รายงานการวิจัย

การแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำขนมตาล

Isolation and Selection of Yeasts and Lactic acid Bacteria from Fermented Palmyra Pulp for Kanom-Tan Starters Production

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทธิรา เดิดปฤงคพ

รองศาสตราจารย์สมใจ ศิริโภค

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณแผ่นดิน ปี 2550

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

รายงานการวิจัย

การแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำขนมตาล

Isolation and Selection of Yeasts and Lactic acid Bacteria from Fermented Palmyra Pulp for Kanom – Tan Starters Production

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทธิรา เลิศปฐงคพ

รองศาสตราจารย์สมใจ ศิริโภค

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณแผ่นดิน ปี 2550

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัย เรื่องการศึกษาการแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมักเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำขนมตาล ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2550 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทธิรา เลิศปฤงคพ สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการความปลอดภัยของอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย และรองศาสตราจารย์สมใจ ศิริโภค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เป็นผู้ร่วมงานวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิม มัติโก อธิการบดี ดร.สาธิต พุทธชัยยงค์ รองอธิการบดี นางจิราภรณ์ สัพทานนท์ ผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายวิจัย ที่ช่วยกรุณาให้การสนับสนุน

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาธุรกิจอาหาร อาจารย์และเจ้าหน้าที่ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัย

ชื่อเรื่อง การแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมักเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำขนมตาล

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทธิรา เลิศปฤงคพ
รองศาสตราจารย์สมใจ ศิริโภค

ปีพ.ศ. 2550

บทคัดย่อ

จำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อตาลที่หมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ความชื้นร้อยละ 85 ของน้ำหนักสด พีเอชเฉลี่ย 3.75 เมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA และ MRS มีค่า 1.1 x 10^9 CFU/g และ 1.3 x 10^9 CFU/g ตามลำดับ จำนวนโคโลนีของยีสต์บนอาหาร PDA มีมากกว่าบนอาหาร MRS เลือกเก็บโคโลนีของยีสต์ 6 ไอโซเลทและแบคทีเรียแลคติก(LAB) 3 ไอโซเลท การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่แยกได้โดยวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี พบว่ายีสต์รหัส YA1, YA2, YA3, YB1 และ YB2 มีความน่าจะเป็น *Candida krusei* ในขณะที่ YB3 มีสมบัติคล้าย *Pichia barkeri* การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ LAB ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก พบว่าเชื้อรหัส BA2 และ BA3 มีรูปร่างเป็นท่อน และเชื้อรหัส BA4 มีรูปร่างแบบ coccobacillus การจัดจำแนกชนิดของ LAB ที่แยกได้โดยวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อรหัส BA2 น่าจะเป็น *Lactobacillus plantarum*, BA3 น่าจะเป็น *Lactobacillus homohiochii* และ BA4 น่าจะเป็น *Leuconostoc dextranicum* การทดลองใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* ในการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งบ่มที่ 40 ^{o}ซ พบว่า การใช้ *Candida krusei* ในปริมาณร้อยละ 0.36 ของน้ำหนักส่วนผสม ใช้เวลาในการบ่มเร็วที่สุดคือ 2.25 ชั่วโมง และทำให้ได้ขนมตาลที่มีปัจจัยคุณภาพใกล้เคียงกับการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณร้อยละ 0.1 อย่างไรก็ตามขนมตาลที่ทำจาก *Candida krusei* มีกลิ่นรสดีกว่าขนมตาลที่ทำจาก *Saccharomyces cerevisiae* เล็กน้อย ดังนั้น *Candida krusei* จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการผลิตขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งได้ดีกว่า การทดลองใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei* ร้อยละ 0.36 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ร้อยละ 0.05 ในการทำขนมตาล พบว่า ขนมตาลที่ใช้ *Candida krusei* เพียงชนิดเดียว มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลาง การใช้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้นี้ไม่มีผลทำให้ได้ขนมตาลที่มีคุณภาพดีขึ้น ขนมตาลที่ผลิตได้มีค่าสี L* a* และ b* เท่ากับ 68.5, 17.11 และ 69.83 ตามลำดับ มีค่า Aw เท่ากับ 0.84 มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า เส้นใยอาหาร ร้อยละ 48.7, 2.33, 3.97, 44.67, 0.51 และ 1.81 โดยน้ำหนักเปียก ตามลำดับ มีปริมาณกรดทั้งหมด ร้อยละ 0.04 และมีเบต้าแคโรทีน 8.67 ไมโครกรัม/100 กรัม

Title Isolation and Selection of Yeasts and Lactic acid Bacteria from Fermented Palmyra Pulp for Kanom – Tan Starters Production

Researchers Assistant Professor Pattira Lertpringkop

Associative Professor Somjai Siripok

Year 2007

Abstract

Total viable count of microorganisms in fermented ripe Palmyra fruit pulp for 12 hours, with 85 % average moisture content w/w and average pH 3.75 , cultured on PDA and MRS were 1.1 x 10^9 CFU/g and 1.3 x 10^9 CFU/g , respectively. Yeast colony numbers were detected on PDA higher number than on MRS. Six colonies of yeast and three colonies of lactic acid bacteria (LAB) were isolated. The identification of the yeast isolates based on morphology, physiology, and biochemical properties revealed that YA1, YA2, YA3, YB1 and YB2 were *Candida krusei* and YB3 was *Pichia barkeri*. Morphology of the LAB isolates (BA2, BA3, BA4) were studied. BA2 and BA3 were bacilli-shaped while BA4 was coccobacilli-shaped. The identification of these LAB based on morphology, physiology, and biochemical properties revealed that BA2 was *Lactobacillus plantarum*, BA3 was *Lactobacillus homohiochii* and BA4 was *Leuconostoc dextranicum*. The experiment was used *Candida krusei* and *Pichia barkeri* to prepare Kanom – Tan from fermented and frozen ripe Palmyra fruit pulp, incubation at 40^{O}C . The results found that 0.36%(w/w of all ingredient weight) *Candida krusei* showed the optimum time for fermentation at 2.25 hours and gave the Kanom-Tan with quality factors closed to the use of 0.1% *Saccharomyces cerevisae*. However, Kanom-Tan prepared from *Candida Krusei* had a little flavour than the one prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore *Candida Krusei* had a potential to be used in Kanom-Tan production from the fermented and frozen ripe Palmyra fruit pulp. The experiment was used 0.36% of *Candida krusei* in addition to 3 isolates of 0.05% LAB in preparation of Kanom-Tan. The overall liking of Kanom-Tan produced from the only *Candida krusei* was rated "moderately like". In addition, the LAB isolates were not improved the quality of Kanom-Tan. The color L* a* b* values of Kanom-Tan were 68.5, 17.11 and 69.83, respectively, with an Aw of 0.84. The proximate analysis was as following : water content, protein, fat, carbohydrate, ash, dietary fiber of 48.7, 2.33, 3.97, 44.67, 0.51 and 1.81% on wet basis, respectively which produced total acid content of 0.04% and beta-carotene content of 8.67 μg/100g.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ	(2)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญภาพ	(7)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของปัญหา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2. ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ขนมตาล	3
2.2 วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการทำขนมตาล	3
2.3 สูตรและวิธีการทำขนมตาล	11
3. อุปกรณ์และวิธีการ	15
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	15
3.2 วิธีการ	17
4. ผลการวิจัย	25
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	44
5.1 สรุปผลการวิจัย	44
5.2 ปัญหาและข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 52

ภาคผนวก ก ภาพผนวก 52

ภาพผนวกที่ 1 การเตรียมเนื้อตาลหมัก 53

ภาพผนวกที่ 2 ขั้นตอนการทำขนมตาล 54

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ 55

ภาคผนวก ค แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส 60

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 64

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การแบ่งข้าวตามปริมาณอะมิโลส	7
2. การเปรียบเทียบส่วนผสมของขนมตาลสูตรต่าง ๆ เป็นร้อยละ	14
3. จำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อตาลหมักเมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA และ MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1%	25
4. ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YMA	26
5. ลักษณะรูปร่างและการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	28
6. ความสามารถในการสร้างไมซีเลียมและ ballistospore ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	30
7. ลักษณะการเจริญในอาหารเหลวและความสามารถในการเจริญในสภาวะต่าง ๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	30
8. การเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากตาลหมักในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน	31
9. ความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	32
10. สมบัติทางชีวเคมีบางประการของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	32
11. การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก	33
12. ลักษณะรูปร่างของเชื้อ LAB การสร้างเอนไซม์คะตะเลส และการเจริญในสภาวะต่าง ๆ	34
13. ผล biochemical test ของเชื้อ LAB	35
14. การเปรียบเทียบการบ่มส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสดกับส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์เพื่อใช้ทำขนมตาล	37
15. การเปรียบเทียบการบ่มส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสดกับส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมยีสต์ขนมปังและเชื้อยีสต์ที่แยกได้เพื่อใช้ทำขนมตาล	38
16. คุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนปัจจัยคุณภาพของขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมยีสต์ขนมปังและเชื้อยีสต์ที่แยกได้	39
17. ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการเรียงลำดับความชอบของขนมตาลที่ใช้ปริมาณยีสต์ 3 ระดับ	40
18. เชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็ง	41
19. คุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนความชอบรวมขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้	42
20. คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี (โดยน้ำหนักเปียก) ของขนมตาลที่ได้จากการวิเคราะห์	43

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ขั้นตอนการทำขนมตาล 22

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ขนมตาลเป็นขนมพื้นบ้านของคนไทยแต่โบราณ มีส่วนผสมหลัก คือ แป้งข้าวเจ้า เนื้อตาลสุก กะทิ และน้ำตาล กระบวนการทำขนมตาลมีความซับซ้อน ละเอียดอ่อน และหลายขั้นตอน ซึ่งต้องใช้เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง เริ่มจากการยีลูกตาลที่สุกเต็มที่แล้วกับน้ำเพื่อคั้นเนื้อตาลออกจากเส้นใย กรองเพื่อแยกเส้นใยและเศษผง แยกเนื้อตาลสุกออกจากน้ำโดยใส่ผ้ากรองแขวนไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้เนื้อตาลสุกข้นๆ นำมานวดกับแป้ง กะทิ และน้ำตาล หมักประมาณ 6 – 10 ชั่วโมง ตักใส่กระทงหรือถ้วยตะไลแล้วนึ่ง จะได้ขนมตาลที่มีเนื้อฟู สีเหลืองสวย หอมกลิ่นตาลสุก รสหวานนุ่มนวล (มนัสนันท์, 2544) นอกจากนี้เนื้อตาลสุกยังมีเบต้าแคโรทีนสูงถึง1,840 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม (นฤมล, 2533) ซึ่งนอกจากนำมาทำขนมตาลแล้วยังมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารให้เป็นที่สนใจของเด็กไทยและชาวต่างประเทศผู้รักสุขภาพได้ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปว่าแคโรทีนเป็น provitamin A ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอในร่างกายของเราได้ ช่วยให้สุขภาพตาและผิวพรรณดี และยังมีคุณสมบัติเป็น antioxidant และ anticancer อีกด้วย (ทิพย์ , 2537)

ในกระบวนการทำขนมตาลพบว่ามีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติซึ่งช่วยในกระบวนการหมักและมีส่วนทำให้เกิดกลิ่นรสของขนมตาล ยีสต์ยังช่วยผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย ทำให้ขนมตาลขึ้นฟูน่ารับประทาน อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในเนื้อตาลสุกที่ใช้ทำขนมตาลแต่ละครั้งมีชนิดและปริมาณเริ่มต้นที่ไม่แน่นอน ทำให้ได้ขนมตาลที่มีคุณภาพไม่คงที่ และผลตาลที่ใช้ในการทำขนมตาลนี้จะมีมากตามฤดูกาลเท่านั้น คือ ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์–เดือนมิถุนายน นอกจากนี้ผลตาลสุกมีอายุการเก็บสั้นมาก และเริ่มเสื่อมคุณภาพหลังหล่นจากต้นแล้วทำให้ กลิ่นรสผิดปกติ อีกทั้งการเตรียมเนื้อลูกตาลสุกต้องใช้เวลาในการเตรียมนานและเนื้อตาลสุกที่เตรียมแล้วก็เก็บได้ไม่นานมักจะเน่าเสียได้ง่าย ดังนั้นการผลิตขนมตาลนอกฤดูกาลจึงจำเป็นต้องใช้เนื้อตาลที่ถนอมไว้โดยวิธีต่าง ๆ กัน เช่น โดยการแช่แข็ง หรือการทำแห้งเป็นผง (นิดดา, 2541) แต่การทำขนมตาลจากเนื้อตาลสุกแช่แข็งหรือเนื้อตาลผงมีความจำเป็นต้องเติมเชื้อยีสต์เพื่อช่วยให้ขนมตาลขึ้นฟูด้วย เนื่องจากการเก็บรักษาเนื้อตาลโดยวิธีดังกล่าวมีผลทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติลดจำนวนลง จนไม่สามารถทำให้ขนมตาลขึ้นฟูได้ ดังนั้นจึงควรทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์และ

แบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตขนมตาลที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ ควบคุมเวลาในการหมักที่แน่นอนได้และเพื่อใช้ร่วมกับเนื้อตาลที่เก็บรักษาไว้ในรูปแช่แข็งหรือเนื้อตาลผงแห้ง ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตขนมตาลคุณภาพดีได้ทุกฤดูกาล เพื่อรองรับการพัฒนาการผลิตขนมตาลแช่แข็งระดับอุตสาหกรรมและการส่งออกได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก
2. จัดจำแนกชนิดของยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้
3. คัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมสำหรับการทำขนมตาล
4. ศึกษาคุณภาพของขนมตาลที่ได้จากวิธีการตามปกติกับวิธีที่เติมยีสต์และแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้
5. วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของขนมตาลที่ได้จากการเติมยีสต์และแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์

ขอบเขตการศึกษา ศึกษาเฉพาะตาลพันธุ์ตาลหม้อที่นำมาทำขนมตาล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ได้ฐานข้อมูลกระบวนการทำขนมตาล โดยเฉพาะสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสม เพื่อการเผยแพร่ และสนับสนุนการดำรงชีพด้วยกระบวนการสร้างความเข้มแข็งของชุมชน โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรในเขตที่มีการปลูกตาล

2. อนุรักษ์ภูมิปัญญาชาวบ้านและพัฒนากระบวนการผลิตโดยใช้ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาขนมไทย

3. พัฒนาศักยภาพทางเทคโนโลยีการผลิตขนมตาลให้สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกได้

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ขนมตาล

ขนมตาลเป็นขนมพื้นบ้านของไทยทำจากเนื้อตาลสุกที่ผ่านการหมัก แป้งข้าวเจ้า กะทิ และน้ำตาลทราย วิธีการทำเริ่มจากการนวดเนื้อตาลหมักกับแป้งข้าวเจ้าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่น้ำตาลทรายแล้วนวดจนน้ำตาลละลาย จากนั้นผสมด้วยกะทิสด นวดส่วนผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ปิดด้วยผ้าขาวบางชุบน้ำบิดหมาดๆ หมักตามธรรมชาติจนเกิดฟองขึ้น ประมาณ 6 – 10 ชั่วโมง ใส่ถ้วยตะไลนำไปนึ่งด้วยไฟแรง จนขนมตาลสุก และโรยด้วยมะพร้าวขูด เนื้อขนมตาลที่ได้มีสีเหลืองเข้ม ลักษณะนุ่ม ฟู มีกลิ่นตาลสุก รสชาติหวานมัน (มนัสนันท์, 2544) ในปัจจุบันหารับประทานขนมตาลที่มีรสชาติดีได้ยาก เนื่องจากปริมาณการปลูกต้นตาลลดลง ฤดูกาลที่มีผลตาลสุกจำนวนมาก คือ ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – มิถุนายน จึงมีการทำขนมตาลขายกันในช่วงดังกล่าว ขนมตาลที่ขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่ ผู้ประกอบการมักใส่เนื้อตาลน้อย เพิ่มแป้งและเจือสีเหลืองแทน ซึ่งทำให้ขนมตาลมีเนื้อกระด้าง ไม่หอมหวาน และไม่อร่อย

