

MC-Transaction on Biotechnology, 2010, Vol. 2, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

台灣東北方黑潮海水中之酵母菌篩選與鑑定

高嘉雲、陳奕伸、陳良宇*

銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

酵母菌的應用十分廣泛，目前在食品、發酵和醫療工業上都可見到酵母菌相關的應用。但相較於各種陸源酵母研究，海洋酵母的研究較為稀少。本研究探討在不同深度台灣東北外海的酵母菌分布與生長情形。海水經過濾後，將海洋酵母菌分離、培養並純化，再利用 rDNA ITS-RFLP 與 rDNA ITS sequences 定序，進行菌種之分類及鑑定。在深度 5 公尺與 25 公尺處海水樣品中分別分離並鑑定出 *Rhodotorula mucilaginosa* 和 *Candida parapsilosis* 菌株。就我們瞭解，這是第一個在天然海水中發現 *Candida parapsilosis* 的研究。

關鍵字：海洋酵母、黑潮、基礎生產力

通訊作者：陳良宇[loknath@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2010-1-2 接受：2010-3-18

緒 論

酵母菌的應用十分廣泛，在食品、發酵和醫療工業上都可見到酵母菌的相關產品。酵母菌為單細胞真菌，形狀呈球形、橢圓形、香腸形等，大小約為 $3\sim 6 \times 7\sim 10 \mu\text{m}$ 左右，內含細胞核、液泡、發芽痕、細胞壁等。酵母菌多為腐生，生殖方式可分為有性生殖與無性生殖兩種。而海洋酵母更因其獨特的生存環境及特性而受到重視[1]。

參照圖一，台灣東北海域有來自西菲律賓海的黑潮洋流(Kuroshio current)經過，黑潮海流由台灣東部順勢而上，碰到陡升的東海陸棚南端受到阻礙，迫使海流主流向東北轉向，由於此種特殊的地理環境，促使此處海域有湧昇流(upwelling)的產生[2]。黑潮上層海水營養鹽較為貧乏，次層海水或底層海水營養鹽較為豐富，由於湧昇作用將豐富的營養鹽帶到黑潮表層來，進而引發較高的生產力[3, 4]。而特殊之海洋酵母菌分佈能幫助我們瞭解微生物在生地化過程中之角色。



圖一、本研究之樣本為採自台灣東北外海黑潮湧昇區之不同深度海水。圖片製作為擷取 Google Map 基礎地圖資料，加以標註黑潮流向及湧昇區位置。

一般對海洋真菌的定義：在海洋環境中完成其世代，包括產生孢子與生長的真菌，稱為「專性海洋真菌」；對於其他來自淡水或陸生環境，可於海洋環境條件下生長，但不產孢子完成整個生活史的，則稱為「兼性海洋真菌」[5]。由於海洋酵母適應海洋特殊環境，如滲透壓、低溫、高壓、酸鹼度、低溶氧度等，在沿岸、遠洋、海底沉積物中都可以分離得到，主要分布於新鮮或腐敗的海洋動植物身上。目前在天然水體中發現的酵母菌，通常不產生孢子且為厭氧或有微微的發酵能力[6]。故多數海洋酵母被認為來自陸地，只有少數為海洋原生種[7]。

由於微生物發酵有多項優點，除微生物多樣性特性外，其生產速度快，品質易控管，培養成本低廉，單一產品的回收較容易，提高有效成分的萃取濃度。近年來酵母菌也常做為模式生物，用於細胞生物學和遺傳學的研究。本研究對台灣東北外海進行海洋酵母的研究探討，期盼能發現新的物種和活性物質，並建立台灣附近海域的微生物資料庫以及產業應用之可行性。

材料與方法

海水樣本採集

海水樣本由海洋大學龔國慶教授提供，利用海研三號於台灣東北海域進行樣本採集，地點為東經 122.6 度及北緯 25 度進行定點採樣，分別在海平面下 2、5、25、50、75 公尺等處進行採水，僅水深 25 公尺處採樣兩次，每次採集 2 公升海水，分別取名為 25m(A)和 25m(B)。

