

酵母菌 *Debarymyces hansenii* 不同菌株耐鹽 特性分析¹

趙秀滂²

摘 要

趙秀滂。酵母菌 *Debarymyces hansenii* 不同菌株耐鹽特性分析。台南區農業改良場研究彙 51：46-56。

早在 70 年代即自海水中發現 *D. hansenii*，該類酵母菌普遍存在日常生活環境中。*D. hansenii* 可生存在 24% NaCl 環境下，較 *Saccharomyces cerevisiae* 的耐鹽性高，但其耐鹽機制仍不清楚。本試驗將 *D. hansenii* 8 株不同來源的菌株進行耐鹽特性分析，以供作後續的研究利用。

關鍵詞：酵母菌、*Debarymyces hansenii*、耐鹽、菌株

接受日期：2009 年 4 月 14 日

前 言

早在 70 年代即自海水中發現 *D. hansenii*，該類酵母菌普遍存在日常生活環境中，除可在 cheese、milk、yogurt、ice-creams、jam、sausages 及 ham 等中被發現⁽¹⁴⁾外，還可以從水果、土壤及空氣中分離出⁽⁷⁾。*D. hansenii* 用於促進 cheese 與 sausages 表面的完熟、香味的產生及抑制表面微生物的生長⁽⁹⁾，在食品工業上有重要的地位。

D. hansenii 的生長適溫為 20 - 25°C，當溫度過高時，生長環境中的 Na⁺、K⁺ 及 sorbitol 可改善其生長⁽⁷⁾；*D. hansenii* 在 pH 3-11 的環境下藉由醱酵 glucose、galactose、sucrose、maltose、raffinose 及 trehalose 等醣類，作為能量的來源，但無法醱酵 lactose⁽⁸⁾。

1. 行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 346 號。

2. 台南區農業改良場義竹工作站助理研究員。嘉義縣義竹鄉中平村 84 號。

Turk 等人(2007)分析 *D. hansenii*，細胞膜組成分 sterol/phospholipid 比值，發現在高鹽分逆境下，不飽和脂肪酸較高，但對細胞膜的 fluidity 並無顯著性的影響，細胞內會累積 glycerol⁽¹⁰⁾ 和 arabinitol⁽¹¹⁾，這兩種 polyhydroxyalcohols 可調節滲透壓，而且是相容溶質(compatible solutes) 扮演保護可溶解性和細胞膜上的蛋白(soluble and membrane proteins)，發揮逆境滲透壓調節者(osmoregulator) 的功能。此外在不同細菌發現 glutamate 扮演滲透保護(osmoprotection)的角；Alba-Lois 等人(2004) 亦發現 *D. hansenii* 在含 1 M NaCl 的培養基下培養時，其 NADP-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) 含量提高 5 倍，可以藉以消除高鹽逆境對 NADP-GDH 酵素的抑制作用。

Larsson and Gustafsson (1987)指出 *D. hansenii* 在鹽分逆境下，其細胞具有調節甘油含量及代謝甘油，以維持細胞正常生長的能力；Andre 等人(1988)更提出當 *D. hansenii* 在鹽分逆境下，其細胞內甘油的累積量，會隨著鹽分逆境的增加而提高；在高鹽分逆境下，可在短時間內迅速累積甘油的量，以抵抗鹽分逆境造成的細胞傷害。高鹽分逆境下酵母菌甘油之合成主要受到 NAD⁺-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺-GPD) 之調控⁽¹⁹⁾。所以 *D. hansenii* 在鹽分逆境下可以產生許多調節滲透壓的物質。

D. hansenii 在高鹽分逆境下，引發兩種主要訊息傳遞路徑，以利在高鹽環境下生存：HOG pathway 和 Calcium-dependent signal pathway。HOG pathway 是藉著調控細胞中 glycerol 濃度以對抗鹽逆境；Bansal 和 Mondal(2000)指出 *D. hansenii* 中的 *HOG* gene 與 *S. cerevisiae*、*C. albicans*、*Zygosaccharomycesrouxi* 之 *HOG* genes 具有高度相似性。因為 *HOG1* 基因 encode MAP kinase 可以維持細胞中水分的穩定。所以當細胞處於高滲透壓環境時，細胞膜上的 sensor 接受到訊息，引發一連串的訊息傳遞以活化 *HOG*，以調控滲透壓的反應⁽¹¹⁾。Calcium-dependent signal pathway 中 Calcineurin 蛋白是一種 Ca²⁺- calmodulin 具有 phosphatase 活性。在高鹽的環境下 Calcineurin 會去除磷酸根及活化轉錄因子促使 *ENA1* 表現量增加；*ENA1* encode Na⁺-ATPase，再促使 Na⁺ 離子由細胞中排除，以增加其耐鹽性⁽¹⁸⁾。

