

การหมักโกโก้ I : การจำแนกและศึกษาเมตาบอไลต์ของจุลินทรีย์ จากการหมักโกโก้ธรรมชาติ

Cocoa Fermentation I : Identification and Metabolites Study of Natural Cocoa Fermentation Microorganisms

อรพิน ภูมิภมร และ จันทนา จินดา¹

Orapin Bhumibhamon and Jantana Jinda

ABSTRACT

840 isolated microorganisms during cocoa fermentation were studied. Six hundred and thirty isolated bacteria were found in 4 families as Lactobacillaceae, Micro-coccaceae, Bacillaceae, Acetobacteraceae and in 5 genera of Lactobacillus sp., Micrococcus sp., Bacillus sp., Acetobacter sp. and Gluconobacter sp. Other 210 isolated yeasts were in family of Sporobolomycetaceae, Saccharomycetaceae and in genus of Candida sp., Kluyveromyces sp., and Saccharomyces sp.

Two hundred and ten isolates each of yeast, bacteria and acetic acid bacteria were investigated for their efficiencies in alcohol (yeast), enzyme pectinase (yeast and bacteria) and acetic acid (acetic acid bacteria) formation. Yeasts produced ethyl alcohol in the amount of 0 - 10 mg / 100 ml. Pectinase-producing yeasts and bacteria produced enzyme pectinase showed pectin degradation clear zone 0-9 mm. and 0-6 mm., respectively. Acetic acid bacteria produced acetic acid 0-0.4 gm / 100 ml. According to the results of metabolites produced, eleven isolated microorganisms were chosen for further cocoa fermentation studied. The selected alcohol-producing yeasts were identified as *Saccharomyces cerevisiae* (KU - Y77), *Candida utilis* (KU- Y79), *Candida krusei* (KU-Y125); pectinase-producing yeasts and bacteria were *Saccharomyces chevalier* (KU - Y150) and *Bacillus* sp. (KU - B190), respectively; acetic acid bacteria were *Acetobacter ranceus* (KU- A40), *Gluconobacter oxydans* (KU A45), *Acetobacter acetic* (KU - A72; KU - A187), *Acetobacter pasteurianus* (KU- A101) and *Acetobacter peroxydans* (KU- A132)

Key words: cocoa fermentation , microorganisms, metabolites

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

บทคัดย่อ

(KU - A132) และ *Acetobacter aceti* (KU - A187)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการหมักโกโก้ ได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรีย ดังนั้นจึงได้แยก และ จำแนก จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักมา 840 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรีย 630 ไอโซเลท ซึ่งจำแนกอยู่ใน 4 วงศ์ คือ Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae, Acetobacteraceae และ 5 สกุล ได้แก่ Lactobacillus sp., Micrococcus sp. Bacillus sp., Acetobacter sp., และ Gluconobacter sp. ส่วนยีสต์ 210 ไอโซเลท จำแนก อยู่ในวงศ์ Sporobolomycetaceae, Saccharomycetaceae และอยู่ใน 3 สกุลคือ Candida sp., Kluyveromyces sp. และ Saccharomyces sp.

นำยีสต์ แบคทีเรีย และ อะซิติก แบคทีเรีย อย่างละ 210 ไอโซเลท มาศึกษาประสิทธิภาพการผลิต เอทิลแอลกอฮอล์ (ยีสต์), เอนไซม์เพคตินเอส (ยีสต์ และแบคทีเรีย) และกรดอะซิติก พบว่ายีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ในปริมาณ 0-10 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ยีสต์ และแบคทีเรียผลิตเพคตินเอส ซึ่งวิเคราะห์เป็นบริเวณใส ในการย่อยสลายเพคตินได้บริเวณใส 0 - 9 มม. และ 0 - 6 มม.ตามลำดับ ส่วนอะซิติกแบคทีเรียผลิตกรด อะซิติกในปริมาณ 0 - 0.4 กรัม/100 มิลลิลิตร

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเมตา โบไลต์ ดังกล่าว ซึ่งได้ทำการเลือกจุลินทรีย์พร้อมทำ การจำแนกทั้งหมดไว้ 11 ไอโซเลท เพื่อนำไปศึกษา การหมักโกโก้ต่อไป จุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ ยีสต์ ผลิตแอลกอฮอล์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* (KU - Y77), *Candida utilis* (KU - Y79), *Candida krusei* (KU - Y125) ; ยีสต์ และแบคทีเรียผลิตเพคตินเอส คือ *Sacharomyces-chevalier* (KU - Y150) และ *Bacillus* sp.(KU - B190) ตามลำดับ ส่วนอะซิติกแบคทีเรีย คือ *Acetobacter rancens* (KU-A40), *Gluconobacter oxydans* (KU - A45), *Acetobacter aceti* (KU - A72), *Acetobacter pasteurianus* (KU-A101), *Acetobacter peroxydans*

