บทคัดย่อ

วานิลลินเป็นสารให้กลิ่นรสที่นิยมใช้มากที่สุดในโลก โดยสะสมอยู่ในฝักสดในรูปสารกลูโควานิลลินที่ไม่มีกลิ่นหอม ปัจจัยที่อาจมีผลต่อปริมาณวานิลลินที่ได้ในระหว่างการบ่ม ได้แก่ ปริมาณสารกลูโควานิลลินที่สะสมในฝักสด กิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างการบ่ม ตลอดจนชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของฝักซึ่งข้อมูลของการวิจัยก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่า เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase; β-glu) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดต่อการเปลี่ยนสารกลูโควานิลลินให้เป็นสารวานิลลิน นอกจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสหรือเซลลูเลสที่อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารวานิลลินที่พบในระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ β-glu การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวฝักวานิลลากับปริมาณวานิลลินในระหว่างการบ่ม โดยทำการ killing ฝักวานิลลาที่มีอายุเก็บเกี่ยว 11 เดือน ด้วยน้ำร้อน 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำฝักไปเก็บในกล่องไม้ที่มีฝาปิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไป sweating ด้วยการตากแดดนาน 4 ชั่วโมง ทำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำฝักที่ได้ไปผึ่งที่อุณหภูมิห้องนาน 10-20 วัน (drying) แล้วเก็บฝักในกล่องไม้นาน 3 เดือน (conditioning) จากผลการทดลองพบว่าในฝักสดมีปริมาณกลูโควานิลลินและกิจกรรมเอนไซม์ β-glu ในระดับสูงสุดเท่ากับ 126.21 $mg.g^{-1}$ DW และ 1,305.02 µmol 4-nitrophenol.min^{-1}mg $protein^{-1}$ ตามลำดับ แต่ภายหลังจากการ killing กิจกรรมเอนไซม์ β-glu ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามหลังจากนำฝักที่ผ่านการ killing ไปเก็บในกล่องไม้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glu เพิ่มขึ้น โดยมีกิจกรรมระดับเดียวกันกับฝักสด หลังจากนั้นพบว่ากิจกรรมลดลง 5 เท่าของฝักสด เมื่อผ่านขั้นตอน sweating drying และ conditioning โดยมีค่าเฉลี่ย 240.32 µmol 4-nitrophenol.min^{-1}mg $protein^{-1}$ สำหรับเอนไซม์ cellulose และ peroxidase มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดภายหลังจากการ killing และหลังจากเก็บในกล่องไม้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่ามากกว่าฝักสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วานิลลินมีปริมาณสูงที่สุดในขั้นตอนหลังจากนำฝักที่ killed แล้วไปเก็บในกล่องไม้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและหลังจากการ sweating ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในผิวฝักวานิลลาสดพบว่าส่วนใหญ่คือแบคทีเรีย *Bacillus* ภายหลังการทำให้ฝักวานิลลาเหี่ยวทันที จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์และเชื้อราลดลงมากกว่า 1 ใน 3 ของประชากรเชื้อที่พบในฝักสด แต่ภายหลังการทำให้เหี่ยว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบยีสต์และรา ในทางตรงข้ามพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มมากขึ้นเท่ากับฝักสด และมีปริมาณคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการบ่ม เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารวานิลลิน กับกิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสและประชากรจุลินทรีย์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการบ่ม พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อแบคทีเรียที่ผิวฝักวานิลลามีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารวานิลลิน แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารวานิลลิน แสดงว่าการไฮโดรไลซ์สารกลูโควานิลลินเป็นวานิลลินในระหว่างกระบวนการบ่มไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพียงชนิดเดียว

คำสำคัญ การบ่ม วานิลลิน เบต้ากลูโคซิเดส จุลินทรีย์

Abstract

Vanillin is the most popular flavor in the world. It is conjugated to a glucose residue to form a complex molecule of glucovanillin, performing odorless. Natural vanillin is obtained by curing of vanilla beans. The content of vanillin may be influenced by many factors such as glucovanillin content, the activities of key enzyme during curing process and type or population of microorganisms in the surface of bean. The previous studies indicated that β-glucosidase (β-glu) plays a major role in the conversion of glucovanillin to vanillin during bean curing. However, some microorganisms could produce β-glu and cellulase enzymes. Therefore we proposed to study the relationship between β-glu activities, the types and population of microorganisms and vanillin content in vanilla at each step throughout the curing process. Eleven months-old vanilla beans after hand pollination were collected and dipped in 65^{o}C hot water for 3 min (killing step), and held in a closed wooden box for 24 h at RT (27±2 ^{o}C). Thereafter, the treated beans were put into hot oven at 65^{o}C (sweating step) for 4 h during 7 consecutive days. The sweated beans were placed in ambient condition to be slow dried (drying step) for 10-20 days before keeping in a wooden box for 3 months (conditioning step) at RT. The results showed that fresh beans exhibited the highest levels of glucovanillin content and β-glu activity (126.21 mg g^{-1}dry weight; and 1,305.02 μmol 4-nitrophenol.min^{-1}mg protein^{-1}, respectively). β-glu activity decreased significantly after hot water dips during the killing step. Surprisingly, the β-glu activity in treated beans was recovered to the initial level as found in fresh beans after incubating in a wooden box for 24 h. β-glu activity decreased nearly five times of fresh bean (avg. 240.32 μmol 4-nitrophenol. min^{-1} mg protein^{-1}) during the sweating, drying and conditioning steps. On the orther ha other enzyme such as cellulase and peroxidase are increased activities to the highest levels after killing and held in a closed wooden box for 24 h with significantly higher than the fresh beans. Whereas vanillin content in cured beans was highest (90.50 mg g^{-1}dry weight) after incubating killed bean in a wooden box for 24 h and after sweating step. The results showed that almost all of the bacteria isolated from fresh bean was *Bacillus* spp. Immediately after the killing step was finished, the population of all yeasts and molds decreased more than 1 in 3 of the initial population of fresh beans but they were not detected in the killed beans kept in wooden box for 24 h, whereas the total bacteria increased to the same numbers as in fresh beans and constant after sweating and conditioning. However, the results also showed that the population of total bacteria was correlated with β-glu activity. This result suggested that bacteria correlated with enzyme associated with vanillin production. However, β-glu activity might not be one enzyme for glucovanillin hydrolysis during the curing processes.

Key words: curing, vanillin, β-glucosidase, microorganisms

ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา
(Relationship between microorganisms and enzymes associated with vanillin production in vanilla pod during curing)

บทนำ

วานิลลา (*Vanilla planifolia*) เป็นพืชเลื้อยในวงศ์กล้วยไม้ ฝักวานิลลาที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ในปี 2007 ทั่วโลกมีผลิตผลวานิลลาที่ได้คุณภาพเฉลี่ย 2,300 ตัน ประเทศที่มีการผลิตมากได้แก่ อินโดนีเซีย โดยมีปริมาณผลผลิตออกสู่ตลาดโลกมากถึง 3,700 เมตตริกตัน รองลงมาคือ ประเทศมาดากัสการ์ 2,800 เมตตริกตัน ส่วนประเทศอื่น ๆ ที่ผลิตมากได้แก่ จีน เม็กซิโกและตุรกี (FAOSTAT, 2007) แต่ราคาผลผลิตในตลาดโลกค่อนข้างผันผวน สาเหตุที่สำคัญเกิดจากการขาดแคลนวัตถุดิบที่มีคุณภาพและการแข่งขันกับกลิ่นวานิลลาสังเคราะห์ จากการสำรวจข้อมูลพบว่า ทั่วโลกมีการบริโภคสารวานิลลินสูงถึง 15,000 ตันต่อปี โดยเป็นวานิลลาจากธรรมชาติ ประมาณ 1% แนวทางการพัฒนาของวานิลลาในตลาดโลก ต้องมีการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์และการเพิ่มผลผลิตในแปลงปลูก (Loeillet, 2003; Odoux, 2003; Walton et al., 2003; Hariom et al., 2006)

ประวัติการทดลองปลูกในประเทศไทย สันนิษฐานว่านำต้นมาจากประเทศอินโดนีเซีย มาทดสอบปลูกที่สถานีทดลองพืชสวนพลิ้ว จังหวัดจันทบุรีเป็นที่แรก โดยใช้ค้างเสาซีเมนต์ที่ใช้ปลูกพริกไทย และปลูกอยู่ใต้ร่มเงาต้นยางพารา นอกจากนั้นยังมีการปลูกวานิลลาเพื่อทดสอบในศูนย์วิจัยและสถาบันวิจัยพืชสวนหลายแห่ง เช่น สถานีทดลองพืชสวนดอยมูเซอจังหวัดตาก ศูนย์วิจัยพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง (http://www.benorchid.com/article/artic003.htm, September 15, 2008) แต่จากการสำรวจพบว่า ปัจจุบันได้เลิกปลูกทดลองไปแล้ว

การปลูกและผลิตวานิลลาเพื่อการค้าในประเทศไทย ส่วนใหญ่มีพื้นที่อยู่ในหน่วยงานของรัฐในภาคเหนือ โดยมีพื้นที่ปลูกรวม 8,496 ตารางเมตร เป็นพื้นที่ที่ให้ผลผลิตแล้วประมาณ 41% ของพื้นที่ปลูก ให้น้ำหนักฝักสดประมาณ 257 กิโลกรัมต่อปี หลังจากบ่มฝักมีน้ำหนักคงเหลือ 51.4 กิโลกรัมต่อปี (สิริพร และคณะ, 2553) สำหรับการปลูกวานิลลาของมูลนิธิโครงการหลวง เป็นลักษณะของการทดลองวิจัย ที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ในระบบโรงเรือนแบบเปิด (หลังคามุงซาแลน) และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง ในระบบโรงเรือนแบบปิด (หลังคามุงพลาสติก) พบว่าวานิลลาสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ฝักที่มีคุณภาพดี แต่การปลูกวานิลลาต้องใช้ระยะเวลานาน 2-4 ปี ต้นวานิลลาก็จะเริ่มให้ผลผลิตประมาณ 7-8 เดือน หลังจากที่ฝักโตเต็มที่สามารถเก็บผลผลิตได้แล้วต้องนำฝักที่ได้ไปบ่มให้ฝักแก่อีกประมาณ 3-4 เดือน ส่วนการผสมเกสรสามารถทำได้โดยผู้ปลูกเลี้ยงต้องเป็นผู้ผสมเกสรซึ่งต้องใช้ความชำนาญในการผสม โดยมีการผสมภายในโรงเรือน ทำให้มีต้นทุนที่ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามฝักแก่ของวานิลลามีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 1,000 - 1,500 บาทต่อน้ำหนักแห้ง และหากทำการสกัดกลิ่นวานิลลาแล้ว จะมีราคาขายที่สูงมาก จึงคุ้มค่าต่อการลงทุน ทำให้มีเกษตรกรหลายรายสนใจ ซึ่งในอนาคตทางมูลนิธิโครงการหลวงเริ่มผลักดันให้เกษตรกรเพาะปลูกวานิลลามากขึ้นเพื่อให้เกิดการกระจายรายได้ในภาคเกษตรกร ทำให้เกิดการพัฒนาธุรกิจในอนาคตได้ ในปัจจุบันการปลูก

วานิลลาของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวางอยู่ภายใต้การกำกับและดูแลของ ดร.ชนะ พรหมทอง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ขณะนี้อยู่ในช่วงของการดำเนินการศึกษาวิจัยสายพันธุ์ และขั้นตอนในการปลูกเลี้ยงที่เหมาะสม และได้ศึกษาการปลูกต้นวานิลลาแซมในโรงเรือนรวมกับพืชชนิดอื่นๆ กว่า 1,000 ต้น (http://ndoae.doae.go.th/news/news_024.html September 15, 2008) จากการสัมภาษณ์ ผู้อำนวยการศูนย์ฯ พบว่ามีนโยบายที่จะพัฒนาให้ศูนย์ฯ เป็นศูนย์กลางถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตวานิลลาให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการ

การบ่ม (curing) ฝักวานิลลาให้มีกลิ่นหอมนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดต่อคุณภาพหรือการพัฒนาสารที่ให้กลิ่น ขั้นตอนการ curing ที่ปฏิบัติในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง เลียนแบบจากวิธีการดั้งเดิมของประเทศที่มีการผลิตวานิลลาเป็นการค้า (Bourbon curing method) ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ

1. การทำให้เหี่ยว (killing) โดยการจุ่มน้ำร้อน 63-65°C นาน 2-3 นาที
2. การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) ใช้แสงแดดในช่วงเวลา 11.00-14.00 น. (45-65°C) เป็นเวลา 7 วัน (อุณหภูมิของฝักวานิลลาประมาณ 50 °C) แล้วห่อฝักด้วยผ้าห่ม และเก็บในกล่องไม้ปิดสนิท
3. การทำให้แห้งอย่างช้า (slow drying) โดยการทำให้แห้งในร่ม ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาประมาณ 1 เดือน
4. การปรับสภาพของฝักวานิลลา (conditioning) นำฝักวานิลลามาม้วนกับนิ้ว ก่อนเก็บฝักวานิลลาในกล่องปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 เดือน

(http://www.orchidasia.com/vanillacuring.htm, September 15, 2008)

รวมระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มนาน 4-6 เดือน โดยฝักวานิลลาที่ปลูกในพื้นที่มูลนิธิโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ภายหลังจากการบ่มฝักพบว่ามีปริมาณผลึกสารวานิลลินเกาะอยู่ที่ผิวฝักมาก แต่ปริมาณสารที่ได้ยังต่ำกว่ามาตรฐาน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547) แต่สภาวะแวดล้อมในการผลิตวานิลลาของประเทศไทยมีความแตกต่างกับ Mexico และ Indian Ocean Islands ซึ่งใช้วิธีการบ่มแบบดั้งเดิม (Bourbon curing method) เป็นหลัก นอกจากนั้นชนิด ปริมาณ และการทำงานของเอนไซม์ หรือจุลินทรีย์ ที่มีบทบาทในการพัฒนากลิ่นของฝักวานิลลาอาจมีความแตกต่างกัน การศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างบ่มฝักวานิลลามีความสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการบ่มและเพิ่มคุณภาพของฝักวานิลลา ขั้นตอนการ curing ที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการสูญเสียของสาร vanillin หรือทำให้การทำงานของเอนไซม์ ที่ทำหน้าที่ hydrolyze สารตั้งต้นซึ่งอยู่ในรูป glycoside ไม่สมบูรณ์ ส่งผลต่อคุณภาพของฝักที่ลดลงหรือมีปริมาณสาร vanillin และสารให้กลิ่นชนิดอื่น ๆ ต่ำ (Frenkel and Havkin-Frenkel, 2006)

การทำ curing มีความสัมพันธ์กับลักษณะชีววิทยาของฝักวานิลลาที่มีผลต่อการพัฒนากลิ่นวานิลลา ซึ่งพบว่าสารตั้งต้น (flavour precursor) ในกระบวนการสังเคราะห์ vanillin อยู่บริเวณเนื้อเยื่อ placenta รอบๆ เมล็ด แต่ hydrolytic และ degradation enzymes ที่ทำหน้าที่ปลดปล่อยสารให้กลิ่นออกจากสารตั้งต้น

ส่วนใหญ่อยู่ที่ผนังหรือเปลือกของฝัก (Arana et al., 1943) แต่การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological study) ของ Odoux et al. (2003) รายงานว่าสารตั้งต้นและเอนไซม์อยู่ในเนื้อเยื่อเดียวกันคือ placenta laminae แต่พบในบริเวณออร์แกนเนลล์ที่แตกต่างกัน คือพบสารตั้งต้น glucovanillin สะสมมากในแวคลิโอล ส่วนเอนไซม์พบมากในไซโตรพลาสมิกหรือเพอริพลาสมิก ดังนั้นขั้นตอนการบ่มซึ่งประกอบด้วยการ killing ด้วยน้ำร้อน การแช่แข็งหรือวิธีอื่น ๆ เพื่อทำลายเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ที่ขวางกั้นระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ โดยขั้นตอนต่อมาคือ sweating ใช้อุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์สูง ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องการสร้างสารให้กลิ่น ส่วนขั้นตอน drying และ conditioning เพื่อการเก็บรักษากลิ่นให้คงอยู่ในฝักได้นาน (Havkin-Frenkel et al., 2004) นอกจากนั้นในสภาพอุณหภูมิสูง มีความเหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ Millard reaction ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนสีฝักเป็นสีน้ำตาล นอกจากนั้น Millard reaction ยังช่วยเพิ่มทำให้มีกลิ่นรส เพิ่มขึ้นและคงกลิ่นในผลิตภัณฑ์ เช่น นมและขนมเค้กได้ยาวนานขึ้น (Young et al., 2006; United States Patent Application 20060045954)

เอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญในย่อยสลายและปลดปล่อยสาร vanillin ได้แก่ β-Glucosidase (β -glu) นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ ได้แก่ cellulase (CEL), hemicellulase, pectinase และเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลของสารประกอบฟีนอลิก เช่น polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) สำหรับเอนไซม์ peroxidase นอกจากจะมีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของสีเปลือกฝักวานิลลาแล้ว Gaterfied et al. (2006) ยังระบุว่าเอนไซม์ POD อาจทำปฏิกิริยา oxidation กับสารให้กลิ่น vanillin กลายเป็นสาร divanillin ในระหว่างกระบวนการบ่มฝักได้อีกด้วย การให้เชื้อราและยีสต์ (*Aspergillus niger, Saccharomyces cerevisiae*) ในรูปสกัดผงสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิดได้ และชักนำให้ฝักวานิลลามีการสร้างสาร vanillin ปริมาณมากขึ้นและเร็วกว่าปกติในระหว่างการ curing (Sreedhar et al., 2009) ในกระบวนการสกัดสาร vanillin จากฝักวานิลลา โดยใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วย arabinase cellulase, hemicellulase, xylanase และ pectinase ที่สกัดจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ เช่น *Aspergillus* และ *Trichoderma reseii* ร่วมกับน้ำหรือเอธานอล และทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารวานิลลินเพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธี Soxhlet (Ruiz-Terán et al., 2001)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีเป้าหมายศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และประชากรจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสารให้กลิ่นรส (flavor compounds) ของฝักวานิลลา ในระหว่างการบ่ม cuirng เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการบ่มวานิลลาที่ผลิตในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงฯ และขยายผลกับพื้นที่อื่นที่อยู่ระหว่างการพัฒนาเพื่อเป็นการค้าในประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (β-glu), cellulose (cel), peroxidase (POD) ในระหว่างขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลา
2. ศึกษาชนิดและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา

3. ศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์และจุลินทรีย์กับการสร้างสารให้กลิ่นรสในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การบ่ม (curing) ฝักวานิลลาให้มีกลิ่นหอมนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดต่อคุณภาพหรือการพัฒนาสารที่ให้กลิ่น การบ่มจัดว่าเป็น biological process การทำให้วานิลลาเกิดกลิ่นหอม ต้องการทั้งกระบวนการที่ใช้ความร้อน (thermal process) ปฏิกิริยาของเอนไซม์ในพืชและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Ranadive, 1994) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดกลิ่นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ในพืชกับกิจกรรมของจุลินทรีย์มีการศึกษาค่อนข้างน้อยและส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ในการสกัดสาร vanillin จากฝักวานิลลาในเชิงอุตสาหกรรมหรือสังเคราะห์สาร vanillin จาก by-product ของอุตสาหกรรมเกษตร Röling et al. (2001) ทำการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ระหว่างการทำ curing แบบดั้งเดิมในประเทศอินโดนีเซีย พบว่าจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย bacilli ที่ชอบหรือทนร้อน และพบว่ามีบาง isolate เท่านั้นที่มีการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์พืช เช่น protease, cellulase, hemicellulase หรือ pectinase ส่วนเชื้อราและยีสต์ที่แยกได้จากการทดลองสร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้แต่มีกิจกรรมต่ำ (weak activities) และพบว่าฝักวานิลลาที่มีการบ่มในสถานที่ต่างกันหรือบ่มคนละครั้งกัน มีผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ องค์ประกอบของจุลินทรีย์หลักและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยพบว่าเชื้อ *B. subtilis* (type 2) ที่แยกจากฝักวานิลลาที่ผ่านการ curing ในบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase และเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ จะเห็นได้ว่าประชากรเชื้อ ชนิดของเชื้อและคุณสมบัติเอนไซม์ในฝักวานิลลาที่บ่มได้ ในแต่ละพื้นที่อาจมีความแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์และจุลินทรีย์ในฝักวานิลลาในพื้นที่ที่จะทำการศึกษาเสียก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ในการกระตุ้นการสร้างสาร vanillin ของฝักวานิลลามีความเป็นไปได้สูงในเชิงการค้า (Sreedhar et al., 2009)

กลิ่นวานิลลาที่สกัดจากฝักวานิลลา ประกอบด้วยโมเลกุลสารที่แตกต่างกันประมาณ 200 ชนิด แต่มีสารวานิลลิน (vanillin) มากที่สุด ประมาณ 85% รองลงมาคือ สาร 4- hydroxybenzaldehyde 8.5% (พิทยา, 2551) ในฝักวานิลลาสดมีสารตั้งต้นอยู่ในรูป glucovanillin หรือ glycosides ซึ่งไม่มีกลิ่นหอม การสะสมของสาร glucovanillin พบหลังจากผสมเกสรเพียง 3-4 เดือน และจะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น เมื่อฝักมีอายุ 7-9 เดือน ฝักแก่เขียว มี glucovanillin สะสมอยู่ 10-15% หลังผ่านกระบวนการบ่มทางการค้าจะมี vanillin เหลือเพียง 1-2% ต่อน้ำหนักสุดท้ายของฝัก (Joel et al., 2003) ดังนั้นกระบวนการ curing ที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้มีการสูญเสียสาร vanillin ระหว่างการบ่ม หรือสภาพการบ่มไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนากลิ่นในฝักวานิลลาขั้นตอนการบ่มฝัก (curing) ให้มีกลิ่นหอม ซึ่งนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดต่อคุณภาพหรือการพัฒนาสารที่ให้กลิ่นหลักคือ vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) มีวิถีการสังเคราะห์ผ่าน phenylpropanoid pathway ซึ่งเริ่มต้นจาก 4-cumaric acid (1) เปลี่ยนเป็น

4- hydroxybenzaldehyde (2) 3,4- dehydroxybenzaldehyde (3) และ vanillin (4) ตามลำดับ ดังนั้นสาร vanillin จึงถูกจัดเป็นผลิตภัณฑ์จาก secondary metabolism ของพืช (ภาพที่ 1)

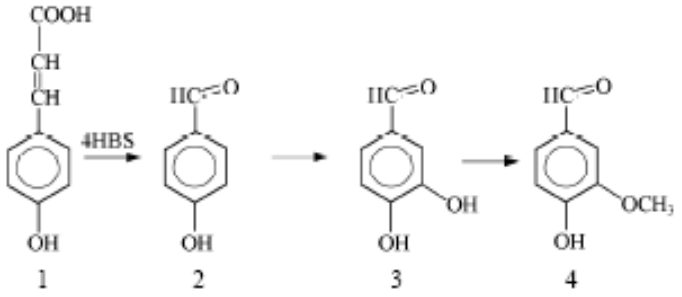


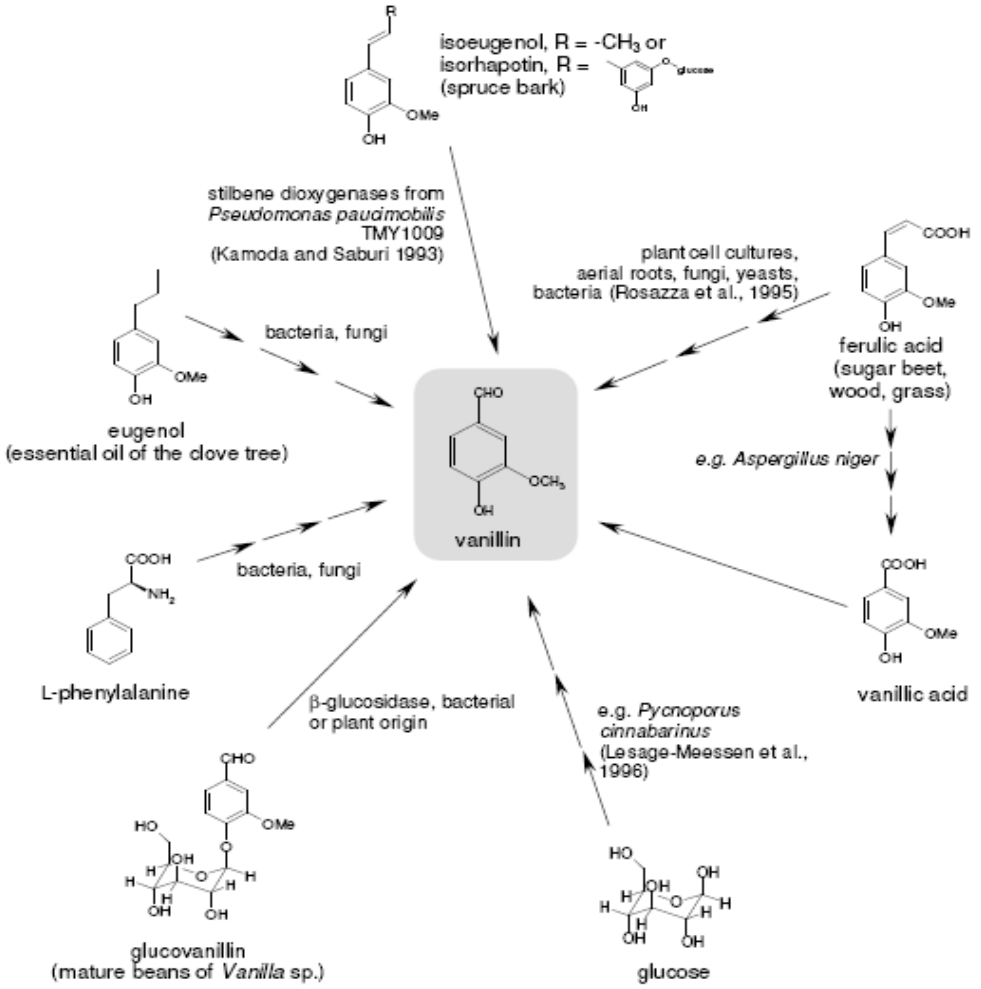
Fig. 1. Proposed vanillin biosynthetic pathway, from 4-coumaric acid (1) via 4-hydroxybenzaldehyde (2) and 3,4-dehydroxy-benzaldehyde (3) to vanillin (4).

ภาพที่ 1 การสังเคราะห์สาร vanillin ในฝักวานิลลา ผ่านวิถี phenylpropanoid
ที่มา Joel et al. (2003)

ในฝักวานิลลาที่ผ่านการบ่มแล้ว มีสารให้กลิ่นรส (flavor compound) และสารประกอบที่สำคัญ ได้แก่ vanillin, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde และ glucovanillin (Sreedhar et al., 2007)

เอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายและปลดปล่อยสาร vanillin ได้แก่ β-glucosidase (β-Glu) นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ ได้แก่ cellulase (CEL) และ peroxidase (POD) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของสารประกอบฟีนอลิก ในวิถี phenyl-propanoid ซึ่งเอนไซม์สองชนิดหลังยีสต์และเชื้อราบางชนิดสังเคราะห์ขึ้นได้ และสามารถกระตุ้นหรือเร่งให้ฝักวานิลลามีการสร้างสาร vanillin ปริมาณมากขึ้นและเร็วกว่าปกติในระหว่างกระบวนการ curing (Sreedhar et al., 2009) เนื่องจากในกระบวนการ curing มีระดับอุณหภูมิและความชื้นที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย cellulose และ hemicellulose แตกต่างกันในแต่ละขั้นตอน จากการแยกเชื้อที่ขั้วของฝักวานิลลาที่ผ่านการ curing พบเชื้อ *Bacillus* หลายจีนัส ที่มีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ β-Glu จึงอธิบายว่าเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hydrolysis ของ flavor glycoside ในฝักวานิลลา (Röling et al., 2001)

ในกระบวนการสังเคราะห์สาร vanillin จากผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมเกษตร หรือการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ มีการใช้เชื้อแบคทีเรีย ราหรือยีสต์บางชนิด ที่มีการผลิตเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการตัดโครงสร้างโมเลกุลสารตั้งต้น ได้แก่ ferulic acid, euglenol, isoeuglenol หรือ glucose ส่วนสารวานิลลินที่สังเคราะห์จาก glucovanillin ในฝักแก่ของวานิลลา โดยการทำงานของกับเอนไซม์ β-Glu ที่สร้างขึ้นโดยพืชหรือแบคทีเรีย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สารตั้งต้นและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารวานิลลิน

ที่มา : Gabor (2004)

เชื้อราสำคัญที่มีบทบาทเป็น bioconversion fungi ในการปลดปล่อยสาร ferulic acid ในกากของต้น sugar beet และรำข้าวสาลี ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Pycroporus cinnabarinus* โดยการสร้างเอนไซม์ xylanase เชื้อราอื่นๆ ที่มีบทบาทในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ *Trichoderma viride, Penicillium fluorescence* แต่เชื้อ *P. cinnabarinus* สร้างเอนไซม์ laccase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน ferulic acid เป็นวานิลลิน (Thibault et al. 1998)

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

1. สุ่มเก็บเกี่ยวฝักวานิลลา เมื่อปลายฝักเริ่มเปลี่ยนสีเหลือง ซึ่งมีอายุฝักประมาณ 11 เดือน หลังผสมเกสร เก็บฝักเกรด II ที่มีความยาวฝักประมาณ 10-15 เซนติเมตร จากแปลงปลูกในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จังหวัดเชียงใหม่ นำฝักวานิลลาบรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู แบ่งเป็น 5 ถุงๆ ละ 30 ฝัก ขนส่งฝักวานิลลามาศึกษาในห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากการเก็บเกี่ยว

2. นำฝักวานิลลามาผ่านกระบวนการ curing ในห้องปฏิบัติการ สุ่มเก็บตัวอย่างฝักวานิลลาเพื่อการตรวจวิเคราะห์ในระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. ฝักวานิลลาก่อนการทำให้เหี่ยว (killing) หรือฝักวานิลลาที่ไม่ผ่านการ curing (Fresh)
2. ฝักวานิลลาหลังการ killing ด้วยการจุ่มน้ำร้อน 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (AFkilling)
3. ฝักวานิลลาก่อนการทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) หรือฝักวานิลลาที่ไม่ผ่านการ sweating (BFSW)
4. ฝักวานิลลาหลังการทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) ที่ 65 องศาเซลเซียส ความชื้น 85% นาน 4 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน (AFSW)
5. ฝักวานิลลาหลังการปรับสภาพ (conditioning) ที่ 27 องศาเซลเซียส ความชื้น 60% นาน 3 เดือน (AFcon 3M)

สุ่มฝักวานิลลาครั้งละ 12 ฝักทั้งหมด 3 ซ้ำ จำนวนฝักที่ใช้ทดลองรวม 300 ฝัก ตรวจวิเคราะห์ผล ดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฝัก

1.1 การเปลี่ยนแปลงของสีเปลือก

นำฝักวานิลลาสดและฝักบ่มที่ผ่านขั้นตอนการบ่มต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 5 ฝักมาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี colorimeter (Model DP-301, Minolta Japan) โดยแสดงผลการทดลองในค่า L* คือ ค่าความสว่าง a* คือค่าการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวไปสีน้ำตาลดำ b* คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง และ Hue ย่อมาจากค่า Hue angle ซึ่งแสดงโทนสีของฝัก

1.2 ปริมาณความชื้นฝัก (moisture content)

นำตัวอย่างฝักวานิลลาที่วัดสีจากข้อ 1.1 มาหั่นตามขวางยาว 1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักสด 3-5 กรัมต่อตัวอย่าง ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นหรือใช้แผ่นฟอยด์อลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นของฝัก (wet weight basis) (AOAC, 1995) ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

2) วิเคราะห์หาปริมาณสารตั้งต้นและสารระเหยให้กลิ่นวานิลลา

สกัดและวิเคราะห์สารระเหยจากฝักสดและฝักบ่ม โดยปรับปรุงจากกรรมวิธีของ Sreedhar et al. (2007) นำตัวอย่างฝักวานิลลามาหั่นตามขวางยาว 1 เซนติเมตร ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อฝักวานิลลา 5 กรัมต่อตัวอย่าง บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 1 กรัม จำนวน 3 ตัวอย่าง เติมเอทธานอลผสมที่ความเข้มข้น 44% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับปริมาตรด้วย เอทธานอล 36% และกรองสารผ่าน filter membrane (Millipore, 0.45μm) วิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC Shimazu รุ่น LC-20AT ใช้ Diode array detector คอลัมม์ Inertsil รุ่น ODS-3 ขนาด 5 ไมครอน 4.6x250 มิลลิเมตร สารละลาย mobile phase คือ เมทธานอล กับ acetic acid ความเข้มข้น 1.25% ในอัตราส่วน 10% ต่อ 90% ใช้อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 40 นาที ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดเท่ากับ 254 นาโนเมตร ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตราฐาน vanillin, 4-hydroxybenzoic acid, 4- hydroxybenzaldehyde และ vanillic acid (Sigma) ความเข้มข้น 1-100 มิลลิเมตรต่อลิตร

3) การสกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบ่มฝักวานิลลา

3.1 การสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างฝักวานิลลา

นำเนื้อเยื่อฝักวานิลลา ปริมาณ 3 กรัมใส่ในหลอดพลาสติก เติมสารละลาย โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (0.1 M sodium citate, pH 5.0) หรือสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต (0.1 M Potassium phosphate buffer, pH 7.0) ที่เย็นจัด (4 ^{o}C) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ปั่นละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (ULTRA-TURRAX model IKA T25, USA) ขณะปั่นแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง และวางสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge; SORVALL model RC5C Plus, UK) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ส่วนใสที่ได้คือสารสกัดเอนไซม์ที่นำไปวัดกิจกรรมด้วย UV-spectrophotometer ตามกรรมวิธีที่ปรับปรุงจาก Sreedhar et al. (2007) ดังนี้

