

深藏不露

——發酵發光的臺灣真菌

柯惠棉、蔡怡陞

真菌，包括釀酒需要的酵母菌、一些料理不可缺的香菇、及森林會出現的發光菇等，是無奇不有、無所不在又跟人的生活及文化息息相關。所以真菌學家的研究範圍包山包海，是興趣及專業上最多樣的一群人了。在中研院生物多樣性研究中心裡的真核微生物基因體學實驗室，正在用不同方法分離並觀察不同環境下真菌物種的奧秘跟演化。在這篇文章，我們會介紹實驗室真菌兩種有趣現象的研究：發酵及發光。這兩個看似迥異的型態，都是許多真菌為了在自然界生存而演化出的特性。英文裡的culture同時具有培養與文化之意—希望藉由研究微生物多樣性的同時，可以追尋人類在自然界留下的生存軌跡。

釀酒酵母跟人類情訂終身前的故事

發酵的英文Fermentation，來自於拉丁文的fervere，也是沸騰之意。每個人對於發酵的印象可能不盡相同：或許是家中廚房大大小小、正在冒泡的瓶瓶罐罐；或許是某家

名店販售的美味麵包，甚至是一對曖昧小倆口間的微妙情感變化（發酵）。而對於正在研究微生物的工作者來說，發酵則是：白天看著實驗室的培養罐冒著泡泡，晚上則看著自製的啤酒冒著泡泡。

生物學家定義發酵為厭氧代謝。在不同自然環境來說，它是微生物在艱困無氧的狀態下利用有機質產生自己需要的能量。在某些機運中，人類在不同時間點發現、利用這種轉化的能力來加工食材。最普遍也最受歡迎的發酵品——酒，在各種文化裡扮演著重要的角色。現在我們已經知道發酵的原理，並分離出一些特定的微生物讓它們在少氧的環境中代謝。人類將這些微生物取名為酵母（圖一），英文Yeast的來源為「泡泡」的意思。這些酵母菌根據後來的研究，主要是不同來源的真菌。這其中最具有代表性的菌就是釀酒酵母（brewer's yeast；學名*Saccharomyces cerevisiae*；取義為來自於酒裡的糖菌）。釀酒酵母也叫麵包酵母（baker's yeast），在諸多的發酵食物中，例如麵包或是咖啡豆都少不了它。

正因為它與人類生活關係密切，在現代分子生物學裡，也是研究最多的模式物種之一。科學家開始知道釀酒酵母裡面有6000多個基因，也開始在實驗室內用不同條件控制誘發及研究出每一個基因的功能。但緊接著，幾個更大的疑問陸續被提出：釀酒酵母到底從哪裡來？我們人類又對它扮演著什麼樣的角色？對一些遺傳學或微生物生態學家來說，這些是很迷人的問題。在2005年，遺傳學家



圖一：兩種酵母菌的外觀。左邊為顯微鏡（100 x）所呈現的細胞模樣，右邊為肉眼觀察到培養基上的聚落模樣。
（圖片來源：李佳燁）

Justin Fay 利用定序五個基因的片段，比較了從不同人為環境，譬如葡萄酒莊周邊，以及較少被人類干擾的環境所收集到的釀酒酵母，彼此之間存在基因差異性。這項研究首次定義出81株釀酒酵母演化樹。其結果顯示：原始譜系都是源自於較為自然的環境。以族群來說，從自然環境所收集到的酵母菌菌株，其遺傳差異性較大；從人為環境所收

集到的酵母菌之間的遺傳差異性則很少。這是首次從遺傳資料提出了人類馴化微生物的證據——人類藉由大規模的農耕，創造出單一環境下的農產品，而釀酒酵母也一次次的被利用、被篩選成單一或少數幾種最容易應用於釀酒或製作麵包的菌株。

最近在基因體定序及分析技術日益價廉而精進的過程中，科學家又重新追尋人類與釀酒酵母的這段歷史。在2009年，由酵母菌學家Gianni Liti 所領導的一個團隊（筆者也參與其中）定序且發表了超過70種酵母菌基因體。這代表著我們可以辨識一個物種不同個體在基因體層級的差異。令人驚訝地，與人類文化密切相關的釀酒酵母菌株並非源自單一共同祖先，而是至少來自五個族群（馬來西亞、西非、東亞、北美、歐洲）。這代表人類在歷史的不同時間點上，從各種不同來源的發酵食物馴化出釀酒酵母品種。跟野生酵母菌相較之下，釀酒酵母菌株的族群結構非常複雜。以致於上述的北美釀酒酵母菌株跟其他四種地區的族群彼此之間，共同分享基因的多樣性。這反映了成千上萬年以來，人類會傳播釀酒酵母到不同地方，並共同演化出現代的釀酒酵母菌。

