

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

利用 *Galactomyces geotrichum* 改善諾麗果汁風味並探討

發酵產生苯乙醇之最適培養基

Improvement of noni juice odor by *Galactomyces*

geotrichum and optimization of media for

2-phenylethanol fermentation

林琮為

Tsung-Wei Lin

指導教授：李根永 博士

Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.

中華民國一百零四年六月

June, 2015

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 林琮為 君所提之論文

利用 *Galactomyces geotrichum* 改善諾麗果汁風味並探討發醇產生苯乙醇之最適培養基

Improvement of noni juice odor by *Galactomyces geotrichum* and optimization of media for 2-phenylethanol fermentation

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任

李松永

指導教授

李松永

中華民國一百零四年六月十八日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 林琮為 君所提之論文
利用 *Galactomyces geotrichum* 改善諾麗果汁風味並探討
發酵產生苯乙醇之最適培養基

Improvement of noni juice odor by *Galactomyces*
geotrichum and optimization of media for 2-phenylethanol
fermentation

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

陳祥麟 國立澎湖科技大學食品科學系教授

胡紹揚 國立屏東科技大學生物科技系助理教授

指導教授：李松永

中華民國一百零四年六月十八日

謝誌

感謝恩師 李根永 博士在學期間於實驗及課業上給予指導，不僅在實驗中提供充分見解與啟發，遇到實驗瓶頸時給予適時指導，並且於生活處事態度上得到許多啟示，使學生獲益良多，論文撰稿期間詳加審閱與斧正，使論文得以順利完成，在此致上最深謝意。

文稿初成，承蒙澎湖科技大學 陳樺翰 博士與屏東科技大學 胡紹揚 博士撥冗審閱，並於口試期間惠賜學生寶貴意見，使得論文更臻周嚴，在此表達最誠摯敬意與謝意。在研究期間尤其感謝 蔡正宗 博士於原料上提供及指導勉勵，於此致上由衷感謝。

感謝系上老師們的指導與照顧，感謝實驗室學長姐怡吩、昱仁、哲暉、佩萱、一立與賢康在實驗上教導與鼓勵以及感謝學弟妹慕義、睿安與俞均的幫忙，感謝在學期間同學及學弟妹們互相扶持與照顧，由於你們的關係為我研究生活中增添大量歡笑，於此一併感謝。

最後感謝我敬愛的爸爸、媽媽、弟弟與女友，謝謝你們全力的支持與鼓勵，並無時無刻給我關懷與包容，讓我得以順利完成學業，謹將此論文獻給我的家人，願與你們一同分享喜悅。

林琮為 謹致於

東海大學食品科學系碩士班

應用生物化學研究室

中華民國一百零四年六月

目錄

摘要.....	IV
Abstract	V
壹、前言.....	- 1 -
貳、文獻回顧.....	- 1 -
一、 <i>Galactomyces geotrichum</i> 基本性質	- 2 -
(一)菌株分離	- 2 -
(二)菌相形態	- 4 -
(三)營養源利用	- 5 -
(四)培養條件	- 5 -
二、 <i>Galactomyces geotrichum</i> 分類	- 8 -
三、 <i>Galactomyces geotrichum</i> 香氣代謝物	- 12 -
四、利用 <i>Galactomyces geotrichum</i> 改善諾麗果汁氣味	- 16 -
(一)諾麗果風味物質	- 16 -
(二)諾麗果氣味改善	- 17 -
參、材料與方法.....	- 22 -
一、實驗材料	- 22 -
二、實驗方法	- 24 -
三、改善發酵苯乙醇之培養基組成分探討	- 30 -
肆、結果與討論.....	- 39 -
一、菌株篩選	- 39 -
二、諾麗果氣味改善	- 48 -
三、改善發酵苯乙醇產量的培養基組成分	- 57 -
伍、結論.....	- 74 -
陸、參考文獻.....	- 75 -
柒、附錄.....	- 80 -

圖索引

圖一、 <i>Galactomyces geotrichum</i> 菌絲及子囊孢子.....	6 -
圖二、 <i>Galactomyces</i> 親緣性關係.....	11 -
圖三、苯丙胺酸透過 Ehrlich pathway 生成苯乙醇.....	15 -
圖四、諾麗果中重要酚類化合物.....	19 -
圖五、 <i>Gal.geotrichum</i> 菌株之苯乙醇產量.....	41 -
圖六、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 菌落外觀.....	44 -
圖七、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 之菌體形態.....	45 -
圖八、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 生長曲線及苯乙醇產量.....	47 -
圖九、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 在諾麗果汁中馴化程度.....	50 -
圖十、25%諾麗小果汁經 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 發酵前後之成分變化.....	51 -
圖十一、25%諾麗大果汁經 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 發酵前後之成分變化.-	52 -
圖十二、培養基成分 Plackett-Burman 試驗設計之效應強度分析.....	60 -
圖十三、培養基成分對 2^2 全因子試驗之分析.....	64 -
圖十四、培養基成分對修飾 2^2 全因子試驗之分析.....	66 -
圖十五、培養基成分對修飾 2^2 全因子試驗之分析.....	68 -

表索引

表一、 <i>Galactomyces geotrichum</i> 營養需求.....	7 -
表二、 <i>Galactomyces</i> 及 <i>Geotrichum</i> 分類之前後修改.....	10 -
表三、 <i>Gal.geotrichum</i> 揮發性香氣成分鑑定.....	14 -
表四、成熟諾麗果揮發性化合物之鑑定.....	20 -
表五、Plackett-Burman 試驗設計.....	33 -
表六、 2^2 全因子試驗設計.....	34 -
表七、修飾 2^2 全因子試驗設計.....	35 -
表八、修飾 2^2 全因子試驗設計.....	36 -
表九、NaCl 單因子.....	37 -
表十、Tryptone 單因子.....	38 -
表十一、諾麗果汁耐性菌株篩選.....	42 -
表十二、諾麗果汁成分比較.....	49 -
表十三、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 於小果汁馴化及風味改善.....	55 -
表十四、 <i>Gal.geotrichum</i> w-5 於大果汁馴化及風味改善.....	56 -
表十五、培養基組成分之 Plackett-Burman 試驗設計.....	59 -
表十六、培養基組成之 2^2 全因子試驗設計.....	63 -
表十七、培養基組成之修飾 2^2 全因子試驗設計.....	65 -
表十八、培養基組成之修飾 2^2 全因子試驗設計.....	67 -
表十九、NaCl 單因子實驗結果.....	70 -
表二十、Tryptone 單因子實驗結果.....	71 -
表二十一、PDB 修飾前後苯乙醇產量比較.....	73 -

摘要

本研究利用能產生香氣的 *Galactomyces geotrichum* 改善諾麗果汁的風味，並嘗試修飾培養基成份以提高發酵苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)香氣之產量。依據對諾麗果汁耐性強度以及苯乙醇產量篩選適用菌株，結果獲得 *Gal. geotrichum* w-5。此菌株經馴化後可生長於 32.5%小諾麗果汁及 40%大諾麗果汁中，並能降解約 30%丁酸以及 95%以上二甲基丁酸含量，顯著的減少了諾麗果汁的不良氣味，而在發酵後的果汁中均可測得 2-PE 之香氣成分。在修飾培養基部分，利用 Plackett-Burman 試驗設計探討苯甲酸、蔗糖、白菜汁、NaCl、Peptone、Tryptone 及 Tyrosin 等七個因子，對 2-PE 生產之影響。結果得知關鍵因子有 Tryptone 及 NaCl。接著以此二因子進行全因子試驗設計探討各因子主效應，結果 NaCl 對 2-PE 生產效果不顯著，因此後續僅探討 Tryptone 及 NaCl 之單因子最佳濃度。結果顯示於 PDB 中添加 2.25% Tryptone 及 1.0% NaCl 之修飾培養基經由此菌培養後 2-PE 含量為 $33.23 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ 相較於傳統 PDB 培養基增加 21.26 倍。綜合上述 *Gal. geotrichum* w-5 可有效改善諾麗果汁風味且經由修飾 PDB 可增加 2-PE 產量，未來或可添加適當的氮源以提高發酵諾麗果汁的香氣。

Abstract

The objective of this research is to improve the odor of noni juice by *Galactomyces geotrichum* fermentation, and to increase the 2-phenylethanol (2-PE) production by modifying fermentation media. A *Gal. geotrichum* w-5 strain was selected according to noni juice tolerance and 2-PE productivity. This strain can tolerate 32.5% small noni fruit juice and 40% large noni fruit juice, and was able to degrade 30% butyric acid and 95% 2-methylbutyric acid. The unpleasant scent of fermented noni juice was significantly reduced and the 2-PE was detected in fermented noni juice. Improvement of 2-PE fermentation, a Plackett-Burman experimental design of seven factors was used to decide the main ingredients for 2-PE production. The result revealed tryptone and NaCl was significant effective ingredients. Then, a 2² full factorial experimental design for assessment of ingredients effects, the data showed that NaCl was not a significant ingredient for 2-PE production. Furthermore, optimal concentrations of tryptone and NaCl were determined as 2.25% tryptone and 1.0% NaCl, respectively. The production of 2-PE was 33.23 ± 0.14 µg/mL, approximately 21.26 folds higher than that in conventional Potato Dextrose Broth. The medium study has showed that to augment the aroma of fermented noni juice by adding more nitrogenous source is feasible.

壹、前言

諾麗果 (*Morinda citrifolia* L.) 一般俗稱為 Noni，許多研究指出具有抗菌性、抗癌、抗發炎、抗氧化、止痛及預防心血管疾病等功效性，其機能性成分主要為酚類化合物、有機酸以及生物鹼，因此諾麗果具有保健功效之食品，但是果實成熟後具有強烈刺鼻氣味，其不良氣味主要為丁酸類之有機酸，使得諾麗果被接受的程度大幅下降，因此改善其氣味成為重要課題。近年來許多減少其氣味之方法，如添加其他果汁稀釋、減壓濃縮、添加乙醇或氫氧化鈣等，但容易造成機能性成分減少。

本研究室經由泡菜中分離得一株 *Galactomyces geotrichum* 具有耐酸及產生香氣之特性，經由初步研究發現此菌可消除諾麗果汁中不良氣味。本研究主要進行兩部分探討，首先利用此菌降解諾麗果汁中丁酸類不良氣味以及產生香氣進而改善其氣味，諾麗果汁中含有許多抑菌物質此菌不易生長，因此需要以馴化方式逐漸提高果汁耐受濃度。其次則利用修飾培養基方式提高此菌生產香氣之能力。期望可利用此菌改善諾麗果汁風味與發酵生產香氣物質之參考依據。

貳、 文獻回顧

一、 *Galactomyces geotrichum* 基本性質

(一) 菌株分離

Gal. geotrichum 為耐酸，酵母樣 (yeast-like) 之小型絲狀真菌。在許多土壤、發酵食品、乳製品及植物組織中容易分離到此菌。

在 2007 年 Yan 等人由中國四川當地油汙土壤中分離到此菌，具有生產 lipase 活性之菌株；2013 年 Zhang 等人由中國蘭州當地正己醇加工廠附近土壤中以 Potato Dextrose agar (PDA) 進行分離純化得兩株真菌，並利用聚合酶連鎖反應法 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 擴增 26S rDNA 基因序列，經由定序後以 GenBank 進行比對，其中一株鑑定為 *Gal. geotrichum* 相似度為 100% 並且具有降解己醇之活性。

另外在 2005 年時 Lacerda 等人檢測巴西當地兩種 Sour cassava starch 發酵食品以 Yeast extract-Malt extract (YM) 培養基分離出 16 株真菌，並利用 PCR 擴增 D1/D2 基因序列，經由定序後以 GenBank 進行比對，其中兩株鑑定為 *Gal. geotrichum* 並且為此發酵食品中優勢菌種；而 Osorio-Cadavid 等人 (2008) 分析哥倫比亞當地玉米發酵飲品 (Champús)

中酵母菌多樣性，以 YPD 培養基進行分離共得 235 株酵母菌，進一步以 PCR 擴增 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 基因序列經由定序後鑑定出 9 株 *Gal. geotrichum*。

而 Chebenova-Turcovska 等人在 2011 年時於斯洛伐克鑑定當地 Bryndza cheese 利用 PCR 擴增核糖體 DNA 中 ITS (Internal Transcribed Spacer) 序列，並鑑定出 *Gal. geotrichum* 且認為此菌在起司中提供蛋白水解活性與賦予特殊風味之能力；另外 Majcher 等人 (2014) 由波蘭當地 Fried cottage cheese 中利用 PCR 擴增核糖體 DNA 中 ITS 序列，鑑定出 *Gal. geotrichum*，並且發現此菌具有生產 2-PE 之玫瑰花香氣能力。

2004 年 Giannoutsou 等人於 *alpeorujo*(橄欖榨油後果渣) 分離出此菌，具有生產脂解酶之活性；另外 Baffi 等人(2012) 分析西班牙當地橄欖加工過程中真菌多樣性，經由 PDA 分離出 53 株真菌並利用 PCR 擴增 ITS 序列，定序後經由 GenBank 比對鑑定出 5 株 *Gal. geotrichum* 相似度高於 98% 其分布於果泥 (1 株) 及果渣 (4 株)，具有 β -glucosidase、carboxymethylcellulase、polygalacturonase 與 lipase 等酵素活性。而 2012 年陳由市售泡菜中以 YPD 培養基純化分離後得

兩株類似酵母菌之優勢菌，並以 PCR 擴增 5.8S rDNA 片段，經由定序後以 BLAST 系統比對並判斷其中一株為 *Gal. geotrichum* 且相似度超過 98%，並觀察到此菌具有產生香氣之能力。

(二) 菌相形態

此菌培養於 4% 麥芽萃取物及 0.5% 酵母萃取物之平板培養基上，在 20 - 22°C 培養 10 天後菌落直徑約為 50 - 80 mm，菌落呈現白色粉狀、乾燥且帶有細毛，並且會產生水果味之香氣 (Redhead and Malloch 1977)。於顯微鏡下觀察 (如圖一) 菌絲呈現透明具有分支而無隔膜，主支寬度約 7 - 12 μm ；分支寬度約 2.5 - 4 μm ，頂端會斷裂成單個或長鏈的節孢子 (Arthroconidia)，節孢子呈現長方形也有圓形及橢圓形其大小約為 5 - 6 \times 5 - 17 μm 。

在生長過程中此菌會有兩種生長型態，分為有性型態及無性型態。有性型態為菌絲交配後形成一個橫向配子囊 (Gametangia)，而配子囊會在頂點或兩側生長出一個子囊孢子 (Ascospores)，子囊孢子呈現橢圓形狀其大小約為 6 - 9 \times 7 - 10 μm ，子囊孢子形成的時間大約為 7 天以上；無性型態則是菌絲生長後於側枝的頂端斷裂成大量的節孢子 (de

