บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาและเคมีของวัตถุดิบในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

4.1.1 ลูกแป้งข้าวหมาก

ปัจจุบันการผลิตลูกแป้งข้าวหมากมักเป็นไปอย่างไม่ถูกต้องตามกฎหมาย มีเพียงไม่กี่รายที่จดทะเบียนอย่างถูกต้องจากกรมสรรพสามิต ดังนั้นการเก็บรวบรวมลูกแป้งจึงต้องเป็นการเก็บตัวอย่างแบบสะสม ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ในครั้งเดียว โดยทำการเก็บรวบรวมจากชาวบ้านในจังหวัดปัตตานี จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากตำบลโคกโพธิ์ ซึ่งกำหนดให้เป็นรหัส 01 จำนวน 30 หน่วย ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง กำหนดให้เป็นรหัส 02 จำนวน 20 หน่วย และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรีกำหนดให้เป็นรหัส 03 จำนวน 35 หน่วย (รูปที่ 5) จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะทั่วไป สี และปริมาณจุลินทรีย์ จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งแต่ละแหล่งจะมีลักษณะและขนาดที่แตกต่างกัน ดังนี้ ลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์ จะมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3 ± 1 เซนติเมตร สูงเท่ากับ 2.5 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วย เท่ากับ 7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวล ลูกแป้งจากอำเภอยะหริ่ง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 ± 1 เซนติเมตร สูง เท่ากับ 1.0 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วย เท่ากับ 3.7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวลเช่นกัน และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 2.6 ± 1 เซนติเมตร สูง เท่ากับ 1.3 ± 1 เซนติเมตร น้ำหนักต่อหน่วย เท่ากับ 3.7 ± 1 กรัม มีสีขาวนวลออกคล้ำ (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาแล้วลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์มีขนาดใหญ่สุด ลูกแป้งจากสายบุรีและยะหริ่งรองลงมาตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยีสต์และราพบอยู่ในช่วง 10^4 - 10^5 CFU/g โดยลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรีมีปริมาณยีสต์และรามากที่สุด เท่ากับ 9.0×10^5 CFU/g รองลงมาได้แก่ ลูกแป้งข้าวมากจากอำเภอยะหริ่ง และอำเภอโคกโพธิ์มีปริมาณ เท่ากับ 1.55×10^4 และ 1.06×10^5 CFU/g ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกพบอยู่ในช่วง 10^4 - 10^6 CFU/g โดยลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์พบปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุด 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) สอดคลองกับผลการศึกษาของอรรณพ และคณะ (2551) ได้ศึกษาสมบัติของกล้าเชื้อลูกแป้งขนมตาลที่ผลิตเอง 7 สูตร พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดพบในช่วง 6.09 - 7.53

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

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

Prince of Songkla University Pattani Campus

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

ข้าวที่นำมาใช้เป็นข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสสูง และควรเป็นข้าวที่มีอายุการเก็บไม่ต่ำกว่า 4 เดือน จะทำให้ขนมขึ้นฟูและนุ่ม (กนก , 2542) จึงเลือกใช้ข้าวพันธุ์ชัยนาท อายุประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี ซึ่งในการเตรียมแป้งสดใช้วิธีการแบบโม่เปียก ส่งผลให้ตัวอย่างแป้งข้าวเจ้าสดในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้านมีความชื้นอยู่สูง 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 หลังจากนั้นนำไปโม่เปียกและทับให้แป้งแห้งนั้น เนื่องมาจากข้าวที่นำมาใช้แต่ละพันธุ์ จะมีโปรตีนในข้าวชนิดที่ละลายน้ำได้ เรียกว่า อัลบูมิน มีแตกต่างกันและจะสูญเสียไประหว่างการล้างและแช่ข้าว (สุภรัตน์ และคณะ, 2534) ขณะที่ข้าวพันธุ์ชัยนาทซึ่งผ่านการโม่เปียก และอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกัน แต่ปริมาณไขมัน โปรตีน เถ้า มีองค์ประกอบทางเคมีของแป้งไม่แตกต่างกัน บุญทิวา (2548)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเจ้าสดที่ผลิตแบบโม่เปียก

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 $1.4x10^{8}$ CFU/g กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ $1.3\ x10^{8}$ CFU/g และพบยีสต์และราปริมาณ เท่ากับ $3.1x10^{2}$ CFU/g ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการผลิตขนมจีนของสุพรรณิการ์ (2548) ที่มีกระบวนการผลิตใกล้เคียงกัน คือ พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ $5.80\ x10^{9}$ CFU/g ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ $4.70\ x10^{9}$ CFU/g และปริมาณยีสต์และรา $8.27x10^{5}$ CFU/g โดยพบแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุดในขั้นตอนการผลิตแป้งหมักการที่แบคทีเรียกรดแลกติกเจริญได้ดีในแป้งข้าวเจ้าสด เนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลกติก มีกลไกการย่อยแป้ง คือ หลังจากแป้งถูกย่อยจนได้เป็นน้ำตาลมอลโตส จากนั้นน้ำตาลมอลโตสถูกส่งเข้าสู่เซลล์เมนเบรนภายในเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก และถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา- กลูโคซิเดส (α-glucosidase) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสุดท้ายจะได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดอินทรีย์ เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Santoyo *et al.,* 2003) กรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติก เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดโพรไพโอนิก โดยสารเหล่านี้สร้างสภาวะความเป็นกรด ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลต่อรสชาติ และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ (สุพรรณิการ์, 2548) ดังนั้น ในแป้งข้าวเจ้าสดจึงพบแบคทีเรียกรดแลกติกได้สูง

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

ตารางที่ 6 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมี ในแป้งข้าวเจ้าสดที่ผลิตแบบโม่เปียก

คุณภาพของแป้งข้าวเจ้าสด	ผลการทดลอง	สุพรรณิการ์ (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 Titrateable Acidity;ร้อยละ TTA)	0.36	-

4.1.3 น้ำตาลโตนดเข้มข้น

น้ำตาลโตนดเข้มข้นที่นำมาศึกษาเป็นตัวอย่างน้ำตาลโตนดเข้มข้นซึ่งจัดซื้อจากร้านค้าจากอำเภอยะหริ่ง มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีน้ำตาลเข้ม ข้นเหนียว 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 ส่วนผลการวิเคราะคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่า น้ำตาลโตนดเข้มข้นก่อนการพาสเจอไรส์ มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 1.3×10^3 CFU/ml จำนวนยีสต์และราเท่ากับ 1.15×10^2 CFU/ml และจำนวนยีสต์ เท่ากับ 25 CFU/ml โดยยีสต์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มออสโมฟิลิกยีสต์ (Osmophilic yeast) ขณะที่น้ำตาลโตนดหลังการพาสเจอไรส์ มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าก่อนการพาสเจอไรส์ โดยพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 2.8×10^2 CFU/ml จำนวนยีสต์และราเท่ากับ 25 CFU/ml และจำนวนยีสต์ เท่ากับ 30 CFU/ml ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ของน้ำตาลโตนดเข้มข้นไม่เกินมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ชุมชน (2546) โดยกำหนดให้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5×10^2 CFU/g และยีสต์และรา ต้องไม่เกิน10^2 CFU/g แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนด เป็นไปได้ว่าการพาสเจอไรส์เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูง เป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่ทนทานต่อความร้อนต่ำ แต่ไม่ได้ทำลายหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด จึงพบปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ นอกจากนี้การเก็บรักษาที่สะอาด ถูกสุขลักษณะทำให้พบปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำตาลโตนดที่วิเคราะห์ได้ไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ เคมี และกายภาพของน้ำตาลโตนดเข้มข้น และน้ำตาลโตนดเข้มข้นพาสเจอไรส์

คุณภาพของน้ำตาลโตนด	น้ำตาลโตนด	น้ำตาลโตนดผ่านการพาสเจอไรส์	Phaichamnan *et.al* (2010)
คุณภาพทางจุลินทรีย์ (CFU/ml)			
จุลินทรีย์ทั้งหมด	$1.3x10^3$	$2.8x10^2$	$1.2x10^3 – 4.8x10^6$
ยีสต์และรา	$1.15 x10^2$	25	$1.3x10^2 – 5.3x10^4$
ออสโมฟิลิก ยีสต์	25	30	$2.0x10^2 – 1.46x10^5$
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 โดยมีค่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมที่กำหนดให้มีค่าไม่ต่ำ 65 องศาบริกซ์ ส่งผลทำให้ความชื้นในน้ำตาลโตนดต่ำ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้องได้ นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด และค่า pH ของน้ำตาลโตนดเข้มข้นต่ำ ทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์มาสูง ส่งผลให้ไม่มีการเสื่อมเสียเกิดขึ้นหรือเกิดจากการหมักในส่วนบนของผิวหน้าน้ำตาลโตนดเข้มข้น (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 และลูกแป้งข้าวหมาก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกพบในแป้งข้าวเจ้าสดเป็นแหล่งสำคัญ ยีสต์และราพบมากในลูกแป้งข้าวหมาก โดยน้ำตาลโตนดเข้มข้นทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน ช่วยให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีในการผลิตขนมถ้วยฟู

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2 การคัดเลือกกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

4.2.1 การเตรียมตัวอย่างกล้าเชื้อ

ลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง และลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี เมื่อนำมาใช้ผลิตเป็นกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน โดยใช้แป้งข้าวเจ้าสด ลูกแป้งข้าวหมาก น้ำตาลโตนด และน้ำ ในอัตราส่วน (โดยน้ำหนัก) 42 : 5 : 25 : 25 กรัม ผสมรวมกันและหมักที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กล้าเชื้อที่ได้มีลักษณะเหลวข้น มีสีขาวนวล และมีฟองอากาศลอยอยู่บนผิวหน้าของกล้าเชื้อ ซึ่งอุณหภูมิขณะหมักอยู่ในช่วง 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 5 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียกรดแลกติก ในช่วง 10^7 - 10^8 CFU/g โดยพบมากที่สุดในกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรี เท่ากับ 3.1 x 10^8 และ 1.4 x 10^8 CFU/g ตามลำดับ ส่วนปริมาณยีสต์พบในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g โดยในกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์มากที่สุด เท่ากับ 1.2 x 10^7 CFU/g และเชื้อยีสต์และรา พบในช่วง 10^6-10^7 CFU/g พบในกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอยะหริ่งมากที่สุด เท่ากับ 4.0 x10^7 CFU/g ดังตารางที่ 8

รูปที่ 5 กล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมากจาก ลูกแป้งจากอำเภอโคกโพธิ์ (A), ลูกแป้งจากอำเภอยะหริ่ง (B) และลูกแป้งจากอำเภอสายบุรี (C)

Prince of Songkla University Pattani Campus

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 Titrateable 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 ในตัวอย่างกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรีมีปริมาณกรดมากสุด เท่ากับ ร้อยละ 0.89 รองลงมาได้แก่ กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งและอำเภอโคกโพธิ์มีค่า เท่ากับร้อยละ 0.81 และ 0.78 ตามลำดับ ค่า pH และค่าความเป็นกรดของกล้าเชื้อไม่ได้เป็นในแนวโน้มเดียวกัน นั้นเป็นเพราะค่า pH เป็นค่าที่วัดความเป็นกรด – ด่างของตัวอย่างซึ่งยืนยันค่าของกรดอินทรีย์ที่เกิดทั้งหมด (Vernocchi *et al*., 2004) ขณะที่ค่าความเป็นกรดในตัวอย่างนั้นเป็นการเทียบเฉพาะกรดแลกติกเท่านั้น

การเปลี่ยนแปลงของค่า pH และความเป็นกรดของกล้าเชื้อในระหว่างการเตรียม พบว่ามีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 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 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 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 สั้น ผลิตจำนวนเซลล์และกรดได้ดี (Santoyo *et al.*, 2003) ปริมาณเชื้อของกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง เมื่อนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากจำนวนเชื้อที่พบในลูกแป้งข้าวหมากซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาใช้ แบคทีเรียกรดแลกติก และปริมาณ

