การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักตามธรรมชาติ

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

RCH
QR
151
ด1164ก
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 54580
วัน,เดือน,ปี 21 ส.ค. 2548

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2540

b. 11348103
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักตามธรรมชาติ

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก พบปริมาณจุลินทรีย์ดังกล่าวมีปริมาณสูงภายหลังการหมัก 1 วัน และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก โดยพบจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และแบคทีเรียแลกติกเป็น 4.25×10^7, 2.85×10^7 และ 2.85×10^7 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ตามลำดับสำหรับแบคทีเรียแอซีติกจะพบปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 คิดเป็น 7.50×10^6 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นปริมาณจุลินทรีย์เหล่านี้มีปริมาณลดลงและจากการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์พบ *Saccharomyces ccrcvisiae* มีปริมาณสูงตลอดระยะเวลาของการหมัก สำหรับ *Candida tropicalis* และ Candida sorbosa จะพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แบคทีเรียกลุ่มแลคติกพบตระกูล Lactobacillus มีปริมาณสูงในช่วงแรกของการหมัก และช่วงสุดท้ายของการหมักจะพบตระกูล Streptococcus ในปริมาณสูง

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกองหมักมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักพบว่า ชุดการทดลองแรกซึ่งเติมเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่แยกได้จากการหมักจะให้ผลดีกว่าชุดการทดลองที่สอง ซึ่งเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียกลุ่มแลคติกทั้งหมดที่แยกได้ และดีกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมจุลินทรีย์ในกองหมัก โดยปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก กรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก และกรดแลคติกในชุดการทดลองที่หนึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ส่วนค่าดรรชนีการหมักในชุดการทดลองที่หนึ่งจะมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชุดการทดลองทั้งสามไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Project Comparative Studies on Quality of Fermented Cocoa Bean Imoculated with Isolated Microorgamisms

Researcher Assistant Professor Duangjai Ochaikul

Abstract

The changes of total amounts of microorganisms, yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria were high in the day of fermentation and the highest in the second day of fermentation. The counts of total microorganisms, yeasts and, lactic acid bacteria were 4.25×10^7 , 2.85×10^7 and 2.85×10^7 CFU/g repectively. For acetic acid bacteria, the highest amount obtained in the third day of fermentation which a value of 7.5×10^6 CFU/g. After that their amounts were decreased. From the studies on classification of yeasts, it was found that *saccharomyces cerevisiae* was the most common during fermentation, while *Candida tropicalis* and *Candida sorbosa* were found in equal amount. For lactic acid bacteria, *Lactobacillus* was found the most common in the early stage of fermentation and *streptococcus* was found the most abundant at the end stage of fermentation.

Studies on biochemical changes of cocoa bean isolated after fermentation found that the first treatment added with all yeasts had better result than the second treatment added with saccharomyces cerevisiae and all lactic acid bacteria and also better than the control treatment which had no addition of microorganisms. The types of acids found were citric acid, volatile acid in the form acetic acid and lactic acid which were lower in the first treatment than in other treatments. The fermentation index in the first treatment was higher than in others. For statistical analysis suggested that all treatments were insinificantly different.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2540 ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้ นายอติพล บุญเรืองถาวร นายอนุรักษ์ อมรเศรษฐชัย และนางสาวอัญญรัตน์ เศรษฐาภินันท์ นักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

คณะผู้จัดทำ

กุมภาพันธ์ 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	3
1.2 ขอบเขตของโครงงานวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
2.1 พันธุ์โกโก้	5
2.2 การหมักเมล็ดโกโก้	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก	9
2.4 การทำแห้ง	13
2.5 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง	14
2.6 การเก็บรักษาเมล็ดโกโก้แห้ง	16
2.7 ประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้ของเมล็ดโกโก้	16
2.8 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	16
2.9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก	21
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	27
1. ผลโกโก้	27
2. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์	27
4. อุปกรณ์	28
5. วิธีการทดลอง	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง	34
1. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก	34
2. การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมัก	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก 34

2. การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมัก 35

3. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์ที่พบระหว่างการหมัก 36

4. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแอซิติกระหว่างการหมัก 37

5. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมัก 38

6. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติก ในระหว่างการหมัก 39

7. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ใน ระหว่างการหมักครั้งที่ 2 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 52

ภาคผนวก 54

เอกสารอ้างอิง 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. การหมักในเข่ง	6
2. การหมักในลังไม้	7
3. การหมักเป็นกองสูงบนพื้น	8
4. การหมักในกระบะหรือถาดไม้	9
5. การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	34
6. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	35
7. การเปลี่ยนแปลงยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	36
8. การเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	37
9. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	38
10. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	39
11. ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้	40
12. การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ	41
13. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ	42
14. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ	43
15. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่างๆ	44
16. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ	45
17. การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกระหว่างการหมักของเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่างๆ	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ 47
19. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ 48
20. การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่าง ๆ 49
21. การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ 50
22. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่างๆ 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการหมักกับค่า cut-test ของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสช็อคโกแลตและการเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีขององค์ประกอบต่าง ๆ	15
2. แสดงชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักของเมล็ดโกโก้	19
3. แสดงปริมาณของกลิ่นรสและการย่อยสลายโปรตีนหลังจากทำการบ่มเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิต่างๆ	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โกโก้(Theobroma cacao L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง และเป็นพืชยืนต้นพุ่มเตี้ย ที่มีองค์ประกอบของเมล็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งเมล็ดประกอบด้วยไขมัน โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ บริโภคในรูปเครื่องดื่มและอาหารขบเคี้ยวเช่น ช็อกโกแลต โกโก้เริ่มปลูกครั้งแรกในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ต่อมาจึงแพร่หลายไปยังภูมิภาคต่างๆของโลก กลุ่มประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ คือ ไอเวอรีโคส กานา บราซิล ไนจีเรียและมาเลเซีย โดยมีสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศนำ เข้ามากที่สุด(ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และคณะ, 2529)

ประเทศไทยมีความต้องการผลิตภัณฑ์โกโก้เพิ่มสูงขึ้นทุกปี มีการนำเข้าทั้งในรูปเมล็ดโกโก้แห้งและผลิตภัณฑ์จากโกโก้ ผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าได้แก่ โกโก้เพสต์ ไขมันโกโก้ ช็อคโกแลต และอาหารอื่น ๆ ที่ผสมโกโก้ ขณะเดียวกันประเทศไทยสามารถส่งออกเมล็ดโกโก้แห้งไปยังต่างประเทศได้ตั้งแต่ปี 2525 เป็นต้นมา ซึ่งมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากนี้ยังส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์โกโก้ เช่น ช็อคโกแลต ผงโกโก้และอาหารปรุงแต่งอื่นๆที่มีโกโก้ ตลาดส่งออกเมล็ดโกโก้และผลิตภัณฑ์โกโก้ที่สำคัญได้แก่ มาเลเซีย สิงค์โปร์ ฮ่องกง และเวียดนาม(ยอดยิ่ง คงทอง, 2529;มณฑา ส.รัตนูปถัมภ์, 2531)

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับการส่งเสริมและสนับสนุนจากรัฐบาล ในช่วงแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6(พศ.2530-2534) ได้มีการส่งเสริมการผลิตตามแผนการผลิตเพื่อขายและกระจายการผลิต เพื่อทดแทนการนำเข้า แต่ในระยะเวลาดังกล่าวนับได้ว่ายังไม่บรรลุเป้าหมายที่กำหนดไว้(ปียนุช นาคะ, 2537) ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกโกโก้ทั้งหมด 18,732 ไร่ เป็นพื้นที่ให้ผลผลิตแล้ว 10,001 ไร่ พื้นที่ส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดภาคใต้ 15,002 ไร่ ส่วนภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ปลูกโกโก้ 400 และ 3,326 ไร่ ตามลำดับ (ปียนุช นาคะ, 2537) การปลูกโกโก้นั้นทำได้ 2 ลักษณะดังนี้ คือ ปลูกแบบพืชเดี่ยว และปลูกเป็นพืชแซมระหว่างพืชอื่น เช่น มะพร้าว ยางพารา และปาล์มน้ำมัน โดยทั่วไปเกษตรนิยมปลูกเป็นพืชแซมในสวนมะพร้าวมากที่สุด เพื่อเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเสริมรายได้ นอกจากนั้นยังมีผลให้มะพร้าวออกลูกดกขึ้น (มณฑา ส.รัตนูปถัมภ์, 2531) สำหรับปริมาณความต้องการใช้โกโก้เพื่ออุตสาหกรรมนั้น ปัจจุบันมีความต้องการเมล็ดโกโก้แห้งมากขึ้น อัตราปีละ 15,000 ตัน ดังนั้นการปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง จึงมีความจำเป็นมากขึ้น

กรรมวิธีการผลิตเมล็ดโกโก้แห้งนั้นมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การหมักเมล็ดโกโก้ ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโกโก้สด โดยเฉพาะสีและกลิ่นรส และขั้นตอนการอบแห้งเมล็ดโกโก้ การหมักมีผลสำคัญต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ โดยขบวนการหมักจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับโกโก้ที่ได้จากการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองส้ม การเก็บเกี่ยวผลโกโก้ในแต่ละประเทศจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้น ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในเยื่อหุ้มเมล็ดโดยน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งในที่สุดจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยกิจกรรมของยีสต์และแบคทีเรีย มีผลให้อุณหภูมิของกองหมักสูงขึ้นและเมล็ดโกโก้สูญเสียการงอก ส่วนเมล็ดโกโก้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อองค์ประกอบของโปรตีนและไนโตรเจนมีการสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อคโกแลตขึ้นมา (Knapp,1937; Forsyth, 1952; Wood,1985; Rohan,1963) แต่กลิ่นรสช็อคโกแลตนั้นจะเกิดขึ้นในขั้นตอนการนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปตากแห้งแล้วนำไปคั่ว

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมัก คือ ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก โดยยีสต์เจริญในระยะแรกของการหมักและสร้างแอลกอฮอล์ ต่อมาแบคทีเรียแอซีติกเจริญขึ้นและเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติก ส่วนแบคทีเรียแลคติกพบได้ตลอดการหมัก แต่เจริญได้ดีในช่วงที่ยีสต์เริ่มลดจำนวนลง ก่อนที่แบคทีเรียแอซีติกเจริญขึ้นแทนที่ ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของเยื่อหุ้มเมล็ดในระหว่างการหมัก คือ ในระยะแรกเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีสีชมพูหรือสีขาว ต่อมาเมื่อเกิดการหมักจะมีสีคล้ำขึ้น และเมื่อจางหายไป โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมา ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโดยกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทำให้เกิดกลิ่น รสช็อคโกแลตขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ที่ทำการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้

1.1 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่าง การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดแอซีติก เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่หมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ

1.2 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อที่แยกได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงขบวนการผลิตเมล็ดโกโก้ให้ได้เมล็ดโกโก้ที่ดีมีคุณภาพ
2. เพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูก
3. เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยเกี่ยวกับเมล็ดโกโก้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 พันธุ์โกโก้ แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ (ผานิต งานกรณาธิการ, 2532; Wood, 1975) คือ

2.1.1 สายพันธุ์คริออลโล ผลมีสีแดงหรือเขียว เปลือกบาง ผิวขรุขระ ก้นผลแหลมและผลยาว เมื่อสุกผลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม เมล็ดขนาดใหญ่มีสีขาวหรือม่วงอ่อน สายพันธุ์นี้จะให้กลิ่นและรสชาติดี ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผลิตช็อคโกแลต แต่เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำและไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงจึงไม่นิยมปลูก

2.1.2 สายพันธุ์ฟอราสเทอโร แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.1.2.1 เวสท์แอฟริกันอะมิโลนาโด (West African Amelonado) ผลมีสีเขียว เมื่อสุกฝักมีสีเหลืองเปลือกหนา ก้นมน เมล็ดแบนกว่าพันธุ์คริออลโล และมีสีม่วงเข้ม สามารถผสมตัวเองได้จึงไม่ค่อยกลายพันธุ์ แต่เป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่อโรคยอดแห้งและกิ่งแห้ง แต่สามารถต้านทานต่อแมลงได้ดี เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและเป็นที่ต้องการของตลาด

2.1.2.2 อัปเปอร์อเมซอน (Upper Amazon) เป็นพันธุ์ที่เจริญได้รวดเร็ว ให้ผลผลิตสูง ต้นแข็งแรง เจริญเติบโตดี ทนทานต่อการรบกวนของโรคและแมลงบางชนิด กลายพันธุ์ได้ง่าย ผลมีลักษณะสีเขียว เมื่อสุกสีเหลืองเมล็ดขนาดเล็กสีม่วงเข้ม ขนาดของผลใกล้เคียงกับพันธุ์อะมิโลนาโด

2.1.3 สายพันธุ์ตรินิตาริโอ (Trinitario) ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ ก้นผลแหลม เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์คริออลโลกับพันธุ์เวสท์แอฟริกันอะมิโลนาโด ให้ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์เวสท์แอฟริกันอะมิโลนาโด นิยมปลูกด้วยการติดตา หรือปักชำ (วิทย์ สุวรรณวุธ,2527)

2.2 การหมักเมล็ดโกโก้

การหมักเมล็ดโกโก้เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการสร้างสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสช็อคโกแลต การหมักยังช่วยป้องกันการย่อยสลายไขมันเนยโกโก้ได้ และยังช่วยเร่งการย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ให้เร็วขึ้น ทำให้สามารถทำแห้งเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักง่ายขึ้น (Zak et al., 1972)

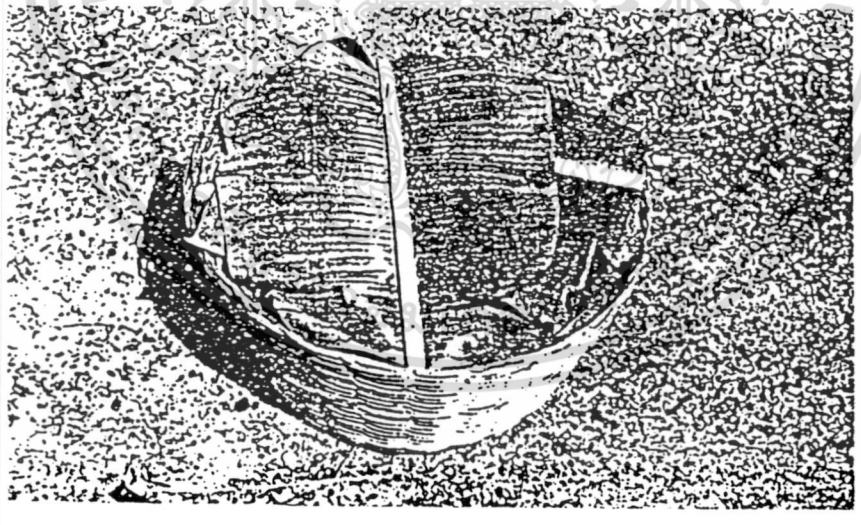
หลังจากเก็บเกี่ยวผลโกโก้ที่สุกจากต้นมากองไว้ ต้องแกะฝักแยกเอาเมล็ดโกโก้ออกมาใส่ในภาชนะสำหรับหมัก อาจใช้เข่งสาน ลังไม้ กะบะ หรือกองบนพื้น ขุดระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักมีการกลับเมล็ดเป็นครั้งคราวเพื่อให้อากาศแก่กองหมัก และเป็นการผสมเมล็ดโกโก้ที่หมักให้เข้ากัน ทำให้การหมักเกิดสม่ำเสมอ วิธีการหมักเมล็ดโกโก้มีหลายวิธีต่างๆ กันดังนี้คือ

2.2.1 <u>การหมักในเข่ง</u> (Basket Fermentation)

เป็นวิธีที่นิยมกันมากในหมู่เกษตรกรรายย่อย โดยเฉพาะในประเทศมาเลเซีย จะบรรจุโกโก้สดลงในเข่งที่รอบเข่งด้วยใบตองสด บรรจุประมาณ 25-30 กิโลกรัม ปิดทับผิวหน้าเมล็ดโกโก้ในเข่งด้วยใบตองสด 2-3 ชั้น นำเข่งตากแดดไว้ 2 วัน จึงถ่ายโกโก้ลงเข่งใหม่ คลุมด้วยใบตอง เมื่อครบ 2 วันถ่ายเมล็ดโกโก้ลงในเข่งใบแรกทิ้งไว้ 2 วัน เมื่อหมักครบ 7 วัน ก็นำเมล็ดโกโก้ออกจากเข่งนำไปตากแดด(Wood and Lass.1985) ดังแสดงในรูปที่ 1 สำหรับเกษตรกรในประเทศไทยพบว่าร้อยละ 78 ใช้เข่งเป็นภาชนะบรรจุในการหมัก เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมทำการหมักเป็นเวลา 5-7 วัน มีการกลับเมล็ดทุก 2 วัน (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534)



