



การคัดแยกและจำแนกยีสต์สะสมไขมันสูงจากดิน บริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี

Isolation and Identification of Oleaginous Yeasts from Soils at Bang Phra Reservoir, Chonburi Province

ศศิวิมล ชมชื่น, มนัสวี อากรรณาค และ พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

Sasiwimon Chomchuen, Manassawee Arkornnak and Patcharanan Amornrattanapan^{*}

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University

Received : 8 June 2020

Revised : 26 August 2020

Accepted : 21 September 2020

บทคัดย่อ

ไขมันจากยีสต์สะสมไขมันสูงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านรวมทั้งการผลิตไบโอดีเซลซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกประเภทหนึ่งที่มีความสนใจในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก และจัดจำแนกยีสต์ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูงจากดินที่เก็บรวบรวมจากบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท และเมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาคัดกรองการสะสมไขมันด้วยวิธี Nile red fluorescence assay และตรวจสอบการสะสมไขมันของยีสต์ด้วยวิธีย้อมสี Sudan Black B พบว่ามียีสต์ 8 ไอโซเลท ได้แก่ I2, J1, J2, J5, L1, L4, M2 และ O3 ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูง เมื่อนำยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลทมาจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ายีสต์ไอโซเลท I2, J5 และ L1 จัดจำแนกได้เป็น *Candida tropicalis* ยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2 จัดจำแนกได้เป็น *Cyberlindnera* sp. ยีสต์ไอโซเลท J2 และ O3 จัดจำแนกได้เป็น *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* ในขณะที่ยีสต์ไอโซเลท L4 จัดจำแนกได้เป็น *Schwanniomyces* sp. โดยยีสต์ทั้ง 3 จินัสจัดอยู่ในไฟลัมเดียวกันคือ Ascomycota และแบ่งออกเป็น 2 แฟมิลี โดย *Candida* กับ *Schwanniomyces* จัดอยู่ในแฟมิลีเดียวกันคือ Debaryomycetaceae และ *Cyberlindnera* จัดอยู่ในแฟมิลี Phaffomycetaceae งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดินเป็นแหล่งอาศัยที่น่าสนใจของยีสต์ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูง อีกทั้งให้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำยีสต์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ : ไขมันจากจุลินทรีย์; ยีสต์สะสมไขมันสูง; *Candida*; *Cyberlindnera*; *Schwanniomyces*



Abstract

Lipid from oleaginous yeasts could be exploited for several applications including the production of biodiesel which is an alternative energy that has been gaining much interest recently. This research aimed to isolate and identify potential oleaginous yeasts from soil samples collected at Bang Phra reservoir in Chonburi province. A total of 39 isolates of yeast were obtained and further screened for intracellular lipid production by Nile red fluorescence assay followed by Sudan Black B staining to observe lipid accumulation in yeast cells. The result showed that there were 8 yeast isolates; I2, J1, J2, J5, L1, L4, M2 and O3 that exhibited high level of intracellular lipid accumulation potential. Identification of yeasts based on nucleotide sequencing of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 regions as well as phylogenetic analysis showed that I2, J5 and L1 were identified as *Candida tropicalis*, J1 and M2 were identified as *Cyberlindnera* sp., and J2 and O3 were identified as *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* and L4 was identified as *Schwanniomyces* sp. These yeast strains belong to the same phylum (Ascomycota) which are divided into 2 families as following; *Candida* and *Schwanniomyces* are members of the family Debaryomycetaceae and *Cyberlindnera* is a member of the family Phaffomycetaceae. This research suggested that soil could be an interesting habitat of potential oleaginous yeasts and this work also provided fundamental and important knowledges for further studies aiming for useful applications.

Keywords : microbial lipid ; oleaginous yeasts ; *Candida* ; *Cyberlindnera* ; *Schwanniomyces*



บทนำ

ยีสต์ ราสาย และสาหร่ายบางชนิดสามารถสะสมไขมันปริมาณสูงภายในเซลล์ ซึ่งหากสะสมไขมันมากกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้งจะเรียกว่า จุลินทรีย์สะสมไขมันสูง (Oleaginous microorganisms) ไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่า น้ำมันเซลล์เดี่ยว (Single Cell Oils, SCO) โดยองค์ประกอบหลักของไขมันที่ได้จากจุลินทรีย์สะสมไขมันสูง คือ ไตรเอซิล-กลีเซอรอล ซึ่งมีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมโอเลโอเคมี (oleochemical industry) และการผลิตไบโอดีเซล (Ratledge & Cohen, 2008; Ochsenreither *et al.*, 2016) ยีสต์มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น ราสายและสาหร่ายขนาดเล็ก เนื่องจากยีสต์มีอัตราการเจริญสูง เพราะเลี้ยงได้ง่าย สามารถเจริญได้ในสารตั้งต้นที่หลากหลาย และยีสต์หลายสายพันธุ์มีปริมาณไขมันสูงกว่าสาหร่ายขนาดเล็ก (Li *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008) สายพันธุ์ของยีสต์สะสมไขมันสูงพบได้ทั้งในแอคโคมายซีตัสยีสต์และแบคทีโอไมซีตัสยีสต์ อย่างเช่น *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, และ *Lipomyces* (Ageitos *et al.*, 2011) ยีสต์พบได้ทั้งในน้ำ บนบก ในอากาศ และเป็นพวกใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ(Chemoorganotroph) (Chanchaichaovivat, 2015) ยีสต์หลายชนิดพบอยู่ในดินชนิดต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ ความชื้น ความเป็นกรดต่าง และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ โดยแอคโคมายซีตัสยีสต์มักพบบ่อยในดินในพื้นที่เกษตรกรรม ดินในสวนผลไม้ และทุ่งหญ้า ในขณะที่แบคทีโอไมซีตัสยีสต์มักพบเป็นหลักในดินป่า (Yurkov, 2018) จีโนมของยีสต์ที่พบได้บ่อยในดิน ได้แก่ *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Cyberlindnera*, *Schwanniomyces* และ *Cryptococcus* (Yurkov, 2018; Limtong, 2006) จะเห็นได้ว่าหลายจีโนมที่พบในดินเป็นจีโนมที่มีสมาชิกที่เป็นยีสต์สะสมไขมันสูงรวมอยู่ด้วย แสดงว่ามีโอกาสที่จะพบยีสต์สะสมไขมันสูงในดินตามไปด้วย

ในการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยานั้น จีโนม ribosomal RNA หรือ ribosomal DNA (rRNA gene/rDNA) ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดอนุกรมวิธานของยีสต์ โดยตำแหน่งของ rDNA ที่นิยมใช้ คือบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งอยู่ระหว่าง Small subunit (SSU) และ Large subunit (LSU) ของ rRNA และบริเวณ ITS ประกอบด้วยบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งช่วยจำแนกสปีชีส์ที่ต่างกันออกจากกันได้ (Kurtzman *et al.*, 2011; Schoch *et al.*, 2012) การค้นหายีสต์สะสมไขมันสูงสายพันธุ์ใหม่ ๆ และการจัดจำแนกยีสต์ที่ค้นพบยังคงเป็นงานที่ทำหาย โดยนอกจากจะทำให้ทราบถึงจีโนมและสปีชีส์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่สนใจแล้ว ยังช่วยให้สามารถศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อนำยีสต์ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก คัดกรอง และจัดจำแนกยีสต์ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูงจากดินบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 และยืนยันการจัดจำแนกโดยวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่จำแนกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกยีสต์

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน จำนวนรวม 16 ตัวอย่าง ได้แก่ ดินบริเวณใกล้ขอบอ่างเก็บน้ำ ดินใต้ต้นคูณ ดินใต้ต้นกระถินณรงค์ ดินใต้ต้นहुกวาง ดินใต้ต้นพฤษ์ ดินใต้ต้นตะแบก ดินใต้ต้นหางนกยูง ดินใต้ต้นหว่า ดินใต้ต้นชัยพฤษ์



