



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาเทคนิคโมเลกุลสำหรับการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ จากอาหารหมัก
และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย

Study of Molecular Techniques for the Identification of Yeast Strains from Thai
Fermented Food and Alcoholic Beverages

นามผู้วิจัย นางสาวเสาวลักษณ์ คำนสกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วีเชียร ลีลาวัชรมาศ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์หทัยรัตน์ อุไรรงค์, ประ.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเทคนิคโมเลกุลสำหรับการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ จากอาหารหมัก
และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย

Study of Molecular Techniques for the Identification of Yeast Strains
from Thai Fermented Food and Alcoholic Beverages

โดย

นางสาวเสาวลักษณ์ ด่านสกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2552

เสาวลักษณ์ คำนสกุล 2552: การศึกษาเทคนิคโมเลกุลสำหรับการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ จากอาหารหมัก และเครื่องดื่มน้ำแอลกอฮอล์ของไทย ปรินญาปริญญาคุณุภันฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ วิเชียร ลิลาวัชรมาศ, Ph.D. 144 หน้า

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

นอกจากนี้ยังพบว่า *Sc. cerevisiae* ถูกพบเป็นสปีชีส์หลักในข้าวหมาก และกระบวนการหมักสาโท และน้ำตาลเมา ขณะที่ *Sm. fibuligera* ถูกพบเป็นสปีชีส์หลักในลูกแป้ง ยีสต์ *Sc. cerevisiae* 26 ไอโซเลต และ *Sm. fibuligera* 11 ไอโซเลต 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 ไอโซเลตถึง 19 รูปแบบ เครื่องหมาย ISSR ถูกนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของ *Sm. fibuligera* โดยใช้ไพรเมอร์ 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. cerevisiae* and *Sm. fibuligera*, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร ลีลาวัชร
มาศ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ เจริญชัย และ ดร.หทัย
รัตน์ อุไรรงค์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการดำเนินงาน
วิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ นอกจากนี้ข้าพเจ้า
ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา
หงส์ตระกูล ที่กรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย
ตามลำดับ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลืออย่าง
ดียิ่งตลอดระยะเวลาในการทำงาน ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ สมาชิกชมรมต้นกล้า' 48 กรมวิชาการ
เกษตร ที่ให้แนวคิดดีๆ ในการร่วมกิจกรรมเพื่อส่วนรวม และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่เป็นกำลังใจใน
การเรียน และการทำงานอย่างดีเสมอมา และกราบขอบพระคุณ ครู อาจารย์ ที่ได้กรุณาดูแลอบรมสั่ง
สอน ให้ข้าพเจ้ามีความฝึกฝน หาความรู้ และให้แนวทางที่ดีในการดำรงชีวิต สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอ
มอบคุณความดี และผลอันพึงมีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แด่ทุกท่านที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ด้วยความ
เคารพ

เสาวลักษณ์ ด้านสกุล

พฤศจิกายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	28
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	45
ผล	45
วิจารณ์	111
สรุปและข้อเสนอแนะ	116
สรุป	116
ข้อเสนอแนะ	118
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	121
ภาคผนวก	132
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	133
ภาคผนวก ข การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ	137
ภาคผนวก ค ตารางแสดงการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ ISSR	138
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	144

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ยีสต์จากแหล่งรวบรวมจุลินทรีย์	31
2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ISSR	41
3 ไอโซเลตยีสต์ที่แยกจากระบวนการหมักน้ำตาลเมา	46
4 ตัวอย่างที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท	47
5 การระบุปีจีส์ของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และระหว่างกระบวนการหมักสาโทและน้ำตาลเมาโดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน โดยชุดทดสอบ API 32 C	48
6 ผลการเจริญของยีสต์ในกลุ่มต่างๆ ในสารประกอบคาร์บอนที่มีอยู่ในชุดทดสอบ API 32 C	52
7 ข้อมูลลำดับเบส (sequence information) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และระหว่างกระบวนการหมักสาโทและน้ำตาลเมา	58
8 การระบุปีจีส์ของยีสต์โดยอาศัยความสามารถในการใช้ คาร์บอนโดยชุดทดสอบ API 32 C และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain	59
9 ขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำ microsatellite ตรงตำแหน่ง SC8132X	81
10 การจัดกลุ่ม <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> ทั้ง 11 ไอโซเลตโดยใช้เทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC จำนวน 8 ชนิด	101
11 ความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากเทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ โดยอาศัยโปรแกรม Restdist ใน Phylip package	103
12 ความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	108
13 ความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	110

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค1 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 811	138
ค2 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 818	139
ค3 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 857	139
ค4 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 880	140
ค5 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 888	141
ค6 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 889	142
ค7 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 890	142
ค8 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 891	143

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตัวอย่างลูกแป้ง (a), ข้าวหมาก (b), น้ำค้อย (c), สาโทที่ผ่านน้ำแล้ว (d), อุ (e), สาโท (f), ฟองก๊าซที่เกิดขึ้น (g) และไม้มะเกลือ (h) ในระหว่างการหมักน้ำตาลเมา	5
2	ส่วนของยีนต่างๆ ที่อยู่บน rDNA ของ fungi	11
3	แผนที่การตัด mtDNA ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ใช้ในทางการค้า 23 สายพันธุ์	22
4	หลักการของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ microsatellite และ ISSR	24
5	ลำดับขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสโดยใช้ Phylip package	37
6	ลำดับขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆ ในการวิเคราะห์ DNA fragments โดยใช้ Phylip package	42
7	ผลผลิต PCR ของไอโซเลทยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท จำนวน 12 ไอโซเลท	55
8	ผลผลิต PCR ของไอโซเลทยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลเมา (ไอโซเลท CT) จำนวน 13 ไอโซเลท	56
9	การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของไอโซเลทยีสต์ ทั้งหมด 25 ไอโซเลท โดย Clustal X	61
10	ความแตกต่างทางพันธุกรรม (Distance matrix) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์	66
11	Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์จำนวน 25 ไอโซเลท	67
12	การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
13	การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลผลิต PCR ตรงตำแหน่ง D1/D2 domain ของ 26S Large subunit ของยีสต์ทั้ง 37 ไอโซเลท ที่จะนำไปวิเคราะห์ DHPLC	76
15	Profile ที่ได้จากการวิเคราะห์ DHPLC ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ก) และ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (ข) ที่อุณหภูมิ 59 และ 58.5 องศาเซลเซียส	77
16	ผลการวิเคราะห์ microsatellite ของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26 ไอโซเลท	78
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ไอโซเลท S1, S2, S3, S4, S5, S6 และ S7 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X	82
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ไอโซเลท S8, S9, S10, S11, S12 และ CT1 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X	83
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ไอโซเลท CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT7 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X	84
20	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ไอโซเลท CT8, CT10, CT11, CT13, RW1, RW3 และ RW4 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X	85
21	Dendrogram ของเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค microsatellite โดยอาศัยวิธี UPGMA และค่าทางสถิติ (bootstrap: 1000 replicates) ตัวเลข bootstrap แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์	86
22	แผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mtDNA- RFLP) ด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i>	88
23	ผลการวิเคราะห์ mtDNA- RFLP ของไอโซเลท <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3	89
24	ผลการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อทดสอบ ISSR ในการจำแนกความแตกต่างภายในสปีชีส์ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	90

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 811	91
26	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 818	92
27	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 857	93
28	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 880	94
29	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 888	96
30	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 889	97
31	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 890	98
32	ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> จำนวน 11 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC 891	99
33	Dendrogram ของเชื้อ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค ISSR โดยอาศัยวิธี UPGMA	105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
34	การจัดกลุ่ม <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> 11 ไอโซเลท โดยอาศัยการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 818 และ 857	106
35	การจัดกลุ่ม <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> 11 ไอโซเลท โดยอาศัยการวิเคราะห์ DHPLC	106

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

<i>act</i>	=	actin gene
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATC	=	cycloheximide (ACTidione)
ARA	=	L-ARAbinose
ARDRA	=	Amplified ribosomal DNA restriction analysis
BLAST	=	Basic Local Alignment Search Tool
CEL	=	D-CELlobiose
CLP-PFGE	=	Chromosome Length Polymorphism - Pulsed-Field Gel Electrophoresis
CT	=	Coconut toddy
DDBJ	=	DNA Data Bank of Japan
DHPLC	=	Denaturing high-performance liquid chromatography
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
DRBC	=	Dichloran Rose-Bengal Chloramphenical Agar
EMBL	=	The European Molecular Biology Laboratory
ERY	=	ERYthritol
ESC	=	ESCulin
ETOH	=	ethyl alcohol
FAM	=	6-carboxy fluorescein
GAL	=	D-GALactose
GLN	=	GlucosamiNe
GLU	=	D-GLUcose
GLY	=	GLYcerol
GNT	=	potassium GlucoNaTe
GRT	=	sodium GlucuRonaTe
IGS	=	Intergenic spacer
INO	=	INOsitol

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

IP-RP	=	ion-pair reversed-phase
ISSRs	=	Inter-Simple Sequence Repeats
ITS	=	Internal Transcribed Spacer
<i>Kl.</i>	=	<i>Kluyveromyces</i>
LAC	=	D-LACtose (bovine origin)
LAT	=	LacTic acid
LSU	=	large subunit gene
LVT	=	lvulinic acid (LeVulinaTe)
MAL	=	D-MALtose
MAN	=	D-MANnitol
MDG	=	Methyl- α D-Glucopyranoside
MEA	=	Malt Extract Agar
MEL	=	D-MELibiose
MLZ	=	D-MeLeZitose
mM	=	millimolar
mtDNA	=	mitochondial DNA
NaCl	=	sodium chloride
NAG	=	N-Acetyl-Glucosamine
nDNA	=	nuclear DNA
NCBI	=	The National Center for Biotechnology Information
ng	=	nanogram
O	=	NO substrate
ORF	=	Open Reading Frames
PCR	=	Polymerase chain reaction
PLE	=	PaLatinosE
PFGE	=	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAF	=	D-RAFFinose
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

rDNA	=	ribosomal deoxyribonucleic acid
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
RHA	=	L-RHAmnose
RIB	=	D-RIBose
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
RW	=	rice wine
SAC	=	D-SACcharose (sucrose)
SBE	=	L-SORbose
<i>Sc.</i>	=	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sm.</i>	=	<i>Saccharomycopsis</i>
SNPs	=	Single Nucleotide Polymorphisms
SOR	=	D-SORbitol
SSRs	=	Simple Sequence Repeats
SSU	=	small subunit
STS	=	Sequence-Tagged Site
STRs	=	Short Tandem Repeats
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
TEAA	=	Triethylammonium acetate
TRE	=	D-TREhalose
UBC	=	University of British Columbia
UPGMA	=	Unweighted Pair – Group Method Using the Arithmetic Average
VNTR	=	Variable Number of Tandem Repeats
XYL	=	D-XYLose
YM	=	Yeast extract-Malt extract
YMS	=	Yeast-Malt extract-Starch
YPD	=	Yeast extract-Peptone-Dextrose medium

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

2KG = potassium 2-KetoGluconate

°C = degree Celsius

μl = micro liter

การศึกษาเทคนิคโมเลกุลสำหรับการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ จากอาหารหมัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย

Study of Molecular Techniques for the Identification of Yeast Strains from Thai Fermented Food and Alcoholic Beverages

คำนำ

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะกระบวนการหมักที่ทำให้เกิดแอลกอฮอล์ สำหรับอาหารหมักและเครื่องดื่มพื้นเมืองของไทย ซึ่งได้แก่ ข้าวหมาก สาโท อุ น้ำตาลเมา และไวน์ผลไม้ จะมียีสต์เป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำให้เกิดแอลกอฮอล์ และสร้างลักษณะกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันได้มีการนำยีสต์บริสุทธิ์มาใช้กันอย่างกว้างขวาง เพื่อขจัดปัญหาความไม่แน่นอนในเรื่องคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้งานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการระบุสายพันธุ์ยีสต์มีความสำคัญมากขึ้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนก และระบุสายพันธุ์ของยีสต์ที่พบในอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่ผ่านมา เป็นการแยกเชื้อจากกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักอาหารหมัก และเครื่องดื่ม (ชัยวัฒน์, 2520; มนตรี, 2521; ปราโมทย์, 2521; สมพร, 2544) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สันฐานวิทยาและสรีระวิทยา แล้วนำมาเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของยีสต์แต่ละชนิดในอนุกรมวิธาน (Kurtman and Fell, 1998) แต่ข้อจำกัดของวิธีการดังกล่าวคือ ไม่สามารถที่จะระบุสายพันธุ์ของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกันได้ ด้วยข้อจำกัดนี้ส่งผลให้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ระดับชีวโมเลกุล สำหรับการระบุสายพันธุ์ยีสต์มากขึ้น มีงานวิจัยหลายเรื่องที่ได้ศึกษาการระบุสายพันธุ์ยีสต์ในอาหารหมักและเครื่องดื่มต่างๆ เทคนิคทางโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกันได้ ได้แก่ การวิเคราะห์ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ (Field and Wills, 1998; Perez *et al.*, 2001; Techera *et al.*, 2001; Howell *et al.*, 2004; Legras *et al.*, 2005; Masneuf-Pomarède *et al.*, 2006) การศึกษาวิเคราะห์ตำแหน่งที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ หรือที่เรียกว่า ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) (Kerrigan *et al.*, 2003) การศึกษาแผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย หรือ mitochondrial DNA–Restriction Fragment Length Polymorphisms (mtDNA-RFLP) (Querol *et al.*, 1992a/b, 1994; Lopez *et al.*, 2001; Schuller *et al.*, 2004; Barrajon *et al.*, 2008)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโครโมโซมของยีสต์ หรือ CLP-PFGE (Chromosome Length Polymorphism - Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Jespersen *et al.*, 2000, 2005; Gallagher, 2006) และการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) อื่นๆ เช่น AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Lopandic *et al.*, 2007; Flores Berrios *et al.*, 2005; Fuller *et al.*, 2008) และ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Pina *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008) เป็นต้น สำหรับข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธีก็จะแตกต่างกัน จำเป็นต้องพิจารณาก่อนที่จะนำมาศึกษา เพื่อให้ได้งานวิจัยที่มีคุณภาพและมีความเหมาะสมกับงานวิจัยมากที่สุด

งานวิจัยนี้เป็นการนำเทคนิคทางโมเลกุล มาใช้ระบุความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc. cerevisiae*) และ *Saccharomycopsis fibuligera* (*Sm. fibuligera*) สำหรับเทคนิคทางโมเลกุลที่ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ *Sc. cerevisiae* ได้แก่ เทคนิค Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), microsatellite และ mtDNA-RFLP และเทคนิคทางโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ *Sm. fibuligera* ได้แก่ เทคนิค DHPLC และ Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) เป็นต้น โดยยีสต์ สปีชีส์ดังกล่าวที่ถูกแยกจากกล้าเชื้อแห้ง อาหารหมัก และเครื่องดื่มพื้นเมืองของไทยแต่ละประเภท แล้วนำมาศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ร่วมกับการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ large subunit (26S) rDNA ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ ก่อนที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เพื่อประโยชน์ในการหาวิธีที่เหมาะสมในการระบุสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมัก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ หรือยีสต์อื่น ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการหมักได้ทันเวลาในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรม และเพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมกระบวนการหมัก การสร้างกลีนาส และลักษณะเฉพาะของยีสต์ในผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* ในอาหารหมักและเครื่องดื่ม แอลกอฮอล์พื้นเมืองของไทย
2. เพื่อศึกษาวิธีการระบุ และจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ภายในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera*
3. เพื่อพัฒนา DNA marker ในการตรวจสอบยีสต์เพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมกระบวนการหมักของอาหารหมัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นเมืองของไทย
4. เพื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ

การตรวจเอกสาร

1. อาหารหมัก และเครื่องดื่มน้ำแอลกอฮอล์ของไทย

การหมัก (fermentation) ถือว่าเป็นหนึ่งในวิธีการแปรรูปและถนอมอาหารที่เก่าแก่ที่สุดวิธีหนึ่ง อาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย ยีสต์ รา โดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ที่ได้จากการหมักหลายชนิด ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้มีการนำกล้าเชื้อผสมมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ สำหรับกล้าเชื้อแห้งของไทยได้แก่ ลูกแป้ง (traditional starter flat cakes) (ภาพที่ 1a) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมัก ข้าวหมาก (ภาพที่ 1b) และสุราพื้นบ้านของไทย เช่น สาโทหรือน้ำข้าว (ภาพที่ 1f) ที่ได้จากการหมักข้าวเหนียวกับลูกแป้งเหล้า ซึ่งราเส้นใยในลูกแป้งจะทำหน้าที่ในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล หรือที่เรียกว่ากระบวนการ saccharification หลังจากหมักได้สักระยะหนึ่งก็จะมีน้ำซึมออกมาจากข้าวเหนียวเรียกว่าน้ำค้อย (ภาพที่ 1c) จากนั้นจะมีการเติมน้ำ หรือที่เรียกว่าการผ่านน้ำ (ภาพที่ 1d) หมักต่ออีกระยะเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ตามต้องการ และเมื่อนำน้ำสาโทมากลั่นก็จะเรียกว่าเหล้ากลั่น ซึ่งจะมีแอลกอฮอล์สูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ กล้าเชื้อที่มีลักษณะเช่นเดียวกับลูกแป้งที่ถูกนำมาใช้ในประเทศต่างๆ ในเอเชีย เช่น Hamei ของอินเดีย, Ragi ของอินโดนีเซีย, Budob ของฟิลิปปินส์, Chu ของจีน, Naruk ของเกาหลี และ Marcha ของลิทัวเนีย เป็นต้น (Jeyaram *et al.*, 2008)

อุเป็นสุราพื้นบ้านของไทยอีกชนิดหนึ่งที่ได้จากการหมักข้าวโดยลูกแป้งเหล้า เช่นเดียวกับสาโท แต่ต่างกันที่จะใช้ข้าวเหนียวผสมกลายเป็นวัตถุดิบ และหมักโดยระบบปิดในไห (ภาพที่ 1e) ซึ่งปิดปากไหด้วยขี้เถ้าเพื่อให้เกิดกระบวนการหมักของยีสต์ในสภาวะปราศจากอากาศ สำหรับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่จัดเป็นสุราพื้นบ้านของไทย แต่ไม่ได้ใช้กล้าเชื้อดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ น้ำตาลเมาหรือกระแช่ ซึ่งได้จากการหมักน้ำตาลจากจันทมะพร้าวหรือต้นตาลโตนด นำมาใส่ไม้มะเกลือ (ภาพที่ 1 g/h) ซึ่งกรรมวิธีในการผลิตทำกันเป็นแบบอุตสาหกรรมในครัวเรือน การหมักจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยอาศัยยีสต์ที่มีอยู่ในน้ำตาลสด ปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณ 6-9% สำหรับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นเมืองจากประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียที่ได้จากการหมักเช่นเดียวกับสาโท ได้แก่ Sake ของประเทศญี่ปุ่น, Shaoshinchu ของประเทศจีน, Tapi ของประเทศมาเลเซีย และ Yakju ของประเทศเกาหลี ซึ่งล้วนแล้วแต่ใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบทั้งสิ้น (Wellala *et al.*, 2004)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างลูกแป้ง (a), ข้าวหมาก (b), น้ำคัวย (c), สาโทที่ผ่านน้ำแล้ว (d), อุ (e), สาโท (f), ฟองก๊าซที่เกิดขึ้น (g) และไม้มะเกลือ (h) ในระหว่างการหมักน้ำตาลเมา

2. จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักอาหารและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

ระบบการหมักแบบดั้งเดิมของแต่ละประเทศส่วนใหญ่ จะเป็นการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ไม่มีระบบฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ จึงทำให้การหมักเกิดขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์กันของจุลินทรีย์ทั้งที่อยู่ในกล้าเชื้อ ซึ่งมีลักษณะเป็นกล้าเชื้อผสม และเชื้อที่มีอยู่เดิมที่อยู่ในภาชนะที่ใช้หมัก ซึ่งหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกล้าเชื้อก็จะทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่นราที่พบในกล้าเชื้อก็จะมีหน้าที่หลักในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล โดยอาศัยกิจกรรมเอนไซม์อะมัยเลส ส่วนยีสต์ก็จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ในเวลาต่อมา นอกจากนี้ในกล้าเชื้อยังพบแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่ก็จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักขั้นที่สอง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติดีขึ้น เนื่องจากกิจกรรม malolactic fermentation นั่นเอง ได้มีงานวิจัยต่างๆ ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่ถูกพบทั้งในกล้าเชื้อและในระหว่างกระบวนการหมัก โดยอาศัยทั้งวิธีแบบดั้งเดิม และวิธีทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการศึกษางานบางส่วนได้แสดงดังต่อไปนี้

งานวิจัยที่ศึกษาการระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยอาศัยวิธีทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี ได้แก่ งานวิจัยของปราโมทย์ (2521) ได้ศึกษาชนิดของยีสต์ในน้ำตาลสด และน้ำตาลเมา ซึ่งจากการศึกษาพบว่าชนิดของยีสต์ที่พบมากในน้ำตาลสดได้แก่ *Kloeckera apiculata* และ *Saccharomyces chevalieri* ที่พบรองลงมาได้แก่ *Candida* spp., *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia membranaefaciens* ตามลำดับ ยีสต์ที่พบน้อยและไม่ค่อยมีความสำคัญนักได้แก่ *Torulopsis*, *Hansenula*, *Rhodotorula* และ *Endomycopsis* (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Saccharomycopsis*) สำหรับในน้ำตาลเมาเชื้อที่พบเป็น *Sc. chevalieri* เกือบทั้งหมด จึงสรุปได้ว่า การหมักน้ำตาลสดในระยะแรกโดยเฉพาะขณะที่กำลังร่อนน้ำตาลอยู่เป็นการหมักโดยเชื้อ *K. apiculata* เป็นส่วนใหญ่แล้วตามด้วยการหมักของ *Sc. chevalieri* ซึ่งเป็นเชื้อสำคัญที่ทำให้เกิดการหมักเป็นน้ำตาลเมาในที่สุด

สมพร (2544) ได้แยกและจัดจำแนกยีสต์และราในลูกแป้งทั้งชนิดลูกแป้งเหล้าและลูกแป้งข้าวหมาก โดยอาศัยวิธีทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี พบว่าจากลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้าจำนวน 19 ตัวอย่าง ที่เก็บในประเทศไทย สามารถแยกยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากได้จำนวน 43 ไอโซเลต และราจำนวน 91 ไอโซเลต ส่วนลูกแป้งเหล้า สามารถแยกยีสต์ได้จำนวน 49 ไอโซเลต และราจำนวน 35 ไอโซเลต เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาจัดจำแนก พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากนั้นมีถึง 29 ไอโซเลต ที่ถูกจัดจำแนกเป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ส่วนที่เหลือเป็น *Candida rhagii* (1), *Issatchenkia orientalis* (2), *Pichia anomala* (1),

Pichia burtonii (1), *Pichia fabianii* (1), *Rhodotolura philyla* (1), *Torulaspora delbrueckii* (1) และ *Torulaspora globosa* (2) ส่วนยีสต์จากลูกแป้งเหล้าส่วนใหญ่เป็น *Sm. fibuligera* เช่นกัน โดยมีจำนวนถึง 17 ไอโซเลท ที่เหลือเป็น *Candida glabrata* (3), *C. rhagii* (2), *I. orientalis* (3), *P. anomala* (6), *P. burtonii* (2), *P. fabianii* (2), *Pichia heimii* (1), *Pichia mexicana* (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *T. globosa* (1) และ *Trichosporon asahii* (1) สำหรับราที่พบในลูกแป้งข้าวหมากนั้นเป็นสกุล *Amylomyces* 31 ไอโซเลท และ *Rhizopus* 27 ไอโซเลท ที่เหลือเป็น *Actinormucor* (5), *Aspergillus* (9), *Aspergillus niger* group (13), *Monascus* (2), *Mucor* (2), *Penicillium* (1) และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้อีก 1 ไอโซเลท ส่วนราที่พบในลูกแป้งเหล้าจัดจำแนกได้เป็น *Rhizopus* (15), *Amylomyces* (12), *Actinomucor* (5), *Aspergillus niger* group (2) และ *Mucor* (1)

Wellala *et al.* (2004) ได้ศึกษาการหมักข้าวโดยอาศัยยีสต์สปีชีส์ *Saccharomyces* ที่แยกมาจากน้ำตาลจากจันทมะพร้าวและต้นตาลโตในประเทศศรีลังกา โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกยีสต์ที่ให้แอลกอฮอล์สูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 15% หลังจากการหมักที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดของยีสต์ไอโซเลทต่างๆ อยู่ในช่วง 7.3-8.4% จากนั้นนำไอโซเลทที่หมักแอลกอฮอล์ได้สูงในการศึกษาขั้นต้น มาทดลองหมักโดยใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบร่วมกับรา *Aspergillus oryzae* พบว่ายีสต์จำนวน 5 ไอโซเลทสามารถหมักข้าวและให้แอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 10.5-13.5%

Dung (2007) ศึกษาถั่วเหลืองที่มีลักษณะคล้ายกับลูกแป้งของไทย ซึ่งเรียกว่า men ถั่วเหลืองนี้ได้นำมาใช้เป็นถั่วเหลืองแห้งในการหมักไวน์ข้าวของประเทศเวียดนาม ซึ่งพบว่าราที่มีหน้าที่หลักในกระบวนการหมักได้แก่ *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oligosporus* และ *R. oryzae* สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีบทบาทหลักในกระบวนการผลิตเอทานอลในไวน์ข้าว นอกจากนี้ยังมียีสต์สปีชีส์อื่นอีก แต่ไม่มีบทบาทเด่นมากนัก เช่น *Candida glabrata* และ *Pichia anomala* เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยที่ได้นำวิธีทางโมเลกุลมาใช้ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ที่แยกจากถั่วเหลืองแห้ง และกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ งานวิจัยของเสาวลักษณ์ (2547) ได้ศึกษาการระบุสปีชีส์ยีสต์ ที่แยกจากลูกแป้งและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย อาศัยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง rDNA ตรงส่วนของ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 5' LSU

และส่วนของ ITS-5.8S rDNA พบว่าทั้งสองตำแหน่งที่ศึกษาให้ผลการระบุสปีชีส์ และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกัน และเสนอแนะว่าลำดับเบสในส่วนของ D1/D2 domain มีความเหมาะสม สะดวก และง่ายกว่าในการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อจุดประสงค์ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ เนื่องจากขนาดของลำดับเบสบริเวณดังกล่าวของทุกไอโซเลทอยู่ที่ประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์เท่ากัน ซึ่งง่ายต่อการหาลำดับเบสโดยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ และง่ายต่อการเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละสปีชีส์อีกด้วย

งานวิจัยล่าสุดที่ศึกษาการระบุสปีชีส์ของยีสต์ที่แยกมาจากกล้าเชื้อที่เรียกว่า Hamei ที่ใช้สำหรับการผลิตไวน์ข้าวในอินเดีย โดยอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุล เริ่มต้นจากการแยกยีสต์จากตัวอย่างกล้าเชื่อดังกล่าวจำนวน 54 ตัวอย่าง ซึ่งได้ยีสต์ทั้งหมดจำนวน 163 ไอโซเลท จากนั้นระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยการวิเคราะห์แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*HaeIII*, *CfoI* และ *HinfI*) ตรงตำแหน่ง rDNA ตรงส่วนของยีน 5.8S rRNA (ITS1-5.8S-ITS2) ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจีนดิเอ็นเอบริเวณดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR พบว่าผลการวิเคราะห์ให้รูปแบบการตัดจำนวน 17 รูปแบบที่แตกต่างกัน และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล CBS yeast database พบว่าให้รูปแบบการตัดตรงกับ 9 สปีชีส์ดังนี้ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *P. guilliermondi*, *P. fabianii*, *Trichosporon* sp., *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. montana* และ *Torulaspora delbrueckii* สำหรับอีก 8 รูปแบบ ไม่ตรงกับรูปแบบการตัดของยีสต์ใดเลยในจำนวน 288 สปีชีส์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

ยีสต์ที่แยกได้จาก Hamei ส่วนใหญ่ได้แก่อยีสต์ในสปีชีส์ *Sc. cerevisiae* (32.5%), *P. anomala* (41.7%) และ *Trichosporon* sp. (8%). งานวิจัยนี้ได้ยืนยันผลการระบุสปีชีส์ยีสต์กลุ่มใหญ่ๆ ข้างต้นอีกครั้ง โดยศึกษาแผนที่การตัดโดยเอนไซม์ *HindIII*, *EcoRI*, *DdeI* และ *MspI* นอกจากนี้ยีสต์ในกลุ่ม *Sc. cerevisiae* ยังถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกันโดยอาศัยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) และเทคนิค mtDNA-RFLP โดยอาศัยเอนไซม์ *HinfI* และ *HaeIII* ซึ่งพบว่าเป็นเทคนิคที่ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Jeyaram *et al.*, 2008)

3. ความสำคัญของวิธีการระบุสายพันธุ์ยีสต์

การศึกษาพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับการระบุ (identification) และจัดจำแนก (characterization) สายพันธุ์ยีสต์ เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเห็นได้ชัดตั้งแต่มีการใช้ยีสต์อย่างกว้างขวางในกระบวนการผลิตอาหารหมักและเครื่องดื่มชนิดต่างๆ เช่น ไวน์ เบียร์ ไซเดอร์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เนย และเนื้อหมัก (cold meat) เป็นต้น สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ยีสต์ส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อย่างไรก็ตามเชื่อว่าสายพันธุ์ *Sc. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์จะมีความเหมาะสมในกระบวนการหมักอาหารและเครื่องดื่มประเภทต่างๆ เนื่องจากกิจกรรมและบทบาทของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันในการผลิตอาหารและเครื่องดื่มแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า *Sc. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์กันยังส่งผลต่อรูปแบบของการสร้างกลิ่นรสในระหว่างการหมักแตกต่างกันอีกด้วย ยีสต์แต่ละสายพันธุ์อาจมีปฏิสัมพันธ์กันในกระบวนการหมัก เช่น ในขั้นตอนการย่อยสลายสารอาหารและสารประกอบร่วมกันของวิธีการสร้างสารกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (Howell *et al.*, 2004)

ความต้องการในการระบุสายพันธุ์ยีสต์ เพื่อปรับปรุงคุณภาพสายพันธุ์ยีสต์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารต่างๆ ข้างต้น ยิ่งส่งผลต่อการพัฒนาเทคนิควิธีต่างๆ ในการระบุและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ให้มีความน่าสนใจมากขึ้น กระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ล้วนแต่จะใช้เชื้อยีสต์แห้ง (active dry yeast) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากมักไม่พบ *Sc. cerevisiae* บนผิวของุ่นที่ใช้ในการทำไวน์ หรือในลูกแป้งที่ถูกใช้เป็นก้ำเชื้อแห้งสำหรับการหมักข้าวหมาก และสาโทของไทย เนื่องจากยีสต์ดังกล่าวต้องการสภาพแวดล้อมที่มีน้ำตาลสูง ซึ่งจะเห็นได้ชัดจากกระบวนการหมักไวน์และสาโท เช่น จะพบ *Sc. cerevisiae* ในสถานะที่มีน้ำตาลจากองุ่นในกระบวนการหมักไวน์และระยะหลังจากการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยเชื้อราสกุล *Amylomyces* และ *Rhizopus* ในกระบวนการหมักสาโท เป็นต้น และเนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ที่เป็น wild yeast ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ และเป็นยีสต์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักตามธรรมชาตินั้นมีจำนวนไม่แน่นอน การเจริญและการอยู่รอดอาจขึ้นอยู่กับยีสต์อื่นๆ ทำให้กระบวนการหมักแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน ไม่สามารถคาดคะเนคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้นกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในระดับอุตสาหกรรม จึงนิยมใช้ starter ของยีสต์มาใช้ในการหมัก (inoculated fermentation) แทนที่จะใช้ยีสต์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (natural fermentation) ด้วยเหตุนี้เองทำ

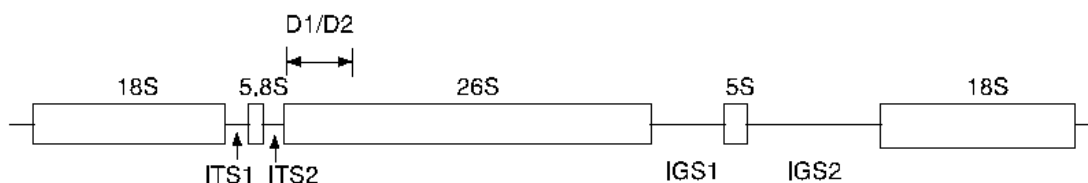
ให้การศึกษาเทคนิควิธีการที่สามารถบอกความแตกต่างของยีสต์ระดับสายพันธุ์ หรือยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับนักจุลชีววิทยา ผู้ผลิต และผู้ขายยีสต์ดังกล่าว เพื่อที่จะยืนยันสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ในทางการค้า (commercialized dry yeast) นั้น ยังคงเป็นสายพันธุ์เดิม (original selected strain) อยู่หรือไม่ ปัญหาดังกล่าวไม่สามารถพิสูจน์ได้โดยใช้เทคนิคแบบดั้งเดิม (conventional method) หรือถ้าพิสูจน์ได้ก็จำเป็นจะต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ซึ่งไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในกระบวนการตรวจสอบระดับการผลิตในอุตสาหกรรม

4. การระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การศึกษาความหลากหลาย (diversity) และการเปลี่ยนแปลง (dynamic) ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วจะใช้วิธีการศึกษาโดยเทคนิคแบบดั้งเดิม (traditional microbiological techniques) เช่น การใช้กล้องจุลทรรศน์ (microscopy) และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (cultivation) เพื่อใช้ในการจัดจำแนก (classification) และการระบุชนิด (identification) ของจุลินทรีย์ และเนื่องจากจุลินทรีย์มีขนาดเล็ก มีลักษณะภายนอกคล้าย ๆ กัน ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงส่งผลให้การจัดจำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ทำได้ค่อนข้างยาก เช่นเดียวกับการจำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา หรือกายวิภาควิทยา (physiology) และลักษณะทางชีวเคมี (biochemistry) ทำให้ทิศทางการศึกษาจุลชีววิทยาในระยะหลังได้หันไปสู่การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มากขึ้น หลายวิธีถูกนำมาใช้เพื่อขจัดปัญหาดังกล่าว และเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มความรวดเร็วและความแม่นยำในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ สำหรับตำแหน่งดีเอ็นเอที่ถูกนำมาศึกษากันมาก ได้แก่

4.1 ribosomal DNA (rDNA)

การศึกษาดีเอ็นเอส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ตำแหน่งต่างๆ เช่น บริเวณ 5.8S rDNA และบริเวณ ribosomal intergenic spacer region เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 5' end ของ large subunit (26S) rDNA มาใช้อย่างแพร่หลาย (เสาวลักษณ์, 2547; Fell *et al.*, 2000; Jespersen *et al.*, 2005) ตำแหน่งต่างๆ ของ rDNA ที่ถูกนำมาศึกษา แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ส่วนของยีนต่างๆ ที่อยู่บน rDNA ของ fungi

ที่มา: Sugita and Nishikawa (2003)

ยีนในกลุ่มของ rRNA โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ 5' ของ large subunit gene (LSU) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาลำดับเบสของยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous (Kurtzman and Robnett, 1998) ซึ่งการศึกษายีสต์ในปัจจุบันนี้ ส่วนใหญ่แล้วจะใช้บริเวณนี้เป็นตำแหน่งของยีนที่มีการศึกษาลำดับเบส เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ เนื่องจากลำดับเบสบริเวณดังกล่าวสามารถที่จะนำมาใช้บอกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวสามารถบอกความแตกต่างของยีสต์ในระดับสปีชีส์เท่านั้น บริเวณ 5' ของ large subunit gene นี้ จะมีส่วนของลำดับเบสที่มีความหลากหลาย (variable regions) นั่นคือบริเวณ D1 และ D2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ โดยตรงส่วนบริเวณ D2 จะมีความหลากหลายมากกว่าลำดับเบสบริเวณ D1 โดยจะแสดง 0-1% divergence ของลำดับเบสของยีสต์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายีสต์สปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (sibling species) ทั้งหมดสามารถแยกออกจากกันโดยอาศัยลำดับเบสบริเวณนี้ เช่น ยีสต์ในจีนัส *Issatchenkia*, *Pichia* และ *Saccharomyces* เป็นต้น (Peterson and Kurtzman, 1991)

อย่างไรก็ตามสำหรับในบางการศึกษาได้รายงานว่าไม่สามารถใช้ลำดับเบสบริเวณนี้ในการบอกความแตกต่างของ *Saccharomyces bayanus* / *Saccharomyces pastorianus* และ *Williopsis saturnus* กับ variety *sargentensis* ได้ (Kurtzman and Robnett, 1998) และจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกันจากยีสต์กลุ่ม ascomycetous ทั้งหมด 103 สปีชีส์โดย Kurtzman and Robnett ในปี 1998 แสดงให้เห็นความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ภายในสปีชีส์เดียวกันจะมีค่าสูงสุดที่ 2 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะแตกต่างกันในทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา มีลำดับเบสแตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ใน 3 สปีชีส์ และมีลำดับเบสแตกต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ใน 1 สปีชีส์ อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบยีสต์ 13 ชนิด (13 sibling species) ที่มีความใกล้ชิดทาง

พันธุกรรม ที่มี nuclear DNA (nDNA) relatedness ต่ำ ประมาณ 10–59% แสดงความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณนี้เพียง 2 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการที่จะใช้ลำดับเบสบริเวณนี้ในการบอกความแตกต่างของยีสต์ทั้งภายใน (intra) และระหว่าง (inter) สปีชีส์นั้นค่อนข้างจะไม่ชัดเจน เช่น กรณีที่ยีสต์ 2 ตัวอย่างมีลำดับเบสบริเวณนี้แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ จะจัดให้ยีสต์ทั้ง 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือจะจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน เป็นต้น ซึ่งปกติแล้วการจัดกลุ่มของยีสต์ที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสน้อยกว่า 3 นิวคลีโอไทด์จะจัดอยู่ในพวกเดียวกัน (conspecific) ซึ่งการสรุปเช่นนี้อาจเป็นการสรุปที่ผิดในการที่จะศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสของยีสต์ทั้งภายใน และระหว่างสปีชีส์ของยีสต์

ยีนในส่วนของ small subunit (SSU) rRNA ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษา phylogeny ของยีสต์กลุ่ม ascomycetous แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลลำดับเบสบริเวณนี้ไม่มากนักในการศึกษายีสต์ภายในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นการนำลำดับเบสดังกล่าวมาศึกษายีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมนั้นค่อนข้างที่จะยากกว่าการศึกษาลำดับเบสบริเวณ D1/D1 ของ LSU โดยทั่วไปแล้วยีนในส่วนของ SSU จะมีลำดับเบสที่ conserve กว่ายีนในส่วนของ LSU และยีนในส่วนของ SSU มักจะถูกนำมาใช้ในจุดประสงค์ในการระบุ (identification) แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องขนาดของลำดับเบสบริเวณดังกล่าว ซึ่งจะต้องวิเคราะห์ลำดับเบสถึง 1800 นิวคลีโอไทด์ ถึงจะเพียงพอเพื่อที่จะนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของยีสต์ได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับเบสบริเวณ rDNA ตำแหน่งต่างๆ ค่อนข้างจะมีความชัดเจน และมีประโยชน์ในการศึกษาเพื่อระบุยีสต์ในระดับสปีชีส์ จนถึงปัจจุบันได้มีการหาลำดับเบสของ rDNA จำนวนหลายร้อยสายพันธุ์ และมีการรวบรวมไว้ในคลังข้อมูล เช่นที่ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> หรือ The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ที่เว็บไซต์ <http://www.embl.de> หรือ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ที่เว็บไซต์ <http://www.ddbj.nig.ac.jp> (สาวิตรี, 2549)

ลำดับเบสส่วนของ rDNA ยังถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) โดยการศึกษาแผนที่การตัดชิ้นส่วนผลผลิต PCR ตรงตำแหน่งต่างๆ บน rDNA เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็น prokaryotes และ eukaryotes ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน รวดเร็ว และไม่มีปัญหาในการทำซ้ำ ลำดับเบสทั้งส่วนที่เป็น conserved และ variable sequences มีความจำเป็นสำหรับการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และสามารถที่จะนำมาใช้ร่วมกับ universal primers สำหรับตำแหน่งที่มีความนิยมที่จะถูกนำมาใช้

