ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปัง

(Study on Survival of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in Bakery Product)

โดย

นางสาวชัญลักษณ์ สิทธิ รหัส 39044418

นายเอกชัย น้อยผา รหัส 39044464

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 21/3/43 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

( )

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

..... มท

( ) ธ 454 ก

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร 2542

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16646

การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปัง

(Study on Survival of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in Bakery Product)

นางสาวธัญลักษณ์ สิทธิ รหัส 39044418

นายเอกชัย น้อยผา รหัส 39044464

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ปฟ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปน54ก)เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

2542 พ.ศ. 2542

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขทะเบียน 99564

วัน.เดือน,ปี 16 Jun 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธัญลักษณ์ สิทธิ และเอกชัย น้อยผา . 2542 : การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปัง (Study on Survival of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in Bread) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์

ขนมปังต่างๆในปัจจุบันมีอยู่หลายประเภทซึ่งสามารถแบ่งประเภทได้ตามปริมาณไขมันที่ใช้ ซึ่งกรรมวิธีการผลิตขนมปังแต่ละประเภทก็มีลักษณะคล้ายกัน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการผลิตได้แก่ เชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งอาจปนเปื้อนในแป้งที่เป็นวัตถุดิบ ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* อาจปนเปื้อนในระหว่างการผลิต ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้องและสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ในขนมปัง โดยการ inoculate เชื้อ *B. cereus* ความเข้มข้นประมาณ 10^5 cfu/g และเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^4 cfu/g ในแป้งโด แล้วนำมาหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-2 ½ ชั่วโมง และนำมาอบที่อุณหภูมิ 350 องศาฟาเรนไฮด์ เป็นเวลา 25-30 นาที แล้วนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในแป้งโดภายหลังการหมักและภายหลังการอบ จากการทดลองผลที่ได้ภายหลังการหมักแป้งโดมีจำนวน MPN ของเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* > 1.1×10^3 และ 7.1×10^1 ตามลำดับ ภายหลังการอบมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอด < 7.9 และ < 3 ตามลำดับ ส่วนแป้งโดของตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ได้ inoculate เชื้อทั้ง 2 ชนิดทั้งภายหลังการหมักและการ อบ

ธัญลักษณ์ สิทธิ

.....	.....	.....
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับ นี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้จัดทำต้องขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ซึ่งกรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และช่วยกรุณาแนะนำข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ ให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆ ในระหว่างทำปัญหาพิเศษตลอดจนแก้ไขรูปเล่มของปัญหาพิเศษจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆ ท่านที่ให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุกๆ คนที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยคิดช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ ในระหว่างการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ธัญลักษณ์ สิทธิ

เอกชัย น้อยผา

14 มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญภาคผนวก	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	1
2.1 ขนมปัง	2
2.2 วิธีการผสมโด	3
2.3 การเสื่อมเสียของขนมปัง	6
2.4 จุลินทรีย์ที่สำคัญในขนมปัง	12
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	17
3.1 วัสดุอุปกรณ์	17
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ	18
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
4.1 การศึกษาจำนวนเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากการ inoculate ภายหลังการหมักโด	21
4.2 การศึกษาจำนวนเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เหลือรอดภายหลังการอบ	22
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Physical Properties of *Bacillus cereus*	13
2.	Principal Exotoxins of *Bacillus cereus*	14
3.	Properties of the Enterotoxins	16
4.	แสดงจำนวนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ในแป้งโดก่อนและหลังการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-2 ½ ชั่วโมง	21
5.	แสดงจำนวนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ในขนมปังภายหลังการอบที่อุณหภูมิ 350 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 25-30 นาที	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg-yolk Phenol Red Polymyxin Agar (MYP)	30
2.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อMannitol Solt Phenol-red Agar (MS-EY)	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

หน้า

ภาคผนวก ก. วิธีการตรวจวิเคราะเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* 26

