ยีสต์ในดินป่าชายเลนจากภาคกลางของประเทศไทยและความสามารถในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน

Yeast in Mangrove Forest Soil from the Central Thailand and Its Ability in the Degradation of Starch, Carboxymethylcellulose and Xylan

รุ่งลักษณ์ แก้ววิเชียร* และ ศรีสุคนธ์ คำไทยกลาง

Rungluk Kaewwichian* and Srisukhon Khamthaiklang

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Microbiology Programme, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University

Received : 12 June 2017

Accepted : 11 July 2017

Published online : 8 August 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์จากดินในพื้นที่ป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ สมุทรสงคราม และสมุทรสาครด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ได้ยีสต์ทั้งหมด 124 ไอโซเลตจากตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน พบว่ามียีสต์ 1 ไอโซเลต คือ *Trichosporon asahii* (ไอโซเลต TA 2.4) ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งสามชนิดได้ ส่วน *Candida thaimueangensis* (ไอโซเลต TA 2.2) และ *Candida tropicalis* จำนวน 13 ไอโซเลตสามารถย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลนได้ นอกจากนี้ยังพบ *Candida tropicalis* จำนวน 15 ไอโซเลต และ *Pichia kudriavzevii* (ไอโซเลต PJ 4.1) ย่อยสลายได้เฉพาะคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส *Candida tropicalis* จำนวน 4 ไอโซเลต (ไอโซเลต BT 1.4, KM 6.1, SS 1.2 และ TA 1.2) และ *Galactomyces candidum* (ไอโซเลต PJ 1.5) ย่อยสลายได้เฉพาะไซแลน และ *Candida tropicalis* ไอโซเลต SS 13.3 และ SS 14.2 ย่อยสลายได้เฉพาะแป้ง

คำสำคัญ : ยีสต์ ป่าชายเลน แป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส ไซแลน

*Corresponding author. E-mail : runglukk@gmail.com

Abstract

This research aims to isolate yeasts from mangrove forest soil in central region of Thailand, Bangkok, Samut Prakan, Samut Songkhram and Samut Sakorn, by using enrichment technique. A total number of 124 yeast isolates were obtained from fifty soil samples. Degradation of starch, carboxymethyl cellulose and xylan of all isolates were determined. An isolate, *Trichosporon asahii* (isolate TA 2.4) , was able to hydrolyze all of the three organic compounds, whereas, *Candida thaimueangensis* (isolate TA 2.2) and 13 isolates of *Candida tropicalis* were able to hydrolyze carboxymethyl cellulose and xylan. In addition, we also found that 15 isolates of *Candida tropicalis* and *Pichia kudriavzevii* (isolate PJ 4.1) could hydrolyze only carboxymethyl cellulose. Four strains of *Candida tropicalis* (isolate BT 1.4, KM 6.1, SS 1.2 and TA 1.2) and *Galactomyces candidum* (isolate PJ 1.5) hydrolyzed only xylan. *Candida tropicalis* (isolate SS 13.3 and SS 14.2) particularly hydrolyzed starch.

Keywords : yeast, mangrove forest, starch, carboxymethylcellulose, xylan

บทนำ

ยีสต์จัดเป็นราชั้นสูงชนิดหนึ่งซึ่งมีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว โดยยีสต์และราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยเฉพาะในบริเวณเขตร้อนและกึ่งร้อนที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์มากจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์สูง (Nakase *et al.*, 2006) ปัจจุบันพบยีสต์ในธรรมชาติมากกว่า 1,500 ชนิด ทั้งในระบบนิเวศบนบก และระบบนิเวศในแหล่งน้ำ (Kurtzman *et al.*, 2011) ซึ่งป่าชายเลนเป็นแหล่งหนึ่งที่มีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์และความสัมพันธ์ของยีสต์ต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในป่าชายเลน โดยยีสต์ที่มีอยู่ในดินบริเวณป่าชายเลนจัดเป็นพวกเฮเทอโรโทรป (heterotroph) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ก่อให้เกิดการหมุนเวียนในระบบนิเวศป่าชายเลน และเสริมสร้างความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดิน (Sumpradit, 2009) จากรายงานที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากยีสต์ทั้งเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ การบำบัดน้ำเสีย และการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ (Carrasco *et al.*, 2016; Thongekkaew *et al.*, 2012, 2016) ประเทศไทยมีรายงานการพบยีสต์ในป่าชายเลนจากตัวอย่างหลายประเภท เช่น กิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง จากจังหวัดตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (Prasatsri, 2006) ตัวอย่างน้ำจากป่าชายเลนของสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง ในเขตอุทยานแห่งชาติแหลมสน (Am-In *et al.*, 2008) ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน (Boonmak, 2009) ตัวอย่างดิน น้ำกร่อย ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ รากไม้ ซากใบไม้และเห็ดบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนฯ จังหวัดชลบุรี (Chanklan *et al.*, 2012) ซึ่งยีสต์ที่พบมีทั้งแอสโคมัยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) และแบซิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) แต่ส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ เช่น *Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Kodameae, Lindnera, Metschnikowia, Pichia* และ *Wickerhamomyces* และยังพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ เช่น *Candida thaimueangensis* sp. nov., *Candida phangngensis* sp. nov., *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., *Candida chanthaburiensis* sp. nov.,