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ได้แก่ rDNA ทั้งส่วนที่เป็น LSU และ SSU และส่วนของ internal transcribed spacer regions ต่างๆ เช่น ITS1, ITS2, IGS และ 5.8S ที่อยู่ระหว่าง ITS1 และ ITS 2 อีกด้วย สำหรับจุดประสงค์ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ Gente *et al.* (2007) ได้พัฒนา species-specific primers สำหรับระบุสปีชีส์ *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces arxianus* และ *Yarrowia lipolytica* เป็นต้น ในปี 2008 Bockelmann *et al.* ได้ใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเอนไซม์ *Hin6I*, *HinfI* และ *BsuRI* ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ 92 สายพันธุ์ ใน 32 สปีชีส์ ซึ่งเป็นตัวอย่างยีสต์ที่มาจากแหล่งผลิตนมและเนย จากงานวิจัยนี้ สามารถแยกสปีชีส์ยีสต์ที่เป็นสายพันธุ์ปนเปื้อนออกจากยีสต์ที่มีบทบาทในกระบวนการผลิตได้จากผลของรูปแบบการตัด และขนาดของผลผลิต PCR นั้นเอง

4.2 การศึกษาอื่น ๆ สำหรับการจัดจำแนกยีสต์

ยีน *act1* (actin1) เป็นยีนอีกตำแหน่งหนึ่งที่ถูกนำมาศึกษา ยีนนี้มีรหัสสำหรับโปรตีน actin ประกอบด้วยส่วนของ coding region และ intervening sequence รวมความยาวประมาณ 1,200 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจากการศึกษายีสต์ *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* และ *Filobasidiella neoformans* พบว่า *act1* จะถูกพบเป็น single copy ในแต่ละ haploid genome ลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีน actin จะ conserve สูง แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสของยีน actin จะมีความหลากหลายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะลำดับเบสในตำแหน่งที่ 3 ของ codon ซึ่งจากลำดับเบสที่แตกต่างกันนี้เอง เป็นที่น่าสนใจที่จะนำยีนดังกล่าวมาศึกษาเพื่อบอกความแตกต่างระหว่างยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน (Daniel *et al.*, 2001)

นอกจากนี้มีผลงานวิจัยที่สรุปได้ว่า actin หรือลำดับเบสบริเวณ SSU อาจจะเป็น marker ที่ดีกว่าที่จะใช้จุดประสงค์สำหรับการระบุยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeast ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน actin สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจน และง่ายกว่า เนื่องจากลำดับเบสของยีน actin ที่มีลำดับเบสที่ conserve สูงนั่นเอง อย่างไรก็ตามการระบุยีสต์ยังขึ้นอยู่กับข้อมูลต่างๆ ในฐานข้อมูล ซึ่งลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ในฐานข้อมูลยีสต์มีมากกว่า 700 สปีชีส์ ซึ่งจะมีค่อนข้างมาก และมีประโยชน์ต่อการเปรียบเทียบลำดับเบส และจะเห็นได้ว่าลำดับเบสบริเวณดังกล่าวก็มักจะถูกนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ โดยการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของสปีชีส์ที่มีใกล้เคียงกันของลำดับเบสมากที่สุดใน

ฐานข้อมูล แต่การระบุยีสต์นั้นถ้าใช้ข้อมูลของหลายยีน หรือใช้ลำดับเบสหลายๆ บริเวณ ก็จะส่งผลให้การวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น (Daniel and Mayer, 2003) ลำดับเบสของยีน *act1* ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic relationship พบว่าประสบความสำเร็จในการศึกษาสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต เช่นกลุ่ม fungi เป็นต้น

5. การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน

เทคนิคทางโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการระบุสายพันธุ์ยีสต์ และบอกความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน ได้แก่ การใช้วิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ตรงส่วนดีเอ็นเอที่เป็น intron splicing site (de Barros Lopez *et al.*, 1996) และดีเอ็นเอบริเวณ delta elements ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่บนข้าง Ty1 retrotransposons ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* (Ness *et al.*, 1993) นอกจากนี้วิธีอื่นๆ ที่อาศัยเทคนิค PCR ได้แก่ วิธี RAPD (Random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยอาศัยไพรเมอร์ขนาด 5-15 เมอร์ สำหรับผลการแยกความแตกต่างในระดับต่ำกว่า หรือสูงกว่าสปีชีส์นั้นขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้ อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่สำคัญของวิธีดังกล่าวคือ ความไม่เสถียรในการทำซ้ำ ซึ่งมักจะให้เกิด low stable (nonrepetitive) pattern

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ในกลุ่มที่เป็นสายพันธุ์ทางการค้า และไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้จากการหมักไวน์ (de Barros Lopez *et al.*, 1999) วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้ในการบ่งบอกความแตกต่างของยีสต์ทั้งระดับสปีชีส์ และระดับต่ำกว่าสปีชีส์ (subspecies levels) นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ผสม (hybrid) อีกด้วย (de Barros Lopez *et al.*, 2002) ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะใช้แรงงานมากกว่าวิธีอื่นๆ ข้างต้น แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธี AFLP จะมีข้อได้เปรียบในเรื่องความเสถียรในการทำซ้ำ (reproducibility)

Electrophoretic karyotypes เป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของโครโมโซมของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ทางการค้า เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของ DNA fingerprinting ซึ่งสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ได้เช่นเดียวกัน การบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ โดยอาศัยความหลากหลายของความยาวของโครโมโซมหรือ

Chromosome Length Polymorphism ร่วมกับเทคนิค Pulsed-Field Gel Electrophoresis (CLP-PFGE) เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งในการศึกษา electrophoretic karyotypes

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ปนเปื้อน และชนิดที่เป็น lager brewing yeasts ในเครื่องดื่มประเภท lager จำนวน 38 และ 15 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยอาศัยเทคนิค CLP-PFGE พบว่าขนาดโครโมโซมของยีสต์อยู่ในช่วง 200-1600 กิโลเบส ความหลากหลายของขนาดโครโมโซมดังกล่าว สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซเลตยีสต์ชนิดปนเปื้อนส่วนใหญ่กับยีสต์ชนิดที่เป็น lager brewing yeasts ทั้งหมดได้ (Jespersen *et al.*, 2000) นอกจากนี้การใช้เทคนิค CLP-PFGE ได้ประสบความสำเร็จในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ในสปีชีส์อื่น ได้แก่ *Candida krusei*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora* spp., *Sc. cerevisiae* และ *Saccharomyces pastorianus* เป็นต้น (Jespersen *et al.*, 2005) งานวิจัยล่าสุดของ Jeyaram *et al.* (2008) ได้ใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ ในการจัดกลุ่มยีสต์สปีชีส์ *Sc. cerevisiae* ที่ถูกนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยสามารถจัดกลุ่ม *Sc. cerevisiae* จำนวน 52 ไอโซเลตออกเป็น 32 กลุ่ม โดยพิจารณาจากรูปแบบของผลการเคลื่อนที่ของโครโมโซมที่ปรากฏบนเจล โดยขนาดของโครโมโซมที่ปรากฏมีขนาดตั้งแต่ 200 kb ถึง 22,000 kb เป็นต้น สำหรับการวิเคราะห์ PFGE ในยีสต์แต่ละสปีชีส์นั้น อาศัยหลักการเดียวกันแต่อาจแตกต่างกันบ้างในเรื่องของการหาสภาวะต่างๆ ในการทำ electrophoresis ให้เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอของแต่ละสปีชีส์ และสำหรับ pattern ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย PFGE จะมีความเสถียร และไม่มีปัญหาในการทำซ้ำทั้งภายในห้องปฏิบัติการ และระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเทคนิค PFGE เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ในปัจจุบัน

6. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ การวิเคราะห์ microsatellite, การวิเคราะห์แผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย mtDNA-RFLP, การวิเคราะห์ ISSR และการวิเคราะห์ DHPLC ซึ่งรายละเอียดหลักการ และการประยุกต์ใช้ของของเทคนิคดังกล่าวข้างต้น ได้แสดงไว้ในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

6.1 การวิเคราะห์ Microsatellite

Microsatellites หรือ SSRs (Simple Sequence Repeats) หรือ STRs (Short Tandem Repeats) เป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดความยาวประมาณ 1-10 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลักษณะเรียงต่อซ้ำๆ กันอย่างต่อเนื่องในลักษณะ tandem repeats กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม ลำดับเบสซ้ำๆ กันนี้ เป็นองค์ประกอบสำคัญของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และลำดับเบสดังกล่าวจะมีความแตกต่างของความยาวค่อนข้างสูง อันเนื่องมาจากความผิดพลาดในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้แก่ การเกิด slipped-strand mispairing หรือ replication slippage และการผิดพลาดในขั้นตอน crossing over ในกระบวนการไมโอซิส (Gallego *et al.*, 2005) ทำให้การวิเคราะห์ microsatellites แสดงถึงระดับความหลากหลายระหว่างสปีชีส์ และภายในสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะที่อยู่บริเวณทั้งสองข้างของดีเอ็นเอชุดซ้ำๆ เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวในการศึกษาพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือความหลากหลายของดีเอ็นเอ โดยอาศัยความแตกต่างในด้านความยาวของดีเอ็นเอ หรือความแตกต่างของปริมาณหรือหน่วยที่เป็น tandem repeats หรือที่เรียกว่า Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)

ข้อดีที่สำคัญของวิธีนี้ก็คือมีความเสถียรในการทำซ้ำ (Masneuf-Pomarède *et al.*, 2006) เพราะการวิเคราะห์ความหลากหลายดังกล่าวจะใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) ด้วยเหตุนี้เองจึงใช้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการ annealing เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอสายสั้นๆ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถถูกนำมาใช้เพื่อแสดงความยาวของอัลลีล (allele) และให้ข้อมูลในเชิงปริมาณแทนที่จะเป็นเพียงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ RAPDs และ AFLP วิธีนี้ยังสามารถวิเคราะห์ได้ทีละหลายๆ ตัวอย่าง และหลายๆ ตำแหน่ง ผลการวิเคราะห์บริเวณตำแหน่ง microsatellite เดียวกันของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย เนื่องจากความแตกต่างของวิธีการ (ไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย fluorescein และการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ กับการใช้เจลด้วย silver) แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้นสามารถที่จะแก้ไขได้ง่ายๆ โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเดียวกันในการเปรียบเทียบ (Techera *et al.*, 2001)

ยีสต์มีตำแหน่ง microsatellite ที่มีความหลากหลายสูง และมีความสำคัญที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็น Sequence-Tagged Site (STS) marker ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการวิเคราะห์ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต โดยเฉพาะจีโนมของ *Saccharomyces cerevisiae* มีตำแหน่งของ microsatellite มากมายซึ่งกระจายอยู่ทั่วทั้ง 16 โครโมโซม รวมถึงดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอน

เครือข่าย microsatellite บางตำแหน่งสามารถนำมาใช้ในการระบุและบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Sc. cerevisiae* ได้ นอกจากนี้ยังมีการสร้างฐานข้อมูล *Saccharomyces* Genome Database (SGD) เพื่อให้ความรู้เกี่ยวกับแนวทางในการวิเคราะห์และเข้าถึงความรู้เกี่ยวกับยีสต์ดังกล่าวได้อย่างรวดเร็ว เพียงแค่ใช้ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ก็สามารถที่จะหาตำแหน่ง microsatellite ของยีสต์ดังกล่าวได้ (Perez *et al.*, 2001) บริเวณของดีเอ็นเอในจีโนมของ *Sc. cerevisiae* ที่เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูง (hypervariable microsatellite) ถูกนำมาแสดงความหลากหลายของสายพันธุ์ต่างๆ และจากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการค้นหารูปแบบของ short tandem repeat ของดีเอ็นเอบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กๆ และมีข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์รวมถึงยีสต์ด้วยพบว่าลำดับเบสที่เป็น trinucleotide repeat สามารถที่จะใช้เพื่อจีโนไทป์สายพันธุ์ยีสต์ได้ (Field and Wills, 1998)

ในปี 2001 Techera *et al.* ได้ใช้การวิเคราะห์ microsatellite เป็นเครื่องหมาย (marker) เพื่อบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ โดยศึกษา microsatellite จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ SCYOR267C, SC8132X และ SCPTSY7 ในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ 9 สายพันธุ์ ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมไวน์ และใช้ในการผลิตไวน์ที่มีลักษณะแตกต่างกันของสาธารณรัฐอูรุกวัย ซึ่งยีสต์จำนวน 6 ใน 9 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา ถูกคัดเลือกมาจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (native strain) ที่แยกได้จากโรงงานไวน์ และอีก 3 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ทางการค้าที่มีใช้กันอยู่ทั่วไป จากการศึกษาพบว่าการใช้ microsatellite marker เฉพาะ SCYOR267C และ SC8132X ก็เพียงพอสำหรับบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่นำมาศึกษา สำหรับระดับของ polymorphism และ heterozygosity ที่ได้ก็ให้ผลเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ในงานวิจัยของ Field and Wills ปี 1998 ที่ศึกษาในสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกใช้ในห้องปฏิบัติการ งานวิจัยนี้ยังใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ผลภายใน 14 ชั่วโมง และยังแนะนำให้ใช้ microsatellite marker เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์อยู่ประจำ (routine) ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการทำไวน์อีกด้วย

ในปี 2004 Howell *et al.* ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ microsatellite ซึ่งเป็นวิธีแรกที่เป็นการนำวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อที่จะศึกษาโครงสร้างประชากรของยีสต์ในกระบวนการหมักไวน์ระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาตรงตำแหน่ง SC8132X เพื่อหาความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยังสามารถใช้วิธีการนี้มาศึกษาในกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์ *Sc. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ร่วมกัน เพื่อทดสอบวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว ภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกับที่หมักจริงในอุตสาหกรรม นอกจากนี้การศึกษาในครั้งนี้ยังเป็นหลักฐานชิ้นแรกของการเจริญ

และการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *Sc. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธีเชิงปริมาณ (quantitative) โดยอาศัย PCR profiles การศึกษาดังกล่าวยังเป็นวิธีการนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการหมักโดยสายพันธุ์ยีสต์ผสม กับองค์ประกอบและกลีณรสที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักไวน์อีกด้วย เนื่องจากความแตกต่างของสัดส่วนของสายพันธุ์ยีสต์ในแต่ละช่วงของการหมักมีผลต่อกลีณรสของไวน์ ยีสต์จะผลิตเอสเทอร์ที่สำคัญในช่วงแรกๆ ของการหมัก และผลิตแอลกอฮอล์ในช่วงต่อมา ดังนั้นปริมาณของยีสต์จึงสำคัญในแต่ละช่วงของการหมัก เนื่องจากจะมีผลต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างกลีณรสในไวน์ และสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกลีณรสในไวน์ด้วย การตรวจติดตามสัดส่วนของสายพันธุ์ยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักจึงมีความสำคัญในกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์มากกว่า 1 สายพันธุ์ การพัฒนาเทคนิค microsatellite ในการระบุสายพันธุ์ยีสต์ สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการเตรียมยีสต์ให้มีปริมาณที่เหมาะสม และใช้เพื่อทำนายการเปลี่ยนแปลงของกลีณรสในไวน์ได้

ในปี 2005 Legras *et al.* ได้สำรวจความแตกต่างด้านพันธุกรรม ที่สามารถถูกตรวจสอบได้โดยตำแหน่งของ microsatellite ตำแหน่งต่างๆ ในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของการวิเคราะห์โดยใช้ microsatellite จากตำแหน่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 41 ตำแหน่ง (ตำแหน่งใหม่ 23 ตำแหน่ง และ 18 ตำแหน่งที่มีรายงานไว้แล้ว) ใน *Sc. cerevisiae* 10 สายพันธุ์ ทั้ง 41 ตำแหน่งกระจายอยู่ในโครโมโซมยีสต์ทั้ง 16 โครโมโซม ซึ่งมี 30 ตำแหน่งที่อยู่บริเวณ Open Reading Frames (ORF) พบว่าเมื่อวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยไพรเมอร์ทั้ง 41 คู่ โดยวิธี gel electrophoresis จะมี 29 ตำแหน่งที่สามารถแสดงความแตกต่างของยีสต์ได้ และจากการวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ของตำแหน่ง microsatellite 21 ตำแหน่ง (ตำแหน่งใหม่ 8 ตำแหน่ง และที่มีรายงานไว้แล้ว 13 ตำแหน่ง) ของยีสต์ 46 สายพันธุ์ โดยวิธี capillary electrophoresis พบว่ามี 6 ตำแหน่ง (SCAAT1, YOR267C, C4, C5, C11 และ YPL009C) มีความหลากหลายมากที่สุดที่จะนำมาศึกษาในยีสต์ *Sc. cerevisiae* และ 3 ใน 6 ตำแหน่งนั้นได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรกในงานวิจัยนี้ ผลการวิเคราะห์ทั้ง 6 ตำแหน่ง รวมกันนั้นจะเป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ได้สูง นอกจากนี้ dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ของทั้ง 6 ตำแหน่ง ในยีสต์ทั้งหมด 67 สายพันธุ์ ยังแสดงถึงการจัดกลุ่มของยีสต์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของยีสต์ (geographic origin) และลักษณะทางพันธุกรรม (genetic characteristics) รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ยีสต์อีกด้วย

Jubany *et al.* (2008) ได้ศึกษายีสต์ที่แยกมาจากอาหารและเครื่องดื่มที่ได้จากการหมัก มีจุดประสงค์เพื่อหาเทคนิควิธีที่เหมาะสมในการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยอาศัยความหลากหลายของตำแหน่ง microsatellite และ/หรือ single nucleotide polymorphisms (SNPs) จากการศึกษาตำแหน่ง microsatellite จำนวน 9 ตำแหน่ง โดยคัดเลือกจาก 33 ตำแหน่ง พบว่าสายพันธุ์ wine yeast ทั้งหมดจำนวน 120 สายพันธุ์ จากแหล่งต่างๆ สามารถแยกได้เป็น 29 สายพันธุ์ และได้เสนอแนะเว็บไซต์เกี่ยวกับตำแหน่ง microsatellite ของยีสต์ *Sc. cerevisiae* หรือ The *Saccharomyces cerevisiae* Microsatellites และ SNPs Genotyping Database ที่เว็บไซต์ www.pasteur.edu.uy/yeast เพื่อประโยชน์ในการศึกษาเพิ่มเติมอีกด้วย

6.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย

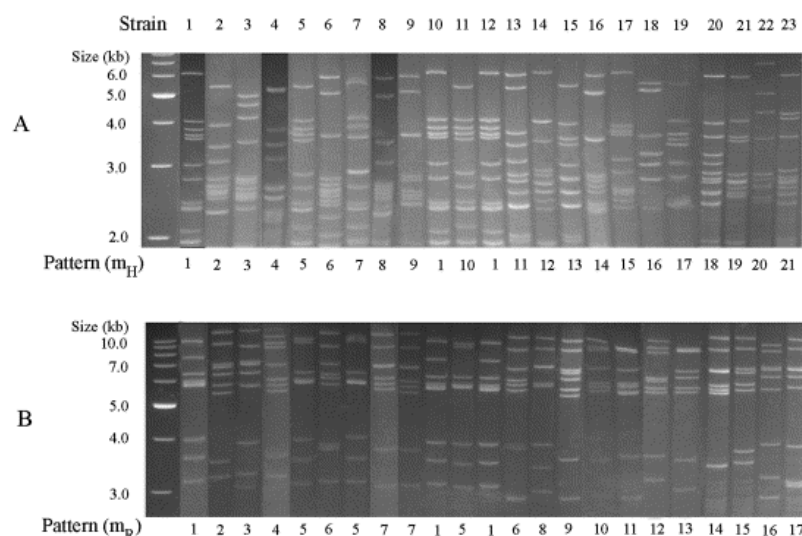
การวิเคราะห์แผนที่การตัดดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโทคอนเดรียด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ หรือ mitochondrial DNA–Restriction Fragment Length Polymorphisms (mtDNA-RFLP) เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้บอกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์มาเป็นเวลานานแล้ว mitochondrial DNA polymorphisms ถูกนำมาประยุกต์ใช้และประสบความสำเร็จในการศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ ซึ่งมีงานวิจัยหลายเรื่องก่อนหน้านี้ได้พัฒนาวิธีการแยก mtDNA เช่นงานวิจัยของ Gargouri (1989) ได้ปรับปรุงวิธีการแยก mtDNA ให้เร็วขึ้น โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการ treat ด้วยฟีนอล ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการทดลอง และให้ผลผลิตของ mtDNA บริสุทธิ์สูง ปริมาณอยู่ในช่วง 50-100 µg ต่อ 100 มิลลิลิตร ของยีสต์เริ่มต้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆ ได้ต่อไป เช่น การวิเคราะห์ restriction enzyme digestion, electrophoresis, blotting, labeling, cloning และ sequencing เป็นต้น อย่างไรก็ตาม mtDNA-RFLP ก็เป็นวิธีที่ค่อนข้างซับซ้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ เพื่อที่จะนำมาวิเคราะห์แผนที่การตัดในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะมีปัญหาที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ในลักษณะของ routine analysis จนกระทั่งปี 1992(a) Querol *et al.* ได้พัฒนาวิธีดังกล่าว เพื่อจุดประสงค์ในการลดระยะเวลา และความซับซ้อนของการวิเคราะห์ ในขณะเดียวกันยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของยีสต์ และความเสถียรในการวิเคราะห์ mtDNA-RFLP จึงกลายมาเป็นเทคนิคที่ง่าย และต่อมาได้ประสบความสำเร็จในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ในสปีชีส์ต่างๆ ได้แก่ ยีสต์ในสกุล *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* และ *Zygosaccharomyces* เป็นต้น

ในการพัฒนาเทคนิคดังกล่าว Querol *et al.* (1992a) ได้พัฒนาการวิเคราะห์แผนที่การตัด mtDNA โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) โดยไม่ต้องแยกไมโทคอนเดรีย และ mtDNA ให้บริสุทธิ์ (โดยวิธี ultracentrifugation ด้วย sucrose gradient และ cesium chloride (CsCl) gradients ตามลำดับ) ก่อนที่จะมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การทดลองนี้สามารถทำได้โดยการแยก DNA ทั้งหมดจากเซลล์ยีสต์โดยอาศัยวิธี standard miniprep และใช้เอนไซม์ G+C rich restriction endonuclease ในการตัดสายดีเอ็นเอ เอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส เช่น *AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *MaeI*, *MaeII*, *MboI*, *Sau3AI*, *RsaI*, *TaqI* หรือ 5 เบส เช่น *DdeI*, *HintI*, *MaeIII* เป็นต้น เนื่องจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) มีทั้งขนาดและความยาวที่มากกว่าดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mtDNA) และเอนไซม์ดังกล่าวมีตำแหน่งจดจำส่วนใหญ่อยู่บนสายดีเอ็นเอในนิวเคลียส และมีตำแหน่งจดจำ 2-3 ตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้รูปแบบการตัด mtDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงแผนที่การตัดได้อย่างชัดเจน และสามารถตรวจสอบได้อย่างง่ายดายบนเจลอะกาโรสโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส วิธีนี้จึงเป็นไปได้ที่จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ RFLP เพื่อบ่งบอกความแตกต่างระหว่าง mtDNA ของยีสต์ การวิเคราะห์นี้ทำได้ง่าย ไม่มีปัญหาในการทำซ้ำ และให้ผลรวดเร็ว โดยใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอ 3 ชั่วโมง เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชั่วโมง และขั้นตอนการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 2 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการวิเคราะห์ mtDNA restriction มีความเหมาะสมในการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ในการทำไวน์ (Querol *et al.*, 1992a, 1994)

ในปีเดียวกัน Querol *et al.* (1992b) ได้พัฒนาการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mtDNA-RFLP ให้มีความรวดเร็ว ง่าย และลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ เพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมกระบวนการหมักไวน์ ที่ถูกชักนำให้เกิดกระบวนการหมักโดยสายพันธุ์ active dry yeast หรือเรียกว่ากระบวนการหมักแบบ inoculated fermentation เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทำให้สามารถเข้าใจทิศทางของกระบวนการหมักต่างๆ เช่น บทบาทของสายพันธุ์ active dry yeast และบทบาทของ *Sc. cerevisiae* ธรรมชาติที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ในงานวิจัยนี้สามารถชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อกระบวนการหมักจริงๆ แต่ยีสต์ดังกล่าวไม่มีผลในการยับยั้งการเกิดสายพันธุ์ยีสต์ตามธรรมชาติในระยะแรกของการหมัก ซึ่งสายพันธุ์ธรรมชาตินี้ยังมีความสำคัญต่อการสร้างกลิ่นรสของไวน์อีกด้วย

ต่อมาในปี 2001 Lopez *et al.* ได้พัฒนาวิธีการศึกษาต่อจากการศึกษาข้างต้น สำหรับการวิเคราะห์ mtDNA restriction เพื่อลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ โดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งต้องการผลที่ถูกต้อง แม่นยำในเวลาสั้นๆ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ในการทำไวน์ โดยอาศัยวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดและการใช้เอ็นไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำส่วนใหญ่อยู่บนสายดีเอ็นเอในนิวเคลียส เช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้น แต่จะปรับเปลี่ยนวิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์และขั้นตอนการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ถูกลดเวลาลงเหลือ 36 ชั่วโมงจากเดิม 48 ชั่วโมงโดยใช้ microfuge tube ในการเลี้ยงเซลล์ สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์การตัดใช้เวลาเพียง 33 นาที โดยใช้เตาอบไมโครเวฟสำหรับการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและการแยกชิ้นดีเอ็นเอบนเจลชนิด minigel และสำหรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอได้ใช้วิธีเดียวกับการทดลองของ Querol *et al.* (1992b) แต่มีการปรับเปลี่ยนโดยลดขั้นตอนและปริมาณของสารเคมี เอ็นไซม์ และสารละลายลงเล็กน้อย วิธีการวิเคราะห์ของ Lopez สามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้ โดยที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ mtDNA restriction รวมกับขั้นตอนในการเลี้ยงเซลล์แล้วจะใช้เวลาลดลง 52.5 ชั่วโมงจากเดิมที่มีรายงานในงานวิจัยของ Querol ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ยีสต์ในสปีชีส์อื่นๆ ได้อีกด้วย

ในระยะหลังจากการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวให้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการบอกความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกันของนักวิจัยกลุ่มต่างๆ ข้างต้น เทคนิค mtDNA RFLP ก็ถูกนำมาใช้มากขึ้น และนอกจากเทคนิคดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการศึกษายีสต์ที่แยกจากอาหารหมักแล้ว เทคนิคนี้ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษายีสต์สายพันธุ์ที่ถูกพบในแหล่งอื่นอีกด้วย เช่น clinical isolates (Llanos *et al.*, 2004) และสายพันธุ์ที่เป็น probiotic strain (Llanos *et al.*, 2006) เป็นต้น และเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษายีสต์สายพันธุ์ทางการค้า ได้แก่งานวิจัยของ Schuller *et al.* (2004) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค mtDNA RFLP โดยอาศัยเอ็นไซม์ *HinfI* และ *RsaI* ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งพบว่าแผนที่การตัดที่ได้จากการตัด mtDNA ด้วยเอ็นไซม์ *HinfI* แสดงรูปแบบการตัดถึง 21 รูปแบบ จากยีสต์ *Sc. cerevisiae* ที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด 23 สายพันธุ์ ในขณะที่แผนที่การตัดที่ได้จากการตัด mtDNA ด้วยเอ็นไซม์ *RsaI* แสดงรูปแบบการตัด 17 รูปแบบ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แผนที่การตัด mtDNA ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ในทางการค้า 23 สายพันธุ์ รูปแบบการตัด 21 รูปแบบ (รูปA) และ 17 รูปแบบ (รูปB) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* และ *RsaI* ตามลำดับ

ที่มา: Schuller *et al.* (2004)

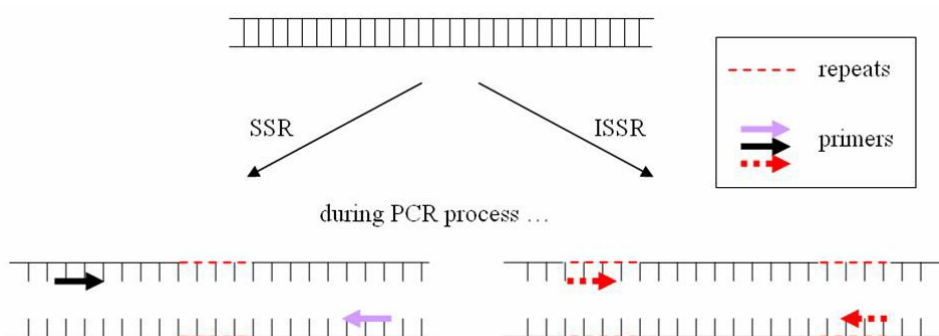
เทคนิคนี้ยังถูกนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของยีสต์ 7 สปีชีส์ จำนวน 35 สายพันธุ์ ที่แยกจากเนื้อหมัก (dry-cured meat) อันได้แก่ สปีชีส์ *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Deharvomyces polymorphus* และ *Pichia carsonii* และพบว่าเทคนิคนี้สามารถแยกความแตกต่างได้ทั้งระดับสปีชีส์ และระดับสายพันธุ์ได้ดี ยกเว้นสปีชีส์ *R. mucilaginosa* ซึ่งไม่แสดงความแตกต่างของแผนที่การตัดในแต่ละสายพันธุ์ (Andrade *et al.*, 2006) วิธีนี้ยังถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม sparkling cider ควบคู่กับการระบุสปีชีส์ยีสต์ด้วยการวิเคราะห์แผนที่การตัด rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 and ITS4 โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดกับแผนที่การตัดของสายพันธุ์อ้างอิงที่มีอยู่ในฐานข้อมูล จากนั้นยีสต์ที่ถูกระบุสปีชีส์เป็น *Saccharomyces* spp. ก็จะถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อหาความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์โดยการศึกษา mtDNA-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *HinfI* (Valles *et al.*, 2008) สำหรับการศึกษายีสต์ในกล้าเชื้อที่เรียกว่า Hamei ซึ่งเป็นกล้าเชื้อที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตเครื่องดื่มที่มีลักษณะคล้ายกับสาโทของไทย ก็ได้มีการศึกษาเช่นกัน โดยศึกษายีสต์จำนวน 163 ไอโซเลทที่แยกจาก Hamei ซึ่งเป็นกล้าเชื้อคล้ายกับลูกแป้งของไทยจำนวน 54 ตัวอย่างโดยการศึกษาคล้ายกับ

การศึกษาของ Valles *et al.* (2008) เนื่องจากการวิเคราะห์แผนที่การตัด rDNA สำหรับการระบุสปีชีส์ของยีสต์ จากนั้น สปีชีส์ที่ถูกระบุว่าเป็น *Sc. cerevisiae* ก็จะถูกนำมาวิเคราะห์ mtDNA-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *HinfI* และ *HaeIII* (Jeyaram *et al.*, 2008) จะเห็นได้ว่าเทคนิคนี้มีการศึกษาเรื่อยมาตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน และเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างภายในสปีชีส์ *Sc. cerevisiae* อย่างมากมายทีเดียว

6.3 การศึกษา Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)

Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิค PCR อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ โดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสที่เป็นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ที่ขนาบข้างตำแหน่งที่ต้องการศึกษา เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถศึกษาได้ครั้งละหลายๆ ตำแหน่งหรือเรียกว่าเป็น multiloci marker การออกแบบไพรเมอร์สามารถออกแบบได้จากการศึกษาลำดับเบสของตำแหน่งส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ เช่น (CA)_n ลำดับเบสนี้มีหลายตำแหน่งในจีโนมของสิ่งมีชีวิต และเนื่องจากลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์ที่มีชุดของลำดับเบสเรียงซ้ำๆ กัน และเป็นลำดับเบสอนุรักษ์นี้เอง ทำให้ไพรเมอร์ที่ได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ หรือนำไปใช้ในรูปแบบของ Universal primers ซึ่งไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนให้เข้ากับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา (Luque *et al.*, 2002)

ไพรเมอร์ที่ใช้อาจใช้ในปฏิกิริยา PCR อาจจะใช้เพียงชนิดเดียวก็ได้ดังภาพที่ 4 ซึ่งเป็นภาพการเปรียบเทียบการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ microsatellite และ ISSRs เทคนิคนี้มีข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลดีเอ็นเอเบื้องต้น (Bornet and Branchard, 2001) และให้ความหลากหลายสูง (highly polymorphic) สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การศึกษา phylogeny การตรวจติดตามยีน (gene tagging) การทำแผนที่จีโนม (genome mapping) และการศึกษาวิวัฒนาการ (evolutionary biology) เป็นต้น (Reddy *et al.*, 2002)



ภาพที่ 4 หลักการของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Microsatellite และ ISSR

ที่มา: Yip *et al.* (2007)

นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วทั้งในเรื่องของการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และในเรื่องของการนำไปใช้งาน เนื่องจากให้รูปแบบของ ISSR product ที่มีความหลากหลายสูง และให้รูปแบบคงเดิมเมื่อทำซ้ำ (รัฐพร, 2547) วิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการศึกษารูปแบบของ ISSRs นั้นนอกจากจะสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ (inter-species) ของสิ่งมีชีวิตแล้ววิธีดังกล่าวยังมีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จในการศึกษาในการศึกษาในระดับภายในสปีชีส์ (intra-species) อีกด้วย

ในประเทศไทย ISSR ถูกนำมาใช้ทั้งในพืช เช่น ในการศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีสารเปลาโนทอล ที่สามารถนำมารักษาโรคกระเพาะได้ และจากการศึกษาปลาน้ำจืดที่ได้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ แทนการศึกษาด้วยเทคนิคอาร์เอฟีดี ซึ่งทำซ้ำแล้วให้ผลไม่เหมือนเดิม งานวิจัยนี้พบว่า 3 ไพรเมอร์คือ $(CA)_8G$, $BSC(GA)_8$ และ $CRN(2)(CTT)_5$ ที่สามารถใช้สร้างเครื่องหมายโมเลกุลแบบไอเอสเอสอาร์ที่ให้รูปแบบคงเดิมเมื่อทำซ้ำ และเมื่อนำมาจัดกลุ่มจากแถบไอเอสเอสอาร์ที่ได้ โดยสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มปลาน้ำจืดได้สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดและลักษณะทางกายภาพของใบ ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้มีความแตกต่างกันตามแหล่งกำเนิด และยังพบว่าไพรเมอร์ $(CA)_8G$ สามารถบอกความแตกต่างเบื้องต้นระหว่างดินปลาน้ำจืดที่มีปริมาณเปลาโนทอลสูงกับต่ำได้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าดินปลาน้ำจืดจากแหล่งกำเนิดต่างกันจะมีปริมาณเปลาโนทอลในใบต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับความแตกต่างทางพันธุกรรม (รัฐพร, 2547)

สำหรับการใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ในการศึกษาในสัตว์ในประเทศไทยได้ถูกนำมาศึกษาในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระบือ เพื่อหาความสัมพันธ์ของ พ่อ แม่ และลูก จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยใช้ oligonucleotide primers จำนวน 24 ชนิด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์โดยเทคนิค ISSRs สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูกได้อย่างชัดเจนที่ 100% (ศักดิ์และคณะ, 2551) ISSRs ยังถูกนำมาใช้การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการจัดจำแนกเชื้อราจากแหล่งต่างๆ 15 สายพันธุ์ ที่เป็นสาเหตุของโรคราสนิมของถั่วเหลือง และแสดงลักษณะรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน โดยอาศัยไพรเมอร์จาก UBC (University of British Colombia) จากการศึกษาดังกล่าวสามารถจำแนกเชื้อราสนิมออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ เช่น เชื้อราสนิมที่แยกได้จากจังหวัดนครปฐมมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แตกต่างจากที่แยกจากจังหวัดเชียงใหม่ที่บางตัวอย่างมีความใกล้ชิดกัน และบางตัวอย่างไม่มีความสัมพันธ์กันในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีความหลากหลายสูงในท้องถิ่นต่างๆ (ศรีสุข และ ขนิษฐา, 2546) สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รายงานเกี่ยวกับการนำเทคนิค ISSR มาใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ *Sm. fibuligera* ออกเป็นกลุ่ม ๆ ซึ่งถือว่าเป็นการนำมาประยุกต์ใช้ครั้งแรกในงานวิจัยเกี่ยวกับยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก

6.4 การวิเคราะห์ Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Denaturing high-performance liquid chromatography เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ได้นำมาใช้ในการจัดกลุ่มยีสต์ในงานวิจัยนี้ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ค่อนข้างใหม่ ซึ่งถูกเริ่มพัฒนาขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1995 (Oefner *et al.*, 1995) อาศัยหลักการในการแยกโครงสร้างดีเอ็นเอที่จับตัวกันแบบ homoduplexes และ heteroduplexes ออกจากกันภายใต้สภาพ denature ที่จำเพาะ และนับว่าเป็นเทคนิคที่ใช้ระบบอัตโนมัติที่สามารถแยกผลผลิต PCR โดยใช้ระบบ ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP HPLC) system. DHPLC ถูกนำมาใช้ในช่วงแรกๆ เกี่ยวกับการตรวจสอบความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดจากการเพิ่มขึ้น (insertions) และการหายไป (deletions) ของลำดับเบส นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบ genomic single nucleotide polymorphisms (SNPs) และ microsatellites เทคโนโลยีในการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR สำหรับการแยกความแตกต่างของ heterozygous DNA fragment โดยอาศัยหลักการของ ion-pair reversed-phase (IP-RP) HPLC และ การวิเคราะห์ temperature-modulated heteroduplex analysis เช่น ในกรณีที่ศึกษาการกลายพันธุ์แบบ point mutations ดีเอ็นเอ

ที่มีโครงสร้างเป็น heterozygous DNA fragment ซึ่งมี single nucleotide polymorphism (SNP) จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR จากนั้นผลผลิต PCR สามารถนำมาโหลดลงคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ ได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้เสียสภาพที่ 95 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงทีละ 1 องศาเซลเซียส จนถึง 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาจับตัวกันใหม่แบบสุ่ม รูปแบบการจับตัวของ heterozygous fragment จะเกิดได้ 4 แบบ โดยมี 2 ชนิดที่จับกันแบบ mismatch (heteroduplexes คือ T/C และ G/A) และอีก 2 ชนิดที่ matched (homoduplexes คือ T/A และ G/C) ในระบบจะประกอบด้วยเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) นั่นคือคอลัมน์ DHPLC ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะถูกยึดจับ matrix โดยทำปฏิกิริยากับ triethylammoniumamine (TEAA) ที่ทำหน้าที่เป็น ion-pairing reagent และ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งจะเป็นตัวชะตัวอย่างดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ ประกอบด้วยส่วนผสมของ aqueous buffer ที่เป็ organic co-solvent (acetonitrile) และ TEAA ซึ่งเป็นสารที่มีประจุตรงข้ามกับ โมเลกุลดีเอ็นเอ เมื่อได้รับ acetonitrile ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม โมเลกุล DNA ที่จับกับ TEAA จะถูกชะออกจาก column

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับแยกความแตกต่างจะขึ้นอยู่กับค่า GC content ของลำดับเบสของผลผลิต PCR ซึ่งกรณีที่เราทราบลำดับเบสของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ สามารถคำนวณได้จากโปรแกรม DHPLC Melt Program ที่เว็บไซต์ <http://insertion.stanford.edu/melt.html> นอกจากเทคนิคดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของลำดับเบสทั้งที่เป็นแบบ Insertion/deletion และ SNP แล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจหา allele frequency ในตัวอย่างที่ถูกรวมกันจำนวนมาก (DNA pooling) เช่น การตรวจหาความแปรปรวนของลำดับเบสภายใน specific PCR amplicon และใช้ในการตรวจหา sequence variation เบื้องต้นก่อนยืนยันผลด้วยวิธีการหาลำดับเบสโดยตรง (DNA sequencing)

การวิเคราะห์ DHPLC สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เวลาไม่เกิน 10 นาที ทั้งนี้รวมถึงขั้นตอน column regeneration และ reequilibration และ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างมากกว่า 100 ตัวอย่างใน 24 ชั่วโมง (Shi *et al.*, 2006) เทคนิคนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ และประสบความสำเร็จในงานวิจัยด้านต่างๆ เช่นทางด้านการแพทย์ (Frueh and Noyer-Weidner, 2003), microbial investigations (Hurtle *et al.*, 2003), methylation analysis (Couvert *et al.*, 2003), RNA analysis (Azarani and Hecker, 2001) และ gene cloning (Spiegelman *et al.*, 2000) ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ได้

ใช้ heteroduplexes ในการตรวจสอบ genetic variations อ้างอิงเทียบกับ homoduplex ภายใต้สภาวะการทำให้สูญเสียสภาพดีเอ็นเอแบบ partial หรือ partially denaturing conditions

สำหรับการศึกษาในยีสต์ Goldenberg *et al.* (2005a) ได้ประยุกต์ DHPLC ในการตรวจสอบ และระบุสปีชีส์ยีสต์จำนวน 13 สปีชีส์ ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือด และอุจจาระผู้ป่วย ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส และการทดสอบทางชีวเคมี พบว่า profiles และ retention times ที่ได้จากการวิเคราะห์ DHPLC สอดคล้องกับสปีชีส์ยีสต์สายพันธุ์ที่เป็น dominant species ที่มีในตัวอย่าง นอกจากนี้จากการศึกษาได้เสนอแนะว่าเทคนิคนี้ไม่มีปัญหาในการทำซ้ำและไม่ขึ้นกับแหล่งเก็บตัวอย่างอีกด้วย นอกจากนี้ยังได้ศึกษายีสต์สปีชีส์ *Candida* sp. ซึ่งเป็นอีกสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ และก่อให้เกิดโรค เทคนิค DHPLC ถูกนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ดังกล่าวและผลการวิเคราะห์สามารถทำได้ภายใน 1 วัน จะเห็นได้ว่าข้อดีของการตรวจสอบในระยะเวลาที่จำกัดของเทคนิคนี้ มีประโยชน์ในการพัฒนาชุดทดสอบในอนาคตอีกด้วย (Goldenberg *et al.*, 2005b)

สำหรับงานวิจัยนี้ เทคนิค DHPLC ได้ถูกนำมาใช้เพื่อจุดประสงค์ในการศึกษาความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักอาหารและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์พื้นบ้านของไทย ซึ่งเป็นอีกหนึ่งในการประยุกต์เทคนิคดังกล่าวในการศึกษาความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง D1/D2 domain นอกจากนี้จะศึกษาการจัดจำแนกยีสต์โดยเทคนิค DHPLC แล้ว ในงานวิจัยนี้ยังเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นๆ อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง PCR Thermal cycler ของ Applied Biosystems
- 1.2 เครื่องเซนตริฟิวจ์ ของ HERAEUS รุ่น Biofuge Primo
- 1.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์ แบบควบคุมอุณหภูมิ ของ HERAEUS รุ่น Biofuge Primo
- 1.4 Vacuum manifold ของ Promega รุ่น Wizard SV96
- 1.5 Gel electrophoresis ของ LIFE TECHNOLOGIES รุ่น Sunrise
- 1.6 ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม ของ Bio- Active
- 1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ SHELLAB
- 1.8 เครื่องวัดปริมาณ DNA และ RNA ของ PERKIN ELMER รุ่น MBA 2,000
- 1.9 Pipetman ของ GILSON
- 1.10 Vortex mixer ของ Scientific Industries
- 1.11 ตู้ดูดควันพิษ (Frame Hood) ของ Trane รุ่น Newlab
- 1.12 ตู้บ่มเชื้อ ของ SHELLAB รุ่น 1575
- 1.13 ตู้แช่เชื้อ
- 1.14 เครื่องชั่ง ของ Sartorius รุ่น BP310S
- 1.15 เครื่องหาลำดับสารพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ (DNA Sequencer) 310 และ 377
- 1.16 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ของ Hirayama Manufacturing Co., Japan รุ่น HA30
- 1.17 ตู้ทำความเย็น -20°C ของ PUFFER HUBBARD รุ่น JUF 1816A
- 1.18 ตู้ทำความเย็น 4°C ของ CHILLED รุ่น PT-30 Series
- 1.19 เครื่องวัด % แอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ยี่ห้อ Salleron Dujadin (Paris, France)
- 1.20 เครื่องวิเคราะห์ DHPLC (The WAVE DNA Fragment Analysis System) รุ่น 3500HT (Transgenomic, Omaha, Nebr).

