



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการพัฒนาหัวเชื้อต้นแบบในการหมักโมโรมิสำหรับการผลิตชีอิ้ว

โดย นายสิทธิวัฒน์ เลิศศิริ และคณะ

ธันวาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการพัฒนาหัวเชื้อต้นแบบในการหมักโมโรมิสำหรับการผลิตชีอิ้ว

คณะผู้วิจัย

1 นายสิทธิวัฒน์ เลิศศิริ

2 นางสาวอภิญญา อัสวนิก

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ มหาวิทยาลัยมหิดล
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ใช้ปรุงอาหารและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเทคโนโลยีการผลิตในอุตสาหกรรมซีอิ๊วของประเทศไทยได้รับการพัฒนามาในระดับหนึ่งแล้วตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ได้แก่ การพัฒนาต้นเชื้อราบริสุทธิ์ (pure starter culture) สำหรับหมักโคจิจากสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus oryzae* เพื่อลดระยะเวลาในการหมักและให้คุณภาพคงที่ นอกจากนี้กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ทดลองแยกเชื้อและการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) และเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักซีอิ๊ว อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในเวลานั้นประเทศไทยยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับสารให้กลิ่นรสของซีอิ๊วซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์ โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาต้นเชื้อบริสุทธิ์ต้นแบบสำหรับการหมักโมโรมิในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดยในต้นเชื้อประกอบด้วยเชื้อ LAB ได้แก่ *Tetragenococcus halophilus* TS71 จาก collection ที่มีอยู่ซึ่งคัดเลือกไว้ก่อนหน้านี้แล้วที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ในโครงการ ส่วนเชื้อยีสต์ที่ใช้ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii* A22 ซึ่งจะใช้เพียงตัวเดียวหรือใช้ *Z. rouxii* A22 ร่วมกับ *Pichia guilliermondii* EM1Y52 เพื่อเพิ่มการผลิตสารระเหยให้กลิ่นก็ได้ โดยสายพันธุ์ทั้งสองถูกคัดแยกมาจากตัวอย่างโมโรมิในโรงงานซีอิ๊วและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สนใจจากความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของซีอิ๊วไทย โดยเชื้อต่างๆ ที่ถูกคัดเลือกมาจะนำไปศึกษาผลที่มีต่อการหมักโมโรมิในระบบจำลองของการหมักโมโรมิโดยใช้น้ำโมโรมิเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน แล้วจึงนำไปทดลองลงในกระบวนการหมักซีอิ๊วจริงในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (500 ลิตร) ซึ่งพบว่าต้นเชื้อที่คัดเลือกมานั้นสามารถทำให้กลิ่นของซีอิ๊วดิบเปลี่ยนแปลงไปในคุณลักษณะที่ดี เช่น กลิ่นหอมหวาน โดยไม่มีกลิ่นผิดปกติหรือคุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่แตกต่างไปจากชุดควบคุม ตลอดจนปริมาณ biogenic amine ที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงถึงความปลอดภัยของการใช้ต้นเชื้อเหล่านี้ ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้สนับสนุนแนวความคิดที่ว่า เชื้อ LAB นั้นส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ซึ่งการเติมต้นเชื้อ LAB ลงไปก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไปน่าจะส่งผลให้ยีสต์เจริญและมีกิจกรรมที่ดี โครงการวิจัยนี้ยังค้นพบบทบาทของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* ในการผลิตสารจำพวก volatile phenolic compounds และยังมีบทบาทในการส่งเสริมการผลิตสารระเหยให้กลิ่นโดย *Z. rouxii* ซึ่งเดิมทีไม่มีใครให้ความสำคัญมาก่อนอีกด้วย

คำสำคัญ : ซีอิ๊ว ต้นเชื้อ โมโรมิ สารระเหยให้กลิ่นรส *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia guilliermondii*

ABSTRACT

Soy sauce is fermented soybean product which is widely consumed as a condiment in Thailand. Up to know, technologies related to Thai soy sauce production have been improved, e.g. application of pure starter culture of *Aspergillus oryzae* for koji making which shorten time and lead to constant quality. Apart from this starter culture, development of lactic acid bacteria (LAB) and yeast starter culture for moromi fermentation have been attempted by Food Biotechnology research group at Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University. Knowledge of volatile flavor profile in Thai soy sauce which recently established enables the selection of LAB and yeast strains based on their flavor volatile production. Moromi starter cultures including *Tetragenococcus halophilus* TS71, *Zygosaccharomyces rouxii* A22, and *Pichia guilliermondii* EM1Y52 were developed in this research project. *T. halophilus* has been isolated previously and showed better performances than isolates from the present project. The two yeast strains were isolated from moromi mash. *Z. rouxii* A22 could be individually applied or co-applied with *P. guilliermondii* in moromi fermentation to enhance flavor volatile compound production. The production of volatile flavor compounds of each strain of interest was firstly monitored in a moromi model system containing moromi liquid as culture medium prior to trial in pilot scale soy sauce fermentation. When the strains were applied with soy sauce fermentation (500 litres), good characteristics such as sweet odor, no off-odor, and low biogenic amine content of raw soy sauce were obtained. The results of pilot scale fermentation also supported the concept that LAB enhances growth and activity yeasts. The results suggested that LAB could be inoculated one week prior to yeast inoculation. Moreover, role of *P. guilliermondii* to enhance volatile flavor compound production by *Z. rouxii* has been discovered by this study.

Keywords: Soy sauce, starter culture, moromi fermentation, volatile flavor compounds, *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia guilliermondii*

Executive Summary

ชีอิ้วเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ใช้ปรุงอาหารและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเทคโนโลยีการผลิตในอุตสาหกรรมชีอิ้วของประเทศไทยได้รับการพัฒนามาในระดับหนึ่งแล้วตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน หนึ่งในความสำเร็จของการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพของไทยที่ส่งผลต่อการพัฒนาของอุตสาหกรรมการผลิตชีอิ้วได้แก่ การพัฒนาต้นเชื้อราบริสุทธิ์ (pure starter culture) สำหรับหมักโคจิจากสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus oryzae* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักชีอิ้วแบบดั้งเดิมของไทยซึ่งได้นำมาผลิตใช้จริงในอุตสาหกรรมจนถึงปัจจุบัน โดยที่ต้นเชื้อรานี้สามารถลดเวลาการหมักโคจิจากแบบดั้งเดิมจาก 7 วัน เหลือแค่ 40 ชั่วโมง รวมทั้งทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างคงที่ ในแต่ละรอบการผลิต นอกจากนี้กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารและอุตสาหกรรมของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ทดลองแยกเชื้อและการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) และเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักชีอิ้ว อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในเวลานั้นประเทศไทยยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับสารให้กลิ่นรสของชีอิ้วซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์ โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาต้นเชื้อบริสุทธิ์ต้นแบบสำหรับการหมักโมโรมิในกระบวนการหมักชีอิ้ว โดยในต้นเชื้อประกอบด้วยเชื้อ LAB และ เชื้อยีสต์ โดยเชื้อ LAB ได้แก่ *Tetragenococcus halophilus* TS71 จาก collection ที่มีอยู่ซึ่งคัดเลือกไว้ก่อนหน้านี้แล้วดีกว่าตัวที่ได้ใหม่จากโครงการวิจัยนี้ ส่วนเชื้อยีสต์ที่ใช้ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii* A22 ซึ่งจะใช้เพียงตัวเดียวหรือใช้ *Z. rouxii* A22 ร่วมกับ *Pichia guilliermondii* EM1Y52 เพื่อเพิ่มการผลิตสารระเหยให้กลิ่นก็ได้ โดยสายพันธุ์ทั้งสองถูกคัดแยกมาจากตัวอย่างโมโรมิในโรงงานชีอิ้วซึ่งได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่สนใจจากความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ของชีอิ้วไทย โดยเชื้อต่างๆ ที่ถูกคัดเลือกมานำไปศึกษาผลที่มีต่อการหมักโมโรมิในระบบจำลองของการหมักโมโรมิโดยใช้น้ำโมโรมิเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นต้นก่อน แล้วจึงนำเชื้อที่มีความเป็นไปได้ไปทดลองลงในกระบวนการหมักชีอิ้วจริงในระดับกึ่งอุตสาหกรรมต่อไป จากผลการศึกษานี้พบว่ต้นเชื้อสามารถทำให้เกิดการสะสมของสารระเหยให้กลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ของชีอิ้วไทยได้ในปริมาณเพิ่มขึ้น

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกไปทดลองเป็นต้นเชื้อในหมักชีอิ้วจริงในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (500 ลิตร) พบว่าต้นเชื้อที่คัดเลือกมานั้นสามารถทำให้กลิ่นของชีอิ้วดิบเปลี่ยนแปลงไปในคุณลักษณะที่ดี เช่น กลิ่นหอมหวาน โดยไม่มีกลิ่นผิดปกติหรือคุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่แตกต่างไปจากชุดควบคุม ตลอดจนปริมาณ biogenic amine ที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงถึงความปลอดภัยของการใช้ต้นเชื้อเหล่านี้ ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้สนับสนุนแนวความคิดที่ว่า เชื้อ LAB นั้นส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ซึ่งการเติมต้นเชื้อ LAB ลงไปก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไปน่าจะส่งผลให้ยีสต์เจริญและมีกิจกรรมที่ดี โครงการวิจัยนี้ยังค้นพบบทบาทของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* ในการผลิตสารจำพวก volatile phenolic compounds และยังมีบทบาทในการส่งเสริมการผลิตสารระเหยให้กลิ่นโดย *Z. rouxii* ซึ่งเดิมทีไม่มีใครให้ความสำคัญมาก่อนอีกด้วย

เนื้อหาบทวิจัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ใช้ปรุงอาหารและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเทคโนโลยีการผลิตในอุตสาหกรรมซีอิ๊วของประเทศไทยได้รับการพัฒนามาในระดับหนึ่งแล้วตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยจักรกลหนึ่งที่มีผลทำให้การพัฒนาปรับปรุงเทคโนโลยีการหมักซีอิ๊วระดับอุตสาหกรรมให้ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ได้แก่ โครงการวิจัยการพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดย่อมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมีการจัดตั้งหน่วยควบคุมคุณภาพ และถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อการผลิตซีอิ๊ว (Quality Control and Training Center for Soybean Fermentation (QCTC-Soybean Fermentation)) ดำเนินการโดย ศาสตราจารย์ ดร. อมเรศ ภูมิรัตน และคณะจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล รวมทั้งได้รับความร่วมมือจากชมรมผู้ประกอบการซีอิ๊ว โดยหน่วยงานนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ และ Carl Duisberg Gesellschaft E.V. หนึ่งในความสำเร็จที่มีผลดีต่ออุตสาหกรรมนี้ได้แก่ การพัฒนาหัวเชื้อราบริสุทรี (pure starter culture) สำหรับหมักโคจิจากสายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus oryzae* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักซีอิ๊วของไทยซึ่งได้นำมาผลิตใช้จริงในอุตสาหกรรมจนถึงปัจจุบัน โดยที่หัวเชื้อนี้สามารถลดเวลาการหมักโคจิตามแบบดั้งเดิมจาก 7 วัน เหลือแค่ 40 ชั่วโมง รวมทั้งทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างคงที่ในแต่ละรอบการผลิต นอกจากนี้ยังมีการประดิษฐ์คิดค้นเครื่องมือต่างๆ เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่โรงงานอุตสาหกรรมขนาดย่อมและขนาดกลาง ได้แก่ เครื่องนึ่งถั่วเหลืองที่ให้อุณหภูมิและความดันสูงเพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนและให้ถั่วเหลืองนิ่ม ทำให้ถูกย่อยโดยเชื้อในโคจิได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการสร้างเครื่องหมักโคจิที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในการหมักให้เหมาะสม รวมทั้งการนำถังไฟเบอร์กลาสมาใช้แทนโถดินในการหมักโมโรมิ ซึ่งนับเป็นก้าวสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊วขนาดกลางและขนาดย่อมในประเทศไทย (Mongkolwai, Assavanig, Amnajsongsiri, Flegel and Bhumiratana, 1997)

ในการหมักซีอิ๊วของไทยนั้น เริ่มจากการแช่ถั่วเหลืองและนึ่ง แล้วนำมาคลุกกับแป้งข้าวเจ้าหรือแป้งสาลีที่คั่วแล้ว จากนั้นเติมหัวเชื้อโคจิลงไปผสม บ่มจนได้โคจิ เมื่อได้โคจิตามต้องการแล้ว นำโคจิลงหมักต่อน้ำเกลือเข้มข้น 22-23% จนกระทั่งได้ สี กลิ่น ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำโมโรมิและกรดตามต้องการ จากนั้นนำโมโรมิไปบีบอัดเพื่อกรองเอาส่วนน้ำไปปรุงรส แล้วนำไปต้มเพื่อให้ได้กลิ่นรสดีขึ้นและฆ่าเชื้อก่อนบรรจุขวดเพื่อวางจำหน่ายต่อไป โดยในกระบวนการหมักโมโรมิใช้เวลาประมาณ 45-60 วัน สำหรับในอุตสาหกรรมหมักซีอิ๊วของญี่ปุ่นนั้น เมื่อเทียบกับประเทศไทย หรือประเทศจีน ซึ่งเป็นต้นตำรับในการหมักซีอิ๊วกว่า 2,000 ปี อุตสาหกรรมหมักซีอิ๊วของญี่ปุ่นมีการสังเคราะห์และพัฒนาเทคโนโลยีมาโดยตลอดจนก้าวหน้าไปอย่างมาก ในการหมักซีอิ๊วของญี่ปุ่นนั้น มีการใช้หัวเชื้อบริสุทรีในการผลิตที่ซับซ้อนกว่า โดยนอกเหนือจากการใช้หัวเชื้อโคจิแล้ว ยังใช้หัวเชื้อบริสุทรีในขั้นตอนการหมักโมโรมิด้วย โดยประกอบด้วยเชื้อ *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็น Lactic acid bacteria (LAB) รวมทั้งยีสต์สายพันธุ์ *Zygosaccharomyces rouxii* หรือใช้ร่วมกับยีสต์ *Candida versatilis* เพื่อย่นระยะเวลาการหมักให้สั้นลง รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพคงที่โดยเฉพาะในแง่ของกลิ่นรส ซึ่งหัวเชื้อนี้มีใช้มานานกว่า 20 ปีแล้ว (Sugiyama, 1984)

สำหรับประเทศไทยเรานั้น กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารและอุตสาหกรรม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ lactic acid bacteria และเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักซีอิ๊ว ทดลองแยกเชื้อต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการหมัก (Sukthavorn, 1996; Mongkolwai, Assavanig, Amnajsongsiri, Flegel and Bhumiratana, 1997) รวมทั้งการเตรียมหัวเชื้อ *T. halophilus* ในระดับห้องปฏิบัติการและทดลองใช้ในการหมัก pilot scale (Pongtanya, Valyasevi, Tapingkae, Srimarut, Dumnit and Assavanig, 2008) ซึ่งทำให้มีองค์ความรู้สั่งสมอยู่ในระดับหนึ่งแล้ว อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็น

หัวเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในขณะที่ทำการศึกษา นั้น ประเทศไทยยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับสารให้กลิ่นรสของชีอิ้ว ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์ จึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม ในข้อเสนอโครงการนี้มุ่งที่จะสร้างหัวเชื้อบริสุทธิ์ต้นแบบสำหรับการหมักโมโรมิในกระบวนการหมักชีอิ้ว โดยแบ่งเป็นหัวเชื้อ lactic acid bacteria และเชื้อยีสต์ โดยคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อจาก stock ที่มีอยู่หรือคัดเลือกเพิ่มเติม โดยหัวเชื้อเหล่านี้จะทำให้ได้ผลผลิตชีอิ้วที่มีกลิ่นรสที่ดีและปลอดภัย รวมทั้งการผลิตที่ได้คุณภาพคงที่ อุตสาหกรรมการผลิตชีอิ้วในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ บางโรงงานใช้หัวเชื้อราและยีสต์ โครงการวิจัยนี้จะเป็นงานแรกที่ให้องค์ความรู้อย่างสมบูรณ์ของการผลิตชีอิ้วในประเทศไทยที่ใช้หัวเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ รา แบคทีเรีย (LAB) และยีสต์ โดยอิงกับคุณลักษณะเอกลักษณ์ของสารระเหยให้กลิ่นรสชีอิ้ว (สิทธิวัฒน์ และคณะ, 2547) และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสจากตัวแทนชมรมผู้ประกอบการชีอิ้ว องค์ความรู้ที่เกิดจากโครงการวิจัยนี้จะช่วยในการปรับปรุงกลิ่นรสของชีอิ้วไทยจากการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ (starter cultures) ที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิต พร้อมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการจัดตั้งมาตรฐาน และการพัฒนากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชีอิ้ว เป็นการพัฒนาการผลิตชีอิ้วให้ได้มาตรฐานสากลเหมาะสมกับการบริโภคทั้งในประเทศไทยและการส่งออก ต่อไป

งานวิจัยที่ผ่านมา

สารให้กลิ่นรสในชีอิ้ว

จากงานวิจัยสารระเหยให้กลิ่นรสในชีอิ้วญี่ปุ่นพบว่า สารระเหยให้กลิ่นรสที่มีบทบาทต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ (character impact compound) คือสาร 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (หรือ HEMF) ที่ให้กลิ่นหอมหวาน กลิ่นคาราเมล ส่วนสารอื่นๆ ที่มีบทบาทรองลงมาได้แก่ สารในกลุ่ม 4-hydroxy furanone เช่น 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (หรือ HDMF) และ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (หรือ HMMF) สารประกอบฟีนอล เช่น 4-ethylguaiacol และ 4-ethylphenol สารพวก higher alcohol เช่น isobutyl alcohol, isoamyl alcohol และ propyl alcohol รวมทั้ง methionol สารประกอบ gamma pyrone สารประกอบ pyrazine สารประกอบ aldehyde นอกจากนี้ยังมี ethanol และ acetic acid ที่มีปริมาณมากในชีอิ้วอีกด้วย สารระเหยเหล่านี้เกิดขึ้นจาก biosynthesis และ ปฏิกิริยาเคมี ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก โดยจะมีความแตกต่างกันไปตามวิธีการหมักและเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง (van der Sluis, Tramper and Wijffels, 2001) ยกตัวอย่างรายงานการวิจัยสารระเหยให้กลิ่นรสชีอิ้วของเกาหลี ที่มีสาร 2,6-dimethyl pyrazine สาร benzaldehyde สาร guaiacol สาร phenol และ สาร bezeneethanol เป็นสารสำคัญ (Lee, Seo, and Kim, 2006) ชีอิ้วอินโดนีเซียซึ่งทำจากถั่วดำนั้นมี 2-methyldihydro-3(2H)-furanone เป็น character impact compound (Apriyantono, Husain, Lie, Jodoamidjojo and Puspitasari-Nienaber, 1999) สำหรับสารระเหยให้กลิ่นรสในชีอิ้วไทยนั้น ทางกลุ่มผู้เสนอโครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาไว้พบว่า มีสารระเหยที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นของชีอิ้วไทยอยู่มากกว่า 90 สาร โดยสารที่สำคัญ ได้แก่สาร methional สาร methyl butanoic acid สารพวกแอลดีไฮด์ ได้แก่ 2-methyl propanal และ methyl butanal สารพวก higher alcohol ได้แก่ butanol, propanol, และ 2-methyl-1-propanol รวมทั้งสารประกอบ phenol ได้แก่ สาร guaiacol โดยจากการสำรวจชีอิ้วไทยจำนวน 51 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม แบ่งตามปริมาณสารระเหย 3 พวก ได้แก่ volatile acid สารประกอบ aldehyde และ สารกลุ่ม alcohol (Wanakhachornkrai and Lertsiri, 2003)

บทบาทของเชื้อ lactic acid bacteria และ เชื้อยีสต์ในการสร้างสารให้กลิ่นรส

ในกรณีของชีอิ้วญี่ปุ่น หลังจากที่ทำโคจิลงหมักในน้ำเกลือความเข้มข้น 22-23% แล้วนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือจะเหลือ 17% และสภาวะการหมักจะเป็นลักษณะ semi-anaerobic condition แม้หัวเชื้อราที่หมักโคจิคือเชื้อ *Aspergillus* จะตายไป แต่เอนไซม์ของรานี้จะยังคงทำงานอยู่ โดยจะย่อยถั่วเหลืองและแป้งที่เป็นวัตถุดิบในการผลิต ให้ได้กรดอะมิโนและน้ำตาลที่เชื้อ lactic acid bacteria และเชื้อยีสต์ที่ทนเกลือ (salt-tolerant) นำไปใช้ในการเจริญได้ เชื้อ Lactic acid bacteria หลักที่สามารถเจริญได้ในภาวะของการหมักโมโรมิ ได้แก่ เชื้อ *Tetragenococcus halophilus*

(เดิมจำแนกเป็น *Pediococcus halophilus*) (Collins, Williams and Wallbanks, 1990) ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้ก็พบในกระบวนการผลิตซีอิ๊วของไทยเช่นกัน (Sukthavorn, 1996) เชื้อ lactic acid bacteria จะผลิต lactic acid รวมทั้ง volatile acid อื่นๆ เช่น acetic acid รวมทั้งย่อยเปปไทด์ให้ได้เป็นกรดอะมิโน ทำให้ pH ของระบบการหมักลดลงจาก 7 ไปเป็น pH ต่ำกว่า 5 จากนั้น เชื้อยีสต์ทนเกลือ ที่สำคัญ ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii* (เดิมจำแนกเป็น *Saccharomyces rouxii* (<http://www.genolevures.org/zyro.html>) จึงเริ่มเจริญขึ้น โดยในภาวะที่มีเกลือ *Z. rouxii* จะใช้กลูโคส เชื้อนี้จะทนเกลือได้เมื่อ pH ต่ำลง โดยจะผลิต ethanol และ higher alcohol รวมทั้ง สารกลุ่ม 4-hydroxyfuranones ที่สำคัญ คือ HEMF จากนั้น *Z. rouxii* จะเริ่มลดบทบาทลง แล้วเชื้อยีสต์อีกกลุ่มหนึ่ง เช่น *Candida versatilis* (เดิมจำแนกเป็น *Torulopsis*) (Sugiyama, 1984) และ *C. etchellsii* ซึ่งจะใช้น้ำตาล maltose จะเริ่มเจริญได้ดี และผลิต volatile phenolic compound ที่สำคัญต่อกลิ่นรส เช่น 4-ethyl guaiacol และ 4-ethyl phenol (van der Sluis, Tramper and Wijffels, 2001)

Lactic acid bacteria จะสามารถผลิตกรดพวก iso-butyric acid และ iso-valeric acid จากกระบวนการ oxidation โดยใช้เอนไซม์จากสารตั้งต้นแอลกอฮอล์และแอลดีไฮด์ที่เกี่ยวข้อง นอกนั้นกระบวนการ pyruvate catabolism และ beta-oxidation ยังก่อให้เกิดสาร diacetyl และ acetoin รวมทั้ง methyl ketone ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม lactic acid bacteria ยังไม่มีบทบาทในการเกิดสารให้กลิ่นรสมากนักในการหมักซีอิ๊ว เชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารให้กลิ่นรสได้แก่ เชื้อยีสต์ โดย *Z. rouxii* จะใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ethanol ส่วน higher alcohol นั้น จะผลิตจาก alpha-keto acid โดยผ่านกระบวนการ decarboxylation และ reduction ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ amino acid biosynthesis นอกจากนี้สามารถผลิต higher alcohol จาก amino acid catabolic pathway (Ehrlich pathway) โดยใช้กรดอะมิโนจากภายนอกเซลล์เป็น substrate ผ่านกระบวนการ deamination และ transamination สำหรับสารกลุ่ม 4-hydroxy furanone ได้แก่ HEMF และ HDMF นั้น *Z. rouxii* จะใช้สาร Maillard intermediate ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมี Maillard ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนในกรณีของ *C. versatilis* ผลิตสาร 4-ethylguaiacol และ 4-ethylphenol จากกระบวนการ decarboxylation และ reduction โดยมี ferulic acid และ p-coumaric acid ที่มาจากวัตถุดิบเป็น substrate (van der Sluis, Tramper and Wijffels, 2001)

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่จะใช้เป็นกล่าเชื้อบริสุทธิ์

ในการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อของญี่ปุ่นนั้น (Sugiyama, 1984) คำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

1) เชื้อที่ใช้ผลิตโคจิ เป็น *Aspergillus oryzae* หรือ *A. sojae* ที่ไม่ผลิต mycotoxin เช่น สาร aflatoxin สาร ochratoxin และ สาร sterigmatocystin ในทุกสภาวะการเจริญ และผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและแป้ง รวมทั้งเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า macerating enzyme เช่น เอนไซม์ pectinase เอนไซม์ cellulase และ hemicellulase ที่ช่วยย่อยถั่วเหลือง ทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถเข้าถึง substrate ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนั้นในโคจิยังมีเอนไซม์ glutaminase ที่เปลี่ยน glutamine เป็น glutamic acid ที่จะมีผลต่อรสอูมามิ (umami) ของซีอิ๊วอีกด้วย

2) เชื้อ lactic acid bacteria ที่ใช้ในการหมักโมโรมิ เป็น *Tetragenococcus halophilus* ที่สามารถผลิต lactic acid และ กรดอินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ สามารถทำให้ pH ลงถึง 4.7- 4.8 ภายใต้อากาศที่มีเกลือสูง อาจถึง 24% โดยมีค่า water activity (Aw) =0.808 นอกจากนั้นยังต้องไม่ผลิตเอนไซม์ tyrosine decarboxylase และ histidine decarboxylase อีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์สองตัวนี้ก่อให้เกิด tyramine และ histamine

3) เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักโมโรมิ เป็น *Zygosaccharomyces rouxii* โดยเชื้อยีสต์นี้เริ่มมีกิจกรรมเมื่อ pH ของระบบต่ำกว่า 5 โดยเชื้อยีสต์นี้สามารถผลิต ethanol และ glycerol รวมทั้งสารให้กลิ่นรสอื่นๆ ได้ที่สภาวะที่มีเกลือสูง

4) เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักโมโรมิในระยะหลังจากที่ *Z. rouxii* เริ่มมีกิจกรรมน้อยลง เป็นเชื้อ *Candida versatilis* และ *C. etchellsii* โดยเชื้อยีสต์นี้ผลิตสารให้กลิ่นรสอื่นๆ ได้ที่สภาวะที่มีเกลือสูงได้

สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราบริสุทธิ์ *A. oryzae* เพื่อเป็นหัวเชื้อโคจิของไทยที่ใช้อยู่ในขณะนี้ จะมีเกณฑ์ต่างๆ ที่ใช้พิจารณา คือ สามารถผลิต extracellular protease และ amylase ได้ดี สีของ conidia ที่อ่อน ไม่สร้าง mycotoxin และสามารถเจริญได้ดีตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมของไทย โดยหัวเชื้อราจะอยู่ในรูปของ ผงสปอร์ ซึ่งมีการผลิตเป็นการค้าแล้วตั้งได้กล่าวไว้ข้างต้น ในกระบวนการหมักซีอิ๊วโดยใช้จุลินทรีย์นั้น เอนไซม์หลายชนิดมีความสำคัญ แต่ที่เด่นชัด คือ proteases และ amylases เพื่อย่อยถั่วเหลือง และแบ่ง ให้เป็นกรดอะมิโน และน้ำตาลตามลำดับ ซึ่งมักใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ในการคัดเลือกสายพันธุ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *A. oryzae* อย่างไรก็ดี ตาม การประยุกต์ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต glutaminase ด้วยก็เป็นที่น่าสนใจ ซึ่งมีรายงานว่า มีการทำงานของ glutaminase ในกระบวนการโคจิและโมโรมิ เปลี่ยน L-glutamine ซึ่งเป็นสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นจากการย่อย โปรตีนที่อยู่ในถั่วเหลืองและแบ่งข้าวเจ้าหรือแป้งสาลี ไปเป็นกรดกลูตามิก (glutamic acid) ซึ่งปริมาณกรดกลูตามิกจะเป็นตัวทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์น่าบริโภคมากขึ้น เนื่องจากการดอะมิโนกลูตามิกเป็นตัวที่ทำให้เกิดรสที่เรียกว่า “อูมา มิ (umami)” ซึ่งเป็นรสเฉพาะตัวของซีอิ๊ว (unique flavor of fermented soy sauce) (Ohshita, Nakajima, Yamakoshi, Kataoka, Kikuchi and Pariza, 2000; Wakayama, Yamagata, Kamemura, Bootim, Yano, Tachiki, Yoshimune, Moriguchi, 2005) นอกจากนี้กรดกลูตามิกยังใช้เป็นตัวบ่งบอกว่า ซีอิ๊วที่ได้จากการหมักมีระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมและมีคุณภาพดีหรือไม่ กล่าวคือ ถ้าซีอิ๊วที่ผลิตได้มีปริมาณกรดกลูตามิกมากแสดงว่าซีอิ๊วนั้นหมักได้นานและมีคุณภาพดี

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Tetragenococcus halophilus* และ ยีสต์ ที่เหมาะสมสำหรับเป็นหัวเชื้อในการผลิตซีอิ๊ว
- 2) เพื่อผลิตหัวเชื้อแบคทีเรีย *Tetragenococcus halophilus* และ ยีสต์ต้นแบบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว
- 3) เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของการใช้หัวเชื้อรา (*Aspergillus oryzae*) แบคทีเรีย (*Tetragenococcus halophilus*) และ ยีสต์ กับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วทางด้านคุณลักษณะรสชาติและกลิ่นรสซีอิ๊ว และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสจากตัวแทนชมรมผู้ประกอบการซีอิ๊ว

ระเบียบวิธีวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์

คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างโคจิ โมโรมิ 1 เดือน โมโรมิ 2 เดือน และ โมโรมิ 3 เดือน ที่เก็บจากโรงงาน ด้วยกระบวนการ 2 กระบวนการที่ความเข้มข้นเกลือแตกต่างกัน ได้แก่กระบวนการ A เกลือ 5% (Non-enrichment) และ กระบวนการ B เกลือ 10% (non-enrichment และ enrichment) ตามรายละเอียดดังนี้

กระบวนการ A

ตัวอย่างโคจิและโมโรมิจะถูกทำให้เจือจางด้วย 0.05 M phosphate buffer และเพาะเชื้อลงบน YPD agar ที่มีเกลือ 5% ที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อที่คัดแยกได้จะนำไปทดสอบการทนเกลือที่ความเข้มข้น 10, 15, 18 และ 20% w/v NaCl จากนั้นนำเชื้อที่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงไปศึกษาสารระเหยให้กลิ่นที่เชื้อผลิตด้วย GC-MS ต่อไป

กระบวนการ B

ในกรณี non-enrichment ตัวอย่างโคจิและโมโรมิจะถูกทำให้เจือจางด้วย 0.05 M phosphate buffer และเพาะเชื้อลงบน YPD agar ที่มีเกลือ 10% ที่อุณหภูมิ 30°C แล้วนำไปทดสอบการทนเกลือที่ความเข้มข้น 10, 15, 18 และ 20% w/v NaCl รวมทั้งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ glutaminase และ/หรือ protease และ amylase โดยในขั้นต้นดูจากการเจริญบน glutamine medium (G-medium), skim milk medium และ soluble starch medium ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่สนใจไปศึกษาสารระเหยให้กลิ่นที่เชื้อผลิตด้วย GC-MS ต่อไป

ส่วนกรณี Enrichment นั้น เชื้อในโคจิและโมโรมิถูก Enrich ใน YPD broth ที่มีเกลือ 10% ที่อุณหภูมิ 30°C ทั้งแบบที่มีการเขย่า และ ไม่มีการเขย่า ก่อนทำการเจือจางเพื่อคัดแยกเชื้อด้วยการเพาะเชื้อลงบน YPD agar ที่มีเกลือ 10, 15, 18 และ 20% ที่อุณหภูมิ 30°C และนำไปศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ glutaminase และ/หรือ protease หรือ amylase โดยในขั้นต้นดูจากการเจริญบน G-medium, skim milk medium และ soluble starch medium ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อที่สนใจไปศึกษาสารระเหยให้กลิ่นที่เชื้อผลิตด้วย GC-MS ต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างโคจิและโมโรมิจะถูกทำให้เจือจางด้วย 0.05 M phosphate buffer เพื่อศึกษาจำนวน total bacteria จะเพาะเชื้อลงบน BHI agar ที่มีเกลือ 10% หรือ ไม่มีเกลือ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทั้งแบบ aerobic และ anaerobic และเพื่อศึกษาจำนวน lactic acid bacteria จะเพาะเชื้อลงบน MRS agar ที่มีเกลือ 10% หรือ ไม่มีเกลือ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทั้งแบบ aerobic และ anaerobic แต่ละ isolate จะถูกทดสอบ catalase activity โดยการหยด hydrogen peroxide และ ความสามารถในการเจริญภายใต้เกลือความเข้มข้น 5, 10, 15, 18 และ 20% NaCl ที่ 37°C แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ glutaminase และ/หรือ protease และ amylase โดยในขั้นต้นดูจากการเจริญบน G-medium, skim milk medium และ soluble starch medium ตามลำดับ

การศึกษาสารระเหยให้กลิ่นที่ยีสต์ผลิต

นำ isolate ที่สนใจไปเลี้ยงในอาหารเหลว double strength YPD (Hayashida *et al.*, 1999) ที่มีเกลือ 10% pH 6.4 (ประกอบด้วย 20 g/L yeast extract, 40 g/L peptone, 40 g/L D-glucose, 100 g/L NaCl) บ่มที่ 30°C นาน 7 วัน แล้วนำ culture broth ที่ได้ไป centrifuge ที่ 5000 xg 4°C นาน 20 นาที เพื่อนำเอา supernatant มาวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นโดยวิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจาก Wanakhachornkrai & Lertsiri (2003) ต่อไป

การวิเคราะห์สารระเหยทำโดย นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5 ml บรรจุลงในขวด 20-ml headspace จากนั้นเติมสารละลาย 2-methyl-3-heptanone ใน methanol (17.45 µL/100 mL) ปริมาณ 10 µL ลงในตัวอย่าง ผกขวดแล้วนำไปอุ่นที่ 40°C นาน 10 นาที จากนั้นเก็บสารระเหยในขวด headspace ด้วย solid-phase microextraction (SPME) (50/30 µm Stable Flex Divinylbenzene / Carboxen / Polymethylsiloxane; DVB/CAR/PDMS, Supelco) ที่ 40°C นาน 20 นาที ซึ่ง SPME ดังกล่าวจะนำไปปลดปล่อยสารระเหยใน GC injection port ที่ 220°C นาน 5 นาที เพื่อเข้าสู่ GC column ต่อไป

สารระเหยที่เก็บได้ถูกแยกด้วย gas chromatography-mass spectrometry หรือ GC-MS (Agilent 6890 plus GC/HP 7973 MSD) โดยใช้ HP-FFAP column (25 m x 0.32 mm id x 50 µm; J&W Scientific) ภายใต้อัตราไหลของแก๊ส 1.5 mL/min โดยมีสภาวะอุณหภูมิของ GC column ดังต่อไปนี้

45°C to 110°C; @ 10°C/min

110°C to 160°C; @ 7°C/min

160°C to 240°C @ 10°C/min

การศึกษากิจกรรมของ Glutaminase

นำ isolate ของยีสต์ หรือ แบคทีเรียที่สนใจไปเลี้ยงใน glutamine-medium (G-medium) ที่มี 0% หรือ 18% NaCl อยู่ด้วย โดยบ่มที่ 30°C แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเอา extracellular glutaminase ในส่วน supernatant ส่วนเซลล์เชื้อที่ได้นำไปศึกษากิจกรรมของ intracellular- และ membrane-bound glutaminase โดยวิเคราะห์ปริมาณของ glutamate ที่เกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ 37°C ด้วย L-glutamic acid assay kit (Boehringer Mannheim) และตรวจสอบการเกิดขึ้นของ glutamate ให้แน่ (confirmatory test) โดยทำปฏิกิริยา glutamate ที่เกิดขึ้นกับ dansyl chloride เพื่อให้วิเคราะห์ glutamate ในรูป dansyl chloride derivative ด้วย high

performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งให้นิยามของ enzyme unit คือ ปริมาณของ glutamate ที่เกิดขึ้นในหน่วย micromole ต่อ นาที (Wakayama *et al.*, 2005)