บทนำ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ฟิ ลิกส์ และ เคมี ในระหว่างการหมักโกโก้โดยยอร์พิน และ คณะ (2536) พบว่ายีสต์ที่พบส่วนมากเป็นพวก ที่เจริญในอุณหภูมิปานกลาง ส่วนแบคทีเรีย และแบค ทีเรียผลิตกรดอะซิติกมีทั้งที่เจริญในอุณหภูมิปาน กลางและอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม ชนิดจุลินทรีย์ที่มี ความสำคัญได้แก่ ยีสต์ ซึ่งจะใช้สารอาหารน้ำตาล จากเนื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ เพื่อการเจริญและผลิต เอทานอลจากนั้นในสภาวะที่มีการกลั่นกรองหมัก โกโก้ก่อให้เกิดมีอากาศ แบคทีเรียชนิดผลิตกรดอะซิ ดิกจะออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก (Shepherd and Hong, 1979 ; Wood and Lass, 1985) ซึ่งทั้งยีสต์และแบคทีเรียต่างมีความสำคัญต่อการหมัก โกโก้

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีจุดประสงค์จะ คัดเลือกจุลินทรีย์ ทั้ง ยีสต์ และแบคทีเรียที่มี ประสิทธิภาพต่อการผลิตเอทานอล กรดอะซิติก และเอนไซม์เพคตินเอสเพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษา เป็นกล้ำเชื้อหมักในการทดลองครั้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลโกโก้

ใช้ผลโกโก้พันธุ์ลูกผสมของอัปเปอร์อเมซอน (Upper Amazon) ที่เป็นผลผลิตจากศูนย์วิจัยพืชสวน ชุมพร อำเภอสวี จังหวัด ชุมพร

การหมักโกโก้

นำเมล็ดโกโก้สดจำนวน 40 กิโลกรัม มาหมัก ในภาชนะถังไม้ขนาด 30 × 30 × 40 เซนติเมตร

และปิดทับด้วยกระสอบป่าน แล้วทำการหมักเป็นเวลา 6 วัน (เป็นการหมักแบบธรรมชาติ) ในระหว่างหมัก โกลีจะเก็บตัวอย่างเพื่อมาแยกจุลินทรีย์ โดยเก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน (รวม 7 ตัวอย่าง)

การแยกและจำแนกจุลินทรีย์

นำตัวอย่างโกลีแต่ละตัวอย่างมาแยกเชื้อยีสต์ แบคทีเรีย แบคทีเรียอะซิติก ด้วยอาหารแยกเชื้อเฉพาะ คือ Yeast extract-Malt extract Agar, Nutrient Agar (A.O.A.C., 1984), Acetobacter Agar และ MRS Agar (Seely and VanDemark, 1971) สำหรับจำนวนโคโลนีที่แยกได้จะแยกเชื้อกลุ่มละ 30 โคลนีต่อตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีเชื้อกลุ่มละ 210 โคลนี รวม 840 โคลนี จากนั้นจึงนำทั้ง 840 โคลนี มาศึกษาสถานฐานวิทยาของยีสต์ ตามวิธีของ Lodder (1992) และจัดกลุ่มแบคทีเรีย แบคทีเรียอะซิติก และแบคทีเรียแลกติก ตามวิธีที่ได้อธิบายโดย De Ley and Frateur (1984)

ศึกษาคุณสมบัติการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์

นำยีสต์ 210 ไอโซเลทที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์โดยดูการสร้างก๊าซในหลอดดักแก๊ส โดยตรวจวัดปริมาณก๊าซในหลอดดักแก๊ส และ จัดแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ตั้งแต่ไม่ผลิตแก๊ส จนกระทั่งมีก๊าซในหลอดดักแก๊ส นำยีสต์กลุ่มละ 3 ไอโซเลท (18 ไอโซเลท) มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยการกลั่นตามวิธีของ Amerene and Ough (1974)

ศึกษาคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์เพคตินเนสจากยีสต์และแบคทีเรีย

นำยีสต์และแบคทีเรียอย่างละ 210 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เพคตินเนส โดยดูการย่อยสลายเพคตินให้เหลวลงในหลอดอาหาร