3.2 กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase; β-glu)

นำสารละลาย *p*NPG (5.5 mM *p*-nitrophenol-β-glycopyranoside) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (substate) เติมสารละลายโซเดียมซิเตรต (0.1 M sodium citate, pH 5) จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (1 M Na_2CO_3) จำนวน 600 ไมโครลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimazu UV-1601, Japan) นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตราฐาน 4-nitrophenol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 100 ไมโครโมลาร์ (μM) (รูปภาคผนวคที่ 2) จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น ไมโครโมลาร์ของ 4-nitrophenol ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (μM 4-nitrophenol/min.mg protein)

3.3 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase ; Cel)

นำสารละลายคาร์บอกซีเมททิล เซลลูโลส (1% carboxymethyl cellulose) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร (substrate) ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (0.1 M sodium citate buffer, pH 5.0) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นำหลอดทดลองใส่ในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไดไนโตซาลิซิลิก ความเข้มข้น 1% (1% DNS) จำนวน 3 มิลลิลิตร (1% DNS จำนวน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) 1 กรัม ฟีนอล (phenol) 0.2 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1 กรัม นำสารทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่มีสารละลายผสมอยู่ แล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที นำหลอดขึ้นมาวางในอ่างที่บรรจุน้ำแข็ง นาน 5 นาที นำหลอดขึ้นมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 632 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตราฐาน D-glucose ความเข้มข้น 0-140 มิลลิโมลาร์ (mM) (รูปภาพผนวกที่ 2) จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ของกลูโคสต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (mM D-glucose /min.mg protein)

3.4 กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase, POD)

นำสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต pH 7.0 (0.1 M Potassium phosphate buffer, pH 7.0) ปริมาณ 2.8 มิลลิลิตร (substrate) ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เติมสารละลายเกียคอล (0.018 M Guaiacol) ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร ใส่สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (30% hydrogen peroxide) จำนวน 0.05 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์ปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง spectrophotometer วัดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงแสง tetraguaiacol ที่เกิดขึ้น (extinction coefficient 25.5 cm^{-2}/µmol) จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น มิลลิโมลาร์ของ tetraguaiacol ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (µM tetraguaiacol /min.mg protein)

4) ตรวจวัดจุลินทรีย์และนับประชากรเชื้อในเนื้อเยื่อฝักวานิลลา

สุ่มฝักวานิลลาหลังจากผ่านขั้นตอน curing ตามข้อ 2 ตัดเนื้อเยื่อฝักวานิลลา ฆ่าเชื้อภายนอกด้วยแอลกอฮอล์ วัดปริมาณจุลินทรีย์รวม (total microorganism) ด้วย Nutrient agar จำแนกเชื้อราและนับประชากรเชื้อ โดยใช้อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และจำแนก Gram ของเชื้อแบคทีเรีย โดยการย้อมแกมด้วยสี Crystal violet และ safanin O และจำแนก Genus ของเชื้อแบคทีเรีย โดย Biochemical test

การวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) Least Significant Difference (LSD) และ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) รุ่น 11.5

ผลการวิจัย

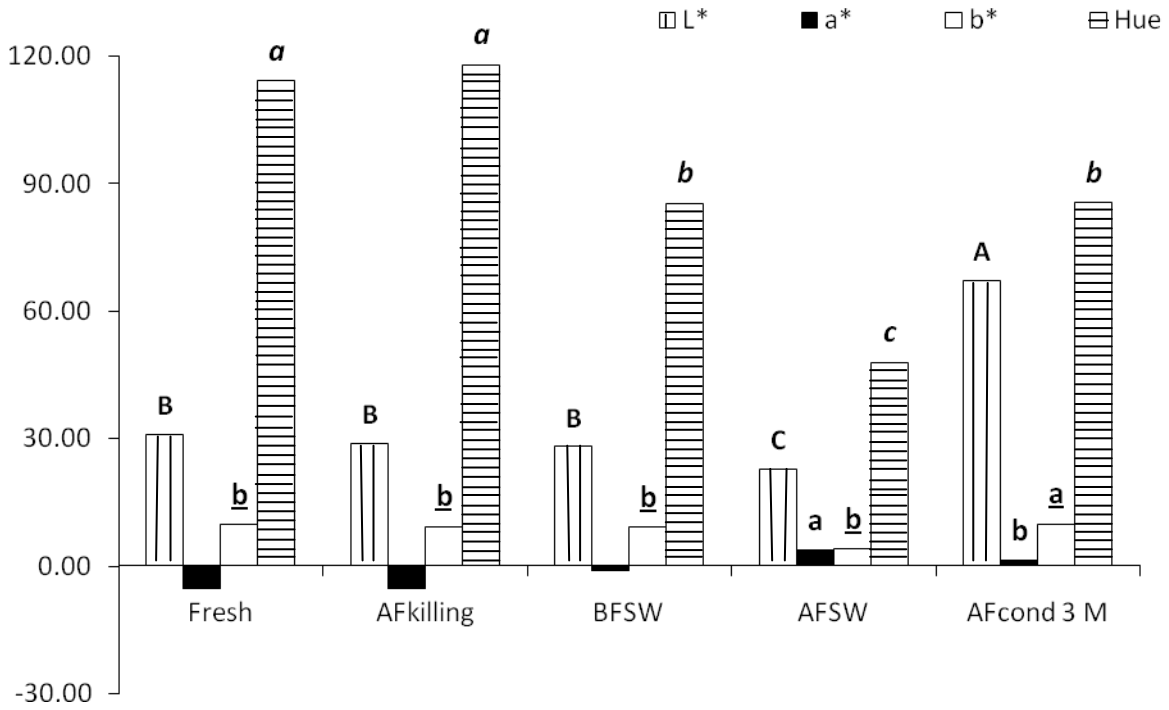
1) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่มฝัก

1.1 สีเปลือกฝัก

ในระหว่างขั้นตอนการบ่มมีการเปลี่ยนแปลงสีฝักวานิลลาแสดงโดยค่า L* a* b* และ Hue angle ดังนี้ ขั้นตอนหลังจาก killing (AFkilling) แล้วนำฝักวานิลลา บ่มในกล่องไม้ปิดฝานาน 24 ชั่วโมง (BFSW) ค่า L* มีค่าคงที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด (Fresh) แต่ภายหลังจาก sweating (AFSW) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีน้ำตาล แต่ภายหลังจากการปรับสภาพ 3 เดือน กลับมีค่า L* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่า a* พบว่ามีค่าติดลบในฝักสด ขั้นตอน AFkilling ซึ่งมีลักษณะปรากฏของสีเปลือกฝักเป็นสีเขียวถึงเขียวอมเหลือง แต่ในขั้นตอน BFSW มีค่า a* เพิ่มขึ้นหรือติดลบน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าเพิ่มขึ้นจนเป็นค่าบวก ภายหลังจากผ่านขั้นตอน sweating (AFSW) ซึ่งมีสีเปลือกฝักเป็นสีน้ำตาลถึงสีดำ แต่เมื่อปรับสภาพนาน 3 เดือน สีเปลือกฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและมีค่า a* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอน AFSW (ตารางภาคผนวกที่ 1) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า b* พบว่ามีค่าค่อนข้างคงที่ในขั้นตอนการบ่มช่วงต้น (AFkilling, BFSW) เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด แต่ในขั้นตอน AFSW มีค่าลดลง แต่กลับมีค่าเพิ่มขึ้นในขั้นตอน AFcond 3M สำหรับค่า Hue angle ซึ่งแสดงถึงโทนสีของฝักวานิลลา พบว่า หลังจากนำฝักที่ killed แล้วไปบ่มในกล่องไม้ปิดฝานาน 24 ชั่วโมง และ AFSW มีค่าลดลงตามลำดับ โดยมีค่า Hue angle เพิ่มขึ้น หลังจากปรับสภาพฝัก 3 เดือน ดังภาพที่ 3

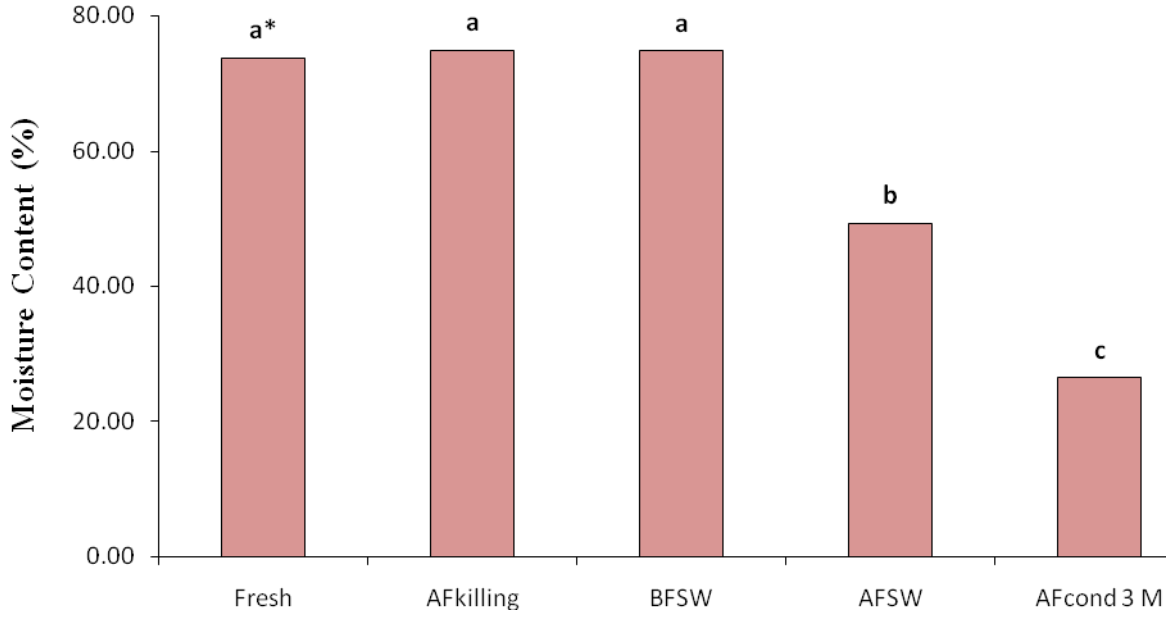
1.2 ความชื้นของฝัก

หลังจากจุ่มฝักวานิลลาในน้ำร้อนในขั้นตอน killing (Afkilling) แล้วนำฝักที่ killed แล้วไปบ่มฝักในกล่องไม้นาน 24 ชั่วโมง (BFSW) มีปริมาณความชื้นของฝัก เฉลี่ย 77.42% ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับฝักวานิลลาสด แต่ภายหลังจากในขั้นตอน sweating (AFSW) มีปริมาณความชื้นฝักเฉลี่ย 50.00% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบ conditioning เป็นเวลา 3 เดือน (AFcond 3 M) มีปริมาณความชื้นฝักต่ำสุดเฉลี่ย 26.45% (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่า L* a* b* และ Hue angle ของสีเปลือกฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

ค่า L* คือ ความสว่างของสี ค่า a* คือการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวไปสีน้ำตาลดำ ค่า b* คือ การเปลี่ยนแปลงสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง และ Hue angle แสดงโทนสีของฝัก



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

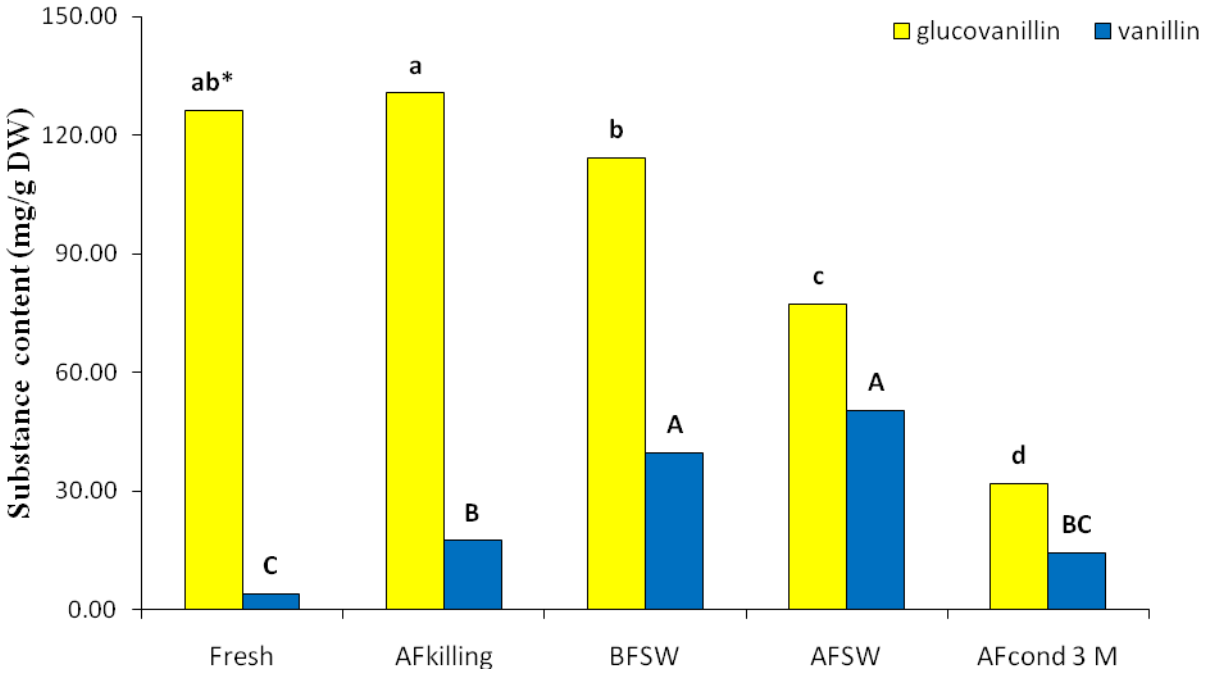
2) ปริมาณสารตั้งต้นและสารระเหยให้กลิ่นรสวานิลลา

2.1 สารกลูโควานิลลินและวานิลลิน

ในระหว่างขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลา พบว่าปริมาณสารตั้งต้น glucovanillin มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างขั้นตอนการบ่ม โดยมีปริมาณต่ำสุดภายหลังจากการปรับสภาพ นาน 3 เดือน (AFcond 3M) สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารให้กลิ่นหลัก vanillin พบว่าหลังจากการทำให้เหี่ยว ด้วยการจุ่มฝักในน้ำร้อน (AFkilling) มีปริมาณสารเพิ่มขึ้นและปริมาณสารวานิลลินมีค่าสูงสุด (p<0.05%) หรือมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณวานิลลินในฝักสด BFSW มีปริมาณค่อนข้างคงที่ แต่ภายหลังจากการทำให้เกิดเหงื่อ (AFSW) พบว่า มีความสอดคล้องกับการลดลงของสาร glucovanillin ซึ่งเป็นสารตั้นต้นของการผลิตวานิลลิน โดยปริมาณ glucovanillin ลดลงประมาณ 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในฝักสด (ภาพที่ 5)

2.2 สารระเหยให้กลิ่นอื่นๆ

สำหรับการเปลี่ยนแปลงสารระเหยให้กลิ่นอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกลิ่นวานิลลา ได้แก่ 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzaldehyde และ vanillic acid ในระหว่างขั้นตอนการบ่มวานิลลามีลักษณะการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่แตกต่างกัน กล่าวคือ พบ 4-hydroxybenzoic acid ปริมาณสูงสุดในฝักวานิลลาสด แต่ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการบ่มต่างๆ ปริมาณสารลดลงตามลำดับมีปริมาณน้อยที่สุดภายหลังจากการ sweating (AFSW) และ conditioning 3 เดือน (AFcond 3M) แต่การเปลี่ยนแปลงของสาร 4-hydroxybenzaldehyde กลับมีลักษณะตรงข้ามคือ ในระหว่างขั้นบ่มต่างๆ มีปริมาณสารคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับฝักสดแต่ภายหลังจากการ conditioning 3 เดือน มีปริมาณสารเพิ่มขึ้นและมีระดับสูงสุด ส่วนสาร vanillic acid พบว่ามีปริมาณสูงสุดภายหลังจากการ sweating แต่ภายหลังจาก conditioning 3 เดือน มีปริมาณสารลดลงจนเท่ากับปริมาณสารที่พบในฝักสด ซึ่งมีระดับต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนการบ่มอื่นๆ (ภาพที่ 6)

