

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาและเคมีของวัตถุดิบในการทำงานนมด้วยฟู่พื้นบ้าน

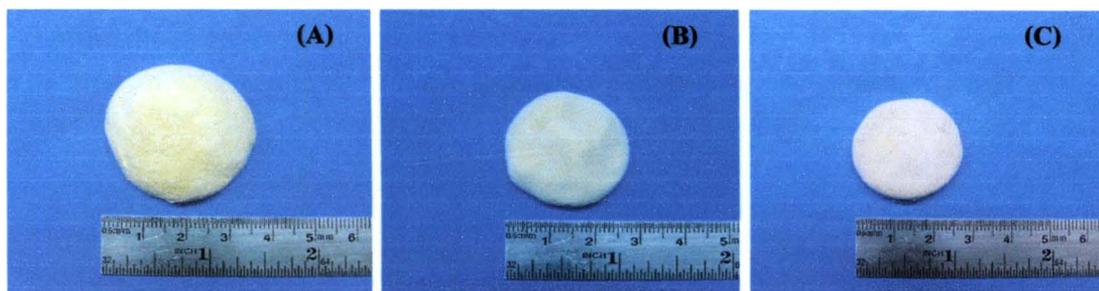
4.1.1 ลูกแป้งข้าวหมาก

ปัจจุบันการผลิตลูกแป้งข้าวหมากมักเป็นไปอย่างไม่ถูกต้องตามกฎหมาย มีเพียงไม่กี่รายที่จดทะเบียนอย่างถูกต้องจากกรมสรรพสามิต ดังนั้นการเก็บรวบรวมลูกแป้งจึงต้องเป็นการเก็บตัวอย่างแบบสะสม ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ในครั้งเดียว โดยทำการเก็บรวบรวมจากชาวบ้านในจังหวัดปัตตานี จำนวน 3 แห่ง ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากตำบลโคกโพธิ์ ซึ่งกำหนดให้เป็นรหัส 01 จำนวน 30 หน่วย ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง กำหนดให้เป็นรหัส 02 จำนวน 20 หน่วย และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรีกำหนดให้เป็นรหัส 03 จำนวน 35 หน่วย (รูปที่ 4) จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะทั่วไป สี และปริมาณจุลินทรีย์ จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งแต่ละแห่งจะมีลักษณะและขนาดที่แตกต่างกัน ดังนี้ ลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์ จะมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 ± 1 เซนติเมตร สูงเท่ากับ 2.5 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วยเท่ากับ 7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวล ลูกแป้งจากอำเภอยะหริ่ง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 ± 1 เซนติเมตร สูงเท่ากับ 1.0 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วยเท่ากับ 3.7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวลเช่นกัน และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรี มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.6 ± 1 เซนติเมตร สูงเท่ากับ 1.3 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วยเท่ากับ 3.7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวลออกคล้ำ (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาแล้วลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์มีขนาดใหญ่ที่สุด ลูกแป้งจากสายบุรีและยะหริ่งรองลงมาตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แห่ง พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยีสต์และราพบอยู่ในช่วง $10^4 - 10^5$ CFU/g โดยลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรีมีปริมาณยีสต์และรามากที่สุด เท่ากับ 9.05×10^5 CFU/g รองลงมาได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง และอำเภอโคกโพธิ์มีปริมาณ เท่ากับ 1.55×10^4 และ 1.06×10^5 CFU/g ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกพบอยู่ในช่วง $10^4 - 10^6$ CFU/g โดยลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์พบปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด เท่ากับ 2.67×10^6 CFU/g รองลงมาได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรีและอำเภอยะหริ่ง มีปริมาณเท่ากับ 5.60×10^5 และ 2.10×10^4 CFU/g ตามลำดับ และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดพบอยู่ในช่วง $10^4 - 10^5$ CFU/g ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 5.8×10^6 CFU/g รองลงมาได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี และอำเภอยะหริ่งมีปริมาณ เท่ากับ 1.53×10^5 และ 2.10×10^4 CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับผลการศึกษาของอรณพ และคณะ (2551) ได้ศึกษาสมบัติของกล้าเชื้อลูกแป้งขนมตาลที่ผลิตเอง 7 สูตร พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดพบในช่วง 6.09 - 7.53



Log CFU/g ปริมาณยีสต์และราพบในช่วง 5.12 - 5.53 Log CFU/g และปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก 1.82 - 4.91 Log CFU/g ซึ่งทั้งปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกจากการทดลองพบปริมาณสูงกว่า เนื่องมาจากวัตถุดิบที่นำมาผลิตลูกแป้ง เช่น แป้งและสมุนไพรจากท้องถิ่นที่ต่างกัน น้ำมันหอมระเหยในเครื่องเทศ และสมุนไพร มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย การใช้ในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก ยีสต์และรา ลูกแป้งข้าวหมากมีปริมาณยีสต์และราอยู่สูง (มณฑัย, 2546) โดยยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่ ได้แก่ สายพันธุ์ *Saccharomycopsis fibuligera* ขณะที่เชื้อรา ได้แก่ สายพันธุ์ *Amylomyces* และ *Rrhizopus* โดยกลุ่มเชื้อราจะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลส ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ดี ส่งผลทำให้แบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ สามารถนำน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนมาใช้ในการเจริญ รวมทั้งสร้างสารเมตาบอไลต์ เช่น กรดอินทรีย์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลต่อคุณภาพของขนมถ้วยฟูอีกด้วยเช่นกัน (Limtong *et al*, 2005)



รูปที่ 4 ลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดปัตตานี ; ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ (A), ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง (B) และ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะบوري (C)

ตารางที่ 4 คุณลักษณะทางด้านจุลินทรีย์ และกายภาพของลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ อำเภอยะหริ่ง และอำเภอสายบุรี

ลักษณะและปริมาณจุลินทรีย์	ลูกแป้งข้าวหมาก		
	อำเภอโคกโพธิ์ (01)	อำเภอยะหริ่ง (02)	อำเภอสายบุรี (03)
คุณภาพทางจุลินทรีย์ (CFU/g)			
จุลินทรีย์ทั้งหมด	5.8×10^6	4.4×10^4	1.53×10^5
ยีสต์และรา	1.06×10^5	1.55×10^4	9.05×10^5
แบคทีเรียกรดแลกติก	2.67×10^6	2.10×10^4	5.60×10^5
คุณภาพทางกายภาพ			
ความสูง (ซม.)	2.5 – 2.6	0.8 – 1.2	1.2 – 1.4
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	3 – 4	2.5 – 2.6	2.5 – 2.7
น้ำหนัก (กรัม)	7	3.6	3.7
สี	ขาวนวล	ขาวนวล	ขาวนวลออกคล้ำ

4.1.2 แป้งข้าวเจ้า

ข้าวที่นำมาใช้เป็นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง และควรเป็นข้าวที่มีอายุการเก็บไม่ต่ำกว่า 4 เดือน จะทำให้ขนมขึ้นฟูและนุ่ม (กนก , 2542) จึงเลือกใช้ข้าวพันธุ์ชัยนาท อายุประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี ซึ่งในการเตรียมแป้งสดใช้วิธีการแบบไม่เปียก ส่งผลให้ตัวอย่างแป้งข้าวเจ้าสดในการทำขนมด้วยฟูพื้นบ้านมีความชื้นอยู่สูง โดยในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยน้ำหนักแห้ง ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า คาร์โบไฮเดรต และใยอาหาร ในแป้งข้าวเจ้าสดของข้าวพันธุ์ชัยนาท (ตารางที่ 5) พบว่า แป้งข้าวซึ่งมีความชื้นร้อยละ 41.80 โปรตีนร้อยละ 5.60 ไขมันร้อยละ 0.13 เถ้าร้อยละ 0.36 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 52.11 และปริมาณเส้นใย ร้อยละ 2.31 โดยพบปริมาณโปรตีนน้อยกว่าขนมจีนแบบไม่หมักซึ่งมีวิธีการผลิตแป้งสดใกล้เคียงกัน โดยวิธีการผลิตแป้งข้าวเจ้าสด นำข้าวแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปไม่เปียกและทับให้แป้งแห้งนั้น เนื่องมาจากข้าวที่นำมาใช้แต่ละพันธุ์ จะมีโปรตีนในข้าวชนิดที่ละลายน้ำได้ เรียกว่า อัลบูมิน มีแตกต่างกันและจะสูญเสียไประหว่างการล้างและแช่ข้าว (สุภรัตน์ และคณะ, 2534) ขณะที่ข้าวพันธุ์ชัยนาทซึ่งผ่านการไม่เปียก และอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกัน แต่ปริมาณไขมัน โปรตีน เถ้า มีองค์ประกอบทางเคมีของแป้งไม่แตกต่างกัน บุญทิศา (2548)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเจ้าสดที่ผลิตแบบไม่เปียก

องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)	ผลการทดลอง	สุภรัตน์และคณะ (2534)	บุญทิวา (2548)
ความชื้น	41.80	43	7.92
ไขมัน	0.13	-	0.14
โปรตีน	5.6	6.31	6.02
เถ้า	0.36	0.36	0.45
คาร์โบไฮเดรต	52.11	-	-
ใยอาหาร	2.31	0.56	Trace

การวิเคราะห์สมบัติด้านจุลินทรีย์ ประกอบด้วย ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณกรดแลกติก พบว่าสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของแป้งข้าวเจ้าสด แสดงในตารางที่ 6 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีปริมาณ เท่ากับ 1.4×10^8 CFU/g กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 1.3×10^8 CFU/g และพบยีสต์และราปริมาณ เท่ากับ 3.1×10^2 CFU/g ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการผลิตขนมจีนของสุพรรณนิการ์ (2548) ที่มีกระบวนการผลิตใกล้เคียงกัน คือ พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 5.80×10^9 CFU/g ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 4.70×10^9 CFU/g และปริมาณยีสต์และรา 8.27×10^5 CFU/g โดยพบแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุดในขั้นตอนการผลิตแป้งหมัก การที่แบคทีเรียกรดแลกติกเจริญได้ดีในแป้งข้าวเจ้าสด เนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลกติก มีกลไกการย่อยแป้ง คือ หลังจากแป้งถูกย่อยจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส จากนั้นน้ำตาลมอลโตสถูกส่งเข้าสู่เซลล์แมนเบรนภายในเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก และถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส (α -glucosidase) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสุดท้ายจะได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดอินทรีย์ เอทานอล และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Santoyo *et al.*, 2003) กรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติก เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดโพรไพโอนิก โดยสารเหล่านี้สร้างสภาวะความเป็นกรด ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลต่อรสชาติ และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ (สุพรรณนิการ์, 2548) ดังนั้น ในแป้งข้าวเจ้าสดจึงพบแบคทีเรียกรดแลกติกได้สูง

ส่วนค่าค่าความเป็นกรดและ ค่าพีเอช (pH) พบว่า แป้งสดมีค่าความเป็นกรดร้อยละ 0.36 และค่า pH 3.7 โดยการเปลี่ยนแปลง pH และค่าความเป็นกรดของกรดแลกติกมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก เป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ ส่งผลต่อแป้งสดมีค่า pH ลดลง

ตารางที่ 6 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมี ในแป้งข้าวเจ้าสดที่ผลิตแบบไม่เปียก

คุณภาพของแป้งข้าวเจ้าสด	ผลการทดลอง	สุพรรณนิการ์ (2548)
คุณภาพทางจุลินทรีย์ (CFU/g)		
จุลินทรีย์ทั้งหมด	1.4×10^8	5.80×10^9
ยีสต์และรา	3.1×10^2	8.27×10^5
แบคทีเรียกรดแลกติก	1.3×10^8	4.70×10^9
คุณภาพทางเคมี		
pH	3.7	-
ปริมาณกรดแลกติก (Total Titratable Acidity; ร้อยละ TTA)	0.36	-

4.1.3 น้ำตาลโตนดเข้มข้น

น้ำตาลโตนดเข้มข้นที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่งน้ำตาลโตนดเข้มข้นซึ่งจัดซื้อจากร้านค้าจากอำเภอยะหริ่ง มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีน้ำตาลเข้ม ขึ้นเหนียว มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติ รสหวานประมาณ 77 องศาบริกซ์ จากนั้นนำมาผ่านความร้อนโดยการพาสเจอไรส์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำมาตรวจสอบคุณภาพทั้งก่อนและหลังการพาสเจอไรส์ (ตารางที่ 7) พบว่า น้ำตาลโตนดเข้มข้นมีค่า pH เท่ากับ 5.08 ความชื้นของน้ำตาลโตนดเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 16.58 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 77 องศาบริกซ์ ไม่แตกต่างกันทั้งก่อนและหลังการพาสเจอไรส์ ส่วนผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่า น้ำตาลโตนดเข้มข้นก่อนการพาสเจอไรส์ มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 1.3×10^3 CFU/ml จำนวนยีสต์และราเท่ากับ 1.15×10^2 CFU/ml และจำนวนยีสต์ เท่ากับ 25 CFU/ml โดยยีสต์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มออสโมฟิลิก ยีสต์ (Osmophilic yeast) ขณะที่น้ำตาลโตนดหลังการพาสเจอไรส์ มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าก่อนการพาสเจอไรส์ โดยพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 2.8×10^2 CFU/ml จำนวนยีสต์และรา เท่ากับ 25 CFU/ml และจำนวนยีสต์ เท่ากับ 30 CFU/ml ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำตาลโตนดเข้มข้นไม่เกินมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ชุมชน (2546) โดยกำหนดให้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5×10^2 CFU/g และยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 10^2 CFU/g แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด เป็นไปได้ว่าการพาสเจอไรส์เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูง เป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่ทนทานต่อความร้อนต่ำ แต่ไม่ได้ทำลายหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จึงพบปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ นอกจากนี้การเก็บรักษาที่สะอาด ถูกสุขลักษณะทำให้พบปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดที่วิเคราะห์ได้ไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ เคมี และกายภาพของน้ำตาลโตนดเข้มข้น และ น้ำตาลโตนดเข้มข้นพาสเจอร์ไรส์

คุณภาพของน้ำตาลโตนด	น้ำตาลโตนด	น้ำตาลโตนดผ่านการพาสเจอร์ไรส์	Phaichamnan <i>et.al</i> (2010)
คุณภาพทางจุลินทรีย์ (CFU/ml)			
จุลินทรีย์ทั้งหมด	1.3×10^3	2.8×10^2	$1.2 \times 10^3 - 4.8 \times 10^6$
ยีสต์และรา	1.15×10^2	25	$1.3 \times 10^2 - 5.3 \times 10^4$
ออสโมฟิลิก ยีสต์	25	30	$2.0 \times 10^2 - 1.46 \times 10^5$
คุณภาพทางเคมี			
ความชื้น	16.58	16.57	-
pH	5.08	5.08	4.5 - 5.37
Total Titratable Acidity (TTA ; %)	0.49	0.51	0.24 - 0.86
คุณภาพทางกายภาพ			
ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°brix)	77	77	59 - 73

