ยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้

ภารดา อุทโท[a] อำไพทิพย์ สุขหอม[a] พิมพ์พิมล เพ็ญจำรัส[b] และ ประเสริฐ สันตินานาเลิศ[a*]

Yeasts Isolated from Fermenting Soybean Curd (Sufu)

Prada Utto[a], Ampaitip Sukhoom[a], Pimpimol Penjamras[b] and Prasert Suntinanalert[a*]

[a]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[b]ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[a]Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112.

[b]Center of Scientific Equipments, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112.

*Corresponding Author. E-mail address: prasert.s@psu.ac.th

Received 29 September 2011; accepted 29 May 2012

บทคัดย่อ

การตรวจหาปริมาณยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ ตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักเป็นเวลา 9 เดือน บนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ที่เติม tetracycline 20 μg /ml และเกลือ (NaCl) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน สามารถตรวจพบยีสต์ตลอดการหมัก และมีปริมาณอยู่ระหว่าง 4.9-6.9, 5.8-6.9 และ 5.4-6.9 log CFU/g บนอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ตามลำดับ และได้แยกยีสต์ทั้งหมด 65 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ทนเกลือความเข้มข้นระหว่าง 10-20% และมี 7 สายพันธุ์ (10.8%) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือไขมัน แต่ไม่มียีสต์สายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้ง และได้คัดเลือกยีสต์ที่มีศักยภาพในการให้กลิ่นเฉพาะคล้ายเต้าหู้ยี้มา 11 สายพันธุ์ โดยนำมาระบุชนิดด้วยวิธีการตรวจหา % ความเหมือนกันของลำดับเบส 26S rDNA พบว่าเป็นยีสต์ *C. versatilis* 4 สายพันธุ์ (PS1505, PS1503, PS1544 และ PS15108), *C. parapsilosis* 1 สายพันธุ์ (PS1524), *P. farinosa* 4 สายพันธุ์ (PS1534, PS1539, PS1593 และ PS15102) และ *Z. rouxii* 2 สายพันธุ์ (PS1522 และ PS1578) และได้คัดเลือกยีสต์เพียง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. versatilis* PS1505, *C. parapsilosis* PS1524, *P. farinosa* PS1534 และ PS15102 และ *Z. rouxii* PS1578 เพื่อศึกษาการผลิตกลิ่นรสของเต้าหู้ยี้ในรูปสารระเหย โดยการสกัดสารด้วยวิธี solid phase micro-extraction (SPME) และวิเคราะห์ชนิดด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ผลปรากฏว่ายีสต์สามารถผลิตสารระเหยได้ทั้งหมด 11 ชนิด ประกอบด้วย alcohols 2 ชนิด, esters 6 ชนิด และสารอื่น ๆ อีก 3 ชนิด โดยสาร esters ที่ผลิตในปริมาณมาก คือ ethyl octanoate (15.8%) และ isobutyl phthalate (15.7%)

คำสำคัญ: ยีสต์ เต้าหู้ยี้ *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*

Abstract

A number of yeasts were isolated from fermenting soybean curds (sufu) and quantitated on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) added with 20 μg/ml tetracycline and salt (NaCl) at various concentrations. The yeasts found from the beginning until the end of fermentation for nine months were between 4.9-6.9, 5.8-6.9 and 5.4-6.9 log CFU/g on media containing salt concentrations of 0, 5 and 10%, respectively. All of the isolated yeasts (65 strains) were halotolerant of salt concentrations between 10-20%. Interestingly, only 7 strains (10.8%) of the yeasts could exhibit proteolytic or lipolytic activity but none of those showed amylolytic activity. Moreover, the potential 11 yeast strains were selected for further identification by % identity of DNA sequence of 26S rDNA according to the frequently found and produced most typical aroma of soybean curd on solid and liquid media. They were identified as *C. versatilis* PS1505, PS1503, PS1544 and PS15108 (4 strains), *C. parapsilosis* PS1524 (1 strain), *P. farinosa* PS1534, PS1539, PS1593 and PS15102 (4 strains) and *Z. rouxii* PS1522 and PS1578 (2 strains). The five potential strains of *C. versatilis* PS1505, *C. parapsilosis* PS1524, *P. farinosa* PS1534 and PS15102, and *Z. rouxii* PS1578 were selected and evaluated a role in the production of aroma as volatile compounds using solid phase micro-extraction (SPME) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 11 compounds were detected as alcohols (2 compounds), esters (6 compounds) and other compounds (3 compounds), of which, ethyl octanoate (15.8%) and isobutyl phthalate (15.7%) were the highest quantity of esters.

