รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักแป้งขนมจีน

Selection of Lactic Acid Bacteria for Use as Starter in Thai Fermented Rice Nooddle (Knom Jeen) Process

โดย

นางปรียานุช บวรเรืองโรจน์
นางวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล
นายณัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์
นางสาวชลธิชา เลี่ยมดำ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ SCI540689S

บทคัดย่อ

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน จากขั้นตอนการผลิตขนมจีน ได้แก่ ข้าวหมัก น้ำแป้ง แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และแป้งนวดจากโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดพัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช และพระนครศรีอยุธยา พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลต และแบคทีเรียแลกติก 3 ไอโซเลต คือ DWS0403 DWS0906 และ DWS0911 แสดงสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสและเพิ่มกลิ่นรสของขนมจีนได้ดี โดยแบคทีเรียทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 ได้ และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ในระดับดี ปานกลาง และดีมาก ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการมีสมบัติการเป็นกล้าเชื้อที่ดี โดยการเติมกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนการหมักข้าวและทำการวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นรสด้วยเทคนิค Headspace Solide Phase Microextraction-Gas Chromatography-mass Spectrometry (HS-SPME GC-MS) พบสารระเหยในกลุ่มแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน และอัลดีไฮด์ ชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 เป็นกล้าเชื้อ พบสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของขนมจีนแป้งหมัก คือ 1-hexanol เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมหวาน กลิ่นหอมดอกไม้ (flowery), 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ซึ่งให้กลิ่นเหม็นเปรี้ยว (sweaty) และ butanoic acid เป็นสารที่ให้กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นสาบ กลิ่นชีส (sour, rancid, cheese), acetoin เป็นสารที่ให้กลิ่นครีม กลิ่นเนย (creamy, buttery) และ hexanal มากกว่าชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้ออื่น และชุดควบคุม

การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA พบว่า แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 DWS0906 และDWS0911 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^{T} *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^{T} และ *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667^{T} ตามลำดับ

การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลต *Lactobacillus plantarum* DWS0403, *Lactobacillus pentosus* DWS0906 และ *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อ10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ในขั้นตอนการหมักข้าว และเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม) พบว่ากระบวนการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกดีที่สุดในระหว่างกระบวนการผลิต มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงสุดคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.3 ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีมีปริมาณอะไมโลสสูง และพบสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นมากกว่าการเติมกล้าเชื้ออื่นและชุดควบคุม เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย มีสีเหลืองน้อยกว่าเส้นขนมจีนที่เติม

กล้าเชื้ออื่น โดยมีค่า L^*, a^* และ b^* เท่ากับ 86.7, -1.2 และ 4.3 ตามลำดับ และมีค่าความแข็งของเส้นขนมจีนเท่ากับ 23.3 นิวตัน จากการศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัส พบว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบมากที่สุด โดยมีคะแนนของกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่เติมกล้าเชื้ออื่นและชุดควบคุม

ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยทำการเติมกล้าเชื้อดังกล่าวในข้าวหมักเปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมัก และการหมักตามธรรมชาติที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก (ชุดควบคุม) การศึกษาพบว่าการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมัก มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงสุดคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.4 และมีสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่ดีมากกว่าชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อในน้ำแป้ง และจากผลการเติมกล้าเชื้อนี้ในน้ำแป้งหมักพบว่าแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีมากทำให้มีปริมาณอะไมโลสสูงสุด เส้นขนมจีนมีความเหนียวและความเกาะติดดีที่สุด และมีความแข็งน้อยที่สุด คือ 0.5, 0.2 และ 18.8 นิวตัน ตามลำดับ นอกจากนี้เส้นขนมจีนมีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย และมีสีเหลืองน้อยที่สุดมีค่า L^*, a^* และ b^* เท่ากับ 86.0, -1.1 และ 5.4 ตามลำดับ และจากการศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมากที่สุด โดยมีคะแนนของสี กลิ่น เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อในข้าว

Abstract

The objective of the researches were to screen lactic acid bacteria (LAB) from Thai fermented rice noodle (Kanom Jeen) process and assessment for their potential use as a starter culture in rice noodle fermentation. A total of 476 LAB were isolated from samples of Fermented rice (FR), Liquid of rice starch (LRS), Residue of sedimented rice starch (RSRS), Sedimented rice starch (SRS), Drained wet starch (DWS) and Kneaded starch (KS) in Phatthalung, Songkhla, Nakhon Si Thammarat and Phra Nakhon Sri Ayutthaya provinces. There are three isolates: DWS0403, DWS0906 and DWS0911 had a good properties to inhibit the growth of indicator bacteria. All of them could inhibit the growth of *Escherichia coli* TISTR 780, *Staphylococcus aureus* TISTR 029 and *Bacillus cereus* TISTR 687. Moreover, they also showed good, moderate and excellent amylase activity, respectively. In addition, the selected strains were tested as a good starter culture by addition of each starter culture in fermented rice, follow by analysis of flavor volatile compounds by Headspace Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HS-SPME GC-MS) method. Fermented rice contained compounds include alcohol, organic acid, ketone and aldehyde. The fermented rice with DWS0403 had more as identity with fermented rice noodle volatile compounds than other starter culture and control. There were many volatile compounds such as 1-hexanol (flowery), 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutanoic acid (sweaty), butanoic acid (sour, rancid, cheese), acetoin (creamy, buttery) and hexanal.

All selected isolated were identified using morphological characterization, biochemical test and 16S rRNA sequence analysis, the isolates DWS0403, DWS0906 and DWS0911 were *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^T, *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^T and *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667^T, respectively.

In addition, they were used as a single starter culture for rice noodle process, by added 10% (v/w) starter culture in rice fermentation and compared with the natural fermentation (control). The fermented rice noodle process used *L. plantarum* DWS0403 as a starter culture had the highest growth of lactic acid bacteria and lactic acid (0.5 %) while

pH value decreased about 3.3. It also showed a good starch degrading ability with the highest amylose content and more flavor volatile compounds than the other starter culture. The rice noodle inoculated with *L. plantarum* DWS0403 had the most white, little green and yellow less than rice noodle added other starter culture and had the lower hardness, the L^*, a^* and b^* value were 86.0, -1.1, 5.4 and 23.2 N, respectively. The sensory evaluation showed that most of the consumer accepted rice noodle added with *L. plantarum* DWS0403. It had the highest scores of aroma, flavor, texture and overall acceptance significant different compared to other starter culture and control at 95% confidence interval ($p<0.05$).

Therefore, *L. plantarum* DWS0403 were selected for used as starter culture in fermented rice noodle with 2 different processes. The one was added this starter culture in rice and the other in liquid of rice starch compared with a natural fermentation of fermented rice and fermented liquid of rice starch (control). Rice noodle added with this starter in fermented rice had more number of lactic acid bacteria than fermented liquid of rice starch, highest lactic acid about 0.5 % while pH value was the lowest about 3.4. In addition, It had more flavor volatile compounds than the fermented liquid of rice starch and control. Noteworthy, treatment inoculated with *L. plantarum* DWS0403 in the fermented liquid of rice starch had a good ability to hydrolyse starch and had the highest amylose content. Moreover, It had the most stickiness and adhesiveness while the lowest hardness about 0.5 N, 0.2 Ns and 18.8 N, respectively. It also more white, little green and yellow less than rice noodle inoculated in fermented rice, the L^*, a^* and b^* value were 86.0, -1.1 and 5.4, respectively. The sensory evaluation founded the mostly consumer accepted rice noodle inoculated with *L. plantarum* DWS0403 in fermented liquid of rice starch. It had the highest scores of color, aroma, texture and overall acceptance. However, It was not significant different compared to rice noodle inoculated with this starter culture in fermented rice at 95% confidence interval ($p<0.05$).

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคล และกลุ่มบุคลต่อไปนี้ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และสนับสนุนอย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และด้านดำเนินการวิจัย จนผลงานวิจัยฉบับนี้สำเสร็จได้ด้วยดี ดังนี้

คุณทองคูณ ไวยเกศรี และ คุณมาลี ไวยเสมา เจ้าของกิจการโรงงานขนมจีน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และเจ้าของกิจการขนมจีนในจังหวัดนครศรีธรรมราช และ พัทลุงที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ในที่นี้ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างขนมจีนเพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ โดยเฉพาะคุณประทีป วิเชียร เจ้าของกิจการโรงงานขนมจีน จังหวัดสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งตัวอย่างขนมจีนเพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย และข้าวเจ้าที่ใช้ในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก รวมถึงการให้คำแนะนำและช่วยเหลือในกระบวนการหมักขนมจีนในการทดลองครั้งนี้เป็นอย่างดี

คุณชลธิชา เลี่ยมดำ นักศึกษาปริญญาโท ที่ช่วยเหลือในด้านดำเนินการทดลองด้วยความตั้งใจเป็นอย่างดี รวมถึงช่วยพิมพ์ผลงานวิจัย และนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกของภาควิชาจุลชีววิทยาที่มีส่วนช่วยในขั้นตอนการผลิตขนมจีน และการทดสอบทางประสาทสัมผัส

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา และคณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวหน้าภาควิชาภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรมที่สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย และบุคคลท่านอื่นๆ ที่มิได้กล่าวนามทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือในการจัดทำรายงานวิจัยฉบับนี้

ท้ายนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ SCI540689S

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพประกอบ	(17)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(19)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	55
2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	56
อุปกรณ์และเครื่องมือ	58
แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	59
ตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีน	59
วิธีการทดลอง	59
3 ผลการทดลอง	75
4 วิจารณ์ผลการทดลอง	130
5 สรุปผลการทดลอง	150
เอกสารอ้างอิง	154
ภาคผนวก	163
ประวัติผู้วิจัย	205

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	อนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติกของ Orla-Jensen (1919) และการเปลี่ยนแปลงในปัจจุบัน	9
1.2	ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลกติก 12 จีนัส	10
1.3	การแบ่งพวกของ *Lactobacillus* ตามชนิดผลผลิต และอุณหภูมิที่เหมาะสม	15
1.4	การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในจีนัส *Lactobacillus*	16
1.5	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติก	25
1.6	กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และโปรติเอสในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก	30
1.7	ตัวอย่างสารระเหยให้กลิ่นรสที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	34
1.8	ลักษณะทางกายภาพและปริมาณโปรตีนของขนมจีนแป้งหมักที่ระยะเวลาต่างกัน	42
1.9	ปัญหาที่พบและต้องแก้ไขในกระบวนการผลิตขนมจีน	52
3.1	จำนวนตัวอย่างและแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตขนมจีน 11 โรงงาน	76
3.2	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีน	77
3.3	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar spot assay	78
3.4	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar well diffusion assay	79
3.5	การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งในอาหารเหลว GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้า 10 % ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	80

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.6	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method ที่เวลา 48 ชั่วโมง (µg/ml) ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในอาหาร GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้า 10 % ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	82
3.7	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และความสามารถในการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 DWS0906 และ DWS0911	84
3.8	การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่พบในชุดควบคุม และตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลความเข้มข้นสารระเหยในตัวอย่างข้าวหมัก 2 วัน ของจีสุดา, 2548	86
3.9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีน	88
3.10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Coliform ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	98
3.11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *E. coli* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	98
3.12	การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่พบกระบวนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	104

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.13	การเปลี่ยนแปลงความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	111
3.14	การเปลี่ยนแปลงค่าสีของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	112
3.15	การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	114
3.16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Coliforms ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	119
3.17	การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ *E. coli* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	119
3.18	ความเข้มข้นของสารระเหยในเส้นขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	123
3.19	การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) น้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	126
3.20	การตรวจสอบค่าสีของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) น้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	127

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.21	การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนแป้งหมัก เมื่อเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำ (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	129

ตารางผนวกที่		หน้า
1	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีนขนมจีนจากโรงงานผลิตขนมจีน 11 แหล่ง	174
2	การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar spot assay	176
3	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (µg/ml) ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในอาหาร GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้า 10 % ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	178
4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	182
5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	182
6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	183

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
7	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	183
8	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	184
9	การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนที่การผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	184
10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนที่การผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	185
11	การตรวจวัดความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	185
12	การตรวจวัดค่าสี (ค่า L*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	186
13	การตรวจวัดค่าสี (ค่า a*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	186

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
14	การตรวจวัดค่าสี (ค่า b*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	186
15	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของสีเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	187
16	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของกลิ่นเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	187
17	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของรสชาติเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	187
18	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของเนื้อสัมผัสเส้นขนมจีน ที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	188
19	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของความชอบโดยรวมเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	188
20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	189

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
21	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	189
22	การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา * ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	190
23	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	190
24	การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าพีเอชในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	191
25	การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	191
26	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	192
27	การตรวจวัดความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	192
28	การตรวจวัดความเหนียวของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	193

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
29	การตรวจวัดความเกาะติดของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	193
30	การตรวจวัดค่าสี (ค่า L*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	193
31	การตรวจวัดค่าสี (ค่า a*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	194
32	การตรวจวัดค่าสี (ค่า b*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	194
33	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของสีเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	194
34	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของกลิ่นเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	195

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
35	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของรสชาติของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	195
36	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของเนื้อสัมผัสเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	195
37	การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของความชอบโดยรวมเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA	196
38	การแปลผลค่า Most Probable Number (MPN: เอ็มพีเอ็น) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}	202

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	วิถีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบ homofermentation โดยแบคทีเรียแลกติก	6
1.2	วิถีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียแลกติก	7
1.3	กระบวนการไฮโดรไลซิสแป้งเป็นกลูโคสโดย *Lactobacillus fermentum* Ogi E1	29
1.4	การสร้างกรดแลกติกจากกลูโคสโดย homofermentative pathway (1, Enzymes of the Emden-Meyerhof-Parnas pathway, 2, lactate dehydrogenase)	35
1.5	กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยยีสต์	36
1.6	Biosynthethic pathway ที่ทำให้เกิด fusel alcohols	37
3.1	รูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก (a) *Lactobacillus plantarum* DWS0403 (b) *Lactobacillus pentosus* DWS0906 (c) *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911	91
3.2	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีนกับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์มาตรฐานโดยใช้ข้อมูล 16S rRNA gene sequence โดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4	92
3.3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียทั้งหมด และยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าวและชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	96
3.4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าวและชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	100

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	110
3.6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียทั้งหมด และยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	117
3.7	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	122
3.8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ	125

รูปภาคผนวกที่		หน้า
1	กราฟมาตรฐานระหว่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	173
2	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะไมโลสมาตรฐาน (เปอร์เซ็นต์) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	173

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

α	=	Alpha
β	=	Beta
CFU	=	Colony forming unit
$^{\circ}C$	=	Degree Celsius
g	=	Gram(s)
pH	=	Hydrogen ion concentration
log	=	Logarithm
µg	=	Microgram(s)
µl	=	Microlitre(s)
ml	=	Mililitre(s)
MPN	=	Most probable number
ng	=	Nanogram(s)
%	=	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ขนมจีนเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของไทยที่มีการผลิตและบริโภคในทุกภูมิภาคของประเทศ ขนมจีนมี 2 ชนิด คือ ขนมจีนแป้งสด และขนมจีนแป้งหมัก ขนมจีนแป้งสดเป็นขนมจีนที่ไม่มีการหมัก มีเนื้อค่อนข้างกระด้าง จะมีสีขาว ไม่มีกลิ่นหมัก ส่วนขนมจีนแป้งหมักพบว่าจะมีผู้นิยมบริโภคกันมากเพราะว่าขนมจีนแป้งหมักจะมีกลิ่นหมักที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ มีรสชาติที่อร่อย เส้นมีความเหนียวนุ่ม ไม่เปื่อยยุ่ยเหมือนขนมจีนแป้งสด เก็บรักษาได้นานกว่า (นวรัตน์ และวรรณี, 2547 ; นุจรี, 2547 ; สุพรรณิการ์, 2548) การผลิตขนมจีนแป้งหมักจะอาศัยการหมักตามธรรมชาติจากจุลินทรีย์ ซึ่งในระหว่างการหมักมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องหลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบตามธรรมชาติต่างๆ เช่น ข้าว น้ำที่ใช้ อุปกรณ์ต่างๆ ภาชนะบรรจุ และสภาพแวดล้อมจากกระบวนการผลิต (ปราโมทย์และคณะ, 2534) การผลิตขนมจีนมักประสบปัญหาในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะวิธีการหมักแบบธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถควบคุมระยะเวลาในกระบวนการหมักได้ ขนมจีนที่ผลิตแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอมีคุณภาพแตกต่างกันออกไปในแต่ละแหล่งที่ผลิต ซึ่งมีผลทำให้เส้นขนมจีนที่ได้มีสีคล้ำ มีความเหนียวลดลง ลักษณะเนื้อสัมผัสค่อนข้างกระด้าง มีกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ และไม่สามารถควบคุมเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิตให้รวดเร็วและสม่ำเสมอได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณภาพของวัตถุดิบ กรรมวิธีการผลิต เป็นต้น (นุจรี, 2547; สุพรรณิการ์, 2548) อาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคค่อนข้างสูง เนื่องจากยังไม่มีการควบคุมการผลิตที่ดีพอ รวมทั้งสุขลักษณะจากการผลิตยังไม่ดีเท่าที่ควร ขนมจีนที่ได้จึงไม่สะอาด และเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจากจุลินทรีย์ก่อโรค (สุพรรณิการ์, 2548)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก คือ แบคทีเรียแลกติก นิตยา (2532) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าในทุกขั้นตอนของการผลิตมีแบคทีเรียแลกติกในปริมาณที่สูง และจากงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการหมักขนมจีน โดยเฉพาะในขั้นตอนการหมักข้าวและนอนน้ำแป้ง โดยกิจกรรมการหมักก่อให้เกิดสารเมแทบอไลท์ เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) เอทานอล ไดอะซีทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ซึ่งอาจเป็นตัวการทำให้ขนมจีนมีลักษณะเหนียว นุ่ม มีกลิ่นรสที่เฉพาะ และมีความปลอดภัย

ซึ่งสารเหล่านี้มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตได้ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตกรดและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสำหรับย่อยแป้ง มีผลทำให้ปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยให้เจลหรือเส้นขนมจีนแป้งหมักมีความเหนียว นุ่ม และไม่แข็งกระด้าง อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างสารระเหยในขนมจีนแป้งหมัก (จีสุดาและคณะ, 2547)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยจะทดสอบสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทในการผลิตขนมจีน ได้แก่ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ ลักษณะเนื้อสัมผัส และกลิ่นรสของขนมจีน ซึ่งจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำแบคทีเรียแลกติกที่มีประโยชน์มาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก เพื่อช่วยในการพัฒนากระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักให้มีคุณภาพที่ดีสม่ำเสมอ ปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวนุ่ม และมีกลิ่นรสดี สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ และยังเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการผลิต อีกทั้งยังเสริมประโยชน์ด้านสุขภาพสำหรับผู้บริโภค และเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตขนมจีนให้ก้าวหน้าอีกประการหนึ่งด้วย

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติก หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะให้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมักคาร์โบไฮเดรต (Sneath *et al.*, 1986) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทั่วไป คือ ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมและท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระบบไซโตโครม ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส บางชนิดสร้างคะตะเลสเทียม (pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่ม porphyrin (Engesser and Hammes, 1994)

แบคทีเรียแลกติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae การเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถทนต่อสภาวะที่มีอากาศ (aerotolerant) และทนกรดได้ (Wood and Hopzapfel, 1995) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแล็กโทส แบคทีเรียแลกติกเป็นพวกที่มีความต้องการอาหารที่ซับซ้อนและค่อนข้างสมบูรณ์ (complex and enrichment media) แบคทีเรียแลกติกจะเจริญในอาหารที่มี growth factor เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) เป็นต้น ส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548) แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น พบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในท่อทางเดินอาหาร ช่องฟัน และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้นยังพบทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักจากธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหมัก เครื่องในสัตว์ และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น (อัจฉรา, 2549)

ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียแลกติก คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง เป็นต้น โดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* มีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ และผลิตภัณฑ์หมักที่ได้จากธัญพืช เช่น ขนมจีนแป้งหมัก ลูกแป้งข้าวหมาก เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

แบคทีเรียแลกติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regognized as Safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยนำมาใช้ในการถนอมอาหาร และใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารหลายประเภท เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมี

สมบัติที่เหมาะสมหลายประการ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน และกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารจำเพาะที่มีผลต่อลักษณะกลิ่น และรสชาติของอาหาร (ภวัต, 2544) แบคทีเรียกลุ่มนี้พบมากในอาหารประเภทหมักดอง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อาหารหมักดองจากพืช และอาหารหมักดองจากสัตว์ (วิเชียร, 2534)

อาหารหมักดองจากพืช

1. ผักดอง ได้แก่ หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง กระเทียมดอง ขิงดอง ตั้งฉ่าย ผักเซี้ยนดอง และสะตอดอง มักพบ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus brevis*

2. ผลไม้ดอง ได้แก่ มะม่วงดอง ท้อดอง และมะยมดอง มักพบ *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp.

3. โกโก้ และกาแฟ มักจะพบ *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *L. plantarum*

4. ธัญพืช ได้แก่ ขนมจีนแป้งหมัก และลูกแป้งข้าวหมาก มักพบ *L. plantarum*

5. ถั่วเหลืองหมัก ได้แก่ ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว และเต้าหู้ยี้ มักพบ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus halophilus*

อาหารหมักดองจากสัตว์

1. ผลิตภัณฑ์จากนม มักพบ *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus* ในนมเปรี้ยว, *L. casei* ในยาคูลท์, *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp. และ *L. acidophilus* ในโยเกิร์ต, *Lactococcus cremoris*, *Lc. lactis*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetyllactis* และ *Leuconostoc* sp. ในเนยแข็ง

2. ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และเนื้อสวรรค์ มักพบ *Pediococcus* sp., *L. plantarum* และ *L. brevis*

3. ผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาส้มฟัก ปลาทูเค็ม ไตปลา และไข่ปลาดอง มักพบ *L. plantarum*, *Leuconostoc* sp., *Pediococcus acidophilus* และ *Streptococcus* sp.

แบคทีเรียแลกติกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการหมักน้ำตาล คือ

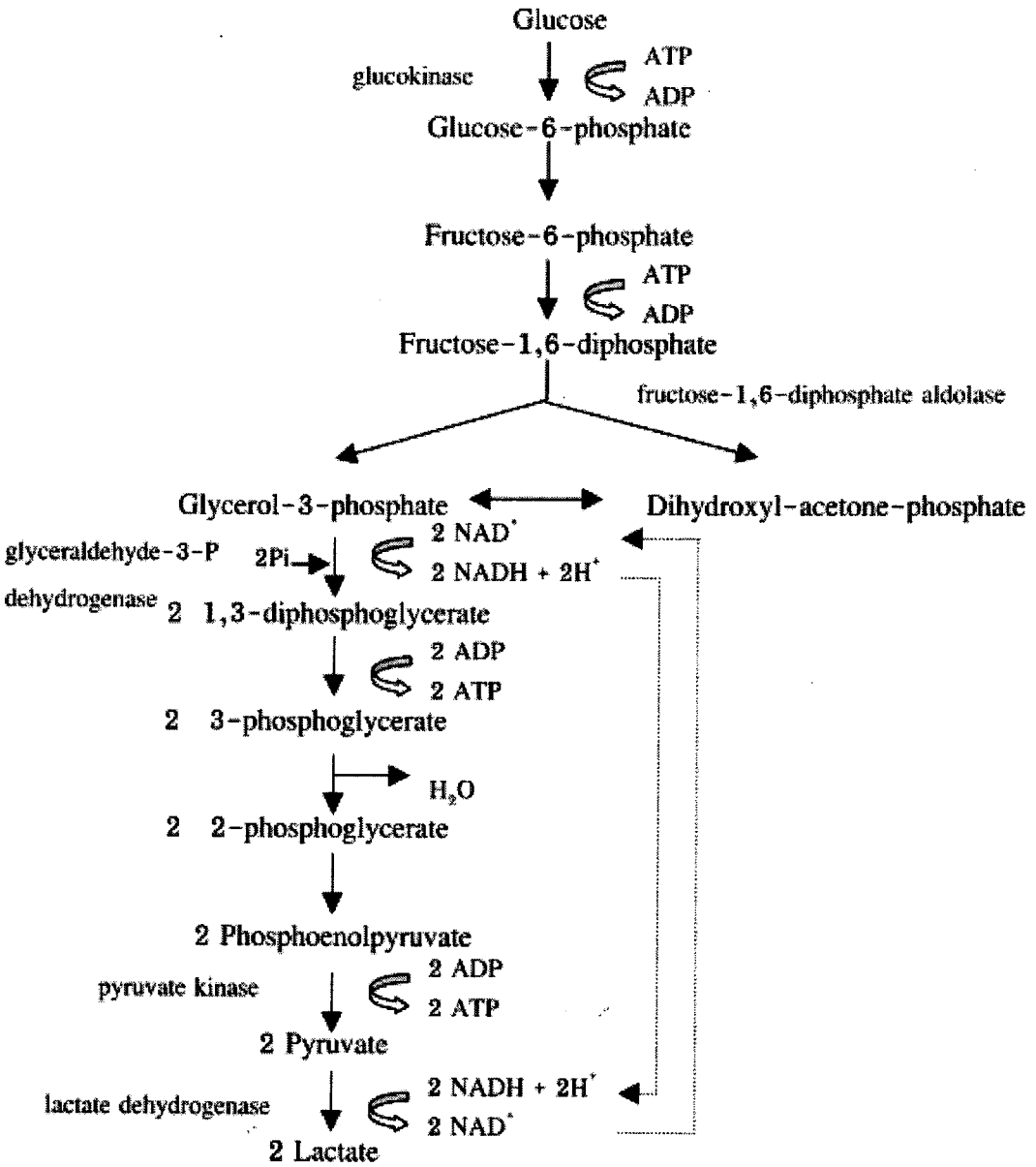
1. Homofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมผ่านวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis หรือ Embden-Mayerhof-parnas pathway, EMP pathway) โดยมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Homofermentation ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ กลไกการเกิดกรดแลกติก คือ ในขั้นตอนแรกจะเกิดการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น glucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น dihydroxy-acetone-phosphate และ glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ด้วยเอนไซม์ lactate dehydrogenase จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก

(pyruvic acid) ด้วยวิถี glycolysis แล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกจะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ดังรูปที่ 1.1 แบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 °C เรียกว่า streptobacterium และพวกที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 15 °C เรียกว่า thermobacterium และแบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่มีเมแทบอไลท์แบบ homofermentative ได้แก่ *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Tetranococcus* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

2. Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลชนิดอื่นผ่านวิถี phosphoketolase (PK pathway หรือ 6-phosphogluconatepathway, 6-PG pathway) ซึ่งจะมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Heterofermentation โดยเป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติกได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น กรดแลกติก กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก เอทานอล อะซีเทต กลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ lactate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถี EMP ดังนั้นจึงเกิดการหมักผ่านวิถี phosphogluconate ดังรูปที่ 1.2 โดย glucose-6-phosphate จะถูกออกซิไดซ์เป็น 6-phospho-gluconate จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่นได้ pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้ว pentose-phosphate จะแตกตัวโดยเอนไซม์ phosphoketolase เป็น trihose-phosphate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นแลกเทต และอะซิติลจะเปลี่ยนเป็นเอธานอล แบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่มีเมแทบอลิซึมแบบ heterofermentative เช่น *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lactobacillus casei* เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

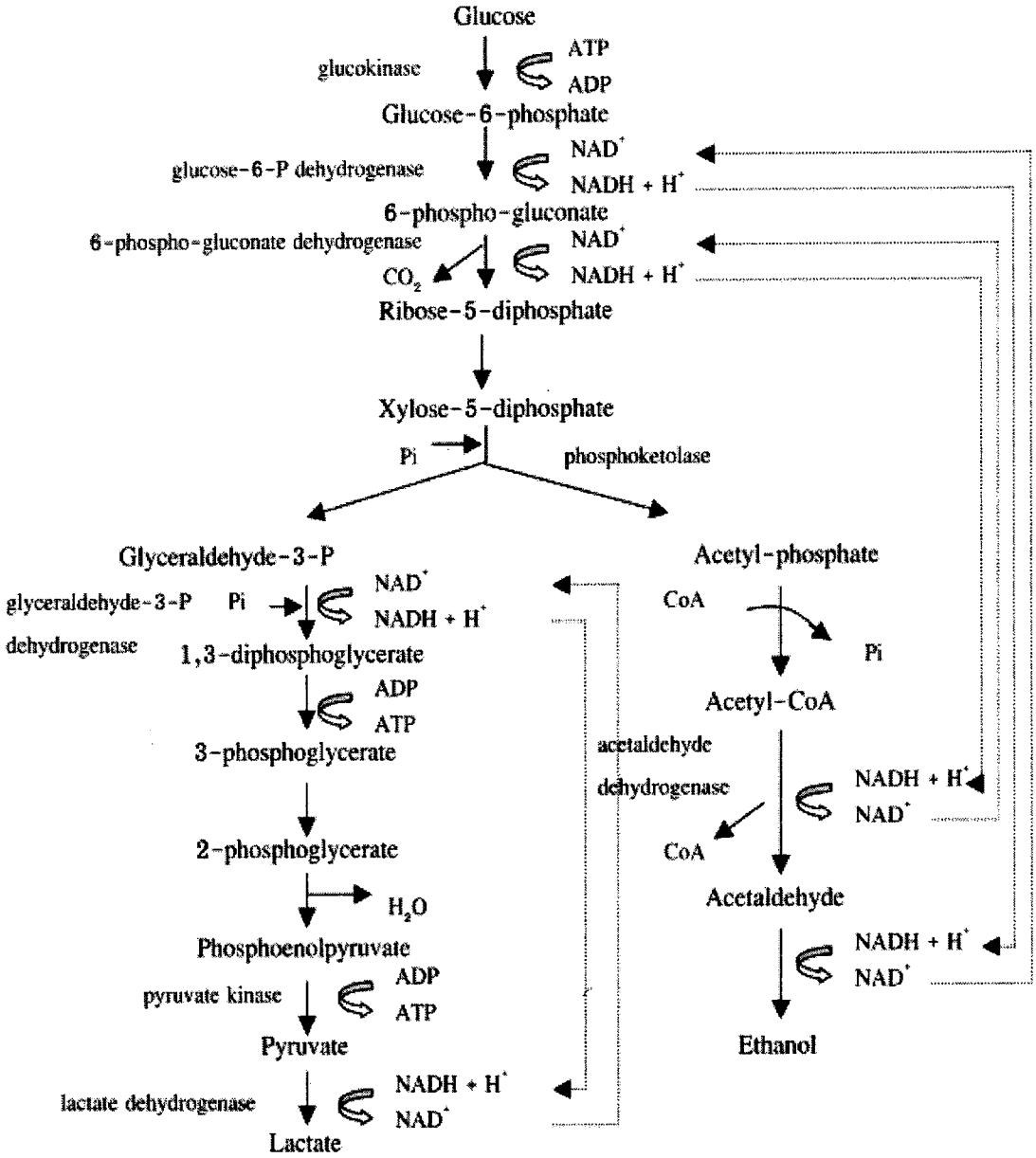
นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกอาจใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น

นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม homofermentative บางชนิดสามารถแสดงผลิตภัณฑ์สุดท้ายเหมือนแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม heterofermentative เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอธานอล (Cogan *et al.*, 1989) ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะผลิตขึ้นเมื่อมีระดับของ fructose-1,6-diphosphate ภายในเซลล์ต่ำ โดยเฉพาะเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณจำกัด (Thomas *et al.*, 1979) ดังนั้นเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า facultative homofermentation (De Vuyst and Vandamme, 1994)



รูปที่ 1.1 วิถีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบ homofermentation โดยแบคทีเรียแลกติก

ที่มา : Axelsson (1998)



รูปที่ 1.2 วิถีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียแลกติก

ที่มา : Axelsson (1998)

1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลกติก

ในปี ค.ศ. 1919 Orla-Jensen เป็นคนแรกที่เริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติกอย่างเป็นระบบ สามารถจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียแลกติกได้เป็น 7 จีนัส โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิด และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเกณฑ์ในการจัดหมวดหมู่ ดังตารางที่ 1.1

นอกจากนี้ Axelsson (1998) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวของเซลล์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และชนิดของกรดแลกติก ซึ่งสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกได้เป็น 12 จีนัส ดังตารางที่ 1.2

ส่วนการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียแลกติกอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ การสลายอาร์จินิน การสร้างอะซีโตอิน (acetoin) การทนต่อน้ำดี การสลายเม็ดเลือดแดง ลักษณะการเจริญในน้ำนม และชนิดของเซรุ่ม เป็นต้น นอกจาก นี้มีการนำวิธีการตรวจสอบถึงระดับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ต่างๆ ภายในเซลล์เพื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์และลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิก โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ร่วมด้วย เช่น อัตราส่วนเบสในดีเอ็นเอ องค์ประกอบของกรดไขมันและการเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลกเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Axelsson, 1998) เป็นต้น

ตารางที่ 1.1 อนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติกของ Orla-Jensen (1919) และการเปลี่ยนแปลงในปัจจุบัน

จีนัส	รูปร่าง	คะตะเลส	ไนเตรทรีดักชัน	การหมัก	จีนัสในปัจจุบัน
Betabacterium	ท่อน	-	-	heterofermentative	*Lactobacillus* *Weissella*
Thermobacterium	ท่อน	-	-	homofermentative	*Lactobacillus*
Streptobacterium	ท่อน	-	-	homofermentative	*Lactobacillus,* *Carnobacterium*
Streptococcus	กลม	-	-	homofermentative	*Streptococcus* *Enterococcus* *Lactococcus* *Vagococcus*
Betacoccus	กลม	-	-	heterofermentative	*Leuconostoc* *Oenococcus* *Weissella*
Microbacterium	ท่อน	+	+	homofermentative	*Brochothrix*
Tetracoccus	กลม	+[a]	+	homofermentative	*Pediococcus* *Tetragenococcus*

หมายเหตุ : [a] : บางสายพันธุ์ของ *Pediococcus* สามารถผลิตคะตะเลสเทียมได้

ที่มา : Stiles and Holzapfel (1997)

ตารางที่ 1.2 ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลกติก 12 จีนัส

ลักษณะการเจริญ	รูปร่างท่อน						รูปร่างกลม			
	Carno.	*Lb.*	*Aero.*	*Ent.*	*Lc. Vago.*	*Leuco. Oeno.*	*Ped.*	*Strep.*	*Tetra.*	*Wei.*[a]
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์ (tetrad)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส[b]	-[d]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 6.5 %	ND[e]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 18 %	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลกติก[c]	L	D,L, DL[f]	L	L	L	D	D, DL[f]	L	L	D, DL[f]

หมายเหตุ : + คือ ผลการทดสอบเป็นบวก, - คือ ผลการทดสอบเป็นลบ,
± คือ ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับชนิด, ND คือ ไม่สามารถระบุได้

[a] : *Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน

[b] : - คือ homofermentative, + คือ heterofermentative

[c] : ชนิดของกรดแลกติกจากการหมักกลูโคส

[d] : อาจผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณน้อยขึ้นกับอาหารเพาะเชื้อ

[e] : ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซนต์

[f] : ชนิดของกรดแลกติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

Carno. = *Carnobacterium*, Lb. = *Lactobacillus*, Aero. = *Aerococcus*,
Ent. = *Enterococcus*, Lc. = *Lactococcus*, Vago. = *Vagococcus*,
Leuco. = *Leuconostoc*, Oeno. = *Oenoccus*, Ped. = *Pediococcus*,
Strep. = *Streptococcus*, Tetra. = *Tetragenococcus*, Wei. = *Weissella*

ที่มา : Axelsson (1998)

1.2 ลักษณะและวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

1.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัว การเคลื่อนที่ การย้อมติดสีแกรม การสร้างแคปซูล การสร้างสปอร์ หรือแฟลกเจลลา เป็นต้น พบว่า จีนัส *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จีนัส *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างออกไปจากกลุ่ม *Bifidobacterium* และแบคทีเรียแลกติกจีนัส Streptococci ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 จีนัส คือ *Lactococcus*, *Enterococcus* และ *Streptococcus* อย่างไรก็ตามสภาวะการเจริญและระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ อาจมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) เช่น *Leuconostoc* เมื่ออยู่ในอาหารที่มีกลูโคส ขนาดของเซลล์จะยืดยาวออกและมีรูปร่างเป็นท่อนใกล้เคียงกับลักษณะทางสัณฐานของ *Lactobacillus* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายสั้น ในขณะที่เจริญบนอาหารแข็ง เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนยาว นอกจากนี้ยังพบบางสายพันธุ์อาจผลิตเมือก (slime) เช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Dellagilo *et al.*, 1995)

1.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiology)

ศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออน ความสามารถในการทนเกลือ และ Hydrostatic pressure เช่น ใช้ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไอออน pH และ Hydrostatic pressure ในการแยกความแตกต่างระหว่าง *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* พบว่า *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 4.5 และบนอาหารเพาะเชื้อแข็งอะซีเทต แต่สามารถเจริญได้ที่ pH 9.0 (Hammes *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ขณะที่ *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ (Kandler and Weiss, 1986) สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยวิธีการทดสอบทางสรีรวิทยาอาจไม่เพียงพอ อาจจะต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.2.3 การหมักแหล่งคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลกติกแต่ละชนิดในการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่

เกิดขึ้นและรูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต จากการเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ในอาหารเพาะเชื้อที่ใส่ธาตุอาหาร บางอย่างลงไปแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากกรด การเกิดกรด การเกิดแก๊ส และการเกิดสารบางชนิด เป็นต้น รวมทั้งการศึกษารูปแบบของการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.2.4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall composition)

องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยเพปติโดไกลแคน ลีโพพอลีแซกคาร์ไรด์ ลิโพโปรตีน กรดไทโคอิก และกรดอะมิโนหลายชนิด เป็นต้น ซึ่งความแตกต่างด้านโครงสร้างของเพปติโดไกลแคน ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ มีความแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย (Schleifer and Kandler, 1972)

การศึกษาจะอาศัยลักษณะการมีหรือไม่มีสารบางชนิดในผนังเซลล์ เช่น meso-diaminoopimelic acid สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธี thin-layer chromatography ซึ่งเหมาะสำหรับในกรณีของจีนัสที่มีสายพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ลักษณะเด่นของผนังเซลล์จีนัส *Lactobacillus* มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ lysine-denylalanine-aspartate (Pot *et al*., 1994)

1.2.5 การเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลกแทตดีไฮโดรจีเนส (Electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase)

ในกระบวนการหมักแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตกรดแลกติกได้เป็นชนิด D, L หรือทั้ง 2 ชนิดทั้งนี้ขึ้นกับการมีเอนไซม์ NAD^+-dependent lactate dehydrogenase (nLDH) ชนิด D-nLDH หรือ L-nLDH ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน (Axelsson, 1998) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ โดยอาศัยหลักของวิธี gel electrophoresis เพื่อจำแนกเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) บน starch gel หรือ polyacrylamide gel ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก เช่น *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* และ *Lactobacillus johnsonii* (Pot *et al*., 1994)

1.2.6 SDS-PAGE ของโปรตีนทั้งเซลล์

อาศัยหลักการเชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน โดยการเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ซึ่งใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้ง่ายรวดเร็วให้ผลถูกต้องแม่นยำในระดับสปีชีส์ และสับสปีชีส์สามารถช่วยในการจำแนกเชื้อที่มีปัญหาในการแบ่งหมวดหมู่ได้ เช่น

Lactobacillus kefir, *Lactobacillus ruteri* สายพันธุ์ของ *Leuconostoc* และ *Lactococcus* (Pot *et al.*, 1994)

1.2.7 การศึกษาเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (DNA base composition/ DNA-DNA hybridization)

เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงในรูปของ mol% G+C พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันมีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกัน (Pot *et al.*,1994) แต่บางครั้งแบคทีเรียที่ไม่สัมพันธ์กันอาจมีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้องและแม่นยำกว่า คือ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการศึกษาดีเอ็นเอที่สามารถเข้าคู่กันได้ (DNA-DNA hybridization) อาศัยหลักการ คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกัน และสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรือสามารถใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมาและวัดเปอร์เซ็นต์ความเหมือนหรือคล้ายกัน (Stiles and Holzapfel, 1997)

1.2.8 การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA (rRNA sequence)

วิธีนี้ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) มีการนำมาใช้หลายรูปแบบ เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNA และ 23S rRNA นอกจากนี้ Schillinger *et al.*, (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. บางสายพันธุ์โดยวิธีนี้เช่นกัน

1.2.9 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

วิธีนี้นิยมใช้กันในปัจจุบันโดยอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีอยู่ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นรวมทั้งสารพันธุกรรมชนิดอื่นๆด้วย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการ PCR ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ก่อนการเข้าสู่ขั้นตอน PCR นอกจากนี้วิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA (RADP) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการใช้ไพรเมอร์เดี่ยวแบบอิสระเพื่อจับกับสาย DNA template ที่ตำแหน่งใดก็ได้ที่สามารถข้าคู่กันได้ และเพิ่มจำนวน DNA ได้ทันที ทำให้เกิดแบบแผนของ DNA ที่เกิดขึ้น (Welsh and McClelland, 1990)

1.2.10 เซรุ่มวิทยา (serology)

เป็นวิธีการสำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส *Streptococcus* ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์โดยอาศัยสมบัติการเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติการเป็นแอนติเจนขององค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น การมีแอนติเจนที่เป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์จัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม A และ G หรือการมีกรดไทโคอิกระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และผนังเซลล์ชั้นใน จัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม D เช่น *Streptococcus pyogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการเจ็บคอจัดอยู่ในกลุ่ม A ส่วน *S. faecalis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจัดอยู่ในกลุ่ม D ส่วน *Lactobacillus* เมื่อใช้ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาสามารถแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่ม ตั้งแต่ A-G ตามชนิดของแอนติเจน (Kandler and Weiss, 1986)

1.2.11 การศึกษารูปแบบพลาสมิด (plasmid profile)

แบคทีเรียแลกติกบางชนิดจะมีพลาสมิดอยู่ในเซลล์ ซึ่งจะควบคุมสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อ ชนิดเดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดออกจากเซลล์นำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบการตัดตำแหน่งที่แน่นอนจึงนำมาทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (gel electrophoresis) โดยถ้าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ที่เหมือนกัน ความหลากหลายของจำนวนและขนาดของพลาสมิดของแบคทีเรียแลกติกในชนิดเดียวกันใช้เป็นลักษณะสำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะและใช้จำแนกแบคทีเรียแลกติกออกจากกัน (Josephson and Nielson, 1988)

1.2.12 hemotaxonomic markers

การจัดจำแนกด้วยวิธีนี้พิจารณาจากการสร้างสารประกอบทางเคมีที่จำเพาะเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ ได้แก่ สาร quinine เช่น menaquinones และ ubiquinones แบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม streptococci ส่วนใหญ่จะขาด menaquinones ซึ่งจะตรวจสอบปริมาณของสารชนิดนี้ โดยวิธี High Pressure Liquid-Chromatography (HPLC) (Pot *et al.*, 1994) และการวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Ester (FAME) โดยวิธี Gas-liquid Chromatography (GC) สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Moss *et al.*, 1974)

1.3 จีนัสของแบคทีเรียแลกติก

1.3.1 *Lactobacillus*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีรูปร่างแท่งหรือทรงรี ติดสีแกรมบวก โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5-53 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่สุด คือ 30-40 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปสามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 หรือต่ำกว่าใน pH ที่เป็นกลาง หรือเริ่มเป็นด่าง ซึ่ง pH ที่เหมาะสมในการเจริญที่สุด คือ 5.5-5.8 *Lactobacillus* มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระเนื่องจากมีค่า mol% G+C แตกต่างกันมากระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* พบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่เชื้อต้องการ เช่น น้ำนม รวมถึงแหล่งธรรมชาติต่างๆ เช่น ในเยื่อเมือกของมนุษย์สัตว์ พืช แหล่งน้ำทิ้งและในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหรืออาหารที่กำลังจะเน่าเสีย เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในมนุษย์ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของผลผลิตที่ได้ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ (วิลาวัณย์, 2539) ดังตารางที่ 1.3 และสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการหมักน้ำตาล (Hammes and Vogel, 1995) ดังตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.3 การแบ่งพวกของ *Lactobacillus* ตามชนิดผลผลิต และอุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิ	Homofermentative	Heterofermentative
อุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส	*L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. thermophilus*, *L. delbrueckii*	*L. fermentation*
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส	*L. casei*, *L. plantarum*, *L. leichmannii*	*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. pastorionus*, *L. hilgardii*, *L. trichodes*

ที่มา : วิลาวัณย์, 2539

แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร ได้แก่ *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentation* และ *L. kefir*

ตารางที่ 1.4 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในจีนัส *Lactobacillus*

สมบัติของ *Lactobacillus*	Obligately homofermentative	Facultatively homofermentative	Obligately heterofermentative
หมักเพนโตส	-	+	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+	+
สร้าง FDP aldolase [a]	+	+	-
สร้าง phosphoketolase	-	+	+
ตัวอย่างของเชื้อ	*L. acidophilus*	*L. casei*	*L. brevis*
	L. delbruckii	*L. curvatus*	*L. buchneri*
	L. helviticus	*L. plantarum*	*L. fermentum*
	L. salivarius	*L. sake*	*L. ruteri*

หมายเหตุ + คือ ให้ผลการทดลองเป็นบวก, - คือ ให้ผลการทดลองเป็นลบ

[a] หมายถึง fructose 1,6 diphosphate-aldolase

ที่มา : Axelsson (1998)

กลุ่มที่ 1 Obligately homofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นกรดแลกติกผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีเอนไซม์ FDP aldolase แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนตได้เนื่องจากขาดเอนไซม์ phosphoketolase ประกอบด้วย 17 สปีชีส์

กลุ่มที่ 2 Facultatively homofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลกติกผ่านวิถี EMP และสามารถผลิตเอนไซม์ FDP aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตเป็นกรดแลกติกและกรดอะซีติกได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

กลุ่มที่ 3 Obligately heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี phosphogluconate ได้เป็นกรดแลกติก กรดอะซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสผ่านวิถีนี้ได้เช่นกัน

สมบัติที่ทำให้ *Lactobacillus* มีความสำคัญทางด้านอาหาร (วิลาวัณย์, 2539) ดังนี้

1. ความสามารถในการหมักน้ำตาลให้กรดแลกติกสามารถนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นม เช่น ยาคูลย์ใช้ *L. casei* โยเกิร์ตใช้ *L. bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* นมแอซิโดฟิลัสใช้ *L. bulgaricus* นมบัลคาเรียนใช้ *L. delbrueckii* นอกจากนี้ในการหมักผักดองใช้ผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม เช่น ใช้ผลิตกรดแลกติกจากหางนม *L. pentosus* (*L. plantarum*) ผลิตกรดแลกติกจากโรงงานกระดาษ แต่ในขณะเดียวกันจะทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว จากการผลิตกรดแลกติกออกมา นอกจากนี้ยังทำให้ไวน์ ไซเดอร์ เบียร์ มีรสเปรี้ยว เป็นต้น

2. การผลิตก๊าซ และผลิตสารระเหยอื่นๆ ในพวก heterofermentative บางครั้งทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพอาหาร เช่น การเจริญของ *L. fermentum* ในเนยแข็งสวิส *L. hilgardii* หรือ *L. trichodes* ในไวน์

3. ความสามารถในการสร้างเมือก เช่น *L. plantarum* ทำให้น้ำแอปเปิ้ล น้ำองุ่น ผักดอง เกิดเมือกได้ *L. brevis* ทำให้น้ำแอปเปิ้ลเกิดเมือกได้ *L. cucumeria* ทำให้ผักดองเกิดเมือกได้

4. ความสามารถในการทนความร้อน (Thermoduric) ทำให้เชื้อรอดชีวิตจากการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ เช่น จะยังคงพบ *L. bulgaricus*, *L. brevis* รอดชีวิตจากการพาสเจอร์ไรส์น้ำนม จากนั้นเชื้อนี้จะหมักน้ำตาลแลกโตสให้กรดแลกติกออกมา ทำให้นมมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้อาจพบเชื้อนี้ในอาหารกระป๋องที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ เช่น ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ถั่ว และผลไม้อื่นๆ

5. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่ำเป็นสาเหตุให้เนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แฮม ไส้กรอก เกิดการเน่าเสียโดยมีกลิ่นเปรี้ยว

6. แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินที่ตัวมันเองต้องการได้ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีวิตามินต่ำ ดังนั้นจึงใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในอาหาร เช่น ใช้ *L. leichmannii* ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน B12

1.3.2 *Streptococcus*

แบคทีเรียรูปร่างกลมหรือไข่ มีขนาด 0.5-2.0 ไมโครเมตร เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือ ต่อกันเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ต้องการอากาศแบบ Falcultative anaerobe มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้โคโลนีสีเขียว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเจริญ คือ 24-42 องศาเซลเซียส มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 34-46 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคสแบบ homofermentative ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี

บางชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์หรือสัตว์ พบได้ในช่องปากและระบบทางเดินหายใจส่วนบน และบางชนิดเป็นจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการผลิตนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต เช่น *S. thermophillus*, *S. lactis* และ *S. cremoris* เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

Streptococcus ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร (วิลาวัณย์, 2539) ดังนี้

1. กลุ่มไพโอจินิก (Pyogenic) เป็นพวกที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยพวกที่ทำให้เกิดโรค เช่น *S. agalactis* และ *S. pyognes* สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งเชื้อ *S. pyoganes* มีระยะพักตัว 1-3 วัน อาการที่พบหลังจากได้รับเชื้อ คือ เจ็บคอ คอแดง ปวดศรีษะ มีไข้สูง คลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน อาหารที่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ นม ไอศครีม ไข่ กุ้ง สลัด อาหารที่มีไข่ และนม

2. กลุ่มวิริแดน (Viridan) ได้แก่เชื้อ *S. thermophilus* มีความสำคัญในการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมพวกโยเกิร์ต แบคทีเรียกลุ่มนี้ทนต่อความร้อน และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

3. กลุ่มเอนเทอโรคอคคัส (Enterococcus) เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 48-50 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญได้ที่ 5-8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกทนความร้อน สามารถอยู่รอดได้ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ สามารถทนเกลือได้ 6.5 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่าง pH 9.6 แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *S. feacalis* และ *S. faecium* ทางอุตสาหกรรมอาหารเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า ฟีคัลสเตรปโตคอคไค (Fecal streptococci) ซึ่งใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของอาหาร

1.3.3 *Pediococcus*

แบคทีเรียรูปร่างกลม มีขนาด 10-20 ไมโครเมตร มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 34-44 เปอร์เซ็นต์ เรียงตัวอยู่เป็นคู่หรือสี่เซลล์ เนื่องจากสามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางระนาบเดียวกัน โดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกัน (tetrad formation) ซึ่งพบน้อยมากที่อยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และแคปซูล ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ต้องการออกซิเจนน้อยและอาหารที่มีความซับซ้อนในการเจริญ ไม่ย่อยแป้งและเจลลาติน ไม่รีดิวส์ไนเตรท มีการหมักแบบ Homofermentative ผลการหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส แมนโนส และซอร์บิทอล เกิดกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะสามารถผลิตกรดแลกติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส (สุพรรณิการ์, 2548) พบทั่วไปในอาหารหมักจากพืช เจริญได้ดีในที่มีเกลือแกง 5-6 เปอร์เซ็นต์ และทนเกลือได้สูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสามารถพบเชื้อนี้ได้ในอาหารหมักดองที่มีเกลือสูง เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว น้ำปลา บูดู ปลาร้า เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกรด กลิ่น และรส ในอาหารหมักดองเหล่านั้น (บุษกร, 2547)

Pediococcus ที่มีความสำคัญในด้านอาหาร ได้แก่ *P. acidilactici*, *P. domonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvurus* และ *P. pentosaceus*

1.3.4 *Leuconostoc*

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียรูปกลม หรือแท่ง มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์คู่ๆ หรือสายสั้น บางครั้งอาจพบรูปท่อนสั้นเรียงต่อกันเป็นสายยาว โคโลนีมีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร มี %mol G+C อยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe และสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญ เจริญในอาหาร GYP ที่มี pH 4.4-5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 20-30 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปในพืช นม และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชและสัตว์ เชื้อที่สามารถแยกได้จากคนได้แก่ *L. citreum*, *L. psudomesenteroides*, *L. lactis*, และ *L. oenos* (Holt *et al.*, 1994)

แบคทีเรียในจีนัสนี้มีความสัมพันธ์กับจีนัส *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ในแง่สรีรวิทยา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นกับอาหารเพาะเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์จะยืดออกคล้าย *Lactobacilli* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การหมักกลูโคสสามารถผลิตกรดแลกติกชนิด D(-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหย จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ ได้แก่ *L. mesenteroid*, *L. lactis*, *L. pseudomesenteroids*, *L. citreum*, *L. argentinum* และ *L. fallax* (สุพรรณิการ์, 2548)

สมบัติที่สำคัญบางอย่างที่ทำให้ *Leuconostoc* มีความสำคัญทางด้านอาหาร (บุษกร, 2547) ได้แก่

1. การผลิตไดอะซิติล และผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นอื่นๆ เช่น *L. cremoris* เปลี่ยนไพรูเวตเป็นไดอะซิโตอิน และไดอะซิติล นำไปใช้ในการทำให้เกิดกลิ่นในเนย

2. ความสามารถในการทนเกลือ เช่น *L. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียที่พบในอาหารหมักประเภทผักดอง เช่น กะหล่ำปลีดอง มีการสร้างกรดออกมาจนมีความเข้มข้น 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ (อยู่ในรูปของกรดแลกติก)

3. ความสามารถในการทนต่อน้ำตาล โดยสามารถเจริญได้ในที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น *L. mesenteroides* สามารถทนน้ำตาลใน sugar syrup ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 55-60 เปอร์เซ็นต์

4. การผลิตสารเมือก เช่น *L. mesenteroides* จะผลิตสารเมือกพวกเดกซ์แทรน (dextran) จากน้ำตาลซูโครสได้ อุณหภูมิที่เหมาะในการสร้างเมือก คือ 20-25 องศาเซลเซียส เชื้อ *L. dextranicum* สามารถสร้างเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้เช่นกัน แต่น้อยกว่า ดังนั้นการผลิตเดกซ์แทรนในระดับการค้าจะใช้ *L. mesenteroides* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ แต่ในขณะเดียวกันการสร้างสารเมือกเหล่านี้ ทำให้เป็นผลเสียต่ออาหาร เช่น ทำให้น้ำอ้อยเกิดเมือก ทำให้ตก

ผลึกไม่ได้ ความหวานของน้ำอ้อยลดลง และสารเมือกเหล่านี้ไปทำให้ท่อต่างๆ อุดตัน เชื้อนี้ยังทำให้ไวน์ ไส้กรอก และแฮมเกิดเมือก เป็นต้น

5. ความสามารถในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาล ทำให้อาหารต่างๆ เกิดเน่าเสีย เช่น การเกิดก๊าซในแตงกวาดอง และ การทำให้ไส้กรอกบวม เป็นต้น

6. ความสามารถในการเริ่มต้นหมักได้เร็วกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น ในการหมักกะหล่ำปลีดอง พบว่า *L. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียแลกติกพวกแรกที่เจริญ และมีบทบาทในการหมัก โดยสามารถผลิตกรดแลกติกออกมาในปริมาณ 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เจริญไม่ได้

1.3.5 *Lactococcus*

Lactococcus เป็นแบคทีเรียที่แยกออกมาจากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.2 x 0.5-1.5 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์คู่หรือต่อกันเป็นสายยาว มี %mol G+C อยู่ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe ต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์ในการเจริญ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและในที่มีเกลือแกง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Holt *et al.*, 1994)

พบได้ในนม และผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative หลายสปีชีส์เป็นปรสิตในมนุษย์และสัตว์ และบางชนิดก่อให้เกิดโรคได้ บางสปีชีส์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักนมและผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ เนื่องจากมีพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการใช้แลกโทส เคซีนและซิเทรตในนม ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *L. lactis* spp. *lactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *L. lactis* spp. *hordniae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* และ *L. piscium* (สุพรรณิการ์, 2548)

1.3.6 *Carnobacterium*

Carnobacterium เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 x 1.0-2.0 ไมโครเมตร เซลล์มีการจัดเรียงตัวคู่ หรืออยู่เดี่ยวๆ บางครั้งมีการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ มี %mol G+C อยู่ระหว่าง 31.6-37.2 เปอร์เซ็นต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส พบในผลิตภัณฑ์เนื้อ และปลา และพบว่า *C. piscicola* เป็นเชื้อที่ก่อโรคในปลาเซลม่อน (Holt *et al.*, 1994)

จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) กรดอะซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ

C. divergens, *C. pisicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* (สุพรรณิการ์, 2548)

1.3.7 *Enterococcus*

Enterococcus เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-2.0 x 0.6-2.5 ไมโครเมตร มักจัดเรียงตัวเป็นเซลล์คู่ หรือสายสั้นๆ มี %mol G+C อยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (Flageella) ไม่มีแคปซูล มีความต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe และสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญ สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.2-4.6 และสามารถเจริญได้ที่ pH 9.6 ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยังสามารถหมักน้ำตาลแลกโตสได้ (Holt *et al.*, 1994)

จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative ผลิตกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้น บางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรค และบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, และ *E. cecorum* (สุพรรณิการ์, 2548)

1.3.8 *Tetragenococcus*

Tetragenococcus เป็นแบคทีเรียจีนัสใหม่ที่แยกออกมาจากจีนัส *Pediococcus* สปีชีส์เดิม คือ *Pediococcus halophilus* ลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* มีลำดับเบสบนยีนส์ 16S rRNA ใกล้เคียงกับจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าจีนัสเดิม (Simpson and Taguchi, 1995) แต่มีลักษณะพิเศษ คือ สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์ และผลิตฮีสตามีน (histamine) ซึ่งทำการแยกได้จากซอสที่สกัดจากตับปลาหมึก โดยใช้วิธี DNA-DNA hybridization และจากการทดลองนี้สามารถพบแบคทีเรีย *T. muriaticus* สายพันธุ์ X-1 (JCM 1000) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ (สมบูรณ์, 2541)

1.3.9 *Aerococcus*

Aerococcus เป็นแบคทีเรียรูปกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0-2.0 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ ซึ่งมีลักษณะการแบ่งตัวใกล้เคียงกับ *Pediococcus* ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส หรือสร้างได้น้อยมาก ไม่สลายเจลาติน และไม่รีดิวซ์ไนเตรท เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่pH 9.6 ในอาหารที่มีเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ และในเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe แต่เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนน้อย ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ผลิตกรดแต่ไม่สร้างแก๊สจากการใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด และมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์จะทำให้เกิดการ

ย่อยเม็ดเลือกแดงแบบไม่สมบูรณ์ (α-hemolysis) บนอาหาร Blood agar มักก่อโรคทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดโรคในกุ้งมังกร เช่น. *A. viridians* (Wood and Holzapfel, 1995) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *A. viridans* และ *A. urinae* (สุพรรณิการ์, 2548)

1.3.10 *Oenococcus*

จีนัสนี้มีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งแยกออกมาจาก *Leuconostoc oenus* โดยมีสมบัติเด่น คือ ทนกรดและเอทานอลในปริมาณสูง และจากการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ (DNA hybridization) และลำดับเบสของ 16S rRNAพบว่า *Oenococcus* มีความแตกต่างจากสปีชีส์อื่นของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et al.*, 1995)

1.3.11 *Weissella*

แบคทีเรียทั้งรูปร่างกลมและท่อน เดิมเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จาก *Leuconostoc paramesenteroides* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Leuconostoc* และ*Lactobacillus* แต่มีลักษณะที่แตกต่างกันที่ขาดกรดอะมิโนบางชนิดที่ผนังเซลล์ ได้แก่ กรดแอสปาติก และกรดไดอะมิโนพิมิลิก ประกอบ 7 สปีชีส์ ได้แก่ *W. paramesenteroids*, *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. viridescens* และ *W. hellenica* (สุพรรณิการ์, 2548)

1.3.12 *Vagococcus*

Vagococcus เป็นแบคทีเรียรูปกลม ไข่ หรือท่อนสั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.2 x 0.5-2.0 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวแบบเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ หรือสายสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe มีการผลิตกรดในการหมักคาร์โบไฮเดรต แต่ไม่เกิดแก๊ส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 25-35 องศาเซลเซียส แยกได้จากน้ำหรือจากปลาแซลมอนที่เป็นโรค มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 33-37% (Stiles and Holzapfel, 1997) ปัจจุบันมี 2 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis* และ *V. salmoniarum*

สำหรับ *Bifidobacterium* มีสารพันธุกรรมที่สัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแกรมบวกพวก Actinomycetaceae มีการหมักน้ำตาลแตกต่างจากกลุ่มของแบคทีเรียแลกติกข้างต้น จึงไม่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก (Salminen and Wright, 1998)

2 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก

ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติกจะมีการสะสมของกรดอินทรีย์โดยเกิดควบคู่กับการลดของค่าpHระดับ และสัดส่วนของผลผลิตเหล่านี้จะสะสมอยู่ในสภาพแวดล้อม และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของกระบวนการหมัก ซึ่งผลผลิตเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้งชนิดอื่นๆ นอกจากกรดอินทรีย์ เช่น เอธานอล ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น และพบว่าสารยับยั้งบางชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น กรดแลกติก กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก และกรดโพรพิโอนิก โดยการยับยั้งเป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของ pH ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เป็นกรดอ่อนจะออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรดสูงมากกว่าสภาวะที่เป็นกลาง โดยกรดแลกติกและกรดอะซีติกมีความสามารถในการยับยั้งได้สูงที่สุด และมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Blom and Moetvedt, 1991) ในสภาวะที่มี pH ต่ำ กรดจะมีค่า pKa สูง จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่า pKa ต่ำ ซึ่งค่า pKa ของกรดอะซีติกสูงกว่ากรดแลกติก 2-4 เท่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.75 และ 3.08 ตามลำดับที่ pH ในช่วง 4-4.6 (Lindgren and DobrogosZ, 1990) ทำให้มีผลในการยับยั้งมากกว่ากรดแลกติก การใช้กรดทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* ได้ดีกว่าการใช้กรดเพียงชนิดเดียวจึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมีฤทธิ์แบบเสริมกัน (synergistic activity)

กลไกการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์เกิดจากกรดอ่อนที่ไม่แตกตัวจะลายในไขมัน ทำให้สามารถแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวของกรดให้ไอออนลบและโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสมทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดและกระจายไปทั่วเซลล์ มีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ เช่น substrate transalocation และ oxidative phosphorylation โดยเกิดปฏิกิริยากับเซลล์มีผลทำลายเซลล์หรือยับยั้งจุลินทรีย์นั้นๆได้ (Fuller, 1989)

แบคทีเรียแลกติกที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus* sp. ซึ่งได้แก่ *L. sake* ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ สามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ Bearso *et al.*, (1997) มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้ง คือ กรดอินทรีย์แพร่

ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่า pH ในช่วงแรกของการเจริญลดลงและมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะจากผู้ทำการศึกษากลุ่มอื่นๆ ว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นเกิดจากการสะสมประจุลบ ซึ่งจะไปลดอัตราการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ และมีผลกระทบต่อการเคลื่อนย้ายสารบริเวณเหนือเยื่อหุ้มเซลล์

ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลกติกซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเพื่อวัตถุประสงค์ในการถนอมอาหาร นอกจากนี้การควบคุมสภาวะการผลิตกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักมีความสำคัญอย่างมากจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่าง เช่น การควบคุมพีเอชเริ่มต้นในการหมัก สภาพบัฟเฟอร์และองค์ประกอบของสารอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลกติก และจุลินทรีย์เป้าหมาย เป็นต้น (Montville and Winkonwski, 1997)

2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างนั้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียแลกติกสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ของเอนไซม์เอ็นเอดีเฮชออกซิเดส (NADH oxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ดังในตารางที่ 1.5 ในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก แบคทีเรียแลกติกจะไม่มีเอนไซม์ catalase ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน แต่จะมีระบบอื่นที่ใช้ในการจำกัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Condon, 1987) นอกจากนี้ ถ้าไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ เนื่องจากถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase), ฟลาโวโปรตีน และซูโดคะตะเลส (pseudocatalase)

ตารางที่ 1.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติก

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
NADH:H_2O_2 oxidase	$NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow NAD + H_2O_2$
Pyruvate oxidase	Pyruvate + phosphate + $O_2 \longrightarrow$ acetylphosphate + CO_2 + H_2O_2
α-Glycerophasphate oxidase	α-Glycerophasphate + $O_2 \longrightarrow$ dihydroxyacetonephosphate + H_2O_2
Superoxide dismutase	$2O^-_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

ที่มา : De Vuyst and Vandamme (1994)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์ และในชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ถูกออกซิไดส์ได้ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจนทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจน ส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบ มีทั้งเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ไทโอไซยาเนต (thiocyanate, SCN-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโอไซยาเนตให้เปลี่ยนเป็นไฮโปไทโอไซยาไนต์ (hypocyanite, OSCN-) และหากมีไฮโดรเจนเจนเปอร์ออกไซด์สูงจะเปลี่ยนเป็น O_2SCN- และ O_3SCN- ตามลำดับ ซึ่งไฮโปไทโอไซยาไนต์จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์อย่างไรก็ตามกลไกหลักในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น คือ ขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส โดยจะไปขัดขวางการขนถ่ายกลูโคสรวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G-3-Pdehydrogenase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีหมู่ซัลไฮดริลเป็นองค์ประกอบซึ่งถูกออกซิไดซ์ได้ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีผลในการทำลายแบคทีเรียแกรมลบอย่างรวดเร็ว

ในอาหารหมักจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อย เนื่องจากมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีข้อดีตรงที่จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปซึ่งอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่เป็นตัวการของการหมักได้ (สุมณฑา, 2545)

จากการทดลองของ Edward (1980) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ใช้ในการถนอมอาหาร มีการเติมลงในน้ำนมดิบโดยใส่ที่ความเข้มข้น 0.02-0.05% จะฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ความเข้มข้น 0.04-0.08% ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53 องสาเซลเซียสนาน 30 นาทีในนมพาสเจอไรซ์ ปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบได้

2.3 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิลหรือ 2,3-butanedione สารนี้พบว่าสังเคราะห์ได้โดยแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ของจีนัส *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* โดยจะสร้างเมื่อมีเมแทบอลิซึมของซิเทรตใน Kreb's cycle ซึ่งไพรูเวตจะถูกเมแทบอไลท์เป็นไดอะซีทิลและอะซิโตนในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกจีนัสเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหางนม หรือนมซึ่งมีซิเตรทเป็นองค์ประกอบ ซิเตรทจะถูกนำเข้าไปในเซลล์โดยเอนไซม์ซิเตรทเพอมีเอส (citrate permease) และเกิดปฏิกิริยาหลายขั้นตอนจนได้สารไดอะซิทิล ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการให้กลิ่นและรสในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดและเครื่องดื่มต่างๆ

ไดอะซีทิลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดที่ pH ต่ำกว่า 7 และจะมีสมบัติในการยับยั้งก็ต่อเมื่อมีกลูโคสอะซีเทต และ tween 80 ในอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าไดอะซีทิลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย และยังมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกได้น้อยที่สุด กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เกิดจากไดอะซีทิลทำปฏิกิริยากับหมู่อาร์จินินภายในโปรตีนของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เกิดรบกวนการใช้อาร์จินินของจุลินทรีย์ (De Vuyst and Vandamme, 1994; Ouwehand, 1998) ไดอะซีทิลได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย (GRAS: Generally Recognized as safe) สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารได้แต่ต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สารชนิดนี้ทำให้มีกลิ่นรุนแรงในอาหารจึงใช้ได้ในอาหารบางชนิด นอกจากนี้อาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะเครื่องมือที่สัมผัสกับอาหารได้เพราะระเหยง่าย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.4 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม heterofermentative นอกจากนี้ พบว่าแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม homofermentative บางชนิดสามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากมาเลท และซิเตรท โดยมาเลทจะเปลี่ยนเป็นแลกเตทและคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซด์มาโลแลกติก (malolactic) ในขณะที่ซิเตรทเปลี่ยนเป็นอะซิเตทและออกซาโลอะซิเตทโดยเอนไซม์ซิเตรทไลเปส (citrate lipase) จากนั้นออกซาโลอะซิเตทจะเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชั่นเปลี่ยนเป็นไพรูเวตและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้พบว่าปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่นของกรดอะมิโน เช่น ฮีสติดีน ไทโรซีน สามารถเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ได้เช่นกัน

การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดสภาวะขาดอากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน ทำให้ pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์มีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Eklund, 1984) โดยทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนและไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) ดังนั้นจึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งมีความสำคัญมากในการทำผักดอง และหญ้าหมัก เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา

2.5 รอยเทอริน (Reuterin)

รอยเทอรินเป็นสารที่มวลโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่ pH เป็นกลาง สร้างโดย *Lactobacillus reuterin* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ มีชื่อเคมีทางการค้าว่า 3-hydroxypropanol ส่วนใหญ่จะถูกสร้างในช่วง stationary phase ของการเจริญ (Axelsson, 1998) แบคทีเรียสามารถผลิตรอยเทอรินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกลูโคสและกลีเซอรอล ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ซึ่งจะมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวางโดยจะมีผลทั้งแบคทีเรียแกรมบวก รา ไวรัส รวมทั้งโปรโตซัว ซึ่งกลไกการยับยั้งเกิดจากรอยเทอรินทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลไฮดริล เช่น เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ทำให้ไม่เกิดการจับกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ส่งผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ DNA ได้ (อรวรรณ, 2546)

มีรายงานว่ามีการใช้รอยเทอรินหรือแบคทีเรียแลกติกลุ่ม *Lactobacilli* ที่สามารถผลิตรอยเทอรินในการถนอมอาหาร ซึ่งจะมีประโยชน์ในการถนอมอาหารประเภทปลาส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียลดลง (อรวรรณ, 2546)

2.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคทีเรียแลกติกหลายชนิดที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไวต่อสารดังกล่าว โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน แต่จะไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิต และยังพบว่าแบคเทอริโอซินยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสียได้ เช่น *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ปัจจุบันแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกได้รับความสนใจอย่างมาก ซึ่งนำไปใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ปรับปรุงกลิ่นรสของอาหารหมักดอง หรือใช้ป้องกันโรคเต้านมอักเสบในวัว (Ryan *et al.*, 1998) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร เช่น ไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถนำมาใช้ทางการค้ามีเพียงชนิดเดียว มีชื่อทางการค้าคือ "nisaplin" เป็นสารที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นวัตถุ

กันเสียและอนุญาตให้ใช้ในประเทศต่างๆ ถึง 47 ประเทศทั่วโลก (Delves-Broughton, 1990) ซึ่งผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ไนซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด และสามารถทนความร้อนได้สูงจึงได้มีการใช้ไนซินรูปแบบต่างๆ ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารหลายประเภท เช่น การใช้ไนซินเป็นสารกันเสีย โดยตรงในอาหารกระป๋อง เนยแข็ง นม และผลิตภัณฑ์นม เบียร์ และน้ำผลไม้ การใช้ไนซินร่วมกับสารอื่นๆ เช่น EDTA และเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysosyme) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ (Schillinger *et al.*, 1996)

แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* N12 ที่แยกได้จากขนมจีนแป้งหมักสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินชนิดไนซิน Z โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสียที่ตรวจพบในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก (Swetwiwathana *et al.*, 2009)

แบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกมีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่า ซึ่งแบคทีเรียแลกติกหลายชนิดที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น ในกลุ่ม *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus* โดยมีสมบัติในการทำลายแบคทีเรียเป้าหมายที่แตกต่างกันได้หลายชนิด โครงสร้างในสายพอลิเพปไทด์ของแบคเทอริโอซิน สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนทำหน้าที่ต่างกัน ดังนี้

2.6.1 binding peptide ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคเทอริโอซินจับกับ receptor บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย

2.6.2 active protein ทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรียโดย active protein จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

2.6.3 immunity protein ทำหน้าที่จับกับ active peptide อย่างจำเพาะซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein เหมือนกัน

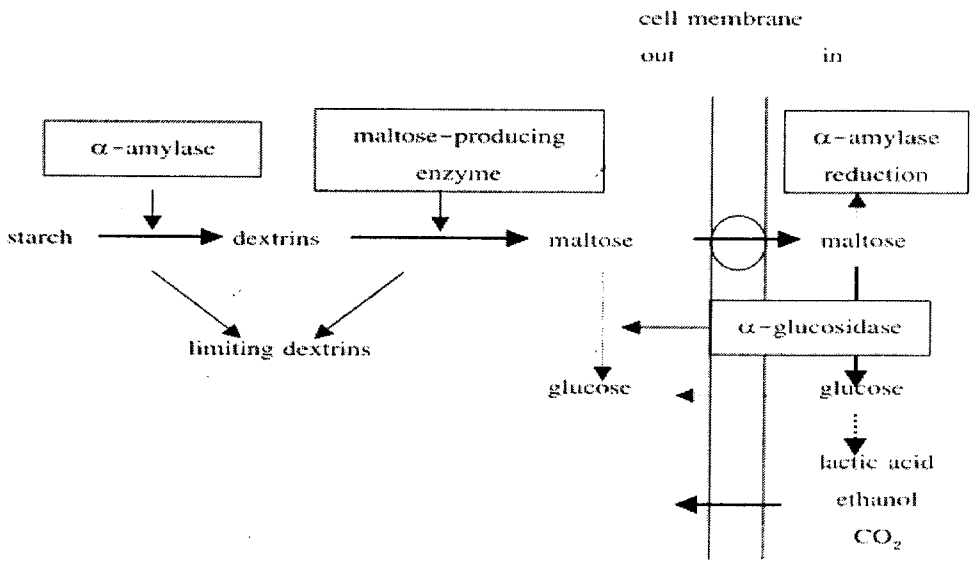
2.6.4 translocation peptide ช่วยให้มีการเคลื่อนย้ายสารเชิงซ้อนของแบคเทอริโอซินผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินเข้าจับกับเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนทำให้เกิดรูหรือช่องว่างที่มีลักษณะคล้ายซี่ไม้ที่นำมาประกอบกันเป็นถังมีรูตรงกลาง (barrel-stave) ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นสารให้พลังงานของเซลล์ และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่สปอร์งอกขึ้นมา และแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophillus* และ *Eshcherichia coli* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3 การสร้างเอนไซม์โดยแบคทีเรียแลกติก

การหมักกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติกช่วยปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์ธัญพืช เบเกอรี่ เป็นต้น เนื่องจากมีเอนไซม์ α-amylase และเอนไซม์อื่นๆ (Salminen and Wright, 1998)

Santoyo *et al.*, (2003) ได้อธิบายกลไกการย่อยแป้งได้เป็นกรดแลกติกของ *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 โดยเริ่มจาก *L. fermentum* Ogi E1 ย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์ที่สร้างมอลโทส (maltose-producing enzyme) ซึ่งเอนไซม์นี้อาจเป็นเบต้า-อะไมเลส (β-amylase) หรือกลูแคนแอลฟา 1,4 มอลโทไฮโดรเลส (glucan α-1,4 maltohydrolase) ได้เป็นน้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลมอลโทสถูกส่งเข้าสู่เซลล์เมนเบรนภายในเซลล์ของ *L. fermentum* Ogi E1 ถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสุดท้ายจะได้เป็นกรดแลกติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังรูปที่ 1.3 แต่ที่ pH ต่ำกว่า 4 นั้นจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์มีผลทำให้เอนไซม์ที่สร้างมอลโทสลดลง แต่กระบวนการหมักธัญพืชมักจะมี pH อยู่ระหว่าง 3.5-4 ซึ่งเป็นจุดหยุดของกระบวนการหมักตามธรรมชาติ



รูปที่ 1.3 กระบวนการไฮโดรไลซิสแป้งเป็นกลูโคสโดย *Lactobacillus fermentum* Ogi E1
ที่มา : Santoyo *et al.* (2003)

Giraud *et al.*, (1994) ได้ศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบด้วยแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* (strain A6) พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระยะ

เวลาการหมัก 2 วันเพื่อใช้ในการย่อยแป้งโดยพิจารณาจากลักษณะเม็ดแป้งที่ได้จากการส่องด้วยกล้อง SEM ซึ่งจะเห็นการถูกทำลายของโครงสร้างเม็ดแป้งได้อย่างชัดเจน

3.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

นิตยา (2532) ได้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และโปรติเอส (protease) ในขั้นตอนต่างๆ ระหว่างกระบวนการผลิตขนมจีนตั้งแต่ปลายข้าวไปจนถึงแป้งทับน้ำ แสดงผลดังตารางที่ 1.6 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมีค่าสูงสุดในขั้นตอนของการหมักปลายข้าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวจะลดลงในขั้นตอนของการนอนน้ำแป้งและทับน้ำแป้งตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการทำขนมจีนแป้งหมักที่สามารถสร้างเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้นั้นจะมีการเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมักปลายข้าว โดยกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีค่าสูงถึง 55.5 หน่วยต่อกรัม ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีการย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-1,4 ได้แป้งที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลงและอาจได้เดกซ์ทริน (dextrin) มอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose)

ตารางที่ 1.6 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และโปรติเอสในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

ขั้นตอนการผลิต	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อกรัม)		
	แอลฟาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	โปรติเอส
ปลายข้าว	0	0	0
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	55.5	0.5	0
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	52.1	0.5	0
แป้งนอนน้ำ	45.8	0.2	0
แป้งทับน้ำ	34.8	0.1	0

ที่มา : ดัดแปลงจาก นิตยา (2532)

ส่วนเอนไซม์กลูโคอะไมเลสนั้นมีกิจกรรมน้อยมาก เมื่อพิจารณาปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดในขั้นตอนนอนน้ำแป้งและทับน้ำแป้ง พบว่ามีกิจกรรมลดลง ดังนั้นจึงไม่น่าจะมีการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในขั้นตอนนอนน้ำแป้งและทับน้ำแป้ง และเอนไซม์ที่ตรวจพบน่าจะเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นในขั้นตอนการหมักปลายข้าวมากกว่า ส่วนเอนไซม์โปรติเอสนั้นตรวจไม่พบกิจกรรมในทุกขั้นตอน แต่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน

พบว่ามีปริมาณลดลง 1.3 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณน้อยมากสำหรับย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้ในการเจริญเท่านั้น จึงทำให้ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

ภควัฒน์ (2547) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และอะไมโลสในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าปริมาณโปรตีนในกระบวนการหมักลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณอะไมโลสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดการไฮโดรไลซ์อะไมโลสเพกทินด้วยกรดหรือเอนไซม์ เกิดดีพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) กลายเป็นอะไมโลส ส่งผลทำให้มีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นการไฮโดรไลซ์แป้งส่วนหนึ่งเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก

สุภรัตน์ และคณะ (2534) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขนมจีนในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมจีนโดยได้ทำการศึกษาทั้งขนมจีนแบบหมักและแบบไม่หมัก พบว่าในขนมจีนแบบหมักเมื่อข้าวหักผ่านการล้าง และหมักเป็นเวลา 1-2 คืน ข้าวจะมีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น 1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนจะลดลงเล็กน้อย แป้งทับน้ำมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 5-6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอะไมโลสจะมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำก้อนแป้งมานึ่งเฉพาะผิวหน้าประมาณครึ่งนิ้ว พบว่าแป้งสูญเสียความชื้นไปบางส่วน จึงต้องมีการเติมน้ำร้อนลงไปในขณะที่ทำการนวดแป้งให้เหนียวจนมีความชื้นมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไปเข้าเครื่องโรยเส้น โดยแป้งที่นวดดีแล้วมีปริมาณอะไมโลสสูงขึ้นระหว่าง 28.5-31.9 เปอร์เซ็นต์ เส้นขนมจีนแบหมักมีปริมาณโปรตีน 4.52-5.59 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้ง 89.56-91.04 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอะไมโลส 29.92-31.87 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขนมจีนแบบไม่หมักนั้น พบว่าในแป้งทับน้ำมีปริมาณโปรตีนลดลงประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้ง และอะไมโลสมีแนวโน้มที่สูงขึ้น เส้นขนมจีนแบบไม่หมักมีปริมาณโปรตีน 5.62-6.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้ง 89.90-90.67 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอะไมโลส 31.44-32.79 เปอร์เซ็นต์

4 สารระเหยให้กลิ่นรสที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก

การศึกษาเกี่ยวกับสารระเหยของผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากคาร์โบไฮเดรต ส่วนใหญ่นั้นเกี่ยวข้องกับการหมักธัญชาติ เช่น โคจิข้าว (rice koji) การหมักแป้งสาลีเป็นขนมปัง การหมักโดเปรี้ยว (sourdough) จากแป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และแป้งข้าวไรย์ เป็นต้น ซึ่งกลุ่มสารระเหยที่พบนั้นมีหลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ กรดอินทรีย์ อัลดีไฮด์ คีโทน และอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งมีสารระเหยเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นในผลิตภัณฑ์ธัญพืชหมัก (จีสุดา, 2548)

กลไกการเกิดสารระเหยให้กลิ่นที่พบในผลิตภัณฑ์ธัญพืชที่สร้างจากกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และจุลินทรีย์ (enzymatic and microbiological process) ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอาจมีอยู่ในวัตถุดิบ หรือมาจากการเติมลงไปเพื่อส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบโปรตีน แป้ง และไขมันในวัตถุดิบ ส่วนกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในวัตถุดิบอาจถูกเหนี่ยวนำได้โดยการโม่แป้ง (flour-milling) หรือจากการนวดโด (dough-kneading) ส่วนจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง เช่น ยีสต์และแบคทีเรียจะเกี่ยวข้องในการหมักโด เชื้อราจะเกี่ยวข้องในการหมักโคจิข้าว เป็นต้น และอีกกลไกเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะการผลิต เช่น ความร้อนสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่แล้วในวัตถุดิบ หรือเปลี่ยนสารที่ได้มาจากกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และจุลินทรีย์ไปเป็นสารให้กลิ่น (จีสุดา, 2548)

การผลิตขนมจีนแป้งหมักมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ดังนั้นกลไกการเกิดสารระเหยน่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับเอนไซม์และกิจกรรมของจุลินทรีย์เป็นหลัก รวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการผลิต เช่น การโม่ข้าว และความร้อนในการทำเส้นสุก น่าจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของวัตถุดิบข้าวที่ใช้ในการผลิตถือเป็นการพัฒนาคุณภาพทางกลิ่นรสของขนมจีนแป้งหมักซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว

แบคทีเรียแลกติกเป็นตัวการในการผลิตสารระเหยและสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งกลิ่นรสที่เกิดขึ้นในอาหารหมักนี้เกิดจากกรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ในขณะที่กิจกรรมการย่อยโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบหอมระเหยจากเพปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมันอิสระ สารให้กลิ่นรสที่สำคัญ เช่น กรดแลกติกและกรดอะซีติกจะให้ลักษณะกลิ่นเฉพาะตัว และให้กลิ่นรสเปรี้ยว (acid flavor) สารหอมระเหย เช่น เอทานอล (ethanol) เอทิลอะซีเทต (ethylacetate) เป็นผลิตภัณฑ์หลักของกลุ่ม heterofermentative ไดอะซีทิล (diacetyl) เป็นผลิตภัณฑ์หลักของกลุ่ม homofermentative อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) เป็นต้น (Gobbetti, 1998)

Leroy and De Vuyst (2004) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative เช่น *L. lactis* จะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาล ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลกติก ซึ่งกระบวนการ

เมแทบอลิซึมต้องผ่านไพรูเวต (pyruvate) เพื่อผลิตพลังงานและรักษาสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวตทำให้เกิดสารเมแทบอไลต์ต่างๆ เช่น อะซีเทต เอทานอล ไดอะซีทิล และอะซีทัลดีไฮด์ ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ เช่น sourdough ได้แลกเทต และอะซีเทต คีเฟอร์ และคูมิสส์ ได้เอทานอล เนย ได้ไดอะซีทิล และโยเกิร์ต ได้อะซีทัลดีไฮด์

4.1 สารระเหยให้กลิ่นที่เกิดจากการหมัก

สารระเหยให้กลิ่นรสของอาหารหมักที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นผลผลิตของ second metabolite โดยจุลินทรีย์ ตัวอย่าง เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโทน เอสเทอร์ เทอร์พีน และแลกโตน เป็นต้น (Scharpf *et al.*, 1986) โดยมีทฤษฎีที่อธิบายเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารให้กลิ่นรสมากมาย ซึ่งสามารถนำจุลินทรีย์แต่ละชนิดมาประยุกต์ใช้เพื่อสร้างสารระเหยให้กลิ่นรสได้แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 1.7

จีสุดาและคณะ (2547) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณสารระเหยต่าง ๆ ที่พบในขั้นตอนของการผลิตขนมจีนแป้งหมัก พบว่า มีสารระเหยมากกว่า 30 สาร โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดโมเลกุลเล็ก และอื่นๆ โดยพบแอลกอฮอล์ในสัดส่วนที่มากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ เช่น เอทานอล โพรพานอล 1-บิวทานอล และ 1-เพนทานอล เป็นต้น รองลงมา คือ เอสเทอร์ เช่น เอทิล อะซีเทตเมทิล อะซีเทต และเอทิลอะซีเทต เป็นต้น สารประกอบคาร์บอนิลที่พบจะเป็น อัลดีไฮด์และคีโตน เช่น เฮกซานอลไดอะซีทิล และ อะซีโทอิน เป็นต้น ส่วนกรดโมเลกุลเล็กพบว่ามีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 2-5 อะตอม เช่น กรดอะซีติก กรดโพรไพโนอิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารประกอบซัลเฟอร์ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ แต่พบในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณสารระเหยทั้งหมด และลักษณะกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของขนมจีนแป้งหมักน่าจะเป็นผลจากการรวมกันของสารหลายชนิด เช่น ไดอะซีทิล กรดอะซีติก กรดบิวทิริก และกรดไอโซเพนทาอิก เป็นต้น

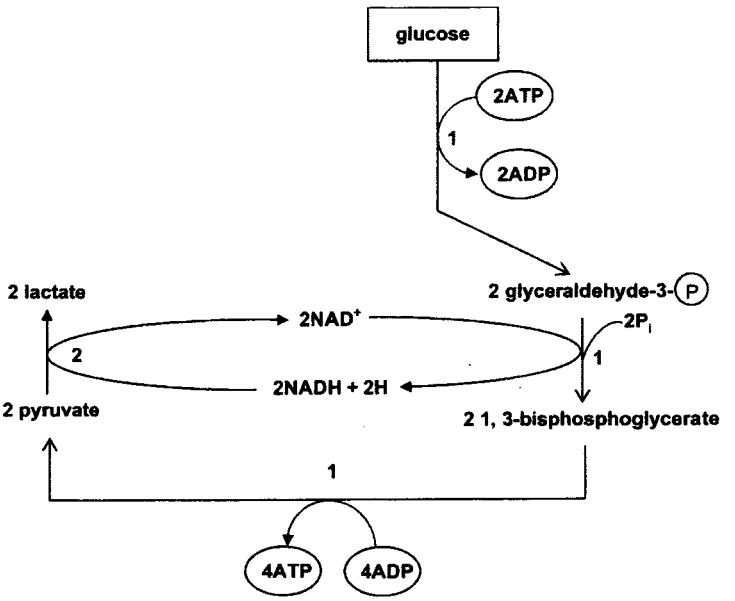
ตารางที่ 1.7 ตัวอย่างสารระเหยให้กลิ่นรสที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดจุลินทรีย์	สารระเหยที่สร้าง	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส
Bacteria		
Lactic acid bacteria	acetaldehyde, diacetyl, aceton,	sharp, buttery, fresh
Streptococcus	lactic acid	
Lactobacillus		
Leuconostoc		
Propionicbacteria	acetoin, dienals. Aldehydes	sour, sharp
Bacillus	3-methyl-1-butanal	granary
Yeasts		
Saccharomyces	Higher alcohols, lactones, thio-compounds	aroma, associated with bread and alcohol fermentations
Molds		
Aspergillus	unsaturated alcohols	fungal, musty, mushroom
Pennicillium	1-octene-3-ol, methyl ketones, 2-phenyl-ethanol, thujopses, nerolidine	mushroom, blue cheese, rose

ที่มา : ดัดแปลงจาก Welsh (1994)

4.1.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่พบในการหมักคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกและกรดอะซีติก ซึ่งพบว่าเป็นกรดชนิดหลักในผลิตภัณฑ์พวก sourdough ที่ใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกับยีสต์ในการหมักแป้งสาลี (Damiani *et al.*, 1996) ซึ่งกลไกการเกิดเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการหมักทั้งสองประเภทของแบคทีเรียแลกติก (Gottschalk, 1986) ได้แก่ การหมักแบบ homofermentative ซึ่งมีกลไกดังรูปที่ 1.4 โดยจะสลายกลูโคสผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway เป็นไพรูเวต โดยไม่เกิดการดีคาร์บอกซีเลชั่นเป็นอัลดีไฮด์เหมือนกับการหมักแอลกอฮอล์ แต่จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์แลกเทตดีไฮโดรจีเนสเกิดเป็นกรดแลกติกประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Pediococcus* และ *L. plantarum* เป็นต้น และการหมักแบบ heterofermentative ด้วยเอนไซม์ฟอสโฟคีโทเลส จะได้กรดแลกติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะได้กรดอะซีติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น *Leuconostoc* และ *L. fermentum* เป็นต้น



รูปที่ 1.4 การสร้างกรดแลกติกจากกลูโคสโดย homofermentative pathway (1, Enzymes of the Emden-Meyerhof-Parnas pathway, 2, lactate dehydrogenase)

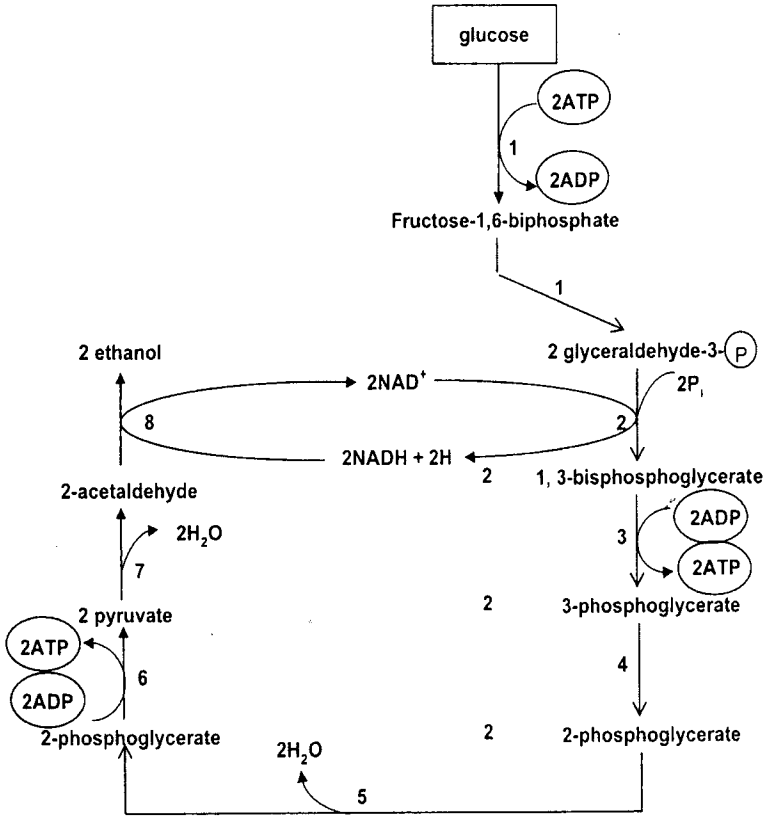
ที่มา : Gottschalk (1986)

ส่วนกรดอินทรีย์สายสั้น (C_2-C_5) มีกลไกการเกิดหลายอย่าง อาจเกิดจากการหมักน้ำตาลของยีสต์และแบคทีเรียแลกติก โดยเกิดการดีคาร์บอกซิเลชั่นของ α-keto acids และกิจกรรมของการย่อยสลายไขมัน (Martinez-Anaya, 1996) นอกจากนี้สาร 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid อาจเกิดจากการย่อยสลายลูซีน และไอโซลูซีน ซึ่งพบว่าเป็นสารสำคัญในขนมปัง bouquet (Urbach, 1997) ซึ่งยีสต์มีความสามารถย่อยสลายกรดอะมิโนโดยเกิดปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น หรือดีคาร์บอกซิเลชั่น

4.1.2 แอลกอฮอล์

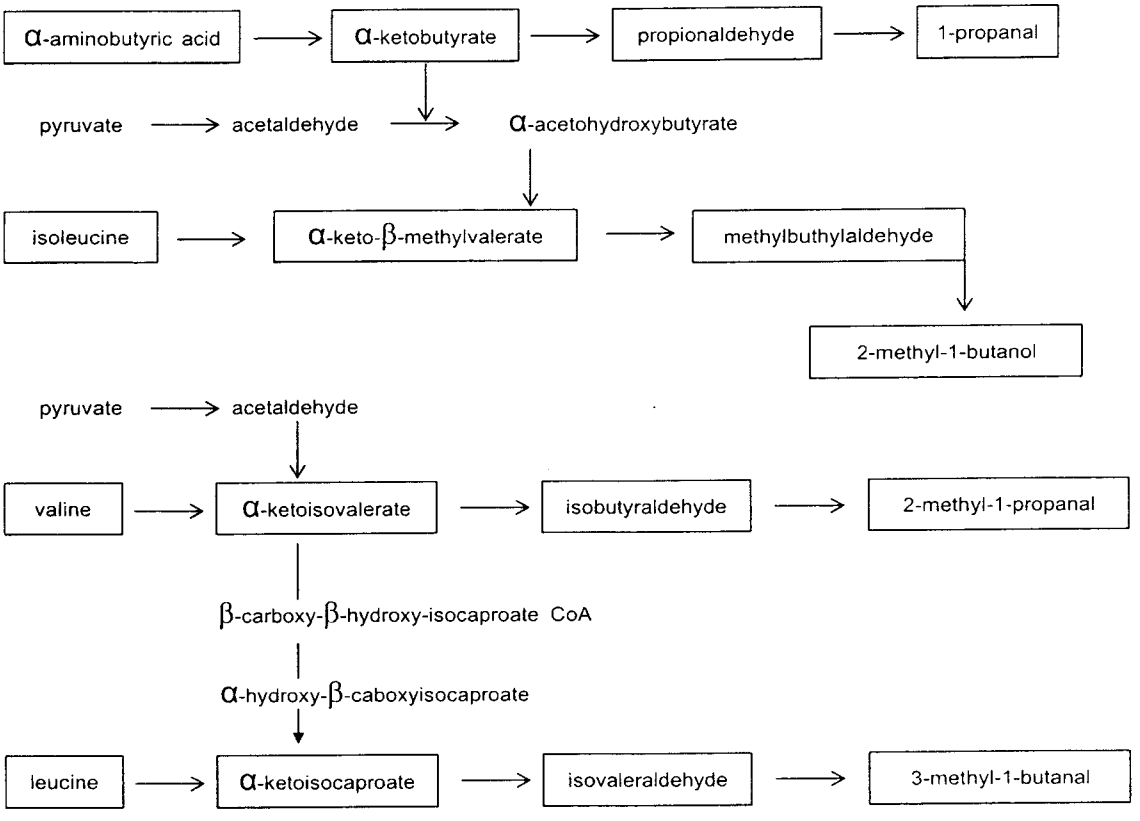
แอลกอฮอล์ที่พบในการหมักส่วนใหญ่เป็นเอทานอลและ fusel alcohol ถึงแม้ว่าจะมีค่า odor threshold ค่อนข้างสูงแต่ก็มีความสำคัญ เนื่องจากพบในปริมาณมาก ยีสต์มีความสามารถในการสร้างเอทานอลจากการสลายกลูโคสผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (Gottschalk, 1986) โดยกลูโคส 1 โมเลกุลจะเปลี่ยนเป็นไพรูเวต 2 โมล ซึ่งจะถูกดีคาร์บอกซิเลตเป็น acetaldehyde โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลสก่อนที่จะถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังรูปที่ 1.5

fusel alcohol หรือ higher alcohol มีกระบวนการเกิดจากยีสต์ได้ 2 รูปแบบ คือ เกิดการดีคาร์บอกซิเลชั่น และรีดักชั่นของกรดอะมิโน หรือถ้ามีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดจะเหนี่ยวนำให้เกิดการ biosynthesis กรดอะมิโนขึ้น ดังรูปที่ 1.6 ซึ่งแอลกอฮอล์ที่ได้จะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่ากรดอะมิโนดั้งต้น โดยจะเกิดจากการรีดิวซ์ α-keto acid ที่ได้จากการสังเคราะห์หรือการสลายกรดอะมิโน ยกเว้น 1-propanol ซึ่งไม่ได้เกิดมาจาก L-threonine นอกจากนี้เชื้อราก็มีความสามารถในการสร้าง fusel alcohol เช่นกันโดยพบว่าการหมักข้าวสุกด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดแอลกอฮอล์ขึ้นเช่นกัน ได้แก่ เอทานอล, 2-methyl-1-propanol และ 3-methyl-1-butanol ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) ที่ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน



1. Initial enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway
2. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
3. 3-phosphoglycerate kinase
4. phosphoglycerate mutate
5. enolase
6. pyruvate kinase
7. pyruvate decarboxylase
8. Alcohol decarboxylase

รูปที่ 1.5 กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยยีสต์
ที่มา : Gottschalk (1986)



รูปที่ 1.6 Biosynthethic pathway ที่ทำให้เกิด fusel alcohols
ที่มา : Jelen and Wasowicz (1998)

4.1.3 อัลดีไฮด์

อัลดีไฮด์ส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์จากธัญพืชที่เกิดจากการสลายกรดไขมัน แต่พบว่ามีอัลดีไฮด์บางชนิดเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น 3-methylbutanal โดย Damiani *et al.*, (1996) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดสารระเหยในการหมัก sourdough จากแป้งสาลีด้วยแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ พบว่าการเกิดอัลดีไฮด์นั้นมีความแปรปรวนอย่างเห็นได้ชัดในตัวอย่างที่หมักด้วยจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงสรุปว่าการเกิดอัลดีไฮด์ไม่น่าจะมีกลไกมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันเพียงอย่างเดียว แต่น่าจะเป็นการสร้างจากแบคทีเรียแลกติกด้วยโดยพบว่า sourdough ที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งมีการหมักแบบ homofermentative มีความสามารถสร้างสาร 3-methylbutanal (ให้กลิ่นมอลท์) กลไกการเกิดสารดังกล่าวน่าจะเกิดจากการทรานส์อะมิเนชั่น และดีคาร์บอกซิเลชั่นของกรดอะมิโน (Reineccius, 1994)

4.1.4 คีโทน

คีโทนที่สำคัญที่ได้จากกระบวนการหมัก เช่น acetoin และ diacetyl ซึ่งเป็น aliphatic ketone ที่ให้กลิ่นเนยเป็นหลัก โดยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* และ *Leuconostoc cremoris* สามารถสร้างสารดังกล่าวได้โดยใช้ซิเทรตเป็นสารตั้งต้น (Gottschalk, 1986) โดยจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีเทต และออกซาโลอะซีเทตด้วยเอนไซม์ซิเทรตไลเอส จากนั้นออกซาโลอะซีเทตจะถูกดีคาร์บอกซิเลตไปเป็นไพรูเวต ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ acetyl-CoA ได้เป็น diacetyl ในที่สุด ซึ่ง diacetyl ที่เกิดขึ้นจะสามารถรีดิวซ์ไปเป็น acetoin โดยเอนไซม์ acetoin dehydrogenase สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้าวหมักนั้น พบว่าโคจิข้าวที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *A. oryzae* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นมีสาร diacetyl และ acetoin เกิดขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) ที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ valine นอกจากนี้ยังพบในผลิตภัณฑ์แป้งหมักจากธัญพืชนิดอื่นด้วย โดย Halm *et al.*, (1993) พบว่า acetoin เป็นสารหลักที่พบในโดแป้งข้าวโพดที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกร่วมกับยีสต์ และ Damiani *et al.*, (1996) พบว่า sourdough ที่ได้จากการหมักแป้งสาลีด้วยแบคทีเรียแลกติกชนิด homofermentative มีสาร diacetyl เกิดขึ้นด้วยเช่นกัน

4.1.5 เอสเทอร์

เอสเทอร์สำคัญที่พบในการหมักคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ คือ ethyl acetate (ให้กลิ่นผลไม้) ซึ่งพบทั้งในโคจิและ sourdough ซึ่งสารเอทิลเอสเทอร์ส่วนใหญ่จะให้กลิ่นคล้ายผลไม้ (Shaikh, 2002) กลไกการเกิดเอสเทอร์ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับยีสต์ โดยยีสต์สามารถสร้างเอสเทอร์ได้ 2 ทาง คือ ใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์อะซิทิลทรานส์เฟอเรสร่วมกับเอนไซม์แอลกอฮอล์แอซิลทรานส์เฟอเรส (alcohol acyl transferase) และการเกิดเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) กรดอินทรีย์ด้วยแอลกอฮอล์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ชนิดอื่นก็มีความสามารถในการสร้างเอสเทอร์เช่นกัน โดยเกี่ยวข้องกับเอนไซม์เอสเทอร์เรสและไลเพสเป็นส่วนใหญ่ เริ่มต้นจากการไฮโดรไลซ์กลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเพสเกิดเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล จากนั้นกรดไขมันอิสระจะทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกับแอลกอฮอล์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอทานอลโดยเอนไซม์เอสเทอร์เรสเกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ในที่สุด

5. ขนมจีน

ขนมจีนเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวที่ได้รับการนิยมบริโภคกันมาก การผลิตขนมจีนในประเทศไทยมีมาตั้งแต่สมัยอยุธยา และในปัจจุบันมีการผลิตเพื่อบริโภคในทุกภาคของประเทศ มีการผลิตตั้งแต่ระดับพื้นบ้านไปจนถึงระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีกรรมวิธีในการผลิตจะคล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันในเรื่องของปริมาณการผลิตและการใช้อุปกรณ์เครื่องมือทุ่นแรงช่วยในการผลิต

5.1 ประเภทของขนมจีน

โดยขนมจีนที่ผลิตจะแบ่งตามวิธีการผลิตออกเป็น 2 ชนิด (นุจรี, 2547) คือ

5.1.1 ขนมจีนแป้งหมัก

เป็นขนมจีนที่ได้จากการหมักข้าวเจ้า หรือปลายข้าวเจ้า โดยจะทำการหมัก 2-3 วัน ก่อนที่จะนำมาโม่แล้วทำเป็นขนมจีน ซึ่งจะทำให้เส้นมีความเหนียวนุ่ม มีสีคล้ำเล็กน้อย มีกลิ่นหมัก และสามารถเก็บไว้ได้นานจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเป็นส่วนใหญ่

5.1.2 ขนมจีนแป้งสด

เป็นขนมจีนที่ทำจากการข้าวเจ้า หรือปลายข้าวเจ้าที่ผ่านการแช่น้ำหรือล้างน้ำก่อนที่จะนำมาโม่แล้วทำเป็นขนมจีน เส้นขนมจีนจะกระด้าง ไม่เหนียว ไม่มีกลิ่นหมัก และมีอายุการเก็บรักษาสั้นจึงมีผู้บริโภคน้อย

ขนมจีนแป้งหมักที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่ในกระบวนการผลิตขนมจีนเป็นจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบต่างๆ เช่น มาจากปลายข้าว น้ำ เครื่องมือที่ใช้ ตลอดจนภาชนะในการบรรจุ หรือจากตัวผู้ผลิตเอง ปัญหาในการผลิตขนมจีนที่พบมาก ได้แก่ เส้นมีสีคล้ำ มีกลิ่นหมักแรง หรือเส้นเปื่อยยุ่ยและขาดง่ายจากการที่มีจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการปนเปื้อน นอกจากนี้เคยมีรายงานของกองระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus aureus* จากการบริโภคขนมจีน (นิตยา, 2532) ในปัจจุบันได้มีการกำหนดเกณฑ์คุณภาพมาตรฐานของขนมจีนขึ้น โดยกำหนดให้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1×10^6 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม จำนวน *S. aureus* ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม จำนวน *Bacillus cereus* ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และมีปริมาณ *Escherichia. coli* น้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัมโดยวิธี MPN (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน, 2547)

5.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตขนมจีน

วัตถุดิบเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตเพราะมีผลต่อลักษณะทางด้านกายภาพของเส้นขนมจีน ได้แก่

5.2.1 ข้าว

ข้าวที่นิยมใช้ คือ ข้าวเจ้า ซึ่งเป็นส่วนปลายหรือท่อน หรือข้าวหัก ซึ่งจะใช้ข้าวที่มีอายุการเก็บมากกว่า 6 เดือน แต่จะไม่เกิน 1 ปี การเลือกข้าวหรือปลายข้าวมาทำขนมจีนต้องพิจารณาปัจจัยหลายประการ เช่น พันธุ์ข้าว แหล่งที่ปลูก วิธีการปลูก วิธีการสีข้าว และอายุการเก็บ ซึ่งจะมีผลต่อการผลิต สีของขนมจีน และลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน พันธุ์ข้าวที่นิยมใช้ในการทำขนมจีน เช่น พันธุ์เหลืองประทิว เหลืองอ่อน เหลืองใหญ่ บัวใหญ่ เป็นต้น จากการตรวจสอบสมบัติต่างๆ ของข้าวเหล่านี้ พบว่าข้าวจะมีปริมาณอะไมโลสสูงถึง 27 เปอร์เซนต์ ผู้ผลิตขนมจีนในปัจจุบันนิยมใช้ข้าวหักแทนข้าวเต็มเมล็ดเนื่องจากข้าวเต็มเมล็ดมีราคาสูงกว่าจึงไม่คุ้มทุน แต่ก็ยังไม่ทราบสมบัติที่แท้จริงของข้าวที่ใช้ทำขนมจีน

จากสมบัติของแป้งในข้าวแบ่งเป็น 3 พวก คือ พวกที่มีอะไมโลสต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ พวกที่มีอะไมโลสปานกลาง 20-25 เปอร์เซ็นต์ และพวกที่มีอะไมโลสสูงมากกว่า 27 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติแล้วแป้งข้าวเจ้าจะมีอะไมโลส 7-33 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของข้าว หรือ 8-37 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแป้ง ส่วนที่เหลือจะเป็นอะไมโลเพคติน (นุจรี, 2547)

5.2.2 น้ำ

น้ำเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตเส้นขนมจีน คุณภาพน้ำที่ดีจะส่งเสริมให้การผลิตได้เส้นขนมจีนที่มีคุณภาพดี แต่ถ้าน้ำไม่มีคุณภาพก็จะเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อคุณภาพเส้นขนมจีนเช่นเดียวกัน ดังนั้นเราต้องใส่ใจกับการเลือกน้ำที่จะนำมาใช้ในการผลิตเส้นขนมจีนให้ได้คุณภาพ ทำให้ได้เส้นขนมจีนที่มีคุณภาพจริงๆ น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำที่สะอาด ไม่มีสารแขวนลอย มีความกระด้างของน้ำต่ำ ถ้าเป็นน้ำบาดาลควรสูบพักไว้เพื่อให้ไอออนของเหล็กตกตะกอนเสียก่อนจึงนำมากรองผ่านทรายแล้วผ่านการกำจัดความกระด้าง แต่ถ้าเป็นน้ำประปาไม่ควรมีคลอรีนมากเกินไป เพราะถ้ามีคลอรีนมากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นผิดปกติ ถ้าน้ำขุ่นจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำ ซึ่งน้ำที่มีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อยมีค่าพีเอช 6.4 จะทำให้ขนมจีนมีสีปกติ คือ สีขาวออกเหลือง แต่ถ้าใช้น้ำที่มีฤทธิ์ค่อนไปทางด่างมีค่าพีเอช 7.4 ขนมจีนที่ได้จะมีสีออกเขียวปน แต่ถ้าใช้น้ำค่อนข้างเป็นกรดมีพีเอช 5.5 จะได้ขนมจีนสีออกแดงปน (อรอนงค์, 2533) ซึ่งเป็นปัญหาคุณภาพของขนมจีนที่เกิดจากน้ำในกระบวนการผลิต

5.2.3 เกลือ

อาจจะใช้เกลือป่นหรือเกลือเม็ดก็ได้ใส่ลงในแป้งโม่ ซึ่งจะใช้เกลือปริมาณ 7 กิโลกรัมต่อข้าว 100 กิโลกรัม โดยเกลือจะช่วยป้องกันการบูดของแป้ง และพบว่าการล้างแป้งด้วยน้ำเกลือที่ความเข้มข้น 7-8 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยกำจัดกลิ่นหมักที่ค่อนข้างรุนแรงได้ โดยทำการล้างแป้งประมาณ 2 ครั้ง ซึ่งใช้น้ำเกลือ 2 เท่าของปริมาณแป้ง แล้วล้างเกลือออกด้วยน้ำ (ปราณี, 2536)

5.3 กระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

5.3.1 การหมักข้าว

ข้าวที่ใช้ผลิตต้องนำมาล้างให้สะอาดและแช่น้ำเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก และลดการปนเปื้อนต่างๆ รวมทั้งทำให้เอนโดสปอร์ของเมล็ดข้าวอ่อนตัวช่วยให้เม็ดแป้งแตกตัวง่ายขึ้นและง่ายต่อการบด (ณรงค์, 2538) แล้วนำมาใส่ในภาชนะสำหรับหมักน้ำไหลผ่านสะดวก หมักโดยตั้งทิ้งไว้กลางแดดหรือในร่ม ถ้าหมักกลางแดดข้าวจะมีสีขาว แต่ถ้าไว้ในร่มข้าวจะมีสีเหลืองอมส้ม มีการรดน้ำในตอนเช้าและเย็นของทุกวันเพื่อทำการล้างข้าว พร้อมทั้งกลับข้าวจากด้านล่างขึ้นมาด้านบนหมุนเวียนกันไป ระยะเวลาในการหมักข้าวขึ้นอยู่กับแต่ละสถานที่ผลิต ส่วนมากจะทำการหมักเป็นเวลา 2-3 วัน ข้าวจะมีสีคล้ำ มีกลิ่นรุนแรง และเปื่อยยุ่ยเนื่องจากแป้งถูกไฮโดรไลซ์แล้วได้สารประกอบเดกซ์ทริน (dextrin) และ มอลโทส (maltose) โดยเอนไซม์อะไมเลสที่อยู่ในแป้งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ณรงค์ และอัญชนีย์, 2538) การหมักข้าวเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตโดยกระบวนหมักเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ เช่น ข้าวหักและน้ำ จุลินทรีย์สำคัญที่พบ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก ยีสต์ รา และแบคทีเรียบาซิลลัส ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วงการหมักข้าวสูงถึง 9 log CFU/ml (นิตยา 2532, จีสุดาและคณะ, 2547) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมี ทางกายภาพ และมีปริมาณโปรตีนของขนมจีนที่แตกต่างกัน (ศุภวรรณ และคณะ, 2542) ดังตารางที่ 1.8 ซึ่งข้าวที่ผ่านการหมักแล้วมีสีคล้ำและมีกลิ่นแรง เนื่องจาก *Lactobacillus* และ *Streptococcus* (ณรงค์, 2538) ซึ่งค่า pH จะลดลงมีค่าประมาณ 3.5-4-0 ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้นถึง 0.9 เปอร์เซ็นต์ เกิดสารระเหยให้กลิ่นต่างๆ เช่น เอทานอล เอทิลอะซีเทต ไดอะซีทิล และกรดอะซีติก (จีสุดาและคณะ, 2547) นอกจากนี้ปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆ เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และข้าวหมักมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส (สุภรัตน์ และคณะ, 2534) การหมักทำให้เม็ดแป้งเละแตกตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับความร้อน ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนที่หุ้มรอบๆ แป้งได้สลายตัวไป 40-50 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์อะไมเลสในเมล็ดข้าวทำให้โมเลกุลของอะไมโลสแตกตัวมีขนาดเล็กลง การแตกของเม็ดแป้งมากขึ้นก็จะมีผลให้อะไมโลสหลุดออกมามากขึ้นด้วย และจับตัวเป็นเจลเมื่อเย็นตัว ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเหนียวมาก

ขึ้น นอกจากนี้การที่มีโปรตีนในแป้งต่ำลงมีผลให้เจลหรือเส้นขนมจีนที่ได้มีลักษณะนุ่มไม่กระด้างเหมือนเส้นหมี่ การหมักข้าวโดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ถ้าใช้เวลาในการหมักข้าวเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ย่อยสารอาหารได้มากขึ้นทำให้ข้าวหมักมีค่าความหนืดลดลง ปริมาณกรดเพิ่มมากขึ้น มีกลิ่นหมักแรงขึ้นและขนมจีนมีสีเข้มขึ้น (รักชนก, 2545)

ตารางที่ 1.8 ลักษณะทางกายภาพและปริมาณโปรตีนของขนมจีนแป้งหมักที่ระยะเวลาต่างกัน

เวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส
1	ขาว	กลิ่นข้าว	ทึบแสง, ขุ่นไม่ยืดหยุ่น, เหนียว
2	ขาวปนเหลือง	กลิ่นหมัก	เป็นมันวาว, ยืดหยุ่น, นุ่มมากกว่า

เวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	โปรตีน (%)		
	ขั้นตอนการหมัก	ขั้นตอนการทับน้ำ	เส้นขนมจีน
1	5.88	3.68	1.54
2	5.79	3.05	1.46
3	4.98	2.48	1.14

ที่มา : ศุภวรรณ และคณะ, 2542

5.3.2 การโม่ข้าว

เมื่อหมักข้าวครบ 2 วัน แล้วทำการล้างข้าวให้สะอาด จากนั้นนำข้าวมาโม่ให้ละเอียด ซึ่งในขณะที่ทำการโม่แป้งอาจมีการใส่เกลือลงไปประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ถ้าเป็นข้าวเก่าใช้ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (เอกสารประกอบการให้คำปรึกษาโดยคลินิกเทคโนโลยีราชมงคลสุรินทร์, 2552.) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แล้วทำการแยกส่วนเปลือกนอกออกจากส่วนของเอนโดสเปริ์มและกรองผ่านผ้ากรองลงไปในตุ่ม เป็นการควบคุมไม่ให้ข้าวที่ไม่ได้ผ่านการบด หรือที่ยังบดไม่ละเอียดลงไปปะปนกับแป้งที่ละเอียด (สุพรรณิการ์, 2548)

5.3.3 การนอนน้ำแป้ง

นำแป้งที่ผ่านการโม่แล้วมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำแป้งใส่ในโอ่ง แล้วปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 วัน เพื่อให้แป้งตกตะกอน แล้วดูดน้ำส่วนบนออก 2-3 ครั้ง

ซึ่งต้องเติมเกลือทุกครั้งที่ดูดน้ำแป้งออก โดยขั้นตอนนี้จะมีผลทำให้แป้งมีสีขาวและมีกลิ่นหมักน้อยลง ในขั้นตอนนี้มีกิจกรรมการหมักของจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกับขั้นตอนการหมักข้าวอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และพบสารระเหยในกลุ่มแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ คีโตน อัลดีไฮด์ และกรดอินทรีย์ที่สำคัญเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (จีสุดา และคณะ, 2547) การนอนน้ำแป้งช่วยให้เม็ดแป้งดูดน้ำได้มากขึ้น เม็ดแป้งแตกตัว และมีการกระจายตัวมากขึ้น พองตัวได้ดี และมีปริมาณอะไมโลสออกมาได้มาก เมื่อได้รับความร้อนในขั้นตอนต่อไปซึ่งจะมีผลต่อการเกิดเจลเพิ่มมากขึ้น

5.3.4 การทับน้ำแป้ง

การทับน้ำเป็นการกำจัดน้ำส่วนเกินออกไป โดยการนำแป้งที่ได้จากการนอนน้ำแป้งใส่ถุงดิบ แล้วผูกปากถุงให้แน่นทับด้วยของหนัก 1 วัน ในโรงงานขนาดใหญ่อาจใช้เครื่องเหวี่ยงแยก (centrifuge) หรือ เครื่องบีบอัด (hydrolic pressure) ความชื้นในแป้งมีปริมาณ 42-44 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักและเวลาที่ใช้ทับ (ณรงค์, 2538) ในขั้นตอนนี้มีกิจกรรมการหมักที่เกิดจากจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับขั้นตอนการหมักข้าวและการนอนน้ำแป้ง (สุพรรณิการ์, 2548)

5.3.5 การต้มหรือนึ่งแป้ง

แป้งที่ผ่านการทับน้ำมีลักษณะเป็นก้อนแข็งเนื้อแป้งเกาะกันแน่น การต้มหรือนึ่งแป้งเป็นการทำให้แป้งสุกบางส่วน และทำให้แป้งเหนียวไม่ขาดง่ายเมื่อนำไปบีบเส้น การต้มแป้งเริ่มด้วยนำแป้งที่ผ่านการทับน้ำมาปั้นเป็นก้อนแล้วต้มในน้ำเดือด โดยให้แป้งสุกเข้าไปข้างในประมาณหนึ่งในสามส่วนหรือประมาณ 27-34 เปอร์เซ็นต์ของแป้งทั้งหมด หรือประมาณ 1-2 เซนติเมตร ไม่ควรให้แป้งสุกมากหรือน้อยเกินไปเพราะจะทำให้แป้งเหนียวหรือแข็งมากเกิน ทำให้โรยเป็นเส้นขนมจีนได้ยาก เส้นขนมจีนจะขาดง่ายและจับเป็นเส้นยาก สำหรับโรงงานขนาดใหญ่จะไม่นิยมต้มเนื่องจากไม่สะดวก จึงใช้วิธีนึ่งแป้งแทนเพื่อให้ได้ปริมาณแป้งสุกที่ใกล้เคียงกัน (จีสุดา, 2548)

5.3.6 การนวดแป้ง

การนวดแป้งเป็นการผสมแป้งดิบ และแป้งสุกที่ผ่านขั้นตอนการทำให้สุกเป็นบางส่วนเข้าด้วยกัน เพื่อให้แป้งแตกมากขึ้น ทำให้แป้งมีความเหนียวมากขึ้น โดยการเติมน้ำร้อนลงไปและนวดให้เข้ากันจนแป้งมีความหนืดพอดี ขั้นตอนนี้อาจเรียกว่า การโน้มแป้ง ซึ่งแป้งจะมีความหนืดพอดีถ้ามีความชื้น 70-75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำแป้งมากรองอีกครั้งเพื่อกำจัดก้อนแป้งที่หลงเหลืออยู่ให้หมดไป (สุพรรณิการ์, 2548)

5.3.7 การกรองแป้ง

เนื่องจากการนวดอาจไม่สามารถทำให้แป้งสุกแตกออกจากกันได้หมด อาจเหลือก้อนแป้งสุกปะปนอยู่บ้าง การกรองผ่านผ้าขาวบางจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็น ซึ่งจะเป็นการกำจัดก้อนแป้งที่หลงเหลืออยู่ เพื่อให้แป้งที่ผ่านการกรองมีความละเอียด ทำให้เส้นที่โรยได้มีความเรียบเนียนสม่ำเสมอ (จีสุดา, 2548)

5.3.8 การโรยเส้นขนมจีน

การโรยเส้นขนมจีนอาจทำได้หลายวิธี ถ้าเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านจะใช้แว่นหรือเฝื่อน ซึ่งแว่นนั้นมีลักษณะเป็นแผ่นโลหะกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้ว เจาะรูเล็กๆ ตามขนาดเส้นที่ต้องการให้เต็มผิวหน้าของโลหะ แล้วเย็บติดกันกับถุงผ้าดิบ และเจาะเป็นวงกลมขนาดเดียวกับแผ่นโลหะ เมื่อทำการใส่แป้งลงในแว่น แล้วเอามือรวบปลายผ้าให้เข้ากัน ใช้อีกมือหนึ่งบีบเพื่อให้แป้งผ่านรูเล็กๆ ลงในน้ำเดือด ระวังอย่าให้เส้นขาด ส่วนเฝื่อนเป็นภาชนะรูปทรงกระบอกทำด้วยโลหะอาจเป็นสังกะสีหรือเหล็กที่ไม่เกิดสนิมเจาะรูเล็กๆ ที่ก้น มีหู 2 หู ซึ่งใช้สำหรับยึดภาชนะอีกใบหนึ่งที่มีขนาดเล็กกว่า สามารถสวมเข้าไปในภาชนะใบแรกได้พอดี ซึ่งใช้กดลงไปให้เกิดเป็นเส้น สำหรับในโรงงานขนาดใหญ่จะใช้เครื่องมือที่มีลักษณะคล้ายแว่นทำด้วยโลหะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 นิ้ว ต่อตรงกับท่อและปั๊ม และถังเก็บแป้งที่นวดแล้ว เมื่อเครื่องทำงานปั๊มจะทำให้น้ำแป้งถูกอัดผ่านแว่น แล้วลงในน้ำร้อน ในขณะที่โรยเส้นควรรักษาให้มีอุณหภูมิของน้ำอยู่ที่ 90-95 องศาเซลเซียส (นุจรี, 2548) และรอจนกระทั่งเส้นขนมจีนลอยจึงตักออก ในขั้นตอนนี้มีกระบวนการเจลาติไนซ์เซชัน (gelatinization) เกิดขึ้น โดยเม็ดแป้งจะเกิดการพองตัวมาก และแตกตัวให้อะไมโลสละลายในน้ำทำให้มีความหนืดสูงขึ้น หลังจากนั้นนำมาผ่านน้ำเย็นเพื่อให้เกิดการจับตัวกันของอะไมโลส และเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นเจลและมีสีขาวขุ่น (สุพรรณิการ์, 2548)

5.3.9 การทำขนมจีนให้เป็นจับ

ทำการจับเส้นขนมจีนที่แช่อยู่ในน้ำ วิธีการจับทำโดยใช้มือจับขนมจีนขึ้นมาจากน้ำ และเรียงเส้นขนมจีนให้เป็นเส้นซ้อนกันโดยให้เรียงประมาณ 7-8 เส้น และพันเส้นไว้ที่นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือ ให้เส้นขนมจีนห้อยลงมาตามจับที่ต้องการแล้ววางขนมจีนในลักษณะคว่ำมือลงในภาชนะ ทิ้งให้สะเด็ดน้ำรอให้เส้นแห้งและหดตัว เส้นจะเหนียวขึ้น (ศรีสุดา, 2547)

5.4 คุณภาพของขนมจีน

ขนมจีนที่มีคุณภาพดีควรมีสีขาว เส้นเหนียว ไม่เละ และไม่มีกลิ่นกรด ไม่มีรสเปรี้ยว และสามารถเก็บไว้ได้นานพอสมควร ซึ่งขนมจีนที่มีเส้นไม่เหนียวและเปื่อยยุ่ยเกิดจาก

การใช้ข้าวที่ไม่เหมาะสม มีการนวดแป้งน้อยเกินไป ใช้น้ำที่มีความกระด้างในการผลิต และการเกิดกลิ่นกรดหรือกลิ่นหมักเกิดจากการล้างแป้งน้อยเกินไป (นุจรี, 2547)

5.5 คุณค่าทางโภชนาการของขนมจีน

ขนมจีนจะมีคุณค่าทางโภชนาการ คือ มีความชื้นอยู่ในเกณฑ์ 69.27-73.69 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีน 4.42-5.59 เปอร์เซ็นต์ แป้ง 89.56-91.04 เปอร์เซ็นต์ อะไมโลส 29.92-31.87 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.60-1.20 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 0.79-1.31 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเถ้า 0.21-0.70 เปอร์เซ็นต์ (สุภรัตน์ และคณะ, 2534)

6 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

ในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจุลินทรีย์จะมีบทบาทมากในขั้นตอนการหมักข้าว การนอนน้ำแป้ง และการทับน้ำแป้ง ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก ยีสต์ และแบคทีเรียบาซิลัส ปราโมทย์ และคณะ (2534) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและกรดในกระบวนการหมักขนมจีน พบในช่วง 20-24 ชั่วโมงแรก ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้ในการผลิตมีจำนวนสูงสุดประมาณ 10.6×10^{10} CFU/g ในขณะที่จุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacilli และ Streptococci นั้นพบว่ามีจำนวนประมาณ 10^8 CFU/g สำหรับการเจริญของยีสต์ในระยะต้น อัตราการเจริญสูงสุดอยู่ในช่วง 15-20 ชั่วโมงแรกประมาณ 10^6 CFU/g แล้วลดลงตามลำดับ ต่อมาเมื่อมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจำนวนยีสต์ก็จะลดลงและไม่พบเลยในขนมจีน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดและ pH มีความสัมพันธ์กันกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นด้วย กล่าวคือ ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ pH ลดลง ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างในขั้นตอนกระบวนการผลิตต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ด้วย HPLC ก็ไม่พบปริมาณน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลไดแซคคาไรด์ใดๆ จึงสันนิษฐานจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ว่าสามารถใช้น้ำตาลหมดไปอย่างรวดเร็ว โดยยีสต์จะเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลในช่วงแรก แบคทีเรียแลกติกเป็นตัวการสำคัญในการใช้น้ำตาล และเปลี่ยนเป็นกรดต่อไป กรดที่พบหลัก คือ กรดแลกติก ซึ่งอาจช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของขนมจีนแป้งหมักทำให้การเน่าเสียช้าลง และให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะของขนมจีนแป้งหมัก

นิตยา (2532) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักขนมจีนของโรงงานกลุ่มผู้ผลิตจังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณสูงสุดในทุกขั้นตอนของกระบวนการหมักและพบยีสต์ในปริมาณที่ใกล้เคียงรองลงมา โดยในขั้นตอนการหมักปลายข้าวพบแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ในปริมาณ 10^9 และ 10^8 โคโลนีต่อกรัมตามลำดับ ในขั้นตอนนอน

น้ำแป้งพบ 10^{10} และ 10^{9} โคโลนีต่อกรัมตามลำดับ ส่วนในขั้นตอนทับน้ำแป้ง พบ 10^{7} และ 10^{7} โคโลนีต่อกรัมตามลำดับ เมื่อทำการจำแนกแบคทีเรียที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ โดยการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า แบคทีเรียแลกติกจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* var *casei*, *Streptococcus avium* และ *S. lactis* ยีสต์จัดจำแนกเป็น *Pichia farinosa*, *P. terricola* และ *Tricosporon cutaneum* สำหรับราไม่สามารถตรวจพบในทุกขั้นตอนการผลิตโดยวิธีการ spread plate แต่สามารถตรวจสอบโดยเทคนิคการวางเมล็ดข้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถจำแนกเป็น *Rhizopus* sp. นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบาซิลลัส แต่เนื่องจากแบคทีเรียบาซิลลัสทำให้ปลายข้าวมีสีและมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ จึงไม่น่ามีบทบาทเกี่ยวข้องในการผลิตขนมจีน

สุพรรณิการ์ (2547) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์มีปริมาณสูงที่สุดในขั้นตอนการหมักข้าว การทับน้ำแป้ง และนอนน้ำแป้ง โดยพบแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดในทุกขั้นตอนการผลิต รองลงมา คือ ยีสต์ รา และแบคทีเรียบาซิลลัส ในระหว่างกระบวนการผลิตจะมีการปนเปื้อนของ *S. aureus*, *E. coli* และ Coliforms ซึ่งปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ และผู้ผลิต การเปลี่ยนแปลง pH และปริมาณของกรดแลกติกมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียแลกติก ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกจึงอาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิต การแยกและเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกจากกระบวนการหมัก พบสกุล *Lactobacillus* เป็นส่วนใหญ่ และเมื่อทดสอบสมบัติความสามารถในการย่อยแป้ง และการสร้างกรดพบว่า แบคทีเรียแลกติกในสกุล *Enterococcus* และ *Streptococcus* สามารถย่อยแป้งได้ดี และสกุล *Lactobacillus* สามารถสร้างกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง

สุพรรณิการ์ (2548) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก พบว่าแบคทีเรียแสกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่พบมากที่สุดในทุกขั้นตอนการผลิต โดยมีปริมาณใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ทั้งหมด รองลงมาคือยีสต์ และแบคทีเรียบาซิลลัส โดยแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณสูงสุดในข้าวหมักประมาณ 10^{9} CFU/g การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง %Titratable acidity ของกรดแลกติก ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกจึงอาจเป็นกลุ่มหลักที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทางกายภาพ และการเกิดกลิ่นรสหมักในขนมจีนแป้งหมัก จากการคัดแยกและเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกจากข้าวหมักได้จำนวน 253 ไอโซเลต พบว่า *Lactobacillus* เป็นจีนัสหลักที่พบคิดเป็น 60.47 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตทั้งหมด โดยมีกลุ่ม homofermentative ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับกลุ่ม heterofermentative รองลงมาคือจีนัส *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* คิดเป็น 24.11, 5.93, 5.53, 2.77 และ 1.19 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทต่อการผลิตขนมจีนแป้งหมัก ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรด การย่อยแป้ง และการยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อคัดเลือกเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิต พบว่า *Lactobacillus* เป็นจีนัสที่ผลิตกรดได้ดีที่สุด และสุพรรณิการ์ (2548) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

และแบคทีเรียที่เป็นดัชนีการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักพบว่า การปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ Coliform พบตั้งแต่วัตถุดิบ ได้แก่ ข้าวหัก น้ำที่ใช้ และในระหว่างกระบวนการหมักข้าว แต่หลังจากหมักข้าวไปแล้ว 2 วัน ตรวจไม่พบอีก นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการเติมแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างข้าวหมัก พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างชัดเจน โดยในกระบวนการหมักข้าว แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 44 ชั่วโมง ตั้งแต่ขั้นตอนการหมักข้าว ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักยังอาศัยการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งจะมีจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือจาก แบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักด้วย (นิตยา, 2532) ประกอบกับในกระบวนการผลิตในขั้นต่อไปยังอาจมีการปนเปื้อนซ้ำจากน้ำที่ใช้ในการผลิต ภาชนะบรรจุ สิ่งแวดล้อม และผู้ผลิตส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาจสามารถแข่งขันและเจริญอยู่รอดในตามธรรมชาติได้ อย่างเช่น *S. aureus* ที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ตลอดในกระบวนการผลิตขนมจีนดังที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ (สุพรรณิการ์ (2548) ดังนั้นการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ตั้งแต่ขั้นแรกของกระบวนการผลิต จะช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษตั้งแต่เริ่มต้น ทำให้ตัวอย่างเกิดสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ และสารเมแทบอไลท์ที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นระหว่างการผลิต ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่ติดมากับวัตถุดิบและที่อาจปนเปื้อนมาภายหลังไม่สามารถเจริญหรือแข่งขันกับแบคทีเรียแลกติกหลักที่มีอยู่ได้ หรืออาจรอดชีวิตในปริมาณต่ำกว่าในระดับที่จะสร้างสารพิษ และถูกทำลายได้หมดจากความร้อนในขั้นตอนการโรยเส้น นอกจากนี้ ยังช่วยลดความเสี่ยงจากสารพิษที่แบคทีเรียก่อโรคสร้างขึ้น เช่น เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก *S. aureus* เนื่องจากการหมักข้าวโดยใช้กล้าเชื้อจะช่วยเร่งให้ pH ของข้าวหมักลดลงได้รวดเร็วกว่าการหมักตามธรรมชาติ ซึ่ง pH ที่ต่ำ 3-4 นั้นเป็นสภาวะที่ *S. aureus* ไม่สามารถผลิตสารพิษได้ อีกทั้งความร้อนที่ใช้ในการโรยเส้นสามารถทำลายเอนเทอโรทอกซินได้หมด ช่วยเพิ่มความปลอดภัย และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากกระบวนการผลิต และในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของขนมจีนแป้งหมัก นอกจากนี้สุพรรณิการ์ (2548) ยังได้ทำการศึกษาสมบัติการเป็นโพรไบโอทิกของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกนี้พบว่า *Leuconostoc lactis* PD128, *Lactobacillus plantarum* 110 และ *Lactobacillus cellobiosus* PD55 เป็นสายพันธุ์ที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากทนต่อของเหลวกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลองได้ดี และเมื่อมีขนมจีนร่วมอยู่ด้วยในขณะส่งผ่านเชื้อในทางเดินอาหาร ช่วยให้การรอดชีวิตของ *Leuco. lactis* PD128, *Lb. plantarum* 110 และ *Lb. cellobiosus* PD55, RE33 และ PD112 เพิ่มมากขึ้น และมีความเป็นไปได้ที่จะมีชีวิตรอดในระหว่างการส่งผ่านแบคทีเรียในกระเพาะอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนปลายมีความไวต่อสารปฏิชีวนะและไม่พบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแบบผิดปกติ

7 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในระหว่างขั้นตอนการผลิต

สุภรัตน์ และคณะ (2534) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขนมจีนในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมจีน โดยได้ทำการศึกษาทั้งขนมจีนแบบหมักและแบบไม่หมัก พบว่า ในขนมจีนแบบหมัก เมื่อข้าวหักผ่านการล้าง และหมักเป็นเวลา 1-2 คืน ข้าวจะมีความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 30-32 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น 1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนจะลดลงเล็กน้อย เมื่อทำเป็นแป้งทับน้ำจะมีความชื้นอยู่ระหว่าง 44-49 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 5-6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอะไมโลสจะมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำก้อนแป้งนึ่งเฉพาะผิวหน้าประมาณครึ่งนิ้ว พบว่าแป้งสูญเสียความชื้นไปบางส่วน จึงต้องมีการเติมน้ำร้อนลงไปในขณะที่ทำการนวดแป้งให้เหนียวจนมีความชื้นมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไปเข้าเครื่องโรยเส้น โดยแป้งที่นวดดีแล้วมีปริมาณอะไมโลสสูงขึ้นระหว่าง 28.5-31.9 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของขนมจีน พบว่ามีความชื้น 69.27-73.69 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 4.52-5.59 เปอร์เซ็นต์ แป้ง 89.56-91.04 เปอร์เซ็นต์ อะไมโลส 29.92-31.87 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.60-1.20 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.21-0.70 เปอร์เซ็นต์ และเส้นใย 0.79-1.31 เปอร์เซ็นต์ สำหรับขนมจีนแบบไม่หมักนั้น พบว่าในแป้งทับน้ำมีปริมาณโปรตีนลดลงประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้งและอะไมโลสมีแนวโน้มที่สูงขึ้น ปริมาณความชื้นของแป้งนวดก่อนอัดเป็นเส้นอยู่ระหว่าง 47-49 เปอร์เซ็นต์ และในขนมจีนแบบไม่หมักนี้จะมีความชื้น 69.38-70.90 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 5.62-6.15 เปอร์เซ็นต์ แป้ง 89.90-90.67 เปอร์เซ็นต์ อะไมโลส 31.44-32.79 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.31-0.69 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.39-0.52 เปอร์เซ็นต์ และเส้นใย 0.47-1.01 เปอร์เซ็นต์

ภควัฒน์ (2547) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนไขมันคาร์โบไฮเดรต และอะไมโลสในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าปริมาณโปรตีนและไขมันในกระบวนการหมักลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีปริมาณโปรตีน และองค์ประกอบอื่นลดลง ปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นจากการไฮโดรไลซ์แป้งในกระบวนการหมัก เกิดจากอะไมโลเพกตินบริเวณผิวหน้าของเม็ดแป้งถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ โดยกระบวนการดีพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) อะไมโลเพคตินกลายเป็นอะไมโลส

นวรัตน์ และคณะ(2549) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อสมบัติทางเคมีในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก ซึ่งการผลิตขนมจีนแป้งหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก 3 ชนิด คือ *Lactobacillus* RE33, *Lactobacillus* PD110 และ *Leuconostoc* PD128 ที่คัดแยกจากข้าวหมักของการผลิตขนมจีนแป้งหมักตามธรรมชาติในทางการค้าสามารถลดระยะเวลาในการหมักข้าวลงได้ โดยการหมักข้าวด้วยกล้าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางเคมีระหว่างกระบวนการผลิตจากข้าวหักจนถึงแป้งทับน้ำคล้ายคลึง

กับการหมักข้าวตามธรรมชาติในห้องปฏิบัติการซึ่งใช้เวลา 48 ชั่วโมง ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบสลดลงจาก 6.6 เป็น 3.5-4.0 ส่วนปริมาณกรดที่ไทเทรตได้มีค่าสูงขึ้น 0.24-0.38 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดแลกติกและปริมาณกรดอะซีติกมีแนวโน้มสูงขึ้น (2,700-5,300 และ 460-1,250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ) เป็นผลจากความแตกต่างของกล้าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการหมัก

8 การเปลี่ยนแปลงของสารระเหยในกระบวนการหมักขนมจีน

ขนมจีนจัดเป็นอาหารธัญพืชหมักในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์จากธัญพืช การเกิดสารระเหยมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ในวัตถุดิบ โดยการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์แล้วผ่านปฏิกิริยาต่างๆ ในขนมจีนมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งประกอบด้วย อะไมโลสและอะไมโลเพคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากจุลินทรีย์ทำให้ได้กลูโคสและมอลโทส การย่อยสลายอะไมโลสทำให้ได้เดกซ์ทริน โดยแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม homofermentative และยีสต์ จะย่อยสลายต่อไปด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นกลูโคสผ่านวิถี Embden-Meyerholf-Parnas pathway ทำให้ได้กรดแลกติก ส่วนแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม homofermentative เช่น *Lactobacilli*, *Leuconostocs* และ *Pediococci* จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดแลกติก กรดอะซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านกระบวนการ Phosphoketolase pathway นอกจากนี้ มีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนเป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์โดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์อะมิเนชัน ดีคาร์บอกซิเลชัน และดีอะมิเนชัน ส่วนการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันได้เป็นกรดไขมันอิสระแล้วผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือเอสเทอริฟิเคชันทำให้ได้สารระเหยที่แตกต่างกันออกไป (Salminen and Wright, 1998)

จีสุดาและคณะ (2547) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณสารระเหยต่างๆ ที่พบในขั้นตอนของการผลิตขนมจีนแป้งหมักจากการวิเคราะห์สารระเหยที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตขนมจีนด้วยวิธี Dynamic headspace sampling-gas chromatography-mass spectrometry (DHS-GC-MS) พบว่า มีสารระเหยมากกว่า 30 สาร โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดโมเลกุลเล็ก และอื่นๆ โดยพบแอลกอฮอล์ในสัดส่วนที่มากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ เช่น เอทานอล โพรพานอล 1-บิวทานอล และ 1-เพนทานอล เป็นต้น รองลงมา คือ เอสเทอร์ เช่น เอทิลอะซีเทต เมทิล อะซีเทต และเอทิลอะซีเทต เป็นต้น สารประกอบคาร์บอนิลที่พบจะเป็นอัลดีไฮด์ และคีโตน เช่น เฮกซานอลไดอะซีทิล และอะซีโทอิน เป็นต้น ส่วนกรดโมเลกุลเล็กพบว่ามีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 2-5 อะตอม เช่น กรดอะซีติก กรดโพรไพโนอิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารประกอบซัลเฟอร์ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ แต่พบในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณสารระเหยทั้งหมด และลักษณะกลิ่น

ที่เป็นเอกลักษณ์ของขนมจีนแป้งหมักน่าจะเป็นผลจากการรวมกันของสารหลายชนิด เช่น ไดอะซีทิล กรดอะซีติก กรดบิวทิริก และกรดไอโซเพนทาอิก เป็นต้น

9 หลักการผลิต และบทบาทของอาหารหมัก

หลักการผลิตอาหารหมักสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (วนิดา, 2544) คือ

9.1 การหมักโดยวิธีธรรมชาติ (Natural fermentation) วิธีนี้จะอาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรือจุลินทรีย์ที่มาจากผลิตภัณฑ์ซึ่งผ่านการหมักมาก่อน เรียกว่า back slopping ดังนั้นการปรับสภาวะของการหมักให้เหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการจึงเป็นสิ่งสำคัญ

9.2 การหมักโดยอาศัยเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture fermentation) วิธีนี้จุลินทรีย์ที่นำมาใช้จะต้องแยกให้บริสุทธิ์ จำแนกชนิดให้ถูกต้อง และเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการ เมื่อจะใช้ก็นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มจำนวน เรียกว่า starter culture แล้วจึงนำมาใช้ในวัตถุดิบ และต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการเจริญ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการบทบาทของอาหารตามคุณลักษณะของอาหาร

10 ปัญหาทางด้านการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

10.1. ปัญหาทางด้านการผลิต

10.1.1 การหมักข้าวหรือแป้ง โดยการหมักแป้งเป็นสิ่งจำเป็นต่อการทำขนมจีน ในระหว่างการหมักแป้งจะมีจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ และน้ำใช้เป็นตัวเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นกรด ดังนั้นโปรตีนในแป้งละลายในน้ำที่เป็นกรดนี้ ทำให้แป้งที่ทำขนมจีนมีส่วนประกอบของโปรตีนเหลือน้อยลง จะได้เส้นที่เหนียวนุ่ม

10.1.2 กลิ่นหมักแรง มักจะเกิดในกรณีที่หมักข้าวนานหลายวัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการวางแผนการผลิตผิดพลาด ซึ่งแก้ไขได้ด้วยการล้างข้าวหมักด้วยน้ำมากๆ

10.1.3 สีคล้ำ เกิดจากการใช้วัตถุดิบที่ไม่สะอาด มีสิ่งสกปรก พวกหินดิน ทรายปะปนอยู่ หรือเกิดจากการล้างข้าวไม่สะอาด ใช้น้ำขุ่น ซึ่งควรแก้ไขสภาพน้ำที่ใช้ และล้างมากๆ

10.1.4 เส้นเปื่อยยุ่ย เกิดจากการใช้ข้าวที่ไม่เหมาะสม นวดแป้งน้อยเกินไปหรือใช้น้ำที่มีความกระด้างสูง นอกจากนี้ยังใส่เกลือน้อยเกินไปในขณะทำการล้างแป้งเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ ทำให้เกิดการหมัก ซึ่งมีผลทำให้โมเลกุลของแป้งแตกตัว จึงควรใช้น้ำอ่อน และใช้ปริมาณเกลือที่เหมาะสม คือ ประมาณร้อยละ 7-8 จะทำให้เส้นเหนียวขึ้น

10.2. ปัญหาแรงงาน

ส่วนใหญ่แล้วการผลิตขนมจีน มักจะทำกันภายในครัวเรือน ซึ่งแรงงานส่วนใหญ่ก็เป็นสมาชิกในครอบครัว และอาจมีการจ้างแรงงานภายนอกบ้าง เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์สดจึงไม่สามารถเก็บได้นาน ส่งผลให้การหาแรงงานที่จะมาทำงานในลักษณะนี้ลำบาก สมาชิกในครอบครัวที่เป็นคนรุ่นใหม่ มักจะไม่ยินดีสืบทอดกิจการ เพราะต้องทำงานแทบไม่มีวันหยุดและไม่มีเวลาเป็นของตัวเอง

10.3. ปัญหาสิ่งแวดล้อม

น้ำเสีย เนื่องจากขั้นตอนการผลิตขนมจีน ต้องใช้น้ำแทบทุกขั้นตอน จึงทำให้เกิดน้ำทิ้งและน้ำเสีย ผู้ประกอบการขนาดเล็กส่วนมาก มักจะไม่มีระบบกำจัดน้ำเสียของตนเอง เพราะโรงงานตั้งมานานแล้ว จึงไม่ได้เตรียมสถานที่ที่จะติดตั้งระบบการบำบัดน้ำทิ้งตั้งแต่แรก หรือมีบริเวณโรงงานไม่เพียงพอ และมีปริมาณการผลิตน้อยเกินไป ซึ่งไม่คุ้มกับการติดตั้งระบบดังกล่าวอีกทั้งยังขาดบุคลากรที่ทำการควบคุมทำให้ผู้ประกอบการบางรายในขณะนี้ประสบปัญหาเกี่ยวกับน้ำเสียและอาจต้องปิดกิจการ