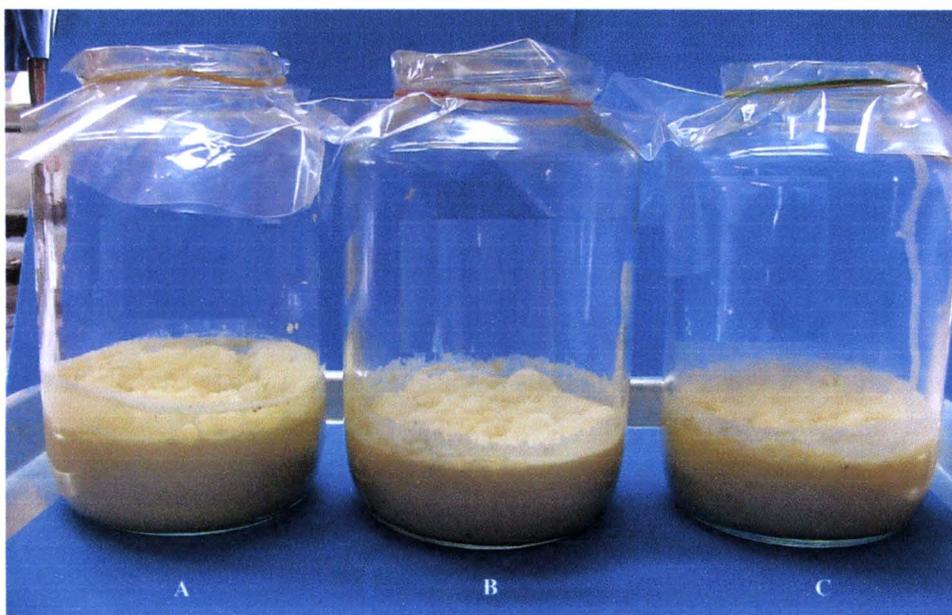
ค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำตาลโตนดเข้มข้น มีค่า 77 องศาบริกซ์ โดยมีค่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมที่กำหนดให้มีค่าไม่ต่ำกว่า 65 องศาบริกซ์ ส่งผลทำให้ความชื้นในน้ำตาลโตนดต่ำ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องได้นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด และค่า pH ของน้ำตาลโตนดเข้มข้นต่ำ ทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์ไม่สูงส่งผลให้ไม่มีการเสื่อมเสียเกิดขึ้นหรือเกิดจากการหมักในส่วนบนของผิวหน้าน้ำตาลโตนดเข้มข้น (Phaichamnan *et.al*, 2010) สอดคล้องกับของ Ruiz-argueso and Rodriguez-navarro (1975) พบว่าในน้ำผึ้งที่มีความชื้นต่ำ จะพบแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ในช่วง $10^2 - 10^4$ CFU/g ขณะที่เชื้อ *Zymomonas* และยีสต์ พบได้น้อยได้แก่ 10^4 CFU/g และ 10^2 CFU/g ตามลำดับ โดยในน้ำผึ้งทั้งในธรรมชาติและในน้ำผึ้ง ที่เพาะเลี้ยงเอง จำนวนแบคทีเรียจะลดลงเมื่อมีค่าความชื้นต่ำ (ประมาณร้อยละ 18)

เมื่อพิจารณาวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตได้แก่ แป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนดเข้มข้น และ ลูกแป้งข้าวหมาก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกพบในแป้งข้าวเจ้าสดเป็นแหล่งสำคัญ ยีสต์และราพบมากในลูกแป้งข้าวหมาก โดยน้ำตาลโตนดเข้มข้นทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน ช่วยให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีในการผลิตขนมถ้วยฟู

4.2 การคัดเลือกกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากในการทำขนมด้วยฟูพื้นบ้าน

4.2.1 การเตรียมตัวอย่างกล้าเชื้อ

ลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอชะหรั่ง และลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี เมื่อนำมาใช้ผลิตเป็นกล้าเชื้อขนมด้วยฟูพื้นบ้าน โดยใช้แป้งข้าวเจ้าสด ลูกแป้งข้าวหมาก น้ำตาลโตนด และน้ำ ในอัตราส่วน (โดยน้ำหนัก) 42 : 5 : 25 : 25 กรัม ผสมรวมกันและหมักที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กล้าเชื้อที่ได้มีลักษณะเหลวข้น มีสีขาวนวล และมีฟองอากาศลอยอยู่บนผิวน้ำของกล้าเชื้อ ซึ่งอุณหภูมิขณะหมักอยู่ในช่วง 30 ± 1 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 5 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียกรดแลกติก ในช่วง $10^7 - 10^8$ CFU/g โดยพบมากที่สุดในกลุ่มกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรี เท่ากับ 3.1×10^8 และ 1.4×10^8 CFU/g ตามลำดับ ส่วนปริมาณยีสต์พบในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g โดยในกลุ่มกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์มากที่สุด เท่ากับ 1.2×10^7 CFU/g และเชื้อยีสต์และรา พบในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g พบในกลุ่มกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอชะหรั่งมากที่สุด เท่ากับ 4.0×10^7 CFU/g ดังตารางที่ 8



รูปที่ 5 กล้าเชื้อขนมด้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมากจาก ลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์ (A), ลูกแป้งจากอำเภอชะหรั่ง (B) และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรี (C)

ตารางที่ 8 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมี ของกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมากจาก
อำเภอโคกโพธิ์, อำเภอยะหริ่ง และอำเภอสายบุรี

คุณภาพของกล้าเชื้อขนมถ้วยฟู	ลูกแป้งข้าวหมาก		
	อำเภอโคกโพธิ์ (01)	อำเภอยะหริ่ง (02)	อำเภอสายบุรี (03)
คุณภาพทางจุลินทรีย์ (CFU/ml)			
จุลินทรีย์ทั้งหมด	1.3×10^8	5.3×10^7	3.1×10^8
ยีสต์และรา	7.7×10^6	4.0×10^7	1.1×10^7
ยีสต์	1.2×10^7	5.2×10^6	5.9×10^6
แบคทีเรียกรดแลกติก	1.3×10^8	6.2×10^7	1.4×10^8
คุณภาพทางเคมี			
pH	4.03	4.18	4.07
Total Titratable Acidity; ร้อยละ TTA)	0.78	0.81	0.89

ค่า pH ของกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่งมีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 4.03, 4.18 และ 4.07 ความเป็นกรดของกล้าเชื้อ โดยเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติก พบว่า ในตัวอย่างกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรีมีปริมาณกรดมากที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 0.89 รองลงมาได้แก่ กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งและอำเภอโคกโพธิ์มีค่า เท่ากับร้อยละ 0.81 และ 0.78 ตามลำดับ ค่า pH และค่าความเป็นกรดของกล้าเชื้อไม่ได้เป็นในแนวโน้มเดียวกัน นั้นเป็นเพราะค่า pH เป็นค่าที่วัดความเป็นกรด – ด่างของตัวอย่างซึ่งขึ้นกับค่าของกรดอินทรีย์ที่เกิดทั้งหมด (Vernocchi *et al.*, 2004) ขณะที่ค่าความเป็นกรดในตัวอย่างนั้นเป็นการเทียบเฉพาะกรดแลกติกเท่านั้น

การเปลี่ยนแปลงของค่า pH และความเป็นกรดของกล้าเชื้อในระหว่างการเตรียม พบว่า มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 24 - 48 ชั่วโมง โดยลดลงจาก 4.5 เป็น 4.0 หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อยจนคงที่ ขณะที่ความเป็นกรด เพิ่มมากขึ้นจาก 0.76 เป็น 0.83 เมื่อพิจารณาที่ปริมาณการหมัก ในชั่วโมงที่ 48 พบว่า มีแบคทีเรียกรดแลกติกเจริญมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในกล้าเชื้อจากทั้ง 3 แหล่ง ส่งผลให้กล้าเชื้อมีสภาวะความเป็นกรดสูง โดยแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส มีค่า pH ที่เหมาะสมโดยปกติ ในช่วง 5.5 - 5.8 หรือต่ำกว่า มีเมแทบอลิซึมแบบ Heterofermentative โดยการสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และสารอื่นๆ ออกมาโดยที่ pH ของกล้าเชื้อขนมถ้วยฟู มีค่าในช่วง 4.0 เป็นช่วงที่แบคทีเรียกรดแลกติก มีระยะ log phase ต้น ผลิตจำนวนเซลล์และกรดได้ดี (Santoyo *et al.*, 2003) ปริมาณเชื้อของกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง เมื่อนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่พบในลูกแป้งข้าวหมากซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ แบคทีเรียกรดแลกติก และปริมาณ



จุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มจำนวนขึ้นในอัตราส่วน 1 : 1000 เท่า ขณะที่ยีสต์และราเพิ่มจำนวนเป็น 1 : 100 เท่า และเมื่อเทียบอัตราส่วนของแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ในตัวอย่างกล้าเชื้อขนมด้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่ง พบว่า มีอัตราส่วน 1 : 10 เท่า ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Haggman and Salovaara (2008) พบว่าหลังจากการขยายเชื้อ (backslopping) ในการทำขนมปังเปรี้ยว โดยตัวอย่างแป้งถูกนำมาหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างมีค่า pH ลดลงเหลือประมาณ 3.8 - 4.0 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนเริ่มต้น มีปริมาณ 10^7 เพิ่มเป็น 10^9 CFU/g โดยสามารถเพิ่มเป็น 100 เท่า ขณะที่ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เพิ่มเป็น $10^7 - 10^8$ CFU/g โดยสามารถเพิ่มเป็น 10 เท่า และอัตราส่วนที่พบแบคทีเรียแลคติกต่อยีสต์ในตัวอย่าง คือ 10 : 1 เท่า เนื่องมาจากการขยายเชื้อ โดยวิธีนี้เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรด สามารถเจริญและผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจึงสามารถเจริญได้ดี ส่วนยีสต์ที่เจริญได้ในตัวอย่างจึงเป็นกลุ่มที่ทนต่อกรดและสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ด้วย เช่นเดียวกับ Vernocchi *et al.* (2004) รายงานว่าจากการวิเคราะห์ผลทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างที่เก็บในการผลิตขนมปังชอร์โดของประเทศอิตาลี ตั้งแต่กล้าเชื้อ (Mother sponge) ตัวอย่างก่อนและหลังการทำการขยายเชื้อ (Refreshment I, II) ตัวอย่างก่อนและหลังการเกิดโด (Dough I, II) และก่อนและหลังการขึ้นฟู โดยพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่ายีสต์ประมาณ 1 log cycle หรือประมาณ 10 เท่า

อัตราส่วนนี้ส่งผลต่อลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์ โดยเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่น กรดอินทรีย์แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์รวมทั้งเอทานอล โดย ปริมาณยีสต์หลังหมัก เท่ากับ 10^7 CFU/g สามารถทำขนมด้วยฟูเป็นแฉกได้ดี หากยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าเป็น 10^8 CFU/g จะผลิตเอทานอล ออกมาระหว่างการหมักผลของเอทานอล ส่งผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติก ทำให้โปรตีนเอนไซม์เสียสภาพ และยังเป็นตัวทำลายเอาไขมันที่เชื่อมเซลล์ออก จึงทำให้โครงสร้างเซลล์ถูกทำลาย จึงส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (กนก, 2542) ขณะที่ Luangsakul *et al.* (2009) ทำการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ในกล้าเชื้อทำซาลาเปาจากตัวอย่างร้านค้า 4 แห่ง ในประเทศไทย พบแบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง $10^4 - 10^8$ CFU/g และเชื้อยีสต์พบในช่วง 0 - 100 CFU/g โดยอัตราส่วนของ ยีสต์ และ แบคทีเรียกรดแลคติก คือ 1 : 1000 จึงเติมยีสต์ทางการค้าภายหลังเพื่อช่วยให้ซาลาเปามีลักษณะการขึ้นฟูตามต้องการ นอกจากนี้อัตราส่วนดังกล่าว ส่งผลให้กล้าเชื้อขนมด้วยฟูมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0 - 5.3 และลดลงเรื่อยๆ จนถึง 4.0 เมื่อใช้ระยะเวลาขึ้น ซึ่งค่า pH ดังกล่าวเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักร่วมกันโดยค่า pH ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของยีสต์ที่อยู่หมักร่วมกัน (Valmorri *et al.*, 2008)

เมื่อพิจารณาการผลิตกล้าเชื้อขนมด้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมาก ซึ่งหมักรวมกับวัตถุดิบอื่นๆ เช่น แป้งและน้ำตาลโตนด โดยในกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากมีลักษณะเป็นแป้งเชื้อเค็ม ใกล้เคียงกับการผลิตขนมปังเปรี้ยวแบบดั้งเดิม หรือแป้งเปรี้ยวชนิดที่ 1 (Sourdough Type I) ซึ่งใช้จุลินทรีย์ในธรรมชาติ หรือแป้งเชื้อเค็ม (Mother dough) เป็นตัวเริ่มต้นการหมัก ระยะเวลาในการหมักอยู่ในช่วงระหว่าง 3 - 48 ชั่วโมง ที่ระดับอุณหภูมิ 20 - 30 องศาเซลเซียส มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0 - 4.5 ซึ่งในสภาวะการหมักดังกล่าว พบว่า จุลินทรีย์ภายในกล้าเชื้อ มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะการหมัก และสร้างสารผลิตภัณฑ์ได้ดี (Corsetti and Settanni, 2007; Vuyst and Patrica, 2005)

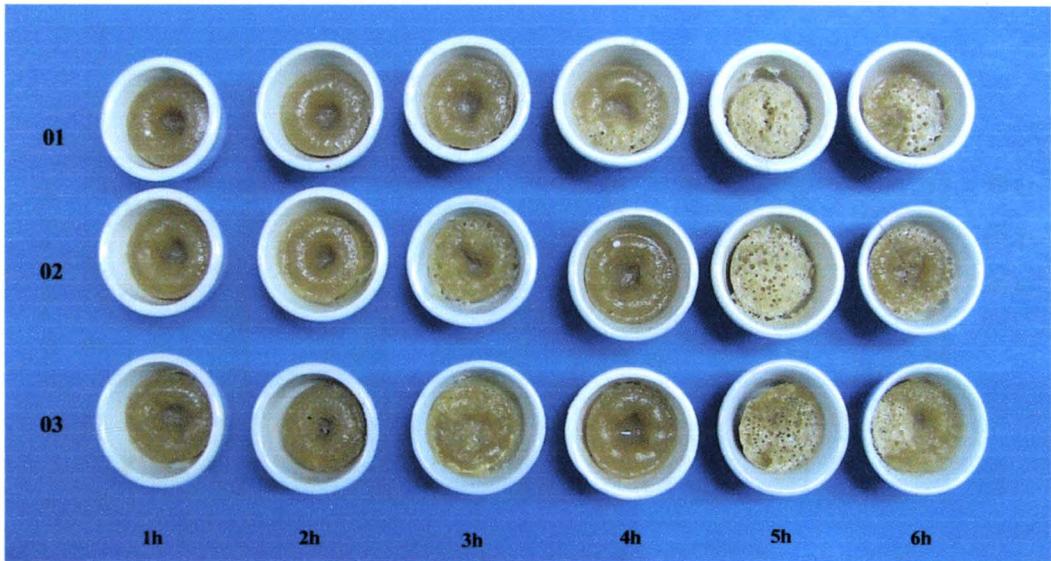
ในการผลิตกล้าเชื้อขนมด้วยฟูต้องการแป้งที่บดละเอียด ไม่ผ่านความร้อนเพื่อให้กระบวนการย่อยแป้งจากจุลินทรีย์ยังคงมีอยู่ เมื่อเติมน้ำจุลินทรีย์ที่อยู่ในแป้งจะเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม และมีผลให้จุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น กรดแลกติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ กลิ่นรสหมัก และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Hammes *et al.*, 2005) ในกล้าเชื้อขนมด้วยฟูซึ่งพบทั้งแบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ เป็นส่วนใหญ่ สารผลิตภัณฑ์จึงเป็นกรดและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ กล้าเชื้อจึงมีสภาวะที่เป็นกรด มีกลิ่นรสหมัก และเกิดฟองอากาศบริเวณบนผิวหน้าของกล้าเชื้อ

4.2.2 การผลิตขนมด้วยฟู

เตรียมส่วนผสมของขนมด้วยฟูพื้นฐาน ประกอบด้วย แป้ง ข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนด น้ำ และกล้าเชื้อขนมด้วยฟูพื้นฐานที่เตรียมไว้จากข้อ 4.2 ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 : 10 ผสมรวมกันและนำไปหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ เคมี และทางกายภาพ ทุก ๆ ชั่วโมง

