LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

16 SEP 1996

ROLE OF LACTIC ACID BACTERIA IN SOY SAUCE FERMENTATION

THITIWAN SUKTHAVORN

ได้รับมอบวิทยานิพนธ์
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

TH
T448 ร
1996

Copyright by Mahidol University

36358

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของแลคติคแอสิดแบคทีเรียในขบวนการหมักซีอิ๊ว
ผู้วิจัย ฐิติวรรณ สุขถาวร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
ผศ.ดร. อภิญญา อัศวนิก
ศ.ดร. อมเรศ ภูมิรัตน
ศ.ดร. ทิม ดับบลิว เฟลเกล
วันที่สำเร็จการศึกษา 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

ซีอิ๊วเป็นซอสปรุงรสที่ได้รับความนิยมทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบทวีปเอเชีย การหมักซีอิ๊วเป็นผลของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดทำงานร่วมกัน ได้แก่ เชื้อรา เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย และยีสต์ การหมักซีอิ๊วของไทยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาใช้หัวเชื้อราบริสุทธิ์ เฉพาะในขั้นต้นของการหมัก และปล่อยให้การหมักเป็นไปตามธรรมชาติจนสิ้นสุดขบวนการ ดังนั้น เพื่อที่จะพัฒนาคุณภาพและรักษาผลิตภัณฑ์จึงพยายามทำหัวเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ซึ่งจะควบคุมการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น รวมทั้งช่วยลดระยะเวลาในการหมักอีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้งหมด และจำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมด รวมทั้ง ค่า pH และ ปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติค นอกจากนั้นยังทำการแยกและจำแนกชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จากตัวอย่างซีอิ๊วอายุต่าง ๆ กัน ตั้งแต่เริ่มต้น จนถึงวันสุดท้ายของการหมักโคจิในน้ำเกลือ (การหมักโมโรมิ) รวมทั้งสิ้น 132 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากโรงงานซีอิ๊ว 2 แห่ง คือ A และ B ในเขตกรุงเทพ ผลปรากฏว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15-BHI อยู่ในช่วง $3.3x10^5$ - $5.3x10^6$ CFU/ml ในวันแรกของการหมัก จำนวนสูงสุดของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดนี้จะอยู่ระหว่าง $7.6x10^6$ - $2.0x10^9$ CFU/ml ในวันที่ 21 ถึง 41 ของการหมัก จากนั้นมีจำนวนลดลงอยู่ระหว่าง $1.0x10^3$ - $1.2x10^6$ CFU/ml ในช่วงวันสุดท้ายของการหมัก (67-120 วัน)

Copyright by Mahidol University

จำนวนเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15-MRS (ซึ่งมี cycloheximide และ sodium azide เป็นสารยับยั้ง) มีจำนวนเริ่มต้นอยู่ในช่วง $6.0x10^5$ - $3.1x10^6$ CFU/ml จากนั้นจำนวนเชื้อเหล่านี้จะลดลงจนเหลือ $1.0x10^2$ - $1.3x10^5$ CFU/ml ในช่วง 10 วันแรกของการหมัก และจำนวนสูงสุดของเชื้อเหล่านี้อยู่ระหว่าง $4.3x10^6$ - $5.0x10^8$ CFU/ml ในช่วงวันที่ 21 ถึง 41 ของการหมัก จากนั้นค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก จะมีเชื้อประมาณ 10^2 - 10^6 CFU/ml

สำหรับเชื้อยีสต์ที่พบ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10-YM มีจำนวนอยู่ในช่วง $6.0x10^2$ ถึง $3.4x10^4$ CFU/ml ในวันที่ 4 -14 ของการหมัก จากนั้นจำนวนเชื้อจะเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในช่วงแรก $8.5x10^4$ - $2.5x10^7$ CFU/ml ในระหว่างวันที่ 19-30 จำนวนเชื้อยีสต์จะลดลงและเพิ่มขึ้นสูงสุดอีกในระดับ $3.0x10^4$ - $6.8x10^5$ CFU/ml ในระหว่างวันที่ 42-91 ต่อมายีสต์จะลดลงจนมีจำนวนระหว่าง $1.0x10^2$ - $4.7x10^4$ CFU/ml ในวันสุดท้ายของการหมัก

