

ความหลากหลายของยีสต์ที่แยกได้จากดอกไม้หอม และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

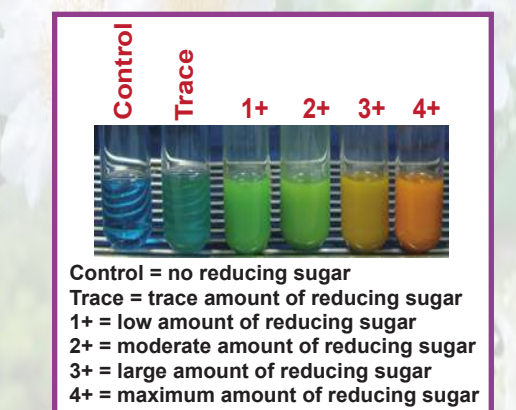
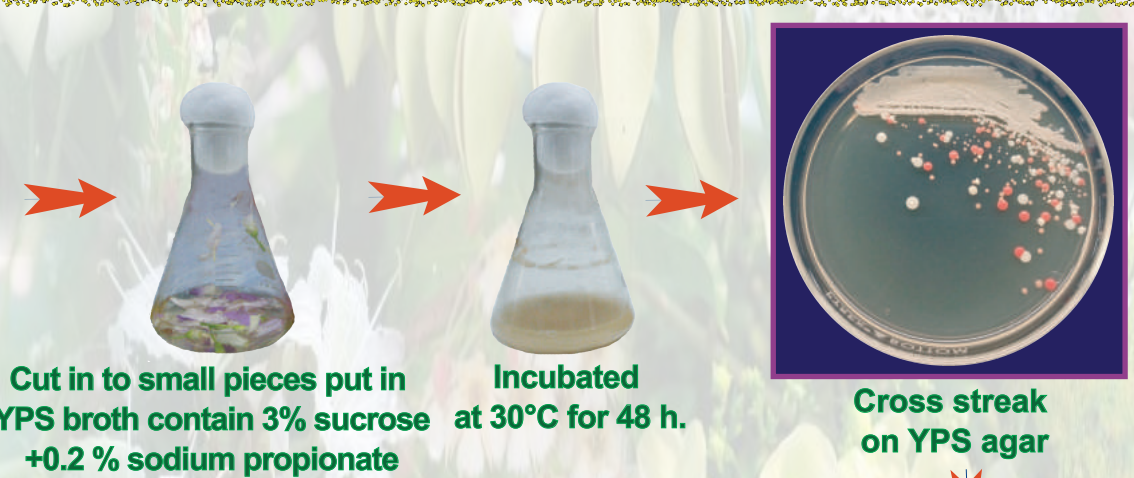


เขมมาก เกตศก หน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์
ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง

ในดอกไม้มีน้ำหวาน ดอกไม้จึงถือเป็นแหล่งอาศัยของยีสต์ที่ดีแหล่งหนึ่งในการค้นหายีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เอนไซม์อินเวอร์เทส ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากดอกไม้หอมและความสามารถในการสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยนำตัวอย่างดอกไม้หอมจำนวน 74 ชนิด จากศูนย์เรือนรัฐสวนไม้หอม ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม มาคัดแยกเชื้อยีสต์ด้วยวิธี enrichment โดยใช้อาหารเหลว YPS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 3% เป็นแหล่งคาร์บอน เต็มคลอแรมพีนิคอลล 0.02% และโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025% สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 387 ไอโซเลท และจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์ 315 ไอโซเลท (81.4%) เป็นยีสต์ที่ทราบสปีชีส์ (known species) ในกลุ่มแอสโคไมซิติสยีสต์