Keywords: yeasts, soybean curd (sufu), *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*

บทนำ

เต้าหู้ยี้ หรือ Sufu เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวจีน ทำมาจากเต้าหู้ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน เต้าหู้ยี้มีรสชาติ กลิ่น สีที่ดี จึงนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในเอเชีย กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันไปตามสูตรของแต่ละโรงงานเนื่องจากได้รับการถ่ายทอดมาในระบบครอบครัว แต่สำหรับการผลิตเต้าหู้ยี้แบบดั้งเดิมนั้น ทำโดยการเตรียมหัวเชื้อราจากข้าวที่หุงสุกแล้วทิ้งให้เย็น เกลี่ยลงบนกระด้ง วางทิ้งไว้ในห้องเฉพาะซึ่งมีเชื้อราประจำถิ่นเป็นเวลา 7-15 วัน จากนั้นเตรียมเต้าหู้โดยใช้ถั่วเหลือง แช่น้ำ 6 ชั่วโมง นำไปบดในโม่หิน ต้มให้

เดือดในน้ำ กรองเอาเปลือกออกแล้วใส่ดีเกลือ (magnesium sulfate) วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในบล็อก เมื่อเต้าหู้แข็งตัว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วตัดเต้าหู้เป็นชิ้นขนาด 3 x 3 x 2.5 ซม. นำเต้าหู้และหัวเชื้อที่เตรียมไว้เรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยวางเรียงสลับกัน ระหว่างเต้าหู้และหัวเชื้อพร้อมโรยเกลือ แล้วหมักทิ้งไว้กลางแดดเป็นเวลา 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มีกลิ่นรสชาติที่ดีและ มีสีเหลือง (ประเสริฐ และคณะ, 2548) ส่วนการผลิตเต้าหู้ยี้แดงนั้น ให้ใส่ข้าวแดง (อังกั๊ก) ที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ซึ่งให้สารสีแดงของ monascarubrin แล้วบ่มต่อ อีก 40-60 วัน จะทำให้เต้าหู้ยี้เกิดสีแดงมีกลิ่นรสที่น่ารับประทานยิ่งขึ้น จากนั้นบรรจุลงขวดแก้วปากกว้างและต้มในน้ำเดือดหรือพาสเจอร์ไรส์เพื่อฆ่าเชื้อก่อนนำไปจำหน่าย ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย รา และ ยีสต์อยู่ระหว่าง 10^1-10^5, 10^1-10^5 และ 10^3-10^5 CFU/g ตามลำดับ (ประเสริฐ และคณะ, 2548) เชื้อราที่ตรวจพบ ได้แก่ *Actinomucor elegans*, *Mucor sufu*, *M. hiemalis*, *M. silvaticus*, *M. subtilissimus*, *A. taiwanensis* (Chou et al., 1988) และ *Rhizopus* spp. (Han et al., 2001) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ ได้แก่ *Bacillus* และ *Micrococcus* spp. (Han et al., 2001; Han et al., 2004; Shi & Fung, 2000) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ประเสริฐ และคณะ (2548) ได้รายงานชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Pediococcus* และ *Saccharomyces* spp. และสามารถตรวจพบยีสต์ในปริมาณมาก (10^3-10^5 CFU/g) จึงนำมาซึ่งความสนใจในการศึกษาปริมาณและสมบัติของยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเป็นการตรวจหาปริมาณและระบุชนิดของยีสต์ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้และตรวจหาสมบัติของยีสต์ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้งและไขมัน รวมทั้งตรวจหาชนิดของสารระเหยที่ให้กลิ่นรสของยีสต์ที่แยกได้ระหว่างการหมัก

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ประมาณ 100 กรัม จากตุ่มหมักใบเดียวกันของโรงงานเต้าหู้ยี้ อ.เมือง จ.สงขลา โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก 9 เดือน รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง และทุกการทดลองได้ทำ 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

2. การตรวจหาปริมาณยีสต์

การตรวจนับปริมาณยีสต์ โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บีบให้เต้าหู้ยี้ละเอียด แล้วเติมอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Difco) (SDB ปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย peptic digest of animal tissue 5.0 กรัม pancreatic digest of casein 5.0 กรัม และ dextrose 20.0 กรัม pH 5.6) ที่เติมมีเกลือ (NaCl) 5% จำนวน 225 มล. แล้วเจือจางแบบ 10 เท่าใน SDB ที่เติมเกลือ 5% และดูดมา 0.1 มล. กระจายเชื้อบนอาหารแข็ง SDA ที่เติม tetracycline (Fluka) 20 μg/ml (เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย) และมีเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 1-5 วัน โดยตรวจดูผลทุกวัน ทำการนับจำนวนและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะต่างกันโดยดูลักษณะโคโลนี สีและขนาด แล้วทำเชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บไว้ที่ -70˚C ในอาหาร SDB ที่เติม 15% glycerol เพื่อศึกษาต่อไป