การวิเคราะห์ glutamate และ glutamine ด้วย HPLC (โดยดัดแปลงจาก Timperio *et al.*, 2007)

นำตัวอย่างปริมาณ 100 μ L ไปผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ sodium bicarbonate (pH 11) ปริมาณ 100 μ L และ สารละลาย dansyl chloride (1% ใน acetonitrile) ทำปฏิกิริยาที่ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 40 μ L acetic acid จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) ตรวจวัดที่ 254 nm ตัวอย่างที่ผ่านการ derivatization แล้วถูกแยกด้วย C18 Hypersil Gold column (150 mm x 4.6 mm, 3 μ m) โดยใช้ gradient elution ด้วย mobile phase ต่อไปนี้

Solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) I distilled water; Solvent B: methanol

โดยมี flow 1 mL/min ตามอัตราส่วนของ solvent ดังนี้

98% A	for 5 min
98% to 50%	from 5 to 20 min
50% to 0%	from 20 to 21 min

การศึกษากิจกรรมของ Protease

นำ isolate ของยีสต์ที่สนใจไปเลี้ยงใน YPD broth ที่ 30°C แล้วนำน้ำเชื้อที่เลี้ยงได้ไปศึกษา extracellular protease โดยใช้ casein เป็น substrate และวิเคราะห์ amino acid ที่เกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ 37°C โดยตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid ก่อน แล้ววัดปริมาณของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นโดยวัด OD 280nm (tyrosine equivalence) ซึ่งนิยามของ enzyme unit คือ ปริมาณของ tyrosine เกิดขึ้นในหน่วย micromole ต่อ นาที (Lakshman *et al.*, 2010)

ในกรณีของแบคทีเรีย นำ isolate ของแบคทีเรียที่สนใจไปเลี้ยงใน BHI หรือ MRS broth ที่ 37°C แล้วนำ culture broth ที่ได้ไปศึกษา extracellular protease โดยใช้ casein เป็น substrate และวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3 ที่ 37°C โดยตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid ก่อนแล้ววัด OD 280nm (tyrosine equivalence) ซึ่งนิยามของ enzyme unit คือ ปริมาณของ tyrosine เกิดขึ้นในหน่วย micromole ต่อ นาที (Lakshman *et al.*, 2010)

การจำแนก isolate

Isolate ของยีสต์ที่สนใจจะนำมาเลี้ยงใน YPD broth แล้วนำมาสกัด DNA โดยย่อยผนังเซลล์ด้วย Zymolyase นำ spheroplast ที่ได้ไปใส่ในสารละลาย 10% SDS (pH 7.2) นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 5500 $\times g$ 4°C 15 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปเติม 2-propanol หลังจากปั่นแยกที่ 9000 $\times g$ 4°C 15 นาที จะได้ตะกอน DNA แล้วนำไปล้างด้วย 70% ethanol เย็น ทำแห้งด้วย SpeedVac แล้วนำไปใส่ในสารละลาย RNase (Ferreira *et al.*, 2010)

จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ primer NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGG AAAAG-3') และ NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') ซึ่งใน 50- μ L reaction mixture ประกอบด้วย 1.25 U Taq DNA polymerase, 10 mM dNTPs, 1 μ M primer, template DNA และ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยการเพิ่มจำนวนด้วย PCR ทำที่อุณหภูมิดังนี้

Initial denaturation	94°C 2 min
Denaturation in PCR cycle	94°C 1 min
Annealing	55°C 40 sec
Extension	72°C 30 sec

Final extension 72°C 5 min

ทำบริสุทธิ์ PCR product (26srDNA D1/D2 domain) ที่ได้ ด้วย purification kit (NucleoSpin® Extract II) เพื่อนำไปหาลำดับของยีนส์ โดยใช้ NL-1 forward primer (บริการของ Macrogen, Korea) และทำ sequence analysis ด้วย GenBank BLASTN search เพื่อจำแนกเชื้อที่แยกได้ต่อไป

การศึกษาการผลิตสารให้กลิ่นรสของเชื้อที่สนใจในระบบจำลองการหมักโมโรมิ

นำโมโรมิที่ได้จากกระบวนการหมักเป็นเวลา 1, 2, และ 3 เดือนจากโรงงานซีอิ๊วมาแยกเฉพาะส่วนน้ำ นำน้ำโมโรมิที่ได้ไปใช้เป็น media ในการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกออกมา โดยนำโมโรมิดังกล่าวซึ่งไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีอยู่ดั้งเดิม ปริมาณ 200 mL ใส่ลงในขวด Duran ขนาด 250 mL เติมน้ำเชื้อลงไปในจำนวน 10^6 cells/mL นำไปบ่มที่ 30°C นาน 7 วัน โดยไม่มีการเขย่าเพื่อเลียนแบบการหมักโมโรมิ ในการทดลองนี้ให้น้ำโมโรมิที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อลงไปเป็นชุดควบคุม และชุดเปรียบเทียบได้แก่ YPD broth ที่มีเกลือ 18% (18-YPD broth)

ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3 และ 7 ไปวิเคราะห์จำนวนยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก และ วิเคราะห์ทางเคมีโดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 xg ที่ 4°C นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วย 0.45 µm membrane filter ก่อนการวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ สารระเหยให้กลิ่นด้วย GC-MS สาร biogenic amines ด้วย HPLC และ น้ำตาลกลูโคสด้วย glucose oxidase-peroxidase kit (Sigma Chemical) ตามวิธีที่ได้กล่าวไปข้างต้น

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิเคราะห์ยีสต์ด้วย YPD agar plate ที่มี 10% เกลือ pH 4.5 และ chloramphenicol 100 mg/L บ่มที่ 30°C นาน 3 ถึง 4 วัน

วิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วย MRS agar plate ที่มี 10% เกลือ pH 7 และ cyclohexamide 50 mg/L บ่มที่ 37°C นาน 2 ถึง 3 วัน

วิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดด้วย BHI agar plate (10% เกลือ pH 7) หรือ TSB agar plate (10% เกลือ pH 7) บ่มที่ 37°C นาน 1 ถึง 2 วัน

การวิเคราะห์สาร *Biogenic amines*

ตกตะกอนโปรตีนในตัวอย่างด้วย 0.4M perchloric acid จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง เติมน้ำ 1,7-diaminoheptane ปริมาณ 10 µL ลงใน 1 mL ของตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนแล้ว แล้วเติม 200 µL ของ 2M NaOH และ 300 µL NaHCO₃ จากนั้นทำปฏิกิริยากับ dansyl chloride ที่ 40°C นาน 45 นาที จากนั้นเติม 30% NH₄OH ปรับปริมาตรแล้วกรองด้วย 0.45-µm filter membrane ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 254 nm

ที่ผ่านการ derivatization แล้วถูกแยกด้วย C18 Hypersil Gold column (150 mm x 4.6 mm, 3 µm) โดยใช้ gradient elution ด้วย mobile phase ต่อไปนี้

Solvent A: I distilled water; Solvent B: acetonitrile

โดยมี flow 1 mL/min ตามอัตราส่วนของ solvent ดังนี้

65% to 70% B from 0 to 5 min

70% to 80% from 5 to 15 min

80% to 100% from 15 to 16 min

100% from 16 to 20 min

การทดลองนำหัวเชื้อต้นแบบไปใช้หมักซีอิ๊วจริงในระดับกึ่งอุตสาหกรรม

โคจิที่นำมาใช้ในการทดลองหมักโดยผสมต้นเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ลง substrate ที่ประกอบด้วยถั่วเหลืองนึ่งและแป้งสาลี (อัตราส่วน 3:1 โดยน้ำหนัก) โดยโรงงานซีอิ๊วเป็นผู้หมักที่อุณหภูมิประมาณ 30°C นาน 2 วัน นำโคจิตั้งกล่าวปริมาณ 100 กิโลกรัม มาผสมกับน้ำเกลือความเข้มข้น 20% ปริมาณ 250 ลิตร ในอ่างไฟเบอร์กลาส ขนาดบรรจุ 500 ลิตร วางอ่างตั้งกล่าวไว้กลางแจ้ง มีฝาปิดมิดชิด ซึ่งดำเนินการทดลองตามแผนใน Table i

ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์จำนวนยีสต์ แบคทีเรีย และแบคทีเรียกรดแลคติก และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g ที่ 4°C นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วย 0.45 μm membrane filter ก่อนการวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพต่อไป

การเตรียมต้นเชื้อต่าง ๆ

ใช้ 5% inoculum ต้นเชื้อเดิมลงในกระบวนการหมักซีอิ๊ว ต้นเชื้อ *T. halophilus* TS71 เตรียมในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ 10% ที่ 37°C โดยไม่เขย่า ประมาณ 24 ชั่วโมง จนมีความเข้มข้น 10^6 cells/mL จากนั้นนำไป centrifuge ส่วนต้นเชื้อยีสต์ *Z. rouxii* A22 และ *P. guilliermondii* EM1Y52 นั้นเตรียมในอาหารเหลว YPD ที่มีเกลือ 10% ที่ 30°C โดยเขย่าที่ 180 rpm ประมาณ 18 ชั่วโมง จนมีความเข้มข้น 10^6 cells/mL จากนั้นนำไป centrifuge

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทำการทดสอบโดยให้ผู้ผลิตซีอิ๊วในโรงงานที่ไปทำการทดลอง จำนวน 5 คน ต้มกลิ่นของซีอิ๊วดิบที่หมักได้ โดยแต่ละคนจะได้รับตัวอย่างปริมาณ 10 mL ในภาชนะสีขาวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งผู้ทดสอบจะไม่ทราบว่าตัวอย่างคืออะไรก็ได้ ผู้ทดสอบจะเปรียบเทียบกลิ่นของซีอิ๊วดิบที่ได้จากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้หัวเชื้อ และ แบบที่มีการทดลองใช้หัวเชื้อแบบต่างๆ โดยจะสัมภาษณ์สอบถามความรู้สึกของผู้ชิมที่มีต่อตัวอย่างต่างๆ

Table i Experimental plan

Experimental	Starter culture			Inoculation
	LAB	Yeast 1	Yeast 2	
Control	-	-	-	-
Treatment 1	<i>T. halophilus</i> TS71	-	-	day 21, 56
Treatment 2	-	<i>Z. rouxii</i> A22	-	day 21, 56
Treatment 3		<i>Z. rouxii</i> A22	-	day 21, 56
Treatment 4		<i>Z. rouxii</i> A22	<i>P. guilliermondii</i> EM1Y52	day 21, 56

ผลการทดลอง และ วิจารณ์ผล

การคัดแยกเชื้อยีสต์

จากกระบวนการ A นี้สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่ทนเกลือ 18% ซึ่งเป็นความเข้มข้นเกลือในน้ำหมักซีอิ๊ว ได้ 9 isolate ซึ่งเมื่อนำไปจำแนก พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Pichia farinosa* ตาม Table 1 เมื่อนำ isolae ต่างๆ ไปศึกษาการสังเคราะห์ให้กลิ่นโดยเลี้ยงใน double strength YPD broth (10% NaCl) ที่ 30°C โดยไม่มีการเขย่า ได้ผลตาม Table 2 กล่าวคือ ตรวจพบสารระเหยทั้งหมด 34 ชนิด โดย 13 ชนิด ได้แก่ acetic acid, ethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, methionol, 2-phenylethanol, 1-butanol, 2,3-butanediol, 2-furanmethanol, benzaldehyde, ethylphenylacetate, 2-phenylethylacetate, 3-hydroxy-2-butanone เป็นสารที่มีรายงานว่าเป็นส่วนประกอบของซีอิ๊วต่างๆ และได้คัดเลือกมา 3 isolate ที่น่าสนใจ ได้แก่ A22, A34, และ A35 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Zygosaccharomyces rouxii* เนื่องจากเป็นยีสต์ทนเกลือที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการหมักซีอิ๊วของญี่ปุ่นอย่างแพร่หลาย (Fukushima, 2004) และสามารถผลิตสารระเหยต่างๆ เช่น ethanol และ higher alcohol (เช่น 3-ethyl-1-butanol) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารระเหยให้กลิ่นสำคัญของซีอิ๊วไทย ตามข้อมูลของคณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้ว (Lertsiri *et al.*, 2011)

Table 1

Identification of yeast isolates by sequence analysis of partial 26S rDNA in GenBank from NCBI database

Coded No.	Fragment		GeneBank rDNA ^b
	sequenced	Name of species ^a	
	(bp)		
A11	540	<i>P. farinosa</i>	99% to AF335973
A21	531	<i>P. farinosa</i>	99% to AF335973
A31	535	<i>P. farinosa</i>	99% to AF335973
A32	536	<i>P. farinosa</i>	99% to AF335973
A12	540	<i>Z. rouxii</i>	99% to AB363048
A22	539	<i>Z. rouxii</i>	99% to AB363048
A33	540	<i>Z. rouxii</i>	99% to AB363048
A34	544	<i>Z. rouxii</i>	99% to AB363048
A35	548	<i>Z. rouxii</i>	99% to AB363048
EKY62		<i>P. guilliermondii</i>	
EM1Y-52		<i>P. guilliermondii</i>	
EM2Y-61		<i>P. guilliermondii</i>	

^a Names of species corresponding to GenBank; ^b Percentage of sequence similarity to GeneBank accession strain; Z,

Zygosaccharomyces; P, *Pichia*

Table 2 Concentration of volatile compounds (µg/L) detected in double strength YPD-medium

No.	RI ^a	Compounds	Strains									
<i>Acids (5)</i>			Control	A11	A12	A21	A22	A31	A32	A33	A34	A35
1	1476	Acetic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Ethyl ester										
3	1825	benzeneacetic acid	ND	ND	5217.1	ND	18.4	ND	ND	ND	12.4	684.6
		2-Phenyl ethyl										
4	1857	ester acetic acid	ND	ND	174.9	5	637.3	17.1	4	208.3	225.3	25929.3
		2-Methyl-2-phenyl										
5	1924	butanoic acid	ND	ND	28.3	ND	ND	ND	ND	30.1	40.2	3732.4
<i>Alcohols (13)</i>												
6	<1100	Ethanol	ND	108.1	9.4	25.3	90.2	58.6	94.6	50.8	21.5	1098.3
		2-Methyl-1-										
7	1137	propanol	ND	2.8	11.3	ND	ND	15.2	ND	ND	27.1	ND
8	1180	1-Butanol	943.4	37.9	16.8	ND	70.1	57.7	ND	ND	32	ND
9	1236	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND	2889.7	9141.4	4385.1	1361.8	2368.9	3100.6	ND
10	1347	2-Heptanol	ND	5	7.7	ND	29.2	17.4	4.3	ND	5	ND
11	1367	1-Hexanol	ND	0.5	3.9	ND	28.9	ND	ND	8.2	ND	447.4
12	1509	2-Ethyl-1-hexanol	2.4	ND	4.7	7	12.9	ND	ND	4.2	5.1	ND
13	1545	2-Nonanol	ND	14.4	16.5	17.9	45.5	43.4	8	11.8	12.8	ND
14	1586	1-Octanol	ND	ND	ND	ND	44.5	ND	ND	24.4	17.5	ND
15	1693	2-Furanmethanol	6.3	15.6	21.3	23.5	149.4	38.5	12.3	17.7	23	1146.1
16	1747	2-Undecanol	ND	2.2	ND	ND	8.8	ND	1.7	ND	3.4	ND
17	1922	Benzenemethanol	ND	3.3	11.7	5.3	25.9	11.7	3.2	7.8	9.7	ND
18	1991	2-Phenylethanol	ND	119.9	714.1	214.2	2392.7	406.6	107.9	673.7	917.4	45734.2
<i>Aldehydes (1)</i>												
19	1562	Benzaldehyde	62.4	8.5	9	ND	ND	ND	ND	5.2	2.1	120.7
<i>Ester (1)</i>												
20	1449	Ethyl caprylate	ND	ND	5	ND	ND	8.6	4.4	3.9	ND	1481.3
<i>Furan (1)</i>												
21	1900	3-Phenyl-furan	5	11.2	13.7	16.3	34.3	33.4	10.6	14	16.5	150.5
<i>Ketones (6)</i>												
		3-Hydroxy-2-										
22	1328	Vutanone	ND	28.7	ND	69.6	ND	57	27.6	7.4	219.3	ND
23	1420	2-Nonanone	ND	67	ND	136.2	ND	147.7	42.2	1.8	ND	ND
24	1612	2,3-Butanediol	ND	ND	9.3	ND	14.3	ND	ND	3	5.8	ND
25	1630	2-Undecanone	ND	11.2	ND	18.7	7.8	16.5	5.8	ND	ND	ND
26	1698	1-Phenyl-ethanone	6.2	5.2	3.9	ND	8	17	5	3.6	ND	ND
		1-(1H-pyrrol-2-yl)-										
27	2022	Ethanone	1.1	2.2	2.9	ND	9.5	7.4	1	2.4	2.4	ND

<i>Pyrazines (7)</i>												
28	1309	Methyl pyrazine	ND	6.1	ND	ND	ND	10	ND	ND	6.6	ND
29	1358	2,5-Dimethyl-pyrazine	32.1	26.4	44.5	35.2	137.1	70.4	23	31.5	ND	ND
30	1416	2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	4.3	ND	ND	ND	26.7	ND	7.5	6.8	11.1	512.4
31	1474	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	ND	3.4	ND	ND	ND	5	285.2
32	1557	2,5-Dimethyl-3-isobutylpyrazine	2	1.7	ND	2.7	9	ND	1.6	ND	ND	ND
33	1650	2-Butyl-3,5-dimethyl-pyrazine	9.9	2.5	ND	3.2	ND	22.9	1	ND	3.9	929.4
34	1656	2,5-Dimethyl-3-N-butylpyrazine	ND	ND	3.4	ND	ND	8.5	ND	3.7	23	ND
<i>Sulfur-containing compound (1)</i>												
35	1756	Methionol	ND	ND	19.9	2.8	72.4	ND	0.7	18	24.1	938.8
<i>Aromatic compound (1)</i>												
36	1978	Benzeneacetonitrile	12.1	18.4	22	26.4	70.1	60.8	18.8	27.9	32.7	ND

^a Retention index calculated based in the retention time of n-alkane standards on FFAP column; ND, not detected

จากนั้นได้นำ isolate ทั้งสาม ได้แก่ A22, A34 และ A35 ไปศึกษาความสามารถในการเจริญใน YPD broth ที่มีเกลือ 18% (18-YPD) ภายใต้สภาวะต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะในการหมักโมโรมิของซีอิ๊วซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือใกล้เคียง 18% พบว่าสภาวะที่ยีสต์เหล่านี้เจริญได้ดีที่สุดคือ pH 4.5, 25°C และมีการให้อากาศโดยการเขย่า ตาม growth curve ของ A22, A34 และ A35 ที่แสดงใน Figure 1, 2 และ 3 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ภายใต้ pH 4.5 นี้ ซึ่งเป็น pH ที่ใกล้เคียงกับ pH ของโมโรมิ ยีสต์เหล่านี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าภายใต้อุณหภูมิทั่วไปคือ 30 ถึง 35°C ได้ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำ isolate เหล่านี้ไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อ (starter culture) ต่อไป

โดยภาพรวมแล้วยีสต์เหล่านี้เจริญได้ดีภายใต้ภาวะ pH 4.5 และ 5 โดยที่ A34 เจริญได้เร็วที่สุด (ยกเว้น pH 7) ในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันภายใต้ pH 4.5 นั้น พบว่า A34 และ A35 เมื่อมีปริมาณเซลล์ถึง 7.6 log CFU/mL แล้วจึงเริ่มลดลง ในขณะที่ A22 ยังคงสามารถเจริญอยู่โดยปริมาณเซลล์ไม่ลดลงจนครบ 7 วัน

ในแง่ของสารระเหยให้กลิ่น ในการทดลองต่อๆ มาได้ปรับมาใช้ single strength YPD แทน double strength YPD เนื่องจาก profile ของสารระเหยไม่แตกต่างกันมาก เพียงแต่ใน single strength YPD มีปริมาณสารระเหยน้อยกว่า จากการทดลองเลี้ยงเชื้อทั้งสามใน 18-YPD broth ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ พบว่าสารที่มีปริมาณมากได้แก่ ethanol, 3-methyl-1-butanol และ 2-phenylethanol โดยสารระเหยเกือบทั้งหมดตรวจพบในปริมาณมากที่ pH 4.5 และ 5 ยกเว้น pyrazine เท่านั้นที่ตรวจจับที่ pH สูง ส่วน 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol และ benzaldehyde พบในทุก pH และยังพบอีกว่า เมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงสูงขึ้น ปริมาณของสารระเหยจะลดลงตาม Table 3, 4 และ 5 สำหรับ A22, A34, A35 ตามลำดับ

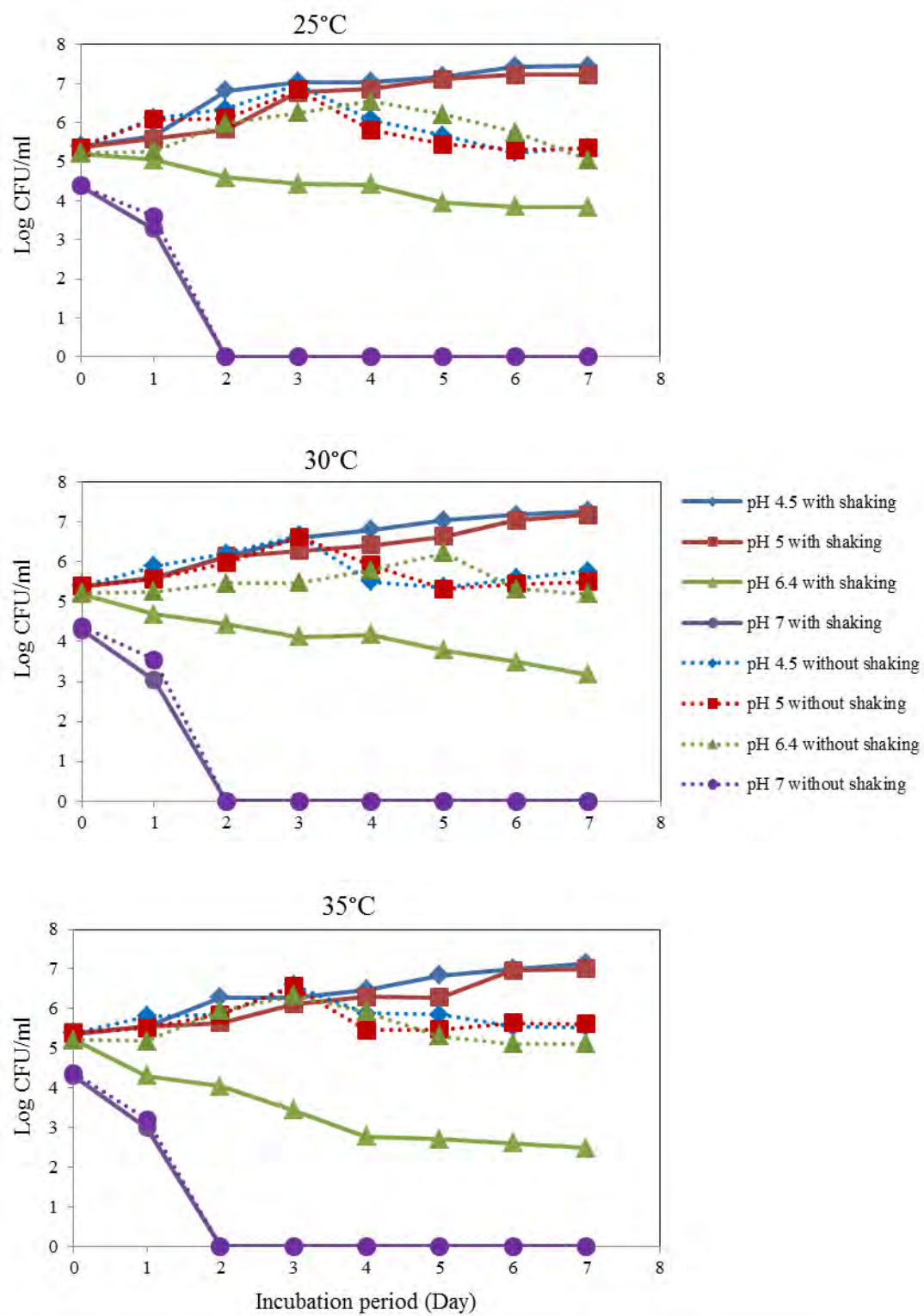


Figure 1 Growth of A22 strain at varied pH, temperature and aeration in 18-YPD broth

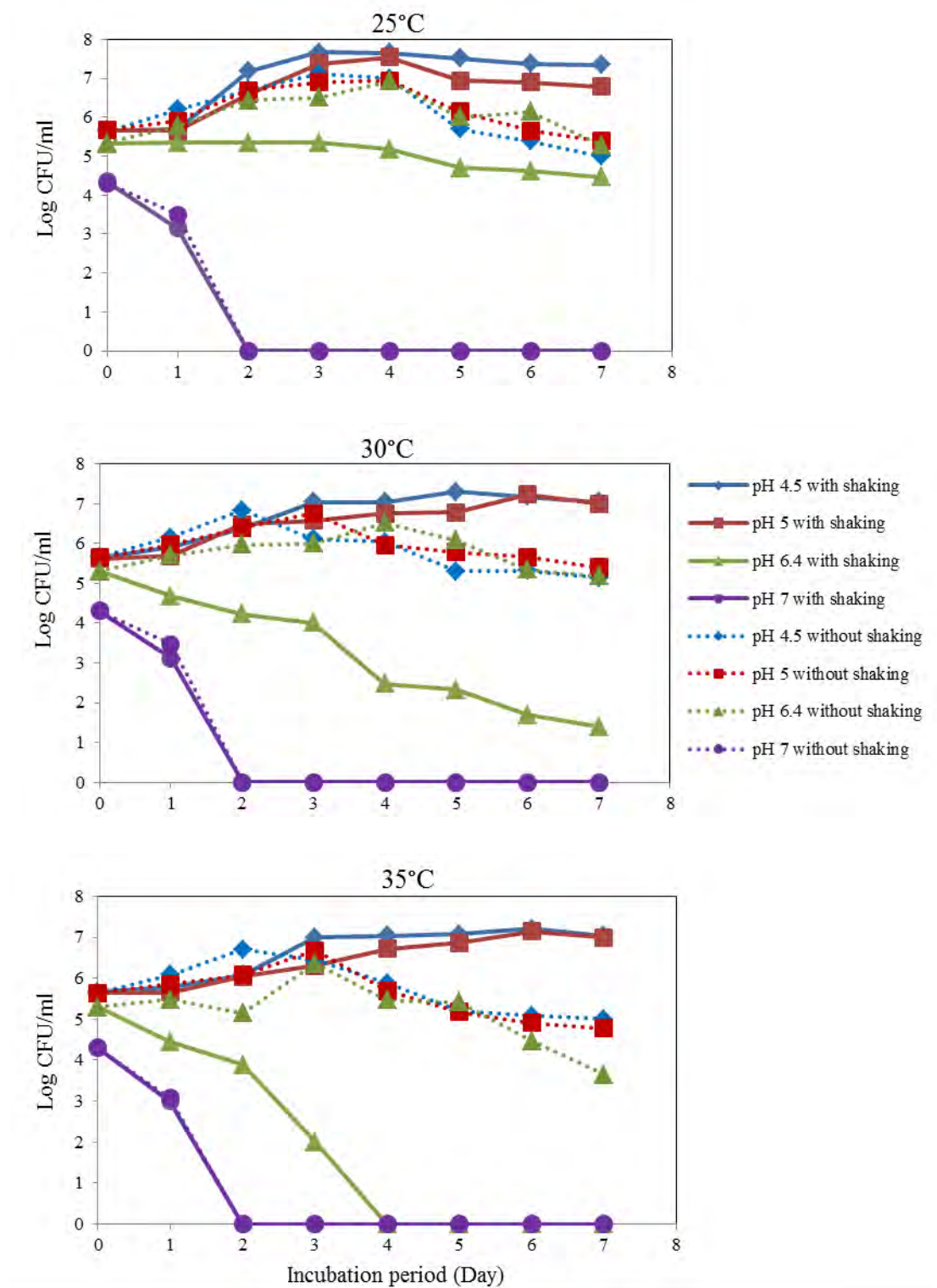


Figure 2 Growth of A34 strain at varied pH, temperature and aeration in 18-YPD broth

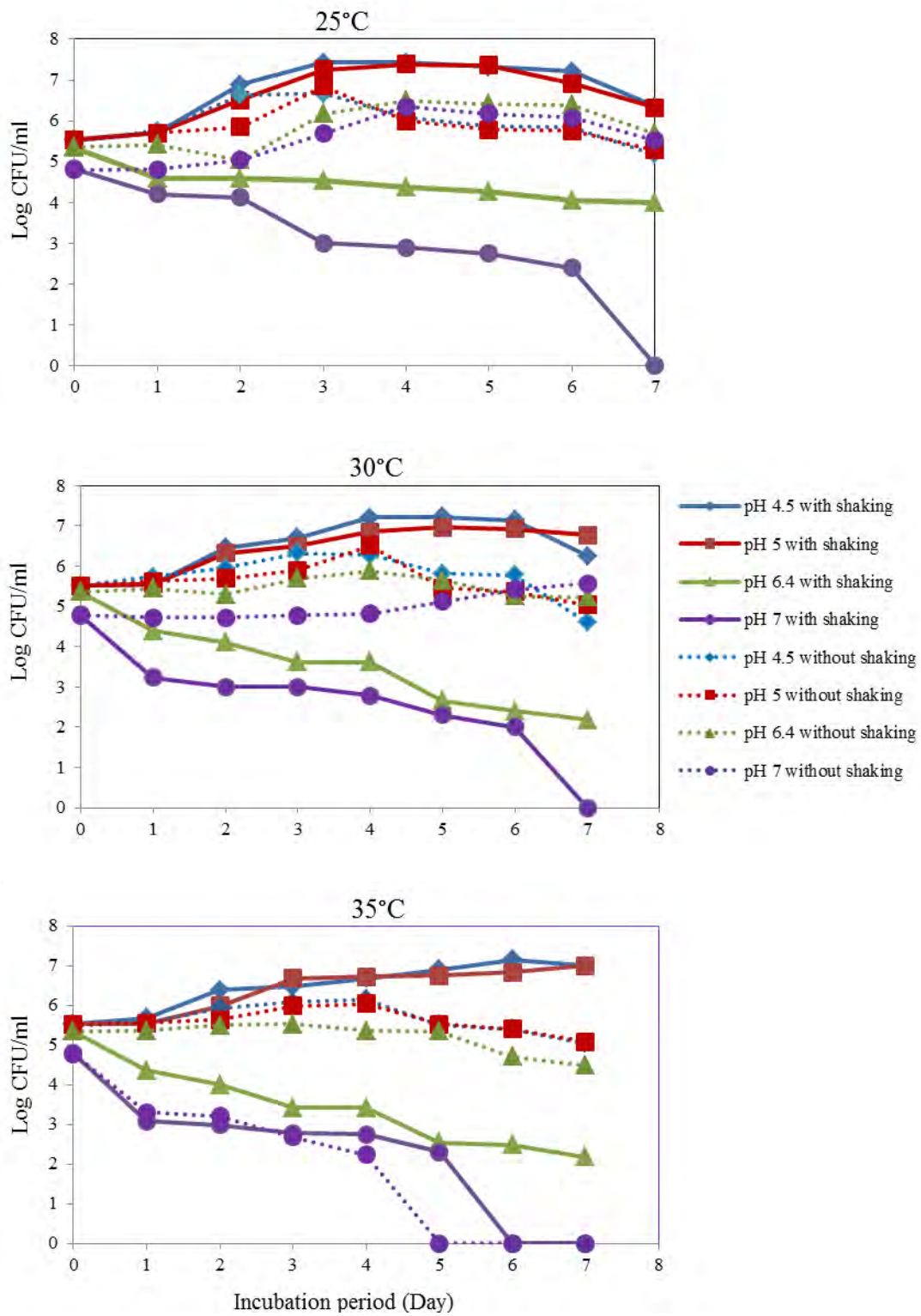


Figure 3 Growth of A35 strain at varied pH, temperature and aeration in 18-YPD broth

Table 3 Volatile compounds produced by A22 strain in 18-YPD broth at varied pH and temperature under static conditions (µg/L)

No.	RI ^a	Compounds	25°C				30°C				35°C			
			pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7
Acids (3)														
1	1476	Acetic acid	0.6	0.5	ND	ND	0.9	0.7	ND	ND	0.3	0.2	ND	ND
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	1.1	1	ND	ND	1.2	0.9	ND	ND	0.9	0.7	ND	ND
3	1645	Butanoic acid	1.3	0.9	ND	ND	2	1.5	ND	ND	1.9	1.2	ND	ND
Alcohols (8)														
4	<1100	Ethanol	459	420.8	296.3	ND	414.7	405.7	286	ND	345	331	272.8	ND
5	1137	2-Methyl-1-propanol	16.4	17.6	9.2	ND	14.5	17	8.6	ND	7.8	11.3	1.3	ND
6	1180	1-Butanol	123.8	133.1	47.1	44.5	120.8	132.6	55.4	38.6	114.5	121.3	168.8	234.5
7	1236	3-Methyl-1-butanol	287.8	305.5	280.3	13	308.6	310.7	273.9	8.9	260.8	273.8	221.8	10.1
8	1509	2-Ethyl-1-hexanol	1.5	2	1.3	ND	2.6	3	2	ND	2	2.6	1.5	ND
9	1612	2,3-Butanediol	0.4	0.2	ND	ND	0.3	0.3	ND	ND	0.2	0.2	ND	ND
10	1756	Methionol	2.9	2.3	1.9	ND	2.6	2.2	1.9	ND	1.7	1.7	1.5	ND
11	1991	2-Phenylethanol	102.4	81.5	40.8	8.8	99	71.9	36.1	7.6	86.8	72.9	36.7	7.4
Aldehyde (1)														
12	1562	Benzaldehyde	1.6	1.2	1	1.2	1.4	1.2	1.3	1.2	1	0.7	0.8	1
Ester (1)														
13	1857	2-Phenylethyl acetate	7.6	7.3	5.1	ND	4.8	4.7	2.8	ND	3.2	2.8	2.5	ND
Ketone (1)														
14	1328	3-Hydroxy-2-propanone	4.8	4.1	2.4	ND	4.1	3.8	2.3	ND	2.3	2.2	1	ND
Pyrazines (2)														
15	1358	2,5-Dimethyl-pyrazine	ND	ND	3.4	100.3	ND	ND	ND	9.4	ND	ND	ND	18.2
16	1474	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	1.7	5.1	ND	ND	ND	1.3	ND	ND	ND	1.9

^a RI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; ND, not detected

Table 4 Volatile compounds produced by A34 strain in 18-YPD broth at varied pH and temperature under static conditions (µg/L)