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทำขนมตาล

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการทำขนมตาลมีดังนี้

2.2.1 เนื้อตาลสุก

(1) ตาลโตนด ตาลโตนดมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer L.* จัดอยู่ในสกุล Borassas ชื่อสามัญ Palmyra Palm เป็นพืชตระกูลปาล์มพัดชนิดหนึ่ง (Talmaceae) เป็นพวกเดียวกับมะพร้าว ชิด จาก และสละ ผลของตาลโตนดมีลักษณะเป็นผลรวม ผลอ่อนมีสีเขียวติดอยู่บนทะลาย เมื่อสุกเต็มที่จะมีสีม่วงเข้มมากจนถึงดำผิวเรียบมัน เส้นผ่านศูนย์กลางของผลประมาณ 15-20 เซนติเมตร ภายในผลมีเมล็ดใหญ่แข็งประมาณ 2-4 เมล็ด ภายนอกเมล็ดมีขนเป็นเส้นใย เมล็ดฝังตัวอยู่ในเนื้อเยื่อที่เป็นเส้นใยของเปลือก เนื้อตาลสุกมีสีเหลืองสดแทรกอยู่ตามเส้นใยมีกลิ่นหอม รสหวานฉ่ำ นิยมนำไปใช้ทำขนมตาลและใช้แต่งสีขนม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544)

พันธุ์ตาลโตนดที่ปลูกทั่วไปมี 3 พันธุ์ คือโตนดหม้อ มีลูกใหญ่ ผลค่อนข้างดำ เปลือกหนา ให้ผลประมาณ 10-20 ผลต่อทะลาย โตนดไข่ มีลูกเล็ก เปลือกบาง เนื้อตาลน้อย สีเหลืองอ่อนกว่ารวมทั้งมีกลิ่นหอมน้อยกว่าพันธุ์โตนดหม้อ ให้ผลประมาณ 15-30 ผลต่อทะลาย เกษตรกรไม่นิยมปลูกเพราะเมล็ดมีขนาดเล็ก และโตนดพันธุ์ลูกผสม ลูกค่อนข้างใหญ่ เปลือกสีเหลืองอมดำ ให้ผลประมาณ 15-30 ผลต่อทะลาย ตาลชนิดนี้ส่วนใหญ่ปลูกกันในจังหวัดเพชรบุรี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544)

ประเทศไทยปลูกตาลโตนดมากที่จังหวัดเพชรบุรี สงขลา สุพรรณบุรี นครปฐม และพระนครศรีอยุธยา ในเขตภาคใต้ที่อำเภอสทิงพระ และอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ถิ่นกำเนิดของตาลยังไม่ทราบแน่ชัดว่าอยู่ที่ใด แต่สันนิษฐานกันว่าน่าจะอยู่บริเวณตอนใต้ของทวีปเอเชีย แถบด้านตะวันออกของประเทศอินเดีย ต่อมาได้กระจายพันธุ์ออกไปพร้อมๆกับการแพร่ขยายของพุทธศาสนา ไปยังประเทศต่างๆ เช่น ไทย พม่า กัมพูชา เป็นต้น ตาลโตนดมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น ทางภาคกลางเรียกว่า ต้นตาล ภาคใต้เรียกว่า ตาลโตนด หรือบางท้องที่แถบจังหวัดยะลา ปัตตานี เรียกว่า ปอเก๊าะตา ส่วนภาคเหนือแถบจังหวัดเชียงใหม่ เรียกว่า ปลีตาล ในปัจจุบันประเทศที่ปลูกต้นตาลกันมากที่สุดได้แก่ ประเทศไทย กัมพูชา พม่า อินเดีย นิวกินี ควีนแลนด์ แอฟริกา เป็นต้น

(2) คุณภาพทางเคมีของเนื้อตาลสุก เนื้อตาลสุกมีความชื้นร้อยละ 94.52 โดยน้ำหนักเปียก โปรตีนร้อยละ 9.85 ไขมันร้อยละ 4.38 เถ้าร้อยละ 7.12 เส้นใยหยาบร้อยละ 45.07 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 33.58 โดยน้ำหนัก มีแคโรทีน 17.65 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง พีเอชเท่ากับ 3.34 มีค่าปริมาณกรดร้อยละ 14.60 (น้ำหนักแห้ง) (มนัสนันท์, 2544) ในขณะที่กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530) รายงานว่า ในเนื้อตาลสุกมีความชื้นร้อยละ 89.4 โปรตีนร้อยละ 0.7 ไขมันร้อยละ 0.6 เยื่อใยร้อยละ 0.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.9 แคลเซียมร้อยละ 7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสร้อยละ 22 มิลลิกรัม และเหล็กร้อยละ 0.9 มิลลิกรัม

(3) เนื้อตาลสุกหมัก เนื้อตาลสุกหมักได้จากการนำผลตาลสุกงอมได้ที่มาเปลือกออก ล้างให้สะอาด แล้วแบ่งออกเป็นพูตามจำนวนเมล็ดตาล ดึงเส้นแข็งที่เรียกว่า ดีตาล ซึ่งอยู่บริเวณสันเมล็ดออก เนื่องจากดีตาลมีส่วนทำให้เนื้อตาลมีรสขม จากนั้นแช่ผลตาลในน้ำเพื่อให้ผลตาลนิ่มง่ายต่อการยี แล้วนำผลตาลสุกครูดกับตะแกรงเพื่อยีเนื้อตาลออกจากเส้นใยให้มากที่สุด จะได้เนื้อตาลสุกที่ผสมกับน้ำ กรองเส้นใยออก นำส่วนผสมที่กรองได้ใส่ถุงผ้าดิบ แขวนไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งไม่มีน้ำหยดออกมา

(4) จุลินทรีย์ในเนื้อตาลสุก เนื้อตาลสุกมีจุลินทรีย์หลายชนิดคือ

1. *Candida krusei* มีรูปร่างทรงกระบอก หรือรูปทรงไข่ ขนาดประมาณ 3-5 x 6-20 ไมครอน เซลล์มีขนาดเล็กและยาว สามารถสร้างไมซีเลียมเทียม (pseudomycelium) กระบวนการหมักเกิดขึ้นเมื่อมีกลูโคสเท่านั้น อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้คือ 43–45 องศาเซลเซียส ไม่สร้างกรดและสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงาน

2. *Saccharomyces* spp. ไม่สร้างกรด แต่สร้างแอสโคสปอร์ (ascospore)

3. *Kloeckera apiculata* มีรูปทรงคล้ายมะนาว รูปทรงไข่ หรือยาวเรียว มีขนาด 1.4-5.3 x 2.6-12.2 ไมครอน มักปรากฏเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ ขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อ สามารถหมักและดูดซึมได้เฉพาะกลูโคสเท่านั้น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. *Hanseniaspora* spp. มีรูปร่างคล้ายมะนาว และรูปทรงไข่ ขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อทั้งสองด้าน ในช่วงที่เซลล์เจริญเต็มที่มีคุณสมบัติในการหมัก แต่ไม่สามารถดูดซับไนเตรทได้ ส่วนใหญ่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สมศรี, 2529)

เนื้อตาลสุกมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ช่วยสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้ขนมตาลขึ้นฟู แต่อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ ถ้ามีมากก็สามารถสร้างกรดที่ทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติและรสเปรี้ยวในเนื้อตาลสุกได้ นอกจากนี้เนื้อตาลสุกหมักมีค่า A_w สูงกว่าค่า A_w ขั้นต่ำที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ วิธีที่จะทำให้ค่า A_w ในอาหารลดลงคือการแยกน้ำออก (dehydration) การเติมตัวถูกละลาย เช่น น้ำตาลหรือเกลือ การแช่แข็ง นอกจากการควบคุมค่า A_w แล้วยังสามารถใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า hurdle technology ซึ่งเป็นการผสมผสานเทคนิคการถนอมอาหารแบบต่างๆมาใช้ร่วมกัน เช่น การใช้อุณหภูมิสูง การใช้สารกันเสีย เป็นต้น

(5) การใช้ประโยชน์จากเนื้อตาลสุก เนื้อตาลสุกสามารถนำมาทำขนมตาล วุ้นลูกตาล และใช้เป็นสีผสมอาหารในขนมต่างๆ เช่น ขนมบัวลอยลูกตาล ขนมขี้หนู และไอศกรีม เป็นต้น แต่เนื่องจากผลตาลสุกมีอายุการเก็บสั้นมาก จะเริ่มเสื่อมคุณภาพหลังหล่นจากต้นแล้วทำให้ กลิ่นรสผิดปกติ อีกทั้งการเตรียมเนื้อตาลสุกต้องใช้เวลาในการเตรียมนานและเนื้อตาลสุกที่เตรียมแล้วเก็บได้ไม่นาน จึงมีผู้ศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อตาลสุก กรรมวิธีและพัฒนากระบวนการผลิตขนมตาล เพื่อทำให้สะดวกในการผลิต และพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก ซึ่งจะช่วยให้ผู้ประกอบการสามารถทำขนมตาลได้ง่ายมากขึ้น ดังนี้

นฤมล (2533) ได้ศึกษากรรมวิธีการผลิตเนื้อตาลสุกผงและการนำเนื้อตาลสุกผงมาใช้ในขนมไทยบางชนิด พบว่า เนื้อตาลสุกผงที่ผลิตด้วยวิธีการทำแห้งด้วยลูกกลิ้งมีคุณภาพดี มีความชื้นร้อยละ 6.1 สามารถดูดซับน้ำได้ดีมาก เก็บรักษาได้ประมาณ 3 เดือนในถุงอลูมิเนียมที่

เคลือบด้วยพลาสติกโพลีเอทิลีน และกระป๋องโลหะสภาวะสุญญากาศ เมื่อนำมาคืนรูปสามารถผลิตขนมตาล และขนมบัวลอยได้ แต่เนื้อตาลสุกผงที่ได้มีกลิ่นลดลงมาก และสีเหลืองซีดลง

กุสุมาลย์ และคณะ(2540) ได้ศึกษาการผลิตเนื้อตาลผง โดยนำเนื้อตาลสุกผ่านกระบวนการทำแห้ง ด้วยเครื่อง Drum Dryer พบว่าขนมตาลที่ได้ ผู้บริโภคให้การยอมรับร้อยละ 45

บุณยกฤต (2544) ได้ทำการวิจัยเรื่องการศึกษาการเตรียมเนื้อตาลสุกและสภาวะการเก็บรักษาเนื้อตาลสุกอบแห้ง พบว่า เนื้อตาลสุกอบแห้งที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนเมื่อเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนตเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สีของเนื้อตาลแห้งจะจางลง ในขณะที่การเก็บในสุญญากาศจะช่วยรักษาสีของเนื้อตาลแห้งได้ดี

ต่อมามนัสนันท์ (2544) ได้ศึกษาคุณภาพของเนื้อตาลสุกและขนมตาลที่ผลิตจากเนื้อตาลสุกผ่านกระบวนการพาสเจอไรเซชัน พบว่าเนื้อตาลสุกพาสเจอไรส์ที่เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็มและปรับพีเอช เป็น 2.8 มีอายุการเก็บอย่างน้อย 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง(30 องศาเซลเซียส) ขนมตาลมีความแข็งและความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น คะแนนความชอบเฉลี่ยของสี รสหวาน รสเปรี้ยว และกลิ่นตาลลดลง

มนัสนันท์ (2544) ได้ทำการวิจัยเรื่องการพัฒนาแป้งข้าวเจ้าผสมและส่วนผสมสำเร็จรูปในการผลิตขนมตาล เพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็กพบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก ผู้บริโภคร้อยละ 100 ยอมรับผลิตภัณฑ์ขนมตาล

ภัทรวดี และคณะ (2548) ได้ศึกษาคุณภาพขนมตาลที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าขนมตาลที่แช่แข็งเป็นเวลา 3 เดือนมีคุณภาพที่ไม่เปลี่ยนแปลงและผู้ชิมยังให้การยอมรับ

ภัทธิรา (2549) ได้ทำการวิจัยเรื่องการเก็บรักษาเนื้อตาลสุกโดยการลดค่า A_w ร่วมกับการแช่แข็งเพื่อใช้ในการทำขนมตาล เนื้อตาลสุกที่ไม่พาสเจอไรส์และพาสเจอไรส์ เก็บรักษาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า A_w มีค่าอยู่ในช่วง 0.85-0.86 และ 0.77-0.85 ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 3.98-4.06 ขนมตาลมีคะแนนเฉลี่ยความชอบรวมอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาการแปรรูปเนื้อตาลสุกเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร สารสีและผลิตภัณฑ์อื่นๆที่ไม่ใช่อาหารอีกด้วย เช่น ทยากร และคณะ (2550) นำแป้งตาลพัฒนาเป็นอาหารแคปซูลและเครื่องดื่มสำเร็จรูป พบว่าไม่เหมาะสมที่จะนำมารับประทานเพราะละลายน้ำได้น้อยและสูญเสียกลิ่นธรรมชาติของตาลโตนด แต่เหมาะสำหรับนำมาทำอาหารเสริมแคปซูลเพราะมีคุณค่าทางอาหารสูง การใช้เนื้อลูกตาลสุกเป็นแหล่งของสารสีในอาหารสัตว์ปีก การศึกษาความเป็นไปได้ของการพัฒนาน้ำยาล้างจานจากผลตาลสุก พบว่าในน้ำแป้งตาลมีหมู่ฟังชันแอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติในการทำความสะอาดได้ดี (ยุสราน, 2550)

2.2.2 แป้งข้าวเจ้า

(1) ความหมายและองค์ประกอบ แป้งข้าวเจ้า หมายถึง แป้งที่ได้จากข้าว ซึ่งมีชื่อทางพฤกษาศาสตร์ว่า ออไรซา วาไตวา (*Oryza sativa linn.*) อาจเป็นข้าวเต็มเมล็ด ข้าวหักหรือปลายข้าว แต่ส่วนใหญ่ได้จากข้าวหักหรือปลายข้าว แช่น้ำที่เติมสารละลายด่างเพื่อกำจัดโปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือสตาร์ช (starch) สำหรับแป้งฟลาวร์จะไม่ผ่านการแช่ในด่างแต่แช่ในน้ำ แล้วโม่ให้ละเอียด ขั้นตอนการโม่ให้เป็นแป้ง ทำได้ 3 วิธีคือ การโม่เปียกหรือการโม่น้ำ การโม่แบบผสม และการโม่แห้ง หลังจากนั้นนำมาอบให้แห้ง ร่อนผ่านตะแกรงละเอียด แป้งข้าวเจ้าที่ขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่ได้จากการโม่เปียกยังมีโปรตีนและสิ่งแปลกปลอมติดอยู่ แป้งที่ได้จึงเป็นประเภทฟลาวร์ (Rice flour)

แป้งข้าวเจ้าที่ทำจากข้าวเก่า เรียกว่า แป้งเก่า แป้งชนิดนี้ดูดน้ำได้ดี เหมาะสำหรับทำขนมที่มีส่วนผสมน้ำมากและต้องการลักษณะอยู่ตัวคงรูปได้ เช่น ขนมน้ำดอกไม้ ขนมทราย ส่วนแป้งที่ทำจากข้าวใหม่ เรียกว่า แป้งใหม่ แป้งใหม่ดูดซึมน้ำได้น้อย เพราะในตัวแป้งเองมีความชื้นสูงอยู่แล้ว ดังนั้น การใช้แป้งชนิดนี้ทำขนมจึงควรปรับปริมาณน้ำในส่วนผสมให้พอเหมาะ หากใส่น้ำมากเกินไปขนมที่ได้จะแฉะหรือเละ แป้งใหม่ทำขนมได้หลากหลายเช่นเดียวกัน