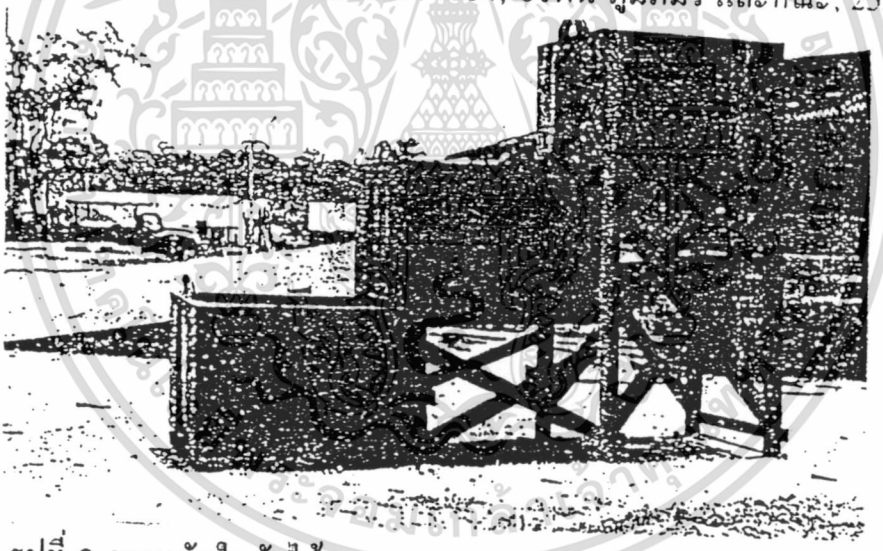
รูปที่ 1 การหมักในเข่ง

ที่มา : Rohan (1963)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 <u>การหมักในถังไม้</u> (Box Fermentation)

การหมักแบบนี้ใช้ในสวนขนาดใหญ่หรือในโรงงานรับซื้อเมล็ดโกโก้สด ขนาดของถังไม้ที่ใช้หมักขึ้นอยู่กับปริมาณของเมล็ดโกโก้สด ลังไม้ทำจากไม้เนื้อแข็งและมีร่องเล็กๆ ด้านใต้ เพื่อให้น้ำหมักที่เกิดขึ้นไหลออกได้ โดยขนาดของร่องกว้าง 15 มิลลิเมตร ระยะห่างกัน 10-15 มิลลิเมตร ขนาดของลังไม้ควรจะมีความลึกไม่เกิน 0.75 เมตร นิยมใช้ลังไม้ในการหมักของประเทศผู้ผลิตโกโก้รายใหญ่ ด้านบนปิดด้วยใบตองหรือกระสอบ ทำการหมัก 6 วัน โดยมีการกลับเมล็ดทุกวันหรือ ทุก 2 วัน การกลับกองหมักกระทำโดยการถ่ายเมล็ดโกโก้จากกล่องใบที่หนึ่งไปยังกล่องอีกใบหนึ่งซึ่งปกติวางอยู่ในระดับต่ำกว่ากล่องใบแรกและวางติดกัน วิธีนี้ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดีเช่นกัน (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534; อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536)



รูปที่ 2 การหมักในลังไม้

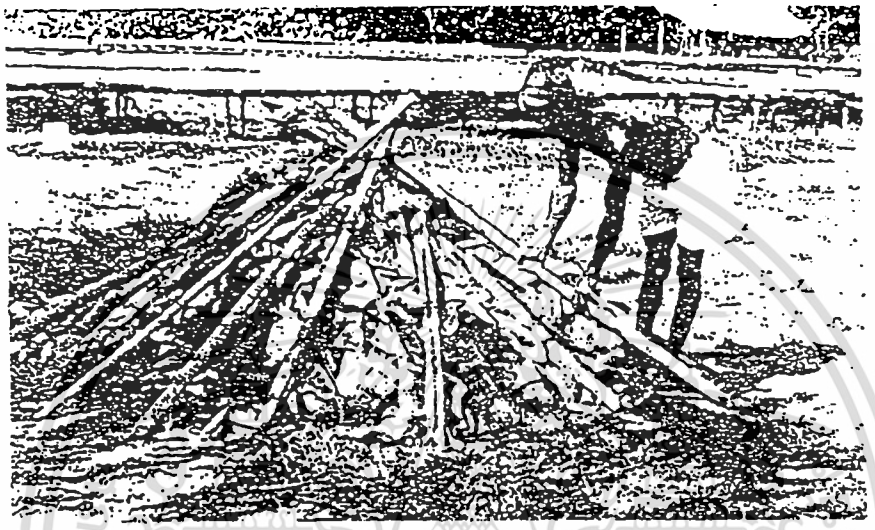
ที่มา : Rohan (1963)

2.2.3 <u>การหมักเป็นกองสูงบนพื้น</u> (Heap Fermentation)

นำเมล็ดโกโก้อย่างน้อยน้ำหนักประมาณ 450 กิโลกรัม นำมากองไว้บนใบตองสดซึ่งปูไว้และมีไม้ท่อนยาวรองไว้ข้างล่างเพื่อให้ของเหลวไหลออกได้ระหว่างการหมัก แล้วคลุมทั้งกองเมล็ดโกโก้ด้วยใบตองสดอีกครั้ง ทั้งนี้เพื่อให้อุณหภูมิของเมล็ดโกโก้ที่หมักสูงขึ้น โดยให้มีความสูงของกองเมล็ดโกโก้ประมาณ 60-90 เซนติเมตร กลับเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุก 2 วัน โดยคลุกเมล็ดกลับไปมาให้เข้ากันและหมักนาน 6 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3 แล้วจึงนำไปตากแดดให้แห้ง (Wood and Lass ,1985)

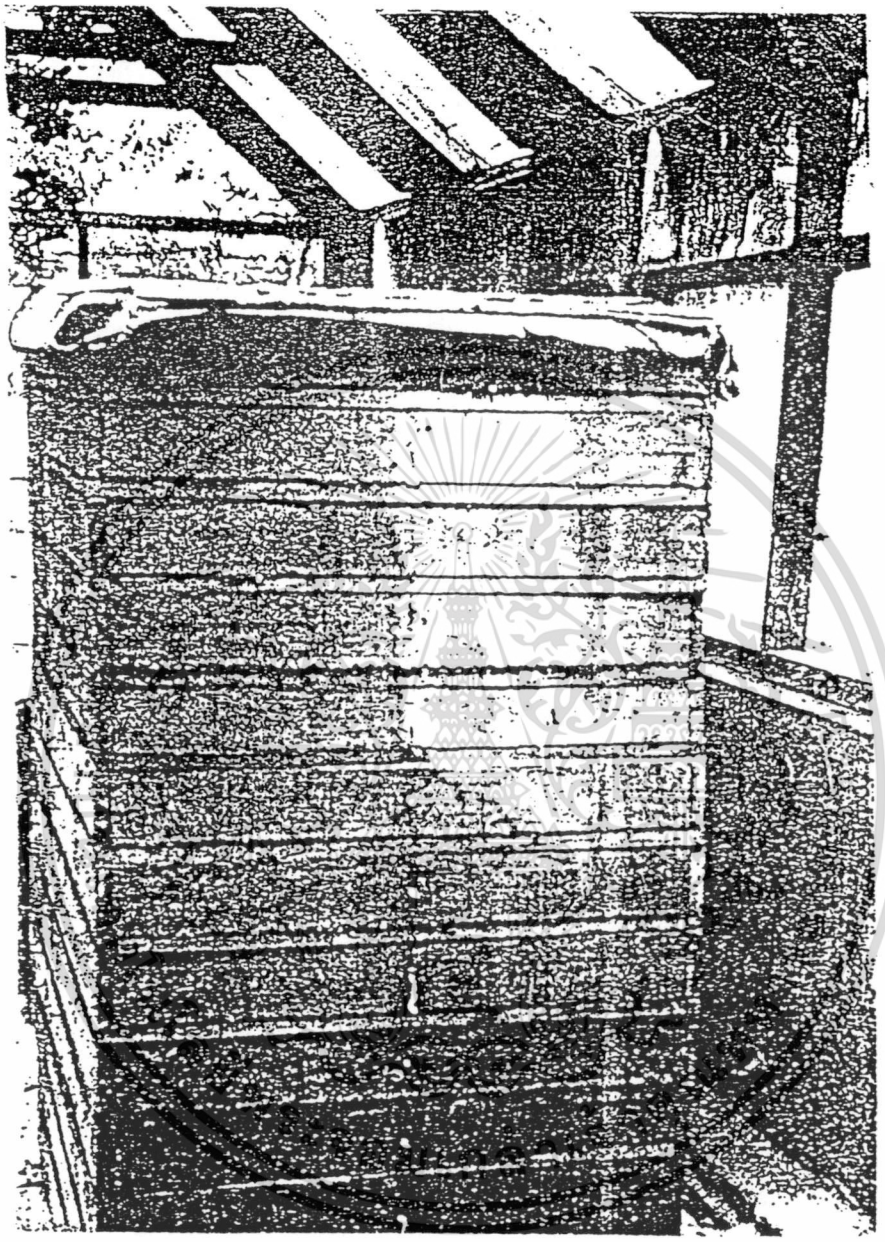


รูปที่ 3 การหมักเป็นกองสูงบนพื้น
ที่มา : Rohan (1963)

2.2.4 <u>การหมักในกะบะหรือถาดไม้</u> (Tray Fermentation)

การหมักโดยวิธีนี้เหมาะกับโกโก้ที่มีปริมาณน้อย โดยภาชนะมีหลายขนาดได้แก่ 90x90x10 เซนติเมตร หรือ90x90x13 เซนติเมตร เป็นต้น โกโก้ที่ใช้หมักในกะบะเช่นนี้จะต้องใช้อย่างน้อย 8-12 ถาด วางซ้อนทับกันเพื่อให้มีความร้อนเพียงพอ โดยในแต่ละถาดจะแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ถาดบนสุดจะปิดด้วยใบตองและชั้นของถาดทั้งหมดจะคลุมด้วยกระสอบ ส่วนใหญ่จะเว้นถาดสุดท้ายให้ว่าง เพื่อให้มีการให้อากาศได้ดีโดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 การหมักในถาดไม้

ที่มา : Rohan (1963)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

2.3.1 ระยะเวลาในการหมัก

เวลาในการหมักโกโก้อยู่ในช่วง 2-12 วัน ซึ่งระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับ ประเทศ ฤดูกาล สถานที่ ปริมาณของเมล็ดโกโก้ กรรมวิธีในการหมักและพันธุ์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โกโก้ (Roelofsen,1958; Rohan, 1963) เช่น เมล็ดพันธุ์คริออลโลจะใช้เวลาในการหมัก 2 วัน พันธุ์ฟอราสเทอโร ใช้เวลาในการหมัก 4-12 วัน (Roelofsen, 1958)

Forsyth and Quesnel (1957) ได้ให้หลักเกณฑ์ในการพิจารณาถึงการสิ้นสุดของการหมักเมล็ดโกโก้ คือการใช้ตารางเวลากำหนด การผ่าดูสีเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก การสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเมล็ด การสังเกตการเปลี่ยนแปลงกลิ่นของกองหมัก การลดลงของอุณหภูมิของกองหมัก

Wood and Lass(1985) พบว่าหากหมักเมล็ดโกโก้นานเกินไป ทำให้แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายโปรตีนในสภาพไร้อากาศเจริญได้ มีผลให้เกิดกลิ่นรสของชื่อคโกแลตน้อยลง แต่หากระยะเวลาการหมักสั้นเกินไป เมล็ดโกโก้ที่ได้มีสีม่วง และมีรสฝาดหรือขม

2.3.2 <u>การให้อากาศแก่กองหมัก</u>

การให้อากาศแก่กองหมักเมล็ดโกโก้ มีผลให้เกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยยีสต์ในช่วงแรกของการหมักในสภาพใช้อากาศไปเป็นกรดแอซีติก การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่มีผลให้เกิดการสลายส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นของเหลว(Lehrian and Patterson,1983)

Lopez and Quesnel(1973) พบว่าหากเกิดความล่าช้าในการให้อากาศ หรือการกลับกองหมักมีผลให้การสร้างกรดแอซีติกเกิดขึ้นช้ากว่าปกติและมีผลทำให้ปริมาณกรดในตอนสุดท้ายของการหมักสูงขึ้นด้วย ถึงแม้ว่าอุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นเหมือนปกติ กรดที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการหมักเป็นตัวจำกัดปริมาณ กรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ โดยกรดแอซีติกมีผลต่อการเจริญของยีสต์และยับยั้งการสร้างเอทานอล

การให้อากาศในระยะหลังของการหมักช่วยให้เกิดการออกซิไดซ์ของกรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Carr et al.,1980)

2.3.3 <u>ขนาดของกองหมักและปริมาณของเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมัก</u>

ปริมาณโกโก้ที่ใช้หมักมีผลต่ออัตราการให้อากาศแก่กองหมัก หากกองหมักมีขนาดใหญ่ บริเวณผิวหน้าของกองหมักมีการถ่ายเทอากาศดีกว่า เป็นผลให้อุณหภูมิบริเวณผิว ของกองหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่าบริเวณในกองหมัก ถ้ากองหมักมีขนาดเล็กมาก ทำให้อากาศสามารถแพร่เข้าสู่กองหมักได้ดีกว่า ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มกิจกรรม

เอกสารนี้ใช้สำหรับการศึกษาเพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของจุลินทรีย์จะแพร่ออกจากกองหมักได้ง่าย การหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อยมีผลทำให้สูญเสียปริมาณความร้อน ได้เร็วกว่าปกติ แนวทางหนึ่งในการหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อยๆ ให้ได้ผลดี คือ การกลับกองหมักให้น้อยครั้งและควรทำฉนวนหุ้มภาชนะหมักเพื่อลดการสูญเสีย ความร้อน (ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และคณะ, 2529) การเพิ่มขึ้นของความร้อนในกองหมักนั้นพบว่าหากมีการเพิ่มอย่างช้าๆ จะให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีกลิ่นรสช็อคโกแลตดีกว่าการให้ความร้อนของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2.3.4 <u>การกลับกองหมักหรือการคนเมล็ดโกโก้ที่หมัก</u>

การกลับกองหมักเป็นวิธีการผสมเมล็ดโกโก้ให้สัมผัสกับอากาศและช่วยให้อากาศแพร่เข้าสู่ภายในกองหมักได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังทำให้กองหมักผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเมล็ดโกโก้และป้องกันการเกิดเชื้อราบริเวณผิวหรือมุมอับของกองหมัก วิธีการกลับกองหมักจะกลับช่างเวลา 2 วัน หรือ 4 วัน การกลับกองหมักในช่วงแรกของการหมัก เป็นการให้อากาศแก่กองหมัก ช่วยให้มีการสร้างเอทานอลและยับยั้งการสร้างกรดแลคติกได้ (Lehrian and Patterson, 1983)

Dougan และคณะ (1981) ศึกษาการกลับกองหมักต่อการให้อากาศ โดยการวัดปริมาณออกซิเจนในกองหมักผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การกลับกองหมักในช่วง 3 วันแรกของการหมักมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนในกองหมัก คือปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นหลังจากมีการกลับกองหมักในครั้งแรก แต่ลดลงเมื่อมีการกลับกองหมักในครั้งที่สอง นอกจากนั้นการกลับกองหมักทุกวันยังทำให้อุณหภูมิของกองหมักลดลงอีกด้วย ซึ่งทำให้อัตราการเกิดเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ต่ำลงและทำให้กรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้แห้งเพิ่มขึ้น

2.3.5 <u>การเก็บรักษาฝักโกโก้ก่อนการหมัก</u>

ฉารเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมักมีผลต่อการหมัก คือ เมื่อนำเมล็ดโกโก้ไปทำการหมักทำให้อุณหภูมิของการหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว(Hancock,1949: Rohan,1963: Wood and Lass,1985) เพราะการเก็บฝักโกโก้ทำให้มีการสูญเสียความชื้น ช่วยให้อากาศแพร่เข้าไปภายในกองหมักได้ง่ายขึ้น ทั้งยังช่วยลดปริมาณน้ำและของแข็งในเมล็ดโกโก้ลง ซึ่งเป็นผลของการระเหย และกระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส พบว่าการเก็บโกโก้ไว้ก่อนการหมัก ทำให้การสร้างกรดและการแพร่ของกรดเข้าไปใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วปริมาณกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากผลโกโก้ทั้งที่ผ่านการเก็บฝักไว้ 1 สัปดาห์ และไม่ผ่านการเก็บฝักไว้มีค่าไม่ต่างกันแต่ปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนทำการหมัก 1 สัปดาห์มีค่าสูงกว่าเมล็ดโกโก้ที่ไม่ได้เก็บฝักไว้ก่อนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าฝักโกโก้ที่เก็บไว้ก่อนการหมักเป็นเวลา 2-4 วัน ให้สัดส่วนเมล็ดสีม่วงและเมล็ดที่มีรอยย่นต่ำกว่าเมล็ดโกโก้ที่เก็บไว้วันเดียว การเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนทำการหมักทำให้ความชื้นในเนื้อเยื่อโกโก้ลดลง มีผลให้เวลาในการหมักสั้นลง และยังเป็นการรวบรวมผลโกโก้ให้เพียงพอต่อการหมักในแต่ละครั้งอีกด้วย ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ได้ทดลองเปรียบเทียบกรรมวิธีการหมัก การบ่มฝักโกโก้ก่อนการหมัก และความถี่ในการกลับเมล็ดโกโก้ขณะหมัก พบว่าการเก็บโกโก้ไว้ก่อนทำการหมักช่วยลดเวลาในการหมักแบบใช้กล่องจาก 6 วันเหลือเพียง 4 วัน โดยให้ค่าดรรชนีการหมักสูงเป็น 1.0-1.1 มีกรดแลคติก กรดที่ระเหยได้ และกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม ส่วนความถี่ในการกลับเมล็ดโกโก้ พบว่าเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการกลับเมล็ดทุก 2 วัน มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองที่กลับเมล็ดโกโก้ในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก

2.3.6 <u>การตายของเมล็ดโกโก้</u>

ในระหว่างที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้จะถูกทำลายการงอก เมื่อเมล็ดโกโก้สูญเสียการงอกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไปกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันของสารตั้งต้น และเอนไซม์ต่างๆในเมล็ดโกโก้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อคโกแลตขึ้น ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมล็ดโกโก้สร้างเอทานอลและกรดแอซีติกขึ้นมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 3.5 และร้อยละ 0.4 ตามลำดับ (Wadsworth and Howet,1954) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถทำลายการงอกของเมล็ดโกโก้ได้