No.	RI ^a	Compounds	25°C				30°C				35°C			
			pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7
Acids (3)														
1	1476	Acetic acid	1	0.7	ND	ND	0.7	0.5	ND	ND	1	1.1	ND	ND
2	1584.6	2-Methyl-propanoic acid	2.5	1.6	ND	ND	2.2	2	ND	ND	2.6	1.3	ND	ND
3	1645	Butanoic acid	2.9	2.1	ND	ND	2.1	2.2	ND	ND	1.9	1.9	ND	ND
Alcohols (8)														
4	<1100	Ethanol	750.5	596.7	399	ND	590.5	554.3	312.8	ND	577.1	531.1	302.7	ND
5	1137	2-Methyl-1-propanol	28.7	32.5	13.5	ND	28.3	30.1	13.7	ND	27.9	28.8	10.9	ND
6	1180	1-Butanol	156.4	162.8	109.4	55.6	143.8	153	96	45.1	134.1	120.1	67.9	34.2
7	1236	3-Methyl-1-butanol	424.5	427	294.9	22.6	409.9	421.6	259.1	22.4	365.9	380.6	237	19.3
8	1509	2-Ethyl-1-hexanol	2.1	2.3	2	ND	2.6	2.9	2.2	ND	2	2.6	2	ND
9	1612	2,3-Butanediol	0.7	0.3	ND	ND	0.6	0.4	ND	ND	0.6	0.3	ND	ND
10	1756	Methionol	4.9	3.6	2.9	ND	4.4	3.4	2.6	ND	3.9	3.5	2.2	ND
11	1991	2-Phenylethanol	163.1	152.9	138.6	11.2	153.1	143.6	134.7	5.7	150.8	153.6	120.4	5.1
Aldehyde (1)														
12	1562	Benzaldehyde	1.6	1.9	1.5	1.1	1.5	1	0.8	1	1.5	0.7	0.9	1
Ester (1)														
13	1857	2-Phenylethyl acetate	30.9	26.1	9.5	ND	9.7	9.6	6.2	ND	9.6	7.1	3.5	ND
Ketone (1)														
14	1328	3-Hydroxy-2-propanone	5.1	4	2.4	ND	4.8	3.9	2.9	ND	3.6	3.4	1.2	ND
Pyrazines (2)														
15	1358	2,5-Dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	23.2	ND	ND	ND	14	ND	ND	ND	13
16	1474	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	3.6	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	1.5

^a RI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; ND, not detected

Table 5 Volatile compounds produced by A34 strain in 18-YPD broth at varied pH and temperature under static conditions (µg/L)

No.	RI ^a	Compounds	25°C				30°C				35°C			
			pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7	pH 4.5	pH 5	pH 6.4	pH 7
Acids (3)														
1	1476	Acetic acid	0.6	0.6	ND	ND	0.6	0.7	ND	ND	0.7	0.5	ND	ND
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	1.5	1.4	ND	ND	1.4	1.3	ND	ND	1.6	1	ND	ND
3	1645	Butanoic acid	2.4	2.5	ND	ND	2.4	2.4	ND	ND	2.5	2.5	ND	ND
Alcohols (6)														
4	<1100	Ethanol	479.6	455.4	447.1	297.9	454.3	445.6	353.3	301.7	444.1	400.5	253.6	ND
5	1137	2-Methyl-1-propanol	26.3	28.5	24.5	22.4	24.6	27.8	24.2	17.5	20.1	25	19.3	ND
6	1180	1-Butanol	154.2	172.4	145.5	143.1	153.2	162.5	150.7	132.4	106.3	110.9	109.2	68.2
7	1236	3-Methyl-1-butanol	366.6	415.1	347.3	251	356.5	384.4	344.8	252.3	302.1	328.2	229.1	42.3
8	1756	Methionol	3.5	3.2	2.1	ND	3.3	3.2	1.9	ND	2.8	2.7	1.4	ND
9	1991	2-Phenylethanol	151.5	150	135.2	124	150.7	148.1	130.3	108	135.7	129.6	121.7	14.5
Aldehyde (1)														
10	1562	Benzaldehyde	1.6	1.5	1	1.8	1.6	1.2	1.3	1.1	1.2	0.8	0.8	1
Ester (1)														
11	1857	2-Phenylethyl acetate	7.7	7.3	6.9	ND	5.3	4.6	4	ND	5.1	4.2	3.7	ND
Ketone (1)														
12	1328	3-Hydroxy-2-propanone	5.2	4.5	2.2	ND	5.2	4.3	2.4	ND	3.6	3.2	1.6	ND
Pyrazines (2)														
13	1358	2,5-Dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND	28.3	ND	ND	ND	188.8
14	1474	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	21.2	ND	ND	ND	18.5

^a RI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; ND, not detected

สำหรับ กระบวนการ B นั้น ได้คัดแยกจากตัวอย่าง batch แรก สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถทนเกลือ 10% ได้ 93 isolate ซึ่ง 70 isolate มาจาก non-enrichment และ 23 isolate มาจาก enrichment ส่วนตัวอย่างใน batch ที่ 2 ได้ 1130 isolate ซึ่ง 1017 isolate มาจาก Non-enrichment และ 123 isolate มาจาก enrichment (Table 6) จากการคัดแยกเชื้อที่มี enzyme activity เบื้องต้นบนฐานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบ isolate ที่สามารถเจริญบน G-medium และ skim milk medium แต่ไม่พบ isolate ที่มี amylase activity (Table 7)

จากการคัดแยกเบื้องต้น พบ isolate ที่ทนเกลือได้ถึง 15% และสามารถเจริญบน G-medium ที่ไม่มี yeast extract ทั้งหมด 11 isolate และเมื่อนำ isolate เหล่านี้ไปศึกษา glutaminase activity โดยศึกษาการสร้าง glutamate จาก glutamine ซึ่งวิเคราะห์ด้วย L-glutamic acid assay kit พบว่า EKY62, EM1Y-52, และ EM2Y-61 ซึ่งเป็น isolate ที่สามารถสร้าง glutamic acid ได้เป็นสายพันธุ์ *Pichia guilliermondii* ทั้ง 3 isolate

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้นำยีสต์ isolate อื่นๆ ที่คัดแยกได้ รวม 90 isolate ไปเลี้ยงใน G-medium ที่มีเกลือ 0.1% และ 0.5% yeast extract ที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ culture เชื้อที่ได้ไปศึกษา extracellular-, intracellular-, membrane-bound glutaminase ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ และมีเกลือ 18% ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมของ glutaminase ของ isolate ที่สนใจ พบว่า 34 isolate มีกิจกรรมของ extracellular-, intracellular-, และ membrane-bound glutaminase ตามที่แสดงใน Figure 4, 5 และ 6 ตามลำดับและยังพบว่า EKY62, EM1Y-52, และ EM2Y-61 เป็น isolate ที่สามารถผลิต glutaminase และทนเกลือได้ถึง 18% รวมทั้งมีกิจกรรม glutaminase สูง โดยเฉพาะ extracellular glutaminase และหากเปรียบเทียบในยีสต์ทั้งสาม พบว่า EM1Y-52 ให้กิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลอง ผู้วิจัยจึงนำ isolate ดังกล่าว ได้แก่ EKY62, EM1Y-52, และ EM2Y-61 ไปศึกษาการสร้างสารระเหยให้กลิ่นโดยเลี้ยงใน double strength YPD broth (10% NaCl) ที่ 30°C ไม่มีการเขย่า ได้ผลตาม Table 8 กล่าวคือ ตรวจพบสารทั้งหมด 12 ชนิด โดยยีสต์ทั้งสามสามารถผลิต ethanol และ higher alcohol ได้แก่ 1-butanol และ 3-methyl-1-butanol รวมทั้ง phenolic compound ได้แก่ benzeneethanol ได้ โดย EM1Y-52 สามารถผลิตสารระเหยได้ดีที่สุด

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงนำ EM1Y-52 ไปศึกษาการเจริญใน 18-YPD broth ภายใต้สภาวะต่างๆ เพื่อจำลองสภาวะในการหมักโมโรมิของซีอิ๊ว พบว่าสภาวะที่ยีสต์เหล่านี้เจริญได้ดีที่สุดคือ pH 4.5, 30°C และมีการให้อากาศโดยการเขย่า ตาม growth curve ที่แสดงใน Figure 7 อย่างไรก็ตาม ภายใต้ pH นี้ ซึ่งใกล้เคียงกับ pH ของโมโรมิ ยีสต์เหล่านี้สามารถเจริญหรือมีกิจกรรมอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าภายใต้อุณหภูมิทั่วไปคือ 30 ถึง 35°C ได้ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อต่อไป อย่างไรก็ตาม EM1Y-52 จะผลิตสารระเหยที่ pH 4.5 และ 5 ตามแสดงใน Table 9 และ 10 ตามลำดับ โดยผลิตได้ดีที่ pH 4.5 แต่จะผลิตสารระเหยในปริมาณต่ำภายใต้ภาวะ pH 6.7 และ 8 (Table 11, 12)

Table 6 Yeast isolates screened from koji, 1-month, 2-month, and 3-month moromi samples

Batch	I			II														
Condition	Non	Enrichment	Total	Enrichment								Total	Non-enrichment					Total
	Enrichment			Shaking condition				Static condition					Non-enrichment					
		%NaCl in YPD																
	0	10		10	15	18	20	10	15	18	20		0	10	15	18	20	
Koji	9	6	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moromi1	34	10	44	34	58	18	0	51	46	3	0	210	16	2	6	10	0	34
Moromi2	27	7	34	79	27	16	0	90	58	42	4	316	20	5	3	2	0	30
Moromi3	0	0	0	84	124	31	25	113	95	5	4	481	4	36	16	3	0	59
Total	70	23	93	207	209	65	25	254	199	50	8	1017	40	43	25	15	0	123

Table 7 Primary screening for glutaminase and protease activities of halotolerance yeasts obtained from koji and moromi sample (Batch 1)

		Koji				Moromi1				Moromi2				Moromi3			
	Medium / %NaCl	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
Non-enrichment isolates	G-medium	9	9	9	9	34	34	25	1	27	27	23	2	0	0	0	0
	G-medium (No YE)	9	9	9	9	33	33	25	1	26	26	23	1	0	0	0	0
	Skim milk medium	0	0	0	0	34	34	34	1	26	26	23	0	0	0	0	0
	Skim milk+5%NaCl medium	0	0	0	0	32	32	32	1	24	24	20	0	0	0	0	0
	Skim milk+10%NaCl medium	0	0	0	0	1	1	1	0	3	3	3	0	0	0	0	0
	Soluble starch medium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G-medium & G-medium (No YE) & Skim milk+10%NaCl medium	0	0	0	0	1	1	1	0	3	3	3	0	0	0	0	0
Enrichment isolates	G-medium	6	6	6	6	9	9	9	5	7	7	7	1	0	0	0	0
	G-medium (No YE)	6	6	6	6	9	9	9	5	7	7	7	1	0	0	0	0
	Skim milk medium	0	0	0	0	7	7	7	2	6	6	6	0	0	0	0	0
	Skim milk+5%NaCl medium	0	0	0	0	7	7	7	2	6	6	6	0	0	0	0	0
	Skim milk+10%NaCl medium	0	0	0	0	1	1	1	1	6	6	6	0	0	0	0	0
	Soluble starch medium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G-medium & G-medium (No YE) & Skim milk+10%NaCl medium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

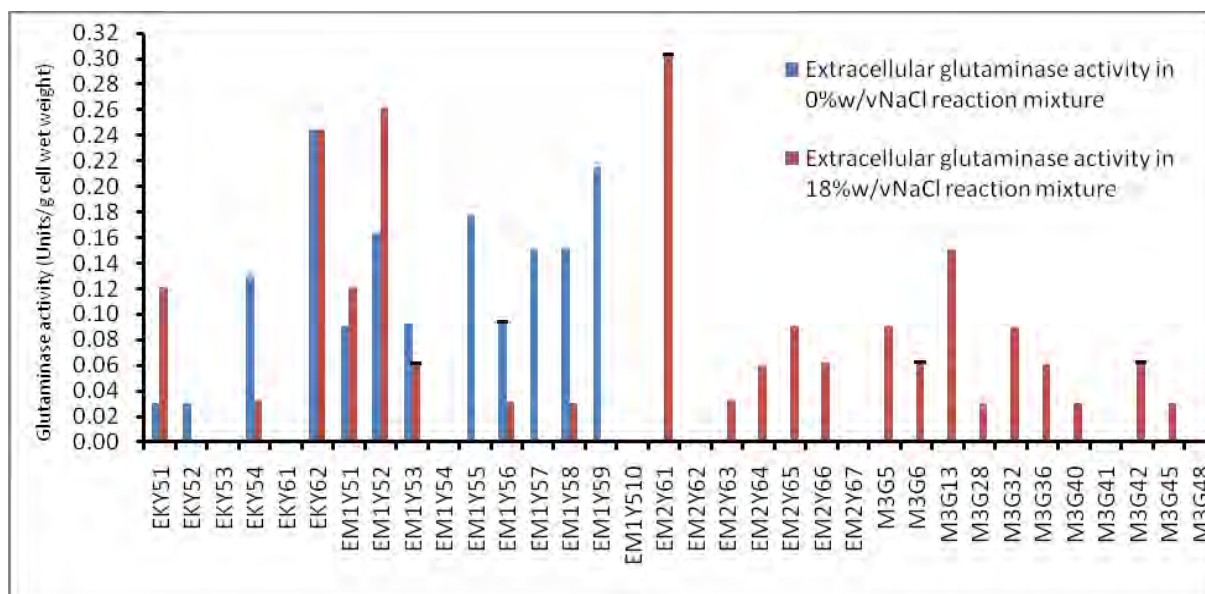


Figure 4 Extracellular glutaminase activity of some selected yeast isolates cultivated in G-medium (30°C for 3 days with 180-rpm)

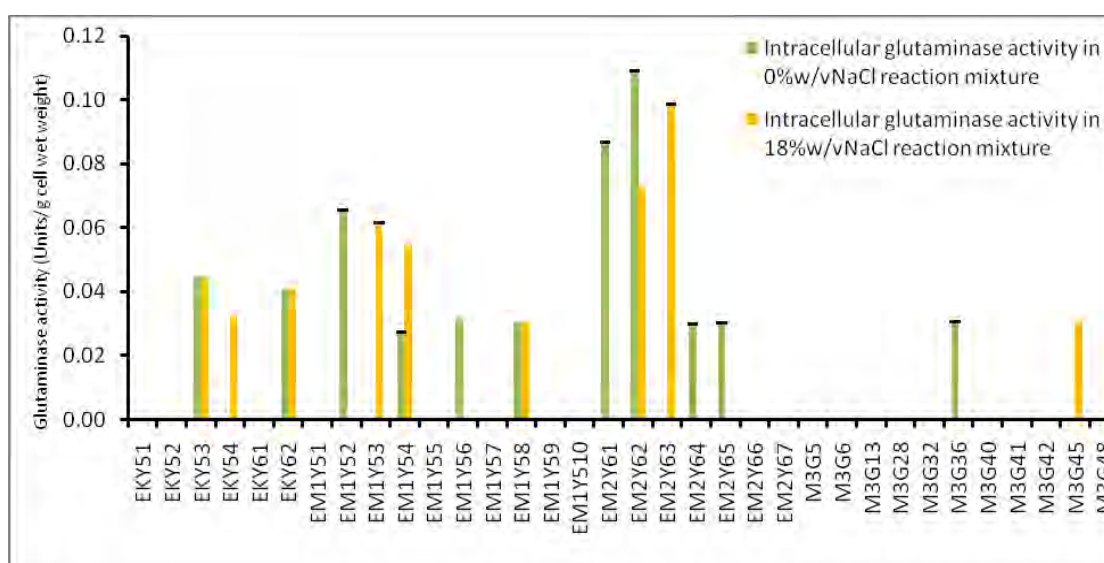


Figure 5 Intracellular glutaminase activity of some selected yeast isolates cultivated in G-medium (30°C for 3 days with 180-rpm)

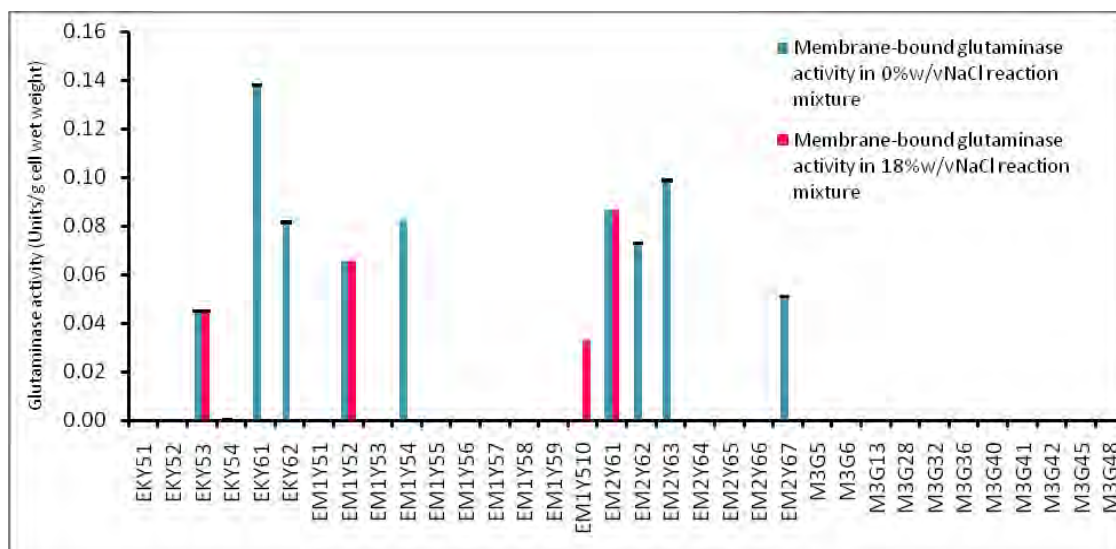


Figure 6 Membrane-bound glutaminase activity of some selected yeast isolates cultivated in G-medium (30°C for 3 days with 180-rpm)

Table 8 Volatile compounds produced by EKY62, EM1Y-52, and EM2Y-61 when cultured in double strength 10-YPD broth under non-shaking conditions

No	Compounds	Peak area ratio subtracted with control		
		EKY62	EM1Y52	EM2Y61
1	Ethanol	5.28	11.77	2.89
2	1-Butanol	30.31	38.99	21.96
3	3-Methy-1-butanol	2.06	3.95	1.28
4	2,5-Dimethy-pyrazine	0.12	0.12	0.05
5	1-Hexanol	0.07	0.03	0.04
6	2,5-Dimethy,3-ethyl, pyrazine	0.04	ND	0.04
7	2-Ethyl,1hexanol	0.2	0.162	0.11
8	Benzaldehyde	0.05	ND	ND
9	2-Fluranmethanol	0.06	0.04	0.06
10	Butanoic acid	0.08	0.06	0.03
11	Benzeneethanol	0.07	0.15	0.07
12	Phenol	0.04	ND	0.04

ND, not detected

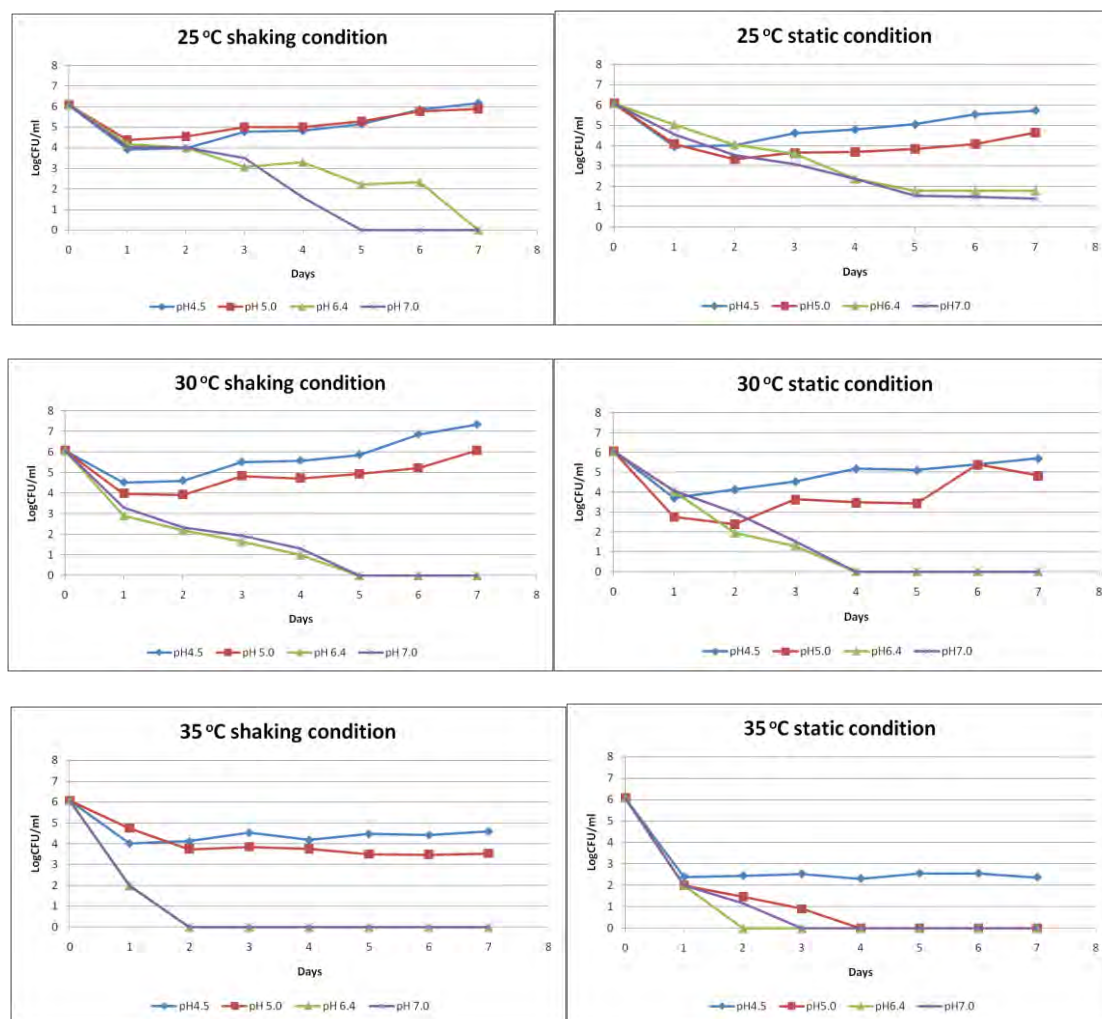


Figure 7 Log CFU/ml of EM1Y52 cultured in varied pHs and temperatures under shaking and static conditions

Table 9 Volatile compounds produced by EM1Y52 in 18-YPD broth, pH 4.5 at varied temperature under shaking and static conditions (µg/L)

No.	Compounds	pH4.5						
			shaking condition			static condition		
		Control	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C
<i>Acids (3)</i>								
1	Acetic acid	ND	ND	0.8	0.3	ND	ND	ND
2	Butanoic acid	3.3	4.4	28.7	2.7	3.7	ND	0.4
3	2-Metyl propanoic acid	3.5	1.1	3.1	1.5	2	ND	0.7
<i>Alcohols (7)</i>								
4	Ethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1-Butanol	491.9	101	2.8	101	1132	152	141
7	3-Methyl-1-butanol	ND	1.1	ND	ND	65.6	12.3	ND
8	1-Hexanol	ND	ND	ND	ND	2.7	ND	ND
9	2-Ethyl-1-hexanol	ND	ND	ND	ND	6.4	ND	ND
10	2-Furanmethanol	2.8	3.2	ND	ND	3.2	0.8	1.5
11	2-Phenylethanol	ND	ND	4.1	0.6	4.2	0.4	ND
<i>Aldehydes (2)</i>								
12	Benzaldehyde	16.3	0.4	0.5	0.6	2.8	0.8	4.6
13	2-Furancarboxaldehyde	6.3	ND	ND	ND	ND	ND	1.5
<i>Phenols (2)</i>								
14	4-Ethyl, 2-methoxy phenol	ND	ND	0.7	ND	ND	ND	ND
15	4-Ethyl phenol	ND	ND	0.5	ND	ND	ND	ND
<i>Sulfur-containing compound (1)</i>								
16	Methionol	ND	ND	0.5	ND	ND	ND	ND
17	Methional	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	0.6
<i>Pyrazines (2)</i>								
18	2,5-Dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

ND, not detected

Table 10 Volatile compounds produced by EM1Y52 in 18-YPD broth, pH 5 at varied temperature under shaking and static conditions (µg/L)

No.	Compounds	pH5.0						
			shaking condition			static condition		
		Control	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C
<i>Acids (3)</i>								
1	Acetic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	Butanoic acid	1.2	0.9	3.8	ND	ND	ND	ND
3	2-Metyl propanoic acid	1.9	0.3	0.9	ND	ND	ND	ND
<i>Alcohols (8)</i>								
4	Ethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1-Butanol	403.2	52.5	71.9	ND	262	152	ND
7	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND	ND	20.1	12.3	ND
8	1-Hexanol	ND	ND	ND	ND	0.7	ND	ND
9	2-Ethyl-1-hexanol	1.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	2-Furanmethanol	ND	0.5	3.5	ND	0.7	0.8	ND
11	2-Phenylethanol	ND	0.4	4.8	ND	0.9	0.4	ND
<i>Aldehydes (3)</i>								
12	Benzaldehyde	8.6	0.3	0.6	ND	1.3	0.8	ND
13	2-Furancarboxaldehyde	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	Benzeenacetaldehyde	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Phenols (2)</i>								
15	4-Ethyl, 2-methoxy phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	4-Ethyl phenol	ND	ND	0.4	ND	ND	ND	ND
<i>Sulfur-containing compound (1)</i>								
17	Methionol	ND	ND	0.6	ND	ND	ND	ND
18	Methional	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pyrazines (2)</i>								
19	2,5-Dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

ND, not detected

Table 11 Volatile compounds produced by EM1Y52 in 18-YPD broth, pH 6.4 at varied temperature under shaking and static conditions (µg/L)

No.	Compounds	pH6.4						
			shaking condition			static condition		
		Control	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C
<i>Acids (3)</i>								
1	Acetic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	Butanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	2-methyl propanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Alcohols (8)</i>								
4	Ethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1-Butanol	404.5	136	74.9	226	360	125	126
7	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	1-Hexanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	2-Ethyl-1-hexanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	2-Furanmethanol	2.7	0.9	0.9	3.9	ND	2.6	ND
11	2-Phenylethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Aldehydes (3)</i>								
12	Benzaldehyde	4.3	1.2	1.3	2.5	1.6	0.4	3.3
13	2-furancarboxaldehyde	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	Benzeenacetaldehyde	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Phenols (2)</i>								
15	4-ethyl, 2-methoxy phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	4-ethyl phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Sulfur-containing compound (1)</i>								
17	Methionol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	Methional	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pyrazines (2)</i>								
19	2,5-Dimethyl-pyrazine	47.3	29.7	0.4	2.1	25.8	0.7	15.9
20	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

ND, not detected

Table 12 Volatile compounds produced by EM1Y52 in 18-YPD broth, pH 7 at varied temperature under shaking and static conditions (µg/L)

No.	Compounds	pH7.0						
			shaking condition			static condition		
		Control	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C	25 ⁰ C	30 ⁰ C	35 ⁰ C
<i>Acids (3)</i>								
1	Acetic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	Butanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	2-Metyl propanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Alcohols (8)</i>								
4	Ethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1-Butanol	347.4	136	79	193	306	136	96.4
7	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	1-Hexanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	2-Ethyl-1-hexanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	2-Furanmethanol	0.5	3.6	0.6	5.1	1	ND	ND
11	2-Phenylethanol	0.9	0.8	0.2		0.4	ND	ND
<i>Aldehydes (3)</i>								
12	Benzaldehyde	4.6	4.4	1	3.2	1.7	0.7	2
13	2-Furancarboxaldehyde	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	Benzeenacetaldehyde	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Phenols (2)</i>								
15	4-Ethyl, 2-methoxy phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	4-Ethyl phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Sulfur-containing compound (1)</i>								
17	Methionol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	Methional	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pyrazines (2)</i>								
19	2,5-Dimethyl-pyrazine	21.7	4.8	31.3	71.7	1	11.8	0.8
20	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	ND	ND	1	ND	ND	0.4	ND

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

ND, not detected

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

พบเชื้อแบคทีเรียในโมโรมิ ประมาณ 10^4 ถึง 10^6 CFU เมื่อศึกษาด้วย BHI agar หรือ BHI agar และเมื่อพิจารณาจากรูปร่าง การย้อมติดสีแกรม และ Catalase activity แล้วน่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Tetragenococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* และ *Bacillus* ซึ่ง Table 5, 6, 7 และ 8 ได้แสดงข้อมูลของ isolate ที่มี enzyme activity ต่างๆ โดยการคัดแยกเบื้องต้น

เนื่องจากไม่สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่า strain เดิมที่มีอยู่แล้วใน Collection ของกลุ่มวิจัย ดังนั้นผู้วิจัยจึงตัดสินใจใช้ strain เดิมที่มีอยู่ซึ่งคัดแยกมาจากโมโรมิในกระบวนการหมักซีอิ๊วของไทยเช่นกัน คือ *Tetragenococcus halophilus* TS71

Table 5 Number of bacteria isolated from koji sample using BHI and MRS mediums

Media	shape	catalase	No. isolates	0% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	18% NaCl	20% NaCl	G	G (NoYE)	SK	SS	Good strains
KBHI	rod	+	55	55	55	31	12	8	32	11	41	31	2
K10-BHI	rod	+	56	56	56	32	13	10	34	13	42	33	4
K15-BHI	rod	+	42	42	42	42	35	21	21	21	36	37	21
K18-BHI	rod	+	13	13	13	13	13	10	7	5	5	8	5
	cocci	+	10	10	10	10	10	8	10	4	14	10	4
K20-BHI	rod	+	11	11	11	11	11	11	8	6	8	10	6
	cocci	+	9	9	9	9	9	9	7	6	8	7	6
KMRS	rod	+	39	39	39	33	11	6	15	4	29	27	2
	cocci	+	16	16	16	11	8	3	10	3	10	11	0
K10-MRS	rod	-	30	30	30	30	16	14	15	4	13	13	3
	cocci	+	12	12	12	11	8	2	4	3	12	11	2
K15-MRS	rod	+	18	18	18	18	13	13	15	4	13	13	3
	cocci	+	11	11	11	11	11	8	4	0	8	9	0
	cocci	-	13	13	13	13	13	13	1	1	0	1	0
K18-MRS	rod	+	12	12	12	12	12	10	8	0	4	9	0
	cocci	-	7	7	7	7	7	2	2	1	5	5	1
K20-MRS	cocci	-	8	8	8	8	8	8	3	1	3	4	1

* Number of isolates found on that medium; +: positive; -: negative; G: G-medium; G (NoYE): G-medium without yeast extract; SK: skim milk medium; SS: soluble starch medium; Good strains: bacteria that tolerate 20% NaCl and produce both glutaminase and protease enzymes.

Table 6 Number of bacteria isolated from 1-month moromi sample using BHI and MRS mediums

Media	shape	catalase	No. isolates	%NaCl					G	G (NoYE)	SK	SS	Good strains
				0	10	15	18	20					
1MBHI	cocci	+	12	12*	12	10	8	2	12	10	8	8	2
1M10-BHI	rod	+	36	36	36	34	14	4	8	3	31	33	2
1M10-BHI(an)	cocci	+	20	20	20	20	12	1	3	0	18	17	0
1M15-BHI	cocci	+	24	24	24	24	22	18	20	18	21	22	17
1M15-BHI(an)	cocci	+	72	72	72	72	54	48	12	4	3	10	3
1M18-BHI	rod	+	14	14	14	14	14	11	13	12	14	13	12
	cocci	+	13	13	13	13	13	9	10	6	6	11	6
	cocci	-	33	33	33	33	33	22	15	5	4	21	4
1M18-BHI(an)	cocci	-	60	60	60	60	60	56	18	15	16	31	15
1M20-BHI	cocci	-	60	60	60	60	60	60	5	4	5	5	4
1MMRS	rod	+	121	121	109	54	13	11	102	54	100	108	5
1MMRS(an)	rod	+	42	42	37	28	12	4	29	25	19	21	2
1M10-MRS	rod	-	37	37	37	33	21	9	22	8	37	31	8
	cocci	+	29	29	29	16	5	4	27	17	22	25	4
1M10-MRS(an)	cocci	+	37	37	37	11	10	2	33	12	34	34	1
	cocci	-	11	11	11	5	4	2	10	3	9	8	2
1M15-MRS	rod	+	52	52	52	52	44	32	21	6	11	17	5
	cocci	+	22	22	22	22	19	11	4	3	5	5	2
	cocci	-	17	17	17	17	11	10	6	1	3	2	1
1M15-MRS(an)	cocci	+	24	24	24	24	20	14	3	0	1	2	0
1M18-MRS	cocci	-	20	20	20	20	20	18	11	3	2	5	2
1M18-MRS(an)	cocci	-	35	35	35	35	35	29	9	0	0	2	0
1M20-MRS	cocci	-	44	44	44	44	44	44	7	2	1	3	1
1M20-MRS(an)	cocci	-	5	5	5	5	5	5	1	0	0	2	0

* Number of isolates found on that medium; +: positive; -: negative; G: G-medium; G (NoYE): G-medium without yeast extract; SK: skim milk medium; SS: soluble starch medium; Good strains: bacteria that tolerate 20% NaCl and produce both glutaminase and protease enzymes.

Table 7 Number of bacteria isolated from 2-month moromi sample using BHI and MRS mediums

Media	shape	catalase	No. isolates	%NaCl					G	G (NoYE)	SK	SS	Good strains
				0	10	15	18	20					
2MBHI	rod	+	42	42*	35	12	5	5	15	9	37	22	5
2M10-BHI	rod	+	44	44	44	40	21	5	14	6	31	36	5
	cocci	+	16	16	16	8	3	1	14	3	11	16	1
2M15-BHI	cocci	+	59	59	59	59	31	11	11	8	50	51	8
	cocci	-	9	9	9	9	8	3	5	4	6	6	3
2M18-BHI	rod	+	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	rod	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	cocci	+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	cocci	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2M20-BHI	cocci	-	28	28	28	28	28	28	4	1	3	5	1
2M20-BHI(an)	cocci	-	32	32	32	32	32	32	4	3	3	5	3
2MMRS	rod	+	56	56	47	36	33	21	37	4	39	42	3
2M10-MRS	rod	+	13	13	13	11	5	3	13	11	12	13	3
	rod	-	19	19	19	15	11	11	1	0	1	8	0
	cocci	+	31	31	31	31	30	30	9	8	8	11	8
	cocci	-	7	7	7	7	7	7	4	2	2	5	2
2M15-MRS	rod	-	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1	0
	cocci	+	17	17	17	17	14	8	4	3	6	6	3
	cocci	-	6	6	6	6	5	5	2	1	1	4	1
2M18-MRS	rod	-	24	24	24	24	24	21	4	0	0	3	0
	cocci	-	6	6	6	6	6	3	4	3	2	2	2
2M20-MRS	cocci	-	65	65	65	65	65	65	0	0	0	1	0
2M20-MRS(an)	cocci	-	16	16	16	16	16	16	0	0	0	0	0

* Number of isolates found on that medium; +: positive; -: negative; G: G-medium; G (NoYE): G-medium without yeast extract; SK: skim milk medium; SS: soluble starch medium; Good strains: bacteria that tolerate 20% NaCl and produce both glutaminase and protease enzymes.

Table 8 Number of bacteria isolated from 3-month moromi sample using BHI and MRS mediums

Media	shape	catalase	No. isolates	%NaCl					G	G (NoYE)	SK	SS	Good strains
				0	10	15	18	20					
3MBHI	rod	+	20	20*	20	18	6	3	15	11	19	17	3
3MBHI(an)	cocci	+	16	16	16	11	5	4	12	9	15	15	4
3M10-BHI	rod	+	7	7	7	7	5	5	7	4	4	6	4
	cocci	+	28	28	28	22	14	9	13	5	22	17	5
3M15-BHI	cocci	+	48	48	48	48	44	31	11	6	44	40	5
	cocci	-	12	12	12	12	8	2	4	2	8	9	1
3M18-BHI	rod	+	29	29	29	29	29	21	11	3	22	25	3
	rod	-	2	2	2	2	2	1	0	0	1	0	0
	cocci	+	10	10	10	10	10	8	3	1	5	1	1
	cocci	-	5	5	5	5	5	3	1	0	3	2	0
3M20-BHI	cocci	-	64	64	64	64	64	64	11	3	4	5	3
3MMRS	rod	+	62	62	62	62	62	62	1	0	4	2	0
3M10-MRS	rod	+	16	16	16	3	0	0	1	1	4	3	0
	rod	-	14	14	14	14	11	7	2	0	0	4	0
	cocci	+	14	14	14	9	9	7	3	0	3	1	0
	cocci	-	6	6	6	6	5	2	1	0	0	5	0
3M15-MRS	rod	-	6	6	6	6	4	1	2	0	0	3	0
	cocci	+	20	20	20	20	13	7	3	0	0	2	0
	cocci	-	5	5	5	5	2	1	0	0	1	3	0
3M18-MRS	rod	-	25	25	25	25	25	23	0	0	1	3	0
	cocci	-	7	7	7	7	7	2	0	0	1	0	0
3M20-MRS	cocci	-	47	47	47	47	47	47	2	0	0	14	0

* Number of isolates found on that medium; +: positive; -: negative; G: G-medium; G (NoYE): G-medium without yeast extract; SK: skim milk medium; SS: soluble starch medium; Good strains: bacteria that tolerate 20% NaCl and produce both glutaminase and protease enzymes.

