สปีชีส์ยีสต์ที่พบในลูกแป้งสาโทจากจังหวัดสุรินทร์: ความสามารถในการย่อยแป้งและการผลิตแอลกอฮอล์

ศศิธร หล่อเรืองศิลป์[1] ทนงศักดิ์ ประเสริฐสิน[2] นรา รอดบุญฤทธิ์[2] นารีรัตน์ มูลใจ[1] และจิดาภา แสงสวัสดิ์[1*]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และ [2]สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190
[*]E-mail: sanom.n@ubu.ac.th

รับบทความ: 29 เมษายน 2565 แก้ไขบทความ: 18 กันยายน 2565 ยอมรับตีพิมพ์: 23 กันยายน 2565

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งสาโทใน 6 อำเภอของจังหวัดสุรินทร์ ได้แก่ เมืองสุรินทร์ ปราสาท สำโรงทาบ ศรีขรภูมิ ท่าตูมและรัตนบุรี โดยนำตัวอย่างลูกแป้งที่ใช้ในการแยกยีสต์ จำนวน 8 ตัวอย่าง มาเพาะเชื้อในอาหารเหลว YM ที่เติม chloramphenicol ในอัตราส่วน 20 ppm และ sodium propionate 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขีดลากแบบไขว้ (cross streak) บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยการเทียบลำดับเบสของบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ยีสต์จำนวน 20 ไอโซเลต มีผลการระบุชนิดของยีสต์เป็นยีสต์ 4 สปีชีส์ คือ *Saccharomycopsis fibuligera* (10 ไอโซเลต) *Issatchenkia orientalis* (5 ไอโซเลต) *Pichia kudriavzevii* (4 ไอโซเลต) และ *Meyerozyma caribbica* (1 ไอโซเลต) ซึ่งยีสต์ *Sm. fibuligera* เป็นสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด โดยพบในลูกแป้งจำนวน 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ลูกแป้งส่วนใหญ่พบยีสต์เพียงสปีชีส์เดียวยกเว้น 3 ตัวอย่างที่พบยีสต์ 2 สปีชีส์ โดยลูกแป้งจากอำเภอรัตนบุรีพบยีสต์ *Sm. fibuligera* ร่วมกับ *P. kudriavzeii* ลูกแป้งจากอำเภอศรีขรภูมิ (แสงจันทร์) พบยีสต์ *Sm. fibuligera* ร่วมกับ *M. caribbica* และลูกแป้งจากอำเภอปราสาท พบยีสต์ *I. orientalis* ร่วมกับ *P. kudriavzevii* เมื่อนำยีสต์ทั้ง 24 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง พบว่ามียีสต์จำนวน 10 ไอโซเลตที่มีการเจริญและสร้างวงใสบนอาหาร starch agar ได้แก่ ไอโซเลต RTN1–1, RTN1–2, RTN1–3, SRT1–1, SRT1–2, SRT1–3, SRT1–4, SJ1–3, SJ1–4 และ TT1–2 ยีสต์ทั้งหมดมีขนาดวงใสใกล้เคียงกันยกเว้น RTN1-1 และ RTN1-3 ที่มีขนาดวงใสเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามยีสต์จำนวน 10 ไอโซเลต ถูกระบุสปีชีส์เป็นยีสต์ *Sm. fibuligera* ส่วนความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ fermentation broth ที่มีน้ำตาลซูโครส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่ายีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์สูงสุด คือ *I. orientalis* MSR2–2, MSR2–3 และ PS1–5 ซึ่งสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) คิดเป็น 0.39 กรัมเอทานอล/กรัมซูโครส

คำสำคัญ: ยีสต์ ลูกแป้ง สุรินทร์ สาโท

Yeasts Found in Loog–pang Sato from Surin Province: Their Amylolytic Activity and Alcohol Production

Sasithorn Lorroengsil[1], Thanongsak Praseartsin[2], Nara Rodboonrit[2], Nareerat Moonjai[1] and Jidapa Sangswan[1*]

[1]Department of Biological Science and [2]Microbiology Major, Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

[*]E-mail: sanom.n@ubu.ac.th

Received: 29 April 2022 Revised: 18 September 2022 Accepted: 23 September 2022

Abstract

The objective of this research was to isolate yeast from the starter (loog–pang) of rice wine (sato) in 6 districts of Surin province including Mueang–Surin, Prasat, Samrong Thap, Sikhoraphum, Thatum and Rattanaburi. Eight samples of loog–pang were used to isolate yeast by adding to YM broth supplemented with 20 ppm of chloramphenicol and 0.05%(w/v) sodium propionate. The flasks were incubated at 35°C for 24 hours. Then yeasts in cultured medium were isolated on YM agar using the cross streaking method after incubation at 35°C for 24–48 hours. Twenty–four of yeast isolates were obtained in present study. The yeast identification procedure based on the sequencing of amplified D1/D2 region of the yeast 26S ribosomal DNA, twenty of yeast isolates were identified to 4 species including *Saccharomycopsis fibuligera* (10 isolates), *Issatchenkia orientalis* (5 isolates), *Pichia kudriavzevii* (4 isolates) and *Meyerozyma caribbica* (1 isolate). Yeast *Sm. fibuligera* was found in 4 samples from total 8 samples which was the most frequently found species in loog–pang. Only one yeast species was found mostly in loog–pang samples, except for 3 samples which two yeast species were found. Yeasts *Sm. fibuligera* and *P. kudriavzeii* were found in loog–pang samples from Rattanaburi district, *Sm. fibuligera* and *M. caribbica* were found in loog–pang samples from Sikhoraphum (Sang–Jan) district and *I. orientalis* and *P. kudriavzevii* were found in loog–pang samples from Prasat district. Among 24 isolates which were tested for starch hydrolysis, it was found that 10 isolates (RTN1–1, RTN1–2, RTN1–3, SRT1–1, SRT1–2, SRT1–3, SRT1–4, SJ1–3, SJ1–4 and TT1–2) could grow and produce clear zone on starch agar. The clear zone diameters of all isolates were similar, except for isolate RTN1–1 and RTN1–3 which were significantly smaller than others. However, all 10 isolates were identified species as *Sm.*

fibuligera. Alcohol production was examined in fermentation broth containing 10%(w/v) sucrose. The highest alcohol contents of 5.0%(v/v) were obtained from *I. orientalis* isolates MSR2–2, MSR2–3 and PS1–5 with ethanol yield of 0.39 $g_{ethanol}/g_{sucrose}$.

Keywords: Yeast, Loog–pang, Surin, Sato

บทนำ

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากข้าว มีการผลิตในหลายประเทศในทวีปเอเชีย สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Tamang *et al.*, 2016) คือ กลุ่มที่ 1 เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ผลิตจากข้าวที่ไม่มีการกลั่นและไม่มีการกรอง ผลิตโดยกล้าเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้ (amylolytic activity starter) เช่น bhaati jaanr ในประเทศอินเดียและเนปาล (Tamang and Thapa, 2006) makgeolli ในประเทศเกาหลี (Jung *et al.*, 2012) กลุ่มที่ 2 เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ผลิตจากข้าวที่ไม่มีการกลั่นแต่มีการกรอง ผลิตโดยกล้าเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้ เช่น สาเก (sake) ของประเทศญี่ปุ่น (Kotaka *et al.*, 2008) และสาโท (sato) ที่ผลิตแบบพื้นบ้านของประเทศไทย และกลุ่มที่ 3 เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ผลิตจากข้าวที่มีการกลั่น ผลิตโดยกล้าเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้ เช่น shochu ของประเทศญี่ปุ่น โซจู (soju) ของประเทศเกาหลี (Steinkraus, 1997) เหล้าพื้นบ้านของประเทศไทย

