การพัฒนาหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* สำหรับการหมักซีอิ๊ว

นางสาวศริยานนท์ พานทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF STARTER CULTURE OF *Zygosaccharomyces rouxii* FOR SOY SAUCE FERMENTATION

Miss Sariyanon Panthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* สำหรับการหมักซีอิ๊ว
โดย	นางสาวศริยานนท์ พานทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

……. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. สุนีย์ โชตินีรนาท)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นางอาภาพรรณ บัวบานพร้อม)

ศริยานนท์ พานทอง : การพัฒนาหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* สำหรับการหมักซีอิ๊ว. (DEVELOPMENT OF STARTER CULTURE OF *Zygosaccharomyces rouxii* FOR SOY SAUCE FERMENTATION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินวิธีการผลิตหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* เข้มข้นสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตหัวเชื้อปริมาณมากขั้นตอนเดียวสำหรับการหมักซีอิ๊ว และศึกษาสภาวะ และอายุการเก็บหัวเชื้อเข้มข้น การทดลองเริ่มจากการ ศึกษารูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* TISTR 5044 สำหรับเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ทนเกลือความเข้มข้นสูงได้ โดยทดลองเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* TISTR 5044 ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือต่างกัน 4 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่ 1 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 1% แบบที่ 2 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% แบบที่ 3 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงใน YM broth ที่มีเกลือ 10% ในรุ่นที่ 2 แบบที่ 4 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 จากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงจากทั้ง 4 แบบไปประเมินความสามารถในการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% พบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากรูปแบบที่ 4 เจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้สูงสุด โดยมีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.13 generation/hour ดังนั้นจึงเลือกการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 4 มาทดลองเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่เพิ่มน้ำตาลกลูโคสจาก 1.5% เป็น 2.5%, 5% และ 7.5% พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดลองนำเซลล์เข้มข้นที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 4 และจากการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีน้ำตาล 1.5% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เซลล์เข้มข้นที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 4 และเซลล์เข้มข้นที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% จะมีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกัน (μ= 0.14) ดังนั้นการผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเข้มข้น จึงเลือกภาวะการเพาะเลี้ยงยีสต์รุ่นที่ 1 ด้วย YM broth ที่มีเกลือ 5% และรุ่นที่ 2 ด้วยน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% เก็บเซลล์เข้มข้นในถุง retort pouch โดยใช้ protectant 3 ชนิด คือ กลีเซอรอล 10% น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% และ soy protein isolate 8% ในอัตราส่วน 8 log CFU/ml ของ protectant และเก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) และอุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ประเมินอายุการเก็บโดยติดตามอัตราการรอด อัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และการปนเปื้อนจาก ยีสต์ รา coliforms และ *E. coli* ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า สภาวะและอายุการเก็บเซลล์เข้มข้นที่เหมาะสม คือ การเก็บหัวเชื้อในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) เพราะยังคงให้จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตไม่เปลี่ยนแปลง ไปจากสัปดาห์ที่ 0 และยังสามารถเจริญได้ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% โดยอัตราการเจริญ (ค่า μ) ของยีสต์ที่ไม่แตกต่างกันกับสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (8 log CFU/ml และ $\mu_{เฉลี่ย}$ = 0.15) และลักษณะทางสัณฐาน วิทยาของเซลล์เข้มข้นก็ ไม่แตกต่างจากเซลล์สดปกติ นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนจากยีสต์ รา coliforms และ *E. coli* ในหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ผลิตจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการหมักโมโรมิที่มีเกลือเข้มข้น 15% เปรียบเทียบกับหัวเชื้อสดที่เตรียมจากรูปแบบการผลิตแบบเดียวกัน พบว่า ทั้งหัวเชื้อสดและหัวเชื้อยีสต์ที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่มีอายุการเก็บ 1 เดือนนั้นมีประสิทธิภาพการหมักไม่แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีการผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ได้จากการศึกษานี้มีศักยภาพ ที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิในอตสาหกรรมซีอิ๊วหมัก

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5072478623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : Soy sauce / *Zygosaccharomyces rouxii* / Concentrated starter culture /

SARIYANON PANTHONG : DEVELOPMENT OF STARTER CULTURE OF *Zygosaccharomyces rouxii* FOR SOY SAUCE FERMENTATION. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. SUTTISAK SUKNAISILP, 87 pp.

This study aimed to evaluate method for the production of active concentrated starter culture of *Zygosaccharomyces rouxii* for use in the culture starter production process for soy sauce fermentation. Initially, the methods for *Z. rouxii* TISTR 5044 cultivation to prepare the concentrated starter culture were evaluated. The cultivations were divided into 4 methods. They were; (1) YM broth containing 1%NaCl (2) YM broth containing 5%NaCl (3) YM broth containing 5%NaCl for the first batch and YM broth containing 10%NaCl for the second batch (4) YM broth containing 5%NaCl for the first batch and soy sauce (SS) containing 5%NaCl for the second batch. The cultures form all methods were subjected to evaluation of their ability to grow in soy sauce containing 10%NaCl and 1.5% sugar. Thus result showed that yeast cultivated in the fourth method had the highest growth rate (μ = 0.13 generation/hour). Thus, the fourth method was selected for the evaluation of the effect of added sugar on the growth rate of the yeast. The result revealed that added sugar did not associate with the growth rate. Consequently, concentrated cells prepared by the fourth method were further evaluated for the ability to grow in a bioreactor using SS containing 10%NaCl and 1.5%sugar as the cultivation media, relative to concentrated cells form the fourth method and further cultivation in SS containing 10%NaCl. It was found that the growth rate of concentrated cells of the both methods were not different (μ = 0.14). According to this study, cultivation of cells in YM broth containing 5%NaCl in the first batch and SS containing 5%NaCl in the second batch was found as an appropriate method for the production of active concentrated starter culture of *Z. rouxii* TISTR 5044. Then, concentrated cells were kept in retort pouch using three protectants (10%glycerol, SS containing 1%NaCl and 8%soy protein isolate) at ratio 8 log CFU per ml of protectant under three temperatures (-20, 0 and 4°C). The survival rate in the pouch and growth rate of concentrated cells in SS containing 10%NaCl and the contamination of yeast&mold, coliforms and *E. coli* were determined every week for 1 month. During storage, the concentrated cells kept in 10%glycerol under 4°C was found as an appropriate condition. Under this condition, viable cells and the growth rate of concentrated cell was not different from the initial week (8 log CFU per ml and $\mu_{average}$=0.15). The morphology of the storaged concentrated cells different from the normal cell. In addition, no contamination were found in the storaged concentrated cells. Then, fermentative activity of the storaged concentrated cells in moromi were evaluated compared to fresh concentrated cells prepared from the same cultivation method. The fermentative ability of the both concentrated cells were not different. Thus, the concentrated cells production method obtained from this study is potential to apply in industrial moromi fermentation.

Department : Food Technology Student's Signature .....

Field of Study : Food Technology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2010 Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โด ยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนค วามเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.สุนีย์ โชตินีรนาท กรรมการจากภายนอกมหาวิทยาลัย และ คุณอาภาพรรณ บัวบานพร้อม ผู้เชี่ยวชาญจากบริษัท ไทยเทพรส ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้การเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัยทุน สกว .- อุตสาหกรรม ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย และบริษัท ไทยเทพรส ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ที่ให้ทุนร่วมสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบริษัท ล่ำซำ ประเทศไทย จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์โมโรมิมาใช้ในการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารด า และครอบครัวที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ให้กำลังใจ และความห่วงใยพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วารสารปริทัศน์..... 3

2.1 ซีอิ๊ว..... 3

2.2 กระบวนการผลิตซีอิ๊ว..... 3

2.2.1 การผลิตโคจิ..... 4

2.2.2 การหมักโมโรมิ..... 4

2.2.3 การกรองและการบรรจุ..... 5

2.3 หัวเชื้อ..... 8

2.4 หัวเชื้อยีสต์..... 9

2.4.1 รูปแบบของหัวเชื้อยีสต์..... 9

2.4.2 หัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักซีอิ๊ว..... 13

2.4.3 กระบวนการผลิตหัวเชื้อยีสต์..... 16

2.5 สภาวะการเก็บกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้น..... 18

2.5.1 สาร protectant 18

2.5.2 อุณหภูมิ..... 19

2.6 วิธีวิเคราะห์คุณภาพของหัวเชื้อในกระบวนการหมัก..... 20

3 การดำเนินงานวิจัย..... 22

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 31

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 67

รายการอ้างอิง..... 69

ภาคผนวก..... 75

บทที่ หน้า

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี..... 76
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์..... 81
ภาคผนวก ค ภาพเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยรูปแบบต่างๆ
เพื่อเตรียมเป็นเซลล์เข้มข้น..... 82
ภาคผนวก ง การคำนวณการเจริญของยีสต์..... 86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	รูปแบบการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อเตรียมเซลล์เข้มข้น…….……..	26
4.1	องค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วดิบ (SS) ……..……..……..	32
4.2	ร้อยละการได้กลับของเซลล์จากการทำเข้มข้น……..……..……	43
4.3	การรอดชีวิตของเซลล์เข้มข้นในระหว่างการเก็บ……	47
4.4	อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ……	49
4.5	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อสดกับหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ในการหมักโมโรมิเป็นเวลา 1 เดือน.....	66

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วตามวิธีดั้งเดิมของโรงงานผลิตซีอิ๊วในประเทศไทย	6
2.2	กระบวนการผลิตซีอิ๊วในประเทศญี่ปุ่น	7
2.3	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อยีสต์สดเข้มข้น (concentrated fresh yeast)	10
2.4	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแอคทีฟดรายยีสต์ (active dry yeast)	11
2.5	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อคอมเพรสยีสต์ (compressed yeast)	11
2.6	ยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii*	13
2.7	กลไกการรักษาสมดุลของเซลล์ยีสต์ *Z. rouxii* เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง.....	15
2.8	การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว.....	17
4.1	อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีปริมาณเกลือแตกต่างกัน	34
4.2	อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5058 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีปริมาณเกลือแตกต่างกัน.....	34
4.3	อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 แบบ.....	36
4.4	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	38
4.5	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	38
4.6	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	39
4.7	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	39
4.8	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	40
4.9	รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	40
4.10	อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และแปรปริมาณน้ำตาล.....	42

รูปที่ หน้า

4.11 อัตราการเจริญของ *Z.rouxii* TISTR 5044 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ A และ แบบ B แล้วเพาะเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีปริมาณน้ำตาล 1.5% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 45
4.12 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บในกลีเซอรอล10%..... 50
4.13 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ1%..... 51
4.14 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บใน soy protein isolate 8%..... 52
4.15 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เก็บเป็นเซลล์เข้มข้นในสัปดาห์ที่ 0..... 53
4.16 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์..... 54
4.17 รูปร่างเซลล์ยีสต์เมื่อเก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ1% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์..... 55
4.18 รูปร่างเซลล์ยีสต์เมื่อเก็บใน soy protein isolate 8% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์..... 56
4.19 เซลล์เข้มข้นที่เก็บเป็นถุงเซลล์เข้มข้นในสัปดาห์ที่ 0 วิเคราะห์ด้วย SEM 58
4.20 เซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์วิเคราะห์ด้วย SEM.... 59
4.21 เซลล์เข้มข้นที่เก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วย SEM..... 60
4.22 เซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วย SEM..... 61
ก.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารละลายกลูโคส..... 77
ค.1 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 82
ค.2 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 82
ค.3 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 83
ค.4 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 83
ค.5 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 84
ค.6 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 84

รูปที่ หน้า

ค.7 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 85

บทที่ 1
บทนำ

ซีอิ๊วเป็นอาหารหมักที่ ใช้ปรุงแต่งรสชาติอาหาร ผลิตจากถั่วเหลือง ธัญพืชพวกข้าวสาลี และเกลือ เป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในแถบเอเชีย โดยมีต้นกำเนิดมาจากประเทศจีน ปัจจุบันมีการผลิตซีอิ๊วในหลายๆประเทศ กระบวนการสำหรับผลิตซีอิ๊วจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำโคจิ ขั้นตอนการหมัก น้ำเกลือที่เรียกว่า โมโรมิ และการกรองซีอิ๊วให้ใสก่อนบรรจุ (Luh, 1995)

ซีอิ๊วมีกรรมวิธีการผลิตอ ยู่ 3 แบบ คือ การ ผลิตโดยอาศัย กิจกรรมของ จุลินทรีย์ การผลิตด้วยวิธีการทางเคมี และการผลิตแบบกึ่งเคมี กรรมวิธีการ ผลิตซีอิ๊วโ ดยจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม เริ่มโดยอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติด้วยการควบคุมสภาวะระหว่าง การหมักให้ เหมาะต่อการเจริญและการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ ที่มีบทบาทสำคัญ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีคุณภาพไม่แน่นอน ไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลัง ผลิตให้สูงขึ้นจากที่เป็นอยู่ได้ และยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือจุลินท รีย์สร้างสารพิษ ดังนั้นในการ ผลิตซีอิ๊วหมัก จึงได้มีการพัฒนามาใช้หัวเชื้อบ ริสุทธิ์หรือกล้าเชื้อ เริ่มต้นที่สะดวกต่อการนำไปใช้ ซึ่งช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ ส่งผลให้การหมักมีประสิทธิภาพ สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมัก หรือขยายกำลังการผลิตได้ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊วคือ เชื้อรา แบคทีเ รียแลกติก และยีสต์ ซึ่ง เชื้อรา จะมีความสำคัญในขั้นตอนการผลิตโคจิ ที่นิยมคือ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus so jae* จะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเอนไซม์อื่นๆ ย่อยวัตถุดิบ ในระหว่างการหมักซีอิ๊ว ทำให้ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสดี และในขั้นตอนการหมักโมโรมิ จุลินทรีย์ที่มี บทบาทสำคัญจะเป็น แบคทีเรียแลกติก และยีสต์ โดยที่แบคทีเรียแลกติก เช่น *Lactobacillus delbrueckii* จะสร้างกรดโคจิในปริมาณมากพอต่อก ารป้องกันการเน่าเสียของซีอิ๊ว ส่วน *Pediococcus halophilus* จะช่วยให้ขั้นตอนโมโรมิมีกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลให้มีสภาวะเหมาะสมต่อ การเจริญของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักโมโรมิ คือ *Zygosaccharomyces rouxii* จะมีหน้าที่ผลิตเอทานอลและเป็นจุลินทรีย์สำคัญเกี่ยวกับการเกิดกลิ่นรสที่ดีของซีอิ๊ว และ *Candida versatilis* จะผลิตสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งมีส่วนช่วยใน การเพิ่มรสชาติของซีอิ๊ วด้วยเช่นกัน (Hamada และคณะ, 1990; van der Sluis และคณะ, 2000; จารุวรรณ มณีศรี, 2551) ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วหมัก สิ่งที่สำคัญประการหนึ่งคือ การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการ หมักโมโรมิ ซึ่งเป็น การเตรียมยีสต์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกร ะบวนการหมัก รวมทั้งปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

กระบวนการหมักโมโรมิในระดับอุ ตสาหกรรม การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ปริมาณมาก ให้เพียงพอต่อการหมักโมโรมิจะต้องมีการเพาะเลี้ยงยีสต์โดยการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวหลายครั้ง ซึ่งทำให้ใช้ระยะเวลา นาน และเนื่องจากโมโรมิมักจะอยู่ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง เมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไป ยีส ต์จะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าปกติ เพื่อลดปัญหาดังกล่าว การใช้หัวเชื้อยีสต์เข้มข้น ที่ผลิตและ เก็บในสภาวะ ที่เหมาะสม และยังคงมีประสิทธิภาพในการหมัก สามารถ นำมาใช้ในการขย ายปริมาณหัวเชื้อให้เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการหมักเพียงขั้นตอนเดียว นอกจากจะช่วยควบคุมคุณภาพของการผลิตหัวเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการหมักโมโรมิให้มีความสม่ำเสมอแล้ว ยังจะช่วยลดร ะยะเวลาและต้นทุนในขั้นตอนการผลิ ตหัวเชื้อด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อ ผลิตหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* เข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการหมักสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตหัวเชื้อขั้นตอนเดียว และศึ กษาสภาวะ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บหัวเชื้อเข้มข้นดังกล่าว

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ซีอิ๊ว

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักตั้งแต่สมัยโบราณมีหลายประเภท หนึ่งในนั้นคือ ซีอิ๊ว ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลีและประเทศ ต่างๆในแถบเอเชีย ซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนของถั่วเหลืองหรือส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลี มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม มีรสเค็มและมีกลิ่นเฉพาะ ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งรสเค็มของอาหารแทนเกลือ ช่วยเพิ่มกลิ่นรสและสีให้กับเนื้อสัตว์ อาหารทะเล ผักและอาหารอื่นๆ และยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ แต่ซีอิ๊วอีกความหมายหนึ่งตามบทนิยามของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหก รรมของไทย หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมัก อาจมีการปรุง แต่งรสและ/หรือสี หรือไม่นั้นตามแต่ชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ แล้วนำไปผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ก่อนการบรรจุ (Luh, 1995; จารุวรรณ มณีศรี, 2551)

2.2 กระบวนการผลิตซีอิ๊ว

กระบวนการผลิตซีอิ๊วประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนคือ การผลิตโคจิ การหมักโมโรมิ และขั้นตอนการกรองซีอิ๊วให้ใส (Luh, 1995) โดยทั่วไปนั้น ซีอิ๊วจะมีกรรมวิธีการผลิตอยู่ 3 แบบ คือ การผลิตโดยอาศัยจุลินทรีย์ การผลิตด้วยวิธีการทางเคมี และการผลิตแบบกึ่งเคมี กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วโดยจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม จะไม่มีการ ใช้หัวเชื้อ บริสุทธิ์ใส่ ลงไปในวัตถุดิบ แต่จะ อาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติด้วยการควบคุมสภาวะระหว่าง การหมักให้ เหมาะต่อการเจริญ และการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ ซึ่งกรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วตามวิธีดั้งเดิมของโรงงา นผลิตซีอิ๊วในประเทศไทยแสดงดังรูปที่ 2.1 แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีคุณภาพไม่แน่นอน ไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรื อขยายกำ ลังผลิ ตให้สูงขึ้นจากที่ เป็นอยู่ได้ และยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์สร้างสารพิษ รวมถึงอาจเกิดความล้มเหลวในการหมั ก โดยจะมีความเสี่ยงสูงสุดในช่วงแรกของการหมัก ดังนั้น เพื่อลดปัญหาดังกล่าว ในการหมักซีอิ๊วจึงได้มีการพัฒนามาใช้หัวเ ชื้อบริสุทธิ์หรือ หัวเชื้อเริ่มต้น ซึ่งจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลังการผลิตได้ โดยที่เชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นจะมีบทบาทอย่างแท้จริงในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊วคือ เชื้อรา แบคทีเรียแลกติก และยีสต์ โดยเชื้อราที่ นิยมเติมลงไปคือ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* นั้น

จะผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเอนไซม์อื่นๆ ย่อยวัตถุดิบ ในระหว่างการหมักซีอิ๊ว ทำให้ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสดี แบคทีเรียแลกติก เช่น *Lactobacillus delbrueckii* จะสร้างกรดโคจิในปริมาณมากพอต่อการป้องกันการเน่าเสียของซีอิ๊วได้ และช่วยเพิ่มความเป็นกรดในขั้นตอนโมโรมิด้วย ส่วน *Pediococcus halophilus* จะช่วยให้ขั้นตอนโมโรมิมีกรดเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งจะมีผล ให้สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดี โดยที่ *Zygosaccharomyces rouxii* จะผลิตเอทานอลและเป็นจุลินทรีย์สำคัญเกี่ยวกับการเกิดกลิ่นรส และ *Candida versatilis* จะผลิตสารประกอบฟีโนลิก ซึ่งมีส่วนช่วยในการเพิ่มรสชาติของซีอิ๊วด้วย เช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตซีอิ๊วในประเทศญี่ปุ่น (Hamada และคณะ, 1990; van der Sluis และคณะ, 2000; จารุวรรณ มณีศรี, 2551)

2.2.1 การผลิตโคจิ

ในกระบวนการผลิตโคจิ จะผลิตจาก ถั่วเหลือง และแป้งสาลี โดยนำถั่วเหลืองไปแช่น้ำเพื่อเพิ่มปริมาณความชื้น และนำไปนึ่ง แล้วทำให้เย็นก่อนนำไปผสมกับแป้งสาลีที่อบและบดละเอียดแล้วในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากนั้นเติมหัวเชื้อรา *Aspergillus oryzae* หรือ *Aspergillus sojae* แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญทั่วทั้งก้อนโคจิ ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล โคจิที่ได้จะมีสีเหลืองออกเขียวซึ่งเป็นผลจากการเจริญของราและการสร้างสปอร์ของรา (Luh, 1995; Thepsingha, 1997)

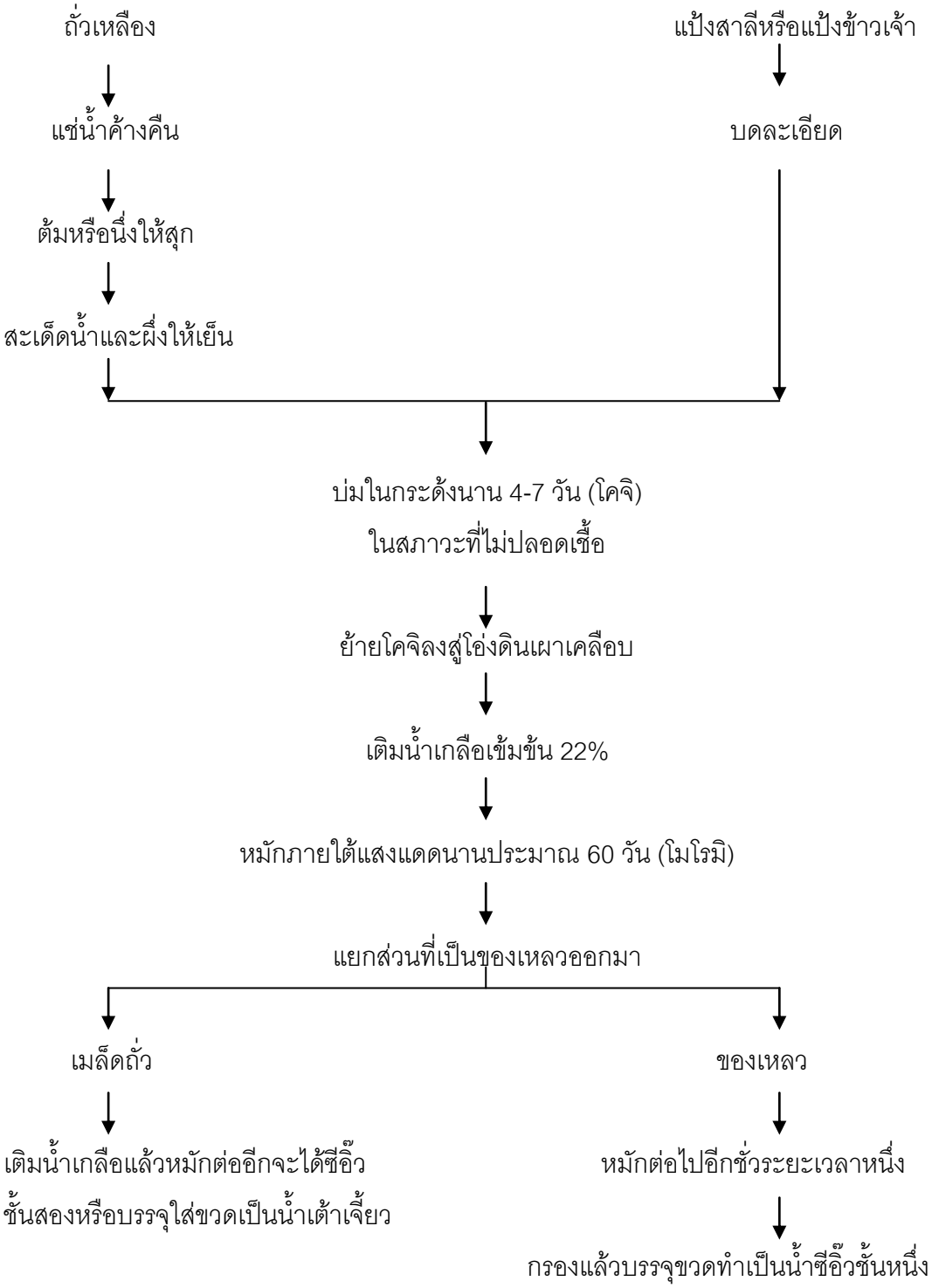
2.2.2 การหมักโมโรมิ

โมโรมิ คือ ส่วนผสมระหว่างโคจิกับน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโคจิจะทำจากส่วนผสมของแป้งสาลีกับถั่วเหลืองที่มี รา *Aspergillus* sp. เจริญทั่วทั้งก้อน เพื่อย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยสุดท้ายจะได้โมโรมิที่มีเกลือความเข้มข้น 17 ถึง 19 เปอร์เซ็นต์ (Luh, 1995; Thepsingha, 1997) จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักโมโรมิ นี้คือ แบคทีเรียแลกติก และยีสต์ โดยจะใช้ในรูปของหัวเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูง และปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แบคทีเรียแลกติกที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักโมโรมิคือ *Lactobacillus delbrueckii* และ *Pediococcus halophilus* จะสร้างกรดที่มีผลต่อการป้องกันการเน่าเสียของซีอิ๊ว และกรดจะทำให้สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ยีสต์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการหมักโมโรมิคือ *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Candida versatilis* หรือ *Candida etchelsii* โดยที่ *Z. rouxii*

จะผลิตเอทานอลประมาณ 2 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์และเป็นจุลินทรีย์สำคัญเกี่ยวกับการเกิดกลิ่นรส อื่นๆ ส่วน *C. versatilis* หรือ *C. etchelsii* จะผลิตสารประกอบฟีโนลิก เช่น 4-ethylguaiacol ซึ่งมีส่วนช่วยในการเพิ่มรสชาติของซีอิ๊ว (Hamada และคณะ, 1989; Hamada และคณะ, 1990; van der Sluis และคณะ, 2000; จารุวรรณ มณีศรี, 2551)