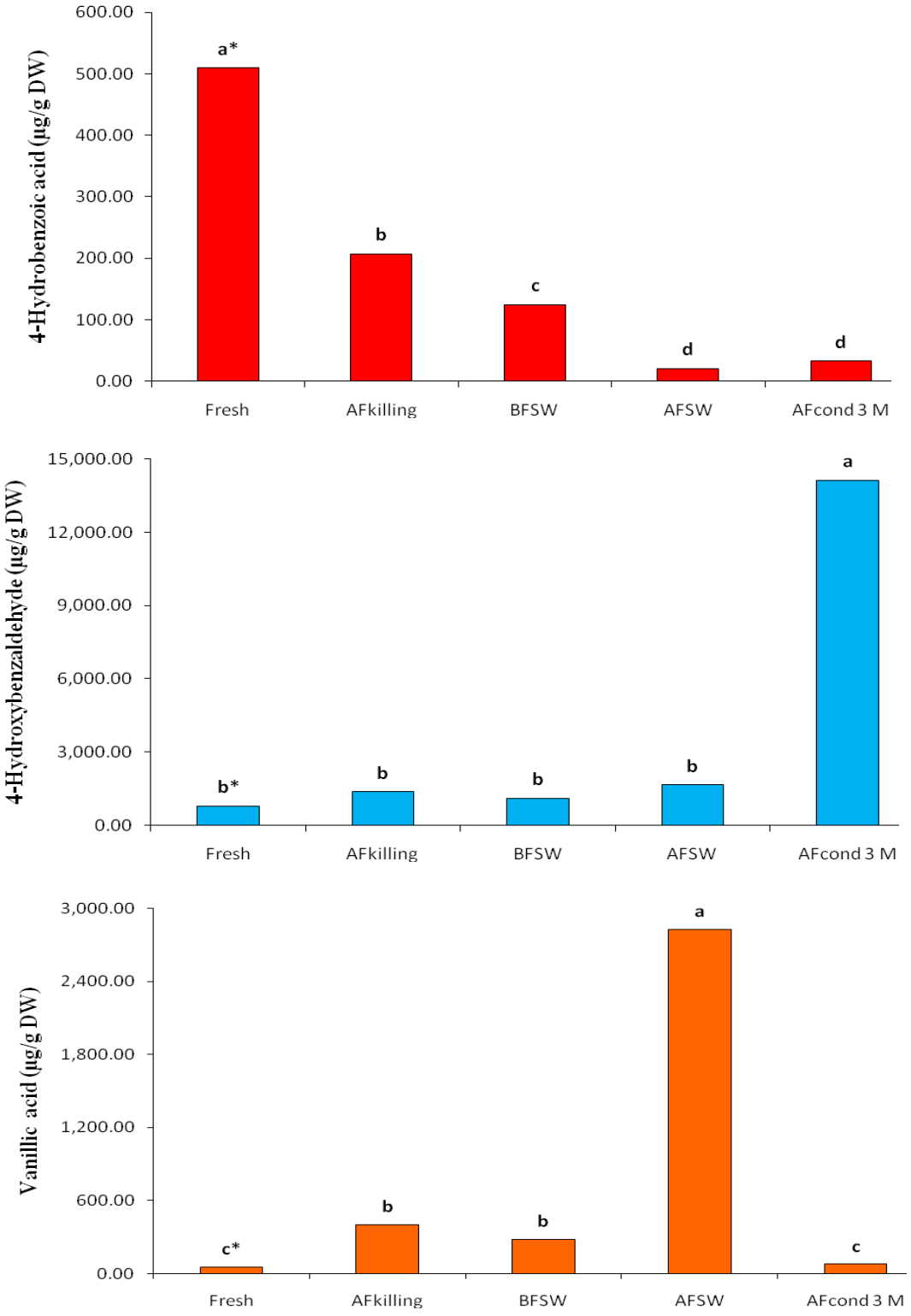


ภาพที่ 5 ปริมาณสารตั้งต้น glucovanillin และ vanilling และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

รูปแบบอักษรที่เหมือนกันเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในกลุ่มเดียวกัน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 6 ปริมาณสาร 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzaldehyde และ vanillic acid และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

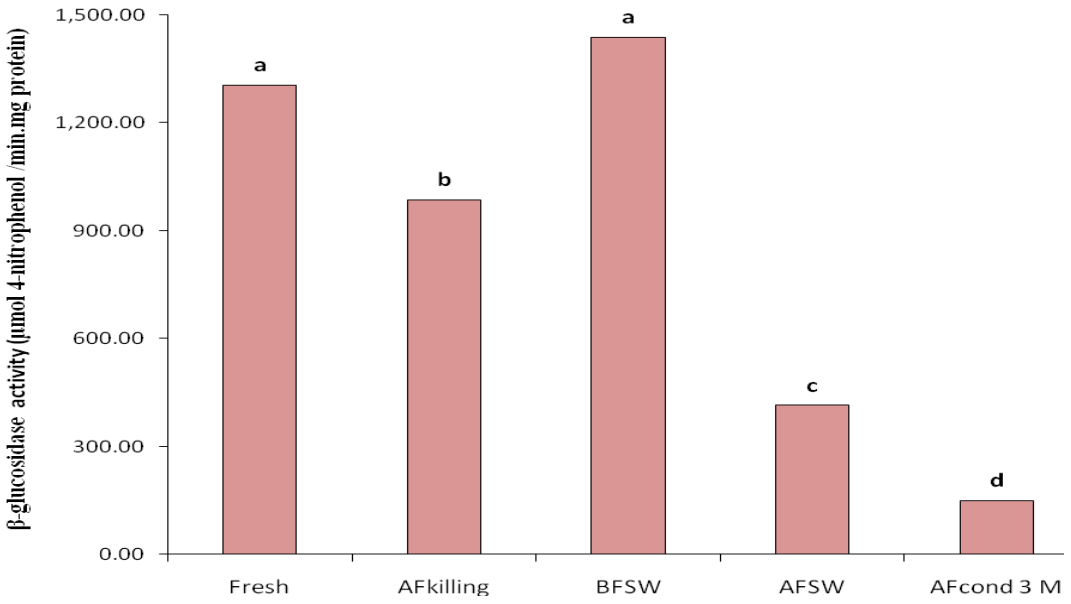
3) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารวานิลลินในระหว่างการบ่มฝัก

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (β-glu)

ฝักวานิลลาสดก่อนเข้าสู่กระบวนการบ่มมีกิจกรรมเอนไซม์ β-glu เท่ากับ 1,305.02 ไมโครโมลของสาร 4-nitrophenol ต่อมิลลิกรัมโปรตีน (μmol 4-nitrophenol /min.mg protein) หลังจากผ่านขั้นตอนการจุ่มในน้ำร้อน (AFkilling) ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ β-glu ในฝักวานิลลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 986.85 μmol 4-nitrophenol /min.mg protein แต่อย่างไรก็ตามภายหลังจากการนำฝักวานิลลาที่ผ่านการจุ่มน้ำร้อน ไปบ่มโดยห่อฝักด้วยผ้าสักหลาดสีดำใส่ในกล่องไม้สนที่มีฝาปิด นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (BFSW) กิจกรรมเอนไซม์ β-glu มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับฝักสด แต่ภายหลังจากขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (AFSW) และหลังจากการปรับสภาพ 3 เดือน (AFcond 3M) กิจกรรมของเอนไซม์ β-glu ลดลงตามลำดับ โดยขั้นตอน AFcond 3M มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดเท่ากับ 150.53 μmol 4-nitrophenol /min. mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase (cel)

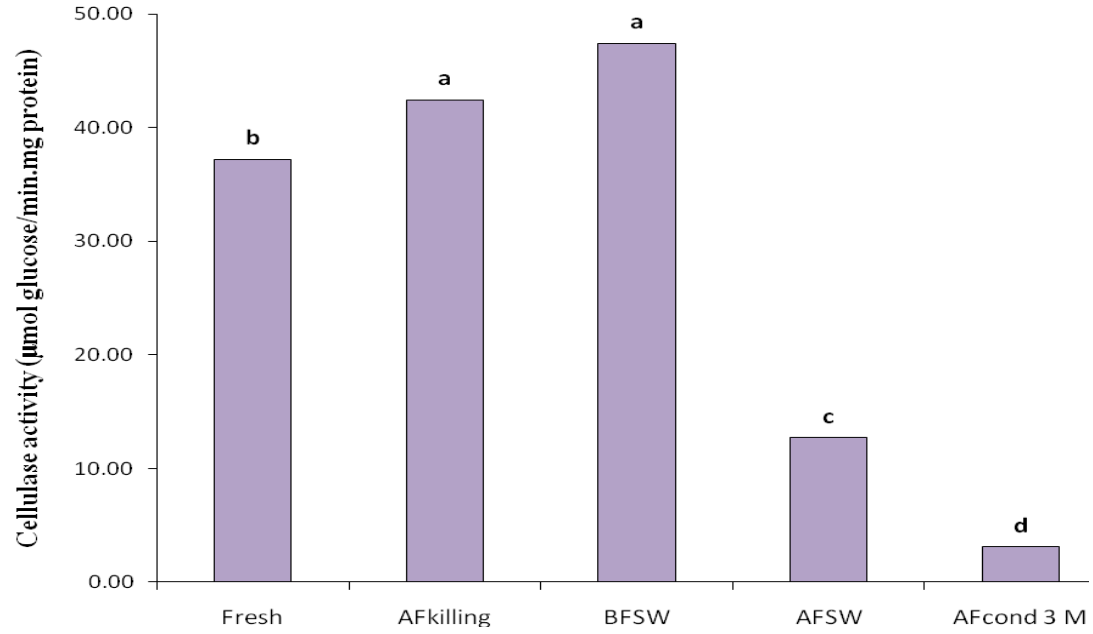
ฝักวานิลลาสดก่อนเข้าสู่กระบวนการบ่ม มีกิจกรรมของเอนไซม์ cel เท่ากับ 37.23 ไมโครโมลกลูโคสต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (μmol glucose/min.mg protein) แต่เมื่อผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอน killing (AFkilling) และหลังจากนำฝักที่ผ่านการจุ่มด้วยน้ำร้อนไปห่อผ้าสักหลาดและเก็บในกล่องไม้สนนาน 24 ชั่วโมงแล้ว (BFSW) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ cel มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42.46 และ 47.43 μmol glucose/min.mg protein แต่หลังจากผ่านขั้นตอน sweating (AFSW) เอนไซม์ในฝักวานิลลามีกิจกรรมลดลงประมาณ 3 เท่า ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์เพียง 12.70 μmol glucose/min.mg protein แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด ขั้นตอน AFkilling และ BFSW ภายหลังจากการปรับสภาพนาน 3 เดือน (AFcond 3M) พบว่าเอนไซม์ cel มีกิจกรรมต่ำสุด เท่ากับ 3.06 μmol/min.mg protein ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



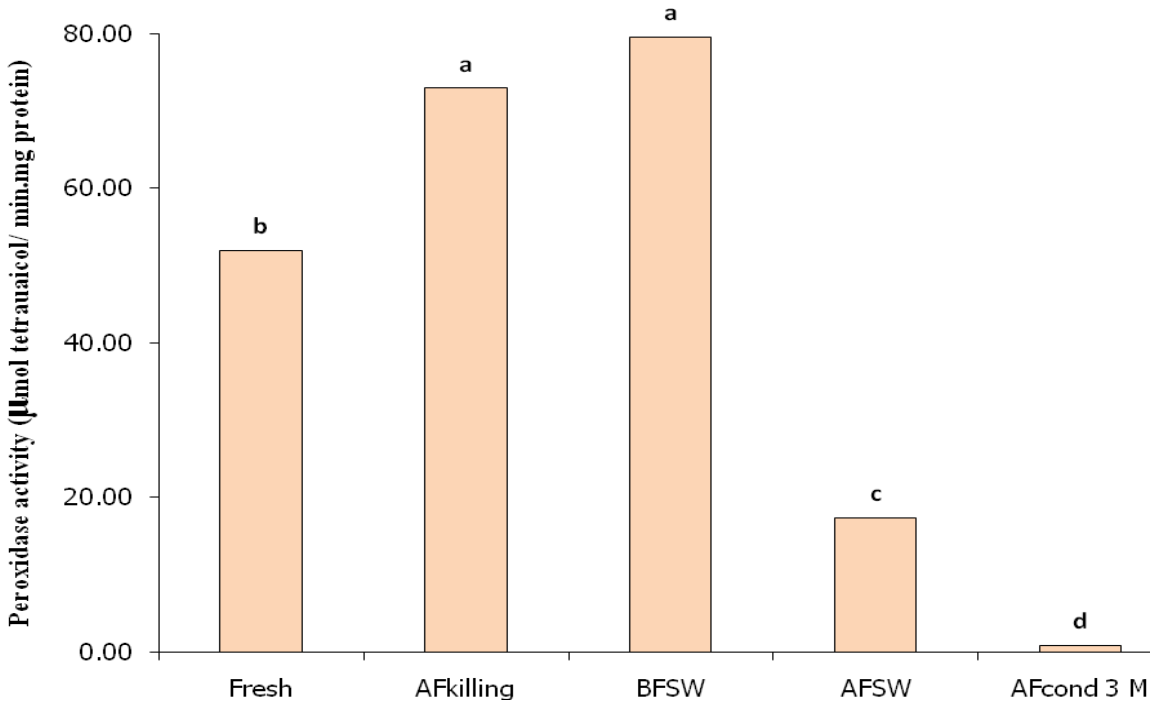
ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase (POD)

ฝักวานิลลาสดก่อนเข้าสู่กระบวนการบ่ม มีกิจกรรมเอนไซม์ POD เท่ากับ 51.99 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (µmol tetraguaicol/min.mg protein) ภายหลังจากผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอน AFkilling และ BFSW พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ เพิ่มขึ้นและมีกิจกรรมสูงสุด เท่ากับ 72.98 และ 79.60 unit/mg protein ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด แต่อย่างไรก็ตามจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ POD ลดลงตามลำดับ และพบว่าหลังจากการปรับสภาพฝักนาน 3 เดือน ซึ่งฝักผ่านกรรมวิธีการบ่มครบทุกขั้นตอน กิจกรรมของเอนไซม์ POD ของฝักบ่มจะมีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.91 unit/mg protein และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนการบ่มอื่นๆ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4) ชนิดและประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อฝักวานิลลา

4.1 ชนิดจุลินทรีย์ในฝักวานิลลาสด

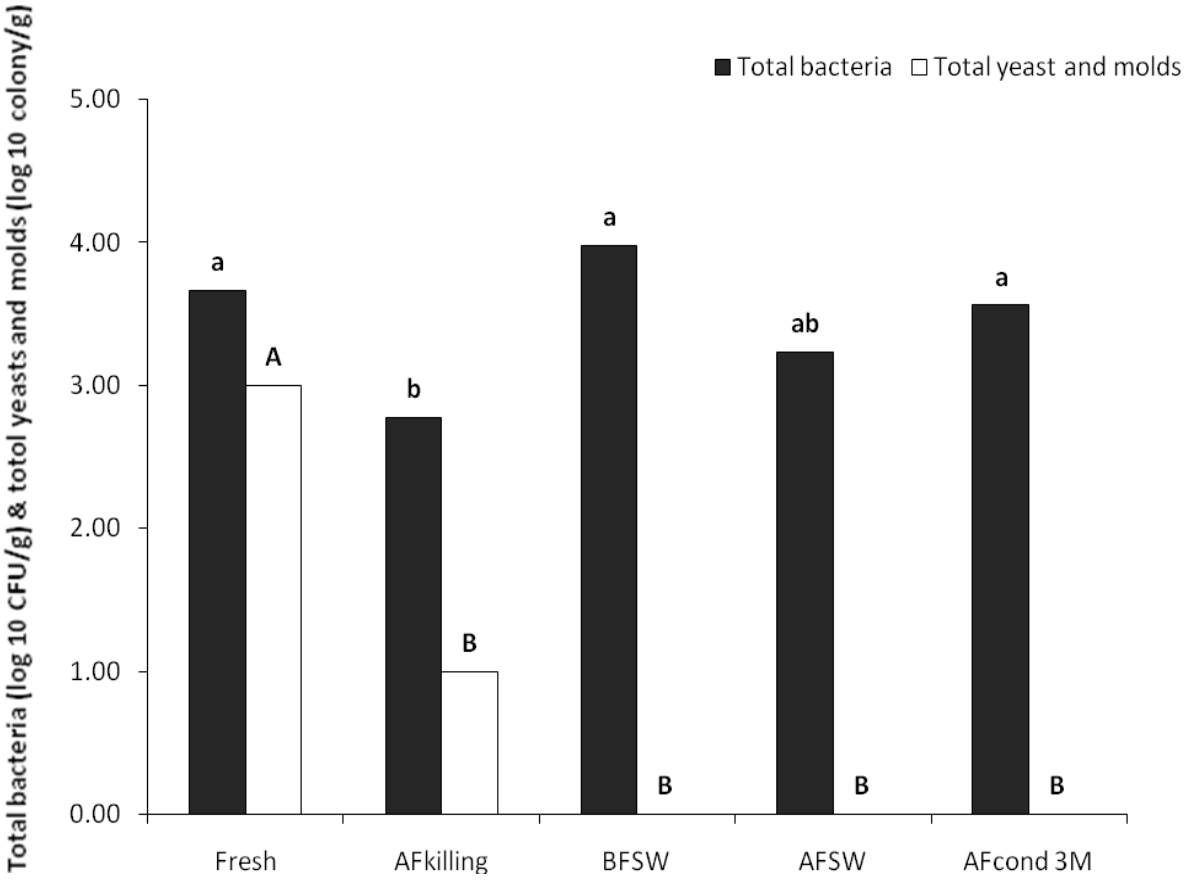
จุลินทรีย์ที่แยกได้จากฝักวานิลลาสดส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียมากกว่ายีสต์และราโดย แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. thuringiensis, B. megaterrium, B. subtilis* และ *B. cereus* ส่วนแบคทีเรียในสกุลอื่นๆ ที่พบคือ *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพของโคโลนีที่แตกต่างกันเล็กน้อย รายละเอียดยดดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากฝักวานิลลาสด

รหัสเชื้อ	จีนัส-สปีชีส	ลักษณะโคโลนี
A1	*Bacillus thuringiensis*	โคโลนีเรียบแบน ขอบของโคโลนีมีสีขาวขุ่นเล็กน้อย ตรงกลางโคโลนี มีสีขาวขุ่นมาก โคโลนีไม่กลม ขอบโคโลนีไม่เรียบมีรอยหยัก
A2	*Bacillus megaterrium*	โคโลนีเยิ้ม มันวาว ตรงกลางโคโลนีมีสีขาวขุ่น นูนเล็กน้อย
A3	*Bacillus subtilis*	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ขอบโคโลนีมีรอยหยัก ตรงกลางโคโลนีนูน
A4	*Bacillus subtilis*	โคโลนีมีลักษณะ 3 วงซ้อนกัน วงนอกสุดมีสีขาวขุ่นมาก ขอบหยัก วงกลางอยู่ถัดจากวงนอกสุด มีสีขาวขุ่นเล็กน้อย กลมเรียบ วงที่ 3 ในสุด โคโลนีมีสีขาวขุ่นมาก คล้ายวงนอกสุด แต่ตรงกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย
A5	*Stenotrophomonas maltophilia*	โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองใส มันวาว ขอบกลมหยักเล็กน้อย โคโลนีเรียบแบน
A6	*Klebsiella pneumonia*	โคโลนีมีลักษณะขาวใส มันวาว กลม นูน
A7	*Bacillus cereus*	โคโลนีมีลักษณะกลม สีขาว ตรงกลางมีสีขาวขุ่น ขอบโคโลนีมีลักษณะเรียบแบนแต่ตรงกลางโคโลนีมีลักษณะนูน

4.2 ประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลา

ภายหลังจากการทำให้เหี่ยว (AFkilling) ประชากรของยีสต์และราลดลงมากกว่า 1 ใน 3 ของประชากรเชื้อที่พบในฝักสด (Fresh) แต่ภายหลังจากนำฝักที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เหี่ยวแล้ว มาห่อในผ้าสักหลาดสีดำแล้วเก็บในกล่องไม้ที่มีฝาปิด นาน 24 ชั่วโมง (BFSW) ปรากฏว่าไม่พบเชื้อยีสต์และรา ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ในระหว่างขั้นตอนการบ่มต่างๆ พบว่ามีปริมาณค่อนข้างคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด ยกเว้นหลังจากการทำให้เหี่ยว พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดลดลง แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนมีปริมาณเท่ากับปริมาณที่พบบนฝักสด ภายหลังจากบ่มฝักที่ killing แล้วในกล่องไม้ปิดฝานาน 24 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในขั้นตอน BFSW, AFSW และ AFcond 3M (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ประชากรของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา บนฝักวานิลลาอายุฝัก 11 เดือน ที่ผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอนต่างๆ

AFkilling คือ ฝักหลังจากการ killing ; BFSW คือ ฝักก่อนทำการ sweating; AFSW คือ ฝักหลังจากการ sweating และ AFcond 3 M คือ ฝักหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

รูปแบบอักษรที่เหมือนกันเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในกลุ่มเดียวกัน

*อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

5) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวานิลลินและปริมาณวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา

วิเคราะห์สหสัมพันธ์เส้นตรง (Linear correlation) โดยกำหนดให้ ปริมาณสารวานิลลินเป็นตัวแปรตาม ปริมาณเชื้อรา แบคทีเรีย และกิจกรรมเอนไซม์ β-glucosidase เป็นตัวแปรอิสระ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ปริมาณเชื้อรา แบคทีเรีย และกิจกรรมเอนไซม์ β-glucosidase ในระหว่างขั้นตอนการบ่มต่างๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณวานิลลินที่ได้รับ แต่พบว่าปริมาณแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ β-glucosidase อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าสหสัมพันธ์เส้นตรงของปริมาณสารวานิลลิน กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด

		Vanillin content	β-glucosidase activity	Total bacteria	Total yeast &mold
Perason Correlation	vanillin	1.0	0.215	-1.08	0.058
	β-glu	0.215	1.000	-0.647	0.297
	bacteria	-1.08	-0.674	1.000	-0.105
	yeast&mold	0.058	0.297	-0.105	1.00
Sig. (1-tail)*	vanillin	.	0.196	0.334	0.409
	β-glu	0.196	.	0.001	0.115
	bacteria	0.334	0.001	.	0.340
	yeast&mold	0.409	0.115	0.340	.

หมายเหตุ *วิเคราะห์สถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, n = 18

อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากผลการทดลองพบว่า ขั้นตอนการบ่มฝักมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกฝักและความชื้นของฝัก ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของคุณภาพฝักวานิลลาบ่ม ในขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกฝักมากที่สุด โดยหลังจากผ่านขั้นตอน sweating (AFSW) ค่า a* [ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียว (ค่าติดลบ) เป็นสีน้ำตาลดำ (ค่าบวก)] มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด (Fresh) ซึ่งมีค่าติดลบ แต่สำหรับการบ่มวานิลลาด้วย Mexican method (แบบดั้งเดิม) สีของเปลือกฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตั้งแต่ในขั้นตอนการทำให้เหี่ยว (Killing or Scalding) โดยนำฝักไปตากแดด จนกระทั่งสีเปลือกฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือเนื้อเยื่อฝักตาย ซึ่งวิธี killing ฝักวานิลลาสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การตากแดด การอบในตู้อบลมร้อน การจุ่มในน้ำร้อน การทำแผลบนฝัก รวมทั้งการแช่แข็ง (Ranadive, 1994) เอนไซม์หลักที่อาจเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของฝักวานิลลาในระหว่างการ killing ฝักคือ เอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) และ peroxidase (POD) (Broderick , 1965b) Gatfield et al. (2006) อธิบายเพิ่มเติมว่า เอนไซม์ POD อาจมีบทบาทมากกว่าการทำให้สีฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เอนไซม์ POD สามารถใช้ไฮโดรเจนเพอร์รอกไซด์ในการเร่งกระบวนการออกซิเดชั่นสารตั้งต้นหลายชนิดที่อยู่ในเซลล์ รวมทั้งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นสาร ประกอบให้กลิ่นวานิลลินให้เปลี่ยนอยู่ในรูป divanillin ได้อีกด้วย

ความชื้นฝักวานิลลาเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญ ในการจัดชั้นคุณภาพของฝักวานิลลาบ่มในหลายประเทศ สำหรับสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นประเทศผู้นำเข้าฝักวานิลลาเพื่อบริโภค รายใหญ่ที่สุดของโลก มี US Code of Federal Regulation of vanilla, 21 CFR 169.3 ซึ่งกำหนดให้ ฝักวานิลลาบ่มจะต้องมีปริมาณความชื้นของฝักโดยเฉลี่ย 25% และเป็นฝักของวานิลลาพันธุ์ *V. planiferia* หรือ *V. taitensis* สำหรับประเทศมาดาร์กัสกาซึ่งเป็นประเทศส่งออกวานิลลาคุณภาพดีที่เป็นที่ยอมรับทั่วโลก กำหนดเกรดของวานิลลาตามลักษณะกายภาพและปริมาณความชื้นของฝักเช่นกัน และมีชื่อเรียกที่แตกต่างกัน ฝักวานิลลาที่มีคุณภาพดีที่สุดคือ Black beans ซึ่งฝักมีสีน้ำตาลดำ เนื้อฝักหนา ฝักอ่อนนุ่ม มันวาว และมีความชื้นมากกว่า 30% ฝักวานิลลาที่มีคุณภาพดีเป็นลำดับสอง เรียก TK vanilla ซึ่งเป็นคุณสมบัติและลักษณะปรากฏเช่นเดียวกับ Black beans แต่มีความชื้นเฉลี่ย 25-30% (Ranadive, 2011) สำหรับผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าหลังจากปรับสภาพฝักเป็นเวลา 3 เดือน ปริมาณความชื้นฝักวานิลลา โดยเฉลี่ย 26.45% แต่มีเนื้อฝักค่อนข้างน้อย ฝักมีความยืดหยุ่นน้อย ผิวฝักไม่มันวาว จึงควรมีการปรับปรุงขั้นตอนการผลิตหรือเพาะปลูกและขั้นตอนการปฏิบัติเพื่อให้ได้ฝักที่มีคุณภาพหลังการบ่มดีขึ้น

จากการเปรียบเทียบปริมาณสารวานิลลินและสารกลูโควานิลลินซึ่งเป็นรูปสะสมของสารวานิลลิน (vanillin glycoside) ในระหว่างขั้นตอนการบ่ม การลดของปริมาณสารกลูโควานิลลินไม่สอดคล้องกับปริมาณวานิลลินที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการขั้นตอนการบ่มฝัก จากการทดลองพบว่าภายหลังจากขั้นตอน killing ปริมาณสารวานิลลินในฝักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด และเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดในขั้นก่อนและหลังการ sweating แต่สารกลูโควานิลลินกลับมีปริมาณลดลงช้ากว่าการเพิ่มขึ้นของสารวานิลลิน คือมีปริมาณสารลดลงภายหลังจากผ่านขั้นตอนการ sweating (AFSW) ซึ่งอธิบายได้ว่าปริมาณสาร

วานิลลินที่เพิ่มขึ้นอาจจะไม่ได้สังเคราะห์จากสารกลูโควานิลลิน ซึ่ง Dignum et al. (2004) รายงานว่าในฝักวานิลลาสด มีการสะสมสารในรูปกลุ่มของสารประกอบ phenolic glucoside ซึ่งมีสารมากถึง 12 ชนิด โดยมีสารที่สำคัญ ได้แก่ glycosides GV, Gvalc, GVA, GpOHb, Glucoside A และ Glucoside B นอกจากนั้นสารวานิลลิน อาจเปลี่ยนรูปจากสารตัวกลางหรือสารระเหยให้กลิ่นอื่นๆ (Joel et al., 2003) เช่น vanillic acid จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าสาร vanillic acid มีปริมาณเพิ่มขึ้น ระดับสูงสุดหลังจากผ่านขั้นตอน sweating และมีระดับลดลงต่ำสุดภายหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน แต่อย่างไรก็ตามสารอื่นๆ อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการผลิตสารวานิลลินน้อยกว่า เนื่องจากผลการทดลองพบว่าสาร 4-hydroxybenzoic acid มีปริมาณสูงสุดในฝักสด ในขณะที่สาร 4-hydroxybenzaldehyde มีปริมาณเพิ่มขึ้นภายหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน

เอนไซม์ β-glucosidase จัดเป็นเอนไซม์ที่บทบาทสำคัญในกระบวนการ hydrolysis สาร glucovanillin ในฝักวานิลลา ทำให้เกิดการพัฒนากลิ่นในฝักวานิลลา (Odoux et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าฝักวานิลลาสดมีกิจกรรม β-glu สูงสุด แต่หลังจาก killing ฝักด้วยการจุ่มน้ำร้อน แต่กลับมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นจนเท่ากับฝักสด ภายหลังจากบ่มในกล่องไม้ปิดฝา 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ β-glu จะลดลงตามลำดับ หลังจากผ่านขั้นตอน sweating, slow drying และ conditioning ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dignum et al. (2002) ที่ทำการ curing ฝักวานิลลาในระดับห้องปฏิบัติการ และพบว่าหลังจาก scalding หรือ killing ฝักวานิลลาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที ทำให้เอนไซม์ β-glu มีกิจกรรมลดลง แต่ถ้าเพิ่มระยะเวลาในการ scalding เป็น 3 ชั่วโมง โดยใช้อุณหภูมิ 50 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 95% (autoclaving) ทำให้เอนไซม์ β-glu ไม่ทำงานและไม่สามารถตรวจพบวัดกิจกรรมเอนไซม์ β-glu จากผลการทดลองแสดงว่า เอนไซม์ β-glu ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ในระดับปานกลาง เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้อุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ในการ killing คือ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ซึ่งทำให้อุณหภูมิภายในฝักเพิ่มขึ้นจากเดิมมีค่าเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นเป็น 58 องศาเซลเซียสภายหลังจากจุ่มในน้ำร้อน แต่ภายหลังจากบ่มในกล่องไม้ 24 ชั่วโมง อุณหภูมิของฝักลดลงจนเท่ากับปกติคือ 27-28 องศาเซลเซียส (ไม่แสดงผล) แต่จากผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมเอนไซม์ β-glu กับปริมาณ vanillin ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ตารางที่ 2) อธิบายได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักหรือข้อจำกัดในการเกิดกระบวนการ hydrolysis ที่สมบูรณ์ ของสารตั้งต้น glucovanillin ในฝักวานิลลา (Odoux et al., 2006) เอนไซม์ β-glu จัดเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ cellulase complex ซึ่งต้องมีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกันแบบเสริมกัน (synergistic action) ในการย่อยสลาย cellulose ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ในพืช รวมทั้งเปลือกของฝักวานิลลาต้องการเอนไซม์ในกลุ่ม endocellulase และ exocellulase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้าง cellulose ให้เป็น polysaccharide chains, disaccharide หรือ tetra saccharide เอนไซม์ β -glucosidase จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ cellobiase และเป็น exogenous cellulase ซึ่งเร่งการย่อยสลาย disaccharide หรือ tetra saccharide ให้เป็น monosacharide หรือ glucose (http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase) Yan et al. (1998) อธิบายว่า เอนไซม์ β-glu ไม่ได้มีหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายเซลลูโลส ในขั้นสุดท้ายให้เป็น monosaccharide เพียงอย่างเดียว แต่ยังมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ cellulose hydrolysis ยาวนานขึ้นโดยเอนไซม์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ exo- และ endoglucanase จากผลิตภัณฑ์ cellobiose ที่สร้างขึ้น จากผลการ

ทดลองพบว่า เอนไซม์ cellulase และ peroxidase มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด ภายหลังจากการ killing ฝักวานิลลาด้วยน้ำร้อน หรือภายหลังจากนำฝักที่ killed แล้วไปบ่มในกล่องไม้ 24 ชั่วโมง การ killing ฝักด้วยน้ำร้อน ทำให้ความเสียหายของเซลล์ที่องค์ประกอบของผนังเซลล์ในฝักวานิลลา ชักนำการทำงานร่วมระหว่างเอนไซม์ cellulase หรือ β-glucosidase และสารตั้งต้นกลูโควานิลลิน การเพิ่มเอนไซม์สำเร็จรูปที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus* ประกอบด้วยเอนไซม์ cellulase, pectinase และ β-glucosidase ที่สกัดจาก almond ร่วมกับวิธีการทำให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหาย โดยการบดทับด้วยลูกกลิ้งยาง (brusing) หรือ การแช่แข็งสลับกับการทำให้ละลาย (freezing and thrawing) ที่ อุณหภูมิ -18 และ 37 องศาเซลเซียส จะชักนำการผลิตสารวานิลลินให้เพิ่มขึ้นถึง 4.25-7% ต่อน้ำหนักแห้ง ในขณะที่วิธีการบ่มแบบดั้งเดิม มีปริมาณวานิลลินเฉลี่ยเพียง 2% ต่อน้ำหนักแห้ง (Perera and Owen, 2007) แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณวานิลลินที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างขั้นตอนการบ่มต่างๆ (ไม่แสดงข้อมูล)

สำหรับผลของการจำแนกชนิดชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อเยื่อฝักวานิลลาสด ส่วนใหญ่พบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* แต่พบเชื้อแบคทีเรียในฝักวานิลลาสดที่แตกต่างจากการศึกษาของ Röling et al. (2001) ซึ่งพบว่า ฝักสดมีเชื้อแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia* เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นหรือมีน้ำ (Caylan et al., 2004) และพบเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการแพร่กระจายได้ทั้งใน แหล่งน้ำผิวดิน น้ำเสีย รวมทั้งน้ำทิ้งอุตสาหกรรม และพบในระบบทางเดินอาหาร และ ระบบทางเดินหายใจของคน สามารถเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนอุจจาระ (http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/kk/klebsiella.html_ July 2011) แบคทีเรียทั้งสองชนิดที่พบใหม่นี้ คาดว่าอาจจะเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับน้ำหรือปุ๋ยที่ใช้ในการปลูกวานิลลา

