

จากการศึกษาการกระจายตัวของยีสต์จากบริเวณป่าภูตาคา และเขื่อนจุฬาภรณ์ โดยเก็บตัวอย่างดิน ผลไม้ และดอกไม้ สามารถแยกยีสต์ได้จากป่าภูตาคา 12 ไอโซเลต จากตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด 16 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้จากเขื่อนจุฬาภรณ์ทั้งหมด 38 ไอโซเลต จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง และศึกษาสมบัติต่างๆ ของยีสต์ที่แยกได้ ดังนี้

การศึกษากิจกรรมของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30°C, 35°C, 40°C, 45°C และ 50°C พบว่า ทุกไอโซเลตเจริญที่อุณหภูมิ 30°C มี 33 ไอโซเลตเจริญที่อุณหภูมิ 35°C 6 ไอโซเลตเจริญที่อุณหภูมิ 40°C และ 3 ไอโซเลตที่นำสนใจคือ PM-JF 04 และ PM-JF 19 แยกได้จากผลไม้ในเขื่อนจุฬาภรณ์และ PM-JS 35 ซึ่งแยกได้จากดินในเขื่อนจุฬาภรณ์ สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 45°C และเมื่อศึกษาการเจริญที่ปริมาณเกลือต่างๆ พบว่ามี 45, 29, 24, 19, 16 และ 4 ไอโซเลต สามารถเจริญที่อาหารมีความเข้มข้นของ NaCl 3%, 5%, 7%, 9%, 11% และ 13% ตามลำดับ

ความสามารถของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ ในการย่อยสลายสับสเตรทขั้นต้น พบว่า สามารถย่อย แป้ง ได้จำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต PM-JS30, ย่อย skim milk ได้ 7 ไอโซเลต โดยไอโซเลต PM-JF06 ให้ขนาดโซนใสกว้างที่สุดคือ 5 มิลลิเมตร, ย่อย carboxymethyl cellulose ได้ 18 ไอโซเลต โดยไอโซเลต PM-JS25 ให้ขนาดโซนใสกว้างที่สุดคือ 10 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบความสามารถสร้างเอนไซม์ β -glucosidase พบ 15 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ โดยไอโซเลต PM-JS20 และ PM-JF11 ซึ่งเมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) เกิดการเรืองแสงกว้างที่สุดคือ 13 และ 12 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบ 22 ไอโซเลต สามารถย่อยสลาย xylan ได้โดยไอโซเลต PM-PF49 และ PM-PF42 ให้ขนาดโซนใสกว้างที่สุดคือ 9 และ 8 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยพบว่าไอโซเลต PM-PF49 สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ 4 ชนิดคือชนิด คือ skim milk, carboxymethyl cellulose, β -glucosidase และ xylan ซึ่งคัดแยกได้จากผลพอกบริเวณป่าภูตาคา ไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ 3 ชนิดมีดังนี้ PM-JF01, PM-JF09, PM-JS20 แยกได้จากผลมะลิป่า, ดอกตำแยตัวผู้ และดินแปลงที่ 1 จากเขื่อนจุฬาภรณ์, PM-PS40, PM-PS41 และ PM-PF47 แยกได้จากดินป่าภูตาคาตามลำดับ สามารถย่อย carboxymethyl cellulose, β -glucosidase และ xylan ได้ สามารถย่อย, PM-JS23 แยกได้จากดินแปลงที่ 1 จากเขื่อนจุฬาภรณ์ สามารถย่อย skim milk, β -glucosidase และ xylan ได้

การผลิตแอลกอฮอล์ จากไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการเจริญ ที่อุณหภูมิ และปริมาณเกลือสูง รวมทั้งความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทได้ดี และมากชนิด จำนวน 21 ไอโซเลต โดยใช้ Megazyme Ethanol Assay Kit ในการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อสามารถผลิตได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* sweden และ *Saccharomyces cerevisiae* QA 23 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้าและสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง พบว่าไอโซเลต PM-JS 34 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อน

จุฬารณย์ สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เท่ากับ 1.439485 g/l และสามารถผลิตได้มากกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyce cerevisiae* Sweden ถึง 0.130818 g/l

การจัดจำแนกยีสต์ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์ 19 สายพันธุ์ ที่มีสมบัติหน้าสนใจข้างต้น โดยสกัดจีโนมเอ ทำให้บริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริสุทธิ์ในส่วน D1/D2 domain ของ 26S rDNA โดยใช้ specific primer F63 และ LR3 ได้จีโนมเอที่มีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ลำดับของ DNA โดย ทำซีควเอน 2 เส้น คือ เส้น Forward sequence กับ Reverse sequence โดยใช้ไพรเมอร์ F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAC ACG-3') เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อตัวอย่างกับฐานข้อมูลของ Genbank โดยวิธี BLAST วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ตามความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยทำ Multiple alignments กับสายพันธุ์ใกล้เคียง ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-Joining วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้ค่า Boot strap เท่ากับ 1000