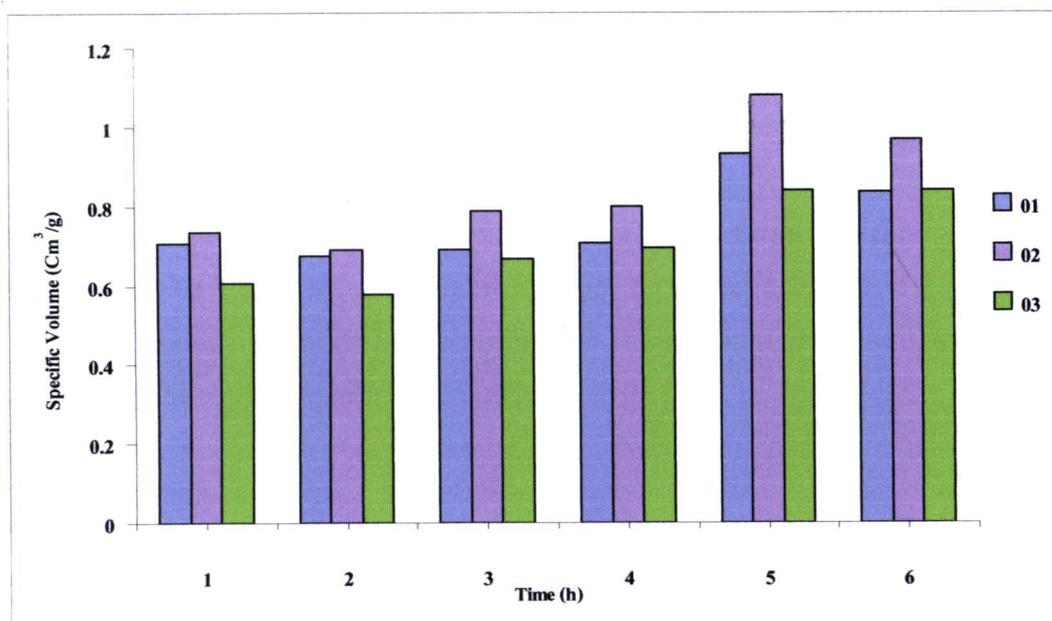
4.2.2.1 การหมักขนมด้วยฟูที่อุณหภูมิห้อง

ขนมด้วยฟูซึ่งหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) พบว่า ขนมด้วยฟูมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักเล็กน้อย รสหวานปานกลาง มีลักษณะการขึ้นฟูน้อย โดยในชั่วโมงที่ 1 - 4 ขนมด้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูน้อยมาก ขณะที่ในชั่วโมงที่ 5 ขนมด้วยฟูมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักจากกรดเล็กน้อย รสหวานปานกลาง ฟูปานกลาง ผิวหน้าแตกเป็นแฉกเล็กน้อย (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ลักษณะของขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก และระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส)

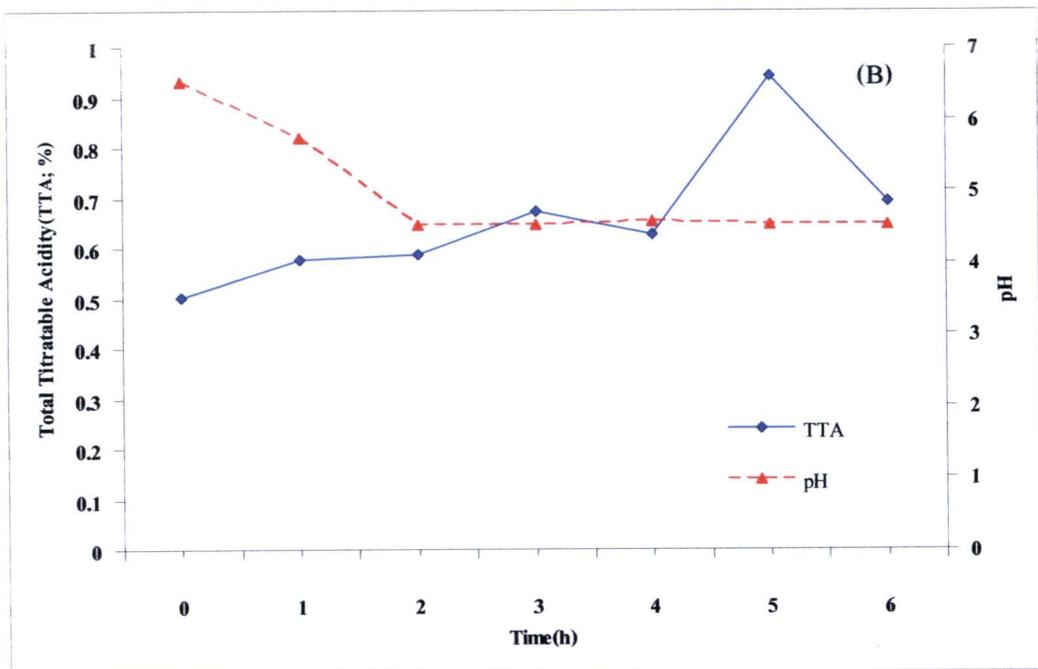
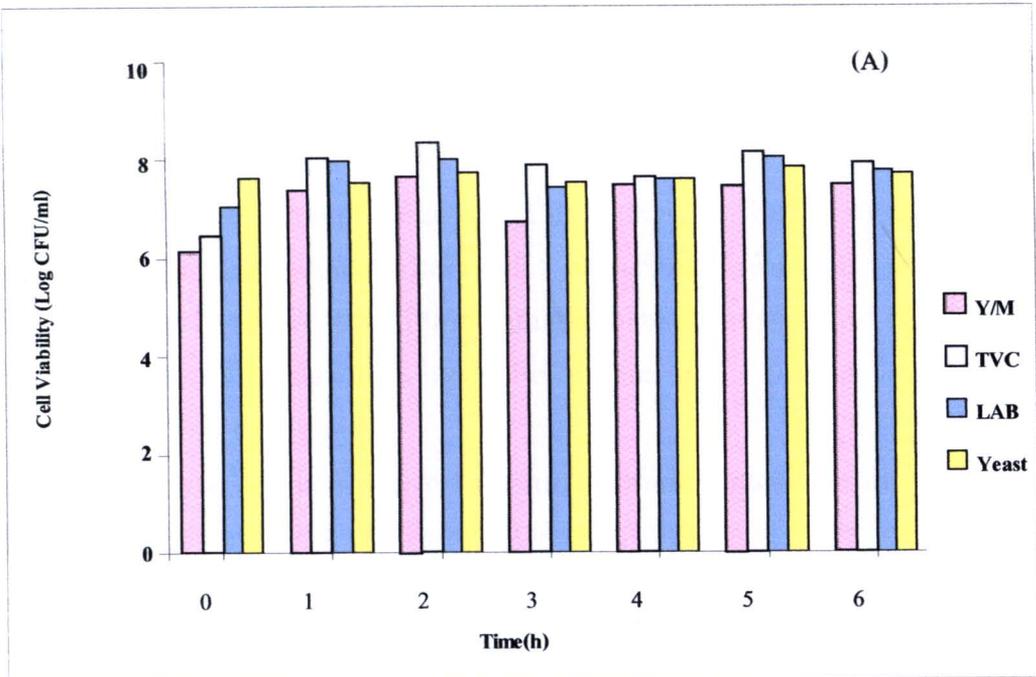
เมื่อวัดปริมาณการขึ้นฟูของขนมด้วยฟูซึ่งผลิตจากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องโดยขนมด้วยฟูที่ 1 - 4 มีปริมาณการขึ้นฟูน้อย อยู่ในช่วง 0.67 - 0.70 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ขณะที่ในช่วงที่ 5 มีลักษณะการขึ้นฟูปานกลาง โดยขนมด้วยฟูมีปริมาณการขึ้นฟู ในช่วง 0.83 - 1.07 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม เมื่อเปรียบเทียบขนมด้วยฟูที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ พบว่า ขนมด้วยฟูที่หมักในเวลา 5 ชั่วโมงมีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉก โดยขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอยะหริ่ง มีปริมาณการขึ้นฟูสูงสุดคือ 1.07 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม รองลงมาได้แก่ ขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีและโคกโพธิ์ มีปริมาณการขึ้นฟู เท่ากับ 0.92 และ 0.83 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ปริมาณการขึ้นฟูของขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง

ผลของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของแป้งในระหว่างการหมักเพื่อผลิตขนมด้วยฟูด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง ในการหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 1 - 6 ชั่วโมง พบว่า จุลินทรีย์หลังหมักของขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง $10^7 - 10^8$ CFU/g ยีสต์และรา ในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g ยีสต์ในช่วง 10^7 CFU/g และแบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง $10^7 - 10^8$ CFU/g โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ (01) ในระหว่างการหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 พบว่า จุลินทรีย์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และมีปริมาณน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 3 โดยจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ยังคงที่และสร้างกรดอย่างต่อเนื่อง จากนั้นจุลินทรีย์จึงลดลงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 4 และเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 5 และ 6 จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงการเข้าสู่ระยะ Log phase โดยมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์เล็กน้อย ในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 1 - 3) และเพิ่มขึ้นมากในชั่วโมงที่ 4 - 6 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดและค่า pH ในระหว่างการหมักขนมด้วยฟู โดยค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงมากในชั่วโมงที่ 2 และคงที่จนเสร็จสิ้นการหมักชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.52 - 5.73 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 ซึ่งมีค่าในช่วงร้อยละ 0.58 - 0.94 (รูปที่ 8) โดยเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 5 ของการหมัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด

เท่ากับ 1.1×10^8 และ 7.0×10^7 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 ดังนั้นการผลิตขนมถ้วยฟูต้องอาศัยส่วนประกอบ แป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาล โตนค น้ำ และเกลือซึ่งขนมถ้วยฟู อัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการหมักที่ดีและได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์และรา ซึ่งการหมักในช่วงแรก พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสูง การสร้างสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดอินทรีย์ จึงมีสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสถานะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.9 ขณะที่ยีสต์สามารถเจริญได้ในสถานะที่เป็นกรด เกิดการสร้างและสะสมสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล จึงส่งผลต่อขนมถ้วยฟูให้มีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5



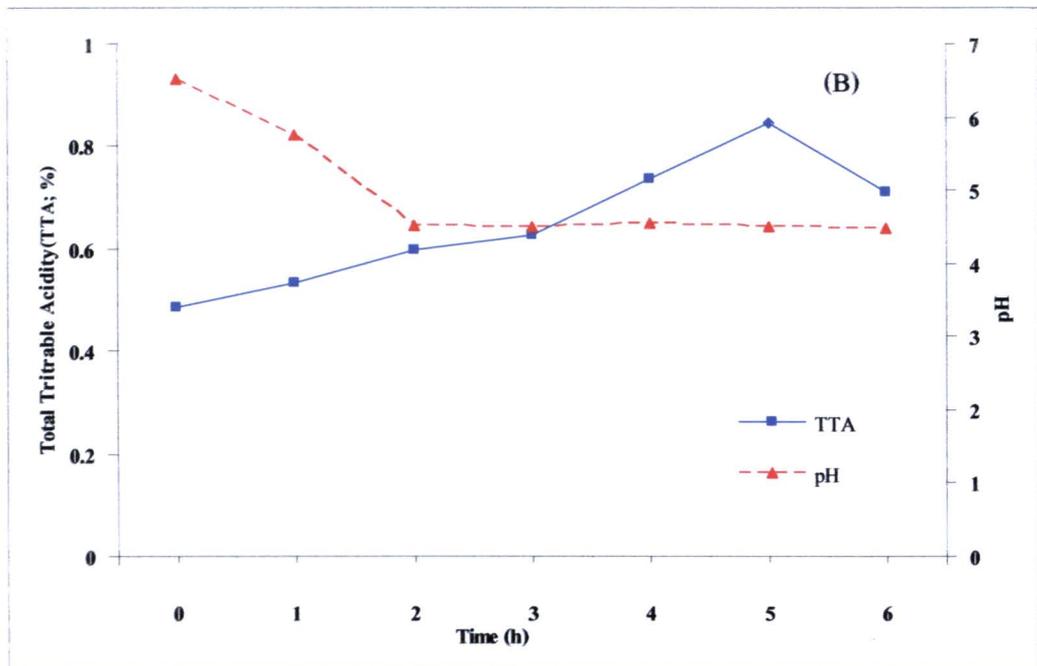
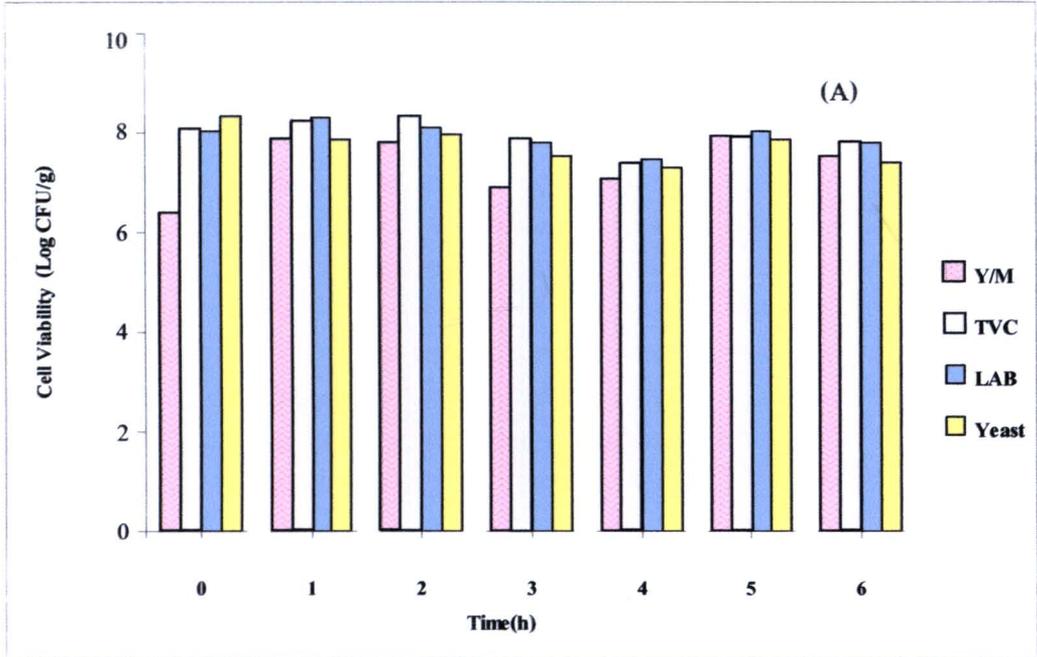
รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอ โศกโพธิ์ ที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาต่าง ๆ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอ ยะหริ่งในระหว่างการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 พบว่า จุลินทรีย์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และมีปริมาณน้อยสุดในชั่วโมงที่ 4 โดยจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้น ยกเว้นยีสต์ เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากนั้นจึงลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 4 และเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 5 และ 6 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดและค่า pH ในระหว่างการหมักขนมถ้วยฟู โดยค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงมากในชั่วโมงที่ 2 และคงที่จนเสร็จสิ้นการหมัก ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.50 - 5.77 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น โดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.54 - 0.85 และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 เท่ากับร้อยละ 0.85 (รูปที่ 9)