菌種分離與保存

採集得來的海水樣本，經由抽氣微過濾的方式進行分離。利用孔徑 0.45 μm 的過濾膜(ADVANTEC, Tokyo, Japan)，每 1 公升海水樣本，利用抽氣過濾原理將菌體留在濾膜上。將濾膜轉移至分離培養基上進行 25°C 厭氣培養(Mitsubishi AnaeroPak™ System, Pack-Anaero, itsubishi Gas Chemicals, Tokyo, Japan)。為了使海洋酵母在與海洋環境相似的條件下生長，我們將樣本過濾後之海水，先進行鹽度與 pH 值的檢測，再進行滅菌，以替代蒸餾水使用於培養基中。經過五天的培養，對生長出的菌落經由外觀、顏色、大小等進行初步的挑選，利用甲基藍染色與顯微鏡的觀察，將生長出的菌落進行單株分離，再次進行培養，經過多次重複分離步驟後，對分離出的菌體進行革蘭氏染色，確認各菌株之外型與單一菌株後，即可利用 YM-DMSO medium 進行菌種保存，存放於-80°C。

菌種鑑定

PCR 放大反應 首先由保存冷凍管中提取酵母菌，接種於 YM 培養基於 25°C 培養一天。DNA 的萃取，是利用總體積為 5 mL 的 YM 培養液，經由 DNA/RNA extraction kit (Viogene, Taiwan) 進行抽取。抽取出的 DNA 利用 PCR(Gene Amp PCR System 9700 (PerkinElmer Corp., Boston, MA, USA)) 進行放大，使用 Takara Ex Taq gene amplification PCR kit(Takara, Shiga, Japan)，primer 為 ITS1 (5-TCCGTAGGTGAA-CCTGCGG-3) 和 ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3)。PCR 流程設計，以 94°C 先解旋雙股 DNA 三分鐘後，進行 30 個溫度循環：94°C 解旋雙股 DNA 三十秒，55°C 引子與模板結合三十秒，72°C 進行一分三十秒的 DNA 聚合反應[8]。

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)分析 做出之 PCR 產物，進行 RFLP 之分析。將做出之產物利用 *Hin*fl (G/ANTC)和 *Hae*III (GG/CC)兩種限制酶進行切割，再利用 1.5%膠片進行電泳分離，之後在 UV 燈下進行觀察，即可初步將酵母菌進行群組分類[9]。

序列分析與菌種比對 經由 PCR 放大的產物純化，是利用 Clean/ Gel Extraction Kit(BioKit, Miaoli, Taiwan)，再利用 ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)進行 5.8S-ITS rDNA 序列分析，採用序列前端的 500bp 序列，利用美國國家生物資訊中心(NCBI) BLASTN 進行序列比對，確認菌種[10]。

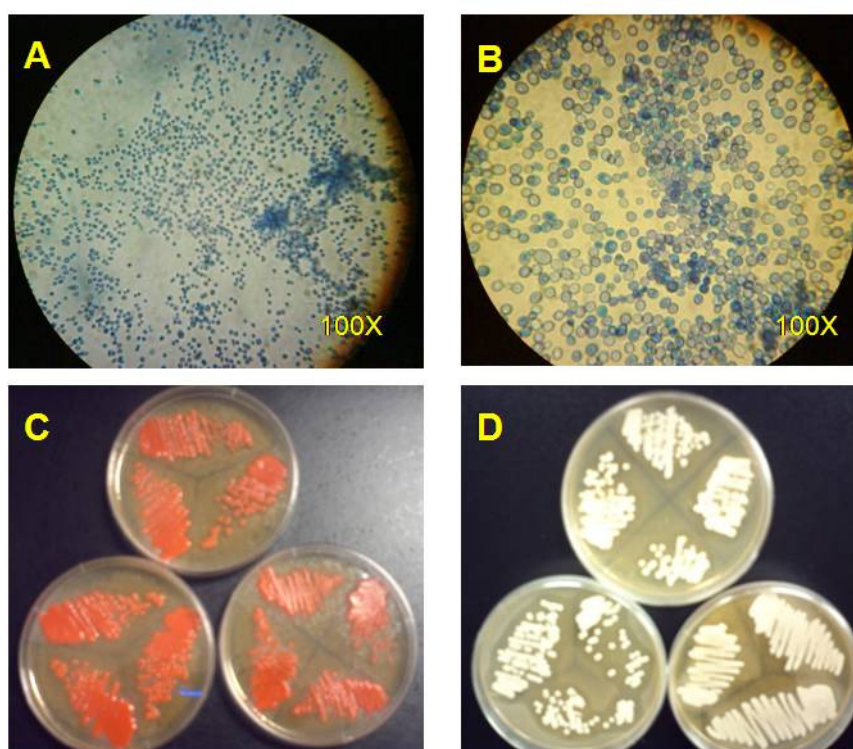
實驗結果

鹽度測定與 pH 值檢測

在不同深度下所測得的 pH 值介於 8.27~8.46 之間。鹽度檢測則是皆為 32 ‰。不同深度採樣海水中的鹽度與 pH 值波動不大，結果顯示微生物生長環境的差異性不高，水樣中微生物的篩選結果可能僅限於採樣機率，與深度無關。

