

具抑菌能力的中草藥用植物葉表酵母菌

林柏緯¹ 汪碧涵^{2*}

¹東吳大學微生物學系

²東海大學生命科學系

(接受刊載日期: 中華民國一〇〇年三月二十二日)

由四十二種中草藥植物葉收集202株酵母菌, 包括白色、紅色與黑色酵母菌。不同植物葉表分佈的酵母菌種類與多樣性不同。將202株菌的培養液以錠片擴散法分別測試對常見的4種革蘭氏陽性細菌與6種革蘭氏陰性細菌的抑制效果, 共篩選出23株酵母菌有抑菌能力, 鑑定出七屬八種, 包括新紀錄種*Debaryomyces castellii*與*Candida edax*。

關鍵字: 酵母菌, 中草藥, 紙錠擴散法。

Antibacterial Phyllosphere Yeasts from the Chinese Medicinal Plants

Bo-Wei Lin¹ and Pi-Han Wang^{2*}

¹Department of Microbiology, Soochow University, No. 70, Linhsi Rd., Shihlin, Taipei 111, Taiwan, ROC

²Department of Life Science, Tunghai University, No. 181, Sec. 3, Taichung-Kan Rd., Taichung 40704, Taiwan, ROC

(Accepted for publication: March 22, 2011)

We collected 202 yeast isolates including white, red, and black yeasts from phyllosphere of 42 Chinese medicinal herbs. The yeast flora on different plants were diversified. A disk diffusion method was used to test the antibacterial ability of 202 yeast isolates against 10 clinical bacteria, including 4 Gram-positive and 6 Gram-negative bacteria. Twenty-three isolates were selected and 11 of them were identified to 7 genera and 8 species, including the new species, *Debaryomyces castellii* and *Candida edax*.

Key words: Yeast, Chinese medicinal plants, Disk diffusion method.

酵母菌菌株可用於篩選作為特殊酵素生產菌、新的食品醱酵菌、污染物分解菌、有機質轉換菌及蛋白質生產菌等。Veenendaal等人⁽¹⁾研究熱帶樹種*Milicia excelsa*上面酵母菌的族群, 結果發現在62株菌中, 有87%皆為*Cryptococcus laurentii*, 其他則為*Candida humicola*、*Candida curvata*、*Candida membranaefaciens*、*Rhodotorula minuta*與*Rhodotorula rubra*, 出現頻率都在5%以下。這些菌株中, 有一半的*Crypt. laurentii*菌株, 其生理生化特性與APILAB酵母菌鑑定系統中的*Crypt. laurentii*的特性非常不同。其中有三株菌株在葉片測試中可以抑制病原真菌*Botrytis cinerea*, 表示*Crypt. laurentii*可能能夠保護葉片不受伺機性植物病原真菌的感染。酵母

菌產生抑制細菌的產物不多見⁽²⁻⁶⁾, 葉表酵母菌中, *Aureobasidium pullulans*, *Citeromyces matritensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*與*Sporobolomyces roseus*菌株會產生抑制細菌的化合物, 抑制*Pseudomonas fluorescens*和*Staphylococcus aureus*的生長⁽¹⁾。

中草藥用植物多含有特殊成分, 使葉表成為特殊的棲地, 可能有非常豐富及珍貴的酵母菌相與菌株。關於中草藥葉表酵母菌的研究幾稀, 我們收集中草藥用植物葉表酵母菌, 從中篩選抑制細菌的菌株。42種中草藥用植物(表一)樣本採集自基隆葉家藥園, 在植株的四個方位各剪取一個葉片, 24小時內分離菌株。修改Rosa等人⁽⁷⁾的方法, 於樣本袋中加入無菌水, 以封口機封口, 置於水

* Corresponding author. E-mail: phwang@thu.edu.tw

表一 供試中草藥植物名錄與葉表分離之酵母菌菌種數

Table 1. Chinese medicinal plants investigated in the study and the amount of phyllosphere yeast species obtained from each plant species