ดินใต้ต้นมะรุ้ม ดินใต้ต้นมะขาม ดินใต้ต้นมะม่วง ดินใต้ต้นมะค่าแต้ ดินใต้ต้นกระถ่อน ดินใต้ต้นมะดัน และดินใต้ต้นขำมะเสียดอย่างละ 1 ตัวอย่าง จากบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี โดยขุดดินที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 2 เซนติเมตร เก็บดินใส่ถุงพลาสติกปิดสนิท จากนั้นนำตัวอย่างมาเลี้ยงห้องปฏิบัติการและทำการคัดแยกเชื้อยีสต์โดยแขวนลอยตัวอย่างดิน 5 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของอาหาร YEPD broth (Yeast extract 10 กรัมต่อลิตร, Peptone 20 กรัมต่อลิตร, Dextrose 20 กรัมต่อลิตร) ที่เติม chloramphenicol 0.05% เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในดิน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (ความเร็ว 150 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาใส่ในสารละลาย NaCl 0.85% ให้ได้ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-5} แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาเกลี่ย (Spread) บนอาหาร YEPD agar (Yeast extract 10 กรัมต่อลิตร, Peptone 20 กรัมต่อลิตร, Dextrose 20 กรัมต่อลิตร, Agar 20 กรัมต่อลิตร) ที่เติม chloramphenicol 0.05% และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 2 วัน เลือกลักษณะที่ผิดปกติต่างก้นมาลาก (Streak) บน YEPD agar ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของยีสต์โดยทำ Wet mount และนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2. การคัดกรองยีสต์สะสมไขมันโดยใช้วิธี Nile red fluorescence assay

ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ไอโซเลทละ 2-3 โคโลนีจาก YEPD agar มาเลี้ยงในอาหาร Dextrose Magnesium sulfate Yeast extract (DMY) broth (Dextrose 40 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร, Yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 8 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 5 วัน โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ย้ายเชื้อยีสต์มาปรับให้มีค่า $OD_{600\text{ nm}}$ เริ่มต้น เท่ากับ 1.0 จากนั้นเตรียมชุดทดสอบโดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่ปรับความขุ่นแล้วมาไอโซเลทละ 250 ไมโครลิตร เติมน้ำ DMSO/DMY broth (1:1, ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปผสมกับเซลล์แขวนลอยหลอดละ 25 ไมโครลิตร และเติม Nile red (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมชุดควบคุมผลลบ (ชุด negative control) โดยทำเช่นเดียวกับชุดทดสอบแต่ใช้เซลล์แขวนลอยของ *Saccharomyces cerevisiae* แทนยีสต์ที่คัดแยกได้ และเตรียมชุดทดสอบแต่ไม่เติม Nile red (ชุด Blank) จากนั้นนำชุดทดสอบ ชุดควบคุมผลลบ และชุด Blank ที่อยู่ในหลุมของ 96-well black microplate ไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณ Fluorescence เพื่อประเมินการสะสมไขมันในเซลล์ยีสต์ โดยตั้งค่าความยาวคลื่นแสงกระตุ้น (Excitation wavelength) และค่าความยาวคลื่นเปล่งแสง (Emission wavelength) ที่ 530 และ 590 นาโนเมตร ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Sitepu *et al.*, 2012)

3. การตรวจสอบการสะสมไขมันของยีสต์ด้วยวิธีย้อมสี Sudan Black B

คัดเลือกไอโซเลทของยีสต์ที่มีค่าความเข้มของสัญญาณ Fluorescence สูงกว่าชุดควบคุมผลลบ (*S. cerevisiae*) และสูงกว่าค่าระดับสัญญาณ (Threshold) ที่กำหนดในการศึกษานี้ (Sitepu *et al.*, 2012) มาตรวจดูการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์โดยการย้อมสี Sudan Black B โดยย้ายโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลท ๗ ละ 2-3 โคโลนีจากอาหาร YEPD agar ไปใส่ในอาหาร DMY broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 5 วัน โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร DMY broth มาเกลี่ยบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรึงเซลล์โดยการนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟ ย้อมด้วยสีย้อม Sudan Black B เป็นเวลา 15 นาที เทสีทิ้ง ชะสีย้อมออกและย้อมด้วยสีย้อม Safranin 0.5% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ (Burdon, 1946; Jape *et al.*, 2014) นำสไลด์ที่ซับน้ำแห้งแล้วไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและตรวจดูบริเวณที่มีการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์



4. การจัดจำแนกเชื้อยีสต์โดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล

4.1 การสกัด genomic DNA

นำโคโลนียีสต์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร YEPD broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเก็บเซลล์มาสกัด genomic DNA โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis, USA) เก็บรักษา DNA ที่ -20 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ด้วยวิธี PCR

ดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') และ ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') (White *et al.*, 1990) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 1X buffer ที่มี $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase 2.5 U และ genomic DNA 50 นาโนกรัม แล้วนำไปดำเนินการปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal cycler โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ 94°ซ 3 นาที (1 รอบ); 94°ซ 45 วินาที, 53°ซ 30 วินาที, และ 72°ซ 45 วินาที (30 รอบ); และ 72°ซ 5 นาที (1 รอบ) จากนั้นตรวจสอบ PCR amplicons ที่ได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (Sambrook & Russell, 2001) โดยใช้ 1.2% agarose gel ใน 1xTAE buffer ที่เติม SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) และให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ถ่ายภาพโดยใช้ Omega Fluor Plus[™] Gel Documentation System (Aplegen, USA)

4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2

นำ PCR amplicons ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis, USA) ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท ATGC ประเทศไทย จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ไปแก้ไขเรียงด้วยซอฟต์แวร์ BIOEDIT Version 7.2.5.0 แล้วนำไป BLASTn เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank และระบุแทกซอนในระดับจีนัสและสปีชีส์เมื่อมี % identity $\geq 97\%$ และ $\geq 99\%$ ตามลำดับ

5. การสร้างแผนภูมิต้นสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของยีสต์ที่จำแนกได้ในงานวิจัยนี้รวมถึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ใกล้เคียงที่ได้จากการวิเคราะห์ BLASTn มาสร้างแผนภูมิต้นสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยซอฟต์แวร์ MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor-joining และใช้ *Yarrowia lipolytica* CBS 6124^T เป็น outgroup และทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกยีสต์

จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จ.ชลบุรี จำนวนรวม 16 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกยีสต์ได้จากดินแต่ละตัวอย่าง ๆ ละ 1-5 ไอโซเลท รวมทั้งหมดเป็น 39 ไอโซเลท โดยสามารถคัดแยกยีสต์ได้มากที่สุดจากดินใต้ต้นพฤษะ และดินใต้ต้นมะรุม ตัวอย่างละ 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) จากการศึกษาลักษณะของยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD agar (ที่มี chloramphenicol 0.05%) ที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) เป็นเวลา 2 วัน พบว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้ส่วน


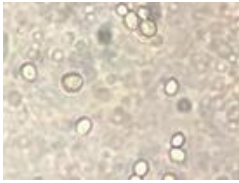

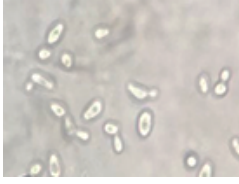




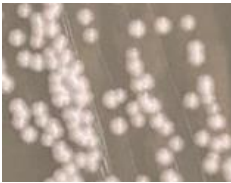
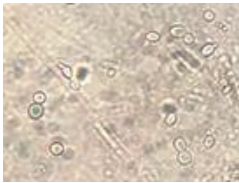

