

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

破囊壺菌屬(*Thraustochytrium*)蛋白一活性菌株之篩選

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN 92-02

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：陳淑芬

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：保健營養系

中華民國九十三年一月三十日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱：破囊壺菌屬 (*Thraustochytrium*) 蛋白酶-活性菌株之篩選 (The screening of strains with protease activity in *Thraustochytrium*)

計畫編號：CNHN 92-02

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

主持人：陳淑芬

執行單位：保健營養系

一、中文摘要

破囊壺菌 (*Thraustochytrium*) 為一群絕對海生的雙鞭毛真菌，生活在半鹹海水中，以腐生或寄生方式在有機物上休眠和著生，在河口的碎食性食物鏈扮演分解者角色；一般只能利用誘釣的方式加以分離培養，並無法直接觀察其在自然環境中所利用的基質類別，本研究嘗試使用定性及定量方法篩選純種保存的破囊壺菌各菌株的蛋白質分解- (protease) 活性。結果顯示有 7 種 16 個菌株可以分解利用蛋白質，其中分離自四草生態保護區沼澤底泥的二株多增殖性破囊壺菌 (*T. multirudimentale*) 比其他分離自水體中的菌株具有較強的蛋白質分解能力；佐證可資利用的生物性基質種類也是影響鞭毛菌種類消長與分佈的因素之一。

關鍵字：破囊壺菌屬，蛋白酶-活性

Abstract

The obligate marine, biflagellatic *Thraustochytrids* are saprotrophic or paratrophic on algal and vascular plant materials and play the decomposers in marine foodchain. They also have been

isolated from the guts of echinoderms and from sponges, but the nature of associations is unknown. However only rarely have been observed in nature. Most of them has come from laboratory studies of species isolated using pollen grains as bait in water and sediment samples. This project is to investigate the protease activity of pure cultured *Thraustocytrids*. The qualitative analysis reveals 7 species 16 strains with the ability to utilize protein. The quantitative analysis shows two strains of *T. multirudimentale* with the notablest of protease activity. They are isolated from the sediment in protected area of Sze-Tsao. This reveals the substrate is one of the factors that effects the scattering of *Thraustochytrids*.

Keywords: *Thraustochytrium*, protease.

二、計畫緣由與目的

海產真菌依其生態上附著生育地可區分為四型：嗜木質素型、嗜海藻型、嗜介殼型及嗜半鹹水型；其中海生鞭毛真菌包括兩類：絕對海生的破囊壺菌 (*Thraustochytrids*)、以及兼性海生的壺

菌 (Chytrids)，在海洋中營腐生或寄生生活，是海洋食物鏈的分解者之一 [7][8][9]。水生真菌的生態學是一個龐大的主題，研究時必須先選定類群，鞭毛真菌的種類很多、形態歧異，分離、鑑定方法各不相同，又其體積極微小、構造簡單、鑑定困難，臺灣地區從事這群真菌的研究者相當少；本著過去在這個類群累積的分類經驗 [1][2][3]，因此選擇破囊壺菌為研究材料，嘗試探討這群真菌生態角色的定位方法。

破囊壺菌屬 (*Thraustochytrium*) 為一群絕對海生的雙鞭毛真菌，生活在半鹹海水中，在河口的碎食性食物鏈扮演分解者角色，以腐生或寄生方式在有機物上休眠和著生 [5][11][12]；部份研究指出這些潮間帶真菌與海生細菌競爭並且支配海水中的維生素 B₁₂ 及 thiamine 的循環 [4]；Raghukumar 觀察海水中破囊壺菌生長，發現當有細菌存在時會利用偽足移動並吞噬細菌細胞，指出破囊壺菌在自然界中扮演奇特的分解複雜的有機物以及吞食細菌 (bacterivory) 雙重角色 [8]；除了常見的在有機物如：藻類 [9]、花粉、海草的表面 [10]，或侵入某些軟體動物體內寄生之外，在海生無脊椎動物的碳酸鈣外殼中也發現有岩生的 (endolithic) 破囊壺菌 [6]。一般只能利用餌物從海水中誘釣的方式分離培養破囊壺菌，並無法直接觀察在自然環境中其所利用的基質類別。

本研究嘗試以蛋白質分解 (protease) 活性測試方法，將 1999 年 1 月至 2002 年 7 月間由台南沿海、曾文溪

口及四草生態保護區的海生鞭毛真菌調查所分離鑑定並且已經純培養保存的破囊壺菌菌株為材料，分別使用定性及定量方法篩選各菌株的蛋白質分解能力，期能初步建立一項利用生理代謝特性定位這類群真菌生態角色的參酌標準。