Candida kungkrabaensis sp. nov., *Candida suratensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov., *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida ranongensis* sp. nov. (Limtong *et al*., 2007; 2008; Limtong and Yongmanitchai, 2010; Am-In *et al*., 2008; 2011) อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังไม่มีรายงานการศึกษายีสต์ในดินป่าชายเลนจากภาคกลาง และทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ของยีสต์ในดินป่าชายเลน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์ในดินจากป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทยและศึกษาความสามารถในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน รวมทั้งจัดจำแนกยีสต์ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านี้โดยใช้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์ในดินจากป่าชายเลน

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทยจากบริเวณต่าง ๆ (ตารางที่ 1) ซึ่งห่างจากชายฝั่ง 300-1,000 เมตร โดยใส่ดินในถุงซิปล็อคพลาสติกแล้วใส่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็งในระหว่างที่ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ ได้ตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ (enrichment technique) โดยชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร yeast extract-malt extract (YM) broth ที่เติม 1% โซเดียมคลอไรด์ ปรับ pH เท่ากับ 5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย 1% โซเดียมคลอไรด์ และนำตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางมาแยกเชื้อด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร YM agar ที่เติม 1%โซเดียมคลอไรด์ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การทดสอบความสามารถของยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน

นำยีสต์ทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน โดยเพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลตบนอาหาร YM agar (yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, malt extract 3 กรัมต่อลิตร, peptone 5 กรัมต่อลิตร, glucose 10 กรัมต่อลิตร และ agar 15 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำมาลงเชื้อแบบจุด (point inoculation) บนอาหาร YM agar ที่มีแป้ง (10 กรัมต่อลิตร) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (10 กรัมต่อลิตร) หรือไซแลน (10 กรัมต่อลิตร) เป็นองค์ประกอบแทนกลูโคส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้ง จากการปรากฎโซนใสรอบโคโลนีภายหลังการย้อมด้วย Lugol’s iodine ส่วนความสามารถในการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลนตรวจสอบได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนีหลังจากย้อมด้วย 0.1% Congo red วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี คำนวณค่า hydrolysis capacity (HC value) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (George *et al*., 2001) นำยีสต์ทุกไอโซเลตที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด ไปจัดจำแนกต่อไป

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) โดยนำเซลล์ยีสต์มาแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที และนำกลับไปแช่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายใสเหนือตะกอนใส่หลอดใหม่เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kurtzman and Robnett (1998) โดยใช้ NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') เป็น reverse primer เตรียมสารละลายผสม (ปริมาตรรวม 30 µL) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ 1X buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.3 pM NL1 primer, 0.3 pM NL4 Primer, 0.025 U *Taq* polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA),ดีเอ็นเอต้นแบบ 3 µL ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycler รุ่น T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., 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 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (1.2% agarose gel/ 1X TAE buffer/ 100 โวลต์/ 30 นาที) นำเจลไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ (SYBR® Gold nucleic acid gel stain, Invitrogen, USA) และตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Dark reader transilluminator รุ่น DR-45M (Clare Chemical Research, USA) เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้กับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ TIAN quick Midi Purification Kit ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต (TIANGEN Biotech (Beijing) Co.,Ltd., China) และส่งไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิจัยนี้ทำการทดสอบความสามารถของยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลนในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลนไอโซเลตละ 3 ซ้ำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มบริบูรณ์ (CRD) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (ONE-WAY-ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การแยกยีสต์ในดินจากป่าชายเลน