如果說釀酒酵母是透過動植物、尤其是人類而傳播，那它最原本的發源地是在哪裡呢？之前同一個團隊在跟中國科學院白逢彥研究員的團隊在2018年分別從全世界或是從中國各地分離了1,011跟266株釀酒酵母，發現其中至少有10個譜系（lineage）的基因多樣性，遠高於已知所有被

定序的菌株。尤其是在前者研究中，臺灣分離到的菌株是目前已知基因多樣性最高的族群！這代表著釀酒酵母的發源地很可能就在東亞，而這也跟考古證據裡的發現不謀而合：最早的發酵飲料出現在約西元前7000年（仰韶文化之前）的中國。

基於工業及商業上的需要，現代大部分的麵包店或是酒廠所使用的釀酒酵母，是經過無數次的反覆培養及篩選而來的（需符合發酵能力穩定且適應商業發酵桶的環境）。若欲自行釀酒，也可以從特定的經銷商購得商業化培養的釀酒酵母。優質的酵母可大幅減少發酵失敗的可能性，諸如黴菌污染、食物腐敗，也更容易調控發酵環境的溫度及濕度條件。然而，這也意味著，我們已經逐漸喪失了從自然發酵環境中篩選菌株的創造力。一個突破此困境的方向，是重新找尋新的釀酒酵母。它們常見於不同環境中：土壤、植物樹皮、落葉、動物（包括人類）的腸道等。酵母菌在自然界，憑藉著能屈能伸的本領繁衍。但是釀酒酵母是如何渡過寒冷的冬天呢？在歐洲，夏天成熟的葡萄會發酵，是透過果皮上的釀酒酵母代謝並繁殖所造成。而一些昆蟲如造紙胡蜂（*Polistes dominula*）會覓食這些果實並順便把這些酵母吃進去，所以胡蜂的腸道也變成釀酒酵母的長期住所之一，這也讓釀酒酵母的多樣性可以穩定的傳承下去。

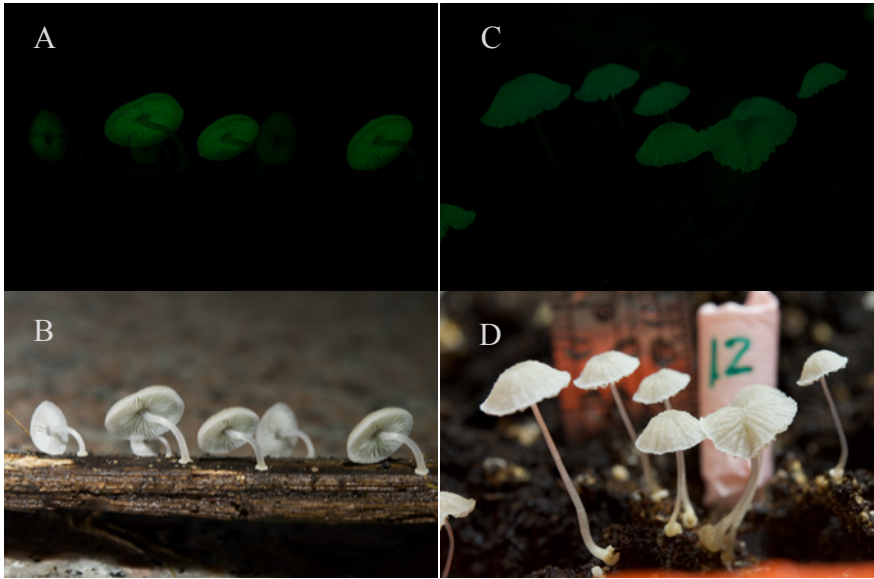
位於酵母菌起源地區內的臺灣，在自然生態環境中存有什麼樣的釀酒酵母？歷史上曾出現過哪些傳統發酵法？