การศึกษาการผลิตสารให้กลิ่นรสของเชื้อที่สนใจในระบบจำลองการหมักโมโรมิ

ผู้วิจัยได้ทดลองศึกษาการเจริญและการผลิตสารระเหยของเชื้อที่สนใจพัฒนาเป็นต้นเชื้อต้นแบบในน้ำโมโรมิ ซีอิ๊ว อายุ 1, 2 และ 3 เดือน (M1, M2, M3) โดยไม่มีการทำให้ปลอดเชื้อก่อนลงต้นเชื้อ ทั้งนี้เพื่อเลียนแบบระบบของการหมักโมโรมิซึ่งมี microflora ต่างๆ และมีสารต่างๆ ที่เป็น precursor ตามธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารระเหยให้กลิ่นรสต่างๆ อยู่แล้ว โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลา 7 วัน มีชุดทดลองดังนี้

- Single culture ของ *Z. rouxii* A22
- Single culture ของ *Z. rouxii* A34
- Single culture ของ *Z. rouxii* A35
- Single culture ของ *P. guilliermondii* EM1Y-52

จากการทดลองพบว่า ปริมาณ CFU ของชุดทดลองที่มีการเติมกล้ำเชื้อลงไปจะสูงกว่าชุดควบคุม คือ ชุดที่ไม่ได้เติมต้นเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยชุดทดลองมี CFU สูงกว่า 1-4 log และพบว่าจำนวน yeast ในชุดทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อลงไปไม่เปลี่ยนแปลงมากในระยะเวลา 7 วัน บ่มไว้ที่ 30°C โดยชุดทดลองทั้ง 4 มีแนวโน้มเหมือนกัน (Figure 8, 9, 10, 11) สำหรับปริมาณ aerobic และ anaerobic LAB นั้นพบว่ามีปริมาณ 5-6 CFU/ml เท่ากันทุกตัวอย่าง (Figure 12, 13, 14, 15) และ จากการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อลงไป มีปริมาณ 120-170 mM ในช่วงแรก และเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน มีกลูโคสเหลือในปริมาณน้อย (0-10 mM) (Figure 16, 17, 18, 19) ซึ่งปริมาณกลูโคสในช่วงวันสุดท้ายของการทดลองที่ต่ำมากอาจส่งผลให้เชื้อเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร

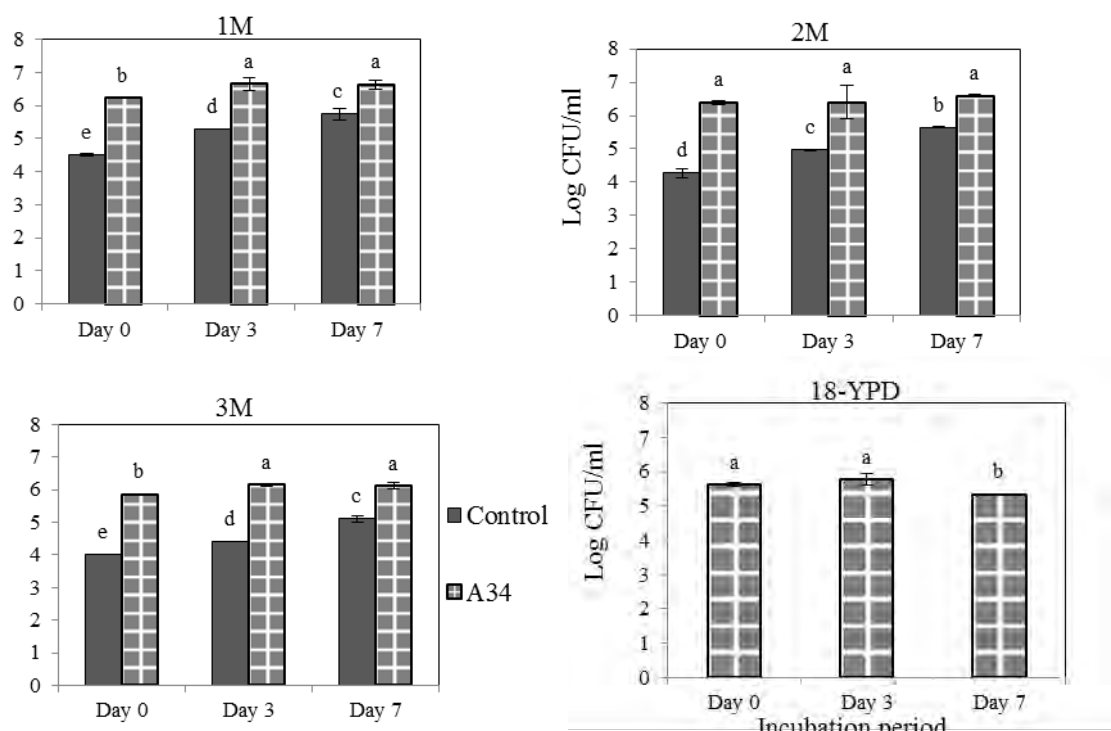


Figure 8 The number of yeast cells of A34 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control; and 18-YPD media.

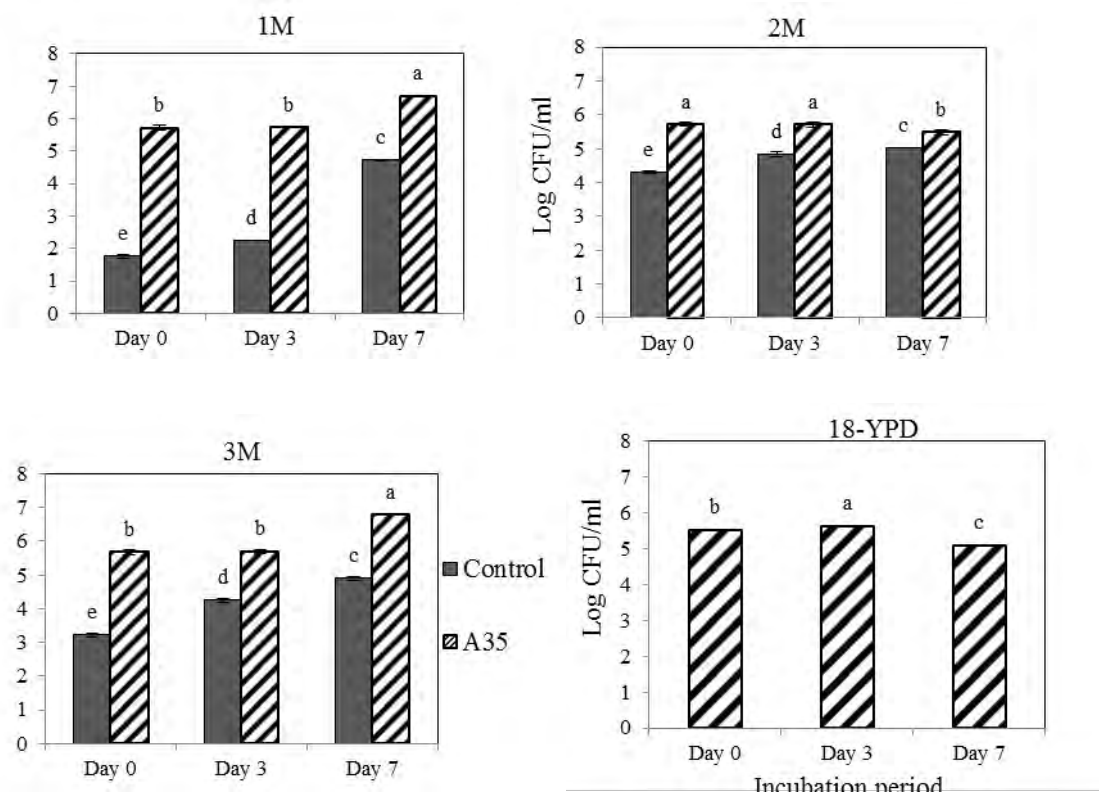


Figure 9 The number of yeast cells of A35 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control; and 18-YPD media.

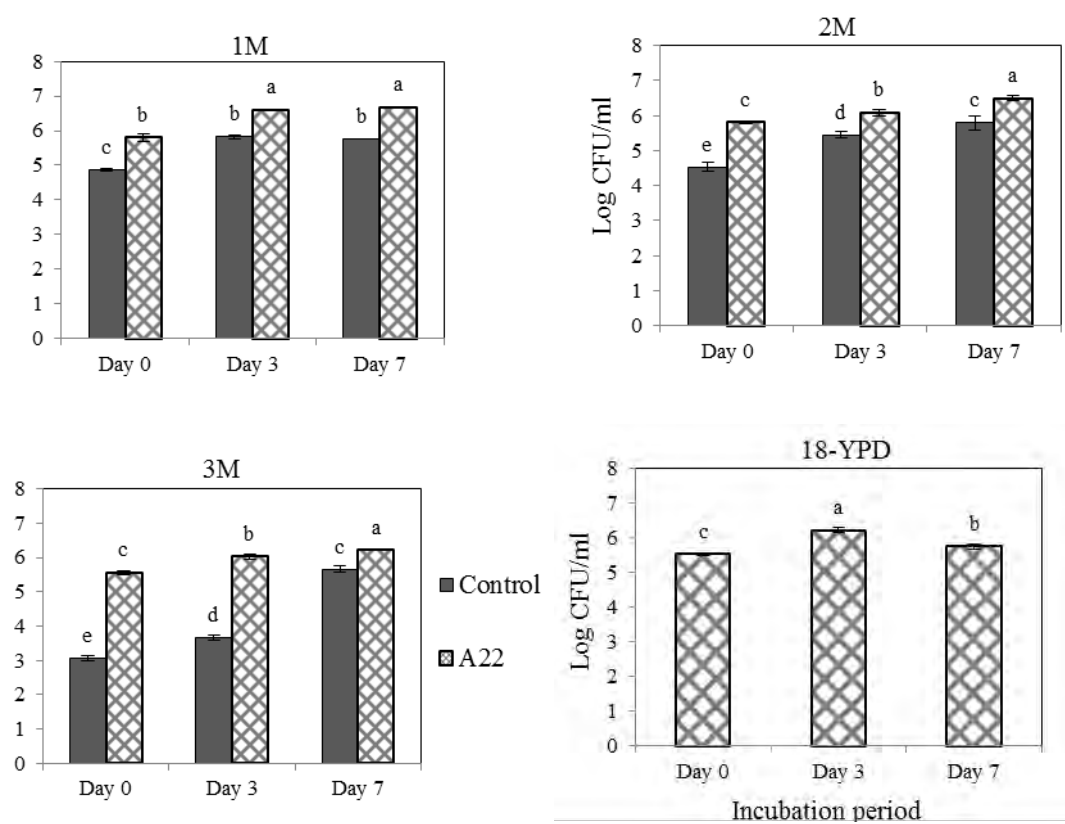


Figure 10 The number of yeast cells of A22 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control; and 18-YPD media.

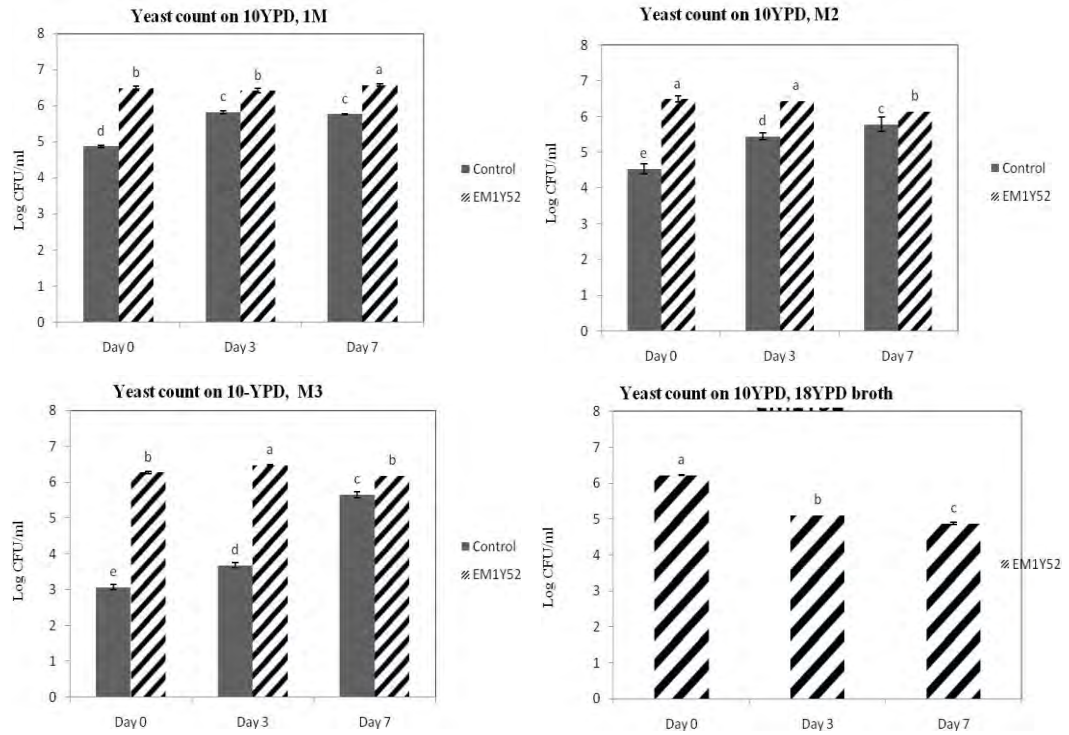
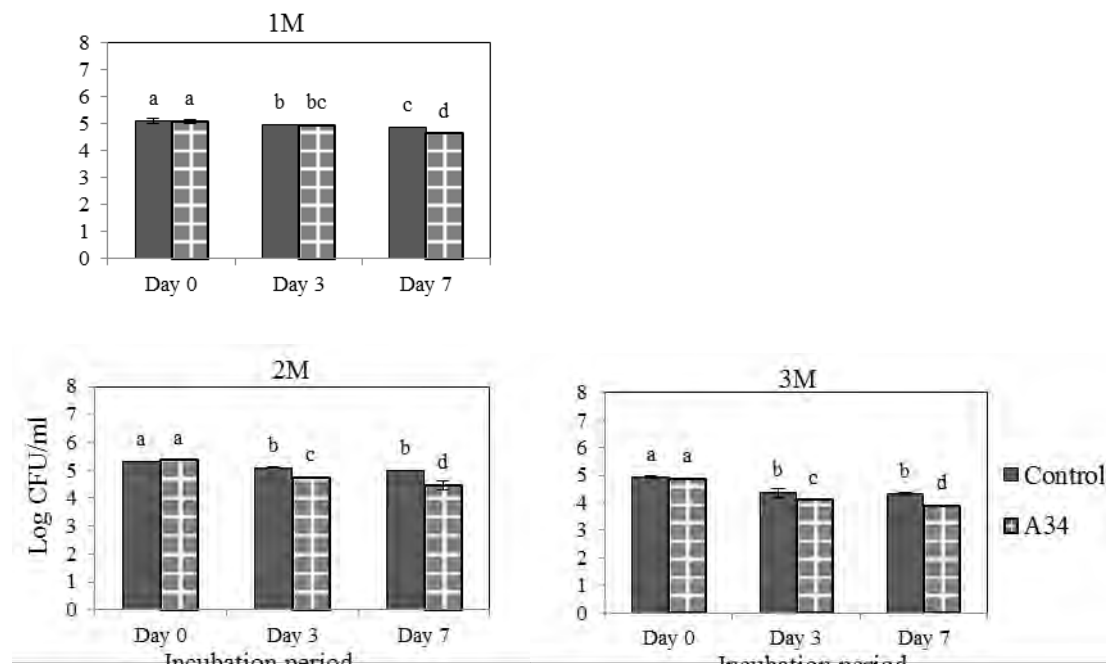


Figure 11 The number of yeast cells of EM1Y-52 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control; and 18-YPD media.

(a)



(b)

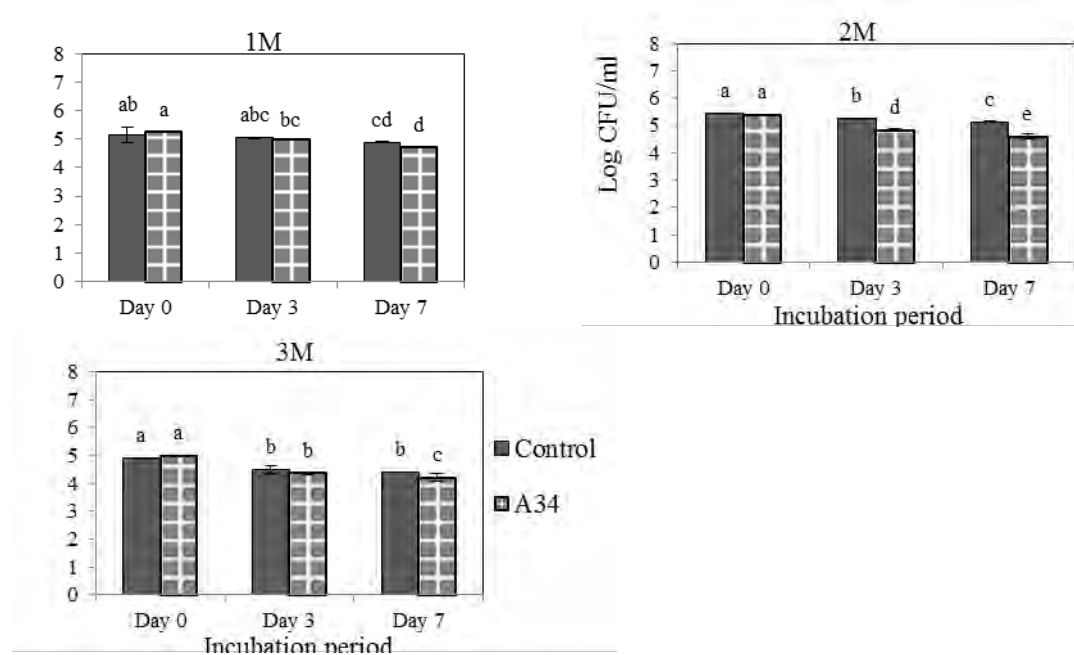
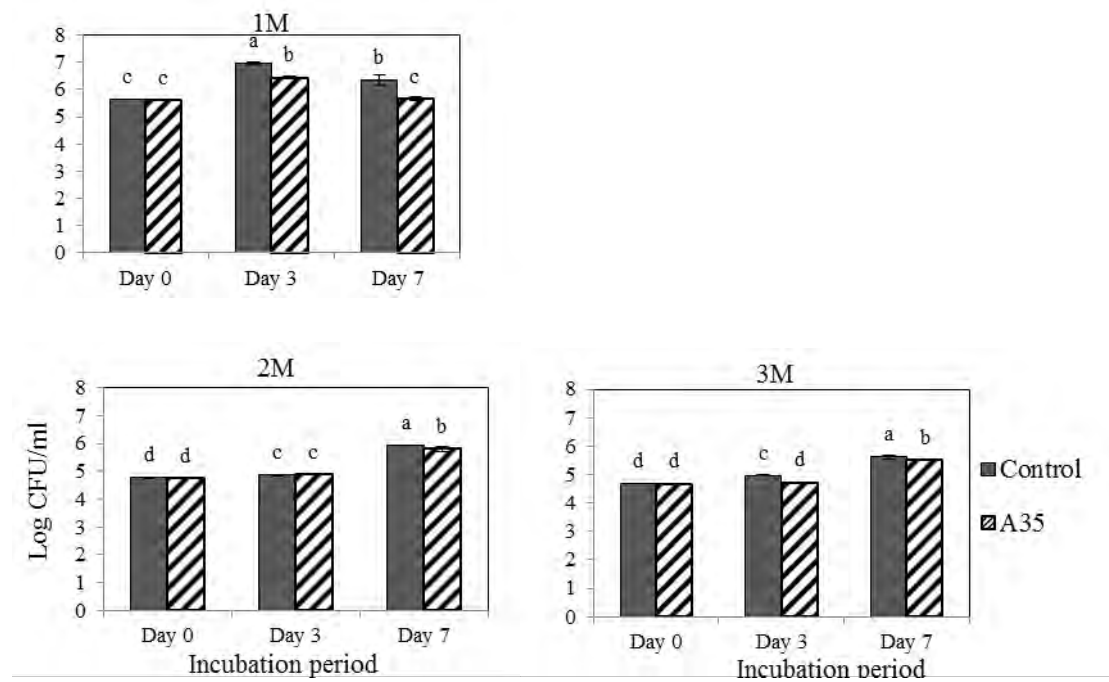


Figure 12 The number of aerobic (a) and anaerobic (b) LAB of A34 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

(a)



(b)

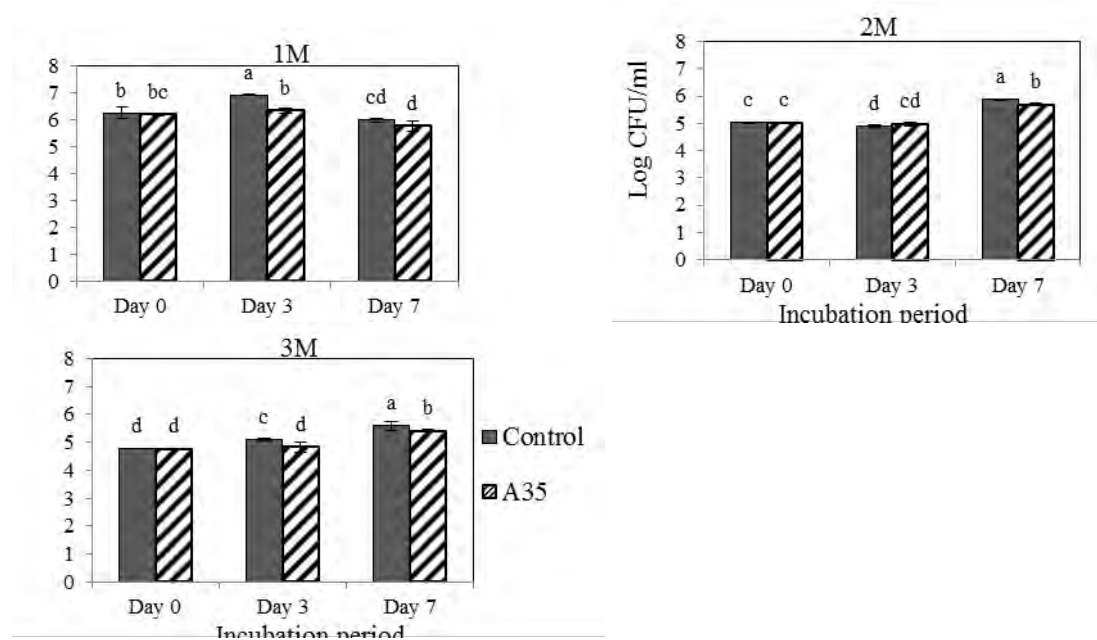
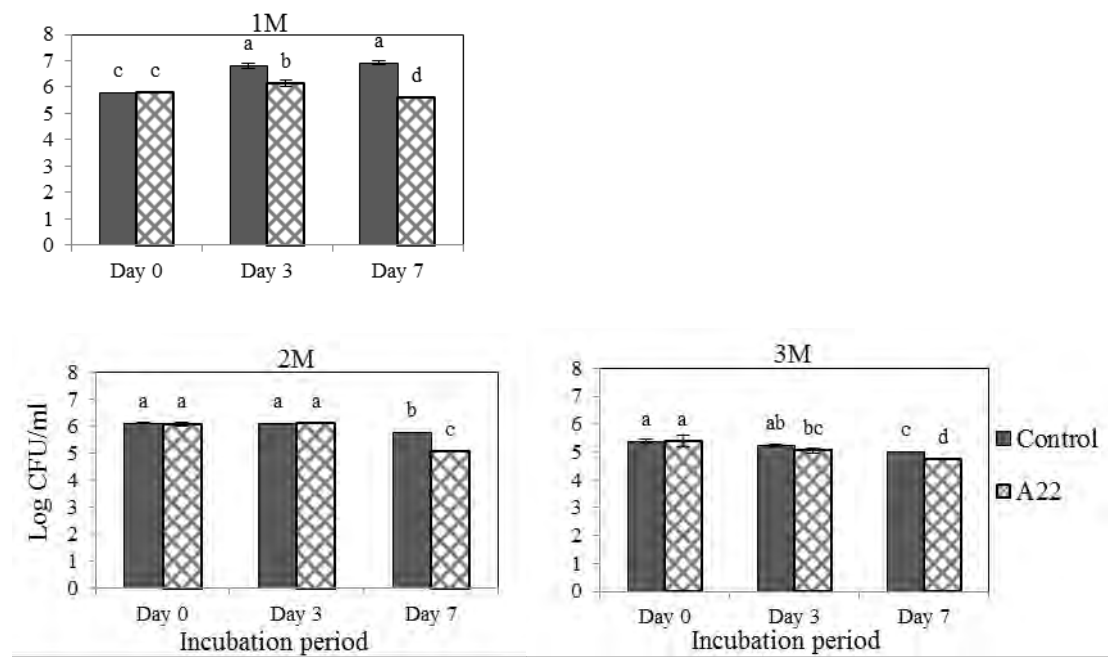


Figure 13 The number of aerobic (a) and anaerobic (b) LAB of A35 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

(a)



(b)

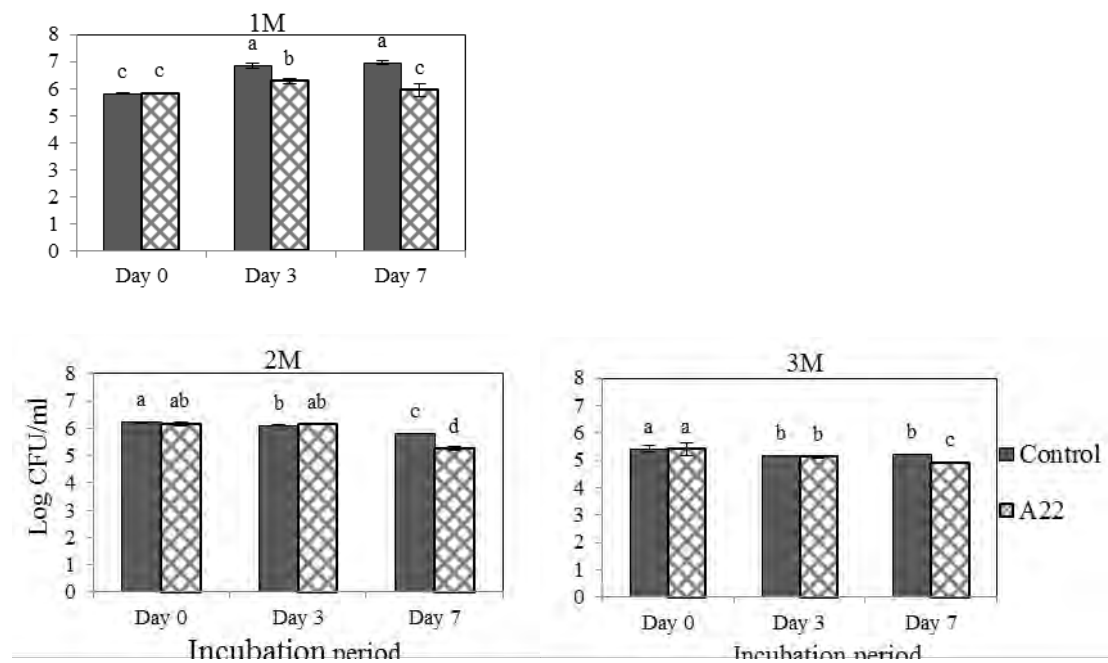
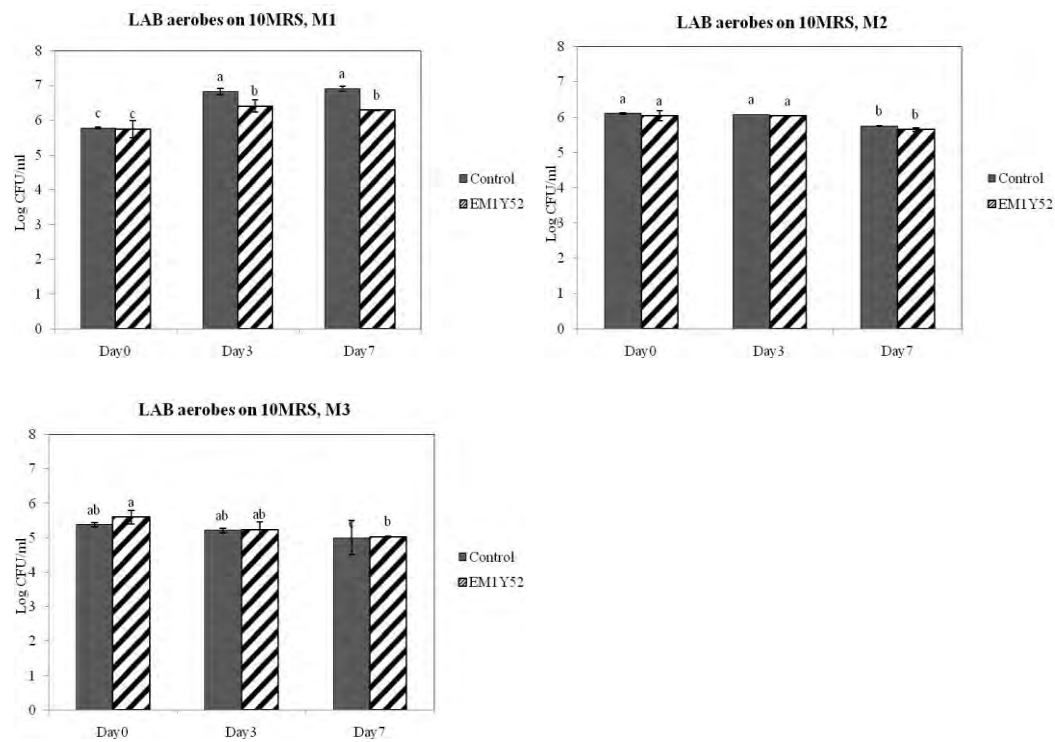


Figure 14 The number of aerobic (a) and anaerobic (b) LAB of A22 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

(a)



(b)

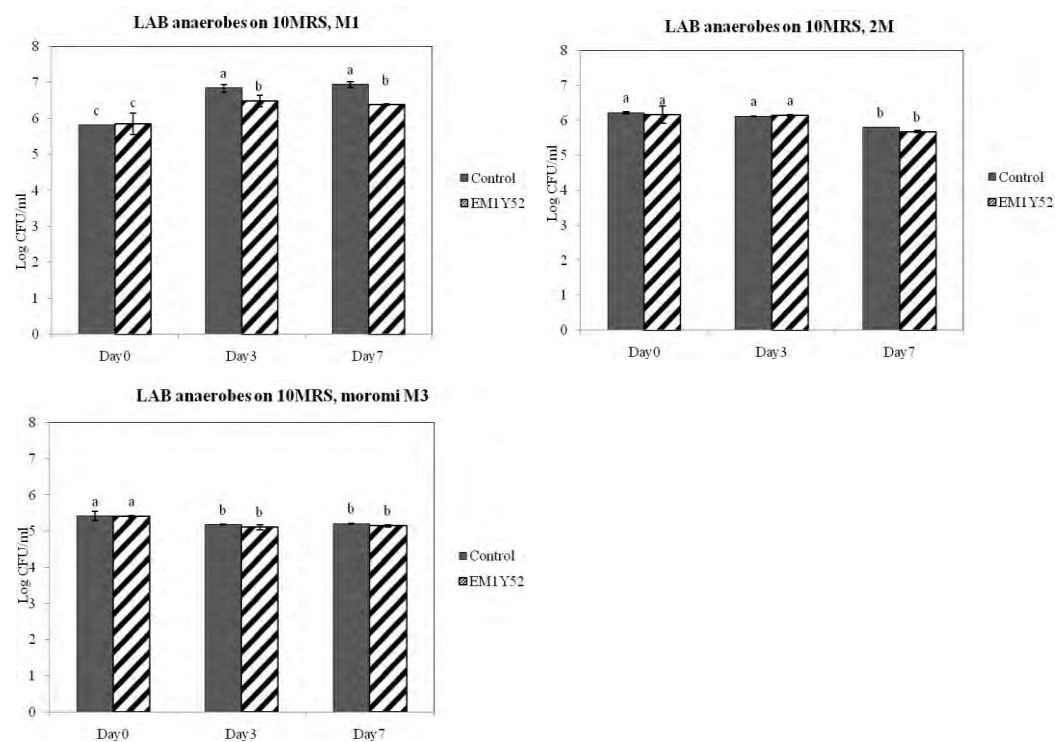


Figure 15 The number of aerobic (a) and anaerobic (b) LAB of EM1Y-52 inoculated in moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

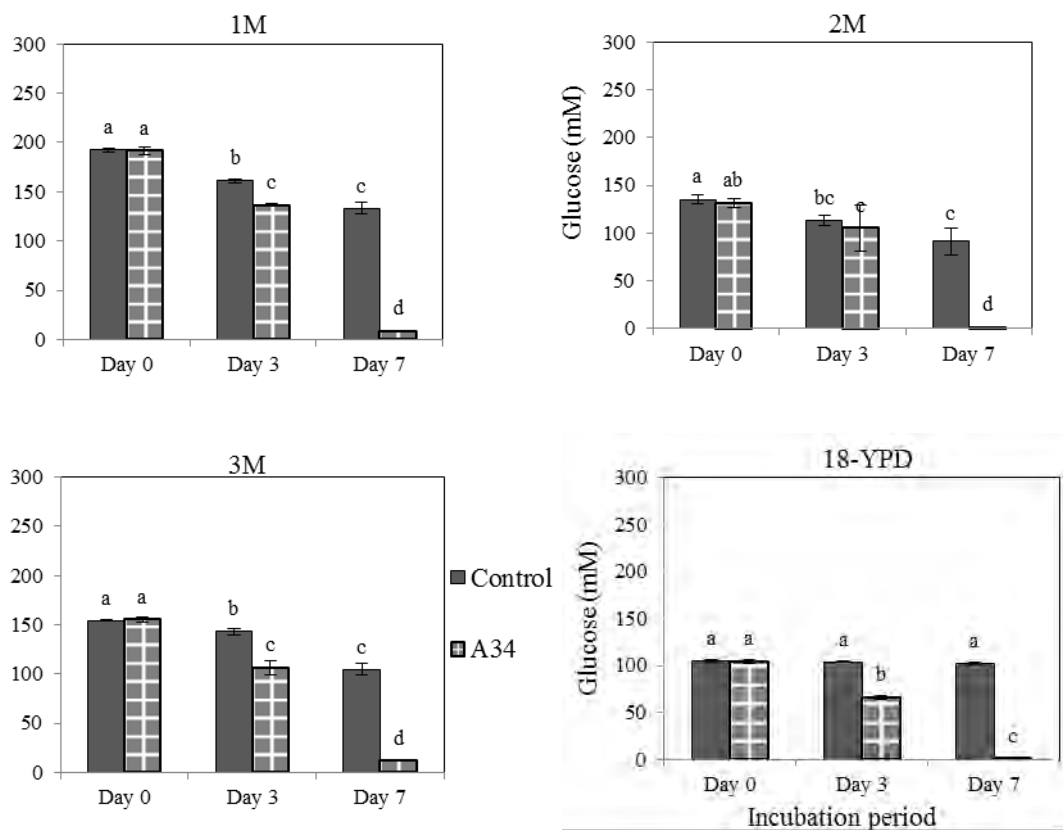


Figure 16 Glucose in A34 inoculated moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

