



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสและการคัดเลือกหายีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลส

Diversity of Xylose Utilizing Yeast and Selection of Xylose Fermenting Yeast Strains
for Ethanol Production

นามผู้วิจัย นางสาวสุกัญญา นิตยนต์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์สาวตรี ลิ้มทอง, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศศิธร จินตามรกฏ, ป.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัชวรัตน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงวี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสและการคัดเลือกหายีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลส

Diversity of Xylose Utilizing Yeast and Selection of Xylose Fermenting Yeast Strains
for Ethanol Production

โดย

นางสาวสุกัญญา นิตยรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัญญา นิธิยนต์ 2553: ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสและการคัดเลือกหายีสต์ที่เหมาะสม
เอทานอลจากไซโลส ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยา
ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, D.Eng.
170 หน้า

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญโดยการแยกยีสต์จากตัวอย่างดิน, ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ จำนวน 79 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 133 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า 108 ไอโซเลต (คิดเป็น 81.2 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ที่รู้จักแล้วโดย 73 ไอโซเลต จัดเป็นแอสโคไมซัยต์สปีชีส์ 18 สปีชีส์ ใน 8 สกุล คือ *Barnettozyma californica*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi* และ *Zygoascus hellenicus* ส่วนอีก 35 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นเป็นเบสิดิโอมัยซัยต์สปีชีส์ 8 สปีชีส์ ใน 2 สกุล คือ *Cryptococcus heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans* และ *T. terricola* ในบรรดาไอโซเลตที่เหลือพบว่ามี 11 ไอโซเลต (คิดเป็น 8.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดย 3 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นแอสโคไมซัยต์สปีชีส์ คือ *Candida* sp. NRRL Y-27159, *Geotrichum* sp. LY16, *Geotrichum* sp. LY5 และ 8 ไอโซเลต เหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นเบสิดิโอมัยซัยต์สปีชีส์ คือ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ *Trichosporon* sp. CBS 8686 มี 5 ไอโซเลต (คิดเป็น 3.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) ที่อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *C. solani*, *G. silvicola*, *S. lactativora*, *Z. hellenicus* และ *T. mycotoxinivorans* นอกจากนี้พบว่ามี 9 ไอโซเลต (คิดเป็น 6.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 7 สปีชีส์ คือ *Candida* sp. A6-2, *Candida* sp. NT31, *Candida* sp. NT36, *Candida* sp. NT40, *Candida* sp. KU-Xs34, *Candida saraburiensis* sp. nov., และ *Pichia* sp. NT29

การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมเอทานอลจากไซโลส พบว่ามียีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสเพียง 8 ไอโซเลต ใน 3 สปีชีส์ คือ *Candida blankii* (ไอโซเลต A6-1, A8-1 และ A8-2), *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T, KU-Xs18 และ KU-Xs20) และ *Zygoascus hellenicus* (ไอโซเลต SN1-1 และ SN1-4) ซึ่งผลิตเอทานอล 0.98-1.78 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth ในฟลาสก์และบ่มแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง

Sukanya Nitiyon 2010: Diversity of Xylose Utilizing Yeast and Selection of Xylose Fermenting Yeast Strains for Ethanol Production. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Savitree Limtong, D.Eng. 170 pages.

Diversity of xylose-utilizing yeast was studied by isolation of yeast using enrichment technique in D-Xylose medium and identification of yeast isolates by sequences analysis of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene and phylogeny. A total of 133 xylose-utilizing yeast strains were obtained from 79 samples of soils, plants and decaying agricultural residues, and others collected in various areas of Thailand. A total of 108 isolates (81.2 %) were identified to be described species. Seventy-three isolates were assigned to 18 described species in eight genera of the phylum Ascomycota consisted of *Barnettozyma californica*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi* and *Zygoascus hellenicus*. Thirty-five isolates were assigned to nine described species in two genera of the phylum Basidiomycota consisted of *Cryptococcus heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans* and *T. terricola*. Eleven isolates (8.3 %) were similar to the undescribed species via three isolates were similar to three ascomycetous yeast species namely *Candida* sp. NRRL Y-27159, *Geotrichum* sp. LY16 and *Geotrichum* sp. LY5, and eight isolates were similar to two basidiomycetous yeast species namely *Cryptococcus* cf. *podzolicus* and *Trichosporon* sp. CBS 8686. Five isolates (3.8%) could be identified as known or new species, which were closest to *C. solani*, *G. silvicola*, *Sporopachydermia lactativora*, *Z. hellenicus* and *T. mycotoxinivorans*. Whereas the other nine isolates were identified to be seven new species i.e. *Candida* sp. A6-2, *Candida* sp. NT31, *Candida* sp. NT36, *Candida* sp. NT40, *Candida* sp. KU-Xs34, *Candida saraburiensis* sp. nov., and *Pichia* sp. NT29.

Selection for D-Xylose fermenting yeast was carried out and the results revealed that only eight isolates of three yeast species could ferment D-xylose to ethanol. They were *Candida blankii* (A6-1, A8-1 and A8-2), *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-Xs20) and *Zygoascus hellenicus* (SN1-1 and SN1-4). These isolates produced ethanol at 0.98-1.78 g/l when cultivation in 4% D-Xylose-YP broth on a rotary shaker at 30°C for 96 h.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้
คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้ง
ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง และขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศศิธร จินดามรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ดูแลเสมอมา
รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST)
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและงานวิจัย
บางส่วน

ขอขอบคุณ ดร. วิเชียร ขงมานิตชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา สีสุข ที่ให้
คำปรึกษาแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกคนที่ให้ความอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมทั้งให้
คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณพ่อและแม่ ที่ช่วยอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจและให้
คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

สุกัญญา นิตยนต์
พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	39
สรุปผล	120
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	123
ภาคผนวก	131
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	132
ภาคผนวก ข ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร IJSEM	145
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	170

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความหลากหลายของยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติในประเทศไทยที่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota	9
2	ความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติในประเทศไทยที่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota	15
3	ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย	39
4	ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย	43
5	ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างอื่นๆ ที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย	47
6	การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่าง ดิน ส่วนประกอบของพืช วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ ที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และยีสต์สปีชีส์ใหม่	50
7	ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	62
8	ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและที่อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	68
9	ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่	69
10	เปรียบเทียบชนิดของยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกจากตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ ดิน ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ ในประเทศไทย	103
11	เปรียบเทียบชนิดของยีสต์ที่อธิบายแล้วซึ่งใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ และยีสต์ที่ใช้กลูโคสเพื่อการเจริญที่เคยมีการรายงานการค้นพบจากตัวอย่างต่างๆ ในประเทศไทย	109
12	ความสามารถในการเจริญและการหมักเอทานอลจากไซโลสของยีสต์ที่แยกได้	115

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แสดงโครงสร้างของไซเลน 4
2	วิธีการใช้ไซโลสและการผลิตเอทานอล 19
3	แสดง rDNAs; 18S rDNA, 5.8S rDNA, LSU/26S rDNA, ETS (external transcribed spacer) และ ITS (internal transcribed spacer) 23
4	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene!แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด 64
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene!แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae, วงศ์ Dipodascaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด 65
6	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene!แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae, วงศ์ Dipodascaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด 66
7	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต A6-2 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 71
8	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida</i> sp. A6-2 ^T 74
9	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs13 ^T , KU-Xs18, KU-Xs20 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 76
10	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida saraburiensis</i> sp. nov. (KU-Xs13 ^T) 79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34 ^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	80
12 สันฐานวิทยาของ <i>Candida</i> sp. KU-Xs34 ^T	83
13 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT29 ^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	84
14 สันฐานวิทยาของ <i>Pichia</i> sp. NT29 ^T	87
15 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT31 ^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	88
16 สันฐานวิทยาของ <i>Candida</i> sp. NT31 ^T	91
17 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT36 ^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	92
18 สันฐานวิทยาของ <i>Candida</i> sp. NT36 ^T	95
19 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT40 ^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene	96
20 สันฐานวิทยาของ <i>Candida</i> sp. NT40 ^T	99
21 ความเข้มข้นของเอทานอลและการเจริญของ <i>Candida saraburiensis</i> sp. nov. ไอโซเลต KU-Xs13 ^T , KU-Xs18, KU-Xs20, <i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 5773 และ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> M30 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth	112

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 22 ความเข้มข้นของเอทานอลและการเจริญของ *Candida saraburiensis* sp. nov.
ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20, *Scheffersomyces stipitis* CBS
5773 และ *Saccharomyces cerevisiae* M30 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 8% D-
Xylose-YP broth

113

ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสและการคัดเลือกหาอีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลส

Diversity of Xylose Utilizing Yeast and Selection of Xylose Fermenting Yeast Strains for Ethanol Production

คำนำ

ปัจจุบันความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงมีมากขึ้นทั้งเพื่อการอุตสาหกรรมและการคมนาคมขนส่ง ในขณะที่มีวิกฤตพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่ใกล้หมดและมีราคาสูง เป็นเหตุให้ประเทศต่างๆ ทั่วโลกตื่นตัวในการหาพลังงานทดแทนที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ ประเทศไทยได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหานี้เช่นกัน และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม แหล่งของพลังงานทดแทนที่เหมาะสมชนิดหนึ่ง คือ ชีวมวล โดยพลังงานจากชีวมวลที่มีการผลิตใช้มากในปัจจุบัน คือ เอทานอล ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากกากน้ำตาล และมันสำปะหลัง ในขณะนี้เอทานอลใช้เป็นเชิงเพลิงโดยการนำไปผสมกับเบนซินในรูปของแก๊สโซฮอล์ ส่งผลให้อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลของประเทศไทยขยายตัวอย่างมาก ความต้องการใช้เอทานอลที่สูงขึ้นนั้น ทำให้เกิดความวิตกกังวลที่พืชอาหารอาจถูกนำไปใช้ผลิตเอทานอลจนทำให้เกิดการขาดแคลน ดังนั้นจึงมีการหาวัตถุดิบชนิดใหม่ วัตถุดิบที่กำลังได้รับความสนใจ คือ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด เนื่องจากมีราคาถูกและมีปริมาณมาก วัสดุเหล่านี้หากสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ นอกจากจะช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลต่ำและลดปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารแล้วยังช่วยการกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้อีกด้วย

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งของลิกโนเซลลูโลส ที่ประกอบด้วยลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อทำการย่อย (hydrolysis) จะได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยปกติอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สำหรับการหมักกลูโคสเป็นเอทานอล แต่ยีสต์สปีชีส์นี้ไม่สามารถใช้และหมักไซโลสเป็นเอทานอลได้ ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสที่รู้จักมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Candida shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* และ *Pachysolen tannophilus* และยังให้ผลผลิตเอทานอลค่อนข้างต่ำ ทำให้มีการวิจัยเพื่อพัฒนายีสต์ *S. cerevisiae* ให้สามารถหมักไซโลส ในขณะที่การหาอีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่มีรายงานอยู่เดิมเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะได้มาซึ่งสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทนี้

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในประเทศไทยมีอย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา โดยได้มีการรายงานทั้งการพบยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (described species) หรือรู้จักแล้ว (known species) และการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ (novel species) การศึกษาส่วนใหญ่ทำโดยการแยกยีสต์จากแหล่งต่างๆ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญและการหมักเอทานอลในประเทศไทย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญในแหล่งที่อยู่ต่างๆ โดยแยกยีสต์จากแหล่งที่อยู่และทำการจัดจำแนกเพื่อระบุชนิด นอกจากนั้นทำการเลือกสายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและรวบรวมสายพันธุ์ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อไป

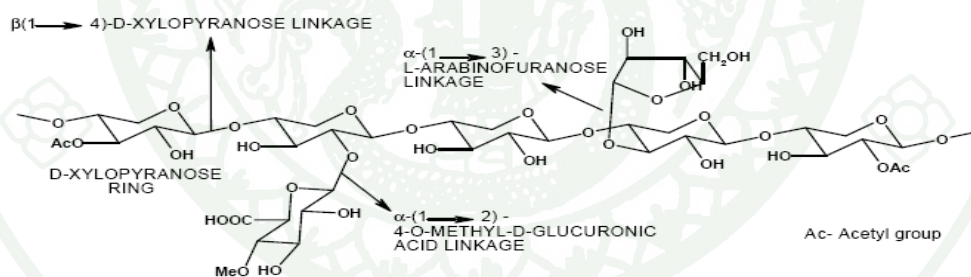
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ ด้วยการแยกและจัดจำแนก โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ไฟโลจีนี
2. เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากไซโลส
3. เพื่อค้นหายีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน จัดจำแนก ตั้งชื่อ และรายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยอาศัยอนุกรมวิธานพหุ фаซิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งประกอบด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี

การตรวจเอกสาร

1. ไซโลสและการนำมาใช้ประโยชน์

ไซโลส ($C_5H_{10}O_5$) เป็นน้ำตาลอัลโดเพนโตส มีน้ำหนักโมเลกุล 150.13 มีรสหวาน มีจุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส เป็นน้ำตาลที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากกลูโคส พบได้ทั่วไปในพืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งและพบมากในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว กากอ้อย กากข้าวโพด ซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยไซโลสจะอยู่ในรูปของ โพลีเมอร์ไซเลนร่วมกับโพลีเมอร์อื่นๆ เช่น กลูแคน, แมนแนน, อะราบิแนนและกาแลกแตน ในส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบในชั้น middle lamella ของพืช ไม้เนื้อแข็งจะมีเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์และ 22 เปอร์เซ็นต์ในไม้เนื้ออ่อน วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยไซเลนจะมีมากในไม้เนื้อแข็ง (11-25 เปอร์เซ็นต์ของเฮมิเซลลูโลส) มากกว่าไม้เนื้ออ่อน (3-8 เปอร์เซ็นต์ของเฮมิเซลลูโลส) (Mishra and Singh, 1993) ไซเลนประกอบด้วย ดี-ไซโลส ประมาณ 85-90 เปอร์เซ็นต์ และสารอื่นอีกเล็กน้อย เช่น อะราบิโนส และกรดกลูโคนิก (Lachke, 2002)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของไซเลน

ที่มา: Lachke (2002)

ปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการเพาะเห็ด ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ และใช้เป็นซับสเตรตของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ราและยีสต์ โดยการไฮโดรไลซิสโพลีเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ คือ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดหรือเอนไซม์เป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลส สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เช่น ไซลิทอล (Carvalho *et al.*, 2002), เอทานอล (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006) และกรดแอสซิดิก (Doran-Peterson *et al.*, 2008) เนื่องจากมีปริมาณมากและราคาถูก

2. ยีสต์

ยีสต์ เป็นสมาชิกของอาณาจักรฟังไจที่สามารถดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยวได้ มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง แบบคณโท หรือยาว เป็นต้น มีขนาดประมาณ 5-10 μm ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือการแบ่งเซลล์แบบ fission เมื่อศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสามารถจัดจำแนกยีสต์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ แอสโคไมซีตยีสต์ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) และเบสิดีโอไมซีตยีสต์ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างเบสิดีโอสปอร์ (basidiospore) (Kurtzman and Fell, 1998)

ยีสต์ส่วนใหญ่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเกิดเมแทบอลิซึม สร้างเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (primary metabolites) ที่จำเป็นต่อร่างกาย และเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญ ไม่สามารถสังเคราะห์แสงและไม่ตรึงไนโตรเจน ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน, น้ำ, พืช, สัตว์, เห็ด และในสิ่งที่มีมนุษย์สร้างขึ้น เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์อาหารหมัก อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลหรือเกลือสูง (สาวิตรี, 2549) โดยยีสต์แต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่มมีแหล่งที่อยู่ (habitat) ที่แน่นอนซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะสรีรวิทยาของยีสต์ ได้แก่ ความสามารถในการใช้สารประกอบบางชนิดและความสามารถในการเจริญในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ (Lachance and Starmer, 1998)

ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพเพื่อการบริโภคนิยมใช้ยีสต์เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาว่าเป็น “GRAS” (generally recognized as safe) เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ใช้เป็นยีสต์ขนมปังและผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์, *Candida utilis* ใช้ในการผลิตยีสต์อาหารคนและยีสต์อาหารสัตว์, *Candida guilliermondii* และ *Candida lipolytica* ใช้ผลิตกรดแลกติก, *Kluyveromyces lactis* และ *Candida pseudotropicalis* ใช้ผลิตเอนไซม์แลกเตสสำหรับไฮโดรไลซิสแลกโทสในนมเป็นกลูโคสและกาแลคโตส ตามลำดับ (U. S. Food and Drug Administration, 2001) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่มีการผลิตโดยยีสต์และสามารถนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เช่น สารให้ความหวาน เช่น อะราบิทอล, อิริทริทอล และไซลิทอล, สารให้สี เช่น แอสต้าแซนทิน และแอลฟา-คาโรทีนอยด์, พอลิแซ็กคาไรด์พวกฟอสโฟแมนแนนและฟูลลูแลน, กรดอะมิโนแอล-ฟีนิลอะลานีน และสารให้กลิ่นรส (สาวิตรี, 2549; Demain *et al.*, 1998)

3. การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในประเทศไทย

การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละแหล่งที่อยู่มีประโยชน์หลายประการ เนื่องจาก จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรมดังเช่นที่กล่าวมาแล้ว จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ทำให้ระบบนิเวศป่าไม้ (forest ecosystem) ระบบนิเวศเกษตร (agricultural ecosystem) ระบบนิเวศประมง (fishery ecosystem) ยังคงสภาพเดิม จุลินทรีย์บางชนิดทำลายสารพิษจากของเหลือใช้ต่างๆ ในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาความหลากหลายของยีสต์หรือจุลินทรีย์อื่นๆ สามารถทำได้ 2 วิธี คือแยกเชื้อจากธรรมชาติโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่หมายถึง Culture dependence technique หรือการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งแวดล้อมโดยตรงไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร ที่หมายถึง Culture independence technique การเลือกวิธีในการศึกษาความหลากหลายขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงานแต่ถ้าสามารถแยกจุลินทรีย์เหล่านั้นออกมาจากแหล่งอาศัยและนำมาเก็บรักษาไว้จะเป็นประโยชน์ในการนำยีสต์ไปใช้ประโยชน์มากกว่า (สาวิตรี, 2549)

เนื่องจากยีสต์ไม่ใช่จุลินทรีย์ชนิดเดียวที่มีอยู่ในธรรมชาติและในการจัดจำแนกยีสต์ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงต้องกำหนดให้ชัดเจนว่าต้องการที่จะหาเชื้อทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในแหล่งที่อยู่นั้นหรือต้องการรู้ถึงเชื้อที่มีความสำคัญที่สุดในแหล่งที่อยู่นั้น โดยออกแบบอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีองค์ประกอบเหมาะสม ส่งเสริมการเจริญของยีสต์และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีองค์ประกอบและสภาวะแวดล้อมใกล้เคียงกับแหล่งที่แยกหรือจำเพาะแหล่งคาร์บอน ขึ้นอยู่กับความต้องการนำยีสต์ที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ ซึ่งอาหารที่เหมาะสมและนิยมแยกยีสต์ คือ อาหาร yeast extract malt extract agar ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Lachance and Starmer, 1998)

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ พืช เห็ด ซึ่งเก็บในประเทศไทย มีการรายงานและเสนอสปีชีส์ใหม่อย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา โดยทำการแยกยีสต์โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract malt extract broth ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอช 3.7-3.8 ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล เติมนสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025-0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยับยั้งการเจริญของราเส้นสาย และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวมีรายงานการพบยีสต์สปีชีส์รู้จักแล้วหรือที่มีการอธิบายแล้วมากกว่า 120

สปิชีส์ โดยอยู่ในไฟลัม Ascomycota ประมาณ 100 สปิชีส์ และไฟลัม Basidiomycota ประมาณ 20 สปิชีส์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย (ตารางที่ 1, 2)

Sumpradit (2005) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสน จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว สามารถแยกยีสต์ได้ 340 ไอโซเลต พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 30 สปิชีส์ (ตารางที่ 1) และพบยีสต์ที่เป็นสปิชีส์ใหม่หรือที่ยังไม่เคยมีการอธิบาย 9 สปิชีส์ โดยได้ศึกษาและเสนอเป็นยีสต์สปิชีส์ใหม่และได้รับตีพิมพ์แล้ว 1 สปิชีส์ คือ *Tetrapisispora namnaensis* sp. nov. (Sumpradit *et al.*, 2005)

Jindamorakot (2006) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งที่อยู่ธรรมชาติในประเทศไทย โดยทำการแยกยีสต์จากขุยแมลง ดอกไม้ ใบไม้ มอส เห็ด และจากแหล่งที่อยู่อื่นๆ สามารถแยกยีสต์ได้ 283 ไอโซเลต พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 39 สปิชีส์ (ตารางที่ 1) และในไฟลัม Basidiomycota 17 สปิชีส์ (ตารางที่ 2) และพบยีสต์ที่เป็นสปิชีส์ใหม่หรือที่ยังไม่เคยมีการอธิบาย 21 สปิชีส์ โดยได้ศึกษาและเสนอเป็นยีสต์สปิชีส์ใหม่โดยการตีพิมพ์แล้ว 15 สปิชีส์ คือ *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov., *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov. (Jindamorakot *et al.*, 2004), *Candida thailandica* sp. nov., *Candida lignicola* sp. nov. (Jindamorakot *et al.*, 2007), *Candida jaroonii* sp. nov., *Candida songkhlaensis* sp. nov. (Imanishi *et al.*, 2008), *Candida hasegawae* sp. nov., *Candida kazuoi* sp. nov. (Nakase *et al.*, 2007a), *Hanseniaspora thailandica* sp. nov., *Hanseniaspora singularis* sp. nov., *Kloeckera hatyaiensis* sp. nov., (Jindamorakot *et al.*, 2009), *Pichia koratensis* sp. nov. (Nakase *et al.*, 2007b), *Pichia nongkratonensis* sp. nov. (Nakase *et al.*, 2005) และ *Trichosporon siamense* sp. nov. (Nakase *et al.*, 2006)

กุศุมวดี (2549) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากกิ่งใบไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้และลูกไม้ร่วงที่แช่อยู่ในน้ำที่เก็บจากป่าชายเลนที่เก็บจากอ่าวไทยในจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพรและสุราษฎร์ธานี พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 17 สปิชีส์ (ตารางที่ 1)

Limtong *et al.* (2007; 2008a) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากน้ำในป่าชายเลนในอุทยานแห่งชาติเขาลำปี-หาดท้ายเหมือง จังหวัดพังงา ในน้ำจากป่าชายเลนสามารถแยกยีสต์ได้ 19 ไอโซเลต พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 8 สปิชีส์ (ตารางที่ 1) และในไฟลัม

Basidiomycota 1 สปีชีส์ (ตารางที่ 2) พบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงานและเสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยการตีพิมพ์แล้ว คือ *Candida thaimueangensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2007) และ *Geotrichum siamensis* sp. nov. (Kaewwichian *et al.*, 2010) นอกจากนี้ศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากน้ำจากป่าชายเลนอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะระเคาะระเคาะพระทอง สามารถแยกยีสต์ได้ 22 ไอโซเลต พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 4 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) และในไฟลัม Basidiomycota 1 สปีชีส์ (ตารางที่ 2) พบยีสต์คล้ายรา 1 สปีชีส์ คือ *Aureobasidium pullulans* และพบยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่เคยมีรายงาน 2 สปีชีส์ โดยได้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยการตีพิมพ์แล้ว 1 สปีชีส์ คือ *Candida phangngensis* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2008a)

สมจิต (2551) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน จังหวัดระนอง จากตัวอย่างน้ำที่เก็บใน 3 ช่วงเวลา ระหว่างปี พ.ศ. 2541, พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 สามารถแยกยีสต์ได้ 149 ไอโซเลต พบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 26 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) และในไฟลัม Basidiomycota 4 สปีชีส์ (ตารางที่ 2) ซึ่งมีเพียง 3 สปีชีส์ที่พบใน 3 ช่วงเวลา คือ *Candida tropicalis*, *Kodamaea ohmeri* และ *Candida sanittii* sp. nov. และพบยีสต์ที่ยังไม่เคยมีการรายงาน 7 สปีชีส์ โดยได้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยการตีพิมพ์แล้ว 2 สปีชีส์ คือ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (Am-in *et al.*, 2008) และ *Candida sanittii* sp. nov. (Limtong *et al.*, 2010) อยู่ในช่วงการรอตีพิมพ์ (inpress, available online) อีก 3 สปีชีส์ คือ *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov., และ *Candida ranongensis* sp. nov. (Am-in *et al.*, 2010)

ชนิตา (2552) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินใต้น้ำจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวไทยตอนบนด้านชายฝั่งตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและตราด และชายฝั่งตะวันตกที่จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ สามารถแยกยีสต์ได้ 138 ไอโซเลตพบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 39 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) และในไฟลัม Basidiomycota 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 2) พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีอธิบาย 4 สปีชีส์ โดยได้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยการตีพิมพ์แล้ว 1 สปีชีส์ คือ *Candida siamensis* sp. nov. (Boonmark *et al.*, 2009)

รุ่งลักษณ์ (2552) ศึกษาความหลากหลายยีสต์จากดินป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สามารถแยกยีสต์ได้ 102 ไอโซเลตพบยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Ascomycota 32 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 1 และในไฟลัม Basidiomycota 1 สปีชีส์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และพบยีสต์ที่ยังไม่เคยมีการรายงาน 4 สปีชีส์ โดยได้เสนอเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่แล้ว 2 สปีชีส์ คือ *Candida*

sekii sp. nov. (Limtong *et al.*, 2010) และ *Geotrichum phurueaensis* sp. nov. (Kaewwichian *et al.*, 2010)

ในการคัดแยกยีสต์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อ เช่น วิธีการคัดแยก ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนให้เหมาะสมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการแยกและศึกษาความหลากหลายของยีสต์ได้ Limtong *et al.* ได้ทำการแยกยีสต์เมทิลโดโทรฟิยีสต์ ซึ่งสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ จากดินและส่วนประกอบของพืชในประเทศไทย จำนวน 634 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร 1% methanol-YNB medium ที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถแยกยีสต์ได้ 253 ไอโซเลตพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ 6 สปีชีส์ คือ *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., *Pichia siamensis* sp. nov. (Limtong *et al.* 2004), *Pichia thermomethanolica* sp. nov. (Limtong *et al.* 2005), *Ogataea chonburiensis* sp. nov. และ *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov. (Limtong *et al.* 2008b)

ตารางที่ 1 ความหลากหลายของยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติในประเทศไทย
ที่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota

สปีชีส์	อ้างอิง						
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	ชนิตา, 2552
<i>Ambrosiozyma</i>							
<i>Ambrosiozyma monospora</i>		+					
<i>Aureobasidium</i>							
<i>Aureobasidium pullulans</i>		+					
<i>Blastobotrys</i>							
<i>Blastobotrys catitulata</i>		+					
<i>Brettanomyces</i>							
<i>Brettanomyces naardenensis</i>							+
<i>Candida</i>							
<i>Candida albicans</i>	+						+
<i>Candida akabanensis</i>							+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง							
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	จินิตา, 2552	รุ่งลักษณ์, 2552
<i>Candida berthetii</i>						+		
<i>Candida boidinii</i>						+		
<i>Candida butyri</i>						+		
<i>Candida chrysomelidarum</i>							+	
<i>Candida conglobata</i>				+				
<i>Candida diversa</i>	+	+					+	+
<i>Candida easanensis</i>		+						
<i>Candida fermentati</i>	+		+					
<i>Candida fukuyamaensis</i>		+	+				+	
<i>Candida ghanaensis</i>								+
<i>Candida glabata</i>	+					+		+
<i>Candida cf. glabata</i>							+	
<i>Candida gotoi</i>							+	
<i>Candida hasegawae</i>		+						
<i>Candida intermedia</i>			+				+	
<i>Candida jaroonii</i>		+						
<i>Candida kazuoi</i>		+						
<i>Candida leandrae</i>		+						
<i>Candida lignicola</i>		+						
<i>Candida maltosa</i>	+							
<i>Candida membranifaciens</i>				+				
<i>Candida nakhonratchasimensis</i>		+						
<i>Candida natalensis</i>			+				+	
<i>Candida nivariensis</i>								+
<i>Candida orthopsilosis</i>								+
<i>Candida palmae</i>		+						
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง							
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	พินิตา, 2552	รุ่งลักษณ์, 2552
<i>Candida pattaniensis</i>		+						
<i>Candida phangngensis</i>				+	+	+		
<i>Candida picinguabensis</i>				+		+		
<i>Candida pseudointermedia</i>			+					
<i>Candida pseudolambica</i>						+	+	+
<i>Candida rancensis</i>		+						
<i>Candida rugosa</i>						+	+	+
<i>Candida sanittii</i>							+	
<i>Candida saopaulonensis</i>								+
<i>Candida sanittii</i>						+	+	
<i>Candida sekii</i>								+
<i>Candida siamensis</i>		+					+	
<i>Candida silvae</i>			+			+	+	
<i>Candida sithepensis</i>		+						
<i>Candida songkhlaensis</i>		+						
<i>Candida thailandica</i>		+						
<i>Candida thaimueangensis</i>				+		+	+	
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+		+	+	+
Clavispora								
<i>Clavispora lusitaniae</i>							+	
Debaryomyces								
<i>Debaryomyces hansenii</i>							+	
<i>Debaryomyces fabryi</i>	+							+
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	+				+	+	+
Galactomyces								
<i>Galactomyces geotrichum</i>						+		
<i>Galactomyces reessii</i>							+	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง						
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	จินดา, 2552
<i>Geotrichum</i>							
<i>Geotrichum fragrans</i>		+					+
<i>Geotrichum phurueansii</i>							+
<i>Geotrichum vulgare</i>							+
<i>Hanseniaspora</i>							
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>							+
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>							+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		+					
<i>Hanseniaspora thailandica</i>		+					
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+						
<i>Hanseniaspora vineae</i>		+					
<i>Kazachstania</i>							
<i>Kazachstania aquatic</i>							+
<i>Kazachstania bovina</i>							+
<i>Kazachstania siamensis</i>							+
<i>Kazachstania unispora</i>							+
<i>Kazachstania telluris</i>	+						
<i>Kloeckera</i>							
<i>Kloeckera lindneri</i>	+	+					+
<i>Kluyveromyces</i>							
<i>Kluyveromyces hubeiensis</i>							+
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	+					
<i>Kluyveromyces siamensis</i>			+			+	+
<i>Kodamaea</i>							
<i>Kodamaea ohmeri</i>	+	+	+			+	+
<i>Lindnera</i>							