Collect 74 fragrant flowers from the Fragrant Flower Garden

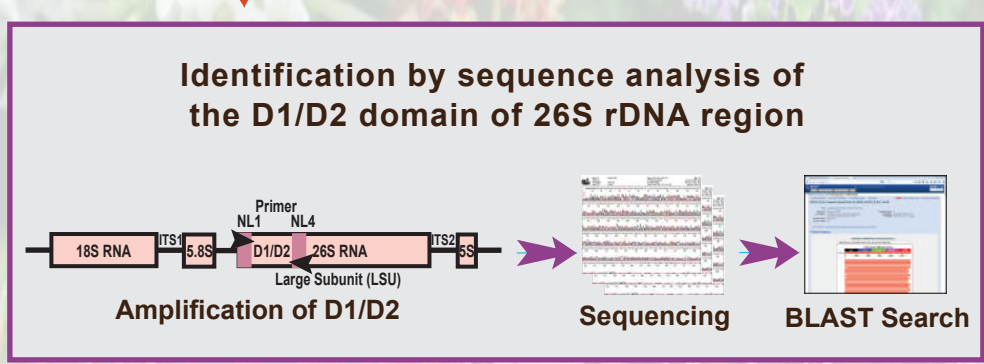


Primary screening for invertase activity by Benedict's test

Invertase assay
- Intracellular & Extracellular according to procedures described by Milintawisamai et al. (2008)
- Reducing sugar were estimated by the method of Somogyi-Nelson (1952)
- The protein content was estimated by the method of Lowry (1951)



Pure yeast cultures



จำนวน 283 ไอโซเลท ใน 26 สปีชีส์ 13 สกุล คือ *Candida*, *Clavispora*, *Cyberlindnera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Kodamaea*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Pichia*, *Starmerella* และ *Yamadazyma* ส่วนอีก 32 ไอโซเลท เป็นแอสโคไมซิติสยีสต์ใน 8 สปีชีส์ 7 สกุล คือ *Cryptococcus*, *Jaminalia*, *Moesziomyces*, *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Sympodiomyopsis* และ *Ustilago* นอกจากนี้ยีสต์อีก 72 ไอโซเลท (18.6%) ที่คาดว่าอาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (novel species) ใน 10 สกุล คือ *Candida*, *Kodamaea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Starmerella*, *Torulaspora*, *Kalmanozyma*, *Moesziomyces*, *Moniliella* และ *Trichosporon* จากการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายของยีสต์สูงโดยสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วส่วนใหญ่อยู่นอกสกุล *Candida* และสปีชีส์ที่พบเป็นจำนวนมากคือ *Kodamaea ohmeri* (62.1%) (ตารางที่ 1)

เมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้งหมด 387 ไอโซเลท มาคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสเบื้องต้นด้วยวิธี Benedict's test พบว่าสามารถคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสมีปริมาณเอนไซม์มาก (4+) จำนวน 10 ไอโซเลท แล้วนำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ไปตรวจหา กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสชนิดภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ พบว่ายีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส และพบอยู่ที่ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ โดยมีกิจกรรมของ เอนไซม์อินเวอร์เทสชนิดภายในเซลล์ (0.14-3.0 U/mg) สูงกว่า ภายนอกเซลล์ (0.02-0.3 U/mg) โดยยีสต์ *Moesziomyces aphidis* S2/4-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสชนิด ภายในเซลล์สูงที่สุด (3.0 U/mg) (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามจะ ทำการศึกษาขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพแวดล้อม ที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสรวมทั้งศึกษา ปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสต่อไป

Table 1 Identification of yeast strains isolated from fragrant flowers and their GenBank accession numbers of the D1/D2 region of LSU rRNA gene and their frequency of occurrence.