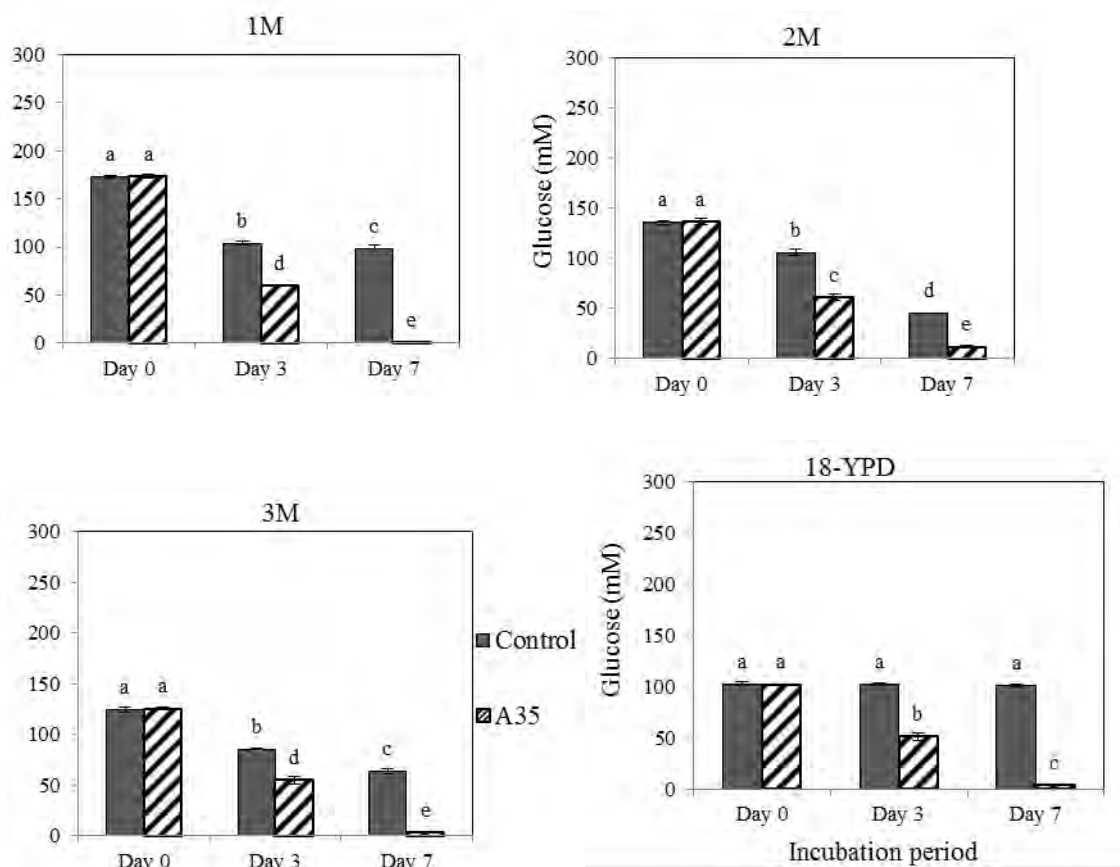


Figure 17 Glucose in A35 inoculated moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

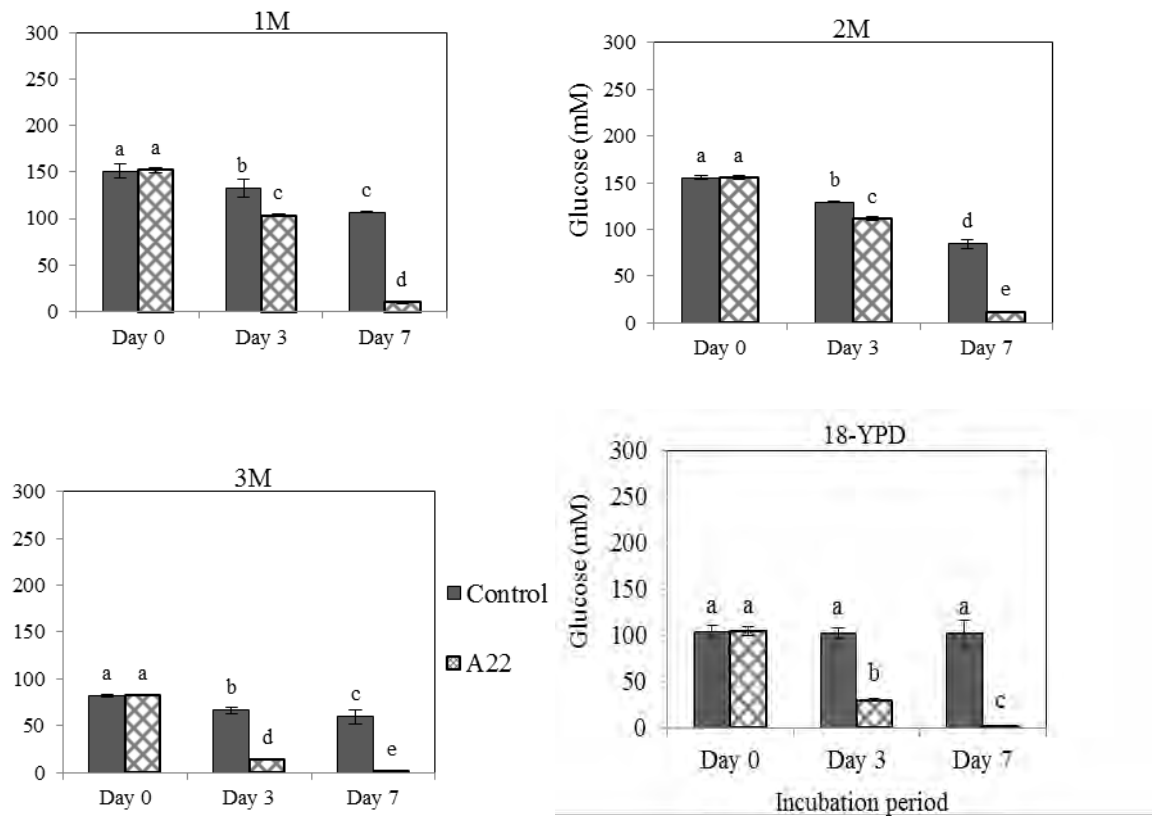


Figure 18 Glucose in A22 inoculated moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

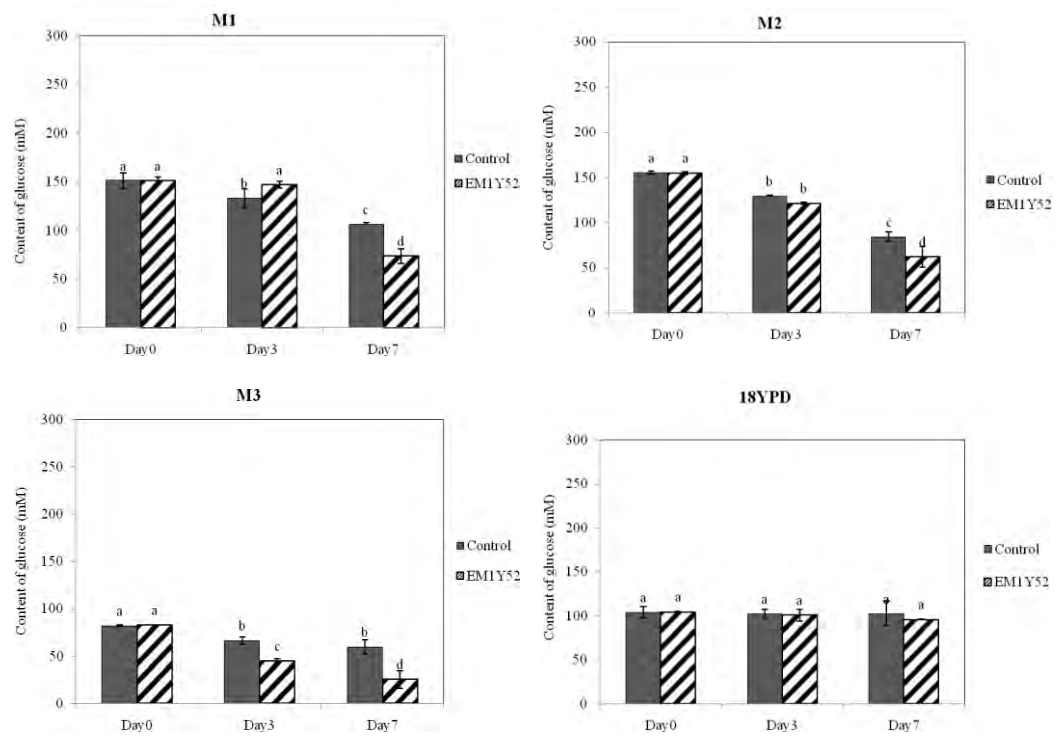


Figure 19 Glucose in EM1Y-52 inoculated moromi media 1M, 2M, 3M comparing to uninoculated control

หลังจากบ่มชุดทดลองและชุดควบคุมเป็นเวลา 7 วัน ได้นำไปวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่น 26 ตัวที่เป็นสารที่สนใจ (Table 9, 10, 11) เนื่องจากเป็นสารสำคัญในชีอิ้วไทยและมีการรายงานว่าพบในชีอิ้วญี่ปุ่นและจีน (Beuchat, 2001; van der Sluis et al., 2001) โดยเปรียบเทียบระหว่าง 18-YPD broth (Table 12) พบว่า ในชุดเปรียบเทียบที่เลี้ยงเชื้อใน 18-YPD broth ผลิตเพียง แอลกอฮอล์ เช่น ethanol, 1-butanol, 2-phenylethanol, กรด, เอสเตอร์ (2-phenylethylacetate) และ คีโตน (2-hydroxy-2-butanone) เนื่องจากใน 18-YPD broth มี precursor ในการผลิตสารระเหยจำกัด คาดว่าปัจจัยที่เป็นตัวจำกัดการเจริญของเชื้อและการหมัก ได้แก่ กลูโคส และ กรดอะมิโน

ในกรณีของ A35 เมื่อเปรียบเทียบเชื้อที่เลี้ยงในน้ำโมโรมิอายุ 1 เดือน (Table 9) พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด โดยสูงกว่าชุดควบคุมถึง 3.5 เท่า แอลกอฮอล์ตัวอื่นก็เช่นเดียวกัน เช่น 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, phenylethanol ที่เพิ่มขึ้น 10 ถึง 29 เท่า ในขณะที่ A34 ที่เลี้ยงในน้ำโมโรมิมีความหลากหลายของชนิดแอลกอฮอล์มากที่สุด มีแอลดีไฮด์มากที่สุด และมีเอสเตอร์ ได้แก่ ethylacetate มาก ส่วน A22 นั้น ให้ HEMF ซึ่งเป็นสารกลุ่ม hydroxy furanone มากที่สุด ซึ่งสารนี้เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นคาราเมล กลิ่นหอมหวาน ในชีอิ้วญี่ปุ่น ส่วน maltol ซึ่งก็เป็นสารที่ให้กลิ่นคาราเมล กลิ่นหอมหวาน เช่นกันนั้น ทั้ง A22 และ A35 ผลิตได้ดี นอกจากนี้ ยีสต์ทั้งสามยังผลิต เอสเตอร์ เช่น ethylacetate ได้ดี โดยเฉพาะ A34 และ A22 มีความหลากหลายในการผลิตสารกลุ่มนี้

ในน้ำโมโรมิอายุ 2 เดือน (Table 10) การผลิตเอทานอลใน A34 และ A22 จะเห็นชัดขึ้น และ A35 ก็ผลิต HEMF และ maltol ได้ดีขึ้น

ในน้ำโมโรมิ 3 เดือน (Table 11) ความหลากหลายของแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ผลิตได้มีมากขึ้น รวมทั้งการผลิต HEMF ก็เห็นชัดเจน และใน A22 มีสาร HDMF อีกด้วย

โดยสรุป A22 จะให้ เอทานอล, HEMF, HDMF, ethylacetate, benzaldehyde, และ phenylacetaldehyde สูง ในขณะที่ A34 ให้ปริมาณของ higher alcohol และ เอสเตอร์ สูง ส่วน A35 จะให้ เอทานอล, 1-butanol, 2-furanethanol, acetic acid, 3-methyl-butanoic acid และ maltol สูง

ส่วนในการทดลองต้นเชื้อ *P. guilliermondii* นั้น พบว่า EM1Y-52 สามารถผลิตสารประกอบฟีนอลที่ระเหยได้ เช่น 2-methoxy-phenol, 4-ethyl-2-methoxy-phenol, และ 4-ethyl-2-phenol ได้ แต่ไม่ผลิตสาร HEMF (Table 13) ในขณะที่ *Z. rouxii* ซึ่งผลิต HEMF จะไม่ผลิตสารประกอบฟีนอลที่ระเหยได้

จากผลการทดลองข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกยีสต์ A22 ซึ่งให้แอลกอฮอล์, HEMF, HDMF รวมทั้ง เอสเตอร์ และแอลดีไฮด์สูง มาใช้ร่วมกับ EM1Y-52 ที่มีกิจกรรมของ glutaminase สูง และ ผลิตสารประกอบฟีนอลที่ระเหยได้ที่สำคัญในชีอิ้วมาทดลองทำ mixed culture ร่วมกับ LAB ที่มีอยู่ คือ *T. halophilus* TS71 ดังนี้

- Mixed culture ของ *Z. rouxii* A22 และ *P. guilliermondii* EM1Y-52
- Mixed culture ของ *Z. rouxii* A22 และ *T. halophilus* TS71

จากการทดลองพบว่า ปริมาณ CFU ของชุดทดลอง co-culture มีปริมาณ CFU สูงกว่า 2-5 log เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพบว่าจำนวนยีสต์ในชุดทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อลงไปไม่เปลี่ยนแปลงมากในระยะเวลา 7 วัน (Figure 20) สำหรับปริมาณ aerobic LAB (Figure 21) และ anaerobic LAB (Figure 22) นั้นพบว่ามีปริมาณในช่วง 5-6 CFU/ml เท่ากันในทุกตัวอย่าง โดยในชุดการทดลองที่มีการเติม LAB ลงไปจะมีปริมาณ CFU สูงกว่า 1-2 log เมื่อถึงวันที่ 7 ปริมาณเชื้อ LAB ของแต่ละชุดทดลองจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย นอกจากนั้น จากการวัดปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อบ่มไว้ 7 วัน พบว่าชุดทดลองที่เป็น co-culture จะมีการใช้กลูโคสมากกว่าชุดควบคุม หรือชุดที่เป็น single culture (Figure 23) อาจกล่าวได้ว่า ปริมาณกลูโคสใน moromi medium ไม่เพียงพอในการเจริญของเชื้อที่มีอยู่ดั้งเดิมในน้ำโมโรมิและเชื้อที่เติมลงไปจึงทำให้ co-culture เจริญได้อย่างจำกัดใน moromi medium

Table 9 Concentration (µg/L) of volatile compounds produced by A34, A22 and A35 single cultures in 1-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	1M moromi											
			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation		
			Incub.	Cont.	A34	Incr.	Incub.	Cont.	A22	Incr.	Incub.	Cont.	A35	Incr.
Acids (4)														
1	1476	Acetic acid	2.9	4.3	2.5	-0.4	5.6	7.1	6.9	0	118.6	57.8	28.5	-0.5
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		8.3	5.2	2.8	-0.5
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	22.5	
Alcohols (8)														
5	<1100	Ethanol	144.1	440.1	911.6	1.1	107.1	889.9	1,499.70	0.7	195.2	142.6	637.9	3.5
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	21	51	1.4	ND	24	28.5	0.2	ND	ND	36.4	
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
8	1236	3-Methyl-1-butanol	47.3	320.1	536.1	0.7	14.3	448.4	450.7	0	23.9	44.6	636.3	13.3
9	1464	1-Octen-3-ol	3.4	4.6	2.3	-0.5	4.3	6.5	2.1	-0.7	5.4	4.7	2.4	-0.5
10	1612	2,3-Butanediol	1.7	1.4	1.8	0.3	ND	0.5	1.8	2.5	2.9	1.4	8.7	5.2
11	1756	Methionol	ND	2.5	3.3	0.3	ND	3.7	3.8	0	ND	ND	5.2	
12	1991	2-Phenylethanol	1.1	30.9	97.5	2.2	1.2	82.8	117.5	0.4	2.5	4.2	125	29
Aldehydes (2)														
13	1562	Benzaldehyde	1.6	2.2	2.5	0.1	1.9	3	4.5	0.5	ND	ND	ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	2	2.3	0.2	ND	ND	1.6		ND	ND	ND	
Esters (5)														
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	29.8		ND	ND	43.6		68.2	ND	15.6	
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		2.2	1.1	0.5	-0.5
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	2.1		ND	0.7	2.3	2.5	ND	ND	ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	0.9		ND	0.4	1	1.6	ND	ND	ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	1.6		ND	2	2.4	0.2	ND	ND	ND	
Phenols (3)														
20	1887	2-Methoxy-phenol	0.1	0.5	0.3	-0.4	ND	ND	ND		2.1	1.1	1.4	0.3
21	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	ND		ND	4.6	1.3	-0.7	ND	ND	ND	
22	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND	1.5	0.2	-0.9	ND	ND	ND	
Furanones (2)														
23	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
24	2115	HEMF	ND	1,901.8	2,362.0	0.2	ND	2,144.6	5,507.1	1.6	ND	ND	1,954.8	
Ketone (1)														
25	1251	3-Hydroxy-2-butanone	650.8	3,652.6	1,621.0	-0.6	ND	5,871.4	3,976.2	-0.3	ND	ND	5,124.8	
Pyrone (1)														
26	1993	Maltol	1,773.40	1,647.9	1,641.6	0	2,782.60	2,128.5	2,284.3	0.1	2,380.3	1,781.0	3,293.7	0.8

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation;

Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected

Table 10 Concentration (µg/L) of volatile compounds produced by A34, A22 and A35 single cultures in 2-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	2M moromi											
			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation		
			Incub.	Cont.	A34	Incr.	Incub.	Cont.	A22	Incr.	Incub.	Cont.	A35	Incr.
Acids (4)														
1	1476	Acetic acid	22.4	11.1	9	-0.2	19.5	19	18.9	0	174.1	42.6	39.1	-0.1
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	2.3	1.3	1.5	0.2	3.3	2.8	2.1	-0.2	11.4	3.5	4	0.1
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	23.8	
Alcohols (8)														
5	<1100	Ethanol	96.4	298.5	700.4	1.3	115	202.1	910	3.5	228.3	613.4	652.7	0.1
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	13.8	38.6	1.8	ND	20	29.2	0.5	2	35.1	35.8	0
7	1180	1-Butanol	ND	ND										
8	1236	3-Methyl-1-butanol	14.8	221	452.9	1	16.7	345.9	348.1	0	53.2	545.1	552.1	0
9	1464	1-Octen-3-ol	3.9	5.9	3.8	-0.4	5	7.5	2.6	-0.7	4	2.9	1.8	-0.4
10	1612	2,3-Butanediol	4.8	4.5	4.9	0.1	3.2	3.9	5.2	0.3	2.1	1.3	13.8	10
11	1756	Methionol	ND	2.1	2.3	0.1	ND	3	3	0	ND	5.3	5.5	0
12	1991	2-Phenylethanol	0.6	21.8	71.4	2.3	1.8	45.2	72.2	0.6	3.6	57.2	98.8	0.7
Aldehydes (2)														
13	1562	Benzaldehyde	0.8	1.6	1.6	0	0.7	0.7	1.5	1	ND	ND	ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	2	2.5	0.2	ND	ND	2.9		ND	ND	ND	
Esters (5)														
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	28.7		ND	6.5	46.6	6.2	59.9	10.9	7.9	-0.3
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	0.9		ND	ND	ND		3	ND	0.4	
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	1.9		ND	2.8	3.3	0.2	ND	ND	ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	1.1		ND	1.5	2.1	0.4	ND	ND	ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	0.7		ND	0.8	3.2	3.2	ND	13.5	14.6	0.1
Phenols (3)														
20	1887	2-Methoxy-phenol	0.9	1.1	0.9	-0.1	1.4	2.4	1.6	-0.3	4.6	1.9	2.3	0.2
21	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	2.5	1	-0.6	1	5.1	3.2	-0.4	ND	ND	ND	
22	2201	4-Ethyl-phenol	ND	0.9	0.4	-0.6	ND	1.4	0.7	-0.5	ND	ND	ND	
Furanones (2)														
23	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND	ND	1,048.9		ND	ND	ND	
24	2115	HEMF	ND	768.5	1,405.5	0.8	ND	3,064.3	7,047.7	1.3	ND	ND	3,952.6	
Ketone (1)														
25	1251	3-Hydroxy-2-butanone	119.4	2,193.0	2,203.5	0	ND	4,635.4	5,018.1	0.1	ND	8,197.4	9,670.9	0.2
Pyrone (1)														
26	1993	Maltol	1,837.4	2,183.1	1,948.9	-0.1	5,296.6	691	3,785.5	4.5	6,545.5	1,318.70	8,733.9	5.6

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation;

Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected

Table 11 Concentration (µg/L) of volatile compounds produced by A34, A22 and A35 single cultures in 3-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	3M moromi											
			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation		
			Incub.	Cont.	A34	Incr.	Incub.	Cont.	A22	Incr.	Incub.	Cont.	A35	Incr.
Acids (4)														
1	1476	Acetic acid	21.6	17	12.3	-0.3	3.2	4.3	4.2	0	169	53.7	51.7	0
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	8.1	6.5	5.7	-0.1		1.2	1.2	0	8.9	3.7	3.4	-0.1
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	31.6	
Alcohols (8)														
5	<1100	Ethanol	104	177.2	686.2	2.9	28.8	35.9	754.5	20	241	309.2	647.7	1.1
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	6.6	31.2	3.8	ND	3.6	14	2.9	ND	18.3	32.9	0.8
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND									
8	1236	3-Methyl-1-butanol	47.9	129.6	366	1.8	6.4	228	377	0.7	32.4	297.2	506.7	0.7
9	1464	1-Octen-3-ol	2.5	4.1	2	-0.5	ND	3.7	1.9	-0.5	4.2	4.3	1.8	-0.6
10	1612	2,3-Butanediol	2.4	2.2	3.5	0.6	1.2	1.5	3	1.1	2.2	0.8	8.4	9.5
11	1756	Methionol	ND	1.8	2.2	0.2	ND	3	3.3	0.1	ND	4.3	5.1	0.2
12	1991	2-Phenylethanol	8	21.5	84.3	2.9	0.6	16.7	88.4	4.3	3.1	35.1	92.2	1.6
Aldehydes (2)														
13	1562	Benzaldehyde	0.6	0.4	1	1.4	ND	0.6	0.6	0	ND	ND	ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	0.6	2.8	3.8	1.6	ND	3.3		2.2	ND	ND	
Esters (5)														
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	24.5		ND	ND	26		54.7	ND	10.9	
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		4.2	1.2	1.3	0
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	5.3		ND	ND	1		ND	ND	ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	10.7		ND	ND	0.4		ND	ND	ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	14		ND	ND	2.4		ND	1.6	4.4	1.8
Phenols (3)														
20	1887	2-Methoxy-phenol	0.9	1	1	0	ND	0.6	0.5	-0.2	5.7	3.3	4.5	0.4
21	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	0.3	ND	-1	ND	3.9	1.9	-0.5	ND	ND	ND	
22	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND	1.4	0.6	-0.5	ND	ND	ND	
Furanones (2)														
23	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND	ND	773.1		ND	ND	ND	
24	2115	HEMF	ND	ND	4,075.7		ND	ND	4,211.5		ND	ND	1,747.4	
Ketone (1)														
25	1251	3-Hydroxy-2-butanone	1,532.7	1,536.1	2,685.0	0.7	2,171.6	3,334.3	4,582.6	0.4	ND	ND	ND	
Pyrone (1)														
26	1993	Maltol	5,062.2	5,696.0	5,226.5	-0.1	1,228.5	1,148.7	1,704.6	0.5	2,956.3	10,473.8	11,223	0.1

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation;

Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected

Table 12 Concentration (µg/L) of volatile compounds produced by A34, A22 and A35 single cultures in 18-YPD medium

No.	RI ^a	Compounds	18-YPD medium											
			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation		
			Incub.	Cont.	A34	Incr.	Incub.	Cont.	A22	Incr.	Incub.	Cont.	A35	Incr.
Acids (4)														
1	1476	Acetic acid	ND	ND	7.5		ND	ND	6.8		ND	ND	6.9	
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	ND	ND	1.9		ND	ND	1.7		ND	ND	1.7	
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	3.7		ND	ND	2		ND	1	3	2.1
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Alcohols (8)														
5	<1100	Ethanol	ND	ND	1,955.6		ND	ND	1,823.0		ND	ND	1,870.6	
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	26.8		ND	ND	20.5		ND	ND	24.1	
7	1180	1-Butanol	702.4	865.2	389.4	-0.5	696.5	812.3	365.8	-0.5	721.3	873.4	381.3	-0.6
8	1236	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	749.2		ND	ND	708.5		ND	ND	721.3	
9	1464	1-Octen-3-ol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
10	1612	2,3-Butanediol	ND	ND	5.2		ND	ND	3.6		ND	ND	ND	
11	1756	Methionol	ND	ND	5.1		ND	ND	4		ND	ND	4.5	
12	1991	2-Phenylethanol	ND	ND	312.6		ND	ND	246.1		ND	ND	261.1	
Aldehydes (2)														
13	1562	Benzaldehyde	1.8	9.7	13.3	0.4	1.7	7.7	10	0.3	1.6	13.6	14.4	0.1
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Esters (5)														
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	49.2		ND	ND	25.9		ND	ND	24.4	
Phenols (3)														
20	1887	2-Methoxy-phenol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
21	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
22	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Furanones (2)														
23	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
24	2115	HEMF	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Ketone (1)														
25	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	ND	12,537.1		ND	ND	8,816.4		ND	ND	8,633.7	
Pyrone (1)														
26	1993	Maltol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation;

Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected

Table 13 Concentration (µg/L) of volatile compounds produced by EM1Y52 single cultures in moromi and 18-YPD media

No.	RI ^a	Compounds	1M moromi				2M moromi				3M moromi				18-YPD medium			
			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation			Before	After incubation		
			Incu.	Cont.	EM1Y52	Incr.	Incu.	Cont.	EM1Y52	Incr.	Incu.	Cont.	EM1Y52	Incr.	Incu.	Cont.	EM1Y52	Incr.
Acids (4)																		
1	1476	Acetic acid	5.6	7.1	6.6	-0.1	19.5	19	14.5	-0.2	3.2	4.3	3.1	-0.3	ND	ND	1.7	
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	ND	ND	0.4		3.3	2.8	1.4	-0.5	ND	1.2	0.5	-0.6	ND	ND	1.8	
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	5.4	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Alcohols (8)																		
5	<1100	Ethanol	107.1	889.9	352.2	-0.6	115	202.1	479.4	1.4	28.8	35.9	188.1	4.2	ND	ND	185.7	
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	24	8.7	-0.6	ND	20	9	-0.5	ND	3.6	5.9	0.7	ND	ND	ND	
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND		696.5	812.3	ND -1	
8	1236	3-Methyl-1-butanol	14.3	448.4	159.1	-0.6	16.7	345.9	159.5	-0.5	6.4	228	171.31	-0.2	ND	ND	ND	
9	1464	1-Octen-3-ol	4.3	6.5	ND	-1	5	7.5		-1	ND	3.7	ND	-1	ND	ND	ND	
10	1612	2,3-Butanediol	ND	0.5	ND	-1	3.2	3.9	2.7	-0.3	1.2	1.5	1.8	0.2	ND	ND	41.9	
11	1756	Methionol	ND	3.7	2.1	-0.4	ND	3	1.5	-0.5	ND	3	2.1	-0.3	ND	ND	ND	
12	1991	2-Phenylethanol	1.2	82.8	32.6	-0.6	1.8	45.2	24.6	-0.5	0.6	16.7	20.7	0.2	ND	ND	6	
Aldehydes (2)																		
13	1562	Benzaldehyde	1.9	3	2.1	-0.3	0.7	0.7	ND	-1	ND	0.6	ND	-1	1.7	7.7	ND -1	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	ND	ND		ND	ND	ND		1.6	ND	ND		ND	ND	ND	
Esters (5)																		
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	ND		ND	6.5	ND	-1	ND	ND	ND		ND	ND	ND	
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
17	1691	Ethyl benzoate	ND	0.7	0.8	0.3	ND	2.8	1.6	-0.4	ND	ND	0.5		ND	ND	ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	0.4		-1	ND	1.5	ND	-1	ND	ND	ND		ND	ND	ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	2	0.4	-0.8	ND	0.8	0.3	-0.6	ND	ND	1.2		ND	ND	ND	
Phenols (3)																		
20	1887	2-Methoxy-phenol	ND	ND	ND		1.4	2.4	1.8	-0.3	ND	0.6	1.1	1	ND	ND	ND	
21	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	4.6	90	18.4	1	5.1	34.1	5.7	ND	3.9	94.8	23.5	ND	ND	ND	
22	2201	4-Ethyl-phenol	ND	1.5	10.1	6	ND	1.4	4.1	2	ND	1.4	9.2	5.6	ND	ND	ND	
Furanones (2)																		
23	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND		ND	ND	ND	
24	2115	HEMF	ND	2,144.6	ND	-1	ND	3,064.3	ND	-1	ND	ND	ND		ND	ND	ND	
Ketone (1)																		
25	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	5,871.4	4,255.1	-0.3	ND	4,635.4	3,978.8	-0.1	2,172.6	3,334.3	2,986.6	-0.1	ND	ND	ND	
Pyrone (1)																		
26	1993	Maltol	2,782.6	2,128.5	2,047.1	0	5,296.6	691	3,304.5	3.8	1,228.5	1,148.7	1,317.6	0.1	ND	ND	ND	

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation;

Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected

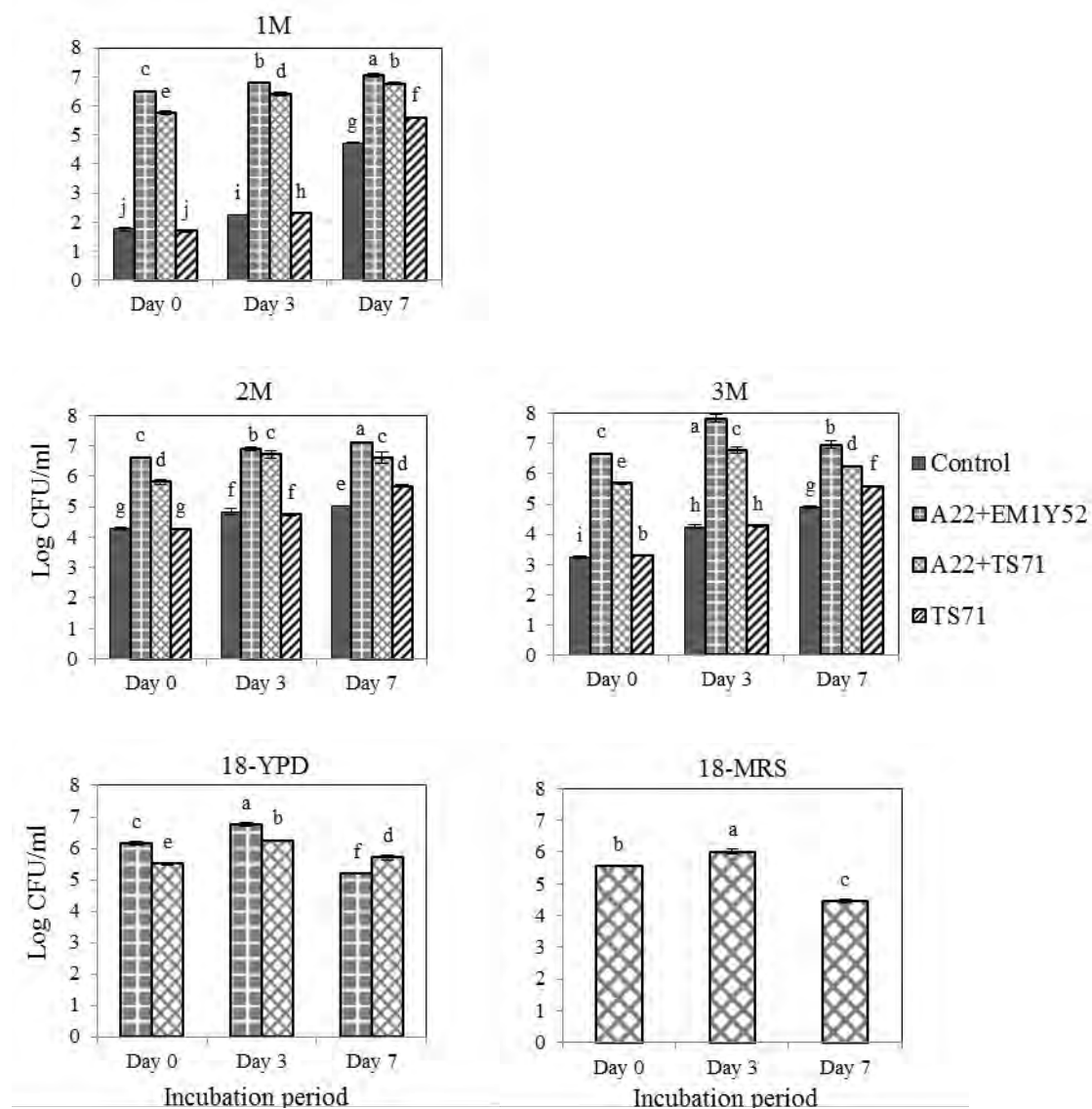


Figure 20 The number of yeast cells on 10-YPD agar from A22+EM1Y52 co-cultures, A22+TS71 co-cultures, TS71 cultures, and uninoculated cultures in moromi 1M, 2M, 3M, 18-YPD and 18-MRS media

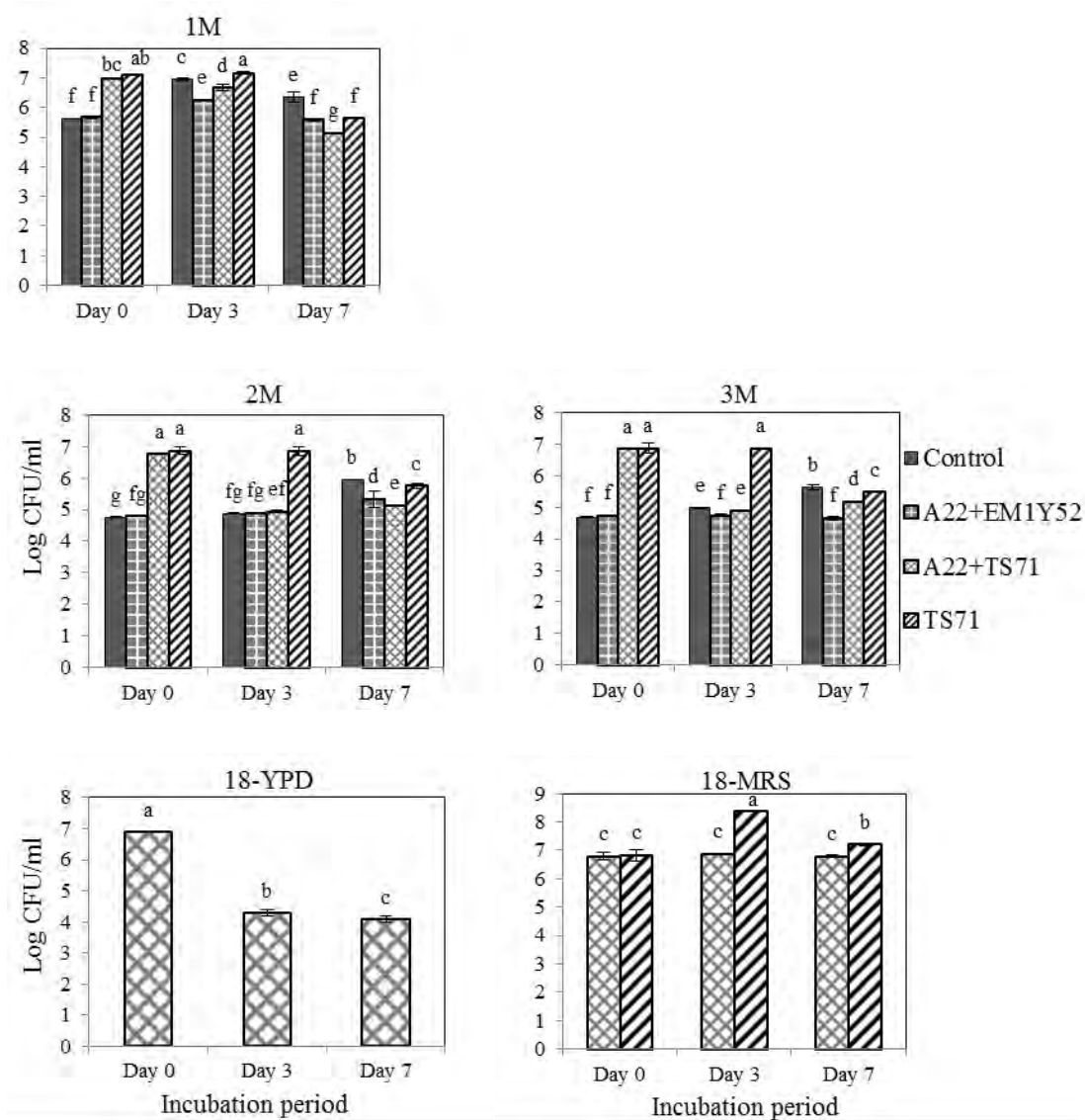


Figure 21 The number of aerobic LAB from A22+EM1Y52 co-cultures, A22+TS71 co-cultures, TS71 cultures, and uninoculated cultures in moromi 0M, 1M, 2M, 3M, 18-YPD and 18-MRS media

