

第一章 緒論

1-1 前言

國內外對高等真菌中地上真菌研究較多，而對地下真菌研究較少。但近些年來，隨著地下真菌資源及其利用價值的不斷發現，地下真菌日益受到人們的關注，尤其對塊菇的研究方興未艾。

塊菇 (truffles) 屬子囊菌類中塊菌目 (Tuberales)、塊菌科 (Tuberaceae) 之塊菌屬 (Tuber), 其子實體 (carpophores) 產於腐植質內，其中黑色類塊菇，如麝香塊菇 (*Tuber brumale* Vitt.)、黑孢塊菇 (*T. melanosporum* Vitt.)、夏塊菇 (*T. aestivum* Vitt.) 及勃根地塊菇 (*Tuber uncinatum*) 為世界最名貴之食品料理，長久以來即為歐美及中東、北非等民族視為佳餚上品，其中以黑孢塊菇經濟價值極高。

黑孢塊菇除了營養豐富，獨特的香味特徵，更倍受人們青睞，為了更好地開發利用一珍稀食用菇，了解其香味成分，目前人們藉由現代先進儀器分析鑑定及確認其香味成分後，進一步以不同培養方式產生出相同之天然香味物質。而利用微生物方式，既可符合美國食品藥物管理局 (FDA) 之法規，又可以得到天然香味物質，更可結合發酵工程及生物技術。相信隨著人們對塊菇香味研究的不斷深入和塊菇認識的加深，塊菇香味化合物分析和產生將會有更進一步的突破性進展。

1-2 微生物產生香味化合物的代謝途徑

一般微生物的代謝產物是因應調節自身生理需求、紓解外界環境壓力而產生的，在化學結構及生物活性上的變異都很大（Woodruff, 1980）。一般而言，一級代謝產物是菌體為生長所產生的必須物質，例如醣類、胺基酸等，而這些物質大部分具有 taste 和 odor 作用，二級代謝產物是紓解外在逆境所產生的，一般產生於生長期間的對數期（log phase）之後，大量生產則多在定常期（stationary phase），且極易受生長條件所影響，例如醇類、醛類、酯類、帖烯類、內酯類等香味化合物（Scharpf et al., 1986）。

以微生物的二級代謝產物當作研究生物合成對象遠比植物有利，主要是因為微生物生長期比植物短，代謝產物較易獲得，而且可以避免植物二級代謝產物的季節變異與老化等困擾（劉，1990）。

1-3 本文大綱

目前塊菇子實體栽培方式仍以傳統的樹木寄生方式為主，在材料取得不易及價格昂貴考量之下，並不利於研究之用。因此如能改以液態菌絲體深層培養，不僅可以縮短時間，生產效益也可大為提昇，對於環境衝擊也能減少，其中仍需考慮的是以發酵液所得的菌絲或菌液是否和天然的子實體具有相同的香味化合物。

本論文研究重點在於以液態培養塊菇菌絲體，首先以自行分離之組織與培養後之純化菌種，進行實驗。再利用塊菇 *Tuber melanosporum* 產生香味化合物，對其影響生長與產生香味的因子 - 培養時間、初始 pH、溫度、培養基組成、前驅物添加對菌絲體產量及特徵性香味化合物（如硫化物）等進行探討，並以實驗設計法去決定塊菇的最佳培養條件。

第二章 文獻回顧

2-1 黑孢塊菇簡介

2-1-1 塊菇的形態特徵

黑孢塊菇(*Tuber melanosporum* Vitt.) 英名 French truffle, 又名廚房的黑色金剛鑽塊菇, 為歐洲可食性塊菇之一種, 主要分佈於歐洲南部的法國、義大利等國家。其可能由盤菌屬(Peziza) 演化而來, 子囊盤(apothecium) 原為向上伸出土表, 經演化後, 向下深埋土中, 而子實層(hymenium) 亦向內演化成脈狀彎曲狀, 最後子囊盤開口漸次縮小, 演化成封閉之黑孢塊菇(Delmas, 1973)。

黑孢塊菇是一種生長在地下、沒有菌帽(pileus) 與菌柄(stipe) 構造的一年生蕈菇。其子實體(carpophore) 為黑褐色, 直徑 2 - 7 公分, 重約 20 - 200 公克, 呈圓球狀, 外皮有如鱗片狀分布, 形成硬殼。產孢組織(gleba) 暗紫至紅褐色, 菌脈呈網狀薔薇色, 稍遲則為黃色, 常帶有麝香、蕈菇、溼地、熟爛的草莓以及濕稻草等氣味。每一子囊(ascus) 內具 2 或 4 個子囊孢子(ascospore); 子囊孢子橢圓形(30~50×20 - 30μm), 表面具細刺。子實體多產於初秋至冬季, 產量不多(胡弘道, 1987b; 林裕森, 2002; Trappe, 1979)。

黑孢塊菇於春天氣候暖和時開始生長, 其冬眠菌根開始復甦活耀, 孢子亦開始發芽(germination), 至四月當其寄主植物光合作用增加且開花時, 新菌根開始產生, 夏季雨量增加, 植物枝葉旺盛, 菌根亦大量增加, 此乃因寄主有大量碳水化合物合成之故。秋天來臨時, 其寄主植物開始落葉, 組織內

醣類被移出，黑孢塊菇亦開始產生子實體，其內孢子亦漸次成熟。直至冬季來臨，冬季菌根開始萎縮或進入休眠狀態，以待次年春季到來，開始另一次循環（Delmas, 1973）（Fig.2-1）。

黑孢塊菌為與林木共生之外生菌根菌，必須與寄主共存，才能形成子實體。主要的寄主有歐洲水青剛（*Fagus sylvatica*）、毛櫟（*Quercus pubescens*）及一些櫟屬（*Quercus*）（如 *Q. pedunculata*, *Q. sessiliflora*, *Q. illex*），樺木屬（*Betula*）、榛木屬（*Corylus*）與半日花屬（*Cistus*）等植物，均能與黑孢塊菌形成菌根（Chevalier, 1978b；Chevalier and Frochot, 1981；Chevalier and Grente, 1978；Chevalier et al., 1978；Giovannetti and Fontana, 1982；Trappe, 1962）。

黑孢塊菌適應能力極強，於山谷、坡地、高原、林地邊緣之廢地或石灰質土壤皆生長良好，然其最適於具有豐富有機質或鈣質土壤上生長，自然狀況下，其子實體多埋於地表下 1 - 6 公分處，孢子須待子實體成熟腐爛後自然釋出。傳播時藉子實體強烈氣味，吸引昆蟲產卵其上，待卵孵出成蟲飛離時將孢子帶走，或經由動物吃食消化後排泄它處，達到傳播孢子目的（Trappe, 1980）。故歐洲人常以訓練有素之豬或狗，藉其靈敏嗅覺，尋找野生塊菇之分佈（Delmas, 1973；Trappe, 1980）。

人工栽培黑孢塊菇時，多以無菌苗培養，將種子消毒後，播種於無菌土壤中，待其發芽時再以黑孢塊菇孢子懸浮液，純培養的菌絲體或攜帶菌根之切根接種於幼根上，促使菌根形成。另一方式則將植物幼苗栽植於黑孢塊菇菌絲之土壤中，促使幼苗根部形成菌根（Delmas, 1983）。

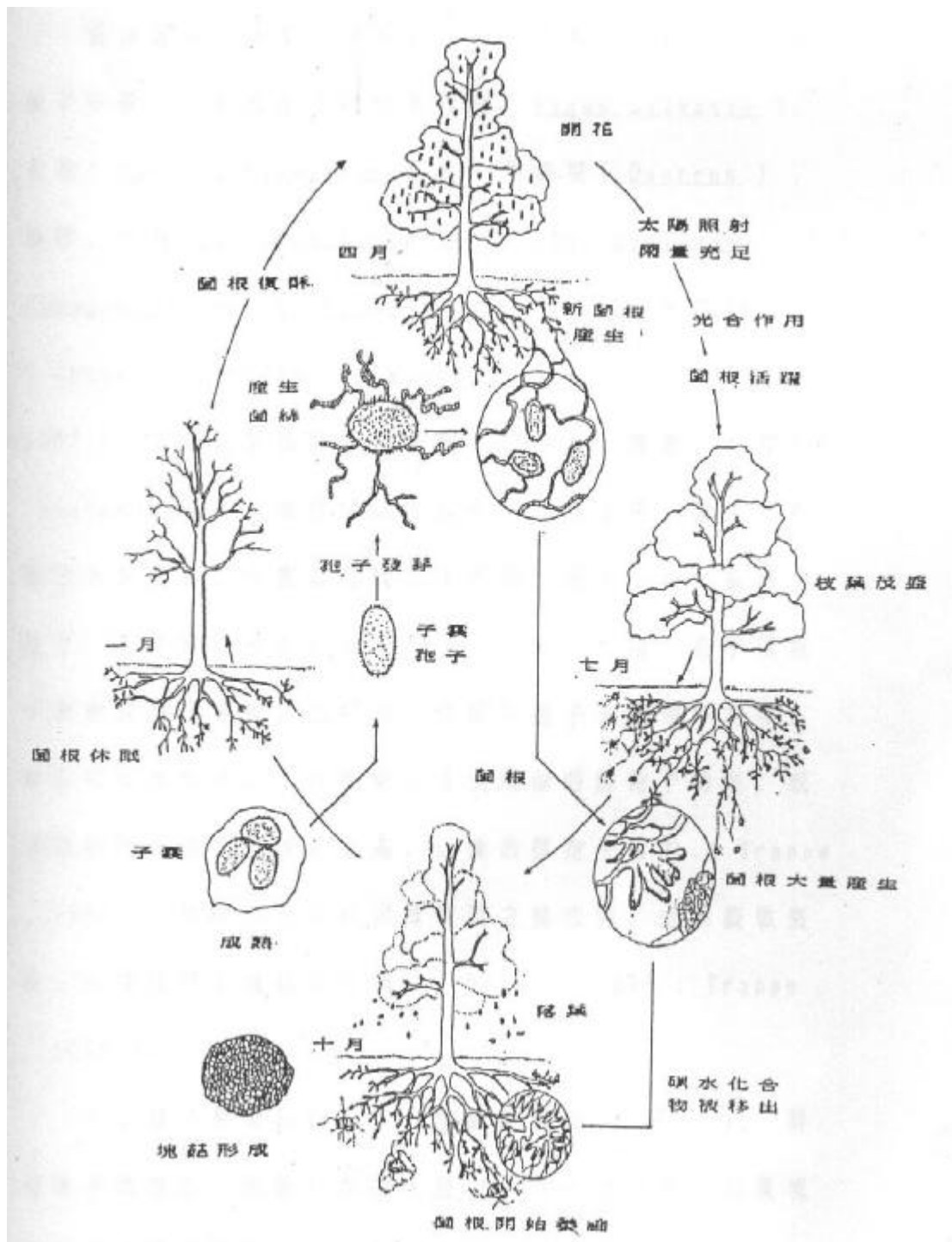


Fig.2 - 1 块菇生长循环 (Delmas, 1973)

2-1-2 黑孢塊菌之純培養技術

大部份的外生菌根菌研究均需培養菌根菌，以供接種用，或為研究外生菌根分類及遺傳。許多外生菌根菌已有生產純菌絲或營養繁殖體的技術(胡弘道, 1976; 1987a; Danell and Fries, 1990; Zak and Bryam, 1963; Zak and Marx, 1964)。有關黑孢塊菌之研究，多著重於形態、生態及人工合成等方面，對於黑孢塊菌的純培養技術較少描述；然黑孢塊菌亦為菌根菌之一種，因此其培養試驗或可參考其它菌根菌培養試驗結果，供作純培養的依據。

所有的外生菌根菌欲得最佳之生長，需要一組合適的環境狀況，影響外生菌根菌生長之因子有溫度、濕度、通氣、光照及生長培養基中之養份（尤其是碳源、氮源）、培養基之型式、培養基 pH 值等（胡弘道，1990），茲分述於次：

1. 培養基

培養基（medium）為菌落生長基床，外生菌根菌之生長受到不同配方之培養基及其組成濃度所支配。合成培養基的養分組成包括碳源、氮源、磷、鉀、鎂、硫、微量元素及維生素，其種類與濃度對外生菌的生長可能具有促進或抑制效應。

(1) 碳源種類

碳源種類有單糖、雙糖及多糖體，包括葡萄糖、果糖、甘露糖、蔗糖、麥芽糖、乳糖、澱粉、纖維素、果膠及木質素等。許多研究證實，大數的外生菌根菌需要簡單之溶解碳水化合物作為碳源（Lewis and Harley, 1965a; 1965c），但不同菌種對不同碳源之利用不同（Ferry and Das, 1968; Lamb, 1974; Lewis and Harley,

1965a ; 1965c)。

胡弘道 (1990) 指出：大部份之外生菌根菌利用木質素與纖維素乃極度受限，在利用澱粉、肝糖、菊糖、單糖和雙糖之能力，因種內及種間而不同；單糖類中之葡萄糖、甘露糖及果糖常是良好之碳源，果膠質能被有些真菌用於生長，有些則不能被利用。因此，對於黑孢塊菌之純培養試驗，碳源種類的供給應加以考量。

(2) 氮源種類

氮源種類可分為有機態氮及無機態氮。前者包括氨基酸，酪蛋白水解產物 (casein hydrolysate)，月生月太 (peptides)，蛋白月東 (peptones) ……等等，後者以硝酸態氮及銨態氮為主，不同外生菌根菌對氮素來源之利用不同 (Hung and Trappe, 1983 ; Littke et al., 1984 ; Lundeberg, 1970)。大部分菌根菌在無機來源中以氮化合物生長最佳，一些能利用硝酸鹽，一些則不能。Littke et al., (1983) 發現 *Hebeloma crustuliniforme* 能有效利用硝酸鹽及銨鹽作為生長，但以銨鹽最佳，其銨離子之吸收則使 pH 上升 (5.0→6.0)。pH 值之改變會影響媒質成分及 CO₂ 之溶解度與細胞表面酵素的活性 (胡弘道，1990)。外生菌根菌對有機氮之利用，菌種間與種內有相當大的變異，而對有機氮的種類需求亦有差異 (Lundeberg, 1970)。

(3) 磷、鉀、鎂、硫等元素及微量元素

磷酸鹽對菌根菌之生長極為重要。在人工培養媒質中一般以無機磷酸鹽存在，但真菌之正常生育地乃土壤之腐植質層，故磷酸鹽能以有機磷酸鹽存在，實驗

的觀察已證實菌根菌能利用有機磷酸鹽 (Theodorou, 1971)。鉀為菌根代謝必需且可影響菌體內陰、陽離子的吸收與交換 (Edmondson et al., 1976 ; Harley and Wilson, 1959)。鎂與酵素系統活性有關，而硫與代謝有關。微量元素為菌根菌生長不可欠缺的元素，然其研究最大困難乃菌根菌需求量少而不易測定。上述的這些養分對黑孢塊菌的培養均可能有所影響。

(4) 維生素

菌根菌對維生素的需求至今仍未十分明瞭。不同菌根菌對維生素的種類有不同需求 (Laiho, 1970 ; Melin, 1963 ; Norkrans, 1950)。Melin (1963) 曾試驗維生素對菌根菌生長之影響，發現大多數菌根菌依賴維生素乙 (thiamine) 之供應，或需嘧啶 (pyrimidine) 及 thiazole 之供給，才能生長良好。

(5) 有關菌根菌不同培養基之試驗結果

洪玲玲(1977)培養 *Pisolithus tinctorius* 及 *Suillus bovinus* 兩種菌根菌時，以下列不同培養基進行試驗：

1. MMN (Melin modified Norkrans agar medium)
2. HA (Hagem agar medium)
3. PDA (Potato dextrose medium)
4. PMA (Palmer's medium)
5. MHA (modified Hagem agar medium)

其中，*P. tinctorius* 以 HA 及 MMN 生長最佳，而 *S. bovinus* 除 PDA 以外，皆生長良好。

Hasija 及 Agarwal (1978) 培養 *Trichothecium roseum* 菌根菌時，以下列培養基進行：

1. Asthana and Hawker' s medium
2. Brown' s medium
3. Coon' s medium
4. Czapek' s medium
5. glucose - asparagine medium
6. Richard' s medium
7. potato dextrose medium

結果以 potato dextrose 及 Brown' s medium 兩種 medium 最佳。

周綠蘋(1983)培養松口蘑(*Tricholoma matsutake*) 菌根菌時，以下列三種培養基進行：

1. Hamada medium
2. CMA (glucose, yeast extract medium)
3. MMN

結果以 CMA 培養基生長最佳。

許碧如 (1987) 培養夏塊菇 (*Tuber aestivum*) 菌根菌時，以下列培養基進行試驗：

1. MMN
2. HN (Hagem nutrient agar medium)
3. Bonner' s medium
4. Oat flake medium
5. YpSs medium

結果以 YpSs 培養基生長之菌落最佳。

邵佐謙 (1992) 培養黑孢塊菇 (*Tuber melanosporum*) 菌根菌時，以下列培養基進行試驗：

1. MECT(Malt extract and Casein hydrolysate Thiamine

agar medium)

2. PGA (Peptone Glucose agar medium)

3. MMN

4. MMNC

5. HM

6. HNAM

7. Oat (Oat flake medium)

8. YpSs

結果顯示以 MECT 培養基生長之菌落最佳。

綜合以上所述，不同菌根菌之最適培養基亦不相同，並無特定通用的培養基皆適用於不同菌種生長。

2. 溫度影響

溫度對菌根菌之新陳代謝具有極重大的影響。各菌種適宜溫度範圍各不相同，而且單一菌種之各品系亦有極大變異 (HacsKaylo et al., 1965 ; Theodorou and Bowen, 1971)。

HacsKaylo et al., (1965) 研究發現，培養六種菌根菌之最適生長範圍為 24 - 29 。 Laiho (1970) 培養 *Paxillus involutus* 諸品係菌種時，以 5 - 32 範圍進行，結果以 15 - 25 之生長最佳。Theodorou 及 Bowen (1971) 培養 *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* 及 *S. luteus* 等松類菌根菌，發現 *Rhizopogon luteolus* 以 20 - 25 之生長最佳；*Suillus granulatus* 之生長以 20 最佳；*S. luteus* 則以 25 之生長最佳。

洪玲玲(1977)培養 *Pisolityhus tinctorius* 及 *Suillus*

bovinus 兩種菌根菌時，發現 *P. tinctorius* 之生長以 28 - 36 之生長最佳，12 以下生長開始受限制。*S. bovinus* 之生長以 20 之生長最佳，8 以下，30 以上生長則受抑制。Hasija 及 Agarwal (1987) 培養 *Trichothecium roseum* 菌根菌時，以 28 時生長最佳，10 以下，40 以上則不生長。

周綠蘋 (1983) 培養 *Tricholoma matsutake* 菌根菌時，認為 20 - 24 生長最佳，4 以下，32 以上菌種則死亡。許碧如 (1987) 培養 *Tuber aestivum* 菌根菌時，其菌落生長以 30 最佳。邵佐謙 (1992) 培養 *Tuber melanosporum* 菌根菌時，其菌落生長以 20 最佳，37 以上菌種死亡。

由上述研究可知各菌種最適生長範圍各不相同，大多於 20 左右最佳。然而各菌種之生態活動、遺傳性質、生理特性及其與寄主共生之關係，亦能左右其生長情形。

3. pH 值之影響

pH 值代表基質之酸鹼性，影響養分有效性及陰陽離子的置換，間接影響培養媒質中菌根菌之生長，因此提供最適宜的媒質 pH 值，對菌根菌接種源的生產極為重要 (Hung and Trappe, 1983)。

胡弘道 (1976) 培養 *Pisolithus tinctorius* 時，其適生長於 pH 範圍 3.1 - 7.0，而以 pH 值 6.0 - 7.0 最佳。洪玲玲 (1976) 培養 *Pisolithus tinctorius* 及 *Suillus bovinus* 兩種菌根菌時，認為 *P. tinctorius* 以 pH 值 6.6 最佳；*S.*

bovinus 以 pH 值 5.5 生長最佳。

Hung 及 Trappe (1983) 培養九種外生菌根菌發現 , *Amanita muscaria* 以 pH6 生長最佳 ; *Cenococcum geophilum* 適生長於 pH3 - pH7 之間 , *Hebeloma crustuliniforme* 以 pH7 時生長最佳 ; *Laccaria laccata* 以 pH4 - 6 生長 ; *Pisolithus tinctoruns* 以 pH3 - 7 最佳 ; *Rhizopogon vinicolor* 以 pH4 - 6 生長最佳 ; *Suillus lakei* 以 pH4 及 6 時最佳 ; *Thelephora americana* 適生長於 pH3 - 6 之間。

許碧如(1987)以 pH 值 4.5 - 8.5 培養 *Tuber aestivum* 菌種時 , 認為 pH6.5 及 5.5 最佳。邵佐謙 (1992) 以 pH 值 5.0 - 8.0 培養 *Tuber melanosporum* 菌種時 , 以 pH6.0 生長最佳。

由上述研究可知不同菌種之最適生長的 pH 值亦不同 , 其忍受範圍亦有差異。而相同菌種的各品系間 , 在適宜之 pH 值中 , 其生長速率亦有很大差異 , 並且適宜生長曲線之形式亦不相同 (Laiho, 1970)。

