โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเปรียบเทียบชนิดจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวานิลลินของฝักวานิลลาโดยวิธีการบ่มที่แตกต่างกัน

ชื่อนิสิต นางสาวสันธิลา ไทยเจริญ

นางสาวปริฏา จันทะบาน

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

Comparison of microorganisms and activities of enzymes related to vanillin production from different methods of vanilla pod curing

Parita Chantaban
Suntila Thaicharoen

Project Advisor

Panita Ngamchuachit, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology Department of Food Technology Faculty of Science Chulalongkorn University Academic Year 2018

หัวข้องานวิจัย การเปรียบเทียบชนิดจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวานิลลินของฝักวานิลลาโดยวิธีการบ่มที่แตกต่างกัน

โดย นางสาวปริฏา จันทะบาน

นางสาวสันธิลา ไทยเจริญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. พนิตา งามเชื้อชิต

ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัญฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหา
ประจาปีการศึกษา 2561

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(อาจารย์ ดร. พนิตา งามเชื้อชิต)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การเปรียบเทียบชนิดจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวานิลลินของฝักวานิลลาโดยวิธีการบ่มที่แตกต่างกัน

โดย นางสาวปริฏา จันทะบาน

นางสาวสันธิลา ไทยเจริญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. พนิตา งามเชื้อชิต

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การผลิตวานิลลาต้องผ่านกระบวนการบ่มหลายขั้นตอน ได้แก่ 1) การทำให้เหี่ยว 2) การทำให้เกิดเหงื่อ 3) การทำแห้ง 4) การปรับสภาพ ฝักวานิลลาเมื่อผ่านการบ่มแล้วจะผลิตสารระเหยให้กลิ่นหลายชนิด โดยหนึ่งในสารให้กลิ่นสำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ของวานิลลาคือ วานิลลิน (vanillin) ซึ่งเกิดจากการสารตั้งต้นไกลโคไซด์ (glycoside) ได้แก่ กลูโควานิลลิน (glucovanilin) ถูกตัดด้วยเอนไซม์ β-glucosidase ที่มาจากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและผลิตได้จากจุลินทรีย์ปลดปล่อยวานิลลินออกจากน้ำตาล งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการสร้างสารให้กลิ่นสำคัญระหว่างกระบวนการผลิตวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มฝักวานิลลาที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ วิธีบ่มแบบ Bourbon และวิธีบ่มแบบ Mexican และศึกษาลักษณะทางประสาทสัมผัสของกลิ่นวานิลลาพันธุ์ *Vanilla tahitensis* ที่ปลูกในประเทศไทย จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อของฝักวานิลลาด้วยเทคนิค spectrophotometry พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ส่วนมากมาจากเนื้อเยื่อพืช โดยมีค่ากิจกรรมสูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในการบ่มแบบ Bourbon มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาในแต่ละขั้นตอนดังนี้ 0.0107, 0.0083, 0.0115, 0.0300 และ 0.1942 μmol of pNp/min.g sample และจากจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้ 0.0007, 0, 0.0006, 0.0025 และ 0.0063 μmol of pNp/min.mL sample (ฝักสด ภายหลังการทำให้เหี่ยว ภายหลังการทำให้เกิดเหงื่อ การทำให้เกิดเหงื่อ ภายหลังการทำแห้ง และ ภายหลังการปรับสภาพ ตามลำดับ) ดังนั้นขั้นตอนที่สำคัญในการทำให้วานิลลาเกิดกลิ่นในการบ่มแบบ Bourbon คือขั้นตอนการปรับสภาพ เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และในการบ่มแบบ Mexican มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่วัดได้จากเนื้อเยื่อในแต่ละขั้นตอนดังนี้ 0.0107, 0.1221, 0.0030 และ 0.0373 μmol of pNp/min.g sample และจากจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้ 0.0007, 0.0092, 0.0130 และ 0.0142 μmol of pNp/min.mL sample (ฝักสด ภายหลังการทำให้เหี่ยวและการทำให้เกิดเหงื่อ ภายหลังการทำแห้ง และ ภายหลังการปรับสภาพ ตามลำดับ) ดังนั้นขั้นตอนที่สำคัญในการทำให้วานิลลาเกิดกลิ่นในการบ่มแบบ Mexican คือขั้นตอนการทำให้เหี่ยวและการทำให้เกิดเหงื่อ เนื่องจากมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จากการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ โดยการจำแนกความแตกต่างของชนิดจุลินทรีย์ ด้วยเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRMA) และ DNA sequencing ในแต่ละขั้นตอนของการบ่มฝักวานิลลาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย 9 ชนิดระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา โดยมีเชื้อในสกุล Bacillus ชนิด

Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis และ *Bacillus megaterium* ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase นอกจากนี้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณาพบว่า วานิลลาพันธุ์ *Vanilla tahitensis* มีคุณลักษณะกลิ่นทั้งหมด 8 กลิ่น ได้แก่ กลิ่นมาร์ชแมลโลว์ กลิ่นช็อคโกแลตสังเคราะห์ กลิ่นใบชาแห้ง กลิ่นบ๊วยเปลือกส้ม กลิ่นบ๊วยเค็ม กลิ่นบ๊วยแผ่น กลิ่นกานพลู กลิ่นช็อคโกแลตนม โดยการบ่มแบบ Mexican ให้กลิ่นมาร์ชแมลโลว์ กลิ่นใบชาแห้ง กลิ่นกานพลู มากกว่าการบ่มแบบ Bourbon อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Project Title Comparison of microorganisms and activities of enzymes related to vanillin production from different methods of vanilla pod curing

Student Parita Chantaban
Suntila Thaicharoen

Study Program Bachelor of Science in Food Technology

Advisor Panita Ngamchuachit, Ph.D.

Academic Year 2018

Abstract

Vanilla curing methods involves four steps including 1) killing 2) sweating 3) drying and 4) conditioning. Cured vanilla pods could produce several volatile compounds which vanillin is one of the key aroma compounds. Vanillin was produced by hydrolysis of glucovanillin precursor by β-glucosidase that found in the vanilla tissue or produced from some microorganism. The objectives of this study are to identify the microorganisms and to analyze enzyme activity involved to vanilla aroma during curing using two different curing methods e.g. Bourbon curing method and Mexican curing method and to study the aroma characteristics of *Vanilla tahitensis* vanilla grown in Thailand which cured from different methods. The analysis of β-glucosidase activity from vanilla tissue and microorganism by spectrophotometry found that enzyme activity was mostly from vanilla tissue which showed significantly higher activity than those of microorganisms ($P < 0.05$). For Bourbon curing method, the enzyme activities from vanilla tissue in each step are 0.0107, 0.0083, 0.0115, 0.0300 and 0.1942 μmol of pNp / min.g sample and those from microorganisms in each step are 0.0007, 0, 0.0006, 0.0025 and 0.0063 μmol of pNp / min.mL sample (fresh, after killing, after sweating, after drying and after conditioning, respectively). The most important step for Bourbon curing method is conditioning because of its highest enzyme activity. Mexican curing method, the enzyme activities from vanilla tissue in each step are 0.0107, 0.1221, 0.0030 and 0.0373 μmol of pNp/min.g sample and those from microorganisms in each step are 0.0007, 0.0092, 0.0130 and 0.0142 μmol of pNp / min.mL sample (fresh, after killing, after sweating and after drying and after conditioning, respectively). The most important step for Bourbon curing method is killing and sweating because of their highest enzyme activity. From the identification of microbial species by High Resolution Melting Analysis (HRMA) and DNA sequencing in each step of cured vanilla pods, nine species of bacteria were identified. The bacteria in the genus *Bacillus* including *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* potentially affecting the activity of β-glucosidase. In addition, the descriptive sensory study found that *Vanilla tahitensis* has 8 aroma characteristics including marshmallow, chocolate extract, dried tea leave, orange peel plum, salted plum, Hawthorn berry,

clove and milk chocolate. Mexican curing method showed significantly higher in marshmallow, dried tea leave and clove aroma notes than Bourbon curing method ($P < 0.05$).

กิตติกรรมประกาศ

โครงการศึกษาการเปรียบเทียบชนิดจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตวานิลลินของฝักวานิลลาโดยวิธีการบ่มที่แตกต่างกันนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนในระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2561 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีอาจารย์ ดร. พนิตา งามเชื้อชิต เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

คณะวิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พนิตา งามเชื้อชิต ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยอย่างสูง ตลอดจนตรวจแก้ไขโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณเหล่าคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการดำเนินงานโครงการนี้

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกระบวนการแปรรูปอาหารฯ ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร และห้องปฏิบัติการประกันคุณภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ได้อำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีในการใช้ห้องปฏิบัติการตลอดการดำเนินโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนา เครือเบทาโกร ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ความร่วมมือในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณรุ่นพี่ เพื่อน และรุ่นน้อง นิสิตปริญญาตรี นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวของคณะผู้วิจัยทั้งสองครอบครัวที่ได้สนับสนุนในทุก ๆ ด้าน จนโครงการนี้สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนส่งเสริมคณะผู้วิจัยด้านโอกาสการศึกษาแก่คณะผู้วิจัยตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ปริฏา จันทะบาน

สันธิลา ไทยเจริญ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ซ
สารบัญ	ฌ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตแนวคิดของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	3
2.1 วานิลลา	3
2.2 การบ่มฝักวานิลลา	3
2.2.1 การทำให้เหี่ยว (Killing)	4
2.2.2 การทำให้เกิดเหงื่อ (Sweating)	4
2.2.3 การทำให้แห้ง (Drying)	5
2.2.3 การปรับสภาพ (Conditioning)	5
2.3 สารวานิลลิน	6
2.4 เทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (High Resolution Melting Analysis: HRMA)	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
3.1 การเตรียมตัวอย่างวานิลลา	9
3.2 วิธีการบ่มฝักวานิลลา	9
3.2.1 วิธีการบ่มแบบ Bourbon	9
3.2.2 วิธีการบ่มแบบ Mexican	10
3.3 การวัดความชื้น	10
3.4 การเก็บเชื้อจุลินทรีย์	11
3.5 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์	11
3.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
3.5.2 spread plate	11

3.5.3 pour plate 11
3.6 การเตรียมเชื้อเพื่อนำไประบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ 11
3.7 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา (curing) 12
3.8 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase 12
3.8.1 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidaseจากเนื้อเยื่อฝักวานิลลา 12
3.8.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์ 13
3.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัส 13
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ 13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล 14
4.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่ม (curing) 14
4.2 ลักษณะทางประสาทสัมผัสของฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มแบบ Bourbon และ Mexican 16
4.3 ความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่ม 16
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อพืชและจากจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา 19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 22
5.1 สรุปผลการวิจัย 22
5.2 ข้อเสนอแนะ 22
เอกสารอ้างอิง 23
ภาคผนวก 25
ภาคผนวก ก การตรวจวิเคราะห์ 26
ภาคผนวก ข ตัวอย่างแบบประเมิน 28
ภาคผนวก ค ตัวอย่างการคำนวณ 29
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ 32
ประวัติผู้วิจัย 37