ภาคผนวก ข. รูปแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* 30

ภาคผนวก ค. สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ขนมปังเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงในปัจจุบัน เพราะรับประทานง่ายและหาซื้อได้ทั่วไป ซึ่งในการผลิตขนมปังอาจพบเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในวัตถุดิบจำพวกแป้ง ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่มักทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการผลิต ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) และสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง อีกทั้งยังสามารถสร้างสารพิษที่ทำให้ผู้ที่บริโภคเชื้อนี้เข้าไปเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งในการผลิตขนมปังในขั้นตอนการหมักโดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-2$^{1}/_{2}$ ชั่วโมง อาจทำให้เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปัง โดยการถ่ายเชื้อในขั้นตอนการผสมแป้งโดก่อนการหมัก และทำการตรวจนับเชื้อดังกล่าวในแป้งภายหลังการหมักและการอบ ซึ่งจากการศึกษานี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการยืนยันวิธีการผลิตขนมปังว่าสามารถทำลายเชื้อดังกล่าวได้มากน้อยเพียงไร

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาจำนวนของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ที่เติมลงไปในแป้งโดภายหลังการหมัก
2. ศึกษาจำนวนเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปังภายหลังการอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ขนมปัง

ขนมปังชนิดต่างๆ ที่จะกล่าว เป็นขนมปังที่จัดอยู่ในพวกที่มีปริมาณไขมันต่ำ ไขมันปานกลาง และไขมันสูง ซึ่งจะกล่าวเป็นชนิดๆ ไปดังนี้ (จิตธนา และอรอนงค์, 2539)

2.1.1 ขนมปังฝรั่งเศส ขนมปังอิตาเลียน และขนมปังเวียนนา

ขนมปังทั้ง 3 ประเภท ทำจากโดที่มีปริมาณไขมันต่ำ ประมาณ 0-3% โดของขนมปังประเภทนี้ส่วนใหญ่จะมีส่วนผสมเหมือนกัน ต่างกันตรงที่โดของขนมปังฝรั่งเศสมีน้ำตาลหรือมอลต์เติมลงไปด้วย แป้งที่ใช้ทำขนมปังชนิดนี้จะต้องเป็นแป้งที่มีปริมาณกลูเตนสูงเพื่อที่จะสามารถทนทานต่อการหมักได้นาน ทนต่อการพักตัวและการขึ้นฟูของโดในระยะแรกของการอบ การผสมโดควรผสมให้เข้ากันดีโดยใช้เครื่องที่มีความเร็วสูง ขนมปังประเภทนี้จะมีความคงตัวต่อการชั่ง การปั้นก้อนและการปั้นรูปของขนมปังโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ

โดที่ผสมเป็นรูปแล้ว จะต้องทาผิวด้วยน้ำ แล้วจึงตัดให้เป็นรอยเฉียงขวางบนก้อนโดก่อนที่จะนำไปอบ

ขนมปังประเภทนี้จะต้องอบให้แห้งและกรอบ อย่าอบในตู้อบที่ร้อนมากเกินไป ควรให้มีไอน้ำอยู่ในตู้อบก่อนที่จะนำโดเข้าอบ และคงปล่อยให้มีไอน้ำมีอยู่ต่อไปจนกระทั่งโดขึ้นเต็มที่และเริ่มมีสีน้ำตาลที่เปลือกนอก

โดของขนมปังอิตาเลียนนี้ นอกจากทำเป็นท่อนยาวแล้ว ยังสามารถทำเป็นโรลล์ เป็นแท่ง เป็นเกลียว และเป็นรูปเขาควาย หรือรูปวงอหวนได้

อิตาเลียนโรลล์ - ชั่งโดหนัก 250-300 กรัม คลึงให้เป็นรูปยาวรี ปลายค่อนข้างแหลม ตัดบนก้อนโดเฉียงตามขวาง ห่างกันประมาณ 4 นิ้ว

ขนมปังแท่ง - ชั่งโดหนัก 20-25 กรัม แล้วม้วนให้เป็นเส้นยาวประมาณ 6 นิ้ว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ½ นิ้ว แล้วโรยด้วยงา ทิ้งไว้ให้ขึ้นแล้วจึงอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ขนมปังปอนด์หัวกะโหลก แซนด์วิช และขนมปังนม