2-2 利用生物技術產生香味物質

所謂生物技術 (bio-technology) , 根據歐洲生物技術聯盟 (1981) 的定義是「利用培養的微生物或細胞體的功能, 組合了生物技術, 微生物學與化學工程等知識, 而達到技術運用的目的」。廣泛的說: 生物技術涵蓋了微生物學, 生物化學, 生化工程等領域, 例如利用發酵製成食品、藥品、抗生素、酵素, 以及細胞的培養, 廢水的處理, 能源的製造, 轉換等等, 都是生物技術應用於今日文明的例子。(程, 1984)

生物技術應用於香料工業可說是一項頗新的嘗試, 於1980年以後才逐漸受到重視 (Gocho, 1984)。目前世界上所有的香料中, 化學合成的香料佔了大部分, 其缺點為缺乏天然香料的複雜與光學選擇性 (S-stereo selectivity)。但高價值的香料乃是以天然植物而來的為主。然而經由農業栽培而來的香料容易受到季節、供需、品質變異甚至政治因素的影響, 造成潛在的不穩定因素。因此生物技術崛起的原因不外乎人類對於『天然』產品之喜好與日俱增, 天然資源日漸減少, 因此利用有限資源提高產量乃成為趨勢, 應用生物技術恰好可以彌補上述兩種香料來源的不足。(程, 1984)

根據美國食品藥物管理局 (FDA) 規定, 凡發酵產品可視之為天然, 又文獻記載, 一些微生物可產生一些具有特徵的香氣化合物。若利用微生物發酵產生之香味物質, 則可名之為天然香料。再者, 發酵方是深具生物技術應用之潛力。因此, 以微生物發酵生產香味配料, 逐為產製天然香料之另一途徑。

在自然界或培養基中, 某些微生物會在其生長過程中散

發出許多揮發性香味物質 (Janssens et al., 1992 ; Omelianski, 1923)。此種代謝物質若依據感官性質 (sensory properties) 則可分為兩大類 (Table 2-1) odorants 及 tastants。tastants 包括鹹、甜、苦及酸味，主要是由胺基酸、月生月太、糖類等貢獻而來；odorants 則極具揮發性，包括醛、酮、酯、醇、帖烯類等 (Scharpf et al., 1986)。這種感官品評所得的香味性質自二十世紀即被微生物學家作為微生物分類的指標之一，Omelianski (1923) 為最早以微生物產生之香氣作為各菌株辨認標準的學者；又 Badcock (1939) 曾對 wood-destroying fungi 所產生之特有氣味加以描述 (Table 2-2)，Nobles 以氣味的有無及氣味的種類 (sweet, fruit, musty, earthy, antiseptic, miscellaneous odor) 作為無子實體之擔子菌綱 (Basidiomycetes) 之分類 (Nobles, 1965)；除外，skunk—like odor 之能否產生也曾被用來作為 *Mucor* 屬菌分類鑑定的指標 (Ellis and Hesseltine, 1969)。

學者進行微生物所產生感官上特殊氣味成分之鑑定工作始於一九四〇年代。如 Birkinshaw 及 Findlay (1940) 鑑定出真菌 *Lentinus lepideus* 的香味物質為 anisic acid, cinnamic acid 及 p-methoxycinnamic acid 的酯類；Birkinshaw 等人 (1944) 亦由 *Trametes suaveolens* 分離鑑定其主要香味成份為 anisaldehyde。

自此之後，陸續有學者發現各種產香菌，並加以分離鑑定其香味成份。

Table 2 - 1 微生物代謝物質之感官性質 (Scharpf et al., 1986)

Primary Odorants	Tastants & Odorants	Primary Tastants
Aldehydes	Amines	Amino acids
acetaldehyde		
phenylacetaldehyde		
Ketones	Fatty acids	Peptides
diacetyl		
acetophenone		
Esters	Pyrazines	Sugars
ethyl butyrate		
Alcohols	Lactones	Polyols
butanol		
Terpenes		
citronellal		

Table 2 - 2 一些真菌菌株產生之香味性質 (Badcock,1939)

Fungi	Odor description
<i>Coprinus micaceus</i>	strong mushroom
<i>Daedalea quercina</i>	apples
<i>Fomes fomentarius</i>	oily, tallow
<i>Fomes fraxineus</i>	faint fragrant
<i>Fomes laricis</i>	faintly fragrant
<i>Fomes lignosus</i>	none
<i>Fomes noxius</i>	none
<i>Fomes pinicola</i>	fish, tallow
<i>Ganoderma applanatum</i>	faint tallow
<i>Ganoderma oregonense</i>	faintly fragrant
<i>Ganoderma resinaceum</i>	none
<i>Lentinus cochleatus</i>	anisaldehyde
<i>Lentinus lepideus</i>	anisaldehyd
<i>Lenzites abietina</i>	none
<i>Lenzites betulina</i>	fish, tallow
<i>Lenzites flaccida</i>	tallow
<i>Lenzites repanda</i>	none
<i>Lenzites sepiaria</i>	slightly spicy
<i>Lenzites striata</i>	iodine
<i>Lenzites trabea</i>	rubber, iodine, bitter
<i>Lenzites tricolor</i>	slight pepper
<i>Marasmius alliaceus</i>	carlic
<i>Merulius confluens</i>	moderately fragrant
<i>Merulius himantioides</i>	iodine, rubber, bitter
<i>Merulius lacrymans</i>	very slight fungus odor
<i>Merulius rufus</i>	faint mushroom
<i>Merulius tremellosus</i>	burnt toffee

Table 2 - 2 (續)

Fungi	Odor description
<i>Paxillus atrotomentosus</i>	unbleached calico
<i>Paxillus panuoides</i>	slight fragrance
<i>Pholiota adiposa</i>	earthy
<i>Pholiota lucifera</i>	earthy
<i>Pholiota murabilis</i>	earthy
<i>Pholiota spectabilis</i>	slightly sweet
<i>Pholiota squarrosa</i>	strong, earthy
<i>Pleurotus euosmus</i>	fragrant
<i>Pleurotus lignatus</i>	new meal
<i>Pleurotus ostreatus</i>	slightly fragrant, mushrooms
<i>Pleurotus sapidus</i>	fragrant
<i>Pleurotus ulmarius</i>	slightly fragrant
<i>Polyporus adustus</i>	slightly fragrant (terpenoid)
<i>Polyporus anceps</i>	none
<i>Polyporus bensoinus</i>	benzaldehyde, anisaldehyde
<i>Polyporus croceus</i>	narcissus
<i>Polyporus dyrus</i>	pleasant, fruity, quince
<i>Polyporus frondosus</i>	hydrocyanic acid, cherry laurel
<i>Polyporus fumosus</i>	none
<i>Polyporus graveolens</i>	unpleasant
<i>Polyporus mollis</i>	none
<i>Polyporus mikadoi</i>	none
<i>Polyporus obducens</i>	hydrocyanic acid, cherry laurel
<i>Polyporus obtusus</i>	moderately fragrant, jasmine
<i>Polyporus picipes</i>	slightly fragrant
<i>Polyporus butilans</i>	slightly fragrant
<i>Polyporus schweinitzii</i>	pleasant, anise

Table 2 - 2 (續)

Fungi	Odor description
<i>Polyporus squamosus</i>	none
<i>Polyporus sulphureus</i>	none
<i>Polystictus tabacinus</i>	none
<i>Polystictus versicolor</i>	fish, tallow
<i>Poria vaillantii</i>	faint mushroom
<i>Poria xantha</i>	limonene, lemon
<i>Stereum frustulosum</i>	fruity, rotting apples
<i>Stereum hirsutum</i>	faintly fragrant
<i>Stereum illudens</i>	sweet, banana
<i>Stereum lobatum</i>	faintly sweet
<i>Stereum murrayi</i>	vanilla
<i>Stereum purpureum</i>	moderately fragrant
<i>Stereum rugosum</i>	fruity, banana
<i>Stereum sanguinolentum</i>	fragrant
<i>Stereum spadileum</i>	faintly fragrant
<i>Trametes malicola</i>	faintly fragrant
<i>Trametes odorata</i>	fruity
<i>Trametes pini</i>	none
<i>Trametes rubescens</i>	faint tallow
<i>Trametes suaveolens</i>	strong, anisaldehyde
<i>Trametes tenuis</i>	none
<i>Ustulina vulgare</i>	none
<i>Xylaria hypoxylon</i>	nitrous
<i>Xylaria polymorpha</i>	none

2-2-1 揮發性物質於微生物界的功能

微生物產生的香味物質屬於二級代謝產物，不為生長所必須，多於生長曲線的靜止期內蓄積。而既不為生長所必須，則它們於微生物界是否扮演著其他角色？根據文獻記載，這些揮發性物質可能具有以下的功能：

1. 解毒機制

將細胞或培養液中的醇類及酸類進行酯化，以免蓄積過多，對微生物造成毒害（Collins, 1976）。

2. 生存競爭的武器

微生物分泌這些物質，期能利用化學方法抑制其他競爭者的生長，而使本身存活，有如高等植物的 alleopathy 現象。如 *Fomes annosus* 產生 triace-tylene、hexa-1-3-5-triynne，而能有效地抑制其他五種真菌的生長。Kurita 等人（1981）亦發現精油中的某些成分（如 cinnamaldehyde）具有抑制真菌生長的效果。

3. 促進真菌孢子發芽

French 等人 n-nonanal 可促進 *Puccinia graminis* 之 uredospore 發芽（French and Gallimore, 1971, 1972）、又 *Agaricus bisporus* 的菌絲產生 isovaleric acid，以誘導附近的孢子發芽（Fries, 1973）。

4. 作為吸引物質

某些真菌可產生揮發性物質作為昆蟲吸引劑，如 *Cer-tocystic fagacearum* 及 *Phellinus* spp.（Collins, 1976；Hutchinson, 1971）。

2-2-2 影響微生物生合成香味物質之因子

自然界中可散發出某種特殊香味物質的微生物，於實驗室培養時，可經由各種培養條件的控制改變其香味組成或含量，因此微生物之香味化合物的產生會受到一些因素（包括內在因子與外在因子）之影響。謹列述如下：

1. Strain

當一般的形態、生理差異性無法作為微生物菌株間之辨認指引時，微生物學家尚可以其產生之揮發性代謝物作為不同 species，不同 strains 的分類標準（Badcock, 1939）。因此菌株間的揮發性香味成份會因 species、甚或 strain 之不同而有所差異。

如 *Ceratocystis fimbriata* 的兩個 strain 835c 與 856，在相同的生長條件下所產生的香味成份完全不同，其中 835c 這一株菌可大量製備 terpene alcohol，而 856 這一株則毫無此種能力（Hanssen and Sprecher, 1981）。而此種特性已被微生物分類學家應用在微生物分類上（Scharpf et al., 1986）。

2. 菌體的生理狀態

於培養產香菌時，大多使用振盪培養，而於生長靜止期產生其特殊香味（Halim et al., 1975b）。但有些菌株只能靜置培養於液體或固體培養基中，待其產孢出現，方有風味物質的形成，此可能是有產香菌需於菌絲狀態方能產生其特有香氣，而有些菌株只有孢子方具有產香能力。如利用 *Penicillium roqueforti* 產生 blue cheese 風味物質時，因為孢子遠較菌絲具有水解乳脂及 β -oxidation 的能力而能產生 methyl ketones（Kinsella, 1976a），故接種大量孢子於基質上，進行固體發

醇，可產生 blue cheese 的主要風味物質（methyl ketones）（Larroche, 1988）。

另 *P.decumbens* 及 *I.benzonium* 亦需靜置培養，方有風味物質出現（Halim et al., 1975b；Berger et al., 1987）。

3. 碳源

碳水化合物一般是提供菌體生物質量（biomass）及生長所需之能量，而文獻記載碳源種類亦會影響產生之香氣組成及含量。

Lanza 等人（1976）發現當培養液之碳源種類改變時，*Ceratocystis moniliformis* 會產生各種不同的水果香，當以 glucose 為碳源時，可產生香蕉香味，以 glycerol 為碳源時，則培養液有桃子味，若改以 oleic acid 為碳源時，反而產生了黴味。

除了碳源種類會影響微生物產香種類，碳源濃度亦對菌種產生之香氣含量有所影響。如對 *Sporobolomyces odorus* 而言，mannitol 於 3% 濃度時，可得到最高之香氣產量，而當濃度提高至 6% 時，產量反而下降（李秀鈴等人，1992）。

4. 氮源

一般微生物利用氮源（包括無機態氮、有機態氮）來作為細胞體構之來源。而由文獻中可發現微生物於不同的氮源培養時，不僅菌體生長率（乾重）有所改變，亦會影響其產生香氣組成和含量。如 *Sporobolomyces odorus* 培養液中含相同碳源，而以其他氮源如 alanine、arginine 或 asparagine 代替 peptone 時，則所測得之揮發性香味成份化合物之種類大致上

均比以 peptone 為氮源時少。(李秀鈴等人, 1992)。

5. 酸鹼值 (pH)

培養基中之氫離子濃度, 對微生物增殖發育有很大的影響。而菌體生長之最適 pH 值不一定是所欲生成代謝產物之最適 pH 值, 如 *Clostridium butyricum* 生產丙酮、丁醇之發酵過程中, 若 pH 維持中性, 菌體生長情形甚佳, 代謝產物的量甚少 (蘇和黃, 1971)。

6. 培養時間 (incubation period)

香味化合物是微生物二級代謝產物, 所產生時間也極易受生長條件的影響 (蕭, 1985), 如 *Ceratocystis variospora* 產生最大量的帖烯香味化合物是在培養 4-6 天 (Hubbal and Collins, 1978)。

2-3 香味之分析技術

食品中香味之組成，有其主要的特徵，即有其特殊之香氣（aroma）成分，可讓人立即判別出何種產品會具有這種香味，有時在這些複雜的香氣成分中，有某些化合物具有主要貢獻，是賦予該項產品香味特徵之主要因子（Emberger, 1985）。但是絕大部分天然產品中香味物質之含量僅在數 ppm 到 100ppm 之間（也有低至 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ ppb 濃度者），且香氣成分平均由 300 ~ 400 個化合物構成（Schreier and Idstein, 1985；Emberger, 1985），甚至有些產品，例如咖啡，含有超過 700 個化合物的組成（Emberger, 1985），而化合物個別的濃度從數 ppm 到 1/100ppb，化學官能基即結構式亦大部分不相同；沸點亦甚廣泛，由 20 ~ 300 不等。且一般僅有相當少量的化合物經鑑定後對香料結構（flavor profile）具有重要性；可見香味分析具有複雜性及艱難性。以下將針對香味成分有關之分析方法及步驟做介紹。

2-3-1 分析步驟

如何決定香味分析的方法，而達成鑑定其成分之目標呢？有 5 項一般常用的方法與步驟（Emberger, 1985）：(1) 選擇具有代表性的產品做為分析樣品。(2) 選擇適當的單離（isolation）方法，分離（separation）並濃縮香味物質，以確認有最佳之結果。(3) 由複雜的香味化合物預先分離（pre-separation）形成更為均一的區分物（uniform fractions）。(4) 高效能分離法：使用氣相層析法（gas chromatography, GC）、毛細管層析法（capillary chromatography）。(5) 以氣相層析（GC）- 質譜儀（mass spectrophotometer, MS）作結構之鑑定。

2-3-2 選擇樣品

欲獲得天然原型產品 (natural prototype) 的香味物質，必須選擇正確的且品質最佳的原型產品做為分析樣品，才能獲得目標物的香味 (target flavor)。例如：新鮮濃郁的塊菇子實體與以深層培養方式培養的塊菇菌絲體，具有不同的香味特徵，不同產品會因樣品來源或型式之不同，而有不同的香味特徵，因此欲得目標物特有的香味，必須針對該型式之產品加以分析。

2-3-3 單離及濃縮

單離之方法之選擇主要是依香味物質具有的性質而定，例如揮發性之大小，是否是親脂性的，而有不同的方法進行蒸餾或萃取，並無一套通用的方法，以下將介紹目前文獻與工業中常用的方法。

1. 蒸汽蒸餾法 (steam distillation)

使用低沸點的溶劑進行萃取，此方法可用於從非揮發性物質 (例如臘質) 中分離香味物質；但是對熱敏感性之香味物質會遭受破壞，而產生人為的香味成分 (artefacts)。此外廣泛被使用的操作為利用 Likens - Nickerson 裝置，此方法於 1964 年由上述兩位發明，目前已有多種改良之型式 (Maarse and Belz, 1981)；使用低沸點的溶劑 (如正戊烷、二氯甲氟甲烷、三氯甲氟甲烷、乙醚) 於 20 ~ 40 °C 下進行萃取的工作，但使用於對熱敏感性的香味物質時 (例如水果香味物質)，亦產生人為的香味成分，可改用減壓蒸餾方式，以改良不利之因素。其缺點為同時萃取非揮發性物質，若溶劑不純或溶劑選擇性不適當會影響準確度，以及濃縮過程中造成揮發性物

質的遺失等，惟其缺點可加以改進。

2. 吸附法 (adsorption)

係使用吸附劑如 Chromosorb 100 系列、Porapak Q、Tenax GC 及活性碳 (charcoal) 等 (Nursten, 1982) 以上部空隙 (headsapce) 方式，將揮發性物質吸著於吸附劑，再使用溶劑萃取，或利用氮、氬氣於加熱狀態下帶出，其優點為可獲得與樣品極接近的香味物質，但是吸附劑容量低 (或容量有限)，並且對於不同揮發性化合物的吸附能力，具有差異性的選擇性 (Emberger, 1985; Stewart and Whitaker, 1984)。

3. 直接萃取法

Emberger (1985) 認為特別適用於液體，尤其是果汁，此乃果汁香味物質不能曝露於極高溫度中的緣故。其缺點是會同時萃取親脂性的物質，如油脂、臘質即色素等，而需要再一次的將這些物質分離。最適用的溶劑的沸點範圍從 25 ~ 40 。

4. 其他方法

超臨界二氧化碳萃取法 (critical CO₂ extraction): 此法之優點為無殘留溶劑、無溶劑不純而造成的不良影響，適於官能分析 (sensory analysis)，有良好的選擇性，尤其適用於果汁香味物質之萃取 (操作溫度低) 等，萃取之能力可由壓力及溫度控制，目前雖已逐漸受商業界之重視，但因設備之投資成本過高，且尚無連續操作之設備，以致應用的較少，僅於實驗室之研究或中間工廠 (pilot plant) 之生產高價值產品時應用的較廣 (郭, 1985; Caragay and Little, 1981; Reineccius and Anandaraman, 1981)。冷凍濃縮法 (freeze concentration): 此法是利用溶質與溶劑結晶速率不同之原理，將溶質與溶劑

分離 (Kepner et al., 1969), 在果汁之濃縮應用較多, 此法之優點為低溫下之操作, 不使用溶劑萃取, 可減少人為產生之物質, 但回收率不高。

2-3-4 預先分離

雖然毛細管柱層析法, 具有高效能之分析能力, 然而仍不足以有效地分離 - 複雜的香味濃縮物質成個別的化合物, 因為組成中有不同的濃度, 是分析的一大障礙, 此外經常可發現含量大的化合物, 對香味貢獻僅是零或為次要的, 反而是有些微量成分才具有顯著之香味特徵, 為有效地分析微量香味成分, 並簡化香味成分的複雜性實有預先分離之必要。

化學官能基、極性、沸點或分子量等均可做為預先分離之準據, 並利用一些方法: 如衍生、液相層析 (LC)、篩分層析 (exclusion chromatography)、矽膠層析法、逆相層析法、蒸餾法及製備型氣相層析法 (preparative GC) 等幫助分析。

2-3-5 毛細管氣相層析 (Capillary GC)

毛細管層析法是香味研究中最重要分離方法, 可提供定量的資料及鑑定工作的線索, 因為在一定條件下, 化合物有一定的滯留時間 (retention time), 藉著比較已知化合物與未知混合物的滯留時間, 可以將未知混合物予以分類, 同時可利用 "Kovats - Index" 做輔助之鑑定, 對結果有相當的幫助。

2-3-6 氣相層析及質譜儀分析鑑定結構式之利用

以質譜分析連接到氣相層析, 對於香味的分析相當的理

想。因為現時之質譜儀具有相當的靈敏度 (sensitivity), 可用於鑑定由毛細管分離出來的個別物質, 且可提供典型的分子碎片圖形, 並給予有關結構式的資料, 但是經常未能始終具有專一性 (specificity), 如果結合有氣相層析所得的 " Kovats - Index " 值, 對照下將變為更有意義 (Emberger, 1985), 在大多數的情況下可由自然界中訂出的化合物的質譜, 鑑定出香味混合物中的各個成分。欲鑑定全然未知的物質, 則需使用紅外線光譜分析法 (infrared spect-roscopy, IR), 尤其是核磁共振儀 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜分析法, 可獲得其他的資料。

Emberger (1985) 認為由於一些已被鑑定出的香味物質, 大多數濃度範圍在 10~100ppb, 而一般又希望達到較高的濃度, 則需要某些物質具有理想的純度, 故可使用有效的微量製備方法 (micropreparation), 能分離樣品中的成分, 具有足夠的含量, 再用官能的篩選及評判, 將更為有效, 直接的用嗅覺來聞經由毛細管分離出來的區分做判斷, 雖然是很敏銳的方法, 但需要非常專心及有足夠的訓練, 因為感官的印象一般僅能維持 0.5 ~ 2 秒, 而且許多的化合物濃度極低 (ng 範圍), 僅些微超過嗅覺閥值濃度 (threshold level concentration), 又因係連續地分離化合物, 必須在極短時間內立即判斷及紀錄, 相當困難, 惟有經過特別訓練者, 方能勝任。