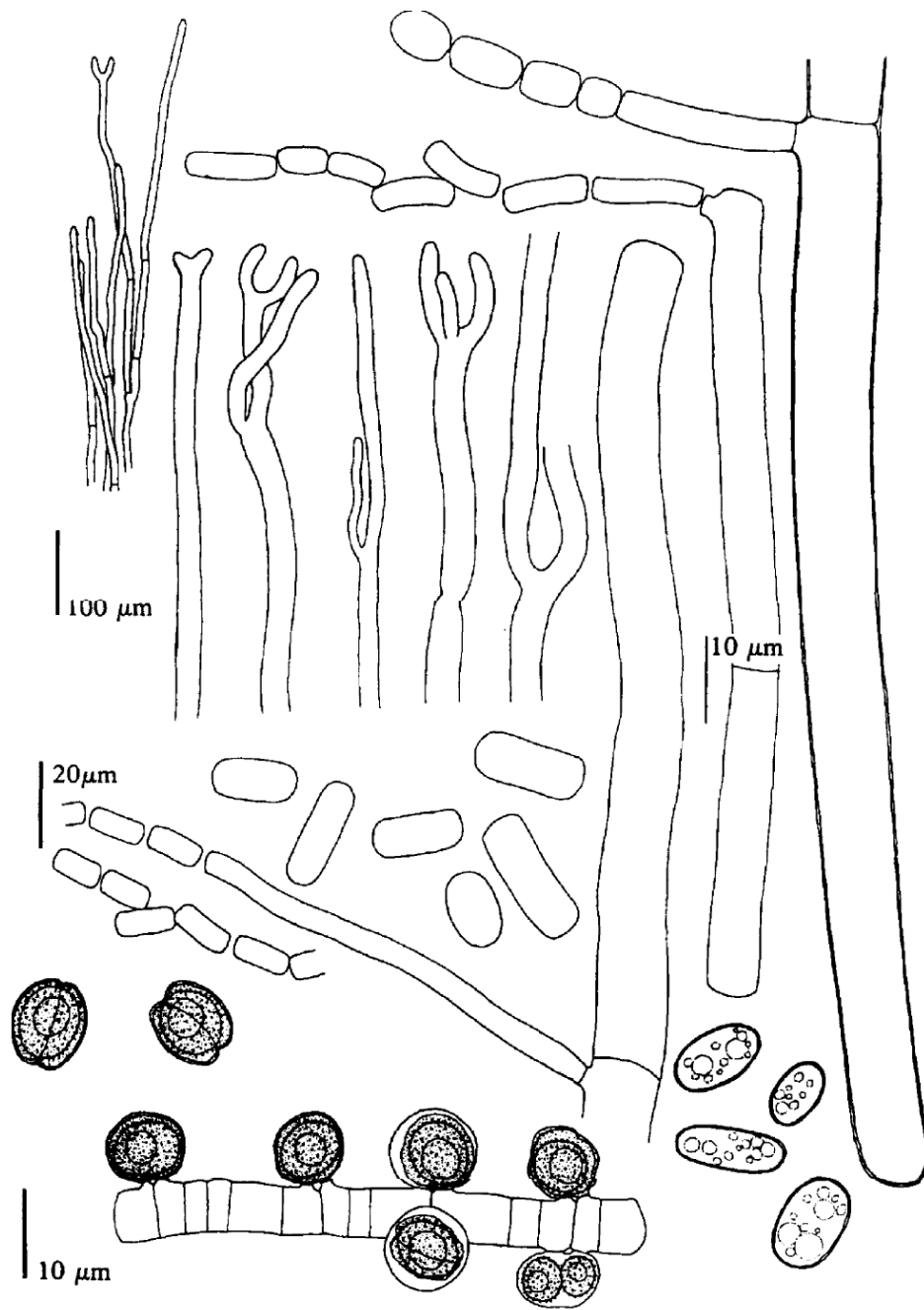
Hoog and Smith, 2011)。

(三)營養源利用

在碳水化合物利用上（如表一）*Gal. geotrichum* 可利用葡萄糖、半乳糖、山梨糖及木糖，醇類的部分則可利用酒精、甘油、甘露醇及山梨醇，可利用乳酸、琥珀酸及檸檬酸等有機酸並且在生長時 *Gal. geotrichum* 不需利用維生素作為營養源 (de Hoog and Smith, 2011)。

(四)培養條件

在培養條件方面 *Gal. geotrichum* 於 YPD 液態培養基中培養其生長溫度範圍約在 5 - 40°C，最適生長溫度為 30°C，40°C 以上則完全無法生長，因此可判斷此菌為冷營菌 (Psychrotroph)。而可生長 pH 值範圍約在 3 - 10 而最適生長 pH 值為 7 - 8。耐鹽性範圍 2 - 7% 皆可生長而 8% 微量生長 9% 及 10% 則完全無法生長 (陳，2012)。



圖一、*Galactomyces geotrichum* 菌絲及子囊孢子

Fig.1 *Galactomyces geotrichum* of fertile hyphae and ascospores
(de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

表一、*Galactomyces geotrichum* 營養需求

Tabel 1. *Galactomyces geotrichum* growth conditions

Growth (in Liquid Media)			
Glucose	+	D-Ribose	-
Inulin	-	Methanol	-
Sucrose	-	Ethanol	+
Raffinose	-	Glycerol	+
Melibiose	-	Erythritol	-
Galactose	+	Ribitol	-
Lactose	-	Galactitol	-
Trehalose	-	D-Mannitol	+/w
Maltose	-	D-Glucitol	-
Melezitose	-	<i>myo</i> -Inositol	+
Methyl- α -D-glucoside	-	DL-Lactate	v
Soluble starch	-	Succinate	-
Cellobiose	-	Citrate	v
Salicin	-	D-Gluconate	-
L-Sorbose	+	D-Glucosamine	-
L-Rhamnose	-	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	n
D-Xylose	+	Hexadecane	n
L-Arabinose	-	Nitrate	-
D-Arabinose	-	Vitamin-free	+

(de Hoog and Smith, 2011)

二、*Galactomyces geotrichum* 分類

在科學分類上屬於 Fungi 真菌界，Ascomycota 子囊菌門，Saccharomycetes 半子囊菌綱，Saccharomycetales 酵母目，Dipodascaceae 雙足囊科，*Galactomyces* 屬。在 1972 年 Butler 與 Petersen 認為 *Gal.geotrichum* 為 *Geotrichum candidum* 有性型態。然而，在 1995 年，Smith 等人利用 DNA/DNA 重組技術，測定 41 株 *Galactomyces* 菌屬之 DNA 中 G+C 含量。根據 DNA 相似度將其分為四組，分別為狹義 *Gal.geotrichum*、*Gal.geotrichum* A 組、*Gal.geotrichum* B 組及 *Gal.geotrichum* C 組，但是在無性型態上面仍認為是 *Geo. candidum*，在廣義上將這些稱之為 *Gal.geotrichum* 複合體 (*Gal.geotrichum* complex) 以及兩個亞種 *Galactomyces citri-aurantii* 與 *Galactomyces reessii*。近年來，隨著分子生物科技的技術進步，在 2004 年，de Hoog 與 Smith 等人利用 PCR 擴增核糖體 DNA 中 ITS 序列鑑定 *Gal.geotrichum* complex 物種，鑑定後結果將此複合體分成四種獨立之個體 (如表二)。原來狹義之 *Gal.geotrichum* 經分類後有性型態為 *Gal.geotrichum* 而無性型態則為未知 *Geotrichum* 物種；而原來 *Gal.geotrichum* A 組經由分類後有性型態為 *Galactomyces candidus* 而無性型態為 *Geo. candidum*，因此 *Gal.geotrichum* 與

Geo. candidum 成為各獨立菌種。*Gal.geotrichum* B 組則重新命名為 *Galactomyces pseudocandidus* sp. nov. 無性型態為 *Geotrichum pseudocandidum*。在 C 組部分有性型態為未知菌種而無性型態為 *Geotrichum europaeum* sp. nov.。而此分類將有性型態分為 *Galactomyces* 屬，無性型態為 *Geotrichum* 屬 (Pottier *et al.*, 2008)。

圖二為 *Galactomyces* 屬與其無性型態 *Geotrichum* 屬之間親源性關係樹狀圖。

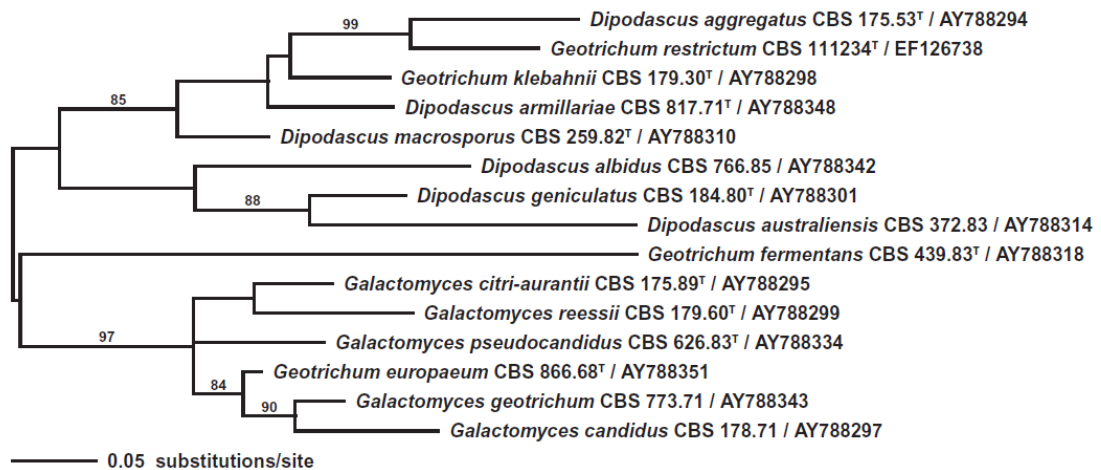


表二、*Galactomyces* 及 *Geotrichum* 分類之前後修改

Table 2. *Galactomyces* and *Geotrichum* before and after taxonomic revision.

Before December 2004		Since December 2004	
<i>Galactomyces geotrichum</i> complex		Four separate species	
Teleomorphic state	Anamorphic state	Teleomorphic state	Anamorphic state
<i>Gal. geotrichum</i> sensu stricto	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Gal. geotrichum</i>	Unnamed <i>Geotrichum</i> species
<i>Gal. geotrichum</i> group A	<i>Geo. candidum</i>	<i>Galactomyces candidus</i>	<i>Geo. candidum</i>
<i>Gal. geotrichum</i> group B	<i>Geo. candidum</i>	<i>Galactomyces pseudocandidus</i> sp. nov.	<i>Geotrichum pseudocandidum</i>
<i>Gal. geotrichum</i> group C	<i>Geo. candidum</i>	Unknown	<i>Geotrichum europaeum</i> sp. nov.

(Pottier *et al.*, 2008)



(Stamatakis *et al.*, 2008)

圖二、*Galactomyces* 親緣性關係

Fig 2. Phylogenetic tree showing the relationship of species of *Galactomyces* and its anamorph genus *Geotrichum* to related taxa as determined from maximum likelihood analysis of ITS sequences using RaxML. Bootstrap values (>80%) are from 1000 replicates. ^T=type strain. GenBank accession numbers follow strain numbers.

三、*Galactomyces geotrichum* 香氣代謝物

Mo 等人(2003)由泡菜分離出此菌與 Majcher 等人(2014)由起司分離出此菌，皆指出 *Gal. geotrichum* 具有生產香氣之能力。在 2012 年時，陳由酸菜中分離此菌並以 GC/MS 分析其香氣代謝物(如表三)，鑑定出五種酯類及三種高級醇類。其中 Phenethyl alcohol 苯乙醇又稱 2-PE，屬於芳香族高級醇類(aromatic alcohols)具有玫瑰花香味，主要用於化妝品、香水及食品中(Hua *et al.*, 2010)，為許多發酵食品如紅酒、起司、茶及醬油的關鍵氣味(Etschmann *et al.*, 2002)。

微生物在生成 2-PE 是透過 Ehrlich pathway 代謝苯丙胺酸(L-phenylalanine)而成，代謝路徑由圖三所示，2-PE 為中間產物，苯丙胺酸首先透過轉胺酶形成苯丙酮酸，再以苯丙酮酸脫羧酶形成苯乙醛接著利用去氫酶還原成苯乙醇(Etschmann *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2002)。近年來美國食品藥物管理局(USFDA)與歐盟宣稱以自然界的原物料經由微生物或酵素所生產的風味化合物被認可為安全之天然化合物(Schrader, 2007)。在 2014 年時，Majcher 等人由起司中分離得一株 *Gal. geotrichum*，將其接種至含有苯丙胺酸之牛奶中進行起司製作，結果顯示在起司熟成階段可測得大量苯乙醇，在過去文獻中記載許多起司如

Camembert(Roger *et al.*, 1988)、Swiss Gruyere(Rychlik *et al.*, 2001)
及 Cheddar (Carunchia *et al.*, 2005) 中含有 2-PE 之香氣物質有助
於增加 CHEESE 風味。此外亦有應用此菌改善食品風味，如諾
麗果汁 (陳，2012；楊，2013)。



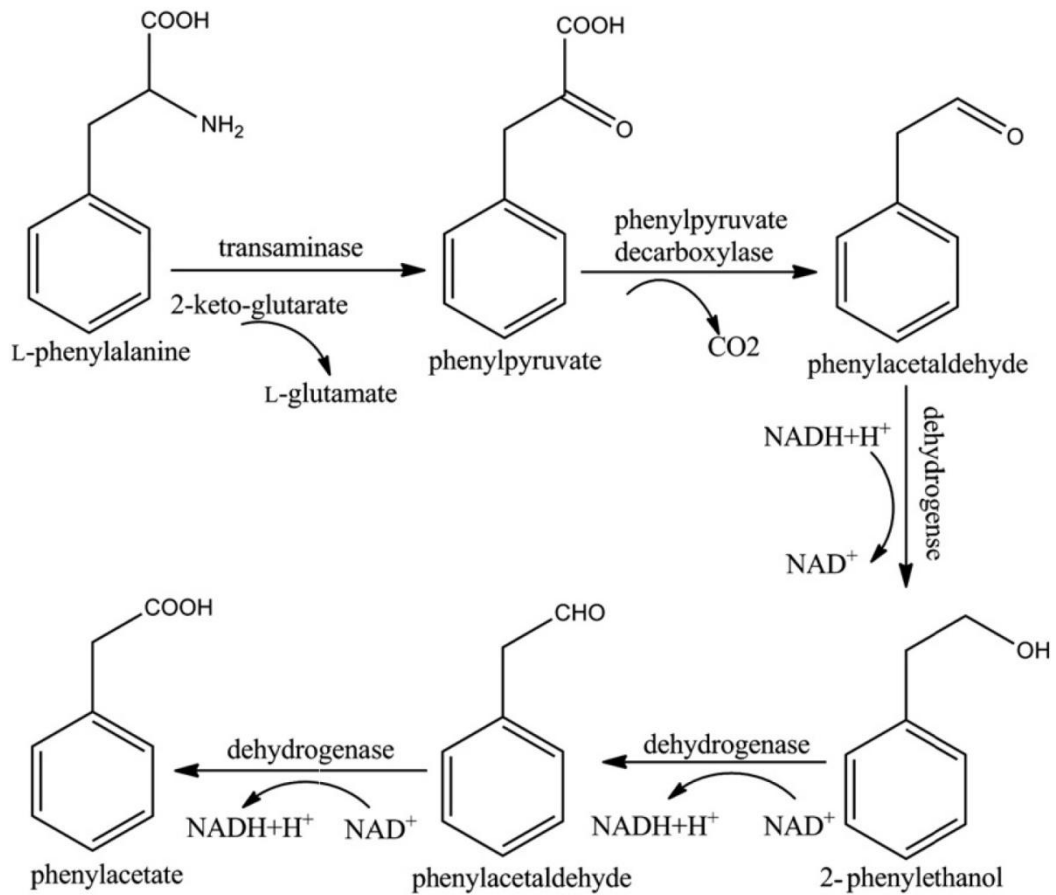
表三、*Gal.geotrichum* 揮發性香氣成分鑑定

Table 3. Characteristics of identified volatile flavor compounds from *Gal.geotrichum*

No.	R.T. ^a	Compound	M.W	Characteristics
1	8.05	Ethyl isobutyrate	116	sweet, ethereal and fruity with pungent, alcoholic odor
2	10.57	Ethyl isovalerate	130	sweet, sharp, fruity, pineapple, apple odor
3	13.44	Isoamyl alcohol	88	fruity, banana, molasses, cherry, plum, cocoa odor
4	14.98	Ethyl tiglate	128	sweet, fruity, tropical berry, floral, caramel odor
5	17.35	Isopentyl isopentanoate	172	sweet fruity, green apple and esteric odor
6	21.27	2-Ethylhexanol	130	citrus, fresh floral, oily sweet odor
7	28.09	Ethyl phenylacetate	164	sweet floral honey, rose balsam, cocoa odor
8	29.87	Phenethyl alcohol	122	sweet, floral, bready with rosey honey odor

^a. Retention time

(陳, 2012)



圖三、苯丙胺酸透過 Ehrlich pathway 生成苯乙醇

Fig 3. Ehrlich pathway for 2-PE production from_L-Phe.