2.3.7 <u>ความสุกของฝักโกโก้</u>

ความสุกของฝักโกโก้มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้ โดยพบว่าถ้าฝักโกโก้ไม่สุกจะทำให้กระบวนการหมักไม่สมบูรณ์ อุณหภูมิจะไม่สูงขึ้น(Knapp,1926)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8 ความแตกต่างของอัตราส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดต่อเมล็ด

อัตราส่วนนี้จะเปลี่ยนแปลงตามพันธุ์ของโกโก้และสภาพในการเจริญเติบโต พบว่าพันธุ์อะมีโลนาโด ในประเทศกานา มีอัตราส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดต่อเมล็ดโกโก้เท่ากับ 0.75 ขณะที่พันธุ์อัปเปอร์อเมซอนในประเทศมาเลเซียและกานา มีอัตราส่วนเป็น1.12 และ1.16 ตามลำดับ ถ้าปริมาณร้อยละของอัตราส่วนดังกล่าวสูง ปริมาณน้ำตาลจะเพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้ปริมาณกรดในเมล็ดมากขึ้น เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก(Carr et al., 1981)

2.4 การทำแห้ง

โกโก้จะต้องผ่านการทำแห้ง เพื่อลดปริมาณความชื้นซึ่งอาจทำได้โดย วิธีการตากแดดโดยตรง(Sun drying) การใช้เครื่องมือในการให้ความร้อน(Artificial drying) หรือใช้ทั้งสองวิธีรวมกัน เพื่อลดปริมาณความชื้นในเมล็ดลง ทำให้สามารถเก็บรักษาได้นาน ปริมาณความชื้นหลังสิ้นสุดการหมักจะมีอยู่ประมาณร้อยละ55 หลังจากการทำแห้งแล้วเมล็ดโกโก้ควรมีความชื้นเหลือประมาณร้อยละ6-7 การทำแห้งยังช่วยลดปริมาณกรดลงและยังทำให้เมล็ดโกโก้เกิดสีน้ำตาลขึ้น เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล พร้อมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

เมล็ดแห้งจะมีอายุการเก็บรักษานาน ขณะที่เมล็ดที่มีความชื้นจะเกิดความเสียหายเนื่องจากมีความเจริญของเชื้อราขึ้นและแทงทะลุเข้าไปในเปลือก ผิวสัมผัสของเมล็ดที่ผ่านการทำแห้งที่ดีจะกรอบ ไม่มีเยื่อหุ้มเมล็ดหลงเหลืออยู่ ทั้งยังมีกลิ่นรสช็อคโกแลตที่ดี ไม่มีกลิ่นกรด กลิ่นควัน และกลิ่นที่ไม่ต้องการอื่นๆ เนื่องจากความชื้นลดลง ปริมาณกรดระเหยได้ซึ่งมีอยู่ในเมล็ดโกโก้ก็จะมีปริมาณลดลงตามไปด้วย ก่อให้เกิดการออกซิเดชันของสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อคโกแลตและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติก ซึ่งหากความชื้นในเมล็ดลดลงในอัตราที่ช้าเกินไปทำให้เกิดกรดแลคติกได้ดี (Lopez and Quesnel,1973)

การทำแห้งโดยใช้แสงแดด เป็นวิธีที่ทำให้เมล็ดโกโก้แห้งมีกลิ่นรสที่ดี และเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ วิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายและทำได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน ต้องการแรงงานสูง ถ้าจำนวนโกโก้มีปริมาณมากจะทำให้วิธีนี้ไม่ได้ผล การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำแห้งโดยแสงแดดใช้เวลาประมาณ 6 วัน ในกรณีที่อากาศแห้ง และใช้เวลานานถึง 6 สัปดาห์ ในกรณีอากาศชื้น ส่วนการทำแห้งโดยใช้ความร้อนจากแหล่งอื่นจะใช้ได้ดีในกรณีที่มีเมล็ดโกโก้จำนวนมากๆและอยู่ในช่วงฤดูฝนหรือช่วงที่มีความชื้นสูง (Jinap et al.,1990)

2.5 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดโกโกแห้ง

2.5.1 การทำ cut test

เป็นการนำเมล็ดโกโก้แห้งมาทำการผ่าออกเพื่อดูลักษณะภายในของเมล็ด ซึ่งควรจะมีลักษณะดังต่อไปนี้คือ เป็นเมล็ดที่มีผิวเต่ง ไม่เหี่ยวย่น ขนาดของเมล็ดสม่ำเสมอ แห้งสนิท ปราศจากกลิ่นควันไฟหรือสิ่งอื่นใด เมล็ดโกโก้ไม่แตกหักมากเกินไป

เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มาตรฐานจะต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้(Wood and Lass,1985)

1. ความชื้นของเมล็ดไม่ควรเกินร้อยละ 7
2. มีน้ำหนักเฉลี่ยเมล็ดโกโก้ไม่น้อยกว่า 1 กรัมต่อเมล็ด
3. ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ดไม่ควรเกินร้อยละ12 โดยน้ำหนัก
4. สุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้ง 200 เมล็ด โดยนำมาผ่าตามยาว เมื่อนับจำนวนเมล็ดจะต้องมีจำนวนเมล็ดดังต่อไปนี้

-เมล็ดที่เป็นเชื้อรามีไม่เกินร้อยละ 7

-เมล็ดที่มีสีเทาหรือสีหินชนวนไม่เกินร้อยละ 3

-เมล็ดที่ถูกแมลงเจาะทำลาย เมล็ดงอกและเมล็ดเสียหรือลีบรวมกันแล้วไม่เกิน ร้อยละ 3

-เมล็ดสีม่วงมีไม่เกินร้อยละ 2-3

-ถ้าเป็นสีม่วงหรือสีน้ำตาลบางส่วนจะมีได้ร้อยละ 40 และอย่างมากไม่เกินร้อยละ 60

5. ปริมาณไขมันโกโก้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 55

ถ้าหากมีเมล็ดที่มีลักษณะดังกล่าวเกินกว่าที่กำหนดไว้ข้างต้น ถือว่าเมล็ดโกโก้นั้นไม่ได้มาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการหมักกับค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ แสดงดังตารางที่ 1

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการหมักกับค่าcut test ของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสช็อคโกแลตและการเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีขององค์ประกอบต่างๆ

เวลาการหมัก	เมล็ดโกโก้แห้ง (100เมล็ด)			กลิ่นรสช็อกโกแลต	ค่าดรรชนีองค์ประกอบต่าง ๆ		
(วัน)	น้ำตาล	ม่วง	หินชนวน		Nitrogen	Catechin	Carbohydrate
0	-	94	6	ไม่มีกลิ่นโกโก้ มีกลิ่นถั่ว รสฝาด	30	1.70	0.245
2	-	80	20	ไม่มีกลิ่นโกโก้ มีกรด รสฝาด	35	0.81	0.262
4	42	54	4	มีกลิ่นโกโก้อ่อน ๆ ฝาด	50	0.81	0.915
6	-	-	-	-	40	0.50	1.470
6:	88	10	2	กลิ่นโกโก้แรง ๆ มีกรดต่ำ	33	0.23	1.660

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hoskin และคณะ(1984)

6: = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการทำแห้งด้วยแสงแดดแล้ว

- = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

2.5.2 <u>การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส</u>

การประเมินคุณภาพจะมีส่วนช่วยในการตัดสินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้าย ซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เกิดความแน่ใจว่าผลิตภัณฑ์อาหารนั้นมีคุณภาพตามต้องการเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

คุณภาพอาหารที่รู้สึกได้โดยประสาทสัมผัสได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นได้ ลักษณะสัมผัสได้โดยกล้ามเนื้อและลักษณะที่รู้สึกได้ด้วยกลิ่นรส การประเมิณคุณภาพว่าอาหารนั้นๆมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับหรือไม่ต้องอาศัยประสาททั้ง 5 ของคน ได้แก่ ประสาทเกี่ยวกับการมองเห็น การได้กลิ่น การรู้รส การสัมผัสและการได้ยิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบคุณภาพของโกโก้แห้งนั้น จะทำการอบเมล็ดโกโก้แห้งก่อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกและปั่นให้ละเอียดและทำการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสทั้ง 5 โกโก้ที่มีคุณภาพดีจะมีกลิ่นกรด กลิ่นควันและกลิ่นหืนน้อย แต่มีกลิ่นโกโก้ชัดเจนและต้องมีรสเปรี้ยว รสฝาดน้อย

2.6 การเก็บรักษาเมล็ดโกโก้แห้ง(Cocao storage)

การเก็บรักษาเมล็ดโกโก้แห้งจะต้องเก็บที่ความชื้นน้อยกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ เพราะเมล็ดโกโก้มีคุณสมบัติในการดูดความชื้นได้ดี(Hydroscopic) โดยจะดูดความชื้นได้ดีที่บรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง

ดังนั้นจึงควรมีการระบายอากาศในห้องเก็บ โดยเปิดประตูเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ภายนอกต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และปิดประตูในช่วงความชื้นสัมพัทธ์ภายนอกสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้มีสภาวะพอเหมาะในโกดังเก็บได้ และจะต้องออกแบบโกดังเพื่อป้องกันมิให้มีการเจริญเติบโตของราและแมลง ซึ่งปริมาณเชื้อราเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ก็ไม่สามารถแยกออกได้ในกระบวนการแปรรูป แมลงที่เข้าทำลายเมล็ดโกโก้ ได้แก่ Cigarette beetle(Lasioderma semicome) , Rust red flour beetle(Tribolium castaneum) , Tropical wavehouse moth(Eschestia cautella)

2.7 ประโยชน์ของวัสดุเหลือใช้ของเมล็ดโกโก้

วัสดุเหลือใช้ของเมล็ดโกโก้ สามารถนำไปผลิตเยลลี่และน้ำโกโก้ สำหรับเป็นของหวานและเครื่องดื่มได้จากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 10-15 เปอร์เซ็นต์ เพคติน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดซิตริก 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรสชาติหวานอมเปรี้ยว ดังนั้นการสกัดเอาของเหลวออกจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยไม่ทำให้เมล็ดเสียหายก่อนนำไปหมักเพื่อนำไปทำเป็นเยลลี่ และน้ำโกโก้นั้น จะสามารถเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร สำหรับฝักโกโก้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากเป็นแหล่งของโปแตสเซียมและไนโตรเจน โดยสามารถนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ได้อีกด้วย

2.8 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

โดยปกติแล้วเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่พบนั้นได้รับจากสิ่งแวดล้อมหลังจากที่เมล็ดถูกแกะออกจากฝักแล้ว จุลินทรีย์ที่แยกได้จากกองหมักคือ Enterobacteriaceae , Lactobacillaceae , Bacillaceae ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Pseudomonadaceae , Micrococcaceae , Corynebacteriaceae , Propionibacteriaceae , Actinomycetaceae , Azotobacteriaceae และ Brevibacteriaceae (Ostovar and Keeney ,1973) จุลินทรีย์เหล่านี้แยกได้จากผิวของฝัก มือของคนงาน และมีดที่ใช้ การหมักเมล็ดโกโก้ที่ประสบผลสำเร็จจะต้องมีปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม บทบาทของจุลินทรีย์ในการหมักเมล็ดโกโก้นอกจากนี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นรสแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกรด และกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเมล็ดโกโก้อีกด้วย จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการหมัก คือ ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก

2.8.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้มากที่สุดในระยะ 1-2 วันแรกของการหมัก ยีสต์จะใช้น้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อย่างรวดเร็ว ได้ผลิตภัณฑ์คือเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังได้กรดเอสเทอร์ กลีเซอรอลและสารประกอบคัลดีไฮด์ ยีสต์จะมีเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ด เกิดเป็นของเหลว กระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ ทำให้ความเป็นกรด-ด่างของเมล็ดโกโก้ลดลงประมาณ 4.0 โดยการเกิดเมตาบอลิซึมของกรดซิตริก(Roelofsen,1958)หลังจากที่เยื่อหุ้มเมล็ดย่อยสลายเป็นของเหลวแล้ว จะทำให้แบคทีเรียพวกแอซีติกเจริญแทนที่ยีสต์ นอกจากนี้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์

ยีสต์ชนิดต่างๆที่พบได้ในการหมักเมล็ดโกโก้แสดงดังตารางที่ 2 โดยยีสต์ชนิดต่างๆจะเจริญในสภาวะที่เหมาะสมต่างกันไปเช่น Saccharomyces *sp.*เจริญได้ดีเมื่อมีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูง และมีความเข้มข้นออกซิเจนในระดับต่ำ ขณะที่ Candida krusei เจริญได้ดีในสภาพมีอากาศและใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้(Lehrian and Patterson,1983)

อรพิน ภูมิภมร และคณะ(2536) ได้ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งหมัก และในลังไม้เป็นเวลา 6 วัน โดยกลับกองหมักวันละครั้งในระยะสองวันแรกของการหมัก พบว่ายีสต์ที่เจริญในกองหมักเมล็ดโกโก้เป็นกลุ่มที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic yeasts) ซึ่งจะพบได้ในปริมาณสูงในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นยีสต์

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

54580

จะมีปริมาณลดลง นิยม กำลังดี(2537) ศึกษาบทบาทของยีสต์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้ยีสต์ 3 ชนิดคือ Saccharomyces cerevisiae, Candida sorbosa, C. sake เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้เป็นเวลา 7 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่า S. cerevisiae มีคุณสมบัติที่เหมาะสมมากที่สุดในการหมักเมล็ดโกโก้คือสามารถเจริญในกองหมักได้ดี ย่อยสลายน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดได้ดี เมล็ดโกโก้มีค่าดรรชนีการหมักสูง ปริมาณกรดแลคติก กรดซิตริก และกรดแอซีติกต่ำ และยังให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงสุดคือร้อยละ 77.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้

ยีสต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
Candida sp.	(1),(2)
C. catenulata	(6)
C. krusei	(2),(6),(7)
C. mycoderma	(2)
C. parapsilosis	(2)
C. sake	(7)
C. sorbosa	(7)
C. tropicalis	(7)
Saccharomyces sp.	(2),(6)
S. cerevisiae	(2),(7)
S. carlsbergensis	(2),(7)
Pichia sp.	(1)
P. farinosa	(6)
P. fermentans	(2),(5),(6)
S. rosei	(5)
S. chevalieri	(3)
Trichosporon cutaneum	(5)
T. pullulans	(6)
T. rosei	(6)
T. holmii	(3)
T. castellii	(3)
T. candida	(3),(4)

ที่มา : (1) Carr et al. (1979,1980) (2) De Carmago et al. (1963)
(3) Rombouts (1952) (4) Maravalhas (1966)
(5) Ravelomanana (1986) (6) ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ตลอดการหมักมีทั้งกลุ่ม โฮโมเฟอร์เมนเทตีฟ ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคลิซิส และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเทตีฟซึ่งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดแอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส บทบาทสำคัญของแบคทีเรียแลคติกคือการสร้างกรดให้รสเปรี้ยวและให้สารให้กลิ่นหอมต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มไมโครแอโรไฟล์(Microaerophile)เจริญได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นออกซิเจนต่ำหรือมีออกซิเจนอยู่แต่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง แบคทีเรียแลคติคที่พบในการหมักเมล็ดโกโก้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุลแลคโตบาซิลลัส ได้แก่ Lactobacillus lactis, L. bulgaricus, L. casei, L. plantarum, Leuconostoc mesenteroides และในช่วงสุดท้ายของการหมักพบแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Streptococcaceae sp. เจริญได้ในปริมาณสูง (Lehrian and Patterson,1983; Passos et al., 1984)

2.8.3 แบคทีเรียแอซีติก

ในช่วง 2 วันแรกของการหมักจะพบแบคทีเรียแอซีติกจำนวนน้อย โดยพบเพียง Acetobacter roseus, A. aceti, A. suboxydans และ Gluconobacter oxydans เนื่องจากช่วงแรกของการหมักมีสภาพไร้อากาศแต่แบคทีเรียแอซีติกเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ แบคทีเรียแอซีติกพบเป็นจำนวนมากในช่วง 72 ชั่วโมงแรกของการหมัก ซึ่งเป็นช่วงที่มีออกซิเจน หลังจากนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้จะค่อยๆ ลดลง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก คือ 30-35 องศาเซลเซียส (Ostovar and Keeny, 1973) แบคทีเรียแอซีติกที่พบมี 2 สกุล คือ Gluconobacter ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกไม่เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำและสกุล Acetobacter สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส และกลีเซอรอลได้ที่ pH 7-4.5 และสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้ ขณะเดียวกันสามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกต่อไปแล้ว ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียแอซีติกกลุ่มนี้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ค่าpHที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-6.3 แบคทีเรียแอซีติกสามารถพบได้ตลอดเวลาการหมัก(Roelofsen,1958) การเจริญของแบคทีเรียแอซีติกทำให้อุณหภูมิของการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักสูงขึ้นถึง 50 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า มีการสร้างกรดต่างๆ นั้น เป็นสาเหตุทำให้เมล็ดโกโก้ตายและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในเมล็ดโกโก้เกิดสารตั้งต้นของกลิ่น รสช็อคโกแลตขึ้นมา (Wood and Lass.1985)