由於結構式之鑑定工作頗為費時費力, 在大多數例子中, 需結合 GC、MS 或 IR、NMR 的片斷消息, 做最可能的推論。因此除了樣品製備過程需小心處理外, 欲結合儀器之分析及結果的判定, 對有關的知識應有基礎的瞭解。

2-4 塊菇香味研究文獻

塊菇除了當作食材之外，最引人注意之處是它的香味，這種香味係一種含硫化合物，有一種特殊的芳香味，經由研究證明：塊菇香味中含有某種性激素，這也許是它特別受西方人青睞的原因之一。

在 1987 年 Talou 等人從法國產地 Perigord 及 Cahors 取得黑孢塊菇子實體，利用 HRGC - MS 與上部空隙吸附 (dynamic headspace) 法，與吸附劑 Tenax 使用下，分析出黑孢塊菇子實體中所含有的香味成分共有 14 種，6 種醇類 (ethanol、2-butanol、1-propanol、2-methyl-1-propanol、2-methyl-1-butanol、3-methyl-1-butanol)、4 種醛類 (acetaldehyde、2-methylpropanal、2-methylbutanal、3-methylbutanal)、1 種醚類 (anisole)、2 種酮類 (acetone、2-butanone) 以及 1 種硫化物 (dimethyl sulfide)。其中醇類含量佔 60% - 85%，主要的原因，可能是與塊菇子實體的冷藏時間有關，而醇類含量的增減，並不會影響塊菇香味。從此次研究分析出的揮發性成分中，並沒有確定可以成為黑孢塊菇子實體的特徵性香味成分。

同年 Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse,FR); Pebeyre S.A.(Cahors ,FR)兩家公司使用 Talou 等人分析之 14 種香味化合物，進行香味合成研究，在 1990 年 3 月申請到美國專利 (United States Patent)，成功的進行適當比例的調配後，合成出類似天然塊菇子實體所散發的香味。但在調配成功之後，指出仍有些許與天然塊菇子實體不同的香味，表示此配方仍需進一步的研究與改進。

在 1989 年 Talou 等人從法國產地 Cahors 取得黑孢塊菇子實體，使用 1987 年研究之相同條件與儀器的分析下，分析出 19 種成分，其中有 14 種成分與 1987 年所分析出的成分相同，其他 5 種成分，分別為 propanal、isopropyl formate、ethyl acetate、1-methyl-propyl formate、acetic acid。其中所含的醇類與醛類之含量仍然佔據相當大的比例，主要原因是成熟的黑孢塊菇中含有大量的胺基酸（amino acids），而這些胺基酸就是醇類與醛類的前驅體（precursors）物質，藉由胺基酸降解（degradation）可產生這些揮發性物質（Kulifaj,1984）。

研究中所分析出的硫化物成分，由文獻證明在很多植物中含有此微量成份，但卻是重要香味的貢獻來源。其中 DMS（dimethyl sulphide）成分，根據 Andreotti 及 Casoli（1968）研究顯示賦予黑孢塊菇硫磺味（sulphurous note）。而 DMS 產生的來源，可能是菌類在代謝過程中，無機硫酸鹽類（sulphates）在還原反應下或 S-methylmethioninesulphonium salt 水解（hydrolysis）產生。另外分析出的 acetic acid 與 anisole 兩種成分，賦予塊菇刺激性（pungent）味道。經由官能品評的分析，確定 DMS（dimethyl sulfide）為黑孢塊菇的特徵性香味成分，2-butanone 及 anisole 則為過熟塊菇所散發出的香味成分。

1989 年 Talou 等人於 American Chemical Society 發表的論文中，由法國產地 Perigord 取得黑孢塊菇子實體以及調整分析條件與儀器設計後，再利用官能品評（sensory assessment），一共分析出 26 種香味成分。最主要的硫化物成分，除了 dimethyl sulphide（DMS）之外，還有 dimethyl disulphide（DMDS）成分。而 DMS 在官能品評分析下，確定為黑孢塊菇香味的特徵性成分。

根據以上 Talou 等人所分析出的黑孢塊菇成分，從原先的 14 種到 26 種成分，可以發現在不同的分析條件與儀器的進步下，發現更多賦予黑孢塊菇的揮發性香味成分。

1995 年 Pelusio 等人報告顯示使用 HS - SPME (Headspace Solid-Phase Microextraction) GC - ITMS (Gas Chromatography-Ion Trap Mass spectrometry) 及 Headspace Tenax Adsorption 等儀器與技術進行分析白塊菇 (*Tuber Magnatum*) 及黑孢塊菇 (*Tuber melanosporum*) 的揮發性成分，發現使用 HS-SPME GC-ITMS 分析 1993 年 10 月 white truffle 含有 7 種硫化物為 S1: dimethyl sulfide、S2: dimethyl disulfide、S3: bis (methylthio) methane、S4: dimethyl trisulfide、S5: 1,2,4-trithiolane、S6: methyl (methylthio) methyl disulfide、S7: tris (methylthio) methane 及兩種含氧的化合物為 O1: 2-butanone 和 O2: 2-butanol，分析 1993 年 10 月 black truffle 中含有 S1、S3、O1、O2 等。分析 1994 年 10 月 white truffle 只含有 S1、S2、S3 及 S4，分析 1994 年 10 月 black truffle 中發現多了 S2 與 S4 成分。由此兩年塊菇的分析，發現硫化物成分不同的原因為 1994 年的塊菇先儲藏 1 個月後才進行分析，造成白塊菇過熟，使得含有的硫化物 S5、S6、S7 等物質消失，對於黑孢塊菇而言，反而增加其硫化物的成分。當使用 Headspace Tenax Adsorption 分析後，最後可以確定 dimethyl sulfide 和 bis (methylthio) methane 為此兩種塊菇的特徵性香味成分。

在 2000 年 Trillini 等人研究中採用白塊菇中的 *Tuber borchii* 所分離出的菌絲，在無菌的 Melin - Norkrans 液態培養中生長，取其發酵液進行揮發性有機物質分析，共有 29 種及含量為 172.2 ng/l 的揮發性有機物質。主要成份 1,3-ditertbutyl

benzene (16.1 ng/l)、3-methylheptane(9.2 ng/l)、butan-2-one (8.8 ng/l)、ethynylbenzene (5.6 ng/l) 及 octan-3-one (4.9 ng/l) , 其中發現硫化物成分為 dimethyltrisulphide , 此成分在 1998 年 Bellesia 等人研究白塊菇中的 *Tuber magnatum* , 也發現此成分 , 產生的原因為 2,4-dithiapentane 在 hydrolytic oxidative 中轉化成 dimethyl disulphide 時 , 同時也衍生出 dimethyltrisulphide。證實了 dimethyltrisulphide 除了是 *Tuber magnatum* 的特徵性香味成分之外 , 也是 *Tuber borchii* 的特徵性香味成分。

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 菌種來源與培養

研究中黑孢塊菌 (*Tuber melanosporum*) BLCC217 由本實驗室係透過台灣馥恩公司於 2001 年 12 月自法國西南部的佩里哥 (Perigord) 引進成熟且具有濃郁香味的塊菇子實體，進行組織分離後，將母菌絲接種於 PDA (Potato Dextrose Agar) 培養基上，於室溫下置於培養箱內培養，經 7 - 10 天，待菌落直徑長至 4 - 6 公分，且無雜菌感染時，即可做為接種源使用。

3-2 實驗藥品

實驗藥品可分為一般藥品與 GC 用標準藥品。

(1) 一般藥品如 Table 3 - 1。

Table 3 - 1 一般藥品

藥品名稱	廠牌	附註
葡萄糖		食品級
可溶性澱粉	石津製藥株式會社	試藥一級
麥芽萃出物	MERCK	防潮
酵母萃出物	DIFCO	防潮
酪蛋白水解產物	林 純藥工業株式會社	試藥一級
消化蛋白質	DIFCO	防潮
Toluene	TEDIA	
Thiamine	SIGMA	
DL - Methionine	ACROS	冷藏
L - Cysteine	SIGMA	
洋菜	DIFCO	
CaCl ₂ •2H ₂ O	林 純藥工業株式會社	試藥一級
FeCl ₃ •6H ₂ O	林 純藥工業株式會社	試藥一級
KH ₂ PO ₄	聯工	EP 級
MgSO ₄ •7H ₂ O	聯工	EP 級
NaCl	聯工	EP 級
Na ₂ SO ₄	聯工	EP 級
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	聯工	EP 級
NH ₄ Cl	聯工	EP 級
鹽酸	聯工	EP 級
氫氧化鈉	聯工	EP 級
二次蒸餾水		微電腦蒸餾水製造機

(2) GC 用標準藥品如 Table 3 - 2。

Table 3 - 2 GC 用標準藥品

藥品名稱	廠牌
Ethyl ether	PHARMCO
2-Methyl-1-butanol	ACROS
Methyl sulfide	ACROS
Methyl disulfide	ACROS
2-Methylbutyraldehyde	ACROS
Methyl ethyl ketone	TEDIA

3-3 實驗儀器與設備

實驗儀器與設備如 Table 3 - 3。

Table 3 - 3 實驗儀器與設備

儀器設備	廠牌	附註
無塵無菌操作台	造鑫	附紫外光與抽氣設備
殺菌釜	新光精機	HL-350
殺菌釜(直立式)	HUXLEY	HL-340
電磁攪拌機	CORNING	Stirrer/Heater
烘箱	Risen	DV-452
光學顯微鏡	Nikon	附照相設備
振管振盪器	Thermolyne	37600 Mixer
均質機	osterixer	Cycle blend
恆溫培養箱(迴轉式)	TKS	OSI-500
冷凍乾燥機	進階	附高真空油式幫浦
空氣壓縮機	復盛	1/4 HP
低溫冷藏櫃	TKS	Kcc-3
高速離心機	HITACHI	05P-21
微電腦蒸餾水製造機	SANYO	WSC044.MH3.4
電子天平	Sartorius	
超音波清潔器	BRANSON 5210	
往復式恆溫振盪水浴箱	TKS	SB302
超純水製造機	MILLIPORE	
pH meter	SUNTEX	2000A
生化反應槽體及控制器	頂生	BTF-A-5L
低溫冷凍循環水槽	YIH-DER	BL-30
SPME所用之 fiber	Supelco	型號為 100 μ m polydimethylsiloxane(PDMS)

3-4 分析方法

3-4-1 pH 值測定

使用 pH meter 測定發酵液之 pH 值。

3-4-2 菌絲長度測定

利用直尺測量固態菌絲生長長度。單位為 cm。

3-4-3 菌體濃度測定

將濾紙放入烘箱以 70 乾燥 8 小時，稱重所得重量為 W₁。將培養 14 天的培養液（菌體與菌液），用上述乾燥濾紙過濾，再將過濾後的濾紙放入烘箱，以 70 乾燥 48 小時後，取出稱重，所得重量為 W₂。將 W₂ 減去 W₁ 後所得的重量即為菌體重。菌體濃度單位為 mg/100ml。

3-4-4 香味成分分析

(一) Likens - Nickerson 蒸氣蒸餾溶劑萃取法（劉，1990）

Likens - Nickerson 裝置如 Fig.3-1 將培養 14 天 *T. melanosporum* 培養液用濾紙（乾燥過）過濾，取其濾液至於 1 公升之圓底燒瓶內（A），直接以加熱包加熱方式蒸餾，溶劑（CH₂Cl₂）受熱（水浴 42）揮發，則蒸氣所攜帶的香味成分被溶劑連續萃取，經冷凝後液相水層經（C）回到（A），而含有香氣成分之溶劑經（D）回到（B），如此循環萃取，連續萃取 2 小時。含香味成分之溶劑以無水硫酸鈉去水、過濾、收集濾液，以減壓濃縮機進行濃縮，濃縮至 1 毫升左右，再分裝到內徑 3 毫米、長度 8 公分之單端封口毛細管中，置於 34 ~ 35 水溶液中繼續去除溶劑，濃縮至管內液面約 0.5 公分高度，得到的香味濃縮液，即可進行定性定量分析。

(二) SPME(solid phase microextraction)萃取法

SPME 裝置如 Fig.3-2 所示，其處理為(1)將培養 14 天 *T. melanosporum* 培養液用濾紙（乾燥過）過濾，取其濾液 40ml 置於 125mL 三角瓶中，添加適當 Toluene 溶液當內標準，放入攪拌石攪拌，並用封口膜封住瓶口。(2) 於室溫以 SPME(solid phase microextraction)吸附 20 分鐘後，注入 GC/MS 進行分析。

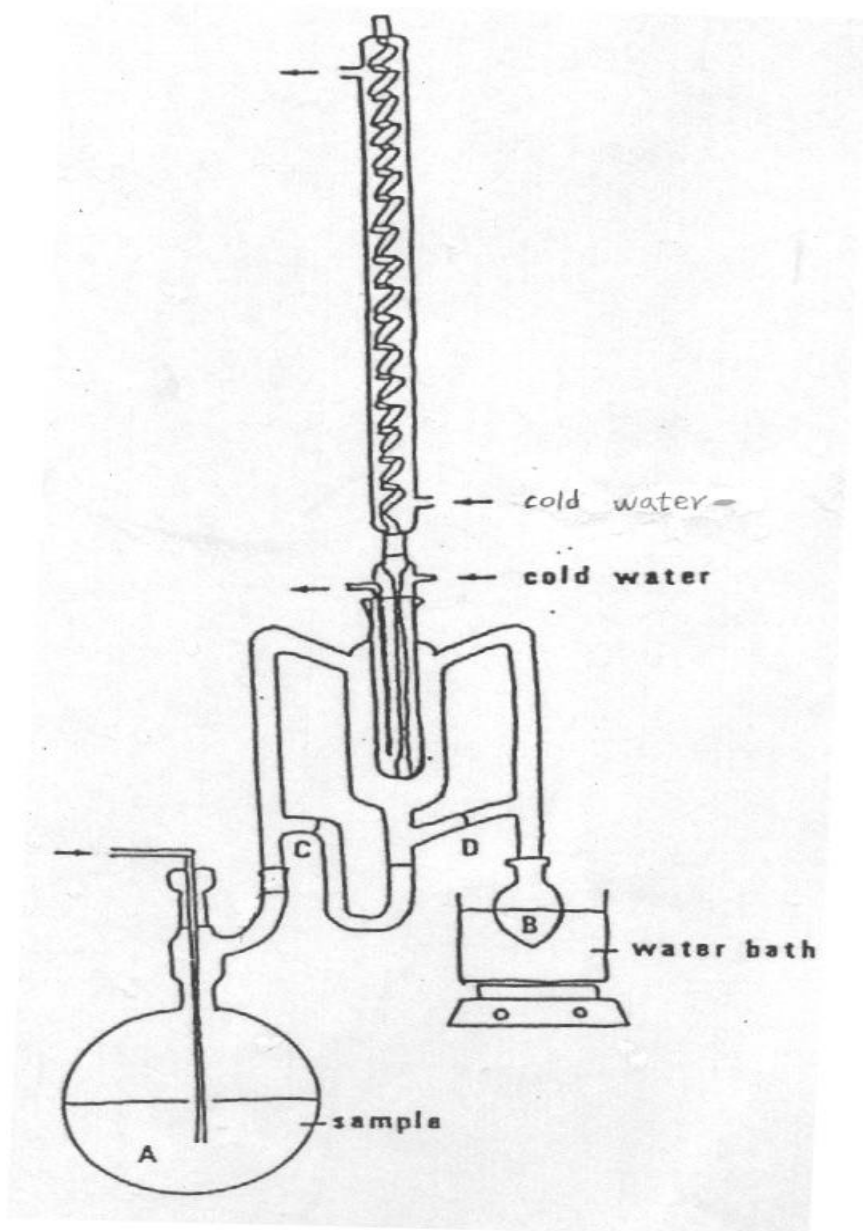


Fig.3 - 1 Likens - Nickerson 蒸氣蒸餾溶劑萃取裝置(劉, 1990)

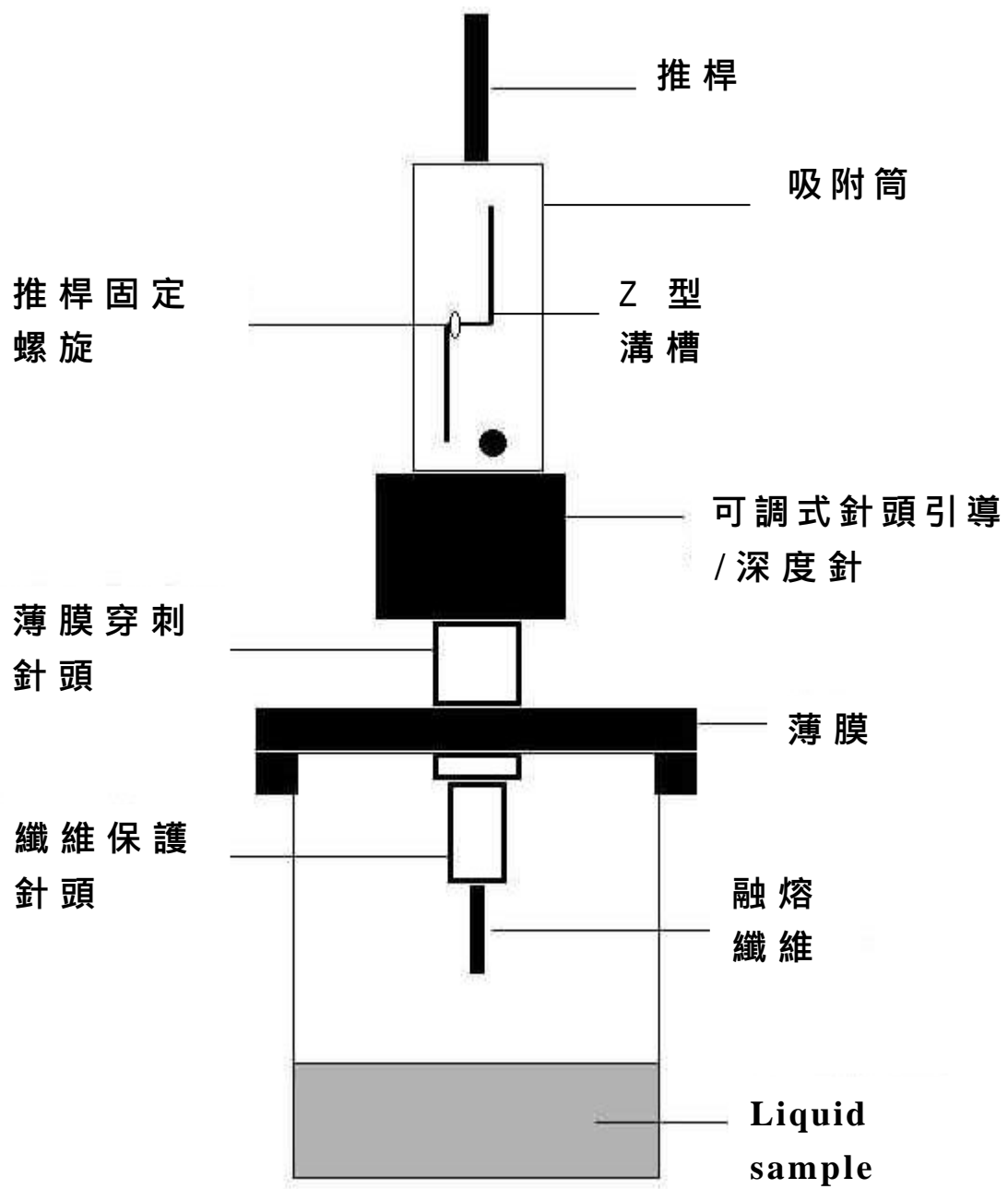


Fig.3 - 2 揮發性成分分析使用之 SPME(solid phase microextraction) 裝置

(三) 揮發性成分之定性分析

(1) 氣相層析之滯留指數 (Retention index ; R.I.) 的測定 :

由氣相層析儀中分析所得各尖端之滯留時間 (retention time) 皆換算為滯留指數 , 滯留指數之計算 (Van Den Dool & Kratz, 1963 ; Schomburg & Dielman, 1973) 乃以含 7 碳至 25 碳的正烷標準品混合液 , 於線性升溫時 , 在 DB-5 毛細管 (Capillary column) 的滯留時間 , 換算成各化合物之氣相層析滯留指數。

計算式如下 :

$$R.I. = 100i \left(\frac{\log t'_x - \log t'_n}{\log t'_m(n+i) - \log t'_m(n)} \right) + 100n$$

上式中各代號表示如下 :

t' : 滯留時間

i : 正烷碳數差

x : 未知物

m : 參考物 (正烷)

n, n+i : 正烷碳數

100n : 碳數為 n 之正烷滯留指數

(2) Likens-Nickerson 蒸氣蒸餾溶劑萃取法之 GC/MS 分析條件

本實驗由交通大學貴儀中心進行氣相層析質譜儀 (GC - MS) 之分析。而揮發性成分之儀器分析及鑑定條件如下：

氣相層析質譜儀 (Gas Chromatograph - Mass Spectrometry ; GC - MS) 硬體為 Hewlett - Packard 之 5890 series II 系統分析條件如下：

管柱：Chrompack fused silica DB - 5 ; 30M×0.25mm(I.D.) ; 0.25 μ m(film thickness) 之毛細管柱

