การคัดเลือกและศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์หอมจากผลตาลสุก

Selection and study for the immobilization of aroma yeast from the ripened palmyra palm fruit

เกศินี จันทรโสภณ [1]
เสรี จันทรโสภณ [2]

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์หอมจากผลตาลสุก โดยเก็บตัวอย่างผลตาลสุกที่หล่นจากต้นเองจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 แหล่งในเขตจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 115 ผล เลือกผลที่มีกลิ่นหอมหวาน 5 ผล ไปคัดแยกเชื้อยีสต์ เนื้อตาลส่วนที่เหลือเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการคัดแยกเชื้อแบบ Cross streak technique บนอาหาร MRS พบว่าได้ยีสต์ที่มีสีและขนาดโคโลนีต่างกัน 16 ไอโซเลต และคัดเลือกยีสต์หอมได้ 4 ไอโซเลต ไอโซเลต 1 โคโลนีสีม่วงอ่อนขนาด 3-5 มิลลิเมตร ไอโซเลต 2 โคโลนีฟ้าขาวขนาด 3-5 มิลลิเมตร ไอโซเลต 3 โคโลนีสีขาวครีมขนาด 5-7 มิลลิเมตรและไอโซเลต 4 โคโลนีฟ้าขาวขนาด 1 มิลลิเมตร เพาะยีสต์หอมไอโซเลตละ $1x10^8$ Cell ในผลตาลสุก บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเกิดกลิ่นหอมแล้วจึงคั้นเนื้อตาลมาตรึงเซลล์กับ Agar ที่ปริมาณร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 พบว่า agar ที่ร้อยละ 6 ทำให้ได้เซลล์ตรึงของยีสต์หอมที่มีลักษณะเจลที่อยู่ตัว เนื้อแน่นและยืดหยุ่น มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็น $3.8\pm2.5x10^5$ CFU/mL เซลล์ตรึงที่ใช้ Agar ปริมาณอื่นจะมีเนื้ออ่อนนิ่มหรือแน่นแข็งเกินไป เมื่อศึกษาความคงตัวของยีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในอาหารดัดแปลงที่มีเนื้อตาลสุกร้อยละ 20 โดยหมักซ้ำ 4 วงรอบ พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช ของแข็งที่ละลายได้ กลิ่น และปริมาณสารกาบาของน้ำหมักที่ได้ในแต่ละวงรอบมีค่าแทบจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในอาหารสูตรปรับต่ำเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในน้ำกลั่นเหมาะสมที่สุดโดยเมื่อนำมาใช้หมักแล้ว น้ำหมักที่ได้มีกลิ่นหอมมากกว่าน้ำหมักเริ่มต้น จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช และของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมักมีค่าเป็น $4.5\pm1.3x10^8$ CFU/mL 3.35±0.1 และ 18.0±0.0 บริกซ์ ตามลำดับ

คำสำคัญ : ผลตาล ยีสต์หอม เซลล์ตรึง อาหารดัดแปลง

[1, 2] อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

ABSTRACT

The objectives of this research were to select and study for immobilization of aroma yeast cell from the ripened palmyra plam fruit. The fallen 115 palmyra plam fruit were obtained from 4 areas of Ubon Ratchathani province. The good smell of 5 fruit samples were selected to isolate for yeast and the rest were extracted for fruit pulp and kept under -18°C for culture medium prepairing. The results of yeast isolation by Cross streak technique on MRS medium and selection of aroma yeast were found as 16 different color and size colonies of yeast isolates and 4 aroma yeast isolates. For aroma isolated, isolate 1, 2, 3 and 4 were light purple, blue-white, white-cream, and blue-white color, and 3-5 mm., 3-5 mm., 5-7 mm. and 1 mm. of colonies diameters, respectively. The $1x10^8$ Cell of each 4 isolates were inoculated into palmyra plam fruit and it was incubated at room temperature until good smell was expressed. The palmyra plam pulp was squeezed and immobilized by using 2%, 4%, 6% and 8% of Agar. Utilization of 6% agar was given the best stable, firming and flexibility of immobilized cell which viable count was $3.8\pm2.5x10^5$ CFU/mL. But, the rest were more sloppy or hardy of gel matrix. The 20% modified palmyra plam pulp medium was used to evaluate the stability of immobilized cell after 4 cycles of fermentation time. The results revealed that viable count, pH, TSS, GABA content and smell test of fermented medium in every cycles were almost non-significant different. Keeping of immobilized aroma yeast cell in minimal medium was performed. After 3 months, the use of distillated water was the best that was showed the more good smell than initial time of the medium. The viable count, pH, and TSS were $4.5\pm1.3x10^8$ CFU/mL, 3.35 ± 0.1, and 18.0+0.0 Brix, respectively.