Prince of Songkla University Pattani Campus

จุลินทรีย์ทั้งหมด เพิ่มจำนวนขึ้นในอัตราส่วน 1 : 1000 เท่า ขณะที่ยีสต์และราเพิ่มจำนวนเป็น 1 : 100 เท่า และเมื่อเทียบอัตราส่วนของแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ในตัวอย่างกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 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 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกมีจำนวนเริ่มต้น มีปริมาณ 10^7 เพิ่มเป็น 10^9 CFU/g โดยสามารถเพิ่มเป็น 100 เท่า ขณะที่ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นเท่ากับ10^6 เพิ่มเป็น 10^7 - 10^8 CFU/g โดยสามารถเพิ่มเป็น 10 เท่า และอัตราส่วนที่พบแบคทีเรียแลกติกต่อยีสต์ในตัวอย่าง คือ 10 : 1 เท่า เนื่องมาจาก การขยายเชื้อโดยวิธีนี้เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรด สามารถเจริญและผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกจึงสามารถเจริญได้ดี ส่วนยีสต์ที่เจริญได้ในตัวอย่างจึงเป็นกลุ่มที่ทนต่อกรดและสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ด้วย เช่นเดียวกับ Vernocchi *et al.* (2004) รายงานว่าจากการวิเคราะห์ผลทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างที่เก็บในการผลิตขนมปังซอร์โดของประเทศอิตาลี ตั้งแต่กล้าเชื้อ (Mother sponge) ตัวอย่างก่อนและหลังการทำการขยายเชื้อ (Refreshment I, II) ตัวอย่างก่อนและหลังการเกิดโด (Dough I, II) และก่อนและหลังการขึ้นฟู โดยพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกมากกว่ายีสต์ประมาณ 1 log cycle หรือประมาณ 10 เท่า

อัตราส่วนนี้ส่งผลดีต่อลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์ โดยเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมของจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่น กรดอินทรีย์แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งเอทานอล โดย ปริมาณยีสต์หลังหมัก เท่ากับ 10^7 CFU/g สามารถทำขนมถ้วยฟูเป็นแฉกได้ดี หากยีสต์เพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าเป็น 10^8 CFU/g จะผลิตเอทานอล ออกมาระหว่างการหมัก ผลของเอทานอล ส่งผลต่อแบคทีเรียกรดแลกติก ทำให้โปรตีนเอนไซม์เสียสภาพ และยังเป็นตัวทำละลายเอาไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ออก จึงทำให้โครงสร้างเซลล์ถูกทำลาย จึงส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (กนก, 2542) ขณะที่ Luangsakul *et al.* (2009) ทำการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ในกล้าเชื้อทำซาลาเปาจากตัวอย่างร้านค้า 4 แห่ง ในประเทศไทย พบแบคทีเรียกรดแลกติกในช่วง 10^4 - 10^8 CFU/g และเชื้อยีสต์พบในช่วง 0 - 100 CFU/g โดยอัตราส่วนของ ยีสต์ และ แบคทีเรียกรดแลกติก คือ 1 : 1000 จึงเติมยีสต์ทางการค้าภายหลังเพื่อช่วยให้ซาลาเปามีลักษณะการขึ้นฟูตามต้องการ นอกจากนี้อัตราส่วนดังกล่าว ส่งผลให้กล้าเชื้อขนมถ้วยฟูมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0 - 5.3 และลดลงเรื่อยๆ จนถึง 4. 0 เมื่อใช้ระยะเวลานานขึ้น ซึ่งค่า pH ดังกล่าวเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่หมักร่วมกัน โดยค่า pH ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของยีสต์ที่อยู่หมักร่วมกัน (Valmorri *et al.*, 2008)

Prince of Songkla University Pattani Campus

เมื่อพิจารณาการผลิตกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูจากลูกแป้งข้าวหมาก ซึ่งหมักรวมกับวัตถุดิบอื่นๆ เช่น แป้งและน้ำตาลโตนด โดยในกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากมีลักษณะเป็นแป้งเชื้อเดิม ใกล้เคียงกับการผลิตขนมปังเปรี้ยวแบบดั้งเดิม หรือแป้งเปรี้ยวชนิดที่ 1 (Sourdough Type I) ซึ่งใช้จุลินทรีย์ในธรรมชาติ หรือแป้งเชื้อเดิม (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)

ในการผลิตกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูต้องการแป้งที่บดละเอียด ไม่ผ่านความร้อนเพื่อให้กระบวนการย่อยแป้งจากจุลินทรีย์ยังคงมีอยู่ เมื่อเติมน้ำจุลินทรีย์ที่อยู่ในแป้งจะเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม และมีผลให้จุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น กรดแลกติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กลิ่นรสหมัก และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Hammes *et al.*, 2005) ในกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูซึ่งพบทั้งแบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์ เป็นส่วนใหญ่ สารผลิตภัณฑ์จึงเป็นกรดและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กล้าเชื้อจึงมีสภาวะที่เป็นกรด มีกลิ่นรสหมัก และเกิดฟองอากาศบริเวณบนผิวหน้าของกล้าเชื้อ

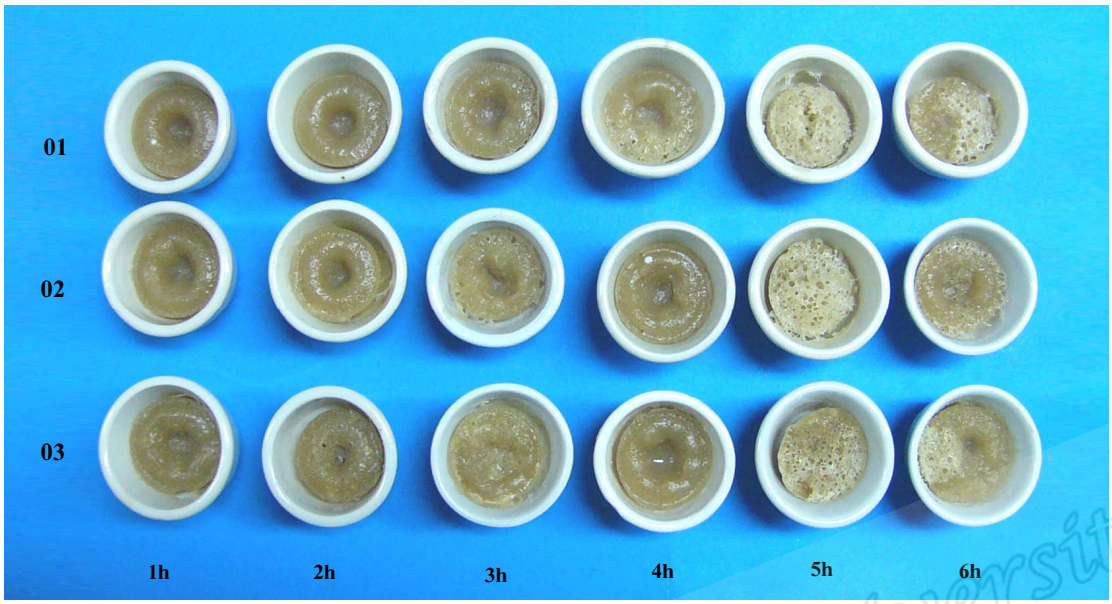
4.2.2 การผลิตขนมถ้วยฟู

เตรียมส่วนผสมของขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน ประกอบด้วย แป้ง ข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนด น้ำ และกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้านที่เตรียมไว้จากข้อ 4.2 ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 : 10 ผสมรวมกันและนำไปหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส) และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์ เคมี และทางกายภาพ ทุก ๆ ชั่วโมง

4.2.2.1 การหมักขนมถ้วยฟูที่อุณหภูมิห้อง

ขนมถ้วยฟูซึ่งหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส) พบว่า ขนมถ้วยฟูมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักเล็กน้อย รสหวานปานกลาง มีลักษณะการขึ้นฟูน้อย โดยในชั่วโมงที่ 1 - 4 ขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูน้อยมาก ขณะที่ในชั่วโมงที่ 5 ขนมถ้วยฟูมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักจากกรดเล็กน้อย รสหวานปานกลาง ฟูปานกลาง ผิวหน้าแตกเป็นแฉกเล็กน้อย (รูปที่ 6)

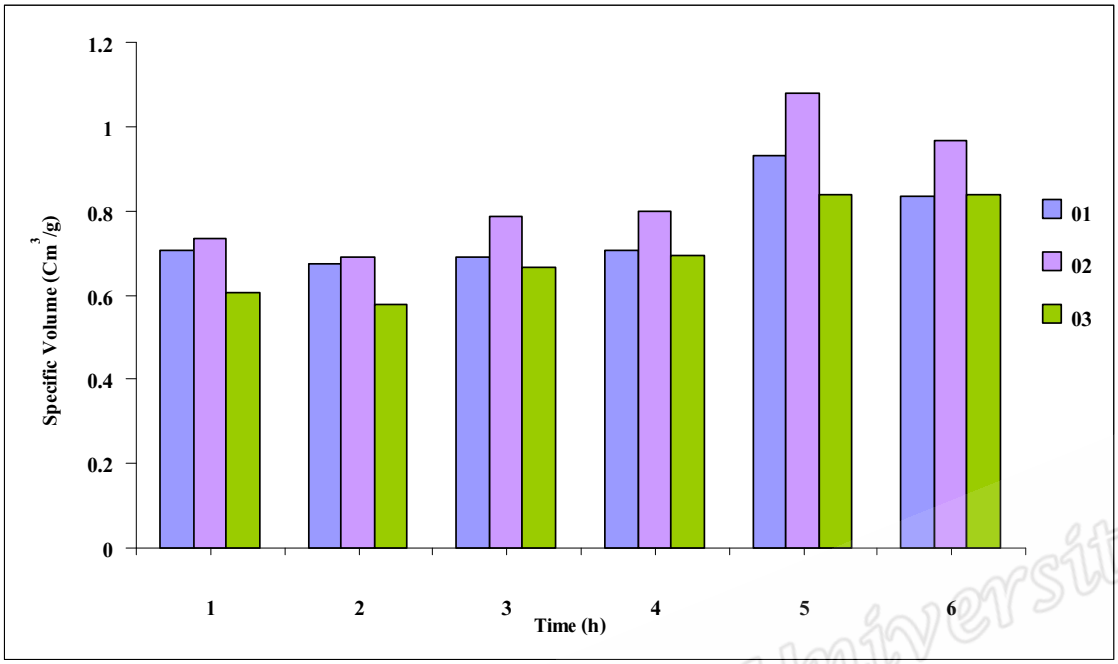
Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 6 ลักษณะของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก และระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส)

เมื่อวัดปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูซึ่งผลิตจากลูกแป้งข้าวหมากที่ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องโดยขนมถ้วยฟูที่ 1 - 4 มีปริมาตรการขึ้นฟูน้อย อยู่ในช่วง 0.67 - 0.70 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ขณะที่ในชั่วโมงที่ 5 มีลักษณะการขึ้นฟูปานกลาง โดยขนมถ้วยฟูมีปริมาตรการขึ้นฟู ในช่วง 0.83 - 1.07 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม เมื่อเปรียบเทียบขนมถ้วยฟูที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ พบว่า ขนมถ้วยฟูที่หมักในเวลา 5 ชั่วโมงมีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉก โดยขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอยะหริ่ง มีปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุดคือ 1.07 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม รองลงมาได้แก่ ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีและโคกโพธิ์ มีปริมาตรการขึ้นฟู เท่ากับ 0.92 และ 0.83 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 7)

