การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล

APPLICATION OF YEAST STARTER TECHNOLOGY FOR PALM CAKE (KA-NOM TAL) MANUFACTURER

อรวรรณ พึ่งคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล

อรวรรณ พึ่งคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์

คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล Application of Yeast Starter Technology for Palm Cake (Ka-nom Tal) Manufacturers
ชื่อ - นามสกุล	นางสาวอรวรรณ พึ่งคำ
สาขาวิชา / วิชาเอก	เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, Ph.D.
ปีการศึกษา	2554

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สาวิตรี วทัญญูไพศาล, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อนันต์ บุญปาน, Ph.D.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.)

คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
(นางสาวจีรวัฒน์ เหรียญอารีย์)

วันที่ 20 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2555

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล
ชื่อ - นามสกุล	นางสาวอรวรรณ พึ่งคำ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์เจริญ เจริญชัย, Ph.D.
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, Ph.D.
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือ 1) ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม 2) พัฒนากระบวนการผลิตขนมตาลโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อบริสุทธิ์ และ3) ศึกษาการยอมรับของผู้ผลิตต่อการใช้เทคโนโลยี และการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์

วิธีการวิจัย การศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม โดยสัมภาษณ์ ผู้ประกอบการ 1 รายจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม พัฒนากระบวนการผลิตขนมตาลโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อบริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนคือ ศึกษากระบวนการผลิตพื้นฐานที่ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ และคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตขนมตาล โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และการยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้ผลิตและผู้บริโภค โดยนำผลงานวิจัยไปให้ผู้ผลิตทดลองใช้ และสัมภาษณ์ความพึงพอใจ และการยอมรับผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ ใช้ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 100 คน ตอบแบบสอบถามความพึงพอใจโดยทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธี (Central Location Test: CLT) และ ประเมินคุณภาพโดยการทดสอบความชอบ (Paired Preference Test) วิเคราะห์ผลโดยใช้ Binomial distribution โดยการเปิดตาราง Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test

ผลการวิจัยพบว่า 1) ส่วนผสมของขนมตาลแบบดั้งเดิมประกอบด้วย เนื้อตาลสุก 600 กรัม แป้งข้าวเจ้า 2,000 กรัม น้ำตาลทราย 1,800 กรัม กะทิ 2,500 กรัม เนื้อมะพร้าวขูด 150 กรัม ผงฟู 50 กรัม และ เกลือ 5 กรัม ต้นทุนรวม 171.50 บาท 2) การพัฒนากระบวนการผลิตขนมตาลโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อเหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาลคือ อัตราร้อยละ 2 และพบว่าขนมตาลที่ใช้ยีสต์ไอโซเลท Y4 และ Y6 เป็นกล้าเชื้อเหลว มีค่าความขึ้นฟูสูงสุดคือ 0.92 และ 0.91 ตามลำดับ และลักษณะเนื้อสัมผัสพบว่า การใช้ยีสต์ไอโซเลท Y6 เป็นกล้าเชื้อเหลว มีความนุ่มมากที่สุดเพราะมีค่าความแข็ง (Hardness) ต่ำสุดที่ 487.94 กรัม เมื่อนำยีสต์ Y6 ไประบุชนิดด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลจากการหาลำดับเบสพบว่า เป็นเชื้อยีสต์ *Hanseniaspora guilliermondii* 3) การศึกษาการยอมรับของผู้ผลิตต่อการใช้เทคโนโลยีและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์พบว่า ผู้ผลิตมีความพึงพอใจที่จะใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์ และมีต้นทุนในการผลิตรวม 376 บาท ซึ่งลดลงจากแบบดั้งเดิม 34.5 บาท และการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์พบว่า คุณภาพของขนมตาล มีความแตกต่างด้านกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม โดยผู้บริโภคมีความชอบขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์มากกว่าขนมตาลแบบดั้งเดิม

คำสำคัญ: ขนมตาล กล้าเชื้อเหลว ยีสต์ เทคโนโลยี

Thesis Title	Application of Yeast Starter Technology for Palm Cake (Ka-nom Tal) Manufacturers
Name - Surname	Miss Orawan Phuengcome
Program	Home Economics Technology
Thesis Advisor	Mr. Charoen Charoenchai, Ph.D.
Thesis Co - Advisor	Mr. Anan Boonpan, Ph.D.
Academic year	2011

ABSTRACT

The objectives of this research were 1) to study the production process and production cost of traditional palm cake, 2) to develop the production process by using pure starter technology and, 3) to investigate the producers' acceptance of the developed process and the consumers' acceptance of the product.

Data about the production process of traditional palm cake and the cost were collected by interviewing a traditional palm cake producer in Nakornchaisri, Nakorn Pathom Province. The production process was then developed by using pure starter technology in two stages: studying the basic production process by using pure yeast, and selecting the most efficient yeast. The experiment was planned by means of Completely Randomized Design. The data were then analyzed by means of Analysis of Variance and the One Way ANOVA and Duncan's New Multiple Range Test to select the efficient yeasts for producing the cake. The producer, after trying the developed production with the yeasts selected, was interviewed while data from 100 customers about their acceptance of the product were collected by means of questionnaire and analyzed by means of Central Location Test (CLT), Binomial Distribution, Paired Preference Test and Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test.

It was found that 1) traditional palm cake contained the following ingredients: 600 grams of ripe palm, 2,000 grams of rice flour, 1,800 grams of sugar, 2,500 grams of coconut milk, 150 grams of scraped coconut, 50 grams of baking powder and 5 grams of salt. The total production cost was 171.50 Baht. 2) For the developed production process with pure starter technology, 2% of liquid starters was best. The rising values of the palm cake dough, when using the yeasts Y4 and Y6, were found to be the highest values of 1.70 and 1.67 with non-significant difference and the yeast Y6 gave the palm cake's texture with the lowest hardness value of 487.94 grams. By using molecular technique, the selected yeast for this palm cake production was identified as *Hanseniaspora guilliermondii.* 3) Concerning the acceptance of the production process and the product, it was found that the technology was acceptable to the producer and the total cost of production was 376 Baht with the decrease of 34.5 Baht from the original process. The consumers experienced the differences in flavor, taste, and texture and they preferred the palm cake with the starter to the one without it.

Keywords: palm cake, liquid starter, yeast, technology

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตากรุณาอย่างสูงมากจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ เจริญชัย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อนันต์ บุญปาน และ รองศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี วทัญญูไพศาล กรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรีที่สนับสนุนมอบทุนตลอดระยะเวลาในการศึกษาของผู้วิจัย และขอขอบคุณสาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติการทดลองในงานวิจัยให้ลุล่วงไปได้ ขอขอบพระคุณ คุณอรพินท์ คุณเล็ก คุณนิภา หลงผาสุข เจ้าของสถานประกอบการผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม ที่อนุเคราะห์สอน และสถานที่สอน ในสถานที่ผลิต ตลอดการทดลองในครั้งนี้ขอขอบคุณบุคลากรคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ทุกคนที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือตลอดช่วงเวลาของการศึกษาและทำการวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชา

ขอขอบพระคุณ บิดาและมารดาที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดจนกำลังใจที่มีให้ยามลูกเหนื่อยล้า ขอขอบคุณ อาจารย์จีรวัฒน์ เหรียญอารีย์ อาจารย์อภิญญา พุกสุขสกุล และอาจารย์รัตนาภรณ์ มะโนกิจ อาจารย์อรอุมา คำแดง อาจารย์ชมุค พรรณดวงเนตร ที่คอยช่วยเหลือและถามไถ่เอาใจใส่ตลอดเวลา

อรวรรณ พึ่งคำ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

    1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

    1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 2

    1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

    1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

    2.1 ขนมตาล 3

    2.2 วัตถุดิบที่ใช้ทำขนมตาล 4

    2.3 กระบวนการผลิตขนมตาล 14

    2.4 ยีสต์ 16

    2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 31

3. วิธีดำเนินการวิจัย 35

    3.1 วัตถุดิบ 35

    3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต 35

    3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพ 35

    3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย 36

4. ผลการวิจัย 41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4.1 ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตของแหล่งผลิตขนมตาลที่เป็นกรณีศึกษา 41

4.2 ศึกษากระบวนการผลิตพื้นฐานที่ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ (*Saccharomyces cerevisiae*) 43

4.3 ผลการคัดแยกยีสต์จากเนื้อตาลสุก 44

4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตขนมตาล 46

4.5 การศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 49

4.6 การระบุสายพันธุ์ของยีสต์ 50

4.7 ผลการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาล 50

5. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 56

5.1 สรุปผลการวิจัย 56

5.2 ข้อเสนอแนะ 58

บรรณานุกรม 59

ภาคผนวก 64

ภาคผนวก ก ตำรับและวิธีการทำขนมตาล 65

ภาคผนวก ข ผลการแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก 72

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์คุณทางกายภาพ 75

ภาคผนวก ง แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส 85

ภาคผนวก จ ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ 92

ภาคผนวก ฉ ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ยีสต์ 100

ประวัติผู้เขียน 106

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ส่วนประกอบของผลตาลสุกแยกตามขนาด 5
2.2 องค์ประกอบทางเคมี (โดยน้ำหนักแห้ง) ของวัตถุดิบเนื้อตาลสุก 9
2.3 สกุลของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในชั้นต่าง ๆ 25
4.1 ต้นทุนการผลิตขนมตาล 41
4.2 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลิตภัณฑ์ขนมตาล ที่ปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน 43
4.3 ผลการคัดแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก 44
4.4 แสดงผลการทดสอบการสร้างก๊าซของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ 45
4.5 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสีและ a_w ขนมตาลที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สิ่งทดลอง 47
4.6 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า เนื้อสัมผัส และการขึ้นฟู ขนมตาลที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สิ่งทดลอง..... 48
4.7 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ ขนมตาล ที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สายพันธุ์ 49
4.8 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่า การขึ้นฟูขนมตาล 4 สิ่งทดลอง 49
4.9 แสดงสายพันธุ์ของยีสต์ที่ตรวจพบโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA 50
4.10 ตารางแสดงข้อมูลทางประชากรศาสตร์ 51
4.11 ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริภคขนมตาล และทัศนคติ ของผู้ตอบแบบสอบถาม 53
4.12 ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ เติมกล้าเชื้อและไม่ได้เติมกล้าเชื้อ 54
4.13 ผลการทดสอบ ระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ เติมกล้าเชื้อและไม่ได้เติมกล้าเชื้อชอบตัวอย่างไหนมากกว่า 54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.14 ต้นทุนการผลิตของขนมตาลระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลแบบดั้งเดิมและขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อเหลว 55

ตารางภาคผนวกที่

1. โปรแกรมสำหรับเครื่อง Thermal cycle PCR ในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Lyse -N- GoTMPCR Reagent 78
2. องค์ประกอบต่าง ๆ ในการทำ PCR บริเวณ ITS-5.8S rDNA 80
3. องค์ประกอบต่าง ๆ ในการทำ PCR บริเวณ D1/D2 domain 81
4. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านลักษณะที่ปรากฏ เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 93
5. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 93
6. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่น เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล ... 93
7. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติ เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 94
8. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านเนื้อสัมผัส เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 94
9. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านความชอบโดยรวม เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล 94
10. การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าการขึ้นฟูผลิตภัณฑ์ขนมตาล 4 สิ่งการทดลอง ... 95
11. การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่า a_w ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 95

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

12. การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (L) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 95
13. การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (a*) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 95
14. การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (b*) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 96
15. การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัส ความแข็ง (Hardness) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 96
16. การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัส ความยืดหยุ่น (Springness) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง 96
17. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านลักษณะที่ปรากฏ เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล ... 97
18. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล 97
19. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่น เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล 97
20. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติ เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล 98
21. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านเนื้อสัมผัส เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล 98
22. การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านความชอบโดยรวม เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล 98
23. Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test (Entries are $x_{\alpha,n}$)..... 99

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 เนื้อตาลสุก 4

2.2 ลักษณะของต้นตาล 6

2.3 *Saccharomyces* spp.(a) *Candida krusei* (b) *Kloeckeraapiculata* (c) *Henseniaspora* spp. (d) 8

2.4 ขนมตาลหลังผ่านกระบวนการนึ่งสุก 15

2.5 การแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติกใน Saccharomyces cerevisiae (a) และการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติกใน Filobasidiella neoformans (b, c) 17

2.6 แสดงการแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน คอนิเดียบนก้าน และ บอลลิสโทคอนิเดีย 18

2.7 รูปร่างของยีสต์แบบต่าง ๆ 19

2.8 รูปร่างของแอสคัสและแอสโคสปอร์ (a) กลมและค่อนข้างรี; Schizosaccharomyces pombe (b) กลมและรูปไข่; Saccharomyces cerevisiae (c) กลมและรูปไข่ (d) (e) รูปไต (ปล่อยออจากแอสคัส); Kluyveromyces marxianus, (f) กลมและผนังเป็นรอยยักที่ผิว (g) รูปร่างเป็นหมวกทหาร (helmet-shaped) หรือรูปร่างครึ่งวงกลม (hemispherical); Pichia membranaefaciens, (h) รูปร่างเป็นหมวก (hat-shaped); Saccharomycopsis fibuligera และ (i) รูปร่างเป็นดาวเสาร์ (Saturn-shaped) และผิวเรียบ; Williopsis saturnus 21

2.9 แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์แสดงการสร้างโฮโลเมตาแบสิเดียม โดยไม่มีการสร้างเทลิโอสปอร์ 21

3.1 กรรมวิธีผลิตขนมตาล โดยใช้กล้าเชื้อเหลวที่คัดเลือกได้ 38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักส่วนผสมทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 46

5.1 ส่วนผสมของขนมตาล 67

5.2 นวดส่วนผสม แป้งข้าวเจ้า เนื้อยีสุก น้ำตาลและเกลือป่น ให้เข้ากัน..... 67

5.3 เติมกะทิลงไปในส่วนผสมนวดให้เข้ากันจนกะทิหมด 68

5.4 เมื่อส่วนผสมเข้ากัน เติมมะพร้าวขูด ผสมให้เข้ากัน 68

5.5 เติมกล้าเชื้อเหลว ปริมาณร้อยละ 2 กรัม ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด 69

5.6 หมักส่วนผสมขนมตาล 3 ชั่วโมง 69

5.7 เติมผงฟู คนส่วนผสมให้เข้ากัน 70

5.8 ตักหยอดใส่ถ้วยตะไล นึ่งไฟแรงที่ อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที 70

5.9 นึ่งเสร็จ พักทิ้งไว้ให้เย็น 71

5.10 ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 71

5.11 เชื้อยีสต์ ไอโซเลท Y1-Y6 ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก 73

5.12 เชื้อยีสต์ ไอโซเลท Y7-Y10 ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก 74

5.13 บริเวณ rDNA ที่ใช้เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ต้นตาลเป็นต้นไม้ ที่ปลูกกันทั่วไปในหลายภาคของประเทศไทย เป็นต้นไม้ตระกูลเก่าแก่ตระกูลหนึ่งของโลก มีสายพันธ์มากกว่า 4,000 ชนิด (Species) มีอายุยืนนับร้อยปี ผลิตผลจากต้นตาลโดยเฉพาะน้ำตาลโตนดเป็นส่วนผสมที่สำคัญในการทำขนมหวานต่างๆ ซึ่งมีชื่อเสียงในเรื่องของความหอมหวานมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับประเทศไทย สันนิษฐานว่าต้นตาลมีการปลูกมาตั้งแต่ก่อนสมัยทวารวดี ซึ่งต้นตาลนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เกือบทุกส่วน เช่น ใบนำมาทำพัดและมุงหลังคา ลำต้นนำมาขุดร่องทำเรืออีโปง, ไม้เท้า, เสาบ้าน รากนำมาปรุงอาหารหรือทำเครื่องดื่ม มีสรรพคุณแก้กระหาย แก้ร้อนใน และลูกนำมาเป็นส่วนผสมในขนมไทย เช่น ขนมตาล (ธมลวรรณ อารยาพันธ์ และคณะ, 2550)

ปัจจุบันขนมตาลจะหารับประทานได้เฉพาะในฤดูฝน เนื่องจากวัตถุดิบหลัก คือ เนื้อตาลสุกจากลูกตาล นั้น จะให้ผลผลิตตามฤดูกาล คือ ลูกตาลจะสุกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - มิถุนายนของทุกปี (มนัสนันท์ บุญทราพงษ์, 2544) และช่วงนี้ผลผลิตจะมีมาก เนื้อตาลสุกมีอายุการเก็บรักษาสั้น โดยการเสื่อมเสียจะเริ่มต้นจากมีกลิ่นรสผิดปกติ และอาจไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค นอกจากนี้ยังพบว่า การขนส่งลูกตาลสุกต้องใช้เนื้อที่มาก เนื่องจากไม่สามารถวางลูกตาลสุกซ้อนทับกันได้ เพราะอาจเกิดการเน่าเสียได้ ทำให้นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง ขนมตาลจะใช้เนื้อลูกตาลสุกเป็นส่วนสำคัญในการทำ และเริ่มหาซื้อรับประทานได้ยากขึ้นเนื่องจากมีการปลูกต้นตาลน้อยลง ขนมตาลมีส่วนประกอบที่สำคัญคือแป้งข้าวเจ้า เนื้อลูกตาลสุก น้ำตาล กะทิ โดยนำไปผสมให้เข้ากันและหมักไว้จนขึ้นฟู นึ่งด้วยไฟแรงให้สุก การหมักส่วนผสมของขนมตาลจัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเนื้อลูกตาลสุกจะมีเชื้อยีสต์ปะปนมาหลายชนิด ซึ่งเชื้อยีสต์เหล่านี้จะเจริญเติบโตและสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้ขนมตาลขึ้นฟูมีลักษณะเนื้อที่พอง เบา และนุ่ม แต่ในบางครั้งพบว่าเนื้อลูกตาลสุกมีเชื้อยีสต์ปนอยู่น้อยทำให้ไม่ขึ้นฟูมากนัก (นฤมล เหลืองนภา, 2533) และทำให้ขนมตาลที่ทำขึ้นในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน เนื่องจากการหมักโดยอาศัยเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุกตามธรรมชาติ ขนมตาลที่ได้จึงมีคุณภาพไม่แน่นอน และ ไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการ หมักได้ นอกจากนี้ยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษต่างๆ

จากปัญหาดังกล่าว จึงได้ทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะพัฒนาคุณภาพของขนมตาล โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ ในการหมักเพื่อให้ขนมตาลมีคุณภาพสม่ำเสมอ หลีกเลี่ยงปัญหาการหมักจากเชื้อยีสต์ธรรมชาติ ลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง โดยจะทำการคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาลจากเนื้อตาลสุก และเตรียมให้อยู่ในรูปของกล้าเชื้อเหลว เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตขนมตาล ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตขนมตาลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตจากขนมตาลแบบดั้งเดิม

1.2.2 เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตขนมตาลโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อบริสุทธิ์

1.2.3 เพื่อศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคและผู้ผลิตต่อขนมตาลที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษากระบวนการผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม และนำมาวิเคราะห์หาเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติของเนื้อตาล โดยใช้แหล่งผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิมในเขตอำเภอนครชัยศรีเป็นกรณีศึกษา ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ จากนั้นนำมาพัฒนาเป็นขนมตาลที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ผู้บริโภคและผู้ผลิตยอมรับ จึงนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตขนมตาล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตเชื้อบริสุทธิ์ในรูปของกล้าเชื้อเหลวจากเนื้อตาลซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตขนมตาลได้อย่างปลอดภัย

1.4.2 เพื่อยกระดับมาตรฐานทางด้านการผลิตและสุขอนามัย ให้กับผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งจะช่วยสร้างความมั่นใจด้านความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

1.4.3 ผู้ผลิตขนมตาลสามารถสร้างมาตรฐานให้กับขนมตาลที่ผลิตได้โดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ร่วมกับการผลิตเพื่อลดระยะเวลาในการหมักและมีคุณภาพที่สม่ำเสมอ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและพัฒนาขนมตาลสู่ระดับอุตสาหกรรมอย่างเป็นที่ยอมรับและได้มาตรฐานประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ขนมไทยถือว่าเป็นมรดกที่มีคุณค่าของชาติอย่างหนึ่งในการสะท้อนความละเอียดอ่อน นุ่มนวล มีความประณีตงดงาม และอร่อย ซึ่งมีเอกลักษณ์ที่บ่งบอกถึงความเป็นไทยในด้านรูปลักษณ์ รสชาติ กลิ่นหอม ความมัน และความสวยงามของขนมไทย แสดงให้เห็นถึงวัฒนธรรมของไทยจึงนับว่าเป็นความภูมิใจของคนไทย การทำขนมไทยในอดีตต้องใช้เวลาในการทำนาน เพราะต้องอาศัยวิธีทางธรรมชาติเกือบทุกขั้นตอน ส่วนผสมหลักของขนมไทย จะประกอบไปด้วย แป้ง กะทิ และน้ำตาลเสมอ แป้งที่นิยมใช้ทำขนมไทยส่วนใหญ่ คือ แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว น้ำตาลที่นิยมใช้ส่วนมากจะเป็นน้ำตาลปี๊บ และน้ำตาลทรายแดงซึ่งจะทำให้ขนมไทยมีกลิ่นและรสชาติที่หอมหวานอีกด้วย ดังนั้นในขนมไทยความหอมจากวัตถุดิบทางธรรมชาติคือสิ่งที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ในการทำขนมไทยแทบทุกชนิด (มณเทียร ศุภลักษณ์, 2541 และอบเชย วงศ์ทอง, 2539)

2.1 ขนมตาล

ขนมตาลเป็นขนมไทยดั้งเดิม เนื้อขนมมีลักษณะเป็นแป้งสีเหลืองเข้ม นุ่ม ฟู มีกลิ่นตาล หอมหวานขนมตาล ทำจากเนื้อตาลจากผลตาลที่สุกงอม แป้งข้าวเจ้า กะทิ และน้ำตาล ผสมกันตามกรรมวิธี ใส่กระทงใบตอง โรยมะพร้าวขูด และนำไปนึ่งจนสุก ในปัจจุบัน หาทานขนมตาลที่มีรสชาติดีได้ยาก เนื่องจากปริมาณต้นตาลที่ลดลง ขนมตาลที่ขายตามท้องตลาดส่วนใหญ่ผู้ประกอบการมักใส่เนื้อตาลน้อย เพิ่มแป้งและเจือสีเหลืองแทน ซึ่งทำให้ขนมตาลมีเนื้อกระด้าง ไม่หอมหวานและไม่อร่อย (วิกิพีเดียสารานุกรมเสรี, ม.ป.ป.) เนื้อตาลสุก คือ เนื้อสีเหลืองที่แทรกอยู่ในเส้นใยของผลตาลสุกจากต้นตาลโตนด ซึ่งมีขึ้นทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย

ขนมตาลที่ดีต้องมีกลิ่นหอมของลูกตาลสุก มีความมัน มีกลิ่นกะทิ เนื้อพองเบา และมีสีเหลืองเข้มจนถึงส้ม (นฤมล เหลืองนภา, 2533) ทำจากแป้งชนิดที่ทำให้ขนมตาลที่ได้มีความนุ่มและพองตัวโดยที่หน้าขนมตาลไม่แตก (ศิริลักษณ์ สินธวาลัย, 2522)

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ทำขนมตาล

2.2.1. เนื้อตาลสุก

ลูกตาลเมื่อโตเต็มที่แล้วจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 - 20 เซนติเมตร ผิวสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ ขั้วยังมีสีเขียวเข้มจนถึงสีน้ำตาล บริเวณก้นเป็นปุ่มเล็กน้อย มีสีเหลืองจนถึงสีส้ม เรียกว่า ลูกตาลสุก คนโบราณมีวิธีการตรวจสอบความสุกของผลตาลได้ง่ายเพียงเอานิ้วกดลงบนผลตาล ถ้าผลตาลสุกจะยุบตัวลงตามแรงที่กด แสดงว่าผลตาลสุกได้ที่แล้วแกะเปลือกสีดำออกจะพบเส้นใยและเนื้อสีเหลืองจนถึงสีส้มห่อหุ้มเมล็ดไว้ 3 - 4 เมล็ดดังแสดงในภาพที่ 1 ตรงกลางระหว่างเมล็ดจะมีแกนกลาง เป็นเส้นใยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ชาวบ้านเรียกว่า ดีตาล เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างขั้วและผล ดีตาลมีรสขมมากจะต้องกำจัดออกก่อนใช้ ผลตาลมีขนาดแตกต่างกันระหว่าง 600 - 2,000 กรัม ผลการวิเคราะห์พบว่าประกอบด้วยขั้วผลร้อยละ 3.2 - 7.5 เปลือกร้อยละ 4.7 - 6.7 เมล็ดร้อยละ 39.8 - 40.8 และกากใยรวมกับเนื้อร้อยละ 45.0 - 54.5 (บุญมา นิยมวิทย์ และพะยอม อัตถวิบูลย์กุล, 2547) โดยส่วนประกอบของผลตาลสุก ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ภาพที่ 2.1 เนื้อตาลสุก

ที่มา : อรพินท์ หลงผาสุก (2555)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของผลตาลสุกแยกตามขนาด

น้ำหนักผล (กรัม)	ส่วนประกอบ (ร้อยละ)				
	ขั้วผล	เปลือก	เมล็ด	กากใย	เนื้อ
ต่ำกว่า 1,000	7.5	6.7	40.8	13.4	31.6
1,000-1,500	6.1	1.5	39.8	14.6	34.1
มากว่า 1,500	3.2	4.7	40.6	17.2	34.3

ที่มา : บุญมา นิยมวิทย์ และพะยอม อัตถวิบูลย์กุล (2547)

พันธุ์ตาลโตนด ตาลเป็นพืชในตระกูล Plamaceac ซึ่งเป็นพวกเดียวกับมะพร้าว จากชิด สาคู ระกำและอินทผาลัม (ปิฐะ บุนนาค, 2535) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabillifer* Linn. เป็นพืชตระกูลปาล์มพันธุ์หนึ่งนักชีววิทยาส่วนใหญ่ลงความเห็นว่าถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ทางตอนใต้ของทวีปเอเชียโดยเฉพาะทางฝั่งตะวันออกของอินเดียในคริสต์ศตวรรษต้นๆตาลโตนดได้แพร่พันธุ์ไปสู่ดินแดนใกล้เคียงโดยเฉพาะทางตะวันออกเฉียงใต้ของทวีป (สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้, 2549)

ต้นสูงถึง 40 เมตร และโตวัดผ่ากลางประมาณ 60 ซม. ลำต้นเป็นเสี้ยนสีดำแข็งมาก แต่ไส้กลางลำต้นอ่อนบริเวณโคนต้นจะมีรากเป็นกลุ่มใหญ่ ใบเหมือนพัดขนาดใหญ่ กว้าง 1 - 1.5 เมตรมีก้านเป็นทางยาว 1 - 2 เมตร ขอบของทางของก้านทั้งสองข้างมีหนามเหมือนฟันเลื่อยสีดำแข็ง ๆ และคมมากโคนก้านแยกออกจากกันคล้ายคีมเหล็กโอบหุ้มลำต้นไว้ ช่อดอกเพศผู้ใหญ่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายนิ้วมือ เราเรียกว่านิ้วตาลแต่ละนิ้วยาวประมาณ 40 ซม.และโตวัดผ่า กลางประมาณ 1.5 - 2 ซม. โคนกลุ่มช่อจะมีก้าน ช่อรวมและมีกาบแข็ง ๆหลายกาบหุ้มโคนก้านช่ออีกทีหนึ่ง ช่อดอกเพศเมียก็คล้าย ๆ กัน แต่นิ้วจะเป็นปุ่มปมปุ่มปมคือดอกที่ติดนิ้วตาล ดอกหนึ่ง ๆ โตวัดผ่ากลางประมาณ 2 ซม. และมีกาบแข็งๆ หุ้ม แต่ละดอก กาบนี้จะเติบโตไปเป็นหัวจุกลูกตาลอีกทีหนึ่ง ผลกลมหรือรูปทรงกระบอกสั้น ๆ โตวัดผ่ากลางประมาณ 15 ซม. ผลเป็นเส้นใยแข็งเป็นมันมักมีสีเหลืองแกมดำคล้ำเป็นมันหุ้มห่อเนื้อเยื่อสีเหลืองไว้ภายใน ผลหนึ่ง ๆจะมีเมล็ดใหญ่แข็ง 1 - 3 เมล็ด