2. เอนไซม์และสารอณูชีวภาพ

- 2.1 เอนไซม์ RNase A; Sigma, USA
- 2.2 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (*Taq* polymerase); MBI, USA
- 2.3 เอนไซม์ *Hinf*I; Boehringer Mannheim, Germany.
- 2.4 เอนไซม์ zymolyase
- 2.5 ไพร์เมอร์ NL1 และ NL4 สำหรับการวิเคราะห์การหาลำดับเบสบริเวณ D1/D2
- 2.6 ไพร์เมอร์ที่ติดฉลากด้วยสี fluorogenic compound สำหรับการวิเคราะห์ microsatellite
- 2.7 บัฟเฟอร์ TE และ TBE
- 2.8 นิวคลีโอไทด์ (dNTPs); Promega, USA
- 2.9 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem, USA)
- 2.10 ชุดทดสอบ API ID 32 C kit (BioMerieux, France)

วิธีการ

1. สายพันธุ์ยีสต์

1.1 แหล่งที่มาของยีสต์ ไอโซเลตยีสต์ที่นำมาศึกษาได้จากการแยกเชื้อยีสต์จากกล้าเชื้อแห้ง (ลูกแป้ง) ข้าวหมาก สาโท และน้ำตาลเมา สำหรับยีสต์ที่นำมาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการวิเคราะห์โดยเทคนิคทางโมเลกุล เป็นยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทต่าง ๆ จำนวน 18 ไอโซเลต ซึ่งเป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 12 ไอโซเลต และ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 6 ไอโซเลต จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งรายละเอียดของแต่ละไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 1

1.2 การแยกยีสต์จากกล้าเชื้อแห้ง ทั้งจากลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก และระหว่างการผลิตสาโท, ข้าวหมาก และน้ำตาลเมา โดยวิธี spread plate ซึ่งมีขั้นตอนการแยกดังต่อไปนี้ นำตัวอย่างกล้าเชื้อแห้งมาบดในโถรงบคยาที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำผงกล้าเชื้อที่ได้ 1 กรัม (สำหรับตัวอย่างที่เก็บระหว่างกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อื่นๆ นำส่วนที่เป็นน้ำหมักมา 1 มิลลิลิตร) ใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex

mixer จะได้สารละลายที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางถึง 10^{-6} คูลสารละลายที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ ใช้ spreader เกลี่ยให้ทั่วจาน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่ต่างกันมาเชียลงบน Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการแยกยีสต์จากเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อื่นๆ จะเก็บตัวอย่างจากข้าวหมากที่มีวางขายทั่วไปตามท้องตลาด และระหว่างการหมักสาโทในสถานที่ผลิต (โรงงานเจ้าพระยาสาโท) จากน้ำตาลเมา และระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลเมา (จังหวัดเพชรบุรี) โดยนำส่วนของน้ำหมักมาแยกยีสต์ โดยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

1.3 การเลี้ยงและเก็บรักษายีสต์ สามารถทำได้โดยเก็บโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะใช้อาหาร Malt extract medium สำหรับกรณีวิเคราะห์คุณสมบัติการหมัก และเก็บใน Yeast extract-Peptone-Dextrose medium (YPD) (ภาคผนวก ก ข้อ 3) สำหรับกรณีที่นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโมเลกุล โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Evans, 1996) ยีสต์ทุกไอโซเลทจะถูกเก็บเพื่อรักษาสกุลในระยะยาว โดยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract (YM) (ภาคผนวก ก ข้อ 4) บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมกลีเซอรอล 60% (v/v) ผสมให้เข้ากัน และแบ่งใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1.2 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที ก่อนที่จะเก็บที่ -80 องศาเซลเซียสหรือใน liquid nitrogen ต่อไป (ดัดแปลงจาก Kurtzman and Fell, 1998)

2. การจำแนกเชื้อยีสต์โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการหมักสารประกอบคาร์บอน ด้วยชุด

ทดสอบ API 32 C (BioMerieux, France)

2.1 การเตรียมภาคทดสอบ ชุดทดสอบ API ID 32 C kit ซึ่งเป็นชุดทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์ โดยภายในชุดทดสอบจะมีหลอดซึ่งถูกบรรจุสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ ทั้งหมด 32 หลอด ซึ่งแต่ละหลอดบรรจุสารประกอบคาร์บอนแตกต่างกันดังต่อไปนี้ D-Galactose, cycloheximide (Actidione), D-Saccharose (sucrose), N-Acetyl-Glucosamine, Lactic acid, L-arabinose, D-cellobiose, D-raffinose, D-maltose, D-trehalose, Potassium 2-Ketogluconate, Methyl- α D-Glucopyranoside, D-Mannitol, D-Lactose (bovine origin), Inositol, D-Sorbitol, D-Xylose, D-Ribose, Glycerol, L-Rhamnose, Palatinose, Erythritol, D-Melibiose, Sodium

Glucuronate, D-Melezitose, Potassium Gluconate, levulinic acid (Levulinate), D-Glucose, L-Sorbose, Glucosamine, Esculin

ตารางที่ 1 ยีสต์จากแหล่งรวบรวมจุลินทรีย์

ลำดับที่	ไอโซเลท	TISTR No.	สปีชีส์	แหล่งที่มา	อ้างอิง
1	S1	5003	<i>Sc. cerevisiae</i>	สาโท	W. Daengsubha
2	S2	5024	<i>Sc. cerevisiae</i>	น้ำตาลเมา	W. Daengsubha
3	S3	5039	<i>Sc. cerevisiae</i>	สาโท	P. Suyanandana
4	S4	5092	<i>Sc. cerevisiae</i>	น้ำตาลเมา	J. Kumnuanta
5	S5	5094	<i>Sc. cerevisiae</i>	สาโท	J. Kumnuanta
6	S6	5110	<i>Sc. cerevisiae</i>	น้ำตาลเมา	J. Kumnuanta
7	S7	5160	<i>Sc. cerevisiae</i>	น้ำตาลเมา	P. Tammarat
8	S8	5161	<i>Sc. cerevisiae</i>	ลูกแป้ง	M. Chaowsongket
9	S9	5197	<i>Sc. cerevisiae</i>	ลูกแป้ง	W. Somporn
10	S10	5278	<i>Sc. cerevisiae</i>	ข้าวหมาก	M. Suzuki
11	S11	5337	<i>Sc. cerevisiae</i>	ลูกแป้ง	K. Supanwong
12	S12	5339	<i>Sc. cerevisiae</i>	high alcohol production	S. Limtong
13	SF1	5033	<i>Sm. fibuligera</i>	อุ	J. Kumnuanta
14	SF2	5096	<i>Sm. fibuligera</i>	สาโท	J. Kumnuanta
15	SF3	5097	<i>Sm. fibuligera</i>	ลูกแป้ง	J. Kumnuanta
16	SF4	5118	<i>Sm. fibuligera</i>	ลูกแป้ง	J. Kumnuanta
17	SF5	5330	<i>Sm. fibuligera</i>	ลูกแป้ง	M. Suzuki
18	SF6	5304	<i>Sm. fibuligera</i>	ลูกแป้ง	M. Suzuki

2.2 การเตรียมไอโซเลทยีสต์ เตรียมได้โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง MEA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยีสต์มา 1 โคลน มาใส่ใน suspension medium แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นปรับระดับความขุ่นให้ได้อยู่ที่ 2 McFarland ดูดสารละลายเซลล์ที่ได้มา 250 ไมโครลิตร มาใส่ใน C medium (ภาคผนวก ก ข้อ 5) แล้วค่อยๆ ผสมอย่าให้เกิดฟอง จากนั้นหยดตัวอย่างลงใน

หลุมทดสอบทั้ง 32 หลุม รวมถึงหลุมควบคุม (ไม่มีสารประกอบคาร์บอน) หลุมละ 3 หยด และบ่มที่อุณหภูมิห้อง

2.3 การอ่านผลการเจริญของเชื้อ สามารถตรวจสอบได้จากความขุ่นที่เกิดขึ้นในหลุมทดสอบหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลุมที่ขุ่นแสดงถึงความสามารถในการใช้สารประกอบชนิดนั้นๆ สำหรับหลุมควบคุมควรจะไม่มีการเจริญของยีสต์ สำหรับการบันทึกผลในกระดาดบันทึกผลก่อนที่จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ทำได้โดยการใส่เครื่องหมายบวก (+) และลบ (-) สำหรับหลุมที่ขุ่น และไม่ขุ่น ตามลำดับ

2.4 การเทียบเคียงผลโดยผ่านระบบออนไลน์ อ่านผลความขุ่นของ strip ที่ได้ และสามารถนำผลไปวิเคราะห์เพื่อจำแนกยีสต์ โดยเข้าไปในเว็บไซต์ [8https://apiweb.biomerieux.com](https://apiweb.biomerieux.com) ผลทางชีวเคมีของเชื้อทดสอบ ผู้ใช้สามารถเข้าไปดูรายละเอียดวิธีการใส่ผลแบบตัวเลขหรือเป็นเครื่องหมายบวกหรือลบ โปรแกรมจะแสดงถึงผลการเทียบเคียง profile ของเชื้อทดสอบกับ database แล้วให้ผลออกมาเป็น % identity (%id) และแสดงสปีชีส์ที่ระบุได้โดยชุดทดสอบนี้ นอกจากนี้ยังแสดงถึงค่า T index เพื่อแสดงระดับความเชื่อมั่นสำหรับผลการทดสอบอีกด้วย

3. การจำแนกเชื้อยีสต์โดยใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอ

3.1 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 26S Large-subunit และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

3.1.1 การเตรียมยีสต์เพื่อสกัดดีเอ็นเอ เตรียมได้โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดลงในอาหารแข็ง YPD โดยวิธี streak plate บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนียีสต์มาจำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร YPD 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอ นำยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยเก็บเซลล์ 3 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงในหลอด microcentrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นเติม lysis buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 6) 300 ไมโครลิตร เติม phenol/chloroform/iso-amyl alcohol (25/24/1 v/v) 250 ไมโครลิตร

และเติม glass beads ประมาณ 0.3 กรัม ลงในตะกอนเซลล์ที่ได้ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วน upper phase แล้วเติม chloroform/iso-amyl alcohol (24 :1 v/v) ในปริมาณที่เท่ากัน หลังจากผสมโดยการกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เก็บ supernatant แล้วเติมเอทานอล 100% ในปริมาณเป็นสองเท่าของส่วนสารละลายที่ได้ จะพบดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวขุ่น เก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย ETOH 70% ก่อนที่จะกำจัด RNA และละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 7) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียมได้อีกครั้งด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เพื่อเก็บรักษาดีเอ็นเอที่เตรียมได้ ควรเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นำดีเอ็นเอของยีสต์ทั้งหมด ที่สกัดได้จากข้อ 3.1.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของดีเอ็นเอตรงบริเวณ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 26S Large-subunit ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยอาศัยไพรเมอร์ NL1 และ NL4 (เสาวลักษณ์, 2547) ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Forward primer NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

Reverse primer NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

องค์ประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 5 ไมโครลิตร, dNTPs mix (100mM) (Bioline USA Inc.) จำนวน 1.6 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNA polymerase (5 unit/ μ l) (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc.) จำนวน 0.1 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 2 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ จำนวน 0.8 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ forward และ reverse (10 μ M) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H₂O แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (GeneAmp PCR 9700; Applied Biosystems Inc.) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ช่วง Preheat 95 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ, ช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing 52 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, extension 72

องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 36 รอบ และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที, จำนวน 1 รอบ และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1.4 การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ sodium acetate สามารถทำได้โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 3.1.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.7 มิลลิลิตร จากนั้นเติม stock solution A ปริมาตร 52 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 3M sodium acetate จำนวน 2 ไมโครลิตร และ EtOH 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที ก่อนที่จะนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างการเก็บนี้น้ำออกมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นเก็บตะกอนผลผลิต PCR โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วล้างตะกอน PCR ที่ได้ด้วย EtOH 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใส่ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งในโถดูดความชื้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย deionized H_2O ปริมาตร 6 ไมโครลิตร

3.1.5 ตรวจวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของผลผลิต PCR โดยเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถทำได้โดยผสมผลผลิต PCR กับสียติดตาม (tracking dye) หรือ loading dye ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อสียติดตามเป็น 1:1 สำหรับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบมีความเข้มข้นเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผสมดีเอ็นเอมาตรฐานกับสียติดตามในอัตราส่วน 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 และ 1:9 โดยจะได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 40, 120, 200, 280 และ 360 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นหยอดดีเอ็นเอเปรียบเทียบเรียงตามลำดับความเข้มข้นและตัวอย่างผลผลิต PCR ลงในหลุมเจลที่มีความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อขั้ว power supply ให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวี และคำนวณหาความเข้มข้นของผลผลิต PCR โดยโปรแกรมในเครื่อง Gel doc โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้ ค่าที่ได้จะแสดงอยู่ในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งความเข้มข้นของผลผลิต PCR ที่จะนำมาใช้ในการหาลำดับเบสอยู่ในช่วง 180-

200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับคุณภาพของผลผลิต PCR สามารถสังเกตได้จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้บนเจลอะกาโรส

3.1.6 การหาลำดับเบส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การทำ cycle sequencing, การล้างสีส่วนเกิน และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ ซึ่งแต่ละขั้นตอนแสดงดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

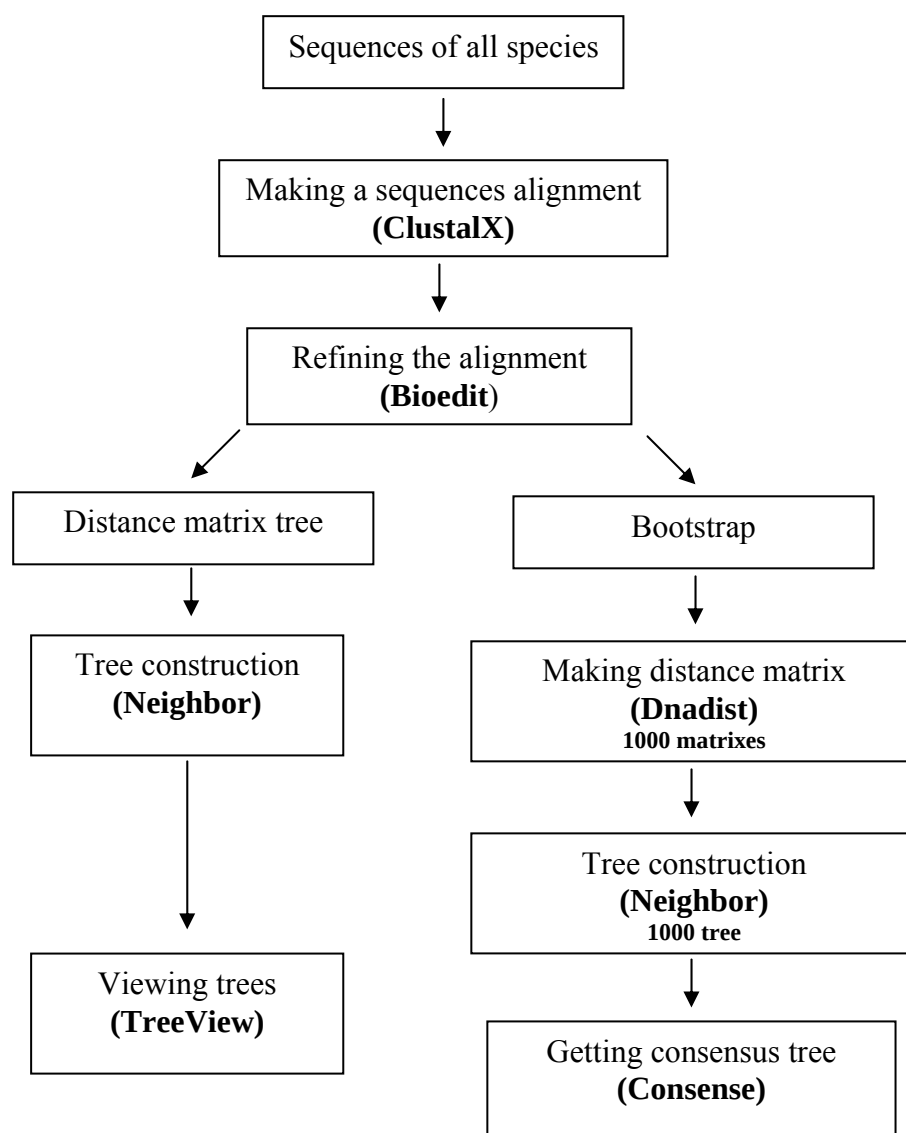
ก. การทำ cycle sequencing องค์ประกอบต่างๆ ในการทำ cycle sequencing โดยปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลผลิต PCR 180-200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, 2.5x Terminator Ready Reaction Premix (BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing RR-100; Applied Biosystems Inc.) จำนวน 4 ไมโครลิตร, 5x Sequencing buffer (BigDye Terminator v1.1, v.3.1) จำนวน 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ forward (NL1) หรือ reverse (NL4) (5 μ m) ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H₂O จากนั้นผสมให้เข้ากันและหมุนเหวี่ยง (spin down) แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler ตั้งโปรแกรมดังนี้ 96 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (preheat) และ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที, 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

ข. การล้างสีส่วนเกิน โดยนำผลผลิต cycle sequencing ที่ได้ในข้อ ก มาใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.7 มิลลิลิตร จากนั้นเติม stock solution B ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 125 mM EDTA จำนวน 2 ไมโครลิตร และ 3M sodium acetate จำนวน 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างการเก็บนี้น้ำออกมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นนำไปเก็บตะกอนผลผลิต PCR โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอน PCR ที่ได้ด้วย EtOH 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งในโถดูดความชื้น และเก็บไว้ในที่มืด

ก. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ โดยนำตะกอน cycle sequencing ที่ได้จากข้อ ข มาละลายด้วยส่วนผสมของ deionized formamide : 2mM EDTA ที่มี blue dextran (50mg/ml) อัตราส่วน 5:1 ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นแช่ลงในน้ำแข็งทันที เพื่อเตรียมไว้สำหรับนำเข้าเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer)(ABI PRISMTM 310 DNA Sequencer; Applied Biosystems Inc.) โดยตรวจผลการอ่านลำดับเบสได้จากซอฟต์แวร์ (software) สำหรับ sequencing (data collection software, sequencing analysis software, sequence navigator และ autoassembler) จากเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ (หทัยรัตน์, 2550)

3.1.7 การวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อระบุชนิดของยีสต์ ทำได้โดยนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเข้าไปที่เว็บไซต์ ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ผลการระบุชนิดจะแสดง accession number ที่มีค่า % homology สูงที่สุดเรียงตามลำดับมากไปน้อย และรายละเอียดการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณดังกล่าว พร้อมด้วยรายละเอียดข้อมูลลำดับเบสนั้นๆ อย่างชัดเจน

3.1.8 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของยีสต์จากข้อมูลลำดับเบส (วสันต์ และ BioIT team, 2547) ลำดับเบสที่ได้จะถูกแก้ไขและเปลี่ยนรูปแบบ (format) ของลำดับเบสให้อยู่ในรูปของ FASTA format โดยใช้โปรแกรม Chromas LITE (version 2.0) ก่อนที่จะเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับเบสของยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และโปรแกรม BioEdit (version 5.0.6) จะถูกนำมาใช้ในการแก้ไข aligned sequences และแปลงไฟล์ให้เป็นนามสกุล Phylip ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมต่างๆ ใน PHYLIP package โดยใช้ Kimura-2-parameter model ในโปรแกรม dnadist เพื่อสร้าง distance matrix โดยภายใน distance matrix จะมีค่า distance ระหว่างลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบ สำหรับ distance matrix นี้สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม neighbor สำหรับค่าทางสถิติ (bootstrap) ได้จากการคำนวณ consensus tree จาก bootstrap tree data (resembling 1000 ครั้ง) โดยโปรแกรม consenses ขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆ แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ลำดับขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส โดยใช้ PhyML package

3.2 การวิเคราะห์ Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

ผลผลิต PCR ที่ได้จากหัวข้อ 3.1.3 จำนวน 5 ไมโครลิตร จะถูกโหลดอัตโนมัติเข้าสู่ส่วนของเฟสเคลื่อนที่หรือที่เรียกว่า mobile phase โดย autosampler สำหรับคอลัมน์ DNASepHT® Cartridge analytical column ถูกใช้เป็น solid phase และ 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) เป็น basic mobile, 25% acetonitrile เป็น organic modifier โดยที่ gradient elution ที่อัตราคงที่ 1.5

มิลลิลิตรต่อนาที โดย elution gradient ถูกตั้งค่าไว้ดังต่อไปนี้ ที่เวลา 0 นาที (41.1% buffer A และ 58.6% buffer B) ที่เวลา 0.1 นาที (38.4% buffer A และ 61.6% buffer B) ที่เวลา 2.1 นาที (28.4% buffer A และ 71.6% buffer B) ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ใช้สำหรับ *Sm. fibuligera* อยู่ที่ 58.5 และ 59 องศาเซลเซียส สำหรับ *Sc. cerevisiae* ผลผลิตที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์โดย UV analysis ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3.3 การวิเคราะห์โดยเทคนิค Microsatellite

3.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ microsatellite เตรียมโดยวิธีเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส (ในหัวข้อ 3.1.1) ดีเอ็นเอแม่แบบที่นำมาใช้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง SC8132X (Field and Wills, 1998; Techera *et al.*, 2001) ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Forward: 5' CTG CTC AAC TTG TGA TGG GTT TTG G 3'

Reverse: 5' CCT CGT TAC TAT CGT CTT CAT CTT GC 3'

ปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 มิลลิลิตร จะประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, dNTPs mix (100mM) (Bioline USA Inc.) จำนวน 4 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNA polymerase (5 unit/ μ l) (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc.) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 2 ไมโครลิตร, 50mM $MgCl_2$ จำนวน 1.6 ไมโครลิตร และ ไพรเมอร์ forward และ reverse (5 μ M) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H_2O แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (GeneAmp PCR 9700; Applied Biosystems Inc.) โปรแกรมสำหรับเครื่อง thermal cycler จะถูกตั้งไว้ภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้ ช่วง preheat 95 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ, ช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, annealing 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที, จำนวน 1 รอบ และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลทำได้ 2 วิธี

ก. การวิเคราะห์โดย gel electrophoresis (Legras *et al.*, 2005) ขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จะถูกตรวจสอบบนเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2.5 % ใน TBE buffer (ภาคผนวก ก ข้อ 8) ซึ่งจะใช้ 100 bp ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้แสงยูวีวิเคราะห์ และบันทึกผลโดย Gel doc 1000 system และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สามารถมองเห็นได้

ข. วิเคราะห์ด้วย เครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer ซึ่งเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR และใช้โปรแกรม GeneScan ในการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เทียบกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานโดยใช้ red DNA size standard (GENE-SCAN-500 ROX, Applied Biosystems) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลแบบจัดกลุ่ม โดยโปรแกรม Genotyper (PE Applied Biosystems) นำข้อมูลนี้มาสร้างเป็น binary matrix โดยอาศัยวิเคราะห์การปรากฏ (1) และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (0)

3.4 การวิเคราะห์ mtDNA–RFLP การวิเคราะห์แผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของยีสต์ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน

3.4.1 การเตรียมยีสต์เพื่อสกัดดีเอ็นเอ เตรียมได้โดยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดลงในอาหารแข็ง YPD โดยวิธี streak plate บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำโคโลนียีสต์มาจำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร YPD 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี enzymatic breakdown (Lopez *et al.*, 2001) การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี enzymatic breakdown เป็นการสกัดดีเอ็นเอในปริมาณมาก เพื่อที่จะได้ mtDNA ในปริมาณมากด้วย ซึ่งทำตามการทดลองของ Querol *et al.* (1992a) และเปลี่ยนแปลงบางขั้นตอนตาม Lopez *et al.* (2001) โดยการปั่นตกตะกอนเซลล์จาก culture 5 มิลลิลิตรโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที และล้างเซลล์ด้วยน้ำและละลายเซลล์ที่ตกตะกอนด้วยสารละลาย A (ภาคผนวก ก ข้อ 9) 500 ไมโครลิตร เติม zymolyase (2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 4 นาที จากนั้นละลาย spheroplasts ด้วยสารละลาย B (ภาคผนวก ก ข้อ 10) จำนวน 500

ไมโครลิตร เดิม 10% w/v SDS จำนวน 50 ไมโครลิตร ก่อนที่จะผสมและบ่มทันทีที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เดิม 5M potassium acetate 200 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ไอโซโพรพานอลปริมาณเท่ากับสารละลายที่ได้ และหลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอเป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% และทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งในโถดูดความชื้นและละลายดีเอ็นเอใน TE จำนวน 50 ไมโครลิตร

3.4.3 ขั้นตอนการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hin*II ในปริมาตรรวมทั้งหมดยของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ได้จากข้อ 3.4.2 โดยดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบมีความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 12 ไมโครลิตร, เอ็นไซม์ *Hin*II (10 ยูนิต/ไมโครลิตร) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์สำหรับเอ็นไซม์ *Hin*II จำนวน 2 ไมโครลิตร, เอ็นไซม์ RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H₂O แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.4 การวิเคราะห์แผนผังที่การตัดดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัด mtDNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบดูแผนผังที่การตัดภายใต้ UV transilluminator หลังจากย้อมเจลด้วยเอธิเดียม โบรไมด์

3.5 การวิเคราะห์ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

3.5.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ ISSR เตรียมโดยวิธีเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบส และการวิเคราะห์ microsatellite (ในหัวข้อ 3.1.1) ดีเอ็นเอแม่แบบที่นำมาใช้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ UBC (University of British Columbia) จำนวน 12 ไพรเมอร์ ซึ่งรายละเอียดของแต่ละไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 2 องค์ประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, dNTPs mix (100mM) (Bioline USA Inc.) จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, เอ็นไซม์ DNA polymerase (5 unit/ μ l) (IMMOLASE™ DNA

Polymerase; Bioline USA Inc.) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ จำนวน 0.75 ไมโครลิตร และ ไพรมเมอร์ (2μM) 2 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครลิตร ด้วย deionized H₂O แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (GeneAmp PCR 9700; Applied Biosystems Inc.) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ช่วง preheat 95 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ, ช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extention 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 40 รอบ และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที, จำนวน 1 รอบ และทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรมเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ISSR

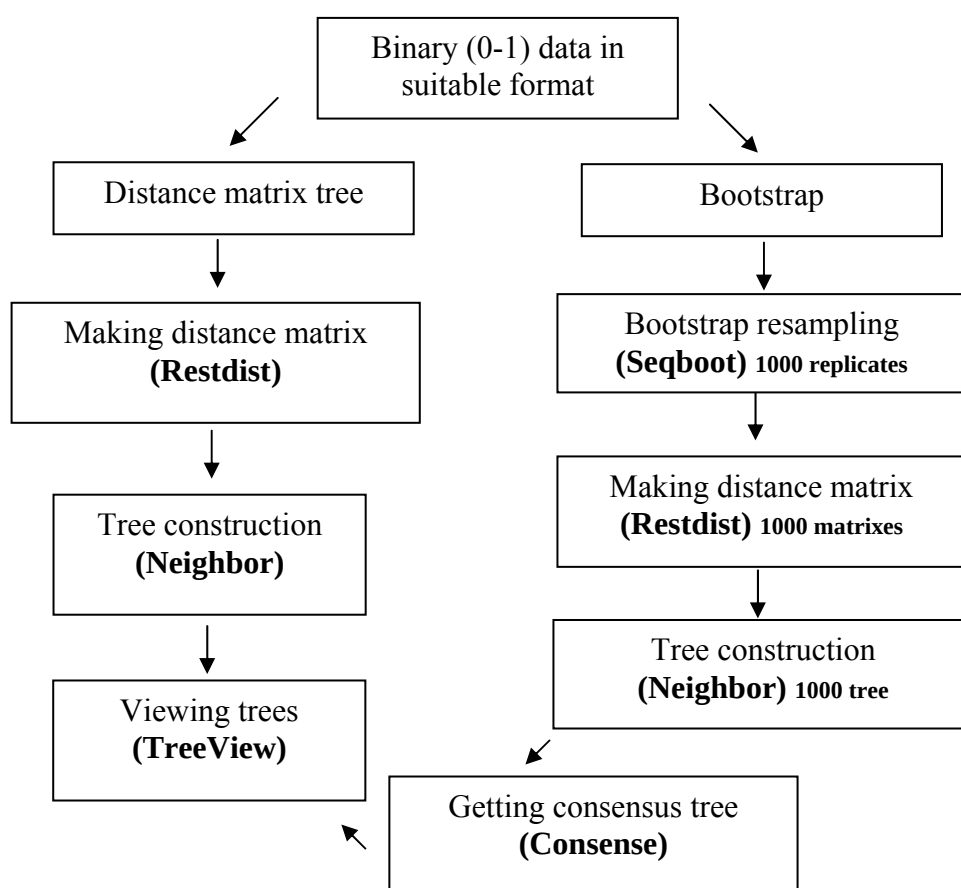
No.	UBC primer no.	DNA sequences	T _m (1mNa ⁺) (°C)
1	UBC 878	(GGAT) ₄	59.81
2	UBC 880	(G(GA) ₂) ₃	61.10
3	UBC 888	BDB(CA) ₇	50.17
4	UBC 889	DBD(AC) ₇	50.17
5	UBC 890	VHV(GT) ₇	50.17
6	UBC 891	HVH(TG) ₇	50.17
7	UBC 811	(GA) ₈ C	63.50
8	UBC 818	(CA) ₈ G	63.50
9	UBC 841	(GA) ₈ YC	62.29
10	UBC 848	(CA) ₈ RG	62.29
11	UBC 857	(AC) ₈ YG	62.29
12	UBC 868	(GAA) ₆	57.67

หมายเหตุ UBC: University of British Columbia primer,

B, D, H, R, V, Y: IUB code

3.6 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship)

จากผลการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการวิเคราะห์ microsatellite, และ ISSR ค่าดังกล่าวจะถูกจัดให้อยู่ในรูปแบบ fasta format แปลงไฟล์ให้อยู่ในนามสกุล Phylip ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมต่างๆ ใน PHYLIP package โดยใช้ โปรแกรม Restdist เพื่อสร้าง distance matrix โดยภายใน distance matrix จะมีค่า distance ระหว่างลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบ สำหรับ distance matrix นี้สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair – Group Method Using the Arithmetic Average) ด้วยโปรแกรม neighbor สำหรับค่าทางสถิติ (bootstrap) ได้จากการคำนวณ consensus tree จาก bootstrap tree data (resembling 1000 ครั้ง) โดยโปรแกรม consense ขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆ แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ลำดับขั้นตอนการใช้โปรแกรมต่างๆในการวิเคราะห์ DNA fragments โดยใช้ Phylip package

4. การทดสอบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

(สมพร, 2544)

4.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ โดยนำยีสต์ 1 ลูกปี่ ที่เลี้ยงบน YPD agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาลงในฟลาสที่บรรจุอาหารเหลว YPD ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมงที่ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (PERKIN ELMER รุ่น MBA 2,000) เพื่อเตรียมกล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันโดยคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$V_1 = N_2 V_2 / N_1$$

เมื่อ N_1 = ค่า OD₆₀₀ ของกล้าเชื้อ

N_2 = ค่า OD₆₀₀ ที่ต้องการใน YPD₁₈ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของ YPD₁₈ ที่ใช้หมักเอธแอลกอฮอล์ (100 มิลลิลิตร)

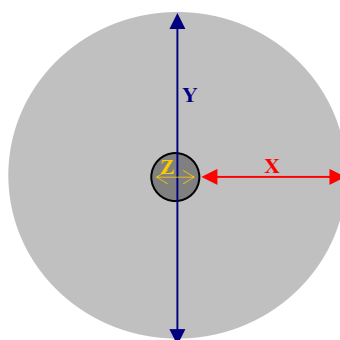
V_1 = ปริมาตรของกล้าเชื้อที่ต้องเติมลงใน YPD₁₈ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.2 ทดสอบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ โดยปิเปตกล้าเชื้อเท่ากับ ปริมาตรที่คำนวณได้ มาใส่ลงในฟลาสที่บรรจุอาหารเหลว YPD₁₈ (ภาคผนวก ก ข้อ 11) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 48 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร สำหรับเปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ที่ยีสต์หมักได้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง วัดได้โดยใช้เครื่องอินูลิโอมิเตอร์ (Salleron Dujadin, Paris, France)

5. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* (สมพร, 2544)

5.1 การเตรียมยีสต์ โดยเพาะเลี้ยงยีสต์แบบ point inoculation 4 จุด ลงบนอาหาร Yeast-Malt extract-Starch (YMS) agar (ภาคผนวก ก ข้อ 12) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายยีสต์ทั้ง 4 จุดลงในอาหาร YMS งานใหม่ด้วยวิธี replica plating บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5.2 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ โดยการราดด้วยสารละลาย Lugol's iodine (ภาคผนวก ก ข้อ 13) ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายออก จากนั้นวัดค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้



เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส: Y

ระยะระหว่างขอบโคโลนีถึงของบริเวณใส: X

เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี: Z

จากนั้นหาค่าอัตราระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส และเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้งของยีสต์ แต่ละไอโซเลท

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การแยกยีสต์

ยีสต์ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แยกจาก ลูกแป้ง ข้าวหมาก และกระบวนการหมักสาโท และน้ำตาลเมา ซึ่งผลการแยกยีสต์จากตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมดจำนวน 25 ไอโซเลตดังนี้ จากน้ำตาลเมาทั้งหมดจำนวน 13 ไอโซเลต จากลูกแป้งจำนวน 1 ไอโซเลต ข้าวหมากจำนวน 7 ไอโซเลต และสาโทจำนวน 4 ไอโซเลต ซึ่งที่มาของยีสต์แต่ละไอโซเลต แสดงในตารางที่ 3 และ 4 จากนั้นยีสต์ทั้ง 25 ไอโซเลตนี้จะถูกนำมาระบุสปีชีส์ในขั้นต้นโดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนด้วยชุดทดสอบ API 32 C และวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลโดยอาศัยลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 5'end ของ Large subunit (26S rDNA) ribosomal DNA ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่ถูกระบุว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย จะถูกนำไปศึกษาโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เพื่อจุดประสงค์ในการศึกษาหาความแตกต่างความหลากหลาย รวมถึงการจัดกลุ่มของยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในแต่ละสปีชีส์อีกด้วย

2. การระบุสปีชีส์ของยีสต์

2.1 การระบุสปีชีส์ของยีสต์โดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน

ผลการระบุสปีชีส์ของยีสต์แสดงในตารางที่ 5 จากยีสต์ทั้งหมด 25 ไอโซเลต สามารถระบุสปีชีส์ของยีสต์ด้วยชุดทดสอบ API 32 C ได้จำนวน 19 ไอโซเลต เนื่องจากชุดทดสอบนี้ไม่สามารถทดสอบยีสต์ได้ทุกสปีชีส์ ซึ่งสปีชีส์ยีสต์ที่สามารถตรวจสอบได้จะถูกแสดงไว้ในฐานข้อมูลของชุดทดสอบนี้ ชุดทดสอบ API 32 C นิยมนำมาใช้ในการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์สปีชีส์ต่าง ๆ ในขั้นต้น (Tempel and Jakobsen, 1998; Rohm

et al., 1990) และมักใช้ร่วมกับการใช้เทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อความถูกต้องแม่นยำในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น (Cocolin *et al.*, 2002; Walczak *et al.*, 2007)

ตารางที่ 3 ไอโซเลตยีสต์ที่แยกจากระบวนการหมักน้ำตาลเมา

ไอโซเลตยีสต์	แหล่งที่มา
CT1	ระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลเมา หลังจากหมักได้ 6 วัน
CT2	ฟองด้านบนภาชนะที่ใช้หมักน้ำตาลเมาหลังจากหมักได้ 6 วัน
CT3	ฟองด้านบนภาชนะที่ใช้หมักน้ำตาลเมาหลังจากหมักได้ 6 วัน
CT4	น้ำตาลสดที่ใส่ไม้พะยอม หมักได้ 1 วัน (น้ำตาลยังไม่ได้ดื่ม)
CT5	น้ำตาลสดที่ใส่ไม้พะยอม หมักได้ 1 วัน (น้ำตาลยังไม่ได้ดื่ม)
CT6	น้ำตาลสดที่ใส่ไม้พะยอม หลังจากหมักได้ 1 วัน (น้ำตาลดื่มแล้ว)
CT7	น้ำตาลสดดื่มแล้ว
CT8	น้ำตาลเมา
CT9	น้ำตาลสดหลังจากกรองไม้พะยอมออก (ยังไม่ดื่ม)
CT10	น้ำตาลเมา
CT11	น้ำตาลสด
CT12	น้ำตาลสด
CT13	บนไม้มะเกลือที่อยู่ในภาชนะที่ใช้หมักน้ำตาลเมา