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 4.1 ลักษณะปรากฏและความชื้นของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่มแบบ Bourbon	15
ตารางที่ 4.2 ลักษณะปรากฏและความชื้นของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่มแบบ Mexican	15
ตารางที่ 4.3 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลาแบบ Bourbon	18
ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลาแบบ Mexican	18
ตาราง ก.1 แสดงความหมายของสารอ้างอิงแต่ละชนิด	27
ตาราง ง.1. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาโดยการบ่มแบบ Bourbon	31
ตาราง ง.2. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาโดยการบ่มแบบ Mexican	32
ตาราง ง.3. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา โดยการบ่มแบบ Bourbon	33
ตาราง ง.4. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาโดยการบ่มแบบ Mexican	34
ตาราง ง.5. ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลักษณะของกลิ่นที่พบในการบ่มฝักวานิลลาแบบBourbonและการบ่มฝักวานิลลาแบบMexican	35

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 2.1 แสดงวิธีการ Killing แบบการลวกด้วยน้ำร้อน	4
ภาพที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการ Sweating	5
ภาพที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการ Drying	5
ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างวานิลลิน	6
ภาพที่ 2.5 โมเลกุลต่าง ๆ ในสารสกัดวานิลลา	7
ภาพที่ 2.6 แสดงตัวอย่างผลทดลองที่ได้จากเทคนิค HRMA	8
ภาพที่ 3.1 แสดงการเตรียมตัวอย่างฝักวานิลลา	9
ภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอน Killing ของวิธีการบ่มแบบ Bourbon	9
ภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอน Sweating ของวิธีการบ่มแบบ Bourbon	10
ภาพที่ 3.4 แสดงวิธีการล้างฝักวานิลลา	11
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นจากฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มแบบ Bourbon และ Mexican	16
ภาพที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา ระหว่างการบ่มแบบ Bourbon	19
ภาพที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา ระหว่างการบ่มแบบ Mexican	20

บทที่ 1
บทนำ

วานิลลา (Vanilla) เป็นพืชในสกุล *Orchidaceae* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่นิยมนำส่วนฝักหรือที่เรียกกันว่าฝักวานิลลามาผ่านกระบวนการบ่มจนมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และนำมาใช้ในการทำอาหารคาวหวานต่าง ๆ วานิลลามีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลางเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเม็กซิโก และได้มีการนำไปปลูกในหลายประเทศ จนกลายเป็นพืชเศรษฐกิจของหลายประเทศและเป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงเป็นอันดับสองของตลาดโลก โดยผลผลิตของวานิลลาคือ ฝักที่บ่มแล้วและมีการสร้างสารที่ให้กลิ่นหอมที่เรียกว่า วานิลลิน (Vanillin) และมีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

ฝักสดของวานิลลาจะมีปริมาณของวานิลลินที่เป็นสารให้กลิ่นสำคัญของวานิลลาในปริมาณน้อย ซึ่งนอกจากไม่มีกลิ่นรสตามธรรมชาติของวานิลลา แล้วยังพบว่ามีกลิ่นจาง ๆ จากสารประกอบฟีนอล ซึ่งต่างจากกลิ่นวานิลลาที่ได้จากการบ่ม โดยทางการค้าจะนำฝักวานิลลาสดไปบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นรสและสีตามที่ต้องการ และตากแห้งหรืออบแห้งลดความชื้นของฝักลงเพื่อป้องกันการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย การบ่มฝักวานิลลานำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ, ชีวเคมี และเคมี เพื่อให้ได้คุณสมบัติของฝักวานิลลาตามที่ต้องการ (Ranadive, 1994) โดยชื่อของวิธีการบ่มจะถูกตั้งตามชื่อของแหล่งเพาะปลูกของวานิลลาสายพันธุ์นั้น ๆ เช่น Mexican process, Bourbon process, Peruvian process และ Guyana process เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนการบ่มจะแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ การทำให้เหี่ยว (killing), การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating), การทำให้แห้ง (drying) และ การปรับสภาพ (conditioning)

วานิลลาเป็นพืชในวงศ์กล้วยไม้ (*Orchidaceae*) ซึ่งแม้จะพบวานนิลลาหรือกล้วยไม้วานิลลากว่า 110 สปีชีส์ แต่มีเพียง 3 สปีชีส์เท่านั้น ได้แก่ *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* และ *Vanilla pompana* โดยนิยมนำส่วนฝักมาบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์และใช้เป็นสารให้กลิ่นในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ยาสูบ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ปัจจุบันมีแหล่งผลิตวานิลลาที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศมาดากัสกา อินโดนีเซีย เม็กซิโก และฮาวาย อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาด ปัจจุบันมีหน่วยงานในประเทศไทย อาทิ มูลนิธิโครงการหลวง ได้ทำการศึกษาวิจัยและปลูกทดสอบตามสถานีวิจัยต่าง ๆ เพื่อจะพัฒนาและส่งเสริมการปลูกให้เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศ

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างการบ่มฝักวานิลลาโดยมีวิธีการบ่มฝักวานิลลาแบบต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ซึ่งมีผลต่อการผลิตวานิลลินระหว่างการบ่มฝักวานิลลาแบบต่าง ๆ

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษากิจกรรมของของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจากจุลินทรีย์ ในแต่ละขั้นตอนของการบ่มฝักวานิลลาทั้ง 2 แบบ
2. ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่พบในแต่ละขั้นตอนของการบ่มฝักวานิลลาทั้ง 2 แบบ ที่อาจจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถบอกขั้นตอนที่สำคัญของการบ่มทั้ง 2 แบบ ได้แก่ การบ่มแบบ Bourbon และการบ่มแบบ Mexicanและสามารถระบุชนิดเชื้อที่สำคัญในการบ่มฝักวานิลลา

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 วานิลลา

วานิลลาเป็นพืชในวงศ์กล้วยไม้ (*Orchidaceae*) ซึ่งแม้จะมีกล้วยไม้วานิลลากว่า 110 สปีชีส์ แต่มีเพียง 3 สปีชีส์เท่านั้น ได้แก่ *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* และ *Vanilla pompana* ที่นิยมนำส่วนฝักมาบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์และใช้เป็นสารให้กลิ่นในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ยาสูบ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ฝักวานิลลาเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก โดยในปี พ.ศ. 2558 มีความต้องการฝักวานิลลาแห้งสูงถึง 16,000 เมตตริกตัน (Givaudan, 2016) ซึ่งมากกว่าปริมาณที่สามารถผลิตได้ถึง 10 เท่า จึงเป็นเหตุให้ฝักวานิลลาแห้งมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ซึ่งประเทศที่มีการผลิตมาก ได้แก่ ประเทศอินโดนีเซีย โดยมีปริมาณผลผลิตออกสู่ตลาดโลกมากถึง 3,700 เมตริกตัน รองลงมาคือ ประเทศมาดากัสการ์ 2,800 เมตริกตัน และประเทศอื่น ๆ ที่มีการผลิตมาก ได้แก่ จีน เม็กซิโก และตุรกี แต่ราคาผลิตในตลาดโลกค่อนข้างผันผวน เนื่องจากการขาดแคลนวัตถุดิบที่มีคุณภาพและการแข่งขันกับวานิลลาสังเคราะห์ จากการสำรวจข้อมูลพบว่าทั่วโลกมีการบริโภคสารวานิลลินสูงถึง 15,000 ตันต่อปี โดยเป็นวานิลลาจากธรรมชาติเพียง 1%

กล้วยไม้วานิลลา *Vanilla tahitensis* เป็นที่ต้องการในตลาดสูง โดยมีความต้องการสูงที่สุดอยู่ที่ประเทศฝรั่งเศสและอิตาลี ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตไอศกรีม มีพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่บนเกาะ Tahiti และ Moorea ลักษณะของกลิ่นรส จะปลดปล่อยออกมาปริมาณมากในช่วงแรกของการบ่ม โดยมีกลิ่นที่ค่อนข้างหวานเลี่ยน และมีกลิ่นอื่นอ่อน ๆ *Vanilla*

2.2 การบ่มฝักวานิลลา

ฝักสดของวานิลลาจะมีปริมาณของวานิลลินที่เป็นสารให้กลิ่นสำคัญของวานิลลาในปริมาณน้อย ซึ่งนอกจากไม่มีกลิ่นรสตามธรรมชาติของวานิลลา แล้วยังพบว่ามีกลิ่นจาง ๆ จากสารประกอบฟีนอล ซึ่งต่างจากกลิ่นวานิลลาที่ได้จากการบ่ม โดยทางการค้าจะนำฝักวานิลลาสดไปบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นรสและสีตามที่ต้องการ และตากแห้งหรืออบแห้งลดความชื้นของฝักลงเพื่อป้องกันการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย การบ่มฝักวานิลลานำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ, ชีวเคมี และเคมี เพื่อให้ได้คุณสมบัติของฝักวานิลลาตามที่ต้องการ (Ranadive, 1994) ระหว่างการบ่มในขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) และ การทำให้แห้ง (drying) จะทำให้ฝักวานิลลาสูญเสียความชื้นมากถึง 80% (Correll, 1953)

การบ่มฝักวานิลลาเป็นกระบวนการที่สำคัญในการผลิต เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ช่วยพัฒนากลิ่นรสและลักษณะของวานิลลาด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Ranadive, 1994) โดยวิธีการบ่มนั้น จะแตกต่างกันไปตามภูมิภาคที่ปลูกวานิลลา เนื่องจากมีการคิดค้นและพัฒนาให้เหมาะสมต่อลักษณะของวานิลลาของแต่ละภูมิภาค ซึ่งพิจารณาจากทรัพยากรและประสบการณ์ที่ได้จากการลองผิดลองถูก (Muralidharan และ Balagopal, 1978) โดยชื่อของวิธีการบ่มจะถูกตั้งตามชื่อของแหล่งเพาะปลูกของวานิลลาสายพันธุ์นั้น ๆ

เช่น Mexican process, Bourbon process, Peruvian process และ Guyana process เป็นต้น วิธีการบ่มอาจมีการแก้ไขตามประสบการณ์ที่เคยได้รับเพื่อให้ได้ฝักวานิลลาที่มีคุณภาพดีที่สุด
การบ่มฝักวานิลลาแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้ (Daphna และ Faith, 2011)

2.2.1 การทำให้เหี่ยว (Killing)

เป็นกระบวนการที่เข้าไปรบกวนกระบวนการการหายใจโดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของฝักวานิลลา เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆที่ช่วยในการผลิตกลิ่นรสของวานิลลา(Ranadive, 1994) ในขั้นตอนการทำให้เหี่ยวสามารถทำได้หลายวิธี อาทิ ลวกด้วยน้ำร้อน, ตากแดด, อบด้วยความร้อน, การทำให้เกิดรอยบนฝักวานิลลา, รมด้วยแก๊สเอธิลีน และ การแช่งแข็ง โดยสามารถเลือกทำวิธีการใด วิธีการหนึ่งที่ได้กล่าวมาข้างต้น วิธีที่นิยมมากที่สุดในการทำขั้นตอนนี้คือ การตากแดด, อบด้วยอุโมงค์ความร้อน และ การลวกด้วยน้ำร้อน (ภาพที่ 2.1)