สาโท (sato) ผลิตโดยใช้ข้าวเหนียวนึ่งนำมาล้างเมือกข้าวออกให้หมด ปล่อยให้แห้ง จากนั้นคลุกเคล้าด้วยหัวเชื้อแห้งที่เรียกว่าลูกแป้ง ซึ่งหัวเชื้อมีส่วนผสมของเชื้อราและยีสต์ เมื่อหมักทิ้งไว้ 3–4 วัน จะมีน้ำเยิ้ม ๆ เกิดขึ้น เรียกว่า น้ำต้อย จากนั้นเติมน้ำเพื่อเจือจางน้ำตาลให้เหมาะสมต่อการหมักของยีสต์ ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ สำหรับประเทศไทยแล้วการผลิตสาโทและการผลิตลูกแป้งจัดเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในแต่ละพื้นที่ ในปัจจุบันนอกจากการผลิตสาโทแบบดั้งเดิมแล้ว ยังมีการปรับเปลี่ยนรสชาติ สี และกลิ่นของสาโทได้โดยใช้น้ำสกัดจากสมุนไพร หรือผลไม้ เติมลงไปในระหว่างการหมัก ทำให้ได้สาโทที่มีกลิ่นและรสชาติที่แตกต่างกัน เช่น สาโทน้ำสับปะรด สาโทน้ำมะขาม และสาโทน้ำมะม่วง (Kaewkongpan *et al.*, 2017) โดยลักษณะของสาโทที่ได้มีทั้งใสและขุ่นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตและความต้องการของผู้บริโภค

สาโทมีความเป็นมาควบคู่กับประวัติศาสตร์ของไทย ตำรับสุรายอดข้าวของไทยมีมาแต่เนิ่นนาน ตราบทุกวันนี้บางครัวเรือนยังคงทำเพื่อใช้สำหรับดื่มกันเอง ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์เองก็เช่นกัน จากการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีอาหารหมักในวัฒนธรรมการกินอาหารของกลุ่มชาติพันธุ์ไทยลาวและไทยเขมร ที่บ้านพนมดิน ตำบลตาเมียง อำเภอพนมดงรัก จังหวัดสุรินทร์ พบว่า อาหารหมักที่ประชาชนในชุมชนยังคงทำอยู่ มี 8 ชนิด ซึ่งรวมถึงสาโทด้วย สาโทหรือเหล้าโท กลุ่มชาติพันธุ์ไทยเขมรเรียกว่า “สราโท” มีการใช้วัตถุดิบหลักคือข้าวเหนียว ลูกแป้งสาโท และน้ำเหมือนกันกับกลุ่มชาติพันธุ์ไทยลาว ภูมิปัญญาการทำสืบทอดมาจากบรรพบุรุษและถ่ายทอดให้ลูกหลานภายในครอบครัว มีกรรมวิธีและขั้นตอนการผลิตเหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างในเรื่องของรสชาติ โดยสาโทของกลุ่มชาติพันธุ์ไทยลาวจะมีความหวานมากกว่า ในขณะที่

สาโทของกลุ่มชาติพันธุ์ไทยเขมรมีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่า ความถี่และช่วงเวลาในการทำใกล้เคียงกัน เฉพาะช่วงเทศกาลสำคัญ เช่น งานบวช งานแต่ง ช่วงทำนา ช่วงปีใหม่ (Trongjit and Suwannapusit, 2020)

ลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่ได้จากการผสมแป้งข้าวเจ้ากับลูกแป้งที่สำเร็จแล้ว เพื่อเป็นการต่อเชื้อและลูกแป้งมักมีการเติมสมุนไพรบางชนิด เช่น กระเทียม ขิง ข่า ชะเอม และพริกไทย กลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งมี 3 ชนิดคือ เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยเชื้อราและยีสต์บางสายพันธุ์มีหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ เชื้อราที่พบในลูกแป้ง ได้แก่ *Amylomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. (Daroonpunt *et al*., 2016; Limtong *et al*., 2005; Luangkhlaypho *et al*., 2014; Roongrojmongkhon *et al*., 2020) ส่วนเชื้อยีสต์ที่พบเป็นยีสต์กลุ่ม Ascomycetes หลากหลายสปีชีส์ (ตาราง 1)

ลูกแป้งจากแต่ละแหล่งมีเชื้อผสมที่ต่างสายพันธุ์ จึงทำให้สาโทในแต่ละพื้นที่มีปริมาณแอลกอฮอล์และรสชาติที่แตกต่างกัน ที่ผ่านมามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้ง (ตาราง 1) จะเห็นได้ว่า ยีสต์ที่พบในลูกแป้งในแต่ละพื้นที่มีบางสายพันธุ์ที่เหมือนกันและบางสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งจะมีทั้งยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ดี และยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งได้ ซึ่งนอกจากจะสามารถนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ด้านอื่น ๆ ได้อีก เช่น ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงไบโอเอทานอล (Chaijamrus and Mouthung, 2011; Kunlabut *et al*., 2020) การผลิตน้ำส้มสายชูร่วมกับ *Acetobacter* sp. (Nuanpeng, 2018) และใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมัก (Rakmai *et al*., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้งสาโทในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ แล้วนำยีสต์ที่คัดแยกได้มาจัดจำแนกและระบุสปีชีส์ ตลอดจนเก็บรักษาเพื่อเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ยีสต์เหล่านี้ไว้และอาจพัฒนาไปสู่การผลิตกล้าเชื้อสำหรับการผลิตสาโทที่มีมาตรฐานหรือนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสารที่มีมูลค่าสูงต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

เก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทจาก 6 อำเภอในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ ได้แก่ เมืองสุรินทร์ ปราสาท สำโรงทาบ ศรีขรภูมิ ท่าตูมและรัตนบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแหล่งละ 10 เม็ด นำตัวอย่างลูกแป้งบรรจุในถุงพลาสติกซิปล็อค เก็บที่อุณหภูมิ 5–10 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาคัดแยกยีสต์

การแยกยีสต์จากลูกแป้ง

นำลูกแป้งที่บดละเอียด ปริมาณ 1 กรัม เติมลงในอาหารเหลว YM (yeast extract–malt extract; yeast extract 0.3%(w/v), malt extract 0.3%(w/v), casein 0.5%(w/v), dextrose 1.0%(w/v)) ที่เติม chloramphenicol ในอัตราส่วน 20 ppm และ sodium propionate 0.05%(w/v) นำไปบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขีด (streak) ลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกัน โดยพิจารณาจากรูปร่าง สี ขนาดและลักษณะผิวหน้าโคโลนี จากนั้นนำโคโลนีที่คัดเลือกมาขีดลากแบบไขว้ (cross streak)

ตาราง 1 การคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งในจังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย

แหล่งที่มาของลูกแป้ง	**ชนิดของลูกแป้ง**	**สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้**	**อ้างอิง**
หลาย ๆ จังหวัดจากหลาย ๆ ภาค	ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก	*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *P. mexicana*, *P. heimii*, *Candida rhagii*, *C. glabrata*, *Issatchenkia orientalis*, *Torulaspora globosa*, *T. delbrueckii*, *Rhodotorula philyla*, *Trichosporon asahii*, *Saccharomycopsis fibuligera*	Limtong *et al*., 2002
เชียงใหม่	ลูกแป้งเหล้า	*Saccharomyces* sp. *Endomycopsis* sp.	Chomchoei, 2005
อยุธยา อ่างทอง ลพบุรี และสระบุรี	ลูกแป้งข้าวหมาก	*C. parapdida*, *C. quercitrusa*, *P. kudriavzevii*	Supcharoenlert, 2010
อุทัยธานี	ลูกแป้ง	*Sm. fibuligera*	Chaijamrus and Mouthung, 2011
ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ลูกแป้ง	*Sm. fibuligera, P. anomala*, *I. orientalis*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *C. glabrata*	Taechavasonyoo *et al*., 2013
อ่างทอง อยุธยา สระบุรี และลพบุรี	ลูกแป้งข้าวหมาก	*Candida* sp. ATY1, *Candida* sp. AUY3, *C. quercitrusa* SRY4 *P. kudriavzevii* LBY2	Chanchaichaovivat *et al*., 2015
เชียงใหม่	ลูกแป้งเหล้า	*S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, *C. glabrata*	Cheenacharoen and Juntachai, 2018
ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และพังงา	ลูกแป้ง	*Wickerhamomyces anomalus*	Paewlueng *et al*., 2019
อุบลราชธานี ศรีสะเกษ และสุรินทร์	ลูกแป้งสาโท	*W. anomalus*, *C. tropicalis*	Kunlabut *et al*., 2020
สุรินทร์	ลูกแป้งสาโท	*Sm. fibuligera*, *P. kudriavzeii*, *I. orientalis*, *S. cerevisiae*, *Meyerozyma caribbica*	การศึกษาครั้งนี้

ลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว ตั้งรหัสเชื้อของแต่ละไอโซเลต เก็บเชื้อยีสต์ในอาหารแข็งผิวหน้าเอียง YM ที่อุณหภูมิ 4–10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป พร้อมกับเก็บเชื้อในอาหารเก็บรักษาเชื้อที่มีกลีเซอรอล (glycerol) ความ

เข้มข้น 15%(v/v) เพื่อเป็น stock culture

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้

นำยีสต์ที่คัดแยกได้ไปขีดลากแบบไขว้บนอาหารแข็ง YPD (yeast extract peptone dextrose; yeast extract 1.0% (w/v), peptone 2.0% (w/v), dextrose 2.0%(w/v) และ agar 2.0%(w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง สังเกตรูปร่าง ลักษณะขอบ สี และผิวหน้าของโคโลนียีสต์

การศึกษาลักษณะสัณฐานของเซลล์ยีสต์ที่แยกได้

ถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสไลด์โดยเทคนิค wet mount แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตรูปร่างและการแตกหน่อ

ศึกษาการสร้างเส้นใยโดยเพาะเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง YPD โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากเป็นเส้นตรงและแตะเชื้อเป็นจุดที่ปลายทั้งสองด้านของเส้นตรงในจานเพาะเชื้อเดียวกัน ปิดทับบริเวณที่จุดเชื้อด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7–10 วัน นำกระจกปิดสไลด์มาทำ wet mount แล้วตรวจสอบการสร้างเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส (zymolyase) ขั้นตอนการสกัดตามที่อธิบายไว้โดย Nonklang (2012) โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้จะใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยเจือจางโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10–200 ng/µL สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ D1/D2 ของ 26S rDNA นั้น forward primer ที่ใช้คือ NL–1 (5'–CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG–3') และ reverse primer ที่ใช้คือ NL–4 (5'–GTCCGTGTTTCAAGACGG–3') และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ KOD Plus PCR kit (Toyobo, Osaka, Japan) สภาวะที่ใช้ คือ pre–heat ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis

การระบุสปีชีส์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 ของยีน 26S rDNA ของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งสาโททั้ง 20 ไอโซเลต มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อระบุสปีชีส์

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง YM ที่แทนน้ำตาล dextrose ด้วย soluble starch 1% (w/v) โดยหยด 4 จุดต่อเพลทต่อไอโซเลต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งด้วยการเทสารละลาย Lugol's

iodine ลงบนอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญอยู่ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเททิ้ง หากมีการย่อยแป้งจะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีน้ำตาลของสารละลายไอโอดีน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

การทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในอาหาร fermentation broth (yeast extract 0.5% (w/v), peptone 0.5%(w/v) และ sucrose 10%(w/v)) ปริมาตร 350 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกไป นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง ebulliometer

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ได้แก่ ร้อยละ แผนภูมิ วัดค่าการกระจายด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (one–way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 26.0.0.1

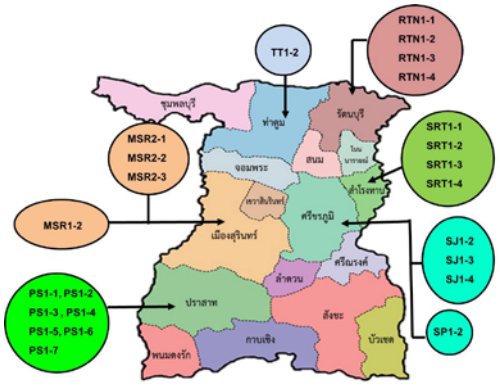
ผลการวิจัย

ลักษณะของลูกแป้ง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทในเขตพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ จากทั้งหมด 6 อำเภอ ได้แก่ เมืองสุรินทร์ ปราสาท สำโรงทาบ ศรีขรภูมิ ท่าตูมและรัตนบุรี (ภาพที่ 1) พบว่าลูกแป้งสาโทของแต่ละอำเภอมีลักษณะไม่เหมือนกัน ลักษณะลูกแป้งส่วนใหญ่เป็นก้อนครึ่งทรงกลม มีทั้งผิวเรียบเนียนและขรุขระ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.5–3.5 เซนติเมตร ลูกแป้งมีทั้งสีขาว สีเหลืองนวลและสีเหลืองปนเทาเล็กน้อย น้ำหนักค่อนข้างเบา และมีเนื้อหยาบ มีชิ้นส่วนสมุนไพรติดบนผิวเล็กน้อย กลิ่นของลูกแป้งจะคล้ายกันคือ มีกลิ่นแป้งหมัก กลิ่นข้าว และกลิ่นเครื่องเทศ แต่ลูกแป้งของอำเภอรัตนบุรีมีกลิ่นเปรี้ยวอ่อน ๆ นอกจากนี้ยังทำเครื่องหมายประทับบนผิวลูกแป้ง เพื่อบ่งบอกยี่ห้อหรือแหล่งผลิต เช่น สัญลักษณ์ต่าง ๆ หรือตัวอักษร ดังในภาพที่ 2 และตาราง 2

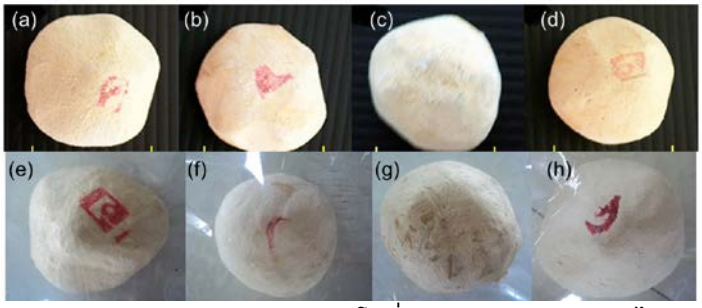
การคัดแยกยีสต์จากลูกแป้ง

จากลูกแป้ง 8 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์



ภาพที่ 1 จำนวนและรหัสของยีสต์แต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากลูกแป้งสาโทจากอำเภอต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์

ที่มา: http://www.surinpao.org/eletion63/map surin/sangkha.html



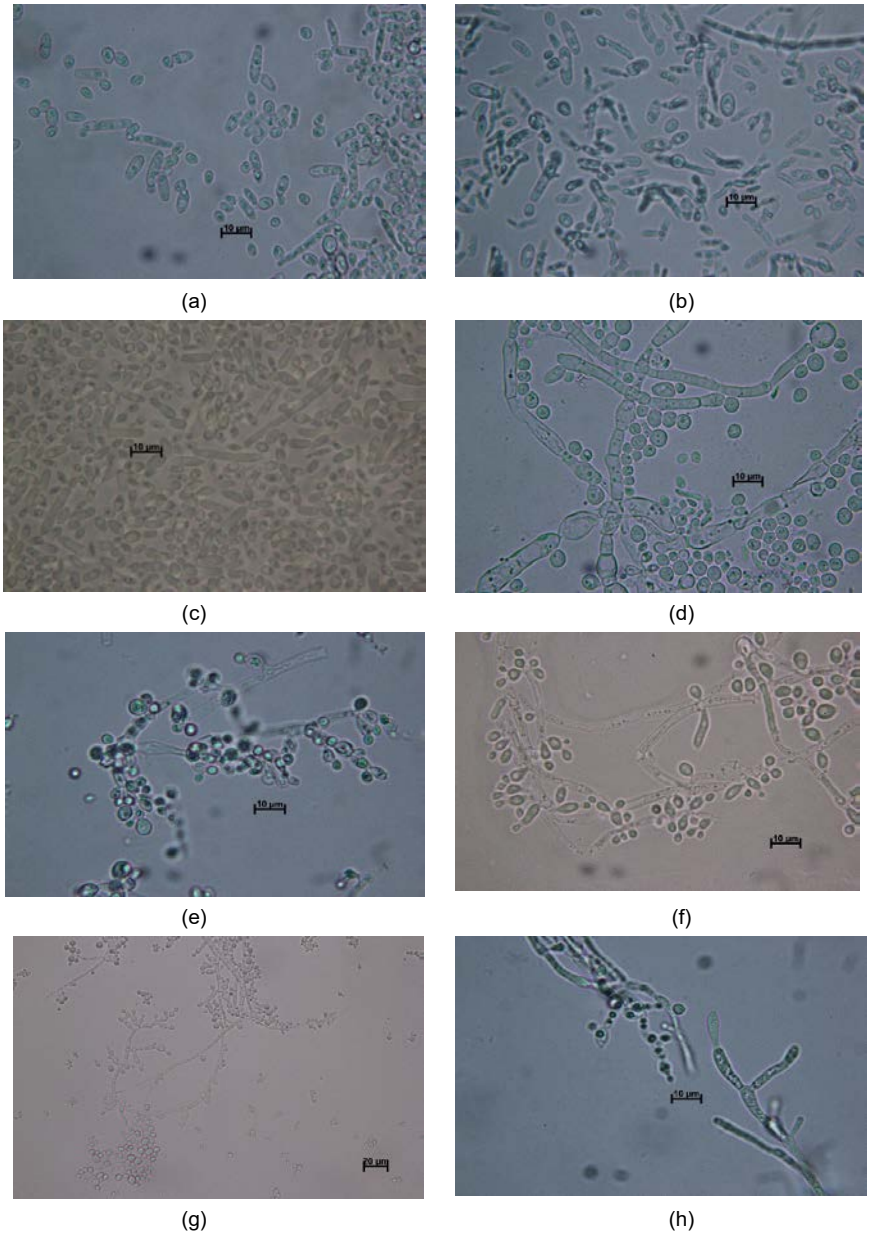
ภาพที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างลูกแป้งสาโทที่นำมาจากอำเภอต่าง ๆ ได้แก่ (a) เมืองสุรินทร์ MSR1 (b) เมืองสุรินทร์ MSR2 (c) รัตนบุรี (d) ปราสาท (e) สำโรงทาบ (f) ศรีขรภูมิ SJ1 (g) ศรีขรภูมิ SP1 และ (h) ท่าตูม

