

放射毛黴生長習性之研究

陳 秀 琴

摘 要

本文發現放射毛黴 (*Actinomucor elegans*) 為製造豆腐乳的最優良菌種。在靜態的合成毛黴培養液 (still synthetic *Mucor* Solution) 中, 放射毛黴菌絲生長以第 5 天之乾重量最高; 孢子之形成與發育, 通常在快速生長期 (rapid growth phase) 之末。就若干環境因素而言, 最適宜其生長條件是: 溫度 30°C, 酸鹼度 7, 相對濕度 92% (30°C 時) 或 98% (25°C 時), 無光, 振盪培養。

緒 言

豆乳腐 (soybean cheese) 是一種大豆蛋白的醱酵產品。當菌長在豆腐上, 菌絲所分泌的酵素會使豆腐所含成分如白蛋白 (abumin) 和球蛋白 (globulin) 逐步分解成簡單構造的縮氨酸 (peptides) 和氨基酸。

筆者首先採集菌種, 即依古老方法, 將曬乾的各種植物覆蓋在豆腐小塊上, 結果在乳腐坯上收集到九種菌種, 經分離及純粹培養後, 再分別接種於豆腐小塊上, 發現以放射毛黴 (*A. elegans*) 之菌絲呈雪白色, 比其它種菌絲緻密、長且牢固, 製出的豆乳腐風味香醇、質地細膩, 故選擇此菌為最佳菌種。本實驗更進一步研究此菌在實驗條件下之生長習性及環境對此菌菌絲生長之影響。

材料和方法

一、採集菌種

乳腐坯 (pehtze) 之製造:

將壓榨較堅硬的豆腐切成小方塊 (3.1 cm × 3.1 cm × 2.3 cm), 排放於竹筐上, 曝曬 3 小時後測其失水量約 15%, 取回室內, 上面覆以曬乾之 (1) 稻稈 (2) 五節芒 (3) 月桃 (4) 竹 (5) 香蕉葉 (6) 菇婆芋 (7) 桑葉 (8) 菸葉, 保持室溫, 閉門窗, 36 小時後在豆腐小塊表面有菌絲生長, 即乳腐坯。

二、分離、鑑定及培養

將乳腐坯上菌種先用胡蘿蔔培養基 (C.A. 見附錄一) 和玉蜀黍培養基 (CMA, 見附錄二) 培養 2

天後, 經初步鏡檢而分離之, 如屬毛黴菌類, 則用合成毛黴培養基 (SMA, 見附錄三), 若屬不完全菌類, 則移至謝培克氏培養基 (Czapek medium, 見附錄四), 再行培養、鑑定之。

三、菌種保存

將分離而得純種中取單一孢子囊接種於馬鈴薯培養基 (PDA, 見附錄五), 5 天後移入 6°C 冰箱內貯存, 每 3 個月重新移植, 以保持菌種活力。

四、選擇最佳菌種

(一) 以濾紙培養基法, 將濾紙放入培養皿, 高壓滅菌 15 分鐘後, 倒入滅過菌的改良謝培克氏培養液 (Modified Czapek Solution, 見附錄六), 分別接種上述分離之純粹菌種, 置於 30°C 溫箱培養 36 小時。

(二) 將豆腐小塊浸漬於酸性食鹽溶液 (Acidic Saline Solution, 見附錄七) 1 小時後, 排列在不銹鋼網上, 置於熱風溫箱 (100°C) 15 分鐘後, 移入冰箱冷卻至 20°C 左右。

(三) 將(二)之豆腐小塊分別沾過長滿上述菌種之濾紙, 放置於 30°C 溫箱, 24 小時後觀察各種菌種之菌絲在豆腐上生長的顏色和習性。

五、試驗放射毛黴生長習性的環境因素包括溫度、酸鹼度、濕度、光及氧。

(一) 溫度

菌落直徑大小測量法:

將放射毛黴接種於豆漿培養基 (見附錄八), 置於溫箱 (30°C) 2 天, 以滅過菌的黃銅鑽孔器鑽直徑 0.7 cm, 高度 0.2 cm 的小圓盤 (disk), 將此

長滿菌絲之小圓盤翻轉於合成毛黴培養基中央，分別倒置於 6°C, 12°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 溫箱內，各組 3 皿，48 小時後觀察結果。

(二) 酸鹼度

菌絲乾重量測定法：

將放射毛黴孢子懸浮液 6×10^2 孢子/ml 接種於 25ml 合成毛黴培養液，其酸鹼度分別為 3.5, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 9, 各組 3 瓶，置於振盪器 (Shaker) 上，每分鐘 75 次振盪，溫度為 25°C，第 4 天後，將各組以濾紙過濾，而後用蒸餾水沖洗 3 次，置於 50°C 烘箱 14 小時烘乾，稱

其菌絲乾重量。

(三) 濕度

將豆腐小塊沾過長滿放射毛黴之濾紙培養基，而後置於 250ml 倒立燒杯上，此燒杯放於盛有 100ml 飽和鹽溶液的 1ℓ 燒杯內 (如圖 A)，再以塑膠紙密封，作成 (1) 4 個濕度容器，各放 KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的飽和溶液，置於恒溫水浴 (thermostat) 保持 30°C, 27 小時後觀察。(2) 5 個濕度容器，各放 NaNO_2 , KNO_3 , NaCl , ZnSO_4 , CaSO_4 的飽和溶液，置於恒溫水浴，保持 20°C, 31 小時後觀察。

下列為不同鹽飽和溶液在一密閉容器內所呈現

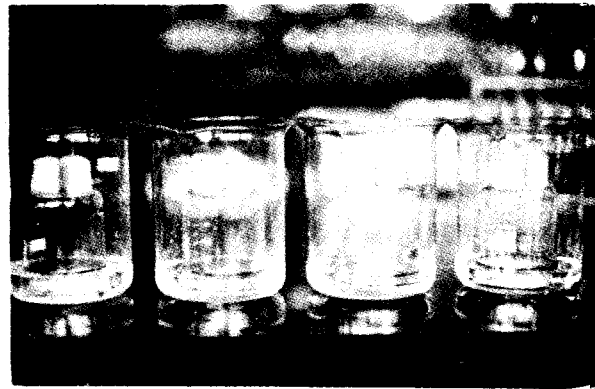


圖 A 濕度容器之裝置

之濕度。

鹽 溶 液	溫度 (攝氏)	濕度 (%)
NaNO_2	20	66
KNO_3	20	72.6
NaCl	20	75
ZnSO_4	20	90
CaSO_4	20	98
KNO_3	30	68.6
NH_4Cl	30	77.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30	81.1
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	30	92.9

(四) 光

將長滿菌絲之小圓盤瓊脂 (disk agar) 翻轉置於合成毛黴培養基中央，分成下列 3 組置於溫箱，3 天後觀察。(1) 照光 (2) 包黑紙 (3) 包黑紙，在培養皿邊緣挖一小洞，讓一小部分光透入。

(五) 氧

將放射毛黴孢子懸浮液 4×10^3 孢子/ml 接種於合成毛黴培養液，分 3 組，一組用振盪器，一組靜止培養，另一組則用石臘封閉瓶口。

結 果

將乳腐坯 (pethze) 上的菌種分離、純粹培養、觀察鑑定後，獲下列九種菌種：*Actinomucor elegans*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Choanephora cucurbitarum*, *Cunninghamella elegans*, *Mucor hiemalis*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus stolonifer* 經實驗觀察後，選擇放射毛黴 (*Actinomucor elegans*) 為製乳腐最優菌種。