3. การทดสอบสมบัติของยีสต์ที่แยกได้

3.1 การทดสอบการเติบโตของยีสต์ในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเพาะเชื้อยีสต์ที่แยกได้บนอาหาร SDA ที่มีเกลือความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูผลการเติบโตทุกวัน

3.2 การทดสอบการเติบโตของยีสต์ในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว SDB และบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45˚C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจดูผลการเติบโตของเชื้อโดยการดูความขุ่นด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมเชื้อ

3.3 การทดสอบการเติบโตของยีสต์ใน pH ต่าง ๆ โดยถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเหลว SDB ที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจดูผลการเติบโตของเชื้อโดยการดูความขุ่นด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมเชื้อ

3.4 การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบความยาวประมาณ 1 ซม. ลงบนอาหารแข็ง GM medium (GM ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม, peptone 10.0 กรัม D-glucose 10 กรัม และ agar 15.0 กรัม pH 6.2) โดยการเติมแหล่งคาร์บอนแทน glucose ได้แก่ 1% skim milk, 1% corn starch หรือ 1% tween 80 เพื่อทดสอบการย่อยโปรตีน แป้ง หรือ ไขมัน ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)

4. การระบุชนิดของยีสต์ที่แยกได้

นำยีสต์ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้มาจำแนกตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง SDA สังเกตสี ขอบ รูปร่าง ผิวหน้า และการเป็นเมือกของโคโลนี ศึกษาลักษณะการเติบโตที่ผิวหน้าอาหารเหลว (pellicle) หรือตกตะกอน (flocculation) ที่ก้นหลอด ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำเซลล์มาย้อมด้วย lactophenol cotton blue ศึกษาการสร้าง ascospore โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร McClary's Acetate agar, Gorodkowa agar, Corn meal agar และ 5% Malt extract agar (Difco) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30˚C อ่านผลทุกวันจนครบ 7 วัน

ส่วนการระบุชนิดของยีสต์ในระดับสปีชีส์โดยใช้วิธีการ

ตรวจความเหมือนกันของลำดับเบส 26S rDNA (large subunit 26S rDNA) โดยการสกัด genomic DNA จากยีสต์ แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ forward primer NL-1 (F63) (5'-CATATCAATAA GCGGAGGAAAAG) และ reverse primer NL-4 (LR-3) (5'-GGTCCGTGTTTCAAGGACGG) ซึ่งเป็น conserved sequence บริเวณ D1/D2 region ของ 26S rDNA (Kurtzman & Robnett, 1997) แล้วทำ PCR reaction และตรวจลำดับเบสของ DNA product ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2007) จากนั้นเลือกที่ nucleotide-nucleotide blast ซึ่งจะทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน (% identity) ระหว่างเชื้อตัวอย่างกับเชื้ออื่น ๆ ที่มีในฐานข้อมูล

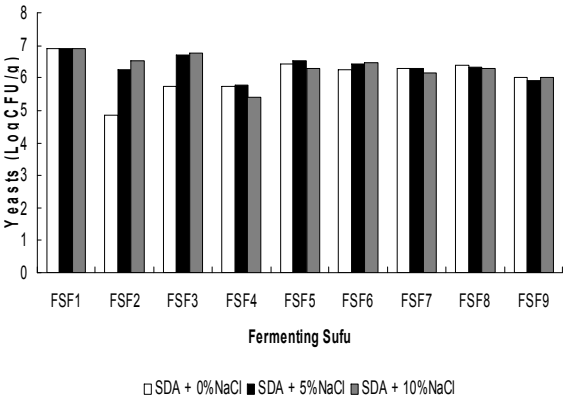
5. การตรวจสารระเหยที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้

คัดเลือกยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่ตรวจพบบ่อยในกระบวนการหมัก และให้กลิ่นคล้ายเต้าหู้ยี้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA (ทำการทดสอบโดยการดมกลิ่น) ได้แก่ *Candida versatilis* PS1505, *C. parapsilosis* PS1524, *Pichia farinosa* PS1534 และ PS15102 *Zygosaccharomyces rouxii* PS1578 และ *Saccharomyces cerevisiae* MI201 (เชื้อเปรียบเทียบ) แล้วนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารให้กลิ่นรส โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร SDB ปริมาตร 100 มล. ปรับ pH 5.6 แล้วเติม 10% เชื้อเริ่มต้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30°C เขย่าที่ 90 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่าง 10 มล. ที่ช่วงเวลา เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 µm แล้วนำ filtrate ไปทำการสกัดสารระเหย (volatile compounds) และกรดอินทรีย์ ดังนี้ ทำการสกัดสารระเหยที่ให้กลิ่นรสด้วย solid phase microextraction (fibre 100 µm polydimethylsiloxane coating) โดยแช่ตัวอย่างสารในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 45 นาที ตามวิธีของ Szkudlarz et al. (2003) นำสารระเหยที่เกาะติดอยู่บนไฟเบอร์ ไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS (Chung et al., 2005) โดยใช้คอลัมน์ HP-Innowax ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มม. และความหนาของฟิลม์ 0.25 µm โดยใช้อุณหภูมิของหัวฉีดเท่ากับ 250°C และมีก๊าซฮีเลียม เป็นตัวพา โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 10°C ต่อนาที จนถึง 200 °C หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 15°C ต่อนาที จนถึง 250 °C เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ mass range ของเครื่อง mass spectrometer อยู่ในช่วง 35-550 amu. (atomic mass units) ส่วนการระบุชนิดของสารระเหยที่ตรวจพบทำได้โดยการเทียบกับ standard library spectra จาก database Wiley 275.L ส่วนการตรวจหากรดอินทรีย์ของยีสต์ โดยนำ filtrate มาเจือจางด้วย methanol ในอัตราส่วน 1:50 แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น

ผลการทดลอง

1. การตรวจหาปริมาณยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การตรวจหาปริมาณยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักบนอาหาร SDA ที่เติม tetracycline 20µg/ml และเติมเกลือ 0, 5 และ 10% (รูปที่ 1) พบว่ายีสต์มีปริมาณระหว่าง 4.9-6.9, 5.8-6.9 และ 5.4-6.9 log CFU/g ตามลำดับ โดยบนอาหาร SDA ที่มีเกลือ 0% มีเชื้อเริ่มต้น 6.9 log CFU/g แล้วลดลงต่ำสุด 4.9 log CFU/g ในเดือนที่ 2 และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเดือนที่ 9 ส่วนอาหาร SDA ที่มีเกลือ 5% มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 6.9 log CFU/g แล้วลดลง 5.8 log CFU/g ในเดือนที่ 4 ส่วนในเดือนที่ 5-9 เชื้อจะมีจำนวนคงที่ ส่วนบนอาหาร SDA ที่มีเกลือ 10% มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 6.9 log CFU/g แล้วลดลง 5.4 log CFU/g ในเดือนที่ 4 ส่วนในเดือนที่ 5-9 เชื้อจะมีจำนวนคงที่



รูปที่ 1 ปริมาณยีสต์ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักเดียวกันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง SDA ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน: FSF1 (1 เดือน), FSF2 (2 เดือน), FSF3 (3 เดือน), FSF4 (4 เดือน), FSF5 (5 เดือน), FSF6 (6 เดือน), FSF7 (7 เดือน), FSF8 (8 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)

2. การศึกษาสมบัติของยีสต์ที่แยกได้

ยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ มีทั้งหมด 65 สายพันธุ์ แล้วนำมาศึกษาสมบัติดังนี้

2.1 การเติบโตของยีสต์บนอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 1) พบว่ายีสต์ ทั้ง 65 สายพันธุ์ (100%) เติบโตได้ดีบนอาหารที่มีการเติมเกลือ 0 และ 5 และ 10% มี 60 สายพันธุ์ (92.3%) เติบโตได้ดีบนอาหารที่มีการเติมเกลือ 15% และมี 54 สายพันธุ์ (83.1%) เติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 20% ซึ่งจัดยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดเป็นยีสต์ทนเกลือ (halotolerant yeasts)

2.2 การทดสอบการเติบโตของยีสต์บนอาหารเหลว SDB ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่ายีสต์สามารถเติบโตดีที่อุณหภูมิ 25°C มี 61 สายพันธุ์ (93.9%) ที่อุณหภูมิ 30 °C มี 65 สายพันธุ์ (100%), ที่อุณหภูมิ 35°C มี 62

