

國立中興大學化學工程學系

碩士學位論文

應用影像辨識技術來探討

最適化固態培養灰白松露生長條件

**Optimized *Tuber borchii* Culture Conditions on
the Solid State Fermentation via
Application of Image Recognition Technology**

National Chung Hsing University

指導教授：劉永銓 博士 Yung-Chuan Liu

研 究 生：鄭欣怡 Sin-Yi Cheng

中華民國一〇六年七月

Department of Chemical Engineering
National Chung Hsing University
Master Thesis

Optimized *Tuber borchii* Culture Conditions on
the Solid State Fermentation via
Application of Image Recognition Technology



Advisor: Yung-Chuan Liu
Graduate: Sin-Yi Cheng

July, 2017

國立中興大學化學工程研究所

碩士學位論文

題目：應用影像辨識技術來探討最適化固態培養灰白松露生長

條件

姓名：鄭欣怡 學號：5103065010

經 口 試 通 過 特 此 證 明

論文指導教授

劉永銓

論文考試委員

陳志義

張景輝

中華民國 一〇六 年 七 月 二 十 八 日

誌 謝

在職期間於中興大學的進修生活即將告一段落，在此感謝指導教授劉永銓博士的指導以及提供完善的研究環境，讓學生可以順利完成此篇論文。感謝修平科技大學陳志義老師及工研院南分院張景輝經理在百忙之中抽空參與我的論文口試，並且給予許多寶貴的意見。

此外，特別感謝實驗室嘉駿學長在我碩士求學期間提供許多創意發想與協助，以及護仁、育淵、智淵與羽溶等學弟妹適時的鼎力相助，也謝謝同屆的好同學怡珍與懿憶在辛苦的半工半讀路上相伴前行。

最後，感謝我的父母在求學路上給予的鼓勵，以及鄉親父老與同事們時常地關心我的求學進度，加上建雄、奇巧、底迪、阿桃與阿肥更是發揮極其撫慰人心的作用，讓我得以堅持下去。



摘要

固態基質培養是目前台灣商業化食用真菌培養的主流，本研究分三階段依序建構灰白松露菌 (*Tuber borchii*) 最適化固態生長培養基配方的生長模型，第一階段應用商業影像處理軟體及編寫影像數值分析程式來驗證目標圖形面積，驗證結果顯示影像分析面積與真實面積相差 0.092 %，可靠性高。第二階段以 PDA 培養基培養灰白松露菌來驗證時間對菌絲擴散的微生物生長模型，研究結果表示灰白松露菌在 PDA 上的初始平均接菌面積為 $47.290 \pm 9.532 \text{ mm}^2$ 時，第 24 天平均生長面積為 $2640.785 \pm 113.215 \text{ mm}^2$ ，平均比生長速率為 $0.174 \pm 0.0114 \text{ day}^{-1}$ 。最後一階段探討灰白松露菌的最佳比生長速率的固態培養基組成成分，以 Box-Behnken 實驗設計法設計三階三變培養基配方，反應曲面法擬合比生長速率模型、變異數分析、脊型分析探討和模型驗證。研究結果顯示培養基中的 Malt extract 與 Potato starch 對灰白松露菌生長具有顯著性影響，而 Glucose 則沒有顯著性影響。RSM 預測最佳的灰白松露菌比生長速率為 0.211 day^{-1} ，而實際培養灰白松露菌的比生長速率結果為 $0.230 \pm 0.0172 \text{ day}^{-1}$ 。顯然培養基預測與實驗結果非常接近。因此，透過數學模型擬合能充分說明其可以作為預測灰白松露菌在 Glucose、Malt extract 和 Potato starch 三種培養基組合的比生長速率。

關鍵字：影像辨識技術、灰白松露、固態培養、反應曲面法

ABSTRACT

The solid state fermentation is the mainstream of commercial edible fungus cultivation in Taiwan. In this study, the growth model of solid-type growth medium formula was established in three stages. The first step was to use the commercial image processing software, and writing an image analysis program to verify the target graphics area. The results showed the image analysis gave the real area where a difference of 0.092 % with high reliability. In the second step, the fungi growth model of mycelial was verified by culturing *Tuber borchii* in PDA medium. The results showed that the average area of the inoculated area was $47.290 \pm 9.532 \text{ mm}^2$ on the PDA. The average growth area was $2640.785 \pm 113.215 \text{ mm}^2$ on the 24th day, and its average specific growth rate was $0.174 \pm 0.0114 \text{ day}^{-1}$. The final step studied the compositions of the solid state medium of the optimized specific growth rate for *Tuber borchii*. The Box-Behnken experimental design method was used to design the Three-level three-factor for the recipes of culture medium. The response surface methodology was used to fit specific growth rate model, analysis of variance, path of steepest ascent, and model validation. The results showed that malt extract and potato starch in the culture medium had significant effects on the growth of *Tuber borchii*, but glucose had no significant effect. The RSM predicted the specific growth rate of *Tuber borchii* was 0.211 day^{-1} , and the specific growth rate of *Tuber borchii* was $0.230 \pm 0.0172 \text{ day}^{-1}$ by experiment. Obviously the prediction and experimental results matched very well. Therefore, the mathematic model could be used to fully predict the specific growth rate of the three medium combinations of glucose, malt extract and potato starch.

Keywords: Image recognition technology, *Tuber borchii*, Solid state fermentation, Response surface methodology

目 錄

摘 要	i
ABSTRACT	ii
目 錄	iii
圖 目 錄	iv
表 目 錄	v
第一章 前言	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	1
第二章 文獻回顧	2
2.1 松露簡介	2
2.2 灰白松露菌簡介	5
2.3 影像辨識	7
2.4 最適化實驗設計	8
第三章 材料與方法	18
3.1 研究菌株	18
3.2 研究材料	18
3.3 實驗流程	19
3.4 影像擷取	19
3.5 影樣處理	19
3.6 MATLAB 分析	19
3.7 比生長速率分析	20
3.8 實驗設計與統計分析	21
第四章 結果與討論	24
4.1 影像分析驗證	24
4.2 灰白松露菌在 PDA 上的生長分析	25
4.3 數學模型擬合	33
4.4 參數的相互影響	36
4.5 獲得最佳的生長條件	42
4.6 模型驗證	42
第五章 結論與未來展望	43
參考文獻	44

圖 目 錄

圖 2.1 蘑菇跟松露的生長型態	3
圖 2.2 灰白松露菌外觀	5
圖 2.3 火焰煙霧偵測示意圖	7
圖 2.4 觀察 <i>Tuber borchii</i> 菌絲體在固態培養基上的生長狀態與平均尺寸	8
圖 2.5 幾何表示 Box-Behnken 設計三階因子	10
圖 3.1 由左而右依序為本研究的實驗流程，影像擷取、影像處理、計算面積、生長 曲線和反應曲面圖	23
圖 4.1 影像辨識驗證圖形	24
圖 4.2 灰白松露菌在 PDA 的生長時間與面積關係圖	25
圖 4.3 (A) 和 (B) 分別為兩組灰白松露菌在 PDA 上培養的生長時間與自然對數 面積的線性關係圖	27
圖 4.4 固定 Glucose 濃度為 30 g/L 時，Malt extract 及 Potato starch 對固態培養灰白 松露菌比生長速率之反應曲面圖	38
圖 4.5 固定 Malt extract 濃度為 30 g/L 時，Glucose 及 Potato starch 對固態培養灰白 松露菌比生長速率之反應曲面圖	39
圖 4.6 固定 Potato starch 濃度為 12 g/L 時，Glucose 及 Malt extract 對固態培養灰白 松露菌比生長速率之反應曲面圖	40
圖 4.7 固定 Malt extract 濃度分別為 10、30 和 50 g/L 時，Glucose 及 Potato starch 對固態培養灰白松露菌比生長速率之等高線圖	41

表 目 錄

表 2.1 Box-Behnken 三因子設計與實驗設計點	12
表 2.2 變異數分析 (ANOVA) 表	16
表 3.1 馬鈴薯葡萄糖培養基成分組成	18
表 3.2 固態培養灰白松露菌之三階三變實驗設計組成分含量範圍	21
表 4.1 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形	28
表 4.2 固態培養灰白松露菌之三階層三變數 Box-Behnken 的個別因子(x_i)、階層、 實驗設計及平均比生長速率	34
表 4.3 固態培養灰白松露菌之比生長速率之變異數分析	35
表 4.4 固態培養灰白松露菌變數之聯合檢測分析	35
表 4.5 脊型分析法預測最大比生長速率之反應值	42



第一章 前言

1.1 研究動機

本研究動機是在尋找培養灰白松露菌的最佳固態培養基條件。天然松露生長於土壤表面之下，因無法自行光合作用而必須與橡木、櫟木和樺木等樹木根部進行共生來獲得所需的營養素，松露的生長型態造成農人在尋找與採集過程的難度提升，以往多透過嗅覺靈敏的動物來協助搜尋，但在動物挖掘松露過程常會破壞松露的菌絲體，松露亦容易受到環境等因素影響，導致原本生長時間就長的天然松露產量更加無法提升。松露獨特的香氣和潛在的健康益處例如口腔健康、體重管理、降低癌症風險，腸道微生物群的相互作用發揮免疫調節作用等優點吸引許多人爭相購買，在需求量逐年增加的情況下促使了人工栽培松露的技術發展[1]。

固態基質培養是目前台灣商業化食用真菌培養的主流，相較於液態培養，固態培養設備要求不高，現已廣泛運用斷木與瓊脂膠固態培養子實體化之牛樟芝菌、太空包培養杏鮑菇、猴頭菇、珊瑚菇、白精靈菇等。本實驗為了優化高經濟價值的灰白松露菌的比生長速率，利用反應曲面法（response surface methodology, RSM）來選擇最適化的培養基條件。RSM 能有效地優化複雜的研究過程，透過數學模型的建立，得以減少實驗數量，並有效地建立最佳的灰白松露菌生長培養基配方。

1.2 研究目的

1. 影像辨識分析真菌在固態培養基上的生長面積。
2. 灰白松露菌在固態培養基上的生長曲線方程式探討。
3. 最適化固態培養基對灰白松露菌比生長速率探討。

第二章 文獻回顧

2.1 松露簡介

松露 (Truffle) 其學名 *Tuber*，亦為塊狀地下真菌之通稱，又稱地菌或塊菌，在分類學上屬[2]：

界：真菌界 Fungi

門：子囊菌門 Ascomycota

亞門：盤菌亞門 Pezizomycotina

綱：盤菌綱 Pezizomycetes

目：盤菌目 Pezizales

科：西洋松露科 Tuberaceae

屬：西洋松露屬 *Tuber*

松露形狀類似小馬鈴薯，其外層表面為封閉狀而沒有形成凸出的莖，外觀為光滑或刻痕般紋路與顏色或淺或暗，內部物質（果肉或產孢組織）含交叉回交的微管組織以及子囊孢子整體為白色至棕色、灰色、粉紅色或黑色[1, 3]。

2.1.1 生長環境

不同於長在地面上的蘑菇，松露生長在地面下約 5 cm 至 30 cm 之深度（圖 2.1），松露為生長在地下真菌界子囊菌門的子實體，子囊菌門的真菌都是腐生或寄生，腐生菌因為無法自行光合作用也無法自行製造有機養分，因此在有機質與礦物土壤等腐物介質間或是在櫟木、楊木、樺木、橡樹和松樹等副熱帶常綠闊葉林樹木的根部位置時而可以發現松露的蹤跡，真菌會與植物的根部產生連接形成外生菌根（Ectomycorrhizas, EcM），真菌菌絲體形成包裹根尖的菌絲鞘，以及包裹植物根部皮層內部細胞的哈氏網，即外生菌根表生菌絲會在土壤和植物碎屑之間形成巨大的網絡，透過此共生機制來促進營養交換，宿主植物透過真菌從土壤中獲得

必須營養來源（如磷酸鹽和氨基酸），而真菌自身無法進行光合作用因此需要藉由宿主植物的根來獲得碳水化合物等營養成分。大多數松露不會長出土壤表面，無法像蘑菇憑藉著風力來散佈孢子，因此松露需要依靠動物吃掉它們來擴散孢子，當子實體成熟時會釋出具有刺激性、果味或令人不愉快的濃烈氣味以確保它們被發現[1]。

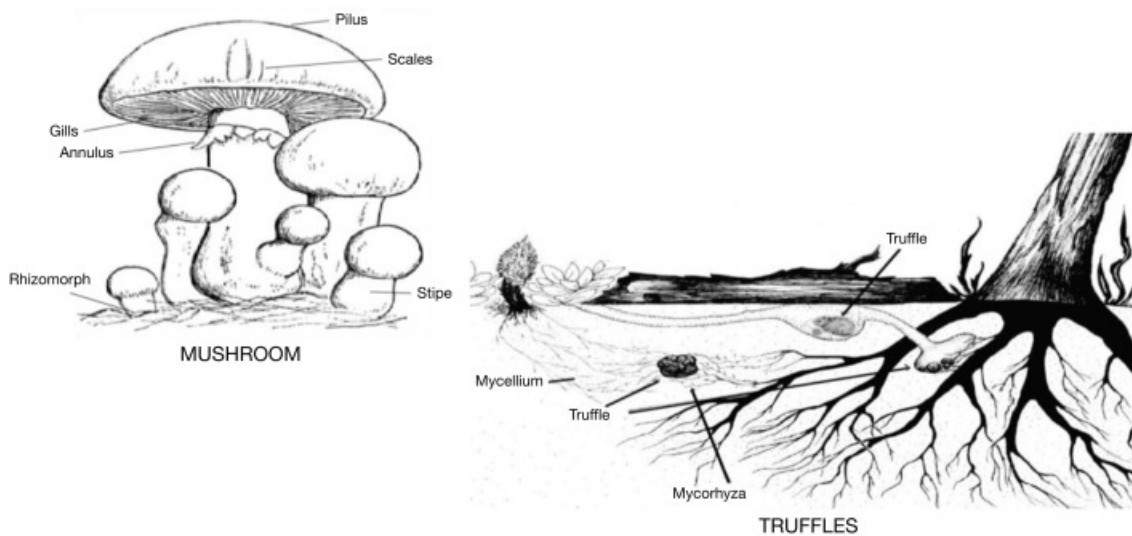


圖 2.1 蘑菇跟松露的生長型態

National Chung Hsing University

2.1.2 經濟價值

松露為最古老的食物之一，古希臘、中國及埃及等古文明皆有其蹤跡可循，約公元前 4000 年時即有美索不達米亞自然奇蹟此等美譽[4]，松露含有極其豐富的營養成分如蛋白質、氨基酸、脂肪酸、礦物質和碳水化合物等營養成分[5-8]。此外，松露在醫學與工業等領域蘊含許多潛在價值，多篇文獻指出松露含有三萜類化合物、植物固醇、類固醇、多醣類、多酚等生物活性物質，具有抗炎、抗氧化、抗微生物、抗誘變、抗致癌和抗結核菌等能力[6, 7, 9, 10]。因為人體在有氧代謝過程中可能產生高反應性的自由基如過氧化物和羥基等等，能夠氧化生物分子如脂質、DNA、碳水化合物和蛋白質進而產生活性氧（ROS），過高的活性氧含量會導致細胞死亡和組織損傷[11]，而抗氧化物如維生素 C、維生素 E 和酚類化合物等會保護由上述自由基誘變引起的損傷，當抗氧化系統的機制因生理機能惡化等因素造成