จังหวัดเพชรบุรีมีต้นตาลมากที่สุดในประเทศไทยดังปรากฏหลักฐานจาก “นิราศเมืองเพชร” ของสุนทรภู่ความตอนหนึ่งว่า ทุกประเทศเขตแคว้นแดนพริบพรี เหมือนจะชี้ไปไม่พ้นแต่ต้นตาลด้วยเหตุนี้ ต้นตาลจึงกลายเป็นเอกลักษณ์ของจังหวัดเพชรบุรีคู่กับเขาวัง หรือ พระนครคีรี ปรากฏเป็นตราและธงประจำจังหวัดเพชรบุรี สืบมาจนถึงทุกวันนี้ ต้นตาลเมืองเพชร ให้ผลผลิตน้ำตาลโตนดที่ดีที่สุดมาตั้งแต่สมัยโบราณตราบจนถึงปัจจุบันจึงมีชื่อเสียงติดปากคนทั่วไปว่า “น้ำตาล

เพชรบุรี” เพราะมีรสหวานหอมอร่อยมีรสชาติกลมกล่อมชวนรับประทาน จนเป็นที่มาของคำว่า “หวานเหมือนน้ำตาลเมืองเพชร” ดังนั้นต้นตาลจึงนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดเพชรบุรี โดยทั่วไปชาวชนบทชาวนาจะปลูกข้าวและทำตาลควบคู่กันไป ส่วนใหญ่จะนิยมปลูกต้นตาลไว้บริเวณคันนาในตัวเมืองเพชรบุรีดังแสดงในภาพที่ 2 แต่ปัจจุบันเนื่องจากมีการทำนา 2 ครั้ง เป็นผลให้ต้นตาลปรับสภาพไม่ทัน เพราะพื้นที่มีน้ำมากเกินไปกลายเป็นที่มีน้ำท่วมขัง ในที่สุดก็ต้องยืนต้นตายภายในเวลาไม่นานนัก เพราะระบบนิเวศเปลี่ยนจากเดิมไม่เป็นไปตามธรรมชาติ

ภาพที่ 2.2 ลักษณะของต้นตาล
ที่มา : www. phetchaburi.doae.go.th

ตาลโตนดที่นิยมนำมาใช้มีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ ตาลหม้อและตาลไข่ ตาลหม้อมีลักษณะลูกกลมป้อม เนื้อตาลมาก เปลือกบาง สีเหลืองจัด กลิ่นหอม ส่วนตาลไข่มีลักษณะลูกรียาว เปลือกหนา เนื้อน้อย สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมน้อยกว่าตาลหม้อ (นิดดา หงส์วิวัฒน์, 2541) เนื้อตาลสุกได้มาจากการยีลูกตาลที่สุกเต็มที่แล้ว มีเนื้อสีเหลืองสดแทรกตัวอยู่ตามเส้นใจในลูกตาล นำลูกตาลมายีกับน้ำเพื่อคั้นเอาเนื้อตาลออกจากเส้นใยที่เกาะติดอยู่กับเมล็ด จากนั้น จึงนำไปกรองด้วยตะแกรงเพื่อแยกกากใย และเศษผงออก เอาน้ำสีเหลืองสดนี้เทใส่ผ้าขาวบาง มัดรวบแล้วนำไปห้อยแขวนไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้สะเด็ดน้ำ ซึ่งนอกจากจะเป็นการแยกเนื้อตาลออกจากน้ำแล้ว ยังเป็นการหมักเนื้อตาลด้วย (เยาวลักษณ์ นทีจารุรัตน์ , 2510) เนื่องจากในเนื้อตาลสุกมีเชื้อยีสต์อยู่ 4 ชนิด คือ *Candida krusei, Saccharomyces* spp., *Kloeckera apiculate* and *Heseniaspora* spp. (สมศรี ลีปิพัฒนา

วิทย์, 2529) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 และจากการศึกษาบทบาทของยีสต์ธรรมชาติต่อการหมักขนมตาล พบว่า ยีสต์ที่มีอยู่ในธรรมชาติของเนื้อตาลสุกคือ

Candida holmii ซึ่งช่วยในกระบวนการหมักเพื่อให้ขนมตาลขึ้นฟู (ธมลวรรณ อารยพันธ์ และคณะ, 2550)

Sacharomyces spp สามารถสร้างเส้นใยเทียม มีเยื่อหุ้มบาง ๆ (pellicle) ไม่สร้างกรด แต่สร้างสปอร์ (ascospore) ประมาณ 1-4 สปอร์ (สมศรี ลีปิพัฒนาวิทย์, 2529)

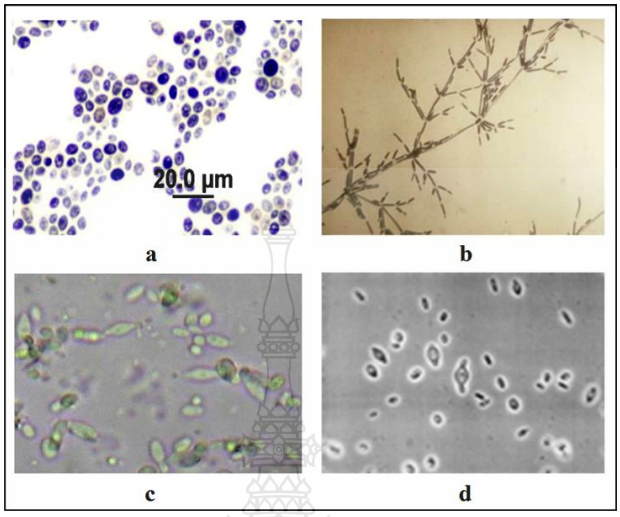
Candida krusei มีรูปร่างทรงกระบอก หรือรูปทรงไข่ มีขนาดประมาณ (3-5) x (6-20) ไมคอน เซลล์มีขนาดเล็กและยาว สามารถสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) กระบวนการหมักเกิดขึ้นเมื่อมีกลูโคสเท่านั้น อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 43-45 องศาเซลเซียส ไม่สร้างกรด และสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงาน (Lodder, 1974)

Kloeckera apiculata มีรูปทรงคล้ายมะนาว รูปทรงไข่ หรือยาวเรียว มักปรากฏเป็นเซลล์เดี่ยว หรือจับเป็นคู่ แต่ในบางโอกาสสามารถพบในลักษณะกลุ่ม 3-4 เซลล์ มีขนาด (1.4-5.3) x (2.6-12.2) ไมครอน ขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อ สามารถหมักและดูดซึมได้เฉพาะกลูโคสเท่านั้น ไม่สร้างเส้นใยเทียม เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Lodder, 1974)

Henseniaspora spp. มีรูปร่างคลายมะนาว และรูปทรงไข่ ขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อทั้ง 2 ด้าน โดยส่วนใหญ่จะไม่สร้างเส้นใยเทียม แต่บางสายพันธุ์สามารถสร้างเส้นใยเทียมได้ สร้างสปอร์รูปหมวก ประมาณ 2-4 สปอร์ภายในเซลล์ และจะปล่อยสปอร์ออกทันทีในช่วงที่เซลล์เจริญเต็มได้ มีคุณสมบัติในการหมัก แต่ไม่สามารถดูดซับไนเตรทได้ ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Lodder, 1974)

เจริญ เจริญชัย และคณะ (1998) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของน้ำตาลต่ออัตราการเจริญเติบโต และปริมาณเซลล์ (cell biomass) ของไวน์ยีสต์ (wine yeast) พบว่า *Sacharomyces cerevisiae., Kloeckera apiculate* และ *Candida* spp. สามารถเจริญที่ pH 3, 3.5 และ 4.0 ได้ไม่แตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นจาก 15 องศาเซลเซียส เป็น 20 และ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์ของ *Kloeckera apiculata และ Candida* spp. ลดลง ในขณะที่การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกัน ความขุ่นของเซลล์ (maximum cell density) *S. cerevisiae* มีปริมาณมากว่า *Kloeckera apiculata* ที่ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล 200 และ 300 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเพิ่มขึ้น ความขุ่นของเซลล์มีปริมาณลดลง ดังนั้น จากการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของ *Kloeckera apiculata , Candida* spp. และ *S. cerevisiae* พบว่า *S. cerevisiae* สามารถแบ่งเซลล์

ได้มากกว่า ทนต่อเอทานอลและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่า *Kloeckera apiculata* และ *Candida* spp. แต่ที่อุณหภูมิต่ำ *Kloeckera apiculata* สามารถเจริญได้ดี



ภาพที่ 2.3 *Saccharomyces* spp. (a) *Candida krusei* (b) *Kloeckeraapiculata* (c) *Henseniaspora* spp. (d)

ที่มา : (a) http://www.deanza.edu/faculty/mccauley/6a-labs-fungi-01.htm

(b) http://www.allposters.com/-sp/Candida-Krusei-Pseudohyphae-Posters_i4259671

(c) http://investigadores.uncoma.edu.ar/labmicrobiologia_biotecnologia

(d) http://investigadores.uncoma.edu.ar/labmicrobiologia_biotecnologia

การสกัดเอาเนื้อตาลสุกสามารถทำได้ 2 วิธีดังนี้

1) นำเอาเนื้อตาลที่ปอกเปลือกแล้วมาขยำกับน้ำโดยตรงวิธีนี้ใช้น้ำประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักลูกตาลสุกเนื้อตาลสุกจะถูกสกัดออกจนหมดการใช้น้ำมากกว่านี้จะไม่เกิดประโยชน์

2) เฉือนเอากากใยและเนื้อออกมาก่อนแล้วนำมาขยำกับน้ำประมาณ 5 เท่าของน้ำหนักผลสำหรับเนื้อตาลสุกที่ได้จากวิธีแรกจะได้เนื้อตาลประมาณร้อยละ 33-40 ของน้ำหนักผล ส่วนวิธีที่สองให้เนื้อตาล ร้อยละ 38-43

ทั้งนี้การได้ปริมาณเนื้อตาลต่างกันเนื่องจากวิธีแรกซึ่งใช้การขยำหรือการนวดนั้นทำได้ยากทำให้เนื้อบางส่วนยังคงเหลืออยู่ที่เมล็ด ส่วนวิธีที่สองนั้นการสกัดเนื้อตาลออกทำได้ง่ายกว่าส่งผลให้ปริมาณเนื้อที่ได้มีมากกว่า เนื้อตาลที่สกัดออกมาได้แล้วจะต้องนำมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อกำจัดเศษผงออกให้หมดโดยเอาน้ำสีเหลืองที่ได้เทลงบนผ้าดิบที่มัดติดไว้กับสาแหรกหรือใส่ถุงผ้าก็ได้แขวนไว้ราว 12 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะสะเด็ดน้ำขั้นตอนนี้จำเป็นมากเพราะนอกจากจะเป็นการแยกเอาเนื้อตาลออกจากน้ำเพื่อกำจัดความขมแล้วยังเป็นการหมักเนื้อตาลเพื่อเพิ่มเชื้อยีสต์อีกด้วย

โดยผลการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าเนื้อตาลที่สะเด็ดน้ำแล้วจะมีองค์ประกอบทางเคมีแสดงคุณค่าทางโภชนาการดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมี (โดยน้ำหนักแห้ง) ของวัตถุดิบเนื้อตาลสุก

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณในวัตถุดิบเนื้อตาลสุก
ความชื้น (ร้อยละ) *	94.52
โปรตีน (ร้อยละ)	9.85
ไขมัน (ร้อยละ)	4.38
เถ้า (ร้อยละ)	7.12
เส้นใยหยาบ (ร้อยละ)	45.07
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	33.58
แคโรทีน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	17.65
ปริมาณกรด (ร้อยละ)	14.60
ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	3.34

หมายเหตุ : * หมายถึง ปริมาณโดยน้ำหนักเปียก

ที่มา : มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ (2544)

นอกจากนี้เนื้อตาลสุกสามารถนำมาทำเป็นขนมไทยได้หลายอย่างนอกจากขนมตาล แล้วยังมีบัวลอยลูกตาล ขนมขี้หนูตาล ไอศครีม และวุ้นลูกตาลซึ่งได้จากการนำเนื้อตาลสุกที่ยีแล้วมาใส่ในน้ำปูนใส เทใส่ภาชนะที่สวยงาม แล้วนำไปตากแดด น้ำปูนใสจะทำให้เนื้อตาลแข็งตัวกลายเป็นวุ้นลูกตาล มีกลิ่นหอมของลูกตาล (นิรนาม, 2541) บางครั้งเนื้อตาลสุกยังทำหน้าที่เป็นสีผสมอาหารในขนมต่างๆ ได้อีกด้วย (กรมอนามัย, ม.ป.ป.)

2.2.2. แป้งข้าวเจ้า

แป้งที่ใช้ในการทำขนมไทยมีหลายอย่าง แต่ที่ใช้เป็นส่วนประกอบหลักในตัวขนมมักจะได้แก่ แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่ว แป้งอื่นที่ใช้มักเป็นส่วนประกอบเสริม เพื่อคุณภาพอย่างใดอย่างหนึ่งของขนมเท่านั้น แป้งที่ใช้ทำขนมจะทำหน้าที่สำคัญในด้าน การทำให้ขนมข้น และเกิดลักษณะพองตัวใส หรือจะเรียกง่าย ๆ ว่าทำให้ขนมจับตัวกันและสุกนั่นเอง แป้งต่างชนิด

กันจะมีส่วนประกอบต่างกันจึงทำให้แป้งมีคุณสมบัติทั้งทางด้านคุณค่าทางโภชนาการ ทางด้านเคมี และทางด้านกายภาพต่างกันด้วย โดยทั่วไปแป้งจะมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด รองลงมาคือโปรตีน นอกจากนี้ มีไขมัน เซลลูโลส เถ้า วิตามิน สารสี เอนไซม์ ความชื้นหรือน้ำมีประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรตในแป้งอยู่ในรูปของสตาร์ช จะมีผลต่อการหุงต้มมากที่สุด ส่วนประกอบของสตาร์ชมี 2 อย่าง คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคทิน (amylopectin) แป้งจากพืชต่างชนิดกันจะมีสัดส่วนของอะไมโลส และ อะไมโลเพคทินต่างกัน แป้งที่มีอะไมโลเพ็คทินมากหรือมีอะไมโลสน้อยจะให้แป้งเปียกที่ใสน้อยจะให้แป้งเปียกที่ใสหนืด ข้นมาก แป้งพวกนี้เขาเรียก แว็กซี่ สตาร์ช (Waxy starch) ถ้าต้องการลักษณะอาหารให้เหนียวข้นแต่ไม่เป็นวุ้น ก็ควรใช้แป้งที่มีอะไมโลเพคทินสูง ปกติแล้วแป้งที่ได้จากพวกรากจะมีอะไมโลเพคทินสูงกว่าที่ได้จากเมล็ดธัญพืช ในระหว่างต้มข้าว น้ำจะให้แป้งจากเมล็ดข้าวพองตัวและใสขึ้น น้ำของข้าวต้มก็ข้นขึ้นเมื่อ ยกลงตั้งทิ้งไว้จะเห็นมันจับตัวกันเป็นวุ้น ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติของอะไมโลส ซึ่งมีอยู่ในข้าวเจ้า

แป้งข้าว (rice flour) มี 2 ชนิดคือ จากข้าวเจ้าและข้าวเหนียวเนื่องจาก ข้าวเจ้า กับข้าวเหนียวมีอะไมโลสไม่เท่ากัน ดังนั้น คุณสมบัติของการต้มแป้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียวจึงต่างกัน และแม้แต่แป้งข้าวเจ้าด้วยกันก็อาจให้ลักษณะต่างกันไปด้วย (ศิริลักษณ์ สินธวาลัย, 2519) ดังนั้นสำหรับการทำขนมตาลแล้วจึงควรใช้แป้งข้าวเจ้าในการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากแป้งข้าวเจ้าเมื่อได้รับความร้อนสามารถเกิดเจลได้ง่ายทำให้ขนมตาลมีความหนืดสูงเพราะมีโมเลกุลอะไมโลส โดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แป้งข้าวเจ้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ (Ju and Mittal, 1995) จึงทำให้ขนมตาลที่ได้มีความนุ่มและพองตัว โดยที่หน้าขนมตาลไม่แตก เพราะแป้งข้าวเจ้าจะพองตัวโดยไม่แตกแยกออกที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ในขณะที่แป้งมันสำปะหลังและหัวสาคูจะแตกแยกออกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 85 องศาเซลเซียส (ศิริลักษณ์ สินธวาลัย, 2522)

2.2.3 น้ำตาล

น้ำตาล หมายถึง สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีรสหวาน และให้พลังงานแก่ร่างกาย และชนิดของน้ำตาล น้ำตาลพื้นบ้านที่มีในประเทศไทย และใช้ประกอบอาหารในชีวิตประจำวัน (เข็มทอง นิ่มจินดา, 2538; กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2539) ได้จำแนกชนิดของน้ำตาลลักษณะดังนี้

- น้ำตาลที่ตกผลึก เป็นน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวบีต ผ่านกระบวนการทำให้ใสและการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศ จะได้น้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.9 (Kretchmer และ Hollenbeck, 1991) สำหรับประเทศไทยน้ำตาลทรายได้จากอ้อย น้ำตาลทรายขาวใช้มากในผลิตภัณฑ์ขนมไทย น้ำตาลทรายมีขนาดความละเอียดต่างๆ กัน น้ำตาลทราย เป็นสารให้ความหวานแก่

ผลิตภัณฑ์เพื่อช่วยในการถนอมรักษาอาหาร ช่วยทำให้เนื้อขนมมีลักษณะดี มีสีสันน่ารับประทาน และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร นอกจากนี้ น้ำตาลยังเป็นอาหารของยีสต์ในระหว่างการหมัก ทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ดี และสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากขึ้น ทำให้ขนมขึ้นฟู และมีเนื้อนุ่ม ช่วยเก็บความชื้นเพราะน้ำตาลทรายมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชุ่มชื้นอยู่ได้นาน (เข็มทอง นิ่มจินดา, 2538; Kretchmer and Hollenbeck, 1991)

- น้ำตาลที่ไม่ตกผลึก ได้แก่ น้ำตาลโตนด และ น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลโตนดได้จากน้ำหวานของดอกตาล หรือปลีตาล แนวโน้มการผลิตน้ำตาลโตนดจะน้อยลง เพราะน้ำตาลโตนดสดนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่ม น้ำตาลโตนดสมมีน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 15 ความหวานจะสูงสุดในช่วงฤดูหนาว มีลักษณะที่แห้งและแข็งกว่าน้ำตาลมะพร้าว ส่วนน้ำตาลมะพร้าว หรือน้ำตาลปี๊บจะใช้น้ำหวานจากดอกมะพร้าว หรือจั่นมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ มะพร้าวที่มีคุณภาพ คือ มีสีนวนโดยไม่ได้ฟอกสี เนื้อละเอียด กลิ่นหอม ปริมาณความชื้นร้อยละ 7 - 8 ไม่เยิ้มเหลว ปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงกว่าร้อยละ 70

น้ำตาลทรายที่ใช้ในขนมตาลจะช่วยให้เกิดความหวานและเป็นอาหารของจุลินทรีย์โดย แบคทีเรีย และยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลทรายให้เป็นกลูโคสและฟรุคโทสก่อนด้วยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) หลังจากนั้นจะเกิดการหมักและสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น และทำให้ขนมขึ้นฟูและเนื้อนุ่ม โดยอัตราเร็วในการย่อยน้ำตาลของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณน้ำตาล (กนก ชวลิตพงศ์, 2542) ส่วนน้ำตาลที่ใส่ขนมและอาหารอื่น ๆ เป็นส่วนสำคัญที่ให้พลังงาน

นอกจากนั้น หน้าที่ของน้ำตาลที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารอาจกล่าวโดยสรุปได้ (ศิริลักษณ์ สินธวาลัย, 2522) ดังนี้

1. ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสหวาน
2. เป็นอาหารของยีสต์ในระหว่างการหมัก
3. ทำให้เนื้อขนมและเนื้อสัมผัสของขนมละเอียด
4. ช่วยในการกักเก็บความชื้น และช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความใหม่สดอยู่ได้นานขึ้น
5. ทำให้เปลือกนอกของผลิตภัณฑ์มีสีดี
6. เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์
7. เพิ่มความทนทานต่อกระบวนการหมัก

นอกจากน้ำตาลเป็นอาหารที่ย่อยง่ายมาก แต่อาจเกิดการแตกตัวด้วยแบคทีเรียในลำไส้ทำให้เกิดแก๊ส กรดแลคติก และสารที่เกิดจากขบวนการการหมักอื่นๆ ซึ่งจะมีผลทำให้รู้สึกระคายเคืองในระบบทางเดินอาหารได้ ส่วนกากน้ำตาลและน้ำเชื่อมอ้อยซึ่งมีเถ้าตามธรรมชาติ นอกจากจะให้คาร์โบไฮเดรตแล้วยังให้ธาตุอื่น ๆ เช่นแคลเซียมและเหล็ก (ศิริลักษณ์ สินธวาลัย, 2519) น้ำตาลที่

เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตขนมตาลคือ น้ำตาลทราย ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลทรายสามารถผสมเข้ากับส่วนผสมอื่น ๆ ได้ดี และละลายได้หมดเมื่อถูกความร้อน (จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ ในวิกุล, 2539) ทั้งยังสามารถถูกย่อยได้ง่ายด้วยเชื้อยีสต์จึงทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากพอ จากกระบวนการหมักแป้งขนมตาลดังกล่าว ส่งผลให้ได้ขนมตาลที่มีเนื้อนุ่มและพองตัว นอกจากนี้น้ำตาลทรายยังมีข้อได้เปรียบกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ในด้านราคาด้วย

2.2.4 กะทิ

กะทิเป็นสัญลักษณ์ของอาหารไทยโดยเฉพาะขนมไทยซึ่งมีการใช้มะพร้าวมาตั้งแต่สมัยสุโขทัยและกรุงศรีอยุธยาตอนต้นโดยใช้ร่วมกับข้าวและแป้งคนไทยรู้จักใช้มะพร้าวทำอาหารตั้งแต่เป็นมะพร้าวอ่อนที่มาของกะทิการขูดมะพร้าวแบบโบราณจะใช้กระต่ายมีใบมีดเป็นซี่ๆเรียกชื่อตามรูปร่างของไม้ที่ใช้ทำถ้ารูปแมวทางเหนือเรียกแมวขูดมะพร้าวและมะพร้าวที่จะนำมาขูดต้องเป็นมะพร้าวแก่ซึ่งดูได้จากกะลาจะเป็นสีน้ำตาลเข้มคนโบราณหากจะทำกับข้าวที่เกี่ยวกับกะทิจะต้องเริ่มตั้งแต่ปอกมะพร้าวผ่าครึ่งลูกน้ำมะพร้าวเก็บไว้ดองผักหรือแช่ผ้าไหมการขูดต้องเริ่มขูดโดยรอบปากก่อนแล้วไล่มาเรื่อยๆ จนถึงตรงกลาง

มะพร้าวส่วนที่ขูดออกครั้งแรกจะมันหวานอาหารจะอร่อยหอมมันหวานก็อยู่ที่กะทิการคั้นกะทิต้องคั้นเป็นจึงจะได้กะทิที่มันในสมัยก่อนจะใช้มะพร้าวขูดใส่ในผ้าขาวบางแล้วจึงเทน้ำอุ่นใส่แต่น้อยห่อผ้าให้สนิทแล้วนวดผ้ากับกะละมังให้กะทิออกกะทิที่คั้นครั้งต่อไปเรียกว่าหางกะทิการคั้นกะทิโดยไม่ใช้ผ้าต้องใช้กระชอนกรองเมื่อก่อนเราใช้กระชอนสานด้วยไม้ไผ่ต่อมาจึงมีการพัฒนาเป็นโลหะต่างๆ

แต่ในปัจจุบันเรามีมะพร้าวที่ขูดเสร็จแล้วขายกะทิถ้าเก็บไว้นานจะเหม็นหรือเก่าทำให้รสชาติและกลิ่นของอาหารเสียไปฉะนั้นการทำอาหารให้อร่อยหอมจึงควรใช้กะทิที่คั้นจากมะพร้าวที่ขูดใหม่ๆในปัจจุบันแม้มีกะทิผงกะทิกล่องกะทิกระป๋องอย่างไรก็ตามรสชาติหรือกลิ่นจะสู้กะทิสดไม่ได้โดยเฉพาะการนำมาทำเป็นขนมหวาน พบว่าในหัวกะทิมีน้ำร้อยละ 69.4 โปรตีนร้อยละ 2.17ไขมันร้อยละ 18.3 กากร้อยละ 9.59 จากการคำนวณวิเคราะห์โดยกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพกรมวิทยาศาสตร์ (พานิชย์ ยศปัญญา, 2544)

ในการทำขนมตาลควรใช้หัวกะทิคั้นสดเพราะในกะทิสดมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่ากะทิกล่องและวิธีการเตรียมกะทิที่ใช้ในการทำขนมตาลคือนำเนื้อมะพร้าวที่ขูดแล้วมาใส่น้ำอุ่นเล็กน้อยให้พอชุ่มเคล้าให้ทั่วและคั้นส่วนผสมผ่านกระชอนหรือผ้าขาวบางน้ำกะทิที่ได้ในครั้งแรกนี้เรียกว่าหัวกะทิน้ำกะทิที่ได้จากการคั้นครั้งที่สองหรือสามเรียกว่าหางกะทิโดยหัวกะทิจะเข้มข้นกว่าหางกะทิและเป็นส่วนผสมหลักในการทำขนมตาล (วิกิพีเดียสารานุกรมเสรี, 2549) กะทิมีลักษณะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water

emulsion) ซึ่งถูกทำให้คงตัวโดยโปรตีนในกะทิกะทิจะเป็นตัวช่วยเพิ่มรสชาติของขนมตาลให้ดีขึ้นเป็นตัวนำความร้อนทำให้ขนมสุกทำให้ขนมมีความเป็นมันสวยงามและช่วยเพิ่มเนื้อสัมผัสและเมื่อใช้หัวกะทิในส่วนประกอบของขนมมากขึ้นเนื้อสัมผัสขนมจะแข็งกระด้างแต่ความมันของเนื้อขนมจะมากขึ้นแต่หากใช้ในปริมาณน้อยเนื้อสัมผัสของขนมจะมีความนุ่มแต่ไม่มีความมันของเนื้อขนมมากนักซึ่งไขมันจากกะทิจะมีผลต่อเนื้อสัมผัสของขนมโดยจะไปห่อหุ้มที่ผิวของเม็ดแป้งทำให้น้ำซึมผ่านเข้าไปในเม็ดแป้งได้น้อยลงและทำให้เม็ดแป้งแตกตัวน้อยลงช่วยยับยั้งการคืนตัวของแป้งได้ทำให้ขนมมีความเหนียวลดลง (ธงชัย พุตทองศิริ, 2542)

2.2.5 มะพร้าว

มะพร้าวคือส่วนผสมที่ใช้ในขนมไทยมากเรียกว่าเป็นส่วนผสมหลักอีกอย่างหนึ่ง มะพร้าวที่ใช้มีทั้งมะพร้าวอ่อน มะพร้าวทึนทึก มะพร้าวแก่ขนมบางอย่างยังใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนผสมอีกด้วย มะพร้าวอ่อนใช้เนื้อผสมในขนม เช่น เปียกกสาคู วุ้นมะพร้าวเปียกรวมมิตร สังขยามะพร้าว เป็นต้น

มะพร้าวทึนทึกจะใช้ขูดฝอยทำเป็นไส้กระฉีกใช้โรยหน้าขนมหลายชนิดเช่นขนมเปียกปูน ขนมดอกดิน ขนมต้ม ขนมเหนียว ขนมตาล ขนมกล้วย ขนมเรไร เป็นต้น การเตรียมมะพร้าวในการทำขนมตาลคือขั้นตอนแรกปอกมะพร้าวผ่าครึ่งลูกนำมาขูดให้เป็นเส้นก่อนที่จะนำไปโรยหน้าขนมตาล (นิรนาม, 2539)

2.2.6 เกลือ

เกลือที่ใช้ในการทำขนมตาล หรือขนมที่มีการหมักจะสามารถทำให้การหมักคงตัวไม่ทำลายยีสต์ โดยทำหน้าที่ในการดึงน้ำออกจากเซลล์ยีสต์แต่ไม่ทำให้ยีสต์ตาย เกลือจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ไซเมสช้าลง ทำให้การใช้น้ำตาลแล้วผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการในการหมัก และการเติมเกลือในเค้กหรือขนมจะช่วยทำให้กลิ่นรสที่มีอยู่เด่นขึ้นได้ ทำให้รสจืดชืดหายไป อีกทั้งยังช่วยเสริมให้รสหวานเด่นขึ้นได้ (จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ ในวิกุล, 2539)