本試驗以 *D. hansenii* 為供試材料，探討酵母菌 *D. hansenii* 不同菌株耐鹽特性分析，未來更可進一步選殖與鹽分逆境有關的基因。

材料與方法

酵母菌材料

酵母菌 *Debaryomyces hansenii* 菌株 BCRC No.21711、21941、21944、21945、21947、22244、22566 及 22568 等 8 株，購自新竹市財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

酵母菌 *D. hansenii* 不同菌株耐鹽特性分析

(一)活化菌株

將冷凍乾燥保存的菌株在無菌環境下進行開管，其操作方式為：以沾有 70%酒精的棉花，擦拭外管，在火焰上加熱外管之尖端，之後滴上無菌水於加熱處，以使外管破裂，再以硬棒敲破尖端。取出隔熱纖維紙和內管，再以鑷子取出內管之棉塞。吸取 500 μ l 無菌

水，滴入內管內，待乾燥粉末溶解後，吸取滴入約 5 mL 無菌水之試管內，輕微震盪使其均勻後，靜置 60 分鐘。再吸取 100 μ l 菌體懸浮液接種於 YM11 固體培養基(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose)，做劃線分離培養，以活化菌株；再經過兩次繼代培養，確定菌種生長正常後，挑選單一菌落進行後續的試驗。

酵母菌 *D. hansenii* 耐鹽特性分析

(一) 菌株耐鹽特性分析

將 8 株活化後的酵母菌菌株，分別挑選單一菌落培養於 50 mL YM11 液體培養基，耐鹽處理為添加 1.5 M 氯化鈉與 2.3 M 氯化鈉至 YM11 培養基，無氯化鈉為對照，菌液置於 24°C/200 rpm 培養，每隔 2 小時取樣 1 mL 以 spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham, U.S.A.) 測定其 O.D. 640 值。

測定時將菌液離心倒除上清液後加入 1 mL 無菌的純水，懸浮後再離心倒除上清液，以去除殘留的可溶性物質，再將菌體懸浮於 1 mL 水中測定 O.D. 640 值。

(二) *D. hansenii* BCRC No.21947 菌株耐鹽特性分析

挑取 *D. hansenii* BCRC No.21947 菌株單一菌落接種於 50 mL 的 YM11 液體培養基，置於 24°C/200 rpm 培養 20 小時後，將菌液稀釋 1x、10x、100x 及 200x 後，各吸取 2 μ l 接種含 2.5 M、3.0 M 及 3.5 M 氯化鈉之 YM11 固體培養基，觀察菌落生長。

結果與討論

將 8 株活化後的酵母菌菌株，分別挑選單一菌落培養於 50 ml 的 YM11 液體培養基，耐鹽處理為添加 1.5 M 氯化鈉與 2.3 M 氯化鈉至 YM11 培養基，無氯化鈉為對照，置於 24°C/200 rpm 培養，其生長曲線如圖一 A-D。No.21711 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長呈現快速期，直至 20 小時後生長才進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，開始呈現緩慢生長，直至 20 小時後生長才達快速期，但時間短暫隨即在 24 小時後生長進入平緩期。No.21941 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長均呈現快速期，在 14 小時後生長又呈現另一個快速期，直至 24 小時後生長方進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，一直呈現緩慢生長，並無顯著之生長快速期表現，在 22 小時後生長進入平緩期。

No.21944 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長呈現快速期，直至 20 小時後生長才進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，開始呈現緩慢生長，直至 18 小時後生長才達快速期，但時間短暫隨即在 24 小時後生長進入平緩期。No.21945 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長均呈現快速期，在 14 小時後生長又呈現另一個快速期，直至 24 小時後生長方進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，一直呈現緩慢生長，並無顯著之生長快速期表現，在 22 小時後生長進入平緩期。