เพคติน (Hakin and Sands, 1971) และจัดแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะของเพคติน ตั้งแต่เพคตินแข็งคงสภาพ จนกระทั่งเพคตินเหลวทั้งหมด นำยีสต์ และแบคทีเรีย ที่ย่อยสลายเพคตินในแต่ละกลุ่ม ละคร 3 ไอโซเลท ไปเลี้ยงในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิกรัมที่มีอาหารเหลว YM และ NB ที่มีเพคตินรวมอยู่ด้วย เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่ 35°C. แล้วนำส่วนใสทั้งหมดไปทำให้เข้มข้นด้วย Speed Vac. Concentrator ให้ได้ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์เอนไซม์เพคตินเนส โดยเลือกเฉพาะยีสต์และแบคทีเรียที่แสดง Clear zone ได้สูงสุด ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ตามวิธี Hakin and Sands (1971)

ศึกษาคุณสมบัติการผลิตกรดอะซิติกจากแบคทีเรียอะซิติก

นำแบคทีเรียอะซิติกจำนวน 210 ไอโซเลท มาเลี้ยงในหลอดอาหารที่มี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่ผลิตกรดจะเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ แล้วจัดกลุ่มแบคทีเรียอะซิติกเป็น 5 กลุ่ม ตั้งแต่ไอโซเลทไม่ผลิตกรด จนกระทั่งเปลี่ยนสีม่วงในอาหารเป็นสีเหลืองหมดจากนั้นนำแบคทีเรียอะซิติกจากทุกกลุ่ม ละคร 3 ไอโซเลท (15 ไอโซเลท) มาเลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าว และ แอลกอฮอล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ใน A.O.A.C. (1984)

การพิจารณาจุลินทรีย์ที่จะนำไปศึกษาเป็นกล่าเชื้อหมักโกลีในการทดลองครั้งต่อไปจะอาศัยคุณสมบัติในการผลิตเมตาบอไลต์ที่ได้วิเคราะห์ในครั้งนี้

ผลและวิจารณ์

การจำแนกจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโกลีแบบธรรมชาติ

จากการเก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักโกลี

เป็นเวลา 6 วัน (7 ตัวอย่าง) แล้วนำมาแยกชนิด ของ จุลินทรีย์ โดยใช้อาหารเฉพาะได้ ซีสต์ แบคทีเรีย แล คดิกแบคทีเรีย และอะซิดิกแบคทีเรีย อย่างละ 210 ไอโซเลทรวมทั้งหมด 840 ไอโซเลท ในส่วนแบคที-เรียที่แยกได้ 630 ไอโซเลท นั้น มีทั้งแกรมลบ และ แกรมบวก รวมทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง และ กลม โดยมีความแตกต่างกันในการหมัก (Table 1)

และจากลักษณะรูปร่างของเซลล์ร่วมทั้งการติดสี พบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งจัด

อยู่ใน วงศ์ Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Bacillaceae และ Acetobacteraceae ส่วนซีสต์นั้น จำแนกจากการสร้างเส้นใย และไม่สร้างเส้นใย ได้ 2 วงศ์คือ Spobolomycetaceae และ Saccharomycetaceae จากนั้น ได้จำแนก ต่อไปเป็น 3 สกุล และ แบคทีเรีย 6 สกุล (Table 2) ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบเหล่านี้ มีในรายงาน เช่นเดียวกัน (ดวงใจ, 2535) ส่วน Ostavar and Keeney (1973) พบจุลินทรีย์อื่นๆ อีก ได้แก่ Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Propionibacteriaceae,

Table 1 Morphology and variation of bacteria during cocoa fermentation.

Fermentation time (days)	Morphology and their percentage ^{1/}		
	gram - rod	gram + rod	gram+ cocci
0	40.0	33.3	26.7
1	37.9	25.2	36.8
2	50.7	28.6	20.7
3	50.7	17.9	31.4
4	47.8	18.8	13.5
5	22.7	31.8	45.4
6	10.4	50.0	16.5

^{1/} Isolation 90 colonies / day

Table 2 Identification of bacteria and yeast in cocoa fermentation.

	Family	Genus
Yeast (210 isolates)	Sporobolomycetaceae	<i>Candida</i> sp.
	Kluyveromyces sp.	
	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i> sp.
Bacteria (630 isolates)	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> sp.
	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i> sp.
	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.
	Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i> sp.
		<i>Gluconobacter</i> sp.