一、放射毛黴在分類學上的地位及形態上的描述：

真菌門 Mycota

真菌亞門 Eumycotina

結合菌綱 Zygomycetes

毛黴目 Mucorales

毛黴科 Mucoraceae

放射毛黴屬 Actinomucor

放射毛黴 (*Actinomucor elegans*) 是毛黴科 (Mucoraceae) 之一屬，首先由 Schostakowitsch (1898) 描述，與毛黴屬 (*Mucor*) 相近，但不同處在於①有匍匐莖 (stolons)，由此產生假根 (rhizoid) 和孢子囊柄 (sporangiophores) ②孢子囊 (sporangia) 成熟後裂開；雖與根黴 (*Rhizopus*) 和 *Absidia* 相近，均有匍匐莖，但中軸 (columellae) 和孢子囊柄不同。

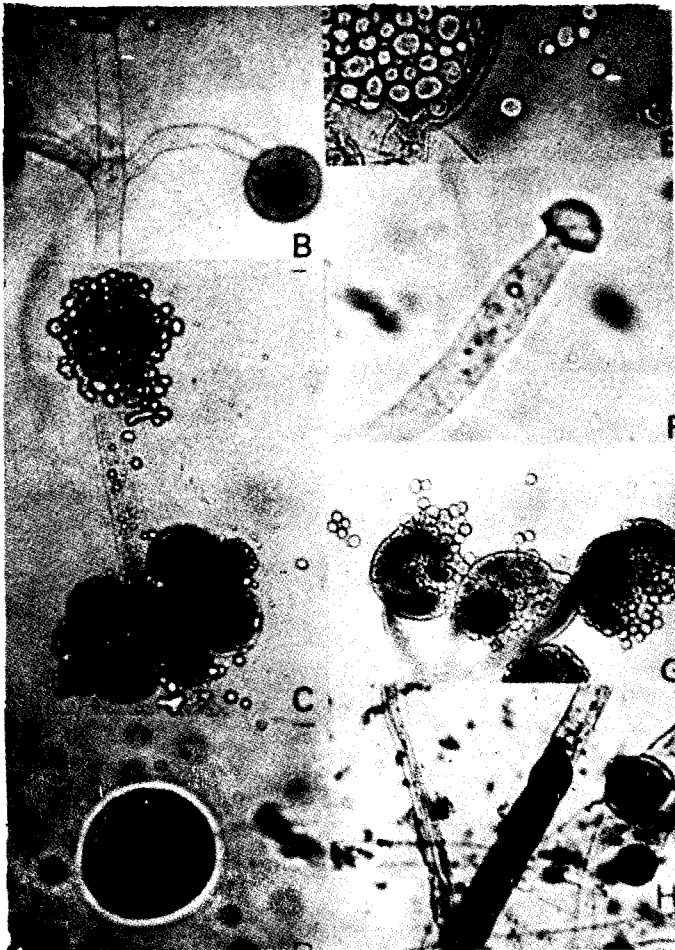
形態描述：

(一) 在合成毛黴培養基中，菌絲白色，有匍匐莖和假根，孢子囊柄典型，分枝，有隔板，由氣生的菌絲 (aerial hyphae) 產生，通常末端有一小的孢子囊 (terminal sporangium)，下方附近著生一輪短枝之孢子囊 (圖 B. C)。