ตาราง 2 ลักษณะ ขนาด สี และกลิ่นของลูกแป้งสาโทจากอำเภอต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์

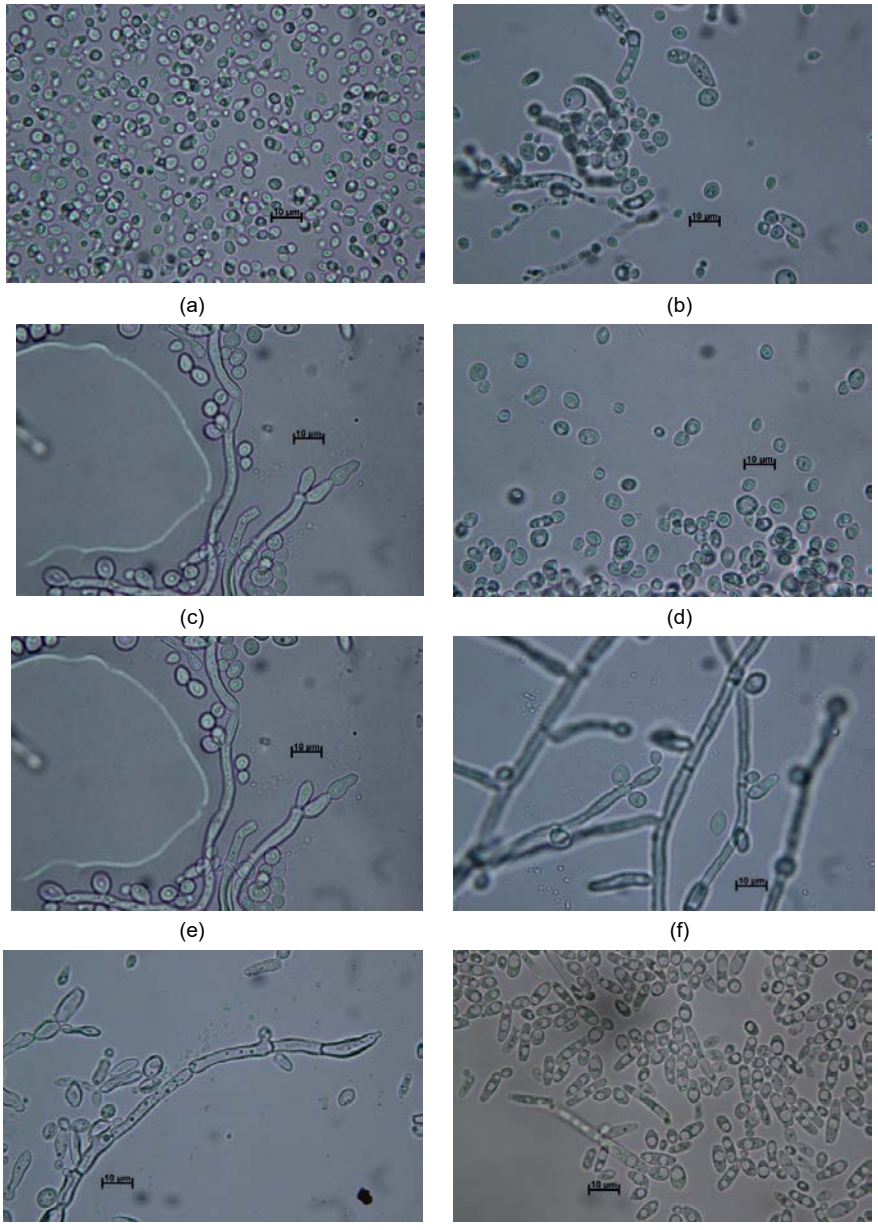
แหล่งเก็บตัวอย่าง	ลักษณะภายนอก	กลิ่น	อักขระบนพื้นผิว	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (cm)	น้ำหนักเฉลี่ย (g)
เมืองสุรินทร์ (MSR1)	ก้อนกลมใหญ่คล้ายเห็ด ผิวเรียบ ขนาดไม่แน่นอน	แป้งหมัก มีกลิ่นข้าว	รูปหัวใจ สีแดง	3.3	7.53
เมืองสุรินทร์ (MSR2)	ก้อนกลมใหญ่ คล้ายเห็ด ผิวขรุขระ	แป้งหมัก หอมกลิ่นเครื่องเทศ และมีกลิ่นเปรี้ยวเล็กน้อย	อักษร ค สีแดง	3.0	7.31
รัตนบุรี	ก้อนกลมนูน ผิวขรุขระ	มีกลิ่นข้าว เครื่องเทศ และมีกลิ่นเปรี้ยวเล็กน้อย	ไม่มี	3.0	6.68
ปราสาท	วงกลมแบน หน้านูน ผิวเนียน ขนาดไม่แน่นอน	แป้งหมัก หอมกลิ่นเครื่องเทศ	อักษร อ สีแดง	3.6	6.80
สำโรงทาบ	ก้อนครึ่งทรงกลม เป็นเหลี่ยมตรง ด้านบนผิวขรุขระ	กลิ่นหอม	อักษร อ สีแดง	3.3	10.42
ศรีขรภูมิ (SJ1)	ก้อนครึ่ง ทรงกลม ผิวเรียบเนียน	กลิ่นหอมและกลิ่นข้าวเล็กน้อย	อักษร ค สีแดง	3.4	6.88
ศรีขรภูมิ (SP1)	ก้อนครึ่งทรงกลมขนาดใหญ่ มีแกลบผสมอยู่	กลิ่นหอมกลิ่นข้าว และกลิ่นสมุนไพร	ไม่มี	5.8	20.57
ท่าตูม	ก้อนครึ่งทรงกลม ผิวเรียบเนียน	กลิ่นหอม	อักษร ค สีแดง	3.2	9.88

ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง YPD พบว่าโคโลนีของยีสต์มีลักษณะผิวหน้าเรียบ สีขาวครีมหรือขาวนวล ขอบเรียบ นูน และมีบางไอโซเลตที่โคโลนี กลม ขอบหยัก และผิวหน้าแห้ง เมื่อศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลม รี (ภาพที่ 3–5) ยกเว้นบางไอโซเลตมีรูปร่างเป็นท่อนยาว ได้แก่ RTN1–4 (ภาพที่ 4h), PS1–3, PS1–4, PS1–5, PS1–6 และ PS1–7 (ภาพ