Prince of Songkla University Pattani Campus



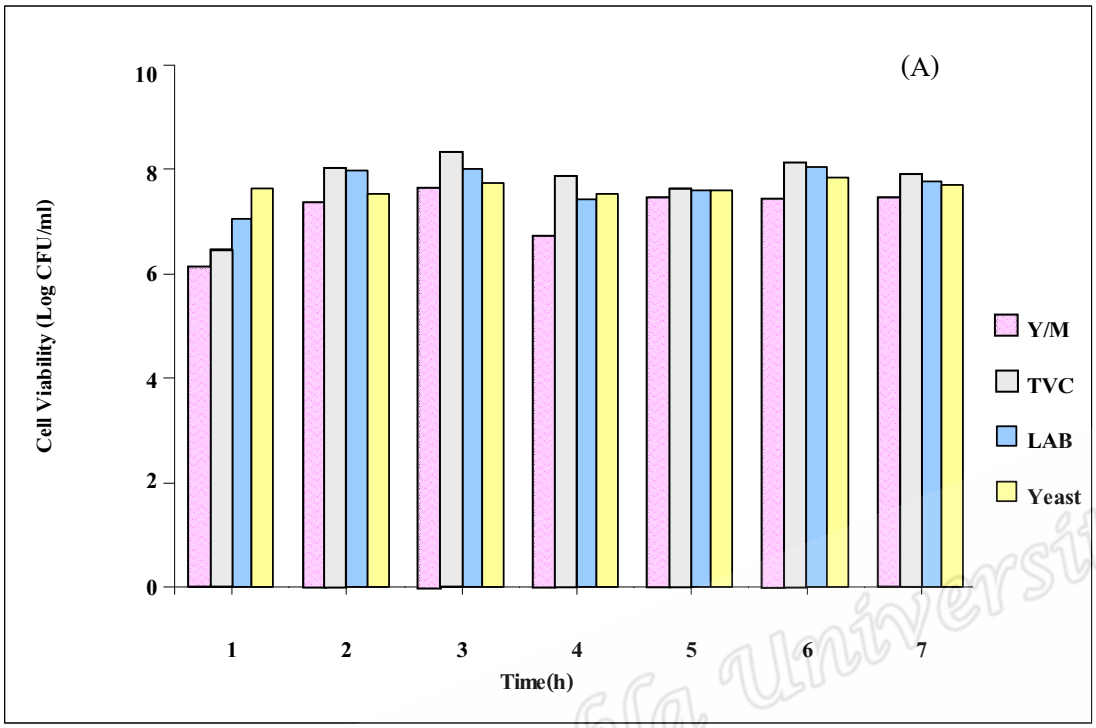
รูปที่ 7 ปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง

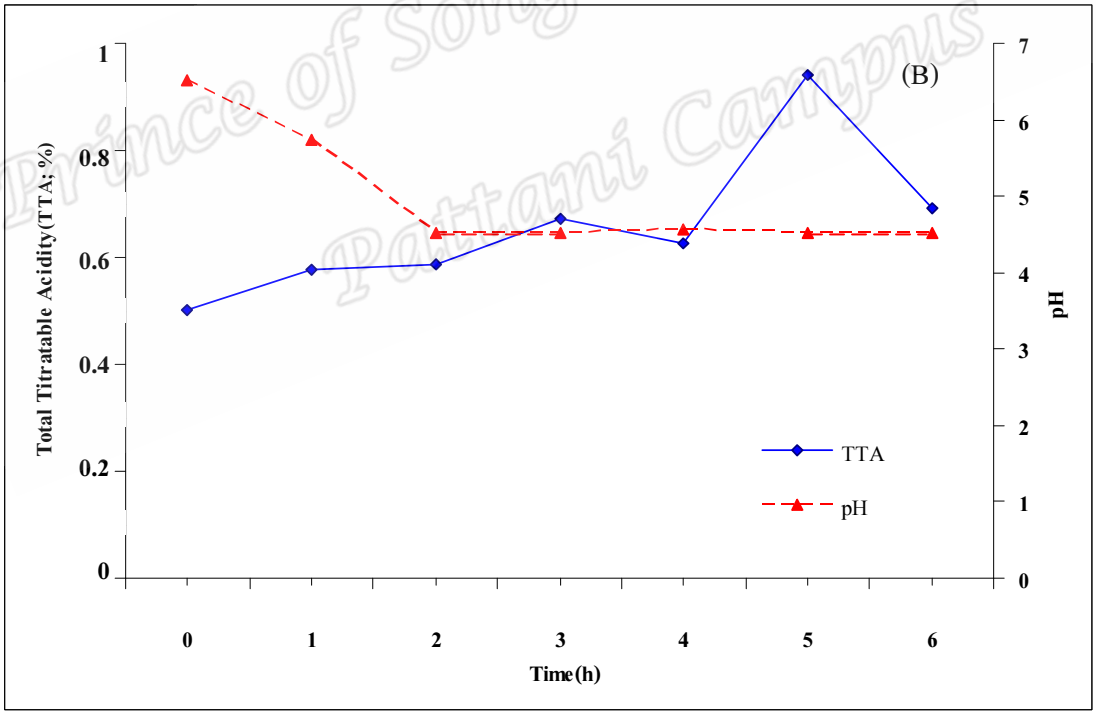
ผลของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของแป้งในระหว่างการหมักเพื่อผลิตขนมถ้วยฟูด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง ในการหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 1 - 6 ชั่วโมง พบว่า จุลินทรีย์หลังหมักของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง 10^7 - 10^8CFU/g ยีสต์และรา ในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g ยีสต์ในช่วง 10^7 CFU/g และแบคทีเรียกรดแลกติกในช่วง 10^7 - 10^8 CFU/gโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ (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 ในระหว่างการหมักขนมถ้วยฟู โดยค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงมากในชั่วโมงที่ 2 และคงที่จนเสร็จสิ้นการหมักชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.52 - 5.73 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ระยะเวลาการหมักนานขึ้น และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 ซึ่งมีค่าในช่วงร้อยละ 0.58 - 0.94 (รูปที่ 8) โดยเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 5 ของการหมัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ 1.1 x 10^8 และ 7.0 x 10^7 CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 ดังนั้นการผลิตขนมถ้วยฟูต้องอาศัยส่วนประกอบ แป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนด น้ำ และกล้าเชื้อขนมถ้วยฟู อัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการหมักที่ดีและได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลกติก ยีสต์และรา ซึ่งการหมักในช่วงแรก พบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง การสร้างสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กรดอินทรีย์ จึงมีสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสภาวะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.9 ขณะที่ยีสต์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดการสร้างและสะสมสารผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล จึงส่งผลต่อขนมถ้วยฟูให้มีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5

Prince of Songkla University Pattani Campus





Prince of Songkla University Pattani Campus

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

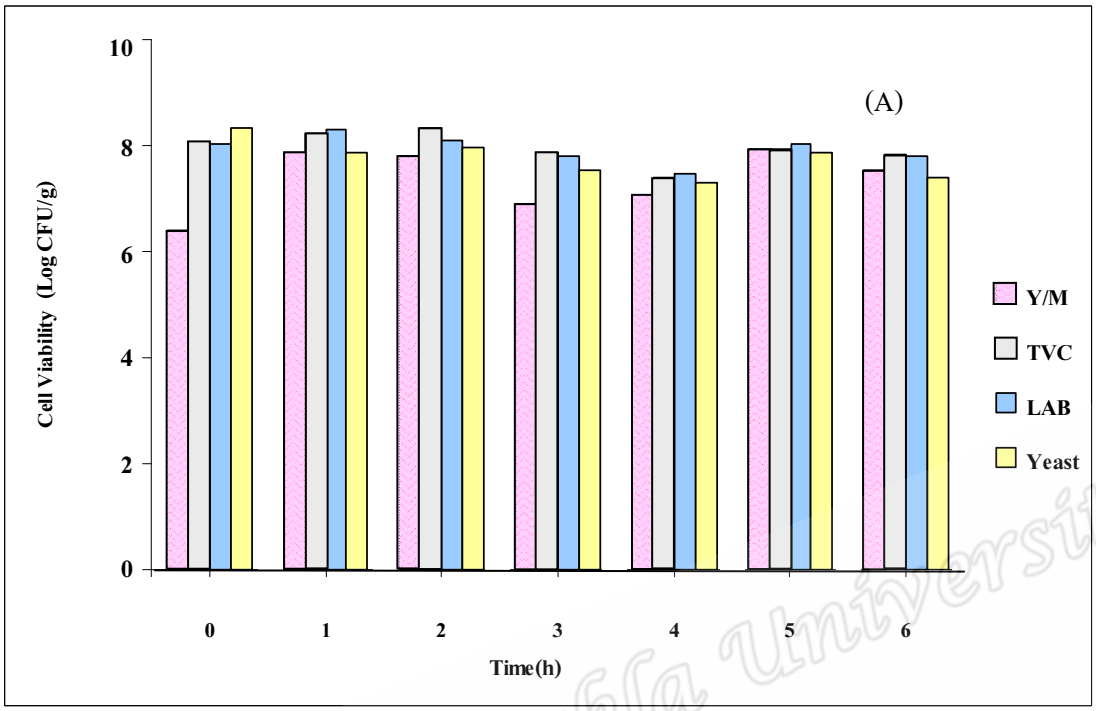
การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งในระหว่างการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 พบว่า จุลินทรีย์มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 5 และมีปริมาณน้อยสุดในชั่วโมงที่ 4 โดยจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงเริ่มต้น ยกเว้นยีสต์ เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 2 จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย 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)

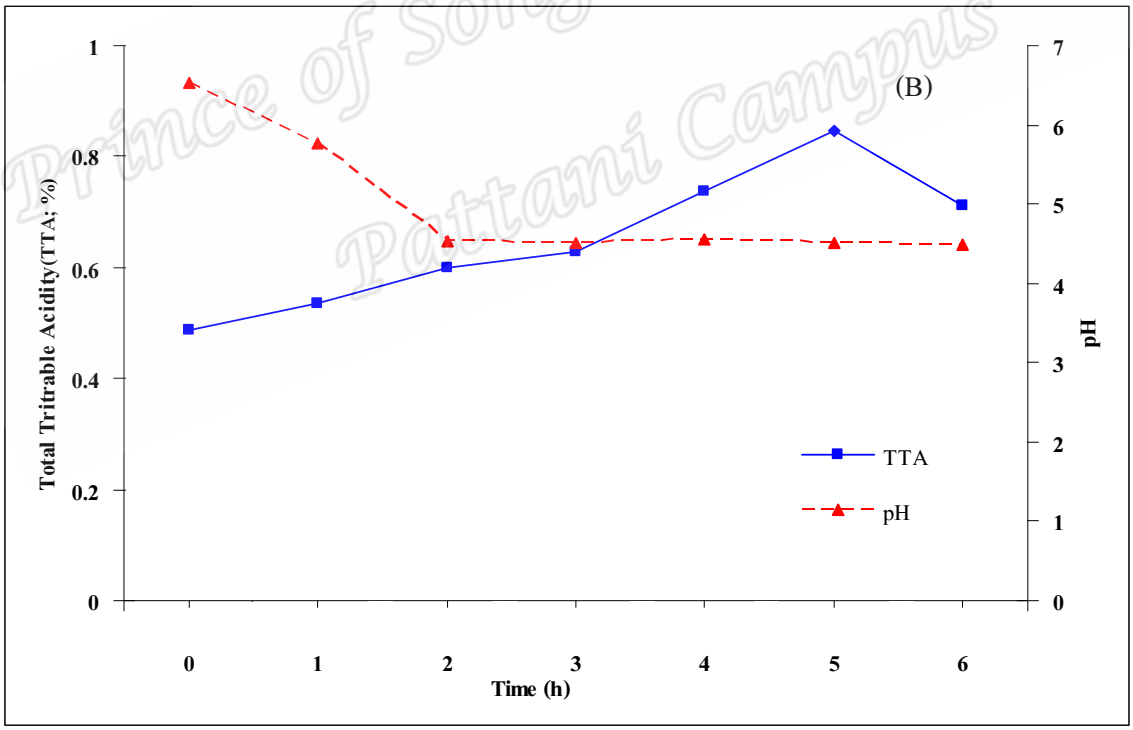
โดยเมื่อพิจารณาในชั่วโมงที่ 5 ของการหมัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ $1.0x10^8$ และ $7.5x10^7$ CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง กรดแลกติกจึงมีปริมาณสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสภาวะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.8 และขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5 เช่นกัน

ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 1 - 6 ของขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรี 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 และยีสต์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ $1.2x10^8$ และ $6.5x10^7$ CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 10 : 1 โดยมีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกสูง กรดแลกติกจึงมีปริมาณสูงเช่นกัน ขนมถ้วยฟูจึงมีสภาวะเป็นกรดโดยมีค่า pH 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.72 ส่งผลให้ขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูได้ดีในชั่วโมงที่ 5 เช่นกัน