哪些傳統發酵法被傳承了下來？這些都尚待我們系統性地去挖掘和揭示。

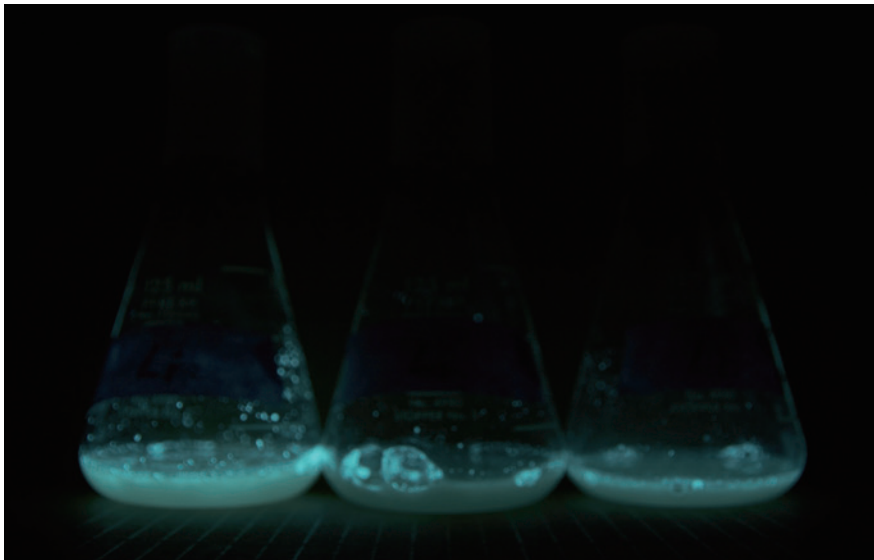
夜光派對—星夜叢林裡華麗隱身的發光蕈

為人熟知的真菌，除了食用菌（如酵母菌、香菇、靈芝）以及病原菌（例如黴菌、造成香蕉黃葉病的尖孢镰刀菌等）之外，尚有夜晚可供觀賞的發光蕈。跟螢火蟲一樣，發光蕈同樣是散放冷光（bioluminescence）的生物。雖然有時候被稱為螢光蕈，但有別於螢光（fluorescence）需要激發光能，冷光是由生物體內化學反應產生的光能。簡單來說，參與發光的過程是一種稱為冷光素酶（luciferase）的蛋白氧化了一種稱為冷光素（luciferin）的化學分子，反應過程中產生的能量以光的形式釋放。

除了發光蕈（圖二），能夠產生冷光的生物，從陸地上的螢火蟲、叩頭蟲，到海洋中的弧菌屬（圖三）以及雙鞭毛蟲門，甚至磷蝦都演化出冷光系統。冷光素酶與冷光素產生冷光，似乎是一個很簡單的化學反應，但冷光素酶與冷光素只是一個統稱。不同物種的冷光素酶蛋白質序列並不一樣，參與的冷光素也不同（圖三）。有別於螢火蟲的冷光素以及冷光素酶早在1968年與1978年由科學家所解開，真菌的冷光素直到2015年才為人們所知，而第一個真菌冷光素酶的序列甚至是在2018年底才被解開。除此之外，產生的光波長在不同物種有些許不同，例如發光真菌



圖二、發光小菇 (*Mycena chlorophos* ; A和B) 及墾丁小菇 (*Mycena kentingensis* ; C和D) 展現淡綠色冷光的現象。(圖片來源：柯惠棉)



圖三、在錐形瓶裡面液態培養中的海洋弧菌屬 *Vibrio* 也展現散發冷光的現象。(圖片來源：柯惠棉)

大多是520-530 nm波長的綠光，細菌大約是490 nm，螢火蟲不同物種的波長從綠光到黃綠光（538-570 nm）都有。

發光蕈是什麼時候被發現的呢？古希臘哲學家亞里斯多德（Aristotle）以及古羅馬作家老普林尼（Pliny the Elder）曾經敘述過發光的木頭。但對當時的他們而言，看到發光的木頭是一種既夢幻又神秘的事情。直到了1954年，奧地利化學家 Johann Florian Heller 才首先確認了木頭發光的原因是裡頭真菌菌絲的傑作。

真菌界分類複雜，較為人所知的主要分為接合菌、子囊菌門（如釀酒酵母）跟擔子菌門。在十萬多種已知的真菌中，只有大約七十幾種具有發光特性，而且都是屬於擔子菌門中的傘菌目（Agaricales）。包括*Omphalotus* lineage當中的12個物種、*Armillaria* lineage裡面的10個物種，以及*Mycenoid* lineage裡面超過50個物種都會發光。至於這些發光的真菌，是不是來自相同祖先？至今仍是一個未解之謎。是否這些發光的真菌是源自於同一個祖先演化出來的，經過一段時間後，部分真菌物種喪失了發光的特性？抑或是這些真菌原本各自演化，但為了某種功能都演化出類似的發光系統？奇妙的是，不同物種發光的部位，不盡相同。譬如*Armillaria mellea*在生活史中只有菌絲體會發光，但是形成子實體之後並無。但是在臺灣常見的「發光小菇 *Mycena chlorophos*」則在菌絲體及子實體的蕈傘與蕈褶皆會發光，但蕈柄則較弱（圖二）。