แป้งข้าวเจ้ามีองค์ประกอบทางเคมี 2 ชนิดปนกันอยู่ คือ อะมิโลเพกตินและอะมิโลส ทำให้สมบัติของแป้งข้าวเจ้าที่ได้แตกต่างกันตามปริมาณอมัยโลสด้วย นอกจากนี้สมบัติของแป้งข้าวเจ้ายังเกิดจากสมบัติของข้าวที่นำมาโม่ได้แก่ ความคงตัวของแป้งสุก (gel consistency) และระยะเวลาการหุงต้ม (cooking time) ด้วย ข้าวแบ่งตามปริมาณอะมิโลส เป็น 4 ประเภท ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งข้าวตามปริมาณอะมิโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณอะมิโลส (ร้อยละ)	ลักษณะข้าวสุก
ข้าวเหนียว	0 - 2	เหนียวมาก
ข้าวเจ้า		
ข้าวอะมิโลสต่ำ	10 - 19	เหนียว-นุ่ม หุงแฉะง่าย
ข้าวอะมิโลสปานกลาง	20 - 25	ค่อนข้างร่วน ไม่แข็ง
ข้าวอะมิโลสสูง	26 - 34	ร่วนแข็ง หุงขึ้นหม้อ

ที่มา : งามชื่น, 2541

แป้งข้าวเจ้าโดยมากทำจากข้าวประเภทที่มีอะมิโลสสูง เมื่อนำไปประกอบอาหารประเภททอดให้ความกรอบแข็ง หรือเมื่อนำไปนึ่งให้สุกและทำให้เย็นลงเกิดลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม เช่น ก๋วยเตี๋ยว เส้นหมี่ ข้าวหอมมะลิมีปริมาณอะมิโลสต่ำจึงไม่เหมาะในการนำมาทำเป็นแป้งเพราะมีสมบัติในการดูดซึมน้ำน้อย

(2) **สมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำแป้ง** เมื่อน้ำแป้งได้รับความร้อน โมเลกุลของน้ำแทรกซึมเข้าไปอยู่ในโครงสร้างของแป้งทำให้เม็ดแป้งพองตัว น้ำแป้งเปลี่ยนสภาพจากของเหลวเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว หนืด (viscosity) และใสขึ้น มีลักษณะคล้ายแป้งเปียก (paste) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า การเกิดเจลาติไนเซชั่น(gelatinization) และอุณหภูมิที่เกิดปรากฏการณ์นี้เรียกว่า อุณหภูมิเจลาติไนเซชั่น หรือ อุณหภูมิแป้งสุก (gelatinization temperation) ถ้าต้มต่อไปอีกโดยให้ความร้อนที่มากเกินไป เม็ดแป้งพองตัวเต็มที่และแตก ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้แป้งเปียกเย็นตัวลง ความหนืดข้นเพิ่มมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ถ้าน้ำแป้งมีความเข้มข้นต่ำไม่เกิดเจล แต่เกิดลักษณะตะกอนขุ่นขาวแทน

แป้งแต่ละชนิดมีอุณหภูมิเริ่มต้นและช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนซ์แตกต่างกัน เนื่องจากเม็ดแป้งมีขนาดต่างกันจึงสุกไม่พร้อมกัน เม็ดแป้งขนาดใหญ่พองตัวและสุกก่อนขนาดเล็ก จึงทำให้เกิดช่วงของการสุกของแป้ง แป้งข้าวเจ้าจะมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชั่น ในช่วงประมาณ 75 - 90 องศาเซลเซียส และสำหรับแป้งมันสำปะหลังจะมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชั่นต่ำกว่าแป้งข้าวเจ้า โดยเป็นช่วงประมาณ 65 - 70 องศาเซลเซียส

2.2.3 กะทิ

กะทิเป็นของเหลวที่ได้จากการคั้นเนื้อมะพร้าวสดขูด อาจเติมน้ำหรือไม่ก็ได้ มีลักษณะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ กะทิมีอิมัลซิไฟเออร์โดยธรรมชาติทำให้อิมัลชันมีความคงตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ยังไม่เพียงพอที่ทำให้กะทิคงตัวอยู่ได้ เนื่องจากมีปริมาณลิปิดอยู่มากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีน ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่พื้นผิวระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำ มีไม่มากพอที่จะป้องกันการรวมตัวของเม็ดไขมันได้ เม็ดไขมันจึงมีแนวโน้มที่จะจับตัวกันและแยกชั้นออกมาก การรวมตัวของเม็ดไขมันก่อให้เกิดเป็นครีมและลอยแยกออกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นชั้นของหางกะทิ (coconut skim milk) และชั้นบนเป็นหัวกะทิ (coconut cream) โดยเริ่มเกิดการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 - 10 ชั่วโมง จนกระทั่งแยกชั้นสมบูรณ์ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการแยกชั้นนี้ไม่ใช่เป็นการแตกตัวของอิมัลชันอย่างสมบูรณ์ สามารถเขย่าให้กลับเป็นเนื้อเดียวกันได้อีก

น้ำกะทิแบ่งตามระบบอุตสาหกรรม แบ่งได้ 5 แบบ คือ น้ำกะทิสด น้ำกะทิพาสเจอไรส์ น้ำกะทิบรรจุกระป๋อง น้ำกะทิบรรจุกล่องยูเอชที และกะทิผง

1. น้ำกะทิสด ได้จากการคั้นน้ำกะทิด้วยเครื่องแล้วเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เน่าเสีย มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1-2 วัน นอกจากนี้กลิ่น รส อาจเปลี่ยนไปด้วยเล็กน้อย อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาต้องไม่ต่ำจนทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง เพราะจะทำให้เนื้อสัมผัสของน้ำกะทิเปลี่ยนไปโดยตะกอนโปรตีนแยกตัวเกิดลักษณะเป็นทราย

2. น้ำกะทิพาสเจอไรส์ เป็นน้ำกะทิที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีพาสเจอไรส์ แต่ก็ยังคงมีเชื้อโรคบางตัวหลงเหลืออยู่จึงควรเก็บในห้องเย็นเหมือนกะทิสด มีอายุการเก็บรักษาประมาณ 4-6 วัน

3. น้ำกะทิบรรจุกระป๋อง เป็นน้ำกะทิที่บรรจุกระป๋องผ่านการฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์ สามารถเก็บรักษาได้โดยไม่ต้องแช่เย็น

4. น้ำกะทิบรรจุกล่องยูเอชที เป็นน้ำกะทิที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยระบบความร้อนสูงเวลาสั้น ประมาณ 140 -145 องศาเซลเซียส นาน 10 – 15 วินาที บรรจุในกล่องที่ฆ่าเชื้อแล้ว เนื่องจากให้ความร้อนในเวลาสั้นทำให้กะทิชนิดนี้มีสภาพคล้ายกะทิสดมาก แต่อายุการเก็บรักษาสั้นกว่าแบบบรรจุกระป๋อง

5. กะทิผง มีลักษณะเป็นผงร่วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำกะทิสดมาทำให้แห้งเป็นผง เติมน้ำแล้วใช้ได้ทันที มีสีและกลิ่นตามธรรมชาติของกะทิ ปราศจากการปนเปื้อนจากสารอื่นๆ กรรมวิธีที่นิยมทำกะทิผง คือ ใช้เครื่องพ่นฝอยด้วยการต้มวัตถุเจือปนอาหารลงไปด้วย กะทิผงมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 4 เดือน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเสื่อมเสียของกะทิส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันการจับตัวกันเป็นก้อนและสูญเสียความสามารถในการละลายน้ำ

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพกะทิ

1. ความแก่อ่อนของมะพร้าว มะพร้าวที่ยังอ่อนมีปริมาณของน้ำตาลสูง และไขมันต่ำ เมื่อนำมาสกัดน้ำกะทิจะได้น้ำกะทิที่มีปริมาณไขมันน้อย แต่มะพร้าวที่แก่เกินไปปริมาณโปรตีนจะลดลงเนื่องจากถูกใช้ไปในกระบวนการ เมตาโบลิซึม

2. วิธีการบีบคั้นกะทิ การใช้แรงขนาด 100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว บีบเนื้อมะพร้าวจะได้ปริมาณน้ำกะทิมากที่สุดและมีประสิทธิภาพมากถึงร้อยละ 90 - 95 การใช้แรงน้อยได้น้ำกะทิในปริมาณน้อยและมีปริมาณไขมันและโปรตีนต่ำ การคั้นน้ำกะทิเพื่อให้ได้ปริมาณมาก และคุณภาพที่สม่ำเสมอควรใช้เครื่องบีบมากกว่าคั้นด้วยมือ

3. ปริมาณน้ำที่ใช้อุณหภูมิในการคั้นและระยะเวลาในการผสมมะพร้าวกับน้ำ ความเข้มข้นของน้ำกะทิจะเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการผสมนานขึ้น และเพิ่มเล็กน้อยตามอุณหภูมิของน้ำที่ใช้สกัด การสกัดจะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อผสมเนื้อมะพร้าวขูดกับน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสก่อนคั้นเป็นเวลา 15 - 20 นาที (มนัสนันท์, 2544)

2.2.4 น้ำตาลทราย

น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ เรียกชื่อทางเคมี คือ น้ำตาลซูโครส สูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทไดแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีรสหวาน และให้พลังงานแก่ร่างกาย โดยมากได้จากอ้อย ที่อุณหภูมิปกติ น้ำตาลทรายละลายน้ำได้ดีและอิ่มตัวที่ความเข้มข้นประมาณ ร้อยละ 66 ถ้าใส่น้ำตาลมากจนถึงจุดอิ่มตัวหรือมากกว่าจุดอิ่มตัว จะทำให้อาหารมี Aw ต่ำมาก แต่การใช้น้ำตาลเลยจุดอิ่มตัว ถ้าไม่มีการย่อยสลายของน้ำตาลซูโครส น้ำตาลซูโครสจะตกผลึกหรือที่เรียกกันว่าตกทราย ถ้าอาหารนั้นมีสภาวะเป็นกรดและผ่านความร้อน น้ำตาลซูโครสบางส่วนถูกย่อยสลายได้เป็นน้ำตาลอินเวิร์ต ซึ่งเป็นน้ำตาลผสมของกลูโคสกับฟรุคโตส ทำให้จุดอิ่มตัวสูงขึ้น

น้ำตาลทรายเป็นสารให้ความหวานแก่ผลิตภัณฑ์ ช่วยในการถนอมอาหาร และช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดี สีสันน่ารับประทาน และเป็นอาหารของยีสต์ในระหว่างการหมักสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากขึ้น ทำให้ขนมขึ้นฟูและมีเนื้อนุ่ม ช่วยเก็บความชื้นเพราะน้ำตาลทรายมีลักษณะในการอุ้มน้ำได้ดี

2.2.5 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เดียว ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบเรียกว่าเบเกอร์ยีสต์ คือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการหมัก สามารถเปลี่ยนน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในระหว่างการหมัก ยีสต์จะเจริญเติบโต ทำให้โดเบาตัว มีความยืดหยุ่นและมีโพรงอากาศ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะในการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นอาหาร ความดันออสโมติก และปริมาณยีสต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอยู่ระหว่าง 27.5 - 35.0 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิในการหมักสูงขึ้นอัตราการเกิดก๊าซขณะหมักจะมากขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิในการหมักสูงเกินไป (มากกว่า 35 องศาเซลเซียส) อัตราการเกิดก๊าซลดลง ยีสต์เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด สามารถทนความเป็นกรดได้ต่ำถึง พีเอช 2.0 แต่จะมีประสิทธิภาพดีมากเมื่อ พีเอชประมาณ 4.5

ยีสต์ที่ทำให้เกิดการขึ้นฟู มี 3 ชนิด คือ

1. ยีสต์สด (compressed yeast) ยีสต์ชนิดนี้มีลักษณะอัดเป็นแผ่นเจริญเติบโตเร็วเมื่อมีอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ดี ราคาไม่แพง แต่ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีอายุการเก็บรักษาสั้นประมาณ 1 - 2 สัปดาห์

2. ยีสต์แห้งชนิดเม็ด (dry yeast) ยีสต์ชนิดนี้ต้องละลายในน้ำอุ่น 40-45 องศาเซลเซียส ก่อนการนำไปผสมในส่วนของแป้ง สามารถเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง

3. ยีสต์แห้งชนิดผงละเอียด (instant dry yeast) เป็นยีสต์แห้งที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดมีความสามารถในการหมักสูง ไม่ต้องละลายน้ำก่อนเติมลงในแป้ง สามารถนำไปผสมกับแป้งและส่วนผสมอื่นๆได้ทันทีมีอายุการเก็บนานในซองที่บรรจุมิดชิด

สำหรับการใช้ยีสต์ทั้ง 3 ชนิด จะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากยีสต์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีกำลังในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่างกัน คือ ยีสต์สดจะมีกำลังในการหมักต่ำสุด ยีสต์เม็ดมีกำลังการหมักรองลงมา และยีสต์ผงมีกำลังการหมักสูงสุด (มนัสนันท์, 2544)

2.3 สูตรและวิธีการทำขนมตาล

สูตรและวิธีการทำขนมตาลตามแบบพื้นบ้านโดยใช้วิธีธรรมชาติมีหลายสูตรดังตัวอย่างต่อไปนี้

สูตรที่ 1

ส่วนผสม

ข้าวเจ้า	3200	กรัม
น้ำตาลทราย	3200	กรัม
เนื้อตาลสุก	200	กรัม
กะทิ (คั้นเอาแต่หัวกะทิ)	3	ลิตร
มะพร้าวทึนทึกขูดเป็นเส้น	1	ถ้วยตวง

วิธีทำ

1.โม่ข้าวเจ้าให้ได้แป้งเนื้อละเอียดแล้วทับเอาน้ำออก จะได้แป้งข้าวเจ้าที่ใช้ทำขนมหรือจะใช้แป้งข้าวเจ้าสำเร็จรูปก็ได้

2.ผสมแป้งกับเนื้อตาลสุกเข้าด้วยกัน ใส่หัวกะทิ นวดนาน ๆ ประมาณ 30 นาที ค่อยๆใส่น้ำตาลทรายทีละน้อย นวดจนน้ำตาลทรายละลาย

3.ผสมกะทิที่เหลือลงในแป้งที่นวด คนให้ทั่ว เทลงในหม้อ ใช้ผ้าขาวบางชุบน้ำบิดหมาดๆ ปิดปากหม้อ หมักทิ้งไว้ตั้งแต่ 3 ทุ่มจนถึง 6 โมงเช้า ซึ่งขนมจะขึ้นดี โดยเนื้อตาลสุกทำให้เกิดการหมัก

4.นำมาตักใส่ถ้วยตะไลหรือกระทงเล็ก นึ่งในน้ำเดือด ไฟแรงจัด ประมาณ 15 -20 นาที จะได้ขนมตาลที่มีหน้าแตกเป็นรูปแฉก โรยด้วยมะพร้าวทึนทึก

ที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544

สูตรที่ 2

ส่วนผสม

แป้งข้าวเจ้า	360	กรัม
เนื้อตาลสุก	80	กรัม
น้ำตาลทราย	270	กรัม
มะพร้าวขูดขาว	360	กรัม
มะพร้าวทึนทึกขูดเป็นเส้น		

วิธีทำ

1.คั้นมะพร้าวขูดขาวใส่น้ำ ½ ถ้วย คั้นให้ได้กะทิ 1 ½ ถ้วย ผสมกะทิกับน้ำตาลตั้งไฟพอเดือด ยกลงปล่อยให้อุ่น

2.นวดแป้งกับเนื้อตาลสุกจนเข้ากันได้ดี ค่อย ๆ ใส่กะทิที่เคี่ยวทีละน้อย ๆ นวดจนนุ่มมือ ทิ้งไว้นาน 4 – 5 ชั่วโมง พอแป้งขึ้นดีตักหยอดใส่กระทง 2 มุม หรือห่อด้วยใบตองที่เตรียมไว้หรือใส่ถ้วยตะไล โรยมะพร้าวที่คลุกเกลือป่นเล็กน้อย นึ่งไฟแรงประมาณ 10 – 15 นาที ถ้าห่อเล็กใช้เวลาน้อย ถ้านึ่งใส่ถ้วยใช้เวลานาน ประมาณ 15 นาที