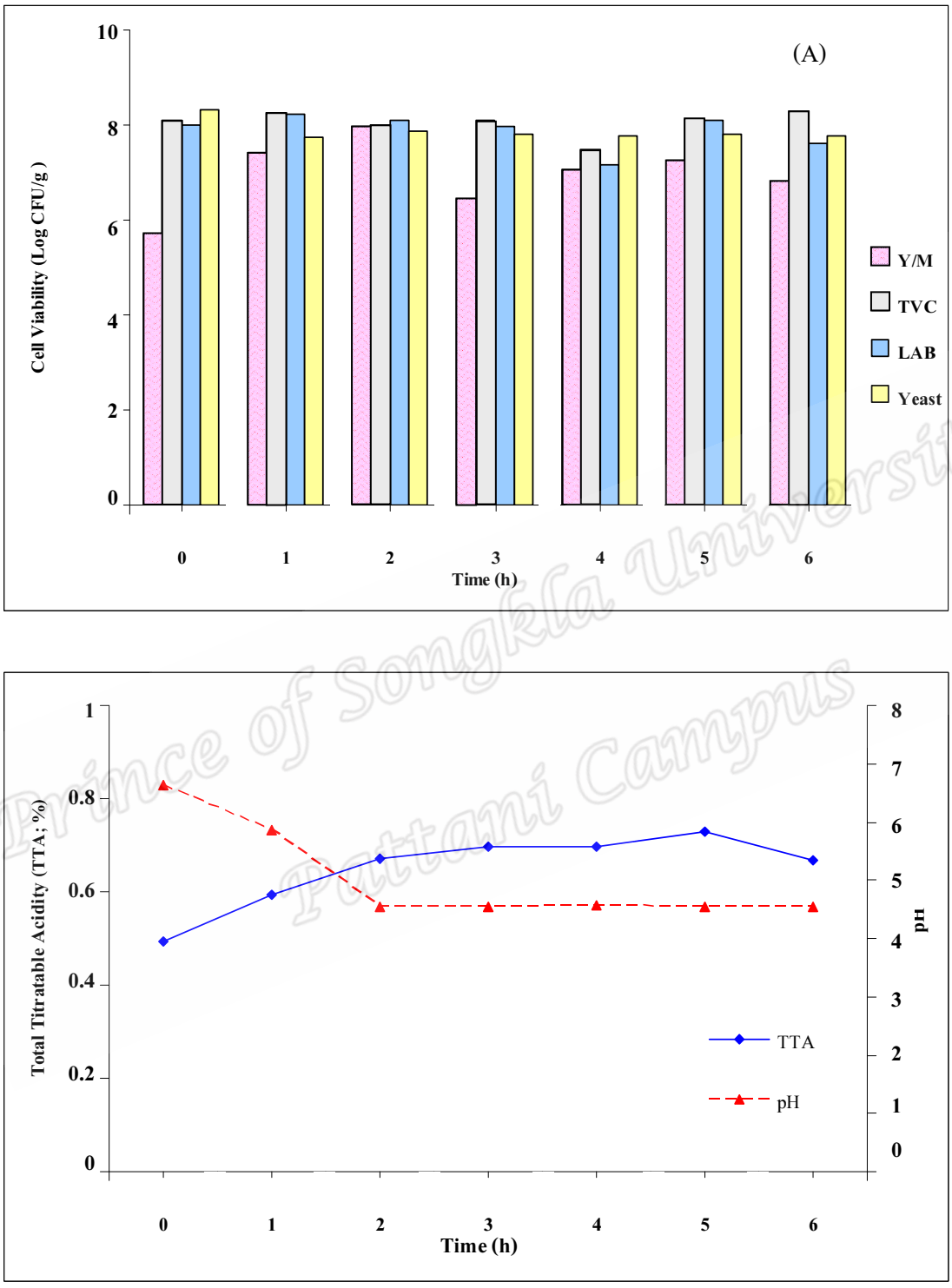
Prince of Songkla University Pattani Campus





Prince of Songkla University Pattani Campus

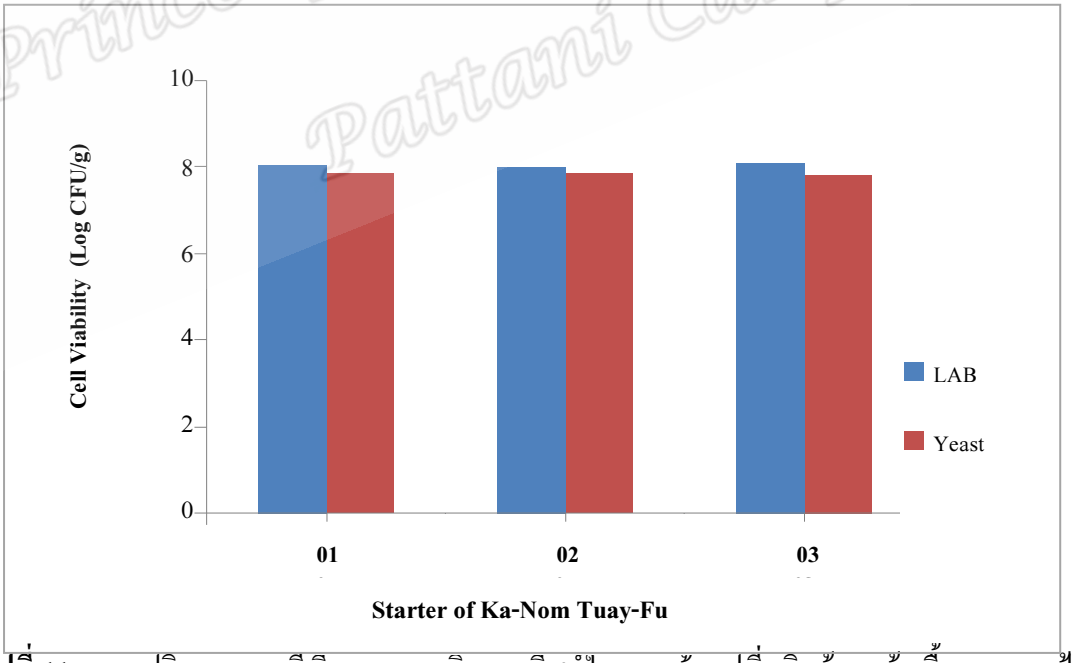
รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาต่าง ๆ



Prince of Songkla University Pattani Campus

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

เมื่อวิเคราะห์ในชั่วโมงที่ 5 ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งพบปริมาณยีสต์สูงสุด คือ 7.50 x 10^7 CFU/g รองลงมาได้แก่ ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอโคกโพธิ์ และ สายบุรี มีปริมาณเท่ากับ 7.0 x 10^7 และ 6.50 x 10^7 CFU/g ตามลำดับ ขณะแบคทีเรียกรดแลกติกมีปริมาณสูงสุดจากขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี คือ 1.26 x 10^8 CFU/g รองลงมาได้แก่ ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอโคกโพธิ์ และยะหริ่ง มีปริมาณเท่ากับ 1.10 x 10^8 และ 1.05 x 10^8 CFU/g ตามลำดับ (รูปที่ 11) ขณะเดียวกันขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีมีค่าความเป็นกรดน้อยที่สุด ซึ่งการมีค่าความเป็นกรดแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative มีกระบวนการหมักที่ผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 80 และกลุ่ม Heterofermentative มีกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติกได้เพียงร้อยละ 50 และจะได้สารผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล แอซีเทต กลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (สุพรรณิการ์, 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 จะมีการขึ้นฟูเพียงร้อยละ17 (Haggman and Salovaara, 2008)

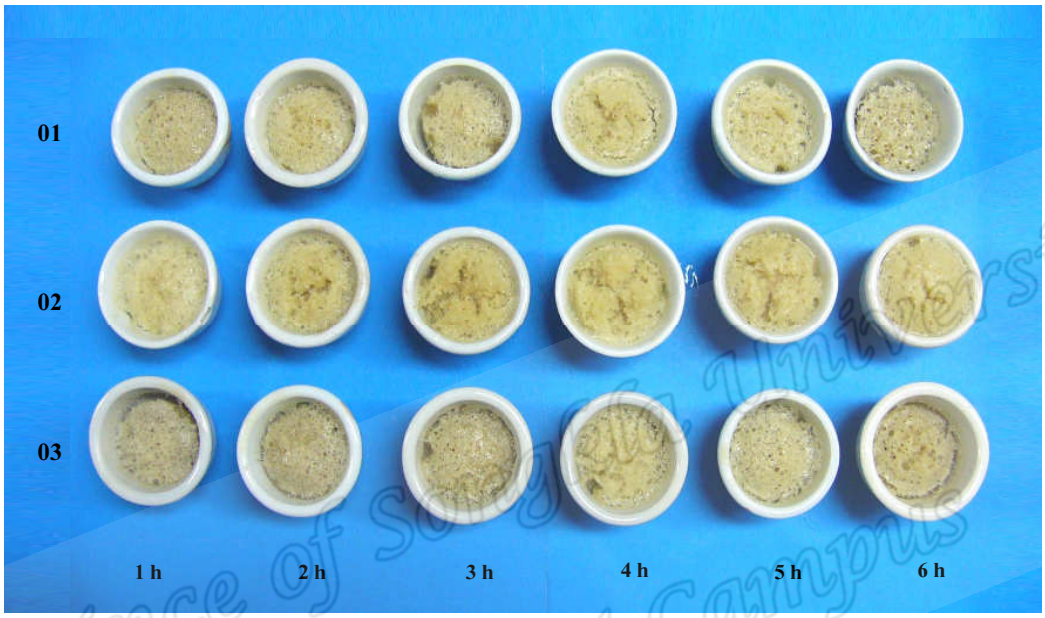


รูปที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์ในขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากของอำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.2.2.1 การหมักขนมถ้วยฟูที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

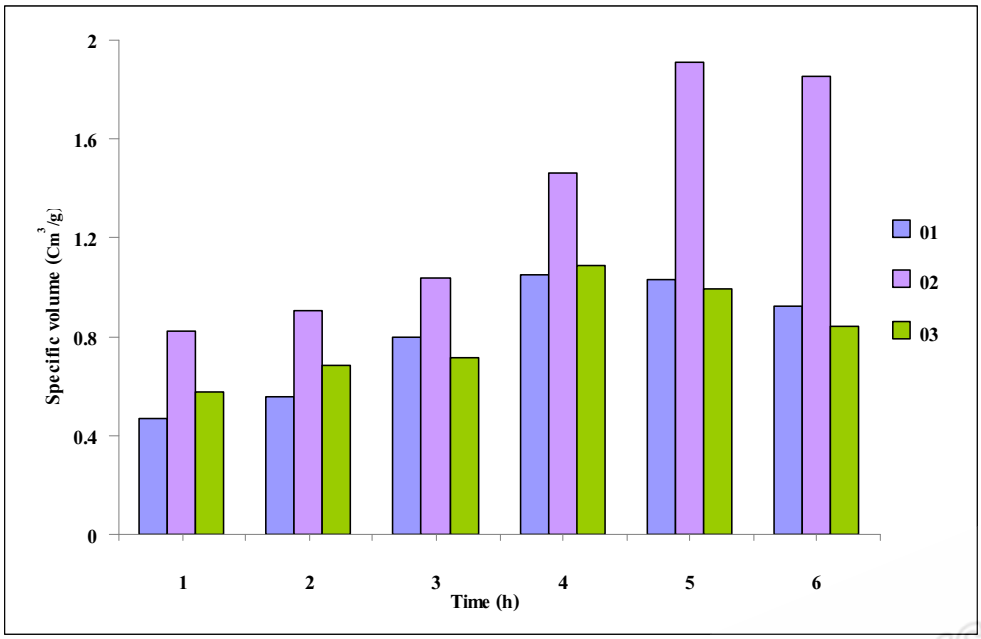
เมื่อนำกล้าเชื้อจากอำเภอโคกโพธิ์ อำเภอยะหริ่ง แลอำเภอสายบุรี มาผลิตขนมถ้วยฟูที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ขนมถ้วยฟูมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหมักเล็กน้อย รสหวานปานกลาง มีลักษณะการขึ้นฟูดี โดยในชั่วโมงที่ 1-3 ขนมถ้วยฟูมีลักษณะขึ้นฟูน้อย ขณะที่ในชั่วโมงที่ 4-5 มีลักษณะการฟูมาก ผิวหน้าแตกเป็นแฉกดี (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ลักษณะของขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เมื่อวัดปริมาตรการขึ้นฟูขนมถ้วยฟูที่ทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 1 - 3 มีปริมาตรการขึ้นฟู ในช่วง 0.7 - 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม ขณะที่ในชั่วโมงที่ 4 - 5 มีลักษณะการฟูมาก ผิวหน้าแตกเป็นแฉก โดยขนมถ้วยฟูมีปริมาตรการขึ้นฟู ในช่วง 0.84 - 1.91 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม เมื่อเปรียบเทียบขนมถ้วยฟูที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ พบว่า ขนมถ้วยฟูที่ได้จากการหมักที่ 4 ชั่วโมง มีลักษณะการขึ้นฟูดี ผิวหน้าแตกเป็นแฉกดี ในระยะเวลาสั้น โดยขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง มีปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุดคือ 1.46 ลูกบาศก์เซนติเมตร/ กรัม รองลงมาได้แก่ ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีและโคกโพธิ์ มีปริมาตรการขึ้นฟู เท่ากับ 1.02 และ 0.90 ลูกบาศก์เซนติเมตร/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 13)