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง							
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิตต์, 2551	จินิตา, 2552	รุ่งลักษณ์, 2552
<i>Lindnera mrakii</i>		+						+
<i>Lindnera sargentensis</i>								+
<i>Lindnera saturnus</i>	+	+	+			+		+
<i>Lindnera subsufficiens</i>							+	
<i>Lindnera veronae</i>							+	
Lodderomyces								
<i>Lodderomyces elongisporus</i>				+				
Metschnikowia								
<i>Metschnikowia koreensis</i>		+					+	
Pichia								
<i>Pichia burtonii</i>						+		
<i>Pichia capsulata</i>	+							
<i>Pichia caribbica</i>				+	+	+	+	+
<i>Pichia fabianii</i>					+			
<i>Pichia galeiformis</i>	+					+		+
<i>Pichia guilliermondii</i>			+	+	+		+	
<i>Pichia kluyveri</i>	+					+		+
<i>Pichia koratensis</i>		+						
<i>Pichia kudriazevii</i>			+			+	+	+
<i>Pichia nakazawae</i> var. <i>akitaensis</i>		+						
<i>Pichia nongkratonensis</i>		+						
<i>Pichia occidentalis</i>			+			+	+	+
<i>Pichia pijperi</i>								+
<i>Pichia pini</i>	+							
<i>Pichia siamensis</i>	+							
<i>Pichia spartinae</i>	+							
<i>Pichia sporocuriosa</i>						+		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง							
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	จินดา, 2552	รุ่งลึกษณ, 2552
<i>Pichia stipitis</i>		+						
<i>Pichia sydowiorum</i>		+	+					
<i>Pichia terricola</i>	+					+	+	
<i>Saccharomyces</i>								
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+					+	
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	+	+						
<i>Saccharomyces unisporus</i>		+						
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	+							
<i>Schwanniomyces</i>								
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	+	+						
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>		+						
var. <i>africanus</i>								
<i>Schwanniomyces</i>			+					
<i>pseudopolymorphus</i>								
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>			+					+
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	+	+						
var. <i>yarrowii</i>								
<i>Stephanoascus</i>								
<i>Stephanoascus smithiae</i>		+						
<i>Tetrapisispora</i>								
<i>Tetrapisispora namnaoensis</i>	+							+
<i>Torulaspora</i>								
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		+					+	
<i>Torulaspora globosa</i>								+
<i>Torulaspora maleeae</i>						+	+	
<i>Torulaspora pretioidensis</i>	+							

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง						
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	จินิตา, 2552
<i>Wickerhamomyces</i>							
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>							+
<i>Zygosaccharomyces</i>							
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	+						+

ตารางที่ 2 ความหลากหลายของยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างธรรมชาติในประเทศไทยที่จัดจำแนกอยู่ในไฟลัม Basidiomycota

สปีชีส์	อ้างอิง						
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	จินิตา, 2552
<i>Bullera</i>							
<i>Bullera dendrophila</i>		+					
<i>Bullera sinensis</i>		+					
<i>Cryptococcus</i>							
<i>Cryptococcus heveanensis</i>		+					
<i>Cryptococcus humicola</i>		+					
<i>Cryptococcus laurentii</i>		+					
<i>Exobasidium</i>							
<i>Exobasidium vexans</i>		+					
<i>Rhodotorula</i>							
<i>Rhodotorula glutinis</i>							+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				+	+	+	+
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>		+					

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สปีชีส์	อ้างอิง						
	Sumpradit, 2005	Jindamorakot, 2006	กุสุมาวดี, 2549	Limtong <i>et al.</i> , 2007	Limtong <i>et al.</i> , 2008a	สมจิต, 2551	ชนิตา, 2552
<i>Rhodotorula toruloides</i>			+				
<i>Rhodotorula nothofagi</i>			+				
<i>Sporidiobolus</i>							
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>			+				
<i>Sporobolomyces</i>							
<i>Sporobolomyces bannaensis</i>			+				
<i>Sporobolomyces odoratus</i>			+				
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>			+				
<i>Trichosporon</i>							
<i>Trichosporon asahii</i>			+				+
<i>Trichosporon coremiiforme</i>							+
<i>Trichosporon japonicum</i>							+
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>							+
<i>Trichosporon siamense</i>			+				

4. ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ

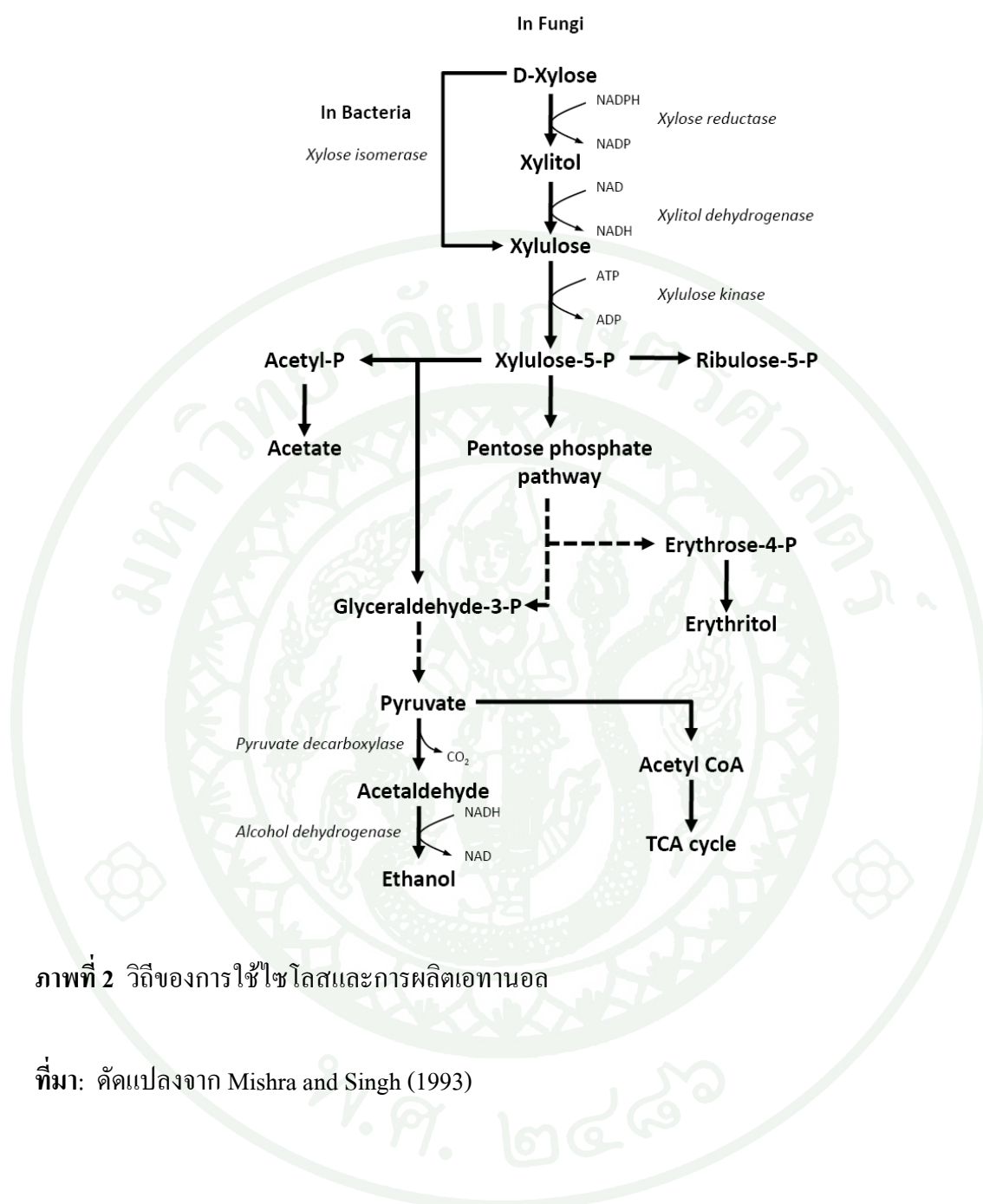
จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบทั้งใน แบคทีเรีย รา และยีสต์ ในปี ค.ศ. 2000 Barnett *et al.* ได้รวบรวมและอธิบายลักษณะของยีสต์ทั้งหมด 678 สปีชีส์ ในหนังสือ *Yeasts : Characteristics and Identification* พบว่ามียีสต์ที่สามารถเจริญโดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างดี คือ ให้ผลการแอสซิมิเลตไซโลสเป็นบวก (positive : +) จำนวน 350 สปีชีส์ มี 28 สปีชีส์ ที่สามารถเจริญหลังจาก 7 วัน (delay: D) จำนวน 154 สปีชีส์ ที่บางสายพันธุ์เป็นบวกและบางสายพันธุ์เป็นลบ แต่ความสามารถในการหมักไซโลสที่ตรวจสอบโดยใช้ Durham fermentation tube และตรวจการสร้างแก๊สตามวิธีของ Yarrow (1998) มีเพียง *Pichia segobiensis* ที่ให้ผลการหมักไซโลสเป็นบวก (positive : +), ส่วน *Brettanomyces naardenensis*, *Candida tenuis* และ *Pachysolen tannophilus* สามารถหมักไซโลสหลังจาก 7 วัน (delay: D), ในขณะที่ *Candida intermedia*, *Candida lyxosophila*, *Candida shehatae* และ *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ซึ่งมีบางสายพันธุ์หมักไซโลสได้บางสายพันธุ์หมักไซโลสไม่ได้ (variable:V) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ *Hansenula polymorpha* (Ryaboya *et al.*, 2003) และ *Enteroamus dimorphus* ซึ่งเป็น yeast-like fungus ที่แยกได้จากลำไส้ของค้างคาว (*Odontotaenius disjunctus*) และมีความใกล้เคียงกับ *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสได้ (Suh *et al.*, 2004)

ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในประเทศไทยยังไม่เคยมีการรายงาน การศึกษาความหลากหลายส่วนใหญ่ให้ความสำคัญเกี่ยวกับความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งต่างๆ โดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการแยกยีสต์ ในปี ค.ศ. 2008 Rao *et al.* รายงานผลการแยกและจัดจำแนกยีสต์ที่สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลจากผลไม้ และเปลือกไม้ ในประเทศอินเดีย โดยแยกยีสต์ได้ 374 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบการหมักในอาหารไซโลส พบว่ามีเพียง 27 ไอโซเลต ที่สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอล โดยสามารถผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 0.12-0.38 กรัมต่อกรัมไซโลส เมื่อจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลพบว่า เป็นยีสต์ในสปีชีส์ *Candida albicans*, *C. maltosa*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus saitoi*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Pichia barkeri*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. kudriazevii*, *P. membranaefaciens*, *P. mexicana*, *P. veronae*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa*, และ *R. pallida*

5. เมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์

ยีสต์ที่สามารถแอสซิมิเลตไซโลสส่วนใหญ่ เมื่อไซโลสเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดยอาศัยตัวพา เกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิตอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเตส (Xylose reductase) โดยมี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปลี่ยนไซลิตอลเป็นไซลูโลส โดยเอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจิเนส (Xylitol dehydrogenase) โดยมี NAD เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนรูปไซโลสเป็นไซลูโลสในขั้นตอนเดียวโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (Xylose isomerase) หลังจากนั้นมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ไซลูโลส โดยเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (Xylulose kinase) ได้เป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ซึ่งเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตได้เป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) สามารถเข้าสู่ Embden-Meyerhof pathway ได้ ไพรูเวตเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอะซิติก โคเอ (Acetyl CoA) และเข้าสู่วัฏจักรคาร์บอกซิลิกแอซิด (TCA cycle) สำหรับการเจริญต่อไป หรือเกิดการหมักเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (Pyruvate decarboxylase) และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (Alcohol dehydrogenase) เปลี่ยนรูปเป็น อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และเอทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ (Mishra and Singh, 1993)

โดยปกติแล้ว *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเอทานอล เนื่องจากสามารถผลิตและทนเอทานอลความเข้มข้นสูงแต่ไม่สามารถใช้ไซโลสในการเจริญและการผลิตเอทานอล เนื่องจากขาดไซโลสรีดักเตส (Xylose reductase) และไซลิตอลดีไฮโดรจิเนส (Xylitol dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ไซโลสของยีสต์ จึงมีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาเกี่ยวกับการดัดแปลงพันธุกรรมของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยเพิ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว คือ *XYL1* และ *XYL2* ตามลำดับ จากยีสต์ที่สามารถเจริญและหมักเอทานอลจากไซโลส เช่น *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 เข้าไปเพื่อให้ *S. cerevisiae* สามารถใช้ไซโลสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอทานอล และมีการพัฒนาสายพันธุ์ของยีสต์เพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นสูงขึ้น (Aristos *et al.*, 2000; Matsushika *et al.*, 2008)



ภาพที่ 2 วิธีของการใช้ไซโลสและการผลิตเอทานอล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mishra and Singh (1993)

6. การจัดจำแนกยีสต์

อนุกรมวิธาน (Taxonomy หรือ Systematics) เป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการจำแนกพันธุ์ คือ การจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะศึกษาในด้านต่าง ๆ 3 ลักษณะ ได้แก่

1. การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่ในลำดับชั้นต่าง ๆ (Classification)
2. การตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของสิ่งมีชีวิต (Identification)
3. การกำหนดชื่อที่เป็นสากลของหมวดหมู่และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Nomenclature)

ตามกฎหมายของอนุกรมวิธานนั้นยีสต์และราชนิดอื่นอยู่ภายใต้ International Code of Botanical Nomenclature (Kurtzman and Fell, 1998)

อนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของยีสต์เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1838 เมื่อ Mayer ได้กำหนดชื่อสกุล *Saccharomyces* จากคำภาษากรีกว่า sakehar ซึ่งแปลว่าน้ำตาล และ Mayers ซึ่งหมายถึงเชื้อรา Hansen เป็นคนแรกที่สร้างระบบสำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ โดยในปี ค.ศ. 1878 Hansen แสดงให้เห็นว่ายีสต์เป็นราที่การดำรงชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยวและได้แยกเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1881 การจัดจำแนกยีสต์ในสมัยเริ่มแรกอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology), สรีรวิทยา (physiology) และชีวเคมี (biochemistry) ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (closely related species) เมื่อเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้ามากขึ้น เช่นการพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ก็ได้เริ่มมีการกล่าวถึงการนำเกณฑ์ของอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) เช่น การศึกษาองค์ประกอบของเบสควีนินและไซโทซีน (G+C contents) การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) การหาลำดับของเบสใน rRNA gene ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม จึงทำให้เทคนิคระดับโมเลกุลถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์มากขึ้น (สาวิตรี, 2549)

ปัจจุบันการจัดจำแนกยีสต์ใช้อนุกรมวิธานพหุเฟส (polyphasic taxonomy) ซึ่งจัดจำแนกโดยใช้อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลร่วมกัน ช่วยให้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ชัดเจนขึ้น โดยมีลักษณะต่างๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกยีสต์ดังนี้

6.1 การจัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (Conventional characteristic)

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งรวบรวมโดย Kurtzman and Fell (1998) ประกอบด้วย

6.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้งที่อยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยทั่วไปการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกประเภทได้ในระดับสกุลหรือสูงกว่าสกุล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ รูปร่างของเซลล์ การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ (asexual endospore) การสร้างคลามัยโดสปอร์ (chlamydospore) การสร้างบอลลิสโตสปอร์ (ballistospore) การสร้างแอสโคสปอร์ การสร้างแบบลิดิโอสปอร์ และการตรวจหาเมดิงไทป์ (mating type)

6.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และสกุล แต่การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีนั้นไม่มีวิธีการทดสอบที่เป็นมาตรฐาน ผลการทดสอบที่ได้จึงมักขึ้นอยู่กับเทคนิคและวิธีที่เลือกนำมาทดสอบลักษณะทั่วไปที่นิยมใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบไนโตรเจน การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับไซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่น ๆ การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส การสร้างการประกอบอไมลอยด์ (amyloid) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) การทนต่อไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue b) (Yarrow, 1998)

6.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

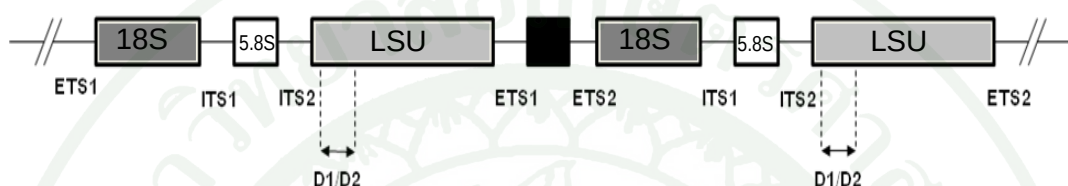
อนุกรมวิธานเคมี คือ การประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งสารแม่แทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารแม่แทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมถึงกิจกรรมทางเคมี หรือสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ได้แก่ ชนิดของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) องค์ประกอบของผนังเซลล์ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) ปริมาณกัวนีนและไซโทซีน (G+C contents) ปกติการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมีจะใช้ร่วมกับการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Yamada, 1998)

6.3 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลเป็นการศึกษาลักษณะยีนไทป์โดยตรง จึงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปลี่ยนสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมีซึ่งเป็นการตรวจลักษณะฟีโนไทป์ของยีสต์ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับหลักการพื้นฐานที่ว่า จีโนมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยบริเวณที่มีอัตราการวิวัฒนาการแตกต่างกันหลายบริเวณ และความแตกต่างนี้เองที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญมาก บริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษา ได้แก่ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของไรโบโซม (ribosomal DNA/RNA) ทั้งในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit, LSU) และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (Small subunit, SSU) เนื่องจากไรโบโซมปรากฏอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน มีหลายชุดในแต่ละเซลล์ซึ่งแต่ละชุดมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอของไรโบโซมมีส่วนที่มีทั้งวิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่าบริเวณผันแปร (variable region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (Valente *et al.*, 1999)

การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นั้นนิยมศึกษาดีเอ็นเอไรโบโซม (ribosomal DNA; rDNA) (ภาพที่ 3) โดยให้ความสำคัญกับทั้งบริเวณที่มีการแสดงออก (coding region) คือ โดเมน D1/D2 ของ LSU/26S rDNA มีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์, SSU/18S rDNA มีความยาวประมาณ 1700 นิวคลีโอไทด์ และบริเวณที่ไม่มีการแสดงออก (non coding region) คือ

internal transcribed spacer (ITS) ทั้ง ITS1 และ ITS2 ซึ่งมีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (Scorzetti *et al.*, 2002) จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ที่มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ LSU/26S rDNA ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือนิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 บนยีนของ rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วกว่าบริเวณอื่นจึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU/26S rDNA ความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ (Kurtzman and Robnett, 1998)



ภาพที่ 3 แสดง rDNAs; 18S rDNA, 5.8S rDNA, LSU/26S rDNA, ETS (external transcribed spacer) และ ITS (internal transcribed spacer)

Kurtzman and Robnett (1998) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rDNA ของแอสโคไมซีตส์ 500 สปีชีส์ รวมทั้ง *Candida* และสกุลที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำโดเมน D1/D2 มาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') โดยทำ PCR 36 รอบ ที่ 52 องศาเซลเซียส สำหรับ annealing และการขยายตัวยาวใช้ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และการทำให้เสียสภาพใช้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gene clean II หาลำดับของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สาย ของ rDNA โดย ABI Tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยาลำดับของนิวคลีโอไทด์ 4 ปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์ของปฏิกิริยาเหล่านี้ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ NL1, NL4, NL-2A (5'-CTTGTTGCCTATCGGTCTC-3') และ NL-3A (5'-GAGACCGATAGCGAACAAG-3') จากผลการวิเคราะห์แสดงว่าสายพันธุ์ในสปีชีส์เดียวกันส่วนใหญ่มีการผันแปร 0-2 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตาม มีสายพันธุ์ของ 3 สปีชีส์ ที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ ส่วนสายพันธุ์ที่มีเมดิงไทป์ของ *Metschnikowia agaves* แตกต่างกันถึง 5 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ *Williopsis californica* ที่ตรวจสอบ 17 สายพันธุ์ มีความแตกต่าง 0-6 นิวคลีโอไทด์ แต่ 3 สายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 5-6 นิวคลีโอไทด์นั้นเป็นการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ติดกัน (base contiguous deletion) มากกว่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (base substitution) นอกจากนี้ยังได้ทำการหาความสัมพันธ์ของ

ดีเอ็นเอในนิวเคลียสพบว่าคู่ของสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ มักจะมีนิวคลีโอไทด์ ต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์และจัดว่าเป็นคนละสปีชีส์ การค้นพบที่เห็นได้จากการเปรียบเทียบข้างต้นใช้ทำนายว่าถ้าสายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในโคเมน D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละ สปีชีส์และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็น สปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมากๆ (Kurtzman and Robnett, 1998)

จนถึงปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA จำนวนหลายร้อยสายพันธุ์และมีการรวบรวมข้อมูลเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล ที่ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.emblheidelberg.de>) และ DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ

แยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) จากตัวอย่าง ดิน, ส่วนประกอบของพืช, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย แกลบ ขี้เลื่อย ฟาง ช้างข้าวโพด และตัวอย่างอื่นๆ จำนวน 79 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ในอาหาร D-Xylose yeast nitrogen base (Xylose-YNB) broth (ประกอบด้วย 2 % D-Xylose, 0.67 % Difco Yeast nitrogen base ปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติม โซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มา streak (streak) ลงบนอาหาร Xylose-YNB agar พีเอช 5.5 ที่เติมโซเดียมโพรพิโอเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ และสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนปรากฏโคโลนี เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่เป็นยีสต์ และมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เช่น สี ขนาด ความมันวาวที่ผิวหน้าโคโลนี ขอบโคโลนี เป็นต้น แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar จากนั้นจึงเก็บลง YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) โดยนำยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง มาเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยใส่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที และนำกลับไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยง (LABNET, USA) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บของเหลวเหนือ

ตะกอน (supernatant) ใส่น้ำเกลือ micro centrifuge หลอดใหม่ และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอูทกโซพอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโคเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kurtzman and Robnett (1998) โดยใช้ NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) เป็น forward primer และ NL4 (5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3) เป็น reverse primer เตรียม PCR reaction mixture ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต Taq polymerase (Fermentas, USA) ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังนี้

PCR buffer (10X)	3	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25 mM)	2.4	ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 mM)	2.4	ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	0.9	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5U/μl)	0.15	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterilized water	17.25	ไมโครลิตร
ปริมาตรทั้งหมด	30	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโคเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ในเครื่อง PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (pre-denaturation)
2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (denaturation)
3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที (annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (extension)
5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (final extension)

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ PCR product โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำเจลไปย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยเครื่อง UV transilluminator (MiniBioPro, Bio imaging system) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ นำ PCR product ผสมกับ PB buffer (ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product) ในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column อีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์วางลงในหลอด micro centrifuge หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในคอลัมน์ด้วยน้ำรีเวอร์สออสโมซิส ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มของ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit โดยนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมี 100 bp DNA Ladder เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene

PCR product บริสุทธิ์ที่ได้ นำไปหาลำดับเบสของโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTN (basic local alignment search tool for nucleotide) homology search program (Altschul *et al.*, 1997) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้า 2 สายพันธุมี

การแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่สัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (sister species) (Kurtzman and Robnett, 1998)

2.5 การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยใช้ multiple alignment program CLUSTAL X ver. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) ส่วนต้นไม้วิวัฒนาการสร้างจาก ข้อมูลความแตกต่างทางวิวัฒนาการตามวิธี two-parameter of Kimura (Kimura, 1980) และ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3. การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและ อนุกรมวิธานเคมี

เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นำยีสต์ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่มาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Yarrow (1998) ในหนังสือ The Yeast, A Taxonomic Study, 4th edition ซึ่งได้แก่ สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ และการสร้างแอสโคสปอร์

3.1.1 สันฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว

การศึกษาสันฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวทำโดยการเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ตรวจสอบสันฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่าง กลไกการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ การจัดเรียงตัวของเซลล์ (เดี่ยว, คู่ หรืออยู่เป็นกลุ่มใหญ่) ขนาดของเซลล์ รวมทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ (culture characteristic) ในอาหารเหลว เช่น เชื้อลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า (pellicle) หรือจับกลุ่มกันเป็นก้อนเล็กๆ ตกตะกอน (flocculent) หรือเป็นเมือกตกตะกอน (mucoïd sediment) หรือเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด (ring) หรือเกาะกันเป็นก้อนเหนียว (coherent) หรือเกาะกันแน่นแข็ง (compact)

3.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

เพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหาร YM agar และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของยีสต์บนอาหาร YM agar โดยสังเกตสี เนื้อสัมผัส (texture) ผิวหน้า ความนูน และขอบของโคโลนี

3.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar หรือ potato dextrose agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไปในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำสไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานเพาะเชื้อ เพาะเชื้อบางๆ โดยการสตรีกบนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 3 วัน

3.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

เพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ เช่น YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้าง

แอสโคสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มเป็นเวลา 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยรายงานรูปร่าง สี และจำนวนของแอสโคสปอร์ ตลอดจนรูปร่าง สี และความคงทนของแอสคัส

3.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

3.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น ดี-ไซโลส, กรดดี-กลูโคโรนิกและอินอซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 40 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส, กาแลกโทสและซอร์โบส
ไดแซ็กคาไรด์	เซลโลไบโอส, แลกโทส, มอลโทส, เมลลิไบโอส, ซูโครสและทรีฮาโลส
ไตรแซ็กคาไรด์	เมลลิซิโทสและราฟฟิโนส
พอลิแซ็กคาไรด์	อินูลินและแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส, แอล-อะราบิโนส, ดี-ไรโบส, แอล-แรมโนสและดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล, อิริทริทอล, ดี-กลูซิทอล, อินอซิทอล, ดี-แมนนิทอล, กลีเซอรอล, ไรบิทอล, เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก, กรดแลกติก, กรดซัคซินิก, กรดดี-กลูโคนิก, กรดดี-กลูโคโรนิกและกรดกาแลกทูโรนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นเอซิทิล-ดี-กลูโคซามีนและดี-กลูโคโน-5-แลกโทน

บางครั้งอาจต้องเพิ่มการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบบางอย่างเพื่อแยก
ระหว่างสปีชีส์ของบางสกุล สารประกอบเหล่านั้น คือ 2-คีโต-ดี-กลูโคเนตและ5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวใช้อาหาร
ในโตรเจนเบสที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control)
และใช้อาหารในโตรเจนเบสที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก
(positive control)

เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้รูปถ่ายเชื้อลงไปในน้ำ
กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยใช้กระดาษขาว
ขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบบกับ
หลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้ำเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มอง
ผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ)
จากนั้นเพาะเชื้อโดยใช้ฟาสเจอร์ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหาร
ทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
ตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้น
ด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการ
เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเฉียงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ
ดังนี้ +++ คือ การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็น
เส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด และ - คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียด
ต่อไปนี้

+	=	มีการเจริญ (positive) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1 หรือสัปดาห์ที่ 2
l	=	มีการเจริญล่าช้า (delayed positive, latent) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ หรือ นานกว่า
s	=	มีการเจริญช้า (slow positive) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้าๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w	=	มีการเจริญน้อย (weak positive) โดยอ่านผลเป็น +
-	=	ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็น -
(+)	=	ไม่ค่อยพบการเจริญ (seldom positive)

v	=	ผันแปร (variable) คือบางสายพันธุ์มีการเจริญและบางสายพันธุ์ไม่มีการเจริญ
+/w	=	มีการเจริญหรือเจริญน้อย คือทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย
w/-	=	มีการเจริญน้อยหรือไม่เจริญ

3.2.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักหมายถึงการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่าง ๆ กัน โดยทั่วไปน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักของยีสต์ คือ ดี-กลูโคส, ดี-กาแลกโทส, มอลโทส, ซูโครส, โซโลส, ทรีฮาโลส, แล็กโทสและราฟฟิโนส โดยทดสอบการหมักน้ำตาลตามวิธีของ Yarrow (1998) วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงไปใต้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบบนหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล่าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้ฟาสเจอร์ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณที่สะสมแก๊สไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

+	=	มีการหมักรุนแรง (strong positive) คือ มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สภายใน 7 วัน
1	=	การหมักเกิดล่าช้า (delayed positive หรือ latent positive) คือ มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สอย่างรวดเร็ว แต่การหมักเกิดหลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
s	=	การหมักเกิดช้าๆ (slowly positive) คือ มีแก๊สค่อยๆ เข้าไปจนเต็มหลอดดักแก๊ส หลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
+/w	=	การหมักอ่อน (weak positive) คือ มีแก๊สไม่เต็มหลอดดักแก๊ส (มีแก๊สน้อยกว่าหนึ่งในสามของหลอด ในขณะที่ถ้ามีแก๊สมากกว่าหนึ่งในสามของหลอดจัดว่าเป็นบวก)
-	=	ไม่มีการหมัก คือ ในหลอดดักแก๊สไม่มีแก๊ส
v	=	บางสายพันธุ์หมักน้ำตาลได้ บางสายพันธุ์ไม่หมัก

3.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนศึกษาบนอาหารแข็งโดยใช้ starved inoculum ตามวิธีของ Nakase and Suzuki (1986) ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการแอสซิมิเลตมี 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, โปแตสเซียมไนเตรต, โซเดียมไนไตรต์, เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์, แอล-ไลซีน และกลูตาเมตไฮโดรคลอไรด์

ศึกษาการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนโดยเฉพาะยีสต์บนอาหาร YM agar เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหาร Yeast Carbon Base (YCB) broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ในโตรเจนที่สะสมไว้ในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้พาสเจอร์ปีเปิดหดยเซลล์ยีสต์แขวนลอย 1 หยดลงบนจานอาหาร YCB agar ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองใช้อาหาร YCB agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหาร YCB agar ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก ตรวจสอบโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

3.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์จะตรวจสอบตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยตรวจภายหลังการทดสอบการแอซซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจน เสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยหยด Lugol's solution ลงในหลอดทดสอบการแอซซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบนจานอาหารทดสอบการแอซซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินแกมเขียว แสดงว่ามีการสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

3.2.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินจะทำการทดสอบตามวิธีของ Komagata and Nakase (1967) โดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

3.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

การสร้างกรดจากกลูโคสสามารถตรวจสอบได้ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ใน Custer's chalk medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเกิดโซนใสบริเวณรอบๆ เชื้อ

3.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซิมายด์

ตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิมายด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยทดสอบในอาหารเหลวที่มีแบคทีเรีย-ยีสต์ในโตรเจนเบส และดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซิมายด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน เพาะยีสต์ลงในอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ

28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.2.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือเกลือความเข้มข้นสูงตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงลงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ อาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

3.2.9 การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงในอาหาร YM broth และบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 15, 25, 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเจริญของยีสต์ เช่นเดียวกับการตรวจสอบการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ตรวจการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียใช้ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

3.2.11 การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนมบลูปี

ทดสอบการทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนมบลูปีบนอาหารแข็งตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปล่อยให้เย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง หยด DBB reagent ลงที่ผิวหน้าโคโลนี ถ้าเกิดสีแดงเข้มจนถึงสีม่วงภายในเวลา 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้องแสดงว่าผลเป็นบวก

3.3 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (การวิเคราะห์ยูบิควิโนน)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ การศึกษาชนิดโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) หรือยูบิควิโนน (ubiquinone) ซึ่งเป็นไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนนที่มีความสำคัญในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในการหายใจของยีสต์ การวิเคราะห์ยูบิควิโนนทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yamada and Kondo (1973)

3.3.1 การเตรียมเซลล์

เพาะยีสต์ในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมเป็นสารแขวนลอยเซลล์ โดยเติมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเทใส่ฟลาस्क้นกลม (round bottom flask) เพื่อเตรียมสกัดยูบิควิโนนในขั้นตอนถัดไป