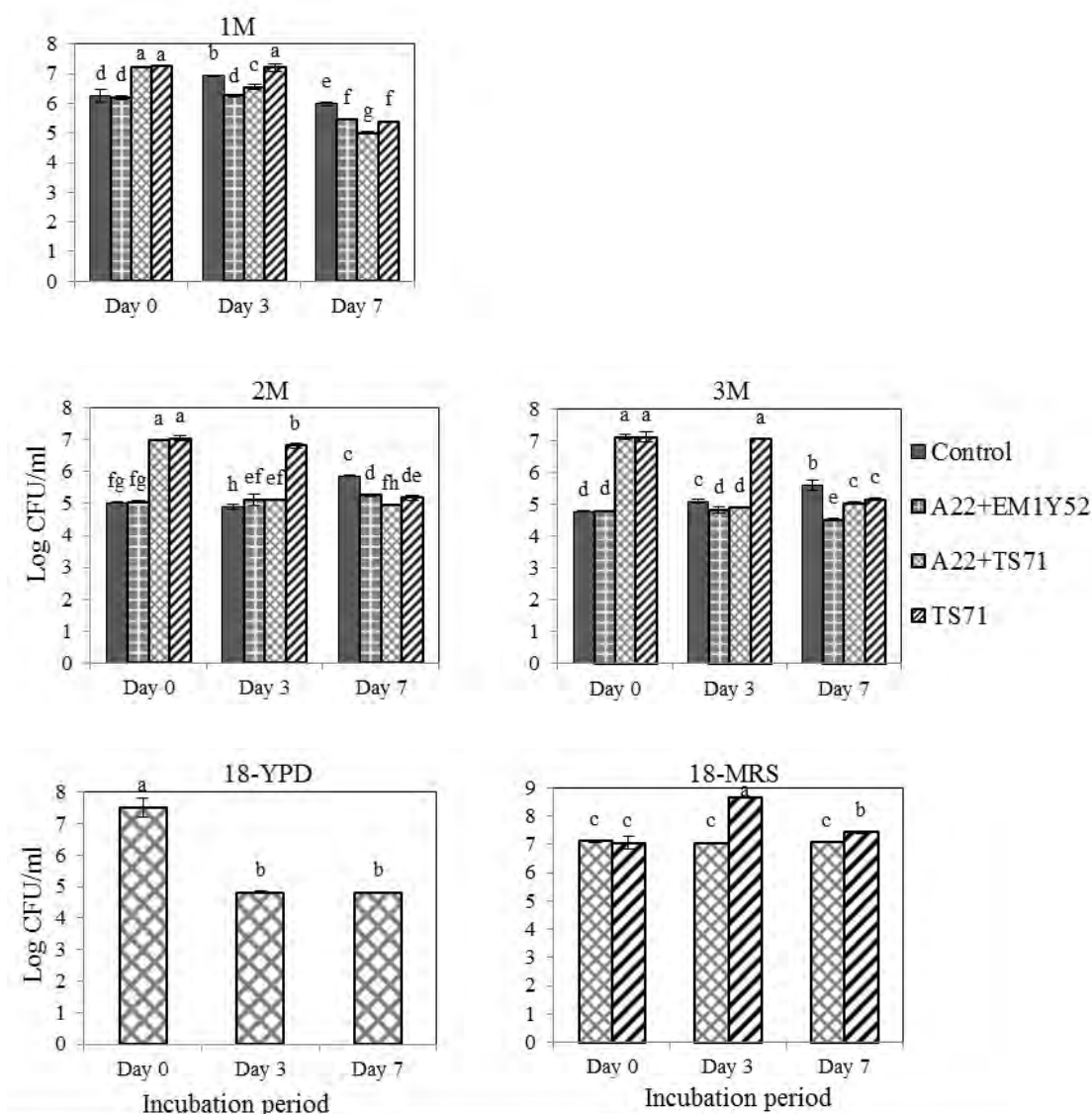


Figure 22 The number of anaerobic LAB from A22+EM1Y52 co-cultures, A22+TS71 co-cultures, TS71 cultures, and uninoculated cultures in moromi 0M, 1M, 2M, 3M, 18-YPD and 18-MRS media

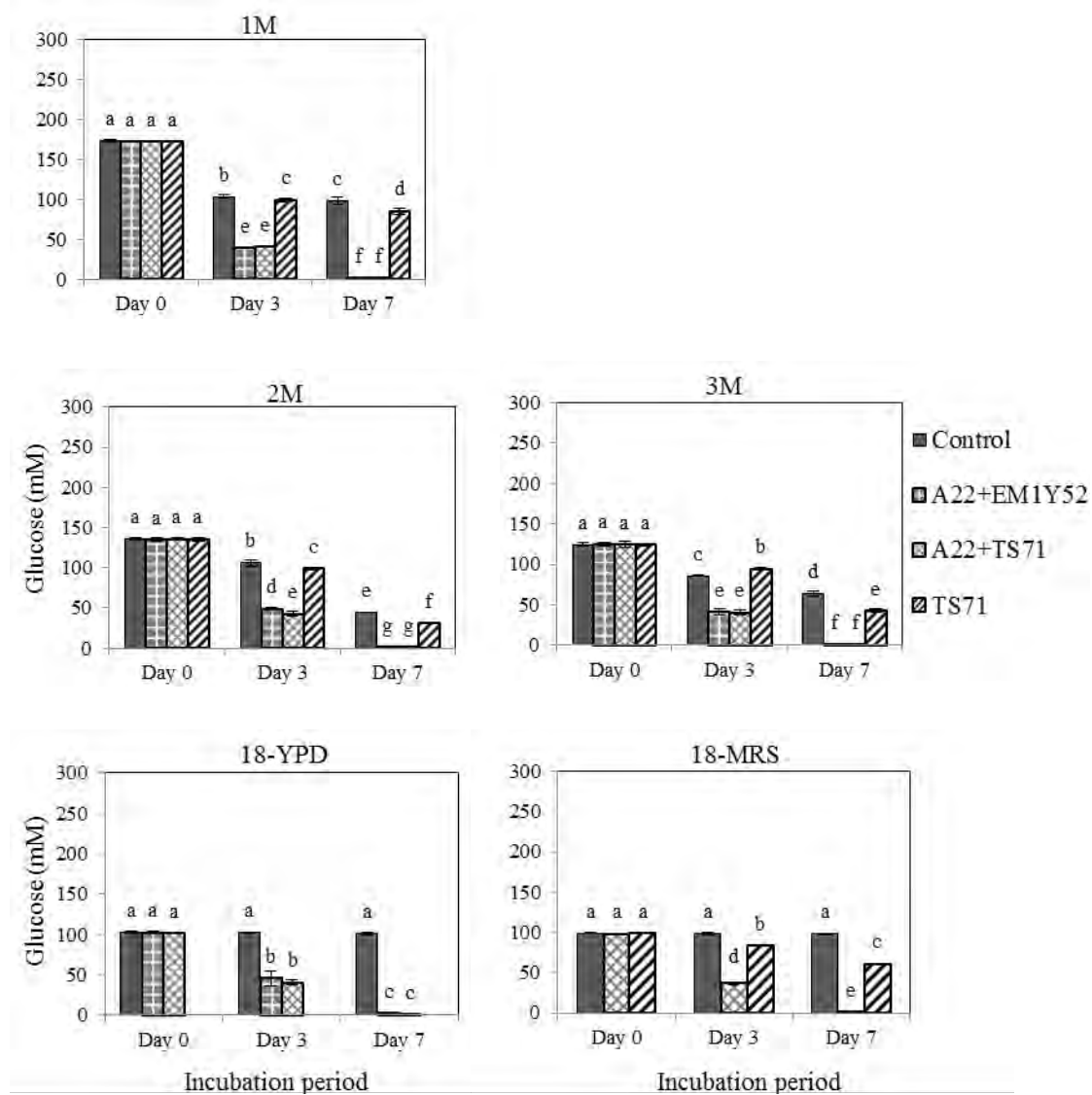


Figure 23 Amount of glucose in A22+EM1Y52 co-cultures, A22+TS71 co-cultures, TS71 cultures, and uninoculated cultures in moromi 0M, 1M, 2M, 3M, 18-YPD and 18-MRS media

จากผลการวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นพบว่า *P. guilliermondii* ช่วยเสริมให้ *Z. rouxii* นั้นผลิตสารกลุ่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ เอทานอล, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, methionol และ 2-phenylethanol มากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของ culture ใน 18-YPD medium โดยเปรียบเทียบผลจาก Table 12, 13 และ 14 นอกจากนี้ co-culture ของ *Z. rouxii* และ *T. halophilus* จะผลิตกรด ได้แก่ acetic acid และ 2-methylpropanoic acid มากขึ้น โดยแนวโน้มเช่นนี้จะสังเกตได้ใน moromi media เช่นกัน (Table 15, 16, 17) นอกจากนี้ใน co-culture ของ *Z. rouxii* และ *P. guilliermondii* นั้น การผลิต HEMF แอลกอฮอล์ และ สารประกอบฟีนอลที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นสารสำคัญก็เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

และจากการวิเคราะห์ปริมาณของ biogenic amine ในชุดการทดลอง single culture ของ A22, A34, และ A35 ใน 1M moromi medium และ 3M moromi medium พบว่า ปริมาณรวมของ biogenic amine ที่วัดได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadavarine, histamine, tyramine, spermidine และ spermine นั้นไม่แตกต่างกันระหว่างการทดลองชุดควบคุม โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 9.61- 18.26 ppm ดังนั้นในแง่ของความปลอดภัยจากสาร biogenic amine นั้น ยีสต์ทั้งสามจึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นต้นเชื้อต่อไป

Table 14 Concentration (µg/L) of volatile flavor compounds produced by multi-culture of *Z. rouxii* A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 or *T. halophilus* T71 in 18-YPD or 18-MRS media

No.	RI ^a	Compounds	18-YPD medium						18-MRS medium					
			Before	After incubation					Before	After incubation				
			Incub.	Cont.	Z+P	Incr.	Z+T	Incr.	Incub.	Cont.	Z+P	Incr.	Z+T	Incr.
Acids (4)														
1	1476	Acetic acid	ND	ND	46.7		39.6		ND	ND	170.6		234.6	
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	ND	ND	27.6		16.8		ND	ND	ND		1.9	
3	1645	Butanoic acid	ND	1	98.1	100.6	42.6	43.2	ND	ND	4.6		8.2	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
Alcohols (8)														
5	<1100	Ethanol	ND	ND	2,860.20		1,823.8		ND	ND	2,491.5		ND	
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	145.8		45.6		ND	ND	ND		ND	
7	1180	1-Butanol	721.3	873.4	2,106.2	1.4	1,173.0	0.3	321.9	983	1,014.6	0	439.1	-0.6
8	1236	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	2,784.9		1,473.9		ND	ND	1,406.9		17.4	
9	1464	1-Octen-3-ol	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
10	1612	2,3-Butanediol	ND	ND	8.7		1		ND	ND	ND		ND	
11	1756	Methionol	ND	ND	32.6		11.8		ND	ND	7.4		ND	
12	1991	2-Phenylethanol	ND	ND	870.7		573.6		ND	ND	403.3		4.5	
Aldehydes (2)														
13	1562	Benzaldehyde	1.6	13.6	67	3.9	130.2	8.5	1.9	14.5	8.1	-0.4	3.3	-0.8
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
Esters (5)														
15	<1100	Ethyl acetate	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
16	1365	Ethyl lactate	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	79.7		45.6		ND	ND	164.7		ND	
Phenols (3)														
22	1887	2-Methoxy-phenol	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
23	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
24	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
Furanones (2)														
13	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
14	2115	HEMF	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	
Ketone (1)														
15	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	ND	9,082.1		6,548.9		ND	ND	8,796.9		ND	
Pyrone (1)														
17	1993	Maltol	ND	ND	ND		ND		ND	ND	ND		ND	

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;
Incu, Incubation; Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount
relative to control; ND, not detected; Z, *Z. rouxii* A22; P, *P. guilliermondii* EM1Y52; T, *T. halophilus* T71

Table 15 Concentration (µg/L) of volatile flavor compounds produced by multi-culture of *Z. rouxii* A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 or *T. halophilus* T71 in 1-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	1M moromi							
			Before	After incubation						
			Incu.	Cont.	Z+P	Incr.	Z+T	Incr.	T	Incr.
Acids (4)										
1	1476	Acetic acid	118.6	57.8	35.5	-0.4	54.4	-0.1	87.1	0.5
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	8.3	5.2	3.8	-0.3	4.5	-0.1	6.4	0.2
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND		ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid		ND	36.4		36.3		ND	
Alcohols (8)										
5	<1100	Ethanol	195.2	142.6	798.5	4.6	785.8	4.5	129.2	-0.1
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	47.4		41.9		ND	
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND		ND			
8	1236	3-Methyl-1-butanol	23.9	44.6	711.4	14.9	690.5	14.5	47.9	0.1
9	1464	1-Octen-3-ol	5.4	4.7	6.4	0.4	2.1	-0.5	9.8	1.1
10	1612	2,3-Butanediol	2.9	1.4	12.2	7.7	8.8	5.3	1.7	0.2
11	1756	Methionol	ND	ND	5		4.9		1	
12	1991	2-Phenylethanol	2.5	4.2	187.6	44.1	148.6	34.7	7.2	0.7
Aldehydes (2)										
13	1562	Benzaldehyde	ND	ND	ND		ND		ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	ND	2.5		4.4		ND	
Esters (5)										
15	<1100	Ethyl acetate	68.2	ND	39.7		35		14.3	
16	1365	Ethyl lactate	2.2	1.1	2.2	0.9	1.6	0.4	1.6	0.4
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	2.8		1.6		ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	ND		ND		ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	ND	2.3		ND		ND	
Phenols (3)										
22	1887	2-Methoxy-phenol	2.1	1.1	2.2	1	1	-0.1	1.2	0.1
23	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	5.3		ND		ND	
24	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND		ND	
Furanones (2)										
13	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND		ND	
14	2115	HEMF	ND	ND	3,289.2		3,788.0		ND	

<i>Ketone (1)</i>										
15	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	ND	7107.8		5896.9		ND	
<i>Pyrone (1)</i>										
17	1993	Maltol	2,380.3	1,781.0	4,071.6	1.3	2,377.3	0.3	1,525.9	-0.1

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column; Incu, Incubation; Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected; Z, *Z. rouxii* A22; P, *P. guilliermondii* EM1Y52; T, *T. halophilus* T71

Table 16 Concentration (µg/L) of volatile flavor compounds produced by multi-culture of *Z. rouxii* A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 or *T. halophilus* T71 in 2-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	2M moromi							
			Before	After incubation						
				Incu.	Cont.	Z+P	Incr.	Z+T	Incr.	T
Acids (4)										
1	1476	Acetic acid	174.1	42.6	103	1.4	83.9	1	52.8	0.2
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	11.4	3.5	6.1	0.7	5.5	0.5	3.8	0.1
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND		ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	52.1		39.6		ND	
Alcohols (8)										
5	<1100	Ethanol	228.3	613.4	1821.8	2	1155.8	0.9	582.4	-0.1
6	1137	2-Methyl-1-propanol	2	35.1	77.8	1.2	55	0.6	36.8	0
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND		ND		ND	
8	1236	3-Methyl-1-butanol	53.2	545.1	1046.9	0.9	797.2	0.5	540.4	0
9	1464	1-Octen-3-ol	4	2.9	6	1.1	1.9	-0.4	3.8	0.3
10	1612	2,3-Butanediol	2.1	1.3	20.7	15.5	20.7	15.4	1.5	0.2
11	1756	Methionol	ND	5.3	8.7	0.7	6.4	0.2	5.4	0
12	1991	2-Phenylethanol	3.6	57.2	257	3.5	190.7	2.3	73.7	0.3
Aldehydes (2)										
13	1562	Benzaldehyde	ND	ND	ND		ND		ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	ND	ND	1.9		3.4		ND	
Esters (5)										
15	<1100	Ethyl acetate	59.9	10.9	24.3	1.2	15.8	0.5	13.7	0.3
16	1365	Ethyl lactate	3	ND	3.3		5.9		1	
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	4.9		4.2		ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	ND		ND		ND	
19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	13.5	37.2	1.8	13.6	0	11.7	-0.1
Phenols (3)										
22	1887	2-Methoxy-phenol	4.6	1.9	5.1	1.6	3.7	0.9	2.6	0.3
23	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	3.5		ND		ND	

24	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
<i>Furanones (2)</i>										
13	2051	HDMF	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
14	2115	HEMF	ND	ND	10,617.4		11,383.0	ND		
<i>Ketone (1)</i>										
15	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	8197.4	9792.1	0.2	8504.6	0	8093.6	0
<i>Pyrone (1)</i>										
17	1993	Maltol	6,545.50	1,318.7	16,005.7	11.1	6,343.6	3.8	1,902.3	0.4

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

Incu, Incubation; Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount relative to control; ND, not detected; Z, *Z. rouxii* A22; P, *P. guilliermondii* EM1Y52; T, *T. halophilus* T71

Table 17 Concentration (µg/L) of volatile flavor compounds produced by multi-culture of *Z. rouxii* A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 or *T. halophilus* T71 in 3-month moromi medium

No.	RI ^a	Compounds	3M moromi							
			Before	After incubation						
			Incu.	Cont.	Z+P	Incr.	Z+T	Incr.	T	Incr.
Acids (4)										
1	1476	Acetic acid	169	53.7	84.7	0.6	90.4	0.7	73.8	0.4
2	1585	2-Methyl-propanoic acid	8.9	3.7	5.1	0.4	4.4	0.2	4.1	0.1
3	1645	Butanoic acid	ND	ND	ND		ND		ND	
4	1661	3-Methyl-butanoic acid	ND	ND	47		42.2		ND	
Alcohols (8)										
5	<1100	Ethanol	241	309.2	917	2	675.9	1.2	386.4	0.2
6	1137	2-Methyl-1-propanol	ND	18.3	47.8	1.6	36.4	1	19.9	0.1
7	1180	1-Butanol	ND	ND	ND		ND		ND	
8	1236	3-Methyl-1-butanol	32.4	297.2	781.9	1.6	588.4	1	347.9	0.2
9	1464	1-Octen-3-ol	4.2	4.3	5.7	0.3	3.7	-0.1	6.5	0.5
10	1612	2,3-Butanediol	2.2	0.8	13.6	16	13.3	15.6	1	0.3
11	1756	Methionol	ND	4.3	6.1	0.4	6	0.4	5.2	0.2
12	1991	2-Phenylethanol	3.1	35.1	147.9	3.2	137.9	2.9	44.4	0.3
Aldehydes (2)										
13	1562	Benzaldehyde	ND	ND	ND		ND		ND	
14	1670	Phenylacetaldehyde	2.2	ND	3		3.1		ND	
Esters (5)										
15	<1100	Ethyl acetate	54.7	ND	23.9		22.7		13.2	
16	1365	Ethyl lactate	4.2	1.2	3.3	1.7	2.9	1.4	1.3	0
17	1691	Ethyl benzoate	ND	ND	4.8		2.4		ND	
18	1805	Ethylphenyl acetate	ND	ND	ND		ND		ND	

19	1857	2-Phenylethyl acetate	ND	1.6	6.6	3.2	4.5	1.9	4.6	1.9
<i>Phenols (3)</i>										
22	1887	2-Methoxy-phenol	5.7	3.3	5.8	0.8	4.8	0.5	3.5	0.1
23	2055	4-Ethyl-2-methoxy-phenol	ND	ND	2.1		ND		ND	
24	2201	4-Ethyl-phenol	ND	ND	ND		ND		ND	
<i>Furanones (2)</i>										
13	2051	HDMF	ND	ND	ND		ND		ND	
14	2115	HEMF	ND	ND	6,611.30		6,658.60		ND	
<i>Ketone (1)</i>										
15	1251	3-Hydroxy-2-butanone	ND	ND	ND		ND		ND	
<i>Pyrone (1)</i>										
17	1993	Maltol	2,956.30	10,473.8	11,668.5	0.1	2,489.3	-0.8	6,989.2	-0.3

^aRI: Retention index, calculated according to the retention time of n-alkane standards on HP-FFAP column;

Incu, Incubation; Cont., Control; Incr., Increment; (-) sign in every increment column, Decrease in amount

relative to control; ND, not detected; Z, *Z. rouxii* A22; P, *P. guilliermondii* EM1Y52; T, *T. halophilus* T71

จากการศึกษาการผลิตสารให้กลิ่นของเชื้อที่สนใจในระบบจำลองการหมักโมโรมิ พบว่า เชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการนำมาพัฒนาเป็นต้นเชื้อ ได้แก่ *Z. rouxii* A22 โดยเหตุผลหลักคือความสามารถในการผลิต ethanol, higher alcohol และ สารที่ให้กลิ่นที่ลักษณะสำคัญของซีอิ๊ว ได้แก่กลุ่ม furanone และ pyranone ได้ในปริมาณสูง นอกจากนั้นยังพบอีกว่า เชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* EM1Y52 ยังมีบทบาทในการผลิตสารประกอบฟีนอลิกระเหยได้ที่ให้กลิ่นที่เป็นลักษณะของซีอิ๊ว และที่สำคัญคือ สามารถส่งเสริมการผลิต higher alcohol และ สารกลุ่ม furanone ในเชื้อ *Z. rouxii* A22 ซึ่งคาดว่าจะน่าจะมาจาก *P. guilliermondii* EM1Y52 สามารถผลิต alpha-ketoglutaric acid จาก Krebs' cycle ที่ไม่สมบูรณ์ในปริมาณสูง ทำให้ *Z. rouxii* นำไปใช้ต่อไป (ดูภาคผนวก บทความ Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation โดย Wah et al., 2013) จึงได้วางแผนการทดลองตาม Table i เพื่อทดลองผลิตซีอิ๊ว โดยใช้เชื้อ *T. halophilus* TS71 เป็นต้นเชื้อ LAB ใช้เชื้อ *Z. rouxii* A22 และ *P. guilliermondii* EM1Y52 เป็นต้นเชื้อ ยีสต์ single culture และ co-culture ต่อไป

การทดลองนำหัวเชื้อต้นแบบไปใช้หมักซีอิ๊วจริงในระดับกึ่งอุตสาหกรรม

จากผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ และ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ พบว่าในชุดควบคุม (Control) และ ชุดทดลอง (Treatment) ทั้ง 4 ชุด เกิดการหมักขึ้น มีการสะสมของกรดที่ไทเทรตได้ (Figure 24) ค่าวิเคราะห์แสดงผลในรูป ปริมาณกรดแลคติก) มีปริมาณมากขึ้น และค่า pH ลดลงตามระยะเวลาในการหมัก (Figure 25) และเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ Total bacterial count ไม่พบความผิดปกติ ค่าอยู่ระหว่าง $10^5 - 10^7$ CFU และสอดคล้องกับปริมาณของเชื้อ LAB ในระหว่างกระบวนการหมัก

ในชุดทดลองที่ 1 เมื่อทำการเติมต้นเชื้อ *T. halophilus* TS71 ลงไปในถังหมักในวันที่ 21 ของการหมักนั้น เมื่อวิเคราะห์ในสัปดาห์ต่อมา พบว่าเชื้อ LAB (ที่ตรวจนับในสภาวะ Anaerobic บน MRS agar 10% NaCl) มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณ CFU สูงกว่าการทดลองชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆ ประมาณ 1 log CFU อย่างไรก็ตาม ในช่วงต่อๆ มาปริมาณเชื้อ LAB ในชุดควบคุมและชุดทดลองจะมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อได้ลองเติมต้นเชื้อลงไป อีกในวันที่ 56 อีกครั้งหนึ่ง ก็ไม่ทำให้ปริมาณของเชื้อ LAB เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด และปริมาณของ LAB ลดลงในการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายเมื่อวันที่ 84 (Figure 26)

นอกจากนั้น ในชุดทดลองที่ 1 นี้ เมื่อทำการเติมต้นเชื้อ *T. halophilus* TS71 ลงไป ก็ส่งผลให้ปริมาณของเชื้อ ยีสต์ในกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น ดังที่เห็นได้ชัดว่า ในวันที่ 42 ชุดทดลองที่ 1 มีปริมาณยีสต์มากกว่าชุดควบคุมถึง 3 log CFU ซึ่งใกล้เคียง หรือ สูงกว่า ชุดทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไป (Figure 27) และคาดว่าเชื้อยีสต์และ LAB ในระบบน่าจะมิกิจกรรมที่สูง ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในชุดทดลองที่ 1 นั้นเหลือน้อยที่สุด (Figure 28) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่สะสมในกระบวนการหมักมากที่สุด (Figure 29)

ในชุดทดลองที่ 2, 3 และ 4 เมื่อทำการเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไปในการหมักในวันที่ 21 จะทำให้ปริมาณของยีสต์เพิ่มขึ้นมา 4 log CFU ในวันที่ 28 และในชุดการทดลองที่ 4 ที่เติมต้นเชื้อยีสต์สองชนิด จะมีปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นถึง 5 log CFU ซึ่งในชุดควบคุมจะไม่สังเกตเห็นการเพิ่มปริมาณ CFU ของยีสต์ จนกระทั่งวันที่ 42 และมีปริมาณเพียง 2 log CFU (Figure 27) และเมื่อพิจารณาปริมาณของน้ำตาลกลูโคส (Figure 28) พบว่า ในชุดการทดลองที่ 4 นั้นจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยเมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ 2, 3 และ 4 และสอดคล้องกับปริมาณของเอทานอลที่สะสมในกระบวนการหมักมากที่สุด (Figure 29)

ผลการทดลองนี้สนับสนุนแนวความคิดที่ว่า เชื้อ LAB นั้นส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ซึ่งเห็นได้ชัดในชุดทดลองที่ 1 ที่มีปริมาณเชื้อยีสต์สูง ซึ่งหากต้องการทดลองครั้งต่อไป ก็อาจเติมต้นเชื้อ LAB ลงไปก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไป เพื่อให้ยีสต์เจริญได้ดีและสามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นรสได้ตามต้องการ

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นรสของ ชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1, 2 และ 4 พบว่า ยีสต์ที่เจริญได้ดีในชุดทดลองที่ 1 ซึ่งเป็น microflora และชุดทดลองที่ 2 ที่มีการเติมต้นเชื้อ *Z. rouxii* A22 ซึ่งน่าจะผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญได้ดี โดยอาศัย metabolite ที่มาจาก LAB ที่เป็น microflora ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดทดลองอื่นๆ ไม่สามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญได้ดีเท่ากับชุดทดลองที่ 4 ที่เป็น co-culture ของต้นเชื้อทั้ง ยีสต์ และ LAB ที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์แล้ว (Figure 29, 30) อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *P. guilliermondii* EM1Y52 นั้นส่งเสริมการสร้างสารระเหยให้กลิ่นรสใน *Z. rouxii* A22 ตามที่เห็นการทดลองก่อนหน้านี้ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงเคมีกายภาพ รวมทั้ง กรดกลูตามิกที่เกี่ยวข้องกับรสอูมามิ และ total biogenic amines ที่เกี่ยวกับความปลอดภัยของต้นเชื้อในการใช้งาน โดยเชื้ออิวหมักที่ผลิตได้จากการทดลองชุดทดลองต่างๆ ก็ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ยกเว้นในชุดทดลองที่ 4 จะมี browning น้อยกว่า (Table 18)

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากการทดสอบดมกลิ่นของเชื้ออิวหมักที่ได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองทดลองต่างๆ พบว่ามีกลิ่นต่างๆ ที่กล่าวถึง ได้แก่ กลิ่นเค็ม กลิ่นหอมหวาน กลิ่นแอลกอฮอล์ และกลิ่นเปรี้ยว โดยเชื้ออิวหมักแต่ละตัวอย่างมีลักษณะเด่นดังนี้

ชุดควบคุม	มีกลิ่นเค็มนำ ตามด้วยกลิ่นแอลกอฮอล์ และมีกลิ่นเปรี้ยว ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (Figure 31)
ชุดทดลองที่ 1	มีกลิ่นเปรี้ยวนำ ตามด้วยกลิ่นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (Figure 31) และ เอทานอล (Figure 29a) และมีกลิ่นหอมหวาน
ชุดทดลองที่ 2	มีกลิ่นหอมหวาน และ กลิ่นเค็ม
ชุดทดลองที่ 3	มีกลิ่นหอมหวาน และ กลิ่นเค็ม
ชุดทดลองที่ 4	มีกลิ่นหอมหวาน และ กลิ่นเค็ม ตามด้วยกลิ่นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เอทานอล (Figure 29a)

จากภาพรวมของความเห็นของผู้ทดสอบสรุปได้ว่า เชื้ออิวหมักที่ได้จากการหมักที่มีการเติมต้นเชื้อต่างๆ ลงไปนั้น ไม่มีกลิ่นรสผิดปกติ และสามารถนำไปผ่านกระบวนการปรุงแต่ง ให้ความร้อนเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายต่อไป

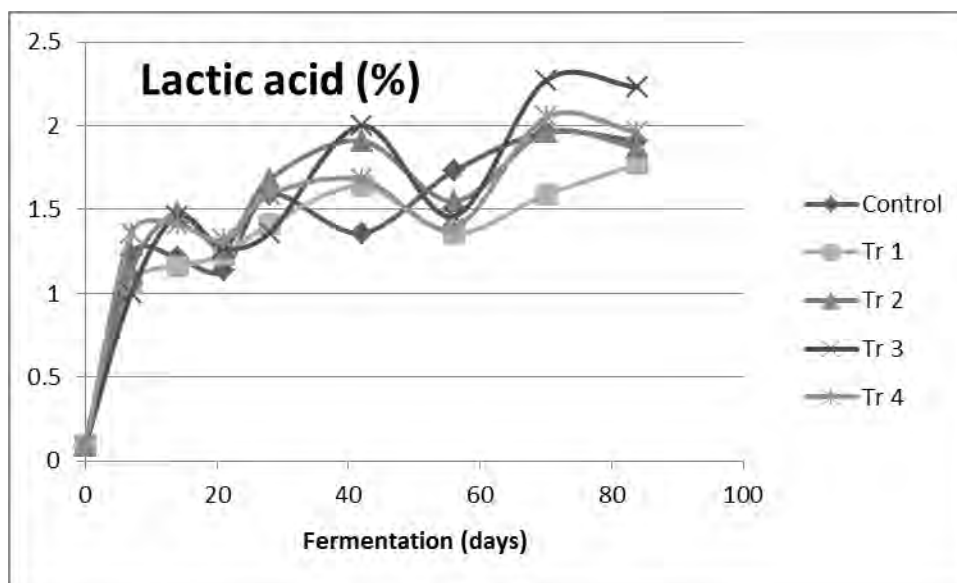


Figure 24 Titratable acids as percents of lactic acid accumulated in soy sauce fermentation; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

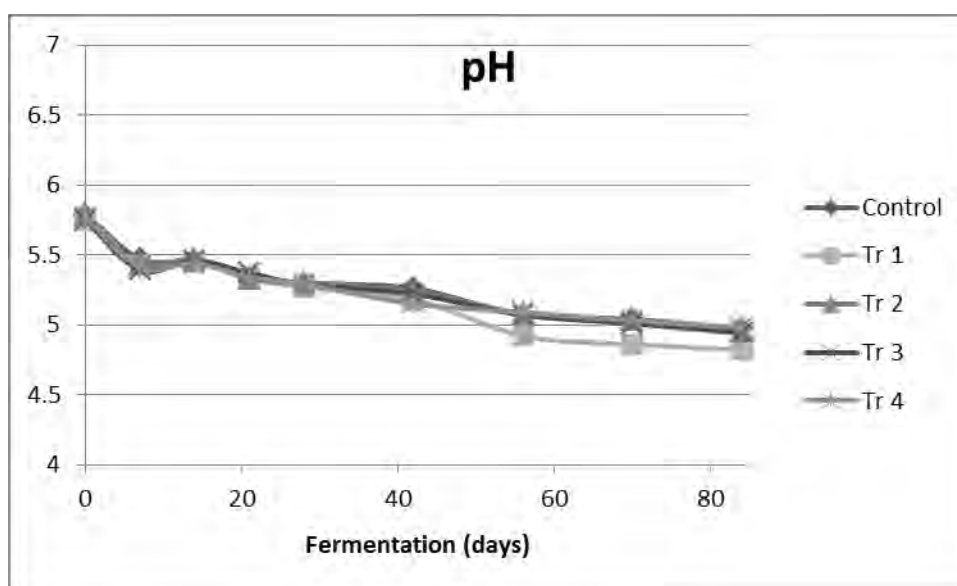


Figure 25 PH changes during soy sauce fermentation; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

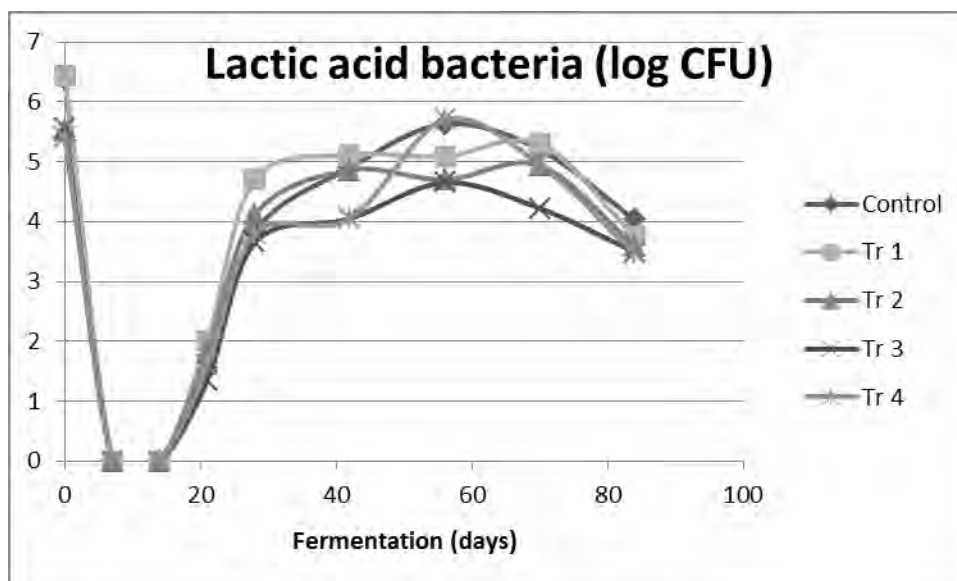


Figure 26 Number of lactic acid bacteria (log CFU) found at each time interval during soy sauce fermentation; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

