# ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์จากลูกแป้งเหล้าในจังหวัดเชียงใหม่

# Diversity and Genetic Relationship of Ethanol Tolerant Yeasts Isolated from Rice Wine Starters (Loog-Pang) in Chiang Mai Province, Thailand

ศรัณย์ จีนะเจริญ* และวีรพงษ์ จันทะชัย

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่*

*ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300*

Saran Cheenacharoen* and Weerapong Juntachai

*Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University,*

*Chang Phueak, Muang, Chiang Mai, 50300*

**บทคัดย่อ**

การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 35 ไอโซเลท จาก 9 แหล่ง โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S rDNA-ITS2 ของ ribosomal DNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อจำแนกสายพันธุ์ พบยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii* และ *Candida glabrata* จำนวน 21, 11 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbour-joining โดยใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 2,000 จากโปรแกรม MEGA 7.0.18 สามารถจัดกลุ่มของ *S. cerevisiae* และ *P. kudriavzevii* ได้ 3 และ 2 กลุ่ม ตามลำดับ แต่ไม่สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *C. glabrata* แบบมีค่า bootstrap ได้ และพบว่ายีสต์จากลูกแป้งเหล้าของแต่ละแหล่งผลิตที่อยู่ต่างอำเภอมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน แต่มีตัวอย่าง *C. glabrata* จำนวน 3 ไอโซเลท จากอำเภอสันทรายที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

**คำสำคัญ :** ยีสต์ทนแอลกอฮอล์; ลูกแป้งเหล้า; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ITS; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

**Abstract**

The aim of this study was to analyze the diversity and genetic relationship of ethanol tolerant yeasts isolated from rice wine starters (Loog-pang) in Chiang Mai province, Thailand. In total, 35

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** scheenacharoen@gmail.com

isolates from 9 samples of Loog-pang were identified by polymerase chain reaction (PCR) technique. The internal transcribed spacer 1 (ITS1) and ITS2 regions and the 5.8S ribosomal DNA (rDNA) region of the yeasts were amplified by using universal primers ITS1 and ITS4. According to the PCR product sequence, 21, 11, and 3 isolates were identified as *Saccharomyces cerevisiae, Pichia kudriavzevii,* and *Candida glabrata,* respectively. A phylogenetic analysis using neighbour-joining method was conducted in MEGA 7.0.18 using 2,000 replication (bootstrap). The phylogram of *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* strains were divided into 3 and 2 groups, respectively, but the *C. glabrata* phylogram with bootstrap could not be carried out. Even though the results demonstrated that the yeasts from each sample of Loog-pang were genetically closely related but three isolates of *C. glabrata* from same district (San-sai) showed a high genetic diversity.

**Keywords:** ethanol tolerant yeast; rice wine starter; genetic relationship; ITS; DNA marker

## 1. บทนำ

การศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ของแต่ละท้องถิ่น มีประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิมและรักษาคุณภาพสุรา สำหรับประเทศที่มีชื่อเสียงด้านอุตสาหกรรมไวน์และเบียร์ ได้มีการศึกษาด้านความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ในแต่ละท้องถิ่นโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาอย่างแพร่หลาย เพื่อคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติพิเศษ เนื่องจากสายพันธุ์ยีสต์มีผลโดยตรงต่อคุณภาพไวน์ที่ผลิต [1]

การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เป็นเทคนิคอย่างง่ายในการวิเคราะห์ตำแหน่งต่าง ๆ บน DNA เช่น delta sequence interspersed regions, chromosomal polymorphisms, mitochondrial DNA (mtDNA), microsatellite เพื่อศึกษาและจัดกลุ่มสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ใช้ผลิตไวน์ พบว่าสามารถใช้วิเคราะห์ในการระบุสายพันธุ์ยีสต์ได้ [2] แม้ว่า PCR-RFLP จะเป็นที่นิยม แต่ในกรณีที่ต้องการความแม่นยำสูงจำเป็นต้องอาศัยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง ซึ่งบริเวณที่นิยมนำมาใช้อ้างอิง คือ บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของยีน ribosomal DNA ที่มีการเรียงตัวของยีนซ้ำ ๆ กัน (tandem repeat) บน genomic DNA [3] ซึ่งแต่ละส่วนของ rDNA จะมีอัตราความแปรผันที่แตกต่างกัน โดยบริเวณที่เป็น coding region ของ rDNA ได้แก่ 18S, 5.8S และ 28S จะมีการอนุรักษ์ลำดับเบสไว้สูงมาก ในขณะที่พบความผันแปรของ ITS region ระหว่างสปีชีส์ค่อนข้างมาก แต่มีการอนุรักษ์ในกลุ่มสปีชีส์เดียวกันสูง ดังนั้นจึงนิยมใช้ ITS region ในการเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในกลุ่มใกล้เคียงกันหรือ sibling species [4,5]