สายพันธุ์ (95.4%), ที่อุณหภูมิ 40°C มี 51 สายพันธุ์ (78.5%) และ ที่อุณหภูมิ 45°C มี 46 สายพันธุ์ (70.8%)

2.3 การทดสอบการเติบโตของยีสต์บนอาหารเหลว SDB ที่ pH ต่างๆ กัน พบว่ามียีสต์ที่เติบโตได้อยู่ในช่วง pH 2 - pH 8 โดยยีสต์ที่สามารถเติบโตที่ pH 2 มี 34 สายพันธุ์ (52.3%), ที่ pH 3 มี 46 สายพันธุ์ (70.8%), ที่ pH 4 มี 61 สายพันธุ์ (93.9%), ที่ pH 5 มี 65 สายพันธุ์ (100%), ที่ pH 6 มี 64 สายพันธุ์ (98.5%), ที่ pH 7 มี 50 สายพันธุ์ (76.9%) และ ที่ pH 8 มี 43 สายพันธุ์ (66.2%)

2.4 การทดสอบย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่ายีสต์สามารถย่อยโปรตีน ได้ 7 สายพันธุ์ (10.8%) โดยมี degree of hydrolysis อยู่ระหว่าง 1.3 - 12 ส่วนอีก 7 สายพันธุ์ (10.8%) สามารถย่อยไขมัน tween 80 โดยมี degree of hydrolysis เท่ากับ 2.4 และ 2.3 แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้งได้

ตารางที่ 1 สมบัติของยีสต์ที่แยกได้ 65 สายพันธุ์ จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

สมบัติ	%จำนวนสายพันธุ์ที่ให้ผลบวก
การเติบโตบนอาหารที่มีเกลือ 0%	100 (65/65)
การเติบโตบนอาหารที่มีเกลือ 5%	100 (65/65)
การเติบโตบนอาหารที่มีเกลือ 10%	100 (65/65)
การเติบโตบนอาหารที่มีเกลือ 15%	92.3 (60/65)
การเติบโตบนอาหารที่มีเกลือ 20%	83.1 (54/65)
การเติบโตที่ อุณหภูมิ 25°C	93.9 (61/65)
การเติบโตที่ อุณหภูมิ 30°C	100 (65/65)
การเติบโตที่ อุณหภูมิ 35°C	95.4 (62/65)
การเติบโตที่ อุณหภูมิ 40°C	78.5 (51/65)
การเติบโตที่ อุณหภูมิ 45°C	70.8 (46/65)
การเติบโตที่ pH 2	52.3 (34/65)
การเติบโตที่ pH 3	70.8 (46/65)
การเติบโตที่ pH 4	93.9 (61/65)
การเติบโตที่ pH 5	100 (65/65)
การเติบโตที่ pH 6	98.5 (64/65)
การเติบโตที่ pH 7	76.9 (50/65)
การเติบโตที่ pH 8	66.2 (43/65)
การย่อยโปรตีน skim milk	10.8 (7/65)
การย่อยแป้ง corn starch	0 (0/65)
การย่อยไขมัน tween 80	10.8 (7/65)

3. การระบุชนิดของยีสต์ที่แยกได้

ได้คัดเลือกยีสต์ 11 สายพันธุ์ โดยอาศัยสมบัติของยีสต์ที่ตรวจพบบ่อยในกระบวนการหมักและให้กลิ่นเฉพาะคล้ายเต้าหู้ยี้บนอาหารแข็งและอาหารเหลวซึ่งทดสอบโดยการดมกลิ่น โดยนำยีสต์ไปทำการตรวจหาลำดับเบสของ 26S rDNA (ตารางที่ 2) พบว่าสามารถเทียบเคียงชนิดของยีสต์เป็น *C. versatilis* 4 สายพันธุ์ (PS1505, PS15103, PS1544 และ PS15108) (ความเหมือนกัน 100%), *C. parapsilosis* 1 สายพันธุ์ (PS1524) (ความเหมือนกัน 99%), *P. farinosa* 4 สายพันธุ์ (PS1534, PS1539, PS1593 และ PS15102) (ความเหมือนกัน 99%) และ *Z. rouxii* 2 สายพันธุ์ (PS1522 และ PS1578) (ความเหมือนกัน 100%)

ตารางที่ 2 การจำแนกยีสต์ 11 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ซึ่งระบุชนิดโดยวิธีการตรวจหาลำดับเบส 26S rDNA