ภาพที่ 2.1 แสดงวิธีการ Killing แบบการลวกด้วยน้ำร้อน
(ที่มา http://cr2014.symrise.com/magazine/integrate-to-move-forward/index.html)

2.2.2 การทำให้เกิดเหงื่อ (Sweating)

ขั้นตอนนี้ คือ การนำฝักวานิลลาไปตากแดด (ภาพที่ 2.2) และเก็บไว้ในกล่องปิด (sweating box) หรือห้องปิด แต่จะไม่ค่อยนิยมทำในเตาอบ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน ซึ่งทำต่อจากขั้นตอน Killing เป็นการการลดความชื้นอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเน่าเสียของฝักวานิลลาแต่เพียงพอสำหรับการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปขั้นตอนนี้อาจจะทำให้ฝักวานิลลามีคุณภาพต่ำลงถ้าหากมีการจัดการที่ไม่เหมาะสมในขั้นตอนนี้ฝักของวานิลลาจะพัฒนาคุณสมบัติในด้านของ กลิ่น สีและรสชาติ

ภาพที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการ Sweating

(ที่มา: https://www.cooksvanilla.com/the-art-of-curing-vanilla-beans/)

2.2.3 การทำให้แห้ง (Drying)

หลังจากขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (Sweating) ฝักวานิลลาจะมีสีน้ำตาลและมีกลิ่นหอม แต่ยังคงมีความชื้นอยู่ประมาณร้อยละ 60 ถึง 70 และฝักยังคงต้องการการทำแห้งเพื่อลดความชื้น เพื่อป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่มีประโยชน์ และมีความชื้นต่ำลงภายหลังการจากการทำให้แห้ง ซึ่งจะช่วยลดกิจกรรมของเอนไซม์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่ไม่พึงประสงค์ได้ ความชื้นของฝักวานิลลาหลังจากการทำแห้งจะอยู่ที่ ร้อยละ 25ถึง32

ภาพที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการ Drying

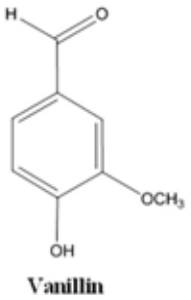
(ที่มา: https://www.cooksvanilla.com/the-art-of-curing-vanilla-beans/)

2.2.4 การปรับสภาพ (Conditioning)

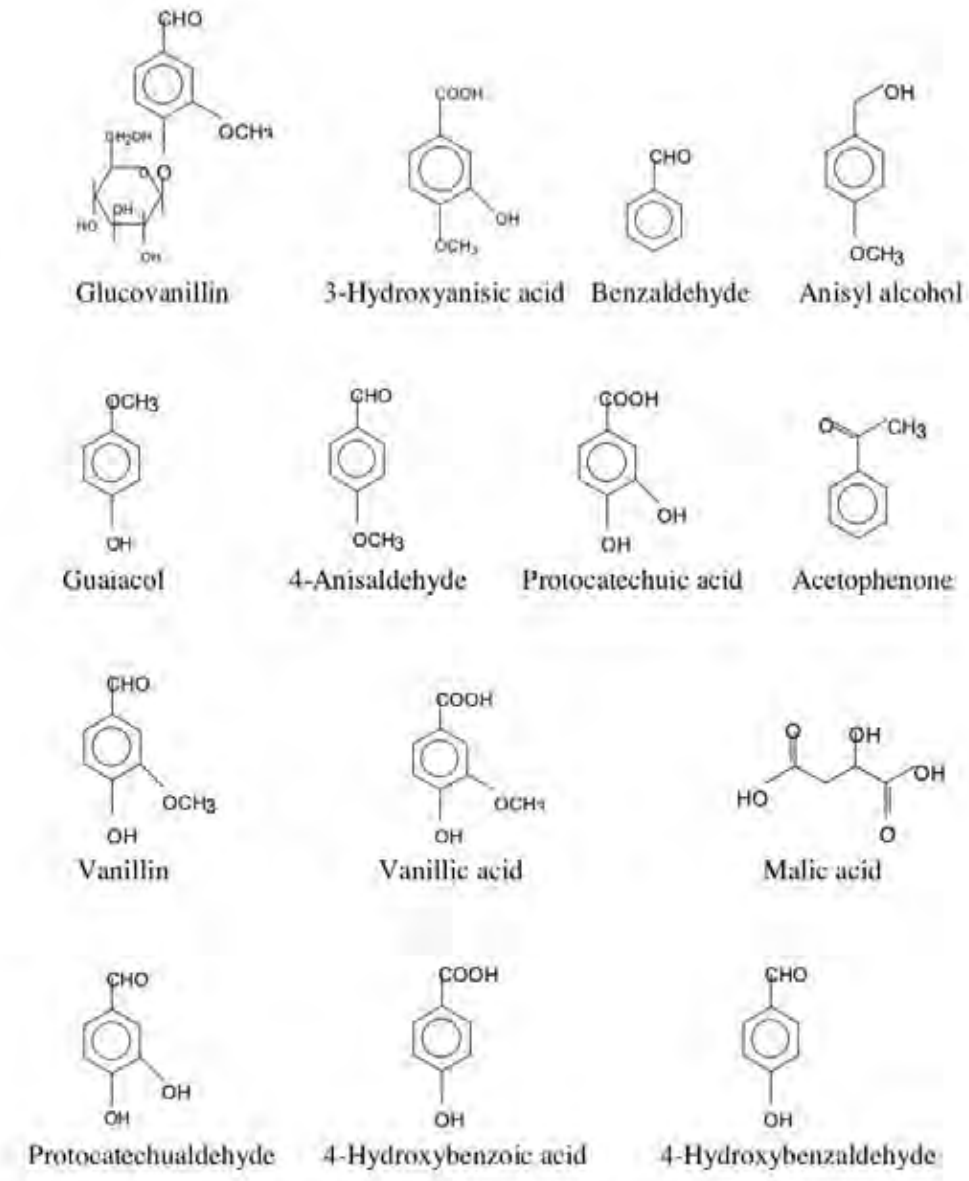
ในขั้นตอนนี้ฝักวานิลาจะถูกเก็บไว้ในกล่องปิด เป็นเวลา 2-3 เดือน ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีและชีวเคมี เช่น esterification, etherification, oxidative degradation ฯลฯ จะเกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ ซึ่งสำคัญต่อการผลิตกลิ่นหอมต่าง ๆ และรสชาติโดยรวมของฝักวานิลลา

2.3 สารวานิลลิน (Vanillin)

กลิ่นวานิลลาที่สกัดได้จากฝักวานิลลามีสารองค์ประกอบที่แตกต่างกันถึง 250 ชนิด (ภาพที่ 2.5) แต่มีสารวานิลลิน (ภาพที่ 2.4) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดและมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 85 ของสารระเหยในฝักวานิลลาสด โดยเกิดจากสารตั้งต้น glucovanillin ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในรูป glycosides เป็นโครงสร้างที่ vanillin เกาะอยู่กับน้ำตาล และยังเป็นสารที่ไม่มีกลิ่น การสะสมของสาร glucovanillin จะพบหลังจากผสมเกสรเพียง 3-4 เดือน และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อฝักมีอายุ 7-9 เดือน ฝักแก่เขียวมี glucovanillin สะสมอยู่คิดเป็นร้อยละ 10 ถึง 15 แต่หลังผ่านกระบวนการบ่มจะมี vanillin เหลือเพียงร้อยละ 1 ถึง 2 ต่อน้ำหนักสุดท้ายของฝัก (Joel et al., 2003) กระบวนการบ่มที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้สูญเสียสาร vanillin ระหว่างการบ่มได้ หรือสภาวะการบ่มที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนากลิ่นในฝักวานิลลา ขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลาให้มีกลิ่นหอม จึงนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดต่อคุณภาพหรือการพัฒนาสารให้กลิ่นของฝักวานิลลา (ธิติมา และคณะ, 2011)



ภาพที่ 2.4 แสดงโครงสร้างวานิลลิน (ที่มา: Birger and Nethaji, 2015)



ภาพที่ 2.5 โมเลกุลต่าง ๆ ในสารสกัดวานิลลา (ที่มา: UNAM, 2016)

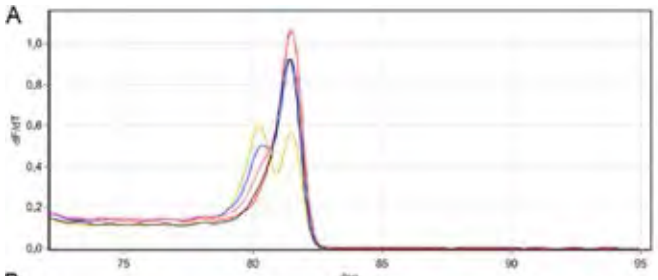
และเอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายและปลดปล่อยสาร vanillin ได้แก่ β-glucosidase นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ ได้แก่ cellulase และ peroxidase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเอนไซม์ cellulase และ peroxidase สามารถสังเคราะห์ได้โดยจุลินทรีย์บางชนิด และสามารถกระตุ้นให้ฝักวานิลลาสร้างสาร vanillin ปริมาณมากขึ้นและเร็วกว่าปกติในระหว่างกระบวนการบ่ม เนื่องจากสารตั้งต้นและเอนไซม์อยู่ในเนื้อเยื่อเดียวกันคือ placenta laminae แต่พบในบริเวณออร์แกเนลที่แตกต่างกัน คือพบสารตั้งต้น glucovanillin สะสมมากในแวคิวโอล ส่วนเอนไซม์ β-glucosidase พบมากในไซโตรพลาสมิกหรือเพอริพลาสมิก ในกระบวนการบ่มฝักวานิลลา มีระดับอุณหภูมิแคมชื้นที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีความหลากหลายของปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายcellulose และ hemicellulose แตกต่างกันในแต่ละ

ขั้นตอน ดังนั้นเอนไซม์ของแบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hydrolysis ของ flavor glycoside ในฝักวานิลลา (Röling et al., 2001)

ดังนั้นเมื่อผนังเซลล์ของฝักวานิลลาถูกย่อยสลาย ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ต่าง ๆ ไม่แข็งแรง ทำให้เซลล์ปลดปล่อย glucovanillin และ β-glucosidase ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ระหว่าง glucovanillin และ β-glucosidase ได้เป็น glucose และวานิลลินที่เป็นสารให้กลิ่นหอมในวานิลลา

2.4 เทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (High Resolution Melting Analysis: HRMA)

HRMA เป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ตำแหน่ง Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ได้หลังจากเทคนิค real-time PCR เมื่อทำ PCR เสร็จสิ้นสามาทำการวิเคราะห์ HRM ต่อซึ่งสามารถแยกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทันที โดยทำการวิเคราะห์ melting curve ที่จะค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้กับผลผลิต PCR การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะทำให้ผลผลิตจาก PCR ที่เดิมเป็น DNA สายคู่ แยกตัวออกจากกันมากขึ้น ทั้งนี้ DNA สายคู่จากผลผลิตPCR ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีค่า melting temperature เป็นค่าเฉพาะตัว ดังนั้นเมื่อทำ HRM แล้วพบ melting peak ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2.6) ก็สามารถแยกชนิดหรือสายพันธุ์ ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รอดเร็ว ราคาเหมาะสม (ธีระวัฒน์, 2017)



