พันธุศาสตร์ของยีสต์และแนวทางการใช้ประโยชน์

สาวิตรี ลิ่มทอง
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพมหานคร 10900
Email: fscistl@ku.ac.th

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว และเป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ เริ่มจากการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่ เมื่อประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ต่อมามีการใช้ยีสต์ในการผลิตไวน์ และขนมปัง ปัจจุบันมีการใช้ยีสต์ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากการหมักในอุตสาหกรรมมากชนิดขึ้น อุตสาหกรรมที่มีการผลิตปริมาณมาก คือ เบียร์ ไวน์ ยีสต์ขนมปัง โปรตีนเซลล์เดี่ยวและยีสต์อาหารสัตว์

การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์อุตสาหกรรมโดย Genome Shuffling

ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักเป็นพวกที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมสองชุด หรือหลายชุดเพื่อให้มีความคงตัวเมื่อใช้ระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์ และมักเป็นพวกที่สร้างสปอร์แบบมีเพศได้น้อยหรือไม่สร้างเลย ทำให้การปรับปรุงพันธุกรรมโดยวิธีต่างๆ ทำได้ยากกว่าในสายพันธุ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ วิธีการที่ใช้ ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์อุตสาหกรรมวิธีแรกๆ คือ การกลายพันธุ์แบบสุ่ม โดยใช้ร่วมกับการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (mutant) ที่มีลักษณะที่ต้องการ วิธีการนี้ปัจจุบันยังคงใช้อยู่ แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและใช้แรงงานมาก ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์อุตสาหกรรมเน้นที่การทำ metabolic engineering ซึ่งใช้วิธีการสมัยใหม่ในการจัดการพันธุกรรมทำให้มีการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ (phenotype) เมื่อใช้ร่วมกับการคัดเลือกที่เหมาสม จะสามารถสร้างสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีขึ้นกว่าเดิมซึ่งเหมาะที่จะใช้ในอุตสาหกรรมได้ การทำ metabolic engineering หรือแม้แต่ genetic engineering นั้น ต้องเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีโนไทป์ (genotype) และฟีโนไทป์นั้นๆ ต้องมีความรู้ว่าจะทำการเปลี่ยนแปลงยีโนไทป์ตรงไหน จึงจะทำให้ได้ฟีโนไทป์ที่ดีขึ้น และต้องรู้รายละเอียดเกี่ยวกับยีโนไทป์หรือยีนที่จะทำการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ นอกจากนี้ การปรับปรุงฟีโนไทป์ของเซลล์ที่ซับซ้อนที่ควบคุมโดยยีนหลายยีน เช่น ความทนต่อความเค้น (stress tolerance) การเพิ่มผลผลิต (production yield) และการเพิ่มความสามารถในการใช้สับสเตรตนั้น ต้องอาศัยการปรับเปลี่ยนทั้งยีนที่รู้จักหรือยีนที่ไม่รู้จัก วิธีระดับโมเลกุลอาจไม่เพียงพอที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีฟีโนไทป์ที่ดีขึ้นได้ สิ่งเหล่านี้จึงเป็นข้อจำกัดของ metabolic engineering ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาแนวทางที่ใช้เพื่อการจัดการยีโนมทั้งหมด เพื่อทำให้มีฟีโนไทป์ที่ดีขึ้น โดยการรวมหลายวิธีการเข้าด้วยกัน ในบรรดาวิธีการเหล่านั้น genome shuffling เป็นวิธีหนึ่งที่มีการพัฒนาขึ้นมา

Genome Shuffling เป็นเทคโนโลยีในการปรับปรุงฟีโนไทป์ของสายพันธุ์จุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว โดยการปรับปรุงในระดับยีโนม เหมาะสมสำหรับการจัดการฟีโนไทป์ที่ควบคุมโดยยีนหลายยีนโดยการผสมข้ามระหว่าง parental strain หลายสายพันธุ์ โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีความรู้เกี่ยวกับชุดของยีนที่จะทำการเปลี่ยนแปลง ทำให้เกิด DNA shuffling กับรีคอมบิเนชัน (recombination) ของยีโนมทั้งหมด โดยใช้การผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม เนื่องจากกระบวนการเกิดโดยอาศัยรีคอมบิเนชันตามธรรมชาติ ดังนั้นสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นไม่ถือว่าเป็น genetic modified organism (GMO) ทำให้ไม่มีข้อจำกัดที่จะนำสายพันธุ์ที่ได้ไปใช้ในอุตสาหกรรม วิธีการ genome shuffling ประกอบด้วยการสร้าง parental library ที่มีฟีโนไทป์ที่หลากหลาย จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดี การกลายพันธุ์ และพันธุวิศวกรรม ขั้นต่อไปคือการรวม parental strain ที่มีฟีโนไทป์หลากหลายเหล่านั้นเข้าด้วยกัน เพื่อนำยีโนมเข้าไปอยู่ด้วยกันและเกิดรีคอมบิเนชัน โดย genome shuffling เริ่มพัฒนาจากการใช้