Actinomycetaceae และ Brevibacteriaceae ความแตกต่างของชนิด และ ปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่าง การหมักโกโก้ขึ้นอยู่กับสถานที่สภาวะแวดล้อมและ สายพันธุ์โกโก้ที่ใช้หมัก (Wood and Lass, 1985)

ศึกษาการผลิตเมตาบอไลต์จากจุลินทรีย์ที่แยกได้

การผลิตแอลกอฮอล์จากยีสต์ นำยีสต์ที่แยกได้ 210 ไอโซเลท มาตรวจสอบ ประสิทธิภาพการผลิต แอลกอฮอล์ โดยในขั้นแรก จะตรวจการผลิตใน หลอดดักแก๊ส พบว่ายีสต์เหล่านี้ผลิตแก๊สในหลอดดัก แก๊สในปริมาณที่ แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยมี ไอโซเลท ที่ไม่ผลิตแก๊ส จนกระทั่งผลิตแก๊สเต็ม หลอดและล้นหลอดดักแก๊ส และ เมื่อนำยีสต์ที่ผลิต แก๊สแตกต่างกันไปเลี้ยง เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ พบว่า ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ผลิตขึ้นมีความแตกต่างกันด้วย (Table 3) ซึ่งจัดแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม โดยยีสต์กลุ่มที่ 1 - 5 จะพบตลอดระยะเวลาการหมัก ส่วนกลุ่มที่ 6 ที่ ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงจะพบในวันที่ 2 - 4 เท่านั้น (Figure 1) และเป็นช่วงวันที่พบยีสต์กลุ่มผลิตเอนไซม์ เพคตินเนสได้ดีมากด้วย ซึ่ง Shephred *et al.* (1984) ได้รายงานว่ เพคตินเนสจะย่อยเยื่อหุ้มเมล็ดได้น้ำตาล ร้อยละ 16 จึงเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารให้ยีสต์ ดังนั้น

ยีสต์กลุ่มที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีมาก จึงเพิ่มจำนวน ขึ้นสำหรับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นในระหว่าง การหมักโกโก้

นอกจากจะเป็นสารอาหารของแบคทีเรียต่อไป แล้ว ยังจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ที่ผลิต กรดอินทรีย์ไม่ระเหย ซึ่งเป็นปัญหาต่อรสโกโก้ได้ (Rohan, 1963 ; Wood and Lass, 1985) ด้วยเหตุนี้จึง ได้เลือกยีสต์ไอโซเลทที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีซึ่งอยู่ใน กลุ่ม 6 จำนวน 3 ไอโซเลท พร้อมทำการจำแนกไว้ ศึกษาเป็นกล่าเชื้อหมักโกโก้ต่อไป เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท คือ KU - Y77 (*Saccharomyces cerevisiae*), KU - Y79 (*Candida utilis*), KU - Y125 (*Candida krusei*)

การผลิตเพคตินเอนจากยีสต์และแบคทีเรีย

เอนไซม์เพคตินเอนมีบทบาทต่อการหมักโกโก้ ในการศึกษครั้งนี้พบเอนไซม์ดังกล่าวทั้งในยีสต์และ แบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งหมักโกโก้ โดยสามารถแบ่ง ออกเป็น 5 กลุ่ม ตามประสิทธิภาพการย่อยสลายเพ คติน ในหลอดทดสอบจากยีสต์และแบคทีเรียอย่างละ 210 ไอโซเลท ซึ่งมีไอโซเลท ที่ไม่สามารถจะย่อย สลายเพคตินได้หมด โดยดูจากระดับความหนืดของ เพคตินที่ลดลง (Table 4) โดยเมื่อนำตัวอย่างยีสต์

Table 3 Grouping of alcohol- producing yeasts during cocoa fermentation.

Yeasts	Percentage (210 isolates)	Gas formation ^{1/}	Alcohol produced (mg./100 ml.)		
Group I	29.25	ND	ND		
Group 2	30.00	+	0.09	-	1.0
Group 3	19.05	++	1.0	-	2.0
Group 4	12.86	+++	2.0	-	4.0
Group 5	5.0	++++	4.0	-	7.0
Group 6	3.3	+++++	7.0	-	10.0

^{1/} Gas produced in tube : ND = Non detectable;
+++ = 3/4 tube ;

+ = 1/4 tube ;
++++ = 4/4 tube ;