3.3.2 การสกัดยูบิควิโนนจากเซลล์ยีสต์

เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัมลงในฟลาस्क้นกลมที่มีสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไพโรแกลลอล (pyrogallol) 1.5 กรัม และเมทานอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึง refluxed ด้วยน้ำเย็นนาน 30 นาที ใน heating mantle โดยใส่ glass bead ลงไปในระหว่างการต้มเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง เมื่อ refluxed เสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมเฮกเซน ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เฮกเซนผสมกับเมทานอล เพื่อดึงยูบิควิโนนที่อยู่ในเมทานอลให้อยู่ในเฮกเซน ถ่ายใส่กรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน ระหว่างเขย่าให้เปิดจุกเพื่อปล่อยอากาศที่อยู่ภายในกรวยแยกออก เก็บสารละลายในส่วนของเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนสุด ปล่อยชั้นเมทานอลที่มีตะกอนดำของไพโรแกลลอลและชั้นของน้ำทิ้งไป ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง ถ่ายสารละลายเฮกเซนใส่ในปิเก็ตเจอร์ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไปในปริมาณน้อย ๆ เพื่อดึงน้ำออก

ถ่ายสารละลายลงในฟลากลสำหรับระเหย (evaporating flask) ทำการระเหยเฮกเซนออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และละลายด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร

3.3.3 การทำให้ยูบิควิโนนบริสุทธิ์

เตรียมสารประกอบยูบิควิโนนให้บริสุทธิ์ด้วยการทำ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel F254 TLC plate) โดยใช้เฮกเซนและไดเอทิลอีเทอร์ ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็น mobile phase ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองที่มีค่า Rf ประมาณ 0.21 ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนนอีกครั้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีดำ ขูดแถบสีเหลืองที่ปรากฏบนแผ่น TLC และสกัดด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

3.3.4 การวิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วย HPLC

วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบยูบิควิโนนด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1100, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอล และไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เป็น mobile phase อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบผลที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่วิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนนมาตรฐาน

4. การคัดเลือกยีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลส

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะยีสต์บนอาหาร 2% D-Xylose yeast extract peptone (YP) agar ซึ่งประกอบด้วย 2% D-Xylose, 2% Peptone และ 1% Yeast extract บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร 2% D-Xylose-YP broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลากลขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.2 การทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากไซโลส

ถ่ายกล้ำเชื้อจากข้อ 4.1 ลงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth (4% D-Xylose, 2% Peptone, และ 1% Yeast extract) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer (UV-1700 pharماسpec, Shimadzu, Japan) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยเครื่อง Gas chromatography (GC-9A, Shimadzu, Japan) โดยใช้เอ็น-โพรพานอลเป็น internal standard

ผลและวิจารณ์

1. การแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ

เก็บตัวอย่าง ดิน, ส่วนประกอบของพืช, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ น้ำ ปุ๋ย จาก 15 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร, สระบุรี, ราชบุรี, เพชรบุรี, ประจวบคีรีขันธ์, นครราชสีมา, ชัยภูมิ, บุรีรัมย์, สุรินทร์, อุบลราชธานี, อำนาจเจริญ, ร้อยเอ็ด, เชียงใหม่, เชียงราย และพะเยา ได้ตัวอย่างรวม 79 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไซโลสและสังเกตความแตกต่างของโคโลนีที่ปรากฏพบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 133 ไอโซเลต โดยจากตัวอย่างดิน 37 ตัวอย่างแยกยีสต์ได้ 61 ไอโซเลต (ตารางที่ 3) จากตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 38 ตัวอย่างแยกยีสต์ได้ 64 ไอโซเลต (ตารางที่ 4) และจากตัวอย่างอื่นๆ 4 ตัวอย่างแยกยีสต์ได้ 8 ไอโซเลต (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
1	ดิน	ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน	29 เม.ย. 51	SN2-2
2	ดินป่า	โครงการพัฒนาแม่ฟ้าหลวง อ.ห้วยหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ พิกัด N12°37.251' E99°45.014'	29 มิ.ย. 51	-
3	ดินป่า	โครงการพัฒนาแม่ฟ้าหลวง อ.ห้วยหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	29 มิ.ย. 51	-
4	ดินป่า	โครงการพัฒนาแม่ฟ้าหลวง อ.ห้วยหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ พิกัด N12°36.412' E99°46.054'	29 มิ.ย. 51	-
5	ดินป่า	โครงการพัฒนาแม่ฟ้าหลวง อ.ห้วยหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	29 มิ.ย. 51	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
6	ดิน	ไร่อ้อย อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ พิกัด N12°35.077' E99°50.0781'	29 มิ.ย. 51	-
7	ดิน (สวนอินทผลาลัม)	ศูนย์รักษาการพัฒนาห้วยทราย อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี พิกัด N12°42.149' E99°54.399'	29 มิ.ย. 51	A17-1, A17-2
8	ดิน (ใต้ต้นไม้ยม)	ลาดพร้าว ซอย 15 กรุงเทพมหานคร	29 มิ.ย. 51	A18-1
9	ดิน (ใต้ต้นไม้ยม)	ลาดพร้าว ซอย 15 กรุงเทพมหานคร	29 มิ.ย. 51	A19-1
10	ดิน	หน้าตึกจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย – พันธุศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร	29 มิ.ย. 51	A20-1, A20-2, A20-3
11	ดิน	โรงงานน้ำตาล จ.ราชบุรี	ก.ค. 51	A21-1
12	ดิน	โรงงานน้ำตาล จ.ราชบุรี	ก.ค. 51	A22-1
13	ดิน	โรงงานน้ำตาล จ.ราชบุรี	ก.ค. 51	-
14	ดิน (ไร่ข้าวโพด)	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกลกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	-
15	ดิน	ไร่อ้อยและมันสำปะหลัง จ.นครราชสีมา พิกัด N15°01'07.2" E102°19'33.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 24, KU-Xs 25
16	ดิน	ไร่อ้อยและมันสำปะหลัง จ.นครราชสีมา พิกัด N15°01'07.2" E102°19'33.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 30, KU-Xs 31
17	ดินคอกวัว	อ. ม่วงสามสิบ จ. อุบลราชธานี พิกัด N15° 30' 33.3" E104° 43' 46.4"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 57

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
18	ดิน	โรงเรือนไม้ อ.หนองพอก จ.ร้อยเอ็ด พิกัด N16°16'45.4" E104°07'07.8"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 62, KU-Xs 63
19	ดิน	โรงเรือนไม้ อ.หนองพอก จ.ร้อยเอ็ด พิกัด N16°16'45.4" E104°07'07.8"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 64, KU-Xs 65
20	ดิน	สวนสิริกิตต์บริเวณเรือนกระจก อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°53'10.9" E98°51'44.4"	15 ธ.ค. 51	NT01
21	ดิน	ห้วยฮวกปุม อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°53'03.4" E098°51'30.8"	15 ธ.ค. 51	NT02, NT03
22	ดิน	เขื่อนแม่งัด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด N19°09'40.5" E099°02'23.7"	15 ธ.ค. 51	NT04, NT05
23	ดิน	วนอุทยานน้ำตกบัวตอง-น้ำพุ 7 สี อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ พิกัด N19°04'37.5" E099°05'12.8"	15 ธ.ค. 51	NT06, NT07, NT08
24	ดิน	วนอุทยานน้ำตกบัวตอง-น้ำพุ 7 สี อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ พิกัด N19°04'37.5" E099°05'12.8"	15 ธ.ค. 51	NT09, NT10, NT11
24	ดิน	ป่าข้างทางไปดอยแม่สลอง อ.แม่จัน จ.เชียงราย พิกัด N19°24'16.3" E099°06'32.5"	15 ธ.ค. 51	NT12, NT13, NT14
26	ดิน	ดอยแม่สลอง อ.แม่จัน จ.เชียงราย พิกัด N20°09'29.3" E099°39'04.4"	15 ธ.ค. 51	NT15
27	ดิน	ดอยแม่สลอง อ.แม่จัน จ.เชียงราย พิกัด N20°09'29.3" E099°39'04.4"	15 ธ.ค. 51	NT16, NT17, NT18
28	ดินเหนียว	ระบบประปาหมู่บ้านป่ามื่น ต.ปล้อง อ.เทิง จ.เชียงราย พิกัด N19°40'02.0" E100°06'26.8"	16 ธ.ค. 51	NT19, NT20, NT21, NT22

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
29	ดิน	ป่าสน ภูชี้ฟ้า ต.ดับเต่า อ.เทิง จ.เชียงราย พิกัด N19°51'02.5" E100°26'52.6"	16 ธ.ค. 51	NT23, NT24, NT25, NT26
30	ดิน	ป่าสน ภูชี้ฟ้า ต.ดับเต่า อ.เทิง จ.เชียงราย พิกัด N19°51'02.5" E100°26'52.6"	16 ธ.ค. 51	-
31	ดิน	จุดชมวิวยางนา อ.เมือง จ.พะเยา พิกัด N19°03'43.9" E099°46'54.5"	16 ธ.ค. 51	NT29, NT30
32	ดิน	จุดชมวิวยางนา อ.เมือง จ.พะเยา พิกัด N19°03'43.9" E099°46'54.5"	16 ธ.ค. 51	NT31 NT33, NT34
33	ดิน	ป่าสน ป่าสัก ห้วยฮ่องไคร้ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°52'43.3" E099°13'02.7"	16 ธ.ค. 51	NT35, NT36, NT37
34	ดิน	ป่าสน ป่าสัก ห้วยฮ่องไคร้ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°52'43.3" E099°13'02.7"	16 ธ.ค. 51	NT38
35	ดินผสมซากหญ้า	ป่าสนดอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°30'40.7" E098°30'46.4"	17 ธ.ค. 51	NT43, NT44, NT45
36	ดิน	ป่าบริเวณรอบหลวง อ.ฮอด จ.เชียงใหม่	17 ธ.ค. 51	NT46, NT47
37	ดิน	ป่าสนสถานีวิจัยบ่อแก้ว อ.ฮอด จ.เชียงใหม่ พิกัด N18°09'07.5" E098°23'20.7"	17 ธ.ค. 51	NT48, NT49

ตารางที่ 4 ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
1	เปลือกไม้	-	พ.ค. 51	A6-1, A6-2
2	เปลือกไม้	-	พ.ค. 51	-
3	เปลือกไม้	-	พ.ค. 51	A8-1, A8-2
4	เปลือกงาดำ	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 01, KU-Xs 02, KU-Xs 03
4	ซังข้าวโพด	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 04, KU-Xs 05,
5	ตอข้าวโพด	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 07, KU-Xs 08, KU-Xs 09
6	ซังข้าวโพดป่น	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 10
7	ซังข้าวโพด ที่ย่อยสลายแล้ว	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 11, KU-Xs 12
8	ซังข้าวโพด ที่ย่อยสลายแล้ว	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 13
9	ก้านข้าวฟ่างสุก	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวาทกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 14, KU-Xs 15

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
10	ฝอยข้าวโพด	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 16, KU-Xs 17
11	ซังข้าวโพด ที่ย่อยสลายแล้ว	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 18
12	ซากหญ้า	สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกสิกิจ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี พิกัด N14°38'34.2" E101°19'15.8"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 20
13	ใบมันสำปะหลัง	ไร่ย่อยและมันสำปะหลัง จ.นครราชสีมา พิกัด N15°01'07.2" E102°19'33.1"	28 ก.ค. 51	
14	ใบอ้อย	ไร่ย่อยและมันสำปะหลัง จ.นครราชสีมา พิกัด N15°01'07.2" E102°19'33.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 29
15	ต้นอ้อยสุ	ไร่ย่อยและมันสำปะหลัง จ.นครราชสีมา พิกัด N15°01'07.2" E102°19'33.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 32, KU-Xs 33
16	ฟางหมัก	จ.นครราชสีมา พิกัด N15°03'17.8" E102°21'46.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 34, KU-Xs 35
17	ฟางแห้ง	จ.นครราชสีมา พิกัด N15°03'17.8" E102°21'46.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 36
18	ฟางหมัก	จ.นครราชสีมา พิกัด N15°03'17.8" E102°21'46.1"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 37, KU-Xs 38
19	ฟางแห้ง	อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ พิกัด N15°00'31.0" E102°54'06.4"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 39, KU-Xs 40

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
20	ฟางหมัก	อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ พิกัด N15°00'31.0" E102°54'06.4"	28 ก.ค. 51	KU-Xs 41, KU-Xs 42,
21	ฟางแห้ง	จ.สุรินทร์ พิกัด N14°54'27.8" E103°45'05.6"	29 ก.ค. 51	KU-Xs 44, KU-Xs 45
22	ฟางแห้ง	จ.สุรินทร์ พิกัด N14°54'27.8" E103°45'05.6"	29 ก.ค. 51	KU-Xs 46, KU-Xs 47, KU-Xs 48
23	ฟางหมัก	จ.สุรินทร์ พิกัด N14°54'27.8" E103°45'05.6"	29 ก.ค. 51	KU-Xs 50
24	เปลือกดินจามจรี	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี พิกัด N15°19'08.4" E105°29'51.0"	29 ก.ค. 51	-
25	ยางดินจามจรี	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี พิกัด N15°19'08.4" E105°29'51.0"	29 ก.ค. 51	KU-Xs 51
26	เฟิร์น (บนดินจามจรี)	อ.โขงเจียม จ.อุบลราชธานี พิกัด N15°19'08.4" E105°29'51.0"	29 ก.ค. 51	KU-Xs 52,
27	ฟางหมัก	อ. ม่วงสามสิบ จ. อุบลราชธานี พิกัด N15°30'33.3" E104°43'46.4"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 54, KU-Xs 55, KU-Xs 56
28	จี๋เลื่อย (ต้นมะม่วง)	ฟาร์มเห็ด อ. เมือง จังหวัดอำนาจเจริญ พิกัด N15°47'45.7" E104°38'00.6"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 58, KU-Xs 59
29	จี๋เลื่อย (จากก้อนเห็ดเก่า)	ฟาร์มเห็ด อ. เมือง จังหวัดอำนาจเจริญ พิกัด N15°47'45.7" E104°38'00.6"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 60, KU-Xs 61
30	แกลบ	อ. หนองพอก จ. ร้อยเอ็ด พิกัด N16°16'45.4" E104°07'07.8"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 66, KU-Xs 67

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่ เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
31	จีเลื้อย	อ. หนองพอก จ. ร้อยเอ็ด พิกัด N16°16'45.4" E104°07'07.8"	30 ก.ค. 51	KU-Xs 68, KU-Xs 69
32	ขานอ้อยหมัก	โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ. ภูเขียว จ. ชัยภูมิ พิกัด N16°28'17.0" E102°07'27.5"	31 ก.ค. 51	-
33	ขานอ้อยหมัก UFIO ล่าง	โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ. ภูเขียว จ. ชัยภูมิ พิกัด N16°28'17.0" E102°07'27.5"	31 ก.ค. 51	KU-Xs 72, KU-Xs 73
34	ขานอ้อยหมัก UFIO บน	โรงงานน้ำตาลมิตรผล อ. ภูเขียว จ. ชัยภูมิ พิกัด N16°28'17.0" E102°07'27.5"	31 ก.ค. 51	KU-Xs 74, KU-Xs 75
35	ต้นพลูแห้ง	อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ อ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี	31 ก.ค. 51	KU-Xs 76, KU-Xs 77
36	เปลือกไม้	อุทยานแห่งชาติแก่งตะนะ อ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี	31 ก.ค. 51	KU-Xs 78 KU-Xs 79
37	ขุยจากขอนไม้ผู้ ธรรมชาติ	จุดชมวิวสูงสุดทางเดินศึกษา ธรรมชาติ คอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ. เชียงใหม่	31 ก.ค. 51	NT40
38	ขุยจากขอนไม้ผู้	พระราชดอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่	31 ก.ค. 51	NT41, NT42

ตารางที่ 5 ผลการแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างอื่นๆ ที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย

ลำดับ	ตัวอย่าง	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่แยกได้
1	น้ำ	ม.เกษตรศาสตร์ บางเขน	29 เม.ย. 51	SN1-1, SN1-2, SN1-3, SN1-4
2	ปุ๋ยหมัก	โครงการชัยพัฒนาแม่ฟ้าหลวง อ.ห้วยหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	29 มิ.ย. 51	-
3	ปุ๋ยหมัก	ศูนย์รักษากาการพัฒนาห้วยทราย อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	29 มิ.ย. 51	A15-1, A15-2, A15-3
4	ปุ๋ยหมัก	ศูนย์รักษากาการพัฒนาห้วยทราย อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี พิกัด N12°42.149' E99°54.399'	29 มิ.ย. 51	A16-1

2. การจัดจำแนกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วย เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการ

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ 133 ไอโซเลต ด้วยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดย การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการจัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของยีสต์สปีชีส์ต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) โดยใช้โปรแกรมโดยใช้ BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (describe species) หรือที่รู้จักแล้ว (known species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (undescribe species) ที่หมายถึงสปีชีส์ที่ยังไม่ได้มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์ แต่มีการนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ไปจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลแล้ว หรือสปีชีส์ใหม่ (new species) ใช้การพิจารณาจากหลักเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนก กับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล หากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ (ถือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ แสดงว่ายีสต์ที่ศึกษาเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือรู้จักแล้ว และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมาก และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยดูจากตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene จากหลักการดังกล่าวสามารถจัดจำแนกยีสต์ 133 ไอโซเลตออกเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 6) คือ

2.1 ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จำนวน 133 ไอโซเลต พบจำนวน 108 ไอโซเลต (คิดเป็น 81.2 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วเนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์และอยู่ในช่วง 0-3 นิวคลีโอไทด์ โดย 73 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ 18 สปีชีส์ใน 8 สกุล ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ต่างๆ ดังนี้ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 4, 5)

1.) วงศ์ Candidaceae มี 2 สกุล 9 สปีชีส์ คือ *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis* และ *Geotrichum silvicola*

2.) วงศ์ Saccharomycetaceae มี 5 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Barnettozyma californica*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi*

3.) วงศ์ Dipodascaceae มี 1 สกุล 1 สปีชีส์ คือ *Zygoascus hellenicus*

ยีสต์ที่เหลือจำนวน 35 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นเป็นแบคทีเรียอิมยีสต์ยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes 2 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus heveanensis*, *C. humicola*, *C. laurentii*, *C. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans* และ *T. terricola* (ตารางที่ 7 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 6 การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่าง ดิน ส่วนประกอบของพืช วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและตัวอย่างอื่นๆ ที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย เป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่และยีสต์สปีชีส์ใหม่

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
SN1-1	AB557754	<i>Zygoascus hellenicus</i> (U40125)	524/525	99.8	0	1	0.2	<i>Zygoascus hellenicus</i>
SN1-2	AB557755	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Candida tropicalis</i>
SN1-3	AB557756	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
SN1-4	AB557757	<i>Zygoascus hellenicus</i> (U40125)	562/566	99.3	0	4	0.7	Known or New Species
SN2-2	AB557758	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	569/570	99.8	1	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
A6-1	AB557759	<i>Candida blankii</i> (U45704)	560/560	100	0	0	0	<i>Candida blankii</i>
A6-2	AB557760	<i>Candida</i> sp. HA174 (AF272395)	468/475	98.5	2	5	1.1	New species
A8-1	AB557761	<i>Candida blankii</i> (U45704)	560/560	100	0	0	0	<i>Candida blankii</i>
A8-2	AB557762	<i>Candida blankii</i> (U45704)	560/560	100	0	0	0	<i>Candida blankii</i>
A15-1	AB557763	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	0	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
A15-2	AB557764	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	597/597	100	0	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
A15-3	AB557765	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	0	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
A16-1	AB557766	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	0	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
A17-1	AB557767	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	597/598	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
A17-2	AB557768	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	0	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
A18-1	AB557769	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	597/597	100	0	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>
A19-1	AB557770	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
A20-1	AB557771	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	591/596	99.2	1	4	0.7	Known or New Species
A20-2	AB557772	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
A20-3	AB557773	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
A21-1	AB557774	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
A22-1	AB557775	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.3	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs01	AB557776	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	596/597	99.8	1	0	0.2	<i>Trichosporon asahii</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs02	AB557777	<i>Trichosporon asahii</i> (AF189882)	597/598	99.0	1	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>
KU-Xs03	AB557778	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AY315663)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs04	AB557779	<i>Candida pseudointermedia</i> (U44816)	518/518	100	0	0	0	<i>Candida pseudointermedia</i>
KU-Xs05	AB557780	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs07	AB557781	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs08	AB557782	<i>Candida pyralidae</i> (AY013715)	558/563	99.0	2	3	0.5	<i>Candida pyralidae</i>
KU-Xs09	AB557783	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs10	AB557784	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs11	AB557785	<i>Geotrichum silvicola</i> (AY158042)	536/541	99.1	1	4	0.7	Known or New Species
KU-Xs12	AB557786	<i>Trichosporon asahii</i> (AF189882)	597/597	100	0	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>
KU-Xs13	AB534915	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	559/571	97.9	1	11	1.2	New species
KU-Xs14	AB557787	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs15	AB557788	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs16	AB557789	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs17	AB557790	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
KU-Xs18	AB534916	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	558/571	97.7	2	11	1.9	New species
KU-Xs20	AB534917	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	559/571	97.9	1	11	1.9	New species
KU-Xs24	AB557791	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs25	AB557792	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs29	AB557793	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs30	AB557794	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AY315663)	597/598	99	1	0	0	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs31	AB557795	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs32	AB557796	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs33	AB557797	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs34	AB557798	<i>Candida yuanshanicus</i> (EF460670)	550/565	97.0	6	9	1.6	New species
KU-Xs35	AB557799	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs36	AB557800	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs37	AB557801	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs38	AB557802	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs39	AB557803	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs40	AB557804	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs41	AB557805	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs42	AB557806	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs44	AB557807	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs45	AB557808	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs46	AB557809	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs47	AB557810	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs48	AB557811	<i>Candida membranifaciens</i> (U45792)	542/542	100	0	0	0	<i>Candida membranifaciens</i>
KU-Xs50	AB557812	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs51	AB557813	<i>Cryptococcus heveanensis</i> (AF075467)	598/599	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus heveanensis</i>
KU-Xs52	AB557814	<i>Lindnera rhodanensis</i> (U73571)	571/573	99.7	0	2	0.4	<i>Lindnera rhodanensis</i>
KU-Xs54	AB557815	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs55	AB557816	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
KU-Xs56	AB557817	<i>Candida membranifaciens</i> (U45792)	542/542	100	0	0	0	<i>Candida membranifaciens</i>
KU-Xs57	AB557818	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs58	AB557819	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs59	AB557820	<i>Lindnera rhodanensis</i> (U73571)	572/573	99.8	0	1	0.2	<i>Lindnera rhodanensis</i>
KU-Xs60	AB557821	<i>Lindnera rhodanensis</i> (U73571)	572/573	99.8	0	1	0.2	<i>Lindnera rhodanensis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs61	AB557822	<i>Lindnera rhodanensis</i> (U73571)	572/573	99.8	0	1	0.2	<i>Lindnera rhodanensis</i>
KU-Xs62	AB557823	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs63	AB557824	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs64	AB557825	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs65	AB557826	<i>Lindnera rhodanensis</i> (U73571)	572/573	99.8	0	1	0.2	<i>Lindnera rhodanensis</i>
KU-Xs66	AB557827	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
KU-Xs67	AB557828	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs68	AB557829	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs69	AB557830	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs72	AB557831	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs73	AB557832	<i>Sporopachydermia lactativora</i> (U45851)	567/571	99.3	0	4	0.7	Known or New Species
KU-Xs74	AB557833	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
KU-Xs75	AB557834	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
KU-Xs76	AB557835	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
KU-Xs77	AB557836	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs78	AB557837	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	595/597	99.7	0	2	0.3	<i>Cryptococcus laurentii</i>
KU-Xs79	AB557838	<i>Pichia caribbica</i> (EU348786)	570/570	100	0	0	0	<i>Pichia caribbica</i>
NT01	AB557839	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686 (AF444718)	595/595	100	0	0	0	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686
NT02	AB557840	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	567/570	99.5	0	3	0.5	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
NT03	AB557841	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686 (AF444718)	595/595	100	0	0	0	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686
NT04	AB557842	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
NT05	AB557843	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	597/598	99.8	1	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT06	AB557844	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836)	593/594	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus humicola</i>
NT07	AB557845	<i>Cryptococcus terrestris</i> (EF370393)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus terrestris</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
NT08	AB557846	<i>Candida pseudointermedia</i> (U44816)	518/518	100	0	0	0	<i>Candida pseudointermedia</i>
NT09	AB557847	<i>Cryptococcus terrestris</i> (EF370393)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus terrestris</i>
NT10	AB557848	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27159 (EU011604)	486/486	100	0	0	0	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27159
NT11	AB557849	<i>Trichosporon terricola</i> (AB086382)	595/596	99.8	0	1	0.2	<i>Trichosporon terricola</i>
NT12	AB557850	<i>Geotrichum silvicola</i> (AY158042)	537/541	99.3	1	3	0.6	<i>Geotrichum silvicola</i>
NT13	AB557851	<i>Cryptococcus terrestris</i> (EF370393)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus terrestris</i>
NT14	AB557852	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836)	594/594	100	0	0	0	<i>Cryptococcus humicola</i>
NT15	AB557853	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT16	AB557854	<i>Debaryomyces fabryi</i> (U94927)	570/570	100	0	0	0	<i>Debaryomyces fabryi</i>
NT17	AB557855	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT18	AB557856	<i>Saturnispora saitoi</i> (U94932)	532/534	99.6	1	1	0.2	<i>Saturnispora saitoi</i>
NT19	AB557857	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
NT20	AB557858	<i>Candida pseudolambica</i> (U71063)	557/559	99.6	0	2	0.4	<i>Candida pseudolambica</i>
NT21	AB557859	<i>Geotrichum</i> sp. LY16 (AB499018)	545/545	100	0	0	0	<i>Geotrichum</i> sp. LY16
NT22	AB557860	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
NT23	AB557861	<i>Candida solani</i> (U70179)	564/568	99.3	0	4	0.7	May be new/known
NT24	AB557862	<i>Lindnera saturnus</i> (U75958)	573/574	99.8	0	1	0.1	<i>Lindnera saturnus</i>
NT25	AB557863	<i>Trichosporon moniliiforme</i> (AF105392)	596/596	100	0	0	0	<i>Trichosporon moniliiforme</i>
NT26	AB557864	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT29	AB557865	<i>Pichia exigua</i> (EF550237)	545/559	97.5	0	14	2.5	New species
NT30	AB557866	<i>Cryptococcus terrestris</i> (EF370393)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus terrestris</i>
NT31	AB557867	<i>Pichia pijperi</i> (U75418)	545/570	95.6	2	23	4.0	New species
NT33	AB557868	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	568/572	99.3	2	2	0.4	<i>Candida maltosa</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			necleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
NT34	AB557869	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Issatchenkia orientalis</i>
NT35	AB557870	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	597/597	100	0	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT36	AB557871	<i>Candida chiropterorum</i> (U45822.1)	557/578	96.4	4	17	3.0	New species
NT37	AB557872	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836)	594/594	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
NT38	AB557873	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836)	594/595	99.8	1	0	0	<i>Cryptococcus humicola</i>
NT40	AB557874	<i>Debaryomyces fabryi</i> (U94927)	563/570	98.8	0	7	1.2	New species
NT41	AB557875	<i>Candida coipomoensis</i> (U45747)	560/562	99.6	0	2	0.4	<i>Candida coipomoensis</i>
NT42	AB557876	<i>Candida coipomoensis</i> (U45747)	554/556	99.6	0	2	0.4	<i>Candida coipomoensis</i>
NT43	AB557877	<i>Barnettozyma californica</i> (U75957)	414/414	100	0	0	0	<i>Barnettozyma californica</i>
NT44	AB557878	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	525/525	100	0	0	0	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>
NT45	AB557879	<i>Barnettozyma californica</i> (U75957)	540/540	100	0	0	0	<i>Barnettozyma californica</i>
NT46	AB557880	<i>Cryptococcus terrestris</i> (EF370393)	596/597	99.3	0	1	0.2	<i>Cryptococcus terrestris</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

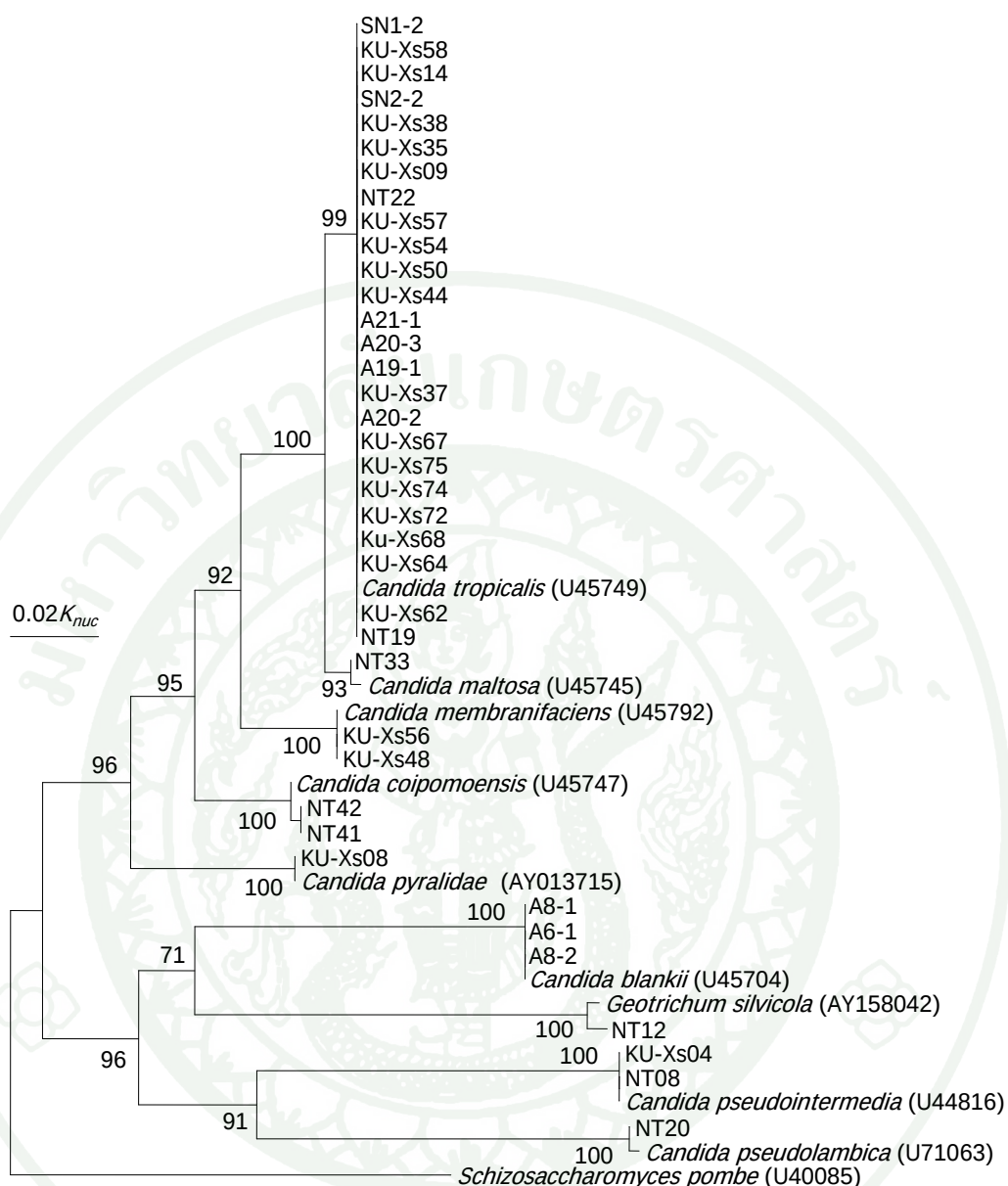
Isolate	Accession Number	Closest Species with Accession Number of DNA DataBank	Nucleotide Identity		Nucleotide different			Result of identification
			in D1/D2 domain		in D1/D2 domain			
			nucleotide identity / total nucleotides	% identity	no. Gap	nucleotide substitution		
						no.	%	
NT47	AB557881	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AF075469)	596/597	99.8	0	1	0.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
NT48	AB557882	<i>Cryptococcus humicola</i> (AF189836)	594/594	100	0	0	0	<i>Cryptococcus humicola</i>
NT49	AB557883	<i>Geotrichum</i> sp. LY5 (AB499010)	544/545	99.8	0	1	0.2	<i>Geotrichum</i> sp. LY5