三、結果與討論

1. 蛋白質分解能力定性分析

將 1999 年 1 月至 2002 年 7 月間由台南沿海、曾文溪口及四草生態保護區的海生鞭毛真菌調查 (表一) 所分離並鑑定的破囊壺菌屬 (*Thraustochytrium*) 13 種總計 100 個純培養保存的菌株，作為本研究分析的材料。13 種 100 株破囊壺菌接種在 CA 固體培養基上培養二週後，觀察可以利用酪蛋白生長的菌株有 7 種 16 株 (表二)。

2. 蛋白一活性定量分析

A. 氮源種類、培養天數與蛋白一活性關係：

分別以酪蛋白培養液 (CB) 培養三週及蛋白五培養液 (PB) 培養二週，測試各培養液蛋白一活性，結果 (表三) 顯示同種的不同菌株選擇利用不同的蛋白質種類；各菌株的蛋白一活性之最適 pH 值也不相同。另外，培養天數與蛋白一活性關係，除了 1B03-1 活性微弱、而 1C08-7 還需要進一步比較外，其他菌株蛋白一活性則不一定都與培養天數呈正相關性。

B. K₂HPO₄ 濃度與蛋白一活性關係：

在蛋白五培養液中加入不同濃度 (0.5、1.0、1.5、2.0 g / 1L) 的 K₂HPO₄，顯示 K₂HPO₄ 含量會影響各菌株的蛋

白一活性 (表四)，而不同的菌株各有不同的 K_2HPO_4 濃度影響。

C. 不同種類菌株的蛋白一活性：

在相同培養基成分及培養條件下，分離自不同地點的 5 種 9 株具有蛋白質分解能力的破囊壺菌，蛋白一活性的表現有相當大的歧異性 (表五)，其中活性最高的種類依序為多增殖性破囊壺菌 (*T. multirudimentale*) 的兩個菌株，其次為動孢破囊壺菌 (*T. motivum*)，而羅斯破囊壺菌 (*T. roseum*) 的不同菌株間蛋白一活性具有明顯的差異性。

本研究的破囊壺菌中不到五分之一的菌株具有蛋白質分解能力，間接說明本屬種類能夠廣泛利用生存環境中許多的基質成分[9][10]，而出現頻度相當高的破囊壺菌種類，例如：集生破囊壺菌 (*T. aggregatum*)、動孢破囊壺菌 (*T. motivum*) [2][3]，僅少數一或二個菌株有蛋白質分解能力，顯示它們存在有利用不同種類基質的生態型；而出現頻度屬於中度的羅斯破囊壺菌 (*T. roseum*) 有較多菌株具有蛋白質分解能力，但是蛋白一活性高低差異頗大，推測本種類的菌株兼具有利用多種基質的特性。歸納比較蛋白一活性最高的種類為多增殖性破囊壺菌 (*T. multirudimentale*)，而此種類出現頻度相當低，僅分離到兩個菌株 2A01-Sa 及 3A02-Sc，而且兩者都是從四草生態保護區不同的沼澤底泥中分離的[3]，顯示底泥中可以利用的基質含有蛋白質成分可能高於水體，而其他分離自水體中的種類蛋白一活性相對較低，可能與水體中可利用的浮游生物、植物碎屑...等種類與比例相對較高有關

[11][12]。至於同一種類的不同菌株間蛋白一活性具有歧異性，推測與其所生活的不同生態微環境間的基質組成差異有關，除了印證過去研究發現水體環境中的物理、化學因子影響鞭毛真菌種類的消長與分佈[2][3][5]外，可以被利用的生物性基質種類也可能是影響鞭毛菌消長與分佈的因素之一。

四、參考文獻

1. 陳淑芬，1999。台南沿海自然保護區水生真菌相調查。研究報告。嘉南藥理學院補助。
2. 陳淑芬，2000。曾文溪感潮河段海生鞭毛真菌—破囊壺菌種類及消長關係研究。國科會專題研究計畫期末報告。
3. 陳淑芬，2002。四草生態保護區海生鞭毛真菌相調查及消長關係研究 (2/2)。國科會專題研究計畫期末報告。
4. Adair, J. and H. S. Vishniac 1958. Marine fungus requiring vitamin B₁₂. Science 127:147-148.
5. Dix, N. T., and J. Webster. 1995. Fungal Ecology. Publ. Hapman and Hall, London. pp.549.
6. Porter, D. and W. L. Lingle 1992. Endolithic thraustochytrid marine fungi from planted shell fragments. Mycologia 84(3):289-299.
7. Powell, M. J. 1993. Looking at mycology with a janus face: a glimpse at Chytridiomycetes active in the environment. Mycologia 85(1):1-20.
8. Raghukumar, S. 1992. Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in

