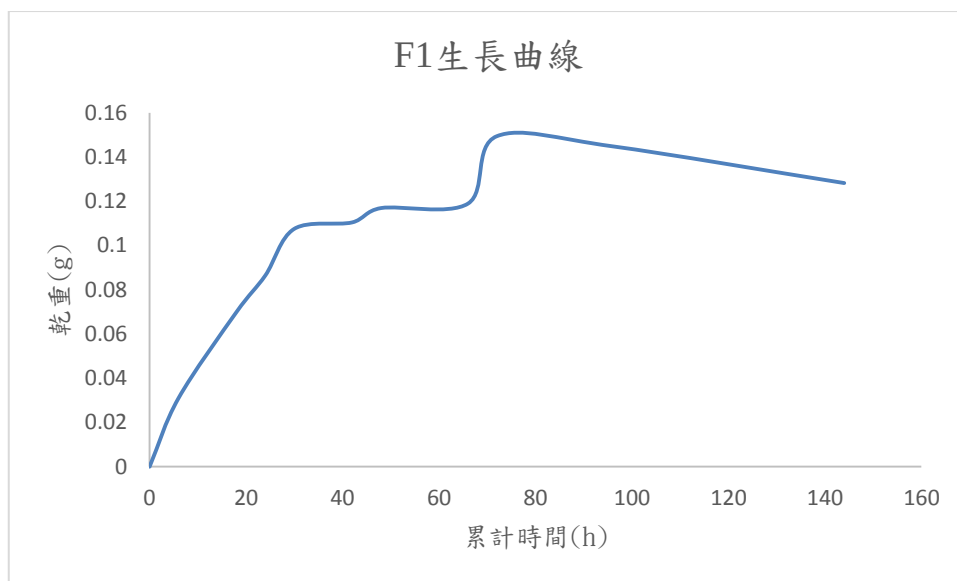
	Agar	15.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 3.5	

Medium title:	Potato Dextrose Broth	
Composition:	Potato Starch	4.0 g
	Dextrose	20.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 3.5	

Medium title:	Czapek Dox Agar	
Composition:	K ₂ HPO ₄	1.0 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	KCl	0.5 g
	NaNO ₃	3.0 g
	Sucrose	30.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 7.3	

2. 培養基殺菌條件：121°C、15 mins
3. 培養溫度：30°C
4. 氣體需求：Aerobic
5. 保存方法：
 - (1) 冷凍保存：
 - 保護劑為 Glycerol：PDB=3：7 混合
 - 保護劑殺菌條件：121°C、15 mins

生長曲線



1. 試驗於 PDB 中進行
2. 約 72 小時可達最大生長量

(二) *Aspergillus Oryzae* 分類學性質

1. 形態特徵：於 PDA 上，初期分生孢子為淺黃色，後轉為淺綠色，再放置幾天後變為黃褐色
2. 分生孢子非常容易飄散
3. 以 16S rDNA 序列比對，並進行形態觀察，判斷最接近 *A. Oryzae*

```

ACGAGCGTATGTCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTT
GCTTCGGCGGGCCCGCCATTTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGC
GCCCCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGT
ATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCG
AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCTCTCCG
GGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTAT
GGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAA
TCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAAAGTCGGGAAAGAAAAATA
  
```

4. 以 Yeast Extract Sucrose Agar 測試，未測得黃麴毒素反應。

微生物培養保存條件

6. 培養基配方：

Medium title:	Potato Dextrose Agar (PDA)
Composition:	Potato Starch 4.0 g

	Dextrose	20.0 g
	Agar	15.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 3.5	

Medium title:	Potato Dextrose Broth (PDB)	
Composition:	Potato Starch	4.0 g
	Dextrose	20.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 3.5	

Medium title:	Czapek Dox Agar (CZA)	
Composition:	K ₂ HPO ₄	1.0 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
	KCl	0.5 g
	NaNO ₃	3.0 g
	Sucrose	30.0 g
	Agar	15.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 7.3	