Species	Genus or Clade	No. of total strain	Closest species and Accession number	Nucleotide substitution to closest species	Nucleotide identity in D1/D2 domain (%)
Ascomycetous yeast					
<i>Candida</i>					
<i>Candida chanthaburiensis</i>	<i>Clavispora/Candida</i>	14	<i>Candida chanthaburiensis</i> EM33 ^T (AB500861)	0	99.6%
<i>Candida conglobata</i>	<i>Yamadazyma/Candida</i>	9	<i>Candida conglobata</i> NRRL Y-1504 ^T (U45789)	1	99.4%
<i>Candida floricola</i>	<i>Starmerella/Candida</i>	2	<i>Candida floricola</i> CBS 7289 ^T (U45710)	2	99.1%
<i>Candida floricola</i>	<i>Starmerella/Candida</i>	8	<i>Candida floricola</i> CBS 7289 ^T (U45710)	2	98.9%
<i>Candida naeodendra</i>	<i>Yamadazyma/Candida</i>	4	<i>Candida naeodendra</i> CBS 6032 ^T (U45759)	4	98.8%
<i>Candida nivariensis</i>	<i>Nakaseomyces/Candida</i>	16	<i>Candida nivariensis</i> CBS 10161 ^T (EF056323)	1-2	99.2-99.4%
<i>Candida potacharoeniae</i>	<i>Starmerella/Candida</i>	3	<i>Candida potacharoeniae</i> ST-490 ^T (AB537430)	0	99.8%
<i>Candida restingae</i>	<i>Kodamaea/Candida</i>	6	<i>Candida restingae</i> CBS 8493 ^T (AF059667)	0	99.6%
<i>Candida sakaeensis</i>	<i>Candida/Lodderomyces</i>	1	<i>Candida sakaeensis</i> LM078 ^T (AB617978)	0	99.8%
<i>Candida stellimalicola</i>	<i>Starmerella/Candida</i>	1	<i>Candida stellimalicola</i> NRRL Y-17912 ^T (EF550286)	2	98.9%
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida/Lodderomyces</i>	7	<i>Candida tropicalis</i> NRRL Y-12968 ^T (U45749)	0	99.8%
<i>Candida uthalhanina</i>	<i>Nakaseomyces/Candida</i>	2	<i>Candida uthalhanina</i> DD-22-1 ^T (AB588752)	1	99.6%
<i>Clavispora</i>					
<i>Clavispora lusitanae</i>	<i>Clavispora</i>	1	<i>Clavispora lusitanae</i> CBS 6936 ^T (AJ539551)	0	99.8%
<i>Cyberlindnera</i>					
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>Cyberlindnera</i>	1	<i>Cyberlindnera fabianii</i> NRRL Y-1871 ^T (EF550321)	2	99.3%
<i>Cyberlindnera rhodanensis</i>	<i>Cyberlindnera</i>	6	<i>Cyberlindnera rhodanensis</i> NRRL Y-7854 ^T (EF550325)	1	99.1%
<i>Hanseniaspora</i>					
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Hanseniaspora</i>	20	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> NRRL Y-1625 ^T (U84230)	0	99.6-99.8%
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<i>Hanseniaspora</i>	5	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> CBS 8733 ^T (AJ512453)	0	99.6%
<i>Kluyveromyces</i>					
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces</i>	2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-8281 ^T (U94924)	0	99.6%
<i>Kodamaea</i>					
<i>Kodamaea kakaduensis</i>	<i>Kodamaea</i>	1	<i>Kodamaea kakaduensis</i> UWOPS 98-119.2 ^T (AF092279)	0	99.7%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea</i>	90	<i>Kodamaea ohmeri</i> CBS 5367 ^T (GU597323)	0-1	99.2-99.8%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea</i>	2	<i>Kodamaea ohmeri</i> CBS 5367 ^T (GU597323)	2	98.9%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea</i>	6	<i>Kodamaea ohmeri</i> CBS 5367 ^T (GU597323)	9	97.6%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Kodamaea</i>	1	<i>Kodamaea ohmeri</i> CBS 5367 ^T (GU597323)	102	74.9%
<i>Lachancea</i>					
<i>Lachancea fermentati</i>	<i>Lachancea</i>	1	<i>Lachancea fermentati</i> NRRL Y-1559 ^T (U84239)	0	99.8%
<i>Metschnikowia</i>					
<i>Metschnikowia cibodasensis</i>	<i>Metschnikowia</i>	1	<i>Metschnikowia cibodasensis</i> ID03-0093 ^T (AB236910)	0	99.8%
<i>Metschnikowia koreensis</i>	<i>Metschnikowia</i>	56	<i>Metschnikowia koreensis</i> KCTC 7998 ^T (AF296438)	0-2	99.2-99.8%