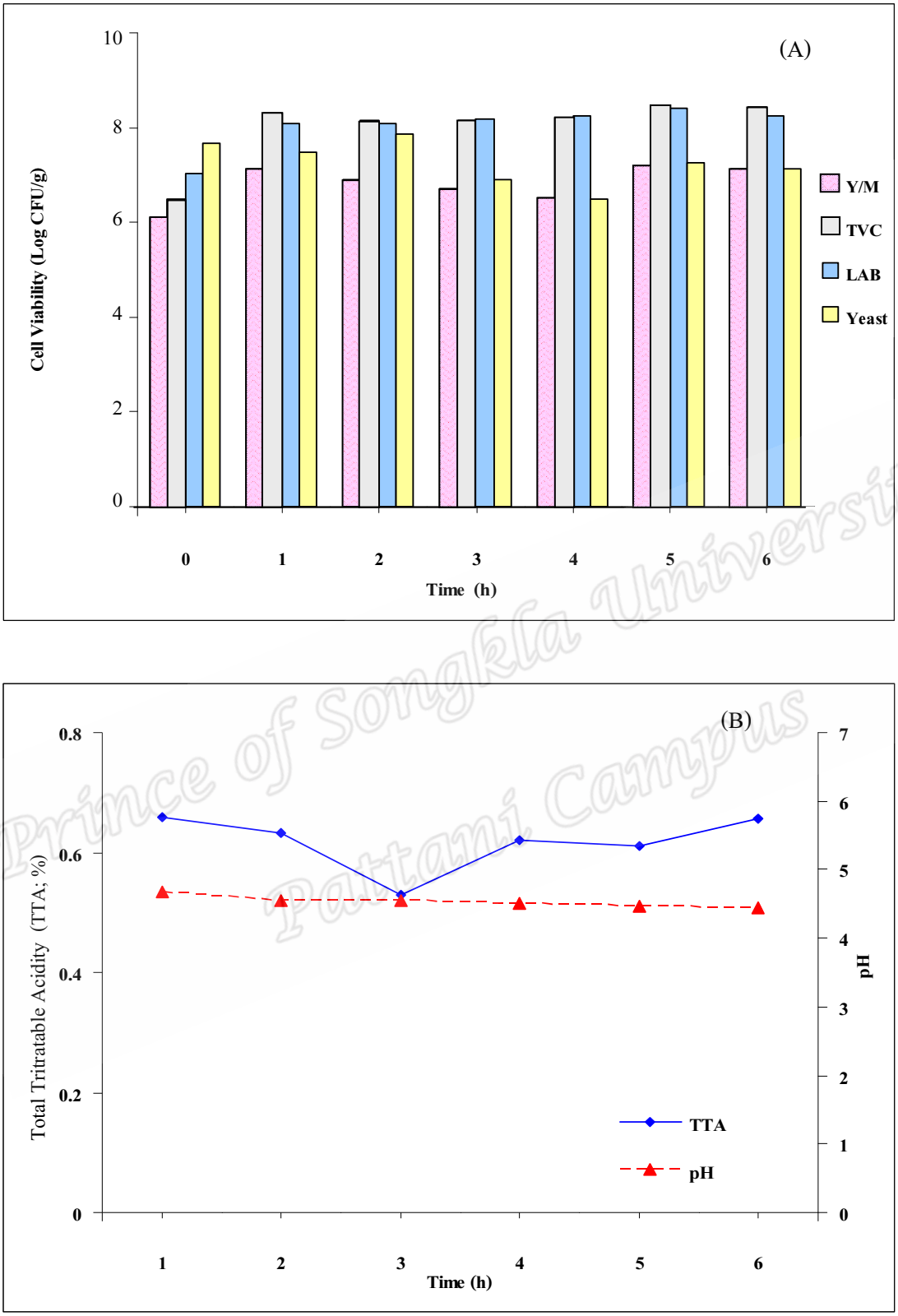
Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากที่ผลิตจากกล้าเชื้ออำเภอโคกโพธิ์ (01) อำเภอยะหริ่ง (02) และอำเภอสายบุรี (03) ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลซียส

ผลของการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของแป้งในระหว่างการหมักเพื่อผลิตขนมถ้วยฟูด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งทั้ง 3 แหล่ง ในการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 - 6 ชั่วโมง หลังหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งพบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง 10^8 CFU/g ยีสต์และรา พบในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g ยีสต์พบในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g และแบคทีเรียกรดแลกติกพบในช่วง 10^8 CFU/g โดยการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ในระหว่างการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 14) พบว่าจากเริ่มต้น (ชั่วโมง ที่ 0) จุลินทรีย์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นยีสต์และรา และเชื้อยีสต์ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 4 เนื่องจากยีสต์บางสายพันธุ์ที่มาจากวัตถุดิบการผลิตไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด จึงส่งผลให้ยีสต์และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ลดลงคงไว้เฉพาะสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีเท่านั้น จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนขึ้นในชั่วโมงที่ 5 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ขณะที่จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 5 ค่า pH ในระหว่างการหมักของขนมถ้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.44 - 4.67 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.52 - 0.65 ซึ่งในชั่วโมงที่ 3 ปริมาณกรดลดลงเหลือร้อยละ 0.52 (รูปที่ 14) เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ค่า pH ลดลง และค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบจึงคงที่หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยขณะที่ยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงโดย เมื่อเวลาที่หมักนานขึ้นจำนวนยีสต์จะลดลง

Prince of Songkla University Pattani Campus



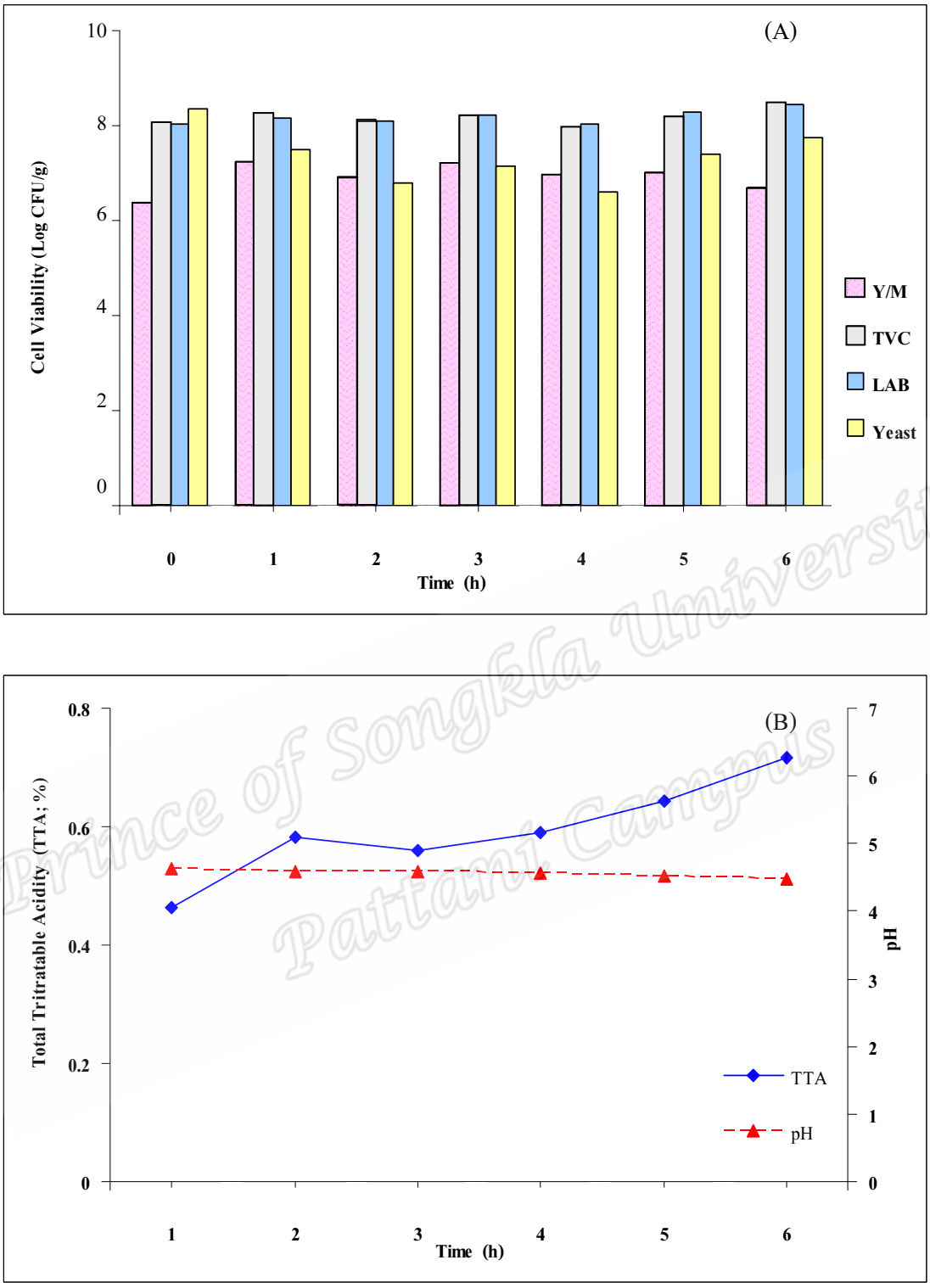
Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่าง ๆ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งในระหว่างการหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 15) พบว่า จากชั่วโมงเริ่มต้นจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3 และลดจำนวนขึ้นในชั่วโมงที่ 4 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 5 และ 6 มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ค่า pH ในระหว่างการหมักของขนมถ้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.46 - 4.62 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.46 - 0.67 (รูปที่ 15)

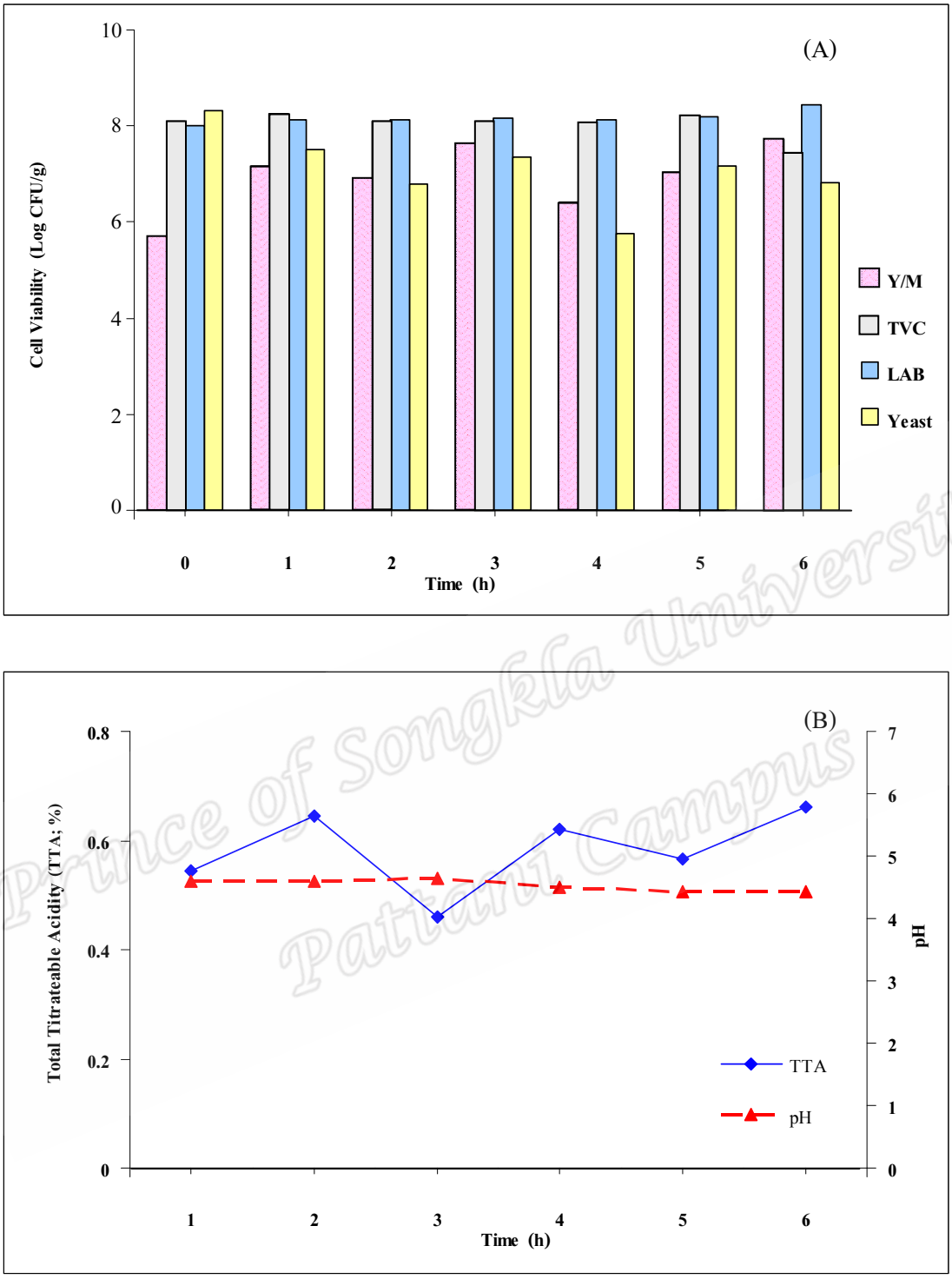
ขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรีในระหว่างการหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 - 6 (รูปที่ 16) พบว่า จากชั่วโมงเริ่มต้น จุลินทรีย์มีปริมาณลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 2 จากนั้นจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 3 เล็กน้อย และลดปริมาณลงในชั่วโมงที่ 4 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 5 มีปริมาณเพิ่มขึ้นและคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ค่า pH ในระหว่างการหมักของขนมถ้วยฟู มีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่า pH ในช่วง 4.44 - 4.65 ขณะที่ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละกรดแลกติกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยโดยมีค่าในช่วงร้อยละ 0.46 - 0.64 ซึ่งในชั่วโมงที่ 3 ปริมาณกรดลดลงเหลือร้อยละ 0.46 (รูปที่ 16)