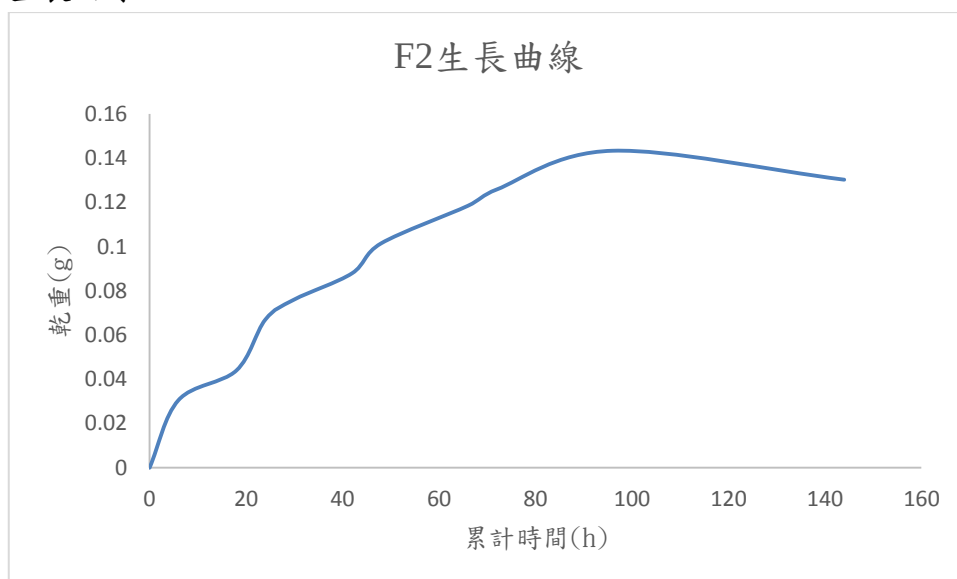
Medium title:	Yeast Extract Sucrose Agar (YES)	
Composition:	Yeast extract	4.0 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	MgSO ₄	0.5 g
	Sucrose	20.0 g
	Agar	15.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 6.2	

7. 培養基殺菌條件：121°C、15 mins
8. 培養溫度：30°C
9. 氣體需求：Aerobic
10. 保存方法：
 - (1) 冷凍保存：

保護劑為 Glycerol：PDB=3：7 混合

保護劑殺菌條件：121°C、15 mins

生長曲線



3. 試驗於 PDB 中進行

4. 約 96 小時可達最大生長量

四、菌粉糖化力分析結果

將 400 mL 的 PDB 接種少量分生孢子，置於 30°C 生長箱中，以 150rpm 震盪，持續 5 天。以抽氣過濾將 PDB 濾除，剩餘菌絲體裝入 50 mL 離心管中，保存於-80°C 冰櫃中 1 天。將樣品放入冷凍乾燥機，持續 3 天。約可收集乾重 0.5~1.0 g 的菌絲體。以研鉢將乾燥菌絲體磨至粉末狀，測定單一菌株的糖化、液化能力。糖化立測定結果如表 6，液化立測定結果如表 7。



表 6、菌粉糖化力分析結果

	KKL3. 001	KKL3. 002	F3	F4	F11
吸光值 1	0. 677	2. 085	1. 662	0. 958	0. 569
吸光值 2	0. 879	1. 788	1. 475	0. 966	0. 636
平均	0. 778	1. 937	1. 568	0. 962	0. 603
含糖濃度(mg/mL)	6. 585	13. 670	11. 418	7. 710	5. 515
糖化力	4390. 0 ^l	4556. 6	3806. 1	2570. 0	3676. 9 ^l