สำหรับประเทศไทยนั้น ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งที่มีความเป็นไปได้สูงที่อาจมีการแลกเปลี่ยนสายพันธุ์จุลินทรีย์ระหว่างแหล่งใกล้เคียงทั้งทางตรงและทางอ้อมในขั้นตอนการผลิตลูกแป้ง จากการซื้อขายแลกเปลี่ยนสมุนไพรหรือเครื่องเทศระหว่างชุมชน ซึ่งจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์จะปนเปื้อนมากับสมุนไพรนั้น และอาจมาแทนที่จุลินทรีย์ดั้งเดิมที่มีอยู่ในท้องถิ่นนั้นได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ยีสต์จึงมีประโยชน์ที่จะช่วย

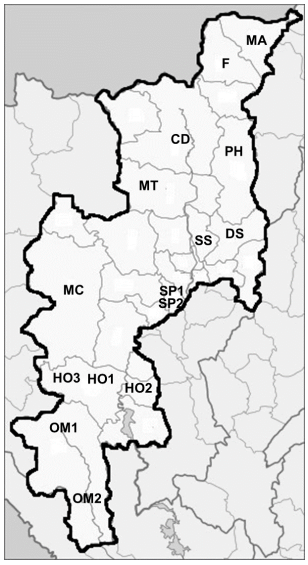
ให้แต่ละท้องถิ่นสามารถอนุรักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิมและรักษาคุณภาพหัวเชื้อลูกแป้งไว้ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่พบในลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับสายพันธุ์ของยีสต์ในลูกแป้งเหล้าของจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการจัดการและอนุรักษ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลถึงรสชาติและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในอนาคต

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 การคัดแยกยีสต์ทนแอลกอฮอล์จากลูกแป้งเหล้า

ลูกแป้งเหล้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง จาก 11 อำเภอ ในจังหวัดเชียงใหม่ (รูปที่ 1) โดยนำตัวอย่างลูกแป้งเหล้าแต่ละตัวอย่างบดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำผงลูกแป้งเหล้า 1 g ไปละลายในน้ำกลั่น 10 ml หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางด้วยวิธี 10-fold serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น $10^{-1}$, $10^{-2}$ และ $10^{-3}$ เท่า จากนั้นนำตัวอย่างจากแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 µl มา spread ลงบนอาหาร YPD-ethanol agar [1 % (w/v) yeast extract, 2 % (w/v) bacto peptone, 2 % (w/v) glucose, ethanol 15 % (v/v)] แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่สามารถทนแอลกอฮอล์ได้ในระดับ 15 % (v/v) ที่มีลักษณะสีและรูปร่างอย่างเดียวกันจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดละ 3-6 โคโลนีจากแต่ละตัวอย่างลูกแป้ง เพื่อนำไปตรวจสอบสายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อไป

### 2.2 การสกัด genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR




**รูปที่ 1** แผนที่แสดงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของตัวอย่างลูกแป้งเหล้าจากแต่ละอำเภอ (MA: อ.แม่อาย, F: อ.ฝาง, CD: อ.เชียงดาว, PH: อ.พร้าว, MT: อ.แม่แตง, SS: อ.สันทราย, DS: อ.ดอยสะเก็ด, MC: อ.แม่แจ่ม, SP: อ.สันป่าตอง, HO: อ.ฮอด, OM: อ.อมก๋อย)

นำยีสต์ทนแอลกอฮอล์แต่ละไอโซเลทมา streak บนอาหาร YPD agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไปสกัด genomic DNA โดยละลายเซลล์ยีสต์ใน isolation buffer [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 1 % (w/v)] ปริมาตร 200 µl เติม glass beads และ 200 µl phenol-chloroform (1 : 1) เขย่าอย่างแรงให้เซลล์แตกด้วย vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใส 200 µl ใน micro tube หลอดใหม่แล้วเติม 10 µl 5 M NaCl และ 500 µl ethanol นำไปแช่เย็นที่ -20 °C หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อให้ DNA ตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

ละลายตะกอน genomic DNA ที่ได้ด้วย TE buffer 50 µl เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ℃

สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR ใช้ universal primer ได้แก่ ITS1 (5′-TCCGTAG GTGAACCTGCGG-3′) และ ITS4 (5′-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3′) [6] ด้วยเอนไซม์ *Taq* polymerase (Vivantis, Malaysia) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยกำหนดให้ pre-denaruation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ซ้ำขั้นตอน denaturation- annealing- extension ดังกล่าว จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

**2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสายพันธุ์ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์**