2.8.4 จุลินทรีย์อื่นๆ ที่พบในการหมัก

ในระยะสุดท้ายของการหมักเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลงหรือในขณะทำแห้งจุลินทรีย์กลุ่มสร้างสปอร์และเจริญในสภาวะที่มีอากาศ โดยเฉพาะกลุ่ม Bacillus สามารถเจริญได้(Ostovar and Keeney 1973) และมีรายงานว่าB. subtilis มีความสัมพันธ์โดยตรงกับสาร tetramethylpyrazine (TMP) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม alkylpyrazine ที่เป็นสารเริ่มต้นชนิดหนึ่งของสารให้กลิ่นรสในเมล็ดโกโก้

จุลินทรีย์อื่นๆ ที่พบ เช่น ๆ Micrococcus *sp.* ซึ่งถ้ามีในกองหมักจะช่วยทำให้ความเป็นกรดของเมล็ดลดลงเนื่องจากสามารถไปเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดแอซีติกและกรดแลคติก นอกจากนี้ยังพบฟรุคโตสและซูโครส ในกระบวนการหมักได้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomyces หากเจริญในกองหมักจะทำให้เกิดการเน่าเสียและเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นอับและมีรสชาติผิดปกติ (De Camargoet al.,1967)จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในกองหมักเมล็ดโกโก้อีกชนิดหนึ่ง คือ เชื้อราซึ่งจะมีผลต่อการเกิดกลิ่นรสผิดปกติของเมล็ดโกโก้

2.9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก

2.9.1 น้ำตาล

Rohan and Stewart (1967) ศึกษาการย่อยสลายของน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานาและไนจีเรีย โดยการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ตลอดเวลาการหมัก 6 วัน พบว่าน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงตลอดการหมัก ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์จึงลดลง

Reineccius และคณะ (1972) ศึกษาและรายงานชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ดังตารางแสดงให้เห็นว่าชนิดของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้สายพันธุ์ต่างๆ นั้นไม่แตกต่างกัน แต่อัตราส่วนน้ำตาลที่พบจะแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปในแต่ละสายพันธุ์ที่เห็นชัดเจนคือ อัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ ที่มีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีในการหมัก

Berbert (1979) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลระหว่างการหมัก พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักนั้นส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ภายหลังการหมักปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงโดยถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสและพบว่าปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสเพิ่มขึ้นในระยะ 4 วันของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณคงที่ สำหรับน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณต่ำเกือบตลอดการหมัก ในระหว่างการหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสมีปริมาณลดลงแต่น้ำตาลแมนนิทอลมีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.9.2 โปรตีน

Dewitt (1957) แยกสารประกอบไนโตรเจนในเมล็ดโกโก้สด โดยการสกัดด้วยเอทานอล พบว่าในเมล็ดโกโก้สดนั้นประกอบด้วยปริมาณกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์อยู่น้อย Offem (1990) พบว่าเมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณโปรตีนสูงนั้นต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า นอกจากนี้ต้นโกโก้ที่มีอายุอ่อนจะให้เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าเมล็ดโกโก้จากต้นที่มีอายุมาก

การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้นพบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 2 วันแรกของการหมักทั้งนี้เพราะว่าไนโตรเจนจากส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ภายในเมล็ด หลังจากนั้นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดลดลงในอัตราที่เกือบคงที่ตลอดการหมัก การย่อยสลายโปรตีนเกิดขึ้นหลังจากเริ่มต้นการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดลง การลดลงของโปรตีนสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ แต่เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สูงไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีกับเมล็ดโกโก้ (Biehl et al., 1985)

Zak and Keeney (1976) พบว่าในระหว่างการหมักปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ลดลงถึงร้อยละ 56 ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนทั้ง 4 กลุ่มเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการหมัก คือ อัลบูลินเพิ่มขึ้นร้อยละ 40-70 ขณะที่โกลบูลิน โปรลามีน และกลูทีลินที่มีปริมาณลดลง การลดลงของโปรตีนที่สกัดได้เป็นผลจากปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดโกโก้ ส่วนอัลบูลินที่เพิ่มขึ้นเกิดการย่อยสลายโปรตีนของสารประกอบเชิงซ้อนในเมล็ดโกโก้ ในเมล็ดมีต่ำกว่าจุดวิกฤติของการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน

2.10 เอนไซม์ในเมล็ดโกโก้

สามารถจำแนกเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้ออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.10.1 เอนไซม์กลุ่มไกลออกซิเดส

ดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้วัดโดยใช้การเปลี่ยนสีของเมล็ดโกโก้จากสารสีม่วงไปเป็นสารสีน้ำตาล เมล็ดโกโก้หากมีสีหินชนวนหรือสีเทาแสดงว่าเป็นเมล็ดโกโก้ที่ยังไม่เกิดการหมัก เอนไซม์ไกลออกซิเดสทำหน้าที่ตัดโมเลกุลของแอนโทไซยานินออกเป็นน้ำตาล และแอนโทไซยานิดิน ภายใต้สภาวะไร้อากาศ หลังจากนั้นเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจึงทำปฏิกิริยาในช่วงสุดท้ายของการหมักและการทำแห้ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขึ้นในเมล็ดโกโก้ (Maravalhas, 1996)

2.10.2 เอนไซม์กลุ่มโปรติเอส

ในระหว่างการหมักที่มีสภาพไร้อากาศนั้น การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกรดอะมิโนโปรตีนเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน Roelofsen (1958) ศึกษาการปล่อยกรดอะมิโนไนโตรเจน และโปรตีนไนโตรเจน ระหว่างการหมักของเมล็ดโกโก้พันธุ์ ICS-1 ในประเทศตรินิแดดข้อมูลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ละลายในเอทานอลลดลงอย่างมาก ขณะเดียวกันมีการเพิ่มของกรดอะมิโนไนโตรเจนมากขึ้น อัตราส่วนของการเปลี่ยนแปลงค่าดังกล่าวมีค่าต่ำในช่วงฤดูร้อน อันมีสาเหตุมาจากการระเหยน้ำอย่างรวดเร็วของเมล็ดโกโก้ในขณะหมักจนทำให้ค่า water activity ในเมล็ดมีต่ำกว่าจุดวิกฤตของการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน นอกจากนั้นพบว่าการให้ความร้อนแก่เมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส มีผลในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนไนโตรเจนน้อยกว่าการเพิ่มระยะเวลาในการหมักเมล็ดโกโก้

2.10.3 เอนไซม์กลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดส

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือการเกิดออกซิเดชันของสารอิพิคาทิชินไปเป็นควิโนน ซึ่งจะเกิดการรวมกับตัวเองหรือสารประกอบควิโนนตัวอื่นๆ เป็นสารประกอบสีน้ำตาลขึ้น สีที่เกิดขึ้นนี้จะเกิดอย่างถาวรในเมล็ดโกโก้ เป็นผลให้มีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดและมีผลในการลดปริมาณโปรตีนอันเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์โปรติเอสลง

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของ ... ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวมีความสำคัญต่อการหมักเมล็ดโกโก้คือ ก่อให้เกิดสารสีน้ำตาลขึ้นในเมล็ดโกโก้ ช่วยลดความขมของสารแทนนินและลดกลิ่นไหม้ในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการอบแห้งลงได้

2.11 <u>คุณภาพและรสชาติ</u>

คุณภาพของเมล็ดโกโก้มีความสำคัญมากต่อการเกิดเป็นกลิ่นรสช็อคโกแลต ซึ่งคุณภาพของเมล็ดโกโก้จากแหล่งผลิตต่างกันจะมีคุณภาพต่างกัน เมล็ดโกโก้ที่มาจากประเทศแถบแอฟริกาตะวันตกมีคุณภาพดีที่สุด คุณภาพนอกจากขึ้นกับแหล่งผลิตแล้วยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล การขนส่ง การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ ผู้ผลิตจากแหล่งใหญ่ๆ มักใช้ผู้ที่มีความชำนาญสูงและประสบการณ์มาก

การเกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นรสช็อคโกแลตต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการเก็บเกี่ยว การหมักไม่สมบูรณ์ การทำแห้งโดยใช้ไฟ หรือการเก็บรักษาไม่ดีหลังขั้นตอนการทำแห้ง กลิ่นรสที่ไม่ต้องการส่วนใหญ่จะไม่สามารถกำจัดออกได้แม้ว่าจะผ่านขบวนการแปรรูปแล้ว กลิ่นรสที่ไม่ต้องการสามารถจำแนกได้ดังนี้

1. กลิ่นรสของรา (Mould off-flavors) เกิดในเมล็ดที่ขึ้นราและสามารถเกิดเพิ่มขึ้นได้จากการหมักที่นานเกินไป นำเมล็ดมาทำแห้งช้า (ถ้าความชื้นในเมล็ดโกโก้มากเกินร้อยละ 8 จะมีโอกาสขึ้นราสูง)

2. กลิ่นควัน (Smoke off-flavors) บางครั้งเรียกว่า hammy ซึ่งอาจเกิดได้หลายสาเหตุ

- การทำแห้งโดยการออกแบบตู้อบแห้งไม่ถูกต้อง การควบคุมระบบไม่ดี ใช้ไม้เป็นเชื้อเพลิงในการให้ความร้อน

- สภาวะในการเก็บรักษาหลังการทำแห้งแล้วไม่ดี

3. กลิ่นรสของกรด (Acidic off-flavors) มักเกิดจากความหลากหลายของเมล็ดโกโก้ หรือวิธีการหมัก การทำแห้งไม่ดี

4. การเกิดรสขม (Excessive bitterness and astringency) เกิดจากการหมักเมล็ดไม่สมบูรณ์ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากการทำ cut test จะพบเมล็ดมีสีหินชนวน

Rohan (1963) พบว่าสารฟลาโวนอยด์ เพียวรีนและกรดอะมิโน มีบทบาทในการพัฒนาเป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อคโกแลต เมล็ดโกโก้จะมีการพัฒนาเป็นสารที่

เอกสารนี้ถูกสงวนลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้กลิ่นรสของช็อคโกแลตหลังจากทำการคั่วเมล็ดแล้วเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักจะมีผลต่อการเกิดกลิ่นรสของช็อคโกแลต ซึ่งความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายโปรตีนอยู่ในช่วง 3.5-4.5 จะได้กรดอะมิโนและเปปไทด์ที่ทำให้เกิดกลิ่นรสช็อคโกแลต ขณะที่ Keeny และคณะ(1985) พบว่าการเกิดกลิ่นรสช็อคโกแลตไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่ปลดปล่อยออกมา การเกิดกลิ่นรสช็อคโกแลตจะสูงเมื่อเมล็ดมีความเป็นกรดต่ำรวมทั้งมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำในระหว่างการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่3 ปริมาณของกลิ่นรสและการย่อยสลายโปรตีนหลังจากทำการบ่มเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH	ไนโตรเจน (%)	peptide-N (%)	Flavour profile			
				a	b	c	d
40	4.5	9.8	48.8	0	2.5	2	1
50	4.5	8	42.6	0	1.5	1	1.5
50	4.5	2.7	28.9	2.5	0.5	1	0.5
40	4.8	5.8	29.1	2	2.5	2.5	2.5
50	4.9	4.1	23	1.5	1.5	1.5	0
40	4.6	10.5	41.2	0	1.5	1.5	0.5

a = กรด

b = กลิ่นหอม

c = กลิ่นรสโกโก้

d = รสขม

ที่มา : Biehl และคณะ (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดโกโก้ที่มีกรดไขมันที่ระเหยได้ในปริมาณน้อยเหมาะสมต่อการเกิดกลิ่นรสช็อคโกแลต ถ้าปริมาณกรดไขมันที่ระเหยมากเกินไปจะทำให้เกิดการเน่าเสียเนื่องจากกิจกรรมของแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์และการหมักเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้พบว่าปริมาณของกรดแลคติกและกรดแอซีติกจะมีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นกรด เมื่อเปรียบเทียบกับกรดซิตริกและกรดออกซาลิคซึ่งมีปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ผลโกโก้

ใช้ผลโกโก้สดจากสวนเกษตรกรในจังหวัดชุมพร

2. จุลินทรีย์และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารที่ใช้สำหรับการเก็บและการเลี้ยงเชื้อ

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักตามธรรมชาติในการหมักเมล็ดโกโก้ครั้งที่ 1 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีหลายชนิดดังนี้ คือ

- อาหาร PDA ใช้จำแนกและเก็บรักษาเชื้อยีสต์
- อาหาร TYGKCP ใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในการหมักเมล็ดโกโก้
- อาหาร MRS ใช้จำแนกและเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแลคติก
- อาหาร DSM ใช้จำแนกเชื้อแบคทีเรียแอซีติก
- อาหาร AA ใช้เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแอซีติก

วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ แสดงรายละเอียดในภาคผนวก

2.2 อาหารที่ใช้ทดสอบ

- อาหารทดสอบการหมักแบบโฮโมแลคติกเฟอร์เมนเทตีฟ และเฮทเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเทตีฟ
- อาหารทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลในสภาพมีอากาศของยีสต์
- อาหารทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศของยีสต์

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

สารเคมีและวิธีการเตรียม (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก) ประกอบด้วย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ปริมาณกรดทั้งหมด

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ปริมาณกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดระเหยได้

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่าดรรชนีการหมัก

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

1.2 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

1.3 เครื่องปั่นละเอียด

1.4 เครื่องชั่งอย่างหยาบและละเอียด

1.5 เครื่องเขย่า

1.6 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์หากรดที่ระเหยได้

1.7 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส

1.8 ตู้อบแห้ง (Hot air oven)

1.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.10 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

1.11 เครื่องแยกเหวี่ยง (Centrifuge) ชนิดปรับอุณหภูมิได้

1.12 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow cabinet)และอุปกรณ์เขี่ยเชื้อ

2. อุปกรณ์อื่นๆ

2.1 ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2.2 บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมขาตั้ง (Clamp)

2.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask)

2.4 บีกเกอร์

2.5 หลอดทดลอง

2.6 กระบอกตวง

2.7 ขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 เทอร์โมมิเตอร์

2.9 ชุดกรวยกรองแบบสูญญากาศและกระดาษกรองเบอร์ 1

2.10 หลอดฝาเกลียว

2.11 จานเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.12 ขวดฝาเกลียว

2.13 กล้องจุลทรรศน์

2.14 เข่งผลไม้

วิธีการ

1. สถานที่และการหมักเมล็ดโกโก้

ทำการหมักเมล็ดโกโก้ 2 ครั้ง ครั้งแรกเพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกองหมักเมล็ดโกโก้ซึ่งเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ สำหรับการหมักครั้งที่ 2 เป็นการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ทางทางชีวเคมีที่ได้จากการหมักซึ่งเติมเชื้อที่แยกได้จากการหมักครั้งแรกเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไป การหมักทั้ง 2 ครั้ง ทำที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. วิธีการหมักเมล็ดโกโก้

การหมักทั้ง 2 ครั้งใช้วิธีการหมักแบบดั้งเดิม โดยเก็บผลโกโก้ที่แก่เต็มที่มาผ่าเปลือกออกทันทีและแกะเมล็ดที่อยู่ในฝักออกจากไส้เมล็ดที่ยึดติดกัน ให้เมล็ดกระจายออกจากกันโดยแยกเมล็ดที่เสียและเป็นราทิ้ง นำเมล็ดโกโก้สดบรรจุในเข่งที่สานด้วยไม้ไผ่ที่รองด้วยใบตอง โดยในการหมักครั้งที่ 1 บรรจุเมล็ดโกโก้สด 40 กิโลกรัมใน 1 เข่ง และไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไป สำหรับการหมักครั้งที่ 2 บรรจุเมล็ดโกโก้สดเข่ง ละ 15 กิโลกรัม และมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในกองหมัก ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดแรกเติมเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดลงไป (เติมเชื้อยีสต์แต่ละชนิดร้อยละ 5) ชุดที่สองเติมยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ร้อยละ 5 และเติมแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดลงไปร้อยละ 5 ต่อเชื้อ 1 ชนิด ชุดที่สามเป็นชุดการทดลองควบคุมไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ ลงไปในกองหมัก หลังจากบรรจุเมล็ดโกโก้สดเสร็จเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิดเข่งด้วยใบตองแล้ววางทับด้วยกระสอบป่านอีกครั้ง ทำการกลับเมล็ดทุก 2 วัน โดยถ่ายลงในเข่งใบใหม่และทำการวัดอุณหภูมิและสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้ มาวิเคราะห์ซึ่งการหมักครั้งแรกจะเก็บตัวอย่างทุกวันมาทำการแยกเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ และตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ส่วนการหมักครั้งที่สองจะเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางเคมี

3. การเก็บตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างทุกวันในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ โดยเก็บตัวอย่างบริเวณตอนบน ตอนกลาง และตอนล่างสุดของกองหมัก นำตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ พร้อมทั้งวัดอุณหภูมิกองหมัก

4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดโกโก้

จากการหมักครั้งที่ 2 (รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก)

4.1 ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์

4.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก โดยการไตเตรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน 0.1 N

4.3 กรดแลคติกตามวิธีของ Barber and Summerson (1941)

4.4 กรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก ตามวิธี A.O.A.C (1984)

4.5 น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสตามวิธีของ Luff-Schoorl (Egan และคณะ,1981)

4.6 ดรรชนีการหมัก(Fermentation Index) ตามวิธีของ Gourieva and Tserevitinov (1979)

5. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่ เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียแอซีติก และยีสต์

5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเมล็ดโกโก้ 50 กรัมใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ภายในบรรจุน้ำเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาณ 450 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1 ต่อ 10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีน้ำเปปโตนที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้ตัวอย่างเจือจาง 1 ต่อ 100 ทำเช่นเดียวกันจนได้ตัวอย่างโกโก้เจือจาง 10 เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 1 ต่อ 100,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี Standard plate count (American Public Health Association,1960)