菌株分離

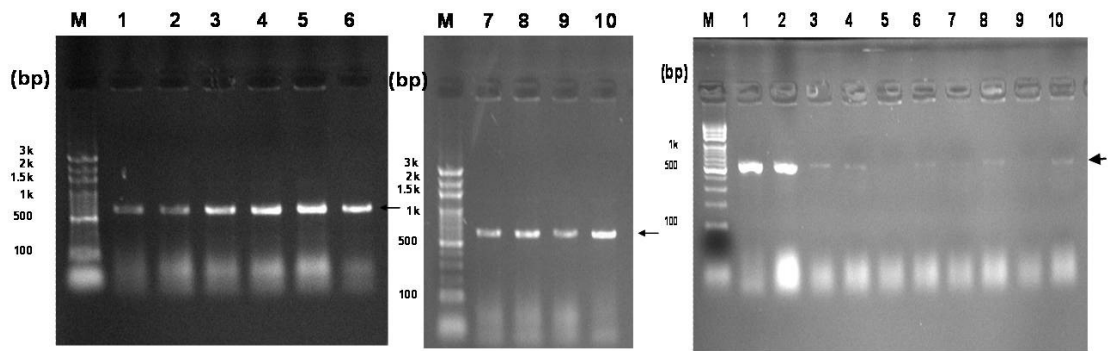
此次實驗在第一次進行樣本分離時，未在培養基中加入抗生素，培養 5 日後分離得到以細菌為主之菌落(圖二 A)。經由 75% 的食鹽水，在次沖洗培養後之濾紙，吸取 200 μ l 重新進行酵母菌的分離培養。自水深 5 m 分離得到粉紅色酵母菌株(圖二 C)，重複單株化分離菌株至第四代時，自水深 25 m(B)培養基上分離得到白色酵母菌(圖二 D)，從此兩深度各別獲得 10 株單株化酵母菌，進行凍管保存。



圖二、利用甲基藍染色，使用顯微鏡放大 100 倍觀察，自 25 m 深海水分離得到的海洋細菌(圖 A)，及自 25 m 深海水分離得到的酵母(圖 B)。圖 C 及圖 D 分別為利用 YM medium 培養採自 5 m 深海水之紅色酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和 25 m 深海水之白色酵母(*Candida parapsilosis*)。