ตารางที่ 7 ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

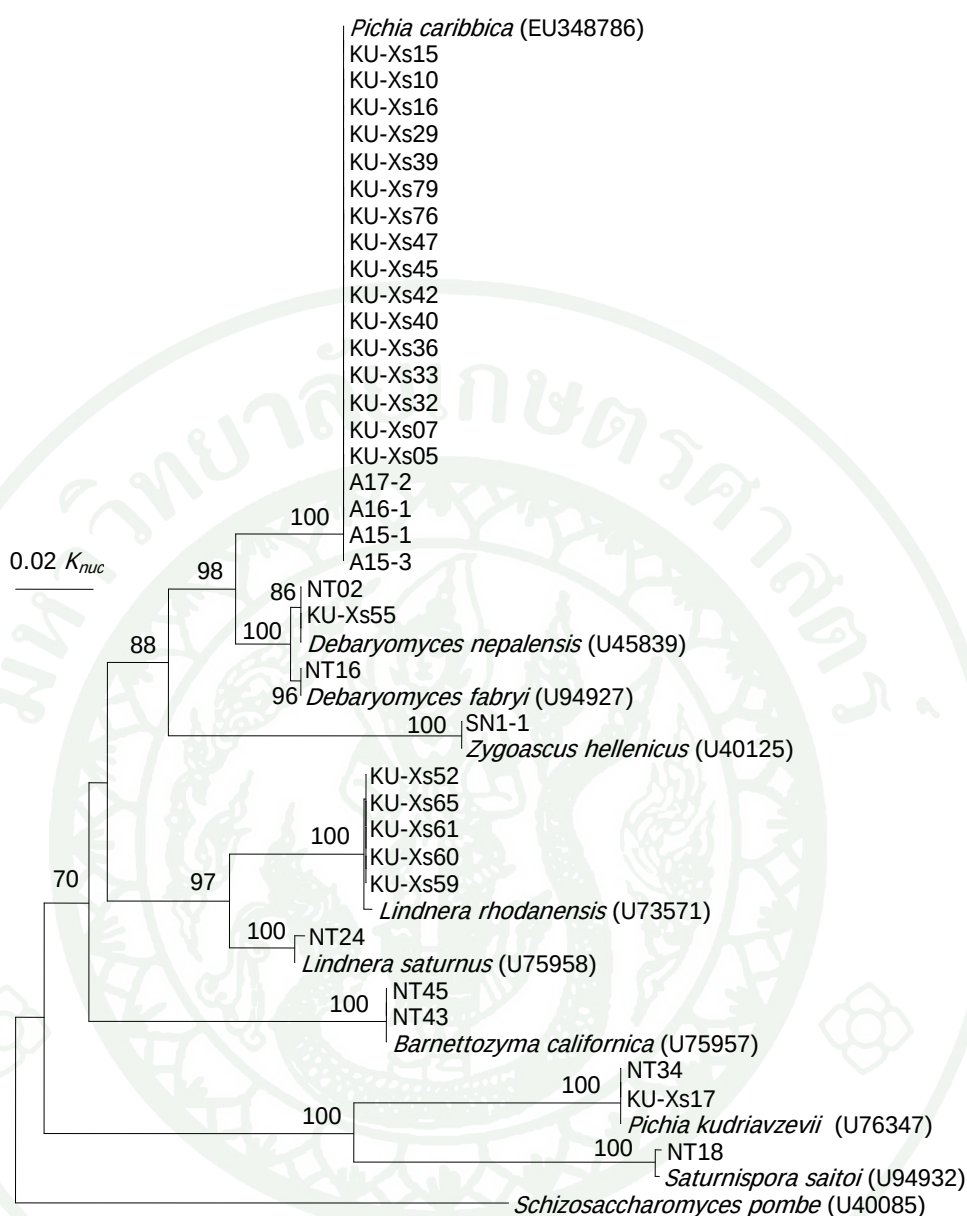
Group			
Family			No.
Genus	Strain		of strain
Species			
Ascomycetus yeast			
Candidaceae			
Candida			
<i>Candida blankii</i>	A6-2, A8-1, A8-2		3
<i>Candida coipomoensis</i>	NT41, NT42		2
<i>Candida maltosa</i>	NT33		1
<i>Candida membranifaciens</i>	KU-Xs48, KU-Xs56		2
<i>Candida pseudointermedia</i>	KU-Xs04, NT08,		2
<i>Candida pseudolambica</i>	NT20		1
<i>Candida pyralidae</i>	KU-Xs08		1
<i>Candida tropicalis</i>	SN1-2, SN2-2, A19-1, A20-2, A20-3, A21-1, KU-Xs09, KU-Xs14, KU-Xs35, KU-Xs37, KU-Xs38, KU-Xs44, KU-Xs50, KU-Xs54, KU-Xs57, KU-Xs58, KU-Xs62, KU-Xs64, KU-Xs67, KU-Xs68, KU-Xs72, KU-Xs74, KU-Xs75, NT19, NT22,		25
Geotrichum			
<i>Geotrichum silvicola</i>	NT12		1
Saccharomycetaceae			
Barnettozyma			
<i>Barnettozyma californica</i>	NT43, NT45		2
Debaryomyces			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	NT16		1
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	KU-Xs55, NT02		2
Lindnera			
<i>Lindnera rhodanensis</i>	KU-Xs52, KU-Xs59, KU-Xs60, KU-Xs61, KU-Xs65		5
<i>Lindnera saturnus</i>	NT24		1

ตารางที่ 7 (ต่อ)

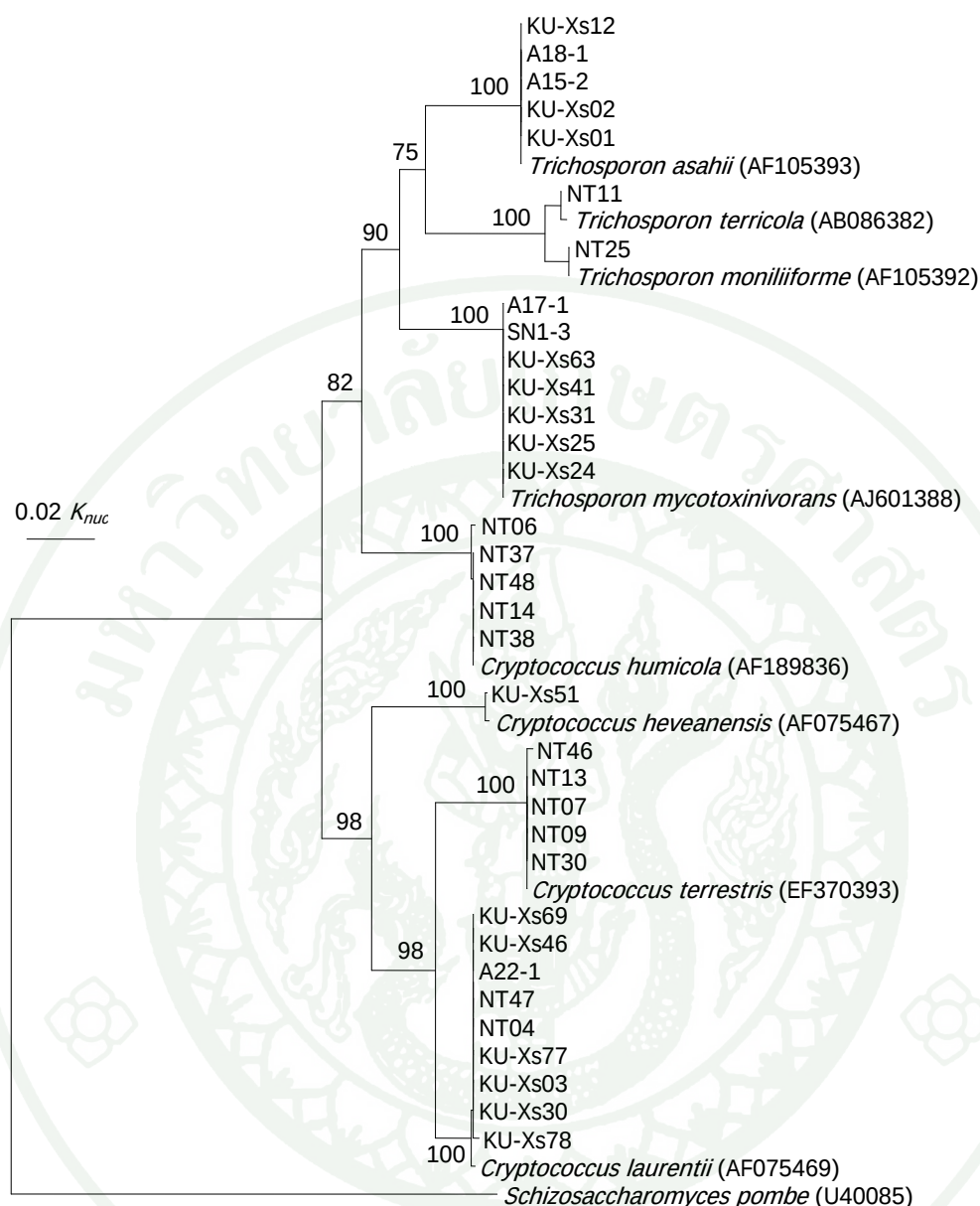
Group		
Family		No.
Genus	Strain	of strain
Species		
<i>Pichia</i>		
<i>Pichia caribbica</i>	A15-1, A15-3, A16-1, A17-2, KU-Xs05 KU-Xs07, KU-Xs10, KU-Xs15, KU-Xs16, KU-Xs29, KU-Xs32, KU-Xs33, KU-Xs36 KU-Xs39, KU-Xs40, KU-Xs42, KU-Xs45 KU-Xs47, KU-Xs76, KU-Xs79	20
<i>Pichia kudriavzevii</i>	KU-Xs17, NT34	2
<i>Saturnispora</i>		
<i>Saturnispora saitoi</i>	NT18	1
Dipodascaceae		
<i>Zygoascus</i>		
<i>Zygoascus hellenicus</i>	SN1-1	1
Basidiomycetus yeast		
<i>Cryptococcus</i>		
<i>Cryptococcus heveanensis</i>	KU-Xs51	1
<i>Cryptococcus humicola</i>	NT06, NT14, NT37, NT38, NT48	5
<i>Cryptococcus laurentii</i>	A22-1, KU-Xs03, KU-Xs30, KU-Xs46, KU-Xs69, KU-Xs77, KU-Xs78, NT04, NT47	9
<i>Cryptococcus terrestris</i>	NT07, NT09, NT13, NT30, NT46	5
<i>Trichosporon</i>		
<i>Trichosporon asahii</i>	A15-2, A18-1, KU-Xs01, KU-Xs02, KU-Xs12	5
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	NT25	1
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	SN1-3, A17-1, KU-Xs24, KU-Xs25, KU-Xs31, KU-Xs41, KU-Xs63, KU-Xs66	8
<i>Trichosporon terricola</i>	NT11	1



ภาพที่ 4 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Candidaceae และ สปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae, วงศ์ Dipodascaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่จำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว อยู่ในสกุล *Cryptococcus* และ *Trichosporon* ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซนต์

2.2 ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

ยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบายหมายถึง ยีสต์ที่ยังไม่ได้มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์ แต่มีการนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ไปจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูลแล้ว จากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จำนวน 133 ไอโซเลต พบจำนวน 11 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (คิดเป็น 8.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์และอยู่ในช่วง 0-3 นิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ในฐานข้อมูล โดยจากการจัดจำแนกพบ 3 ไอโซเลตจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Candidaceae ในสกุล *Candida* และ *Geotrichum* ได้แก่ ไอโซเลต NT10 ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27159, ไอโซเลต NT21 ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. LY16 และ ไอโซเลต NT49 ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Geotrichum* sp. LY5 แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ 8 ไอโซเลตจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ในสกุล *Cryptococcus* และ *Trichosporon* โดย 6 ไอโซเลต คือ NT05, NT15, NT17, NT26, NT35 และ NT44 เหมือนกับ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ 2 ไอโซเลต ได้แก่ NT01 และ NT03 เหมือนกับ *Trichosporon* sp. CBS 8686 (ตารางที่ 8)

2.3 ยีสต์สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

ยีสต์สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ หมายถึง ยีสต์ที่เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ในฐานข้อมูล พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมากกว่า 3 นิวคลีโอไทด์แต่น้อยกว่า 6 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ต้องศึกษาเพิ่มเติม โดยจากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้จำนวน 133 ไอโซเลต พบจำนวน 5 ไอโซเลต ที่อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ (คิดเป็น 3.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) โดยจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Candidaceae มี 2 สกุล คือ ไอโซเลต NT23 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida solani* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลต KU-Xs11 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Geotrichum silvicola* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ และวงศ์ Dipodascaceae มี 2 สกุล คือ ไอโซเลต KU-Xs 73 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Sporopachydermia lactativora* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลต SN1-4 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Zygoascus hellenicus* แต่มีการ

แทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ และจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ในสกุล *Trichosporon* คือ ไอโซเลต A20-1 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Trichosporon mycotoxinivorans* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและที่อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้ว หรือสปีชีส์ใหม่

Isolate	Closest Species	nucleotide substitution	
		nt sub/total nt	%
ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย			
NT01, NT03	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686 (AF444718)	0/595	0
NT05	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	0/598	0
NT15, NT17,NT26, NT35	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	0/597	0
NT44	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> (FJ743620)	0/525	0
NT10	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27159 (EU011604)	0/486	0
NT21	<i>Geotrichum</i> sp. LY16 (AB499018)	0/545	0
NT49	<i>Geotrichum</i> sp. LY5 (AB499010)	1/545	0.2
ยีสต์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่			
A20-1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	4/596	0.7
KU-Xs 11	<i>Geotrichum silvicola</i> (AY158042)	4/541	0.7
KU-Xs 73	<i>Sporopachydermia lactativora</i> (U45851)	4/571	0.7
NT23	<i>Candida solani</i> (U70179)	4/568	0.7
SN1-4	<i>Zygoascus hellenicus</i> (U40125)	4/566	0.7

2.4 ยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากหลักเกณฑ์การพิจารณาของ Kurtzman and Robnett (1998) คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกกับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล หากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะจัดจำแนกให้เป็นสปีชีส์ใหม่ ซึ่งจากผลการจัดจำแนกพบว่า

9 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ (คิดเป็น 6.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) ใน 7 สปีชีส์ คือ ไอโซเลต A6-2 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. HA174 แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene 1.1 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต KU-Xs 13, ไอโซเลต KU-Xs18 และ ไอโซเลต KU-Xs 20 มีลำดับของเบสในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida lodderae* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.9 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต KU-Xs13 และ KU-Xs20 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันแต่แตกต่างจาก ไอโซเลต KU-Xs18 โดยเกิดช่องว่าง 1 ตำแหน่ง, KU-Xs34 ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida yuanshanicus* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต NT29 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia exigua* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต NT31 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia pipperi* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4.0 เปอร์เซ็นต์, ไอโซเลต NT36 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida chiropterorum* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.9 เปอร์เซ็นต์, และไอโซเลต NT40 ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Debaryomyces fabryi* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.22 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Isolate	Closest Species	nucleotide substitution	
		nt sub/total nt	%
A6-2	<i>Candida</i> sp. HA174 (AF272395)	5/475	1.1
KU-Xs 13	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	11/571	1.9
KU-Xs 18	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	11/571	1.9
KU-Xs 20	<i>Candida lodderae</i> (U45755)	11/571	1.9
KU-Xs 34	<i>Candida yuanshanicus</i> (EF460670)	9/565	1.6
NT29	<i>Pichia exigua</i> (U76349)	14/559	2.5
NT31	<i>Pichia pipperi</i> (U75418)	23/570	4.0
NT36	<i>Candida chiropterorum</i> (U45822)	17/578	3.0
NT40	<i>Debaryomyces fabryi</i> (U94927)	7/570	1.2

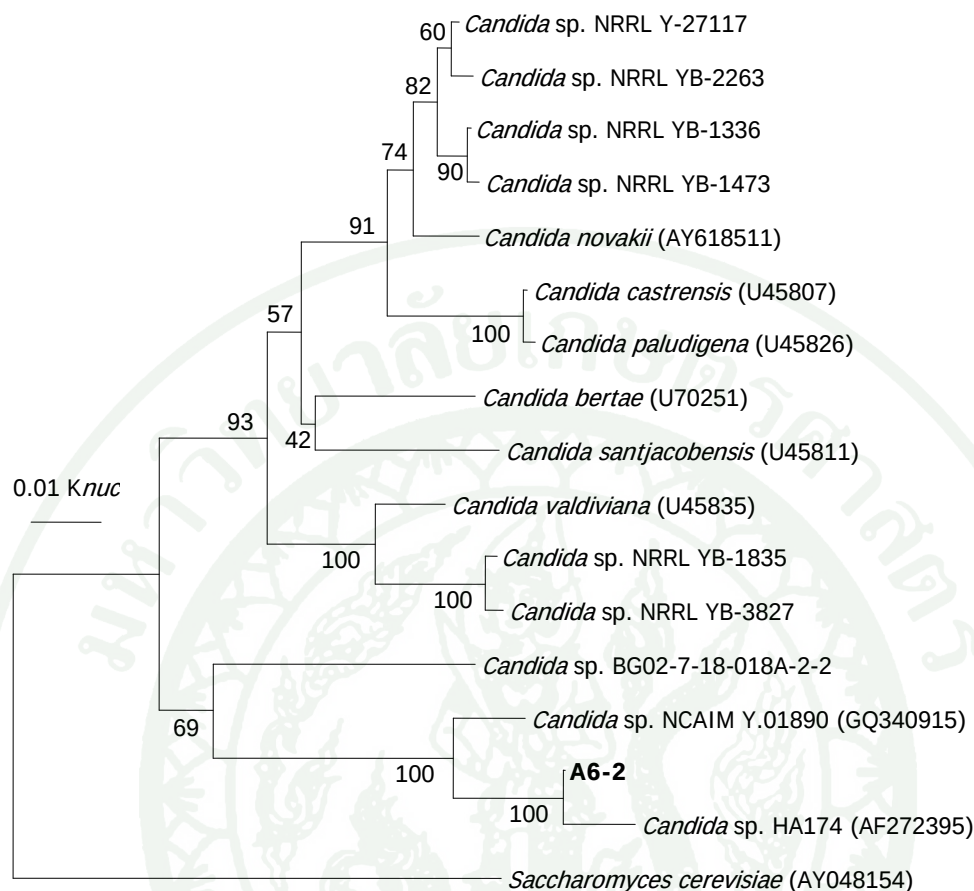
3. การอธิบายสปีชีส์ใหม่

การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ทำโดยศึกษาลักษณะต่างๆ ของยีสต์ตามเกณฑ์อนุกรมวิธาน โพลีฟายิกซึ่งประกอบด้วย อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลรวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ดังนี้

3.1 *Candida* sp. A6-2

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ ไอโซเลต A6-2 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. HA174 ซึ่งเป็น สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.1 เบอร์เซนต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 5 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 2 ตำแหน่ง ใน 475 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เบอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ ไอโซเลต A6-2 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่าไอโซเลต A6-2 อยู่คนละตำแหน่งกับ *Candida* sp. HA174 และสร้างครีสเตอร์ย่อย *Candida* sp. NCAIM Y.01890 และ *Candida* sp. BG02-7-18-018A-2-2 กับ *Candida* sp. HA174 (ภาพที่ 7) และครีสเตอร์แยกจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วอื่นๆ ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต A6-2 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ไอโซเลต A6-2 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida*



ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต A6-2 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida* sp. A6-2

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อป้อนเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมและยาวรี ขนาด 3-4 x 3-7 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเจริญต่อเป็นสั้นๆ แยกแขนง เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 8a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ด้าน เจริญบนราบไปกับผิวหน้าอาหารมีการสร้างเส้นใยที่ขอบโคโลนี

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 8b)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	w
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	w
ซอร์บิต	+	อิริทริทอล	+
เอ็นเอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไบริทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	w	กาแลกทิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	+
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
มอลโทส	w	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟามะทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-

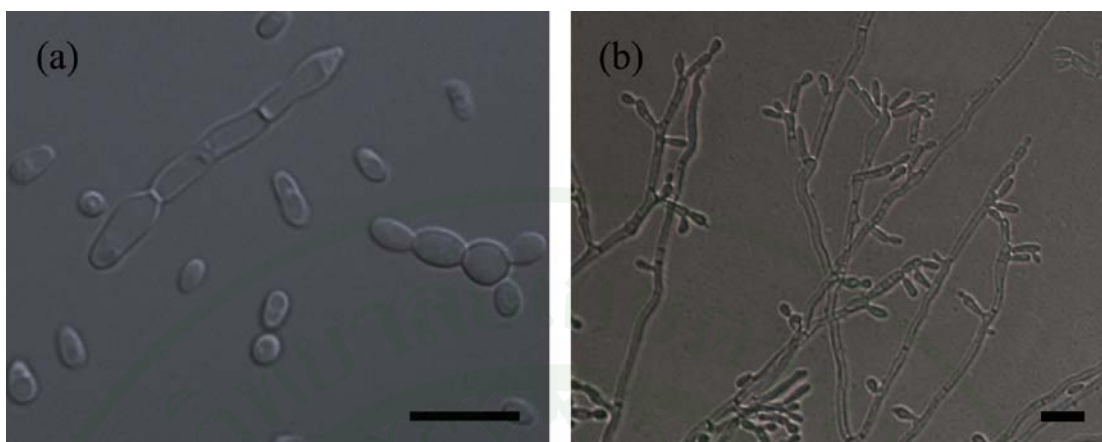
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกทูโรนิก	+
ซาลิซิน	w	กรดแลกติก	w
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	w	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	w		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	-
แอล-ไลซีน	-	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	-

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	+
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีโคอะโซเนียมบลูปี	-



ภาพที่ 8 สัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. A6-2^T

(a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

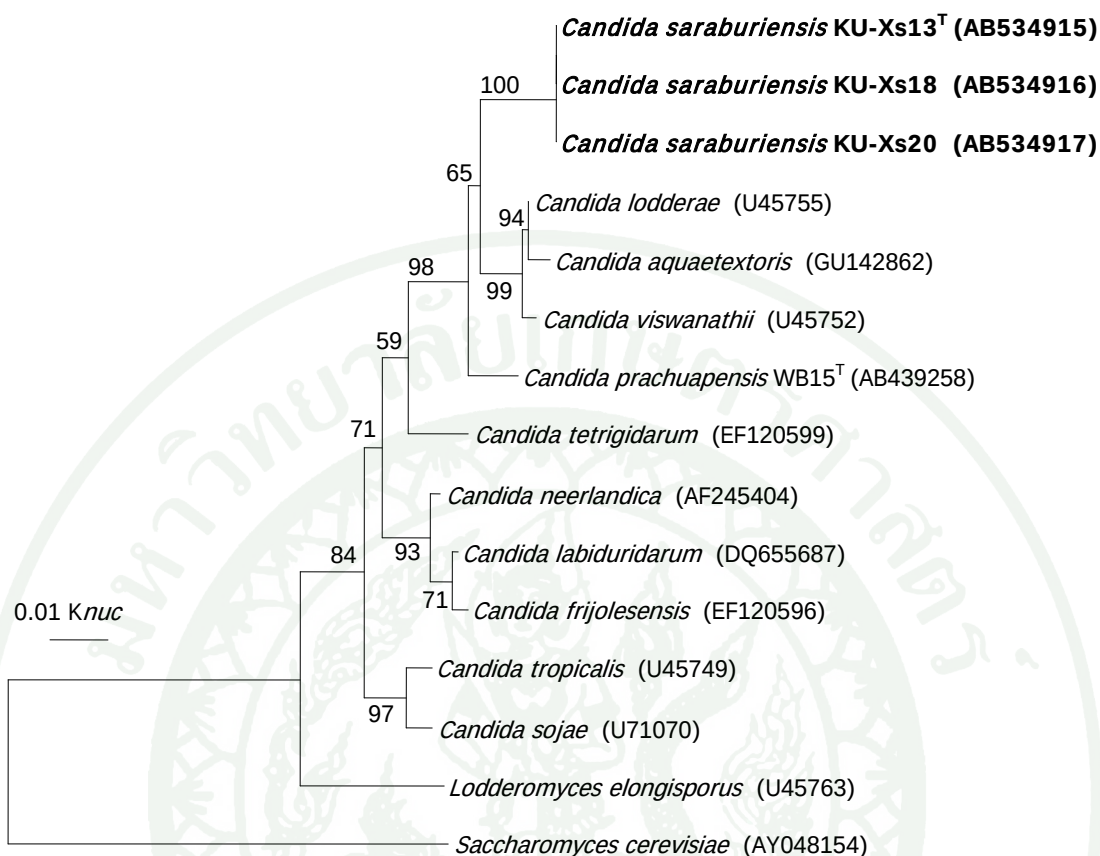
(b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.2 *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20)

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20 พบว่า KU-Xs13^T และ KU-Xs20 มีลำดับของเบสในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene เหมือนกันและแตกต่างจาก KU-Xs 18 โดยเกิดช่องว่าง 1 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida lodderae* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.9 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 11 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 1-2 ตำแหน่ง ใน 571 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์สปีชีส์ใหม่ทั้ง 3 ไอโซเลตอยู่ในตำแหน่งเดียวกันและสร้างครัสเตอร์กับ *Candida lodderae*, *Candida aquatextoris* และ *Candida viswanathii* และอยู่ต่างแขนงกับยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบาย

แล้วอื่นๆ (ภาพที่ 9) ดังนั้นจึงยืนยันว่า ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่า ยีสต์ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ทั้งที่เมื่ออยู่เป็นไอโซเลตเดี่ยวและผสมเป็นคู่กับไอโซเลตอื่น และมีฟีโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็น สปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida saraburiensis* sp. nov. โดยมี KU-Xs13 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*saraburiensis*” เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างซังข้าวโพด และซากหญ้าที่เก็บจากจังหวัดสระบุรี ประเทศไทย สำหรับไอโซเลต KU-Xs13ที่เป็น type strain ได้นำไปฝากเก็บที่หน่วยรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และมี accession number ดังนี้ BIOTEC Culture Collection (BCC 39601^T) ประเทศไทย, NITE Biological Resource Center (NBRC 106721^T) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 11696^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 9 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs13^T, KU-Xs18, KU-Xs20 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida saraburiensis* sp. nov.

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมและรูปไข่ ขนาด 2-6 x 4-10 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 10a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม มัน ขอบโคโลนีเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ ทั้งที่อยู่เป็นไอโซเลตเดี่ยวและผสมเป็นคู่กับไอโซเลตอื่น

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 10b)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	+	ทรีฮาโลส	1
กาแลกโทส	1	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	+/w	แล็กโทส	-
ซูโครส	+	ราฟฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิลเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์บิต	+	อิทริทอล	-
เอ็นแอสทิล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรวิทอล	+
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แล็กโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	-

แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	+
เซลโลไบโอส	w	กรดกาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	w	กรดแลกติก	w
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	l
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบในโตรเจน

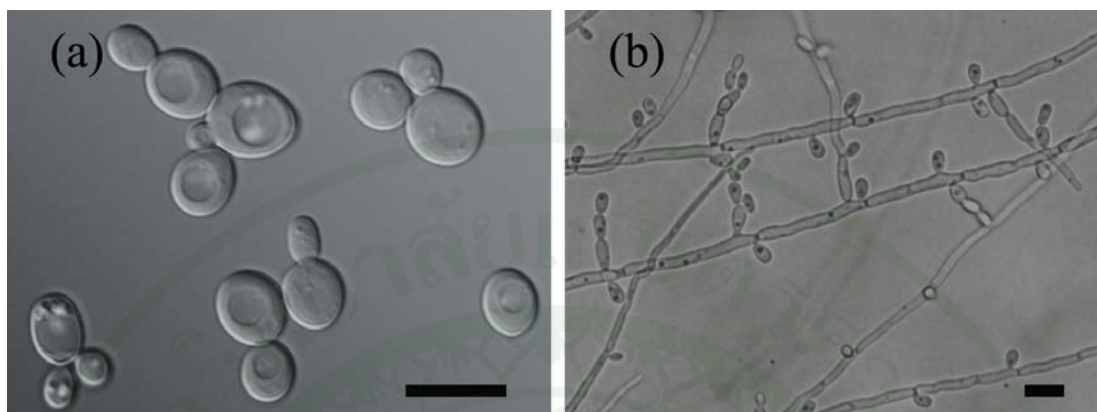
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรด	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-

การทำปฏิกิริยากับสไลด์อะโซเนียมบลูปี
สารประกอบยูบิควิโนน

-
Q9



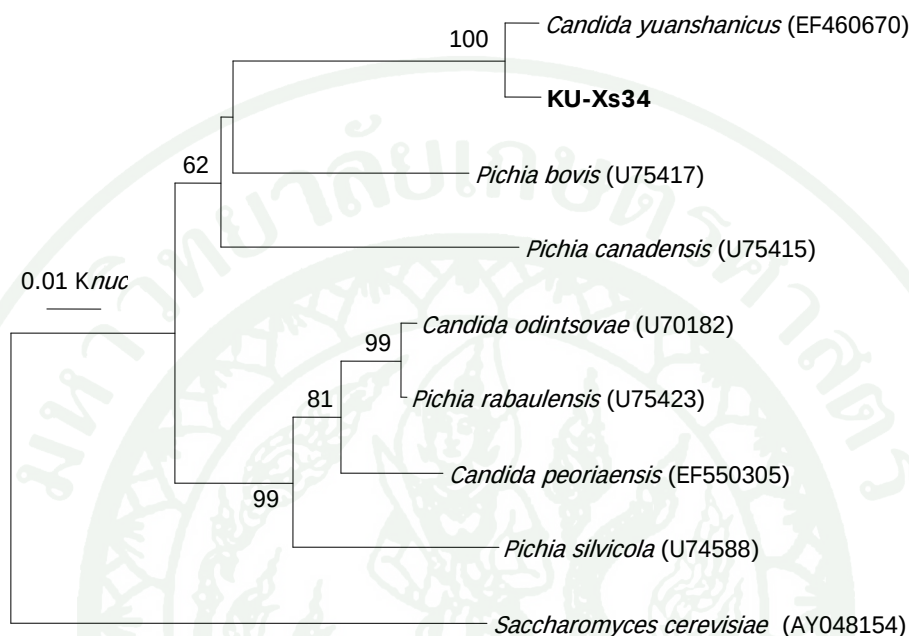
ภาพที่ 10 ลักษณะวิทยาของ *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T)

- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.3 *Candida* sp. KU-Xs34

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Candida yuanshanicus* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 9 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 6 ตำแหน่ง ใน 565 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่าไอโซเลต KU-Xs34 อยู่คนละตำแหน่งกับ *Candida yuanshanicus* (ภาพที่ 11) และอยู่บนแขนงที่แยกจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วอื่นๆ ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต KU-Xs34 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่า ยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึง จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida*



ภาพที่ 11 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซนต์

ลักษณะของ *Candida* sp. KU-Xs34

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมและรี ขนาด 2-6 x 2-6 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 12a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม มั่น โคโลนีกลมขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 12b)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	+	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์บิต	+	อิริทริทอล	-
เอ็นเอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไרבิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	w	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	w	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	w
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	-