(Hua & Xu, 2011)

四、利用 *Galactomyces geotrichum* 改善諾麗果汁氣味

(一)諾麗果風味物質

諾麗果 (*Morinda citrifolia* L.) 一般俗稱為 Noni，屬於茜草科 (Rubiaceae)，廣泛分布於熱帶及亞熱帶地區。果實形狀類似於手榴彈 (grenade-like) 長約 3 - 10 公分，寬約 3 - 6 公分，未成熟果實呈現綠色且表面十分堅硬不易拿來加工使用，果實成熟顏色會逐漸變黃色甚至轉變成白色此時果實表面非常軟爛並且會散發出強烈類似丁酸之腐敗味 (Morton, 1992; Dixon *et al.*, 1999)，一般會將成熟之諾麗果壓榨成汁而製成果汁飲品使用。

諾麗果已被鑑定出含有 160 多種植物化學成分 (phytochemical compounds) 主要成分為酚類化合物 (如圖四)、有機酸以及生物鹼且具有抗菌性、抗癌、抗發炎、抗氧化、止痛及預防心血管疾病等功效性 (Chan-Blanco *et al.*, 2006)，因此諾麗果是非常具有保健功效之食品，但是成熟果實具有強烈氣味，經由 GC/MS 分析已被鑑定出為 51 種揮發性化合物 (如表四)，其中 20 種有機酸佔了整體揮發性化合物之 83%，醇類佔 5% 以及酯類佔 3%，而酮類與內酯類含量非常少。五種化合物佔了整體 85%，分別為辛酸 (58%)、

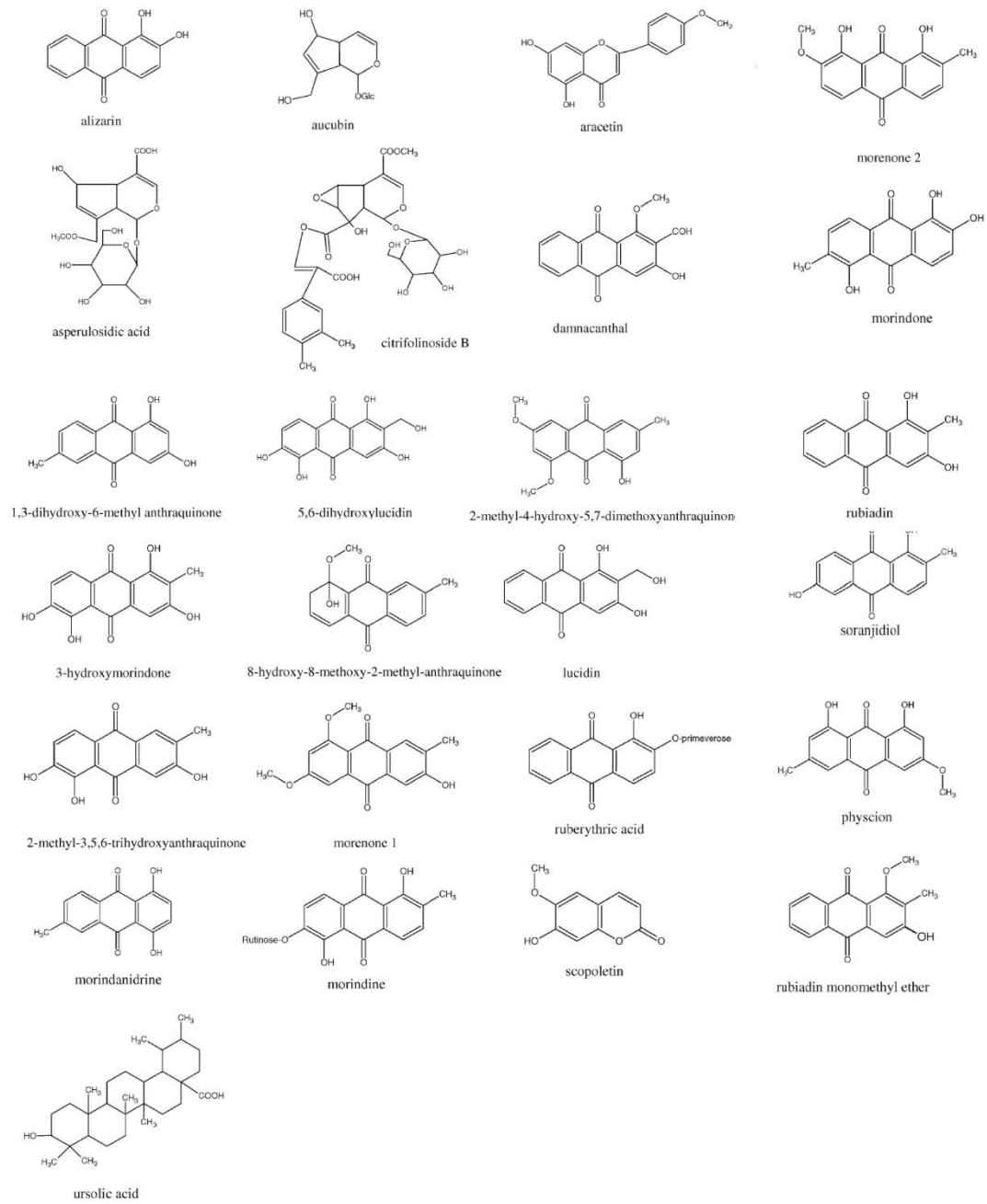
己酸 (20%)、3-methyl-3-buten-1-ol (4%)、東良宕素 (2%) 及癸酸 (1%) (Farine *et al.*, 1996)。而丁酸類的含量約佔 1% 左右但這些有機酸為諾麗果不良氣味主因之一，使得諾麗果被接受的程度大幅下降，因此改善其氣味成為非常重要課題。

(二)諾麗果氣味改善

近年來許多減少其氣味之方法，如添加其他果汁稀釋、減壓濃縮、添加乙醇或氫氧化鈣等，但容易造成機能性成分（如東良宕素或芸香素）的減少（蔡，2010）。在 2012 年陳以酵母菌處理新鮮諾麗果汁，結果顯示 50% 諾麗果之經由酵母菌處理 14 天後，以 GC/MS 分析其風味成分主要為 Ethanol、Butanol、Isoamyl alcohol、Isoprenol、Hexanol、Octanol、Hexanoic acid、Phenethyl alcohol、Octanoic acid，發酵後具有似蘋果之香氣而諾麗果不良氣味中丁酸及二甲基丁酸則已無法測量出。2013 年楊利用酵母菌處理經由自然發酵三周後諾麗果汁，其結果顯示出以酵母菌處理 3 天後丁酸、二甲基丁酸、己酸及辛酸可去除 99% 以上之含量但總多酚、東良宕素及芸香素有減少之情況，而類黃酮、縮合丹寧以及抗氧

化能力上則無顯著差異。因此微生物是具有改善諾麗果汁風味之潛力。





圖四、諾麗果中重要酚類化合物

Fig 4. Phenolic compounds in noni juice.

(Chan-Blanco *et al.*, 2006)

表四、成熟諾麗果揮發性化合物之鑑定

Table 2. Identified volatile compounds from ripe fruits of *Morinda citrifolia*.

compounds	MW	Identification [*]	%	ppm
Acids				
Acetic	60	a,b,c	0.04	0.02
2-methyl propanoic	88	a,b	0.11	0.05
Butanoic	88	a,b,c	0.71	0.31
2-methylbutanoic	102	a,b	0.54	0.23
Hexanoic	116	a,b,c	19.24	8.26
3-methylthiopropoic	120	a,b	0.41	0.18
Benzoic	122	a,b,c	0.19	0.08
Heptanoic	130	a,b,c	0.09	0.04
Octanoic	144	a,b,c	58	24.98
Hexanedioic	146	a,b	0.08	0.03
Nonanoic	158	a,b	0.03	0.01
Decanoic	172	a,b,c	1.54	0.66
Undecanoic	186	a,b,c	0.03	0.02
Lauric	200	a,b,c	0.16	0.07
Myristic	228	a,b,c	0.14	0.06
Palmitic	256	a,b,c	0.49	0.21
Linoleic	280	a,b,c	0.05	0.02
Elaidic	282	a,b,c	0.29	0.12
Oleic	282	a,b,c	0.06	0.03
(Z,Z,Z)-8,11,14-eicosatrienoic	306	a,b	0.68	0.3
Undecanoic	186	a,b,c	0.03	0.02
Total			82.88	35.68
Alcohols				
1-Butanol	72	a,b,c	0.07	0.03
3-methyl-3-buten-1-ol	86	a,b	4.13	1.78
3-methyl-2-buten-1-ol	86	a,b	0.3	0.13
1-Hexanol	102	a,b,c	0.11	0.05
Benzyl alcohol	108	a,b,c	0.05	0.02
Eugenol	164	a,b	0.03	0.01
(Z,Z)-2,5-Undecadien-1-ol	168	a,b	0.41	0.18
Total			5.1	2.2

表四、成熟諾麗果揮發性化合物之鑑定 (續)

Table 2. Identified volatile compounds from ripe fruits of *Morinda citrifolia* (continud)

compounds	MW	Identifcation*	%	ppm
Ketones				
3-Hydroxy-2-butanone	88	a,b,c	0.06	0.03
2-Heptanone	114	a,b,c	0.35	0.15
Total			0.41	0.18
Esters				
Methyl hexanoate	130	a,b,c	0.37	0.16
Methyl 3-methylthio-propanoate	134	a,b	0.03	0.01
Ethyl hexanoate	144	a,b,c	0.12	0.05
Methyl octanoate	158	a,b,c	0.85	0.37
Ethyl octanoate	172	a,b,c	0.45	0.19
Methyl decanoate	186	a,b,c	0.57	0.25
Ethyl decanoate	200	a,b,c	0.19	0.08
Methyl palmitate	270	a,b,c	0.04	0.02
Ethyl palmitate	284	a,b,c	0.03	0.02
Methyl elaidate	296	a,b,c	0.05	0.02
Methyl oleate	296	a,b,c	0.03	0.01
Total			2.76	1.18
Lactones				
(E)-6-Dodeceno- γ -lactone	196	a,b	0.09	0.04
(Z)-6-Dodeceno- γ -lactone	196	a,b	0.09	0.04
Total			0.18	0.08
Miscellaneous compounds				
Hexanamide	115	a,b	0.03	0.01
Limonene	136	a,b,c	0.39	0.17
(Ethylthiomethyl) benzene	152	a,b	0.07	0.03
Unknown 1	166	b	1.48	0.64
Unknown 2	168	b	0.56	0.25
Unknown 3	184	b	0.57	0.25
Scopoletin	192	a,b	1.97	0.85
Vomifoliol	206	a,b	0.95	0.40
Unknown 4	212	b	1.65	0.71
Total			7.67	3.31

* Chemical identifications were based on EI mass spectra (a); CI mass spectra (b); and/or comparisons of their R_s with those of synthetic compounds (c).

(Farine *et al.*, 1996)

參、材料與方法

一、實驗材料

(一)菌種

Galactomyces geotrichum BCRC 920079 東海大學專利

菌株

(二)諾麗果原料

本實驗所採用之諾麗果原料購自雲林縣東豐景觀園藝公司(小果)與屏東縣珍果生技股份有限公司(大果)。

(三)培養基與試藥

1. Potato Dextrose Broth (PDB)，購自 HIMEDIA, India
2. Agar powder，購自 HIMEDIA, India
3. NaCl, Peptone, Tryptone, Yeast Extract，購自 amersco, U.S.A.
4. 2-phenylethenol, NaH₂PO₄, H₃PO₄, sucrose，購自 和光試藥, Japan
5. Benzoic acid, butyric acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Gallic acid, L-Tyrsoine，購自 SIGMA, U.S.A.
6. Na₂CO₃ 購自 聯工化學，台灣

(四)儀器設備

1. 單門式高壓滅菌釜 (YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD. Model : YMT)
2. 恆溫震盪培養箱 (TKS ORBITAL SHARKING INCUBATOR Model : OSI 500R)
3. 無菌操作台 (TH320, Taiwan)
4. 離心機 (HITACHI HIMAC CR22G, Japan)
5. 桌上型離心機 (Hettich MIKRO 22R, Germany)
6. 研究型顯微鏡 (OLYMPUS BX50, Japan)
7. 紫外光/可見光分光光度計 (Shimadzu UV Mini 1240, Japan)
8. pH meter (EUTECH Instrument, Cyberscan 510, Singapore)
9. 高效液相層析儀 HPLC
 - (1)幫浦 (HITACHI L-6200A Intelligent Pump, Japan)
 - (2)偵測器 (HITACHI L-4200 UV/VIS Detector, Japan)
 - (3)積分儀 (HITACH D-2500 Chromato Integrator, Japan)

二、實驗方法

(一)培養基配置

1. Potato Dextrose Broth (PDB)成分

Ingredients	Gms / Litre
Potatoes, infusion from	200.000
Dextrose	20.000
Final pH (at 25°C) 5.1±0.2	

2. 斜面培養基

秤取適量 PDB 約 24g/L，並加入洋菜約 15g/L，加熱溶解。取 10 mL 注入有螺旋蓋之試管中，滅菌（121°C, 15 min）後將試管斜放冷卻，待凝固後備用。

3. 平板培養基

秤取適量 PDB 約 24g/L，並加入洋菜約 15g/L 於血清瓶中，滅菌（121°C, 15 min）後冷卻至約 45°C，再倒入無菌培養皿中，待冷卻凝固後備用。

(二)諾麗果汁處理

1. 將新鮮果實洗淨後於室溫下風乾及熟成兩天。
2. 風乾完成後將果實進行壓榨成汁，將果汁保存於-20°C。
3. 欲使用果汁時將其解凍後以 13000 rpm 離心 30 min，去除果汁中沉澱物並以 0.45 μm 濾膜過濾除菌，將其保存於 4°C 備用。

(三) 篩選苯乙醇生產菌株

1. 取 1 mL 冷凍甘油小管中菌株 *Gal.geotrichum* 菌液，活化接種至 50 mL PDB 培養基中，在 20°C 下以 100 rpm 震盪培養三天。
2. 於 PDA 平板培養基上以三區劃線法隨機挑選出 20 個單一菌落並接種至 PDA 斜面培養基上，最後接種 1 loop 之菌量於 10 mL PDB 培養基中，在 20°C 培養五天。
3. 培養完成後取 1 mL 菌液以 0.45 μ m 濾膜過濾除菌，以 HPLC 分析苯乙醇含量並挑選出苯乙醇產量較高之菌株。

(四) 篩選諾麗果耐受性菌株

經由上步驟篩選出 6 株菌株，分別自斜面培養基中取 1 loop 於 PDB 活化並接種至兩種諾麗果汁中各 10 mL，其濃度分別為 5、10、15 及 17.5% 果汁中（果汁：無菌水）於 20°C 下生長並判斷是否於果汁表面生成白色菌絲，有生成以+表示；否則以-表示。將此步驟篩選出一株菌株命名為 *Gal.geotrichum* w-5，並保存於 PDB 斜面培養基上。

(五) 菌株特性探討

1. 將 *Gal.geotrichum* w-5 菌株培養於 20°C 及 30°C 下觀察菌落形態及鏡檢。
2. *Gal.geotrichum* w-5 菌株接種於 50 mL PDB 在 20°C 下以 100 rpm 震盪培養，每日測其菌數及苯乙醇產量。

(六) 諾麗果風味改善

1. 馴化

Gal.geotrichum w-5 起初可生長於 20% 諾麗果汁中 (諾麗果汁：無菌水)，藉由逐步提高諾麗果汁濃度而達到菌體能在高濃度下諾麗果汁中生長。

20% 諾麗果汁加入 5 mL *Gal.geotrichum* w-5 PDB 菌液，總體積維持 50 mL，於 20°C，100 rpm 震盪培養，直到果汁表面產生大量白色菌絲記錄其生長天數，並取 10 mL 發酵後果汁分析丁酸降解能力、苯乙醇產量及總多酚含量。其於發酵後果汁取 5 mL 加入提高濃度後之諾麗果汁中，每次提升 2.5% 果汁濃度並重複上述步驟。

若生長天數到 30 天皆無白色菌絲生長時，則取 5 mL 果汁於 PDB 培養基中培養使菌體大量生長，再取 5 mL 菌液加入同濃度果汁再進行馴化，若有生成白色菌絲則提升

2.5% 果汁繼續馴化培養，無產生白色菌絲則重複此步驟，
依然無產生白色菌絲則視為馴化之最高濃度。

2. 丁酸降解能力

取發酵後果汁 10 mL 以 4°C、6000 rpm 離心 15 min，
取上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，以 HPLC 分析其丁酸含量
並以同濃度未發酵前果汁之丁酸含量進行計算：

$$\left(1 - \frac{\text{發酵後丁酸含量}}{\text{發酵前丁酸含量}}\right) \times 100 = \text{丁酸降解能力}\%$$

3. 二甲基丁酸降解能力

取發酵後果汁 10 mL 以 4°C、6000 rpm 離心 15 min，
取上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，以 HPLC 分析其二甲基丁
酸含量並以同濃度未發酵前果汁之二甲基丁酸含量進行計
算：

$$\left(1 - \frac{\text{發酵後二甲基丁酸含量}}{\text{發酵前二甲基丁酸含量}}\right) \times 100 = \text{二甲基丁酸降解能力}\%$$

4. 苯乙醇 (2-PE) 濃度

取發酵後果汁 10 mL 以 4°C、6000 rpm 離心 15 min，
取上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，以 HPLC 分析其苯乙醇濃
度。

