

# 放射毛黴——豆腐乳最佳菌種之研究

## 高中教師組生物科第二名

省立基隆海事職校

作者：陳秀琴

### 摘 要

本文發現發放射毛黴( *Actinomucor elegans* ) 爲製豆腐乳之最佳菌種。實驗包括形態、生理及孢子萌芽之生理。

在靜態合成毛黴培養液( *Still Synthetic Mucor Solution* ) 中放射毛黴生長以第 5 天之乾重量最高，孢子形成與發育在快速生長期之末。最宜生長之生理條件爲溫度 30 °C 酸鹼度 7，相對濕度 92 % ( 30 °C 時 )，振盪培養。

更進一步在不同溫度，酸鹼度、濕度、孢子濃度、基本營養物、氮源、乙醇蒸氣、二氧化碳濃度下加以探討孢子萌芽生理，結果顯示放射毛黴孢子萌芽最宜溫度爲 30 °C、酸鹼度 7，相對濕度 92 %，孢子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、硝酸鹽和磷酸二氫鹽三種混合物，數種供試的氮源以酵母抽取物刺激孢子萌芽最有效，乙醇蒸氣 1 % 或 1 % 以上孢子萌芽即受抑制，大氣中的 CO<sub>2</sub> 濃度已足夠孢子萌芽之需，太高或太低濃度反而有害，孢子熱死點測得爲 55 °C。

### 緒 言

豆腐乳( *soybean cheese* ) 是一種大豆蛋白的發酵產品，放射毛黴長在豆腐上，其菌絲所分泌的酵素會使豆腐所含的成分如白蛋白( *albumin* ) 和球蛋白( *globulin* ) 逐步分解成縮氨酸( *peptides* ) 和氨基酸( *amino acid* )。

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，而孢子萌芽爲菌絲生長之起始階段，關係著生長，目前國內外尚無此菌之形態與生理方面研究報告發表，故筆者以此爲題，詳加探討。

## 材料與方法

### 一、菌種來源

#### 1. 乳腐壞之製造：

將壓榨較堅硬的豆腐塊曝曬後分別覆以晒乾的稻稈、五節芒、月桃、香蕉葉、菇婆芋、桑葉、菸葉等，保持室溫，36 小時後豆腐塊表面有菌生長，即乳腐壞。

#### 2. 分離培養：

將乳腐壞上各菌種先用葫蘿蔔培養基（C. A. 附錄一）和玉蜀黍培養基（C. M. A. 附錄二）培養 2 天後，作初步鏡檢而分離之，如爲毛黴菌類，用合成毛黴培養基（S. M. A. 附錄三），若爲不完全菌類，則移至謝培克氏培養基（附錄四）培養。

#### 3. 選最佳乳腐菌種：

(1) 豆腐小方塊首先浸漬於酸性食鹽溶液（Acidic Saline Solution 附錄七）1 小時後，排列於不銹鋼網上，置於熱風溫箱（100 °C）15 分鐘。

(2) 以濾紙培養基法，放濾紙於培養皿中，高壓滅菌後，倒入滅過菌之改良的謝培克氏培養液（Modified Czapek 'os Solution，附錄八）分別接種上述之純粹菌種，置於 30 °C 溫箱培養 36 小時。

(3) 將(1)之豆腐塊分別沾過長滿上述菌種之濾紙上，則孢子能附在豆腐表面，置於 30 °C 溫箱，24 小時後觀察各種菌在豆腐上生長之顏色和習性。

### 二、放射毛黴生長之生理條件試驗

#### 1. 溫度對生長之影響：

將放射毛黴接種於合成毛黴培養基，置於 30 °C 溫箱 2 天，以滅菌之黃銅鑽孔器鑽直徑 0.7 公分，高度 0.2 公分之小圓盤（disk），將此長滿菌絲之小圓盤翻轉於合成毛黴培養基中央，分別置於 6 °C，12 °C，20 °C，25 °C，30 °C，35 °C，40 °C 溫箱，每溫度