檢測器：火焰離子檢測器 (flame ionization detector, FID)

載體流速：He(1.0ml/min)

檢測器/注射器溫度：200

介面溫度：150

管柱升溫條件：初溫 35 (2min) , 升溫速度 5 /min , 終溫 160

質譜儀條件：

離子源溫度：150

檢測器：photo multiplier

電子束能量 (electron current) : 70 V

電子束加速電壓 (electron multiplier voltage) : 720V

發射電流 (emission current) : 200 μ A

積分時間 (integration time) : 1ms/uma

(3) SPME 萃取法之 GC/MS 分析條件

本實驗由弘光科大食品營養系進行氣相層析質譜儀(GC - MS)之分析。而揮發性成分之儀器分析及鑑定條件如下：

氣相層析質譜儀 (Gas Chromatograph - Mass Spectrometry ; GC - MS)硬體為 Angilent 6890GC - Angilent 5973N/MSD 系統分析條件如下：

管柱：Chrompack fused silica DB - 1 ; 60M×0.25mm(I.D.) ;
0.25 μ m(film thickness)之毛細管柱

檢測器：火焰離子檢測器(flame ionization detector, FID)

載體流速：He(1.0ml/min)

檢測器/注射器溫度：250

介面溫度：280

管柱升溫條件：初溫 40 (1min), 以 5 /min 升溫至 150 ,
再以 10 /min 升溫至 200

質譜儀條件：

離子源溫度：230

檢測器：MSD

電子束能量 (electron current) : 70 V

電子束加速電壓 (electron multiplier voltage) : 1400V

積分時間 (integration time) : 1ms/uma

3-5 攪拌式反應器

玻璃槽體，工作體積 5 公升，面板部分可控制溫度，氣體流量計可控制通氣量，頂部有溫度電極、pH 電極、溶氧電極、液位電極等插孔。

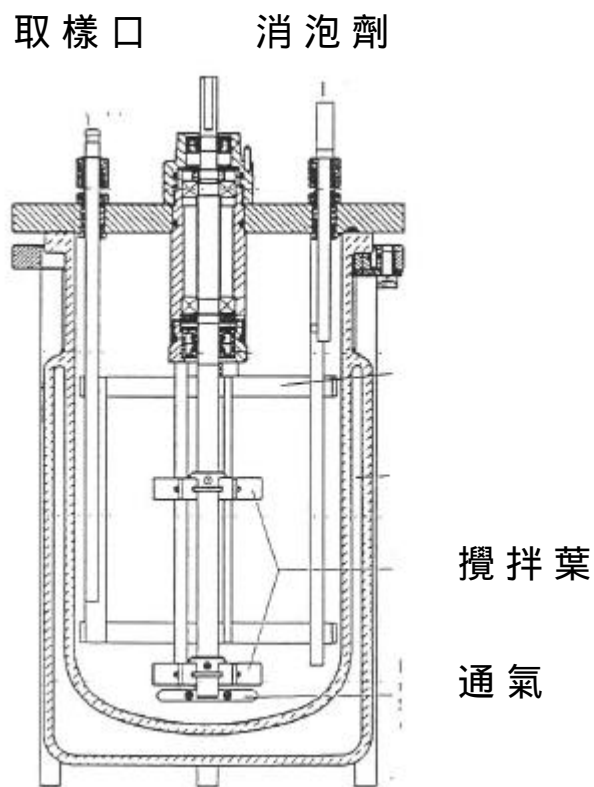


Fig.3 - 3 攪拌式發酵槽體 (黃, 2001)

第四章 實驗方法

4-1 斜面培養

4-1-1 PDA 斜面培養

- (1) 以 39 g /L 濃度的馬鈴薯 - 葡萄糖洋菜培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 溶於蒸餾水，置於水浴加熱溶解。
- (2) 每支試管趁熱裝入適量之 PDA 溶液。
- (3) 將試管以矽膠塞塞住並在外層以鋁箔紙包覆，放入殺菌釜中殺菌 20 分鐘。(操作壓力 1.2 kg / cm²，溫度 121)
- (4) 將殺菌後之試管取出，使之適當傾斜，放置 1-2 天確定無污染發生，接塊菇菌於斜面上並置於 20 恆溫箱培養或置於冰箱備用。

4-1-2 培養皿平面培養

- (1) 配製 120ml 39 g /L 濃度的 PDA 溶液於 250 ml 三角瓶。
- (2) 將三角瓶以矽膠塞塞住並以鋁箔紙包覆，放入殺菌釜中殺菌 20 分鐘。(操作壓力 1.2 kg / cm²，溫度 121)
- (3) 取 4 個培養皿 (塑膠製，不可加熱) 置於無塵無菌操作台，噴撒 75% 酒精，並打開紫外線燈殺菌 20 分鐘以上。
- (4) 將殺菌後之三角瓶取出，趁熱平均分配於 4 個培養皿。
- (5) 待培養基冷卻凝固後立刻接 1 單位 (5mm ×5mm) 塊菇菌於培養皿中央。
- (6) 最後將培養皿倒置，放入 20 恆溫箱培養。

4-1-3 菌體活化

為維持菌體的活性必須將菌體活化，將菌種接種於 PDA 斜面培養基上 20 培養 14 日後即更換新的 PDA 斜面繼續做培養。

4-2 液態基礎培養基組成

本實驗研究所採用之液態基礎培養基係參考 1992 年邵左謙培養黑孢塊菌之培養基。

液態基礎培養基成分如下：

Malt extract	10g
Casein hydrolysat	0.2g
Thiamine	2×10^{-4} g
Deionized water	1000ml

並利用 0.1NHCl 和 0.1NaOH 將液態培養基之 pH 調成 5.5。

4-3 種菌培養與製備

為了控制接菌量的穩定度，以免干擾後續的試驗因子。將塊菇菌絲體接種於 PDA 培養皿，以自製之菌體切割器 - 將鋁罐切開，裁取一片 2 cm × 5 cm 鋁片，在較短的一邊分成 4 等分，並折成一長柱體，中空部分的面積則為 $5 \times 5 \text{mm}^2$ ，即定義為一單位面積的接菌量依所需的接菌量，將培養皿中最外圍的塊菇菌絲體切成 4 單位菌絲塊，再以白金鉤將菌絲塊接入液態培養基中。置於 20 、 100rpm 的迴轉式恆溫培養箱中培養 14 天作為種菌。

將培養 14 天的液態種菌，利用滅過菌的均質機打碎，以作為 250ml 三角瓶培養試驗的接種源。

4-4 培養基試驗

黑孢塊菇菌絲體分別以 MECT(Malt extract and Casein hydrolysat Thiamine Agar Medium)、PGA(Peptone Glucose Agar Medium)、MMN(Melin Modified Norkrans Agar Medium)、MMNC(Melin Modified Norkrans Agar Medium + Casein hydrolysat)、HM(Hamada Medium)、HNAM(Hamada Nutrient Agar Modified)及 PDA(Potato Dextrose Agar Medium)洋菜培養基等進行試驗，各培養基配方(邵，1992)如下：

1.MECT Agar Medium (MECT)

Malt extract	10 g
Casein hydrolysat	2 g
Thiamine	200 μ g
Agar	20 g
Deionized water	1000 ml

2.Peptone Glucose Agar Medium (PGA)

Glucose	10g
Peptone	10g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	0.96g
KH ₂ PO ₄	1.45g
Agar	20 g
Deionized water	1000ml

3.Melin Modified Norkrans Agar Medium (MMN)

CaCl ₂	0.05g
NaCl	0.025g
KH ₂ PO ₄	0.5g
NH ₄ Cl	0.25 g

Malt extract	3g
FeCl ₃ (1%)	1.2 ml
Thiamine	100 µg
Glucose	10g
Agar	15 g
Deionized water	1000ml

4. Melin Modified Norkrans Agar Medium + Casein hydrolysate (MMNC)

CaCl ₂	0.05 g
NaCl	0.025 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
NH ₄ Cl	0.25 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.15 g
FeCl ₃ (1%)	1.2 ml
Thiamine	100 µg
Malt extract	3g
Glucose	10 g
Casein hydrolysate	1g
Agar	15g
Deionized water	1000 ml

5. Hamada Medium (HM)

Glucose	10g
Yeast extract	5g
HCl (0.5N)	1ml
Agar	20 g
Deionized water	1000ml

6. Hamada Medium Hamada Nutrient Agar Modified (HNAM)

KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.15 g
NH ₄ Cl	0.5g
FeCl ₃ (1%)	1.2 ml
Malt extract	5g
Glucose	5 g
Thiamine	100 µg
Agar	15 g
Deionized water	1000 ml

7. Potato Dextrose Agar Medium (PDA)

Potato Dextrose Agar	39 g
Deionized water	1000 ml

(一) 塊菇子實體組織分離與培養之形態觀察

目的：利用組織分離的方式，培養塊菇母菌絲及觀察生長形態。

方法：

1. 將選擇好的種菇，放在乾淨的燒杯中，用無菌水沖洗幾次，用 75 % 酒精擦拭表面，然後再用無菌水沖洗幾次，用無菌濾紙吸乾，放於無菌培養皿中，用消毒過後的小刀把塊菇子實體縱切為二。
2. 用解剖刀取內部 0.5 立方厘米的一小塊菌肉，移植到新鮮、適宜的培養基（PDA）上，於 20 左右的恆溫箱內培養。
3. 約 1 周至 10 天的時間，即可用肉眼觀察到組織塊的四周有白色絨毛狀菌絲出現。

(二) 不同固態基礎培養基對塊菇菌絲體生長之影響

目的：利用固態培養的方式，尋找出菌絲體生長最佳的基礎培養基。

方法：

1. 依上述培養基配方，各配製 100ml 於錐形瓶 (flask) 中，經高溫、高壓殺菌後，取出錐形瓶置於通氣無菌箱中，待其滅菌 20 分鐘後，溫度降至 60 - 70 且溶液尚未凝固前倒入無菌培養皿中，待培養基凝固後，即可接種。
2. 將活化後的塊菇菌絲培養皿以自製的菌絲切割器，切成一個單位的菌絲塊，分別接種於上述配方之培養基中，於 20 恆溫培養箱中靜置培養，每天觀察菌絲變化及檢視是否受雜菌感染。
3. 接種 14 天後，利用直尺以接菌的地方為中心，量測菌絲生長直徑，選取生長最佳之培養基，作為接種之培養基。

(三) 溫度 (20) 對塊菇固態培養皿 (PDA) 生長之影響

目的：探討 20 下塊菇於培養皿 (PDA) 之生長曲線。

方法：

1. 依上述 PDA 培養配方配製，待滅菌 20 分鐘後，溫度降至 60 - 70 且溶液尚未凝固前倒入無菌培養皿中，待培養基凝固後，即可接種。
2. 以自製的菌絲切割器，切成一個單位的菌絲塊，置於平面培養中央。
3. 將平面培養基分別於 20 ，恆溫培養箱中靜置培養。
4. 利用直尺以接菌的地方為圓心，每 24 小時量測一次菌絲生長直徑。

(四) 溫度對塊菇菌絲體固態培養皿 (Oat Medium) 生長形態之觀察

目的：觀察在 Oat Medium 與 PDA 固態培養基間之形態差異。

方法：

1. Oat Medium 培養基分如下：

Oat flake 30g

Agar 15g

Deionized Water 1000ml

2. 依上述 Oat Medium 培養配方配製，待滅菌 20 分鐘後，溫度降至 60 - 70 且溶液尚未凝固前倒入無菌培養皿中，待培養基凝固後，即可接種
3. 以自製的菌絲切割器，切成一個單位的菌絲塊，置於平面培養中央。
4. 將平面培養基分別於 20、25、30，恆溫培養箱中靜置培養。
5. 每星期觀察菌絲變化。

(五) 不同液態基礎培養基對塊菇菌絲體生長之影響

目的：利用液態培養的方式，尋找出菌絲體生長最佳的基礎培養基。

方法：

1. 除了 PDA 培養基之外及其他培養基在不添加 Agar 下，依上述培養基配方，各配製 100ml 於錐形瓶 (flask) 中，調整 pH 值為 5.5，經高溫、高壓殺菌後，取出錐形瓶置於通氣無菌箱中，待溫度降至室溫後，即可接種。
2. 將液態種源經由均質機處理後，接入 5% 比例的接菌量。
3. 在 20、100rpm 迴轉式恆溫控制箱中震盪培養，於 14 天後測量 pH 及菌體濃度。選取菌體濃度最高之培養基，作為液態培養之用。

4-5 三角瓶培養試驗 - 物理因素

(一) 不同培養溫度對塊菇菌絲體生長之影響

目的：探討溫度的變化對塊菇菌絲體生長的影響，並求最適的培養溫度。

方法：

1. 配製基礎液態培養基，分別以每一瓶 100 毫升的量倒入數個 250 毫升的三角瓶中，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
2. 將液態種菌以均質機打碎，以 5% 比例的接菌量接入。
3. 分別置於 20、25、30，pH5.5 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
4. 在培養第 14 天時測量 pH 及菌體濃度。

(二) pH 值對塊菇菌絲體生長之影響

目的：探討不同初始 pH 值對塊菇菌絲體生長的影響，並求最適當的初始 pH 值。

方法：

1. 配製基礎液態培養基，分別以每一瓶 100 毫升的量倒入數個 250 毫升的三角瓶中，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
2. 將液態種菌以均質機打碎，以 5% 比例的接菌量接入。
3. 分別置於 pH 為 3、4、5、6、7、8 的培養基中，在 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
4. 在培養第 14 天時測量 pH 值及菌體濃度。

(三) 接菌量對塊菇菌絲體生長之影響

目的：探討接菌量多寡對塊菇菌絲體生長的影響，並求最適當的接菌比例。

方法：

1. 配製基礎液態培養基，分別以每一瓶 100 毫升的量倒入數

- 個 250 毫升的三角瓶中，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
2. 將液態種菌以均質機打碎，以 1%、3%、5%、9%、11% 比例的接菌量接入。
 3. 分別置於 pH5 的培養基中，在溫度 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
 4. 在培養第 14 天時測量 pH 及菌體濃度。

(四) 時間變化對塊菇菌絲體生長之影響

目的：探討時間變化對塊菇菌絲體生長的影響，並求最佳的培養天數。

方法：

1. 配製基礎液態培養基，分別以每一瓶 100 毫升的量倒入數個 250 毫升的三角瓶中，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
2. 將液態種菌以均質機打碎，以 9% 比例的接菌量接入。
3. 分別置於 pH5 的培養基中，在溫度 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
4. 每隔 2 天測量 pH 及菌體濃度，直至 20 天為止。

4-6 三角瓶培養試驗 - 香味成分生成之探討

4-6-1 SPME(solid phase microextraction)萃取法

(一) 添加 Methionine 對 *T.melanosporum* 產生香味化合物的影響

目的：由文獻指出塊菇特徵性香味成分硫化物可由 Methionine 生化轉變產生，故探討添加 Methionine 對 *T.melanosporum* 產生香味成分硫化物及菌體濃度的影響。

方法：

1. 製 MECT 基礎液態培養液，再分別配製 Blank 及添加 0.05

% 比例的 Methionine。

2. 以每一瓶 100 毫升的量倒入 250 毫升的三角瓶中，利用 0.1NHCl 或 0.1NaOH 分別將 pH 調成 5，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
3. 將液態種菌以均質機打碎，以 9% 比例的接菌量接入。
4. 置於溫度 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
5. 取 0%、0.05% 之培養 14 天菌液以萃取 SPME 及 GC-MS 分析。

4-6-2 Likens - Nickerson 蒸氣蒸餾溶劑萃取法

(一) 不同濃度 Malt extract 對 *T.melanosporum* 生長與產生香味化合物的影響

目的：探討添加不同濃度 Malt extract 對塊菇菌絲體產生香味成分硫化物及菌體濃度的影響。

方法：

1. 配製 MECT 基礎液態培養液，原培養基中之 Malt extract 含量改為添加 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%，其他組成含量不變。
2. 以每一瓶 100 毫升的量倒入 250 毫升的三角瓶中，利用 0.1NHCl 或 0.1NaOH 分別將 pH 調成 5，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
3. 將液態種菌以均質機打碎，以 9% 比例的接菌量接入。
4. 置於溫度 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
5. 在 14 天時測量 pH 及菌體濃度。
6. 取 10% 及 Blank 之菌液進行香味萃取與 GC-MS 分析。

(二) 添加 Methionine 對 *T.melanosporum* 生長與產生香味化合物的影響

目的：由文獻指出塊菇特徵性香味成分硫化物可由 Methionine 生化轉變產生，故探討添加 Methionine 對 *T.melanosporum* 產生香味成分硫化物及菌體濃度的影響。

方法：

1. 配製 MECT 基礎液態培養液，再分別添加 0%、0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 比例的 Methionine。
2. 以每一瓶 100 毫升的量倒入 250 毫升的三角瓶中，利用 0.1NHCl 或 0.1NaOH 分別將 pH 調成 5，待其滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
3. 將液態種菌以均質機打碎，以 9% 比例的接菌量接入。
4. 置於溫度 20 及轉速 100rpm 下的迴轉式恆溫培養箱中培養。
5. 在 14 天時測量 pH、菌體濃度及進行 0.05% 及 Blank 菌液之 L-N 裝置溶劑萃取與 GC-MS 分析。

4-7 發酵槽培養試驗

(一) 5 公升批式攪拌式發酵槽塊菇菌絲體培養試驗

目的：探討規模放大至 4 公升批式攪拌式發酵槽之塊菇菌絲體生成情形，並觀察發酵狀況。

方法：

1. 配製基礎液態培養基 4 公升置入發酵槽中，調整起始 pH5.0。將槽體置於殺菌釜中滅菌 20 分鐘後冷卻備用。
2. 將液態種源以均質機打碎，接入發酵槽液態種源 100ml。
3. 培養條件設定：溫度 20、轉速 100rpm、通氣量 0.5vvm。
4. 定時取樣，測量其 pH、菌體濃度，並記錄之。

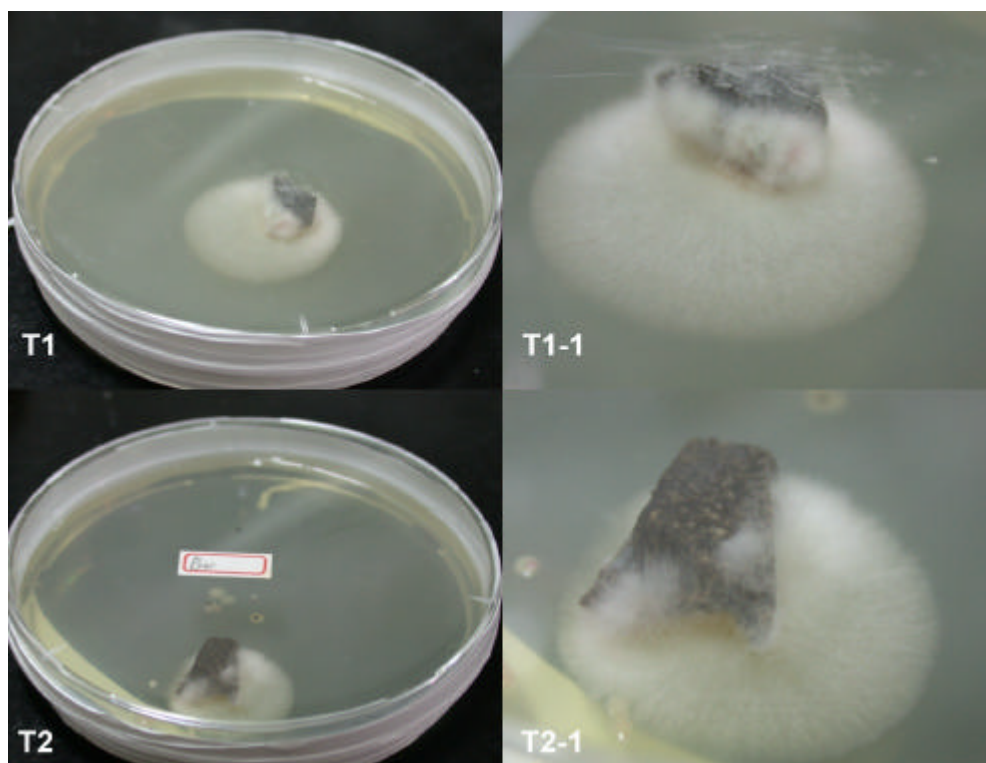
第五章 結果與討論

5-1 培養基試驗

(一) 塊菇子實體組織分離與培養之形態觀察

由照片 5-1 所示為塊菇子實體進行組織分離，於 20 及平面固態洋菜培養基 (PDA) 上培養 7-10 天之菌絲型態，菌絲生長方向是以接菌點以輻射狀沿著洋菜基平面向外生長。

約 1 周到 10 天的時間，由編號 T1、T1-1、T2、T2-1 照片中，即可用肉眼觀察到組織塊的四周有白色絨毛狀菌絲出現，最後經過連續幾次移接到新鮮和適宜的培養基後，最後所得到的純種，即為經過純化後的母種。