2.3 กระบวนการผลิตขนมตาล

2.3.1 การเตรียมวัตถุดิบ มี 2 ขั้นตอน

2.3.1.1 การเตรียมเนื้อตาลสุก

เนื้อตาลสุกได้จากการนำตาลสุกมาล้างทำความสะอาดทั้งลูก ลอกเปลือกสีดำออกให้หมดเมื่อแกะเมล็ดออกจากกันจะพบดีตาล มีลักษณะเป็นส่วนที่แข็งอยู่ระหว่างเมล็ดให้ดึงออกทิ้ง นำเมล็ดตาลยีกับน้ำทีละน้อยอย่าใช้น้ำมาก จนเนื้อลูกตาลหลุดออกมาหมด แล้วกรองด้วยกระชอนตาถี่ เพื่อกรองเส้นใยออก เทใส่ผ้าขาวชนิดหนา หรือผ้าดิบ ใช้เชือกผูกให้แน่นแล้วแขวนไว้ให้น้ำไหลออกจนหมดทำค้างไว้ 1 คืนประมาณ 12 ชั่วโมง ถ้าน้ำยังไหลออกไม่หมดให้หาของหนักทับให้แห้ง (จันทร ทศานนท์, 2532) หรือจนกว่าจะสะเด็ดน้ำ

2.3.1.2 การเตรียมแป้งข้าวเจ้าและส่วนผสมอื่น ๆ

แต่เดิมแป้งข้าวเจ้าที่ใช้ทำขนมตาลต้องจากการนำข้าวสารหรือปลายข้าวมาแช่น้ำและโม่ให้ละเอียดทิ้งให้แป้งนอนก้น นำใส่ถุงผ้าทับให้สะเด็ดน้ำ ตากบนตะแกรงจนแห้งบดเม็ดแป้งที่ได้ร่อนผ่านตะแกรงละเอียดหรือ อาจจะทำโดยการนำปลายข้าวมาบดให้ละเอียดแป้งข้าวเจ้าที่สุกจะมีลักษณะเป็นวุ้นใสนุ่ม แต่ปัจจุบันจะใช้แป้งข้าวเจ้าสำเร็จรูปแทนเนื่องจากมีความสะดวกกว่าการเตรียมเองแค่นำมาร่อนก็ใช้ได้ และแป้งที่ใช้ทำขนมมีหน้าที่สำคัญคือ จะทำให้เกิดความข้นและเกิดลักษณะพองตัวใส (Gelatinization) ทำให้ขนมจับตัวกันและสุก (กนก ชวลิตพงษ์, 2542) สำหรับการเตรียมส่วนผสมอื่นๆ ให้ชั่งตวงตามสูตร

2.3.2 การผสม

นำกะทิผสมกับน้ำตาลตั้งไฟพอเดือดแล้วยกลงพักไว้ให้อุ่นจากนั้นนวดแป้งที่ผสมผงฟูแล้วกับเนื้อตาลให้เข้ากันค่อยๆ ใส่กะทิ ลงนวดทีละน้อย จนแป้งนุ่มจากนั้นก็นำไปพัก (นฤมล เหลืองนภา, 2533)

2.3.3 การพักขนมตาล

การพักขนมตาลเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดการหมักโดยยีสต์ที่มีอยู่ในเนื้อตาลทำกิจกรรมเปลี่ยนน้ำตาลทรายให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตสเกิดการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นและทำให้ขนมขึ้นฟูและเนื้อนุ่ม การหมักขนมตาลแต่โบราณนิยมตากแดดทิ้งไว้ประมาณ 6 - 8

ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืน และไม่ควรหมักนานเกินนี้เนื่องจากยีสต์ที่มีในเนื้อตาลสามารถสร้างกรดได้ ดังนั้น หากมีการหมักที่นานเกินไปจะทำให้ขนมตาลมีรสเปรี้ยวได้ (ทัศนีย์ โรจนไพบูลย์, 2532)

2.3.4 การนึ่ง

การนึ่ง คือการให้ความร้อนชื้นแก่อาหารที่ต้องการทำให้สุกโดยการใช้ภาชนะสองชั้นชั้นล่างสำหรับใส่น้ำต้มให้เดือดชั้นบนมีช่องหรือแผ่นตะแกรงสำหรับวางอาหารหรือมีภาชนะที่มีแผ่นตะแกรงเพื่อวางอาหารเหนือน้ำและให้ไอเดือดจากน้ำด้านล่างสามารถลอยตัวขึ้นไปเบื้องบนผ่านชั้นอาหารทำให้สุกได้หลักสำคัญของการนึ่งมี 3 ประการคือ

2.3.4.1 ปล่อยให้ไอน้ำผ่านอาหารโดยตรงเช่นการนึ่งชิ้นปลาและไก่โดยวางชิ้นอาหารในภาชนะที่มีช่องให้ไอน้ำผ่านได้มีฝาปิดแล้ววางเหนือหม้อน้ำเดือดหรือใส่ชามสองใบใบหนึ่งใส่อาหารอีกใบครอบปิดปากที่ใส่อาหารแล้ววางลงในหม้อน้ำเดือดไอน้ำเดือดจะทำให้อาหารสุก

2.3.4.2 ปล่อยให้ไอน้ำผ่านอาหารที่ปรุงแต่งด้วยเครื่องเทศและมีผักรองพื้นภาชนะใส่อาหารหรือน้ำสต๊อกตามชอบ

2.3.4.3 การนึ่งขนมจำพวกพุดดิ้ง ซึ่งต้องใช้กระดาษไขหรือกระดาษอะลูมิเนียมห่อหุ้มขนมปังไว้ป้องกันไอน้ำรวมตัวกันเป็นหยดทางด้านบนขนมขนมและอาหารทำให้สุกโดยการนึ่งมีหลายอย่างเช่นเนื้อสัตว์ขนมหวานเผือกมันเทศ (อบเชย วงค์ทองและขนิษฐา พูนผลกูล, 2544) ในการทำขนมตาลจะนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีทั้งนี้เพื่อทำให้ขนมตาลขึ้นฟูดีผิวมันเนื้อละเอียดไม่เละหรือกระด้าง (ทัศนีย์ โรจนไพบูลย์, 2532) ดังภาพที่ 2.4

ภาพที่ 2.4 ขนมตาลหลังผ่านกระบวนการนึ่งสุก

ที่มา : อรพินท์ หลงผาสุก (2555)

2.4 ยีสต์

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน (fission) และมีทั้งชนิดที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ที่เรียกว่า แอสโคมัยซีตัสยีสต์ (Ascomycetous yeasts) และชนิดที่สร้างแบสิดิโอสปอร์ ที่เรียกว่า แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (Basidiomycetous yeast) ซึ่งอาจจะไม่พบระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัย โดยยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำตาล พอลิออล (polyol) กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และพอลิเมอร์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ยีสต์เกี่ยวข้องกับมนุษย์มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ โดยมีบทบาทเกี่ยวกับการหมักของน้ำผลไม้ การทำขนมปังขึ้นฟู ทำให้อาหารบางชนิดมีคุณค่าทางอาหาร ในปัจจุบันยีสต์จะยิ่งมีความสำคัญมากขึ้น เพราะใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ การสังเคราะห์สาร เช่น วิตามิน ไขมัน และโปรตีน จากน้ำตาลอย่างง่ายและแอมโมเนียมไนโตรเจน นอกจากนี้ยังใช้ยีสต์เพื่อการศึกษาทางด้านชีวเคมีพื้นฐาน และกระบวนการทางเมแทบอลิซึมของยูคาริโอติกเซลล์ ซึ่งอย่างไรก็ตาม มียีสต์บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืชและสัตว์ และทำความเสียหายให้แก่อาหาร เสื้อผ้า และวัสดุอื่นๆ (ดุชณี ธนะบริพัฒน์, 2546)

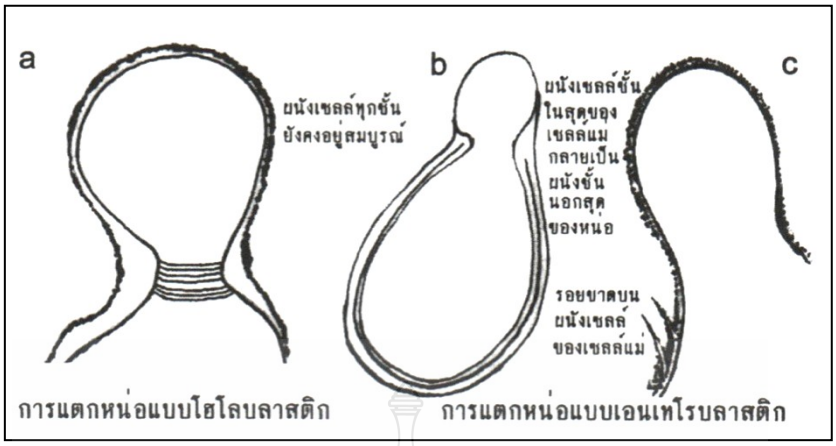
ปัจจุบันมีการค้นพบศึกษายีสต์แล้ว 100 สกุล มากกว่า 700 สปีชีส์ โดยมีผู้ประเมินว่าถ้าการค้นพบยีสต์ชนิดใหม่ ๆ สามารถทำได้ในอัตรารวดเร็วที่เท่ากับปัจจุบัน เนื่องจากวิธีการแยกยีสต์ในปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลจะช่วยตรวจสอบและค้นพบยีสต์โดยไม่ต้องแยกเชื้อออกมาจากแหล่งที่อยู่ เหมือนวิธีดั้งเดิม

2.4.1 การจำแนกประเภทยีสต์

วิธีการที่ใช้จำแนกยีสต์มีตั้งแต่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมทั้งเกณฑ์ของอนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยมีแนวทางโดยย่อดังนี้ (Van der Walt and Yarrow, 1984; Yarrow, 1998 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.4.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

สัณฐานวิทยาทั้งที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีความสำคัญในอนุกรมวิธาน โดยปกติใช้สำหรับการจำแนกประเภทในระดับสกุลหรือกลุ่มอนุกรมวิธานที่สูงกว่าสกุล



ภาพที่ 2.5 การแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติกใน *Saccharomyces cerevisiae* (a) และการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติกใน *Filobasidiella neoformans* (b, c)

ที่มา : วาดจากภาพถ่ายใน Moore (1998) อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

ก) การเพิ่มจำนวนของเซลล์แบบไม่อาศัยเพศ

วิธีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของยีสต์นั้นอาจเกิดโดยการแตกหน่อ การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน และการแตกหน่อร่วมกับการแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน นอกจากนั้น ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้าง คอนิเดีย (Conidiogensis)

- การแตกหน่อ วิธีการแตกหน่อแบ่งเป็นการแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติก (holoblastic budding) และการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติก (enteroblastic budding) ดังภาพที่ 2.5 ตามโครงสร้างละเอียดของผนังเซลล์ในระหว่างการแตกหน่อ โดยในการแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติกผนังเซลล์ของเซลล์แม่ทุกชั้นยังคงอยู่สมบูรณ์ในระหว่างการสร้างหน่อ การแตกหน่อแบบนี้เป็นลักษณะของ *Saccharomycetales* และยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้ ส่วนการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติกนั้นการแตกหน่อจะเกิดจากการมีรอยแยกบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่ โดยที่ชั้นในของผนังของเซลล์แม่ยื่นเจริญออกไปเพื่อสร้างชั้นนอกสุดของผนังของหน่อ และท้ายสุดขาดออกจากเซลล์แม่หลังจากที่มีหน่อจำนวนมากเกิดที่บริเวณเดียวกัน ตำแหน่งที่สร้างหน่อบนเซลล์แม่จะล้อมรอบด้วยคอลลา (Colla) วิธีการแตกหน่อแบบนี้พบในแบสิดิโอมัยซีดัสยีสต์ และพวกที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้ รวมทั้งยีสต์ใน Class Archiascomycetes (Kurtzman and Sugiyama, 2001อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

- การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน เป็นการเพิ่มจำนวนโดยมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ก่อนแล้วจึงมีผนังกั้นตามขวางแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ พบเฉพาะใน *Schizosaccharomyces*

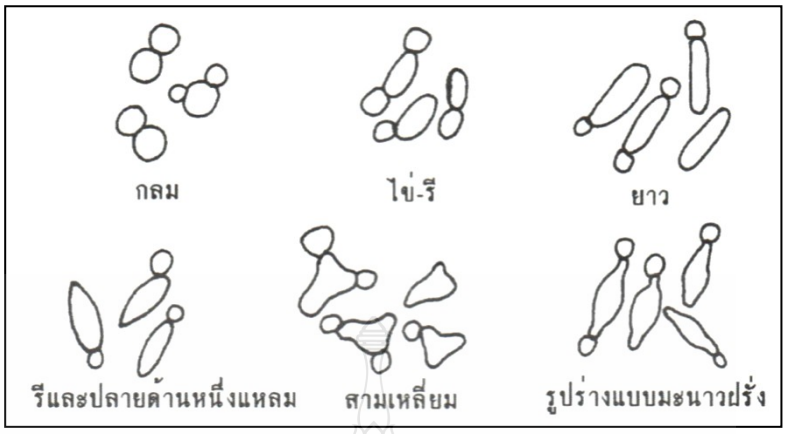
- การสร้างคอนิเดีย การสร้างคอนิเดียแบบต่าง ๆ ดังภาพที่ 2.6 ใช้ในการแยกสกุลยีสต์ คอนิเดียอาจเป็นบอลลิสโทคอนิเดียซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศที่ค่อนข้างจำเพาะ บอลลิสโทคอนิเดียสร้างบนปลายสเทริกมาที่ยื่นออกมาจากเซลล์ พบเฉพาะในแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์บางชนิดมีทั้งที่เกิดทั้งสองด้านของเซลล์แบบสมมาตร (bilateral symmetry) เช่นใน *Klockovaella, Sporidiobolus, Sporobolomyces* และ *Udeniomyces* หรือเกิดรอบเซลล์แบบสมมาตร (rotationary symmetry) เช่นใน *Bullera* สำหรับคอนิเดียบนก้าน (conidia on stalk) เกิดโดยมีโครงสร้างลักษณะเป็นท่อโผล่ออกไปจากเซลล์ 1 ก้าน (stalk) หรือมากกว่า 1 ก้าน พบในสกุล *Sterigmatomyces*

ภาพที่ 2.6 แสดงการแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน คอนิเดียบนก้าน และ บอลลิสโทคอนิเดีย
ที่มา : สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

ยีสต์โดยมากมีการเพิ่มจำนวนแบบอาศัยเพศได้มากกว่า 1 วิธี เช่น *Bullera* เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อหลายขั้ว และสร้างบอลลิสโทคอนิเดีย ส่วน *Kockovaella* เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อหลายขั้ว การสร้างบอลลิสโทคอนิเดีย และการสร้างคอนนิเดียบนก้าน (Nakase, 2001 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ข) ลักษณะของเซลล์

ยีสต์มีรูปร่างเซลล์หลายแบบ เช่น กลม (round, spheroidal, spherical) ค่อนข้างกลม (subglobose) รูปไข่ (oval ovoidal) รี (ellipsoidal) ทรงกระบอก (cylindrical) ยาว (elongated) แหลมหัวแหลมท้ายแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เป็นสาย (filamentous) รีและปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival) สามเหลี่ยม (triangular) และคนโท หรือ ฟลาสก์ (flask) เป็นต้น ดังภาพที่ 2.7 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์นั้นอาจใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวหรือบนอาหารแข็งก็ได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)



ภาพที่ 2.7 รูปร่างของยีสต์แบบต่าง ๆ
ที่มา : สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

สำหรับอาหารเหลวที่นิยมใช้สำหรับศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ คือ malt extract broth หรือ glucose peptone yeast extract (GPY) broth หรือ yeast extract malt extract (YM) broth แต่ยีสต์บางชนิดอาจต้องใช้อาหารเฉพาะ

ส่วนอาหารแช่แข็งก็เช่นเดียวกัน คือ ใช้เพื่อศึกษาทั้งสัณฐานวิทยาของเซลล์และลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง อาหารแข็งที่ใช้มากที่สุด คือ yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar) หรือ glucose peptone yeast extract agar (GPY agar) และ malt extract agar โดยอาจใช้ในรูปของอาหารแข็งเอียง หรือถ้าใช้ morphology agar อาจใช้เทคนิค Dalmau plate หรือ agar-covered slide สำหรับยีสต์บางชนิดอาหารอื่นอาจเหมาะสมกว่า เช่น *Bullera, Cryptococcus, Leucosporidium, Rhodosporidium, Rhodotorula* และ *Sporobolomyces* มักอยู่ได้นานกว่าบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (Barnett et al., 2000 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ยีสต์มีลักษณะของโคโลนีหลายแบบ เช่น เป็นเมือก (mucoid) ซึ่งมักแสดงว่ามีการสร้างแคปซูล ส่วนการเกาะกันเป็นก้อนเหนียวมักจะสัมพันธ์กับการสร้างเส้นใยเทียมหรือเส้นใยแท้ สำหรับสีของโคโลนีนั้นยีสต์ส่วนใหญ่จะมีโคโลนีสีขาว ครีม หรือน้ำตาลอื่น ๆ แต่บางชนิดอาจมีสีเหลือง ส้ม และแดง เช่น *Rhodotorula, Sporobolomyces* และ Phaffia เนื่องจากความสามารถในการสร้างรงควัตถุคาโรทีนอยด์ (carotenoid pigment) สำหรับผิวหน้าของโคโลนีมีหลายแบบเช่นกัน เช่น เรียบ (smooth) หยาบ (rough) เป็นส่วนของวงกลมที่ตัดออกโดยเส้นรัศมีสองเส้น (sector) ด้าน (dull) และเป็นมันวาว (glistening) ยีสต์บางชนิดอาจมีโคโลนีแบนราบ (flat) กระจายทั่วไป (spreading) และนูน (raised) นอกจากนั้น ขอบของโคโลนีอาจเรียบ โค้งเว้า (lobate) ขอบไม่เรียบคล้ายรากพืช (rhizoid) และเป็นคลื่น (undulating)

ในการการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์นั้น เพื่อให้ได้ผลที่เหมือนกันทุกครั้ง ควรต้องใช้สภาวะมาตรฐาน คือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่รู้องค์ประกอบทางเคมี และ ศึกษาเซลล์ในระยะเอกซ์โพเนนเชียล เนื่องจากสัณฐานวิยาของเซลล์ยีสต์มักผันแปรตามระยะการเจริญและอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ (Barnett et al., 2000 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

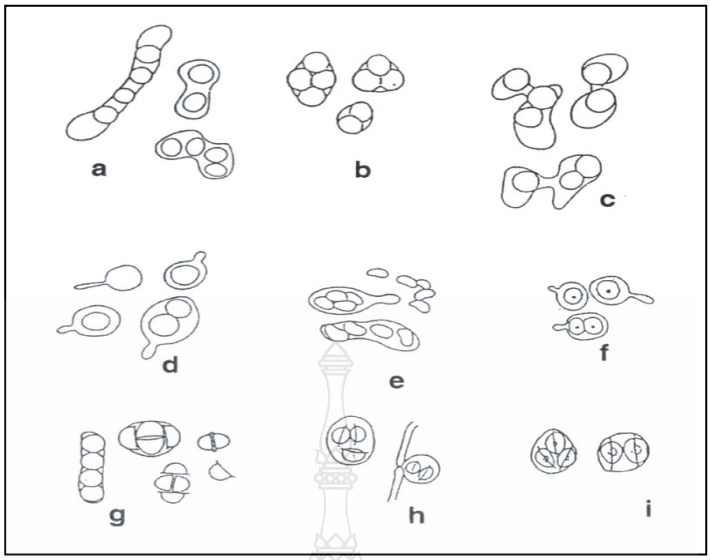
ค) ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมี 2 กลุ่ม คือ แอสโคมัยซีตัสยีสต์ และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์

- **ลักษณะการสร้างแอสโคสปอร์** เนื่องจากยีสต์ที่สามารถสืบพันธุ์โดยการสร้างแอสโคสปอร์นั้นมีทั้งพวกที่เป็นโฮโมทาลลิกซึ่งวงจรชีวิตอาจเป็นแฮพลอนติก (haplontic) ดิพลอนติก (diplontic) และดิพลอแฮพลอนติก (diplohaplontic) กับพวกที่เป็นเฮเทอโรทาลลิก ดังนั้นการเกิดแอสโคสปอร์จะมีความแตกต่างกัน

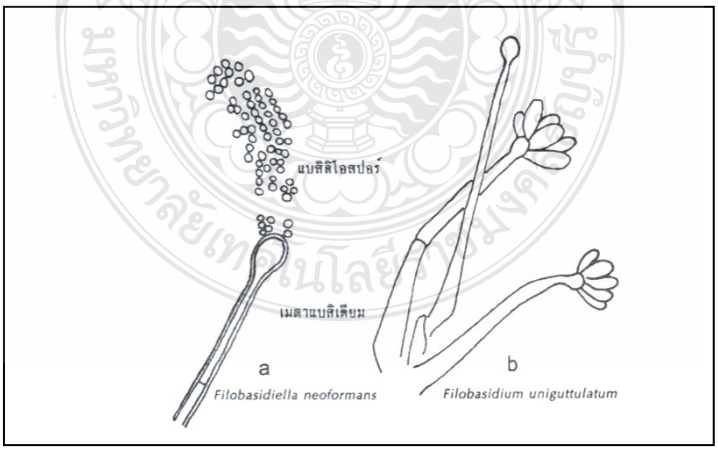
แอสโคสปอร์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี รูปถั่ว (reniform) ทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical with obtusen ends) รูปหมวก (hat) รูปหมวกทหาร (helmet) รูปกระสวยและมีระยางค์ (spindle with appendages) และรูปดาวเสาร์ (Saturn, saturniform) ผิวของแสโคสปอร์อาจมีลักษณะเรียบ บาง หนา และขรุขระ หรือเป็นรอยยักที่ผิว (warty) ดังภาพที่ 2.8 นอกจากนั้น การเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส สี ขนาด และจำนวนของแอสโคสปอร์ต่อแอสคัสซึ่งอาจมีตั้งแต่หนึ่งจนถึงหลายแอสโคสปอร์มีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์

- **ลักษณะการสร้างแบสิดิโอสปอร์** สำหรับการสร้างแบสิดิโอสปอร์ในแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ดังภาพที่ 2.9 ที่มีวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิกนั้น เริ่มจากเกิดคอนจูเกชันของเซลล์ยีสต์ที่ต่างเมติงไทป์ 2 เซลล์ สร้างเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียสและมักมีการเชื่อมแคลมป์ จากนั้นนิวเคลียสเกิดการรวมกันและเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสในแบสิเดียม โดยหลังจากเกิดไมโทซิสแล้วแบสิเดียมอาจยังคงเป็นเซลล์เดียวที่เรียกว่า โฮโลแบสิเดียม



ภาพที่ 2.8 รูปร่างของแอสคัสและแอสโคสปอร์ (a) กลมและค่อนข้างรี; *Schizosaccharomyces pombe* (b) กลมและรูปไข่; *Saccharomyces cerevisiae* (c) กลมและรูปไข่ (d) (e) รูปไต (ปล่อยออจากแอสคัส); *Kluyveromyces marxianus*, (f) กลมและผนังเป็นรอยยักที่ผิว (g) รูปร่างเป็นหมวกทหาร (helmet-shaped) หรือรูปร่างครึ่งวงกลม (hemispherical); *Pichia membranaefaciens*, (h) รูปร่างเป็นหมวก (hat-shaped); *Saccharomycopsis fibuligera* และ (i) รูปร่างเป็นดาวเสาร์ (Saturn-shaped) และผิวเรียบ; *Williopsis saturnus*

ที่มา : Nakase (2001) โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Takashi Nakase
อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)



ภาพที่ 2. 9 แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์แสดงการสร้างโฮโลเมตาแบสิเดียมโดยไม่มีการสร้างเทลิโอสปอร์
ที่มา : วาดจากภาพถ่ายใน Fell *et al*. (2001) อ้างในสาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

2.4.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ คือ การหมักคาร์โบไฮเดรตและการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน การเจริญบนแหล่งไนโตรเจน ความต้องการวิตามิน การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลหรือเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง การไฮโดรไลซ์ยูเรีย และความทนต่อสารปฏิชีวนะ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.4.2. ความสามารถของเกณฑ์อนุกรมวิธานต่าง ๆ ในการแยกระดับอนุกรมวิธาน

เกณฑ์อนุกรมวิธานถูกนำมาใช้ในการจัดระดับอนุกรมวิธานที่หลายหน่วยอนุกรมวิธาน ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ สปีชีส์ สกุล วงศ์ อันดับ และชั้น เช่น สัณฐานวิทยามีความสำคัญลดลงแต่ยังคงมีความสำคัญในกรณีที่ศึกษายีสต์ที่มีชีวิต ส่วนลำดับของเบสในยีน สามารถใช้ในทุกระดับของอนุกรมวิธานถ้าเลือกใช้โมเลกุลหรือบริเวณของโมเลกุลที่เหมาะสม และสำหรับดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชันเป็นเกณฑ์ที่ใช้ตัดสินระดับสปีชีส์ร่วมกับ interferity

2.4.3 การจำแนกประเภทแอสโคมัยซีตัสยีสต์

แอสโคมัยซีตัสยีสต์มีทั้งสกุลที่มีเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่าสกุลอะนามอร์ฟิก (anamorphic genus) และสกุลที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่าสกุลเทลีโอมอร์ฟิก (teleomorphic genus) โดยกระจายอยู่ใน 3 ชั้น ของ Phylum Ascomycota (Kurtzaman and Fell, 1998; Kurtzman and Sugiyama, 2001 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ทั้ง 3 ชั้น คือ

Class 1 ***Archiascomycetes*** แบ่งเป็น 4 อันดับ คือ Taphrinales, Protomycetales, Pneumocystidales และ Schizosaccharomycetales

Class 2 ***Euascomycetes*** ชั้นนี้ประกอบด้วยเพียง 2 สกุล คือ *Endomyces* ซึ่งเฉพาะ *E. scopularum* เท่านั้นที่จัดอยู่ในชั้นนี้ และอีกสกุลหนึ่ง คือ *Oosporidium*

Class 3 ***Hemiascomycetes*** สำหรับชั้นนี้หลังจากการเปลี่ยนแปลงขณะนี้ประกอบด้วยยีสต์ที่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อและสกุลที่คล้ายยีสต์ เช่น *Ascoidea* และ *Cephaloascus* ซึ่งแต่เดิมอยู่ใน Order Endomycetales ชั้นนี้มี 1 อันดับ คือ Saccharomycetales ประกอบด้วย 15 สกุล ซึ่งรวมทั้ง *Debaryomyces, Pichia, Saccharomyces, Torulaspora* และ *Zygosaccharomyces* สำหรับวงศ์

Candidaceae ประกอบด้วย 12 สกุล และทุกสกุลเป็นระยะที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น *Candida* (163 สปีชีส์), *Geotrichum, Kloeckera* และ *Trigonopsis*

2.4.4 การจำแนกประเภทแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์

แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์มีทั้งสกุลที่มีเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและสกุล ที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเช่นเดียวกับยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ ลักษณะที่สำคัญของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ คือ ระยะที่มีการเจริญจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างกลม รี หรือยาว เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติก เอนเทอโรบลาสติกบลาสโทคอนิเดีย (enteroblastic blastoconidia) ฟิสชัน หรือสร้างอาร์โทรคอนิเดีย และ/ หรือสร้างบอลลิสโทคอนิเดีย มีการแตกหน่อที่ขั้วโดยอาจเป็นการแตกหน่อขั้วเดียวหรือแตกหน่อสองขั้ว รวมทั้งอาจพบเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียส มีการเชื่อมแคลมป์มีการแตกกิ่งก้านฮอสโทเรียล (haustorial branch) เทลิโอสปอร์และแบสิเดียม

การจำแนกสกุลของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในขณะนี้อาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีใช้ในการจำแนกสปีชีส์ด้วย สำหรับลักษณะสำคัญในแต่ละชั้นมีดังต่อไปนี้ (Boekhout et al., 1998; Barnett et al., 2000; Fell et al., 2001อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

Class 1 ***Urediniomycetes*** มีผนังกั้นเป็นแบบมีรูธรรมดา หรือแบบเหมือนไดอะแฟรม (diaphragm like) และไม่มี Woronin body ในไฮโดรไลเสตของเซลล์มีแมนโนสมากที่สุด ไม่พบไซโลส แต่อาจพบฟรุคโตส กาแลกโทส และ/หรือแรมโนส ไม่สร้างสารประกอบคล้ายแป้งออกมานอกเซลล์ ไม่ใช้ อินอซิทอล ส่วนใหญ่มีโคเอนไซม์ Q-9 และ Q-10 ยกเว้น *Reniforma strues* ที่มี Q-7