หมายเหตุ CT: Coconut Toddy

ผลการระบุสปีชีส์ทั้ง 19 ไอโซเลต ที่สามารถทดสอบโดยชุดทดสอบ API 32 C สามารถระบุยีสต์ได้เป็นสปีชีส์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลเมาที่สามารถระบุสปีชีส์โดยอาศัยชุดทดสอบนี้ สามารถทดสอบได้ทั้งหมดทุกไอโซเลต จากจำนวน 13 ไอโซเลต (ไอโซเลต CT1-CT13) ระบุว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 11 ไอโซเลต (CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT10, CT11 และ CT13) *Candida krusei* จำนวน 1 ไอโซเลต (CT12) และ *Debaryomyces etchellsii* / *carsonii* จำนวน 1 ไอโซเลต (CT9) สำหรับยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท ที่สามารถระบุสปีชีส์โดยอาศัยชุดทดสอบนี้มีจำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ได้แก่ RW1, RW3, RW4, RW5, RW7 และ RW11 ซึ่งระบุว่าเป็น *Sc.*

cerevisiae จำนวน 3 ไอโซเลท (RW1, RW3 และ RW4) *Candida guilliermondii* จำนวน 2 ไอโซเลท (RW5 และ RW7) และ *D. etchellsii* / *carsonii* จำนวน 1 ไอโซเลท (RW11) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท

ไอโซเลทยีสต์	แหล่งที่มา
RW1	Starter ของโรงงานเจ้าพระยา
RW 2	น้ำคัวยระหว่างกระบวนการหมักสาโทของโรงงานเจ้าพระยา
RW 3	น้ำคัวยระหว่างกระบวนการหมักสาโทของโรงงานเจ้าพระยา
RW 4	สาโทที่ผลิตจากโรงงานเจ้าพระยา
RW 5	ข้าวหมากกรรมน (ข้าวเหนียวขาว)
RW 6	ข้าวหมากกรรมน (ข้าวเหนียวขาว)
RW 7	ข้าวหมากกรรมน (ข้าวเหนียวดำ)
RW 8	ข้าวหมากกรรมน (ข้าวเหนียวดำ)
RW 9	ข้าวหมากรสสุคนธ์
RW 10	ข้าวหมากคุณเบญญ
RW 11	ข้าวหมากคุณเบญญ
RW 12	ลูกแป้งเหล้า

หมายเหตุ RW: Rice Wine

ผลการระบุสปีชีส์ของยีสต์ จะแสดงออกมาในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์ identification (%ID) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความเหมือนกันระหว่างรูปแบบการใช้สารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ ระหว่างไอโซเลทที่ทดสอบกับสปีชีส์ยีสต์ที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งค่า %ID ของเกือบทุกไอโซเลทแสดงค่าที่สามารถยอมรับได้ กล่าวคือ %ID ที่ยอมรับได้จะต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 80% จากค่าที่แสดงในตารางที่ 5 ค่า %ID ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีค่าอยู่ในช่วง 94.2-99.9%, *Candida krusei* มีค่าเท่ากับ 97.8%, *Candida guilliermondii* มีค่าเท่ากับ 92.1% และ *Debaryomyces etchellsii* / *carsonii* มีค่าเท่าอยู่ในช่วง 79.1-97.5% นอกจากนี้โปรแกรมการวิเคราะห์ยังแสดงค่า T index ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างศูนย์ถึงหนึ่ง ซึ่งค่าดังกล่าวนี้จะมีค่าสูงเมื่อยีสต์ที่นำมาทดสอบสอดคล้องกับยีสต์ส่วนใหญ่ในกลุ่มสปีชีส์ที่ได้ระบุ ซึ่งค่า T index ของยีสต์ *Sc. cerevisiae*

มีค่าอยู่ในช่วง 0.73-0.93, *C. krusei* มีค่าเท่ากับ 1, *C. guilliermondii* มีค่าเท่ากับ 0.93 และ *D. etchellsii* / *carsonii* มีค่าเท่าอยู่ในช่วง 0.84-0.97

ตารางที่ 5 การระบุสปีชีส์ของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และระหว่างกระบวนการหมัก
สาโทและน้ำตาลเมา โดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนโดย ชุด
ทดสอบ API 32 C

ลำดับที่	ไอโซเลท	สปีชีส์	%ID	T index	ระดับความ น่าเชื่อถือ
1	CT1	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
2	CT2	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
3	CT3	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
4	CT4	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
5	CT5	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
6	CT6	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
7	CT7	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
8	CT8	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
9	CT9	<i>D. etchellsii/carsonii</i>	97.5	0.97	Good
10	CT10	<i>Sc. cerevisiae</i>	99.6	0.77	Very good
11	CT11	<i>Sc. cerevisiae</i>	99.8	0.86	Very good
12	CT12	<i>C. krusei</i>	97.8	1.00	Good
13	CT13	<i>Sc. cerevisiae</i>	94.2	0.73	Good
14	RW1	<i>Sc. cerevisiae</i>	99.9	1.00	Excellent
15	RW3	<i>Sc. cerevisiae</i>	99.9	0.93	Excellent
16	RW4	<i>Sc. cerevisiae</i>	99.9	0.93	Excellent
17	RW5	<i>C. guilliermondii</i>	92.1	0.93	Good
18	RW7	<i>C. guilliermondii</i>	92.1	0.93	Good
19	RW11	<i>D. etchellsii/carsonii</i>	79.1	0.84	-

หมายเหตุ CT: Coconut Toddy, RW: Rice Wine

สำหรับการวิจารณ์ผลการทดสอบ ซึ่งมีระดับการวิจารณ์ ที่สามารถยอมรับได้คือ excellent identification, very good identification, good identification และ acceptable identification สำหรับการทดสอบในครั้งนี้ ระดับการวิจารณ์หรือระดับความน่าเชื่อถือในการระบุสปีชีส์ส่วนใหญ่อยู่ในระดับ good, very good และ excellent identification นอกจากค่าเปอร์เซ็นต์ identification, T index และระดับการวิจารณ์แล้ว โปรแกรมนี้ยังแสดงค่า test against ซึ่งเป็นค่าที่แสดงเปอร์เซ็นต์การทดสอบแหล่ง คาร์บอนที่แตกต่างจากยีสต์ส่วนใหญ่ในกลุ่มสปีชีส์ที่ระบุ ซึ่งการทดสอบแหล่งคาร์บอนบางชนิดที่ยีสต์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้สามารถใช้ได้ แต่ตัวอย่างที่ทดสอบไม่สามารถใช้ได้หรืออีกความหมายก็คือยีสต์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้ ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดนี้ได้แต่ตัวอย่างที่ทดสอบสามารถใช้ได้ (เสาวลักษณ์, 2547)

จากตารางที่ 5 สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามค่าเปอร์เซ็นต์ identification ซึ่งได้มาจากความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน และรายละเอียดการใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์ในกลุ่มในแต่ละกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 6 ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน โดยพิจารณาจากการเจริญของยีสต์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8 และ CT13 ยีสต์กลุ่มนี้แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 94.2%ID และค่า T index เท่ากับ 0.73 (ตารางที่ 5) ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 5 ชนิด (ตารางที่ 6) ได้แก่ D-Galactose, D-Sucrose, D-Raffinose, Methyl- α -D-Glucopyranoside และ D-Glucose (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามการระบุสปีชีส์ในกลุ่มที่ 1 นี้แสดง test against Mal 91% ค่านี้แสดงให้เห็นว่า 91% ของสปีชีส์ *Sc. cerevisiae* สามารถที่จะใช้ D-Maltose ได้

สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท CT10 ยีสต์กลุ่มนี้แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 99.6%ID และค่า T index เท่ากับ 0.77 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 6 ชนิด โดยสามารถใช้ Lactic acid เพิ่มเติมจากผลการใช้สารประกอบคาร์บอนของกลุ่มที่ 1 และเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 ที่แสดง test against เป็น Mal 91% จะเห็นได้ว่าถึงแม้การระบุสปีชีส์ในกลุ่มที่ 1 และ 2 จะแสดง test against แต่ผลการวิเคราะห์ยังแสดงค่า %ID ค่อนข้างสูง กล่าวคือสูงกว่าค่าที่ยอมรับได้ (80%ID) และให้ระดับความน่าเชื่อถือเป็นในระดับดี และดีมากสำหรับทั้งสองกลุ่มข้างต้น สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลท CT11 ยีสต์กลุ่มนี้แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 99.8%ID และค่า T index เท่ากับ 0.86 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 6 ชนิด โดยสามารถใช้ D-Maltose เพิ่มเติมจากผลการใช้สารประกอบคาร์บอนของกลุ่มที่ 1 นอกจากนี้ยังแสดงผลการเจริญใน Lactic acid ไม่

ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม โปรแกรมการวิเคราะห์นี้ สามารถที่จะใส่เครื่องหมาย ? ในกรณีที่ผลการเจริญไม่ชัดเจน ซึ่งโปรแกรมก็สามารถที่จะวิเคราะห์ผลได้ และไม่แสดง test against สำหรับกลุ่มนี้ในกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลท RW1 แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 99.9%ID และค่า T index เท่ากับ 1 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 6 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, D-Sucrose, Lactic acid, D-Raffinose, D-Maltose และ D-Glucose ได้ ในกลุ่มที่ 5 ได้แก่ ไอโซเลท RW3 และ RW4 แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 99.9%ID และ ค่า T index เท่ากับ 0.93 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 7 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, D-Sucrose, Lactic acid, D-Raffinose, D-Maltose และ D-Glucose ได้เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 4 แต่สามารถใช้ Methyl- α D-Glucopyranoside เพิ่มเติม สำหรับผลการวิเคราะห์ *Sc. cerevisiae* ในกลุ่มที่ 4 และ 5 พบว่าไม่แสดง test against

สำหรับ *Debaryomyces etchellsii* / *carsonii* สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท CT9 แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 97.5 %ID และค่า T index เท่ากับ 0.97 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 14 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, D-Sucrose, N-Acetyl-Glucosamine, D-Maltose, D-Trehalose, Potassium 2-Ketogluconate, Methyl- α D-Glucopyranoside, D-mannitol, D-Sorbitol, D-Xylose, Palatinose, D-Melezitose, D-Glucose และ L-Sorbose ได้ สำหรับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท RW11 แสดงผลการระบุนอยู่ที่ 79.1 %ID และค่า T index เท่ากับ 0.84 ซึ่งสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 14 ชนิด เช่นเดียวกับ *D. etchellsii* / *carsonii* กลุ่มที่ 1 แต่สามารถใช้ Glycerol ได้และไม่เจริญใน L-Sorbose และแสดง test against SBE 91% ค่านี้แสดงให้เห็นว่า 91% ของสปีชีส์ *D. etchellsii* / *carsonii* สามารถที่จะใช้ L-Sorbose ได้

สปีชีส์ที่ถูกระบุว่าเป็น *Candida krusei* มีเพียงไอโซเลทเดียวได้แก่ ไอโซเลท CT12 ซึ่งให้ค่า %ID และ T index เท่ากับ 97.8% และ 1 ตามลำดับ ยีสต์ไอโซเลทนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 4 ชนิด ได้แก่ N-Acetyl-Glucosamine, Lactic acid, Glycerol และ D-Glucose ได้

สำหรับสปีชีส์ที่ถูกระบุว่าเป็น *Candida guilliermondii* มี 2 ไอโซเลทได้แก่ RW5 และ RW7 ซึ่งให้ค่า %ID และ T index เท่ากันทั้งสองไอโซเลท คือ 97.5%ID และ T index เท่ากับ 0.97 ยีสต์ในกลุ่มนี้สามารถใช้สารประกอบคาร์บอนได้ถึง 20 ชนิด ได้แก่ D-Galactose, Actidione, D-Sucrose, N-Acetyl-Glucosamine, L Arabinose, D-Cellobiose, D-Raffinose, D-Maltose, D-Trehalose, Potassium 2-KetoGluconate, Methyl- α D-Glucopyranoside, D-Mannitol, D-Sorbitol,

D-Xylose, Glycerol, Palatinose , Melezitose, D-Glucose, L-Sorbose และ Glucosamine และไม่มี test against

ยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* เป็นสปีชีส์ยีสต์ที่ต้องการแยกและศึกษาความแตกต่างภายในสปีชีส์ ซึ่งไม่สามารถทดสอบได้โดยอาศัยชุดทดสอบดังกล่าว ในการระบุสปีชีส์จะต้องอาศัยการพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีในขั้นต้น ก่อนที่จะคัดเลือกไปวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งลักษณะโคโลนีจะมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน เป็นผง มีเส้นใยปกคลุม ตรงกลางโคโลนีนูน ขอบมีเส้นใยชัดเจน ลักษณะข้างต้นได้มีการอธิบายอย่างชัดเจนในรายงานของสมพร (2544) จากไอโซเลตยีสต์ทั้ง 25 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีตามที่กล่าวไว้ข้างต้นมีจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต RW2, RW4, RW8, RW9 และ RW12 และถึงแม้จะไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้โดยอาศัยการใช้สารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ ข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามทุกไอโซเลตจะถูกนำมาระบุสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง เช่นเดียวกับไอโซเลต RW10 ที่ให้ผลไม่ชัดเจนในการระบุสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 32 C จากการทดลองพบว่าทั้ง 6 ไอโซเลตนี้ ให้ผลการระบุสปีชีส์โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 6 ผลการเจริญของยีสต์ในกลุ่มต่างๆ ในสารประกอบคาร์บอนที่มีอยู่ในชุดทดสอบ API 32 C

สปีชีส์	สารประกอบคาร์บอน															
	GAL	ATC	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	O
<i>Sc. cerevisiae</i>																
กลุ่มที่ 1	+		+					+				+				
กลุ่มที่ 2	+		+		+			+				+				
กลุ่มที่ 3	+		+		?			+	+							
กลุ่มที่ 4	+		+		+			+	+							
กลุ่มที่ 5	+		+		+			+	+			+				
<i>D. etchellsii / carsonii</i>																
กลุ่มที่ 1	+		+	+					+	+	+	+	+			
กลุ่มที่ 2	+		+	+					+	+	+	+	+			
<i>C. krusei</i>				+	+											
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+			

หมายเหตุ เครื่องหมาย + : สามารถเจริญในหลุมที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดนั้นๆ ได้ และ สัญลักษณ์ ? : ผลการเจริญของยีสต์ไม่ชัดเจน

GAL (D-GALactose), ATC (cycloheximide(ACTidione)), SAC (D-SACcharose (sucrose)), NAG (N-Acetyl-Glucosamine), LAT (LacTic acid), ARA (L-ARAbinose), CEL (D-CELLobiose), RAF (D-RAFFinose), MAL (D-MALtose), TRE (D-TREhalose), 2KG (potassium 2-KetoGluconate), MDG (Methyl- α D-Glucopyranoside), MAN (D-MANNitol), LAC (D-LACtose (bovine origin), INO (INOsitol), O (NO substrate)

ตารางที่ 6 (ต่อ)

สปีชีส์	สารประกอบคาร์บอน																
	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC	test against
<i>Sc. cerevisiae</i>																	
กลุ่มที่ 1													+				Mal 91%
กลุ่มที่ 2													+				Mal 91%
กลุ่มที่ 3													+				
กลุ่มที่ 4													+				
กลุ่มที่ 5													+				
<i>D. etchellsii / carsonii</i>																	
กลุ่มที่ 1	+	+				+				+			+	+			
กลุ่มที่ 2	+	+		+		+				+			+				SBE 91%
<i>C. krusei</i>																	
				+									+				
<i>C. guilliermondii</i>																	
	+	+		+		+				+			+	+	+		

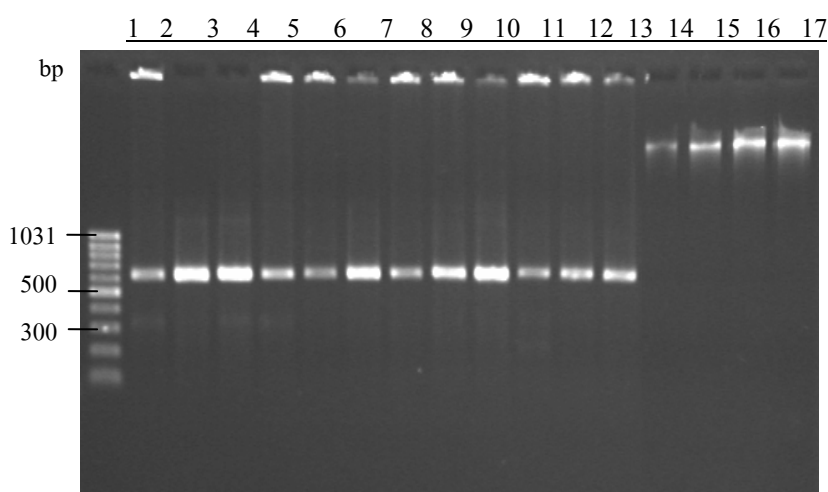
หมายเหตุ เครื่องหมาย + : สามารถเจริญในหลุมที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดนั้นๆ ได้, SOR (D-SORbitol), XYL (D-XYLose), RIB (D-RIBose), GLY (GLYcerol), RHA (L-RHAMnose), PLE (PaLatinosE), ERY (ERYthritol), MEL (D-MELibiose), GRT (sodium GlucuRonaTe), MLZ (D-MeLeZitose), GNT (potassium GlucoNaTe), LVT (lvulinic acid (LeVulinaTe)), GLU (D-GLUcose), SBE (L-SOrBosE), GLN (GlucosamiNe) และ ESC (ESCulin)

2.2 การระบุยีนของยีสต์ โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain

ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) หรือ cycle sequencing ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังต่อไปนี้ (1) การสกัดดีเอ็นเอ (2) การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain โดยเทคนิค PCR (3) การทำ cycle sequencing และ (4) การวิเคราะห์ลำดับเบส

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ของยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท จะถูกนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อหาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้พบว่าแถบดีเอ็นเอไม่มีลักษณะ smear ซึ่งสอดคล้องกับผลการหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นให้ค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 มีค่าอยู่ในช่วง 1.7-2.0 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ค่าที่เหมาะสมที่สุดควรมีค่าเท่ากับ 1.8 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ และในกรณีที่ค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามี RNA ปนเปื้อน

ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะถูกนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ที่อยู่บริเวณ 5'end ของ Large subunit (26S rDNA) ribosomal DNA โดยอาศัยไพรเมอร์ NL1 และ NL4 ซึ่งขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ขนาดผลผลิต PCR ที่ได้นี้ให้ผลเช่นเดียวกับที่มีรายงานของ Kurtzman and Robnett ซึ่งได้ทำการศึกษายีสต์ในกลุ่ม ascomycetous และ *Saccharomyces complex* ในปี 1998 และ 2003 ตามลำดับ ภาพที่ 7 และ 8 แสดงผลการทำปฏิกิริยา PCR และขนาดของผลผลิต PCR ของไอโซเลทที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท (ภาพที่ 7) และจากน้ำตาลเมา (ภาพที่ 8) ตามลำดับ หลังจากตกตะกอนให้ผลผลิต PCR มีความบริสุทธิ์มากขึ้น นอกจากนี้ทั้ง 2 ภาพ ยังแสดงแถบของดีเอ็นเอทราบความเข้มข้น ซึ่งจะใช้ในการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของผลผลิต PCR ของไอโซเลทต่างๆ สำหรับการเตรียมผลผลิต PCR ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยา cycle sequencing อีกด้วย



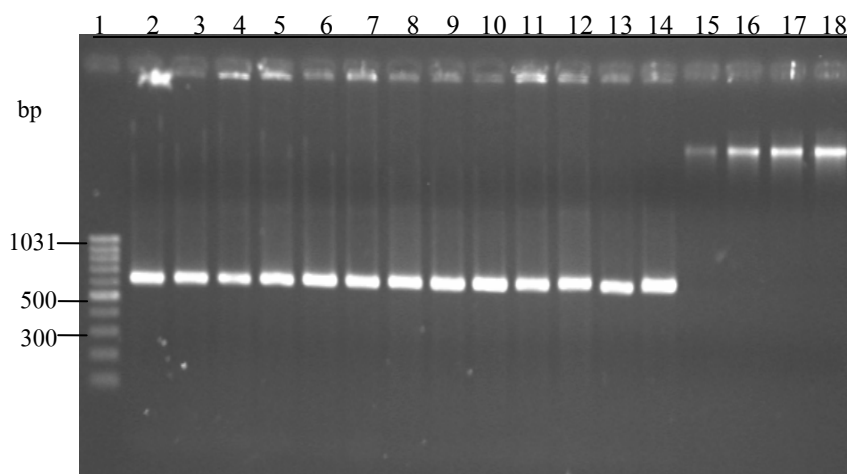
ภาพที่ 7 ผลผลิต PCR ของไอโซเลทยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท จำนวน 12 ไอโซเลท

แถวที่ 1 คือ 100 bp ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)

แถวที่ 2-13 คือ RW1, RW2, RW3, RW4, RW5, RW6, RW7, RW8, RW9, RW10, RW11, RW12 ตามลำดับ

แถวที่ 14-17 คือ ดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้น 40, 120, 200 และ 280 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

หลังจากตกตะกอนผลผลิต PCR เพื่อให้ผลผลิต PCR มีความบริสุทธิ์มากขึ้นแล้ว ผลผลิต PCR ดังกล่าวจะถูกนำมาหาความเข้มข้นอย่างคร่าวๆ โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น ที่มีความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 40, 120, 200 และ 280 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1.5% ซึ่งหลังจากทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น ดังกล่าวแล้ว ทำการปรับความเข้มข้นของผลผลิต PCR ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 180-250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ cycle sequencing (เสาวลักษณ์, 2547) ซึ่งในการทำปฏิกิริยา cycle sequencing นี้ได้ใช้ไพรเมอร์สาย forward (NL1) จากนั้นนำผลผลิต PCR จากการทำ cycle sequencing ไปล้างสีส่วนเกิน เพื่อกำจัดสีส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยอาศัยเครื่องอ่านลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (DNA sequencer)



ภาพที่ 8 ผลผลิต PCR ของไอโซเลทยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลเมา (ไอโซเลท CT) จำนวน 13 ไอโซเลท

แถวที่ 1 คือ 100 bp ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)

แถวที่ 2-14 คือ CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT9, CT10, CT11, CT12, CT13 ตามลำดับ

แถวที่ 15-18 คือ ดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้น 40, 120, 200 และ 280 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

การระบุยีสต์ของยีสต์สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากเครื่องอ่านลำดับเบส มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ที่เว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งเป็นเครื่องมือในการเปรียบเทียบสายลำดับ alignment ที่มักใช้ในกรณีที่สายลำดับเส้นที่เปรียบเทียบ (query sequence) สั้นกว่าเส้นที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วน (local alignment) (วสันต์ และ BioIT Team, 2547) ซึ่งผลการเปรียบเทียบจะแสดงออกมาในรูปของ % identification ผลการระบุยีสต์ของยีสต์ทั้ง 25 ไอโซเลท โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain แสดงดังตารางที่ 7 จากตารางพบว่าไอโซเลทที่ให้ผลการระบุยีสต์ตรงกับ accession number เดียวกัน ได้แก่ CT1 และ CT6 ให้ผลการระบุยีสต์เป็น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งตรงกับ accession number เดียวกันคือ AY529516 ไอโซเลท CT2, CT4, CT7, CT8, CT10 และ RW1 ให้ผลการระบุยีสต์ตรงกับ EF192587 และ ไอโซเลท CT3, CT5 และ CT11 ให้ผลการระบุยีสต์ตรงกับ AY518285 สำหรับ

ไอโซเลท RW2 และ RW12 ให้ผลการระบุยีสต์เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งตรงกับ accession number เดียวกัน คือ AB198183 นอกจากนี้ไอโซเลท RW5 และ RW7 ให้ผลการระบุยีสต์เป็น *Candida caribbica* / *Candida fermentati* ซึ่งตรงกับ accession number เดียวกัน คือ EF063131 สำหรับไอโซเลทอื่นๆ แสดงผลการระบุยีสต์ดังตารางที่ 7 และสำหรับตารางที่ 8 ได้แสดงผลการระบุยีสต์ของทั้ง 2 วิธี ทั้งจากการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนโดยชุดทดสอบ API 32 C และจากข้อมูลลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain เพื่อเปรียบเทียบผลการระบุยีสต์ทั้ง 2 วิธีนี้อีกด้วย

จากการระบุยีสต์ของยีสต์โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ D1/D2 (ตารางที่ 7) สามารถระบุยีสต์ของยีสต์ได้ทุกไอโซเลท ไอโซเลทยีสต์ส่วนใหญ่ให้ค่า % identification (%id) อยู่ในช่วง 98-99% ยกเว้นไอโซเลท CT7 และ RW11 ที่ให้ค่า %identification เท่ากับ 96% และ 91% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่าที่สูงและเป็นที่ยอมรับ มีระดับความน่าเชื่อถือสูง จากทั้งหมด 25 ไอโซเลท ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลเมา (สัญลักษณ์ CT) จำนวน 13 ไอโซเลท สามารถระบุว่าเป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 11 ไอโซเลท *Candida tropicalis* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Issatchenkia orientalis* จำนวน 1 ไอโซเลท สำหรับยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท (สัญลักษณ์ RW) จำนวน 12 ไอโซเลท สามารถระบุยีสต์ ซึ่งระบุว่าเป็น *Sc. cerevisiae* จำนวน 3 ไอโซเลท *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 5 ไอโซเลท และ *Candida caribbica* / *Candida fermentati* จำนวน 2 ไอโซเลท *Pichia farinosa* และ *C. tropicalis* อย่างละ 1 ไอโซเลท และสำหรับไอโซเลทยีสต์ 6 ไอโซเลทที่ไม่สามารถระบุยีสต์ได้โดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนนั้น สามารถระบุยีสต์ได้โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 พบว่า ในทั้งหมด 6 ไอโซเลท ยีสต์จำนวน 5 ไอโซเลท สามารถระบุได้ว่าเป็น *Sm. fibuligera* (RW2, RW6, RW8, RW9 และ RW12) สำหรับ RW10 สามารถระบุได้ว่าเป็นยีสต์ *P. farinosa* ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลท แสดงผลการระบุยีสต์ที่มีระดับความน่าเชื่อถือสูง โดยแสดง %id ถึง 98-99%

ตารางที่ 7 ข้อมูลลำดับเบส (sequence information) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้ง ข้าวหมาก และกระบวนการหมักสาโทและน้ำตาลเมา

ไอโซเลตยีสต์	สปีชีส์ยีสต์	%Identity	Accession number
CT1	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	AY529516
CT2	<i>Sc. cerevisiae</i>	98	EF192587
CT3	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	AY518285
CT4	<i>Sc. cerevisiae</i>	98	EF192587
CT5	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	AY518285
CT6	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	AY529516
CT7	<i>Sc. cerevisiae</i>	96	EF192587
CT8	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	EF192587
CT9	<i>C. tropicalis</i>	98	AJ749824
CT10	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	EF192587
CT11	<i>Sc. cerevisiae</i>	98	AY518285
CT12	<i>I. orientalis</i>	99	AM159110
CT13	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	EF192590
RW1	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	EF192587
RW2	<i>Sm. fibuligera</i>	98	AB198183
RW3	<i>Sc. cerevisiae</i>	99	EF063139
RW4	<i>Sc. cerevisiae</i>	98	AM159109
RW5	<i>P. caribbica</i> / <i>C. fermentati</i>	99	EF063131/DQ377634
RW6	<i>Sm. fibuligera</i>	99	AB195270
RW7	<i>P. caribbica</i> / <i>C. fermentati</i>	98	EF063131/DQ377634
RW8	<i>Sm. fibuligera</i>	99	AB196495
RW9	<i>Sm. fibuligera</i>	99	U09238
RW10	<i>P. farinosa</i>	99	AF335973
RW11	<i>C. tropicalis</i>	91	EF151501
RW12	<i>Sm. fibuligera</i>	99	AB198183

หมายเหตุ CT: Coconut Toddy, RW: Rice Wine

ตารางที่ 8 การระบุปฏิกิริยาของยีสต์โดยอาศัยความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนโดยชุดทดสอบ API 32 C และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain

ไอโซเลท	API 32 C	วิเคราะห์ลำดับเบส D1/D2 domain
CT1	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT2	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT3	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT4	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT5	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT6	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT7	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT8	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT9	<i>D. etchellsii</i> / <i>carsonii</i>	<i>C. tropicalis</i>
CT10	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT11	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
CT12	<i>C. krusei</i>	<i>I. orientalis</i>
CT13	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
RW1	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
RW2	-	<i>Sm. fibuligera</i>
RW3	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
RW4	<i>Sc. cerevisiae</i>	<i>Sc. cerevisiae</i>
RW5	<i>C. guilliermondii</i>	<i>P. caribbica</i> / <i>C. fermentati</i>
RW6	-	<i>Sm. fibuligera</i>
RW7	<i>C. guilliermondii</i>	<i>P. caribbica</i> / <i>C. fermentati</i>
RW8	-	<i>Sm. fibuligera</i>
RW9	-	<i>Sm. fibuligera</i>
RW10	-	<i>P. farinosa</i>
RW11	<i>D. etchellsii</i> / <i>carsonii</i>	<i>C. tropicalis</i>
RW12	-	<i>Sm. fibuligera</i>

หมายเหตุ CT: Coconut toddy, RW: Rice wine

จากผลการทดลองข้างต้น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจะถูกนำไปศึกษาในลำดับต่อไป ให้ผลการระบุยีนที่สอดคล้องกันโดยอาศัยทั้งการทดสอบโดย API 32 C และการวิเคราะห์ลำดับเบส และสำหรับลำดับเบสที่ได้ของทุกไอโซเลทที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จะถูกนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relation) ของยีสต์แต่ละสปีชีส์ที่ได้ระบุยีนที่ไว้วางต้น โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณดังกล่าว เพื่อจุดประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายและศึกษาผลของการจัดกลุ่มของยีสต์ในแต่ละไอโซเลท

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ในแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และระหว่างการหมักสาโท และน้ำตาลเมา ทั้ง 25 ไอโซเลท สามารถวิเคราะห์ได้โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA โดยอาศัยโปรแกรม Clustal X ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ทำงานบนระบบปฏิบัติการ Window โดยใช้ในการเปรียบเทียบลำดับเบสแบบ multiple alignment คือการเปรียบเทียบสายลำดับเบสหลายสายในคราวเดียวกัน จำนวน 3 เส้นขึ้นไป โดยจัดเรียงเป็นรูปสามเหลี่ยมผืนผ้า ซึ่งแต่ละแถวจะประกอบด้วยสายลำดับ 1 เส้นที่อาจมีช่องว่างแทรกอยู่ และมีการเน้นตำแหน่งที่เหมือนกัน (similarity) หรือมีการอนุรักษ์ (conservation) การเปรียบเทียบลำดับเบสพร้อมกันหลายๆ เส้นอย่างเหมาะสมจะต้องให้ค่าคะแนนที่เหมาะสม หมายถึงระดับความเหมือนกันมากที่สุด หรือมีการสูญเสียค่าที่น้อยที่สุด (วสันต์ และ BioIT team, 2547) ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ทั้ง 25 ไอโซเลท แสดงดังภาพที่ 9 ข้อมูลที่เอนเอหลังจากมีการแก้ไขโดยใช้โปรแกรม BioEdit เพื่อจัดการกับลำดับเบสส่วนเริ่มต้นและตัวสิ้นสุดให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันแล้ว จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมต่างๆ ที่มีอยู่ใน Phylip package เริ่มต้นจากการวิเคราะห์หาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม Dnast 2 parameter ค่าที่แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลท แสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งจะแสดงอยู่ในรูปของ Triangular distance matrix ค่าดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อเพื่อสร้าง phylogenetic tree หรือ dendrogram โดยโปรแกรม Neighbor โดยใช้วิธี Neighbor-joining (วสันต์ และ BioIT team, 2547) ซึ่ง dendrogram ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 11

จากภาพที่ 11 ตัวเลขที่อยู่บน phylogenetic tree เรียกว่าค่าความน่าเชื่อถือซึ่งเป็นค่าทางสถิติ (bootstrap) ค่านี้ได้มาจากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Seqboot ในการสร้างจำนวนชุดของลำดับเบสจำนวน 1000 ครั้ง (จำนวนครั้งในการสร้างจำนวนชุดของข้อมูล ขึ้นอยู่กับผู้วิเคราะห์ ซึ่งส่วนใหญ่งานวิจัยที่ถูกตีพิมพ์ นิยมใช้จำนวน 1000 ซึ่งจะเป็นค่าที่เหมาะสมต่อระดับความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมต่อการคำนวณ) ค่าดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อ เพื่อที่จะสร้าง distance matrix จำนวน 1000 matrixes โดยโปรแกรม Dnadist ซึ่งแต่ละ matrix ก็จะถูกนำไปสร้าง phylogenetic tree จำนวน 1000 trees อาศัยวิธี Neighbor-joining ในโปรแกรม Neighbor จากนั้นโปรแกรม Consense ก็จะทำการคำนวณหา consensus tree ซึ่งเป็น tree ที่ถูกต้อง เป็นไปได้ และที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุดจากการเปรียบเทียบทั้ง 1000 trees และจะแสดงค่าทางสถิติ (bootstrap) มา ซึ่งค่านี้จะนำไปแสดงไว้ใน phylogenetic tree ที่ได้ในครั้งแรก ซึ่งค่าระดับความเชื่อมั่นที่ได้จากการทดลองนี้แสดงบนกิ่งของ Phylogenetic tree ดังภาพที่ 11

```

RW6      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCACC
RW8      TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCACC
RW9      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAGCTAGCACC
RW12     CTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAAGCTAGCACC
RW2      CTTGTCCCG - CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAANCTAGCACC
RW5      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACC
RW7      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACC
RW10     CTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAATCTGGCGTC
RW11     TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAATTTTCAAATTTGAAATCTGGCNCT
CT9      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCT
CT2      TTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT5      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
RW3      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAATCTGGTACC
RW4      TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAATCTGGTCCC
CT3      CTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT8      CTTGTACCG - CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTTAAATTTGAAATCTGGTACC
CT11     TTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT10     TTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT1      CTAGTAACCGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT13     CTAGTA - CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT6      TTAGTANCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT4      TTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
RW1      TTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT7      TTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACC
CT12     TCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCTGTGC ---
          **      *****      * *      *****      *

```

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของไอโซเลทยีสต์
ทั้งหมด 25 ไอโซเลท โดย Clustal X

หมายเหตุ บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของเบส

RW6 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG--TAGTCCTTTATCTATG--
 RW8 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG--TAGTCCTTTATCTATG--
 RW9 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG--TAGTCCTTTATCTATG--
 RW12 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG--TAGTCCTTTATCTATG--
 RW2 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG--TAGTCCTTTATCTATG--
 RW5 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTC-TTGTCTATG--
 RW7 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTC-TTGTCTATG--
 RW10 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTC-TTGTCTATG--
 RW11 TTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCTGGCTCCTTGTCTATGTT
 CT9 TTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGCTGGCTCCTTGTCTATG--
 CT2 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT5 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 RW3 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 RW4 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT3 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT8 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT11 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT10 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT13 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT6 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT4 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 RW1 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT7 TTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGG-CCGTTCCCTTGTCTATG--
 CT12 TTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAG-TCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAG--
 ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

RW6 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTG-GATACTA
 RW8 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTG-GATACTA
 RW9 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTG-GATACTA
 RW12 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTG-GATACTA
 RW2 TTCCTTGG-AACATAGACGT-CATAGAGGAGTGAGAACCCCGTATGATTTTG-GATACTA
 RW5 TTTCTTGG-AACA-GGACGT-CACAG-AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATG-CCCAA
 RW7 TTTCTTGG-AACA-GGACGT-CACAG-AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATG-CCCAA
 RW10 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CACAG-AGGGTGAGAATCCCGTGAGATAAGCTT-CCCAG
 RW11 NTNCTTGGGAACA-GAACGTTACAGTAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAN
 CT9 TTTCTTGG-AACA-GAACGT-CACAG-AGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAG
 CT2 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT5 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 RW3 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 RW4 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT3 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT8 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT11 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT10 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT1 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT13 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT6 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT4 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 RW1 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT7 TTCCTTGG-AACA-GGACGT-CATAG-AGGGTGAGAATCCCGTGTTGGCGAGG-AGTGCGG
 CT12 TCCCTTGG-AACA-GGGCGC--CCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCG---GCCG
 ***** ** * ** * ** * ** *

ภาพที่ 9 (ต่อ)

RW6 CTCTTTGTGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW8 CTCTTTGTGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW9 CTCTTTGTGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW12 CTCTTTGTGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW2 CTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW5 TCCTATGTAAGGTGCTTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW7 TCCTATGTAAGGTGCTTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW10 TTCTATGTAAGGTGCTTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW11 GCCTATGTAAGGTTCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGGTAATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT9 GCCTATGTAAGGTTCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT2 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT5 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW3 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW4 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT3 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT8 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT11 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT10 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT1 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT13 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT6 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT4 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 RW1 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT7 TTCTTTGTAAAGTGCCCTTC-GAAGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCTAAGTGGG
 CT12 AAGCA-GTGAGGCCCTTCT-GACGAGTCGAGTTGTTTGGG--AATGCAGCTCCAAGCGGG
 * * * * *

RW6 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW8 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW9 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW12 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW2 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW5 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW7 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW10 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW11 CGGTAAAATCCATCTCAAAGCTAAATTTTTGGCGAGAGACTCGATCGCGAACAAGTACA
 CT9 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT2 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT5 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW3 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW4 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT3 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT8 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT11 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT10 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT1 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT13 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT6 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT4 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 RW1 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT7 TGGTAAA-TTCCATCT-AAAGCTAAATATT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACA
 CT12 TGGTAAA-TTCCATCT-AAGGCTAAATACT-GGCGAGAGAC-CGATAGCGAACAAGTACT
 * * * * *

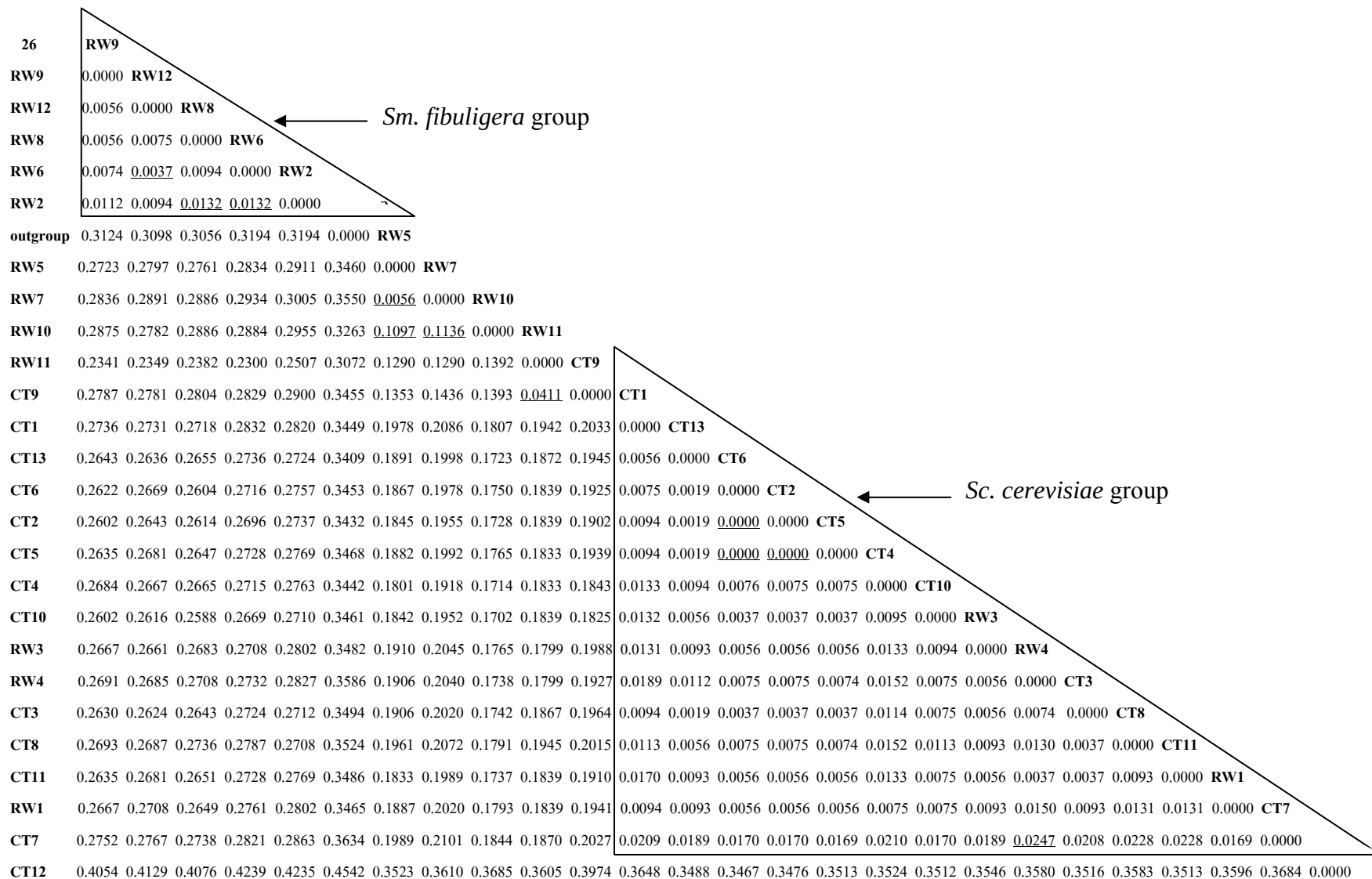
ภาพที่ 9 (ต่อ)