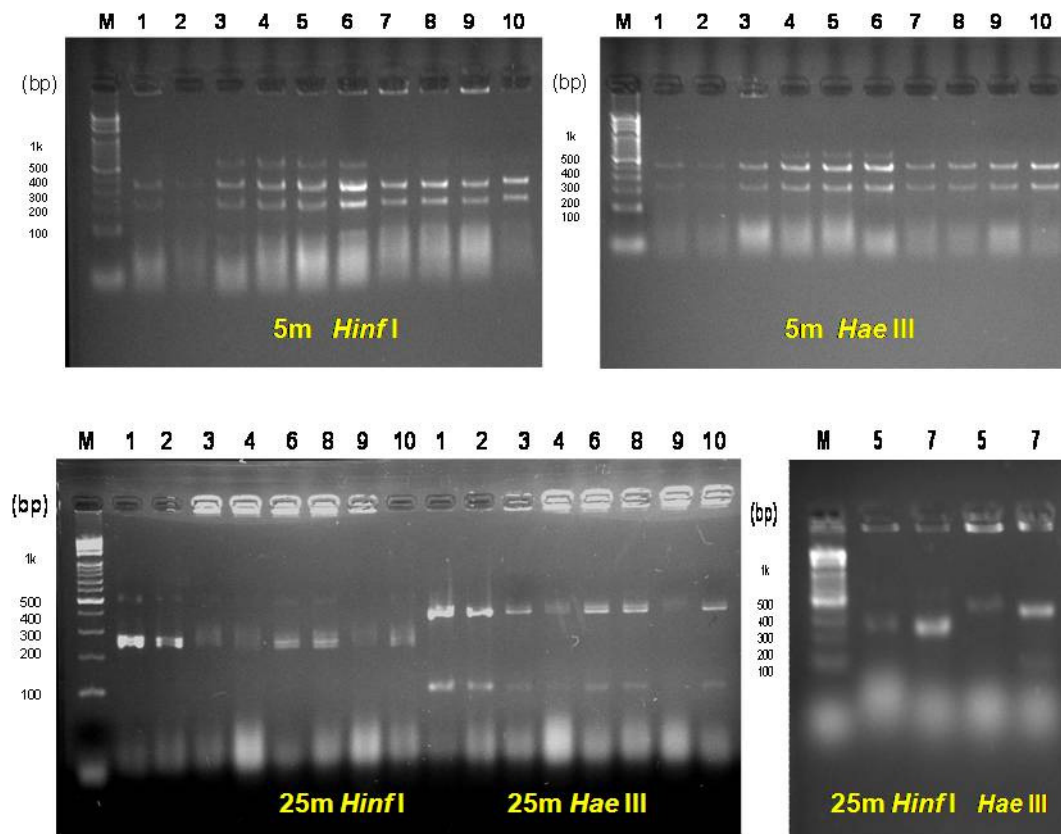
菌種鑑定

PCR 放大反應 利用 ITS 當引子(Forward ITS1 和 Reverse ITS4)，對在水深 5 公尺與 25 公尺處純化菌株之抽取 DNA 進行 PCR 放大，夾出之片段約落在 400~800 bp 之間(圖三)。



圖三、由 5 m 及 25 m 深度之海水所分離之酵母菌株 PCR 增殖 DNA 電泳圖。

RFLP 分析 分別對水深 5 公尺與 25 公尺處的 PCR 產物，利用 *HinfI* 和 *HaeIII* 進行內切(圖四)，由切出的片段大小顯示，5 公尺與 25 公尺的菌株為不同菌株。而 5 公尺處的 10 株菌，初步判定應屬相同菌株，25 公尺處也應為同一菌株。



圖四、分別對 5 m 深及 25 m 深海水分離酵母菌株之 PCR 增殖產物，進行 *HinfI* 和 *HaeIII* 內切酵素處理所得到的 DNA 電泳圖。

菌種比對 為了確認兩組菌株為何，分別將水深 5 公尺與 25 公尺處之菌株隨機挑選 2 株進行 5.8S-ITS rDNA 序列分析，分析出之序列經由 NCBI BLASTN 進行序列

比對，分別自水深 5 公尺處鑑定出 *Rhodotorula mucilaginosa* 菌株，於水深 25 公尺處鑑定出 *Candida parapsilosis* 菌株。

討 論

此次所分離出之細菌菌株，我們經由簡單的革蘭氏染色與雙氧水檢測，確認其為革蘭氏陽性菌。酵母菌分離實驗中，由於並未立即加入抗生素，可能導致原本應該存在之酵母菌被優勢種細菌所覆蓋，造成所分離篩選之酵母菌數較少的結果。然而，文獻報導顯示海洋微生物的濃度本就很低，每升海水中從沒有到數百個菌落[1]。黑潮海水因為較少懸浮有機體及藻類，導致入射光線之高穿透性而得名，故結果尚屬合理。

擔子菌的 *Rhodotorula* 菌屬，會分泌紅色或橘黃色色素，菌落表面微突且平滑有光澤。此菌屬有個重要的特徵，即是不會消化肌醇，故可藉由此特性與 *Cryptococcus* 進行區分[10]。此次由海水中分離得到的 *Rhodotorula mucilaginosa* 菌株，為常見的分離菌株，中文稱之為膠紅酵母，廣泛分佈於全球的陸地、水域以及不同的基質上。台灣目前針對紅色酵母的研究，利用不同限制酶進行切割，可以將紅色酵母區分為 19 群，其中以 *R. mucilaginosa* 分布最為廣泛[11]。