Keywords : Palmyra palm fruit, Aroma yeast, Immobilized cell, Modified medium

บทนำ

ตาลหรือตาลโตนดเป็นพืชตระกูลปาล์ม (Palmyra palm) เมื่อผลตาลสุกจนหล่นจากต้นจะพบว่าส่วนของเนื้อตาลที่อยู่รวมกับเส้นใยจะมีสีเหลืองส้มและมีกลิ่นรสหอมหวาน Saranya and Vijayakumar (2016); Pramod et al. (2013) และ Mohite et al. (2012) รายงานว่าหลายประเทศจึงนำเนื้อตาลส่วนนี้ไปรับประทาน ในประเทศไทยนิยมนำไปทำขนมตาลซึ่งมีจุดเด่นที่สีสวย กลิ่นหอมหวาน เนื้อสัมผัสเด้งและฟู แต่การหมักขนมตาลแต่ละครั้งพบว่าให้กลิ่นรสและการขึ้นฟูไม่คงที่ มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ (2544) รายงานว่าในเนื้อตาลสุกนั้นมียีสต์เด่นอยู่ 4 กลุ่มหลัก คือ Candida krusei, Saccharomyces spp., Kloeckera apiculata และ Hansenniaspora spp. นอกจากนี้ Artnarong et al. (2016) สามารถคัดแยกยีสต์ Candida stellimalicola ได้จากเนื้อตาลสุก ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตสารกาบาซึ่งเป็นสารสื่อประสาทประเภทยับยั้งในระบบประสาทส่วนกลาง ที่ช่วยรักษาอาการอัลไซเมอร์ได้ (Masuda et al., 2008) และยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษายีสต์จากผลตาลที่ผลิตสารกาบาได้ สำหรับยีสต์ที่ผลิตกลิ่นหอมนั้น Forti et al. (2015) รายงานว่าเนื่องจากยีสต์สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นหอมชนิดต่างๆ เช่น อัลดีไฮด์ คีโตน แต่การผลิตกลิ่นหอมของยีสต์จากผลตาลในธรรมชาติไม่คงที่เนื่องจากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นชนิด สายพันธุ์ และจำนวนของยีสต์ในผลตาลสุก ตลอดจนสภาวะและสิ่งแวดล้อม การคัดเลือกเชื้อยีสต์หอมจากผลตาลสุกเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมัก จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่สม่ำเสมอได้

เทคโนโลยีที่ช่วยให้สามารถนำเซลล์ที่ใช้หมักแล้วกลับมาใช้ซ้ำได้อีกคือการตรึงเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในวัสดุที่เหมาะสม เพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์หรือการสูญเสียของเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย ส่งผลให้จุลินทรีย์มีความคงตัวระหว่างการเก็บรักษาและการใช้งาน ประหยัดทั้งค่าใช้จ่ายและเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อ สารที่ใช้ตรึงเซลล์ส่วนใหญ่เป็นอัลจิเนตและเสริมด้วยสารอื่น (Elakkiya et al., 2016; Gildas and Vandamme, 2012; Fuentes-Zaragoza et al., 2011) กรณีของเชื้อยีสต์หอมจากผลตาลสุกนั้นการตรึงเซลล์จะทำให้ได้ยีสต์หอมที่มีความคงตัวและสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง และหากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ก็จะเป็นวิธีการที่นำไปถ่ายทอดแก่ผู้ประกอบการในชุมชนได้ง่ายขึ้นด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1 เพื่อคัดแยกและคัดเลือกยีสต์หอมจากผลตาลสุกและใช้หมักผลตาลให้หอม

2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Agar ที่ใช้ตรึงเซลล์และตัวกลางในการเก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์