(二) 孢子囊圓形 (圖 B)，含無數孢子，無隆起 (Apophysis)，囊壁不平滑，孢子囊直徑約 54μ ，壁成熟後破裂 (圖 G)。

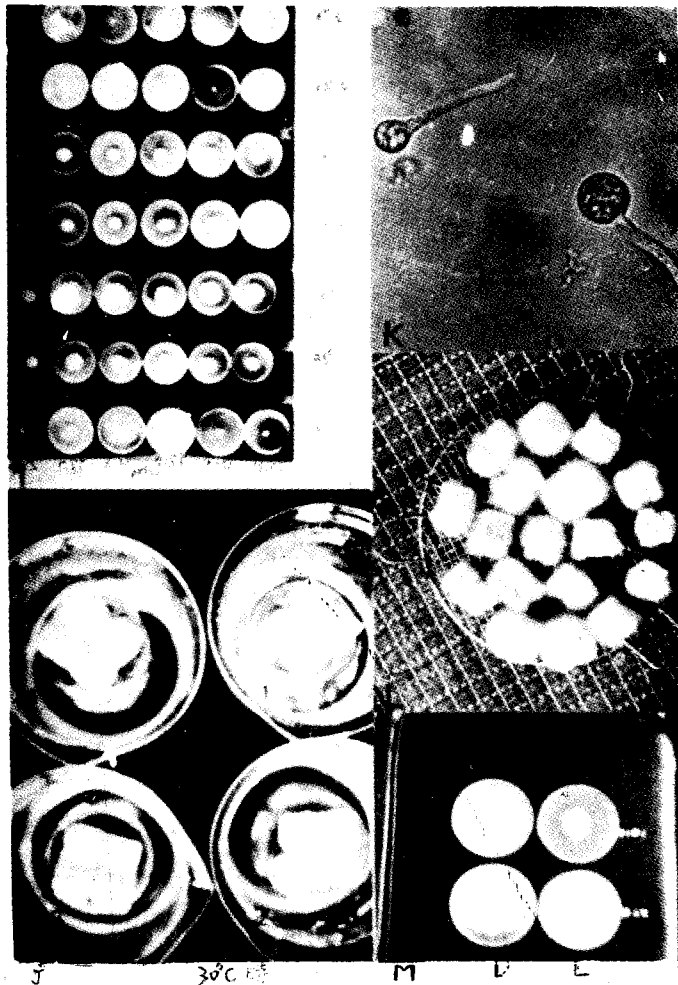
(三) 孢子透明，壁無紋路，二層壁，圓形 (圖 D)，約 $9\sim 12\mu$ 。

(四) 結合孢子 (Eygospores) 未被發現，若環境不良或液體培養基缺氧或二氧化碳堆積太多，則有厚膜孢子 (chlamydo spores) 形成 (圖 H)。



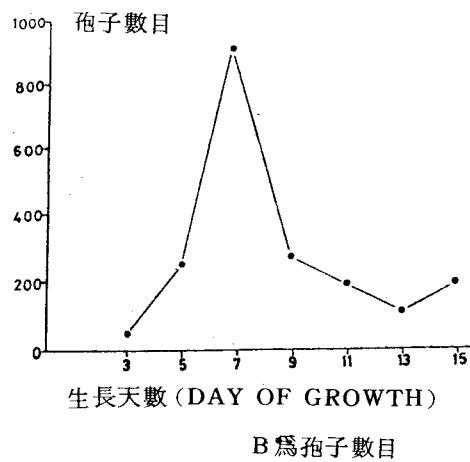
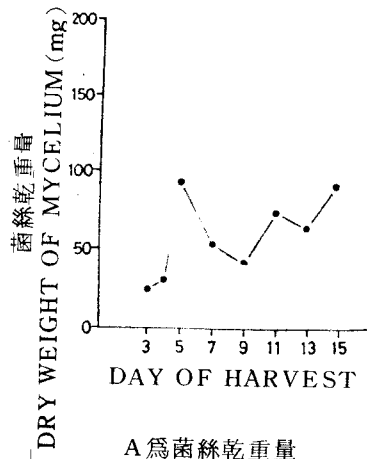
- B. 孢子囊柄末端部分。顯示孢子囊柄分枝，末端之中軸和下端兩個孢子囊 $\times 100$
- C. 末端孢子囊及輪生之短孢子囊 $\times 100$
- D. 含兩層壁之孢子 $\times 500$
- E. 圓形之中軸及無數孢子 $\times 500$
- F. 圓頂形之中軸 $\times 500$
- G. 破裂之孢子囊 $\times 100$
- H. 單獨或成鏈狀的厚膜孢子 $\times 200$