โดย purification ชิ้นส่วน DNA ที่เป็นผลผลิตจาก PCR ด้วย GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ หลังจากนั้นส่งชิ้นส่วน DNA เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ($1^{st}$ BASE, Singapore) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ระบุสายพันธุ์ยีสต์โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบจากค่า max score, total score และ identity ที่ได้อันดับสูงสุด หรือมีค่า max score สูงสุด

**2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์แต่ละไอโซเลทมาเปรียบเทียบการจัดเรียง (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม MUSCLE (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbour-joining โดยโปรแกรม MEGA 7.0.18 (http://www.megasoftware.net) โดยทำซ้ำ 2000 ครั้ง (bootstrap)

## 3. ผลการทดลอง

**3.1 การคัดแยกยีสต์ทนแอลกอฮอล์จากลูกแป้งเหล้า**

ลูกแป้ง 15 ตัวอย่าง พบโคโลนีของยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่สามารถเจริญบนอาหาร YPD-ethanol agar จำนวน 9 ตัวอย่าง จาก 6 อำเภอ ได้แก่ แม่อาย พร้าว ดอยสะเก็ด สันทราย ฮอด และอมก๋อย แต่ 6 ตัวอย่าง ไม่พบการเจริญของยีสต์ใด ๆ บนอาหาร YPD-ethanol agar สำหรับสัณฐานวิทยาของโคโลนียีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่คัดแยกมี 2 ลักษณะ คือ ชนิดขอบเรียบ ผิวนูนเรียบ สีขาว จำนวน 11 โคโลนี และชนิดขอบหยัก ผิวนูนไม่เรียบ สีขาว จำนวน 24 โคโลนี เมื่อสังเกตลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มี 3 ลักษณะ คือ เซลล์ชนิดกลม ชนิดรี และชนิดสายรา (รูปที่ 2)

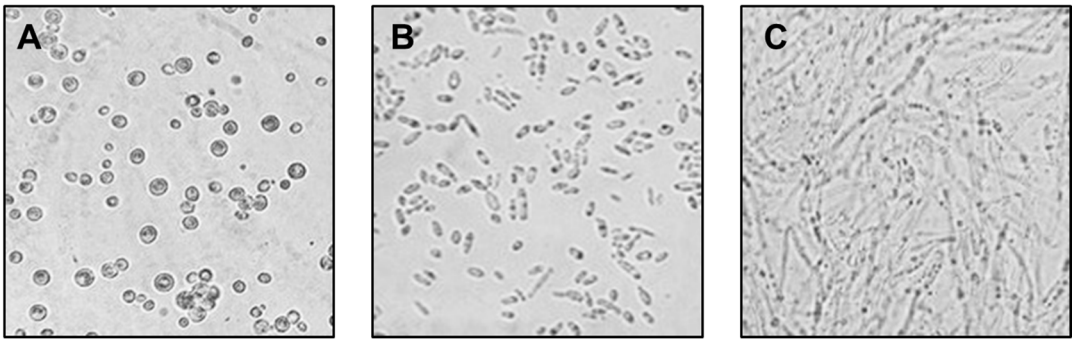
**3.2 การระบุสายพันธุ์ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์**

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของยีสต์ทนแอลกกอฮอล์ จำนวน 35 ไอโซเลท ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์มีความคล้ายคลึงกับ *S. cerevisiae, Pichia* sp. (*P. kudriavzevii*) และ *C. glabrata* จำนวน 21, 11 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์แต่ละไอโซเลทมีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล 98-100% (ตารางที่ 1)

**3.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์**

**ตารางที่ 1** ผลการระบุสายพันธุ์จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S DNA-ITS2 ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์จากลูกแป้งเหล้า

| Isolates | Genus | Species | Strain | Identity (%) |
|---|---|---|---|---|
| MA-1 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| MA-2 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| MA-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | YJM1592 | 100 |
| MA-4 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | YJM1592 | 99 |
| MA-5 | *Pichia* | *kudriavzevii* | DMic165169 | 100 |
| MA-6 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | YJM1592 | 100 |
| PH-1 | *Pichia* | *kudriavzevii* | B187B | 98 |
| PH-2 | *Pichia* | *kudriavzevii* | KDLYL17-1 | 100 |
| PH-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| SS-1 | *Candida* | *glabrata* | 11H4032 | 99 |
| SS-2 | *Candida* | *glabrata* | M356B | 99 |
| SS-3 | *Candida* | *glabrata* | CNRMA7.1370 | 99 |
| DS-1 | *Pichia* | sp. | AQGWD7 | 99 |
| DS-2 | *Pichia* | *kudriavzevii* | - | 99 |
| DS-3 | *Pichia* | sp. | AQGWD7 | 99 |
| HO1-1 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 100 |
| HO1-2 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| HO1-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 99 |
| HO1-4 | *Pichia* | *kudriavzevii* | - | 99 |
| HO1-5 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | YJM1592 | 100 |
| HO1-6 | *Pichia* | *kudriavzevii* | AUMC10288 | 99 |
| HO2-1 | *Pichia* | *kudriavzevii* | DMic165169 | 100 |
| HO2-2 | *Pichia* | *kudriavzevii* | - | 100 |
| HO2-3 | *Pichia* | *kudriavzevii* | - | 99 |
| HO2-4 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 100 |
| HO2-5 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 100 |
| HO3-1 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | YJM1592 | 100 |
| HO3-2 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 99 |
| HO3-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 99 |
| OM1-1 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 100 |
| OM1-2 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| OM1-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 99 |
| OM2-1 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | P1 | 100 |
| OM2-2 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | ATCC9080 | 100 |
| OM2-3 | *Saccharomyces* | *cerevisiae* | - | 99 |



