บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ขนมถ้วยฟู

ขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน หรือขนมจอกเป็นขนมไทยที่จัดเป็นภูมิปัญญาอีกชนิดหนึ่ง และเป็นที่ทราบว่าเป็นขนมพื้นบ้านที่แสดงถึงลักษณะของแต่พื้นที่ ซึ่งในแต่ละพื้นที่จะเรียกขนมชนิดนี้แตกต่างกันเช่น ขนมจอก ขนมขึ้น และขนมป่า เป็นต้น ขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากการหมักแป้งมีลักษณะคล้ายๆกัน คือมีรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 4 เซนติเมตร หนาประมาณ 2 - 3 เซนติเมตร เนื้อสัมผัสนุ่ม ฟู มีความยืดหยุ่นดี ผิวหน้าขนมจะแตกออกเป็นแฉกๆ รสชาติไม่หวานจัด มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัวซึ่งเกิดจากการหมักขนมถ้วยฟู และอาจใส่สีหรือไม่ใส่ โดยส่วนมากมักใช้สีจากธรรมชาติ เพื่อให้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

ในการหมักแป้งขนมถ้วยฟูในสมัยโบราณมีบันทึกไว้ว่าใช้ลูกแป้งสำหรับขนมถ้วยฟูเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักโดยเฉพาะ ซึ่งทำให้ขนมที่ได้ มีลักษณะแตกอยู่ส่วนบน และมีกลิ่นหมักเฉพาะเป็นลักษณะของขนมถ้วยฟู ซึ่งปัจจุบันลูกแป้งสำหรับทำขนมถ้วยฟูได้เลือนหายไป ไม่มีผู้ใดสามารถคิดค้นได้เพราะว่าไม่มีการบันทึกไว้ แต่ในปัจจุบันมีการใช้ ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) สำหรับผลิตกล้าเชื้อมากขึ้น เพื่อให้ได้กลิ่นรสหมักคล้ายกับขนมถ้วยฟูชนิดดั้งเดิม ซึ่งลักษณะของขนมถ้วยฟู ที่ผลิตจากยีสต์ขนมปัง จะมีลักษณะเนื้อสัมผัส พอง ฟู คล้ายขนมปัง มีกลิ่นที่คล้ายกับขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากลูกแป้ง การใช้ผงฟูเป็นตัวช่วยให้ส่วนบนของขนมมีลักษณะแตกเป็นแฉก ซึ่งจะไม่ได้กลิ่นรสจากการหมัก ส่วนขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อลูกแป้ง มีเนื้อสัมผัสนิ่ม เนื้อแน่น มีกลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะ

การทำขนมถ้วยฟูแป้งหมักที่ได้จากลูกแป้งเป็นกระบวนการผลิตที่ค่อนข้างยากและใช้ระยะเวลานาน ซึ่งต้องอาศัยเทคนิคและประสบการณ์ของผู้ผลิต สูตรการผลิตและสภาวะที่ใช้ในการหมักจะเป็นความรู้เฉพาะที่สืบทอดกันรุ่นต่อรุ่น ซึ่งบางครั้งจะถูกเก็บเป็นความลับ ในการผลิตขนมถ้วยฟู แป้งหมักเป็นสิ่งที่ต้องเตรียมเป็นอันดับแรกเสมอโดยผู้ที่มีความชำนาญ ซึ่งจะนำลูกแป้งผสมกับ แป้งข้าวบด น้ำ และน้ำตาล นิยมใช้น้ำตาลโตนด ตั้งไว้ให้เกิดการหมักโดยธรรมชาติ ประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะของแป้งที่ได้จะเป็นของเหลว ข้น สีขาวนวล มีฟองอากาศเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของแป้งหมัก มีกลิ่นเฉพาะตัว อาจเรียกว่า น้ำแป้งหมัก เมื่อผู้ผลิตได้แป้งหมักเป็นกล้าเชื้อ ตั้งต้นในการผลิต จะมีการหมุนเวียนใช้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจนหมด

Prince of Songkla University Pattani Campus

บางแห่งการผลิตภาชนะที่ใช้หมักจะใช้อย่างต่อเนื่องกันไปหลายๆรอบการผลิตเช่นกัน การผลิตขนมถ้วยฟูมีหลายขั้นตอน โดยเริ่มจากนำแป้งหมักที่ได้ก่อนหน้านี้มาผสมกับแป้งข้าวบด หรืออาจใช้แป้งสำเร็จรูป น้ำ และน้ำตาล ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้หมักตามธรรมชาติประมาณ 4 - 5 ชั่วโมง นำไปนึ่งให้ขนมสุกจึงได้ผลิตภัณฑ์ขนมถ้วยฟู

ในกระบวนการผลิตน้ำแป้งหมักที่ได้จะมีการเตรียมเริ่มแรกที่คล้ายกับการเตรียมขนมปังเปรี้ยว (Sourdough)ในประเทศอื่นๆ เช่น อิตาลี กรีก ฝรั่งเศส และอเมริกา เป็นต้น ซึ่งเกิดการทำงานของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกจากแป้งข้าวบด หรือจากวัตถุดิบอื่นๆในกระบวนการผลิต ซึ่งงานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตจึงเป็นวัตถุประสงค์สำคัญในการศึกษาครั้งนี้

2.2 ลูกแป้งข้าวหมาก

กล้าเชื้อของไทย หรือที่เรียกว่าลูกแป้ง ลูกแป้งข้าวหมาก จัดเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บอยู่ในรูปของเชื้อแห้งใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด ในแถบเอเชียการผลิตลูกแป้งเข้าใจว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีน กล้าเชื้อนี้มีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่นในแต่ละประเทศแตกต่างกันไป เช่น ชาวตะวันตก เรียกลูกแป้งของจีนว่า Chinese yeast, Chinese yeast cake หรือ Chinese koji ในเกาะไต้หวัน ประเทศจีนเรียกลูกแป้งว่า Peka ในมาลายาและอินโดนีเซียเรียกว่า Raji หรือ Raggi ในประเทศอินเดียเรียก Bukhar (มนตรี, 2521) ลูกแป้งทั่วไปมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม เนื้อมีสีขาวนวล โปร่งเบา มีผงปกคลุมรอบๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 - 5 เซนติเมตร เมื่อบดแล้วเป็นผงละเอียด ภายในมี เส้นใยราขึ้นอยู่ นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักวัตถุดิบประเภทมีแป้งเป็นส่วนประกอบ ในประเทศไทยแบ่งลูกแป้งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่หนึ่งใช้หมักผลิตภัณฑ์ประเภทข้าวหมาก ชนิดที่สองใช้สำหรับหมักผลิตภัณฑ์ประเภทเหล้า และชนิดที่สามใช้หมักผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำส้มสายชู ลูกแป้ง ทั้งสามชนิดมีใช้กันอย่างกว้างขวางในท้องถิ่นทั่วไป และที่นิยมที่สุดเป็นลูกแป้งเหล้า เพื่อให้ผลิตเครื่องดื่มประเภทมีแอลกอฮอล์ (สมพร, 2544)