ขนมปังเหล่านี้เป็นที่นิยมกันมากในสหรัฐอเมริกา และใช้ในการทำแซนด์วิชชนิดต่างๆ ซึ่งต่างจากโรลล์ตรงที่ขนมปังเหล่านี้ทำเป็นแท่ง โดยใช้พิมพ์ขนาดยาวแคบ เพื่อบังคับรูปร่างและปริมาตรของโดให้เสมอกันทั้ง 2 ข้าง มีเนื้อละเอียดนุ่ม ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของขนมปัง เมื่อนำมาพับทำแซนด์วิชจะให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

2.1.3 ซอฟต์โรลล์ (Soft Roll)

ซอฟต์โรลล์ทำจากโดที่มีความเข้มข้นสูง ปกติจะทำจากโดที่มีน้ำตาลและไขมันมากกว่า 2 พวกแรก ปริมาณไข่อาจเพิ่มขึ้น หรืออาจไม่ใช่ไข่ก็ได้ แป้งที่ทำซอฟต์โรลล์เป็นแป้งที่มีความแข็งปานกลาง คือกลูเตนไม่แข็งมาก โรลล์ที่อบได้จะมีรสหวาน นุ่ม และมีเนื้อละเอียด

ซอฟต์โรลล์ จะมีการพักตัวเพื่อให้ขึ้นฟูก่อนถึงขั้นสูงสุด โดยทั่วไปจะอบในถาดและทิ้งช่วงให้ห่างกันเล็กน้อยพอที่โรลล์จะติดกันหลังจากอบแล้ว ซึ่งเป็นลักษณะของโรลล์ประเภทนี้โดยเฉพาะแฮมเบเกอร์และฮอตด็อกโรลล์ สำหรับผลิตภัณฑ์อื่นที่ทำจากซอฟต์โรลล์นี้เช่น โคลเวอร์ลีฟและบัตเตอร์เฟลกโรลล์ จะอบในถาดหลุมหลังจากที่ขึ้นเต็มที่แล้ว อาจใช้ไอน้ำช่วยในการอบเพื่อให้เปลือกของโรลล์บาง และช่วยให้เกิดสีเร็วขึ้นที่เปลือก สำหรับโรลล์ที่มีชื่อปาร์เคอร์เฮาส์ มักจะอบโดยไม่มีไอน้ำ แต่จะทาผิวด้วยนมหรือเนยละลายก่อนอบ

2.2 วิธีการผสมโด

การทำขนมปังและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ยีสต์อื่นๆ มีวิธีผสมโดหลายวิธีด้วยกัน แต่ที่นิยมใช้โดยทั่วๆ ไปมีอยู่ 2 วิธี คือ

- วิธีผสมครั้งเดียว (Straight Dough Method)
- วิธีผสมสองครั้ง (Sponge and Dough Method)

ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีหลักการผสมต่างกันดังนี้

2.2.1 วิธีผสมครั้งเดียว (Straight Dough Method)

วิธีนี้เป็นการผสมส่วนผสมต่างๆ ที่ใช้ในสูตรพร้อมกัน และผสมให้ส่วนผสมเข้ากันหมดครั้งเดียว จนได้โดที่มีความเรียบเนียน และเมื่อผสมโดแล้วก็นำไปหมักเพียงครั้งเดียว สำหรับการผสมวิธีนี้จำเป็นต้องมีการไล่ลมหรือลดปริมาตรของก้อนโดเมื่อหมักไปได้ประมาณ 80% ของเวลาที่ใช้หมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมวิธีการผสมเพียงครั้งเดียวมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ชั่งตวงส่วนผสมที่ใช้ทั้งหมดในสูตร
2. ละลายยีสต์ด้วยน้ำ ถ้าใช้ยีสต์เม็ด แต่ถ้าใช้ยีสต์ผงก็คลุกไปกับแป้งโดยตรง
3. เติมเกลือ น้ำตาล ไข่ ลงในชามผสม คนให้ทั่วจนส่วนผสมเข้ากันดี
4. ถ้าใช้นมผงให้ผสมนมผงไปกับแป้ง
5. เติมสารละลายลงไป ผสมด้วยความเร็วต่ำของเครื่องผสมจนเข้ากันแต่ยังไม่จับเป็นก้อนโด
6. เติมไขมันลงไป แล้วผสมต่อด้วยความเร็วปานกลางจนกระทั่งโดมีลักษณะเรียบเนียนแห้ง และมีความยืดหยุ่น ปกติใช้เวลาประมาณ 20 ถึง 25 นาที ก้อนโดหลังจากผสมแล้ว ควรมีอุณหภูมิประมาณ 82-85 องศาฟาเรนไฮต์