10.4. ปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในการผลิตขนมจีน เกิดขึ้นได้หลายขั้นตอน โดยเฉพาะขนมจีนแป้งหมัก จุลินทรีย์จะมีบทบาทต่อการผลิตให้ได้คุณภาพเป็นที่ยอมรับเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นกระบวนการหมักตามธรรมชาติ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่ จึงเป็นจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่มาจากปลายข้าวและน้ำ นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนมาจากเครื่องมือเครื่องใช้ ตลอดจนภาชนะบรรจุหรือจากตัวผู้ผลิต ซึ่งการผลิตและปฏิบัติที่ไม่ถูกต้องตามสุขลักษณะ ทำให้ขนมจีนที่ได้ไม่สะอาดถูกหลักอนามัย

นอกจากนี้ยังมีปัญหาการผลิตขนมจีนที่มักพบในระดับโรงงานอุตสาหกรรมโดยจะมีลักษณะให้สังเกต รวมทั้งการแก้ไข โดยสรุปดังตารางที่ 1.9 (เอกสารเผยแพร่บริษัท พ.ศ.ช. ซัพพลายส์ จำกัด)

ตารางที่ 1.9 ปัญหาที่พบและต้องแก้ไขในกระบวนการผลิตขนมจีน

ปัญหาที่พบ	ลักษณะที่พบ	การสังเกต	การแก้ปัญหา
1. น้ำมีจุลินทรีย์มาก	ซึ่งเป็นน้ำที่ไม่สะอาด ไม่ควรนำมาใช้ในกระบวนบวนการผลิตเส้นขนมจีน จะทำให้เส้นขนมจีนที่เก็บไว้ด้านล่างจะแฉะหรือขึ้นรา เน่า บูดเร็วกว่าปกติ เส้นเก็บได้ไม่นาน นอกจากนี้การเก็บเส้นในบริเวณที่ไม่สะอาด มีปริมาณจุลินทรีย์และฝุ่นละอองมาก หากไม่มีการป้องกันจะทำให้เก็บเส้นได้ไม่นานเช่นกัน	น้ำที่มีจุลินทรีย์มากจะไม่ใส ขุ่น โดยมากเป็นน้ำจากแหล่งที่เป็นบ่อน้ำตื้น น้ำในฤดูฝน น้ำแม่น้ำ น้ำประปาเทศบาลหรือประปาหมู่บ้านในช่วงปลายหน้าแล้ง-ต้นฤดูฝนหรือแหล่งน้ำที่ใกล้แหล่งน้ำสกปรก (ใกล้บ่อน้ำทิ้ง)หรือพื้นที่ที่สกปรก เช่น ใกล้ที่ทิ้งขยะ เป็นต้น	1. สูบมาเก็บไว้ในอ่างทิ้งให้ตกตะกอนกลางแดด 2. ติดเครื่องกรองน้ำที่กรองจุลินทรีย์ได้ 3. ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน 4. น้ำที่ใช้นวดต้องผ่านการต้มหรือใช้น้ำร้อน 5. ใส่เกลือในน้ำจับเส้นและควรเปลี่ยนน้ำที่ใช้ล้างและจับเส้นบ่อยๆ 6. น้ำที่ใช้นวดหรือจับเส้นเปลี่ยนไปใช้น้ำจากแหล่งอื่น 7. ภาชนะใส่เส้นต้องสะอาด อากาศถ่ายเทไม่อับชื้น
2. น้ำที่มีคลอรีนมาก	เส้นขนมจีนที่ผลิตไม่เหนียว มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ มีสีขุ่น และเส้นค่อนข้างแข็งไม่นิ่ม	น้ำที่มีคลอรีนมากจะมีกลิ่นของคลอรีน	เก็บน้ำใส่ภาชนะที่เปิดฝาทิ้งไว้กลางแจ้งอย่างน้อย 12 ชั่วโมงหรือใช้น้ำจากแหล่งอื่นโดยเฉพาะน้ำที่ใช้นวดและจับเส้น

ตารางที่ 1.9 (ต่อ)

ปัญหาที่พบ	ลักษณะที่พบ	การสังเกต	การแก้ปัญหา
3. น้ำกระด้าง	เส้นขนมจีนจะค่อนข้างแข็งไม่นิ่ม มีสีขุ่นและไม่เหนียว	มีรสเฝื่อน เวลาใช้สบู่และผงซักผ้าจะให้ฟองน้อยหรือไม่เกิดฟอง ทำให้เกิดตะกอนในหม้อต้ม พบในน้ำประปาและแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป	น้ำกระด้างชั่วคราวแก้ไขโดยการต้ม ส่วนน้ำกระด้างถาวรต้องใช้วิธีทางเคมี น้ำกระด้างสามารถนำมาใช้ในขั้นตอนการล้างเส้นได้ ส่วนการนวด โรยเส้น และจับเส้นต้องใช้น้ำจากแหล่งอื่น
4. น้ำมีไอออนของโลหะหนักสูง	สีเส้นขนมจีนจะคล้ำแดง หรือสีอื่นๆ ที่ไม่ใช่สีเดียวกับแป้ง (ขึ้นอยู่กับสีของโลหะ)	น้ำประปาถ้ามีโลหะเหล็ก น้ำจะสีแดง ขุ่น มีกลิ่นสนิม ส่วนน้ำบาดาลที่เพิ่งสูบใหม่ๆ ทิ้งไว้ระยะหนึ่งจะตกตะกอนซึ่งถ้าเป็นสังกะสี น้ำจะมีสีและมีรสขม	สูบใส่อ่างทิ้งไว้กลางแจ้งให้ตกตะกอนหรือเร่งการตกตะกอนโดยการแกว่งสารส้ม แต่หากเป็นปัญหามากควรเปลี่ยนใช้น้ำจากแหล่งอื่นในการนวดแป้งและโรยเส้น โดยจะใช้ในการจับเส้น
5. น้ำที่มีความเป็นด่างสูง(ค่า pH ของน้ำที่เหมาะสม คือ 5–7)	เส้นขนมจีนไม่ใสและไม่เหนียวเท่าที่ควร และอาจเป็นสาเหตุของเส้นคล้ำถ้าน้ำสีเหลืองหรือแดง	พบในน้ำบาดาลและน้ำประปา ถ้าเป็นด่างจัดจะมีรสฝาด	ใช้สารส้มแกว่งในน้ำสักระยะหนึ่ง(ตามค่าความเป็นด่างมากหรือน้อย ทดสอบโดยวัด pH)หรือใช้น้ำจากแหล่งอื่นในการนวดแป้งและโรยเส้น แล้วใช้น้ำดังกล่าวในการล้างเส้น

ตารางที่ 1.9 (ต่อ)

ปัญหาที่พบ	ลักษณะที่พบ	การสังเกต	การแก้ปัญหา
6. น้ำที่มีความเป็นกรดสูง(ค่า pH ต่ำกว่า 4)	เส้นขนมจีนมีรสเปรี้ยว(ถ้าน้ำเป็นกรดสูง)หรือเส้นเปรี้ยวและแฉะเร็ว เก็บได้ไม่นาน	น้ำมีรสออกเปรี้ยว	ใช้น้ำปูนใส(ปูนเคี้ยวหมากละลายน้ำเทเอาส่วนใส)ผสมพอประมาณตามความเหมาะสม(ความเป็นกรดทดสอบโดยเครื่องวัดpH)
7. น้ำที่มีความเข้มข้นเกลือสูง(มากกว่า 2%)	เส้นขนมจีนมีรสเค็มและเส้นแฉะ หรือเก็บได้ไม่นาน	น้ำมีรสออกเค็ม	ใช้น้ำจากแหล่งอื่นในการนวดแป้งและโรยเส้น แล้วใช้น้ำดังกล่าวในการล้างเส้น
8. น้ำขุ่นมีตะกอนมาก	เส้นขนมจีนมีสีขุ่นคล้ำ ไม่ใสเท่าที่ควร	น้ำขุ่น โดยมากเป็นน้ำจากแม่น้ำหรือบ่อน้ำตื้น	ใช้สารส้มแกว่งเพื่อให้ตกตะกอน ถ้ายังเปรี้ยวให้ใช้น้ำปูนใสร่วมด้วยเพื่อปรับ (pH 5-7) หรือใช้น้ำจากแหล่งอื่น

ที่มา : เอกสารเผยแพร่บริษัท พ.ศ.ช. ซัพพลายส์ จำกัด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีน
2. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก
3. เพื่อเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
4. เพื่อศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก
5. เพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมจีนแป้งหมักที่ผลิตจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
1. Agar	Merck
2. Baird Parker agar (BP)	Difco
3. Bacteriocin Screening medium (BSM)	
4. Brain Heart Infusion broth (BHI)	Difco
5. Brilliant Green Lactose Bile broth (BGLB)	Difco
6. De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)	Difco
7. De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)	Difco
8. Eosin Methylene Blue agar (EMB)	Difco
9. Escherichia coli broth (EC)	Difco
10. Glucose Yeast Extract Peptone medium (GYP)	
11. Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST)	Difco
12. Mannitol Egg Yolk-Polymycin agar (MYP)	Difco
13. Meat Extract Powder	HiMedia
14. Nitrate broth	Difco
15. Nutrient agar (NA)	Difco
16. Peptone	Difco
17. Peptone Water	Difco
18. Potato Dextrose agar (PDA)	HiMedia
19. Plate Count agar (PCA)	Difco
20. Tryptone	Difco
21. Tryptic Soy agar (TSA)	Bacto
22. Tryptic Soy broth (TSB)	Bacto
23. Yeast extract	HiMedia

1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Acetic acid	Merck
2. Ammonium Sulphate	Reagent
3. Amylose	Sigma
3. Bromocresol Purple	LabChem
4. Calcium Carbonate	Merck
5. Citric acid ammonium salt	LabChem
6. di-Potassium hydrogen orthophosphate	Reagent
7. Glucose	Merck
8. Glycerol	Sigma
9. Iodine	Merck
10. Magnesium sulphate hydrated	Reagent
11. Manganess(II) sulphate, monohydrate	Reagent
12. Phenol	Sigma
13. Potassium dihydrogen orthophosphate	Reagent
14. Potassium iodide	Merck
15. Sodium acetate	Reagent
16. Sodium azide	LabChem
17. Sodium chloride	Merck
18. Sodium hydroxide	Merck
19. Sulfuric acid	Merck
20. Tween 80	LabChem
21. Tyrosine	Merck
22. 2-methyl-3-heptanone	Sigma

1.3 เอนไซม์

ชื่อเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
1. เอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	Fluka

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์	ยี่ห้อ/บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1800	Shimadzu, Japan
2. เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง	Denver Instrument, Germany
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น TW 20	Shel-Lab, USA
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo seven easy
5. เครื่อง Hot Plate and Stirrer รุ่น PC-420D	Fisher scientific, USA
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus, Germany
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy, Japan
8. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)	Venticell
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet)	ASTEC microflow, UK
10. เครื่อง Vortex Mixer	Genie II
11. ไมโครปิเปต ขนาด 2-20, 20-200 และ 1000µl	Eppendorf Research
12. ตู้เย็น 4 °C	Sanden intercool, Japan
13. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filter)	Gelman Sciences, Germany
14. กล้องจุลทรรศน์	Olympus
15. กระดาษกรอง (Cellulose Acetate Filter)	Sartorius
16. กระดาษกรองเบอร์ 1	Whatman
17. Gas Chromatography-Mass Spectrometer รุ่น Trace GC Ultra/ ISQ MS	Thermo Scientific Inc, USA
18. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)	Sorvall RC 5C Plus
19. ไมโครเวฟ	Sanyo
20. ตู้เย็นแช่แข็ง -80 °C	Sanyo, Japan
21. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernia caliper)	

3 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

2.3.1 *Lactobacillus curvatus* TISTR 938

2.3.2 *Lactobacillus sake* TISTR 911

2.3.3 *Bacillus cereus* TISRT 687

2.3.4 *Escherichia coli* TISTR 780

2.3.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 029

แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN).

4 ตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีน

เก็บตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตขนมจีน ได้แก่ ข้าวหมัก น้ำแป้ง แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และแป้งนวดจากโรงงานขนมจีนทั้งหมด 11 โรงงานในจังหวัดสงขลา (2 โรงงาน) นครศรีธรรมราช (1 โรงงาน) พัทลุง (6 โรงงาน) และพระนครศรีอยุธยา (2 โรงงาน) โดยทำการเก็บตัวอย่างละ 1 ครั้งต่อ 1 โรงงาน

5 วิธีการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณและคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีน

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตขนมจีน ได้แก่ ข้าวหมัก น้ำแป้ง แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และแป้งนวดจากโรงงานขนมจีนทั้งหมด 11 โรงงานในจังหวัดสงขลา (2 โรงงาน) นครศรีธรรมราช (1 โรงงาน) พัทลุง (6 โรงงาน) และพระนครศรีอยุธยา (2 โรงงาน) โดยทำการเก็บตัวอย่างละ 1 ครั้งต่อ 1 โรงงาน เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในขวดฝาปิดสนิทที่ผ่านการฆ่าเชื้อและบรรจุลงในถังน้ำแข็งและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาสภาพตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์ และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังเก็บภายใน 24 ชั่วโมง

1.2 การแยกและการหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีน

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก โดยนำตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในสารละลาย peptone water 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทำการเจือจางด้วย

สารละลาย peptone water 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตรจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-9} แล้วทำการ pour plate ที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-3}-10^{-9} (ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบในแต่ละขั้นตอนของการผลิตขนมจีน) ทำความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งเติม Bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sodium azide 0.02 เปอร์เซ็นต์ (Swetwiwathana, 1996) แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียแลกติก โดยตรวจนับโคโลนีที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลืองในจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วทำการเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันจากนั้นนำมา streak บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัว โดยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบคะตะเลส ตามวิธีในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ เพื่อดูว่าเป็นแบคทีเรียแลกติก และทำการเก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อศึกษาต่อไป

การคำนวณหาปริมาณแบคทีเรีย

ปริมาณแบคทีเรียสร้างกรด (CFU/g) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ × dilution factor

1.2.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัว

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที แล้วเททิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ทิ้งสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบการคิดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.2.2 การทดสอบคะตาเลส (catalase)

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงมาเขี่ยบนแผ่นสไลด์ที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

1.3 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (%Titratable acidity (%TA) ของกรดแลกติก) ตามวิธีของ AOAC (2000)

โดยชั่งตัวอย่าง 5 กรัมเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 50 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง คนเบาๆ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร แล้วเติม

ฟีนอฟทาลีน 1-2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วทำการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัลจนกระทั่งถึงจุดยุติหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู แล้วทำการคำนวณ %TA ของกรดแลกติก

$$\%TA \text{ ของกรดแลกติก} = \frac{(N \times V_1 \times 90.08 \times 100)}{1000 \times V_2}$$

N = ความเข้มข้นนองสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร/กรัม)

1.4 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH) ตามวิธีของ AOAC (2000)

โดยชั่งตัวอย่าง 5 กรัม และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันและทำการวัดโดยใช้ pH meter

2. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีน

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีน

2.1.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* TISTR 029, *E. coli* TISTR 780 และ *B. cereus* TISTR 687 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับระดับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ด้วยอาหารเหลว TSB แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml ส่วน *L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับระดับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ด้วยอาหารเหลว MRS แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml

2.1.2 วิธี agar spot assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Fleming, *et al.*, 1985)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1.2 จากตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตขนมจีนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียแลกติกปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง Bacteriocin screening medium (BSM) ซึ่งดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร MRS และมีส่วนประกอบ

ดังนี้คือ glucose 0.2 เปอร์เซ็นต์, meat extract 0.2 เปอร์เซ็นต์, tryptone 1 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 0.4 เปอร์เซ็นต์, tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์, citric acid diammonium salt 0.2 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์, $MnSO_4.4H_2O$ 0.005 เปอร์เซ็นต์, $K_2HPO_4.3H_2O$ 0.87 เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.8 เปอร์เซ็นต์ Agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ปราศจากเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Tichaczek *et al.*, 1992) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วยอาหารเพาะเชื้อกึ่งแข็ง TSB (TSB ผสมกับ Agar 0.7 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 7 มิลลิลิตรที่ผสมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* TISTR 029, *E. coli* TISTR 780 และ *B. cereus* TISTR 687 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 0.14 มิลลิลิตร และเททับด้วยอาหารเพาะเชื้อกึ่งแข็ง MRS (MRS ผสมกับ Agar 0.7 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 7 มิลลิลิตรที่ผสมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *L. sake* TISTR 911 หรือ *L. curvatus* TISTR 938 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml ปริมาตร 0.14 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจากการวัดขนาดของวงใสรอบรอยเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดสอบ โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2.1.3 วิธี agar well diffusion assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Schillinger and Lucke, 1989)

นำแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการคัดเลือกด้วยวิธี agar spot assay มาทดสอบการยับยั้งอีกครั้งโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำการเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียแลกติกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปรับpHเท่ากับ 6.5 ด้วยสาร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ แล้วกรองส่วนใสผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion โดยทำการ swab เชื้อแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* TISTR 029, *E. coli* TISTR 780 และ *B. cereus* TISTR 687 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml บนอาหาร TSA ที่มีปริมาตรเท่ากับ 25 มิลลิลิตร และ *L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml บนอาหาร BSM ที่มีปริมาตรเท่ากับ 25 มิลลิลิตร จากนั้นหยดส่วนใสที่ต้องการทดสอบลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรรอให้แห้งจนได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีเก็บไว้ศึกษาต่อไป

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

2.2.1 นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 1.2 เลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast Extract Peptone medium (GYP) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้าแทนน้ำตาลกลูโคส (โดยทำการเติมแป้งข้าวเจ้า 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในขั้นตอนของการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาปริมาณ แป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน วิธีทดสอบโดยเขย่าหลอดเลี้ยงเชื้อด้วย Vortex mixer แล้วดูดสารละลายไอโอดีน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer อีกครั้ง ตรวจผลโดยดูความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสีของสารละลายไอโอดีน และสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของอาหาร GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้าที่ปราศจากเชื้อกับสารละลายไอโอดีน แล้วทำการบันทึกผลเป็นผลการย่อยแป้งได้ต่ำเมื่อสารละลายเป็นสีน้ำเงินอ่อน ย่อยแป้งได้ปานกลางเมื่อสารละลายเป็นสีน้ำตาลปนม่วง ย่อยแป้งได้ดีเมื่อสารละลายเป็นสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน และย่อยแป้งได้ดีมากเมื่อสารละลายเป็นสีเหลือง แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดีและดีมาก เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2.2 นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2.1 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดีและดีมากเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้าแทนน้ำตาลกลูโคส (เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการอบฆ่าปริมาณ 2 กรัม และสารละลายเกลือแร่ 50 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 0.3 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % pH 4.5 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง โดยเก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำการเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียแลกติกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method (Dubois, 1956) คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรส โดยการศึกษาสารระเหยที่เกิดขึ้นในการผลิตขนมจีน

2.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2.1 และ 2.2 ที่มีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีนและปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีนโดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียแลกติกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แล้วนำมาปรับระดับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarlane โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml

2.3.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวหมัก

นำข้าวเจ้า 50 กรัมมาล้างให้สะอาดประมาณ 3-4 ครั้ง แช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำออก แล้วเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ที่เตรียมไว้ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/ml โดยเติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ส่วนตัวอย่างชุดควบคุมเติมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์แทน คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 เซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.3 การตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรส (Volatile compounds)

การตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรส (Volatile compounds) ของตัวอย่างข้าวหมักโดยใช้เทคนิค Headspace Solide Phase Microextraction-Gas Chromatography-mass Spectrometry (HS-SPME GC-MS) ตามวิธีการทดสอบ WI-RES-GC-ISQMS-001 และ REF-REF-Sampleprep GC-ISQME-007 โดยชั่งตัวอย่างข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงของการหมักปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับวิเคราะห์ แล้วเติมสาร internal standard 5 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยสารละลาย 2-methyl-3-heptanone ใน methanol ความเข้มข้น 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (จีสุดา, 2548) หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน และให้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดดุลยภาพของสารระเหย หลังจากนั้นทำการสกัดสารระเหยที่ให้กลิ่นด้วย Solide Phase Microextraction โดยใช้ไฟเบอร์ชนิด 100 µm polydimethylsiloxane โดยให้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลงมาจาก Qin และ Ding, 2007) หลังจากนั้นสารระเหยที่อยู่บนไฟเบอร์จะถูกฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer, Trac GC Ultra / ISQ MS ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ TR-WaxMS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร

และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้อุณหภูมิหัวฉีดเท่ากับ 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาด้วยอัตรา 75 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์จะให้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 260 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับเครื่อง Mass Spectrometer ใช้อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส โดยให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และมี mass range อยู่ในช่วง 25-500 amu และการระบุสารประกอบของ flavor profile โดยเก็บบันทึกข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ที่มี standard library spectra พร้อมโปรแกรมค้นหา เพื่อใช้เทียบเคียง mass spectra กับ GC-MS database ชื่อ Wiley 9

การคำนวณปริมาณสารระเหยแต่ละชนิดทำได้โดยการคำนวณเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารนั้นๆ กับ Internal standard ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และรายงานเป็นความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารชนิดนั้นๆ ต่อน้ำหนักตัวอย่างขนมจีน (นาโนกรัม/กรัม) โดยการหาความเข้มข้นของสารระเหยที่ต้องการทราบปริมาณคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้ (จีสุดา, 2548)

$$\text{ความเข้มข้นของสารระเหย คือ } X = \frac{As \times 402}{Ai \times Ws}$$

X = ความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารระเหย (ng/g)

As = พื้นที่ใต้กราฟของสารระเหยที่ต้องการทราบปริมาณ

Ai = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน 2-methyl-3-heptanone

Ws = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (g)

402 = เนื้อสารมาตรฐาน 2-methyl-3-heptanone

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส และเพิ่มกลิ่นรสของขนมจีนมาทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีโดยอ้างอิงหลักเกณฑ์ของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Kandier and Weiss, 1986) และเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของแบคทีเรียแลกติกจีนัสต่างๆ ตาม Axelsson (1998) รวมทั้งทดสอบการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ โดยเพาะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเพาะเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำมาทดสอบ ดังนี้ (ตามวิธีของสุพรรณิการ์, 2548)

3.1 การตรวจสอบการสร้างก๊าซและการหมักคาร์โบไฮเดรต

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงในอาหารเพาะเชื้อเหลว Andrade's carbohydrate broth medium ของน้ำตาลแต่ละชนิดดังนี้ Glucose, Amygdalin, Sorbitol, Mannitol, Cellobiose, Lactose, Maltose, Mannose, Raffinose, Sucrose, Fructose, Ribose, Xylose, Arabinose, Galactose, Melibiose, Trehalose, Esculin และ Melezitose ที่ใส่หลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร

ผลบวก คือ อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดที่มีอยู่ในอาหารแล้วเกิดกรด

ผลลบ คือ อาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถหมักน้ำตาลชนิดที่มีอยู่ในอาหารแล้วเกิดกรด

แบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative จะพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative จะไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3.2 การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ลงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง

3.3 การทดสอบความทนเกลือ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ลงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2, 4, 6.5, 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง

3.4 การตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับพีอช ต่าง ๆ

เตรียมอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ที่pH 9.6 โดยใช้สารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำมาปรับpH ให้เท่ากับ 9.6 นำสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวใช้แทนน้ำกลั่นในการเตรียมอาหารเพาะเชื้อ เมื่อเตรียมอาหารเพาะเชื้อแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เตรียมอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ที่ pH 4.5 โดยใช้อะซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

แล้วปรับpHเท่ากับ 4.5 ด้วยสารละลายกรดอะซีติกเจือจางนำสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวใช้แทนน้ำกลั่นในการเตรียมอาหารเพาะเชื้อ เมื่อเตรียมอาหารเพาะเชื้อแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ลงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ที่pHเท่ากับ 4.5 และ 9.6 ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง

3.5 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

ทดสอบการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอซึ่งได้จากการเพิ่มขยายโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis ส่งตรวจที่ MICROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี ประมวลผลด้วยข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

4. การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

4.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง แล้วนำมาปรับระดับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarlane โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml

4.2 ขั้นตอนการหมักขนมจีน

4.2.1 การหมักข้าวโดยใช้กล้าเชื้อ

นำข้าวเจ้าจำนวน 1 กิโลกรัมมาล้างให้สะอาดประมาณ 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แล้วนำมาแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมงจากนั้นเทน้ำออก แล้วเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในข้อที่ 2 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/ml โดยเติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ผสมให้เข้ากันแล้วหมักที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำข้าวที่หมักได้มาล้าง แล้วนำไปโม่ ซึ่งใช้น้ำในการโม่ 1.5 เท่าของน้ำหนักข้าว โดยมีการเติมเกลือประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วปล่อยให้

แป้งตกตะกอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างแป้งนอนน้ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (ในข้อ 4.4) ทางเคมี (ในข้อ 4.5) และทางกายภาพ (ในข้อ 4.6) ส่วนชุดควบคุมนั้นทำการหมักข้าวเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เติมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่เติมกล้าเชื้อ

4.2.2 การหมักน้ำแป้งโดยใช้กล้าเชื้อ

นำข้าวเจ้าจำนวน 1 กิโลกรัมมาล้างให้สะอาดประมาณ 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แล้วนำมาแช่น้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง นำไปโม่ ซึ่งใช้น้ำในการโม่ 1.5 เท่าของน้ำหนักข้าวข้าวพร้อมกับเติมเกลือประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/ml โดยเติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ผสมให้เข้ากันแล้วหมักที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อที่ 4.2.1 ส่วนชุดควบคุมเป็นการหมักน้ำแป้งเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เติมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่เติมกล้าเชื้อ

4.3 ขั้นตอนการผลิตขนมจีน

นำแป้งหมักที่ได้จากข้อที่ 4.2.1 และ 4.2.2 รินน้ำส่วนบนทิ้ง แยกแป้งที่ผ่านการนอนน้ำใส่ถุงผ้าแล้วทับด้วยของหนักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแป้งมาปั้นเป็นก้อนแล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที โดยให้แป้งส่วนนอกสุกประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำมานวดด้วยน้ำอุ่น (อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส) จนแป้งเนียนและเป็นเนื้อเดียวกัน นวดจนแป้งมีลักษณะเหนียว หนืด และเนียน จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและนำมาโรยเส้นในน้ำเดือดที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส รอจนเส้นขนมจีนลอยขึ้นมาบนผิวน้ำ ตักขึ้นมาใส่ในน้ำเย็นและจับเส้น รอให้สะเด็ดน้ำ นำเส้นขนมจีนที่ได้ไปวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (ในข้อ 4.4) ทางเคมี (ในข้อ 4.5) และทางกายภาพ (ในข้อ 4.6) ต่อไป

4.4 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

4.4.1 ตัวอย่างวัตถุดิบและเส้นขนมจีนที่ใช้ในการวิเคราะห์

ทำการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ ได้แก่ ข้าวหมักที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง (4.2.1) น้ำแป้งหมักที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง (4.2.1 และ4.2.2) แป้งทับน้ำ และเส้นขนมจีน (4.3) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4.4.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

โดยชั่งตัวอย่าง ได้แก่ วัตถุดิบและเส้นขนมจีนจากข้อ 4.4.1 ปริมาณ 25 กรัมใส่ในสารละลาย peptone water 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการเจือจางด้วยสารละลาย peptone water 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตรจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} -10^{-7} โดยใช้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียแลกติก จุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา *B. cereus* และ *S. aureus* ส่วนระดับความเจือจาง 10^{-1} -10^{-3} วิเคราะห์หาปริมาณ Coliforms และ *E. coli* โดยวิธี MPN

4.4.3 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก

ทำการ pour plate ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ซึ่งเติม Bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sodium azide 0.02 เปอร์เซ็นต์ (Swetwiwathana, 1996) ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียแลกติก โดยตรวจนับโคโลนีที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลืองในจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

4.4.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ตามวิธีของ BAM (2002)

ทำการ pour plate ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Plate Count agar (PCA) ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียสแล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

4.4.5 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีของ BAM (2002)

ทำการ spread plate ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรบนจานเพาะเชื้อแข็ง Potato Dextrose agar (PDA) ที่ปรับpH 3.5 ด้วย 10% Tartaric acid บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี หากไม่มีการเจริญของเชื้อบ่มต่อจนครบ 5 วันแล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อ

4.4.6 การตรวจนับปริมาณ *Bacillus cereus* ตามวิธีของ BAM (2002)

ทำการ spread plate ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรบนจานเพาะเชื้อแข็ง Mannitol Egg Yolk-Polymycin agar (MYP, เติม egg-yolk emulsion และ Polymyxin B) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีสีชมพูรอบๆ เนื่องจากไม่เกิดการหมักน้ำตาล mannitol และจะเห็น precipitate zone ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสร้างเอนไซม์ lecithinase ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 15-150 โคโลนี เป็น presumptive plate count ของ *Bacillus* sp. จากนั้นทำการยืนยัน *B. cereus* โดยนำโคโลนีที่มีลักษณะข้างต้นอย่างน้อย 5 โคโลนีมาลงใน NA slant จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม โดยติดสีแกรมบวก รูปแท่งขนาดใหญ่ต่อเป็นสาย สร้างสปอร์ และให้ผลทางชีวเคมี คือ สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ในอาหาร nitrate broth และย่อยสลาย tyrosine คำนวณจำนวนโคโลนี *B. cereus* ต่อกรัม

4.4.7 การตรวจนับปริมาณ *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ BAM (2002)

ทำการ spread plate ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างบนจานเพาะเชื้อแข็ง Baird Parker agar (BP, เติม egg-yolk tellurite emulsion) 3 จาน โดยจานที่ 1 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จานที่ 2 และ 3 จานละ 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจนับโคโลนีที่มีสีดำ บริเวณขอบโคโลนีเป็นสีขาวรอบๆ โคโลนีเป็นบริเวณใสบนจานเพาะเชื้อที่อยู่ในช่วง 20-200 โคโลนี จากนั้นทำการยืนยัน *S. aureus* โดยการทดสอบ coagulase test ซึ่ง *S. aureus* จะให้ผลบวกในการทดสอบโดยสุ่มเลือกโคโลนีดังกล่าวข้างต้นประมาณ 5 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลว BHI บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BHI 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ coagulase plasma 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนของ plasma แสดงว่าให้ผลบวก หากไม่เกิดการจับตัวภายในระยะเวลาดังกล่าวให้ทำการบ่มต่ออีกจนครบ 24 ชั่วโมง คำนวณจำนวนโคโลนี *S. aureus* ต่อกรัม

4.4.8 การตรวจนับปริมาณ Coliforms และ *E. coli* โดยวิธี MPN ตามวิธีของ BAM (2002)

Presumtive test สำหรับ coliform bacteria นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4.4.2 ที่ระดับความเจือจางละ 3 หลอด ปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเพาะเชื้อ LST ซึ่งมีหลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง ตรวจการเกิดก๊าซที่เวลา 24

ชั่วโมง หากไม่เกิดก๊าซบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ถ้าเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซนำไปทดสอบ confirmed ต่อไป

Confirmed test สำหรับ coliforms ทำการเขย่าหลอด LST ที่เกิดก๊าซ แล้วใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดก๊าซทุกหลอดลง BGLB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซ คำนวณ most probable number (MPN) รายงานผล MPN coliforms ต่อกรัม จากตารางภาคผนวกที่ 36

Confirmed test สำหรับ fecal coliforms ทำการเขย่าหลอด LST ที่เกิดก๊าซ แล้วใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดก๊าซทุกหลอดลง EC broth บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 45.5±0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดก๊าซบ่มต่อจนครบ 48±2 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซ คำนวณ MPN รายงานผล MPN fecal coliforms ต่อกรัม จากตารางภาคผนวกที่ 36

Completed test สำหรับ *E. coli* ทำการถ่ายเชื้อจากหลอด EC broth ที่เกิดก๊าซ streak บนอาหาร EMB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่น่าจะเป็น *E. coli* คือ ตรงกลางโคโลนีสีเข้ม อาจมีหรือไม่มี methallic sheen จากนั้นถ่ายเชื้อโคโลนีดังกล่าวลงหลอดอาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบย้อมสีแกรม *E. coli* ติดสีแกรมลบ รูปท่อนสั้นไม่สร้างสปอร์ ทดสอบ IMViC test ซึ่งให้ผลเป็น + + - - หรือ - + - - คำนวณ MPN โดยดูจากหลอก EC broth ที่ตรวจ confirmed แล้วว่ามี *E. coli* รายงานผล MPN *E. coli* ต่อกรัม จากตารางภาคผนวกที่ 36

4.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

4.5.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (%Titratable acidity (%TA) ของกรดแลกติก) ตามวิธีของ AOAC (2000)

โดยชั่งตัวอย่าง ได้แก่ วัตถุดิบและเส้นขนมจีนจากข้อ 4.4.1 ปริมาณ 5 กรัมเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 50 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง คนเบาๆ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร แล้วเติมฟีนอฟทาลีน 1-2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วทำการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัลจนกระทั่งถึงจุดยุติหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู แล้วทำการคำนวณ %TA ของกรดแลกติก

4.5.2 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ตามวิธีของ AOAC (2000)

โดยชั่งตัวอย่าง ได้แก่ วัตถุดิบและเส้นขนมจีนจากข้อ 4.4.1 ปริมาณ 5 กรัม และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันและทำการวัดโดยใช้ pH meter

4.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส ตามวิธีของ Juliano, 1971

โดยใช้สารละลายตัวอย่างที่เตรียมดังภาคผนวก ค 2.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 M acetic acid 1 มิลลิลิตร และไอโอดีน 2 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ส่วน blank เตรียมวิธีการเดียวกับตัวอย่างแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเทียบปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะไมโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

4.5.4 วิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นรส

การตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรส (Volatile compounds) ของตัวอย่างเส้นขนมจีน โดยใช้เทคนิค Headspace Solide Phase Microextraction-Gas Chromatography-mass Spectrometry (HS-SPME GC-MS) ตามวิธีการทดสอบ WI-RES-GC-ISQMS-001 และ REF-REF-Sampleprep GC-ISQME-007 โดยทำการชั่งตัวอย่างเส้นขนมจีนมา 5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับวิเคราะห์ แล้วเติมสาร internal standard 5 ไมโครลิตร (ประกอบด้วยสารละลาย 2-methyl-3-heptanone ใน methanol ความเข้มข้น 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (จีสุดา, 2548) ผสมให้เข้ากันและให้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดดุลยภาพของสารระเหย หลังจากนั้นทำการสกัดสารระเหยที่ให้กลิ่นด้วย Solide Phase Microextraction โดยใช้ไฟเบอร์ชนิด 100 µm polydimethylsiloxane โดยให้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลงมาจาก Qin และ Ding, 2007) หลัง จากนั้นสารระเหยที่อยู่บนไฟเบอร์จะถูกฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography -Mass Spectrometer, Trac GC Ultra / ISQ MS ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ TR-WaxMS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้อุณหภูมิหัวฉีดเท่ากับ 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาด้วยอัตรา 75 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์จะให้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 260 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับเครื่อง Mass Spectrometer ใช้อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส โดยให้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และมี mass range อยู่ในช่วง 25-500 amu และการระบุสารประกอบของ flavor profile โดยเก็บบันทึกข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ที่มี standard library spectra พร้อมโปรแกรมค้นหา เพื่อใช้เทียบเคียง mass spectra กับ GC-MS database ชื่อ Wiley 9 และทำการคำนวณปริมาณสารระเหยแต่ละชนิดดังสมการในข้อ 2.3.3

4.6 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

4.6.1 การหาปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตาม AOAC (2000)

นำ Aluminium disk ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ได้แก่ วัตถุดิบและเส้นขนมจีนจากข้อ 4.4.1 ประมาณ 5 กรัม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำใส่ลงใน Aluminium disk ที่อบไว้ แล้วแผ่ตัวอย่างให้กระจายสม่ำเสมอ จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อบจนได้น้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำ Aluminium disk ออกจากตู้อบใส่ใน desicator ทิ้งให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ–น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

4.6.2 การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน

โดยวัดค่าความแข็ง (Hardness) ความเหนียว (Stickiness) และความเกาะติด (Adhesiveness) ของเส้นขนมจีน โดยใช้เครื่อง Texture analyzer รุ่น TA-XTplus (Surrey, England) 5 kg Load cell โดยใช้หัววัดทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตรความเร็วขณะทดสอบ 2.0 มิลลิเมตรต่อวินาที กดลงบนเส้นขนมจีน 2 เส้นที่วางขนานกันด้วยระยะกด 75 เปอร์เซ็นต์ของความหนาเส้น

4.6.3 การตรวจสอบค่าสีของเส้นขนมจีน

โดยวัดค่าสีของเส้นขนมจีน โดยใช้เครื่องวัดค่าสียี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Flex สภาวะการทดสอบ CIELab Scale D65/10^0 โดยมี port size ขนาด 1.25 นิ้ว

5. การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยนำเส้นขนมจีนที่ได้จากการหมักแบบเติมกล้าเชื้อและชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติมาทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คนมาร่วมทดสอบชิมตัวอย่างเส้นขนมจีน โดยทำการทดสอบความชอบทางด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม โดยใช้ระดับความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์ของผู้ทำการทดสอบเป็นเกณฑ์ในการให้คะแนน ซึ่งมีระดับความชอบ 5 ระดับ (5-point hedonic scale) คือ

ระดับคะแนน 1 ไม่ชอบ

ระดับคะแนน 2 พอใช้

ระดับคะแนน 3 ชอบปานกลาง

ระดับคะแนน 4 ชอบมาก

ระดับคะแนน 5 ชอบมากที่สุด

แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการประเมินมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีทางสถิติ One Way Anova post-hoc comparision of means (Duncan's multiple rang test) โดยใช้โปรแกรม SPSS สำหรับ Window XP version 14 (SPSS Inc. Chicago, III., U.S.A)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อการดูกระจายของข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยโปรแกรม SPSS สำหรับ Window XP version 14 (SPSS Inc. Chicago, III., U.S.A) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan' s multiple range test (DMRT)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1 การศึกษาปริมาณและคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีน

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตขนมจีน ได้แก่ ข้าวหมัก น้ำแป้ง แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และแป้งนวดจากโรงงานผลิตขนมจีนทั้งหมด 11 โรงงานในจังหวัดสงขลา (2 โรงงาน) นครศรีธรรมราช (1 โรงงาน) พัทลุง (6 โรงงาน) และพระนครศรีอยุธยา (2 โรงงาน) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกรวมถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดแลกติก ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

กระบวนการผลิตขนมจีนของแต่ละจังหวัดมีกระบวนการผลิตที่คล้ายคลึงกัน ส่วนโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาจะมีกระบวนการผลิตแตกต่างจากโรงงานอื่นในขั้นตอนของการหมักข้าวซึ่งมีการหมักข้าวไว้ 2 คืนก่อนนำมาโม่ ส่วนโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และ สงขลา มีการหมักข้าวเพียงแค่คืนเดียว จากการสำรวจสามารถเก็บตัวอย่างในขั้นตอนการผลิตขนมจีนได้ทั้งหมด 29 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวหมัก (8 ตัวอย่าง) น้ำแป้ง (2 ตัวอย่าง) กากแป้งนอนน้ำ (1 ตัวอย่าง) แป้งนอนน้ำ (5 ตัวอย่าง) แป้งทับน้ำ (11 ตัวอย่าง) และแป้งนวด (2 ตัวอย่าง) และสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลกติก ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแต่ละแหล่งการผลิตมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลกติกที่คล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 3.1 จำนวนตัวอย่างและแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตขนมจีน 11 โรงงาน

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ (ไอโซเลต)
ข้าวหมัก	8	107
น้ำแป้ง	2	25
กากแป้งนอนน้ำ	1	28
แป้งนอนน้ำ	5	87
แป้งทับน้ำ	11	200
แป้งนวด	2	29
รวม	29	476

จากการศึกษาพบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณสูงในทุกขั้นตอนของกระบวนผลิต โดยตัวอย่างแป้งทับน้ำมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงที่สุดอยู่ในช่วง 8.37-9.37 logCFU/g รองลงมา คือ แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ ข้าวหมัก น้ำแป้ง และแป้งนวด โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก คือ 7.36-9.33, 8.47, 7.47-8.48, 7.81-8.09 และ 7.56-7.60 logCFU/g ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 3.2 ดังนั้นกระบวนการหมักที่สำคัญจึงเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนแป้งทับน้ำ แป้งนอนน้ำ และข้าวหมัก

การเปลี่ยนแปลงพีเอช และปริมาณกรดแลกติกในระหว่างกระบวนการผลิตมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียแลกติก คือ ปริมาณกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่พีเอชจะลดลง จากผลการศึกษาในตารางที่ 3.2 แบคทีเรียแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำและปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นสูงสุดในขณะที่พีเอชลดลงต่ำสุด โดยปริมาณกรดแลกติกสูงสุดและพีเอชต่ำสุด คือ อยู่ในช่วง 0.38-0.85 เปอร์เซ็นต์ และค่าพีเอชเท่ากับ 2.69-3.89 และพบปริมาณกรดแลกติกรองลงมาในขั้นตอนแป้งนวด แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ ข้าวหมัก และน้ำแป้ง โดยมีปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 0.56-0.76, 0.35-3.58, 0.37, 0.32-0.73 และ 0.30-0.48 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ คืออยู่ในช่วง 3.17-3.18, 2.74-3.66, 3.26, 3.38-3.62 และ 3.42-3.99 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างแป้งนอนน้ำมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก และปริมาณกรดแลกติกลดลง เนื่องจากมีการแทนที่ของน้ำ ในขณะที่ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีน

ตัวอย่าง (จำนวน)	การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา	การวิเคราะห์ทางเคมี	
	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (logCFU/g)	pH	ปริมาณกรดแลกติก (เปอร์เซ็นต์)
ข้าวหมัก (8)	7.47-8.48	3.38-3.62	0.32-0.73
น้ำแป้ง (2)	7.81-8.09	3.42-3.99	0.30-0.48
กากแป้งนอนน้ำ (1)	8.47	3.26	0.37
แป้งนอนน้ำ (5)	7.36-9.33	2.74-3.66	0.35-0.58
แป้งทับน้ำ (11)	8.37-9.37	2.69-3.89	0.38-0.85
แป้งนวด (2)	7.56-7.60	3.17-3.18	0.56-0.76

2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีน

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีน

2.1.1 วิธี agar spot assay

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลตด้วยวิธี agar spot assay โดยใช้แบคทีเรียทดสอบจำนวน 5 ชนิด คือ *L. sake* TISTR 911, *L. curvatus* TISTR 938, *S. aureus* TISTR 029, *E. coli* TISTR 780 และ *B. cereus* TISTR 687 โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารแข็ง Bacteriocin screening medium (BSM) ที่เติมปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อช่วยลดผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่ผสมเชื้อทดสอบ 10^6 CFU/ml หลังจากบ่มทำการตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจากวงใสรอบรอยเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดสอบ

จากการทดลองผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 3.3 และตารางภาคผนวกที่ 2 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 55 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ โดยการ

ยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย ทดสอบของแต่ละไอโซเลตแตกต่างกัน และความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกันด้วย คือ แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 ได้มากที่สุด คือ 30 ไอโซเลต โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งในช่วง 1.05-5.20 มิลลิเมตร รองลงมา คือ 29 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 มีขนาดวงใสของการยับยั้ง 0.90-4.28 มิลลิเมตร มี 11 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 029 โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้ง 2.15-5.80 มิลลิเมตร มี 4 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. sake* TISTR 911 ซึ่งมีขนาดของวงใสของการยับยั้ง 0.95-2.95 มิลลิเมตร และมีเพียง 1 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *L. curvatus* TISTR 938 มีขนาดวงใสของการยับยั้ง 1.90 มิลลิเมตร

อย่างไรก็ตาม การทดสอบความสามารถในการยับยั้งด้วยวิธี agar spot assay เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น ต่อไปนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 55 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay

ตารางที่ 3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแ-บคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar spot assay

แบคทีเรียทดสอบ	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (ไอโซเลต)	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)
E. coli TISTR 780	30	1.05–5.20
B. cereus TISTR 687	29	0.90–4.28
S. aureus TISTR 029	11	2.15–5.80
L. sake TISTR 911	4	0.95–2.95
L. curvatus TISTR 938	1	1.90

2.1.2 วิธี agar well diffusion assay

นำแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 55 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยการนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อกำจัดผลที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วนำสารละลายใสมาปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.5 เพื่อกำจัดผลที่เกิดจากกรดอินทรีย์ แล้วหยดลงในหลุมอาหารเพาะเชื้อที่ swab ด้วยเชื้อทดสอบ หลังจากบ่มแล้วทำการตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส แล้วทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.4 โดยสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต

DWS0906, DWS0911, DWS0403, FR0513, SRS1108 และ FR0512 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และทุกไอโซเลตจะไม่มีผลในการยับยั้ง *L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938 ซึ่งสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้สูง ได้แก่ ไอโซเลต DWS0911, DWS0906 และ DWS0403 โดยสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0911 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 029 ได้สูงสุด รองลงมา คือ เชื้อ *B. cereus* TISTR 687 มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 14.40 และ 13.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0906 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 ได้สูงสุด รองลงมา คือ *E. coli* TISTR 780 มีค่าการยับยั้งกับ 13.80 และ 11.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ สุดท้าย คือ สารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 029ได้สูงสุด รองลงมา คือ *B. cereus* TISTR 687 มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 13.65 และ 12.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar well diffusion assay

ไอโซเลต	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	L. sake **TISTR 911**	***L. curvatus*** **TISTR 938**	***S. aureus*** **TISTR 029**	***B. cereus*** **TISTR 687**	***E. coli*** **TISTR 780**
DWS0403	-	-	13.65	12.30	9.80
FR0512	-	-	7.50	7.80	8.40
FR0513	-	-	8.35	9.55	7.50
DWS0906	-	-	11.10	13.80	11.65
DWS0911	-	-	14.40	13.65	9.80
SRS1108	-	-	8.20	9.75	8.40

หมายเหตุ : - : ไม่มีผลการยับยั้ง

FR : ข้าวหมัก, SRS : แป้งนอนน้ำ, DWS : แป้งทับน้ำ

6.0-9.0 มิลลิเมตร : การยับยั้งต่ำ, 9.1-11.0 มิลลิเมตร : การยับยั้งปานกลาง

11.1-13.0 มิลลิเมตร : การยับยั้งดี, >13.1 มิลลิเมตร : การยับยั้งดีมาก

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ทำได้โดยการนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีน 476 ไอโซเลตเลี้ยงในอาหารเหลว GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้า 10 % ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน โดยตรวจผลโดยดูความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสีของสารละลายไอโอดีน และสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของอาหาร GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้าที่ไม่เติมเชื้อกับสารละลายไอโอดีน แล้วทำการบันทึกผลเป็นผลการย่อยแป้ง ได้ต่ำเมื่อสารละลายเป็นสีน้ำเงินอ่อน ย่อยแป้งได้ปานกลางเมื่อสารละลายเป็นสีน้ำตาลปนม่วง ย่อยแป้งได้ดีเมื่อสารละลายเป็นสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน และย่อยแป้งได้ดีมากเมื่อสารละลายเป็นสีเหลือง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งในอาหารเหลว GYP ที่มีการเติมแป้งข้าวเจ้า 10 เปอร์เซ็นต์ ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง			
	ต่ำ	ปานกลาง	ดี	ดีมาก
ข้าวหมัก	19	64	24	-
น้ำแป้ง	4	19	2	-
กากแป้งนอนน้ำ	19	9	-	-
แป้งนอนน้ำ	39	41	7	-
แป้งทับน้ำ	73	98	28	1
แป้งนวด	9	9	11	-
รวม	163	240	72	1

หมายเหตุ : - ไม่มีผลการย่อยแป้ง

จากการทดลอง พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่มีความสามารถในการย่อยแป้งในระดับปานกลางถึง 240 ไอโซเลต โดยสามารถย่อยแป้งได้ดี 72 ไอโซเลต และย่อยแป้งได้ดีมาก 1 ไอโซเลต ซึ่งการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง

ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้าแล้วตรวจหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน เป็นการคัดเลือกเบื้องต้นเท่านั้น และทำการยืนยันผลการย่อยแป้งอีกครั้งด้วยการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method

โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีและดีมากจำนวน 73 ไอโซเลตมาทดสอบ โดยนำส่วนใสมาหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่า OD ที่ 490 นาโนเมตร (y=0.0093x) (รูปภาคผนวกที่ 1)ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.6 และตารางภาคผนวกที่ 2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก

จากการทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เกิดจากการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตค่อยๆเพิ่มขึ้นจนครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกครบระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลตสามารถย่อยแป้งดิบได้ดีมาก คือ ไอโซเลต FR0512 สามารถย่อยแป้งดิบได้ดีมากที่สุดซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 2,667 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ไอโซเลต DWS0911, FR0514, SRS1108 และ DWS0807 ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 2,329, 2,080, 2,072 และ 2,027 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดี คือ ไอโซเลต FR0501, FR0513, FR0502, DWS0403 และ DWS0405 โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1,964, 1,924, 1,813, 1,731 และ 1,544 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แบคทีเรียแลกติก 32 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ปานกลาง และแบคทีเรียแลกติก 31 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ต่ำ

ตารางที่ 3.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในอาหาร GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้า 10 เปอร์เซ็นต์ ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, µg/ml)	**ไอโซเลต**
ดีมาก (> 2,001 µg/ml)	FR0512, FR0514, DWS0807, DWS0911, SRS1108
ดี (1,501-2,000 µg/ml)	DWS0403, DWS0405, FR0501, FR0502, FR0513
ปานกลาง (1,001-1,500 µg/ml)	FR0307, SRS0317, DWS0310, DWS0311, DWS0413, DWS0430, FR0508, DWS0805, DWS0816, DWS0906, DWS0912, DWS1015, FR1103, FR1104, FR1106, FR1107, FR1110, FR1112, FR1113, LRS1101, LRS1110, SRS1104, DWS1110, DWS1111, DWS1112, KS1103, KS1105, KS1106, KS1107, KS1108, KS1111, KS1113
ต่ำ (< 1,000 µg/ml)	FR0106, FR0115, FR0116, SRS0115, DWS0404, DWS0438, DWS0439, FR0511, FR0516, SRS0502, SRS0513, SRS0514, DWS0501, DWS0502, DWS0503, DWS0506, DWS0512, DWS0520, KS0501, KS0507, KS0510, FR0801, FR0802, DWS0808, DWS0815, FR1102, FR1105, FR1111, SRS1110, DWS1114, KS1102

หมายเหตุ : µg/ml : ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
FR : ข้าวหมัก, LRS : น้ำแป้ง, SRS : แป้งนอนน้ำ,
DWS : แป้งทับน้ำ, KS : แป้งนวด

จากผลการศึกษาแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีนที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีน และการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ ซึ่งให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ แบคทีเรียแลกติกไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี จะมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีเช่นกัน

จากผลการทดลอง พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้ 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906, และ DWS0911 โดยแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0911 มีความสามารถในยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 029 ได้ดีมากที่สุด โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 14.40 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 ได้ปานกลาง และยังมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ดีมาก ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 2,329 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0906 มีความสามารถในยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้ดีมากที่สุด โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 13.80 มิลลิเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 และ *S. aureus* TISTR 029ได้ดี และมีความ สามารถในการย่อยแป้งดิบได้ปานกลาง ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1,031 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 มีความสามารถในยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 029 ได้ดีมาก โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 13.65 มิลิเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้ดี โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 12.30 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 ได้ปานกลาง และมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ดี ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 1,731 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และความสามารถในการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 DWS0906 และ DWS0911

ไอโซเลต	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (mm)			ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	S. aureus TISTR 029	*B. cereus* TISTR 687	*E. coli* TISTR 780	
DWS0403	13.65	12.30	9.80	ดี (1,731)
DWS0906	11.10	13.80	11.65	ปานกลาง (1,031)
DWS0911	14.40	13.65	9.80	ดีมาก (2,329)

หมายเหตุ : FR : ข้าวหมัก, SRS : แป้งนอนน้ำ, DWS : แป้งทับน้ำ
6.0-9.0 mm : การยับยั้งต่ำ, 9.1-11.0 mm : การยับยั้งปานกลาง
11.1-13.0 mm : การยับยั้งดี, >13.1 mm : การยับยั้งดีมาก

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรส โดยการศึกษาสารระเหยที่เกิดขึ้นในการผลิตขนมจีน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ DWS0403, DWS0906, DWS0911 ที่มีสมบัติทั้งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในกระบวนการผลิตขนมจีนและปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีนโดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบมาเตรียมเป็นกล้าเชื้อ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml ในการหมักข้าว โดยเติมกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ส่วนชุดควบคุมเป็นการหมักตามธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่เติมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์แทน คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างมาตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรสโดยใช้เทคนิค HS-SPME GC-MS พบว่ามีสารระเหยในข้าวหมักทั้งหมด 37 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะการหมักที่แตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารระเหยในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มสารระเหยที่พบเป็น 5 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ โดยตัวอย่างการหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อที่แตกต่างกันจะพบองค์ประกอบของสารระเหยที่ต่างกันด้วย โดยตัวอย่างข้าวหมักชุดควบคุมมีจำนวนชนิดสารระเหยมากที่สุด รองลงมาคือ ข้าวหมักที่เติมเชื้อ DWS0906, DWS0403 และ DWS0911 ตามลำดับ

2.3.1 แอลกอฮอล์

สารระเหยแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่จะพบในตัวอย่างชุดควบคุมมากกว่าตัวอย่างที่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยในตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 พบ 2 ชนิด คือ 1-hexanol และ 1-heptanol ส่วนตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0906 พบ 6 ชนิด คือ benzene ethanol, 2-methoxy-4-vinylphenol, 2,6-dimethyl-4-heptanol, isoamylalcohol, 2,3-butanediol และ (5-methyltetrahydro-2-furanyl)methanol และตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0911 พบแอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ 1-heptanol, 4-vinyl-2-methoxyphenol และ 2,3-butanediol

2.3.2 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่พบในตัวอย่างชุดควบคุมมี 3 ชนิด คือ acetic acid, butanoic acid และ 2-methylpropanoic acid ในตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 พบ 6 ชนิด คือ acetic acid, butanoic acid, valeric acid, hexanoic, acid 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ส่วนตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0906 พบ 3 ชนิด คือ acetic acid, valeric acid และ 2-methylpropanoic acid และตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0911 พบกรดอินทรีย์ 5 ชนิด คือ acetic acid, butanoic acid, 2-methylpropanoic acid, 3-methylbutanoic acid และ 3-methyl-2-butenoic acid ซึ่งกรดอินทรีย์ที่พบในตัวอย่างทุกชนิด คือ acetic acid และ 2-methylpropanoic acid

2.3.3 คีโตน

ตัวอย่างชุดควบคุมพบคีโตน 4 ชนิด คือ acetone, 4-octanone, 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone และ acetoin ในตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 พบคีโตนเพียงชนิดเดียว คือ acetoin ส่วนตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0906 พบ 4 ชนิด คือ 2-nonanone, 2-undecanone, 5-methyl-3-hexanone และ acetoin และ ตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0911 พบคีโตนชนิดเดียว คือ acetone

2.3.4 อัลดีไฮด์

อัลดีไฮด์ที่พบมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ acetaldehyde และ hexanal โดย acetaldehyde จะพบในตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0906 และ hexanal จะพบในตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403

ตารางที่ 3.8 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่พบในชุดควบคุม และตัวอย่างข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	ชุดควบคุม	ข้าวหมักด้วย DWS0403	ข้าวหมักด้วย DWS0906	ข้าวหมักด้วย DWS0911
แอลกอฮอล์				
benzene ethanol	441.3	-	298.6	-
1-hexanol	-	14.6	-	-
1-heptanol	-	3.6	-	4.2
3-methylthio-1-propanol	129.2	-	-	-
3-methyl-1-butanol	390.4	-	-	-
4-ethyl-2-methoxyphenol	4,022.5	-	-	-
2-methoxy-4-vinylphenol	910.8	-	1,395.2	-
2,6-dimethyl-4-heptanol	386.5	-	239.1	-
4-vinyl-2-methoxyphenol	-	-		51.3
isoamylalcohol	-	-	1,987.5	-
1,3-butanediol	516.3	-	-	-
2,3-butanediol	403.1	-	48.1	8.4
(5-methyltetrahydro-2-furanyl)methanol	-	-	52.4	-
กรดอินทรีย์				
acetic acid	81.1	230.8	133.9	77.8
butanoic acid	1,036.6	9.0	-	18.2
valeric acid	-	22.2	237.8	-
hexanoic acid	-	9.0	-	-
2-methylpropanoic acid	230.7	11.9	117.7	113.4
3-methylbutanoic acid	-	573.3	-	206.4
3-methyl-2-butenoic acid	-	-	-	21.8

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	ชุดควบคุม	ข้าวหมักด้วย DWS0403	ข้าวหมักด้วย DWS0906	ข้าวหมักด้วย DWS0911
คีโตน				
acetone	1,127.1	-	-	276.7
2-nonanone	-	-	72.0	-
4-octanone	266.5	-	-	-
2-undecanone	-	-	57.6	-
3-hydroxy-3-methyl-2-butanone	135.3	-	-	-
5-methyl-3-hexanone	-	-	46.5	-
acetoin	1,266.9	129.5	183.6	-
อัลดีไฮด์				
acetaldehyde	-	-	297.3	-
hexanal	-	4.8	-	-
กลุ่มอื่นๆ				
trimethylpyrazine	61.6	-	-	-
2-methyl-5-isopropyl pyrazine	560.2	-	-	-
2-ethenyloxypropane	-	-	279.3	-
2,5-dimethylpyrazine	-	-	162.5	8.2
2-isopropyl-5,6-dimethylpyrazine	470.6	-	-	-
2-propyl-3,5,6-trimethylpyrazine	2,158.5	-	-	-
methoxyethene	-	8.5	-	4.7
pentadecane	-	12.0	-	-

หมายเหตุ - : ตรวจไม่พบ

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

จากการศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี การปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน โดยการศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ และสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสของขนมจีน โดยการศึกษาสารระเหยที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขนจีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติดังกล่าวได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906, DWS0911 ซึ่งสมบัติเหล่านี้เป็นสมบัติหลักที่ใช้ในการคัดเลือก แบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทต่อการปรับปรุงคุณภาพของขนมจีนเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน

จากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตมาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียแลกติกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Kandier and Weiss, 1986) และ Axelsson (1998) โดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวของเซลล์ การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส และสมบัติทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 3.9 และเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของแบคทีเรียแลกติกจีนัสต่างๆ

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่และสาย แสดงดังรูปที่ 3.1 ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และไม่มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส ตรวจไม่พบการสร้างก๊าซในหลอดดักก๊าซ ซึ่งมีกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ homofermentative ดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และDWS0911 ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีน

สมบัติ	DWS0403	DWS0906	DWS0911
การติดสีแกรม	+	+	+
รูปร่าง	แท่ง	แท่งสั้น	แท่ง
การจัดเรียงตัว	คู่ สาย	คู่ สาย	คู่ สายสั้น
การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	-	-	-
การเจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	+	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+	+	+
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	+	+
การเจริญที่ 50 องศาเซลเซียส	-	-	-
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 2 %	+	+	+

ตารางที่ 3.9 (ต่อ)

สมบัติ	DWS0403	DWS0906	DWS0911
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 4 %	+	+	+
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 6.5 %	+	+	+
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 10 %	-	-	-
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ 18 %	-	-	-
การเจริญที่ pH 4.5	+	+	+
การเจริญที่ pH 9.6	+	+	+
การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	-	-	-
กระบวนการหมักน้ำตาล	homo	homo	homo
การสร้างกรดจากน้ำตาล			
1. Amygdalin	+	+	+
2. Sobitol	+	+	+
3. Mannitol	+	+	+
4. Cellobiose	+	+	+
5. Lactose	+	-	+
6. Maltose	+	+	+
7. Mannose	+	+	+
8. Raffinose	+	±	+
9. Sucrose	+	+	+
10. Fructose	+	+	+
11. Ribose	+	+	+
12. Xylose	±	±	±
13. Arabinose	+	±	±
14. Galactose	+	-	+
15. Melibiose	+	±	-
16. Trehalose	+	+	+
17. Esculin	+	+	+
18. Melezitose	+	±	±

หมายเหตุ + ผลการทดสอบเป็นบวก, - ผลการทดสอบเป็นลบ, ± : ผลไม่ชัดเจน

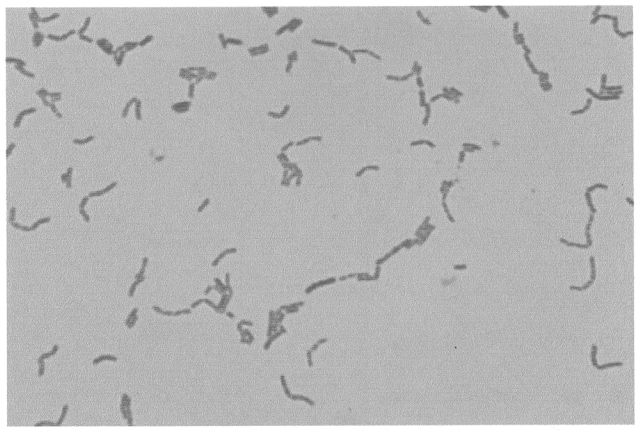
Homo : homofermentative

โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10, 35 และ45 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลต DWS0403 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และทุกไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง3 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2, 4 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ และทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5 และ 9.6

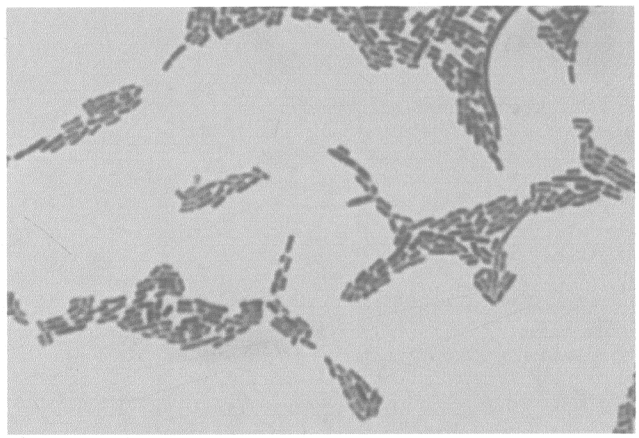
จากการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกโดยการตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล พบว่าไอโซเลต DWS0403 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* มากที่สุด ไอโซเลต DWS0906 และ DWS0911 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* และ *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis*

นอกจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้แล้ว ยังมีการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอซึ่งได้จากการเพิ่มขยายโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis แล้วทำการประมวลผลด้วยข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 แสดงดังรูปที่ 3.2 ดังนั้น ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก พบว่า แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accession number คือ D79210 ไอโซเลต DWS0906 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accession number คือ D79211 และไอโซเลต DWS0911 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accession number คือ AJ306297

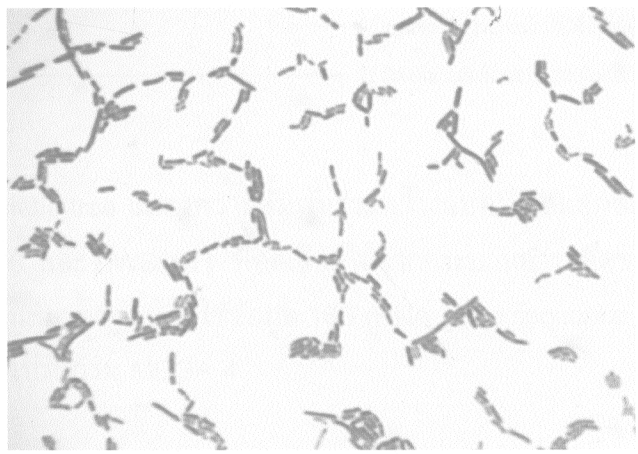
(a)



(b)



(c)

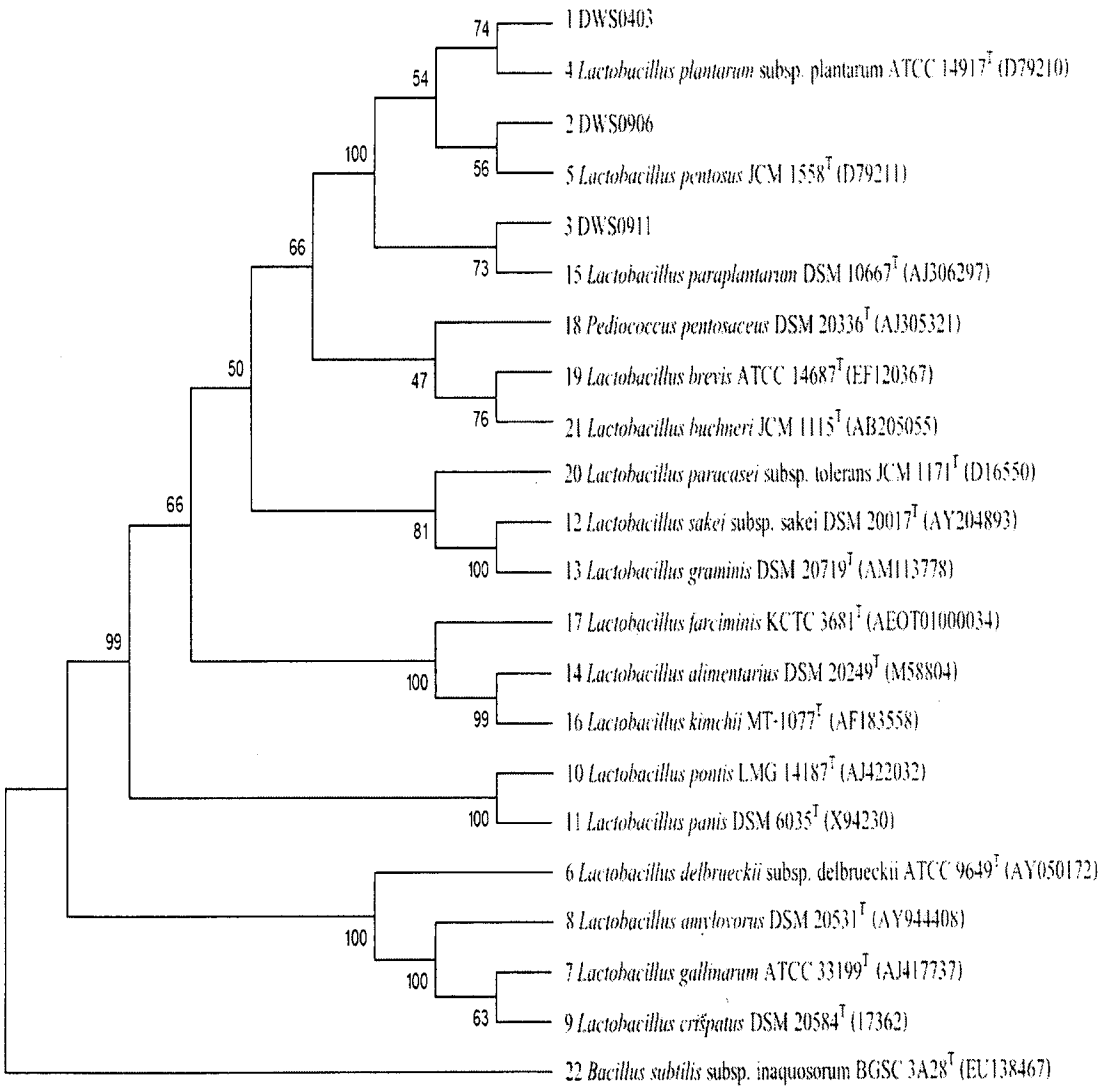


รูปที่ 3.1 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

(a) *Lactobacillus plantarum* DWS0403

(b) *Lactobacillus pentosus* DWS0906

(c) *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911



รูปที่ 3.2 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีนกับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์มาตรฐานโดยใช้ข้อมูล 16S rRNA gene sequence โดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4

4. การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* DWS0403, *Lactobacillus pentosus* DWS0906 และ *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีน เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนที่แตกต่างกัน คือ *L. plantarum* DWS0403 มีสมบัติในการย่อยแป้งดิบได้ดี *L. pentosus* DWS0906 มีสมบัติ ในการย่อยแป้งดิบได้ปานกลาง และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีสมบัติในการย่อยแป้งดิบได้ดีมาก และแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ยังมีสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรส โดยการผลิตสารระเหยให้กลิ่นอีกด้วย แล้วทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์และรา *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, Coliforms และ *E. coli* การเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช ปริมาณ อะไมโลส สารระเหยให้กลิ่นรส รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น ปริมาณความชื้น ลักษณะ เนื้อสัมผัส และค่าสีของเส้นขนมจีน และยังศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่ผลิตโดยวิธีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในข้าวและน้ำแป้งเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติ โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (v/w) ส่วนชุดควบคุมเป็นการหมักตามธรรมชาติเติมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์แทน โดยเก็บตัวอย่างขั้นตอนการผลิตที่สำคัญ คือ ข้าวหมัก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง แป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และเส้นขนมจีน

4.1 การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการหมักข้าว

4.1.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

4.1.1.1 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก

ผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก แสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่าข้าวหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ*L. paraplantarum* DWS0911 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นอยู่ที่ 6.7-6.8 logCFU/g และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเชื้อแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นในข้าวหมักชุดควบคุม ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 3.7 logCFU/g เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณของแบคทีเรียแลกติกจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกชุดของการหมัก ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มี

ปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิตและมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 9.1 logCFU/g รองลงมา คือ ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 และ *L. pentosus* DWS 0906 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 8.9 และ 8.8 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับข้าวหมักชุดควบคุม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับข้าวหมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 หลังจากการนอนน้ำแป้ง พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีจำนวนลดลง โดยแป้งนอนน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ยังคงมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุด รองลงมา คือ *L. pentosus* DWS0906 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 8.4 และ 8.3 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และตามด้วยแป้งนอนน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุมเท่ากับ 8.0 และ 8.1 logCFU/g ตามลำดับ และขั้นตอนแป้งทับน้ำมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้น โดยแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ยังมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดเท่ากับ 8.8 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากัน คือ 8.5 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุมที่มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 8.4 logCFU/g ส่วนในเส้นขนมจีน พบว่าชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงกว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกมีค่าเท่ากับ 3.1 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต

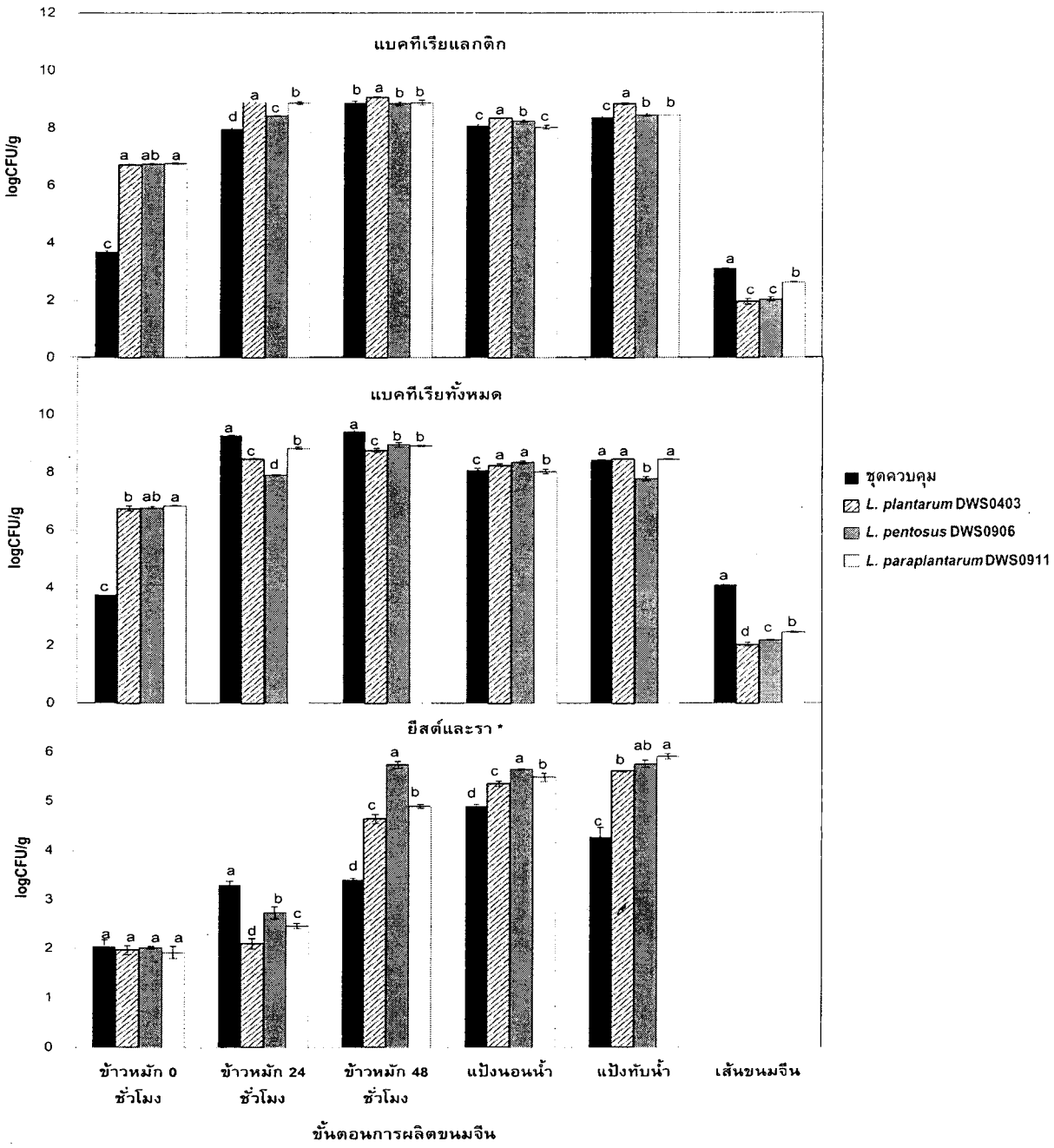
4.1.1.2 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

ผลการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ไม่มีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เท่ากับ 6.8, 6.8 และ 6.9 logCFU/g ตามลำดับ แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 3.8 logCFU/g และเมื่อระยะเวลาการหมักข้าวเพิ่มขึ้นปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยพบว่าชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดในช่วงของการหมักข้าว และมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุดที่ข้าวหมัก 48 ชั่วโมงเท่ากับ 9.4 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.8, 9.0 และ 8.9 logCFU/g ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลงในขั้นตอนนอนน้ำแป้ง และเพิ่มขึ้นในขั้นตอนแป้งทับน้ำในชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม

มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.5, 8.5 และ 8.4 logCFU/g ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 เท่ากับ 7.8 logCFU/g เส้นขนมจีน พบว่าชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 4.1 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการหมัก โดยชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดน้อยที่สุดในเส้นขนมจีน

1.1.3 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา

ผลการตรวจนับปริมาณยีสต์และรา แสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่าตรวจไม่พบราในทุกขั้นตอนของการผลิต เมื่อเริ่มต้นการหมักข้าวที่ 0 ชั่วโมงพบว่าตรวจพบยีสต์อยู่ระหว่าง 1.9-2.1 logCFU/g เมื่อทำการหมักข้าวได้ 24 ชั่วโมงพบว่าข้าวหมักชุดควบคุมมีปริมาณยีสต์สูงสุดเท่ากับ 3.3 logCFU/g และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลอง ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณยีสต์เพิ่มสูงสุดในข้าวหมักที่ 48 ชั่วโมง และลดงลงในขั้นตอนแป้งนอนน้ำ และปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ พบว่าแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณยีสต์สูงสุดเท่ากับ 5.9 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 มีปริมาณยีสต์เท่ากับ 5.8 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณยีสต์เท่ากับ 5.6 และ 4.3 logCFU/g ตามลำดับ ส่วนในเส้นขนมจีนตรวจไม่พบยีสต์ในทุกชุดการหมัก



รูปที่ 3.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียทั้งหมด และยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) * หมายถึง ตรวจพบยีสต์แต่ไม่พบรา

4.1.1.4 การตรวจนับปริมาณ *Bacillus cereus*

ผลการตรวจนับปริมาณ *B. cereus* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีนแป้งหมักตรวจไม่พบ *B. cereus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911

4.1.1.5 การตรวจนับปริมาณ *Staphylococcus aureus*

ผลการตรวจนับปริมาณ *S. aureus* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีนแป้งหมักตรวจไม่พบ *S. aureus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911

4.1.1.6 การตรวจนับปริมาณ Coliforms และ *E. coli*

ผลการตรวจนับปริมาณ Coliforms แสดงดังตารางที่ 3.10 พบว่าปริมาณ Coliforms เริ่มต้นในทุกชุดการทดลองน้อยกว่า 3 MPN/g และชุดควบคุมมีปริมาณ Coliforms เพิ่มขึ้นมากกว่า 1100 MPN/g ในข้าวหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง และหลังจากการนอนน้ำแป้งปริมาณ Coliforms มีจำนวนลดลงน้อยกว่า 3 MPN/g ส่วนในชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 พบว่ามีปริมาณ Coliforms น้อยกว่า 3 MPN/g ในทุกขั้นตอนของการผลิตตั้งแต่เริ่มหมักข้าวจนเป็นเส้นขนมจีน แสดงดังตารางที่ 3.10 เมื่อทำการตรวจนับปริมาณ *E. coli* พบว่าชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติมีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ในทุกขั้นตอนการผลิตตั้งแต่เริ่มหมักข้าวจนเป็นเส้นขนมจีน แสดงดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Coliforms ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	Coliforms (MPN/g)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	>1100	<3	<3	<3
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	>1100	<3	<3	<3
แป้งนอนน้ำ	<3	<3	<3	<3
แป้งทับน้ำ	<3	<3	<3	<3
เส้นขนมจีน	<3	<3	<3	<3

ตารางที่ 3.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *E. coli* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	*E. coli* (MPN/g)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
แป้งนอนน้ำ	<3	<3	<3	<3
แป้งทับน้ำ	<3	<3	<3	<3
เส้นขนมจีน	<3	<3	<3	<3

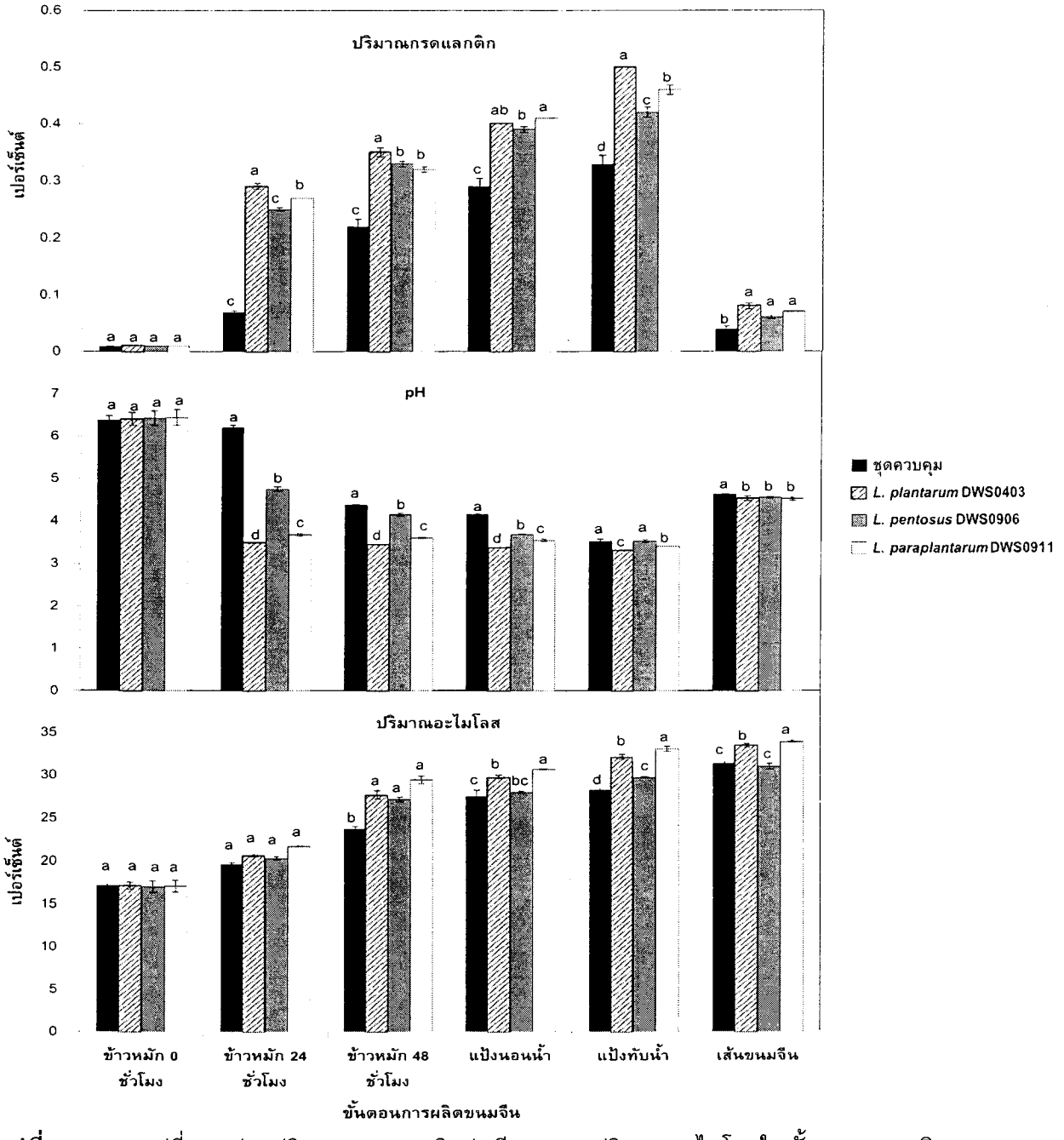
4.1.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

4.1.2.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (%Titratable acidity (%TA) ของกรดแลกติก)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก แสดงดังรูปที่ 3.4 พบว่าปริมาณกรดแลกติกเริ่มต้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการหมัก และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น และพบว่าชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต และมีปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ โดยมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม โดยมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 0.42, 0.46 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.06-0.08 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณกรดเท่ากับ 0.04 เปอร์เซ็นต์

4.1.2.2 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH)

ผลการตรวจวัดค่าพีเอช แสดงดังรูปที่ 3.4 พบว่าข้าวที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และข้าวหมักชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยอยู่ระหว่าง 6.4-6.5 เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพบว่าค่าพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีค่าพีเอชต่ำสุดในทุกขั้นตอนการผลิต และค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำเท่ากับ 3.3 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911, *L. pentosus* DWS0906 และชุดควบคุม ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.4, 3.5 และ 3.5 ตามลำดับ ส่วนเส้นขนมจีนพบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีค่าพีเอชของไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.5 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.6



รูปที่ 3.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกค่าพีเอช และปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

4.1.2.3 วิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส แสดงดังรูปที่ 3.4 พบว่าปริมาณอะไมโลสเริ่มต้นอยู่ในช่วง 17.0-17.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พบว่าชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณอะไมโลสสูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต รองลงมาคือชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนแป้งทับน้ำ พบว่าแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณอะไมโลสสูงสุดเท่ากับ 33.1 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 32.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 มีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 29.7 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)กับชุดควบคุมเท่ากับ 28.3 เปอร์เซ็นต์ เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณอะไมโลสสูงสุดเท่ากับ 33.9 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 33.5 เปอร์เซ็นต์ และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับตัวอย่างชุดควบคุมมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 31.0 และ 31.4 เปอร์เซ็นต์

4.1.2.4 วิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นรส

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงชนิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค HS-SPME GC-MS วิเคราะห์สารระเหยในกระบวนการผลิตทั้งหมด 5 ขั้นตอน คือ ข้าวหมักวันที่ 1 ข้าวหมักวันที่ 2 แป้งนอนน้ำ แป้งทับน้ำ และเส้นขนมจีน พบว่ามีสารระเหยทั้งหมด 47 ชนิด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มหลัก คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน เอสเทอร์ อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารระเหย 12, 11, 7, 3, 3 และ 11 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งสารระเหยแต่ละชนิดมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 3.12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะการหมักที่แตกต่างกันใน แต่ละขั้นตอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารระเหยในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้กระบวนการหมักแต่ละขั้นตอนมีลักษณะกลิ่นที่แตกต่างกัน โดยมีการเพิ่มจำนวนของชนิดสารระเหยทั้งหมดมากที่สุดในขั้นตอนข้าวหมัก 48 ชั่วโมง โดยพบสารระเหยกลุ่มแอลกอฮอล์มากกว่ากรดอินทรีย์ และขั้นตอนของแป้งนอนน้ำพบว่าสารระเหยที่เกิดขึ้นมีจำนวนลดลง และเส้นขนมจีนมีจำนวนสารระเหยน้อยที่สุด

4.1.2.4.1 แอลกอฮอล์

จากการทดลองพบว่าชุดควบคุมมีชนิดของสารแอลกอฮอล์ที่มากกว่าชุดการหมักที่เติมด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีน โดยมีจำนวนมากที่สุดในขั้นตอนข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นมีจำนวนลดลงและต่ำสุดในเส้นขนมจีน โดยในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักเกิดแอลกอฮอล์ที่มีคุณลักษณะในการให้กลิ่นที่สำคัญ คือ 1-hexanol ซึ่งเป็นสารที่ให้คุณลักษณะหอมหวาน มีกลิ่นหอมดอกไม้ โดยจะเกิดในขั้นตอนของข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และสารแอลกอฮอล์ที่น่าจะมีความสำคัญในการเกิดกลิ่นอีกหนึ่งชนิด คือ 3-methyl-1-butanol ซึ่งพบในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงในชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

4.1.2.4.2 กรดอินทรีย์

จากการทดลองพบว่ากรดอินทรีย์มีจำนวนสูงสุดในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นมีจำนวนลดลงและต่ำสุดในเส้นขนมจีน โดยในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะเกิด acetic acid ในชุดควบคุมตั้งแต่ข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งสิ้นสุดขั้นตอนแป้งทับน้ำ และเกิด acetic acid ในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง และข้าวหมักเวลา 48 ชั่วโมงในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ส่วนกรดอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น butanoic acid, valeric acid, heptanoic acid และ hexanoic acid จะมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงต่างออกไป และพบสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะในการให้กลิ่นในขั้นตอนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก ได้แก่ 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ซึ่งพบ 2-methylpropanoic acid ในข้าวหมักเวลา 24 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 ขั้นตอนแป้งนอนน้ำที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 และในขั้นตอนแป้งทับน้ำที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ส่วน 3-methylbutanoic acid จะพบตั้งแต่ข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 ข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403และชุดควบคุม และขั้นตอนแป้งนอนน้ำซึ่งพบเฉพาะในชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403

4.1.2.4.3 คีโตน

จากการทดลองพบว่าคีโตนมีจำนวนสูงสุดในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง และตรวจไม่พบในขั้นตอนแป้งนอนน้ำ และเพิ่มจำนวนขึ้นในขั้นตอนแป้งทับน้ำ โดยในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะเกิดสารคีโตนที่น่าจะมีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่น คือ acetoin โดยสามารถ

ตรวจพบได้ในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม ซึ่งจะตรวจไม่พบในขั้นตอนแป้งนอนน้ำ และตรวจพบในขั้นตอนแป้งทับน้ำในชุดควบคุม

4.1.2.4.4 เอสเทอร์

จากการทดลองพบว่าในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะเกิดสารเอสเทอร์ 3 ชนิด คือ ethyl acetate ซึ่งพบเฉพาะในแป้งทับน้ำของชุดควบคุมเท่านั้น methyl palmitate โดยพบในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม และสาร 14-methylpentadecanoate ซึ่งพบในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911

4.1.2.4.5 อัลดีไฮด์

จากการทดลองพบว่าในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะเกิดอัลดีไฮด์ 3 ชนิด คือ hexanol โดยพบในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 acetaldehyde พบในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ benzaldehyde ซึ่งพบในขั้นตอนแป้งนอนน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911

ตารางที่ 3.12 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่พบกระบวนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																			
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง					ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง					แป้งนอนน้ำ					แป้งทับน้ำ					เส้นขนมจีน				
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	
แอลกอฮอล์																				
benzene ethanol	116.3	-	-	-	24.6	502.7	33.0	200.7	7.0	872.1	41.90	118.4	22.2	94.47	32.4	208.1	2.1	3.2	2.5	119.2
1-butanol	-	-	-	-	20.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-hexanol	-	-	-	-	-	14.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-heptanol	-	-	-	-	-	3.6	-	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-octanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13.9	6.9	5.8	2.1	-	4.4	7.6	-	-	20.1	-
4-ethylphenol	-	-	-	-	5.1	-	-	6.1	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-methoxy-4-vinylphenol	117.0	-	-	3.92	45.6	-	4.8	-	9.7	-	-	-	22.2	-	-	-	-	-	-	-
3-methyl-1-butanol	390.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-ethyl-2-methoxyphenol	-	-	14.1	-	143.5	24.3	-	45.7	47.8	-	-	-	16.8	-	-	-	1.3	-	-	-

ตารางที่ 3.12 (ต่อ)

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																			
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง					ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง					แป้งนอนน้ำ					แป้งทับน้ำ					เส้นขนมจีน				
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	
แอลกอฮอล์ (ต่อ)																				
2,4-ditertbutylphenol	37.7	4.1	6.4	2.7	4.1	17.4	1.4	3.9	4.3	12.6	3.5	3.2	4.2	4.4	7.0	9.3	3.5	2.6	8.6	5.0
2,3-dimethyl-2,3-butanediol	89.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-methyl-2,6-ditertbutylphenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22.9	-	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-
กรดอินทรีย์																				
acetic acid	39.9	-	6.7	4.9	138.2	-	34.2	-	56.8	4.7	-	-	22.7	-	-	-	-	-	-	-
butanoic acid	-	-	-	-	317.8	-	-	-	110.8	-	-	-	41.9	-	-	-	-	-	-	-
valeric acid	-	-	-	-	-	-	5.5	-	-	-	21.9	32.6	-	5.1	5.4	49.3	-	-	3.5	-
heptanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	13.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hexanoic acid	-	-	-	-	-	9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.12 (ต่อ)

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																					
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง						ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง						แป้งนอนน้ำ						แป้งทับน้ำ						เส้นขนมจีน					
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
กรดอินทรีย์ (ต่อ)																						
phenylacetic acid	-	-	-	-	-	14.94	-	7.8	-	-	-	-	-	-	-	6.0	-	-	-	-		
hexadecanoic acid	-	-	5.5	3.0	-	-	0.8	2.8	-	-	8.0	11.2	-	-	5.4	10.4	-	-	-	-		
2-methylpropanoic acid	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	40.8	10.1	9.4	-	34.9	-	4.4	-	-	-	-		
3-methylbutanoic acid	-	-	15.6	-	13.1	15.8	-	-	-	160.3	-	-	-	-	-	-	-	-		3.2		
3-methylthiopropionic acid	-	-	-	-	5.4	-	-	-	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2-methyl-5-oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid	117.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
คีโตน																						
acetone	-	-	-	-	127.1	-	-	276.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2-nonanone	96.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

ตารางที่ 3.12 (ต่อ)

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																					
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง						ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง						แป้งนอนน้ำ						แป้งทับน้ำ						เส้นขนมจีน					
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	
กรดอินทรีย์ (ต่อ)																														
3-hexadecanone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,6-decanedione	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3	1.6	5.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
คีโตน																														
acetoin	-	10.3	-	-	266.9	-	129.5	183.6	-	-	-	-	17.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
butyroin	-	-	-	-	-	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,2-methyl-1-propenyl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เอสเทอร์																														
ethyl acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	165.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
methyl palmitate	-		1.9	-	3.0	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-methylpentadecanoate	-	2.1	-	-	-	-	1.1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
อัลดีไฮด์																														
acetaldehyde	-	-	-	-	-	-	248.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.12 (ต่อ)

สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																			
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง					ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง					แป้งนอนน้ำ					แป้งทับน้ำ					เส้นขนมจีน				
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
อัลดีไฮด์ (ต่อ)																				
hexanal	-	-	-	-	-	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benzaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.5	-	-	-	-	-	-	-	-
กลุ่มอื่นๆ (ต่อ)																				
ethenylbenzene	-	-	45.8	33.3	-	25.5	16.4	55.1	-	-	-	-	-	-	-	40.2	-	-	-	-
pentadecane	283.3	17.4	23.5	7.8	20.2	-	2.0	18.6	3.4	-	-	2.8	-	-	7.1	7.2	-	1.1	-	-
heptadecane	125.7	12.7	-	-	17.6	-	6.2		5.8	5.1	5.1	2.7	-	6.7	8.2	-	-			
hexadecane	-	18.0	20.7	7.5	22.6	19.3	10.0	18.0	5.1	-	-	3.1	-	4.5	8.7	-	6.4	-	-	-
tetradecane	-	-	6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-chloro-2-methylbenzene	508.0	139.8	34.5	78.9	114.4	47.2	72.5	36.7	57.0	-	43.6	37.2	21.8	34.2	77.8	57.6	-	4.1	25.8	7.5
1-chloro-4-methylbenzene	310.8	50.9	-	23.6	92.1	-	69.3	30.5	8.1	-	25.9	22.5	13.6	23.1	50.3	38.6	-	-	-	-
2,5-dimethylpyrazine	385.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3.12 (ต่อ)

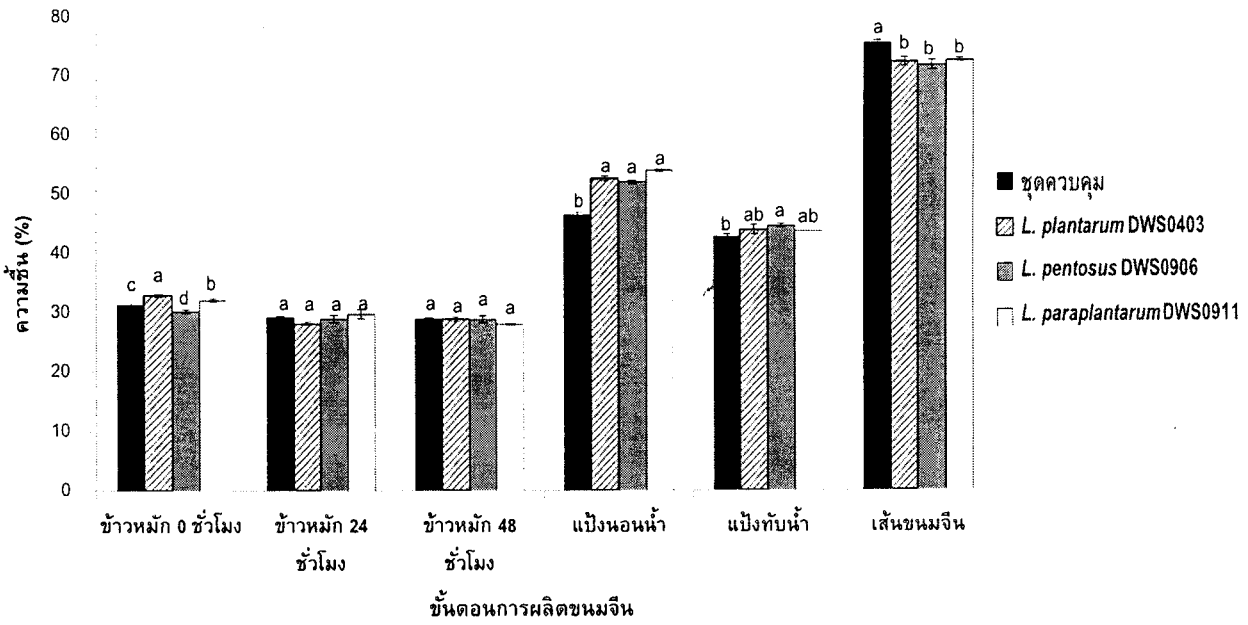
สารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)																							
	ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง						ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง						แป้งนอนน้ำ						แป้งทับน้ำ						เส้นขนมจีน					
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911			ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911		
กลุ่มอื่นๆ (ต่อ)																														
2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane	134.2	9.0	10.9	-	-	-	4.1	9.4	-	-	-	-	-	4.4	-	-	-	-	-	-										
2,5-dioxo-3-methylpiperazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5	-	-	-										
1-hydroxy-4-methyl-2,6-ditert-butylbenzene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	-										