不平衡時，便會產生疾病與加速老化。因此，定期攝取此天然抗氧化劑可能有助於防止癌症、心血管疾病、糖尿病[9]。

除了松露的營養重要性外，其香氣與風味受到國際美食界的推崇，目前研究已發現各品種松露具備超過 200 種以上的揮發性化合物，此外，Bellesia 等人表示 1-octen-3-ol（蘑菇醇）是松露的主要揮發物[12]，另外 Culleré 等人透過 GC/MS 分析鑑定其揮發性化合物含有烴、醇、醛、酯、酮、苯衍生物和硫化化合物[13]，每種松露的香氣特徵不同也代表其成分不盡相同，即使品種相同亦容易受到環境因素如氣候、土壤等影響，其化學特徵也會因此產生變化[14]。工業上則利用甲硫醇和甲醛縮合二甲硫基甲烷有機化合物作為化學松露代表香劑。天然松露採集多需依靠有經驗的專家，因為松露的香氣來自於本身散發揮發性化合物所致，一般會利用嗅覺靈敏的動物如豬和狗來協助搜尋。動物在挖掘的過程容易破壞松露的菌絲體與受到環境與氣候變化影響等因素，導致松露的產量下降。在供不應求的需求下促使松露價格居高不下[1]。



2.2 灰白松露菌簡介

灰白松露菌 (*Tuber borchii*) 為義大利塊莖種類之一，有著類似於義大利白松露的褐棕色不規則球體外觀，其柔軟的內部呈現深棕色，有幾條大的白色脈絡[1]。



圖 2.2 灰白松露菌外觀

2.2.1 生長環境

挖掘灰白松露的區域顯示其對生長環境有一定的要求，生長在松林和砂質酸性石灰質地且含有鈣及有機質的土壤以及海拔高達 1000 公尺的山區，也可以在松樹、橡樹、毛櫸和楊樹下找到[6]。

2.2.1 培養方法

天然栽種外生菌根真菌容易受到共生之樹木狀態、土壤條件、氣候變化以及孢子傳播力較低等不可抗力之因素影響，皆可能導致松露產量不佳[15, 16]，隨著人工培養技術日新月異，已逐漸取代天然栽種方式。常見人工培養方式即以培養基作為菌落生長之基床，亦是菌絲純培養之基礎，故不同配方與濃度多寡之培養基皆會影響菌絲體的生長。培養基的養分組成包含碳源、氮源、磷、鉀、鎂、硫、微量元素等。菌絲體培養是人工繁殖菌根苗之重要接種來源，適當的菌絲體培養條件，可源源不斷提供優質之接種源。

絲狀真菌微生物適合以固態發酵的方式進行培養，因此技術可模擬其棲息地，且易處理、成本低與允許多次同時測試的優點[17]，文獻指出灰白松露菌可利用 Malt extract agar、Potato dextrose agar (PDA) 等固態培養基進行培養與保存[18, 19]，

但目前幾乎沒有探討固態發酵最適培養基的相關期刊發表，Yeh 等人的文獻中指出灰白松露菌絲體生長速度緩慢加上純化有著一定的難度[20]，相較於液態培養其固態培養對發酵設備條件要求較低，且固態培養透過目視方式可以快速觀察培養基的物理狀態，例如微生物的生長狀態與培養基介質的分解[21]，因此，本實驗試著將灰白松露菌以固態培養的方式探討最適的 Glucose、Malt extract 和 Potato starch 三種培養基之組合並搭配影像辨識技術進行最適參數探討。



2.3 影像辨識

影像辨識即是將擷取之影像輸入分析儀器中透過分析軟體運算排除干擾資訊後獲得目標結果。近年來，影像辨識技術在日常生活中時有所見，舉例高速公路上使用的車牌圖像辨識系統，利用即時對焦、拍照、電腦擷取字元經解算後即可知道通過車輛之車牌號碼後進行收費與贓車查緝等作業[22, 23]，以及現代人們逐漸對安全意識的提升，智慧型監控辨識系統如影像位移偵測技術、人像辨識技術與火災煙霧偵測(圖 2.3)等維安與防災相關領域皆不乏運用此技術[24-27]。此外，商業、醫學、軍事和建築等各領域皆可見此快速且高精度之技術運用[28-31]。

以往文獻顯示真菌的生長狀態多是透過比例尺量測固態培養基上的菌絲體平均直徑來討論(圖 2.4) [32]，但真菌在固態培養基上生長本為不規則形狀，此計算方法僅適合規律圖形，若非如此，其實際面積與利用比例尺估算之面積可能存在著極大的誤差，本實驗透過影像辨識之方法，從影像擷取到影像去背處理最後經由統計分析軟體將圖像轉換為二維數據來求得生長面積，是在真菌生長分析技術上的巨大突破。

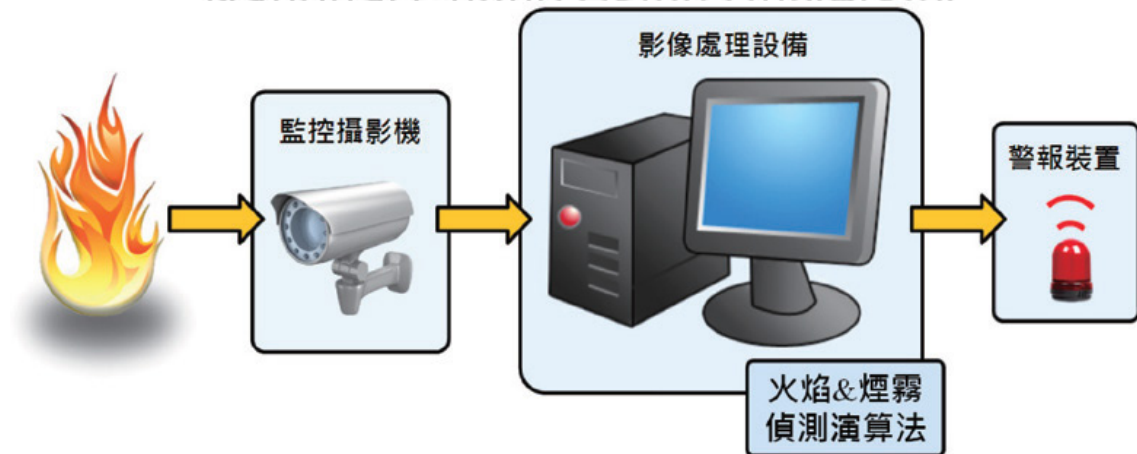


圖 2.3 火焰煙霧偵測示意圖

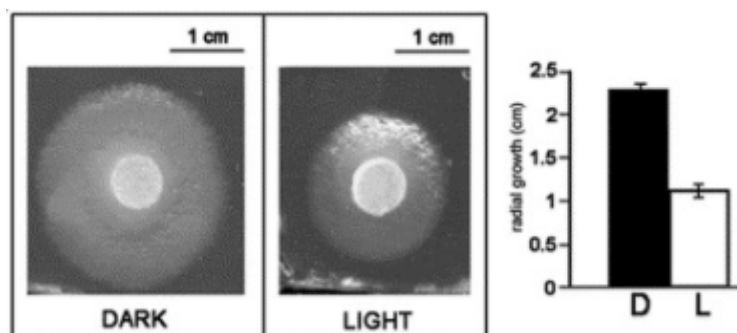


圖 2.4 利用比例尺方式來觀察 *Tuber borchii* 菌絲體在固態培養基上的生長狀態與平均尺寸

2.4 最適化實驗設計

RSM 即是透過實驗設計後進行實驗數據之模型建構驗證，其主要優點是協助研究人員減少潛在測試數量，使實驗更不費力，可降低研究成本與時間[33, 34]，反應曲面法已被廣泛用於各領域中，例如食品、藥物科學與生物科學等優化或最適參數條件研究[35-39]。

2.4.1 反應曲面法

反應曲面法 (response surface methodology, RSM) 為結合數學與統計之技術，用於建立模型和分析變數產生的影響，此最適化實驗或生產條件之設計工具可以使實驗在對短的時間內達到研究目的。反應曲面法主要概念如下[40, 41]：

1. 反應 (response)：因變數，即為品質特性，例如： y 。
2. 獨立變數 (independent variable)：自變數，即為品質因子，例如： x_1, x_2, \dots 。
3. 反應曲面 (response surface)：為獨立變數 (品質因子) 與反應 (函數值) 構成之立體曲面圖，表達品質因子與品質反應間的關係。
4. 等高線圖 (contour plot)：獨立變數 (品質因子) 為變數之平面圖中，相同的品質反應 (函數值) 之點連線即可構成等高線圖。

透過控制自變數來得到因變數的結果來決定最後自變數的特定參數值以達到預期的實驗結果。常見的反應曲面法設計程序如下：

1. 實驗設計：選擇幾個獨立變數後，利用最少量的實驗組合獲得所需之數據以建立系統模型之程序即為實驗設計。
2. 模型建構：獲得的實驗數據透過統計迴歸分析後，建構獨立變數與反應間的函數關係之程序即為模型建構；目標反應函數可用此相近的公式來表示： $y = f(x_1, x_2, x_3 \dots) + \varepsilon$ ，其中 y 為因變數， $x_1, x_2 \dots$ 是獨立變數， ε 是誤差值（error value），由 $y = f(x) + \varepsilon$ 方程式中。
3. 參數優化：透過參數優化可獲得最適化參數，利用模型建構程序中獲得的獨立變數與反應間的函數關係（反應曲面）來持續修正獨立變數之水準組合之程序即為參數優化。



2.4.2 Box-Behnken 設計

在培養基設計之實驗規劃作業前，必須完整了解品質設計原理對配方結果的分析之影響才得以確保配方設計實驗足以構成最佳的反應曲面與等高線圖，因此在規劃實驗前須先找尋適切的分析因子種類，再藉由實驗規劃法設計水準階層範圍，才得以透過模型分析結果的變異數分析與脊型分析分析尋求最佳參數以獲得最佳結果。

本研究採用Box-Behnken實驗設計法決定實驗方法，對該實驗設計法說明以三因子設計為例說明，採用球面法設計，即是實驗區域內任一點與設計中心點的距離皆為等距，變異數為實驗區域內任一點至設計中心點的距離函數，Box-Behnken實驗設計實務上因子並不會取立方體構成的上、下限外的範圍作為實驗的變數，可避免很多因實際限制而無法進行的實驗[42, 43]。

實驗端點設計以圖 2.5 Box-Behnken的三因子為例來做實驗說明會顯得更為清楚，圖 2.5上各邊際軸標示A、B、C，其分別代表著三種不同因子的軸，因子即是獨立變數意思，而這些因子是可以定量的，所有的實驗設計點分散在軸上中間的端點位置與中心點，如表 2.1所示分別以-1、0和1代表下限(low level)、中心點(center point)和上限(high level)，即欲分析之因子（獨立變數）的區間範圍，例如樣品的濃度、反應的時間、操作壓力……等。以通俗的中文說法，圖 2.5 Box-Behnken實驗設計即是典型的「三階三變」(three-level-three-factor)。

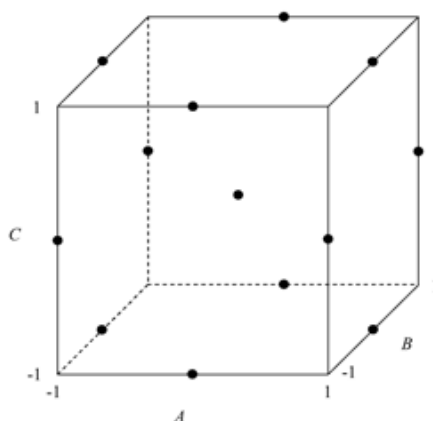


圖 2.5 幾何表示 Box-Behnken 設計三階因子

透過Box-Behnken實驗設計所設計點，經由實驗操作所得的期望值（ η ），符合數學方程式 $\eta = f(x_1, x_2, x_3 \dots) + \varepsilon$ ，其中 η 期望值， x_1, x_2, \dots 是獨立變數， ε 誤差值，透過數學方程式分析出反應曲面。

因此在獨立變數與期望值（ η ）之間的迴歸模型建構，設因變數 y ，具有 k 個獨立變數 $x_1, x_2 \dots x_k$ ，收集 n 組樣品數據：

$$\begin{array}{lll} \text{Run 1: } x_1, x_2 \dots x_k. & \eta = & y_1 \\ \text{Run 2: } x_1, x_2 \dots x_k. & \eta = & y_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \text{Run } n: x_1, x_2 \dots x_k. & \eta = & y_n \end{array} \quad (2.1)$$

迴歸模型建構反應曲面可分為線性模型（Linear model），如下式(2.2)：

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2.2)$$

上式(2.2)整理後可獲得如下方程式：

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.3)$$

其中 y 是因變數，同時也是期望值， β_0 是截距項， β_i 是迴歸係數， x_i 獨立變數， k 是獨立變數之數目， ε 是誤差值。

若要符合數學模型與期望值之間像非曲面的二因子交互作用模型（two-factor interaction model, 2FI），如方程式(2.4)所表示，或者是以二次迴歸模型（quadratic model）方程式(2.5)、三次迴歸模型（cubic model），如方程式(2.6)，迴歸次方越多，越接近真實模型。