表 7、菌粉液化力分析結果

	KKL3. 001	KKL3. 002	F3	F4	F11
吸光值 1	0. 694	0. 505	0. 496	0. 612	0. 556
吸光值 2	0. 655	0. 482	0. 516	0. 625	0. 576
平均	0. 675	0. 493	0. 506	0. 619	0. 566
酶濃度(U/mL)	3. 017	3. 35	3. 321	3. 102	3. 198
液化力	724. 08	804	797. 04	744. 5	767. 5

五、協助金酒公司於食工所生資中心進行專利菌株申請、保存。

本計畫選定 *Aspergillus nidulans* (KKL3. 001)、*Aspergillus Oryzae* (KKL3. 002)兩株菌株於食工所生資中心進行專利菌株申請、保存。寄存相關證明文件如圖 3、圖 4。

財團法人 食品工業發展研究所
專利生物材料寄存

新竹市食品路331號 Tel: 03-5223191-6 http://www.firdi.org.tw Fax: 03-5224172 或 03-5214016

afao ISO 9001 Quality AFNOR CERTIFICATION

No. FP20150005

寄存證明書

寄存者於民國 104 年 1 月 16 日申請之生物材料
(名稱: 橘黃曲黴 *Aspergillus nidulans* KKL3.001) 專利寄存, 經本所審核通過, 並編號為 BCRC 930173。
該生物材料經本所於民國 104 年 1 月 28 日進行試驗並確認試驗當時存活。

寄存者資料

☐ 個人寄存 ☒ 機構寄存

寄 存 者 資 料 表	
名 稱	金門酒廠實業股份有限公司
身分證或營利事業登記證統一編號	16436466
住 址	台灣892金門縣金寧鄉桃園路一號
聯絡人姓名	林威龍
Tel: 0919761439	Fax:

寄存機構
財團法人 食品工業發展研究所
住址: 新竹市食品路331號
中華民國 104 年 1 月 30 日

T-PT-005

圖 3、*Aspergillus nidulans* (KKL3. 001) 寄存證明書

財團法人 食品工業發展研究所
專利生物材料寄存

新竹市食品路331號 Tel: 03-5223191-6 http://www.firdi.org.tw Fax: 03-5224172 或 03-5214016

afao ISO 9001 Quality AFNOR CERTIFICATION

No. FP20150006

寄存證明書

寄存者於民國 104 年 1 月 16 日申請之生物材料
(名稱: 米麴黴 *Aspergillus oryzae* KKL3.002) 專利寄存, 經本所審核通過, 並編號為 BCRC 930174。
該生物材料經本所於民國 104 年 1 月 28 日進行試驗並確認試驗當時存活。

寄存者資料

☐ 個人寄存 ☒ 機構寄存

寄 存 者 資 料 表	
名 稱	金門酒廠實業股份有限公司
身分證或營利事業登記證統一編號	16436466
住 址	台灣892金門縣金寧鄉桃園路一號
聯絡人姓名	林威龍
Tel: 0919761439	Fax:

寄存機構
財團法人 食品工業發展研究所
住址: 新竹市食品路331號
中華民國 104 年 1 月 30 日

T-PT-005

圖 4、*Aspergillus Oryzae* (KKL3. 002) 寄存證明書

第二年度計畫結果

一、於兩廠發酵過程中，翻槽後與最高品溫時進行採樣，分離純化最具功能性之酵母菌與醋酸菌株。

酵母菌、醋酸菌取樣於酒醪發酵過程中，翻槽後進行樣品採集與最高品溫進行醋酸菌採樣，採集樣品如圖 5。



第四天N-9-1-4

第五天N-9-1-5

第六天 N-9-1-6

第七天N-9-1-7

第八天N-9-1-8

新廠第二道



第四天N-9-2-4

第五天N-9-2-5

第六天N-9-2-6

第七天N-9-2-7

第八天N-9-2-8

舊廠第一道



第二天O-2-1-2

第四天O-2-1-4

第六天O-2-1-6

第八天O-2-1-8

第十天O-2-1-10

舊廠第二道



第二天O-2-2-2

第四天O-2-2-4

第六天O-2-2-6

第八天O-2-2-8

第十天O-2-2-10

第十二天O-2-2-12

圖 5、新舊廠酒醪樣品

二、酵母菌分離

以 PDB 液態培養基培養可快速增殖酒醪中的酵母菌，將增殖後的菌液稀釋塗佈於 PDA 固體培養基上使其長出單一菌落，藉此篩選分離，Ampicillin 可抑制細菌類的雜菌生長，故可減少 PDA 受雜菌污染的機率。將肉眼可判斷差異的菌落與隨機挑選肉眼無法判斷差異的菌落集中於新的 PDA 培養基純化培養。酵母菌擴增利用先前所設計之引子，且證實具有準確有效區隔鑑別酒廠環境與樣品中之能力，將純化的單一菌株以 PCR (polymerase chain reaction) 聚合鏈鎖反應進行特定片段擴增。擴增後之基因產物進行核酸序列分析，並將結果進行資料庫比對。比對結果如下表 8。

表 8、酵母菌菌株鑑定結果

菌株編號	採樣編號	菌株名稱
NY5	N-9-1-4	<i>Pichia kudriavzevii</i>
NY19	N-9-1-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NY35	N-9-2-4	<i>Candida humilis</i>
OY1	O-2-1-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
OY3	O-2-1-2	<i>Pichia kudriavzevii</i>
OY4	O-2-1-2	<i>Kodamaea ohmeri</i>
OY32	O-2-1-2	<i>Candida humilis</i>

三、寄存菌株特性分析與分子序列資料

(二) *Saccharomyces cerevisiae* 分類學性質

1. 形態特徵：於 PDA 上，菌落呈白色至米白色且中間偏黃的圓形菌落。
2. 以 18S rDNA 序列比對，並進行形態觀察，判斷最接近 *Saccharomyces cerevisiae*。可作為菌株鑑別用的 18S rDNA 序列資料如下：

```
GATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGAC
AAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCT
AGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTCTGTGC
```

TTTTGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT
 TCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGAATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAG
 GTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACAA
 GAATTTTCGTAACCTGGAAATTTTAAAATATTAAAAACTTTCAACAACGGAT
 CTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATG
 TGAATTGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
 CCTTGTTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAAC
 ATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGG
 CCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGA
 GGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTT
 TTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGG
 CGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTG
 AACTTAAGCATATC

微生物培養保存條件

1. 培養基配方：

Medium title:	Potato Dextrose Agar (PDA)		
Composition:	Potato Starch	4.0 g	
	Dextrose	20.0 g	
	Agar	15.0 g	
	Distilled water	1.0 L	
Description:	Adjust pH to 3.5		

Medium title:	Potato Dextrose Broth (PDB)		
Composition:	Potato Starch	4.0 g	
	Dextrose	20.0 g	
	Distilled water	1.0 L	
Description:	Adjust pH to 3.5		