5. 總多酚含量

參考 JulKunen-Titto (1985) 之方法。其原理為以福林酚試劑 (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) 與酚類化合物之羥基進行還原反應，使其中磷鉬酸與磷鎢酸複合物產生電子轉移，並且在鹼性環境下使黃色轉變成藍色，於波長 760 nm 下有最大吸收光。取 0.5 mL 諾麗果汁加入 2.5 mL 0.2 N 福林酚試劑，再加入 7.5% 碳酸氫鈉溶液及 5 mL 水混合均勻後於室溫靜置 1 hr 並以分光光度計於波長 760 nm 下測其吸光值。以沒食子酸 (Gallic acid) 做為標準品並製作標準曲線 (附錄一)，並以不添加福林酚試劑之反應組作為空白組。將諾麗果汁中酚類化合物之含量藉由此標準曲線求得相對應沒食子酸之含量，以 $\mu\text{g gallic acid equivalent/mL}$ ($\mu\text{g gae/mL}$) 表示。並以同濃度未發酵前果汁之總多酚含量進行計算：

$$\left(\frac{\text{發酵後總多酚含量}}{\text{發酵前總多酚含量}} \right) \times 100 = \text{總多酚保留率}\%$$

(七)HPLC 分析

1. 分析條件

分析管柱：Agilent Zorbax SB-Aq 150mm × 4.6mm, 5 μ m

移動相：Acetonitrile：20 mM NaH₂PO₄ pH 2.0 (20:80)

流速：1.0 mL/min

管柱溫度：35 $^{\circ}$ C

UV 檢測器：210 nm

注射量：10 μ L

2. 含量計算

以丁酸、二甲基丁酸及苯乙醇標準品製作標準曲線(附錄二、附錄三及附錄四)，將樣品測得面積帶入標準曲線中求得其濃度，以 μ g/mL 表示。

三、改善發酵苯乙醇之培養基組成分探討

(一)本研究以修飾 PDB 決定最佳組成分，方法如下

1. Plackett-Burman (PB) 試驗設計篩選組成分

本試驗採七因子(7 factors)、二階層(2 levels)之 PB 試驗設計法，七個因子分別為 Benzoic acid、Sucrose、Vegetable juice、NaCl、Tryptone、Tyrosine 及 Yeast extract，並將各個因子正規化為 +1 和 -1 之高低階層，以苯乙醇濃度作為回應值(Response)，各因子濃度範圍如表五所示。

2. 全因子 (Full factorial experimental design) 試驗設計判斷關鍵組成分

本試驗採二因子(2 factors)、二階層(2 levels)之全因子試驗設計，二因子分別為 Tryptone 及 NaCl，並將各個因子正規化為 +1 和 -1 之高低階層，並增加 3 個中心點(central point)增加試驗準確性，以苯乙醇濃度作為回應值(Response)，各因子濃度範圍如表六、七及八所示。

3. 探討 NaCl 單因子最佳濃度

表九為 NaCl 濃度範圍。將 Tryptone 濃度固定為 1.25%。

4. 探討 Tryptone 單因子最佳濃度

表十為 Tryptone 濃度範圍。將 NaCl 濃度固定為 1%。

5. 探討 PDB 修飾後之結果

Tryptone 濃度為 2.25% 而 NaCl 濃度為 1%。以傳統 PDB 培養基作為對照組。

(二) 使用軟體：

使用軟體為 STATGRAPHICS Plus Version 15.1(StatPoint, Inc., Virginia, U.S.A.)。

(三) 實驗步驟

1. 利用 PB 試驗設計所測量出苯乙醇結果輸入 STATGRAPHICS Plus 軟體分析以篩選出最適培養基成分。
2. 利用全因子試驗設計所測量出苯乙醇結果輸入 STATGRAPHICS Plus 軟體分析。
3. 探討單因子最佳濃度。
4. 綜合單因子最佳濃度測量苯乙醇最佳結果。

(四) 液態培養發酵方法

1. 實驗組依 STATGRAPHICS Plus 軟體設計出各項培養基成分比例添加至 50 mL PDB 培養基後以 121°C、15 min 滅菌。
2. 取活化菌株 *Gal. geotrichum* w-5 之菌液接種至培養基中，以 20°C、100 rpm 培養 5 天。

3. 培養完成後，取 10 mL 菌液以 4°C、6000 rpm 下離心 15 min，
取上清液並稀釋至適當倍數以 HPLC 分析苯乙醇濃度。



表五、Plackett-Burman 試驗設計

Table 5. Plackett-Burman experiment design.(A) Experimental worksheet
(B)Variable levels.

(A)Experimental worksheet

No.	Benzoic acid	Sucrose	Vegetable juice	NaCl	Tryptone	Tyrosine	Yeast extract
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
6	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
7	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
8	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
9	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
10	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
11	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1

(B)Variable levels

Independent variables (%)	Coded levels	
	+1	-1
Benzoic acid	0.1	0
Sucrose	0.2	0
Vegetable juice	10	0
NaCl	1.0	0
Tryptone	0.25	0
Tyrosine	0.5	0
Yeast extract	0.25	0

表六、 2^2 全因子試驗設計

Table 6. A 2^2 fractional factorial experiment design.(A) Experimental worksheet(B)Variable levels.

(A)Experimental worksheet

No.	Tryptone	NaCl
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

(B) Variable levels

Independent variables	Coded levels	
	+1	-1
(%)		
Tryptone	1.25	0.05
NaCl	5.0	0.2

表七、修飾 2^2 全因子試驗設計

Table 7. A modified 2^2 fractional factorial experiment design.

(A)Experimental worksheet(B)Variable levels.

(A)Experimental worksheet

No.	Tryptone	NaCl
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

(B) Variable levels

Independent variables	Coded levels	
	(%)	+1
Tryptone	2.0	1.5
NaCl	1.1	0.9

表八、修飾 2^2 全因子試驗設計

Table 8. A modified 2^2 fractional factorial experiment design.(A)
Experimental worksheet(B)Variable levels.

(A)Experimental worksheet

No.	Tryptone	NaCl
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

(B) Variable levels

Independent variables	Coded levels	
(%)	+1	-1
Tryptone	2.0	1.5
NaCl	1.0	0.2

表九、NaCl 單因子

Table 9. The singel variable experiment of NaCl.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)
1		0.5
2	1.25	1.0
3		1.5
4		2.0



表十、Tryptone 單因子

Table 10. The singel variable experiment of Tryptone.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)
1	1.75	
2	2.0	
3	2.25	
4	2.5	1.0
5	2.75	
6	3.0	



肆、 結果與討論

一、 菌株篩選

Gal.geotrichum 能分解諾麗果汁中丁酸及己酸，並可產生苯乙醇的香氣 (陳, 2012)。然而諾麗果中含有多種抑菌物質 (Locher *et al.*, 1995), *Gal.geotrichum* 不易在諾麗果汁中生長。為提升 *Gal.geotrichum* 改善諾麗果汁不良氣味的能力，因此篩選產生香氣濃郁並能耐高濃度諾麗果汁的菌株。

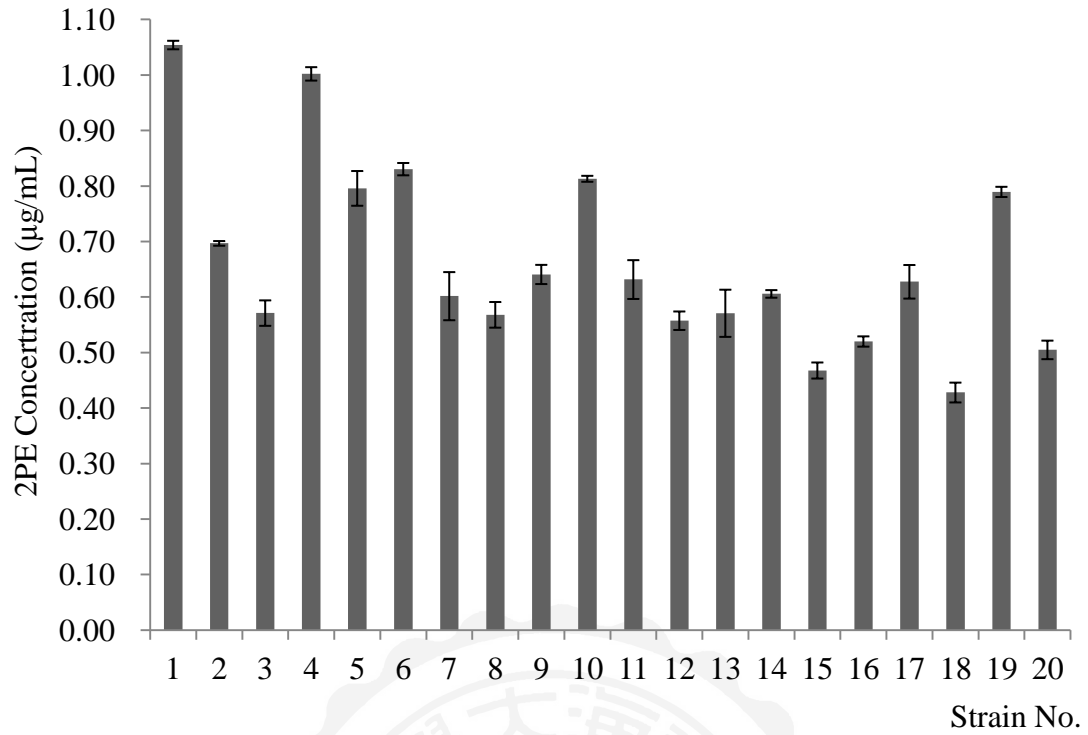
首先從原始菌株中分離純化 20 株菌，篩選苯乙醇產量高之菌株。其結果如圖五所示，20 株菌株苯乙醇產量介於 $0.46 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ 至 $1.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 之間，平均為 $0.66 \mu\text{g/mL}$ 。其中編號 1、4、5、6、10 及 19，苯乙醇產量較高，因此挑選此六株進行後續實驗。

將上述步驟所篩選到六株菌株分別接種至不同濃度諾麗果汁中 (如表十一)，在 20°C 培養 7 天並觀察白色菌絲生成判斷其耐性。

在小果汁部分六株菌株皆可生長於 5% 及 10% 而 1 號菌株與 5 號菌株可在 15% 濃度下生長但 5 號菌株生長狀況較良好於第四天即可長出白色菌絲而在 17.5% 下所有菌株皆無法生長，因此在小果汁耐性下由 5 號菌株表現較為優秀。

在大果果汁中所有菌株皆可於 5% 及 10% 下生長，在 15% 時編號 1、5 及 19 生長良好而 4 號菌株耐性較差，在 17.5% 下只有 5 號菌株可以生長並且在第五天即可生成白色菌絲，因此在大果果汁耐受性測試下 5 號菌株表現較佳。綜合上述結果 5 號菌株對於兩種果汁耐性較其他五株菌株優秀，固挑選此菌並將其命名為 *Gal.geotrichum* w-5，在諾麗果汁風味改善及改善苯乙醇生產之探討皆以此菌株進行實驗，期望可改善諾麗果汁風味以及得到更高苯乙醇之產量。





圖五、*Gal.geotrichum* 菌株之苯乙醇產量

Fig 5. Amounts of 2-phenylethanol from *Gal.geotrichum* strains.

表十一、諾麗果汁耐性菌株篩選

Table 11. Screening of noni juice tolerance strains.

Strain No.	%	小果汁				大果汁			
		5	10	15	17.5	5	10	15	17.5
1		+	+	w	-	+	+	+	-
4		+	+	-	-	+	+	w	-
5		+	+	+	-	+	+	+	+
6		+	w	-	-	+	+	-	-
10		+	w	-	-	+	+	-	-
19		+	+	-	-	+	+	+	-

+ 表示有白色菌絲生成；w 表示有微弱白色菌絲生成；- 表示無白色菌絲生成

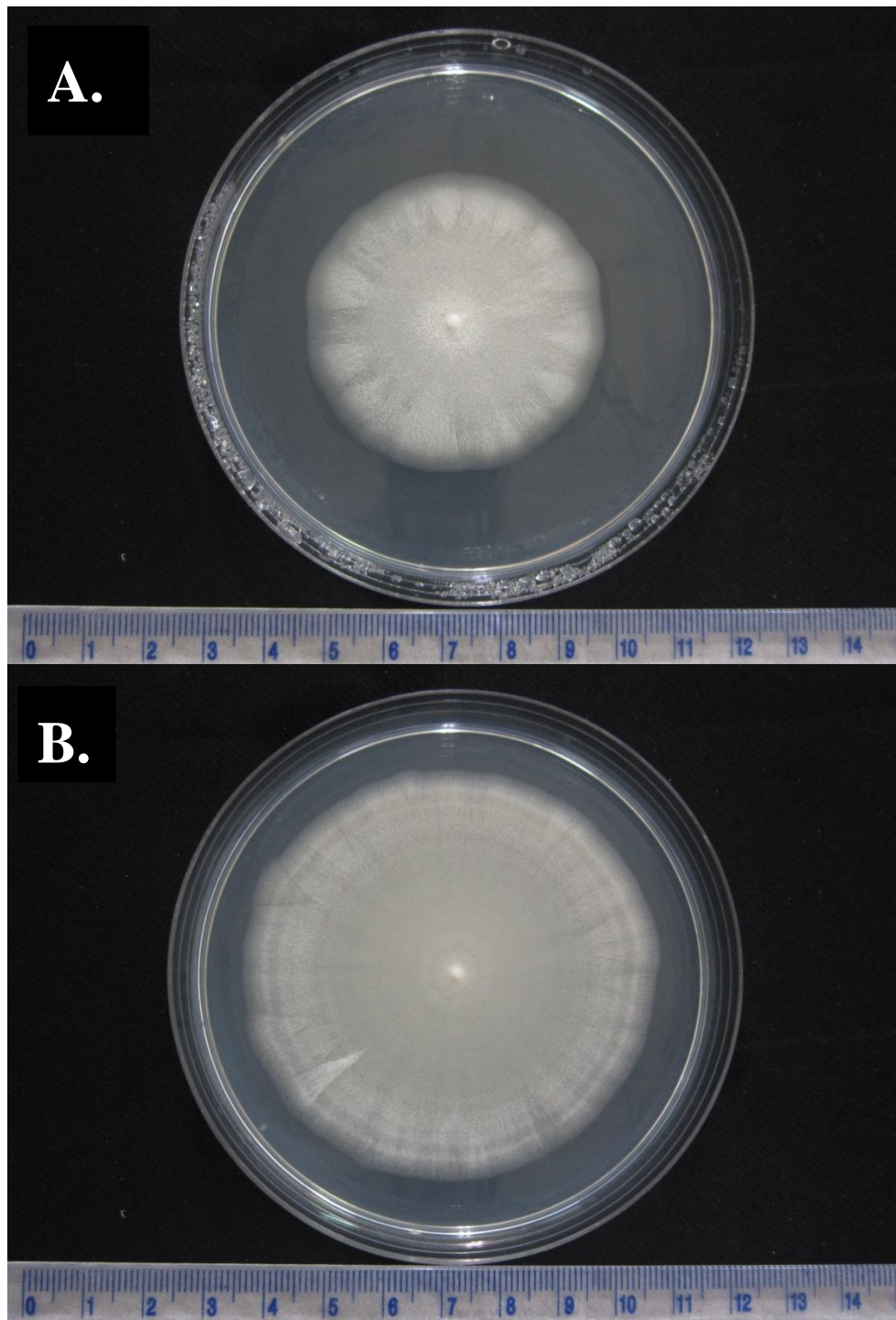
(一)*Gal.geotrichum* w-5 特性探討

1. 菌相觀察

將 *Gal.geotrichum* w-5 接種於 PDA 上於 20°C 與 30°C 培養七天，觀察菌落形態及鏡檢觀察菌體形態。由圖六可觀察到 *Gal.geotrichum* w-5 在 PDA 上菌落呈現白色且向外輻射擴散，中央有隆起且有細狀毛絲。在 20°C 菌落直徑為約 50 mm 而 30°C 菌落直徑約為 70 mm，在 30°C 培養下菌落生長速率較快，而 20°C 培養下可明顯聞到濃郁水果香氣。

平板培養將 *Gal.geotrichum* w-5 接種於 PDA 培養基而液態培養則將 *Gal.geotrichum* w-5 接種於 PDB 液態培養基在 100 rpm 進行培養，在 20°C 與 30°C 培養七天後以顯微鏡觀察如圖七所示，菌體在生長後會產生許多透明菌絲而菌絲具有分岔，菌絲周邊會形成節孢子，在液態培養 (C、D) 其菌絲較為豐富而平板培養 (A、B) 多以單獨節孢子呈現，而在 20°C 培養 (A、C) 菌絲又較 30°C 培養 (B、D) 來的豐富。另外節孢子形態部分 20°C 培養 (A、C) 下節孢子呈現方形而 30°C 培養 (B、D) 節孢子呈現圓形或橢圓形。