No.21947 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長呈現快速期，直至 18 小時後生長才進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，開始呈現生長快速期，直至 24 小時後生長方進入平緩期。No.22244 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長均呈現快速期，在 14 小

時後生長進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，一直呈現緩慢生長，直至 18 小時後方有生長快速期表現，但在 24 小時後生長進入平緩期。

No.22566 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長均呈現快速期，直至 18 小時後生長方進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，開始一直呈現緩慢生長，生長快速期表現不明顯，而在 22 小時後生長進入平緩期。No.22568 在正常之 YM11 液體培養基及含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，8 小時後生長均呈現快速期，直至 20 小時後生長方進入平緩期；但在含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，一直呈現緩慢生長，並無顯著之生長快速期表現，在 22 小時後生長進入平緩期。

供試之 8 株菌株培養在正常之 YM11 液體培養基下，除了菌株 No.21947 開始即呈現快速生長外，其餘均在 8 小時後呈現快速生長，而生長進入平緩期的時間，隨菌株而異；菌株 No.21947 的菌數濃度其 O.D. 640 吸光值可達 2.5，其餘菌株其 O.D. 640 吸光值在 2.0-2.5 之間。另外接種於含 1.5 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，其生長曲線與接種於正常之 YM11 液體培養基相同，除了菌株 No.21947 開始即呈現快速生長外，其餘均在 8 小時後呈現快速生長，而生長進入平緩期的時間，隨菌株而異；菌株 No.21947 的菌數濃度其 O.D. 640 吸光值可達 2.5，其餘菌株其 O.D. 640 吸光值均維持在 1.5-2.3 之間。而接種於含 2.3 M 氯化鈉之 YM11 液體培養基，除了菌株 No.21947 在 20 小時內生長較其他菌株快速，在 25 小時後才進入生長平緩，其生長表現特別外，其餘菌株均在 20 小時內其呈現生長緩慢，而且其生長快速期短暫，迅速進入平緩生長。顯示 No.21947 菌株其耐鹽特性之表現較其他菌株不同，故選用該菌株做為後續研究之材料。

將培養之 *D. hansenii* BCRC No.21947 菌株的菌液予以序列稀釋後，接種含 2.5 M、3.0 M 及 3.5 M 氯化鈉的 YM11 固體培養基，其菌落生長結果如圖二，在含 2.5 M 氯化鈉之 YM11 固體培養基均可正常生長，而且菌落外觀無明顯差別；而在含 3.0 M 氯化鈉的 YM11 固體培養基，只有在菌液稀釋 1 倍與 10 倍的呈現生長正常，稀釋 100 倍及 200 倍雖然可以生長，但是菌落生長表現較稀釋 1 倍與 10 倍的差；另外接種在含 3.5 M 氯化鈉的 YM11 固體培養基，均無法正常生長。顯示酵母菌 *D. hansenii* BCRC No.21947 其最高忍受氯化鈉濃度介於 3.0 M-3.5 M 之間。*D. hansenii* 最早是在海水中被發現⁽¹⁴⁾，其耐鹽機制與酵母菌 *S. cerevisiae* 不同，Lages 等人(1999)指出 *D. hansenii* 為耐鹽酵母菌，而且由不同的寄主來源分離出的 strains，其耐鹽能力亦不同，與本試驗結果相同。

根據 Almagro 等人(2001) 的研究指出，*D. hansenii* 採用 includer 方式，將細胞中 Na⁺離子累積於液胞中，所以大量的 Na⁺不會造成毒害⁽¹⁵⁾，可忍受環境高達 24%的鹽分；但 *S. cerevisiae* 採用 excluder 之方式，將 Na⁺離子排出細胞外，所以細胞內不會累積大量 Na⁺離子，只可忍受高達環境 10%的鹽分。此外 *D. hansenii* 在適量 Na⁺離子環境中，可以增加其生長⁽³⁾，改善 K⁺離子吸收⁽¹⁵⁾，還可抵抗溫度逆境⁽³⁾。所以 *D. hansenii* 是利用降低高 Na⁺離子造成的毒害，使其能在高鹽分的逆境下生存。雖然目前對其相關機制尚不清楚，但 *D. Hansenii* 仍是做為研究真核生物耐鹽機制的模式生物⁽¹⁶⁾。