<i>Metschnikowia koreensis</i>	<i>Metschnikowia</i>	4	<i>Metschnikowia koreensis</i> KCTC 7998 ^T (AF296438)	2	98.9%
<i>Metschnikowia koreensis</i>	<i>Metschnikowia</i>	2	<i>Metschnikowia koreensis</i> KCTC 7998 ^T (AF296438)	85	81.5%
<i>Meyerozyma</i>					
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Meyerozyma</i>	2	<i>Meyerozyma caribbica</i> Y-27274 ^T (AY187283)	0	100%
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma</i>	13	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> Y-2075 ^T (U45709)	4	99.1-99.3%
<i>Millerozyma</i>					
<i>Millerozyma koratensis</i>	<i>Millerozyma</i>	1	<i>Millerozyma koratensis</i> ST-237 ^T (DQ404484)	0	99.8%
<i>Pichia</i>					
<i>Pichia bruneiensis</i>	<i>Candida</i>	3	<i>Pichia bruneiensis</i> 11-485 ^T (JQ692181)	4	98.7%
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Pichia</i>	18	<i>Pichia kudriavzevii</i> Y-5396 ^T (EF550222)	2-3	99.1-99.5%
<i>Pichia piliperi</i>	<i>Wickerhamomyces</i>	3	<i>Pichia piliperi</i> NRRL YB-4309 ^T (EF550335)	6	98.4%
<i>Starmerella</i>					
<i>Starmerella meliponinorum</i>	<i>Starmerella</i>	2	<i>Starmerella meliponinorum</i> CBS 9117 ^T (KJ630492)	2	99.1%
<i>Starmerella caucasica</i>	<i>Starmerella</i>	1	<i>Starmerella caucasica</i> 11-1071.1 ^T (JX112043)	12	97.2%
<i>Torulaspora</i>					
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulaspora</i>	1	<i>Torulaspora delbrueckii</i> Y-866 ^T (U72156)	5	98.5%
<i>Yamadazyma</i>					
<i>Yamadazyma mexicana</i>	<i>Yamadazyma</i>	3	<i>Yamadazyma mexicana</i> CBS 7060 ^T (U45797)	0	100%
Total 32 species, 14 genera, 319 isolates					
Basidiomycetous yeast					
<i>Cryptococcus</i>					
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Papillotrema</i>	1	<i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 ^T (AF075469)	1	99.5%
<i>Jaminalia</i>					
<i>Jaminalia angkorensis</i>	<i>Jaminalia</i>	3	<i>Jaminalia angkorensis</i> C5b ^T (EU587489)	1	99.3%
<i>Kalmanozyma</i>					
<i>Kalmanozyma brasiliensis</i>	<i>Kalmanozyma</i>	3	<i>Kalmanozyma brasiliensis</i> GHG001 ^T (KF737866)	5	98.7%
<i>Moesziomyces</i>					
<i>Moesziomyces aphidis</i>	<i>Moesziomyces</i>	19	<i>Moesziomyces aphidis</i> CBS 517.83 ^T (AB089363)	2	99.2-99.4%
<i>Moesziomyces aphidis</i>	<i>Moesziomyces</i>	1	<i>Moesziomyces aphidis</i> CBS 517.83 ^T (AB089363)	5	98.7%
<i>Moesziomyces aphidis</i>	<i>Moesziomyces</i>	3	<i>Moesziomyces aphidis</i> CBS 517.83 ^T (AB089363)	6	97.9%
<i>Moesziomyces parantarcticus</i>	<i>Moesziomyces</i>	2	<i>Moesziomyces parantarcticus</i> CBS 10005 ^T (AB089357)	0	99.6%
<i>Rhodospordiobolus</i>					
<i>Rhodospordiobolus azoricus</i>	<i>Rhodospordiobolus</i>	1	<i>Rhodospordiobolus azoricus</i> IGC 5062 ^T (AF321977)	0	100%
<i>Rhodotorula</i>					
<i>Rhodotorula paludigena</i>	<i>Rhodotorula</i>	1	<i>Rhodotorula paludigena</i> CBS 6566 ^T (AF363640)	0	99.5%
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	<i>Rhodotorula</i>	10	<i>Rhodotorula taiwanensis</i> BCRC23118 ^T (GU646863)	1	99.6%
<i>Sympodiomyopsis</i>					
<i>Sympodiomyopsis paphiopedilii</i>	<i>Sympodiomyopsis</i>	6	<i>Sympodiomyopsis paphiopedilii</i> CBS7429 ^T (AF190005)	1	99.5%
<i>Trichosporon</i>					
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Trichosporon</i>	6	<i>Trichosporon asahii</i> CBS 2479 ^T (EU559350)	1	98.9%
<i>Moniliella</i>					
<i>Moniliella megachiliensis</i>	<i>Moniliella</i>	4	<i>Moniliella megachiliensis</i> CBS 190.92 ^T (EF137916)	13	97.1%
<i>Ustilago</i>					
<i>Ustilago siamensis</i>	<i>Ustilago</i>	8	<i>Ustilago siamensis</i> CBS 9960 ^T (AB117963)	0	99.6%
Total 12 species, 10 genera, 68 isolates					

