

# 放射毛黴孢子萌芽生理之研究

陳 秀 琴

## 摘 要

本實驗以放射毛黴 (*Actinomucor elegans*) 在不同的溫度、酸鹼度、濕度、孢子本身濃度、基本營養物、氮源、乙醇蒸氣、二氧化碳下加以探討，結果顯示孢子萌芽最適宜溫度為 30°C，酸鹼度為 7，相對濕度為 92%，萌芽率因孢子濃度增加而減少，最有效刺激孢子萌芽之基本營養物，需要葡萄糖 (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)、硝酸鹽 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 和磷酸二氫鹽 (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) 三種混合物。孢子在蒸餾水中萌芽率最低。在數種供試的氮源以酵母抽取物 (yeast extract) 刺激其孢子萌芽最有效。乙醇蒸氣 1% 或 1% 以上，孢子萌芽即受抑制。大氣中的二氧化碳已足夠孢子萌芽之需，太高或太低之二氧化碳濃度反而有害，此菌之孢子熱死點測得為 55°C。

## 緒 言

放射毛黴 (*Actinomucor elegans*) 是製豆腐乳的最優良菌種，其菌絲所分泌的酵素如 proteolytic enzymes 和 peptidases 會使豆腐所含的成分如白蛋白 (albumin) 和球蛋白 (globulin) 逐步分解成更簡單構造的縮氨酸 (peptides) 和氨基酸。

放射毛黴菌絲在豆腐上生長的情形，決定製出的豆腐乳品質，而此菌的孢子萌芽為菌絲生長的起始階段，關係著生長。目前國內外尚無此菌的孢子萌芽方面研究報告發表，故筆者以無此為題，作進一步的探討。

## 材料與方法

### 一、孢子濃度對孢子萌芽之影響：

將長至第 5 天之放射毛黴菌絲用滅過菌之金屬半細微攪拌器 (Semi-micro Waring Blendor jar) 打碎 30 秒，作成合成毛黴培養液 (見附錄一) 之懸浮液，分成 5 組：

- (1) 控制組：1330 孢子 / ml
- (2) 稀釋 2 倍：665 孢子 / ml
- (3) 稀釋 5 倍：266 孢子 / ml
- (4) 稀釋 10 倍：133 孢子 / ml
- (5) 稀釋 20 倍：67 孢子 / ml

將上述 5 組置於室溫 20°C，經 16 小時後，計算各組之萌芽百分率 (以 5 個視野平均之)。

### 二、溫度對孢子萌芽之影響

將放射毛黴孢子懸浮液 (5 × 10<sup>3</sup> 孢子 / ml) 接種於合成毛黴培養基中 (pH 6.85)，分別置於 6°C，12°C，25°C，30°C，35°C，40°C，45°C 溫箱，經 2.5 小時後，計算孢子萌芽百分率 (以 7 個視野平均之)。

### 三、酸鹼度對放射毛黴孢子萌芽之影響

以懸滴技術 (hanging-drop technique) 將合成毛黴培養液之孢子懸浮液 (2 × 10<sup>3</sup> 孢子 / ml)，酸鹼度分別為 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 各一滴懸於蓋玻片上，而翻轉置於凡蒂漢濕室 (Van Tieghem Cells) 之上，置於 30°C 溫箱中，3 小

時後計算孢子萌芽百分率。

#### 四、濕度對孢子萌芽之影響

在 30°C 恒溫水浴中，以四種飽和溶液即  $\text{KNO}_3$ ， $\text{NH}_4\text{Cl}$ ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  作成 4 個濕度容器，以懸滴技術將含合成毛黴培養液之放射毛黴孢子懸浮液 ( $4.8 \times 10^3$  孢子/ml) 懸於蓋玻片上，而翻轉置於凡蒂漢濕室之上，放在 4 個濕度容器內，3 小時後計算孢子萌芽百分率。

#### 五、孢子萌芽之營養需要

將不同成分培養液 (見附錄 2) 中之放射毛黴孢子懸浮液 ( $6.8 \times 10^3$  孢子/ml) 1 滴懸於蓋玻片中央，翻轉置於凡蒂漢濕室，放入保持一定濕度之培養皿中，置於 30°C 溫箱，4 小時後計算孢子萌芽百分率。