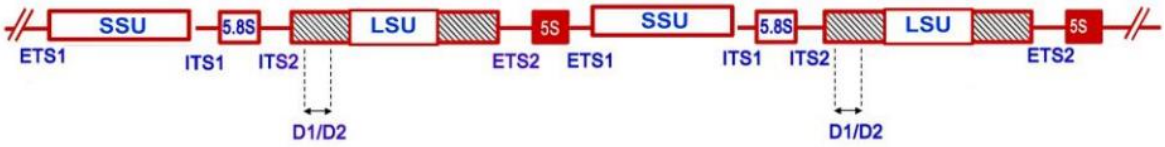
โปรโตฟลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion) เพื่อรวบ parental strain หลายสายพันธุ์เข้าด้วยกัน จากนั้นมีผู้พัฒนาวิธีการอื่นขึ้นเพื่อให้ได้ผลการรวม parental strain และยีโนม เกิดดีขึ้น เช่น การทำ mating การทำ protoplast fusion ที่ไม่ใช้ polyethylene glycol (PEG) รวมถึงการนำยีโนมทั้งหมดของ parental strain หนึ่งเข้าไปในอีก parental strain หนึ่ง โดย electroporation อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้ เช่น โปรโตฟลาสต์ฟิวชัน จะต่างจากเทคนิคดั้งเดิม ซึ่งทำการรวม parental strain 2 สายพันธุ์ ในขณะที่ genome shuffling อาจใช้ parental parent หลายสายพันธุ์ ในการทำแต่ละครั้ง ร่วมกับการทำโปรโตฟลาสต์ฟิวชันหลายรอบเพื่อให้เกิดการรวมกันของยีโนมซ้ำๆ กัน ทำให้ได้สายพันธุ์ที่ดีกว่าเดิมเพราะมีการรวมพันธุกรรมจากสายพันธุ์เริ่มต้นหลายสายพันธุ์ ขั้นสุดท้ายที่มีความสำคัญมาก คือ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฟีโนไทป์ที่ดีกว่าเดิม ในระยะ 4-5 ปีที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวนหนึ่ง เช่น การเพิ่มความทนเอทานอลและเพิ่มผลผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* โดยการทำ genome shuffling 3 รอบ วิธีการ คือ นำ diploid cell มาทำการกลายพันธุ์ จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสปอร์อย่างมีประสิทธิภาพ ตามด้วยทำให้มีการผสมกันของ haploid cell ที่ได้จากสปอร์เหล่านั้นแบบสุ่ม (Hou, 2009) การเพิ่มความทนร้อน ทนเอทานอล และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* โดยการทำ genome shuffling 3 รอบ วิธีการคือ นำ haploid cell มาเตรียมเป็นโปรโตพลาสต์แล้วทำ protoplast mutagenesis และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ดีขึ้น และทำ genome shuffling โดยการทำโปรโตฟลาสต์ฟิวชันของสายพันธุ์กลายหลายๆ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (Shi *et al*., 2009) การเพิ่มความทนต่อความเค้น ของ Top fermenting yeast *S. cerevisiae* โดยการทำ genome shuffling 3 รอบ วิธีการ คือนำ diploid cell มาทำการกลายพันธุ์ นำ mutant cell ที่ได้มาเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์จำนวนมาก แยกสปอร์ และนำ haploid cell ที่ได้ไปทำโปรโตฟลาสต์ฟิวชัน โดยไม่ต้องใช้ PEG เหนี่ยวนำ (Wang and Hou, 2010) การเพิ่มความทนกรดอะซิติกของ *S. cerevisiae* โดยการทำ genome shuffling ที่อาศัย drug-resistant marker ช่วย (Zheng *et al*., 2011) การเพิ่มการผลิตเอทานอลของ xylose-fermenting recombinant yeast strain ที่สร้างจาก modified genome shuffling method (Zhang and Geng, 2012) การสร้าง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลจากไซโลสและกลูโคสได้ความเข้มข้นสูง จากการทำ genome shuffling 3 รอบ วิธีการคือ สร้าง *S. cerevisiae* transformant 3 ชนิด คือ ทรานสฟอร์แมนต์ที่มี xylose reductase gene ทรานสฟอร์แมนต์ที่มี xylitol dehydrogenase gene และทรานสฟอร์แมนต์ที่มี xylukinase gene จากนั้นทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่างทรานสฟอร์แมนต์ ทั้ง 3 ชนิด โดยไม่ใช้ PGE และคัดเลือกฟิวแซนต์ที่มาใช้เป็น parental strain ในการทำ genome shuffling รอบถัดไป และทำซ้ำรวม 3 รอบ (Jingping *et al*., 2012) การทำเพิ่มความทนต่อ hard wood sulphite liquor (HW SSL) ของยีสต์ที่หมักเอทานอลจากน้ำตาลที่มี 5 คาร์บอน คือ *Schefferomyces stipitis* วิธีการคือ นำ *S. stipitis* มาทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี หรืออัลตราไวโอเลต 3 รอบ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทน HW SSL เพิ่มขึ้น ขั้นต่อไปใช้สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้เป็น parental strain ในการทำ mating นำ diploid cell ที่ได้มาเหนี่ยวนำให้สร้างแอสโคสปอร์ แยกแอสโคสปอร์ไปเลี้ยง และคัดเลือกรีคอมบิแนนต์ที่ทน HW SSL สูงขึ้น (Bajwa *et al*., 2010) และการเพิ่มการสร้างสารที่ให้กลิ่นของ *Hansenula anomala* ในซีอิ้ว จากการทำ genome shuffling วิธีการคือ ทำการกลายพันธุ์ โดยใช้สายพันธุ์กลายที่ได้เป็น parental strain สำหรับการทำโปรโตฟลาสต์ฟิวชัน ที่ใช้ PEG เป็นสารเหนี่ยวนำ (Cao *et al*., 2010) นอกจากนั้นยังมีรายงานการปรับปรุงพันธุกรรมของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์อุตสาหกรรมโดยใช้ genome shuffling ร่วมกับ metabolic engineering (Wang *et al*., 2012)