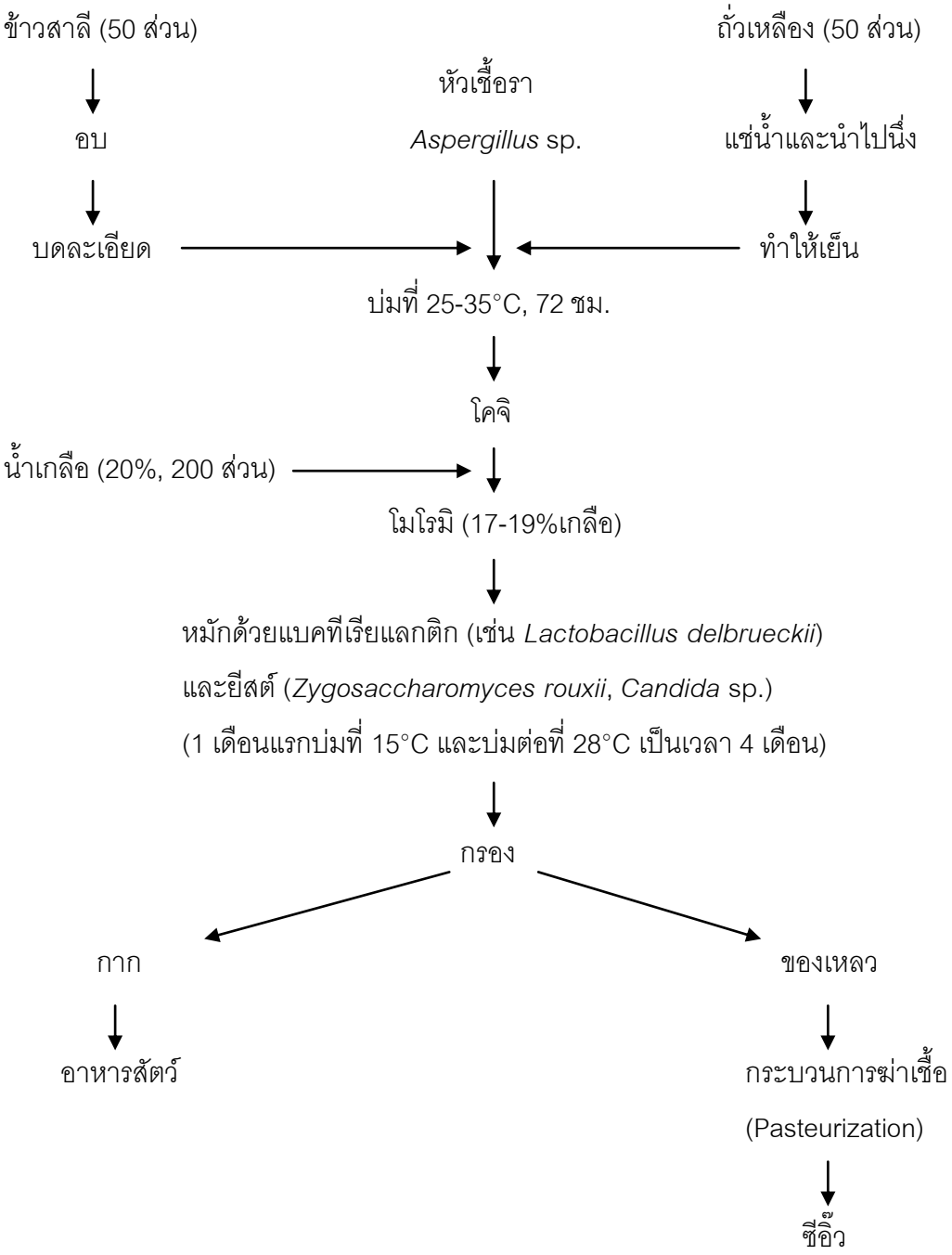
2.2.3 การกรองและการบรรจุ

นำโมโรมิที่บ่มเหมาะสมแล้วมา ทำให้ใสก่อนการบรรจุโดยการ กรองแยกส่วนของเหลวและกากออกจากกัน หลังจากกรองแล้ว นำส่วนที่เป็นของเหลวไปฆ่าเชื้อโดยการพาสเจอร์ไรซ์ด้วยความร้อน 70 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 นาทีเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นบรรจุน้ำซีอิ๊วที่ได้ในขวดแก้วหรือในบรรจุภัณฑ์พลาสติก ส่วนกากที่แยกออกมาอาจนำไปทำซีอิ๊วเกรดต่ำหรือทำอาหารสัตว์ (Luh, 1995; Thepsingha, 1997)



รูปที่ 2.1 กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วตามวิธีดั้งเดิมของโรงงานผลิตซีอิ๊วในประเทศไทย

ที่มา : Bhumiratana และคณะ (1980)



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตซีอิ๊วในประเทศญี่ปุ่น

ที่มา : Luh (1995)

2.3 หัวเชื้อ

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊วมี 3 ชนิดที่สำคัญ คือ รา แบคที เรียแลกติก และยีสต์ โดยอาจเติมในรูปของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว หรือ เชื้อผสม หรือบางครั้งไม่มีการเติมจุลินทรีย์ถ้าหากมีจุลินทรีย์อยู่ใน สภาพแวดล้อมการหมัก ในปริมาณพอเพียงแล้ว แต่ปัจจุบัน พบว่า การหมักส่วนใหญ่จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ในรูปของหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อเ ริ่มต้น เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสม่ำเสมอ สมบัติโดยทั่วไปของหัวเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะต้องมีลักษณะดังนี้ (นภา โล่ห์ทอง, 2537; Stanbury, 1999; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

1. เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และไม่สร้างสารพิษ

2. ต้องมีความสมบู รณ์ และมีสัณฐานวิท ยาที่เหมาะสม รวมถึงอยู่ในระยะ log phase ซึ่งจะทำให้เวลาของระยะ lag phase ของการหมักสั้นลง

3. เป็นสายพันธุ์ที่มี stability ที่ดี หรือมีโครงสร้างทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี

4. สามารถเจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ดีในช่วงอุณหภูมิและพีเอชกว้าง ซึ่งจะเป็นผลดีถ้าเลือกระดับพีเอชที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้

5. ต้องมีปริมาณมากพอ เพื่อให้ได้ปริมาณหัวเชื้อที่เพียงพอต่อความต้องการในการนำไปใช้

6. ต้องปราศจากการปนเปื้อน

7. อยู่ในรูปแบบที่ใช้ง่ายและเหมาะสมกับกรรมวิธีการหมักแต่ละชนิด

8. ควรมีอายุการเก็บนานพอสมควร โดยมีจุลินทรีย์ที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการหมัก

9. วัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อและผสมในกล้าเชื้อต้องไม่มีผลต่อกลิ่นรสและคุณสมบัติอื่นๆของอาหารหมัก

10. ในกรณีที่กิจกรรมการหมักเกิดจากเชื้อผสม หัวเชื้อต้องประกอบด้ วยจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสม

11. สำหรับหัวเชื้อที่ผลิตขายในระดับอุตสาหกรรม จะต้องอยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการขนส่ง บรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่ สามารถป้องกันออกซิเจน ความ ชื้น และแมลงได้ดี มีรายละเอียดกำหนดปริมาณการใช้และอายุของเชื้อที่แน่นอน

ในการผลิต หัวเชื้อให้มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น จะต้องพัฒนาหัวเชื้ อหรือมีกระบวนการผลิตที่เหมาะสม เพื่อให้ได้หัวเชื้อที่ดี สภาวะที่มีผลต่อการพัฒนาหัวเชื้อ ประการหนึ่ง คือ การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสม กับเชื้อที่จะนำไปใช้ในการหมัก และควรเป็นอาหารที่ มีองค์กระกอบใกล้เคีย งกับอาหาร ที่ใช้เป็นการหมัก เพื่อเป็นการลดเวลาที่เชื้อต้องปรับตัว ซึ่งมีผลให้เวลาของ

ระยะ lag phase และการหมักลดลง นอกจากนี้ แรงดันออสโมติก ไ อออนที่มีประจุลบ อาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการนำ สารอาหารเข้าสู่เซลล์ ที่จะมีผลต่อการเจริญและกิจกรรมของเชื้อ รวมทั้งสภาวะทางสรีระวิทยาของหัวเชื้อเมื่อถ่ายลงในถังหมัก

2.4 **หัวเชื้อยีสต์**

ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เอทานอล ไวน์ สุรากลั่น ไซเดอร์ ขนมปัง และซีอิ๊ว ล้วนแต่มีการใช้หัวเชื้อยีสต์สำหรับกระบวนการผลิตที่มีรูปแบบแตกต่างกันไปตามลักษณะการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Bamforth, 2005; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; จารุวรรณ มณีศรี, 2551)

2.4.1 **รูปแบบของหัวเชื้อยีสต์**

ตัวอย่างของ หัวเชื้อยีสต์ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นมีดังต่อไปนี้

2.4.1.1 **ยีสต์สด** (fresh yeast)

ยีสต์สดคือ เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์สดจะให้คุณภาพของสี กลิ่น และรสที่ดี เนื่องจากเป็นยีสต์ใหม่ เซลล์ยีสต์จึงมีความแข็งแรงมาก และมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาสูงมากด้วย ยีสต์สดสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 7 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 3 ถึง 4 เดือน หากต้องการนำยีสต์สดมาใช้จะต้องมีการเพาะเลี้ยงโดยการขยายขนาดก ารเพาะเลี้ยงยีสต์ในลักษณะของหัวเชื้อ หรือ starter ก่อน (ช่อขวัญ วงษ์สุวรรณ, 2547)

รูปที่ 2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อยีสต์สดเข้มข้น (concentrated fresh yeast)
ที่มา: http://www.mountainhomebrew.com

2.4.1.2 **แอคทีฟดรายยีสต์** (active dry yeast)

แอคทีฟดรายยีสต์เป็นยีสต์ที่คัดเลือกมาใช้ในลักษณะของสายพันธุ์เดี่ยว หรืออาจผสม กับยีสต์หลายส ายพันธุ์ซึ่งมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการ แล้ว นำไปทำให้แห้ง โดยวิธีที่เหมาะสม ซึ่งทำให้เซลล์มีความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 6 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้อยู่ในรูปร่างก้อนกลมหรือเส้นขนาดเล็ก แล้วบรรจุในสภาพสูญญากาศหรือมี ไนโตรเจนเหลวหรือคาร์บอนไ ดออกไซด์ (ช่อขวัญ วงษ์สุวรรณ , 2547) แอคทีฟดรายยีสต์นี้มีอายุ การเก็บนานถึง 1 ปี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (Berry และคณะ, 1987) การนำแอคทีฟดรายยีสต์มา ใช้จำเป็นต้องนำมาผสมกับน้ำเย็นหรือน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Verachtert และ Mot, 1990) เขย่าเล็กน้อยประมาณ 10 ถึง 20 นาที เพื่อกระ ตุ้นเซลล์ยีสต์โดยการเพิ่มความชื้ น ให้แก่เซลล์ เนื่องจากในระหว่างการเก็บเซลล์ยีสต์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ไม่สมบูรณ์นั้นอาจเกิดการรั่วไหล ของสารอาหารออกนอกเซลล์ บางครั้งอาจมีผลให้เซลล์ตา ยได้ (Stewart, 1987; Subden, 1990) โดยปกติแอคทีฟดรายยีสต์ นั้นมีเซลล์ยีสต์ประมาณ $2x10^6$ ถึง $3x10^6$ เซลล์ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) แอคทีฟดรายยีสต์นี้จะเป็นยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง

รูปที่ 2.4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อแอคทีฟดรายยีสต์ (active dry yeast)
ที่มา: www.cookingforengineer.com และ http://freeculinaryschool.com

2.4.1.3 **คอมเพรสยีสต์** (compressed yeast)

คอมเพรสยีสต์คือ การนำหัวเชื้อยีสต์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) หรือการกรอง (filtration) แล้วทำให้แห้ง (Spencer และ Spencer, 1989) อาจอัดให้อยู่ในรูปก้อนหรือแท่ง มีสีครีมอ่อนถึงสีน้ำตาลอ่อนค่อนข้างขาว มีกลิ่นหอมของยีสต์ตามธรรมชาติ คอมเพรสยีสต์จะมีปริมาณเซลล์ยีสต์ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาใช้ได้ทันที (Verachtert และ Mot, 1990) คอมเพรสยีสต์นี้มีอายุการเก็บค่อนข้างสั้น จึงต้องเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส โดยสามารถเก็บไว้ได้ ประมาณ 3 สัปดาห์ คอมเพรสยีสต์จะเป็นหัวเชื้อยีสต์อีกหนึ่งรูปแบบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง

รูปที่ 2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หัวเชื้อคอมเพรสยีสต์ (compressed yeast)
ที่มา: http://www.dlc.fi.com และ http://uk.ask.com

ในที่นี้จะกล่าวถึงอุตสาหกรรมการหมักซีอิ๊วที่มีการใช้หัวเชื้อในขั้นตอนการหมักโมโรมิสำหรับกระบวนการผลิต โดยมีสิ่งที่สำคัญประการหนึ่งคือ การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ซึ่งเป็นการเตรียมยีสต์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมัก รวมทั้งปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งหัวเชื้อที่เตรียมเรียบร้อยแล้วจะถ่ายลงไปในถังหมักต่อไป มีรายงานที่เกี่ยวกับการ เตรียมหัวเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตซีอิ๊ว เช่น งานวิจัยของ Thepsingha (1997) ที่ได้ศึกษาวิธีการเตรียม หัวเชื้อยีสต์ *Z. rouxii* และ *C. versatilis* 3 แบบ คือ แบบที่หนึ่งเป็นการ เตรียมหัวเชื้อโดยการทำ ให้แห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นกระจาย พบว่าวิธีนี้ไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะอัตราการรอด ชีวิตของเซลล์มีค่าน้อยหลังจากทำแห้งแบบพ่นกระจายที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์จะถูกทำลายจากการสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว มีผลให้เซลล์ตายและความสามารถในการหมัก ต่ำลง แบบที่สองเป็นการเตรียม หัวเชื้อโดยการอบแห้งด้วย ลมร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์ลดลงทั้งในระหว่างการทำแห้งและการเก็บ และแบบที่สาม เตรียมในรูปของเซลล์เข้มข้นจากการเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์สด แล้วนำมาทำให้เข้มข้นโดยการปั่นเหวี่ยง แล้วจึง resuspend ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีปริมาณเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์หรือ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้มีเซลล์เริ่มต้น 8log CFU/ml และเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซล เซียส พบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องจะมีค่าลดลง 2 log CFU /ml ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเก็บ แต่แตกต่างกับเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งจะ มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เพราะยังคงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่ลดลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml เมื่อเก็บเซลล์เป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์

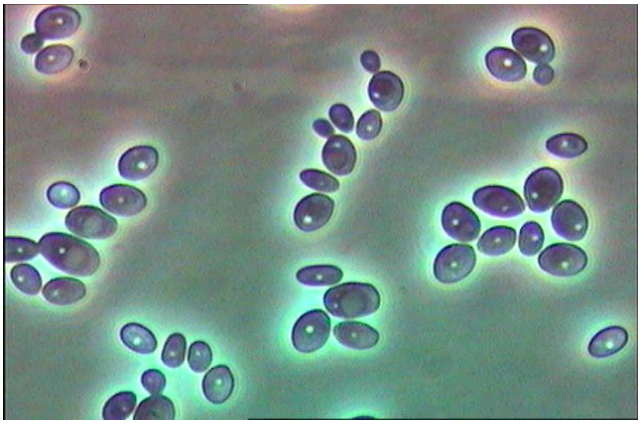
จากงานวิจัยที่กล่าวมานี้ จะเห็นว่า การเตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยการทำให้แห้งด้วยการทำแห้งแบบพ่นกระจาย และการอบแห้งด้วย ลมร้อน จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ลดลง ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมัก เพราะประสิทธิภาพการหมักต่ำลง เช่นเดียวกันกับรูปแบบของหัวเชื้อชนิดคอมเพรสยีสต์ (compressed yeast) และ แอคทีฟดรายยีสต์ (active dry yeast) ดังกล่าวข้างต้น ที่มีข้อเสียคือ มีปริมาณเซลล์ในผลิตภัณฑ์ต่อหนึ่งกรัม ปริมาณน้อย ทำให้เวลานำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณมากเพื่อให้เพียงพอต่อการดำเนินกิจกรรมการหมัก ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย ต้นทุนสูง และสิ้นเปลืองพื้นที่การเก็บหัวเชื้อ ส่วนการเตรียม หัวเชื้อยีสต์ในรูปของเซลล์ยีสต์เข้มข้นที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สด (fresh yeast หรือ concentrated fresh yeast) นั้น เซลล์จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงและสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้เป็นเวลานาน อีกทั้งยังเป็นวิธีการเตรียมที่มีราคาถูกกว่าการเตรียม หัวเชื้อโดยการทำแห้งแบบพ่นกระจาย และการอบแห้งด้วยลมร้อนอีกด้วย ซึ่งการทำ หัวเชื้อยีสต์เข้มข้นดังกล่าวจะมาจากรูปแบบ หัวเชื้อชนิดหัวเชื้อยีสต์สด (fresh yeast) ที่มีข้อดีคือ เป็นยีสต์ที่มีความแข็งแรงมาก และมีประสิทธิภาพในการ

หมักสูง ให้กลิ่นรสที่ดี เพราะมีความสด ใหม่ และหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นนี้เมื่อเก็บในสภาวะที่เหมาะสม จะสามารถเก็บไว้ได้นานและยังคงมีประสิทธิภาพในการดำเนินกิจกรรมการหมักที่ดี

2.4.2 **หัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักซีอิ๊ว**

ในปัจจุบัน การเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ใช้ในการหมักโมโรมิ ส่วนใหญ่จะเลือกใช้ยีสต์ *Z. rouxii* มาเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นเพราะเป็นยีสต์ทนเกลือความเข้มข้นสูงและผลิตแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

2.4.2.1 **ยีสต์** ***Zygosaccharomyces rouxii***

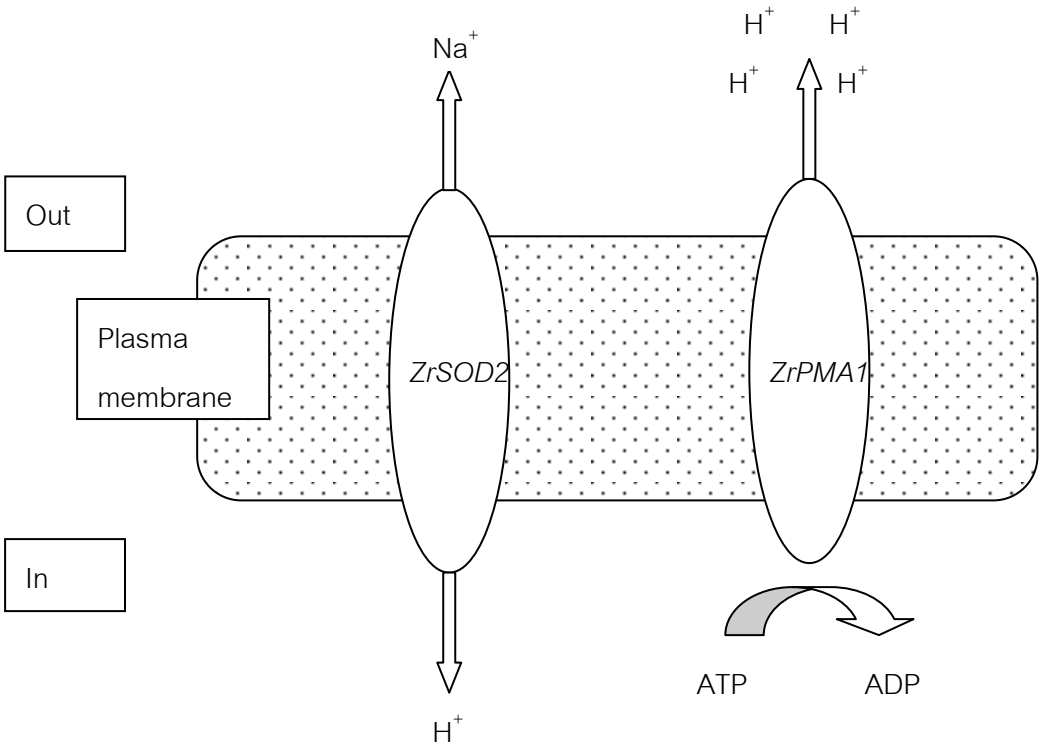


รูปที่ 2.6 ยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii*

Zygosaccharomyces rouxii มีชื่อเรียก (synonyms) อีกหลายชื่อคือ *Saccharomyces rouxii*, *Z. barker*, *S. soya*, *Z. soya*, *Z. japonicus*, *Z. japonicus*, *Zygopichia japonicus*, *Z. major*, *Z. salsus*, *Zygopichia salsa*, *Z. dairensis*, *Z. vini*, *Z. cavarae*, *Z. richteri*, *Z. gracilis*, *Z. polymorphus*, *Z. variabilis*, *Z. rugosus*, *Z. nectarophilus*, *Z. citrus*, *Z. felsineus*, *Z. miso*, *Z. nukamiso*, *Z. halomembranis*, *S. acidifaciens*, *Torulopsis osloensis*, *S. osmophilus*, *T. mogii*, *S. bailii*, *Candida placentae*, *S. placentae* (Kurtzman และ Fell, 1998)

Z. rouxii เป็นยีสต์ที่มีโคโลนีรูปร่างกลม สีขาวหรือครีม มีการสืบพันธุ์ 2 แบบคือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ หรือเรียกว่า แอสโคมัยซีตัสยีสต์ โดยเซลล์จะมีการสร้างท่อคอนจูเกชันเชื่อมระหว่างเซลล์ทั้งสองในระหว่างการสร้างสปอร์ *Z. rouxii* จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นหลักเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ โดยทั่วไป *Z.rouxii* สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารที่ไม่เติมเกลือและอาหารที่มีเกลือปริมาณสูง ในอาหารที่ไม่เติมเกลือ *Z. rouxii* จะหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสได้เป็นแอลกอฮอล์และเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้าง คือ พีเอช 3.0 ถึง 7.0 อุณหภูมิ 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส ขณะที่ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง *Z. rouxii* จะหมักน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว เจริญได้ในช่วงพีเอชแคบ คือ 4.0 ถึง 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Kurtzman และ Fell, 1998)

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่า *Z. rouxii* เป็น salt-tolerant yeast มีคุณสมบัติสามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงได้ เพราะยีสต์มี gene ที่เกี่ยวข้องในการ รักษาสมดุลภายใ นกับภายนอกเซลล์จากแรงดันออสโมติ กได้ คือ gene ที่ควบคุมเกี่ยวกับ Na^+/H^+-antiporter และ H^+-ATPase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชื่อว่า *ZrSOD2* และ *ZrPMA*1 ตามลำดับ โดยที่ gene ทั้งสองจะมีการทำงานที่ควบคู่กันไปเมื่ออยู่ ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสู ง กลไกที่เกิดขึ้นจาก gene ทั้งสองชนิดจะทำงานโดยการขับ Na^+ ออกจากเซลล์ผ่านทาง Na^+/H^+-antiporter โดยแรงขับของ H^+-gradient ที่เกิดจากกลไกของ plasma membrane H^+-ATPase รวมถึงลดการ influx Na^+ เข้าสู่เซลล์ (Watanabe และคณะ ,1995; Watanabe และคณะ, 1999; Watanabe และคณะ, 2003; Watanabe และคณะ, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 กลไกการรักษาสมดุลของเซลล์ยีสต์ *Z. rouxii* เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง
ที่มา : ดัดแปลงจาก Hohmann และ Mager (2003)

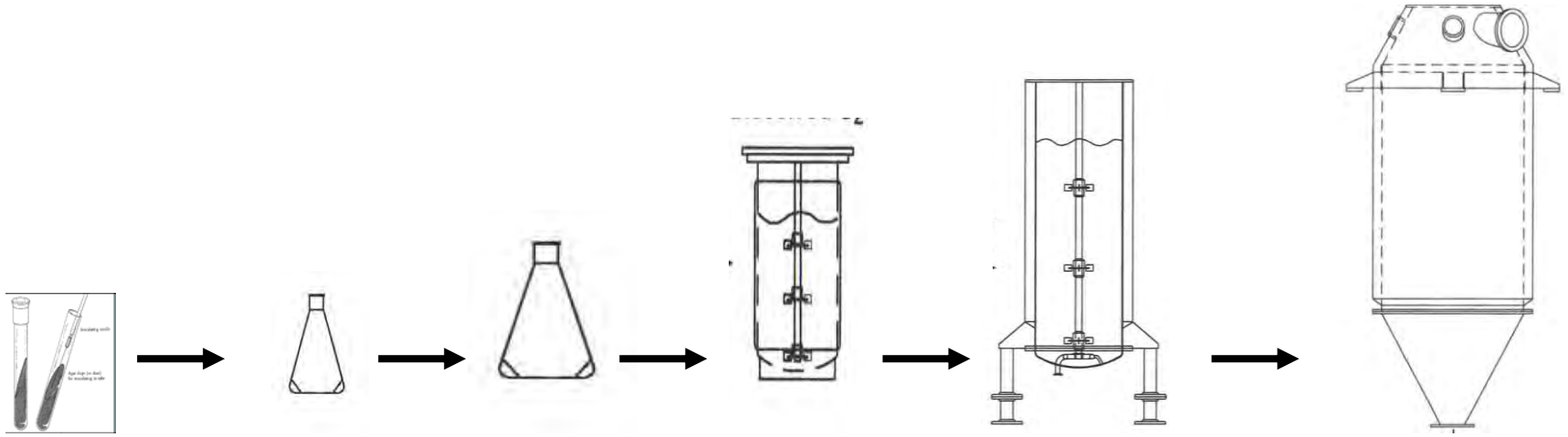
ด้วยเหตุที่ *Z. rouxii* สามารถทนเกลือความเข้มข้นสูง ผลิตแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสที่ดีในซีอิ๊วได้ ซึ่งเป็ นที่ทราบกันดีถึงเหตุผลดังกล่าว ยีสต์ *Z. rouxii* จึงถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วในขั้นตอนการหมักโมโรมิ (Aoki และ Uchida, 1991; Watanabe และคณะ, 1995; Yoshikawa และคณะ, 1995; Kobayashi และ Hayashi, 1998; Watanabe และคณะ, 1999) เคยมีรายงานที่ได้กล่าวถึงการนำ *Z. rouxii* มาใช้ในการหมักโมโรมิสำหรับการผลิตซีอิ๊ว เช่น Kobayashi และ Hayashi (1998) ศึกษาการเสริมเกลือโซเดียมคลอไรด์ใน starter culture ของยีสต์ *Z. rouxii* และวัดอัตราการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และแอคติวิตีของยีสต์ โดยทำการทดลองเป็น 2 ขั้น ขั้นที่หนึ่งเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีปริมาณเกลืออยู่ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนในขั้นที่สองนำเซลล์ยีสต์จากขั้นตอนที่หนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นเป็น 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ 15 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมักโมโรมิ พบว่า หลังจากหมักโมโรมิ 60 วัน อัตราการรอดชีวิตของ *Z. rouxii* ยังคงมีค่าสูงเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อตอนเริ่ มกระบวนการหมัก อัตราการเจริญคงที่จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 4 จึงลดลง ระยะ lag phase คงที่จนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 3 จะมีระยะ lag phase นานขึ้น และกิจกรรมในการหมักของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร

ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 16 เปอร์เซ็นต์จะมีค่าเป็นสองเท่าของ กิจกรรมในการหมักเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แสดงว่า *Z. rouxii* เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและทนเกลือ ที่มีความเข้มข้นสูงได้ โดยเมื่อเพิ่ม เกลือโซเดียมคลอไรด์ให้กับ starter culture ของยีสต์ *Z. rouxii* เซลล์จะยังมีคงอัตราการเจริญ อัตราการรอดชีวิตและแอคติวิตีในกระบวนการหมักโมโรมิได้

2.4.3 กระบวนการผลิตหัวเชื้อยีสต์

ในขั้นตอนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตซีอิ๊วในระดับอุตสาหกรรม การเตรียมหัวเชื้อยีสต์จะเป็นการเตรียมจุลินทรีย์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากให้เพียงพอต่อกา รหมักโมโรมิ ดังนั้นจึงต้องมีการเพาะเลี้ยงยีสต์โดยการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว โดยอาจจะประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ภายใต้สภาวะการให้อากาศแบบเขย่า 2-3 ขั้นตอน และในถังปฏิกรณ์การหมัก 1-3 ขั้นตอน ขึ้นอยู่กับขนาดของถังปฏิกรณ์การหมักในขั้นตอนการ ผลิต ซึ่งในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงดังกล่าวโดยทั่วไปจะเป็นการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณมากขึ้นเป็นลำดับ ใน 2-3 ครั้งแรกมักเพิ่มทีละ 10 เท่า หรือต่ำกว่า 10 เท่า (สาวิตรี ลิ่มทอง , 2549) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ซึ่งการเพาะเลี้ยงหลายขั้นตอนเช่นนั้นจะทำให้ใช้ระยะเวลานาน และเนื่องจาก โมโรมิที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วมักจะอยู่ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง เมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไป ยีสต์จะมีอัตราการเจริญต่ำกว่าปกติ ทำให้การผลิตกลิ่นรสเกิดขึ้นช้า

Hamada และคณะ (1991) ได้ศึกษาถึงการผลิตเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ทนเกลือ *Z. rouxii* โดยการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำซีอิ๊วที่มีเกลือความเข้มข้นสูง 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ batch พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงยี สต์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพผ่านไป 60 วัน เซลล์ที่มีชีวิ ตยังคงมีสูงถึง 8 ถึง 9 log CFU/ml ไม่แตกต่างกับเซลล์เริ่มต้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบต่อเนื่องจะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch 5 ถึง 6 เท่า โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) อยู่ในช่วง 0.16 ถึง 0.19 generation/hr



รูปที่ 2.8 การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว

ที่มา: ดัดแปลงจาก www.fermentationtechnology.blogspot.com

นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาถึงการปรับปรุงและพัฒนาหัวเชื้อที่ใช้ในกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพ โดยใช้การตรึงเซลล์กับสาร protectant หรือการเก็บหัวเชื้อเซลล์เข้มข้นที่ได้ด้วยสาร protectant บางประเภท รวมถึงการเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้หัวเชื้อยังคงอยู่ในสภาวะที่ปลอดภัย รักษาเซลล์ให้ยังมีชีวิตอยู่ได้ ไม่เพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บและเมื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วแล้ว ยังคงมีประสิทธิภาพในการดำเนินกิจกรรมในระหว่างการหมัก

2.5 สภาวะการเก็บหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น

ในกระบวนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตซีอิ๊ว หัวเชื้อยีสต์ที่เติมลงไปในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูงจะมีอัตราการเจริญจะต่ำกว่าสภาวะปกติ ทำให้การผลิตกลิ่นรสเกิดขึ้นช้า จึงต้องมีการปรับปรุงหัวเชื้อยีสต์เพื่อให้ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น ยังคงมีแอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลง โดยการใช้สารปกป้องเซลล์และอุณหภูมิการเก็บที่เหมาะสม เพื่อให้ กระบวนการผลิตกลิ่นรสและรสชาติมีระยะเวลาสั้น และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตซีอิ๊ว

2.5.1 สาร protectant

มีการศึกษาการนำสาร protectant หลายชนิดมาใช้ในการช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะที่ถูกทำลายได้โดยง่าย โดย วิธีการตรึงเซลล์ยีสต์มาใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิ เช่น งานวิจัยของ van der Sluis และคณะ (2001) ซึ่งศึกษาการเร่งการผลิตกลิ่นรสจาก ยีสต์ทนเกลือในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว โดยผลิตหัวเชื้อด้วยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยเจลอัลจิเนท พบว่า เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงจะมีความสามา รถในการผลิตสาร ให้กลิ่นรสได้สูง กว่ายีสต์ที่ไม่ถูกตรึงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพราะเจลอัลจิเนทจะไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือค วามเข้มข้นสูงและไม่มีความคงตัวสำหรับใช้ในกระ บวนการผลิตซีอิ๊วเป็นระยะเวลานาน จึงได้มีการพัฒนาการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยเซรามิคหรือเจลโพ ลีเอทิลีน-ออกไซด์แทนเจลอัลจิเนท พบว่าเจลโพลีเอทิลีน- ออกไซด์ทนเกลือได้สูงและมีเปอร์เซ็ นต์การรอดชีวิตของยีสต์สูง มีความคงตัวที่ดี ดังนั้นจึงมีศักยภาพดีกว่าการตรึงเซลล์ด้วยเจลอัลจิเนท (van der Sluis และคณะ, 2000; van der Sluis และคณะ, 2001) แต่ก็ยังมีรายงานการรอดชีวิตที่ต่ำของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น การรอดชีวิตของ *Nitrosomonas europaea* ที่มีเพียง 0.05 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นเนื่องจากจากการเป็นพิษในระหว่างกระบวนการตรึงเซลล์จากการเกิดพันธะทางเคมีของเจลโพลีเอทิลีน-ออกไซด์ (Leenen, 1996)

ในการเก็บหัวเชื้อหรือจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ มักจะใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant เพรามีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเซลล์ยีสต์ด้วยการแช่เย็นหรื อแช่แข็ง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; Fonseca และคณะ, 2006; Sidari และ Caridi, 2009) ด้วยเหตุผลที่ว่า กลีเซอรอลจะมีจุดเยือกแข็งที่ต่ำกว่าน้ำ และยังคงมีคุณสมบัติเป็นของไหลโดยปฏิกิริยา colligative ได้ที่อุณหภู มิ -46 องศาเซลเซียสเป็นอย่างต่ำ ดังนั้นจึงป้องกันการเ กิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ (eutectic crystallization) (Hubálek, 2003; Sidari และ Caridi, 2009) มีรายงานของ Fonseca และคณะ (2006) ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant สำหรับเก็บรักษา *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียสโดยมีเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงเหลือ 6 log CFU/ml ซึ่ง Henry และ Kirsop (1990) ก็เคยใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant ด้วยเช่นกัน โดยศึกษาการเก็บรักษายีสต์ด้วยความเย็น (cryopreservation) ในหลอดพอลิโพรไพลีนและใช้กลีเซอรอล 10% เป็นสารป้องกันความเย็นให้แก่ยีสต์ หรือแม้แต่ Sidari และ Caridi (2009) ก็ได้รายงานถึงการรอดชีวิตของยีสต์สำหรับผลิตไวน์ในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant พบว่า การ รอดชีวิตของยีสต์ยังคงมีค่าสูงและยังคงความเป็นของเหลวอยู่ และอัตราการรอดชีวิตจะสูงมากขึ้นถ้าเติมกรดแอสคอบิคลงไปด้วย

2.5.2 **อุณหภูมิ**

การเก็บรักษาหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยหัวเชื้อที่เก็บจะต้ องยังคงไม่สูญเสียลักษณะที่สำคัญต่อกระบวนการหมักโมโรมิ หรือสูญเสียน้อยที่ สุด ในการเก็บรักษาหัวเชื้อนั้น ถ้ามีสภาวะที่ส่งเสริมให้อายุการเก็บหัวเชื้อมีระยะเวลานานขึ้น เพราะไม่เกิดการทำลายเซลล์ หรือทำลายผนังเซลล์ให้เสียหาย ก็จะเป็นสิ่งที่ดีที่ควรนำมาใช้ในระหว่ างการเก็บรักษา โดยส่วนใหญ่จะใช้เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เช่น อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิแช่แข็ง 0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง -18 หรือ -20 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) เป็นต้น อุณหภูมิดังกล่าวจะช่วยยับยั้งการเจริญและกิจกรรมต่างๆที่ เกิดขึ้นภายในเซลล์ รวมถึงลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพราะการเก็บหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ที่เป็นสภาวะที่เหมาะ สมต่อการเจริญ และการทำ กิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ ทำให้เก็บได้ระยะเวลาสั้น เซลล์ตายอย่างรวดเร็ว อีกทั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมินี้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บรักษาได้ง่าย

Thepsingha และคณะ (1997) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อเข้มข้นที่เก็บที่

อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการเก็บหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 8 log CFU/ml ผลการทดลองพบว่า เมื่อเก็บหัวเชื้อที่อุณหภูมิห้องจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีค่าลดลงคือมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 6 log CFU/ml ตั้งแต่ในสัปดาห์แรกของการเก็บและเหลือเพียง 5 log CFU/ml เมื่อระยะเวลาการเก็บผ่านไป 3 สัปดาห์ แต่สำหรับเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณห ภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่าเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยยังคงมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่ลดลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml เมื่อเก็บเซลล์เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แสดงว่าการเก็บรักษาหัวเชื้อเข้มข้นที่อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียสนั้นมีความเหมาะสม เพราะเซลล์เข้มข้นที่เก็บด้วยสภาวะอุณหภูมินี้จะมีการรอดชีวิตสูง ทำให้มีอายุการเก็บนานขึ้น ซึ่งการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียสจะให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจากเซลล์เริ่มต้น ดังจะเห็นได้จากการศึก ษาของ Fonseca และคณะ (2006) ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant สำหรับเก็บรักษา *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียสโดยมีเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจากเซลล์เริ่มต้นถึง 2 log CFU/ml เหลือจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 6 log CFU/ml หรือแม้แต่ Cowman และ Speck (1965) ก็เคยศึกษาการเก็บรักษา *Streptococcus lactis* ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงในระหว่างการเก็บ 60 วัน ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ ลดลงส่งผลให้การผลิตกรดและแอคติวิตีในการย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ลดลงอีกด้วย

Abadias และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงผลของการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของยีสต์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ คือ *Candida sake* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแอ๊ปเปิ้ลและลูกแพร์ แล้วพบว่า การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจะเป็นวิธีที่ดีที่จะรักษาเซลล์ให้รอดชีวิตอยู่ได้ 28.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ระเหิดแห้งโดยใช้นมขาดมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์เป็นสารป้องกันความเย็น

2.6 วิธีวิเคราะห์คุณภาพของหัวเชื้อในกระบวนการหมัก

ในการผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิ จะต้องมีการคัดเลือกหัวเชื้อที่มีคุณภาพ ในที่นี้คือเมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีสับสเตรทเป็นโมโรมิซึ่งมีเกลือความเข้มข้นสูงแล้วหัวเชื้อยีสต์ยังคงรอดชีวิตและมีกิจกรรมการหมักที่ดี โดยทั่วไปการ ติดตามอัตราการรอดชีวิตหรืออัตราการเจริญของยีสต์จะใช้วิธีการนับจำนวนโคโลนีจากการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; Hamada และคณะ, 1989; Hamada และคณะ, 1990; Hamada และคณะ, 1991; Kobayashi และคณะ, 1998; van der Sluis และคณะ, 2000) หรือ

วัดจากความขุ่นของเซลล์โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660nm) สำหรับวัดยีสต์ *Z. rouxii* (Tomita, 1976; Kobayashi และคณะ, 1998; Kobayashi และคณะ, 1998) ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตรสำหรับวัดยีสต์ *C. satilis* (van der Sluis และคณะ, 2001) ซึ่งรวมถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้นของยีสต์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในระหว่างกระบวนการหมัก (Hamada และคณะ, 1991) ส่วนการวัดกิจกรรมการหมัก มักจะวัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากการผลิตของหัวเชื้อยีสต์ โดยการใช้เครื่อง Gas chromatography (GC) (Hamano และคณะ, 1971; Hamada และคณะ, 1989; Hamada และคณะ, 1991; Strel และคณะ, 1993; Phowchinda และคณะ, 1995; Kobayashi และคณะ, 1998; van der Sluis และคณะ, 2001) หรือใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์สารให้กลิ่นรสเช่ น 4-ethylguaiacol ที่ผลิตจาก *C. versatilis* (Hamada และคณะ, 1990) หรือผลิตจาก *C. satilis* (van der Sluis และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ การวัดกิจกรรมการหมักของหัวเชื้อยังสามารถวัดได้จากการหายไปของน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากการหายใจเกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยคิดเป็นมิลลิกรัมของก๊าซต่อเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อชั่วโมง (Hamada และคณะ, 1991; Kobayashi และคณะ, 1998) หรือการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีที่เกี่ยวกับเอนไซม์ คือวิธี glucose oxidase-peroxidase (Trinder, 1969; Hamada และคณะ, 1991; Kobayashi และคณะ, 1998) ได้อีกด้วย

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

น้ำซีอิ๊วดิบได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทผู้ผลิตซีอิ๊วทางการค้า และเก็บตัวอย่างในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับใช้ตลอดงานวิจัย

โมโรมิได้รับความอนุเคราะห์ จากบริษัท ล่ำซำ ประเทศไทย จำกัด (มหาชน) และเก็บตัวอย่างในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสำหรับใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Absolute ethanol (C_2H_5OH) (Mallinckrodt, Mexico)	AR grade
2. Agar powder (Himedia, India)	AR grade
3. Boric acid (H_3BO_3) (Merck, Germany)	AR grade
4. Ethanol 95% (Mallinckrodt, Mexico)	AR grade
5. D-glucose ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)	AR grade
6. 3,5-dinitrosalicylic acid (Merck, Germany)	AR grade
7. Glycerine 100% (Merck, Germany)	USP grade
8. Hydrochloric acid (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand)	AR grade
9. Methyl red- methylene blue (Merck, Germany)	AR grade
10. Methyl red -bromocrysol green (Merck, Germany)	AR grade
11. Potassium Chromate (K_2CrO_4) (Fluka, Switzerland)	AR grade
12. Potassium Sodium Tartrate (Merck, Germany)	AR grade
13. Selenium reagent mixture (Merck, Germany)	AR grade
14. Silver nitrate ($AgNO_3$) (Merck, Germany)	AR grade
15. Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)	AR grade
16. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)	AR grade
18. Sulfuric acid (H_2SO_4) (J.T Baker, USA)	AR grade
19. Yeast extract malt extract broth (YM broth) (Himedia, India)	AR grade
20. Yeast extract malt extract agar (YM agar) (Himedia, India)	AR grade

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Autoclave (TOMY, SS-320, Japan)
2. Centrifuge (Hettich, ROTANTA 460R, Germany)
3. Colony counter (Suntex 560, China)
4. Digestion unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, K-424, Switzerland)
5. Distillation unit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (BUCHI, B-324, Switzerland)
6. Incubator (Memmert, USA)
7. Hot air oven (Memmert, USA และ WTC binder 78532 Tuttlingen, Germany)
8. pH meter (Mettler Toledo, 204)
9. Micropipette P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
10. Refrigerator (Mitsubishi, Thailand)
11. Shaker (New Brunswick Scientific, USA)
12. Spectrophotometer (Spectronic 20 genesis, USA)
13. Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
14. Water bath (Memmert, USA)
15. Weight balance (Sartorius, BP 310, Germany)
16. Fermentor (Marubishi, BEMT-T-5L, Thailand)
17. Trinocular phase contrast microscope (Olympus, BX 51, USA)

จุลินทรีย์

1. *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 และ TISTR 5058 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บรักษาและการคงกิจกรรมของ *Z. rouxii*

นำเซลล์ยีสต์ *Z. rouxii* ที่ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract malt extract broth (YM broth) ภายใต้สภาวะการให้อากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัลเจอร์ที่ได้ มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract malt extract agar (YM agar) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วบ่มในตู้ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยง ในหลอดอาหารวุ้นเอียง YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปเก็บ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดย subculture ทุกสัปดาห์ และเมื่อจะทำการทดลอง จะนำเชื้อที่เก็บไว้มา streak ลงบนอาหาร YM agar แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว YM broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำซีอิ๊วดิบ

นำตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบมาตรวจวิ เคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเค มีรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ทุกรายการแสดงในภาคผนวก ก ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อนำข้อมูลมาใช้ปรับน้ำซีอิ๊วดิบสำหรับใช้เพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเซลล์เข้มข้น

3.2.1 สมบัติทางกายภาพ

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด -ด่าง (pH meter) (AOAC, 2005)

3.2.2 สมบัติทางเคมี

- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Phenol-sulfuric acid (AOAC, 2005)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS reagent (AOAC, 2005)
- ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjedahl (AOAC, 2005)
- ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ โดยวิธี Titratable acidity (AOAC, 2005)
- ปริมาณเกลือ โดยวิธีของ Mohr (AOAC, 2005)

- ปริมาณเอทานอลด้วย Gas chromatography ตามสภาวะของ Limthong และคณะ (2007)

จากข้อมูลที่ได้จะนำไปปรับน้ำซีอิ๊วดิบด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเกลือ 10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นเกลือที่ใช้จริงในโรงงานผู้ผลิตซีอิ๊ว สำหรับไว้ใช้ตลอดการทดลอง

3.3 คัดเลือกสายพันธุ์ *Z. rouxii* เพื่อใช้ผลิตเซลล์เข้มข้น

เปรียบเทียบอัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 และ *Z. rouxii* TISTR 5058 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือเข้มข้น 0%, 1%, 5%, 10%, 15% และ 20%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้น inoculate เชื้อ *Z. rouxii* อายุ 24 ชั่วโมง จากข้อ 3.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามอัตราการเจริญด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) ทุกๆ 24 ชั่วโมง วิธีการดังแสดงในภาคผนวก ข จากนั้นคัดเลือก *Z. rouxii* สายพันธุ์ที่สามารถเจริญในภาวะเกลือความเข้มข้นสูงสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.4 ประเมินรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น

3.4.1 รูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับใช้เตรียมเซลล์เข้มข้น

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Z. rouxii* ที่คัดเลือกจากข้อ 3.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรูปแบบดังแสดงในตารางที่ 3.1เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามอัตราการเจริญด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เซลล์ในแต่ละรุ่นจำนวน 8 log CFU/ml นำคัลเจอร์ที่ได้ในรุ่นสุดท้ายของแต่ละรูปแบบไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบ (raw soy sauce, ss) ปลอดเชื้อที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 โดยมีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ติดตามอัตราการเจริญ ด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงที่ และเปรียบเทียบอัตรา

การเจริญของยีสต์ในแต่ละรูปแบบการเลี้ยง โดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) ของยีสต์ (Walker, 1998; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ตามสมการ

$$\mu = \frac{\log X - \log X_0}{0.301 \times t}$$

เมื่อ X_0 เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น

X เป็นจำนวนเซลล์เมื่อเวลา t

t เป็นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญ

ที่มาของสมการแสดงในภาคผนวก ง

ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงทั้ง 4 รูปแบบโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 3.1 รูปแบบการเพาะเลี้ยงยีสต์สำหรับใช้เตรียมเซลล์เข้มข้น

รูปแบบ	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2
1	YM broth ที่มีเกลือ 1%	-
2	YM broth ที่มีเกลือ 5%	-
3	YM broth ที่มีเกลือ 5%	YM broth ที่มีเกลือ 10%
4	YM broth ที่มีเกลือ 5%	ss ที่มีเกลือเข้มข้น 5%

- หมายถึง ไม่มีการเพาะเลี้ยงต่อในรุ่นที่ 2

3.4.2 ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลต่ออัตราการเจริญของ *Z. rouxii* ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%

นำเซลล์ยีสต์ *Z. rouxii* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.1 มาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบปลอดเชื้อที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) มีน้ำตาล 1.5%(w/v) และเพิ่มปริมาณน้ำตาลในน้ำซีอิ๊วดิบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็น 2.5%, 5% และ 7.5%(w/v) โดยเพาะเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามอัตราการเจริญด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงที่ เลือกความเข้มข้นน้ำตาลที่ให้อัตราการเจริญดีที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5 ศึกษาวิธีการทำให้เซลล์เข้มข้น

3.5.1 การตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง

ปิเปตคัลเจอร์ที่ได้ในรุ่นสุดท้ายจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากข้อ 3.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด eppendorf ชนิดก้นแหลม นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็ว 10000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Hamada และคณะ, 1991) จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และใช้น้ำ ซีอิ๊วดิบปลอดเชื้อที่มีเกลือเข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชะส่วนที่ตกตะกอนออกมา เพื่อนำเซลล์เข้มข้นที่ได้ไปตรวจสอบร้อยละการได้กลับของเซลล์ที่มีชีวิต (%Cell recovery) ด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีในคัลเจอร์ก่อนการปั่นเหวี่ยง

$$\%\text{Cell recovery} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์จากตะกอนเซลล์เข้มข้น (CFU/ml)}}{\text{ปริมาณเซลล์จากหัวเชื้อที่ไม่ผ่านการทำให้เข้มข้น (CFU/ml)}} \times 100$$

3.5.2 การตกตะกอนเซลล์ด้วยการลดอุณหภูมิ

ปิเปตคัลเจอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากข้อ 3.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด eppendorf ชนิดก้นแหลม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Shen และคณะ, 2005) จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และใช้

น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5%ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชะส่วนที่ตกตะกอนออกมา เพื่อนำเซลล์เข้มข้นที่ได้ไปตรวจสอบร้อยละการได้กลับของเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธีเช่นเดียวกันกับข้อ 3.5.1

3.6 ศึกษาการเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีน้ำซีอิ๊วดิบซึ่งมีเกลือเข้มข้น 10% เป็นวัตถุดิบ และใช้เซลล์ยีสต์เข้มข้นที่เพิ่มรุ่นการเลี้ยงด้วยน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เข้มข้นโดยตรง (แบบ A)

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่เลือกจากข้อ 3.4 และทำให้เข้มข้นด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 3.5 มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยใช้น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) และมีความเข้มข้นน้ำตาลตามที่เลือกจากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 2 ลิตร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ลิตรต่อนาที (Hamada และคณะ, 1991) ติดตามอัตราการเจริญโดย วิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคงที่

3.6.2 การเพิ่มรุ่นการเลี้ยงก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์เข้มข้น (แบบ B)

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่เลือกจากข้อ 3.4.1 มาเพิ่มรุ่นการเลี้ยงอีก 1 รุ่น โดยการนำคัลเจอร์รุ่นสุดท้ายของรูปแบบดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีเซลล์เริ่มต้น 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามอัตราการเจริญ ด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธีที่เลือกจากข้อ 3.5 จากนั้นนำเซลล์เข้มข้นไปเพาะเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์การหมักภายใต้สภาวะเดียวกันกับข้อ 3.6.1

เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์เข้มข้นที่เตรียมจากข้อ 3.6.1 และ3.6.2 โดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ แล้วเลือกวิธีที่ให้ค่า μ ดีที่สุด

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.7 ศึกษาสภาวะและอายุการเก็บหัวเชื้อเข้มข้น

ผลิตเซลล์เข้มข้นจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากรูปแบบที่คัดเลือกจากข้อ 3.4 แล้วทำให้เข้มข้นด้วยวิธีที่ได้จากข้อ 3.5 นำเซลล์เข้มข้นเก็บในถุง aluminium retort pouch ชนิด PET12/DL/MOTT ALU9/DL/NY15/DL/CPP70 ขนาด 1 x 2 นิ้ว ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ แล้วโดยผสมเซลล์ ยีสต์เข้มข้นให้มีอัตราส่วน 8 log CFU/ml ของสาร protectant โดยใช้สาร protectant 3 ชนิดคือ กลีเซอรอล 10%(v/v) (Fonseca และคณะ, 2006) น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1%(w/v) (ดัดแปลงจาก Thepsingha, 1997) และ soy protein isolate 8%(w/v) โดยทำการบรรจุในตู้ปลอดเชื้ อ แล้วปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกแบบ บาร์ร้อน (Bar Sealer) นำถุงเซลล์เข้มข้นเก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (Fonseca และคณะ, 2006) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) และอุณหภูมิแช่เย็น (4°C) (ดัดแปลงจาก Yuan และ Bellgardt, 1994) ติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลล์เข้มข้นดังต่อไปนี้