照片 5 - 1 塊菇子實體組織分離之菌絲生長形態

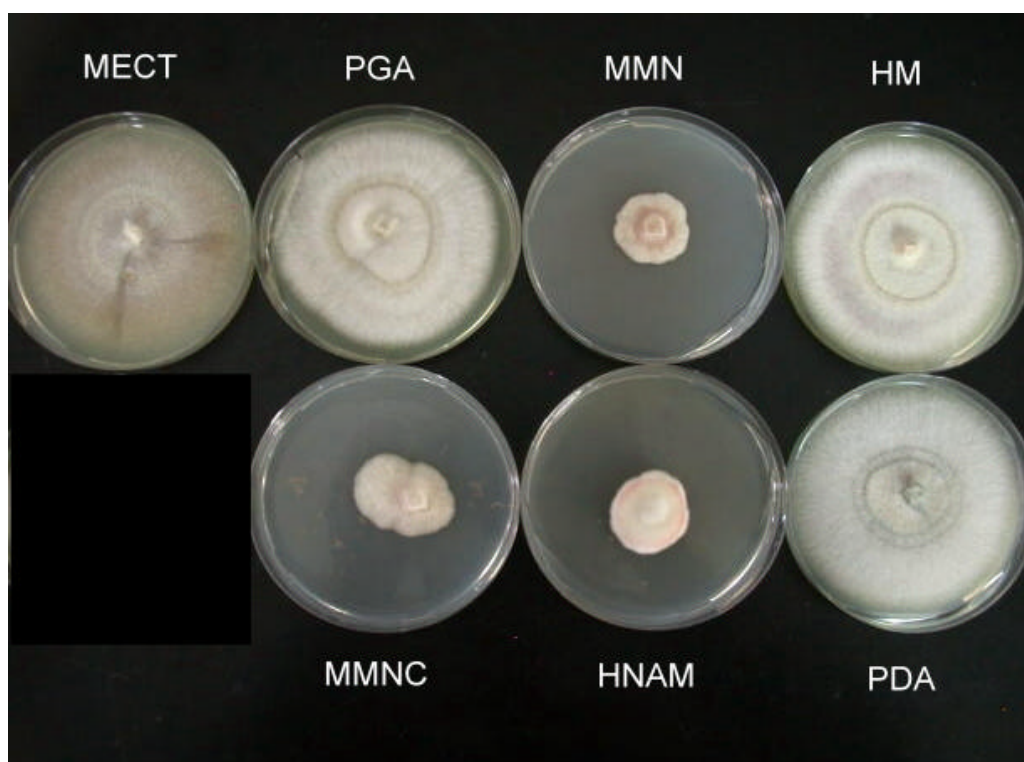
培養條件：

1. 在直徑 8.6 公分的培養皿中裝入 30 毫升的基礎培養基。
2. 培養基：PDA
3. 培養溫度為 20 。
4. 接菌量：一個單位的菌絲塊 (0.5 cm×0.5 cm)。
5. 培養時間為 7-10 天。

註：照片 5-1 中之編號 T1-1 為 T1 之近照，編號 T2-1 為 T2 之近照。

(二) 不同固態基礎培養基對塊菇菌絲體生長之影響

黑孢塊菌菌絲體在七種不同固態基礎培養基中，於 20 恆溫箱下培養 14 天後，其形態變化（照片 5-2）與菌落生長量示於 Table 5-1。由於塊菇菌落多呈較規則圓形，故以直尺直接測量菌落長度代表生長量(cm)。



照片 5 - 2 塊菇在不同固態基礎培養基上生長之型態

照片 5-2 中顯示黑孢塊菌在培養基 HM、MMN 與 MMNC 菌絲形態為黃紅色，推測可能是培養基中含有 FeCl_3 成分造成，而其他培養基皆呈現白色絨毛狀菌絲。然而在其培養基菌絲外觀上有類似年輪之形態，此乃為子囊菌類之特徵，可以經由此年輪的生成，推算出長滿培養皿之時間，在照片中之各培養基中僅有些可觀察到年輪，而有些卻沒有，可能是菌絲在生長過程中覆蓋已經生成的年輪，因此造成年輪數目

不均一與不明顯。

Table 5-1 黑孢塊菌菌絲在不同培養基中之生長量(cm) (14 天)

培養基 重複	MECT	PGA	MMN	HM	MMNC	HNAM	PDA
1	8.5	7.4	2.3	8.6	2.9	2.5	8.6
2	8.3	7.5	2.5	8.4	3	2.8	8.6
3	8.3	7.8	2.6	8.5	2.8	2.6	8.5
X	8.37	7.57	2.47	8.5	2.9	2.63	8.57

Table 5-1 資料經變方分析後如 Table5-2 所示, 由 Table5-2 知 F 值為極顯著, 乃進行 t 測驗。由 Table5-3 可知黑孢塊菌菌落於不同培養基間, PDA、HM 與 MECT 呈不顯著、MMNC 與 HNAM 呈不顯著外, 其他各媒質間之菌落生長皆呈極顯著差異。

Table 5-2 黑孢塊菌菌絲體菌落大小在不同培養基中之變方分析

變異來源	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	實測 F 值	理論 F 值	
					5%	1%
處理	6	162.5381	27.0897	1497.061**	2.845	4.4558
機差	14	0.2533	0.01809			
總合	20	162.7914				

Table 5-3 黑孢塊菌菌絲體菌落大小在不同培養基中之梯形比較

培養基	菌落生長量	均 數					差
PDA	8.57						
HM	8.5	0.07					
MECT	8.37	0.2	0.13				
PGA	7.57	1.0**	0.93**	0.8**			
MMNC	2.9	5.67**	5.6**	5.47**	4.67**		
HNAM	2.63	5.94**	5.87**	5.74**	4.94**	0.27	
MMN	2.47	6.1**	6.03**	5.9**	5.1**	0.43	0.16

$$L.S.D\ 0.05 = 2 \times 2.14 \times \sqrt{\frac{2 \times 0.018095}{3}} = 0.4942$$

$$L.S.D\ 0.01 = 2 \times 2.98 \times \sqrt{\frac{2 \times 0.018095}{3}} = 0.6882$$

Fig. 5-1 為黑孢塊菌菌落於不同培養基之平均生長。其中以 PDA 培養基上之菌落平均生長量最高，HM 培養基次之，然後依序為 MECT、PGA、MMNC、HNAM 培養基，而以 MMN 培養基生長量最低。

綜合以上分析結果，則可以確定上述七種培養基質中，以 PDA 為最適於黑孢塊菌菌絲體之培養，故可選取 PDA 培養基進行溫度 20 下之生長曲線試驗。

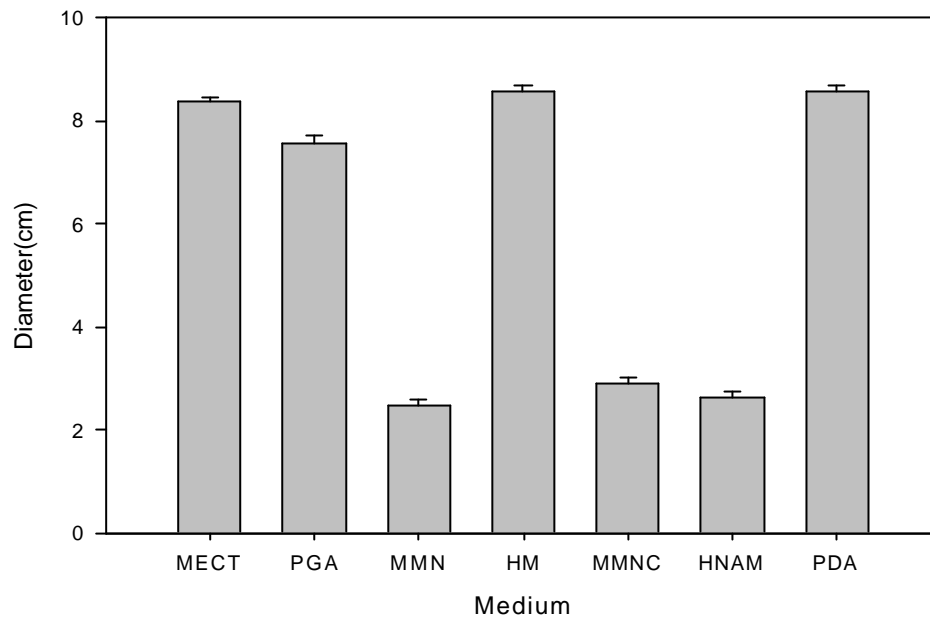


Fig.5 - 1 不同固態基礎培養基對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 在直徑 8.6 公分的培養皿中裝入 30 毫升的基礎培養基。
2. 培養溫度為 20 、培養時間為 14 天。
3. 接菌量：一個單位的菌絲塊 (0.5 cm×0.5 cm)。

註：Fig.5-1 中所代表之各培養基如下所示：

- a. MECT (MECT Agar Medium)
- b. PGA (Peptone Glucose Agar Medium)
- c. MMN (Melin Modified Norkrans Agar Medium)
- d. HM (Hamada Medium)
- e. MMNC (Melin Modified Norkrans Agar Medium + Casein hydrolysat)
- f. HNAM (Hamada Medium Hamada Nutrient Agar Modified)
- g. PDA (PotataoDextrose Agar Medium)

(三) 溫度(20)對塊菇固態培養皿 (PDA) 生長之影響

根據邵左謙 (1992) 研究黑孢塊菇顯示最佳生長溫度為 20 ，以此做為塊菇固態培養皿生長之試驗溫度。

塊菇此株菌，在直徑 8.6 公分的培養皿生長，前 3 天菌絲生長速率較慢，到了第 4 天之後，以穩定的生長速率生長，直到第 13~14 天時，菌絲生長長度已經開始受到限制，由於還有培養基養分，所以要到 60 天左右才會把養分完全耗盡。在菌絲外觀上，最初為白色，後轉為灰白色，隨著培養時間的延長，逐漸變為深灰色、灰褐色。

最後將量測得到的菌絲生長直徑除上天數，便可得到每天的生長速率，在 20 下培養的生長速率為 0.614 cm/day。

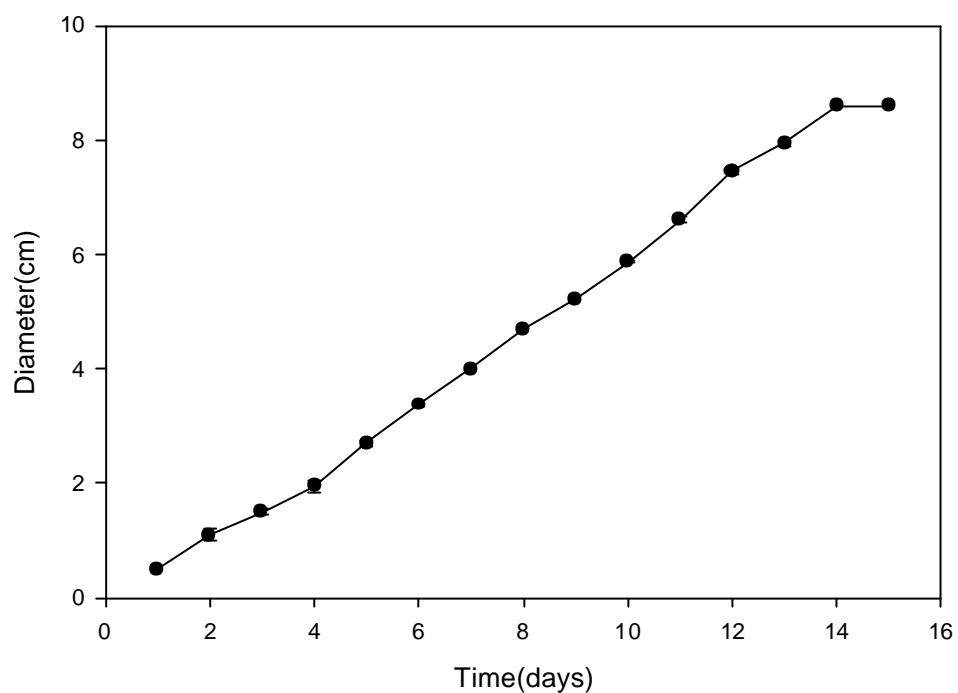


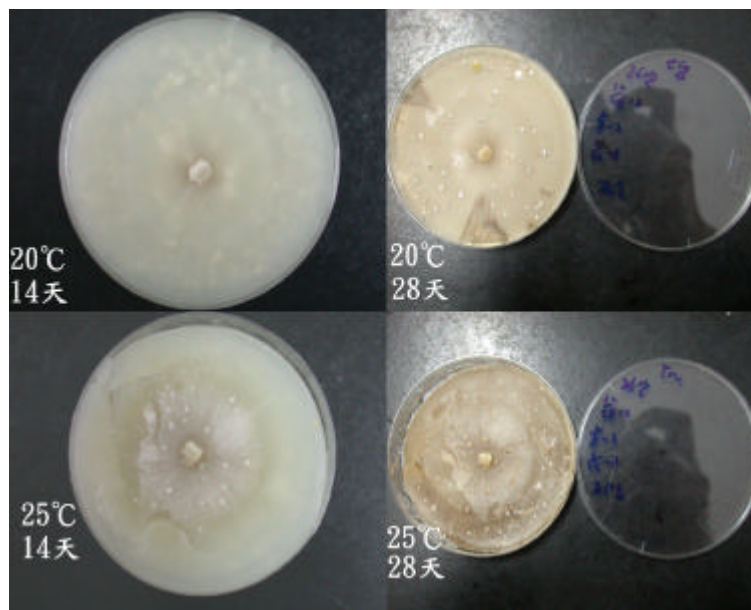
Fig.5 - 2 20 對塊菇固態培養皿(PDA)生長之影響

培養條件：

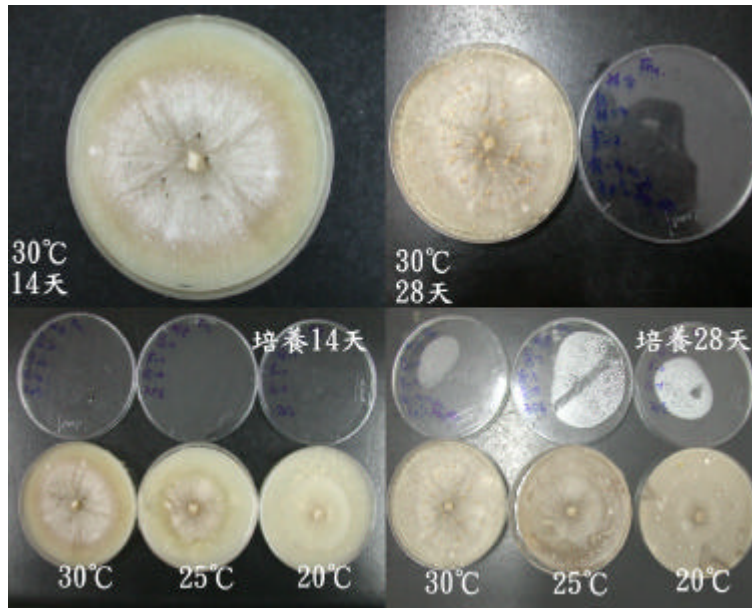
1. 在直徑 8.6 公分的培養皿中裝入 30 毫升的基礎培養基。
2. 培養基：PDA
3. 培養溫度為 20 。
4. 接菌量：一個單位的菌絲塊 (0.5 cm × 0.5 cm)。
5. 培養時間為 15 天。

(四) 溫度對塊菇菌絲體固態培養皿 (Oat Medium) 生長形態之觀察

塊菇在 Oat medium 之生長形態，由照片 5-3 中可以觀察到塊菇在 20、25、30 及各在 14 天下培養之形態有很大的差異，在 20 培養皿中僅看到菌絲平貼著培養基生長，在 25 與 30 之培養皿中，除了看見菌絲平貼於培養基生長外，接種處周圍有凸起之白黑色菌絲形態，其白色部分為菌絲，黑色部分推測可能為子實體原基部分。在 14 天所培養之各溫度培養皿之原基部份尚未很多，隨著天數增加，原基數目隨著增加，照片 5-3 之各溫度 28 天之培養皿中，接種處周圍之原基數目比 14 天時增加許多。因此 Oat 與 PDA 培養基塊菇菌絲形態上的差別在於原基的產生。

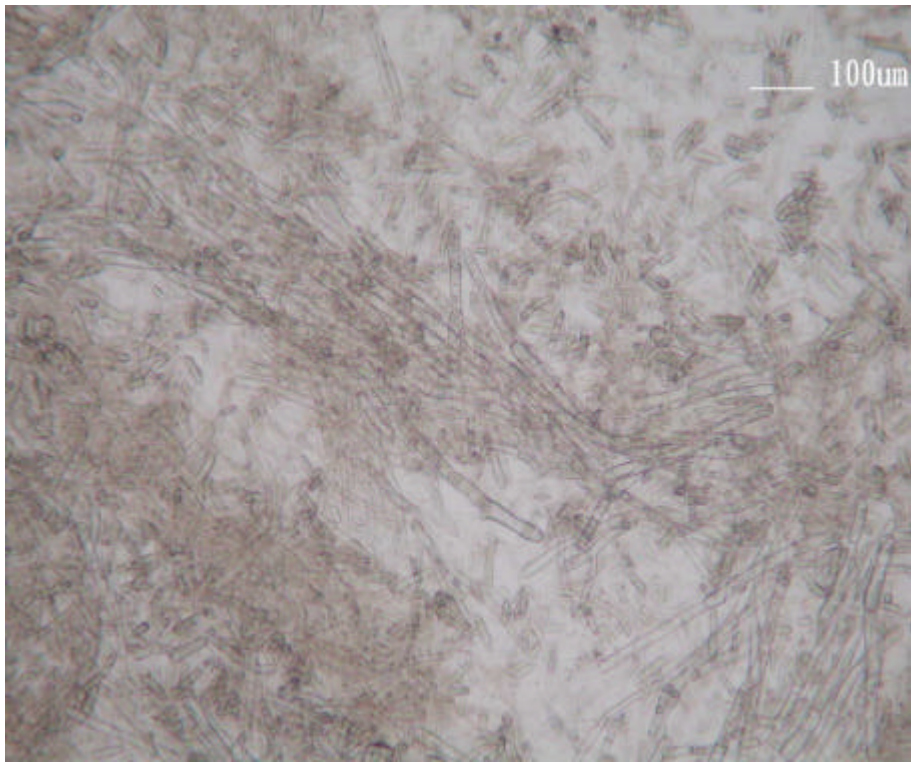


照片 5 - 3 溫度對塊菇菌絲體固態培養皿
(Oat Medium) 生長形態之觀察 (1/2)

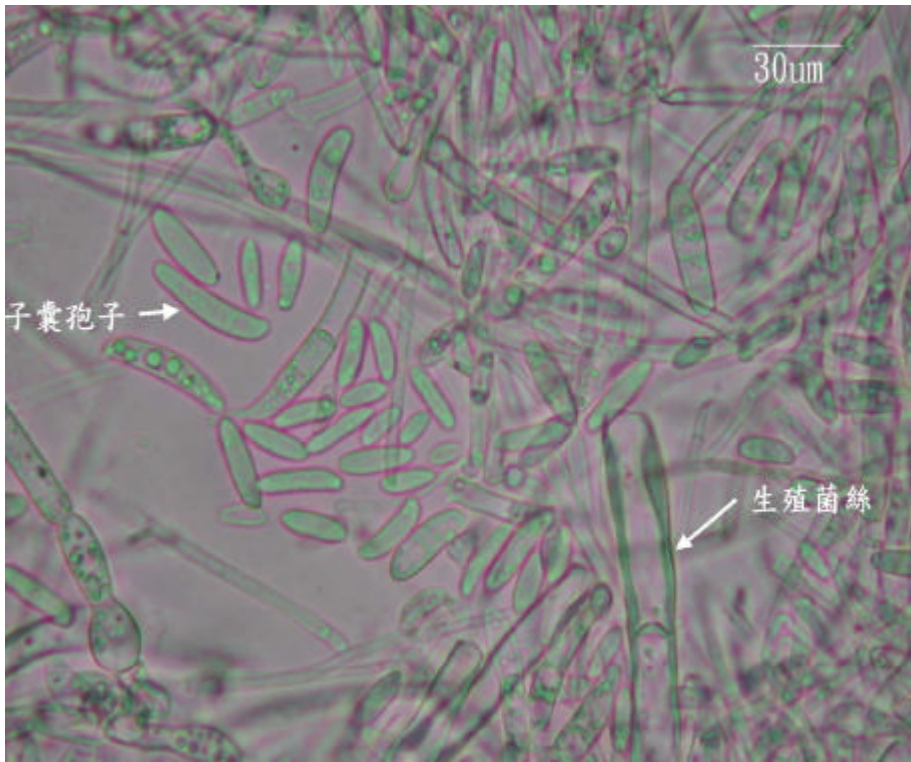


照片 5-3 溫度對塊菇菌絲體固態培養皿
(Oat Medium) 生長形態之觀察 (2/2)

為了觀察其原基之形態，取 20 之原基部分，經由處裡後，由照片 5-4 (1/2) 所示，可以看到生殖菌絲與孢子部分，至於骨骼菌絲在此並不明顯，可能是被生殖菌絲遮住，故在此倍數下，並未發現。由照片 5-4 (2/2) 所示，可以看到孢子形態，證明了此原基中已經產有孢子，表示此株塊菇菌已具有產孢能力，因此以後可經由挑單孢或以孢子懸浮液至培養皿純種培養。



照片 5 - 4 20 之原基顯微鏡形態 (1/2)



照片 5 - 4 20 之原基顯微鏡形態 (2/2)