Class 2 ***Hymenomycetes*** สมาชิกในชั้นนี้เส้นใยมีผนังกั้นเป็นแบบโดลิพอร์ ไฮโดรไลเสตของเซลล์มีกลูโคส แมนโนส และไซโลส มักแอสซิมิเลตอินอซิทอล สปีชีส์ส่วนใหญ่สร้างสารประกอบคล้ายแป้งได้

Class 3 ***Ustilaginomycetes*** ผนังเซลล์ประกอบด้วยกลูโคสปริมาณมากที่สุดมีกาแลกโทสและแมนโนส ไม่มีไซโลสและมักไม่มีแรมโนสหรือฟูโคส ผนังกั้นเส้นใยเป็นแบบเหมือนไมโครพอร์ (micropore like) มีโคเอนไซม์ Q-10 ยกเว้นใน *Malassezia* ที่มี Q-9 ไม่สร้างสารประกอบคล้ายแป้ง

แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ที่มีเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในขณะนี้มี 2 วงศ์ คือ Cryptococcaceae ที่มี *Cryptococcus* เป็น type genus และ Sporobolomycetaceae

ที่มี Sporobolomyces เป็น type genus ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงใกล้ ๆ นี้ โดยเฉพาะ *Sporobolomycetaceae* คาดว่าต่อไปจะไปรวมอยู่ในพวกที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่วนกลุ่มที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นแบ่งเป็น 11 อันดับ (Boekhout et al., 1998 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) รายละเอียดของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ แสดงในตารางที่ 2.3

2.4.5 การจัดจำแนกยีสต์

สำหรับการจัดจำแนกยีสต์ (indentification of yeasts) นั้น เริ่มด้วยการนำยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปศึกษาลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์สำหรับอนุกรมวิธาน

2.4.5.1 การจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีดั้งเดิม

การจัดจำแนกโดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) นั้น ใช้ลักษณะตามเกณฑ์ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น สำหรับขั้นตอนการจัดจำแนกที่แนะนำไว้มีดังนี้

1) ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อที่ต้องการจัดจำแนกตามวิธีในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) และ/หรือ Yeasts: Characteristics and Identification (Barnett et al., 2000 อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2) นำผลจากการศึกษาลักษณะต่าง ๆ มาเทียบกับ key ในหนังสือ 2 เล่มข้างต้น หรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการจัดจำแนก เพื่อประเมินว่ายีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกนั้นจะเป็นชนิด (สกุล/สปีชีส์) ใด

3) เมื่อประเมินได้ว่าจะเป็นชนิด (สกุล/สปีชีส์) ใดแล้ว นำลักษณะทั้งหมดของยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกมาเปรียบเทียบกับลักษณะของยีสต์ชนิด (สกุล/สปีชีส์) ที่ได้จากการประเมิน

4) ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกกับยีสต์ชนิด (สกุล/สปีชีส์) ที่ได้จากการประเมิน เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลการทดลอง

5) สำหรับผลการจัดจำแนกนั้น ถ้าลักษณะทั้งหมดเหมือนกันก็สามารถจัดจำแนกเป็นชนิด (สุกล/สปีชีส์) ที่ประเมินไว้นั้น แต่ถ้าลักษณะของยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกใกล้เคียงแต่ไม่เหมือนกันทั้งหมดกับลักษณะของยีสต์ชนิด (สกุล/สปีชีส์) ที่ประเมินไว้ ให้ลองตรวจสอบกับ สปีชีส์ที่พบใหม่จากวารสาร และทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอรีแอสโซซิเอชัน และ/หรือทดสอบ interfertility กับยีสต์ชนิด (สกุล/สปีชีส์) ที่ประเมินไว้นั้น รวมทั้งอาจศึกษาโลจีนีระดับโมเลกุลเพื่อช่วยในการจัดจำแนกเชื้อต่อไป

2.4.5.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยใช้ชุดทดสอบที่ผลิตเป็นการค้า

ปัจจุบันมีชุดทดสอบผลิตขึ้นมาเพื่อเป็นการค้า (commercially product kits) สำหรับการจัดจำแนกยีสต์จำนวนหลายชนิดจากหลายบริษัท โดยเฉพาะยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์ ซึ่งต้องการผลการจัดจำแนกเร็วเนื่องจากมีผลต่อการรักษาดูแลผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการจะใช้ชุดทดสอบเหล่านี้ในการจัดจำแนกยีสต์ชนิดอื่นต้องอยู่ในดุลพินิจของผู้ใช้

ตารางที่ 2.3 สกุลของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในชั้นต่าง ๆ

ชั้น	สกุลที่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ	สกุลที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ
Hymenomycetes	*Bulleromyces*	*Bullera*
	Cystifilobasidium	*Crytococcus*
	Fibulobasidium	*Fellomyces*
	Filobasidium	*Kockovaella*
	Filobasidiella	*Phaffia*
	Holtermannia	*Trichosporon*
	Itersonilia	*Tsuchiyaea*
	Mrakia	*Udeniomyces*
	Sirobasidium	
	Sterigmatosporidium	
	Tremella	
	Xanthophyllomyces	
Urediniomycetes	*Rhodosporidium*	*Bensingtonia*
	Leucosporidium	*Kurtzmanomyces*
	Kondoa	*Rhodotorula*
	Sporidiobolus	*Sporobolomyces*
	Sakaguchia	*Sterigmatomyces*
	Mastigobasidium	
	Erythrobasidium	

ตารางที่ 2.3 สกุลของแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ในชั้นต่าง ๆ (ต่อ)

ชั้น	สกุลที่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ	สกุลที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ
Ustilaginomycetes	*Ustilago*	*Malassezia*
	Tilletia	*Pseudozyma*
		Rhodotorula (in part)
		Sympodiomycopsis
		Tilletiopsis

ที่มา : ได้รับความอนุเคราะห์จาก Nakase (2001) อ้างใน สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

2.4.6 วิธีการระบุชนิดโดยใช้อณูชีววิทยา

การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) คือ วิธีการสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบที่เป็นเอกลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต วิธีการเหล่านี้ช่วยให้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้

วิธีการระบุชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอ (DNA typing methods) ที่สำคัญประกอบด้วยคารีโอไทปิง (karyotyping) โดยใช้ pulsed field gel electrophoresis (PFGE) การวิเคราะห์ยีโนมโดย random amplified polymorphic DNA (RAPD) การวิเคราะห์ amplified fragment length polymorphism (AFLP) การวิเคราะห์ restriction fragment length polymorphism (RELP analysis) ของ amplified ribosoma DNA และการวิเคราะห์ Microsatellite

2.4.6.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

RFLP เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้บอกความเหมือนหรือแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ วิธีนี้อาศัยการวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) แล้วนำไปแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (agarose gel electroresis) จากนั้นถ่ายชิ้นดีเอ็นเอจากเจลโดย Southern blotting และตรวจโดยตัวติดตามที่ติดฉลาก (label probe) หรือตรวจโดยใช้วิธีอื่นซึ่งไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งตัวติดตามอาจจะเตรียมเพื่อตรวจสอบยีนชนิดใดก็ได้ เช่น ยีนกำหนดการสร้าง tRNA เอนไซม์หลายชนิดและ transposable element เอนไซม์ตัดเฉพาะทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอจำนวนมากที่มีขนาดต่าง ๆ กันเป็นผลให้แบบรูปของแถบบนเจลมีความแตกต่างกัน วิธีนี้จึงมีประโยชน์ในการจัดจำแนกยีสต์ระดับสกุล สปีชีส์ สายพันธุ์ และพันธุ์

2.4.6.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

RAPD เป็นวิธีหนึ่งสำหรับตรวจหาความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ วิธีนี้อาศัยการเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เนื่องจากการเพิ่มจำนวนเป็นแบบสุ่มทำให้แบบรูปของ RFLP ที่ได้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้น เช่น อุณหภูมิ จำนวนรอบในการเพิ่มจำนวน ความเข้มข้นของ Tag polymerase และชนิดของเครื่อง DNA Thermal cycle ที่ใช้ สำหรับการจัดจำแนกยีสต์ระดับสปีชีส์และสายพันธุ์นั้นในกรณีที่แบบรูป RAPD ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้อาจใช้แบบรูปที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะแล้วนำชิ้นดีเอ็นอีที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี RAPD ไปตรวจหาลำดับเบส

วิธี RAPD นี้ มีการนำไปใช้สำหรับการจัดจำแนกเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ซึ่งมีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น *Malassezia furfur* และ *Cryptococcus neoformans* และในบางสปีชีส์ที่ไม่ใช่เชื้อโรค

2.4.6.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

AFLP เป็นเทคนิคสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งอาศัยการเลือกเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ PCR ด้วยการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด จากนั้นนำดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็น adaptor (dsDNA-adaptor) มาต่อเข้ากับปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มจำนวนโดย PCR สำหรับการทำ PCR ใช้ไพรเมอร์สองชนิดที่เข้าคู่กันได้กับลำดับเบสบน adaptor และลำดับเบสของตำแหน่งที่ตัด (restriction site) จากนั้นใช้นิวคลีโอไทด์คัดเลือก (selective nucleotide) ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอขยายยาวออกทางปลายด้าน 3 นิ้วของไพรเมอร์ ด้วยวิธีนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันกับ นิวคลีโอไทด์ที่เลือกเท่านั้นที่เพิ่มจำนวนได้ ต่อจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย PCR ไปวิเคราะห์ด้วยเมื่อนำแบบรูปของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละเชื้อมาเปรียบเทียบกันจะบอกความแตกต่างกันได้ ความแตกต่างนี้แสดง polymorphism ของดีเอ็นเอ ซึ่ง polymorphism ที่ตรวจพบในลายพิมพ์ รวมทั้งการกลายที่ทำให้ตำแหน่งที่ตัดหายไปหรือเกิดขึ้นมาเพิ่ม การแทรก การขาดหายไป หรือการเปลี่ยนเบสระหว่างตำแหน่งที่ตัดทั้งสอง

2.4.6.4 การวิเคราะห์ Microsatellite (เสาวลักษณ์ ด่านสกุล, 2546)

Microsatellites หรือ SSRs (Simple Sequence Repeats) หรือ STRs (Short Tandem Repeats) เป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดความยาวประมาณ 1-10 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลักษณะเรียงต่อซ้ำๆ กันอย่างต่อเนื่องในลักษณะ tandem repeats กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม ลำดับเบสซ้ำๆ กันนี้ เป็นองค์ประกอบสำคัญของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และลำดับเบสดังกล่าวจะมีความแตกต่างของความยาวค่อนข้างสูง อันเนื่องมาจากความผิดพลาดในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้แก่ การเกิด slipped-strand misparing หรือ replication slippage และการผิดพลาดในขั้นตอน crossing over ในกระบวนการไมโอซิส ทำให้การวิเคราะห์ microsatellites แสดงถึงระดับความหลากหลายระหว่างสปีชีส์ และภายในสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาไพร์เมอร์ที่จำเพาะที่อยู่บริเวณทั้งสองข้างของดีเอ็นเอชุดซ้ำๆ เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวในการศึกษาโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือความหลากหลายของดีเอ็นเอ โดยอาศัยความแตกต่างในด้านความยาวของดีเอ็นเอ หรือความแตกต่างของปริมาณหรือหน่วยที่เป็น tandem repeats หรือที่เรียกว่า Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)

ข้อดีที่สำคัญของวิธีนี้ก็คือมีความเสถียรในการทำซ้ำ (Masneuf-Pomarède *et al*., 2006) เพราะการวิเคราะห์ความหลากหลายดังกล่าวจะใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) ด้วยเหตุนี้เองจึงใช้อุณหภูมิสูงในขั้นตอนการ annealing เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอสายสั้นๆ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยังสามารถถูกนำมาใช้เพื่อแสดงความยาวของอัลลีล (allele) และให้ข้อมูลในเชิงปริมาณแทนที่จะเป็นเพียงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ RAPDs และ AFLP วิธีนี้ยังสามารถวิเคราะห์ได้ทีละหลายๆ ตัวอย่าง และหลายๆ ตำแหน่ง ผลการวิเคราะห์บริเวณตำแหน่ง microsatellite เดียวกันของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย เนื่องจากความแตกต่างของวิธีการ (ไพร์เมอร์ที่ติดฉลากด้วย fluorescein และการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ กับการย้อมเจลด้วย silver) แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้นสามารถที่จะแก้ไขได้ง่ายๆ โดยการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเดียวกันในการเปรียบเทียบ (Techera *et al*., 2001)

2.4.7 การคัดแยกยีสต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์

2.4.7.1 วิธีการแยกยีสต์ การแยกยีสต์มีหลายเทคนิคขึ้นกับลักษณะของตัวอย่างที่นำมาแยกดังนี้

1) การแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเจือจาง (yeast isolation by dilution technique) การแยกเชื้อวิธีนี้จัดเป็นวิธีทางอ้อมโดยการนำตัวอย่างทุกชนิดมาทำเป็นของแขวนลอยหรือสารละลายโดยทั่วไปมักจะใช้เครื่องตีปั่น (blender) ช่วย จากนั้นจึงนำไปสตรีกหรือกระจาย (spread) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อหรือนำไปกรองผ่านเมนเบรนเพื่อให้เซลล์ยีสต์ติดอยู่บนแผ่นกรองเมนเบรน จากนั้นจึงนำแผ่นกรองเมมเบรนนั้นไปวางบนอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ ข้อพึงระวังในระหว่างการทำให้ตัวอย่างเจือจาง คือ ป้องกันการเพิ่มและลดจำนวนของยีสต์ การเพิ่มจำนวนอาจเกิดจากการให้อากาศ (aeration) ทำให้ยีสต์เจริญเพิ่มจำนวน ส่วนการที่ยีสต์ลดจำนวนลงอาจเนื่องมาจากตัวทำเจือจางไม่เหมาะสมทำให้ยีสต์ตาย การลดปัญหาที่ยีสต์เพิ่มจำนวนในระหว่างกระบวนการแยกเชื้ออาจทำได้โดยการใช้ตัวทำเจือจางที่เย็นและทำในสภาวะที่เย็น

2) การแยกยีสต์โดยเทคนิคการเพิ่มจำนวน (yeast isolation by enrichment technique) วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้แยกยีสต์ในตัวอย่างที่มียีสต์จำนวนน้อยโดยการส่งเสริมให้ยีสต์ชนิดหนึ่งเจริญมากกว่ายีสต์ชนิดอื่นหรือจุลินทรีย์อื่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้นับจำนวนยีสต์ในตัวอย่างที่นำมาตรวจได้เพราะยีสต์บางชนิดมีการเพิ่มจำนวนในระหว่างการแยก วิธีปฏิบัติคือใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ส่งเสริมเฉพาะการเจริญของยีสต์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทุกชนิด นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนนาน 12-24 ชั่วโมง หรือจนยีสต์เจริญ นำอาหารเหลวที่มียีสต์เจริญอยู่ไปสตรีกหรือกระจายลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ เมื่อมีโคโลนีของยีสต์เจริญขึ้นมาเก็บโคโลนี และนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์

3) การแยกยีสต์โดยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน (yeast isolation by membrane filtration technique) การแยกเชื้อวิธีนี้อาจจะใช้ทั้งในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวและของแข็ง โดยตัวอย่างที่เป็นของแข็งต้องนำมาทำเตรียมเป็นสารละลายหรือของแขวนลอย สำหรับการกรองนั้นแผ่นกรองเมมเบรนที่ใช้อาจจะต้องมีขนาดของรูกรอง(Pore size) 0.8-1.2 ไมครอน หรือถ้ายีสต์มีขนาดเล็กมากอาจจะต้องใช้ขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่งยีสต์และจุลินทรีย์อื่นที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนแผ่นกรองเมมเบรน จากนั้นจึงนำแผ่นกรองเมมเบรนไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เหมาะสำหรับยีสต์จนกว่าจะมีโคโลนีของยีสต์เจริญขึ้นมา (รุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต และวราวุฒิ ครูส่ง, 2532)

4) การแยกเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อมีการเจริญของเชื้อแล้วการได้เชื้อบริสุทธิ์อาจทำโดยนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมาสตรีกบนอาหารแข็งที่เหมาะสม เช่น อาหารแข็ง YM และอาหารแข็ง YPD ซึ่งลดการปะปนของแบคทีเรียโดยการปรับให้อาหารที่มีสภาพเป็นกรดหรือการเติมสารปฏิชีวนะ ควรตรวจโคโลนีของเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่กำลังแยกเชื้อทุก ๆ วันจนโคโลนีมีขนาดใหญ่พอที่จะเห็นความแตกต่างของโคโลนี การตรวจโคโลนีในจานเพาะเชื้อควรใช้แว่นขยายกำลังขยาย 4 เท่าหรือกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่ำ ๆ เพื่อดูว่าโคโลนีกี่แบบโดยอาศัยสี ขนาด และรูปร่างควรนับจำนวนโคโลนีแต่ละแบบและเลือก 2-3 โคโลนีเป็นตัวแทนสำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์และศึกษาต่อไป โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันและแยกห่างจากกันมาทำการสตรีกซ้ำอีกครั้งทันที หรือเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือถ้าทำไม่ได้ในทันทีให้ถ่ายเชื้อไปยังอาหารแข็งเอียงในหลอดก่อนแล้วจึงนำออกมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ภายหลัง

2.4.7.2 อาหารเลี้ยงยีสต์และสภาวะที่ใช้สำหรับการแยกยีสต์

อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการแยกยีสต์อาจแบ่งเป็นอาหารมาตรฐาน (standard medium) ซึ่งยีสต์ทุกชนิดสามารถเจริญได้ อาหารแสดงความแตกต่าง (differential medium) ซึ่งใช้เมื่อมีการปะปนของจุลินทรีย์อื่นมาก และอาหารคัดเลือก (selective medium) ซึ่งเป็นอาหารชนิดที่ยอมให้ยีสต์น้อยชนิดเจริญ

การใช้อาหารคัดเลือกสำหรับการแยกยีสต์เฉพาะชนิด ถ้าชุมชีพของยีสต์ในแหล่งที่อยู่บางแหล่งมีผู้ศึกษารายละเอียดมากและรู้ว่าสปีชีส์ที่มีจำนวนมากคือ สปีชีส์อะไรบ้างมีความเป็นไปได้ที่จะประเมินจำนวนของยีสต์ที่มีอยู่แม้ว่าจะมีจำนวนน้อย แนวทางนี้เป็นไปได้โดยใช้อาหารสังเคราะห์คัดเลือก (selective synthetic medium) ซึ่งเป็นอาหารที่มีการเพิ่มหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบบางอย่างเพื่อให้เหมาะสมสำหรับยีสต์บางชนิดหรือโดยเลือกให้เหมาะสมตามลักษณะทางสรีรวิทยาหรือชีวเคมีของยีสต์ที่ต้องการแยก

อุณหภูมิสำหรับการแยกยีสต์ สำหรับการเลี้ยงยีสต์ทั่วไปมักบ่มที่ 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อในตอนแยกยีสต์ควรใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติของแหล่งที่เก็บตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างซึ่งเก็บจากขั้วโลก ในระหว่างการขนส่ง การเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อและการบ่มเชื้อควรทำที่อุณหภูมิต่ำระดับ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการแยก *Cyniclomyces guttulatus* ซึ่งพบในมูลกระต่ายต้องบ่มที่ 35-40 องศาเซลเซียสและบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนตัวอย่างจากแหล่งทั่วไปอาจจะบ่มตัวอย่างที่สามอุณหภูมิ คือ บ่มที่ 4 - 15 องศาเซลเซียสสำหรับการแยกยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ บ่มที่ 20-25 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเพื่อแยกยีสต์ที่

สัมพันธ์กับสัตว์เลือดอุ่น (Bouix and Leveau, 1995; Deak and Beuchat, 1996; Fell and Kurtzman, 1996 อ้างในสาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อรรณพ ทัศนอุดม (2551) ได้ศึกษาวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบคุณลักษณะทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ระหว่างขนมตาลที่ผลิตโดยใช้หัวเชื้อกับขนมตาลที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม จากการศึกษาในครั้งนี้จึงพบว่า ปริมาณของเนื้อตาลสุกร้อยละ 60 ของน้ำหนักแป้งข้าวเจ้า โดยหัวเชื้อที่ได้จะมีลักษณะที่ดี คือ โปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ในขณะที่การใช้ปริมาณเนื้อตาลสุกร้อยละ 80 และ 100 ของน้ำหนักแป้งข้าวเจ้า หัวเชื้อที่ได้จะมีลักษณะเนื้อที่แน่นแข็ง ไม่โปร่งเบา ทั้งนี้ขนมตาลที่ได้จากการผลิตโดยใช้หัวเชื้อขนมตาลในทุกสิ่งทดลอง จำเป็นต้องเติมสีผสมอาหารลงไปเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติด้านสี (สีเหลือง) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ขนมตาลที่ผลิตโดยการใช้หัวเชื้อที่มีปริมาณเนื้อตาลสุกร้อยละ 60 ของน้ำหนักแป้งข้าวเจ้า ได้รับคะแนนทางด้านประสาทสัมผัสที่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับขนมตาลที่ผลิตด้วยหัวเชื้อที่มีปริมาณเนื้อตาลสุก ร้อยละ 80 และ 90 ของน้ำหนักแป้งข้าวเจ้า ตามลำดับ และยังพบว่า ขนมตาลที่ผลิตโดยการใช้หัวเชื้อขนมตาลนั้น ยังมีความแตกต่างทั้งในด้านสี กลิ่นหอม รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบรวม เมื่อเปรียบเทียบกับขนมตาลที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม (ไม่ใช้หัวเชื้อขนมตาล) อย่างไรก็ตาม พบว่า หัวเชื้อขนมตาลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้นั้น สามารถนำมาใช้ในการผลิตขนมตาลได้ หากแต่ต้องมีการใช้ร่วมกับสารปรุงแต่งชนิดอื่น ๆ เช่น สีผสมอาหาร และควรต้องมีการพัฒนาสูตรขนมตาลที่เฉพาะให้เหมาะสมกับการผลิตด้วยการใช้หัวเชื้อ ทั้งนี้เพื่อให้ขนมตาลดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับขนมตาลที่ผลิตด้วยวิธีดั้งเดิม

Mohamed and Hamid (1998) ศึกษาส่วนผสมที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพเค้กจากแป้งข้าว และพบว่าการใช้ยีสต์นอกจากจะทำให้เกิดการขึ้นฟูแล้วยังเพิ่มกลิ่นรสให้แก่เค้ก และการใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดการขึ้นฟูจะใช้ระยะเวลาการหมักให้ขึ้นฟูสั้นกว่าการใช้ยีสต์ แต่เค้กที่ได้มีกลิ่นรสน้อยกว่าใช้ยีสต์ นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลจากส่วนผสมอื่นๆต่อคุณภาพของเค้ก จากแป้งข้าวร่วมด้วย เช่น ปริมาณและชนิดของโปรตีน ปริมาณเกลือ และปริมาณไขมัน

Ju and Mittal (1995) ได้ทำการศึกษาแป้งข้าวเจ้าพบว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ จึงทำให้ขนมตาลที่ได้มีความนุ่มและพองตัว โดยที่หน้าขนมตาลไม่แตก เพราะแป้งข้าวเจ้าจะพองตัวโดยไม่แตกแยกออกที่อุณหภูมิ 90 - 95 องศาเซลเซียส ในขณะที่แป้งมันสำปะหลังและหัวสาคูจะแตกแยกออกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 85 องศาเซลเซียส

ธมลวรรณ อารยพันธ์ และคณะ (2550) ได้ศึกษาบทบาทของยีสต์ธรรมชาติต่อการหมักขนมตาล พบว่า บทบาทของยีสต์ที่มีผลต่อการหมักขนมตาลทั้งหมด 4 ประเภท ได้แก่ ขนมตาลที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ยีสต์ ขนมปัง ขนมตาลที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่ใส่ยีสต์ขนมปัง ขนมตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ยีสต์ขนมปัง และขนมตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่ใส่ยีสต์ขนมปัง พบว่า ขนมตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ยีสต์ขนมปัง มีเปอร์เซ็นต์การขึ้นฟูสูงสุดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเกิดการใส่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์ที่มีอยู่ในธรรมชาติของเนื้อตาล คือ *Candida holmii* ในส่วนของผลการทดลองเรื่องศึกษาหาเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติของขนมตาล พบว่า เป็น *Candida holmii* ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ายีสต์ชนิดนี้มีผลทำให้ขนมตาลขึ้นฟู ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการใช้น้ำตาลของ *Candida holmii* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า มีการใช้น้ำตาลที่คล้ายกัน ส่วนการศึกษาจลนศาสตร์ของการเจริญในการหมักขนม พบว่า ในเนื้อตาลธรรมชาติที่มี *Candida holmii* รวมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากที่สุด ส่วนในเนื้อตาลธรรมชาติที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วรวมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีการเจริญเติบโตรองลงมา เนื่องจากยีสต์ที่มีอยู่ในเนื้อตาลธรรมชาติ ได้ผ่านการให้ความร้อน ซึ่งทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อตาล ส่วนในเนื้อตาลที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนและไม่ใส่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก เนื่องจากมีเพียงเชื้อยีสต์ในเนื้อตาลธรรมชาติเพียงอย่างเดียว และในเนื้อตาลที่ผ่านการให้ความร้อนและไม่ใส่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดเลย จากการประเมินทางประสาทสัมผัส (HEDONIC TEST) พบว่า ขนมตาลที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนใส่ยีสต์ขนมปัง มีความชอบรวมมากที่สุด ที่ระดับคะแนน 7.80 เนื่องจากขนมตาลมีลักษณะของเนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติยังคงไว้ของขนมตาล

บุญมา นิยมวิทย์ และพะยอม อัตถวิบูลย์กุล (2547) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในเนื้อตาลสุก พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุลของ *Candida krusei, Sacharomyces* spp., *Kloeckera apiculate* และ *Heseniaspora* spp. โดยผลการวิเคราะห์พบว่า เนื้อตาลที่ทำให้สะเด็ดน้ำก่อนนำไปทำการผลิตขนมตาลจะมีความชื้นร้อยละ 86-92 มีเบต้าแคโรทีนร้อยละ 6.075 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ที่ 5.0-6.0

และของแข็งที่ละลายน้ำได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกน้ำตาล 3.5 บริกซ์ นอกจากนี้พบว่ามีน้ำตาลชนิดอื่น ๆ น้ำมัน และกรดปนด้วย

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ (2543) ได้ศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟู และระยะเวลาการหมักต่อคุณภาพของขนมตาล พบว่า เมื่อลดอัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟู หรือเพิ่มระยะเวลาการหมัก ค่า pH ของเหลวผสมมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของขนมตาลที่ผลิตได้ ค่าความแข็งเฉลี่ยของขนมตาลมีค่าสูงสุด ที่อัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟู 1:1.3 และจากคะแนนความชอบ พบว่า ที่อัตราส่วนของยีสต์ต่อ ผงฟู 1:1.3 มีคะแนนความชอบเฉลี่ยสูงทุกปัจจัย คุณภาพทางประสาทสัมผัส และพบว่า ปริมาณส่วนผสมยีสต์และผงฟูที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 2.3 ที่อัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟู 1:1.3 และหมักเป็นระยะเวลา 45 นาที ได้ขนมตาลที่มีคะแนนความชอบรวมระดับชอบปานกลาง (7.1)