1. การปนเปื้อนจากยีสต์ รา ด้วยวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) และการปนเปื้อนจาก coliforms และ *E. coli* ด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วย 3M Petrifilm™ (Minisota, USA)

2. อัตราการรอดชีวิต ด้วยการตรวจวัดจำนวนประชากรยีสต์ที่มีชีวิตตามวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005)

3. อัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) โดยนำเซลล์เข้มข้นมาเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และติดตามอัตราการเจริญตามวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005) และประเมินอัตราการเจริญโดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์

4. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ

ติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลล์เข้มข้นโดยในเดือนแรกจะตรวจสอบทุกสัปดาห์ และในเดือนที่สอง ตรวจสอบเฉพาะสัปดาห์ที่ 4

เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเซลล์เข้มข้นในระหว่างการเก็บนำเซลล์เข้มข้นไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์และรูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.8 ทดสอบประสิทธิภาพการหมักโมโรมิของหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น

นำเซลล์เข้มข้นที่ได้จากสภาวะการผลิตและการเก็บที่ดีที่สุดจากข้อ 3.7 มาทดสอบ

ประสิทธิภาพการหมักโมโรมิเปรียบเทียบกับหัวเชื้อสดซึ่งเตรียมจากการเพาะเลี้ยงด้วยรูปแบบเดียวกัน โดยนำถุงหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็ บในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.7 กับหัวเชื้อสดมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ เซลล์ในน้ำซีอิ๊วดิบปลอดเชื้อที่มีเกลือเข้มข้น 10%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ แล้ว โดยมีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5 log CFU/ml เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศด้วยการเขย่าแบบ orbital shaking ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้จำนวนเซลล์สุดท้าย 8 log CFU/ml ก่อนนำไปหมักโมโรมิที่มีเกลือเข้ มข้น 15%(w/v) (เป็นสภาวะจำลอง) โดยมีเซลล์เริ่มต้น 6 log CFU/ml ติดตามการเปลี่ยนแปลงหลังจากหมักเป็นเวลา 1 เดือน ดังต่อไปนี้

1. จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ตามวิธี Yeast mold count (AOAC, 2005)
2. ค่าความเป็นกรด-ด่างโดยเครื่อง pH meter
3. ปริมาณเกลือในน้ำหมักโดยวิธีของ Mohr (AOAC, 2005)
4. ปริมาณเอทานอลด้วย Gas chromatography ตามสภาวะของ Limthong และคณะ (2007)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการผลิตหัวเชื้อยีสต์ *Z. rouxii* เข้มข้นที่ยังแอคทีฟสำหรับใช้ในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดย ศึกษารูปแบบการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและวิธีการทำให้เข้มข้นเพื่อใช้สำหรับการเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่สามารถเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีปริมาณเกลือสูงได้ และศึกษาสภาวะการเก็บหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นและอายุการเก็บที่เหมาะสม เพื่อลดขั้นตอนการเตรียม starter สำหรับการหมักโมโรมิ

4.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำซีอิ๊วดิบ

ผลการวิเคราะห์สมบั ติของน้ำซีอิ๊วดิบ ที่ใช้ในการวิจัยนี้ พบว่า มีเกลือเป็น องค์ประกอบ 17.55%(w/v) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.50 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2.50%(w/v) 1.32%(w/v) และ 2.50%(w/v) ตามลำดับ และมีปริมาณเอทานอล 3.75% และยังพบกรดในน้ำซีอิ๊วดิบที่ คำนวณในรูปของกรดแลคติก ได้เท่ากับ 2.25%(v/v) ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนการหมักโมโรมินั้นแลกติคแบคทีเรีย มีบทบาทสำคัญทำให้ได้กรดแลกติกเป็นผลผลิต มีผลให้ค่า pH มีค่าประมาณ 4.50 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีส ต์และดำเนินกิจกรรมในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (Luh, 1995)

จากข้อมูลองค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วดิบที่ได้ จึ งนำมาใช้พิจารณาปรับความเข้มข้นของน้ำซีอิ๊วดิบเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Z. rouxii* ในการผลิตเซลล์เข้มข้น โดยปรับน้ำซีอิ๊วดิบให้มีปริมาณเกลือ 10% (สภาวะที่โรงงานผลิตซี อิ๊วแนะนำให้ใช้) เพื่อนำไปใช้สำหรับเป็ นอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจึงทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำซีอิ๊วดิบลดลงเป็น 1.50%(w/v) 0.75%(w/v) และ 1.50%(w/v) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วดิบ (ss)

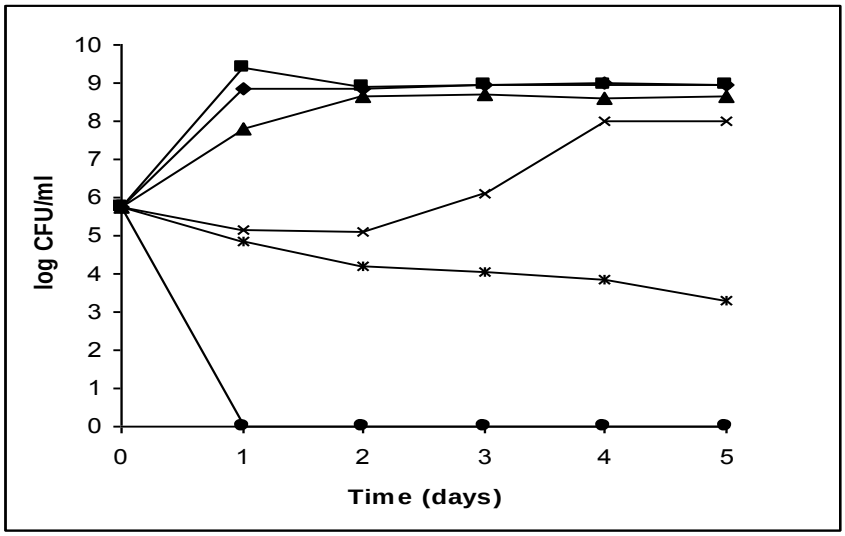
องค์ประกอบ	ss เริ่มต้นมีเกลือเข้มข้น 17% (w/v)	ss ปรับให้มีเกลือเข้มข้น 10% (w/v)
pH	4.50	4.50
ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	2.50%(w/v)	1.50%(w/v)
ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้(กรดแลกติก)	2.25%(v/v)	1.55%(v/v)
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	2.50%(w/v)	1.50%(w/v)
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	1.32%(w/v)	0.75%(w/v)
ปริมาณเอทานอล	3.75%	2.05%

4.2 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ *Z. rouxii* เพื่อใช้ผลิตเซลล์เข้มข้น

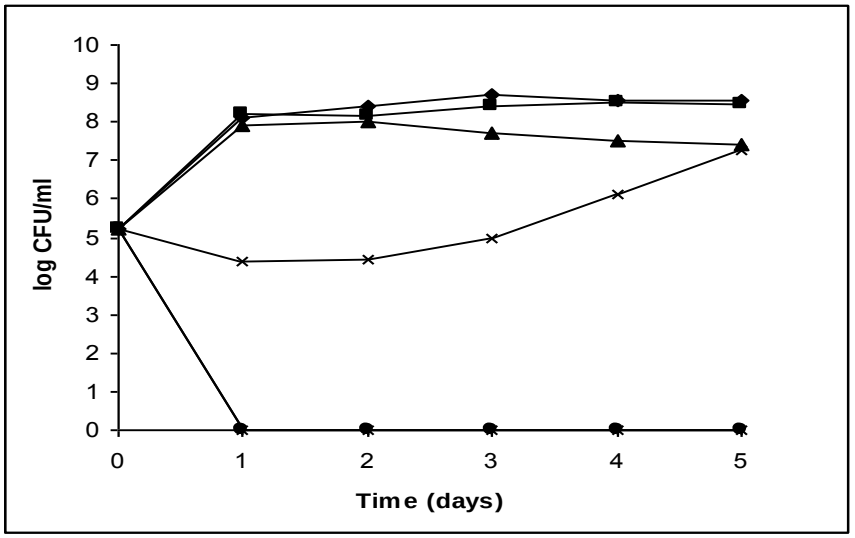
Z. rouxii เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว เพราะเป็นยีสต์ทนเกลือที่มีหน้าที่ผลิตแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสในขั้นตอนการหมักโมโรมิ (Luh, 1995) *Z. rouxii* สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารที่ไม่มีเกลือ และอาหารที่มีเกลือ (Kurtzman และ Fell, 1998) และแต่ละสายพันธุ์จะทนเกลือได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน (Kurtzman และ Fell, 1998; Devahuti, 1978; Fukushima, 1989) สำหรับในการทดลองนี้จะทดสอบการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 กับ *Z. rouxii* TISTR 5058 ซึ่งเป็นตัวแทนของสายพันธุ์ยีสต์ที่นิยมใช้ในขั้นตอนการหมักโมโรมิสำหรับการผลิตซีอิ๊ว (Hamada และคณะ, 1991; Luh, 1995; Thepsingha, 1997) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YM broth ที่มีปริมาณเกลือแตกต่างกันคือ 0%, 1%, 5%, 10%, 15% และ 20%(w/v) เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในเกลือที่มีความเข้มข้นสูงกว่าได้ และจะใช้เป็นยีสต์สำหรับทดลองผลิตเซลล์เข้มข้นตลอดการทดลอง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* TISTR 5044 ใน YM broth ที่ไม่เติมเกลือและที่มีเกลือ 1% จะได้จำนวนเซลล์สูงถึง 8.83 log CFU/ml และ 9.40 log CFU/ml ตามลำดับ ภายในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะคงที่ไปตลอดกา รเพาะเลี้ยง และเมื่อเพาะเลี้ยงใน YM broth ที่มีเกลือ 5% ต้องใช้เวลาถึง 2 วันจึงจะมีจำนวนเซลล์ถึง 8.63 log CFU/ml ส่วนการเพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 10% จำนวนเซลล์จะลดลงในช่วงแรก และค่อยๆปรับตัวจนเจริญได้ถึง 8.02 log CFU/ml ในวันที่ 4 แต่ใน YM broth ที่มีเกลือ 15% จำนวนเซลล์จะลดลงตั้งแต่วันที่ 1 และลดลงอย่างต่อเนื่อง

ตลอดการเพาะเลี้ยง ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงใน YM broth ที่มีเกลือ 20% จะตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตตลอดการเพาะเลี้ยง สำหรับ *Z. rouxii* TISTR 5058 จะเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่ไม่เติมเกลือและที่มีเกลือ 1% เหมือนสายพันธุ์แรกโดยเจริญได้สูงถึง 8.10 log CFU/ml และ 8.21 log CFU/ml ตามลำดับ ภายในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แต่พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้แม้จะเจริญได้ดีใน YM broth ที่มีเกลือ 5% มีจำนวนเซลล์ 8.03 log CFU/ml ภายในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% จำนวนเซลล์จะลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วน การเพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 10% นั้น จำนวนเซลล์จะลดลงในช่วงแรกเช่นเดียวกันกับสายพันธุ์แรก แต่สามารถปรับตัวเจริญได้ถึง 7.29 log CFU/ml ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งใช้ระยะเวลานานกว่าและได้จำนวนเซลล์ต่ำกว่าสายพันธุ์แรก และเมื่อเพาะเลี้ยงใน YM broth ที่มีเกลือ 15% และ 20% จะตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตตลอดการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 4.2 จะเห็นว่า *Z. rouxii* ทั้งสองสายพันธุ์จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 1% ซึ่งเป็นสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ *Z. rouxii* เจริญได้เป็นปกติและแม้จะเติมเกลือ 1% ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นเกลือที่น้อยมาก ยีสต์ก็ยังคงสามารถเจริญได้ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือเป็น 5% และ 10% จำนวนเซลล์ของ *Z. rouxii* ทั้งสองสายพันธุ์จะลดลงแต่ยีสต์ยังสามารถเจริญและทนต่อสภาวะความเข้มข้นเกลือนี้ได้ แต่เมื่อเพิ่มควา มเข้มข้นเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 15% และ 20% การเจริญของยีสต์จะมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Devahuti (1978) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *Z. rouxii* เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นเกลือ 5 ถึง 10% และอัตราการเจริญจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่ออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์มีความเข้มข้นเกลือสูงกว่า 10% นอกจากนี้ยังมีรายงานกล่าวถึง *Z. rouxii* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ ไม่เติมเกลือและเพาะเลี้ยงต่อในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 18% พบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างชัดเจนตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง (Onishi, 1990)

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงคัดเลือก *Z. rouxii* TISTR 5044 สำหรับใช้ในการ ทดลองต่อไป เนื่องจากสามารถปรับตัวให้เจริญและทนอยู่ใน YM broth ที่มีเกลือ 10% ได้ดีกว่า



รูปที่ 4.1 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่ไม่เติมเกลือ (◆), เติมเกลือ 1% (■), เติมเกลือ 5% (▲), เติมเกลือ 10% (X), เติมเกลือ 15% (*) และ เติมเกลือ 20%(●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

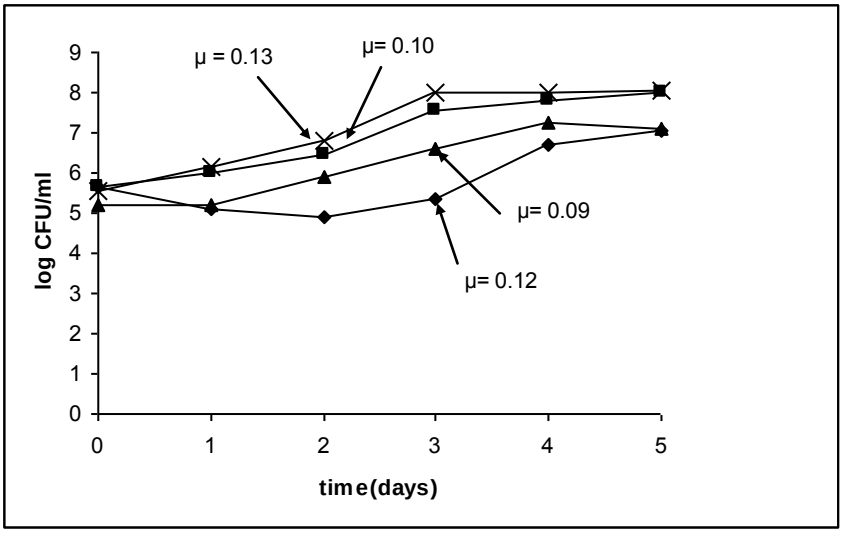


รูปที่ 4.2 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5058 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่ไม่เติมเกลือ (◆), เติมเกลือ 1% (■), เติมเกลือ 5% (▲), เติมเกลือ 10% (X), เติมเกลือ15% (*) และ เติมเกลือ 20%(●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.3 ประเมินรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น

4.3.1 รูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับใช้เตรียมเซลล์เข้มข้น

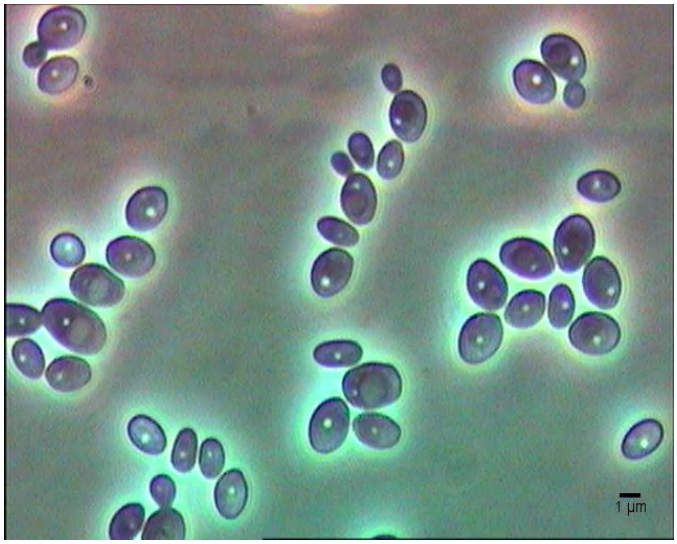
จากการศึกษาในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ จะเห็นได้ว่ายีสต์จะสามารถเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือได้สูงสุดเพียง 10 ถึง 15% โดยที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 15% การเจริญของยีสต์มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งในความเป็นจริงนั้น ยีสต์ที่ใช้ในขั้นตอนการหมักโมโรมิจะต้องสามารถดำเนินกระบวนการหมักในสภาวะที่มีเกลือได้สูงถึง 18 ถึง 22 % (Bhumiratana และคณะ, 1988; Thepsingha, 1997) ดังนั้นในการผลิตหัวเชื้อยีสต์ *Z. rouxii* ในระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงยีสต์โดยการเพิ่มความเข้มข้นเกลือในระหว่างการขยายขนาดหัวเชื้อ (scale up) ในแต่ละรุ่นของการเพาะเลี้ยงให้เพียงพอต่อการหมัก ซึ่งจะเป็นการสร้างความคุ้นเคยต่อเกลือให้กับยีสต์ เพื่อให้สามารถปรับตัวเข้ากับความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้นได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงประเมินหารูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* เพื่อเตรียมเป็นเซลล์เข้มข้นที่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้นสูงได้ ในการทดลองนี้เลือกประเมินที่ความเข้มข้นเกลือ 10% (สภาวะตามข้อแนะนำจากโรงงานผลิตซีอิ๊ว) กล่าวคือ แบบที่ 1 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 1% แบบที่ 2 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% แบบที่ 3 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 แล้วเลี้ยงต่อใน YM broth ที่มีเกลือ 10% ในรุ่นที่ 2 และแบบที่ 4 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5 % ในรุ่นที่ 2 จากนั้นนำคัลเจอร์ที่ได้จากทั้ง 4 แบบไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่า ยีสต์ที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงแต่ละแบบจะสามารถเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้ต่างกัน โดยจะเห็นว่ายีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแบบที่ 1 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% จำนวนเซลล์จะลดลงจากค่าเริ่มต้นในวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 และจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 6.70 log CFU/ml โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.12 generation/hour ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในแบบที่ 2 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ยีสต์จะสามารถเจริญและปรับตัวได้ โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 7.54 log CFU/ml ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่า μ เท่ากับ 0.10 generation/hour ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในแบบที่ 3 เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ยีสต์จะมีช่วง log phase นานขึ้นโดยได้จำนวนเซลล์สูงสุด 7.23 log CFU/ml ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ มีค่า μ เท่ากับ 0.09 generation/hour และแบบที่ 4 ยีสต์จะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด ได้จำนวนเซลล์สูงสุดที่ 7.98 log CFU/ml ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงและมีค่า μ เท่ากับ 0.13 generation/hour



รูปที่ 4.3 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 แบบคือ แบบที่ 1 (◆) แบบที่ 2 (■) แบบที่ 3 (▲) แบบที่ 4 (X) ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

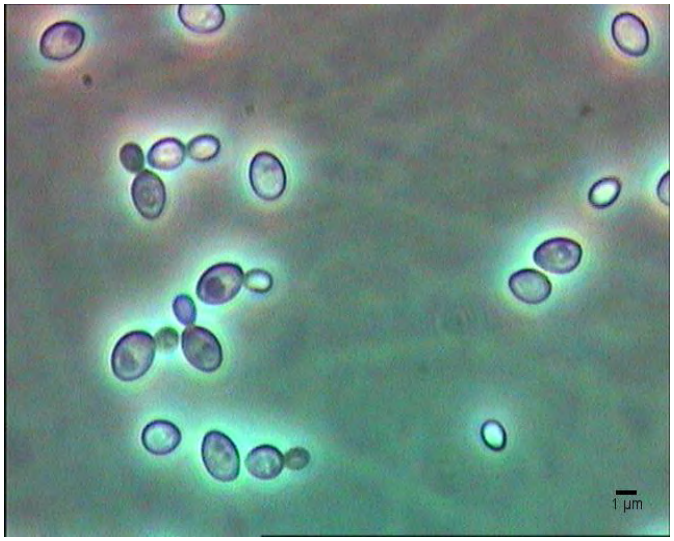
จากผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 4 แบบดังกล่าวข้างต้น พบว่าลักษณะการเจริญของยีสต์ซึ่งพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่ได้และค่า specific growth rate (μ) จะมีความแตกต่างกัน โดยที่การเพาะเลี้ยงยีสต์ในแบบที่ 4 จะได้จำนวนเซลล์และมีค่า μ สูงที่สุด ดังนั้นในการเพ าะเลี้ยงยีสต์ทั้ง 4 แบบแล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% นั้น ซึ่งในการประเมินคุณสมบัติของหัวเชื้อนั้น เซลล์ที่ได้จะต้องมีความสมบูรณ์และมีสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมและยังคงแอคทีฟ (นภา โล่ห์ทอง , 2537; Stanbury, 1999; สาวิตรี ลิ่มทอง , 2549) จึงต้องมีการศึกษาติดตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ในแต่ละขั้นตอนระหว่างการเพาะเลี้ยงแต่ละแบบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ พบว่า ยีสต์ ที่เจริญใน YM broth ไม่เติมเกลือและมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เซลล์ยีสต์จะมีรูปร่างกลม ใหญ่ หรือรูปร่ างไข่ ซึ่งเป็นสภาวะปกติของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์นี้ ดังแสดงในรูปที่ 4.4 แต่เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบที่ 1 คือใน YM broth ที่มีเกลือ 1% เซลล์ยังคงมีลักษณะไม่แตกต่าง จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ เนื่องจากที่สภาวะความเข้มข้นเกลือ 1-2% นี้ยังคงเป็นสภาวะที่ยีสต์สามารถเจริญได้ จึงมีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะปกติ (Kurtzman และ Fell, 1998) แต่เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เซลล์จะมีรูปร่างเรียว ลีบ และมีขนาดเล็กลง (ดังแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.1 และ ค.2 ตามลำดับ) ส่วนยีสต์ที่เพาะเลี้ยงแบบที่ 2 คือ เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่1 เซลล์จะมีรูปร่างเรียว ลีบลง และมีลักษณะไม่สมมาตร และ เมื่อ นำไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เซลล์ยังคงมีรูปร่างเรียว และลีบ

เช่นเดียวกัน (ดังแสดงใน ภาคผนวก ค รูปที่ ค.3 และ ค .4 ตามลำดับ) สำหรับ เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงแบบที่ 3 คือ เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 เซลล์จะมีรูปร่างเรียว ลีบลง และมีลักษณะไม่สมมาตร และเลี้ยงต่อใน YM broth ที่มีเกลือ 10% ในรุ่นที่ 2 เซลล์ยังคงมีรูปร่างเรียว ขนาดเล็กกว่าในสภาวะปกติ แต่เมื่อนำไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มี เกลือเข้มข้น 10% ยีสต์จะมีรูปร่างกลมขึ้น เนื่องจากปรับตัว คุ้นเคยกับความเข้มข้นเกลือ 10% มาแล้ว แต่จะใช้ร ะยะเวลาในการเจริญช่วง log phase นานขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้องอยู่ในสภาว ะที่แหล่งอาหารไม่สมบูรณ์เท่ากับในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth และต้องปรับตัวให้รอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (ดังแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.5 ค.6 และ ค.7 ตามลำดับ) ส่วนเซลล์ยีสต์ที่ เพาะเลี้ยงแบบที่ 4 ซึ่งเป็นรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุดสำหรั บใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อเตรียมเซลล์เข้มข้น คือ เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 เมื่อได้มีการติดตามศึกษาถึง การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงด้วยรูปแบบนี้ จะพบว่าเมื่อเลี้ยงใน YM broth ที่มีเกลือ 5% เซลล์มีรูปร่างเรียว ลีบลง และมีลักษณะไม่สมมาตร เมื่อนำไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% เซลล์ยีสต์จะมีรูปร่างกลมเหมือนเจริญในอาหารที่ไม่เติมเกลือ เนื่องจาก ยีสต์สามารถป รับตัวได้แล้ว ทำให้เมื่อเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ยีสต์จึงสามารถเจริญและปรับตัวอยู่ ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ถึง 4.9 แสดงให้เห็นว่า รูปแบบการเพาะเลี้ยงที่มีการสร้างความคุ้นเคยต่อเกลือให้กับยีสต์ โดยเลี้ยงยีสต์รุ่นที่ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญ แต่เพิ่มปริมาณเกลือเป็น 5% เพื่อให้ยีสต์เจริญภายใต้ภาวะเครียดจากความเข้มข้นเกลือเพียงอย่างเดีย ว ซึ่งจะทำให้ยีสต์ค่อยๆปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นเกลือ 5% ได้ จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อในรุ่นที่ 2 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มี เกลือเข้มข้น 5% ยีสต์จะต้องปรับตัวภายใต้ภาวะเครียดจากน้ำซีอิ๊วดิบ แต่เนื่องจากยีสต์ได้ปรับตัวให้ทนต่อเกลือ 5% มาก่อนแล้ว ทำให้ยังคงเจริญในน้ำซี อิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5%ได้ มีรายงานว่ายีสต์กลุ่ม halotolerant มีกลไกการปรับตัวในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสู งด้วยการขับ Na^+ ออกจากเซลล์ผ่านทาง Na^+/H^+-antiporter โดยแรงขับของ H^+-gradient ที่เกิดจากกลไกของ plasma membrane H^+-ATPase รวมถึงลดการ influx Na^+ เข้าสู่เซลล์ (Nishi และ Yagi, 1995; Watanabe และคณะ ,1995; Prista และคณะ, 1997; Watanabe และคณะ, 1999; Watanabe และคณะ, 2003) จากเหตุผลดังกล่าว เมื่อนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากรุ่นที่ 2 ของแบบที่ 4 ไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ในรุ่นต่อไป ยีสต์จึงสามารถทนต่อ น้ำซีอิ๊วดิบและปรับตัว เข้ากับน้ำซีอิ๊วดิบที่มีความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่าเซลล์ที่เตรียมจากรูปแบบอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ

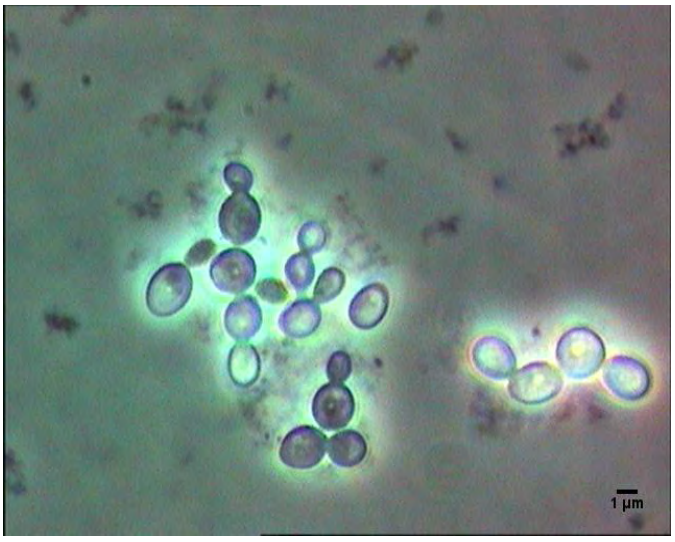


รูปที่ 4.4 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

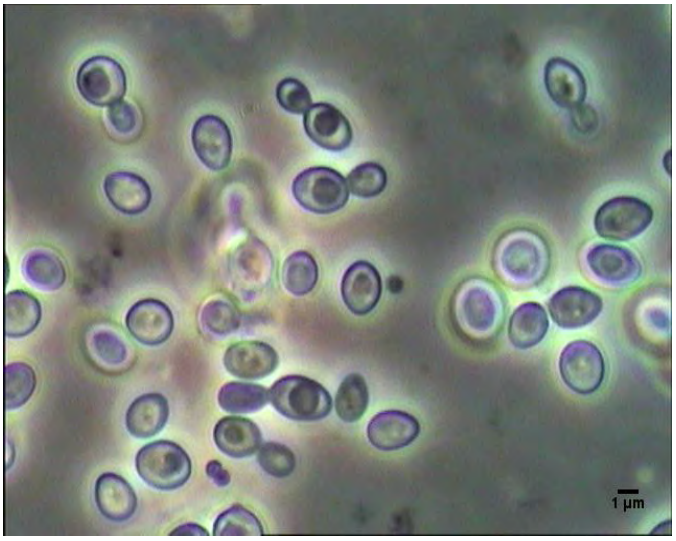
รูปที่ 4.5 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า



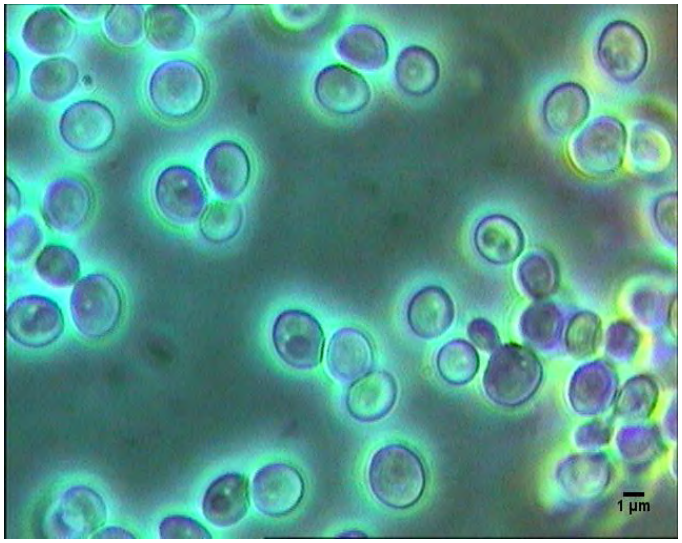
รูปที่ 4.6 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 4.7 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า



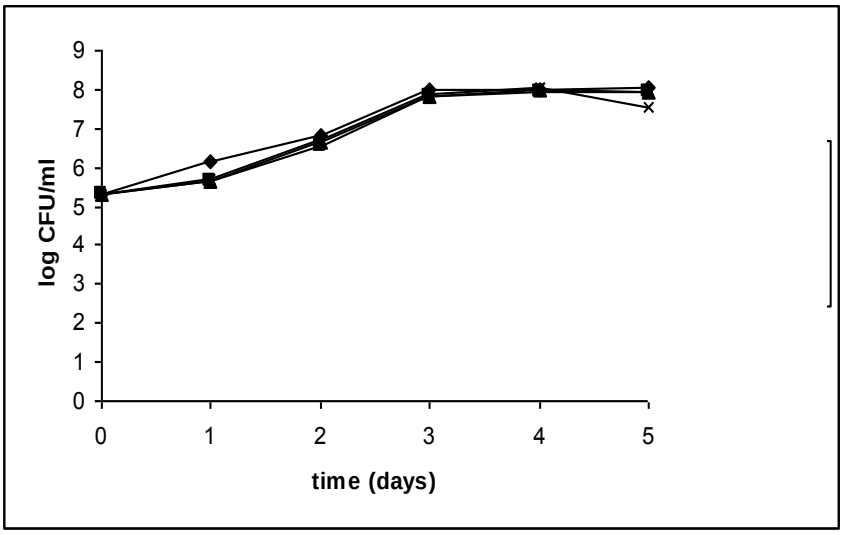
รูปที่ 4.8 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ 4.9 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

4.3.2 ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลต่ออัตราการเจริญของ *Z. rouxii* ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%

ยีสต์ *Z. rouxii* จะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก (Kurtzman และ Fell, 1998; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) สำหรับในกระบวนการหมักอาหารที่ไม่มีเกลือนั้น ยีสต์ *Z. rouxii* จะใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสเพื่อการผลิตแอลกอฮอล์ แต่ถ้าอยู่ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวสำหรับการดำเนินกิจกรรมการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ (Thepsingha, 1997) และเนื่องจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตซีอิ๊วจะมีการเติมน้ำตาลลงไปให้มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 6 ถึง 8% (ข้อมูลจากผู้ผลิตซีอิ๊ว) ดังนั้นจึงมีการศึกษาผลของการเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนให้ยีสต์ ว่าจะมีต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของยีสต์หรือไม่ จากการทดลองในข้อ 4.3.1 จะพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากแบบที่ 4 เซลล์ยีสต์ที่ได้จะสามารถเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้ดีกว่าแบบอื่นๆ และจำนวนเซลล์สูงสุดที่เลี้ยงได้คือ 7.98 log CFU/ml สำหรับในการทดลองนี้จึงดำเนินการโดยทดลองเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ คือ น้ำตาลกลูโคส ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากแบบที่ 4 โดยแปรปริมาณน้ำตาลเป็น 1.5%, 2.5%, 5% และ 7.5%(w/v) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาล กลูโคส อัตราการเจริญของยีสต์ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และในช่วงวันที่ 5 การเจริญของยีสต์ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีปริมาณน้ำตาล 7.5% จะลดลงหรือเซลล์เริ่มตายลง แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ไม่ได้ใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีอยู่ 1.5% มีความเพียงพอต่อการเจริญของยีสต์แล้ว และในสภาวะที่ยีสต์เจริญภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ยีสต์จะมีการปรับตัวให้มีภาวะสมดุลกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์โดยใช้แรงขับจากโปรตอนปั๊ม (H^+-pump) ที่ plasma membrane ซึ่งอาจมีผลต่อการนำเข้าของสารอาหารและแมทาบอลิซึ่ม และเมื่อยีสต์เจริญในที่ที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูง หน้าที่ของไมโตคอนเดรียจะถูกกดดันที่เรียกว่า อิทธิพลแคร็บทรี (crabtree effect) หรืออิทธิพลกลูโคส (glucose effect) หรือการกดดันจาก catabolite repression ทำให้ยีสต์มีการหายใจลดลง การเจริญของยีสต์จึงลดลง หรือทำให้เซลล์ตาย (Walker, 1998; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ดังนั้นถ้าวัตถุดิบที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์มีปริมาณน้ำตาลถึง 1.5% แล้ว ในกระบวนการผลิต หัวเชื้อยีสต์จึงไม่ต้องเติมน้ำตาลลงไปเพิ่มในระหว่างกระบวนการผลิต ทั้งยังเป็นการช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและลดต้นทุนการผลิต



รูปที่ 4.10 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* TISTR 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น10% และแปรปริมาณน้ำตาลเป็น 1.5% (◆), 2.5% (■), 5% (▲) และ 7.5% (x) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4.4 ศึกษาวิธีการทำให้เซลล์เข้มข้น

วิธีการเตรียมเซลล์เข้มข้นนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำเข้มข้นด้วยการตกตะกอนเซลล์ด้วยการลดอุณหภูมิ (Shen และคณะ, 2005) การตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Centrifugation) (Hamada และคณะ, 1991) การตกตะกอนเซลล์ด้วยการกรอง (Filtration) (Spencer และ Spencer, 1989) แต่วิธีที่เหมาะสมนั้นจะต้องมีร้อยละการได้กลับ (% Cell recovery) ของเซลล์สูง รวมทั้งเซลล์ที่ได้ยังคงมีชีวิตและยังคงมีประสิทธิภาพในการหมัก โดยการทดลองนี้จะทดสอบประสิทธิภาพของการทำให้เซลล์ยีสต์เข้มข้นด้วยการตกตะกอนเซลล์ 2 วิธี คือ การตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็วรอบ 10000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Hamada และคณะ, 1991) และการตกตะกอนเซลล์ด้วยวิธีการลดอุณหภูมิของน้ำหมัก (coagulation) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Shen และคณะ, 2005) ซึ่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนี้จะเป็นสภาวะที่ยีสต์หยุดการเจริญและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ เซลล์ยีสต์จึงตกตะกอนลงมาจับกลุ่มรวมตัวกันได้

ผลการทดลองพบว่า วิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge สามารถทำให้เซลล์ตกตะกอนได้มากกว่า โดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่า และเซลล์ยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า โดยมีร้อย

ละการได้กลับของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 98.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการทำ เซลล์เข้มข้นด้วยการลดอุณหภูมิน้ำหมัก อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่มีร้อยละการได้กลับของเซลล์ที่มีชีวิ ตเท่ากับ 95.53 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ดังนั้นการทำเข้มข้นด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการนำไ ปใช้ในการผลิตเซลล์เข้มข้นต่อไป แต่สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมที่ไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวได้ เนื่องจากเครื่อง centrifuge มีราคาสู ง ก็สามารถตกตะกอนเซลล์ด้วยการทำเข้มข้นด้วยการลดอุณหภูมิน้ำหมักได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการได้กลับของเซลล์จากการทำเข้มข้น

วิธีการทำเข้มข้น	ร้อยละการได้กลับของเซลล์ที่รอดชีวิต
การปั่นเหวี่ยง	$98.65^{b} \pm 0.10$
การลดอุณหภูมิของน้ำหมัก	$95.53^{a} \pm 0.08$

[a,b] ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันระหว่างแถวแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

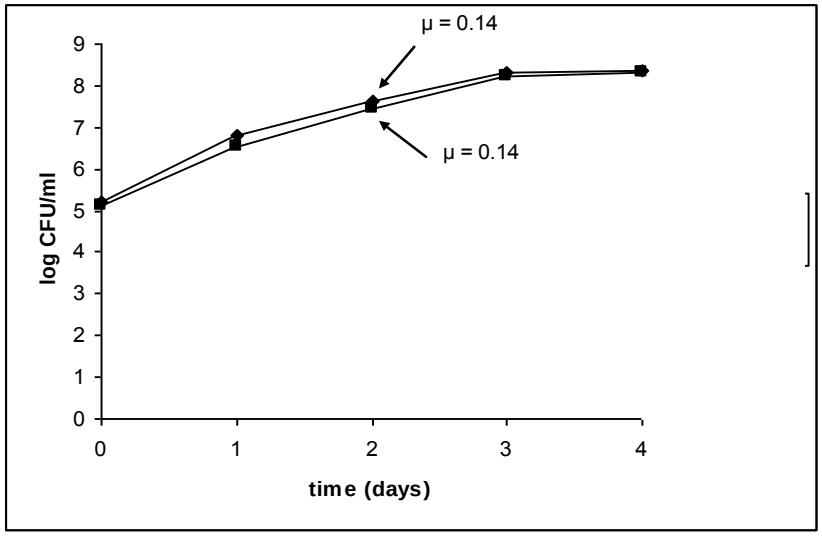
4.5 ศึกษาการเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีน้ำซีอิ๊วดิบ ซึ่งมีเกลือเข้มข้น 10% เป็นวัตถุดิบ และใช้เซลล์ยีสต์เข้มข้น ที่เพิ่มรุ่นการเลี้ยงด้วยน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเชื้อเริ่มต้น

จากผลการทดลองรูปแบบการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่ได้คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากแบบที่ 4 จะนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ มาทำให้เข้มข้นก่อนด้วยการปั่นเหวี่ยง แล้วเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ซึ่งในขั้นตอนนี้จะต้องเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก ที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เพื่อเพิ่มจำนวน เซลล์ยีสต์ อีกขั้นตอนหนึ่งก่ อนนำไปใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิ ในการทดลองนี้ต้องการที่จะประเมินว่า หากเพิ่มรุ่นการเลี้ยงเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ในขวดรูปชมพู่ก่อนเพื่อสร้างความคุ้นเคยต่อเกลือ 10% ให้กับยีสต์ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณในถังปฏิกรณ์การหมัก และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และในถังปฏิกรณ์การหมัก พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีอาหารเลี้ ยงเชื้อเป็นน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้ม ข้น 10% จะมีอัตราการเจริญสูง กว่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงยีสต์

ด้วยรูปแบบที่ 4 แล้วเลี้ยง ต่อในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน โดยจะมีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.14 และ 0.13 generation/hour ตามลำดับ และได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 8.31 log CFU/ml และ7.99 log CFU/ml ตามลำดับ ภายในระยะเวลา 3 วัน ทั้งนี้เนื่องจากในถังปฏิกรณ์การหมักมีระบบการควบคุมสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น การให้อากาศ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จึงทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงขึ้นดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Reyes และคณะ (2003) ที่พบว่าการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ ในถังปฏิกรณ์การหมักจะให้ค่าอัตราการเจริญสูงกว่าที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ เช่นเดียวกับ Vandenberghe และคณะ (2004) ที่พบว่าการผลิตกรดซิตริกด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* LPB21 ในถังปฏิกรณ์การหมักจะให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ทำให้ยีสต์ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญอยู่ได้ และถ้ามีการสร้างความคุ้นเคยให้กับยีสต์อีกครั้ง อาจทำให้ยีสต์ใช้เวลาในการปรับตัวและเพิ่มจำนวนได้เร็วขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาว่า การเพิ่มรุ่นการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในถังปฏิกรณ์การหมัก จะทำให้ยีสต์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนปริมาณมากในระยะเวลาสั้นขึ้นหรือไม่ จากรูปแบบการผลิตเซลล์ที่ทำให้ยีสต์สามารถทนเกลือความเข้มข้นสูง 10% ได้ ซึ่งก็คือการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่ 4 จึงทดลองนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 (แบบ A) และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% (แบบ B) ทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แล้วนำเซลล์เข้มข้นที่ได้ มาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีน้ำตาล 1.5% ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์สำหรับผลิตหัวเชื้อในการหมักโมโรมิโดยทั่วไป ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบ A และแบบ B ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือได้จำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 8.31 log CFU/ml และ 8.26 log CFU/ml โดยมีค่า specific growth rate (μ) เท่ากันคือ 0.14 generation/hour ภายในระยะเวลา 3 วัน แสดงให้เห็นว่า การสร้างความคุ้นเคยให้ยีสต์ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นเดียวกันอีกขั้นตอนหนึ่งไม่ได้จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์เข้มข้น อาจเนื่องจากเซลล์ยีสต์สามารถปรับตัวจากการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% และ 10% ได้ และในการเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ซ้ำอีกครั้งนั้นเซลล์ยีสต์ได้ปรับตัวให้เจริญได้ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้มาก่อนแล้วในระดับสูงสุดที่เซลล์ทำได้ (maximum level) แล้วจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นได้อีก ดังนั้น การเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยแบบที่ 4 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นเซลล์เข้มข้นสำหรับใช้ในการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องเพิ่มรุ่นการเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ

10% ก่อน ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและพลังงานที่ใช้ในการเตรียมเซลล์เข้มข้นสำหรับผลิตหัวเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักได้อีกด้วย



รูปที่ 4.11 อัตราการเจริญของ *Z.rouxii* TISTR 5044 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ A (◆) และ แบบ B (■) แล้วเพาะเลี้ยงต่อในถังปฏิกรณ์การหมักที่มีน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 1.5% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.6 ศึกษาสภาวะและอายุการเก็บหัวเชื้อเข้มข้น

เมื่อได้วิธีการผลิตเซลล์เข้มข้น คือ การเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 แล้วเลี้ยงต่อด้วยน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 แล้วทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 10000xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเซลล์เข้มข้นที่ได้ในถุง aluminium retort pouch ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้เป็นอย่างดี (ปุ่น และ สมพร, 2541) เพื่อป้องกันถุงบวมหรือแตกจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการใช้อ๊อกซิเจนของยีสต์ โดยใช้สาร protectant 3 แบบคือ กลีเซอรอล 10%(v/v) น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1%(w/v) และ soy protein isolate 8%(w/v) ในอัตราส่วน 8 log CFU/ml ของสาร protectant และเก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 3 แบบ คือ อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) และอุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ประเมินอายุการเก็บโดยติดตามการปนเปื้อนจากยีสต์ รา coliforms และ *E. coli* ติดตามจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและติดตามอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%

ผลการทดลองพบว่า ไม่พบการปนเปื้อนจากยีสต์ รา coliforms และ *E. coli* ในหัวเชื้อที่ผลิต ซึ่งการตรวจไม่พบการปนเปื้อนจากยีสต์ รา coliforms และ *E. coli* ทำให้เห็นว่าวิธีที่ใช้ในการผลิตและการบรรจุหัวเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นหัวเชื้อที่มีความบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงสุขลักษณะที่ดีในระหว่างการผลิตและหลังการผลิตถุงเซลล์เข้มข้น (O' Brien และคณะ, 2004)

ส่วนการติดตามจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการเก็บเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ และเก็บใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) จำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml แต่การเก็บเซลล์เข้มข้นใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) จำนวนเซลล์รอดชีวิตยังคงไม่เปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml ได้เพียงสัปดาห์ที่ 1 เท่านั้น หลังจากนั้น ในสัปดาห์ที่ 2 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลง เหลือ 7.19 log CFU/ml และเมื่อเก็บเซลล์เข้มข้นนานขึ้น จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลงเรื่อยๆ ตามลำดับ ส่วนการเก็บเซลล์เข้มข้นใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) นั้น จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะเปลี่ยนแปลงไปโดยมีค่าลดลง 1 log CFU/ml ตั้งแต่ในสัปดาห์แรกของการเก็บ หลังจากนั้นค่อนข้างจะคงที่ตลอด 4 สัปดาห์ของการเก็บ

ตารางที่ 4.3 การรอดชีวิตของเซลล์เข้มข้นในระหว่างการเก็บ

สาร protectant	อุณหภูมิการเก็บ (°C)	การรอดของเซลล์ (log CFU/ml)				
		สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
กลีเซอรอล 10%	-20	8.83^{a}±0.04	8.54^{b}±0.08	8.43^{b}±0.01	8.43^{b}±0.03	8.35^{b}±0.07
	0	8.83^{a}±0.04	8.69^{ab}±0.03	8.58^{b}±0.06	8.60^{b}±0.09	8.54^{b}±0.07
	4	8.83^{a}±0.04	8.62^{b}±0.13	8.50^{b}±0.01	8.51^{b}±0.04	8.58^{b}±0.06
น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1%	-20	8.90^{a}±0.10	8.45^{b}±0.05	8.42^{b}±0.07	8.11^{c}±0.08	8.11^{c}±0.04
	0	8.90^{a}±0.10	8.50^{b}±0.06	8.27^{c}±0.02	8.24^{c}±0.08	8.08^{d}±0.05
	4	8.90^{a}±0.10	8.57^{b}±0.02	8.62^{b}±0.04	8.61^{b}±0.10	8.50^{b}±0.11
soy protein isolate 8%	-20	8.75^{a}±0.07	8.32^{b}±0.04	7.19^{c}±0.12	7.03^{c}±0.09	6.56^{c}±0.13
	0	8.75^{a}±0.07	7.71^{b}±0.05	7.10^{c}±0.10	7.08^{c}±0.03	7.02^{c}±0.07
	4	8.75^{a}±0.07	8.39^{b}±0.08	8.25^{b}±0.06	8.34^{b}±0.13	8.33^{b}±0.06

$^{a, b, c,...}$ ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$ by Duncan's new multiply range test)

สรุปสภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้นที่มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 คือ เซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% และในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่เก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ รวมถึงเซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ส่วนสภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้นที่การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงภายในสัปดาห์ที่ 1 คือ เซลล์เข้มข้นที่เก็บ ใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) และสภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้นที่การรอดชีวิตลดลงภายในสัปดาห์ที่ 2 คือ เซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C)

จากผลการติดตามอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์เข้มข้นที่เก็บภายใต้สภาวะต่างๆ แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่สามารถนำมาใช้ในการเก็บเซลล์เข้มข้นโดยที่ยังคงรักษาเซลล์ให้รอดชีวิตอยู่ได้นานถึง 1 เดือน คือ กลีเซอรอล 10% และ น้ำซีอิ๊บดิบที่มีเกลือ 1% ภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ และ soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ซึ่งหัวเชื้อเซลล์เข้มข้นที่จะนำมาใช้ในกระบวนการหมักโมโรมินั้น นอกจากจะต้องเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิด

อื่น มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูง ไม่เปลี่ยนแปลงจากเซลล์เข้มข้นที่เก็บเริ่มต้นแล้ว ยังต้องคง ความแอคทีฟ หรือคงความสามารถใ นการเจริญ ในสับสเตร ทที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนปริมาณมากอีกขั้นตอนหนึ่งได้ด้วย นั่นคือ ในการทดลองจะต้องมีการติดตามอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิ บที่มีเกลือเข้มข้น 10% ด้วย เมื่อเก็บในสาร protectant ต่างกัน อุณหภูมิการเก็บต่างกัน และ อายุการเก็บต่างกัน เพื่อให้การคัดเลือกสภาวะการเก็บและอายุการเก็บเซลล์เข้มข้นนั้นมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการนำไปใช้

ในการติดตามอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% นั้นจะติดตามทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า ในเวลา 1 เดือน มีเพียงเซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) เท่านั้นที่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% จะมีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกับการเจริญของเซลล์เข้มข้นในสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีค่า $\mu_{เฉลี่ย}$ เท่ากับ 0.15 generation/hour แต่ในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) กับอุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นจะลดลงโดยมีค่า $\mu_{เฉลี่ย}$ ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 ของอายุการเก็บ สำหรับเซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% และในน้ำซีอิ๊ วดิบที่มีเกลือ 1% ที่ทุกสภาวะอุณ หภูมินั้น อัตราการเจริญของเซลล์เข้ม ข้นจะลดลงเช่นกัน โดยมีค่า $\mu_{เฉลี่ย}$ ลดลงตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 3 ของอายุการเก็บ โดยเมื่อนำอัตราการ เจริญของเซลล์เข้มข้นที่เก็บภายใต้สภาวะทุกสภาวะมา สร้าง กราฟจะพบลักษณะการเจริญดังแสดงในรูปที่ 4.12 ถึง 4.14

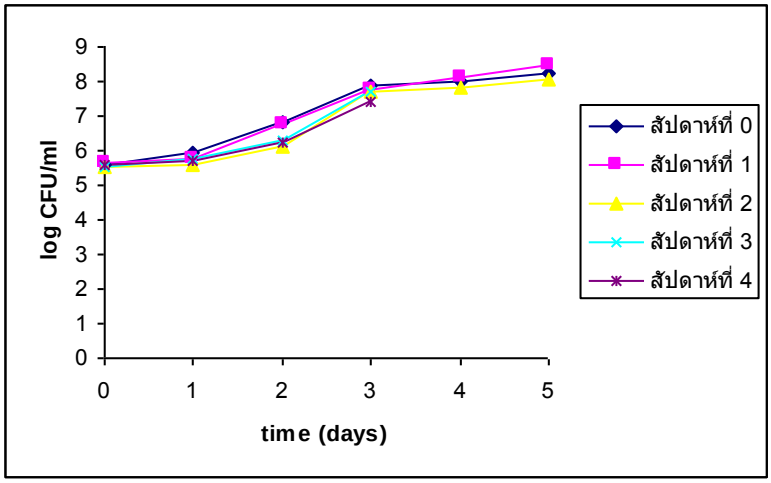
ตารางที่ 4.4 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%

สาร protectant	อุณหภูมิการเก็บ (°C)	ค่า specific growth rate (μ)				
		สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
กลีเซอรอล 10%	-20	0.14^{a}±0.01	0.14^{a}±0.03	0.13^{a}±0.01	0.13^{a}±0.01	0.11^{b}±0.00
	0	0.14^{a}±0.01	0.13^{a}±0.00	0.13^{a}±0.01	0.15^{a}±0.02	0.12^{b}±0.00
	4	0.14^{a}±0.01	0.14^{a}±0.04	0.14^{a}±0.01	0.15^{a}±0.00	0.15^{a}±0.01
น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1%	-20	0.14^{a}±0.01	0.14^{a}±0.01	0.14^{a}±0.00	0.11^{b}±0.00	0.11^{b}±0.01
	0	0.14^{a}±0.01	0.13^{a}±0.02	0.15^{a}±0.01	0.10^{b}±0.01	0.11^{b}±0.02
	4	0.14^{a}±0.01	0.13^{a}±0.01	0.15^{a}±0.01	0.10^{b}±0.04	0.09^{b}±0.01
soy protein isolate 8%	-20	0.13^{a}±0.00	0.13^{a}±0.01	0.14^{a}±0.01	0.09^{b}±0.01	0.11^{b}±0.02
	0	0.13^{a}±0.00	0.13^{a}±0.00	0.13^{a}±0.01	0.11^{b}±0.02	0.11^{b}±0.04
	4	0.13^{a}±0.00	0.14^{a}±0.04	0.14^{a}±0.00	0.11^{b}±0.01	0.09^{b}±0.01