綜合上述，以苯乙醇產量與諾麗果汁耐性進行篩選後得 *Gal.geotrichum* w-5 其菌相形態與原始菌株並無差異。

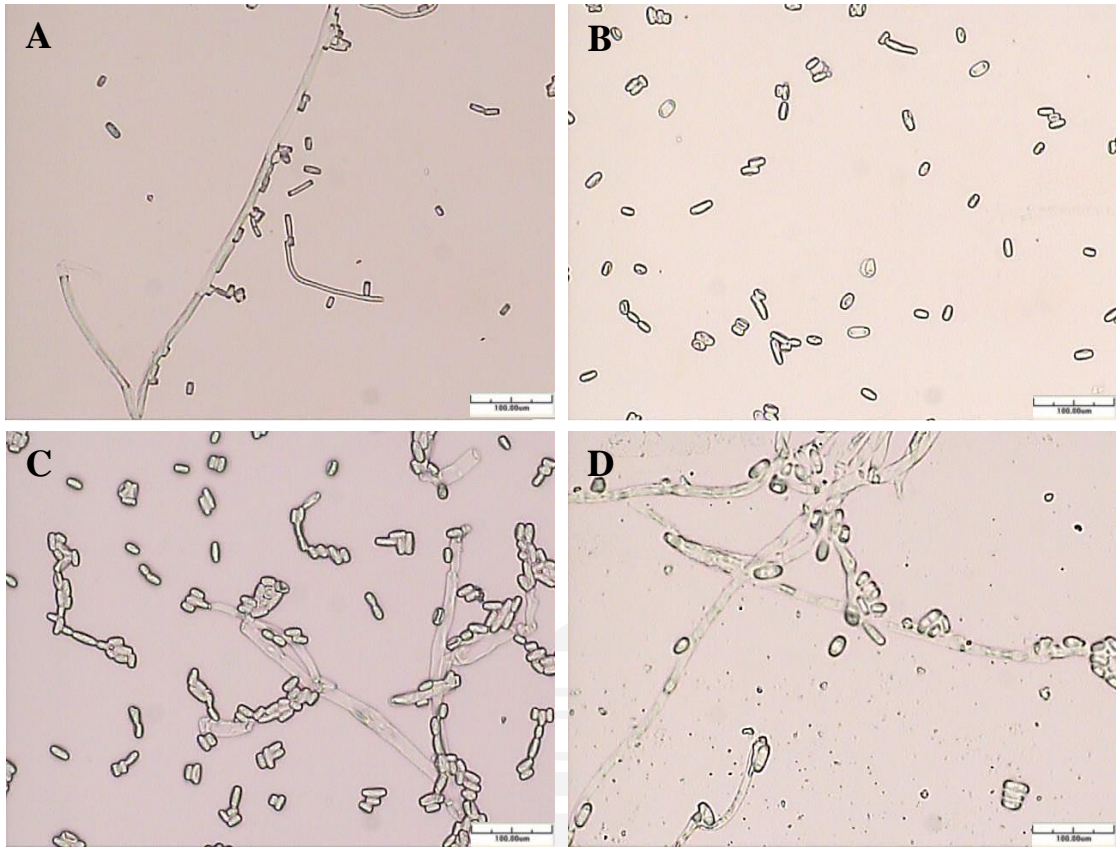


圖六、*Gal.geotrichum* w-5 菌落外觀

(A) 20°C (B) 30°C

Fig 6. Colony of *Gal.geotrichum* w-5.

(A) 20°C (B) 30°C



圖七、*Gal.geotrichum* w-5 之菌體形態

(A) 20°C 平板培養 (B) 30°C 平板培養

(C) 20°C 液態培養 (D) 30°C 液態培養

Fig 7. Morphological observation of *Gal.geotrichum* w-5 by microscopy.

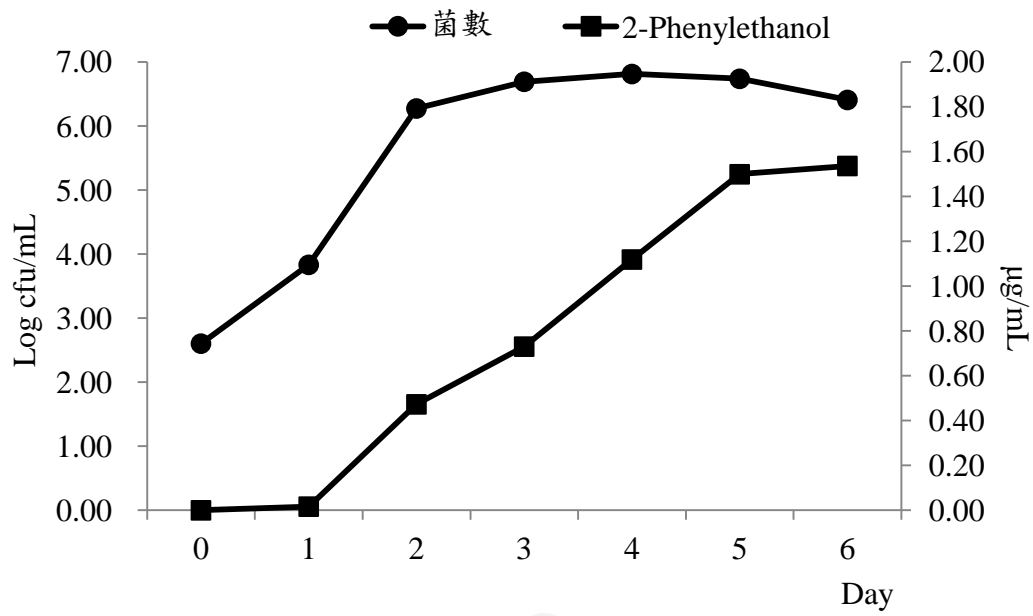
(A) 20°C Plate culture (B) 30°C Plate culture

(C) 20°C Liquid culture (D) 30°C Liquid culture

2. 菌體生長與苯乙醇的產生

Gal.geotrichum w-5 接種於 PDB 液態培養基於 20°C、100rpm 下共培養六天，每天測其生菌數及 2-PE 產量，其結果如圖八所示，菌數在第一天時開始有上升趨勢，此時進入對數生長期 (log phase)，在第二天時有最高菌數 1.88×10^6 CFU/mL 之後進入穩定期 (stationary phase) 階段，而第六天菌數開始有下降趨勢。

苯乙醇產量在第二天時有開始上升趨勢直到第五天時有最高產量約 1.5 $\mu\text{g/mL}$ ，此時菌體生長為穩定期末期而苯乙醇仍持續穩定生產。因此，由圖得知苯乙醇生成並不會影響到菌株生長，可判斷苯乙醇為 *Gal.geotrichum* 二次代謝物 (secondary metabolites)，並有文獻指出高級醇類屬於酵母菌在代謝過程中二次代謝產物 (Swiegers *et al.*, 2005)。



圖八、*Gal.geotrichum* w-5 生長曲線及苯乙醇產量

Fig 8. Amount of 2-phenylethanol and the growth curves of *Gal.geotrichum* w-5.

二、諾麗果氣味改善

諾麗果成熟後具有不良氣味，此氣味來自於許多揮發性有機酸，如丁酸、二甲基丁酸、己酸及辛酸（蔡，2010），其中又以丁酸及二甲基丁酸氣味較無法接受。因此藉由 *Gal.geotrichum* 耐酸以及產生香氣的特性針對諾麗果的不良氣味做改善。

本實驗所使用兩種諾麗果汁其成分分析如表十二所示，兩種果汁 pH 約在 3.8 左右，其結果與 Chunhieng (2003) 及楊(2013) 相似。丁酸及二甲基丁酸則是小果汁顯著高於大果汁，小果汁其不良氣味較為濃厚。然而在總多酚含量上兩種果汁則是無顯著差異 ($p>0.05$)。

圖九可看出馴化後會在果汁表面形成明顯白色菌絲並且果汁會呈現白色混濁，而果汁味道由刺鼻腐臭味轉變成具有水果香氣及酒香。再進一步以 HPLC 分析經由 *Gal.geotrichum* w-5 處理後之諾麗果汁，可以比較其前後差異（如圖十及十一），由 HPLC 分析後丁酸滯留時間為 3.41 min 二甲基丁酸為 5.20 min 而 2-PE 為 7.23 min，在小果汁部分丁酸面積高於大果汁，兩種果汁發酵後丁酸面積有減少而產生 2-PE。

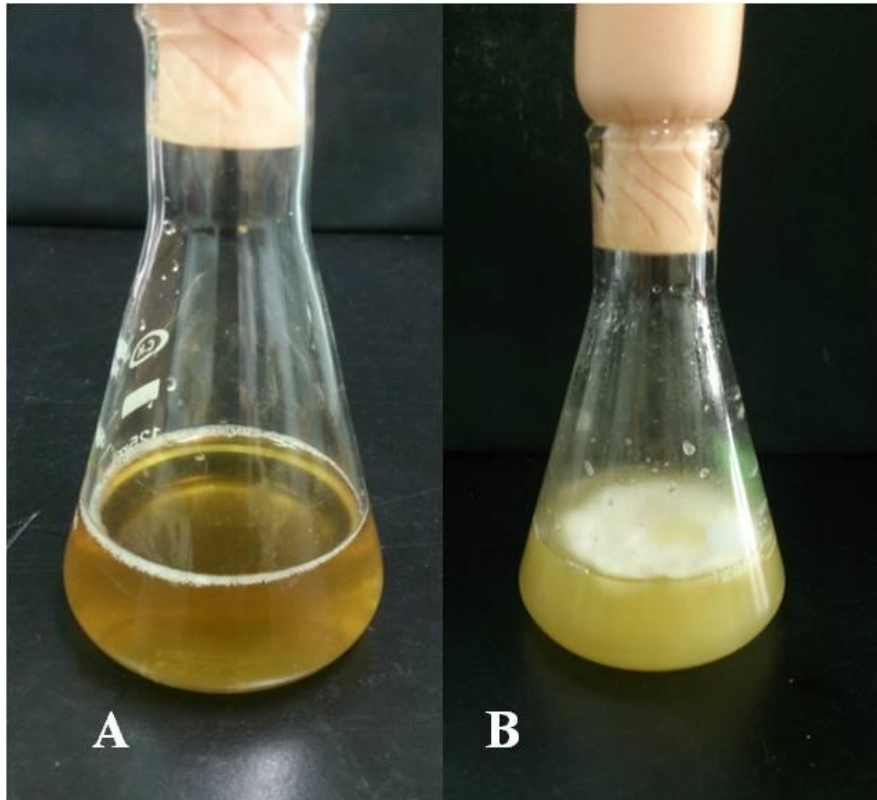
表十二、諾麗果汁成分比較

Table 12. Comparison of compositions of two noni juice.

	小果汁	大果汁
pH	3.80	3.78
丁酸 (µg/mL)	3.19 ± 0.04 ^a	2.19 ± 0.09 ^b
二甲基丁酸 (µg/mL)	0.57 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.00 ^b
總多酚含量 (µg gae/mL)	1633 ± 64 ^a	1608 ± 37 ^a

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).

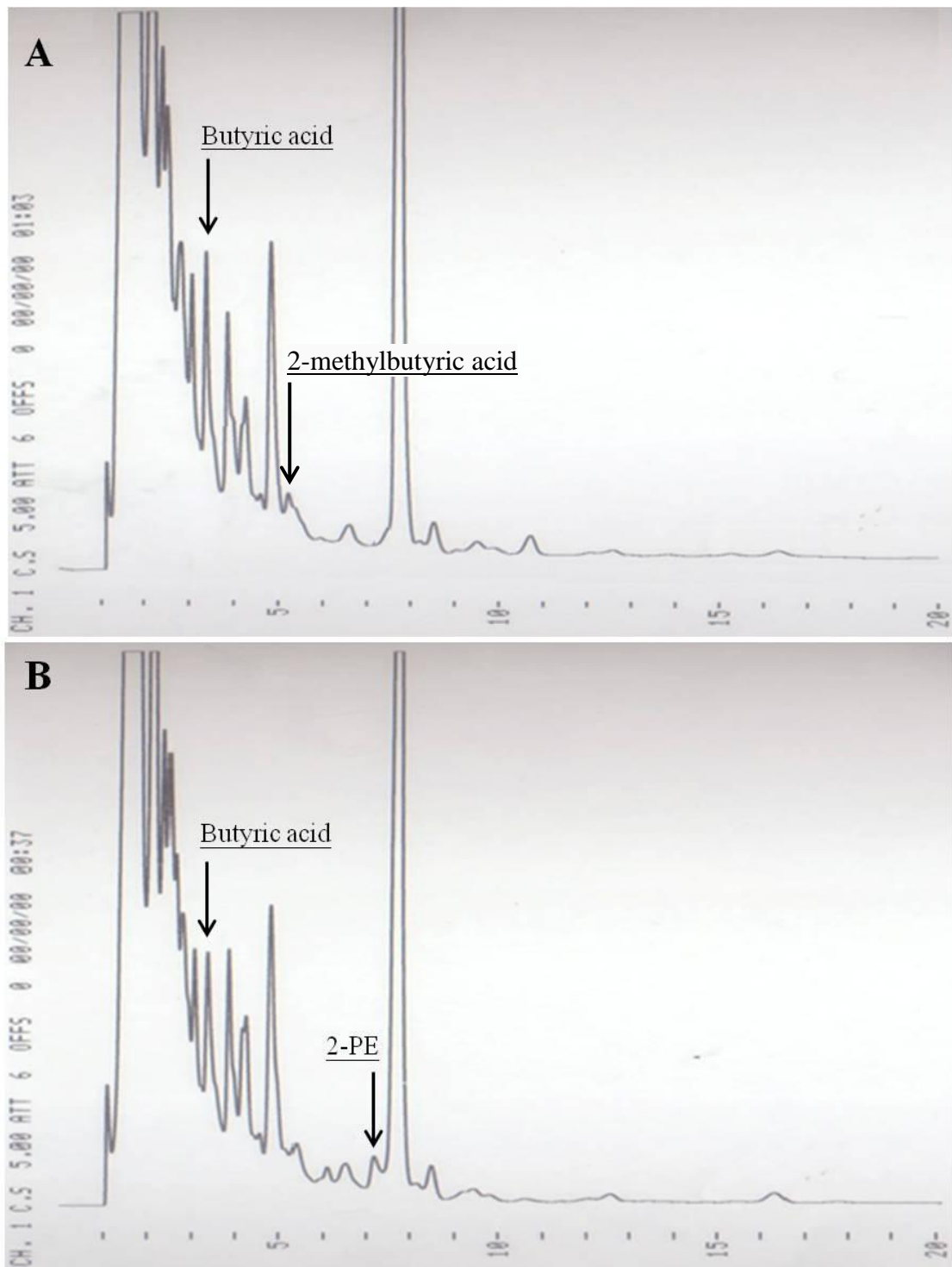
^{a-b} Means in the same column with different lines are significantly different ($p < 0.05$).