Candida parapsilosis 由顯微鏡下觀察呈現卵形或圓形，菌落表面光滑且有微微突起，其會形成偽菌絲，可生長於 10~15% NaCl [7, 12]。更經常存在於生物體的表皮與黏膜組織，為致病原菌之一[13]。*C. parapsilosis* 曾被發現存在於海洋生物上，並具有木糖還原能力可將木糖轉化成木糖醇(xylitol) [14]，目前也有水解蝦蟹蛋白質之應用[15]。

不同深度下篩選出之海洋真菌，由於水文環境的差異，自 5 m 深篩選出之 *R. mucilaginosa* (紅酵母)在培養時顯示較為好氧的特性，而自 25 m 深篩選出之 *C. parapsilosis* (白酵母)應具有較高之低氧及低溫耐受性。推論表層海洋真菌之好氣性跟海氣交換有關，而溫躍層(thermocline layer)附近及較深處海水處之真菌，可能跟沉降之大顆粒懸浮有機顆粒有關。

誌 謝

感謝國立台灣海洋大學海洋環境化學與生態研究所之龔國慶及洪慶章教授，慷慨提供珍貴之黑潮海水，本研究始得以順利進行。作者感謝本研究部分財務支援來自國科會計劃(NSC 97-2313-B-130-001-MY2)的補助經費。

參考文獻

- [1] Kutty SN, and Philip R, 2008, Marine yeasts – a review. *Yeast* 25:465–483.
- [2] Liu CY, Shyu GZ, Shin WH, 1992, The kuroshio fronts and cold eddies off northeastern Taiwan Observed by NOAA-AVHRR Imageries. *TAO* 3:335-242.
- [3] 陳良宇 (1996) 台灣東北海域湧升流之流量及硝酸鹽傳輸通量之模式計算。台灣大學海洋所碩士論文。
- [4] Liu KK, Tang TY, Gong GC, Chen LY, Shiah FK, 2000, Cross-shelf and along-shelf nutrient fluxes derived from flow fields and chemical hydrography observed in the southern East China Sea off northern Taiwan. *Continental Shelf Research* 20:493-523.
- [5] Kohlmeyer J, and Volkmann-Kohlmeyer B, 1991, Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina* 34:1-61.
- [6] Pitt JI, Miller MW, 1970, The parasexual cycle in yeasts of the genus *Metschnikowia*. *Mycologia* 62:462–473.
- [7] Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde-Cimerman N, 2005, Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* 244:229 –234
- [8] Nisiotou AA, and Gibson GR, 2005, Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8S-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Lett Appl. Microbiol.* 41: 454-463.
- [9] Osorio-Cadavid E, Chaves-López C, Tofalo R, Paparella A, Suzzi G, 2008, Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol.* 25: 771-777.
- [10] Carvalho CM, Rocha A, Estevinho MLF, Choupina A, 2005, Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 5(1):11-17.
- [11] 汪碧涵、張瀨文、王嫻婷 (2003) 臺灣沿岸海水中五種紅酵母屬酵母菌之分布。台灣農業化學與食品科學 41: 101-112。
- [12] Sean FL, and Geraldine B, 2005, Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151:1073–1081.

- [13] Weems JJ, 1992, *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 14:756–766.
- [14] Preziosi-Belloy L, Nollet V, Navarro JM, 1997, Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme Microb. Technol.* 21:124-129.
- [15] 楊孟琳 (2001) 以微生物水解蝦殼蛋白質分離幾丁質後的廢液作為植物液肥之可行性。國立海洋大學食品科學研究所碩士論文。

Preliminary Study of Yeast in Kuroshio Seawater off the Northeast of Taiwan

Chia-Ying Kao, Yi-Sheng Chen, Liang-Yu Chen*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University,
(Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

The marine environment plays a special role in geographical and ecological system. Thus, the sea microorganism could develop the special growth mechanism, product the new active materials, and be applied with the unique function in pharmaceuticals. Six sea-water samples were collected at the Kuroshio upwelling zone off the northeastern Taiwan in this study. Marine yeasts isolated from the seawater were classified by phenotype, restriction fragment length polymorphism analysis and the sequencing of 5.8S-ITS ribosomal DNA. Two species were found as *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida parapsilosis*, which is isolated and reported firstly from the natural seawater.

Keyword: marine yeast, Kuroshio current, basic productivity

Corresponding author: Liang-Yu Chen [loknath@mail.mcu.edu.tw]

Received 2 January 2010/Accepted 18 March 2010

MC-Transaction on Biotechnology, 2010, Vol. 2, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.