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.4)$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i \leq j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.5)$$

其中 y 是因變數，同時也是期望值， β_0 是截距項， β_i 是線性係數， β_{ij} 是二因子交互作用係數， x_i 、 x_j 為獨立變數， k 是獨立變數之數目， ε 是誤差值。

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i \leq j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i \leq j \leq k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \varepsilon \quad (2.6)$$

其中 y 是因變數，同時也是期望值， β_0 是截距項， β_i 是線性係數 (linear coefficients)， β_{ij} 是二因子交互作用係數， β_{ijk} 是三因子交互作用係數 (three interaction coefficients)， x_i 、 x_j 、 x_k 為獨立變數， k 是獨立變數之數目， ε 是誤差值。

表 2.1 Box-Behnken三因子設計與實驗設計點

Run	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Factors	A	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	0	0	0	0
	B	-1	1	-1	1	0	0	0	0	-1	-1	1	1	0	0
	C	0	0	0	0	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0

2.4.3 變異分析[44]

反應曲面模型建立是否具有顯著性，須透過功能強大的變異數分析（analysis of variance, ANOVA）技術來分析預測值與觀測值。在探究變異數分析前必須知道平方和是指各個數據與平均數之差平方的平均數。因此，變異數分析過程中，首先必須要探究一個因變量和自變量之間是否存在線性關係，其中數據收集必須要包含一個獨立的變數。而收集觀測到的實驗數據值可由下列方程式的標準差判定：

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (2.7)$$

其中 s 是標準差； y_i 是 i 階的實驗觀測值； n 是實驗觀測數值個數； \bar{y} 是 n 個觀測值之平均值。方程式(2.7)式的分子項是所有實驗觀察值數值與觀測值之平均值差平方的總和，又稱為平方和。因此，為了增加分析數值模型的準確性，透過最小平方法（least square estimator）將誤差平方和最小化。重要的定義像是總平方和（sum of cor total square, SS_T ）是指真實數值之平均值與實驗觀測真實值相比較的平方和。殘差平方和（sum of residual squares, SS_E ），用來預測模型產生的預測值與真實值平均後相互比較的最小平方和。迴歸造成的平方和（sum of model square, SS_R ），預測模型產生的預測值與真實值之平均值相比較的平方和。 SS_T 、 SS_E 和 SS_R 方程式說明如下列所示：

$$SS_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.8)$$

$$SS_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (2.9)$$

$$SS_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (2.10)$$

其中 y_i 是實驗觀測值； \bar{y} 是觀測值之平均值； \hat{y}_i 是實驗預測值。

三方程式(2.8)、(2.9)和(2.10)三平方差和的方程式可由方程式(2.11)表示如下：

$$SS_T = SS_R + SS_E \quad (2.11)$$

即

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (2.12)$$

其中 y_i 是實驗觀測值； \bar{y} 是實驗觀測值之平均值； \hat{y} 是實驗預測值。

總平均平方和 MS_T 是自由度樣本變異數關係式，分母是與樣本變異數的自由度數量。當中 $dof(SS_T)$ 是自由度個數是 $n - 1$ ，分子是總平方和 SS_T 。

$$MS_T = \frac{SS_T}{dof(SS_T)} = \frac{SS_T}{n - 1} \quad (2.13)$$

殘差平均平方和 MS_E 是自由度樣本變異數關係式，分母是與樣本變異數的自由度數量。當中 $dof(SS_E)$ 是自由度個數是 $n - 2$ ，分子是殘差平方和 SS_E 。

$$MS_E = \frac{SS_E}{dof(SS_E)} = \frac{SS_E}{n - 2} \quad (2.14)$$

迴歸造成的平均平方和 MS_R 是自由度樣本變異數關係式，分母是與樣本變異數的自由度數量。當中 $dof(SS_R)$ 是自由度個數是1，迴歸造成的平方和 SS_R 。

$$MS_R = \frac{SS_R}{dof(SS_R)} = \frac{SS_R}{1} \quad (2.15)$$

在數值迴歸過程透過判定係數（coefficients of determination， R^2 ）來解釋平方和與總平方和之關係式由下列方程式表示：

$$R^2 = \frac{SS_R}{SS_T} = \frac{SS_T - SS_E}{SS_T} = 1 - \frac{SS_E}{SS_T} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.16)$$

由(2.16)方程式表示迴歸造成的平方和對總平方和之比，其中 R 表示多元相關係數（multiple correlation coefficients）。若判定係數介於0到1之間，判定係數越趨近於1對ANOVA的解釋能力越大。然而，反應曲面模型分析的樣品數量較少或自變數過多，會使自由度降低，特別是迴歸方程式中的無關自變數使得判定係數值增加，進而高估反應模型對ANOVA的解釋能力之傾向，無法客觀的說明反應曲面模型，因此透過調整判定係數修正。

$$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \times \frac{n-1}{n-k-1} = 1 - \frac{SS_E}{SS_T} \times \frac{n-1}{n-k-1} \quad (2.17)$$

$$= 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \times \frac{n-1}{n-k-1}$$

其中 R_{adj}^2 是調整判定係數； n 是欲分析數據之數目； k 分子自由度即自變數的數目量； R^2 是判定係數； SS_E 是殘差平方和； SS_T 是總平方和。

模型迴歸顯著性檢定是指判定自變數 x 和因變數 y 是否存在有線性關係，因此迴歸模型顯著性檢定可用 F 統計量（ F -value或稱為 F 檢定）判斷。

$$F = \frac{MS_R}{MS_E} = \frac{SS_R/k}{SS_E/(n-k-1)} \quad (2.18)$$

其中 n 是欲分析數據之數目； k 為分子自由度即自變數的數目量； $n-k-1$ 是分母自由度； MS_R 迴歸平均方差； MS_E 是未迴歸的平均平方和； SS_R 是迴歸平方和 SS_E 是誤差平方和。

由方程式(2.18)可知道 F 值為 MS_R 對 MS_E 比，代表著 F 統計量越大，即因變數 y 和自變數 x 之間越趨向於線性關係。當 F 統計量大過 F 統計量臨界值($F_{k,n-k-1}$)時，迴歸模型將會更顯著。假若 F 統計量小於 $F_{k,n-k-1}$ 時，虛無假說成立，意思是說無法獲得論證的假說遭到推翻，在統計學上不支持虛無假說，因為會導致其論證一旦成立，檢定範圍會落在非拒絕域範圍內，自變數與因變數之間將不存在線性關係，反之，若統計量落在 F 分配之拒絕域範圍內，自變數與因變數之間存在線性關係。以 F 值計算得到顯著值 p ，顯著值 p 為 0.05 說明數據的顯著性差異的可能性為 95%，通常顯著值小於 0.05 代表該數據在統計上具有顯著性，顯著值 p 越小即顯著性越高。

表 2.2 變異數分析 (ANOVA) 表

Source	Sum of squares 平方和	Degree of freedom 自由度	Mean square 平均平方和	F value F 值	Prob>F* 顯著值
Model 迴歸	SS_R	k	MS_R	F	p
Pure error 殘差	SS_E	$n - k - 1$	MS_E		
Cor total 總和	SS_T	$n - 1$	MS_T		

*Prob>F: level of significance

2.4.4 脊型分析法

為逼近極值點運用脊型分析法 (method of ridge analysis) 來找出絕對最大值 (maximum) 或最小值 (minimum) 之 y 值，此法可快速有效地將目標範圍縮小。自一連串取樣之數據經分析後可得迴歸方程式，如方程式(2.19)。

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.19)$$

其中 y 是因變數，同時也是期望值， β_0 是截距項， β_i 是迴歸係數， x_i 自變數， k 是自

變數之數目， ε 是誤差值。透過改變自變數(x)可得對應之反應值(y)，獲得的 y 值可用等高線圖等表示與 x_i 對應高低關係，且可根據該擬合方程式中顯著變量係數大小來設計爬升的方向和步長，不顯著之變數取值則依正反應結果來取較高值，負反應則取較低值進行實驗，以最陡路徑來尋求最高點之 y 值對應的 x 變數條件，選定 x 值後利用 RSM 再次進行實驗驗證，脊型分析法可逐步獲得最適 x 值之組合以逐步接近最大反應值(y) [41]。



第三章 材料與方法

3.1 研究菌株

3.1.1 菌株來源

研究菌株灰白松露菌 *Tuber borchii* ATCC MYA-1019 係獲自於美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

3.1.2 菌株保存

灰白松露菌係保存於馬鈴薯葡萄糖培養基，培養基成分如表 3.1 所列。將灰白松露菌接菌絲塊 50 mm² 到新鮮培養基上作繼代保存，培養環境溫度為 25 ± 2 °C。灰白松露菌在 PDA 上之生長情形如表 4.1 圖形，培養期程約為一個月。

表 3.1 馬鈴薯葡萄糖培養基成分組成

Formula	Concentration (g/L)
Potato Starch	4
Glucose	20
Agar	15

3.2 研究材料

研究材料如馬鈴薯葡萄糖培養基、麥芽萃取物係購自於 BD Difco™, USA；瓊脂膠購自於 Scharlau Chemie S.A., Spain；馬鈴薯澱粉購自於 Sigma-Aldrich, USA；D (+) -葡萄糖，ACS 試藥級，C₆H₁₂O₆，購自於 MP Biomedicals, USA。其他未列舉出之藥品皆為分析級試劑。

3.3 實驗流程

本研究利用影像辨識技術與實驗設計進行灰白松露菌之固態培養基條件探討，實驗流程如圖 3.1，第一步進行擷取灰白松露菌之固態培養基外觀影像，第二步將擷取所得影像後製移除灰白松露菌菌絲體外之干擾物圖形，第三步利用 MATLAB code 計算灰白松露菌菌絲體之面積，第四步為將所得之菌絲體生長面積進行生長曲線與時間作圖，從而瞭解灰白松露菌之生長情形，最後利用 RSM 進行實驗設計以探討最適化之固態培養基參數，將所得之實驗數據進行迴歸統計分析預測出反應曲面圖後進行驗證實驗。

3.4 影像擷取

設計一影像邊長為 100 mm 之黑色正方形圖形，面積為 10^4 mm^2 ，將直徑 90 mm 之 Petri plate 置於上述黑色正方形圖形中央。研究使用擷取影像設備為 Apple iPhone 6s Plus，擷取影像軟體為 Microsoft Office Lens，鏡頭距拍攝平台約 7.5 cm 處向下拍攝如圖 4.1 目標物影像，軟體特點是可以自動捕捉黑色邊框基準線為邊長 100 mm 之正方形面積，並自動校正為正方形。

3.5 影樣處理

為增加影像辨識之精確度，擷取之影像以 Ulead PhotoImpact X3 後製將邊長 100 mm 之黑色正方形圖形中除菌絲體外之拍攝過程光影與干擾物等移除。

3.6 Matlab 分析

影像面積計算係採用 MATLAB R2016a 作為分析的軟體，將預定分析之圖形檔案放置於程式碼相同資料夾，然後將程式碼載入圖形檔案名稱，選定適當的閾值後進行運算，MATLAB code 會將黑色以外的顏色轉換成白色並計算白色圖形面佔全面積中之百分比，因此可以計算出白色面積的面積值，即可獲得分析物的面積值。而因為本研究擷取之影像影像面積皆為 10^4 mm^2 ，所以估算出目標物面積單位皆為

mm²。

3.7 比生長速率分析

利用閉鎖式瓊脂膠平板培養法，灰白松露菌之對數生長期以下式表示：

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (3.1)$$

其中 N 為灰白松露菌之生長面積值 (mm²)，本研究假設在瓊脂膠固態培養基皆均勻分布，對數生長期的菌絲生長之鬆密度 (bulk density) 相同時，菌絲質量正比於菌絲體積；又假設所有平板上生長菌絲高度相同時，菌絲在平板上的生長體積則正比於生長面積，菌絲生長面積正比於菌絲質量，因此得以菌絲生長面積計算； t 為灰白松露菌之培養時間 (day) 和 μ 為灰白松露菌的比生長速率 (day⁻¹)。將式(3.1)之兩邊乘以 dt/N 得下列式子：

$$\frac{dN}{N} = \mu dt \quad (3.2)$$

將上式(3.2)進行積分後得下式：

$$\int \frac{dN}{N} = \int \mu dt + c \quad (3.3)$$

其中 c 為常數項。將上式(3.3)積分後，常數項取成自然對數時，則成為下式：

$$\ln N = \mu t + \ln A \quad (3.4)$$

其中 $c = \ln A$ ， N 為灰白松露菌之生長面積值 (mm²)， A 為前指數因子 (mm²) 和 t 為灰白松露菌之培養時間 (day)。方程式(3.4)是一個 t 和 $\ln N$ 一次式線性關係的方程式，分析灰白松露菌比生長速率，會將生長面積取自然對數後與時間作圖，線性

迴歸分析其關係是以獲得比生長速率 μ 值。

3.8 實驗設計與統計分析

使用瓊脂膠平板培養法來進行灰白松露菌培養，研究採用三階三變之 Box-Behnken 實驗設計，三個水準與三個變數因子來培養灰白松露菌時所需之三種培養基成分：Glucose 10 - 50 g/L、Malt extract 10 - 50 g/L 與 Potato starch 4 - 20 g/L，共設計 15 組合濃度，以隨機順序進行試驗，如表 3.2 所列，所有實驗組的 Agar 濃度皆為 15 g/L。瓊脂膠平板培養製作過程必須將葡萄糖溶液分開滅菌後，在無菌環境下均勻混合以製作瓊脂膠平板，每一平板皆準確秤量 20 ± 1 g，冷卻備用。

灰白松露菌在 PDA 平板上形成菌落，再從該平板上取出瓊脂片段將其接菌到表 3.2 設計之瓊脂膠固態培養基上，接菌菌絲塊面積約為 50 mm^2 。接菌後置於 25°C 恆溫環境下培養 24 天。灰白松露菌的生長期間利用 Apple iPhone 6s Plus 的手機搭配擷取影像軟體 (Microsoft Office Lens) 拍攝目標物，每 3 天記錄一次灰白松露菌生長狀況。