圖九、*Gal.geotrichum* w-5 在諾麗果汁中馴化程度

(A) 馴化前 (B) 馴化後

Fig 9. *Gal.geotrichum* w-5 acclimate in noni juice.
(A) Before acclimation (B) after acclimation

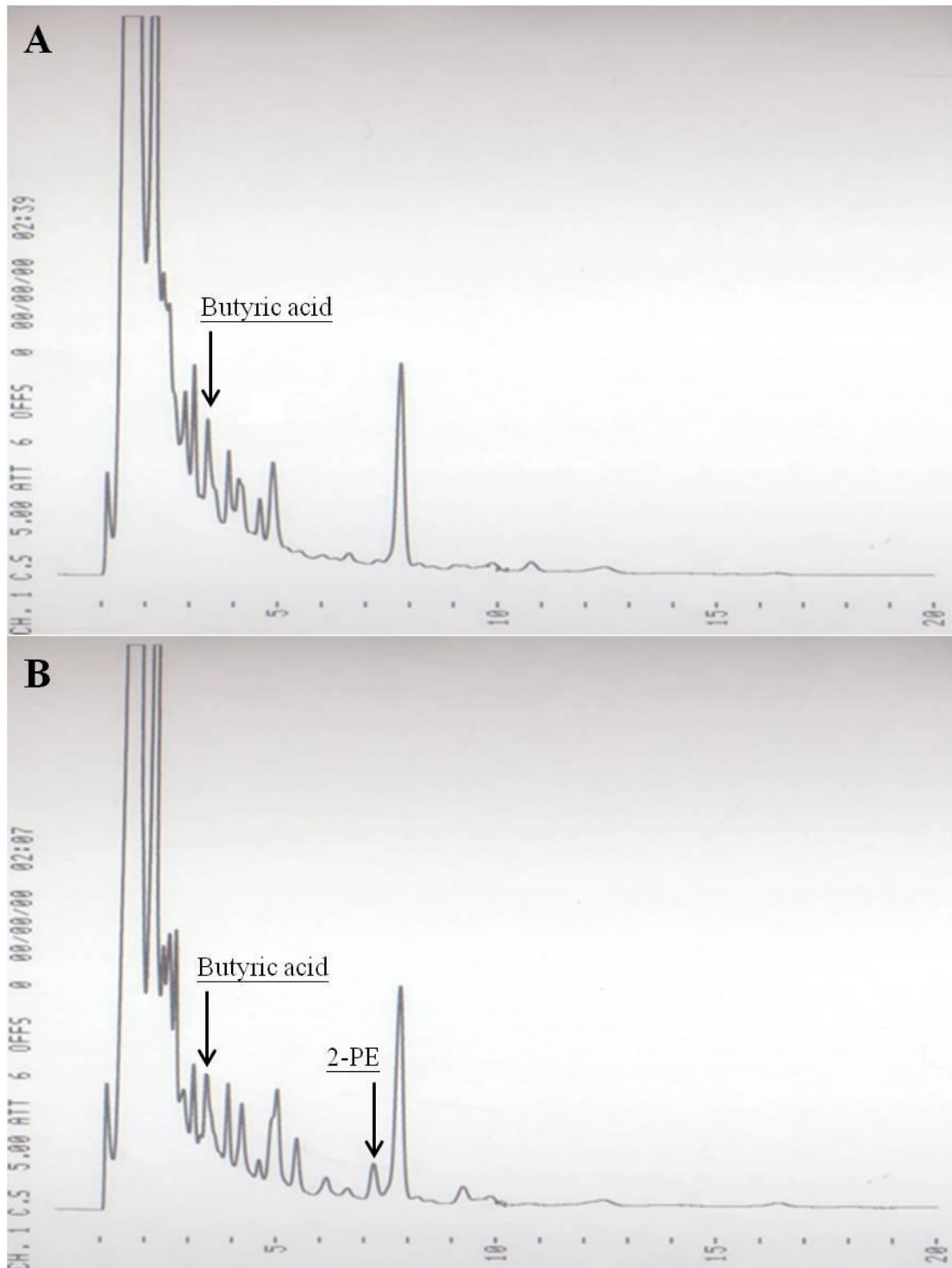


圖十、25%諾麗小果汁經 *Gal.geotrichum* w-5 發酵前後之成分變化

(A) 發酵前 (B) 發酵後

Fig 10. HPLC profiles of 25% small noni juice fermented by *Gal.geotrichum* w-5

(A) Before fermentation (B) after fermentation



圖十一、25%諾麗大果汁經 *Gal.geotrichum* w-5 發酵前後之成分變化

(A) 發酵前 (B) 發酵後

Fig 11. HPLC profiles of 25% large noni juice fermented by *Gal.geotrichum* w-5

(A) Before fermentation (B) after fermentation

Gal.geotrichum w-5 在諾麗果汁馴化及風味改善結果皆以先記錄其白色菌絲生成時間後再進行丁酸、苯乙醇及總酚含量測定，藉由發酵後丁酸的降解以及苯乙醇的產生來判斷諾麗果汁風味改善之能力並以總多酚含量來判斷其機能性成分是否遭受破壞。

小果果汁處理結果如表十三所示，起初 *Gal.geotrichum* w-5 可生長於 20% 果汁中經由馴養後可達到 32.5% 的濃度，隨著果汁濃度增加所需馴化時間亦會跟著增加，由 30% 到達 32.5% 時需要 18 天才可生長出白色菌絲。在不良氣味上經由 *Gal.geotrichum* w-5 發酵後丁酸含量與發酵前有顯著減少，丁酸降解率平均為 36.14%，而二甲基丁酸在發酵後皆有 95% 以上降解率，此外發酵後皆會產生苯乙醇最高可測得 $7.96 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$ ，平均為 $4.88 \mu\text{g/mL}$ 。

大果汁處理結果如表十四所示，*Gal.geotrichum* w-5 由 20% 開始而馴化最終濃度為 40%，果汁濃度越高所需馴化時間也越久，由 37.5% 馴化至 40% 所需時間為 23 天，而在丁酸降解上發酵後均有顯著減少其平均降解率約為 28.80%，二甲基丁酸因大果汁中含量過低發酵前後均無法檢測出，發酵後均可測出苯乙醇最高可測得 $6.67 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ ，平均為 $3.88 \mu\text{g/mL}$ 。

兩種果汁處理後在總多酚含量上其保留率會跟著馴化時間越久而減少之趨勢，推測多酚化合物受到微生物代謝或因培養時間過長而導致光與熱破壞，但發酵後多酚化合物仍有 90% 以上保留能力。

綜合上述經由 *Gal.geotrichum* w-5 處理諾麗果汁後可產生香氣成分並且有效地降低不良氣味含量具有改善諾麗果汁風味能力。



表十三、*Gal.geotrichum* w-5 於小果汁馴化及風味改善

Table 13. The result of improve flavor and acclimate in small noni juice by *Gal.geotrichum* w-5.

馴化 濃度 (%)	馴化 時間 (Days)	丁酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)	發酵前丁酸 含量 ($\mu\text{g/mL}$)	丁酸降解 率(%) ^A	二甲基丁酸 含量 ($\mu\text{g/mL}$)	發酵前二甲 基丁酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)	二甲基丁 酸降解率 (%) ^B	2-PE 產量 ($\mu\text{g/mL}$)	總多酚含量 ($\mu\text{g gae/mL}$)	發酵前總多 酚含量(μg gae/mL)	總多酚 保留率 (%) ^C
20	5	0.49 ± 0.01	0.85 ± 0.03	42.84	ND	0.11 ± 0.00	ND	4.70 ± 0.70	352 ± 11	354 ± 20	99.28
22.5	6	0.60 ± 0.02	0.95 ± 0.01	36.48	0.01 ± 0.00	0.12 ± 0.00	91.40	3.03 ± 0.31	348 ± 19	367 ± 9	94.71
25	9	0.61 ± 0.01	1.06 ± 0.02	42.86	0.01 ± 0.00	0.14 ± 0.00	92.66	3.03 ± 0.15	375 ± 9	408 ± 11	91.84
27.5	10	0.85 ± 0.01	1.16 ± 0.01	26.88	0.008 ± 0.00	0.15 ± 0.00	94.06	4.45 ± 0.34	400 ± 11	417 ± 9	96.06
30	15	0.84 ± 0.00	1.27 ± 0.02	33.91	0.005 ± 0.00	0.16 ± 0.00	96.46	6.12 ± 0.23	407 ± 8	455 ± 12	89.46
32.5	18	0.91 ± 0.01	1.38 ± 0.04	33.87	0.001 ± 0.00	0.18 ± 0.00	99.35	7.96 ± 0.79	418 ± 3	493 ± 28	84.91

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).

ND: no detection

^A: $(1 - \text{發酵後丁酸含量} \div \text{發酵前丁酸含量}) \times 100$

^B: $(1 - \text{發酵後二甲基丁酸含量} \div \text{發酵前二甲基丁酸含量}) \times 100$

^C: $(\text{發酵後總多酚含量} \div \text{發酵前總多酚含量}) \times 100$

表十四、*Gal.geotrichum* w-5 於大果汁馴化及風味改善

Table 14. The result of improve flavor and acclimate in large noni juice by *Gal.geotrichum* w-5.

馴化濃度 (%)	馴化時間 (Days)	丁酸含量 (μg/mL)	發酵前丁酸含量(μg/mL)	丁酸降解率 (%) ^A	2-PE 產量 (μg/mL)	總多酚含量 (μg gae/mL)	發酵前總多酚含量(μg gae/mL)	總多酚保留率(%) ^B
20	4	0.38 ± 0.02	0.52 ± 0.02	27.03	2.91 ± 0.16	322 ± 2	325 ± 5	99.12
22.5	6	0.43 ± 0.00	0.59 ± 0.01	27.26	3.03 ± 0.13	324 ± 9	352 ± 7	92.26
25	7	0.45 ± 0.01	0.65 ± 0.00	30.05	3.12 ± 0.24	380 ± 4	402 ± 13	94.50
27.5	8	0.57 ± 0.00	0.72 ± 0.04	21.46	3.75 ± 0.79	405 ± 10	430 ± 35	94.22
30	10	0.56 ± 0.00	0.78 ± 0.01	28.54	3.81 ± 0.11	435 ± 21	469 ± 10	92.82
32.5	13	0.61 ± 0.00	0.85 ± 0.00	28.58	6.67 ± 0.10	469 ± 5	508 ± 7	92.24
35	15	0.65 ± 0.02	0.91 ± 0.02	28.23	6.67 ± 0.42	481 ± 11	547 ± 27	87.97
37.5	18	0.65 ± 0.01	0.98 ± 0.06	33.36	6.33 ± 0.35	532 ± 3	586 ± 9	90.78
40	23	0.68 ± 0.01	1.04 ± 0.03	34.69	4.97 ± 0.26	560 ± 9	625 ± 11	89.56

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).

^A : $(1 - \text{發酵後丁酸含量} \div \text{發酵前丁酸含量}) \times 100$

^B : $(\text{發酵後總多酚含量} \div \text{發酵前總多酚含量}) \times 100$

三、改善發酵苯乙醇產量的培養基組成分

Gal. geotrichum w-5 能改善諾麗果汁的氣味，然而諾麗果汁的營養成份限制了苯乙醇的產量，因此期望透過培養基的最適化組成分的瞭解，作為未來調整諾麗果汁成份的依據，以達到發酵改善風味的效果。

(一)組成分篩選

利用 Plackett-Burman 部分因子設計方法，可以減少實驗組處理，篩選有效應的因子。依據 PB 試驗設計法設計之培養基組合進行實驗，培養基比例及苯乙醇產量結果如表十五，結果可得知在第一號樣品有最高 2-PE 產量為 5.80 $\mu\text{g/mL}$ ，而第十二號樣品苯乙醇含量最低 0.39 $\mu\text{g/mL}$ ，兩組差異在於添加 Benzoic acid、Sucrose、Tryptone 及 Tyrosine，進一步以 Pareto chart 分析其試驗結果（如圖十二），Pareto chart 為各因子效應影響強度圖，經由 T 統計量（T-statistic）計算其相對效應，長條圖越長代表此因子對 2-PE 產量影響越高，其中灰色表示正向效應而藍色為負向效應，圖中直線為顯著線超過此線表示添加因子對 2-PE 生產有達到顯著效果。其中添加 Tryptone 對於 2-PE 具有顯著正向效應，表十五中 1、2、6、8、10 及 11 號試驗組，為高劑量 Tryptone 組別，2-PE 總

和產量為 19.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 而 3、4、5、7、9 及 12 為低劑量 Tryptone 組別，2-PE 總和產量為 5.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此結果顯示出添加 Tryptone 會增加 *Gal. geotrichum* w-5 生產 2-PE 之產量。而苯甲酸 (Benzoic acid) 與酪胺酸 (Tyrosine) 其結構式中含有一個苯環與 2-PE 相似，期望可做為生成 2-PE 之前驅物，但結果顯示添加兩者後反而會造成 2-PE 產量下降。而 NaCl 添加對 2-PE 生產有正向效應但尚未達到顯著效果。

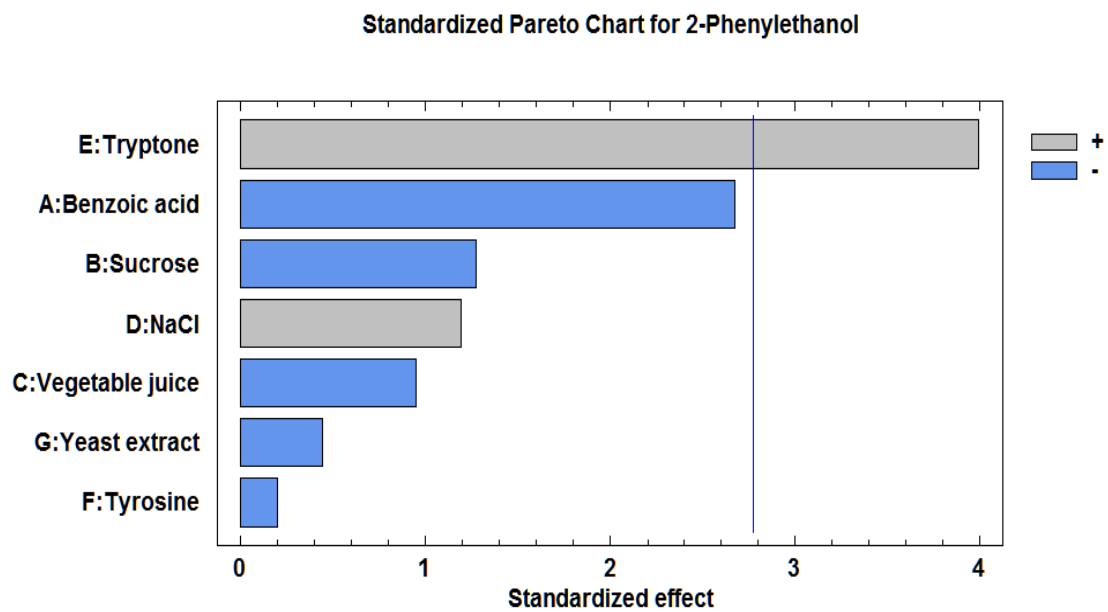
綜合上述以 Pareto chart 分析後正向效應因子有 Tryptone 及 NaCl; 負向效應為 Benzoic acid、Sucrose、Vegetable juice、Tyrosine 及 Yeast extract，故之後添加 Tryptone 及 NaCl 進行後續實驗。

表十五、培養基組成分之 Plackett-Burman 試驗設計

Table 15. The Plackett-Burman experimental design for screening suitable medium ingredients.

No.	Benzoic acid (%)	Sucrose (%)	Vegetable juice (%)	NaCl (%)	Tryptone (%)	Tyrosine (%)	Yeast extract (%)	2-PE 產量 (μg/mL)
1	0	0	0	1.0	0.25	0.5	0	5.80 ± 0.10
2	0	0	10	1.0	0.25	0	0.25	3.44 ± 0.03
3	0	0	0	0	0	0	0	1.56 ± 0.01
4	0	0.2	0	0	0	0.5	0.25	1.05 ± 0.00
5	0	0.2	10	1.0	0	0.5	0.25	1.30 ± 0.20
6	0	0.2	10	0	0.25	0	0	4.05 ± 0.01
7	0.1	0	10	0	0	0	0.25	0.62 ± 0.01
8	0.1	0	10	1.0	0.25	0.5	0	2.54 ± 0.39
9	0.1	0	10	1.0	0	0.5	0	0.83 ± 0.10
10	0.1	0.2	10	0	0.25	0.5	0	0.73 ± 0.01
11	0.1	0.2	0	1.0	0.25	0	0.25	2.89 ± 0.25
12	0.1	0.2	0	1.0	0	0	0	0.39 ± 0.00

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).



圖十二、培養基成分 Plackett-Burman 試驗設計之效應強度分析

Fig 12. Effects analysis of medium ingredients according to a Plackett-Burman experimental design.