5.2.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 5.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อทำระดับละ 2 จาน เทอาหาร TYGKCP agar ที่หลอมเหลวและอุ่นประมาณ 15 มิลลิลิตรลงไป หมุนจานให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่ว ๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัว พลิกกลับจานเพาะเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

5.2.2 นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

5.3 การตรวจนับจำนวนยีสต์

5.3.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 5.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อทำระดับละ 2 จาน เทอาหาร PDAที่หลอมเหลวและอุ่น (เติม Oxytetracycline ร้อยละ0.1) ประมาณ 15 มิลลิลิตรลงในแต่ละจาน หมุนจานอาหารให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่ว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง

5.3.2 เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนีทั้งหมด หาค่าเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนยีสต์ต่อกรัมของตัวอย่าง

5.3.3 เก็บเชื้อโดยใช้วิธีการสุ่มจากจานเพาะเชื้อที่มี โคโลนี 30-300 โคโลนี เป็นจำนวนทั้งหมด 10 โคโลนี streak บนอาหารPDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

5.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแอซีติก

5.4.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 5.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อทำระดับละ 2 จานเทอาหาร DSMที่หลอมเหลว และอุ่นประมาณ 15 มิลลิลิตรลงในแต่ละจาน หมุนจานให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่ว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง

5.4.2 เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่มีสีเหลืองและสีม่วง หาค่าเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนแบคทีเรียแอซีติกต่อกรัมของตัวอย่าง

เอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ...การค้า

5.4.3 เก็บเชื้อโดยใช้วิธีการสุ่มจากจานเพาะเชื้อ ที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี เป็นจำนวนทั้งหมด 10 โคโลนี ขีดบนอาหาร AA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม

5.5 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก

5.5.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 3 ระดับ ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อทำระดับละ 2 จาน เทอาหารMRS ที่หลอมเหลวและอุ่นประมาณ 15 มิลลิลิตรลงในแต่ละจาน หมุนจานให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่วๆ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง

5.5.2 เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวยและเปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองคิดค่าเฉลี่ยเป็นจำนวนแบคทีเรียแลคติกต่อกรัมของตัวอย่าง

5.5.3 เก็บเชื้อโดยใช้วิธีการสุ่มจากจานเพาะเชื้อ ที่มีโคโลนี30-300 โคโลนี เป็นจำนวน 10 โคโลนี ขีดบนอาหาร MRS จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม

6. <u>การจำแนกเชื้อ</u>

6.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของยีสต์

โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงเชื้อPDA มาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

6.1.1 ความสามารถในการใช้อาหารคาร์บอนในสภาพไร้อากาศ โดยใช้น้ำตาล 7 ชนิด คือ เดกซ์โทรส,กาแลคโตส,แลคโตส,มอลโตส,ราฟฟีโนส,ซูโครสและทรีฮาโลส โดยใช้ปริมาณร้อยละ 1 ในอาหารbase for yeast fermentation (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สที่ใส่ไว้ในอาหาร

6.1.2 ความสามารถในการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ในสภาพมีอากาศ โดยใช้แหล่งคาร์บอน 12 ชนิด คือ เดกซ์โทรส,ดูซิทอล,มอลโตส,ซูโครส,แลคโตส,กาแลคโตส,เมลลิไบโอส,เซลโลไบโอส,อินโนซิทอล,ไซโลส,ราฟฟีโนสและทรีฮาโลส ซึ่งใช้ Yeast nitrogen base [Difco] (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก) เป็น basal medium

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำแผ่น disc ที่จุ่มน้ำตาล แต่ละชนิด(ความเข้มข้นร้อยละ10) วางบนอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดยมีเชื้อเจริญรอบแผ่นdisc

6.1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาสัณฐานวิทยาของ Vegetative cell ในอาหาร 2% glucose-yeast extract-peptone agar ความสามารถในการสร้าง pseudomycelium and true mycelium โดยการทำ slide culture บนอาหาร corn meal agar [Difco] ตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40-100 เท่า

6.1.4 ลักษณะการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ นำยีสต์เลี้ยงบนอาหารทดสอบบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาตรวจดูการสร้าง ascospore และรูปร่างของ ascospore โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก(Sharpe and Fryer,1966;Krieg and Holt,1986)

นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มาทดสอบคุณสมบัติต่างๆดังนี้

6.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลจากกล้องจุลทรรศน์

6.2.2 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยด H_2O_2 ร้อยละ3 ลงบนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่ามีเอนไซม์คาตาเลส

6.2.3การหมักแบบโฮโมแลคติกเฟอร์เมนเทตีฟและเฮทเทอโรแลคติกเฟอร์เมนเทตีฟ ตามวิธีของGibson and Abd-el-Malek(1945)เลี้ยงเชื้อและนำมาทดสอบในอาหารทดสอบ(Gibson's Semi-solid Tomato Juice Medium (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก)เทวุ้นเข้มข้นร้อยละ3 ปิดผิวหน้าให้หนาประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน แบคทีเรียที่หมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเทตีฟจะให้แก๊สและดันวุ้นที่ปิดทับผิวหน้าขึ้นมา ส่วนพวกที่หมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเทตีฟ วุ้นจะมีลักษณะปกติ

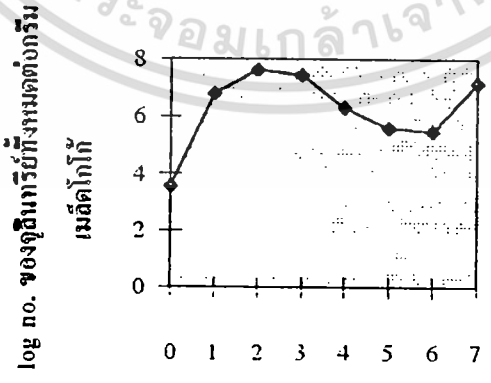
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

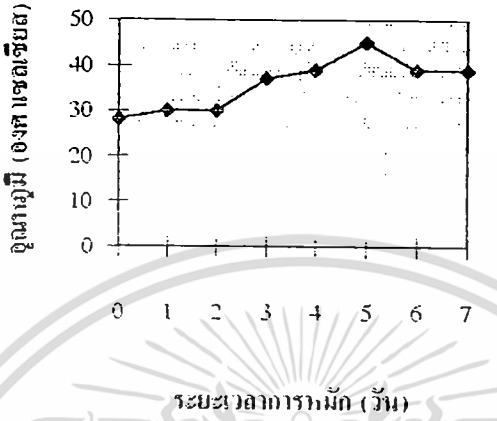
1. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก

ผลจากการศึกษาพบว่าปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักมีปริมาณ 3.5×10^3 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้จะแตกต่างกันเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การปะปนของจุลินทรีย์ที่มาจากฝักโกโก้ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงปริมาณจุลินทรีย์จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจะมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก คือ มีปริมาณ 4.25×10^7 โคโลนีต่อกรัม จากนั้นปริมาณจะเริ่มลดจำนวนลงเรื่อยๆ จน มีปริมาณต่ำสุดในวันที่ 6 ของการหมักโดยมีปริมาณจุลินทรีย์ 3×10^5 โคโลนีต่อกรัมสำหรับช่วงสุดท้ายของการหมักปริมาณจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของเชื้อรา ดังแสดงในรูปที่ 5 อุณหภูมิที่วัดได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ อุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนมีอุณหภูมิสูงสุด 45 องศาเซลเซียสในวันที่ 5 ของการหมัก หลังจากนั้นอุณหภูมิจะลดลง โดยในวันสุดท้ายของการหมักอุณหภูมิกองหมักมีค่าเป็น 39 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

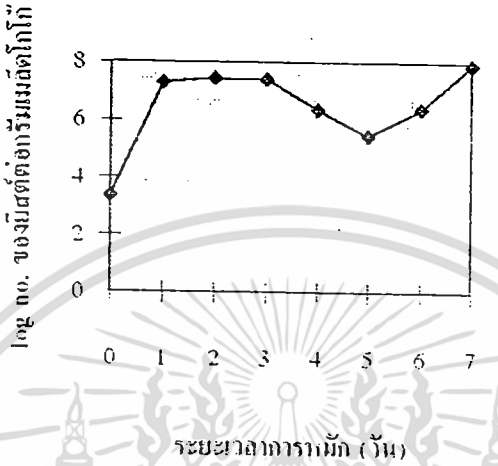


รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

2. <u>การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมัก</u>

ผลการตรวจนับปริมาณของยีสต์ในระหว่างการหมักพบว่ามีปริมาณสูง โดยการเปลี่ยนแปลงยีสต์มีลักษณะแปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่าในตอนเริ่มต้นของการหมักยีสต์มีปริมาณ 2.23 $x10^3$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อหมักเมล็ดโกโก้ได้สองวัน ยีสต์จะมีปริมาณ 2.85 x 10^7 โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นปริมาณของยีสต์จะลดลงจนถึงวันที่ 5 ของการหมักและเริ่มมีการปนเปื้อนของเชื้อราทำให้ปริมาณของยีสต์ที่นับได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 7 การที่ในช่วงแรกของการหมักยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องมาจากในช่วงแรกของการหมักเกิดสภาพไร้อากาศ และมีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดอยู่สูง ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ หลังจากนั้นปริมาณของยีสต์จะเริ่มลดลงและปริมาณแบคทีเรียแอซีติกจะเพิ่มขึ้น การที่ยีสต์ลดปริมาณลงอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียแอซีติกผลิตกรดต่าง ๆ รวมทั้งมีการกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ ซึ่งทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

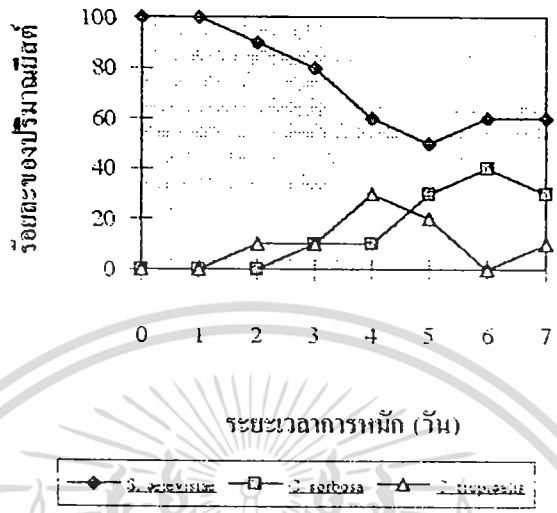


รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

3. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์ที่พบระหว่างการหมัก

เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้มาจัดจำแนกตามวิธีของ Kreger-Van Rij (1984) โดยศึกษาถึงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในสภาพที่มีและไม่อากาศ รวมทั้งคุณสมบัติต่างๆ พบว่าเชื้อยีสต์ที่จำแนกได้มี 3 ชนิด ดังนี้คือ Saccharomyces cerevisiae, Candida sorbosa, Candida tropicalis คุณสมบัติของยีสต์เหล่านี้แสดงรายละเอียดในภาคผนวก การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของยีสต์พบว่าในระยะแรกของการหมักพบยีสต์เพียงชนิดเดียว คือ Saccharomyces cerevisiae ต่อมาจะพบ C. sorbosa and C. tropicalis ในปริมาณใกล้เคียงตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยพบในปริมาณน้อยกว่า S. cerevisiae ดังแสดงตามรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

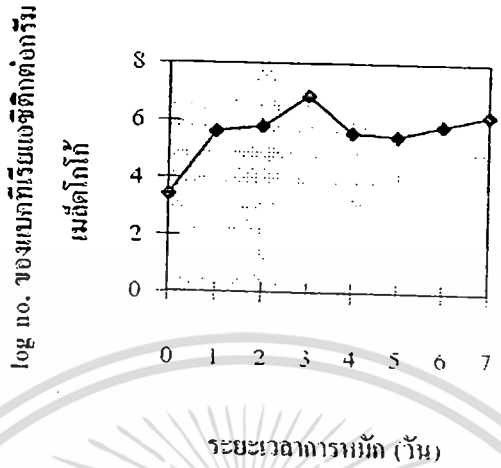


รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

4. <u>การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแอซีติกระหว่างการหมัก</u>

จากการศึกษาพบว่าปริมาณแบคทีเรียแอซีติกเปลี่ยนแปลงโดยแปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ระยะเริ่มต้นของการหมักแบคที เรียแอซีติก 2.58×10^{3} โคโลนีต่อกรัม และหลังจากการหมักได้หนึ่งวันปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะเพิ่มในอัตราที่ช้าลง ระหว่างการหมักปริมาณแบคทีเรียแอซีติกสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักคือ มีปริมาณ 7.5×10^{6} โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในรูปที่ 9 การที่ปริมาณแบคทีเรียแอซีติกเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเนื่องมาจากมีการกลับเมล็ดโกโก้ในวันที่ 2 ของการหมักจึงทำให้กองหมักเมล็ดโกโก้เกิดสภาพมีอากาศซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



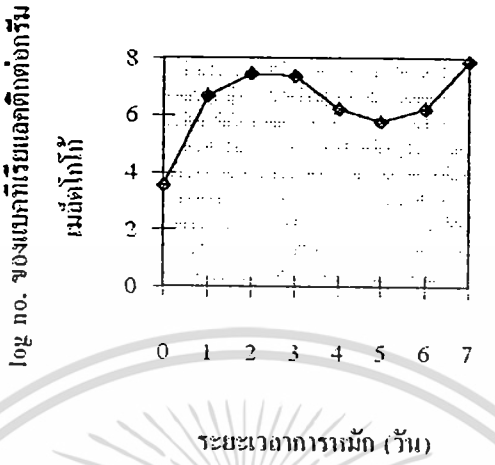
รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียแอซีติกมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงไม่ได้ทำการศึกษาและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแอซีติก รวมทั้งไม่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ทางเคมีได้

5. <u>การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมัก</u>

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แสดงในรูปที่ 10 โดยปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นมีปริมาณ 3.37×10^{3} โคโลนีต่อกรัม หลังจากหมักเมล็ดโกโก้เป็นเวลา 2 วัน จะพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงสุด คือมีปริมาณ 2.85×10^{7} โคโลนีต่อกรัมหลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียกลุ่มนี้จะลดลง และในระยะสุดท้ายของการหมัก จุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นจะนำแก๊สออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ทำให้ปริมาณแก๊สออกซิเจนน้อยลงเกิดสภาพไร้อากาศในกองหมักอีกครั้ง จึงมีผลให้แบคทีเรียแลคติกนี้เจริญขึ้นมาอีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



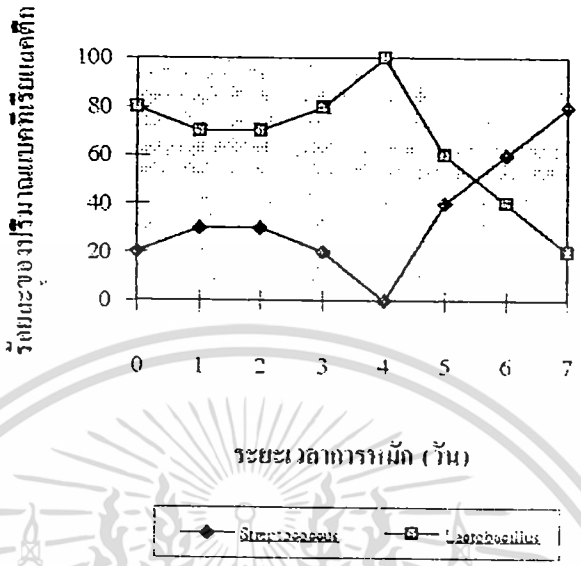
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

6. <u>คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติกที่ พบในระหว่างการหมัก</u>

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาจำแนกตามหลักของ Sharpe และ Fryer (1966) ,Krieg และ Hott (1986) สามารถจำแนกได้ 2 ตระกูล คือ Streptococcus และ Lactobacillus การศึกษานี้จะทดสอบเพื่อจำแนกตระกูลของแบคทีเรียแลคติกเท่านั้น เนื่องมาจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลา โดยจะทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คาตาเลส การย้อมสีแกรม และการทดสอบการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเทตีฟหรือแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเทตีฟ รายละเอียดแสดงในภาคผนวก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดแบคทีเรียแลคติกพบว่าในช่วงแรกของการหมักจะมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกในตระกูล Lactobacillus เป็นจำนวนมาก หลังจากการหมักเมล็ดโกโก้เป็นเวลา 4 วัน แบคทีเรียในตระกูลนี้จะเริ่มมีปริมาณลดลง ส่วนแบคทีเรียแลคติกในตระกูล Streptococcus จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้ตรงกันกับการทดลองของ Rombouts (1952)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้

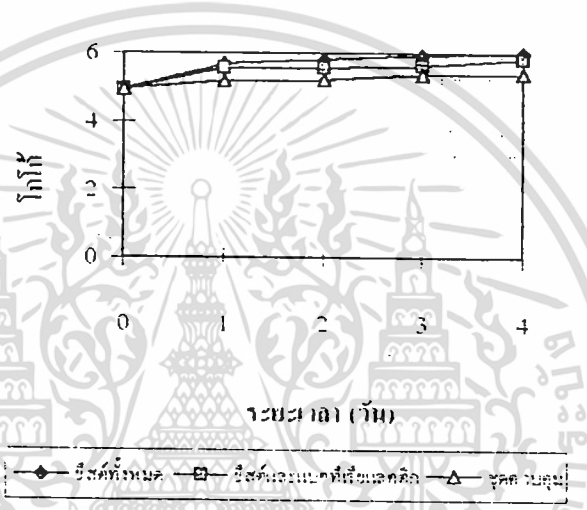
7. <u>การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในการหมักครั้งที่ 2</u>