由於發光小菇在臺灣的普遍性，目前臺灣發光小菇的採集記錄甚多，分佈在臺灣各地的枯竹上，這也是在日本常見的物種。這類發光蕈屬*Mycena*的物種，由於他們長成蕈狀的樣子，需要高溫高濕的環境，經常在5-9月下過雨的嘉義阿里山、新化國家植物園、屏東墾丁的竹林都可發現他們的蹤跡。而另一種「墾丁小菇*Mycena kentingensis*」數量則較少，在2014年才在臺灣南部的墾丁被發現，是其他國家沒有發現過的新物種！通常都會在夏季時，長在枯相思樹上，而非竹子。

至於其他的物種，由於種類繁多（全世界大約有五百多種），在真菌中的型態鑑定是有名的困難。近幾年高孝偉教授研究團隊根據型態及分子方法鑑定出臺灣新種晶瑩小菇（*Mycena jingyinga*）、鹿谷小菇（*Mycena luguensis*）及維納斯小菇（*Mycena venus*）。此外，我們實驗室利用了定序發光真菌全基因體的方式，致力於研究發光真菌的演化。取出亮與微弱或不亮的組織RNA，比較其轉錄體，找出表現程度不同的基因，來預測可能參與發光的機制。在其他國家則有不同的發光蕈，例如巴西常見的一種屬於臍菇屬（*Neonothopanus*）的真菌，直徑可以達九公分，亮度是發光真菌中較亮的。

既然提到了發光蕈演化的過程可能跟功能有關，接下來我們便想問：為何真菌要發光？為誰發光？生物做出一些吸引注意的特殊行為，目的就是要吸引異性，增加繁衍下一代的機會。那真菌發光的原因是否也跟這件事情有關

呢？

真菌為何發光？科學家目前提出的其中一個假說便是：發亮的子實體可以吸引昆蟲啃食並幫忙散播孢子。這個假說由科學家在巴西椰林中做了一個實驗來驗證。19個像蕈類形狀的假蕈，黏附在發出530 nm波長的LED燈上，模擬野生的*Neonothopanus gardneri*（屬於前述的*Omphalotus lineage*其中一員）所發出的光。對照組則是將另外19個假蕈所黏附的LED燈關掉。就這樣連續觀察五個夜晚。實驗的結果顯示，有LED燈照的假蕈吸引了六隻鞘翅目（對照組為零），17隻雙翅目（對照組為四）。發光真菌多生長在森林樹冠下，這裡鮮少有流動的風，藉由發光吸引昆蟲散播孢子，是個聰明的繁殖策略。雖然有以上的實驗佐證，但其他發光真菌物種是否也是為了吸引昆蟲而發光呢？畢竟有些發光蕈只有在無性世代的菌絲會發亮。所以其他物種發光原因仍有待釐清。

雖然發光蕈的演化及機制已有相當進展，但若能進一步探討，可望發掘出突破性的發現。例如應用於工業生產，開發出更亮更多顏色的冷光。相對於日光燈，冷光屬於很微弱的光，但是藉由基因工程，把冷光素酶蛋白表現在其他生物細胞內，讓生物持續製造此類的蛋白來增加亮度。再者，就尖端科技技術應用上，以冷光當作標記，不需激發就可偵測到光，因而能夠觀察活體細胞或是藉由冷光素酶接在啟動子後面，用於偵測轉錄的程度。此外，俄國的科學家，也開始利用改變冷光素的結構，與冷光素酶

反應之後，發出不同波長的光，讓發展生物冷光的應用更為廣泛。

多樣且複雜的真菌仍舊有許多未解之謎，藉由釀酒酵母的地理分佈及族群演化史，以及發光蕈的生態棲位及機制研究，期望更了解微生物在環境中扮演的重要角色，以及開發在改善人類生活的應用價值。

後記

沉酣於探索微生物在地球上的活動歷史，驚覺紛紛擾擾的世事，在演化的時間軸上，其實是如此渺小。

作者簡介



柯惠棉

中央研究院生物多樣性研究中心博士後研究學者。國立中興大學與中央研究院之微生物基因體學程博士。研究興趣為了解發光細菌及真菌在環境中如何求生。



蔡怡陞

中央研究院生物多樣性研究中心副研究員，英國帝國理工學院博士，三個小孩的爸。專長為遺傳及微生物基因體學跟洗奶瓶。喜歡臺灣的人、事、物，在實驗室角落研究並追尋迷人的微生物演化史。