โดยเมื่อพิจารณาการหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ $1.79x10^{8}$ และ $3.0x10^{6}$ CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 100 : 1 ส่วนในการหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก และยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ $1.09\ x10^{8}$ และ $4.0x10^{6}$ CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 100 : 1 ขณะที่การหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกและยีสต์มีจำนวนสูงสุด เท่ากับ $1.31x10^{8}$ และ $6.0x10^{5}$ CFU/g ตามลำดับ อัตราส่วนที่พบ คือ 1000 : 1 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญในอุณหภูมิสูง ช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส จึงสามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ได้ดี โดยมีค่า pH เท่ากับ 4.5 และมีค่าความเป็นกรด เท่ากับร้อยละ 0.60 - 0.64 ขณะที่ยีสต์เจริญในอุณหภูมิช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส จำนวนยีสต์และสารผลิตภัณฑ์จึงลดลง ซึ่งมียีสต์บางสายพันธุ์ที่เจริญได้ที่อุณหภมิสูง มีสภาวะความเป็นกรด หรือทนกรดได้ดี (จิตธนา และอรอนงค์, 2527) โดยยีสต์เหล่านี้ สามารถสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี ส่งผลต่อการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟู



Prince of Songkla University Pattani Campus

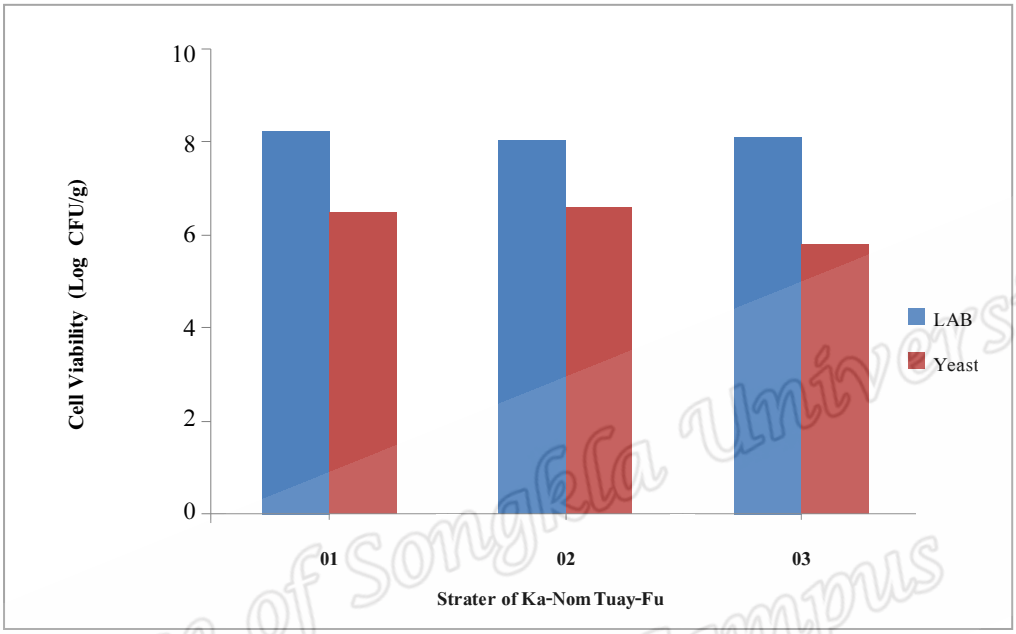
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่าง ๆ



Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (A) และค่า pH และค่าความเป็นกรด (B) ของขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอสายบุรี ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาต่าง ๆ

เมื่อวิเคราะห์ขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อทั้ง 3 แหล่ง ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่งมีปริมาณยีสต์สูงสุด รองลงมา ได้แก่ อำเภอโคกโพธิ์และสายบุรี ตามลำดับ ขณะแบคทีเรียกรดแลกติก พบมากในขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วย กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอโคกโพธิ์ รองลงมาได้แก่ ขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอสายบุรีและโคกโพธิ์ ตามลำดับ (รูปที่ 17)



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

เมื่อพิจารณาขนมถ้วยฟูที่ได้จากการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่เกิดการขึ้นฟูแตกต่างกัน โดยการหมักที่อุณหภูมิห้อง และระยะเวลาในการหมัก 5 ชั่วโมง ขนมถ้วยฟูมีลักษณะของผลิตภัณฑ์ 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 โดยขนมถ้วยฟูที่หมักจากกล้าเชื้ออำเภอยะหริ่งให้ปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุด ขณะที่ขนมถ้วยฟูที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 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 โดยขนมถ้วยฟูที่หมักจากกล้าเชื้ออำเภอ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ยะหริ่งให้ปริมาตรการขึ้นฟูสูงสุด (ตารางที่ 9) และเนื่องจากขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ที่หมักอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลาหมัก 4 ชั่วโมง มีลักษณะการขึ้นฟูได้ดีและเร็ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งอำเภอยะหริ่ง ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 9 ปริมาณจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรด และปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูที่ใช้กล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากต่าง ๆ และหมักที่ อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

สภาวะ	กล้าเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ (cfu/g)				TTA (%)	ปริมาตรการขึ้นฟู (Cm^3/g)
		จุลินทรีย์ทั้งหมด	แบคทีเรียกรดแลกติก	ยีสต์	ยีสต์และรา		
อุณหภูมิ 30°c ระยะเวลา 5 ชั่วโมง	01	1.32×10^8	1.10×10^8	7.00×10^7	2.70×10^7	0.94	0.92
	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 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	01	1.68×10^8	1.79×10^8	3.00×10^6	3.20×10^6	0.62	1.04
	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) ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง (02) และลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี (03)

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.3 ศึกษาสมบัติของยีสต์ที่มีผลต่อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

คัดแยกยีสต์ในตัวอย่างแป้งซึ่งใช้ผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อยะหริ่ง บนอาหาร YM Agar ซึ่งเติมคลอแรมเฟนนิคอล ร้อยละ 0.01 โดยเทคนิค spread plate สุ่มเลือกโคโลนีจำนวน 20 โคโลนี จากนั้นนำมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเทคนิค streak plate แล้วนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ ได้แก่ การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะมัยเลส 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 และY12 ให้ปริมาณแก๊สเท่ากับ 12, 10 และ 9

มิลลิลิตร ตามลำดับ ไอโซเลทที่ผลิตก๊าซได้ปานกลาง 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 และไอโซเลทที่ผลิตก๊าซได้น้อย คือสร้างแก๊สได้น้อยกว่า 5 มิลลิลิตร จำนวน 11 ไอโซเลท (ตารางที่ 10)

4.3.2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะมัยเลส

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

4.3.3 ความสามารถในการทนกรดของของยีสต์

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 x 10^7 CFU/g รองลงมาได้แก่ Y20 และ Y12 มีการเจริญเติบโตได้ เท่ากับ 2.57 x10^7 CFU/g และ 2.47x10^7 CFU/g ที่ระดับpH 4.5 มีการเจริญเติบโตในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g โดยไอโซเลท Y14 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.9 x 10^7 CFU/g รองลงมาได้แก่ Y20, Y15, Y16 และ Y03 พบในช่วง 2.71 x 10^7 - 2.67 x 10^7 CFU/g และที่ระดับค่า pH 5.0 มีการเจริญเติบโตในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/g โดยไอโซเลท Y03 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.5 x 10^7 CFU/g รองลงมาได้แก่ Y11, Y19, Y20 และ Y14 พบในช่วง 2.2 x 10^7 - 2.5 x 10^7 CFU/g (ตารางที่ 10)

จากผลการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติของยีสต์ ทั้ง 20 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลทที่ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ได้สูง ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y01, Y09 และY12 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท Y04 และ Y07 และไอโซเลทที่ทนกรดได้ดีที่ระดับ pH 4.0 ได้แก่ ไอโซเลท Y03, Y20 และ Y12 ตามลำดับ ที่ระดับ pH 4.5 ได้แก่ไอโซเลท 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 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาได้ดี แม้ในสภาวะที่ pH ของการหมักมีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ไอโซเลท Y03 มีคุณสมบัติที่ดีทั้งการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และความสามารถในการทนกรดทั้ง 3 ระดับได้

Prince of Songkla University Pattani Campus

ดี ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตขนมถ้วยฟู ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกยีสต์ไอโซเลท Y03 เพื่อจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ API 32 (Biomerieux, France)

ตารางที่ 10 สมบัติของยีสต์ไอโซเลทที่แยกได้จากแป้งหมักขนมถ้วยฟูที่ผลิตด้วยกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากอำเภอยะหริ่ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ไอโซเลท	**ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (ml)**	**อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและโคโลนี**	**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

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.4 ศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีผลต่อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยพิจารณาจากโคโลนีที่สร้างบริเวณใส (clear zone) จากการทำปฏิกิริยาของกรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นกับแคลเซียมคาร์บอเนต บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.3 จำนวน 20 โคโลนี มาทำการขีดลากบนอาหารแข็ง เพื่อให้เชื้อที่คัดแยกมาได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้ไปตรวจสอบรูปร่าง ได้แก่ การย้อมแกรม และการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส โดยแบคทีเรียกรดแลกติกต้องแสดงลักษณะติดสีแกรมบวก (สีน้ำเงิน) และให้ผลทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ (ไม่เกิดฟองอากาศ) ดังตารางที่ 9 โคโลนีที่ให้ลักษณะดังกล่าวนำมาทดสอบสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ 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 0.49 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 มีการเจริญเติบโตสูงสุด เท่ากับ 4.4×10^5 CFU/g รองลงมาได้แก่ L04, L10, L13 และ L06 พบ เท่ากับ 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

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตามลำดับ ที่มีเอทานอลร้อยละ 10 ได้แก่ ไอโซเลท L02 และ L04 ตามลำดับ ขณะที่ที่ความเข้มข้นของเอทานอลระดับร้อยละ 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	แกรมแบคทีเรีย	เอนไซม์คะตะเลส	ปริมาณกรดแลกติก (% TTA)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะที่มีเอทานอล (CFU/g)		
				เอทานอล 5 %	เอทานอล 10 %	เอทานอล 15 %
L01	+	-	0.17	-	-	-
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 (-) ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และ ไม่มีการเจริญบนอาหาร MRS agar