กนก ชวลิตพงษ์ (2542) ได้ทำการวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการผลิตขนมถ้วยฟูและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต วิธีการผลิตลูกแป้งขนมถ้วยฟูและอายุการเก็บ การเตรียมขนมถ้วยฟูแบบชาวบ้าน ขนมที่ได้มีลักษณะไม่ขึ้นฟูและเนื้อแข็งมาก แต่เมื่อเติมยีสต์ขนมปังหรือลูกแป้งขนมถ้วยฟูลงในส่วนผสมหมักทิ้งไว้จะได้ขนมที่มีลักษณะฟูและนุ่มมาก เมื่อเติมไขมันจากกะทิร้อยละ 20 จะได้ขนมที่มีความนุ่มปานกลางและขนมถ้วยฟูจะนุ่มมากขึ้น เมื่อเติมข้าวสุกร้อยละ 40 ผลิตภัณฑ์ที่ได้ เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การผลิตลูกแป้งขนมถ้วยฟูทำได้ 2 วิธีโดยวิธีแรกเตรียมจาก เชื้อบริสุทธิ์ วิธีที่ 2 เตรียมจากลูกแป้ง ข้าวหมากเติมยีสต์สำหรับวิธีแรกเตรียมจาก แป้งข้าวเจ้าที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมกับ *Sacharomyces cerevisiae* 5017 ให้มีจำนวน 4.10 x 105 โคโลนี ต่อกรัม และ *Leuconostoc mesenteroides* ให้มีจำนวน 2.60 x 104 โคโลนีต่อกรัม วิธีที่ 2 เตรียม จากแป้งข้าวเจ้าผสมกับ *Sacharomyces cerevisiae* 5017 ให้มีจำนวน 3.35 x 105 โคโลนีต่อกรัม และ เติมลูกแป้งข้าวหมากร้อยละ 10 ของน้ำหนักแป้ง ทั้ง 2 วิธีนี้หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง และอบแห้ง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลูกแป้งขนมถ้วยฟูที่ได้มีลักษณะรูปทรงครึ่งวงกลม มีสีขาวอมเทาและแห้งมาก ขนมถ้วยฟูที่เตรียมจากลูกแป้งข้าวหมากเติมยีสต์จะให้เนื้อสัมผัสที่นุ่มกว่าขนมถ้วยฟูที่เตรียมจากเชื้อบริสุทธิ์ลูกแป้งขนมถ้วยฟูที่เตรียมจากวิธีที่ 2 สามารถเก็บได้นาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในภาชนะที่ปิดสนิทโดยคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ (2544) ได้ศึกษาอายุการเก็บเนื้อตาลสุกที่ผ่านกระบวนการสเตอริไรเซชัน พบว่า สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 41 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อนำเนื้อตาลสุกที่ผ่านกระบวนการ สเตอริไรเซชันมาผลิตขนมตาลจึงต้องใช้สารที่ช่วยทำให้เกิดการขึ้นฟู ได้แก่ เบเกอร์ยีสต์ และสารเคมีที่ทำให้ขึ้นฟู เช่น เบกิงโซดา ผงฟู และแอมโมเนีย

นฤมล เหลืองนภา (2533) ได้ทำการศึกษาวิธีการผลิต วิธีการเก็บ และการใช้ประโยชน์ของเนื้อลูกตาลสุกผงในขนมไทยบางชนิด โดยการนำลูกตาลมาสกัดเนื้อด้วยน้ำ ใส่ลงในถุงผ้าแขวนค้างคืนไว้ให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 65 องสาเซลเซียส นาน 5 นาที ในอ่างน้ำร้อนผสมกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate) ร้อยละ 0.1 และแป้งข้าวเจ้า ร้อยละ 5 นำของผสมที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องเคลือบแห้ง ตู้อบแห้ง และตู้ลดความชื้น บรรจุถุงพลาสติกในสภาวะที่ต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่า เนื้อลูกตาลสุกผงที่ได้ดูดน้ำได้ดีมาก และมีสีอยู่ในเกณฑ์ดี แต่กลิ่นลดน้อยลงมาก ผลการวิเคราะห์พบว่า มีความชื้นร้อยละ 6.1 เถ้าร้อยละ 1.9 คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 79.6 โปรตีน ร้อยละ 3.3 และเบต้าแคโรทีน ร้อยละ 53.792 หน่วยสากล เมื่อบรรจุในถุงอลูมินัมภายใต้สุญญากาศ หรือในกระป๋องที่ดึงอากาศออกหมดแล้ว จะสามารถเก็บได้มากกว่า 3 เดือน โดยที่กลิ่นลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อต้องการนำมาทำขนมให้เติมน้ำลงไปประมาณ 7 เท่าของน้ำหนักเนื้อลูกตาลสุกผง และปริมาณที่ใช้ร้อยละ 20 สำหรับขนมบัวลอย หรือร้อยละ 30 ของขนมตาล

สมศรี ลีปิพัฒนาวิทย์ (2529) ได้ทำการวิจัยเรื่องจุลินทรีย์ในผลตาลสุก เชื้อยีสต์อยู่ 4 สายพันธุ์ ในเนื้อตาลสุก คือ *Candia krusei*, Saccharomyces spp, *Kloeckera apiculata* และ *Hanseniaspora* spp ซึ่งยีสต์เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการหมัก สามารถเปลี่ยนน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในระหว่างการหมักยีสต์จะเจริญเติบโตทำให้โดมีความยืดหยุ่น และมีโพรงอากาศ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เนื้อตาลสุก

3.1.2 แป้งข้าวเจ้า ตราสามเศียร

3.1.3 กะทิสดจากตลาดเคหะ คลองหก

3.1.4 น้ำตาลทราย ตราลิน

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต

3.2.1 อุปกรณ์เครื่องครัว

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.3.1 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ precisa รุ่น xt220A
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อTomy
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ยี่ห้อ Jeiotech
- ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Wiseven
- ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- จานเพาะเชื้อ (Plate)
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Hockey stick)
- ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
- ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
- ถุงพลาสติกปลอดเชื้อสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างทางจุลชีววิทยา

3.3.2 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

- เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR – 10
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัสยี่ห้อ Lloyd รุ่น LRX PLUS
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ eutech instruments
- เครื่องวัดค่า a_w ยี่ห้อ AqualabLITE, 2004 Decagon Devices Inc.

3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (Malt Extract Agar)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar (yeast extract peptone dextrose agar)

3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.4.1 ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตของแหล่งผลิตขนมตาลที่เป็นกรณีศึกษา

ศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตของแหล่งผลิตขนมตาลโดยการสัมภาษณ์ผู้ผลิตขนมตาลที่มีประสบการณ์ 10 ปีขึ้นไปเพื่อใช้ในการคัดเลือกผู้ที่มีประสบการณ์และมีกรรมวิธีการผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม จำนวน 1 โรงงาน ซึ่งสัมภาษณ์ในหัวข้อกระบวนการผลิต ต้นทุนการผลิต และปัญหาที่พบในการผลิต หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการคำนวณต้นทุนการผลิต

3.4.2 ศึกษากระบวนการผลิตพื้นฐานที่ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

ทำการศึกษากระบวนการผลิตพื้นฐานที่ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ (*Saccharomyces cerevisiae*) โดยนำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ทำขนมปังผสมกับน้ำอุ่นทิ้งไว้ครู่หนึ่งให้ยีสต์พองตัว นำไป streak ลงบนอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

หลังจากนั้นนำโคโลนีที่ได้ไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเหลว โดยนำน้ำตาลสดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 จุกด้วยสำลี นำไปฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อยีสต์ขนมปังที่ได้ 1 loop ใส่ลงในน้ำตาลสดที่เตรียมไว้ บ่มไว้ 1 วันโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในน้ำตาลสด จะได้หัวเชื้อเหลวพร้อมใช้นำไปผลิตขนมตาลแบบดั้งเดิม

จากการศึกษาของ (ปริญญา ฝาระมี และคณะ, 2554) ได้ทำการทดลองผลิตขนมตาลที่ไม่เติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อปริมาณร้อยละ 2 โดยประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสพบว่าขนมตาลทั้ง 2 สิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกันในด้าน สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ดังนั้นจึงทำการทดลองนำกล้าเชื้อเหลวที่ได้ มาผลิตขนมตาลดังตำรับและวิธีการที่แสดงใน ภาคผนวกที่ ก - 1 โดยใช้ปริมาณ

กล้าเชื้อเหลวร้อยละ 2, 4 และ 6 นำขนมตาลที่ได้ไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน ใช้แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9 Point Hedonic scale Test) ในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยดูค่าคะแนนความชอบสูตรที่มีค่าความชอบมากที่สุด เพื่อหาปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม

3.4.3 การคัดแยกยีสต์จากเนื้อตาลสุก

นำตัวอย่างเนื้อตาลสุกยีจำนวน 25 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตีในเครื่องตีปั่น (Stomacher) เป็นเวลา 1 นาที (จะได้ความเจือจางที่ 10^{-1}) ดูดสารละลายที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในโซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเขย่า (vortex mixer) จะได้สารละลายที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางถึง 10^{-8}

ดูดสารละลายที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึงที่ระดับความเจือจาง 10^{-8} จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร Malt Extract agar (MEA) โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ จากนั้นใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader) เกลี่ยให้ทั่วจาน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

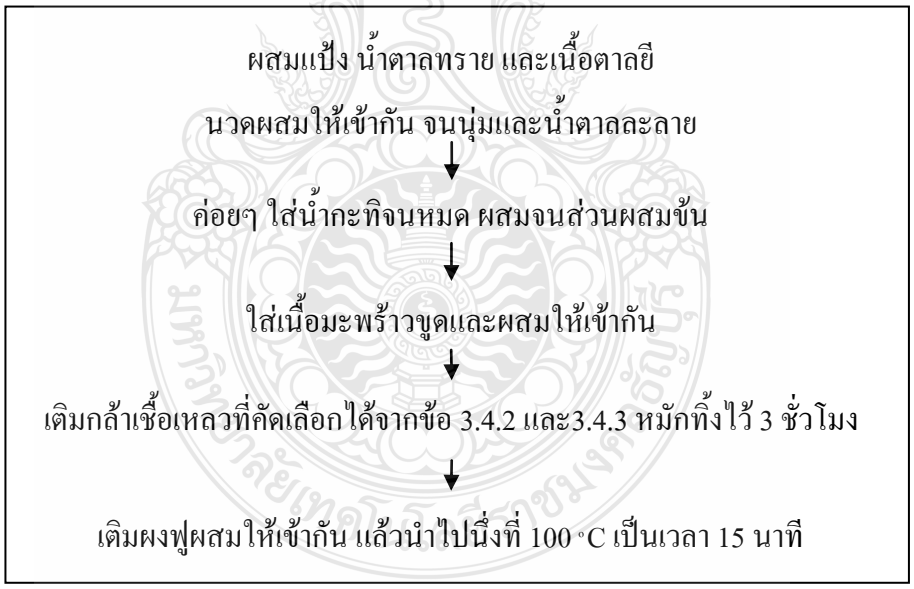
ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกันได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ความมันวาว และลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำโคโลนีที่คัดเลือกได้มาเขี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน ใช้ห่วงเพาะเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนหลอดอาหารเอียง Malt Extract agar

หลังจากนั้นทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักสารประกอบคาร์บอนของยีสต์ที่แยกได้ นำยีสต์ที่คัดแยกได้มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีระดับความขุ่น 0.5 จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยของยีสต์ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับทดสอบการใช้สารประกอบคาร์บอน (fermentation basal medium) ที่มีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) คว่ำอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลการหมักสารประกอบคาร์บอน ที่ 1-7 วัน และที่ 14 วัน เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมัก โดยการสังเกตปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส เพื่อทำการคัดเลือกโคโลนีที่คัดเลือกได้อย่างน้อย 3 - 5 ไอโซเลต ไปเป็นต้นเชื้อโดยทำเป็นกล้าเชื้อเหลวต่อไป

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้ไปเป็นต้นเชื้อโดยทำเป็นกล้าเชื้อเหลวซึ่งมีวิธีการทำคือ นำน้ำตาลสด ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.5 จากนั้นใส่ขวดที่ลวกน้ำร้อนแล้ว บรรจุขณะร้อน ปิดให้สนิทด้วยจุกสำลี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อที่แยกได้จากเนื้อตาล 1 ลูป ใส่ลงในน้ำตาลสดที่เตรียมไว้ บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะได้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 เติมลงในน้ำตาลสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะได้เป็นหัวเชื้อเหลว เพื่อนำไปทดลองทำขนมตาลต่อไป

3.4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตขนมตาล

นำกล้าเชื้อเหลวที่ได้จากข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 ไปผลิตขนมตาลโดยเริ่มจากนำลูกตาลมาปอกเปลือกสีดำออก นำเนื้อตาลที่ปอกเปลือกแล้วมาผสมน้ำ จากนั้นทำการยีตาลด้วยกระชอนตาถี่ และนำไปเทลงในผ้าขาวบางใช้เชือกผูกให้แน่นแล้วแขวนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำเนื้อตาลสุกมาทำขนมตาลตามตำรับที่แสดงในภาคผนวกที่ ก - 1 ตามกระบวนการผลิตดังนี้



ภาพที่ 3.1 กรรมวิธีผลิตขนมตาล โดยใช้กล้าเชื้อเหลวที่คัดเลือกได้

นำขนมตาลที่ผลิตได้มาทดสอบคุณภาพของดังนี้

ก) ทดสอบคุณภาพทางกายภาพ

- ค่าความเป็นกรดด่างของระหว่างการหมัก โดยใช้เครื่อง PH METER
- ค่าสี (L,a*,b*) ด้วยเครื่อง Minolta รุ่น CR-10
- ค่า Water Activity ด้วยเครื่อง Aqualab LITE
- ค่า Springness และ Hardness ของขนมตาลโดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัสด้วย (Texture analyze) รุ่น TA. XT. Plus, UK.
- ค่าการขึ้นฟู (ปริญญา ฝาระมี และคณะ, 2554)

ข) ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำขนมตาลที่ได้ มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้บริโภค จำนวน 30 คน ใช้แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (9 Point Hedonic scale Test) ในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมดังแบบสอบถามแสดงในภาคผนวกที่ ง-2 โดยวางแผนแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อใช้ในการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตขนมตาลต่อไปในสถานประกอบการ

3.4.5 ศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

ศึกษาระยะเวลาโดยการนำกล้าเชื้อเหลวที่ได้รับการคัดเลือกมาผลิตเป็นขนมตาลโดยจัดสิ่งทดลองออกเป็น 4 สิ่งทดลอง คือ

สิ่งทดลองที่ 1 ขนมตาลไม่เติมกล้าเชื้อหมักระยะเวลา 90 นาที
สิ่งทดลองที่ 2 ขนมตาลเติมกล้าเชื้อหมักระยะเวลา 90 นาที
สิ่งทดลองที่ 3 ขนมตาลไม่เติมกล้าเชื้อหมักระยะเวลา 180 นาที
สิ่งทดลองที่ 4 ขนมตาลเติมกล้าเชื้อหมักระยะเวลา 180 นาที

โดย : เติมกล้าเชื้อปริมาณที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 ของน้ำหนักทั้งหมด โดยที่ส่วนผสมอื่นๆ ยังคงที่ดังภาคผนวกที่ ก-1 ตามลำดับ ตรวจสอบคุณภาพโดยวัดการขึ้นฟู (ปริญญา ฝาระมี และคณะ, 2554)

3.4.6 การระบุชนิดของยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตขนมตาล

การระบุชนิดของยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตขนมตาล โดยการศึกษาเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมล D1/D2 ของ 26S rDNA (เสาวลักษณ์ ด่านสกุล, 2552) วิธีการแสดงในภาคผนวก ข.

3.4.7 ทดสอบประสิทิภาพในกระบวนการผลิตและการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในสถานที่ผลิต

นำกล้าเชื้อเหลวที่ได้ ไปผลิตเป็นขนมตาล ณ สถานที่การผลิต อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม โดยทำขนมตาล ตามตำรับและขั้นตอนการผลิต ดังแสดงในภาคผนวกที่ ก - 1 นำขนมตาลที่ได้ไปทดสอบดังนี้

3.4.7.1 การทดสอบการยอมรับในกระบวนการผลิตโดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในสถานที่ผลิต ทดสอบการยอมรับในกระบวนการผลิตโดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เติมลงในกระบวนการผลิตในสถานที่ผลิตอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม และทำการสัมภาษณ์ในหัวข้อต้นทุนการผลิต และวัดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต เพื่อศึกษาการยอมรับและเปรียบเทียบความแตกต่างของขนมตาลแบบดั้งเดิมและขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต

3.4.7.2 ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่โดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ โดยทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธี (Central Location Test: CLT) ณ สถานที่ผลิตอำเภอนครชัยศรี บ้านโรงหวด โดยทดสอบผลิตภัณฑ์ที่เสนอให้พร้อมแบบสอบถาม กับผู้บริโภคที่บริโภคขนมตาลของคุณอรพินท์ ณ บ้านโรงหวด จำนวน 100 คน และใช้แบบประเมินคุณภาพโดยการทดสอบความชอบ Preference test (Paired Preference test) ดังแบบสอบถามแสดงในภาคผนวกค-3 โดยการเสิร์ฟ 2 ตัวอย่างเปรียบเทียบกัน วิเคราะห์ผลโดยใช้ Binomial distribution โดยการเปิดตาราง Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อศึกษาความแตกต่างของขนมตาลแบบดั้งเดิมและขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของผู้บริโภค

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษากระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตของแหล่งผลิตขนมตาลที่เป็นกรณีศึกษา

โดยการสัมภาษณ์ผู้ผลิตขนมตาลที่มีประสบการณ์ และมีกรรมวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม โดยใช้การสัมภาษณ์ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ มาทำการคำนวณต้นทุนการผลิต

จากการสัมภาษณ์ คุณ อรพินท์ หลงผาสุข ซึ่งเป็นผู้ที่ทำขนมตาล ขายในเขต อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม มีประสบการณ์ในการทำขนมตาลแบบดั้งเดิมมาเป็นระยะเวลา 15 ปี โดยจะทำ ขนมตาล 2 - 3 ครั้ง/สัปดาห์ใช้เวลาในการผลิต 5 ชั่วโมงต่อครั้ง และมีรายได้จากขายขนมตาล 500 บาท/วัน โดยกรรมวิธีการผลิตเริ่มตั้งแต่ ยีเนื้อตาลสุก จากผลตาลที่เก็บได้จากตามท้องนา และเก็บไว้ใช้เพื่อทำขนมตาล คั้นกะทิจากการขูดมะพร้าวแก่แล้วนำมาคั้นเอง จนได้เป็นกะทิสดซึ่งในการกระบวนการผลิต จากที่กล่าวมาปัญหาที่พบในการผลิตคือระยะเวลาในการหมักส่วนผสมขนมตาล ซึ่งจะใช้เวลานานถึง 3 ชั่วโมง อีกทั้งบางครั้งการหมักทำให้ขนมตาลมีกลิ่นและรสชาติเปรี้ยวอีกด้วย ในการผลิตขนมตาลมีส่วนผสมและต้นทุนการผลิตดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ต้นทุนการผลิตขนมตาล

ส่วนผสมการผลิต	ต้นทุน (บาท/ก.ก.)	น.น./สูตร (กรัม)	ต้นทุนต่อการผลิต (บาท)
แป้งข้าวเจ้า	36	2,000	72
เนื้อตาลสุก	20	600	12
น้ำตาลทราย	25	1,800	45
กะทิ	30	1,300	39
ผงฟู	70	50	3.5
รวม	211	6,150	171.5

หมายเหตุ : ขนมตาล 1 ตำรับได้ขนมตาล 480 ชิ้น บรรจุถุงละ 8 ชิ้น: หน่วยบริโภค

ค่าวัตถุดิบ	=	171.50 บาท
ค่าโสหุ้ย	=	30% ของค่าวัตถุดิบ
	=	(171.50 × 30) / 100
	=	51.50 บาท
ค่าแรงงาน	=	300 บาทต่อวัน หรือ 37.50 บาทต่อชั่วโมง
	=	37.50 × 5
	=	187.50 บาท
ต้นทุนผลิตภัณฑ์	=	ค่าวัตถุดิบ + ค่าโสหุ้ย + ค่าแรงงาน
	=	171.50 + 51.50 + 187.50
	=	410.50 บาท

ต้นทุนในการผลิตขนมตาลต่อขนมตาลหนึ่งชิ้นเท่ากับ 410.50 บาท/480 ชิ้น ขนมตาล 1 ชิ้น มีต้นทุน 0.85 บาท

ดังนั้นในหนึ่งหน่วยบรรจุ 8 ชิ้น มีต้นทุน 6.80 บาท หรือประมาณ 7 บาท

4.2 ศึกษากระบวนการผลิตพื้นฐานที่ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ (*Saccharomyces cerevisia*)

ผลิตขนมตาลโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 2, 4 และ 6 ไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน ศึกษา ปัจจัยในด้าน ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ได้ผลดังตารางที่ 4.2พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเหลวที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปัจจัยคุณภาพ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ความชอบโดยรวม แต่ในด้านลักษณะปรากฏ ซึ่งมีความแตกต่างกัน พบว่า ขนมตาลที่มีปริมาณกล้าเชื้อ 3 ระดับคือ ร้อยละ 2 และ 4 มีลักษณะปรากฏที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับ ขนมตาลที่มีปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 6 ซึ่งมีค่าคะแนนความชอบ 7.51, 7.30, และ 6.66 ตามลำดับ เพราะว่า การขึ้นฟูของขนมตาลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์ ทั้งนี้ เพราะการหมักแป้ง ยีสต์จะเจริญเติบโตและผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ทำให้เกิดฟองก๊าซภายในแป้งและมีขนาดใหญ่ขึ้น และจะสูญเสียได้ง่ายขึ้นเนื่องจาก ขนมตาลนั้นใช้แป้งข้าวเจ้าจึงไม่เกิดกลูเตนขึ้น เมื่อผสมทำให้ไม่สามารถ เกิดก๊าซได้เหมือนแป้งสาลี (บุญกฤต รัตนพันธ์, 2545) จึงทำให้ลักษณะปรากฏของขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อร้อยละ 2 มี ค่าคะแนนสูงที่สุด

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานผลิตภัณฑ์ขนมตาล ที่ปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน

คุณลักษณะ	ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 2	ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 4	ปริมาณกล้าเชื้อร้อยละ 6
ลักษณะที่ปรากฏ	7.51 ± 1.25^{a}	7.30 ± 1.26^{a}	6.66 ± 1.70^{b}
สี ^{ns}	7.66 ± 1.25	7.65 ± 0.93	7.45 ± 1.25
กลิ่นตาล ^{ns}	7.01 ± 1.32	7.05 ± 0.94	7.23 ± 1.11
รสชาติโดยรวม ^{ns}	7.35 ± 1.13	7.38 ± 0.76	7.31 ± 0.99
เนื้อสัมผัสความนุ่ม ^{ns}	6.91 ± 1.47	7.33 ± 0.89	6.95 ± 1.17
ความชอบโดยรวม ^{ns}	7.30 ± 1.16	7.40 ± 0.84	7.03 ± 1.22

หมายเหตุ : ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 ผลการคัดแยกยีสต์จากเนื้อตาลสุก

จากการคัดแยกยีสต์จากเนื้อตาลสุกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract agar (MEA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน พบว่า สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ Y1-Y10 มีลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลทที่คล้ายคลึงกัน คือ กลม สีขาวขุ่น ผิวมีทั้งมันวาวและด้าน ส่วนใหญ่โคโลนีมีขอบเรียบ โดยแสดงดังตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก พบว่า มีผลคล้ายกับงานวิจัย ของไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ (2552) ทำการแยกเชื้อโดยการเกลี่ยบนจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์จำนวน 13 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ จึงทำการเลือกเฉพาะเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะแตกต่างกันในเบื้องต้นได้จำนวน 10 ไอโซเลท และจากงานวิจัยของ บุญมา นิยมวิทย์ และพะยอม อัตถวิบูลย์กุล (2547) พบว่าในเนื้อตาลสุกมีเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์หลักๆ คือ *Candida krusei, Saccharomyces* sp., *Kloekera apiculata* และ *Henseniaspora* sp. ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 ชนิดนี้ช่วยให้ขนมตาลขึ้นฟูตามธรรมชาติ

ตารางที่ 4.3 ผลการคัดแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
Y1	กลม สีขาวขุ่น ผิวมันวาว ขอบเรียบ	มะนาวฝรั่ง (Apiculate)
Y2	กลม สีขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวด้าน	วงรี (oval)
Y3	กลม สีขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวด้าน	ยาว (elongated)
Y4	กลม สีขาวขุ่น ผิวมันวาว ขอบเรียบ	มะนาวฝรั่ง (apiculate)
Y5	กลม สีขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวด้าน	วงรี (oval)
Y6	กลม ขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวมันวาว	มะนาวฝรั่ง (apiculate)
Y7	กลม ขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวด้าน	วงรี (oval)
Y8	กลม สีขาวขุ่น ตรงกลางนูน ผิวด้าน	กลม (round)
Y9	กลม สีขาวขุ่น ผิวมันวาว ขอบเรียบ	มะนาวฝรั่ง (apiculate)
Y10	กลม สีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบหยักเล็กน้อย	วงรี (oval)

หมายเหตุ : Y1-Y10 เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จากเนื้อตาลสุกทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการหมักสารประกอบคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลการหมักสารประกอบคาร์บอน โดยการสังเกตปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองพบว่า เชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลทสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม W ได้แก่ ไอโซเลท Y1, Y2, Y3, Y5 และ Y7 และกลุ่ม + ได้แก่ Y4, Y6, Y8, Y9 และ Y10 แสดงดังตารางที่ 4.4 จากผลการทดลองพบ 5 ไอโซเลทที่สามารถสร้างก๊าซได้ดีและเร็ว จึงนำไปศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของไพโรจน์วิริยจารี และคณะ (2552) ที่ศึกษาและพบว่า เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ซึ่งระยะเวลาในการหมักน้ำตาลและเกิดก๊าซได้ช้าและเร็วแตกต่างกัน มีผลทำให้การพองตัวและขึ้นฟูของโดมีความแตกต่างกันไปด้วย

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบการสร้างก๊าซของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	ระดับของการหมัก
Y1	W
Y2	W
Y3	W
Y4	+
Y5	W
Y6	+
Y7	W
Y8	+
Y9	+
Y10	+

หมายเหตุ Y1-Y10 = เชื้อยีสต์ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก

\+ = การหมักรุนแรง มีก๊าซเต็มหลอดดักก๊าซภายใน 7 วัน

L = การหมักเกิดขึ้นช้า แต่มีก๊าซเต็มหลอดดักก๊าซอย่างรวดเร็วหลังบ่ม 7 วัน

S = การหมักเกิดขึ้นช้า มีก๊าซเต็มหลอดดักก๊าซหลัง 7 วัน

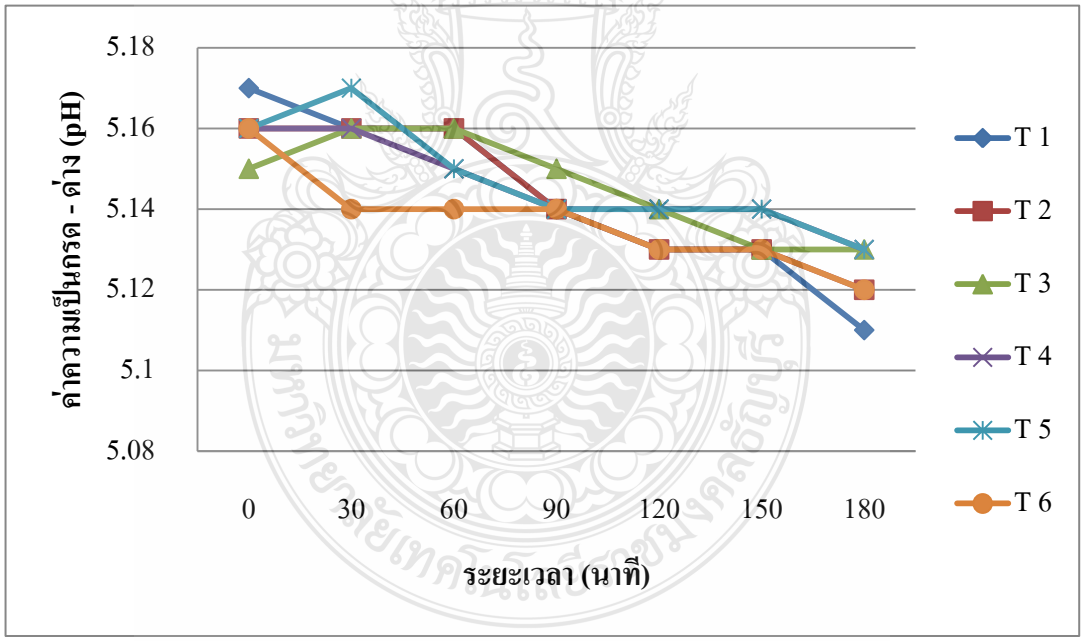
W = การหมักอ่อนมีฟองก๊าซบางส่วนในหลอดดักก๊าซ

\- = ไม่มีการหมัก ไม่มีฟองก๊าซ บางส่วนในหลอดดักก๊าซ

4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตขนมตาล

จากการผลิตขนมตาลเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมโดยการทำการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design CRD) ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเหลวร้อยละ 2 กับกล้าเชื้อเหลวที่แยกได้ทั้งหมด 5 ชนิด ตามที่คัดเลือกจากข้อ 4.4 และกล้าเชื้อเหลวจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากข้อ 4.2 ตามลำดับ นำขนมตาลที่ได้ 6 สิ่งทดลองมาตรวจสอบคุณภาพ ทางกายภาพ และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 ระดับ (9 Point Hedonic Scale Test)