(五) 不同液態基礎培養基對塊菇菌絲體生長之影響

實驗結果可得 (Fig.5-3) , MECT 液態培養基之菌體量最高 , MMNC 液態培養基次之 , 然後依序為 HM、MMN、HNAM 液態培養基 , 而以 PGA 液態培養基菌體量最低。

在不同固態培養基菌落生長試驗中 , 菌落生長以 MECT、HM、PDA 固態培養基最高 , PGA 固態培養基次之 , 然後依序為 MMNC、HNAM 固態培養基 , 而以 MMN 固態培養基生長最差。

經由液態與固態培養基比較下 , 除了 MECT 之外 , 其餘培養基 , 在固態培養基下生長良好 , 在液態下生長不好 , 表示 MECT 培養基對於塊菇這株菌 , 固、液態皆可生長良好 , 故選擇此培養基作為液態基礎培養基。

由 Fig.5-3 發現 , MECT、PGA、HM 液態培養基之 pH 值由初始 pH5.0 上升至 pH6.0 以上 , 而 MMN、MMNC、HNAM 液態培養基由初始 pH5.0 下降至 pH3.0 以下 , 其原因推測可能是培養基中之有機態氮與無基態氮的差別 , 無機態氮如 NH_4Cl , 由歷屆學長姊研究中顯示無機氮源添加至培養基中 , Final pH 會呈現下降趨勢 , 推測可能是銨離子之吸收導致培養基變酸。而有機氮源是否會造成 pH 下降或上升 , 則有待探討。

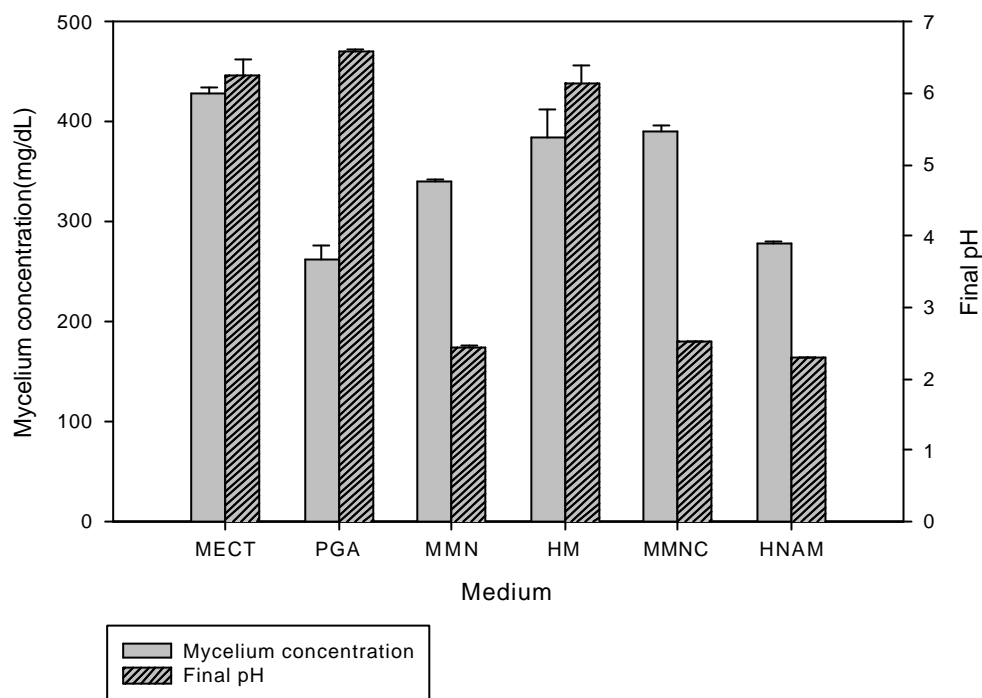


Fig.5 - 3 不同液態基礎培養基對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT、PGA、MMN、HM、MMNC、HNAM。
2. 接菌量-液態種源 5% 接菌量。
3. 培養溫度為 20、初始 PH5.5、轉速 100rpm、培養 14 天。

註：Fig.5-3 中所代表之各培養基如下所示：

- a. MECT (MECT Agar Medium)
- b. PGA (Peptone Glucose Agar Medium)
- c. MMN (Melin Modified Norkrans Agar Medium)
- d. HM (Hamada Medium)
- e. MMNC (Melin Modified Norkrans Agar Medium + Casein hydrolysat)
- f. HNAM (Hamada Medium Hamada Nutrient Agar Modified)

5-2 三角瓶培養試驗 - 物理因素

(一) 不同培養溫度對塊菇菌絲體生長之影響

由實驗結果 (Fig.5-4) 顯示，當培養溫度在 20 時可達到最大菌體量 (421.3mg/dL)。由 Fig.5-4 發現隨著溫度增加，菌體濃度減少，測得的 pH 值越高，推測可能的原因為菌體隨著溫度越高，其生長過快，在 25 及 30 溫度下，菌體產生自溶狀態，使發酵液中產生鹼性物質，故最後 pH 值上升至 7.8 左右，且此時的發酵液顏色也比 20 深。

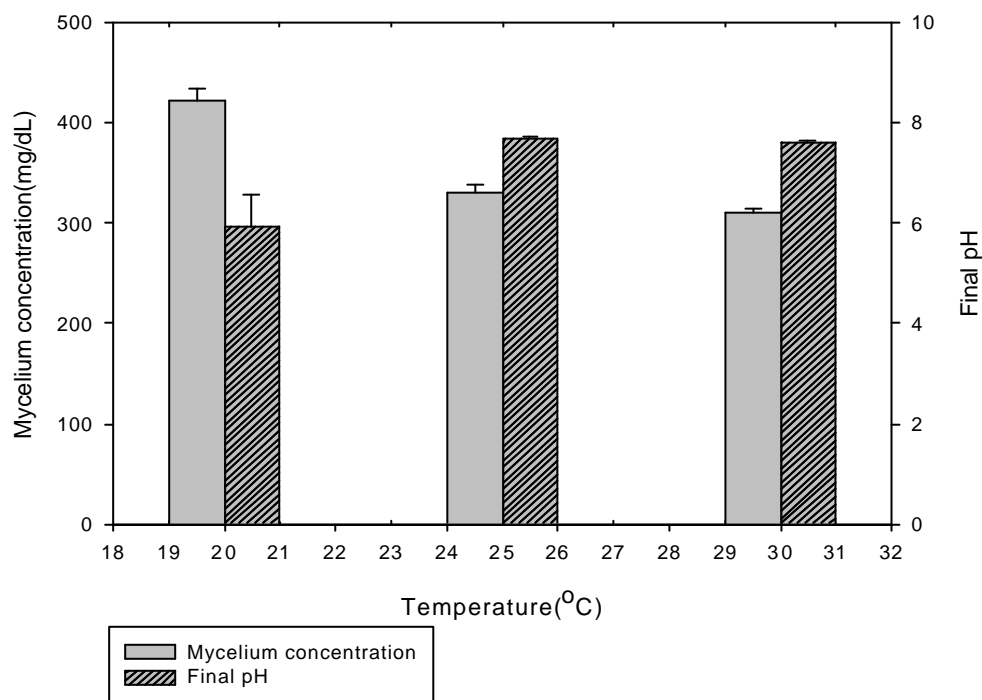


Fig.5 - 4 不同培養溫度對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT
2. 培養溫度為 20、25、30。
3. 接菌量-液態種源 5% 接菌量。
4. 初始 PH5.5、轉速 100rpm、培養 14 天。

(二) pH 值對塊菇菌絲體生長之影響

為了能瞭解塊菇菌絲體所適應的酸鹼值範圍，故選擇 pH3~8 做測試，找出塊菇菌絲體適合的酸鹼條件。

結果顯示 (Fig.5-5)，發現塊菇菌絲體對於 pH3~8 範圍皆能適應。在菌體量方面，除了 pH8 菌體量 (409.5mg/dL) 稍低之外，其他 pH 值皆無相差太多。但是仍以塊菇菌絲體在初始 pH5.0 時，會得到最大的菌體量 460.8mg/dL。

在培養後之 pH 值，初始 pH3~6 之最後 pH 上升幅度不大，但在初始 pH7~8 之最後 pH 下降至 pH6 以下，其原因可能是初期 (3~7 天) 培養中之酪蛋白水解產物含量多時，造成 pH 值下降很多，隨著天數增加，pH 值隨之增加，不過當上升至某一 pH 值範圍，其值不再上升，因此大部分 Final pH 值都在 pH5~6 左右。

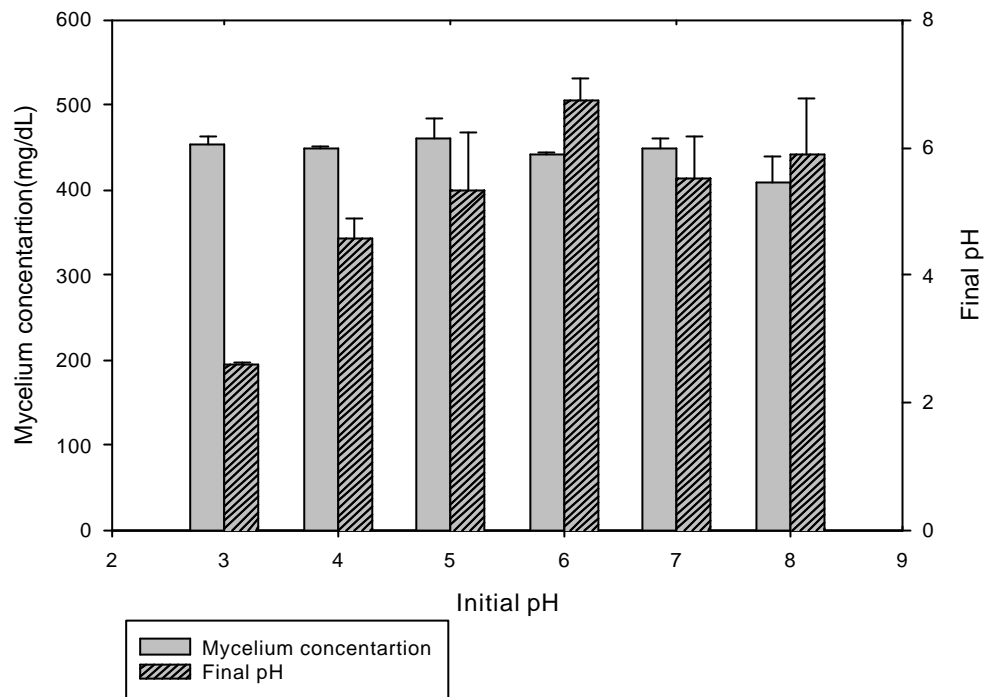


Fig.5 - 5 初始 pH 值對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT
2. 初始 pH 為 3、4、5、6、7、8。
3. 接菌量-液態種源 5% 接菌量。
4. 培養溫度為 20 、轉速 100rpm、培養 14 天。

(三) 接菌量對塊菇菌絲體生長之影響

由結果顯示 (Fig.5-6) , 菌絲體隨著接菌量增加而增加 , 當接菌量為 9% 時 , 其菌體量達到最大值 (451.4mg/dL) , 當接菌量增加到 11% , 推測可能是菌體自身開始產生競爭 , 有抑制的效應生成 , 由菌體量 (398.8mg/dL) 大幅度下降產生 , 就可以知道接菌量過多 , 反而不利於生長。

以 pH 的曲線來觀察 , 接菌量 1% ~9% 之 pH 值改變不大 , 當接菌量 11% 時 , pH 值急速上升至 7 左右 , 推測可能接菌量過多 , 菌體間開始有死亡現象 , 釋放出鹼性物質 , 故由初始 pH5 上升至 pH7 左右。

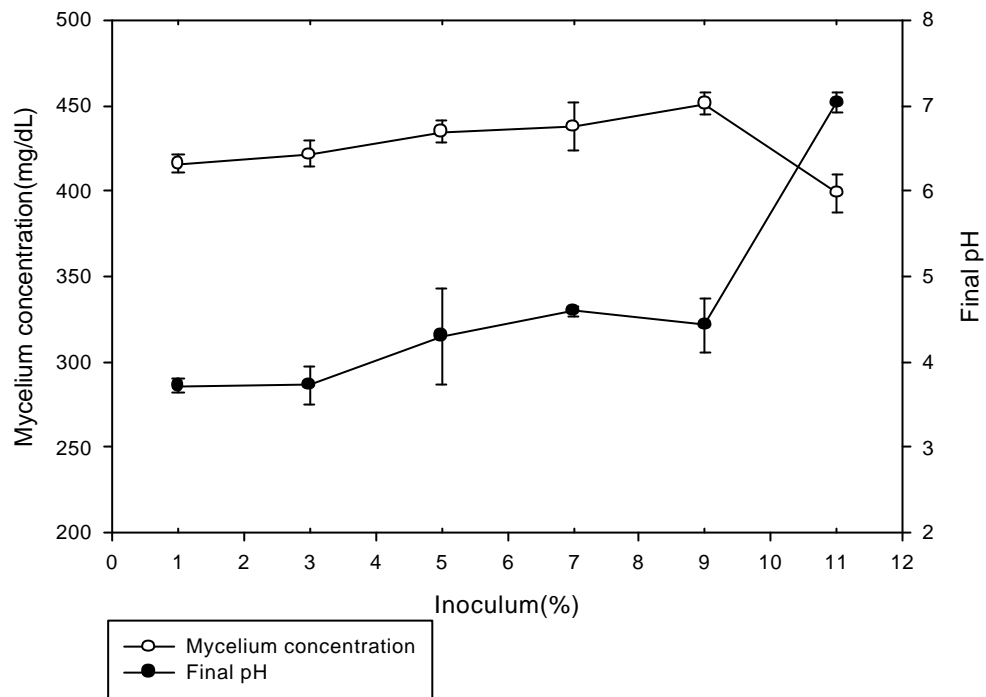


Fig.5 - 6 接菌量對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT
2. 接菌量-液態種源為 1%、3%、5%、7%、9%、11% 接菌量。
3. 培養溫度為 20 。
4. 初始 pH 為 5、轉速 100rpm、培養 14 天。

(四) 時間變化對塊菇菌絲體生長之影響

從生長曲線 (Fig.5-7) , 可看出 , 菌體濃度隨著天數增加而增加 , 在第 10、12、14 天之菌體濃度分別為 420.2、418.6、416.1mg/dL , 其中以第 10 天之菌體濃度最高 , 但是由於第 10 及 12 天培養基中之酪蛋白水解產物尚有殘量 , 為避免其誤差 , 選擇已無殘量的第 14 天 , 作為接下來試驗之最適培養時間。

以 pH 的曲線來觀察 , 隨著天數增加先降後升 , 直到 20 天 , 其培養液顏色也比之前略深 , 推測可能是塊菇菌絲體開始產生自溶狀態 , 使得發酵液中產生出鹼性的物質。

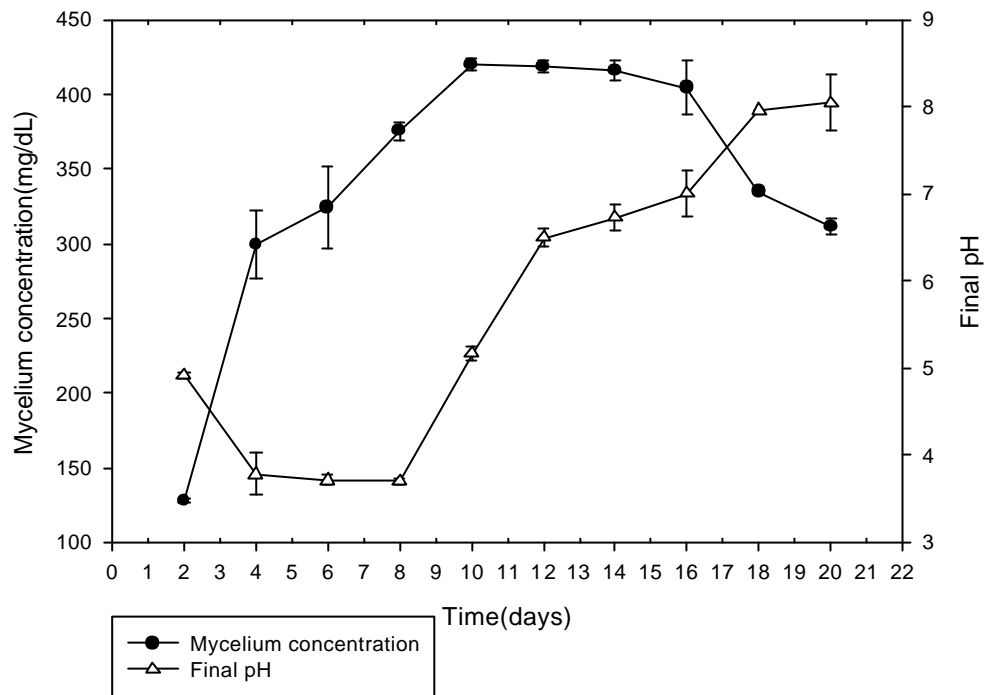


Fig.5 - 7 時間變化對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT
2. 培養時間為 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 天。
3. 培養溫度為 20 。
4. 接菌量-液態種源為 9% 接菌量。
5. 初始 pH 為 5、轉速 100rpm。

5-3 三角瓶培養試驗 - 香味成分生成之探討

5-3-1 SPME(solid phase microextraction)萃取法

(一) 添加 Methionine 對 *T.melanosporum* 產生香味化合物的影響

Tuber melanosporum 在 1% Malt extract 及 0.2% Casein hydrolysate 基礎培養基中添加 0.05% Methionine，分別作為 Blank 及振盪培養 14 天，進行 GC-MS 分析鑑定後可得 Fig.5-8 和 Fig.5-9 之氣相層析圖。經由比對發酵前與發酵後之氣相層析圖，發現滯留時間在 8.76min 的標準品 Toluene 及 29.48min 的 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol 成分外，並無發現其他成分，推測可能有(1)在處理樣品過程中，其樣品置於溫度較低之下，不利於香味成分揮發出來，故使用 SPME 吸附過程中之濃度不夠，造成吸附量不足 (2)在使用 SPME 吸附的時間太短，因此吸附量未能達飽和(3)標準品濃度太高(200ppm)，導致尚未吸附其他香味物質時，其吸附量已近飽和。因此將來若要使用 SPME 進行吸附，應朝向樣品置於更高溫度下處理，以及吸附時間更久，使其吸附量能足夠以進行 GC-MS 分析。相信在改進以上之處理步驟後，對於香味物質的分析，一定能夠更加完善。

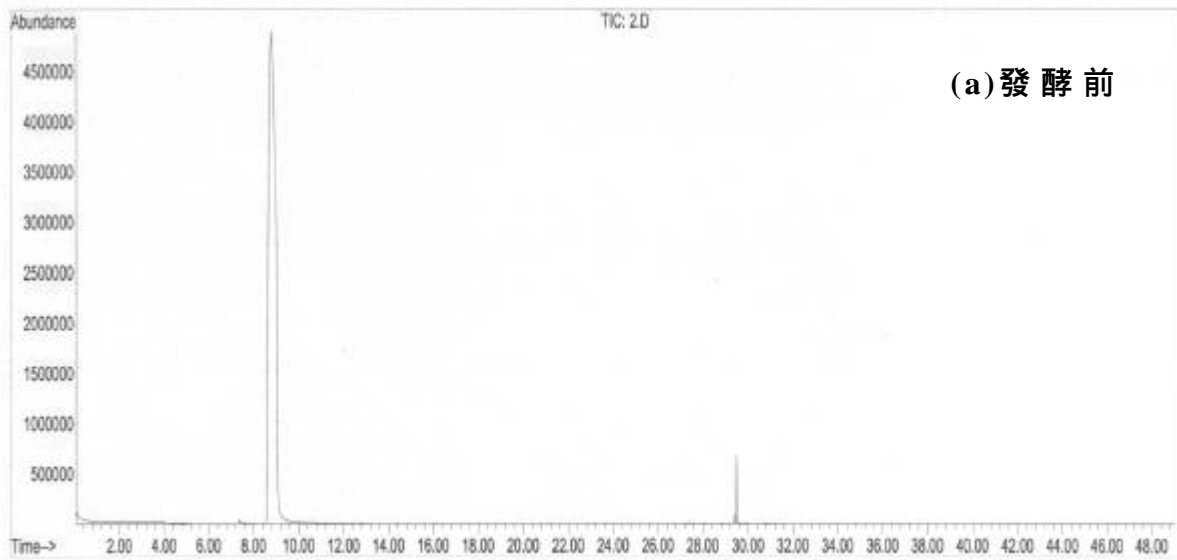


Fig.5 - 8 Methionine 之 Blank 培養液香味成分氣相層析圖

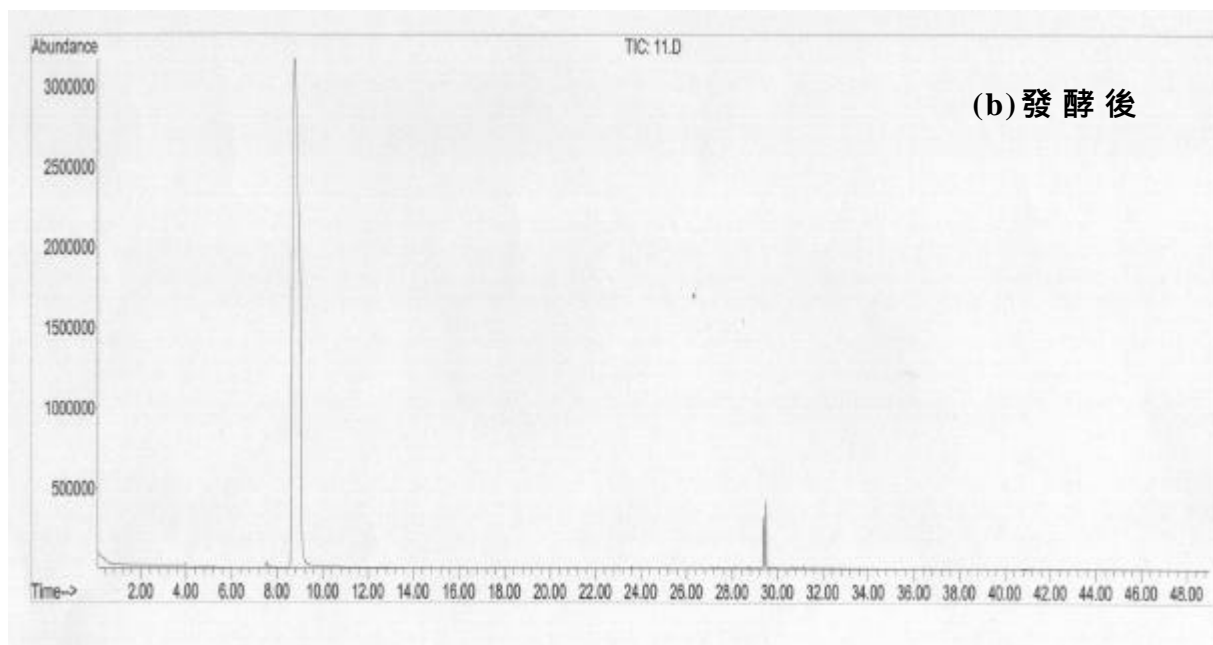


Fig.5 - 9 添加 0.05% Methionine 培養液香味成分氣相層析圖

5-3-2 Likens - Nickerson 蒸氣蒸餾溶劑萃取法

(一) 培養基成分 - 氮源 Malt extract 對塊菇菌絲體生長與香味生成之影響

由結果顯示 (Fig.5-10), 隨著氮源含量增加, 菌體濃度隨之增加, 由 0% 時可看出其菌體濃度 (75.1mg/dL) 相當低, 其 Final pH 相當高, 可能是菌體在無營養物質提供下, 產生死亡現象, 最後導致 pH 值由 5.0 上升至 8.6。當添加 1% 濃度氮源時, 其菌體濃度 (384.8mg/dL) 遠比 0% 時之菌體濃度高出許多, 最後 10% 時之菌體濃度為 1550 mg/dL, 表示氮源 Malt extract 的添加, 有利於菌體生長。雖然可以獲得高菌體量, 不過 Malt extract 價格昂貴, 考量其經濟與成本下, 若由三角瓶放大至發酵槽階段, 則需謹慎評估