หมายเหตุ - : ตรวจไม่พบ

4.1.3 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

4.1.3.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น แสดงดังรูปที่ 3.5 พบว่าความชื้นของข้าวหมักเริ่มต้นอยู่ในช่วง 30.2-32.9 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความชื้นจะลดลงต่ำสุดที่ระยะเวลาการหมักข้าว 48 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม โดยอยู่ในช่วง 27.9-28.9 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นในขั้นตอนแป้งนอนน้ำ พบว่าชุดที่เติมกล้าเชื้อกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตมีความชื้นอยู่ในช่วง 51.9-53.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และปริมาณความชื้นลดลงในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ส่วนเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตมีความชื้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อยู่ในช่วง 71.7-72.5 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุม ซึ่งมีความชื้นเท่ากับ 75.5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

4.1.3.2 การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน

ผลการตรวจวัดค่าความแข็ง (Hardness) ของเส้นขนมจีน แสดงดังตารางที่ 3.13 พบว่าเส้นขนมจีนชุดควบคุมมีความแข็งมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 25.92 นิวตัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีค่าความแข็งเท่ากับ 23.27 และ 23.58 นิวตัน ตามลำดับ และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 มีความแข็งน้อยที่สุด เท่ากับ 19.89 นิวตัน

ตารางที่ 3.13 การเปลี่ยนแปลงความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเส้นขนมจีน	ความแข็ง (N)
ชุดควบคุม	25.92 ± 0.10^{a}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403	23.27 ± 0.12^{b}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906	19.89 ± 0.03^{c}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911	23.58 ± 0.12^{b}

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-c ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-c ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) หน่วยการวัด : นิวตัน (N)

4.1.3.3 การตรวจสอบค่าสีของเส้นขนมจีน

ผลการตรวจวัดค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมัก แสดงดังตารางที่ 3.14 พบว่าค่า L* a* b*โดย ค่า L* หมายถึง ค่าที่บอกถึงความสว่าง โดย L* =100 หมายถึง มีความสว่างมากที่สุด ค่า a* ที่ติดลบ หมายถึง มีสีค่อนไปทางสีเขียวอ่อนจนถึงเข้ม และค่า b* ที่เป็นบวก หมายถึง มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเข้ม โดยพบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีที่สว่างสูงสุด โดยมีค่า L* เท่ากับ 86.68 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ซึ่งมีค่า L* เท่ากับ 83.81 และ 83.32 ตามลำดับ และยังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุม โดยมีค่า L* เท่ากับ 79.72 และเส้นขนมจีนชุดควบคุมมีค่า a* สูงสุด เท่ากับ 0.10 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้า

เชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0911 และ *L. paraplantarum* DWS0906 ซึ่งมีค่า a* เท่ากับ -1.23, -1.28 และ -1.31 ตามลำดับ และค่า b* ของเส้นขนมจีนชุดควบคุมมีค่าสูงสุด ซึ่งได้เส้นขนมจีนที่มีสีเหลืองที่สุด โดยมีค่า b* เท่ากับ 9.42 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และ *L. plantarum* DWS0403 ซึ่งมีค่า b* เท่ากับ 6.08, 5.18 และ 4.32 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.14 การเปลี่ยนแปลงค่าสีของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. plantarum* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเส้นขนมจีน	ค่าสี		
	L*	a*	b*
ชุดควบคุม	79.72±0.99^{c}	0.10±0.03^{a}	9.42±0.03^{a}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403	86.68±0.10^{a}	-1.23±0.01^{b}	4.32±0.01^{d}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906	83.81±0.12^{b}	-1.31±0.02^{d}	6.08±0.01^{b}
เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911	83.32±0.10^{b}	-1.28±0.010^{c}	5.18±0.01^{c}

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-d ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-d ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

L* หมายถึง ค่าที่บอกถึงความสว่าง โดย L* =100 หมายถึง มีความสว่างมากที่สุด

a* ที่ติดลบ หมายถึง มีสีค่อนไปทางสีเขียวอ่อนจนถึงเข้ม

b* ที่เป็นบวก หมายถึง มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเข้ม

4.1.4 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนแป้งหมัก แสดงดังตารางที่ 3.15 แบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งนำไปทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One Way Anova post-hoc comparision of means (Duncan's multiple rang test) ซึ่งใช้ระดับความชอบในการประเมิน 5 ระดับ (5-point hedonic scale) โดยการทดสอบคุณลักษณะต่างๆ ของเส้นขนมจีน ได้แก่

คุณลักษณะด้านสี พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum*DWS0403 มากที่สุดในระดับที่ชอบมากเท่ากับ 4.1 ส่วนเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 ผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลาง โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุม ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านกลิ่น พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.5 โดยมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เท่ากับ 3.0 และ 3.3 และเมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนชุดควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านรสชาติ พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.8 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เท่ากับ 3.6 และ 3.7 และมีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนชุดควบคุม ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.9 โดยไม่มีความแตก ต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เท่ากับ 3.7 และ 3.9 และมีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนชุดควบคุม ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านการยอมรับโดยรวม พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มากที่สุดในระดับที่ชอบมากเท่ากับ 4.0 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เท่ากับ 3.7 และ 3.8 และมีความแตกต่างอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนชุดควบคุม ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

ตารางที่ 3.15 การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลก ติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเส้นขนมจีน	ลักษณะผลิตภัณฑ์				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
ชุดควบคุม	2.41±1.09^{c}	2.80±1.12^{b}	2.86±1.17^{b}	2.92±0.98^{b}	2.70±1.01^{b}
DWS0403	4.05±0.77^{a}	3.47±0.92^{a}	3.82±0.88^{a}	3.92±0.64^{a}	4.03±0.88^{a}
DWS0906	4.08±0.71^{a}	3.02±0.97^{ab}	3.60±0.74^{a}	3.74±0.86^{a}	3.71±0.81^{a}
DWS0911	3.38±0.94^{b}	3.29±1.02^{ab}	3.65±0.79^{a}	3.85±0.83^{a}	3.80±0.64^{a}

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-c ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-c ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ระดับคะแนน 1 ไม่ชอบ
ระดับคะแนน 2 พอใช้
ระดับคะแนน 3 ชอบปานกลาง
ระดับคะแนน 4 ชอบมาก
ระดับคะแนน 5 ชอบมากที่สุด

จากการศึกษาผลการใช้แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยการเติมกล้าเชื้อในขั้นตอนของการหมักข้าว พบว่า แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 มีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ดีในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตขนมจีน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่า *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดี และมีสมบัติในการย่อยแป้งได้ดีเกิดอะไมโลสในปริมาณสูง ได้เส้นขนมจีนที่มีความแข็งน้อยกว่าการเติมกล้าเชื้ออื่น และชุดควบคุม เส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีขาวสว่างและมีสีเหลืองที่น้อยกว่า

เส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้ออื่น และชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ และยังสามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นรสที่ดีในกระบวนการผลิตขนมจีนด้วย และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบมากที่สุด ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยทำการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักเปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมักต่อไป

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการหมักข้าวและการหมักน้ำแป้ง

4.2.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

4.2.1.1 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก แสดงดังรูปที่ 3.6 พบว่าข้าวหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นอยู่ที่ 6.0-6.1 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับปริมาณแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นในชุดควบคุม และปริมาณแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในทุกชุดของการหมัก เวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมงมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมัก และเมื่อเวลาการหมักเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง พบว่าชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดเท่ากับ 8.94 logCFU/g และมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงที่สุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำในชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักเท่ากับ 9.3 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 8.9 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมทั้งสองชุดมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากันคือ 8.5 logCFU/g ส่วนเส้นขนมจีน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการทดลอง

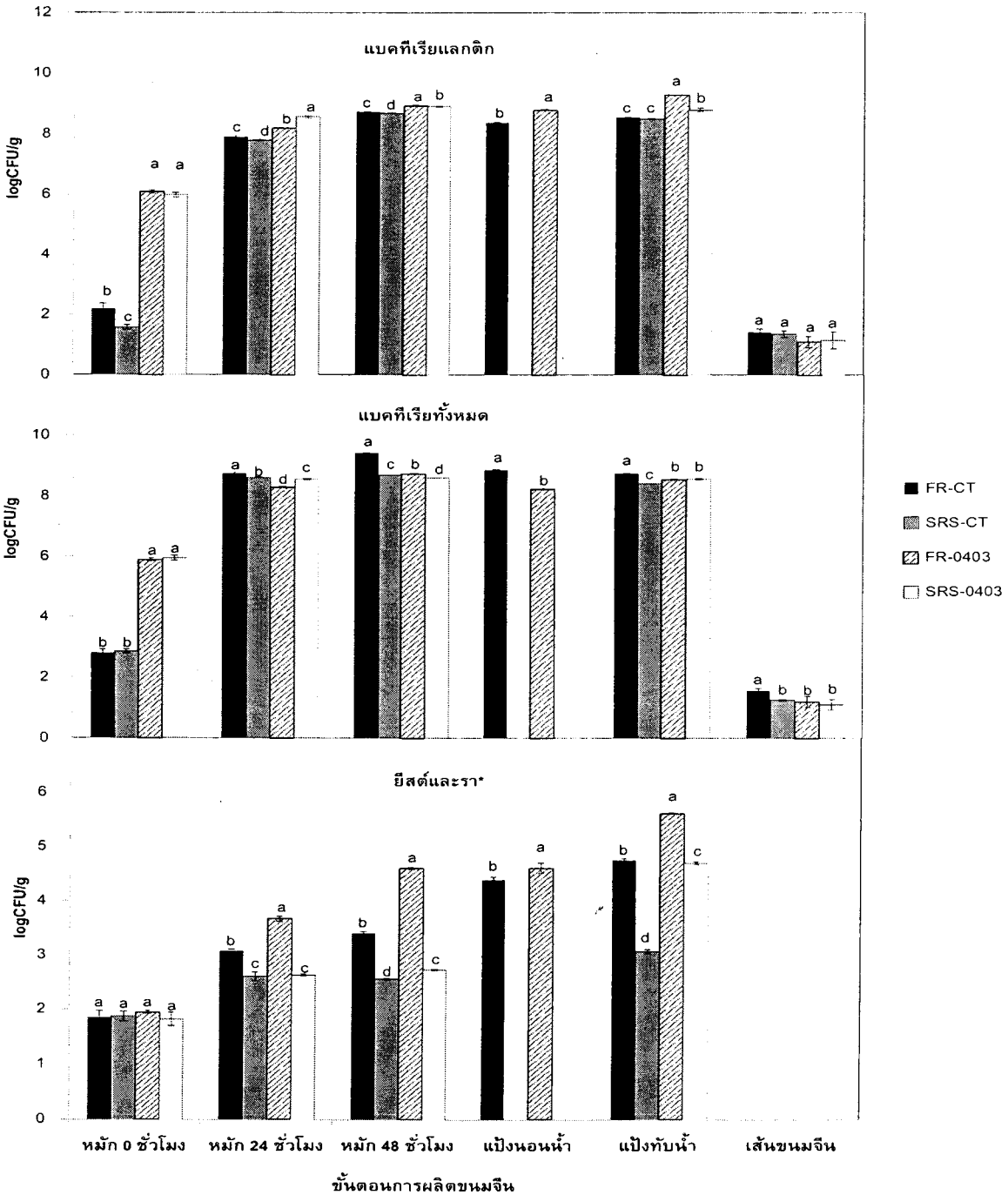
4.2.1.2 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แสดงดังรูปที่ 3.6 พบว่าข้าวหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ที่ 5.9-6.0 logCFU/g ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 2.8-2.9 logCFU/g เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

พบว่าชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมงเท่ากับ 9.4 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 8.7 และ 8.6 logCFU/g แป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากัน คือ 8.6 logCFU/g มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับแป้งทับน้ำชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 8.7 logCFU/g ส่วนของเส้นขนมจีน พบว่า ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดเท่ากับ 1.6 logCFU/g มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้งมีปริมาณ แบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 1.3, 1.2 และ 1.1 logCFU/g ตามลำดับ

4.2.1.3 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา

ผลการตรวจนับปริมาณยีสต์และรา แสดงดังรูปที่ 3.6 พบว่าในทุกขั้นตอนจะตรวจไม่พบรา เมื่อเริ่มต้นการหมักข้าวที่ 0 ชั่วโมงตรวจพบยีสต์เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 logCFU/g เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณยีสต์สูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ พบว่าตัวอย่างแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 ในข้าว มีปริมาณยีสต์สูงสุดเท่ากับ 5.6 logCFU/g รองลงมา คือ ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณยีสต์เท่ากับ 4.8 logCFU/g และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมัก มีปริมาณยีสต์ เท่ากับ 4.7 logCFU/g และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักมีปริมาณยีสต์น้อยที่สุดในทุกขั้นตอนของการผลิต ส่วนในตัวอย่างเส้นขนมจีนตรวจไม่พบยีสต์ในทุกชุดการหมัก



รูปที่ 3.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียทั้งหมด และยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) * หมายถึง ตรวจพบยีสต์แต่ไม่พบรา

4.2.1.4 การตรวจนับปริมาณ *Bacillus cereus*

ผลการตรวจนับปริมาณ *B. cereus* ในตัวอย่างวัตถุดิบ พบว่า ไม่มีการตรวจพบ *B.cereus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก ชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้ง

4.2.1.5 การตรวจนับปริมาณ *Staphylococcus aureus*

ผลการตรวจนับปริมาณ *S. aureus* ในตัวอย่างวัตถุดิบ พบว่า ไม่มีการตรวจพบ *S.aureus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก ชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้ง

4.2.1.6 การตรวจนับปริมาณ Coliforms และ *E. coli*

ผลการตรวจนับปริมาณ Coliforms แสดงดังตารางที่ 3.16 พบว่าปริมาณ Coliforms เริ่มต้นในชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณน้อยกว่า 3 MPN/g ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณ Coliforms น้อยกว่า 3 MPN/g ในทุกขั้นตอนของการผลิตตั้งแต่เริ่มหมักข้าวจนถึงเส้นขนมจีน ส่วนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณ Coliforms สูงสุดมากกว่า 1100 MPN/g ที่ระยะเวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง และหลังจากการนอนน้ำแป้งในชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณ Coliforms ลดลงน้อยกว่า 3 MPN/g และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักมีปริมาณ Coliforms เท่ากับ 3.6 MPN/g ในขั้นตอนแป้งทับน้ำใน เมื่อทำการตรวจนับปริมาณ *E. coli* พบว่ามีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ในทุกขั้นตอนการผลิตทั้งชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก แสดงดังตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ Coliforms ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	Coliforms (MPN/g)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
หมัก 24 ชั่วโมง	>1100	>1100	<3	<3
หมัก 48 ชั่วโมง	>1100	>1100	<3	<3
แป้งนอนน้ำ	<3	-	<3	-
แป้งทับน้ำ	<3	3.6	<3	<3
เส้นขนมจีน	<3	<3	<3	<3

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 3.17 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ *E. coli* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	*E.coli* (MPN/g)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
หมัก 24 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
หมัก 48 ชั่วโมง	<3	<3	<3	<3
แป้งนอนน้ำ	<3	-	<3	-
แป้งทับน้ำ	<3	<3	<3	<3
เส้นขนมจีน	<3	<3	<3	<3

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

4.2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

4.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (%Titratable acidity (%TA) ของกรดแลกติก)

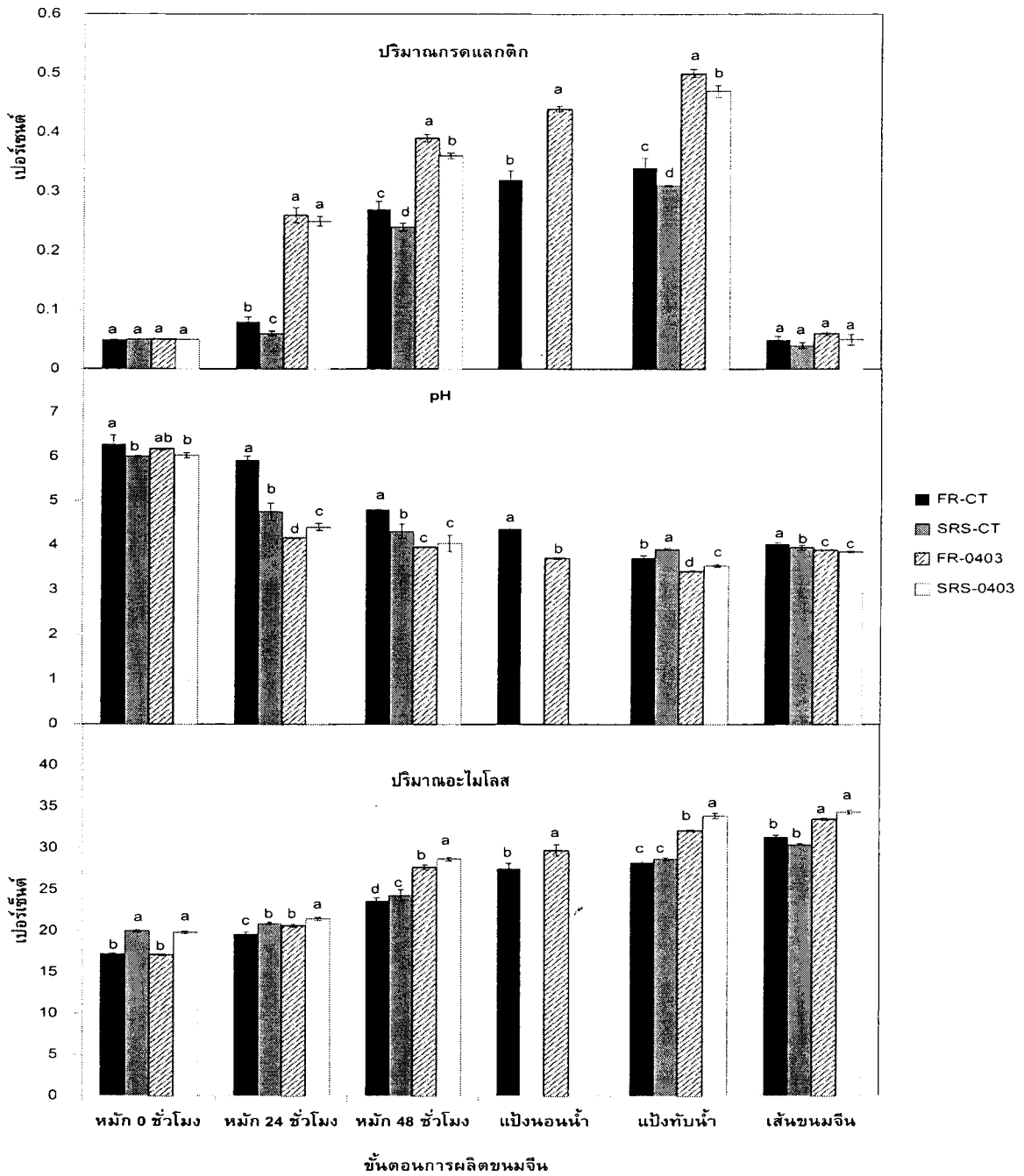
ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก แสดงดังรูปที่ 3.7 พบว่าปริมาณกรดแลกติกเริ่มต้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกชุดการหมัก และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น โดยชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในทุกขั้นตอนของการผลิตและสูงที่สุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 0.47 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกเท่ากัน คือ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเส้นขนมจีนมีปริมาณกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 0.04-0.06 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ของเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้ง และชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก

4.2.2.2 วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH)

ผลการตรวจวัดค่าพีเอช แสดงดังรูปที่ 3.7 พบว่าชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีค่าพีเอชสูงสุดเท่ากับ 6.3 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับข้าวหมักเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2 และมีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากัน คือ 6.0 แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ*L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในทุกขั้นตอนการผลิต และมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำเท่ากับ 3.4 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมัก ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6, 3.7 และ 3.9 ตามลำดับ ส่วนเส้นขนมจีนมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.9 ในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักซึ่งมีค่าพีเอชประมาณ 4.1

4.2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส แสดงดังรูปที่ 3.7 พบว่าชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณอะไมโลสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 และ 19.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณอะไมโลสเริ่มต้นเท่ากัน คือ 17.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีปริมาณอะไมโลสสูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมงมีปริมาณ อะไมโลสสูงสุดเท่ากับ 28.7 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 27.7 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและข้าวหมัก เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนแป้งทับน้ำพบว่า แป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีปริมาณอะไมโลส สูงสุดเท่ากับ 33.9 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำ ที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 ในข้าวหมักมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 32.2 เปอร์เซ็นต์ และเส้นขนมจีนมีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นสูงสุด โดยเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีปริมาณอะไมโลสสูงสุดกว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก โดยมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 34.6 และ 33.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เป็นชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 31.4 และ 30.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 3.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติก ค่าพีเอช และปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

4.2.2.5 วิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นรส

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงชนิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในเส้นขนมจีนแป้งหมักแบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก และชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค HS-SPME GC-MS พบว่ามีสารระเหยทั้งหมด 12 ชนิด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มหลัก คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน เอสเทอร์ อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารระเหย 1, 1, 3, 1 และ 5 ชนิด ตามลำดับ โดยแสดงความเข้มข้นของสารระเหยแต่ละขั้นตอนการผลิตขนมจีนดังตารางที่ 3.18 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน มีผลทำให้เส้นขนมจีนที่ได้มีลักษณะกลิ่นที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 3.18 ความเข้มข้นของสารระเหยในเส้นขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ชนิดสารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	FR-CT	FR-0403	SRS-CT	SRS-0403
แอลกอฮอล์				
benzene ethanol	-	2.44	6.97	-
กรดอินทรีย์				
valeric acid	-	1.90	1.29	1.14
คีโตน				
2-octen-4-one	-	-	14.89	8.82
5,6-decanedione	-	1.96	1.91	-
2,2-dimethyl-3-heptanone	3.49	5.32	-	-
เอสเทอร์				
isopropyl pentanoate	-	15.87	-	-
อัลดีไฮด์				
3,3-dimethylhexanal	34.89	45.72	-	-
กลุ่มอื่นๆ				
tridecane	-	-	2.16	-
2,3,3,4-Tetramethylpentane	-	-	-	1.69
1-chloro-2-methylbenzene	52.49	115.36	126.41	70.22

ตารางที่ 3.18 (ต่อ)

ชนิดสารระเหย	ความเข้มข้นสารระเหย (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	FR-CT	FR-0403	SRS-CT	SRS-0403
กลุ่มอื่นๆ (ต่อ)				
1-chloro-3-methylbenzene	12.41	34.88	46.69	23.14
2,5-dioxo-3-methylpiperazine	2.88	2.31	2.11	1.69

หมายเหตุ - : ตรวจไม่พบ

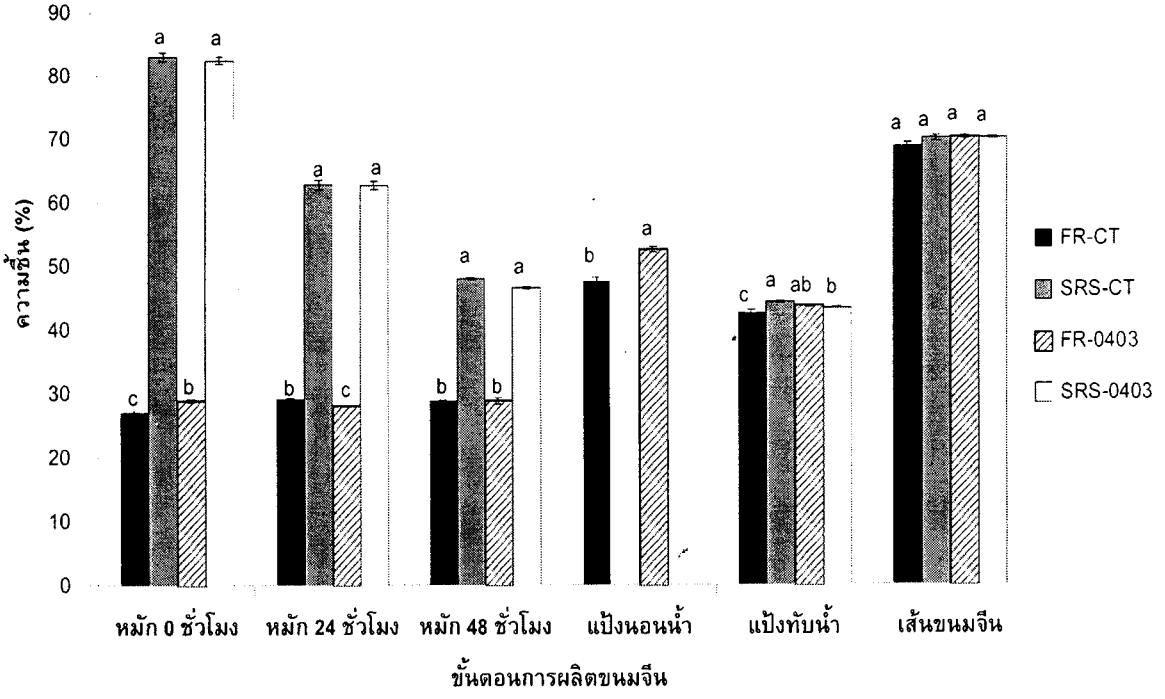
จากการทดลองวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในเส้นขนมจีน โดยพบสารกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดเดียว คือ benzene ethanol ซึ่งพบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก สารกลุ่มอินทรีย์ชนิดเดียว คือ valeric acid ในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก สารกลุ่มคีโตน 3 ชนิด คือ 2-octen-4-one พบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักและชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก 5,6-decanedione พบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก 2,2-dimethyl-3-heptanone พบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก และชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก สารกลุ่มเอสเทอร์เพียงชนิดเดียว คือ isopropyl pentanoate พบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก และสารกลุ่มอัลดีไฮด์เพียงชนิดเดียว คือ 3,3-dimethylhexanal พบในเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก และชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก

4.2.3 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

4.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น แสดงดังรูปที่ 3.8 พบว่า ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 83.1 และ 82.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก และข้าวที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 29.3 และ 28.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณความชื้นในชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและข้าวที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ปริมาณความชื้นไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงใน

ขั้นตอนของการหมักข้าว แต่ปริมาณความชื้นมีค่าเพิ่มขึ้นในขั้นตอนของแป้งนอน และลดลงในขั้นตอนแป้งทับน้ำ และจะลดลงในขั้นตอนแป้งทับน้ำ โดยชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักมีความชื้นสูงสุดเท่ากับ 44.4 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีความชื้นเท่ากับ 43.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งและชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีความชื้นเท่ากับ 43.5 และ 42.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเส้นขนมจีนปริมาณความชื้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) มีความชื้นระหว่าง 68.9-70.2 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

4.2.3.2 การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน

ผลการตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน แสดงดังตารางที่ 3.19 พบว่าเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีความแข็ง (Hardness) มากที่สุดเท่ากับ 24.68 นิวตัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก โดยมีค่าความแข็งเท่ากับ 21.78 และ 20.91 นิวตัน ตามลำดับ และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีความแข็งน้อยที่สุดเท่ากับ 18.76 นิวตัน ส่วนความเหนียว (Stickiness) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีความเหนียวมากที่สุดเท่ากับ 0.53 นิวตัน ตามด้วยเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก เส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและข้าวหมักมีค่าเท่ากับ 0.48, 0.37 และ 0.36 นิวตัน ตามลำดับ และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีความเกาะติด (Adhesiveness) สูงสุดเท่ากับ 0.16 นิวตัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก โดยมีค่าความเกาะติดที่เท่ากัน คือ 0.12 นิวตัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีค่าความเกาะติดเท่ากับ 0.11 นิวตัน

ตารางที่ 3.19 การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) น้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ลักษณะเนื้อสัมผัส		
	ความแข็ง (N)	ความเหนียว (N)	ความเกาะติด (Ns)
FR-CT	24.68±0.12 [a]	0.36±0.56 [c]	0.11±0.08 [c]
SRS-CT	20.91±0.90 [b]	0.37±1.94 [c]	0.12±0.43 [b]
FR-0403	21.78±0.12 [b]	0.48±1.01 [b]	0.12±0.67 [b]
SRS-0403	18.76.±0.36 [c]	0.53±0.80 [a]	0.16±0.19 [a]

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-c ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-c ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) หน่วยการวัด : นิวตัน (N)

4.2.3.3 การตรวจสอบค่าสีของเส้นขนมจีน

ผลการตรวจวัดค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมัก แสดงดังตารางที่ 3.20 พบว่า ค่า L* a* b* โดย ค่า L* หมายถึง ค่าที่บอกถึงความสว่าง โดย L* = 100 หมายถึง มีความสว่างมากที่สุด ค่า a* ที่ติดลบ หมายถึง มีสีค่อนไปทางสีเขียวอ่อนจนถึงเข้ม และค่า b* ที่เป็นบวก หมายถึง มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเข้ม โดยพบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีสีสว่างสูงสุด มีค่า L* เท่ากับ 85.99 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและข้าวหมักซึ่งมีค่า L* เท่ากับ 84.76, 84.71 และ 80.18 ตามลำดับ เส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีค่า a* สูงสุดเท่ากับ -1.05 ตามด้วยเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักและข้าวหมัก และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักมีค่า a* เท่ากับ -1.13, -1.23 และ -1.24 ตามลำดับ ส่วนค่า b* ของเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.88 ซึ่งได้เส้นขนมจีนที่มีสีเหลืองที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีค่า b* เท่ากับ 6.06, 5.88 และ 5.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.20 การตรวจสอบค่าสีของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) น้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเส้นขนมจีน	ค่าสี		
	L*	a*	b*
FR-CT	80.18±0.39^{c}	-1.05±0.04^{a}	7.88±0.13^{a}
SRS-CT	84.71±0.07^{b}	-1.24±0.02^{c}	6.06±0.03^{b}
FR-0403	84.76±0.17^{b}	-1.23±0.03^{c}	5.85±0.09^{c}
SRS-0403	85.99±0.07^{a}	-1.13±0.02^{b}	5.36±0.13^{d}

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-d ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-d ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

4.2.4 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนแป้งหมัก แสดงดังตารางที่ 3.21 แบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก และน้ำแป้งหมักซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งนำไปทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบจำนวน 40 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One Way Anova post-hoc comparision of means (Duncan's multiple rang test) ซึ่งใช้ระดับความชอบในการประเมิน 5 ระดับ (5-point hedonic scale) โดยการทดสอบคุณลักษณะต่างๆ ของเส้นขนมจีน ได้แก่

คุณลักษณะด้านสี พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมากที่สุดในระดับที่ชอบมากเท่ากับ 4.05 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักเท่ากับ 4.03 ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบมากเช่นกัน ส่วนเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก ผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลางมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านกลิ่น พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักและข้าวหมักมากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.68 และ 3.65 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและข้าวหมัก โดยผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลางและระดับพอใช้

คุณลักษณะด้านรสชาติ พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางและให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS00403 ในน้ำแป้งหมักในระดับชอบปานกลางเช่นกัน เท่ากับ 3.68 และ 3.63 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและข้าวหมัก ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลางและระดับพอใช้

คุณลักษณะด้านเนื้อสัมผัส พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมากที่สุดในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.68 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS00403 ในข้าวหมักผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับชอบปานกลางเท่ากับ 3.63 และชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากันคือ 3.35 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

คุณลักษณะด้านความชอบโดยรวม พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมากที่สุดเท่ากับ 3.94 ผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับชอบปาน และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักในระดับที่ชอบปานกลางเท่ากับ 3.9 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่ชอบปานกลาง และเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับที่พอใช้

ตารางที่ 3.21 การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนแป้งหมักเมื่อเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำ (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่างเส้นขนมจีน	ลักษณะผลิตภัณฑ์				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
FR-CT	2.40±1.08^{b}	1.90±1.01^{c}	2.75±0.74^{c}	2.98±1.03^{b}	2.85±0.89^{c}
SRS-CT	3.88±0.56^{a}	3.15±0.86^{b}	3.30±0.56^{b}	3.35±0.77^{a}	3.54±0.67^{b}
FR-0403	4.03±0.58^{a}	3.65±0.77^{a}	3.68±0.57^{a}	3.63±0.77^{a}	3.90±0.67^{a}
SRS-0403	4.05±0.50^{a}	3.68±0.86^{a}	3.63±0.63^{a}	3.68±0.62^{a}	3.94±0.64^{a}

หมายเหตุ 1) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ 2) ตัวอักษร a-c ที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$) 3) ตัวอักษร a-c ที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ระดับคะแนน 1 ไม่ชอบ

ระดับคะแนน 2 พอใช้

ระดับคะแนน 3 ชอบปานกลาง

ระดับคะแนน 4 ชอบมาก

ระดับคะแนน 5 ชอบมากที่สุด

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การศึกษาปริมาณและคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีน

การสำรวจกระบวนการผลิตขนมจีนของโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช พัทลุง และพระนครศรีอยุธยา พบว่ามีกระบวนการผลิตที่คล้ายคลึงกันแต่โรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาจะมีขั้นตอนของการหมักข้าวที่นานกว่า และมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักแต่ละแหล่งผลิตจะมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลกติกที่คล้ายคลึงกัน คือ มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ รองลงมา คือ แป้งนอนน้ำ กากแป้งนอนน้ำ และข้าวหมัก แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่พบในปริมาณสูงสุดในทุกขั้นตอนของกระบวนการหมักในการผลิตขนมจีน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของนิตยา (2532) และสุพรรณิการ์ (2548) โดยพบว่าแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณสูงสุดในทุกขั้นตอนของกระบวนการหมัก จึงอาจกล่าวได้ว่า แม้ว่าจะมีกระบวนการผลิตหรือแหล่งผลิตที่แตกต่างกัน วัตถุดิบที่ใช้แตกต่างกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่คล้ายคลึงกัน

โดยในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำและปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นสูงสุด ในขณะที่พีเอชลดลงต่ำสุด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดแลกติกในระหว่างกระบวนการผลิตมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียแลกติก คือ ปริมาณกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่พีเอชจะลดลง เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตกรดแลกติก (Salminen and Wright, 1998) และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชและปริมาณกรดแลกติกในระหว่างกระบวนการผลิตของณรงค์ (2538) และนิตยา (2532) พบว่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ Kraidej *et al.*, (2003) พบว่าแบคทีเรียแลกติกเป็นตัวการทำให้พีเอชของขนมจีนลดลงและมีปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้น ซึ่งมีผลช่วยยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีนให้นานขึ้น จึงทำให้แบคทีเรียแลกติกน่าจะมีความสำคัญในกระบวนการหมัก ดังนั้น แบคทีเรียแลกติกจึงอาจเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทางกายภาพ และการเกิดกลิ่นรสหมักในขนมจีนแป้งหมัก

2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีน

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีน

แบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด โดยเฉพาะบทบาทในการถนอมอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีสมบัติในการสร้างสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กรดอินทรีย์ (เช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ในการทดลองนี้ได้นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขนมจีนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี agar spot assay พบว่าการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของแต่ละไอโซเลตแตกต่างกัน และความสามารถในการยับยั้งแตกต่างกันด้วย จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 55 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 029, *B. cereus* TISTR 687, *L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938 โดยผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกอาจเกิดจากสารแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นมา ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน (De Vuyst and Vandamme, 1994) และพบว่าการยับยั้ง *E. coli* ของ *L. plantarum* เป็นผลมาจากกรดอินทรีย์เป็นหลัก ซึ่งไม่มีผลมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน

อย่างไรก็ตาม การคัดแยกด้วยวิธี agar spot assay เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น จึงทำการยืนยันผลการยับยั้งอีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีมาก และทุกไอโซเลตจะไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบกลุ่มแบคทีเรียแลกติก คือ ไอโซเลต DWS0911 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 029 และ *B. cereus* TISTR 687 ได้ดีมาก และสามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 780 ได้ปานกลาง ไอโซเลต DWS0403 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 029 ได้ดีมาก สามารถยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 ได้ดี และสามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 780 ได้ปานกลาง และไอโซเลต DWS0906 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้ดีมาก สามารถยับยั้ง *S. aureus* TISTR 029 และ *E. coli* TISTR 780 ได้ดี

โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น อาจเป็นสารคล้ายแบคเทอริโอซิน เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกได้ แต่อาจจะมีผลที่เกิดจากการยับยั้งของกรดอินทรีย์ หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเพราะมีผลในการยับยั้ง *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบด้วย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเหลว MRS แบคทีเรียแลกติกมีการผลิตกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นหลัก และสารเมแทบอไลท์อื่นๆ เช่น ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ ผลิตในปริมาณน้อยหรือระเหยออกไป ซึ่งไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ (Salminen and Wright, 1998)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และการสร้างสารระเหยที่มีบทบาทต่อการผลิตขนมจีน โดยสามารถสร้างสารยับยั้งบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994) เช่น กรดอินทรีย์ แอมโมเนียม เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น โดยสุพรรณิการ์ (2548) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกต่อการลดปริมาณของ *S. aureus* และ *E. coli* ในข้าวหมัก พบว่าการเจริญของแบคทีเรียแลกติกอย่างรวดเร็วมีผลทำให้พีเอชลดลงและปริมาณกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วรวมทั้งผลโดยรวมของสารเมแทบอไลท์อื่นๆ มีผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบลดลงอย่างรวดเร็ว

การเติมแบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยแบคทีเรียแลกติกจะมีการเจริญแข่งขันควบคู่ไปกับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือมีการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ดังนั้น การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจะเป็นผลจากสารเมแทบอไลท์ต่างๆ ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นพร้อมๆกัน เช่น กรดอินทรีย์ สารคล้ายแบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ

ลักษณะสำคัญของขนมจีนแป้งหมัก คือ มีสีขาวนวลสม่ำเสมอ มีลักษณะเหนียวนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง ดังนั้นการศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง จึงเป็นสมบัติอย่างหนึ่งในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก จากการศึกษาของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากข้าวหมักมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ โดยการตรวจวัดบริเวณใสรอบโคโลนีบน starch agar มีวงใสประมาณ 8.0-10 มิลลิเมตร ซึ่งจีนัส *Lactobacillus* และ *Streptococcus* มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีที่สุด

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในการทดลองครั้งนี้ โดยการตรวจหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้าแทนน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยแป้งได้ดี 72 ไอโซเลต และย่อยแป้งได้ดีมาก 1 ไอโซเลต จากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 73 ไอโซเลตมาหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric total sugar method พบว่าแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบที่แตกต่างกัน โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เกิดจากการย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตค่อยๆเพิ่มขึ้นจนครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดีมาก และ 5 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดี โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 1,544-2,667 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และอะไมโลสในกระบวนการผลิตขนมจีนของภควัฒน์ (2547) พบว่าปริมาณโปรตีนในกระบวนการหมักลดลงเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณอะไมโลสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดการไฮโดรไลซ์อะไมโลเพกทินด้วยกรดหรือเอนไซม์ เกิดดีพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) กลายเป็นอะไมโลสส่งผลทำให้มีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น โดยการไฮโดรไลซ์แป้งส่วนหนึ่งเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถผลิตกรด และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสำหรับการย่อยแป้ง ซึ่งปริมาณอะไมโลสที่เพิ่มขึ้นช่วยให้ขนมจีนแป้งหมักมีความเหนียว และปริมาณโปรตีนที่ลดลงช่วยให้ขนมจีนแป้งหมักมีลักษณะนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง ซึ่งแบคทีเรียแลกติก สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้เป็นน้ำตาล ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น (นิตยา, 2532) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยแป้งได้จะช่วยให้แหล่งพลังงานกับแบคทีเรียแลกติกอื่นที่ไม่สามารถย่อยแป้งเองได้ ส่งผลให้เกิดสมบัติด้านกลิ่นและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ (Sanni *et al.*, 2002)

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรส โดยการศึกษาสารระเหยที่เกิดขึ้นในการผลิตขนมจีน

แบคทีเรียแลกติกเป็นตัวการในการผลิตสารระเหยและสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งกลิ่นรสที่เกิดขึ้นในอาหารหมักนี้เกิดจากกรดแลกติกที่ได้จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ในขณะที่กิจกรรมการย่อยโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบหอมระเหยจากเพปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมันอิสระ (Gobbetti, 1998) แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ผลิตกรดต่างๆ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเกิดกลิ่นรส และรสชาติที่สำคัญต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Salminen and Wright, 1998) และสามารถผลิตแอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอร์ เทอร์ฟีน และแลกโตน เป็นต้น ซึ่งเป็นสารระเหยให้กลิ่นรสของอาหารหมัก (Scharpf *et al.*, 1986) จีสุดาและคณะ (2547) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณสารระเหยต่าง ๆ ที่พบในขั้นตอนของการผลิตขนมจีนแป้งหมัก พบว่า มีสารระเหยมากกว่า 30 สาร โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ สารประกอบคาร์

บอนิล กรดโมเลกุลเล็ก และอื่นๆ โดยพบ แอลกอฮอล์ในสัดส่วนที่มากที่สุด และลักษณะกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ของขนมจีนแป้งหมักน่าจะเป็นผลจากการรวมกันของสารหลายชนิด เช่น ไดอะซีทิล กรดอะซีติก กรดบิวทิริก และกรดไอโซเพนทาอิก เป็นต้น เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่พบกระบวนการหมักของการผลิตขนมจีนมากที่สุด และยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งและการสร้างกรด ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกอาจเป็นกลุ่มหลักที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ และกลิ่นรสในขนมจีนแป้งหมัก

การนำแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน ซึ่งมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ดี ปานกลาง และดีมาก คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 ตามลำดับ มาทดลองตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรสโดยใช้เทคนิค HS-SPME GC-MS ในครั้งนี้ พบสารระเหยในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงทั้งหมด 37 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 5 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ โดยตัวอย่างการหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อที่แตกต่างกันจะพบองค์ประกอบของสารระเหยที่ต่างกัน โดยสารระเหยกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบ คือ 1-hexanol ซึ่งพบในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมหวาน กลิ่นหอมดอกไม้ และ 3-methyl-1-butanol พบในข้าวหมักชุดควบคุม ให้กลิ่นมอลท์ (จีสุดา, 2548)

สารระเหยกลุ่มกรดอินทรีย์ที่พบในทุกชุดการหมักข้าว คือ acetic acid ซึ่งพบทั้งในข้าวหมักชุดควบคุม ข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 งานวิจัยของจีสุดา (2548) พบ acetic acid มีปริมาณสูงในข้าวหมักวันแรก และกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่น คือ 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ซึ่งให้กลิ่นเหม็นเปรี้ยว (sweaty-cheesiness) โดยพบ 2-methylpropanoic acid พบทั้งในข้าวหมักชุดควบคุม ข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 และพบ 3-methylbutanoic acid ในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 และ DWS0911 มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ จีสุดา (2548) ซึ่งพบสารดังกล่าวในปริมาณเพิ่มขึ้นในการหมักข้าวสองวันแรก และ butanoic acid พบในข้าวหมักชุดควบคุม ข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 และ DWS0911 ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นสาบ กลิ่นชีส (sour, rancid, cheese) เป็นกรดที่สำคัญในการให้กลิ่นในขั้นตอนการหมักข้าวสองวันแรก (จีสุดา, 2548)

สารระเหยกลุ่มคีโตนที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบ คือ acetoin โดยพบในข้าวหมักชุดควบคุม ข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 และ DWS0906 ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นครีม กลิ่นเนย (creamy, buttery) มีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นในขั้นตอนข้าวหมักวันที่ 2 (จีสุดา, 2548) และมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Frasse *et al.*, (1993) ซึ่งพบว่าการหมักมีผลทำให้เกิดสารดังกล่าวในขนมปังฝรั่งเศส เช่นเดียวกับการหมัก Sourdough (Kirchhoff

and Schieberle, 2002) ดังนั้นสารนี้น่าจะเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถเปลี่ยนซิเทรตไปเป็น diacetyl ได้ แต่ diacetyl ไม่เสถียรจึงสามารถถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น acetoin ได้ (Gottschalk, 1986)

สารระเหยกลุ่มอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบ คือ hexanal พบในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 จากงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบว่าเมื่อมีการหมักเกิดขึ้นจะทำให้ปริมาณของ hexanal ลดลงอาจเกิดจากการถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ และงานวิจัยของ Kirchhoff and Schieberle (2002) พบว่าการหมักเป็นผลทำให้ปริมาณ hexanal ลดลงกว่า 6 เท่า และ acetaldehyde พบในข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0906 ซึ่งงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบในขั้นตอนของการนอนน้ำแป้ง และแป้งทับน้ำ

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

การศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี การปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีน โดยการศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ และสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสของขนมจีน โดยการศึกษาสารระเหยที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการผลิตขนจีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติดังกล่าวได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906, DWS0911 ซึ่งสมบัติเหล่านี้เป็นสมบัติหลักที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทต่อการปรับปรุงคุณภาพของขนมจีน เพื่อใช้เป็นกล้าในกระบวนการผลิตขนมจีน

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่และสาย ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ homofermentative และแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต ซึ่งจากผลที่ได้จากการศึกษา พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก เนื่องจากในกระบวนการผลิตขนมจีนจะเกิดความร้อนขึ้นในขั้นตอนของการหมักข้าว เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทำให้มีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นถึง 44.33 องศาเซลเซียส (นุจรี, 2547) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10, 35 และ 45 องศาเซลเซียส และในขั้นตอนของการโม่แป้งจะมีการเติมเกลือลงประมาณ 3-7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตก็สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2, 4 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และในการผลิตขนมจีนจะมีการใช้น้ำในขั้นตอนของการหมัก การโม่ หรือการล้างข้าว ซึ่งน้ำที่ใช้ต้องมีค่าพีเอชอยู่ที่ 6.4 จะทำให้ได้เส้นขนมจีนที่มีคุณภาพ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5 และ 9.6

การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ผลการตรวจสอบทางชีวเคมีโดยการตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล และการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA พบว่า

ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันในระดับสปีชีส์ ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA สามารถใช้ในการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ได้ถูกต้องมากกว่า เนื่องจากเป็นการจัดจำแนกในระดับโมเลกุล และกรดนิวคลีอิกที่เป็นองค์ประกอบในไรโบโซมชนิด 16S ของเซลล์โปรคาริโอตเป็นหน่วยอนุรักษ์สายพันธุ์และมีความคงตัวสูงมาก ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปน้อยมากแม้มีการวิวัฒนาการมานาน (Axelsson, 1998) ในขณะที่การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลอาจมีข้อผิดพลาดได้มากกว่า เนื่องจากอาจมีลักษณะที่คล้ายกันระหว่างแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือจีนัสเดียวกัน ซึ่งไม่มีความจำเพาะพอสำหรับการจำแนกในระดับสปีชีส์ ซึ่งจากผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกของสุพรรณิการ์, 2548 พบว่าจากการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก 10 ไอโซเลตด้วยการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลและใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA โดยให้ผลการจัดจำแนกที่สอดคล้องกัน 7 ไอโซเลต และไม่สอดคล้องกัน 3 ไอโซเลต นอกจากนี้ อรวรรณ (2546) ได้รายงานว่าการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกให้ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกันของทั้งสองวิธีที่กล่าวมาเช่นกัน

ในการศึกษาการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลต สรุปโดยใช้ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA และนำข้อมูล มาสร้าง Phylogenetic tree พบว่าผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^{T} *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^{T} และ *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667^{T} ตามลำดับ

4. การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* DWS0403 *Lactobacillus pentosus* DWS0906 และ *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนที่แตกต่างกัน คือ *L. plantarum* DWS0403 *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี ปานกลาง และ ดีมาก ตามลำดับ และแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ยังมีสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรส โดยการผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่มีความสำคัญในข้าวหมักได้เช่นเดียวกัน