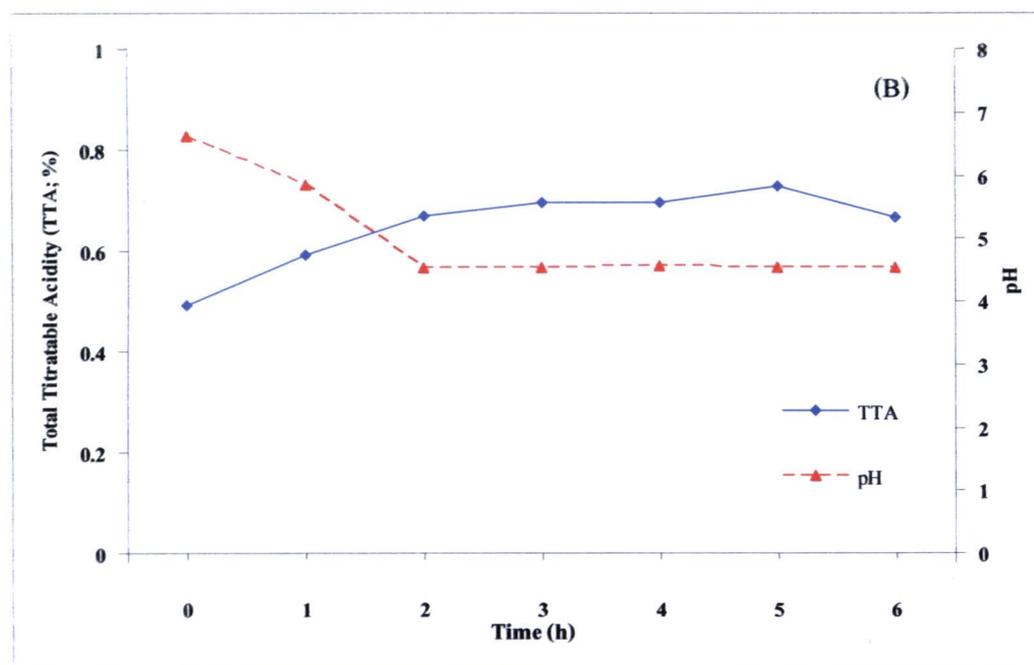
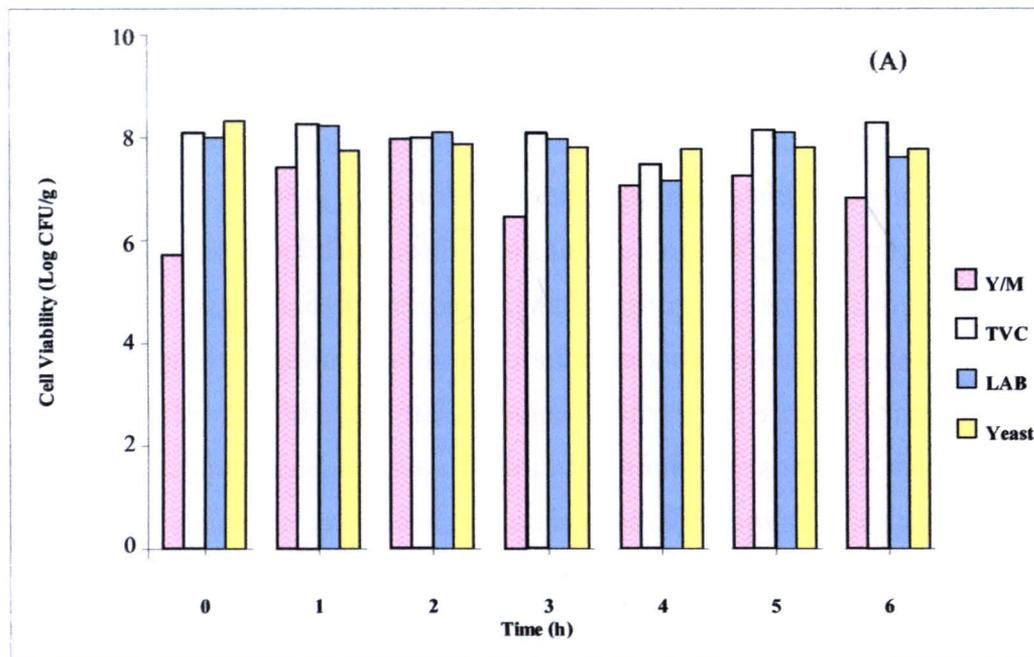
โดยเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 5 ของการหมัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 1.0×10^8 และ 7.5×10^7 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง กรดแลกติกจึงมีปริมาณสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสถานะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.8 และขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5 เช่นกัน

ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 - 6 ของขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสาขานบุรี พบว่า จุลินทรีย์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และมีปริมาณน้อยสุดในชั่วโมงที่ 4 โดยจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่ แบคทีเรียกรดแลกติกมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงเริ่มต้น และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติก คงที่จนถึงชั่วโมงที่ 3 จากนั้นลดลงในชั่วโมงที่ 4 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 5 และ 6 ขณะที่ยีสต์มีปริมาณลดลงเล็กน้อย จากชั่วโมงที่ 1 - 6 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดและค่า pH ในระหว่างการหมักขนมถ้วยฟู โดยค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงมากในชั่วโมงที่ 2 และคงที่จนเสร็จสิ้นการหมัก ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.54 - 5.86 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติก มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น มีค่าในช่วงร้อยละ 0.59 - 0.72 โดยในชั่วโมงที่ 5 มีค่าสูงสุด เท่ากับร้อยละ 0.72 (รูปที่ 10)

โดยเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 5 ของการหมัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 1.2×10^8 และ 6.5×10^7 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 โดยมีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง กรดแลกติกจึงมีปริมาณสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสถานะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.72 ส่งผลให้ขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5 เช่นกัน

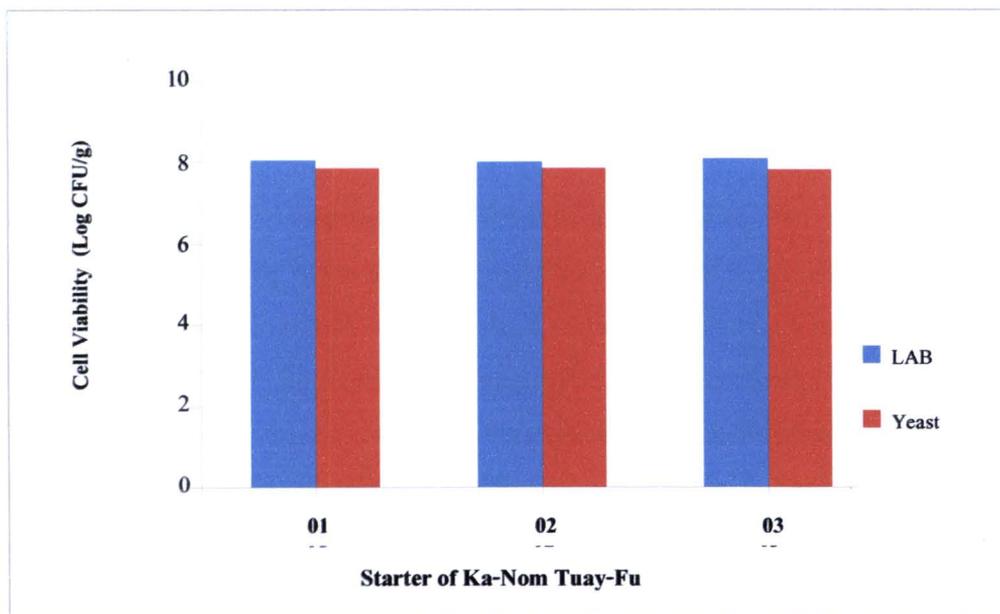


รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถั่วฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอชะหรั่ง ที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี ที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาต่าง ๆ

เมื่อวิเคราะห์ในชั่วโมงที่ 5 ขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งพบปริมาณยีสต์สูงสุด คือ 7.50×10^7 CFU/g รองลงมาได้แก่ ขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอโคกโพธิ์ และ สายบุรี มีปริมาณเท่ากับ 7.0×10^7 และ 6.50×10^7 CFU/g ตามลำดับ ขณะที่เรียกรดแลกติกมีปริมาณสูงสุดจากขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี คือ 1.26×10^8 CFU/g รองลงมาได้แก่ ขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอโคกโพธิ์ และยะหริ่ง มีปริมาณเท่ากับ 1.10×10^8 และ 1.05×10^8 CFU/g ตามลำดับ (รูปที่ 11) ขณะเดียวกันขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีมีค่าความเป็นกรดน้อยที่สุด ซึ่งการมีค่าความเป็นกรดแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative มีกระบวนการหมักที่ผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 80 และกลุ่ม Heterofermentative มีกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติกได้เพียงร้อยละ 50 และจะได้สารผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล แอซีเทต กลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (สุพรรณิการ, 2548) เมื่อนำยีสต์มาหมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative และ Heterofermentative พบว่า การหมักยีสต์ร่วมกับกลุ่ม Homofermentative มีการขึ้นฟูที่สูงกว่ากลุ่ม Heterofermentative เมื่อใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 22, 25 และ 28 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการหมัก 12-16 ชั่วโมง โดยการหมักร่วมกับกลุ่ม Homofermentative การขึ้นฟูเพิ่มขึ้นร้อยละ 29 ในขณะที่การหมักร่วมกับกลุ่ม Heterofermentative จะมีการขึ้นฟูเพียงร้อยละ 17 (Haggman and Salovaara, 2008)

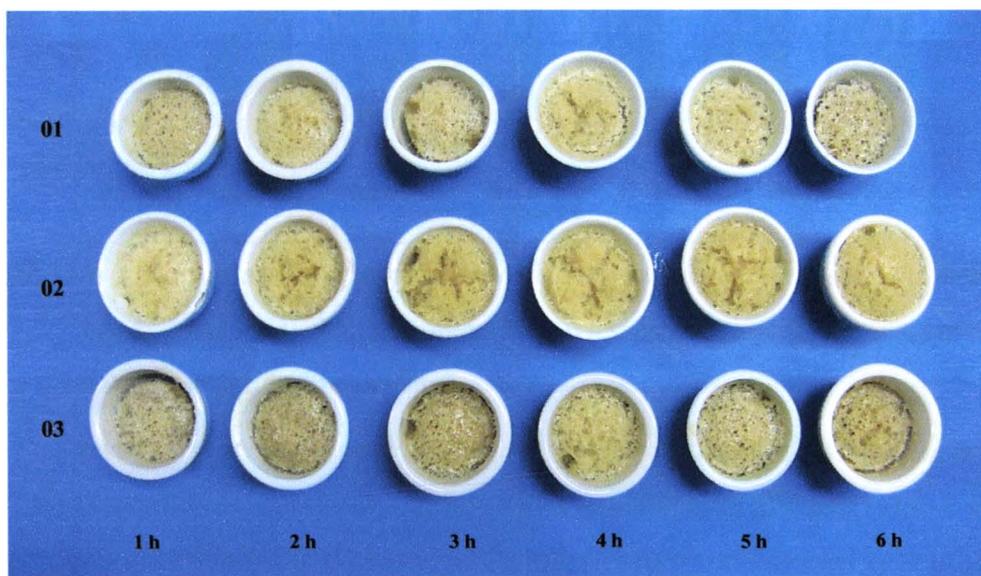


รูปที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในขนมห่วงฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากของอำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส



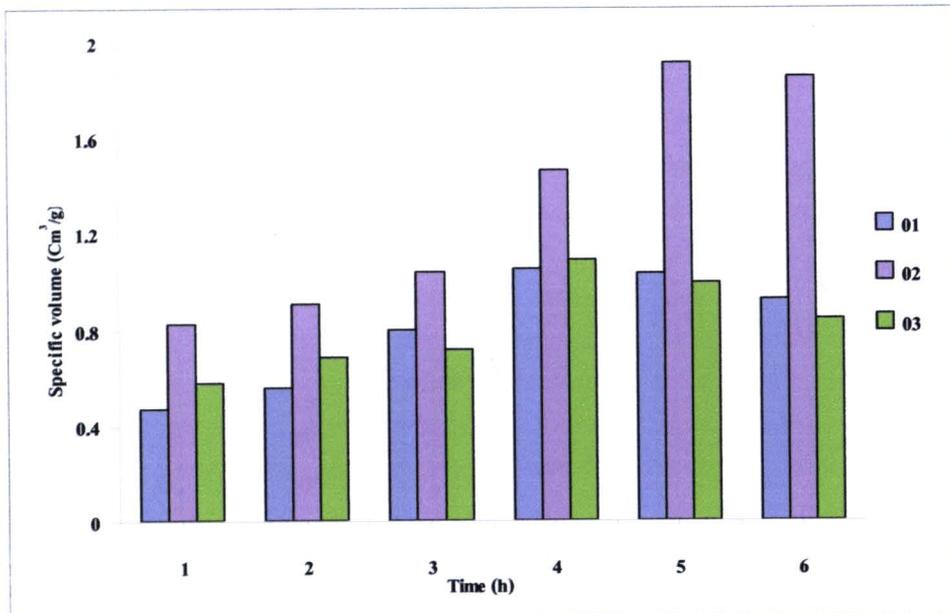
4.2.2.1 การหมักขนมด้วยฟูที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เมื่อนำกล้าเชื้อจากอำเภอโคกโพธิ์ อำเภอยะหริ่ง และอำเภอสาขบุรี มาผลิตขนมด้วยฟูที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ขนมด้วยฟูมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักเล็กน้อย รสหวานปานกลาง มีลักษณะการขึ้นฟูดี โดยในช่วง 1-3 ชม. ด้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูน้อย ขณะที่ในช่วง 4-5 ชม. มีลักษณะการฟูมาก ผิวหน้าแตกเป็นแฉกดี (รูปที่ 12)