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5 การจำแนกสายพันธุ์

เมื่อนำยีสต์ไอโซเลท Y03 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง YM agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะเป็นโคโลนี สีขาวนวล ขอบเรียบ จากนั้นนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32C โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่า ยีตส์สายพันธุ์ Y03 เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* โดยสามารถใช้น้ำตาลและสารอินทรีย์15 ชนิดได้แก่ D-galactose, D-saccharose(sucrose), N-Acetyl-glucosamine, L-cellobiose, D-moltose, D-trehalose, Potessium2-ketogluconate, Methyl-D-glucopyranoside, D-sorbitol, D-xylose, Palatinose, D-melezitose, D-mannitol, D-glucose และGlucosamine 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-moltose, D-lactose (bovine origin), D-melibiose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose และ Gentiobiose แสดงดังตารางที่ 13

Prince of Songkla University Pattani Campus

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-moltose	+
D-trehalose	+
Potessium 2-ketogluconate	+
Methyl-D-glucopyranoside	+
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 (-)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 13 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท L02

Characteristics : Assimilation	Reaction
Esculin ferric citrate	+
Salicine	+
L-cellobiose	+
D-moltose	+
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	-
Potessium 2-ketogluconate	-
Potessium 5-ketogluconate	-

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

Prince of Songkla University Pattani Campus

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 และ สามารถย่อยน้ำตาล 5 โมเลกุล โดยผ่าน pentose phosphate pathway (PPP) ได้เช่นกัน ส่งผลให้ *C. tropicalis* สามารถปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากการกระบวนการใช้น้ำตาลหลายชนิด (Jamai *et al.*, 2007)

4.6 การประยุกต์ใช้ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

การเตรียมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* เพื่อนำมาผลิตเป็นขนมถ้วยฟูพื้นบ้านจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ โดยการศึกษาการเจริญเติบโตสูงสุดของยีสต์ สายพันธุ์ *C. tropicalis* และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* จากการนำเชื้อบริสุทธิ์ไปเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ MRS ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* มีการเจริญในระยะ Lag phase ในช่วงโมงที่ 0 – 6 และการเจริญในช่วง log phase ใช้เวลาประมาณ 9 - 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง Stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมง ที่ 15 - 60 แล้วจึงเข้าสู่ช่วงระยะ Death phase จากการศึกษาพบว่า *C. tropicalis* มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 12 โดยอัตราการเจริญสูงสุดเท่ากับ 0.54 ชั่วโมง$^{-1}$ (ตารางที่14) การเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 6.62 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.61x10^{7}$ CFU/ml (รูปที่ 18)

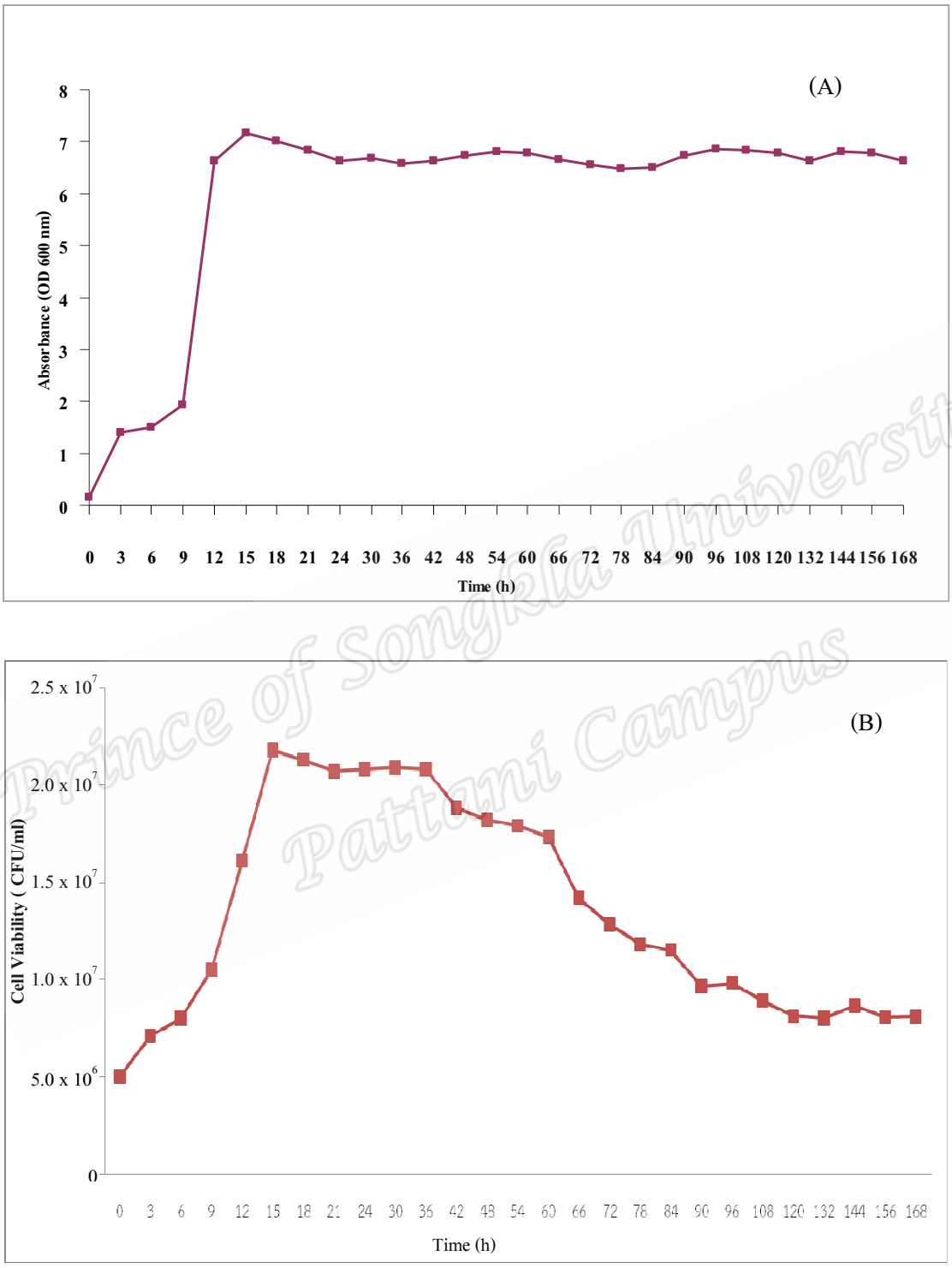
ขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* พบระยะ Lag phase ในช่วงเวลาประมาณ 0 - 9 ชั่วโมง และมีการเจริญในช่วง log phase ใช้เวลาประมาณ 12 - 30 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วง Stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมง ที่ 36 - 48 ชั่วโมง แล้วจึงเข้าสู่ช่วงระยะ Death phase จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติก *L. plantarum* มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 21 โดยอัตราการเจริญสูงสุด เท่ากับ 0.57 ชั่วโมง$^{-1}$ (ตารางที่ 13) การเจริญเติบโต (OD_{600}) เท่ากับ 2.82 และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $1.51x10^{9}$ CFU/ml (รูปที่ 19)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 14 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600})	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	อัตราการเจริญสูงสุด (h^{-1})
0	0.15	5.00×10^6	0
3	1.401	7.10×10^6	0.416
6	1.511	8.00×10^6	0.226
9	1.93	1.05×10^7	0.197
12	6.62	1.61×10^7	0.539
15	7.16	2.18×10^7	0.467
18	7.02	2.13×10^7	0.382
21	6.83	2.07×10^7	0.318
24	6.63	2.08×10^7	0.270
30	6.69	2.09×10^7	0.218
36	6.57	2.08×10^7	0.178
42	6.64	1.88×10^7	0.154
48	6.73	1.82×10^7	0.137
54	6.81	1.79×10^7	0.123
60	6.77	1.73×10^7	0.110
66	6.65	1.42×10^7	0.098
72	6.54	1.28×10^7	0.089
78	6.48	1.18×10^7	0.081
84	6.51	1.15×10^7	0.076
90	6.74	9.65×10^6	0.073
96	6.86	9.80×10^6	0.069
102	6.83	8.90×10^6	0.062
120	6.79	8.10×10^6	0.055
132	6.64	7.98×10^6	0.049
144	6.8	8.66×10^6	0.046
156	6.77	8.05×10^6	0.042
168	6.62	8.07×10^6	0.038

Prince of Songkla University Pattani Campus



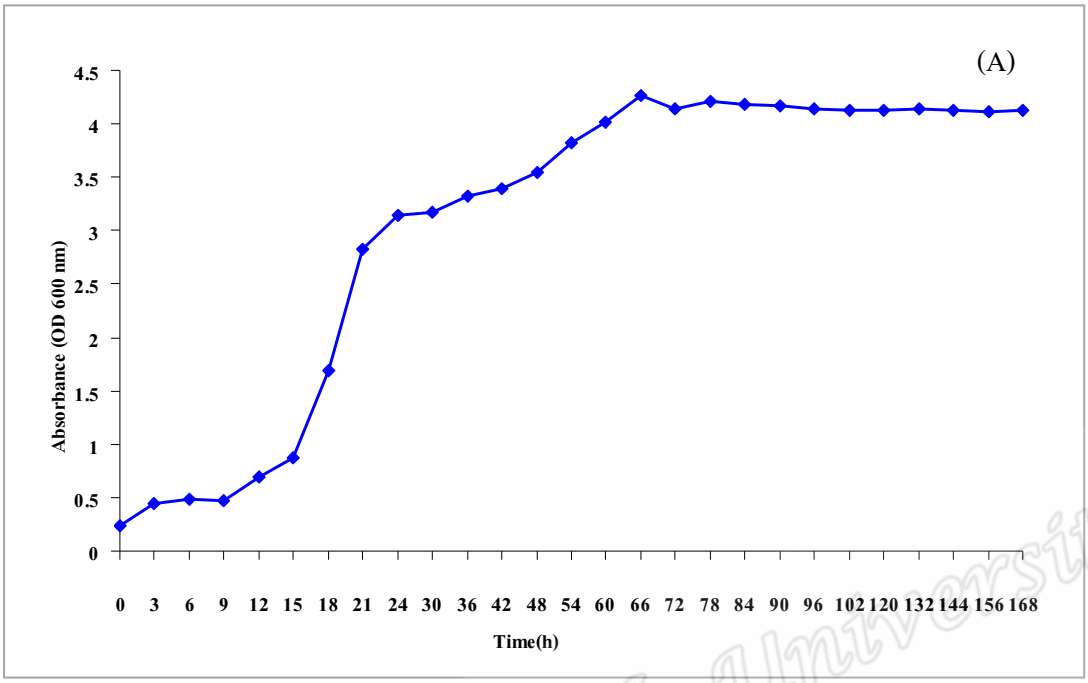
Prince of Songkla University Pattani Campus