เมื่อพิจาณาการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์บนฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม พบว่าหลังจาก killing ด้วยน้ำร้อนทำให้ประชากรรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และราลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ภายหลังจากนำฝักที่ killed แล้วไปบ่มในกล่องไม้ปิดฝา 24 ชั่วโมง ประชากรของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ชอบหรือทนต่อความร้อน (Röling et al., 2001) แต่ยีสต์และเชื้อราซึ่งทนต่อความร้อนค่อนข้างน้อย จึงไม่สามารถพบเชื้อดังกล่าวเลย ภายหลังจากบ่มฝักที่ killed กล่องไม้ปิดฝา 24 ชั่วโมง และหลังจากผ่านขั้นตอน sweating รวมทั้งภายหลังจากปรับสภาพ 3 เดือน ฝักมีความชื้นเฉลี่ยเพียง 26% ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และเชื้อรา แต่เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ β-glu และปริมาณประชากรแบคทีเรียรวมในระหว่างขั้นตอนการบ่ม พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าประชากรแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ β-glu ซึ่งในเอนไซม์สกัดในเชิงการค้า สามารถสกัดได้จากเมล็ดพืชหลายชนิด รวมทั้งสกัดจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา โดยนิยมสกัดจากสกัดเมล็ดพืช เช่น อัลมอล (Sigma) หรือสกัดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* (β-glucosidase II) (www.calazyme.com/commerce/catalog_April 2010; Yang et al., 1998) นอกจากนั้นยังสามารถสกัดเอนไซม์ β-glucosidase จากยีสต์ ในจีนัส *Saccharomyces* ซึ่งเอนไซม์ β-glu สามารถเพิ่มความหอมหวานของไวท์องุ่นในระหว่างกระบวนการบ่มหมักไวท์ (พัชราภรณ์, 2548)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของฝักวานิลลามีการเปลี่ยนแปลงไปภายหลังผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เหี่ยว (AFkilling) กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฝักสด แต่ภายหลังจากนำฝักที่ killing แล้วไปบ่มในกล่องไม้ปิดฝานาน 24 ชั่วโมง (Before sweating; BFSW) เอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเท่ากับฝักสด แต่ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (AFSW) กิจกรรมเอนไซม์ β-glu ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับทั้งสองขั้นตอนและในฝักสด แต่ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการปรับสภาพฝัก 3 เดือน (AFcond 3M) เอนไซม์ β-glu มีกิจกรรมลดลงตามลำดับ

2. เอนไซม์เซลลูเลสและเปอร์รอกซิเดส มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นภายหลังจากการ killing ฝักด้วยน้ำร้อน และมีกิจกรรมสูงสุดภายหลังจากนำฝักที่ killing แล้วไปบ่มในกล่องไม้ปิดฝานาน 24 ชั่วโมง ในขั้นตอน AFSW และ AFcond 3M กิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิด มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์คล้ายคลึงกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

3. เชื้อแบคทีเรีย สกุล *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่น่าจะมีบทบาทต่อการบ่มฝักวานิลลามากที่สุด เนื่องจากปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดกระบวนการบ่ม แต่ไม่พบประชากรเชื้อราและยีสต์ภายหลังจากการจุ่มฝักในน้ำร้อน แล้วบ่มในกล่องไม้นาน 24 ชั่วโมง

4. ในระหว่างขั้นตอนการบ่ม การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และปริมาณจุลินทรีย์ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารวานิลลินที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการบ่ม แต่พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสและปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากวานิลลาเป็นพืชที่ออกผลผลิต เพียงปีละ 1 ครั้ง โดยฝักมีความแก่ที่เหมาะสมกับการบ่ม หลังจากผสมเกสรประมาณ 11 เดือน ปกติฝักวานิลลาที่ผลิต ณ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวางเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน แต่ในฤดูการผลิต 2553/2554 ฝักวานิลลามีการสุกแก่ที่เร็วขึ้น (มกราคม-มีนาคม) ทำให้ในเดือนเมษายนซึ่งเป็นกำหนดการเก็บฝักวานิลลา มีปริมาณฝักน้อย และหลังเมษายน มีผลผลิตไม่เพียงพอต่อการทดลองซ้ำ

บรรณานุกรม

พัชราภรณ์ ศรีปัญญา. 2548. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพื่อเพิ่มความหอมในไวน์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 110 หน้า.

พรรณนีย์ วิชชาชู, ไม่ระบุปีที่แต่ง, พืชเครื่องเทศตระกูลกล้วยไม้ "วานิลลา", [Online], Available : http://www.benorchid.com/article/article_03.php, [15 กันยายน 2551].

พิทยา สรวมศิริ. 2551. อุตสาหกรรมพืชเครื่องเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 3 เชียงใหม่ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). 2547. การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมในการผลิตวานิลลาในพื้นที่ป่าเมี่ยง. รายงานประจำปี 2547 [http://www.tistr.or.th/tistr2006/source/report/annual2004_September 2008]

สิริพร สีแดง, ธิติมา วงษ์ชีรี, สุเมธ ท่านเจริญ, วันเพ็ญ วรวงศ์พงศา และ ชนะ พรหมทอง. 2553. การผลิต การตลาดและการวิจัยวานิลลาในประเทศไทย, วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร, ฉบับที่ 41(3/1) (พิเศษ), หน้า 469-472.

สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่, ไม่ระบุปีที่แต่ง, [Online], Available : http://ndoae.doae.go.th/news/news_024.html, [15 กันยายน 2551].

AOAC, Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). 1995, Washington D.C., USA.

Caylan, R., Kaklikkaya, N., Aydin, K., Aydin, F., Yilmaz, G., Ozgumus, B. and Koksal, I. 2004. An Epidemiological Analysis of Stenotrophomonas maltophilia Strains in a University Hospital. Jpn. J.Infect. Dis., 57,37-40. [http://WWW.nih.go.ip/JJID/57/37.pdf. _August 5 2008]

Dignum, M.J.W., Kerler, J. and Verpoorte, R. 2002. Vanilla curing under laboratory conditions. Food Chemistry 79: 165-171.

Dignum, M.J.W., Heijden, R., Kerler J., Winkel C., and Verpoorte R. 2004. Identification of glucosidase in green beans of *Vanilla planifolio* Andrews and kinetics of vanilla β-glucosidase. Food Chemistry 85: 199-205.

Frenkel, C. and Havkin-Frenkel, D., 2006, The physics and chemistry of vanillin. Perfumer Flavorist, Vol.31, pp. 28–36.

Gabor, Esther Michèle. 2004. Havesting nobel biocatalysis from the metagenome . Ph. D. thesis. University of Groningen, Groningen, Netherlands. [http://dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/science/2004/e.m.gabor/c7.pdf _September 2008]

Gatfield, I., Reiss, I., Krammer, G., Schmidt, C. O., Kindel, G., & Bertram, H.J. 2006. Novel teste-active component of fermented vanilla beans. *Perfumer Flavorist, 31,* 18-20.

Hariom, B. N., Shyamala, M., Prakash, M. and Bhat, K.K. 2006. Vanilla Flavour by Sensory and Electronic Nose Techniques. Journal of Sensory Studies 21: 228-239.

Havkin-Frenkel, D., French, J.C., Graft, N.M., Pak, F.E., Frenkel, C. and Joel, D.M. 2004. Interrelation of curing and botany in vanilla (*Vanilla planifolia*) bean. Acta Hort 629: 93-98.

Jole, D.M., French, J.C., Graft, N., Kourteva, G., Dinox, R. A. and Havkin-Frenkel, D. 2003. A hairy tissue produces vanillin. Israel Journal of Plant Sciences 51: 157-159.

Loeillet, D. Chad-flhor. 2003. The international vanilla market : Price is the main handicap. Fruitrop 98: 4-7.

Odoux E., 2000. Changes in vanillin and glucovanillin concentrations during the various stages of the process traditionally used for curing *Vanilla fragrans* beans in Réunion. Fruits 55: 119-125.

Odoux, E., Escoute, J., Verdeil, J.L., and Brillouet, J.M. 2003. Localization of activity and glucovanillin in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews). Annual of Botany 92: 437-444.

Odoux, E., Escoute, J. and Verdeil, J.L. 2006. The relation between glucovanillin, β-D-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. Annual of Applied Biology 149: 43-52.

Perera, C.O. and Owen, E. 2007. Effect of tissue disruption by different methods followed by incubation with hydrolyzing enzymes on the production of vanillin from tongan vanlla beans. Food Bioprocess Technol 10.1007/s11947-007-0048-4

Ranadive, A.S. 1994. Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products, p. 517-577. *In* G. Charalambous (ed.), Development in Food Science, vol 34. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Netherlands.

Ranadive, A.S. 2011. Quality control of vanilla beans and extracts, p. 141-161. *In* D. Havkin-Frenkel and F. C. Belanger (eds.), Handbook of Vanilla Science and Technology, Blackwell Publishing Ltd., UK.

Röling, Wilfred F.M., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H. and Van Verseveld, H. W. 2001. Microorganism with taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. Applied and Environment Microbiology 67: 1995-2003.

Ruiz-Terán, F., Perez-Amador, I. and López-Munguia, A. 2001. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5207-5209.

Sreedhar, R.V., Roohie, K., Maya, P., Venkatachalam, L., Narayan, M.S. and Bhagyashmi, N. 2007. Specific pretreatments reduce curing period of vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. Journal of Agricultural Food Chemistry 55: 2947-2955.

Sreedhar, R.V., Roohie, K., Maya, P., Venkatachalam, L. and Bhagyashmi, N. 2009. Biotic elicitors enhance flavour compounds during accelerated curing of vanilla beans. Food Biochemistry 112: 461-468.

Thibault, J.F., Asther, B.C., Ceccaldi, D., Couteau, M., Delattre,J.C., Duarte, C. Faulds, H.P. Heldt-Hansen, P. Kroon, L. Lesage-Meessen, V. Micard, C.M.G.C. Renard, M. Tuohy, S. van Hulle and G. Williamson. 1998. Fugal bioconversion of agricultultural by-products to vanillin. Food Sci. Technol. Lebensm. Wiss. 31: 530-536.

Walton, N.J., Mayer, M.J., and Narbad, A. 2003. Molecules of interest vanillin. Phytochemistry 63: 505-515.

Young, D., Bauer, K., Guentert, M., Augurusa, T. and Genchi, S. 2006. Vanilla flavor compositions. United States Patent Application. 20060045954.

Yan, T.R., Lin, Y.H., and Lin, C.L. 1998. Purification and characterization of an extracellular β-Glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. Food Chem 46: 432-437.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่า L* a* b* และ Hue ของสีเปลือกฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	Bean's peel color			
	L*	a*	b*	Hue
Fresh	31.05[b]	-5.24[d]	9.75[b]	114.12[a]
AFkilling	28.86[b]	-5.40[d]	9.21[b]	117.95[a]
BFSW	28.07[b]	-1.22[c]	9.03[b]	85.40[b]
AFSW	22.74[c]	3.77[a]	4.02[b]	47.89[c]
AFconditioning 3 M	67.14[a]	1.22[b]	9.85[b]	85.46[b]
F-test	*	*	*	*
CV (%)	50.35	-291.78	29.37	31.26

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร (ค่า L* คือ ความสว่างของสี ค่า a* คือการเปลี่ยนแปลงสีจากเขียวไปสีน้ำตาลดำ ค่า b* คือ การเปลี่ยนแปลงสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง และ Hue angle แสดงโทนสีของฝัก)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้นของฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร (11 M)

Treatments	Moisture Content (%)
Fresh	73.70[a]
AFkilling	74.79[a]
BFSW	74.73[a]
AFSW	49.24[b]
AFconditioning 3 M	26.45[c]
F-test	*
CV (%)	36.11

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณสาร Glucovanillin และ Vanillin (µg/g dry weight) ในฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	Glucovanillin (µg/g dry weight)	Vanillin (µg/g dry weight)
Fresh	126,215.83[ab]	4,014.68[c]
AFkilling	130,601.1[a]	17,493.7[b]
BFSW	114,268.1[b]	39,691.61[a]
AFSW	77,217.14[c]	50,410.72[a]
AFconditioning 3 M	31,954.19[d]	14,323.82[bc]
F-test	*	*
CV (%)	43.24	76.17

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยปริมาณสาร 4-Hydroxybenzoic acid, 4-Hydroxybenzaldehyde และ Vanillic acid (µg/g dry weight) ในฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	4-Hydroxybenzoic acid (µg/g dry weight)	4-Hydroxybenzaldehyde (µg/g dry weight)	Vanillic acid (µg/g dry weight)
Fresh	509.46[a]	789.90[b]	54.10[c]
AFkilling	206.79[b]	1,361.96[b]	402.57[b]
BFSW	124.32[c]	1,106.51[b]	280.60[b]
AFSW	20.47[d]	1,657.89[b]	2,826.54[a]
AFconditioning 3 M	32.85[d]	14,120.15[a]	77.71[c]
F-test	*	*	*
CV (%)	111.68	151.66	162.27

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์ β – glucosidase (µmol 4-nitrophenol/ min.mg protein) ในฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	β – glucosidase (µM/min/mg protein)
Fresh	1,305.02[a]
AFkilling	986.85[b]
BFSW	1,437.08[a]
AFSW	414.40[c]
AFconditioning 3 M	150.53[d]
F-test	*
CV (%)	65.07

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase (µmol glucose /min.mg protein) ในฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	Cellulase activity (µmol glucose /min.mg protein)
Fresh	37.23[b]
AFkilling	42.46[a]
BFSW	47.43[a]
AFSW	12.70[c]
AFconditioning 3 M	3.06[d]
F-test	*
CV (%)	68.36

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase (unit / mg protein) ในฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม

Treatment	Peroxidase activity (unit / mg protein)
Fresh	51.99[b]
AFkilling	72.98[a]
BFSW	79.60[a]
AFSW	17.40[c]
AFconditioning 3 M	0.91[d]
F-test	*
CV (%)	77.17

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

หมายเหตุ : ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลอง อายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร

ตารางภาคผนวกที่ 8 ประชากรของแบคทีเรียทั้งหมดและยีสต์และเชื้อราทั้งหมดบนฝักวานิลา อายุฝัก 11 เดือน ที่ผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอนต่างๆ

Treatment	Total bacteria & yeasts and molds (log 10 cfu /g)	
	Total bacteria (log 10 CFU/g)	**Total yeasts and molds (log 10 colony/g)**
Fresh	3.67[a]	3.00[a]
AFkilling	2.78[b]	1.00[b]
BFSW	3.98[a]	0.00[b]
AFSW	3.23[ab]	0.00[b]
AFconditioning 3 M	3.56[a]	0.00[b]
F-test	*	*
CV (%)	13.34	162.98

* = ข้อมูลในแต่ละ colum มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P>0.05) โดยใช้ DMRT

CV = coefficient of variation

T1 Fresh bean (Fresh)

T2 After Killing(Afkilling)

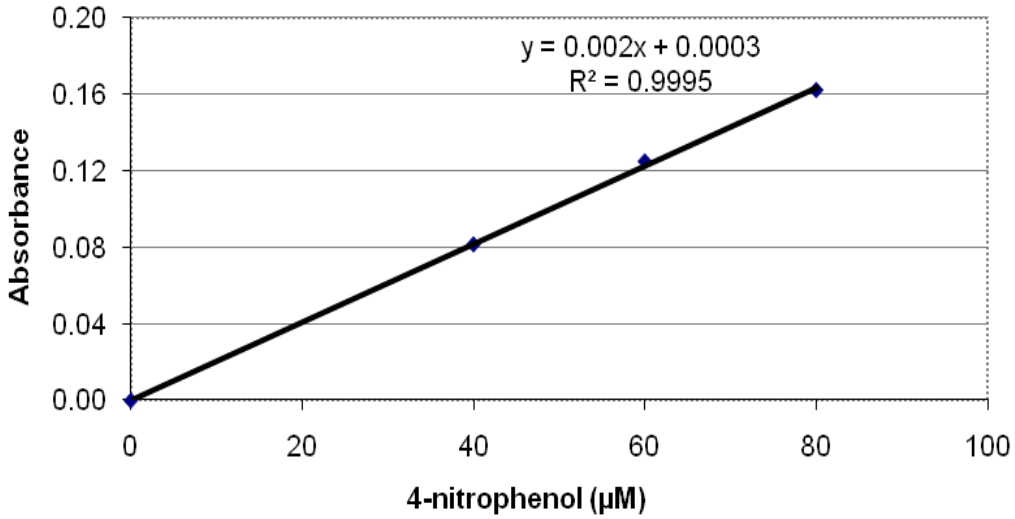
T3 Before Sweating (BFSW)

T4 After Sweating (AFSW)

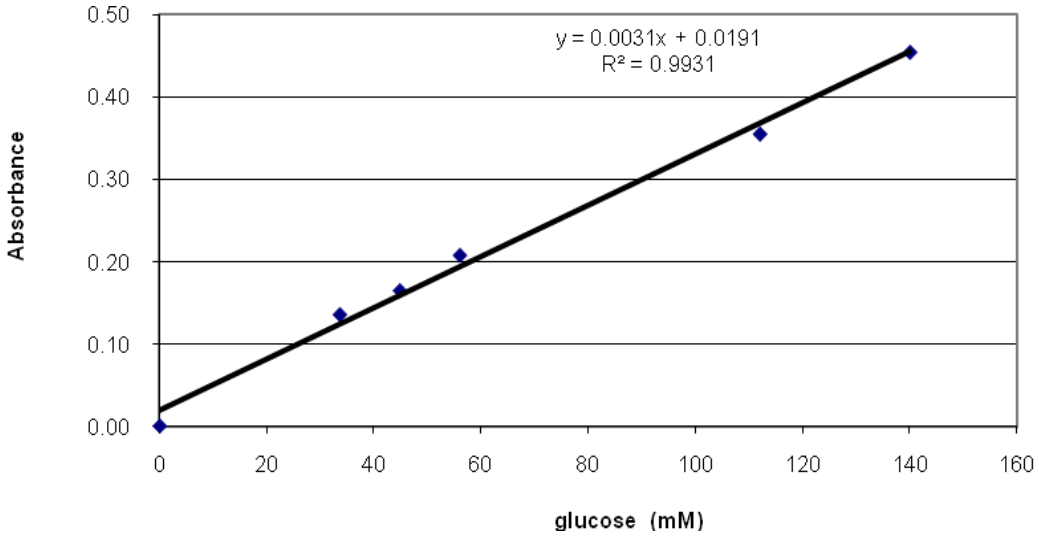
T5 After Slow drying (AFSD)