7.1 <u>การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้</u>

ค่าการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองทั้ง 3 ชุด พบว่า ชุดแรกซึ่งทำการเติมเชื้อยีสต์ทุกชนิดที่แยกได้จากการทดลองครั้งที่ 1 ชุดที่สองเติมเชื้อ S. <u>cerevisiae</u> และเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกชนิดที่แยกได้จากการหมักครั้งที่ 1 ชุดที่สามเป็นชุดการทดลองควบคุมไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ใดๆ พบว่าเริ่มต้นของการหมักทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นมีค่าเป็น 4.95 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรด- ด่างเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ในช่วงสุดท้ายของการหมักคือ วันที่ 5-7 จะไม่สามารถวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์จนหมด เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จึงกลายสภาพเป็นของเหลว ชุดการทดลองที่หนึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ตลอดการหมัก โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 6.0 ดังแสดงในรูปที่ 12 และชุดการทดลองที่สองมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมตลอดการหมักเช่นกัน การที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

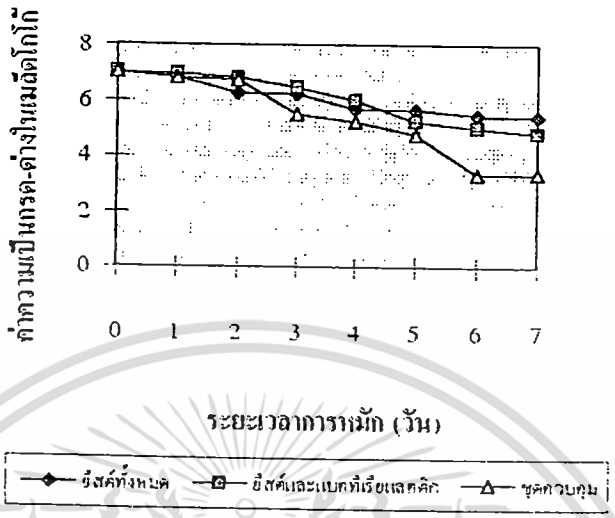
เช่นกัน การที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดชนิดต่างๆ โดยจุลินทรีย์หลายชนิดจากนั้นกรดที่สร้างขึ้นจะถูกส่งเข้าไปในเมล็ดโกโก้ จึงมีผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าเพิ่มขึ้น



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้ของทุกชุดการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้ของทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มลดลงตลอดการหมัก โดยในวันเริ่มต้นการหมักวัดค่าความเป็นกรด-ด่างได้ 7.04 ชุดการทดลองที่หนึ่งจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงน้อยที่สุด ซึ่งในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่หนึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.4 สำหรับชุดการทดลองที่สอง และชุดการทดลองควบคุม มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.8 และ 3.4 ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้มีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

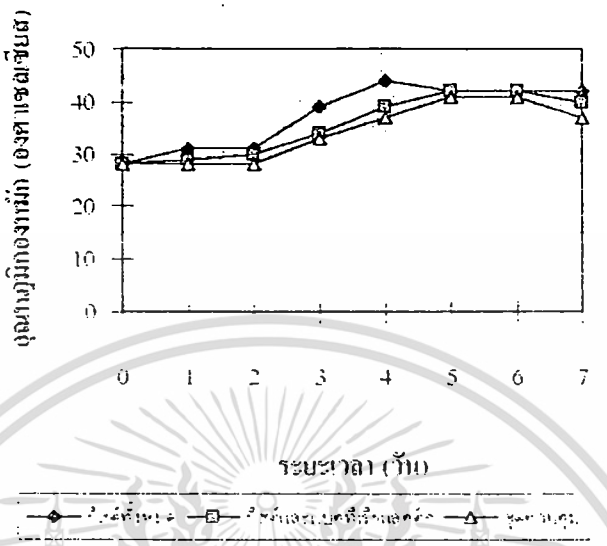


รูปที่13 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้พบว่า ชุดการทดลองที่หนึ่งอุณหภูมิของกองหมักมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ โดยมีอุณหภูมิสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 44 องศาเซลเซียส วันที่ห้าของการหมักอุณหภูมิลดลงเป็น 42 องศาเซลเซียส และมีค่าคงที่จนการหมักสิ้นสุดลง สำหรับอุณหภูมิกองหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่สองและสาม มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกันและอุณหภูมิจะสูงสุดในวันที่ห้าของการหมักเป็น 42 และ 41 องศาเซลเซียสตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักแสดงดังรูป 14

อุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้มีผลต่อการทำลายเชื้อจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



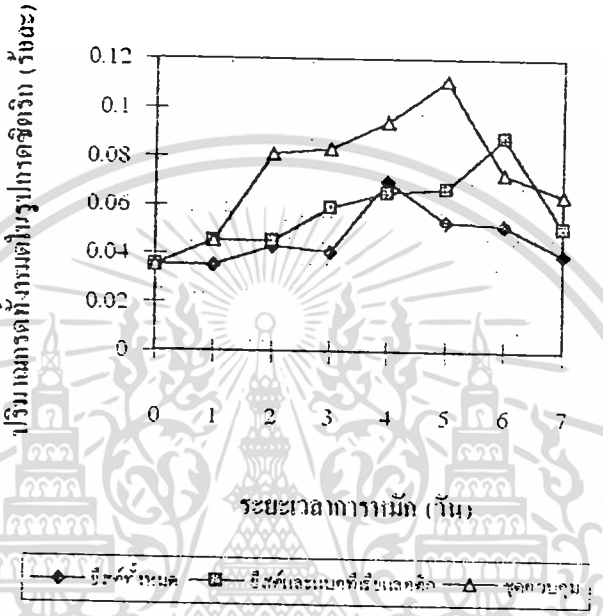
รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่าง ๆ

8. <u>การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก</u>

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก พบว่าชุดการทดลองทั้ง 3 มีค่ากรดทั้งหมด เริ่มต้นเป็น 0.035 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และทุกชุดการทดลองจะมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดดังนี้คือ ปริมาณกรดทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุดหลังจากนั้นปริมาณกรดทั้งหมดจะมีค่าลดลง โดยในชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์ทั้งหมดจะมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 0.07 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก สำหรับชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์และแบคทีเรียแลคติก มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด ในวันที่ 6 ของการหมักเป็น 0.088 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักและชุดการทดลองควบคุมจะมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมักเป็น 0.111 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่หนึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดต่ำสุดคิดเป็น 0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังแสดงในรูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมดจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกและการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอซีติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้



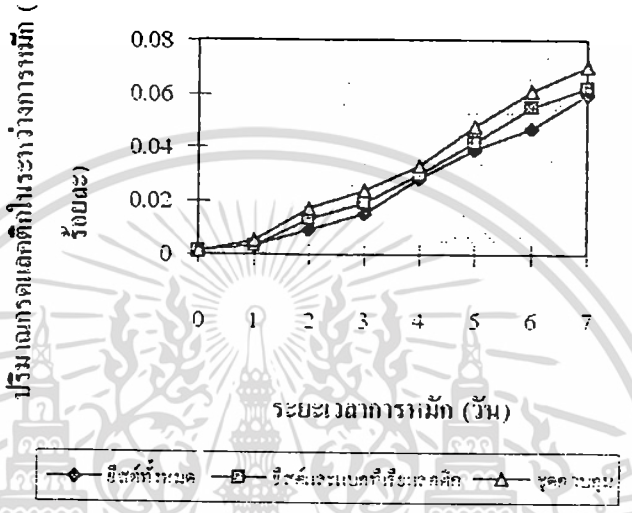
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่าง ๆ

7.3 <u>การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในระหว่างการหมัก</u>

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของทุกชุดการทดลองจะมีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดที่ไม่ระเหยจึงทำให้เกิดการสะสมตลอดการหมัก ปริมาณกรดแลคติกในตอนเริ่มต้นของทุกชุดการทดลองเป็น 0.001 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองควบคุมจะมีปริมาณกรดแลคติกมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ตลอดการหมักโดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 คือ มีปริมาณกรดแลคติก 0.07 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์ทั้งหมดในตอนเริ่มต้นการหมักจะมีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นน้อยที่สุดคือ มีปริมาณกรดแลคติกในวันสุดท้ายเป็น 0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักดังแสดงในรูปที่ 16 การที่ปริมาณกรดแลคติกในชุดการทดลอง ที่เติมเชื้อยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองควบคุมอาจมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติกในปริมาณที่สูงกว่าในชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์เพียงอย่างเดียว



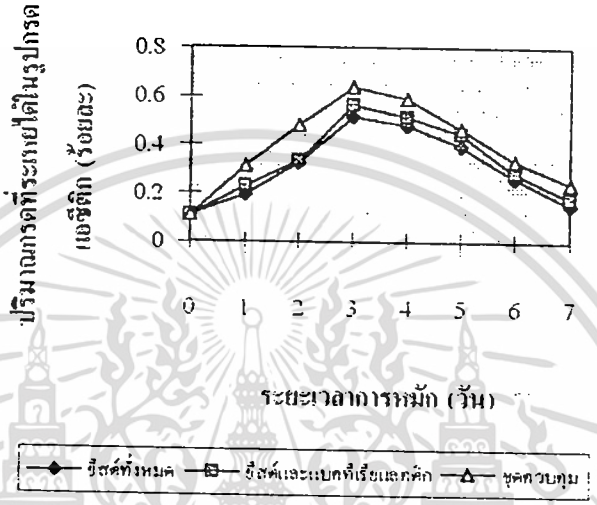
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

7.4 <u>การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก</u>

จากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกมีแนวโน้มที่เหมือนกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก โดยในช่วงแรกของการหมักปริมาณกรดแอซีติกจะเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นปริมาณกรดแอซีติกจะมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 17 โดยชุดการทดลองควบคุมจะมีปริมาณกรดแอซีติกสูงสุดเป็น 0.24 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และชุดการทดลองที่หนึ่งซึ่งเติมเชื้อยีสต์ในระยะเริ่มต้นของการหมักจะมีกรดแอซีติกเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด โดยมีปริมาณกรดแอซีติกในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 0.156 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก การที่ปริมาณกรดแอซีติกของชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณสูงเนื่องมาจากอุณหภูมิกองหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองควบคุมเพิ่มขึ้นไม่มากนัก จึงไม่อาจทำลายเชื้อจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแอซีติกได้มากเท่ากับชุดการทดลองอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นไม่มากนัก จึงไม่อาจทำลายเชื้อจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียแอซีติกได้มากเท่ากับชุดการทดลองอื่น ๆ



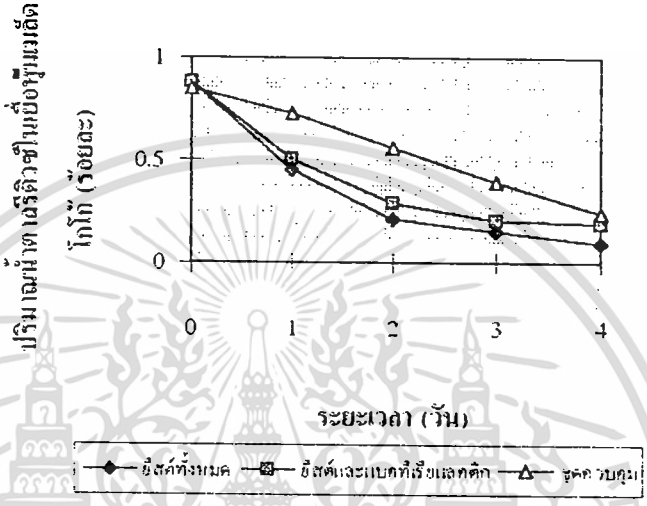
รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่างๆ

7.5 <u>การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส</u>

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังรูป 18 โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะมีค่าลดลงตลอดการหมัก และมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกของการหมัก ซึ่งจะสามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพียงวันที่ 4 ของการหมัก เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะถูกย่อยสลายกลายเป็นของเหลว ทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันเริ่มต้นของการหมัก 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่หนึ่ง มีการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น สำหรับชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์พร้อมกับเชื้อแบคทีเรียแลคติกและชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 0.19 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ การที่ชุดการทดลองที่หนึ่งซึ่งเติมยีสต์มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ต่ำสุดเนื่องจากมีเชื้อยีสต์เป็นจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

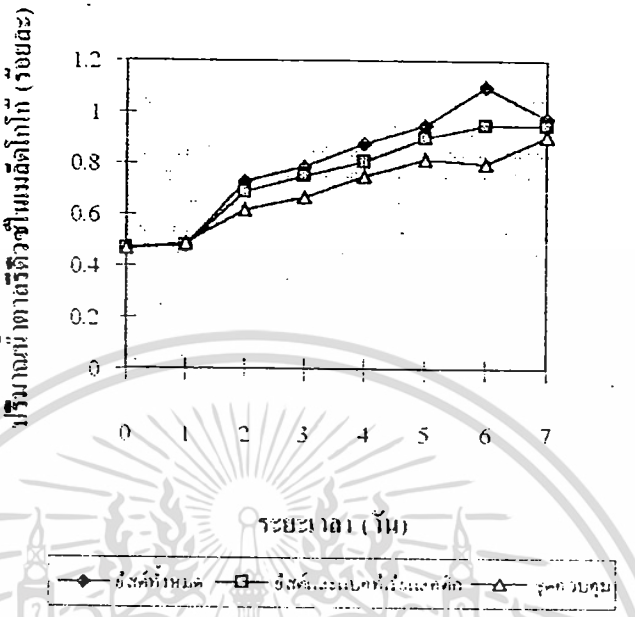
มากในกองหมัก โดยเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมักเนื่องจากกองหมักมีสภาพไร้อากาศ



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ของทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดการหมักโดยชุดการทดลองควบคุมมีการเพิ่มของน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้น้อยที่สุด คิดเป็น 0.91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์ในตอนเริ่มต้นของการหมักจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงสุด โดยพบว่าในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิดเป็น 0.98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ค่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้แสดงดังรูป 19 น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองต่าง ๆเป็นผลจากเมล็ดโกโก้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้จึงมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

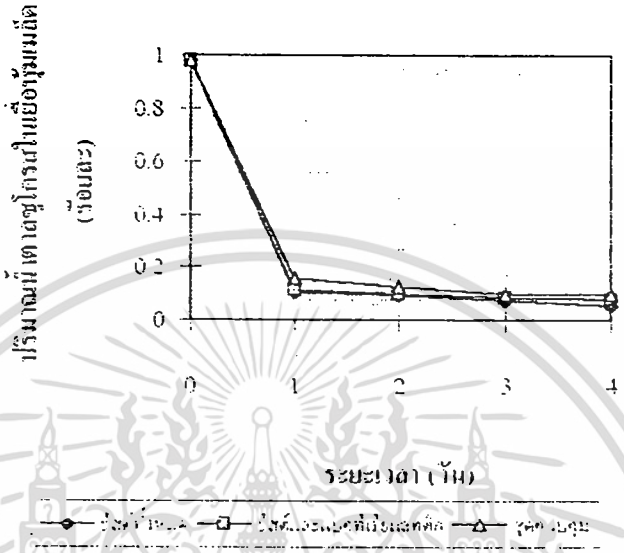


รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

7.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในระหว่างการหมัก

จากการศึกษาพบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คือมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก โดยชุดการทดลองควบคุมมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสน้อยที่สุด คือ มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 0.095 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์ในตอนเริ่มต้นของการหมักมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสมากที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในรูปที่ 20

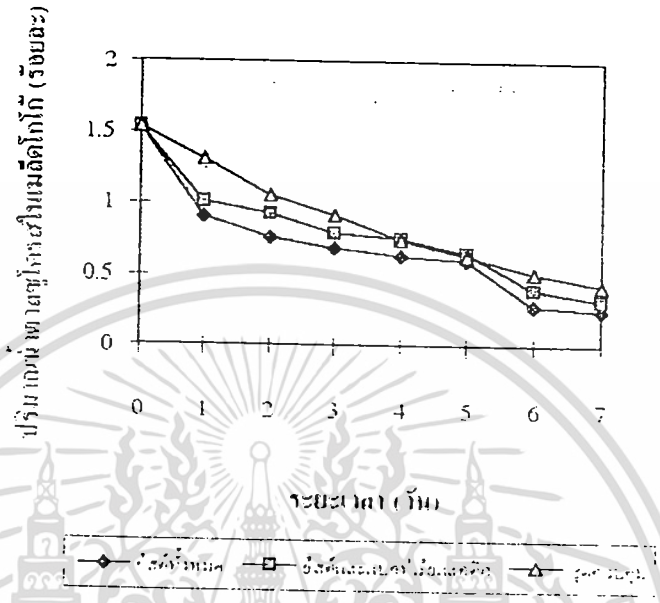
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่าง ๆ

ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ของทุกชุดการทดลองจะมีค่าลดลงตลอดการหมัก โดยในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติมยีสต์ ชุดการทดลองที่เติมทั้งยีสต์และแบคทีเรียแลคติกและชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ดังนี้ คือ 0.25,0.32และ 0.43 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์มีปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้น้อยที่สุด เนื่องจากน้ำตาลซูโครสถูกย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จึงทำให้ชุดการทดลองนี้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงที่สุดดังที่กล่าวมาแล้ว สำหรับชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลซูโครสลดลงน้อยที่สุด เนื่องจากชุดการทดลองควบคุมนี้ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไป ทำให้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและการลดลงของพีเอช จากกิจกรรมของจุลินทรีย์น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