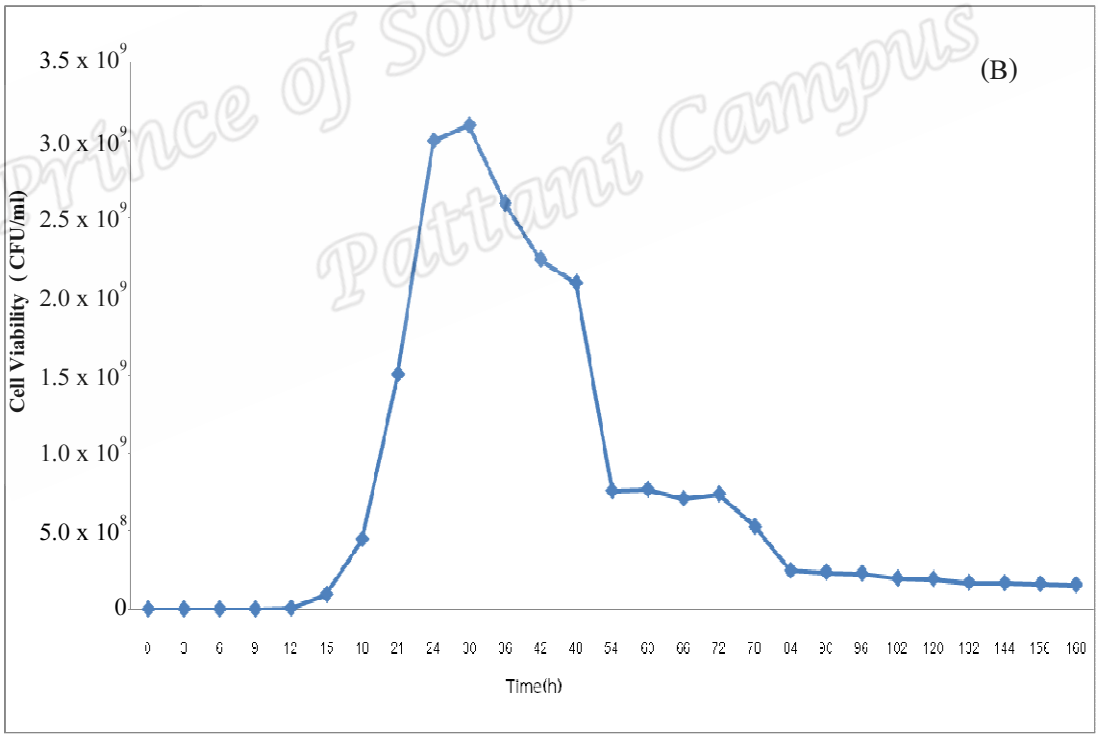
รูปที่ 18 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของยีสต์ *Candida tropicalis* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ตารางที่ 15 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600})	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	อัตราการเจริญสูงสุด (h^{-1})
0	0.23	1.90×10^{6}	0
3	0.44	2.40×10^{6}	0.070
6	0.48	2.20×10^{6}	0.041
9	0.47	2.04×10^{6}	0.026
12	0.69	8.30×10^{6}	0.230
15	0.87	9.70×10^{7}	0.042
18	1.69	4.50×10^{8}	0.081
21	2.82	1.51×10^{9}	0.572
24	3.14	3.00×10^{9}	0.121
30	3.17	3.10×10^{9}	0.098
36	3.32	2.60×10^{9}	0.394
42	3.39	2.24×10^{9}	0.075
48	3.55	2.09×10^{9}	0.069
54	3.82	7.60×10^{8}	0.303
60	4.02	7.70×10^{8}	0.063
66	4.26	7.10×10^{8}	0.061
72	4.14	7.40×10^{8}	0.246
78	4.21	5.30×10^{8}	0.051
84	4.18	2.50×10^{8}	0.047
90	4.17	2.40×10^{8}	0.199
96	4.14	2.32×10^{8}	0.041
102	4.13	2.00×10^{8}	0.038
120	4.13	1.97×10^{8}	0.148
132	4.14	1.73×10^{8}	0.030
144	4.13	1.70×10^{8}	0.027
156	4.11	1.64×10^{8}	0.113
168	4.12	1.58×10^{8}	0.023

Prince of Songkla University Pattani Campus

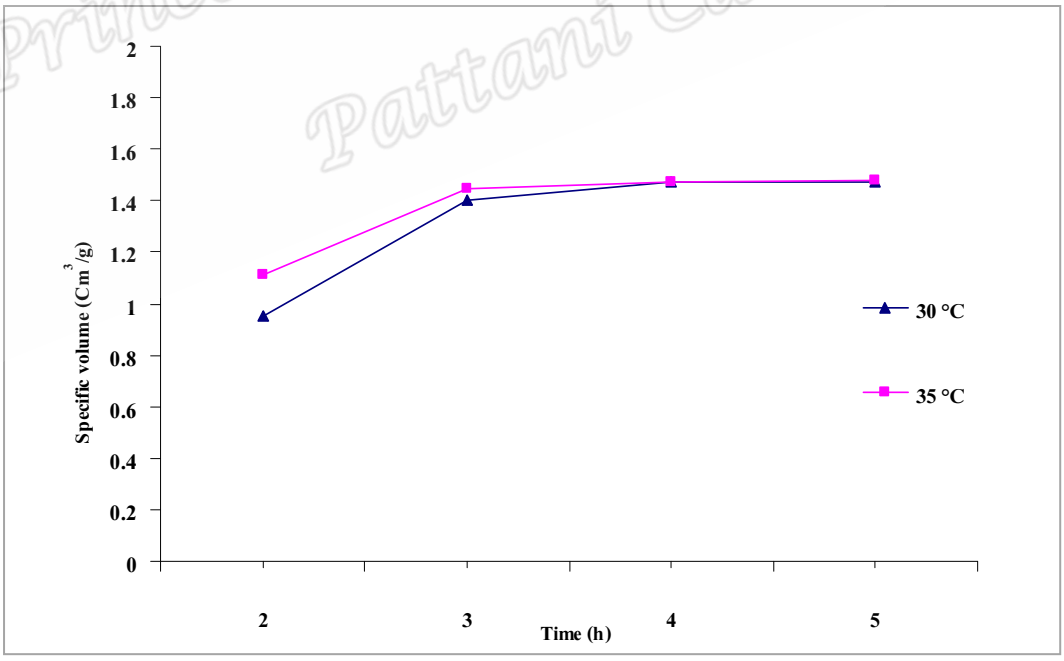




Prince of Songkla University Pattani Campus

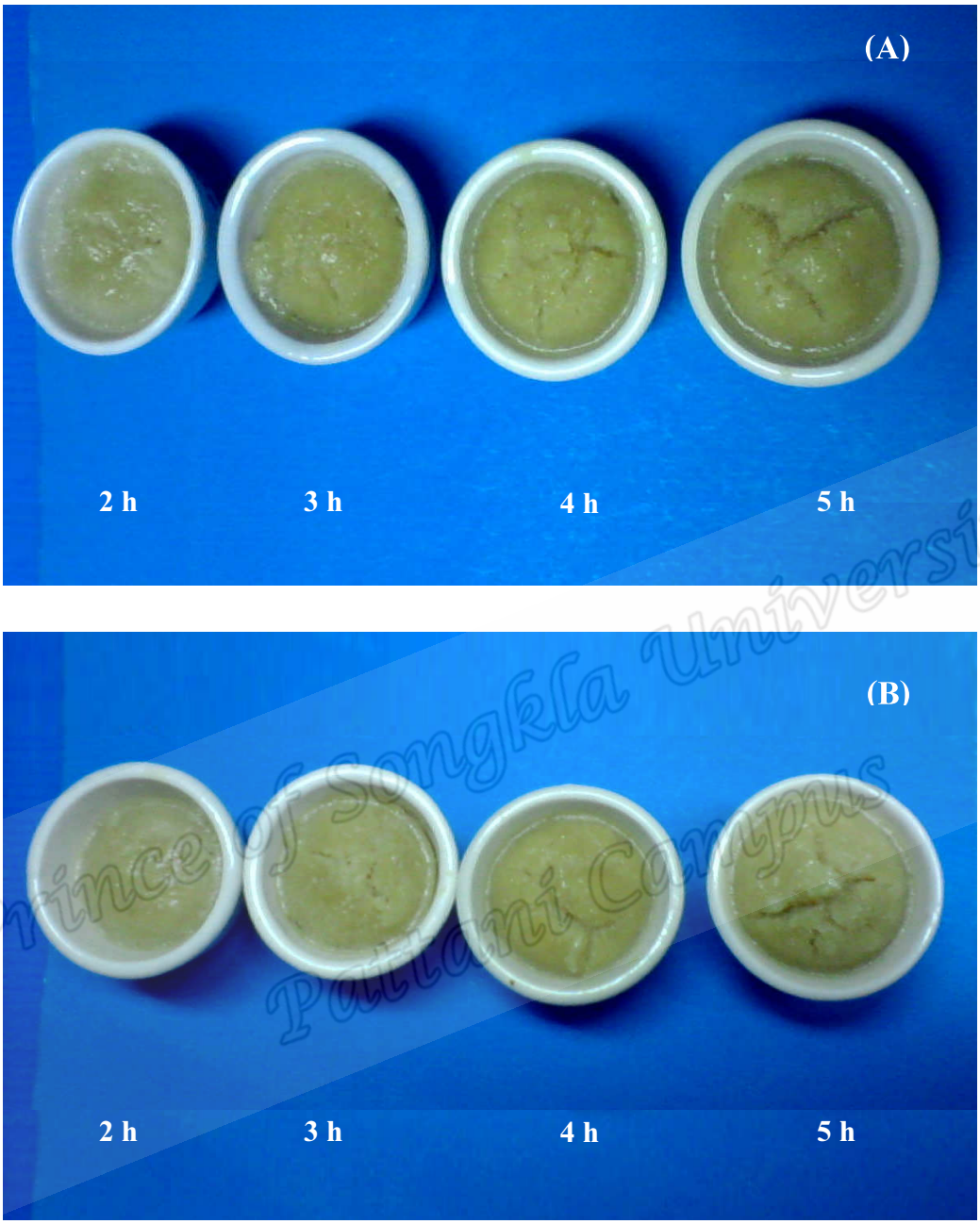
รูปที่ 19 การเจริญเติบโต (A) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (B) ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากแป้งหมักในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

เมื่อผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ โดยเตรียมยีสต์สายพันธุ์ *C. tropicalis* จากช่วงเวลาที่มีอัตราการเจริญสูงสุด ได้แก่ ชั่วโมงที่ 12 ให้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml โดยอยู่ในรูปของสารละลายยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* จากช่วงเวลาที่มีอัตราการเจริญสูงสุด ได้แก่ ชั่วโมงที่ 21 ให้มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10^9 CFU/ml โดยอยู่ในรูปของสารละลายแบคทีเรียกรดแลกติก เทียบเท่ากับปริมาณเชื้อจากการผลิตขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากของอำเภอยะหริ่ง เพื่อเป็นส่วนผสมในการผลิตขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน ประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนด สารละลายยีสต์ และสารละลายแบคทีเรียกรดแลกติก ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 :10 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จากนั้นผสมรวมกันและหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$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 $\pm$ 1 และ 35 องศาเซลเซียส

Prince of Songkla University Pattani Campus



Prince of Songkla University Pattani Campus

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

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

ตารางที่ 16 ปริมาตรการขึ้นฟูของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์และกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ที่ระดับอุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส

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

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ และกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ที่หมักเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

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

เมื่อทดสอบขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากและกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ผลทางประสาทสัมผัส พบว่า ด้านเนื้อสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ มีค่าน้อยกว่า เนื่องจากในลูกแป้งข้าวหมากมีราผสมอยู่ภายในลูกแป้งด้วย ซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ เช่น เอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส กลูโคอะมัยเลส ที่สามารถย่อยอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน ให้มีขนาดเล็กลง (นภา, 2534) ส่งผลให้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อลูกแป้งข้าวหมากให้ค่าที่สูงกว่ากล้าเชื้อบริสุทธิ์

คุณสมบัติทางเคมีของขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธ์ 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 เถ้าร้อยละ 0.13 ใยอาหารร้อยละ 1.09 - 1.11 และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 54.4 - 55.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ขนมถ้วยฟูจากกกล้าเชื้อบริสุทธิ์ 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

เมื่อนำแป้งหมักขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ มาวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก พบว่า การหมักในชั่วโมงเริ่มต้นที่อุณหภูมิห้อง แป้งหมักมีปริมาณยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 5.56×10^6 และ 6.37×10^8 CFU/ml เมื่อวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการหมักเพิ่มขึ้น ในชั่วโมงที่ 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 ในชั่วโมงเริ่มต้น แป้งหมักมีจำนวนยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก เท่ากับ 5.67×10^6 และ 6.66×10^8 CFU/ml และปริมาณยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการหมัก ในชั่วโมงที่ 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 หลังจากการหมักแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เท่ากับ10^8 -10^9 CFU/ml เนื่องมาจากยีสต์จะมีการเจริญได้เร็ว จำนวนยีสต์ที่เพิ่มขึ้นจึงผลิตเอทานอลออกมาในระหว่างการหมัก ผลของเอทานอลจะทำให้โปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพ ส่งผลทำลายเอาไขมันที่เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกออก ทำให้กิจกรรมของเซลล์แบคทีเรียหยุดชะงักจึงชะลอการเจริญเติบโตได้บางส่วน (กนก, 2542)

ตารางที่ 19 ปริมาณจุลินทรีย์ในขนมถ้วยฟูจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในการหมักที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

สภาพการหมัก		จำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก (CFU/g)	
อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)	ยีสต์	แบคทีเรียกรดแลกติก
30 $\pm$ 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

Prince of Songkla University Pattani Campus