ที่มา : จันทร และคณะ, 2524

สูตรที่ 3

ส่วนผสม

แป้งข้าวเจ้า	1000	กรัม
น้ำตาลทราย	1000	กรัม
เนื้อตาลสุก	400	กรัม
มะพร้าวขูดขาว	1600	กรัม
น้ำมะพร้าวน้ำหอม	8	ถ้วยตวง
เกลือป่น	1	ช้อนชา
ผงฟู	1	ช้อนชา

มะพร้าวทึนทึกขูดเป็นเส้น

วิธีทำ

1.คั้นมะพร้าวขูดขาวกับน้ำมะพร้าวน้ำหอมให้ได้หัวกะทิ 8 ถ้วยตวง

2.นวดแป้ง เกลือ ผงฟู กับ กะทิ โดยค่อย ๆ ใส่กะทิทีละน้อยนวดจนกระทั่งแป้งเนียนดีประมาณ 20 นาที

3.ใส่เนื้อตาลสุกนวดต่อจนเข้ากันประมาณ 20 นาที

4.ใส่น้ำตาลทราย นวดจนกระทั่งน้ำตาลทรายละลาย ใส่กะทิที่เหลือคนจนเข้ากันดี

5.กรองด้วยผ้าขาวบาง ใส่ภาชนะที่มีฝาปิดหรือคลุมด้วยผ้าขาวบางชุบน้ำบิดหมาดๆ หมักไว้ประมาณ 6-8 ชั่วโมง จนขึ้นฟู

6.ตักใส่ถ้วยตะไล นึ่งในน้ำเดือด ไฟแรงประมาณ 25 - 30 นาทีจนกระทั่งสุก จะได้ขนมตาลที่มีลักษณะ ฟู เหลือง โรยหน้าด้วยมะพร้าวทึนทึกขูดเป็นเส้น

ที่มา : วัลลภ เปรมานุพันธ์, สัมภาษณ์ 15 พฤศจิกายน 2547

จากสูตรตัวอย่างข้างต้นทั้ง 3 สูตรนำมาคำนวณเปรียบเทียบเป็นร้อยละ ของส่วนผสมของขนมตาลแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบส่วนผสมของขนมตาลสูตรต่าง ๆ เป็นร้อยละ

ส่วนผสม	ปริมาณ (ร้อยละ)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
แป้งข้าวเจ้า	33.33	33.64	22.62
น้ำตาลทราย	33.33	25.24	22.62
กะทิ	31.26	33.64	45.25
เนื้อตาลสุก	2.08	7.48	9.05
เกลือป่น	-	-	0.23
ผงฟู	-	-	0.23
รวม	100	100	100

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. **วัตถุดิบ**

1.1 ลูกตาลสุกพันธุ์ตาลหม้อ	ซื้อที่ตลาดคลองเตย
1.2 มะพร้าวน้ำหอม	ซื้อที่ตลาดคลองเตย
1.3 มะพร้าวขูดขาว	ซื้อที่ตลาดสวนพลู
1.4 น้ำตาลทราย	ตรามิตรผล
1.5 แป้งข้าวเจ้า	ตราช้างสามเศียร
1.6 ยีสต์แห้งชนิดเม็ดเล็ก	ตราเฟอร์มิพัน
1.7 เกลือป่น	ตรานายพราน

2. **อุปกรณ์สำหรับการผลิตขนมตาล**

2.1 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า	Metter Toledo (Model PB 30020 – S)
2.2 ตู้บ่มไฟฟ้า	บริษัทบัณฑิตไทยโลหะ
2.3 เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ	Turbovac (Model DZD 500 – 2SD)

2.4 ตู้แช่เยือกแข็งแบบ Air blast freezing อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส

2.5 ถุงพลาสติก ชนิด LLDPE ขนาด 6 นิ้ว X 11 นิ้ว

2.6 ผ้ากรอง

2.7 ถุงผ้าติบ

2.8 ภาชนะบรรจุพลาสติกทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 14 ซม. สูง 12 ซม.

2.9 อุปกรณ์งานครัว เช่น อ่างผสม ตะแกรง ช้อนตวง ถ้วยตวง ลังถึง เตาแก๊ส เป็นต้น

3. **อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบคุณภาพด้านกายภาพ**

3.1 เครื่องวัดค่าความชื้น	Sartorius (Model MA 30)
3.2 เครื่องวัดค่าพีเอช	Mettler Toledo (Model MP 220)
3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า	Metter Toledo (Model PB 30020 – S)
3.5 เครื่องวัดค่าสี(spectrophotometer)	Gretag Macbath (Model color – eye 3100)

3.6 ปิเปต (measuring pipette) ขนาดความจุ 1 – 10 มิลลิลิตร

4. **อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส**

4.1 ห้องปฏิบัติการทดสอบทางประสาทสัมผัส

4.2 อุปกรณ์ทดสอบ

4.3 แบบสอบถาม

5. **อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์**

5.1 ตู้แยกเชื้อ	Nuaire (Model No.NU-440-400E)
5.2 ตู้บ่มเชื้อ	Shel-Lab (Model 2020)
5.3 ตู้เก็บเชื้อ (10, -20 และ –80°C)	Sanyo, Jouan (VX570E)
5.4 ตู้อบความร้อน	Shelllab (Model 1370GX)
5.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	Tomy ES-315
5.6 เครื่องชั่ง	Satorius
5.7 เครื่องวัดพีเอช	Precisca
5.8 ไมโครเวฟ	Sharp
5.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้	Memmert
5.10 เครื่องเซนตริฟิวจ์	Sorvall
5.11 กล้องจุลทรรศน์	Olympus
5.12 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Shimadzu

5.13 อุปกรณ์ทางจุลชีววิทยาและเครื่องแก้วบางส่วน

6. **อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางสถิติ**

6.1 เครื่องคอมพิวเตอร์

6.2 โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

วิธีการ

งานวิจัยนี้แบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. การเตรียมเนื้อตาลหมัก

นำผลตาลสุกพันธุ์ตาลหม้อ ปอกเปลือกสีดำออกจนหมด แช่ผลตาลในน้ำ อัตราส่วน ผลตาลสุก : น้ำสะอาด = 1:3 โดยน้ำหนัก นำไปแยกเนื้อและเส้นใยโดยการครูดกับตะแกรง กรองเส้นใยออกด้วยกระชอน นำของเหลวที่กรองได้ใส่ถุงผ้าดิบ แขวนไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้เป็นเนื้อตาลหมัก การเตรียมเนื้อตาลหมักแสดงดังภาพผนวกที่ 1

ตรวจสอบคุณภาพเนื้อตาลโดย วัดค่าสี L* a* และ b* ค่าพีเอช และค่าความชื้น บรรจุถุงพลาสติก Low Density Polyethylene (LLDPE) ปิดผนึกแบบสุญญากาศเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (Air blast freezing) ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำขนมตาลในหัวข้อ 7 และ 8

2. การแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก

นำเนื้อตาลสุกที่หมักไว้ 12 ชั่วโมง มาแยกเชื้อยีสต์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และแยกแยกโคโลนีเดี่ยว ๆ ไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดย restreak บนอาหาร PDA หรือ MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ 1%

เก็บรักษาเชื้อยีสต์ที่แยกได้บนอาหาร YM agar slant และเก็บรักษาแบคทีเรียแลกติก (LAB) บนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น working stock

เก็บรักษา stock culture ของยีสต์ในอาหาร YM broth + 20% glycerol และเก็บรักษา stock culture ของ LAB ในอาหาร MRS broth + 10% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การจัดจำแนกชนิดของยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี ของยีสต์ที่แยกได้ดังนี้

3.1 ศึกษาลักษณะโคโลนีของยีสต์ โดย cross streak ยีสต์ลงบนอาหาร Yeast malt extract agar (YMA) สังเกตลักษณะรูปร่าง ขนาด ขอบ และสีของโคโลนี

3.2 ศึกษารูปร่างของเซลล์และการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) โดยเพาะเลี้ยงยีสต์บน sporulation medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Campbell & Duffus, 1998) และเพาะเลี้ยงเชื้อบน GE medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปย้อมสีสปอร์โดยใช้ malachite green ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตรูปร่าง และจำนวนแอสโคสปอร์ในแอสคัส

3.3 ศึกษาการสร้างไมซีเลียม (mycelium) และ ballistospore โดยเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหาร corn meal agar (CMA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Campbell & Duffus, 1998) ทำ wet mount ด้วย lactophenol cotton blue แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตดูว่ามีการสร้างไมซีเลียมหรือไม่ และเป็นแบบ true mycelium หรือ pseudomycelium หรือมีทั้ง 2 แบบ และสังเกตการสร้าง septum ภายในไมซีเลียมด้วย

3.4 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลวและการเจริญบนอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูงๆ

3.4.1 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อใน YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและการตกตะกอนที่ก้นหลอด

3.4.2 ศึกษาการเจริญบนอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง ๆ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มี 10% NaCl และ 50% Glucose agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน

3.5 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอน 19 ชนิด คือ glucose, galactose, sucrose, maltose, cellobiose, trehalose, lactose, raffinose, soluble starch, xylose, L-arabinose, D-ribose, rhamnose, methanol, ethanol, glycerol, mannitol, salicin และ inositol ในอาหาร basal basc medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการเจริญของยีสต์

3.6 ศึกษาความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล โดยเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงในอาหาร fermentation basal medium ที่มี bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ และใส่หลอดดักก๊าซลงไป เพื่อตรวจสอบการสร้างก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.7 ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

3.7.1 ศึกษาความสามารถในการสร้างกรดอะซิติกจากการเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส โดยใช้อาหาร Custer's chalk medium (5% glucosc-0.5% calcium carbonate agar) สังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี

3.7.2 ศึกษาการใช้ไนเตรท โดยเลี้ยงเชื้อใน nitrate broth และอาหาร Czapek agar

3.7.3 ศึกษาการสร้าง extracellular amyloid compounds หรือ starch โดยใช้อาหาร ammonium sulfate-glucose agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นหยดสารละลาย Lugol's iodine ให้ท่วมโคโลนี สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้ามีการสร้าง starch จะเกิดสีน้ำเงิน

3.8 วิเคราะห์ชนิดของยีสต์โดยเทียบเคียงกับ The Yeasts: A Taxonomic Study (Kreger-van Rij, 1984) และ Yeasts in Natural and Artificial Habitats (Spencer and Spencer, 1997)

4. <u>การทดลองนำเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มาทำขนมตาล</u>

4.1 การจำแนกชนิด LAB ในระดับ Genus

4.1.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตรูปร่างและการติดสีแกรม

4.1.2 ศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปสเมียร์บนสไลด์ และหยด 3% H_2O_2 ลงไป 1 หยด สังเกตการเกิดฟองแกส ถ้ามีฟองแกสเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

4.1.3 เพาะเลี้ยงเชื้อใน MRS broth 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบการเจริญในสภาพต่าง ๆ ดังนี้

4.1.3.1 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการใส่เชื้อที่เลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1 ลูป ลงไปในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

4.1.3.2 ทดสอบการเจริญในอาหาร MRS broth ที่ปรับ pH 4.4 และ 9.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยการใส่เชื้อที่เลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงไป 1 ลูป บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.1.3.3 ทดสอบการเจริญในอาหาร MRS broth + NaCl 6.5% และ MRS broth + NaCl 18% ปริมาตร 5 ml โดยการใส่เชื้อที่เลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงไป 1 ลูป บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.1.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างแกสคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส ใส่เชื้อที่เลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1 loop ลงในอาหาร MRS broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคส ที่บรรจุในหลอดทดสอบที่มีหลอดดักแกส นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตดูว่าเกิดฟองแกสคาร์บอนไดออกไซด์ในหลอดดักแกสหรือไม่

4.1.5 วิเคราะห์จีนัสของแบคทีเรียแลกติก โดยนำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.1.1-4.1.4 ไปเปรียบเทียบกับตาราง Differential Characteristics of Lactic acid Bacteria ใน Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects (Salminen and Wright, 1998)

4.2 การจำแนกชนิด LAB ในระดับ species

4.2.1 ทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยนำเชื้อมาเลี้ยงใน MRS basal medium ที่เติมคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ arabinose, cellobiose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, ribose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose และ esculin โดยใส่ bromo-cresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2.2 วิเคราะห์ species ของแบคทีเรียแลกติก โดยเปรียบเทียบผลที่ได้จากข้อ 4.2.1 กับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986) และ The Genera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995)

5. <u>การเตรียมยีสต์เพื่อใช้เป็น starter ในการหมักขนมตาล</u>

5.1 เลี้ยงยีสต์ในอาหาร YM broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วย normal saline จากนั้นจึงนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เพื่อแยกเซลล์ยีสต์มาไว้สำหรับใช้เป็น starter ในการหมักขนมตาล

6. การเตรียมแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็น starter ในการหมักขนมตาล

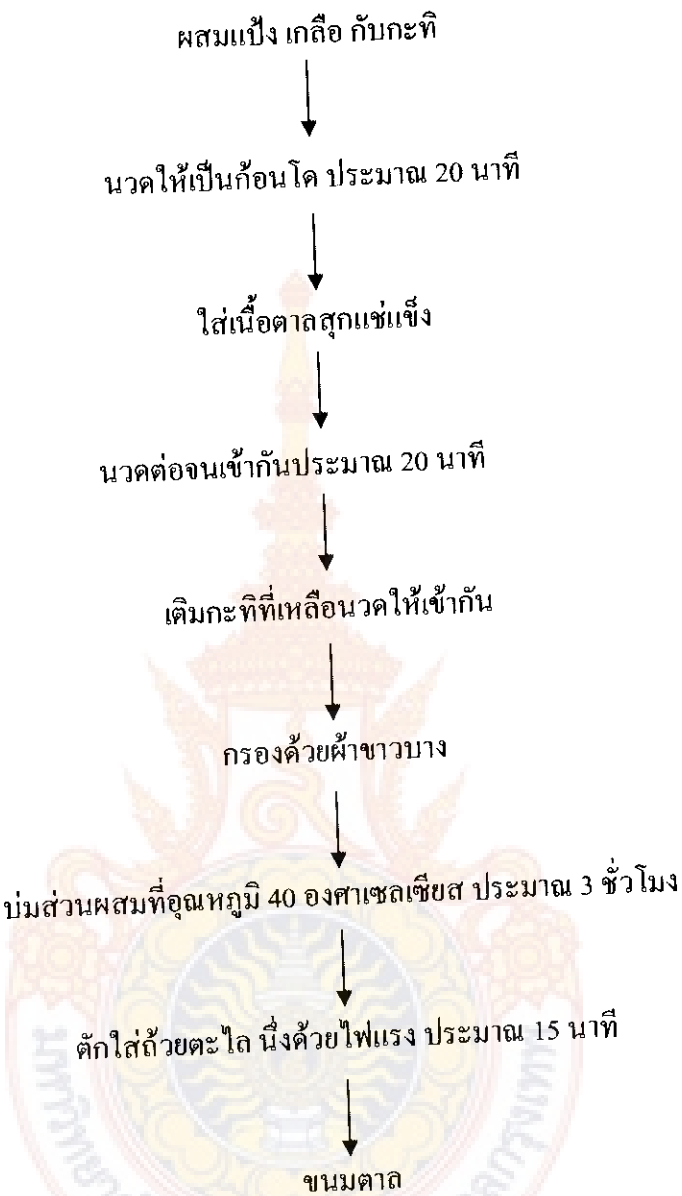
6.1 เลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