จากการนำดินที่เก็บมาจากพื้นที่ป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 50 ตัวอย่าง มาคัดแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ก่อนนำไป spread plate และเลือกยีสต์ที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน พบว่าแยกยีสต์ได้ 124 ไอโซเลต ซึ่งมาจากตัวอย่างดินที่โรงเรียนคลองพิทยาลงกรณ์ เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 11 ไอโซเลต, ป้อมพระจุลจอมเกล้า อ.พระสมุทรเจดีย์ สถานที่ตากอากาศบางปูและ

วัดอโศการาม อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ 28 ไอโซเลต ตำบลคลองโคน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม 27 ไอโซเลต และอ่าวมหาชัย ตำบลบางหญ้าแพรก อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร 58 ไอโซเลต

2. **ความสามารถของยีสต์ที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน**

จากยีสต์ 124 ไอโซเลต พบยีสต์ 38 ไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยมียีสต์จำนวน 16 ไอโซเลต แสดงความสามารถในการย่อยสลายได้เฉพาะคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเท่านั้น ส่วนยีสต์ที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายได้เฉพาะไซแลนหรือแป้ง มีจำนวน 5 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลการทดสอบที่น่าสนใจคือพบยีสต์จำนวน 15 ไอโซเลตแสดงความสามารถในการย่อยสลายได้ทั้งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลน ซึ่งในจำนวนนี้มี 1 ไอโซเลต คือ TA 2.4 ซึ่งแยกได้จากดินป่าชายเลนในพื้นที่สถานตากอากาศบางปู อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ แสดงความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้อีกด้วย (ตารางที่ 2) ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่แสดงความสามารถในการย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ (31/38) รองลงมาคือไซแลน (20/38) และพบยีสต์ที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ในจำนวนที่น้อยที่สุด ทั้งนี้เพราะคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสมีโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่ซับซ้อนประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารอาหารที่ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ดี (Heldt and Heldt, 2005) ต่างจากไซแลนที่จัดเป็นเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสซึ่งพบยีสต์บางสปีชีส์เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายได้ (Soetarto, 1998; Heldt and Heldt, 2005) ส่วนแป้งประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสหลายพันโมเลกุลเชื่อมกันเป็นโครงสร้างตาข่ายทำให้มียีสต์น้อยชนิดที่จะสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อไปย่อยสลายแป้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ที่ย่อยสลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ ส่วนใหญ่แสดงความสามารถในการย่อยสลายไซแลนได้เช่นกันอาจเนื่องมาจากการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสมักจะสร้างออกมาพร้อมๆ กัน เมื่อเชื้อสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสับเสรตจึงทำให้มีการสร้างเอนไซม์ไซลาเนสออกมาด้วย (Sinjaroonsak, 2011)

ตารางที่ 1 แหล่งเก็บตัวอย่างและการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทย

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	รหัสยีสต์ที่คัดแยกได้
กรุงเทพมหานคร	3	11 ไอโซเลต
โรงเรียนคลองพิทยาลงกรณ์ เขตบางขุนเทียน		BT 1.1, BT 1.2, BT 1.3, BT 1.4, BT 1.5, BT 2.1, BT 2.2, BT 2.3, BT 2.4, BT 3.1, BT 3.2
จังหวัดสมุทรปราการ	11	28 ไอโซเลต
ป้อมพระจุลจอมเกล้า อ. พระสมุทรเจดีย์		PJ 1.1, PJ 1.5, PJ 2.3, PJ 3.2, PJ 4.1, PJ 4.5
สถานที่ตากอากาศบางปู อ. เมือง		TA 1.1, TA 1.2, TA 1.3, TA 1.4, TA 2.1, TA 2.2, TA 2.3, TA 2.4
วัดอโศการาม อ. เมือง		ASK 1.3, ASK 1.4, ASK 2.1, ASK 2.2, ASK 2.4, ASK 3.1, ASK 3.2, ASK 3.3, ASK 4.2, ASK 5.1, ASK 5.2, ASK 5.3, ASK 5.4, ASK 5.5
จังหวัดสมุทรสงคราม	16	27 ไอโซเลต
ต. คลองโคน อ.เมือง		KM 1.1, KM 1.2, KM 2.1, KM 2.2 , KM 2.3, KM 3.1, KM 3.2, KM 4.1, KM 4.2, KM 4.3, KM 5.1, KM 6.1, KM 6.2, KM 6.3, KM 7.1, KM 7.2, KM 7.3, KM 7.4, KM 8.1, KM 9.1, KM 9.2, KM 10.1, KM 10.2, KM 10.3, KM 12.1, KM 13.1, KM 16.1
จังหวัดสมุทรสาคร	20	58 ไอโซเลต
อ่าวมหาชัย ต.บางหญ้าแพรก อ. เมือง		SS 1.1, SS 1.2, SS 2.1, SS 2.2, SS 3.1, SS 3.2, SS 4.1, SS 5.1, SS 5.2, SS 5.3, SS 6.1, SS 6.2, SS 6.3, SS 6.4, SS 6.5, SS 6.6, SS 6.7, SS 7.1, SS 7.2, SS 7.3, SS 7.4, SS 8.1, SS 9.1, SS 10.1, SS 10.2, SS 11.1, SS 12.1, SS 12.2, SS 12.3, SS 12.4, SS 13.1, SS 13.2, SS 13.3, SS 14.1, SS 14.2, SS 14.3, SS 14.4, SS 14.5, SS 15.1, SS 15.2, SS 15.3, SS 15.4, SS 16.1, SS 17.1, SS 17.2, SS 18.1, SS 18.2, SS 18.3, SS 18.4, SS 19.1, SS 19.2, SS 20.1, SS 20.2, SS 20.3, SS 20.4, SS 20.5, SS 20.6, SS 20.7

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene

จากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่จัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTn search และพิจารณาตามหลักเกณฑ์การระบุสปีชีส์ยีสต์ หากมีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าร้อยละ 1 (มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอด์ 6 นิวคลีโอไทด์ ใน 600 นิวคลีโอไทด์) สามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กัน แต่หากว่ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0 - 3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (sister species) (Kurtzman and Robnett, 1998) จากเกณฑ์ดังกล่าวสามารถจัดจำแนกยีสต์ที่พบ