均放 3 皿，48 小時測菌落直徑大小。

## 2. 酸鹼度對生長之影響：

將放射毛黴孢子液（ $6 \times 10^2$  孢子/ml）接種於 25ml 合成毛黴培養液，酸鹼度分別為 3.5，4.5，5.5，6，6.5，7，8，9，每組 2 瓶，置於振盪器（Shaker）上，每分鐘 75 次振動，溫度為 25 °C，第 4 天後，將各組以濾過紙過濾，置於 50 °C 溫箱 14 小時，稱其乾重量。

## 3. 相對濕度對生長之影響：

將豆腐小塊沾過長滿放射毛黴之濾紙，然後把豆腐小塊放在 250 ml 的倒立燒杯上，而將此燒杯置於盛有 100ml 之鹽類飽和溶液的 1ℓ.，燒杯內，再以 4 層塑膠紙密封，作成① 4 個濕度器，各放  $\text{KNO}_3$ ， $\text{NH}_4\text{Cl}$ ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  的飽和鹽溶液，置於恒溫水浴（thermostat），保持 30 °C，27 小時後觀察。② 5 個濕度器，各放  $\text{NaNO}_2$ ， $\text{KNO}_3$ ， $\text{NaCl}$ ， $\text{ZnSO}_4$ ， $\text{CaSO}_4$  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之濕度：

鹽溶液	溫度 ( C )	濕度 ( % )
$\text{NaNO}_2$	20	66
$\text{KNO}_3$	20	72.6
$\text{NaCl}$	20	75
$\text{ZnSO}_4$	20	90
$\text{CaSO}_4$	20	98
$\text{KNO}_3$	30	68.6
$\text{NH}_4\text{Cl}$	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

## 4. 氧對生長之影響：

以放射毛黴的孢子液（ $4 \times 10^3$  孢子/ml），接種於合成毛黴培養液中，分 3 組，一組為振盪培養，一組為靜止培養，另一組以石

臘封口。

### 三、放射毛黴孢子萌芽之生理試驗

#### 1. 孢子濃度對孢子萌芽之影響：

作成合成毛黴培養液之放射毛黴孢子液，分5組，即①控制組：1330 孢子/ml ②稀釋2倍③稀釋5倍④稀釋10倍⑤稀釋20倍，置於20°C，16小時後計算各組萌芽率（以5個視野平均）

#### 2. 溫度對孢子萌芽之影響：

將放射毛黴孢子液（ $5 \times 10^3$  孢子/ml）接種於合成毛黴培養基中（PH6.85），分別置於6°C，12°C，25°C，30°C，35°C，40°C，45°C，溫箱，2.5小時後計算萌芽率（7個視野平均）

#### 3. 酸鹼度對孢子萌芽之影響：

將放射毛黴孢子液（ $2 \times 10^3$  孢子/ml）接種於酸鹼度分別為2，3，4，5，6，7，8，9，10的合成毛黴培養基，置於30°C溫箱，3小時後計算孢子萌芽率。

#### 4. 相對濕度對孢子萌芽之影響：

在30°C恒溫水浴中，以4種鹽飽和溶液即 $KNO_3$ ， $NH_4Cl$ ， $(NH_4)_2SO_4$ ， $NH_4H_2PO_4$  作成4個濕度器，以懸滴技術將含合成毛黴培養液之放射毛黴孢子液（ $4.8 \times 10^2$  孢子/ml）滴於蓋玻片上，而翻轉於凡蒂漢濕室（Van Tieghem Cells）之上，放在4個濕度器內，3小時後計算孢子萌芽率。

#### 5. 孢子萌芽之營養需要：

如上法，將不同成份培養液（附錄六）中之放射毛黴孢子液（ $6.8 \times 10^2$  孢子/ml）1滴作懸滴技術培養，置於30°C溫箱，4小時後計算孢子萌芽率。