6.2 นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย normal saline จากนั้นจึงนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียแลกติกมาไว้สำหรับใช้เป็น starter ในการหมักขนมตาล

7. การใช้ยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเนื้อตาลหมักมาทำขนมตาล

7.1 การทำขนมตาล

เนื้อตาลหมักที่เตรียมได้ในข้อ 1 นำมาทำขนมตาล (ภาพที่ 1 และภาพผนวก ก) สูตรขนมตาลดัดแปลงจากภัทธิรา (2549) มีส่วนผสมดังนี้ แป้งข้าวเจ้า 330 กรัม น้ำตาลทราย 330 กรัม กะทิ 625 มิลลิลิตร (มะพร้าวขูด 500 กรัม น้ำมะพร้าวน้ำหอม 625 กรัม) เกลือป่น 0.27 กรัม และเนื้อตาลหมัก 180 กรัม คิดเป็นร้อยละ 22.52, 22.52, 42.66 , 0.02 และ 12.28 ตามลำดับ วิธีการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักสด คือ ผสมแป้ง เกลือ เข้าด้วยกัน นวดกับหัวกะทิบางส่วนนานประมาณ 20 นาที จากนั้นใส่เนื้อตาลหมัก นวดต่อประมาณ 20 นาที ค่อยๆใส่น้ำตาลทรายทีละน้อย นวดจนน้ำตาลทรายละลายหมด ประมาณ 20 นาที เติมหัวกะทิที่เหลือลงในส่วนผสมแป้งที่นวด คนให้เข้ากัน กรองด้วยผ้าขาวบาง ปิดปากภาชนะด้วยผ้าขาวบาง บ่มส่วนผสมในตู้บ่มไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนส่วนผสมขึ้นฟูซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วหยอดส่วนผสมขนมตาลในถ้วยตะไล นึ่งขนมตาลในน้ำเดือดด้วยไฟแรง ประมาณ 20 นาที ส่วนขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งจะใส่ยีสต์ในส่วนผสม เนื่องจากยีสต์จากธรรมชาติที่มีอยู่ในเนื้อตาลถูกทำลายจากการแช่แข็ง



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำขนมตาล

ที่มา : ดัดแปลงจากภัทธิรา เลิศปฤงคพ, 2549

7.2 การทดสอบใช้ยีสต์ที่แยกได้ในการทำขนมตาล

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้มาใช้เป็น starter สำหรับการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด (control) เพื่อทดสอบเบื้องต้นว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถใช้ทำขนมตาลได้ โดยใช้ปริมาณเชื้อยีสต์คิดเป็นน้ำหนักเปียกร้อยละ 0.08 ของน้ำหนักส่วนผสม ทำการบ่มส่วนผสมจนกว่าจะขึ้นฟูซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

ตรวจสอบคุณภาพการบ่มส่วนผสมโดยการสังเกต ลักษณะฟองอากาศ วัดระดับการขึ้นฟูของส่วนผสม วัดค่าพีเอช

ตรวจสอบขนมตาลโดยการตรวจพินิจทาง สี การแตกของหน้าขนม ความฟู ความนุ่ม กลิ่น รส รสชาติ

7.3 การศึกษาชนิดของยีสต์ที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้มาใช้เป็น starter สำหรับการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง เปรียบเทียบกับยีสต์ขนมปัง *(Saccharomyces cerevisiae)* และขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับทำขนมตาล ปริมาณเชื้อยีสต์สดที่ใช้ คิดเป็นน้ำหนักเปียกร้อยละ 0.2 ของน้ำหนักส่วนผสม สำหรับยีสต์ขนมปังใช้ปริมาณร้อยละ 0.1 (ดัดแปลงจากภัทธิรา, 2549) ทำการบ่มส่วนผสมเป็นเวลา 2 1/2 และ 3 ชั่วโมง

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนมตาล โดยใช้การทดสอบแบบให้คะแนน 5 ระดับ (Scoring test) (ภาคผนวก ข) ผู้ชิมจำนวน 14 คน วางแผนทดสอบชิมแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design,RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) (อนุวัตร, 2544) วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

7.4 การศึกษาปริมาณของยีสต์ที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.2 มาทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งโดยใช้ปริมาณ 3 ระดับ คือร้อยละ 0.12, 0.24 และ 0.36 ของน้ำหนักส่วนผสม

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนมตาล โดยใช้การทดสอบแบบเรียงลำดับความชอบ (Ranking test) โดยใช้ผู้ชิมระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 30 คนวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ตาราง Rank Sum Test (ปราณี, 2547)

7.5 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

นำเชื้อยีสต์จากข้อ 7.3 และแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 6 มาทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง โดยใช้แบคทีเรียแลกติกปริมาณร้อยละ 0.05 เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด

นำขนมตาลที่ได้มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 1-9 คะแนน ให้คะแนนความชอบจาก 9 (ชอบมากที่สุด) ถึง 1(ไม่ชอบมากที่สุด) ประเมินปัจจัยคุณภาพด้านความชอบรวม โดยผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 30 คนวางแผนทดสอบชิมแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design,RCBD) วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) (อนุวัตร, 2544)

8. <u>การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของขนมตาลที่ได้จากการเติมยีสต์และแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์</u>

คุณภาพทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า คาร์โบไฮเดรต เส้นใยอาหาร และปริมาณกรดทั้งหมด ตามวิธีการของ AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณเบต้า-แคโรทีน โดยใช้ UV-Spectophotometry

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมเนื้อตาลหมัก

ผลตาลที่นำมาเตรียมเนื้อตาลหมักเป็นผลตาลสุกเปลือกนุ่มแต่ไม่เละขั้วผลมีสีเขียวเข้มจนถึงสีน้ำตาล ผลตาลมีขนาดและน้ำหนักที่แตกต่างกันมาก มีน้ำหนักระหว่าง 1.1–2.5 กิโลกรัม น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 1.6 กิโลกรัม หลังปอกเปลือก พูตาลรวมเมล็ดมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 800 กรัม คิดเป็นร้อยละ 54 ของผลตาลสุก เนื้อตาลสุกสดมีกลิ่นตาลมาก สีเหลืองเข้มอมส้ม ค่าความสว่างของสี(L*) ค่าสีแดง(a*) และค่าสีเหลือง(b*) เท่ากับ 60.51, 25.61 และ 51.07 ตามลำดับหมายความว่าเนื้อตาลสุกมีค่าความสว่างของสีค่อนข้างมาก มีความเป็นสีแดงเล็กน้อย และมีความเป็นสีเหลืองปานกลาง มีความชื้นเฉลี่ยร้อยละ 88 ของน้ำหนักสด และพีเอชเฉลี่ย เท่ากับ 4.10 สำหรับเนื้อตาลสุกที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบว่าความชื้นและพีเอช ลดลงเล็กน้อย เหลือร้อยละ 85 ของน้ำหนักสด ค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 3.75 และได้เนื้อตาลหมักมีน้ำหนักเฉลี่ย 70 กรัม ต่อลูก

4.2 การแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก

จากการนำเนื้อตาลหมักมาทำ dilution pour plate โดยใช้อาหาร PDA และ MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1% พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบน PDA มีค่าเฉลี่ย 1.1 x 10^9 CFU/g และจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบน MRS มีค่าเฉลี่ย 1.3 x 10^9 CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยบนอาหาร PDA จะพบโคโลนีของยีสต์มากกว่าบนอาหาร MRS และบนอาหาร MRS จะพบโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างกรด ทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี เลือกเก็บโคโลนีของยีสต์จาก PDA และโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างกรดบน MRS agar ไปทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 จำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อตาลหมัก เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA และ MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1%

Sample	จำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อตาลหมัก (CFU/g)	
	PDA	MRS + $CaCO_3$ 1%
A	2.2 x 10^8	8.9 x 10^8
B	1.9 x 10^9	1.7 x 10^9
Average	1.1 x 10^9	1.3 x 10^9

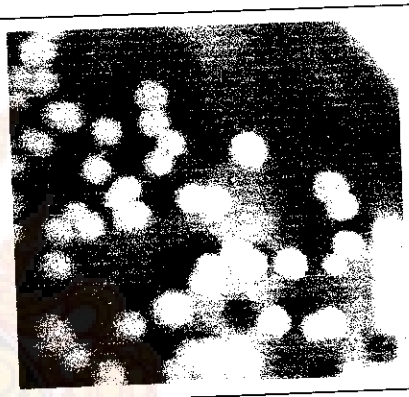
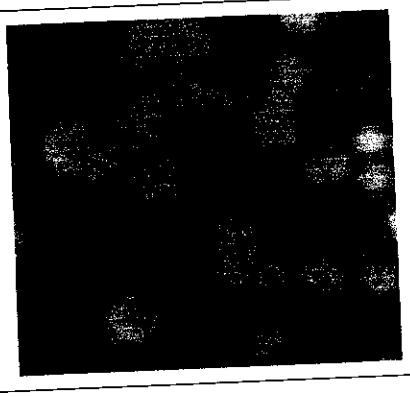
หมายเหตุ: การเพาะเลี้ยงเชื้อใน PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน
การเพาะเลี้ยงเชื้อใน MRS บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน

4.3 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

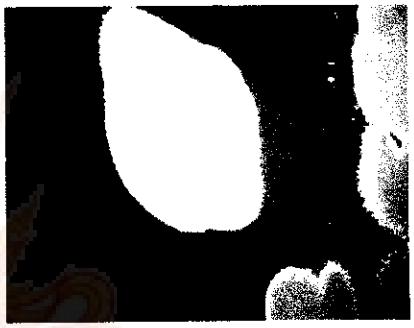
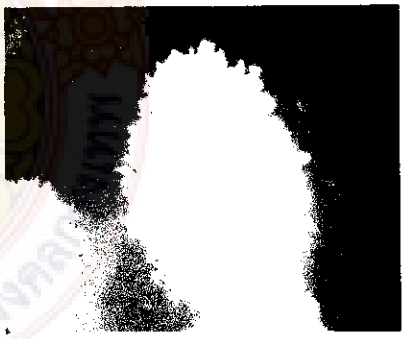
4.3.1 การศึกษาลักษณะโคโลนีของยีสต์บนอาหาร Yeast malt extract agar (YMA)

จากการนำโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร PDA มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดย restreak บนอาหาร PDA แล้วนำไป cross streak ลงบนอาหาร YMA สังเกตลักษณะรูปร่าง ขนาด ขอบ และสีของโคโลนี พบว่ายีสต์ที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีทั้งแบบกลมและไม่กลม และทุกไอโซเลทมีโคโลนีขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YMA

Sample	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ภาพโคโลนี
A	YA1	โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	
	YA2	โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	
	YA3	โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	

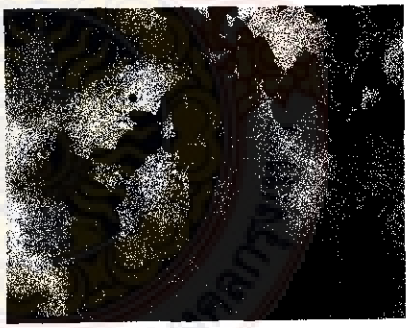
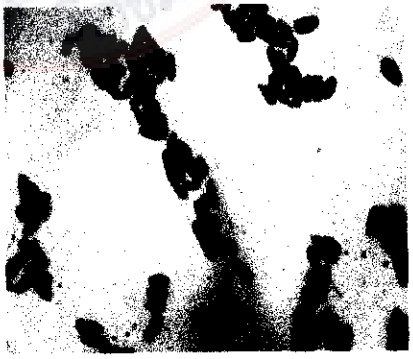
ตารางที่ 4 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร YMA (ต่อ)

Sample	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ภาพโคโลนี
B	YB1	โคโลนีไม่กลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	
	YB2	โคโลนีไม่กลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	
	YB3	โคโลนีไม่กลม ขนาดใหญ่ ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง	

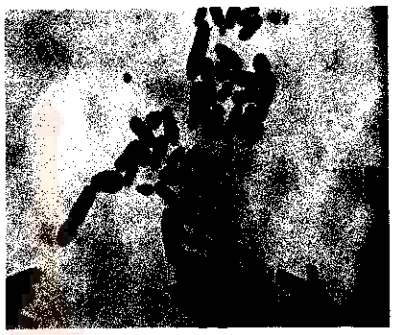
4.3.2 การศึกษารูปร่างของเซลล์และการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore)

จากการศึกษารูปร่างของเซลล์และการสร้างแอสโคสปอร์ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบน sporulation medium เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และบนอาหาร GE medium เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำเชื้อมาย้อมสีโดยใช้เทคนิคการย้อมสีสปอร์ พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทมีรูปร่างค่อนข้างยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และมีเพียงไอโซเลทเดียวที่สร้างแอสโคสปอร์ คือ YB3 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างและการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

Sample	รหัสเชื้อ	ลักษณะรูปร่างและการติดสีของเซลล์และสปอร์
A	YA1	
	YA2	
	YA3	

ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างและการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก (ต่อ)

Sample	รหัสเชื้อ	ลักษณะรูปร่างและการติดสีของเซลล์และสปอร์
B	YB1	
	YB2	
	YB3	

4.3.3 การศึกษาการสร้างไมซีเลียม (mycelium) และ ballistospore

เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหาร corn meal agar (CMA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วทำ wet mount ด้วย lactophenol cotton blue ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทมีการสร้างไมซีเลียมทั้งแบบ true และ pseudomycelium แต่ไม่พบว่ามีการสร้าง ballistospore ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่6 ความสามารถในการสร้างไมซีเลียมและ ballistospore ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

	YA1	YA2	YA3	YB1	YB2	YB3
การสร้างไมซีเลียม	True / pseudo	True / pseudo	True / pseudo	True / pseudo	True / pseudo	True / pseudo
การสร้าง ballistospore	-	-	-	-	-	-

4.3.4 การศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลวและการเจริญบนอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง ๆ

การเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมักในอาหาร YM broth ที่บรรจุในหลอดทดลอง พบว่ามีลักษณะการเจริญเป็นแบบ pellicle ที่ผิวหน้าอาหาร และมีการตกตะกอน (sediment) ที่ก้นหลอดด้วยทุกไอโซเลท โดยที่ยีสต์ทั้งหมดนี้สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้บนอาหารที่มี 10% NaCl และ 50%Glucose agar ซึ่งเป็นอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ลักษณะการเจริญในอาหารเหลวและความสามารถในการเจริญในสภาวะต่าง ๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

	YA1	YA2	YA3	YB1	YB2	YB3
ลักษณะการเจริญในอาหารเหลว	Pellicle / Sediment	Pellicle / Sediment	Pellicle / Sediment	Pellicle / Sediment	Pelliele / Sediment	Pellicle / Sediment
การเจริญที่อุณหภูมิ 37°C/40°C	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
การเจริญใน high osmotic pressure medium	+	+	+	+	+	+

4.3.5 การศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่ายีสต์แต่ละไอโซเลทมีความ สามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 19 ชนิดได้แตกต่างกัน โดยแหล่งคาร์บอนที่ทุกไอโซเลท สามารถใช้ได้ คือ กลูโคส และเอทธานอล สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ไม่พบว่ามียีสต์ไอโซเลทใดใช้ได้เลยคือ soluble starch, xylose และ inositol ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากตาลหมักในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน

Assimilation	YA1	YA2	YA3	YB1	YB2	YB3
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	-	-	-	-	-
Suerose	+	+	+	-	+	+
Maltose	-	-	+	+	-	-
Cellobiose	-	-	-	+	+	+
Trehalose	-	-	+	+	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	+	+	-	-	-
D-ribose	-	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	+	-	-	-
Methanol	-	-	-	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	-	-	-
Salicin	-	+	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-

4.3.6 การศึกษาความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล

จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อดาลหมักในอาหาร fermentation basal medium ที่เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยใช้ bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ และใส่หลอดดักก๊าซลงไปเพื่อตรวจสอบการสร้างก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทสามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคสได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อดาลหมัก