สำหรับ pH ของน้ำหมักซีอิ๊วเหล่านี้จะอยู่ระหว่าง 5.7-6.0 ในวันแรก และ 4.8-5.4 ในวันสุดท้ายของการหมัก และมีปริมาณกรดแลคติคอยู่ในช่วง 0.1-0.8% ในวันแรก และ 1.9 ถึง 2.8% ในวันสุดท้ายของการหมัก

จากการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15-MRS ดังกล่าวข้างต้น ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 507 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 447 สายพันธุ์เป็นเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และจัดเรียงตัวเป็นแบบคู่สี่ เป็นพวก Facultative anaerobe ไม่สามารถสร้างเอมไซม์ catalase สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 °C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 °C เชื้อเหล่านี้เจริญได้ดีใน pH 9.6 และ 8.5 แต่เจริญได้น้อยมากใน pH 4.5 และไม่เจริญใน pH 4.2 เชื้อเหล่านี้ต้องเติบโตและเจริญดีในที่ๆมีเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือระหว่าง 5% ถึง 15% เชื้อเหล่านี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *Tetratogenococcus halophilus* และสามารถตรวจพบเชื้อเหล่านี้ได้ตลอดระยะเวลาของการหมักซีอิ๊ว ส่วนเชื้อที่เหลือจำนวน 60 สายพันธุ์นั้น ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสรีรวิทยาเหมือนกัน แต่มันสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ ในจำนวนนี้ถูกจัดเป็น *Micrococcus* sp. 12 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus* sp. 48 สายพันธุ์ บางสายพันธุ์ของ *Staphylococcus* sp และทุก ๆ สายพันธุ์ของ *Micrococcus* sp จะพบในช่วง 20 วันแรกของการหมัก และไม่พบเมื่อซีอิ๊วอายุเกิน 20 วัน

เชื้อ *T. halophilus* สายพันธุ์ TS71, TS72 และ NC133 ถูกคัดเลือกว่าเป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมในการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์จากข้อกำหนดดังนี้ 1) อยู่ในช่วงเวลาที่มีเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสูงที่สุด 2) สามารถเจริญได้เร็วและมากในเกลือที่มีความเข้มข้นสูงๆ และ 3) สามารถ

Copyright by Mahidol University

ใช้น้ำตาลได้หลายชนิดเพื่อการเจริญเติบโต (glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose) เชื้อทั้งสามสายพันธุ์เจริญได้ดีในเกลือความเข้มข้น 18, 15, 10, 20 และ 5 % ตามลำดับ และยังพบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปแบบและอัตราการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน

เมื่อนำสายพันธุ์ TS71 และ NC133 มาศึกษาการเจริญเติบโตร่วมกันกับเชื้อยีสต์ (*Zygosaccharomyces rouxii*) ในน้ำซีอิ๊วดิบอายุ 20 วัน พบว่า TS71 และ NC133 เจริญได้ดีมากขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับ *Z. rouxii* แต่เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Z. rouxii*

จากการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *T. halophilus* TS71 และการทำแห้งโดยวิธี Spray Dry ในขั้นต้นพบว่าจำนวนเชื้อก่อนทำ Spray Dry มีค่า $8.4x10^{7}$ CFU/ml และ ลดลงประมาณ 1 log เหลือ $5.9x10^{6}$ CFU/ml หลังการทำ Spray Dry โดยใช้ 30 % (w/v) dextrin เป็น carrier เชื้อผงเหล่านี้เก็บใน desiccator ได้นาน 3 อาทิตย์ ที่อุณหภูมิห้อง.

Copyright by Mahidol University

Thesis title Role of Lactic Acid Bacteria in Soy Sauce Fermentation

Name Thitiwan Sukthavorn

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Supervisory Committee

Apinya Assavanig, Ph.D.

Amaret Bhumiratana, Ph.D.

Timothy W. Flegel, Ph.D.