圖 B—H 放射毛黴 (*Actinomucor elegans*)



- I. 溫度與酸鹼度對放射毛黴生長之影響
- J. 相對濕度對長於豆腐上之放射毛黴生長之影響
- K. 放射毛黴孢子腫大及萌芽管之形成
- L. 乳腐坯(放射毛黴長在豆腐上)
- M. 光對放射毛黴之影響

圖 I—M. 放射毛黴 (*Actinomucor elegans*)



圖一 放射毛黴在靜止的合成毛黴培養液中十五天之生長狀態 (the dynamics of growth)

(五) 中軸 (columellae) 圓形 (圖 E)，圓頂形 (圖 F)。

(六) 放射毛黴之群落如棉絮，因培養基之不同，氣生的菌絲白色，老化後轉變成灰色。

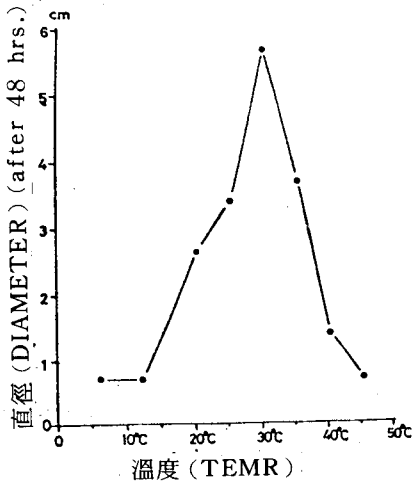
二、放射毛黴 (Actinomucor elegans) 之生長狀態：

在靜態的合成毛黴培養液中，放射毛黴之生長速率以菌絲乾重量為計算標準，如圖一A所示：第4天以前為遲滯期 (lag phase)，即生長不顯著時期。第4天至第5天為快速生長期 (rapid growth phase)，第5天到達第一個生長高峯 (peak)，第5天後為自體分解 (autolysis) 或乾重量減少期 (a phase of decline in dry weight)。第9天後，約第11天出現第二個生長高峯。當第5天乾重量到達高峯時，此時孢子數目為 2.5×10^2 孢子/ml 當乾重量減少後第2天，即第7天，孢子數目增至3.6倍 (見圖一B)，足見在靜態培養時，放射毛黴孢子之形成及發育在快速生長期之末。

三、若干環境因素對放射毛黴生長之影響

(一) 溫度

溫度影響放射毛黴生長甚鉅 (見圖二)。在

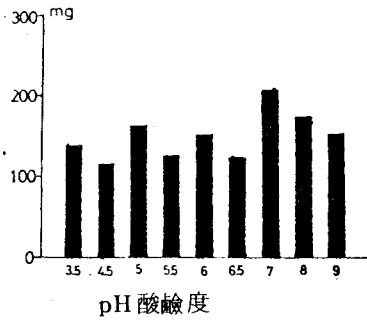


圖二 以菌落直徑大小 (colony diameter) 測量溫度對放射毛黴生長之影響

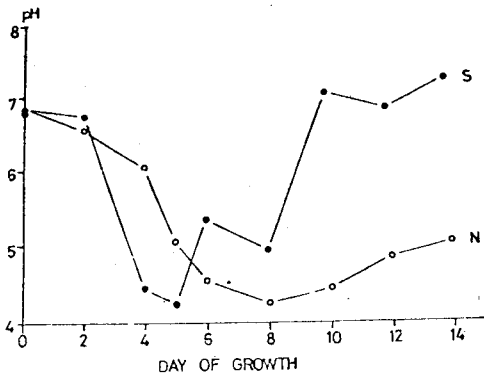
6°C 短時期內無生長，兩星期後，仍見生長良好；在 45°C 或 45°C 以上則不生長。此菌生長之溫度範圍為 18°C ~ 40°C (如圖 I)，最適宜溫度為 30°C (圖 I)。