Fermentation	YA1	YA2	YA3	YB1	YB2	YB3
Glucose	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-

4.3.7 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

การศึกษาความสามารถในการสร้างกรดอะซิดิกจากการเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส บนอาหาร Custer's chalk medium (5% glucose-0.5% calcium carbonate agar) โดยการสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนี และการศึกษาการใช้ไนเตรท โดยเลี้ยงเชื้อใน nitrate broth และอาหาร Czapek's agar รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ammonium sulfate-glucose agar แล้วทดสอบการสร้าง extracellular amyloid compounds หรือ starch โดยการหยดสารละลาย Lugol's iodine ให้ท่วมโคโลนี พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทไม่สร้างกรดอะซิติก ไม่สามารถใช้ไนเตรท และไม่สร้าง extracellular amyloid compounds หรือ starch ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 สมบัติทางชีวเคมีบางประการของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อดาลหมัก

	YA1	YA2	YA3	YB1	YB2	YB3
การสร้างกรดอะซิติก	-	-	-	-	-	-
การใช้ไนเตรท	-	-	-	-	-	-
Starch formation	-	-	-	-	-	-

4.3.8 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์

การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก โดยการเทียบเคียงกับ The Yeasts: A Taxonomic Study (Kreger-van Rij, 1984) และ Yeasts in Natural and Artificial Habitats (Spencer and Spencer, 1997) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 11 ยีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่มีความน่าจะเป็น *Candida krusei* ยกเว้นไอโซเลท YB3 ซึ่งมีสมบัติคล้าย *Pichia barkeri*

ตารางที่ 11 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

Isolate	**Identification**
YA1	*Candida krusei*
YA2	*Candida krusei*
YA3	*Candida krusei*
YB1	*Candida krusei*
YB2	*Candida krusei*
YB3	*Pichia barkeri*

4.4 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก

4.4.1 การจำแนกชนิด LAB ในระดับ Genus

จากการนำ LAB ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth แล้วนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกไอโซเลทติดสีแกรมบวก โดยเชื้อรหัส BA2 และ BA3 มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ในขณะที่เชื้อรหัส BA4 มีรูปร่างแบบ coccobacillus และทุกไอโซเลทไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

การทดสอบการเจริญของ LAB ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหาร MRS broth ที่มีค่า pH 4.4 และ pH 9.6 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่มี NaCl 6.5% และ 18% และการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหาร MRS basal medium ที่เติม glucose พบว่าได้ผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ลักษณะรูปร่างของเชื้อ LAB การสร้างเอนไซม์คะตะเลส และการเจริญในสภาวะต่าง ๆ

รหัสเชื้อ	Shape	Catalase	10°C	45°C	pH4.4	pH9.6	NaCl 6.5%	NaCl 18%	CO_2 from glucose
BA2	rod	-	-	-	+	-	-	-	-
BA3	rod	-	-	-	+	-	-	-	-
BA4	coccobacillus	-	-	-	+	-	-	-	+

เมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง Differential Characteristics of Lactic acid Bacteria (Salminen and Wright, 1998) สามารถเทียบเคียงได้ว่าเชื้อ BA2 และ BA3 อยู่ในจีนัส *Lactobacillus* และเชื้อ BA4 อยู่ในจีนัส *Leuconostoc*

4.4.2 การจำแนกชนิด LAB ในระดับ species

จากการทดสอบความสามารถของ LAB ในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ species โดยเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986) และ The Genera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995) พบว่าเชื้อรหัส BA2 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum*, BA3 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus homohiochii* และ BA4 ใกล้เคียงกับ *Leuconostoc dextranicum*

ตารางที่ 13 ผล biochemical test ของเชื้อ LAB

Test / Strain	BA2	BA3	BA4
Arabinose	+	-	-
Cellobiose	+	-	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	-	+
Glucose	+ / no gas	+ / no gas	+ / gas
Lactose	+	-	+
Maltose	+	-	+
Mannitol	+	+	-
Mannose	+	-	+
Raffinose	+	-	+
Rhamnose	-	-	-
Ribose	-	-	-
Salicin	+	-	+
Sorbitol	+	-	+
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	-	+
Xylose	-	-	+
Esculin	+	-	-

4.5. การใช้ยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเนื้อตาลหมักมาทำขนมตาล

4.5.1 การทดสอบใช้ยีสต์ที่แยกได้ในการทำขนมตาล

จากข้อ 4.3.8 แยกเชื้อยีสต์ได้ 2 ชนิด คือ *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* นำมาใช้เป็น starter สำหรับการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลสุกหมักสด(Control) โดยทดลองใช้ในปริมาณ คิดเป็นน้ำหนักเปียกร้อยละ 0.08 ของน้ำหนักส่วนผสม ทำการบ่มส่วนผสมจนกว่าจะขึ้นฟูซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เพื่อทดสอบเบื้องต้นว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถใช้ทำขนมตาลได้ ผลแสดงดังตารางที่ 14 พบว่าเมื่อบ่มส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสด เป็นเวลา 2 ½ และ 3 ชั่วโมง ส่วนผสมมีการเปลี่ยนแปลงคือ มีการขึ้นฟูเพิ่มขึ้น 0.5 และ 1 เซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อยีสต์ในเนื้อตาลหมักสดเจริญเติบโตและสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดฟองอากาศทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ค่อนข้างมากเมื่อบ่มส่วนผสมที่เวลา 2 ½ ชั่วโมง และฟองอากาศขนาดใหญ่จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้เวลาในการบ่มส่วนผสม 3 ชั่วโมง พีเอชของส่วนผสมลดลงเมื่อเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น คือที่เวลา 0 , 2 ½ และ 3 ชั่วโมง พีเอชของส่วนผสมเท่ากับ 4.83, 4.68 และ 4.50 ตามลำดับ จากการที่พีเอชของส่วนผสมมีค่าลดลงเมื่อเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นนั้นเพราะยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเกิดกระบวนการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ โดยผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แอลกอฮอล์ กรด สารให้กลิ่นรส และน้ำ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายน้ำเกิดกรดคาร์บอนิกทำให้พีเอชลดลง (บุณยกฤต, 2545 ; มนัสนันท์, 2545) ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสดมีสีเหลืองเข้ม หน้าขนมแตกเล็กน้อย ลักษณะฟูเบา เนื้อนุ่ม รสหวานและมีกลิ่นตาลสุกมาก

สำหรับส่วนผสมที่มีการเติมเชื้อยีสต์ 2 ชนิด คือ *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* การบ่มในเวลา 3 ชั่วโมง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ต้องใช้เวลาบ่มส่วนผสมนานกว่า 5 ชั่วโมงจึงเกิดฟองอากาศขึ้นและมีการขึ้นฟูเล็กน้อย ทั้งนี้เพราะปริมาณของเชื้อยีสต์ที่เติมลงไปในส่วนผสมยังไม่เหมาะสม คือ มีปริมาณน้อยเกินไปจึงทำให้เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ช้า ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในส่วนผสมในการทำขนมตาลสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า จึงส่งผลต่อกลิ่นรสของส่วนผสมที่บ่มและขนมตาล ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทดลองเพิ่มปริมาณยีสต์เริ่มต้นในการทำขนมตาล

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบการบ่มส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสดกับส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์เพื่อใช้ทำขนมตาล

ตัวอย่าง	เวลาบ่ม (ชม.)	พีเอช	ระดับการขึ้นฟูของส่วนผสม (ซม.)		การเปลี่ยนแปลงของส่วนผสมที่บ่ม
			ก่อนบ่ม	หลังบ่ม	
Control	2 ½	4.68	4	4.5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดเล็กและขนาดใหญ่ค่อนข้างมาก
	3	4.50	4	5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดใหญ่จำนวนมาก
Candida krusei	2 ½	4.79	4	4	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
	3	4.75	4	4	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
Pichia barkeri	2 ½	4.81	4	4	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง
	3	4.80	4	4	ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

4.5.2 การศึกษาชนิดของยีสต์ที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

จากผลข้อ 4.5.1 จึงทำการศึกษาอีกครั้งโดยเพิ่มปริมาณของเชื้อยีสต์ *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* เป็นร้อยละ 0.18 ของน้ำหนักส่วนผสมนำมาใช้เป็น starter สำหรับการทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจาก *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* , ยีสต์ขนมปัง) และขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด (control) เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับทำขนมตาล สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* ใช้ปริมาณร้อยละ 0.1 ของน้ำหนักส่วนผสม (ดัดแปลงจากภัทธิรา, 2549) บ่มส่วนผสมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลแสดงดังตารางที่ 15 พบว่าส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักสดมีการขึ้นฟูเร็วกว่าส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อยีสต์ที่แยกได้ โดยเวลาในการบ่มที่ 2 ½ และ 3 ชั่วโมง มีระดับการขึ้นฟู 1 เซนติเมตรและ 2 เซนติเมตร รองลงมา คือ ส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์ *Candida krusei* และ *Saccharomyces cerevisiae* มีระดับการขึ้นฟู 1 เซนติเมตร เมื่อใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง สำหรับส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมและส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์ *Pichia barkeri* ใช้เวลาในการบ่ม 3 ½ ชั่วโมง

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบการบ่มส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสดกับส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อยีสต์ที่แยกได้เพื่อใช้ทำขนมตาล

ตัวอย่าง	เวลาบ่ม (ชม.)	พีเอช หลังบ่ม	ระดับการขึ้นฟูของส่วนผสม (ซม.)		การเปลี่ยนแปลงของส่วนผสมที่บ่ม
			ก่อนบ่ม	หลังบ่ม	
Control	2 ½	4.48	4	5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดเล็กและขนาดใหญ่จำนวนมากมาก
	3	4.35	4	6	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดใหญ่จำนวนมาก
S. cerevisiae	2 ½	4.65	4	4.5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีฟองอากาศขนาดเล็กค่อนข้างมาก
	3	4.38	4	5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก
Candida krusei	2 ½	4.52	4	4.8	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีฟองอากาศขนาดเล็กค่อนข้างมาก
	3	4.26	4	5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก
Pichia barkeri	2 ½	4.66	4	4.8	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีฟองอากาศขนาดเล็กค่อนข้างมาก
	3 ½	4.24	4	5	ส่วนผสมมีปริมาตรเพิ่มขึ้น มีฟองอากาศขนาดเล็กจำนวนมาก

เมื่อนำขนมตาลที่ได้มาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนน5 ระดับ (Scoring test) ประเมินปัจจัยคุณภาพด้านสี การแตกของหน้าขนม ความฟู ความนุ่ม กลิ่นรสตาล รสชาติและ ความชอบรวม ผลแสดงดังตารางที่ 16 พบว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด , ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* , *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* มีคะแนนเฉลี่ยในด้านสี การแตกของหน้าขนม ความนุ่ม กลิ่นรสตาล รสชาติและความชอบรวม ไม่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) โดยมีค่าคะแนนเฉลี่ย คือ 4.2, 3.7 , 3.7, 3.4 ,3.6 และ 3.4 ตามลำดับ หมายความว่า ขนมตาลมีสีเหลืองเข้ม การแตกของหน้าขนมอยู่ในระดับแตกปานกลาง

ถึงแตกมาก มีความนุ่มปานกลางถึงนุ่มมาก กลิ่นรสตาลเข้ม รสหวานเล็กน้อยถึงปานกลาง และค่าคะแนนความชอบอยู่ในระดับชอบ สำหรับคะแนนเฉลี่ยปัจจัยคุณภาพด้านความฟู พบว่าความฟูของขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida krusei* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ มีค่าคะแนนเฉลี่ย 3.9 อยู่ในระดับฟูมากที่สุด แต่มีความแตกต่างจากขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์ *Pichia barkeri* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่มีค่าคะแนนเฉลี่ยความฟูที่ 3.2 อยู่ในระดับฟูปานกลาง ดังนั้นจึงเลือกเชื้อยีสต์ *Candida krusei* มาศึกษาในหัวข้อต่อไป เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มให้ส่วนผสมขึ้นฟูใกล้เคียงกับส่วนผสมที่ใช้เนื้อตาลหมักสด และให้กลิ่นรสดีกว่าการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เล็กน้อย

ตารางที่ 16 คุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนปัจจัยคุณภาพของขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อยีสต์ที่แยกได้

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนเฉลี่ย				
	control	*S. cerevisiae*	*Candida krusei*	*Pichia barkeri*	คะแนนเฉลี่ยรวม
สี (ns)	4.1	4.2	4.5	4.1	4.2
การแตกของหน้าขนม (ns)	3.6	3.9	3.7	3.7	3.7
ความฟู	3.9[a]	3.9[a]	3.9[a]	3.2[b]	3.7
ความนุ่ม (ns)	3.9	3.9	3.6	3.3	3.7
กลิ่นรสตาล (ns)	3.6	3.1	3.4	3.4	3.4
รสชาติ (ns)	3.6	3.4	3.9	3.6	3.6
ความชอบ (ns)	3.9	3.4	3.9	3.6	3.7

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.5.3 การศึกษาปริมาณของยีสต์ที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

จากผลข้อ 4.5.2 ได้เชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการทำขนมตาล คือ *Candida krusei* จึงนำมาศึกษาปริมาณยีสต์ที่มีผลต่อการทำขนมตาล พบว่าเมื่อปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นเวลาที่ใช้ในการบ่มส่วนผสมขึ้นฟูจะเร็วขึ้น คือ ที่ปริมาณยีสต์ร้อยละ 0.12, 0.24 และ 0.36 ของน้ำหนักส่วนผสม ใช้เวลาในการบ่มส่วนผสม 3.15 , 2.45 และ 2.25 ชั่วโมง ตามลำดับ ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่เย็งโดยใช้ปริมาณยีสต์ 3 ระดับ มีสีเหลืองเข้ม หน้าขนมแตกปานกลาง ลักษณะฟูมาก เบา เนื้อนุ่ม รสหวานและมีกลิ่นตาลสุกมาก

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการเรียงลำดับความชอบของขนมตาลที่ใช้ปริมาณยีสต์ 3 ระดับ (ตารางที่ 17) ใช้ผู้ชิมระดับจำนวน 30 คน โดยให้ลำดับที่ 1 เท่ากับ ชอบมากที่สุด และลำดับที่ 3 เท่ากับชอบ น้อยที่สุด ดังนั้นถ้าคะแนนรวมสูงที่สุดแสดงว่าตัวอย่างนั้นมีความชอบสูงสุด ผลปรากฏว่าที่ปริมาณร้อยละ 0.12 , 0.24,และ 0.36 ผู้ชิมให้คะแนนเฉลี่ยความชอบเท่ากับ 56, 59, 65, ตามลำดับ หมายความว่า ผู้ชิมชอบขนมตาลที่ใช้ยีสต์ที่ปริมาณร้อยละ 0.36 มากที่สุด ชอบรองลงมาคือ ขนมตาลที่ใช้ยีสต์ที่ปริมาณร้อยละ 0.24 และชอบน้อยที่สุด คือ ขนมตาลที่ใช้ยีสต์ที่ปริมาณร้อยละ 0.12 แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จึงเลือกยีสต์ที่ปริมาณร้อยละ 0.36 ในการทดลองต่อไป เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเร็วใกล้เคียงกับเนื้อตาลหมักสด

ตารางที่ 17 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการเรียงลำดับความชอบของขนมตาลที่ใช้ปริมาณยีสต์ 3 ระดับ

ปริมาณยีสต์ (ร้อยละ)	คะแนนเฉลี่ยความชอบ	ลำดับความชอบ
0.12	56[a]	ชอบน้อยที่สุด
0.24	59[a]	ชอบรองลงมา
0.36	65[a]	ชอบมากที่สุด

4.5.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมในการทำขนมตาล

นำเชื้อยีสต์ *Candida krusei* และแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 3 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus homohiochii* และ *Leuconostoc dextranicum* มาทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง โดยใช้เชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 0.36 และแบคทีเรียแลกติกปริมาณร้อยละ 0.05 เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสดรวมเป็น 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 เชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็ง