RW6	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGCT
RW8	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGCT
RW9	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGCT
RW12	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGCT
RW2	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGCT
RW5	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW7	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW10	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW11	GTTGATGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT TAAAATTGTT
CT9	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT2	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT5	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW3	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW4	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT3	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT8	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT11	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT10	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT13	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT6	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT4	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
RW1	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT7	GT - GATGGAAA - GATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGT - GAAATTGTT
CT12	GT - GAAGGAAA - GATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGT - GAAATTGTT
	** ** *
RW6	GAAAGGG - AA - GGGCTTGAGGTCAGACTTGG - TGTTTA - ATGATTATCAGTTCTTCTTG
RW8	GAAAGGG - AA - GGGCTTGAGGTCAGACTTGG - TGTTTA - ATGATTATCAGTTCTTCTTG
RW9	GAAAGGG - AA - GGGCTTGAGGTCAGACTTGG - TGTTTA - ATGATTATCAGTTCTTCTTG
RW12	GAAAGGG - AA - GGGCTTGAGGTCAGACTTGG - TGTTTA - ATGATTATCAGTTCTTCTTG
RW2	GAAAGGGGAA - GGGCTTGAGGTCAGACTTGG - TGTTTA - ATGATTATCAGTTCTTCTTG
RW5	GAAAGGGGAA - --GGGTTTGAGATCAGACTCGA - TATTTT - GTGAGCCTTGCCCT - TCGTGG
RW7	GAAAGGGGAA - --GGGTTTGAGATCAGACTCGA - TATTTT - GTGAGCCTTGCCCT - TCGTGG
RW10	GAAAGGGGAA - --GGGCTTGAGATCAGACATGG - TATTTT - GTAAACCTTCTCTCTCGTGG
RW11	GAAACGGGAAATGGTNTTGANATAACACTTNGGTATTTT - GTATGGTNCCTTN - TTCCGG
CT9	GAAAGGGGAA - --GGGCTTGAGATCAGACTTGG - TATTTT - GTATGTTAC - TT - CTTCCG
CT2	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT5	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
RW3	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
RW4	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT3	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT8	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT11	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GNGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT10	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT1	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT13	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT6	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT4	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
RW1	GAAAGGGGAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTT - GTGCCCTCTGCTCCTTGTTG
CT7	GAAAGGTAA - --GGGCATTTGATCAGACATGG - TGTTTTTGTCCTCTGCTCCTTGTTG
CT12	GAAAGGGGAA - --GGGTATTGCGCCCGACATGGGATTGC - GCACCGCTGCTCCTTGTTG
	*** *

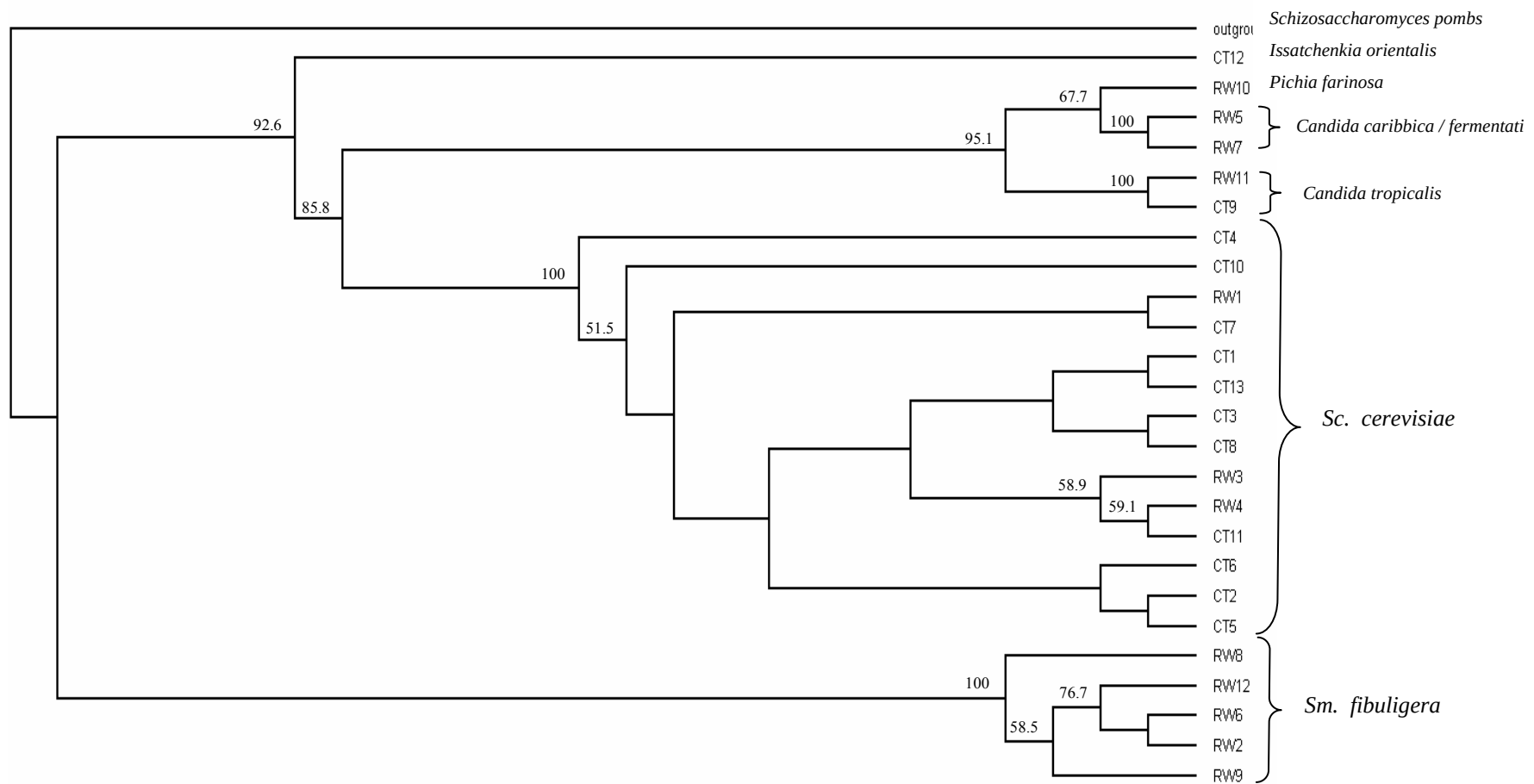
ภาพที่ 9 (ต่อ)

RW6	G- ACTGTGCAC
RW8	G- ACTGTGCAC
RW9	G- ACTGTGCAC
RW12	G- ACTGTGCAC
RW2	G- ACTGTGCAC
RW5	C- GGGGTGACC
RW7	C- GGGGTGACC
RW10	A- GGGGGCCCC
RW11	G- GNTGTCCTC
CT9	G- GGTGGCCTC
CT2	GTAGGGGAATC
CT5	GTAGGGGAATC
RW3	GTAGGGGAATC
RW4	GTAGGGGAATC
CT3	GTAGGGGAATC
CT8	GTAGGGGAATC
CT11	GTAGGGGAATC
CT10	GTAGGGGAATC
CT1	GTAGGGGAATC
CT13	GTAGGGGAATC
CT6	GTAGGGGAATC
CT4	GTAGGGGAATC
RW1	GTAGGGGAATC
CT7	GTAGGGGAATC
CT12	G- - CGGCGCTC
	* *

ภาพที่ 9 (ต่อ)



ภาพที่ 10 ความแตกต่างทางพันธุกรรม (Distance matrix) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain



ภาพที่ 11 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของยีสต์จำนวน 25 ไอโซเลต โดยวิธี Neighbor-joining และค่าทางสถิติ แสดงเฉพาะที่มีค่ามากกว่า 50% โดยกำหนดให้ *Schizosaccharomyces pombs* เป็น outgroup

พิจารณาจากค่าใน Triangular distance matrix ซึ่งจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 กล่าวคือ เมื่อระยะห่างทางพันธุกรรมของ 2 ไอโซเลทมีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าไอโซเลทที่เปรียบเทียบเหมือนกันทุกประการ และเมื่อระยะห่างทางพันธุกรรมของ 2 ไอโซเลท มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าไอโซเลทที่เปรียบเทียบต่างกัน 100% จากภาพที่ 10 พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษามีค่าน้อยมาก (ค่าใกล้ศูนย์) นั่นหมายความว่ายีสต์ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในกลุ่มมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ซึ่งยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Saccharomyces cerevisiae* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละกลุ่มนี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.0037-0.0132 และ 0.000-0.247 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มของ *Candida caribbica* / *Candida fermentati* ซึ่งได้แก่ RW5 และ RW7 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 2 ไอโซเลทนี้เท่ากับ 0.0056 นอกจากนี้สำหรับค่าดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทั้ง 2 ไอโซเลทนี้กับไอโซเลท RW10 มีค่าเท่ากับ 0.1097 และ 0.1136 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าไอโซเลท RW10 ความใกล้ชิดกับไอโซเลท RW5 และ RW7 มากกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งแสดงได้จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมดังกล่าว สำหรับไอโซเลท RW11 ให้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0411 เมื่อเปรียบเทียบกับ CT9 และผลการระบุสปีชีส์ก็ระบุว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันคือ *Candida tropicalis*

จาก Triangular distance matrix ที่ได้จากการวิเคราะห์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA large subunit นี้ สามารถที่แสดงถึงลักษณะการจัดกลุ่มของยีสต์ในรูปแบบของ phylogenetic tree (ภาพที่ 11) จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทยีสต์ที่เป็น *Saccharomyces cerevisiae* ก็ถูกจัดกลุ่มให้อยู่กลุ่มเดียวกัน เช่นเดียวกับไอโซเลทที่เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ก็ถูกจัดกลุ่มให้อยู่กลุ่มเดียวกัน และแยกออกจากสปีชีส์อื่น ๆ อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังให้ค่าทางสถิติสำหรับการจัดกลุ่มของทั้ง 2 สปีชีส์ที่ระดับความเชื่อมั่นถึง 100% เช่นเดียวกันกับที่สปีชีส์ *Candida tropicalis* ได้แก่ไอโซเลท RW11 และ CT9 ก็ถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกัน สำหรับ *Candida caribbica* / *Candida fermentati* ไอโซเลท RW5 และ RW7 ก็ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ค่าทางสถิติสำหรับการจัดกลุ่มของทั้ง 2 สปีชีส์ ที่ระดับความเชื่อมั่นถึง 100% เช่นเดียวกัน สำหรับไอโซเลท CT12 พิจารณาทั้งจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและจาก phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าค่าในตารางระหว่าง CT2 เทียบกับไอโซเลทอื่นๆ มีค่าค่อนข้างสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมกับยีสต์ในกลุ่มอื่นๆ และเมื่อพิจารณาจาก phylogenetic tree สามารถแยก CT2 ออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจนที่ระดับความเชื่อมั่นถึง 92.6% เช่นเดียวกับที่มีรายงานในการศึกษาของ Peterson and Kurtzman ในปี 1991 พบว่าลำดับเบสบริเวณดังกล่าวสามารถแยกสปีชีส์ของยีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เช่นยีสต์ในจีนัส *Issactchenkia*, *Pichia* และ *Saccharomyces* ออก

จากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งหน้าที่แต่ละจีโนม แยกออกเป็นกลุ่มๆ โดยมีค่า bootstrab สนับสนุนผลการจัดกลุ่ม ดังภาพที่ 11

สำหรับการเปรียบเทียบลำดับเบสเฉพาะสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* แสดงในภาพที่ 12 และภาพที่ 13 ตามลำดับ จากภาพการเปรียบเทียบลำดับเบสแสดงให้เห็นว่าภายในสปีชีส์เดียวกันลำดับเบสบริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างกันน้อยมาก แสดงให้เห็นจากเครื่องหมาย * ที่ปรากฏในภาพที่ 12 และ 13 ซึ่งแสดงถึงเบสที่เหมือนกันของลำดับเบสที่ศึกษา และด้วยข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายในการทำซ้ำในขั้นตอนการหาลำดับเบส วิธีดังกล่าวนี้ถือว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และน่าเชื่อถือในการระบุยีสต์ในระดับสปีชีส์ นอกจากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ข้างต้นแล้ว งานวิจัยนี้ยังศึกษาโดยวิธีทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อจุดประสงค์ในการแยกความแตกต่างภายในสปีชีส์ของยีสต์ *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* อีกด้วย

จากผลการศึกษาข้างต้น นอกจากสามารถระบุสปีชีส์ยีสต์ต่างๆ ได้แล้ว ยังสามารถที่จะจัดจำแนกยีสต์แต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้อีกด้วย โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ในการศึกษาในลำดับต่อไปจะเป็นการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* รวมถึงการจัดกลุ่มยีสต์ดังกล่าวด้วย งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์เทคนิค DHPLC ในการศึกษาความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง D1/D2 domain เนื่องจากเทคนิคนี้มีรายงานดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าสามารถที่จะบอกความแตกต่าง โดยการตรวจหา sequence variation และเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้เพื่อการหาการเปลี่ยนแปลงของเบส หรือตรวจหาการเกิดการกลายพันธุ์ งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการจัดกลุ่มยีสต์เบื้องต้น ก่อนที่จะศึกษาเทคนิคทางโมเลกุลอื่นต่อไป

```

CT2      GCCTTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT5      GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT1      - - - CTAGTAACCGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT13     - GCCTAGTA - CGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT6      GCCTTAGTANCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT7      TGCTTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
RW1      GCCTTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT4      GCCTTAGTAC - GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT3      - - CCTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT8      CTCCTTGTACCG - CGAGTGAAGCGGCAAAAGCTTAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
CT11     GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
RW3      GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTG
RW4      GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGTTCAAATTTGAAATCTGGTCCCTTCGGTG
CT10     GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTCTTTTCAGAG
CT9      GCCTTAGTACCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTCTTTTCAGAG
CT12     GCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTG - - - CTTTGC GG
          ***      *****      * * *      *****      *      * *      *

CT2      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT5      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT1      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT13     CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT6      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT7      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
RW1      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT4      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT3      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT8      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT11     CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
RW3      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
RW4      CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT10     CCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGTCTATGTTCCCTTGGA
CT9      TCCGAGTTGTAATTTGAAGAAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGA
CT12     CACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTTGGA
          *****      * * *      * *      * *      *      * *      *

CT2      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT5      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT1      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT13     CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT6      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT7      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
RW1      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT4      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT3      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT8      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT11     CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
RW3      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
RW4      CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT10     CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGG - AGTGCGGTTCTTTGTAAAGTG
CT9      CAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGATCCAGGCTATGTAAAGTT
CT12     CAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCG - - - - GCGGAAGCA - GTGAGGCC
          ***      * * *      *****      *****      *      *      *      * *      *

```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์

Saccharomyces cerevisiae

หมายเหตุ บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของเบส

```

CT2      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT5      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT1      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT13     CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT6      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT7      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
RW1      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT4      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT3      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT8      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT11     CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
RW3      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
RW4      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT10     CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT9      CCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAA
CT12     CTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCATCTAA
          * * * * *

CT2      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT5      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT1      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT13     AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT6      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT7      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
RW1      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT4      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT3      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT8      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT11     AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
RW3      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
RW4      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT10     AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT9      AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAA
CT12     GGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCA
          * * * * *

CT2      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT5      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT1      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT13     CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT6      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT7      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
RW1      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT4      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT3      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT8      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT11     CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
RW3      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
RW4      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT10     CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT9      CTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CT12     CTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGA
          * * * * *

```

ภาพที่ 12 (ต่อ)

CT2 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT5 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT1 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT13 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT6 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT7 CATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 RW1 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT4 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT3 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT8 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT11 CATGGTGTTTT -GNGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 RW3 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 RW4 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT10 CATGGTGTTTT -GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCC
 CT9 CTTGGTATTTT - - - - -GTATGTTACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTACCGGGCC
 CT12 CATGGGGATTGCGCACCG -CTGCCTCTCGTGGGCGGC - -GCTCTGGGCTTTCCCTGGGGCC
 *

CT2 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT5 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT1 AGCATCAGTTTTGG -TGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT13 AGCATCAGTTTTGG -TGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT6 AGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT7 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGAAG -TTA
 RW1 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTTGGTAA -GTA
 CT4 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -NCTNGGTAA -GTA
 CT3 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT8 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT11 AGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 RW3 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 RW4 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT10 AGCATCAG -TTTTGGTGGCAGGATAAAATCCATAGGAATGTAGCTTG -CCTCGGTAA -GTA
 CT9 AGCATCAG -TTTGGCGGTAGGAGAATTGCGATGGAATGTGGCAGGACCTCGGTGTGTG
 CT12 AGCATCGGTTCTTGCTGCAAGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCT - - -TCGGA - - -GTG
 *

CT2 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCNAC - - -GTA -GTCAAG -
 CT5 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCNAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT1 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGG -ACTGAGGACTGCGAC - - -CTAAGTCAAG -
 CT13 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT6 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGC -AC - - -GTAAGTCANG -
 CT7 TTATAACCCTGGGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCNAC - - -NTAAGTCAAG -
 RW1 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCCAC - - -CTAAGTCAAGG
 CT4 TTATAGCC - -TGTGGAATACTGCCAGCTGGGACTGANGACTGCNAC - - -CTAAGTCAAG -
 CT3 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGG -ACTGAGGACTGCNAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT8 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT11 TTATAGCCCTGTGGGAATACTGCCAGCTTGGAAGTGGGACTGAGGACTGCAAC - - -GTA -GTCAAGG
 RW3 TTATAGCC -TGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCAAC - - -GTA -GTCAAG -
 RW4 TTATAGCCCTGTGGGAATACTGCCAGCTTGGAAGTGGGACTGAGGACTGCAAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT10 TTATAGCC -TGTGG -AATACTGCCAGCTNGGACTGAGGACTGCNAC - - -GTAAGTCAAGG
 CT9 TTATAGCC -TTTCGTAATACTGCCAGCTTAGACTGAGGACTGCGGT - - -TTATACCTAGG
 CT12 TTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGG
 *

ภาพที่ 12 (ต่อ)

CT2 ATGCTG-CATAATGG-TATATGCC-GCCCTCTT--
 CT5 ATGCTG-CATAATGGGTATATGCCCGCCCTCT---
 CT1 ATGCTG-CATA-TGG-TATTTGC-GCCCTCTG---
 CT13 ATGCTG-CATAATGG-TATATGC-GCCCTCTT---
 CT6 ATGCTGGCATA-TGG-TATATGCCGCCCCTCTTA--
 CT7 ATGCTTGCATAATGG-TTTTTGCCCCCTTTTGAA
 RW1 ATGCTGGC-TAATGG-TATTTGCC-----
 CT4 ATGCTGGA-TAATGG-TATTTCCGCCCTCTT----
 CT3 ATGCTGGCATAATGG-TATATGCCCCCTC-----
 CT8 ATGCTGGCATAATGG-TAT-TGCCGCGCTA----
 CT11 ATGCTGGCATAATGG-TATATGCCCCCTCT-----
 RW3 ATGCTGGCATAATGG-TATTTGCCCCCTCTTTGAA
 RW4 ATGCTGGC-TAATGG-TATATGCCCCCGCTTGA-
 CT10 ATGCTGGC-TTATGG-TTTATGCCCGCTCTTA--
 CT9 ATGCTGGCTTAATGATCTTAAGTCGCCCTCTG---
 CT12 ATGCTGGCAAAACGGCGCAACACCGCCCGTTT---
 ***** *

ภาพที่ 12 (ต่อ)

RW8 TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCC
 RW9 TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCC
 RW6 TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCC
 RW13 TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCC
 RW2 TCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAGTAGTCCTTTATCTATGTTCC

RW8 TTGGAACA-GGACGTCATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTG
 RW9 TTGGAACA-GGACGTCATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTG
 RW6 TTGGAACA-GGACGTCATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTG
 RW13 TTGGAACA-GGACGTCATAGAGG-GTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTG
 RW2 TTGGAACATAGACGTATAGAGGAGTGAGAACCCCGTATGATTTTGGATACTACTCTTTG

RW8 TGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
 RW9 TGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
 RW6 TGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
 RW13 TGGG-ATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
 RW2 TGGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
 **** *****

RW8 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGAT
 RW9 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGAT
 RW6 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGAT
 RW13 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGAT
 RW2 CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGAT

RW8 GAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGG-AAGGGCTT
 RW9 GAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGG-AAGGGCTT
 RW6 GAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGG-AAGGGCTT
 RW13 GAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGG-AAGGGCTT
 RW2 GAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGGAAGGGCTT

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

หมายเหตุ บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของเบส

```

RW8      GAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGAAGTGTGCACTCGTTTTTCA
RW9      GAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGAAGTGTGCACTCGTTTTTCA
RW6      GAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGAAGTGTGCACTCGTTTTTCA
RW13     GAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGAAGTGTGCACTCGTTTTTCA
RW2      GAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCTTCTTGGAAGTGTGCACTCGTTTTTCA
          *****

RW8      CCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCC - TTGAAATGTGGCTTNCCTTCGGGGA
RW9      CCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCC - TTGAAATGTGGCTTNCCTTCGGGGA
RW6      CCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCC - TTGAAATGTGGCTTNCCTTCGGGGA
RW13     CCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCC - TTGAAATGTGGCTTNCCTTCGGGGA
RW2      CCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACCCC - TTGAAATGTGGCTTNCCTTCGGGGA
          *****

RW8      GTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGACTGCC - CTTCGGCAAGGAT
RW9      GTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGACTGCC - CTTCGGCAAGGAT
RW6      GTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGACTGCC - CTTCGGCAAGGAT
RW13     GTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGACTGCC - CTTCGGCAAGGAT
RW2      GTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGGGACTGAGGACTGCC - CTTCGGCAAGGAT
          *****

RW8      ATTGGCGTAATGACCTTAA
RW9      ATTGGCGTAATGACCTTAA
RW6      ATTGGCGTAATGACCTTAA
RW13     ATTGGCGTAATGACCTTAA
RW2      ATTGGCGTAATGACCTTAA
          *****

```

ภาพที่ 13 (ต่อ)

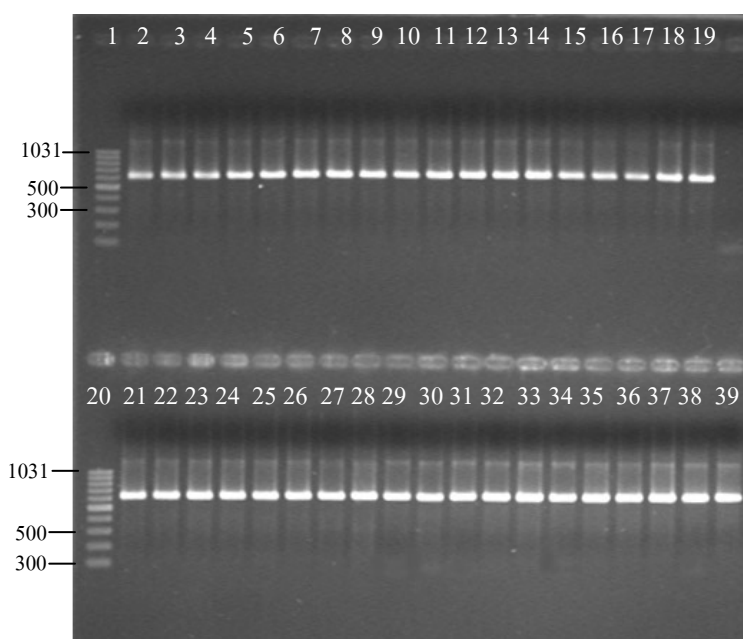
4. การวิเคราะห์ DHPLC

ยีสต์ที่แยกได้ในหัวข้อที่ 1 ที่ผ่านการระบุชนิดโดยเทคนิคข้างต้นในหัวข้อ 2.1 และ 2.2 ว่าเป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งหมดจำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RW1, RW3, RW4, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT10, CT11 และ CT13 และ *Saccharomycopsis fibuligera* ทั้งหมดจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต RW2, RW6, RW8, RW9 และ RW12 ซึ่งทั้ง 5 ไอโซเลต ที่เป็น *Sm. fibuligera* นี้จะถูกเปลี่ยนชื่อไอโซเลต เพื่อความต่อเนื่องในการทำความเข้าใจ โดยเปลี่ยนเป็น SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ตามลำดับ เนื่องจาก *Sm. fibuligera* ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ ไอโซเลต SF1, SF2, SF3, SF4, SF5 และ SF6 และยีสต์ *Sc. cerevisiae* ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ ไอโซเลต S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12 ซึ่งที่มาของแต่ละไอโซเลต ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น (ตารางที่ 1) *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* ทุกไอโซเลต ทั้งที่แยกได้จากตัวอย่างและสายพันธุ์ที่ได้จากศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ จะถูกนำมาศึกษาโดยการวิเคราะห์ DHPLC รวมจำนวนไอโซเลตยีสต์ที่นำมาศึกษาทั้งหมดมีจำนวน 37 ไอโซเลต แบ่งเป็น *Sc. cerevisiae* จำนวน 26 ไอโซเลต และ *Sm. fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลต

การวิเคราะห์ DHPLC ในงานวิจัยนี้ ถูกนำมาใช้เพื่อจุดประสงค์ในการจัดจำแนกยีสต์ และ ศึกษาความแตกต่างระหว่าง profile ของยีสต์ที่แตกต่างกัน โดยศึกษาดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง D1/D2 domain ของ 26S Large subunit โดยที่ผลผลิต PCR ตรงตำแหน่งดังกล่าวของยีสต์ทั้งหมด 37 ไอโซเลต ซึ่งมีขนาด 600 คู่เบส ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ DHPLC แสดงดังภาพที่ 14

ผลผลิต PCR จะถูกโหลดลงสู่คอลัมน์โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ ผลผลิต PCR จะถูกแยกออกจากคอลัมน์ที่เวลาต่างๆ อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ DHPLC และเป็น อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* มีค่าเท่ากับ 59 และ 58.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งเส้นประมาณ 3 นาที ซึ่ง profile ที่ได้จาก การวิเคราะห์ DHPLC แสดงดังภาพที่ 15

ผลการจัดกลุ่มโดยการเปรียบเทียบ profile ที่ได้จาก การวิเคราะห์ DHPLC พบว่าสามารถ จำแนก *Saccharomyces cerevisiae* ออกเป็น 3 กลุ่มเนื่องจาก profile ที่ได้ มีลักษณะแตกต่างกัน 3 แบบ ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต S1, กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต S8 และ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต *Sc. cerevisiae* ที่เหลือจำนวน 24 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S11, S12, RW1, RW3, RW4, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT10, CT11 และ CT13 สำหรับการจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถจำแนก ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลต SF1, กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต SF2, กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลต SF3 และ SF6 และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลต *Sm. fibuligera* ที่เหลือจำนวน 7 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ ไอโซเลต SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ซึ่งผลการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ DHPLC ข้างต้นสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง profile ที่ได้ระหว่างยีสต์ *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* ได้อย่างชัดเจน และสามารถจัดกลุ่มทั้งสองสปีชีส์ ตามลักษณะความแตกต่างของ profile ที่ได้ ออกเป็น 3 และ 4 กลุ่ม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างของ profile ไม่มากนัก ภายในยีสต์สปีชีส์เดียวกัน



ภาพที่ 14 แสดงผลผลิต PCR ตรงตำแหน่ง D1/D2 domain ของ 26S Large subunit ของยีสต์ทั้ง 37

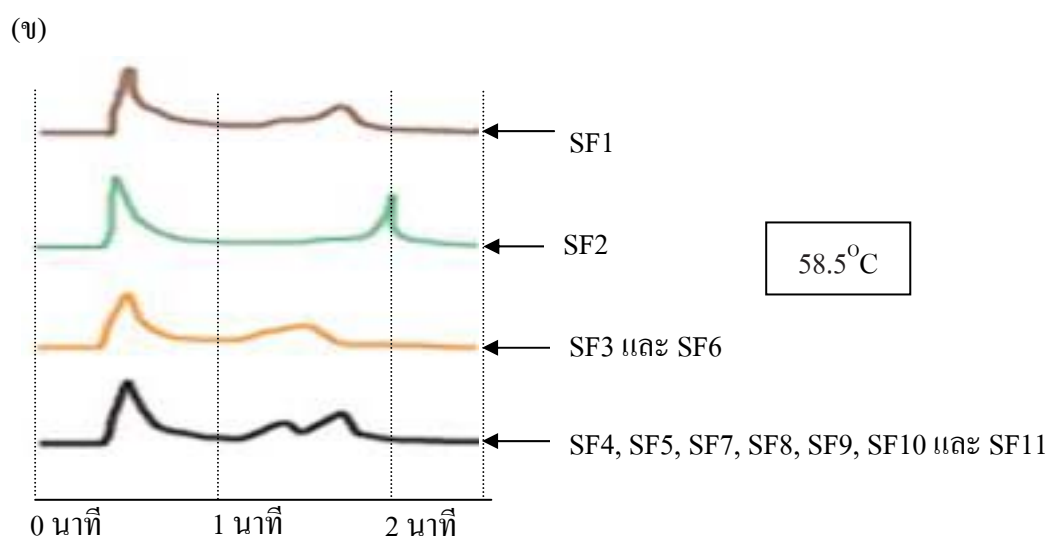
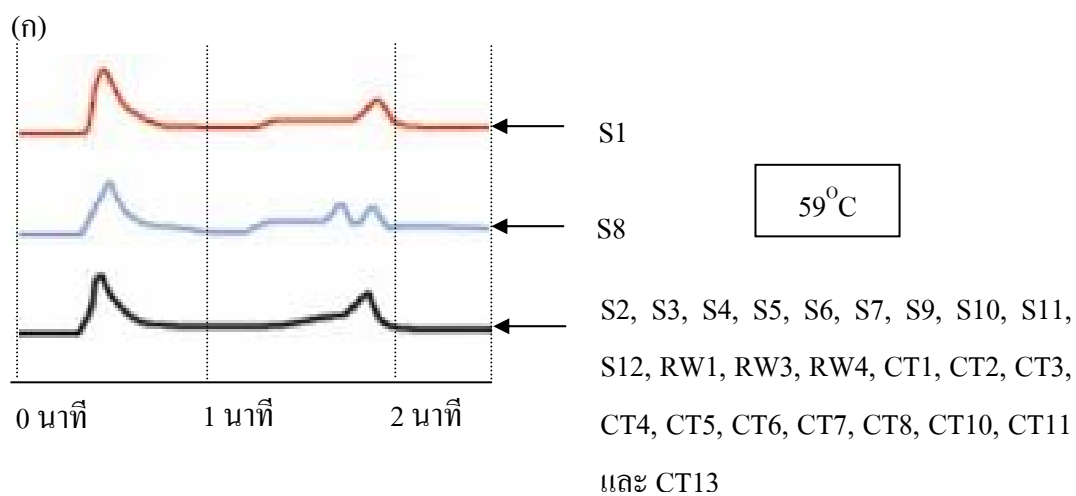
ไอโซเลต ที่จะนำไปวิเคราะห์ DHPLC

แถวที่ 1 และ 20 คือ 100 bp ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)

แถวที่ 2-19 คือ S1, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 CT6 ตามลำดับ

แถวที่ 21-39 คือ CT7, CT8, CT10, CT11, CT13, RW1, RW3, RW4, SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ตามลำดับ

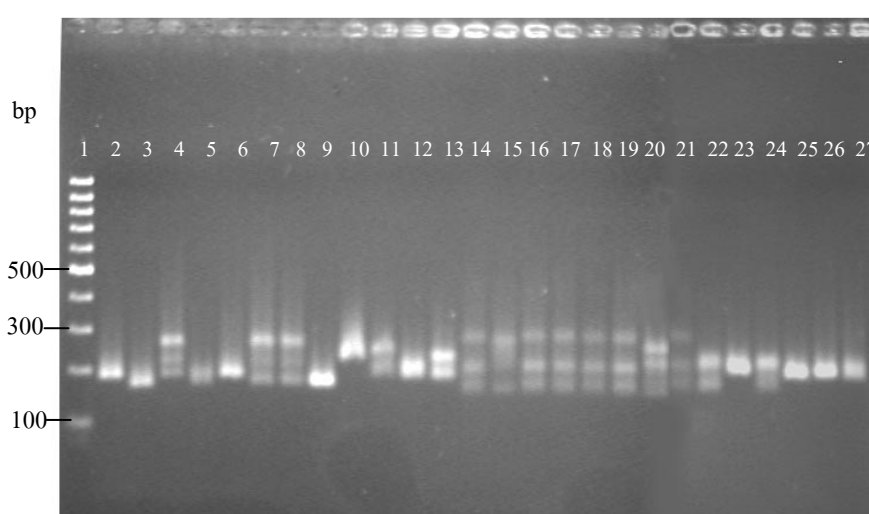
การศึกษาในครั้งนี้จึงมีการศึกษาเทคนิคอื่นๆ และผลของเทคนิค DHPLC จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างของยีสต์ และเปรียบเทียบเทคนิคทางโมเลกุลชนิดต่างๆ โดยคัดเลือกจากเทคนิคโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ และประสบความสำเร็จในการศึกษายีสต์จากแหล่งอื่นๆ เช่น การศึกษาดำแหน่ง microsatellite และแผนที่การตัด mtDNA ของยีสต์ *Sc. cerevisiae* และสำหรับยีสต์ *Sm. fibuligera* ได้ใช้เทคนิค ISSR ในการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ เนื่องจากยีสต์สปีชีส์ดังกล่าวยังไม่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุล งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค ISSR ร่วมกับไพรเมอร์ UBC ซึ่งเป็น universal primers ซึ่งเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น



ภาพที่ 15 Profile ที่ได้จากกราฟวิเคราะห์ DHPLC ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ก) และ *Saccharomycopsis fibuligera* (ข) ที่อุณหภูมิ 59 และ 58.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ microsatellite ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยการวิเคราะห์ microsatellite ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 26 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) พิจารณาจากภาพที่ 16 สามารถแยกขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้แบบคร่าวๆ โดยการวิเคราะห์ห่ออิเล็กทรอนิกส์โทรโพรซิสมบนเจลอะกาโรส ซึ่งขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 100-300 คู่เบส



ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์ microsatellite ของยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* 26 ไอโซเลท บนเจลอะกาโรส 2.5%, 100v, 3 ชั่วโมง

แถวที่ 1 คือ 100 bp ladder

แถวที่ 2-27 คือ ไอโซเลท S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT7, CT8, CT10, CT11, CT13, RW1, RW3 และ RW4 ตามลำดับ

เพื่อแก้ปัญหาคำถามไม่ชัดเจนของการวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้ และเพื่อความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น สามารถวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR โดยอาศัยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer โดยใช้โปรแกรม GeneScan ในการวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR แต่ที่แตกต่างจากการวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์โทรโพรซิสม ก็คือ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ จะถูกติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ 6-carboxy fluorescein (FAM)

สำหรับขั้นตอนการทำ PCR แต่สำหรับองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และโปรแกรมอุณหภูมิ สำหรับเครื่อง thermal cycle จะเหมือนเดิมทุกประการ

ผลจากการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer พบว่าผลการทำ PCR ตรงตำแหน่ง SC8132X ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 15 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ของแต่ละไอโซเลท สอดคล้องกับการวิเคราะห์ผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 144-217 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับที่รายงานไว้ในวารสารของ Howell *et al.* ในปี 2004 ซึ่งได้ทำการศึกษาหาความแตกต่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในทางการค้าจำนวน 6 สายพันธุ์ โดยเทคนิค microsatellite โดยอาศัยตำแหน่งการวิเคราะห์เดียวกันนี้ พบว่ายีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่หลายแถบ แต่แถบที่เข้ม และชัดเจน ได้ถูกคัดเลือกมาใช้ในการแสดงความแตกต่างของรูปแบบ microsatellite โดยใช้เป็น strain marker มีขนาดอยู่ในช่วง 190-205 คู่เบส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกับการทดลองนี้ ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอาจจะมากหรือน้อยกว่านี้ หากมีการศึกษายีสต์จำนวนหลายๆ ตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองที่มีรายงานนั้นเป็นการวิเคราะห์เพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้น และสำหรับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ของแต่ละไอโซเลทที่ได้จากการทดลองครั้งนี้แสดงดังภาพที่ 17, 18, 19 และ 20 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่พบจะมีขนาดอยู่ในช่วง 144-146, 156-158, 162-163, 165-166, 174-175, 177-178, 180-181, 186-187, 189-190, 192-193, 195-196, 201-202, 204-207, 210-211 และ 216-217 คู่เบส แสดงในตารางที่ 9

พิจารณาจากภาพที่ 17 พบว่าไอโซเลท S1 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 186.30 คู่เบส, ไอโซเลท S2 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 165.45 คู่เบส, ไอโซเลท S3 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 180.25 และ 210.97 คู่เบส, ไอโซเลท S4 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 162.53 และ 165.45 คู่เบส, ไอโซเลท S5 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 177.41 คู่เบส, ไอโซเลท S6 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 162.61 และ 201.59 คู่เบส, ไอโซเลท S7 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 162.61 และ 201.64 คู่เบส

พิจารณาจากภาพที่ 18 ไอโซเลท พบว่า S8 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 162.67 คู่เบส, ไอโซเลท S9 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 216.92 คู่เบส, ไอโซเลท S10 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 177.47 และ 192.66 คู่เบส, ไอโซเลท S11 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 177.38 และ 180.30 คู่เบส, ไอโซเลท S12 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 174.29 และ

180.31 คู่เบส, ไอโซเลท CT1 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.80, 157.11 และ 205.17 คู่เบส