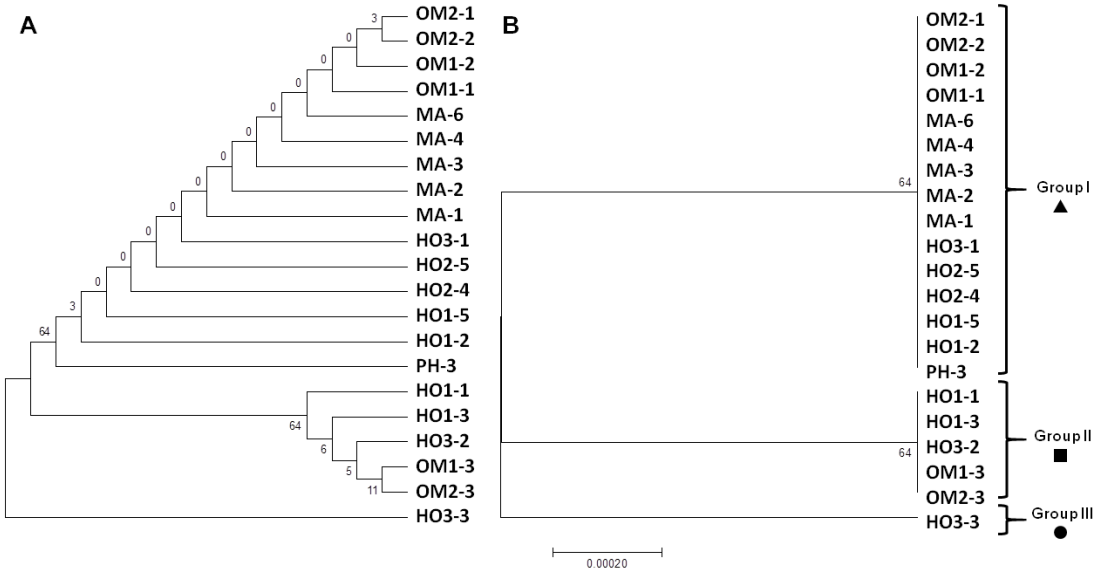

**รูปที่ 2** ลักษณะสัณฐานของเซลล์ยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า), A: ชนิดกลม (ไอโซเลท OM2-1), B: ชนิดรี (ไอโซเลท DS-2), C: ชนิดสายรา (ไอโซเลท HO2-1)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์มาวิเคราะห์ความหลากรูป (polymerphism) โดยmultiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม MUSCLE พบว่าระหว่างแต่ละไอโซเลทของยีสต์ *S. cerevisiae* มีการอนุรักษ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ค่อนข้างสูง โดยพบ polymorphism เพียง 2 รูปแบบ ได้แก่ pyrimidine transition และ transversion เพียงอย่างละ 1 ตำแหน่ง ในขณะที่ *P. kudriavzevii* และ *C. glabrata* พบตำแหน่งและรูปแบบของ polymorphism มากกว่า โดยเฉพาะ transversion ที่พบถึง 5 และ 7 ตำแหน่ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ความหลากรูป (polymorphism) ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์แต่ละสปีชีส์ (ตัวเลขอารบิกในวงเล็บแสดงจำนวนไอโซเลท)

| Types of mutation | Organisms | | |
|---|---|---|---|
| | *S. cerevisiae* (21) | *P. kudriavzevii* (11) | *C. glabrata* (3) |
| InDel | 0 | 3 | 2 |
| Purine transition | 0 | 2 | 2 |
| Pyrimidine transition | 1 | 0 | 1 |
| Transversion | 1 | 5 | 7 |