ภาพที่ 2.6 แสดงตัวอย่างผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค HRMA
(ที่มา: https://www.researchgate.net/figure/A-Selected-HRMA-results-from-cell-line-dilutions-testing-analytical-sensitivity-Melting_fig1_236910325)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and methods)

3.1 การเตรียมตัวอย่างวานิลลา

รับฝักวานิลลาสดมาจาก อำเภอหมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี จากนั้นนำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู คัดแยกตามขนาดแล้วสุ่ม เพื่อนำไปบ่ม 2 วิธี วิธีละประมาณ 15 ฝัก

ภาพที่ 3.1 แสดงการเตรียมตัวอย่างฝักวานิลลา

3.2 วิธีการบ่มฝักวานิลลา

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีแบบดั้งเดิม 2 วิธี คือ วิธีการบ่มแบบ Bourbon และ วิธีการบ่มแบบ Mexican ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.1 วิธีการบ่มแบบ Bourbon (ดัดแปลงจากวิธีของ Chaim และคณะ,2019)

3.2.1.1 การทำให้เหี่ยว (killing) ลวกฝักวานิลลาในน้ำที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที (ภาพที่ 3.2) แล้ว นำไปห่อด้วยผ้าเก็บใส่กล่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอน Killing ของวิธีการบ่มแบบ Bourbon

3.2.1.2 การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) นำฝักวานิลลาไปตากแดดตั้งแต่ช่วงเวลา 11.00 น. เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นห่อด้วยผ้า แล้วนำมาเก็บลงกล่อง ทำซ้ำเป็นเวลา 6-8 วัน

ภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอน sweating ของวิธีการบ่มแบบ Bourbon

3.2.1.3 การทำให้แห้ง (drying) นำฝักวานิลลามาตากแห้งในห้องที่มีการถ่ายเทของอากาศ เป็นเวลา 2-3 เดือน

3.2.1.4 การปรับสภาพ (conditioning) นำฝักวานิลลามาเก็บในภาชนะปิดที่ไม่มีการถ่ายเทของอากาศเป็น เวลา 3 เดือน

3.2.2 วิธีการบ่มแบบ Mexican (ดัดแปลงจากวิธีของ Chaim และคณะ,2019)

3.2.2.1 การทำให้เหี่ยว (killing) และ การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) นำฝักวานิลลาไปตากแดดตั้งแต่ช่วงเวลา 11.00 น. บนผ้าสีเข้มเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นห่อด้วยผ้าแล้วตากแดดต่อจนถึงเย็น และนำมาเก็บลงกล่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สังเกตได้จากสีของฝักวานิลลากลายเป็นสีที่น้ำตาล ถือว่าเสร็จสิ้นขั้นตอน killing และ sweating

3.2.2.2 การทำให้แห้ง (drying) นำฝักวานิลลามาตากแห้งในห้องที่มีการถ่ายเทของอากาศ เป็นระยะเวลา 1 เดือน

3.2.2.3 การปรับสภาพ (conditioning) มัดฝักวานิลลารวมกันจากนั้นนำไปเก็บไว้ในกล่อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน

3.3 การวัดความชื้น

สุ่มฝักวานิลลาจากแต่ละขั้นมาขั้นตอนละ 1 ฝัก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆแล้วนำไปวัดปริมาณความชื้นด้วยเครื่อง Moisture Analyzer (model: HB43-S, made in Switzerland) แล้วบันทึกผล

3.4 การเก็บเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 100 mL แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ Autoclave สุ่มฝักวานิลลา 1 ฝัก ล้างด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ที่เตรียมไว้ (ภาพที่ 3.4) หลังจากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปทำ dilution ที่ 10^0, 10^{-1}, 10-2, 10-3, 10^{-4}, 10^{-5}, 16^{-6} เพื่อนำไปเพาะเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนของเหลวที่เหลือเก็บใส่หลอด Falcon ขนาด 50 mLแล้วนำไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 3.4 แสดงวิธีการล้างฝักวานิลลา

3.5 การเพาะจุลินทรีย์

3.5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient agar ผสมกับ 3% Tryptic (Trypticase) Soy Agar ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave ทิ้งไว้ให้อุ่นพอสัมผัสได้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปใช้สำหรับ spread plate และ pour plate ต่อไป

3.5.2 spread plate

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มาเทลงจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตต์ dilution ของของเหลวจากขั้นตอนการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 0.1 mL นำ spreader ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟ และทิ้งไว้จนเย็นนำมาวนบนจานเพาะเชื้อที่ปิเปตต์ของเหลวเรียบร้อยแล้วจนแห้ง ทำซ้ำจนครบทุก dilution หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส

3.5.3 pour plate

ปิเปตต์ dilution ของของเหลวจากขั้นตอนการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 1 mL ลงบนจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ห้ามเทอาหารเลี้ยงในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อร้อนจัด วนจานเพาะเชื้อให้เกิดการผสมอย่างทั่วถึง ทิ้งไว้แห้ง ทำซ้ำจนครบทุก dilution หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส

3.6 การเตรียมเชื้อเพื่อนำไประบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ (ดัดแปลงวิธีมาจาก Anton และคณะ, 2001)

3.6.1 นำจุลินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเชื้อมาจำแนกตามลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า

3.6.2 เพาะเชื้อที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยบ่มตามสภาวะเดิม จนกว่าจะได้โคโลนีเดี่ยว

3.6.3 หลังจากได้โคโลนีเดี่ยวแล้ว นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใส่ในหลอด cryotube ขนาด 2 mL และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ผสม Nutrient Broth กับ ร้อยละ3 ของ Tryptic (Trypticase) Soy Broth เติม ร้อยละ20ของ Glycerol, ร้อยละ0.4ของ Glucose , ร้อยละ0.6ของ Yeast extract และ ร้อยละ1.25ของ Peptone เติมน้ำกลั่น และนำไปผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic Stirrer หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave และทิ้งไว้ให้เย็นด้วยอุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้งาน

3.7 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา (curing)

3.7.1 นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จากข้อ 5 มาสกัด DNA วัดคาวมเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 Spectrophotometer พบว่าอัตราส่วนระหว่างค่า A260 กับ A280 อยู่ในช่วง 1.65-2.00 แสดงว่า DNA มีความบริสุทธิ์และคุณภาพดีพอสำหรับปฏิกิริยา Real time-PCR

3.7.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR

3.7.3 จำแนกความแตกต่างของชนิดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค High Resolution Melting Analysis (HRMA)

3.7.4 นำไปวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของจุลินทรีย์

3.8 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase

3.8.1 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลา (ดัดแปลงวิธีมาจาก Akatin, 2013)

3.8.1.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

3.8.1.1.1 สุ่มฝักวานิลลาในแต่ละขั้นตอนมาขั้นตอนละ 2 ฝัก

3.8.1.1.2 หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วไปบดด้วยเครื่อง Mixer Mill ด้วยความเร็ว 100 รอบ/วินาที เป็นเวลา 60 วินาที

3.8.1.1.3 นำผงตัวอย่างที่ได้จากการบดเก็บใส่หลอด Falcon ขนาด 50 mL และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.8.1.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase

นำผงตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.8.1.1.3 มาผสมกับน้ำกลั่น (ตัวอย่าง 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 2 mL) จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 10-15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อัตราเร็ว 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง 300 µL และ pNPG (p-nitrophenyl-β-D-glucosidase) 300 µL ใส่ในหลอดขนาด 2 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม 0.1 M Sodium Carbonate (Na_2CO_3) 1.2 mL เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm

3.8.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์ (ดัดแปลงวิธีมาจาก Akatin, 2013)

นำน้ำล้างฝักวานิลลาที่ได้จาก 3.4 ปริมาตร 30 mL มา vertex 10-15 นาที ปิเปตสารละลายน้ำล้างฝักวานิลลา 1 mL ใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อัตราเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปิเปตสารละลายน้ำล้างฝักวานิลลา 200 µL และ pNPG (p-nitrophenyl-β-D-glucosidase) 200 µL ใส่ในหลอดขนาด 2 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม 0.1 M Sodium Carbonate (Na_2CO_3) 1.2 mL เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm ด้วยเครื่อง microplate reader spectrophotometry

3.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัส (Jonh et al., 2014)

การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน เป็นนิสิตคณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร อายุ 21-23 ปี โดยนำตัวอย่างใส่ภาชนะบรรจุพลาสติกปิดสนิท ตัวอย่างละ 0.3 กรัม โดยแต่ละตัวอย่างถูกวิเคราะห์ลักษณะกลิ่นจากผู้เข้าร่วมทดสอบทั้ง 12 คน เพื่อหาคำนิยามของกลิ่นที่พบในตัวอย่าง โดยลักษณะของกลิ่นที่พบในตัวอย่างมีดังต่อไปนี้ sweet, sour, spices และ woody หลังจากนั้นให้ผู้ทดสอบดมสารอ้างอิงของกลิ่นนั้นๆ ซึ่งสารอ้างอิงที่ใช้ marshmallow, สารสกัดกลิ่นช็อคโกแลต และ milk chocolate (sweet), บ๊วยเค็ม, บ๊วยแผ่นเชียงจา และบ๊วยเปลือกส้ม (sour), กานพลู (spices) และ ใบชาแห้ง (woody) จากนั้นดมตัวอย่างฝักวานิลลาเพื่อให้คะแนนกลิ่นที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยมีสเกล 0-15 โดย 0 คือ ไม่ได้กลิ่นเลย และ 15 คือ ได้กลิ่นมากที่สุด

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ SPSS (Statistical Packages for the Social Science) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการวิเคราะห์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลา และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์

ใช้การเปรียบเทียบ t-test (Independent Samples t-Test, ตัวอย่างอิสระสำหรับค่าเฉลี่ย) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลักษณะของกลิ่นที่พบในการบ่มฝักวานิลลาแบบBourbonและการบ่มฝักวานิลลาแบบMexican

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่ม (curing)

การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ ความเข้มของกลิ่นวานิลลา และความชื้นของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่มแบบ Bourbon และแบบ Mexican แสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ จากการวิจัยพบว่าลักษณะปรากฏของฝักวานิลลาที่บ่มแบบวิธี Bourbon (ตารางที่ 4.1) พบการเปลี่ยนแปลงสีของฝักวานิลลาจากสีเขียวสดเป็นสีเขียวอมน้ำตาลภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) ด้วยการลวกด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และภายหลังการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating) ฝักจะเริ่มมีสีน้ำตาลและมีเกล็ดสีขาวบนผิวฝัก Daphna และ Faith (2011) รายงานว่าเกล็ดสีขาวดังกล่าวคือผลึกวานิลลิน (vanillin) ที่เกิดขึ้นบนผิวฝักวานิลลา โดยฝักจะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นภายหลังการทำแห้ง (after drying) และการปรับสภาพ (after conditioning) Waliszewski และคณะ (2009) รายงานว่าสีน้ำตาลของฝักวานิลลาที่เกิดขึ้นเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลด้วยเอนไซม์ polyphenol oxidase และ peroxidase กลิ่นวานิลลาเริ่มปรากฏขึ้นภายหลังการทำให้เกิดเหงื่อ โดยมีความเข้มกลิ่นลดลงเล็กน้อยภายหลังการทำให้แห้งและเพิ่มขึ้นภายหลังการปรับสภาพ จากการวัดค่าความชื้นพบว่าความชื้นเริ่มต้นของฝักสดของวานิลลาคิดเป็นร้อยละ 77.88 และมีค่าสูงขึ้นเป็นร้อยละ 81.42 ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) และค่อยๆลดลงเป็นร้อยละ 74.58, 60.70 และ 37.62 ภายหลังการทำให้เกิดเหงื่อ การทำให้แห้ง และการปรับสภาพตามลำดับ