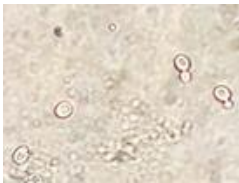
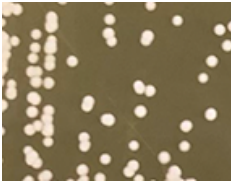
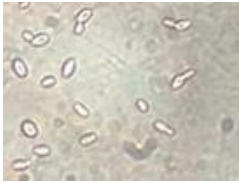
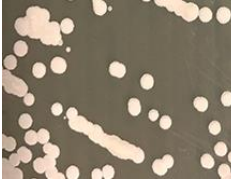
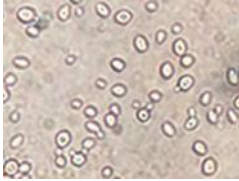


ใหญ่มีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม (Circular) หนูน (Convex) ขอบเรียบ (Entire) ผิวเรียบ (Smooth) และจากการสังเกตลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของไอโซเลทส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมและทุกไอโซเลทมีการแตกหน่อ (Budding) โดยในตารางที่ 2 ได้แสดงให้เห็นถึงลักษณะของยีสต์บางไอโซเลทที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บมาศึกษา

No.	ตัวอย่างดิน	รหัสของตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลทยีสต์ ที่คัดแยกได้
1	ดินบริเวณใกล้ขอบอ่างเก็บน้ำ	A	1
2	ดินใต้ต้นคูณ	B	2
3	ดินใต้ต้นกระถินณรงค์	C	2
4	ดินใต้ต้นหูขวาง	D	1
5	ดินใต้ต้นพญา	E	5
6	ดินใต้ต้นตะแบก	F	1
7	ดินใต้ต้นหางนกยูง	G	1
8	ดินใต้ต้นหว้า	H	2
9	ดินใต้ต้นชัยพญา	I	2
10	ดินใต้ต้นมะรุม	J	5
11	ดินใต้ต้นมะขาม	K	2
12	ดินใต้ต้นมะม่วง	L	4
13	ดินใต้ต้นมะค่าแต้	M	2
14	ดินใต้ต้นกระท้อน	N	3
15	ดินใต้ต้นมะดัน	O	3
16	ดินใต้ต้นขำมะเลียง	P	3
จำนวนรวม			39

ตารางที่ 2 สันฐานวิทยาของยีสต์บางไอโซเลทที่คัดแยกได้

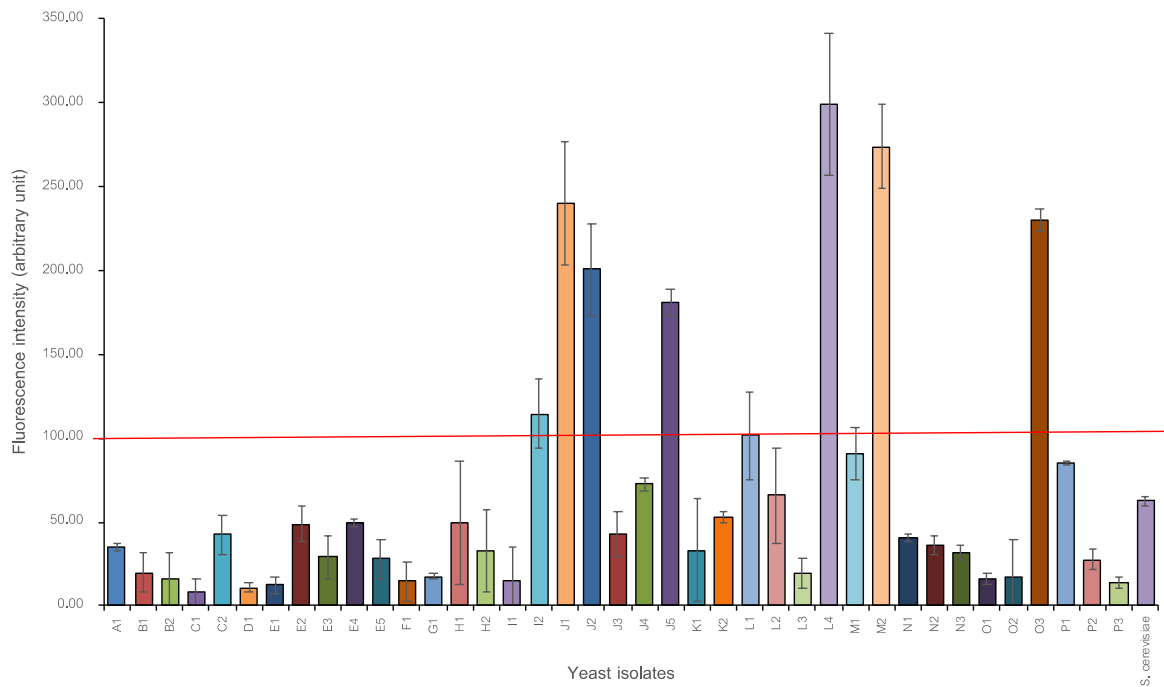
ไอโซเลท	แหล่งที่พบ	ลักษณะโคโลนี	ภาพโคโลนี	ลักษณะเซลล์	ภาพเซลล์ (กำลังขยายรวม 400x)
I2	ดินใต้ต้น ชัยพฤกษ์	รูปร่างกลม นูน (Convex) ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ขนาด Ø 2-3 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและ มีการแตกหน่อ	
J1	ดินใต้ต้น มะรุ่ม	รูปร่างกลม นูน (Convex) ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ขนาด Ø 2 mm		เซลล์รูปร่างรี เซลล์ เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
J2	ดินใต้ต้น มะรุ่ม	รูปร่างกลม แบนราบ (Flat) ขอบหยัก ผิวย่น ด้าน สีขาวครีม ขนาด Ø 4 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
J5	ดินใต้ต้น มะรุ่ม	รูปร่างกลม นูน (Convex) ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ขนาด Ø 1-2 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
L1	ดินใต้ต้น มะม่วง	รูปร่างกลม นูน (convex) ขอบเรียบ ผิวเรียบ ด้าน สีขาว ขนาด Ø 2 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
L4	ดินใต้ต้น มะม่วง	รูปร่างกลม เรียบแบน (Flat) ขอบหยัก ผิวย่น ด้าน สีขาวครีม ขนาด Ø 2 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
M2	ดินใต้ต้น มะค่าแต้	รูปร่างกลม นูน (Convex) ขอบเรียบ ผิว เรียบ สีขาวครีม ขนาด Ø 1-2 mm		เซลล์รูปร่างรี เซลล์ เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	
O3	ดินใต้ต้น มะดัน	รูปร่างกลม เรียบแบน (Flat) ขอบหยัก ผิวย่น ด้าน สีขาวครีม ขนาด Ø 2 mm		เซลล์รูปร่างกลม เซลล์เดี่ยวและมีการ แตกหน่อ	



2. การคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงโดยใช้วิธี Nile red fluorescence assay และการตรวจสอบการสะสมไขมันของยีสต์ด้วยวิธีย้อมสี Sudan Black B