#### 6. 氮源和溫度對孢子萌芽之影響。

將放射毛黴孢子液（ $6.3 \times 10^2$  孢子/ml）各接種於葡萄糖（10g/l），丙氨酸（L-alanine）（2g/l），酵母提取物（yeast extract）（2g/l）葡萄糖加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 , 3 小時後計算萌芽率。

#### 7. 孢子熱死點試驗：

將含合成毛黴培養液之放射毛黴孢子液 (  $2 \times 10^3$  孢子 / ml ) 分別置於 30 °C , 40 °C , 45 °C , 50 °C , 55 °C , 60 °C 恒溫水浴 10 分鐘後，移入 30 °C 溫箱培養，2 和 12 小時後觀察。

#### 8. 乙醇蒸氣對孢子萌芽之影響：

將上述孢子液懸滴培養於乙醇 1 % , 5 % , 10 % , 無菌水各 40 ml 燒杯中，各置於乾燥器內，2.5 小時後計算萌芽率。

#### 9. 通氣對孢子萌芽之影響：

將上述孢子液培養於對照組，二氧化碳減少 ( 放 40ml , 2 % 氫氧化鉀溶液 ) ，二氧化碳增加 ( 放 40ml , 碳酸鈉與硫酸溶液 ) 3 具乾燥容器內，2.5 小時後計算萌芽率。

## 結 果

由乳腐坯上之菌種分離、培養、鑑定後，獲得九種菌種，即 Actinomucor elegans 、 Aspergillus clavatus 、 Aspergillus flavus 、 Aspergillus oryzae 、 Choanephora cucurbitarum 、 Cunninghamella elegans 、 Mucor hiemalis 、 Mucor mucedo 、 Rhizopus stolonifer ，觀察上述九種菌種其菌絲在豆腐小塊上生長情形，發現放射毛黴之菌絲白色、長、細密且堅牢，製出之豆腐乳味道香醇，質地細膩，故選放射毛黴 ( Actinomucor elegans ) 為製豆乳腐最佳菌種。

### 一、放射毛黴之形態觀察

放射毛黴 ( Actinomucor elegans ) 是毛黴科 ( Mucoraceae ) 之一屬，屬低等菌的藻狀菌類。在合成毛黴培養基中，菌絲白色，有葡萄莖和假根，孢子囊柄由氣生菌絲產生，典型、分枝，有隔板，一般在末端有小的孢子囊，下方附近著生一輪短枝的孢子囊，孢子囊圓形，含無數孢子，無隆起，囊壁不平滑，孢子囊直徑約  $54\mu$  ，壁成熟

後破裂。孢子透明，壁無紋路，二層壁，圓形，約  $9 \sim 12\mu$ 。結合孢子未被發現。若環境不良或液體培養基缺氧或  $\text{CO}_2$  堆積太多，則有厚膜孢子形成。中軸圓形。放射毛黴群落如棉絮，因培養基不同，氣生菌絲也異。快速生長期時菌絲白色，老化後，轉為灰色。

## 二、放射毛黴之生長曲線

在靜態的合成毛黴培養液中，以菌絲乾燥量計算，則放射毛黴生長速率，第 4 天前為遲滯期，第 4 天第 5 天為快速生長期，第 5 天到達第一個生長高峯，第 5 天後乾重量減少，第 11 天出現第二個高峯。第 5 天孢子數為  $2.5 \times 10^2$  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。

## 三、放射毛黴生長的生理試驗

### 1 溫度對生長的影響：

溫度影響放射毛黴生長甚鉅， $6^\circ\text{C}$  時初期不長，二星期後，生長良好， $45^\circ\text{C}$  或  $45^\circ\text{C}$  以上則不生長。