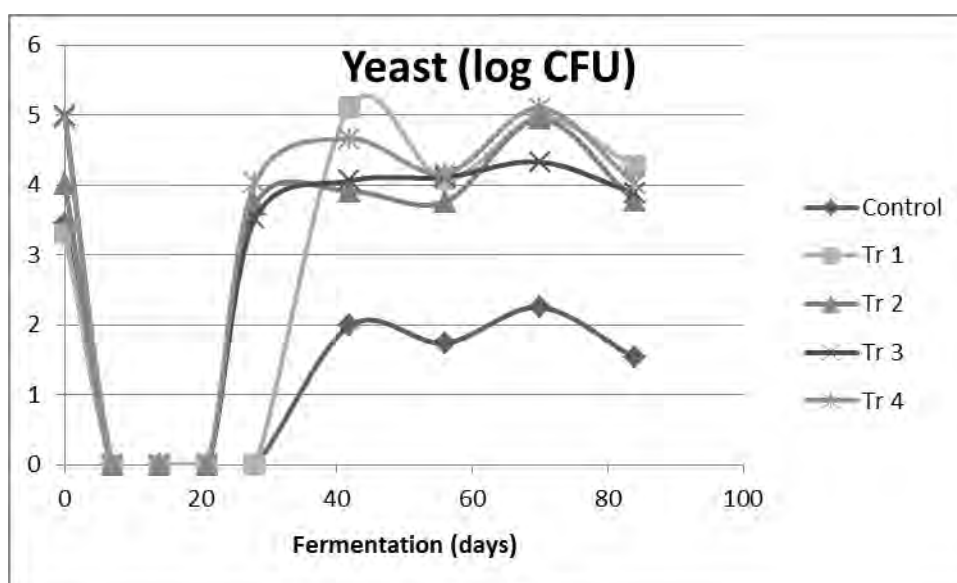


Figure 27 Number of yeasts (log CFU) found at each time interval during soy sauce fermentation; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

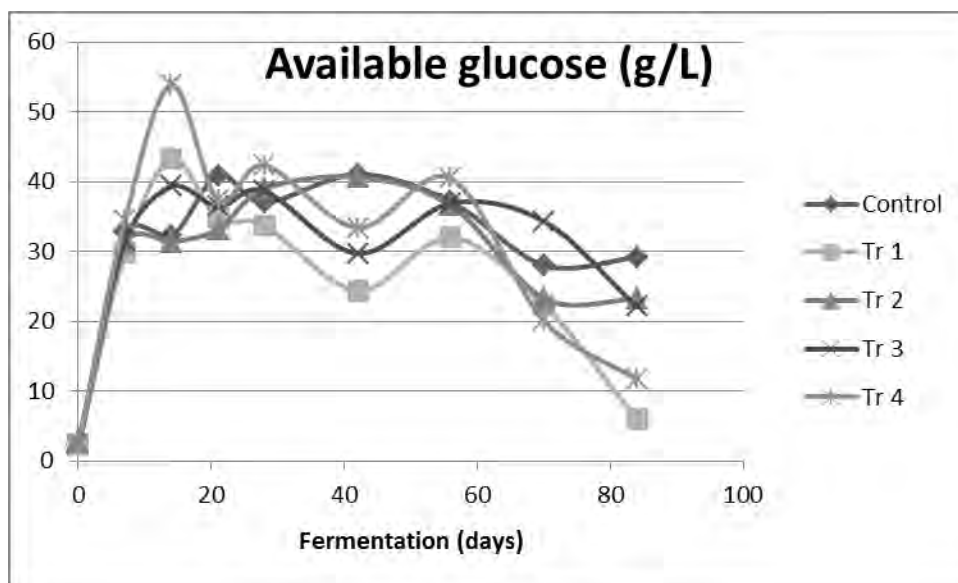


Figure 28 Amount of available glucose (g/L) found during soy sauce fermentation; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

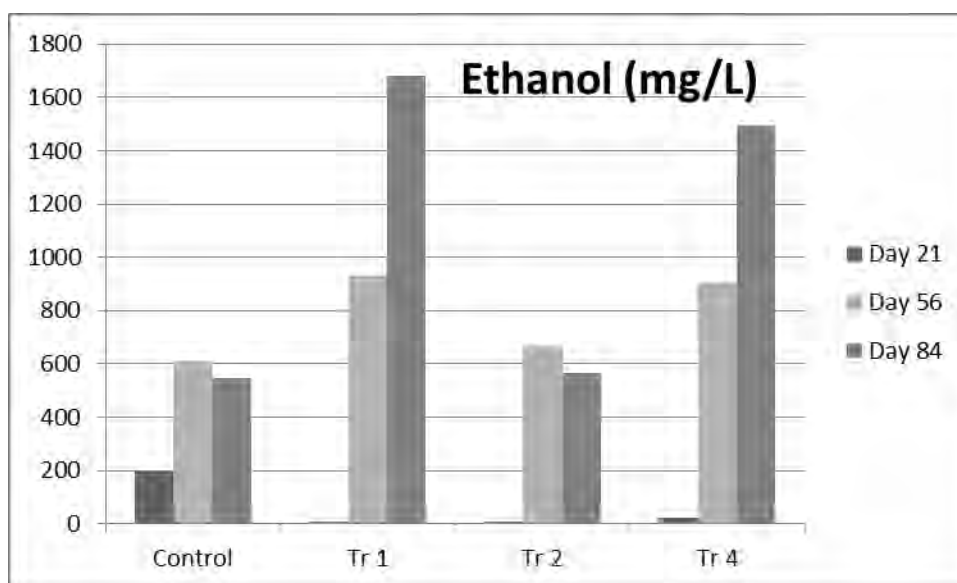


Figure 29a Amount of ethanol (mg/L) in soy sauce fermentation monitored on day 21, day 56, and day 84; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

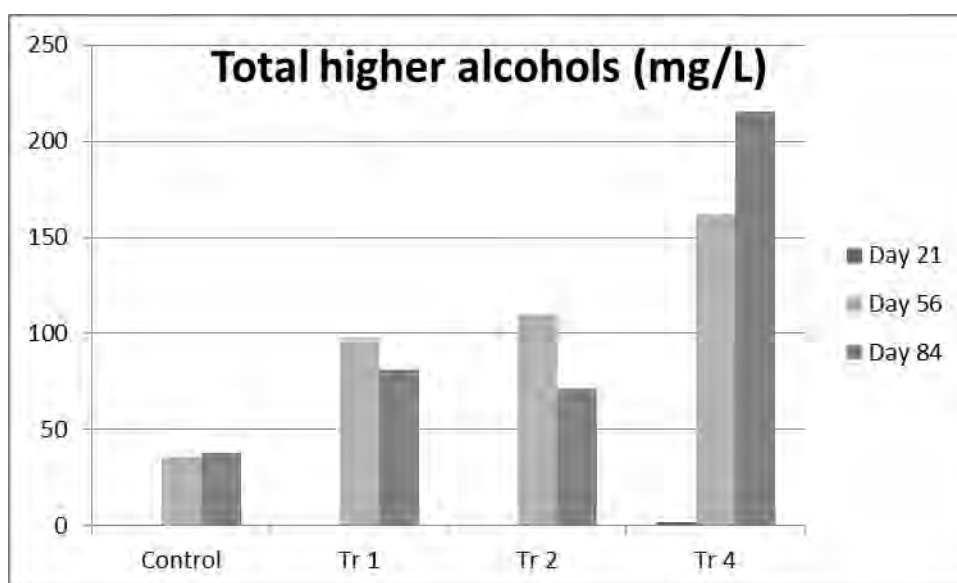


Figure 29b Amount of total higher alcohols (mg/L) in soy sauce fermentation monitored on day 21, day 56, and day 84; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

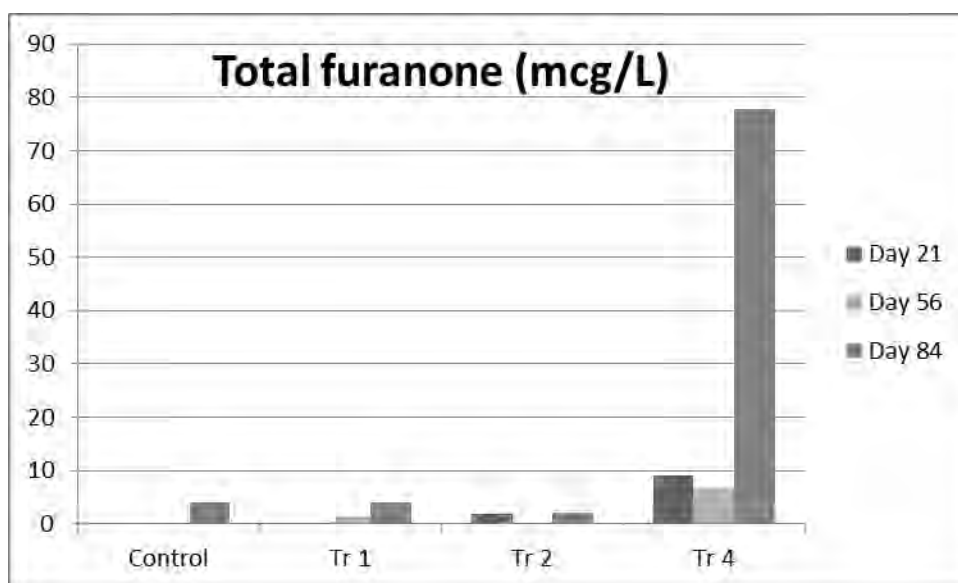


Figure 30a Amount of furanones ($\mu\text{g/L}$) in soy sauce fermentation monitored on day 21, day 56, and day 84; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

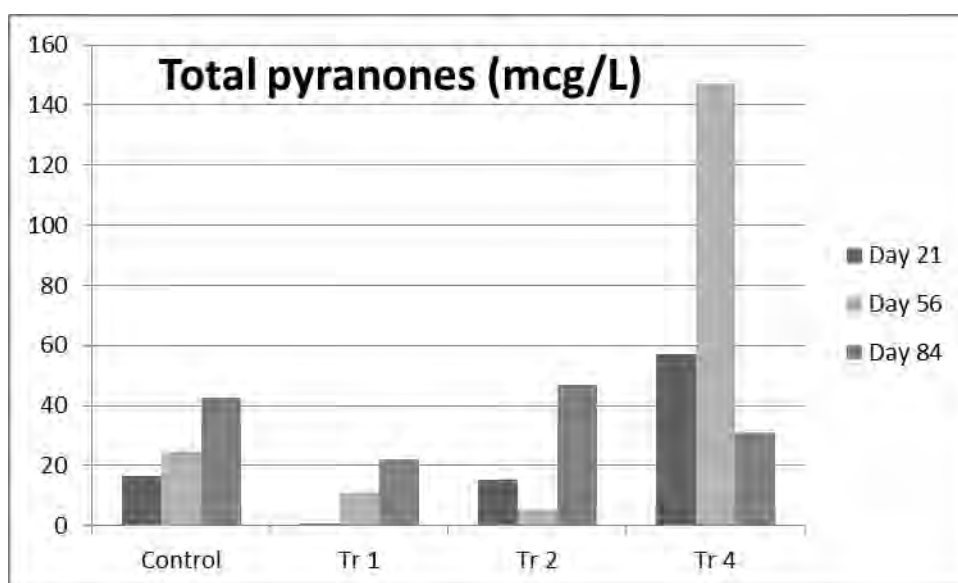


Figure 30b Amount of pyranones ($\mu\text{g/L}$) in soy sauce fermentation monitored on day 21, day 56, and day 84; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

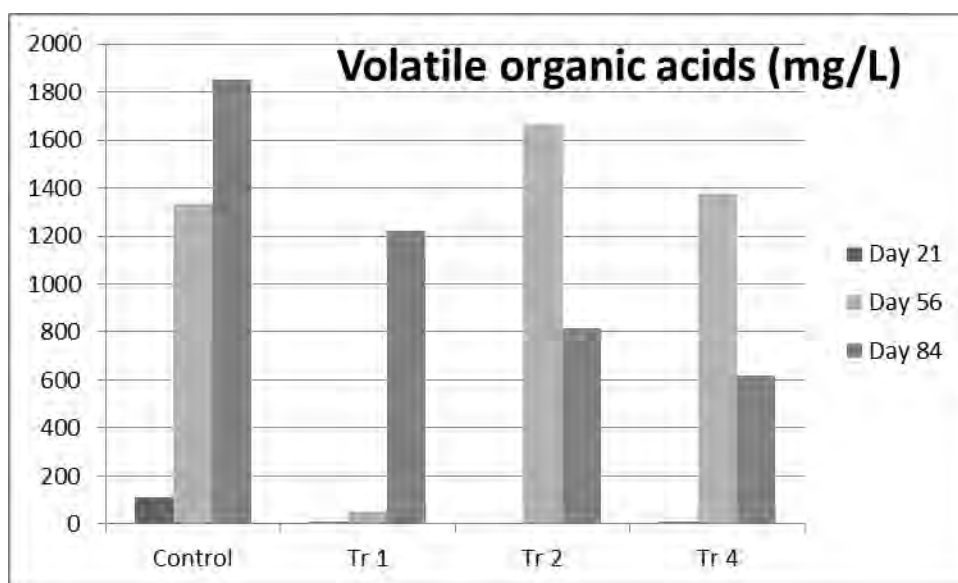


Figure 31 Amount of volatile organic acids (mg/L) in soy sauce fermentation monitored on day 21, day 56, and day 84; Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

Table 18 Some physicochemical properties of raw soy sauce samples from each treatment obtained on day 84 of the fermentation

Experimental	NaCl (%)	Glutamic acid (g/L)	Total biogenic amine (mg/L)	Color		
				L*	a*	b*
Control	17.8	7.25	35.5	27.4	-0.5	0.54
Treatment 1	17.6	6.9	19.7	29.5	-0.26	0.68
Treatment 2	18.7	10.25	39.2	29.6	-0.37	0.51
Treatment 3	19.6	8.9	37.4	29.5	-0.32	0.64
Treatment 4	17.6	9.15	18.6	29.3	-0.54	0.16

Tr 1, inoculated with *T. halophilus* TS71; Tr 2, inoculated with *Z. rouxii* A22; Tr 3, inoculated with *T. halophilus* TS71 and *Z. rouxii* A22; Tr. 4, inoculated with *T. halophilus* TS71, *Z. rouxii* A22, and *P. guilliermondii* EM1Y52

สรุป

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียและยีสต์เพื่อพัฒนาต้นเชื้อบริสุทธิ์ต้นแบบสำหรับการหมักโมโรมิในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดยในต้นเชื้อประกอบด้วยเชื้อ LAB ในที่นี้คือ *T. halophilus* TS71 ซึ่งได้ทำการคัดแยกมาก่อนหน้าโครงการวิจัยนี้เนื่องจากเป็นเชื้อตัวที่สร้างกรดได้ดีที่สุดใน LAB collection ที่มีอยู่และดีกว่าตัวที่ได้ใหม่จากโครงการวิจัยนี้ ส่วนเชื้อยีสต์ที่ใช้ ได้แก่ *Z. rouxii* A22 นั้นจะใช้เพียงตัวเดียวหรือใช้ร่วมกับ *P. guilliermondii* EM1Y52 โดยคัดแยกสายพันธุ์จากตัวอย่างโมโรมิในโรงงานซีอิ๊ว และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สนใจจากความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ของซีอิ๊วไทยในระบบจำลองของการหมักโมโรมิโดยใช้โมโรมิเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกไปทดลองเป็นต้นเชื้อในหมักซีอิ๊ว พบว่าต้นเชื้อที่คัดเลือกมานั้นสามารถทำให้กลิ่นของซีอิ๊วเปลี่ยนแปลงไปในคุณลักษณะที่ดี เช่น กลิ่นหอมหวาน โดยไม่มีกลิ่นผิดปกติหรือคุณลักษณะทางเคมีกายภาพที่แตกต่างไปจากชุดควบคุม ตลอดจนปริมาณ biogenic amine ที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงถึงความปลอดภัยของการใช้ต้นเชื้อเหล่านี้ ผลการวิจัยจากโครงการวิจัยนี้สนับสนุนแนวความคิดที่ว่า เชื้อ LAB นั้นส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของเชื้อยีสต์ ซึ่งการเติมต้นเชื้อ LAB ลงไปก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงเติมต้นเชื้อยีสต์ลงไปน่าจะส่งผลให้ยีสต์เจริญและมีกิจกรรมที่ดี โครงการวิจัยนี้ยังค้นพบบทบาทของเชื้อยีสต์ *P. guilliermondii* ในการผลิตสารจำพวก volatile phenolic compounds และยังมีบทบาทในการส่งเสริมการผลิตสารระเหยให้กลิ่นโดย *Z. rouxii* ซึ่งเดิมที่ไม่มีใครให้ความสำคัญมาก่อนอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Apriyantono A, Husain H, Lie L, Jodoamidjojo M, Puspitasari-Nienaber NL. Flavor Characteristics of Indonesian Soy Sauce (*Kecap manis*). In Flavor Chemistry of Ethnic Foods, Shahidi F; Ho CT, Eds.; Plenum Press: New York, 1999. pp. 15-31.
- Beuchat, L. R. (2001). Traditional Fermented Foods. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat & T. J. Montville (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Second Edition* (pp. 701-719). Washington, DC: ASM Press.
- Collins MD, Williams AM, Wallbanks S. The Phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as Determined by 16s rRNA Sequence Analysis: Description of *Tetragenococcus* gen. nov. FEMS Microbiol. Lett. 1990;70: 255-262.
- Ferreira, N., Belloch, C., Querol, A., Manzanares, P., Vallez, S., and Santos, A. (2010). Yeast microflora isolated from Brazilian cassava root: taxonomical classification based on molecular identification. *Current Microbiology*, 60, 287-298
- Fukushima, D. (2004). Industrialization of Fermented Soy Sauce Production Centering Around Japanese Shoyu. In K. H. Steinkraus (Ed.), *Industrialization of Indigenous Fermented Foods, Revised and Expanded*. CRC Press.
- Lakshman, N., Toyokawa, T., Toyama, H., Taira, T. and Yasuda, M. (2010). Purification and characterization of two extracellular and proteases from *Monascus pilosus*. *Food Chemistry*, 121, 1216-1224
- Lee SM, Seo BC, Kim YS. Volatile Compounds in Fermented and Acid-Hydrolyzed Soy Sauces. J. of Food Sci. 2006;71: 146-156

- Lertsiri, S., Wanakachornkrai, P., Assavanig, A., Chaiseri, S., and Suwonsichon, T. (2011). Volatile Flavor Compounds and Flavor Profile of Thai soy sauce. In S. Chang and K. Cadwallader, *Chemistry, Texture, and Flavor of Soy*. ACS Symposium Series, Vol. 1059. Chapter 23, pp. 375-387. American Chemical Society.
- Mongkolwai T, Assavanig A, Amnajsongsiri C, Flegel TW, Bhumiratana A. Technology Transfer for Small and Medium Soy Sauce Fermentation Factories in Thailand: a Consortium Approach. *Food Research International*. 1997;**30**(8): 555-563
- Ohshita K, Nakajima Y, Yamakoshi J, Kataoka S, Kikuchi M, Pariza MW. Safety Evaluation of Yeast Glutaminase. *Food Chem. Toxicol*. 2000;**38**: 661-670.
- Pongtanya P, Valyasevi R, Tapingkae W, Srimarut Y, Dumnil J, Assavanig A. Development of Formulation for Dry Powder Starter Culture and its Application for Sour Soy Sauce Fermentation at the Industrial Level. 2008. Final report.
- Sugiyama S. Selection of Micro-organisms for Use in the Fermentation of Soy Sauce. *Food Microbiol*. 1984; **1**(4): 339-347
- Sukthavorn T. Role of Lactic Acid Bacteria in Soy Sauce Fermentation. M.Sc. Thesis in Biotechnology, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1996.
- Timperio, A.M., Fagioni, M., Grandinetti, F., and Zolla, L. (2007). Chemically enhanced liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of glutamic acid in the diffusion medium of retinal cells. *Biomedical Chromatography*, **21**, 1069-1076
- 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. *Trends in Food Science & Technology*, **12**(9), 322-327
- Wakayama, M., Yamagata, T., Kamemura, A., Bootim, N., Yano, S., Tachiki, T., Yoshimune, K., and Moriguchi, M. (2005). Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**, 383-390
- Wanakhachornkrai, P. and Lertsiri, S. (2003). Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce. *Food Chemistry*, **83**, 619-629

Output ที่ได้จากโครงการ

ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม

1. ได้ต้นเชื้อต้นแบบ (prototype) ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *T. halophilus* TS71 ยีสต์ *Z. rouxii* A22 และ ยีสต์ *P. guilliermondii* EM1Y52
2. ได้องค์ความรู้คุณลักษณะชีวไทย และ เทคโนโลยีต้นแบบการใช้ต้นเชื้อสำหรับกระบวนการหมักโมโรมิ ซึ่งนำไปถ่ายทอดให้กับชมรมผู้ประกอบการต่อไป
3. ยื่นขอจดสิทธิบัตรในนาม มหาวิทยาลัยมหิดล ผ่านทางศูนย์บริหารทรัพย์สินทางปัญญา มหาวิทยาลัยมหิดล เรื่อง “การใช้ยีสต์ *Pichia guilliermondii* ร่วมกับ ยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ในกระบวนการหมักโมโรมิของการผลิตชีวเพื่อเพิ่มปริมาณสารระเหยให้กลิ่นรส”

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. บทความ เรื่อง Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation ลงตีพิมพ์ใน International Journal of Food Microbiology 160 (2013) หน้าที่ 282-289 โดย Thin Thin Wah, Supawan Walaisri, Apinya Assavanig, Nuttawee Niamsiri, Sittiwat Lertsiri* [IF 2011 = 3.327] * corresponding author (ดูในภาคผนวก)
2. ต้นฉบับเรื่อง Glutaminase from salt-tolerant *Pichia guilliermondii* and its characteristics เพื่อขอรับการพิจารณาตีพิมพ์ใน Bioresource Technology โดย Phichayaphorn Aryuman, Wonnop Visessanguan, Sittiwat Lertsiri, Apinya Assavanig* [IF 2011 = 4.980] * corresponding author
3. ต้นฉบับเรื่อง Role of *Tetragenococcus halophilus* in volatile flavor compound formed during mormi fermentation เพื่อขอรับการพิจารณาตีพิมพ์ใน Apinya Assavanig, Nuttawee Niamsiri, Sittiwat Lertsiri* [IF 2011 = 3.327] * corresponding author

นักศึกษาบัณฑิตศึกษาที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยฯ

นักศึกษาปริญญาเอก

1. Ms Thin Thin Wah วิทยานิพนธ์เรื่อง Formation of volatile flavor compounds by salt tolerant yeasts isolated from Thai soy sauce fermentation สำเร็จการศึกษานี้ พ.ศ. 2555
2. นางสาวพิชญพร อายุมัน วิทยานิพนธ์เรื่อง Screening of salt-tolerant yeast producing glutaminase and determining its characteristics กำลังเตรียมสำเร็จการศึกษานี้ พ.ศ. 2556 นี้
3. นางสาวพรรณรัตน์ สิงห์ราชา วิทยานิพนธ์เรื่อง Production of reduced sodium salt soy sauce

นักศึกษาปริญญาโท

1. นางสาวศุภวรรณ วลัยศรี วิทยานิพนธ์เรื่อง Isolation of a salt-tolerant yeast, *Pichia guilliermondii* and its potential application as a starter culture for soy sauce production สำเร็จการศึกษานี้ พ.ศ. 2556
2. นางสาวนฤวรรณ เพ็ญพรหม วิทยานิพนธ์เรื่อง Development of bacteria starter culture for soy sauce fermentation กำลังเตรียมสำเร็จการศึกษานี้ พ.ศ. 2556 นี้

ภาคผนวก



Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation

Thin Thin Wah^a, Supawan Walaisri^{a,b}, Apinya Assavanig^a, Nuttawee Niamsiri^a, Sittiwat Lertsiri^{a,*}

^a Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand

^b Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10400, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2012

Received in revised form 15 October 2012

Accepted 24 October 2012

Available online 16 November 2012

Keywords:

Salt-tolerant yeasts

Soy sauce

Zygosaccharomyces rouxii

Pichia guilliermondii

Volatile flavor compounds

Moromi medium

ABSTRACT

The roles of salt-tolerant yeasts such as *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*, and *Candida etchellsii* in the production of volatile flavor compounds (VFCs) in soy sauce fermentation have been well documented. However, the knowledge of VFC production by other salt-tolerant yeasts is still limited. In this work, the roles of *Z. rouxii* and *Pichia guilliermondii* strains in VFC production were investigated in moromi medium as a model system for soy sauce fermentation. Inoculation of a single culture of either *Z. rouxii* or *P. guilliermondii* as well as co-cultures of these two yeasts into moromi medium showed increased numbers of viable yeast at around 0.7 to 1.9 log CFU/mL after 7 days of cultivation at 30 °C. During cultivation, both single and co-cultures displayed survival over a 7-day time period, compared with the controls (no culture added). Overall, yeast inoculation enhanced the production of VFCs in the moromi media with higher amounts of ethanol, alcohols, furanones, esters, aldehyde, acid, pyrone and phenols, known as important characteristic flavor compounds in soy sauce. Moreover, the co-culture produced more alcohols, furanones, esters, maltol and benzoic acid than the single culture of *Z. rouxii*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Soy sauce is a condiment produced from soybeans, wheat and brine through a two-step fermentation process. In general, the process involves the activities of koji mold, lactic acid bacteria and yeasts (Sugiyama, 1984). Koji is prepared by culturing mold (e.g. *Aspergillus oryzae*) on a mixture of cooked soybeans and wheat flour. Based on the raw materials used, there are two main types of soy sauce: the Japanese type which is made from equal amounts of soybeans and wheat, and the Chinese type with more soybeans and less wheat flour (Wanakhachornkrai and Lertsiri, 2003). Thai soy sauce or *see-ieu* is included in the Chinese-type soy sauce. Matured koji contains various types of enzymes necessary for breakdown of macromolecules such as proteins and polysaccharides during moromi fermentation (Fukushima, 1989; Huang and Teng, 2004). In the case of Thai soy sauce, the matured koji is mixed with brine solution (22–23% w/v) at the ratio of 1:3 (w/v) to obtain moromi which is further fermented by salt-tolerant lactic acid bacteria and yeasts. After fermentation and aging for at least 3 months, the raw soy sauce obtained is pressed to filter and subjected to pasteurization prior to bottling (Lertsiri et al., 2011). In terms of soy sauce characteristic flavor, yeasts involved in the moromi fermentation contribute to volatile flavor compounds

(VFCs) in soy sauce. Moreover, chemical and biochemical reactions occurred during the fermentation and heat pasteurization also generates VFCs that make a complex blend of compounds contributing to the overall flavor of the finished product (Noda et al., 1980). However, the formation mechanism of VFCs in soy sauce is complex and difficult to control (Cao et al., 2010). Possible variation in the quality of soy sauce during fermentation can be standardized by applying suitable microbial starter strains into koji and moromi fermentations that would eventually lead to improvement of the production.

Considering the limited oxygen and high salt concentration in the moromi fermentation, lactic acid bacteria such as *Tetragenococcus halophilus* firstly grow and convert simple sugars to organic acids, mainly lactic acid. These acids result in pH drop which further facilitates growth of salt-tolerant yeasts. Various genera of yeasts, i.e. *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, and *Zygosaccharomyces* have already been isolated and characterized from the moromi (Hanaya and Nakadai, 2003). Among these, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* or *Candida etchellsii* are considered as the predominant active yeasts in the moromi fermentation of Japanese soy sauce (Yokotsuka, 1986). *Z. rouxii* is capable of alcoholic fermentation and hydrolysis of various amino acids into their respective alcohols, resulting in an accumulation of alcoholic substances that gives soy sauce its characteristic flavor. *Z. rouxii* also synthesizes important flavor compounds, i.e. 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF), using the Maillard intermediates

* Corresponding author at: Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, 272 Rama VI Rd., Rachathevi, Bangkok 10400, Thailand. Tel.: +66 2 2015307; fax: +66 2 3547160.

E-mail address: sittiwat.ler@mahidol.ac.th (S. Lertsiri).

as precursors (Hayashida et al., 1999). As the alcohol fermentation progresses, the growth of *Z. rouxii* is decreased since it is sensitive to alcohol at a concentration of around 4% (v/v) (Hanaya and Nakadai, 2003; van der Sluis et al., 2001). Next, *C. versatilis* and *C. etchellsii* begin to grow after the alcohol fermentation by *Z. rouxii*. These yeasts are more aerobic with weaker alcoholic production capability, however they are not as salt-tolerant as *Z. rouxii*. They grow in the maturation stage of the moromi fermentation, leading to the production of volatile phenolic compounds (Huang and Teng, 2004). The *Z. rouxii* starter culture *Z. rouxii* has been widely applied in the Japanese soy sauce industry (Fukushima, 2004; Hanaya and Nakadai, 2003; Hayashida et al., 1997; Luh, 1995; Sugiyama, 1984). On the other hand, *Pichia guilliermondii* (its anamorph: *Candida guilliermondii*) which is one of the microflora found in soy sauce moromi fermentation (Hanaya and Nakadai, 2003) has not yet been employed as an additional starter in soy sauce production. *P. guilliermondii* has been known to produce 4-ethylguaiacol (Suezawa & Suzuki, 2007), which is an important phenolic compound to mature the flavor of soy sauce (Fukushima, 2004; Yokotsuka et al., 1967), and 4-ethylphenol (Dias et al., 2003).

Our group has been investigating volatile compounds involved in the characteristic flavor of Thai soy sauce in order to develop suitable microbial starter strains for the moromi fermentation. In this study, we demonstrated the production of volatile flavor compounds by two salt-tolerant yeast species isolated from Thai soy sauce moromi, i.e. *Z. rouxii* and *P. guilliermondii*. The cultures of these strains were conducted in moromi medium as a model system of soy sauce fermentation. We also investigated the application of co-cultures of these strains in order to observe their synergistic effect on the volatile flavor compound production.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

Z. rouxii (coded A22) and *P. guilliermondii* (coded EM1Y52) were obtained from the culture collection of the Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University. These halotolerant yeasts, the former and the latter, were previously isolated from soy sauce moromi samples that had been fermented for 2 months and 1 month respectively. Those moromi samples were of similar moromi type as the moromi samples of this study. These yeasts could grow in yeast extract–peptone–dextrose (YPD) medium containing sodium chloride of up to 18% w/v (18-YPD). The colonies of the *Z. rouxii* strain were globose, raised, smooth, has an entire margin and creamy, whereas the colonies of the *P. guilliermondii* strain were globose, flat, smooth, has an entire margin and white. They reproduced asexually by budding and grew as pseudohyphae. Molecular identification of the strains was performed using sequence analysis of the D1/D2 domain of the 26S rDNA as described by Ferreira et al. (2010). Their GenBank access numbers for nucleotide sequence were JX848543 and JX848542 for A22 and EM1Y52 respectively.

2.2. Moromi medium

Soy sauce moromi liquid portions were randomly collected from SS Factory in Samutprakan province at 1-month (1M), 2-months (2M), and 3-months (3M) of moromi fermentation (from different batches of koji). The moromi was prepared from koji and 18% brine at the ratio of 1:1; w/v. The liquid portions obtained were used as culture media without sterilization. Prior to inoculation, each moromi sample was determined for contents of total nitrogen (TN) by Kjeldahl's method (AOAC, 1984), glucose using a glucose oxidase kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and pH using a pH meter (IQ Scientific Instruments, Inc., Carlsbad, CA, USA) at 25 °C. The average values obtained are presented in Table 1.

2.3. Preparation of the inoculums

Z. rouxii A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 from frozen stocks were cultured separately in 500-mL flasks containing 200 mL of YPD broth plus 18% (w/v) NaCl (18-YPD), incubated at 30 °C with 150-rpm shaking to obtain optical density (OD_{600 nm}) equal to 1.0. The cells were harvested by centrifugation at 5000×g, 4 °C for 20 min. The cell pellets were then suspended to the same volume of 18-YPD broth.

2.4. Fermentation experiment

Moromi model systems were conducted with 1-month, 2-month, and 3-month moromi since A22 and EM1Y52 were isolated from 2-month and 1-month moromi samples respectively. Moreover, viable counts of yeasts were also detected in 3-month moromi in our previous study. Details of all 12 treatments and 4 controls used in the experiment are shown in Table 1. Culturing yeast starters in either moromi media or 18-YPD broth was performed in duplicate in 250-mL Duran bottles with a working volume of 200 mL. The experiments were conducted with 10% (v/v) of each yeast starter culture at a final concentration of ~10⁶ cells per mL in both media and incubated statically at 30 °C for 7 days, allowing the bottles to be loosely capped. The co-cultures of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* were carried out by inoculating each strain at the ratio of 1:1. Concurrently, parallel runs of uninoculated media were also incubated as controls under the same conditions. Aliquots of samples collected before and after incubation were subjected to enumeration of yeast cells on duplicate YPD agar (supplemented with 10% w/v NaCl (10-YPD) and 100 mg/L chloramphenicol) plates at 30 °C for 3–4 days. The agar was adjusted to pH 4.5 with 1 N HCl. Plates with 30 to 300 colony-forming units per mL (CFU/mL) were counted and the results were expressed as log CFU/mL of the samples. For chemical analysis and VFC determination, the samples were centrifuged at 5000×g, 4 °C for 20 min and the supernatant obtained was then filtered through a 0.45-μm membrane. Glucose content and pH of the portions were measured as previously described in Section 2.2. All analytical determinations were carried out in triplicate of the two

Table 1
Treatments and controls of fermentation experiment.

Medium	Single culture	Co-culture	Control
1M moromi 0.88% TN, pH 5.0, 162.0 mM glucose	Treatment 1 <i>Z. rouxii</i>	Treatment 2 <i>P. guilliermondii</i>	Control 1 no inoculation
2M moromi 0.95% TN, pH 4.6, 145.5 mM glucose,	Treatment 4 <i>Z. rouxii</i>	Treatment 5 <i>P. guilliermondii</i>	Control 2 no inoculation
3M moromi 0.88% TN, pH 4.7, 103.2 mM glucose	Treatment 7 <i>Z. rouxii</i>	Treatment 8 <i>P. guilliermondii</i>	Control 3 no inoculation
YPD plus 18% w/v NaCl, pH 4.5	Treatment 10 <i>Z. rouxii</i>	Treatment 11 <i>P. guilliermondii</i>	Control 4 no inoculation
		Treatment 12 <i>Z. rouxii</i> + <i>P. guilliermondii</i>	

experiments and then presented as the average values. The two experiments were conducted at the same time.

2.5. Determination of volatile flavor compounds (VFCs)

2.5.1. Determination of VFCs by solid phase microextraction coupling with gas chromatography–mass spectrometry (SPME–GC–MS)

Ten microliters of 2-methyl-3-heptanone (142.4 µg/mL of methanol) was added into 5 mL of a supernatant of the culture medium as an internal standard. The aliquot was placed in a 20-mL headspace vial sealed with a PTFE septum in an aluminum cap. To obtain equilibrium, the samples were preheated at 40 °C for 10 min in a water bath. A SPME manual holder (Supelco, Bellefonte, PA, USA), equipped with a 2-cm 50/30 µm stable flex divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was inserted into the headspace vial through the PTFE cap. The VFCs in the headspace were absorbed by exposing the fiber to the headspace at 40 °C for 20 min. Prior to collection of volatiles, the fiber was preconditioned at 230 °C for 105 min in the GC injection port. The VFCs were then thermally desorbed by directly introducing the fiber into the injection port of the GC–MS (Agilent 6890 plus GC/HP 5973 MSD, New York, USA) maintained at 220 °C with the splitless mode and holding for an injection purge-off time of 5 min. The separation of volatile compounds was achieved on an HP-FFAP column (25 m × 0.32 mm i.d. × 0.50 µm; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The oven temperature was initially programmed from 45 to 110 °C at a rate of 10 °C/min, then ramped up to 160 °C at 7 °C/min and increased to 240 °C at 10 °C/min and post run for 2 min. The ultra high-purity helium gas (TIG; Thai Industrial Gas, Thailand) flow rate was 1.5 mL/min. The total runtime was 23.64 min. The mass selective detector capillary direct-interface temperature was 250 °C. All mass spectra were obtained by electron ionization at 70 eV. The detector was operated with a mass range between 20 and 350 m/z and with a scan rate of 4.33 scans/s.