เสร็จแล้วนำโดมาหมักต่ออีกประมาณ $1^{1}/_{2} - 2$ ชั่วโมง แล้วไล่ลมออก หมักต่อไปอีกประมาณครึ่งชั่วโมง หรือจนโดขยายตัวเกือบเท่าเดิมจึงนำมาตัดแบ่ง แล้วดำเนินตามขั้นตอนของการเตรียมการ

2.2.2 วิธีผสมสองครั้ง (Sponge and Dough Method)

การผสมสองครั้ง หรือการผสมแบบสปันจ์-โดนี้ มีขั้นตอนของการผสมและการหมัก 2 ครั้ง การผสมครั้งแรก เป็นการผสมแป้งส่วนหนึ่งจากแป้งทั้งหมดที่ใช้ในสูตรกับน้ำ ยีสต์ และอาหารของยีสต์ ใช้เวลาในการผสมเพียง 4-5 นาที ผสมพอให้แป้งเข้ากันกับยีสต์และน้ำ ไม่จำเป็นต้องผสมโดจนเรียบเนียนผสมเพียงเพื่อให้เกิดกลูเตนมากพอที่จะอุ้มก๊าซที่เกิดขึ้นจากการหมักได้เพียงพอ การผสมใช้อัตราเร็วของเครื่องต่ำสุด โดที่ได้จากการผสมครั้งนี้เรียกว่า "สปันจ์" นำสปันจ์ไปหมักประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือนานกว่านั้น จนส่วนบนของสปันจ์เริ่มลดตัวยุบลงมาประมาณ 1 นิ้ว การยุบตัวลงของสปันจ์นั้นมาจากการยืดตัวเต็มที่ของโครงสร้างของสปันจ์ตามแรงดันของก๊าซที่เกิดขึ้นจากการหมัก จนทนไม่ได้จึงขาดและปล่อยให้ก๊าซบางส่วนออกจากสปันจ์ สปันจ์ที่หมักได้ที่ดีนั้น โครงสร้างข้างในจะเป็นร่างแหละเอียดและแห้ง ถ้าละเอียดมากไปแสดงว่ายังหมักได้ไม่ได้ที่ หรือจะตรวจโดยการดึงส่วนของสปันจ์มาเล็กน้อยแล้วยืดดูด้วยมือ สปันจ์จะขาดง่ายและขาดอย่างเรียบร้อย โดยมีแรงต้านการดึงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ถ้ายังหมักไม่ได้ที่ เมื่อดึงจะขาดไม่เป็นระเบียบอีกทั้งยังฝืดและฝืนการดึงออก แต่ถ้าหมักนานเกินไป เมื่อดึงก้อนสปันจ์ก็จะขาดง่ายและรุ่ยไม่เป็นระเบียบเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อหมักสปันจ์ได้ที่แล้วก็นำมาเข้าเครื่องผสมอีกครั้งเป็นการผสมครั้งที่สอง โดยผสมส่วนผสมที่เหลือทั้งหมดในสูตรลงไปในสปันจ์ซึ่งได้แก่แป้งที่เหลือจากแบ่งไปทำสปันจ์ น้ำ น้ำตาล นมผง ไข่ ไขมัน และกลิ่นรสอื่นๆ ตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ทำ แล้วผสมจนเข้ากันดี ได้โดที่มีลักษณะเรียบเนียน เมื่อดึงยืดออก โดจะแผ่เป็นแผ่นบางใสแสงผ่านได้ไม่ขาดออกจากกัน ขั้นตอนนี้เรียกว่าขั้นการเป็นโด และส่วนผสมที่ได้นี้เรียก สปันจ์-โด