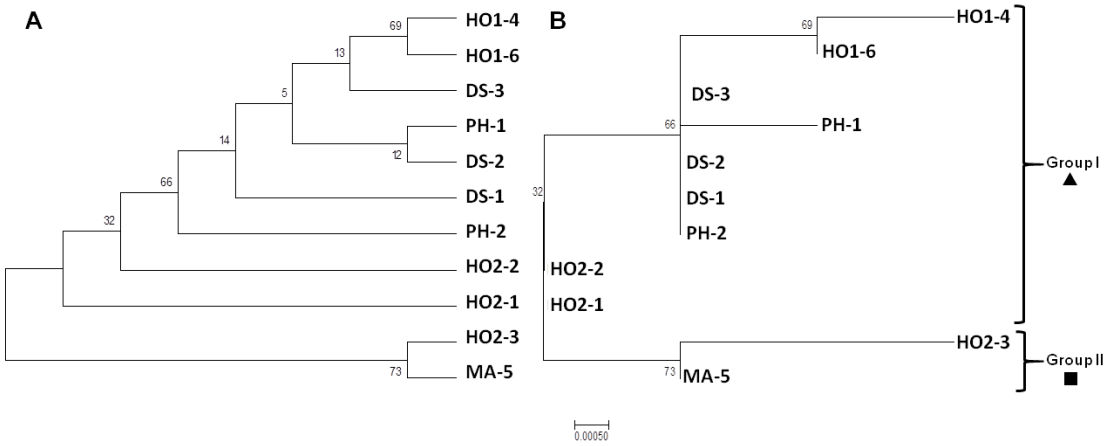
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0.18 เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างยีสต์ *S. cerevisiae* ได้เป็น 3 กลุ่ม โดย group I พบว่ามีการกระจายตัวทั่วจังหวัดเชียงใหม่ตั้งแต่เหนือสุดที่อำเภอแม่อายจนถึงใต้สุดที่อำเภออมก๋อย แต่ group II และ III พบเฉพาะในอำเภอทางตอนใต้ของจังหวัดเชียงใหม่คือ อำเภอฮอดและอำเภออมก๋อยเท่านั้น (รูปที่ 3)

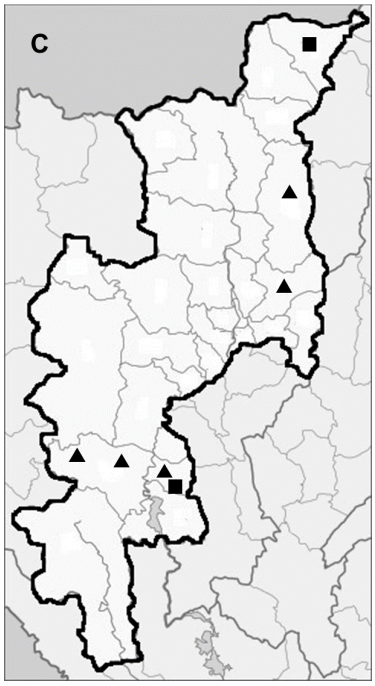



**รูปที่ 3** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ทนแอลกอฮอล์ (เลขอารบิกบนแผนภูมิแสดงค่าความเชื่อมั่นจากการทำ bootstrap จำนวน 2,000 ครั้ง), A: cladogram, B: phylogram, C: การกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบยีสต์

สำหรับยีสต์ *P. kudriavzevii* สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม โดย group I มีการกระจายตัวใน 5 แหล่งผลิตจาก 3 อำเภอ ในจังหวัดเชียงใหม่ เหนือสุดที่อำเภอพร้าวและใต้สุดที่อำเภอฮอด และยีสต์ group II พบเพียง 2 แหล่งคือ อำเภอฮอดและอำเภอแม่อาย (รูปที่ 4)

สำหรับยีสต์ *C. glabrata* พบได้น้อยสุดเพียง 3 ไอโซเลท เท่านั้น จึงไม่สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบใช้ bootstrap ได้ (แผนภูมิไม่มีค่า bootstrap) นอกจากนี้แหล่งผลิตที่พบยีสต์ทนแอลกอฮอล์สปีชีส์นี้มีเพียงแหล่งเดียวเท่านั้นคือ อำเภอสันทราย เท่านั้น (รูปที่ 5)