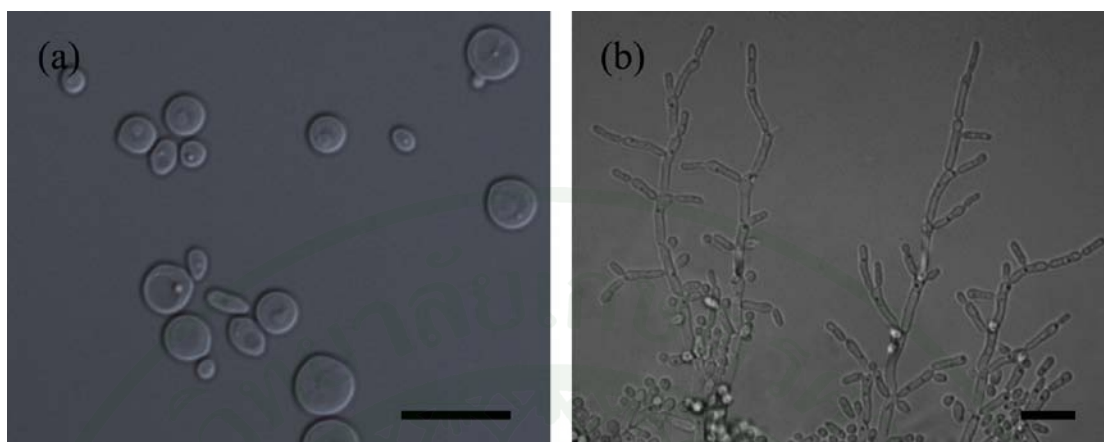
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	w	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	w		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	w
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซีไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซีไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	w
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสีโคอะโซเนียมบลูปี	-



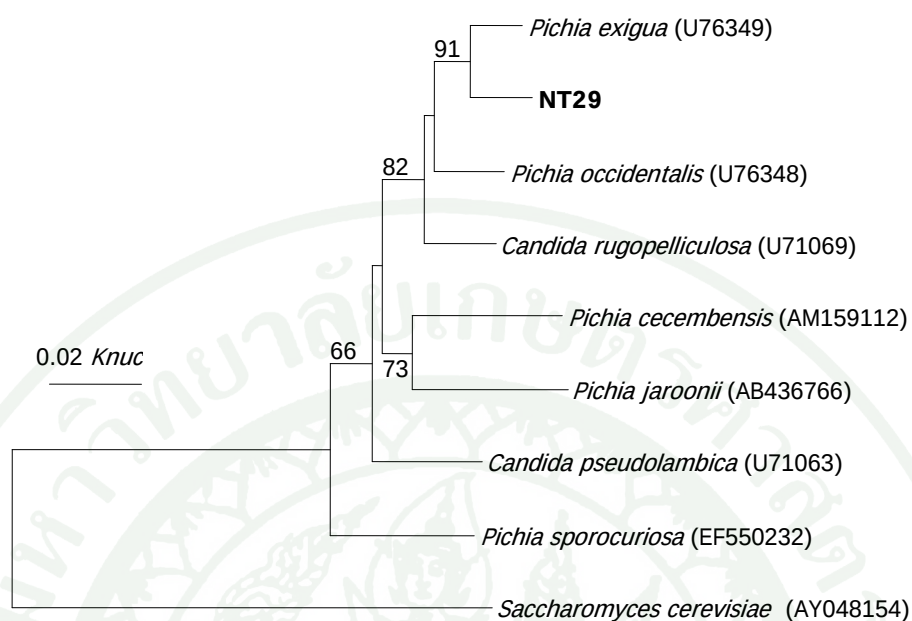
ภาพที่ 12 สัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. KU-Xs34^T

- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.4 *Pichia* sp. NT29

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต KU-Xs34 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงกับ *Pichia exigua* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 14 นิวคลีโอไทด์ ใน 559 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต NT29 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่าไอโซเลต NT29 อยู่ในแขนงเดียวกับ *P. exigua* (ภาพที่ 13) และที่แยกจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วอื่นๆ ใน *Pichia* clade ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต NT29 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ไอโซเลต NT29 สร้างแอสโคสปอร์หลังจากบ่ม 5 วันบนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar ที่ 25 องศาเซลเซียส และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Pichia*



ภาพที่ 13 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT29^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Pichia* sp. NT29

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างรียาว ขนาด 2-5 x 2-8 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 14a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม แบน ด้าน ขอบโคโลนีไม่เรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar หลังจากบ่ม 5 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบการสร้างแอสโคสปอร์ 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส (ภาพที่ 14b)

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	s	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิลเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-/w
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	-
ซอร์บิต	-	อิทริทอล	-
เอ็นแอสทิล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-ไซโลส	w	ดี-แมนนิทอล	-
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-

ดี-อะราบีโนส	-	อินอซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	-/w
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-/w	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	-/w	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-/w	กรดกาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลกติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟไฟโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	w		

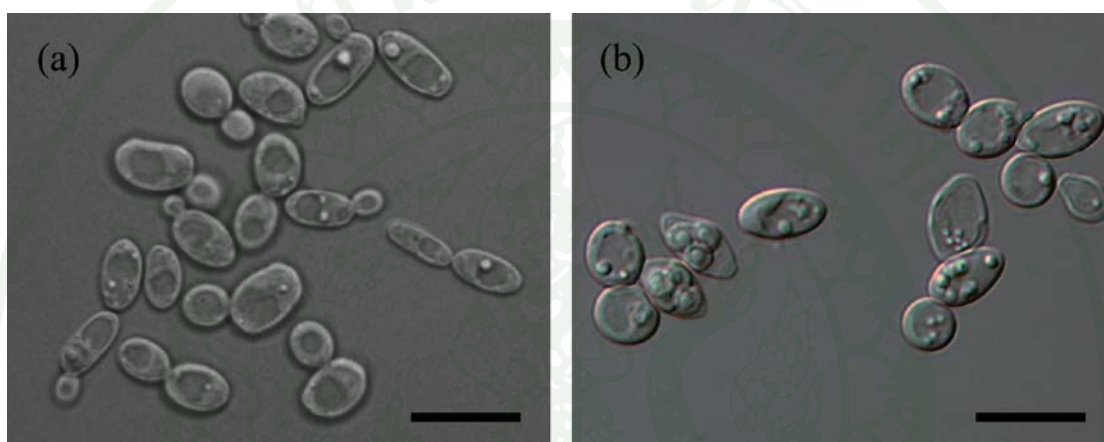
การแอซซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+

การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไลโคอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7



ภาพที่ 14 สัณฐานวิทยาของ *Pichia* sp. NT29^T

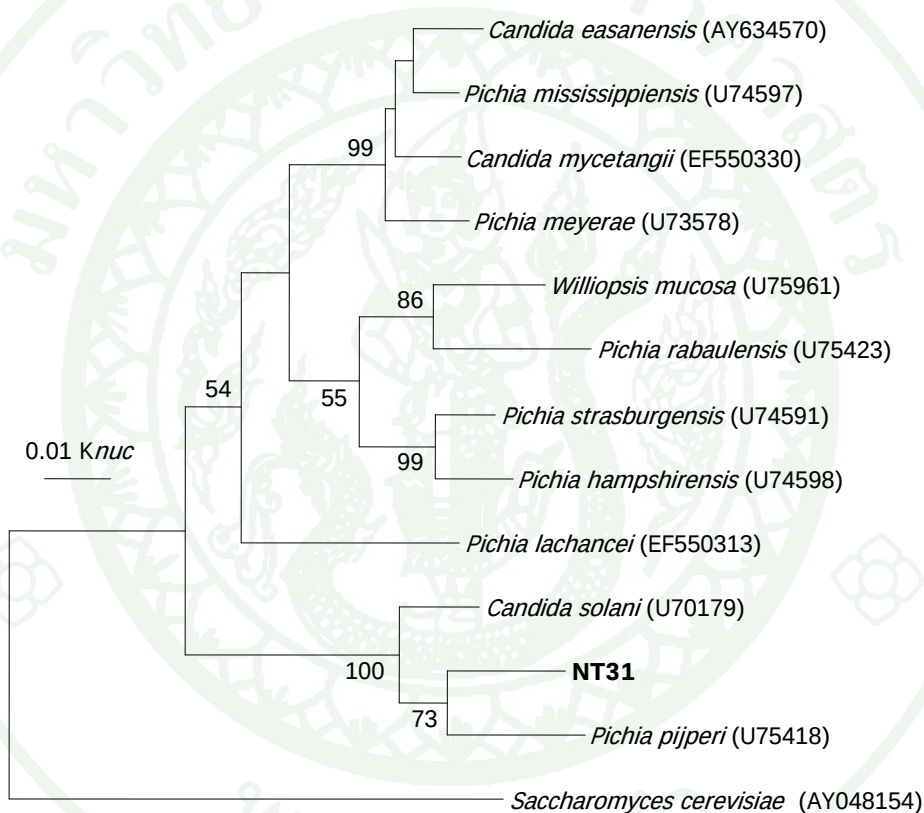
- (a) การเจริญในอาหารเหลว YEA เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar หลัง บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.5 *Candida* sp. NT31

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต NT31 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia pijperi* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4.0 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 23 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 2 ตำแหน่ง ใน 570 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต NT31 และยีสต์สายพันธุ์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน พบว่าไอโซเลต NT31 อยู่ในแขนงเดียวกันแต่อยู่คนละตำแหน่งกับ *Pichia pijperi* (ภาพที่ 15) และแยกจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วอื่นๆ ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต NT31 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ไอโซเลต NT31 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida*



ภาพที่ 15 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT31^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida* sp. NT31

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลม รูปไข่และรี ขนาด 3-6 x 4-9 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 16)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม มั่น โคโลนีขึ้นตรงกลาง กลม ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	+	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์บิต	+	อิทริทอล	-
เอ็นเอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไบริทอล	-
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-

แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	w
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	1	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	-		

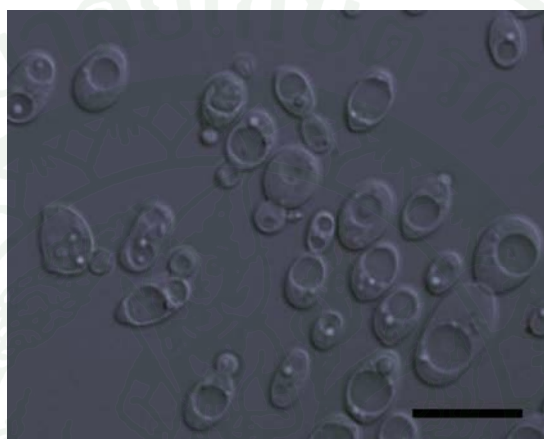
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	w
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+

การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไลโคอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบยูบิควิโนน	Q7



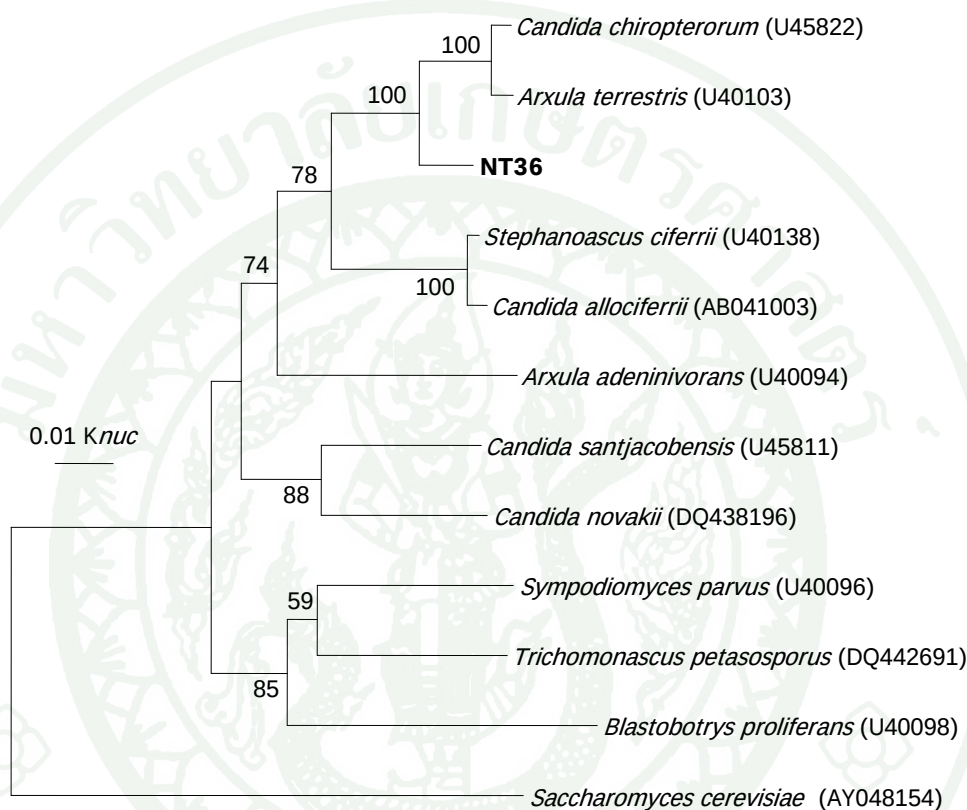
ภาพที่ 16 สัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. NT31^T

การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อป้อนเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.6 *Candida* sp. NT36

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต NT36 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida chiropterorum* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 17 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 4 ตำแหน่ง ใน 578 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ไอโซเลต NT36 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่าไอโซเลต NT36 อยู่คนละตำแหน่งกับ *Candida chiropterorum* (ภาพที่ 17) และอยู่บนแขนงที่แยกจากสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วอื่นๆ ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต NT36 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่า ยีสต์ไอโซเลต NT36 ไม่สร้างแอสโกสปอร์ และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida*



ภาพที่ 17 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT36^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida* sp. NT36

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมและรี ขนาด 3-5 x 3-9 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อเป็นเส้นสาย เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 18a)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม มั่น โคโลนีกลมขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ พบการสร้างเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งก้านสาขาแต่ไม่พบการสร้างเส้นใยแท้ (ภาพที่ 18b)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

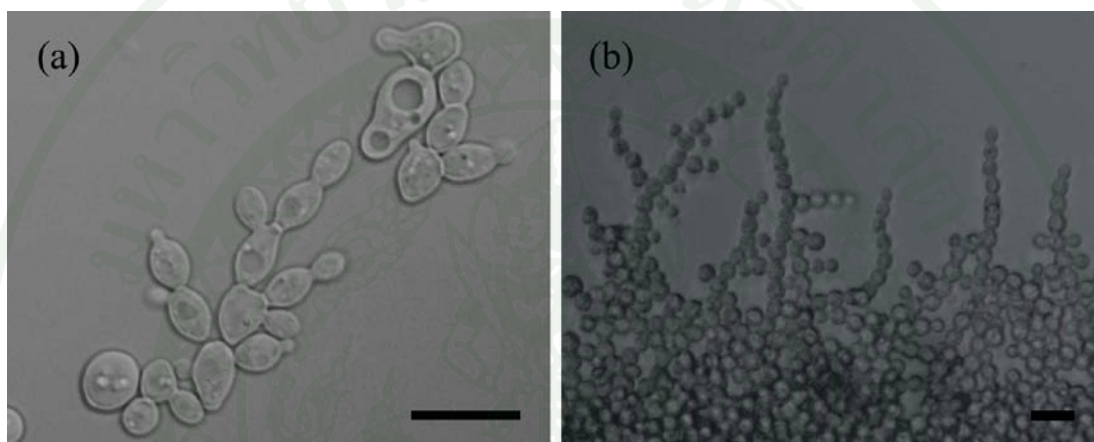
กลูโคส	-	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิลเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	1
ซอร์บิต	+	อิทริทอล	+
เอ็นแอสทิล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	+

ดี-อะราบีโนส	w	อินอซิทอล	+
แอล-แรมโนส	+	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	w
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	+
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกทูโรนิก	+
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	l
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	w	กรดซิตริก	w
ราฟไฟโนส	+	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	w		
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน			
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+
ลักษณะอื่นๆ:			
การสร้างกรดจากกลูโคส			-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน			+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์			-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์			w
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์			w
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส			+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส			+

การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไลโคอะโซเนียมบลูปี	-
สารประกอบบูบิควิโนน	Q9



ภาพที่ 18 สัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. NT36^T

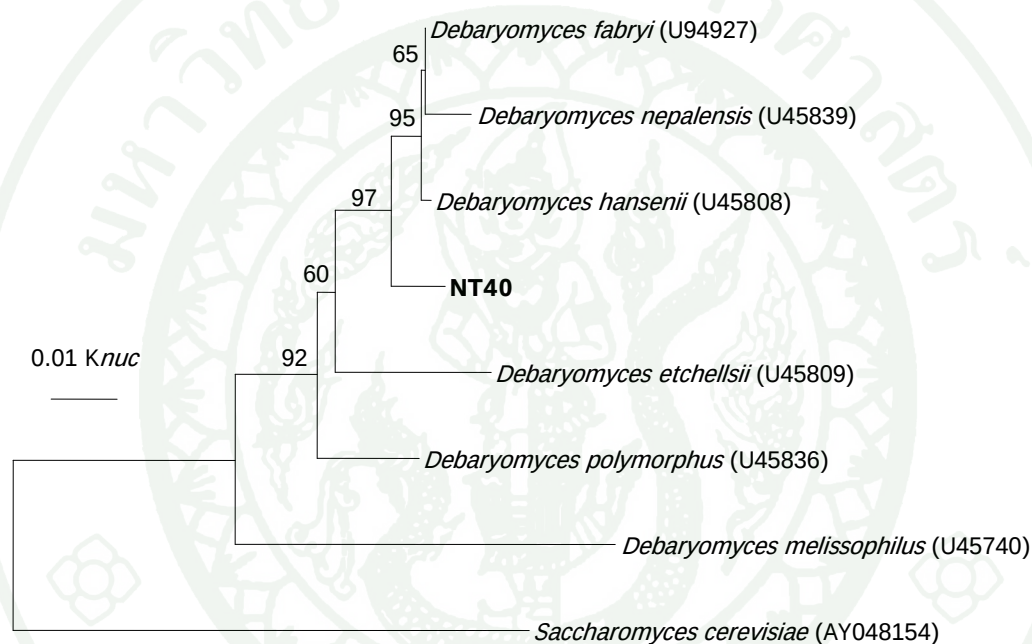
- (a) การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- (b) การสร้างเส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลัง บ่ม 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

3.7 *Candida* sp. NT40

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ *ไอโซเลต* NT40 กับ สปีชีส์ในฐานข้อมูล GeneBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Debaryomyces fabryi* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 7 นิวคลีโอไทด์ ใน 570 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ใน โดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ *ไอโซเลต* NT40 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน

พบว่าไอโซเลต NT40 สร้างครีستเคอร์กับ *Debaryomyces etchellsii*, *D. fabryi*, *D. hansenii*, *D. melissophilus*, *D. nepalensis* และ *D. polymorphus* โดยอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 19) ดังนั้นจึงยืนยันว่าไอโซเลต NT40 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ไอโซเลต NT40 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีฟิโนไทป์อื่นๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida*



ภาพที่ 19 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลต NT40^T และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะของ *Candida* sp. NT40

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม ขนาด 3-5 x 3-5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 20)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม มั่น โคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	ทรีฮาโลส	-
กาแลกโทส	-	เมลลิไบโอส	-
มอลโทส	-	แลคโทส	-
ซูโครส	-	ราฟฟิโนส	-
ดี-ไซโลส	-		

การแอสซิมิลเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	w
ซอร์บิต	+	อิริทริทอล	+
เอ็นเอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไרבิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	+

แอล-แรมโนส	+	ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	+
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลกติก	+
เมลลิไบโอส	-	กรดซักซินิก	+
แลกโทส	w	กรดซิตริก	+
ราฟไฟโนส	+	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	+	เอทานอล	+
อินูลิน	+		

การแอสมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซีไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซีไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+

การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส

-

การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส

-

การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส

-

การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

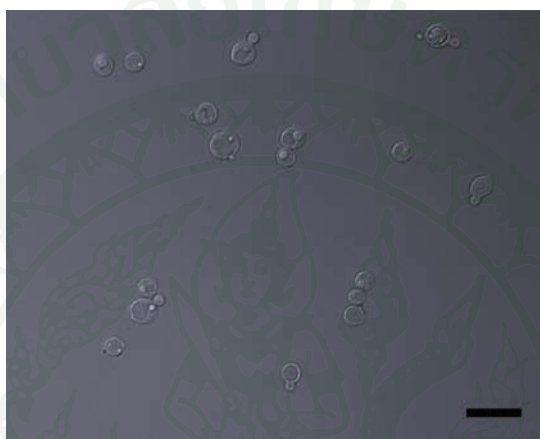
-

การทำปฏิกิริยากับสียโคอะโซเนียมบลูบี

-

สารประกอบยูบิควิโนน

Q9



ภาพที่ 20 สัณฐานวิทยาของ *Candida* sp. NT40^T

การเจริญในอาหารเหลว YM เมื่อป้อนเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
(บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4. ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญในประเทศไทย

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกจากตัวอย่าง ดิน, ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ น้ำและปุ๋ย จำนวน 133 ไอโซเลต พบว่าจำนวน 108 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (ตารางที่ 6 และ 7) โดยส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซ์ิตส์ยีสต์ใน 8 สกุล 17 สปีชีส์ คือ *Barnettozyma californica*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi* และ *Zygoascus hellenicus* และจัดจำแนกเป็นเป็นแบคทีเรียอิมยีสต์ยีสต์ 2 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans* และ *T. terricola* นอกจากนี้ยังพบว่า 11 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายโดย 3 ไอโซเลตเป็นแอสโคไมซ์ิตส์ยีสต์ คือ ไอโซเลต NT10 ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27159, ไอโซเลต NT21 ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. LY16 และ ไอโซเลต NT49 ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Geotrichum* sp. LY5 นอกจากนี้ 8 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นแบคทีเรียอิมยีสต์ โดย 6 ไอโซเลต คือ NT05, NT15, NT17, NT26, NT35 และ NT44 เหมือนกับ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ 2 ไอโซเลต คือ NT01 และ NT03 เหมือนกับ *Trichosporon* sp. CBS 8686 และพบจำนวน 5 ไอโซเลต ที่อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ใน 5 สกุล คือ ไอโซเลต NT23 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida solani*, ไอโซเลต KU-Xs11 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Geotrichum silvicola*, ไอโซเลต KU-Xs 73 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Sporopachydermia lactativora*, ไอโซเลต SN1-4 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Zygoascus hellenicus* และ ไอโซเลต A20-1 ใกล้เคียงที่สุดกับ *T. mycotoxinivorans*

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญข้างต้นแสดงว่า 67.6 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (73 ไอโซเลต) จัดจำแนกเป็นแอสโคไมซ์ิตส์ยีสต์ โดยสปีชีส์ที่พบมาก คือ *C. tropicalis* (25 ไอโซเลต) และ *P. caribbica* (20 ไอโซเลต) และ 32.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว (35 ไอโซเลต) จัดจำแนกเป็นเป็นแบคทีเรียอิมยีสต์ โดยสปีชีส์ที่พบมาก คือ *Cryp. laurentii* (9 ไอโซเลต) และ *T. mycotoxinivorans* (8 ไอโซเลต)

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสโดยแยกตามกลุ่มตัวอย่างที่แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ (1) ดิน (2) ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และ (3) อื่นๆ ได้แก่ น้ำ และปุ๋ย (ตารางที่ 10) ได้ผลดังนี้

(1) ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างดิน 37 ตัวอย่าง จำนวน 61 ไอโซเลต พบว่า 23 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแอสโคไมซ์ยีสต์ 9 สกุล 13 สปีชีส์ คือ *Barnettozyma californica*, *Candida maltose*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *Pichia caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi* โดยสปีชีส์ที่พบบ่อย คือ *C. tropicalis* (10 ไอโซเลต) และ 22 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นเป็นเบสิดิโอมัยซิดยีสต์ 2 สกุล 7 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans*, *T. terricola*

นอกจากนี้ยังพบว่า 11 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายโดย 3 ไอโซเลต เป็นแอสโคไมซ์ยีสต์ คือ ไอโซเลต NT10 ที่เหมือนกับ *Candida* sp. NRRL Y-27159, ไอโซเลต NT21 ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. LY16 และ ไอโซเลต NT49 ที่ใกล้เคียงที่สุดกับ *Geotrichum* sp. LY5 นอกจากนี้ 8 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นเบสิดิโอมัยซิดยีสต์ โดย 6 ไอโซเลต คือ NT05, NT15, NT17, NT26, NT35 และ NT44 เหมือนกับ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ 2 ไอโซเลต คือ NT01 และ NT03 เหมือนกับ *Trichosporon* sp. CBS 8686 จำนวน 2 ไอโซเลต อาจจะ เป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ ไอโซเลต NT23 ใกล้เคียงที่สุดกับ *C. solani* และ ไอโซเลต A20-1 ใกล้เคียงที่สุดกับ *T. mycotoxinivorans* และจำนวน 3 ไอโซเลตเป็นยีสต์สปีชีส์ ใหม่ คือ ไอโซเลต NT29 ใกล้เคียงที่สุดกับ *P. exigua*, ไอโซเลต NT31 ใกล้เคียงที่สุดกับ *P. pipperi* และ ไอโซเลต NT36 ใกล้เคียงที่สุดกับ *C. chiropterorum*

(2) ตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากการแยกยีสต์จาก ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 38 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 64 ไอโซเลต โดย 45 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแอสโคไมซ์ยีสต์ 9 สกุล 14 สปีชีส์ คือ *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces nepalensis*, *Lindnera rhodanensis*, *Pichia caribbica* และ *P. kudriavzevii* โดย สปีชีส์ที่พบบ่อย คือ *Candida tropicalis* (14 ไอโซเลต) และ *Pichia caribbica* (14 ไอโซเลต) ส่วน อีก 11 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นเป็นเบสิดิโอมัยซิดยีสต์ 2 สกุล 4 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus*

heveanensis, *Cryp. laurentii*, *Trichosporon asahii* และ *T. mycotoxinivorans* โดยสปีชีส์ที่พบบ่อย คือ *C. tropicalis* (5 ไอโซเลต)

นอกจากนี้ยังพบว่า 2 ไอโซเลต อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ ไอโซเลต KU-Xs11 ใกล้เคียงกับ *Geotrichum silvicola* และไอโซเลต KU-Xs73 ใกล้เคียงกับ *Sporopachydermia lactativora* และจำนวน 6 ไอโซเลตเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ ไอโซเลต A6-2 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. HA174, ไอโซเลต KU-Xs 13, ไอโซเลต KU-Xs18 และ ไอโซเลต KU-Xs 20 ใกล้เคียงที่สุดกับ *C. lodderae*, KU-Xs34 ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida yuanshanicus* และไอโซเลต NT40 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Debaryomyces fabryi*

(3) ตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ น้ำและปุ๋ย จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างดังกล่าวจำนวน 4 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 8 ไอโซเลต โดย 5 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแอสโคไมซีตยีสต์ 3 สกุล คือ *Candida tropicalis*, *Pichia caribbica* และ *Zygoascus hellenicus* มี 2 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นเป็นแบคทีเรียยีสต์ 2 สกุล 2 สปีชีส์ คือ *Trichosporon asahii* และ *T. mycotoxinivorans*

นอกจากนี้ยังพบว่า 1 ไอโซเลต อาจจะเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ ไอโซเลต SN1-4 ใกล้เคียงที่สุดกับ *Zygoascus hellenicus*

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบชนิดของยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้วที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกจาก
ตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ ดิน ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และ
ตัวอย่างอื่นๆ ในประเทศไทย

Group				
Family			ส่วนประกอบของพืช	
Genus	ดิน		วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	อื่นๆ
Species				
Ascomycetus yeast				
Candidaceae				
Candida				
<i>Candida blankii</i>			+ (3)	
<i>Candida coipomoensis</i>			+ (2)	
<i>Candida maltosa</i>	+ (1)			
<i>Candida membranifaciens</i>			+ (2)	
<i>Candida pseudointermedia</i>	+ (1)		+ (1)	
<i>Candida pseudolambica</i>	+ (1)			
<i>Candida pyralidae</i>			+ (1)	
<i>Candida tropicalis</i>	+ (10)		+ (14)	+ (1)
Geotrichum				
<i>Geotrichum silvicola</i>	+ (1)			
Saccharomycetaceae				
Debaryomyces				
<i>Debaryomyces fabryi</i>	+ (1)			
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+ (1)		+ (1)	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Group				
Family	ดิน	ส่วนประกอบของพืช	วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	อื่นๆ
Genus				
Species				
<i>Barnettozyma</i>				
<i>Barnettozyma californica</i>	+ (2)			
<i>Lindnera</i>				
<i>Lindnera rhodanensis</i>	+ (1)	+ (4)		
<i>Lindnera saturnus</i>	+ (1)			
<i>Pichia</i>				
<i>Pichia caribbica</i>	+ (1)	+ (16)		+ (3)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+ (1)	+ (1)		
<i>Saturnispora</i>				
<i>Saturnispora saitoi</i>	+ (1)			
Dipodascaceae				
<i>Zygoascus</i>				
<i>Zygoascus hellenicus</i>				+ (1)
Basidiomycetus yeast				
<i>Cryptococcus</i>				
<i>Cryptococcus heveanensis</i>		+ (1)		
<i>Cryptococcus humicola</i>	+ (5)			
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+ (4)	+ (5)		
<i>Cryptococcus terrestris</i>	+ (5)			
<i>Trichosporon</i>				
<i>Trichosporon asahii</i>	+ (1)	+ (3)		+ (1)
<i>Trichosporon moniliiforme</i>	+ (1)			
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+ (5)	+ (2)		+ (1)
<i>Trichosporon terricola</i>	+ (1)			

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Group				
Family	ดิน	ส่วนประกอบของพืช	อื่นๆ	
Genus		วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร		
Species				
Undescribed species				
<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27159	+ (1)			
<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	+ (6)			
<i>Geotrichum</i> sp. LY5	+ (1)			
<i>Geotrichum</i> sp. LY16	+ (1)			
<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686	+ (2)			
May be known or new species				
<i>Candida solani</i>	+ (1)			
<i>Geotrichum silvicola</i>		+ (1)		
<i>Sporopachydermia lactativora</i>		+ (1)		
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+ (1)			
<i>Zygoascus hellenicus</i>				+ (1)
รวม (ไอโซเลต)	58	58		8

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนไอโซเลต

เมื่อเปรียบเทียบกับตารางงานความหลากหลายของยีสต์จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ก่อนหน้านี้ พบว่ายีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกได้จากการศึกษานี้ทั้งหมด 26 สปีชีส์ มี 15 สปีชีส์ เป็นสปีชีส์ที่เคยมีรายงานการพบจากตัวอย่างต่างๆ ในประเทศไทยที่ทำการแยกออกมาศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 11) คือ *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. tropicalis*, *D. fabryi*, *D. nepalensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriazevii*, *Cryp. heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *T. asahii*, *T. mycotoxinivorans* (Sumpradit, 2005; Jindamorakot, 2006; กุสุมาวดี, 2549; สมจิต, 2551; ชนิตา, 2552; รุ่งลักษณ์, 2552; Limtong *et al.*, 2008a) แสดงให้เห็นว่ายีสต์สปีชีส์ดังกล่าวสามารถใช้ทั้งกลูโคสและไซโลสเพื่อการเจริญได้ดีและยังพบ 11 สปีชีส์ที่

สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญได้ดีที่ยังไม่มีรายงานการค้นพบจากการใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในประเทศไทย คือ *B. californica*, *C. blankii*, *C. coipomoensis*, *C. pyralidae*, *G. silvicola*, *L. rhodanensis*, *Sat. saitoi*, *Z. hellenicus*, *Cryp. terrestris*, *T. terricola* และ *T. moniliiforme*

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกจากตัวอย่างดิน, ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ จำนวน 133 ไอโซเลต พบว่ามี 11 สปีชีส์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินเท่านั้น คือ *B. californica*, *C. maltosa*, *C. pseudolambica*, *Cryp. humicola*, *Cryp. terrestris*, *D. fabryi*, *G. silvicola*, *L. saturnus*, *Sat. saitoi*, *T. moniliiforme*, *T. terricola* ส่วน 5 สปีชีส์ แยกได้จากตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเท่านั้น คือ *C. blankii*, *C. coipomoensis*, *C. membranifaciens*, *C. pyralidae*, *Cryp. heveanensis* และมีจำนวน 1 สปีชีส์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างอื่นๆ (น้ำ) เท่านั้น คือ *Z. hellenicus* นอกจากนั้นพบว่ามี 5 สปีชีส์ ที่แยกได้จากตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างดินและตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ *C. pseudointermedia*, *D. nepalensis*, *L. rhodanensis*, *P. kudriavzevii* และ *Cryp. laurentii* และพบ 4 สปีชีส์ แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม คือ *C. tropicalis*, *P. caribbica*, *T. asahii*, และ *T. mycotoxinivorans*

เมื่อเปรียบเทียบยีสต์ที่แยกได้จากดินเท่านั้นในการศึกษานี้ 11 สปีชีส์ คือ *B. californica*, *C. maltosa*, *C. pseudolambica*, *Cryp. humicola*, *Cryp. terrestris*, *D. fabryi*, *G. silvicola*, *L. saturnus*, *S. saitoi*, *T. moniliiforme*, *T. terricola* กับการรายงานการศึกษายีสต์ในดินในประเทศไทย ก่อนหน้านี้นี้ พบว่า 5 สปีชีส์ เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยแล้ว โดย 3 สปีชีส์ คือ *C. maltosa* (ไอโซเลต NT33), *D. fabryi* (ไอโซเลต NT16) และ *L. saturnus* (ไอโซเลต NT24) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในภาคเหนือในการศึกษานี้เคยมีรายงานการค้นพบในดินที่เก็บจากป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (รุ่งลักษณะ, 2552) และดินในอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ (Sumpradit, 2005) แต่ยังไม่พบในตัวอย่างชนิดอื่นๆ ในประเทศไทย จึงอาจกล่าวได้ว่าดินเป็นแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ 3 สปีชีส์นี้ ส่วน *C. pseudolambica* (ไอโซเลต NT20) เคยมีรายงานว่าพบจากแหล่งที่อยู่หลากหลาย คือ ดินในป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (รุ่งลักษณะ, 2552), จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว (Sumpradit, 2005), น้ำจากป่าชายเลน (ชนิตา, 2552; สมจิต, 2551) และตะกอนดินจากป่าชายเลน (ชนิตา, 2552) ในขณะที่สปีชีส์ *Cryp. humicola* (ไอโซเลต NT06, NT14, NT37, NT38 และ NT48) มีรายงานการค้นพบจากตัวอย่างเห็ด (Jindamorakot, 2006) จึงอาจกล่าวได้ว่า *C. pseudolambica* และ *Cryp. humicola* ไม่ได้มีความจำเพาะกับแหล่งที่อยู่ เนื่องจากนอกจาก

จะพบในดินจากการศึกษานี้แล้วยังพบจากแหล่งที่อยู่อื่นๆ ด้วย นอกจากนั้นพบยีสต์ 6 สปีชีส์ คือ *B. californica*, *Cryp. terrestris*, *Geotrichum silvicola*, *S. saitoi*, *T. moniliiforme*, *T. terricola* ยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบในประเทศไทย

ยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเท่านั้น จำนวน 5 สปีชีส์ คือ *C. blankii*, *C. coipomoensis*, *C. membranifaciens*, *C. pyralidae* และ *Cryp. heveanensis* พบว่ามี 2 สปีชีส์ ที่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยแล้ว คือ สปีชีส์ *C. membranifaciens* ซึ่งในการศึกษานี้แยกได้จากฟางแห้ง (ไอโซเลต KU-Xs48) และฟางหมัก (ไอโซเลต KU-Xs56) เคยมีรายงานการค้นพบจากตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาลำปี-หาดท้ายเหมือง จังหวัดพังงา (Limtong *et al.*, 2008a) และ *Cryp. heveanensis* ซึ่งแยกได้จากยางต้นจามจุรี (ไอโซเลต KU-Xs51) เคยมีรายงานการค้นพบจากตัวอย่างขุยมะพร้าว (Jindamorakot, 2006) และ 3 สปีชีส์ คือ *C. blankii*, *C. coipomoensis* และ *C. pyralidae* ยังไม่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย ยีสต์สปีชีส์ *Z. hellenicus* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำ (ไอโซเลต SN1-1) ยังไม่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย

นอกจากจะพบยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญสปีชีส์ *Candida pseudointermedia*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces nepalensis*, *Lindnera rhodanensis*, *Pichia kudriavzevii*, *P. caribbica*, *Trichosporon asahii*, และ *T. mycotoxinivorans* จากตัวอย่างมากกว่าหนึ่งชนิดในการศึกษานี้แล้ว ยังมีรายงานการค้นพบยีสต์สปีชีส์ดังกล่าวจากตัวอย่างอื่นดังแสดงในตารางที่ 11 ยกเว้นสปีชีส์ *L. rhodanensis* ที่ยังไม่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทย ซึ่งการที่พบยีสต์จากหลายแหล่งที่อยู่อาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนกันระหว่างยีสต์จากแหล่งที่อยู่หนึ่งไปสู่อีกแหล่งที่อยู่หนึ่งในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยพาหะ เช่น คน สัตว์ ลม และฝน แสดงให้เห็นว่ายีสต์สปีชีส์เหล่านี้สามารถใช้สารอาหารเพื่อการเจริญได้หลายชนิดและสามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมได้หลายสภาวะ หรืออาจเป็นยีสต์ที่มีมากในสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษานี้ซึ่งแยกเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลที่แตกต่างจากการแยกเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ พบแบคทีเรียโอมัยซีตีสปีชีส์มากถึง 32.4 เปอร์เซ็นต์ (35 ไอโซเลต) ของยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว โดยในตัวอย่างดินซึ่งเป็นแหล่งที่มียีสต์หลายชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน พบแบคทีเรียโอมัยซีตีสปีชีส์จำนวน 22 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็น 2 สกุล 7 สปีชีส์ คือ *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *T. asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans*, *T. terricola* และยังพบว่า 8 ไอโซเลต

เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ *Trichosporon* sp. CBS 8686 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Sumpradit (2005) ซึ่งศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง และป่าสน จากอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว ที่แยกยีสต์ได้ 340 ไอโซเลต แต่ไม่พบว่ามีไอโซเลตใดเป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ ในขณะที่รุ่งลักษณ์ (2552) ซึ่งศึกษาความหลากหลายยีสต์จากดินป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แยกยีสต์ได้ 102 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นยีสต์ที่มีการอธิบายแล้ว 82 ไอโซเลต แต่พบเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์เพียง 1 ไอโซเลต คือ *T. mycotoxinivorans* สาเหตุที่พบผลการศึกษาแบบนี้ อาจจะเป็นเพราะ *Cryptococcus* และ *Trichosporon* สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญได้ดีกว่ากลูโคส จึงพบมากเมื่อแยกโดยการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซโลส

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบชนิดของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ และยีสต์ที่ใช้กลูโคสเพื่อการเจริญที่เคยมีการรายงานการค้นพบจากตัวอย่างต่างๆ ในประเทศไทย

สปีชีส์	ดิน	ส่วนประกอบของพืช วัสดุเหลือทิ้งการเกษตร	อื่นๆ		ดิน ^{1,2}	ตะกอนดิน ป่าชายเลน ³	น้ำ ป่าชายเลน ^{3, 4, 5}	อินทรีย์วัตถุ ป่าชายเลน ⁶	ขุยแมลง ⁷	มอส ⁷	เห็ด ⁷
			น้ำจืด	ปุ๋ย							
<i>Candida maltosa</i>	+				+						
<i>Candida membranifaciens</i>		+					+				
<i>Candida pseudointermedia</i>	+	+						+			
<i>Candida pseudolambica</i>	+				+	+	+				
<i>Candida tropicalis</i>		+	+		+	+	+				+
<i>Debaryomyces fabryi</i>	+				+						
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	+	+			+				+		
<i>Lindnera saturnus</i>	+				+						
<i>Pichia caribbica</i>	+	+		+	+		+				
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	+			+		+	+			
<i>Cryptococcus heveanensis</i>		+							+		
<i>Cryptococcus humicola</i>	+										+

ตารางที่ 11 (ต่อ)

สปีชีส์	ดิน	ส่วนประกอบของพืช วัสดุเหลือทิ้งการเกษตร	อื่นๆ		ดิน ^{1,2}	ตะกอนดิน ป่าชายเลน ³	น้ำ ป่าชายเลน ^{3,4,5}	อินทรีย์วัตถุ ป่าชายเลน ⁶	บูยแมลง ⁷	มอส ⁷	เห็ด ⁷
			น้ำจืด	ปุ๋ย							
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	+							+		
<i>Trichosporon asahii</i>	+	+		+					+	+	
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	+	+	+		+						

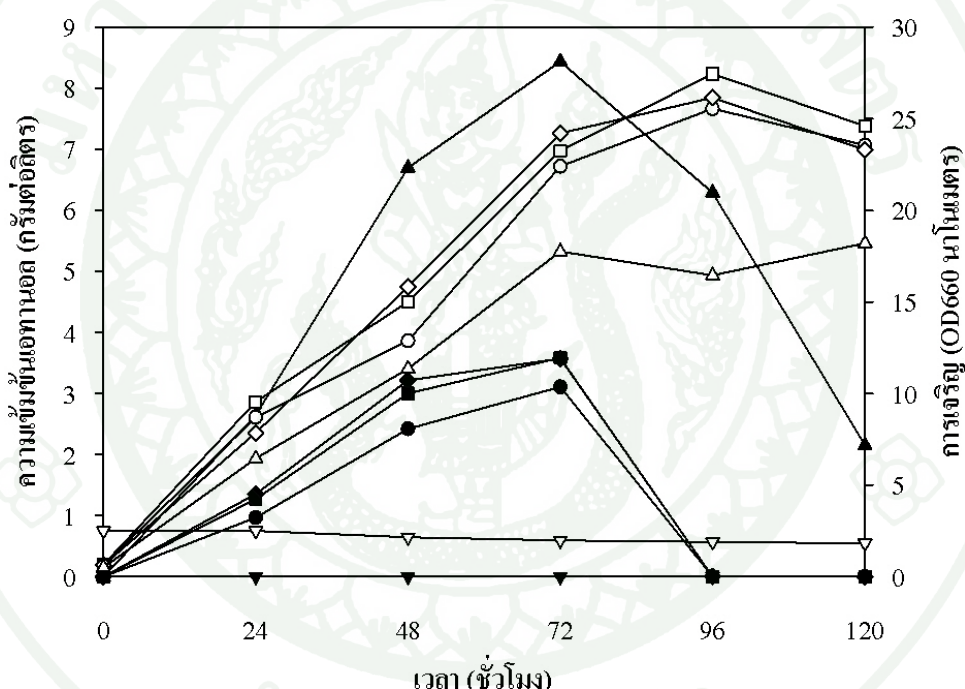
หมายเหตุ 1 Sumpradit, 2005; 2 รุ่งลักษณ์, 2552; 3 ชนิตา, 2552; 4 สมจิต, 2551; 5 Limtong *et al.*, 2008a; 6 กุสุมาวดี, 2549; 7 Jindamorakot, 2006

4. การคัดเลือกยีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลส

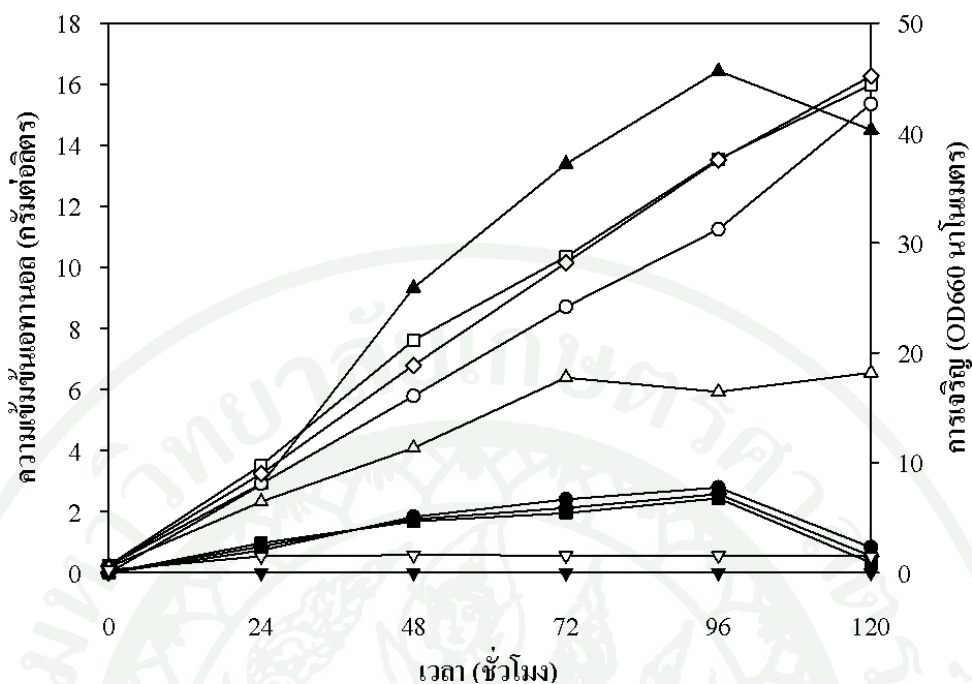
เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลสจึงนำยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 133 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากไซโลสโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 96 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยเครื่อง Gas chromatography พบว่า มียีสต์เพียง 8 ไอโซเลต 3 สปีชีส์ คือ *Candida blankii* (ไอโซเลต A6-1, A8-1 และ A8-2), *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T, KU-Xs18 และ KU-Xs20) และ *Zygoascus hellenicus* (ไอโซเลต SN1-1 และ SN1-4) สามารถหมักให้เอทานอลความเข้มข้น 1.70, 0.98, 1.53, 1.56, 1.78, 1.64, 1.03 และ 1.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเจริญให้เซลล์วัดเป็นความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 45.5, 43.6, 50.1, 23.1, 24.9, 31.3, 47.4 และ 41.8 ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญและการหมักเอทานอลจากไซโลสของ *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 ซึ่งเป็นยีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลสได้ที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบให้เอทานอลสูงกว่ามาก คือ 5.27 กรัมต่อลิตร และเจริญให้เซลล์วัดเป็นความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 6.5 ที่เวลาเดียวกัน ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ไม่สามารถเจริญและหมักเอทานอลจากไซโลสได้นั้น พบว่ามีการเจริญเล็กน้อยให้เซลล์วัดเป็นความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.90 ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการใช้คาร์บอนปริมาณน้อยที่มีใน yeast extract และ peptone เพื่อการเจริญทำให้มีการเพิ่มความขุ่นเพียงเล็กน้อยโดยไม่พบการผลิตเอทานอล (ตารางที่ 12)

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากไซโลสเพิ่มเติมเพื่ออธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ *Candida saraburiensis* sp. nov. 3 ไอโซเลต คือ KU-Xs13^T, KU-Xs18 และ KU-Xs20 โดยการสังเกตการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส (Durham tube) ตามวิธีของ Yarrow (1998) พบว่าไม่มีการสร้างแก๊ส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน และทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth และ 8% D-Xylose-YP broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง นาน 120 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดย เครื่อง Gas chromatography พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth และ 8% D-Xylose-YP broth ไอโซเลต KU-Xs13, KU-Xs18 และ KU-Xs20 เริ่มมีการหมักเอทานอลเมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมง สามารถหมักให้เอทานอลความเข้มข้น

เอทานอลสูงสุดเมื่อบ่มนาน 72 ชั่วโมง และความเข้มข้นเอทานอลลดลงเป็นศูนย์เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 4 เปอร์เซ็นต์สามารถหมักให้เอทานอลความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 3.11, 3.58 และ 3.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 2.79, 2.43 และ 2.58 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลส 4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 8.43 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มนาน 72 ชั่วโมงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 4 เปอร์เซ็นต์ และ 16.44 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 8 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในอาหารทั้งสองชนิด



ภาพที่ 21 ความเข้มข้นของเอทานอล (ดำ) และการเจริญ (ขาว) ของ *Candida saraburiensis* sp. nov. ไอโซเลต KU-Xs13^T (●, ○), KU-Xs18 (■, □), KU-Xs20 (◆, ◇), *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 (▲, △) และ *Saccharomyces cerevisiae* M30 (▼, ▽) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth



ภาพที่ 22 ความเข้มข้นของเอทานอล (ดำ) และการเจริญ (ขาว) ของ *Candida saraburiensis* sp. nov. ไอโซเลต KU-Xs13^T (●, ○), KU-Xs18 (■, □), KU-Xs20 (◆, ◇), *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 (▲, △) และ *Saccharomyces cerevisiae* M30 (▼, ▽) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร 8% D-Xylose-YP broth

เมื่อวิเคราะห์การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไอโซเลต KU-Xs13, KU-Xs18 และ KU-Xs20 เจริญให้เซลล์สูงสุดวัดเป็นความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 25.55, 27.45, 26.15 ตามลำดับ เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการเจริญมีแนวโน้มลดลง และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ชั่วโมงที่ 120 ให้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 42.65, 44.40, 45.20 ตามลำดับ และการเจริญยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 เจริญให้เซลล์สูงสุดวัดเป็นความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 16.45 และ 16.20 เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่าการเจริญของไอโซเลต KU-Xs13, KU-Xs18 และ KU-Xs20 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญได้ดีกว่าการหมักเอทานอลจากไซโลส (ภาพที่ 21, 22)

Toivola *et al.* (1984) ทำการทดสอบการหมักเอทานอลจากไซโลสของยีสต์มากกว่า 200 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 2 % D-Xylose และ 1% Yeast extract ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองที่บรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 10 วัน พบว่ามีเพียง 6 สปีชีส์ คือ *Brettanomyces naardenensis* CBS 6042, *Candida shehatae* CBS 5813, *C. tenuis* CBS 4113, *Pachysolen tannophilus* CBS 4044, *Pichia segobiensis* CBS 6857, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 สามารถสร้างแก๊สใน หลอดดักแก๊ส และเมื่อปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสไปวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้ gas chromatography พบว่านอกจาก 6 สายพันธุ์ใน 6 สปีชีส์ ที่สร้างแก๊สในหลอดดักแก๊สแล้ว ยังพบว่าบางสายพันธุ์ของ *C. albicans*, *C. chilensis*, *C. entomophila*, *C. insectamans*, *C. intermedia*, *C. lodderae*, *C. maltosa*, *C. steatolytica*, *C. succiphila*, *C. torresii*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *Metschnikowia bicuspidate*, *M. zobellii*, *P. guilliermondii*, *P. naganishii*, *P. segobiensis*, *Sporopachydermia quercuum* และ *Wingea robertsii* สามารถหมักเอทานอลจากไซโลสได้โดย 6 สายพันธุ์ที่สร้างแก๊สในหลอดดักแก๊สให้ความเข้มข้นเอทานอลอยู่ในช่วง 1.8-6.6 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลจากไซโลส โดยสายพันธุ์ที่ไม่พบการสร้างแก๊สจะให้ความเข้มข้นเอทานอลอยู่ในช่วง 0.1-1 กรัมต่อลิตร ส่วน Rao *et al.* (2008) รายงานผลการแยกและจัดจำแนกยีสต์ที่สามารถหมักไซโลสเป็นเอทานอลจากผลไม้และเปลือกไม้ ในประเทศอินเดีย สามารถแยกยีสต์ได้ 374 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบการหมักเอทานอลในอาหารไซโลส พบว่ามีเพียง 27 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลส โดยให้เอทานอล 0.12-0.38 กรัมต่อกรัมไซโลส โดยเมื่อจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล พบว่ายีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากไซโลสประกอบด้วย 20 สปีชีส์ คือ *C. albicans*, *C. maltosa*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *Clavispora lusitaniae*, *Cryp. saitoi*, *D. hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *M. chrysoperlae*, *P. barkeri*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. kudriazevii*, *P. membranaefaciens*, *P. mexicana*, *P. veronae*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilaginosa* และ *R. pallida*

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในครั้งนี้กับการรายงานของ Toivola *et al.* (1984) และ Rao *et al.* (2008) ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าในงานนี้สามารถแยกยีสต์สปีชีส์ *C. maltosa*, *C. tropicalis*, *D. hansenii*, *P. kudriazevii*, *P. membranaefaciens* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ไม่พบการสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส แต่ไม่พบการหมักเอทานอลจากไซโลสของยีสต์สปีชีส์ดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากยีสต์บางสายพันธุ์ใน 5 สปีชีส์ดังกล่าวเท่านั้นที่สามารถหมักเอทานอลได้บางสายพันธุ์เท่านั้น หรืออาจเกิดเนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลที่สามารถหมักได้ค่อนข้างต่ำ เกิดการระเหยในระหว่างการหมักและทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้ นอกจากนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบ

ความสามารถในการหมักไซโลสของสายพันธุ์ของยีสต์ในสกุล *Candida blankii* และ *Zygoascus hellenicus* ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Toivola *et al.* (1984) และ Rao *et al.* (2008) และที่ไม่พบว่ายีสต์ทั้งสองสปีชีส์หมักเอทานอลจากไซโลสได้

ตารางที่ 12 ความสามารถในการเจริญและการหมักเอทานอลจากไซโลสของยีสต์ที่แยกได้

Isolate	Species/Closest species	0 h		96 h	
		OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)	OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)
SN1-1	<i>Zygoascus hellenicus</i>	0.92	0	47.35	1.03
SN1-2	<i>Candida tropicalis</i>	0.16	0	12.55	0
SN1-3	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	2.95	0	22.00	0
SN1-4	<i>Zygoascus hellenicus</i>	1.06	0	41.75	1.45
SN2-2	<i>Candida tropicalis</i>	0.34	0	18.70	0
A6-1	<i>Candida blankii</i>	0.92	0	45.50	1.7
A6-2	<i>Candida</i> sp. HA174	0.55	0	18.75	0
A8-1	<i>Candida blankii</i>	0.93	0	43.55	0.98
A8-2	<i>Candida blankii</i>	0.74	0	50.10	1.53
A15-1	<i>Pichia caribbica</i>	2.78	0	31.95	0
A15-2	<i>Trichosporon asahii</i>	1.06	0	16.40	0
A15-3	<i>Pichia caribbica</i>	2.67	0	32.20	0
A16-1	<i>Pichia caribbica</i>	2.76	0	40.00	0
A17-1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1.16	0	24.80	0
A17-2	<i>Pichia caribbica</i>	2.62	0	30.85	0
A18-1	<i>Trichosporon asahii</i>	1.18	0	16.80	0
A19-1	<i>Candida tropicalis</i>	0.68	0	14.95	0
A20-1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1.38	0	25.70	0
A20-2	<i>Candida tropicalis</i>	0.29	0	3.06	0
A20-3	<i>Candida tropicalis</i>	0.55	0	11.98	0
A21-1	<i>Candida tropicalis</i>	0.61	0	9.38	0
A22-1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.06	0	12.18	0
KU-Xs 01	<i>Trichosporon asahii</i>	0.59	0	11.75	0
KU-Xs 02	<i>Trichosporon asahii</i>	0.80	0	17.60	0
KU-Xs 03	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.26	0	18.08	0

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Isolate	Species/Closest species	0 h		96 h	
		OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)	OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)
KU-Xs 04	<i>Candida pseudointermedia</i>	0.61	0	13.63	0
KU-Xs 05	<i>Pichia caribbica</i>	0.94	0	23.88	0
KU-Xs 07	<i>Pichia caribbica</i>	1.08	0	22.38	0
KU-Xs 08	<i>Candida pyralidae</i>	0.48	0	20.10	0
KU-Xs 09	<i>Candida tropicalis</i>	0.62	0	10.55	0
KU-Xs 10	<i>Pichia caribbica</i>	1.81	0	26.10	0
KU-Xs 11	<i>Geotrichum silvicola</i>	0.74	0	20.12	0
KU-Xs 12	<i>Trichosporon asahii</i>	1.10	0	30.20	0
KU-Xs 13	<i>Candida saraburiensis</i>	0.73	0	23.10	1.56
KU-Xs 14	<i>Candida tropicalis</i>	0.59	0	10.80	0
KU-Xs 15	<i>Pichia caribbica</i>	2.67	0	35.60	0
KU-Xs 16	<i>Pichia caribbica</i>	2.19	0	42.90	0
KU-Xs 17	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.06	0	1.92	0
KU-Xs 18	<i>Candida saraburiensis</i>	0.53	0	24.90	1.78
KU-Xs 20	<i>Candida saraburiensis</i>	0.52	0	31.30	1.64
KU-Xs 24	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1.21	0	35.10	0
KU-Xs 25	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	0.99	0	31.20	0
KU-Xs 29	<i>Pichia caribbica</i>	2.66	0	36.65	0
KU-Xs 30	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.14	0	39.15	0
KU-Xs 31	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	0.97	0	29.10	0
KU-Xs 32	<i>Pichia caribbica</i>	2.18	0	41.15	0
KU-Xs 33	<i>Pichia caribbica</i>	2.44	0	37.45	0
KU-Xs 34	<i>Candida</i> sp. KU-Xs34	2.18	0	61.45	0
KU-Xs 35	<i>Candida tropicalis</i>	1.31	0	15.50	0
KU-Xs 36	<i>Pichia caribbica</i>	2.11	0	39.70	0
KU-Xs 37	<i>Candida tropicalis</i>	1.33	0	20.30	0
KU-Xs 38	<i>Candida tropicalis</i>	1.45	0	19.85	0
KU-Xs 39	<i>Pichia caribbica</i>	2.19	0	38.75	0
KU-Xs 40	<i>Pichia caribbica</i>	1.90	0	35.35	0
KU-Xs 41	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1.43	0	35.40	0

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Isolate	Species/Closest species	0 h		96 h	
		OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)	OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)
KU-Xs 42	<i>Pichia caribbica</i>	2.16	0	36.40	0
KU-Xs 44	<i>Candida tropicalis</i>	1.61	0	18.00	0
KU-Xs 45	<i>Pichia caribbica</i>	2.45	0	40.00	0
KU-Xs 46	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.30	0	31.55	0
KU-Xs 47	<i>Pichia caribbica</i>	2.19	0	52.20	0
KU-Xs 48	<i>Candida membranifaciens</i>	2.29	0	43.70	0
KU-Xs 50	<i>Candida tropicalis</i>	1.85	0	11.85	0
KU-Xs 51	<i>Cryptococcus heveanensis</i>	1.88	0	36.85	0
KU-Xs 52	<i>Pichia rhodanensis</i>	1.62	0	32.65	0
KU-Xs 54	<i>Candida tropicalis</i>	4.36	0	7.75	0
KU-Xs 55	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	2.19	0	37.10	0
KU-Xs 56	<i>Candida membranifaciens</i>	2.70	0	44.00	0
KU-Xs 57	<i>Candida tropicalis</i>	0.59	0	10.30	0
KU-Xs 58	<i>Candida tropicalis</i>	2.34	0	12.60	0
KU-Xs 59	<i>Pichia rhodanensis</i>	1.46	0	31.90	0
KU-Xs 60	<i>Pichia rhodanensis</i>	1.21	0	32.80	0
KU-Xs 61	<i>Pichia rhodanensis</i>	1.45	0	27.35	0
KU-Xs 62	<i>Candida tropicalis</i>	1.42	0	10.10	0
KU-Xs 63	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	1.38	0	31.75	0
KU-Xs 64	<i>Candida tropicalis</i>	0.85	0	12.50	0
KU-Xs 65	<i>Pichia rhodanensis</i>	1.05	0	49.30	0
KU-Xs 66	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	0.79	0	28.65	0
KU-Xs 67	<i>Candida tropicalis</i>	1.20	0	19.20	0
KU-Xs 68	<i>Candida tropicalis</i>	1.00	0	12.80	0
KU-Xs 69	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.42	0	45.95	0
KU-Xs 72	<i>Candida tropicalis</i>	1.24	0	20.85	0
KU-Xs 73	<i>Sporopachydermia lactativora</i>	2.21	0	69.50	0
KU-Xs 75	<i>Candida tropicalis</i>	1.28	0	18.45	0
KU-Xs 76	<i>Pichia caribbica</i> strain	1.69	0	35.65	0
KU-Xs 77	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.83	0	23.05	0

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Isolate	Species/Closest species	0 h		96 h	
		OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)	OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)
KU-Xs 78	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.29	0	21.75	0
KU-Xs 79	<i>Pichia caribbica</i> strain	1.84	0	32.50	0
NT01	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686	1.51	0	27.30	0
NT02	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	1.89	0	33.50	0
NT03	<i>Trichosporon</i> sp. CBS 8686	1.44	0	26.30	0
NT04	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.45	0	23.56	0
NT05	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.18	0	20.10	0
NT06	<i>Cryptococcus humicola</i>	1.44	0	21.70	0
NT07	<i>Cryptococcus terrestris</i>	1.72	0	37.00	0
NT08	<i>Candida pseudointermedia</i>	1.18	0	22.20	0
NT09	<i>Cryptococcus terrestris</i>	1.68	0	38.10	0
NT10	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27159	0.58	0	24.00	0
NT11	<i>Trichosporon terricola</i>	0.35	0	23.20	0
NT12	<i>Geotrichum silvicola</i>	0.60	0	29.40	0
NT13	<i>Cryptococcus terrestris</i>	1.66	0	37.10	0
NT14	<i>Cryptococcus humicola</i>	1.32	0	23.50	0
NT15	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.31	0	22.00	0
NT16	<i>Debaryomyces fabryi</i>	1.96	0	57.50	0
NT17	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.51	0	26.30	0
NT18	<i>Saturnispora saitoi</i>	0.31	0	2.54	0
NT19	<i>Candida tropicalis</i>	1.24	0	12.60	0
NT20	<i>Candida pseudolambica</i>	0.61	0	15.20	0
NT21	<i>Geotrichum</i> sp. LY16	1.64	0	51.30	0
NT22	<i>Candida tropicalis</i>	1.30	0	11.80	0
NT23	<i>Candida solani</i> (U70179)	0.13	0	1.93	0
NT24	<i>Lindnera saturnus</i>	0.52	0	20.40	0
NT25	<i>Trichosporon moniliiforme</i>	1.46	0	27.10	0
NT26	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.35	0	22.40	0
NT29	<i>Pichia exigua</i>	0.46	0	7.50	0
NT30	<i>Cryptococcus terrestris</i>	1.69	0	38.20	0