การผลิตลูกแป้งมักทำเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีที่คล้ายคลึงกัน ส่วนประกอบที่สำคัญในการทำลูกแป้งโดยทั่วไป คือ เครื่องเทศ หรือสมุนไพร เช่น กระเทียม ขิง พริกไทย พริกแห้ง เป็นต้น ผสมกับน้ำ ลูกแป้งเดิม หรือนำมาโรยบนก้อนลูกแป้งใหม่ เพื่อใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์ บ่มไว้ให้เชื้อขึ้นฟูดีแล้วนำไปตากให้แห้ง ปัจจุบันนี้การผลิตลูกแป้งยังคงมีผลิตอยู่ตามภูมิภาคต่าง ๆ ซึ่งจะมีสูตรที่ใช้ผลิตแตกต่างกันตามเทคนิคของผู้ผลิต สมุนไพรที่ใช้ในการผลิต ทำหน้าที่ยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยเฉพาะเชื้อราชนิดที่สร้างสารพิษ สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการผลิตลูกแป้ง คือ เมื่อลูกแป้งมีความชื้นสูงจะมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่ลูกแป้งที่มีความชื้นต่ำ จะมีผลให้เนื้อลูกแป้งแห้งเกินไปลูกแป้งจะไม่ขึ้นฟู รวมถึงความสะอาดในการผลิต ซึ่งทั้งหมดเป็นเทคนิคสำคัญในการผลิตลูกแป้งข้าวหมาก

จุลินทรีย์ในลูกแป้งทำหน้าที่ย่อยแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยน้ำย่อยของเชื้อรา นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกจะสร้างกรดทำให้สภาพน้ำหมักเกิดเป็นกรด ส่งผลให้เกิดรสเปรี้ยวเล็กน้อย และยังทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนต่าง ๆ เมื่อมีน้ำตาลเกิดขึ้นยีสต์ที่อยู่ในลูกแป้งจะใช้น้ำตาลเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเกิดเป็นกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะซึ่งทั้งหมดเป็นการทำงานร่วมของจุลินทรีย์ในลูกแป้ง การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในลูกแป้งมีรายงานวิจัยต่าง ๆ ดังนี้

มณชัย (2546) ได้ศึกษาบทบาทของเชื้อราและยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า พบว่า ลูกแป้งทั้งสองชนิดพบเชื้อรา ได้แก่ *Amylomyces* sp. และ *Rhizopus* sp. โดยเชื้อรากลุ่ม *Rhizopus* sp. ผลิตกรดได้ปริมาณมากกว่าเชื้อรากลุ่ม *Amylomyces* sp. สามารถย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้น้อยกว่ากลุ่ม *Amylomyces* sp. ส่วนยีสต์ที่พบ ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligere* โดยเมื่ออุณหภูมิสูงอัตราการเจริญสูงขึ้น ขณะที่เมื่ออุณหภูมิต่ำยีสต์จะทนเอทานอลได้ดีขึ้น รวมทั้งแสดงกิจกรรมของ เอนไซม์อะมัยเลส โปรติเอส แต่ไม่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคิลเลอร์ยีสต์

สมพร (2544) ทำการคัดแยกเชื้อราและยีสต์ จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง พบว่า ในลูกแป้งส่วนใหญ่ มีปริมาณเชื้อราจำนวน 10^4-10^5 CFU/g และยีสต์จำนวน 10^5-10^6 CFU/g โดยที่มีเชื้อราจากลูกแป้งจากหมาก 91 ไอโซเลท และจากลูกแป้งเหล้า 35 ไอโซเลท ซึ่งเชื้อราที่พบในลูกแป้งข้าวหมากส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Amylomyces* และ *Rhizopus* นอกนั้นเป็นสกุล *Actinomucor*, *Aspergillus niger* group, *Monascus*, *Mucor* และ *Pennicillium* ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าพบว่าส่วนใหญ่เป็น *Rhizopus*, *Amylomyces*, *Actinomucor*, *Aspergillus niger* group และ *Mucor ragi* ในขณะที่สามารถแยกยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากได้ 43 ไอโซเลท และจากลูกแป้งเหล้า 49 ไอโซเลท ซึ่งยีสต์ที่พบในลูกแป้งข้าวหมาก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในสกุล *Saccharomycopsis fibuligera* นอกนั้นเป็น *Candida rhagii*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *Rhodotorula philyla*, *Tolulaspora delbrueckii* และ *T. globosa* ส่วนยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า พบว่าส่วนใหญ่เป็น *S. fibuligera* นอกนั้นเป็น *C. glabrata*, *C. rhagii*, *I. orientalis*, *P. anomala*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *P. heimii*, *P. mexicana*, *S. cerevisiae*, *T. globosa* และ *Trichosporon asahii*

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.3 แป้งข้าว

แป้งข้าว วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ ข้าวหักหรือปลายข้าว กรรมวิธีการผลิต 3 วิธี คือ วิธีโม่แห้ง วิธีโม่เปียก และวิธีผสม โดยแป้งที่ได้จากการโม่แห้งจะมีคุณภาพต่ำ เพราะเมล็ดแป้งค่อนข้างหยาบ และสิ่งเจือปนอยู่สูง อายุการเก็บรักษาสั้นเพราะเกิดกลิ่นหืน และถูกทำลายจากแมลงได้ง่าย สำหรับวิธีการโม่เปียกเป็นวิธีการผลิตแป้งข้าว ในปัจจุบันแป้งมีคุณภาพดี มีความละเอียดและสิ่งเจือปนน้อย ส่วนการผลิตแป้งวิธีผสมเป็นการโม่แป้งจากข้าวที่แช่น้ำ และอบแห้งด้วยความร้อน ดังนั้นแป้งในข้าวจะถูกทำให้สุกก่อนโม่ (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2543)

2.3.1 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของแป้ง

โครงสร้างภายในของเมล็ดแป้งจะประกอบด้วย โพลีเมอร์กลูแคน 2 ชนิดผสมกัน คือ อะมัยโลส (Amylose) เป็นโพลีเมอร์สายยาวของแอลฟา 1 - 4 กลูแคน และอะมัยโลสแพคติน (Amylosepactin) เป็นสายแขนงที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1 - 4 เป็นสายตรงและ มีพันธะแอลฟา 1 - 6 เป็นแขนงอะมัยโลส และอะมัยโลสแพคตินที่เป็นองค์ประกอบในแป้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล, ระดับการเกิดโพลิเมอร์ (Degree of polymerization) ของแต่ละสาย ตำแหน่งที่อยู่ในเม็ดแป้ง และสัดส่วนของอะมัยโลสและอะมัยโลสแพคตินการที่แป้งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการทำหน้าที่แตกต่างกัน (นิธิยา, 2539) ปฏิกิริยาเคมีกับสารอื่น ๆ เนื่องจากแป้งเป็นสารประกอบที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) จำนวนมาก จึงสามารถทำปฏิกิริยาอื่นกับสารอื่น ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มไฮดรอกซิลที่อยู่ในตำแหน่ง C2, C3 และ C6 การสลายตัวด้วยกรด ด่าง เมื่อโมเลกุลแป้งสัมผัสกับกรดหรือด่างจะขาดออกจากกันเป็นส่วน ๆ ความยาวของแต่ละส่วนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด ระยะเวลาที่ใช้ และชนิดของกรด