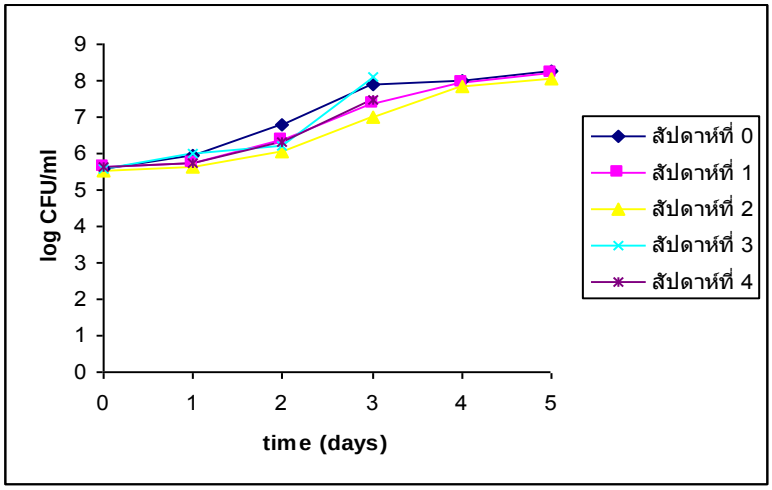
$^{a, b, c, \ldots}$ ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$ by Duncan's new multiply range test)

สำหรับสภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้นที่เมื่อติดตามอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่สัปดาห์ที่ 4 แล้วมีค่าอัตราการเจริญไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 คือ การเก็บเซลล์เข้มข้นในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) แต่สภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้นที่เมื่อติดตามอัตราการเจริญข องเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% แล้ว มีค่าลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 คือ การเก็บเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% และใน soy protein isolate 8% ที่เก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ และ อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้ น 10% จะลดลงเมื่อเก็บเซลล์เข้มข้นในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) และอุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

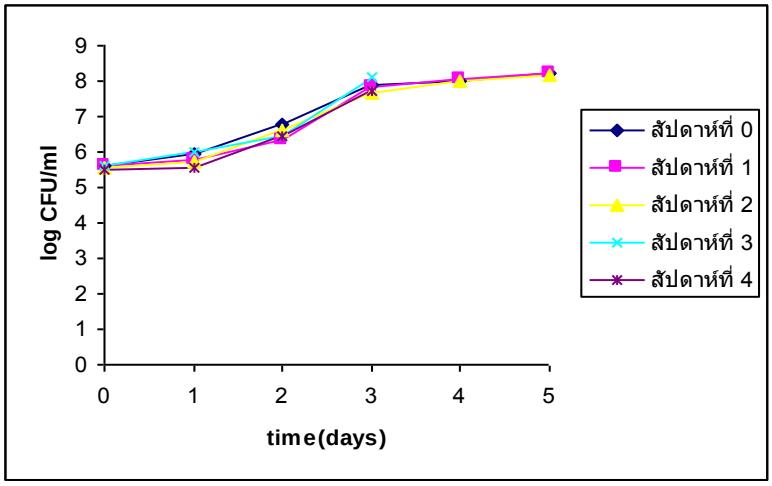
(ก)



(ข)

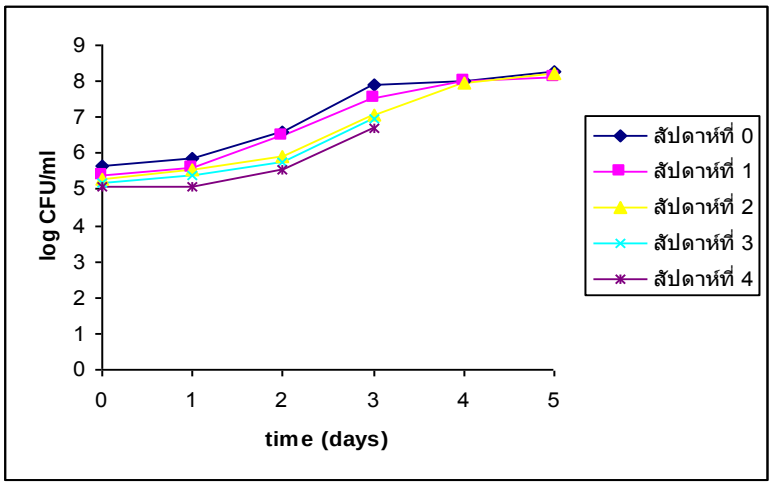


(ค)

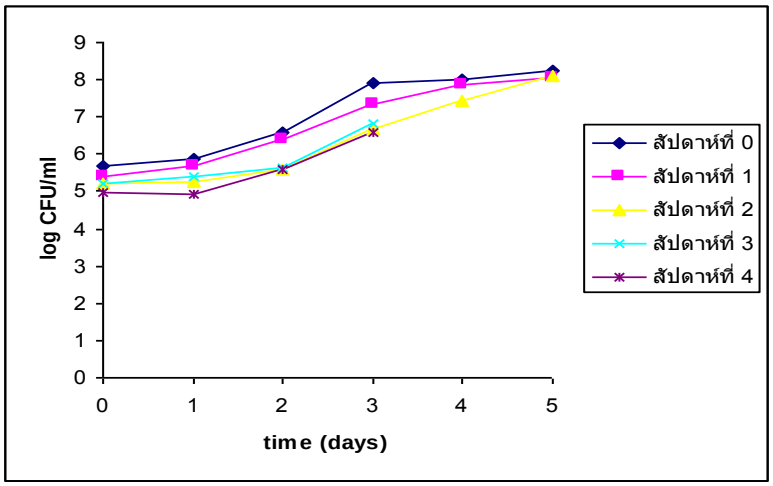


รูปที่ 4.12 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%เมื่อเก็บในกลีเซอรอล 10% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C)

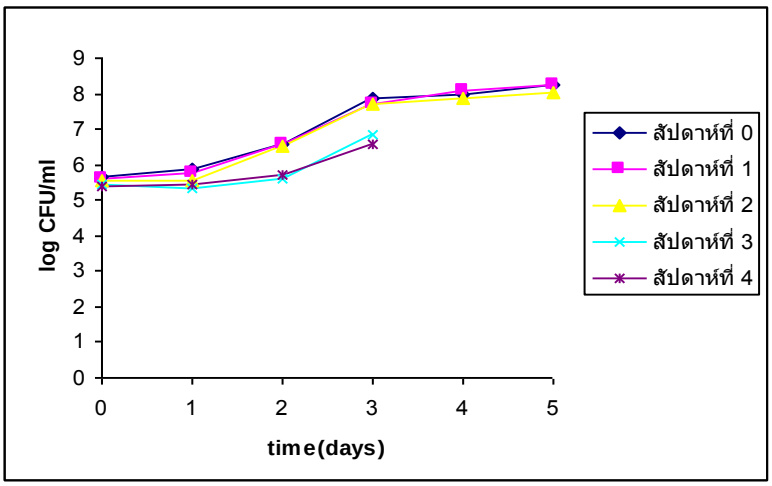
(ก)



(ข)

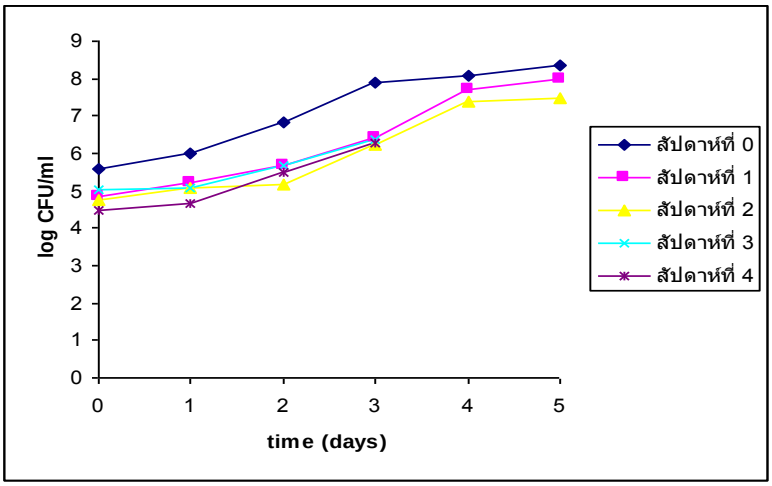


(ค)

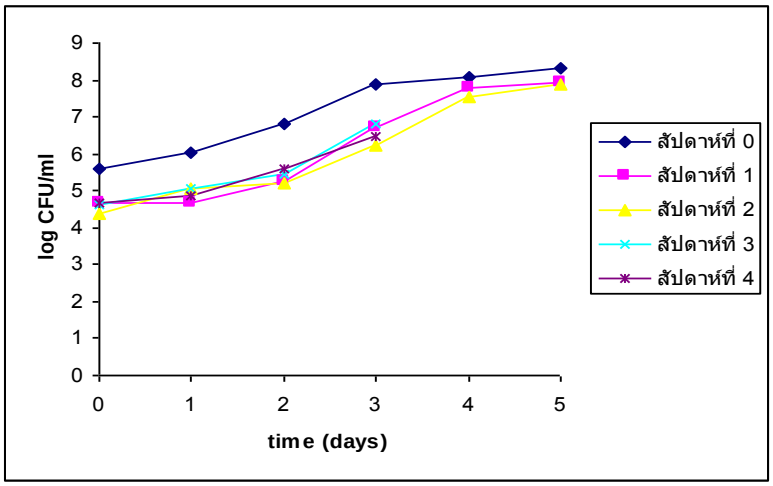


รูปที่ 4.13 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ1% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C)

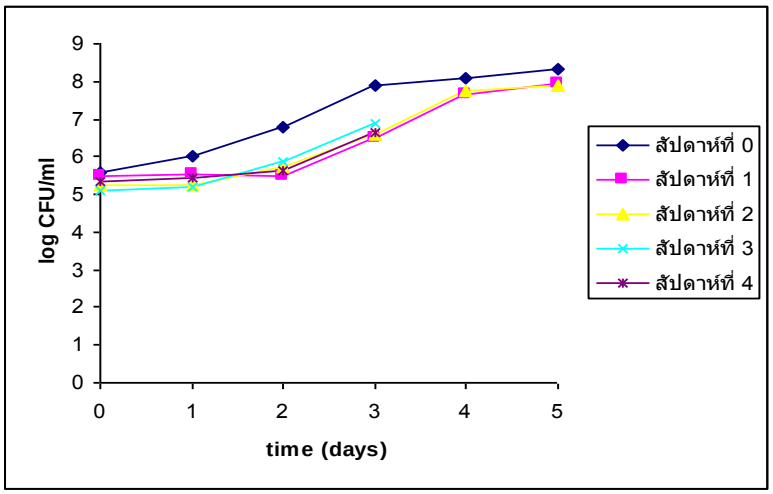
(ก)



(ข)

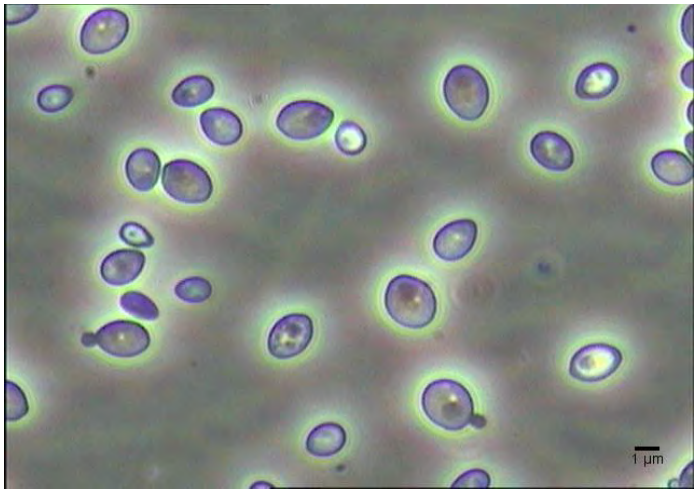


(ค)



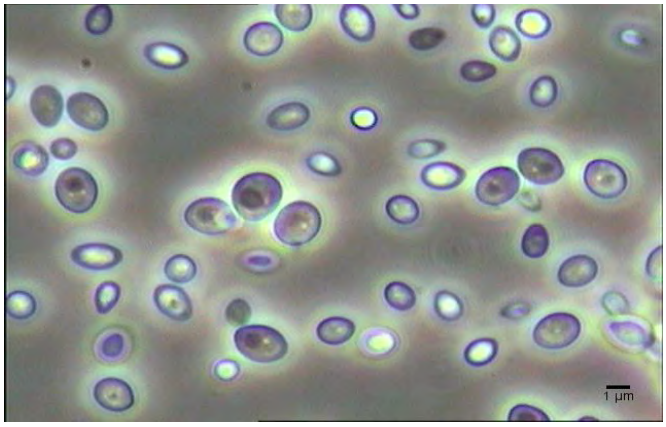
รูปที่ 4.14 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น *Z. rouxii* TISTR 5044 ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บใน soy protein isolate 8% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C)

จากผลการทดลองการติดตามจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต และการติดตามอัตราการเจริญขอ งเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% พบว่า ในบางสภาวะการเก็บที่มี จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ไม่แตกต่าง จากสัปดาห์ที่ 0 ได้แก่ การเก็บเซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% และในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่เก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ รวมถึงเซลล์เข้มข้นที่ เก็บใน soy protein isolate 8% ภายใต้อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) นั้น เมื่อนำมาทดสอบอัตราการเจริญ กลับพบว่า เซลล์เข้มข้นนั้นมีกิจกรรมการเจริญแสดงในค่าของ μ ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สำหรับการเก็บเซลล์เข้มข้นใน soy protein isolate 8% ที่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงนั้น ก็ยังพบว่า กิจกรรมหรืออัตรา การเจริญจะมีค่าลดลงด้วยเช่นกัน จึงได้มีการศึกษาสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยนำหัวเชื้อยีสต์ที่เก็บในถุงเป็นเซลล์เข้มข้นเป็น ระยะเวลา 4 สัปดาห์มาส่องกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ พบว่าเซลล์เข้มข้นที่ยังคงค่าการรอดชีวิตและอัตราการเจริญไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 ได้แก่ เซลล์ที่ เก็บ ในกลีเซอรอล 10% กับน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่เก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิจะยังคงมีรูปร่างกลม และขนาดไม่แตกต่ างกับเซลล์ที่เก็บในสัปดาห์ที่ 0 ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17 แต่เซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% ที่อัตราการรอดและอัตราการเจริญลดลงนั้นจะมีรูปร่างเรียว และมีขนาดเล็กลงแตกต่างกันกับเซลล์ในสัปดาห์ที่ 0 ดังแสดงในรูปที่ 4.18

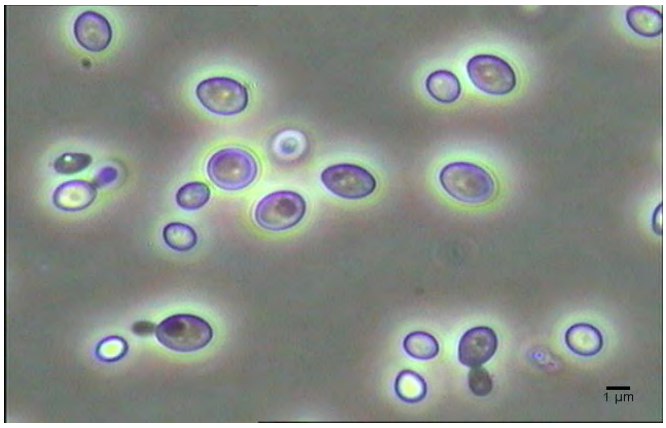


รูปที่ 4.15 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เก็บเป็นเซลล์เข้มข้นในสัปดาห์ที่ 0
ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

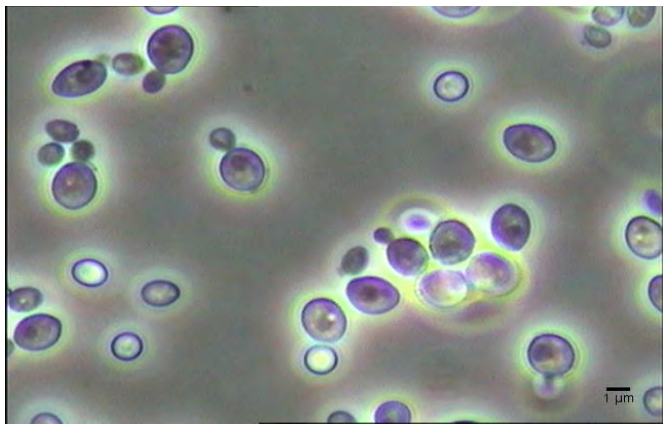
(ก)



(ข)

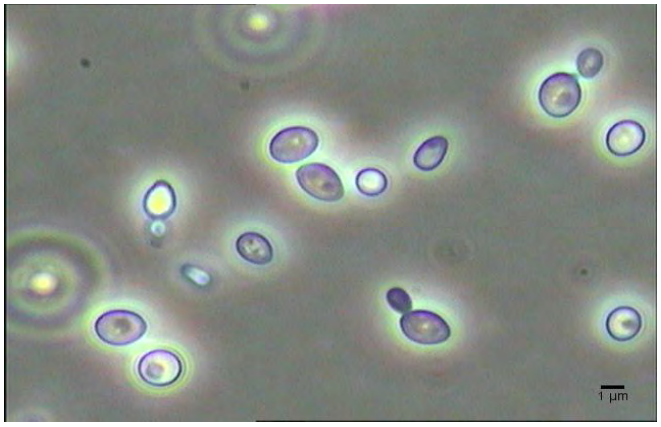


(ค)

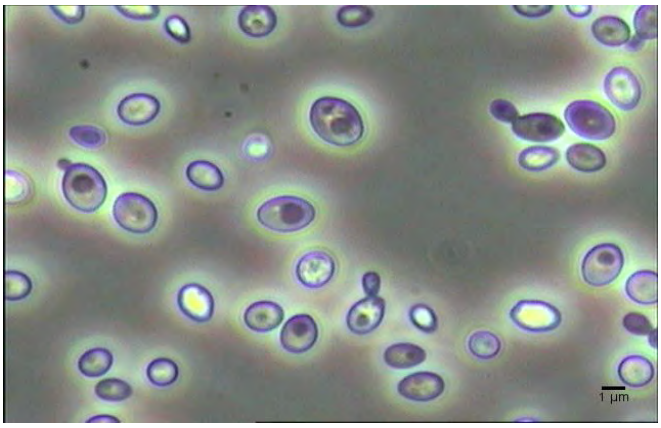


รูปที่ 4.16 รูปร่างเซลล์ยีสต์ที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

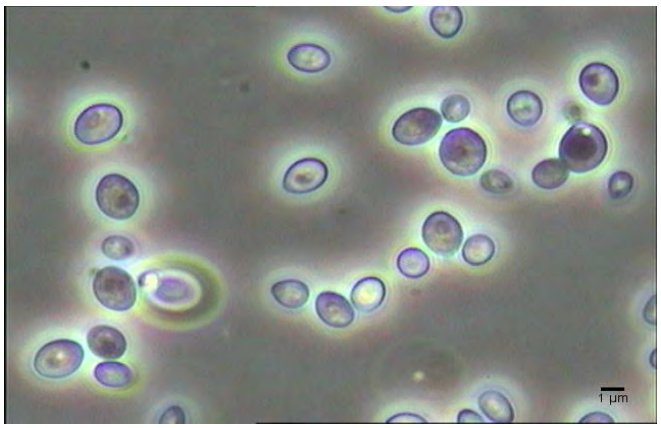
(ก)



(ข)

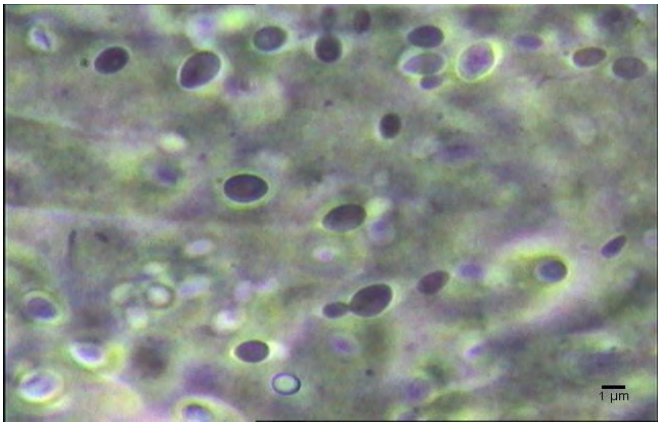


(ค)

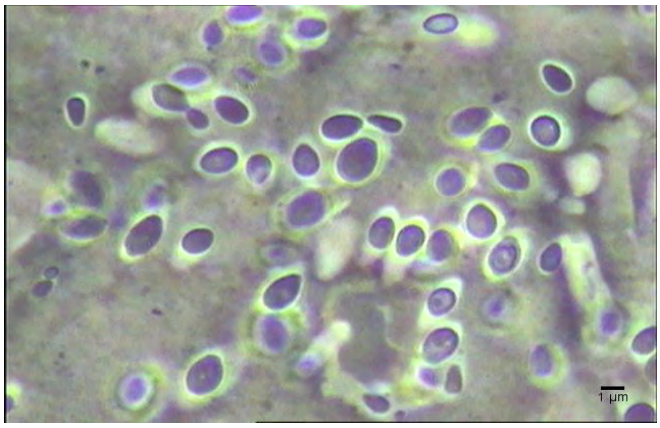


รูปที่ 4.17 รูปร่างเซลล์ยีสต์เมื่อเก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

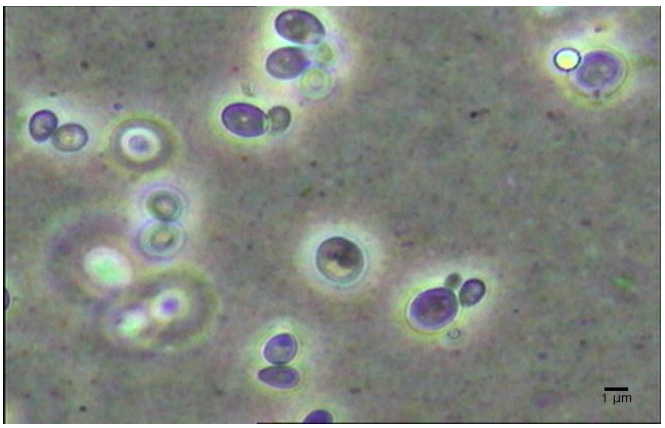
(ก)



(ข)

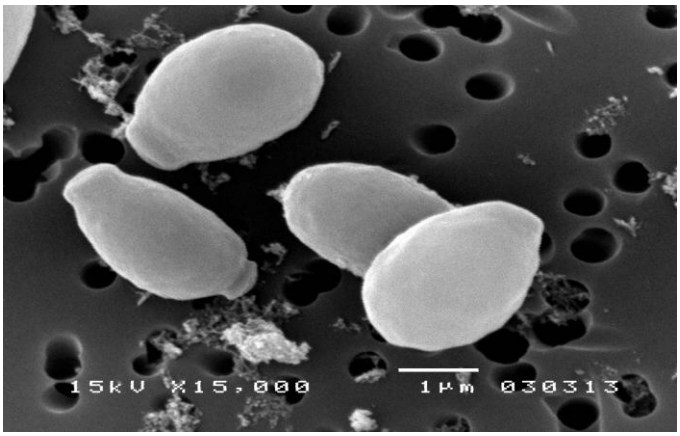


(ค)



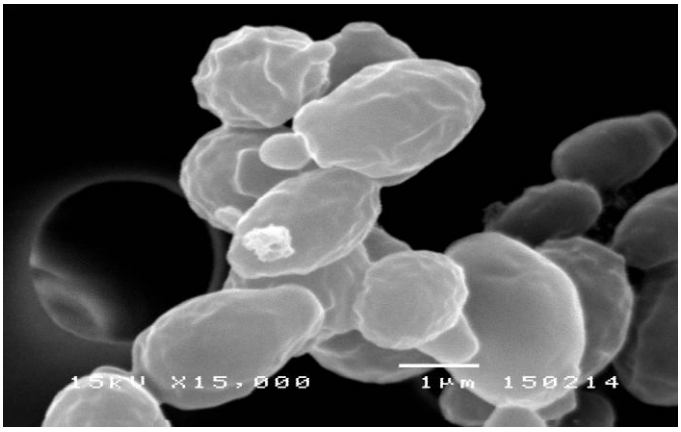
รูปที่ 4.18 รูปร่างเซลล์ยีสต์เมื่อเก็บใน soy protein isolate 8% ที่ (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