ค่า pH ของ ของเหลวผสมที่ระยะเวลาการหมัก ต่างๆดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มลดลง โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.11-5.17 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงดังกล่าวเป็นช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญได้และสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ มณชัย สังกรานนท์ (2546) รายงานว่า pH เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญ และระบบเมทาบอลิซึมของยีสต์ โดยทั่วไปแล้วยีสต์จะเจริญได้ดีที่สุดที่ pH อยู่ในระดับกรด ที่ประมาณ 4.5-5



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักส่วนผสมทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

หมายเหตุ: T1 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ Y4
T2 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ Y6
T3 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ Y8

T4 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ Y9

T5 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ Y10

T6 ขนมตาลที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อเหลวที่มียีสต์ขนมปัง

การวัดค่าสี และค่า a_w ของขนมตาลจาก 6 สิ่งทดลอง พบว่า ค่าความสว่าง L ค่าสีแดง a^* และสีเหลือง b^* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่า L ที่พบในขนมแสดงถึงค่าความสว่าง (Lightness) มีค่าที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากส่วนผสมมีแป้งเป็นตัวให้สีขาวแทนที่ด้วยเนื้อตาลสีเหลือง ในส่วนค่า a^* ซึ่งเป็นค่าในช่วง 0 - 60 เป็นค่าสีแดง ค่า b^* เป็นค่าแสดงถึงความเป็นสีเหลือง ทั้งนี้สีเหลืองของขนมตาล ได้จาก สารเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารสีเหลืองที่มีอยู่ในเนื้อตาลสุก (อรรณพ ทัศนอุดม, 2552) ดังนั้นในการทดลองนี้ชนิดของกล้าเชื้อไม่มีผลต่อค่าสีที่เกิดขึ้น ค่า a_w พบว่า 6 สิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสีและ a_w ขนมตาลที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลอง / ขนมตาลเติมกล้าเชื้อยีสต์	ค่าสี			a_w ns
	L ns	a* ns	b* ns	
T 1	44.94	8.45	31.65	0.942
T 2	44.38	8.90	30.28	0.945
T 3	45.14	8.30	30.61	0.941
T 4	44.48	8.25	32.43	0.943
T 5	43.48	8.16	31.11	0.943
T 6	42.43	8.68	33.24	0.941

หมายเหตุ : ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ *95*

L* หมายถึง ความสว่างของสีซึ่งมีค่าจาก 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว)

a* หมายถึง ค่าความเป็นสีเขียวและสีแดงโดยมีค่าเป็น - คือ สีเขียวและค่าที่ได้เป็น + คือสีแดง

b* หมายถึง ค่าความเป็นสีเขียวและสีแดงโดยมีค่าเป็น - คือ สีน้ำเงินและค่าที่ได้เป็น + คือสีเหลือง

ลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมตาลที่วัดด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสพบว่า ค่าความแข็ง (Hardness) และค่าความยืดหยุ่น (Springiness) มีความแตกต่างกัน ทางสถิติ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้เกิดจาการใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันมีผลทำให้ค่า Hardness และค่า Springiness มีความแตกต่างกันด้วย ในส่วนการขึ้นฟูมีผลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จากค่า Hardness มีค่าต่ำที่สุดจึงมีความนุ่มสูงที่สุด

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า เนื้อสัมผัส และการขึ้นฟู ขนมตาลที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลอง	ค่า Hardness (กรัม)	ค่า Springiness (มม.)	การขึ้นฟู (มล./กรัม)
T 1	579.48 ± 0.58^{b}	0.87 ± 0.01^{ab}	0.92
T 2	487.94 ± 0.26^{c}	0.84 ± 0.04^{b}	0.91
T 3	602.20 ± 0.73^{bc}	0.85 ± 0.01^{ab}	0.89
T 4	592.31 ± 0.24^{bc}	0.89 ± 0.01^{a}	0.89
T 5	635.81 ± 0.36^{bc}	0.84 ± 0.01^{b}	0.91
T 6	659.93 ± 0.49^{a}	0.83 ± 0.04^{b}	0.91

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อนำขนมตาล 6 สิ่งทดลอง มาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ1 ถึง 9 คะแนน (9 Point Hedonic scale Test) ประเมินปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน ลักษณะปรากฏ สี กลิ่นตาล รสชาติโดยรวม เนื้อสัมผัสความนุ่ม และความชอบโดยรวม ได้ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่า ผลของกล้าเชื้อยีสต์ที่สกัดได้ 5 ชนิด และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งใช้ทำขนมตาลไม่มีความแตกต่างในด้านต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยที่ค่าเฉลี่ยในปัจจัยทุกๆ ด้าน อยู่ในช่วง 7.10 - 7.77 แสดงว่า มีความชอบในระดับ ชอบปานกลาง ดังนั้นเมื่อพิจารณาปัจจัยทางกายภาพ และทางประสาทสัมผัส ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในด้านการวัดเนื้อสัมผัส ในตัวอย่างที่ 2 (T 2) มีค่า Hardness (ความแข็ง) ต่ำสุดจึงเลือกยีสต์ Y 6 ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ ขนมตาล ที่มีกล้าเชื้อยีสต์ต่างกัน 6 สายพันธุ์

คุณลักษณะ	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6
ลักษณะที่ปรากฏ ns	7.42 ± 1.44	7.52 ± 1.18	7.54 ± 1.19	7.55 ± 1.34	7.56 ± 1.19	7.40 ± 1.22
สี ns	7.73 ± 1.19	7.77 ± 0.96	7.64 ± 1.14	7.73 ± 1.17	7.77 ± 1.01	7.77 ± 1.08
กลิ่นตาล ns	7.44 ± 1.32	7.21 ± 1.34	7.22 ± 1.35	7.25 ± 1.54	7.10 ± 1.48	7.34 ± 1.39
รสชาติโดยรวม ns	7.35 ± 1.09	7.46 ± 1.21	7.25 ± 1.37	7.45 ± 1.13	7.38 ± 1.26	7.60 ± 1.28
เนื้อสัมผัสความนุ่ม ns	7.21 ± 1.28	7.05 ± 1.53	7.11 ± 1.50	7.45 ± 1.35	7.23 ± 1.28	7.46 ± 1.46
ความชอบโดยรวม ns	7.26 ± 1.23	7.13 ± 1.41	7.24 ± 1.47	7.50 ± 1.24	7.43 ± 1.24	7.44 ± 1.36

หมายเหตุ : ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.5 การศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

จากการผลิตขนมตาล 4 สิ่งทดลอง เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล พบว่า ขนมตาลทั้ง 4 สิ่งทดลองมีค่า การขึ้นฟูดังแสดงในตารางที่ 4.8 ของขนมตาลเติมกล้าเชื้อหมัก 90 นาทีมีค่าการขึ้นฟูสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อย่างไรก็ตาม ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อหมัก 180 นาที ไม่มีความแตกต่างจากขนมตาลที่เติมเชื้อหมัก 90 นาที และ ขนมตาลไม่เติมกล้าเชื้อหมัก 90 นาที และ 180 นาทีอีกด้วย

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าคะแนนเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่า การขึ้นฟูขนมตาล 4 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลอง	การขึ้นฟู (มล./กรัม)
ไม่เติมกล้าเชื้อ หมัก 90 นาที	0.70 ± 0.06^{b}
เติมกล้าเชื้อ หมัก 90 นาที	0.89 ± 0.05^{a}
ไม่เติมกล้าเชื้อ หมัก 180 นาที	0.72 ± 0.08^{b}
เติมกล้าเชื้อ หมัก 180 นาที	0.80 ± 0.05^{ab}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.6 การระบุสายพันธุ์ของยีสต์

จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 28S rDNA พบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลต Y4, Y6 และY9 คือ *Hanseniaspora guilliermondii* ไอโซเลต Y8 คือ *Pichia kudriavzevii* และไอโซเลต Y10 คือ *Issatchenkia orientalis* ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงสายพันธุ์ของยีสต์ที่ตรวจพบโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

ไอโซเลต	สายพันธุ์	ร้อยละความเชื่อมั่น
Y4	*Hanseniaspora guilliermondii*	99
Y6	*Hanseniaspora guilliermondii*	99
Y8	*Pichia kudriavzevii*	99
Y9	*Hanseniaspora guilliermondii*	99
Y10	*Issatchenkia orientalis*	99

4.7 ผลการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาล

การศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ได้รับการพัฒนาแล้วให้ผู้บริโภคเป้าหมายทดสอบชิม ด้วยการทดสอบผลิตภัณฑ์ขนมตาล พร้อมกับแบบสอบถามโดยใช้วิธี Central Location Test (CLT) กับผู้บริโภคเป้าหมายชาวบ้านในหมู่บ้าน อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม จำนวน 100 คน รวบรวมแบบสอบถามทั้งหมด แล้วทำการประมวลผลค่าเฉลี่ยทางสถิติ ดังนี้

4.8.1 ผลการทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ขนมตาลโดยทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธีการ Central Location Test (CLT)

จากการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ผลิตจากกล้าเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ จากผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมาย จำนวน 100 คน พบว่า ผู้บริโภคเพศหญิงมีมากกว่าเพศชาย คือ เพศหญิง ร้อยละ 72 และเพศชายร้อยละ 28 อายุส่วนใหญ่อยู่ในช่วงมากกว่า 49 ปี คิดเป็นร้อยละ 36 รองลงมาอยู่ในช่วง 18 - 25 ปี คิดเป็นร้อยละ 24 และช่วง 34 - 41 ปี คิดเป็นร้อยละ14 ตามลำดับ ระดับการศึกษาอยู่ในระดับต่ำกว่าปริญญาตรี คิดเป็นร้อยละ 6 ระดับปริญญาตรีคิดเป็นร้อยละ 34 และ ระดับต่ำกว่ามัธยมร้อยละ 36 ตามลำดับ อาชีพอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 35 ค้าขายคิดเป็น

ร้อยละ 16 และ นักศึกษา ร้อยละ 15 ตามลำดับ และมีรายได้ต่อเดือนอยู่ในช่วงน้อยกว่า 5,000 บาท น้อยกว่า 11,000 บาท คิดเป็นร้อยละ 40 และ 23 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ตารางแสดงข้อมูลทางประชากรศาสตร์

หัวข้อ	จำนวนคน	ค่าร้อยละ
1. เพศ		
เพศชาย	28	28.0
เพศหญิง	**72**	**72.0**
2. อายุ (ปี)		
< 18	8	8.0
18 – 25	24	24.0
26 – 33	6	6.0
34 – 41	14	14.0
42 – 49	12	12.0
> 49	**36**	**36.0**
3. ระดับการศึกษา		
< มัธยม	**36**	**36.0**
มัธยมต้น	11	11.0
มัธยมปลาย	5	5.0
อนุปริญญา	7	7.0
ปริญญาตรี	34	34.0
> ปริญญาตรี	7	7.0
4. อาชีพ		
นักเรียน	7	7.0
นักศึกษา	15	15.0
พนักงานวิสาหกิจ	1	1.0
พนักงานบริษัท	5	5.0

ตารางที่ 4.10 ตารางแสดงข้อมูลทางประชากรศาสตร์ (ต่อ)

หัวข้อ	จำนวนคน	ค่าร้อยละ
ธุรกิจส่วนตัว	9	9.0
ค้าขาย	16	16.0
รับจ้าง	12	12.0
อื่นๆ	**35**	**35.0**
5. เงินเดือน		
< 5,000	**40**	**40.0**
5,000 - 7,000	21	21.0
7,001 - 9,000	5	5.0
9,001 - 11,000	11	11.0
> 11,000	23	23.0

ในด้านข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภคขนมตาลและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับความชอบในการรับประทานขนมนั้น ส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 52 มีความชอบอยู่ในระดับชอบ และผู้ที่ชอบรับประทาน ขนมตาลระดับ เฉยๆ คิดเป็นร้อยละ 40 ตามลำดับ ความถี่ในการรับประทานนั้น ส่วนใหญ่รับประทานขนมตาลน้อยกว่า 1 - 2 ครั้ง/สัปดาห์ คิดเป็นร้อยละ 42 รับประทาน 3 - 4 ครั้ง / สัปดาห์ คิดเป็นร้อยละ 11 สถานที่เลือกซื้อขนมตาลส่วนใหญ่ ซื้อจากตลาดสด คิดเป็นร้อยละ 45 รองลงมาซื้อตามร้านขายขนมไทยทั่วๆ ไป คิดเป็นร้อยละ 41 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริภคขนมตาล และทัศนคติ ของผู้ตอบแบบสอบถาม

หัวข้อ	จำนวนคน	ค่าร้อยละ
1. ความชอบในการรับประทาน “ขนมตาล”		
ชอบ	**52**	**52.0**
เฉยๆ	40	40.0
ไม่ชอบ	8	8.0
2. ความถี่ในการรับประทาน “ขนมตาล”		
ทุกวัน	2	2.0
1 - 2 ครั้ง/สัปดาห์	3	3.0
3 - 4 ครั้ง/สัปดาห์	11	11.0
น้อยกว่า 1 - 2 ครั้ง/สัปดาห์	**42**	**42.0**
อื่นๆ	42	42.0
3. สถานที่ในการเลือกซื้อ “ขนมตาล”		
ตลาดสด	**45**	**45.0**
ร้านขายขนมไทยทั่วๆ ไป	41	41.0
ห้างสรรพสินค้า	1	1.0
อื่นๆ	13	13.0

ข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ผลิตแบบดั้งเดิม และขนมตาลที่ผลิตโดยเติมกล้าเชื้อยีสต์ โดยทดสอบความแตกต่างอย่างง่าย ในด้าน ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ได้ผลดังตารางที่ 4.12 พบว่า ในด้านลักษณะปรากฏ สี ของขนมตาลทั้ง 2 สิ่งทดลองไม่แตกต่างกัน 86 และ 80 คน ตามลำดับแสดงว่าด้านลักษณะที่ปรากฏ และสี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้านกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม ของขนมตาลทั้ง 2 สิ่งทดลอง แตกต่างกัน 84, 63, 90 และ 68 คน ตามลำดับ แสดงว่า กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบความแตกต่าง ระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ เติมกล้าเชื้อและไม่ได้เติมกล้าเชื้อ

คุณลักษณะ	จำนวนผู้ตอบ (คน)	
	แตกต่าง	ไม่แตกต่าง
ลักษณะปรากฏ	14	86
สี	20	80
กลิ่นตาล*	84	16
รสชาติโดยรวม*	63	37
เนื้อสัมผัสความนุ่ม*	90	10
ความชอบโดยรวม*	68	32

หมายเหตุ : * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นจากผลการศึกษาดังตารางที่ 4.12 จึงนำขนมตาลไปทดสอบในปัจจัยคุณภาพทั้ง 3 ด้าน คือ กลิ่น เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม โดยวิธีการทดสอบความชอบ Paired Preference Test เพื่อวิเคราะห์หาว่า ขนมตาลสูตรดั้งเดิม และขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ผู้บริโภคมีความชอบสิ่งทดลองไหนมากกว่า ซึ่งผลดังตารางที่ 4.13 พบว่า ในด้าน กลิ่น เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม โดยผู้บริโภคชอบสิ่งทดลองที่ 2 มากกว่าสิ่งทดลองที่ 1 78, 83 และ 84 คน แสดงว่า ผู้บริโภคชอบขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ (สิ่งทดลองที่ 2) มากกว่าขนมตาลแบบดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบ ระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ เติมกล้าเชื้อและไม่ได้เติมกล้าเชื้อชอบตัวอย่างไหนมากกว่า

คุณลักษณะ	จำนวนผู้ตอบ (คน)	
	ชอบตัวอย่างที่ 1 มากกว่า	ชอบตัวอย่างที่ 2 มากกว่า
กลิ่น*	22	78
เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม)*	17	83
ความชอบโดยรวม*	16	84

หมายเหตุ : * หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.8.2 จากการสัมภาษณ์ คุณ อรพินท์ หลงผาสุข หลังจากที่นำกล้าเชื้อไปใช้ในสถานที่ผลิต พบว่า คุณอรพินท์ หลงผาสุข มีความพอใจมาก ในขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ และมีความต้องการที่จะใช้กล้าเชื้อยีสต์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนดังแสดงผลในตารางที่ 4.14 พบว่าขนมตาลที่ใช้กล้าเชื้อเหลวมีต้นทุนลดลงจาก 6.80 บาทเป็น 5.84 บาทต่อหน่วยจำหน่าย อีกทั้งการใช้กล้าเชื้อยีสต์ยังเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการผลิตลงจาก 180 นาที เป็น 90 นาที อีกด้วย

ตารางที่ 4.14 ต้นทุนการผลิตของขนมตาลระหว่างผลิตภัณฑ์ขนมตาลแบบพื้นบ้านและขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อเหลว

ต้นทุน	ขนมตาลแบบพื้นบ้าน (บาท)	ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อเหลว (บาท)
ค่าวัตถุดิบ	171.50	181.50
ค่าโสหุ้ย	51.50	63.50
ค่าแรงงาน	187.50	131
ต้นทุนรวมของผลิตภัณฑ์	410.50	376
ต้นทุนต่อหนึ่งชิ้น	0.85	0.78
ต้นทุนต่อหน่วยจำหน่าย 8 ชิ้น	6.80	6.24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเชื้อยีสต์สำหรับผลิตภัณฑ์ขนมตาล มีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้ ศึกษาการคัดแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล ศึกษาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล และการระบุชนิดของยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตขนมตาล

1. จากการสัมภาษณ์คุณ อรพินท์ หลงผาสุข ซึ่งจะทำขนมตาลจำหน่าย 2 - 3 ครั้ง / สัปดาห์ และมีรายได้จากการขายขนมตาล ประมาณ 500 - 570 บาทต่อวัน ซึ่งต้นทุนในการผลิตแต่ละครั้งจะใช้ต้นทุนเป็นเงินจำนวน 171.50 บาท คิดเป็นต้นทุนต่อหน่วยบริโภค 4.50 บาท / 8 ชิ้น ใช้ระยะเวลาในการผลิตตั้งแต่เวลา 06.00 - 11.30 น.

2. ผลจากการคัดแยกยีสต์จากเนื้อตาลสุกที่ได้มาจาก อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม พบเชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท จึงได้ทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซของยีสต์ ที่แยกได้พบว่ามียีสต์เพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างก๊าซได้ดี จึงได้นำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเหลว เพื่อนำไปทดสอบทำขนมตาล

3. ผลจากการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล โดยนำเชื้อยีสต์ทำ ขนมปัง *Saccharomyces cerevisiae* มาผลิตเป็นกล้าเชื้อเหลวและนำไปทำขนมตาลโดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเหลวในปริมาณร้อยละ 2, 4 และ 6 พบว่า ด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ในด้านลักษณะปรากฏ ตัวอย่างที่ 1 และ ตัวอย่างที่ 2 มีค่าคะแนน 7.51 และ 7.30 ซึ่งแตกต่างจาก ตัวอย่างที่ 3 ซึ่งมีค่าคะแนน 6.66 ดังนั้น จึงเลือกปริมาณกล้าเชื้อที่ปริมาณร้อยละ 2 มาผลิตเป็นขนมตาล

4. ผลจากการนำกล้าเชื้อเหลวที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท และกล้าเชื้อเหลวจากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* รวม 6 สิ่งทดลองมาทำขนมตาลเพื่อคัดเลือกยีสต์ พบว่า ค่า pH ทั้ง 6 สิ่งทดลองอยู่ในช่วง 5.17 - 5.11 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ค่าสี L, a^*, และ b^* ไม่มีความแตกต่างกัน ค่า a_w อยู่ในช่วง 0.941 - 0.945 คาดเดาได้ว่าขนมตาลอาจมีอายุการเก็บ 3 วัน ในอุณหภูมิห้อง จากการศึกษาการวัดค่าเนื้อสัมผัส ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) มีค่า 0.87, 0.84, 0.85, 0.89, 0.84 และ 0.83

ตามลำดับ และค่าความแข็ง (Hardness) มีค่า 579.48, 487.94, 602.20, 592.31, 635.81, และ 659.93 ตามลำดับ แต่ค่าที่ได้จากการทดสอบประเมินทางประสาทสัมผัส ไม่มีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับค่า pH ค่าสี ค่า a_w แต่ในด้านการวัดเนื้อสัมผัส ตัวอย่างที่ 2 มีความแตกต่าง ในด้าน ค่าความแข็ง (Hardness) ซึ่งตัวอย่างที่ 2 มีค่าต่ำสุด ขนมตาลซึ่งมีความนุ่มมากที่สุด จึงได้เลือก ตัวอย่างที่ 2

5. จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาลพบว่า ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อใช้ระยะเวลาการหมัก 90 นาที เป็นขนมตาลที่มีลักษณะ ฟู นุ่ม มากที่สุด โดยค่า การขึ้นฟู เท่ากับ 0.89 ซึ่งมีความแตกต่างจากขนมตาลอีก 3 สิ่งทดลอง ดังนั้น กล้าเชื้อมีผลต่อระยะเวลาการหมักทำให้ความฟูนุ่ม ของขนมตาล จึงเป็นการลดระยะเวลาในการหมักได้จาก 180 นาที เป็น 90 นาที ซึ่งจากการสอบถามผู้บริโภค 100 คน ก็สามารถคาดการได้ว่า ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อ มีความนุ่มกว่าขนมตาลไม่เติมกล้าเชื้อยีสต์ อีกด้วย

6. การระบุสายพันธ์ของยีสต์ พบว่า ในเนื้อตาลสุก มี ยีสต์ทั้งหมด 3 ชนิด คือ *Hanseniaspora guilliermondii Pichia kudriavzevii* และ*Issatchenkia orientalis.*

7. จากการศึกษาการยอมรับโดยนำกล้าเชื้อยีสต์ไปใช้ ณ สถานที่ผลิต และสอบถามโดยการทดสอบความแตกต่างพบว่า ขนมตาลทั้ง 2 ชนิด คือขนมตาลที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิมและขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ มีความแตกต่างกันในด้าน ด้าน คือ กลิ่น เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม จึงได้ทำการศึกษาต่อในด้านปัจจัยคุณภาพ 3 ด้านคือ กลิ่น เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) และความชอบโดยรวม พบว่า ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ ผู้บริโภคมีความชอบมากกว่า ขนมตาลแบบดั้งเดิม ในทุกๆ ด้านดังนั้นผลจากความชอบของผู้บริโภคจึงบอกได้ว่า ขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ มีปัจจัยคุณภาพที่ดีกว่าและมีความชอบมากกว่า ขนมตาลแบบดั้งเดิม กล้าเชื้อยีสต์จึงมีผลต่อการผลิตขนมตาลไปในทิศทางที่ดีกว่า

8. จากการสัมภาษณ์ คุณ อรพินท์ หลงผาสุข หลังจากที่นำกล้าเชื้อยีสต์ไปใช้ในสถานที่ผลิต พบว่า คุณอรพินท์ หลงผาสุข มีความพอใจมาก ในขนมตาลที่เติมกล้าเชื้อยีสต์ และมีความต้องการที่จะใช้กล้าเชื้อยีสต์อีกด้วย หากมีการพัฒนาเพื่อให้ใช้ได้ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตขนมตาลต่อไปเพราะว่าผลการทดลองกล้าเชื้อยีสต์สามารถช่วยลดระยะเวลา และทำให้มีลักษณะของขนมตาลที่ดีขึ้นอีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล พบว่ามีข้อเสนอแนะดังนี้

1. ควรจะมีการทดลองกับสถานประกอบการอื่นๆ อีกเพื่อพัฒนามาเป็นขนมตาลสำเร็จรูปที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ ในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้จริงและมีประสิทธิภาพในการผลิตขนมตาล

2. ในการศึกษานี้ กล้าเชื้อยีสต์จะมียีสต์ที่คัดเลือกได้มีผลที่ดีต่อขนมตาล อาจจะมีการพัฒนากล้าเชื้อยีสต์ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นหากมีการนำกล้าเชื้อยีสต์ชนิดเหลวไปใช้ได้จริงในอุตสาหกรรมขนมตาล ก็จะเป็นสิ่งที่ดีทำให้ขนมตาลที่ได้มีลักษณะ และกลิ่น ที่เป็นขนมตาลแบบดั้งเดิมได้อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บรรณานุกรม

กนก ชวลิตพงศ์. 2542. **ขนมถ้วยฟู**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกื้อกูล จันทร์รัตน์. 2552. **การพัฒนาการผลิตแป้งลูกตาลหมักโดยเทคนิคเชื้อบริสุทธิ์และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย. 2547. **การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อราสกุล *Aspergillus spp.* จากลูกแป้งเหล้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จรุงศักดิ์ ธรรมรักษ์. 2551. ตาลเมืองเพชร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : **http://www.phetchaburi.doae.go.th** [สืบค้นเมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2555]

จิตธนา แจ่มเมฆ และ อรอนงค์ นัยวิกุล. 2539. **เบเกอรี่เทคโนโลยีเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทร ทศานนท์. 2532. **อาหารไทย.** กรุงเทพมหานคร: ศิริวัฒนาอินเตอร์ปริ้นท์.

ดุชณี ธนะบริพัฒน์. 2546. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทัศนีย์ โรจนไพบูลย์. 2532. **ตำรับขนมไทย**. กรุงเทพมหานคร: บริษัท เจเนอรัล บุคส์ เซ็นเตอร์ จำกัด.

ธงชัย พุฒทองศิริ. 2542. **แป้งขนมชั้นสำเร็จรูป.** ปริญญานิพนธ์ปริญญาตรี. สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธมลวรรณ อารยาพันธ์ และคณะ. 2550. **บทบาทของยีสต์ธรรมชาติต่อการหมักขนมตาล**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

นภา โล่ทอง. 2535. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

นฤมล เหลืองนภา. 2533. **การผลิตและการใช้เนื้อลูกตาลสุกผงในขนมไทยบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. **เคมีอาหาร.** กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

นิดดา หงส์วิวัฒน์. 2541. **ขนมตาลภูมิปัญญาชาวบ้าน**. ชุดสารคดีอาหาร: ครัวไทยคนไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แสงแดด.

นิรนาม ข. 2539. **อาหารเป็นอาชีพ ขนมหวาน**. แสงแดด, กรุงเทพฯ.

บุณยกฤต รัตนพันธุ์. 2545. **การศึกษากระบวนการผลิตแป้งขนมตาลสำเร็จรูป**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญมา นิยมวิทย์ และ พะยอม อัตถวิบูลย์กุล. 2547. **ผลิตภัณฑ์จากลูกตาล**. มทป.

ปริญญา ฝาระมี, ชลดา รุ่งเรือง, ธัญญรัตน์ ปัญญายิ่ง . 2554. "การผลิตขนมตาลโดยใช้เชื้อบริสุทธ์ที่คัดแยกได้จากเนื้อตาลสุก". **ปัญหาพิเศษ.** สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ปิฎฐะ บุนนาค. 2535. **ปาล์ม**. บรรณกิจเทรดดิ้ง, กรุงเทพฯ.

พานิชย์ ยศปัญญา. 2544. มะพร้าวพืชสารพัดประโยชน์. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.

ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ. 2552. **การพัฒนาการผลิตแป้งลูกตาลหมักโดยเทคนิคเชื้อบริสุทธิ์และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี (ปีที่ 1)**. เชียงใหม่: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มณชัย เดชสังกรานนท์. 2546. **คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและสาโท**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณเฑียร ศุภลักษณ์. 2541. **ตำนานขนมไทย**. บริษัทเอส.ที.พี.เวิลด์ มีเดีย จำกัด, จตุจักร, กรุงเทพฯ.

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์. 2543. **การศึกษาคุณภาพของเนื้อลูกตาลสุก และขนมตาลที่ผลิตจากเนื้อตาลสุกผ่านกระบวนการพาสเจอไรเซชั่น.** ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2544. **การพัฒนาแป้งข้าวเจ้าและส่วนผสมสำเร็จรูปในการผลิตขนมตาลเพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็ก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มนัสนันท์ บุญทราพงษ์ กมลวรรณ แจ้งชัด และวิชัย หฤทัยธนาสันติ์. 2545**. อิทธิพลของอัตราส่วนของยีสต์ต่อผงฟูและระยะเวลาหมักต่อคุณภาพขนมตาลจากเนื้อตาลสุกสเตอริไรซ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มหาวิทยาลัยสารคาม. 2550. "การทดสอบความชอบและการยอมรับ," [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: **http://www.cyberclass.msu.ac.th,** [สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2555]

เยาวลักษณ์ นทีจารุรัตน์. 2540. **จากเต้าสู่จาวตาล**. นิตยสารอาหารและการครัว. มทป.