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในอนุกรมวิธานและการจัดจำแนกยีสต์

วิธีการที่ใช้จำแนกประเภทและจัดจำแนกสปีชีส์โดยวิธีดั้งเดิม อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี ซึ่งเป็นการตรวจฟีโนไทป์ของเชื้อ เป็นวิธีการที่ใช้แรงงานมาก ใช้เวลานาน ไม่แม่นยำ และขาดความสามารถในการแยกชนิดที่ชัดเจน รวมทั้งอาจให้ผลการจัดจำแนกที่ผิดพลาดและมีข้อโต้แย้งมาก ความก้าวหน้าของชีววิทยาระดับโมเลกุลในระยะสิบปีที่ผ่าน มาทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาลักษณะของยีสต์ที่ระดับยีโนม ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในการอนุกรมวิธาน และจัดจำแนกสปีชีส์อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลช่วยแก้ปัญหาความไม่แม่นยำ และขจัดข้อโต้แย้งในการจัดจำแนกได้ (Kurtzman and Robnett, 1998; Fell *et al*., 2000; Lopandic and Prillinger, 2001) สำหรับวิธีการที่อาศัยการศึกษาระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ หรือปริมาณกัวนีนกับไซโทซีนในดีเอ็นเอ และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียส โดยการทำ DNA hybridization ทั้งสองวิธียังมีข้อจำกัด เนื่องจากไม่สามารถแยกสปีชีส์ที่มีพันธุกรรมหรือความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันได้ดีนัก ดังนั้นนักอนุกรมวิธานจึงได้หันความสนใจไปสู่การเปรียบเทียบระดับโมเลกุลอื่นๆ เช่น การเทียบโครโมโซมโดยใช้ pulsed field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์(nucleotide sequencing) ในบรรดาวิธีการต่าง ๆ การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน region หรือ domain หรือยีนต่างๆ เป็นวิธีการที่เป็นให้ความนำเชื่อถือมากกว่าวิธีอื่น เพราะไม่ว่าจะมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือมากสามารถพิสูจน์ได้ ดังนั้นวิธีการลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้เพื่อบอกความสัมพันธ์ในบรรดายีสต์ได้ (Valente *et al*., 1999)