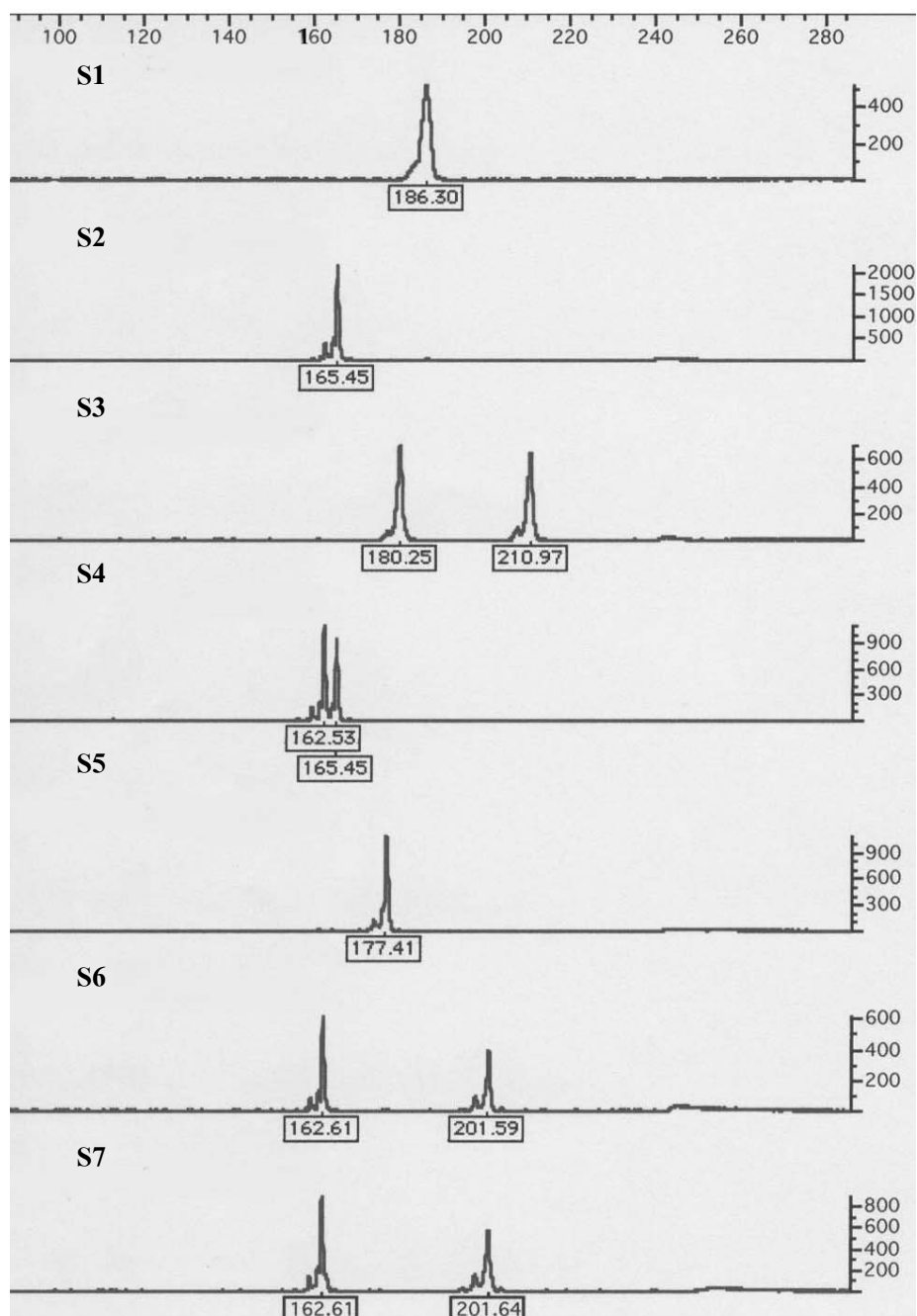
พิจารณาจากภาพที่ 19 พบว่า ไอโซเลท CT2 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.88, 189.63 และ 195.84 คู่เบส, ไอโซเลท CT3 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.81, 157.11 และ 205.13 คู่เบส, ไอโซเลท CT4 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.65, 156.85 และ 205.09 คู่เบส, ไอโซเลท CT5 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.92, 156.55 และ 206.18 คู่เบส, ไอโซเลท CT6 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.76, 157.15 และ 205.15 คู่เบส, ไอโซเลท CT7 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.98, 165.86 และ 189.72 คู่เบส

พิจารณาจากภาพที่ 20 พบว่า ไอโซเลท CT8 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.82, 157.11 และ 205.23 คู่เบส, ไอโซเลท CT10 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบมีขนาดเท่ากับ 145.01, 157.24 และ 165.95 คู่เบส, ไอโซเลท CT11 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 180.58 คู่เบส, ไอโซเลท CT13 ให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบมีขนาดเท่ากับ 144.83, 157.17, 165.94 และ 204.97 คู่เบส, ไอโซเลท RW1 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 174.89 คู่เบส, ไอโซเลท RW3 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดเท่ากับ 177.78 คู่เบส, ไอโซเลท RW4 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบมีขนาดเท่ากับ 174.63 และ 177.73 คู่เบส

จากตารางที่ 9 และ dendogram (ภาพที่ 21) ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* แต่ละไอโซเลท โดยพิจารณาการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ตำแหน่ง microsatellite แสดงผลการจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน โดยสามารถจัดได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท S5 และ RW3 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท S6 และ S7 และ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลท CT1, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT8 ซึ่งจะเห็นได้ว่านอกจาก 10 ไอโซเลทที่อยู่ใน 3 กลุ่มข้างต้นนี้แล้วอีก 16 ไอโซเลทที่เหลือก็แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันออกไป ทำให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมด 26 ไอโซเลท ให้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันถึง 19 รูปแบบ

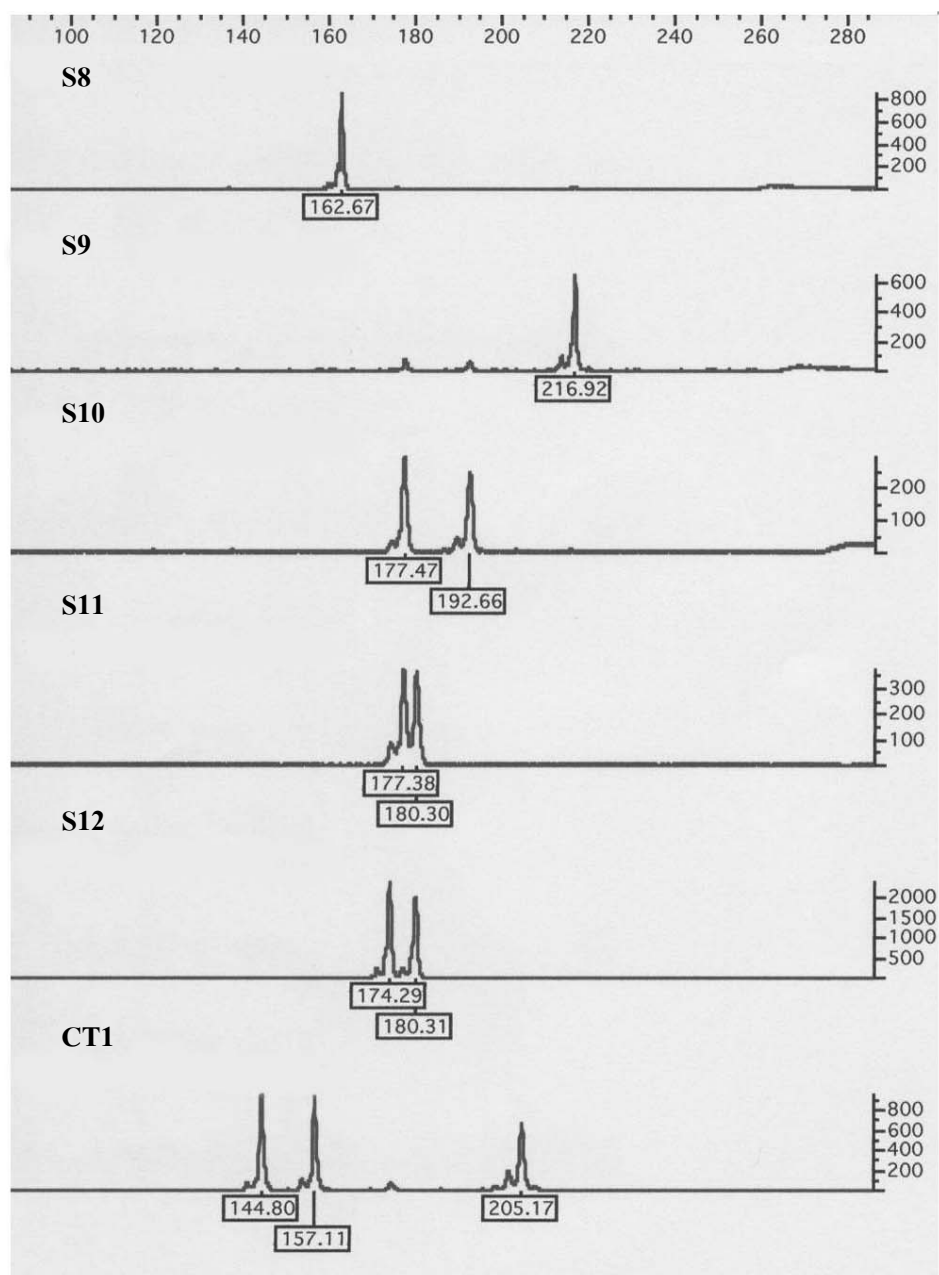
ตารางที่ 9 แสดงขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำ microsatellite ตรงตำแหน่ง SC8132X

ไอโซเลท	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)													
	144-146	156-158	162-163	165-166	174-175	177-178	180-181	186-187	189-190	192-193	195-196	201-202	204-207	210-211
S1								186.3						
S2				165.45										
S3							180.25							210.97
S4			162.53	165.45										
S5						177.41								
S6			162.61									201.59		
S7			162.61									201.64		
S8			162.67											
S9														216.92
S10						177.47				192.66				
S11						177.38	180.30							
S12					174.29		180.31							
CT1	144.80	157.11											205.17	
CT2	144.88								189.63		195.84			
CT3	144.81	157.11											205.13	
CT4	144.65	156.85											205.09	
CT5	144.92	156.55											206.18	
CT6	144.76	157.15											205.15	
CT7	144.98			165.86					189.72					
CT8	144.82	157.11											205.23	
CT10	145.01	157.24		165.95										
CT11							180.58							
CT13	144.83	157.17		165.94									204.97	
RW1					174.89									
RW3						177.78								
RW4					174.63	177.73								



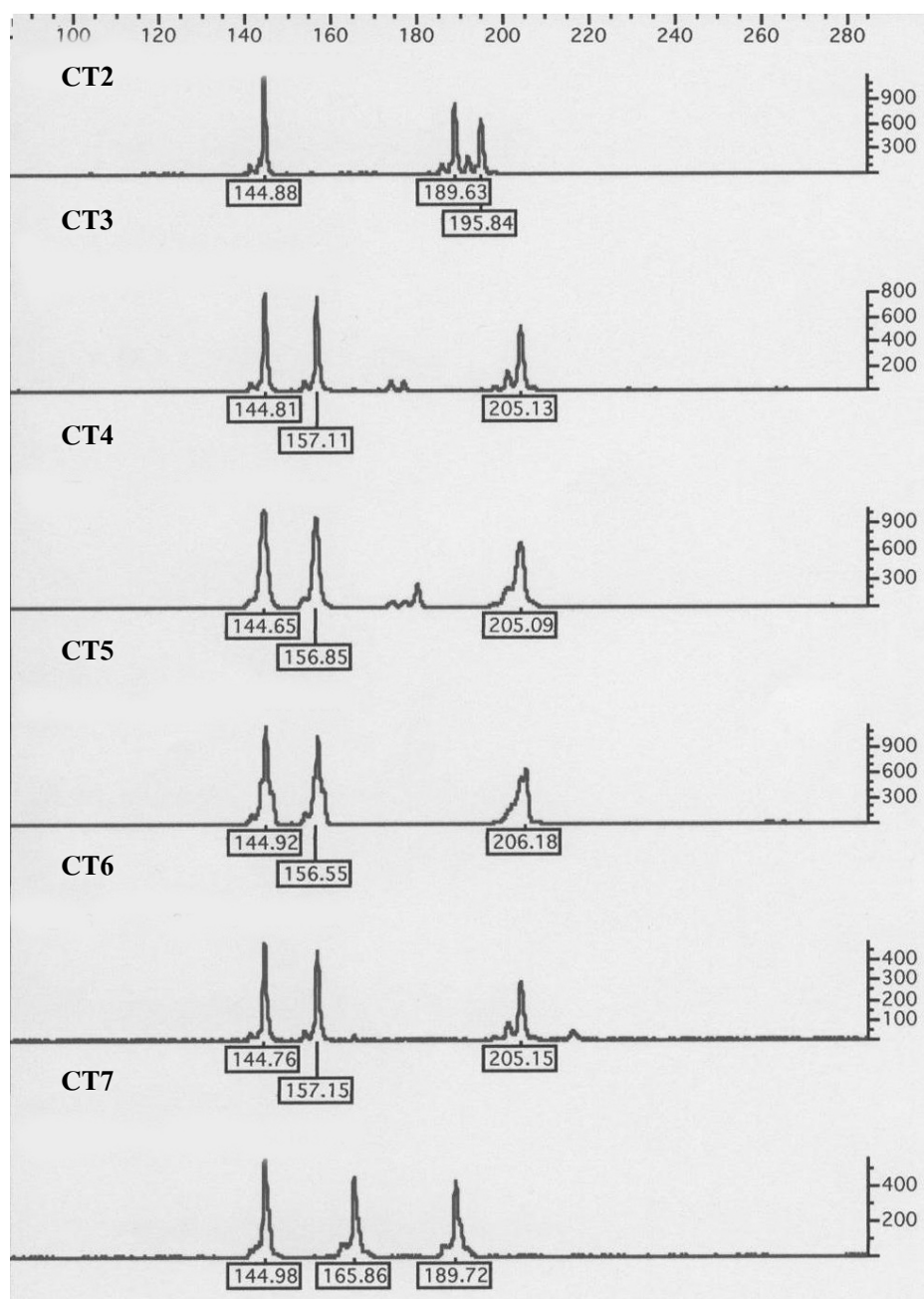
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไอโซเลต S1, S2, S3, S4, S5, S6 และ S7 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X

หมายเหตุ ตัวเลขด้านบนและใต้ peak แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีหน่วยเป็นคู่เบส



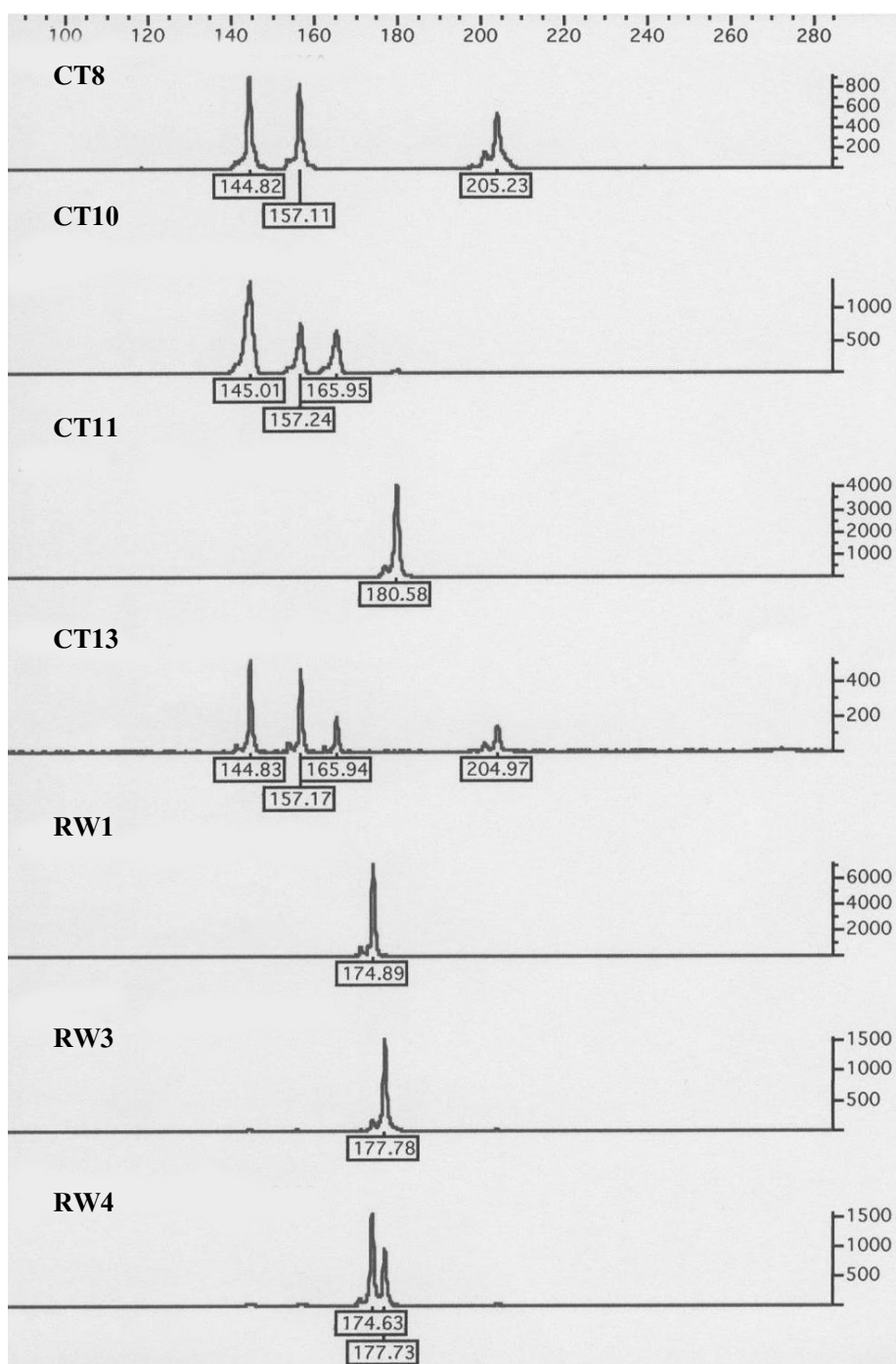
ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไอโซเลท S8, S9, S10, S11, S12 และ CT1 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X

หมายเหตุ ตัวเลขด้านบนและใต้ peak แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีหน่วยเป็นคู่เบส



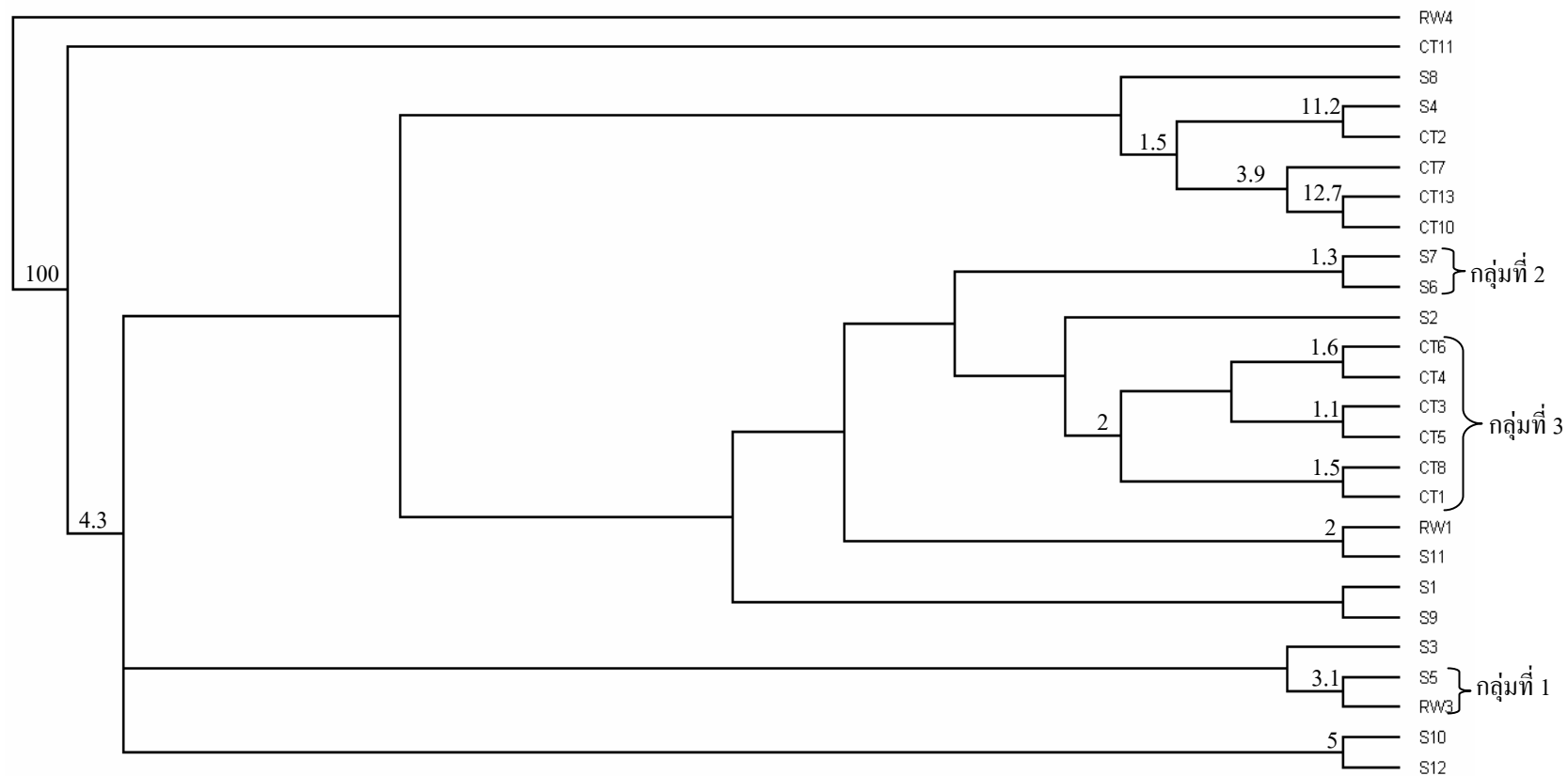
ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไอโซเลต CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT7 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X

หมายเหตุ ตัวเลขด้านบนและใต้ peak แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีหน่วยเป็นคู่เบส



ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไอโซเลท CT8, CT10, CT11, CT13, RW1, RW3 และ RW4 ที่ได้จากเทคนิค microsatellite ด้วยไพรเมอร์สำหรับตำแหน่ง SC8132X

หมายเหตุ ตัวเลขด้านและใต้ peak แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีหน่วยเป็นคู่เบส



ภาพที่ 21 Dendrogram ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค microsatellite โดยอาศัยวิธี UPGMA และค่าทางสถิติ หรือตัวเลข bootstrap แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

6. การวิเคราะห์แผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mtDNA- RFLP) ของยีสต์

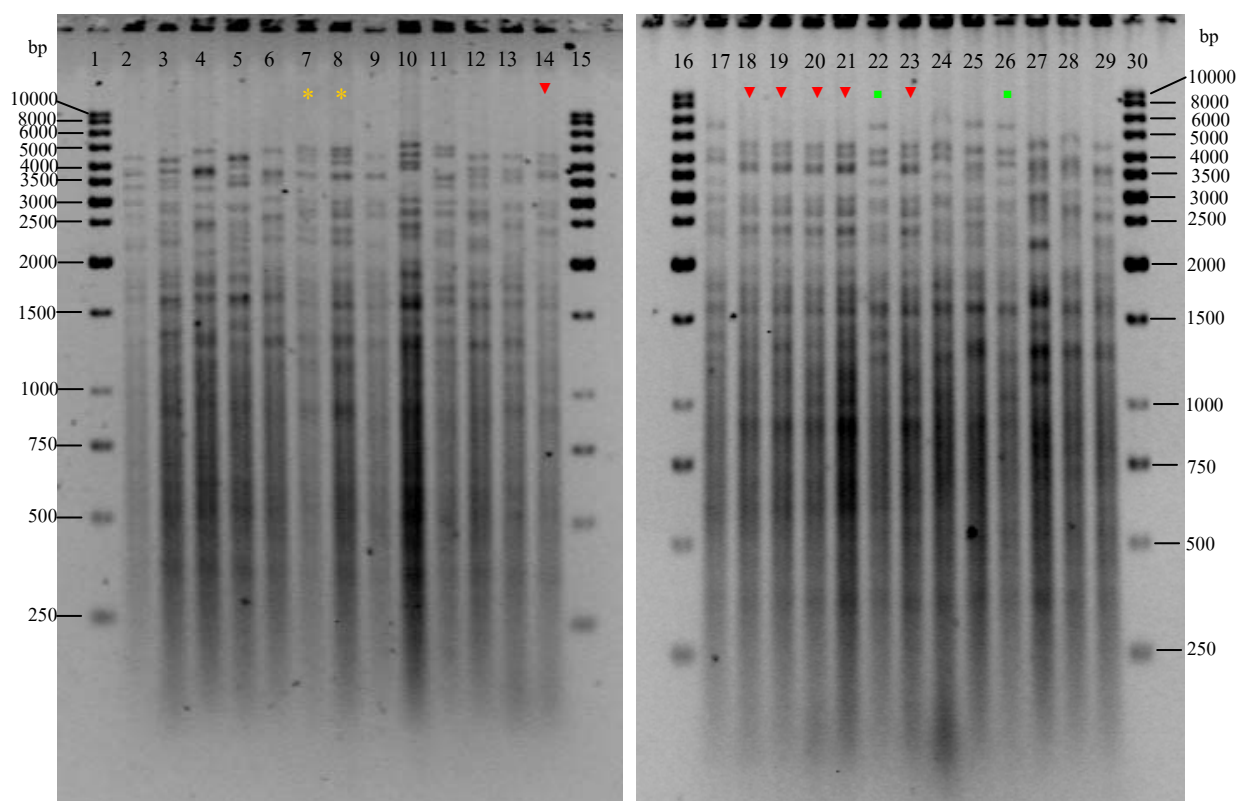
Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae ทั้ง 26 ไอโซเลตข้างต้นได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอรวมกับการใช้เอนไซม์ zymolyase เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก และเหมาะสมต่อการวิเคราะห์แผนที่การตัดในลำดับต่อไป ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะเป็นดีเอ็นเอทั้งส่วนของดีเอ็นเอในนิวเคลียส และดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย จากการทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์ *Hin*III ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำชนิด 5 เบส โดยมีตำแหน่งจดจำส่วนใหญ่บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และมีตำแหน่งจดจำบนดีเอ็นเอในนิวเคลียสเพียง 2-3 ตำแหน่งเท่านั้น (Querol *et al.*, 1992a) และเมื่อวิเคราะห์แผนที่การตัดบนอะกาโรส ซันดีเอ็นเอที่ถูกย่อยเป็นชิ้นที่เล็กมากซึ่งเป็นดีเอ็นเอในนิวเคลียสก็เคลื่อนที่หลุดออกจากเจล เหลือเฉพาะซันดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเท่านั้น

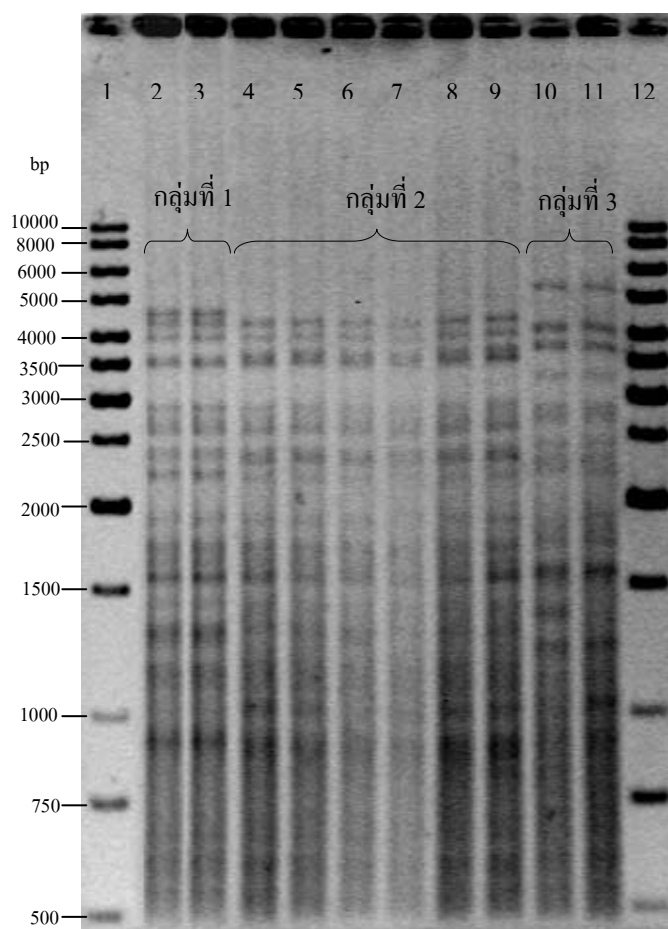
จากการศึกษาแผนที่การตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA: mtDNA) โดยอาศัยเอนไซม์ ชนิดเอนโคนิวคลีเอส *Hin*III ในครั้งนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจน และสามารถนำมาวิเคราะห์ได้มีขนาดตั้งแต่ 1.5 กิโลเบส ถึง 6 กิโลเบส เปรียบเทียบกับการทดลองของ Martinez *et al.*, ในปี 2004 ซึ่งทำการศึกษาในยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ในแถบอเมริกาใต้ พบว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียมีขนาดอยู่ในช่วง 1.5 กิโลเบส ถึง 14.5 กิโลเบส และจากการวิเคราะห์รูปแบบการตัด mtDNA-RFLP โดยอาศัยอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 22) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการตัด mtDNA ของยีสต์แตกต่างกันสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 (สัญลักษณ์ *) ได้แก่ ไอโซเลต S6 และ S7, กลุ่มที่ 2 (สัญลักษณ์ □) ได้แก่ CT7 และ CT13 และ กลุ่มที่ 3 (สัญลักษณ์ ▼) ได้แก่ CT1, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT8 เป็นต้น

นอกจาก *Saccharomyces cerevisiae* ทั้ง 10 ไอโซเลต ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มทั้ง 3 กลุ่มข้างต้นแล้ว ไอโซเลตอื่นๆ ที่เหลืออีก 16 ไอโซเลต แสดงรูปแบบการตัดที่แตกต่างกันออกไป ทำให้รูปแบบการตัด mtDNA ของตัวอย่างทั้งหมด 26 ไอโซเลต ให้รูปแบบการตัดที่แตกต่างกันถึง 19 รูปแบบ (ภาพที่ 22) และเพื่อความชัดเจนมากขึ้นในการวิเคราะห์รูปแบบการตัด mtDNA ของทั้ง 3 กลุ่มนี้ จึงได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบการตัด mtDNA ของทั้ง 3 กลุ่ม โดยทำการวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลแผ่นเดียวกันแสดงดังภาพที่ 23

เมื่อเปรียบเทียบการจัดกลุ่มไอโซเลทของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ mtDNA-RFLP และ microsatellite พบว่าทั้งสองเทคนิคสามารถจัดกลุ่มยีสต์ได้เป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกัน ซึ่ง 2 ใน 3 กลุ่ม ให้ผลเหมือนกันนั่นคือ CT1, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT8 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ S6 และ S7 ก็ถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์นี้กับการวิเคราะห์ DHPLC และ microsatellite พบว่าการวิเคราะห์ microsatellite และ mtDNA-RFLP ให้ผลที่ดีกว่าสำหรับจุดประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ เนื่องจากการวิเคราะห์ DHPLC แสดงความแตกต่างของ profile เพียง 3 รูปแบบ ขณะที่การวิเคราะห์ microsatellite และ mtDNA-RFLP ให้รูปแบบที่แตกต่างกันถึง 19 รูปแบบ



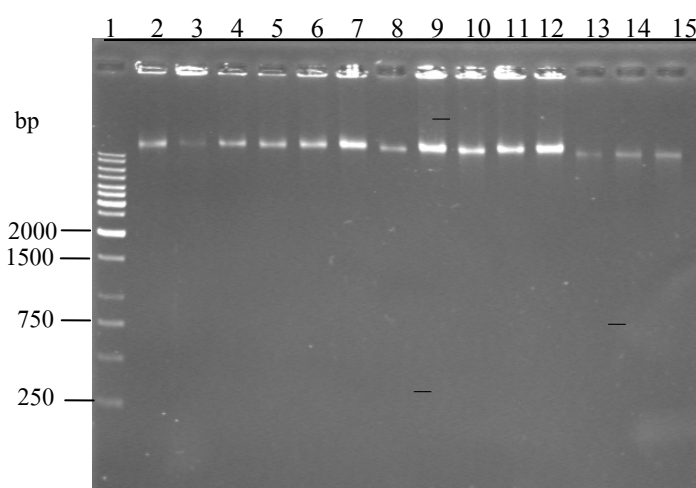
ภาพที่ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (mtDNA- RFLP) ด้วย เอนไซม์ *Hinf*I บนอะกาโรส 1% agarose, 100V, 3.5 ชั่วโมง
 แถวที่ 1,15, 16 และ 30 คือ 1kb ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)
 แถวที่ 2-13 คือ ตัวอย่าง S1-S12, แถวที่ 14 คือ CT1
 แถวที่ 17-29 คือ CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8, CT10, CT11, CT13, RW1, RW3 และ RW4 ตามลำดับ



ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ mtDNA- RFLP ของไอโซเลต *Saccharomyces cerevisiae* ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3
 แถวที่ 1 และ แถวที่ 12 คือ 1kb ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)
 แถวที่ 2-3 คือ ไอโซเลต S6 และ S7 (กลุ่มที่ 1)
 แถวที่ 4-9 คือ CT1, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT8 (กลุ่มที่ 2)
 แถวที่ 10-11 คือ CT7 และ CT13 (กลุ่มที่ 3)

7. การศึกษาความแตกต่างภายในสปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้เทคนิค ISSR-PCR

ยีสต์ไอโซเลทที่ถูกระบุสปีชีส์แล้วว่าเป็น *Saccharomycopsis fibuligera* จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์โดยใช้เทคนิค ISSR อาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์จำนวน 8 ชนิด ซึ่ง *Sm. fibuligera* ที่ได้จากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ไอโซเลท SF1, SF2, SF3, SF4, SF5 และ SF6 จะถูกนำมาใช้เป็นยีสต์เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ความแตกต่างภายในสปีชีส์ในครั้งนี้ด้วย สำหรับผลการสกัดดีเอ็นเอก่อนที่จะนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปเป็นต้นแบบในการทำ PCR ของทุกไอโซเลทที่เป็น *Sm. fibuligera* แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ผลการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ISSR ของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

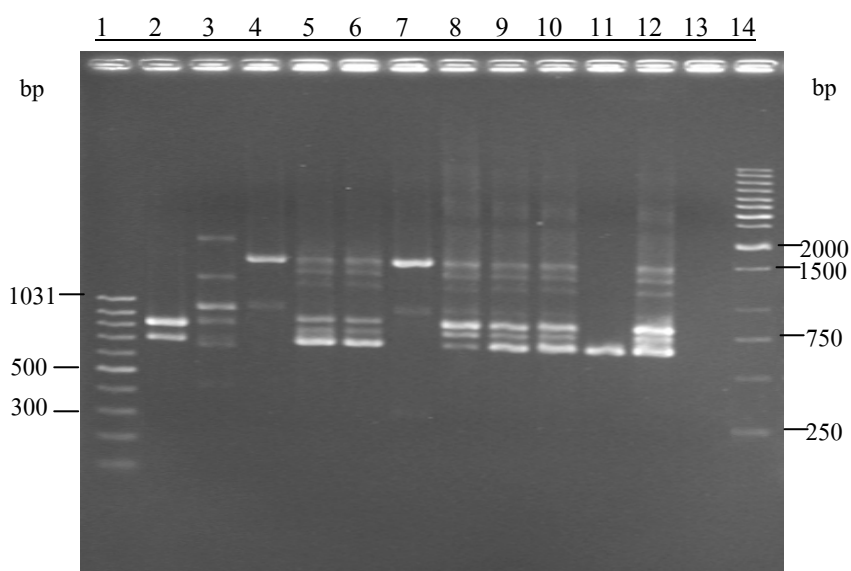
แถวที่ 1: 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas)

แถวที่ 2-12: ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11

แถวที่ 13-15: DNA ที่ทราบความเข้มข้น 40, 80 และ 120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

จากการศึกษาด้วยเทคนิค ISSR ในการจำแนกเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ UBC (University of British Columbia) จำนวน 8 ชนิด พบว่าแถบไอเอสเอสอาร์ที่ได้ มีจำนวนทั้งสิ้น 80 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 300 คู่เบส จนถึงมากกว่า 2,000 คู่เบส ดังรายละเอียดในแต่ละไพรเมอร์ดังต่อไปนี้ ไพรเมอร์ UBC 811 (ภาพที่ 25) ให้แถบดี

เอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 11 แถบ ดังนี้ ไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดเหมือนกัน 3 ขนาด ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส ขนาด 1,200 คู่เบส และ ขนาด 750 คู่เบส ไอโซเลทต่าง ๆ ข้างต้นยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF1 และ SF10 และยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 820 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF1 และ SF2 อีกด้วย สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF3 และ SF6 เท่านั้น เช่นเดียวกับแถบดีเอ็นเอขนาด 2,200, 1400 และ 650 คู่เบส ที่พบเฉพาะในไอโซเลท SF2 เท่านั้น สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส พบในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท SF1, SF2 และ SF10 และแถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบส พบในไอโซเลท SF2, SF7, SF8, SF9 และ SF11 ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ก (ข้อ 1)

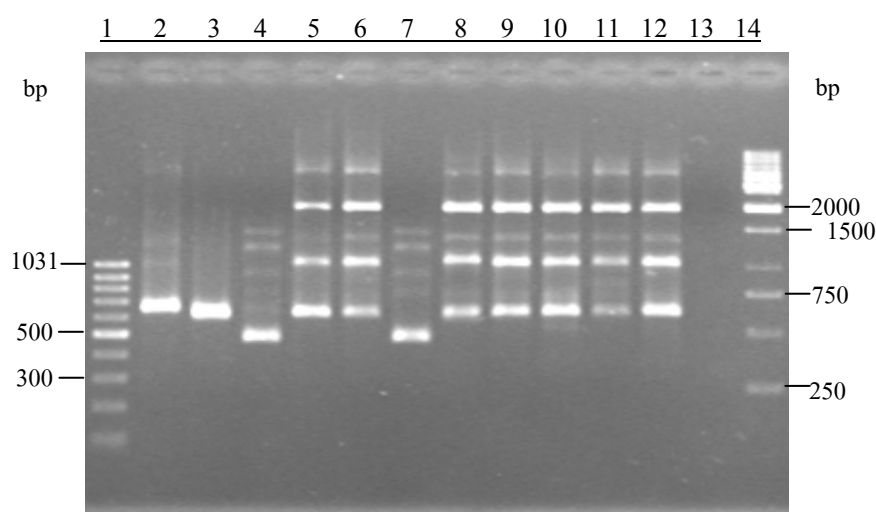


ภาพที่ 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 811
 แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ Fermentas) ตามลำดับ
 แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11
 แถวที่ 13 : negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 811 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่ม B ได้แก่ ไอ

โชนเลข SF2, กลุ่ม C ได้แก่ โชนเลข SF3 และ SF6, กลุ่ม D ได้แก่ โชนเลข SF4, SF5, SF7, SF8, SF9 และ SF11 และกลุ่ม E ได้แก่ โชนเลข SF10 ไพร์เมอร์นี้สามารถแยก SF10 ออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน

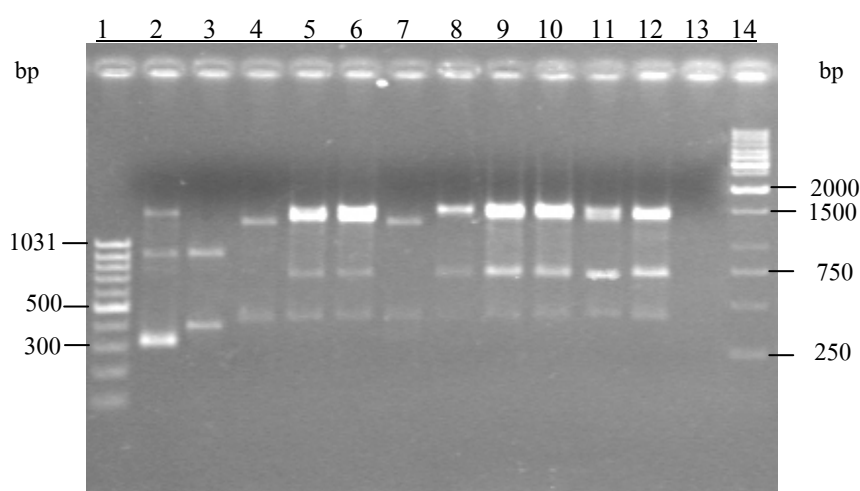
ไพร์เมอร์ UBC 818 (ภาพที่ 26) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 10 แถบ ดังนี้ โชนเลข SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดเหมือนกัน 4 ขนาด ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 2,000 คู่เบส ขนาด 2,000 คู่เบส ขนาด 1,400 คู่เบส และ ขนาด 1,100 คู่เบส โชนเลขต่างๆ ข้างต้นยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสเช่นเดียวกับโชนเลข SF2 อีกด้วย สำหรับโชนเลข SF3 และ SF6 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนกัน 4 ขนาด ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส ขนาด 1,300 คู่เบส ขนาด 950 คู่เบส และ ขนาด 500 คู่เบส ซึ่งดีเอ็นเอทั้ง 4 ขนาดนี้พบเฉพาะใน SF3 และ SF6 เท่านั้น สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ก็พบเฉพาะในโชนเลข SF1 เท่านั้น ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ก (ข้อ 2)



ภาพที่ 26 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 โชนเลข ที่ได้จากการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพร์เมอร์ UBC 818
 แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ
 แถวที่ 2 – 12 : โชนเลข *Sm. fibuligera* SF1-SF11
 แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 818 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่ม B ได้แก่ ไอโซเลท SF2, กลุ่ม C ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6 , กลุ่ม D ได้แก่ ไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11