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Isolate	Species/Closest species	0 h		96 h	
		OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)	OD ₆₆₀	เอทานอล (g/l)
NT31	<i>Pichia pipperi</i>	1.34	0	24.10	0
NT33	<i>Candida maltosa</i>	1.17	0	20.34	0
NT34	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.77	0	2.21	0
NT35	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.32	0	20.50	0
NT36	<i>Candida chiropterorum</i>	1.33	0	28.00	0
NT37	<i>Cryptococcus humicola</i>	1.36	0	20.10	0
NT38	<i>Cryptococcus humicola</i>	1.50	0	25.30	0
NT40	<i>Debaryomyces fabryi</i>	1.11	0	20.30	0
NT41	<i>Candida coipomoensis</i>	1.28	0	27.20	0
NT42	<i>Candida coipomoensis</i>	1.35	0	25.00	0
NT43	<i>Barnettozyma californica</i>	2.03	0	34.80	0
NT44	<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1.44	0	27.00	0
NT45	<i>Barnettozyma californica</i>	2.04	0	37.40	0
NT46	<i>Cryptococcus terrestris</i>	1.54	0	39.00	0
NT47	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.10	0	30.50	0
NT48	<i>Cryptococcus humicola</i>	1.13	0	20.40	0
NT49	<i>Geotrichum</i> sp. LY5	2.31	0	40.10	0
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 5773		0.91	0	6.50	5.27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M30		2.5	0	1.90	0

สรุปผล

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ โดยแยกยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่าง ดิน, ส่วนประกอบของพืชและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ น้ำและปุ๋ย จำนวน 79 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ 133 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ผลดังนี้

1. สปีชีส์ที่อธิบายแล้วมี 108 ไอโซเลต (คิดเป็น 81.2 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา)

1.1 แอสโคไมซีตยีสต์มี 73 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็น 17 สปีชีส์ ใน 8 สกุล คือ *Barnettozyma californica*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pyralidae*, *C. tropicalis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *L. saturnus*, *P. caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi* และ *Zygoascus hellenicus*

1.2 แบสิดิโอไมซีตยีสต์ 35 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็น 8 สปีชีส์ ใน 2 สกุล คือ *Cryptococcus heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Cryp. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T. mycotoxinivorans* และ *T. terricola*

2. สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

พบมี 11 ไอโซเลต (คิดเป็น 8.3 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) โดย 3 ไอโซเลต เหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นแอสโคไมซีตยีสต์ คือ *Candida* sp. NRRL Y-27159, *Geotrichum* sp. LY16 และ *Geotrichum* sp. LY5 ในขณะที่ 8 ไอโซเลตเหมือนกับสปีชีส์ที่เป็นแบสิดิโอไมซีตยีสต์ คือ *Cryptococcus* cf. *podzolicus* และ *Trichosporon* sp. CBS 8686

3. สปีชีส์ที่อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

พบมี 5 ไอโซเลต (คิดเป็น 3.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida solani*, *Geotrichum silvicola*, *Sporopachydermia lactativora*, *Zygoascus hellenicus* และ *Trichosporon mycotoxinivorans*

4. สปีชีส์ใหม่

พบมี 9 ไอโซเลต (คิดเป็น 6.8 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา) จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ 7 สปีชีส์ คือ *Candida saraburiensis* sp. nov., *Candida* sp. A6-2, *Candida* sp. KU-Xs34, *Pichia* sp. NT29, *Candida* sp. NT31, *Candida* sp. NT36 และ *Candida* sp. NT40

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ที่ใช้ไซโลสเพื่อการเจริญ ได้ผลดังนี้

1. พบแอสโคไมซีตยีสต์ 67.6 เปอร์เซ็นต์ (73 ไอโซเลต) และพบแบคทีเรียโอมัยซีตยีสต์มากถึง 32.4 เปอร์เซ็นต์ (35 ไอโซเลต) ของยีสต์ในกลุ่มสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว โดยพบแบคทีเรียโอมัยซีตยีสต์มากกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน

2. สปีชีส์ที่พบบ่อย คือ *Candida tropicalis* และ *Pichia caribbica*

3. ยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการเจริญในการศึกษานี้จำนวนทั้งหมด 25 สปีชีส์ พบว่ามี 15 สปีชีส์ เป็นสปีชีส์ที่เคยมีรายงานว่าพบจากตัวอย่างต่างๆ ในประเทศไทยเมื่อทำการแยกออกมาศึกษาโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมาก่อน คือ *Candida maltosa*, *C. membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces fabryi*, *D. nepalensis*, *Lindnera saturnus*, *Pichia caribbica*, *P. kudriazevii*, *Cryptococcus heveanensis*, *Cryp. humicola*, *Cryp. laurentii*, *Trichosporon asahii* และ *T. mycotoxinivorans* ในขณะที่มี 10 สปีชีส์ ยังไม่เคยรายงาน คือ *Barnettozyma californica*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. pyralidae*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *Saturnispora saitoi*, *Zygoascus hellenicus*, *Cryptococcus terrestris*, *Trichosporon terricola* และ *T. moniliiforme*

เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่หมักเอทานอลจากไซโลสจึงทดสอบการหมักเอทานอลจากไซโลสของ
ยีสต์ที่แยกทั้งหมดได้ 133 ไอโซเลต โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร 4% D-Xylose-YP broth ใน
พลาสติกและบ่มแบบเขย่า ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง พบยีสต์ 8 ไอโซเลต ใน 3 สปีชีส์ คือ
Candida blankii (ไอโซเลต A6-1, A8-1 และ A8-2), *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T,
KU-Xs18 และ KU-Xs20) และ *Zygoascus hellenicus* (ไอโซเลต SN1-1 และ SN1-4) โดยผลิต
เอทานอลได้ 0.98-1.78 กรัมต่อลิตร



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กุสุมาดี ประสาทศรี. 2549. การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลน โดย
อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนิดา บุญมาก. 2552. ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่ง
ทะเลของอ่าวไทยตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร. 2552. ความหลากหลายของยีสต์ในดินจากป่าไม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ของประเทศไทยและความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมจิต อ้ออินทร์. 2551. ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำจากป่าชายเลนในเขตอุทยานแห่งชาติแหลม
สน จังหวัดระนอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Altschul, S. F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman.
1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402.
- Am-In, S., W. Yongmanitchai and S. Limtong. 2008. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an
ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong Province,
Thailand. **FEMS Yeast Res.** 8: 823-828.

- Am-In, S., S. Limtong, W. Yongmanitchai and S. Jindamorakot. 2010. *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov., and *Candida ranongensis* sp. nov., three anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol.** DOI 10.1099/ij.s.0.022038-0.
- Aristos, A. and M. Penttilä. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Curr Opin Biotech.** 11 (2): 187-198.
- Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 2000. **Yeasts : Characteristics and Identification, 3rd edition.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Boonmak, C., S. Jindamorakot, H. Kawasaki, W. Yongmanitchai, P. Suwanarit, T. Nakase and S. Limtong. 2009. *Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 9: 668–672.
- Carvalho, W., S.S. Silva, M. Vitolo, Maria G. A. Felipe and I.M. Mancilha. 2002. Improvement in Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Achieved by the Use of a Repeated-Batch Immobilized Cell System. **Z Naturforsch C Biosci.** 57 (1-2): 109-112.
- Demain, A.L., H.J. Phaff and C.P. Kurtzman. 1998. The industrial and agricultural significance of yeast, pp. 13-17. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic study, 4th edition.** Elsevier Science, Amsterdam.
- Doran-Peterson, J., D. M. Cook and S. K. Brandon. 2008. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. **Plant J.** 54: 582–592.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution.** 39: 738-791.
- Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén and G. Zacchi. 2006. Bio-ethanol : the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnol.** 24 (12): 549-556.

- Imanishi, Y., S. Jindamorakot, K. Mikata, A. Nakagiri, S. Limtong, W. Potacharoen, M. Tanticharoen and T. Nakase. 2008. Two new ascomycetous anamorphic yeast species related to *Candida friedrichii*-*Candida jaroonii* sp. nov., and *Candida songkhlaensis* sp. nov.- isolated in Thailand. **Antonie van Leeuwenhoek**. 94: 267–276.
- Jindamorakot, S. 2006. **The species diversity of yeasts in some natural habitats of Thailand**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- _____, S. Am-in, T.T. Thuy, N.D. Duy, H. Kawasaki, W. Potacharoen, S. Limtong, M. Tanticharoen and T. Nakase. 2004. *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov. and *Candida nakhonratchasimensis* sp. nov., three new species of yeasts isolated from insect frass in Thailand. **J Gen. Appl. Microbiol.** 50: 261–269.
- _____, S. Limtong, W. Yongmanitchai, M. Tuntirungkij, W. Potacharoen, H. Kawasaki and T. Nakase. 2007. Two new anamorphic yeasts, *Candida thailandica* sp. nov. and *Candida lignicola* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 7: 1409–1414.
- _____, S. Ninomiya, S. Limtong, W. Yongmanitchai, M. Tuntirungkij, W. Potacharoen, K. Tanaka, H. Kawasaki and T. Nakase. 2009. Three new species of bipolar budding yeasts of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 9: 1327–1337.
- Kaewwichian, R., W. Yongmanitchai, N. Srisuk, K. Fujiyama, S. Limtong. 2010. *Geotrichum siamensis* sp. nov. and *Geotrichum phurueaensis* sp. nov., two asexual arthroconidial yeast species isolated in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 10: 214–220.
- Kimura, M. 1980. A sample method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111–120.

Komagata, K and Nakase, T .1967 Reitoshokuin no biseibutsu nikannsuru kenkyu V. Shihan reituoshokushin yori bunri shita kobo no seiyo (Microbiological study in foods. V. General properties of yeasts isolated from frozen foods) (in Japanese). **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**. 8: 53–57.

Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73: 331-371.

_____ and J.W. Fell. 1998. **The yeasts: A Taxonomic Study, 4th edition**. Elsevier Science, Amsterdam.

Lachance, M.A., W.T. Starmer. 1998. Ecology and yeasts, pp. 22-30. *In* C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic study, 4th edition**. Elsevier Science, Amsterdam.

_____, M.A., J.M. Bowles, W.T. Starmer, S.F. Barker. 1999. *Kodamaea kadaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Can J Microbiol**. 45: 172-177.

Lachke, A., 2002. Biofuel from D-xylose: the second most abundant sugar. **Resonance**. 7(5): 50-58.

Limtong S., N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H.Kawasaki, H.Yurimoto, T. Nakase, and N. Kato. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp.nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 50: 119–127.

_____, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2005. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol**. 55: 2225–2229.

- Limtong S., W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2007. *Candida thaimueangensis* sp. nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in a mangrove forest in Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol.** 57: 650–653.
- _____, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2008a. *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the Yarrowia clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol.** 58: 515–519.
- _____, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto and T. Nakase. 2008b. *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. **Int J Syst Evol Microbiol.** 58: 302–307.
- _____, R. Kaewwichian, S. Am-In, C. Boonmak, S. Jindamorakot, W. Yongmanitchai, N. Srisuk, H. Kawasaki and T. Nakase. 2010. Three anamorphic yeast species *Candida sanitii* sp. nov., *Candida sekii* sp. nov. and *Candida suwanaritii*, three novel yeasts in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand. **FEMS Yeast Res.** 10: 114–122.
- Mishra, P. and A. Singh. 1993. Microbial Pentose Utilization. **Adv Appl Microbiol.** 39: 91-152.
- Matsushika, A., S. Watanabe, T. Kodaki, K. Makino and S. Sawayama. 2008. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. **J Biosci Bioeng.** 105: 296-299.
- Nakase, T. and M. Suzuki. 1986. *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp. in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 32: 225-240.

- Nakase, T., S. Jindamorakot, S. Am-in, H. Kawasaki, W. Potacharoen and M. Tanticharoen. 2005. *Pichia nongkratonensis* sp. nov., a new species of ascomycetous yeast isolated from insect frass collected in Thailand. **Mycoscience**. 46:192–195
- _____, S. Jindamorakot, T. Sugita, S. Am-in, H. Kawasaki, W. Potacharoen and M. Tanticharoen. 2006. *Trichosporon siamense* sp. nov. isolated from insect frass in Thailand. **Mycoscience**. 47:106–109.
- _____, S. Jindamorakot, S. Limtong, S. Am-in, H. Kawasaki, Y. Imanishi, W. Potacharoen and M. Tanticharoen. 2007a. *Candida kazuoi* sp. nov. and *Candida hasegawae* sp. nov., two new species of ascomycetous anamorphic yeasts isolated from insect frass in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 53: 239–245.
- _____, S. Jindamorakot, K. Mikata, S. Ninomiya, H. Kawasaki, S. Limtong, W. Potacharoen and M. Tanticharoen. 2007b. *Pichia koratensis* sp. nov., a new ascomycetous yeast related to *Pichia acaciae* isolated from insect frass in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 53: 345–351.
- Rao, R.S., B. Bhadra and S. Shivaji. 2008. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Lett Appl Microbiol.** 47 (1): 19-24.
- Ryabova, O.B., O.M. Chmil and A.A. Sibirny. 2003. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Res.** 4: 157-164.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** 4, 406-425.
- Scorzetti, G., J.W. Fell, A. Fonseca, A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeast: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA region. **FEMS Yeast Res.** 2: 495-517.

- Suh, S.O., M.M. White, N.H. Nguyen, M. Blackwell. 2004. The status and characterization of *Enteroramus dimorphus*: a xylose-fermenting yeast attached to the gut of beetles. **Mycologia**, 96(4): 756–760.
- Sumpradit, T. 2005. **Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forest of Nam Nao National Park**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- _____, S. Limtong, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2005. *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao National Park, Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol**. 55: 1735–1738.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The CLASTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Res** 25:4876-4882.
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P. and Scheffers, W. A. 1984. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. **Appl Environ Microbiol**. 47, 1221-1223.
- U. S. Food and Drug Administration. 2001. **Partial List of Microorganisms And Microbial-Derived Ingredients That Are Used In Foods**. U. S. Food and Drug Administration. Available Source: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm078956.htm>, October 7, 2009.
- Valente, P., J.P. Ramos, O. Leoncini. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Can J Microbiol**. 45:949-958.

Yamada, Y. 1998. Identification of Coenzyme Q (Ubiquinone) homologs, pp. 101-102. *In* C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic Study, 4th edition**. Elsevier. Amsterdam.

_____ and K. Kondo. 1973. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus* and the yeast like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. **Gen. Microbiol.** 19: 59-77.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 77-100. *In* C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic Study, 4th edition**. Elsevier. Amsterdam.





อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. D-Xylose yeast nitrogen base (Xylose-YNB) broth

ไซโลส	20	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล		
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

2. D-Xylose yeast nitrogen base (Xylose-YNB) agar

ไซโลส	20	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล		
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

3. 2% D-Xylose yeast extract peptone (YP) broth

ไซโลส	20	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	20	กรัม
เปปโทน	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

4. 2% D-Xylose yeast extract peptone (YP) agar

ไซโลส	20	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	20	กรัม

เปปโทน	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

5. 4% D-Xylose yeast extract peptone (YP) broth

ไซโลส	40	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	20	กรัม
เปปโทน	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

6.4% D-Xylose yeast extract peptone (YP) agar

ไซโลส	40	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	20	กรัม
เปปโทน	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

7. 8% D-Xylose yeast extract peptone (YP) broth

ไซโลส	80	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	20	กรัม
เปปโทน	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

8. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

9. Yeast extract malt extract (YM) broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

10. Yeast extract malt extract (YM) broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
กลีเซอรอล	100	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

11. Yeast extract peptone dextrose (YPD) broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	10	กรัม
เปปโทน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

12. 5% malt extract agar

มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

13. Fowell's acetate agar

โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

14. Corn meal agar

Corn meal agar	1.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

15. Gorodkova agar

กลูโคส	0.1	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	2.0	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. Stock carbon solution (10X)

ยีสต์ในโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
สารประกอบคาร์บอน	5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

17. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ stock carbon solution (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน การเตรียมอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนนั้น มีสารประกอบคาร์บอน 7 ชนิด ที่ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดสอบ ได้แก่ อินูลิน เอทานอล เมทานอล แป้ง กาแลกทิทอล 2-ดีไฮโดร-ดี-กลูโคเนต และ 5-ดีไฮโดร-ดี-กลูโคเนต

18. Yeast carbon base (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

19. Yeast carbon base broth (1X)

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ yeast carbon base (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุ น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

20. Stock nitrogen solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
สารประกอบไนโตรเจน*	X	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารประกอบไนโตรเจน*: แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.5 กรัม โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) 0.78 กรัม โซเดียมไนไตรต์ (NaNO_2) 0.26 กรัม เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine-HCl) 0.64 กรัม แอล-ไลซีน (L-lysine-HCl) 0.56 กรัม และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) 0.68 กรัม

21. อาหารทดสอบการแอคซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

ชั่งวุ้น 1.67 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 90 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ร่อนวุ้นอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติม stock nitrogen solution (10X) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

22. Fermentation basal medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	4.5	กรัม
เปปโตน	7.5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

บรอมไทมอลบลู จำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม

แบ่ง fermentation basal medium ลงในหลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอด

ดักแก๊ส หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์)

23. Fermentation test of glucose

ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

บรอมไทมอลบลู จำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม

แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

24. อาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium)

กลูโคส	10	กรัม
Vitamin assay casamino acids (Difco)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 5.5 และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

25. Custer's chalk medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	5	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เมื่ออุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทำการเทลงบนเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเขย่าขวดเพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตละลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหาร

26. อาหารตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซอไมด์

1) การเตรียม Basal medium (10X)

ไซโคลเฮกซอไมด์ 1 กรัม ละลายในอะซิโตน 2.5 มิลลิลิตร

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) Active medium

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ basal medium (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

27. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

1) อาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	1	กรัม
วุ้น	1.3	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที		

2) อาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	60	กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	1	กรัม
วุ้น	1.3	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที		

3) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	100	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

4) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	150	กรัม
กลูโคส	50	กรัม

ยีสต์ในโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

28. Christensen's urea agar

1) การเตรียมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์

ยูเรีย	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) การเตรียมอาหารทดสอบการไฮโดรไลต์ยูเรีย

กลูโคส	1	กรัม
เปปโตน	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
วุ้น	20	กรัม
ฟีนอลเรด	0.012	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 6.8 แบ่งใส่หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Bromothymol blue stock solution

ละลายบรอมไทมอลบลู 50 มิลลิกรัม ในน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร วิธีใช้ คือ เติม bromothymol blue stock solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงใน fermentation basal medium และ fermentation test of glucose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Lugol's solution

ไอโอดีน	1	กรัม
โปแตสเซียม ไอโอไดด์	2	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส 300 มิลลิลิตร		

3. Diazonium blue B reagent (DBB reagent)

Diazonium blue B salt	0.15	กรัม
0.25 M Tris hydroxymethyl aminomethane (pH 7.0)	10	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วควรเก็บไว้ในที่เย็น และใช้ภายใน 30 นาที หลังจากเตรียมเสร็จ

4. 10X TBE buffer

Tris base	10.8	กรัม
กรดบอริก	5.5	กรัม
0.5 mM EDTA (pH 8.0)	4.0	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. Loading dye

บรอมฟีนอล บลู	0.25	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสให้ครบ 100 มิลลิลิตร		

7. 1kb DNA ladder (DNA marker)

DNA ladder	1	ไมโครลิตร
6X loading Dye	1	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	4	ไมโครลิตร

8. 2.5 mM dNTP

dATP	25	ไมโครลิตร
dCTP	25	ไมโครลิตร
dGTP	25	ไมโครลิตร
dTTP	25	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	4	ไมโครลิตร



ภาคผนวก ข

ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร IJSEM

International Journal of Systematic
and Evolutionary Microbiology

HOME | HELP | FEEDBACK | SUBSCRIPTIONS | ARCHIVE | SEARCH

QUICK SEARCH: [advanced]

Author: Keyword(s):

Go:

Year: Vol: Page:

Published online ahead of print on 26 March 2010 as doi:10.1099/ijs.0.023317-0
Int J Syst Evol Microbiol (2010); DOI 10.1099/ijs.0.023317-0
© 2010 International Union of Microbiological Societies

Candida saraburiensis sp. nov. and Candida prachuapensis sp. nov., two xylose-utilizing yeast species isolated in Thailand

Sukanya Nitiyon¹, Chanita Boonmak¹, Somjit Am-In², Sasitorn Jindamorakot², Hiroko Kawasaki³, Wichien Yongmanitchai¹ and Savitree Limtong^{1,4}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University;
² Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC);
³ Department of Biotechnology, NITE Biological Resource Center
⁴ E-mail: fscistl@ku.ac.th

Four strains of two novel xylose-utilizing yeast species were obtained from samples collected in Thailand from decaying corn cobs (KU-Xs13 and KU-Xs18), a decaying grass (KU-Xs20), and estuarine water in a mangrove forest (WB15). On the basis of morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, and the sequence analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene, the four strains were found to represent two novel *Candida* species in the *Candida albicans*/*Lodderomyces elongisporus* clade. Three strains (KU-Xs13, KU-Xs18 and KU-Xs20) were assigned as a single novel species, which was named *Candida saraburiensis* sp. nov. The type strain is KU-Xs13^T (= CBS 11696^T = NBRC 106721^T = BCC 39601^T). Strain WB15 represented another novel *Candida* species which was named *Candida prachuapensis* sp. nov. The type strain is WB15^T (= CBS 11024^T = NBRC 104881^T = BCC 29904^T).

HOME | HELP | FEEDBACK | SUBSCRIPTIONS | ARCHIVE | SEARCH

INT J SYST EVOL MICROBIOL | MICROBIOLOGY | J GEN VIROL

J MED MICROBIOL | ALL SGM JOURNALS

Copyright © 2010 by the International Union of Microbiological Societies.

This Article

Full Text (Papers in Press) PDF1

Alert me when this article is cited

Alert me if a correction is posted

Services

Email this article to a friend

Similar articles in this journal

Similar articles in PubMed

Alert me to new issues of the journal

Download to citation manager

© Gal Permissions

Citing Articles

Citing Articles via CrossRef

Google Scholar

Articles by Nitiyon, S.

Articles by Limtong, S.

PubMed

PubMed Citation

Articles by Nitiyon, S.

Articles by Limtong, S.

Agricola

Articles by Nitiyon, S.

Articles by Limtong, S.

1 Full paper

2 *Candida saraburiensis* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov., two
3 xylose-utilizing yeast species isolated in Thailand

4

5 Sukanya Nitiyon¹, Chanita Boonmak^{1,2}, Somjit Am-In³, Sasitorn
6 Jindamorakot³, Hiroko Kawasaki², Wichien Yongmanitchai¹ and Savitree
7 Limtong^{1*}

8

9 ¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

10 ²Department of Biotechnology, NITE Biological Resource Center, National Institute of
11 Technological and Evaluation, Chiba, Japan

12 ³Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
13 (BIOTEC), Pathumthani, Thailand

14

15 *Correspondence :

16 Savitree Limtong, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University,
17 Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2 562 5444, ext: 4017; fax: +66 2 579 2081; e-mail:
18 fscistl@ku.ac.th

19

20 **Running word:** *Candida saraburiensis* and *C. prachuapensis* spp. nov.

21

22 The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the sequence of the D1/D2 domain of the
23 LSU rRNA gene of KU-Xs13^T and WB15^T are respectively AB534915 and AB439258.

24

1 Summary

2 Four strains of two novel xylose-utilizing yeast species were obtained from samples
3 collected in Thailand from decaying corncobs (KU-Xs13 and KU-Xs18), a decaying grass
4 (KU-Xs20), and estuarine water in a mangrove forest (WB15). On the basis of
5 morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, and the
6 sequence analysis of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene, the four strains were
7 found to represent two novel *Candida* species in the *Candida albicans/Lodderomyces*
8 *elongisporus* clade. Three strains (KU-Xs13, KU-Xs18 and KU-Xs20) were assigned as a
9 single novel species, which was named *Candida saraburiensis* sp. nov. The type strain is
10 KU-Xs13^T (= CBS 11696^T = NBRC 106721^T = BCC 39601^T). Strain WB15 represented
11 another novel *Candida* species which was named *Candida prachuapensis* sp. nov. The type
12 strain is WB15^T (=CBS 11024^T = NBRC 104881^T = BCC 29904^T).

13

14

1 Introduction

2 At present lignocellulose in plant biomass is of interest as a substrate for production
 3 of many microbial products, such as xylitol, acetic acid, and ethanol (Carvalho *et al.*, 2002;
 4 Doran-Peterson *et al.*, 2008; Hahn-Hägerdal *et al.* 2006). D-Xylose is the second most
 5 abundant sugar in the lignocellulose of plant cell walls. It is a major sugar component of
 6 xylan, which is one of the principal polysaccharides constituent of lignocellulose. Many yeast
 7 species can assimilate xylose as a sole carbon source. Also, many species have been tested
 8 for D-xylose fermentation (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman & Fell, 1998; Toivola *et al.*, 1984).
 9 Only a few yeast species have been reported to ferment D-xylose to ethanol. These include
 10 *Brettanomyces naardenensis*, *Candida lyxosophila*, *C. intermedia*, *C. shehatae*, *C. tenuis*,
 11 *Pachysolen tannophilus*, *Pichia segobiensis*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* (Barnett *et al.*,
 12 2000; Kurtzman & Fell, 1998), *Candida jeffriesii*, *Spathaspora passalidarum* (Nguyen *et al.*,
 13 2006), and *Spathaspora arborariae* (Cadete *et al.*, 2009).

14 During investigations of xylose-utilizing yeasts and yeasts in mangrove forest
 15 ecosystems in Thailand, four xylose utilizing yeast strains were found to represent two novel
 16 *Candida* species in *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade based on the analysis
 17 of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rRNA gene sequence. In this present paper,
 18 three D-xylose fermenting strains (KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-Xs20) are described as
 19 *Candida saraburiensis* sp. nov. and one D-xylose assimilating strain (WB15^T), is described
 20 as *Candida prachuapensis* sp. nov.

21

1 **METHOD**

2 **Yeast isolation and characterization**

3 Xylose-utilizing yeasts were isolated from decaying agricultural residues and soil,
 4 using an enrichment technique. Each sample (1 g) was added to 50 ml of D-xylose-yeast
 5 nitrogen base (YNB) broth (2% D-xylose, 0.67% Difco yeast nitrogen base; adjusted to pH
 6 5.5 with 1M HCl) supplemented with 0.025% sodium propionate and 200 mg
 7 chloramphenicol L⁻¹ in a 250 ml Erlenmeyer flask and incubated on a rotary shaker at 25 °C
 8 for 48 hours. The enrichment culture was spread on D-xylose-YNB agar and incubated at 25
 9 °C. After incubation, yeast colonies were picked and purified by streaking on yeast extract
 10 malt extract (YM) agar (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose and
 11 1.5% agar). Yeasts in estuarine water were isolated by a membrane filtration technique
 12 following the method of Limtong *et al.* (2007a). Purified yeast strains were suspended in YM
 13 broth supplemented with 10% glycerol and maintained at -80 °C.

14 **DNA sequencing and phylogenetic analysis**

15 The sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene were determined from
 16 PCR products amplified from genomic DNA extracted from yeast cells by using a slightly
 17 modified version of the method described by Lachance *et al.* (1999). The D1/D2 domain of
 18 the LSU rRNA gene was amplified by PCR with the forward primer NL-1 and the reverse
 19 primer NL-4 (O'Donnell, 1993). The PCR product was checked by agarose gel
 20 electrophoresis and purified by using the QIAquick purification kit (Qiagen). The purified
 21 PCR product was submitted to Macrogen Inc. (Korea) for sequencing with the external
 22 primers NL-1 and NL-4. The sequences were compared pairwise using a BLASTN search
 23 (Altschul *et al.*, 1997) and were aligned with the sequences of related species retrieved from

1 GenBank using the multiple alignment program CLUSTAL_X version 1.81 (Thompson *et*
 2 *al.*, 1997). A phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data with
 3 Kimura's two-parameter correction (Kimura, 1980), using the neighbor-joining method
 4 (Saitou & Nei, 1987). Confidence levels of the clades were estimated from bootstrap analysis
 5 (1000 replicates) (Felsenstein, 1985).

6 **Phenotypic characterization and xylose fermentation test**

7 The strains of novel species were characterized morphologically, biochemically, and
 8 physiologically according to the standard methods described by Yarrow (1998). Assimilation
 9 of nitrogen compounds was examined on solid media with starved inocula following the
 10 method of Nakase & Suzuki (1986). Growth at various temperatures was determined by
 11 cultivation in YM broth. Ubiquinones were extracted from cells cultivated in a 500 ml
 12 Erlenmeyer flask containing 200 ml of yeast extract peptone dextrose (YPD) broth (1% yeast
 13 extract, 2% peptone and 2% dextrose) on a rotary shaker at 28 °C for 72 hours and purified
 14 according to the method described by Yamada & Kondo (1973) and Kuraishi *et al.* (1985).
 15 The isoprenologues were identified by HPLC as described previously (Limtong *et al.*,
 16 2007b).

17 The fermentation of D-xylose was tested by cultivation in a 50 ml of 4% D-xylose
 18 yeast extract peptone (YP) broth (4% D-xylose, 2% peptone and 1% yeast extract) in a 250
 19 ml Erlenmeyer flask on a rotary shaker at 150 rpm and 30 °C. Ethanol production and growth
 20 were measured at every 24 h for 120 h. Ethanol was analysed by gas chromatography
 21 (Shimadzu GC-9A, Japan) with n-propanol as internal standard and the cell concentration
 22 was determined as optical density at 660 nm. *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 was used as
 23 a positive control and *Saccharomyces cerevisiae* M30 was used as a negative control.

1 RESULTS AND DISCUSSION

2 Species delineation, classification and ecology

3 A total of 133 xylose-utilizing yeast strains were isolated from 84 samples of
 4 decaying agricultural residues and soils collected in various areas of Thailand. Seventy-eight
 5 strains were assigned to 18 described species in nine genera of the phylum Ascomycota
 6 (*Barnettozyma californica*, *Candida blankii*, *C. coipomoensis*, *C. maltosa*, *C.*
 7 *membranifaciens*, *C. pseudointermedia*, *C. pyralidae*, *C. solani*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces*
 8 *hansenii* var. *fabryi*, *D. nepalensis*, *Geotrichum silvicola*, *Lindnera rhodanensis*, *Pichia*
 9 *caribbica*, *P. kudriavzevii*, *Saturnispora saitoi*, *Sporopachydermia lactativora*, and
 10 *Zygoascus hellenicus*). Forty-two strains were assigned to nine described species in two
 11 genera of the phylum Basidiomycota (*Cryptococcus* cf. *podzolicus*, *C. heveanensis*, *C.*
 12 *humicola*, *C. laurentii*, *C. terrestris*, *Trichosporon asahii*, *T. moniliiforme*, *T.*
 13 *mycotoxinivorans* and *T. terricola*). Four strains were similar to three undescribed species and
 14 nine strains were found to represent seven novel species.