++ = 1/2 tube
+++++ = over

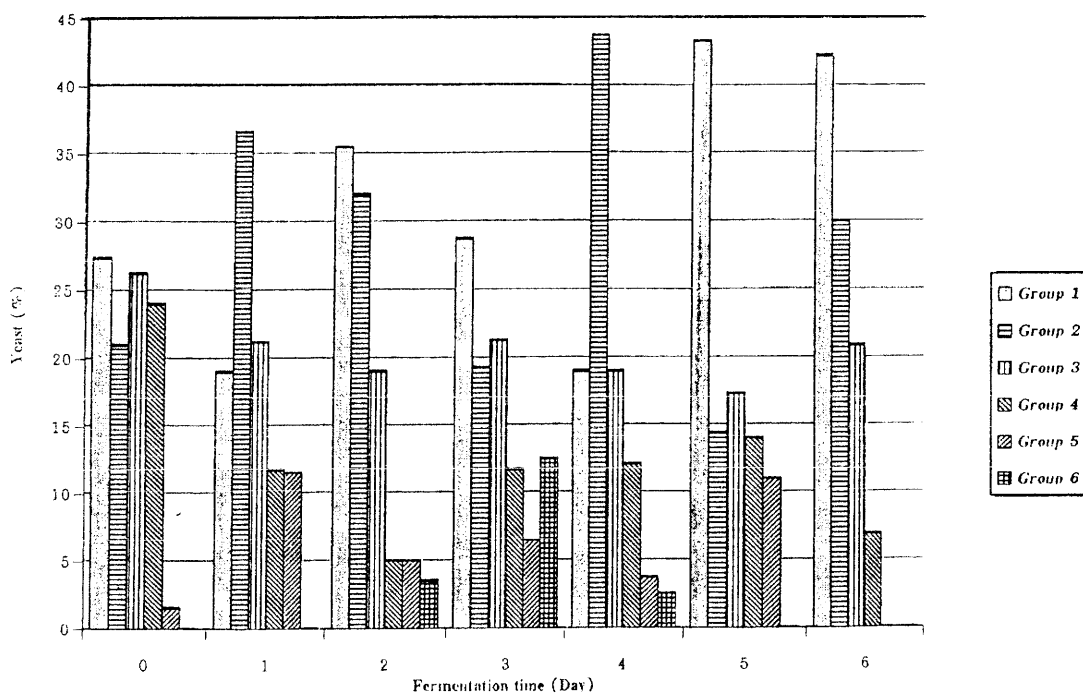


Figure 1 Variation of alcohol producing yeasts during cocoa fermentation.

gas produced in tube : Group 1 = Non detectable ; Group 2 = 1/4 tube ; Group 3 = 1/2 tube ;
Group 4 = 3/4 tube ; Group 5 = 4/4 tube ; Group 6 = over

Table 4 Grouping of yeast and bacteria which degraded pectin and their enzyme pectinase activities.

	Percentage (210 isolates)	Degradable pectin ^{1/}	Pectinase activities (clear zone mm.)		
Yeasts					
Group 1	19.05	ND	ND		
Group 2	74.76	+	0.3	-	0.9
Group 3	22.38	++	1.0	-	3.0
Group 4	17.62	+++	3.0	-	5.0
Group 5	19.19	++++	5.0	-	9.0
Bacteria					
Group 1	4.29	ND	ND		
Group 2	25.24	+	0.01	-	1.0
Group 3	27.62	++	1.0	-	1.5
Group 4	27.14	+++	1.5	-	3.0
Group 5	15.71	++++	3.0	-	6.0

^{1/} Pectin degraded in tube : ND = Non Detectable; + = 1/4 tube ; ++ = 1/2 tube; +++ = 3/4 tube; ++++ = 4/4 tube

และแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม (กลุ่มละ 10 ไอโซเลท) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ด้วยการดูบริเวณใสที่เพคตินถูกย่อย (clear zone) พบว่า ยีสต์จะมีประสิทธิภาพ ในการผลิตเพคตินเอสได้ดีกว่าแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ได้เลือกยีสต์ KU - Y150 และ แบคทีเรีย KU - B190 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ (clear zone) สูงสุด คือ 9.0 และ 6.0 มม. ตามลำดับมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธีวัดความหนืดของเพคตินที่ถูกย่อยพบว่า แบคทีเรีย KU - B190 ผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่ายีสต์ KU - Y150 กล่าวคือผลิตได้ 287 หน่วย/มล. และทำงานได้ดีที่ pH 8 - 9 ส่วนยีสต์ KU - Y150 ผลิตเอนไซม์ได้ 133 หน่วย/มล.ทำงานได้ดีที่ pH 4.5 - 5.5 จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด - ด่าง ทั้งในการทดลองครั้งนี้และที่มีในรายงานครั้งก่อน (อรพิน และคณะ, 2536) พบว่า ความเป็นกรด - ด่าง ในลำหมักจะมีสถานะเป็นกรด เอนไซม์เพคตินเอสจากยีสต์จึงน่าจะมีความทนทานมากกว่าจากแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ทั้งยีสต์และแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพคตินเอสดังกล่าวจะเลือกไว้สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบการหมักโกโก้ต่อไปอันเนื่องจากความแตกต่างของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

