กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจาก สำนักงานกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553 ขอขอบพระคุณ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย คุณอนันต์ บุญมี ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพัฒนาโครงการหลวงขุนวาง ดร.ชนะ พรหมทอง นักวิจัยและหัวหน้าศูนย์ประสานงานพัฒนาเกษตรที่สูง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ ดร.ทศพร ทองเที่ยง ที่กรุณาให้คำแนะนำและ ข้อเสนอแนะต่างๆในระหว่างการดำเนินการวิจัย

ธิติมา วงษ์ชีรี

สิงหาคม 2554

บทคัดย่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2553 จำนวนเงิน 429,500 บาท ระยะเวลาการทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตั้งแต่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึง 30 สิงหาคม พ.ศ. 2554

ชื่อผู้วิจัย

1. ดร.ธิติมา วงษ์ชีรี ศูนย์วิจัยและบริการเพื่อชุมชนและสังคม สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โทรศัพท์ 02-4709682
2. ผศ.ดร. ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียนโทรศัพท์ 02-4707722
3. ผศ.ดร. เฉลิมชัย วงษ์อารี หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน โทรศัพท์ 02-4707725
4. ผศ.ดร. วาริช ศรีละออง หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน โทรศัพท์ 02-4707726
5. นายวัชระ พันธ์ทอง ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-229645
6. นางวาสนา มานิช ศูนย์วิจัยและบริการเพื่อชุมชนและสังคม สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โทรศัพท์ 02-4709709

ส่วนที่ 2 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 other hand 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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายคำย่อ	ซ
บทคัดย่อ	1
บทนำ	3
วัตถุประสงค์โครงการ	5
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	9
ผลการวิจัย	12
อภิปรายและวิจารณ์ผล	23
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	26
ปัญหาและอุปสรรค	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	31
ประวัติคณะผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากฝักวานิลลาสด 20

ตารางที่ 2 ค่าสหสัมพันธ์เส้นตรงของปริมาณสารวานิลลิน กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด 22

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	การสังเคราะห์สาร vanillin ในฝักวานิลลา ผ่านวิถี phenylpropanoid	7
ภาพที่ 2	สารตั้งต้นและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร วานิลลิน	8
ภาพที่ 3	การเปลี่ยนแปลงค่า L* a* b* และ Hue angle ของสีเปลือกฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	13
ภาพที่ 4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นฝักวานิลลาสด (Fresh) และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	13
ภาพที่ 5	ปริมาณสารตั้งต้น glucovanillin และ vanilling และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	15
ภาพที่ 6	ปริมาณสาร 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzaldehyde และ vanillic acid และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	16
ภาพที่ 7	กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	18
ภาพที่ 8	กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	18
ภาพที่ 9	กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และฝักวานิลลาในระหว่างขั้นตอนการบ่ม (ฝักวานิลลาที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 11 เดือนหลังการผสมเกสร)	19
ภาพที่ 10	ประชากรของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา บนฝักวานิลาอายุฝัก 11 เดือน ที่ผ่านกระบวนการบ่มในขั้นตอนต่างๆ	21

คำอธิบายคำย่อ

Fresh	Fresh vanilla bean
AFkilling	After killing step
BFSW	Before sweating step
AFSW	After sweating step
AFconditioning 3 M	After conditioning for 3 months