Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 103-106 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 103-106 (2554)

การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการบ่มฝักวานิลลา

Change of Microorganism Population during Curing Process of Vanilla Beans

ธิติมา วงษ์ชีรี[1], **ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์**[2], **เฉลิมชัย วงษ์อารี**[2] **วาริช ศรีละออง**[2] **และ วัชระ พันธ์ทอง**[3]
Thitima Wongsheree[1], Pongphen Jitareerat[2], Chalermchai Wongs-Aree[2], Varit Srilaong[2]and Vatchara Punthong[3]

Abstract

Vanillin is the most popular flavor in the world. Natural vanillin is obtained by curing of vanilla beans. The content of vanillin and its derivatives may be influenced by many factors: bean maturity, temperature during curing, sunlight intensity, and type and population of microorganisms on the surface of bean. Therefore, the aim of this experiment was to study the types and population of microorganisms on vanilla beans during curing process. Nine-month-old vanilla beans were dipped in hot water at 65°C for 3 min (killing step), and held in a closed wooden box for 24 h. Thereafter, the killed beans were exposed to sunlight (sweating step) 4 h/day for 10 days. The sweated beans were placed in the atmosphere to dry for 10-20 days (drying step) before being kept in the closed wooden box for 3 months (conditioning 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. Total bacteria decreased significantly in sweating step and then increased to the same numbers as in fresh beans after conditioning step for 3 months. However, the results also showed that the population of total bacteria was correlated with the increase of vanillin content and the decrease of glucovanillin content. These results implied that bacteria may play a role for vanillin aroma developing during the curing process.

Keywords: vanilla, curing, microbe

บทคัดย่อ

วานิลลินเป็นสารให้กลิ่นรสที่นิยมใช้มากที่สุดในโลก การผลิตกลิ่นรสวานิลลาธรรมชาติได้จากการบ่ม (curing) ฝักวานิลลา ปัจจัยที่อาจมีผลต่อปริมาณวานิลลินและอนุพันธ์ที่ได้ในระหว่างการบ่ม ได้แก่ อายุของฝัก อุณหภูมิระหว่างการบ่ม แสงแดด ตลอดจนชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของฝัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนฝักวานิลลาในระหว่างการบ่ม โดยนำฝักวานิลลาที่มีอายุเก็บเกี่ยว 9 เดือน มาทำให้เหี่ยว (killing) ด้วยน้ำร้อน 65°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำฝักไปเก็บในกล่องไม้ที่มีฝาปิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำให้เกิดเหงื่อ (sweating) ด้วยการตากแดดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำทุกวันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำฝักที่ได้ไปผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-20 วัน เพื่อทำให้แห้งอย่างช้า (slow drying) แล้วจึงทำการปรับสภาพ (conditioning) ด้วยการเก็บฝักในกล่องไม้เป็นเวลา 3 เดือน ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากฝักวานิลลาสดส่วนใหญ่คือ *Bacillus* และพบว่าภายหลังการ ทำให้เหี่ยวทันที จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์และเชื้อราลดลงมากกว่า 1 ใน 3 ของประชากรเชื้อที่พบในฝักสด และภายหลังการทำให้เหี่ยว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะไม่พบยีสต์และรา ในทางตรงข้ามพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดเหงื่อแล้ว อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บฝักในสภาพปรับสภาพ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มมากขึ้นเท่ากับฝักสด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณวานิลลินและการลดลงของกลูโควานิลลิน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียอาจมีบทบาทต่อการพัฒนากลิ่นวานิลลาในระหว่างกระบวนการบ่มได้

คำสำคัญ: วานิลลา การบ่ม จุลินทรีย์

---

[1]สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
[1]Institute of Scientific and Technological Research and Services, King Mongut's University of Technology, Bangkok 10140
[2]คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
[2] School of Bioresources and Technology, King Mongut's University of Technology, Bangkok 10140
[3]ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง มูลนิธิโครงการหลวง อ.เมือง จ. เชียงใหม่ 50200
[3]Royal Project Foundation (Khunwang), Chiangmai 50200