ไพรเมอร์ UBC 857 (ภาพที่ 27) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 7 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส พบในทุกไอโซเลท ยกเว้น SF2, SF3 และ SF6 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF3 และ SF6 เท่านั้น แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF1 และ SF2 เท่านั้น แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส พบในไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส พบในทุกไอโซเลท ยกเว้น SF1 และ SF2 แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส พบในเฉพาะไอโซเลท SF2 และแถบดีเอ็นเอขนาด 320 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF1 ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ค (ข้อ 3)



ภาพที่ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 857

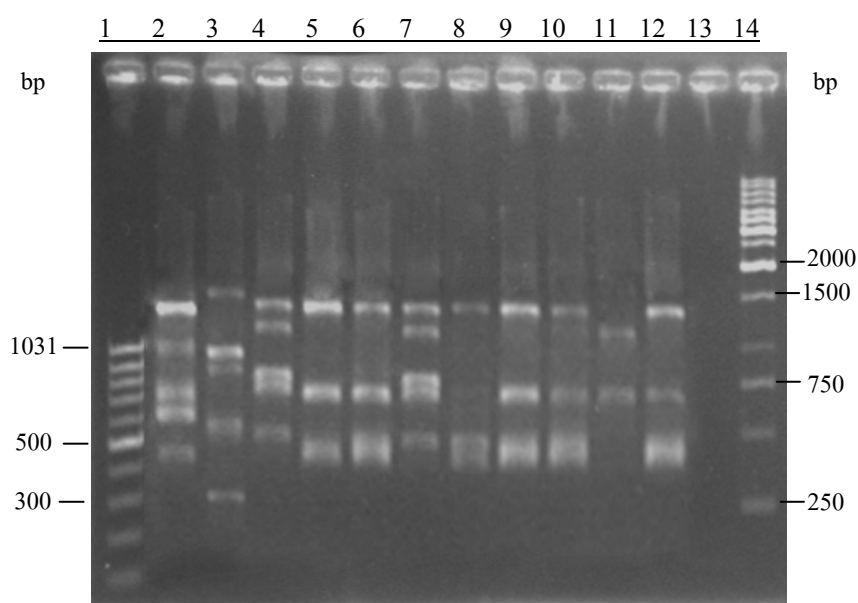
แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ

แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11

แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 857 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 4 กลุ่ม เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ UBC 818

ไพรเมอร์ UBC 880 (ภาพที่ 28) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 13 แถบ ดังนี้ ไอโซเลต SF1, SF4, SF5, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสเหมือนกัน และไอโซเลตข้างต้นยกเว้น SF10 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสเช่นเดียวกับ SF7 สำหรับ แถบดีเอ็นเอขนาด 1500, 900, 550 และ 300 คู่เบสพบเฉพาะไอโซเลต SF2 แถบดีเอ็นเอขนาด 800, 750, 500 พบเฉพาะไอโซเลต SF3 และ SF6 ทั้งสองไอโซเลตนี้ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลต SF10 อีกด้วย สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,030 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลต SF1 และ SF2 นอกจากนี้ไอโซเลต SF1 ยังให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 อีกด้วย สำหรับ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,400 คู่เบสพบในทุกไอโซเลต ยกเว้น SF2 และ SF10 ผลการ score 0-1 จาก แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ค (ข้อ 4)

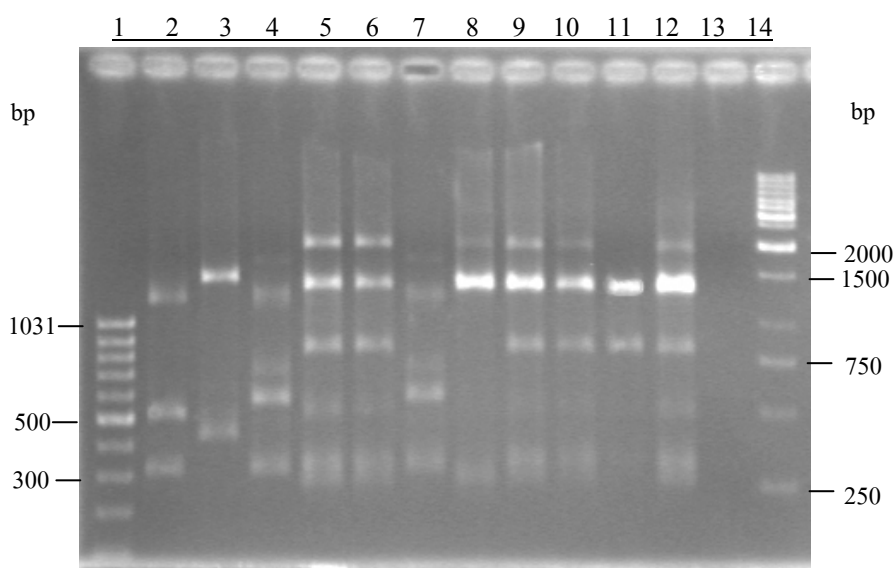


ภาพที่ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลต ที่ได้จาก การวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 880
 แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ
 แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลต *Sm. fibuligera* SF1-SF11, แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 880 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่ม B ได้แก่ ไอโซเลท SF2, กลุ่ม C ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6, กลุ่ม D ได้แก่ ไอโซเลท SF4, SF5, SF8, SF9 และ SF11, กลุ่ม E ได้แก่ ไอโซเลท SF7 และกลุ่ม F ได้แก่ ไอโซเลท SF10

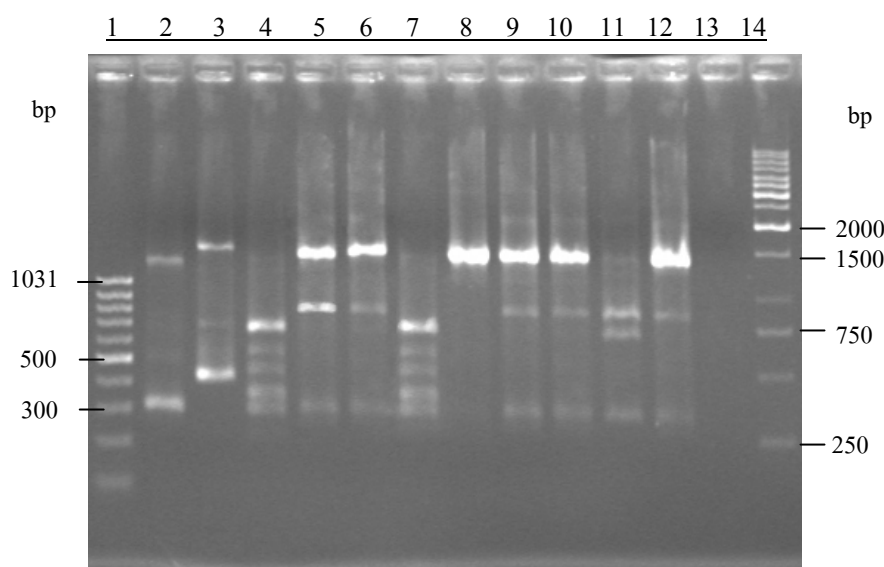
ไพรเมอร์ UBC 888 (ภาพที่ 29) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 11 แถบ ดังนี้ ไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสเหมือนกัน และไอโซเลทข้างต้น รวมถึงไอโซเลท SF2 และ SF10 ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส เช่นเดียวกัน กลุ่มข้างต้นยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 320 คู่เบส เช่นเดียวกับ SF1 นอกจากนี้ไอโซเลท SF4, SF5, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 875 คู่เบสเหมือนกันอีกด้วย สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 520 คู่เบส พบในไอโซเลท SF1, SF4, SF5, SF8, SF9 และ SF11 สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 1750, 1250, 750, 600 และ 350 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF3 และ SF6 เท่านั้น เช่นเดียวกับดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ที่พบเฉพาะในไอโซเลท SF1 ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ก (ข้อ 5)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 888 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 6 กลุ่ม เช่นเดียวกับผลจากการวิเคราะห์ โดยไพรเมอร์ UBC 880



ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 888
 แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ
 แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11
 แถวที่ 13: negative control

ไพรเมอร์ UBC 889 (ภาพที่ 30) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 9 แถบ ดังนี้ ไอโซเลท SF4, SF5, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสเหมือนกัน และไอโซเลทต่างๆ ข้างต้นยกเว้น SF10 ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF2 และ SF7 สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 550, 450 และ 350 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF3 และ SF6 เท่านั้น เช่นเดียวกับแถบดีเอ็นเอขนาด 1,450 คู่เบส ที่พบเฉพาะในไอโซเลท SF1 และแถบดีเอ็นเอขนาด 420 คู่เบสที่พบใน SF2 เท่านั้น สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส พบในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท SF2 และ SF7 และแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส พบในไอโซเลท SF2, SF3, SF6 และ SF10 ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ค (ข้อ 6)



ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จาก การวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 889

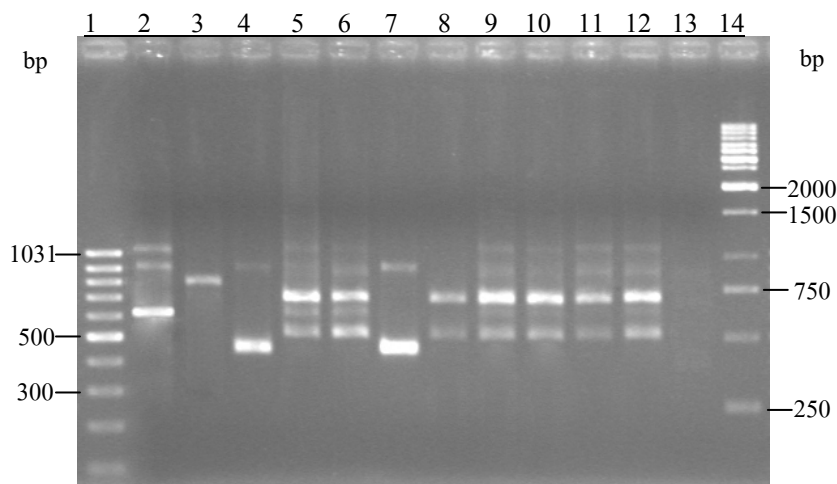
แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ

แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11

แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 889 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 6 กลุ่ม เช่นเดียวกับผลจากการวิเคราะห์ โดยไพรเมอร์ UBC 880 และ UBC 888

ไพรเมอร์ UBC 890 (ภาพที่ 31) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 7 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส ซึ่งพบในทุกไอโซเลท ยกเว้น SF2, SF3, SF6 และ SF7 แถบดีเอ็นเอขนาด 910 คู่เบส ที่พบในทุกไอโซเลท ยกเว้น SF2 และ SF7 แถบดีเอ็นเอขนาด 820 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF2 แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 500 คู่เบส พบในทุกไอโซเลท ยกเว้น SF1, SF2, SF3 และ SF6 แถบดีเอ็นเอขนาด 620 คู่เบส พบในไอโซเลท SF1, SF4, SF5, SF8, SF9 และ SF11 แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส พบเฉพาะไอโซเลท SF3 และ SF6 เท่านั้น ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดงในภาคผนวก ค (ข้อ 7)



ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จาก การวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 890

แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ

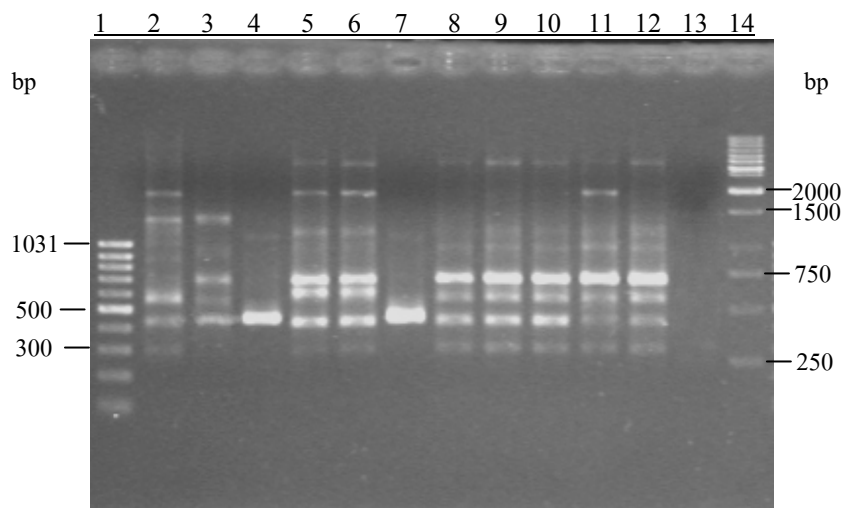
แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11

แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 890 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่ม B ได้แก่ ไอโซเลท SF2, กลุ่ม C ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6, กลุ่ม D ได้แก่ ไอโซเลท SF7, กลุ่ม E ได้แก่ ไอโซเลท SF4, SF5, SF8, SF9, SF10 และ SF11

ไพรเมอร์ UBC 891 (ภาพที่ 32) ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 12 แถบ ดังนี้ ไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดเหมือนกัน 4 ขนาด ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 2,000 คู่เบส ขนาด 1,250 คู่เบส ขนาด 1,000 คู่เบส และ ขนาด 600 คู่เบส ไอโซเลทต่างๆข้างต้นยังให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF1 และแถบดีเอ็นเอขนาด 420 คู่เบสเช่นเดียวกับไอโซเลท SF1 และ SF2 อีกด้วย สำหรับไอโซเลท SF3 และ SF 6 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนกัน 2 ขนาด ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 1200 คู่เบส และขนาด 480 คู่เบส สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสพบในไอโซเลท SF1, SF4, SF5 และ SF10 และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,450 และ 550 คู่เบส พบเฉพาะในไอโซเลท SF1 และ SF2 เท่านั้น ผลการ score 0-1 จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแสดง

ในภาคผนวก ก (ข้อ 8)



ภาพที่ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ได้จากการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 891
 แถวที่ 1, 14 : 100 bp DNA Ladder และ 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™ MBI Fermentas) ตามลำดับ
 แถวที่ 2 – 12 : ไอโซเลท *Sm. fibuligera* SF1-SF11
 แถวที่ 13: negative control

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 891 สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม A ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่ม B ได้แก่ ไอโซเลท SF2, กลุ่ม C ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6, กลุ่ม D ได้แก่ ไอโซเลท SF4, SF5 และ SF10 และกลุ่ม E ได้แก่ ไอโซเลท SF7, SF8, SF9 และ SF11

ไพรเมอร์ UBC 891 นี้สามารถแยก SF4, SF5 และ SF10 ออกจากกลุ่ม SF7, SF8, SF9 และ SF11 ได้ ซึ่งไอโซเลทดังกล่าวทั้งหมดไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 857, UBC 890 และ UBC 818

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC ทั้ง 8 ชนิดไพรเมอร์ ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ สามารถจัดกลุ่มยีสต์ดังกล่าวจำนวน 11 ไอโซเลทได้เป็น 7 กลุ่ม ดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 10)

กลุ่ม 1	ได้แก่ ไอโซเลท SF1 (AAAAA)
กลุ่ม 2	ได้แก่ ไอโซเลท SF2 (BBBBB)
กลุ่ม 3	ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6 (CCCCC)
กลุ่ม 4	ได้แก่ ไอโซเลท SF7 (DEDDE)
กลุ่ม 5	ได้แก่ ไอโซเลท SF10 (DDEEF)
กลุ่ม 6	ได้แก่ ไอโซเลท SF4 และ SF5 (DDDED)
กลุ่ม 7	ได้แก่ ไอโซเลท SF8, SF9 และ SF11 (DEDED)

ไพรเมอร์แต่ละชนิดในกลุ่ม UBC** สามารถจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ได้สูงสุด 6 กลุ่ม และเมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งในกลุ่มนี้ร่วมกับไพรเมอร์ UBC 891 ก็จะสามารถจัดกลุ่ม *Sm. fibuligera* ได้ถึง 7 กลุ่ม ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งในกลุ่ม UBC** ร่วมกับไพรเมอร์ UBC 891 ก็เพียงพอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้พบว่า SF1 และ SF2 สามารถแยกออกมาจากกลุ่มอื่นๆ เช่นเดียวกับ SF3 และ SF6 ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยอาศัยไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิด ต่างจากไอโซเลทอื่นๆ และไม่ว่าจะใช้ไพรเมอร์ชนิดใดใน 8 ชนิดข้างต้น และเพียง 1 ไพรเมอร์ก็เพียงพอที่จะใช้ในการจัดจำแนกออกจากกลุ่มอื่นๆ

ตารางที่ 10 แสดงการจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* ทั้ง 11 ไอโซเลทโดยใช้เทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 8 ชนิด

ไอโซเลท												
ไพรเมอร์												จำนวน
UBC	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8	SF9	SF10	SF11	กลุ่ม
UBC*	A	B	C	D	D	C	D	D	D	D	D	4
891	A	B	C	<u>D</u>	<u>D</u>	C	E	E	E	D	E	5
811	A	B	C	D	D	C	D	D	D	<u>E</u>	D	5
890	A	B	C	E	E	C	<u>D</u>	E	E	E	E	5
UBC**	A	B	C	D	D	C	<u>E</u>	D	D	<u>F</u>	D	6
กลุ่ม	AAAAA	BBBBB	CCCCC	DDDED	DDDED	CCCCC	DEDDE	DEDED	DEDED	DDEEF	DEDED	
	(1)	(2)	(3)	(6)	(6)	(3)	(4)	(7)	(7)	(5)	(7)	

หมายเหตุ A, B, C, D, E, F: รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

UBC* คือไพรเมอร์ UBC 818 และ UBC 857 ซึ่งให้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถจัดกลุ่มแต่ละไอโซเลทเหมือนกัน

UBC** คือไพรเมอร์ UBC 880, UBC 888 และ UBC 889 ซึ่งให้รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถจัดกลุ่มแต่ละไอโซเลทเหมือนกัน

ผลการวิเคราะห์ ISSR ของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ทั้ง 11 ไอโซเลท โดยเทคนิค PCR อาศัยไพรเมอร์ 8 ชนิด ถูกนำไปศึกษาการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ในรูปของ dendrogram หรือ phylogenetic tree อาศัยวิเคราะห์การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้การมีแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น 0 ค่าการปรากฏ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งดังกล่าวข้างต้น สามารถนำมาคำนวณหาความแตกต่างทางพันธุกรรมหรือระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของแต่ละไอโซเลทที่นำมาศึกษาได้ โดยใช้โปรแกรม Restdist ซึ่งเป็นโปรแกรมที่อยู่ใน Phylip package ผลการวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมได้แสดงในตารางที่ 11 ค่าในตารางมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งค่าที่แสดงจะเป็น 0 หรือระยะห่างมีค่าเท่ากับ 0 ก็ต่อเมื่อไอโซเลทที่เปรียบเทียบเหมือนกันทุกประการ และมีค่าเป็น 1 หรือระยะห่างมีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าไอโซเลทที่เปรียบเทียบต่างกัน ค่าดังกล่าวยังมีค่าเข้าใกล้ 1 มากเท่าไร ก็แสดงถึงไอโซเลทเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันมากเท่านั้น ค่าระยะห่างระหว่าง SF8, SF9 และ SF11 มีค่าเป็น 0 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 ไอโซเลทนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือมีความเหมือนกันถึง 100% และไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC ทั้ง 8 ชนิดนี้ พิจารณาค่าระหว่าง SF3 และ SF6 มีค่าเท่ากับ 0.0011 และระหว่าง SF4 และ SF5 มีค่าเท่ากับ 0.0008 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยมาก แสดงให้เห็นว่าไอโซเลทภายในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันน้อยมาก

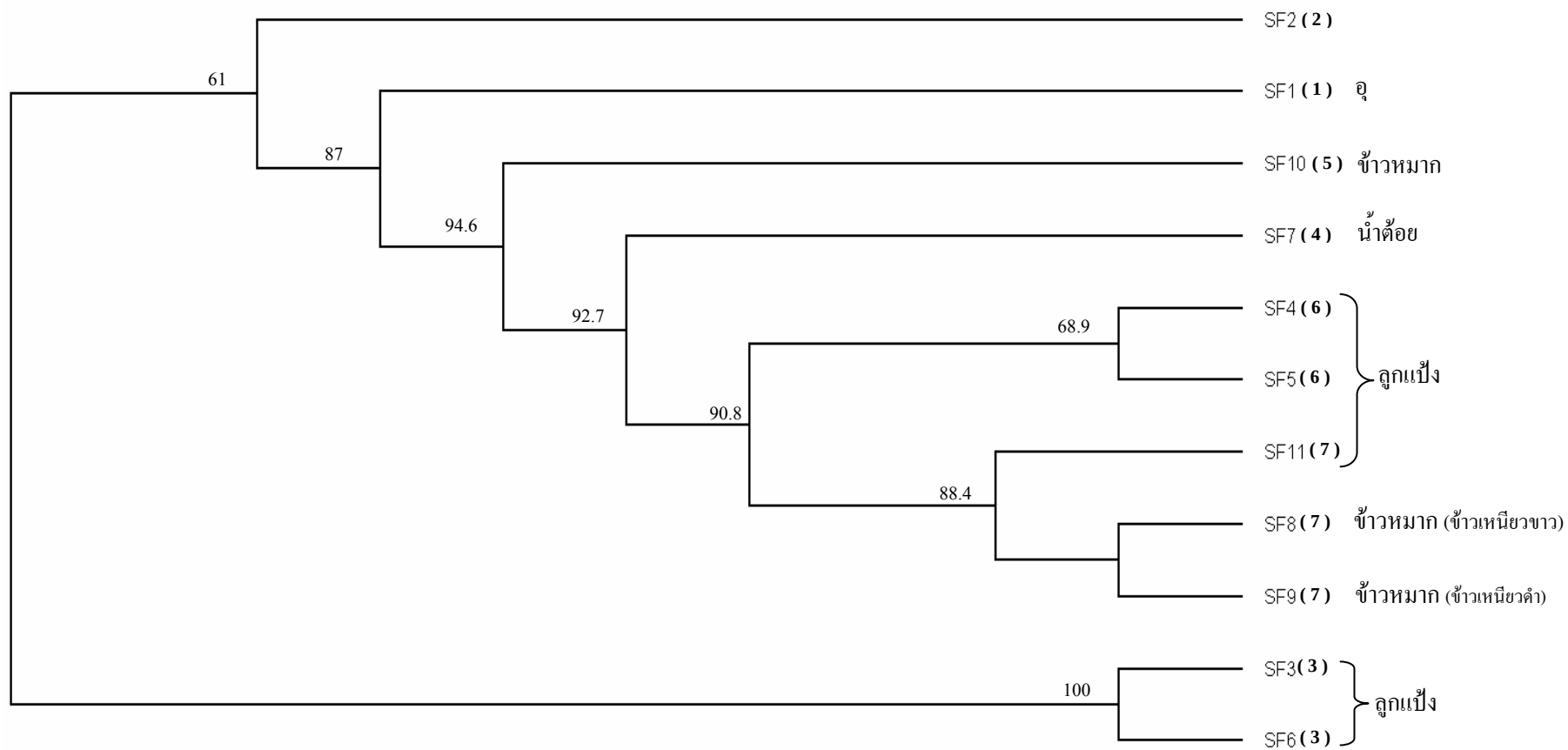
ค่าระยะห่างของแต่ละไอโซเลทนี้ถูกนำไปใช้สร้าง dendrogram โดยใช้วิธี UPGMA เพื่อดูความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของแต่ละไอโซเลท (ภาพที่ 33) เพื่อความถูกต้องแม่นยำในการจัดกลุ่มดังกล่าวได้แสดงระดับความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มแต่ละกลุ่มโดยอาศัยค่า bootstraps โดยกำหนดให้มีการ resampling ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์การปรากฏของแถบดีเอ็นเอข้างต้นมาสร้างเป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจำนวน 1000 ตาราง หรือ 1000 matrix โดยใช้โปรแกรม Restdist จากนั้นนำแต่ละ matrix ไปสร้าง dendrogram โดยโปรแกรม Neighbor ซึ่งโปรแกรมก็จะแสดง dendrogram ทั้งหมด 1000 รูปแบบ ซึ่งทั้ง 1000 รูปแบบจะถูกนำมาเข้าโปรแกรม Consense เพื่อหา dendrogram ที่เป็นตัวแทนของทั้ง 1000 รูปแบบข้างต้น ค่าระดับความเชื่อมั่นนี้สามารถหาได้จากจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่แต่ละกลุ่มจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยคำนวณจาก 1000 ครั้ง แสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 ความแตกต่างระหว่างไอโซเลทของเชื้อ *Sccharomycopsis fibuligera* จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากเทคนิค ISSR ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ โดยอาศัยโปรแกรม Restdist ใน Phylip package

SF1											
SF1	0.0000	SF2									
SF2	0.0876	0.0000	SF3								
SF3	0.1238	0.2364	0.0000	SF4							
SF4	0.0417	0.1042	0.1228	0.0000	SF5						
SF5	0.0386	0.1054	0.1102	<u>0.0008</u>	0.0000	SF6					
SF6	0.1446	0.2347	<u>0.0011</u>	0.1216	0.1228	0.0000	SF7				
SF7	0.0770	0.0851	0.1550	0.0073	0.0082	0.1536	0.0000	SF8			
SF8	0.0461	0.0928	0.1228	0.0016	0.0023	0.1216	0.0054	0.0000	SF9		
SF9	0.0461	0.0928	0.1228	0.0016	0.0023	0.1216	0.0054	<u>0.0000</u>	0.0000	SF10	
SF10	0.0635	0.1039	0.1097	0.0147	0.0156	0.1083	0.0226	0.0172	0.0172	0.0000	SF11
SF11	0.0461	0.0928	0.1228	0.0016	0.0023	0.1216	0.0054	<u>0.0000</u>	<u>0.0000</u>	0.0172	0.0000

เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มในตารางที่ 10 กล่าวคือไอโซเลท SF1, SF2, SF7 และ SF10 ไม่จัดอยู่ในกลุ่มใด แยกออกจากไอโซเลทอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 87%, 61%, 92.7% และ 94.6% ตามลำดับ กลุ่มที่ 6 (SF4 และ SF5) และ กลุ่มที่ 7 (SF8, SF9 และ SF11) แยกออกจากกลุ่มอื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 68.8% และ 88.4% ตามลำดับ สำหรับ SF3 และ SF6 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และแยกออกจากไอโซเลทอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ซึ่งให้ค่าระดับความเชื่อมั่นถึง 100 % จากการศึกษาด้าน ISSRs โดยอาศัยไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิดนี้ ไม่สามารถแยกไอโซเลททั้งสองนี้ออกจากกันได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าทั้งสองไอโซเลทเป็น *Saccharomycopsis fibuligera* สายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากทั้งสองไอโซเลทได้มาจากลูกแป้งเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม 2 ไอโซเลทนี้ ยังสามารถแยกออกจากไอโซเลท SF4, SF5 และ SF11 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกมาจากลูกแป้งเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าแม้ในแหล่งที่มาเดียวกัน ยังมีความหลากหลายของ *Sm. fibuligera* ให้เห็นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ SF11 ยังถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ SF8 และ SF9 ซึ่งแยกมาจากข้าวหมากที่ทำมาจากข้าวต่างชนิดกันคือ ข้าวเหนียวขาว และข้าวเหนียวดำ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ไอโซเลทได้ถูกผลิตจาก

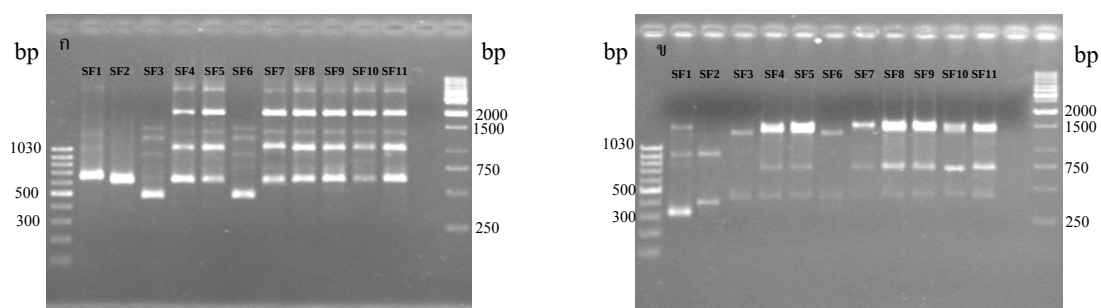
แหล่งเดียวกัน และอาจเป็นไปได้ว่าได้ใช้สัตว์เดียวกันในการหมักข้าวหมาก จากภาพแสดงให้เห็นว่า กลุ่มที่ 7 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มที่ 6 มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ แต่ 2 กลุ่มนี้สามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC 891 ดังตารางที่ 10 สำหรับ SF1 ใกล้กับ SF2 มากกว่ากลุ่มอื่นๆ และ SF7 และ SF10 ก็ใกล้ชิดกับกลุ่มที่ 6 และ กลุ่มที่ 7 มากกว่ากลุ่มอื่นด้วย



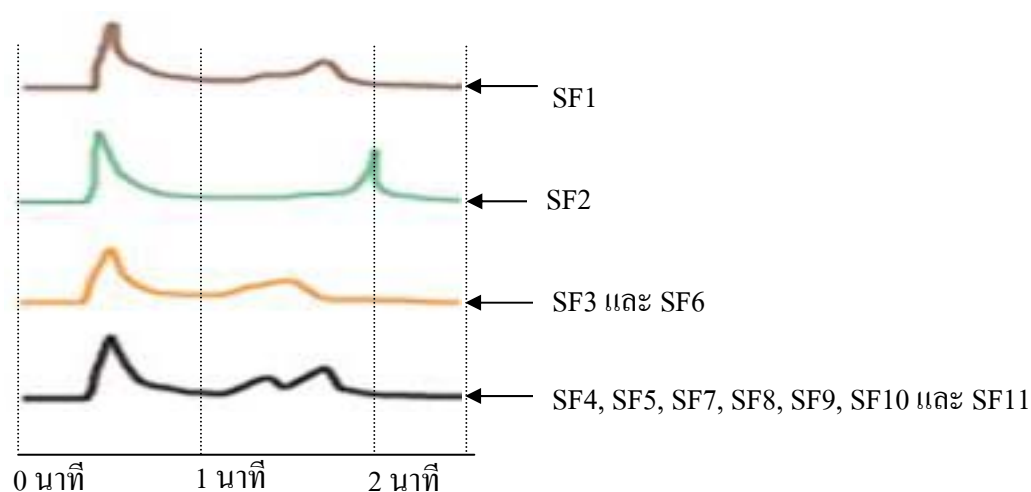
ภาพที่ 33 Dendrogram ของเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค ISSR โดยอาศัยวิธี UPGMA

หมายเหตุ ค่าทางสถิติแสดงเฉพาะที่มีค่ามากกว่า 50

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 7 เทียบกับการจัดกลุ่มในหัวข้อที่ 4 พบว่าการจัดกลุ่มยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ทั้ง 11 ไอโซเลท โดยวิธีการวิเคราะห์ profile ที่ได้จากเทคนิค DHPLC ในหัวข้อที่ 4 ให้ผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยไพรเมอร์ UBC 818 และ 857 จากหัวข้อที่ 7 ซึ่งสามารถจำแนก *Sm. fibuligera* สามารถจำแนก ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท SF1, กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท SF2, กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลท SF3 และ SF6 และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลท *Sm. fibuligera* ที่เหลือ 7 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท SF4, SF5, SF7, SF8, SF9, SF10 และ SF11 ซึ่งการเปรียบเทียบการจัดกลุ่มยีสต์ *Sm. fibuligera* ด้วยทั้งสองวิธี เพื่อความชัดเจนยิ่งขึ้น ได้แสดงไว้ในภาพที่ 34 และ ภาพที่ 35



ภาพที่ 34 แสดงการจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* 11 ไอโซเลท โดยอาศัยการวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์ UBC 818 (ก) และ 857 (ข) ตามลำดับ



ภาพที่ 35 แสดงการจัดกลุ่ม *Saccharomycopsis fibuligera* 11 ไอโซเลท โดยอาศัยการวิเคราะห์ DHPLC

8. ความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

Saccharomycopsis fibuligera เป็นยีสต์ที่มีความสามารถย่อยแป้งได้ โดยยีสต์จะมีการสร้าง extracellular amylase 2 ชนิด นั่นคือ glucoamylase และ α -amylase (Choi *et al.*, 1997) และยังมีรายงานว่ายีสต์ดังกล่าวสามารถผลิต α -amylase ได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สปีชีส์อื่นๆ ที่แยกได้จากอาหารหมัก ซึ่งได้แก่ *Candida tropicalis*, *Hansenula anomala*, *Lipomyces sp.*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Trichosporon pullulans* เป็นต้น (Dhanwant *et al.*, 1987) และพบว่า *Sm. fibuligera* ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง เช่นเดียวกับราสกุล *Amylomyces*, *Rhizopus* และ *Actinomucor* ที่แยกได้จากลูกแป้งเช่นเดียวกัน (สมพร, 2544)

จากการทดลองวัดความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และสาโท โดยการวัดบริเวณใสหรือ clear zone ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์บนอาหาร YM-starch agar ผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส และเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ยีสต์ ระยะระหว่างขอบโคโลนีถึงของบริเวณใส และอัตราระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส และเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีแสดงดังตารางที่ 12 ยีสต์ที่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ ได้แก่ ไอโซเลท SF2, SF3 และ SF6 ซึ่งไม่ปรากฏบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และยีสต์เจริญได้น้อยมากเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ที่สามารถย่อยแป้งได้ เส้นผ่าศูนย์กลางที่วัดได้เพียง 0.2 ซม. ในขณะที่ไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้มีขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 0.75-0.93 ซม. และมีระยะระหว่างขอบโคโลนีถึงของบริเวณใสอยู่ในช่วง 1.27-1.45 ซม. เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของยีสต์ในกลุ่มไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้ พบว่าค่าดังกล่าวอยู่ในช่วง 2.42-2.91 ซม. ซึ่งไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้สูงสุดและต่ำสุดได้แก่ไอโซเลท RW2 และ RW9 ที่แยกได้จากน้ำด้อยระหว่างกระบวนการหมักสาโทของโรงงานเจ้าพระยา และข้าวหมากรสสุคนธ์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของสมพรและคณะในปี 2544 ซึ่งรายงานว่า *Sm. fibuligera* ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า แสดงค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีอยู่ในช่วง 1.18-3.25 ซม. และ 2.08-3.13 ซม. ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Sm. fibuligera* ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าจะมีค่าดังกล่าวสูงกว่ายีสต์ที่แยกจากลูกแป้งข้าวหมาก เช่นเดียวกับการทดลองนี้ยีสต์ที่ได้จากกระบวนการหมักสาโทสามารถย่อยแป้งได้สูงสุด ในขณะที่ยีสต์ที่ได้จากข้าวหมากมีค่าต่ำกว่า เป็นต้น

ตารางที่ 12 แสดงความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

ไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของบริเวณใส (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของโคโลนี (ซม.)	ระยะระหว่างขอบโคโลนี ถึงของบริเวณใส (ซม.)	อัตราระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส และเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี
SF1	2.33	0.88	1.45	2.65
SF2	-	0.2	-	-
SF3	-	0.2	-	-
SF4	2.35	0.90	1.45	2.61
SF5	2.1	0.80	1.30	2.63
SF6	-	0.2	-	-
RW2/SF7	2.18	0.75	1.43	2.91
RW6/SF8	2.05	0.78	1.27	2.63
RW8/SF9	2.15	0.8	1.35	2.69
RW9/SF10	2.25	0.93	1.32	2.42
RW13/SF11	2.05	0.75	1.30	2.73

9. ความสามารถในการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ผลการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารที่มีกลูโคส 18% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ *Sc. cerevisiae* ทุกไอโซเลทให้ระดับเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์จากการวัดด้วยเครื่องอิมูลิโอมิเตอร์ พบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 4.7-9.07% แสดงดังตารางที่ 13 ไอโซเลท CT13 และ S12 มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุดซึ่งค่า % แอลกอฮอล์ มีค่าเท่ากันคือ 9.07 สำหรับไอโซเลท CT13 แยกจากบนไม้มะเกลือที่อยู่ในภาชนะที่ใช้หมักน้ำตาลเมา และไอโซเลท S12 เป็นสายพันธุ์อ้างอิงที่แยกจากกระบวนการผลิตเอทานอล (high alcohol production) สายพันธุ์นี้ให้ปริมาณเอทานอลที่สูง ซึ่งได้มาจากศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ ไอโซเลท CT7 ที่แยกจากน้ำตาลสดที่ผ่านการต้มแล้ว มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยที่สุดซึ่ง % แอลกอฮอล์มีค่าเท่ากับ 4.7 %

ตารางที่ 13 ยังแสดงผลการศึกษาความสามารถในการตกตะกอนยีสต์ โดยการสังเกตลักษณะการตกตะกอนที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าระดับความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์หลังจากหมักได้ 48 ชั่วโมง โดยสังเกตจากการตกตะกอนนอนก้นของยีสต์ในพลาสติก เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาทีจากตารางแสดงให้เห็นว่าไอโซเลท CT13 และ S12 นอกจากจะมีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงที่สุดแล้ว ยังสามารถตกตะกอนได้ดีมากอีกด้วย ซึ่งสมบัติการตกตะกอนของยีสต์ก็เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญในการคัดเลือกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในการกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม เพื่อลดต้นทุนในการกรองยีสต์หลังจากการหมักก่อนที่จะบรรจุขวด ดังนั้นยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลทนี้มีคุณสมบัติที่เหมาะสม น่าจะมีการนำไปศึกษาต่อ และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลในอนาคต

ตารางที่ 13 แสดงความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ลำดับ ที่	ไอโซเลท	เซลล์ (OD ₆₀₀)		จุดเดือด (°C)	% แอลกอฮอล์	ความสามารถในการ ตกตะกอน
		0 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง			
1	S1	0.406	205	93.2	8.75	**
2	S2	0.420	417	95.75	4.93	**
3	S3	0.451	108	93.18	8.8	**
4	S4	0.474	170	93.40	8.41	**
5	S5	0.466	150	93.23	8.7	**
6	S6	0.486	128	93.33	8.52	**
7	S7	0.553	179	93.4	8.41	**
8	S8	0.382	154	93.1	8.9	**
9	S9	0.382	137	93.2	8.75	**
10	S10	0.676	82	93.3	8.85	**
11	S11	0.493	124	93.25	8.67	**
12	S12	0.563	38	93	9.07	****
13	CT1	0.561	450	94.35	6.9	**
14	CT2	0.568	537	94.4	6.83	****
15	CT3	0.551	518	94.43	6.8	****
16	CT4	0.495	423	95.78	4.88	****
17	CT5	0.446	560	95.9	4.74	**
18	CT6	0.520	383	95.88	4.75	***
19	CT7	0.479	594	95.93	4.7	****
20	CT8	0.513	373	94.4	6.83	****
21	CT10	0.475	433	95.25	5.63	**
22	CT11	0.431	424	93.25	8.65	****
23	CT13	0.349	305	93	9.07	****
24	RW1	0.363	977	95.85	4.8	**
25	RW3	0.357	659	93.2	8.75	**
26	RW4	0.400	821	95.8	4.86	**

หมายเหตุ ค่าของจุดเดือดได้จากการเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง, สัญลักษณ์: ยีสต์ที่สามารถตกตะกอนได้ดีมาก (****), ตกตะกอนดี (***), ตกตะกอนปานกลาง (**) และ ไม่ ตกตะกอน (*)