- the sea. *Marine Biology* 113:165-169.
9. Raghukumar, C., S. Nagarkar and S. Raghukumar 1992. Association of thraustochytrids and fungi with living marine algae. *Mycol. Res.* 96(7):542-546.
10. Sparrow, F. W. 1960. *Aquatic Phycomycetes*, 2nd ed. The University of Michigan Press, Ann Arbor.
11. Suzuki, S. 1961. The seasonal changes of aquatic fungi in the lake bottom of Lake Nakanuma. *Botan. Mag. (Tokyo)* 74:30-33.
12. Ulken, A. 1980. On some chytrids found in estuarine habitats. *Botanica Marina* 23:343-352.



(表一) 本研究使用之破囊壺菌種類與分離紀錄

屬名	種名	陳, 1999	陳, 2000	陳, 2002
<i>Thraustochytrium</i>	<i>proliferum</i>	*	*	*
	<i>multirudimentale</i>	*	*	*
	<i>motivum</i>	*	*	*
	<i>aureum</i>	*	*	*
	<i>rossi</i>			*
	<i>kinnei</i>		**	
	<i>kerguelensis</i>			**
	<i>globosum</i>	*	*	*
	<i>pachydermum</i>		**	*
	<i>roseum</i>	*	*	*
	<i>aggregatum</i>	*	*	*
	<i>striatum</i>	*		*
	<i>visurgensis</i>			**
	<i>Sp.</i>	*	*	
<i>Schizochytrium</i>	<i>aggregatum</i>	*	*	*
	<i>minutum</i>	**		
	<i>mangrovei</i>		*	*
	<i>octosporum</i>		*	*
	<i>limacinum</i>			**
	<i>Sp.</i>		*	
<i>Ulkenia</i>	<i>radiata</i>	*		*
	<i>minuta</i>		**	*
3 屬	20+2 種	12 種	13 種	18 種

註：**表示為臺灣新紀錄種

(表二) 可利用酪蛋白培養基 (CA) 的破囊壺菌種類及菌株

種類	菌株代號	種類	菌株代號	
<i>T. motivum</i>	2B03-1	<i>T. roseum</i>	4A03-2	
	2B09-1		1C08-7	
<i>T. aureum</i>	1C08-2		2B08-3	
	2B08-2		1C09-2	
<i>T. multirudimentale</i>	3A02-Sc		4A09-1	
	2A01-Sa		4A09-3	
<i>T. pachyderma</i>	4A01-1		302M-1	
<i>T. aggregatum</i>	1B03-2		<i>T. globosum</i>	3A02-1

(表三) 培養在酪蛋白培養液(CB)三週及蛋白五培養液(PB)二週的蛋白一活性

種類	菌株	CB		PB	
		pH	(天數)活性單位	pH	(天數)活性單位
<i>T. roseum</i>	302M-1	9	(21) 0.260	9	(14) 1.972
	4A03-2	9	(21) 0.365	9	(14) 0.755
	1C08-7	10	(21) 0.515	9	(14) 0.324
<i>T. motivum</i>	1B03-1	10	(21) 0.075	6	(14) 0.076
	2B09-1	10	(21) 0.365	9	(14) 0.020
<i>T. globosum</i>	3A02-1	6	(21) 0.785	10	(14) 0.075
<i>T. multirudimentale</i>	3A02-Sc	9	(21) 0.490	10	(14) 3.303
<i>T. pachyderma</i>	4A01-1	10	(21) 0.430	6	(14) 0.605

(表四) K_2HPO_4 濃度變化與蛋白一活性關係

種名	菌株	K_2HPO_4 (g/L)	培養天數	pH	活性單位
<i>T. motivum</i>	2B03-1	0.5	7	10	0.145
<i>T. aureum</i>	1C08-2	0.5	7	10	0.175
	2B08-2	1.5	7	6	0.120
<i>T. roseum</i>	1C09-2	1.5	7	6	0.345
	4A09-1	0.5	7	9	0.140
	4A09-3	2.0	7	6	0.525

(表五) 不同破囊壺菌各菌株的蛋白一活性比較

種名	菌株代號	培養天數	pH	活性單位
<i>T. motivum</i>	2B09-1	14	9	2.900
<i>T. roseum</i>	4A03-2	14	9	0.740
	1C08-7	14	9	0.324
	2B08-3	14	9	0.824
	302M-1	14	9	2.009
<i>T. multirudimentale</i>	2A01-Sa	14	10	5.090
	3A02-Sc	14	10	3.303
<i>T. pachyderma</i>	4A01-1	14	6	0.605
<i>T. aggregatum</i>	1B03-2	14	7	1.745