สำหรับฝักวานิลลาที่ได้รับการบ่มแบบวิธี Mexican (ตารางที่ 4.2) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเขียวสดเป็นสีน้ำตาล คล้ายกับวิธีการบ่มแบบ Bourbon แต่แตกต่างกันตรงที่การบ่มแบบ Mexican ฝักวานิลลาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตั้งแต่ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) โดยฝักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีเกล็ดสีขาวบนผิวฝักภายหลังการทำแห้ง (after drying) และการปรับสภาพ (after conditioning) จากการวัดค่าความชื้นพบว่าความชื้นเริ่มต้นของฝักสดของวานิลลาคิดเป็นร้อยละ 77.88 และมีค่าลดลงเป็นร้อยละ 61.93 ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) และการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating) และลดลงเป็นร้อยละ 40.31 และ 32.80 ภายหลังการทำให้แห้ง (after drying) และการปรับสภาพ (after conditioning) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ลักษณะปรากฏและความชื้นของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่มแบบ Bourbon

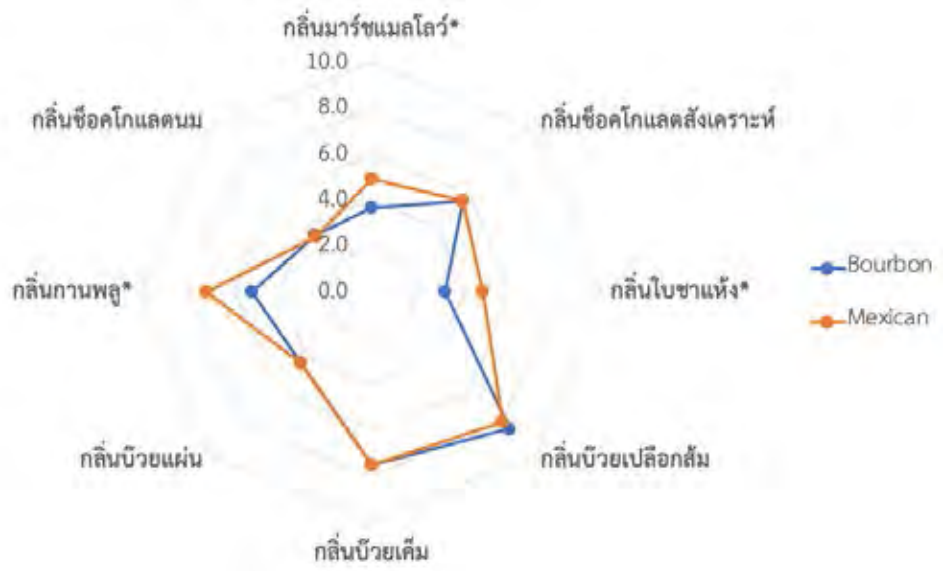
ลักษณะทางกายภาพ	**ฝักวานิลลาสด**	**ฝักวานิลลาภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing)**	**ฝักวานิลลาภายหลังการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating)**	**ฝักวานิลลาภายหลังการทำให้แห้ง (after drying)**	**ฝักวานิลลาภายหลังการปรับสภาพ (after conditioning)**
ลักษณะปรากฏ	สีเขียวสด	สีเขียวอมน้ำตาล	สีน้ำตาล (มีเกล็ดสีขาวบนผิวฝัก เล็กน้อย)	สีน้ำตาลเข้ม (มีเกล็ดสีขาวบนผิวฝัก)	สีน้ำตาลเข้ม (มีเกล็ดสีขาวบนผิวฝักเล็กน้อย)
ความเข้มของกลิ่น (+++++)	กลิ่นเขียว (++)	กลิ่นเขียว (++)	กลิ่นวานิลลา (+++)	กลิ่นวานิลลา (++)	กลิ่นวานิลลา (++++)
ความชื้น (ร้อยละ)	77.88	81.42	74.58	60.7	37.62

ตารางที่ 4.2 ลักษณะปรากฏและความชื้นของฝักวานิลลาระหว่างกระบวนการบ่มแบบ Mexican

ลักษณะทางกายภาพ	**ฝักวานิลลาสด**	**ฝักวานิลลาภายหลังการทำให้เหี่ยว และการทำให้เกิดเหงื่อ (after killing and sweating)**	**ฝักวานิลลาภายหลังการทำให้แห้ง (after drying)**	**ฝักวานิลลาภายหลังการปรับสภาพ (after conditioning)**
ลักษณะปรากฏ	สีเขียวสด	สีน้ำตาลเข้ม	สีน้ำตาลเข้ม (มีเกล็ดสีขาวบนผิวฝัก)	สีน้ำตาลเข้ม (มีเกล็ดสีขาวบนผิวฝักเล็กน้อย)
ความเข้มของกลิ่น (+++++)	กลิ่นเขียว (++)	กลิ่นวานิลลา (+++)	กลิ่นวานิลลา (++)	กลิ่นวานิลลา (++++)
ความชื้น (ร้อยละ)	77.88	61.93	40.31	32.80

4.2 ลักษณะทางประสาทสัมผัสของฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่ม (curing) แบบ Bourbon และ Mexican

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาของฝักวานิลลาพันธุ์ *Vanilla tahitensis* ที่ผ่านกระบวนการบ่ม (curing) แบบ Bourbon และ Mexican โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 13 คน พบว่าผู้ทดสอบสามารถจำแนกลักษณะกลิ่นของฝักวานิลลาได้ทั้งหมด 8 กลิ่น ได้แก่ กลิ่นมาร์ชแมลโลว์, กลิ่นช็อคโกแลตสังเคราะห์, กลิ่นใบชาแห้ง, กลิ่นบ๊วยเปลือกส้ม, กลิ่นบ๊วยเค็ม, กลิ่นบ๊วยแผ่น, กลิ่นกานพลู และ กลิ่นช็อคโกแลตนม โดยวิธีการบ่มฝักวานิลลาแบบ Mexican จะให้ลักษณะเฉพาะตัว ได้แก่ กลิ่นมาร์ชแมลโลว์, กลิ่นใบชาแห้ง, และกลิ่นกานพลู สูงกว่าการบ่มฝักวานิลลาแบบ Bourbon อย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) แต่ในการบ่มทั้งวิธี Bourbon และ Mexican ฝักวานิลลาจะให้กลิ่นบ๊วยเค็ม บ๊วยแผ่น บ๊วยเปลือกส้ม และกลิ่นช็อคโกแลตสังเคราะห์ ที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นจากฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มแบบ Bourbon และ Mexican (*ตัวอย่างฝักวานิลลามีความแตกต่างของลักษณะทางประสาทด้านกลิ่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$))

4.3 ความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่ม (curing)

จากการศึกษาชนิดจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มแบบ Bourbon และ Mexican ด้วยเทคนิค High resolution melting analysis (HRMA) และ วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของจุลินทรีย์พบเชื้อแบคทีเรียบนผิวฝักวานิลลามีทั้งหมด 9 ชนิด โดยในงานวิจัยนี้พบเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดบนผิวฝักสด ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Rhodococcus* sp., *Bacillus amyloliquefacien* และ *Pantoea* sp. งานวิจัยนี้พบเชื้อแบคทีเรียในฝักวานิลลาสดที่แตกต่างจากการศึกษาของ Röling et al. (2001) และ ธิติมา และคณะ (2011) ที่พบเพียงเชื้อแบคทีเรียชนิด *Rhodococcus* sp. และ *Pantoea* sp. ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช

ฝักวานิลลาที่ผ่านกระบวนการบ่มแบบ Bourbon ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) ด้วยการลวกด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ยังคงพบเชื้อ *Bacillus licheniformis* และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ เพิ่มเติม 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus gibsonii*, *Staphylococcus warneri* และ *Brevibacterium casei* การพบเชื้อ *Bacillus* sp. หลายชนิดเนื่องมาจากเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมและสามารถสร้างสปอร์ได้ จึงอาจทำให้เหลือรอดหลังจากลวกฝักวานิลลา ซึ่งเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ชนิด *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* สามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase, protease, hemicellulase, cellulase ซึ่งสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ของฝักวานิลลาได้ (Patrick and Krishna, 2012) Odoux และคณะ (2003) รายงานว่าสารตั้งต้นและเอนไซม์อยู่ในเนื้อเยื่อเดียวกันคือ placenta laminae แต่พบในบริเวณออร์แกเนลที่แตกต่างกัน โดยสารตั้งต้น glucovanillin สะสมมากในแวคิวโอล ส่วนเอนไซม์พบมากในไซโตรพลาสมิกหรือเพอริพลาสมิก เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย อาจส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidaseได้ สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* และ *Brevibacterium casei* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้บนผิวหนังของมนุษย์ (James et al., 2011) ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนจากผู้ทำการวิจัยขณะขนส่งและบ่มฝักวานิลลาในระหว่างทำการทดลอง และหลังจากขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating) ยังคงพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus licheniformis* และพบแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. เพิ่มเติม ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Paenibacillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ β-glucosidase (Ahmed et al., 2017) ซึ่งอาจส่งผลต่อค่ากิจรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียหลังการทำให้แห้ง (after drying) แต่ภายหลังการปรับสภาพ (after conditioning) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution melting analysis (HRMA) พบแบคทีเรียชนิด *Terribacillus* sp. ซึ่งแบคทีเรียมีการใช้ประโยชน์จากกลูโคส และสารอื่น ๆ ในการเจริญเติบโต (Akira et al., 2007) ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสนั้น สามารถส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ได้

ในการบ่มแบบ Mexican ในขั้นตอนหลังการทำให้เหี่ยวและทำให้เกิดเหงื่อ (after killing & after sweating) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution melting analysis (HRMA) พบเชื้อที่แตกต่างจากวิธีการบ่มแบบ Bourbon ได้แก่ *Curtobacterium citreum* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในพืช (Alexander et al., 2016) และ *Microbacterium foliorum* สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้บนผิวของใบหญ้า (Andreas et al., 2001) และในขั้นตอนอื่น ๆ พบชนิดเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างจากงานวิจัยของ ธิติมา และคณะ (2011) และจากวิธีการบ่มแบบ Bourbon ที่ได้กล่าวไปข้างต้น ในขั้นภายหลังการปรับสภาพ (after conditioning) ได้แก่ *Gordonia terrae* พบได้บนผิวหนังของมนุษย์และในดิน (Alexander et al., 2004)