คำนำ

วานิลลา (*Vanilla planifolia*) เป็นพืชเลื้อยในวงศ์กล้วยไม้ เมื่อนำฝักไปบ่ม (curing) จะทำให้เกิดการพัฒนาสารให้กลิ่นขึ้น ซึ่งเป็นกลิ่นที่ผู้บริโภคนิยมมากที่สุดในโลก องค์ประกอบหลักของสารให้กลิ่นที่สกัดได้จากฝักวานิลลาคือวานิลลิน (vanillin; 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) ซึ่งปริมาณสารชนิดนี้เป็นตัวกำหนดมาตรฐานคุณภาพฝักวานิลลาที่ใช้ในเชิงการค้า (Sreedhar et al., 2007) ปัจจัยที่อาจมีผลต่อปริมาณวานิลลินและอนุพันธ์ที่ได้รับหลังการบ่ม ได้แก่ อายุของฝัก (ธิติมา และคณะ, 2552) อุณหภูมิในระหว่างการบ่ม แสงแดด ตลอดจนชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของฝัก เนื่องจากการบ่มจัดว่าเป็นกระบวนการทางชีววิทยาที่ต้องผ่านกระบวนการใช้ความร้อน ปฏิกิริยาของเอนไซม์ในพืชและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Ranadive, 1994) R**Ö**ling et al. (2001) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ ได้แก่ protease, cellulase, hemicellulase, pectinase รวมทั้ง β-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการสร้างสารวานิลลิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในฝักวานิลลาในระหว่างการบ่ม ตลอดจนหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กับปริมาณสารวานิลลินในระหว่างการบ่มฝักวานิลลา

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บเกี่ยวฝักวานิลลา อายุ 9 เดือน หลังจากผสมเกสร ความยาวฝัก 10-15 ซม. (เกรด 2) จากแปลงปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จ.เชียงใหม่ นำฝักวานิลลามาบ่มตามขั้นตอนที่ต่อเนื่องกัน ที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างฝักวานิลลาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ ตลอดจนวิเคราะห์ปริมาณ glucovanillin และ vanillin ในระหว่างการบ่ม โดยทำการเก็บตัวอย่างในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ 1. ตัวอย่างฝักสด (fresh) ก่อนทำการบ่ม 2. ฝักสดที่ผ่านการจุ่มในน้ำร้อน 65°C เป็นเวลา 3 นาที (after killing, AFkilling) หลังจากนั้นนำฝักวานิลลามาห่อฝักด้วยผ้าสักหลาดสีดำ เก็บในกล่องไม้สนที่มีฝาปิด เป็นเวลา 24 ชม. แล้วสุ่มเก็บ 4. ตัวอย่างฝักก่อนการทำให้เกิดเหงื่อ (before sweating, BFsweating) จากนั้นนำฝักทั้งหมดไปทำให้เกิดเหงื่อ ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 65°C ความชื้น 70±10% เป็นเวลา 3 ชม. ห่อฝักด้วยผ้า แล้วเก็บในกล่องไม้ เป็นเวลา 24 ชม. โดยในขั้นตอน การทำให้เกิดเหงื่อ ทำติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงสุ่มเก็บ 5 ตัวอย่างฝักหลังจากการทำให้เกิดเหงื่อ (after sweating, AFsweating) จากนั้นนำฝักที่ได้มาเรียงในตะกร้าไม่ให้ซ้อนทับกัน แล้ววางไว้ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก เพื่อให้ฝักแห้งอย่างช้าๆ (slow drying) ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ (27±2°C) เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ จนกระทั่งฝักมีความชื้นประมาณ 30% จึงมัดฝักรวมกันด้วยเชือก จำนวน 30-40 ฝักต่อมัด ห่อด้วยกระดาษไข แล้วนำไปเก็บในกล่องไม้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน และ 6. สุ่มเก็บตัวอย่างฝักวานิลลา (after conditioning 3 months, AFconditioning 3M)

1. ชนิดของจุลินทรีย์ในฝักสดและการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มฝัก

ตัดเนื้อเยื่อฝักวานิลาตามขวางด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 25 กรัม นำไปใส่ในถุงตีป่น (stomacher) แล้วเติม 0.1% peptone water จำนวน 225 มล. จากนั้นนำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นตัวอย่าง นาน 1 นาที ดูดสารแขวนลอยที่ได้ปริมาตร 1.0 มล. ไปทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-4} และ 10^{-6} เท่า จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มล. หยดลงหน้าอาหาร potato dextrose agar (PDA) และ plate count agar (PCA) เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อราและยีตส์ และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ และรายงานผลในหน่วย $\log_{10}$CFU/g สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวเคมี

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตั้งต้นและสารระเหยให้กลิ่นรสวานิลลาในระหว่างการบ่มฝัก