#### 六、氮源和溫度對孢子萌芽之影響

以下列有機物試驗對孢子萌芽之刺激作用。

- (1) 葡萄糖 (glucose) 10g/l
- (2) 酵母提取物 (yeast extract) 2g/l
- (3) 丙氨酸 (L-alanine) 2g/l
- (4) 精氨酸 (L-arginine) 2g/l
- (5) 甘氨酸 (glycine) 2g/l
- (6) 纈氨酸 (L-valine) 2g/l
- (7) 白氨酸 (L-leucine) 2g/l

將上述有機物分別加到 15g 琼脂之基本培養基中，滅菌十五分鐘後待用。

1. 以放射毛黴孢子懸浮液 ( $6.3 \times 10^3$  孢子/ml) 接種於 5 種氨基酸培養皿即丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、白氨酸、纈氨酸，和以上五種氨基酸混合之培養基，置於 30°C 溫箱，4.5 小時後計算孢子萌芽百分率。

#### 2. 溫度之影響

以 1 之孢子懸浮液接種於葡萄糖、丙氨酸、酵母提取物、葡萄糖和酵母提取物之培養基中，分別置於 5°C，10°C，20°C，25°C，30°C，35°C，40°C，45°C 溫箱中，3 小時後計算孢子萌芽率。

#### 七、熱死溫度試驗

將含合成毛黴培養液之孢子懸浮液 ( $2 \times 10^3$  孢子/ml) 10ml 試管 6 支，分別置於 30°C，40°C，45°C，50°C，55°C，60°C 恒溫水浴中 10 分鐘，再以凡蒂漢濕室法，移入 30°C 溫箱中，2 小時和 12 小時觀察之。

#### 八、乙醇蒸氣影響

以 1%，5% 和 10% 乙醇各 40ml 分別置於 3 具乾燥器內，另一具乾燥器中置 40ml 無菌水為對照組。

將含合成毛黴培養液之放射毛黴孢子懸浮液 ( $1.6 \times 10^3$  孢子/ml) 懸於蓋玻片中央，置於凡蒂漢濕室，放入上述之 4 具乾燥器中，2.5 小時計算孢子萌芽率。

#### 九、通氣之影響

分 3 種情況試驗：

1. 對照組：置於密閉乾燥器中培養 (培養環境中  $\text{CO}_2$  濃度不變)。

2. 培養環境中  $\text{CO}_2$  濃度減少：放 1 小碟 2% KOH 溶液於密閉乾燥器中 ( $\text{CO}_2$  被 KOH 吸收)。

3. 置於含多量  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  由  $\text{NaHCO}_3$  與  $\text{H}_2\text{SO}_4$  作用產生) 的乾燥器中，此時培養環境中  $\text{CO}_2$  濃度增加，但氧不缺乏。

將含合成毛黴培養液之放射毛黴孢子懸浮液 ( $1.6 \times 10^3$  孢子/ml) 懸於蓋玻片中央，置於凡蒂漢濕室，放入上述 3 個乾燥器中，2.5 小時後計算孢子萌芽率。

## 結果與討論

放射毛黴之孢子萌芽為孢子腫大 ( $11\mu \rightarrow 15\mu$ ) 而後伸出萌芽管 (germination tube) (如圖一 a, b, c, d)