ในดินจากป่าชายเลนที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลนจำนวน 38 ไอโซเลต เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 4 สปีชีส์ 3 สกุล ได้แก่ *Candida thaimueangensis*, *Candida tropicalis, Galactomyces candidum* และ *Pichia kudriavzevii* และ แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Trichosporon asahii* โดยยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบเป็น *C. tropicalis* มากถึง 34 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 89.5 ของยีสต์ทั้งหมดที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ทั้งนี้เพราะ *C. tropicalis* เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนบริเวณรอบเส้นศูนย์สูตรของโลกและสามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างหลากหลายประเภท (Prasatsri, 2006; Boonmak, 2009; Chanklan *et al.*, 2012) (ตารางที่ 3) โดย *T. asahii* (TA 2.4) สามารถย่อยได้ทั้งแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน ส่วน *C. thaimueangensis* (TA 2.2) สามารถย่อยทั้งคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลนได้เช่นเดียวกับ *C. tropicalis* อีก 13 ไอโซเลต นอกจากนี้ *C. tropicalis* 15 ไอโซเลตย่อยได้เฉพาะคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ 4 ไอโซเลต (BT 1.4, KM 6.1, SS 1.2 และ TA 1.2) ย่อยได้เฉพาะไซแลน และอีก 2 ไอโซเลต (SS 13.3 และ SS 14.2) ที่ย่อยได้เฉพาะแป้งซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่า *C. tropicalis* สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอนที่หลากหลายเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ (Jamai and Ettayebi, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า *C. tropicalis* หลายสายพันธุ์ที่คัดแยกจากตัวอย่างในธรรมชาติสามารถย่อยเซลลูโลสหรือไซแลนได้ (Soetarto, 1998; Thongekkaew *et al.,* 2012; Sulman and Rehman, 2013; Hermansyah and Wiraningsih, 2016) สำหรับ *P. kudriavzevii* (PJ 4.1) สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสเพียงชนิดเดียว และ *G. candidum* (PJ 1.5) สามารถย่อยไซแลนได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบ *P. kudriavzevii* (Tran, 2014) และ *G. candidum* (Witkowska *et al.,* 2006) ที่ย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสและไซแลน นอกจากนี้ยังพบรายงานที่กล่าวถึงการย่อยเซลลูโลสและไซแลนจากยีสต์สปีชีส์อื่น เช่น *Pichia fabianii, Pichia guilliermondii, Trichosporon mycotoxinivorans, T. asahii* (Thongekkaew *et al.,* 2012) *Torulaspora globosa, Williopsis saturnus* var. *mrakii* (Kaewwichian, 2009) และรายงานของ Limtong *et al.* (2002) ที่พบ *T. asahii* ในลูกแป้งข้าวหมากสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส รวมทั้งรายงานอื่น ๆ ที่พบว่า *Aureobasidium pullulans, Candida sake, Candida railenensis, Guehomyces pullulans* (Brandao *et al.*, 2011) *Candida pseudolambica, Geotrichum fragrans, Pichia sporocuriosa, Trichosporon mycotoxinivorans* (Kaewwichian, 2009) สามารถย่อยแป้งได้ จากรายงานก่อนหน้าที่กล่าวถึงยีสต์ในป่าชายเลนจากตัวอย่างธรรมชาติของประเทศไทย ในจังหวัดจันทบุรี ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และระนอง พบยีสต์ที่เหมือนกับงานวิจัยนี้ทั้ง *C. thaimueangensis, C. tropicalis, G. candidum, P. kudriavzevii* และ *T. asahii* อาจเป็นเพราะสารอาหารและสภาพแวดล้อมในป่าชายเลนเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์สปีชีส์เหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบยีสต์หลากหลายสปีชีส์ที่อยู่ในสกุล *Candida, Debaryomyces, Galactomyces, Geotrichum, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Kodamaea, Linera, Lodderomyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Torulaspora, Trichosporon* และ *Wickerhamomyces* (Boonmak, 2009; Limtong *et al.*, 2007, 2008; Am-in *et al.*, 2011)

ตารางที่ 2 ค่า Hydrolysis capacity ของยีสต์ที่ย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน

ไอโซเลต	Hydrolysis capacity		
	แป้ง	**คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส**	**ไซแลน**
ASK 1.3	-	$1.07±0.00^{ab}$	$1.16±0.01^{abcdef}$
ASK 2.1	-	$1.21±0.00^{fgh}$	$1.20±0.05^{cdef}$
ASK 2.2	-	$1.14±0.01^{bcdef}$	$1.26±0.05^{ef}$
BT 1.2	-	$1.28±0.04^{h}$	$1.06±0.01^{ab}$
BT 1.4	-	-	$1.08±0.00^{abc}$
BT 2.2	-	$1.50±0.07^{i}$	$1.16±0.06^{abcdef}$
BT 2.4	-	$1.08±0.04^{abcd}$	$1.10±0.04^{abc}$
KM 3.1	-	$1.25±0.04^{gh}$	$1.42±0.17^{h}$
KM 3.2	-	$1.19±0.01^{efg}$	$1.24±0.06^{def}$
KM 4.2	-	$1.22±0.06^{fgh}$	$1.21±0.11^{cdef}$
KM 6.1	-	-	$1.28±0.05^{fg}$
KM 6.2	-	$1.14±0.03^{bcdef}$	$1.12±0.09^{abcd}$
KM 6.3	-	$1.16±0.03^{def}$	$1.39±0.13^{gh}$
PJ 1.5	-	-	$1.03±0.00^{a}$
PJ 2.3	-	$0.07±0.00^{ab}$	$1.15±0.01^{abcde}$
PJ 4.1	-	$0.07±0.00^{ab}$	-
SS 1.2	-	-	$1.08±0.00^{abc}$
SS 6.4	-	$1.08±0.04^{abcd}$	-
SS 7.3	-	$1.08±0.02^{abc}$	-
SS 8.1	-	$1.08±0.04^{abc}$	-
SS 10.2	-	$1.09±0.01^{abcd}$	-
SS 11.1	-	$1.14±0.08^{bcdef}$	-
SS 13.3	$1.08±0.00^{a}$	-	-
SS 14.2	$1.08±0.01^{a}$	-	-
SS 14.4	-	$1.16±0.04^{cdef}$	-
SS 15.1	-	$1.14±0.02^{bcdef}$	-
SS 15.2	-	$1.13±0.02^{bcde}$	-
SS 16.1	-	$1.07±0.00^{ab}$	-
SS 17.2	-	$1.02±0.04^{a}$	-
SS 19.1	-	$1.02±0.04^{a}$	-
SS 19.2	-	$1.03±0.05^{a}$	-
SS 20.1	-	$1.21±0.10^{fgh}$	-
SS 20.2	-	$1.19±0.05^{efg}$	-
SS 20.3	-	$1.16±0.05^{def}$	-
TA 1.2	-	-	$1.17±0.05^{bcdef}$
TA 2.1	-	$1.14±0.08^{bcdef}$	$1.18±0.05^{bcdef}$
TA 2.2	-	$1.07±0.01^{ab}$	$1.24±0.06^{def}$
TA 2.4	$2.43±0.09^{b}$	$1.03±0.00^{a}$	$1.03±0.00^{a}$