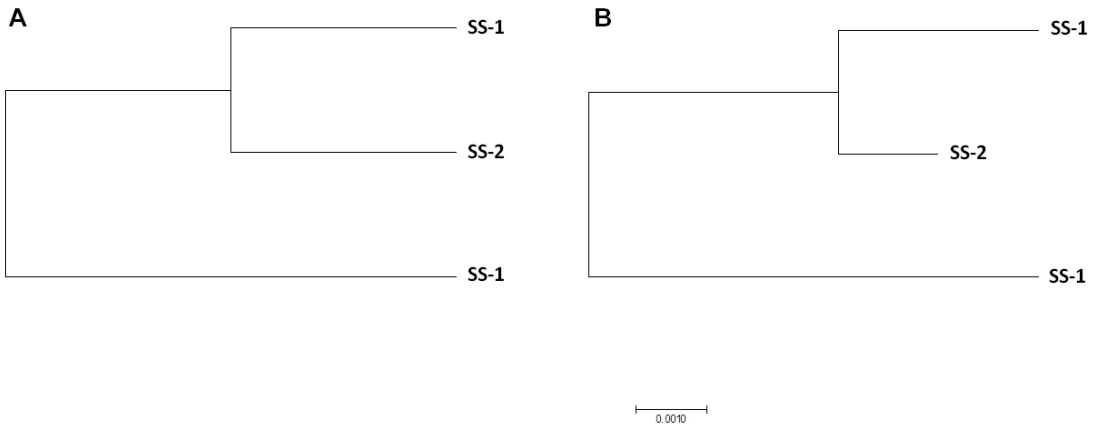




**รูปที่ 4** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบของยีสต์ *P. kudriavzevii* ที่ทนแอลกอฮอล์ (เลขอารบิกบนแผนภูมิแสดงค่าความเชื่อมั่นจากการทำ bootstrap จำนวน 2,000 ครั้ง), A: cladogram, B: phylogram, C: การกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบยีสต์

เมื่อดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยรวมของยีสต์ทุกไอโซเลท สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม ตามสปีชีส์ของยีสต์ทนแอลกอฮอลทั้ง 3 สปีชีส์ โดย *S. cerevisiae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. glabrata* มากกว่า *P. kudriavzevii* (รูปที่ 6)

## 4. วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดแยกยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่สามารถเจริญภายใต้เอทานอลที่ความเข้มข้น 15 % (v/v) พบว่าลูกแป้งเหล้าเพียงบางแหล่งเท่านั้นที่มียีสต์เหล่านี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกแป้งเหล้าของแต่ละแหล่งมีจุลินทรีย์หัวเชื้อที่มีสมบัติทนต่อแอลกอฮอล์แตกต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นเอทานอล 15 % (v/v) เป็นความเข้มข้นที่ยีสต์ส่วนมากจะไม่สามารถเจริญได้ [7,8] และเป็นความเข้มข้นที่ผู้ผลิตไวน์ใช้กำหนดยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทนแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการผลิตไวน์ [9] ซึ่งจากผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ทนแอลกอฮอล์จากลูกแป้งเหล้าจากแหล่งต่าง ๆ พบทั้ง