#### 一、孢子本身濃度對孢子萌芽之影響

放射毛黴孢子濃度愈高，則萌芽率愈低 (圖二)。這可能是有限營養之競爭或孢子本身產生抑制物質使然。

#### 二、溫度之影響

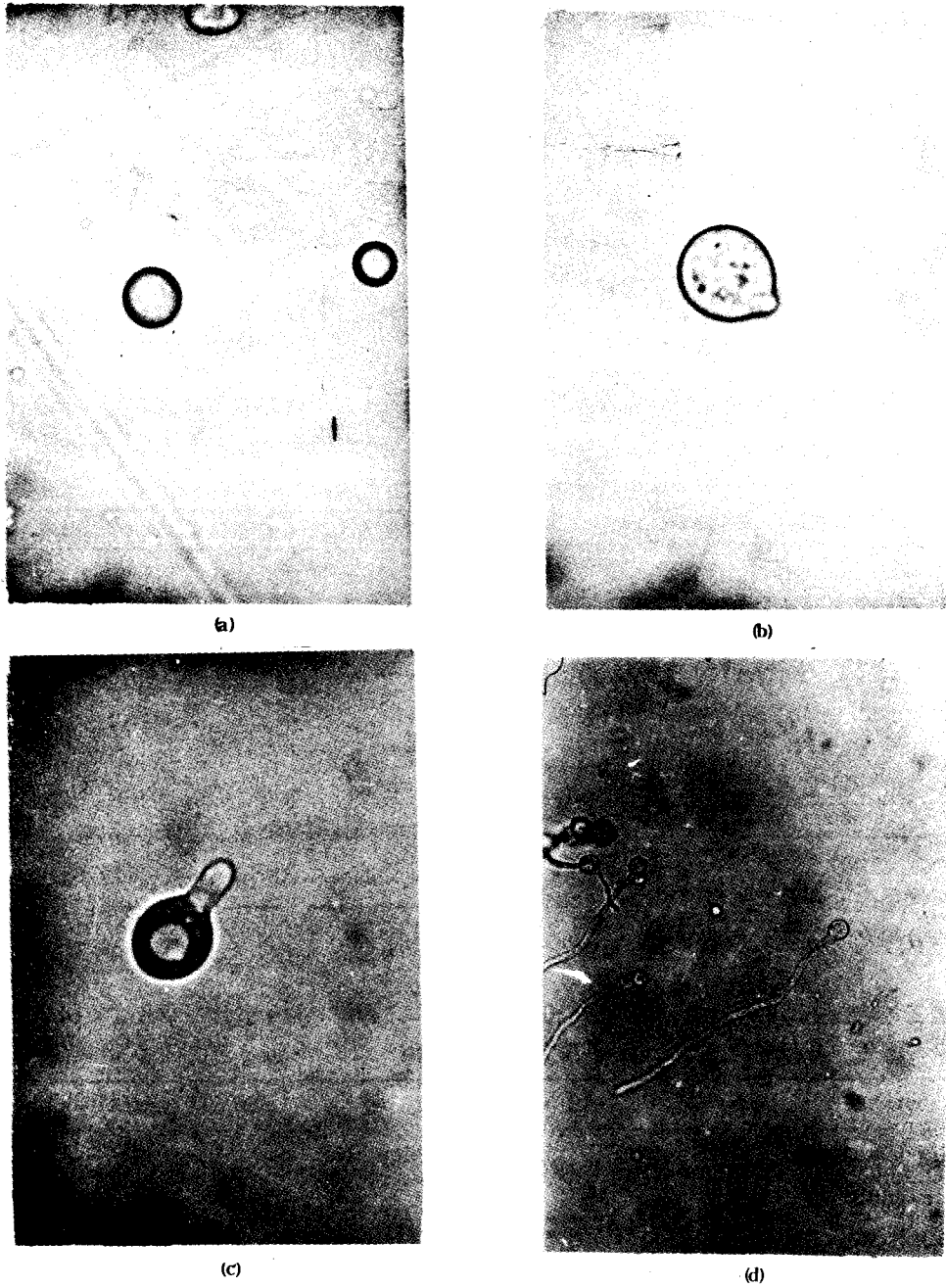
孢子萌芽發生在 6°C ~ 40°C。最適宜溫度是 30°C，而 45°C 或 45°C 以上則不萌芽 (見圖三)。

#### 三、濕度之影響

濕度愈大，放射毛黴孢子萌芽率愈高，最高萌芽率 (95.6%) 發生在 30°C 時，相對濕度 92.9% (表一)。

#### 四、酸鹼度之影響

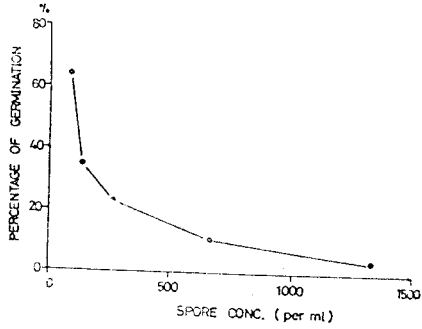
最適和酸鹼度為 7，而酸鹼度 3 時孢子不萌芽，酸鹼度 2 時不但不萌芽，且有萎縮現象，酸鹼度 10 時，尚有少數孢子萌芽 (見表二)。