ชื่อเชื้อยีสต์	จำนวนสายพันธุ์	ความหมือนกัน (%)
C. versatilis PS1505, PS1503, PS1544, PS15108	4	100
C. parapsilosis PS1524	1	99
P. farinosa PS1534, PS1539, PS1593, PS15102	4	99
Z. rouxii PS1522, PS1578	2	100

4. การตรวจหาสารระเหยที่ผลิตจากยีสต์ที่แยกได้

การตรวจหาสารระเหยโดย GC-MS นั้น ในการทดลองนี้ระบุชนิดเฉพาะสารระเหยที่มีปริมาณมากกว่า 80% quality และวัดปริมาณของสารแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) เนื่องจากไม่ได้ทำกราฟมาตรฐานของสารตัวอย่างที่ตรวจพบ และผลปรากฏว่ายีสต์ 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ผลิตสารระเหยทั้งหมดมี 11 ชนิด (สารที่ซ้ำกันนับเป็นชนิดเดียว) (ตารางที่ 3) ประกอบด้วย alcohols 2 ชนิด, esters 6 ชนิด และสารอื่นๆ อีก 3 ชนิด โดยสาร esters ที่ผลิตในปริมาณมาก คือ ethyl octanoate (15.8%) และ isobutyl phthalate (15.7%) ซึ่งสารระเหยที่ผลิตโดยเชื้อ *C. versatilis* PS1505 มี esters 5 ชนิด, *C. parapsilosis* PS1524 มี alcohol 1 ชนิด และสารอื่น 1 ชนิด, *P. farinosa* PS1534 มี esters 2 ชนิด, *P. farinosa* PS15102 มี esters 3 ชนิด, *Z. rouxii* PS1578 มี alcohol 1 ชนิด และสารอื่น 2 ชนิด ส่วนยีสต์ที่นำมาเปรียบเทียบ *S. cerevisiae* MI201 ผลิตสารระเหยทั้งหมด 14 ชนิด ได้แก่ alcohols 5 ชนิด hydrocarbons 3 ชนิด และ esters 6 ชนิด

ตารางที่ 3 การผลิตสารระเหยของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร SDB บ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยการเขย่าที่ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	สารระเหย (%)
1. *C. versatilis* PS1505	Ethyl octanoate (15.8%), Isobutyl phthalate (11.0%), Methyl hexanoate (6.5%), Methyl dodecanoate (6.5%), Methyl octadecanoate (2.2%)
2. *C. parapsilosis* PS1524	1-Pentadecanol (1.3%), Octyl phenol isomer (13.9%)
3. *P. farinosa* PS1534	Isobutyl phthalate (15.7%), Methyl octadecanoate (3.2%)
4. *P. farinosa* PS15102	Butyl 2-ethylhexyl phthalate (10.7%), Isobutyl phthalate (10.7%), Methyl octadecanoate (3.3%)
5. *Z. rouxii* PS1578	Isoamyl alcohol (5.2%), Phenol 3,5-bis(1,1-dimethylethyl) (9.6%), 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexane,2,6,10,15,19,23-hexamethyl (0.8%)
6. *S. cerevisiae* MI201	Isoamyl alcohol (14.1%), 1-Hexadecanol (4.1%), 1-Heptadecanol (4.1%), 1-Pentadecanol (4.1%), 1-tetradecanol (4.1%), Cyclohexadecene (4.1%), Cyclotridecene (4.1%), 9-Octadecene (4.1%), Butyl 2-ethylhexyl phthalate (5.9%), Isobutyl phthalate (6.0%), Methyl hexanoate (9.7%), Methyl dodecanoate (5.4%), Methyl hexadecanoate (9.7%), 1-Methylethyl tetradecanoate (4.1%)

วิจารณ์ผลการทดลอง

ยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ในการทดลองนี้มีรูปแบบของปริมาณเชื้อยีสต์ แตกต่างจากการรายงานของ ประเสริฐ และคณะ (2548) เนื่องจากการทดลองนี้ได้เติมสารปฏิชีวนะ tetracycline ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* spp. ที่สามารถตรวจพบตลอดระยะเวลาการหมัก และยังสามารถเติบโตได้ดีบนอาหาร SDA (pH 5.6) ที่ใช้เป็น selective medium สำหรับยีสต์ โดยแบคทีเรียเติบโตได้เร็วกว่าทำให้ไม่เห็นโคโลนีของยีสต์ และสิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่ง คือ การตรวจพบยีสต์ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป จำนวน 1 ตัวอย่าง (CSF1) จาก 9 ตัวอย่าง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อยีสต์เหลือรอดจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนออกจำหน่าย โดยปริมาณยีสต์ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เติมเกลือ 0, 5 และ 10% ตรวจพบปริมาณยีสต์ที่ 3.0, 3.1 และ 3.9 log CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเหมือนกับการรายงานของ ประเสริฐ และคณะ (2548) ที่ตรวจพบยีสต์ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (ชนิดเดียวกัน) มีปริมาณ 4.7 log CFU/g ซึ่งเกินมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของเต้าหู้ยี้ ซึ่งระบุว่า ปริมาณยีสต์และราไม่เกิน 2 log CFU/กรัม (100 CFU/กรัม) และ Coliform จะต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่างต่อกรัม โดยการตรวจด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) (มผช. 510/2547)