(二)全因子關鍵組成分確定

根據 2^2 全因子試驗設計加上三個中心點確認組成份之影響能力，二因子階層試驗設計與試驗結果如表十六所示。根據 Pareto chart 分析結果（如圖十三），Tryptone 為顯著正向效應而 NaCl 與兩者交互作用呈現顯著負向效應。由表十六可觀察到 Tryptone 低劑量組(1、2) 2-PE 總和為 10.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而高劑量組(3、4) 2-PE 總和為 41.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，因此 Tryptone 的添加對於 2-PE 生產有極佳之效果。在 NaCl 部分低劑量組別(1、3) 2-PE 總和為 31.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而高劑量組別(2、4) 2-PE 總和為 19.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 由此得知 NaCl 添加過高會造成 2-PE 產量下降。為了評估 NaCl 較佳添加範圍，因此以 NaCl 添加量為單一變數探討 2-PE 產量之效應。結果如表十九所示 NaCl 添加量為 1% 時具有最高 2-PE 產量(18.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，故後續修飾全因子試驗時設定 NaCl 高低劑量將添加量為 1% 包含於其中，並提高 Tryptone 濃度進行探討。

修飾後全因子試驗設計結果如表十七所示，可觀察到 NaCl 低劑量組別(1、4) 2-PE 總和為 48.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而高劑量組別(2、3) 2-PE 總和為 49.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此結果顯示出高劑量 NaCl 雖會增加 2-PE 產量但效益不大。根據 Pareto chart

分析結果(如圖十四), Tryptone 仍具有顯著正向效應之因子。但 NaCl 對產量之效應呈現不顯著且影響力極低。因此將 NaCl 添加劑量進行修飾而 Tryptone 添加量不變的狀況下探討 NaCl 添加之影響效應。其結果如表十八所示, NaCl 高劑量組 (2、3) 2-PE 總量為 43.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而低劑量組 (1、4) 2-PE 總量為 42.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 根據 Pareto chart 分析結果 (如圖十五) NaCl 添加量修飾後影響效應雖然有增加但是仍未達到顯著效果。

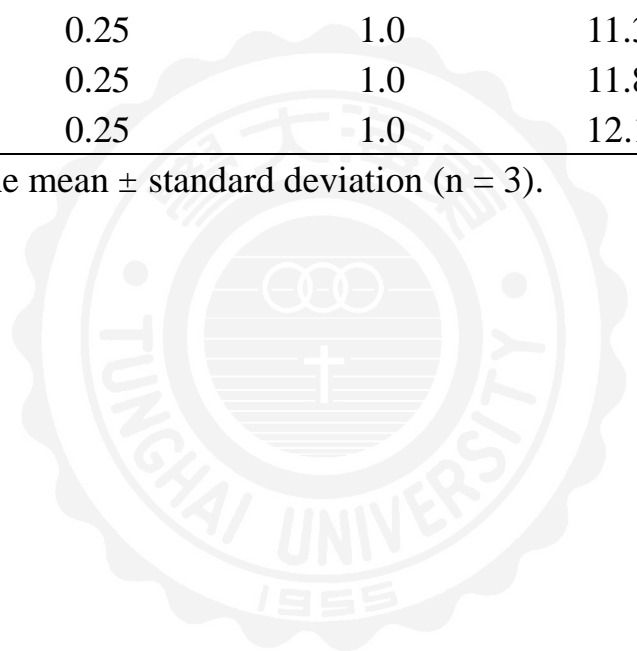
綜合上述, 經過多次修飾 NaCl 添加量後結果顯示出對於 *Gal. geotrichum* w-5 生產 2-PE 之影響效應非常不顯著。因此後續實驗將以探討 Tryptone 之添加量對 2-PE 產量結果。

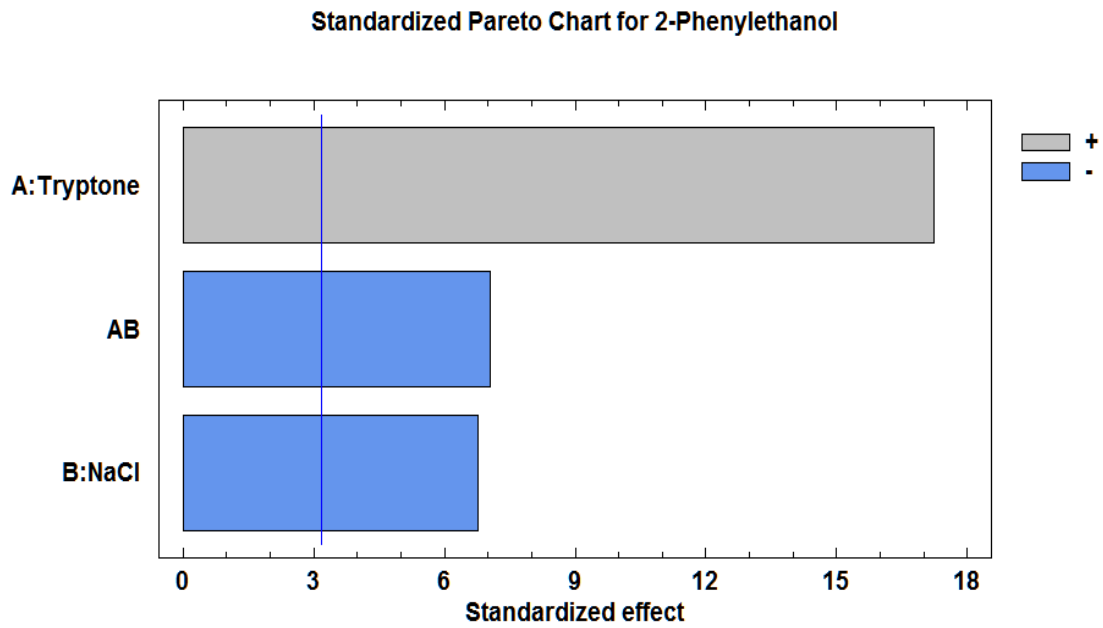
表十六、培養基組成之 2² 全因子試驗設計

Table 16. The 2² full factorial experimental design for estimating effects of medium ingredients on 2-PE production.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)	2-PE 產量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.05	0.2	5.06 \pm 0.31
2	0.05	5.0	5.32 \pm 0.16
3	1.25	0.2	26.67 \pm 3.16
4	1.25	5.0	14.37 \pm 0.18
5	0.25	1.0	11.31 \pm 0.29
6	0.25	1.0	11.85 \pm 0.31
7	0.25	1.0	12.17 \pm 0.28

Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3).





圖十三、培養基成分對 2^2 全因子試驗之分析

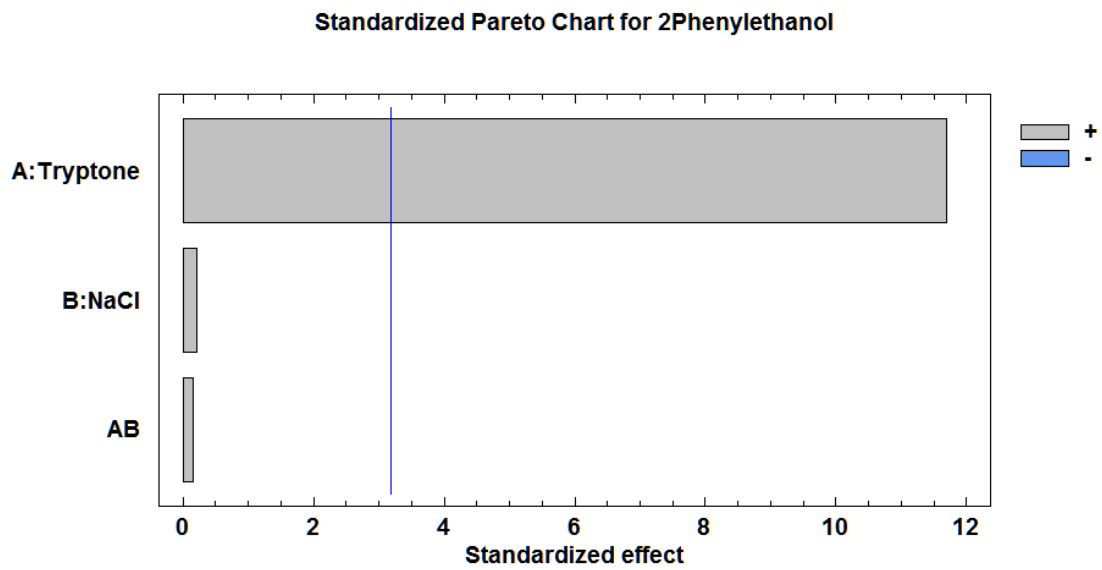
Fig 13. Analysis of medium ingredients effects according to measures of 2^2 full factorial experiments design.

表十七、培養基組成之修飾 2² 全因子試驗設計

Table 17. The modified 2² full factorial experimental design for estimating effects of medium ingredients on 2-PE production.

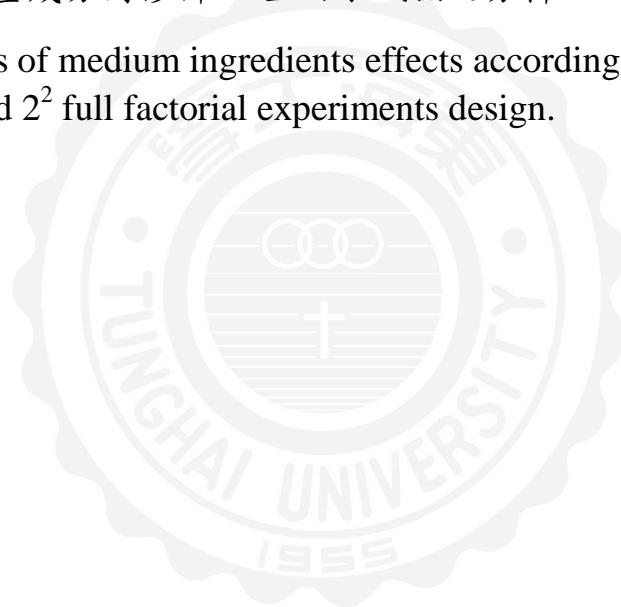
No.	Tryptone (%)	NaCl (%)	2-PE 產量 (μg/mL)
1	2.0	0.9	27.84 ± 0.13
2	2.0	1.1	28.05 ± 0.46
3	1.5	1.1	21.11 ± 0.24
4	1.5	0.9	21.08 ± 0.34
5	1.75	1.0	25.16 ± 0.08
6	1.75	1.0	25.56 ± 0.83
7	1.75	1.0	24.70 ± 0.32

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).



圖十四、培養基成分對修飾 2^2 全因子試驗之分析

Fig 14. Analysis of medium ingredients effects according to measures of modified 2^2 full factorial experiments design.

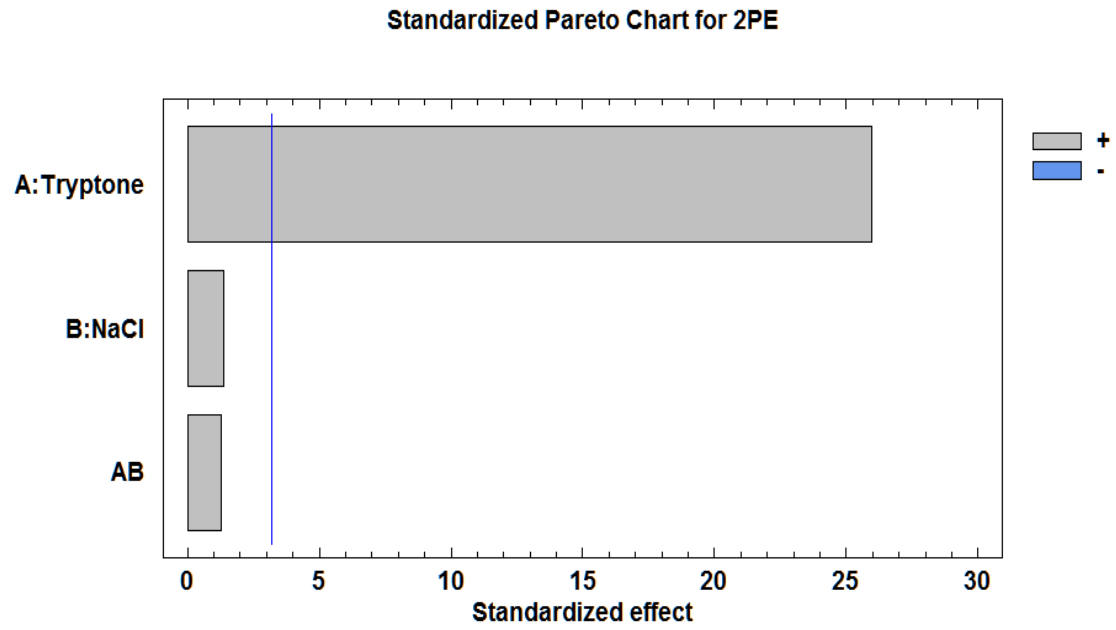


表十八、培養基組成之修飾 2² 全因子試驗設計

Table 18. The modified 2² full factorial experimental design for estimating effects of medium ingredients on 2-PE production.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)	2-PE 產量 ($\mu\text{g/mL}$)
1	2.0	0.2	24.29 \pm 0.81
2	2.0	1.0	24.92 \pm 1.02
3	1.5	1.0	18.46 \pm 0.55
4	1.5	0.2	18.44 \pm 1.28
5	1.75	0.6	21.85 \pm 0.47
6	1.75	0.6	21.77 \pm 0.31
7	1.75	0.6	21.36 \pm 0.29

Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3).



圖十五、培養基成分對修飾 2^2 全因子試驗之分析

Fig 15. Analysis of medium ingredients effects according to measures of modified 2^2 full factorial experiments design.

(三)單因子探討

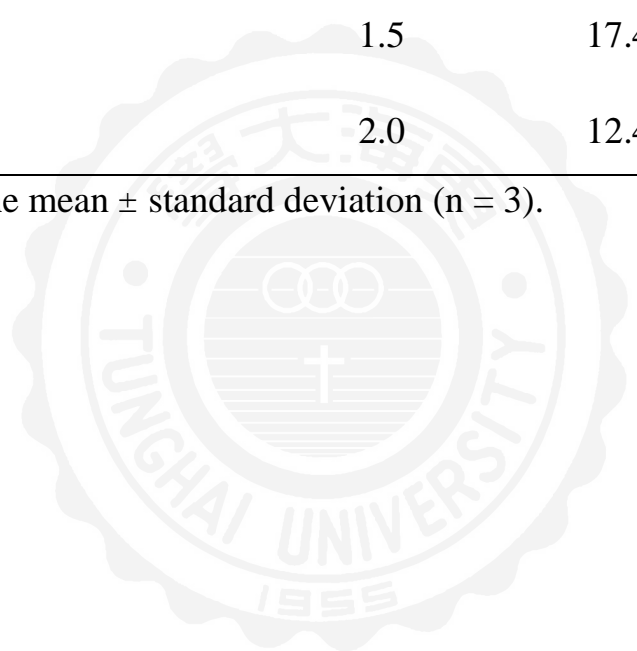
根據表十九顯示出 NaCl 單因子在添加量為 1% 時有最高 2-PE 產量，因此在探討添加 Tryptone 生產 2-PE 最佳產量之濃度時將固定 NaCl 濃度為 1% 而改變 Tryptone 濃度，其實驗結果如表二十所示，當 Tryptone 添加量為 2.25% 時 2-PE 有最高產量 ($33.23 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$)，因此 *Gal. geotrichum* w-5 培養於添加 2.25% Tryptone 及 1.0% NaCl 之 PDB 培養基於 20°C、100 rpm 下培養五天可得到最高 2-PE 產量，後續將比較 PDB 修飾前後之 2-PE 濃度，驗證是否可增加 2-PE 產量。

表十九、NaCl 單因子實驗結果

Table 19. Result of single variable experiment of NaCl.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)	2-PE 產量 (μg/mL)
1		0.5	13.52 ± 1.03
2		1.0	18.14 ± 1.14
3	1.25	1.5	17.48 ± 1.28
4		2.0	12.40 ± 0.91

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).



表二十、Tryptone 單因子實驗結果

Table 20. Result of single variable experiment of Tryptone.

No.	Tryptone (%)	NaCl (%)	2-PE 產量 (μg/mL)
1	1.75		26.50 ± 1.06
2	2.0		29.57 ± 1.11
3	2.25		33.23 ± 0.14
4	2.5	1.0	30.55 ± 0.92
5	2.75		28.88 ± 1.02
6	3.0		25.51 ± 0.79

Each value is the mean ± standard deviation (n = 3).

(四)PDB 修飾結果

根據表二十一結果得知經由 *Gal. geotrichum* w-5 培養後未修飾 PDB 培養基其 2-PE 產量平均為 1.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 而修飾後 PDB 培養基 2-PE 平均產量為 33.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。相比之下經過添加修飾後 PDB 培養基其產量增加 21.26 倍，因此經由添加 Tryptone 及 NaCl 之修飾 PDB 培養基在 20°C、100 rpm 下培養確實可提高 2-PE 產量。



表二十一、PDB 修飾前後苯乙醇產量比較

Table 21. Comparison of 2-phenylethanol productivity of PDB and modified PDB.

	No.	2-PE 產量($\mu\text{g/mL}$)
未修飾	1	1.58 ± 0.11
	2	1.57 ± 0.13
	3	1.62 ± 0.18
修飾後	1	33.84 ± 0.51
	2	33.65 ± 0.81
	3	33.87 ± 0.55

Each value is the mean \pm standard deviation (n = 3).