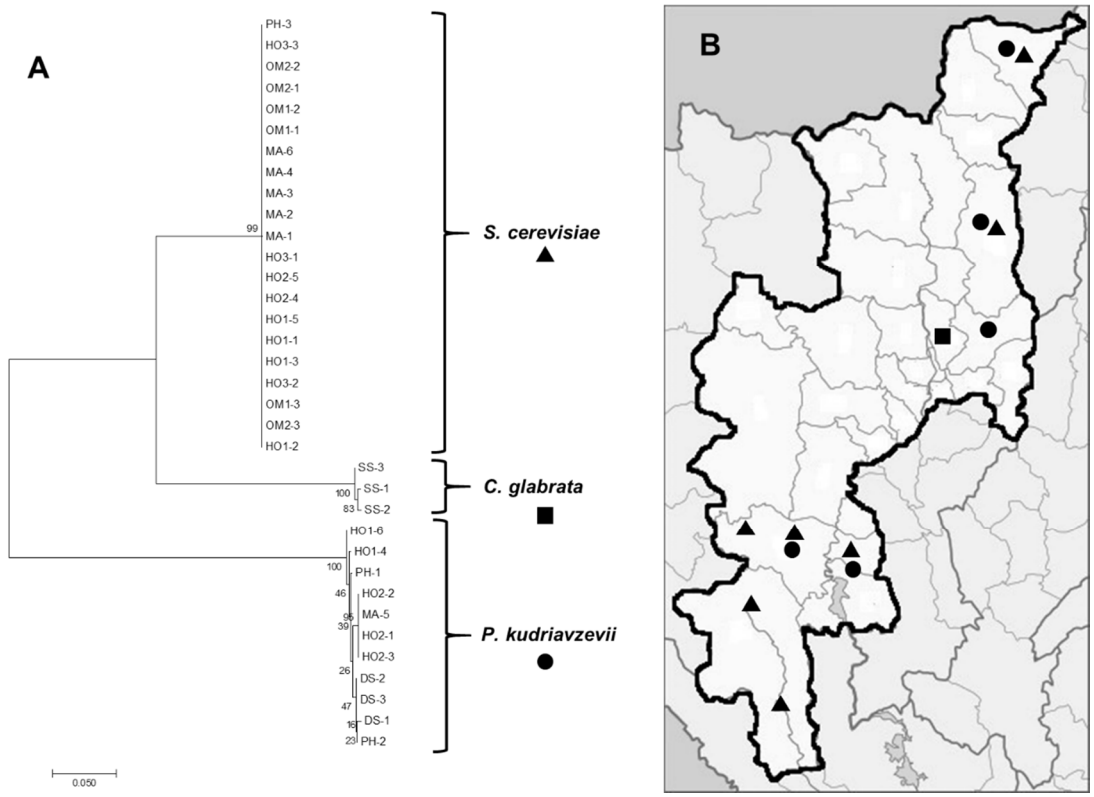



**รูปที่ 5** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบของยีสต์ *C. glabrata* ที่ทนแอลกอฮอล์, A: cladogram, B: phylogram, C: การกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบยีสต์

ยีสต์ *Saccharomyces* และยีสต์ non-*Saccharomyces* คือ *Pichia* และ *Candida* ซึ่งผลการจำแนกชนิดยีสต์นี้คล้ายคลึงกับชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งเหล้าที่เรียกว่า Hamei ของรัฐมณีปุระ (Manipur) ประเทศอินเดีย โดย Hamei เป็นหัวเชื้อผสมแบบแห้งที่ปั้นเป็นแผ่นแบน ๆ คล้ายลูกแป้งเหล้าของไทย และยังใช้หมักข้าวเหนียวสุกให้เป็นสาโท (rice wine) ที่เรียกว่า Atingba อีกด้วย ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP บริเวณ ITS1-5.8S DNA-ITS2 พบยีสต์หลายชนิดในจีนัส *Saccharomyces, Pichia* และ *Candida* เช่นเดียวกัน [10] อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้พบสปีชีส์ของยีสต์ในกลุ่ม non-*Saccharomyces* ในลูกแป้งเพียงจีนัสละ 1 สปีชีส์ เท่านั้น ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ไม่มีในรายงานวิจัยชนิดของจุลินทรีย์ใน Hamei ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากส่วนประกอบลูกแป้งที่แตกต่างกันและวิธีการคัดแยกยีสต์ที่ไม่ได้คัดเลือกเฉพาะยีสต์ทนแอลกอฮอล์ดังเช่นในงานวิจัยนี้ แต่ทั้งสปีชีส์ *C. glabrata* และ *P. kudriavzevii* ที่พบในงานวิจัยนี้ต่าง

ก็เป็นยีสต์ที่มีสมบัติทนต่อแอลกอฮอล์สูงและมีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ สามารถพบร่วมกับ *S. cerevisiae* ในการหมักไวน์ และบางสายพันธุ์มีศักยภาพสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม bioethanol อีกด้วย [11,12]

สำหรับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ทนแอลกอฮอล์นั้น เป็นที่น่าสนใจว่ายีสต์กลุ่ม *S. cerevisiae* มีรูปแบบของความหลากรูปที่คล้ายคลึงกันมาก (ตารางที่ 2) โดยเมื่อดูผลเปรียบเทียบกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า group I และ group II แตกต่างกันจาก transition ส่วนตัวอย่าง HO3-3 (group III) แตกต่างจากตัวอย่างอื่นด้วย transversion แต่เมื่อแบ่งเป็น 3 กลุ่ม และพิจารณาเปรียบเทียบกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ พบว่า group I เป็น *S. cerevisiae* พบได้ตั้งแต่ตอนเหนือถึงตอนใต้ของจังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่ group II และ group III มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นยีสต์เฉพาะท้องถิ่น เพราะพบในลูกแป้งของอำเภอฮอดและอมก๋อยเท่านั้น นอกจากนี้ยีสต์ *P. kudriavzevii* แม้ว่าจะมีรูปแบบ polymorphism ที่หลากหลายกว่า แต่เมื่อจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ที่มีการกระจายตัวคล้ายกับ *S. cerevisiae* คือ อำเภอที่พบยีสต์ *S. cerevisiae* ก็มักพบ *P. kudriavzevii* ด้วย และน่าสังเกตว่ายีสต์ 2 สปีชีส์ ของแหล่งผลิตลูกแป้งในอำเภอฮอดและพร้าวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทางสายพันธุ์ของยีสต์จากแหล่งดังกล่าว แม้ว่าแหล่งผลิตค่อนข้างอยู่ห่างไกลกันในทางภูมิศาสตร์ก็ตาม สำหรับ