วิธีดำเนินการวิจัย

1) เก็บตัวอย่างผลตาลสุกโดยเป็นผลตาลสุกที่หล่นจากต้นเองจากพื้นที่ในจังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างเดือนมีนาคม-กันยายน พ.ศ.2557-2558 จาก 4 พื้นที่ คือ หมู่ 6 ตำบลปะอาว หมู่ 5 ตำบลขี้เหล็ก และหมู่ 15 ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง และสวนต้นตาลพื้นที่สาธารณประโยชน์ ตำบลตาลสุม อำเภอตาลสุม เลือกผลตาลที่มีกลิ่นหอมหวานและอบอวลนาน จากสถานที่ต่างกันไปใช้คัดเลือกยีสต์หอม และผลตาลส่วนที่เหลือคั้นเอาเนื้อตาลไปเก็บรักษาที่ -18 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่มีเนื้อตาลสุกร้อยละ 20

2) คัดแยกยีสต์หอมจากตัวอย่างผลตาลสุก โดยใช้เทคนิคการขีดลากเชื้อแบบ Cross streak บนอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไปเพาะในอาหาร PDA แบบวุ้นเอียง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นคัดเลือกยีสต์หอมโดยเปิดหลอดที่เพาะเชื้อใน PDA slant เพียงครึ่งฝาเกลียวและดมกลิ่นที่ระเหยออกมาจากการเปิดหลอด เลือกไอโซเลตที่มีกลิ่นหอมมาคัดแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะที่แตกต่างของสีและขนาดโคโลนีเชื้อที่คัดเลือกได้ตามวิธีของเกศินี จันทรโสภณและรุจิรัศม์ มุตธิกุล (2556)

3) ศึกษาความเข้มข้นของ Agar ที่ใช้ตรึงเซลล์ยีสต์หอมที่คัดเลือกได้ตามวิธีของ เกศินี จันทรโสภณและรุจิรัศม์ มุตธิกุล (2556) โดยใช้ Agar ที่ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 ผสมกับน้ำคั้นจากเนื้อตาลที่เพาะด้วยยีสต์หอม 4 ไอโซเลตๆ ละ 1x108 Cell ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตรต่อปริมาตรแบบกึ่งปลอดเชื้อ ขึ้นรูปให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมหนา 5 มิลลิเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ตัดให้เป็นชิ้นขนาด 1x1x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจลักษณะการอยู่ตัว ลักษณะเนื้อสัมผัส และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตของเจลตรึงเซลล์

4) ศึกษาความคงตัวของยีสต์หอมแบบตรึงเซลล์โดยใช้เป็นกล้าเชื้อหมักในอาหารดัดแปลงที่มีเนื้อตาลสุกร้อยละ 20 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงโดยหมักซ้ำ 4 วงรอบ ตรวจวัดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช ของแข็งที่ละลายได้ และปริมาณสารกาบา ตลอดจนกลิ่นของน้ำหมักที่ได้ในแต่ละวงรอบ (ดัดแปลงวิธีของ Karladee and Suriyong, 2012)

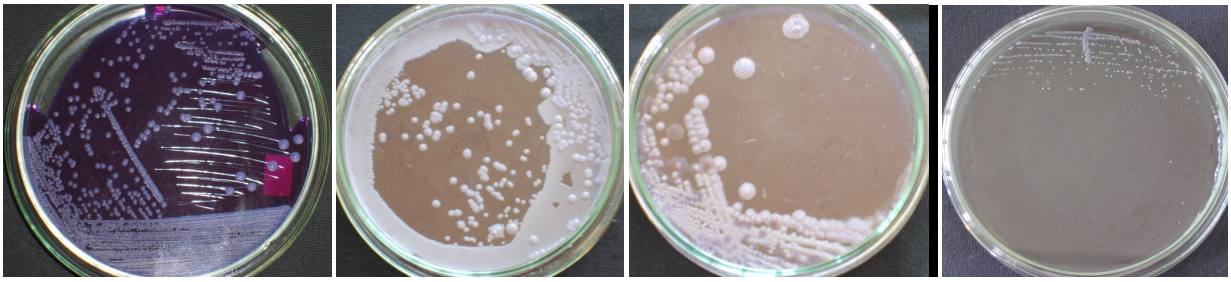
6) เก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB แบบปรับต่ำเป็น 10% และ 20% และในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3 เดือน ตรวจวัดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช ของแข็งที่ละลายได้ และกลิ่นของน้ำหมักที่ได้จากเซลล์ตรึงในอาหารปรับต่ำ

7) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างแบบ One-way analysis of variance (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range test

ผลการวิจัย

1 ผลการเก็บตัวอย่างผลตาลสุกที่หล่นจากต้นเองจากพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 แหล่งในเขตจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าได้จำนวน 115 ผล เลือกผลที่มีกลิ่นหอมหวาน 5 ผล สำหรับคัดแยกเชื้อยีสต์ ผลการคัดแยกเชื้อแบบ Cross streak technique บนอาหาร MRS พบว่าได้ยีสต์ที่มีสีและขนาดโคโลนีต่างกัน 16 ไอโซเลต และคัดเลือกยีสต์หอมบนอาหาร PDA ได้ 4 ไอโซเลต ไอโซเลต 1 โคโลนีสีม่วงอ่อนขนาด 3-5 มิลลิเมตร ไอโซเลต 2 โคโลนีฟ้าขาวขนาด 3-5 มิลลิเมตร ไอโซเลต 3 โคโลนีสีขาวครีมขนาด 5-7 มิลลิเมตรและไอโซเลต 4 โคโลนีฟ้าขาวขนาด 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1)



Isolate 1 Isolate 2 Isolate 3 Isolate 4

ภาพที่ 1 โคโลนีของยีสต์ที่คัดเลือกได้จากผลตาลสุกซึ่งต่างกัน 4 ลักษณะ

2. ผลการใช้ Agar ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 ตรึงเซลล์ยีสต์หอม พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Agar ร้อยละ 6 ทำให้ได้เซลล์ตรึงของยีสต์หอมซึ่งมีลักษณะเจลที่อยู่ตัว เนื้อแน่นและยืดหยุ่น จับกันเป็นก้อนได้ดีไม่แตกตัวง่ายเมื่อมีการเคลื่อนย้าย มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็น 3.8+2.5x10^{5} CFU/mL เซลล์ตรึงที่ใช้ Agar ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 8 นั้นจะมีเนื้ออ่อนนิ่มหรือแน่นแข็งเกินไป

3. ผลการศึกษาความคงตัวของยีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในอาหารดัดแปลงที่มีเนื้อตาลสุกร้อยละ 20 โดยหมักซ้ำ 4 วงรอบ พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช ของแข็งที่ละลายได้ กลิ่น และปริมาณสารกาบาของน้ำหมักที่ได้ในแต่ละวงรอบมีค่าแทบจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

4. ผลการเก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในอาหารสูตรปรับต่ำเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในน้ำกลั่นเหมาะสมที่สุดโดยเมื่อนำมาใช้หมักแล้ว น้ำหมักที่ได้มีกลิ่นหอมมากกว่าน้ำหมักเริ่มต้น จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ค่าพีเอช และของแข็งที่ละลายได้ในน้ำหมักมีค่าเป็น 4.5±1.3x10^{8} CFU/mL 3.35±0.1 และ 18.0±0.0 บริกซ์ ตามลำดับ การเก็บรักษาในอาหารปรับต่ำร้อยละ 10 มีค่าเป็น 3.6±2.2x104 CFU/mL 3.55±0.15 และ 20.0±0.0 บริกซ์ ตามลำดับ และการเก็บรักษาในอาหารปรับต่ำร้อยละ 20 มีค่าเป็น 5.2±2.1x102 CFU/mL 3.52±0.1 และ 19.50±0.5 บริกซ์ ตามลำดับ

Table 1 Odor intensity, pH, TSS, and GABA content of fermented medium which were used immobilized aroma yeast cell as inoculums for 4 cycles time