### 2 酸鹼度對生長之影響

$\text{PH}3.5 \sim 9$  均生長良好，但以  $\text{pH}7$  最適宜振盪培養之酸鹼度變化較靜止培養為大而振盪培養所得菌絲乾重量是靜止培養的 2 倍以上。

### 3 濕度對生長的影響：

在溫度  $30^\circ\text{C}$ ，相對濕度  $68.6\% \sim 92.9\%$  下，27 小時後均生長良好，而同時培養的在  $20^\circ\text{C}$ ，濕度  $66\% \sim 98\%$  下均未生長，直到 31 小時後，濕度  $72.6 \sim 98\%$  生長良好，濕度  $66\%$  不良，故所需之濕度似受溫度左右，也即  $30^\circ\text{C}$  時，濕度  $92.9\%$  最適宜，而  $20^\circ\text{C}$  時，濕度  $98\%$  最適宜。

### 4 氧對生長之影響

振盪培養增加氧供量，則放射毛黴在振盪培養所得乾重量為靜止培養 2 倍以上，若一組瓶口封石臘，另一組塞以棉塞，則兩組在 4 天中，乾重量沒顯著差別，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。

#### 四、放射毛黴孢子萌芽之生理條件試驗：

放射毛黴孢子之萌芽為孢子腫大(11 $\mu$ →15 $\mu$ )而後伸出萌芽管。

1. 孢子濃度對孢子萌芽之影響：

孢子濃度愈高，則萌芽率愈低。

2. 溫度對孢子萌芽之影響：

孢子萌芽發生在 6 °C ~ 40 °C ，最宜溫度為 30 °C ， 45 °C 或 45 °C 以上則不萌芽。

3. 相對濕度對孢子萌芽之影響：

濕度愈大，孢子萌芽率愈高。

4. 酸鹼度對孢子萌芽之影響：

最宜之 pH 為 7 ，而 pH3 時孢子不萌芽， pH2 時不但不萌芽，且有萎縮現象。 pH10 時，尚有少數孢子萌芽。

5. 放射毛黴孢子萌芽之營養需要：

由表二結果顯示萌芽率要到達最高則需碳，氮源和碳物質。

6. 氮源和溫度對萌芽之影響：

在供試的四種代謝物中在 5 °C ， 10 °C ， 45 °C 下， 4.5 小時後孢子均不萌芽，而最高萌芽率是在 30 °C ，酵母抽取物之培養基中。

7. 孢子熱死點試驗：

測得為 55 °C 。

8. 乙醇蒸氣對萌芽之影響：

含乙醇蒸氣 1 % ，孢子萌芽即受抑制， 5 % 或 5 % 以上則不萌芽。

9. 通氣對萌芽之影響：

表四結果顯示大氣中 CO<sub>2</sub> 濃度已足夠萌芽之需，太高或太低濃度反而不利。

討論與結論：

放射毛黴在靜止液態培養時，第7天至第9天乾重量減少可能是自體分解之故，第9天至第11天乾重量增加可能是利用次期代謝產物。

生長停止可能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pH有關，很顯然地，pH變化愈大，供給菌的生長愈好。

孢子濃度愈高，則萌芽率愈低，這可能是有限營養之競爭或孢子本身產生抑制物質之故。

放射毛黴孢子在蒸餾水中仍有低的萌芽率，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所致。若將孢子液離心（5000r.p.m. 2分鐘）以洗淨之，則在蒸餾水中不萌芽。

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葡萄糖氧化供給能。

由氮源與溫度之動勢（dynamics）推測在孢子萌芽過程中，酵素參與反應。

## 應 用

本文可供食品工業、釀造、發酵及真菌生理學參考之用。

## 五、參考文獻

1 Allen, P. J. 1955. The role of a self-inhibitor in the germination of rust uredospores *Phytopathology*. 45 : 259-266。

2 Barnett, H. L. , and V. G. Lilly. 1955. The effects of humidity, temperature and carbon dioxide on sporulation of Choanephora cucurbitarum. *Mycologia* 47 : 26-29。

3. Brown, w. 1922. On the germination and growth of fungi at various concentrations of oxygen and carbon dioxide *Ann. Botany*. 36 : 257-283.



