219406

เสาวลักษณ์ ด่านสกุล 2552: การศึกษาเทคนิคโมเลกุลสำหรับการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ จากอาหารหมัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, Ph.D. 144 หน้า

ยีสต์ทั้งหมดจำนวน 25 ไอโซเลท แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก กระบวนการหมักสาโท และน้ำตาลเมา ถูกนำมาระบุสปีชีส์โดยการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนด้วยชุดทดสอบ API ID 32 C และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์จำนวน 14 ไอโซเลท ถูกระบุว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งไม่สามารถระบุโดยชุดทดสอบนี้ ถูกระบุโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าเป็นสปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98-99% สำหรับอีก 6 ไอโซเลทที่เหลือถูกระบุว่าเป็น *Candida tropicalis* (2), *Issatchenkia orientalis* (1) *Pichia caribbica/Candida fermentati* (2) และ *Pichia farinosa* (1) ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของไอโซเลทยีสต์ส่วนใหญ่ที่เปรียบเทียบ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลอยู่ในช่วง 98-99% จากนั้นลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalX และศึกษาความสัมพันธ์ของยีสต์แต่ละไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ phylogenetic โดยมีค่า bootstrab สนับสนุนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ ค่านี้ได้จากการคำนวณโดยวิธี neighbor joining พบว่า *Sc. cerevisiae* ทุกไอโซเลทถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่นเดียวกับกลุ่มของ *Sm. fibuligera*

นอกจากนี้ยังพบว่า *Sc. cerevisiae* ถูกพบเป็นสปีชีส์หลักในข้าวหมาก และกระบวนการหมักสาโทและน้ำตาลเมา ขณะที่ *Sm. fibuligera* ถูกพบเป็นสปีชีส์หลักในลูกแป้ง ยีสต์ *Sc. cerevisiae* 26 ไอโซเลท และ *Sm. fibuligera* 11 ไอโซเลท ซึ่งในจำนวนนี้รวมถึงสายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง จะถูกนำมาศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ โดยวิธีการวิเคราะห์ DHPLC ของ D1/D2 domain พบว่า *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* แสดง profile จำนวน 3 และ 4 รูปแบบ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ microsatellite และ mtDNA-RFLP พบว่าทั้ง 2 วิธีแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน ของ *Sc. cerevisiae* จำนวน 26 ไอโซเลทถึง 19 รูปแบบ เครื่องหมาย ISSR ถูกนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของ *Sm. fibuligera* โดยใช้ไพร์เมอร์ UBC จำนวน 8 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 80 แถบ มีขนาดประมาณ 300 ถึง 2000 คู่เบส ซึ่งสามารถแยก *Sm. fibuligera* ได้เป็น 7 กลุ่มอย่างชัดเจน จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าประสบความสำเร็จและเป็นอีกหลักฐานที่ใช้ในการสนับสนุนถึงความหลากหลายของยีสต์ทั้งระดับสปีชีส์ และต่ำกว่าสปีชีส์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ ในประเทศไทย ในงานวิจัยนี้ยังได้วิเคราะห์ผลการหมักเอธิลแอลกอฮอล์ของ *Sc. cerevisiae* และ ความสามารถในการย่อยแป้งของ *Sm. fibuligera* อีกด้วย

Saowalak Dansakul 2009: Study of Molecular Techniques for the Identification of Yeast Strains from Thai Fermented Food and Alcoholic Beverages. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Vichien Leelawatcharamas, Ph.D. 144 pages.

Twenty-five yeast isolates were taken from Loog-pang (mold bran starter), Kao-mag (alcoholic sweetened rice) and during Satho (traditional Thai rice wine) and coconut toddy fermentation process. Yeast isolates were identified by carbon compound assimilations using the API ID 32 C kit and by sequencing of their D1/D2 domain of 26S rDNA region. Fourteen isolates of *Sacharomyces cerevisiae* were identified whereas 5 isolates of *Saccharomycopsis fibuligera* could not be identified by this kit however, this species shows high homology when identified by sequence analysis. The 6 remaining isolates were identified as *Candida tropicalis* (2), *Issatchenkia orientalis* (1), *Pichia caribbica/Candida fermentati* (2) and *Pichia farinosa* (1). For most sequenced isolates homologies of 98-99% were obtained with sequences in GenBank. D1/D2 domain sequencing yielded approximately 600 bp region for alignment using ClustalX program. Bootstrap values from a phylogenetic analysis using neighbor joining method showed strong support. All *Sc. cerevisiae* isolates clustered together as the same result of the *Sm. fibuligera* group.

Sc. cerevisiae was found to be the dominant species for Kao-mag and the fermentation of Satho and coconut toddy, whereas *Sm. fibuligera* was found to be the dominant species for Loog-pang and Kao-mag. The intraspecies variations were examined by molecular DNA markers. Twenty-six isolates of *Sc. cerevisiae* and 11 isolates of *Sm. fibuligera* including referent strains were screened for polymorphism of DHPLC analysis of D1/D2 domain. Three and 4 different profiles were obtained for *Sc. cerevisiae* and *Sm. fibuligera* isolates, respectively. *Sc. cerevisiae* isolates were further differentiated by microsatellite and mtDNA-RFLP. Both markers produced 19 polymorphic profiles among the 26 isolates. ISSR marker was used to differentiate *Sm. fibuligera*. The patterns obtained by eight UBC (University of British Columbia) primers gave 80 reproducible amplified bands ranging from approximately 300 to 2000 bp. This marker could classify 11 isolates of *Sm. fibuligera* into 7 groups with clear profiles. This study provides addition evidence of a genetic separation. DNA markers used in this study could be successfully applied to study intra-specific variation and genetic variations in the yeast species from different kinds of food products in Thailand. This research also included a small survey for study of ethyl alcohol fermentation and amylolytic activity for *Sc. cervisiae* and *Sm. fibuligera*, respectively.