ตารางที่ 4.3 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลาแบบ Bourbon

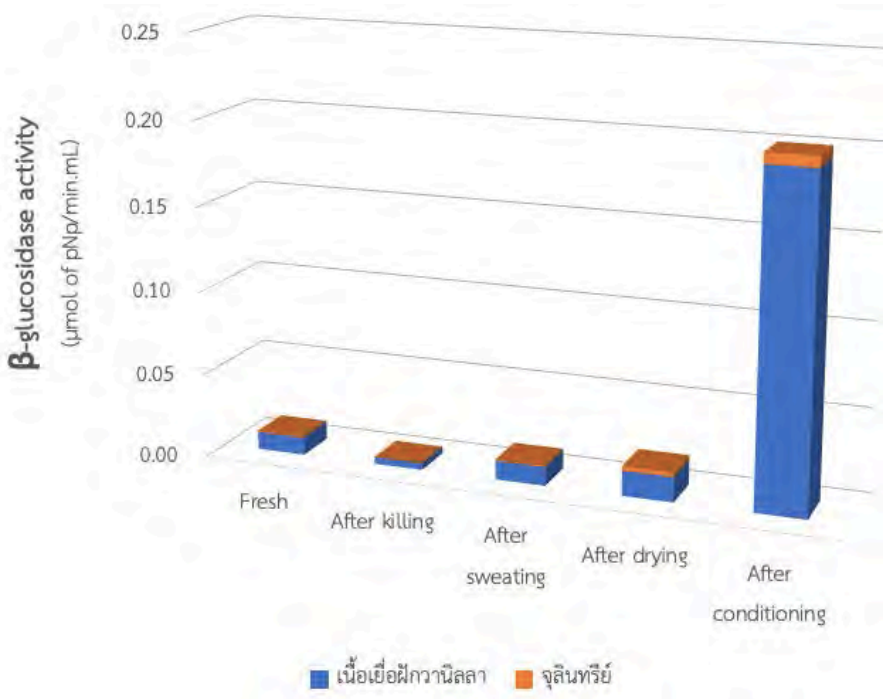
ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	ฝักสด	กระบวนการบ่มฝักวานิลลา			
		Killing	Sweating	Drying	Conditioning
Bacillus licheniformis	✓	✓	✓	ไม่พบเชื้อ	
Rhodococcus sp.	✓				
Bacillus amyloliquefacien	✓		✓		
Pantoea sp.	✓				
Bacillus subtilis		✓			
Bacillus megaterium		✓	✓		
Bacillus gibsonii		✓			
Staphylococcus warneri		✓			
Brevibacterium casei		✓			
Paenibacillus sp.			✓		
Terribacillus sp.					✓

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลาแบบ Mexican

ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	ฝักสด	กระบวนการบ่มฝักวานิลลา		
		Killing & Sweating	Drying	Conditioning
Bacillus licheniformis	✓			✓
Rhodococcus sp.	✓			
Bacillus amyloliquefacien	✓			✓
Pantoea sp.	✓			
Bacillus subtilis		✓		
Bacillus megaterium			✓	
Bacillus gibsonii				
Staphylococcus warneri				
Brevibacterium casei				
Curtobacterium citreum		✓		
Microbacterium foliorum		✓		
Gordonia terrae				✓

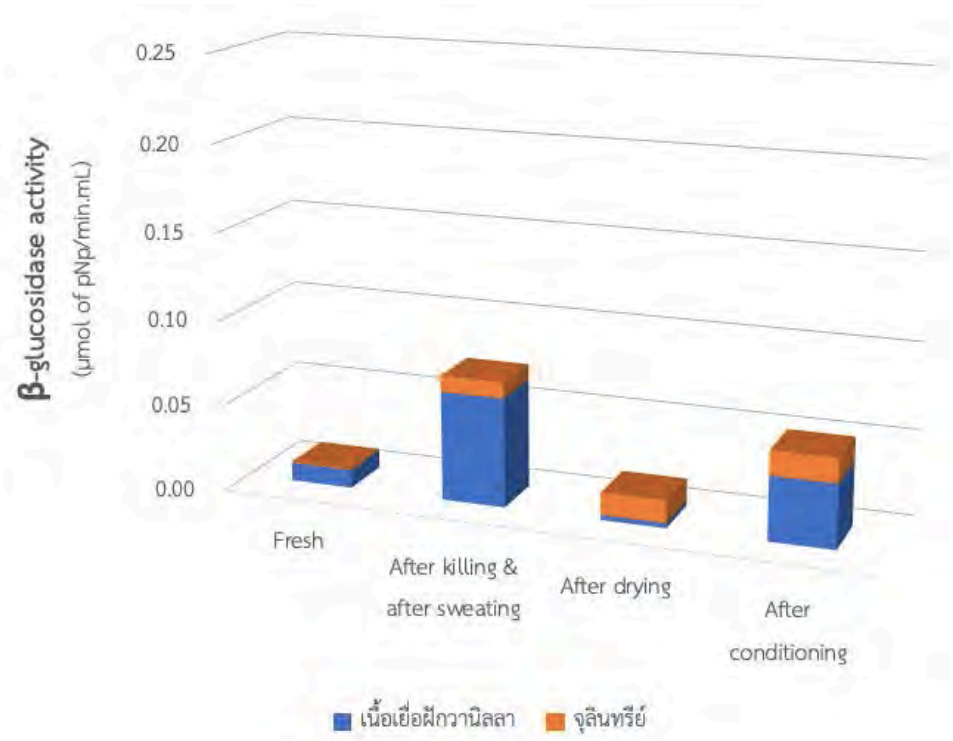
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อพืชและจากจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา

เอนไซม์ β-glucosidase จัดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ hydrolysis สาร glucovanillin ในฝักวานิลลา ทำให้เกิดการพัฒนากลิ่นในฝักวานิลลา (Odoux et al., 2000) ซึ่งนอกจากเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเนื้อเยื่อพืชแล้วนั้น เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ β-glucosidase หรือ cellulase ได้อีกด้วย (Patrick and Krishna, 2012) ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่วัดได้ จากการทดลองวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อของฝักวานิลลา โดยใช้เทคนิค spectrophotometry พบว่า ในการบ่มแบบ Bourbon มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ดังแสดงในรูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาสูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์บนผิวฝักเป็นอย่างมาก โดยกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) ด้วย จากทั้งเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจากเชื้อจุลินทรีย์บนผิวฝักมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ภายหลังการ killing ด้วยการลวกด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาทีจากฝักวานิลลาสด และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตลอดกระบวนการบ่มฝักวานิลลา เนื่องจากความร้อนจากการลวกฝักวานิลลายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase (Marquez และ Waliszewski, 2008) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขั้นปรับสภาพ (after conditioning) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของ β-glucosidase สูงที่สุด



ภาพที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาระหว่างการบ่มแบบ Bourbon

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่วัดได้จากจุลินทรีย์ของการบ่มแบบ Bourbon มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยมีแนวโน้มค่อย ๆเพิ่มขึ้นสูงขึ้นตลอดการบ่ม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบมาจากจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 4.2) ได้แก่ **ขั้นตอนการทำให้เหี่ยว** (killing) พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ชนิด *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่ม β-glucosidase, กลุ่ม protease, กลุ่ม hemicellulose และกลุ่ม cellulase ซึ่งสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของฝักวานิลลาได้ (Patrick and Krishna, 2012) และยังพบ *Bacillus megaterium* ซึ่งมีรายงานว่าใช้ glucose ในการเจริญเติบโต (MoBiTec GmbH, 2012) **ขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อ** (sweating) พบเชื้อ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* และ *Paenibacillus* sp. ซึ่งแบคทีเรียชนิด *Paenibacillus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์ β-glucosidaseได้ (Ahmed et al., 2017) จึงอาจส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนนี้ **ขั้นตอนการทำให้แห้ง** ไม่พบแบคทีเรียชนิดใดเลย และใน**ขั้นตอนการปรับสภาพ** (conditioning) พบเชื้อ *Terribacillus* sp. ซึ่งแบคทีเรียชนิดมีการใช้ประโยชน์จากกลูโคส และสารอื่น ๆ ในการเจริญเติบโต (Akira et al., 2007) ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสนั้น สามารถส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ เช่น ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสสูงสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Pawan et al., 2017)



ภาพที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาและจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลาระหว่างการบ่มแบบ Mexican

ในการบ่มแบบ Mexican มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ดังแสดงในรูปที่ 4.3 การบ่มแบบ Mexican นี้ไม่ต้องผ่านกระบวนการลวกด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Marquez และ Waliszewski, 2008) โดยการบ่มแบบ Mexican ใช้การทำให้เหี่ยว (killing) และ การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) โดยนำฝักวานิลลาไปตากแดดตั้งแต่ช่วงเวลา 11.00 น. บนผ้าสีเข้มเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นห่อด้วยผ้าแล้วตากแดดต่อจนถึงเย็น และนำมาเก็บลงกล่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เท่านั้น ภายหลังการทำให้เหี่ยว (after killing) และการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating) กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่วัดได้จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลามีค่าสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการตากแดดจะทำให้ฝักวานิลลามีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase (Pawan et al., 2017) จึงทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนนี้มีค่าสูงที่สุดในการบ่มแบบ Mexican เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนเดียวกันกับวิธีการบ่มแบบ Bourbon พบว่าในการบ่มแบบ Mexican มีค่าสูงกว่าอีกด้วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการลวกด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-glucosidase ได้ (Marquez และ Waliszewski, 2008) จากภาพที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ภายหลังการทำให้แห้ง (after drying) มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลมาจากความชื้นของฝักวานิลลาที่ลดลงจากร้อยละ 61.93 ภายหลังการทำให้เหี่ยว (killing) และ การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) เหลือเพียงร้อยละ 40.31 นอกจากนี้การลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ยังอาจส่งผลมาจากปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสสูงจากขั้นตอนการทำให้เหี่ยว (killing) และ การทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ได้เช่นกัน (Pawan et al., 2017) อย่างไรก็ตามในขั้นปรับสภาพค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase มีค่าสูงขึ้นอาจเป็นผลมาจาก อาจมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ซึ่งพบในขั้นตอนนี้ใช้ glucose ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (MoBiTec GmbH, 2012) มีผลทำให้ปริมาณกลูโคสในเนื้อเยื่อมีปริมาณลดลงและเอื้อให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase มีค่าสูงขึ้น

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ที่วัดได้จากจุลินทรีย์ของการบ่มแบบ Mexican โดยมีแนวโน้มค่อยๆเพิ่มขึ้นสูงขึ้นตลอดการบ่ม ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบมาจากจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 4.3) ได้แก่ **ขั้นตอนการทำให้เหี่ยวและการทำให้เกิดเหงื่อ** (killing & sweating) พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่ม β-glucosidase, กลุ่ม protease, กลุ่ม hemicellulose และกลุ่ม cellulase ซึ่งสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของฝักวานิลลาได้ (Patrick and Krishna, 2012) **ขั้นตอนการทำให้แห้ง** พบแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ซึ่งมีการใช้ glucose ในการเจริญเติบโต (MoBiTec GmbH, 2012) และใน**ขั้นตอนการปรับสภาพ** (conditioning) พบเชื้อชนิด *Bacillus licheniformis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่ม β-glucosidase, กลุ่ม protease, กลุ่ม hemicellulose และกลุ่ม cellulase ซึ่งสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของฝักวานิลลาได้ (Patrick and Krishna, 2012)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองในขณะนี้ พบว่ามีความแตกต่างของชนิดเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในขั้นตอนทำให้เหี่ยว (killing) ของวิธีการบ่มแบบ Bourbon และ Mexican โดยชนิดแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* ใน**การบ่มแบบ Bourbon** ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* และ *Bacillus gibsonii ส่วน*ใน**การบ่มแบบ Mexican** ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium*