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และวราวุฒิ ครูส่ง. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รุ่งรัตน์ แจ่มจันทร์. 2544. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์แป้งขนมถ้วยฟูสำเร็จรูป**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลาวรรณ์ บัวสาย. 2550. “การพัฒนากรรมวิธีการผลิตขนมเค้กจากเนื้อตาล”. **รายงานการวิจัย.** สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2549. “ขนมตาล,” [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: **http://www.wikipedia.org/wiki,** [สืบค้นเมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2555]

_____. 2549. “กะทิ,” [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก **http://www.wikipedia.org/wiki**, [สืบค้นเมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2555]

วิมลลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. **การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตสาโท.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2519. **ทฤษฎีอาหารเล่ม 1 การประกอบอาหาร**. แผนกวิชาอาหารและโภชนาการ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2522. **ทฤษฎีอาหารเล่ม 3 หลักการทดลองอาหาร**. กรุงเทพมหานคร: เกษมศรีการพิมพ์.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโยลีชีวภาพ.** กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมพักตร์ เอี่ยมสะอาด. 2546. **ผลของลูกแป้งพันธ์ข้าวเหนียวละสีธรรมชาติต่อคุณภาพของข้าวหมาก**. ปริญญานิพนธ์ปริญญาตรี. สถาบันราชภัฏเพรชบุรี.

สมศรี ลีปิพัฒนาวิทย์. 2529. “จุลินทรีย์ในผลตาลสุก,” **วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์.** 5, (1): 11-17.

“สัณฐานวิทยาที่ใช้จัดจำแนกยีสต์”. 2551. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: **http://www.botany.utoronto.ca/Moulds/Candida.html,** [สืบค้นเมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2555]

เสาวลักษณ์ ด่านสกุล. 2552. **การระบุชนิดยีสต์ที่แยกจากข้าวหมาก และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ของไทยโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ rDNA**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อาหารเป็นอาชีพ ขนมหวาน. 2539. กรุงเทพมหานคร: แสงแดด.

อุทัยวรรณ ทองทั้งวงศ์ และ สุนทรี สุวรรณสิชณน์. 2553. “ผลของการทดแทนแป้งสาลีด้วยแป้งข้าวสีนิลต่อคุณภาพของบัตเตอร์เค้ก,” **รายงานการวิจัย.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

อบเชย วงศ์ทอง และ ขนิษฐา พูลผลกูล. 2544. **หลักการประกอบอาหาร**. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรรณพ ทัศนอุดม. 2551. **การเปรียบเทียบคุณลักษณะทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ระหว่างขนมตาลที่ผลิตโดยหัวเชื้อ กับขนมตาลที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

อรพินท์ หลงผาสุก. 1 พฤษภาคม 2555. **สัมภาษณ์**

Bioonelabbolatoly. 2010. Henseniaspora spp. [On-line]. Available : **http://www.bioone.org/doi/abs/10.1662/0002**

Charoenchai, C., G.H.Fleet and P.A. Henschke. 1998. **Effects of Temperature, pH and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts**. Am. J. Enol. Vitic.

DeAnza college Biology6A Brin McCauley. 2011. September 17. Saccharomyces sp. [On-line]. Available : **http://www.deanza.edu/faculty/mccauley/6a-labs-fungi-01.htm**

Gallego, F.J., M.A. Perez, Y. Nunez and P. Hidalgo. 2005. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbilol.** 22: 561-568.

Investigadores labmicrobiology. 2010. Kloeckeraapiculata. [On-line]. Available : **http://investigadores.uncoma.edu.ar/labmicrobiologia_biotecnologia**

Ju, J. and Mittal, G.S. 1995. **Physical Properties of Various Starch Based Fat-Subtitutes.** J. Food Pro. and Pre. 361-383.

Kularatnam. P.K. 1971 "**Some Effects about the Palmara Palm (tan) its importance**" Food. 3(4) : 19-23

Lodder, L. 1974. **The Yeasts.** North-Holland Publishing Company. Netherlands.

Masneuf-Pomarède, I., C.L. Jeune, P. Durrens, M. Lollier, M. Aigle and D. Dubourdieu. 2006. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. **Syst. Appl. Microbiol.** 30(1): 75-82.

Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1999. **Sensory Evaluation Techniques.** 3nd ed. CRC Press. Roca Raton, Fl 354.

Mohamed, S and N.A. Hamid. 1998. **Effect of Ingredients on the Characteristic of Rice Cakes.** Sci FoodAgri. 76: 464-468.

Nakagawa, S. and Ouchi, K. 1994. **Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs**. App. Env. Microbiol. 60(10) : 3499-3502.

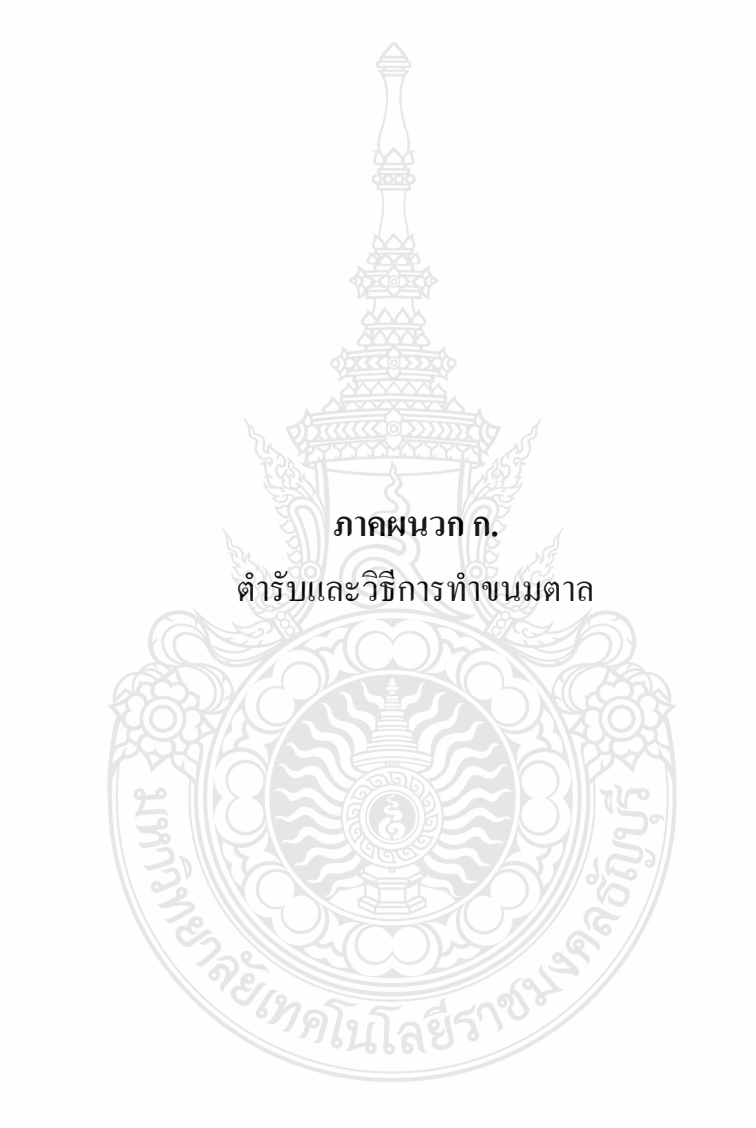
Oda, Y. and ouchi, K. 1990. **Effect of invertase activity on the leavening ability of yeast in sweet dough.** Food Microbiol. 58(7) : 241-248.

Ponte, J.G. and Tsen, C.C. 1987. **Bakery products**. In food and Beverage Mycology,pp. 233-267.2nd ed. Edited dy L.R. Beuchat. AVI New York.

Sabrinpromise. 2011. Candida krusei. [On-line]. Available : **http://www.sabrinpromise.com/candida/candida-krusei**

"Standard Nucleotide BLAST". 2012. [On-line]. Available: **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, [Retrieved May 21, 2012]**

Techera, A.G., S. Jubany, F.M. Carrau and C. Gaggero. 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 71-75.



ภาคผนวก ก.

ตำรับและวิธีการทำขนมตาล

ภาคผนวกที่ ก - 1 ส่วนผสม และวิธีการทำขนมตาล

ตำรับ ขนมตาล

เนื้อตาลสุก	600	กรัม
แป้งข้าวเจ้า	2,000	กรัม
น้ำตาลทราย	1,800	กรัม
กะทิ	2,500	กรัม
เนื้อมะพร้าวขูด	150	กรัม
ผงฟู	50	กรัม
เกลือ	5	กรัม

วิธีทำ

1. ผสมแป้ง น้ำตาลทราย และเนื้อตาลสุกนวดผสมให้เข้ากัน จนนุ่มและน้ำตาลละลาย ค่อยๆ ใส่น้ำกะทิจนหมด ผสมจนให้เข้ากัน
2. ใส่เนื้อมะพร้าวขูดและผสมให้เข้ากัน
3. เติมกล้าเชื้อเหลวหมัก 3 ชั่วโมง
4. เติมผงฟูผสมให้เข้ากัน ตักใส่ถ้วยตะไล นึ่งไฟแรงที่อุณหภูมิ 100 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที

ภาพที่ 5.1 ส่วนผสมของขนมตาล

ภาพที่ 5.2 นวดส่วนผสม แป้งข้าวเจ้า เนื้อตาลยีสุก น้ำตาลและเกลือป่น ให้เข้ากัน

ภาพที่ 5.3 เติมกะทิลงไปในส่วนผสมนวดให้เข้ากันจนกะทิหมด

ภาพที่ 5.4 เมื่อส่วนผสมเข้ากัน เติมมะพร้าวขูด ผสมให้เข้ากัน

ภาพที่ 5.5 เติมกล้าเชื้อเหลว ปริมาณร้อยละ 2 กรัม ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด

ภาพที่ 5.6 หมักส่วนผสมขนมตาล 3 ชั่วโมง

ภาพที่ 5.7 เติมผงฟู คนส่วนผสมให้เข้ากัน

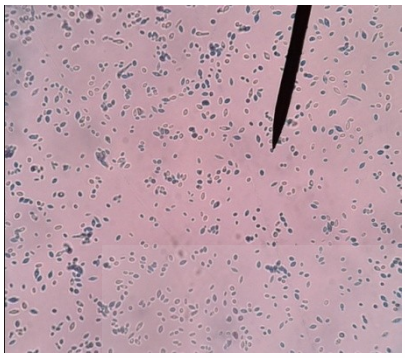
ภาพที่ 5.8 ตักหยอดใส่ถ้วยตะไล นึ่งไฟแรงที่ อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาพที่ 5.9 นึ่งเสร็จ พักทิ้งไว้ให้เย็น

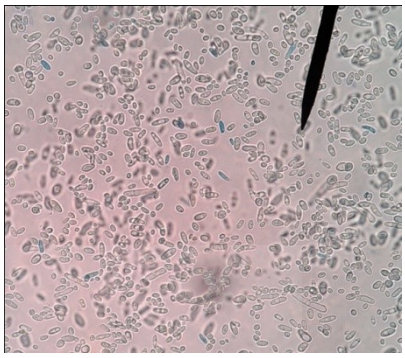
ภาพที่ 5.10 ผลิตภัณฑ์ขนมตาล

ภาคผนวก ข.

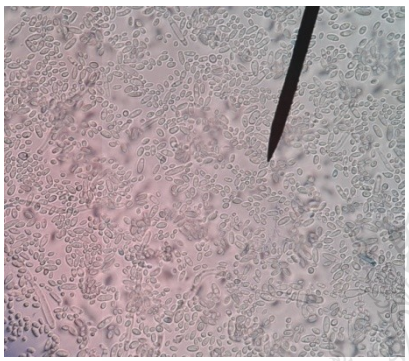
ผลการแยกเชื้อยีสต์จากเนื้อตาลสุก



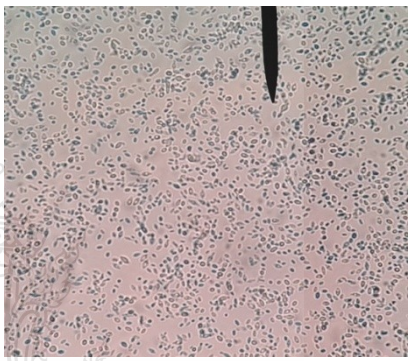
ยีสต์ ไอโซเลท Y 1



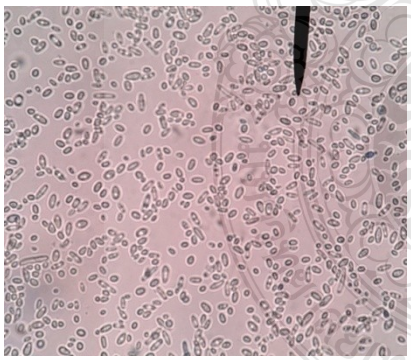
ยีสต์ ไอโซเลท Y 2



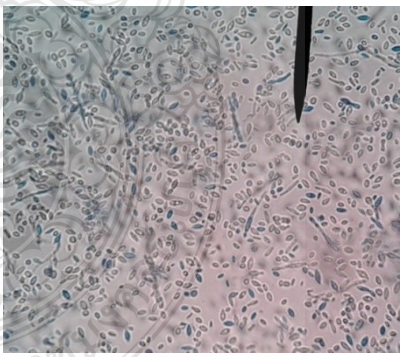
ยีสต์ ไอโซเลท Y 3



ยีสต์ ไอโซเลท Y 4

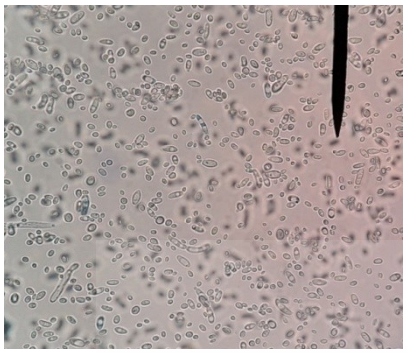


ยีสต์ ไอโซเลท Y 5

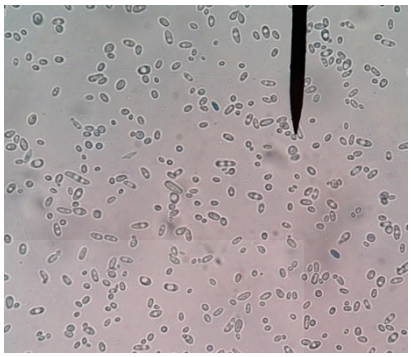


ยีสต์ ไอโซเลท Y 6

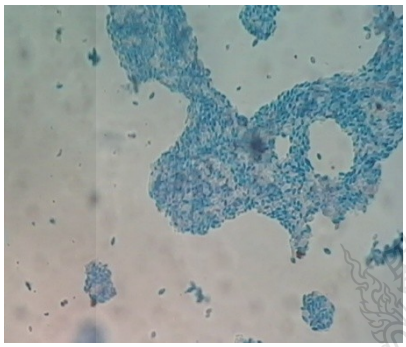
ภาพที่ 5.11 เชื้อยีสต์ ไอโซเลท Y1-Y6 ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก



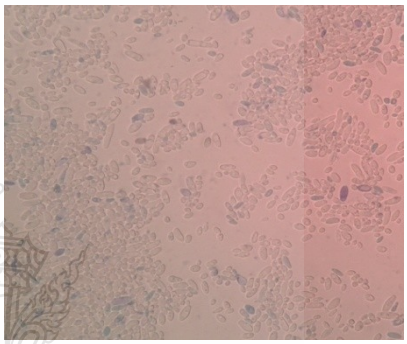
ยีสต์ ไอโซเลท Y 7



ยีสต์ ไอโซเลท Y 8

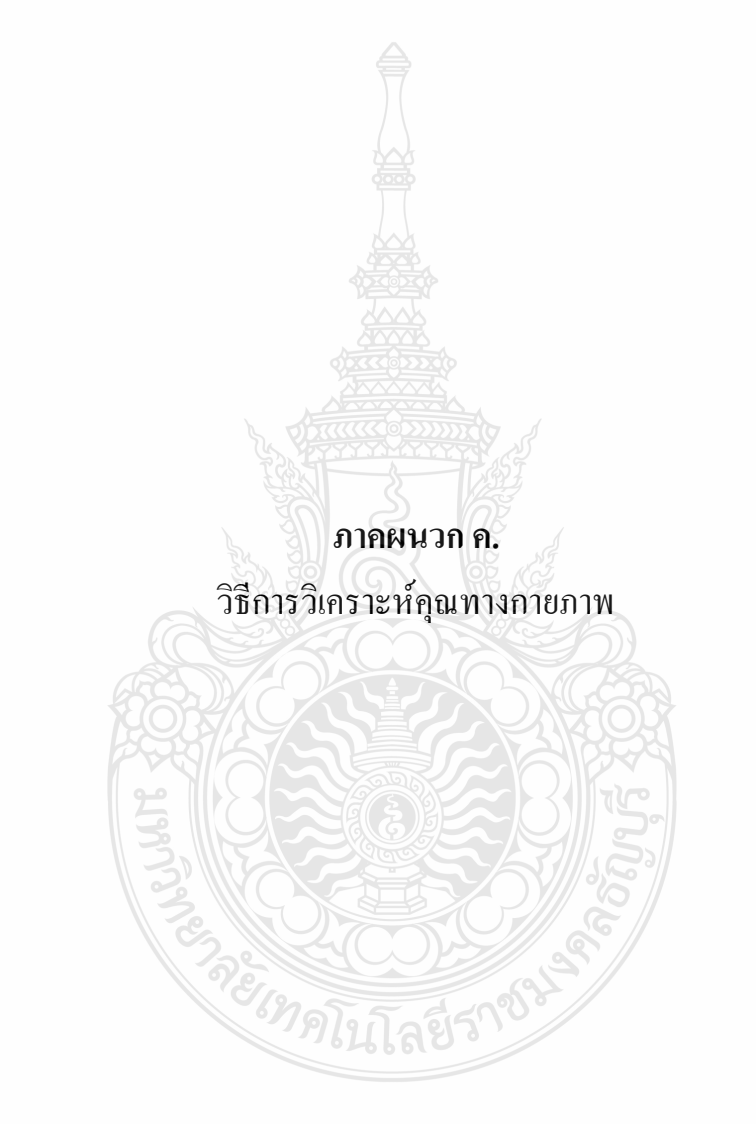


ยีสต์ ไอโซเลท Y 9



ยีสต์ ไอโซเลท Y 10

ภาพที่ 5.12 เชื้อยีสต์ ไอโซเลท Y7-Y10 ที่แยกได้จากเนื้อตาลสุก



ภาคผนวก ค.

วิธีการวิเคราะห์คุณทางกายภาพ

1. การวิเคราะห์ค่าเนื้อสัมผัส

ตรวจสอบด้วยวิธีการ Texture Profile Analysis

ตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Texture Analyzer TA. XT. Plus, UK โดยใช้หัววัดแบบทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ความเร็วการเคลื่อนที่ของหัววัด (Cross head speed) 1 มิลลิเมตรต่อวินาที เป็นระยะทางร้อยละ 50 ของความสูงตัวอย่าง เป็นเวลา 15 วินาที ก่อนกดซ้ำอีกครั้ง ตรวจสอบค่าต่างๆ คือ ความแข็ง (Hardness) และความยืดหยุ่น (Springiness)

2. การวัดค่าสีของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Minolta Chroma meter

1. เครื่องมือ Minolta Chroma meter, CR - 10 Series

2. วิธีการ วัดสีของผลิตภัณฑ์โดยใส่ตัวอย่างในภาชนะ ทำการวัด ค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือคือ ค่า L, a และ b โดยที่

ค่า L คือค่าความสว่าง มีค่าระหว่าง 0 - 100 หรือสีดำถึงสีขาว

ค่า a* แสดงค่า (+) สีแดง หรือ (-) สีเขียว

ค่า b* แสดงค่า (+) สีเหลือง หรือ (-) สีน้ำเงิน

3. วิธีการหาค่า Water Activity (a_w)

วิธีการวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างบดละเอียดใส่ตลับพลาสติกสำหรับวัดค่า a_w นำไปใส่ในช่องตัวเอย่างในเครื่องวัดค่า a_w (Aqualab LITE) จับเวลาประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งเครื่องวัดอ่านค่า a_w ของตัวอย่างคงที่ จึงอ่านค่า a_w ที่ได้จากเครื่องวัด

4. การวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง ของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Laboratory pH Meter

4.1 เครื่องมือ

ยี่ห้อ Sartorius / รุ่น Docu-pH

4.2 วิธีการ

วัดค่าความเป็นกรด - ด่าง โดยใช้ตัวอย่างในบีกเกอร์ทำการวัดค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือ

5. การขึ้นฟู (ปริญญา ฝาระมี และคณะ, 2554)

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง แล้วใส่ลงในภาชนะที่มีความสูงและกว้างกว่าตัวอย่าง

2. เติมเมล็ดงาให้เติมช่องว่าง ทั้งด้านข้างและด้านบนปาดให้เรียบ วัดปริมาตรของเมล็ดงาที่ใช้เติมลงไปทั้งหมด

3. วัดปริมาตรของภาชนะโดยเติมเมล็ดงาเต็มภาชนะปาดให้เรียบ แล้ววัดปริมาตรเมล็ดงาทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ปริมาตรการขึ้นฟู (มล./กรัม)} = \frac{\text{ปริมาตรเมล็ดงาของภาชนะ} - \text{ปริมาตรเมล็ดงาที่มีขนมอยู่}}{\text{น้ำหนักขนมตาล}}$$

6. การระบุสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล (เสาวลักษณ์ ด่านสกุล, 2552)

6.1 ขั้นตอนการสกัด DNA

นำเซลล์ยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดลงในอาหารแข็ง YPD โดยวิธี streak plate บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนียีสต์มาจำนวน 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร YPD 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ซ้ำประมาณ 2–3 รอบ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ A (TE buffer; pH 8.0) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายที่ใช้ล้างทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ไว้ ล้างตะกอนซ้ำอีกครั้ง ตะกอนเซลล์ที่ได้นำมาเติมบัฟเฟอร์ B (lysis buffer) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer บ่มสารละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างการบ่มนำมาผสมโดยการกลับไปมาทุก 10 นาที ตกตะกอนเศษเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บสารละลายใส (supernatant) ใส่ microtubeใหม่ เติมสารละลายผสมของ Chloroform : Isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายเฟสบนใส ดูดสารละลายเฟสบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube ใหม่ ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติมสารละลายผสม Chloroform : Isoamyl alcohol จนกระทั่งถึงขั้นตอน นำสารละลายเฟสบนมาใส่ microtube ใหม่ซ้ำอีก 2 รอบ เติม 3 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท (3M CH_3COONa) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (ร้อยละ10 ของสารละลายเฟสบนที่ได้) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับไปมาเบา ๆ เติมไอโซโร-พรานอลร้อยละ 60 ของปริมาตรสารละลายรวมที่

ได้ แล้วผสมกลับไปมา เก็บที่ (-20) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ถึง 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เทส่วน supernatant ทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนโดยเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ล้างตะกอน 2 ครั้ง) เทส่วน supernatant ทิ้ง และทิ้งให้แห้งในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม TE RNase แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ (-20) องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป เพื่อลดระยะเวลาในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจึงใช้ชุดทดสอบ Lyse-N-GoTM PCR Reagent (Bio-Active) ในการสกัดดีเอ็นเอ ทำได้โดยการ pick โคโลนี 1 จุดลงในหลอด PCR ที่มีสารละลาย Lyse-N-GoTM PCR Reagent 10 ไมโครลิตร นำสารละลายเซลล์เข้าเครื่อง Thermal cycle PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตารางภาคผนวกที่ 1 จากนั้นนำออกจากเครื่อง และเก็บส่วนใสไว้เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป สำหรับการตรวจผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 2 วิธีทำได้โดย agarose gel- electrophoresis ซึ่งจะอธิบายไว้ในลำดับต่อไป

ตารางผนวกที่ 1 โปรแกรมสำหรับเครื่อง Thermal cycle PCR ในการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Lyse-N-GoTMPCR Reagent

รอบที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)
1	65	30
2	8	30
3	65	90
4	97	180
5	8	60
6	65	180
7	97	60
8	65	60
9	80	hold

6.2 การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการใช้ spectrophotometer

ผสมสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ 5 ไมโครลิตรกับสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 495 ไมโครลิตรให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอจำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvett (quatrz) นำไปวัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ TE เป็น blankบันทึกค่าการดูดกลืนแสง การคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (μg/ml) = A260 x 50 x Dilution (A260 1 หน่วย มีค่าเท่ากับเมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.3 การหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ดูดสารละลายดีเอ็นเอจำนวน 400 ไมโครลิตร (ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ TE ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูงมาก) ใส่ลงใน cuvett จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 และ 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์พร้อมนำไปใช้งานในขั้นต่อไป ควรแสดงค่าอยู่ในช่วง 1.8 - 2.0

6.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR

6.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR บริเวณ ITS-5.8S rDNA

เตรียมดีเอ็นเอของยีสต์ตามวิธี 4.1 โดยละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น หรือบัฟเฟอร์ TE (สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ชุดทดสอบไม่ต้องละลายตะกอน นำมาใช้ได้เลย) และตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด โดยการใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอส่วนของ ITS-5.8S rDNA โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 (KU vector) ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Forward primer ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

Reverse primer ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

โดยเตรียมองค์ประกอบในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณ ITS-5.8S rDNA ดังตารางที่ 2 สำหรับโปรแกรมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอคือ ช่วง preheat = 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.0 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง denaturation = 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.0 นาที annealing = 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.0 นาที และ extension = 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 นาที จำนวน 30 รอบ ตั้งอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ และลดลงมา 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ในขั้นตอนต่อไป

ภาพผนวกที่ 5.13 บริเวณ rDNA ที่ใช้เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบต่าง ๆ ในการทำ PCR บริเวณ ITS-5.8S rDNA

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
น้ำดีไอโอไนซ์ปลอดเชื้อ	10.9
บัฟเฟอร์10X	2.0
นิวคลีโอไทด์ (10 mM)	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.0
ไพร์เมอร์ ITS1 (2 μM)	1.0
ไพร์เมอร์ ITS4 (2 μM)	1.0
ดีเอ็นเอแม่แบบ (40 ng/μl)	2.0
Taq DNA polymerase	0.1
ปริมาตรรวม ต่อ 1 ปฏิกิริยา	20.0

6.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR บริเวณ D1/D2 domain

การเตรียมดีเอ็นเอของยีสต์ทำเช่นเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอ ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS-5.8S rDNA สำหรับไพร์เมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain จะใช้ไพร์เมอร์ NL1 และ NL4 (KU vector) ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Forward primer NL1 5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’

Reverse primer NL4 5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’

โดยเตรียมองค์ประกอบในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 domain ดังตารางผนวกที่ 3 สำหรับโปรแกรมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอคือ ช่วง preheat = 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.0 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง denaturation = 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.0 นาที,annealing = 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.0 นาที และ extension = 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.0 นาที จำนวน 36 รอบ ตั้งอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ และลดลงมา 4 องศาเซลเซียส และตรวจผลผลิต PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ในขั้นตอนต่อไป

ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบต่าง ๆ ในการทำ PCR บริเวณ D1/D2 domain

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
น้ำดีไอโอไนซ์ปลอดเชื้อ	7.7
บัฟเฟอร์10X	2.0
นิวคลีโอไทด์ (10 mM)	1.6
25 mM $MgCl_2$	1.6
ไพร์เมอร์ ITS1 (10 μM)	1.0
ไพร์เมอร์ ITS4 (10 μM)	1.0
ดีเอ็นเอแม่แบบ (40 ng/μl)	5.0
Taq DNA polymerase (5U ng/μl)	0.1
ปริมาตรรวม ต่อ 1 ปฏิกิริยา	20.0

6.5 การตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ และผลผลิต PCR โดยวิธีอะกาโรสอิเล็คโตโฟริซีส

กรณีที่ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอจะใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตรวจผลผลิต PCR จะใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมผงอะกาโรส 1 และ 1.5 กรัมใน 1XTrisborate buffer (TBE) 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทลงบน chamber ค่อย ๆ เทอย่าให้เกิดฟองอากาศ ใส่หวีเพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอ ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว แล้วดึงหวีออก จากนั้นเทบัฟเฟอร์ 1xTBE ลงไปจนท่วมเจล โดยมีระดับสูงกว่าเจลประมาณ 1 - 3มิลลิเมตร สำหรับการเตรียมตัวอย่างทำได้โดยการผสมตัวอย่างกับ loading dye ในอัตราส่วน 4 : 1 (ดีเอ็นเอ : loading dye) แล้วหยอดลงในช่องที่เตรียมไว้บนอะกาโรสเจล ด้วยไมโครปิเปต ต่อขั้วอิเล็คโทรดเข้ากับ power - supply โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่ง

จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ตั้งความต่างศักย์ที่ 250 volt จะใช้เวลาประมาณ 45 นาที หรือสังเกตสีของ bromophenol blue เคลื่อนไปเกือบถึงปลายอีกข้างของเจล แล้วปิดกระแสไฟ นำเจลไปย้อมสีใน ethidium bromide ขั้นตอนนี้ต้องสวมถุงมือ โดยแช่ไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที นำไปตรวจผลภายใต้แสง UV บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

6.6 การตกตะกอนผลผลิต PCR (Polymerase Chain Reaction product)

นำผลผลิต PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube 1.7 มิลลิลิตร เติม Stock-solution A (3M CH_3COONa 2 μl และ ร้อยละ 95 EtOH 50 μl) ปริมาตร 52 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ระหว่างเก็บนำมาผสมกลับไปมาทุก 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกลับไปมาทุก 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วปล่อยให้แห้งในโถดูดความชื้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำมาตรวจดูผลโดยวิธีอะกาโรสอิเลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสร้อยละ 1.5

6.7 การหาลำดับเบส

6.7.1 การวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของผลผลิต PCR เป็นขั้นตอนสำคัญ

ก่อนนำผลผลิต PCR ไปหาลำดับเบส ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณของผลผลิต PCR โดยการหาความเข้มข้นของผลผลิต PCR อย่างคร่าว ๆ นั้น สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบผลผลิต PCR กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นแล้ว บนอะกาโรสร้อยละ 1.5 ที่ผ่านการย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งมีเริ่มจากทำการละลายผลผลิต PCR ที่ผ่านการตกตะกอนในขั้นตอน 6. ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ 8 μl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งมาผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 2 : 1 (ดีเอ็นเอ : loading dye) สำหรับดีเอ็นเอมาตรฐานจะใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้นข้น 40 ng/μl นำดีเอ็นเอ มาตรฐานผสมกับ loading dye ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อ loading dye เท่ากับ 1 : 1, 3 : 1, 5 : 1, 7 : 1 และ 9 : 1 เพื่อจะให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นมาตรฐานเท่ากับ 40, 120, 200, 280 และ 360 ng /μl ตามลำดับ จากนั้นโหลดดีเอ็นมาตรฐานเรียงตามลำดับความเข้มข้นจนครบทุกความเข้มข้น และ โหลดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจลร้อยละ 1.5 ทำการต่อขั้วอิเล็คโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ตั้งความต่างศักย์ที่ 250 volt เดินเครื่องจนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนไปเกือบถึงปลายอีกข้างของเจล แล้วปิดกระแสไฟ นำเจล

ไปย้อมสีใน ethidium bromide จากนั้นเปรียบเทียบการเรืองแสงของตัวอย่างผลผลิต PCR เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 40, 120, 200, 280 และ 360 ng /μl ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรมของเครื่อง Gel Doc ค่าที่ได้จากการคำนวณโดยใช้โปรแกรมดังกล่าวจะแสดงออกมาในหน่วย ng /μl สำหรับคุณภาพของผลผลิต PCR สามารถสังเกตได้จากลักษณะของแถบดีเอ็นเอ

6.7.2 การทำ cycle sequencing ในที่นี้จะกล่าวถึงการทำโดยใช้ชุดสารเคมี Terminator Ready Reaction (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem, USA)) เริ่มจากการคำนวณปริมาณของผลผลิต PCR ที่จะใช้ในการทำ cyclesequencing ซึ่งต้องการดีเอ็นที่ระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 180 - 200 ng/μl โดยนำผลผลิต PCRในปริมาณที่คำนวณไว้แล้วใส่ในหลอด PCR 0.2 มิลลิลิตร เตรียมไว้ จากนั้นเติม Terminalpremix 4 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ ITS1 หรือ ITS4 (5 μM) 1 ไมโครลิตร (กรณีที่หาลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain จะใช้ไพร์เมอร์ NL1 หรือ NL4) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10ไมโครลิตรด้วยน้ำดีไอออไนซ์ สำหรับตัวควบคุมจะใช้ดีเอ็นเอ pGEM สำหรับไพร์เมอร์ของ pGEM จะมาพร้อมกับชุดทดสอบดังกล่าว จากนั้นผสมให้เข้ากัน และ spin down นำไปทำปฏิกิริยาต่อโดยเครื่อง PCR (Perkin Elmer 2400) โดย pre heat หลอดทดลองที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำปฏิกิริยาต่อที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 25 รอบ

6.7.3 การตกตะกอนผลผลิต cycle sequencing (cycle sequencing product)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ cycle sequencing มาใส่ในหลอด microtube 1.7 มิลลิลิตร เติม stock solution A (ddH2O 16 μl และ 95% EtOH 64 μl) ปริมาตรรวม 80 ไมโครลิตร ผสมโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาผสมโดยการกลับไปมาทุก 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับไปมา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและอุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้แห้งในโถดูดความชื้น โดยจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายตะกอนโดยการเติม solution A (hidi 2.5 μl และ Matrix (loading buffer) 0.5 μl) ปริมาตร 3 μl นำไป preheat ที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วแช่น้ำแข็งเตรียมไว้สำหรับโหลดเข้าเครื่อง 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA) สำหรับตรวจผลการอ่านลำดับเบสได้จาก Applied system software

6.7.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อระบุสปีชีส์ของยีสต์

สามารถทำได้โดยนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธนาคารข้อมูลเบสหรือที่เรียกว่าฐานข้อมูล GenBankโดยเข้าที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov ซึ่งเป็นเวปไซต์ของ NCBI (National Centre for Biotechnology Information) โดยเข้าไปที่ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) และเลือกโปรแกรม blastn สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของยีสต์ในแต่ละกลุ่ม เริ่มจากการแก้ไขและเปลี่ยนรูปแบบของลำดับเบสให้อยู่ในรูป fasta format ใช้โปรแกรม Chromas (version 1.45) จากนั้นทำการเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Clustal X (version 1.83) และทำการแก้ไข alignment sequence โดยโปรแกรม BioEdit (version 5.0.6) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในรูปแบบของ phylogenetic tree ของยีสต์แต่ละกลุ่มจะใช้โปรแกรมต่าง ๆ ใน PHYLIP package โดยใช้ Kimura-2-parameter model ในโปรแกรม Dnadis เพื่อสร้าง distance matrix โดยภายใน distance-matrix จะมีค่า distance ระหว่างลำดับเบสของแต่ตัวอย่างเปรียบเทียบ สำหรับ distance matrix นี้สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี neighbour joining โดยใช้โปรแกรม Neighbour และสำหรับค่าทางสถิติ (bootstrap) ได้จากการคำนวณ consensus tree จาก bootstrap tree data (resampling 1000 ครั้ง) โดยโปรแกรม Consensus และค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree ที่ได้ข้างต้น

ภาคผนวก ง.

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ภาคผนวกที่ ง - 1 แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชุดที่ 1)

แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

ขนมตาล

ชื่อผู้ประเมิน ..... วันที่ ..... / ..... / .....

แบบประเมินผลนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ จึงขอความร่วมมือจากผู้บริโภคประเมินผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยชิมตัวอย่างตามที่จัดเรียง และให้คะแนนการทดสอบถึงความรู้สึกของท่าน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	2 = ไม่ชอบมาก	3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	5 = เฉย ๆ	6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง	8 = ชอบมาก	9 = ชอบมากที่สุด

เกณฑ์การประเมิน	รหัส			หมายเหตุ
	432	305	650	
ลักษณะปรากฏ				
สี				
กลิ่น				
รสชาติ				
เนื้อสัมผัส				
ความชอบโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ

ภาคผนวกที่ ง - 2 แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชุดที่ 1)

แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

ขนมตาล

ชื่อผู้ประเมิน ..... วันที่ ..... / ..... / .....

แบบประเมินผลนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ จึงขอความร่วมมือจากผู้บริโภคประเมินผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยชิมตัวอย่างตามที่จัดเรียง และให้คะแนนการทดสอบถึงความรู้สึกของท่าน โดยมีเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก 9 = ชอบมากที่สุด

เกณฑ์การประเมิน	รหัส			หมายเหตุ
	ตัวอย่าง 1	ตัวอย่าง 2	ตัวอย่าง 3	
ลักษณะปรากฏ				
สี				
กลิ่น				
รสชาติ				
เนื้อสัมผัส				
ความชอบโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ

หมายเหตุ ใช้แบบสอบถาม 2 ชุดสำหรับการทดสอบ

ภาคผนวกที่ ง - 3 แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชุดที่ 3)

แบบสอบถาม

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

โครงการพัฒนากรรมวิธีการผลิตขนมตาล

คำชี้แจง

แบบสอบถามชุดนี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยเรื่อง “การประยุกต์เทคโนโลยีกล้าเชื้อยีสต์สำหรับผู้ผลิตขนมตาล” สร้างขึ้นเพื่อสอบถามการยอมรับขนมตาล และใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาขนมตาลอนามัยต่อไป

แบบสอบถามแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

ส่วนที่ 2 ข้อมูลเชิงพฤติกรรมและทัศนคติ

ข้อมูลทั้งหมดจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัย และจะถือเป็นความลับ โดยจะไม่มีผลใด ๆ ต่อผู้ตอบแบบสอบถามทั้งสิ้น

ขอขอบพระคุณทุกท่านอย่างยิ่งที่ให้ความร่วมมือ

ผู้ทำวิจัย

<u>คำแนะนำ</u> กรุณาใส่เครื่องหมาย ✓ ในช่อง ( ) ที่ท่านเห็นว่าเหมาะสมและตรงกับความคิดเห็นของท่าน

<u>ส่วนที่ 1</u> : ข้อมูลของผู้ตอบแบบสอบถาม

1. เพศ

( ) ชาย ( ) หญิง

2. อายุ

( ) ต่ำกว่า 18 ปี ( ) 18-25 ปี ( ) 26-33 ปี

( ) 34-41 ปี ( ) 42-49 ปี ( ) มากกว่า 49 ปี

3. ระดับการศึกษา

( ) ต่ำกว่ามัธยมศึกษา ( ) มัธยมศึกษาตอนต้น

( ) มัธยมศึกษาตอนปลาย / ปวช. ( ) อนุปริญญา / ปวส.

( ) ปริญญาตรี ( ) สูงกว่าปริญญาตรี

4. อาชีพ

( ) นักเรียน ( ) นิสิต / นักศึกษา ( ) พนักงานรัฐวิสาหกิจ

( ) พนักงานบริษัท ( ) ธุรกิจส่วนตัว ( ) ค้าขาย

( ) รับจ้าง ( ) อื่น ๆ (ระบุ).....

5. รายได้ต่อเดือน

( ) น้อยกว่า 5,000 บาท ( ) 5,001-7,000 บาท ( ) 7,001-9,000 บาท

( ) 9,001-11,000 บาท ( ) มากกว่า 11,000 บาท

<u>ส่วนที่ 2</u> : ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมและทัศนคติของผู้ตอบแบบสอบถาม

6. ท่านชอบรับประทานขนมตาลหรือไม่

( ) ชอบ ( ) เฉย ๆ ( ) ไม่ชอบ

7. ท่านรับประทานขนมตาลบ่อยแค่ไหน

( ) ทุกวัน ( ) 3-4 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) 1-2 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) น้อยกว่า 1-2 ครั้ง/สัปดาห์ ( ) อื่น ๆ (ระบุ).....

8. สถานที่ที่ท่านเลือกซื้อขนมตาล

( ) ตลาดสด ( ) ร้านขายขนมไทยทั่ว ๆ ไป

( ) ห้างสรรพสินค้า ( ) อื่น ๆ (ระบุ).....

ขอขอบคุณทุกท่านที่สละเวลา

ภาคผนวกที่ ง - 3 แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชุดที่ 3)

แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

ผลิตภัณฑ์ขนมตาล

ชื่อผู้ประเมิน ..... วันที่ ..... / ..... / .....

แบบประเมินความแตกต่างอย่างง่าย ของผลิตภัณฑ์ขนมตาล โดยชิมตัวอย่างขนมตาลทั้ง 2 ตัวอย่าง แล้วใส่เครื่องหมาย ✓ ลงในช่องว่างตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสม

คุณลักษณะ	คุณภาพ	
	แตกต่าง	ไม่แตกต่าง
ลักษณะที่ปรากฏ	.....	.....
สี	.....	.....
กลิ่น	.....	.....
รสชาติ	.....	.....
เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม)	.....	.....
ความชอบโดยรวม	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณ ทุกท่านที่สละเวลา

ภาคผนวกที่ ง - 4 แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (ชุดที่ 4)

แบบประเมินการยอมรับของผู้บริโภค

ผลิตภัณฑ์ขนมตาล

ชื่อผู้ประเมิน ..... วันที่ ..... / ..... / .....

แบบประเมินความแตกต่างอย่างง่าย ของผลิตภัณฑ์ขนมตาล โดยให้ผู้ทดสอบชิม ชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนมตาล 2 ตัวอย่าง แล้วใส่เครื่องหมาย ✓ ลงในช่องว่างของตัวอย่างที่มีความชอบมากกว่าตามคุณลักษณะปัจจัยคุณภาพที่กำหนดไว้

คุณลักษณะปัจจัยคุณภาพ	ตัวอย่างขนมตาล	
	491	762
กลิ่น	.....	.....
เนื้อสัมผัส (ความนุ่ม)	.....	.....
ความชอบโดยรวม	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณ ทุกท่านที่สละเวลา

ภาคผนวก จ.

ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านลักษณะที่ปรากฏ เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	23.41	11.70	6.92
Block	29	108.82	3.75	2.22
Error	148	250.08	1.69	
Total	180	9613.00		

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	1.74	0.87	0.89
Block	29	93.91	3.23	3.33
Error	148	143.92	0.97	
Total	180	10606.00		

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่น เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	1.63	0.81	0.63
Block	29	37.53	1.29	1.00
Error	148	191.03	1.29	
Total	180	9304.00		

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติ เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	0.13	0.67	0.07
Block	29	40.45	1.39	1.60
Error	148	128.36	0.86	
Total	180	9893.00		

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านเนื้อสัมผัส เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	6.43	3.21	2.28
Block	29	48.53	1.67	1.18
Error	148	208.23	1.40	
Total	180	9252.00		

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านความชอบโดยรวม เมื่อศึกษาหาปริมาณกล้าเชื้อยีสต์เหลวที่เหมาะสมในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	2	4.31	2.15	2.00
Block	29	51.91	1.79	1.66
Error	148	159.02	1.07	
Total	180	9662.00		

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าการขึ้นฟูผลิตภัณฑ์ขนมตาล 4 สิ่งการทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	3	0.06	0.02	4.65
Block	2	0.00	0.00	0.55
Error	6	0.02	0.00	
Total	12	7.45		

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่า Aw ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	3.64	7.28	1.37
Block	2	2.14	1.07	2.01
Error	10	5.32	5.32	
Total	18	15.99		

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (L) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	46.58	9.91	0.39
Block	2	57.59	28.79	1.21
Error	46	1090.47	23.70	
Total	54	106443.84		

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (a^+) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	3.59	0.71	1.23
Block	2	3.21	1.60	2.76
Error	46	26.76	0.58	
Total	54	3899.45		

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ทางสถิติของ ค่าสี (b^+) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	56.94	11.38	0.77
Block	2	128.10	64.05	4.37
Error	46	672.87	15.62	
Total	54	54634.89		

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัส ความแข็ง (Hardness) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	88085.79	17617.15	6.97
Block	4	5184.49	1296.12	0.51
Error	20	50536.95	2526.84	
Total	30	1.069E7		

ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเนื้อสัมผัส ความยืดหยุ่น (Springness) ผลิตภัณฑ์ขนมตาล 6 สิ่งทดลอง

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	0.01	0.00	3.20
Block	4	0.00	0.00	1.71
Error	20	0.01	0.00	
Total	30	22.06		

ตารางภาคผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านลักษณะที่ปรากฏ เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	2.34	0.46	0.36
Block	29	217.49	7.50	5.90
Error	505	641.15	1.27	
Total	540	31251.00		

ตารางภาคผนวกที่ 18 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	1.21	0.24	0.24
Block	29	150.92	5.20	5.28
Error	505	497.56	0.98	
Total	540	33006.00		

ตารางภาคผนวกที่ 19 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านกลิ่น เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	13.31	2.66	1.48
Block	29	149.40	5.15	2.86
Error	505	908.02	1.79	
Total	540	29498.00		

ตารางภาคผนวกที่ 20 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติ เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	6.12	1.22	0.88
Block	29	108.96	3.75	2.70
Error	505	700.49	1.38	
Total	540	30549.00		

ตารางภาคผนวกที่ 21 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านเนื้อสัมผัส เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	13.31	2.66	1.48
Block	29	149.40	5.15	2.86
Error	505	908.02	1.79	
Total	540	29498.00		

ตารางภาคผนวกที่ 22 การวิเคราะห์ทางสถิติของคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านความชอบโดยรวม เมื่อศึกษากล้าเชื้อยีสต์เหลวที่ต่างกันในการผลิตขนมตาล

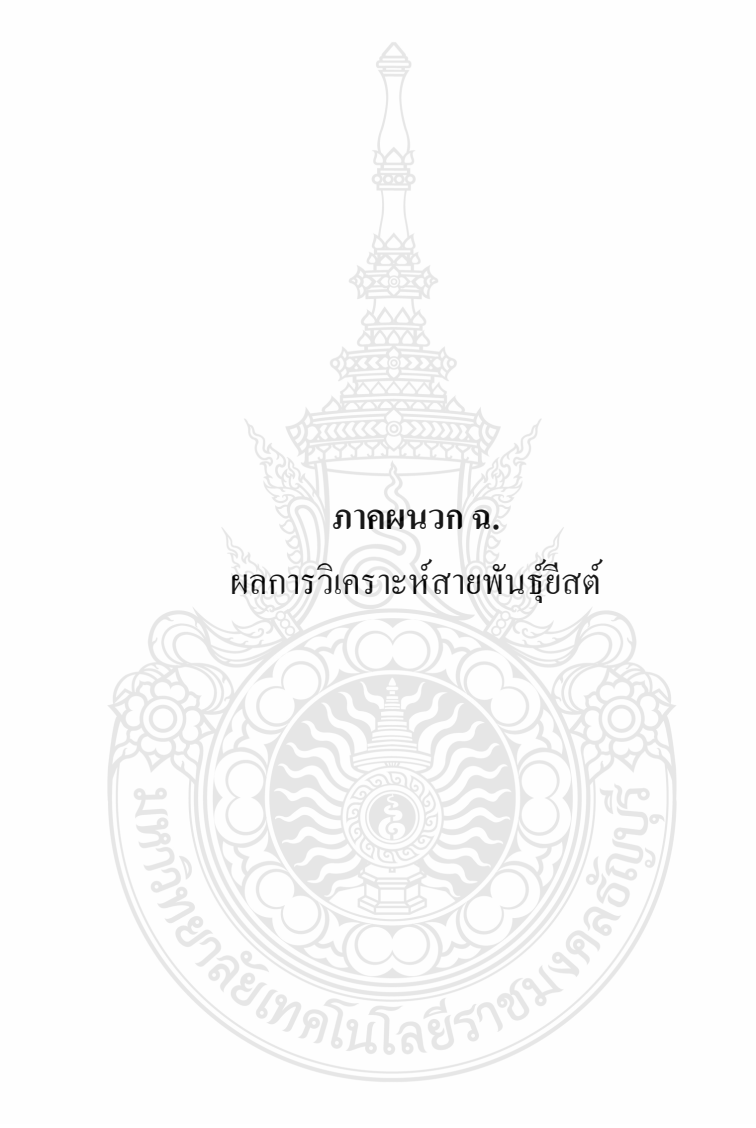
SOV	d.f.	SS	MS	F
Treatment	5	9.215	1.843	1.163
Block	29	149.215	5.145	3.247
Error	505	800.230	1.585	
Total	540	30028.000		

ตารางภาคผนวกที่ 23 Critical Number of Correct Responses in a Duo-Trio or One-Sided Directional Difference Test (Entries are $x_{a,n}$) (Meilgaard,1999)

Entries are the minimum number of correct responses required for significance at the stated α-level (i.e., column) for the corresponding number of respondents, n (i.e., row). Reject the assumption of "no difference" if the number of correct responses is greater than or equal to the tabled value.

			a								*a*					
n	***0.40***	***0.30***	***0.20***	***0.10***	***0.05***	***0.01***	***0.001***	***n***	***0.40***	***0.30***	***0.20***	***0.10***	***0.05***	***0.01***	***0.001***
								31	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*23*	*25*
2	*2*	*2*	—	—	—	—	—	*32*	*18*	*18*	*19*	*21*	*22*	*24*	*26*
3	*3*	*3*	*3*	—	—	—	—	*33*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*24*	*26*
4	*3*	*4*	*4*	*4*	—	—	—	*34*	*19*	*20*	*20*	*22*	*23*	*25*	*27*
5	*4*	*4*	*4*	*5*	*5*	—	—	*35*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*25*	*27*
6	*4*	*5*	*5*	*6*	*6*	—	—	*36*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*26*	*28*
7	*5*	*5*	*6*	*6*	*7*	*7*	—	*40*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*28*	*31*
8	*5*	*6*	*6*	*7*	*7*	*8*	—	*44*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*31*	*33*
9	*6*	*6*	*7*	*7*	*8*	*9*	—	*48*	*26*	*27*	*28*	*29*	*31*	*33*	*36*
10	*6*	*7*	*7*	*8*	*9*	*10*	*10*	*52*	*28*	*29*	*30*	*32*	*33*	*35*	*38*
11	*7*	*7*	*8*	*9*	*9*	*10*	*11*	*56*	*30*	*31*	*32*	*34*	*35*	*38*	*40*
12	*7*	*8*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*60*	*32*	*33*	*34*	*36*	*37*	*40*	*43*
13	*8*	*8*	*9*	*10*	*10*	*12*	*13*	*64*	*34*	*35*	*36*	*38*	*40*	*42*	*45*
14	*8*	*9*	*10*	*10*	*11*	*12*	*13*	*68*	*36*	*37*	*38*	*40*	*42*	*45*	*48*
15	*9*	*10*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	*72*	*38*	*39*	*41*	*42*	*44*	*47*	*50*
16	*10*	*10*	*11*	*12*	*12*	*14*	*15*	*76*	*40*	*41*	*43*	*45*	*46*	*49*	*52*
17	*10*	*11*	*11*	*12*	*13*	*14*	*16*	*80*	*42*	*43*	*45*	*47*	*48*	*51*	*55*
18	*11*	*11*	*12*	*13*	*13*	*15*	*16*	*84*	*44*	*45*	*47*	*49*	*51*	*54*	*57*
19	*11*	*12*	*12*	*13*	*14*	*15*	*17*	*88*	*46*	*47*	*49*	*51*	*53*	*56*	*59*
20	*12*	*12*	*13*	*14*	*15*	*16*	*18*	*92*	*48*	*50*	*51*	*53*	*55*	*58*	*62*
21	*12*	*13*	*13*	*14*	*15*	*17*	*18*	*96*	*50*	*52*	*53*	*55*	*57*	*60*	*64*
22	*13*	*13*	*14*	*15*	*16*	*17*	*19*	*100*	*52*	*54*	*55*	*57*	*59*	*63*	*66*
23	*13*	*14*	*15*	*16*	*16*	*18*	*20*	*104*	*54*	*56*	*57*	*60*	*61*	*65*	*69*
24	*14*	*14*	*15*	*16*	*17*	*19*	*20*	*108*	*56*	*58*	*59*	*62*	*64*	*67*	*71*
25	*14*	*15*	*16*	*17*	*18*	*19*	*21*	*112*	*58*	*60*	*61*	*64*	*66*	*69*	*73*
26	*15*	*15*	*16*	*17*	*18*	*20*	*22*	*116*	*60*	*62*	*64*	*66*	*68*	*71*	*76*
27	*15*	*16*	*17*	*18*	*19*	*20*	*22*	*122*	*63*	*65*	*67*	*69*	*71*	*75*	*79*
28	*16*	*16*	*17*	*18*	*19*	*21*	*23*	*128*	*66*	*68*	*70*	*72*	*74*	*78*	*82*
29	*16*	*17*	*18*	*19*	*20*	*22*	*24*	*134*	*69*	*71*	*73*	*75*	*78*	*81*	*86*
30	*17*	*17*	*18*	*20*	*20*	*22*	*24*	*140*	*72*	*74*	*76*	*79*	*81*	*85*	*89*

***Note**:*For values of *n* not in the table, compute *, where k* is the number of correct responses. *Compare the value of z* to the α-critical value of a standard normal variable, i.e., the values in the last row of Table T3 ($z_{(} = t_{(,\infty)}$).



ภาคผนวก ฉ.

ผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ยีสต์

ภาคผนวกที่ ฉ-1 ลำดับเบสบริเวณ 26S Ribosomal RNA gene ของไอโซเลต T1

AAAAAGGGGATACTTAGTACGGCGAGTGAGCGGTAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTA
CTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTT
CCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCT
GTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCT
CTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAGTTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAGAATG
TAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTGC
GCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCA
A

GenBank: EU386752.1

LOCUS EU386752 575 bp DNA linear PLN 04-FEB-2008

DEFINITION Hanseniaspora guilliermondii strain A11-1-5 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ภาคผนวกที่ ฉ-2 ลำดับเบสบริเวณ 26S Ribosomal RNA gene ของไอโซเลต T2

AAAAGGGGGGCATACTTAGTACGGCGAGTGAGCGGTAAAAGCTCAATTTGAAATCTGG
TACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATG
TTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCT
CTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCC
TCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAGTTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAGAAT
GTAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTG
CGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAA
TGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCA

GenBank: EU386752.1

LOCUS EU386752 575 bp DNA linear PLN 04-FEB-2008

DEFINITION Hanseniaspora guilliermondii strain A11-1-5 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ภาคผนวกที่ ฉ-3 ลำดับเบสบริเวณ 26S Ribosomal RNA gene ของไอโซเลต T3

CAAAAGGGGAAGGGCTCAGTAGCGGCGAGTGAGCGGCAGAGCTCAGATTTGAATCGT
GCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAA
GTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGC
AGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTG
GGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCT
CTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCG
TGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAAACACGGACCA
A

GenBank: JQ420003.1

LOCUS JQ420003 582 bp DNA linear PLN 07-MAY-2012

DEFINITION Pichia kudriavzevii clone test122 26S ribosomal RNA gene, partial
sequence.

ภาคผนวกที่ ฉ-4 ลำดับเบสบริเวณ 26S Ribosomal RNA gene ของไอโซเลต T4

CAAAATGGGGATACTTAGTACGGCGAGTGAGCGGTAAAAGCTCAATTTGAAATCTGGT
ACTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGT
TCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTC
TGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTCGCCTCTCGTGGGCTTGGGCC
TCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAGTTCTGGCAGCAGGATAAATCATTAAGAAT
GTAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGGGATTGAGGACTG
CGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAAT
GCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCA

GenBank: EU386752.1

LOCUS EU386752 575 bp DNA linear PLN 04-FEB-2008

DEFINITION Hanseniaspora guilliermondii strain A11-1-5 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ภาคผนวกที่ ฉ-5 ลำดับเบสบริเวณ 26S Ribosomal RNA gene ของไอโซเลต T5

CAAAAAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAGCGGCAGAGCTCAGATTTGAAATCGT
GCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAA
GTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGC
AGTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
AGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTG
GGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTTCTGGAACGTGGCT
CTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCG
TGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTTGAAACACGGACCA
AA

GenBank: AY529501.1

LOCUS AY529501 621 bp DNA linear PLN 03-FEB-2005

DEFINITION Issatchenkia orientalis isolate 181 26S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - นามสกุล	อรวรรณ พึ่งคำ
วัน เดือน ปีเกิด	10 กรกฎาคม 2523
ที่อยู่	เลขที่ 189/11 ถนนวัชรพล แขวงท่าแร้ง เขตบางเขน จังหวัดกรุงเทพมหานคร 12110
การศึกษา	2537 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเขมะสิริอนุสรณ์ กรุงเทพฯ 2540 ประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) สาขาวิชาอาหาร โภชนาการ วิทยาลัยอาชีวศึกษาเสาวภา กรุงเทพฯ 2544 ปริญญาตรีคหกรรมศาสตรบัณฑิต (คศ.บ.) สาขาอาหารและ โภชนาการ - ธุรกิจอาหาร คณะคหกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คลองหก จังหวัดปทุมธานี 2555 ปริญญาโทคหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (คศ.ม.) สาขาเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลองหก จังหวัดปทุมธานี
ประสบการณ์การทำงาน	2545 - ปัจจุบัน อาจารย์ประจำ สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลองหก จังหวัดปทุมธานี