4.1 การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการหมักในข้าว

4.1.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

กระบวนการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกสูงที่สุดในระหว่างกระบวนการผลิต โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงจนถึงขั้นตอนแป้งทับน้ำมากกว่ากระบวนการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในข้าวหมักที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 9.1 logCFU/g และเส้นขนมจีนมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 2.0-3.1 logCFU/g ซึ่งเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกน้อยที่สุด โดยผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่าการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* PD110 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในข้าวหมัก แป้งนอนน้ำ และแป้งทับน้ำมากกว่าการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus cellobiosus* RE33 และการหมักตามธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของนุจรี (2547) พบว่าข้าวหมักที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดเท่ากับ 9.4 logCFU/g เส้นขนมจีนที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกน้อยกว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 4.1-5.4 logCFU/g นอกจากนี้นุจรี (2547) พบว่าเส้นขนมจีนแป้งหมักที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 และชุดควบคุม มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 1.8 และ 1.5 logCFU/g ตามลำดับ

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดที่ระยะเวลาการหมักข้าว 48 ชั่วโมงในข้าวหมักชุดควบคุมเท่ากับ 9.4 logCFU/g มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลงในขั้นตอนนอนน้ำแป้ง และเพิ่มขึ้นในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ส่วนในเส้นขนมจีนมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.0-4.1 logCFU/g ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน (มผช.500/2547) คือ มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 6 logCFU/g (ภาคผนวก จ) ซึ่งเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดน้อยที่สุด จากงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) มีการตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในขนมจีนอยู่ในช่วง 4.2-5.5 logCFU/g และจากงานวิจัยของนุจรี (2547) พบว่าเส้นขนมจีนแป้งหมักที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 และชุด

ควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 3.6 และ 4.5 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเส้นขนมจีนในการทดลองครั้งนี้ จากงานวิจัยของรักชนก (2545) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในขั้นตอนการหมักขนมจีน ส่วนใหญ่จะมีการปนเปื้อนมาจากแหล่งต่างๆ เช่น การปนเปื้อนจากวัตถุดิบ น้ำที่ใช้ ภาชนะเครื่องมือเครื่องจักรตลอดจนภาชนะบรรจุหรืออาจปนเปื้อนจากผู้ผลิตเอง ซึ่งการผลิตที่ไม่ดีและปฏิบัติไม่ถูกต้องตามสุขลักษณะทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในปริมาณที่สูงและมีผลทำให้คุณภาพของขนมจีนลดลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และแบคทีเรียที่เป็นดัชนีการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักพบว่า การปนเปื้อนของ *S. aureus*, *E. coli* และ Coliforms พบตั้งแต่วัตถุดิบ ได้แก่ ข้าวหัก น้ำที่ใช้ และในระหว่างกระบวนการหมักข้าว นอกจากนี้นิตยา (2532) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะอาศัยการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งจะมีจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก

ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนตรวจไม่พบรา เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณยีสต์สูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ โดยแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณยีสต์สูงสุดเท่ากับ 5.9 logCFU/g รองลงมาคือ แป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. plantarum* DWS0403 และชุดควบคุม และตรวจไม่พบยีสต์ในเส้นขนมจีนในทุกชุดการผลิต เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการโรยเส้นสามารถทำลายยีสต์ได้หมด ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) ได้ศึกษาปริมาณยีสต์ในการผลิตขนมจีนแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก พบว่ายีสต์มีปริมาณ 2-3 logCFU/g ในข้าวหมักและแป้งนอนน้ำ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในขั้นตอนแป้งทับน้ำ และงานวิจัยของนิตยา (2532) พบว่ายีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการะบวนการหมักขนมจีน ซึ่งปริมาณยีสต์ในการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณใกล้เคียงกับที่พบในการหมักตามธรรมชาติ ยกเว้น *L. cellobiosus* RE33 ซึ่งตรวจพบยีสต์ในข้าวหมักวันที่ 2 มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เนื่องจาก *L. cellobiosus* RE33 ผลิตกรดได้ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น

ตรวจไม่พบ *B. cereus* และ *S. aureus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ และชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน (มผช.500/2547) คือ มีปริมาณ *B. cereus* และ *S. aureus* ไม่เกิน 2 logCFU/g (ภาคผนวก จ) อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนของการล้างข้าว ซึ่งใช้น้ำที่สะอาดในการล้างข้าวและทำการล้างข้าว 3-4 ครั้ง ทำให้ช่วยลดปริมาณ *B. cereus* ลงได้ และความสะอาดของอุปกรณ์ น้ำ และข้าวที่ใช้ในการผลิต และสุขลักษณะที่ดีของผู้ผลิตจะช่วยลดปริมาณของ *S. aureus* ได้ และอาจเป็นผลมาจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียแลกติกผลิตเพิ่ม ขึ้นในขั้นตอนการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ในทุกขั้นตอน ของการผลิตขนมจีน จากงานวิจัยของ สุพรรณิการ์ (2548) ได้ศึกษา

ปริมาณแบคทีเรียบาซิลลัสและ *S. aureus* ในกระบวนการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก พบว่าปริมาณแบคทีเรียบาซิลลัสในระหว่างการหมักมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วง 4-6 logCFU/g ยกเว้นการใช้กล้าเชื้อ *Leuconostoc lactis* PD128 พบว่าปริมาณแบคทีเรียบาซิลลัสลดลงจากการหมักข้าวตามธรรมชาติ และการใช้กล้าเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และพบแบคทีเรียบาซิลลัสในขนมจีนอยู่ในช่วง 2.2-3.2 logCFU/g และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ *S. aureus* ได้ดีที่สุดและหมดตั้งแต่ขั้นตอนการหมักข้าว ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงจากสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

การผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณ Coliforms และ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ตลอดการผลิตขนมจีนตั้งแต่เริ่มหมักข้าวจนกระทั่งเป็นเส้นขนมจีน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน คือ มีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g อาจเป็นผลมาจากค่าพีเอชที่ลดลงและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นมีผลไปยับยั้งการเจริญของ Coliforms และ *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนในครั้งนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ Coliforms และ *E. coli* ได้ดี จากงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่า *Leuconostoc lactis* PD128, *L. plantarum* PD110 และ *L. cellobiosus* RE33 สามารถยับยั้ง Coliforms และ *E. coli* ได้หมดในขั้นตอนของการนอนน้ำแป้ง

4.1.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดและมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดตลอดกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.31 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น และมีค่าพีเอชลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียลกติกที่เพิ่มขึ้น เพราะแบคทีเรียแลกติกจะสามารถสร้างกรดมีผลทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นและมีค่าพีเอชลดลง จากงานวิจัยของปราโมทย์ และคณะ (2534) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ และความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและกรดในกระบวนการหมักขนมจีน พบว่าปริมาณกรดและค่าพีเอชจะมีความ สัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น คือปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นในขณะที่ค่าพีเอชลดลง และในกระบวนการหมักข้าวสันนิษฐานว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลหมดอย่างรวดเร็วทำให้มีกรดเกิดขึ้น และผลที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของนวรัตน์ (2549) พบว่า *L. plantarum* PD110 มีผลทำให้กระบวนการหมักมีพีเอชต่ำ และผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูง งานวิจัยของนิตยา (2532) และ

สุพรรณิการ์ (2548) พบว่าในการผลิตขนมจีนแป้งหมักตามธรรมชาติ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทำให้ค่าลดลง เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียแลกติก ส่วนการผลิตขนมจีนแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Leuconostoc lactis* PD128, *L. plantarum* PD110 และ *L. cellobiosus* RE33 ในงานวิจัยของสุพรรณิการ์ (2548) พบว่ามีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการหมักตามธรรมชาติ ข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อจะมีค่าพีเอชที่ต่ำกว่าการหมักตามธรรมชาติตั้งแต่ขั้นตอนการหมักข้าวที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าพีเอชระหว่าง 3.8-4.6 และจากงานวิจัยของนุจรี (2547) พบว่าข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1, Lk2 และ Lk3 มีค่าพีเอชที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นและลดลงต่ำสุดที่ระยะเวลาการหมักข้าว 72 ชั่วโมง โดยข้าวที่หมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* Lk1 มีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 3.6

เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีปริมาณอะไมโลสสูงสุดในทุกขั้นตอนของการผลิตและมีปริมาณอะไมโลสสูงสุดในเส้นขนมจีนเท่ากับ 33.94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการผลิตที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เท่ากับ 33.52 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานที่ผ่านมา คือ กล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ดีมาก และ *L. plantarum* DWS0403 มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบได้ดี จากงานวิจัยของภควัฒน์ (2547) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรต และอะไมโลสในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรต และปริมาณอะไมโลสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดการไฮโดรไลซ์อะไมโลเพกทินด้วยกรดหรือเอนไซม์ เกิดดีพอลิเมอไรเซชัน กลายเป็นอะไมโลส ทำให้มีประมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น การไฮโดรไลซ์แป้งส่วนหนึ่งเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขนมจีนในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมจีนแป้งหมักของสุภรัตน์ และคณะ (2534) พบว่าข้าวที่หมักเป็นเวลา 1-2 คืน จะมีปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้น 1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอะไมโลสเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแป้งที่ผ่านการนวดดีแล้วจะมีปริมาณอะไมโลสสูงขึ้นระหว่าง 28.5-31.9 เปอร์เซ็นต์ และเส้นขนมจีนมีปริมาณอะไมโลส 29.92-31.87 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงชนิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าสภาวะการหมักที่แตกต่างกันในแต่ละขั้นตอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดสารในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้กระบวนการหมักแต่ละขั้นตอนมีลักษณะกลิ่นที่แตกต่างกัน สารระเหยกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะในการให้กลิ่นที่สำคัญ คือ 1-hexanol ซึ่งเป็นสารที่ให้คุณลักษณะหอมหวาน มีกลิ่นหอมดอกไม้ โดยจะเกิดในขั้นตอนของข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบ 1-hexanol ในขั้นตอนการหมักข้าววันที่ 2 และสารแอลกอฮอล์ที่น่าจะมีความสำคัญในการเกิดกลิ่นอีกหนึ่งชนิด คือ 3-methyl-1-butanol ซึ่งพบในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงในชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ เป็นสารที่ให้กลิ่นมอลท์ ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญในขนมปังฝรั่งเศสและ sourdough จากข้าวไรย์ (Frasse *et al.*, 1993,

Kirchhoff and Schieberle, 2002) สารระเหยกลุ่มกรดอินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักจะเกิด acetic acid ในช่วงของการหมักข้าว 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบ acetic acid ในปริมาณสูงตลอดการผลิตขนมจีน โดยมีปริมาณสูงในข้าวหมักวันแรก และงานวิจัยของ Anan *et al.*, (2003) ซึ่งทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารระเหยในกระบวนการหมักโดจากแป้งข้าวโพด (maize dough) พบว่ามี acetic acid เกิดขึ้นในการหมักวันแรก และพบสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะในการให้กลิ่นในขั้นตอนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก ได้แก่ 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ซึ่งให้กลิ่น sweaty-cheesiness โดยพบในข้าวหมัก 24, 48 ชั่วโมงและแป้งนอนน้ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของจีสุดา (2548) ซึ่งพบสารดังกล่าวในปริมาณเพิ่มขึ้นในการหมักข้าวสองวันแรก จากนั้นจะลดลงและเพิ่มปริมาณขึ้นอีกครั้งในขั้นตอนการทับน้ำ และงานวิจัยของ Kirchhoff and Schieberle (2002) ซึ่งพบว่ามีการหมักแป้งข้าวไรย์ในการผลิต Sourdough เป็นผลทำให้ปริมาณ 3-methylbutanoic acid เพิ่มขึ้น และ butanoic acid ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นสาบ กลิ่นชีส (sour, rancid, cheese) เป็นกรดที่สำคัญในการให้กลิ่นในขั้นตอนการหมักข้าวสองวันแรก (จีสุดา, 2548) และพบว่าเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญใน sourdougth ที่ผลิตจากข้าวสาลีและข้าวไรย์ (Kirchhoff and Schieberle, 2002) สารระเหยกลุ่มคีโตนที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก คือ acetoin โดยสามารถตรวจพบได้ในข้าวหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุม ซึ่ง acetoin เป็นสารที่ให้กลิ่นครีม กลิ่นเนย (creamy, buttery) มีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นในขั้นตอนข้าวหมักวันที่ 2 (จีสุดา, 2548) และมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Frasse *et al.*, (1993) ซึ่งพบว่าการหมักมีผลทำให้เกิดสารดังกล่าวในขนมปังฝรั่งเศส เช่นเดียวกับการหมัก sourdough (Kirchhoff and Schieberle, 2002) ดังนั้นสารนี้น่าจะเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถเปลี่ยนซิเทรตไปเป็น diacetyl ได้ แต่ diacetyl ไม่เสถียรจึงสามารถถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น acetoin ได้ (Gottschalk, 1986) สารระเหยกลุ่มเอสเทอร์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก คือ ethyl acetate ซึ่งพบเฉพาะในแป้งทับน้ำของชุดควบคุม ซึ่งงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบ ethyl acetate เฉพาะในขั้นตอนการหมักข้าววันแรกและการทับน้ำแป้ง และมีความโดดเด่นในการหมักโดข้าวโพดซึ่งตรวจพบในวันที่ 2 ของการหมัก (Anan *et al.*, 2003) สารระเหยกลุ่มอัลดีไฮด์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่พบกระบวนในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก คือ hexanol โดยจะเกิดในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และพบ benzaldehyde ในขั้นตอนแป้งนอนน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. paraplantarum* DWS0911 จากงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบว่าสารชนิดนี้มีการเพิ่มปริมาณสูงสุดในการหมักข้าววันที่สอง และตรวจพบ acetaldehyde โดยจะเกิดในข้าวหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 ซึ่งเป็นสารให้

กลิ่นผลไม้และกลิ่นเขียว (fruity และ green) มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของจีสุดา (2548) พบว่า acetaldehyde มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นหลังจากขั้นตอนการหมักข้าว

4.1.3 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

ปริมาณความชื้นจะลดลงต่ำสุดที่ระยะเวลาการหมักข้าว 48 ชั่วโมง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในขั้นตอนของแป้งนอนน้ำ เนื่องจากขั้นตอนนี้ต้องใช้น้ำในการโม่แป้ง ทำให้มีความชื้นเพิ่มขึ้น และลดลงในขั้นตอนของแป้งทับน้ำ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการนำแป้งที่ได้จากการนอนน้ำมาทำการทับน้ำออกเพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออก เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุมมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นโดยอยู่ในช่วง 71.7-75.5 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองเห็นได้ว่าช่วงแรกของการหมักความชื้นของข้าวหมักจะลดลง เนื่องจากในช่วงที่มีการหมักจะเกิดความร้อนขึ้นและน้ำจะระเหยได้เร็วมากขึ้น (นุจรี, 2547) ซึ่งสุภรัตน์และคณะ (2534) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขนมจีนในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมจีน พบว่าในขณะหมักข้าวจะมีความชื้นอยู่ในช่วง 30-32 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิของข้าวหมักอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส และเส้นขนมจีนพบว่ามีปริมาณความชื้น 69.3-73.7 เปอร์เซ็นต์

การตรวจวัดความแข็ง (Hardness) ของเส้นขนมจีน พบว่าเส้นขนมจีนชุดควบคุมมีความแข็งมากที่สุดเท่ากับ 25.9 นิวตัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 และ*L. paraplantarum* DWS0911 มีค่าความแข็งเท่ากับ 23.3 นิวตัน และ 23.6 นิวตัน ตามลำดับและเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 มีความแข็งน้อยที่สุดเท่ากับ 19.9 นิวตัน โดยเส้นขนมจีนแป้งหมักที่ได้จากการทดลองนี้จะมีความแข็งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเส้นขนมจีนทางการค้าในงานวิจัยของนวรัตน์ และวรรณี (2547) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความแข็งของเส้นขนมจีนแป้งหมักทางการค้าจากแหล่งผลิต 4 แหล่ง พบว่าความแข็งของเส้นขนมจีนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเส้นขนมจีนแป้งหมักของฉะเชิงเทรามีความแข็งมากที่สุด เท่ากับ 41.2 ซึ่งมีความแตกต่างจากเส้นขนมจีนปราจีนบุรี ดอนเมือง และรามอินทรามีความแข็งเท่ากับ 33.9, 31.4 และ 28.6 นิวตัน ตามลำดับ โดยภควัตน์ (2547) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลง ปริมาณโปรตีนในกระบวนการผลิตขนมจีน พบว่าปริมาณในกระบวนการหมักลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้โปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญ โดยกระบวนการทรานส์แอมิเนชั่น ดีคาร์บอกซิเลชั่น และดิแอมิเนชั่น ได้กรดอะมิโน เนื่องจากปริมาณโปนตีนที่ลดลงช่วยให้ขนมจีนแป้งหมักมีลักษณะนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง

จากการตรวจวัดค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมักพบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย และมีสีเหลืองน้อยกว่าเส้นขนมจีนอื่น โดยมีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 86.7, -1.2 และ 4.3 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 มีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 83.8, -1.3 และ 6.1 ตามลำดับ และ *L. paraplantarum* DWS0911 มีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 83.3, -1.3 และ 5.2 ตามลำดับ และเส้นขนมจีนชุดควบคุมจะมีสีคล้ำเหลืองมากที่สุด มีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 79.7, 0.1 และ 5.2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 และชุดหมักข้าวควบคุมในงานวิจัยของนุจรี (2547) พบว่า เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลตที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีสีขาวสว่างมากกว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อมีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 78.9,- 0.9 และ 7.5 ตามลำดับ และชุดข้าวหมักควบคุมโดยมีค่า L^* a^* b^* เท่ากับ 76.8, -2.8 และ 13.8 ตามลำดับ และมีสีที่ขาวสว่างมากกว่าเส้นขนมจีนแป้งหมักทางการค้าในงานวิจัยของนวรัตน์ และวรรณี (2547) ได้ศึกษาเปรียบเทียบค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมักทางการค้าจากแหล่งผลิต 4 แหล่ง คือ ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ดอนเมือง และรามอินทรา พบว่า เส้นขนมจีนทั้ง 4 แหล่งมีค่า L^* ระหว่าง 68.3-70.4 ค่า a^* ระหว่าง -1.5 ถึง -1.7 ค่า b^* ระหว่าง 0.1-1.8 โดยเส้นขนมจีนของฉะเชิงเทรามีค่า b^* สูงสุด ซึ่งความแตกต่างของสีที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากน้ำที่ใช้ โดยเส้นขนมจีนที่มีลักษณะสีออกเหลืองปกติทำจากน้ำใช้ที่มีพีเอช 3.4-3.5 เส้นขนมจีนที่มีลักษณะสีออกเขียวมากกว่าเหลืองทำจากน้ำใช้ที่มีพีเอช 7.3-7.4 และเส้นขนมจีนที่มีลักษณะสีเหลืองคล้ำทำจากน้ำใช้ที่มีพีเอชต่ำกว่า 5.5 (อรอนงค์ และคณะ, 2534) และอาจเกิดจากจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ เช่น ในการหมักมี *Bacillus* sp. ซึ่งสร้างสารสีเหลืองในระหว่างการหมัก (นวรัตน์ และวรรณี, 2547)

4.1.4 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนแป้งหมักแบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906, *L. paraplantarum* DWS0911 และชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ จากผู้ประเมิน 30 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One Way Anova post-hoc comparision of means (Duncan's multiple rang test) ซึ่งใช้ระดับความชอบในการประเมิน 5 ระดับ (5-point hedonic scale) ได้ทำการประเมินคุณลักษณะของเส้นขนมจีนทั้งหมด 5 ด้าน คือ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มากที่สุด โดยมีคะแนนของกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัสในระดับความชอบปานกลาง และความชอบโดยรวมในระดับชอบมาก ส่วนสีของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 จะมีคะแนนน้อยกว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. pentosus* DWS0906 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยผู้ทดสอบให้การยอมรับในระดับชอบมาก และพบว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งสามสายพันธุ์จะมีลักษณะสี กลิ่น

รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เป็นชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติซึ่งมีคะแนนของลักษณะสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมต่ำที่สุด เนื่องจากเส้นขนมจีนชุดควบคุมเป็นการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งเส้นขนมจีนที่ได้มีสีเหลืองคล้ำมากที่สุด มีกลิ่นแรง และเส้นมีลักษณะเปื่อยยุ่ย อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น เช่น *Bacillus* sp. จากงานวิจัยของนุจรี (2547) ได้ศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนที่มีการหมักแบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 และการหมักแบบธรรมชาติ พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อมากกว่าเส้นขนมจีนแบบธรรมชาติ ทั้งด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม

จากการศึกษาผลการใช้แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยการเติมกล้าเชื้อในขั้นตอนของการหมักข้าว พบว่า แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 มีความสามารถในการเจริญได้ดีในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิตขนมจีน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดี มีสมบัติในการย่อยแป้งได้ดีมีปริมาณอะไมโลสสูง และมีสมบัติในการผลิตสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่สำคัญในกระบวนการผลิตขนมจีน ได้เส้นขนมจีนที่มีความแข็งน้อย เส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีขาวสว่างและมีสีเหลืองน้อยกว่าเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้ออื่นและชุดควบคุมซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า เส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบมากที่สุด ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยทำการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวเปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งต่อไป

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการหมักข้าวและการหมักน้ำแป้ง

4.2.1 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

แบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญในน้ำแป้งหมักได้ดีกว่าในข้าวหมักที่ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง เนื่องจากในน้ำแป้งหมักจะมีขนาดของเม็ดแป้งที่เล็กจึงทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถย่อยแป้งได้เป็นน้ำตาลได้ดีกว่าในข้าว จึงส่งผลให้แบคทีเรียแลกติกใช้น้ำตาลเป็น

แหล่งพลังงานในการเจริญได้ดีกว่า แต่ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง แบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญในข้าวหมักได้ดีกว่าในน้ำแป้งหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และแบคทีเรียแลกติกมีการเจริญได้ดีที่สุดในแป้งทับน้ำ ซึ่งการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวมีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้ง ซึ่งการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้งมีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ดีกว่าในชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีน และเส้นขนมจีนมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.1-1.4 logCFU/g

ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก และชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้งในทุกขั้นตอนของการหมักและเส้นขนมจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เนื่องจากมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมากับข้าว และน้ำที่ใช้ (รักชนก, 2545) ส่งผลให้แบคทีเรียทั้งหมดเจริญอย่างรวดเร็วในชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงสุดในข้าวหมักที่ 48 ชั่วโมงมีปริมาณลดลงในขั้นตอนแป้งนอนน้ำ และแป้งทับน้ำ เนื่องจากในกระบวนการผลิตขนมจีนจะมีจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการหมักด้วย (นิตยา, 2532) ในเส้นขนมจีนมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.1-1.6 logCFU/g ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน คือ มีแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 6 logCFU/g

ในทุกขั้นตอนจะตรวจไม่พบรา เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวมีปริมาณยีสต์สูงสุดในทุกขั้นตอนการผลิต และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ซึ่งจะเห็นว่ายีสต์สามารถเจริญในชุดที่เป็นข้าวหมักได้ดีกว่าในชุดที่เป็นน้ำแป้งหมัก โดยการหมักช่วงเวลา 48 ชั่วโมงแรกพบว่าชุดที่เป็นข้าวหมักจะมีการเจริญของยีสต์ดีกว่าชุดที่เป็นน้ำแป้งหมักอย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากชุดที่เป็นน้ำแป้งหมักมีน้ำในการหมักในปริมาณมาก ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์เท่ากับชุดที่เป็นข้าวหมัก และเส้นขนมจีนทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบยีสต์ทุกขั้นตอนของการผลิต เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการโรยเส้นสามารถทำลายยีสต์ได้หมด

ตรวจไม่พบ *B.cereus* และ *S. aureus* ในทุกขั้นตอนของการผลิตขนมจีนทั้งชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก และชุดที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้ง ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน คือ มีปริมาณ *B.cereus* และ *S. aureus* ไม่เกิน 2 logCFU/g อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนของการล้างข้าว ซึ่งใช้น้ำที่สะอาดในการล้างข้าวและทำการล้างข้าว 3-4 ครั้ง ทำให้ช่วยลดปริมาณ *B. cereus* ลงได้ และความสะอาดของอุปกรณ์น้ำ และข้าวที่ใช้ในการผลิต และสุขลักษณะที่ดีของผู้ผลิตจะช่วยลดปริมาณของ *S. aureus* ได้ และอาจเป็นผลจากกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนของการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* ได้

ชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักและน้ำแป้งหมักมีปริมาณ Coliforms และ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ตลอดการผลิตขนมจีนตั้งแต่เริ่มหมักข้าวจนกระทั่งเป็นเส้นขนมจีน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน คือ มีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g อาจเป็นผลมาจากค่าพีเอชที่ลดลงและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นมีผลไปยับยั้งการเจริญของ Coliforms และ *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนในครั้งนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี

4.2.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดและมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดตลอดกระบวนการหมัก และมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอชต่ำสุดเท่ากับ 3.4 ซึ่งมีปริมาณกรดแลกติกและค่าพีเอชแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับแป้งทับน้ำที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมัก เนื่องจากในชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งจะมีน้ำในปริมาณมากตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการหมักจึงทำให้มีปริมาณกรดแลกติกน้อยกว่า (สุพรรณิการ์, 2548) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่เพิ่มขึ้น เพราะแบคทีเรียแลกติกจะสามารถสร้างกรดได้ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นในขณะเดียวกันทำให้ค่าพีเอชลดลง เส้นขนมจีนมีปริมาณกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 0.04-0.06 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีค่าพีเอชของเส้นขนมจีนอยู่ในช่วง 3.9-4.1 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน คือ อยู่ระหว่าง 3.0-4.5

ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีปริมาณอะไมโลสเริ่มต้นสูงกว่าชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งการโม่ข้าวทำให้เม็ดแป้งแตกตัวมากขึ้นส่งผลให้อะไมโลสหลุดออกมาด้วย เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณอะไมโลสเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีปริมาณอะไมโลสสูงสุดในเส้นขนมจีน โดยเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีปริมาณอะไมโลสสูงสุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก โดยมีปริมาณอะไมโลสเท่ากับ 34.6 และ 33.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงชนิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรสในเส้นขนมจีนแป้งหมักแบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้ง และชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก

และน้ำแป้งหมักซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ พบว่ามีสารระเหยทั้งหมด 12 ชนิด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มหลัก คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน เอสเทอร์ อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวพบสารระเหยทั้ง 6 กลุ่มและเกิดสารระเหยมากที่สุด โดยจากการวิเคราะห์ชนิดของสารระเหยในเส้นขนมจีนพบว่าชนิดของสารระเหยมีจำนวนที่ลดลงจากขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตขนมจีน เนื่องจากการผ่านความร้อนในการทำให้เส้นสุกในน้ำเดือดและเกิดการละลายไปกับน้ำเป็นผลทำให้สารระเหยบางชนิดสูญหายไป ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gobbetti *et al.*, (1995) ซึ่งพบว่าการอบมีอิทธิพลต่อปริมาณสารระเหยทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ Sourdough โดยทำให้มีปริมาณสารระเหยลดลง 12 เปอร์เซ็นต์

4.2.3 การวิเคราะห์ทางกายภาพ

ชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมักและน้ำแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีความชื้นเริ่มต้นที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 เนื่องจากชุดการหมักที่เป็นน้ำแป้งหมักมีน้ำที่ใช้ในการโม่แป้งเข้ามาเกี่ยวข้องในปริมาณมาก ซึ่งใช้น้ำ 1.5 ส่วนในการโม่ข้าว 1 ส่วน และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง และลดลงต่ำสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ส่วนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ปริมาณความชื้นไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนของการหมักข้าว แต่ปริมาณความชื้นมีค่าเพิ่มขึ้นในขั้นตอนของแป้งนอนน้ำเนื่องจากขั้นตอนนี้ต้องใช้น้ำในการโม่แป้ง ทำให้มีความชื้นเพิ่มขึ้น และลดลงในขั้นตอนแป้งทับน้ำ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการนำแป้งที่ได้จากการนอนน้ำมาทับน้ำออก จากการทดลองจะเห็นได้ว่าช่วงแรกของการหมักความชื้นของข้าวหมักจะลดลงเนื่องจากช่วงที่มีการหมักจะเกิดความร้อนขึ้นและน้ำจะระเหยได้เร็วมากขึ้น (นุจรี, 2547)

การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนแป้งหมัก พบว่าเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักมีความแข็ง (Hardness) มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก และเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อในน้ำแป้ง ซึ่งเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมีความแข็งน้อยที่สุด เท่ากับ 18.8 นิวตัน ซึ่ง เมื่อทดสอบความเหนียว (Stickiness) พบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 ในน้ำแป้งมีความเหนียวมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.5 นิวตัน ซึ่ง ในงานวิจัยของนวรัตน์ และวรรณี (2547) ซึ่งได้ศึกษาเปรียบเทียบความความเหนียวของเส้นขนมจีนแป้งหมักทางการค้า พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีความเหนียวในช่วง 0.5 นิวตัน และเมื่อทดสอบความเกาะติด (Adhesiveness) พบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้ง

มีความเกาะติดสูงสุดเท่ากับ 0.2 นิวตัน และยังมีค่าสูงกว่าเส้นขนมจีนทางการค้าในงานวิจัยของนวรัตน์ และวรรณี (2547) อีกด้วย

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักทำให้เส้นขนมจีนมีความเหนียว การเกาะติดที่ดีกว่า และมีค่าความแข็งน้อยกว่าการเติมกล้าเชื้อในข้าวเป็นผลมาจากปริมาณอะไมโลสที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการหมักและมีปริมาณสูงสุดในเส้นขนมจีน และอาจเกิดจากจุลินทรีย์มีการใช้โปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญ ทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง ซึ่งช่วยให้เจลขนมจีนแป้งหมักมีลักษณะนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง (ภควัตน์, 2547) เส้นขนมจีนที่ได้จากการทดลองนี้จะมีความแข็งน้อยกว่าเส้นขนมจีนทางการค้าจากแหล่งผลิต 4 แหล่ง คือ เส้นขนมจีนแป้งหมักของฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ดอนเมือง และรามอินทรา เส้นขนมจันที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีความเหนียวเท่ากับเส้นขนมจีนของรามอินทรา ซึ่งมีค่าความเหนียวเท่ากับ 0.5 นิวตัน และเส้นขนมจีนทางการค้าทั้ง 4 แหล่งมีค่าความเกาะติดระหว่าง 0.01-0.13 นิวตัน (นวรัตน์และวรรณี, 2547)

เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย และมีสีเหลืองน้อยที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมัก และเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักจะมีสีคล้ำเหลืองมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบค่าสีของเส้นขนมจีนแป้งหมักที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* Lk1 และชุดหมักข้าวควบคุมในงานวิจัยของนุจรี (2547) พบว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งและข้าวที่ได้จาการทดลองครั้งนี้มีสีขาวสว่างมากกว่าเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ Lk1 และมีสีขาวสว่างมากกว่าเส้นขนมจีนแป้งหมักทางการค้าในงานวิจัยของนวรัตน์และวรรณี (2547)

4.2.4 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

การประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีนแบบเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวและน้ำแป้ง ชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมักซึ่งเป็นการหมักตามธรรมชาติ จากผู้ประเมิน 40 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One Way Anova post-hoc comparision of means (Duncan's multiple rang test) ซึ่งใช้ระดับความชอบในการประเมิน 5 ระดับ (5-point hedonic scale) ได้ทำการประเมินคุณลักษณะของเส้นขนมจีนทั้งหมด 5 ด้าน คือ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งมากที่สุด โดยมีคะแนนของสี กลิ่น เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมสูงที่สุด ซึ่งผู้ทดสอบให้การยอมรับสีในระดับความชอบมาก และให้การยอมรับกลิ่น เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมในระดับความชอบปานกลาง เนื่องจากเส้นขนมจีนที่ได้นี้มีลักษณะความเหนียว และการเกาะติดดีที่สุด และมีความแข็งน้อยที่สุด และมีสีขาวสว่างมากที่สุด

มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย และมีสีเหลืองน้อยที่สุด จึงทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าในข้าวหมักและเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นน้ำแป้งหมัก แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับเส้นขนมจีนชุดควบคุมที่เป็นข้าวหมัก ซึ่งมีคะแนนของลักษณะสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยโดยรวมต่ำที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันการผลิตขนมจีนแป้งหมักส่วนใหญ่นั้นเป็นการหมักตามธรรมชาติจึงมักประสบปัญหาในการผลิต ทำให้ไม่สามารถควบคุมระยะเวลาในกระบวนการหมักได้ ขนมจีนที่ผลิตแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอได้เส้นขนมจีนที่มีคุณภาพแตกต่างกันออกไปในแต่ละแหล่งที่ผลิต ซึ่งมีผลทำให้เส้นขนมจีนที่ได้มีสีคล้ำ มีความเหนียวลดลง ลักษณะเนื้อสัมผัสค่อนข้างกระด้าง มีกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณภาพของวัตถุดิบ กรรมวิธีการผลิต เป็นต้น และอาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคค่อนข้างสูง เนื่องจากยังไม่มีการควบคุมการผลิตที่ดีพอ รวมทั้งสุขลักษณะจากการผลิตยังไม่ดีเท่าที่ควร ขนมจีนที่ได้จึงไม่สะอาด และเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจากจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นการนำแบคทีเรียแลกติกที่มีประโยชน์มาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมักเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อช่วยในการพัฒนากระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักให้มีคุณภาพที่ดีสม่ำเสมอ ปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีกลิ่นคล้ายกับการหมักตามธรรมชาติ สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกระบวนการผลิตขนมจีน และทำการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งดิบที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก ซึ่งจะมีผลทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นขนมจีนดีขึ้น และศึกษาสมบัติในการปรับปรุงกลิ่นรส ซึ่งจะศึกษาถึงสารระเหยที่เกิดขึ้นในการหมักขนมจีนที่ให้กลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ของขนมจีนแป้งหมัก และทำการคัดลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติดังกล่าวดีที่สุด เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการพัฒนากระบวนการผลิตและคุณภาพของเส้นขนมจีน และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และการประเมินทางประสาทสัมผัสของเส้นขนมจีน

การศึกษาปริมาณและคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิตขนมจีนจากโรงงานผลิตขนมจีนในจังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช พัทลุง และพระนครศรีอยุธยาทั้งหมด 11 โรงงาน พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักแต่ละแหล่งผลิตจะมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในขั้นตอนแป้งทับน้ำมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 8.37-9.37 logCFU/g ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 0.54 % ในขณะที่พีเอชลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.05 ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มหลักที่พบในปริมาณสูงสุดในทุกขั้นตอนของกระบวนการหมักขนมจีน และมีความสัมพันธ์

กับปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นในขณะที่พีเอชจะลดลง และสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากกระบวนการผลิตขนมจีนได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลต

การนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลตมาศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar spot assay พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 55 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (*E. coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 029, *B. cereus* TISTR 687, *L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938) ได้ จากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 55 ไอโซเลตมาทำการยืนยันผลการยับยั้งอีกครั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลตที่ยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *E. coli* TISTR 780, *S. aureus* TISTR 029 และ *B. cereus* TISTR 687 และทุกไอโซเลตจะไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบกลุ่มแบคทีเรียแลกติก (*L. sake* TISTR 911 และ *L. curvatus* TISTR 938) และมีแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีมาก คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906 และ DWS0911

การนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 476 ไอโซเลตมาศึกษาสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีน โดยศึกษาการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบของแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้าแทนน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยแป้งได้ดี 72 ไอโซเลต และย่อยแป้งได้ดีมาก 1 ไอโซเลต จากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 73 ไอโซเลตมาหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric total sugar method พบว่าแบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดีมาก คือ ไอโซเลต FR0512, DWS0911, FR0514, SRS1108 และ DWS0807 และ 5 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ดี คือ ไอโซเลต FR0501, FR0513, FR0502, DWS0403 และDWS0405 โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 1,544-2,667 µg/ml

การนำแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง และมีสมบัติในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมจีนได้ดี ปานกลาง และดีมาก คือ ไอโซเลต DWS0403, DWS0906, และ DWS0911 ตามลำดับ มาใช้เป็นกล้าเชื้อเติมในข้าวแล้วหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการตรวจหาสารระเหยที่ให้กลิ่นรสโดยใช้เทคนิค HS-SPME GC-MS พบสารระเหยทั้งหมด 37 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 5 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ คีโตน อัลดีไฮด์ และกลุ่มอื่นๆ จากการทดลองพบว่าข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 พบสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นมากกว่าข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้ออื่น และข้าวหมักที่เป็นชุดควบคุม โดยข้าวหมักที่เติมกล้าเชื้อ DWS0403 พบสารระเหยกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่น คือ 1-hexanol เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมหวาน กลิ่นหอมดอกไม้ สารระเหยกลุ่มกรดอินทรีย์ คือ 2-methylpropanoic acid และ 3-methylbutanoic acid ซึ่งให้กลิ่นเหม็นเปรี้ยว (sweaty-cheesiness) และ butanoic acid เป็นสารที่ให้กลิ่นเปรี้ยว กลิ่นสาบ กลิ่นชีส

(sour, rancid, cheese) สารระเหยกลุ่มคีโตน คือ acetoin เป็นสารที่ให้กลิ่นครีม กลิ่นเนย (creamy, buttery) สารระเหยกลุ่มอัลดีไฮด์ คือ hexanal

การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA แล้วนำข้อมูลที่ได้จากการ BLAST มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 พบว่า แบคทีเรียแลกติกไอโซเลต DWS0403 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^{T} ไอโซเลต DWS0906 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^{T} และ ไอโซเลต DWS0911 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667^{T}

การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลต *Lactobacillus plantarum* DWS0403, *Lactobacillus pentosus* DWS0906 และ *Lactobacillus paraplantarum* DWS0911 เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อในขั้นตอนการหมักข้าวและเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม) พบว่ากระบวนการผลิตขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกดีที่สุดในระหว่างกระบวนการผลิต มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงสุดและมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดตลอดกระบวนการหมัก มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีมีปริมาณอะไมโลสสูง และพบสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นมากที่สุด เส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 มีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย มีสีเหลืองน้อยที่สุด และมีค่าความแข็งของเส้นขนมจีนน้อย จากการศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อดังกล่าวเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์นี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก โดยทำการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักเปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมักต่อไป

การศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลต *L. plantarum* DWS0403 เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตขนมจีน โดยเติมกล้าเชื้อในข้าวหมักเปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมัก และเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติที่เป็นข้าวหมักและน้ำแป้งหมัก (ชุดควบคุม) พบว่าการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในข้าวหมักมีการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อในน้ำแป้งหมัก มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงสุดและมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดตลอดกระบวนการหมัก และมีสารระเหยที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่ดีในปริมาณมาก และจากผลการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักพบว่าแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีมากทำให้มีปริมาณอะไมโลสสูงสุด ทำให้เส้นขนมจีนมีความเหนียวและความเกาะติดดีที่สุด มีความแข็งน้อยที่สุด และเส้นขนมจีนมีสีขาวสว่างมากที่สุด มีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย และมีสีเหลืองน้อยที่สุด ผู้ทดสอบให้การ

ยอมรับมากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับเส้นขนมจีนที่เติมกล้าเชื้อในข้าวหมัก

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในน้ำแป้งหมักมีผลในการช่วยพัฒนากระบวนการผลิตและคุณภาพของเส้นขนมจีนให้ดีขึ้น โดยมีผลในการช่วยลดการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษและก่อให้เกิดอาหารเน่าเสียที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตขนมจีนให้มีปริมาณที่ลดน้อยลงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนด และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมทั้งมีผลช่วยให้เส้นขนมจีนมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่มีความเหนียว นุ่ม ไม่แข็ง และได้เส้นขนมจีนที่ขาวสว่าง และมีส่วนช่วยในการเกิดสารระเหยให้กลิ่นที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักลง 1 วัน ช่วยลดปริมาณน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต และยังช่วยลดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมักได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

จีสุดา เกตุกราย. 2548. สารระเหยให้กลิ่นรสของขนมจีนแป้งหมัก. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จีสุดา เกตุกราย, สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, วรรณี จิรภาคย์กุล, สุดสาย ตรีวานิช และอรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์และองค์ประกอบสารระเหยในระหว่างกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก. การประชุมทางวิชาการอุตสาหกรรมเกษตรครั้งที่ 6. ศูนย์แสดงสินค้าอิมแพคอารีน่าเมืองทองธานี, ปทุมธานี.

ณรงค์ นิยมวิทย์. 2538. ขนมจีน. วารสารการอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 123-129.

ณรงค์ นิยมวิทย์ และ อัญชนีย์ อุทัยพัฒนาชีพ. 2538. วิทยาศาสตร์การประกอบอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพมหานคร

นวรัตน์ สุพิชญางกุร และวรรณี จิรภาคย์กุล. 2547. การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพและชนิดของสารระเหยในขนมจีนแป้งหมักทางการค้า. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาประมง. กรุงเทพมหานคร. 521-526

นวรัตน์ สุพิชญางกูร, วรรณี จิรภาคย์กุล และอรอนงค์ นัยวิกุล. 2549. ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางเคมีในกระบวนการผลิตขนมจีนแป้งหมัก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเศรษฐศาสตร์ สาขาบริหารธุรกิจ. กรุงเทพมหานคร. 356-362

นิตยา บุญมี. 2532. จุลินทรีย์ในการผลิตขนมจีนแป้งหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

นุจรี สอนสะอาด. 2547. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้ในการหมักขนมจีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยนเรศวร.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภารกิจเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

ปราณี วราสวัสดิ์. 2536. ผลิตภัณฑ์จำพวกเส้น. เอกสารประกอบการสอนวิชา ทอ 475 เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ธัญพืช. ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์, ลาวัณย์ ไกรเดช, อรอนงค์ นัยวิกุล, สุภรัตน์ ชวนะ, พัชรี โสธนาสมบูรณ์, พรเทพ พัฒนานุรักษ์, มาลี สุวรรณอัตถ์ และ ผู้ผลิตจากนิคมอุตสาหกรรมขนมจีนฉะเชิงเทรา. 2534. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ และความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและกรดในกระบวนการหมักขนมจีน. 365-373.รายงานผลการวิจัยสาขาสิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร คหกรรมศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ เศรษฐศาสตร์ สังคมศาสตร์ มนุษย์ศาสตร์ ศึกษาศาสตร์, การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 29. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

ภวัต สังขะวัฒนะ. 2544. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภควัฒน์ เดชชีวะ. 2547. การใช้กัมและสตาร์ชดัดแปรสำหรับการผลิตในขนมจีนคืนรูปเร็ว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัย. เกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

รักชนก จัดวงษ์. 2545. การพัฒนาแป้งขนมจีนหมักสำเร็จรูป. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

ลาวัณย์ ไกรเดช, ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, มาลัย บุญรัตนกรกิจ, พัชรี ตั้งตระกูล, ปทุมพร ฉิมเอนก, วรรณา ประไพหลง,สิริพร สธนเสาวภาคย์ และปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2546. มาตรฐานขนมจีน., การประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 5 นวัตกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ. กรุงเทพมหานคร.

วนิดา โอศิริพันธุ์. 2544. บทบาทของเทคโนโลยีชีวภาพต่อกระบวนการผลิตอาหาร. ศูนย์ความหลาก หลายทางชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร. ภาคจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. การผลิตอาหารหมักจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย. การประชุมวิชาการเรื่องแลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศษสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร.

ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และคณะ. 2542. การศึกษาความสัมพันธ์คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของแป้งข้าวจ้าว กรรมวิธีการทำขนมจีนและคุณภาพขนมจีน. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร. คณะเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยข่อนแก่น. ข่อนแก่น.

ศรีสุดา บงแก้ว. 2547. การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียกลุ่มแลกติก โคลิฟอร์ม ยีสต์และรา ในกระบวนการผลิตขนมจีน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยลงกรณ์.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2541. แบคทีเรียกรดแลกติก. เอกสารวิชาการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, สุดสาย ตรีวานิช, วรรณี จิรภาคย์กุล และอรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพมหานคร. 307-314

สุภรัตน์ ชวนะ, พัชรี ตั้งตระกูล, อรอนงค์ นัยวิกุล, มาลี สุวรรอัตถ์, ลาวัณย์ ไกรเดช, ปราโมทย์ ศิรโรจน์ และพรเทพ พัฒนานุรักษ์. 2534. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขนมจีนในกระบวนการผลิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. รายงานผลการวิจัยสาขาสิ่งแวดล้อมวิทยาศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร คหกรรมศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ เศรษฐศาสตร สังคมศาสตร์ มนุษย์ศาสตร์ ศึกษาศาสตร์, การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 29. 417-425

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 470 หน้า.

อรอนงค์ นัยวิกูล, จิตธนา แจ่มเมฆ, สินีนาถ จริยโชติเลิศ, กนกพรรณ เกรียงไกรกฤษฎา และวีระ วงศ์ทรัพย์คณา. 2533. รายงานความก้าวหน้า โครงการผลิตแป้งข้าวผสมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเส้น : ขนมจีน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ ละอองคำ. 2546. การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต KUB-L0026, KUB-FV1-4 และ KUB-FV4-3. ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล, สุภรัตน์ ชวนะ, พัชรี โสธนาสมบูรณ์, มาลี สุวรรอัตถ์, ลาวัณย์ ไกรเดช, ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และพรเทพ พัฒนานุรักษ์. 2534. การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพของขนมจีนในกระบวนการผลิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 375-384

เอกสารประกอบการให้คำปรึกษาโดยคลินิกเทคโนโลยีราชมงคลสุรินทร์. 2552. การผลิตขนมจีนแป้งหมัก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ สนับสนุนงบประมาณ โดยกระทรวงวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี

เอกสารเผยแพร่บริษัท พ.ศ.ช. ซัพพลายส์ จำกัด. ปัญหาคุณภาพที่เกิดจากน้ำในกระบวนการผลเส้นขนมจีน. http://www.pschgroup.comlindex.php?show=report&file=readreport&jd=27. (September 5, 2010)

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman,D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215, 403–410.

Annan, N.T., Poll, L., Plahar, W.A. and Jakobsen, M. 2003. Aroma characteristics of spontaneously fermented Ghanaian maize dough for kenkey. Eur. Food Res. Technol. 217: 53-60.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. In: The Association of Official Analytical Chemists International 17 ed., Washington, D.C. 1018 p.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-72. In Salminen, S. and Wright, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects. Marcel Dekker, Inc., New York. 617.

BAM. 2002. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8 ed., AOAC International, USA.

Beaso, S., Bearson, B. and Foster, J.W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. In Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York. 135-164.

Blom, H. and Mortvedt, C. 1991. Anti-microbial substance produced by food associated microorganism. In Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York. 135-164.

Cogan, J.F., Walsh, D. and Condon, S. 1989. Impact of aeration on the metabolic end products from glucose and galactose be *Streptococcus lactis*. J Appl Bacteriol. 66: 77-81

Condon, S. 1987. Response of lactic acid to oxygen, pp. 42-43. Cited De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blakei Academic & Professional.

Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M.S. and Rossi, J. 1996.The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeast and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 29: 63-70.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torriani, S. 1995. The genus Leuconostoc. In Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds). The genera of lactic acid Bacteria. Chapman & Hall, Glasgow. 235-236.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin ans its use as a food preservative. Food Technol. 4: 100-117.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., eds. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic & Professional, London. 91-142.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications. Blackie Academic & Professional, London. Cited Baird-Parker, A.C.1980. Microbial Ecology of Foods.

Dobois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Clorimetric method for determination of sugar and relates substrance. Anal. Chem. 28(3) : 350-356

Edward, G.F. 1980. Acetic acid. In antimicrobial food additives. Pp. 167-174. New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Eklund, T. 1984. The effect of carbondioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. Int. J. Food Microbiol. 1: 179-185.

Engesser, D. and Hammes, W. 1994. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. System. Sppl. Microbiol. 17: 11-19.

Fleming, H.P., Etchells, J.L. and Costilow, R.L. (1985). Microbial Inhibition by an Isolate of Pediococcus from Cucumber Brines. Applied Microbiology. 30: 1040-1042.

Frasse, P., Lambert, S., Richard-Molard, D. and Chiron, H. 1993. The influence of fermentation on volatile compounds in French bread dough. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 26: 126-132.

Fuller, R. 1989. Probiotics in human and animals. J Appl Bacteriol. 66 : 1430-1434.