นำฝักวานิลามาหั่นตามขวางมีความยาวประมาณ 1 ซม. ชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กรัม แล้วแช่ตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวและเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่ -20°C จนกว่าได้ตัวอย่างครบทุกขั้นตอน จึงทำการสกัดตัวอย่างด้วยการบดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่บดแล้วจำนวน 1 กรัม มาเติมด้วยเอทานอลความเข้มข้น 44% ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชม. กรองสารผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1) กรองสารอีกครั้งด้วย filter membrane (Millipore, 0.45μm) ทำการวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu model LC-20AT, Japan) โดยใช้ diode array detector คอลัมม์ Inertsil รุ่น ODS-3 ขนาด 5 ไมครอน ขนาด 4.6x250 มม. สารละลาย mobile phase คือ เมทานอล กับ 1.25% acetic acid (1:10) ใช้อัตราการไหล 1.5 มล.ต่อนาที นาน 40 นาที ความยาวคลื่น 254 nm ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของวานิลลินมาตรฐาน (Sigma) ความเข้มข้น 1-100 mg/L

ผลการทดลอง

1. ชนิดของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มฝัก

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากฝักวานิลลาสดส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียมากกว่ายีสต์และรา แบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. thuringiensis, B. megaterrium, B. subtilis* และ *B. cereus* แบคทีเรียในสกุลอื่นๆ ที่พบคือ *Stenotrophomonas maltophilia* และ *Klebsiella pneunoniae* ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพของโคโลนีที่แตกต่างกันเล็กน้อย (ไม่แสดงข้อมูล) สำหรับการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างขั้นตอนการบ่มพบว่า ภายหลังจากการทำให้เหี่ยวฝักวานิลลาด้วยการจุ่มในน้ำร้อน (AFkilling) ประชากรของยีสต์และราลดลงมากกว่า 1 ใน 3 ของประชากรเชื้อที่พบในฝักสด (fresh) แต่ภายหลังจากนำฝักที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เหี่ยวมาห่อในผ้าสักหลาดสีดำและเก็บในกล่องไม้ที่มีฝาปิด นาน 24 ชม. (BFsweating) ผลปรากฏว่าไม่พบยีสต์และรา แต่กลับพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดและมีปริมาณเท่ากับที่พบในฝักสด และปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลงภายหลังจากการทำให้เกิดเหงื่อ (AFsweating) จากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งภายหลังจากปรับสภาพนาน 3 เดือน (AFconditioning 3M) (Figure 1)

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตั้งต้นและสารระเหยให้กลิ่นรสวานิลลาในระหว่างการบ่มฝัก

ในระหว่างขั้นตอนการบ่มฝักวานิลลาพบว่าปริมาณสารตั้งต้น glucovanillin มีแนวโน้มลดลงค่อยๆ ลดลงตามลำดับ โดยมีปริมาณต่ำสุดภายหลังจากการปรับสภาพ นาน 3 เดือน (AFconditioning 3M) สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ vanillin ในช่วงแรก (fresh, AFkilling และ BFsweating) มีปริมาณค่อนข้างคงที่ แต่ภายหลังจากการทำให้เกิดเหงื่อ (AFsweating) พบว่าปริมาณสารวานิลลินมีค่าสูงสุด (p<0.05%) หรือมีปริมาณเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณวานิลลินในฝักสด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการลดลงของสาร glucovanillin ซึ่งเป็นสารตั้นต้นของการผลิตวานิลลิน โดยปริมาณ glucovanillin ลดลงประมาณ 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในฝักสด (Figure 2)

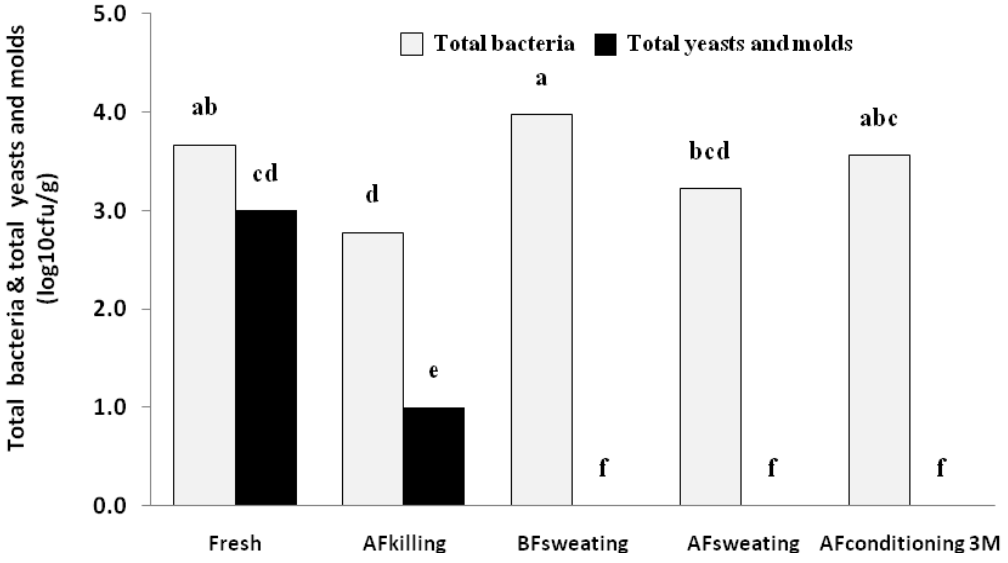

Figure 1 Population of total bacteria (gray column) and yeasts and molds (black column) on vanilla beans during different curing steps. AF and BF mean after and before.