Tuber melanosporum 分別在 1% Malt extract 和 0.2% Casein hydrolysat 的基礎培養基作為 Blank, 10% Malt extract 和 0.2% Casein hydrolysat 的基礎培養基振盪培養 14 天, 進行 GC-MS 分析鑑定可得 Fig.5-11 及 Fig.5-12 之氣相層析圖和整理分析鑑定後之各揮發性成分 Table 5-4。

由 Table5-4 比對發酵前後之香味成分, 發酵前與發酵後香味成分皆有不同, 發酵前偵測的香味成分在發酵後皆無偵測到, 相對的發酵後香味成分在發酵前皆無偵測到, 推測可能是在處理樣品過程中之減壓濃縮階段造成發酵前香味成分散失或是菌體在培養過程中代謝轉換成其他香味成分。

發酵後之香味成分比對 MS 圖庫 (Nist、Wiley) 後發現共有 11 種, 其中 2-methyl-1-propanol、3-methyl-1-butanol 與 Talou

等人(1987)分析 *Tuber melanosporum* 成分相符合，以及這兩種成分可能是由胺基酸 (valine, isoleucine) 降解 (degradation) 所產生的香味物質。而 phenethyl alcohol 此成分之生成機制根據文獻 (Akita, 1990) 指出可經由芳香族胺基酸 (phenylalanine, tyrosine, tryptophan) 生合成路徑 (biosynthetic pathway) 產生。

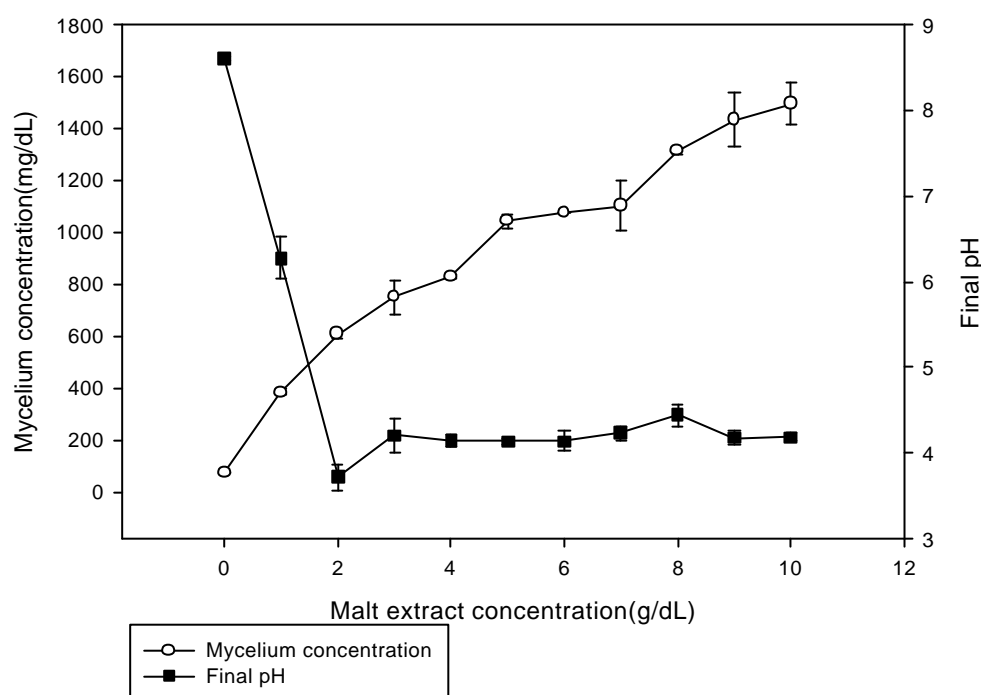


Fig.5 - 10 不同初始 Malt extract 濃度對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：malt extract 0~10%、casein hydrolysate 0.2%、thiamine $2 \times 10^{-5}\%$ 。
2. 培養時間為 14 天。
3. 培養溫度為 20 。
4. 接菌量-液態種源為 9% 接菌量。
5. 初始 pH 為 5、轉速 100rpm。

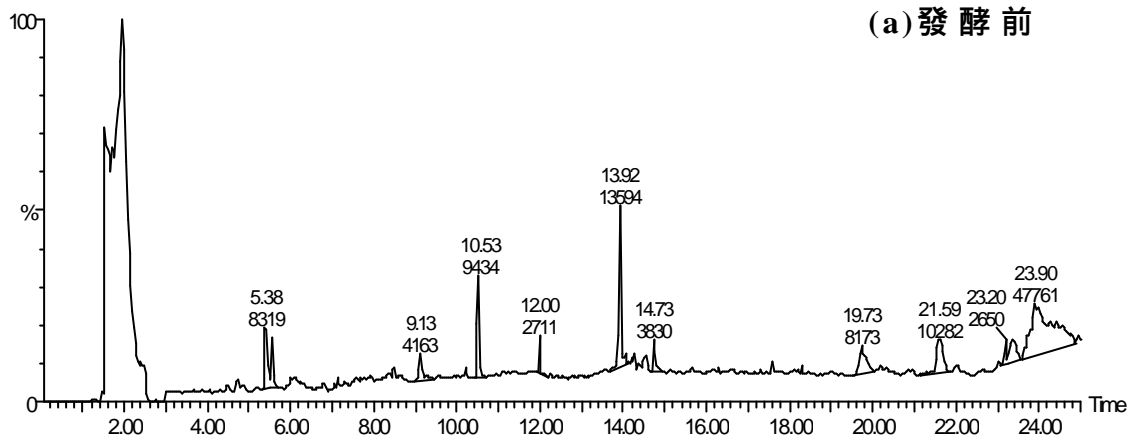


Fig.5 - 11 Malt extract 之 Blank 培養液香味成分氣相層析圖

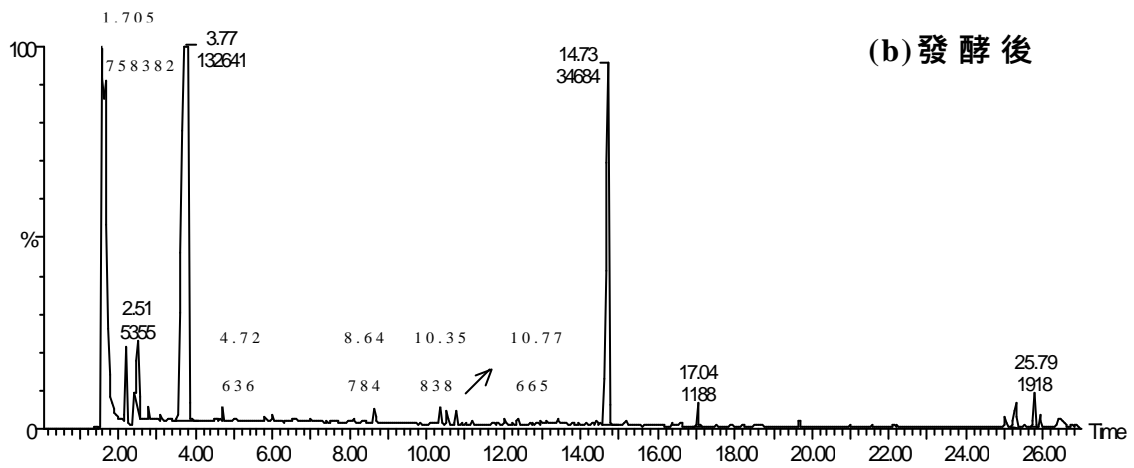


Fig.5 - 12 添加 10% Malt extract 培養液香味成分氣相層析圖

Table5-4 MECT 培養基發酵前後之揮發性成分

化合物名稱	化學式	面積 ($\times 10^3$)		CAS Reg. No.	滯留 指數 (R.I.)
		發酵前 (blank)	發酵後 (10% ME)		
2-methyl-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	-	33.78	78-83-1	
cyclohexane	C ₆ H ₁₂	-	5.36	110-82-7	
3-methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	-	132.64	123-51-3	747
cyclopentanone	C ₅ H ₈ O	-	S	120-92-3	791
2-furaldehyde	C ₅ H ₄ O ₂	8.32	-	98-01-1	823
2-methoxy-2-methyl-butane	C ₆ H ₁₄ O	S	-	994-05-8	831
3-ethyl-4,5-dihydro-1,4- dimethyl-1H-pyrazole		-	S		1024
phenol	C ₆ H ₆ O	-	S	108-98-2	1031
phenylethanal	C ₈ H ₈ O	9.43	-	122-78-1	1031
2,2,4,6,6-pentamethylheptane	C ₁₂ H ₂₆	-	S	2051-30-1	1042
2-(2-butoxyethoxy)ethanol	C ₈ H ₁₈ O ₃	12.59	-	112-34-5	1175
phenethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	-	34.684	60-12-8	1210
2-methyl-2-heptenal	C ₈ H ₁₄ O	3.83	-	30567-26-1	1211
2-butoxy-ethanol	C ₆ H ₁₄ O ₂	-	1.14	111-76-2	1320
4-ethyl-2-methoxy-phenol	C ₉ H ₁₂ O ₂	-	S	2785-89-9	1455
1-octadecanol	C ₈ H ₃₈ O	8.17	-	112-92-5	1459
heneicosyl-cyclopentane	C ₂₆ H ₅₂	10.28	-	6703-82-8	1561
1-dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	-	S	112-53-8	1767

註：(1) “S”表示面積小於 1×10^3 (2) “-”表示無偵測到 (3) “ME”表示 Malt extract

(二) 添加 Methionine 對塊菇菌絲體生長與香味生成之影響

由結果顯示 (Fig.5-13), 甲硫胺酸 (Methionine) 含量增加, 其菌體濃度有逐漸下降的趨勢, 從含量 0.05~0.1% 之菌體下降不多, 但是當添加到 0.15% 時, 其菌體量下降的很多, 因此甲硫胺酸的添加, 有抑制菌體濃度的現象。

以 pH 的曲線來看, 當未添加甲硫胺酸前之 pH 為 8 左右, 當添加 0.05% 時, 其 pH 值產生極大下降趨勢, 由 pH8 下降至 pH3.49, 表示甲硫胺酸的添加, 可能會抑制菌體生長, 造成 pH 值下降, 這樣的現象在 0.2% 時, 最後 pH 值下降不多, 可能是其濃度過濃, 影響 pH 值的效應就已經不那麼明顯了。

Tuber melanosporum 在 1% Malt extract 及 0.2% Casein hydrolysate 基礎培養基中添加 0.05% Methionine, 分別作為 Blank 及振盪培養 14 天, 進行 GC-MS 分析鑑定後可得 Fig.5-14 和 Fig.5-15 之氣相層析圖及整理分析鑑定後之揮發性成分 Table 5-5。

由 Table5-5 比對發酵前後之香味成分, 發酵前與發酵後香味成分皆有不同, 發酵前偵測的香味成分在發酵後皆無偵測到, 相對的發酵後香味成分在發酵前皆無偵測到, 推測可能是在處理樣品過程中之減壓濃縮階段造成發酵前香味成分散失或是菌體在培養過程中代謝轉換成其他香味成分。

在發酵後之香味成分中發現 *Tuber melanosporum* 之特徵性香味成分 dimethyl disulfide 及 trisulfide, 此結果與文獻中之 Talou 等人 (1989) 提出 Methionine 為硫化物前驅物之添加劑會產生硫化物成分相符合。

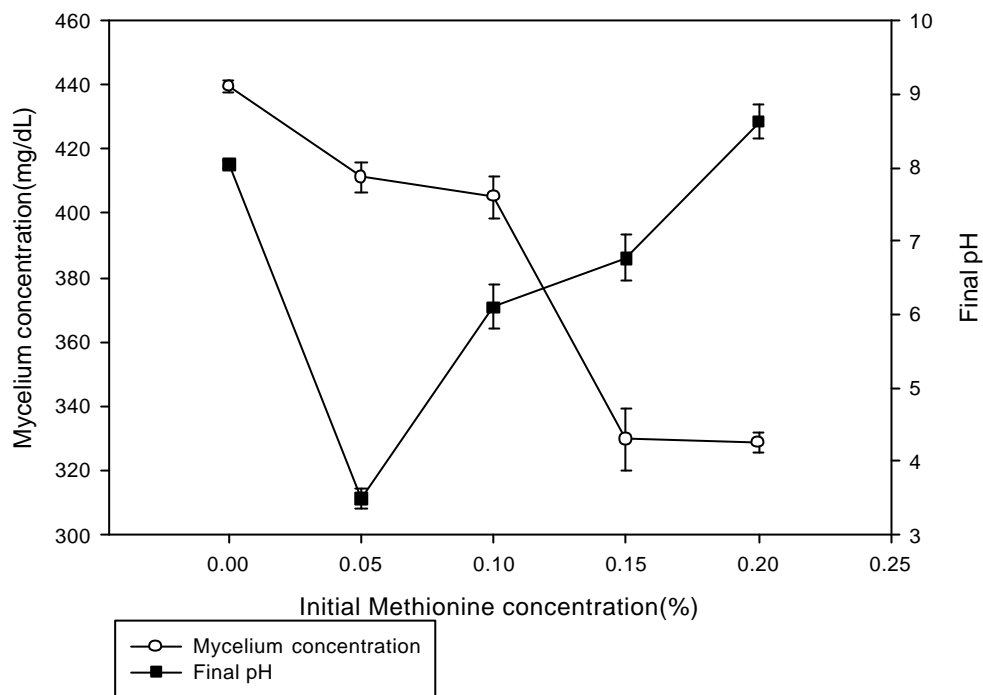


Fig.5 - 13 不同初始 Methionine 濃度對塊菇生長之影響

培養條件：

1. 培養基：MECT。
2. 添加 Methionine：0%~0.2%
3. 培養時間為 14 天。
4. 培養溫度為 20 。
5. 接菌量-液態種源為 9% 接菌量。
6. 初始 pH 為 5、轉速 100rpm。

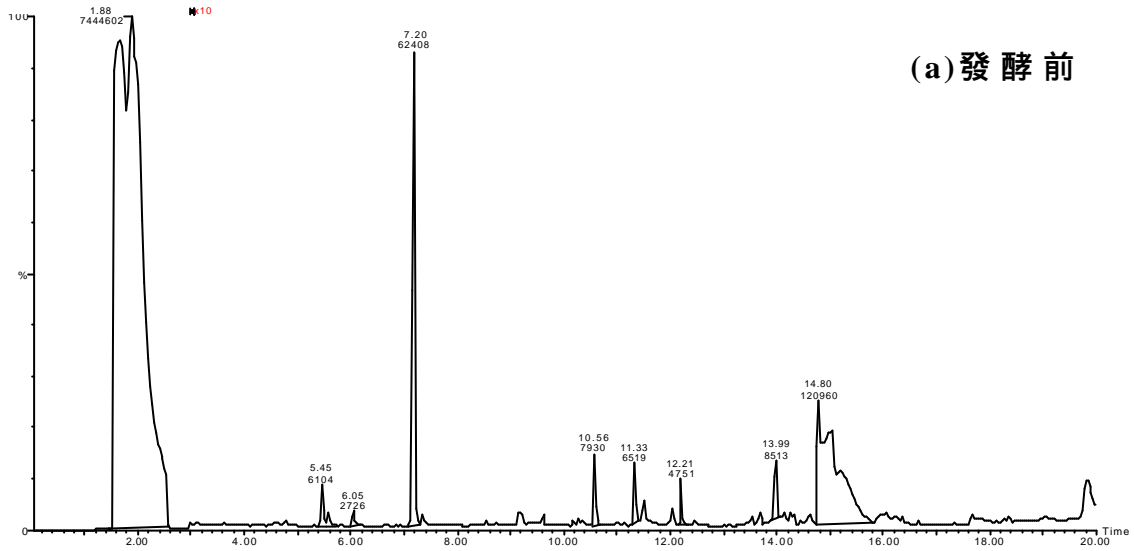


Fig.5 - 14 Methionine 之 Blank 培養液香味成分氣相層析圖

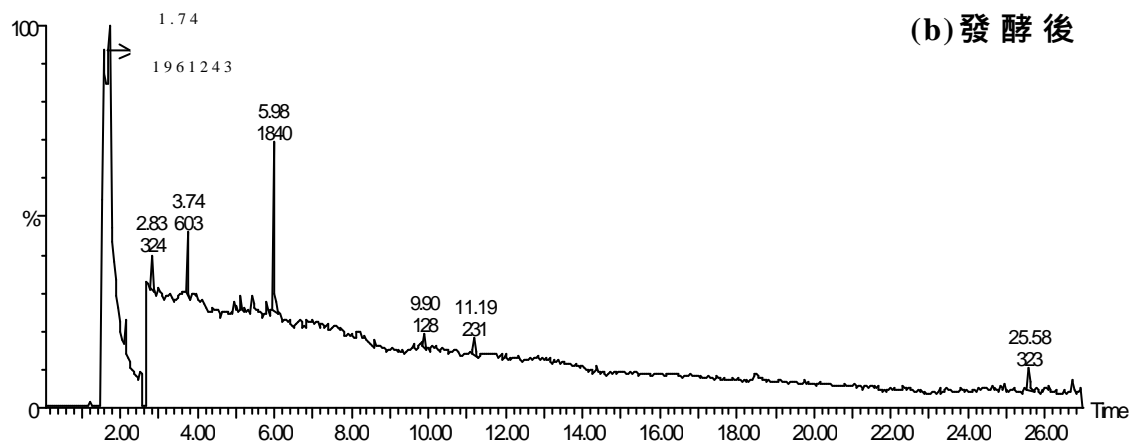


Fig.5 - 15 添加 0.05% Methionine 培養液香味成分氣相層析圖

Table 5-5 添加 Methionine 之培養基發酵前後揮發性成分

化合物名稱	化學式	面積 ($\times 10^3$)		CAS Reg. No.	滯留 指數 (R.I.)
		發酵前 (blank)	發酵後 (0.05% Me)		
dimethyl disulfide	$C_2H_6S_2$	-	S	624-92-0	746
2-furaldehyde	$C_5H_4O_2$	6.1	-	98-01-1	826
3-methoxy-3-methyl-2-butanone	$C_6H_{12}O_2$	-	1.84	36687-98-6	849
2-furanmethanol	$C_5H_6O_2$	2.73	-	98-00-0	853
methional	C_4H_8OS	62.41	-	3268-49-3	898
dimethyl trisulfide	$C_2H_6S_3$	-	S	3658-80-8	1003
phenylethanal	C_8H_8O	7.93	-	122-78-1	1033
2-chlorocrotonaldehyde		-	S		1059
2-furyl ethyl ketone	$C_7H_8O_2$	6.52	-	3194-15-8	1065
3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	$C_6H_6O_3$	4.75	-	118-71-8	1099
2-(2-butoxyethoxy)ethanol	$C_8H_{18}O_3$	8.51	-	112-34-5	1178
5-methyl-4-hepten-3-one	$C_8H_{14}O$	120.96	-	1447-26-3	1214
cetylpyridinium chloride	$C_{21}H_{40}ONCl$	S	-	6004-24-6	1462