Date of Graduation 13 May B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Soy sauce is a very popular condiment worldwide especially in Asia. Japanese and Thai soy sauce processes depend on fermentation of three major microorganisms; koji mold, lactic acid bacteria and yeast. The production of Thai soy sauce nowadays utilizes pure koji mold cultivation. However, it still depends on naturally occurring lactic acid bacteria and yeast fermentations. In order to improve the process, attempts to produce pure cultures of lactic acid bacteria suitable for soy sauce fermentation have been carried out.

Copyright by Mahidol University

In this study, 132 soy sauce samples at different ages were collected during moromi fermentation from 2 factories, A and B located in Bangkok and the total bacteria, lactic acid bacteria (LAB), yeast, pH and % total acidity (expressed as % lactic acid) were determined. The results showed that the total bacterial counts on 15-BHI agars ranged from $3.3x10^5$ to $5.3x10^6$ CFU/ml on the first day of fermentation, reached a maximum of $7.6x10^6$ to $2.0x10^9$ CFU/ml during 21 to 41 days, and decreased to $1.0x10^3$-$1.2x10^6$ CFU/ml on the last day of fermentation (67 to 120 days).

The amounts of LAB on 15-MRS agars (plus cycloheximide and sodium azide) were initially about $6.0x10^5$ - $3.1x10^6$ CFU/ml and decreased to $1x10^2$- $1.3x10^5$ CFU/ml during 10 days of fermentation. The highest number of LAB ranged $4.3x10^6$ - $5.0x10^8$ CFU/ml during 21-41 days. The LAB decreased to 10^2 - 10^6 CFU/ml by the last day of fermentation.

The numbers of yeasts on 10-YM agar were $6.0x10^2$- $3.4x10^4$ CFU/ml from 4 -14 days and gradually increased to the maximum of $8.5x10^4$ to $2.5x10^7$ CFU/ml during 19-30 days. The amount of yeast decreased and increased again to the maximum of $3.0x10^4$ - $6.8x10^5$ CFU/ml during 42-91 days. The yeast decreased to $1.0x10^2$ to $4.7x10^4$ CFU/ml by the last day of fermentation.

Copyright by Mahidol University

The samples had pH around 5.7 - 6.0 and 4.8 - 5.4 and lactic acid about 0.1 - 0.8% and 1.9 - 2.8% on the first day and last day of fermentation, respectively.

Lactic acid bacteria were isolated and identified from 15-MRS agar plates plus inhibitors. Among 507 isolates, 447 strains were gram positive cocci that occurred in tetrads, pairs and rarely as single cells. They were facultatively anaerobic, did not produce catalase and grew well in 15-MRS broth at 37 °C, but not at 45 °C. They also grew at pH 9.6 and 8.5, but grew very weakly at pH 4.5, and could not grow at pH 4.2. These strains were identified as *Tetratogenococcus halophilus*. They could be detected through out the fermentation period. The remaining isolates (60 strains) showed similar morphological characteristics but produced catalase and were identified as *Micrococcus* sp. (12 strains) and *Staphylococcus* sp. (48 strains).

Most *Staphylococcus* sp. and all *Micrococcus* sp. were found at the early stage of fermentation (1-20 days) and disappeared after 20 days

Tetratogenococcus halophilus strains TS71, TS72 and NC133 were selected under the following criteria, a) present at the time of maximum concentration of lactic acid bacteria, b) good growth at high salt concentration, and c) capability to use various types of carbohydrates, i.e., glucose, fructose, lactose, maltose and sucrose. For all 3 strains, growth from best to worst with salt was 18%, 15%, 10%, 20% and 5% NaCl. The

Copyright by Mahidol University

growth rates and characteristics of these 3 strains were similar in these specified salt media. In addition, for TS71 or NC133 mixed with *Zygosaccharomyces rouxii* in 20 day-old soy sauce, incubated at 37 °C for 3 days, growth of TS71 or NC133 was promoted in the presence of *Z. rouxii*.

A spray dried formulation of *T. halophilus* TS71 could be prepared by using 30% w/v of dextrin as carrier, the inlet and outlet temperatures were about 80 °C and 54 °C, respectively. The number of viable cells was $8.4x10^7$ CFU/ml before spray drying and decreased by 1 log to $5.9x10^6$ CFU/ml after spray drying. Viability gradually decreased within 3 weeks upon stroage in a desiccator at room temperature.

Copyright by Mahidol University