植物名稱	學名	菌種	植物名稱	學名	菌種
夏枯草	<i>Prunella vulgaris</i> L.	9	雷公藤	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	4
巴豆	<i>Croton tiglium</i> L.	6	板藍根	<i>Baphicacanthus cusia</i> (Nees.) Bremek	3
金剛纂	<i>Euphorbia antiqorum</i> Linn.	6	苧麻	<i>Boehmeria nivea</i> (L.) Gaud.	3
青脆枝	<i>Nothapodytes nimmoniana</i> Mablerley	6	薏苡	<i>Coix lacyna-jobi</i> Linn.	3
椒草	<i>Peperomia pellucida</i> (Linn.) Humboldt	6	綠珊瑚	<i>Euphorbia tirucalli</i> Linn.	3
龍葵	<i>Solanum nigrum</i> L.	65	馬醉木	<i>Pieris taiwanensis</i> Hayata	3
槭樹	<i>Acer serrulatum</i> Hayata		印度	<i>Scutellaria indica</i> L.	3
大青葉	<i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> Turcz.	5	黃芩		2
八角蓮	<i>Dysosma pleiantha</i> (Hance) Woodson	5	韭菜	<i>Allium tuberosum</i> Rottler	
雀梅藤	<i>Sageretia thea</i> (Osbeck) Johnst.	5	廣東山葡萄	<i>Ampelopsis cantoniensis</i> (Hook. & Arn.) Planch.	2
藤三七	<i>Anredera scandens</i> Moq.	4	穿心蓮	<i>Andrographis paniculata</i> Nees	2
刺楸	<i>Aralia bipinnata</i> Blanco	4	由跋	<i>Arisaema ringens</i> (Thunb.) Schott	2
橄欖	<i>Canarium album</i> (Lour.) Raeuschel.	4	細辛	<i>Asarum macranthum</i> Hook. f.	2
台灣山豆根	<i>Euchresta formosana</i> (Hayata) Ohwi	4	七日暈	<i>Breynia officinalis</i> Hemsley	2
布朗藤	<i>Heterostemma brownii</i> Hayata	4	長春花	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	2
黃花石蒜	<i>Lycoris aurea</i> Herb.	4	大花	<i>Datura suaveolens</i> Humb. & Bonpl. ex Wild.	2
白鶴靈芝	<i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.)Kurz	4	曼陀	<i>Gymnocoronis spilanthoides</i> Decandolle	2
台灣蒲公英	<i>Taraxacum formosanum</i> Kitam.	4	羅光葉	<i>Melastoma candidum</i> D. Don	2
			水菊	<i>Patrinia Formosana</i> Kitamura	2
			野牡丹	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit.	2
			敗醬草	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	2
			半夏	<i>Ranunculus japonicus</i> Thunb.	2
			何首烏	<i>Scutellaria barbata</i> D.Don	2
			毛茛	<i>Thalictrum fauriei</i> Hayata	2
			半枝蓮		
			台灣唐松草		

平震盪器上震盪一小時。取1 mL水樣連續稀釋，將稀釋度 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 懸浮液各取100 μ L水樣，平板塗抹於含抗生素chloramphenicol (40 mg/L)的酸化YM培養基(yeast-extract-malt extract agar: yeast extract 0.5%, malt extract 0.5%, peptone 0.5%, glucose 1%, agar 1.8%, pH 3.7)，各三重複，置於26°C培養48-72小時。待菌落形成後，計數各種形態酵母菌的菌落總數並於YM培養基純化。酵母菌株拮抗細菌能力的測試採紙錠擴散法(disk diffusion method)，以YM培養基26°C活化培養菌株兩天，製備成100 cells/mL的接種液，取1 mL接種液加入含有5 mL YM培養液的15 mL離心管中，26°C，1,500 rpm震盪培養三天。將菌液