註：(1) “S”表示面積小於 1×10^3 (2) “-”表示無偵測到 (3) “Me”表示 Methionine

5-4 發酵槽培養試驗

(一) 5 公升批式攪拌式發酵槽塊菇菌絲體培養試驗

黑孢塊菇為世界珍稀菇類，由於栽培困難，有關黑孢塊菇之研究，多注重於形態、生態及人工合成等方面，對於黑孢塊菌的純培養技術較少描述。對於塊菇菌絲體放大規模發酵槽培養文獻更是未見有報告發表，因此在此將針對塊菇菌絲體放大規模發酵槽培養，觀察塊菇菌絲體生成情形與發酵狀況。

結果如 Fig.5-16 顯示，第 1 天至第 9 天的平均比生長速率 μ 約為 0.338day^{-1} 。當培養至第 9 天時菌體濃度為 446mg/dL ，與三角瓶培養至第 14 天菌體濃度為 416.1mg/dL 相較下，培養時間及菌體濃度皆以發酵槽較佳。推測可能是攪拌式發酵槽中葉片攪拌比恆溫培養箱震盪培養更容易達到培養液均勻混合，故利於菌體吸收營養物質與生長。發酵槽的培養過程中，菌體呈現鬆散、白色狀態。

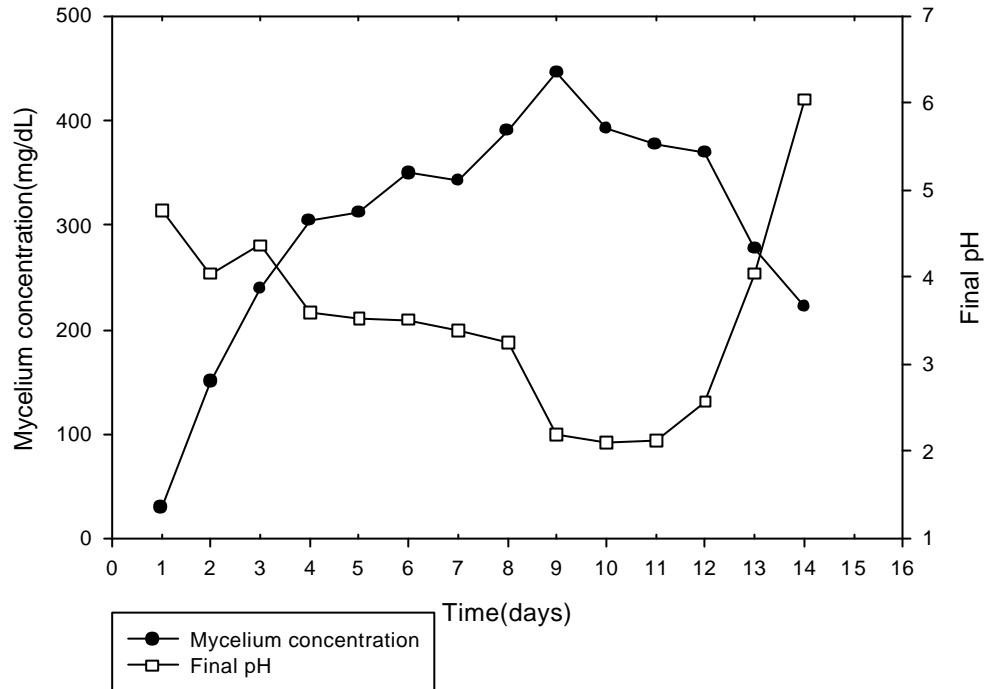


Fig.5 - 16 5 公升攪拌式發酵槽時間對塊菇菌絲體生成之變化

培養基成分：

Malt extract	1%
Casein hydrolysate	0.02%
Thiamine	2×10^{-5} %

培養條件：

1. 菌種 - BLCC 217
2. 接菌量 - 液態種源 100ml。
3. 初始 pH5、培養溫度 20、轉速 100rpm、通氣量 0.5vvm。

第六章 結論與展望

6-1 結論

本研究重點在於利用三角瓶液態培養，探討不同物理及化學環境因子，對塊菇菌絲體菌體濃度及香味化合物生成之影響，希望藉由培養因子的調整與控制提高菌絲生長速率、菌體濃度及特徵性香味成分之生成。

整體而言，主要結果與討論如下：

- 一、影響塊菇菌落生長之純培養環境極多，所採用之培養基質亦直接控制菌落生長，黑孢塊菌於不同固態培養基上，其生長量不同，以 PDA 培養基最適其生長，而 MMN 則不適合，只有 Oat Medium 可產生子實體原基部份。在不同液態培養基上，其菌體濃度不同，以 MECT 培養基最高，而 PGA 則不適合。
- 二、培養溫度與初始 pH 值方面：在最適生長溫度與初始 pH 值探討上，本實驗結果顯示在 20 及 pH5 為最佳，由之前實驗室培養菇類經驗發現，此 pH 質會隨著不同培養基成分有所改變。
- 三、培養時間方面：在塊菇液態天數上選擇 14 天為較切合的時間，但此時間應會隨選用培養基和溫度等因子不同而有所調整。
- 四、接菌量方面：以培養 14 天的種菌打碎接入法，塊菇菌體濃度會隨著接菌量的增加而增加，在 9% 比例下，可獲的最高菌體濃度，但當 11% 接菌量會對菌體濃度有所抑制。

五、塊菇菌絲體生長與香味生成研究方面：發現隨著 Malt extract 含量增加，菌體濃度隨之增加，雖然可以獲得高菌體量，不過 Malt extract 價格昂貴，考量其經濟與成本下，若由三角瓶放大至發酵槽階段，則需謹慎評估。

培養 *Tuber melanosporum* 在氮源 Malt extract 10% 濃度實驗中，經由 GC-MS 定性分析有 phenethyl alcohol、2-methyl-1-propanol、3-methyl-1-butanol 等 11 種成分。

六、添加前驅物方面：使用 SPME 萃取法與 L-N 蒸氣蒸餾溶劑萃取裝置進行添加 Methionine 於基礎培養液培養，雖然在 SPME 萃取法上並無分析鑑定出很多香味成分，若改進其萃取步驟與過程，相信將來分析出的物質會最接近天然的塊菇香味成分。而以 L-N 萃取裝置萃取分析鑑定後有 *Tuber melanosporum* 之特徵性香味成分 dimethyl disulfide 及 trisulfide 生成，但是香味成分仍然未見有如文獻中的 26 種之多，表示此分析方法仍需進一步改進。

七、發酵槽方面：發酵槽培養下之菌體濃度以培養第 9 天時最高為 446.1mg/dL，比三角瓶培養至第 14 天之菌體濃度 416.1mg/dL 高，表示發酵槽以葉片攪拌方式有利於菌體生長。

6-2 未來展望

此次研究世界上稀有的菌種 - 黑孢塊菇，由於純培養技術參考文獻較少，實驗中之液態培養基成分則參考紹佐謙(1992)培養 *Tuber melanosporum* 之培養基。將來可以針對不同之物理因素與化學因素探討，決定出屬於 *Tuber melanosporum* 株菌之培養基。

由於本實驗採用液態培養方式產生出硫化物成分，但塊菇最原始生活模式乃是與樹木共生於土壤內生長，因此將來可以固態培養方式培養 *Tuber melanosporum*，朝向生成特徵性香味成分-硫化物。

對於香味分析方面，受限於時間影響，並未建立出最佳的分析方法，目前僅定性分析，將來可以朝向定性與定量分析同步以及建立更完善的分析過程。

參考文獻

李秀鈴、周正俊、吳淳美，”*Kluveromyces lactis*, *Ceratocystis moniliformis* 及 *Sporobolomyces odoros* 產生之香氣成份鑑定”，中國農業化學會誌，29(1)：43 - 53，1991。

周綠蘋，“台灣松口磨之基本研究”台灣大學植物研究所碩士論文，1983。

林裕森，“佩里哥松露”，時報周刊，1289期：172 - 177，2002。

邵佐謙，“溫度及 pH 值對黑孢塊菌生長之效應及菌根合成試驗”，台灣大學森林研究所碩士論文，1992。

洪玲玲，“兩種外生菌根之生理及其對台灣二葉松之菌根誘導”，東海大學生物研究所碩士論文，1977。

胡弘道，“林木菌根”，國立編譯館主編，121 - 151(1990)。

胡弘道，“塊菇與林木共生關係之研究(I)菌根合成試驗”，台大實驗林研究報告，1(1)：1 - 6，1987a。

胡弘道，“塊菇與林木共生關係之研究(II)4號塊菇之特徵及其與夏塊菇之菌根合成”，台大實驗林研究報告，1(3)：17 - 26，1987b。

胡弘道，“台灣二葉松幼苗菌根之研究(一)分離形態”，台大實驗林研究報告，118：17 - 30，1976。

許碧如，“溫度、pH 值及葡萄糖濃度對夏塊菇菌生長之效應”，台灣大學森林研究所碩士論文，1987。

郭美琴，“臨界二氧化碳萃取法” 食品工業，17(2): 19 - 24，1985。

程竹青，“應用微生物技術研製香料之探討” 食品工業，16(8): 19 - 27 (1984)。

劉黛蒂，“利用 *Ceratocystis moniliformis* 產生香氣化合物之研究”，中國文化大學家政研究所碩士論文，1990。

黃惠琴，“樟芝菌絲體深層培養之研究”，東海大學化學工程研究所碩士論文，2001。

蕭明熙，“真菌代謝物之最新研究趨勢，真菌學之最近發展”，行政院國家科學委員會生物科技研究中心發行，1985。

蘇遠志、黃世佑，“微生物化學工程學”，天然書社，1971。

Akita O., Ida T., Obata T., Hara S., "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate", J. Ferment. Bioeng., 69(2):125 - 128,1990.

Andreotti R., Casoli U., "Composizione chimica e tecnologia di conservazione del tartufo", Industria Conserve (Parma), 43 : 215 - 219,1968.

Badcock E. C., "preliminary account of the odour of wood-destroying fungi in culture", Transactions of the Brit. Mycol. Soc.,23 : 188 - 198,1939.

Berger R. G., Neuhauser K., Drawert F., "Biotechnological production of flavor compounds. III.High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma benzoinum*", Biotechnol. Bioeng., 30 : 987,1987.

Birkinshaw J. H., Bracken A., Findlay W.P.K., " Biochemistry of the woodrotting fungi. 4. Metabolic products of *Trametes suaveolens* (Linn.) ", *Biochem. J.*,38 : 131 - 132,1944.

Birkinshaw J. H., findlay W. P. K., "Biochemistry of the woodrotting fungi. I. Metabolic products of *Lentinus lepideus* ", *Biochem. J.*,34 : 82 - 88,1940.

Caragay A. B., Little A. D., "Supercritical fluids for extraction of flavors and fragrances from natural products", *Perfumer & Flavorist.*,6 : 43 - 55, 1981.

Chevalier G., Chantal Desmas H. Frochot et L. Rioussset., " L espèce *Tuber aestivun* Vitt. : I. Definition", *Mush. Sci. X*, part I : 957 - 975,1978.

Chevalier G., Frochot H., "Truffle production from artificially mycorrhizal plants ", first result. (Abs) Fifth North American Conf. on Mycorrhizae, Laval Univ., Quebec, Canada., PP.35,1981.

Chevalier G., Grente J., "Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne : Production a grande echelle de plants mycorrhizes par la truffle(*Tuber melanosporum* Vitt.)", *Mush. Sci. X.*, part II : 483 - 505,1978.

Chevalier G., "L espèce *Tuber aestivun* Vitt. : II. Ecologie", *Mush. Sci. X*, part I : 977 - 994,1978b.

Collins R. P., "Terpenes and odoriferous materials from microorganisms", *Lloydia*, 39 : 20 - 24,1976.

Danell E., Fries N., "Method for isolation of *Cantharellus*

species, and the synthesis of ectomycorrhizae with *Picea abies*", *Mycotaxon*, 38 : 141 - 148,1990.

Delmas J., "La truffle et sa culture", Institut national de la recherche agronomique, Paris., 1 - 35,1983.

Delmas J., "La truffle : son ecologie", *Agric.*, 82 - 86,1973.

Edmonds A. S., Wilson J. M., Harley J. L., "Factors affecting potassium uptake by beech mycorrhizas", *New Phytol.*, 76 : 307 - 315, 1976.

Ellis J. J., Hesseltine C. W., " Two new members of the mucorales.", *Mycologia.*, 61 (5) : 863 - 872,1969.

Emberger R., "An analytical approach to flavor research", *Cereal Foods World*, 30 (10) : 691 - 694, 1985.

Ferry B. W., Das N., "Carbon nutrition of some mycorrhizal *Boletus* species", *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 51 : 795 - 798,1968.

French R. C., Gallimore M. D., " Effect of some nonyl derivatives and related compounds on germination of uredospores", *J. Agric. Food Chem.* 19 (5) : 912-915,1971.

French R. C., Gallimore M. D., " Stimulation of germination of uredospores of stem rust of wheat in the pustule by nonanal and related compounds", *J. Agric. Food Chem.* 20 (2) : 421-423,1972.

Fries N., " Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi", *Brit. Mycol. Soc.Trans.*,60 (1) : 1-21,1973.

Giovannetti G., Fontana A., "Mycorrhizal synthesis between *Cistaceae* and *Tuberaceae*", *New Phytol.*, 92 : 533-537, 1982.

Gocho S., "Application of Biotechnology to the Perfumery Industry", *Perfumer and Flavorist*, 9 (Feb/Mar) : 61 - 65, 1984.

HacsKaylo E., Palmer J. G., Vozzo J. A., "Effect of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi", *Mycologia.*, 57 : 748 - 756, 1965.

Halim A. F., Narciso J. A., Collins R. P., "Odorous constituents of *Penicillium decumbens*", *Mycologia.*, 67 : 1158-1165, 1975.

Hanssen H. P., Sprecher E., "Aroma-producing fungi : influence of strain specificity and culture conditions on aroma production", In *Flavour' 81. Proceedings of the 3rd Weurman Symposium*, ed. Schreier P. Walter de Gruyter & Berlin Co., New York, 547-556, 1981.

Harley J. L., Wilson J. M., "The absorption of potassium by beech mycorrhizas", *New Phytol.*, 58 : 281 - 298, 1959.

Hasija S. K., Agarwal H. C., "Nutritional physiology of *Trichotecium roseum*", *Mycologia.*, 70 : 47 - 60, 1978.

Hubbal J. A., Collins R. P., "A study of factors affecting the synthesis of terpenes by *Ceratocystis variispora*", *Mycologia.*, 70, pp.117, 1978.

Hung L. L., Trappe J. M., "Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro", *Mycologia.*, 75 (2) : 234 - 241, 1983.

Hutchinson S. A., " Biological activity of volatile fungal metabolites", Brit. Mycol. Soc. Trans., 57 (2) : 185-200, 1971.

Janssens L., De Pooter H. L., Schamp N. M., Vandamme E. J., "Production of Flavours by Microorganisms", Process Biochem., 27 : 195 - 215, 1992.

Kepner R. E., Straten S. V., Weurman C., "Freeze concentration of volatile components in dilute aqueous solution", J. Agric. Food Chem., 17 (5) : 1123 - 1127, 1969.

Kinsella J. E., Hwang D., "Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*", Biotechnol. Bioeng., 927-938, 1976.

Kulifaj M., "*Tuber melanosporum* : contribution à l' étude de la morphogénèse et de la physiologie de l' ascocarpe", PhD Thesis, University Paul Sabatier, Toulouse, pp14 - 30, 1984.

Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y., " Antifungal activity of components of essential oils", Agric. Biol. Chem., 45(4) : 945-952, 1981.

Laiho O., "Paxillus involutus as a mycorrhizal symbiont of forest tree", Acta for. Fenn., 106 : 1 - 65, 1970.

Lamb R. J., "Effects of D - glucose on utilization of single carbon sources by ectomycorrhizal fungi", Tran. Br. Mycol. Soc., 63 : 295 - 306, 1974.

Lanza E., Ko K. H., Palmer J. K., "Aroma production of cultures of *Ceratocystis moliniformis*", J. Agric. Food Chem., 24, pp.1247, 1976.

Larroche C., Tallu B., Gros, J. B., "Aroma production by spores of *Penicillium roqueforti* on a synthetic medium", J. Ind. Microbiol., 3 (1) : 1 - 8, 1988.

Lewis D. H., Harley J. L., "Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. II Utilization of exogenous sugars by uninfected mycorrhizal roots", New Phytol, 64 : 238, 1965a.

57. Lewis D. H., Harley J. L., "Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between host and fungus", New Phytol, 64 : 257, 1965c.

Littke W. R., Bledsoe C. S., Edmonds R. L., "Nitrogen uptake and growth in vitro by *Hebeloma crustuliniforme* and other Pacific Northwest mycorrhizal fungi", Can. J. Bot., 62 : 647 - 652, 1984.

Lundeberg G., "Utilization of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi", Stud Forest. Suec., 79 : 1 - 95, 1970.

Maarse H., Belz R., "Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma", Kluwer Boston Inc., Hingham, MA, U.S.A., 21 - 24, 1981.

Melin E., "Some effects of forest tree roots on mycorrhizal Basidiomycetes", In Symbiotic Associations (Eds B. Mosse and P. S. Nutman 1963.) 124 - 145, 1963.

Ney K. H., Freytag W. G., "Truffle-Aroma", Gordian, 80, pp. 214, 1980.

Norkrans B., "Studies in growth and cellulolytic enzymes of

Tricholoma", Sym. Bot. Upsaliens, 11 : 1 - 126, 1950.

Nursten H., "Flavor chemistry", Food, Flavorings, Ingredients, Packa-ging and Processing, 4 : 14 - 21, 1982.

Omelianski V. L., "Aroma-producing microorganisms", J. Bacterio.,8 : 393 - 419,1923.

Pacioni G., Bellina-agostinone C., D'antonio M., "Odour composition of the *Tuber melanosporum* complex", Mycol .Res.,94 (2) : 201-201, 1990.

Pelusio F., Nilsson T., Montananrella L., Tilio R., Larsen B., Fac-chetti S., Madsen J. O., "Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile organic sulfur compounds in black and white truffle aroma", J. Agric. Food Chem., 43 : 2138 - 2143, 1995.

Reineccius G.A., Anandaraman S., "Innovative methods for isolating volatiles flavors", Perfumer & Flavorist., 6 : 63 - 71,1981.

Scharpf L. G., Jr Seitz E. W., Morris J. A., Farbood M. I., "Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes", In Biogeneration of Aroma, edited by Parliment T. H. & Croteau R., American Cjemical So-ciety, Washington, DC, ACS symposium series, 317 : 323 - 346,1986.

Schomburg G., Dielman G., "Identification by means of retention parameters", J. Chromatogr. Sci., 11 : 151-161,1973.

Schreier P., Idstein H., "Advances in the instrumental analysis of food flavours", Z Lebeusm Unters Forsch., 180 : 1 - 14, 1985.

Talou T., Delmas M., Gaset A., "Analysis of Headspace Volatiles from Entire Black Truffle (*Tuber melanosporum*) ", J. Sci. Food Agric., 48 : 57 - 62, 1989.

Talou T., Delmas M., and Gaset A., "New Trends in Black Truffle Aroma Analysis", American Chemical Society, Flavor chemistry : trends and developments, 202-212, 1989.

Talou T., Delmas M., Gaset A., "Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma", J. Agric. Food Chem., 35 : 774 - 777, 1987a.

Theodorou C., Bowen C. O., "Influence of temperature on the mycorrhizal association of *Pinus radiata* D", Don Aus. J. Bot., 19 : 13 - 20, 1971.

Tirillini B., Verdelli G., Paolocci C., Frattoni M., "The volatile organic compounds from the mycelium of *Tuber borchii* Vitt", Phytochemistry 55 : 983-985, 2000.

Trappe J. M., "The orders, families, and genera of hypogeous *Ascomycotina* (truffles and their relatives) ", Mycotaxon IX (1) : 297 - 340, 1979.

Trappe J. M., "Truffles in north America", McIlivain, 1 - 5, 1980.

Trappe K. M., "Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae", Bot. Rev., 538 - 606, 1962.

Van Den Dool H., Kratz P.D., "A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatograph", J. Chromatogr., 11 :

463-467(1963).

Woodruff R. C., Thompson J. N. Jr., "Hybrid release of mutator activity and the genetic structure of natural populations", *Evolutionary biology.*,12 : 129-162,1980.

Zak B., Bryan W. C., "Isolation of fungal symbionts from pine mycorrhizae", *For. Sci.*, 9 : 270 - 278,1963.

Zak B., Marx D. H., "Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines", *For. Sci.*,10 : 214 - 222,1964.

簡 歷

姓 名：黃國展

籍 貫：台灣省苗栗縣

出生年月日：民國六十八年五月十六日

學 歷：國立聯合技術學院化學工程系畢業

私立東海大學化學工程研究所畢業

經 歷：東海大學化工系 兼任助教