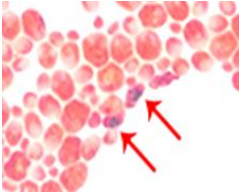
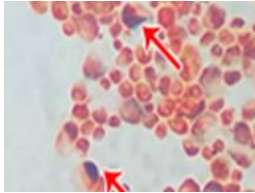
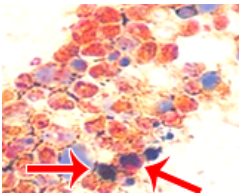
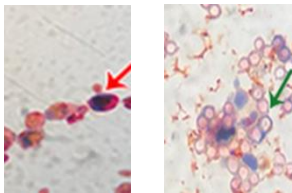
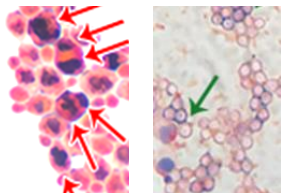
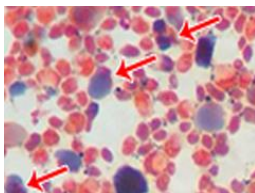
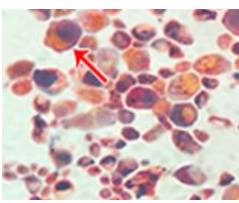
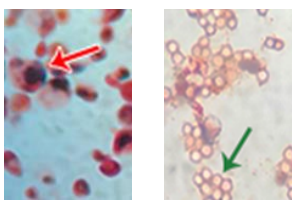
เพื่อคัดกรองยีสต์ที่มีศักยภาพในการสะสมไขมันจึงได้นำยีสต์ทั้งหมด 39 ไอโซเลทที่คัดแยกได้มาประเมินการสะสมไขมันด้วยวิธี Nile red fluorescence assay โดยเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 39 ไอโซเลทในอาหาร DMY broth ซึ่งเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีแหล่งไนโตรเจนจำกัดจึงช่วยส่งเสริมการสะสมไขมันในยีสต์ได้ดี (Rattledge, 2004) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแขวนลอยเซลล์ยีสต์กับ Nile red แล้วนำไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณ Fluorescence ให้ผลดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามียีสต์ 8 ไอโซเลท ได้แก่ J2, J1, J2, J5, L1, L4, M2 และ O3 ที่มีความเข้มของสัญญาณ Fluorescence สูงกว่า 100 a.u. ซึ่งกำหนดให้เป็นค่าระดับสัญญาณ (Threshold) สำหรับการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์สะสมไขมันสูงในการศึกษานี้เนื่องจากเป็นความเข้มของสัญญาณ Fluorescence ที่สูงกว่าความเข้มของสัญญาณ Fluorescence ที่พบใน *S. cerevisiae* ซึ่งเป็น Non-oleaginous yeast ที่นำมาใช้เป็นชุดควบคุมผลลบเกือบสองเท่าซึ่งเพียงพอสำหรับการแยกยีสต์ที่เป็นพวกสะสมไขมันสูงออกจากพวกที่เป็น Non-oleaginous yeast (Sitepu *et al.*, 2012) จึงทำให้คัดเลือกยีสต์ได้จำนวน 8 ไอโซเลท ที่เป็นไปตามเงื่อนไขที่กำหนดซึ่งมีศักยภาพในการสะสมไขมันสูง

เมื่อนำยีสต์ทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากวิธี Nile red fluorescence assay มาเลี้ยงในอาหาร DMY broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (29.5 ± 2.5 °ซ) ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน และทำการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Sudan Black B เพื่อตรวจสอบการสะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายรวม 1000x ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทแสดงการสะสมไขมันโดยสังเกตได้จากบริเวณที่ติดสีเทาไปจนถึงดำภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม แต่ละไอโซเลทแสดงระดับในการสะสมไขมันที่แตกต่างกัน โดยมียีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ J1, J2, J5, L4, M2 และ O3 ที่มีการสะสมไขมันที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่ามี การสะสมไขมัน >50% ของพื้นที่ภายในเซลล์ ในขณะที่ยีสต์อีก 2 ไอโซเลทที่เหลือมีการสะสมไขมันภายในเซลล์ในระดับที่น้อยกว่าจากการประเมินด้วยสายตาโดยพิจารณาจากขนาดของบริเวณที่ติดสีเทาหรือดำ (ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสะสมไขมัน) เทียบกับขนาดของเซลล์ที่ประกอบด้วยบริเวณที่ติดสีแดงของ Safranin (ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มี การสะสมไขมัน) ร่วมกับบริเวณที่ติดสีเทาหรือดำ ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ ยังพบว่ายีสต์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ J2, L4, และ O3 ที่มีลักษณะการเจริญเป็นเซลล์ทั้งหมดในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMY broth แต่เมื่ออายุของเชื้อเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาตั้งแต่ 2-5 วันพบว่ามี การสร้างแอสโคสปอร์เกิดขึ้น และพบว่ายีสต์ 3 ไอโซเลทดังกล่าว ได้แก่ J2, L4, และ O3 มีการสะสมไขมันบริเวณรอบผนังแอสโคสปอร์โดยสังเกตได้จากการติดสีเทาของ Sudan Black B ตรงบริเวณดังกล่าว ในขณะที่บริเวณด้านในที่ลึกลงไปจากบริเวณรอบผนังแอสโคสปอร์พบว่าไม่ติดสีของ Sudan Black B และสีของ Safranin ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจากการติดสีของเซลล์ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 1 ค่าความเข้มของสัญญาณ fluorescence ของ Nile red ที่ย้อมติดไขมันภายในเซลล์ยีสต์ไอโซเลตต่าง ๆ โดยกำหนดให้ค่าระดับสัญญาณ (Threshold) สำหรับการคัดเลือกยีสต์สะสมไขมันสูงอยู่ที่ 100 a.u.

ตารางที่ 3 ลักษณะของไขมันและระดับของไขมันภายในเซลล์ยีสต์เมื่อย้อมด้วย Sudan Black B

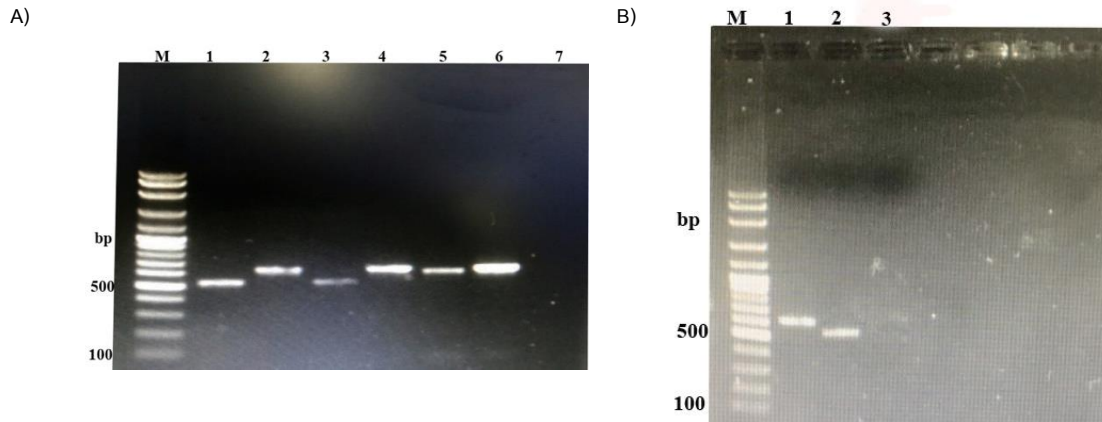
ไอโซเลท	ลักษณะเซลล์จากการย้อมสี Sudan Black B (กำลังขยายรวม 1000x)	ระดับของการสะสมไขมันภายในเซลล์	ไอโซเลท	ลักษณะเซลล์จากการย้อมสี Sudan Black B (กำลังขยายรวม 1000x)	ระดับของการสะสมไขมันภายในเซลล์
I2		+	L1		+
J1		+++	L4*		+++
J2*		+++	M2		+++
J5		+++	O3*		+++

หมายเหตุ เครื่องหมาย + และ +++ หมายถึง พบการสะสมไขมัน <50% และ >50% ของพื้นที่ภายในเซลล์ ตามลำดับ; สัญลักษณ์ * หมายถึง ไอโซเลทที่พบการสร้างแอสโคสปอร์; ภาพของไอโซเลท J2, L4 และ O3 มี 2 ฝั่ง ฝั่งซ้ายคือภาพเซลล์ และฝั่งขวาคือภาพแอสโคสปอร์; ลูกศรสีแดงและสีเขียวชี้ตำแหน่งที่พบการสะสมไขมันภายในเซลล์และใกล้กับผนังสปอร์ ตามลำดับ