แป้งในข้าวจะมีอยู่ 2 ชนิด คือ อะมัยโลส ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายยาวและ อะมัยโลสเพคตินที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา หรือเป็นแขนง อัตราส่วนของอะมัยโลสกับอะมัยโลสเพคตินมีผลสำคัญต่อเนื้อสัมผัสของข้าว คือ ถ้าอะมัยโลสสูงมีผลทำให้เนื้อสัมผัสข้าวที่สุก แข็ง และร่วน โดยมีปริมาณอะมัยโลสในช่วงร้อยละ 12 - 37 ของน้ำหนักแป้ง (Arroy, 1974)

เมื่อนำข้าวมาผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นแป้งข้าวนั้น จะทำให้แป้งข้าวที่ได้มีสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากปัจจัยคุณภาพที่สำคัญ คือ ปริมาณอะมัยโลสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยสามารถจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ตามปริมาณอะมัยโลสที่แสดงในตารางที่ 1

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 1 ปริมาณอะมัยโลสและคุณสมบัติของข้าว

ชนิดของข้าว	ปริมาณอะมัยโลส (ร้อยละ)	ลักษณะข้าวสุก	การใช้ประโยชน์
ข้าวเหนียว	0 – 2	เหนียวมาก	บริโภคหรือทำขนม อาหารว่าง
ข้าวเจ้าอะมัยโลสต่ำ	10 – 19	เหนียว นุ่ม	บริโภคเป็นข้าวสุก
ข้าวเจ้าอะมัยโลสปานกลาง	20 – 25	ค่อนข้างร่วน	บริโภค หรือ แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์
ข้าวเจ้าอะมัยโลสสูง	26 – 34	ร่วนแข็ง	แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์

ที่มา : งามชื่น (2531)

สวนิต และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพของแป้งข้าวเจ้าที่ผลิตโดยกระบวนการโม่แห้งและโม่เปียกในระดับอุตสาหกรรม พบว่า ปริมาณโปรตีน ไขมัน และอะมัยโลสของแป้งข้าวเจ้าที่ผลิตจากทั้ง 2 กระบวนการมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าแป้งข้าวเจ้าที่ผลิตโดยกระบวนการโม่เปียกมีความเหมาะสมในการนำไปผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด รวมทั้งผลิตภัณฑ์ขนมต่าง ๆ

2.4 น้ำตาลโตนด

การผลิตน้ำตาลโตนด

สำหรับประเทศไทยพื้นที่ที่มีผู้ประกอบอาชีพตาลโตนดอย่างมาก ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดสงขลา ตาลโตนดเป็นวัสดุดิบที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรมขนาดย่อม เช่น น้ำตาลโตนดจากช่อดอก ซึ่งช่อดอก ตาลโตนดมีช่อดอก 2 ชนิดคือ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย ส่วนของดอกตัวผู้ที่แตกแขนงออกเรียกว่า “งวงตาล” ส่วนช่อดอกตัวเมียเรียกว่า “ปลีตาล” ซึ่งทั้งสองชนิดให้น้ำหวานได้โดยผ่านกรรมวิธีการปาดงวงตาลและปลีตาล น้ำหวานนี้เรียกว่า “น้ำตาลใส” หรือ “น้ำตาลสด” ที่สามารถดื่มสดได้ทันที และหากนำน้ำหวานนี้ไปเคี่ยวไฟจะได้น้ำตาลเข้มข้นตามรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ น้ำผึ้ง น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลปึก น้ำตาลแว่น ขึ้นอยู่กับความต้องการ นอกจากนั้นน้ำตาลสดในรูปน้ำหวานนี้ ยังสามารถใช้ทำน้ำส้มสายชู และน้ำตาลแอลกอฮอล์ ช่อดอกตาลโตนดนอกจากจะให้น้ำหวานแล้ว ยังสามารถใช้เป็นยาสมุนไพรอีกด้วย ผลการศึกษาของกนก (2521) รายงานว่า คุณค่าทางโภชนาการของน้ำตาลโตนดสดมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 11.6 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 16.8 น้ำตาลรีดิวซิ่งร้อยละ 1.8 และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15.0 นอกจากนี้น้ำตาลโตนดสด ยังมีองค์ประกอบดังนี้ ความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ

Prince of Songkla University Pattani Campus

29 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วง 1.058 - 1.077 ปริมาณของแข็งทั้งหมด อยู่ในช่วง 152 - 19.7 กรัม/100 มิลลิลิตร เถ้าอยู่ในช่วง 0.11 - 0.41 กรัม/100 มิลลิลิตร และโปรตีน อยู่ในช่วง 0.23 - 0.32 กรัม/100 มิลลิลิตร นอกจากนี้มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (2546) เรื่องน้ำตาลโตนด ได้กำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไว้ดังนี้ น้ำตาลโตนด หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเคี่ยวน้ำตาลสดจากงวงตาลหรือดอกของต้นตาลจนมีลักษณะข้นเหนียว แล้วทำให้เป็นรูปทรงตามต้องการ หรือบรรจุในภาชนะบรรจุ มีลักษณะทั่วไป คือ ต้องเป็นก้อน กรณีบรรจุในภาชนะบรรจุต้องมีลักษณะข้นเหนียว มีสีและกลิ่นรสหอมหวานตามธรรมชาติ ไม่พบสิ่งแปลกปลอมในน้ำตาลโตนด เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์ เช่น แมลง หนู นก วัตถุเจือปนอาหารให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนดและ ด้านคุณภาพด้านจุลินทรีย์ กำหนดให้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน 5 x 10^2 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.4.1 การพาสเจอไรส์

การพาสเจอไรส์เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงมากนัก โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และทำลายจุลินทรีย์ ที่มีความทนทานต่อความร้อนต่ำ เช่น แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ยีสต์และรา การพาสเจอไรส์เป็นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่แต่ไม่ใช่จุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร วัตถุประสงค์หลักในการพาสเจอไรส์อาหารที่มีความเป็นกรดสูงคือ การทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเน่าเสียและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เวลาและอุณหภูมิในการพาสเจอไรส์ขึ้นอยู่กับความต้านทานความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์ หรือเชื้อโรคที่ต้องการทำลายและความไวต่อความร้อนของผลิตภัณฑ์ (วิไล, 2547) ดังนั้นอาหารที่ผ่านการพาสเจอไรส์ แล้วต้องเข้าสู่กระบวนการต่อไป หรือต้องเก็บรักษาในสภาวะที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เช่น การเก็บรักษาน้ำผลไม้พาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 4 – 10 องศาเซลเซียส

2.4.1.1 ประเภทของการพาสเจอไรส์

ประเภทของการพาสเจอไรส์แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามระบบให้ความร้อน (ทนง, 2540) ดังนี้

1. ระบบช้าอุณหภูมิต่ำ (Low Temperature Long Time, LTLT) เป็นระบบที่ให้ความร้อนไม่สูงมากนักแต่ใช้เวลานาน เช่น การใช้อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันที เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถทำได้ในครัวเรือน