Parameters	Cycle times of the fermented medium[1]				
	Initial	1	2	3	4
Odor[2]	+	++++	++++	++++	++++
pH	4.05±0.1	3.32±0.15^{a}	3.41±0.2^{a}	3.28±0.15^{a}	3.34±0.2^{a}
TSS (Brix)	20.5±0.5	17.5±0.5^{a}	18.0±0.0^{a}	17.0±0.5^{a}	17.5±0.0^{a}
TPC	0	3.3±1.2x10^{8ab}	4.0±0.5x10^{8a}	3.1±1.4x10^{8b}	3.8±1.1x10^{8ab}
GABA	ND	15.20±7.5^{a}	16.0±2.5^{a}	15.40±1.5^{a}	14.80±6.5^{a}

[1] Each value was the mean ± standard deviation of three replicate analyses,

[a, b, c] Mean in the same row with a different superscript letter were significantly different (P<0.05)

[2] +++++ = The highest intensity of good odor

++++ = Very high intensity of good odor

+++ = High intensity of good odor

++ = Low intensity of good odor

+ = The lowest intensity of good odor

การอภิปรายผล

ผลการคัดแยกยีสต์หอมจากผลตาลสุกที่ได้ สอดคล้องบางส่วนกับการรายงานของอรวรรณ พึ่งคำ (2554) ที่รวบรวมรายงานเกี่ยวกับเชื้อยีสต์ในผลตาลสุกที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ว่า การคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในเนื้อตาลสุกนั้นมีรายงานว่าพบเชื้อยีสต์อยู่ 4 ชนิด คือ Candida spp., Saccharomyces spp., Kloeckera apiculet และ Heseniaspora spp. แต่ไม่ได้รายงานว่าเป็นยีสต์ผลิตกลิ่นหอม และการที่พบว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้จะผลิตกลิ่นหอมในอาหารดัดแปลงจากเนื้อตาลสุก แต่จะมีกลิ่นหอมเพียงเล็กน้อยถึงไม่มีในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งคาดว่าอาจมาจากอาหารสงเคราะห์มีองค์ประกอบและสภาวะการบ่มเชื้อไม่เหมาะสมกับการผลิตกลิ่นหอมของยีสต์ที่คัดเลือกได้ รวมถึงการคัดแยกออกมาเป็นเชื้อเดี่ยวไม่ใช่เชื้อผสมเหมือนกับผลตาลสุกในธรรมชาติ ทำให้เมแทบอลิซึมที่สร้างกลิ่นหอมหวานที่อบอวลได้นานจึงไม่เกิดขึ้น ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จึงเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าในการทดลองขั้นต่อไปควรใช้ยีสต์หอมที่คัดเลือกได้ฉีดเข้าไปยังผลตาลที่กำลังจะสุกเพื่อให้มียีสต์หอมเป็นตัวช่วยให้ผลตาลสุกหอมได้เร็วขึ้นและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวที่หอมหวานและอบอวลแบบที่ต้องการออกมาได้ดีขึ้นกว่าการปล่อยตามธรรมชาติ และเพื่อเป็นการรักษาสภาพสมดุลของเชื้อในการศึกษาขั้นการตรึงเซลล์ จึงใช้น้ำคั้นจากผลตาลสุกที่มีกลิ่นหอมที่ต้องการ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการตรึงเซลล์ และไม่จำเป็นต้องทำการคัดแยกหาเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

ในการตรึงเซลล์ยีสต์หอม พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Agar ร้อยละ 6 จะได้ชิ้นเซลล์ตรึงที่มีเนื้อแน่น ยืดหยุ่น จับกันเป็นก้อนได้ดีไม่แตกตัวง่าย ทำให้มีการกักเก็บเซลล์ยีสต์หอม และสารอาหารอื่นๆ ที่ใช้ในการผลิตกลิ่นหอมเอาไว้ได้ดี ซึ่งจะเกิดการแลกเปลี่ยนสารอาหารและเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีได้ดีกว่า เห็นได้จากการนำกลับมาใช้ซ้ำในวงรอบที่ 4 ก็ยังคงให้กลิ่นหอมเหมือนวงรอบแรก ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ เกศินี จันทรโสภณและรุจิรัศม์ มุตธิกุล (2556) ที่พบว่า การตรึงเซลล์คีเฟอร์ที่ใช้คาราจีแนน 4% ร่วมกับ resistant starch 1% ให้เจลที่ใช้แล้วทำให้น้ำหมักมีคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ดีกว่าการใช้สารตรึงเซลล์ที่เข้มข้นสูง