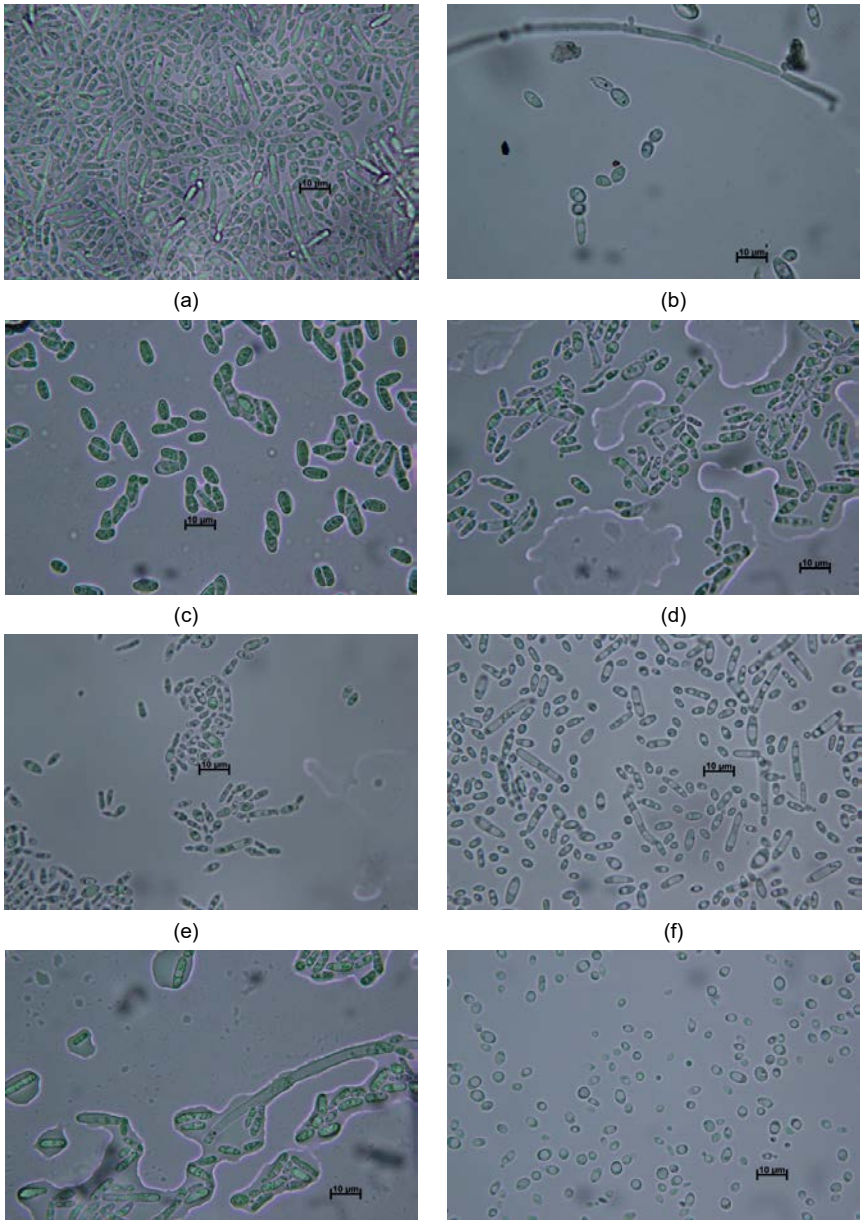
ที่ 5) พบการสร้างเส้นใยใน 9 ไอโซเลต ได้แก่ SRT1–1, SRT1–2, SRT1–3, SRT1–4, TT1–2 (ภาพที่ 3) RTN1–1, RTN1–2, RTN1–3 และ SP1–2 (ภาพที่ 6) ยีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีแตกหน่อ (budding)



ภาพที่ 3 การสร้างเส้นใยของยีสต์ไอโซเลต (a) MSR2–2, (b) MSR2–3, (c) MSR1–2, (d) TT1–2, (e) SRT1–1, (f) SRT1–2, (g) SRT1–3 และ (h) SRT1–4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7–10 วัน



ภาพที่ 4 การสร้างเส้นใยของยีสต์ไอโซเลต (a) SJ1–2, (b) SJ1–3, (c) SJ1–4, (d) SP1–2, (e) RTN1–1, (f) RTN1–2, (g) RTN1–3 และ (h) RTN1–4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7–10 วัน



ภาพที่ 5 การสร้างเส้นใยของยีสต์ไอโซเลต (a) PS1–1, (b) PS1–2, (c) PS1–3, (d) PS1–4, (e) PS1–5, (f) PS1–6, (g) PS1–7 และ (h) MSR2–1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7–10 วัน

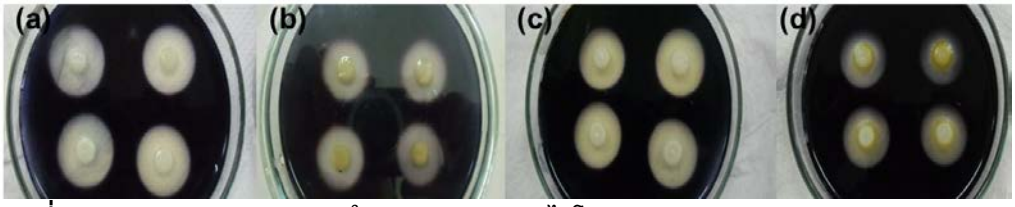
ความสามารถในการย่อยแป้ง

จากยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต มี 10 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง (ตาราง 3) ความกว้างของวงใสอยู่ระหว่าง 1.56–2.40 เซนติเมตร เป็นยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง อ.รัตนบุรี 3 ไอโซเลต อ.สำโรงทาบ 4 ไอโซเลต อ.ศรีขรภูมิ 2 ไอโซเลต และ อ.ท่าตูม 1 ไอโซเลต ไอโซเลต SRT1–3 ให้วงใสขนาดใหญ่ที่สุด เท่ากับ 2.40±0.10 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลต SRT1–1, SRT1–2 และ TT1–2 (ภาพที่ 6) ส่วนยีสต์ที่เหลือจำนวน 14 ไอโซเลตไม่พบความสามารถในการย่อยแป้ง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่านอกจากเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งแล้ว ยังมียีสต์บางสายพันธุ์ทำหน้าที่ร่วมด้วย

ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (cm)	ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (cm)
RTN1–1	1.70 ± 0.10^{a}	SRT1–3	2.40 ± 0.10^{e}
RTN1–2	$2.02\pm0.11^{b,c}$	SRT1–4	$2.17\pm0.05^{c,d}$
RTN1–3	1.56 ± 0.05^{a}	SJ1–3	$2.13\pm0.05^{b,c,d}$
SRT1–1	$2.20\pm0.10^{c,d}$	SJ1–4	1.97 ± 0.11^{b}
SRT1–2	$2.30\pm0.10^{d,e}$	TT1–2	$2.23\pm0.15^{d,e}$

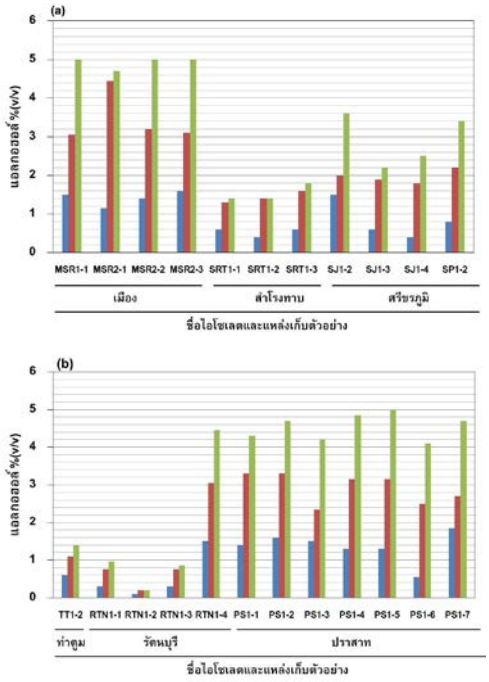
หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b, c, … ที่อยู่ต่อท้ายค่าเฉลี่ย (mean±SD) แสดงค่าที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$)