2. ระบบเร็วอุณหภูมิสูง (High Temperature Short Time, HTST) เป็นระบบที่ให้ความร้อนในระดับที่สูงขึ้นแต่ใช้เวลาสั้นลง เช่น อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันที

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.4.1.2 ผลของการพาสเจอไรส์ต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

การพาสเจอไรส์เป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนที่ไม่สูงมากนักจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านโภชนาการและประสาทสัมผัสของอาหารน้อยมาก โดยวิธีนี้สามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์ไปได้หลายวันหรือหลายสัปดาห์

สุภารัตน์ (2547) ศึกษาผลของการใช้ความดันสูงและความร้อนต่อคุณภาพของน้ำตาลโตนด โดยผลทางด้านจุลชีววิทยาของน้ำตาลโตนดพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 10, 15 และ 20 นาที พบว่า การใช้อุณหภูมิ ตั้งแต่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 500 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และไม่พบยีสต์และราและแบคทีเรียกรดแลกติก ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ของน้ำตาลโตนดสด และน้ำตาลโตนดพาสเจอไรส์ ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

Temperature (C^o)	**Time (min)**	**TVC (CFU/ml)**	**Yeast and mold (CFU/ml)**	**Lactic acid bacteria (CFU/ml)**
Fresh palm sap *		6.04×10^7	3.66×10^6	2.59×10^7
70	10	5.68×10^2	0	0
	15	1.50×10^2	0	0
	20	1.31×10^7	0	0
80	10	5.60×10^1	0	0
	15	3.05×10^1	0	0
	20	0	0	0
90	10	0	0	0
	15	0	0	0
	20	0	0	0
100	10	0	0	0
	15	0	0	0
	20	0	0	0

* Microbiology analysis in fresh palm sap was done after 15 hours of collecting palm sap. Each value is the mean of triplicate determination.

ที่มา : สุภารัตน์ (2547)

Prince of Songkla University Pattani Campus

หน้าที่ของน้ำตาลโดยทั่วไปต่อผลิตภัณฑ์ขนมไทย ได้แก่ เป็นแหล่งให้ความหวานแก่ผลิตภัณฑ์ และเป็นแหล่งอาหาร หรือแหล่งคาร์บอนของยีสต์ในระหว่างการหมัก ทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้ดี และสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากขึ้น ทำให้อาหารขึ้นฟูมีเนื้อนุ่ม เนื้อขนมเก็บความชื้นและมีความชุ่มนาน เป็นต้น (จิตธนา และอรอนงค์, 2527)

2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในแป้งหมัก

แป้งหมักหรือน้ำแป้งหมักเป็นการผสมกันของแป้ง (ข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวเจ้า) และน้ำแล้วเกิดการหมัก ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาท ได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก มีที่มาจากวัตถุดิบต่าง ๆ ในการผลิต ได้แก่ แป้ง ส่วนผสม รวมทั้งสภาพแวดล้อม ในผลิตภัณฑ์ขนมปัง เมื่อนำแป้งหมักดังกล่าวมาใช้ในการผลิตขนมปัง ส่งผลให้โดแป้งมีสมบัติดีขึ้น เช่น เนื้อสัมผัส กลิ่น รส การยืดระยะเวลาการเสื่อมเสีย และยับยั้งเชื้อราและจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสีย (Gobbetti,1998) ซึ่งสมบัติที่ได้เป็นผลดีจากการทำงานร่วมกันอย่างเหมาะสมระหว่างเมตาบอลิซึมของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก นอกจากนี้แป้งหมักจัดเป็นแหล่งสำคัญของแบคทีเรียกรดแลกติกหลายสายพันธุ์ กิจกรรมการหมักสร้างสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมออกมาขึ้นกับกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญในช่วงระหว่างการหมักของแป้ง โดยการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) สร้างสารผลิตภัณฑ์หลักได้แก่ กรดแลกติก (lactic acid) และการหมักแบบเฮเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) สร้างสารผลิตภัณฑ์หลัก ได้แก่ กรดแลกติก เอทานอล กรดซิตริก และคาร์บอนไดออกไซด์

2.5.1 แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์คะตะเลส มีรูปร่างแบบ cocci coccibacilli หรือ rods ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (Aerotolerant) ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (Strictly anaerobe) แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ใน Family Lactobacteriaceae ประกอบด้วย genus ต่าง ๆ ได้แก่ คือ *Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Lactobacillus* อุณหภูมิที่เจริญอยู่ในช่วง 5 - 53 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ อยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส และมีพีเอชที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 5.5 - 5.8 หรือน้อยกว่านี้ ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลกติก คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก ซึ่งเป็นการหมักแบบ Homofermentation หรือการได้กรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติก ซึ่งเป็นการหมักแบบ Heterofermentation ทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความต้องการอาหารที่

ค่อนข้างสลับซับซ้อนและสมบูรณ์ โดยใช้แหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ (Soluble carbohydrate) และแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources) ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อกลุ่มนี้ หากมีกรดอะมิโนไม่เพียงพอมักการเติมเกลือแอมโมเนียม (Ammonium salt) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนสร้างกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น และสารประกอบไนโตรเจนที่จำเป็นในโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) ได้เป็นวิตามิน และ สารที่ช่วยในการเจริญ (growth factor) ซึ่งความต้องการสารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ (สุพรรณิการ์, 2548)

2.5.1.1 กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติก (Lactic fermentation)