T6 After Conditioning for 1 mon.
(AFCond 1M)

รูปภาพผนวกที่ 1 ลักษณะปรากฏของฝักวานิลลา ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการบ่มต่างๆ



รูปภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร



รูปภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของ glucose ที่ความยาวคลื่น 632 นาโนเมตร

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. **ชื่อ –สกุล** ดร. ธิติมา วงษ์ชีรี (Dr. Thitima Wongsheree)
2. **หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน** 4-2201-00001-47-6
3. **ตำแหน่ง** นักวิจัย ระดับ 7
4. **หน่วยงาน/ที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ศูนย์วิจัยและบริการเพื่อชุมชนและสังคม (ศวช.) สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวท.)
ชั้น 7 สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
เลขที่ 126 ถ.ประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
โทร 0-2470-9682, 02-4709709 โทรสาร. 0-2470-9680
E-mail: thitima.won@kmutt.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา/ผลงาน**

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน
2534	ปริญญาตรี	วท.บ.	พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2538	ปริญญาโท	วท.ม.	วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2550	ปริญญาเอก	ปร.ด.	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)**
   - 6.1 การวิจัยทางด้านหลังการเก็บเกี่ยวของฝักวานิลลา
   - 6.2 การวิจัยเชิงสหวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวไม้ผลอุตสาหกรรม
   - 6.3 การถ่ายทอดเทคโนโลยีในระบบอุตสาหกรรมเกษตร
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: 1 โครงการ

   การวิจัยพัฒนากระบวนการบ่มในการปรับปรุงคุณภาพของฝักวานิลลาที่ผลิตในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภค-1ช/52)

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: 2 โครงการ

1. ผลของความแก่ของฝัก ความชื้นและอุณหภูมิระหว่างการบ่มต่อคุณภาพของฝักวานิลลา (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภค-1ช/52)

2. ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ว-1ช/53)

7.3 งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

1. ธิติมา วงษ์ชีรี, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ และเฉลิมชัย วงษ์อารี. 2542. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชบางชนิดร่วมกับสารเคลือบผิวที่มีต่อโรคแอนแทรคโนสและโรคขั้วผลเน่าของมะม่วงในระหว่างการเก็บรักษา. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 22 (3): 77-92.

2. ธิติมา วงษ์ชีรี, **เตชค์ฐสิณป์ เพียซ้าย**, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ และเฉลิมชัย วงษ์อารี. 2553. รายงานโครงการวิจัยย่อยที่ 4 เรื่อง การศึกษาเทคนิคการตรวจวัดโรคแอนแทรกโนสในผลมะม่วงระยะแก่เขียว *ใน* ชุดโครงการ เรื่อง ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อคุณภาพของผลมะม่วง สนับสนุนโดย ศูนย์นวตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ม.เชียงใหม่ ปีงบประมาณ 2552, 29 หน้า.

3. **ธิติมา วงษ์ชีรี,** ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี และ เตชค์ฐสิณป์ เพียซ้าย. 2553. คุณสมบัติและปริมาณของสารเมลานินจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของผลมะม่วง .วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(3) (พิเศษ): 481-484.

4. **Wongsheree**, **T.**, Rittiron R., Jitareerat P., Wongs-Aree C. and Phiasai T. 2010. "*Near Infrared Spectroscopic Analysis for Latent Infection of Colletrotrichum gloeosporioides, a Causal Agent of Anthracnose Disease in Mature-Green Mango Fruit.*" International Conference for a Sustainable Grater Mekong Subregion. (GSMETC2010) 26-27 August , The Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok Thailand, p. 341-343. (CD ROM)

7.4 การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1. **ธิติมา วงษ์ชีรี**, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี, วาริช ศรีละออง และวัชระ พันธ์ทอง, 2552, "*ผลของความแก่ของฝักต่อปริมาณสารให้กลิ่นในฝักวานิลลา*", การสัมมนาทางวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่ง ชาติ ครั้งที่ 7, 19-20 สิงหาคม, โรงแรมอ่าวนางวิลล่ารีสอร์ท, จ.กระบี่, หน้า 115. (โปสเตอร์)

2. **ธิติมา วงษ์ชีรี**, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี, วาริช ศรีละออง และวัชระ พันธ์ทอง, 2553, "*การศึกษาวิธีลดระยะเวลาการบ่มฝักวานิลลาที่ผลิตในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง*", การประชุมวิชาการวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง ภาคเหนือของประเทศไทย, 7-9 มกราคม, โรงแรมดิเอ็มเพรส, จ. เชียงใหม่, หน้า 104-105.

7.5 ผลงานที่ได้รับรางวัล

1. รางวัลการนำเสนอผลงาน ภาคโปสเตอร์ ระดับดี สาขาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว

ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และ**ธิติมา วงษ์ชีรี**, 2553, "*ผลกระทบของรังสีแกมมาต่อคุณภาพของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์สี่ในระหว่างการขนส่งและวางจำหน่าย*", การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9, 11-14 พฤษภาคม, โรงแรมกรุงศรีริเวอร์, จ.พระนครศรีอยุธยา, หน้า 218.

2. รางวัลการนำเสนอผลงาน ภาคบรรยาย ระดับดีเด่น สาขานวัตกรรมทางพืชสวนและการแปรรูป

ธิติมา วงษ์ชีรี, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี, วาริช ศรีละออง และวัชระ พันธ์ทอง, 2553, "*การใช้ตู้อบลมร้อนทดแทนการใช้แสงแดดในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา*", การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9, 11-14 พฤษภาคม, โรงแรมกรุงศรีริเวอร์, จ.พระนครศรีอยุธยา, หน้า 55.

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ-สกุล** นางสาวผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ (Miss Pongphen Jitareerat)
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3749900252975
3. **ตำแหน่ง** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
4. **หน่วยงาน/ที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
เลขที่ 126 ถ.ประชาอุทิศ แขวงบางมด กรุงเทพ 10140
โทรศัพท์ 0-2470-7722 โทรสาร 0-2470-7720

5. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่จบ	**ระดับการศึกษา**	**วุฒิการศึกษา**	**วิชาเอก**	**ชื่อสถาบัน**
2535	ปริญญาตรี	วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	โรคพืช	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2539	ปริญญาโท	วท.ม. (เกษตรศาสตร์)	โรคพืช	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2545	ปริญญาเอก	Ph.D.	โรคพืช	Gifu Univ. (Shizuoka Univ.)

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   - Postharvest pathology
   - Molecular biology in Plant pathology
   - Food safety and Microbiology

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย**

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

– ไม่มี -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1) การชักนำการแสดงออกของยีน Pathogenesis-Related (PR) Proteins และ Systemic Acquired Resistance (SAR) โดย Biotic และ Abiotic elicitors ในพริก

แหล่งทุน – สภาวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551

สถานภาพ – ได้ทำงานไปแล้วร้อยละ 12

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

PROCEEDING/CONFERENCES

1. Chookhongkha, N., **Jitareerat, P**., Kanlayanarat, S., and Niyomlao, W. (2004). Effect of Hot Water Treatment (HWT) on the Quality and storage Life of Netted Melon. Agricultural Sci. J. 35 5-6 (Suppl) : 89-92.

2. **Jitareerat, P.,** Uthairatanakij, A., Photchanachai, S., Srilaong, V. and Chookhongka, N. (2004). Effect of coating materials on mangosteen fruit quality. pp 173-177. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

3. Buntong, B., **Jitareerat, P.**, Wongs-Aree, C. and Kanlayanarat**,** S. (2004). Microbial assessment of fresh-cut papaya from supermarkets and decontamination using sodium hypochlorite. pp. 279-282. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

4. Sukewijaya, I.M., **Jitareerat, P.,** Uthiratanakij, A. and Kanlayanarat, S. (2004). Microbial Assessment and De-contamination of Fresh-cut Pummelo (*Citrus maxima*) by Sodium Hypochlorite. Pp. 283-286. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

5. Benitez, M.M., **Jitareerat, P.,** Kanlayanarat, S. and Acedo, Jr. A.L. (2004). Assessment of Microbial Contamination of Retail Fresh-cut Watermelon and Effects of Sodium Hypochlorite Treatment. pp 301-304. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

6. Jansri, S., **Jitareerat, P.,** and Kanlayanarat, S. (2004). Maintaining the Quality of Red Ginger Cut-Flower by 1-methlycyclopropane. pp 405-407. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

7. Na-rungsri, B., **Jitareerat, P.,** Phochanachai, S., and Kanlayanarat, S. (2004). Effects of Thiourea Pulsing on the vase Life of Torch Ginger Flower (*Eltlingera elatior* Smith). pp 383-387. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

8. Boonchoo,T., **Jitareerat, P.,** and Photchanachai, S. (2004). Inhibition of Aspergillus flavas in Brown rice with gamma irradiation. Pp. 431-432. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

9. Yong, B., Wong-Aree, C., **Jitareerat, P.** and Kanlayanarat, S. (2004). Postharvest attributes of 'Trad Seethong' pineapple under superatmospheric oxygen. pp. 267-271. In S. Kanlayanarat and W.B. MacGlasson (eds.). APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

10. Srilaoang, V., Uthiratanakij, A., **Jitareerat, P.,** and Kanlayanarat, S. (2004). Effect of plastic Tray packaging on quality of "Rong-rien" rambutan. Pp.195-199. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

11. Paumchai,S., **Jitareerat, P**., Kanlayanarat, S., and Sangchote. S. (2005). Effect of chitosan on controlling of anthracnose disease in mango cv. Nam Dok Mai. Faculty of Science, National University of Singapore, Singapore, 2nd Asian Conference on Plant Pathology 25-28 June 2005.

12. **Jitareerat, P.,** Sangchote. S. and Wongs-Aree, C. (2005).Detection of latent infection of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal anthracnose disease of raw mango fruit by Polymerase Chain Reaction. Faculty of Science, National University of Singapore, Singapore, 2nd Asian Conference on Plant Pathology 25-28 June 2005.

13. Kriratikron, W., **Jitareerat P**., Uthiratanakij, A., Photchanachai, S. (2005). Effect of Irradiation on Fungal Severity on Postharvest Diseases on Banana cv. Kluai Kai. International Symposium on New Frontier of the Irradiated Food and Non Food Products. 22-23 September 2005. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.

14. Waehamo, C., **Jitareerat P**., Uthiratanakij, A., Photchanachai, S. (2005). Effect of Irradiation on Fungal Severity on Postharvest Diseases on Manges cv. Num Dok Mai. International Symposium on New Frontier of the Irradiated Food and Non Food Products. 22-23 September 2005. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.

15. Jansri, S., Uthiratanakij, A., Kanlayanarat, S. and **Jitareerat P.** (2005). Effect of irradiation on flower dropping of 'Walter Oumae' orchid inflorescence after spraying calcium. International Symposium on New Frontier of the Irradiated Food and Non Food Products. 22-23 September 2005. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.

16. Uthairatanakij, A., Jansri, S., **Jitareerat, P**., Kanlayanarat, S. (2005) Effect of preharvest calciums spraying on gamma irradiate inflorescences of 'Walter Oumae 4N' *Dendrobium*. International Symposium on New Frontier of the Irradiated Food and Non Food Products. 22-23 September 2005. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.

17. Sritananan, S., Uthairatanakij, A., **Jitareerat, P**., Photchanachai, S. and Vongcheeree, S. (2005). Effects of irradiation and chitosan coating on physiological changes of mangosteen fruit stored at room temperature. International Symposium on New Frontier of the Irradiated Food and Non Food Products. 22-23 September 2005. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand.

18. Kyu Kyu Win, N., **Jitareerat, P.** and Kanlayanarat, S. (2006). Preharvest Chitosan Spraying on Leaf Spot Disease and Growth of Orchid (*Dendrobium missteen*). Pp.457-461. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

19. Kyu Kyu Win, N., **Jitareerat, P.** and Kanlayanarat, S. (2006). Antifungal Activity of Cinnamon (*Cinnamonmum zeylanicum*) Extract on Banana Crown Rotting Fungi. Pp.477. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

20. **Jitareerat, P**., Pradabsri, D., Kasinkaseampong, Y. and Chanthanumaut, P. (2006). Effect of chitosan for pre- and post-harvest diseases control of rambutan cv. Rong Rean. Pp. 463-472. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

21. **Jitareerat, P.,** Simonne, A. and Hsu, W. (2006). Survival of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh herbs. pp 363. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

22. Keawpet, N., **Jitareerat, P.** and Kanlayanarat, S. (2006). Inhibition of fiber formation and lignification of asparagus by 1-methycyclopropene. Pp. 247-250. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

23. Keawpet, N., **Jitareerat, P.** and Kanlayanarat, S. (2006). Effects of ethylene and 1-methycyclopropene on fiber and lignin content of Asparagus. Pp. 251-254. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

24. Aiamla-Or, S., Manakongtreecheep, D., Uthairatanakij, A., and **Jitareerat, P**. (2006). Effect of 1-methycyclopropene fumigation and holding solution on quality of Dendrobium Sonia 'No 17'. Pp. 393-397. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

25. Simonne, A. H., Hsu, W-Y., **Jitareerat, P.** and Marshall, M. R. (2006). Low-dose Irradiation Extend the Shelf-Life of Fresh Mint (*Mentha Piperita* L.) while improving Hygienic Quality. International Society of Horticultural Sciences--MQUIC. Bangkok, Thailand.

26. Hsu, W-Y., Simonne, A.H. and **Jitareerat, P.** (2006). Effects of Low-dose irradation on survival of *E. coli O157:H7*, *Salmonella* and MS2 bacteriophage on Fresh mint (*Menta piperita L.*). International Association for Food Protection Annual Meeting. (Accepted)

27. Hsu, W., Simonne, A. H., **Jitareerat, P.,** Evans, K.M. and Marshall, M.R. (2006). Effect of low-dose irradiation on quality characteristics of fresh mint (*Menta piperita* L.). Institute of Food Technology (IFT) National Meeting, Orlando, FL.

28. Jansri, S., **Jitareerat, P**., Niyomlao, W., Kanlayanarat, S. (2007) Maintaing the quality of red ginger cut flower using 1-Methlycyclopropene. (Abstract) P. 88, 5th National Conference on Postharvest Technology , At Miracle Grand Hotel, Bangkok, 28-29 July 2007.

29. **Jitareerat, P**. and Sa-ngunpuag, K. (2007) Effect of organic acids on browning and quality of fresh cut cauliflower. (Abstract) P. 93, 5th National Conference on Postharvest Technology , At Miracle Grand Hotel, Bangkok, 28-29 July 2007.

30. **Jitareerat, P.** and Uthairatanaki, A. (2007) A study on the combined effects of slow release sulphur dioxide and various plastic bags for controlling fruit rot diseases of "Daw" longan during storage. (Abstract) P. 131, 5th National Conference on Postharvest Technology , At Miracle Grand Hotel, Bangkok, 28-29 July 2007.

JOURNALS

1. Benitez, M.M., Acedo J.A.L., **Jitareerat, P.,** and Kanlayanarat, S. (2006). Induction of disease resistance in mango fruit by postharvest heat treatment. Acta Horticulturae 712:785-792.

2. Benitez, M.M., Acedo J.A.L., **Jitareerat, P.,** and Kanlayanarat, S. (2006). Mango fruit softening response to postharvest heat treatment. Acta Horticulturae 712 :811-816.

3. Uthiaratanakij, A., **Jitareerat, P.,** and Kanlayanarat, S. (2006). Effects of irradiation on quality attributes of two cultivars of mango. Acta Horticulturae 712 :885-891.

4. Phokum,C., **Jitareerat,** P., Phochanachai, S., and Cheevadhanarak, S. (2006). Detection and classification of soft rot Eriwinia of vegetables in Thailand by DNA Polymerase Chain Reaction. Acta Horticulturae 712:917-925.

5. **Jitareerat, P**., Wong-Aree, C., and Sangchote, S. (2006). Detection of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on green mango fruit by Polymerase Chain Reaction. Acta Horticulturae 712:927-935.

6. Hsu, W-Y., Simonne, A. H. and **Jitareerat, P.** (2006) Fates of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during storage. *J. Food Protection* 69 (8) :1997-2001.

7. Manuwong, S., Uthairatanakij, A. **Jitareerat, P**. (2007) Effects of hot water and sodium hypochorite treatments on survival of *Salmonella* spp. and qualities of fresh-cut pineapple. ACTA Horticulturae 746: 401-408.

8. Worakeeratikul, W. Srilaong, V., Uthairatanakij, A. and **Jitareerat, P**. (2007) Effects of hydrocooling and chitosan coating on browning and physiological changes in fresh-cut rose apple. ACTA Horticulturae 746: 427-434.

9. Worakeeratikul, W. Srilaong, V., Uthairatanakij, A. and **Jitareerat, P**. (2007) Effect of Whey protein concentrate on qualities and biochemical changes in fresh-cut rose apple. ACTA Horticulturae 746: 435-442.