D. hansenii 的基因體已解序完成，越來越多與高鹽分逆境相關的基因已被選殖出，包含 *DhKHA1*、*DhNHA1*、*DhGDP1* and *DhGPP2* 其功能與 Na⁺ transporter 有關，*DhTRK1* and *DhHAK1* 與 K⁺ transporter 有關，*DHAL2*、*DhENA1* and *DhENA2* 與 ATPase Pump 有關，*DhARO4*、*DhGDH* and *DhGLN1*、*DhALK1* and *DhALK2* 與胺基酸的合成有關，*DhGPD1* 和 *DhHOG1* 與膨壓有關。當生物面對環境逆境時，除改變行為模式，生物的基因亦受到調控以延續生命，所以當

生物對於逆境的反應為生理與發育的改變。Kang 等人(1998)根據基因表現的差異性指出可用 subtractive hybridization、differential RNA display (DDRT-PCR)、RNA fingerprinting by arbitrarily primer PCR、representational difference analysis、serial analysis of gene expression、electronic subtraction 及combinatorial gene matrix analysis等方式，選殖與分析不同處理後表現量差異的基因，這些方法各具優缺點，且適用對象範圍亦不相同。所以可以 *D. hansenii* 作為材料，利用不同的選殖方法，選殖該酵母菌在鹽分逆境下所誘導的基因。