กระบวนการหมักที่เกิดจากกรดแลกติกมี 2 แบบ คือ

2.5.1.1.1 การหมักแบบ Homofermentation

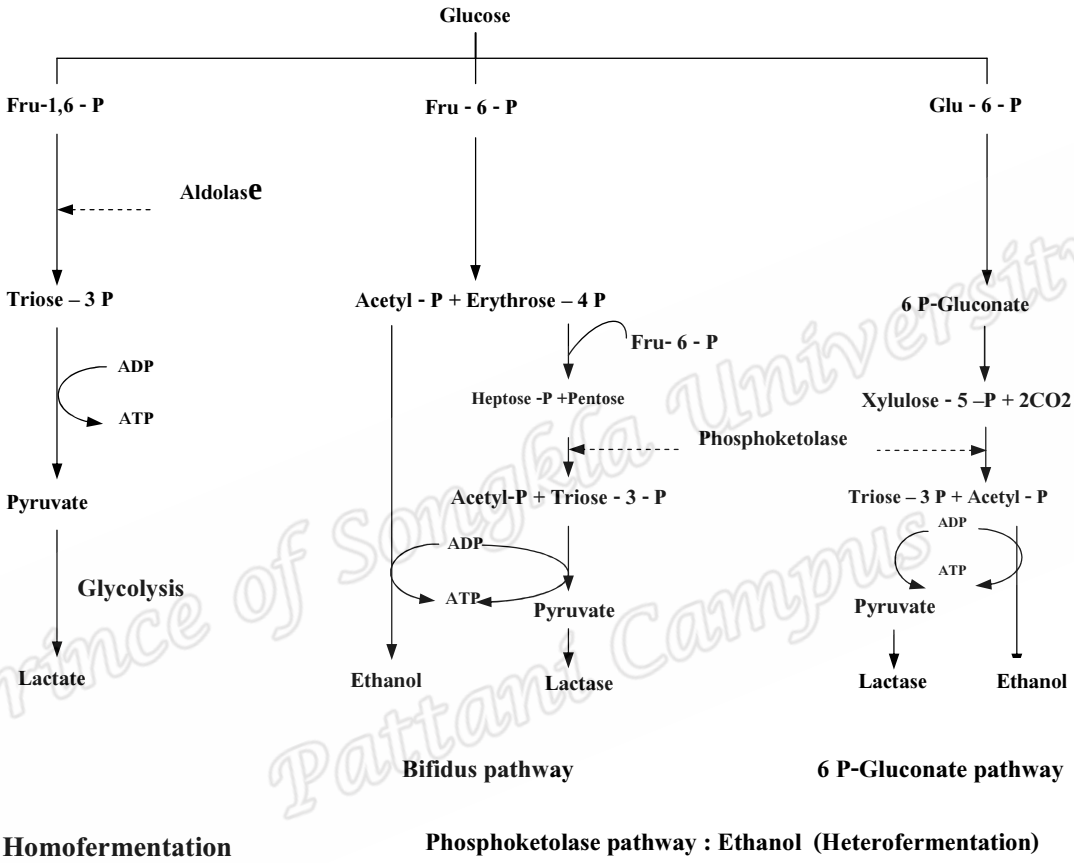
เป็นกระบวนการหมัก โดยใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านเข้าวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในการหมักและได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น กรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ กลไกการเกิดกรดแลกติกเริ่มต้นจาก การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็น Fructose-1,6-diphosphate และอาศัยวิถีที่มีเอนไซม์ Aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการไกโคไลซิส เปลี่ยนเป็น Triose-3-phosphate จากนั้นเอนไซม์ Dehydrogenase เปลี่ยนให้เป็นกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) แล้วกรดไพรูวิกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกต่อไป ดังรูปที่ 1 จากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกจะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล แบคทีเรียกรดแลกติก กลุ่มที่มีเมตาบอลิซึมแบบ Homofermentative ได้แก่ *Enterococcus, Streptococcus, Lactococcus, Vagococcus, Tetranococcus* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *L. plantarum* **(**กุณฑิกา, 2547; สุพรรณิการ์, 2548**)**

2.5.1.1.2 การหมักแบบ Heterofermentation

เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติกได้เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น โดยใช้น้ำตาลผ่านเข้าวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด ได้แก่ กรด แลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล แอซีเทต กลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังรูปที่1 ซึ่งแบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ Aldolase จึงไม่สามารถเปลี่ยน Fructose-1,6-diphosphate เป็น Triose-3-phosphateได้ กลไกการเกิดจึงต้องออกซิไดซ์ Triose-3-phosphate ให้ได้เป็น 6-phosphogluconate และเปลี่ยนเป็น Pentose-phosphate กับคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้น Pentose-phosphate จะแตกตัวเป็น Triose-3-phosphateและAcetyl–phosphate โดยอาศัยเอนไซม์ Phosphoketolase ซึ่ง Triose-3-phosphate เข้าสู่วิถี เปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก และแลกเตทต่อไป ส่วน Acetyl–phosphate จะเปลี่ยนเป็นอะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldahyde) และเอทานอล นอกจากนี้อาจสร้างสารผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เมื่อมีกระบวนการอื่นๆ ร่วมด้วย (กุณฑิกา, 2547) แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มที่มีเมตาบอลิซึมแบบ

Prince of Songkla University Pattani Campus

Heterofermentative ได้แก่ *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *L. bulgaricus* และ *L. casei* (สุพรรณิการ์, 2548)



รูปที่ 1 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงสารในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติก

ที่มา : Wood and Holzapfel (1995) อ้างโดย กุณฑิกา (2547)

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.5.2 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ ที่มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อหรือวิธีการแบ่งตัวออกเป็นเซลล์ 2 เซลล์ คล้ายแบคทีเรีย มีขนาดเล็กมาก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ยีสต์มีอยู่ตามธรรมชาติเป็นตัวสำคัญทำให้เกิดการหมักและยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าอีกด้วยเพราะเป็นแหล่งวิตามิน และเอนไซม์ที่สำคัญ ยีสต์มีความสำคัญมากสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ เช่น ขนมปัง ซาลาเปา ขนมถ้วยฟู เป็นต้น อีกทั้งเป็นตัวที่ทำให้โดหมักที่มีความหนัก เปลี่ยนเป็นเบาตัว มีความยืดหยุ่น มีรูอากาศ ซึ่งเมื่อนำไปอบแล้วจะเป็นอาหารที่มีคุณค่าและย่อยง่าย ยีสต์มีความต้องการอาหาร ได้แก่ น้ำตาล ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับยีสต์ในการสร้างพลังงาน ส่วนแร่ธาตุและสารประกอบไนโตรเจนจัดว่าเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของยีสต์เช่นกัน ซึ่งแหล่งอาหารเหล่านี้มาจากแป้ง นม และส่วนผสมอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์ ยีสต์จะเจริญได้ดีสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 20 - 35 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิต่ำกว่านี้การหมักมักจะเกิดช้าลง ในทางตรงกันข้ามหากอุณหภูมิในการหมักสูงเกินไปการหมักก็เกิดขึ้นเร็วเกินไป ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะผิดไปจากที่ควรจะเป็น การเจริญเติบโตของยีสต์และการหมักขึ้นอยู่กับพีเอช ในขณะที่ยีสต์เริ่มทำการหมักโด ควรมีพีเอช 5.5 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของยีสต์ จากนั้นพีเอช จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จนเมื่อการหมักถึงช่วงสุดท้าย จะมีพีเอช 4.5 - 4.6 (จิตธนา และอนงค์, 2527)

การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ในสภาวะไม่มีอากาศโดยทั่วไปเรียกว่า การหมัก (Fermentation) พลังงานในรูป ATP ที่ได้มาจากการใช้สับสเตรท ผ่านกระบวนการไกโคไลซิสหรือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway) ในกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศนอกจากได้เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วยังได้สารอื่น ๆ ได้แก่ กลีเซอรอล อะซีเตท เอสเทอร์ และสารประกอบคาร์บอนิล ที่มีส่วนในการเพิ่มกลิ่นและรสชาติของเอทานอลที่ได้ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศ ยีสต์มีการใช้น้ำตาลผ่านกระบวนการหายใจ ผลิตพลังงานในรูปของ ATP และผลผลิตที่ได้ คือ ปริมาณเซลล์ (Biomass) ในขั้นตอนแรกเซลล์จะใช้กลูโคสผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส เช่นเดียวกันกับสภาวะที่ไม่มีอากาศ ในกระบวนการไกลโคไลซิสกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ (Acetyle CoA) และผ่านเข้าสู่วิถี Tricarboxylic acid cycle (TCA) ซึ่งในสภาวะที่มีอากาศ พบว่า ออกซิเจนมีผลทำให้ไม่เกิดกระบวนการหมัก การผลิตเอทานอลจึงลดลง เนื่องจากในสภาวะที่มีออกซิเจนเอนไซม์ Pyruvate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ (Aerobic repiration) จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ Pyruvate decarboxylaseที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Neway, 1989)