ภาพที่ 6 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของไอโซเลต (a) SRT1–3, (b) SRT1–4, (c) TT1–2 และ (d) SJ1–3 ซึ่งจะพบบริเวณใสรอบโคโลนีภายหลังราดด้วย Lugol's iodine

ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์

จากการทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์จำนวน 22 ไอโซเลต พบว่า สามารถแบ่งยีสต์ได้ 3 กลุ่มตามปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ (ภาพที่ 7) ได้แก่ กลุ่มที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อย ซึ่งผลิตแอลกอฮอล์ได้ไม่เกิน 2.0% (v/v) คือ ไอโซเลต SRT1–1, SRT1–2, SRT1–3, TT1–2, RTN1–1, RTN1–2 และ RTN1–4 กลุ่มที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ปานกลาง ซึ่งผลิตแอลกอฮอล์ได้อยู่ในช่วง 2.1–4.0%(v/v) คือ ไอโซเลต SJ1–2, SJ1–3, SJ1–4 และ SP1–2 และกลุ่มที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง ซึ่งผลิตแอลกอฮอล์ได้มากกว่า 4.0%(v/v) คือ MSR2–1, MSR2–2, MSR2–3 และ RTN1–4 และทั้ง 7 ไอโซเลตที่แยกได้จากลูกแป้ง อ. ปราสาท (PS1) ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์สูงสุด คือ ไอโซเลต MSR2–2, MSR2–3 และ PS1–5 ผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.39 กรัมเอทานอล/กรัมซูโครส



ภาพที่ 7 ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งใน (a) อำเภอเมืองสุรินทร์ สำโรงทาบ ศรีขรภูมิ และ (b) ท่าตูม รัตนบุรีและปราสาท ที่เวลา 24 ( ) 48 ( ) และ 72 ( ) ชั่วโมง

การจัดจำแนกสายพันธุ์

เมื่อนำ PCR product ของยีสต์จำนวน 24 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast พบว่า เชื้อยีสต์จำนวน 4 ไอโซเลตไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ และยีสต์จำนวน 20 ไอโซเลต มีผลการระบุสปีชีส์ เป็นยีสต์ 4 สปีชีส์ คือ *Sm. fibuligera, P. kudriavzevii, I. orientalis* และ *M. caribbica* (ตาราง 4) ซึ่งยีสต์ *Sm. fibuligera* พบในลูกแป้งจำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) รองลงมาคือยีสต์ *P. kudriavzeii* พบในลูกแป้ง 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.5) และยีสต์ *I. orientalis* พบในลูกแป้ง 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25) จากตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมด 8 ตัวอย่าง และเมื่อพิจารณาจำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในแต่ละตัวอย่างลูกแป้งนั้น มี 4 ตัวอย่างที่พบยีสต์เพียง 1 สปีชีส์ และอีก 3 ตัวอย่างพบยีสต์ 2 สปีชีส์ (ตาราง 5) ซึ่งในลูกแป้งจากทั้ง 3 แหล่งพบยีสต์ต่างสปีชีส์กัน คือ *Sm. fibuligera* ร่วมกับ *P. kudriavzeii* พบในลูกแป้งจาก อ.รัตนบุรี ยีสต์สปีชีส์ *Sm. fibuligera* ร่วมกับ *M. caribbica* พบในลูกแป้งจาก อ.ศรีขรภูมิ (แสงจันทร์) และยีสต์สปีชีส์ *I. orientalis* ร่วมกับ *P. kudriavzevii* พบในลูกแป้งจาก อ.ปราสาท (ตาราง 5)

อภิปรายผล

จากผลการคัดแยกและศึกษาความหลากหลายของยีสต์จากลูกแป้งสาโทในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บจากอำเภอเมืองสุรินทร์ ปราสาท รัตนบุรี สำโรงทาบ ศรีขรภูมิ และท่าตูม สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต และถูกนำมาจัดจำแนกเพื่อระบุสปีชีส์ได้จำนวน 20 ไอโซเลต พบยีสต์ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Sm. fibuligera, P. kudriavzevii, I. orientalis* และ *M. caribbica* ซึ่งใน 5 สปีชีส์ พบยีสต์ *Sm. fibuligera* ในลูกแป้งบ่อยที่สุด โดยพบในลูกแป้งจำนวน 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ผลการคัดแยกยีสต์ของงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในลูกแป้งแหล่งอื่น ๆ โดยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้าว่ายีสต์ *Sm. fibuligera* พบมากที่สุดในลูกแป้งเหล้าที่คัดแยกได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย (Limtong *et al*., 2002) เช่นเดียวกันกับในหัวเชื้อไวน์ข้าว Hong Qu และ Yao Qu ของประเทศจีน

ตาราง 4 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ ribosomal DNA ของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลตกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 จากฐานข้อมูล GenBank

ลำดับที่	ไอโซเลต	สายพันธุ์ยีสต์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม	Accession Number	Identity (%)
1	RTN1–1, RTN1–2, RTN1–3	*Saccharomycopsis fibuligera* strain 3–1Y	KF717372.1	100
2	RTN1–4, MSR1–2,	*Pichia kudriavzevii* strain Scj01	KF667515.1	100
3	PS1–3	*Pichia kudriavzevii* isolate YTHJL-3	JX848640.1	99
4	PS1–4, PS1–5, PS1–6	*Issatchenkia orientalis* isolate YZ4	EU394711.1	99
5	MSR2–2, MSR2–3	*Issatchenkia orientalis* isolate YZ4	EU394711.1	100
6	PS1–7	*Pichia kudriavzevii* strain T91–NL1	KF214396.1	99
7	SRT1–1, SRT1–2, SRT1–3, SRT1–4, SJ1–3, SJ1–4	*Saccharomycopsis fibuligera* NRRL Y–2388^{T} = CBS 2521^{T}	EU057552	100
8	SJ1–2	*Meyerozyma caribbica* (Teleomorph) CBS 9966^{T} = NRRL Y–27274^{T} หรือ *Candida fermentati* (Anamorph)	EU348786	100
9	TT1–2	*Saccharomycopsis fibuligera* g–4b–1	HM107785	99

ตาราง 5 สายพันธุ์ยีสต์ที่พบในตัวอย่างลูกแป้งสาโทจากอำเภอต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์

ลำดับที่	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งสาโท	ชื่อไอโซเลต	สายพันธุ์ยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร) บน YM agar ที่มี 1%(w/v) soluble starch	ปริมาณแอลกอฮอล์ %(v/v)
1	รัตนบุรี	RTN1–1	*Saccharomycopsis fibuligera*	1.70±0.10^{a}	0.95
2	รัตนบุรี	RTN1–2	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.02±0.11^{b,c}	0.20
3	รัตนบุรี	RTN1–3	*Saccharomycopsis fibuligera*	1.56±0.05^{a}	0.85
4	รัตนบุรี	RTN1–4	*Pichia kudriavzevii*	-	4.45
5	ปราสาท	PS1–1	Unknown yeast	–	4.30
6	ปราสาท	PS1–2	Unknown yeast	–	4.70
7	ปราสาท	PS1–3	*Pichia kudriavzevii*	–	4.20
8	ปราสาท	PS1–4	*Issatchenkia orientalis*	–	4.85
9	ปราสาท	PS1–5	*Issatchenkia orientalis*	–	5.0
10	ปราสาท	PS1–6	*Issatchenkia orientalis*	–	4.10
11	ปราสาท	PS1–7	*Pichia kudriavzevii*	–	4.70
12	เมืองสุรินทร์ 1	MSR1-2	*Pichia kudriavzevii*	–	ไม่ได้ทดสอบ
13	เมืองสุรินทร์ 2	MSR2–1	Unknown yeast	–	4.70
14	เมืองสุรินทร์ 2	MSR2–2	*Issatchenkia orientalis*	–	5.0
15	เมืองสุรินทร์ 2	MSR2–3	*Issatchenkia orientalis*	–	5.0
16	สำโรงทาบ	SRT1–1	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.20±0.10^{c,d}	1.40
17	สำโรงทาบ	SRT1–2	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.30±0.10^{d,e}	1.40
18	สำโรงทาบ	SRT1–3	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.40±0.10^{e}	1.80
19	สำโรงทาบ	SRT1–4	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.17±0.05^{c,d}	ไม่ได้ทดสอบ