2. 培養基殺菌條件：121°C、15 min

3. 培養溫度：30°C

4. 氣體需求：Aerobic

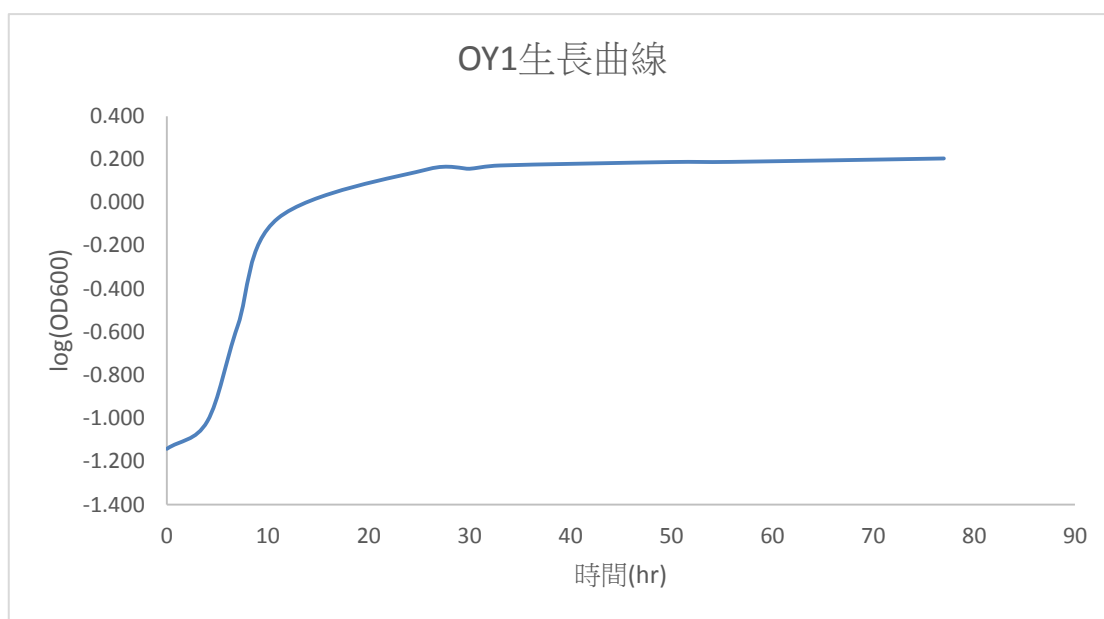
5. 保存方法：

(2) 冷凍保存：

保護劑為 25%甘油 (Glycerol：PDB=1：3 混合)

保護劑殺菌條件：121°C、15 min

生長曲線



1. 試驗於 PDB 中進行。
2. 約 8 小時後進入快速生長期，24 小時可達最大生長量。

五、依分離出之酵母菌和醋酸菌種測其酵素活性與最適生長條件

了解菌株的生長速度，可得知何時菌株活力最旺盛(log phase)以進行酵母菌的發酵力試驗。於 30°C 下以 150 rpm 震盪培養，每間隔一段時間測量 OD600。以小時(hr)為 X 軸， $\log(\text{OD}_{600})$ 為 Y 軸，繪製生長曲線。由生長曲線結果得知，酵母菌約在培養 30 小後會達 log phase 時期，菌株活力最旺盛，並取樣做後續發酵力分析。

六、酵母菌之酵母菌發酵力測定

酵母可使酒醅中的還原糖發酵，生成酒精與二氧化碳。測定發酵過程中生成的二氧化碳量，以評估不同酵母菌株的發酵能力。由表 9 結果得知，以菌粉計算發酵力以 *Saccharomyces cerevisiae* 這株菌最高，分別為 3000 與 2992(gCO₂/g)。

表 9、酵母菌發酵力測定

菌株編號	採樣編號	菌株名稱	發酵力(g/mL)	發酵力(g CO ₂ /g)
NY5	N-9-1-4	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.56	280.00
NY19	N-9-1-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4.05	3000.00
NY35	N-9-2-4	<i>Candida humilis</i>	5.12	2730.67
OY1	O-2-1-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6.06	2992.59
OY3	O-2-1-2	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.56	289.03
OY4	O-2-1-2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.81	437.25
OY32	O-2-1-2	<i>Candida humilis</i>	4.86	2442.21

七、醋酸菌分離

以 YGB 液態培養基培養可快速增殖酒醪中的醋酸菌，將增殖後的菌液稀釋塗佈於 AMA 固體培養基上使其長出單一菌落。AMA 培養基含有碳酸鈣，菌株若產酸可分解碳酸鈣形成透明圈，可藉此初步篩選出會產酸的菌株，但產酸菌株除了醋酸菌以外，亦有乳酸菌，故必須進一步以形態或定序區分，培養基中加入乙醇乃因醋酸菌亦有將乙醇轉為醋酸的能力，酵母菌亦可生長於 AMA 培養基，故培養基需添加抗真菌抗生素 Amphotericin B 以抑制酵母菌生長，分離出之醋酸菌如下表 10。