พบว่า มียีสต์ที่จัดเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับสายพันธุ์ที่ทราบชื่อแล้ว (Know species) 9 สปีชีส์ ได้แก่ PM01 ตรงกับ *Aureobasidium pullulans*, PM02 ตรงกับ *Candida leandrae*, PM04 ตรงกับ *C. michaelii*, PM06 ตรงกับ *C. natalensis*, PM08 ตรงกับ *Cryptococcus* sp., PM20 ตรงกับ *Debaryomyces polymorphus*, PM41 ตรงกับ *Hanseniaspora occidentalis*, PM46 ตรงกับ *Metschnikowia koreensis*, และ PM49 ตรงกับ *Pichia caribbica* และ 1 สายพันธุ์ คือ PM12 ที่จัดเป็นสายพันธุ์เดียวกับสายพันธุ์ที่ทราบชื่อแล้ว แต่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ว่ามีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ไหนมากที่สุด ระหว่าง *Pichia caribbica* กับ *P. guilliermondii* ซึ่งจะต้องมีการทดสอบด้านอื่นเพิ่มเติมต่อไป และพบว่า เชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ มีความใกล้เคียง (sister species) กับเชื้อที่ทราบชื่อแล้ว 3 สปีชีส์ ได้แก่ PM09 กับ *C. natalensis*, PM31 กับ *Issatchenkia terricola*, และ PM40 กับ *Pichia guilliermondii*

เชื้อยีสต์ 6 สายพันธุ์ที่คาดว่าจะสายพันธุ์ใหม่ (new species) ได้แก่ PM05, PM07, PM19, PM21, PM34, PM47 เนื่องจาก มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากเชื้อ ที่ทราบชื่อแล้ว 14, 12, 4, 6, 4, 36 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ซึ่งการพิสูจน์ว่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ต้องมีการ ศึกษาสมบัติ ด้านอื่นๆ เพิ่มเติมอีก ในลำดับต่อไป

Fifty yeast strains were isolated from 71, soil fruits and flowers samples in the area of Phu Ta Ga, Khon kaen province and Chulabhorn Dam. The isolated strains were studied growing temperature at 30°C, 35°C, 40°C, 45°C and 50°C degree Celsius. The results show that, all isolate could grow at 30°C. Thirty-three and six isolates could grow at 35°C and 40°C respectively. Only PM-JF 04, PM-JF 19 (from fruit at Chulabhorn Dam) and PM-JS 35 (from soil at Chulabhorn Dam) could grow at 45°C. And no one could grow at 50°C. For study of NaCl concentration in PDA medium on growth found that 45, 29, 24, 19 and 4 isolated could grow on the medium of 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13% and 15% NaCl respectively.

The isolated strains were studied substrate digestion abilities such as starch, carboxy-methyl cellulose, oat spelt xylan, skim milk and beta-glucosidase activity (MUG test) by using the agar plate diffusing method. The results showed that, only one isolate PM-JS30 could produce amylolytic substance. The isolate PM-JF06 gave highest activity (5 mm. clear zone) from seven proteolytic isolate. From 18 isolate of cellulolytic activity positive, PM-JS25 gave largest clear zone at 10 mm. There were 15 isolate of beta-glucosidase positive and isolate PM-JS20 gave highest activity. For xylanolytic activity test found that PM-PF49 gave highest clear zone diameter at 9 mm. from 22 positive isolate.

The PM-PF49 isolated from *Parinari anamense* Hance.(Ma-phok) at Chulabhorn Dam can gave four activity type of cellulolytic, xylulolytic beta-glucosidase. The isolate PM-JF01, PM-JF09 and PM-JS20 from *Jasminum adenophyllum*. (Ma-Li-Pa), *Acalypha indica*.(Tum-Ya-Tour-Poo) and Chulabhorn Dam soil respectively gave 3 type of digestion activity.

Twenty-one isolated strains were selected from capability on growing at high temperature and high NaCl concentration. And capability on substrate digestion in others experiment. The selected isolate were studied ethanol production ability by using Megazyme Assay Kit in the medium of YM broth with 1% glucose incubated for 62 hours at 30°C. The results show that, The PM-JS 34 from soil at Chulabhorn Dam could produce highest ethanol concentration about 1.44 g/l. When compared with high ethanol production strain (*Saccharomyces cerevisiae* Sweden) found that, PM-JS 34 could produce 0.13 g/l more than reference strain.

The nineteen isolates of yeast from Chulabhon Dam were identified by D1/D2 domain of 26S rDNA. The nucleotide sequences indicated that the nine isolates were know species, the isolate PM12 could not identified between *Pichia caribbica* and *P. guilliermondii*. The isolate PM05, PM07, PM19, PM21 PM34 and PM47 were 14, 12, 4, 6, 4 and 36 different nucleotides from know species, respectively. These 6 isolates were possibility as new species.