จากการประเมิน การรอดชีวิตของเซลล์ เข้มข้นที่คงการรอดชีวิตได้ถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ไม่แตกต่ างจากสัปดาห์ที่ 0 ได้แก่เซลล์เข้มข้นที่เก็บ ในกลีเซอรอล 10% และในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่ทุกสภาวะอุณหภูมิ และใน soy protein isolate 8% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่จากผลการติดตามอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในระหว่างการเก็บที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์เมื่อเก็บในสภาวะ เหล่านี้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% โดยพิจารณาจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (ค่า μ) ของจุลินทรีย์ พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้น ที่เก็บทุกสภาวะ จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ยกเว้นเซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ยังคงมีอัตราการเจริญไม่แตกต่าง จากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งจากผลดังกล่าว จึงได้มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและผนังเซลล์ของเซลล์ ยีสต์ เข้มข้นที่เก็บเพื่ออธิบายเหตุผลของผลการทดลองที่ได้ด้วย เครื่อง Scanning Electron Microscop e ผลการทดลองพบว่า เซลล์เข้มข้นอายุการเก็บ 0 สัปดาห์มีลักษณะเซลล์ที่สมบูรณ์ คือ รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ผนังเซลล์เรียบหรือพบรอยย่นเพียงเล็กน้อยดังแสดงในรูปที่ 4.19 ส่วนเซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ เซลล์ยังคงมีขนาดและรูปร่างไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เก็บในสัปดาห์ที่ 0 แต่พื้นผิวของเซลล์ยีสต์จะมีรอยย่น เกิดขึ้นเล็กน้อย โดยที่เซลล์เข้มข้นที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พื้นผิวเซลล์จะมีรอยย่น เกิดขึ้นน้อยที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.20 (ค) โดยที่เมื่อเก็บเซลล์เข้มข้นที่อุณหภูมิต่ำลง จะพบรอยย่นบนผิวเซลล์มากขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.20 (ก) และ 4.20 (ข) ส่วนเซลล์เข้มข้นที่เก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% ที่อุณหภูมิ -20 และ 0 องศาเซลเซียส เซลล์มีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงแต่เห็นได้ชัดว่า ผนังเซลล์ ถูกทำล าย เซลล์มีลักษณะเหี่ยว ย่นและขนาดเล็ก ลง แต่เซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะยังคงมีขนาดรูปร่างไม่เปลี่ยนไปมากนัก แต่ยังพบรอยย่นที่ผนังเซลล์อยู่ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.21 (ก) (ข) และ (ค) ตามลำดับ ส่วน เซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% ภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมินั้น จะเห็นได้ชัดว่าเซลล์มีขนาดเล็กลง แต่เมื่อพิจารณาพื้นผิวเซลล์ จะเห็นเพียงรอยย่นเล็กน้อยแต่ไม่มีรอยรั่วหรือแตกเสียหาย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ soy protein isolate ถึง 8% ซึ่งมีโปรตีนปริมาณสูงและโปรตีนจะจับน้ำไว้ทำให้มีน้ำอิสระที่จ ะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งได้น้อย หรือเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กที่ไม่ทำลายผนังเซลล์ได้ ในขณะเดียวกัน อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากเซลล์ถูกตรึงในร่างแหของโปรตีน โดยไม่มีสารปกป้องหรือของเหลวที่เคลือบผนังเซลล์เหมือนกันการเก็บเซลล์เข้มข้นในกลีเซอรอล 10% หรือในน้ำซีอิ๊วที่มีเกลือ 1% จึงทำให้น้ำค่อยๆระเหยออกจากเซลล์ในระหว่างการเก็บ เซลล์จึงมีขนาดเล็กลงและเกิดรอยย่นที่ผนังเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.22 และการสูญเสียน้ำดังกล่าวจะส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ยีสต์เข้มข้นที่เก็บนั้นลดลง

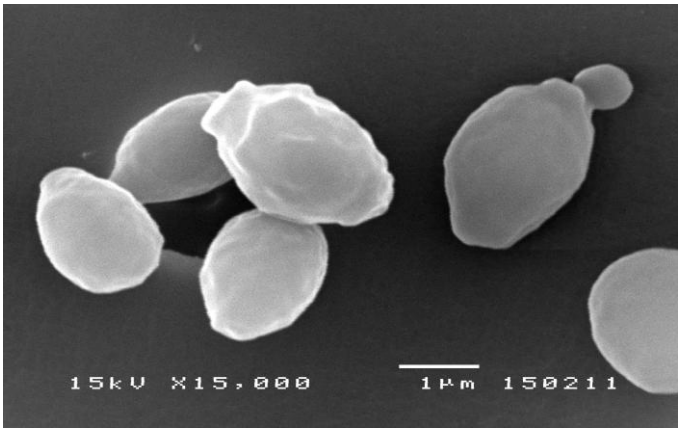


รูปที่ 4.19 เซลล์เข้มข้นที่เก็บเป็นถุงเซลล์เข้มข้นในสัปดาห์ที่ 0 วิเคราะห์ด้วย SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า

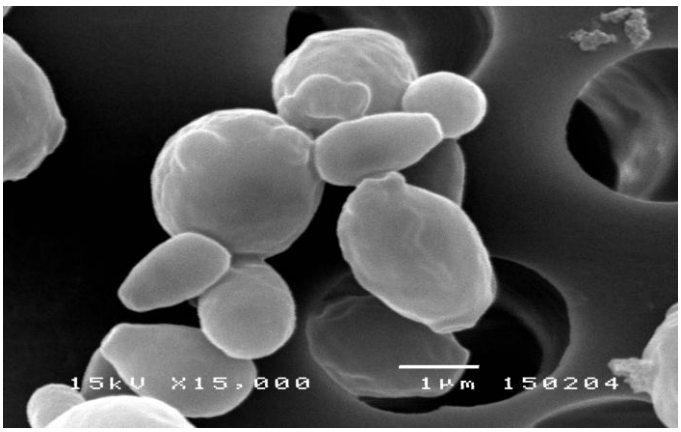
(ก)



(ข)

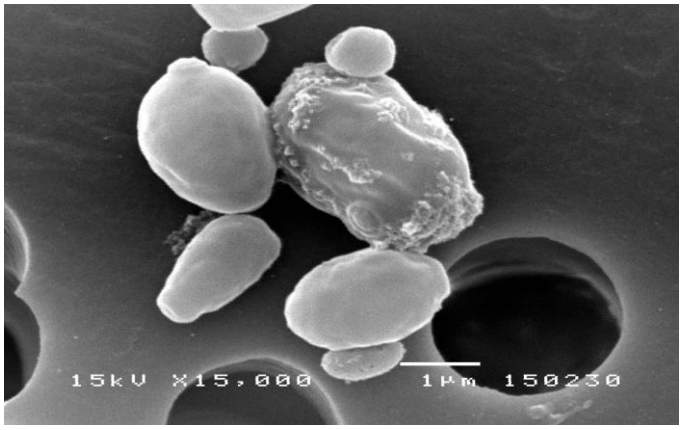


(ค)

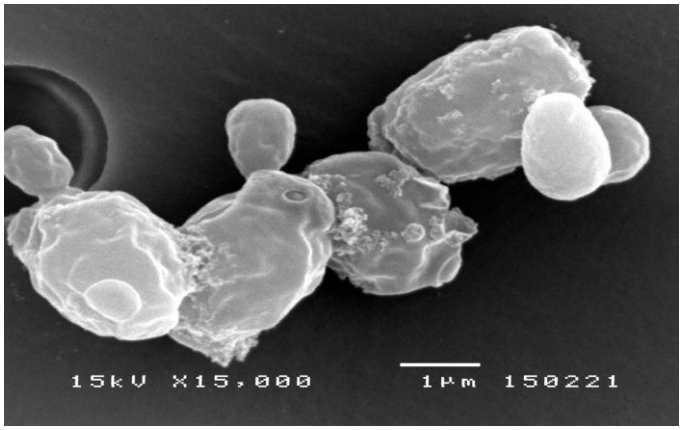


รูปที่ 4.20 เซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วย SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า

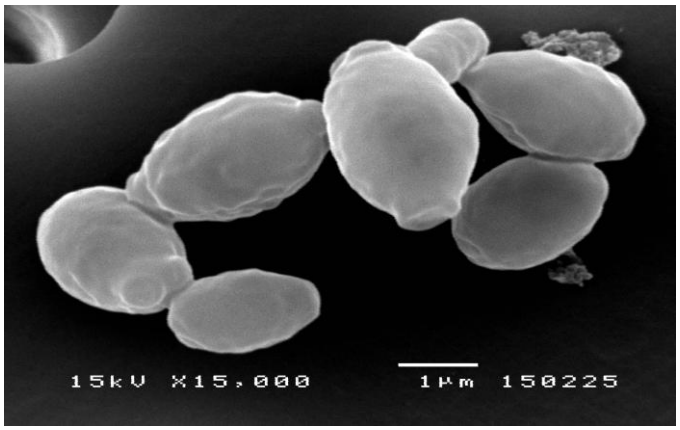
(ก)



(ข)

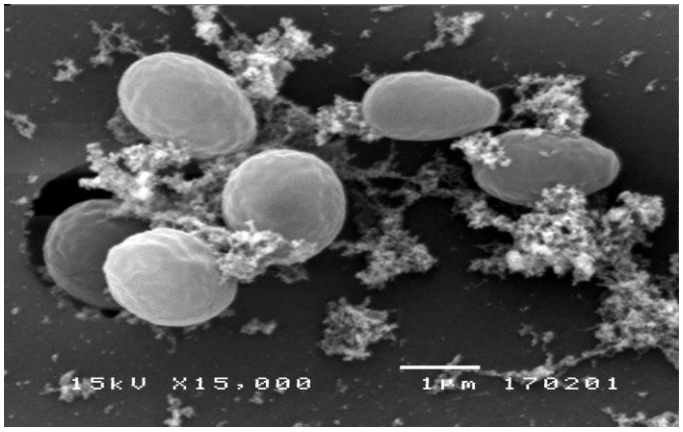


(ค)



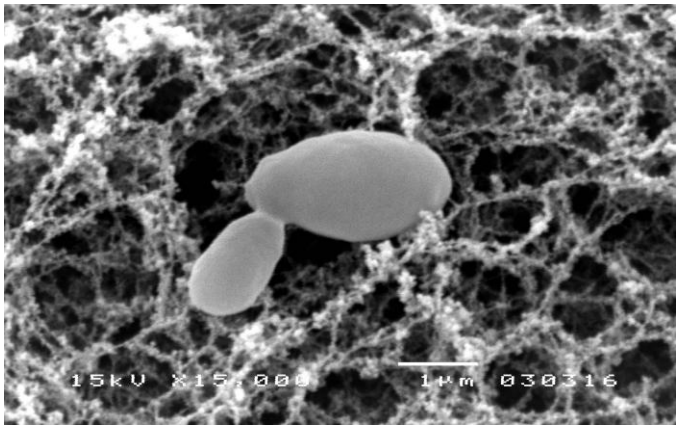
รูปที่ 4.21 เซลล์เข้มข้นที่เก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วย SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า

(ก)



(ข)

(ค)



รูปที่ 4.22 เซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% (ก) อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20°C) (ข) อุณหภูมิแช่แข็ง (0°C) (ค) อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ด้วย SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า

จากการศึกษาการประเมินสภาวะการเก็บและอายุการเก็บเซลล์เข้มข้นนั้น สรุปได้ว่า เซลล์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตยังคงไม่แตกต่างกับเซลล์ในสัปดาห์ที่ 0 และยังมีอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะนี้ไม่มีปัจจัยที่ก่อให้ ผนังเซลล์ของเซลล์เข้มข้น มีความเสียหายและเซลล์ ยังคงมีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายไปมากนัก แต่เซลล์เข้มข้นที่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 0 องศาเซลเซียสนั้น แม้ว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตยังคงไม่แตกต่างกับเซลล์ในสัปดาห์ที่ 0 แต่ในส่วนของอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% จะลดลงเล็กน้อย ทั้งนี้การเก็บเซลล์เข้มข้นที่อุณหภูมิต่ำอาจส่งผลให้เกิดภาวะเครียดกับเซลล์ถึงขั้นทำเกิดการบาดเจ็บมากขึ้น โดยจะ พบรอยย่นที่ผนังเซลล์มากกว่าเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนเซลล์เข้มข้นที่เก็บในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% นั้นเมื่อเก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตยังคงมีจำนวนไม่แตกต่างกับเซลล์ในสัปดาห์ ที่ 0 เช่นเดียวกับที่เก็บในกลีเซอรอล 10% แต่เซลล์เข้มข้นจะมีอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 ของอายุการเก็บ และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ด้วยเครื่อง SEM จึงพบว่า เซลล์เข้มข้นจะมีผนังเซลล์ที่ถูกทำลาย จากผลึกน้ำแข็ง จึงทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วซึมออกมา ทำให้ต้องใช้เวลาในการปรับตัวในการเจริญมากขึ้น หรือมีระยะ lag phase นานขึ้น และอาจตายได้ในที่สุด

สำหรับเซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับเซลล์ในสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml ของสาร protectant ส่วนเซลล์เข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 0 องศาเซลเซียสนั้น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลง 1 log CFU/ml ตั้งแต่ในสัปดาห์ ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 1 ตามลำดับ และแม้ว่าจะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างกันเมื่อเก็บเซลล์เข้มข้นที่อุณหภูมิต่างกัน แต่สิ่งที่เหมือนกันคือ อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เมื่อเก็บภายใต้ทุกสภาวะอุณหภูมิ จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 ของอายุการเก็บ และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ด้วยเครื่อง SEM จะพบว่า เซลล์มี ขนาดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด และมีรอยย่นเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์เล็กน้อย ดังเหตุผลที่อธิบายไว้ข้างต้น

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมา แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอล 10% จะเป็นสาร protectant ที่ดีและเหมาะสมที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% และ soy protein isolate 8% นั่นเป็นเพราะกลีเซอรอลจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับใช้ในเป็นสาร protectant เพื่อเก็บรักษาเซลล์ โดยจะเป็นสารละลายที่ใช้เป็นส่วนใหญ่สำหรับการเก็บรักษาเซลล์ยีสต์ด้วยการแช่เย็นหรือแช่แข็ง (Cleland และคณะ, 2004; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; Fonseca และคณะ,

2006; Sidari และ Caridi, 2009) ด้วยเหตุผลที่ว่ากลีเซอรอลจะมีจุดเยือกแข็งที่ต่ำกว่าน้ำ และยังคงมีคุณสมบัติเป็นของไหลโดยปฏิกิริยา colligative ได้ที่อุณหภูมิ -46 องศาเซลเซียสเป็นอย่างต่ำ ดังนั้นจึงป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ได้ (eutectic crystallization) (Hubálek, 2003; Sidari และ Caridi, 2009) ซึ่งการใช้กลีเซอรอล เป็นสาร protectant นั้นได้มีรายงานกล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ยกตัวอย่างเช่น Fonseca และคณะ (2006) ที่รายงานเกี่ยวกับการศึกษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและการผลิตกรดของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ที่เก็บในอุณหภูมิแช่เยือกแข็งโดยนำกลีเซอรอล 10% มาใช้เป็นสาร protectant เซลล์ หรือแม้แต่การศึกษาของ Henry และ Kirsop (1990) ในการเก็บรักษายีสต์ด้วยการแช่แข็งในหลอดแก้ววโพลีโพรพิลีนโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสาร protectant ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

สำหรับสาร protectant ในการทดลองอีก 2 ประเภทนั้น จะมีผลการทดลองที่เป็นไปในทางเดียวกัน โดยที่น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% จะเป็นสาร protectant ที่นำมาประยุกต์ใช้จากวัตถุดิบที่มีอยู่แล้วในบริษัทผู้ผลิตซีอิ๊ว และจากรายงานของ Thepsingha (1997) ได้ทดลองเก็บเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10 และ 15% พบว่า เซลล์จะรอดชีวิตทั้งหมดได้ถึง 3 สัปดาห์แต่หลังจากนั้นเซลล์รอดชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การเก็บเซลล์ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10 และ 15% จะเป็นสภาวะที่มีความรุนแรงเกินไป ซึ่งในการเก็บเซลล์เข้มข้นควรจะเก็บในสภาวะที่ไม่รุนแรงต่อเซลล์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงประยุกต์ใช้น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% เป็นสาร protectant เพื่อให้เซลล์เข้มข้นที่เก็บในสาร protectant ชนิดนี้มีความคุ้นเคยกับสภาวะต่างๆ ในน้ำซีอิ๊วดิบ และความเข้มข้นเกลือ 1% นี้ก็เป็นสภาวะที่ให้ระดับความเข้มข้นของสารภายนอกเซลล์ไม่มากจนเกินไป ซึ่งจะเป็นการรักษาสมดุลของเซลล์ยีสต์ในระหว่างการเก็บรักษา จึงไม่ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียด บาดเจ็บ หรือตายในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่จากผลของการศึกษาอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 10% ที่ลดลงนั้นอาจเป็นเพราะเซลล์เข้มข้นที่ถูกเก็บเป็นระยะเวลานานต้องมีการปรับตัว พักฟื้นตัวจากผนังเซลล์ที่ถูกทำลายไป จึงทำให้มีช่วงระยะ lag phase นานขึ้น และมีอัตราการเจริญต่ำลง ส่วนเซลล์เข้มข้นที่เก็บใน soy protein isolate 8% จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 10% มีค่าลดลงเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น พบว่าผนังเซลล์ยังคงความปกติ ไม่มีรอย ย่นมากนัก และไม่พบรอยแตกเสียหายเหมือนในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% แต่เซลล์มีขนาดเล็กลงกว่าการเก็บเซลล์ เข้มข้นในสาร protectant อื่นๆ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ soy protein isolate ถึง 8% ซึ่งมีโปรตีนปริมาณสูงและโปรตีนจะจับน้ำไว้ทำให้มีน้ำอิสระที่จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งได้น้อย ลง ทำให้ผนังเซลล์ไม่ถูกทำลาย หรือทำลายได้น้อยลง หรือเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กที่ไม่ทำลายผนังเซลล์ได้ ในขณะเดียวกัน การที่เซลล์มีขนาดเล็กลงอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการที่เซลล์เข้มข้นเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% มาก่อนทำให้เซลล์ปรับค่า isotonic point ของผนังเซลล์ให้เป็นไปตามความเข้มข้นเกลือ 5% เมื่อเซลล์ถูกเก็บ

ใน soy protein isolate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งน้ำยังไม่แข็งตัว ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารภายนอกสูงกว่าสารภายในเซลล์ ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำในลักษณะที่ค่อยๆแพร่ออกมาโดยที่เซลล์ไม่แตกเสียหาย แต่เซลล์จะมีขนาดเล็กลง และในกรณีที่เก็บใน soy protein isolate ที่อุณหภูมิ -20 และ 0 องศาเซลเซียสซึ่งน้ำกลายเป็นน้ำแข็งทั้งหมด ดังนั้นการที่เซลล์มีขนาดเล็กลงในระหว่างการเก็บนั้น อาจเนื่องมาจาก เซลล์ถูกตรึงในร่างแหของโปรตีน โดยไม่มีของเหลวห่อหุ้มเหมือนการเก็บใน protectant ชนิดอื่น ทำให้น้ำระเหยออกจากเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาได้ง่าย ทำให้ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ในลักษณะที่ไม่สมบูรณ์นัก ดังนั้นเซลล์เข้มข้นจึงไม่สามารถเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบได้อย่างเต็มที่ อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นจึงต่ำลงโดยจะมีช่วงระยะ lag phase นานขึ้น

เมื่อพิจารณาที่ผลของอุณหภูมิการเก็บเซลล์เข้มข้น ในสาร protectant กลีเซอรอล 10% และน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 1% พบว่า การเก็บรักษายีสต์ที่อุณหภูมิ - 20 0 และ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์เข้มข้น เมื่อเก็บที่สัปดาห์ที่ 4 ไม่ลดลงหรือ ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8log CFU/ml หรือแม้แต่การเก็บเซลล์เข้มข้นใน soy protein isolate 8% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์เข้มข้นก็ไม่ลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 เช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือ 10% ของเซลล์เข้มข้นที่เก็บในสาร protectant ทั้ง 3 ประเภทนั้น จะพบว่า เซลล์เข้มข้ นที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 0 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการ เจริญลดลง (ค่า μ ลดลง) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และลักษณะผนังเซลล์ยังพบรอยย่นและการถูกทำลาย รวมถึงเซลล์มีลักษณะเหี่ยวย่นและขนาดเล็กลงด้วย แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษายีสต์ที่อุณหภูมิ - 20 0 และ 4 องศาเซลเซียสจะมีผลต่อ เซลล์เข้มข้นแตกต่างกัน ดังมีรายงานที่สอดคล้องกันถึงสภาวะอุณหภูมิสำหรับใช้ในการเก็บเซลล์ โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะเป็นอุณหภูมิแช่เย็นที่ใช้เป็นส่วนมากสำหรับ เก็บจุลินทรีย์ โดยที่ระดับอุณหภูมินี้จะยับยั้งการเจริญ การแตกหน่อและเหนี่ยวนำให้ เกิดการเรียงตัวใหม่ของแวคิวโอล จึงทำให้เซลล์ยังคงความแอคทีฟอยู่ได้ (Walker, 1998) Thepsingha (1997) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของหัวเชื้อเข้มข้นที่เก็บ ที่อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่ลดลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 คือ 8 log CFU/ml เมื่อเก็บเซลล์เป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์ แต่ถ้าอุณหภูมิที่เก็บหัวเชื้อเป็นอุณหภูมิแช่เยือก แข็ง -20 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่มีผู้ รายงานไว้ก็สอดคล้อง กับผลที่ได้ดังกล่าวข้างต้น โดย Fonseca และคณะ (2006) ได้ศึกษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและการผลิตกรดของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* โดยนำกลีเซอรอล 10% มาใช้เป็นสาร protectant และเก็บที่ อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อ เวลาผ่านไป 1 เดือน จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงจากเซลล์เริ่มต้น 2 log CFU/ml และมีการผลิตกรดลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น บ่งชี้ให้เห็นว่า เซลล์เข้มข้นที่เก็บในสาร protectant ทั้ง 3 ชนิดที่ทุกช่วงอุณหภูมิยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ แต่พบว่าโดยส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญลดลงนั้น อาจเนื่องมาจากเซลล์ไม่ได้ถูกทำให้เสียหายอย่างรุนแรงเมื่อเก็บภายใต้สภาวะอุณหภูมิเหล่านี้ จึงทำให้เมื่อนำเซลล์เข้ม ข้นไปเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เซลล์จึงยังสามารถเจริญต่อไปได้แต่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวในระยะ lag phase นานขึ้น และเมื่ออายุการเก็บนานขึ้นเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์เหล่านี้จะมีอัตราการตายสูงขึ้น

ดังนั้น จาก การประเมินสภาวะการเก็บเซลล์เข้มข้น จะ เห็นว่า สภาวะการเก็บหัวเชื้อเข้มข้น *Z. rouxii* ที่ดีที่สุดคือการเก็บหัวเชื้อเข้มข้นในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงเลือกสภาวะการเก็บสภาวะนี้มาศึกษาการเพิ่มอายุการเก็บโดยทดลองเก็บหัวเชื้อเข้มข้นเป็นระยะเวลา 2 เดือน หรือ 8 สัปดาห์ แล้วติดตามการร อดชีวิตของเซลล์ อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% พบว่า จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตยังสูงถึง 8.18 log CFU/ml และมีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับหัวเชื้อเข้มข้นที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ โดยพิจารณาจากค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.15 generation/hour ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการเก็บหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้นสามารถเก็บไว้สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วได้โดยมีอายุการเก็บนานถึง 2 เดือน และมีความเป็นไปได้ที่จะมีอายุการเก็บนานกว่า 2 เดือน โดยต้องมีการทดลองศึกษาต่อไป

4.7 ทดสอบประสิทธิภาพการหมักโมโรมิของหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น

เมื่อได้สาร protectant และสภาวะอุณหภูมิที่ดีและเหมาะสมต่อการเก็บรักษาหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นแล้ว นั่นคือ การบรรจุเซลล์เข้มข้นในกลีเซอรอล10% เก็บที่อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส และมีอายุการเก็บ 4 สัปดาห์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการหมักโมโรมิ ในที่นี้คือโมโรมิสภาวะจำลอง ซึ่งมีความเข้มข้นเกลือที่สูงขึ้นคือ 15%(w/v) ค่า pH เริ่มต้น 5.20 โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น 6 log CFU/ml โดยจะทดสอบเปรียบเทียบกับหัวเชื้อ สดที่ผลิตจากรูปแบบการผลิตเช่นเดียวกันกับหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นดังกล่าวข้างต้น ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของหัวเชื้อสดกับหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์ในการหมักโมโรมิ (สภาวะจำลอง) เป็นเวลา 1 เดือน

ค่าที่ตรวจวัดในโมโรมิ	โมโรมิเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0)	หัวเชื้อสด	หัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์
pH	5.20	4.60	4.70
ปริมาณ NaCl	15%(w/v)	17%(w/v)	17%(w/v)
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต	6 log CFU/ml	4.25 log CFU/ml	4.06 log CFU/ml
ปริมาณเอทานอล	-	0.307%	0.311%

จากผลการทดลองที่ได้ จะเห็นว่าประสิทธิภาพของหัวเชื้อสดกับหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อายุการเก็บ 4 สัปดาห์เมื่อนำมาหมักโมโรมิเป็นเวลา 1 เดือน จะไม่แตกต่างกันแต่เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อหมักโมโรมิผ่านไปเป็นระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งมีค่าลดลงจากเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 4 log CFU/ml อาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรดในโมโรมิที่ลดลง และปริมาณความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดภาวะเครียดแก่เซลล์ยีสต์ ส่วนปริมาณเอทานอลที่วัดได้นั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Thepsingha (1997) ที่ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการหมักโมโรมิของหัวเชื้อยีสต์ *Z. rouxii* IFO 0505 เข้มข้น แล้วติดตามค่า pH ปริมาณ NaCl จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และปริมาณเอทานอล เมื่อหมักโมโรมิ่ผ่านไปเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ค่า pH ที่ตรวจวัดได้ลดลงจาก 5.60 เหลือ 4.80 ปริมาณ NaCl ที่วัดได้จากโมโรมิเริ่มต้น 23%(w/v) เพิ่มสูงขึ้นเป็น 26%(w/v) เมื่อติดตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่ามีจำนวนเซลล์เริ่มต้นจาก 6 log CFU/ml ลดลงเหลือ 5 log CFU/ml เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือน และสำหรับการตรวดวัดปริมาณเอทานอลที่เวลาหมัก 1 เดือน พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.6 ถึง 0.8% ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า การผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นแล้วเก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุการเก็บ 4 สัปดาห์สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักโมโรมิได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. รูปแบบการเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เหมาะสม คือการเพาะเลี้ยงด้วย YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 และการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% และน้ำตาล 1.5% ไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลเป็นแนวทางในการผลิตหัวเชื้อเข้มข้นได้ต่อไป ดังแสดงดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

↓

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มปริมาณเกลือ

↓

น้ำซีอิ๊วดิบที่มีปริมาณเกลือเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ

↓

น้ำซีอิ๊วดิบที่มีปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นครั้งละ 5%

↓

ผลิตเซลล์เข้มข้น

2. การเตรียมเซลล์เข้มข้น ที่เหมาะสม จะทำโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (centrifugation) ซึ่งจะให้ร้อยละของการได้กลับของเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง 98.63%

3. สภาวะกา รเก็บและอายุการเก็บเซลล์เข้มข้น ที่เหมาะสม คือ การเก็บหัวเชื้อในสารกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสัปดาห์ที่ 0 และยังคงอัตราการเจริญ ในน้ำซีอิ๊วดิบที่มี เกลือเข้มข้น 10% ไม่แตกต่างกันกับสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และยังพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ของเซลล์เข้มข้นมีลักษณะใกล้เคียงกับเซลล์สดปกติในสัปดาห์ที่ 0 และเมื่อเพิ่มอายุการเก็บเป็น 2 เดือน เซลล์ที่มีชีวิตและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน

4. หัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพในการหมักโมโรมิที่มีเกลือเข้มข้น 15% เหมือนหัวเชื้อสดที่เตรียมจากรูปแบบการผลิตแบบเดียวกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้หรือศึกษาเพิ่มเติมดังต่อไปนี้

1. หัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เก็บในสภาวะการเก็บที่เหมาะสมนี้ มีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มอายุการเก็บได้นานมากกว่า 2 เดือน ซึ่งต้องมีการทดลองศึกษาต่อไป และมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ได้ในกระบว นการหมักโมโรมิ ทำให้สามารถผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นเก็บไว้ใช้ได้ จึงส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตซีอิ๊วที่จะสามารถควบคุมการผลิตหัวเชื้อได้อย่างสม่ำเสมอทุก batch และเป็นการลดต้นทุนการผลิต ประหยัดพลังงาน และยังส่งขายในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

2. ในการใช้ soy protein isolate ความเข้มข้น 8%(w/v) เป็นสารเก็บรักษาเซลล์ในการศึกษานี้ อาจจะต้องมีการปรับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นลดลงจากเดิม เพื่อให้ร่างแหโปรตีนที่เกิดขึ้นไม่ยึดติดแน่นเกินไป และอาจใช้สารละลายเกลือเป็นตัวทำละลาย soy protein isolate แทนการใช้น้ำ เพื่อให้เป็นสารเคลือบเ ซลล์ที่ยังคงค่า isotonic point ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกฝึกให้คุ้นเคยกับเกลือความเข้มข้นสูงได้

3. ในการทดสอบประสิทธิภาพการหมักของหัวเชื้อยีสต์เข้มข้น อาจต้องมีการปรับปรุงในเรื่องของการสร้างความคุ้นเคยให้กับยีสต์ เพื่อให้สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 15% และยังคงมีกิจกรรมการหมักที่ดี

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จารุวรรณ มณีศรี. 2551. เทคโนโลยีการหมัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

ช่อขวัญ วงษ์สุวรรณ. 2547. ไวน์ผลไม้. กรุงเทพฯ: ชมรมผู้ผลิตไวน์ผลไม้ไทย.