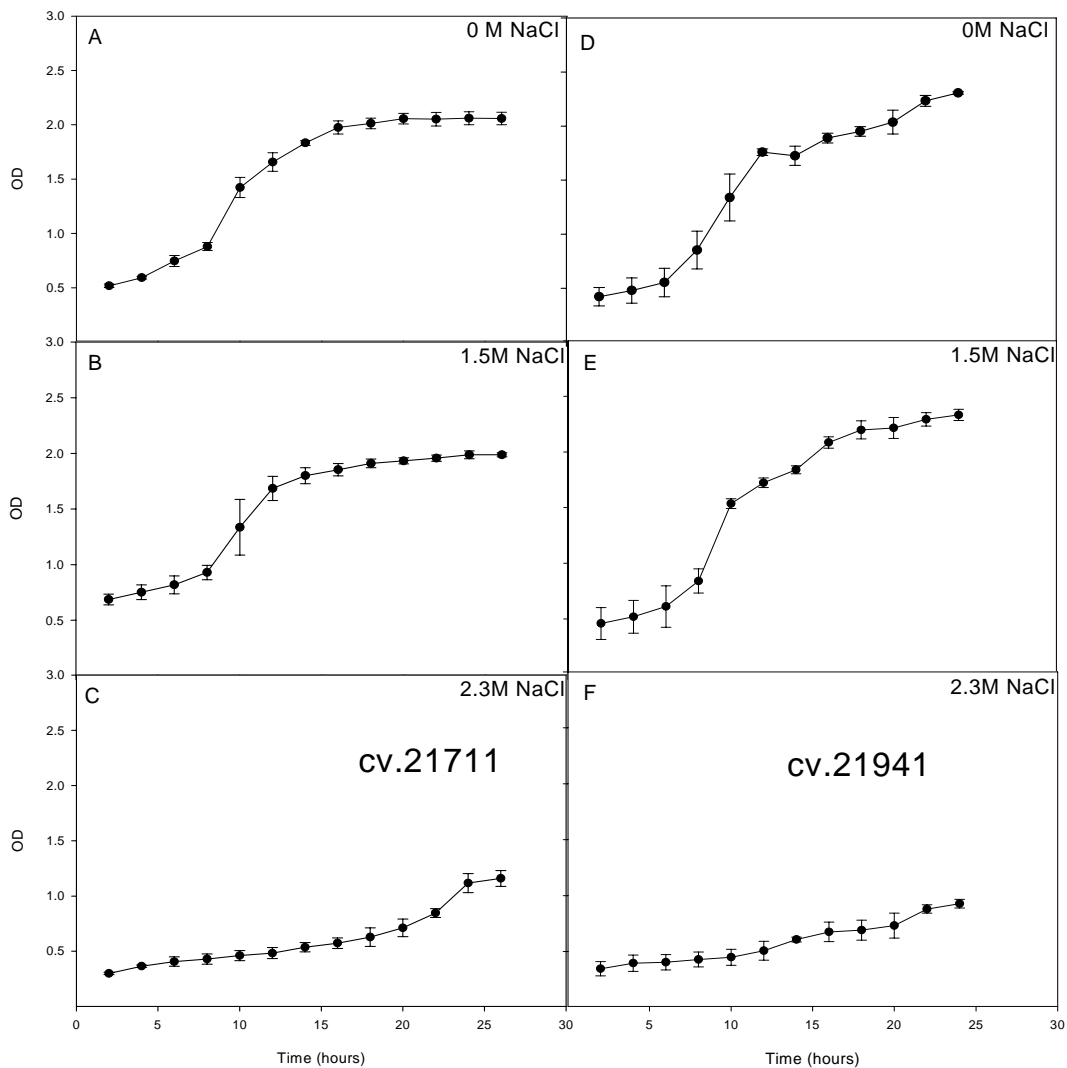


Fig.1-A. The growth curve of *D.hansenii* cv.21711 and 21941 under different salt concentrations.

* A-C: 21711

* D-F: 21941

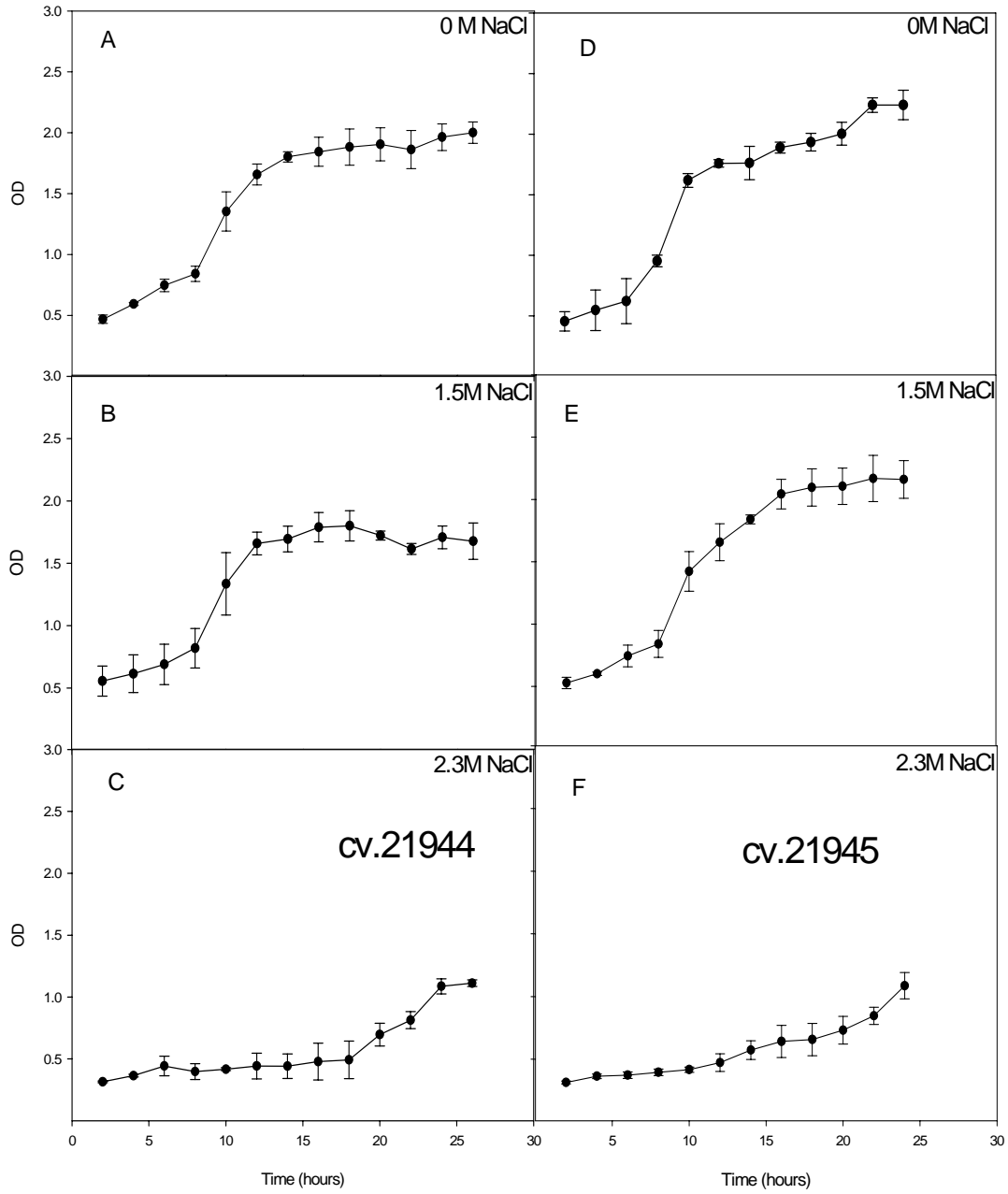


Fig.1-B. The growth curve of *D.hansenii* cv.21944 and 21945 under different salt concentrations.