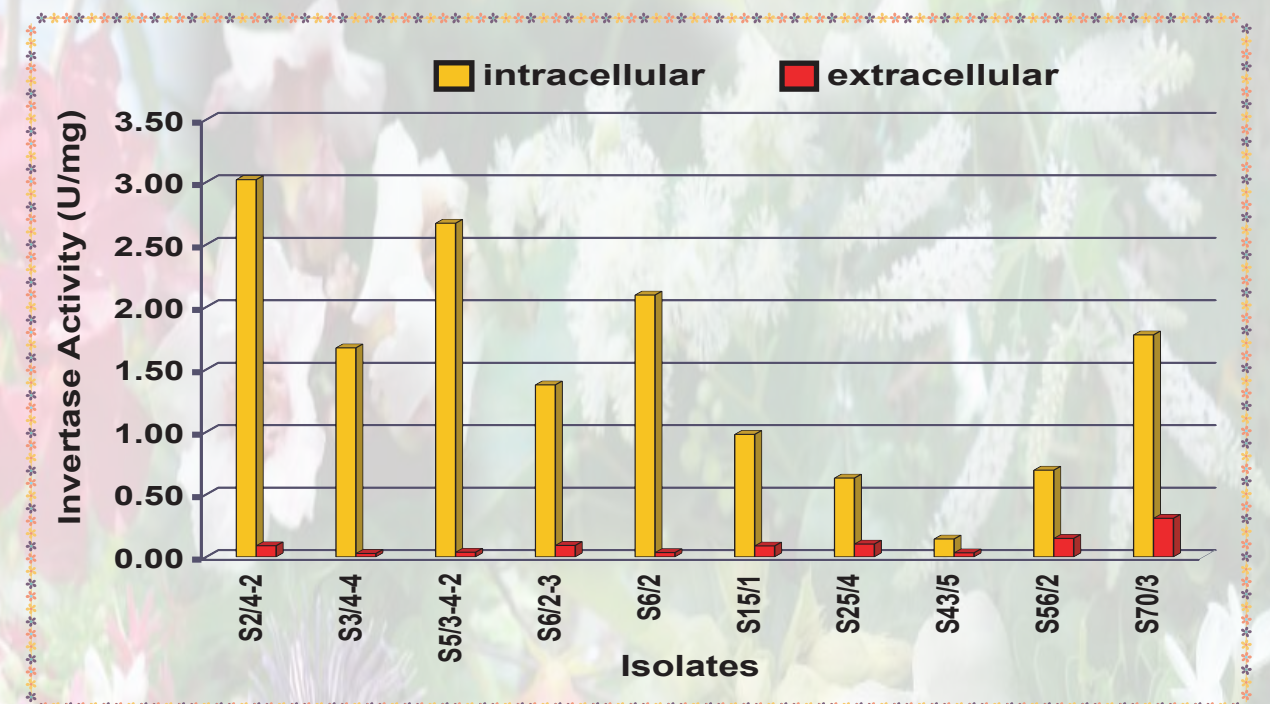


Figure 1 Intracellular and extracellular invertase activity of 10 yeast strains from fragrant flowers.

REFERENCES
Kerdkhong, C., M. Tantirungkij and O. Choutragoon. 2016. Diversity of yeasts isolated from fragrant flowers and their invertase activity. p. 131. In The Abstracts of The 42nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT 42). 30 November-2 December, Centara grand at Central plaza Ladprao, Bangkok.
Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
Milintawisamai, N., S. Promputta and S. Niamsanit. 2008. Isolation of microorganisms exhibiting high invertase activity. KKU Res J 13(1):5-16.
Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol.Chem. 195:19-23.