表 10、醋酸菌分離鑑定結果

編號	樣品來源	菌株
A6	N-9-1-7	<i>Gluconobacter frateurii</i>
A8	N-9-2-4	<i>Lactobacillus paracase</i>
A9	N-9-2-4	<i>Lactobacillus pantheris</i>

B3	0-2-1-4	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
B13	0-2-2-6	<i>Acetobacter cerevisiae</i>
B16	0-2-2-6	<i>Acetobacter malorum</i>
B18	0-2-2-8	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
B23	0-2-2-8	<i>Acetobacter persici</i>

八、寄存菌株特性分析與分子序列資料

(1) *Acetobacter pasteurianus* 分類學性質

1. 形態特徵：於 AMA 上呈淡橘黃色，大顆菌落邊緣有些微波浪紋，培養數天後菌落周圍將有透明圈。
2. 以 16S rDNA 序列比對，並進行形態觀察，判斷最接近 *Acetobacter pasteurianus*。可作為菌株鑑別用的 16S rDNA 序列資料如下：

Primer 338F/1401R

GATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCGACG
GGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
CGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGTGT
AGGCGGTTTTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAGCTGCATTTG
ATACGTGCAGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAA
ATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATTACTG
ACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGTGTGCTAGATGTTGGGTGACTTAGTCATTCAGTGTGCGAGTTAAC
GCGTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA
CCTTACCAGGGCTTGAATGTAGAGGCTGCAAGCAGAGATGTTTGTTCGCAAGGG
ACCTCTAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTGCCATCAGGTTGGGCTGGGCAC
TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC
ATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCT
AGGTGGTGACACCATGCTGATCTCTAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA
ACTCGAGTGCATGATGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGCGCTGTGTCGACACACACACAAAAAAA

微生物培養保存條件

1. 培養基配方：

Medium title:	Acetobacter medium agar (AMA)	
Composition:	Glucose	4.0 g/L
	Yeast extract	20.0 g/L
	Calcium carbonate	15.0 g/L
	Agar	20.0 g/L
	Distilled water	1.0 L
Description:	pH 值自然，冷卻至 60℃ 後加入 95%乙醇 42 mL/L	

Medium title:	Yeast extract-glucose broth (YGB)	
Composition:	Glucose	10.0 g/L
	Yeast extract	15.0 g/L
	Potassium dihydrogen phosphate	0.5 g/L
	Magnesium sulfate	0.5 g/L
	Distilled water	1 L
Description:	調整 pH 至 6.5，冷卻至 60℃ 後加入 95%乙醇 36.8 mL/L	