* A-C: cv. 21944

* D-F: cv. 21945

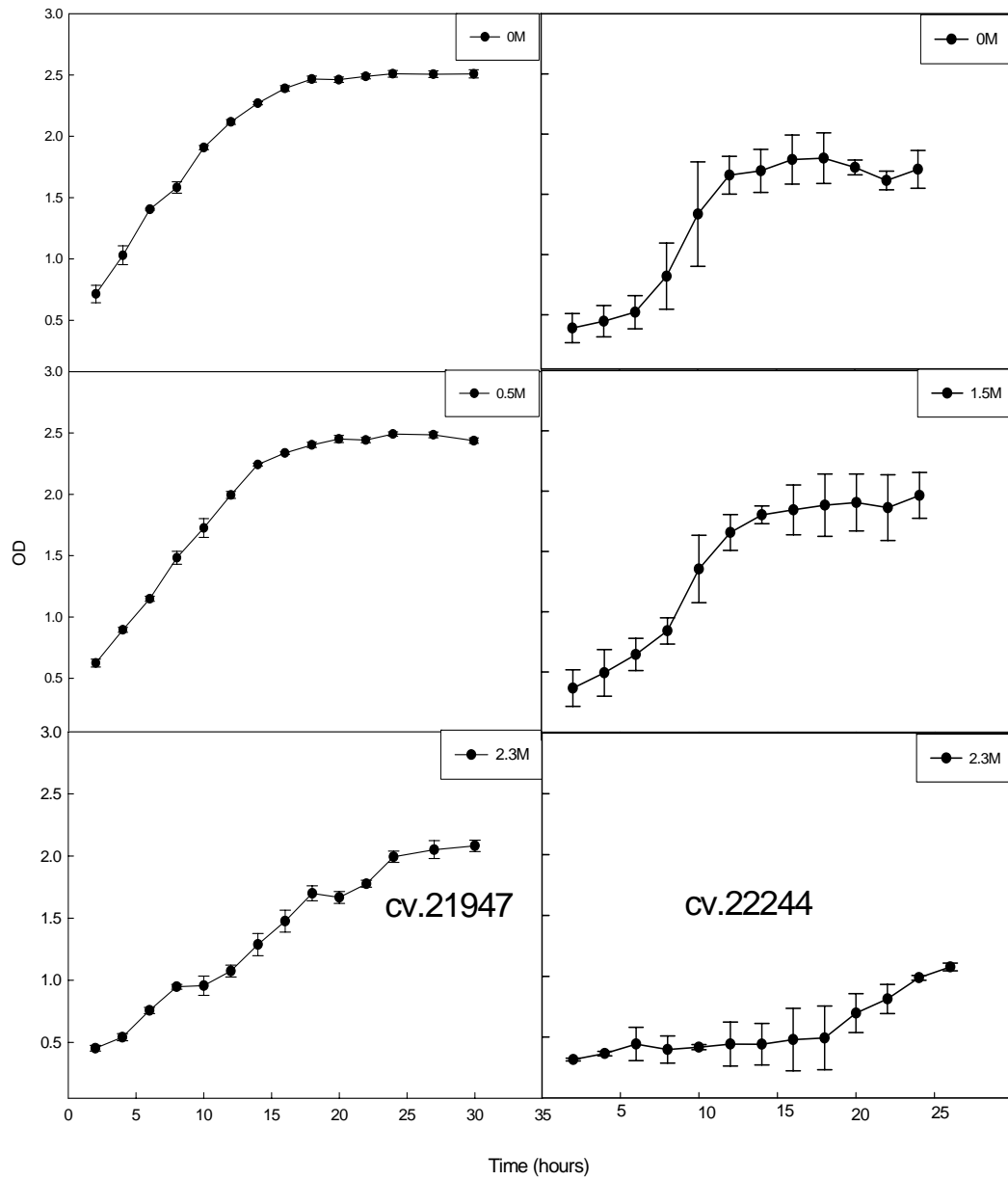


Fig.1-C.The growth curve of *D.hansenii* cv.21947 and 22244 under different salt concentrations.