สำหรับยีสต์ KU - Y150 ต่อมาได้จำแนกเป็น *Saccharomyces chevalier* และ KU - B190 เป็น *Bacillus* sp. ปริมาณยีสต์และแบคทีเรียที่ผลิตเพคตินเอสทั้ง 5 กลุ่ม จะแตกต่างกันไปในแต่ละวันของการหมักโกโก้ (Figure 2) อย่างไรก็ตาม ทั้งยีสต์ และแบคทีเรียต่างก็ทำหน้าที่ในการขับเอนไซม์เพคตินเอสออกมาข่อยยื้อหุ้มเมล็ดโกโก้ ทำให้มีสารอาหารที่จุลินทรีย์จะนำไปสร้างแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก ในระหว่างการหมักอย่างต่อเนื่อง

การผลิตกรดอะซิติกจากอะซิติกแอซิติกแบคทีเรีย

กรดอะซิติกเป็นกรดระเหยและเป็นเมตา

บอไลท์ที่สำคัญชนิดหนึ่งต่อการหมักโกโก้ โดยช่วยเสริมสภาวะการหมักเป็นกรด และแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเมล็ดโกโก้ มีผลต่อกลิ่น-รสโกโก้ ดังอธิบายไว้ก่อนแล้ว (อรพินและคณะ, 2536) จากความสำคัญดังกล่าว จึงได้ทำการศึกษาการผลิตกรดอะซิติกแบคทีเรียที่แยกได้ 210 ไอโซเลทโดยดูจากการผลิตกรดในหลอดอาหารที่มีการเปลี่ยนสีของ methylene blue พร้อมกับแยกตามประสิทธิภาพการเปลี่ยนสีได้ 5 กลุ่มตั้งแต่ไม่มีการเปลี่ยนสีของ pH อินดิเคเตอร์จนกระทั่งเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทั้งหมด จากนั้นได้นำตัวอย่างแต่ละกลุ่ม (กลุ่มละ 10 ไอโซเลท) มาเลี้ยงในอาหารเหลว แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตขึ้นได้ตั้งแต่ 0.09 - 0.40 กรัม / 100 มล. (Table 5) โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกแต่ละกลุ่ม จะมีปริมาณแตกต่างกันในระหว่างการหมัก (Figure 3) เนื่องจาก กรดอะซิติกมีความสำคัญต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก เพราะการสะสมกรดอะซิติกในเมล็ดมากเกินไป จะทำให้กลิ่นและรสโกโก้จางลง (Jinap and Dimick, 1990) แต่ถ้ามีกรดอะซิติกน้อยไป เมล็ดโกโก้จะเกิดการหมักไม่สมบูรณ์ (Wood and Lass, 1985) ดังนั้นจึงได้เลือกอะซิติกแบคทีเรีย จำนวน 6 ไอโซเลท ที่จะนำมาศึกษาการหมักโกโก้ร่วมกับยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์และผลิตเอนไซม์เพคตินเอส ซึ่งได้แก่ อะซิติกแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดได้ 0.25 - 0.30 % (KU - A45, KU - A101) ผลิตกรดได้ 0.30 - 0.35 % (KU - A40, KU - A132); ผลิตกรดได้ 0.35 - 0.40 % (KU - A72, KU - A187) และ อะซิติกแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท จำแนกได้ต่อมา คือ KU - A40 (*Acetobacter ranceus*), KU - A45 (*Guconobacter oxydans*), KU - A72 (*Acetobacter aceti*), KU - A101 (*Acetobacter pasteurians*), KU - A132 (*Acetobacter mesoxydans*), KU - A187 (*Acetobacter aceti*) สำหรับจุลินทรีย์ทั้งยีสต์และแบคทีเรียที่จำแนกได้ทั้ง 11 ไอโซเลท จะได้นำไปศึกษาประสิทธิภาพการหมักโกโก้ต่อไป