表 3.2 固態培養灰白松露菌之三階三變實驗設計組成分含量範圍

Level	Glucose (g/L)	Malt extract (g/L)	Potato starch (g/L)
-1	10	10	4
0	30	30	12
1	50	50	20

實驗數據透過統計分析軟體 (Design-Expert) 反應曲面迴歸程序進行分析，各試驗因子對因變數的影響如下列三階多項式(3.5)表示：

$$\mu = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{iij} x_i^2 x_j \quad (3.5)$$

其中 μ 是因變數即灰白松露菌的比生長速率， b_0 是截距項， b_i 是線性係數， b_{ii} 是一

因子二次式係數、 b_{ij} 和 b_{iij} 是二因子交互作用係數， x_i 和 x_j 是自變數。Design-Expert 是用於計算原始設計中心增加半徑以應變出最適化的比生長速率結果。



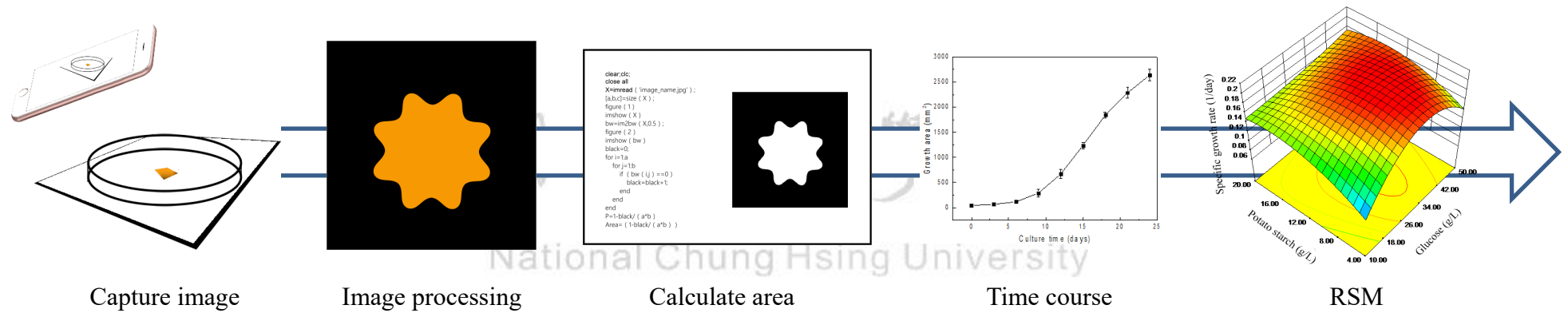


圖 3.1 由左而右依序為本研究的實驗流程，影像擷取、影像處理、計算面積、生長曲線和反應曲面圖

第四章 結果與討論

4.1 影像分析驗證

圖 4.1 為影像分析驗證圖形，設計一影像邊長為 100 mm 之黑色正方形圖形，面積為 10^4 mm^2 ，其正中間有白色正方形作為估計面積之目標物，邊長為 20 mm，面積為 400 mm^2 ，Matlab 分析計算結果面積值為 399.632 mm^2 ，白色面積占全面積的 4%，與理論面積 400 mm^2 相差 0.092%。影像拍攝經辨識計算後的面積誤差值極小，顯然本影像辨識分析技術可嘗試應用於松露真菌在固態培養基的研究探討。

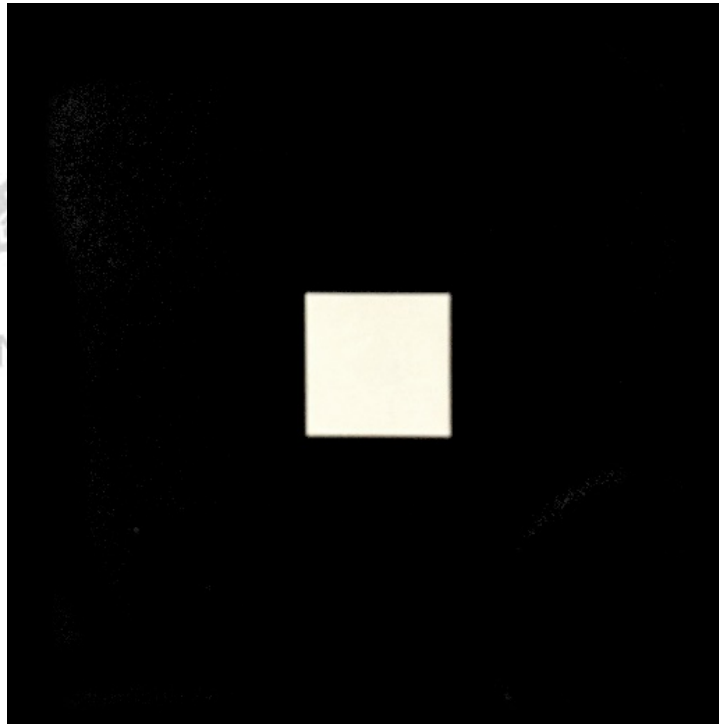


圖 4.1 影像辨識驗證圖形

4.2 灰白松露菌在 PDA 上的生長分析

4.2.1 灰白松露菌在 PDA 上的培養

灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 上培養作為初步研究與驗證影像辨識分析菌絲擴增生長面積，實驗為二重複試驗，表 4.1 是其中一組試驗灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形。隨著實驗天數增加，灰白松露菌的生長面積也持續擴增。

4.2.2 灰白松露菌在 PDA 上的生長面積分析

灰白松露菌在 PDA 上的生長面積分析方法是將表 4.1 原始擷取之灰白松露菌的生長影像以 Ulead PhotoImpact X3 去除干擾背景後，Matlab 色相分離為黑白兩色來分析菌絲生長面積，得到的結果如圖 4.2 所示。影像擷取與分析程序如設計一影像邊長為 100 mm 之黑色正方形圖形，面積為 104 mm²，將直徑 90 mm 之 Petri plate 置於上述黑色正方形圖形中央。的圖像摘要描述，原理參閱 4.1 節的影像辨識技術。圖 4.2 為二重複的灰白松露菌在 PDA 平板上生長的曲線圖，第 0 天到第 6 天為遲滯生長期，在第 6 天開始為灰白松露菌的對數生長期開始。

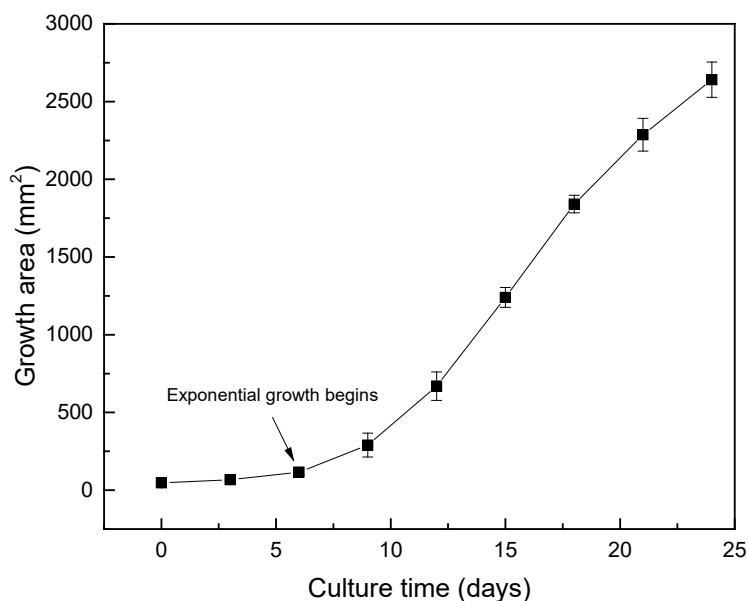


圖 4.2 灰白松露菌在 PDA 的生長時間與面積關係圖

4.2.3 灰白松露菌在 PDA 上的比生長速率

灰白松露菌在 PDA 上的比生長速率的分析是根據生長時間與對數生長的面積之線性關係方程式(3.4)來計算得知，將灰白松露菌的生長面積 (N , mm^2) 取自然對數後，第六天開始的對數生長期作圖，圖 4.3 為兩試驗組的個別比生長速率圖，試驗 (A) 的比生長速率為 0.182 day^{-1} ，初始接菌面積為 54.030 mm^2 ，第 24 天生長面積為 2560.730 mm^2 ，面積增加 2506.700 mm^2 即擴增 47.395 倍；試驗 (B) 的比生長速率為 0.166 day^{-1} ，初始接菌面積為 40.550 mm^2 ，第 24 天生長面積為 2720.840 mm^2 ，面積增加 2680.290 mm^2 即擴增 67.098 倍，初始平均接菌面積為 $47.290 \pm 9.532 \text{ mm}^2$ ，第 24 天平均生長面積為 $2640.785 \pm 113.215 \text{ mm}^2$ ，灰白松露菌在 PDA 上的平均比生長速率為 $0.174 \pm 0.0114 \text{ day}^{-1}$ 。



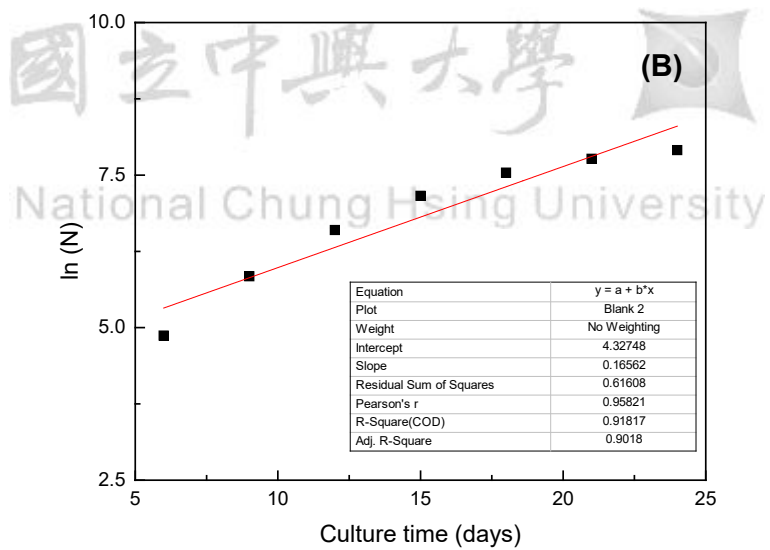
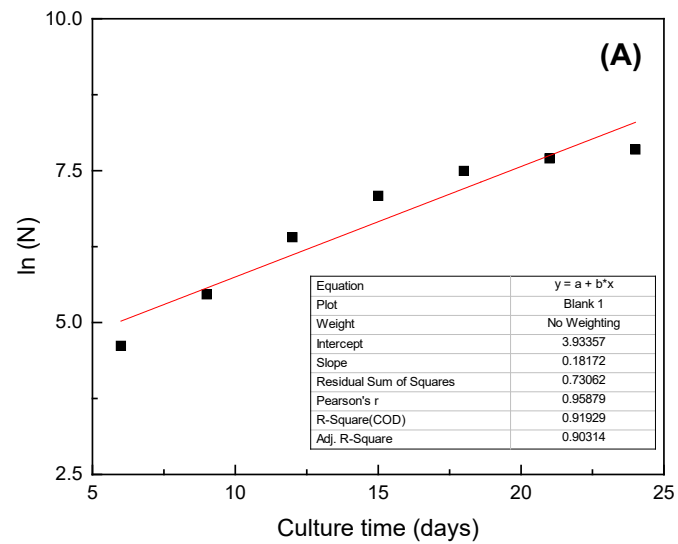