以5,000 rpm、4°C離心10 min去除細胞，取上層液，再重複一次，取上層液供測。作為測試指標的10種常見細菌與病原細菌包括*Aeromonas* sp.、*Bacillus cereus*、*Bacillus subtilis*、*Enterococcus faecalis*、*Escherichia coli*、*Listeria monocytogenes*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella choleraesuis*、*Staphylococcus aureus*、*St. epidermidis*與一株酵母菌*Candida albican*，經TSB (Tryptic Soy Broth)培養液活化備用。細菌拮抗測試：將測試用的指標菌，以無菌棉棒均勻塗抹於TSA (Tryptic Soy Agar)平板培養基上。取直徑0.8 cm的無菌濾紙圓錠沾取酵母菌培養上清液，貼於塗有指標細菌的培養基上，置於30°C培養二至三天後，測量抑制圈的生成

與大小。

參考The Yeast⁽⁸⁾一書描述之菌株形態與生理生化特性鑑定。菌株於YM培養基上，26℃培養七天，以解剖顯微鏡(Olympus SE-ZT, Japan)鏡檢，觀察紀錄菌落形態。以Dalmau plates法⁽⁹⁾，觀察偽菌絲(Pseudomycelia)之形成與否。觀察細胞形狀與其群聚方式，將菌株接於YM培養液中，26℃下培養三天後鏡檢。以Biolog YT Microplate™測定生理生化特性及鑑定菌種；參照操作手冊，讀取供試菌株的94種生理生化反應結果，比對Biolog's MicroLog™ 3.0版資料庫鑑定酵母菌。

從同一栽培地，基隆葉家藥園採集四十二種藥用植物，由葉表分離純化獲得202株酵母

菌。依據菌落外觀形態，包括白色酵母菌18群70株，紅色酵母菌10群48株，黑色酵母菌15群84株，不同植物葉表分佈的酵母菌種類與多樣性不同(表一)，夏枯草最多，有九種；食、藥用韭菜最少，只有二種。將202株菌的培養液以錠片擴散法分別測試對常見的四種格蘭氏陽性細菌與六種格蘭氏陰性細菌的抑制效果。共篩選出23株酵母菌有抑菌效果(表二)，鑑定出七屬八種共11株菌，其他12株菌未能以Biolog鑑定套組達成鑑定。其中*Debaryomyces castellii*與*Candida edax*為新紀錄種。

有四株源自半枝蓮、韭菜與敗醬草的*Sporidiobolus pararoseus*都具有抑菌能力，但是雖為同種，各菌株拮抗細菌的種類不同，分

表二 以錠片擴散法測試中草藥植物葉表酵母菌培養液對十種供試細菌與白色念珠菌之抑制效果

Table 2. Inhibitory ability of the phyllosphere yeasts isolated from Chinese medicinal plants against ten clinical bacteria and *Candida albicans* tested by the disk diffusion method

菌株編碼	酵母菌	植物來源										
			<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
G9-8	<i>Bulleromyces albus</i>	巴豆										3+
G9-1	<i>Candida edax</i>	巴豆									+	
G1-7	<i>Debaryomyces castellii</i>	青脆枝										+
G16-3	<i>Debaryomyces castellii</i>	野牡丹		3+		2+						4+
G3-7	<i>Pichia carsonii</i>	夏枯草										+
G19-B-1	<i>Rhodotorula acheniorum</i>	龍葵		2+		2+		2+				
G2-1	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	半枝蓮										+
G2-2	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	半枝蓮									3+	
G10-3	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	韭菜										3+
G13-4	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	敗醬草								2+		
G2-7	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	半枝蓮			+	+						
G4-3		長春花									2+	
G4-4		長春花									+	
G4-5		長春花									+	
G5-4		八角蓮		+			+				+	
G6-2		黃花石蒜						2+		2+		
G9-2		黃花石蒜								+		2+
G11-2		馬醉木							3+			3+
G11-3		馬醉木							2+			3+
G14-2		台灣山豆根		3+		3+				2+		2+
G27-A-2		薏苡			+						+	
G27-A-3		薏苡									+	
G35-2		藤三七									+	