Prince of Songkla University Pattani Campus

การเจริญของยีสต์ส่วนใหญ่ขึ้นกับปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเช่นกัน ปัจจัยทางเคมีที่สำคัญคือ พีเอช เอทานอล ความเข้มข้นของสับสเตรท และธาตุอาหาร โดยหน้าที่ของยีสต์ต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมัก คือ การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของผลิตภัณฑ์ มีปริมาตรมากขึ้น ก่อให้เกิดโครงสร้าง และลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังก่อให้เกิดกลิ่นเฉพาะรสตัว ที่มาจากสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆที่ยีสต์สร้างขึ้นมาระหว่างการหมัก การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลในแป้งหมักและสร้างสารผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงจึงเป็นลักษณะที่ต้องการในผลิตภัณฑ์แป้งหมัก ในการเลือกใช้ยีสต์ในรูปแบบต่าง ๆ มาทำการหมักแป้งจะให้ผลในการหมักที่แตกต่างกัน เช่น การใช้ยีสต์ในรูปแบบแห้งให้ผลดีกว่าการใช้ยีสต์สด เนื่องจากยีสต์แห้งเป็นยีสต์ที่ใช้ทางการค้า มีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์มาแล้ว ให้ผลดีกว่าใช้ยีสต์สดซึ่งต้องการสภาวะการเจริญแตกต่างกันตามความเหมาะสม (รัตนภรณ์, 2542) ในผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด จึงมีชนิดของยีสต์ที่เจริญแตกต่างกันตามความสามารถในการเจริญร่วมกันของยีสต์ในขนมปังเปรี้ยว (Sourdough) ต่าง ๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจำแนกยีสต์ในขนมปังเปรี้ยว (Sourdough)

แหล่งที่พบ	สายพันธุ์ยีสต์
ขนมปังเปรี้ยวจากข้าวไรย์ ข้าวโพดและข้าวสาลี	*Saccharomyces cerevisiae*
	S. chevalieri
	S. curvatus
ขนมปังเปรี้ยวจากข้าวไรย์ และข้าวโพด	*Torulopsis delbrueckii*
ขนมปังเปรี้ยวจากข้าวไรย์ และข้าวสาลี	*S. exiguus (T.holmii , C.milleri)*
	Candida crusel
ขนมปังเปรี้ยวจากข้าวสาลี	*S. fructuum*
	C. guillermondii
	C. norvegensis
	Hansenula anomala
	H. subpelliculosa
ขนมปังเปรี้ยวจากข้าวไรย์	*Pichia satoi*
ขนมปังเปรี้ยวซานฟรานซิสโกจากข้าวสาลี	*Candida boidinii*
	S. inusitatus
	S. pani fermentati

ที่มา : Maloney and Foye (2003)

Prince of Songkla University Pattani Campus

Rosenquist and Hansen (2000) ศึกษาปริมาณของจุลินทรีย์ของแป้งหมักที่ผลิตจากข้าวไรย์ที่มีการเพาะปลูกต่างกัน ได้แก่ การปลูกแบบธรรมดา และการปลูกแบบอินทรีย์ พบว่า แป้งหมักจากแหล่งทั้งสอง พบแบคทีเรียกรดแลกติก ประมาณ log 8.43 - 9.14 CFU/กรัม และยีสต์ประมาณ log 6 - 8 CFU/กรัม รวมทั้งเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณมากขึ้น แต่ยีสต์มีปริมาณลดลง ซึ่งในแป้งหมักทั้งสองแหล่งพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกในปริมาณมากตลอดกระบวนการหมัก โดยสายพันธุ์ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Lactobacillus* sp. ตามลำดับ

Simsek *et al.* (2006) ศึกษาการแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อน จากแป้งหมัก 60 ตัวอย่างของประเทศตุรกี โดยคัดเลือกจากสมบัติการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ปริมาณกรดทั้งหมด กรดอินทรีย์ การผลิตไดอะซิติล และปริมาณเอนไซม์ชนิดโปรติโอไลติก (Proteolytic) และอะไมโลไลติก (Amylolytic) นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus brevis . lindneri* 2103*, L. viridenscens* 241*,* 242*, Pediococcus* sp. E5 และ *L. delbrueckii* F5 แสดงสมบัติในการให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ดี เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent)

Pulvirenti *et al.* (2004) ศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ในขนมแป้งหมักที่ผลิตแบบครัวเรือนจากพื้นที่แตกต่างกัน 4 แหล่งของประเทศอิตาลี พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Candida milleri, C. humilis, S. exiguous* และ *Issatchenkia orientalis* ตามลำดับ

Gul *et al.* (2005) ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อที่แยกได้จากแป้งขนมปังเปรี้ยว (Sourdough) จำนวน 14 ตัวอย่าง เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus divergens* (ร้อยละ 6.1), *L. brevis* (ร้อยละ 15.1), *L. amylophilus* (ร้อยละ 6.1), *L. sake* (ร้อยละ 6.1), *L. acetotolerans* (ร้อยละ 6.1)*, L. plantarum* (ร้อยละ 3.0), *Pediococcus pentosaceus* (ร้อยละ 6.1), *P. acidilactici* (ร้อยละ 6.1) และ *Tetragenococcus halophilus* (*Pediococcus halophilus*) (ร้อยละ 3.0) และยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* (ร้อยละ 27.0), *S. delbrueckii* (ร้อยละ 2.7), *Torulopsis holmii* (ร้อยละ 10.8) และ *T. unisporus* (ร้อยละ 2.7)

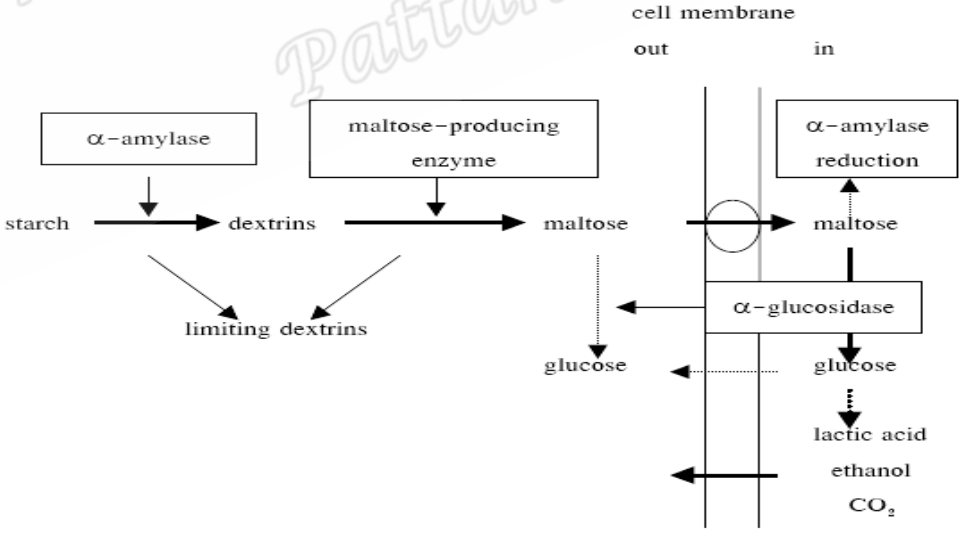
Ferchichi *et al.* (2007) จำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในขนมปังเปรี้ยวของประเทศฝรั่งเศส (French sourdough) จาก 4 แหล่งผลิตที่มีมีสภาพแวดล้อมต่างกัน พบว่า เมื่อสภาวะแวดล้อมต่างกันจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Lactobacillus sanfranciscensis* โดยแหล่งที่ 1 พบแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus sanfranciscensis, L. spicheri* และ *L. pontis* แหล่งที่ 2 พบแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L.sanfranciscensis,*

