การประเมินวิธีการผลิตหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* เข้มข้นที่ยังแอคทีฟ

Evaluation Method for the Production of Active Concentrated Starter Culture of *Zygosaccharomyces rouxii*

ศริยานนท์ พานทอง[1] ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา[1] และสุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์[1]

Sariyanon Panthong[1], Cheunjit Prakitchaiwattana[1] and Suttisak Suknaisilp[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการผลิตหัวเชื้อ *Zygosaccharomyces rouxii* เข้มข้นที่ยังแอคทีฟสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตหัวเชื้อสำหรับการหมักซีอิ๊ว การทดลองเริ่มจากการประเมินรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับเตรียมหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ทนเกลือความเข้มข้นสูงได้ โดยทดลองเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือต่างกัน 4 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่ 1 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YMB ที่มีเกลือ 1% ในรุ่นที่ 1 แบบที่ 2 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YMB ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 แบบที่ 3 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YMB ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงใน YMB ที่มีเกลือ 10% ในรุ่นที่ 2 แบบที่ 4 เพาะเลี้ยงยีสต์ใน YMB ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 จากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงจากทั้ง 4 แบบไปประเมินความสามารถในการเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้จากรูปแบบที่ 4 จะเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้สูงสุด โดยมีค่า specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.09 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% จะมีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (μ= 0.14) ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Z.rouxii* เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเข้มข้น คือการเพาะเลี้ยงยีสต์ในรุ่นที่ 1 ด้วย YMB ที่มีเกลือ 5% และในรุ่นที่ 2 ด้วยน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5%

คำสำคัญ : ซีอิ๊ว *Zygosaccharomyces rouxii* หัวเชื้อเข้มข้น

ABSTRACT

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* cultivation to prepare the concentrated starter culture were evaluated. The cultivations were divided into 4 methods. They were; (1) YMB containing

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Food Technology, Faculty of science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

1%NaCl (2) YMB containing 5%NaCl (3) YMB containing 5%NaCl for the first batch and YMB containing 10%NaCl for the second batch (4) YMB containing 5%NaCl for the first batch and soy sauce (SS) containing 10%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 = 0.09 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 cell 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 cell form in SS containing 10%NaCl. It was found that the growth rate of concentrated cell of the both methods were not different (μ = 0.14). According to this study, cultivation of cell in YMB containing 5%NaCl in the first batch and SS containing 5% in the second batch was found as an appropriate method for the production of active concentrated starter culture of *Z. rouxii* .

Keywords : soy sauce, *Zygosaccharomyces rouxii*, concentrated starter culture

E-mail : **sariyanon.p@gmail.com**

คำนำ

ซีอิ๊วเป็นเครื่องปรุงรสที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองและข้าวสาลี กระบวนการหมักจะเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ ยีสต์ รา และแลกติคแบคทีเรีย *Zygosaccharomyces rouxii* เป็นยีสต์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตสารให้กลิ่นรสที่สำคัญในซีอิ๊ว โดยในการผลิตซีอิ๊วในระดับอุตสาหกรรม นิยมใช้ *Z. rouxii* ในรูปแบบของหัวเชื้อบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม ในการหมักจะต้องใช้หัวเชื้อยีสต์ปริมาณมากเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์มากพอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมัก จึงต้องมีการเตรียมหัวเชื้อ *Z. rouxii* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและขยายขนาดการเพาะเลี้ยงหลายขั้นตอน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องใช้เวลานานถึงหนึ่งสัปดาห์ ดังนั้นเพื่อลดขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อ แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่ยังแอคทีฟสำหรับใช้ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ปริมาณมากในขั้นตอนเดียว โดยที่หัวเชื้อยีสต์ที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมักขนาดใหญ่เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อีกหนึ่งครั้งก่อนนำไปหมักซีอิ๊ว และเนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อส่วนใหญ่มักจะใช้น้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ดังนั้นในการผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นจะต้องประเมินวิธีการเพาะเลี้ยงยีสต์ให้ได้เซลล์ที่สามารถเจริญในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือความเข้มข้นสูงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประเมินรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* เพื่อเตรียมเซลล์เข้มข้น

เพาะเลี้ยง *Z. rouxii* ATCC 5044 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามรูปแบบที่แสดงในตารางที่ 1 โดยเลี้ยงยีสต์แต่ละรุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการให้อากาศ

แบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เซลล์ในแต่ละรุ่นจำนวน 10^8 CFU/ml นำคัลเจอร์ที่ได้ในรุ่นสุดท้ายของแต่ละรูปแบบไปเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบ (SS) ที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีน้ำตาล 1.5% โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^5 CFU/ml ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ติดตามอัตราการเจริญทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยการตรวจวัดจำนวนประชากรยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Yeast Malt Agar (YMA)(Himedia, USA) ด้วยการ spread plate และเปรียบเทียบอัตราการเจริญโดยพิจารณาจากค่า specific growth rate (μ) ตามสมการ

$$\mu = \log N_t - \log N_0 / 0.301 \times t$$

เมื่อ N_o เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้น

N_t เป็นจำนวนเซลล์เมื่อทำการแบ่งตัวเป็นเวลา t

t เป็นเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเจริญ

ตารางที่ 1 รูปแบบการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อเตรียมเซลล์เข้มข้น

รูปแบบ	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2
1	YMB ที่มีเกลือ 1%	-
2	YMB ที่มีเกลือ 5%	-
3	YMB ที่มีเกลือ 5%	YMB ที่มีเกลือ 10%
4	YMB ที่มีเกลือ 5%	SS ที่มีเกลือเข้มข้น 5%

2. ประเมินการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Z. rouxii* โดยการเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอน

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์จากรูปแบบที่เหมาะสมที่เลือกจากข้อ 1 มาเพาะเลี้ยงใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 1.5%, 2.5%, 5% และ 7.5% ภายใต้สภาวะเดียวกันกับข้อ 1 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ติดตามอัตราการเจริญทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยใช้วิธีเดียวกันกับข้อ 1

3. ประเมินความสามารถในการเจริญของเซลล์เข้มข้นที่ยังแอคทีฟของ *Z.rouxii* ในถังปฏิกรณ์การหมัก

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่เลือกจากข้อ 1 และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่เลือกจากข้อ 1 แล้วเลี้ยงต่อใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9500 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และตรวจวัดร้อยละการได้กลับของเซลล์ก่อนที่จะนำเซลล์เข้มข้นที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก (รุ่น BEMT-T-5L, Marubishi, Thailand) โดยใช้ SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีปริมาณน้ำตาลตามที่เลือกจากข้อ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เซลล์เริ่มต้น 10^5 CFU/ml ภายใต้สภาวะ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ลิตรต่อนาที ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ติดตามอัตราการเจริญด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1

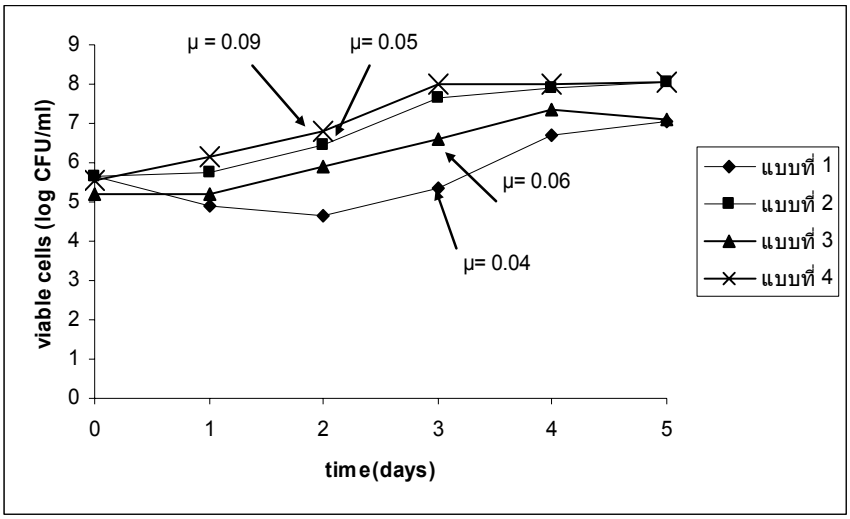
ผลและวิจารณ์

1. การประเมินรูปแบบการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* เพื่อเตรียมเซลล์เข้มข้น

ในการเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* สำหรับเตรียมเป็นหัวเชื้อในการหมักโมโรมิที่มีเกลือความเข้มข้นสูงนั้น จะต้องมีการสร้างความคุ้นเคยต่อเกลือให้กับยีสต์ก่อน เพื่อให้ *Z. rouxii* สามารถเจริญและปรับตัวได้ใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักซีอิ๊วได้ จึงทดลองเพาะเลี้ยง *Z. rouxii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อรูปแบบต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงแต่ละแบบจะสามารถเจริญใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้ต่างกัน โดยจะเห็นว่ายีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแบบที่ 4 จะมีอัตราการเจริญสูงที่สุด มีค่า μ เท่ากับ 0.09 generation/hour ได้จำนวนเซลล์สูงสุดที่ 8.1 log CFU/ml ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่า รูปแบบการเพาะเลี้ยงที่มีการสร้างความคุ้นเคยต่อเกลือให้กับยีสต์ โดยเลี้ยงยีสต์รุ่นที่ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน YMB ที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญ แต่เพิ่มปริมาณเกลือเป็น 5% เพื่อให้ยีสต์เจริญภายใต้ภาวะเครียดจากความเข้มข้นเกลือเพียงอย่างเดียว ซึ่งจะทำให้ยีสต์ค่อยๆปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นเกลือ 5% ได้ จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงต่อในรุ่นที่ 2 ใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 5% ยีสต์จะต้องปรับตัวภายใต้ภาวะเครียดจากน้ำซีอิ๊วดิบ (องค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วดิบแสดงดังตารางที่ 2)แต่เนื่องจากยีสต์ได้ปรับตัวให้ทนต่อเกลือ 5% มาก่อนแล้ว ทำให้ยังคงเจริญใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 5%ได้ มีรายงานว่ายีสต์กลุ่ม halotolerant มีกลไกการปรับตัวในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงด้วยการขับ Na^+ ออกจากเซลล์ผ่านทาง Na^+/H^+-antiporter โดยแรงขับของ H^+- gradient ที่เกิดจากกลไกของ plasma membrane H^+-ATPase รวมถึงลดการ influx Na^+เข้าสู่เซลล์ (Watanabe และคณะ ,1995; Watanabe และคณะ, 1999) จากเหตุผลดังกล่าว เมื่อนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงจากรุ่นที่ 2 ของแบบที่ 4 ไปเลี้ยงต่อใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ในรุ่นต่อไปยีสต์จึงสามารถทนต่อ SS และปรับตัวเข้ากับ SS ที่มีความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่าเซลล์ที่เตรียมจากรูปแบบอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วดิบ (SS) ที่มีเกลือเข้มข้น 5% และ 10%

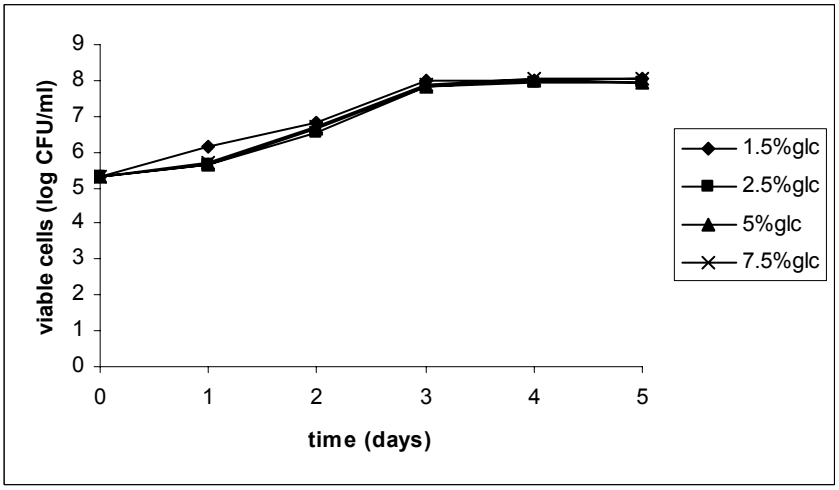
องค์ประกอบ	SS ที่มีเกลือเข้มข้น 5%	SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10%
ค่า pH	4.35	4.35
ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	0.73%	1.50%
ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้	2.25%	2.25%
ปริมาณ reducing sugar	0.73%	1.50%
ปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	2.35%	4.70%
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	0.38%	0.75%



ภาพที่ 1 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* ATCC 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 แบบใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10%

2. การประเมินการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Z. rouxii* โดยการเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอน

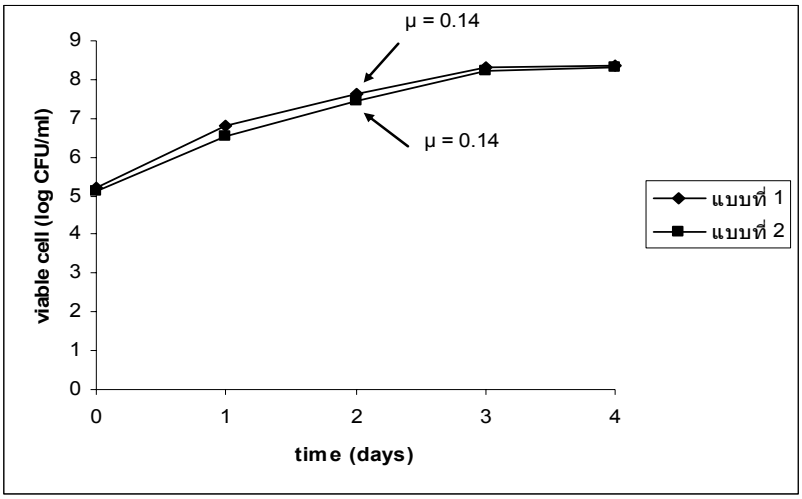
จากการทดลองในข้อ 1 พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากแบบที่ 4 จะสามารถเจริญใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ได้ดีกว่าแบบอื่นๆ และจำนวนเซลล์สูงสุดที่เลี้ยงได้คือ 8.1 log CFU/ml ดังนั้นจึงมีการทดลองเพิ่มสารอาหารให้ยีสต์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น โดยทดลองเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนด้วยน้ำตาลกลูโคสใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ที่เตรียมจากแบบที่ 4 ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคส อัตราการเจริญของยีสต์ใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ไม่ได้ใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสภาวะที่ยีสต์เจริญภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ยีสต์จะต้องปรับตัวให้สามารถทนอยู่ได้ด้วยการเพิ่มอัตราการขับ Na^+ ออกจากเซลล์ และลดการ influx Na^+ เข้าสู่เซลล์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งอาจส่งผลต่อกระบวนการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้ในการเจริญด้วย จึงอาจทำให้ยีสต์ไม่ใช้น้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในระบบในการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว



ภาพที่ 2 อัตราการเจริญของ *Z. rouxii* ATCC 5044 ที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 ใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน

3. การประเมินความสามารถในการเจริญของเซลล์เข้มข้นที่ยังแอคทีฟของ *Z.rouxii* ในถังปฏิกรณ์การหมัก

เมื่อได้รูปแบบการผลิตเซลล์ที่ทำให้ยีสต์สามารถทนเกลือความเข้มข้นสูง 10% ได้ ซึ่งก็คือการเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยรูปแบบที่ 4 จึงทดลองนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% มาทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นเหวี่ยง แล้วนำเซลล์เข้มข้นเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีน้ำตาล 1.5% ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์สำหรับผลิตหัวเชื้อในการหมักโมโรมิโดยทั่วไป ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่า เซลล์เข้มข้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 และเซลล์เข้มข้นที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงด้วยแบบที่ 4 แล้วเลี้ยงต่อใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.14 generation/hour แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยแบบที่ 4 เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเป็นเซลล์เข้มข้นสำหรับใช้ในการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์การหมัก เนื่องจากได้จำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน แต่ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าอีกแบบหนึ่ง ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาที่ใช้ในการเตรียมเซลล์เข้มข้นสำหรับผลิตหัวเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักได้อีกด้วย



ภาพที่ 3 อัตราการเจริญของเซลล์เข้มข้นของ *Z. rouxii* ATCC 5044 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบที่ 4 และเซลล์เข้มข้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% ในถังปฏิกรณ์การหมักที่มี SS ที่มีเกลือเข้มข้น 10% และมีปริมาณน้ำตาล 1.5% เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า วิธีการผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นที่เหมาะสม คือ การเพาะเลี้ยงด้วย YMB ที่มีเกลือ 5% ในรุ่นที่ 1 และเพาะเลี้ยงต่อในน้ำซีอิ๊วดิบที่มีเกลือเข้มข้น 5% ในรุ่นที่ 2 ซึ่งรูปแบบการผลิตที่ได้จะนำไปใช้ในการผลิตหัวเชื้อเข้มข้นที่ยังแอคทีฟและศึกษาสภาวะการเก็บรักษาหัวเชื้อเข้มข้นสำหรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตหัวเชื้อยีสต์เข้มข้นเพื่อการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ มณีศรี. 2550. เทคโนโลยีการหมัก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

วรรณี เทพสิงห์. 2540. การพัฒนากล้ายีสต์สำหรับการหมักซีอิ๊ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Washington D.C. Association of Official Analytical Chemists.

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.

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

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.

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., Miwa, S. and Tamai, Y. 1995. Characterization of Na^+/H^+ -Antiporter Gene Closely Related to the Salt-Tolerant of Yeast. Yeast. 11:829-838.