สิ่งที่สำคัญในการใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์สำหรับจำแนกประเภทและจัดจำแนกยีสต์ คือการเลือกว่าจะนำบริเวณใดของยีโนมมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากยีโนมของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยส่วนที่มีวิวัฒนาการด้วยอัตราที่ต่างกัน มีผลทำให้ความสามารถในการแยกแตกต่างกัน การเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของ nuclear rRNA gene ใช้มากสำหรับการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อย หรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมาก ที่เรียกว่าบริเวณผันแปร (variable region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิง เพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (Valente *et al*., 1999) สำหรับ rRNA gene หรือ rDNA ของ budding yeast มี 1 rRNA gene cluster อยู่แบบ linear array ที่มี rRNA gene ที่ซ้ำๆ กัน 150-200 ชุด ใน *S. cerevisiae* อยู่บนโครโมโซมเส้นที่ 12 ใน rRNA gene แต่ละชุดมี 2 transcribed gene คือ (1) 35S rRNA gene และ (2) 5S rRNA gene นอกจากนั้นมี 2 non-transcribed region (NTS1 และ NTS2) สำหรับ 35S rRNA gene จะถอดรหัสโดย RNA polymerase I ได้ 35S RNA transcript หรือ pre-rRNA 1 โมเลกุล ที่จะเปลี่ยนเป็น mature rRNAs คือ small subunit (SSU), 5.8S และ large subunit (LSU) rRNA ส่วน 5S rRNA gene จะถอดรหัสโดย RNA polymerase III ซึ่งการที่ยีสต์มี 5S rRNA gene อยู่ใน rRNA gene แต่ละชุด ทำให้แตกต่างจากยูคารีโอตชั้นสูงอื่นๆ ในบรรดา nuclear rRNA gene นั้น D1/D2 domian ของ large subunit (LSU) rRNA gene ช่วยในการแยกสปีชีส์ของยีสต์ส่วนใหญ่ได้ดีกว่าบริเวณอื่น ในขณะที่ยีสต์บางกลุ่ม internal transcribed spacer (ITS) region ในขณะนี้ D1/D2 domian และ ITS region เป็น sequence-based ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักสำหรับการจัดจำแนกยีสต์อย่างรวดเร็ว

D1/D2 domian มีขนาด 500-600 นิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ LSU rRNA gene เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ความแตกต่างในบริเวณนี้พอเพียงที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ หลักการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ใน D1/D2 domian คือ ถ้ายีสต์ 2 สายพันธุ์มีการแทนที่ (substitution) นิวคลีโอไทด์เท่ากับ 6 นิวคลีโอไทด์ (1%) หรือมากกว่า 2 สายพันธุ์นั้นถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และถ้า 2 สายพันธุ์มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 การแทนที่นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก ๆ (sister species) (Kurtzman and Robnett, 1998)



รูปที่ 1 แสดง D1/D2 domian และ ITS region ของ LSU rRNA gene ของยีสต์

สำหรับ ITS region อยู่ระหว่างปลายด้าน 3′ ของ SSU rRNA gene กับปลายด้าน 5′ ของ LUS rRNA gene โดย ITS1 region และ ITS2 region แยกจากกันโดยมี 5.8S rRNA gene แทรกอยู่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS นิยมใช้สำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ ราอื่น และพืช โดยใช้มากเพื่อกำหนดสปีชีส์ของราเส้นใย ความยาวของ ITS ในสายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันค่อนข้างคงที่แต่ลำดับของเบสอาจผันแปร ข้อเสียอย่างหนึ่งสำหรับการใช้ลำดับเบสของ ITS นี้คือความยากในการเทียบลำดับเบสที่เหมาะสมเนื่องจากมีความแตกต่างในอัตราที่สูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ลำดับเบสของบริเวณ ITS เพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Valente *et al*., 1999; Fell *et al*., 2000) ในยีสต์ ITS region มักใช้ร่วมกับ D1/D2 domian ในการจัดจำแนกยีสต์ยีสต์บางสกุล (Kurtzman *et al*., 2011)

จากการจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domian ของ LSU rRAN gene และของ D1/D2 domian กับ ITS region ร่วมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ในระยะประมาณ 5 ปีที่ผ่านมาคณะของ สาวิตรี ลิ่มทอง ได้จัดจำแนกยีสต์และรายงานยีสต์จากแหล่งต่างๆ จำนวนมากและได้ค้นพบและเสนอยีสต์สปีชีส์ใหม่มากกว่า 50 สปีชีส์ เช่น *Candida phayaonensis* sp. nov., *C. sakaeoensis* sp. nov., *C. sirachaensis* sp. nov., *C. uthaithanina* sp. nov., *Metschnikowia lopburiensis* sp. nov., *M. saccharicola* sp. nov., *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov., *O. wangdongensis* sp. nov., *Wickerhamomyces siamensis* sp. nov., *W. xylosica* sp. nov., *Yamadazyma phyllophila* sp. nov. และ *Y. siamensis* sp. nov. (Kaewwichian *et al*., 2012; 2013 a; 2013b; Limtong *et al*., 2011; 2012a; 2012b; 2013)

เอกสารอ้างอิง

Bajwa, P.K,, D. Pinel, V.J. Martin, J.T. Trevors and H. Lee. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. J. Microbiol. Methods. 2010. 81: 179-186.