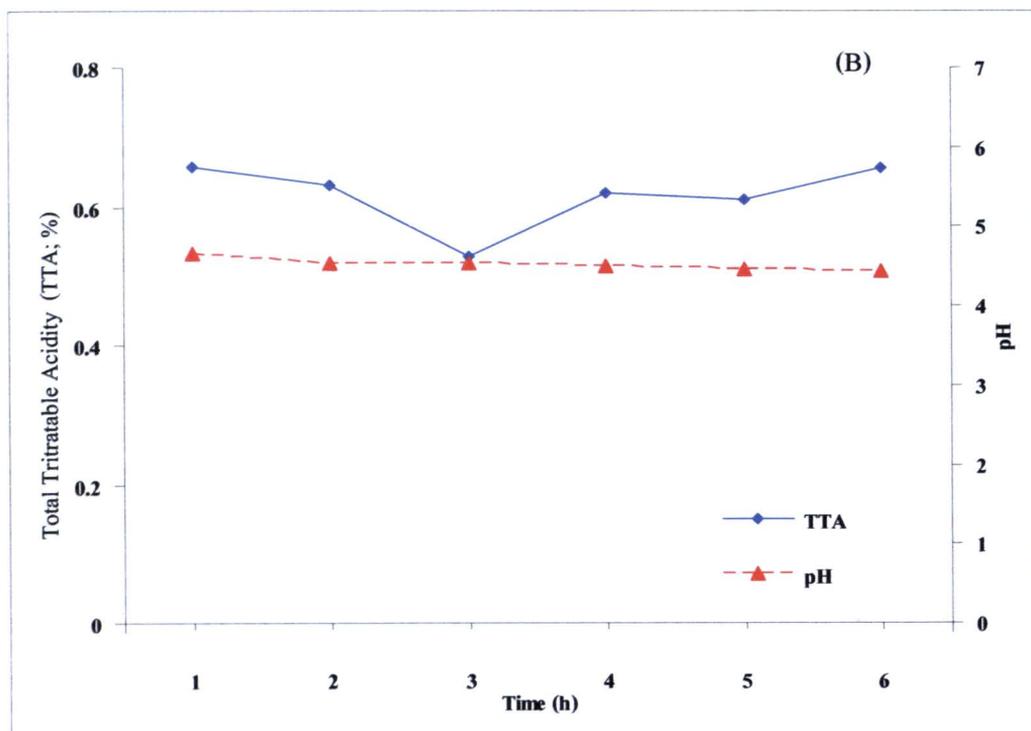
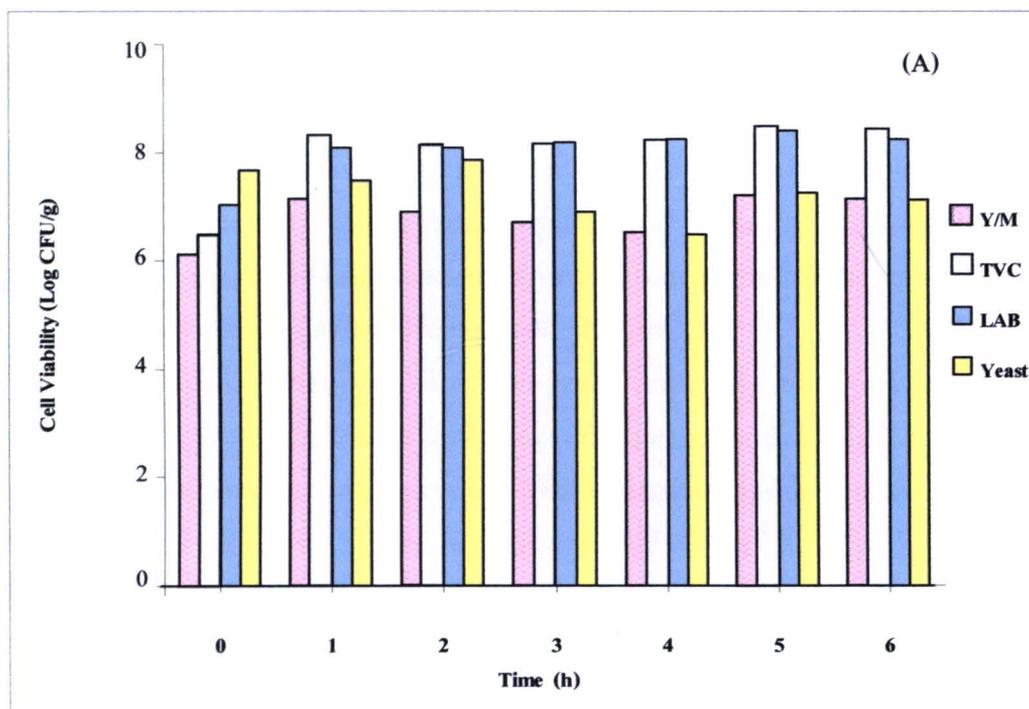
รูปที่ 12 ลักษณะของขนมด้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสาขบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เมื่อวัดปริมาตรการขึ้นฟูขนมด้วยฟูที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในช่วง 1 - 3 ชม. ปริมาตรการขึ้นฟู ในช่วง 0.7 - 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม ขณะที่ในช่วง 4 - 5 ชม. มีลักษณะการฟูมาก ผิวหน้าแตกเป็นแฉก โดยขนมด้วยฟูมีปริมาตรการขึ้นฟู ในช่วง 0.84 - 1.91 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม เมื่อเปรียบเทียบขนมด้วยฟูที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ พบว่า ขนมด้วยฟูที่ได้จากการหมักที่ 4 ชั่วโมง มีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉกดี ในระยะเวลาสั้น โดยขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง มีปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุดคือ 1.46 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม รองลงมาได้แก่ ขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสาขบุรีและโคกโพธิ์ มีปริมาตรการขึ้นฟูเท่ากับ 1.02 และ 0.90 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรการขึ้นฟูของขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของแป้งในระหว่างการหมักเพื่อผลิตขนมด้วยฟูด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง ในการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 - 6 ชั่วโมง หลังหมักขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งพบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง 10^8 CFU/g ยีสต์และรา พบในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g ยีสต์พบในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g และแบคทีเรียกรดแลคติกพบในช่วง 10^8 CFU/g โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ของขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ในระหว่างการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 14) พบว่าจากเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) จุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นยีสต์และรา และเชื้อยีสต์ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 4 เนื่องจากยีสต์บางสายพันธุ์ที่มาจากวัตถุดิบการผลิตไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเป็นกรด จึงส่งผลให้ยีสต์และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ลดลงไปเฉพาะสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีเท่านั้น จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนขึ้นในชั่วโมงที่ 5 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ขณะที่จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 5 ค่า pH ในระหว่างการหมักของขนมด้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.44 - 4.67 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.52 - 0.65 ซึ่งในชั่วโมงที่ 3 ปริมาณกรดลดลงเหลือร้อยละ 0.52 (รูปที่ 14) เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ค่า pH ลดลง และค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจึงคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขณะที่ยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงโดย เมื่อเวลาที่หมักนานขึ้นจำนวนยีสต์จะลดลง

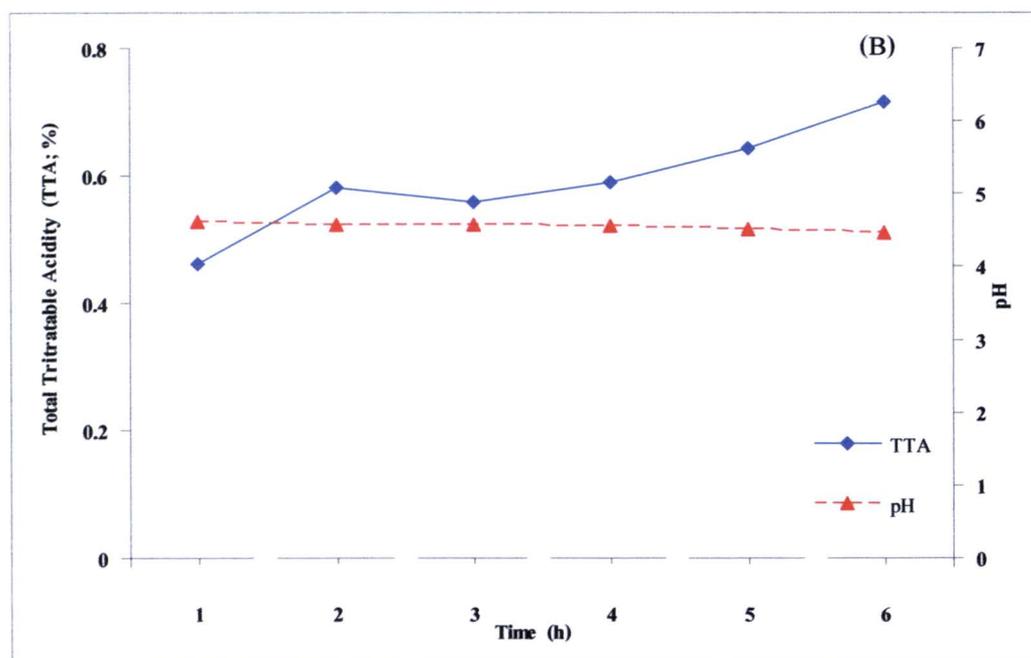
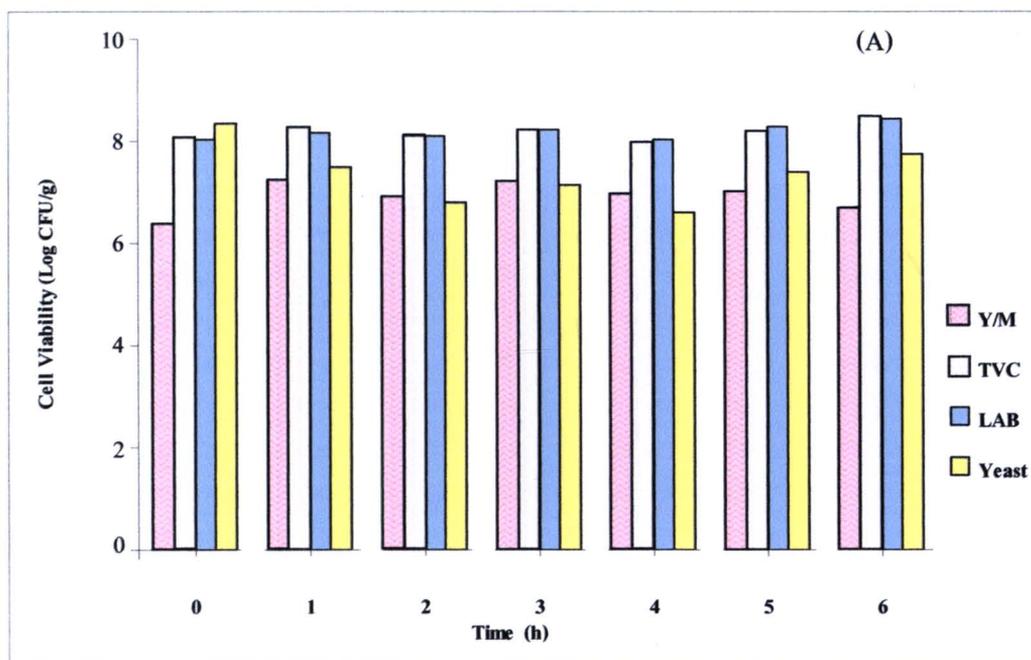


รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่างๆ

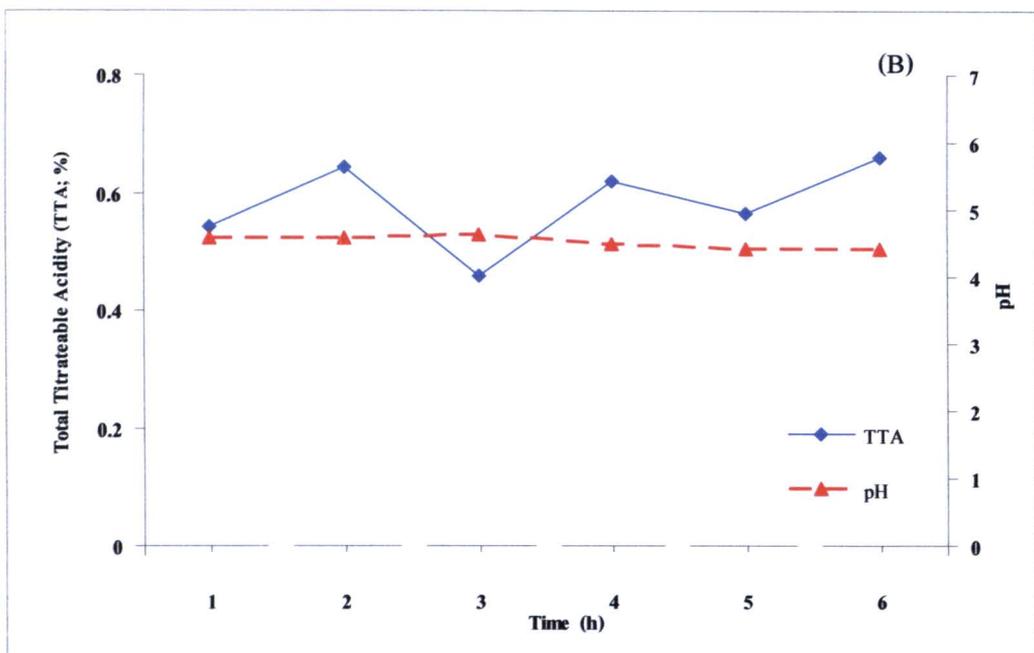
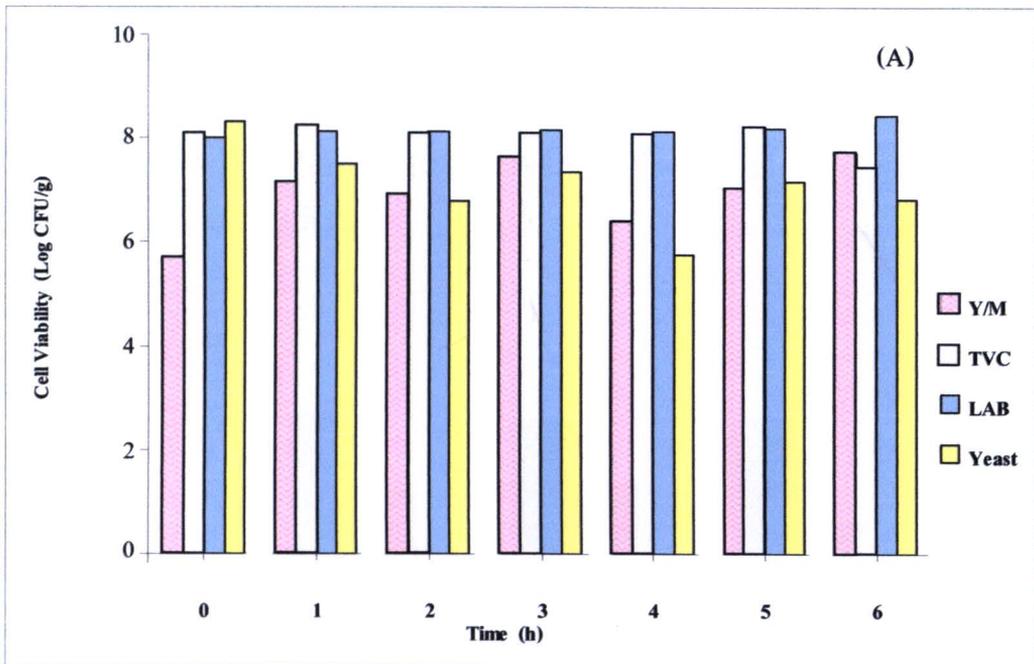
การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอ ยะหริ่งในระหว่างการหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 15) พบว่า จากชั่วโมงเริ่มต้นจุลินทรีย์มี ปริมาณลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3 และลดจำนวนขึ้นในชั่วโมงที่ 4 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 5 และ 6 มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลง เล็กน้อย ค่า pH ในระหว่างการหมักของขนมถ้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึง ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.46 - 4.62 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติก มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.46 - 0.67 (รูปที่ 15)

ขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้ง อำเภอสาขบุรีในระหว่างการหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 16) พบว่า จากชั่วโมงเริ่มต้น จุลินทรีย์ มีปริมาณลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3 เล็กน้อย และลดปริมาณลง ในชั่วโมงที่ 4 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 5 มีปริมาณเพิ่มขึ้นและคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ค่า pH ในระหว่าง การหมักของขนมถ้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.44 - 4.65 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมีค่า ในช่วงร้อยละ 0.46 - 0.64 ซึ่งในชั่วโมงที่ 3 ปริมาณกรดลดลงเหลือร้อยละ 0.46 (รูปที่ 16)

โดยเมื่อพิจารณาการหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ 1.79×10^8 และ 3.0×10^6 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 100 : 1 ส่วนในการหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจาก ลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ 1.09×10^8 และ 4.0×10^6 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 100 : 1 ขณะที่การหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อ จากลูกแป้งอำเภอสาขบุรี พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ 1.31×10^8 และ 6.0×10^5 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 1000 : 1 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญใน อุณหภูมิสูง ช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส จึงสามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ได้ดี โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.60 - 0.64 ขณะที่ยีสต์เจริญในอุณหภูมิช่วง 20 - 35 องศา เซลเซียส จำนวนยีสต์และสารผลิตภัณฑ์จึงลดลง ซึ่งมียีสต์บางสายพันธุ์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง มีสภาวะความเป็นกรด หรือทนกรดได้ดี (จิตรนา และอรอนงค์, 2527) โดยยีสต์เหล่านี้ สามารถ สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี ส่งผลต่อการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟู

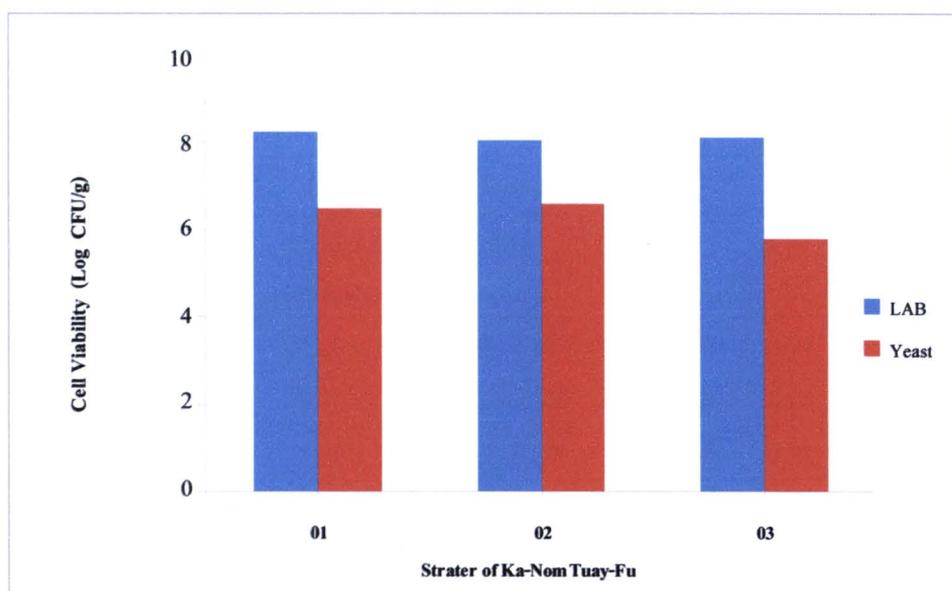


รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอชะหรั่ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของนมถั่วฝูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสาขานูรี ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ขนมด้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อทั้ง 3 แหล่ง ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า ขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งมีปริมาณยีสต์สูงสุด รองลงมา ได้แก่ อำเภอโคกโพธิ์และสายบุรี ตามลำดับ ขณะที่เรียกรดแลกติก พบมากในขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วย กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ รองลงมา ได้แก่ ขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวมหากอำเภอสายบุรีและโคกโพธิ์ ตามลำดับ (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในขนมด้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวมหากของอำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาขนมด้วยฟูที่ได้จากการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่เกิดการขึ้นฟูแตกต่างกัน โดยการหมักที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาในการหมัก 5 ชั่วโมง ขนมด้วยฟูมีลักษณะของผลิตภัณฑ์ คือ เกิดการขึ้นฟูได้ดี มีกลิ่นรสหมักเล็กน้อย ปริมาณยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก พบในช่วง 10^7 CFU/g ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก พบในช่วง $10^7 - 10^8$ CFU/g และมีสัดส่วนเป็น 1 : 10 ค่าความเป็นกรดมีค่าในช่วง 0.72 - 0.94 และเมื่อวัดปริมาตรการขึ้นฟู อยู่ในช่วง 0.83 - 1.07 ลูกบาศก์เซนติเมตร / กรัม โดยขนมด้วยฟูที่หมักจากกล้าเชื้ออำเภอยะหริ่งให้ปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุด ขณะที่ขนมด้วยฟูที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ คือ เกิดการขึ้นฟู ผิวหน้าแตกเป็นแฉกดี มีกลิ่นรสหมักเล็กน้อย ปริมาณยีสต์พบในช่วง $10^5 - 10^9$ CFU/g ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก พบในช่วง $10^8 - 10^9$ CFU/g มีสัดส่วนเป็น 1 : 100 ค่าความเป็นกรดมีค่าในช่วง 0.58 - 0.62 และเมื่อวัด ปริมาตรการขึ้นฟู อยู่ในช่วง 1.04 - 1.46 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม โดยขนมด้วยฟูที่หมักจากกล้าเชื้ออำเภอ

ยะหรีงให้ปริมาณการขึ้นฟูสูงสุด (ตารางที่ 9) และเนื่องจากขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหรีง ที่หมักอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 4 ชั่วโมง มีลักษณะการขึ้นฟูได้ดีและเร็ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหรีง ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 9 ปริมาณจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรด และปริมาณการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากต่าง ๆ และหมักที่ อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

สภาวะ	กล้าเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/g)				TTA (%)	ปริมาณการขึ้นฟู (Cm ³ /g)	
		จุลินทรีย์ทั้งหมด	แบคทีเรียกรดแลกติก	ยีสต์	ยีสต์และรา			
อุณหภูมิ 30°C	01	1.32×10^8	1.10×10^8	7.00×10^7	2.70×10^7	0.94	0.92	
	ระยะเวลา 5 ชั่วโมง	02	8.70×10^7	9.35×10^7	7.50×10^7	8.45×10^7	0.84	1.07
	03	1.35×10^8	1.26×10^8	6.50×10^7	1.86×10^7	0.72	0.83	
อุณหภูมิ 35°C	01	1.68×10^8	1.79×10^8	3.00×10^6	3.20×10^6	0.62	1.04	
	ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	02	9.35×10^8	1.09×10^9	4.00×10^6	9.00×10^6	0.58	1.46
	03	1.16×10^8	1.31×10^8	6.00×10^5	2.60×10^6	0.62	1.08	

หมายเหตุ กล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ (01) ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหรีง (02) และลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี (03)

4.3 ศึกษาสมบัติของยีสต์ที่มีผลต่อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

คัดแยกยีสต์ในตัวอย่างแป้งซึ่งใช้ผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อยะหรีง บนอาหาร YM Agar ซึ่งเติมคลอแรมเฟนิคอล ร้อยละ 0.01 โดยเทคนิค spread plate สุ่มเลือกโคโลนีจำนวน 20 โคโลนีจากนั้นนำมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเทคนิค streak plate แล้วนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ ได้แก่ การผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส และความสามารถในการทนกรด

4.3.1 การผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ของยีสต์ไอโซเลทต่าง ๆ พบว่า ยีสต์ 20 ไอโซเลท สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนได้ดี โดยสร้างแก๊สได้สูงกว่า 10 มิลลิลิตร จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Y03 ให้ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุด เท่ากับ 14 มิลลิลิตร รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท Y01, Y09 และ Y12 ให้ปริมาณแก๊สเท่ากับ 12, 10 และ 9



มิลลิลิตร ตามลำดับ ไอโซเลทที่ผลิตแก๊สได้ปานกลาง คือ สร้างได้ในช่วง 5 – 9 มิลลิลิตร จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Y12 ให้ปริมาณแก๊สสูงสุด เท่ากับ 9 มิลลิลิตร รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท Y04, Y02, Y14 และ Y13 ให้ปริมาณแก๊สเท่ากับ 7, 7, 6 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ และไอโซเลทที่ผลิตแก๊สได้น้อย คือสร้างแก๊สได้น้อยกว่า 5 มิลลิลิตร จำนวน 11 ไอโซเลท (ตารางที่ 10)

4.3.2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

การทดสอบยีสต์ที่ให้ลักษณะการย่อยแป้งได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท Y04 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส เท่ากับ 1.15 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท Y07 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส เท่ากับ 1.03 เซนติเมตร และเป็นยีสต์ที่ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้งจำนวน 18 ไอโซเลท โดยการผลิตขนมถ้วยฟู (ตารางที่ 10) ซึ่งใช้ลูกแป้งข้าวหมากเป็นส่วนผสมของกล้าเชื้อจึงมียีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากบางสายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตอะไมเลสย่อยแป้งได้ เช่น *S. fibuligera* (Limtong *et al.*, 2002)

4.3.3 ความสามารถในการทนกรดของยีสต์

การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นกรด ได้แก่ 4.0, 4.5 และ 5.0 พบว่า ที่ pH 4.0 มีการเจริญเติบโตในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g โดยไอโซเลท Y03 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.6×10^7 CFU/g รองลงมา ได้แก่ Y20 และ Y12 มีการเจริญเติบโตได้ เท่ากับ 2.57×10^7 CFU/g และ 2.47×10^7 CFU/g ที่ระดับ pH 4.5 มีการเจริญเติบโตในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g โดยไอโซเลท Y14 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.9×10^7 CFU/g รองลงมา ได้แก่ Y20, Y15, Y16 และ Y03 พบในช่วง $2.71 \times 10^7 - 2.67 \times 10^7$ CFU/g และที่ระดับค่า pH 5.0 มีการเจริญเติบโตในช่วง $10^6 - 10^7$ CFU/g โดยไอโซเลท Y03 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.5×10^7 CFU/g รองลงมา ได้แก่ Y11, Y19, Y20 และ Y14 พบในช่วง $2.2 \times 10^7 - 2.5 \times 10^7$ CFU/g (ตารางที่ 10)

จากผลการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติของยีสต์ ทั้ง 20 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ได้สูง ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y01, Y09 และ Y12 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท Y04 และ Y07 และไอโซเลทที่ทนกรดได้ดี ที่ระดับ pH 4.0 ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y20 และ Y12 ตามลำดับ ที่ระดับ pH 4.5 ได้แก่ ไอโซเลท Y14, Y20, Y15, Y16 และ Y03 ตามลำดับ และที่ pH 5.0 ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y11, Y19, Y20 และ Y14 ตามลำดับ โดยยีสต์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำกว่าปกติ (pH 5.0 – 5.5) สามารถหมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก และผลิตสารผลิตภัณฑ์ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาได้ดี แม้ในสภาวะที่ pH ของการหมักมีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ไอโซเลท Y03 มีคุณสมบัติที่ดีทั้งการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และความสามารถในการทนกรดทั้ง 3 ระดับได้

ดี ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตขนมถ้วยฟู ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกยีสต์ไอโซเลท Y03 เพื่อ
จำแนกสายพันธุ์โดยใช้ API 32 (Biomerieux, France)

ตารางที่ 10 สมบัติของยีสต์ไอโซเลทที่แยกได้จากแป้งหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจาก
ลูกแป้งข้าวหมากอำเภอชะอวดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ปริมาณแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ (ml)	อัตราส่วนระหว่าง เส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใสและโคโลนี	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)		
			pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0
Y01	12	-	7.1×10^6	1.4×10^7	7.3×10^6
Y02	7	-	1.2×10^7	7.8×10^6	1.6×10^7
Y03	14	-	2.6×10^7	2.2×10^6	2.5×10^7
Y04	7	1.15	1.3×10^7	5.7×10^6	1.7×10^7
Y05	3.5	-	1.6×10^7	4.0×10^6	1.0×10^7
Y06	4.5	-	1.4×10^7	5.2×10^6	6.1×10^6
Y07	4	1.05	7.0×10^6	1.2×10^7	6.9×10^6
Y08	1	-	1.0×10^7	1.1×10^7	7.6×10^6
Y09	10	-	6.7×10^6	1.0×10^7	9.6×10^6
Y10	2	-	1.1×10^7	1.5×10^7	4.8×10^6
Y11	2	-	1.5×10^7	1.0×10^7	2.5×10^7
Y12	9	-	2.4×10^7	2.5×10^7	1.8×10^7
Y13	5	-	1.7×10^7	2.0×10^7	9.6×10^6
Y14	6	-	1.6×10^7	2.7×10^7	2.3×10^7
Y15	3	-	1.1×10^7	2.6×10^7	5.8×10^6
Y16	2	-	1.4×10^7	2.6×10^7	9.1×10^6
Y17	1	-	8.0×10^6	1.6×10^7	1.7×10^7
Y18	2	-	4.8×10^6	1.9×10^7	6.6×10^6
Y19	4	-	1.0×10^7	2.1×10^7	2.5×10^7
Y20	3	-	2.5×10^7	2.7×10^7	2.3×10^7

หมายเหตุ (-) มองไม่เห็นวงใส

4.4 ศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีผลต่อขนมถ้วยฟูที่บ้าน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยพิจารณาจากโคโลนีที่สร้างบริเวณใส (clear zone) จากการทำปฏิกิริยาของกรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นกับแคลเซียมคาร์บอเนต บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.3 จำนวน 20 โคโลนี มาทำการซิดลากบนอาหารแข็ง เพื่อให้เชื้อที่คัดแยกมาได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้ไปตรวจสอบรูปร่าง ได้แก่ การย้อมแกรม และการทดสอบเอนไซม์อะเลส โดยแบคทีเรียกรดแลกติกต้องแสดงลักษณะดิสแกรมบวก (สีน้ำเงิน) และให้ผลทดสอบเอนไซม์อะเลสเป็นลบ (ไม่เกิดฟองอากาศ) ดังตารางที่ 11 โคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวนำมาทดสอบสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ การผลิตกรด และความสามารถในการทนต่อเอทานอล

4.4.1 ความสามารถในการผลิตกรด

ความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตกรดได้ดี ในช่วงร้อยละ 0.15 - 0.4 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตกรดได้สูงมี จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท L02, L13, L09 และ L04 โดยไอโซเลท L02 และ L13 ผลิตปริมาณกรดได้สูงสุด เท่ากับร้อยละ 0.48 รองลงมา คือ L09 ผลิตกรดได้ร้อยละ 0.45 และ L04 ผลิตกรดได้ร้อยละ 0.44 ขณะที่ไอโซเลทที่ผลิตกรดได้ปานกลาง พบในช่วงร้อยละ 0.20 - 0.23 มีจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ L16, L12, L03, L07 และ L11 ให้ปริมาณกรดเท่ากับร้อยละ 0.23, 0.22, 0.20, 0.20 และ 0.20 ตามลำดับ และไอโซเลทที่ผลิตกรดได้น้อยมี 11 ไอโซเลท โดยพบในช่วงร้อยละ 0.15 - 0.19 (ตารางที่ 11)

4.4.2 ความสามารถในการทนต่อเอทานอล

การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะมีเอทานอลต่าง ๆ ได้แก่ ร้อยละ 5, 10 และ 15 พบว่า ในอาหารเหลว MRS ที่มีเอทานอลร้อยละ 5 จะมีแบคทีเรียกรดแลกติก 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท L02, L04, L06, L10 และ L13 มีการเจริญเติบโตในช่วง 10^2 - 10^5 CFU/g โดยไอโซเลท L02 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 4.4×10^5 CFU/g รองลงมาได้แก่ L04, L10, L13 และ L06 พบเท่ากับ 3.1×10^5 , 1.7×10^5 , 1.0×10^5 และ 2×10^2 CFU/g ในอาหารเหลวที่มีระดับเอทานอลร้อยละ 10 มีเพียงไอโซเลท L02 และ L04 มีการเจริญเติบโตโดยพบในช่วง 10^3 CFU/g โดยไอโซเลท L02 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.9×10^3 CFU/g รองลงมา ได้แก่ 2.7×10^3 CFU/g และในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 15 ไม่พบการเจริญเติบโตในทุกไอโซเลท (ตารางที่ 11)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 20 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดได้สูงได้แก่ ไอโซเลท L02, L13 และ L09 ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลทที่สามารถทนต่อเอทานอลได้ดี ได้แก่ ที่มีเอทานอลร้อยละ 5 ได้แก่ ไอโซเลท L02, L04, L06, L10 และ L13 ตามลำดับ ที่มีเอทานอลร้อยละ 10 ได้แก่ ไอโซเลท L02 และ L04 ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น

ของเอทานอลระดับร้อยละ 15 ไม่พบไอโซเลทใดสามารถเจริญได้ และเนื่องจากไอโซเลท L02 มีสมบัติในการผลิตกรดและการทนต่อเอทานอลได้ดีว่าไอโซเลทอื่น ๆ ดังนั้นเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท L02 นำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ API 50 CHL (Biomerieux, France) และเพื่อนำไปใช้ในการผลิตขนมถ้วยฟูต่อไป