Prince of Songkla University Pattani Campus

L. panis, L. nantensis และ *L. hammesii* แหล่งที่ 3 พบแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. sanfranciscensis, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และแหล่งที่ 4 พบแบคทีเรียกรดแลกติก *L. frumenti, L. hammesii* และ *L. paralimentarius*

2.6 การหมักคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์แป้งหมัก

แบคทีเรียแลกติกแต่ละชนิดอาศัยความสามารถในการใช้ประโยชน์ของน้ำตาลในรูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยการเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึม จนได้เป็นสารอาหารและสารผลิตภัณฑ์ออกมา (สุพรรณิการ์, 2548) การเข้าไปใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกนั้น มีกลไกการย่อยแป้ง (Starch) คือ หลังจากแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase)ได้เป็นเด็กซ์ทริน และถูกย่อยต่อจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส จากนั้นน้ำตาลมอลโตสถูกส่งเข้าสู่เซลล์เมนเบรนภายในเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก และถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส (α-glucosidase) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสุดท้ายจะได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดแลกติก เอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งในกระบวนการหมักนั้นหากมีพีเอชต่ำกว่า 4 การเจริญและสร้างเอนไซม์ไม่เหมาะสม และมีผลทำให้เอนไซม์ในการย่อยลดลง ซึ่งในกระบวนการหมักธัญชาติโดยมากมักเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 3.5 - 4 ซึ่งกระบวนการหมักตามธรรมชาติจะหยุดลง เช่น การใช้น้ำตาลของ *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 (Santoyo *et al*., 2003) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กระบวนการไฮโดรไลซิสแป้งเป็นกลูโคส โดย *Lactobacillus fermentum* Ogi E1
ที่มา : Santoyo *et al.* (2003)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ส่วนในยีสต์ การใช้น้ำตาลจะเกิดขึ้นในระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรตหรือแป้ง โดยการหมักน้ำตาลที่มีอยู่ในส่วนผสมหรือจากการย่อยสลายเชื้อแบคทีเรียแลกติก เช่น น้ำตาลกลูโคส ในระหว่างการหมัก ยีสต์จะใช้น้ำตาลภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส และมอลโตส โดยส่วนใหญ่มักใช้น้ำตาลกลูโคส ทั้งนี้เพื่อผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ ฟองอากาศ (Leavening) เอทานอล และพลังงาน นอกจากนี้ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลมอลโตส ที่ได้จากกระบวนการย่อยแป้งของจุลินทรีย์อื่น หลังจากนั้นน้ำตาลมอลโตสจะถูกเอนไซม์มอลเตสจากยีสต์ เปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และถูกเอนไซม์ไซเมส (Zymase) จากยีสต์เปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลต่อไป อย่างไรก็ตาม ยีสต์จะสร้างเอนไซม์มอลเตสขึ้นเมื่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสถูกใช้หมดแล้ว อีกทั้งปฏิกิริยาการย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส เกิดขึ้นเร็วมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ซึ่งการย่อยน้ำตาลมอลโตสโดยเอนไซม์มอลเตส (Maltase) จากยีสต์อาจไม่ถูกใช้เลย (โศรยา, 2544) ดังนั้น แบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในผลิตภัณฑ์แป้งหมักนั้นมีจลศาสตร์ในการใช้คาร์โบไฮเดรตที่ต่างกัน ในแบคทีเรียกรดแลกติกใช้พวกน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ น้ำตาลซูโคส มอลโตส ขณะที่ยีสต์ส่วนมากจะใช้คาร์โบไฮเดรตในกลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่บางชนิด หรือน้ำตาลในกลุ่มของน้ำตาลเฮกโซส เป็นต้น

นอกจากการใช้คาร์โบไฮเดรตที่ต่างกันของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาล ซึ่งเป็นผลมาจากระบบขนส่งน้ำตาลนั้นมีความเกี่ยวข้องกัน โดยแบคทีเรียกรดแลกติกมีระบบการขนส่งน้ำตาลโดยนำน้ำตาลมอลโตสเข้าสู่เซลล์ เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสและถูกส่งออกนอกเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลในเซลล์ปริมาณสูง พบว่าเมื่อแบคทีเรียแลกติกเจริญร่วมกับยีสต์มีผลให้ปริมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคสถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว หากความเข้มข้นของน้ำตาลมีปริมาณต่ำ น้ำตาลกลูโคสจึงถูกขับออกนอกเซลล์มีปริมาณลดลง แหล่งอาหารของยีสต์จึงน้อยลงเช่นกัน ส่งผลต่อสารผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นลดน้อยลง ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และความกรดในผลิตภัณฑ์แป้งหมักที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกลดลง เมื่อความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์ลดลง ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเปลี่ยนไป และอายุการเก็บรักษาสั้นลง ดังนั้นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้กับผลิตภัณฑ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างกรดแลกติก และกรดอะซิติก และสารผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จากแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งจะส่งผลต่อยีสต์ มีแหล่งคาร์บอนเพิ่ม และเจริญได้ดี

Prince of Songkla University Pattani Campus

2.7 ปฏิกิริยาร่วมกันของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก ในกล้าเชื้อแป้งหมัก

ผลิตภัณฑ์จากแป้งหมักมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกันหลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ ซึ่งปัจจัยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดที่สำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และสภาวะแวดล้อม รวมทั้งปฏิกิริยาของการเมตาบอลิซึมระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด โดยกิจกรรมที่เกิดร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์แป้งหมักแบบธรรมชาติให้ผลที่ส่งเสริมกัน ปฏิกิริยาที่เกิดร่วมกันจึงนับว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน ซึ่งส่งผลต่อลักษณะผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus sanfranciscensis* และ *Saccharomyces. exiguus* หรือ *Candida humilis* หรือทั้งสองสายพันธุ์ โดย *L. sanfranciscensis* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ใช้น้ำตาลมอลโตส (Maltose) เพื่อนำมาผลิตเป็นพลังงานมากสุด ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *S. exiguus* หรือ *C. humilis* ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีลักษณะไม่ใช้น้ำตาลมอลโตส (Maltose negative yeasts) ใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส จึงไม่มีการแย่งใช้น้ำตาลมอลโตสกับแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเริ่มจากเชื้อราที่มาจากวัตถุดิบย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสให้เป็นน้ำตาลมอลโตส หลังจากนั้น *L. sanfranciscensis* จะย่อยสลายมอลโตส ด้วยเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสสะสมในเซลล์บางส่วน เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลึซึม ผลิตเป็นสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ และกลูโคสบางส่วนถูกปล่อยออกนอกเซลล์ ยีสต์สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส และสร้างสารผลิตภัณฑ์ต่อไป (Gobbetti, 1998)