ตัวอย่างที่	เนื้อตาล	ยีสต์	แบคทีเรียแลกติก	คำย่อ
1	เนื้อตาลหมักสด	-	-	Control
2	เนื้อตาลหมักแช่แข็ง	*Candida krusei*	-	YB2
3	เนื้อตาลหมักแช่แข็ง	*Candida krusei*	*Lactobacillus plantarum*	YB2+BA2
4	เนื้อตาลหมักแช่แข็ง	*Candida krusei*	*Lactobacillus homohiochii*	YB2+BA3
5	เนื้อตาลหมักแช่แข็ง	*Candida krusei*	*Leuconostoc dextranicum*	YB2+BA4

เมื่อนำขนมตาลที่ได้มาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ (9 – point hedonic scale) ประเมินปัจจัยคุณภาพด้านความชอบรวม ได้ผลแสดงดังตารางที่ 19 พบว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสดมีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยมากกว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก ส่วนขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Candida krusei* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus plantarum* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus homohiochii* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus dextranicum* มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลาง

อย่างไรก็ตามขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Candida krusei* เพียงชนิดเดียว ได้คะแนนความชอบรวมเฉลี่ยมากกว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมแบคทีเรียแลกติกเล็กน้อย ดังนั้นจึงไม่ควรใช้แบคทีเรียแลคติก 3 สายพันธุ์นี้ในการทำขนมตาล เนื่องจากจะทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิตโดยไม่มีผลช่วยให้คุณภาพขนมตาลดีขึ้นกว่าการใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei* เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 19 คุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนความชอบรวมขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้

ปัจจัยคุณภาพ	คะแนนเฉลี่ย				
	control	YB2	YB2+BA2	YB2+BA3	YB2+BA4
ความชอบรวม	7.8^{a}	7.1^{b}	6.8^{b}	6.9^{b}	6.7^{b}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.6. การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของขนมตาลที่ได้จากการเติมยีสต์และแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์

นำขนมตาลมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และคุณภาพทางเคมี พบว่าค่าสีในระบบ L* a* และ b* ของขนมตาล คือ 68.5. 17.11 และ 69.83 ตามลำดับ นั่นคือ ขนมตาลมีค่าความสว่างของสี (L*) ปานกลาง มีค่าความเป็นสีแดง (a*) น้อย ส่วนค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ค่อนข้างมาก ดังนั้น ขนมตาลจึงมีลักษณะสีเหลืองเข้มอมส้มเล็กน้อย มีค่า Aw เท่ากับ 0.84 องค์ประกอบทางเคมีของขนมตาลมี ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้าเส้นใยอาหาร ร้อยละ 48.7, 2.33, 3.97, 44.67, 0.51 และ 1.81 โดยน้ำหนักเปียกตามลำดับ มีปริมาณกรดทั้งหมด(ในรูปโซเดียมไบคาร์บอเนต) ร้อยละ 0.04 และมีเบต้า-แคโรทีน 8.67 ไมโครกรัม/100 กรัม (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี (โดยน้ำหนักเปียก) ของขนมตาล ที่ได้จากการวิเคราะห์

คุณภาพ	ขนมตาล
ทางกายภาพ	
ค่าสี	
L*	68.5
a*	17.11
b*	69.83
ทางเคมี	
ความชื้น (ร้อยละ)	48.7
โปรตีน (ร้อยละ)	2.33
ไขมัน (ร้อยละ)	3.97
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	44.67
เถ้า (ร้อยละ)	0.51
เส้นใยอาหาร (ร้อยละ)	1.81
ปริมาณกรด (ร้อยละ)	0.04
ในรูปโซเดียมไบคาร์บอเนต	
เบต้าแคโรทีน ไมโครกรัม/100 กรัม	8.67

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการนับจำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อตาลที่หมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ความชื้น ร้อยละ 85 ของน้ำหนักสด พีเอชเฉลี่ย 3.75 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และ MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1% พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบน PDA มีค่าเฉลี่ย 1.1×10^9 CFU/g และจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบน MRS มีค่าเฉลี่ย 1.3×10^9 CFU/g โดยที่บนอาหาร PDA มีโคโลนีของยีสต์มากกว่าบนอาหาร MRS และบนอาหาร MRS มีโคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างกรด ทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี

เมื่อเลือกเก็บโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันจำนวน 6 ไอโซเลท ไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร YMA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทมีโคโลนีขนาดใหญ่ ทั้งแบบกลมและไม่กลม ขอบหยัก ผิวแห้ง สีขาวครีม ทึบแสง เมื่อเพาะเลี้ยงบน sporulation medium และ GE medium พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทมีรูปร่างค่อนข้างยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ มีเพียงไอโซเลทเดียวที่สร้างแอสโคสปอร์ได้ คือ YB3 เมื่อเพาะเลี้ยงบน corn meal agar (CMA) ยีสต์ทุกไอโซเลทสร้างไมซีเลียมได้ทั้งแบบ true และ pseudomycelium แต่ไม่สร้าง ballistospore เมื่อเลี้ยงใน YM broth มีลักษณะการเจริญเป็นแบบ pellicle และมีตะกอนเชื้อที่ก้นหลอด สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้บนอาหารที่มี 10% NaCl และ 50%Glucose ซึ่งเป็นอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง

การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี ของยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก พบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ คือ เชื้อรหัส YA1, YA2, YA3, YB1 และ YB2 มีความน่าจะเป็น *Candida krusei* ยกเว้นไอโซเลท YB3 ซึ่งมีสมบัติคล้าย *Pichia barkeri*

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเนื้อตาลหมัก พบว่าติดสีแกรมบวกทั้ง 3 ไอโซเลท โดยเชื้อรหัส BA2 และ BA3 มีรูปร่างเป็นท่อน ในขณะที่เชื้อรหัส BA4 มีรูปร่างแบบ coccobacillus และทุกไอโซเลทไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารที่มี pH 4.4 และ pH 9.6 การเจริญในอาหารที่มี NaCl 6.5% และ 18% การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ และการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกเชื้อ พบว่าเชื้อรหัส BA2 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum*, BA3 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus homohiochii* และ BA4 ใกล้เคียงกับ *Leuconostoc dextranicum*

การใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei* และ *Pichia barkeri* ที่แยกได้จากเนื้อตาลหมักสดเป็น starter ทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง ปริมาณร้อยละ 0.08 ของน้ำหนักส่วนผสม พบว่าต้องใช้เวลาบ่มส่วนผสมนานกว่า 5 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อยีสต์ เป็นร้อยละ 0.18 ของน้ำหนักส่วนผสม เปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae* , ยีสต์ขนมปัง) ปริมาณร้อยละ 0.1 และเชื้อธรรมชาติในเนื้อตาลหมักสด พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia barkeri* ใช้เวลาในการบ่ม 3 , 3 และ 3½ชั่วโมง ตามลำดับ จึงทำให้มีระดับการขึ้นฟู 1 เซนติเมตร ขณะที่ส่วนผสมจากเนื้อตาลหมักสดใช้เวลาบ่ม 3 ชั่วโมง มีระดับการขึ้นฟู 2 เซนติเมตร และจากคะแนน 5 ระดับ พบว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่ใช้เชื้อยีสต์ *Candida krusei*, *Pichia barkeri* และ *Saccharomyces cerevisiae* มีคะแนนเฉลี่ยในด้านสี การแตกของหน้าขนม ความนุ่ม กลิ่นรสตาล รสชาติและความชอบรวม ไม่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ส่วนคะแนนเฉลี่ยปัจจัยคุณภาพด้านความฟู พบว่าความฟูของขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด ขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่ใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* และ *Candida krusei* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คืออยู่ในระดับฟูปานกลาง อย่างไรก็ตามขนมตาลที่ทำจาก *Candida krusei* มีกลิ่นรสดีกว่าขนมตาลที่ทำจาก *Saccharomyces cerevisiae* เล็กน้อย ดังนั้น *Candida krusei* จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการผลิตขนมตาลได้ดีกว่า

การศึกษาปริมาณ *Candida krusei* ร้อยละ 0.12, 0.24 และ 0.36 พบว่าส่วนผสมจะขึ้นฟูเร็วเมื่อปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้น คือ *Candida krusei* ที่ร้อยละ 0.36 ใช้เวลาในการบ่ม 2.25 ชั่วโมง และมีลำดับความชอบ คือ ชอบมากที่สุด แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ปริมาณยีสต์ทั้ง 3 ระดับ

การทดลองใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 3 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus homohiochii* และ *Leuconostoc dextranicum* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Candida krusei* ทำขนมตาลจากเนื้อตาลหมักแช่แข็ง โดยใช้เชื้อยีสต์ปริมาณร้อยละ 0.36 และแบคทีเรียแลกติกปริมาณร้อยละ 0.05 เปรียบเทียบกับขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสด พบว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักสดมีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยมากกว่าขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก ส่วนขนมตาลที่ทำจากเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Candida krusei* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus plantarum* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus homohiochii* , *Candida krusei* และ *Lactobacillus dextranicum* มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ มีคะแนนความชอบรวมเฉลี่ยอยู่ในระดับชอบปานกลาง ดังนั้น

ในการทำขนมตาลจากเชื้อที่แยกได้จึงควรใช้ยีสต์ *Candida krusei* เพียงอย่างเดียว เนื่องจากการใช้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากการทดลองนี้ไม่มีผลทำให้ได้ขนมตาลมีคุณภาพดีขึ้น

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของขนมตาลที่ผลิตได้พบว่ามีค่าสี L* a* และ b* เท่ากับ 68.5, 17.11 และ 69.83 ตามลำดับ คือ ขนมตาลมีสีเหลืองเข้มอมส้มเล็กน้อย มีค่า Aw เท่ากับ 0.84 มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้าเส้นใยอาหาร ร้อยละ 48.7, 2.33, 3.97, 44.67, 0.51 และ 1.81 โดยน้ำหนักเปียก ตามลำดับ มีปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปโซเดียมไบคาร์บอเนต) ร้อยละ 0.04 และมีเบต้าแคโรทีน 8.67 ไมโครกรัม/100 กรัม

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

จากการแยกและคัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจากเนื้อตาลหมัก แล้วนำมาทดลองใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำขนมตาล พบว่า

1. ความแก่อ่อนของผลตาลมีผลต่อการผลิตขนมตาล ควรเลือกใช้ผลตาลที่สุกพอเหมาะ ซึ่งเนื้อตาลมีสีเหลืองแก่และมีกลิ่นหอมเฉพาะของตาล ผลตาลที่สุกเกินไปจะมีกลิ่นรสเปรี้ยว เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกจะสร้างกรดที่ทำให้เกิดรสเปรี้ยว ส่วนผลตาลที่ห่ามจะมีรสฝาดเนื่องจากสารแทนนินซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ส่วนผสมไม่ขึ้นฟู และกลิ่นรสไม่หอม

2. กระบวนการหมักเนื้อตาลสุกแต่ละครั้งควรมีการควบคุมความชื้นของเนื้อตาลหมัก ความชื้นของเนื้อตาลหมักที่แตกต่างกันมากจะส่งผลต่อกลิ่นรสของขนมตาล โดยเฉพาะการใช้เนื้อตาลหมักสดในการทำขนมตาล ถ้าเนื้อตาลหมักสดมีความชื้นสูงจะส่งผลต่อระยะเวลาในการหมักอีกด้วย

3. กระบวนการทำขนมตาลมีหลายขั้นตอน ใช้เวลานาน ต้องอาศัยความชำนาญ และเทคนิคในการทำให้ได้ขนมตาลที่มีคุณภาพดี โดยเฉพาะขั้นตอนการนวดต้องใช้แรงงานคนทำให้ไม่สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก และยากต่อการควบคุมคุณภาพ จึงควรมีการศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตขนมตาลในเชิงอุตสาหกรรม

บรรณานุกรม

กุสุมาลย์ พยุงวีระน้อย และคณะ 2540 . การผลิตลูกตาลผง. โครงงานปริญญาตรี โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสวนดุสิต, 64 หน้า

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ตาลโตนด: ผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและรูปแบบโรงงานผลิต. กรุงเทพฯ : ม.ป.ท.

กองโภชนา กรมอนามัย.2530. ตารางแสดงคุณค่าทางอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 48 น.

งามชื่น คงเสรี. 2541. ผลิตภัณฑ์ข้าว. เอกสารการสอนชุดวิชาผลิตภัณฑ์อาหาร หน่วยที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, นนทบุรี

จันทร ทศนนท์ และคณะ. 2524. อาหารไทย. โรงพิมพ์อักษรสัมพันธ์, กรุงเทพฯ

ทยากร สุวรรณรัตน์และคณะ. 2550 . การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารแคปซูลและเครื่องดื่มสำเร็จรูปจากแป้งตาล. โครงงานปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , กรุงเทพฯ .

ทิพย์ บุญล้ำ. 2537 . การสกัดและสมบัติของแคโรทินอยด์จากเนื้อตาลโตนดสุก. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นฤมล เหลืองนภา . 2533 . การผลิตและการใช้เนื้อลูกตาลสุกผงในขนมไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

นิดดา หงษ์วิวัฒน์. 2541. ขนมตาลภูมิปัญญาชาวบ้าน, น.165-169. *ใน* ชุดสารคดีอาหาร: ครัวไทยคนไทย. แสงแดด, กรุงเทพฯ.

บุณยกฤต รัตนพันธ์ . 2545. การศึกษากระบวนการผลิตแป้งขนมตาลสำเร็จรูป . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ .

ปราณี อ่านเปรื่อง . 2547 . หลักการวิเคราะห์อาหารด้วยประสาทสัมผัส . โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ .

ภัทธิรา เลิศปฤงคพ . 2549 . การเก็บรักษาเนื้อตาลสุกโดยการลดค่า Aw ร่วมกับการแช่แข็งเพื่อใช้ในการทำขนมตาล. วารสารวิจัยและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. 9 (3) : 11-19 .

ภัทรวตี ศรีวงษ์ชัย และคณะ. 2548. การศึกษาคุณภาพขนมตาลที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็ง. แผนงานพิเศษระดับปริญญาตรี . สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ .

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ และคณะ. 2545 . อิทธิพลของอัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟูและระยะเวลาหมักต่อคุณภาพขนมตาลจากเนื้อตาลสุกสเตอริไรซ์ , น. 437-444. *ใน* เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545 .

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ . 2544 . การพัฒนาแป้งข้าวเจ้าผสมและส่วนผสมสำเร็จรูปในการผลิตขนมตาลเพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็ก . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

ยุสราน ดาโอ๊ะและคณะ. 2550 . การศึกษาความเป็นไปได้ของการพัฒนาน้ำยาล้างจานจากผลตาลสุก. โครงงานปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , กรุงเทพฯ .

รุ่งรัตน์ แจ่มจันทร์ . 2544 . การพัฒนาผลิตภัณฑ์แป้งขนมถ้วยฟูสำเร็จรูป . วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ .

วัลลภ เปรมานุพันธุ์. 2547. สัมภาษณ์ 15 พฤศจิกายน.

สมศรี ลีปิพัฒนาวิทย์. 2529. จุลินทรีย์ในผลตาลสุก. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 5 (1) : 11 –17.

สุรพล อุปดิสสกุล. 2537. สถิติการวางแผนการทดลอง เล่ม 2. สหมิตรออฟเซต,กรุงเทพฯ

อนุวัตร แจ้งชัด . 2544 . สถิติและการวางแผนการทดลองสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์. เอกสารประกอบการสอนวิชา 054-355 . ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemistry : Association of official chemistry, Inc, Washington, D.C. 1015 p.

Campbell, I and J. H. Duffus. 1988. **Yeast: A practical Approach.** Oxford: IRL Press.

Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. **The Yeasts : A Taxonomic Study.** Amsterdam: Elsevier.