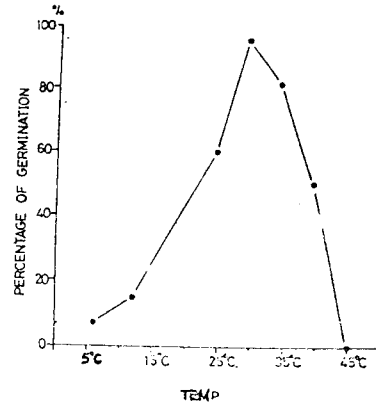
圖一

表一：濕度對放射毛黴孢子萌芽之影響

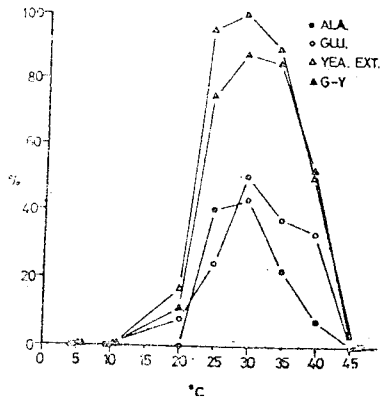
Relative Humidity	% of Germination
68.6 %	83
77.5 %	87.7
81.1 %	92
92.9 %	95.6



圖二：放射毛黴孢子濃度對其孢子萌芽百分率之影響



圖三：溫度對放射毛黴孢子萌芽百分率之影響



圖四：在不同溫度下四種代謝物對放射毛黴孢子萌芽百分率之影響

表二：酸鹼度對放射毛黴孢子萌芽百分率之影響

pH	% of spore germination
2	0
3	0
4	38.1
5	59.8
6	63
7	95.2
8	68
9	50.8
10	22.2

表三：培養基不同成分對放射毛黴孢子萌芽百分率之影響 (孢子數目每毫升  $3 \times 10^8$  , 每一萌芽率為五次平均, 採用 Van Tieghem cell method)

substance supplied	element lacking	% germination
(1) Redistilled water	Carbon & Minerals	2.4
(2) dextrose (glucose) 5%	Minerals	71.0
(3) $KNO_3 + KH_2PO_4 + MgSO_4$	Carbon	27.7
(4) Dextrose + $KNO_3 + KH_2PO_4 + Na_2SO_4$	Magnesium	82.2
(5) Dextrose + $KNO_3 + KCl + MgSO_4$	Phosphorus	76.2
(6) Dextrose + $KCl + KH_2PO_4 + MgSO_4$	Nitrogen	58.5
(7) Dextrose + $KNO_3 + KH_2PO_4 + MgSO_4$	None	87.7

Dextrose conc. 5%, Mineral salts conc. 1.0 millimol.

## 五、孢子萌芽之營養需要：

由表三顯示下列結果

1. 以凡蒂漢濕室法實驗，則放射毛黴孢子在蒸餾水中仍萌芽，只是百分率最低。這可能是移植孢子時從原來的培養基攜帶足夠萌芽所需的營養物質所致。將孢子懸浮液離心（5000 r.p.m. 2分鐘）以洗淨之，則在蒸餾水中不萌芽。

2. 培養基中若不含葡萄糖，則孢子萌芽不良由此推測葡萄糖在放射毛黴孢子萌芽過程佔重要角色的原因可能有二：(1)葡萄糖供給合成蛋白質、核酸、細胞壁物質、貯藏物質等所需的碳。(2)葡萄糖氧化而供給能。

3. 放射毛黴孢子萌芽需要磷、鎂等礦物質。

4. 放射毛黴孢子萌芽要達到最高百分率，則需碳、氮源和礦物質。

## 六、氮源和溫度

## 1. 氮源

在琼脂基本培養基中加入酵母抽取物 (yeast extract)，則放射毛黴孢子在 30°C 時萌芽率最高，達 100%。而葡萄糖加酵母抽取物其孢子萌芽率為 87%。丙氨酸其萌芽率為 66%，精氨酸其萌芽率為 40%，缬氨酸為 38%，至於甘氨酸、白氨酸均為 0，這五種氨基酸混合液，其萌芽率為 35%。在數種供試的氮源以酵母抽取物刺激孢子萌芽最有效。