Giraud, E., Champailler, A. and Raimbault, M. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Envir. Micro. 60(12):4319-4323.

Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J. and Damiani, P. 1995. Volatile Compound and Organic acid Productions by Mixed Wheat Sour Dough Starters: Influence of Fermentation Parameters and Dynamics During Baking. Food Microbiol. 12: 497-507.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial fermentations, pp. 210-282. In Gottschalk, G. ed. Bacterial Metabolism. 2nd ed. Springer-Verlage, New York.

Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K. and Jakobsen, M. 1993. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. Inter. J. Food Micro. 19: 135-143.

Hammes, W.P. and Vogal, R.F. 1995. The genera Lactobacillus. In Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (eds). The genera of lactic acid bacteria. Chapman&Hall, Glasgow. 19-28.

Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzapfel, W.P. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Cited De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional. 43-44.

Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994.Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins. A Waverly Co. Baltimore, London.

Jelen, H. and Wasowicz, E. 1998. Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. Food Rew. Int. 14(4): 391-426.

Josephson, J. and Neilsen, E.W. 1988. Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of cheddar starter used for five years wihout rotation. Cited De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie Academic&Professional. 46 p.

Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled rice amylase. Cereal Science Today. 16(10):334-340

Kandier, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In Sneath P.H.A. ed. Bergey's Manual of Systermatic Bacteriology Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1208-1234.

Kirchhoff, E. and Schieberle, P. 2002. Quantitation of odor-active compounds in rye flour and rye sourdough using stable isotope dilution assays. J Agric Food Chem. 50: 5378-5385.

Kraidej, L., Wongkhalaung, C., Mouangnoi, M., Watana, P., Patarakulpong, P., Chimaneg, P., Phoopat, S. and Yongmanitchai, W. 2003. Khanom-chin. The fifth international conference on global impacts of applied microbiology, November 21-26, Bankok. 35 p.

Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antigonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87: 149-164

Leroy, F., and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends. Food Sci. Technol. 15: 67-78.

Martinez-Anaya, M.A. 1996. Enzymes and bread flavour. J Agric Food Chem. 44 (9): 2469-2480.

Montville, T.J. and Winkowski, K. 1997. Biologically bases preservation system and probiotic bacteria, pp. 558. In Michael, P.D., Beuchat, L.R. and Montville, T.J., eds. Food Microbiology Fundamentals and Frontievs. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Moss, C.W., Lambert, M.A. and Merwin, W.H. 1974. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. Cited De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional. 43 p.

Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria, 2-3 p. Cited by Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. Int. Food Microbiol. 36 : 1-29.

Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Salminen, S. and Von Wright, A. eds. Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York. 139-160.

Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Heinz, K. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. In De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. eds. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic & Professional, London. 13-90

Qin, L. and Ding, X. (2007). Formation of taste and odour compounds during preparation of Douchiba, a Chinese traditional soy-fermented appetizer. Journal of Food Biochemistry, 31, 230-251.

Reineccius, G. 1994. Source Book of Flavors. 2nd ed. Chapman and Hall, New York.

Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P. and Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl Environ Microbiol. 64: 2287-2290.

Salminen, S. and Wright, A. 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects. Marcel Dekker, INC. Newyork. 617 p.

Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J.P. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. Int. J Food Microbiol. 72: 53-62.

Santoyo M.C., Loiseau, G., Sanoja, R.R and Guyot, J.P. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* ogi reveals uncoupling between growth and α-amylase at pH 4. Int J Food Sci Technol. 80: 77-87

Scharpf, L.G., Seitz, E.W., Morris, J.A. and Farbood, M.I. 1986. Generation of flavor and odor compounds through fermentation process, pp. 323-346. In Parliament, T.H. and Croteau, R., eds. Biogeneration of Aromas. ACS pub., Washington, D.C.

Schillinger, U., and Lucke, F.K. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. Applied Environmental Microbiology. 55: 1901 - 1906.

Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends. Food Sci. Technol. 7 : 158-164.

Schleifer, K.H. and Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication. Bacteriol. Rev. 36 : 407-477.

Shaikh, Y. 2002. Specialty Aroma Chemicals in Flavors and Fragrances. Allure Publishing Corporation, Illinois.

Simson, W.J. and Taguchi, H. 1995. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In Wood, B. J. and Holzapfel, W.H., eds. The Lactic Acid Bacteria vol. 2 : The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall, Glasgow, UK. 126-164.

Sneath, P.H.A. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriolofy Vol. 2. Williums and Wilkins, Baltimore, UAS.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H.. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Cited Santivarangkanac (eds). Screening and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from law cow's milk in Thailand. Master Thesis. Kasetsart University, Bankok. 5-8.

Swetwiwathana, A. 1996. Comparative study of the growth of some commercial lactic acid bacterial starter culture on MRS agar under various incubation atmospheres. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2009. Identification of Nisin Z producing *Lactococcus lactis* N12 associated with traditional Thai fermented rice noodle (Kanom Jien). Asian Journal of Food and Agro-Industry. 2(02) : 116-125

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24:1596-1599.

Tichaczek,P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. 1992. Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH 673. Systematic and Applied Microbiology 15: 460-468.

Thomas, T., Yoshioka, E. and Longyear, V.M.C. 1979. Change from homo- to hetrolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat culture. J Bacteriol. 138: 109-117.

Urbach, G. 1997. The Chemical and Biochemical Basis of Chesse and Milk Aroma, pp. 253-298. In Law, B.A., ed. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Ferment Milk. 2nd ed. Chapman & Hall, Great Britain.

Welsh, F.W. 1994. Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production, pp. 1-17 In A. Gabelman, ed. Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Welsch, J. and McClelland, M.1990. Fingerprinting genomes, using PCR with urbitary primer. Cited Salminen, S. and Wright, A.. (eds). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc. 21 p.

Wood, B.J. and Holzapfel, W.H.. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall. London, Melbourne.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)

Proteose Peptone	10	กรัม
Beat extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.10	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง MRS 70 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)

Proteose Peptone	10	กรัม
Beat extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.10	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Glucose-yeast extract-peptone medium (GYP)

Proteose Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Tween 80	0.25	กรัม
Sodium acetate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.20	กรัม
Manganese sulfate	0.01	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อตามสูตรในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Bacteriocin screening medium (BSM)

Tryptone	10	กรัม
Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Glucose	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Citric acid diammonium salt	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.20	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
di-Potassium hydrogen orthophosphate	8.70	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate	8	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อตามสูตร ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Baird Parker agar (BP)

Peptone	10	กรัม
Meat extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม

Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง BP 63 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เติม egg-yolk tellurite emulsion จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. Brain Heart Infusion broth (BHI)

Calf brain infusion solid	12.5	กรัม
Beef heart infusion solid	5	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Glucose	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Di-sodium phosphate	2.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว BHI 37 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Brilliant Green Lactose Bile broth (BGLB)

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Ox-bile (purified)	20	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว BGLB 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซในหลอดทดลองฝาเกลียว มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Escherichia Coli broth (EC)

Tryptone	20.	กรัม
Lactose	5	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
Di-potassium phosphate	4	กรัม
Mono-potassium phosphate	1.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว EC 37.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซในหลอดทดลองฝาเกลียว แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Eosin Methylene Blue agar (EMB)

Tryptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Eosine Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.06	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง EMB 37.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Lauryl Sulphate Tryptose broth (LST)

Tryptone	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.75	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.75	กรัม
Sodium lauryl sulphate	0.1	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว LST 35.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซในหลอดทดลองฝาเกลียว แล้วทำ

ให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Mannitol Egg Yolk-Polymycin Agar (MYP)

Meat extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Mannitol	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	12	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง MYP 21.5 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เติม egg-yolk emulsion จำนวน 50 มิลลิลิตร และ Polymyxin B (Bacillus cereus selective supplement; SR 99E) 1 vial (2 มิลลิลิตร/vial) ผสมให้เข้ากัน

12. Peptone water

Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร หรือขวดสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. Plate Count agar (PCA)

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง PCA 23.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. Potato Dextrose agar (PDA)

Potato extract	4	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย Tartaric acid ความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

15. Trypticase Soy agar (TSA)

Casein peptone	15	กรัม
Soymeal peptone	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง TSA 30.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

16. Trypticase Soy broth (TSB)

Casein peptone	17	กรัม
Soymeal peptone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว TSB 30 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมสารละลายดังนี้

A : สารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ผสมสารละลายไกลซีน 15.01 กรัม ในน้ำกลั่น1,000 มิลลิลิตร)

B : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

จากนั้น ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 22.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายอะซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 4.6

เตรียมสารละลายดังนี้

A : กรดอะซีติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ผสมกรดอะซีติกเข้มข้น 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

B : เกลืออะซีเทตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ละลาย CH_3 COONa 16.4 กรัม หรือ CH_3 $COONa_3H_2O$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 25.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 24.4มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

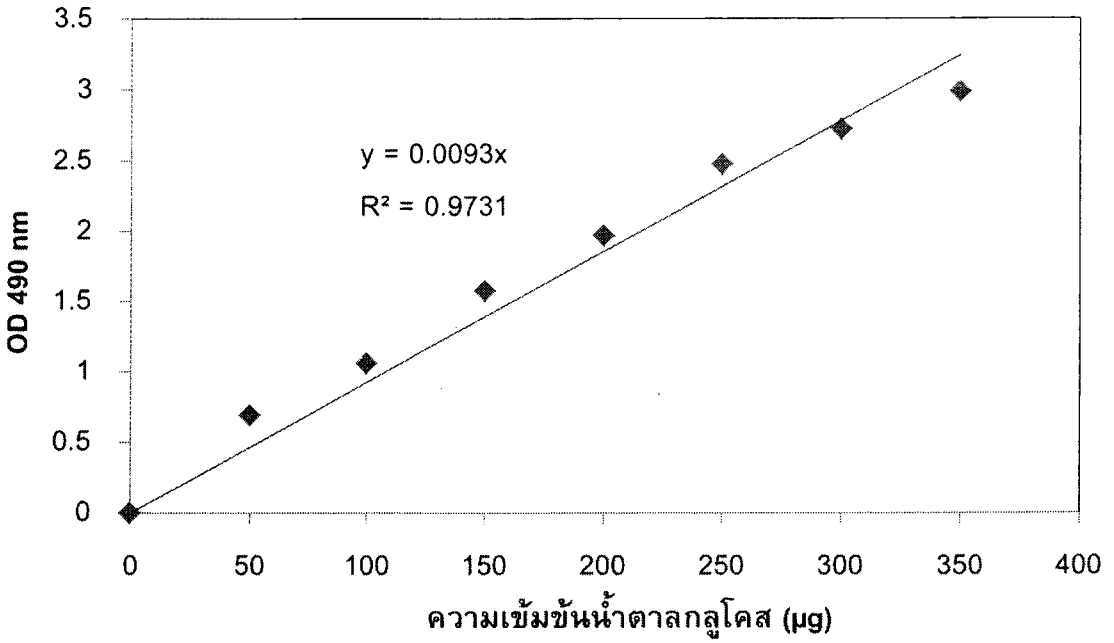
1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method (Dubois, 1956)

1.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน โดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองโดยการเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวางบนก้อนน้ำแข็ง แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

1.2 การเตรียสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวางบนก้อนน้ำแข็ง แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐาน



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

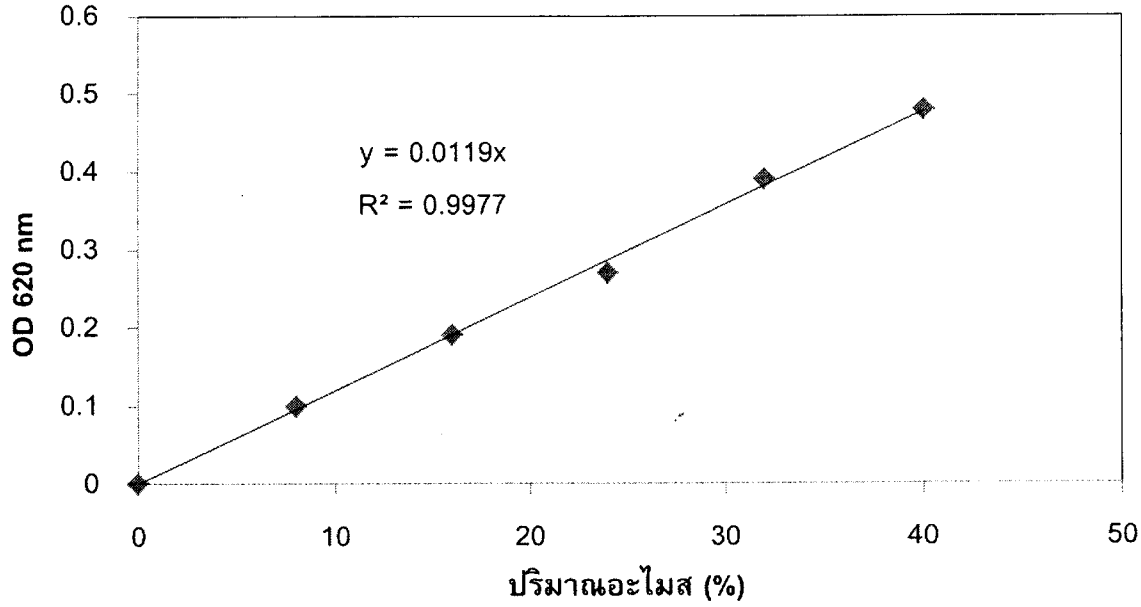
2. การวิเคราะห์หาปริมาณอะไมโลส (Juliano, 1971)

2.1 การเตรียมสารละลายอะไมโลสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายอะไมโลสมาตรฐาน โดยชั่งอะไมโลส 0.04 กรัม แล้วเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำในขวดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และกวนด้วย magnetic sterire เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเอาแท่งกวนออกล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเตรียมสารละลายอะไมโลส มาตรฐานให้มีปริมาณอะไมโลส 8, 16, 24, 32 และ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยการดูดสารละลายอะไมโลสมาตรฐาน 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 70 มิลลิลิตร กรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตรตามลำดับความเข้มข้น และเติมสารละลายไอโอดีนปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 20 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม แล้วเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำในขวดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และกวนด้วย magnetic sterire เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเอาแท่งกวนออกล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 70 มิลลิลิตร กรดอะซีติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 20 นาที ส่วน blank ทำเช่นเดียวกัน โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐาน



รูปภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะไมโลสมาตรฐาน (เปอร์เซ็นต์) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง
ตารางและข้อมูลผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างในกระบวนการผลิตขนมจีนขนมจีนจากโรงงานผลิตขนมจีน 11 แหล่ง

ตัวอย่าง	การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา	การวิเคราะห์ทางเคมี	
	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (logCFU/g)	pH	ปริมาณกรดแลกติก (%)
1. ขนมจีนหลวงประทีป จ. สงขลา			
ข้าวหมัก	8.12	3.38	0.37
น้ำแป้ง	7.81	3.42	0.30
แป้งนอนน้ำ	8.42	2.74	0.54
แป้งทับน้ำ	8.59	2.84	0.58
2.แป้งขนมจีน จ.นครศรีธรรมราช			
ข้าวหมัก	8.36	3.47	0.45
แป้งนอนน้ำ	8.12	3.41	0.35
แป้งทับน้ำ	8.83	2.69	0.59
3. ขนมจีนแม่เขียว จ.พัทลุง			
ข้าวหมัก	7.71	3.61	0.33
แป้งนอนน้ำ	7.36	3.68	0.37
แป้งทับน้ำ	9.11	3.39	0.45
4. ขนมจีนคุณเสรี จ.พัทลุง			
แป้งทับน้ำ	8.89	3.00	0.38
5. ขนมจีนคุณมาลี จ.พระนครศรีอยุธยา			
ข้าวหมัก	8.48	3.51	0.32
กากแป้งนอนน้ำ	8.47	3.26	0.37
แป้งนอนน้ำ	9.33	2.80	0.58
แป้งทับน้ำ	8.77	2.77	0.52
แป้งนวด	7.60	3.18	0.56

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา	การวิเคราะห์ทางเคมี	
	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (logCFU/g)	pH	ปริมาณกรดแลกติก (%)
6. ขนมจีนควนขนุน 1 จ.พัทลุง			
แป้งทับน้ำ	8.07	3.09	0.59
7. ขนมจีนควนขนุน 2 จ.พัทลุง			
แป้งทับน้ำ	8.40	2.88	0.39
8. ขนมจีนมโนราห์ จ.พัทลุง			
ข้าวหมัก	7.47	3.65	0.38
แป้งทับน้ำ	8.37	3.12	0.52
9. ขนมจีนแม่จิตต์ จ.พัทลุง			
ข้าวหมัก	8.36	3.48	0.45
แป้งทับน้ำ	8.95	3.22	0.48
10. ขนมจีนแม่หวน จ.สงขลา			
ข้าวหมัก	8.38	3.62	0.49
แป้งทับน้ำ	8.96	3.89	0.54
11. ขนมจีนคุณทองคูณ จ.พระนครศรีอยุธยา			
ข้าวหมัก	8.41	3.58	0.73
น้ำแป้ง	8.09	3.99	0.48
แป้งนอนน้ำ	8.20	3.66	0.54
แป้งทับน้ำ	9.37	2.66	0.85
แป้งนวด	7.56	3.17	0.76

ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระบวนการผลิตขนมจีนด้วยวิธี agar spot assay

ไอโซเลต	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	L. sake TISTR 911	*L. curvatus* TISTR 938	*S. aureus* TISTR 029	*B. cereus* TISTR 687	*E. coli* TISTR 780
FR0108	-	-	-	2.10	-
FR0109	-	-	-	0.90	-
FR0112	-	-	-	2.50	-
DWS0101	-	-	-	1.20	-
DWS0102	-	-	-	0.90	-
SRS0206	-	-	-	1.70	-
SRS0208	-	-	-	1.70	-
DWS0202	-	-	-	3.20	-
FR0305	-	-	-	1.40	-
DWS0403	-	-	3.70	3.10	-
DWS0405	-	-	3.80	-	-
FR0512	-	-	5.35	4.28	-
FR0513	-	-	5.80	-	-
DWS0503	-	-	4.60	-	-
DWS0607	-	-	-	2.40	-
DWS0608	-	-	-	1.85	-
DWS0610	-	-	-	-	1.70
DWS0611	-	-	-	1.85	-
DWS0618	-	-	-	-	2.47
DWS0620	-	-	-	-	2.45
DWS0621	-	-	2.30	-	1.50
DWS0625	-	-	-	0.95	1.60
DWS0628	-	-	-	-	1.55
DWS0629	-	-	-	-	1.60
DWS0632	-	-	-	-	2.30
DWS0711	-	-	-	-	1.85

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	L. sake **TISTR 911**	***L. curvatus*** **TISTR 938**	***S. aureus*** **TISTR 029**	***B. cereus*** **TISTR 687**	***E. coli*** **TISTR 780**
FR0801	-	-	-	-	1.85
FR0802	-	-	-	-	1.45
FR0806	-	-	-	-	1.45
FR0807	-	-	-	-	2.00
FR0810	-	-	-	-	2.65
FR0811	-	-	-	-	2.15
FR0813	-	-	-	-	2.00
FR0816	-	-	-	-	1.43
DWS0802	-	-	-	-	1.65
DWS0803	-	1.90	-	-	2.30
DWS0815	-	-	-	-	1.75
DWS0819	-	-	-	-	1.55
DWS0820	-	-	4.15	-	2.15
DWS0822	0.95	-	-	-	1.50
FR0901	1.30	-	-	-	2.20
FR0904	2.95	-	-	-	2.60
DWS0906	-	-	4.35	-	2.86
DWS0909	2.55	-	-	-	1.65
DWS0911	-	-	-	-	5.20
DWS1001	-	-	-	-	2.15
DWS1006	-	-	-	2.0	1.05
DWS1015	-	-	-	1.85	-
FR1114	-	-	-	1.35	-
LRS1108	-	-	-	1.20	-
LRS1112	-	-	-	1.55	-
SRS1108	-	-	-	3.60	-
DWS1101	-	-	2.75	-	-

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลต	วงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	L. sake TISTR 911	*L. curvatus* TISTR 938	*S. aureus* TISTR 029	*B. cereus* TISTR 687	*E. coli* TISTR 780
DWS1102	-	-	2.65	-	-
DWS1104	-	-	2.15	-	-

หมายเหตุ : บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร), - : ไม่มีผลการยับยั้ง
FR : ข้าวหมัก, LRS : น้ำแป้ง,
SRS : แป้งนอนน้ำ, DWS : แป้งทับน้ำ,

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric total sugar method ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในอาหาร GYP ที่เติมแป้งข้าวเจ้า 10 เปอร์เซ็นต์ในรูปผงแทนน้ำตาลกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาต่าง ๆ (ไมโครกรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
FR0106	442	672	693	903	954
FR0115	448	691	790	888	948
FR0116	461	720	807	960	980
SRS0115	474	714	759	891	900
FR0307	436	690	801	1,008	1,011
SRS0317	462	723	732	894	1,020
DWS0310	594	753	801	957	1,023
DWS0311	668	744	756	1,020	1,023
DWS0403	1,048	1,283	1,492	1,649	1,731
DWS0404	560	711	771	987	999
DWS0405	870	1,053	1,286	1,492	1,554
DWS0413	456	756	813	1,017	1,020
DWS0430	500	756	759	948	1,167
DWS0438	384	418	436	460	653

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาต่าง ๆ (ไมโครกรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
DWS0439	289	360	418	453	769
FR0501	433	471	871	1,156	1,964
FR0502	480	484	640	1,236	1,813
FR0508	364	509	596	1,173	1,267
FR0511	1,644	602	587	362	389
FR0512	1,213	1,831	2,062	2,151	2,667
FR0513	1,084	1,363	1,585	1,738	1,924
FR0514	502	593	902	1,911	2,080
FR0516	1,922	551	309	364	260
SRS0502	1,262	250	360	382	418
SRS0513	593	879	902	543	478
SRS0502	1,262	250	360	382	418
SRS0513	593	879	902	543	478
DWS0439	289	360	418	453	769
FR0501	433	471	871	1,156	1,964
FR0502	480	484	640	1,236	1,813
FR0508	364	509	596	1,173	1,267
FR0511	1,644	602	587	362	389
FR0512	1,213	1,831	2,062	2,151	2,667
FR0513	1,084	1,363	1,585	1,738	1,924
FR0514	502	593	902	1,911	2,080
FR0516	1,922	551	309	364	260
SRS0514	2,595	384	351	429	270
DWS0501	1,964	1,511	259	500	396
DWS0502	2,533	1,111	520	491	400
DWS0503	1,342	954	364	387	398
DWS0506	1,191	858	358	387	380
DWS0512	1,653	378	351	356	369

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาต่าง ๆ (ไมโครกรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
DWS0520	2,578	724	531	487	420
KS0501	1,724	502	424	411	371
KS0507	978	542	364	362	311
KS0510	1,680	747	404	440	451
FR0801	1,276	544	520	496	411
FR0802	1,437	568	542	498	473
DWS0805	524	591	1,058	1,298	1,404
DWS0807	518	560	1,089	1,893	2,027
DWS0808	1,520	1,236	529	538	544
DWS0815	622	573	760	782	997
DWS0816	564	573	796	818	1,022
DWS0906	553	551	813	858	1,031
DWS0911	1,067	1,331	1,835	2,057	2,329
DWS0912	636	907	929	933	1,067
DWS1015	547	982	1,013	1,040	1,133
FR1102	558	800	827	840	867
FR1103	576	1,053	1,067	1,076	1,288
FR1104	556	929	1,000	1,044	1,138
FR1105	529	569	924	944	969
FR1106	533	1,020	1,061	1,151	1,297
FR1107	529	550	987	1,001	1,015
FR1110	536	536	896	907	1,013
FR1111	547	530	574	911	982
FR1112	536	532	556	1,040	1,226
FR1113	552	548	565	880	1,019
LRS1101	458	1,001	1,022	1,060	1,076
LRS1110	905	992	1,008	1,035	1,080
SRS1104	940	1,037	1,061	1,058	1,133

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เวลาต่าง ๆ (ไมโครกรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	**12 ชั่วโมง**	**24 ชั่วโมง**	**36 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
SRS1108	1,006	1,285	1,585	1,984	2,072
SRS1110	674	890	886	882	850
DWS1110	889	1,031	1,063	1,050	1,080
DWS1111	850	1,004	1,055	1,064	1,089
DWS1112	858	1,004	1,014	1,023	1,057
DWS1114	776	869	868	930	996
KS1102	588	699	630	602	653
KS1103	850	923	974	990	1,015
KS1105	995	1,012	1,013	1,031	1,044
KS1106	906	1,016	1,028	1,026	1,058
KS1107	958	976	1,034	1,050	1,067
KS1108	974	1,057	1,062	1,077	1,113
KS1111	908	956	993	1,009	1,028
KS1113	609	1004	1,057	1,078	1,088

หมายเหตุ : FR : ข้าวหมัก, LRS : น้ำแป้ง, SRS : แป้งนอนน้ำ,
DWS : แป้งทับน้ำ, KS : แป้งนวด
< 1,000 µg/ml : การย่อยแป้งดิบต่ำ,
1,001-1,500 µg/ml : การย่อยแป้งดิบปานกลาง
1,501-2,000 µg/ml : การย่อยแป้งดิบดี
> 2,001 µg/ml : การย่อยแป้งดิบดีมาก

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (logCFU/g)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	3.71±0.02	6.73±0.01	6.75±0.01	6.77±0.02
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	7.96±0.04	8.95±0.04	8.43±0.02	8.88±0.04
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	8.88±0.05	9.07±0.02	8.84±0.06	8.88±0.08
แป้งนอนน้ำ	8.08±0.02	8.35±0.01	8.25±0.043	8.03±0.06
แป้งทับน้ำ	8.36±0.05	8.84±0.03	8.45±0.04	8.45±0.001
เส้นขนมจีน	3.12±0.01	1.96±0.10	2.04±0.07	2.62±0.01

ตารางผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	3.76±0.01	6.75±0.10	6.78±0.04	6.85±0.01
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	9.29±0.02	8.47±0.03	7.92±0.02	8.84±0.03
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	9.43±0.03	8.76±0.07	8.96±0.07	8.92±0.03
แป้งนอนน้ำ	8.09±0.05	8.25±0.04	8.35±0.06	8.03±0.07
แป้งทับน้ำ	8.43±0.01	8.46±0.01	7.78±0.06	8.45±0.01
เส้นขนมจีน	4.10±0.00	2.04±0.07	2.19±0.03	2.46±0.02

ตารางผนวกที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา* ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณยีสต์และรา * (logCFU/g)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	2.05±0.13	1.98±0.09	2.03±0.02	1.93±0.13
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	3.31±0.07	2.11±0.10	2.74±0.13	2.47±0.05
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	3.41±0.03	4.65±0.09	5.75±0.07	4.91±0.04
แป้งนอนน้ำ	4.91±0.04	5.36±0.05	5.66±0.01	5.5±0.09
แป้งทับน้ำ	4.29±0.19	5.62±0.01	5.77±0.08	5.92±0.06
เส้นขนมจีน	-	-	-	-

หมายเหตุ : * : ตรวจพบยีสต์แต่ไม่พบรา - : ตรวจไม่พบ

ตารางผนวกที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแลกติก (เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000	0.01±0.000
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	0.07±0.003	0.29±0.005	0.25±0.003	0.27±0.000
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	0.22±0.013	0.35±0.008	0.33±0.005	0.32±0.005
แป้งนอนน้ำ	0.29±0.014	0.40±0.000	0.39±0.005	0.41±0.000
แป้งทับน้ำ	0.33±0.014	0.50±0.000	0.42±0.009	0.46±0.008
เส้นขนมจีน	0.04±0.005	0.08±0.005	0.06±0.003	0.07±0.000

ตารางผนวกที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	pH			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	6.39±0.09	6.41±0.15	6.43±0.17	6.45±0.19
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	6.21±0.06	3.5±0.01	4.75±0.05	3.68±0.03
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	4.38±0.01	3.45±0.01	4.15±0.03	3.60±0.01
แป้งนอนน้ำ	4.15±0.01	3.37±0.01	3.68±0.01	3.55±0.02
แป้งทับน้ำ	3.53±0.05	3.31±0.01	3.53±0.03	3.41±0.01
เส้นขนมจีน	4.63±0.02	4.53±0.05	4.55±0.02	4.52±0.04

ตารางผนวกที่ 9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนที่การผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณอะไมโลส (เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	17.24±0.10	17.15±0.10	17.03±0.69	17.12±0.67
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	19.70±0.19	20.67±0.19	20.33±0.17	21.73±0.04
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	23.73±0.28	27.7±0.27	27.18±0.26	29.45±0.45
แป้งนอนน้ำ	27.52±0.70	29.76±0.70	28.00±0.09	30.73±0.09
แป้งทับน้ำ	28.3±0.10	32.15±0.10	29.73±0.09	33.09±0.32
เส้นขนมจีน	31.42±0.14	33.52±0.14	31.03±0.32	33.94±0.14

ตารางผนวกที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนที่การผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)			
	ชุดควบคุม	*L. plantarum* DWS0403	*L. pentosus* DWS0906	*L. paraplantarum* DWS0911
ข้าวหมัก 0 ชั่วโมง	31.15 ±0.34	32.90±0.21	30.19±0.29	32.06±0.25
ข้าวหมัก 24 ชั่วโมง	29.26±0.05	28.10±0.23	28.88±0.60	29.65±0.74
ข้าวหมัก 48 ชั่วโมง	28.92±0.10	28.84±0.41	28.78±0.49	27.91±0.11
แป้งนอนน้ำ	46.33±0.54	52.56±0.43	51.94±0.21	53.94±0.13
แป้งทับน้ำ	42.64±0.40	43.88±0.71	44.57±0.19	43.54±0.01
เส้นขนมจีน	75.46±0.49	72.26±0.68	71.67±0.80	72.54±0.23

ตารางภาคผนวกที่ 11 การตรวจวัดความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	569307.981	189769.327	51.601	0.000
Error	8	29421.057	3677.632		
Total	11	598729.038			

ตารางภาคผนวกที่ 12 การตรวจวัดค่าสี (ค่า L*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	73.356	24.452	24.508	0.000
Error	8	7.982	0.998		
Total	11	81.338			

ตารางภาคผนวกที่ 13 การตรวจวัดค่าสี (ค่า a*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	4.259	1.420	7744.409	0.000
Error	8	0.001	0.000		
Total	11	4.261			

ตารางภาคผนวกที่ 14 การตรวจวัดค่าสี (ค่า b*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	44.868	14.956	43773.301	0.000
Error	8	0.003	0.000		
Total	11	44.870			

ตารางภาคผนวกที่ 15 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของสีเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	60.447	20.149	25.413	0.000
Error	116	101.485	0.793		
Total	119	161.932			

ตารางภาคผนวกที่ 16 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของกลิ่นเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	8.568	2.856	2.694	0.049
Error	116	135.697	1.060		
Total	119	144.265			

ตารางภาคผนวกที่ 17 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของรสชาติเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	17.687	5.896	7.085	0.000
Error	116	106.515	0.832		
Total	119	124.203			

ตารางภาคผนวกที่ 18 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของเนื้อสัมผัสเส้นขนมจีน ที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	21.233	7.078	10.019	0.000
Error	116	90.424	0.706		
Total	119	111.657			

ตารางภาคผนวกที่ 19 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของความชอบโดยรวมเส้นขนมจีนที่ได้จากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403, *L. pentosus* DWS0906 และ *L. paraplantarum* DWS0911 ในข้าว และชุดควบคุมที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	34.591	11.530	16.055	0.000
Error	116	91.924	0.718		
Total	119	126.515			

ตารางภาคผนวกที่ 20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (logCFU/g)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	2.20±0.17	1.58±0.08	6.09±0.06	5.99±0.07
หมัก 24 ชั่วโมง	7.92±0.02	7.79±0.03	8.20±0.01	8.57±0.03
หมัก 48 ชั่วโมง	8.74±0.01	8.69±0.01	8.94±0.01	8.91±0.01
แป้งนอนน้ำ	8.37±0.03	-	8.79±0.02	-
แป้งทับน้ำ	8.54±0.02	8.50±0.02	9.29±0.02	8.80±0.04
เส้นขนมจีน	1.42±0.10	1.36±0.10	1.10±0.17	1.16±0.28

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในขั้นตอนการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (logCFU/g)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	2.82±0.10	2.86±0.07	5.90±0.05	5.95±0.08
หมัก 24 ชั่วโมง	8.75±0.015	8.61±0.01	8.29±0.01	8.56±0.01
หมัก 48 ชั่วโมง	9.41±0.01	8.69±0.01	8.73±0.03	8.61±0.01
แป้งนอนน้ำ	8.86±0.01	-	8.24±0.01	-
แป้งทับน้ำ	8.74±0.01	8.42±0.01	8.55±0.01	8.56±0.02
เส้นขนมจีน	1.56±0.07	1.26±0.02	1.20±0.17	1.10±0.17

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 22 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และรา * ในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณยีสต์และรา * (logCFU/g)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	1.85±0.13	1.88±0.09	1.95±0.02	1.83±0.13
หมัก 24 ชั่วโมง	3.09±0.03	2.61±0.08	3.68±0.05	2.64±0.01
หมัก 48 ชั่วโมง	3.41±0.04	2.56±0.02	4.61±0.02	2.74±0.01
แป้งนอนน้ำ	4.40±0.06	-	4.61±0.09	-
แป้งทับน้ำ	4.76±0.03	3.08±0.04	5.62±0.01	4.71±0.02
เส้นขนมจีน	-	-	-	-

หมายเหตุ : * : ตรวจพบยีสต์แต่ไม่พบรา - : ตรวจไม่พบ และไม่ตรวจวิเคราะห์ขั้นตอนแป้งนอนน้ำของ SRS-CT และ SRS-0403

ตารางภาคผนวกที่ 23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดแลกติก (เปอร์เซ็นต์)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	0.05±0.000	0.05±0.000	0.05±0.001	0.05±0.000
หมัก 24 ชั่วโมง	0.08±0.008	0.06±0.004	0.26±0.013	0.25±0.008
หมัก 48 ชั่วโมง	0.27±0.013	0.24±0.006	0.39±0.006	0.36±0.005
แป้งนอนน้ำ	0.32±0.015	-	0.44±0.005	-
แป้งทับน้ำ	0.34± 0.016	0.31±0.001	0.50±0.007	0.47±0.010
เส้นขนมจีน	0.05±0.005	0.04±0.005	0.06±0.003	0.05±0.009

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าพีเอชในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	pH			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	6.29±0.20	6.01±0.01	6.17±0.01	6.04±0.06
หมัก 24 ชั่วโมง	5.93±0.09	4.76±0.20	4.17±0.01	4.42±0.07
หมัก 48 ชั่วโมง	4.81±0.01	4.32±0.16	3.96±0.01	4.05±0.19
แป้งนอนน้ำ	4.38±0.01	-	3.72±0.01	-
แป้งทับน้ำ	3.74±0.05	3.93±0.01	3.43±0.01	3.56±0.02
เส้นขนมจีน	4.05±0.02	3.96±0.05	3.91±0.01	3.87±0.01

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 25 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมโลสในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณอะไมโลส (เปอร์เซ็นต์)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	17.24±0.10	20.03±0.12	17.15±0.10	19.89±0.16
หมัก 24 ชั่วโมง	19.70±0.19	20.95±0.11	20.67±0.19	21.53±0.18
หมัก 48 ชั่วโมง	23.73±0.27	24.33±0.69	27.70±0.27	28.68±0.21
แป้งนอนน้ำ	27.52±0.70	-	29.76±0.70	-
แป้งทับน้ำ	28.30±0.10	28.73±0.16	32.15±0.10	33.94±0.28
เส้นขนมจีน	31.42±0.141	30.48±0.12	33.52±0.14	34.39±0.22

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 26 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)			
	FR-CT	SRS-CT	FR-0403	SRS-0403
หมัก 0 ชั่วโมง	27.11 ±0.34	83.12±0.65	28.91±0.21	82.46±0.55
หมัก 24 ชั่วโมง	29.25±0.05	62.84±0.67	28.10±0.02	62.69±0.66
หมัก 48 ชั่วโมง	28.92±0.10	48.05±0.21	28.84±0.41	46.58±0.16
แป้งนอนน้ำ	47.66±0.54	-	52.56±0.41	-
แป้งทับน้ำ	42.64±0.40	44.36±0.19	43.76±0.17	43.46±0.10
เส้นขนมจีน	68.91±0.32	70.05±0.45	70.19±0.19	70.15±0.18

หมายเหตุ : - : ไม่ตรวจวิเคราะห์

ตารางภาคผนวกที่ 27 การตรวจวัดความแข็งของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	705560.833	235186.944	32.627	0.000
Error	8	57667.374	7208.422		
Total	11	763228.207			

ตารางภาคผนวกที่ 28 การตรวจวัดความเหนียวของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	618.653	206.218	143.152	0.000
Error	8	11.524	1.441		
Total	11	630.177			

ตารางภาคผนวกที่ 29 การตรวจวัดความเกาะติดของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	42.9233	14.308	82.330	0.000
Error	8	1.390	0.174		
Total	11	44.313			

ตารางภาคผนวกที่ 30 การตรวจวัดค่าสี (ค่า L*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	78.392	26.131	557.800	0.000
Error	8	0.562	0.047		
Total	11	78.954			

ตารางภาคผนวกที่ 31 การตรวจวัดค่าสี (ค่า a*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	0.102	0.034	39.215	0.000
Error	8	0.010	0.001		
Total	11	0.113			

ตารางภาคผนวกที่ 32 การตรวจวัดค่าสี (ค่า b*) ของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีนโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	14.581	4.860	457.524	0.000
Error	8	0.127	0.011		
Total	11	14.708			

ตารางภาคผนวกที่ 33 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของสีเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	72.525	24.175	45.796	0.000
Error	156	82.350	0.528		
Total	159	154.875			

ตารางภาคผนวกที่ 34 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของกลิ่นเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	83.019	27.673	35.803	0.000
Error	156	120.575	0.773		
Total	159	203.594			

ตารางภาคผนวกที่ 35 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของรสชาติของเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	21.725	7.242	15.679	0.000
Error	156	72.050	0.462		
Total	159	93.775			

ตารางภาคผนวกที่ 36 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของเนื้อสัมผัสเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	12.369	4.123	6.292	0.000
Error	156	102.225	0.655		
Total	159	114.594			

ตารางภาคผนวกที่ 37 การประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA ของความชอบโดยรวมเส้นขนมจีนที่ได้จากการผลิตขนมจีน โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DWS0403 ในข้าว (FR) และน้ำแป้ง (SRS) และชุดควบคุม (CT) ที่เป็นการหมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA

	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Sig.
Treatment	3	30.506	10.169	19.231	0.000
Error	156	82.488	0.529		
Total	159	112.994			

ภาคผนวก จ
มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนขนมจีน
(มผช.500/2547)

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมขนมจีนแป้งหมักและขนมจีนแป้งสด บรรจุในภาชนะบรรจุ

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

ขนมจีน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากข้าวเจ้าหรือข้าวเจ้ากล้องที่ผ่านการหมักหรือไม่ก็ได้ นำมาโม่และทับน้ำ หรือทำจากแป้งขนมจีน อาจผสมส่วนประกอบอื่น เช่น ใบเตย ดอกอัญชัน นำไปนวด โรยเป็นเส้นในน้ำเดือด ช้อนเส้นที่สุกแล้วใส่ในน้ำเย็น นำขึ้นแล้วจับเรียงหรือทำเป็นรูปร่างตามต้องการ

3. คุณลักษณะที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป ในภาชนะบรรจุเดียวกันต้องจับเรียงหรือทำให้มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกัน อาจมีเส้นขาดได้บ้างเล็กน้อย

3.2 สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ และสม่ำเสมอ

3.3 กลิ่น ต้องไม่มีกลิ่นอับหรือกลิ่นเหม็นบูด

3.4 กลิ่นรส ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของขนมจีน ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์

3.5 ลักษณะเนื้อสัมผัส ต้องนุ่มเหนียว ไม่เละ

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 8.1 แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไมjมีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

3.6 สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด เศษไม้ ชิ้นส่วนหรือปฏิกูลจากสัตว์

3.7 วัตถุเจือปนอาหาร หากมีการใช้วัตถุกันเสีย สารฟอกขาว และสารทำให้ข้น ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

3.8 ความเป็นกรด-ด่าง

3.8.1 ขนมจีนแป้งหมัก ต้องอยู่ระหว่าง 3.0 -4.5

3.8.2 ขนมจีนแป้งสด ต้องอยู่ระหว่าง 4.0-6.0

3.9 จุลินทรีย์

3.9.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน $1x10^6$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.9.2 *Staphylococcus aureus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.9.3 *Bacillus cereus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.9.4 *Escherichia coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

4 สุขลักษณะในการทำขนมจีน

4.1 สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

4.1.1 สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ทำเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดยสถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบต้องสะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะ และสกปรก อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า ควัน มากผิดปกติ ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

4.1.2 อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบ และก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดยพื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ พื้นที่ปฏิบัติงานไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

4.2 เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ในการทำ

ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ทำจากวัสดุมีผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

4.3 การควบคุมกระบวนการทำ

วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้ การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง ให้มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

4.4 การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ มีวิธีการป้องกัน และกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่ผลิตภัณฑ์ สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัด

สัตว์นำเชื้อ และแมลง ใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

4.5 บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน หลังการใช้ห้องสุขา และเมื่อมือสกปรก

5 การบรรจุ

5.1 ให้บรรจุขนมจีนในภาชนะบรรจุที่เหมาะสมที่ไม่ได้ทำด้วยไม้ สะอาด แห้ง และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

5.2 น้ำหนักสุทธิของขนมจีนในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

6 เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ที่ภาชนะบรรจุขนมจีนทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

6.1.1 ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น ขนมจีนแป้งหมัก ขนมจีนแป้งสด

6.1.2 ชนิดและปริมาณวัตถุเจือปนอาหาร (ถ้ามี)

6.1.3 น้ำหนักสุทธิ

6.1.4 วัน เดือน ปี ที่ทำ และวัน เดือน ปี ที่หมดอายุ หรือข้อความว่า "ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)"

6.1.5 ข้อแนะนำในการเก็บรักษา

6.1.6 ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ขนมจีนที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำโดยกรรมวิธีเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน

7.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

7.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วย

ภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.7, 5 และ 6 จึงจะถือว่าขนมจีนรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่น กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส ให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ 7.2.1 แล้ว จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.1-3.5 จึงจะถือว่าขนมจีนรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุเจือปนอาหารและความเป็นกรด-ด่าง ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เพื่อทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 500 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มีน้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.7 และ 3.8 จึงจะถือว่าขนมจีนรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบจุลินทรีย์ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุเพื่อทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 500 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มีน้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.9 จึงจะถือว่าขนมจีนรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างขนมจีนต้องเป็นไปตามข้อ 7.2.1, 7.2.2, 7.2.3 และ 7.2.4 ทุกข้อ จึงจะถือว่าขนมจีนรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

8 การทดสอบ

8.1 การทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่น กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส

8.1.1 ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบขนมจีนอย่างน้อย 5 คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

8.1.2 วางตัวอย่างขนมจีนวางลงบนจานกระเบื้องสีขาว ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจและชิม

8.1.3 หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ 1 มผช.500/2547

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การให้คะแนน (ข้อ 8.1.3)

ลักษณะที่ตรวจ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสินใจ (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	ในภาชนะบรรจุเดียวกันต้องจับเรียงหรือทำให้มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกัน อาจมีเส้นขาดได้บ้างเล็กน้อย	4	3	2	1
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้และสม่ำเสมอ	4	3	2	1
กลิ่น	ต้องไม่มีกลิ่นอับหรือกลิ่นเหม็นบูด	4	3	2	1
กลิ่นรส	ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของขนมจีนปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์	4	3	2	1
ลักษณะเนื้อสัมผัส	ต้องนุ่ม เหนียว ไม่เละ	4	3	2	1

8.2 การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ตรวจพินิจ

8.3 การทดสอบวัตถุเจือปนอาหารและความเป็นกรด-ด่าง ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

8.4 การทดสอบจุลินทรีย์ ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

8.5 การทดสอบน้ำหนักสุทธิ ให้ใช้เครื่องชั่งที่เหมาะสม

ภาคผนวก ฉ

การแปลผลค่า Most Probable Number

ตารางภาคผนวกที่ 38 การแปลผลค่า Most Probable Number (MPN: เอ็มพีเอ็น) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากสามหลอดทดลอง			MPN/g	ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	
0.1	0.01	0.001		ต่ำกว่า	สูงกว่า
0	0	0	<3	-	9.5
0	0	1	3	0.15	9.6
0	1	0	3	0.15	11
0	1	1	6.1	1.2	18
0	2	0	6.2	1.2	18
0	3	0	9.4	3.6	38
1	0	0	3.6	0.17	18
1	0	1	7.2	1.3	18
1	0	2	11	3.6	38
1	1	0	7.4	1.3	20
1	1	1	11	3.6	38
1	2	0	11	3.6	42
1	2	1	15	4.5	42
1	3	0	16	4.5	42
2	0	0	9.2	1.4	38
2	0	1	14	3.6	42
2	0	2	20	4.5	42
2	1	0	15	3.7	42
2	1	1	20	4.5	42
2	1	2	27	8.7	94
2	2	0	21	4.5	42
2	2	1	28	8.7	94
2	2	2	35	8.7	94

ตารางภาคผนวกที่ 38 (ต่อ)

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกจากสามหลอดทดลอง			MPN/g	ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	
0.1	0.01	0.001		ต่ำกว่า	สูงกว่า
2	3	0	29	8.7	94
2	3	1	36	8.7	94
3	0	0	23	4.6	94
3	0	1	38	8.7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1,000
3	3	0	240	42	1,000
3	3	1	460	90	2,000
3	3	2	1100	180	4,100
3	3	3	>1100	420	-

ภาคผนวก ช

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

นักศึกษา ☐ ป.ตรี ☐ ป.โท ☐ ป.เอก ☐ อื่นๆ .....

เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง อายุ.....วันที่ทดสอบ.....

ชื่อผลิตภัณฑ์ ขนมจีน

คำชี้แจง โปรดทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้ และให้ระดับความชอบ และไม่ชอบต่อผลิตภัณฑ์แต่ละตัวอย่าง ใช้ระดับที่เหมาะสมเพื่อแสดงถึงความรู้สึกชอบ และไม่ชอบต่อตัวอย่าง

ท่านเป็นผู้ทดสอบผู้หนึ่งที่สามารถบอกว่าท่านชอบผลิตภัณฑ์ใด ในระดับความชอบอย่างไร การแสดงความรู้สึกของท่านอย่างแท้จริงจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทดลองครั้งนี้

ระดับคะแนน 1 ไม่ชอบ

ระดับคะแนน 2 พอใช้

ระดับคะแนน 3 ชอบปานกลาง

ระดับคะแนน 4 ชอบมาก

ระดับคะแนน 5 ชอบมากที่สุด

ลักษณะผลิตภัณฑ์	รหัสผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง			
	.....	.....	.....	.....
สี				
กลิ่น				
รสชาติ				
เนื้อสัมผัส				
ความยอมรับรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

.....

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวชลธิชา เลี่ยมดำ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310220103

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2554

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ชลธิชา เลี่ยมดำ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, ณัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์ และปรียานุช บวรเรืองโรจน์. 2555. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักขนมจีน. การประชุมวิชาการครั้งที่ 50. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน. 31 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2555.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล นางวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล
ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
90112

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
2522	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์
2524	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล นายณัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7
หน่วยงานที่สังกัด แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี อ. เมือง จ. ปัตตานี 94000

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
2529	ตรี	วท.บ.	อุตสาหกรรมเกษตร	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
2534	โท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

วิศวกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Aquacultural Engineering)
การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor Design)
เทคโนโลยีชีวภาพสาหร่าย (Algal Biotechnology)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล นางปรียานุช บวรเรืองโรจน์
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
2529	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	ม. รามคำแหง
2534	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา	ม. เกษตรศาสตร์
2548	เอก	วท.ด	เทคโนโลยีชีวภาพ	ม. เกษตรศาสตร์

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (Industrial Microbiology)
เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation Technology)
เทคโนโลยีเอนไซม์ (Enzyme Technology)
เทคโนโลยีชีวภาพของอาหาร (Food Biotechnology)