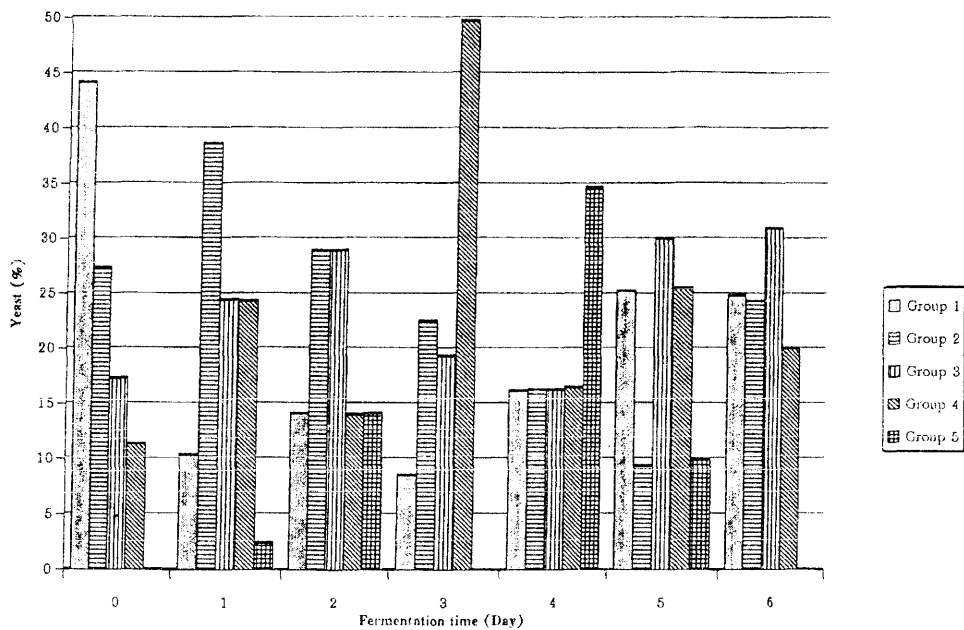


Figure 2a Variation of pectin-degrading yeasts during cocoa fermentation.

Pectin degrade in tube : Group 1 = Non detectable, Group 2 = 1/4 tube; Group 3 = 1/2 tube, Group 4 = 3/4 tube, Group 5 = 4/4 tube

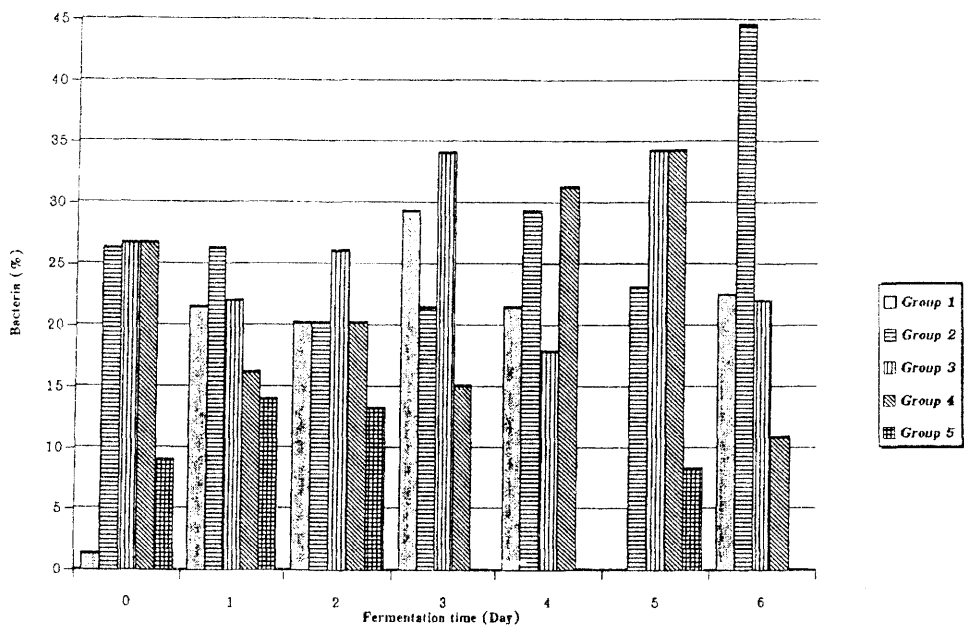


Figure 2b Variation of pectin-degrading bacteria during cocoa fermentation.

pectin degrade in tube : Group 1 = Non detectable ; Group 2 = 1/4 tube; Group 3 = 1/2 tube ; Group 4 = 3/4 tube ; Group 5 = 4/4 tube

Table 5 Grouping of acetic acid bacteria during cocoa fermentation.

Bacteria	Percentage (210 isolates)	Acid formation ^{1/}	Acetic acid produced g / 100ml.
Group 1	0.45	-	ND
Group 2	12.86	+	0.0 - 0.09
Group 3	29.52	++	0.09 - 0.10
Group 4	36.67	+++	0.10 - 0.25
Group 5	20.48	++++	0.25 - 0.40

^{1/} Change purple colour in media : - = purple ;