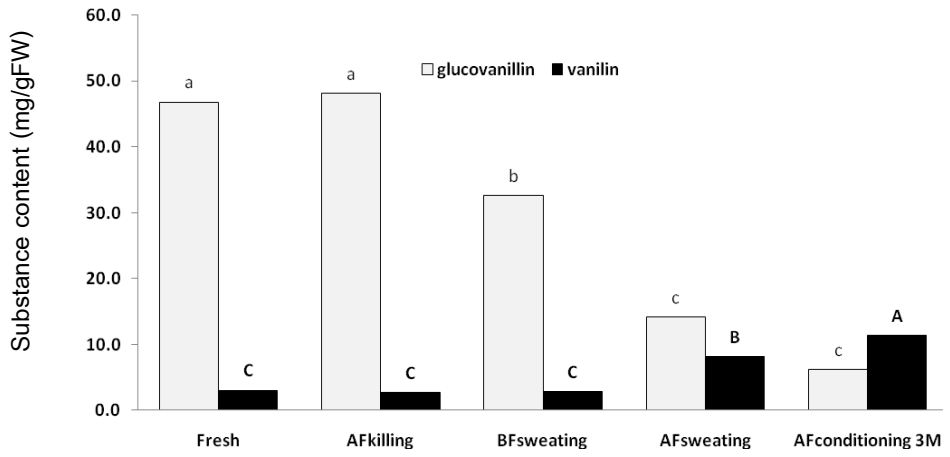

Figure 2 Glucovanillin (gray column) and vanillin (black column) levels of vanilla beans in different curing steps. AF and BF mean after and before.

วิจารณ์ผล

การลดลงของประชากรของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และรา ภายหลังจากการทำให้เหี่ยว อาจเนื่องจากความร้อนที่อุณหภูมิ 65°C สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผิวของฝักวานิลลาได้ แต่ความร้อนระดับนี้อาจไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนได้ดี ดังนั้นในผลการทดลองจึงพบเชื้อ *Bacillus* spp. มากกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในขั้นตอนก่อนการทำให้เกิดเหงื่อ (BFsweating) คือหลังจากที่นำฝักที่ผ่านการจุ่มน้ำร้อนแล้วบ่มในกล่องไม้ที่มีฝาปิดเป็นเวลา 24 ชม. พบว่าประชากรของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่กลับตรวจไม่พบยีสต์และรา R**Ö**ling et al. (2001) อธิบายว่าการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อในระหว่างการบ่มฝัก อาจเป็นผลมาจากความร้อนและปริมาณความชื้นของฝักวานิลลาที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการบ่ม จากการทดลองภายหลังจาก killing ด้วยน้ำร้อน แล้วนำไปเก็บในกล่องไม้พบว่าอุณหภูมิภายในฝักวานิลลาเพิ่มขึ้นเป็น 55°C และฝักมีความชื้นสูงมากกว่า 90% (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนร้อน (thermophylic bacteria) รวมทั้งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ด้วย แต่ในสภาพดังกล่าวยีสต์และราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้พบว่าขั้นตอนหลังการปรับสภาพ 3 เดือน (AFsweating 3 M) ประชากรของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นเท่ากับฝักสด ในขณะที่มีปริมาณกลูโควานิลลินลดลงและปริมาณวานิลลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียอาจมีบทบาทต่อการพัฒนากลิ่นวานิลลาในระหว่างกระบวนการบ่ม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สนับสนุนทุนวิจัยนี้ ภายใต้ยุทธศาสตร์ด้านการพัฒนาและส่งเสริมอาชีพ เพื่อรองรับงานมูลนิธิโครงการหลวง ประจำปีงบประมาณ 2552

เอกสารอ้างอิง

ธิติมา วงษ์ชีรี, ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี, วาริช ศรีละออง และ วัชระ พันธ์ทอง. 2552. *ผลของความแก่ของฝักต่อปริมาณสารให้กลิ่นในฝักวานิลลา*. การสัมมนาทางวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมอ่าวนางวิลล่ารีสอร์ท จ.กระบี่. หน้า 115.

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

Röling, W. F. M., J. Kerler, M. Braster, A. Apriyantono, H. Stam and H. W. van Verseveld. 2001. Microorganism with taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1995-2003.

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