ตาราง 5 สายพันธุ์ยีสต์ที่พบในตัวอย่างลูกแป้งสาโทจากอำเภอต่าง ๆ ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ (ต่อ)

ลำดับที่	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งสาโท	ชื่อไอโซเลต	สายพันธุ์ยีสต์	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร) บน YM agar ที่มี 1%(w/v) soluble starch	ปริมาณแอลกอฮอล์ %(v/v)
20	ศรีขรภูมิ	SJ1–2	*Meyerozyma caribbica* (Teleomorph) CBS 9966^{T} = NRRL Y-27274^{T} หรือ *Candida fermentati* (Anamorph)	–	3.60
21	ศรีขรภูมิ	SJ1–3	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.13±0.05^{b,c,d}	2.20
22	ศรีขรภูมิ	SJ1–4	*Saccharomycopsis fibuligera*	1.97±0.11^{b}	2.50
23	ศรีขรภูมิ	SP1–2	Unknown yeast	–	3.40
24	ท่าตูม	TT1–2	*Saccharomycopsis fibuligera*	2.23±0.15^{d,e}	1.40

(Lv *et al*., 2013) และในหัวเชื้อไวน์ข้าว nuruk ของประเทศเกาหลี (Farh *et al*., 2017) ในลูกแป้งสาโทส่วนใหญ่พบยีสต์เพียง 1 สปีชีส์ มีส่วนน้อยที่พบ 2 สปีชีส์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Limtong *et al*. (2002) พบยีสต์ 1 สปีชีส์ในลูกแป้ง 24 ตัวอย่างจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 31 ตัวอย่าง ยีสต์ *Sm. fibuligera* ทั้ง 10 ไอโซเลตมีลักษณะที่เหมือนกันคือมีสามารถในการย่อยแป้งและผลิตแอลกอฮอล์ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งยีสต์ *Sm. fibuligera* เป็นยีสต์ที่ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส (Farh *et al*., 2017; Limtong *et al*., 2002; Lv *et al*., 2013;) และกลูโคอะไมเลส (Guo *et al*., 2011)

จากสปีชีส์ยีสต์ทั้งหมดที่พบในลูกแป้งในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ยีสต์ที่พบได้บ่อยในลูกแป้งจากภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย (ตาราง 1) ยกเว้นเชื้อ *M. caribbica* (*C. fermentati*) ที่พบไม่บ่อยนัก แต่ก็เคยมีรายงานการนำ *M. caribbica* XY2 ที่แยกได้จากกล้าเชื้อหมักแอลกอฮอล์ในประเทศไทยไปใช้ในการศึกษายีน xylitol dehydrogenase และ L–arabitol dehydrogenase ซึ่งยีนทั้งสองยีนเกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลเพนโทส (pentose) (Sukpipat *et al*., 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยก *M. caribbica* AY33–1 ได้จากข้าวและผลไม้หมักในประเทศไทย ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตกรดมาลิกและสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) พูลลูแลนเนส (pullulanase) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ไซแลนเนส (xylanase) และเซลลูเลส (cellulase) จึงนำ *M. caribbica* AY33–1 มาศึกษาการผลิตกรดมาลิกจากกากมันสำปะหลัง (Tachaapikoon *et al*., 2019) ดังนั้น *M. Caribbica* SJ1–2 ที่แยกได้จากลูกแป้ง อ.ศรีขรภูมิ จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปทดสอบการใช้น้ำตาลเพนโทส เช่น ไซโลสและอะราบิโนส ซึ่งนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์หรือสารที่มีมูลค่าสูงจากเซลลูโลซิกไบโอแมส (cellulosic biomass) ต่อไปในอนาคต

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ในลูกแป้งทั้ง 4 สปีชีส์ พบว่า *I. orientalis* มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ดีกว่ายีสต์สปีชีส์อื่น ซึ่งยีสต์ *I.* orientalis เป็นยีสต์ที่ทนกรดและเกลือ ซึ่งนอกจากจะพบในลูกแป้งแล้ว ยังพบในแหล่งอื่นได้อีก เช่น ชีส

(Prillinger *et al*., 1999) เมล็ดโกโก้ (Daniel *et al*., 2009) fermented rice bran (Koh and Suh, 2009) มีรายงานการแยก *I. orientalis* MF–121 จากแม่น้ำที่มีค่าความเป็นกรด เท่ากับ 3.0 ในพื้นที่ที่มีน้ำพุร้อนในประเทศญี่ปุ่น ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถหมักและเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลในภาวะที่เป็นกรด (pH=2.0) และมี Na_2SO_4 5%(w/v) (Hisamatsu *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ายีสต์ *I. orientalis* ทนต่อ inhibitory compounds เช่น furfural, 5–hydroxymethyl furfural (5–HMF) vanillin (Kwon *et al*., 2011) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการผลิตเอทานอลได้ การที่ยีสต์ *I. orientalis* สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในสภาวะที่เป็นกรดต่ำ ๆ เหมาะสำหรับนำไปผลิตเอทานอลจากแป้งหรือเซลลูโลสิกไบโอแมสที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรด ดังเช่น การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลซิกไบโอแมส (lignocellulosic biomass) ด้วยกรดซัลฟูริก โดย *I. orientalis* MF–121 (Thalagala *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะนำ *I. orientalis* ไปศึกษายีนที่เกี่ยวกับการทนกรดและทนเกลือด้วย เนื่องจากมีการคิดค้นระบบการทรานสฟอร์มเมชันและแสดงออกยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นในยีสต์ *I. orientalis* สำเร็จแล้ว (Kitagawa *et al*., 2010)

ยีสต์ *P. kudriavzevii* เป็นยีสต์ที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง มีหลายสายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส และมีบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 43 องศาเซลเซียส (Isono *et al*., 2012). *P. kudriavzevii* DMKU 3-ET15 สามารถผลิตเอทานอลได้ที่ 45 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส (Yuangsaard *et al*., 2013) นอกจากนี้ *P. kudriavzevii* ยังมีศักยภาพของในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากหลากหลายวัตถุดิบ เช่น น้ำอ้อย (Dhaliwal *et al*., 2011) เปลือกของผลไม้ตระกูลส้ม (Patsalou *et al*., 2019; Sandhu *et al*., 2011) ฟางข้าวที่ผ่านการทรีตเมนต์ด้วยเบส (Oberoi *et al*., 2012) ชานอ้อยที่ถูกไฮโดรไลซ์ (Chamnipa *et al*., 2018) เศษไม้อัด (plywood chips) ชานอ้อย (Yuan *et al*., 2017)

จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้ 4 สปีชีส์ ที่มีลักษณะโดดเด่นต่างกัน ได้แก่ ยีสต์ *Sm. fibuligera* มีความโดดเด่นเรื่องการย่อยแป้ง ยีสต์ *M. caribbica* มีความโดดเด่นเรื่องการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด ยีสต์ *I. orientalis* มีความโดดเด่นเรื่องการผลิตแอลกอฮอล์ในภาวะที่เป็นกรด และยีสต์ *P. kudriavzevii* โดดเด่นเรื่องการผลิตแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิสูง ยีสต์ทั้ง 4 สปีชีส์สามารถพัฒนาไปสู่การผลิตกล้าเชื้อสำหรับการผลิตสาโทที่มีมาตรฐานหรือนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์หรือสารที่มีมูลค่าสูงจากเซลลูโลซิกไบโอแมส (cellulosic biomass) ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2555 และทุนสนับสนุนการวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

Chaijamrus, S., and Mouthung, B. (2011). Se-

lection of Thai starter components for ethanol production utilizing malted rice from waste paddy. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** 33(2): 163–170.

Chamnipa, N., Thanonkeo, S., Klanrit, P., and Thanonkeo, P. (2018). The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8–1 for high–temperature ethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology** 49(2): 378–391.