(二) 酸鹼度

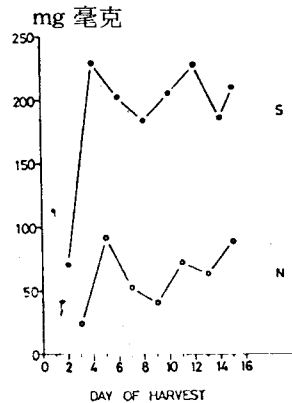
放射毛黴在酸鹼度 3.5 ~ 9 均生長良好，但以酸鹼度 7 最適宜 (如圖三)。



圖三 酸鹼度對放射毛黴生長之影響



圖四 一○—○ 接種放射毛黴後震盪培養液酸鹼度之變化情形
—○—○ 接種放射毛黴後靜止培養液酸鹼度之變化情形



圖五 圖上一○—○ 為震盪器震盪 (每分鐘 75 次) 培養，—○—○ 為靜止培養

振盪培養之酸鹼度變化較靜態培養為大(圖四), 而得之乾重量為振盪培養是靜態培養的2倍以上(圖五)。

(二) 濕度

當溫度為30°C, 相對濕度68.6%~92.9% 27小時後, 菌絲生長均良好(見圖J), 同時培養在20°C, 各種濕度(66%, 72.6%, 75%, 90%, 98%)下均未長, 直到31小時後, 在相對濕度72.6~98%生長良好, 66%下不長, 故所需之濕度似受溫度左右, 也即在溫度30°C時, 相對濕度92.9%最適宜; 在20°C時, 相對濕度98%最適宜。

(四) 光

在不同酸鹼度(pH6, pH10)培養基中, 強光抑制放射毛黴的生長(如圖M), 且菌絲生長對光無趨性。

(五) 氧

振盪培養增加氧供量, 放射毛黴在振盪培養所得之乾重量為靜態培養的兩倍以上(見圖五), 若一組瓶口封以石臘, 使空氣中的氧無法進入, 另一組瓶口則以棉花輕輕塞住, 使氧仍可透入, 此兩組在4天中, 乾重量無甚差異, 但第5天後, 石臘組之乾重量較棉塞組少得多, 且在第8天後, 有厚膜孢子產生(圖H)。

討 論

放射毛黴(*A. elegans*)在靜態培養液中, 第7天至第9天乾重量減少可能是自體分解(*autolysis*)之故。第9天至第11天乾重量增加可能是利用代謝產物而合成, 此生長曲線與不完全菌之一種 *Helminthosporium maydis* 在葡萄糖培養液中生長相似。

溫度影響細胞活動, 菌生長或代謝物的產生是受酵素控制的無數過程之相互作用結果, 而每一過程可能有不同的溫度係數和適宜溫度。

空氣中氧已足夠放射毛黴生長所需, 振盪培養增加氧量, 則促進生長, 在缺氧環境下(以石臘封閉瓶口), 培養初期, 仍夠菌絲生長, 但第5天後, 瓶內氧可能耗盡, 故生長減少, 且在第8天產生厚膜孢子(*chlamydo-spores*)以適應不良環境。