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลามีค่าสูงกว่าที่ผลิตจากจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase มีค่าสูงสุดในขั้นตอน

การปรับสภาพ ในฝักวานิลลาที่บ่มแบบ Bourbon และในขั้นตอนการทำให้เหี่ยวและทำเกิดเหงื่อในฝักวานิลลาที่บ่มแบบ Mexican ดังนั้นในขั้นตอนดังกล่าวจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการผลิตสารให้กลิ่นที่สำคัญในวานิลลา

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาพบว่า วานิลลาพันธุ์ *Vanilla tahitensis* การบ่มแบบ Mexican ให้กลิ่นเฉพาะตัว ได้แก่ มาร์ชแมลโลว์ กลิ่นใบชาแห้ง กลิ่นกานพลู โดยมีความเข้มสูงกว่าฝักวานิลลาจากการบ่มแบบ Bourbon อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาชนิดเชื้อจุลินทรีย์ของแต่ละขั้นของการบ่มฝักวานิลลา สามารถนำไปต่อยอดโดยการวิเคราะห์หาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ β-glucosidase เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกลิ่นวานิลลา โดยสามารถลดระยะเวลาในการผลิตหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกลิ่นวานิลาในอนาคตได้
2. เพื่อลดความแปรปรวนและความคลาดเคลื่อนในการทดลอง ควรใช้จำนวนฝักวานิลลาในปริมาณมากพอที่จะทำ3ซ้ำได้ ในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อพืชและระบุชนิดเชื้อจุลินทรีย์ของแต่ละขั้นของการบ่มฝักวานิลลา
3. ควรหาปริมาณวานิลลินในแต่ละขั้นตอนเพื่อหาความสอดคล้องของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อและเอนไซม์ในจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อปริมาณวานิลลินในแต่ละขั้นตอนการบ่ม

เอกสารอ้างอิง

Ahmed A., Nasim F. H., Batool K. and Bibi A. (2017). **Microbial β-Glucosidase: Sources, Production and Applications.** Journal of Applied & Environmental Microbiology, 31-46

Alexander B. C., Philip A., Martin F. P., Renaud B. and Jennifer B. H. M. (2016). **Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium.*** Frontiers in Microbiology. 7:1874

Alexander S., Daniel B. and Matthias A. (2004). **Biology of Metabolically Diverse Genus *Gordonia*.** Applied and Environmental Microbiology. 3195-3204

Andreas U., Peter S. and Undine B. (2001). **Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51, 1267-1276

Anuradha K., Shyamala N. B. and Naidu M. M. (2013). **Vanilla-Its Science of Cultivation, Curing, Chemistry, and Nutraceutical Properties.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 53:12, 1250-1276

Chen Q. et al. (2014). **Occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids**., 11, 874-85

Daphna H. and Faith C. B. (2011). **Handbook of Vanilla Science and Technology Second Edition**, 242-246

Fariborz M., Morahem A. and Sayyed H. Z. (2011). **Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid,** 62, 553–558

Givaudan, 2016. **Anything but Plain Vanilla. Givaudan Taste Essentials Vanilla**. (Accessed 29 July 2016). http:/ / www.givaudan.com/ flavours/ world-flavours/tasteessentials/vanilla.

Goethals, K.; Vereecke, D.; Jaziri, M.; Van, Montagu M.; Holsters, M. (2001). **Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians***, Annu. Rev. Phytopathol. 39: 27–52.

James Versalovic et al. (2011). **Manual of Clinical Microbiology 10th Edition** , http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=779 (ค้นเมื่อ 25 พฤษภาคม 2562)

Khoyratty Sh., Kodja H. and Verpoorte R.. 2018. **Vanilla flavor production methods: A review,** Industrial Crops and Product. 125, 433-442.

Lionnett, J. F. G., 1994. **Seychelles Vanilla I. A valuable orchid crop.** World Crops. 10, 15-17.

Muralidharan, A. and Balagopal, C., 1987. **Studies on curing of vanilla.** Indian Spices. 10, 3-4.

Musalem, L.O. ,2002. **De nuestra cosecha**, Revista Claridades Agropercuarias, http//www.infoaserca.gob.mx.

Ningbo W., Peng C., Lei Y., Zhengrong W., Suyue L., Zhongtian B., Xiaojuan Y., Ning L. and Hongyu L. (2015). **A microbial transformation using *Bacillus subtilis* B7-S to produce natural vanillin from ferulic acid**, 6, 20400

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

Patrick D. and Krishna B. (2012). **The role of microorganisms in vanilla curing. Part 1: evidence for microbial involvement,** Ingredients, 24-29

Ranadive, A. S. (1994). **Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial produtcs,** In: Spices, Herbs and Edible Fungi, pp. 517-577

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

Sun-Young A., Mika A., Keiichi G., Hiroaki K. and Akira Y. (2007). ***Terribacillus saccharophilus* gen. nov., sp. Nov. and *Terribacillus halophilus* sp. Nov., spore-forming bacteria isolated from field soil in Japan.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 51-55

ธีระวัฒน์. (2017). **การตรวจตำแหน่งสนิปด้วยการประยุกต์ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบเวลาจริงร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์การคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดของพืชสมุนไพร,** วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, หน้า 3-4

ปทุมพร ยิ่งธงชัย. **วานิลลา.....อนาคตพืชเศรษฐกิจตัวใหม่**. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโลยี มช. (ค้นเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2562), https://stri.cmu.ac.th/article_detail.php?id=39.

วาสนา มานิช , วาริช ศรีละออง , ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์ , วัชระ พันธ์ทอง , เฉลิมชัย วงษ์อารี , ธิติมา วงษ์ชีรี . 2555. **ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา**, กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การตรวจวิเคราะห์

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Nutrient agar (NA)

- Nutrient agar	28	กรัม
- 3% Tryptic (Trypticase) Soy Agar	30	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม Nutrient agar (NA)

1.ชั่งสารดังนี้ Nutrient agar 28 กรัม 3% Tryptic (Trypticase) Soy Agar 30 กรัม

2.ผสมสารเข้าด้วยกัน นำไปละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นบรรจุใส่ขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient broth (NB)

- Yeast extract	3	กรัม
- Nutrient broth (NB)	14	กรัม
- 3% Tryptic (Trypticase) Soy broth	15	กรัม
- Peptone	6.25	กรัม
- Glycerol	100	มิลลิลิตร
- Glucose	2	กรัม

วิธีการเตรียม Nutrient broth (NB)

1.ชั่งสารดังนี้ Nutrient Broth กับ 3% Tryptic (Trypticase) Soy Broth เติม Glycerol 20%, Glucose 0.4%, Yeast extract 0.6% และ Peptone 1.25%

2.ผสมสารเข้าด้วยกัน นำไปละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นบรรจุใส่ขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2.การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ตาราง ก.1 แสดงความหมายของสารอ้างอิงแต่ละชนิด

ลำดับ	ลักษณะของกลิ่น	ชนิดของสารอ้างอิง
1	Marshmallow	Mini Rocky Mountain Marshmallows
2	Chocolate extract	กลิ่นช็อกโกแลต ตราวินเนอร์
3	ใบชาแห้ง	ใบชา เบอร์ 2 ตราสามม้า
4	บ๊วยส้ม	บ๊วยเปลือกส้ม ตราผึ้งทอง
5	บ๊วยเค็ม	บ๊วยเค็ม ตรา Furi Plum
6	บ๊วยแผ่น	บ๊วยแผ่น เซียงจา
7	กานพลู	กานพลู ตรา McGarret
8	Milk chocolate	ช็อคโกแลตเหรียญ

ภาคผนวก ข
ตัวอย่างแบบประเมิน

แบบทดสอบประสาทสัมผัสแบบพรรณนาเชิงปริมาณ

<u>คำชี้แจง</u> กรุณาทดสอบตัวอย่าต่อไปนี้ทีละตัวอย่าง เปรียบเทียบความเข้มของแต่ละคุณลักษณะกับตัวอย่างอ้างอิง แล้วทำเครื่องหมายเส้นตรงตามขวางตั้งฉากกับสเกลแนวนอนที่ให้ไว้ พร้อมเขียนรหัสตัวอย่างกำกับเพื่อแสดงความเข้มที่ปรากฏในแต่ลคุณลักษณะ

ชื่อ ..... อายุ .....
ชุดตัวอย่างที่ ..... (รหัส .....)

1. **กลิ่นมาร์ชเมลโลว์**

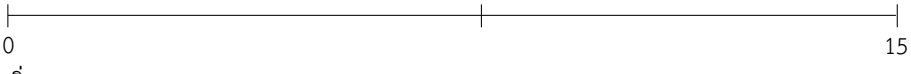
2. **กลิ่นช็อคโกแลตสังเคราะห์**

3. **กลิ่นใบชาแห้ง**

4. **กลิ่นบ๊วยส้ม**

5. **กลิ่นบ๊วยเค็ม**

6. **กลิ่นบ๊วยแผ่น**



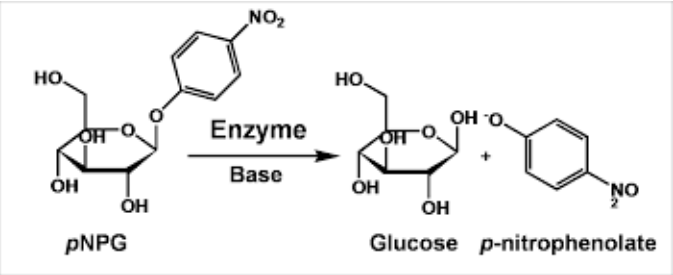
7. **กลิ่นกานพลู**

8. **กลิ่นช็อคโกแลตนม**

ภาคผนวก ค
ตัวอย่างการคำนวณ

ค.1. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลา

ตัวอย่างการหาปริมาณ p-nitrophenol (pNP) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง p-nitrophenyl-β-D-glucosidase (pNPG) และเอนไซม์ β-glucosidase



ขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลา	ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์		ค่า Absorbance ที่ 410 nm		
	เนื้อเยื่อฝักวานิลลา (g)	น้ำกลั่น (mL)	$A_{control}$	A_{sample}	$A_{sample} - A_{control}$
Fresh 1	5.299	10	0.716	0.8395	0.1235
Fresh 2	2.1158	5	0.408	0.4765	0.0685

จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert law)

$$A = \varepsilon cL$$

เมื่อ A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm.