Chanchaichaovivat, A., Phornphisutthimas, S., and Mookseang, K. (2015). Analysis and comparison of yeast β–glucan from Loog–Pang Kao–Mak in the central part of Thailand. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 6(2): 188–197. (in Thai)

Cheenacharoen, S., and Juntachai, W. (2018). Diversity and genetic relationship of ethanol tolerant yeasts isolated from rice wine starters (Loog–Pang) in Chiang Mai province, Thailand. **Journal of Science and Technology** 26(3): 478–489. (in Thai)

Chomchoei, A. (2005). **Screening of Microbial in Lookpang for Pure–inoculum Development in Rice Fermented Products**. Thesis of Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai (Thailand). Aggie Technology Faculty; Pasu Pramokchon. (in Thai)

Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., de Vos, P., and de Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Research** 9: 774–783.

Daroonpunt, R., Tanasupawat, S., and Keeratipibul, S. (2016). Characterization and amylolytic activity of yeast and mold strains from Thai sweet rice. **Malaysian Journal of Microbiology** 12(2): 121–131.

Dhaliwal, S., Oberoi, H., Sandhu, S., Nanda, D., Kumar, D., and Uppal, S. (2011). Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology** 102: 5968–5975.

Farh, M. E.–A., Cho, Y., Lim, J. Y., and Seo, J.–A. (2017). A diversity study of *Saccharomycopsis fibuligera* in rice wine starter *nuruk*, reveals the evolutionary process associated with its interspecies hybrid. **Journal of Microbiology** 55: 337–343.

Guo, Z.–P., Zhang, L., Ding, Z.–Y., Gu Z.–H., and Shi, G.–Y. (2011). Development of an industrial ethanol–producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. **Enzyme and Microbial Technology** 49(1): 105–112.

Hisamatsu, M., Furubayashi, T., Karita, S., Mishima, T., and Isono, N. (2006). Isolation and identification of a Novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions. **Journal of Applied Glycoscience** 53(2): 111–113.

Isono, N., Hayakawa, H., Usami, A., Mishima, T., and Hisamatsu, M. (2012). A compa-

rative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 113: 76–78.

Jung, M. J., Nam, Y. D., Roh, S. W., and Bae, J.W. (2012). Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters. **Food Microbiology** 30: 112–123.

Kaewkongpan, D., Chompubai, P., Punyapliew, S., and Punaui, O. (2017). A comparative study of the qualities of fruit Sato brewed from a variety of ingredients. **Scientific Research Journal Lampang Rajabhat University** 2(1): 17–28. (in Thai)

Kitagawa, T., Tokuhiro, K., Sugiyama, H., Kohda, K., Isono, N., Hisamatsu, M., Takahashi, H., and Imaeda, T. (2010). Construction of a β–glucosidase expression system using the multistress–tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 87: 1841–1853.

Koh, J. H., and Suh, H. J. (2009). Biological activities of thermo–tolerant microbes from fermented rice bran as an alternative microbial feed additive. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 157: 420–430.

Kotaka, A., Bando, H., Kaya, M., Kato–Murai, M., Kuroda, K., Sahara, H., Hata, Y., Kondo, A., and Ueda, M. (2008). Direct ethanol production from barley β–glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae* β–glucosidase and endoglucanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 105(6): 622–627.

Kunlabut. A., Porntrai, S., and Sangswan, J. (2020). Ethanol production from Loog–Pang–Sato yeast cultivation with molasses. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 11(1): 53–65. (in Thai)

Kwon, Y. J., Ma, A. Z., Li, Q., Wang, F., Zhuang, G. Q., and Liu, C. Z. (2011). Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly–isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology** 102(17): 8099–8104.

Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., and Lotong, N. (2005). Species diversity of molds in Thai traditional fermentation starters (Loog–Pang). **Kasetsart Journal (Natural Science)** 39: 511–518.

Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., and Lotong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional alcoholic starter (Loog–pang). **Kasetsart Journal (Natural Sciences)** 36(2): 149–158.

Luangkhlaypho, A., Pattaragulwanit, K., Leepipatpiboon, N., and Yompakdee, C. (2014). Development of a defined starter culture mixture for the fermentation of sato, a

Thai rice–based alcoholic beverage. **Science Asia** 40(2): 125–134.

Lv, X. C., Huang, X. L., Zhang, W., Rao, P. F., and Ni, L. (2013). Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture–dependent and culture–independent methods. **Food Control** 34: 183–190.

Nonklang, S. (2012). Factor affecting the transformation efficiency of linear DNA in yeast *Kluyveromyces marxianus* UBU–1–1. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University** 14(4): 34–41.

Nuanpeng, S. (2018). Comparison rice vinegar production from Hom–nil rice and Riceberry rice. **Agricultural Science Journal** 49(2): 605–608.

Oberoi, H. S., Babbar, N., Sandhu, S. K., Dhaliwal, S. S., Kaur, U., Chadha, B. S., and Bhargav, V. K. (2012). Ethanol production from alkali–treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP–1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 39(4): 557–566.

Paewlueng, P., Deeseenthum, S., and Rattanasuk, S. (2019). Screening of yeasts from Thai traditional fermentation starter (Loog–pang) for alcoholic fermentation products in community enterprise. **ICoFAB2019 Proceedings** (pp. 74–78). Doi: 10.14457/MSU.res.2019.15.

Patsalou, M., Samanides, C., Protopapa, E., Stavrinou, S., Vyrides, I., and Koutinas, M. (2019). A citrus peel waste biorefinery for ethanol and methane production. **Molecules** 24: 2451.

Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases–Lechner, F., and Lopandic, K. (1999). Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. **Antonie Van Leeuwenhoek** 75: 267–283.

Rakmai, J., Cheirsilp, B., and Srinuanpan, S. (2019). Designation of rice cake starters for fermented rice products with desired characteristics and fast fermentation. **Journal of Food Science and Technology** 56(6): 3014–3022.

Roongrojmongkhon, N., Rungjindamai, N., Vatanavicharn, T., and Ochaikul, D. (2020). Isolation and identification of fungi with glucoamylase activity from Loog–pang–khao–mak (A Thai traditional fermentation starter). **Journal of Pure and Applied Microbiology** 14: 233–247.

Sandhu, S., Oberoi, H., Dhaliwal, S., Babbar, N., Nanda, D. and Kumar, D. (2011). Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Annals of Microbiology** 62: 1–12.

Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: Worldwide review of household fermentation techniques. **Food Control** 8: 331–317.

Sukpipat, W., Komeda, H., Prasertsan, P., and Asano, Y. (2017). Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with l–arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose–fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 123(1): 20–27.

Supcharoenlert, A. (2010). **Isolation of Molds and Yeasts from Lookpang**. Master of Engineering (Chemical Engineering). Bangkok: King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Tachaapikoon, C., Rattanapatpokin, T., Waeonukul, R., Wattanachaisaereekul, S., Ratanakhanokchai, K., and Pason, P. (2019). Newly isolated malic acid fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* AY 33–1 for bioconversion of glucose and cassava pulp. **SEATUC Journal of Science and Engineering** 1: 62–70.

Taechavasonyoo, A., Thaniyavarn, J., and Yompakdee, C. (2013). Identification of the molds and yeasts characteristic of a superior Loogpang, starter of Thai rice based alcoholic beverage Sato. **Asian Journal of Food and Agro–Industry** 6: 24–38.

Tamang, J. P., and Thapa, S. (2006). Fermentation dynamics during production of bhaati jaanr, a traditional fermented rice beverage of the Eastern Himalayas. **Food Biotechnology** 20: 251–261.

Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in Microbiology** 7: 377.

Thalagala, T. A. T. P., Kodama, S., Mishima, T., Isono, N., Furujyo, A., Kawasaki, Y., and Hisamatsu, M. (2009). Study on ethanol fermentation using D–glucose rich fractions obtained from lignocelluloses by a two–step extraction with sulfuric acid and *Issatchenkia orientalis* MF121. **Journal of Applied Glycoscience** 56: 7–11.

Trongjit, K., and Suwannapusit, U. (2020). Fermented food technology, local wisdom and eating culture of ethnic groups along the Thailand – Cambodia Border regions. **Koch Cha Sarn Journal of Science** 42(2): 23–39. (in Thai)

Yuan, S.–F., Guo, G.–L., and Hwang, W.–S. (2017). Ethanol production from dilute–acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress–tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Microbial Biotechnology** 10(6): 1581–1590.

Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., and Limtong, S. (2013). Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. **Antonie van Leeuwenhoek** 103: 577–588.