ตารางที่ 11 สมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลทที่แยกได้จากแป้งหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอยะหริ่ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ไอโซเลท	แกรม แบคทีเรีย	เอนไซม์ อะตะเลส	ปริมาณกรดแลกติก (% TTA)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในสถานะที่มี เอทานอล (CFU/g)		
				เอทานอล 5 %	เอทานอล 10 %	เอทานอล 15 %
				L01	+	-
L02	+	-	0.48	4.4×10^5	2.9×10^3	-
L03	+	-	0.20	-	-	-
L04	+	-	0.44	3.1×10^5	2.7×10^3	-
L05	+	-	0.16	-	-	-
L06	+	-	0.19	2.0×10^2	-	-
L07	+	-	0.20	-	-	-
L08	+	-	0.15	-	-	-
L09	+	-	0.45	-	-	-
L10	+	-	0.16	1.7×10^5	-	-
L11	+	-	0.20	-	-	-
L12	+	-	0.22	-	-	-
L13	+	-	0.48	1.0×10^5	-	-
L14	+	-	0.18	-	-	-
L15	+	-	0.19	-	-	-
L16	+	-	0.23	-	-	-
L17	+	-	0.17	-	-	-
L18	+	-	0.19	-	-	-
L19	+	-	0.18	-	-	-
L20	+	-	0.19	-	-	-

หมายเหตุ (-) ไม่ผลิตเอนไซม์อะตะเลส และไม่มีการเจริญบนอาหาร MRS agar

4.5 การจำแนกสายพันธุ์

เมื่อนำยีสต์ไอโซเลท Y03 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง YM agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะเป็นโคโลนี สีขาวนวล ขอบเรียบ จากนั้นนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32C โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ Y03 เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* โดยสามารถใช้น้ำตาลและสารอินทรีย์ 15 ชนิด ได้แก่ D-galactose, D-saccharose(sucrose), N-acetyl-glucosamine, L-cellobiose, D-maltose, D-trehalose, Potassium 2-ketogluconate, Methyl-D-glucopyranoside, D-sorbitol, D-xylose, Palatinose, D-melezitose, D-mannitol, D-glucose และ Glucosamine แสดงดังตารางที่ 12

และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท L02 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะเป็นโคโลนี สีขาว จากนั้นนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 50 CHL โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก สายพันธุ์ L02 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* โดยสามารถใช้น้ำตาลและสารอินทรีย์ 10 ชนิด ได้แก่ Esculin ferric citrate, Salicine, L-cellobiose, D-maltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose และ Gentiobiose แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 12 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่าง ๆ ของยีสต์ไอโซเลท Y03

Characteristics : Assimilation	Reaction
D-galactose	+
Cycloheximide (actiduone)	-
D-saccharose (sucrose)	+
N-Acetyl-glucosamine	+
Lactic acid	-
L-arabinose	-
L-cellobiose	+
D-raffinose	-
D-maltose	+
D-trehalose	+
Potassium 2-ketogluconate	+
Methyl-D-glucofuranoside	+
D-sorbitol	+
D-xylose	+
D-ribose	-
Glycerol	-
L-rhamnose	-
Palatinose	+
Erythritol	-
D-melibiose	-
Sodium glucuronate	-
D-melezitose	+
Potassium gluconate	-
Lenulinic acid (lenulenate)	-
D-mannitol	+
D-lactose (bovine origin)	-
Inositol	-
D-glucose	+
L-sorbose	-
Glucosamine	+
Esculin ferric citrate	-

หมายเหตุ Positive reaction (+), Negative reaction (-)

ตารางที่ 13 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท L02

Characteristics : Assimilation	Reaction
Esculin ferric citrate	+
Salicine	+
L-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose (bovine origin)	+
D-melibiose	+
D-saccharose (sucrose)	+
D-trehalose	+
Inuline	-
D-melezitose	+
D-raffinose	-
Amidon (Starch)	-
Glycerol	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

หมายเหตุ Positive reaction (+), Negative reaction (-)

โดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่พบได้โดยทั่วไปในอาหารหมักของประเทศไทย โดย *C. tropicalis* เป็นยีสต์ที่พบได้ในขนมปังเปรี้ยวในประเทศอิตาลี หรือในซาลาเปาของเอเชีย ขณะที่ *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในกลุ่ม Homofermentative ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในอาหารหมักส่วนใหญ่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ผักดอง, แหนม และแป้งข้าวหมาก รวมทั้งซาลาเปา เป็นต้น (Luangsakul *et al.*, 2009) *C. tropicalis* สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่น น้ำตาลโมเลกุลคู่ ฟีนอล อัลเคน อัลคีน เป็นต้น นอกจากนี้ *C. tropicalis* สามารถเจริญในอุณหภูมิที่สูง ประมาณ 40 องศาเซลเซียส และทนต่อเอทานอลได้ดี และสามารถย่อยน้ำตาล 5 โมเลกุล โดยผ่าน pentose phosphate pathway (PPP) ได้เช่นกัน ส่งผลให้ *C. tropicalis* สามารถปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากการกระบวนการใช้น้ำตาลหลายชนิด (Jamai *et al.*, 2007)

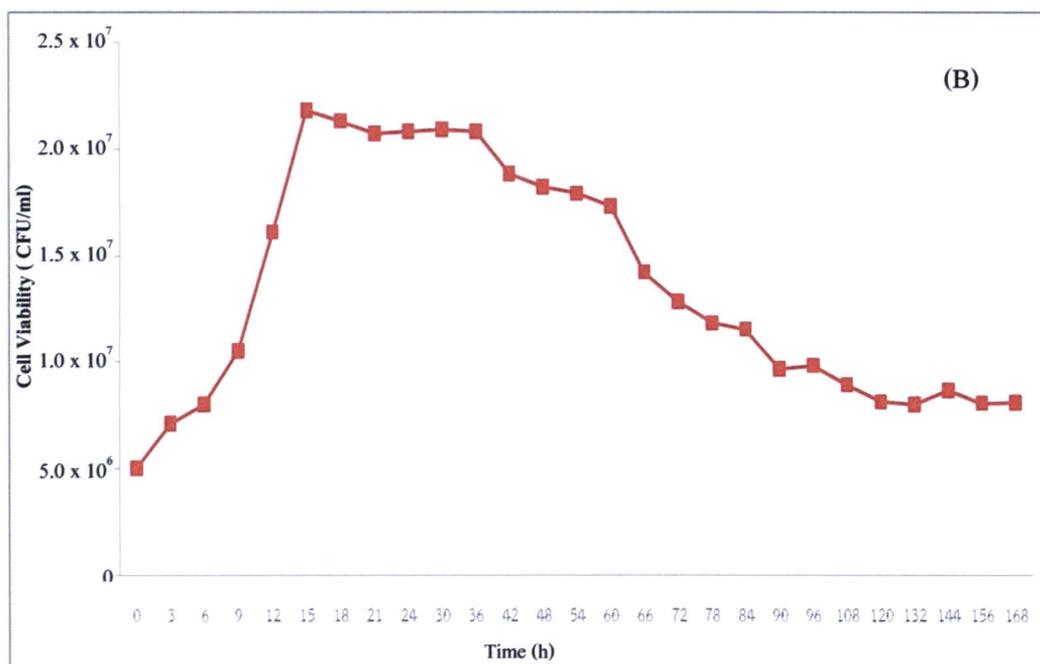
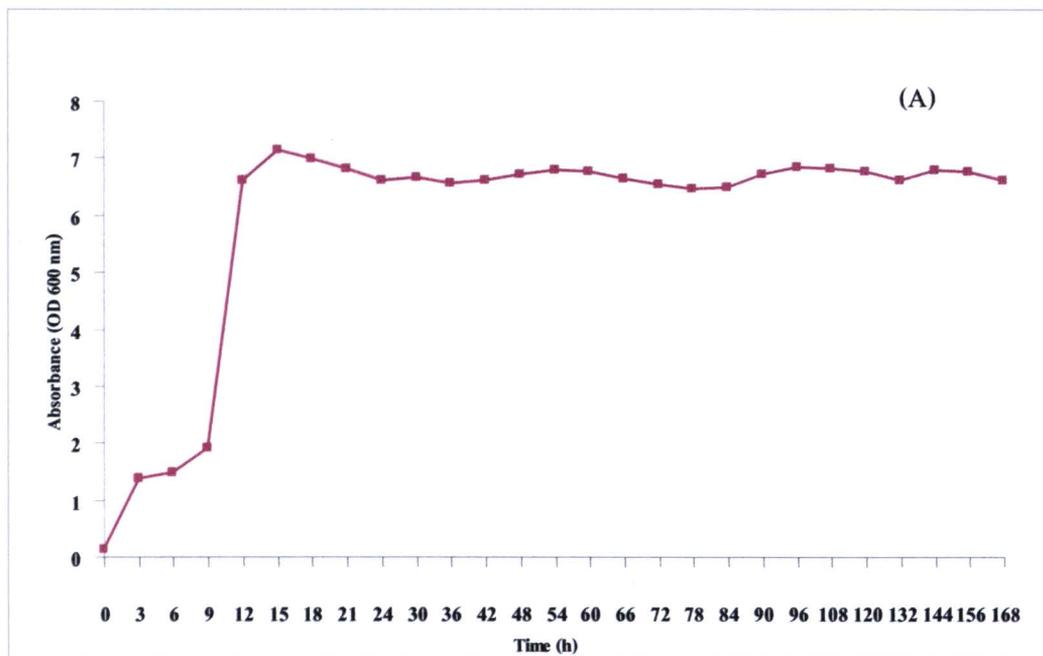
4.6 การประยุกต์ใช้ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในการทำขนมด้วยฟูพื้นบ้าน

การเตรียมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* เพื่อนำมาผลิตเป็นขนมด้วยฟูพื้นบ้านจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ โดยการศึกษาการเจริญเติบโตสูงสุดของยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* จากการนำเชื้อบริสุทธิ์ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ MRS ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* มีการเจริญในระยะ Lag phase ในช่วงโมเมนต์ 0 - 6 และการเจริญในช่วง log phase ใช้เวลาประมาณ 9 - 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง Stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 - 60 แล้วจึงเข้าสู่ช่วงระยะ Death phase จากการศึกษาพบว่า *C. tropicalis* มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 12 โดยอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ $0.54 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ (ตารางที่ 14) การเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 6.62 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.61 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ (รูปที่ 18)

ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* พบระยะ Lag phase ในช่วงเวลาประมาณ 0 - 9 ชั่วโมง และมีการเจริญในช่วง log phase ใช้เวลาประมาณ 12 - 30 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง Stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 - 48 ชั่วโมง แล้วจึงเข้าสู่ช่วงระยะ Death phase จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก *L. plantarum* มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 21 โดยอัตราการเจริญสูงสุด เท่ากับ $0.57 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ (ตารางที่ 15) การเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 2.82 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.51 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ (รูปที่ 19)

ตารางที่ 14 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* ที่แยกได้จากแป้งหมักใน
การทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₆₀₀)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	อัตราการเจริญสูงสุด (h ⁻¹)
0	0.15	5.00 x10 ⁶	0
3	1.401	7.10 x10 ⁶	0.416
6	1.511	8.00 x10 ⁶	0.226
9	1.93	1.05 x10 ⁷	0.197
12	6.62	1.61 x10 ⁷	0.539
15	7.16	2.18 x10 ⁷	0.467
18	7.02	2.13 x10 ⁷	0.382
21	6.83	2.07 x10 ⁷	0.318
24	6.63	2.08 x10 ⁷	0.270
30	6.69	2.09 x10 ⁷	0.218
36	6.57	2.08 x10 ⁷	0.178
42	6.64	1.88 x10 ⁷	0.154
48	6.73	1.82 x10 ⁷	0.137
54	6.81	1.79 x10 ⁷	0.123
60	6.77	1.73 x10 ⁷	0.110
66	6.65	1.42 x10 ⁷	0.098
72	6.54	1.28 x10 ⁷	0.089
78	6.48	1.18 x10 ⁷	0.081
84	6.51	1.15 x10 ⁷	0.076
90	6.74	9.65 x10 ⁶	0.073
96	6.86	9.80 x10 ⁶	0.069
102	6.83	8.90 x10 ⁶	0.062
120	6.79	8.10 x10 ⁶	0.055
132	6.64	7.98 x10 ⁶	0.049
144	6.8	8.66 x10 ⁶	0.046
156	6.77	8.05 x10 ⁶	0.042
168	6.62	8.07 x10 ⁶	0.038

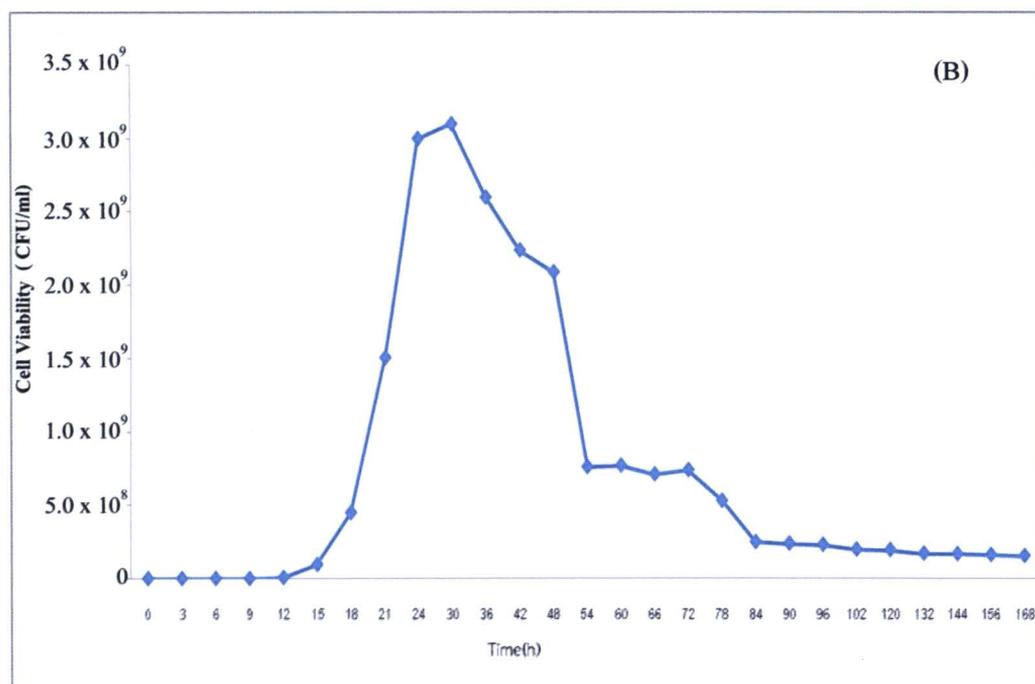
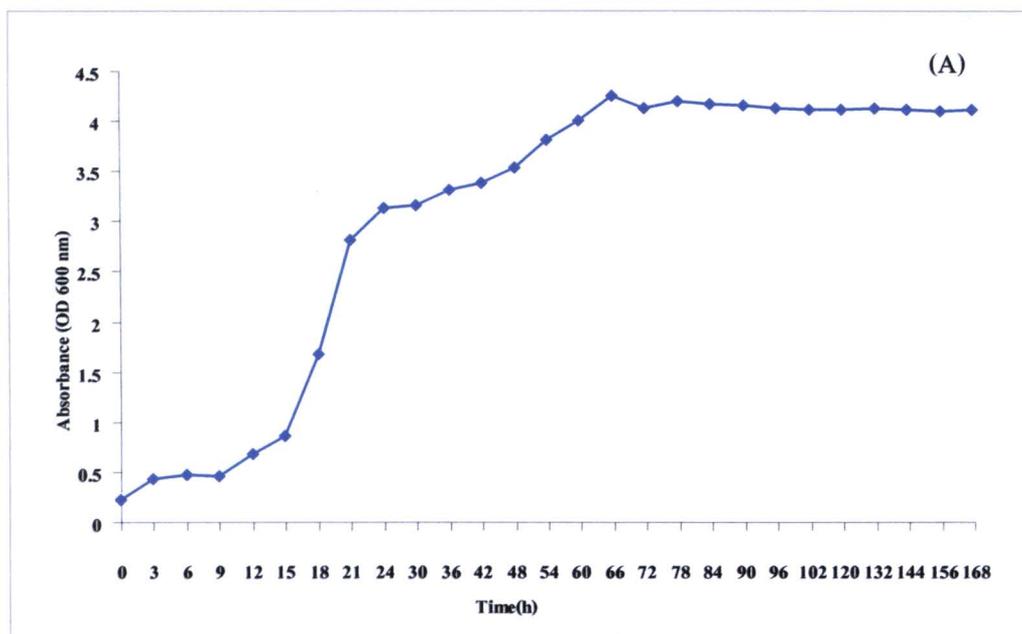