* A-C: cv.21947

* D-F: cv.22244

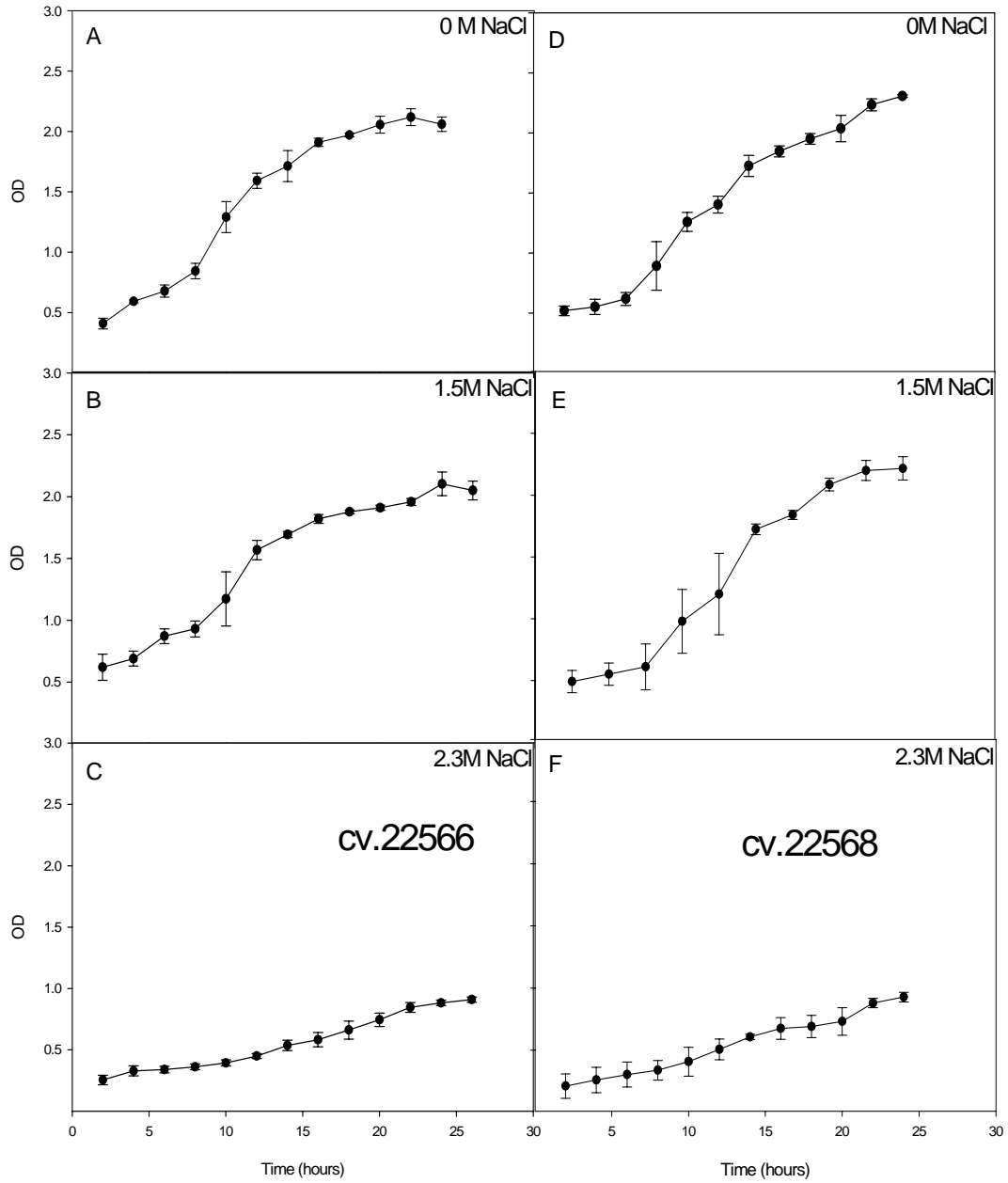


Fig.1-D. The growth curve of *D.hansenii* cv.22566 and 22568 under different salt concentrations.