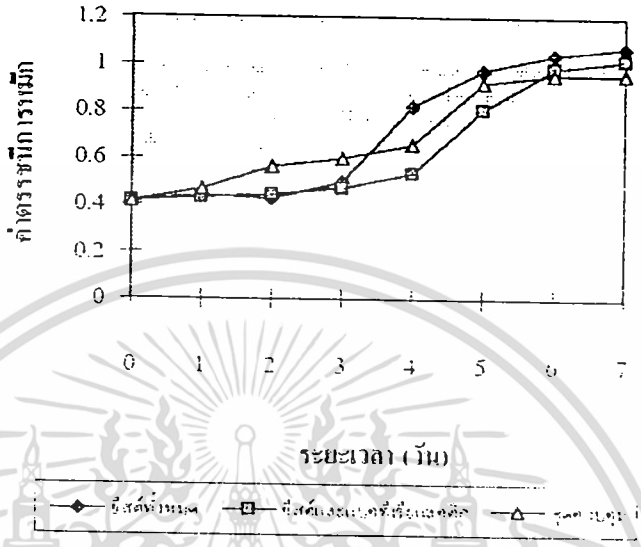


รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักของชุดการทดลองต่างๆ

7.7 ดรรชนีการหมักในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

ค่าดรรชนีการหมักของชุดการทดลองต่างๆ แสดงดังรูป22 พบว่าทุกชุดการทดลองจะมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์ในตอนเริ่มต้นของการหมักมีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียง1 ตั้งแต่วันที่ 5 ของการหมักและมีค่าดรรชนีการหมักสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมักเป็น1.074 ส่วนอีก 2 ชุดการทดลองมีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียง1 ในวันที่ 6 ของการหมักและมีค่าดรรชนีการหมักสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 1.021และ 0.964 สำหรบชุดการทดลองที่เติมยีสต์และแบคทีเรียแลคติกในตอนเริ่มต้นของการหมักและชุดการทดลองควบคุมตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อยีสต์มีค่าดรรชนีการหมักสูงที่สุดเนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิกองหมักมากที่สุด ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโกโก้โดยปฏิกิริยาต่างๆได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงค่าความสามารถในการหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. จุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ

การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และแบคทีเรียแลคติก พบว่าปริมาณจุลินทรีย์เหล่านี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการหมัก หลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลงโดยจะพบปริมาณสูงสุดในวันที่2ของการหมัก สำหรับแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณสูงสุดในวันที่3 หลังจากนั้นก็ลดลงเช่นกัน เมื่อนำจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ไปทำการจัดจำแนกโดยวิธีของ Kreger-Van Rij(1984) พบยีสต์ 3 ชนิดคือ Saccharomyces cerevisiae Candida sorbosa และCandida tropicalis โดย S. cerevisiae จะพบในปริมาณสูงตลอดระยะเวลาของการหมักสำหรับC. sorbosa and C. tropicalis จะมีปริมาณใกล้เคียงกันและพบในปริมาณไม่สูงมากนัก จากการจำแนกแบคทีเรียแลคติกตามวิธีของ Sharpe and Fryer (1966) และ Krieg and Holt(1986) พบแบคทีเรียแลคติก 2 สกุล คือ สกุล Lactobacillus และ Streptococcus ช่วงแรกของการหมักส่วนใหญ่พบ Lactobacillus และช่วงสุดท้ายจะพบ Streptococcus ในปริมาณสูง สำหรับแบคทีเรียแอซีติกไม่สามารถทำการจัดจำแนกได้ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระหว่างการหมัก ดังนั้นในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถทำได้

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้

จากการทดลองมี 3 ชุดการทดลอง ดังนี้ ชุดแรกเติมเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากการหมักครั้งแรกโดยเติมเชื้อแต่ละชนิดมีความเข้มข้นร้อยละ 5 ชุดการทดลองที่สองเติม Saccharomyces cerevisiae ร้อยละ 5 และแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มีความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิดร้อยละ 5 เช่นกัน สำหรับ ชุดการทดลองที่สาม เป็นชุดควบคุมไม่มีการเติมจุลินทรีย์ลงในกองหมัก จากการทดลองพบว่าระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อต่าง ๆ เหล่านี้ ชุดการทดลองแรก เมล็ดโกโก้จะมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกกรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก กรดแลคติก ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และค่าดรรชนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักมีค่าใกล้เคียง 1 ในวันที่ 5 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่สองและสาม มีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียง 1 ในวันที่ 6 ของการหมัก รวมทั้งปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองแรก มีค่าลดลงมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เมื่อนำค่าต่าง ๆ เหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสาม ส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้เพื่อให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะทำให้ราคาของเมล็ดโกโก้แห้งสูงขึ้น ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองครั้งนี้เป็นเพียงแนวทางอย่างหนึ่งในการพัฒนาคุณภาพของเมล็ดโกโก้ให้ดีขึ้นกว่าเดิมและสิ่งที่น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมมีดังนี้

1. ศึกษาชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้รวมถึงบทบาทของแบคทีเรียแอซีติกที่มีผลต่อการหมัก

2. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในรูปที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้เติมในตอนเริ่มต้นของการหมัก

3. ศึกษาความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง

4. ศึกษาคุณภาพทางเคมีของเมล็ดโกโก้หลังจากทำการตากแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและอาหารทดสอบเชื้อและวิธีการทดสอบ

1. TYGKCP (Ostovar and Keeney,1973)

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	1	กรัม
$CaCO_3$	1	กรัม
ทริปโตน	1	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	1	กรัม
เพคโตน-เมทิลเซลลูโลส	10	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายสารทั้งหมดข้างต้นกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. MRS (Rogosa and Sharpe,1959)

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	2.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
$CH_3COONa.3H_2O$	5.00	กรัม
$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	2.00	กรัม
เปปโตน	10.00	กรัม
ยีสต์สกัด	4.00	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20.00	กรัม
ผงวุ้น	17.00	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น เติม Bromocresol purple ร้อยละ 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.2 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. DSM (Cirigliano, 1982)

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.02	กรัม
Calcium Lactate	15.0	กรัม
D-sorbitol	1.0	กรัม
D-mannitol	2.0	กรัม
bromocresol purple [Difco]	0.03	กรัม
cycloheximide	0.004	กรัม
sodium desoxycholate [Difco]	0.1	กรัม
หรือ brilliant green [Difco]	29.5	ไมโครกรัม
โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โตรส	1.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ยกเว้น cycloheximide ละลายในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 แล้วเติมในอาหารก่อนฆ่าเชื้อ ปรับพีเอชให้เป็น 4.2-4.4 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน15 นาที

4. Acetobacter agar

ประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1	กรัม
เปปโตน	3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลกลูโคส	18	กรัม
ยีสต์สกัด	2	กรัม
ผงวุ้น	17	กรัม
น้ำกลั่น	1	กรัม
สารละลายA	5	มิลลิลิตร
สารละลายB	5	มิลลิลิตร

สารละลาย A

K_2HPO_4	50	กรัม
KH_2PO_4	50	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. PDA

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. 2% Glucose-yeast extract-peptone agar

ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
ผงวุ้น	10	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7. Sporulating medium

ประกอบด้วย

Sodium acetate trihydrate	8.2	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	1.0	กรัม
ยีสต์สกัด	2.5	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เป็น 4.8 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. Base for yeast fermentation

ประกอบด้วย

bromthymol blue 1%	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5.5	กรัม
เปปโตน	7.6	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

9. Yeast nitrogen base [Difco]

ประกอบด้วย

Yeast nitrogen base	0.67	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Gibson's Semi-solid Tomato Juice Medium

ประกอบด้วย

Nutrient agar	200	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	2.5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	50.0	กรัม
น้ำมะเขือเทศ	100.0	มิลลิลิตร
นมผงคืนรูป	800.0	มิลลิลิตร

วิธีการ

นำน้ำมะเขือเทศผสมกับน้ำนม เติมยีสต์สกัดและน้ำตาลกลูโคส นำไปต้มให้เดือด และเติมNutrient agar ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร ฆ่าเชื้อโดยการต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน

วิธีการทดสอบและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบด้านจุลินทรีย์

1. การย้อมแกรม

สารเคมี

1. คริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)

ชั่งผงคริสตัลไวโอเลต 2 กรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ95 ปริมาณ20 มิลลิลิตร ละลายสารผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลทร้อยละ 1 ลงไป 80 มิลลิลิตร

2. สารละลายไอโอดีน (Iodine)

ชั่งผงไอโอดีน 1 กรัม โปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายซาฟรานิน [Safranin]

สารละลายซาฟรานิน 10 มิลลิลิตร (ซึ่งเตรียมโดยชั่งซาฟรานิน 2.5 กรัม ในเอทธานอล ร้อยละ 95 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ปล่อยให้แห้งและยึดเชื้อด้วยเปลวไฟ
2. หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ 2-3 วินาที แล้วเทน้ำออกให้หมด
3. หยดสารละลายไอโอดีน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ
4. หยดแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ล้างจนสีน้ำเงินจางเกือบหมด (30วินาที) และล้างด้วยน้ำ
5. หยดสารละลายซาฟรานีน 15 วินาที ล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้งนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

1. การหาค่าความเป็นกรด- ด่าง

นำตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในปีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อนปริมาตร 90 มิลลิลิตร คนช้าๆเขย่า แล้วนำไปกรอง ทำให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

2. การหาค่าดรรชนีการหมัก (Fermentation Index) (Gourieva and Tserevitino,1979)

สารเคมี

- เมทานอล

- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

เตรียมโดยผสม เมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 97 ต่อ 3

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งเมล็ดโกโก้ที่บดแล้วปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายผสมของเมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้ลงไป 50มิลลิลิตร

3. เขย่าขวดรูปกรวยดังกล่าวนำไปเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

4. นำสารละลายในขวดรูปกรวย มากรองด้วยระบบสูญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

5. สารละลายที่ได้จากการกรอง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 และ 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

6. คำนวณค่าดรรชนีการหมัก

$$\text{ค่าดรรชนีการหมัก} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส(Egan et al., 1981; A.O.A.C., 1990)

3.1 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Luff-Schoorl method

สารเคมี

- anhydrous sodium carbonate
- citric acid monohydrate
- copper(II) sulphate pentahydrate
- zinc acetate dihydrate
- acetic acid
- potassium ferrocyanide trihydrate
- potassium solution 30% w/v
- sulphuric acid solution (3M)
- isopentanol
- sodium thiosulphate solution (0.1M)

การเตรียมสารละลาย Carrez I

เตรียมโดยละลายกรดแอซีติก ปริมาณ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อย แล้วเติมสาร Zinc acetate dihydrate ปริมาณ 2.19 กรัมลงไปละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Carrez II

เตรียมโดยทำการละลาย potassium ferrocyanide trihydrate ปริมาณ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Luff-Schoorl Reagent

1. ละลายAnhydrous sodium carbonate 143.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จึงเติมสารละลายที่เตรียมจากข้อ 2
2. ละลาย citric acid monohydrate ปริมาณ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1 พร้อมกับเขย่าให้ทั่ว
3. เมื่อสารละลายไม่มีฟองแก๊สเกิดแล้ว เติม copper(II) sulphate pentahydrate 25 กรัม ลงไปในสารละลาย
4. ปรับปริมาตรของผสมภายในขวด และผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออก

6. สารละลายที่ได้จะต้องมีความเข้มข้นของสารที่แน่นอน คือ copper(II) มีความเข้มข้น 0.1 โมล และ sodium carbonate มีความเข้มข้น 1 โมล

วิธีการทำ Standardize สาร Luff-Schoorl Reagent

1. ใช้สารละลาย reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมด้วยโปแตสเซียมไอโอไดด์ 3 กรัม และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) เมื่อสิ้นสุดการไตเตรตควรใช้โซเดียมไธโอซัลเฟตประมาณ 25 มิลลิลิตร

3. ใช้ reagent 10 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

4. เติมสาร reagent ที่เจือจางแล้วในข้อ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

5. นำไปวางบนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ทำให้เย็นลง และปรับปริมาตรให้เท่าเดิมด้วยน้ำกลั่น

7. นำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N โดยมีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 5.5-6.5 มิลลิลิตร

8. ไตเตรตสาร reagent ที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตควรจะเท่ากับ 6.0-7.5 มิลลิลิตร

9. ค่าพีเอชของสาร reagent ควรประมาณ 9.3-9.4

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 15-20 กรัม) ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำร้อนลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการแช่น้ำ เพื่อสกัดสารที่ละลายน้ำออกมา

3. ทำสารละลายให้ใส ด้วยการเติมสารละลาย Carrez I ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยการเติมสารละลาย Carrez II อีก 5 มิลลิลิตร

4. แช่น้ำและปรับปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนของของเหลวออกมาโดยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำส่วนของเหลวที่ได้มาเจือจางจนกระทั่งตัวอย่างสารละลายที่เจือจาง 25 มิลลิลิตร นั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 15-60 มิลลิลิตร

6. ใส่สารละลาย Luff-Schoorl Reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ 300 มิลลิลิตร

7. เติมสารละลายที่เจือจางไว้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป

8. ใส่เม็ดแก้วกันกระแทกลงไปในฟลาสก์ 2-3 ลูก

9. ทำการ reflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือด เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วลดอุณหภูมิของการ reflux ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดเบาๆอีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

10. เติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ (30%w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วค่อยๆ เติมด้วย 25 มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติม isopentanol ลงไป 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

11. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้วนำไปไตเตรต กับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักอาจลงไป 2-3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ x มิลลิลิตร

12. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับ y มิลลิลิตร

13. เมื่อนำปริมาตร y-x จะเป็นปริมาตรของ copper ที่ถูกรีดิวซ์ด้วยน้ำตาลในสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก

14. คำนวณค่าร้อยละของน้ำตาลกลูโคส (ในรูปของน้ำตาลอินเวอร์ท)

3.2 <u>การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยวิธี Luff-Schoorl</u>

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 4 ของการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มา 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1:1 (โดยปริมาตรต่อปริมาตรในน้ำกลั่น) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปผสม

3. นำขวดปรับปริมาตรไปวางลงในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. เอาออกมาวางไว้ให้เย็น แล้วเติมฟีนอฟทาลีนลงไป 2-3 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 N เมื่อใกล้จุดยุติ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 N ลงไป ปริมาณเล็กน้อย จนกระทั่งสีแดงของสารละลายหายไป

6. ทำการเจือจาง และปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าเพื่อให้เกิดการผสมกัน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส

1. นำสารละลายที่เตรียมได้จากก่อนและหลังการย่อยด้วยกรด มาเจือจางให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 15-60 มิลลิลิตร ต่อ 25 มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง

2. ใส่สารละลาย Luff-Schoorl ลงไปในฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร 2 ใบ ปริมาตรใบละ 25 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป โดยฟลาสก์ใบแรกเติมสารละลายตัวอย่างก่อนการย่อยสลายด้วยกรด และใบหลังเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้หลังจากการย่อยด้วยกรด

4. ใส่ antifoam-chip ลงในฟลาสก์

5. ทำการreflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือดเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วลดคุณหภูมิของการ reflux ลงไป ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดเบาๆอีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

6. เติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ (30%w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติม isopentanol ลงไป 2-3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

7. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้ว นำไปไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) ลงไป 2-3 มิลลิลิตรแล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ x มิลลิลิตร

8. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับ y มิลลิลิตร

9. เมื่อนำปริมาตร y-x จะเป็นปริมาตรของสาร copper ที่ถูกรีดิวซ์ด้วยน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์) ในรูปน้ำตาลอินเวอร์ทที่ไฮโดรไลซ์ได้จากสารละลาย ทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายน้ำตาลด้วยกรด

11. คำนวณหาปริมาณน้ำตาลน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง เมื่อกำหนดให้

BI = ค่าร้อยละของน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการย่อยสลายน้ำตาลด้วยกรดในรูปน้ำตาลอินเวอร์ท

TI = ค่าร้อยละของน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยสลายน้ำตาลด้วยกรดในรูปน้ำตาลอินเวอร์ท

ปริมาณน้ำตาลซูโครส คำนวณได้จากสูตร

ร้อยละน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง = (TI - BI)*0.95

4. <u>การหาปริมาณกรดแลคติกโดยการวัดสี</u> (Barber and Summerson , 1941)

<u>สารเคมี</u>

- sulphuric acid A.R. grade
- ผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ A.R. grade
- colour reagent เตรียมโดยละลาย 1.5 กรัมของ p-hydroxybiphenyl ในสารละลาย 0.5% NaOH ปริมาณ 10 มิลลิลิตร
- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 4 และความเข้มข้นร้อยละ 20
- สารละลายมาตรฐาน เตรียมโดยเติมสารลิเทียมแลคเตท ปริมาณ 213 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อย แล้วเติมกรดซัลฟูริก 0.5 มิลลิลิตร ทำสารละลายให้เจือจางเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปริมาณของกรดแลคติกสุดท้ายจะมีค่า 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างโกโก้ 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดฝาต้มให้เดือดนานประมาณ 30 นาที
2. กรองของผสมผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ
3. เจือจางสารละลายให้มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10- 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
5. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เติมผงแคลเซี่ยมไฮดรอกไซด์ลงไป 1 กรัม และเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงแยก

7. ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

8. เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น ร้อยละ 4 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรลงไป

9. เขย่าพร้อมกับเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงไป และเขย่าอีกครั้ง

10. วางในเครื่องอังน้ำเดือดเป็นเวลา 7 นาที แล้วทำให้อุณหภูมิลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำแข็ง