圖 4.3 (A) 和 (B) 分別為兩組灰白松露菌在 PDA 上培養的生長時間與自然對數面積的線性關係圖

表 4.1 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形

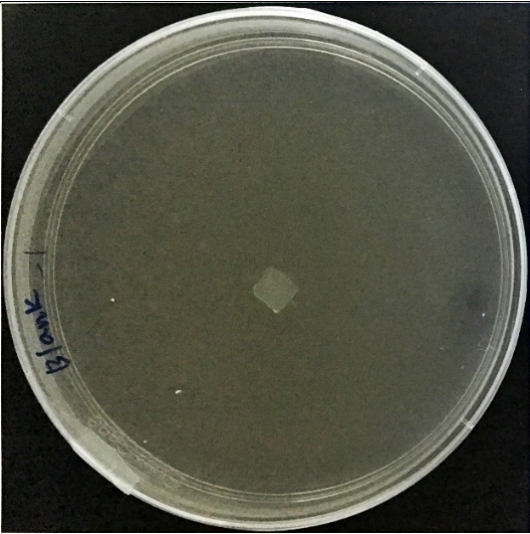
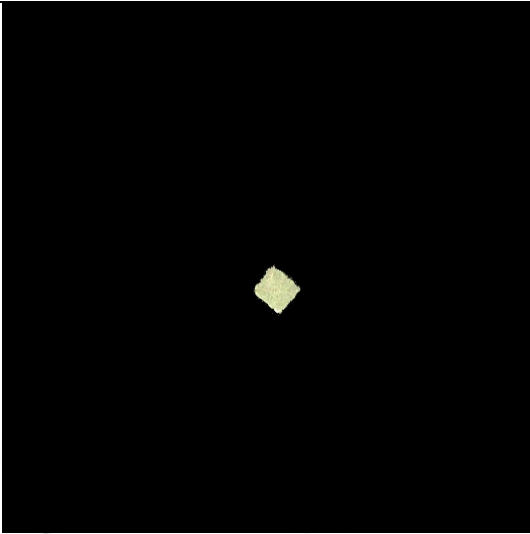
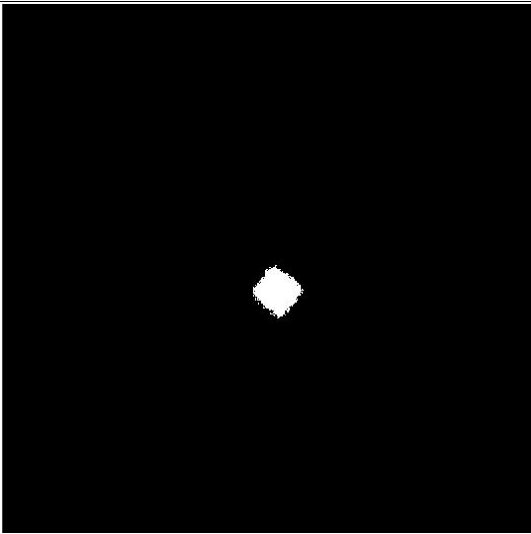
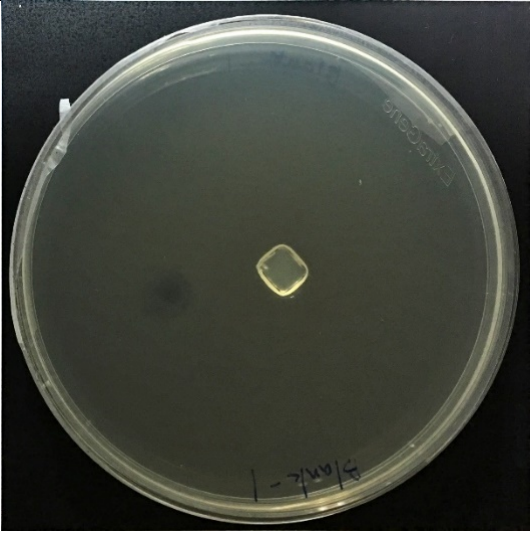
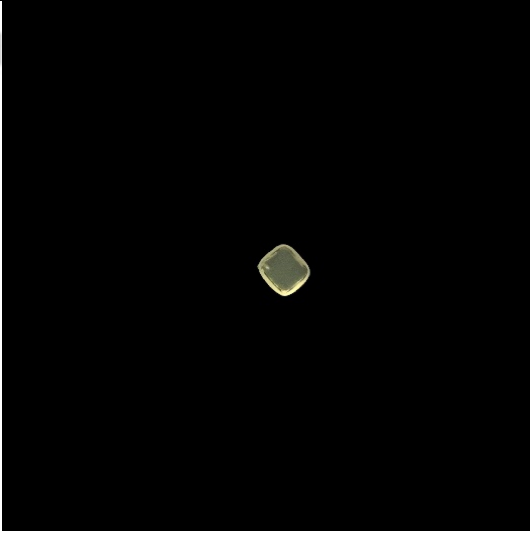
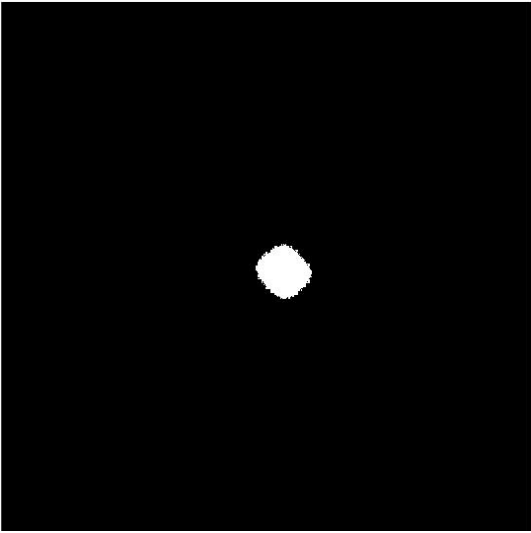
實驗天數	原始擷取影像	Ulead PhotoImpact X3 處理後影像	Matlab 分析後影像
0			
3			

表 4.2 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形（續）

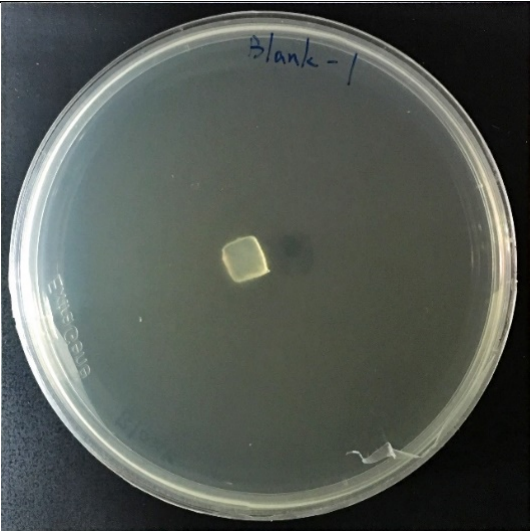
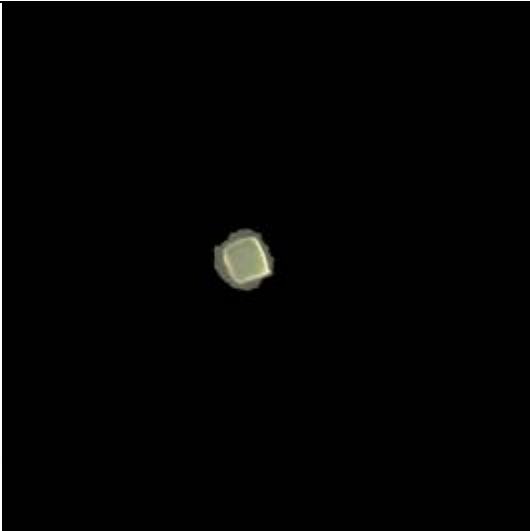
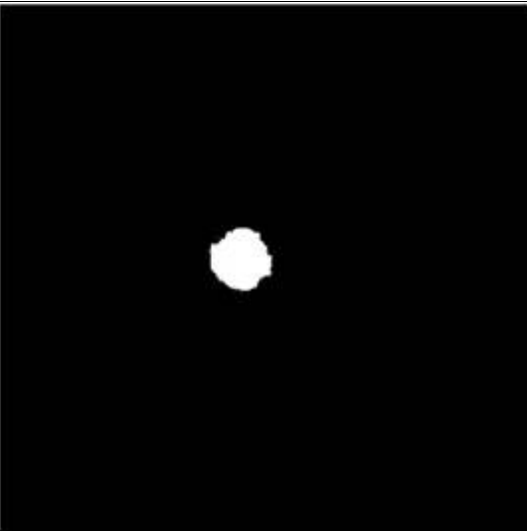
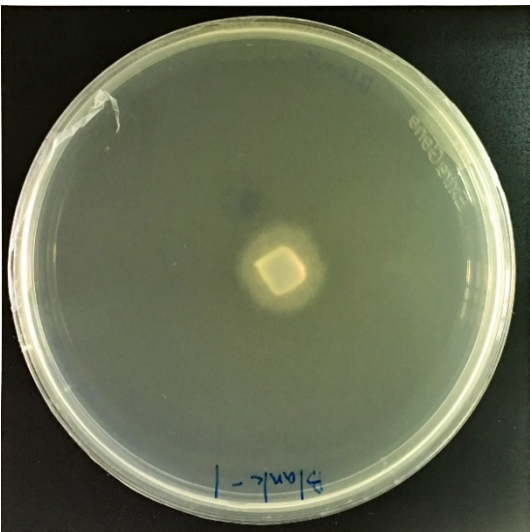
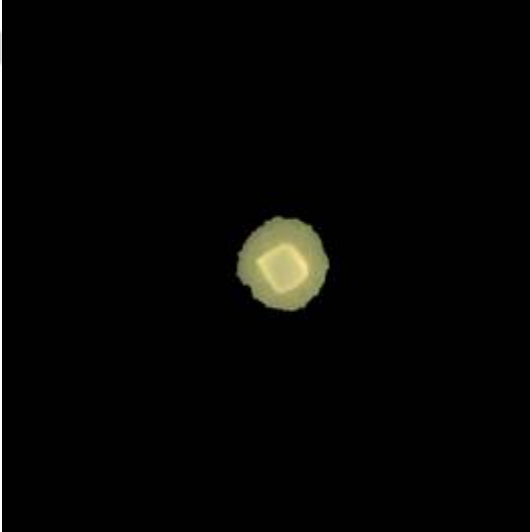
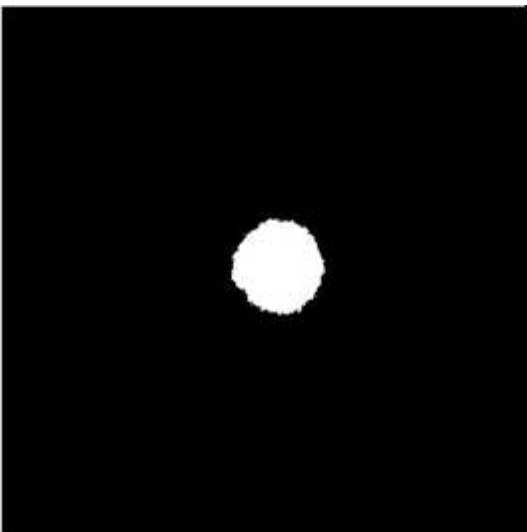
實驗天數	原始擷取影像	Ulead PhotoImpact X3 處理後影像	Matlab 分析後影像
6			
9			

表 4.2 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形（續）

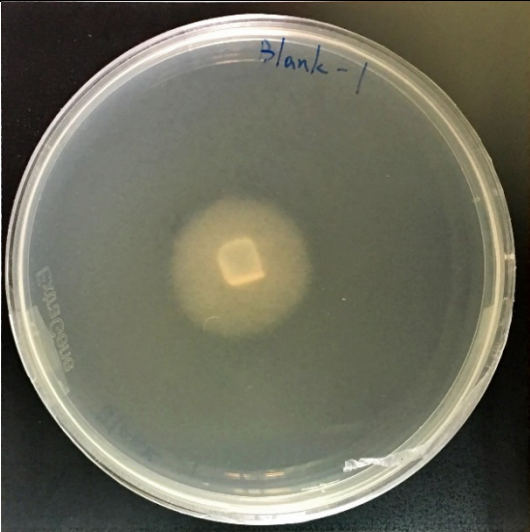
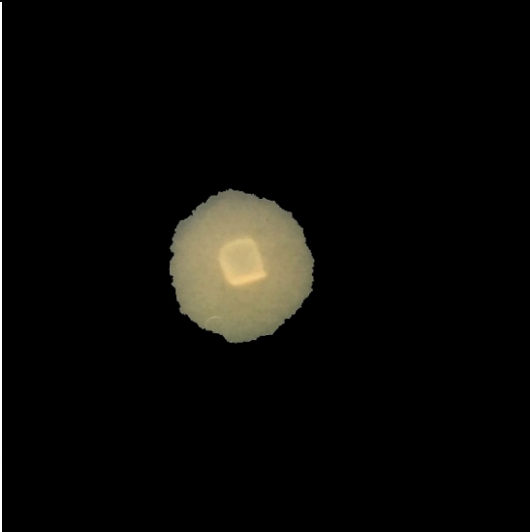
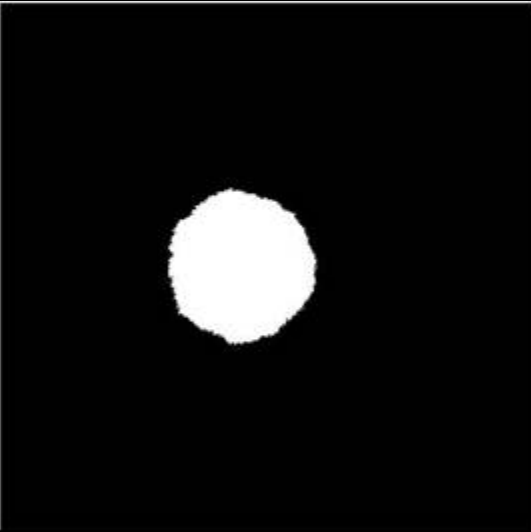
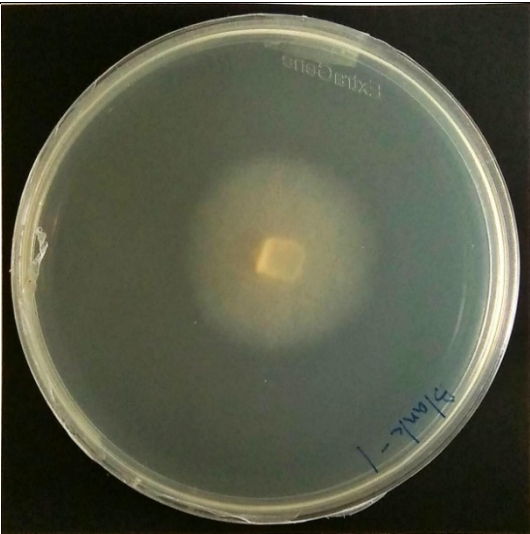
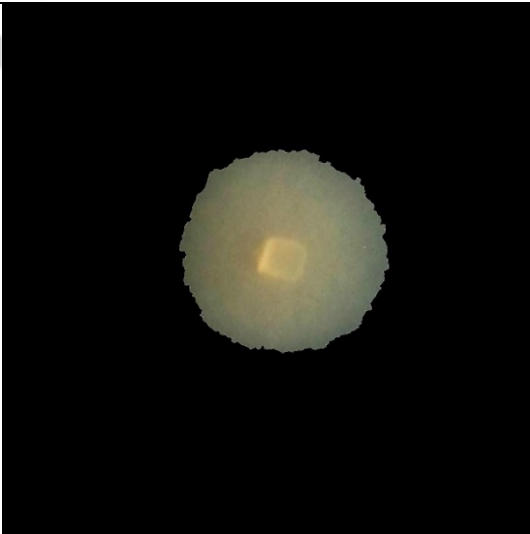
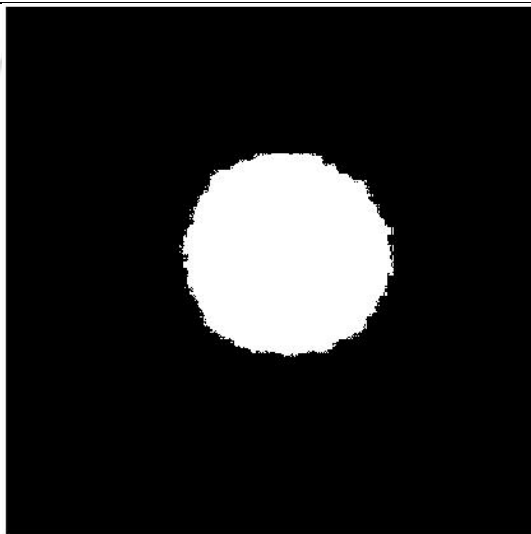
實驗天數	原始擷取影像	Ulead PhotoImpact X3 處理後影像	Matlab 分析後影像
12			
15			