10. Thommohaway, C., Kanlayanarat, S., Uthairatanakij, A., and **Jitareerat, P**. (2007) Quality of fresh cut Gauva (*Psidium guajava* L.) as affected by chitosan treatment. ACTA Horticulturae 746: 449-454.

11. Thommohaway, C.., Uthairatanakij, A., and **Jitareerat, P**. (2007) Effects of sucrose fatty acid ester on the quality of fresh cut Gauva (*Psidium guajava* L.). ACTA Horticulturae 746: 455-460.

12. **Jitareerat, P.**, Tanapaisankit, T., Srilaong, V., and Photchanachai, S. (2007). Chitosan Treatment for Controlling of Fruit Rot Disease Caused by *Lasiodiplodia theobromea* on Rambutan cv. Rong-Rien. *ACTA Horticulturae* xxx: xxx-xxx.. (Nov)2007

13. **Jitareerat, P.**, Ruenroengklin, N., Uthairatanakij, A. and Wongs-Aree, C. (2007) Use of Herbal Extracts for Inhibiting Microbial growth in Holding Solution of Cut-Rose. *ACTA Horticulturae* xxx: xxx-xxx. (Nov)2007

14. **Jitareerat, P**. and Sa-ngunpuag, K. (2007) Effect of oraganic acids on browning and quality of fresh cut cauliflower. *Agricultural Science Journal,* Vol 38(5): 82-86.

15. **Jitareerat, P.** and Uthairatanaki, A. (2007) A study on the combined effects of slow release sulphur dioxide and various plastic bags for controlling fruit rot diseases of "Daw" longan during storage. *Agricultural Science Journal,* Vol 38(5): 209-212.

16. **Jitareerat, P**., Paumchai, S., Kanlayanarat, S. and Sangchote, S. (2007) Effect of chitosan on ripening, enzymatic activity and disease development of mango fruit. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 35: 211-218.

17. Win, N.K.K., **Jitareerat, P.,** Kanlayanarat, S. and Sangchote, S. (2007) Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana. Postharvest Biological and Technology 45:333-340.

18. Wongs-Aree, C., **Jitareerat, P.**, Ketsa, S. 2007. Characteristics of ripe papaya stored at low temperature. ISHS Acta Horticulturae 738: (in press)

19. Komnueng, S., **Jitarerat**, P., Uthairatanakij, A., Wongs-Aree, C. and Aoki, S. 2008. Effects of Antagonistic Bacteria and Salicylic Acid on Crown Rot of Banana 'Kluai Hom Thong'. Agricultural Science Journal, vol. xx: xx-xx. *In press.*

20. Chatkeaw, A., **Jitareerat**, P., and Uthairatanakij, A. 2008. Combined effects of crude extracts from *Cassia siamea* leaves and packaging for controlling anthracnose disease of banana fruits cv. Klai Hom Thong during storage. Agricultural Science Journal, vol. xx: xx-xx. *In press.*

21. Srepong, K., **Jitarerat**, P., Srelaong, V. and Aoki, S. 2008. Selection of Chitinase Producing Bacteria from Soil in Shrimp Farms for Using as Antagonistic Bacterium Against Crown Rot Pathogens of Banana cv. Kuai Hom Thong. Agricultural Science Journal, vol. xx: xx-xx. *In press.*

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-สกุล นายเฉลิมชัย วงษ์อารี (Mr. Chalermchai Wongaree)

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3100901850601

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7

4. หน่วยงาน /ที่อยู่ที่ติดต่อได้

สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

เลขที่ 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กทม. 10150

โทร 0-2470-9804 โทรสาร 0-2470-9796

Email: chalermchai.won@kmutt.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	ชื่อสถาบัน
2535	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (พืชสวน)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2538	ปริญญาโท	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชสวน)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2546	ปริญญาเอก	ดุษฎีบัณฑิต (Plant Molecular and Cell Biology)	The University of Nottingham (UK)

6. สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

- Recombinant gene expression
- Aroma analysis of fresh produce
- Postharvest Physiology and Biochemistry

7. ชื่อข้อเสนองานวิจัย ปีที่พิมพ์ และการเผยแพร่ (พ.ศ. 2547 – 2551)

Boonchoo, T., W.Kongtanajarusakul , **C. Wongs-aree,** V. Srilaong, and S. Kanlayanarat. 2004. Storage characteristics of 'Nam Dokmai' mango pretreated with 1-MCP vapour. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

Buntong, B., P. Jitareerat, **C. Wongs-Aree** and S. Kanlayanarat. 2004. Microbial assessment of fresh-cut papaya from supermarkets and decontamination using sodium hypochlorite. pp. 279-282. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

Chunprasert A., A. Uthairatanakij and **C. Wongs-Aree 2006**. Storage quality of 'Neang' sugar apple treated with chitosan coating and MAP. Acta Hort. 712: 857-863.

Jitareerat, P., Sangchote. S. and **C. Wongs-Aree.** 2005. Detection of latent infection of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal anthracnose disease of raw mango fruit by Polymerase Chain Reaction. Proceeding of National University of Singapore on 2nd Asian Conference on Plant Pathology, Singapore.

Jitareerat P., **C. Wongs-Aree** and S. Sangchote. 2006. Detection of quiescent infection of Collectotrichum gloeosporioides on green mango fruit by polymerase chain reaction. Acta Hort. 712: 927-935.

Katawatcharakul, W., P. Jitareerat, R. Kopradisakul and **C. Wongs-Aree**. 2003. Effect of plant extracts on stem-end rot and anthracnose pathogens of mango fruit. pp 383-387. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

Meelarp, P., , W. Kongtanajarusakul , **C. Wongs-aree,** A. Uthairatanakij, and S. Kanlayanarat.. 2004. Storage life extension of 'Pann' lime using edible coating. pp. 305. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

Pongprasert, N., **C. Wongs-Aree**, V. Srilaong, S. Kanlayanarat. 2007. Alleviation of browning and lignification in minimally processed sweet bamboo (*Dendrocalamus asper*) shoots by packaging. News Zealand Journal of Crops and Horticultural Science. Vol 35: 253-257.

Singkaew, J., **C. Wongs-aree**, V. Srilaong, S. Photchanachai, and S. Kanlayanarat. 2004. Storage of 'Nam Dokmai' mango under high CO_2 and low O_2 partial pressure. pp 179-182. In S. Kanlayanarat and W.B. McGlasson (eds.). Proceedings of the APEC Symposium on Postharvest Handling Systems, Bangkok, Thailand.

Wongs-Aree, C. and S. Kanlayanarat. 2004. $CaCl_2$ applications on storage quality of rambutan. Acta Hort. 687: 213-218.

Wongs-Aree C. and V. Srilaong. 2006. CaCl2 infiltration on 'Klom Sali' guava quality at low temperature storage. Acta Hort. 712: 851-856.

Wongs-Aree, C., V. Srilaong and S. Kanlayanarat. 2004. Quality alteration of 'Klom Sali' guava stored under modified atmosphere packaging. pp. 295-298. In S. Kanlayanarat and W.B. MacGlasson (eds.). APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

Wongs-Aree C., M.M. Giusti and S.J. Schwartz 2006. Anthocyanins derived only from delphinidin in the blue petals of *Clitoria ternatea*. Acta Hort. 712: 437-442.

Yong, B ., **C**. **Wongs-Aree** , A. Uthairatanakij and S. Kanlayanarat. 2004. A reduction of internal browning in 'Trad Sritong' pineapple using controlled atmosphere storage. pp 273-277. In S. Kanlayanarat and W.B. MacGlasson (eds.). APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

Yong, B ., **C**. **Wongs-Aree** , P. Jitareerat and S. Kanlayanarat. 2004. Postharvest attributes of 'Trad Sritong' pineapple under superatmospheric oxygen. pp. 267-271. In S. Kanlayanarat and W.B. MacGlasson (eds.). APEC symposium on quality management in Postharvest systems, Bangkok, Thailand.

ชวนพิศ จิระพงษ์, วาริช ศรีละออง และ**เฉลิมชัย วงษ์อารี.** 2548. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกะเพราที่เก็บรักษาในสภาพบรรยากาศดัดแปลงที่อุณหภูมิต่ำ. วารสาร วิทย. กษ. 36(5-6): 1144-1147.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล ดร. วาริช ศรีละออง (Dr. Varit Srilaong)

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 9299 00427 86 2

3. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงาน/ที่อยู่ที่ติดต่อได้

สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
เลขที่ 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพ 10150
โทร. 02-470-7726 โทรสาร 02-470-7728
e-mail: varit.sri@kmutt.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

Year	Course	Specialization	College/ university
2001-2004	Ph.D.	Postharvest Biology and Technology	Kagoshima University, Japan
1994-1997	M.Sc.	Postharvest Technology	King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand
1990-1994	B.Sc	Food Technology *(First Class Honor Award)	The University of Thai Chamber of Commerce, Thailand

6. สาขาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

- การควบคุมคุณภาพของผลิตผลทางการเกษตรและอาหาร โดยอาศัยหลักการ HACCP, GMP และ GAP
- การเก็บรักษาอาหารโดยใช้เทคนิค modified atmosphere และ controlled atmosphere
- สารสำคัญที่มีในพืช (Bioavailable compounds in plants)

7. Publication papers:

1. Tin Ohnmar Win, **Varit Srilaong**, Khin Lay Kyu and Sirichai Kanlayanarat. 2006. Biochemical and physiological changes during chlorophyll degradation in lime (Citrus aurantifolia cv. 'Paan'). Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 81(3): 471-477.
2. Tin Ohnmar Win, **Varit Srilaong**, Julian Heyes, Khin Lay Kyu and Sirichai Kanlayanarat. 2006. Effects of different concentrations of 1-MCP on the yellowing of West Indian lime (Citrus aurantifolia, Swingle) fruit. Postharvest Biology and Technology. 42: 23-30.

3. N. Pongprasert, C. Wongs-Aree, **V. Srilaong** and S. Kanlayanarat. 2007. Alleviation of browning and lignification in minimally processed sweet bamboo shoots by packaging. New Zealand J. Crop Hort. Sci. 35: 253-257.
4. P. Yingsanga, **V. Srilaong**, S. Noichinda, W.B. McGlasson and S. Kanlayanarat. 2008. Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. Postharvest Biology and Technology. (IN PRESS)

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ-สกุล** นายวัชระ พันธ์ทอง (Mr. Vatchara Punthong)
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3-5301-00912-59-1
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** นักเกษตร (ไม้ดอก)
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

   ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง บ้านขุนวาง
   หมู่ 12 ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ 50360
   โทรศัพท์ 0-5322-9645
5. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	ชื่อสถาบัน
2542	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยแม่โจ้

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   การผลิตและแปรรูปวานิลลา
   ไม้ดอกเมืองหนาว

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ-สกุล** นางวาสนา มานิช (Mrs.Wasana manish)
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3101600381981
3. **ตำแหน่ง** ผู้ช่วยนักวิจัย 3
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ศูนย์วิจัยและบริการเพื่อชุมชนและสังคม สำนักวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานอธิการบดี ชั้น 7 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
126 ถนนประชาอุทิศ แขวงบางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
โทรศัพท์ 0-2470-9709 โทรสาร 0-2470-9680
E-mail: khunwasana@yahoo.com, phwasanadee@hotmail.com

5. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน
2539	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต	โรคพืช	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2544	ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   - การจัดการสิ่งแวดล้อมชุมชน
   - ปุ๋ยชีวภาพจากของเหลือใช้ทางการเกษตร
   - เกษตรยั่งยืน (เกษตรปลอดสารพิษ)
   - การส่งเสริมและการพัฒนาชนบท
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

- การจัดการเทคโนโลยีการปลูกส้มบางมดรูปแบบเกษตรสังคมเมืองอย่างยั่งยืน
- การวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานของสวนส้ม กรณีศึกษาสวนส้มบางมด พื้นที่ทุ่งครุ – บางขุนเทียน
- โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีรูปแบบการผลิตปุ๋ยหมักแบบไม่กลับกอง ที่เหมาะสมกับชุมชน กรณีศึกษาบ้านหุบมะกล่ำ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี
- การใช้กากมูลหมักจากบ่อก๊าซชีวภาพทดแทนปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวโพดฝักอ่อน

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- การวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานของสวนส้ม กรณีศึกษาสวนส้มบางมด พื้นที่ทุ่งครุ – บางขุนเทียน (2551, หัวหน้าโครงการ ทุนวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2550)
- โครงการบทบาทเครือข่ายอุดมศึกษาจังหวัดราชบุรีต่อการพัฒนาธุรกิจโคนม กรณีศึกษาชุมชนหุบมะกล่ำ ตำบลบ้านเลือก อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี (2551, ผู้ร่วมโครงการ, ทุนวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2549-2551)
- การศึกษาคุณภาพน้ำและสารเคมีปนเปื้อนในแหล่งน้ำในร่องสวนที่มีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน บริเวณสวนส้มบางมด (2551, ผู้ร่วมโครงการ, ทุนวิจัย พระจอมเกล้าธนบุรี ประจำปีการศึกษา 2549 รอบที่ 1)
- การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพและการสร้างขีดความสามารถของชุมชนเพื่อการปรับปรุงดินและการเพาะปลูก (2550, ผู้ร่วมโครงการ, ทุนวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)
- โครงการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีรูปแบบการผลิตปุ๋ยหมักแบบไม่กลับกอง ที่เหมาะสมกับชุมชน กรณีศึกษาบ้านหุบมะกล่ำ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี (2550, หัวหน้าโครงการ ทุนวิจัย เครือข่ายภาคกลางตอนล่าง สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ปีงบประมาณ 2550)

บทความทางวิชาการเสนอในการประชุมวิชาการ (Proceeding)

- วาสนา คำกวน, ริเรืองรอง รัตนวิไลสกุล, ทศพร ทองเที่ยง, **วาสนา มานิช** และ ปัทมา ศิริธัญญา, 2551, “การจัดการภายในแปลงปลูกและผลผลิตข้าวไร่ของเกษตรกรในพื้นที่ศูนย์ภูฟ้าพัฒนาตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน”, การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551, หัวข้อ พลังงานทดแทนแก่นเกษตรยั่งยืน ฟื้นชีวีสิ่งแวดล้อม น้อมรับพระราชดำริ วันที่ 8-10 กันยายน 2551, คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, จังหวัดพิษณุโลก, หน้า 144.
- พรรณปพร กองแก้ว, **วาสนา มานิช** และปรีชา รอดอิ่ม, 2551, “การเปรียบเทียบกากมูลหมักจากโคนมกับปุ๋ยเคมีต่อปริมาณและคุณภาพในการผลิตหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออก”, โครงการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ภายใต้หัวข้อ “พืชสวนไทย ใต้ร่มพระบารมี” ระหว่างวันที่ 26 – 30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอมรินลากูน อ.เมืองพิษณุโลก จ. พิษณุโลก, หน้า 389.
- โชคธำรงค์ จงจอหอ ดร.จุรีพร กาญจนการุณ ดร.ทศพร ทองเที่ยง และ**นางวาสนา มานิช**. ความคิดเห็นของพหุภาคีส้มบางมดต่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศในสวนส้มบางมด (Bang Mod Tangerine’s Multilaterals Perspective on Ecotourism in Bang Mod Tangerine Orchard) โครงการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ภายใต้หัวข้อ “พืชสวนไทย ใต้ร่มพระบารมี” ระหว่างวันที่ 26-30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ.เมืองพิษณุโลก จ.พิษณุโลก, หน้า 378.

- **วาสนา มานิช** นิพนธ์ จีนขาวขำ เสรี มุ่งเมือง และพรรณปพร กองแก้ว. เทคโนโลยีการผลิตปุ๋ยหมักที่เหมาะสมกับชุมชนหุบมะกล่ำ อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี. (Appropriate Technology for Composting at HubMaKhum AmPhur Photharam Ratchaburi Province) การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย “ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 1” วันที่ 22 พฤศจิกายน 2550. ณ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม. (นำเสนอภาคการบรรยายและโปสเตอร์)
- วาสนา คำกวน ริเรืองรอง รัตนวิไลสกุล ปัทมา ศิริธัญญา **วาสนา มานิช** ประสาธน์ สุยะ และ ทศพร ทองเที่ยง วิถีการปลูกข้าวไร่ของเกษตรในพื้นที่ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา ต.ภูฟ้า อ.บ่อเกลือ จ.น่าน. (The Way of upland rice growing by farmers at Phufha Development Center, Nan Province). การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 1 วันที่ 19-20 กรกฎาคม 2550. ณ โรงแรม เอส ดี อเวนิว กรุงเทพฯ. จัดโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. (นำเสนอภาคโปสเตอร์)
- **Manish W**., Kongkaew P., and Klinpratoom S. 2006. Effect of sludge from biogas digesting pool for fresh baby corn production. The 4th KU-NPUST Bilateral Conference “Food for Health: The Magic of ASEAN Agriculture” November 6-8, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (Oral Presentation)

งานวิจัยที่กำลังทำ

- การจัดการเทคโนโลยีการปลูกส้มบางมดรูปแบบเกษตรสังคมเมืองอย่างยั่งยืน

(แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552 , หัวหน้าโครงการ ทำการวิจัยลุล่วงแล้ว ร้อยละ 80)