註：+：抑制區1-5 mm；2+：抑制區5-10 mm；3+：抑制區11-15 mm；4+：抑制區16-20 mm。

別抑制 *Escherichia coli* (G2-2)、*Staphylococcus aureus* (G10-3)，與 *Aeromonas* sp. (G13-4)；兩株同樣源自半邊蓮葉片的 *Sp. pararoseus*，G2-2 抑制 *E. coli*，G2-1 抑制 *St. aureus*，為不同株系。有 2 株紅色酵母菌 *Debaryomyces castellii* 具抑菌效果，分別源自野牡丹與青脆枝，前者 (G16-3) 對 *Bacillus subtilis*、*Enterococcus faecalis* 與 *St. aureus* 有很好的抑制效果，後者 (G1-7) 只對 *St. aureus* 有效，菌株差異很大。馬醉木上分得的白色酵母菌株 G11-2 與 G11-3 則抑菌種類與效果相近，都能抑制供試的兩種葡萄球菌 *St. aureus* 與 *St. epidermidis*，可能為相同株系。

抑菌效果最好的是 G14-2 白色酵母菌菌株，由台灣山豆根所分得，可抑制四種細菌的生長，包括 *B. subtilis*、*En. faecalis*、*Aeromonas* sp. 與 *St. aureus*，且抑制效果顯著。紅色酵母菌 *Rhodotorula aceniorum* G19-B-1 源自龍葵葉表，抑制三種細菌，*B. subtilis*、*En. faecalis* 與 *St. epidermidis*，也有不錯的抑制能力。以 202 株酵母菌測試，結果只有一株菌 G9-2 能抑制 *Salmonella choleraesuis* 的生長。兩株菌 G5-4 與 G6-2 抑制 *Listeria monocytogenes*。對 *Bacillus cereus* 與 *Pseudomonas aeruginosa* 則都沒有抑制能力。對於選試的臨床酵母菌白色念珠 *Candida albicans*，只有源自半枝蓮的紅色酵母菌 *Sterigmatomyces halophilus* G2-7 與源自薏苡葉的 G27-A-2 菌株的培養液有抑菌效果。酵母菌培養液具抑菌效果，表示酵母細胞外泌之次級代謝物有抑制能力，毋須自細胞萃取，具有應用潛力。

誌 謝

本研究承行政院國家科學委員會計畫補

助，葉金印博士與葉家藥園提供樣本，謹此致謝。

參 考 文 獻

- (1) H. Li, E. Veenendaal, N. A. Ab Shukor, J. R. Cobbinah and C. Leifert: Yeast populations on the tropical timber tree species *Milicia excelsa*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**: 322-326 (1995).
- (2) T. Sasaki, J. Watari, M. Kohgo, N. Nishikawa and Y. Matsui: Breeding of a brewer's yeast possessing anticontaminant properties *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, **42**: 164-166 (1984).
- (3) C. A. Bilinski, G. Innamorato and G. G. Stewart: Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 1330-1332 (1985).
- (4) P. J. McCormack, H. G. Wildman, and P. Jeffries: Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Appl Environ Microbiol.*, **60**: 927-931 (1994).
- (5) P. Oliva-Neto, M. A. Ferreira and F. Yokoya: Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Biores. Technol.*, **92**: 1-6 (2004).
- (6) M. C. Meneghin, V. R. Reis and S. R. Ceccato-Antonini: Inhibition of bacteria contaminating alcoholic fermentations by killer yeasts. *Braz. arch. biol. technol.*, **53**: 1043-1050 (2010).
- (7) C. A. Rosa, P. B. Morais, S. R. Santos, P. R. Peres Neto, L. C. Mendonca-Hagler and A. N. Hagler: Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycol. Res.*, **99**: 1047-1054 (1955).
- (8) C. P. Kurtzman and J. W. Fell: A Taxonomic Study. In: *The Yeast*, 4th ed., Elsevier Science, Netherlands (1998).
- (9) L. J. Wickerman: Taxonomy of yeasts. *US Dep. Agric. Tech. Bull.*, **1029**: 11-56 (1951).