2.5.2. Determination of semi-VFCs by direct solvent extraction coupling with gas chromatography–mass spectrometry (DSE–GC–MS)

The method was modified based on the work of Wanakhachornkrai and Lertsiri (2003). Ten milliliters of a sample was mixed with 50 µL of each methanolic solution of internal standard: 2-ethyl butanoic acid (446.0 µg/mL), 2-methyl-3-heptanone (142.4 µg/mL) and 2,4,6-trimethyl pyridine (405.6 µg/mL) prepared. Then the mixture was saturated with sodium chloride and adjusted to pH 3.0 with 5 N HCl. The volatile compounds were then extracted thrice with 15 mL of methyl acetate (Hayashida et al., 1997). After collecting the organic fraction, the mixture was re-adjusted to pH 12.0 with 5 N NaOH and extracted again as described above. The collected acidic and basic fractions were separately kept at –80 °C overnight for removal of water. These fractions were filtered through Whatman#1 filter paper, then reduced to 3 mL under gentle nitrogen stream and dried over about 1.9 g of anhydrous sodium sulfate to remove any residual water and then concentrated to a final volume of 100 µL using a gentle stream of nitrogen gas. The concentrated organic extracts were analyzed by GC–MS using the Agilent 6890 plus GC/HP 5973 MSD, equipped with an HP-FFAP column described previously. One microliter of the sample extract was injected at 220 °C with a split ratio of 10:1. The GC oven temperature was held at 45 °C for 2 min, raised an initial 45 °C to 230 °C at a rate of 5 °C/min with a running time of 44 min. The flow rate was 1.5 mL/min. The mass range was set at 35 to 450 m/z, 3.50 scans/s.

2.5.3. Identification and semi-quantification of VFCs

Positive identification of a compound was conducted by comparing its retention index (RI) and mass spectrum in a database (Wiley 275.L mass spectral database, Hewlett-Packard Co.). RI was calculated according to the retention time of n-alkane standards. The peak area cut-off for detection was 10,000 and peak integration was performed

on RTE mode, Enhanced Chemstation Software version B.01.00 (Hewlett-Packard Co.). For semi-quantification, the amounts of the VFCs were calculated from the peak area of each compound relative to that of the internal standards.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the statistical package XLSTAT™ software for Windows. Significant difference at a *p* value of less than 0.05 was analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA), and followed with Duncan's test to compare means. Principal component analysis (PCA) was carried out to correlate the abundance of the VFCs in treatments and control by applying to the concentration of compounds.

3. Results and discussion

3.1. Survival of yeast inoculums

All yeast inoculums (single culture of *Z. rouxii*, single culture of *P. guilliermondii*, and co-culture of both strains) were found to be able to survive or grow slowly in all three different moromi media (1M, 2M, 3M) as observed in the increasing log CFU/mL after the 7-day incubation compared to their original numbers at day 0 (Fig. 1). The initial numbers of yeast cells in the inoculated samples were 1 to 3 logs higher than the controls (at day 0). For *Z. rouxii* cultured in 1M, 2M and 3M moromi media, the viable counts of ~5.8 log CFU/mL increased to 6.7, 6.5 and 6.2 log CFU/mL, respectively, at day 7. On the other hand, the viable counts of *P. guilliermondii* cultured in those moromi media were over 6 log CFU/mL at day 0, and they remained constant in the 1M and 3M moromi media but slightly reduced in the 2M moromi medium at day 7. The increasing trend of about 1 log CFU/mL was also observed in the co-culture experiments (Fig. 1a). Glucose consumption was higher in the cultures with *Z. rouxii* rather than that with *P. guilliermondii* as observed in the decrease of glucose content in the moromi media (Fig. 1b). These results indicated that glucose was utilized by microbes in the moromi media, including indigenous salt tolerant microbes and inoculated yeasts. *P. guilliermondii* consumed glucose less than *Z. rouxii* during the 7 days of incubation. In the case of *Z. rouxii* cultures, glucose was almost completely consumed during the 7 days. This also indicated that the moromi medium as the model system was capable to culture the yeasts for a 7-day period. The limitation was due to substrates available.

Considering the viable cell count and glucose consumption of yeast cultures in the 18-YPD broth, the numbers of cells decreased (from ~6 log CFU to ~5 log CFU) in all cases except in the *Z. rouxii* single culture (Fig. 2). Correspondingly, the glucose content remained ~90 mM in the *P. guilliermondii* single culture, while glucose depletion reached 1 to 3 mM in the *Z. rouxii* single culture and co-culture. The results were probably due to the fact that *P. guilliermondii* prefers more aerobic conditions (Fukushima, 2004).

3.2. Volatile flavor compound production in 18-YPD medium

With respect to metabolites from yeast fermentation, alcoholic groups were mainly identified in the 18-YPD medium inoculated with single or co-cultures. No target volatile flavor compounds (VFCs) were detected in the 18-YPD control (no inoculums added). VFCs produced by *Z. rouxii* culture and co-culture of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* included ethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, methionol and 2-phenylethyl acetate (Table 2). These are VFCs produced by yeast strains, which have been described as involved in the development of soy sauce flavor (Beuchat, 2001; van der Sluis, et al., 2001). In the case of the single culture of *P. guilliermondii*, only ethanol (185.7 µg/L) and 2-phenylethanol (6.0 µg/L) were produced (Table 2). Interestingly, the co-culture presented the highest contents, compared

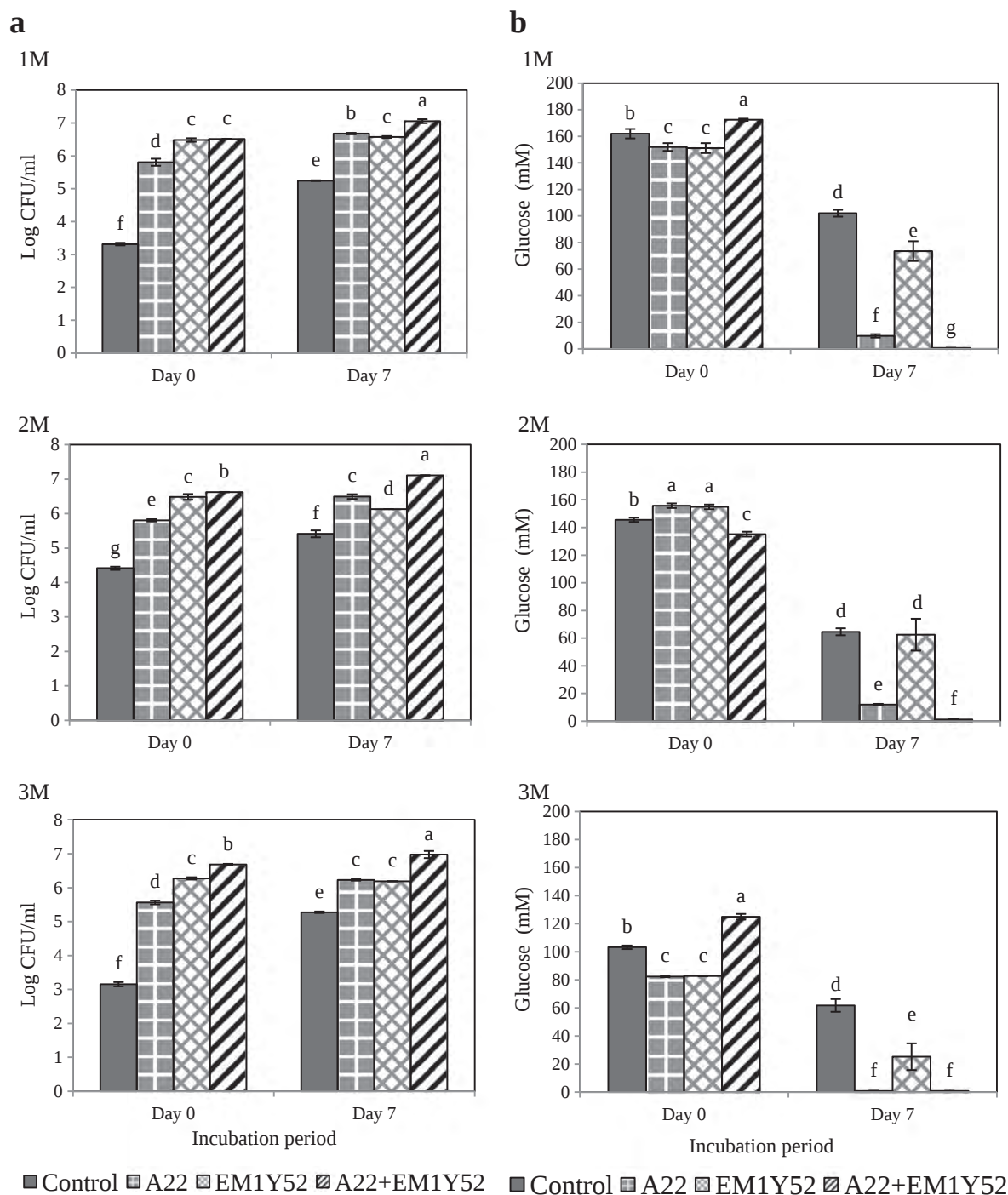


Fig. 1. (a) The number of yeast cells and (b) glucose consumption from single culture and co-culture of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* in 1M, 2M and 3M moromi media. Bars with different small letters show significant difference ($p \leq 0.05$).

to those obtained from the single culture of *Z. rouxii* or *P. guilliermondii* (Table 2). These results suggested that *P. guilliermondii* could not well utilize glucose to produce ethanol. It is possible that *P. guilliermondii* might metabolize free amino acids to generate energy for survival as assumed in *Candida utilis* that could break down the carbon skeleton of amino acids completely (Large, 1986). Evidently, 2-phenylethanol was converted by *P. guilliermondii* from phenylalanine. This 2-phenylethanol has been reported to be commonly produced by yeast fermentation and can be synthesized from glucose or phenylalanine by yeasts (Hanaya and Nakadai, 2003). It has also been observed that the batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae* could produce phenylethanol

during fermentation when phenylalanine is the sole nitrogen source or under anaerobic conditions (Hazelwood et al., 2008). Furthermore, phenylethanol might be formed through biosynthesis of L-alanine from pyruvate using aromatic amino acid aminotransferase (Kradolfer et al., 1982).

In general, yeasts produce ethanol from glucose via the glycolytic pathway and anaerobic fermentation (Benitez and Codon, 2004). In some yeasts, higher alcohols can be produced from the Ehrlich pathway in which the deamination or transamination of extracellular amino acids is performed and/or other amino acid biosynthesis pathway (van der Sluis et al., 2002; Webb and Ingraham, 1963). In the

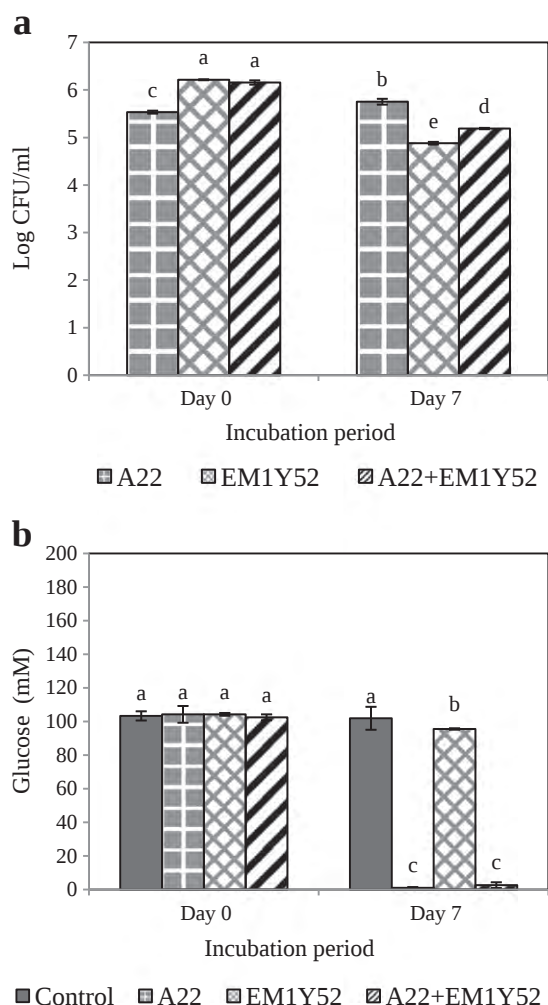


Fig. 2. (a) The number of yeast cells and (b) glucose consumption from single culture and co-culture of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* in YPD medium containing 18% w/v NaCl (18-YPD). Bars with different small letters show significant difference ($p \leq 0.05$).

Ehrlich pathway, branched-chain amino acids (*i.e.* leucine, valine, and isoleucine), aromatic amino acids (*i.e.* phenylalanine), and sulfur-containing amino acids (*i.e.* methionine) undergo a three-enzymatic-step pathway: 1) transamination of an amino group from amino acids to α -ketoglutaric acid resulting in α -keto acids, 2) decarboxylation of the α -keto acids to aldehydes, and 3) reduction of the correspondent aldehydes to higher alcohols (Hanaya and Nakadai, 2003; van der Sluis et al., 2001). α -Ketoglutarate is the general substrate that is involved in the first step of transamination. α -Keto acids are key intermediates involved in this pathway (van der Sluis et al., 2001). Among these higher alcohols, methionol is produced merely via the Ehrlich pathway in *Z. rouxii* (van der Sluis et al., 2002). Since there was no

methionol detected in the single culture of *P. guilliermondii* (Table 2), the results thus suggested that *P. guilliermondii* was not able to use the Ehrlich pathway for the formation of higher alcohols. However, it was evident that the co-culture produced a much higher content of methionol than the single culture of *Z. rouxii*.

3.3. Volatile flavor compound production in moromi medium

Eighteen volatiles that are reported to be important VFCs in Japanese, Chinese, and Thai soy sauces were distinguished in the moromi media (1M, 2M, 3M). These included 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, methionol, ethanol, phenylacetaldehyde, ethyl acetate, ethyl lactate, ethyl benzoate, ethylphenyl acetate, 2-phenylethyl acetate, 2-methoxy-phenol (or guaiacol), 4-ethyl-2-methoxy-phenol, 4-ethyl-phenol, 4-hydroxy-2-ethyl-5-methoxy-3(2H)-furanone (HEMF), 4-hydroxy-2,5-dimethoxy-3(2H)-furanone (HDMF), 3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one (or maltol) and benzoic acid (Table 3).

Considering ethanol production in single cultures and co-cultures of both yeasts, it was characteristic that *P. guilliermondii* cultures resulted in low ethanol concentration in both 18-YPD and moromi media compared to that of *Z. rouxii*. The contents of residual glucose remarkably decreased in single cultures and co-cultures of *Z. rouxii*, which might be due to the ability of *Z. rouxii* to possibly synthesize ethanol from glucose which was plentiful in the moromi media. Regarding higher alcohols in the cultures, *Z. rouxii* cultures and co-cultures accumulated these compounds at higher concentrations than the controls and *P. guilliermondii* single cultures. These results were in agreement with the volatile formation in cultures of 18-YPD broth. The co-cultures exhibited the highest increase in the following VFCs, including 2-fold increase of 3-methyl-1-butanol particularly in 1M and 3M moromi media, 3.4-fold increase of 2-methyl-1-propanol in 3M moromi and 1.1-fold increase of methionol in 2M moromi relative to the controls (Table 3). Likewise, high content of 2-phenylethanol was obtained in the co-cultures, reaching the maximum value of 4.7-fold increase in the 3M medium while 2-phenylethanol production by *Z. rouxii* cultures has only 2.4-fold increase in the 3M medium (Table 3).

Among branched-chain amino acids which are precursors for the Ehrlich pathway (Hazelwood et al., 2008), these amino acids except methionine were abundant in soy sauce mixtures (O'Toole, 1997). In addition, the production of methionol which merely occurs via the Ehrlich pathway was enhanced in co-cultures of both 18-YPD and moromi media. We hypothesized that *P. guilliermondii* was not capable for the Ehrlich pathway. However, *P. guilliermondii* could produce some general substrates, *e.g.* α -ketoglutarate which is for the first step of transamination in the Ehrlich pathway or/and α -keto acids from transamination of amino acids. These α -keto acids were secreted or leached from the yeast cells and then uptaken by *Z. rouxii* to convert into higher alcohols. The previous study has shown that at pH around 4.0 to 6.0 and in the presence of 0 to 18% (w/v) NaCl, considerable amounts of α -keto acids as the deaminated products from the branched-chain amino acids are found to be accumulated extracellularly in the *Z. rouxii* culture (Jansen et al., 2003). Accumulation of α -keto acids is accomplished by the flow through of the Ehrlich pathway which increases at increased concentrations of extracellular amino acids (Aoki and Uchida, 1991; van der Sluis et al., 2000).

For HEMF and HDMF production, *Z. rouxii* cultures enhanced HEMF formation, resulting in an increase of 1.6 and 2.5 folds in the 1M and 2M moromi media respectively, compared to the controls (Table 3). On the contrary, no furanone compounds were observed in *P. guilliermondii* single cultures. It is important to note that the co-cultures yielded a 1-fold higher production of HEMF than the *Z. rouxii* cultures. Since HEMF is one of the key aroma compounds with low detection threshold (Hanaya and Nakadai, 2003), our findings strongly confirmed the significance of *Z. rouxii* in the formation of

Table 2

Concentration ($\mu\text{g/L}$) of volatile flavor compounds (VFCs) produced by single culture and co-culture of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* in YPD broth containing 18% w/v NaCl (18-YPD).

No.	RI ^a	Compounds	A22	EM1Y52	A22 + EM1Y52
1	<1100	Ethanol	1823	185.7	2860.2
2	1137	2-Methyl-1-propanol	20.5	nd	145.8
3	1236	3-Methyl-1-butanol	708.5	nd	2784.9
4	1991	2-Phenylethanol	246.1	6	870.7
5	1756	Methionol	4	nd	32.6
6	1857	2-Phenylethyl acetate	25.9	nd	79.7

nd: not detected.

^a RI based on HP-FFAP column.

Table 3Concentration ($\mu\text{g/L}$) of volatile flavor compounds (VFCs) produced by single culture and co-culture of *Z. rouxii* and *P. guilliermondii* in 1M, 2M and 3M moromi media.

Compounds	1M moromi						2M moromi						3M moromi					
	Control 1	A22	Increment ^a for A22 (fold)	EM1Y52	A22 + EM1Y52	Increment for A22 + EM1Y52 (fold)	Control 2	A22	Increment for A22 (fold)	EM1Y52	A22 + EM1Y52	Increment for A22 + EM1Y52 (fold)	Control 3	A22	Increment for A22 (fold)	EM1Y52	A22 + EM1Y52	Increment for A22 + EM1Y52 (fold)
Ethanol	516.2	1499.7	1.9	352.2	798.5	0.5	407.7	910.0	1.2	479.4	1821.8	3.5	172.6	754.5	3.4	188.1	917.0	4.3
2-Methyl-1-propanol	24.0	28.5	0.2	8.7	47.4	1.0	27.5	29.2	0.1	9.0	77.8	1.8	10.9	14.0	0.3	5.9	47.8	3.4
3-Methyl-1-butanol	246.5	450.7	0.8	159.1	711.4	1.9	445.5	348.1	nc	159.5	1046.9	1.3	262.6	377.0	0.4	171.31	781.9	2.0
2-Phenylethanol	43.5	117.5	1.7	32.6	187.6	3.3	51.2	72.2	0.4	24.6	257.0	4.0	25.9	88.4	2.4	20.7	147.9	4.7
Methionol	3.7	3.8	nc	2.1	5.0	0.4	4.1	3.0	nc	1.5	8.7	1.1	3.7	3.3	nc	2.1	6.1	0.7
2-Methoxy-phenol	1.1	nd	nc	nd	2.2	1.0	2.2	1.6	nc	1.8	5.1	1.3	1.9	0.5	nc	1.1	5.8	2.0
4-Ethyl-2-methoxy-phenol	4.6	1.3	nc	90.0	5.3	0.1	5.1	3.2	nc	34.1	3.5	nc	3.9	1.9	nc	94.8	2.1	nc
4-Ethyl-phenol	1.5	0.2	nc	10.1	nd	nc	1.4	0.7	nc	4.1	nd	nc	1.4	0.6	nc	9.2	nd	nc
Maltol ^{b,c}	1954.7	2284.3	0.2	2047.1	4071.6	1.1	1004.9	3785.5	2.8	3304.5	16005.7	14.9	5811.2	1704.6	nc	1317.6	11668.5	1.0
HDME ^{c,d}	nd	nd	nc	nd	nd	nc	nd	1048.9	nc	nd	nd	nc	nd	773.1	nc	nd	nd	nc
HEMF ^{c,e}	2144.6	5507.1	1.6	nd	3289.2	0.5	3064.3	7047.7	1.3	nd	10617.4	2.5	nd	4211.5	nc	nd	6611.3	nc
Ethyl acetate	nd	43.6	nc	nd	39.7	nc	8.7	46.6	4.4	nd	24.3	1.8	nd	26.0	nc	nd	23.9	nc
Ethyl lactate	1.1	nd	nc	nd	2.2	0.9	nd	nd	nc	nd	3.3	nc	1.2	nd	nc	nd	3.3	1.7
Ethyl benzoate	0.7	2.3	2.5	0.8	2.8	3.3	2.8	3.3	0.2	1.6	4.9	0.8	nd	1.0	nc	0.5	4.8	nc
Ethylphenyl acetate	0.4	1.0	1.6	nd	nd	nc	1.5	2.1	0.4	nd	nd	nc	nd	0.4	nc	nd	nd	nc
2-Phenylethyl acetate	2.0	2.4	0.2	0.4	2.3	0.2	7.2	3.2	nc	0.3	37.2	4.2	1.6	2.4	0.5	1.2	6.6	3.2
Phenylacetaldehyde	nd	1.6	nc	nd	2.5	nc	nd	2.9	nc	nd	1.9	nc	nd	3.3	nc	nd	3.0	nc
Benzoic acid	2850.4	4242.1	0.5	2522.9	3818.9	0.3	2298.5	3725.6	0.6	2591.2	2752.3	0.2	1820.3	2183.0	0.2	1294.2	4798.1	1.6

nd: no detection.

^a The increment values were calculated by VFCs in the inoculated sample divided by VFCs in the uninoculated sample. If the compound did not occur in the control or the amount decreased, the increment was not calculated (nc).^b 3-Hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one.^c Detected by DSE.^d 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-furanone.^e 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-furanone.

flavor compounds in soy sauce products. Regarding its biosynthesis, *Sasaki et al. (1991)* described that the pentose-phosphate cycle is involved in HEMF biosynthesis by yeasts in soy sauce. In addition, *Sugawara and Sakurai (1999)* suggested that HEMF is synthesized by yeasts using a precursor derived from the Maillard reaction of ribose with serine or alanine during heating. Furthermore, HEMF biosynthesis by *Z. rouxii* in moromi fermentation was claimed to occur through the combination of the 5-carbon compound produced from the Maillard reaction and the 2-carbon compound provided by the yeast (*Ohata et al., 2007*). However, the yeast enzymes involved in the furanone biosynthesis have not been known up to this time. Hence, these 4-hydroxyfuranones were not detected in any of the yeast cultures in the 18-YPD broth since no precursors were present. On the other hand, since the Maillard reaction occurs at every stage of soy sauce production (*Lertsiri et al., 2001*), the yeasts probably use the Maillard intermediates as precursors in relation with this 4-hydroxyfuranone biosynthesis.

P. guilliermondii single cultures were found to play an important role in the production of phenolic compounds (2-methoxyphenol, 4-ethyl-2-methoxyphenol and 4-ethylphenol) whereas no increase in the production of phenolic compounds was found in *Z. rouxii* single cultures. Occurrence of *P. guilliermondii* and its production of volatile phenolic compounds were also reported as a spoilage yeast in wine fermentation (*Sáez et al., 2010*). Phenolic compounds, such as 4-ethyl-2-methoxy-phenol, were produced by *P. guilliermondii* cultures with the highest increase of 24-folds higher than the control, especially in the 3M medium (*Table 3*). In addition, *P. guilliermondii* single cultures produced the concentration of 4-ethylphenol up to a maximum increase of 6 folds in both 1M and 3M moromi media, compared to the controls, despite the fact that there was no detection for this compound in the co-cultures. This finding suggested that *P. guilliermondii* was a producer of volatile phenols, which are responsible for the spicy clove-like and woody, smoky flavor to soy sauce. The co-cultures had a higher level of 2-methoxyphenol production with 1–2 folds than the controls (*Table 3*). It has been demonstrated that biosynthesis of these compounds by yeasts involves carboxylation and reduction of ferulic acid and *p*-coumaric acid (*van der Sluis et al., 2001*).

3.4. Principle component analysis (PCA)

To evaluate the correlations among the important VFC compounds and the contribution among the cultures, the concentration of VFCs as variables was subjected to principal component analysis (PCA). PCA condenses all of the VFC variables into principal components (PCs) which are used as axes on which the data are plotted and structurally visualized on a biplot (*Lawless and Heymann, 1998*). *Fig. 3a* and *b* shows the 2-dimensional biplots of PC1 against PC2 for loadings and scores respectively. PC1 explained 35.37% of the variance which correlated with ethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, HEMF, 2-methoxy-phenol, 4-ethyl-2-methoxy-phenol, 4-ethyl-phenol, ethyl lactate, ethyl benzoate and maltol. PC2 explained 32.22% of the variance and correlated with methionol, phenylacetaldehyde, ethyl acetate, 2-phenylethyl acetate and benzoic acid. PC3 explained 14.63% which was correlated with HDMF and ethylphenylacetate (not illustrated).

In PCA, it is possible to distinguish the single cultures and co-cultures which had different characteristics from the controls (*Fig. 3b*). The group of co-cultures in the moromi media located in PC1 was highly influenced by ethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, HEMF, ethyl benzoate and maltol, as the co-cultures had their highest concentration. On the other hand, the group of *P. guilliermondii* cultures in the moromi media was found on the opposite side of the co-culture group, indicating a negative correlation with those VFCs. This indicated the presence of a lower amount or the absence of those compounds in *P. guilliermondii* cultures. It was indeed clustered by increasing the

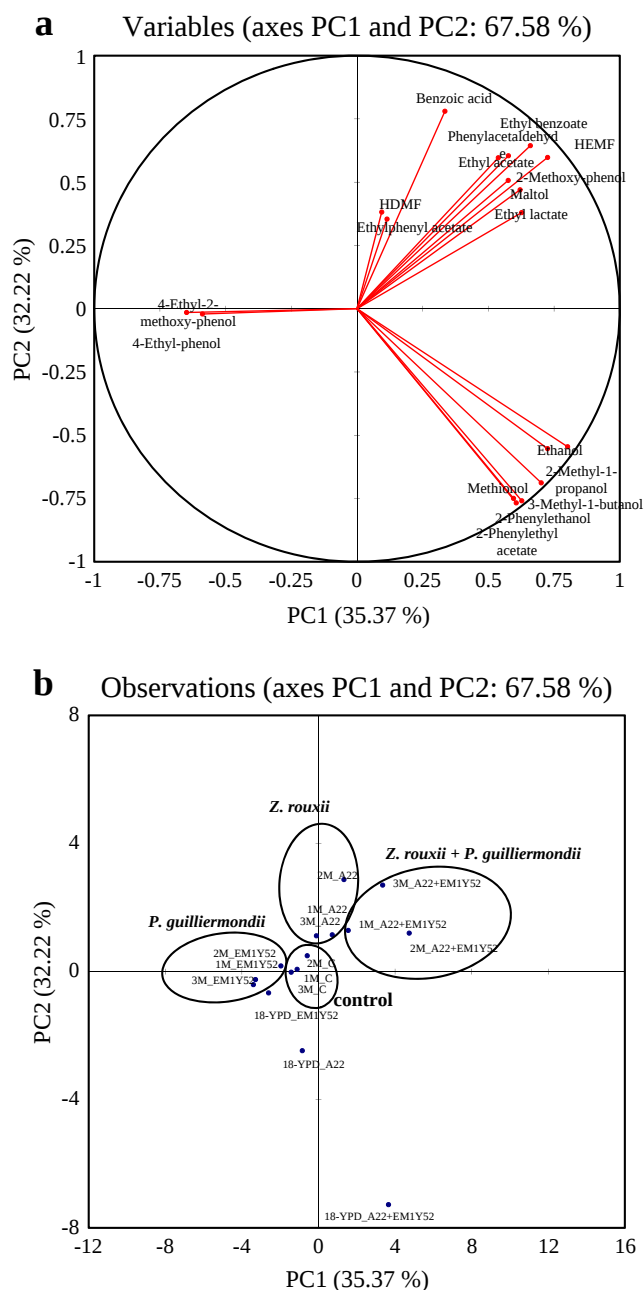


Fig. 3. Principle component analysis: (a) loading plot illustrated the contribution of volatile flavor compounds; (b) score plots presented the distribution of cultures in groups.

concentration of 4-ethyl-2-methoxy-phenol and 4-ethyl-phenol. Regarding *Z. rouxii* cultures in moromi media located on PC3 (not illustrated), they were strongly associated with the highest concentration of HDMF and ethylphenylacetate. According to the loadings of VFCs produced by the cultures in the 18-YPD broth, separated positions of the culture on the biplot (*Fig. 3b*) demonstrated that ethanol, higher alcohols and 2-phenylethylacetate basically contributed to the characteristics of each culture. This also indicated that the co-cultures indeed had the highest amount of these compounds including ethanol and higher alcohols.

4. Conclusions

Moromi medium as the model system demonstrated the possibility of using selected *Z. rouxii* A22 and *P. guilliermondii* EM1Y52 strains for soy sauce fermentation. In terms of VFCs, the former could

produce HEMF and HDMF, and the latter could produce phenolic volatiles in the moromi medium but not in the 18-YPD broth. Co-culture of these two strains in both moromi medium and 18-YPD could enhance the formation of VFCs.

Acknowledgments

We would like to thank the Thailand International Development Cooperation Agency (TICA), Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), and The Thailand Research Fund (grant no. DBG5380022) for the financial support of this study. Special thanks also go to SS Soy Sauce Factory for kindly providing the soy sauce moromi samples.

References

- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Aoki, T., Uchida, K., 1991. Amino acids-uptake deficient mutants of *Zygosaccharomyces rouxii* with altered production of higher alcohols. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 2893–2894.
- Benitez, T., Codon, A., 2004. Ethanol-tolerance and production by yeast. In: Arora, D.K. (Ed.), *Handbook of Fungal Biotechnology*, Second edition. (Revised and Expanded).
- Beuchat, L.R., 2001. Traditional fermented foods. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Second edition. ASM Press, Washington, DC, pp. 701–719.
- Cao, X., Hou, L., Lu, M., Wang, C., 2010. Improvement of soy-sauce flavour by genome shuffling in *Candida versatilis* to improve salt stress resistance. *International Journal of Food Science and Technology* 45 (1), 17–22.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20 (5), 567–574.
- Ferreira, N., Belloch, C., Querol, A., Manzanares, P., Vallez, S., Santos, A., 2010. Yeast microflora isolated from Brazilian cassava roots: taxonomical classification based on molecular identification. *Current Microbiology* 60 (4), 287–293.
- Fukushima, D., 1989. Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu. In: Steinkraus, K.H. (Ed.), *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1–88.
- Fukushima, D., 2004. Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu. In: Steinkraus, K.H. (Ed.), *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. CRC Press (Revised and Expanded).
- Hanaya, Y., Nakadai, T., 2003. Yeasts and soy products. In: Boekhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Foods*, pp. 413–428.
- Hayashida, Y., Kuriyama, H., Nishimura, K., Slaughter, J.C., 1999. Production of 4-hydroxyfuranones in simple media by fermentation. *Biotechnology Letters* 21 (5), 505–509.
- Hayashida, Y., Nishimura, K., Slaughter, J.C., 1997. The influence of mash pre-aging on the development of the flavour-active compound, 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), during soy sauce fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 32 (1), 11–14.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R., 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), 2259–2266.
- Huang, T.-C., Teng, D.-F., 2004. Soy sauce: manufacturing and biochemical changes. In: Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, A.S., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P.S., Toldra, F. (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. CRC Press.
- Jansen, M., Veurink, J.H., Euverink, G.-J.W., Dijkhuizen, L., 2003. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research* 3 (3), 313–318.
- Kradolfer, P., Niederberger, P., Hütter, R., 1982. Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Archives of Microbiology* 133 (3), 242–248.
- Large, P.J., 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2 (1), 1–34.
- Lawless, H.T., Heymann, H., 1998. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Chapman and Hall, New York.
- Lertsiri, S., Maungma, R., Assavanig, A., Bhumiratana, A., 2001. Roles of the Maillard reaction in browning during moromi process of Thai soy sauce. *Journal of Food Processing Preservation* 25, 149–162.
- Lertsiri, S., Wanakhachornkrai, P., Assavanig, A., Chaiseri, S., Suwonsichon, T., 2011. Volatile Flavor Compounds and Flavor Profiles of Thai Soy Sauce, vol. 1059. American Chemical Society, pp. 375–387.
- Luh, B.S., 1995. Industrial production of soy sauce. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14 (6), 467–471.
- Noda, F., Hayashi, K., Mizunuma, T., 1980. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. *Applied and Environmental Microbiology* 40 (3), 452–457.
- O'Toole, D.K., 1997. The role of microorganisms in soy sauce production. *Advances in Applied Microbiology* 45, 87–152.
- Ohata, M., Kohama, K., Morimitsu, Y., Kubota, K., Sugawara, E., 2007. The formation mechanism by yeast of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone in miso. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71 (2), 407–413.
- Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.C., Sangorrín, M.P., 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Letters in Applied Microbiology* 51 (2), 170–176.
- Sasaki, M., Nunomura, N., Matsudo, T., 1991. Biosynthesis of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone by yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (5), 934–938.
- Sugawara, E., Sakurai, Y., 1999. Effect of media constituents on the formation by halophilic yeast of the 2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone aroma component specific to miso. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63 (4), 749–752.
- Suezawa, A., Suzuki, M., 2007. Bioconversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and 4-ethylguaiacol and of 4-vinylguaiacol to 4-ethylguaiacol by halotolerant yeasts belonging to the genus *Candida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1058–1062.
- Sugiyama, S.-I., 1984. Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce. *Food Microbiology* 1 (4), 339–347.
- van der Sluis, C., Rahardjo, Y., Smit, B., Kroon, P., Hartmans, S., Ter Schure, E., Tramper, J., Wijffels, R., 2002. Concomitant extracellular accumulation of alpha-keto acids and higher alcohols by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (2), 117–124.
- van der Sluis, C., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2001. Enhancing and accelerating flavour formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. *Trends in Food Science and Technology* 12 (9), 322–327.
- van der Sluis, C., Wolken, W., Giuseppin, M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 2000. Effect of threonine, cystathionine, and the branched-chain amino acids on the metabolism of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2–4), 292–300.
- Wanakhachornkrai, P., Lertsiri, S., 2003. Comparison of determination method for volatile compounds in Thai soy sauce. *Food Chemistry* 83 (4), 619–629.
- Webb, A.D., Ingraham, J.L., 1963. Fusel oil. *Advances in Applied Microbiology* 5, 317–353.
- Yokotsuka, T., 1986. Soy sauce biochemistry. In: Chichester, C.O., Mrak, E.M., Schweigert, B.S. (Eds.), *Advances in Food Research*, vol. 30. Academic Press, pp. 195–329.
- Yokotsuka, T., Asao, Y., Sakasai, T., 1967. Studies of the flavorful substances in shoyu. XXVI. Flavorous components produced by yeast fermentation. *Nippon Noeikagaku Kaishi* 41 (9), 434–441.