การใช้กล้าเชื้อจากแป้งหมักซึ่งกล้าเชื้อนั้นจัดเป็นกล้าเชื้อผสม ที่มีลักษณะเหลว กึ่งเหลว มีฟองอากาศลอยบนผิวหน้าซึ่งเกิดจากกิจกรรมของยีสต์ และกลิ่นรสเปรี้ยวจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในแป้งหมัก นอกจากนี้ยังช่วยให้เกิดลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์ในด้านต่าง ๆ สมบัติด้านความหนาหรือการขยายตัวของผลิตภัณฑ์ เป็นผลจากยีสต์ทำหน้าที่หมักน้ำตาลภายใต้สภาวะไร้อากาศ สร้างสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอลกอฮอล์ออกมา โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะถูกกักเก็บไว้ในโพรงอากาศภายใน ทำให้เกิดลักษณะการขยายขนาด เรียกว่า เกิดการขึ้นฟู สมบัติด้านการป้องกันการเสื่อมเสียและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เป็นผลจากแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้หลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ (กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก) คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดแอซีทิล เอทานอล และ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น ซึ่งกรดอะซิติกจัดเป็นสารผลิตภัณฑ์สำคัญในการเกิดกลิ่นรส และป้องกันการเสื่อมเสีย สมบัติด้านการผลิตสารระเหยและสารให้กลิ่นรส ซึ่งกรดแลกติกจากแบคทีเรียกรดแลกติกย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งกิจกรรมการย่อยโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบ

Prince of Songkla University Pattani Campus

หอมระเหยจากเอสเทอร์ เปปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างสารให้กลิ่นรสที่สำคัญ เช่น กรดแลกติก และอะซิติกให้ลักษณะกลิ่นเฉพาะตัว และให้กลิ่นรสเปรี้ยว (Acid flavor) ตัวอย่างสารหอมระเหย เช่น เอทานอล เอทิลแอซีเทต ไดแอซีทิล และแอซีทัลดีไฮด์ เป็นต้น (โศรยา, 2544)

Vernocchi *et al.* (2004) ศึกษาเกี่ยวกับยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการทำงานร่วมกันในการผลิตขนมปังหวานซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แป้งหมักของประเทศอิตาลี พบว่า ยีสต์ *C. milleri* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากและแยกได้ในช่วงก่อนแป้งหมักเกิดโด ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาลมอลโตส (Maltose negative) แต่ใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารโดยตรง และในช่วงก่อนการฟูพบยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ซึ่งใช้น้ำตาลมอลโตสได้ (Maltose positive) ส่วนการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในการหมักมีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงการผลิต และการสร้างสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดแลกติก กรดซิติก และกรดอะซิติก โดยการผลิตในช่วงแรกก่อนการขึ้นฟู จะมีการสร้างสารผลิตภัณฑ์ออกมามากกว่าช่วงหลังจากขึ้นฟูแล้ว เนื่องจากช่วงแรกของการผลิตจะมียีสต์กลุ่มที่ไม่ใช้น้ำตาลมอลโตส ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยของแบคทีเรียกรดแลกติก และมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลกติกมาก ส่งผลให้สร้างสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มาก

Plessas *et al.* (2005) ศึกษาการใช้ คีเฟอร์ (Kefir) ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผสมจากธรรมชาติมีลักษณะเป็นนมหมักที่มีแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์อยู่ร่วมกัน ซึ่งผลิตกรดแลกติกและแอลกอฮอล์ เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ขนมปังทางการค้า (Baker's yeast) พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกล้าเชื้อผสมมีความแน่นเนื้อ การก่อตัวจับเป็นก้อนขนมปัง เนื้อสัมผัส และรสชาติดีกว่าผลิตภัณฑ์จากยีสต์ขนมปังทางการค้า รวมทั้งอายุการเก็บรักษาได้นานกว่า

Paramithiotis *et al.* (2006) ศึกษากิจกรรมการสร้างสารผลิตภัณฑ์ต่างๆของแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในผลิตภัณฑ์แป้งหมักของประเทศกรีก โดยแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ *Lactobaillus Sanfran ciscensis, L. brevis, L. paralimentarius, Weissellacibaria*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecium* และยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ซึ่งแยกได้จากขนมปังเปรี้ยวที่ผลิตแบบดั้งเดิม โดยการหมักแป้งและน้ำด้วยใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Monoculture) และการใช้เชื้อแบบผสม (Co-culture) ตั้งไว้จนเกิดโดประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การหมักร่วมกันของเชื้อ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. sanfranciscensis, L. brevi* และ *W. cibaria* จะมีการผลิตกรดอะซิติก แต่การหมักแบบใช้สายพันธุ์เดียว ไม่มีการผลิตกรดอะซิติก รวมทั้งสารกลีเซอรอล และน้ำตาลแมนนิทอล นอกจากนี้ สารผลิตภัณฑ์หลัก เช่น

Prince of Songkla University Pattani Campus

เอทานอล และกรดแลกติก พบว่า การหมักด้วย *S. cerevisiae* และ *L. brevis* ร่วมกันให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักด้วย *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว

Valmorri *et al.* (2008) ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์แป้งหมักด้วยยีสต์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae*, *C. milleri* ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* และ *L. rossiae* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากขนมปังเปรี้ยวของประเทศอิตาลี โดยมีสัดส่วนของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 1 : 10 พบว่า ค่าพีเอชที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5.3 และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชภายนอกเซลล์อยู่ประมาณ 4.3 - 4.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าว เกิดจากการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลกติกเมื่อมีการหมักร่วมกัน แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยการหมักของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ร่วมกับ *L. plantarum* จะให้ความเป็นกรดดีที่สุด ส่วนค่าพีเอชภายในเซลล์ของสายพันธุ์ *C. milleri* จะมีค่าคงที่ ประมาณ 8.0 ในขณะที่ *S. cerevisiae* มีค่าพีเอชภายในเซลล์อยู่ในช่วง 7.3 - 7.5 และมีการเปลี่ยนแปลงตลอดการหมัก เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้น้ำตาลมอลโตสได้ โดยการใช้น้ำตาลมอลโตสต้องอาศัยการเข้าสู่เซลล์แลกเปลี่ยนกับโปรตรอน ส่งผลให้ค่าพีเอชภายในไม่คงที่เปลี่ยนแปลงตลอดและลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ *C. milleri* ส่วนโปรตอนที่ถูกส่งออกนอกเซลล์ส่งผลให้ค่าพีเอชนอกเซลล์ลดลง ดังนั้น ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถรักษาระดับความแตกต่างของพีเอชภายนอกและภายในเซลล์ได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีสต์ *C. milleri* มีค่าบัฟเฟอร์ในเซลล์และความทนต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอช รวมทั้งการเข้าออกของโปรตรอนผ่านเยื่อหุ้มพลาสมาน้อยกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* จึงกล่าวได้ว่า กลไกการเกิดกรดภายในเซลล์ของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

Prince of Songkla University Pattani Campus