**รูปที่ 6** แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบของยีสต์ที่ทนแอลกอฮอล์ทุกไอโซเลท (เลขอารบิกบนแผนภูมิแสดงค่าความเชื่อมั่นจากการทำ bootstrap จำนวน 2,000 ครั้ง), A: cladogram, B: phylogram, C: การกระจายตัวของแหล่งลูกแป้งที่พบยีสต์

*C. glabrata* พบ 3 ตัวอย่าง จากเพียงแหล่งเดียว คือ อำเภอสันทราย ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นยีสต์เฉพาะถิ่นเช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* group III แต่มีความแตกต่าง คือ พบความหลากรูปของ *C. glabrata* สูงกว่า *S. cerevisiae* โดยพบ mutation ของ *C. glabrata* 3 ตัวอย่าง ถึง 12 ตำแหน่ง ในขณะที่ *S. cerevisiae* 21 ตัวอย่าง พบการเกิด mutation เพียง 2 ตำแหน่ง เท่านั้น

## 5. สรุป

ยีสต์ทนแอลกอฮอล์ที่พบในลูกแป้งเหล้าในจังหวัดเชียงใหม่ เป็นยีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจังหวัดเชียงใหม่ แต่มีบางไอโซเลทที่มีความเป็นไปได้ที่เป็นยีสต์เฉพาะถิ่น ซึ่งการกระจายของยีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในท้องถิ่นต่าง ๆ นี้ สันนิษฐานได้ว่าเกิดจากการแลกเปลี่ยนวัตถุดิบในการทำลูกแป้งเหล้ากันระหว่างท้องถิ่น ทำให้ยีสต์ทนแอลกอฮอล์สายพันธุ์เดียวกันแพร่หลายไปในหลายแหล่งผลิต เพราะมีรายงานวิจัยของ Jeyaram และคณะ [13] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภูมิประเทศกับสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในลูกแป้งเหล้าของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย โดยตรวจสอบ DNA fingerprinting ของ mtDNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จาก phylogenetic tree ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ยีสต์ของรัฐมณีปุระ (Maneepura) และรัฐสิกขิม (Sikkim) แยกเป็น 2 กลุ่ม ชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ของ 2 รัฐ ที่มีแม่น้ำพรหมบุตร (Brahmaputra) คั่นกลาง ทำให้การแลกเปลี่ยนสิ่งของและผู้คนระหว่างรัฐเกิดได้น้อย สายพันธุ์เฉพาะถิ่นของแต่ละรัฐจึงถูกอนุรักษ์ไว้ได้ ดังนั้นในการอนุรักษ์ยีสต์สายพันธุ์เฉพาะถิ่นหรือยีสต์สายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษจึงควรพิจารณาความสัมพันธ์ทางภูมิศาสตร์ร่วมด้วย

## 6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ปีงบประมาณ 2559

## 7. รายการอ้างอิง

[1] Romano, P., 2003, Function of yeast species and strains in wine flavor, Int. J. Food Microbiol. 86: 169-180.

[2] Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M., 2004, Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains, FEMS Microbiol. Lett. 231: 19-26.

[3] Richard, G., Kerrest, A. and Dujon, B., 2008, Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72: 686-727.

[4] Kurtzman, C. P., 2015, Identification of food and beverage spoilage yeasts from DNA sequence analyses, Int. J. Food Microbiol. 213: 71-88.

[5] Ghindea, R., Csutak, O., Stoica, I., Ionescu, R., Soare, S., Pelinescu, D., Nohit, A.M., Creangă, O., Vassu, T., 2004, Molecular taxonomy techniques used for yeast identification, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol 49: 105-113.

[6] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, pp. 315-322, In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press,

Inc., New York.

[7] Ma, M. And Liu, Z.L., 2010, Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 829-845.

[8] Stanley, D. , Bandara, A. , Fraser, S. , Chambers, P.J. and Stanley G.A., 2010, The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol. 109: 13-24.

[9] Zoecklein, B. W. , Fugelsang, K. C. , Gump, B. H. and Nury, F. S. , 1995, Wine Analysis and Production, Kluwer Academic Publishers, New York.

[10] Jeyaram, K. , Singh, W. M. , Capece, A. and Romano, P., 2008, Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' – a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India, Int. J. Food Microbiol. 124: 115-125.

[11] Aponte, M. and Blaiotta, G. , 2016, Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG, Front. Microbiol. 7: 809.

[12] Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., 2009, Characterization of a spontaneous flocculation mutant derived from *Candida glabrata*: A useful strain for bioethanol production, J. Biosci. Bioeng. 107: 379-382.

[13] Jeyaram, K., Tamang, J.P., Capece, A. and Romano, P., 2011, Geographical markers for *Saccharomyces cerevisiae* strains with similar technological origins domesticated for rice- based ethnic fermented beverages production in North East India, Antonie Van Leeuwenhoek 100: 569-578.