ยีสต์ที่แยกได้มีทั้งหมด 65 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ทนเกลือความเข้มข้นระหว่าง 10-20% แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ในปริมาณน้อยโดยดูจากบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น ดังนั้น ยีสต์ที่แยกได้จึงน่าจะมีบทบาทร่วมกับแบคทีเรียในการย่อยสลายสับสเตรท โดยมี *Bacillus* spp. ทำหน้าที่หลักในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ส่วนเชื้อราที่เป็นเชื้อเริ่มต้นมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนและแป้งในระยะ 2 เดือนแรกของการหมัก แล้วหลังจากนั้นจะตรวจไม่พบเชื้อรา (ประเสริฐ และคณะ, 2548) แต่เนื่องจากยีสต์ที่แยกได้ไม่สามารถย่อยแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในเต้าหู้ยี้โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งโดยแบคทีเรียและรา และสามารถใช้โปรตีนและกรดอะมิโนจากการย่อยสลายร่วมของกลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortia)

การศึกษาบทบาทของยีสต์ที่มีต่อการให้กลิ่นรสของเต้าหู้ยี้ โดยการตรวจวิเคราะห์หาสารระเหยและกรดอินทรีย์โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB พบว่ามีความแตกต่างกันของสารระเหยที่ผลิตจากยีสต์ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อและสารระเหยที่ตรวจพบในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเต้าหู้มีองค์ประกอบของสารอาหารที่ซับซ้อนและผลผลิตการหมักของจุลินทรีย์เป็นกลุ่มของสารที่เป็น acids, alcohols, aromatic compounds และ esters ที่ให้กลิ่นรสแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารที่เป็นสับสเตรทของจุลินทรีย์ ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Chung et al. (2005) ที่ตรวจหาสารระเหยในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยวิธี supercritical fluid extraction แล้ววิเคราะห์สารด้วยเครื่อง GC-MS ซึ่งพบสารระเหย 83 ชนิด และมี 68 ชนิด ที่ตรวจพบบ่อย ได้แก่ กลุ่มของ acids 15 ชนิด alcohols 17 ชนิด และ esters 16 ชนิด โดยสารระเหยที่ตรวจพบในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปในการทดลองนี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) มี 5 ชนิด ที่เหมือนกับสารที่ตรวจพบโดย Chung et al. (2005) ดังนี้ acetic acid, octadecanoic acid, ethanol, ethyl octanoate และ ethyl decanoate อีกประการหนึ่ง การตรวจพบสารระเหยที่แตกต่างกัน เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกรายงานเฉพาะสารที่มีปริมาณมากกว่า 80% quality ทำให้ไม่ได้ระบุชนิดสารที่มีปริมาณน้อยกว่าความเข้มข้นดังกล่าว