* A-C: 22566

* D-F:22568

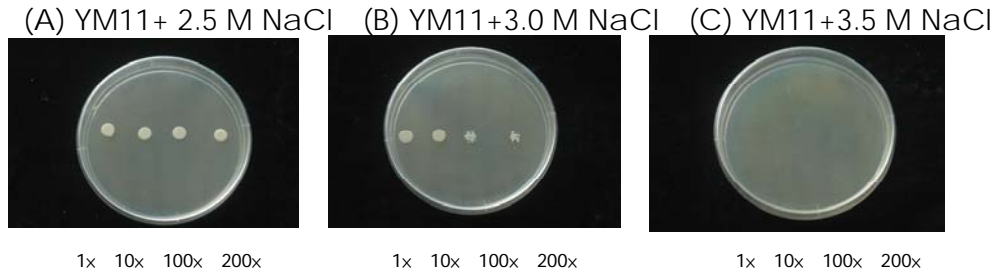


Fig.2. The *D. hansenii* BCRC No.21947 under different salt concentration.

引用文獻

1. Adler, L., and L.Gustafsson.1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch.Microbiol.124:123-130.
2. Alba-Lois, L, Segal C, Rodarte B, Valdés-López V, DeLuna A, Cárdenas R. 2004. NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Curr Microbiol.48(1):68-72.
3. Almagro A, Prista C, Castro S, Quintas C, Madeira-Lopes A, Ramos J, Loureiro-Dias MC.2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. Int J Food Microbiol. 56(2-3):191-197.
4. Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J.2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the alt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J Bacteriol 183:3251 - 3255.
5. Andre L, Nilsson A & Adler L.1988. The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *ebaryomyces hansenii*. J Gen Microbiol 134: 669 - 677.
6. Bansal PK, Mondal AK.2000. Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1* Delta strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 16(1):81-88.
7. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D.2000.Yeasts: characteristics and identification, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
8. Breuer U, Harms H.2006.*Debaryomyces hansenii*--an extremophilic yeast with biotechnological potential. Yeast. 23(6):415-37.
9. Eliskseslechner F, Ginzinger W. 1995. The yeast flora of surfaceripened cheeses. *Milchwissenschaft* 50: 458 - 462.

10. Gustafsson L, Norkrans B. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. Arch Microbiol. 110(23):177-83.
11. Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev. 66(2):300-72.
12. Kang SW, Baines IC, Rhee SG. 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. J Biol Chem. 273(11):6303-11.
13. Larsson C, Gustafsson L. 1987. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. Arch Microbiol. 147(4):358-63.
14. Onishi, H. 1963. Osmophilic yeasts. Advances in Food Research. 12:53-94.
15. Prista C, Almagro A, Loureiro Dias MC & Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. Appl Environ Microbiol 63: 4005 – 4009.
16. Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J. 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res. 5(8):693-701.
17. Papouskova K, Sychrova H. 2007. The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. Int J Food Microbiol. 118(1):1-7.
18. Ruiz A, Yenush L, Ariño J. 2003. Regulation of ENA1 Na(+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. Eukaryot Cell. 2(5):937-48.
19. Thomé PE, Trench RK. 1999. Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. Mar Biotechnol (NY). 1999 May;1(3):230-238.
20. Turk M, Montiel V, Zigon D, Plemenitas A, Ramos J. 2007. Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. Microbiology. 2007.153(Pt 10):3586-3592.

The Salt Tolerance Analysis from *Debaryomyces* *hansenii* Different Strains¹

Chao, H. F².

Summary

In early 1970s, *D. hansenii* was found and extracted from ocean water. *D. ansenii* exists almost everywhere in our daily lives. *Debaryomyces hansenii* is capable of surviving in a 24% NaCl environment and is more salt-resistant than *Saccharomyces cerevisiae*; however, the salt resistance mechanisms of *Debaryomyces hansenii* remain unclear. The objective of this research is to investigate 8 strains salt tolerance from different sources for future study.

Key words : yeast, *Debaryomyces hansenii* , salt tolerance, strain

Accepted for publication : 14 May,2009

1. Contribution No.346 from Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture.

2. Assistant researcher, Yichu Branch Station of Tainan, DAIS, 84, Chungpin, Yichu, Chiayi County, Taiwan, R.O.C.