表 4.2 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形（續）

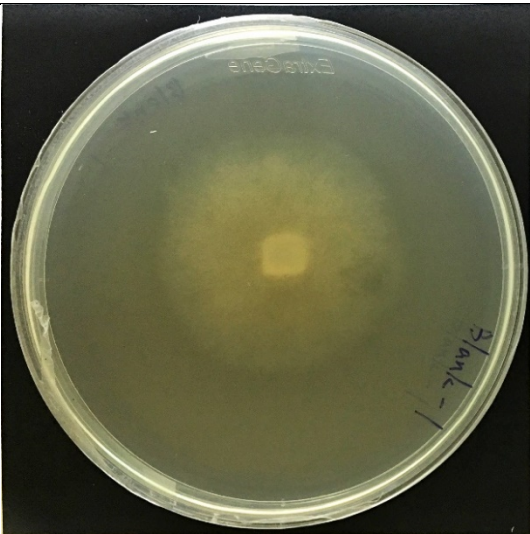
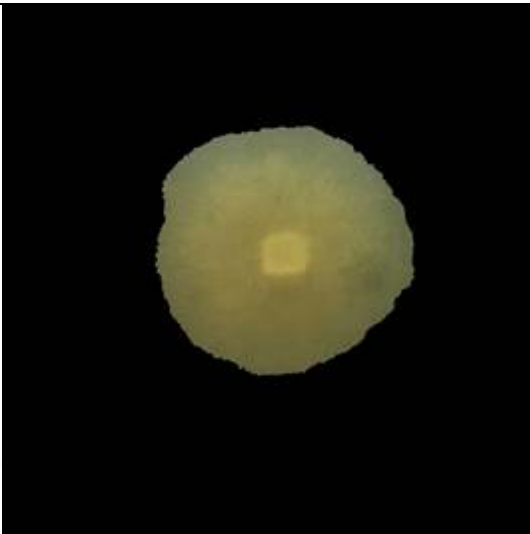
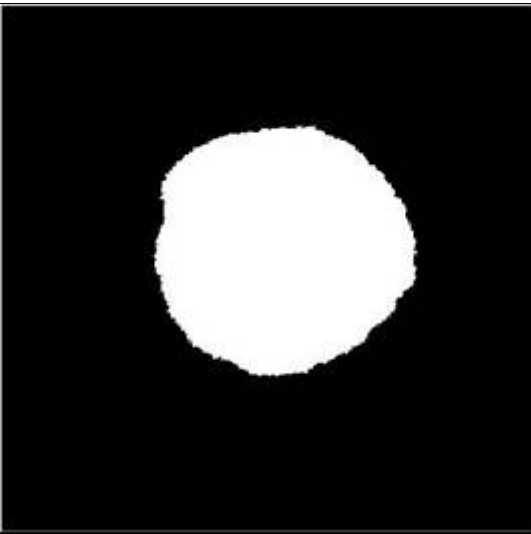
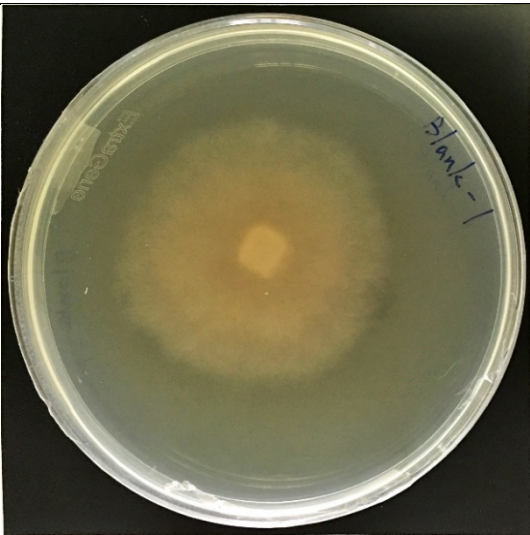
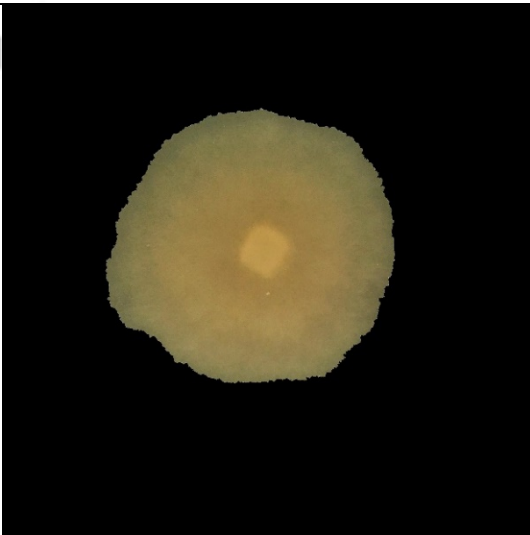
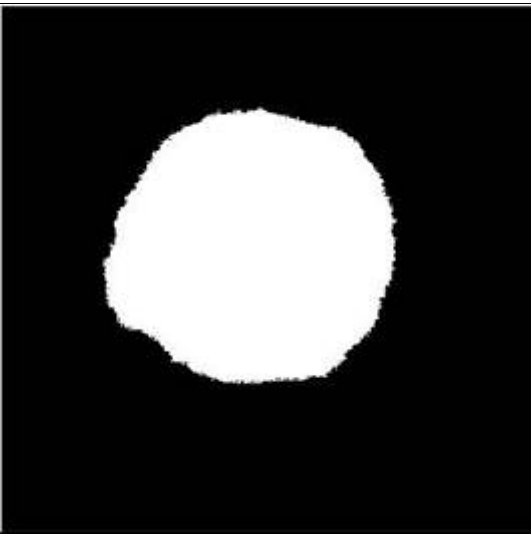
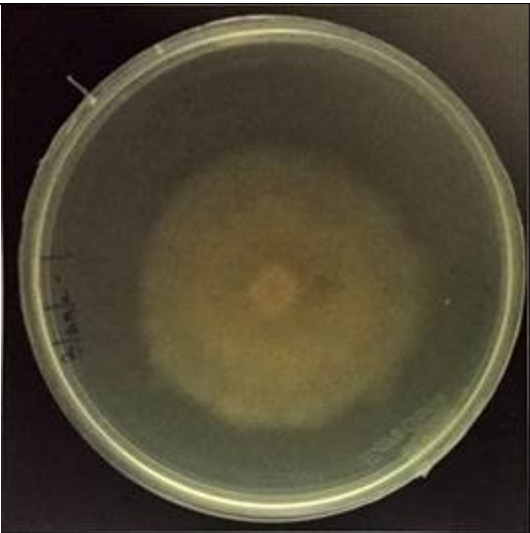

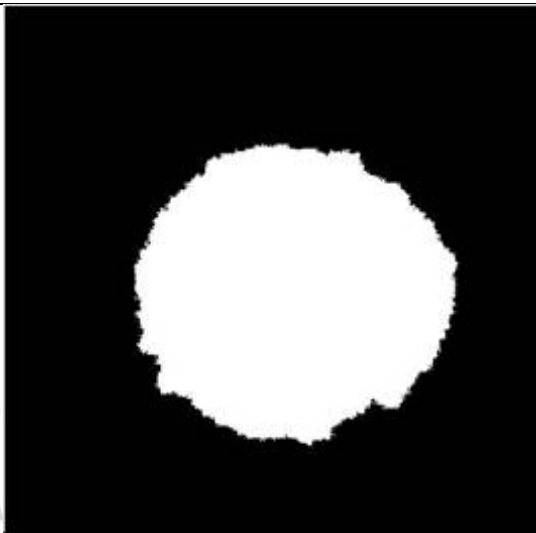
實驗天數	原始擷取影像	Ulead PhotoImpact X3 處理後影像	Matlab 分析後影像
18			
21			

表 4.2 灰白松露菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基的生長與影像分析圖形（續）

實驗天數	原始擷取影像	Ulead PhotoImpact X3 處理後影像	Matlab 分析後影像
24			

National Chung Hsing University

4.3 數學模型擬合

為了獲得固態培養灰白松露菌的比生長速率，三變數因子設計如表 4.2 所示，使用三階三變的 Box-Behnken 實驗設計來設計 15 組試驗。實驗結果如表 4.2 所示，將 15 組灰白松露菌的比生長速率之數據套入統計分析軟體（Design-Expert）進行反應曲面迴歸分析，獲得下列三次多項式：

$$\begin{aligned}\mu(\text{day}^{-1}) = & 152.6467 \times 10^{-3} - 6.4188 \times 10^{-3}x_1 + 37.8963 \\ & \times 10^{-3}x_2 - 21.7788 \times 10^{-3}x_3 + 8.9038 \\ & \times 10^{-3}x_1x_2 - 5.5388 \times 10^{-3}x_1x_3 + 4.9288 \\ & \times 10^{-3}x_2x_3 + 20.5635 \times 10^{-3}x_1^2 + 8.6410 \\ & \times 10^{-3}x_2^2 - 24.8540 \times 10^{-3}x_3^2 - 54.3275 \\ & \times 10^{-3}x_1^2x_2 + 38.6750 \times 10^{-3}x_1^2x_3 \\ & + 15.2600 \times 10^{-3}x_1x_2^2\end{aligned}\quad (4.1)$$

為了系統性地瞭解在固態培養基中添加 Glucose (x_1)、Malt extract (x_2)與 Potato starch (x_3)對灰白松露菌比生長速率之間的關係，應用三階三變的 Box-Behnken 來設計實驗。不同基質濃度的固態培養灰白松率菌其培養時間對生長面積的分析比生長速率方法如第 4.2.3 節描述，每 3 日記錄一次並分析灰白松露菌的生長情形，共培養 24 日，將所得到的比生長速率計算後記錄於表 4.2。根據 Design-Expert 分析出來的反應曲面結果表示在這 15 組不同基質的設計濃度之實驗中，編號第 15 號的實驗組（Glucose 10 g/L，Malt extract 10 g/L，Potato starch 12 g/L），其灰白松露菌的比生長速率最快（ $0.198 \pm 0.00315 \text{ day}^{-1}$ ），而編號第 6 號的實驗組（Glucose 30 g/L，Malt extract 10 g/L，Potato starch 20 g/L），其灰白松露菌的比生長速率最慢（ $0.0718 \pm 0.00378 \text{ day}^{-1}$ ）。

表 4.2 固態培養灰白松露菌之三階層三變數 Box-Behnken 的個別因子(x_i)、階層、實驗設計及平均比生長速率

Treatment* No.	Factors			Specific growth rate (day ⁻¹) $\mu \times 10^3 \pm \text{SD} \times 10^3$
	Glucose (g/L)	Malt extract (g/L)	Potato starch (g/L)	
	x_1	x_2	x_3	
1	1†(50)	1 (50)	0 (12)	183.17 ± 4.21
2	0 (30)	0 (30)	0 (12)	153.59 ± 1.77
3	0 (30)	1 (50)	1 (20)	157.48 ± 9.29
4	0 (30)	0 (30)	0 (12)	154.43 ± 5.95
5	1 (50)	-1 (10)	0 (12)	198.22 ± 2.01
6	0 (30)	-1 (10)	1 (20)	71.83 ± 3.79
7	0 (30)	0 (30)	0 (12)	149.93 ± 3.83
8	-1 (10)	0 (30)	1 (20)	177.21 ± 9.04
9	1 (50)	0 (30)	1 (20)	153.30 ± 12.8
10	-1 (10)	1 (50)	0 (12)	147.68 ± 7.11
11	0 (30)	1 (50)	-1 (4)	191.18 ± 8.78
12	1 (50)	0 (30)	-1 (4)	130.58 ± 5.49
13	-1 (10)	0 (30)	-1 (4)	132.34 ± 8.78
14	0 (30)	-1 (10)	-1 (4)	125.25 ± 1.83
15	-1 (10)	-1 (10)	0 (12)	198.35 ± 3.15

* The treatments were run in random order.

† The values (-1), (0), and (1) are coded levels.

表 4.3 為三次多項式變異分析反應曲面迴歸分析模型結果，擬合模型的 P 值為 0.0045、判定係數 R^2 為 0.9948，分析結果具有顯著性 ($P < 0.01$)。

表 4.3 固態培養灰白松露菌之比生長速率之變異數分析

Source	Degree of freedom	Sum of Squares $S \times 10^2$	Prob > F^*
Model	12	1.5334	0.0045
Linear	9	1.4353	0.0036
2FI	6	1.3816	0.0025
Quadratic	3	0.9360	0.0018
Cubic	0	0	-
Pure error	2	0.0011	-
Total error	32	5.2874	-
R^2	0.9948		

* Prob > F : level of significance.

表 4.4 為聯合檢測分析表，顯示各個變數對於比生長速率之影響大小。結果表示實驗中 Malt extract (x_2) 10 - 50g/L 與 Potato starch (x_3) 4 - 20 g/L 為影響比生長速率的顯著因子 ($P < 0.01$)，而 Glucose (x_1) 在 10 - 50 g/L 的範圍對比生長速率沒有顯著影響 ($P = 0.0331$)。

表 4.4 固態培養灰白松露菌變數之聯合檢測分析

Factor	Degree of freedom	Sum of Squares $Z \times 10^2$	Prob > F^*
Glucose (x_1)	1	3762.197	0.0331 [†]
Malt extract (x_2)	1	1639.118	0.0010
Potato starch (x_3)	1	6651.325	0.0030

* Prob > F : level of significance.

[†] Not significant at $P > 0.01$.