ส่วนกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นสารระเหยและสารอินทรีย์ที่อยู่ในอาหารที่สามารถรับรู้ด้วยประสาทสัมผัส ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำตาล ไขมัน และโปรตีนในอาหาร โดยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นเชื้อหลายชนิดผสมกัน (microbial consortia) ซึ่งได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ส่วนกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักอาหารมาจาก free fatty acid ที่ได้จากการย่อยสลายสารไขมันโดยเอนไซม์ย่อยไขมันที่ผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. ส่วนสารระเหย alcohols และ esters เป็นกลุ่มของสารประกอบที่พบบ่อยและเป็นผลผลิตในเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน ได้เป็น α - keto acids, aldehydes, alcohols และ esters ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก (Kranenburg et al., 2002) ส่วน ethyl ester เป็นสารประกอบที่เกิดจาก esterification ของ free fatty acids กับ ethanol, สารประกอบ furans อาจพบในเต้าหู้ยี้ให้กลิ่นคล้ายถั่วเขียว แต่รสหวานที่มีกลิ่น caramel เกิดจากปฏิกิริยา maillard reaction (Chung et al., 2005) สารประกอบ ketones มีกลิ่นเนยเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์และกลิ่นเฉพาะในอาหารที่อาจเกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโน (Kranenburg et al., 2002) นอกจากนี้การระเหยของสารที่ใช้อุณหภูมิสูงของเครื่อง GC injector อาจเกิด artifacts ของสารที่ไม่เกี่ยวกับกลิ่นรส แต่อย่างไรก็ตามสารที่เกิดมีปริมาณน้อย ส่วนสารที่ให้กลิ่นรสเฉพาะ เช่น acetic acid ให้รสเปรี้ยว, 1-hexanol ให้รสหวานและรสสมุนไพร, 2-methoxyphenol ให้กลิ่นรส alcohol, ethyl dodecanoate ให้รสสาหร่าย นอกจากนี้ กรดอะมิโนอิสระที่อยู่ในอาหารหมักให้รสเฉพาะ เช่น glutamic acid ให้รสคาวของเนื้อ (umami), aspartic acid ให้รสเปรี้ยว, glycine, alanine, threonine, proline, serine และ glutamine ให้รสหวาน ส่วน phenylalanine, tyrosine, arginine, leucine, isoleucine, valine, methionine และ histidine ให้รสขม เป็นต้น (Chung et al., 2005) ส่วนกลิ่นรสของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (CSF1) ที่ทำเปรียบเทียบในการทดลองนี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) มีกลิ่นเฉพาะของแอลกอฮอล์ (ethanol 73.3%) กลิ่นคล้ายผลไม้ของ ester (isopropyl myristate 73.3% และ ethyl octanoate 3%) และให้กลิ่นรสเปรี้ยวของกรด (octadodecanoic acid 16.8%) นอกจากนี้ Chung et al. (2005) ได้ตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยวิธี GC-FID (Gas chromatography - flame ionization detector - olfactometry analyses) และได้ระบุว่าเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีสาร 5 ชนิดที่ให้กลิ่นเฉพาะที่สำคัญและโดดเด่น (dominant odour) คือ acetic acid, methional, ethyl (Z, Z)-9,12-octadecadienoate, ethyl (Z)-9-ocatadecenoate และ 3-methylbutanoic acid

สรุปผลการทดลอง

ยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ เป็นยีสต์ทนเกลือความเข้มข้น 10-20% และมียีสต์เพียง 10.8% ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือไขมัน แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้ง และยีสต์ที่แยกได้สามารถผลิตสารระเหยสำคัญในกลุ่ม alcohols และ esters ซึ่งมีบทบาทในการกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กลิ่นรสของเต้าหู้ยี้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2549 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

เต้าหู้ยี้ มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช 510/2547). (2547). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ) กระทรวงอุตสาหกรรม. Retrived September 20, 2011, from http://app.tisi.go.th/otop/pdf_file/tcps 510_47.pdf

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, ชาคริยา ฉลาด, สิริพร ภูมธ, สุวรรณี แสงแก้ว และอำไพทิพย์ สุขหอม. (2548). จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้ที่หมักแบบดั้งเดิม. *วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 27*(2), 263-375.

Chung, H.Y., Fung, P.K. & Kim, J.S. (2005). Aroma impact components in commercial plain sufu. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1684-1691.

Chou, C.C., Ho, F.M. & Tsai, C.S. (1988). Effects of temperature and relative humidity on the growth of and enzyme production by *Actinomucor taiwanensis* during sufu pehtze preparation. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 688-692.

Han, B.Z., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. & Nout, M.J.R. (2001). Microbiological safety and quality of commercial Sufu- a Chinese fermented soybean food. *Journal of Food Control*, 12, 541-547.

Han, B.Z., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. & Nout, M.J.R. (2004). Microbial change during the production of sufu-a chinese fermented soybean food. *Journal of Food Control*, 15, 265-270.

Kranenburg, R.V., Kleerebezem, M., Vlieg, J.V.K., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., & Siezen, R.J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12, 111-121.

Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5, end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1216-1223.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Retrieved November 29, 2007, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Shi, X. R. & Fung, D. Y. C. (2000). Control of food borne pathogens during sufu fermentation and aging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(5), 399-425.

Szkudlarz, S., Jelen, H., Wojtasiak, Z. & Wasowicz, E. (2003). Application of headspace-solid phase microextraction and multivariate analysis for plant oils differentiation. *Food Chemistry*, 83, 515-522.

Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (Eds.). *The Yeast: A Taxonomic study* (4th ed, pp.77-100). Amsterdam: Elsevier science.