## 2. 溫度

在供試的四種代謝物（即丙氨酸 0.2%，葡萄糖 1%，酵母抽取物 0.2%，葡萄糖 1% 加酵母抽取物 0.2%）中，5°C，10°C，45°C 孢子均不萌芽，而最高的孢子萌芽率是在 30°C 酵母抽取物之培養基中（見圖四），由此溫度動勢（the kinetics of temperature）推測在孢子萌芽過程中，酵素可能參與反應。

## 七、孢子熱死點試驗

放射毛黴孢子有一高的熱死點，測得為 55°C。

## 八、乙醇蒸氣對孢子萌芽之影響

含乙醇蒸氣 1%，孢子萌芽即受抑制，5% 或

5% 以上則不萌芽（表四），顯然地，乙醇蒸氣對孢子萌芽有毒害作用。

表四：乙醇蒸氣之影響

乙醇蒸氣	萌芽百分率
控制組	80
1%	47.1
5%	0
10%	0

## 九、通氣對孢子萌芽之影響

本實驗結果（表五）顯示大氣中 CO<sub>2</sub> 濃度（對照組）已足夠放射毛黴孢子萌芽之需，若太高或太低濃度對孢子萌芽不利。

表五：通氣之影響

二氧化碳	萌芽百分率
控制組（大氣內之二氧化碳）	52
二氧化碳減少 （以氫氧化鉀 2% 吸收之）	38
二氧化碳增多 （碳酸氫鈉和硫酸作用）	0

## 致 謝

本研究承蒙恩師 簡秋源教授悉心指導與支持，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*. Bull. Inst. Chem. Acad. Sinica. 14:14-23.
3. Cantrell H.F., and W.M. Dowler. 1971. Effects of temperature and pH on growth and composition of *Pythium irregulare*.

- Mycologia. 63:31-37.
4. Allen, P. J. 1955. The role of a self-inhibitor in the Germination of rust uredospores. *Phytopathology*. 45:259-266.
  5. Wolf Frederick A., and Frederick T. Wolf. 1947. *The fungi*. 2:210-235. John Wiley and Sons, Inc. N. Y.
  6. Barnett, H. L., and V. G. Lilly, 1955. The effects of humidity, temperature and carbon dioxide on sporulation of *Choanephore cucurbitarum*. *Mycologia* 47:26-29.
  7. Sussman, A. S., and Halvorson H. O. 1966. Sporestheir domancy and germination. Harper and Row, Rub., Inc., N. Y. 354 pp.
1. SMA ( Synthetic Mucor Agar )
 

Dextrose	40g
Asparagine	2g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5g
$\text{MgSO}_4$	0.25g
Thiamine chloride	0.005g
Agar	15g
Distilled water	1ℓ
  2. 不同成分之培養液
    - (1) Distilled water.
    - (2) Dextrose 5%
    - (3)  $\text{KNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$
    - (4) Dextrose +  $\text{KNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$
    - (5) Dextrose +  $\text{KNO}_3 + \text{MgSO}_4$
    - (6) Dextrose +  $\text{KCl} + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$
    - (7) Dextrose +  $\text{KNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$
- 註: Minerals conc. 1 millimole.

## 附 錄

# Physiological Studies of Spore Germination of *Actinomucor elegans*

Hsiu-Chin Chen

### Abstract

The experiment was that spore germination of *Actinomucor elegans* under different conditions, i.e. temperature, pH, spore concentration, humidity, mineral nutrient combination, nitrogen sources, alcohol vapore,  $\text{CO}_2$ , thermal death-point, The result was that: Optimum conditions for spore germination of *Actinomucor elegans* was at temperature  $30^\circ\text{C}$ , pH 7, and humidity 92%. However spore germination, on percentage basis, was reduced by high spore concentration. The minimal nutrient combination tested which appeared to be reasonably effective for germination consisted of glucose,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Germination was poor in distilled water. Yeast extract was a higher effective stimulant to spore germination in several nitrogen sources tested. Alcohol vapore inhibited germination, and 5% or more of alcohol no spore germination.  $\text{CO}_2$  in atmosphere was optimum, higher or lower concentration has a deleterious effect on germination. The thermal death-point for spore germination was about  $55^\circ\text{C}$ .