Kurtzman et al. 1999. **The Yeasts: A Taxonomic study**. Elsevier Science B.V.

Pitt J. I. and A. D. Hocking. 1985. **Fungi and Food Spoilage.** Sydney: Academic Press.

Reed, G. and T. W. Nagodawithana. 1991. **Yeast Technology.** 2nd ed. New York: AVI.

Salminen, S. and A. von Wright. 1998. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects.** New York: Marcel Dekker.

Salminen, S., A. von Wright and A. Ouwehand. 2004. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.** 3rd ed. New York: Marcel Dekker.

Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (editors). 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2 Baltimore: Williams & Wilkins.

Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer. 1997. **Yeasts in Natural and Artificial Habitats.** New York: Springer.

Stiles, M. E. and W. H. Holzapel. 1997. Lactic Acid bacteria in Foods and Their Current Taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1-29.

Velazquez, E., J. M. Cruz-Sanchez, T. Rivas-Pala, J. L. Zurdo-Pineiro, P. F. Mateos, E. Monte, E. Martinez-Molina and A. Chordi. 2001. YeastIdent-Food / ProlcFood, a new system for the identification of food yeasts based on physiological and biochemical tests. **Food Microbiol.** 18: 637-646

Wood, B. J. B. and W. H. Holzapel. 1995. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London: Chapman & Hall

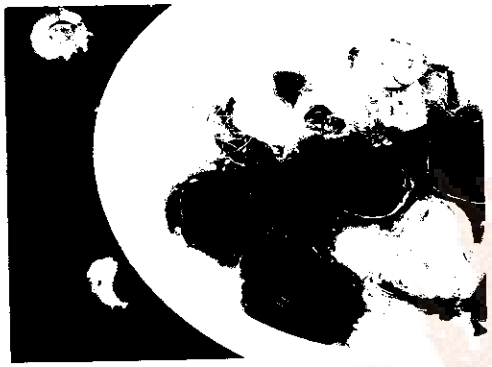
Wojtatowicz, M., J. Chrzanowska, P. Juszezyk, A. Skiba and A. Gdula. 2001. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 69: 135-140.

ภาคผนวก ก

ภาพผนวก

ก. ผลตาลสุก

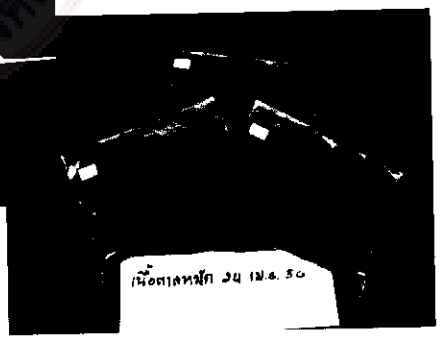
ข. ปอกเปลือก



ค. แช่น้ำ

ง. ครูดกับตะแกรง

จ. กรองใส่ถุงผ้าดิบ



ฉ. แขวนหมักไว้ 12 ชั่วโมง

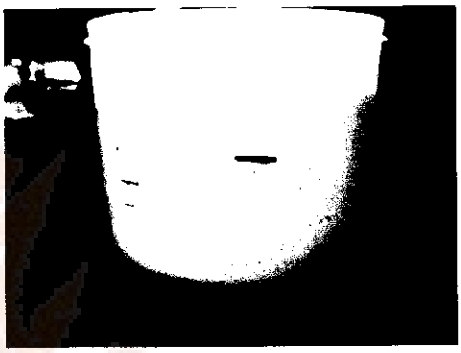
ช. เนื้อตาลหมัก

ภาพผนวกที่ 1 การเตรียมเนื้อตาลหมัก

ก. วัตถุดิบ

ข. นวดส่วนผสม

ค. กรองส่วนผสม



ง. ส่วนผสมที่บ่มจนขึ้นฟู

จ. นึ่งส่วนผสมในถ้วยตะไล

ฉ. ขนมตาล

ภาพผนวกที่ 2 ขั้นตอนการทำขนมตาล

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 **Acetate agar** (McClary et al.1959)

Glucose	1.0	g
Potassium chloride	1.8	g
Sodium acetate trihydrate	8.2	g
Yeast extract	2.5	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

1.2 **Ammonium sulfate-glucose agar**

Ammonium sulfate	2.0	g
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	g
Magnesium sulfate	1.0	g
Glucose	20.0	g
Agar	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

After autoclaved at 121°C for 15 min Add 20 ml of 20% yeast extract.

1.3 **Basal base medium** โดยใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ 19 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน

Basal agar medium

Ammonium sulfate	5.0	g
Potassium dihydrogen phosphate	1.0	g
Magnesium sulfate	0.05	g
Yeast extract	2.0	g
Agar	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

Add 1 ml of concentrated sugar solution to give a final sugar concentration of 2 %(w/v).

1.4 Corn meal agar (CMA)

Com meal infusion form	50.0	g
Dextrose	2.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

1.5 Custer's chalk medium (5% glucose-0.5% calcium carbonatc)

Glucose	50.0	g
Calcium carbonate	5.0	g
Yeast extract	5.0	g
Agar	20.0	g
Distilled water	1,000	ml

1.6 Czapek's agar

$NaNO_3$	3.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	g
KCl	0.5	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	g
Sucrose	30.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

1.7 Fermentation basal medium (bromothymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ และใส่หลอดดักก๊าซ)

Yeast extract	4.5	g
Peptone	7.5	g
Bromothymol blue solution	40.0	ml
Distilled water	1,000	ml

Add 1 ml of concentration sugar solution to give a final sugar concentration of 2 %(w/v).

1.8 50% Glucose agar และอาหารที่มี 10% NaCl และ 5% glucose

Glucose	500	g
Yeast extract	10	g
Agar	13	g
Distilled water	1,000	ml

1.9 MRS broth

Peptone	10.0	g
Beef extract	5.0	g
Yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	g
Tween80	1.0	g
Di-ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
Agar	12.0	g
Distilled water	1000	ml

2.0 Nitrate broth

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
KNO_3	5.0	g
Distilled water	1000	ml

2.1 Plate count agar

Tryptone	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000	ml

22. Potato dextrose agar (PDA)

Infusion from potato	20.0	g
Dextrose	20.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1000	ml

23. Sporulation medium

Sodium acetate	5.0 g
Potassium chloride	10.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml

24. YM broth & agar +อาหาร YM broth + 20% glycerol

Yeast extract	3.0	g
Malt extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Glucose	10.0	g
Distilled water	1000	ml

ภาคผนวก ค
แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีให้คะแนน

ชื่อผู้ชิม ..... วันที่ .....

ชื่อตัวอย่าง ขนมตาล รหัสการทดสอบ .....

คำแนะนำ โปรดประเมินตัวอย่าง ขนมตาล จากซ้ายไปขวาโดยพิจารณาให้คะแนนแต่ละตัวอย่างในปัจจัยคุณภาพด้าน สี การแตกของหน้าขนม ความฟู ความนุ่ม กลิ่นรส รสชาติ และความชอบรวม โดยใช้เกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ระดับคะแนน	สี	การแตกของหน้าขนม	ความฟู	ความนุ่ม
5	เหลืองเข้มที่สุด	แตกมากที่สุด	ฟูมากที่สุด	นุ่มมากที่สุด
4	เหลืองเข้ม	แตกมาก	ฟูมาก	นุ่มมาก
3	เหลืองปานกลาง	แตกปานกลาง	ฟูปานกลาง	นุ่มปานกลาง
2	เหลืองอ่อน	แตกเล็กน้อย	ฟูเล็กน้อย	นุ่มเล็กน้อย
1	เหลืองซีด	ไม่แตกเลย	ไม่ฟูเลย	ไม่นุ่มเลย

ระดับคะแนน	กลิ่นรส	รสชาติ	ความชอบ
5	กลิ่นรสเข้มมาก	รสหวานมาก	ชอบมาก
4	กลิ่นรสเข้ม	รสหวานปานกลาง	ชอบ
3	กลิ่นรสปานกลาง	รสหวานเล็กน้อย	เฉย
2	กลิ่นรสอ่อน	รสหวานอมเปรี้ยว	ไม่ชอบ
1	ไม่มีกลิ่นรส	รสเปรี้ยว	ไม่ชอบมาก

การประเมินผล

รหัสตัวอย่าง	———	———	———	———
สี	.....	.....	.....	.....
การแตกของหน้าขนม	.....	.....	.....	.....
ความฟู	.....	.....	.....	.....
ความนุ่ม	.....	.....	.....	.....
กลิ่นรส	.....	.....	.....	.....
รสชาติ	.....	.....	.....	.....
ความชอบ	.....	.....	.....	.....

ความคิดเห็น.....

.....

ขอบคุณในความร่วมมือ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีเรียงลำดับ

ชื่อผู้ชิม ..... วันที่ .....

ชื่อตัวอย่าง ขนมตาล รหัสการทดสอบ .....

<u>คำแนะนำ</u> กรุณาจัดลำดับตัวอย่างขนมตาล จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยพิจารณา ความฟู การแตกของหน้าขนม เนื้อสัมผัส กลิ่นรส รสชาติ แล้วจัดอันดับความชอบรวมของท่าน โดย

ชอบมากที่สุด = 3 ชอบรองลงมา = 2 ชอบน้อยที่สุด = 1

กรุณาบ้วนปากก่อนชิมตัวอย่างต่อไป

รหัสตัวอย่าง	**ลำดับความชอบ**
.....	ลำดับที่ .....
.....	ลำดับที่ .....
.....	ลำดับที่ .....

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ขอขอบคุณในความร่วมมือ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ

ชื่อผู้ชิม ..... วันที่ .....

ชื่อตัวอย่าง ขนมตาล รหัสการทดสอบ .....

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างขนมตาล 5 ตัวอย่าง ตามลำดับที่เสนอ และขีดเครื่องหมาย ✓ แสดงความรู้สึกให้ตรงกับใจท่านที่สุด กรุณาบ้วนปากก่อนชิมตัวอย่างต่อไป

ระดับความพอใจ	รหัสตัวอย่าง				
	.....	.....	.....	.....	.....
9 = ชอบมากที่สุด	.....	.....	.....	.....	.....
8 = ชอบมาก	.....	.....	.....	.....	.....
7 = ชอบปานกลาง	.....	.....	.....	.....	.....
6 = ชอบเล็กน้อย	.....	.....	.....	.....	.....
5 =บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ	.....	.....	.....	.....	.....
4= ไม่ชอบเล็กน้อย	.....	.....	.....	.....	.....
3 = ไม่ชอบปานกลาง	.....	.....	.....	.....	.....
2 = ไม่ชอบมาก	.....	.....	.....	.....	.....
1 = ไม่ชอบเลย	.....	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ขอขอบคุณในความร่วมมือ

ภาคผนวก ง
ตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของคะแนนปัจจัยคุณภาพของขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสดและเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติม *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อยีสต์ที่แยกได้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: color

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.677(a)	16	.542	1.530	.138
Intercept	994.924	1	994.924	2807.098	.000
people	7.177	13	.552	1.558	.141
tan	1.477	3	.492	1.389	.260
Error	13.823	39	.354		
Total	1034.000	56			
Corrected Total	22.500	55			

a R Squared = .386 (Adjusted R Squared = .134)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: crack

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12.905(a)	16	.807	1.186	.321
Intercept	764.133	1	764.133	1123.557	.000
people	12.333	13	.949	1.395	.206
tan	.526	3	.175	.258	.855
Error	26.524	39	.680		
Total	812.000	56			
Corrected Total	39.429	55			

a R Squared = .327 (Adjusted R Squared = .051)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: fu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13.677(a)	16	.855	1.688	.091
Intercept	758.196	1	758.196	1497.075	.000
people	8.857	13	.681	1.345	.230
tan	4.548	3	1.516	2.994	.042
Error	19.752	39	.506		
Total	806.000	56			
Corrected Total	33.429	55			

a R Squared = .409 (Adjusted R Squared = .167)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: fu
LSD

(I) tan	(J) tan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.1231	.26967	.651	-.6685	.4224
	3	-.1286	.26446	.630	-.6635	.4063
	4	.5857(*)	.26446	.033	.0508	1.1206
2	1	.1231	.26967	.651	-.4224	.6685
	3	-.0055	.27410	.984	-.5599	.5489
	4	.7088(*)	.27410	.014	.1544	1.2632
3	1	.1286	.26446	.630	-.4063	.6635
	2	.0055	.27410	.984	-.5489	.5599
	4	.7143(*)	.26898	.011	.1702	1.2583
4	1	-.5857(*)	.26446	.033	-1.1206	-.0508
	2	-.7088(*)	.27410	.014	-1.2632	-.1544
	3	-.7143(*)	.26898	.011	-1.2583	-.1702

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: soft

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19.424(a)	16	1.214	2.047	.034
Intercept	738.573	1	738.573	1245.346	.000
people	15.013	13	1.155	1.947	.054
tan	3.920	3	1.307	2.203	.103
Error	23.130	39	.593		
Total	793.000	56			
Corrected Total	42.554	55			

a R Squared = .456 (Adjusted R Squared = .233)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: flv

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25.022(a)	16	1.564	2.506	.010
Intercept	627.929	1	627.929	1006.336	.000
people	23.600	13	1.815	2.909	.005
tan	1.465	3	.488	.783	.511
Error	24.335	39	.624		
Total	694.000	56			
Corrected Total	49.357	55			

a R Squared = .507 (Adjusted R Squared = .305)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: taste

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10.584(a)	16	.662	1.585	.120
Intercept	728.943	1	728.943	1747.005	.000
people	8.915	13	.686	1.644	.115
tan	1.927	3	.642	1.540	.220
Error	16.273	39	.417		
Total	770.000	56			
Corrected Total	26.857	55			

a R Squared = .394 (Adjusted R Squared = .146)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: like

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15.763(a)	16	.985	2.175	.024
Intercept	759.860	1	759.860	1677.564	.000
people	14.227	13	1.094	2.416	.017
tan	1.335	3	.445	.982	.411
Error	17.665	39	.453		
Total	806.000	56			
Corrected Total	33.429	55			

a R Squared = .472 (Adjusted R Squared = .255)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของคะแนนความชอบรวมขนมตาลที่ใช้เนื้อตาลหมักสด และเนื้อตาลหมักแช่แข็งที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: over all liking

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	76.753(a)	33	2.326	2.887	.000
Intercept	7504.807	1	7504.807	9316.755	.000
people	52.593	29	1.814	2.251	.001
tan	24.160	4	6.040	7.498	.000
Error	93.440	116	.806		
Total	7675.000	150			
Corrected Total	170.193	149			

a R Squared = .451 (Adjusted R Squared = .295)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: like
LSD

(I) tan	(J) tan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.7333(*)	.23174	.002	.2744	1.1923
	3	1.0000(*)	.23174	.000	.5410	1.4590
	4	.9333(*)	.23174	.000	.4744	1.3923
	5	1.1333(*)	.23174	.000	.6744	1.5923
2	1	-.7333(*)	.23174	.002	-1.1923	-.2744
	3	.2667	.23174	.252	-.1923	.7256
	4	.2000	.23174	.390	-.2590	.6590
	5	.4000	.23174	.087	-.0590	.8590
3	1	-1.0000(*)	.23174	.000	-1.4590	-.5410
	2	-.2667	.23174	.252	-.7256	.1923
	4	-.0667	.23174	.774	-.5256	.3923
	5	.1333	.23174	.566	-.3256	.5923
4	1	-.9333(*)	.23174	.000	-1.3923	-.4744
	2	-.2000	.23174	.390	-.6590	.2590
	3	.0667	.23174	.774	-.3923	.5256
	5	.2000	.23174	.390	-.2590	.6590
5	1	-1.1333(*)	.23174	.000	-1.5923	-.6744
	2	-.4000	.23174	.087	-.8590	.0590
	3	-.1333	.23174	.566	-.5923	.3256
	4	-.2000	.23174	.390	-.6590	.2590

Based on observed means.
* The mean difference is significant at the .05 level.