4.4 參數的相互影響

透過反應曲面圖來研究 Glucose、Malt extract 和 Potato starch 對灰白松露菌的比生長速率的相互影響。三階三變的 Box-Behnken 設計實驗（表 4.2）的結果用於建構 3-D 反應曲面與 2-D 等高線圖，以下顯示了三個獨立的反應曲面圖（圖 4.4—圖 4.6）及其各自的等高線圖（圖 4.7），藉此推測出每個變數與實驗水準之間的反應關係以及兩個獨立因子之間相互作用的方式。在具有 30 g/L 的 Glucose 濃度，圖 4.4 顯示 Malt extract 濃度在 10 到 50 g/L 之間和 Potato starch 濃度在 4 到 20 g/L 之間對灰白松露菌的比生長速率影響。最低的 Malt extract 濃度（10 g/L）和最高的 Potato starch 濃度（20 g/L）僅得到 0.08 day^{-1} 的比生長速率。最高的 Malt extract 濃度（50 g/L）和 Potato starch 濃度（10 g/L）時，達到 0.2 day^{-1} 的比生長速率。

使用相同策略研究 Glucose 和 Potato starch 對灰白松露菌的比生長速率影響。在 30 g/L 的 Malt extract 濃度，圖 4.5 顯示 Glucose 濃度在 10 到 50 g/L 之間，Potato starch 濃度在 4 到 20 g/L 之間對比生長速率的影響。Glucose 濃度在 22 到 44 g/L 之間，Potato starch 濃度在 8 到 14 g/L 之間，比生長速率約略為 0.16 day^{-1} 。最低的 Glucose 濃度（10 g/L）和 Potato starch 濃度（16 g/L）時，預測比生長速率為 0.18 day^{-1} 。固定 Potato starch 濃度（12 g/L）時，圖 4.6 表示當 Glucose 濃度在 10 - 50 g/L 之間，Malt extract 濃度在 10 到 50 g/L 之間對比生長速率的影響。Glucose 濃度在 22 - 48 g/L 之間，Malt extract starch 濃度在 42 - 50 g/L 之間，比生長速率為 0.18 day^{-1} 。

透過固定不同濃度的 Malt extract（10、30 和 50 g/L）來探討 Glucose 和 Potato starch 的濃度關係生成一系列的等高線圖形，如圖 4.7 所示，可以更好地理解濃度因子與比生長速率之間的關係。Malt extract (x_2) 是具有較小之 P 值，也是灰白松露菌生長最重要的變量（表 4.4），因此可以被認為是灰白松露菌生長有效的績效性指標。總而言之，在圖 4.7 中的三個等高線圖表現預測最高的比生長速率隨著 Malt extract 的添加量增加而增加比生長速率。因此，提出了 Malt extract 濃度為 50 g/L 時的比生長速率，比其他實驗組 Malt extract 濃度的比生長速率更快。且預測圖形發現到，當 Malt extract 濃度逐步增加到 50 g/L 時候，Glucose 濃度在 29 - 39 g/L，Potato starch 濃度在 6 到 12.9 g/L 有很穩定的比生長速率 0.2 day^{-1} 。

最高濃度的 Glucose (50 g/L) 的設計培養基中，相對於 Glucose 濃度為 10 g/L 時，比生長速率明顯降低，證明過高濃度的 Glucose 會抑制灰白松露菌生長，此結果與 Saltarelli, R. 等人利用液態培養基添加高濃度 Glucose 造成抑制 *Tuber borchii* 菌絲體生長的研究結果相呼應[45]。



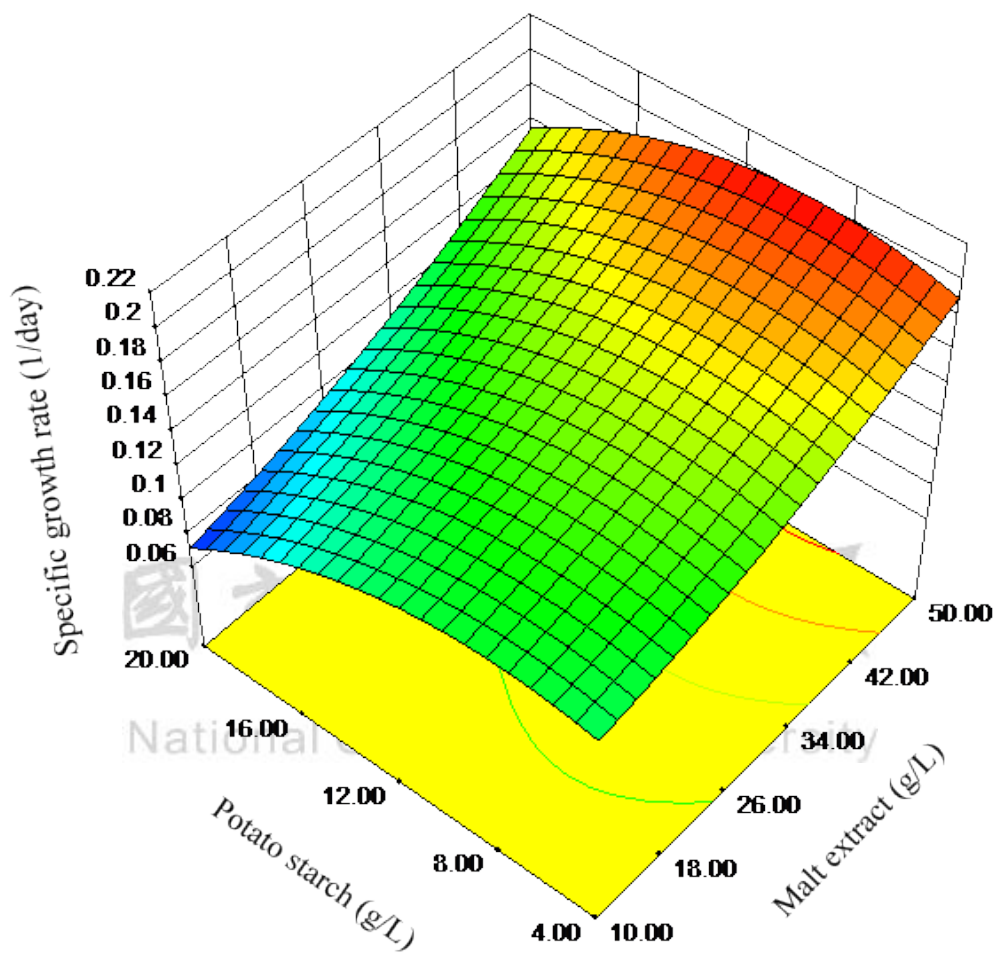


圖 4.4 固定 Glucose 濃度為 30 g/L 時，Malt extract 及 Potato starch 對固態培養灰白松露菌比生長速率之反應曲面圖

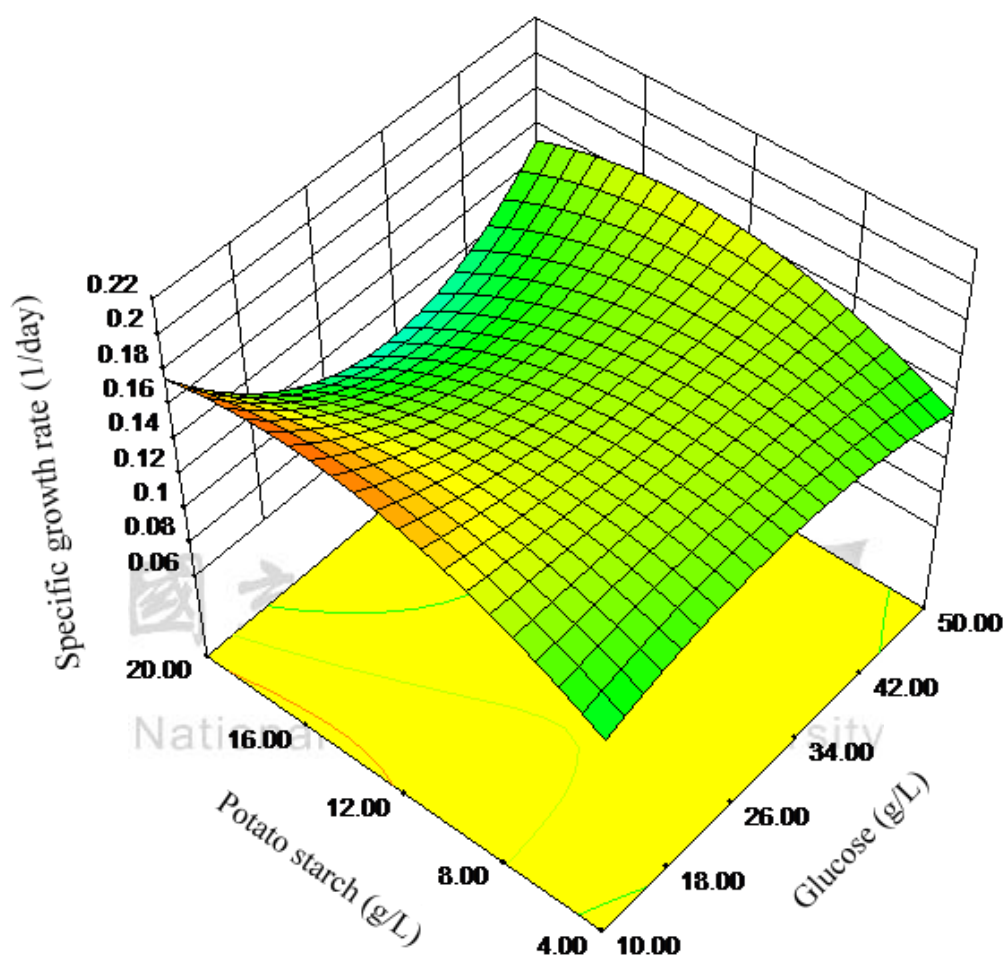


圖 4.5 固定 Malt extract 濃度為 30 g/L 時，Glucose 及 Potato starch 對固態培養灰白松露菌比生長速率之反應曲面圖

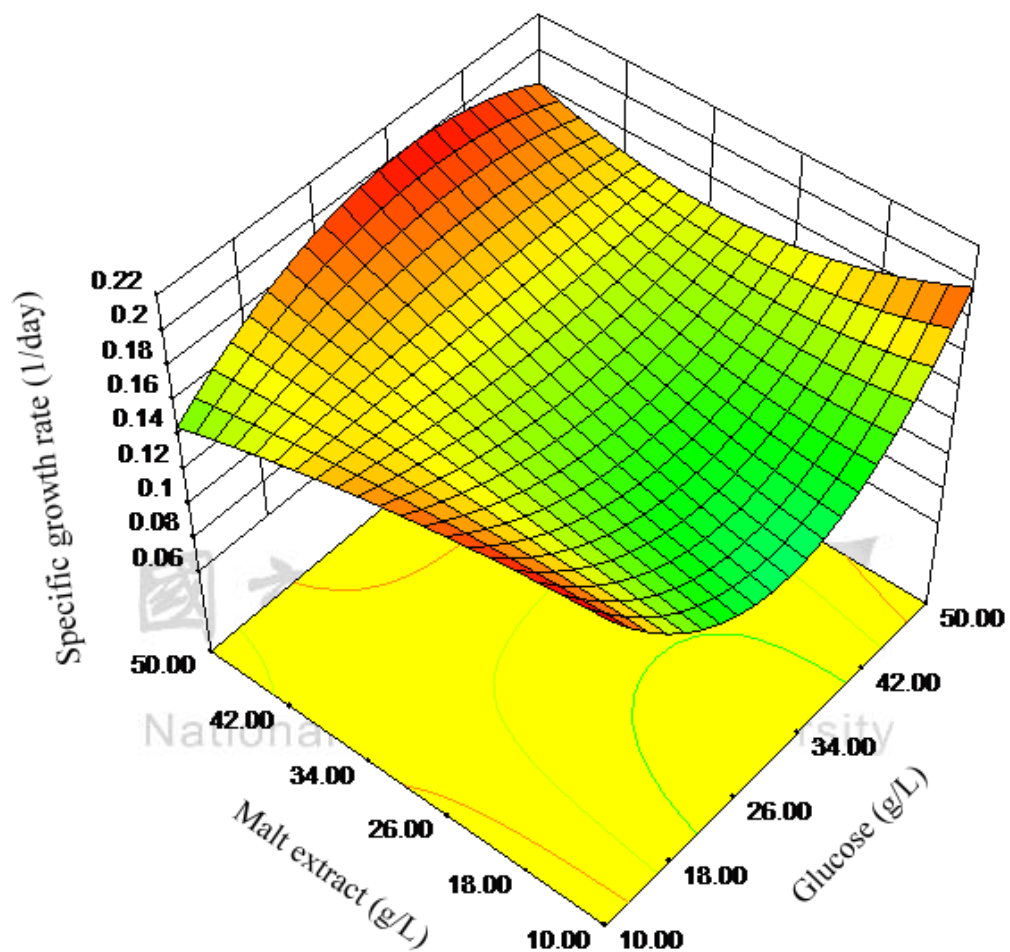


圖 4.6 固定 Potato starch 濃度為 12 g/L 時，Glucose 及 Malt extract 對固態培養灰白松露菌比生長速率之反應曲面圖

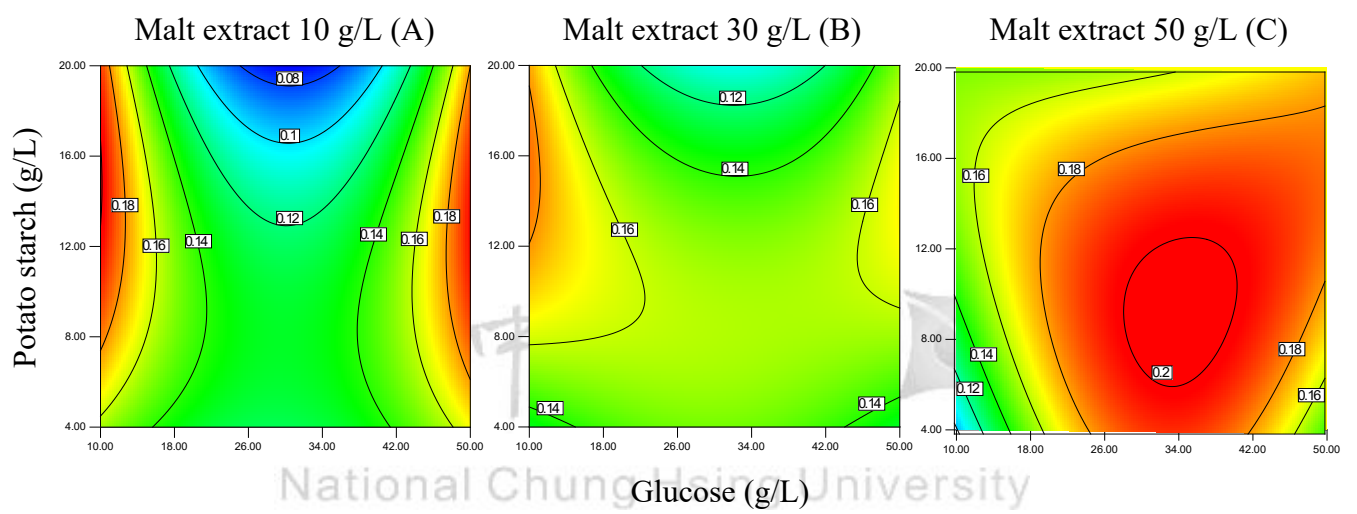


圖 4.7 固定 Malt extract 濃度分別為 10、30 和 50 g/L 時，Glucose 及 Potato starch 對固態培養灰白松露菌比生長速率之等高線圖