3. การจัดจำแนกยีสต์สะสมไขมันสูงโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (Forward primer) และ ITS4 (Reverse primer) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจจสอบด้วยการทำ Agarose gel electrophoresis พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีขนาดประมาณ 500-700 bp โดย amplicons ของ I2, L1 และ J5 มีขนาดที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 550 bp ในขณะที่ amplicons ของ M2 และ J1 มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 600 bp ส่วน amplicons ของ J2, L4 และ O3 มีขนาดใกล้เคียงกันที่ประมาณ 650 bp แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 PCR amplicons บน Agarose gel 1.2 % โดยมี 1X TAE เป็นบัฟเฟอร์และทำ Electrophoresis ภายใต้ภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยเลน M คือ VC 100bp Plus DNA Ladder (0.5 µg) (A) เลนที่ 1-6 คือ PCR amplicons จากยีสต์ไอโซเลท I2, J2, L1, L4, M2 และ O3 ตามลำดับ และเลนที่ 7 คือ NTC (No template control) (B) เลน 1 และ 2 คือ PCR amplicons จากยีสต์ไอโซเลท J1 และ J5 ตามลำดับ และเลนที่ 3 คือ NTC

3.2 การวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลท

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างยีสต์สะสมไขมันสูงทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ I2, J1, J2, J5, L1, L4, M2 และ O3 มาเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่ายีสต์ไอโซเลท I2, J5 และ L1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ที่คล้ายคลึง >99% กับ *Candida tropicalis* สายพันธุ์ต่าง ๆ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงสูงสุด (99.61%, 100% และ 100% ตามลำดับ) กับ *Candida tropicalis* strain CBS 1920 (MH545915.1) จึงระบุแทกซอนของยีสต์ไอโซเลท I2, J5 และ L1 เป็น *Candida tropicalis* (ตารางที่ 4)

ยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึง >99% กับ *Cyberlindnera* สปีชีส์ต่าง ๆ ได้แก่ *Cyberlindnera subsufficiens* CBS: 5763 (KY103114. 1) , *Cyberlindnera saturnus* CBS: 254 (KY103100. 1) *Cyberlindnera suaveolens* CBS:255 (KY103113.1) และ *Cyberlindnera suaveolens* CBS:1670 (KY103109.1) ดังนั้นจึงไม่สามารถจัดจำแนกยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2 ในระดับสปีชีส์ได้และถูกระบุแทกซอนเป็น *Cyberlindnera* sp. (ตารางที่ 5)

ยีสต์ไอโซเลท J2 และ O3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึง 100 % กับ *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* CBS:3024 (KY105408.1) และ *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* CBS:5549 (KY105404.1) จึงระบุแทกซอนของยีสต์ไอโซเลท J2 และ O3 เป็น *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* ในขณะที่ยีสต์ไอโซเลท L4 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึง 100 % กับ *Schwanniomyces* สปีชีส์ต่าง ๆ ได้แก่ *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* CBS:3024 (KY105408.1) *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* CBS:5549 (KY105404.1) และ *Schwanniomyces yamadae* CBS:793 (KY105419.1) ดังนั้นจึงจัดจำแนกยีสต์ไอโซเลท L4 ในระดับจีนัสได้เป็น *Schwanniomyces* sp. (ตารางที่ 6)



เมื่อพิจารณาอนุกรมวิธานของยีสต์พบว่า ยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลทจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota, คลาส Saccharomycetes และออร์เดอร์ Saccharomycetales เช่นเดียวกัน โดยมี 6 ไอโซเลทที่อยู่ในแฟมิลี Debaryomycetaceae และอีก 2 ไอโซเลทอยู่ในแฟมิลี Phaffomycetaceae (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4 แทกซอนของยีสต์ไอโซเลท I2, J5 และ L1

ไอโซเลท	แทกซอนที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession no.)	%identity	แทกซอน	อนุกรมวิธาน	
I2	<i>Candida tropicalis</i> CBS 1920 (MH545915.1)	99.61	<i>Candida tropicalis</i>	Phylum	Ascomycota
	Class			Saccharomycetes	
J5	<i>Candida tropicalis</i> CBS 1920 (MH545915.1)	100	<i>Candida tropicalis</i>	Order	Saccharomycetales
	Family			Debaryomycetaceae	
L1	<i>Candida tropicalis</i> CBS 1920 (MH545915.1)	100	<i>Candida tropicalis</i>		
	<i>Candida tropicalis</i> AUMC 13439 (MH534909.1)			100	

ตารางที่ 5 แทกซอนของยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2

ไอโซเลท	แทกซอนที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession no.)	%identity	แทกซอน	อนุกรมวิธาน	
J1	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i> CBS:5763 (KY103114.1)	99.80	<i>Cyberlindnera</i> sp.	Phylum	Ascomycota
	<i>Cyberlindnera saturnus</i> CBS:254 (KY103100.1)	99.41		Class	Saccharomycetes
	<i>Cyberlindnera suaveolens</i> CBS:255 (KY103113.1)	99.21		Order	Saccharomycetales
M2	<i>Cyberlindnera subsufficiens</i> CBS:5763 (KY103114.1)	99.45	<i>Cyberlindnera</i> sp.	Family	Phaffomycetaceae
	<i>Cyberlindnera suaveolens</i> CBS:1670 (KY103109.1)			99.44	
	<i>Cyberlindnera saturnus</i> CBS:254 (KY103100.1)	99.26			
	<i>Cyberlindnera suaveolens</i> CBS:255 (KY103113.1)	99.07			

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของยีสต์ไอโซเลท I2, J1, J2, J5, L1, L4, M2 และ O3 และยีสต์สายพันธุ์ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล GenBank มาสร้างแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA X โดยมี



Yarrowia lipolytica CBS 6124^T เป็น outgroup เนื่องจาก *Y. lipolytica* เป็นโมเดลสำหรับการศึกษายีสต์สะสมไขมันสูงและอยู่ในออเดอร์ Saccharomycetales เช่นเดียวกับยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลทที่จำแนกได้ในการศึกษานี้ จากผลการวิเคราะห์ พบว่าแผนภูมิประกอบด้วย 3 clades ได้แก่ clade ของยีสต์ *Cyberlindnera*, clade ของยีสต์ *Schwanniomyces* และ clade ของยีสต์ *Candida* โดยยีสต์ไอโซเลท I2, J5 และ L1 ถูกจัดวางอยู่ใน clade ของยีสต์ *Candida* โดยมีความใกล้เคียงกับกลุ่มของ *Candida tropicalis* มากกว่ายีสต์อื่นของ *Candida* ยีสต์ไอโซเลท J2, L4 และ O3 ถูกจัดวางอยู่ใน clade ของยีสต์ *Schwanniomyces* โดยไอโซเลท J2 และ O3 มีความใกล้เคียงกับ *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* ในขณะที่ยีสต์ไอโซเลท L4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับทั้ง *Schwanniomyces vanriijae* var. *vanriijae* และ *Schwanniomyces yamadae* ในขณะที่ไอโซเลท J1 และ M2 ถูกจัดวางอยู่ใน clade ของยีสต์ *Cyberlindnera* (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 6 แทกซอนของยีสต์ไอโซเลท J2, O3 และ L4