4. Cantrell H. F. and W. M. Dowler, 1971 Effects of temperature and pH on growth and composition of Pythium irregulare. *Mycologia*. 63 : 31-37 ◦
5. Chang Shun-ming 1966. A preliminary survey on proteolytic enzymes of Actinomucor elegans. *Bull. Inst. Chem Acad. Sinica*. 12 : 13-24 ◦
6. Chang Shun-ming 1967. Studies on extracellular peptidases of Actinomucor elegans *Ibid*, 14 : 14-23 ◦
7. Ellis, J. J. , G. A. Bennett, and C. W. Hesseltine, 1973. utilization of carbon, *Mycologia* 65 : 539-547 ◦
8. Fletcher J. , and Morton A. G. 1970. physiology of germination of Penicillium griseofulvum conidia. *Trans Br. Mycol. Soc.* 54 : 65-81 ◦
9. Goldstein A. L. , and K. Erd. 1972. Some effects of nitrogen sources, vitamins, and temperatures on the swelling phase of Dimargaris verticillata spore germination *Mycologia* 64 : 1118-1123 ◦
10. Judd, Jr. R. W. and J.L. Peterson, 1972. Temperature and humidity requirements for the germination of Cercospora oenophora spores. *Mycologia* 64 : 1253-1257 ◦
11. Lilly, V.G. and H.L. Barnett. 1951. physiology of the fung. Inc. N.Y. Toronto, London, 463pp ◦
12. Schein, R.D. , and J. Rotem. 1956. Temperature and humidity effects on uredospore variability *Mycologia* 57 : 397-398 ◦
13. Sussman, A.S. and Halvorson H.O. 1966. Spores-their dormancy and germination. Harper and Row, Pub. Inc., N. Y. 354.pp ◦
14. Tansey, Michael R. 1972. Effect of Temperature on growth rate and development of the thermophilic fungus

Chaetomium thermophile. Mycologia. 64 : 1290-1297 .

附錄：

一 C. A Medium

Whole Carrot	200g
Agar	15g
Distilled water	1 liter

二 C. M. A. Medium

Corn meal	40g
Agar	15g
Distilled water	1 liter

三 S. M. A Medium

Dextrose	40 g
Asparagine	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub>	0.25 g
Thamine chloride	0.005g
Agar	15 g
Distilled water	1 liter

四 Czapek's Agar

NaNO <sub>3</sub>	3.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Sucrose	30.0 g
Agar	15 g
Distilled water	1 liter

五 P. D. A. Medium

Peeled, sliced potatoes	200 g
-------------------------	-------

Dextrose	20g
Agar	15g
Distillod water	1 Iiter

## 六、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 +  $\text{KNO}_3 + \text{KCl} + \text{MgSO}_4$
6. Dextrose +  $\text{KCl} + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$
7. Dextrose +  $\text{KNO}_3 + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4$

Minerals conc. 1.0 Millimole

## 七、酸性食鹽溶液

NaCl	6 g
Citric acid	2.5 g
Distilled water	100 ml

## 八、改良的謝培克氏培養基

Sucrose	30 g
$\text{NaNO}_3$	3 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g
KCl	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01g
Potato	50 g
Sodium glutamate	2 g
Distilled water	1 liter

- 評語：1. 由多種菌種中選出製造豆腐乳之優良菌種，並研究其生理及形態，兼具學術及實用價值。
2. 展示之文件中並沒有比較多種菌種之原始比較資料，故標題最好不要用“最佳”兩字，宜改為“製作豆腐乳之菌種——放射毛黴之形態及生理研究”。
3. 圖文優美，引用文獻書寫正確，現場說明也精簡適當。