นภา โล่ห์ทอง. 2537. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.

ปุ่น และ สมพร คงเจริญเกียรติ. 2541. บรรจุภัณฑ์อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัทโรงพิมพ์หยี่เฮง จำกัด.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Washington D.C. Association of Official Analytical Chemists.

Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J. and Vinas, I. 2001. Effect of freezing drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. International Journal of Food Microbiology. 65: 173-182.

Aoki, T. and Uchida, K. 1991. Amino acid-uptake deficient mutant of *Zygosaccharomyces rouxii* with altered production of higher alcohols. Agricultural Biology and Chemistry. 55: 2893-2894.

Bamforth, C.W. 2005. Food, fermentation and micro-organisms. Iowa: Blackwell Science Ltd.

Berry, D.R., Russell, I. and Stewart, G.G. 1987. Yeast biotechnology. London: Allen&Unwin Ltd.

Bhumiratana, A., Flegel, T.W., Glinsukorn, T. and Somporan, W. 1980. Isolation and analysis of molds from soy sauce koji in Thailand. Applied and Environmental Microbiology. 39(2): 430-435.

Bhumiratana, A., Flegel, T.W., Lotong, N. and Suwanarit, P. 1988. A manual of soy sauce production for small scale manufacturers in the ASEAN countries. Thailand: Text and journal Cooporation Co.,Ltd.

Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J. and Emerson, D. 2004. Glycine betaine as cryoprotectant for prokaryotes. Journal of Microbiological Methods. 58: 31-38.

Cowman, R.A. and Speck, M.L. 1965. Ultra-low temperature storage of lactic streptococci. Journal of Daily Science. 48: 1531.

Devahuti, P. 1978. A study on the yeast in soy sauce and soybean paste. M.Sc. Thesis in Microbiology. Faculty of Science, Kasetsart University.

Fonseca, F., Marin, M. and Morris, G. J. 2006. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetic and storage temperature effects. Applied and Environmental Microbiology. 72(10): 6474-6482.

Fukushima D. 1989. Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu. In: Industrialization of indigenous fermented foods. Edited by Steinkraus KH. New York: Marcel Dekker.

Hamada, T., Ishiyama, T. and Motai, H. 1989. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an airlift reactor. Applied Microbiology and Biotechnology. 31: 346-350.

Hamada, T., Sugishita, M. and Motai, H. 1990. Continuous Production of 4-ethylyguaiacol by immobilized cells of salt-tolerant *Candida versatilis* in an airlift reactor. Journal of Fermentation and Bioengineering. 69(3): 166-169.

Hamada, T., Fukushima, Y., Hashiba, H. and Motai, H. 1991. Improved production of viable cells of salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by continuous culture. Applied Microbiology and Biotechnology. 36: 388-393.

Hamano, M., Okuhara, A., Aoyama, Y. and Saito, N. 1971. Quantitative determination of acetic acid and ethyl alcohol on soy sauce with gas liquid chromatography. Seasoning Science (Japan). 18:72-78.

Henry, J. and Kirsop, B. 1990. Cryopreservation of yeasts in polypropylene straws. World of Journal of Microbiology and Biotechnology. 6: 447-449.

Hohmann, S. and Mager, W.H. 2003. Yeast stress responses. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelbreg.

Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 46:205-229.

Kobayashi, M. and Hayashi, S. 1998. Modeling combined effects of temperature and pH on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* in soy sauce mash. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85: 638-641.

Kobayashi, M. and Hayashi, S. 1998. Supplementation of NaCl to starter culture of the soy yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85: 642-644.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. The Yeasts, a taxonomy study. 4th edition. Amsterdam:Elsevier. .

Leenen, E.J.T.M. 1996. Nitrification by artificially immobilized cells. Model and practical system. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Limthong, S., Sringiew, C. and Yongmanitchai, W. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. Bioresource Technology. 98: 3367-3374.

Luh, B.S. 1995. Industrial production of soy sauce. Journal of Industrial Microbiology. 14: 467-471.

Nishi, T. and Yagi, T. 1995. Efflux of sodium ions by a Na^+/H^+-antiporter during salt stress in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of General and Applied Microbiology. 41: 87-97.

O'Brien, S.S., Lindsay, D. and von Holy, A. 2004. The presence of *Enterococcus*, coliforms and *E. coli* in a commercial yeast manufacturing process. International Journal of Food Microbiology. 94:23-31.

Onishi, H. 1990. Yeast in fermented foods. In: Yeast technology. Edited by Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.

Phowchinda, O., Délia-Dupuy, M.L. and Strehaiano, P. 1995. Effect of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 17(2): 237-242.

Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M.C. and Ramos, J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces Hansenii*. Applied and Environmental Microbiology. 63(10): 4005-4009.

Reyes, C., Pena, C. and Galindo, E. 2003. Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of aliginates by *Azotobacter vinelandii*. Journal of Biotechnology. 105: 189-198.

Shen, T., Benet, G.U., Brul, S. and Knorr, D. 2005. Influence of high-pressure-low-temperature treatment on the inactivation of *Bacillus subtilis* cells. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 6: 271-278.

Sidari, R. and Caridi, A. 2009. Viability of commercial wine yeasts during freezer storage in glycerol-based media. Folia Microbiologica. 54(3): 230-232.

Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. 1989. Yeast technology. Berlin: Springer-Verlag.

Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1999. Principle of fermentation technology. Reed Educational and Professional, Oxford.

Stewart, G.G. 1987. Alcoholic beverages. Food and beverage mycology. 2nd edition. New York: An AVI Pub Book.

Strel, B., Grba, S. and Maric, V. 1993. Enhancement of biomass and fermentation activity of surplus brewers' yeast in a fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology. 39: 53-57.

Subden, R.E. 1990. Wine yeast: Selection and modification. Yeast Strain Selection. New York: Marcel Dekker.

Thepsingha, W. 1997. Development of yeast inoculum for soy sauce fermentation. M.Sc. Thesis in Biotechnology. Faculty of Science, Mahidol University.

Tomita, M. 1976. Characterization of an osmo-tolerant yeast for miso making. Journal of Fermentation and Technology. 54: 287-291.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Annals of Clinical Biochemistry. 6: 24-27.

Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Prado, F.C. and Pandey, A. 2004. Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray, and drum bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology. 118: 293-303.

van der Sluis, C., Mulder, A.N.T., Grolle, K.C.F., Engbers, G.H.M., ter Schure, E.G., Tramper, J. and Wijffels, R.H. 2000. Immobilized soy-sauce yeasts: development and characterization of a new polyethylene-oxide support. Journal of Biotechnology. 80: 179-188.

van der Sluis, C., Stoffelen, C.J.P., Castelein, S.J., Engbers, G.H.M., ter Schure, E.G., Tramper, J. and Wijffels, R.H. 2001. Immobilized salt-tolerant yeasts: application of a new polyethylene-oxide support in a continuous stirred-tank reactor for flavour production. Journal of Biotechnology. 88: 129-139.

van der Sluis, C., Tramper, J. and Wijffels, R.H. 2001. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. Trades in Food Science and Technology. 12: 322-327.

Verachtert, H. and Mot, R. 1990. Yeast: Biotechnology and Biocatalysis. New York: Marche Dekker.

Walker, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. England: Wiley & Sons.

Watanabe, Y., Miwa, S. and Tamai, Y. 1995. Characterization of Na^+/H^+ -antiporter gene closely related to the salt-tolerant of yeast. Yeast. 11:829-838.

Watanabe, Y., Iwaki, T., Shimono, Y., Ichimiya, A., Nagaoka, Y. and Tamai, Y. 1999. Characterization of the Na^+ -ATPase gene (*ZENA1*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 88(2): 136-142.

Watanabe, Y., Hirasaki, M., Tohnai, N., Yagi, K., Abe, S. and Tamai, Y. 2003. Salt shock enhance the expression of *ZrATP2*, the gene for the mitochondrial ATPase β subunit of *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 96(2): 193-195.

Watanabe, Y., Oshima, N. and Tamai, Y. 2005. Co-expression of the Na^+/H^+-antiporter and H^+-ATPase genes of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. 5: 411-417.

Yoshikawa, S., Mitsui, N., Chikara, K., Hashimoto, H., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1995. Effect of salt stress on plasma membrane permeability and lipid saturation in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 80(2): 131-135.

Yuan, J.-Q. and Bellgardt, K.-H. 1994. Investigation on the optimal control of storage stability of compressed baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology. 32:261-272.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่างด้วยเครื่อง pH meter

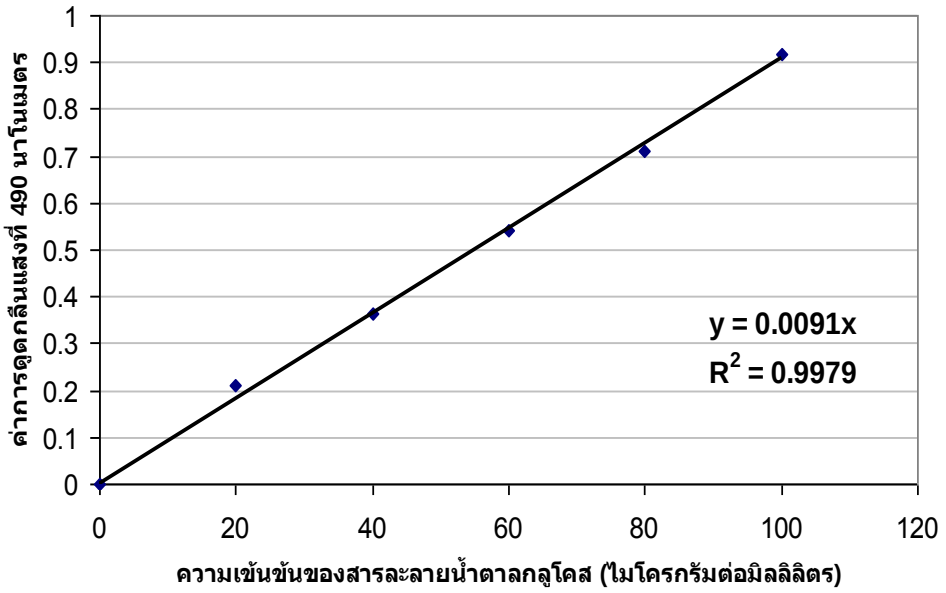
นำ probe ของเครื่อง pH meter วัดค่าความเป็นกรด- ด่าง หรือ ค่า pH โดยจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำซีอิ๊วดิบที่เตรีย มไว้ เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ จะมีสัญญาณเตือนแสดงบ นหน้าจออ่านค่า pH ที่ได้

ก.2 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric acid ตามวิธี AOAC (2005)

เจือจาง ตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบ 400 เท่า นำตัวอย่างน้ำซีอิ๊ วดิบที่เจือจางแล้วปริมาตร 1มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่า และนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับ กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส (ค่า blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

<u>การสร้างกราฟมาตรฐาน</u>

ชั่งกลูโคสที่มีน้ำหนักแน่นอน 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตรใน volumetric flask (จะได้สารละลายกลูโคส 10^{-3} กรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นเป็น 20 40 60 80 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์สารละลายกลูโคส

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยวิธีของ Mohr ตามวิธี AOAC (2005)

เจือจางตั วอย่างน้ำซีอิ๊วดิบ 1000 เท่า นำตัวอย่างน้ำ ซีอิ๊วดิบที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรและเติมสารละลายโพแทสเซียมโครเมต 5% 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรต 0.1 นอร์มอล ซึ่งเตรียมโดย ละลายซิ ลเวอร์ไนเตรต 16.987 กรัมในน้ำ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตรใน volumetric flask จนถึงจุ ดยุติของสารละลายเป็นสีน้ำตาลแดง บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้ไป และนำไปคำนวณปริมาณเกลือ (NaCl) ต่อไป

ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity) ตามวิธี AOAC (2005)

เจือจา งตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบ 500 เท่า นำตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.1% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2-3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ซึ่งเตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัมในน้ำ 1000 มิลลิลิตร จนถึงจุดยุติของสารละลายที่มีสีชมพูนาน 30 วินาที บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอลที่ใช้ และนำไปคำนวณปริมาณกรดเป็นเปอร์เซ็นต์

$$\% \text{ acid} = [V \times N \times \text{factorของกรด} / S] \times 100$$

เมื่อ V คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
N คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)
S คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Factor	:	Malic acid	=	0.067
		Oxalic acid	=	0.045
		Citric acid monohydrate	=	0.070
		Tartaric acid	=	0.075
		Sulfuric acid	=	0.049
		Acetic acid	=	0.060
		Lactic acid	=	0.090

ก.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS reagent ตามวิธี AOAC (2005)

DNS reagent เตรียมโดยผสม 100 มิลลิลิตรของ 5% 3,5-dinitrosalicylic acid ใน 2 M NaOH กับ 250 มิลลิลิตรของ 60% Potassium sodium tartrate solution

<u>การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u>

เจือจางตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบ 50 เท่า ปิเปตตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบที่เจือจางแล้ว และน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DNS reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank) แล้วนำหลอดทั้งหมดไปตั้งทิ้งไว้ในอ่างให้ความร้อน (boiling bath) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงโดยย้ายมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างให้ความเย็น (ice bath) เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่เป็นน้ำกลั่นเป็นหลอดเปรียบเทียบ นำค่าที่ได้ไปหาค่าปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ ต่อไป โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

ก.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl ตามวิธี AOACm(2005)

ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม (ตัวอย่างน้ำซีอิ๊วดิบประมาณ 5 มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน เติม selenium reagent mixture ซึ่งใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม และก รดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร จากนั้น นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 8 (ก่อนนำตัวอย่างเข้าย่อยควรเปิดเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 10 ก่อน ประมาณ 15 นาที) และปิดฝาด้านที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกรด (scrubber) ย่อยตัวอย่างจนส่วนผสมในหลอดย่อยกลายเป็นสีเขียวใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อ ง จากนั้น นำมาเข้าเครื่องกลั่นโดยปรับให้เครื่องเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้ มข้น 35 % ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และสารละลายกรดบอริคความเข้มข้น 4 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายเมทิลเรด-เมทิลีนบลู หรือ สารละลายเมทิลเรด-โบรโมครีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด เตรียมโดยผสมสารละลายเมทิลีนบลู 0.2 % ในแอลกอฮอล์ 25 มิลลิลิตร กับสารละลายเมทิลเรด 0.2 % ในแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร หรือ ผสมสารละลายเมทิลเรด 0.2% ในแอลกอฮอล์ 25 มิลลิลิตร กับ สารละลายโบรโมครีซอลกรีน 0.2 % ในแอลกอฮอล์ 125 มิลลิลิตร ซึ่งในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น และจะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 4 % boric acid จะได้สารละลายสีเขียว ล้างส่วนปลายของ condenser ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในฟลาสก์ที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้ จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้ใน ฟลาสก์ทั้งหมดมาไทเทรตด้วยสารละลายไฮ ดรอคลอริค มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีม่วงแดง และใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็น blank ทำการทดลองเช่นเดียว กับที่กล่าวมาข้างต้น โดยคำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(Va-Vb) \times N \times 1.4007 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ Va คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต มีหน่วยเป็นนอร์มอล

CF คือ Convection factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นหน่วยโปรตีน (ในที่นี้ใช้ 6.25)

ก.7 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วย Gas chromatography ตามสภาวะของ Limthong และคณะ (2007)

ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลนั้น จะวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas chromatography (Shimadzu GC-9A, Shimadzu, Kyoto, Japan) และมี flame ionization detector คอลัมน์แก้วที่ใช้แพ็คด้วย 20% polyethylene glycol (PEG)-20M (Shimadzu, Kyoto, Japan) อุณหภูมิของ injector, detector port และ column oven คือ 150, 150 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แก๊สไนโตรเจนเป็น carrier gas มีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมี internal standard คือสารละลายไอโซโพรพานอล และ external standard คือสารละลายมาตรฐานเอทานอล 1% ผลที่ได้จะแสดงเป็น % v/v ethanol

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์

ข.1 การตรวจหายีสต์และรา ตามวิธี AOAC.(2005)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง
3. แท่งแก้วรูปตัวแอลสำหรับเขี่ยเชื้อ
4. เครื่อง Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)
5. ไมโครปิเปต (Micropipette) P 200 และ P 1000 (Gilson, France)
6. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract agar (YM agar) (Himedia, India)
2. Normal saline (NaCl) 0.85% (Merck, Germany)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างมาทำให้เจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลาย Normal saline 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำเจือจางตามลำดับ

2. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร YM agar

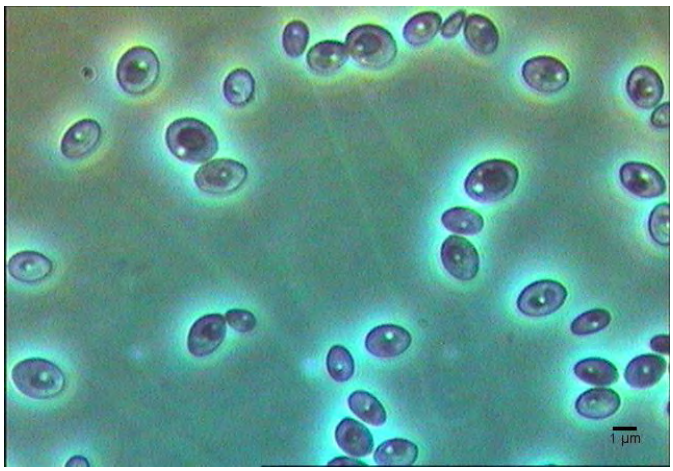
3. ใช้ Spreader จุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ เกลี่ยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วๆ

4. นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนับโคโลนีของยีสต์และราในจานเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี

ภาคผนวก ค

ภาพเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยรูปแบบต่าง ๆเพื่อเตรียมเป็นเซลล์เข้มข้น

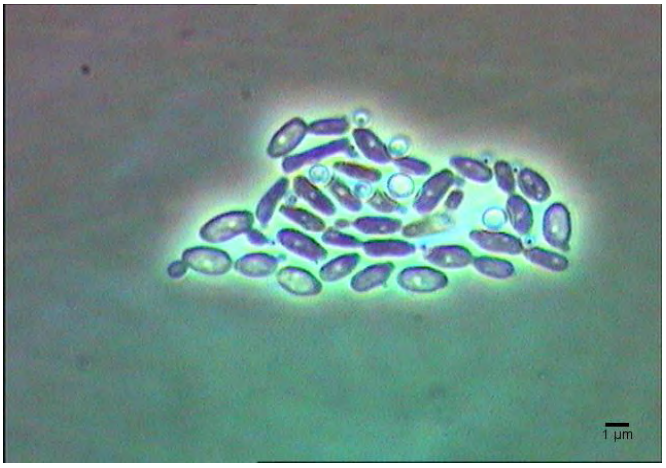
ค.1 การเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 1 คือ YM broth ที่มีเกลือ 1% แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%



รูปที่ ค.1 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 1% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

รูปที่ ค.2 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

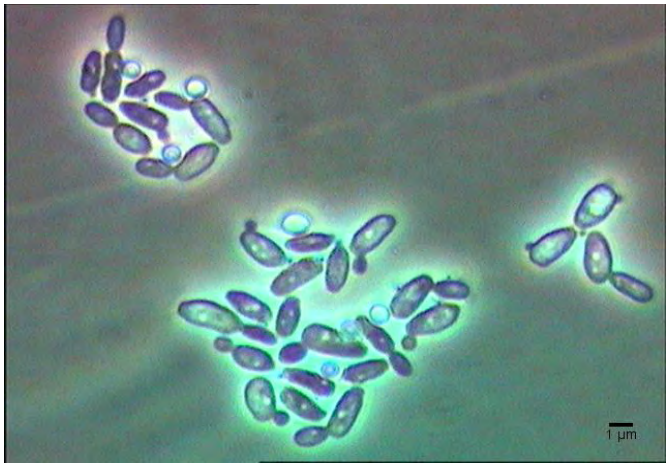
ค.2 การเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 2 คือ YM broth ที่มีเกลือ 5% แล้วเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%



รูปที่ ค.3 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

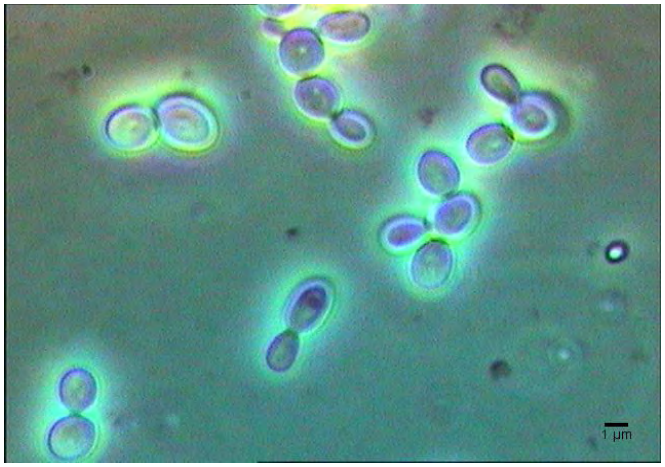
รูปที่ ค.4 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

ค.3 การเพาะเลี้ยงยีสต์แบบที่ 3 คือ YM broth ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 แล้วเลี้ยงต่อใน YM broth ที่มีเกลือ 10% ในรุ่นที่ 2 แล้วเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10%



รูปที่ ค.5 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

รูปที่ ค.6 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ที่มีเกลือ 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า



รูปที่ ค.7 เซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำชีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ 3 มิติ กำลังขยาย 1000 เท่า

ภาคผนวก ง

การคำนวณการเจริญของยีสต์

การเจริญของเซลล์สามารถอธิบายเป็นปริมาณได้เท่ากับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่าต่อหน่วยของเวลา หรือการเพิ่มชีวมวลเป็นสองเท่าต่อหน่วยของเวลา

ถ้าสมมติให้เซลล์เริ่มต้นมี X_0 เซลล์ ผ่านการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไป n ครั้ง (generation) ดังนั้นจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัว n generation จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ $X_0 \times 2^n$ เซลล์

ดังนั้น $X = X_0 \times 2^n$

X_0 คือจำนวนเซลล์เริ่มต้น

X คือจำนวนเซลล์เมื่อเวลา t

t เป็นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญ

n เป็นจำนวนครั้งที่แบ่งตัวเมื่อใช้เวลา t

เมื่อใส่ค่า log

$$\log X = \log X_0 + n \log 2$$

$$n = \frac{\log X - \log X_0}{\log 2}$$

$$= \frac{\log X - \log X_0}{0.301}$$

อัตราการเจริญของยีสต์มักแสดงในรูปของอัตราการเจริญจำเพาะ หรือ specific growth rate (μ) มักแสดงในรูปของจำนวนครั้งที่แบ่งตัวต่อหนึ่งชั่วโมง

ดังนั้น $$\mu = \frac{\log X - \log X_0}{0.301 \times t}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศริยานนท์ พานทอง เกิดเมื่อวันที่ 19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2549 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ศริยานนท์ พานทอง, ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. 2552. การประเมินวิธีการผลิตหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* เข้มข้นที่ยังแอคทีฟ. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6 (ภาคบรรยาย). วันที่ 8-9 ธันวาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.