รูปที่ 18 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของยีสต์ *Candida tropicalis* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมด้วยฟูฟิ่นบ้าน



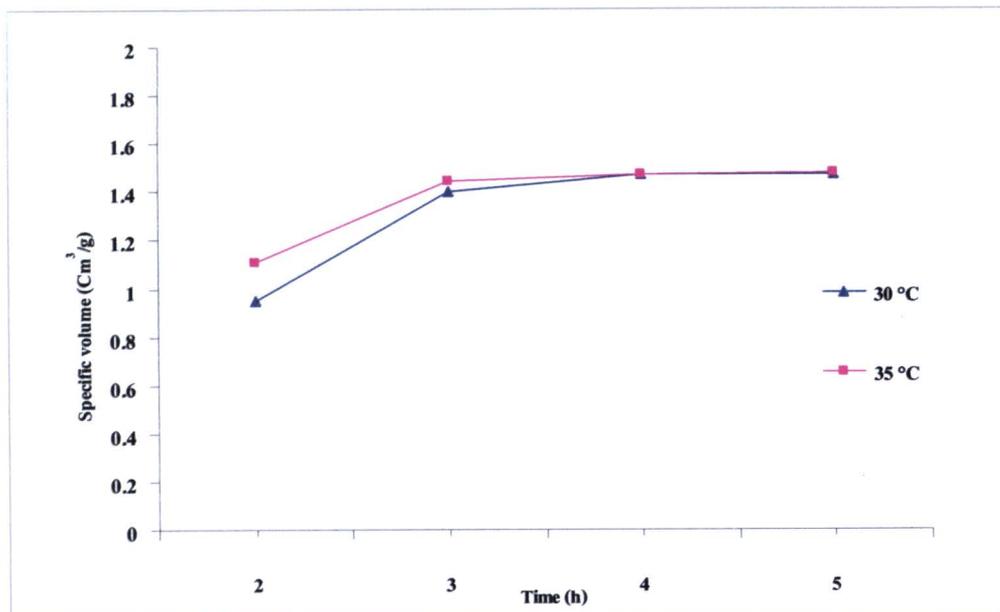
ตารางที่ 15 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₆₀₀)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	อัตราการเจริญสูงสุด (h ⁻¹)
0	0.23	1.90 x10 ⁶	0
3	0.44	2.40 x10 ⁶	0.070
6	0.48	2.20 x10 ⁶	0.041
9	0.47	2.04 x10 ⁶	0.026
12	0.69	8.30 x10 ⁶	0.230
15	0.87	9.70 x10 ⁷	0.042
18	1.69	4.50 x10 ⁸	0.081
21	2.82	1.51 x10 ⁹	0.572
24	3.14	3.00 x10 ⁹	0.121
30	3.17	3.10 x10 ⁹	0.098
36	3.32	2.60 x10 ⁹	0.394
42	3.39	2.24 x10 ⁹	0.075
48	3.55	2.09 x10 ⁹	0.069
54	3.82	7.60 x10 ⁸	0.303
60	4.02	7.70 x10 ⁸	0.063
66	4.26	7.10 x10 ⁸	0.061
72	4.14	7.40 x10 ⁸	0.246
78	4.21	5.30 x10 ⁸	0.051
84	4.18	2.50 x10 ⁸	0.047
90	4.17	2.40 x10 ⁸	0.199
96	4.14	2.32 x10 ⁸	0.041
102	4.13	2.00 x10 ⁸	0.038
120	4.13	1.97 x10 ⁸	0.148
132	4.14	1.73 x10 ⁸	0.030
144	4.13	1.70 x10 ⁸	0.027
156	4.11	1.64 x10 ⁸	0.113
168	4.12	1.58 x10 ⁸	0.023

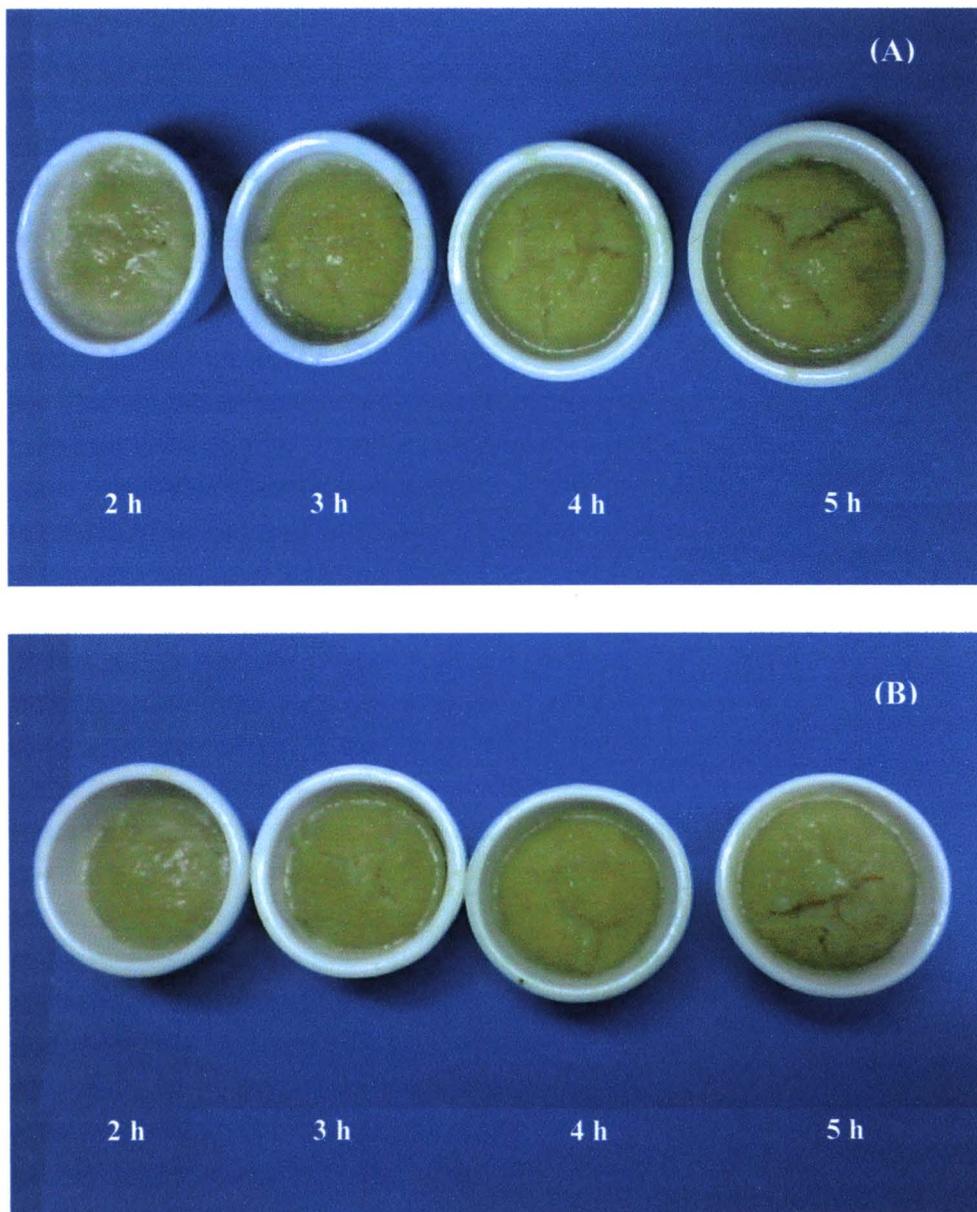


รูปที่ 19 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมด้วยฟู้พื้นบ้าน

เมื่อผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ โดยเตรียมยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* จากช่วงเวลาที่มียีสต์สูงที่สุด ได้แก่ ชั่วโมงที่ 12 ให้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml โดยอยู่ในรูปของสารละลายยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* จากช่วงเวลาที่มียีสต์สูงที่สุด ได้แก่ ชั่วโมงที่ 21 ให้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10^9 CFU/ml โดยอยู่ในรูปของสารละลายแบคทีเรียกรดแลกติก เทียบเท่ากับปริมาณเชื้อจากการผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากของอำเภอชะอำ เพื่อเป็นส่วนผสมในการผลิตขนมถ้วยฟูที่บ้าน ประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนด สารละลายยีสต์ และสารละลายแบคทีเรียกรดแลกติก ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 : 10 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จากนั้นผสมรวมกันและหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 1 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง พบว่าขนมถ้วยฟูในชั่วโมงที่ 3 มีลักษณะการขึ้นฟูดีมาก ผิวหน้าแตกเป็นแฉก มีกลิ่นหมักเล็กน้อย รสหวานปานกลาง ที่ระดับอุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ เมื่อวัดปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งหมักที่ระดับอุณหภูมิห้อง มีค่าเท่ากับ 1.40 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ขณะที่การหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาตรการขึ้นฟู มีค่า 1.45 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม (รูปที่ 20) ส่วนขนมถ้วยฟูที่ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องในชั่วโมงที่ 4 และ 5 มีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉก มีปริมาตรการขึ้นฟูมีค่าใกล้เคียงกัน (1.47 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม) และการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 4 และ 5 มีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉก เช่นเดียวกัน พบว่าขนมมีปริมาตรการขึ้นฟู เท่ากับ 1.47 และ 1.48 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 21)



รูปที่ 20 ปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ระยะเวลาการหมัก 2- 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 และ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 21 ลักษณะของขนมหงอกด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ระยะเวลาการหมัก 2 - 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส (A) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (B)

จากการผลิตขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ที่ระดับอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 16) พบว่า การหมักในชั่วโมงที่ 3, 4 และ 5 ขนมด้วยฟูมีปริมาตรการขึ้นฟูสูงกว่าการผลิตขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ทั้ง 2 ระดับอุณหภูมิ โดยขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ที่หมักเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง มีปริมาตรการขึ้นฟูที่ดีและใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นที่ระดับอุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ จึงคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ Hedonic scale (9 คะแนน) ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน พบว่า ขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์มี ลักษณะของสีและกลิ่น ที่ผู้ทดสอบชอบเล็กน้อย เท่ากับ 6.2 และ 6.7 ตามลำดับ ผู้ทดสอบเฉย ๆ ด้านรสชาติและความชอบโดยรวม เท่ากับ 5.6 และ 5.5 ตามลำดับ ขณะที่เนื้อสัมผัสผู้ทดสอบไม่ชอบเล็กน้อย เท่ากับ 4.7 ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 16 ปริมาตรการขึ้นฟูของขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์และกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ที่ระดับอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส

แหล่งกล้าเชื้อ และระยะเวลาการหมัก	ปริมาตรการขึ้นฟู (ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม)	
	30 ± 1 °C	35 °C
ขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง (ชั่วโมง)		
2	0.70	0.90
3	0.79	1.04
4	0.80	1.46
5	1.08	1.91
ขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ (ชั่วโมง)		
2	0.95	1.11
3	1.40	1.45
4	1.47	1.47
5	1.47	1.48

ตารางที่ 17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ และกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ที่หมักเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

แหล่งกล้าเชื้อ	ลักษณะของขนมถ้วยฟู				
	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	รสชาติ	ความชอบรวม
ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก	6.2 (\pm 0.63)	5.8 (\pm 1.14)	5.4 (\pm 1.22)	5.8 (\pm 0.77)	6.2 (\pm 0.89)
ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์	6.2 (\pm 1.22)	6.7 (\pm 1.39)	4.7 (\pm 1.12)	5.6 (\pm 1.32)	5.5 (\pm 1.33)

เมื่อทดสอบขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากและกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ผลทางประสาทสัมผัส พบว่า ด้านเนื้อสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ มีค่าน้อยกว่า เนื่องจากในลูกแป้งข้าวหมากมีราผสมอยู่ภายในลูกแป้งด้วย ซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส ที่สามารถย่อยอะไมโลส และอะไมโลเพคติน ให้มีขนาดเล็กลง (นภา, 2534) ส่งผลให้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากให้ค่าที่สูงกว่ากล้าเชื้อบริสุทธิ์

คุณสมบัติทางเคมีของขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ที่หมักอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ขนมถ้วยฟูที่หมักทั้ง 2 ระดับ มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน ประกอบด้วย ปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 0.58 ค่าความชื้นร้อยละ 40.4 - 40.5 โปรตีนร้อยละ 3.7 - 3.8 ไขมันร้อยละ 2.4 - 2.6 เถ้าน้อยร้อยละ 0.13 ใยอาหารร้อยละ 1.09 - 1.11 และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 54.4 - 55.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ (ร้อยละ)	สภาวะการหมัก (องศาเซลเซียส)	
	30 ± 1	35
ปริมาณกรดแลกติก	0.58	0.58
ความชื้น	40.51	40.44
โปรตีน	3.73	3.81
ไขมัน	0.26	0.24
เถ้า	0.13	0.13
ใยอาหาร	0.19	1.11
คาร์โบไฮเดรต	55.37	54.4

เมื่อนำแป้งหมักขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ มาวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติก พบว่า การหมักในช่วงเริ่มต้นที่อุณหภูมิห้อง แป้งหมักมีปริมาณยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 5.56×10^6 และ 6.37×10^8 CFU/ml เมื่อวิเคราะห์ปริมาณยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการหมักเพิ่มขึ้น ในช่วงเวลาที่ 2, 3 และ 4 พบว่า ปริมาณยีสต์เท่ากับ 1.05×10^7 , 7.13×10^7 และ 1.34×10^8 CFU/ml ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 6.92×10^8 , 8.07×10^8 และ 8.30×10^8 CFU/ml ตามลำดับ การหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในช่วงเริ่มต้น แป้งหมักมีจำนวนยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 5.67×10^6 และ 6.66×10^8 CFU/ml และปริมาณยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการหมัก ในช่วงเวลาที่ 2, 3 และ 4 พบว่า ปริมาณยีสต์เท่ากับ 2.33×10^7 , 1.26×10^8 และ 2.30×10^8 CFU/ml ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 7.31×10^8 , 9.04×10^8 และ 1.11×10^9 CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 19) เมื่อพิจารณา พบว่า การเพิ่มจำนวนของยีสต์จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนหมัก เท่ากับ 10^6 CFU/ml มีผลทำให้ปริมาณยีสต์หลังหมักมีจำนวน 10^8 CFU/ml ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น ก่อนหมัก เท่ากับ 10^8 CFU/ml หลังการหมักแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เท่ากับ 10^8 - 10^9 CFU/ml เนื่องมาจากยีสต์จะมีการเจริญได้เร็ว จำนวนยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจึงผลิตเอทานอลออกมาในระหว่างการหมัก ผลของเอทานอลจะทำให้โปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพ ส่งผลทำลายเอาไขมันที่เชื่อมเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกออก ทำให้กิจกรรมของเซลล์แบคทีเรียหยุดชะงักจึงชะลอการเจริญเติบโตได้บางส่วน (กนก, 2542)

ตารางที่ 19 ปริมาณจุลินทรีย์ในขนมด้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในการหมักที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สภาพการหมัก		จำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก (CFU/g)	
อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	ยีสต์	แบคทีเรียกรดแลกติก
30 ± 1	0	5.56×10^6	6.37×10^8
	2	1.05×10^7	6.92×10^8
	3	7.13×10^7	8.07×10^8
	4	1.34×10^8	8.30×10^8
35	0	5.67×10^6	6.66×10^8
	2	2.33×10^7	7.31×10^8
	3	1.26×10^8	9.04×10^8
	4	2.30×10^8	1.01×10^9