Cao, X., Q. Song, C. Wang and L. Hou. Genome shuffling of *Hansenula anomala* to improve flavour formation of soy sauce. World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. 28: 1857-1862.

Fell, J.W., T. Boekhout, A. Fonesca, G. Scorzetti, and A.S. Tallman. Biodiversity and systematics of basdiomycetous yeasts determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. 50: 1351-1371.

Hou, L. Novel methods of genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett. 2009. 31: 671-677.

Jingping, G., S. Hongbing, S. Gang, L. Hongzhi and P.A. Wenxiang. A genome shuffling-generated *Saccharomyces cerevisiae* isolate that ferments xylose and glucose to produce high levels of ethanol. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. 39:777-787.

Kaewwichian R., W. Yongmanitchai, H. Kawasaki and S. Limtong. *Metschnikowia saccharicola* sp. nov. and *Metschnikowia lopburiensis* sp. nov., two novel yeast species isolated from phylloplane in Thailand. Antonie van Leeuwenhoek. 2012. 102: 743-751.

Kaewwichian, R., H. Kawasaki and S. Limtong. *Wickerhamomyces siamensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from phylloplane in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013a. 63: 1568-1573.

Kaewwichian, R., W. Yongmanitchai, H. Kawasaki, P.-H. Wang, S.-H. Yang and S. Limtong. *Yamadazyma siamensis* sp. nov., *Yamadazyma phyllophila* sp. nov. and *Yamadazyma paraphyllophila* sp. nov., three novel yeast species isolated from phylloplane in Thailand and Taiwan. Antonie van Leeuwenhoek. 2013b. 103: 777-788.

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

Kurtzman, C.P., J.W. Fell and T. Boekhout. Gene sequence analyses and other DNA-based method for yeast species recognition. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) The yeasts, a taxonomic study, 5th edn. Elsevier, Amsterdam. 2011. vol 2, pp 137-144.

Limtong S., R. Kaewwichian and M. Groenewald. *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov. and *Ogataea wangdongensis* sp. nov., two novel methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand. Antonie van Leeuwenhoek. 2013. 103: 551-558.

Limtong, S., N. Koowadjanakul, S. Jindamorakot, W. Yongmanitchai, T. Nakase. *Candida sirachaensis* sp. nov. and *Candida sakaeoensis* sp. nov. two anamorphic yeast species from phylloplane in Thailand. Antonie van Leeuwenhoek. 2012b. 102: 221-229.

Limtong, S., S. Jindamorakot, S. Am-In, R. Kaewwichian, S. Nitiyon, W. Yongmanitchai and T. Nakase. *Candida uthaithanina* sp. nov., an anamorphic yeast species in *Nakaseomyces* clade isolated in Thailand. Antonie van Leeuwenhoek. 2011. 99: 865-871.

Limtong, S., S. Nitiyon, R. Kaewwichian, S. Jindamorakot, Am-In, S., and W. Yongmanitchai. *Wickerhamomyces xylosica* sp. nov. and *Candida phayaonensis* sp. nov., two novel xylose-assimilating yeast species isolated in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012a. 62: 2786-2792.

Lopandic, K. and H. Prillinger. Genotypic identification and phylogenetic characteriza-tion of yeasts from Austrian dairy products. Fachgruppe Mikrobiologice und Molekularbiologir. 2001. 117-118

Shi, D.J, C.L. Wang and K.M. Wang. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. 36: 139-147.

Valente, P., J.P. Ramos and O. Leoncini. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. Can. J. Microbiol. 1999. 45: 949-958.

Wang H, Hou L. Genome shuffling to improve fermentation properties of top-fermenting yeast by the improvement of stress tolerance. Food Sci. Biotechnol. 2010. 19: 145-150.

Wang, P.M., D.Q. Zheng, T. Z. Liu, X.L. Tao, M. G .Feng, H. Min, X.H. Jiang and X.C. The combination of glycerol metabolic engineering and drug resistance marker-aided genome shuffling to improve very-high-gravity fermentation performances of industrial Saccharomyces cerevisiae. Bioresour. Technol. 2012. 108: 203-210.

Zhang, W. and A. Geng. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recom-binant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. Biotechnol. Biofuels. 2012. 5: 46.

Zheng, D.Q., X.C. Wu, P.M. Wang, X.Q., X.Q. Chi, X.L. Tao, P. Li, X.H. Jiang and Y.H. Zhao. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011. 38: 415-422