未修飾：PDB 培養基

修飾後：PDB 培養基加入 2.25% Tryptone 及 1.0% NaCl

伍、 結論

由 *Gal. goetrichum* 原始菌株分離出 20 株菌株並以苯乙醇產量與諾麗果汁耐性進行篩選，得一株產生較高香氣並具有諾麗果汁耐性之菌株，命名為 *Gal. goetrichum* w-5。

利用 *Gal. goetrichum* w-5 改善諾麗果汁風味，結果顯示在此菌可生長於 32.5% 小果汁及 40% 大果汁中，可降解丁酸及二甲基丁酸減少諾麗果汁中不良氣味並且產生香氣，具有改善諾麗果汁風味之能力。

PDB 中添加 2.25% Tryptone 及 1.0% NaCl 之修飾 PDB 培養基經由 *Gal. goetrichum* w-5 在 20°C、100 rpm 下培養五天後其 2-PE 含量相較於傳統 PDB 培養基增加 21.26 倍。

未來在發酵諾麗果汁時，可適當添加 Tryptone 及 NaCl 使 *Gal. goetrichum* 改善諾麗果汁風味時增加苯乙醇產量，進而生產香氣更濃郁之諾麗果汁。

陸、 參考文獻

1. 林怡吩 (2013)。雞貧血病毒結構蛋白最適化生產培養之探討。
東海大學食品科學研究所碩士論文。
2. 高國倫 (2006)。重組大腸桿菌p274發酵生產降血壓胜肽能力之
探討。東海大學食品科學研究所碩士論文。
3. 陳冠閔 (2012)。利用酸菜酵母菌改善諾麗果汁氣味。東海大學
食品科學研究所碩士論文。
4. 楊哲暉 (2013)。利用酵母菌MRA6發酵改善諾麗果汁不良氣味。
東海大學食品科學研究所碩士論文。
5. 詹佳育 (2002)。利用紫外光誘發*Leuconostoc mesenteroides*突變
以提高酒精發酵能力。東海大學食品科學研究所碩士論文。
6. 蔡正宗、李根永、江文德 (2010)。保健諾麗果汁之改良生產。
行政院國家科學委員會補助專題研究計畫。
7. Baffi, M. A., S. Romo-Sanchez, J. Ubeda-Iranzo and A. I. Briones-Perez (2012). Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *N Biotechnol* 29(3): 451-456.
8. Butler, E. E. and L. J. Petersen (1972). *Endomyces geotrichum* a perfect state of *Geotrichum candidum*. *Mycologia* 64(2): 365-374.
9. Carunchia Whetstine, M. E., K. R. Cadwallader and M. Drake (2005). Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *J Agric Food Chem* 53(8): 3126-3132.
10. Chan-Blanco, Y., F. Vaillant, A. Mercedes Perez, M. Reynes, J.-M.

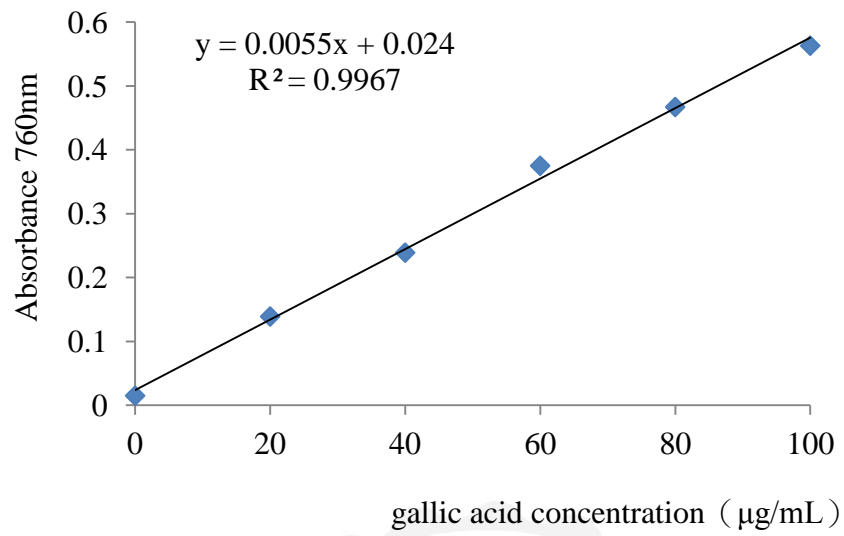
- Brillouet and P. Brat (2006). The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(6-7): 645-654.
11. Chebenova-Turcovska, V., K. Zenisova, T. Kuchta, D. Pangallo and B. Brezna (2011). Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *Int J Food Microbiol* 150(1): 73-78.
 12. Chunhieng, T. (2003). Développement de nouveaux aliments santé à partir de graines et fruits d'origine tropicale : application à la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et au fruit du Cambodge *Morinda citrifolia*. Ph.D., Institut National Polytechnique de Lorraine.
 13. de Hoog, G. S. and A. H. Gerrits van den Ende (1998). Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous *Basidiomycetes*. *Mycoses* 41(5-6): 183-189.
 14. de Hoog, G. S. and M. T. Smith (2004). Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* 50: 489–515.
 15. de Hoog, G. S. and M. T. Smith (2011). *Galactomyces* Redhead & Malloch (1977). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. C. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout, April 2011. 5: 413-420.
 16. Dixon, A. R., H. McMillen and N. L. Etkin (1999). Ferment this: The transformation of Noni, a traditional polynesian medicine (*Morinda Citrifolia*, Rubiaceae). *Economic Botany* 53(1): 51-68.
 17. Etschmann, M. M., W. Bluemke, D. Sell and J. Schrader (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(1): 1-8.
 18. Farine, J.-P., L. Legal, B. Moreteau and J.-L. Le Quere (1996). Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. *Phytochemistry* 41(2): 433-438.
 19. Fernandez, L., I. Perez-Victoria, A. Zafra, P. L. Benitez, J. C. Morales, J. Velasco and J. L. Adrio (2006). High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in

- Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 49(2): 256-264.
20. Giannoutsou, E. P., C. Meintanis and A. D. Karagouni (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresour Technol* 93(3): 301-306.
 21. Hua, D., S. Lin, Y. Li, H. Chen, Z. Zhang, Y. Du, X. Zhang and P. Xu (2010). Enhanced 2-phenylethanol production from L-phenylalanine via in situ product adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation* 28(4): 259-266.
 22. Hua, D. and P. Xu (2011). Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnol Adv* 29(6): 654-660.
 23. Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33(2): 213-217.
 24. Lacerda, I. C., R. L. Miranda, B. M. Borelli, A. C. Nunes, R. M. Nardi, M. A. Lachance and C. A. Rosa (2005). Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *Int J Food Microbiol* 105(2): 213-219.
 25. Locher, C. P., M. T. Burch, H. F. Mower, J. Berestecky, H. Davis, B. Van Poel, A. Lasure, D. A. V. Berghe and A. J. Vlietinck (1995). Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 49(1): 23-32.
 26. Majcher, M. A., K. Myszka, J. Kubiak and H. H. Jeleń (2014). Identification of key odorants of fried cottage cheese and contribution of *Galactomyces geotrichum* MK017 to the formation of 2-phenylethanol and related rose-like aroma compounds. *International Dairy Journal* 39(2): 324-329.
 27. Mo, E.K., Hyo, J.K., Chang, T.L., Bao, J.X., Jae, H.K., Qi, J.W., Jae, C.K. and Chang, K.S. (2003). Identification of phenylethyl alcohol

- and other volatile flavor compounds from yeasts, *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 13(5): 800-808.
28. Morton, J. F. (1992). The ocean-going noni, or Indian Mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colorful” relatives. *Economic Botany* 46(3): 241-256.
 29. Osorio-Cadavid, E., C. Chaves-Lopez, R. Tofalo, A. Paparella and G. Suzzi (2008). Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol* 25(6): 771-777.
 30. Pottier, I., S. Gente, J. P. Vernoux and M. Gueguen (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int J Food Microbiol* 126(3): 327-332.
 31. Redhead, S. A. and D. W. Malloch (1977). The Endomycetaceae: new concepts, new taxa. *Canadian Journal of Botany* 55(13): 1701-1711.
 32. Roger, S., C. Degas and J. Gripon (1988). Production of phenyl ethyl alcohol and its esters during ripening of traditional camembert. *Food Chemistry* 28(2): 129-140.
 33. Rychlik, M. and J. O. Bosset (2001). Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal* 11(11-12): 903-910.
 34. Schrader, J. (2007). Microbial Flavour Production. *Flavours and Fragrances*. R. G. Berger. Germany, Springer Berlin Heidelberg: 507-574.
 35. Smith, M. T., A. W. A. M. De Cock, G. A. Poot and H. Y. Steensma (1995). Genome Comparisons in the Yeastlike Fungal Genus *Galactomyces* Redhead et Malloch. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(4): 826-831.
 36. Stamatakis, A., P. Hoover and J. Rougemont (2008). A rapid

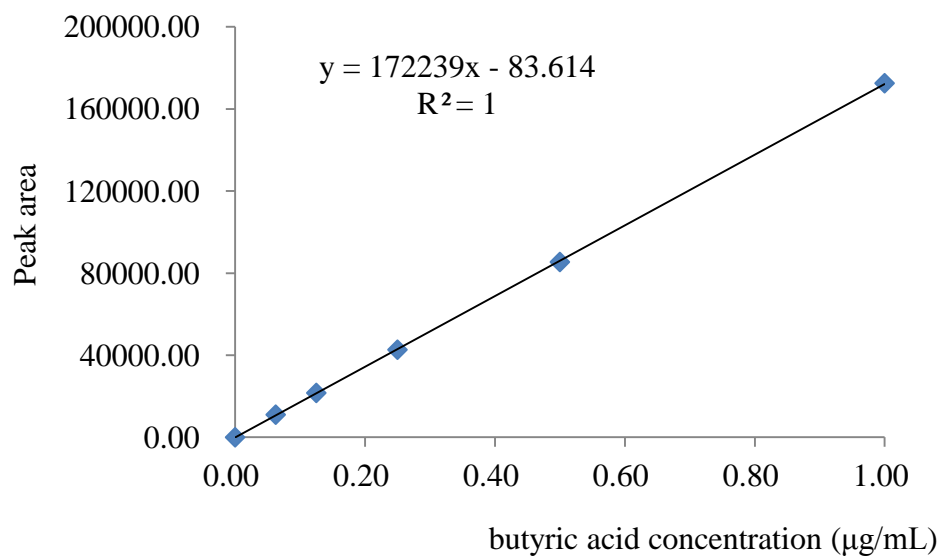
- bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol* 57(5): 758-771.
37. Swiegers, J. H., E. J. Bartowsky, P. A. Henschke and I. S. Pretorius (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11(2): 139-173.
 38. Wittmann, C., M. Hans and W. Bluemke (2002). Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19(15): 1351-1363.
 39. Yan, J.-Y., J.-K. Yang and Y.-J. Yan (2007). Optimization of lipase production conditions by *Galactomyces geotrichum* Y25. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering* 5(2): 46-51.
 40. Zhang, J., J. Shi, H. Lv and Y. Liu (2013). Induction of hexanol dehydrogenase in *Geotrichum* spp. by the addition of hexanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(3): 1279-1287.

柒、附錄



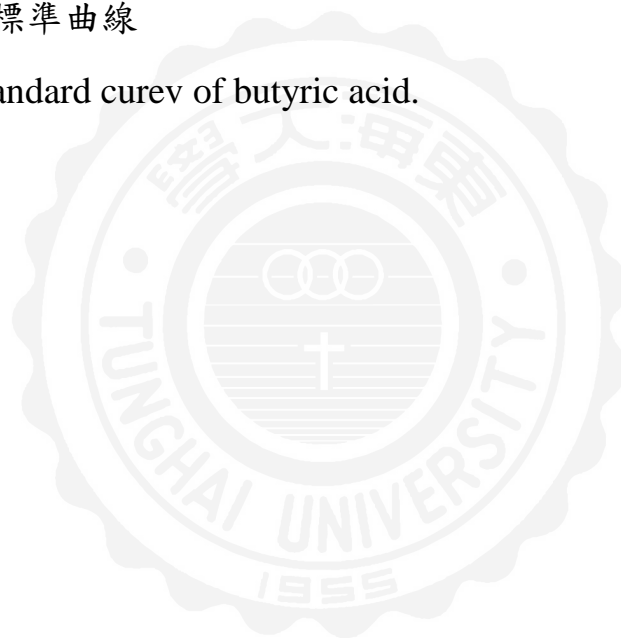
附錄一、沒食子酸標準曲線

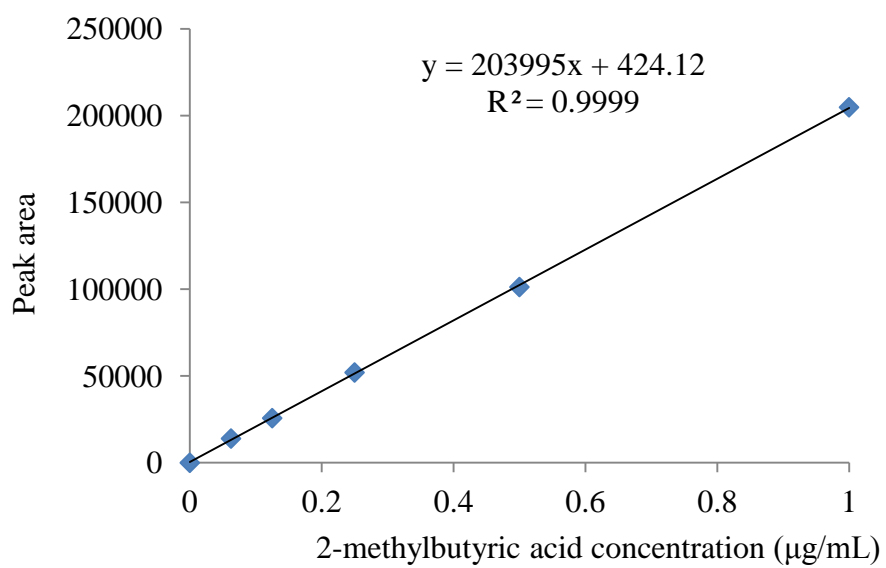
Appendix 1. Standard curve of gallic acid.



附錄二、丁酸標準曲線

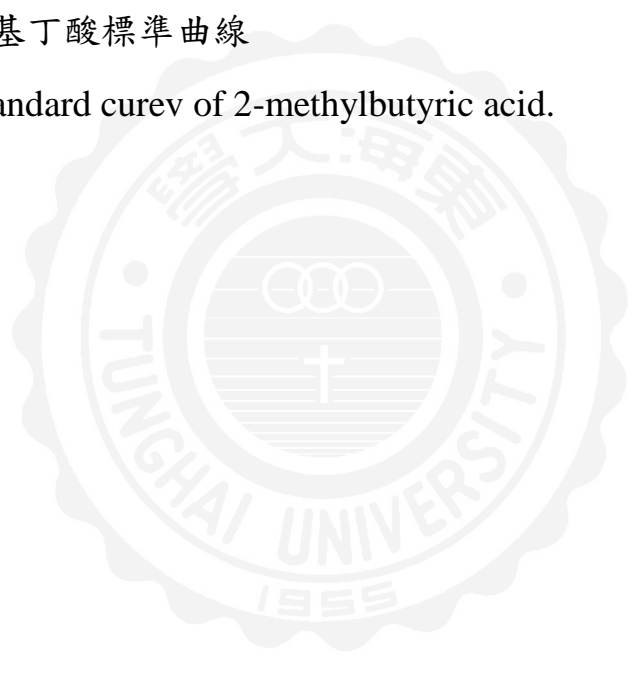
Appendix 2. Standard curve of butyric acid.

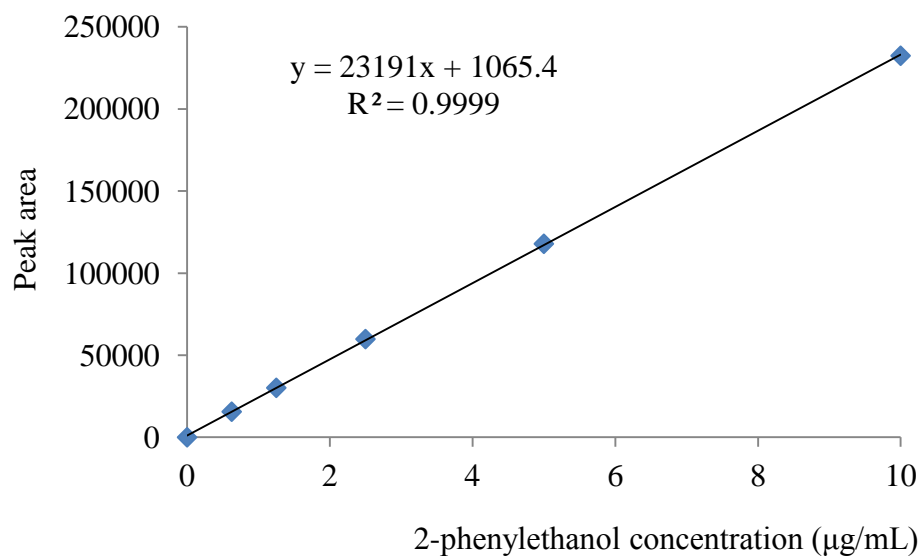




附錄三、二甲基丁酸標準曲線

Appendix 3. Standard curve of 2-methylbutyric acid.





附錄四、苯乙醇標準曲線

Appendix 4. Standard curve of 2-phenylethanol.