生長停止似乎是碳水化合物和氮源的供應耗盡

或阻碍生長的有毒代謝物堆積, 這現象與培養基內的酸鹼度有關, 很顯然地, 酸鹼度變化愈大, 供給菌生長愈好。

結 論

本文對釀造學、醱酵及真菌生理學方面有重要之參考。

致 謝

本研究承蒙恩師 簡秋源教授的悉心指導與支持, 深為感激, 特此致謝。

參考文獻

1. Chang Shun-ming. 1966. A preliminary survey on proteolytic enzymes of *Actinomucor elegans*. Bull. Inst. Chem. Acad. Sinica, 12: 13-24.
2. Chang Shun-ming. 1967. Studies on extracellular peptidases of *Actinomucor elegans*. Ibid, 14: 14-23.
3. Wai Nganshou, 1964. Soybean cheese. Bull. Inst. Chem. Acad. Sinica. 9: 75-94.
4. Tansey, Michael R. 1972. Effect of Temperature on growth rate and development of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile*. Mycologia. 64: 1290-1297.
5. Schein, R.D., and J. Rotem. 1956. Temperature and humidity effects on uredospore variability. Mycologia. 57: 397-398.
6. Judd, Jr. R.W., and J.L. Peterson. 1972. Temperature and humidity requirements for the germination of *Cercospora omphakodes* spores. Mycologia 64: 1253-1257.
7. Sumino, Y., S. Akiyama, and H. Fukuda. 1972. Power consumption. J. Ferment. Tech. 50: 203.
8. Cochrane, W.W. 1958: Physiology of fungi. John Wiley and sons N.Y. 524 pp.

9. Lilly, V. G., and H. L. Barnett. 1951. *Physiology of the fungi*. Inc. N. Y. Toronto, London. 463 pp.
10. Ellis J. J., G. A. Bennett, and C. W. *Henselmine*. 1973. Utilization of carbon compounds by *Helminthosporium maydis* and *H. carbonum*. *Mycologia* 65: 539-547.
11. Deverall, B. J. 1965. The physical environment for fungal growth. 1. Temperature 543-550. In G. C. Ainsworth and A. S. Sussman (ed.) *The fungi Vol. 1. The fungal cell*. Academic Press, N. Y.
- | | |
|----------------------------------------|---------|
| NaNO ₃ | 3.0g |
| K ₂ HPO ₄ | 1.0g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.5g |
| KCl | 0.5g |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.01g |
| Sucrose | 30.0g |
| Agar | 15.0g |
| Distilled water | 1 liter |
- 五、馬鈴薯培養基 Potato Dextrose Agar (PDA)
- | | |
|-------------------------|---------|
| Peeled, Sliced potatoes | 200g |
| Dextrose | 20g |
| Agar | 15g |
| Distilled water | 1 liter |

附 錄

一、胡蘿蔔培養基 Carrot agar (CA)

Whole Carrot	200g
Agar	15g
Distilled water	1 liter

二、玉蜀黍培養基 Corn Meal Agar (CMA)

Corn Meal	40g
Agar	15g
Distilled water	1 liter

三、合成毛黴培養基 Synthetic Mucor Agar (SMA)

Dextrose	40g
Asparagine	2g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄	0.25g
Thamine Chloride	0.005g
Agar	15g
Distilled water	1 liter

四、謝培克培養基 Czapek's Agar (Difco and Czapek-Dox)

六、酸性食鹽溶液 Acidic Saline Solution

NaCl	6g
Citric acid	2.5g
Distilled water	100ml

七、改良謝培克氏培養基 Modified Czapek Solution

Sucrose	30g
NaNO ₃	3g
K ₂ HPO ₄	1g
KCl	0.5g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01g
Potato	50g
Sodium glutamate	2g
Distilled water	1 liter

八、豆漿培養液 Soybean juice agar

Soybean	200g
Distilled water	1 liter
Diluted to 2%	
Agar	15g

The Growth Characteristics of *Actinomucor elegans*

Shiu-Chin Chen

Abstract

Having observed the growths of several fungi in manufacture of Soybean cheese, to discover *Actinomucor elegans* was adaptable for the preparation of Soybean cheese.

The dynamics of growth of *A. elegans* in still synthetic mucor solution: the dry weight of mycelium at 5 days growth was maximum; spore production and development in still liquid medium is usually at the end of rapid growth phase. Under certain environmental conditions, optimum growth of *A. elegans* in shake cultures in the dark at pH 7 was at humidity 92% at 30°C, and at 98% humidity at 25°C.