น้ำหมักจากยีสต์หอมแบบตรึงเซลล์หลังจากหมักวงรอบที่ 1-4 ยังคงมีกลิ่นหอมสม่ำเสมอ ผลที่ได้บ่งชี้ว่ายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์สามารถสร้างกลิ่นหอมได้เป็นอย่างดี แม้ว่าปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการหมักลักษณะนี้ต่ำกว่าในผลตาลถึง 5 เท่าตัว ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Duarte et al. (2013) ได้ทดลองตรึงเซลล์ยีสต์ด้วย calcium alginate beads เมื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล พบว่า สามารถนำกล้าเชื้อแบบตรึงเซลล์นี้กลับไปใช้ซ้ำได้อีก 8 วงรอบของการหมัก เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกาบาในน้ำหมักอาหารดัดแปลง พบว่ามีปริมาณสารกาบาเป็น 15.20+7.5-16.0+2.5 mg/100 mL ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับยีสต์ขนมปังแต่ต่ำกว่าฟิล์มยีสต์กลุ่ม Pichia (91.54 mg/100 mL) ตามรายงานของ Masuda et al. (2008) การเก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในน้ำกลั่นสามารถเก็บรักษายีสต์หอมได้นาน 3 เดือน น้ำหมักที่ได้มีกลิ่นหอมหวานและอบอวล ในขณะที่การเก็บรักษาในอาหารสูตรปรับต่ำให้ผลไม่ดี สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากน้ำกลั่นไม่มีสารอาหารใดๆ จึงทำให้กลุ่มยีสต์หอมและจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ถูกตรึงเซลล์ไว้ปรับตัวให้เจริญและมีกิจกรรมลดลงจนเกือบหยุดหรือเข้าสู่ช่วงพักเซลล์ และเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอาหารที่คุ้นเคย ก็สามารถปรับตัวขึ้นมาใช้สารอาหารและทำกิจกรรมผลิตสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ตามปกติ จึงทำให้น้ำหมักที่ได้จากแต่ละเดือนมีกลิ่นหอมหวานอบอวล ในขณะที่การใช้อาหาร PDB สูตรปรับต่ำที่ 10% และ 20% เก็บรักษายีสต์หอม ทำให้น้ำหมักมีความเข้มข้นของกลิ่นหอมระดับต่ำและไม่มีกลิ่นหอมเลย สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มยีสต์และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ถูกตรึงเซลล์ไว้สามารถใช้สารอาหารที่มีในการเจริญและเข้าสู่ระยะ Death phase ยิ่งมีสารอาหารมากยิ่งทำให้จุลินทรีย์เจริญได้มากและตายได้เร็วกว่าจากการผลิตสารที่เป็น feedback inhibition ซึ่งเห็นได้จากระดับความเข้มข้นของกลิ่นหอมที่เป็น ++ ในเดือนแรกและเป็น + ในเดือนที่ 2 และ 3 ของการใช้อาหาร PDB สูตรปรับต่ำที่ 10% เทียบกับการใช้อาหาร PDB สูตรปรับต่ำที่ 20% ซึ่งคาดว่าเซลล์ยีสต์หอมตายเกือบหมดจึงไม่มีกลิ่นหอม ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Fuentes-Zaragoza et al. (2011) ที่กล่าวว่าในการยืดอายุเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษา เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงแต่ละแบบแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

สรุปผลการวิจัย

ยีสต์หอมที่คัดแยกได้จากผลตาลสุกมีโคโลนีที่แตกต่างกัน 4 ลักษณะ การใช้ agar ที่ระดับร้อยละ 6 ทำให้ได้เซลล์ตรึงของยีสต์หอมแบบผสมมีความคงตัวและให้กลิ่นหอมในอาหาร

ดัดแปลงที่หมักซ้ำ 4 วงรอบ และน้ำหมักมีปริมาณสารกาบาเป็น 15.20+7.5-16.0+2.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร การเก็บรักษายีสต์หอมแบบตรึงเซลล์ในน้ำกลั่นที่เวลา 3 เดือน ยีสต์หอมยังให้กลิ่นหอมหวานอบอวลในน้ำหมักอาหารสูตรดัดแปลง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีในน้ำหมักจากยีสต์หอมแบบตรึงเซลล์เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากเนื้อตาลสุก

2. ควรใช้น้ำหมักยีสต์หอมฉีดบริเวณโคนต้นตาลเพื่อให้เกิดการส่งผ่านเชื้อที่มีความหอมหวานอบอวลไปยังผลตาลสุกให้มากขึ้นกว่าใช้วิธีธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

เกศินี จันทรโสภณ. (2555). การใช้ข้าวกล้องงอกเสริมในโยเกิร์ต แหนม และแหนมเห็ด. การเกษตรราชภัฏ. 11(1): 21-32.