4.5 獲得最佳的生長條件

灰白松露菌的最適化培養基條件是透過脊型分析法來確定，計算從原始設計中心增加半徑的最大反應估計值，表 4.5 預期灰白松露菌培養基變數因子為 Glucose 39.2 g/L、Malt extract 55 g/L 與 Potato starch 14.38 g/L 時可得到最大的比生長速率 (0.211 day^{-1})，因為 Malt extract 與 Potato starch 為培養灰白松露菌之主要影響。

表 4.5 脊型分析法預測最大比生長速率之反應值

Coded Radius	Predicted Response ($\mu \text{ day}^{-1}$)	Uncoded Factor Values		
		Glucose x_1 (g/L)	Malt extract x_2 (g/L)	Potato starch x_3 (g/L)
0	0.151	24.2	40	1.88
1	0.180	29.2	45	4.38
2	0.204	34.2	50	9.38
3	0.211	39.2	55	14.38
4	0.207	44.2	60	19.38
5	0.197	49.2	65	24.38

4.6 模型驗證

模型驗證結果，在建議最佳生長培養基培養灰白松露菌的生長條件下，進一步透過獨立的實驗來驗證預測模型可行性。由反應曲面預測最佳的灰白松露菌比生長速率為 0.211 day^{-1} ，而實際培養灰白松露菌之固態培養基配方為 Glucose (34.2 g/L)、Malt extract (50 g/L)、Potato starch (9.38 g/L) 和 Agar (15 g/L) 時可得最佳比生長速率結果為 $0.230 \pm 0.0172 \text{ day}^{-1}$ ，比生長速率超出 9.00%，符合預測結果。因此，透過數學模型擬合所獲得的方程式(4.1)能充分說明其可以作為預測灰白松露菌在 Glucose、Malt extract 和 Potato starch 三種培養基組合的比生長速率。

第五章 結論與未來展望

本文以影像擷取、處理和計算分析技術估算灰白松露菌在瓊脂膠上的生長面積，進而求得時間對菌絲擴散的生長面積，從而計算出灰白松露菌的比生長速率，為全球獨步之估算方法，得以突破灰白松露菌在固態培養基質上配方設計的困境。根據研究結果，在初步研究實驗確認設計影像面積與經由影像拍攝、辨識分析求得的面積相差 0.092%，此為非常小的誤差，顯示本法可嘗試應用於灰白松露菌的生長培養。第二步驟嘗試在 PDA 上培養灰白松露菌來分析其生長情形，實驗結果顯示灰白松露菌在 PDA 上生長至 24 天時之平均比生長速率為 $0.174 \pm 0.0114 \text{ day}^{-1}$ 。

最適化的灰白松露菌在瓊脂膠培養生長的配方設計，選用 Glucose、Malt extract 和 Potato starch 三種碳水化合物之培養基組合驗證影像辨識技術計算生長面積來推估灰白松露菌的比生長速率。研究表明，反應曲面法設計尋求最佳生長培養基設計，根據 ANOVA 分析結果，顯示培養基中的 Malt extract 和 Potato starch 對灰白松露菌具有顯著性的生長影響，但是過高濃度的 Glucose 會抑制灰白松露菌菌絲的比生長速率。

脊型分析分析尋找最佳的灰白松露在固態最佳的配方為 Glucose (34.2 g/L)、Malt extract (50 g/L)、Potato starch (9.38 g/L) 和 Agar (15 g/L)，最佳的比生長速率結果為 $0.230 \pm 0.0172 \text{ day}^{-1}$ ，培養基配方濃度符合預期成效，有助於提升天然松露子實體在未來做菌絲分離或純松露菌絲量產的效益。

農委會與國立宜蘭大學於宜蘭縣大同鄉南山村與四季村進行大規模的青剛櫟與黑松露種植計畫試驗，期許透過本研究方法繼續試驗以調配出適合松露生長的配方組合，並計算出符合法規需求的 Dose-response 曲面圖與 EC_{50} 值，以符合主管機關之試驗規定。

參考文獻

- [1]. Saritha, K., B. Prakash, G. Khedkar, and Y.M. Reddy, "Mushrooms and Truffles: Role in the Diet", in Encyclopedia of Food and Health, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Kidlington, Oxford ; Waltham, MA : Academic Press is an imprint of Elsevier. p. 1-8.
- [2]. Volk, T.J., "Fungi A2 - Levin, Simon A", in Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition). 2013, Academic Press: Waltham. p. 624-640.
- [3]. Saltarelli, R., P. Ceccaroli, P. Cesari, E. Barbieri, and V. Stocchi, "Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species", Food Chemistry, 2008. **109**(1): p. 8-16.
- [4]. Bahrani, Z., "Race and ethnicity in Mesopotamian antiquity 1", World Archaeology, 2006. **38**(1): p. 48-59.
- [5]. Bokhary, H.A. and S. Parvez, "Chemical Composition of Desert Truffles *Terfezia clavaryi*", Journal of Food Composition and Analysis, 1993. **6**(3): p. 285-293.
- [6]. Wang, S. and M.F. Marcone, "The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles", Food Research International, 2011. **44**(9): p. 2567-2581.
- [7]. Dahham, S.S., S.S. Al-Rawi, A.H. Ibrahim, A.S. Abdul Majid, and A.M.S. Abdul Majid, "Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia clavaryi*", Saudi Journal of Biological Sciences, 2016.
- [8]. Patel, S., "Food, health and agricultural importance of truffles: a review of current scientific literature", Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2012. **6**(1): p. 15-27.
- [9]. Hamza, A., N. Zouari, S. Zouari, H. Jdir, S. Zaidi, M. Gtari, and M. Neffati, "Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia boudieri* Chatin, a wild edible desert truffle from Tunisia arid zone", Arabian Journal of Chemistry, 2016. **9**(3): p. 383-389.
- [10]. Janakat, S., S. Al-Fakhiri, and A.K. Sallal, "A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavaryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro", Phytotherapy Research, 2004. **18**(10): p. 810-813.
- [11]. Dubost, N.J., B. Ou, and R.B. Beelman, "Quantification of polyphenols and

- ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity", *Food Chemistry*, 2007. **105**(2): p. 727-735.
- [12]. Bellesia, F., A. Pinetti, B. Tirillini, and A. Bianchi, "Temperature-dependent evolution of volatile organic compounds in *Tuber borchii* from Italy", *Flavour and Fragrance Journal*, 2001. **16**(1): p. 1-6.
- [13]. Culleré, L., V. Ferreira, B. Chevret, M.E. Venturini, A.C. Sánchez-Gimeno, and D. Blanco, "Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry", *Food Chemistry*, 2010. **122**(1): p. 300-306.
- [14]. Hussain, G. and I.M. Al-Ruqaie, "Occurrence, chemical composition, and nutritional value of truffles: an overview", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 1999. **2**(2): p. 510-514.
- [15]. Iotti, M., E. Lancellotti, I. Hall, and A. Zambonelli, "The ectomycorrhizal community in natural *Tuber borchii* grounds", *FEMS Microbiology Ecology*, 2010. **72**(2): p. 250-260.
- [16]. Bakker, M., J. Garbaye, and C. Nys, "Effect of liming on the ectomycorrhizal status of oak", *Forest Ecology and Management*, 2000. **126**(2): p. 121-131.
- [17]. Soccol, C.R., E.S.F.d. Costa, L.A.J. Letti, S.G. Karp, A.L. Woiciechowski, and L.P.d.S. Vandenberghe, "Recent developments and innovations in solid state fermentation", *Biotechnology Research and Innovation*, 2017.
- [18]. Sabella, E., E. Nutricati, A. Aprile, A. Miceli, C. Negro, P. Rampino, M. Lenucci, and L. De Bellis, "*Tuber borchii* Vitt. mycorrhiza protects *Cistus creticus* L. from heavy metal toxicity", *Environmental and Experimental Botany*, 2016. **130**: p. 181-188.
- [19]. Leonardi, P., M. Iotti, S. Donati Zeppa, E. Lancellotti, A. Amicucci, and A. Zambonelli, "Morphological and functional changes in mycelium and mycorrhizas of *Tuber borchii* due to heat stress", *Fungal Ecology*, 2017. **29**: p. 20-29.
- [20]. Yeh, C.-W., S.-C. Kan, C.-C. Lin, C.-J. Shieh, and Y.-C. Liu, "Polyhydroxylated steroids and triterpenoids from an entophytic fungus, *Hypocreales* sp. NCHU01 isolated from *Tuber magnatum*", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016. **64**: p. 22-30.

- [21]. Zhang, Y., L. Wang, and H. Chen, "Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation", *Chemical Engineering Science*, 2017. **165**: p. 65-73.
- [22]. 陳麗妘，在未設限環境下車牌的定位與辨識，資訊教育學系，1999，國立臺灣師範大學，p. 1-67。
- [23]. 許伯誠，車牌辨識系統，電腦與通訊工程學系，2007，國立高雄第一科技大學，p. 1-73。
- [24]. üge Çarıkçı, M. and F. Özen, "A Face Recognition System Based on Eigenfaces Method", *Procedia Technology*, 2012. **1**: p. 118-123.
- [25]. 李亭緯，利用人臉五官為特徵之人臉辨識系統，資訊工程學系，2008，國立中央大學，p. 1-51。
- [26]. 黃崇竣，應用影像位移偵測於居家防盜系統，電子工程學系，2016，健行科技大學，p. 1-32。
- [27]. 邱柏訊，陳信銘，鍾承君，簡大為與朱國華，"影像式火焰及煙霧偵測方法"，*前瞻科技與管理*，2013. **3**(1)：p. 149-163。
- [28]. Nguyen, K., C. Fookes, R. Jillela, S. Sridharan, and A. Ross, "Long range iris recognition: A survey", *Pattern Recognition*, 2017. **72**: p. 123-143.
- [29]. Chen, J.-H., M.-C. Su, R. Cao, S.-C. Hsu, and J.-C. Lu, "A self organizing map optimization based image recognition and processing model for bridge crack inspection", *Automation in Construction*, 2017. **73**: p. 58-66.
- [30]. Zhou, S.K., "Chapter 1 - Introduction to Medical Image Recognition, Segmentation, and Parsing", in *Medical Image Recognition, Segmentation and Parsing*. 2016, Academic Press. p. 1-21.
- [31]. Hu, Y. and L. Nie, "An aerial image recognition framework using discrimination and redundancy quality measure", *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 2016. **37**: p. 53-62.
- [32]. Ambra, R., B. Grimaldi, S. Zamboni, P. Filetici, G. Macino, and P. Ballario, "Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of Tbwc-1, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*", *Fungal Genetics and Biology*, 2004. **41**(7): p. 688-697.
- [33]. Zhao, Z.-Y., Q. Zhang, Y.-F. Li, L.-L. Dong, and S.-L. Liu, "Optimization of

- ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface methodology and their antioxidant activities", *Carbohydrate Polymers*, 2015. **119**: p. 101-109.
- [34]. Liu, Z., X. Ma, B. Deng, Y. Huang, R. Bo, Z. Gao, Y. Yu, Y. Hu, J. Liu, and Y. Wu, "Development of liposomal *Ganoderma lucidum* polysaccharide: Formulation optimization and evaluation of its immunological activity", *Carbohydrate Polymers*, 2015. **117**: p. 510-517.
- [35]. Gupta, V.K., M.W. Assmus, T.E. Beckert, and J.C. Price, "A novel pH-and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. II. Optimization of multiple response variables", *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. **213**(1): p. 93-102.
- [36]. Ghadiri, M., S. Fatemi, A. Vatanara, D. Doroud, A.R. Najafabadi, M. Darabi, and A.A. Rahimi, "Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size", *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **424**(1): p. 128-137.
- [37]. Yang, S., J. Chen, D. Zhao, D. Han, and X. Chen, "Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency", *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **434**(1): p. 155-160.
- [38]. 黃嘉駿，嗜酸乳桿菌胞外多醣體醱酵製程，純化與結構鑑定，化學工程學系，2013，國立中興大學，p. 1-205。
- [39]. 林純卉，探討 *Aspergillus niger* 和 *Bacillus sp.* 混菌在紡織染料中脫色與降解效果，生物科技學系，2010，國立台灣科技大學，p. 1-93。
- [40]. 葉怡成，*高等實驗計畫法*，2009：五南圖書出版有限公司，p. 1-452。
- [41]. Vadde, K.K., V.R. Syrotiuk, and D.C. Montgomery, "Optimizing protocol interaction using response surface methodology", *IEEE Transactions on Mobile Computing*, 2006. **5**(6): p. 627-639.
- [42]. Box, G.E. and D.W. Behnken, "Some new three level designs for the study of quantitative variables", *Technometrics*, 1960. **2**(4): p. 455-475.
- [43]. Box, G.E. and K.B. Wilson, "On the experimental attainment of optimum conditions", in *Breakthroughs in Statistics*. 1992, Springer. p. 270-310.
- [44]. St, L. and S. Wold, "Analysis of variance (ANOVA)", *Chemometrics and*

- Intelligent Laboratory Systems, 1989. **6**(4): p. 259-272.
- [45]. Saltarelli, R., P. Ceccaroli, E. Polidori, B. Citterio, L. Vallorani, and V. Stocchi, "A high concentration of glucose inhibits *Tuber borchii* mycelium growth: a biochemical investigation", *Mycological Research*, 2003. **107**(1): p. 72-76.