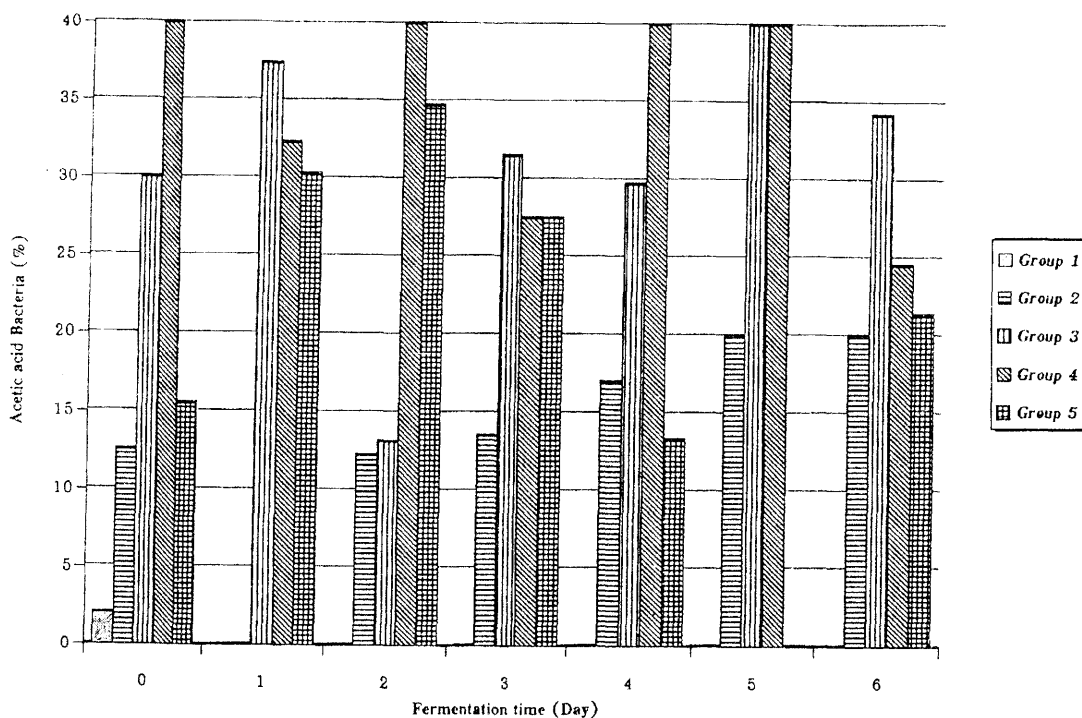
+ = lightly green ;

++ = green ;

+++ = lightly yellow ;

++++ = yellow ;

ND = Non Detectable

**Figure 3** Variation of acid producing acetic acid bacteria during cocoa fermentation.

Change purple colour in media: Group 1 = purple ; Group 2 = lightly green ; Group 3 = green

Group 4 = lightly yellow ; Group 5 = yellow

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ที่ได้ให้คำปรึกษาในเรื่องจำแนกยีสต์

เอกสารอ้างอิง

- ดวงใจ ช่วยสฤติย์. 2535. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- อรพิน ภูมิภมร, ปิยนุช นาคะ, และ อัมพล จุลสวัสดิ์. 2536. การหมักโกโก้: ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ฟิสิกส์และเคมีระหว่างการหมักโกโก้. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27:303-313
- Amerene, M.A. and C.S.Ough. 1974. Wine and Must Analysis. John & sons. Inc., New york. 346 p.
- A.O.A.C. 1984. Official Method of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 14th ed. Association of Official Analytical Chemist.. Arlington Virginia USA. 1141 p.
- De ley, J. and J. Frateur. 1984. The genus *Acetobacter*, pp. 276-279. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore : The Williams and Wilkin Co, Baltimore
- Hakin, L.M.Z. and D.C. Sands. 1971. Improve solid medium for detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* 22: 205-209.
- Jinap, S. and P.S. Dimick. 1990. Acidic characteristics of fermentation and fried cocoa bean from different countries of origin. *J. Food Sci.* 55:547-550.
- Lodder, J. 1970. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam, North Holland Publishing Co. 385p.
- Ostavar, K. and P.G. Keeney. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans. *J. Food Sci.* 38:611-617.
- Rohan, T.A.. 1963. Precursors of chocolate aroma. *J. Sci. Ed. Agric.* 14:799-805.
- Seeley, H.W. and P.J Van Demark. 1971. *Selected Exercises from Microbes in Action*. 121 p.
- Shephred, R.C., C.F. Chong, J.G. Taylor and J.D. Menneer. 1984. Commercial Production of low acid beans, pp.1-14. In *International Conference on Cocoa and Coconut*.
- Shephred, R.C. and C.W. Hong. 1979. Prospects and problems of Malaysian cocoa beans, pp. 23-26. In *The Manufacturing Confectioner*. May.
- Wood, G.A.R. and R.A. Lass. 1985. *Cocoa*. 4 th ed. Tropical Agriculture Series. Longman New York. 342 p.