วิจารณ์

1. การระบุยีนของยีสต์

การระบุยีนของยีสต์โดยอาศัยการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนของยีสต์นั้น แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถทดสอบสารประกอบคาร์บอนได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน แต่ชุดทดสอบนี้มีข้อจำกัดในการระบุยีสต์ ซึ่งสามารถระบุได้เฉพาะกลุ่มยีสต์ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูล software ของชุดทดสอบเท่านั้น ซึ่งไม่ครอบคลุมทุกสปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ควบคู่กันไปด้วย ทำให้ผลการระบุยีสต์ของยีสต์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และถึงแม้ดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA ก่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เนื่องจากเป็นบริเวณของยีนมีรหัสสำหรับสังเคราะห์ ribosomal RNA แต่บริเวณ 26S rDNA ยังมีส่วนของ D1/D2 domain ที่มีความผันแปรในยีสต์แต่ละสปีชีส์ จึงทำให้สามารถที่จะใช้ลำดับเบสบริเวณดังกล่าวนี้ในการระบุยีสต์ ยีสต์สปีชีส์เดียวกันอาจมีความหลากหลายไม่มากนัก แต่บริเวณ D1/D2 domain ก็สามารถที่จะใช้ในการจัดกลุ่มยีสต์ได้ดีในระดับสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี และมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์เพื่อจุดประสงค์ในการระบุยีสต์ เนื่องจากยีสต์มากกว่า 500 สปีชีส์ (Kerrigan *et al.*, 2003) ที่มีการศึกษาลำดับเบสบริเวณดังกล่าวนี้ได้ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank นอกจากนี้บริเวณดังกล่าวมีความยาวประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งสามารถทำ direct sequencing ได้เลยจากผลผลิต PCR โดยไม่จำเป็นต้องโคลนเข้าเวกเตอร์ และเป็นขนาดที่เหมาะสมที่สามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA sequencer และง่ายต่อการเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับเบสของแต่ละสปีชีส์ ซึ่งผลการทำ direct sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ข้างเดียวนั้น ถึงแม้จะให้ความยาวไม่ครบเต็มทั้งเส้น แต่จากการทดลอง พบว่าเพียงพอสำหรับการระบุยีสต์ต่างๆ ของยีสต์ ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

2. การจัดกลุ่มยีสต์โดยอาศัยการวิเคราะห์ DHPLC

จากการใช้ระบบการวิเคราะห์ The WAVE DNA Fragment Analysis System (Trangenomic) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอ ซึ่งขนาดดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ ควรมีความยาวอยู่ในช่วง 150-700 คู่เบส และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นสั้นกว่าจะมีความไวในการวิเคราะห์มากกว่า (Posteraro *et al.*, 2006) จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain พบว่าสามารถจัดกลุ่มยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ

Saccharomycopsis fibuligera ออกเป็น 3 และ 4 กลุ่ม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีนี้ให้ความหลากหลาย (polymorphism) ไม่มากนักสำหรับการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ซึ่งจากการทดลองนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของยีสต์ทั้ง 2 สปีชีส์ ซึ่งปกติแล้วเทคนิคนี้ให้ผลดีมากในการวิเคราะห์ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนไม่ว่าจะเป็นการกลายพันธุ์แบบการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตำแหน่งเดียวก็ตาม

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้เทคนิค microsatellite และ mt DNA-RFLP

ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์สปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยเทคนิค microsatellite สามารถวิเคราะห์ขนาดได้อย่างรวดเร็ว ไม่ยุ่งยากด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่การวิเคราะห์ขนาดของผลผลิต PCR ด้วยวิธีนี้ไม่เหมาะสมสำหรับกรณีตัวอย่างจำนวนมากๆ เนื่องจากไม่สามารถวิเคราะห์ได้ภายในเจลแผ่นเดียวกัน ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบขนาด แต่อย่างไรก็ตามสามารถแก้ปัญหาได้โดยการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบนเจล หรือการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA sequencer เนื่องจากผลที่ได้จากเครื่องดังกล่าวนี้แสดงออกมาในรูปของ peak และบอกขนาดได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีโปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์การปรากฏ และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้โดยไม่ต้องวิเคราะห์ด้วยตาเปล่าเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งนอกจากเป็นวิธีที่ง่ายกว่าแล้ว ยังให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่าอีกด้วย เช่นเดียวกับที่มีในรายงานของ Gallego *et al.* (2005) เสนอให้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ภายในสปีชีส์ *Sc. cerevisiae* เนื่องจากพบว่า เป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และสามารถแสดงความหลากหลายได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ microsatellite เป็นไพรเมอร์สำหรับบริเวณ SC8132X ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนยีน YPL009c บนโครโมโซมที่ 16 ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งยีนดังกล่าวนี้ไม่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ใดๆ ตามที่ฐานข้อมูล *Saccharomyces* genome database (SGD) ได้รายงานไว้ แต่อย่างไรก็ตามการเกิดการกลายพันธุ์แบบการขาดหายไปของยีน (deletion mutation) นี้ (Howel *et al.*, 2004) ก็เป็นหลักฐาน และเพียงพอที่จะแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ *Sc. cerevisiae* ที่แยกได้จากอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทย เช่นเดียวกับที่ได้มีรายงานการแยกความแตกต่างของ *Sc. cerevisiae* ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ที่ใช้กระบวนการหมักน้าองุ่น

(Howell *et al.*, 2004) และในอุตสาหกรรมไวน์ใน Uruguayan winery (Techera *et al.*, 2001) และยังมีรายงานว่าตำแหน่งดังกล่าวยังเป็น 1 ใน 9 ตำแหน่งบนโครโมโซมของยีสต์ *Sc. cerevisiae* ที่แสดง highly polymorphic loci จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 41 ตำแหน่ง ซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาความหลากหลายของยีสต์สปีชีส์นี้อีกด้วย (Legras *et al.*, 2005)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้จากการปรากฏ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ microsatellite พบว่า phylogenetic tree ที่ได้สามารถจัดกลุ่มยีสต์ ทั้ง 26 ไอโซเลท ออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท S5 และ RW3 เป็นไอโซเลทที่แยกได้จากสาโท กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท S6 และ S7 และ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลท CT1, CT3, CT4, CT5, CT6 และ CT8 ซึ่งกลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำตาลเมา ซึ่งจะเห็นได้ว่านอกจาก 10 ไอโซเลทที่อยู่ใน 3 กลุ่มข้างต้นนี้แล้วอีก 16 ไอโซเลทที่เหลือแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันออกไป พิจารณาจาก 16 ไอโซเลทที่เหลือไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มใด และกระจายตัว ไม่จัดเป็นกลุ่มตามแหล่งที่มาของแต่ละไอโซเลท ที่เป็นเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าเนื่องจากแต่ละไอโซเลทมีความใกล้เคียงกันมาก นอกจากจะเป็นสปีชีส์เดียวกันแล้ว ยังแยกมาจากอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทยเหมือนกันอีกด้วย ทำให้แต่ละไอโซเลทมีความใกล้เคียงกันมากไม่ว่าจะแยกมาจากแหล่งใด จึงไม่สามารถจัดกลุ่มตามแหล่งที่มาได้อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่า bootstrap ที่มีค่าต่ำมาก แต่อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ microsatellite นี้พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถแสดงความแตกต่างและแยกยีสต์ที่เป็น closely related strain ได้เป็นอย่างดี

ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียนับว่าเป็นอีกดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) หนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวมีอัตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว (Yamada *et al.*, 2002) จากการศึกษารูปแบบการตัดดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย โดยใช้เอนไซม์ *Hin*FI หรือ mtDNA-RFLP พบว่าขั้นตอนการวิเคราะห์รูปแบบการตัดบนเจลอะกาโรส ก่อนข้างไม่ชัดเจน จากการทดลองได้หาเปอร์เซ็นต์เจลที่เหมาะสมในการแยกขนาดดีเอ็นเอ พบว่าที่ 1% agarose ให้ผลที่ดีที่สุด พอที่จะแยกความแตกต่างและจัดกลุ่มของยีสต์ได้ และเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ microsatellite เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากๆ เนื่องจากยากต่อการเปรียบเทียบ และการจัดกลุ่มของยีสต์ นอกจากนี้เทคนิค mtDNA-RFLP จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นสูงๆ เพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตัดด้วย *Hin*FI ซึ่งจะต้อง

ใช้ความเข้มข้นในระดับมิลลิกรัมต่อไมโครลิตรขณะที่ในการวิเคราะห์วิธีที่อาศัยเทคนิค PCR ต้องการเพียงระดับนาโนกรัมต่อไมโครลิตรเท่านั้น

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้เทคนิค ISSR

สำหรับการวิเคราะห์ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีการศึกษาน้อยกว่าสปีชีส์ *S. cerevisiae* ส่วนมากจะเน้นในเรื่องการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง เช่น เอ็นไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส เป็นต้น (Shen *et al.*, 2008) จากผลการทดลองเกี่ยวกับเทคนิค ISSR แสดงให้เห็นว่า นอกจากไพรเมอร์ในกลุ่ม UBC** (880/888/889) แล้ว SF10 สามารถแยกออกจากกลุ่มอื่นๆ โดยอาศัยไพรเมอร์ 811 นอกจากนี้ไพรเมอร์ 811 ยังเป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบไอเอสเอสอาร์ที่ชัดเจน และสามารถแยกไอโซเลทนี้ออกจากไอโซเลทอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน กล่าวคือจะให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบขนาด 700 คู่เบส ซึ่งง่ายต่อการวิเคราะห์ สำหรับไอโซเลท SF7 ก็สามารถแยกออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้โดยอาศัยไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งในกลุ่ม UBC** เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ SF7 ยังสามารถแยกจากกลุ่มอื่นๆ ได้โดยการใช้ไพรเมอร์ UBC 890 อีกด้วย

พิจารณาจาก dendrogram ไอโซเลท *Saccharomycopsis fibuligera* ที่แยกจากอุและสาโท ได้แก่ SF1 และ SF2 ตามลำดับ สามารถแยกออกจากกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน แต่สำหรับไอโซเลทอื่นๆ ที่แยกมาจากตัวอย่างอื่นๆ ก็กระจายอยู่ในกลุ่มต่างๆ ไม่ได้อยู่แยกกันตามแหล่งตัวอย่างเดียวกันได้อย่างชัดเจนนัก ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก *Sm. fibuligera* ที่แยกได้จากลูกแป้ง ข้าวหมาก และ สาโท ในประเทศไทยมีความหลากหลายค่อนข้างสูง ยีสต์สายพันธุ์เดียวกันอาจถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างกัน และในผลิตภัณฑ์เดียวกันอาจใช้ *Sm. fibuligera* สายพันธุ์ต่างกันได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาความหลากหลายของยีสต์สปีชีส์ *Sm. fibuligera* โดยอาศัยวิธีทางชีวโมเลกุลในประเทศไทย ซึ่งการทดลองนี้สามารถแสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Sm. fibuligera* ซึ่งเป็นการศึกษาในขั้นต้น และเป็นแนวทางเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไปซึ่งมีประโยชน์ทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์ พัฒนาผลิตภัณฑ์ อาหารหมัก และ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทยและตรวจติดตามสายพันธุ์ที่ดำเนินอยู่ในระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วเนื่องจากใช้หลักการของเทคนิคของ PCR

เครื่องหมายดีเอ็นเอต่างๆ ข้างต้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ทั้งในเรื่องของการตรวจติดตามยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมัก และที่สำคัญ สำหรับกระบวนการหมักที่มีการใช้ยีสต์มากกว่า 1 สายพันธุ์ และสามารถนำมาใช้ในขั้นตอนการเตรียมยีสต์ที่จะใช้ในกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังสามารถคาดคะเนถึงผลของลักษณะกลีณรสที่จะได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่ได้คัดเลือกไว้แล้วอีกด้วย เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะการสร้างกลีณรสที่แตกต่างกันและมีปฏิสัมพันธ์กันเนื่องจากในกระบวนการ flavour producing metabolic pathway มีการใช้สาร metabolite และ co-modification ร่วมกัน นอกจากนี้ความรวดเร็วการระบุนสายพันธุ์ของยีสต์ทำให้สามารถเข้าใจ และแสดงถึงความสัมพันธ์ในการสร้างกลีณรสระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลและรูปแบบของประชากร (population profile) ของสายพันธุ์ยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักได้อีกด้วย (Howell *et al.*, 2004)

5. ความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* และ การย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera*

ผลการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* อาจจะทำให้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์มากกว่านี้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ สมพรในปี 2544 เนื่องจากเมื่อสังเกตจากภาชนะที่ใช้หมัก พบว่ายังมีฟองผุดขึ้นมาจากน้ำหมัก ซึ่งหากให้เวลามากกว่านี้ระดับ % แอลกอฮอล์ น่าจะมีแนวโน้มสูงขึ้น แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์เบื้องต้นจึงได้หยุดปฏิบัติการหมักไว้ที่ 48 ชั่วโมง

จากการทดลองความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* และความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์และการตกตะกอนของ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกไอโซเลทที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่มีคุณสมบัติที่ดีทั้ง 3 คุณสมบัติ ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักที่ไม่ต้องมีการย่อยแป้งหรือไม่ต้องผ่านกระบวนการ saccharifying process เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งได้ทำการทดลองปรับปรุงพันธุ์ยีสต์โดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชันระหว่าง *Sm. fibuligera* และ *Sc. cerevisiae* ที่มีคุณสมบัติเด่นในการย่อยแป้งและการผลิตเอทานอล ตามลำดับ ซึ่งพบว่าลูกผสมสามารถผลิตเอทานอล 3.1%v/v ในอาหารที่เตรียมโดยใช้ soluble starch ที่เวลา 3 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า amylase activity ของลูกผสมที่ได้มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 2.5 เท่า ที่ระยะเวลาการทดลอง

2 วันอีกด้วย (Choi *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ของ *Sm. fibuligera* มักถูกนำมาโคลนเพื่อเชื่อมต่อเข้าสู่สายพันธุ์ *Sc. cerevisiae* เช่นการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดส หรือ BGL1 gene จาก *Sm. fibuligera* และเชื่อมเข้ากับโครโมโซมยีสต์ *Sc. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมตรงส่วนของ rDNA เพื่อสร้างลูกผสมที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าว (Shen *et al.*, 2008)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้ง ข้าวหมาก และกระบวนการหมักสาโท และน้ำตาลเมา สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท ยีสต์จำนวนดังกล่าวถูกนำมาระบุสปีชีส์โดยการทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนด้วยชุดทดสอบ API ID 32 C และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA พบว่าผลการระบุสปีชีส์จาก 2 วิธีข้างต้นสามารถระบุสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้จำนวน 14 ไอโซเลท สำหรับ *Saccharomycopsis fibuligera* ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ด้วยชุดทดสอบนี้ แต่สามารถระบุสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งพบว่ายีสต์จำนวน 5 ไอโซเลท ถูกระบุว่าเป็น *Sm. fibuligera* ส่วนที่เหลืออีก 6 ไอโซเลท ถูกระบุว่าเป็น *C. tropicalis* จำนวน 2 ไอโซเลท *I. orientalis* จำนวน 1 ไอโซเลท *P. caribbica* / *C. fermentati* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *P. farinosa* จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของไอโซเลทยีสต์ส่วนใหญ่ที่เปรียบเทียบ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลอยู่ในช่วง 98-99% homology และเมื่อนำลำดับเบสที่ได้ของทุกไอโซเลท มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม clustalX เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ ก่อนที่จะมาสร้าง Phylogenetic tree จากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละไอโซเลท พบว่าแต่ละไอโซเลทที่เป็น *Sc. cerevisiae* แยกออกจากกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับไอโซเลทที่เป็น *Sm. fibuligera* ก็แยกได้ชัดเจนเช่นกัน โดยมีค่า bootstrab ได้จากการคำนวณโดยวิธี neighbor joining สนับสนุนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในครั้งนี้

Saccharomyces cerevisiae ทั้ง 14 ไอโซเลท และ *Saccharomycopsis fibuligera* 5 ไอโซเลท ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Sc. cerevisiae* จำนวน 12 สายพันธุ์ และ *Sm. fibuligera* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* รวมทั้งหมดที่นำมาศึกษาจำนวน 37 ไอโซเลท ยีสต์ทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อการจัดกลุ่ม โดยการวิเคราะห์ DHPLC ตรงตำแหน่ง D1/D2 domain ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อการระบุสปีชีส์ของยีสต์ข้างต้น ซึ่งลำดับเบสบริเวณดังกล่าวมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากผลการวิเคราะห์ DHPLC พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ DHPLC ของยีสต์ *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* มีค่าเท่ากับ 59 และ 58.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และแสดง profile สำหรับกลุ่มยีสต์ *Sc. cerevisiae* และ *Sm. fibuligera* ที่แตกต่างกันจำนวน 3 และ 4 รูปแบบ ตามลำดับ

จากการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 26 ไอโซเลท โดยวิเคราะห์ Microsatellite and mtDNA-RFLP พบว่าทั้ง 2 วิธีให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันของ *Sc. cerevisiae* ถึง 19 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ *Sc. cerevisiae* เช่นเดียวกับการศึกษาความหลากหลายภายในสปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยใช้ ISSR โดยอาศัยไพรเมอร์ UBC จำนวน 8 ชนิด ผลที่ได้แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 80 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 ถึง 2000 คู่เบส ซึ่งสามารถแยก *Sm. fibuligera* ได้เป็น 7 กลุ่มอย่างชัดเจน

ผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้และเป็นประโยชน์ ในด้านการพัฒนากระบวนการหมักอาหาร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมซึ่งต้องการผลการวิเคราะห์ภายในเวลาจำกัด เช่น ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น เนื่องจากโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ นิยมใช้ยีสต์แห้งสายพันธุ์ทางการค้ามาเป็นหัวเชื้อหรือ starter ในกระบวนการหมัก เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนที่เกิดจาก wild yeast ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักตามธรรมชาติ และเป็นยีสต์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ และเนื่องจากยีสต์นี้มีจำนวนไม่แน่นอน การเจริญ และการอยู่รอดอาจขึ้นอยู่กับยีสต์อื่น ๆ ทำให้กระบวนการหมักแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน ไม่สามารถคาดคะเนคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้

วิธีการระบุสปีชีส์โดยอาศัยการใช้สารประกอบคาร์บอนและการวิเคราะห์ลำดับเบส สามารถระบุสปีชีส์ยีสต์ได้รวดเร็วกว่าวิธีแบบดั้งเดิม (conventional method) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมกระบวนการหมักในด้านการตรวจสอบการปนเปื้อนของยีสต์สปีชีส์อื่นๆ ได้ทันเวลา เนื่องจากยีสต์หลายสปีชีส์ที่อาจปนเปื้อนได้ในระหว่างกระบวนการหมัก ปัญหาดังกล่าวถ้าใช้เทคนิคแบบดั้งเดิมก็จำเป็นจะต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ซึ่งไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในกระบวนการตรวจสอบระดับการผลิตในอุตสาหกรรม นอกจากนี้สำหรับการใช้ประโยชน์จากการวิเคราะห์ยีสต์ระดับต่ำกว่าสปีชีส์ ยังสามารถใช้ประโยชน์เพื่อยืนยันสายพันธุ์ที่แยกได้ระหว่างกระบวนการหมักว่ายีสต์นั้นยังคงเป็นสายพันธุ์เดิมที่ใส่ในตอนเริ่มต้นอยู่หรือไม่ จากงานวิจัยได้ทำการศึกษาจำแนกความแตกต่างของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เกือบทุกชนิด เทคนิคทางโมเลกุลที่น่าเสนอในงานวิจัยนี้สามารถบอกความแตกต่างของยีสต์ภายในสปีชีส์เดียวกันได้ นอกจากนี้ยังเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางโมเลกุลมาใช้แยกความแตกต่างของยีสต์ในสปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่ถูกพบในลูกแป้งและกล้าเชื้อแห้งในกระบวนการหมักข้าวหมาก สาโท ของไทยอีกด้วย การจัดจำแนกระดับต่ำกว่าสปีชีส์นี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ เนื่องจากในกระบวนการหมักยีสต์สปีชีส์เดียวกันอาจจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น ความสามารถในการหมัก การทนเอทานอล การทนต่อแรงดันออกซิเจน และคุณสมบัติอื่นๆ ในการหมัก เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอไรโบโซมบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S large sub unit ให้ผลเป็นที่น่าพอใจสำหรับจุดประสงค์ในการระบุสปีชีส์ของยีสต์ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของไอโซเลตยีสต์ส่วนใหญ่จากการทดลองมีค่ามากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากการทดลองนี้เป็นการหาลำดับเบสเพียงบางส่วน (partial sequence) จึงไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เนื่องจากจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำลำดับเบสทั้งหมด (complete sequence) จึงจะสามารถบอกความแตกต่างของยีสต์ในแต่ละไอโซเลตได้ดี แต่เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายในการทำซ้ำ และค่าใช้จ่ายในการหาลำดับเบสในหลายๆ ตำแหน่ง จึงแนะนำให้ใช้เทคนิคทางโมเลกุลอื่น ที่มีความเหมาะสมมากกว่าเพื่อลดค่าใช้จ่าย เช่น เทคนิคการวิเคราะห์ mtDNA-RFLP, microsatellite และ ISSR ดังที่มีในรายงานผลการทดลองในงานวิจัยนี้

สำหรับการใช้โปรแกรมต่างๆ ใน Phylip package ซึ่งเป็นเครื่องมือชีวสารสนเทศที่ได้รับ ความนิยมมาก ในการศึกษา Phylogenetic analysis เพื่อศึกษาการจัดจำแนกกลุ่ม และศึกษาถึง ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสามารถดาวน์โหลดมาใช้งานได้เต็มรูปแบบ โดยไม่เสีย ค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังมีการรวบรวมพารามิเตอร์ และ methods เอาไว้อย่างมากมาย สามารถรองรับการ ปรับแต่งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อให้เหมาะสมกับงานวิจัย และยังสามารถใช้งานร่วมกับโปรแกรม อื่นๆ เช่น ClustalX ที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับเบส และ โปรแกรม TreeView32 ที่ใช้ในการ แสดง phylogenetic tree ทำให้รองรับการศึกษาในด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ได้ทุกรูปแบบ สำหรับงานวิจัยนี้ได้อธิบายขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยใช้ วิธี distance matrix method ทั้งกรณีวิเคราะห์ ลำดับเบส และ fragment ก่อนข้างละเอียด ซึ่งจะเป็น ประโยชน์และประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมได้

การวิเคราะห์ microsatellite สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว และค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ เทคนิคอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทียบกับเทคนิค mtDNA-RFLP ซึ่งเหมาะสมที่จะถูกนำมาใช้เพื่อ การตรวจสอบยีสต์ และสามารถนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเพื่อประโยชน์ในการตรวจ ติดตามยีสต์ ระหว่างกระบวนการหมักยีสต์ในระดับอุตสาหกรรม ทั้งที่เป็นการหมักในลักษณะของ เชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม เช่นในกระบวนการผลิตไวน์ และแนะนำให้ใช้ในการใช้งานในลักษณะ routine analysis เนื่องจากให้ผลค่อนข้างรวดเร็ว และชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับการวิเคราะห์ ด้วยเครื่องลำดับเบสอัตโนมัติ และใช้การติดฉลากไพรเมอร์ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ นอกจากนี้ผล ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยังสามารถวิเคราะห์ซ้ำแล้วให้ผลเช่นเดิมอีกด้วย

เครื่องหมายดีเอ็นเอ ISSR สามารถแยกความแตกต่างของยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ได้ โดยผลการวิเคราะห์รูปแบบ ISSR แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏอาจจะไม่ชัดเจนในการทดสอบสำหรับบางไพรเมอร์ และเทคนิค ISSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker ซึ่งไม่สามารถที่จะแสดงถึงความแตกต่างของ homozygous และ heterozygous ได้ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ โดยเทคนิคดังกล่าว สามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อยืนยันการจัดจำแนก *Saccharomycopsis fibuligera* ให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด เป็นการศึกษาในยีสต์เฉพาะที่แยกจากอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของไทยเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองแสดงความหลากหลายในแต่ละไอโซเลทที่ได้ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้ไม่ชัดเจนในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มของยีสต์ ภายในสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากยีสต์แต่ละสปีชีส์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง กรณีการวิเคราะห์การจัดกลุ่มของยีสต์ อาจจะต้องมีการนำยีสต์จากแหล่งอื่นๆ จากอาหารอื่นๆ หรือประเทศต่างๆ ในโลกมาเปรียบเทียบ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพิ่มเติม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชัยวัฒน์ จาคีเสถียร. 2520. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2521. การศึกษายีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการหมักอัลกอฮอล์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนตรี เขาวนัสเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัฐพร กลิ่นบรรทม. 2547. การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์เป้าน้อย *Croton sublyratus* Kurz. ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วสันต์ จันทราพิทย และ BioIT Team. 2547. เรียนรู้โปรแกรม ชีวสารสนเทศด้วยตนเอง. สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ศักดิ์ ทองจันทร์, ฉลองชัย ชุ่มชื่น, สุพรชัย ฟ้ารี, ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร, กฤษฎา บุณนารมย์ และกฤษณ์ ปิ่นทอง. 2551. บทความเรื่องเครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์สำหรับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระบือปลักไทย. กรมปศุสัตว์.

ศรีจรรยา สุขมนอนมณต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลต์ สำหรับปลาอุกยูงและการประยุกต์เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีสุข พูนผลกุล และชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2546. บทความเรื่องการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 11 หน้า

สมพร สีนธรา. 2544. การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1. 611 หน้า.

เสาวลักษณ์ ด้านสกุล. 2547. การระบุชนิดยีสต์ที่แยกจากข้าวหมาก และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ของไทยโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2550. การพัฒนาและใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอในการจำแนกความแตกต่างในระดับ race และการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Andrade, M.A., M. Rodriguez, B. Sanchez, E. Aranda and J.J. Cordaba. 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. **Int. J. Food Microbiol.** 107: 48-58.

Azarani, A. and K.H. Hecker. 2001. RNA analysis by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. **Nucleic Acids Res.** 29, e7.

Barrajón, N., M. Arévalo-Villena, L.J. Rodríguez-Aragón and A. Briones. 2008. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. **Food Control**, In Press, Corrected Proof, Available online 17 October 2008.

Bockelmann, W., M. Heller and K. J. Heller. 2008. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **Int. Dairy J.** 18: 1066–1071.

- Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Mol. Biol. Rep.** 19: 209-215.
- Choi, S. H., C. Sung, M.J. Oh and C. J. Kim. 1997. Intergeneric protoplast fusion in *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Fermentation and Bioengineering** 84(2): 158-161.
- Couvert, P., K. Poirier, A. Carri, C. Chalas, P. Jouannet, C. Beldjord, T. Bienvenu, J. Chelly and A. Kerjean. 2003. DHPLC-based method for DNA methylation analysis of differential methylated regions from imprinted genes. **BioTechniques** 34: 356–362.
- Daniel H.M. and W. Meyer. 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** 86: 61-78.
- _____, T.C. Sorrell and W. Meyer. 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 1593–1606.
- de Barros Lopes M., A. Soden, P.A. Henschke and P. Langridge. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4514-4520.
- _____, S. Rainieri, P.A. Henschke and P. Langridge. 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. **Int. J. Syst. Bact.** 49: 915-924.
- _____, J.R. Bellon, N.J. Shirley and P.T. Ganter. 2002. Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. **FEMS Yeast Res.** 1: 323-331.

- Dhanwant, S. K., V.S. Kamaljit and S.K. Sanjeev. 1987. Production of α -Amylase by *Saccharomycopsis fibuligera*. [J. fermentation technol.](#) 65(4): 387-394.
- Dung, N.T.P., F.M. Rombouts and M.J.R. Nout. 2007. Characteristics of some traditional Vietnamese starch-based rice wine fermentation starters (men). **L.W.T.** 40: 130-135.
- Evans, I.H. 1996. **Yeast protocols; methods in cell and molecular biology**. 1st ed., Humana. USA. 423p.
- Fell J.W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 50: 1351–1371.
- Field, D. and C. Wills. 1998. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 1647-1652.
- Flores Berrios, E.P., J.F. Alba Gonzalez, J.P. Arrizon Gavino, P. Romano, A. Capece and A. Gschaedler Mathis. 2005. The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. **Let. Appl. Microbiol.** 41: 147–152.
- Frueh, F.W. and M. Noyer-Weidner. 2003. The use of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. **Clin. Chem. Lab. Med.** 41: 452–461.
- Fuller, L.J., D.A. MacKenzie and I. N. Roberts. 2008. Species-specific variation in efficacy of yeast genomic DNA isolation techniques assessed using amplified fragment length polymorphism. **Analytic. Biochem.** 381: 154–156.

- Gallagher, S. 2006. **Pulsed Field Electrophoresis for Separation of Large DNA.**
<http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>, 20 Sept. 2006.
- Gallego, F.J., M.A. Perez, Y. Nunez and P. Hidalgo. 2005. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiol.** 22: 561-568.
- Gargouri, A. 1989. A rapid and simple method for extraction Yeast mitochondrial DNA. **Curr. Genet.** 15: 235-237.
- Gente, S., S. Larpin, O. Cholet, M. Gueguen, J.P. Vernoux and N. Desmasures. 2007. Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. **J. Dairy Res.** 74: 137-145.
- Goldenberg O., B. Graf, S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, A. Fischer, G. Hong, S. Bereswill and U. Gobel. 2005a. **Rapid molecular detection of clinically relevant yeasts by PCR-based denaturing high performance liquid chromatography.** 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. April 2-5.
- Goldenberg, O., S. Herrmann, T. Adam, G. Marjoram, G. Hong, U. Gobel and B. Graf. 2005b. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and Identification of Seven *Candida* Species. **J. Cli. Microbiol.** 43: 5912-5915.
- Howell, K.S., E.J. Bartowaky, G.H. Feet and P.A. Henschke. 2004. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 315-320.

- Huang, C.H., F.L. Lee and C.J. Tai. 2008. A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **J. Microbiol. Methods** 75: 531–534.
- Hurtle, W., L. Lindler, W. Fan, D. Shoemaker, E. Henschal and D. Norwood. 2003. Detection and identification of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by denaturing high-performance liquid chromatography. **J. Clin. Microbiol.** 41: 3273–3283.
- Jespersen, L., A. van der Aa Kühle and K.M. Petersen. 2000. Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** 60: 43-53.
- _____, D.S. Nielsen, S. Hønholt and M. Jakobsen. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Res.** 5: 441-453.
- Jeyaram, K., W. Mohendro Singh, A. Capece and P. Romano. 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(2): 115-125.
- Jubany, S., I. Tomasco, I. Ponce de León, K. Medina, F. Carrau, N. Arrambide, H. Naya and C. Gaggero. 2008. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **FEMS Yeast Res.** 8(3): 472-84.
- Kerrigan, J. M.T. Smith, J.D. Rogers, G. A. Poot and G. W. Douhan. 2003. *Ascobotryozyma cognata* sp. nov., a new ascomycetous yeast associated with nematodes from wood-boring beetle galleries. **Mycol. Res.** 107(9): 1110–1120.

- Kurtzman C.P. and C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek.** 73: 331–371.
- _____, C.P. and C.J. Robnett. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Res.** 3: 417-432.
- _____, C.P. and J.M. Fell. 1998. **The Yeast: A Taxonomic Study.** 4th ed., Elsevier Science Publisher, Amsterdam. 1055 p.
- Legras, J.L., O. Ruh, D. Merdinoglu and F. Karst. 2005. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Int. J. Food Microbiol.** 102: 73-83.
- Llanos, R., A. Querol, A.M. Planes and M.T. Fernández-Espinar. 2004. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. **Syst. Appl. Microbiol.** 27: 427–435.
- _____, A. Querol, A.M. Planes, J. Peman., M. Gobernado and M.T. Fernández-Espinar. 2006. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. **Int. J. Food Microbiol.** 110: 286–290
- Lopandic, K., H. Gangl, E. Wallner, G. Tscheik, G. Leitner, A. Querol, N. Borth, M. Breitenbach, H. Prillinger and W. Tiefenbrunner. 2007. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. **FEMS Yeast.** 7: 953- 965.

- López, V., A. Querol, D. Ramón and M.T.F. Espinar., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** 68: 75-81.
- Luque, C., L. Legal, H. Staudter, C. Gers and M. Wink. 2002. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidopter). **Hereditas.** 136: 251-253.
- Masneuf-Pomarède, I., C.L. Jeune, P. Durrens, M. Lollier, M. Aigle and D. Dubourdieu. 2006. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. **Syst. Appl. Microbiol.** 30(1): 75-82.
- Martinez, C., S. Gac, A. Lavin and M. Ganga. 2004. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. **J. Appl. Microbiol.** 96: 1161-1168.
- Ness, F., F. Lavalley, D. Dubourdieu, M. Aigle and L. Dulau. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. **J. Sci Food Agric.** 62: 89-94.
- Oefner, P.J. and P.A. Underhill. 1995. Comparative DNA sequence by denaturing high performance liquid chromatograph (DHPLC). **Am. J. Hum. Genet.** 57: p. A266.
- Perez, M.A., F.J. Gallego, I. Martinez and P. Hidalgo. 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. **Lett. Appl. Microbiol.** 33:461-466.
- Peterson, S.W. and C.P. Kurtzman. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Syst. Appl. Microbiol.** 14:124-129.

- Pina, C., P. Teixeira, P. Leite, M. Villa, C. Belloch and L. Brito. 2005. PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. **J. Appl. Microbiol.** 98: 1107-1114.
- Posteraro, P., G. Branca, M. Sanguinetti, S. Ranno, G. Cammarota, S. Rahimi, M.D. Carlo, B. Posteraro and G. Fadda. 2006. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. **J. Antimicrobial Chemotherapy.** 57: 71-78.
- Querol, A., E. Barrio and D. Ramon. 1992a. A Comparative study of different methods of yeast strain characterization. **Syst. Appl. Microbiol.** 15: 439-446.
- _____, E. Barrio, T. Huerta and D. Ramon. 1992b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2948-2953.
- _____, E. Barrio and D. Ramon. 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. **Int. J. Food Microbiol.** 21: 315-323.
- Ready, M.P, N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica.** 128: 9-17.
- Rohm, H., F. Lechner and M. Lehner. 1990. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** 11(3-4): 215-223.
- Schuller, D., E. Valerob, S. Dequinb and M. Casal. 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiol Lett.** 231: 19-26.

- Shen Y., Y. Zhang, T. Ma, X. Bao, F. Du, G. Zhuang and Y. Qu. 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing b-glucosidase. **Biores. Technol.** 99: 5099–5103.
- Shi, R., K. Otomo, H. Yamada, T. Tatsumi and I. Sugawara. 2006. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. **Microbes and Infection** 8(1): 128-135.
- Spiegelman, J.I., M.N. Mindrinos, C. Fankhauser, D. Richards, J. Lutes, J. Chory and P.J. Oefner. 2000. Cloning of the arabidopsis RSF1 gene by using a mapping strategy based on high-density DNA arrays and denaturing high-performance liquid chromatography. **Plant Cell** 12: 2485– 2498.
- Sugita, T. and A. Nishikawa. 2003. Fungal Identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of the pharmaceutical society of Japan and the Japanese Pharmacopoeia. **J. Health Sci.** 49: 531-533.
- Techera, A.G., S. Jubany, F.M. Carrau and C. Gaggero. 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 71-75.
- Tempel, T. and M. Jakobsen. 1998. [Yeasts Associated with Danablu](#). **Int. Dairy J.** 8(1): 25-31.
- Wellala, C. K. D., M.H.W. Gunawardhane, M.C.P. Wijeratne and C.K. Illeperuma. 2004. Fermentation of rice using yeast isolated from coconut and palmyrah sap. **Tropical Agri. Res.** 16: 114-120.
- Valles, B.S., R.P. Bedrinana, A.L. Queipo and J.J.M. Alonso. 2008. Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). **Food Microbiol.** 25(5): 690-697.

- Yamada, Y., K. Makimura, H. Mirhendi, K. Ueda, Y. Nishiyama, H. Yamaguchi and M. Osumi. 2002. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. **Jpn. J. Infect. Dis.** 55: 122-125.
- Yip, P.Y., C.F. Chau, C.Y. Mak and H.S. Kwan. 2007. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. **Chinese Medicine** 2(9).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (อาหารสำเร็จรูป)

ละลาย DRBC 31.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2. Malt Extract Agar (MEA) (อาหารสำเร็จรูป)

ละลาย MEA 61 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3. Yeast extract-Peptone-Dextrose medium (YPD)

Glucose	2%
Yeast extract	1%
Peptone	2%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4. Yeast extract-Malt extract (YM)

Yeast extract	0.3%
Malt extract	0.3%
Peptone	0.5%
Glucose	1%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

5. API C Medium ประกอบด้วย

Ammonium sulfate	5	กรัม
Monopotassium phosphate	0.31	กรัม
Dipotassium phosphate	0.45	กรัม
Disodium phosphate	0.92	กรัม
Sodium chloride	0.1	กรัม
Calcium chloride	0.05	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
L-Histidine	0.005	กรัม
L-Tryptophan	0.02	กรัม
L-Methionine	0.02	กรัม
Gelling agent	0.5	กรัม
Vitamin Solution	1	มิลลิลิตร
Trace elements	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย Demineralized water เพื่อให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH
สุดท้ายเท่ากับ 6.4-6.8 ที่ 20-25 องศาเซลเซียส

6. Lysis buffer

2M Tris-HCl	0.5	มิลลิลิตร
0.5MEDTA	0.2	มิลลิลิตร
2.5M NaCl	4	มิลลิลิตร
TritonX100	2	มิลลิลิตร
SDS (pH8)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส นาน 20 นาที

7. TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารผสมประกอบด้วย

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.02	มิลลิลิตร

8. 1X TBE buffer

บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) เพื่อเตรียม 1X TBE buffer โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE buffer จำนวน 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 10X TBE buffer (89 mM Tris-OH, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA)

Tris base	108	กรัม
boric acid	55	กรัม
Na ₂ EDTA	93	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

9. สารละลาย A

0.5 M EDTA (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
Sorbitol	9.11	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ 50 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

10. สารละลาย B

2M Tris-HCl	1.25	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ 50 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

11. Yeast extract-Peptone-Dextrose 18 medium (YPD₁₈)

Glucose	18%
Yeast extract	1%
Peptone	2%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

12. Yeast-Malt extract-starch agar (YMS agar)

Soluble starch	10	กรัมต่อลิตร
KCl	1.8	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2.5	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate.3H ₂ O	8.2	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15.0	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

13. Lugol's iodine

iodine	2	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม

ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ข

การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก ศรีจรรยา, 2546; หทัยรัตน์, 2550)

หลังจากสกัดดีเอ็นเอ จำเป็นจะต้องนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาหาการหาปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เพื่อการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป สำหรับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน สำหรับเทคนิคที่ต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบส เป็นต้น ซึ่งการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer มีขั้นตอนดังนี้

1. ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้น 2 ไมโครลิตร กับ TE buffer 198 ไมโครลิตร (dilution factor = 200) แล้วใส่ลงใน cuvette จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้ TE buffer เป็น blank

2. คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (หน่วยไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร) สามารถคำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ = $A_{260} \times 50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times$ dilution factor
หมายเหตุ: A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถคำนวณได้จาก ค่าสัดส่วนระหว่าง $A_{260} : A_{280}$ สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.65-1.85 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.65 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่ และในกรณีที่ค่ามากกว่า 1.80 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนเปื้อน

ตารางผนวกที่ ค5 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์
UBC 888

NO.	ขนาด (คู่เบส)	ไอโซเลข										
		SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	2000	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
2	1750	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
3	1500	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
4	1250	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
5	875	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
6	750	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
7	600	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
8	520	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
9	450	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	350	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
11	320	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1

ตารางผนวกที่ ค6 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์
UBC 889

		ไอโซเลต										
NO.	ขนาด (คู่เบส)	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1500	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
2	1450	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	800	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
4	700	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
5	550	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
6	450	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
7	420	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	350	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
9	300	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ ค7 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์
UBC 890

		ไอโซเลต										
NO.	ขนาด (คู่เบส)	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1100	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
2	910	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
3	820	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	700	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
5	620	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
6	500	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
7	450	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ค8 การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ ISSR ด้วยไพรเมอร์
UBC 891

NO.	ขนาด (คู่เบส)	ไอโซเลท										
		SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	>2000	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
2	2000	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
3	1450	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1250	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
5	1200	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
6	1000	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
7	700	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
8	600	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
9	550	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	480	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
11	420	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
12	300	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวเสาวลักษณ์ ด้านสกุล
เกิดวันที่	4 สิงหาคม 2522
สถานที่เกิด	อ. พุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (พ.ศ. 2544) วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)
ผลงาน	ผลงานในรูปแบบ poster เรื่อง Identification of Yeast Isolated from Thai Fermented Foods by Sequence Analysis of rDNA. Book of Abstracts. The 19 th International ICFMH symposium Foodmicro2004, 12-16 September 2004. Protoroz. Slovenia. ผลงานในรูปแบบ poster เรื่อง Diversity of <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> in Thai rice wine starter by molecular techniques ในการประชุม The International Microbial Biotechnology Conference, 11-13 November 2008. Jakarta, Indonesia.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2551