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (Molar)

ε คือ ค่าคงที่ในการดูดกลืนแสง (extinction coefficient)

โดยค่าคงที่ในการดูดกลืนแสงของ p-nitrophenol (pNP) ที่ 405 nm.

คือ 18.5 L $mmol^{-1}cm^{-1}$ (Sigma., 1997)

L คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย (1 cm)

ดังนั้น $$c = \frac{A_{sample} - A_{control}}{\varepsilon \left(\mathrm{L} mol^{-1} cm^{-1} \right) \times L(cm)}$$

ที่ Fresh1 $$c = \frac{0.1235}{18.5 \ (\mathrm{L\ m} mol^{-1} cm^{-1}) \times 1 \ (cm)}$$

$$c = \ 0.00668 \ \frac{mmol}{L}$$

$$\text{ปริมาณ } pNP\left(\frac{\mu g}{g\ sample}\right) = MW of\ pNP\left(\frac{g}{mol}\right) \times \frac{1mol}{1000\ mmol} \times C\left(\frac{mmol}{L}\right) \times \frac{1L}{1000mL} \times \frac{mL\ water}{g\ Sample} \times \frac{10^6\ \mu M}{1M}$$

$$\text{ปริมาณ } pNP\left(\frac{\mu g}{g\ sample}\right) = 139.1\left(\frac{g}{mol}\right) \times \frac{1mol}{1000\ mmol} \times 0.0067\left(\frac{mmol}{L}\right) \times \frac{1L}{1000mL} \times \frac{10\ mL}{5.299\ g\ Sample} \times \frac{10^6\ \mu g}{1g}$$

$$\text{ปริมาณ } pNP\left(\frac{\mu g}{g\ sample}\right) = 1.8$$

เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (Enzyme Activity Unit (U)) คือ $\frac{\mathbf{1\ \mu mol\ of\ pNP}}{\mathbf{1\ min}}$ (Strahsburger et al., 2017)

ดังนั้น $$U_{\text{ของ}}\ \beta - \text{glucosidas} = \frac{1.8\left(\frac{\mu g}{g\ sample}\right)}{139.1\left(\frac{g}{mol}\right) \times 1\ min}$$

$$= \frac{0.0126\ \mu mol}{g\ sample \times 1\ min}$$

หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (Enzyme Activity Unit (U)) ของ Fresh1 และ Fresh2 (2ซ้ำ) จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

ค.2. การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา

ขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลา	ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (mL)	ค่า Absorbance ที่ 410 nm.		
		$A_{control}$	A_{sample}	$A_{sample} - A_{control}$
Fresh 1	10	0.1060	0.1077	0.0017
Fresh 2	10	0.1060	0.1067	0.0007
Fresh 3	10	0.1060	0.1073	0.0013

จากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert law)

$$A = \varepsilon cL$$

เมื่อ A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 410 nm.

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย (Molar)

ε คือ ค่าคงที่ในการดูดกลืนแสง (extinction coefficient)

โดยค่าคงที่ในการดูดกลืนแสงของ p-nitrophenol (pNP) ที่ 405 nm.

คือ 18.5 x 10^{-3} $Lmol^{-1}cm^{-1}$ (Sigma., 1997)

L คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย (1 cm)

ดังนั้น $$c = \frac{A_{sample} - A_{control}}{\varepsilon\left(\mathrm{L}mol^{-1}cm^{-1}\right) \times L(cm)}$$

<u>ที่ Fresh1</u> $$c = \frac{0.0017}{18.5\ (\mathrm{L}\ mmol^{-1}cm^{-1}) \times 1\ (cm)}$$

$$c = 0.000092\ \frac{mmol}{L}$$

ปริมาณ $pNP\left(\frac{\mu g}{g\ sample}\right) = MWof\ pNP\left(\frac{g}{mol}\right) \times \frac{1mol}{1000\ mmol} \times C\left(\frac{mmol}{L}\right) \times \frac{1L}{1000mL} \times \frac{mL\ water}{g\ Sample} \times \frac{10^6\ \mu g}{1g}$

ปริมาณ $pNP\left(\frac{\mu g}{mL\ sample}\right) = 139.1\left(\frac{g}{mol}\right) \times \frac{1mol}{1000\ mmol} \times 0.000092\left(\frac{mmol}{L}\right) \times \frac{1\ L}{1000\ mL} \times \frac{10\ mL}{1\ mL\ sample} \times \frac{10^6\ \mu g}{1g}$

ปริมาณ $pNP\left(\frac{\mu g}{mL\ sample}\right) = 0.13$

เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (Enzyme Activity Unit (U)) คือ $\frac{1\ \mu\mathrm{mol\ of\ pNP}}{1\ \mathrm{min}}$ (Strahsburger et al., 2017)

ดังนั้น $$U_{\text{ของ}}\ \beta - \text{glucosidas} = \frac{0.13\left(\frac{\mu g}{mL\ sample}\right)}{139.1\left(\frac{g}{mol}\right) \times 1\ min}$$

$$= \frac{9.3 \times 10^{-4}\ \mu mol}{mL\ sample \times 1\ min}$$

หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase (Enzyme Activity Unit (U)) ของ Fresh1, Fresh2 และ Fresh3 (3ซ้ำ) จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ SPSS (Statistical Packages for the Social Science) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง ง.1. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลาโดยการบ่มแบบ Bourbon

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: value

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.052[a]	4	.013	3.239	.115
Intercept	.026	1	.026	6.478	.052
trt	.052	4	.013	3.239	.115
Error	.020	5	.004		
Total	.098	10			
Corrected Total	.072	9			

a. R Squared = .722 (Adjusted R Squared = .499)

value

	trt	N	Subset 1	Subset 2
Duncan[a,b]	k	2	.008300	
	fr	2	.010700	
	sw	2	.011500	
	d	2	.030000	
	c	2		.194150
	Sig.		.751	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .004.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

ตาราง ง.2. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากเนื้อเยื่อฝักวานิลลา โดยการบ่มแบบ Mexican

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: value3

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.018[a]	3	.006	88.998	.000
Intercept	.015	1	.015	223.910	.000
trtmt	.018	3	.006	88.998	.000
Error	.000	4	6.691E-5		
Total	.033	8			
Corrected Total	.018	7			

a. R Squared = .985 (Adjusted R Squared = .974)

value3

	trtmt	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
Duncan[a,b]	d	2	.003000		
	fr	2	.010700		
	c	2		.037300	
	ksw	2			.122100
	Sig.		.400	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 6.691E-5.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = .05.

ตาราง ง.3. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา โดยการบ่มแบบ Bourbon

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: value2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.943E-5[a]	4	1.986E-5	25.179	.000
Intercept	6.080E-5	1	6.080E-5	77.096	.000
trtbbw	7.943E-5	4	1.986E-5	25.179	.000
Error	7.887E-6	10	7.887E-7		
Total	.000	15			
Corrected Total	8.732E-5	14			

a. R Squared = .910 (Adjusted R Squared = .874)

value2

	trtbbw	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
Duncan[a,b]	k	3	.000000		
	sw	3	.000600		
	fr	3	.000667		
	d	3		.002500	
	c	3			.006300
	Sig.		.401	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 7.887E-7.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ตาราง ง.4. ผลทางสถิติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase จากจุลินทรีย์บนผิวฝักวานิลลา โดยการบ่มแบบ Mexican

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: value4

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000[a]	3	.000	32.287	.000
Intercept	.001	1	.001	297.427	.000
trtmw	.000	3	.000	32.287	.000
Error	2.767E-5	8	3.458E-6		
Total	.001	12			
Corrected Total	.000	11			

a. R Squared = .924 (Adjusted R Squared = .895)

value4

	trtmw	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
Duncan[a,b]	fr	3	.000667		
	ksw	3		.009233	
	d	3			.012967
	c	3			.014167
	Sig.		1.000	1.000	.452

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.458E-6.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ใช้การเปรียบเทียบ t-test (Independent Samples t-Test, ตัวอย่างอิสระสำหรับค่าเฉลี่ย) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง ง.5. ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลักษณะของกลิ่นที่พบในการบ่มฝักวานิลลาแบบBourbonและการบ่มฝักวานิลลาแบบMexican

Group Statistics

	method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
mml	bb	13	3.6692	1.85417	.51426
	mex	13	4.9000	.14142	.03922
che	bb	13	5.5969	2.91873	.80951
	mex	13	5.5885	2.52329	.69984
dt	bb	13	3.1938	2.64952	.73484
	mex	13	5.3200	2.32600	.64512
op	bb	13	8.4392	4.39369	1.21859
	mex	13	8.0262	4.49401	1.24642
sp	bb	13	7.5115	3.62896	1.00649
	mex	13	7.5277	4.24499	1.17735
psh	bb	13	4.3762	3.17325	.88010
	mex	13	4.3731	2.56083	.71025
cl	bb	13	4.9077	2.95210	.81877
	mex	13	7.5000	3.18172	.88245
mch	bb	13	3.4662	2.08630	.57864
	mex	13	3.4062	2.14215	.59412

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
mml	Equal variances assumed	19.227	.000	-2.386	24	.025	-1.23077	.51575	-2.29522	-.16632
	Equal variances not assumed			-2.386	12.140	.034	-1.23077	.51575	-2.35306	-.10848
che	Equal variances assumed	.237	.631	.008	24	.994	.00846	1.07008	-2.20008	2.21700
	Equal variances not assumed			.008	23.509	.994	.00846	1.07008	-2.20252	2.21945
dt	Equal variances assumed	.425	.520	-2.174	24	.040	-2.12615	.97784	-4.14432	-.10799
	Equal variances not assumed			-2.174	23.604	.040	-2.12615	.97784	-4.14611	-.10620
op	Equal variances assumed	.076	.785	.237	24	.815	.41308	1.74313	-3.18457	4.01073
	Equal variances not assumed			.237	23.988	.815	.41308	1.74313	-3.18467	4.01082
sp	Equal variances assumed	1.826	.189	-.010	24	.992	-.01615	1.54893	-3.21298	3.18067
	Equal variances not assumed			-.010	23.433	.992	-.01615	1.54893	-3.21708	3.18477
psh	Equal variances assumed	.649	.429	.003	24	.998	.00308	1.13094	-2.33107	2.33722
	Equal variances not assumed			.003	22.975	.998	.00308	1.13094	-2.33659	2.34275
cl	Equal variances assumed	.059	.810	-2.153	24	.042	-2.59231	1.20378	-5.07679	-.10782
	Equal variances not assumed			-2.153	23.867	.042	-2.59231	1.20378	-5.07753	-.10709
mch	Equal variances assumed	.870	.360	.072	24	.943	.06000	.82934	-1.65167	1.77167
	Equal variances not assumed			.072	23.983	.943	.06000	.82934	-1.65174	1.77174

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวสันธิลา ไทยเจริญ
ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา วท. บ. (เทคโนโลยีทางอาหาร)
ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา 2561
โทรศัพท์ 083-0110691
E-mail suntilatroy@outlook.com

ชื่อ-สกุล นางสาวปริฏา จันทะบาน
ตำแหน่ง ผู้วิจัยร่วม
วุฒิการศึกษา วท. บ. (เทคโนโลยีทางอาหาร)
ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา 2561
โทรศัพท์ 097-3159447
E-mail prang_parita@hotmail.com