เกศินี จันทรโสภณและรุจิรัศม์ มุตธิกุล. (2556). การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยคาราจีแนนและ resistant starch เพื่อผลิตคีเฟอร์นมถั่วเหลือง. การเกษตรราชภัฏ. 12(2): 74-88.

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์. 2544. **การพัฒนาแป้งข้าวเจ้าผสมและส่วนผสมสำเร็จรูปในการผลิตขนมตาลเพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็ก.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ พึ่งคำ. (2554). **การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล.** ปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

Artnarong, S., Masniyom, P. and Maneesri, J. (2016). Isolation of yeast and acetic acid bacteria from palmyra palm fruit pulp (Borassus flabellifer Linn.). International Food Research Journal. 23(3): 1308-1314.

Duarte, J.C., Rodrigues, J.A.R., Moran, P.A.S., Valença, G.P., and Nunhez, J.R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **AMB Express.** 3:31.

Elakkiya, M., Prabhakaran, D., Thirumarimurugan, M. (2016). Methods of Cell Immobilization and Its Applications. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 5(4): 5429-5433.

Forti, L., Mauro, S.I., Cramarossa, M.R., Filippucci, S., Turchetti, B., and Buzzini, P. (2015). Non-Conventional Yeasts Whole Cells as Efficient Biocatalysts for the Production of Flavors and Fragrances. **Molecules.** 20: 10377-10398.

Fuentes-Zaragoza, E., Sa´ nchez-Zapata E., Sendra E., Sayas E., Navarro C., Ferna´ ndez-Lo´ pez J., Pe´ rez-Alvarez JA. (2011). Resistant starch as prebiotic: a review. Starch. 63: 406–415.

Gildas, K.G., and Vandamme, T. (2012). Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. Pharmaceutics. 4: 149-163.

Karladee, D., Suriyong, S. (2012). γ–aminobuytric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination. Science Asia. 38(February 2012): 13-17.

Latifah, S.Y., Armania, N., Tze, T.H., Azhar, Y., Nordiana, A.H., Norazalina, S., Hairuszah, I., Saidi, M., and Maznah, I. (2010). Germinated brown rice (GBR) reduce incidence aberrant crypt foci with the involvement of β-catenin and COX-2 in azoxymethane-induce cilon cancer in rats. Nutrition Journal. 9: (16); 1-8.

Masuda, K., Guo, X., Uryu, N., Hagiwara, T., Watabe, S. (2008). Isolation of marine yeasts collected from the Pacific Ocean showing a high production of γ–aminobutyric acid. Biosci, Biotechnol, Biochem. 72(12): 3265-3272.

Mohite, M.S., Yadav A.V., Raje V.N., Mohite, Y.G. and Thombre, S.A. (2012). Preliminary phytochemical investigation and In-Vitro antioxidant activity of Borassus flabellifer L. fruit pulp. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 4(6): 326-329.

Park, K.T. Ji, K., Nam, J., Oh, M., Yu, S., Joo, Y., Han, J.K. (2016). Effects of gamma aminobutyric acid and yeast culture on performance, blood cell of broiler subjected to multi-stress environments. Global Journal of Science Frontier Research: Agriculture and Veterinary. 16(1): 1-10.

Pramod, H.J., Yadav, A.V., Raje, V.N., Mohite, M. and Wadker, G. (2013). Antioxidant activity of Borassus flabellifer (Linn.) fruits. Asian Journal of Pharmacy and Technolgy. 3(1): 16-19.

Saranya, P., Poongodi Vijayakumar, T. (2016). Preliminary phytochemical screening of raw and thermally processed palmyra palm (Borassus flabellifer linn.) fruit pulp. Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences. 3(1): 186-193.