2. 培養基殺菌條件：121℃、15 min

3. 培養溫度：30℃

4. 氣體需求：Aerobic

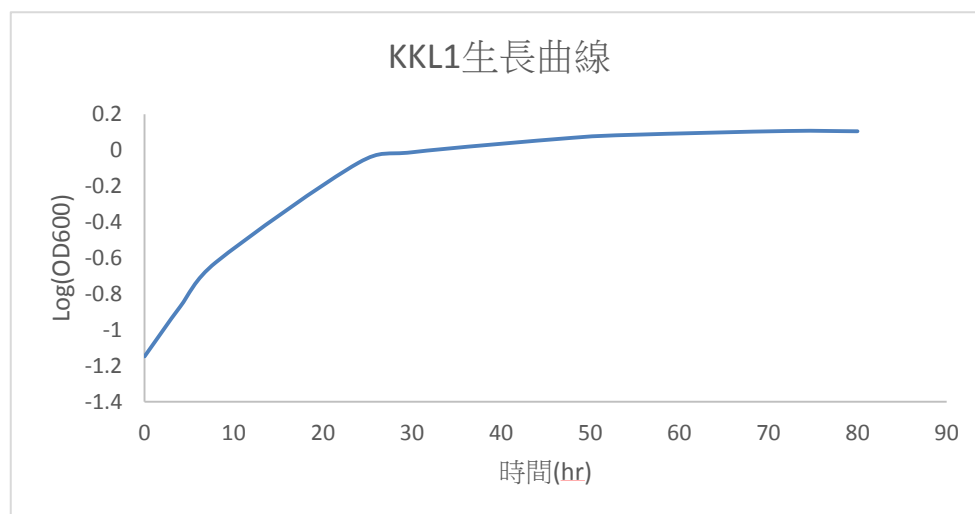
5. 保存方法：

(3) 冷凍保存：

保護劑為 25%甘油 (Glycerol：PDB=1：3 混合)

保護劑殺菌條件：121℃、15 min

生長曲線



1. 試驗於 YGB 中進行
2. 約 24 小時可達最大生長量

九、醋酸菌最適生長曲線

了解菌株的生長速度，可得知何時菌株活力最旺盛(log phase)，在後續進行醋酸菌的產酸力、酯化力測定時，有最佳的效果。於 30℃ 下以 150 rpm 震盪培養，每間隔一段時間測量 OD600。以小時(hr)為 X 軸，log(OD600)為 Y 軸，繪製生長曲線。由生長曲線結果得知，醋酸菌約在培養 25 小後會達 log phase 時期，菌株活力最旺盛，並取樣做後續產酸力與酯化力分析。

十、醋酸菌產酸能力測定

醋酸菌在糖源充足的情況下，可以直接將葡萄糖轉變為醋酸；在缺少糖源的情況下，則會將乙醇轉為乙醛再轉變成醋酸。將醋酸菌培養於含有葡萄糖及乙醇的培養基中，並以 NaOH 進行中和滴定，可測定醋酸菌的產酸量。接種單一菌落至裝有 50 mL AMB 的 250 mL 錐形瓶，於 30℃ 下以 150 rpm 震盪培養 48 hr。以 6%體積接種至裝有 50 mL AMB 的 250 mL 錐形瓶，於 30℃ 下以 150 rpm 震盪培養，取不同時段發酵液測量產酸量。取 1 mL 發酵液，加入 10 mL dH₂O，3 滴酚酞。以 0.1 M NaOH 滴定至粉紅色。由結果得知，約 150 小時產酸達平穩期，由表 11 結果得知 0~168 小時測其產酸量數值，以 *Acetobacter pasteurianus*(B3)在 168 小時有較高的產酸量 34.53g/L(表 11)。

表 11、0~168 小時測其產酸量數值

hr 產 酸量 (g/L)	A6	A8	A9	B3	B13	B16	B18	B23

	<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Lactobacillus paracase</i>	<i>Lactobacillus pantheris</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Acetobacter malorum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Acetobacter persici</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	2.62	3.16	2.89	2.73	4.25	2.78	3.38	3.71
47	5.89	6.44	6.16	6.27	11.51	7.53	7.53	10.96
69	8.62	10.80	11.35	9.71	18.16	14.35	9.16	17.45
97	10.80	15.82	22.80	17.73	24.55	20.07	12.44	21.82
120	13.64	19.80	24.71	26.62	27.44	26.89	18.44	29.07
144	15.71	20.62	30.98	34.80	31.25	31.53	20.62	33.71
168	15.16	20.89	36.98	34.53	33.16	33.16	21.16	33.71

十二、酯化力測定結果

酯化酶是脂肪酶和酯酶的統稱。白酒香味是以酯類為主的複合體，白酒釀造過程中酯酶的作用是使一個酸元和一個醇元結合、脫水而生成酯。酯化是一個可逆反應，酯酶既能產酯，也能使酯分解，特別在不適宜的酯化條件下(如溫度、pH、空氣量等)，會將已生成的酯類迅速分解。因此，要篩選產酯能力強，酯分解能力相對較弱的菌株，才能使白酒中留存較多的酯類。由菌粉換算結果表12得知 *Acetobacter pasteurianus* (B3) 酯化力為 5715.2mg/g、*Acetobacter cerevisiae* (B13) 酯化力為 6766.8mg/g、*Acetobacter malorum* (B16) 酯化力為 6306.8mg/g。