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกยีสต์ 38 ไอโซเลตที่สามารถย่อยสลายแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ/หรือไซแลน

ไอโซเลต	Closest species (accession no.)	% identities	การจัดจำแนก
ASK 1.3, ASK 2.1, ASK 2.2, BT 1.2, BT 1.4, BT 2.2, BT 2.5, KM 3.1,KM 3.2, KM 4.2, KM 6.1, KM 6.2,KM 6.3, PJ 2.3, SS 1.2, SS 6.4,SS 7.3, SS 8.1, SS 10.2, SS 11.1,SS 13.3, SS 14.2, SS 14.4, SS 15.1, SS 15.2, SS 16.1, SS 17.2, SS 19.1, SS 19.2, SS 20.1, SS 20.2, SS 20.3, TA 1.2, TA 2.1	*Candida tropicalis* (U45749)	99.8-100%	*Candida tropicalis*
TA 2.2	*Candida thaimueangensis* (AB264009)	100%	*Candida thaimueangensis*
PJ 1.5	*Galactomyces candidum* (AY788297)	99.8%	*Galactomyces candidum*
PJ 4.1	*Pichia kudriavzevii* (EF550222)	100%	*Pichia kudriavzevii*
TA 2.4	*Trichosporon asahii* (AF105393)	100%	*Trichosporon asahii*

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกยีสต์จากดินในพื้นที่ป่าชายเลนภาคกลางของประเทศไทย 50 ตัวอย่าง ได้ยีสต์ทั้งหมด 124 ไอโซเลต พบว่ามียีสต์ 38 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และ/หรือไซแลนได้ เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ได้เป็นแอสโคมัยซีตัสยีสต์ 4 ชนิด ใน 3 สกุล ได้แก่ *Candida thaimueangensis*, *Candida tropicalis*, *Galactomyces candidum* และ *Pichia kudriavzevii* ซึ่งสามารถย่อยสารอินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Trichosporon asahii* ที่ย่อยได้ทั้งแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน จากผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลยีสต์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส สามารถพัฒนาไปสู่การจัดทำคลังจุลินทรีย์และให้ข้อมูลเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ที่มีศักยภาพในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อาหารสัตว์ การทำเยื่อกระดาษ การบำบัดน้ำเสีย และการผลิตพลังงานชีวภาพ

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ขอขอบพระคุณ ดร. ศศิธร จินดามรกฎ และคุณสมจิต อ่ำอินทร์ ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.ชยารัตน์ ศรีสุนนท์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนคลองโคน จังหวัดสมุทรสงคราม และขอขอบคุณสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Am-In, S., Limtong, S., Yongmanitchai, W. and Jindamorakot, S. (2011). *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol*, *61*, 454-461.

Am-In, S., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. (2008). *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from water in mangrove forest in Ranong Province, Thailand. *FEMS Yeast Res, 8*, 823-828.

Boonmak, C. (2009). *Diversity of yeast in water and sediment from mangrove forest in the upper coast of the Gulf of Thailand*. Master of Science (Microbiology). Kasetsart University. (in Thai)

Brandao, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B., Espírito Santo, L.C., Moliné, M., de García, V., (2011). Yeasts from an oligotrophic lak e in Patagonia (Argentina) : diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol Ecol, 76*, 1-13.

Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V. and Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology*, *16*(21), DOI 10.1186/s12866-016-0640-8.

Chanklan, R., Kungkaew, P., Am-In, S. & Jindamorakot, S. (2012). Diversity of yeasts in the Nature Education Center for mangrove Conservation and Ecotourism, Chonburi Province. *Thai Journal of Science and Technology*, *1*(3), 155-168. (in Thai)

George, S.P., Ahmad, A. and Rao, M.B. (2001). Studies on carboxy methyl cellulose produced by an Alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology*, *77*(2), 171–175.

Heldt, H.M.and Heldt, F. (2005). *Plant Biochemistry*, 3rd edition. Elsevier. Amsterdam.

Hermansyah, N. and Wiraningsih, M. (2016). Bioethanol production from cellulose by *Candida tropicalis*, as an alternative microbial agent to produce ethanol from lignocellulosic biomass. *Sriwijaya Journal of Environment*, *1*(1), 10-13.

Jamai, L. and Ettayebi, M. (2013). Bioethanol production process using the non-conventional yeast *Candida tropicalis*. *2013 International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC)*, 477-481. Retrieved March 20, 2017, from IEEE Xplore.

Kaewwichian, R. (2009). Diversity of yeast in forest soil in the north eastern part of Thailand and their ability in degradation of organic compounds. Master of Science (Microbiology). Kasetsart University. (in Thai)

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

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011). *The Yeasts : A Taxonomic Study,* 5th edition. Elsevier: Amsterdam.

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

Limtong, S. and Yongmanitchai, W. (2010). *Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaensis* sp. nov. and *Candida suratensis* sp. nov., three novel yeast species from decaying plant materials submerged in water of mangrove forests. *Antonie van Leeuwenhoek, 98*, 379-388.

Limtong, S., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H. and Seki, T. (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.

Limtong, S., Youngmanitchai, W., Kawasaki, H. and Seki, T. (2008). *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.

Nakase, T., Jindamorakot, S. Am-In, S. Potacharoen, W., and Tanticharoen, M. (2006). Yeast biodiversity in tropical forests of Asia. In Rosa, C. A., Peter, G. (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer: Germany, 441-460.

Prasatsri, K. (2006). *Identification of Yeast isolated from organic matter in mangrove forest by conventional and molecular taxonomy*. Master of Science (Microbiology). Kasetsart University. (in Thai)

Sinjaroonsak, S. (2011). *Production of cellulose and xylanase by Bacillus subtilis and application for oil separation from palm oil mill effluent*. Master of Science in Biotechnology. Prince of Songkla University. (in Thai)

Soetarto, E.S. (1998). Xylan degrading enzymes of the yeast *Candida tropicalis* strain R1. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 173-179.

Sulman, S. and Rehman, A. (2013). Isolation and characterization of cellulose degrading *Candida tropicalis* W2 from environmental samples. *Pakistan J Zool, 45*(3), 809-816.

Sumpradit, T. (2009). *Yeast diversity in soils collected in the Hill Evergreen Forest and the Pine Forest of Nam Nao National Park*. Complete report sponsored by Medical science, Naresuan University. (in Thai)

Thongekkaew, J., Khumsap, A. and Chatsanga, P. (2012). Yeasts in mixed deciduous forest areas of Phujong Nayoy National Park and their ability to produce xylanase and carboxymethyl cellulase. *Songklanakarin J Sci Technol*, *34*(2), 157-163.

Thongekkaew, J. and Kongsanthia, J. (2016). Screening and identification of cellulase producing yeast from Rongkho Forest, Ubon Ratchathani University. *Bioengineering and Bioscience, 4*(3), 29-33.

Tran T. N. N. (2014). *Isolation and screening of aerobic microorganisms that produce pectinase and cellulase from cocoa tree* (*Theobroma cacao*). B.S.Thesis, Vietnam National University Hochimine City International University.

Witkowska, D. and Piegza, M. (2006). Capability of *Geotrichum candidum* yeasts for cellulases and xylanases. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, Retrieved December 10, 2014, from http://www.ejpau.media.pl/ volume9/issue4/art-41.html.