11. เติมสาร colour reagent ลงไป 0.1 มิลลิลิตร

12. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ใน waterbath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. นำมาเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ใน waterbath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีกไม่น้อยกว่า 15 นาที แล้วนำหลอดไปวางในน้ำเดือดนาน 1.5 นาที เพื่อละลายตะกอน

14. ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำก๊อก แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (สีที่ปรากฏจะมีความคงตัวในระยะเวลาสั้นๆ)

15. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายลิเทียมแลคเตท

16. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานแล้ว คำนวณปริมาณกรดแลคติก

5. <u>การหาปริมาณกรดทั้งหมด</u> (A.O.A.C., 1990)

<u>สารเคมี</u>

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N
- ฟีนอฟทาลีน

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. นำตัวอย่างเยื่อหุ้มหรือเมล็ดโกโก้มา 5 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2. ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นผสมด้วยเครื่องปั่น เป็นเวลา 5 นาที อาจต้องกรองเอาตะกอนออก หากมีตะกอนมาก

3. ไตเตรตสารละลายกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N หาจุดยุติ มีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

4. คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก จากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก(\%)} = \frac{\text{ไตเตรท*N*64*100}}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง*100}}$$

6. <u>การหาปริมาณของกรดที่ระเหยได้</u> (A.O.A.C.,1990)

<u>สารเคมี</u>

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 N
- ฟีนอฟทาลีน

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. นำตัวอย่างโกโก้ผงมา 10 กรัม กลั่นด้วยไอน้ำ ให้ได้ปริมาตรของของเหลวที่รองรับได้ 250 มิลลิลิตร
2. ทำการไตเตรตของเหลวที่ได้จากการกลั่นในข้อ 1 ด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 N โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์
3. คำนวณปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปของกรดแอซีติก

1มิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 N = 0.006กรัมกรดแอซีติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางผลการวิจัยและตารางวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ แบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียแอซีติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	log no. ของปริมาณ			
	จุลินทรีย์ทั้งหมด	ยีสต์	แบคทีเรียแลคติก	แบคทีเรียแอซีติก
0	3.54	3.35	3.53	3.41
1	6.78	7.28	6.65	5.60
2	7.63	7.45	7.45	5.78
3	7.43	7.41	7.39	6.88
4	6.31	6.37	6.22	5.57
5	5.60	5.48	5.78	5.48
6	5.48	6.39	6.23	5.86
7	7.17	7.93	7.88	6.22

ตารางภาคผนวกที่ ค2 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ชุดควบคุม ..	28 a	28 a	28 a	33 a	37 a	41 a	41 a	37 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	28 a	29 a	30 a	34 a	39 a	42 a	42 a	40 a
ยีสต์ทั้งหมด	28 a	31 a	31 a	39 a	44 a	42 a	42 a	42 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค3 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)				
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4
ยีสต์ทั้งหมด	4.95a	5.70a	5.82a	5.95a	6.00a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	4.95a	5.55a	5.57a	5.62a	5.81a
ชุดควบคุม	4.95a	5.19a	5.20a	5.35a	5.40a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ ค4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	7.01a	6.80a	6.29a	6.24a	5.70a	5.65a	5.45a	5.40b
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	7.01a	6.95a	6.80a	6.45a	6.00a	5.25a	5.00a	4.80ab
ชุดควบคุม	7.01a	6.79a	6.73a	5.50a	5.26a	4.76a	3.36a	3.40a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ค 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	0.001 a	0.003 a	0.009 a	0.015 a	0.028 a	0.039 a	0.047 a	0.060 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	0.001 a	0.003 a	0.013 a	0.019 a	0.030 a	0.042 a	0.055 a	0.062 a
ชุดควบคุม	0.001 a	0.005 a	0.017 a	0.024 a	0.033 a	0.048 a	0.061 a	0.070 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ ค6 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	0.035 a	0.035 a	0.043 a	0.041 a	0.070 a	0.053a	0.052 a	0.040 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	0.035 a	0.045 a	0.045 a	0.059 a	0.065 a	0.067 ab	0.088 a	0.051 a
ชุดควบคุม	0.035 a	0.045 a	0.081 a	0.083 a	0.094 a	0.111b	0.073 a	0.064 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	0.108 a	0.192 a	0.324 a	0.516 a	0.480 a	0.396 a	0.264 a	0.156 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลกติก	0.108 a	0.228 a	0.336 a	0.564 a	0.516 a	0.444 a	0.288 a	0.180 a
ชุดควบคุม	0.108 a	0.312 a	0.480 a	0.636 a	0.588 a	0.468 a	0.336 a	0.240 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ ค8 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)				
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4
ยีสต์ทั้งหมด	0.85a	0.45a	0.21a	0.15a	0.09a
ยีสต์+แบคทีเรียแลกติก	0.85a	0.50a	0.29ab	0.20a	0.19b
ชุดควบคุม	0.85a	0.73a	0.56b	0.39b	0.24b

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	0.47a	0.48a	0.73a	0.79a	0.88a	0.95a	1.10b	0.98a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	0.47a	0.48a	0.69a	0.75a	0.81a	0.90a	0.95 ab	0.95a
ชุดควบคุม	0.47a	0.49a	0.92a	0.67a	0.75a	0.82a	0.80a	0.91a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ ค10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)				
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4
ยีสต์ทั้งหมด	0.981a	0.103a	0.093a	0.070a	0.050a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	0.981a	0.115a	0.096a	0.083a	0.076ab
ชุดควบคุม	0.981a	0.157a	0.124a	0.098a	0.095b

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	1.540 a	0.907 a	0.754 a	0.683 a	0.634 a	0.596 a	0.283 a	0.250 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	1.540 a	1.011 a	0.927 a	0.786 a	0.749 a	0.652 a	0.400 a	0.320 a
ชุดควบคุม	1.540 a	1.312 b	1.055 a	0.917 a	0.748 a	0.632 a	0.511 a	0.430 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

ตารางภาคผนวกที่ ค12 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก

ชุดการทดลอง	ระยะเวลา(วัน)							
	D_0	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7
ยีสต์ทั้งหมด	0.410 a	0.437 a	0.427 a	0.499 a	0.828 a	0.978 a	1.042 a	1.074 a
ยีสต์+แบคทีเรียแลคติก	0.410 a	0.433 a	0.447 a	0.472 a	0.535 a	0.807 a	0.981 a	1.021 a
ชุดควบคุม	0.410 a	0.467 a	0.564 a	0.599 a	0.657 a	0.923 a	0.957 a	0.964 a

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางนัยสำคัญ $P< 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

คุณสมบัติทางสัณฐาน สรีรวิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์

ตารางภาคผนวกที่ ง1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของยีสต์ซึ่งแยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้

	Saccharomyces cerevisiae	Candida sorbosa	Candida tropicalis
แอสซิมิเลชัน			
เดกซ์โทรส	+	+	+
มอลโตส	+	-	+
ซูโครส	+	-	+
แลคโตส	-	-	-
กาแลคโตส	+	-	+
เมลิไบโอส	-	-	-
เซลลูไบโอส	-	-	+
อินโนซิทอล	-	-	-
ไซโลส	-	-	+
ราฟฟิโนส	+	-	-
ทรีฮาโลส	+	-	+
ดูซิทอล	-	-	-
เฟอร์เมนเทชัน			
เดกซ์โทรส	AG	+	+
กาแลคโตส	AG	-	+
ซูโครส	AG	-	+
มอลโตส	AG	-	+
ทรีฮาโลส	AG	-	+
แลคโตส	-	-	-
ราฟฟิโนส	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sab's broth	+	+	+
Urease	-	-	-

AG = มีการสร้างกรดและแก๊ส

คุณสมบัติทางกายภาพของยีสต์ซึ่งแยกจากการหมักเมล็ดโกโก้

Candida sp.

ลักษณะการเจริญบนอาหาร 2% glucose-yeast extract-peptone agar : โคโลนีมีรูปร่างกลมนูน สีขาว ผิวเรียบ ขอบโคโลนีเรียบ รอบโคโลนีมีเส้นใยยื่นออกมา

ลักษณะใน slide culture บนอาหาร corn meal agar : เชื้อสามารถสร้างได้ทั้ง true mycelium และ pseudomycelium

ลักษณะการสืบพันธุ์ : ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เชื้อมีการสืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ(budding) เซลล์แม่แต่ละเซลล์สามารถแตกหน่อได้จากทุกตำแหน่งของเซลล์(multilateral budding)

Saccharomyces sp.

ลักษณะการเจริญบนอาหาร 2% glucose-yeast extract-peptone agar : โคโลนีมีรูปร่างกลมนูน สีขาวและสีครีม ผิวเรียบ

ลักษณะใน slide culture บนอาหาร corn meal agar : เชื้อสามารถสร้างได้ทั้ง true mycelium และ pseudomycelium

ลักษณะการสืบพันธุ์ : มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยเชื้อจะสร้าง ascospore

ตารางภาคผนวกที่ ง2 คุณสมบัติทางสัณฐาน สรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะที่ศึกษา	Streptococcus	Lactobacillus
รูปร่าง	กลม	แท่ง
การติดสีแกรม	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-
รูปแบบของการหมัก	โฮโมเฟอร์เมนเทตีฟ	เฮทเทอโรเฟอร์เมนเทตีฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตัวย่อและสัญลักษณ์

CFU	= Colony Forming Unit
MRS	= De Man, Rogosa and Sharp agar ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก
DSM	= Dextrose Sorbitol Mannitol ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแอซีติก
PDA	= Potato Dextrose Agar ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์
AA	= Acetolacter Agar ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแอซีติก
TYGKCP	= อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วย tryptone, Yeastextract, Glucose, K_2HPO_4 and Cocoa pulp extract
OD	= Optical Density

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรพิน ภูมิภมร, ปิยนุช นาคะและ อัมพล จุลสวัสดิ์ 2536 การหมักโกโก้ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ฟิสิกส์ และเคมี ในระหว่างการหมักโกโก้ ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27: 303-313

A.O.A.C. 1984 official methol of analysis of the association of analytical chemists . 14th ed. Association of official Analytical Chemist,USA.

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis of the association of analytical chemist.14th ed. Association of official analytical chemist, USA.

Abdul Samah, O., Fared Putih, M., Selamat, J. and Alimon, H. 1993. Fermentation product in cocoa beans inoculated with *Acetobacter xylinum*. ASEAN Food J. 86(1) : 22-25.

Abiola, S.S. and Tewe, O.O. 1991 Chemical evaluation of cocoa by-product. Trop. Agric. 68 [4] : 335-336

American Public Health Association. 1960 . Standard method for the examination of dairy products. 11th ed. American public Health Association,Inc New York.

Barber, S. B. and Summerson, W. M. 1941. Analytical of lactic acid in fruits. J. Biol. Chem. 138: 535.

Berbert, P. R. F. 1979. Contribuicao para o conhecimento dos acucares componentes da amedoa e do mel de cacau. Revista Theobroma. 9: 955.

Biehl, B., Meyer, Crone, G. and Pollman, L. 1989. Chemical and physical changes in the pulp during ripening and postharvest storage of cocoa pods. J. Sci. Food Agric. 48: 189-208.

Biehl, B., Brunner,E., Passern, D., Quesnel, V.C. and Adomako, D. 1985. Acidification Proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. J. Sci. Food Agric. 36 :583-598.

Carr, J. G., Davies, P. A. and Dougan. 1980. Cocoa Fermentation in Ghana and Malaysia. Part II. Further microbiological methods and results. Ghana: The Cocoa Research Institute.

Carr, J. G., Davies, P. A. and Dougan. 1981. Cocoa Fermentation in Ghana and Malaysia. Proc. Conference International surla Recherche Caoyere, Teme,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Douala, Cameroun, Actes. London: J. de Lafforest and Transla-Inter Limited. 573.

De Camargo, R., Leme, J. and Martinelli, A. 1963. General observations on the microflora of fermenting cocoa beans in Bahia (Brazil). Food Technol. 19: 116-117.

Dewitt, K. W. 1957 . Nitrogen metabolism in fermenting cocoa. In A Report on Cocoa Research, 1955-1965, p.54 The imperial College of Tropical Agriculture. St Augustine,Trinidad. cited by Lehrian, D.W. and Patterson, G.R. 1983 Cocoa fermentation. In Biotechnology. [ed. Reed, G., and Rehm, H.J] vol. 5 Food and Feed production with microorganisms [vol. ed Reed, G.] pp. 531-575,Wienheim:Verlag Chemie.

Dougan, J. 1980. Methods for the Analysis of Cocoa Pulp and Cotyledons. London: Tropical Products Institute.

Dougan, J., Duncan, R. J. E., Jardine, Robinson, Simmons, P. M. and Woodage,C. 1981. The Relationship Between Oxygen, Temperature, Acetic Acid and Lactic Acid During Cocoa Fermentation. London: Cocoa Chocolate and Confectionery Alliance.

Egan, H., Rick, R. S. and Sawyer, R. 1981. Pearson's chemical analytical of food. 8th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Forsyth, W. G. C. and Quesnel, V. C. 1957. Variations in cocoa preparation.VI. Conf. Interam. de Cacau Salvador, Bahia. cited by Wood, G. A. R. and Lass. 1985. Cocoa, 4th ed. Tropical Agriculture Series, Longman, New York. 157-168.

Gibson, T. and Abd-el-Malek, Y.1948. The formation of carbondioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. J. Diary Res. 14:35.

Gourieva, V. B. and Tserevitinov. 1979. Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. USSR. State Committe on Invention and Discoveries, UDC 911. 13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hancock, B. L. 1949. Quality in cocoa. Trinidad Rep. Cocoa Conf, London. 75-79. cited by Wood, G. A. R. and Lass. 1985. Cocoa, 4th ed. Tropical Agriculture Series Longman, New York. 461-462.

Hoskin, J. C. and Dimick, P. S. 1984. Role of non-enzymatic browning during the processing of chocolate flavour: A Review. Proc. Biochem. 19 (3): 92.

Jinap, S. and Dimick, P.S. 1990. Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different origins. J. Food Sci. 55(2) : 547-550.

Keeney, P. G. 1972. Various interactions in chocolate flavour. J. Am. Oil Chem. Soc. 49 (10): 567.

Knapp, A. W. 1926. Experiment in the fermentation of cocoa. J. Soc. Chem. Ind. 45 : 140-142. cited by Wood, G. A. R. and Lass. 1985. Cocoa, 4th ed. Tropical Agriculture Series, Longman, New York.

Kreger-van Rij N.J.W. 1984 . The yeast -a taxonomic study Elsevier Science Publishers Amsterdam.p. 1082

Lehrian, D. W. and Patterson, G.R. 1983. Cocoa fermentation on Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie. Food and Feed Production with Microorganisms. Rehm, H. J. and Reed, G. 5:531-575.

Lopez, A. and Quesnel, V. C. 1973. Volatile fatty acid production in cocoa fermentation and effect on chocolate flavour. J. Sci. Food Agric. 24 : 319-326.

Offem, J. O. 1990. Individual variation in the amino acid and chemical composition of defatted cocoa bean meal of three variaties of cocoa (Theobroma cocoa) from South-eastern Nigeria. J. Sci. Food Agric. 52 : 129-135.

Ostovar, K. and Keeney, P. G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans. J. Food Sci. 38 : 11-61.

Passos, F. M. L., Solva, D. O., Lopez, A., Ferreira, C. L. L. F. and Guimaraes, W. V. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

from traditional cocoa bean fermentations in Bahia (Brazil). J. Food Sci. 49(1) : 205-208.

Quesnel, V.C. 1965. Agents inducing the death of cocoa seeds during fermentation. J. Sci. Food Agric. 16 : 441-447.

Reineccius, G. A., Andersen, D.A., Kavanagh , T.E. and Keeney,P.G.1972 Identification and quantification of the free sugars in cocao beans. J. Agric. Food chem. 20:199-202.

Roelofsen, P. A. 1958. Fermentation, Drying and Storage of cocoa beans. Adv. Food Res., 8 : 25-296

Rohan, T. A. 1963. Processing of raw cocoa for the market. FAO Agricultural Studies No. 60. Rome: FAO.

Rohan, T. A. 1964. Precursors of chocolate aroma. A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. J. Food Sci. 29 : 456-459.

Rohan, T. A. and Stewart, T. 1964. The volatile and non-volatile acids of cocoa beans. Rev. Int. Choc. 19 (11): 503.

Rohan, T. A. and Stewart, T. 1967. Precursors of chocolate aroma : Production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. J. Food Sci. 32 : 395.

Rombouts, J.E. 1952 Observations on the microflora of fermenting cocoa beans in Trinidad. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 15, 103. cited by de Camergo,R.,Leme,J., and Martinelli, A. 1963. General observation on the microflora of fermenting cocoa beans (Theobroma cacao) in Bahia (Brazil). Food Technol. 19 : 116-117.

Romboute, J. E. 1952. Observation on the microflora of fermenting cocoa beans in Trinidad Proc. Soc. Bacteriol. 15: 111-130.

Sharpe, M.E. and Fryer, T.F. 1966 Identification of the lactic acid bacteria. In Identification methods for Academic Press, London. p. 65-79.

Wadsworth, R. V. and Howat, G.R. 1954 Cocoa fermentation. Nature. 28 : 392-394

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wood, G. J. B. and Lass, R.A. 1985. Cocoa, 4th ed, Tropical Agriculture Series. Longman, New York.

Zak, D. K., Ostovar, K. and Keeney, P. G. 1972. Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cocoa beans. J. Food Sci. 37 : 967-968.

Zak, D. K. and Keeney, P. G. 1976. Extraction and fractionation of cocoa protein as applied to serveral varieties of cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 24(3) : 479-482.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้