表 12、酯化力分析

	A6	A8	A9	B3	B13	B16	B18	B23
	<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Lactobacillus paracase</i>	<i>Lactobacillus pantheris</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Acetobacter malorum</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Acetobacter persici</i>

NaOH	20	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
H2SO4	19.4	19.29	19.45	19	19.3	18.8	19.05	19.01
淨差	0.6	1.21	1.05	1.5	1.2	1.7	1.45	1.49
酯化力 (mg/mL)	10.57	21.32	18.50	26.43	21.15	29.96	25.55	26.26
酯化力 (mg/g)	1301.3	4489.0	1947.7	5715.2	6766.8	6306.8	5241.4	6001.5

十三、協助金酒公司於食工所生資中心進行專利菌株申請、保存。

本計畫選定 *Saccharomyces cerevisiae* (KKL2.001)、*Acetobacter*

pasteurianus (KKL1.001)兩株菌株於食工所生資中心進行專利菌株申請、

保存。寄存相關證明文件如圖 6、圖 7。



財團法人 食品工業發展研究所
專利生物材料寄存

新竹市食品路331號
Tel: 03-5223191-6

http://www.firdi.org.tw
Fax: 03-5224172 或 03-5214016



No. FP20150082

寄存證明書

寄存者於民國 104 年 11 月 24 日申請之生物材料
(名稱: 釀酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* KKL2.001)專利寄存, 經本
所審核通過, 並編號為BCRC 920103。

該生物材料經本所於民國 104 年 11 月 30 日進行
試驗並確認試驗當時存活。

寄存者資料

☐ 個人寄存
☒ 機構寄存

寄 存 者 資 料 表	
名 稱	金門酒廠實業股份有限公司
身分證或營利事業 登記證統一編號	16436466
住 址	台灣892金門縣金寧鄉統園路一號
聯 絡 人 姓 名	林威龍
Tel: 0919761439	Fax:

寄存機構



財團法人 食品工業發展研究所
所長 廖啓成

中華民國 104 年 12 月 1 日

T-PT-005

圖 6、*Saccharomyces cerevisiae* KKL2.001 寄存證明



財團法人 食品工業發展研究所
專利生物材料寄存

新竹市食品路331號 http://www.firdi.org.tw
Tel: 03-5223191-6 Fax: 03-5224172 或 03-5214016



No. FP20160001

寄存證明書

寄存者於民國 105 年 1 月 7 日申請之生物材料
(名稱: 巴斯德醋酸桿菌 *Acetobacter pasteurianus* KKL1.001) 專利寄存
，經本所審核通過，並編號為BCRC 910719。

該生物材料經本所於民國 105 年 1 月 12 日進行試
驗並確認試驗當時存活。

寄存者資料

☐ 個人寄存
☒ 機構寄存

寄 存 者 資 料 表	
名 稱	金門酒廠實業股份有限公司
身分證或專利事業 登記證統一編號	16436466
住 址	台灣892金門縣金寧鄉桃園路一號
聯 絡 人 姓 名	林威龍
Tel: 0919761439	Fax:



寄存機構
財團法人 食品工業發展研究所
所長 廖啓成
中華民國 105 年 1 月 19 日

圖 7、*Acetobacter pasteurianus* KKL1.001 寄存證明

透過本計畫之執行將金門酒廠特有功能性菌種分離並進行專利菌株申請，並長久保存，確保需要時可使用。而後將此優勢菌種進行大量培養與保存，期望未來能將此純化之優勢菌種，應用在現有育麴製程中，加以發展「強化大麴」及「功能性大麴」，以提昇產酒率。