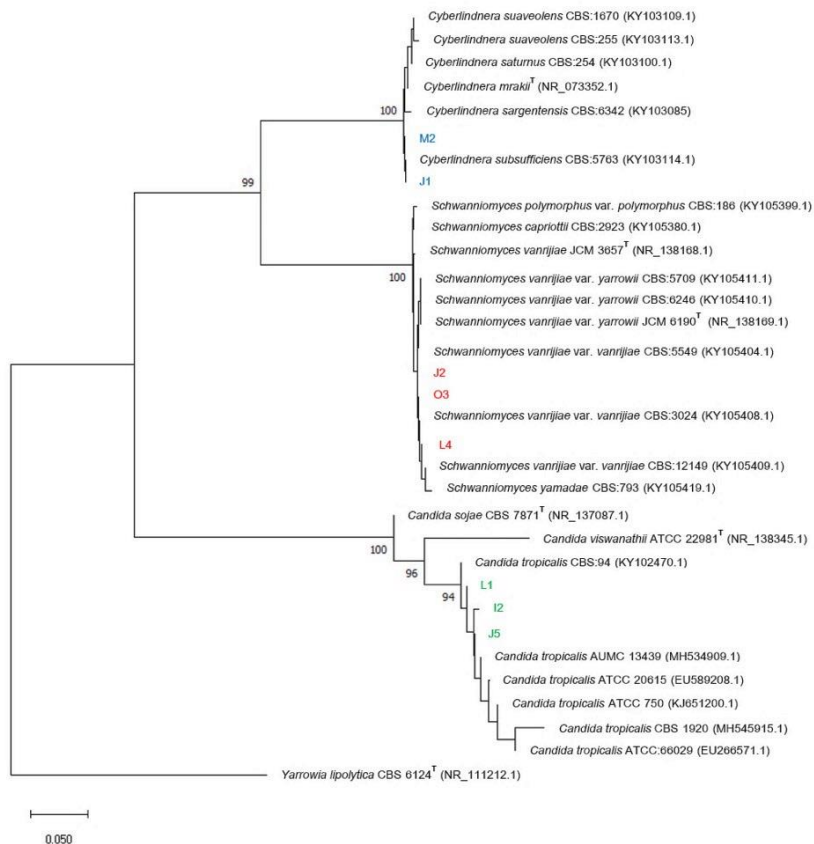
ไอโซเลท	แทกซอนที่ใกล้เคียงที่สุด (Accession no.)	%identity	แทกซอน	อนุกรมวิธาน	
J2	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:3024 (KY105408.1)	100	<i>Schwanniomyces</i> <i>vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i>	Phylum	Ascomycota
	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:5549 (KY105404.1)	100		Class	Saccharomycetes
				Order	Saccharomycetales
				Family	Debaryomycetaceae
O3	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:3024 (KY105408.1)	100	<i>Schwanniomyces</i> <i>vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i>		
	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:5549 (KY105404.1)	100			
L4	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:3024 (KY105408.1)	100	<i>Schwanniomyces</i> sp.		
	<i>Schwanniomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> CBS:5549 (KY105404.1)	100			
	<i>Schwanniomyces yamadae</i> CBS:793 (KY105419.1)	100			

วิจารณ์ผลการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลทจากดินบริเวณอ่างเก็บน้ำซึ่งเกือบทั้งหมดที่เก็บรวบรวมมาเป็นดินใต้ต้นไม้ มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่คัดแยกยีสต์จากดินหลายแบบและจากหลายพื้นที่อย่างเช่นจากการศึกษาของ Kaewwichian & Khamthaiklang (2017) ที่คัดแยกยีสต์ได้ 124 ไอโซเลทจากดินในพื้นที่ป่าชายเลนในภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 50 ตัวอย่าง และการศึกษาของ Pongcharoen *et al.* (2018) ที่คัดแยกยีสต์ได้ 60 ไอโซเลทจากดินบริเวณไร่ข้อยในจังหวัดอุตรดิตถ์ กำแพงเพชร ชัยนาท สุโขทัย นครสวรรค์และพิษณุโลกจำนวนรวม 18 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าจำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินแต่ละแหล่งมีความผันแปรแตกต่างกันไปโดยมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของพืชพรรณ

การจัดการที่ดิน ตลอดจนปัจจัยที่ไม่มีชีวิต (Abiotic factors) ได้แก่ ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ และธาตุอาหารหลัก เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม และแมกนีเซียม (Botha, 2011; Yurkov, 2018) และมักจะพบยีสต์มากขึ้นในดินที่อยู่ใต้ต้นไม้ที่มีผลไม้ที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตโดยเมื่อผลไม้เน่าเสียอยู่ในดินจะได้สารอาหารสำหรับการเจริญของยีสต์ (Botha, 2011)

ในงานวิจัยนี้สามารถคัดกรองยีสต์ที่คาดว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันสูงได้ 8 ไอโซเลทจากยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 20.51% ของจำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นการแพร่กระจายของยีสต์สะสมไขมันสูงในดินในสัดส่วนที่แตกต่างกันออกไป อย่างเช่นในการศึกษาของ Leesing & Nontaso (2011) ที่รายงานการคัดแยกยีสต์จากดินได้ทั้งสิ้น 69 ไอโซเลท และพบว่ามียีสต์เพียง 10 ไอโซเลทที่คาดว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันสูงซึ่งคิดเป็น 14.49% ของจำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด การศึกษาของ Pan *et al.* (2009) ที่คัดแยกยีสต์จากดินได้ทั้งสิ้น 40 ไอโซเลท พบว่ามียีสต์ 16 ไอโซเลทที่คาดว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันสูงซึ่งคิดเป็น 40% ของจำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด



ภาพที่ 3 แผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ 8 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากการศึกษานี้และยีสต์สายพันธุ์ใกล้เคียงที่สร้างโดยโปรแกรม MEGA X โดยใช้วิธี Neighbor-Joining และใช้วิธีของ Tajima-Nei เป็นโมเดลในการวิเคราะห์ระยะห่างทางวิวัฒนาการ ตัวเลขที่ปรากฏบน Node คือค่าเปอร์เซ็นต์ของการทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิโดยวิธี Bootstrap (หมายเหตุ: ตัวอักษร T ที่กำกับอยู่ท้ายชื่อสายพันธุ์ยีสต์ หมายถึง สายพันธุ์ Type strain)



ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค Nile red fluorescence assay สำหรับการคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงในขั้นแรก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วในการคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงจากตัวอย่างยีสต์หลาย ๆ ไอโซเลตได้พร้อมกัน (Sitepu *et al.*, 2012) โดย Nile red เป็นสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้สำหรับตรวจหาหยดไขมัน (Lipid droplets) ซึ่งเป็นที่เก็บสะสมของไขมันชนิดไตรเอซิลกลีเซอรอลภายในเซลล์ของสาหร่าย ยีสต์ และราสาย (Sitepu *et al.*, 2014; Ayadi *et al.*, 2018) เนื่องจากสีย้อม Nile red สามารถละลายได้ในไขมันและสามารถจับกับไขมันได้อย่างจำเพาะ (Sitepu *et al.*, 2012) มีงานวิจัยอื่นที่ใช้ Nile red เพื่อช่วยคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงเช่นเดียวกัน อย่างเช่นจากการศึกษาของ Ayadi *et al.* (2018) ที่คัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงโดยใช้วิธี Nile red fluorometry พบว่าจากยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 205 ไอโซเลต มี 12 ไอโซเลตที่เป็นยีสต์สะสมไขมันสูง ในขณะที่การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลตและคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงด้วยวิธี Nile red fluorescence assay ได้ 8 ไอโซเลต

ในขั้นต่อมาได้นำยีสต์ 8 ไอโซเลตที่ผ่านการคัดกรองโดยเทคนิค Nile red fluorescence assay มาย้อมสี Sudan Black B เพื่อตรวจดูการสะสมไขมันโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เนื่องจาก Sudan Black B เป็นสีที่ละลายในไขมันจึงย้อมติด Neutral lipid หรือไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในหยดไขมันของยีสต์ (Pawar *et al.*, 2019) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลตมีบริเวณภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ย้อมติดสีเทาไปจนถึงดำซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมไขมันภายในเซลล์ เช่นเดียวกับรายงานของ Amornrattanapan & Thongthep (2019) และ Jape *et al.* (2014) ที่พบบริเวณที่สะสมไขมันภายในเซลล์ยีสต์ย้อมติดสีของ Sudan Black B นอกจากนี้การศึกษานี้พบว่ามียีสต์ 3 ไอโซเลต ได้แก่ J2, L4, และ O3 หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร DMY broth ซึ่งเป็นอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด เป็นเวลา 2-5 วัน ยีสต์สามารถสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลมที่ย้อมติดสีเทาของ Sudan Black B บริเวณใกล้กับผนังแอสโคสปอร์ ผลการศึกษานี้คล้ายกับการศึกษาของ Arous *et al.* (2016) ที่พบว่ายีสต์สะสมไขมันสูง *Debaryomyces etchellsii* (ปัจจุบันมีชื่อเรียกว่า *Shwanniomycetes etchellsii*) สามารถสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลมและมีการสะสมไขมันภายในแอสโคสปอร์ตรงบริเวณใกล้กับ ascospore-delimiting membranes ภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน

การคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงในการศึกษานี้แม้จะช่วยระบุได้เบื้องต้นว่ายีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลตมีโอกาสที่จะเป็นยีสต์สะสมไขมันสูง อย่างไรก็ตามในการศึกษาขั้นถัดไปจะต้องดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณไขมันภายในเซลล์ยีสต์เพื่อยืนยันศักยภาพของการสะสมไขมันสูงในยีสต์เหล่านี้ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการทดลองกับยีสต์ 1 ไอโซเลตและพบว่าสามารถสะสมไขมันได้ประมาณ 26% เทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (เป็นข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่) ซึ่งเป็นปริมาณไขมันที่สูงกว่า 20% เมื่อเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เป็นค่าจำกัดความของยีสต์สะสมไขมันสูง (Ratledge & Cohen, 2008) ผู้วิจัยจึงคาดว่ายีสต์ไอโซเลตอื่น ๆ ที่คัดกรองได้ในการศึกษานี้จะมีปริมาณไขมันที่ไม่ต่ำกว่า 20% เช่นกันและจะต้องทำการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

จากการจัดจำแนกยีสต์ทั้ง 8 ไอโซเลตด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 พบว่าไอโซเลต J2, J5 และ L1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงสูงสุดกับ *Candida tropicalis* ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota, ออเดอร์ Saccharomycetales (Zuza-Alves *et al.*, 2017) ลักษณะโคโลนีของ *C. tropicalis* บนอาหาร 1/2YPD Agar เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C มีสีขาว ผิวเรียบ และเซลล์มีรูปร่างกลม (Spherical) อยู่แบบเซลล์เดี่ยวหรืออยู่



เป็นคู่ เมื่อเลี้ยงในอาหาร 1/2YPD เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C (Hernández-Chávez, *et al.*, 2019) ซึ่งมีลักษณะ
 สัณฐานตรงกับยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทในการศึกษานี้ที่ถูกจัดจำแนกได้เป็น *Candida tropicalis*

ยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2 จัดจำแนกได้เป็น *Cyberlindnera* sp. ซึ่งจีโนมนี้จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota และเป็น
 สมาชิกอยู่ในออกเคอร์ Saccharomycetales จีโนมนี้เดิมมีชื่อเรียกว่าจีโนม *Lindnera* ซึ่งมีสมาชิกที่ถูกย้ายมาจากจีโนม *Pichia*,
Williopsis และ *Candida* จากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Large subunit
 (LSU), small subunit (SSU) rRNA genes และ translation elongation factor-1a (EF-1a) gene เซลล์ในจีโนมนี้มีรูปร่างกลม
 (Spherical), รูปไข่ (Ovoid) หรือเป็นท่อนยาว (Elongate) และพบการแตกหน่อ (Kurtzman *et al.*, 2008) ซึ่งมีลักษณะสัณฐาน
 คล้ายกับยีสต์ไอโซเลท J1 และ M2 ในการศึกษา

ในส่วนของยีสต์ไอโซเลท J2 และ O3 จัดจำแนกได้เป็น *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* ในขณะที่
 ไอโซเลท L4 จัดจำแนกได้เป็น *Schwanniomyces* sp. ซึ่งจีโนมนี้จัดอยู่ในแฟมิลี Debaryomycetaceae จีโนม
Schwanniomyces จัดเป็น sister genera กับจีโนม *Debaromyces* โดยมีสปีชีส์ใน clade ของ *Debaromyces polymorphus*
 ที่ถูกย้ายมาอยู่ในจีโนม *Schwanniomyces* จากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ
 D1/D2 large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) rRNA gene จีโนมนี้มีเซลล์รูปร่างกลม (Spherical) ไปจนถึงรูป
 ท่อนยาว (Elongate) พบการแตกหน่อ และสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม (Suzuki & Kurtzman,
 2011) ซึ่งมีลักษณะสัณฐานตรงกับยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทในการศึกษานี้ที่ถูกจัดจำแนกได้เป็น *Schwanniomyces*

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของ *Candida tropicalis*, *Cyberlindnera* sp. และ *Schwanniomyces*
 spp. ในตัวอย่างดินที่นำมาศึกษา เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานการคัดแยกยีสต์ *C. tropicalis*, *Cyberlindnera*
 sp. และ *Schwanniomyces* spp. จากดินในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก อย่างเช่นการพบ *C. tropicalis* ในดินจากพื้นที่เกษตรกรรม
 ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศคาเมรูน (Aljohani *et al.*, 2018) ดินจากสวนผลไม้ในเมืองหนานหนิง เขตปกครองตนเอง
 กว่างซีจ้วง สาธารณรัฐประชาชนจีน (Pan *et al.*, 2009) ดินในป่าดิบชื้นแอมะซอน ประเทศบราซิล (Bastos *et al.*, 2000)
 การพบ *Cyberlindnera* สปีชีส์ต่าง ๆ ในดิน อย่างเช่นการพบ *Cy. subsufficiens* และ *Cy. saturnus* จากดินในพื้นที่
 เกษตรกรรมในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศคาเมรูน (Aljohani *et al.*, 2018) *Cy. saturnus* และ *Cy. misumaiensis* จากดินใน
 ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Groenewald *et al.*, 2018) *Cy. tropicalis* จากดินในตำบลบางกะเจ้า อำเภอพระประแดง จังหวัด
 สมุทรปราการ (Boontham *et al.*, 2017) และการพบ *Schwanniomyces* สปีชีส์ต่าง ๆ ในดิน อย่างเช่น การพบ
Schwanniomyces vanriijiae จากดินในป่า birch–pine ในแคว้น Novosibirsk oblast สหพันธรัฐรัสเซีย (Maksimova *et al.*,
 2016) *Schw. capriottii* และ *Schw. Polymorphus* จากดินในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Groenewald *et al.*, 2018)
Schw. castellii ในดินจากพื้นที่ป่าและทุ่งหญ้าในประเทศเยอรมนี (Yurkov *et al.*, 2012)

สายพันธุ์ยีสต์ในแทกซอนเดียวกับที่คัดแยกและจำแนกได้ในงานวิจัยนี้ถูกรายงานว่าเป็นยีสต์สะสมไขมันสูงมาก่อน
 ไม่ว่าจะเป็น *C. tropicalis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *C. tropicalis* V209 (Miranda *et al.*, 2020) *C. tropicalis* J3-1 (Pan
et al., 2009) *C. tropicalis* Y-L2 (Ayadi *et al.*, 2018) และมีงานวิจัยที่รายงานว่าเป็นยีสต์
 สะสมไขมันมาก่อนเช่นกัน อย่างเช่น *Cy. jadinii* V124 (Miranda *et al.*, 2020) *Cy. jadinii* CBS1517 และ *Cy. suaveolens*
 NRRL Y-17396 (Yaguchi *et al.*, 2020) และ *Cy. fabianii* Y-B14 (Ayadi *et al.*, 2018) แม้ว่าจะไม่พบงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่



รายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์สะสมไขมันสูงของ *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* แต่ก็พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการสะสมไขมันสูงของสปีชีส์ใกล้เคียง ได้แก่ *Schw. vanriijiae* var. *yarrowii* (Sitepu et al., 2014, Yaguchi et al., 2020) และสปีชีส์อื่น ๆ ได้แก่ *Schw. occidentalis* var. *occidentalis* (Yaguchi et al., 2020)

แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะไม่ได้ออกมาแสดงความสัมพันธ์ในเชิงนิเวศวิทยาระหว่างยีสต์และดินที่เก็บมาศึกษาเนื่องจากไม่ใช่จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้ แต่ก็ได้แสดงให้เห็นว่าดินเป็นทรัพยากรที่น่าสนใจสำหรับการคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติจำเพาะ โดยยีสต์ที่คัดแยกและจำแนกได้ในงานวิจัยนี้มีศักยภาพในการสะสมไขมันสูง

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปแล้วงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกและคัดกรองยีสต์สะสมไขมันสูงได้ 8 ไอโซเลทจากตัวอย่างดินบริเวณอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี โดยจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของยีสต์ 8 ไอโซเลทพบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 3 จินัส ได้แก่ *Candida tropicalis* (I2, J5 และ L1), *Cyberlindnera* sp. (J1 และ M2), *Schwanniomyces vanriijiae* var. *vanriijiae* (J2 และ O3) และ *Schwanniomyces* sp. (L4) โดยทั้งหมดเป็นแอสโคไมซีตยีสต์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับศักยภาพในการผลิตและสะสมไขมันของยีสต์สายพันธุ์เหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นในแง่ของการศึกษาการสะสมไขมันเชิงปริมาณโดยการสกัดไขมันออกจากเซลล์และคำนวณปริมาณไขมันเทียบกับน้ำหนักเซลล์ การศึกษาจุลชีววิทยาของการเจริญและสะสมไขมัน การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันที่ยีสต์ผลิตได้ ตลอดจนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและสะสมไขมันเพื่อพัฒนาไปสู่การนำไขมันจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์หรือค้นคว้าหาศักยภาพของยีสต์ในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติมอย่างเช่นการผลิตเอโนไซม์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยบริการนวัตกรรมการทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้อุปกรณ์เครื่อง Fluorescence spectrophotometer สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories.

Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 1219-1227.

Aljohani, R., Samarasinghe, H., Ashu, T., & Xu, J. (2018). Diversity and relationships among strains of culturable yeasts in agricultural soils in Cameroon. *Scientific Reports*, 8, 15687.



Amornrattanapan, P. & Thongthep, P. (2019). Isolation and screening of oleaginous yeasts capable of using glycerol as a carbon source. *Ramkhamhaeng Research Journal of Sciences and Technology*, 22(2), 61-70.

Arous, F., Mechichi, T., Nasri, M., & Aggelis, G. (2016). Fatty acid biosynthesis during the life cycle of *Debaryomyces etchellsii*. *Microbiology*, 162, 1080-1090.

Ayadi, I., Belghith, H., Gargouri, A., & Guerfali, M. (2018). Screening of new oleaginous yeasts for single cell oil production, hydrolytic potential exploitation and agro-industrial by-products valorization. *Process Safety and Environmental Protection*, 119, 104–114.

Bastos, A. E. R., Moon, D. H., Rossi, A., Trevors, J. T., & Tsai, S. M. (2000). Salt-tolerant phenol degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology*, 174(5), 346-352.

Boontham, W., Limtong, S., Rosa, C. A., Lopes, M. R., Vital, M. J., & Srisuk, N. (2017). *Cyberlindnera tropicalis* fa, sp. nov., a novel yeast isolated from tropical regions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2569-2573.

Botha, A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1-8.

Burdon, K. (1946). Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried and fixed slide preparations. *Journal of Bacteriology*, 52(6), 665-678.

Chanchaichaovivat, A. (2015). *Yeast and Yeast Technology*. (1st ed.). Bangkok: Kao Thai Advertising & Printing. (in Thai)

Groenewald, M., Lombard, L., de Vries, M., Lopez, A. G., Smith, M., & Crous, P. W. (2018). Diversity of yeast species from Dutch garden soil and the description of six novel Ascomycetes. *FEMS Yeast Research*, 18(7), 1-14.



- Hernández-Chávez, M. J., Clavijo-Giraldo, D. M., Novák, Á., Lozoya-Pérez, N. E., Martínez-Álvarez, J. A., Salinas-Marín, R., Hernández, N. V., Martínez-Duncker, I., Gácsér, A., & Mora-Montes, H. M. (2019). Role of protein mannosylation in the *Candida tropicalis*-Host interaction. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2743.
- Jape, A., Harsulkar, A., & Sapre, V. R. (2014). Modified Sudan Black B staining method for rapid screening of oleaginous marine yeasts. *International Journal of Current Microbiology and Sciences*, 3(9), 41-46.
- Kaewwichian, R., & Khamthaiklang, S. (2017). Yeast in mangrove forest soil from the central Thailand and its ability in the degradation of starch, carboxymethylcellulose and xylan. *Burapha Science Journal*, 22(Special issue; The 9th National Science Reseach Conference), 411-422. (in Thai)
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout. (Eds), *The Yeasts; A taxonomic study*. (pp. 137-144). Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. and Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research*, 8, 939-954.
- Leesing, R., & Nontaso, Ng. (2011). Isolation and cultivation of oleaginous yeast for microbial oil production. *KKU Research Journal*, 16(2), 112-126. (in Thai)
- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 749-756.
- Limtong, S. (2006). *Yeast: Diversity and Biotechnology*. (1st ed.). Bangkok: Kasetsart University Press. (in Thai)
- Maksimova, I. A., Glushakova, A. M., Kachalkin, A. V., Chernov, I. Y., Panteleeva, S. N., & Reznikova, Z. I. (2016). Yeast communities of *Formica aquilonia* colonies. *Microbiology*, 85(1), 124-129.



- Miranda, C., Bettencourt, S., Pozdniakova, T., Pereira, J., Sampaio, P., Franco-Duarte, R., & Pais, C. (2020). Modified high-throughput Nile red fluorescence assay for the rapid screening of oleaginous yeasts using acetic acid as carbon source. *BMC Microbiology*, 20(1), 60.
- Ochsenreither, K., Glück C., Stressler T., Fischer L., & Sylatk C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1539.
- Pan, L. X., Yang, D. F., Shao, L., Li, W., Chen, G. G., & Liang, Z. Q. (2009). Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid producing capacities. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 215-220.
- Pawar, P. P., Odaneth, A. A., Vadgama, R. N., & Lali, A. M. (2019). Simultaneous lipid biosynthesis and recovery for oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 237.
- Pongcharoen, P., Chawneua, J., & Tawong, W. (2018). High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil. *Agriculture and Natural Resources*, 52, 511-518.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20, 155-160.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109(16), 6241- 6246.



- Sitepu, I. R., Garay, L. A., Sestric, R., Levin, D., Block, D. E., German, J. B., & Boundy-Mills, K. L. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32, 1336-1360.
- Sitepu, I. R., Ignatia, L., Franz, A. K., Wong, D. M., Faulina, S. A., Tsui, M., Kanti, A., & Mills, K. B. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 321-328.
- Suzuki, M., & Kurtzman, C. P. (2011). *Schwanniomyces Klöcker* emend. M. Suzuki & Kurtzman (2010). In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout. (Eds.), *The Yeasts; A Taxonomic Study*. (pp. 785-794). London: Elsevier.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A., Innis, D. H., Gelfand, J. J., Sninsky, & T. J., White. (Eds.), *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315 - 322). New York: Academic Press.
- Yaguchi, A., Franaszek, N., O'Neill, K., Lee, S., Sitepu, I., Boundy Mills, K. & Blenner, M. (2020). Identification of oleaginous yeasts that metabolize aromatic compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02269-5>.
- Yurkov, A. M. (2018). Yeasts of the soil-obscure but precious. *Yeast*, 35(5), 369-378.
- Yurkov, A. M., Kemler, M., & Begerow, D. (2012). Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5(1), 24-35.
- Zhu, L. Y., Zong M. H., & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99, 7881-7885.
- Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1927.