15 All 133 strains were tested for D-xylose fermentation using shake flask cultivation.
 16 The results revealed that only eight strains could ferment D-xylose to ethanol. They were two
 17 strains of *Zygoascus hellenicus* (SN1-1 and SN1-4), three strains of *Candida blankii* (A6-1,
 18 A8-1 and A8-2) and three strains of a novel species (KU-Xs13, KU-Xs18 and KU-Xs20).
 19 Among the xylose-fermenting strains of the novel species, two strains (KU-Xs13^T and KU-
 20 Xs18) were isolated from decaying corncobs and one strain (KU-Xs20) was obtained from
 21 decaying grass leaf collected in Saraburi province. The sequences of the D1/D2 domain of
 22 the LSU rRNA gene of two strains, KU-Xs13^T and KU-Xs20 were identical and differed
 23 from that of strain KU-Xs18 by only one gap out of 571 nucleotides (nt). With respect to their
 24 closest species in term of pairwise sequences similarity the three strains differed by 2.3%

1 nucleotide substitution (13 nucleotide substitutions and one to two gaps out of 571 nt) from
 2 the type strain of *Candida viswanathii* and by 1.9% nucleotide substitutions (11 nucleotide
 3 substitutions and one to two gaps out of 571 nt) from the type strain of *Candida lodderae*.
 4 The two yeast species, *Candida viswanathii* and *Candida lodderae*, were reported to be
 5 synonymous because they differ from each other by only two nucleotides in the D1/D2
 6 domain of LSU rRNA gene sequences (Kurtzman & Robnett, 1997) and belong to the
 7 *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade. According to Kurtzman & Robnett
 8 (1998), yeast strains showing nucleotide substitutions of greater than 1% in the D1/D2
 9 domain of the LSU rRNA gene are usually representative of different species. The
 10 phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene
 11 further demonstrated that the three strains (KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-Xs20) formed a
 12 clade that is distinct from *C. viswanathii*, *C. lodderae* and other related species in the
 13 *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade (Fig. 1).

14 From another investigation of yeasts in mangrove forest ecosystems strain WB15^T,
 15 which was isolated from estuarine water collected in a mangrove forest in Prachuap Khiri
 16 Khan province, showed the ability to assimilate but not ferment D-xylose, and represented
 17 another novel species. The closest species in terms of pairwise sequence similarity of the
 18 D1/D2 domain of the LSU rRNA gene were *C. viswanathii* and its synonymous species, *C.*
 19 *lodderae*, but with 2.3% nucleotide substitutions (13 nucleotide substitutions out of 570 nt)
 20 and 1.9% nucleotide substitutions (11 nucleotide substitutions out of 570 nt), respectively.
 21 The sequence of strain WB15^T differed from those of the three xylose fermenting strains
 22 (KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-Xs20) by 2.1% nucleotide substitutions (12 nucleotide
 23 substitutions and one to two gaps out of 571 nt). In the phylogenetic tree (Fig. 1), strain

1 WB15^T was placed in the *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade at a separate
2 branch from *C. viswanathii*, *C. lodderae* and the three strains of another novel species.

3 Cells of the two novel species proliferated by multilateral budding, were negative for
4 Diazonium blue B and urease reactions. Starch-like compounds were not produced as do the
5 other member of *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade. Ascospores were not
6 produced from individual strains or strains paired on 5% malt extract agar, Fowell's acetate
7 agar, Gorodkova agar and YM agar after 5 weeks at 25 °C. The characteristics fit well with
8 those of the genus *Candida*. Therefore, we concluded that the four strains represent two novel
9 species for which the name *Candida saraburiensis* sp. nov. is proposed to accommodate the
10 three strains KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-Xs20, and *Candida prachuapensis* sp. nov. for
11 strain WB15^T.

12 In practice, *C. saraburiensis* sp. nov. and *C. prachuapensis* sp. nov. can be
13 distinguished from each other and from *C. viswanathii* and *C. lodderae*, their closest
14 described species, by many characteristics as show in Table 1.

15 The *Candida albicans/Lodderomyces elongisporus* clade consists of more than 20
16 species and includes some medically important species such as *Candida albicans*, *C.*
17 *parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. viswanathii*. The members of this clade have been isolated
18 not only from humans, but also from soils, water, plants, insects, and from industrial
19 processes (Ji *et al.*, 2009; Kurtzman *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2007; Rao
20 *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2008; Vallini *et al.*, 1997). The two novel *Candida* species in this
21 work were obtained from different habitats. Strains of *C. saraburiensis* were isolated from
22 decaying corncoobs and a decaying grass while *C. prachuapensis* was isolated from estuarine

1 water in a mangrove forest. The two novel species are closely related to *C. viswanathii*,
 2 although it is not known whether they are pathogenic.

3

4 **Xylose fermentation**

5 Ethanol fermentation from xylose of the four strains of the two novel species was
 6 determined by shaking flask cultivation using 4% D-xylose-YP broth. The result revealed
 7 that three strains of *Candida saraburiensis* sp. nov. produced ethanol at 3.1-3.6 g/l at 72 h but
 8 all ethanol was either consumed or evaporated after 96 h (Supplementary Fig. S1). The strain
 9 WB15^T of *Candida prachuapensis* sp. nov. did not produce ethanol from xylose, similar to
 10 the non-D-xylose fermenting reference yeast, *Saccharomyces cerevisiae* M30. In the same
 11 experiment *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773, the D-xylose fermenting reference yeast,
 12 produced the highest ethanol concentration at 8.4 g/l after 72 h, although ethanol was also
 13 reduced to 6.3 g/l and 2.2 g/l after 96 h and 120 h, respectively. In contrast, when D-Xylose
 14 fermentation was tested by the standard methods described by Yarrow (1998) i.e. Durham
 15 fermentation tube test, all four strains gave negative result.

16 **Latin diagnosis of *Candida saraburiensis* Nitiyon, Boonmak, Am-In, Jindamorakot,**
 17 **Kawasaki, Yongmanitchai et Limtong sp. nov.**

18 *In agaro YM post dies 3 ad 25 °C cellulae ovoidae aut cylindricae, (2-6 × 4-10 µm),*
 19 *singulae, binae, aut pseudohyphae fiunt, per germinationem multipolarem reproducentes.*
 20 *Cultura butyrosa, crenea, glabra, seminitidae, centrum colonia altum, margine glabra. In*
 21 *agaro YM post dies 5 ad 25 °C pseudohyphae formantur, hyphae non formantur. Ascosporae*
 22 *non formantur. D-Glucosum, D-galactosum (infirme), maltosum (infirme), sucrosum et*
 23 *α,α-trehalosum fermentantur at non melibiosum, lactosum nec raffinose. D-Glucosum, D-*

1 *galactosum, L-sorbosum, N-acetyl-D-glucosaminum, D-xylosum, sucrosum, maltosum, α,α-*
 2 *trehalosum, α-methyl-D-glucosidum, cellobiosum (infirme), salicinum (infirme),*
 3 *melezitosum, glycerolum, ribitolum, D-glucitolum, D-mannitolum, D-glucono-1,5-lactonum,*
 4 *acidum 2-ketogluconicum, acidum D-gluconicum, acidum DL-lacticum, acidum succinicum,*
 5 *acidum citricum, ethanolum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur. D-*
 6 *Ribosum, L-arabinosum, D-arabinosum, L-rhamnosum, melibiosum, lactosum, raffinose,*
 7 *inulinum, amyllum solubile, erythritolum, galactitolum, inositolum, acidum 5-ketogluconicum,*
 8 *acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum, methanolum, kalium nitricum nec*
 9 *natrum nitrosum non assimilantur. Vitamina externa crescentiae non necessaria sunt. Crescit*
 10 *postest in temperatura 40 °C at non in 42 °C. Non crescit in 0.01% cycloheximido nec 0.1%*
 11 *cycloheximido. Crescit in 50% glucosum, 60% glucosum, 10% natrii chloridum/5%*
 12 *glucosum et 16% natrii chloridum/5% glucosum. Amyllum non formatur. Ureum non*
 13 *hydrolysat. Diazonium caeruleum B non respondens. Ubiquinonum majus: Q-9*
 14
 15 *Typus stirpis, KU-Xs13^T(= CBS 11696^T = NBRC 106721^T = BCC 39601^T) isolatus digesta*
 16 *granum core, Saraburi provincia, Thailandica, conservatur in collectionibus culturarum quas*
 17 *Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), NITE Biological*
 18 *Resource Center (Chiba, Japan) et BIOTEC Culture Collection, National Central for*
 19 *Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand (Pathumthani, Thailand) deposita est.*
 20
 21

1 **Description of *Candida saraburiensis* Nitiyon, Boonmak, Am-In, Jindamorakot,**
 2 **Kawasaki, Yongmanitchai & Limtong sp. nov.**

3 *Candida saraburiensis* (sa.ra.bu.ri.en'.sis. N.L. fem. adj. *saraburiensis*, belonging to
 4 Saraburi, Thailand).

5 After growth on YM agar for 3 days at 25 °C, cells are ovoid to cylindrical (2-6 × 4-10 µm)
 6 and occur singly, in pairs or in short chain (Fig. 2). Budding is multilateral. Colony is
 7 butyrous, cream-colored, smooth, semi-glistening, umbonate and has an entire margin.
 8 Pseudohyphae are formed, but true hyphae are not formed in slide culture on cornmeal agar
 9 after 5 days at 25 °C. Ascospores are not produced from individual strain or strains paired on
 10 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, Gorodkova agar and YM agar after 5 weeks at
 11 25 °C. The major ubiquinone is Q-9. Fermentation of D-glucose, D-galactose (weak), maltose
 12 (weak), sucrose and α,α -trehalose are positive but negative for melibiose, lactose and
 13 raffinose. D-Glucose, D-galactose, L-sorbose, N-acetyl-D-glucosamine, D-xylose, sucrose,
 14 maltose, α,α -trehalose, α -methyl-D-glucoside, cellobiose (weak), salicin (weak), melezitose,
 15 glycerol, ribitol, D-glucitol, D-mannitol, D-glucono-1,5-lactone, 2-ketogluconic acid, D-
 16 gluconic acid, DL-lactic acid, succinic acid, citric acid, ethanol, ethylamine-HCl, L-lysine-
 17 HCl and cadaverine are assimilated, but D-ribose, L-arabinose, D-arabinose, L-rhamnose,
 18 melibiose, lactose, raffinose, inulin, soluble starch, erythritol, galactitol, inositol, 5-
 19 ketogluconic acid, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, methanol, potassium nitrate and
 20 sodium nitrite are not assimilated. Growth in vitamin free medium is positive. Growth at 40
 21 °C is positive, but at 42 °C is negative. Growth with 0.01% cycloheximide and 0.1%
 22 cycloheximide are negative. Growth on medium containing 50% (w/v) glucose, 60% (w/v)
 23 glucose, 10% (w/v) sodium chloride/5% (w/v) glucose or 16% (w/v) sodium chloride/5%

1 (w/v) glucose are positive. Starch like compounds are not produced. Diazonium blue B color
2 and urease reactions are negative.

3 The type strain KU-Xs13^T (= CBS 11696^T = NBRC 106721^T = BCC 39601^T) was isolated
4 from decaying corncobs collected in Saraburi province, Thailand.

5 **Latin diagnosis of *Candida prachuapensis* Boonmak, Nitiyon, Am-In, Jindamorakot,**
6 **Kawasaki, Yongmanitchai et Limtong sp. nov.**

7 *In agaro YM post dies 3 ad 25 °C cellulae ovoidae aut cylindricae, (3-6 × 3-13 μm), singulae*
8 *aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes. Cultura butyrosa, crenea,*
9 *centrum colonia altum et margine filamentum. In agaro farina Zea mays post dies 7 ad 25 °C*
10 *pseudohyphae formantur, hyphae non formantur. Ascosporae non formantur. D-glucosum,*
11 *sucrosum et maltosum fermentantur at non D-galactosum, lactosum, raffinose nec α,α-*
12 *trehalosum. D-Glucosum, L-sorbosum, sucrosum, maltosum, cellobiosum, melibiosum*
13 *(infirme), raffinose, melezitose, inulinum, amyllum solubile, D-xylosum, ethanolum,*
14 *glycerolum, ribitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum,*
15 *acidum DL-lacticum, acidum succinicum, acidum citricum, N-acetyl-D-glucosaminum,*
16 *acidum 2-ketogluconicum, acidum 5-ketogluconicum, acidum D-gluconicum, D-glucono-1,5-*
17 *lactonum, xylitolum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur. D-Galactosum,*
18 *lactosum, L-arabinosum, D-arabinosum, D-ribosum, L-rhamnosum, erythritolum,*
19 *galactitolum, inositolum, methanolum, acidum D-glucuronicum, acidum D-galacturonicum,*
20 *kalium nitricum nec natrum nitrosum non assimilantur. Vitamina externa crescentiae non*
21 *necessar sunt. Crescit in temperatura 42 °C (infirme) at non in 45 °C. Non crescit in 0.01%*
22 *cycloheximido nec 0.1% cycloheximido. Crescit in 50% glucosum, 60% glucosum et 10%*

1 *natrii chloridum/5% glucosum. Amylum non formatur. Ureum non hydrolysatur. Diazonium*
 2 *caeruluem B non respondens. Ubiquinonum majus: Q-8*

3 *Typus stirpis* WB15^T (=CBS 11024^T = NBRC 104881^T = BCC 29904^T) *isolatus aqua,*
 4 *Prachuap Khiri Khan provincia, Thailandica, conservatur in collectionibus culturarum quas*
 5 *Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), NITE Biological*
 6 *Resource Center (Chiba, Japan) et BIOTEC Culture Collection, Nationnal Central for*
 7 *Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand (Pathumthani, Thailand) deposita est.*

8

9 **Description of *Candida prachuapensis* Boonmak, Nitiyon, Am-In, Jindamorakot,**
 10 **Kawasaki, Yongmanitchai & Limtong sp. nov.**

11 *Candida prachuapensis* (pra.chuap.en'.sis. N.L. fem. adj. *prachuapensis*, belonging to
 12 *Prachuap Khiri Khan, Thailand).*

13 After growth on YM agar for 3 days at 25 °C, cells are ovoid to cylindrical (3-6 × 3-13 µm)
 14 and occur singly, in pairs or in short chain (Fig. 3). Budding is multilateral. Colony is
 15 butryous, cream-colored, umbonate with mycelial margin. Pseudohyphae are formed, but true
 16 hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 25 °C. Ascospores
 17 are not produced on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, Gorodkova agar and YM
 18 agar after 6 weeks at 15 °C. The major ubiquinone is Q-8. Fermentation of D-glucose,
 19 sucrose and maltose are positive but negative for D-galactose, lactose, raffinose and α-α
 20 trehalose. D-Glucose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, melibiose (weak), raffinose,
 21 melezitose, inulin, soluble starch, D-xylose, ethanol, glycerol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol,
 22 α-methyl-D-glucoside, salicin, DL-lactic acid, succinic acid, citric acid, N-acetyl-D-

1 glucosamine, 2-ketogluconic acid, 5-ketogluconic acid, D-gluconic acid, D-glucono-1,5-
 2 lactone, xylitol, ethylamine-HCl, L-lysine-HCl and cadaverine are assimilated, but D-
 3 galactose, lactose, L-arabinose, D-arabinose, R-ribose, L-rhamnose, erythritol, galactitol,
 4 inositol, methanol, D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, potassium nitrate and sodium
 5 nitrite are non-assimilated. Growth in vitamin free medium is positive. Growth at 42 °C is
 6 positive (weak), but at 45 °C is negative. Growth with 0.01% cycloheximide and 0.1%
 7 cycloheximide are negative. Growth on medium containing 50% (w/v) glucose, 60% (w/v)
 8 glucose or 10% (w/v) sodium chloride/5% (w/v) glucose are positive. Starch like compounds
 9 are not produced. Diazonium blue B color and urease reactions are negative.

10 The type strain WB15^T (=CBS 11024^T = NBRC 104881^T = BCC 29904^T) was isolated from
 11 water collected in a mangrove forest in Prachuap Khiri Khan province, Thailand

12 Acknowledgements

13 This work was partially supported by the Thailand Graduate Institute of Science and
 14 Technology (TGIST) grant TGIST 01-51-023. Many thanks go to Ms Rungluk Kaewwichian
 15 and Mr Teera Yimyoo for their assistance.

16

1 **References**

- 2 **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. &**
3 **Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
4 database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- 5 **Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (2000).** *Yeasts: Characteristics and*
6 *Identification*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- 7 **Cadete, R. M., Santos, R. O., Melo, M. A., Mouro, A. Goncaleves, D. L., Stambuk, B. U.,**
8 **Gomes, F. C. O., Lanchance, M. A. & Rosa, C.A. (2009).** *Spathaspora arborariae* sp. nov.,
9 a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Res* **9**,
10 1338-1342.
- 11 **Carvalho, W., Silva, S. S., Vitolo, M., Felipe, M. G. A. & Mancilha, I. M. (2002).**
12 Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use
13 of a repeated-batch immobilized cell system. *Z Naturforsch C Biosci* **57**, 109-112.
- 14 **Doran-Peterson, J., Cook, D. M. & Brandon, S. K. (2008).** Microbial conversion of sugars
15 from plant biomass to lactic acid or ethanol. *Plant J* **54**, 582–592.
- 16 **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
17 *Evolution* **39**, 783-791.
- 18 **Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G. & Zacchi, G. (2006).**
19 Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* **24**, 549-556.

- 1 **Ji, Z. H., Jia, J. H. & Bai, F. Y. (2009).** Four novel *Candida* species in the *Candida*
2 *albicans/Lodderomyces elongisporus* clade isolated from the gut of flower beetles. *Antonie*
3 *van Leewenhoek* **95**, 23-32.
- 4 **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions
5 through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- 6 **Kuraishi, H., Katayama-Fujimura, Y., Sugiyama, J. & Yokoyama, T. (1985).**
7 Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of
8 ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans*
9 *Mycol Soc Jpn* **26**, 383-395.
- 10 **Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (1998).** *The yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Amsterdam:
11 Elsevier.
- 12 **Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1997).** Identification of clinically important
13 ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S)
14 ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* **35**, 1216-1223.
- 15 **Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998).** Identification and phylogeny of ascomycetous
16 yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.
17 *Antonie van Leewenhoek* **73**, 331-371.
- 18 **Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. & Yarrow, D. (2001).** Two new anamorphic yeasts:
19 *Candida germanica* and *Candida neerlandica*. *Antonie van Leewenhoek* **80**, 77-83.
- 20 **Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T. & Baker, S. F. (1999).** *Kodamaea*
21 *kadaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian
22 *Hibiscus* flowers. *Can J Microbiol* **45**, 172-177.

- 1 **Limtong, S., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H. & Seki, T. (2007a).** *Candida*
- 2 *thaimueangensis* sp. nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in a mangrove
- 3 forest in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 650-653.

- 4 **Limtong, S., Yongmanitchai, W., Tun, M. M., Kawasaki, H. & Seki, T. (2007b).**
- 5 *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand.
- 6 *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 419-422.

- 7 **Meyer, S. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1998).** *Candida* Berkhout. In *The Yeasts, A*
- 8 *Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 454-573. Edited by C.P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam:
- 9 Elsevier.

- 10 **Nakase, T. & Suzuki, M. (1986).** *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming
- 11 larger ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa*
- 12 sp. in Japan. *J Gen Appl Microbiol* **32**, 225-240.

- 13 **Nguyen, N. H., Suh, S. O., Marshall, C. J. & Blackwell, M. (2006).** Morphological and
- 14 ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts,
- 15 *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res* **110**, 1232-
- 16 1241.

- 17 **Nguyen, N.H., Suh, S.O. & Blackwell, M. (2007).** Five novel *Candida* species in insect-
- 18 associated yeast clades isolated from *Neuroptera* and other insects. *Mycologia* **99**, 842-858.

- 19 **O'Donnell, K. (1993).** *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic*
- 20 *and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225-233. Edited by D. R. Reynolds &
- 21 J. W. Taylor. Wallingford, UK: CAB International.

- 1 **Rao, R. S., Bhadra, B., Kumar, N. N. & Shivaji, S. (2007).** *Candida hyderabadensis* sp.
- 2 nov., a novel ascomycetous yeast isolated from wine grapes. *FEMS Yeast Res* **7**, 489-493.
- 3 **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
- 4 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- 5 **Suh, S. O., Nguyen, N. H. & Blackwell, M. (2008).** Yeasts isolated from plant-associated
- 6 beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast*
- 7 *Res* **8**, 88-102.
- 8 **Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).**
- 9 The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment
- 10 aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 4876-4882.
- 11 **Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P. & Scheffers, W. A. (1984).**
- 12 Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **47**, 1221-1223.
- 13 **Vallini, G., Frassinetti, S. & Scorzetti, G. (1997).** *Candida aquaetextoris* sp. nov., a New
- 14 Species of Yeast Occurring in Sludge from a Textile Industry Wastewater Treatment Plant in
- 15 Tuscany, Italy. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 336-340.
- 16 **Yamada, Y. & Kondo, K. (1973).** Coenzyme Q system in the classification of the yeast
- 17 genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and
- 18 *Rhodospiridium*. *J Gen Appl Microbiol* **19**, 59-77.
- 19 **Yarrow, D. (1998).** Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In
- 20 *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, pp. 77-100. Edited by C.P. Kurtzman & J.W. Fell.
- 21 Amsterdam: Elsevier.

- 1 **Table 1.** Differential phenotypic characteristics of *Candida saraburiensis* sp. nov. and
 2 *Candida prachuapensis* sp. nov., *Candida viswanathii* and *Candida lodderae*.
 3 Species: 1, *C. saraburiensis*; 2, *C. prachuapensis*; 3, *C. viswanathii* & *C. lodderae*
 4 +, Positive; w, weak; v, variable; -, negative. Data for *C. viswanathii* and *C. lodderae* were
 5 taken from Meyer *et al.* (1998) and Barnett *et al.* (2000)

Characteristic	1	2	3
Fermentation of :			
D-Galactose	w	-	v
Maltose	w	+	+
Sucrose	+	+	v
Trehalose	+	-	v
Assimilation of:			
D-Galactose	+	-	+
L-Sorbose	+	+	v
D-Ribose	-	-	v
L-Arabinose	-	-	v
Cellobiose	w	+	+
Salicin	w	+	v
Melibiose	-	w/-	-
Raffinose	-	+	-
Inulin	-	+	-
Soluble starch	-	+	+
5-Ketogluconic acid	-	+	+
DL-Lactic acid	+	+	-
Growth at/with			
Vitamin-free medium	+	+	-
0.01% Cyclohexamide	-	-	+
0.1% Cyclohexamide	-	-	+
60% Glucose	+	+	-
16% NaCl/5% Glucose	+	nd	-
Acid formation from glucose	+	nd	-
40 °C	+	+	v
42 °C	-	w	-

6

1 Figure legends

2 **Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA
 3 gene, showing positions of *Candida saraburiensis* sp. nov. (KU-Xs13^T, KU-Xs18 and KU-
 4 Xs20) and *Candida prachuapensis* sp. nov. (WB15^T) with respect to closely related species.
 5 The phylogenetic tree was constructed from evolutionary distance data with correction
 6 Kimura's two-parameter (Kimura, 1980), using the neighbor-joining method. Numbers
 7 indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1000 samples.

8 **Fig. 2.** *Candida saraburiensis* KU-Xs13^T. (a) Cells grown on YM agar after 3 days at 25 °C
 9 and (b) pseudohyphae produced on cornmeal agar after 5 days at 25 °C; Bar, 10 µm.

10 **Fig. 3.** *Candida prachuapensis* WB15^T. (a) Cells grown on YM agar after 3 days at 25 °C
 11 and (b) pseudohyphae produced on cornmeal agar after 5 days at 25 °C; Bar, 10 µm.

12

13 Supplementary

14 **Fig. S1.** Ethanol concentration (close symbol) and cell growth (open symbol) of strains KU-
 15 Xs13 (●, ○), KU-Xs18 (■, □), KU-Xs20 (◆, ◇) *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 (▲,
 16 △) and *Saccharomyces cerevisiae* M30 (▼, ▽) in 4% xylose-YP broth by shaking flask
 17 cultivation on a rotary shaker at 150 rpm and 30 °C.

18

19

1 Fig. 1.

2

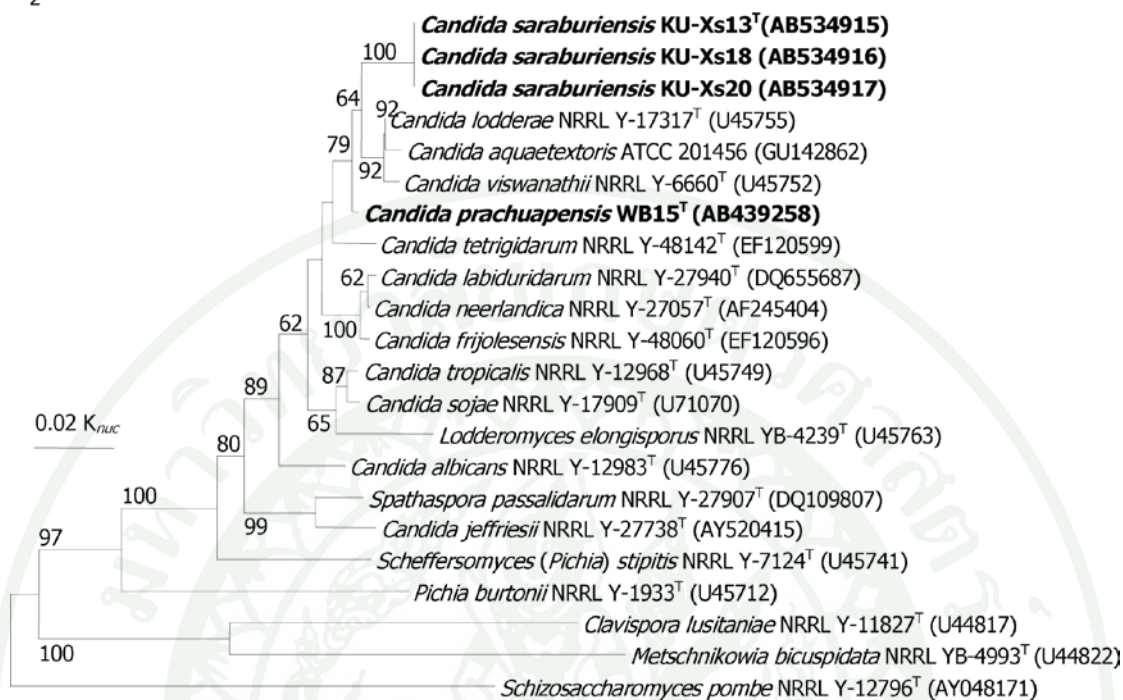


Fig. 2.

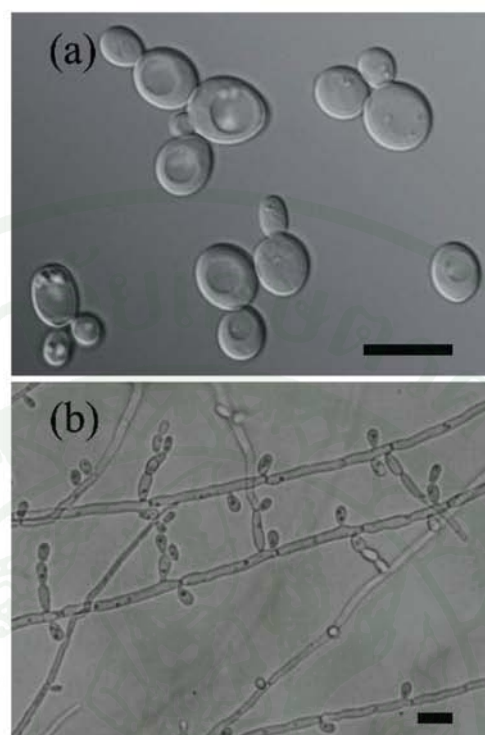


Fig. 3.

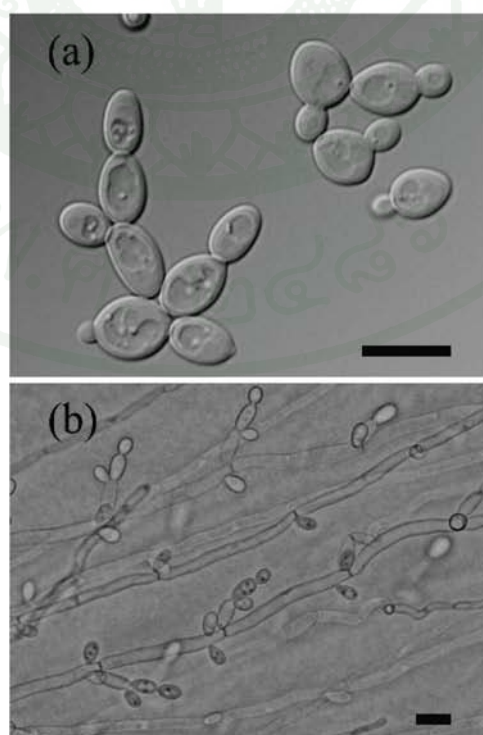
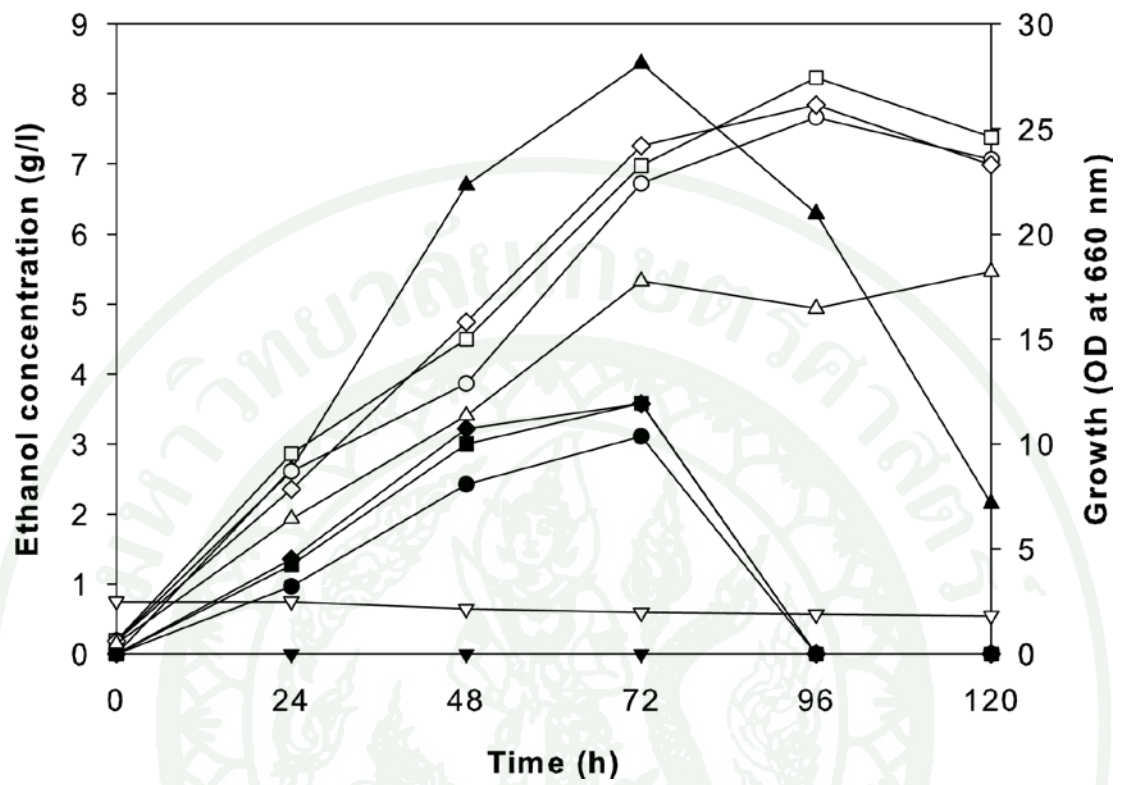


Fig. S1.



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุกัญญา นิธิยนต์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 กันยายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	- รางวัลผลการเรียนดีเด่น เป็นผู้สอบได้เต็มระดับคะแนนเฉลี่ยในปีการศึกษา 2549 ตั้งแต่ 3.25 ขึ้นไป (พ.ศ. 2551) - ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง (พ.ศ. 2551)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนจากโครงการสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) เป็นระยะเวลา 2 ปี (พ.ศ. 2551-2553)
ประวัติการฝึกงานและประสบการณ์การทำงาน	เข้ารับการฝึกงานและฝึกอบรมจากสถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ระยะเวลา 1 เดือน (พ.ศ. 2550)