ปริมาณของแป้งที่แบ่งใช้ในส่วนของสปันจ์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและการผสม ถ้าใช้เครื่องผสมก็มักจะใช้แป้งในส่วนของสปันจ์ 80% ที่เหลืออีก 20% แบ่งไว้ใช้ในส่วนของโด แต่ถ้าใช้มือผสมควรใช้แป้งมากขึ้นในส่วนของสปันจ์

หลังจากผสมจนได้โดแล้ว ต้องพักโดไว้อีกระยะหนึ่ง จะนานหรือเร็วแค่ไหนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของโด เปอร์เซนต์ของแป้งที่ใช้ในโด ชนิดของแป้ง และปริมาณของส่วนผสมที่จะยับยั้งการขึ้นของโดที่ใส่ไปในส่วนผสม อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องพักโดไว้ในระยะเวลาที่เหมาะ เพื่อให้โดได้พักตัวและยืดหยุ่นพอที่จะนำไปม้วนเป็นรูปใส่ในพิมพ์ โดยทั่วๆ ไปจะพักโดไว้นานประมาณ 20-30 นาที

การผสมแบบสปันจ์-โด มีขั้นตอนการผสมดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักของแป้งที่ผสมในขั้นสปันจ์ประมาณ 80% ของน้ำหนักแป้งที่ใช้ทั้งหมดในสูตร
2. ผสมอาหารยีสต์ลงไป ถ้าจำเป็นต้องใช้
3. ตวงน้ำเพื่อใช้ในขั้นตอนของสปันจ์ประมาณ 55% ของน้ำหนักแป้งที่มีอยู่ในสปันจ์
4. ละลายยีสต์ในน้ำถ้าใช้ยีสต์เม็ด แต่ถ้าใช้ยีสต์ผงก็ผสมกับแป้งโดยตรง
5. ผสมส่วนผสมทั้งหมด โดยใช้อัตราความเร็วของเครื่องต่ำ ประมาณ 4-5 นาที อุณหภูมิของสปันจ์ควรอยู่ประมาณ 80-85 องศาฟาเรนไฮด์ แล้วหมักสปันจ์จนได้ที่
6. นำสปันจ์กลับไปผสมกับแป้ง น้ำที่เหลือจากการแบ่งไปใช้ในสปันจ์ และส่วนผสมอื่นๆ ที่ต้องการ เช่น น้ำตาล ไข่ นม ผสมต่อไปด้วยความเร็วต่ำจนสปันจ์เข้ากันดีกับส่วนผสมอื่นๆ
7. ใส่ไขมันลง แล้วต่อด้วยอัตราความเร็วของเครื่องปานกลาง จนโดเรียบแห้ง และมีความยืดหยุ่น อุณหภูมิของโดเมื่อออกจากเครื่องผสมควรอยู่ประมาณ 80-82 องศาฟาเรนไฮด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การเสื่อมเสียของขนมปัง (จิตธนา และอรอนงค์, 2539)

2.3.1 การเสื่อมเสียจากเชื้อรา

อาหารหลายชนิดที่เน่าเสียหรือเสื่อมเสียเนื่องจากเชื้อรา การเสื่อมเสียดังกล่าว มีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาไม่ดีพอ ลักษณะการเน่าเสียดังกล่าวจะเห็นได้ชัดเจนคือ เห็นมีเชื้อราอยู่ ขนมปังก็เช่นเดียวกับอาหารอื่นๆ ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ และผู้ที่ประกอบการเกี่ยวกับขนมปังจะประสบปัญหาเกี่ยวกับเชื้อรานี้เป็นประจำ ถ้าหากสุขลักษณะภายในโรงงานไม่ดีพอ

เชื้อรานอกจากจะให้โทษคือทำให้อาหารเสื่อมเสียแล้ว ยังมีเชื้อราหลายชนิดที่ให้ประโยชน์เช่น ใช้ทำยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เพนนิซิลิน หรืออาจใช้อุตสาหกรรมหมักดอง ได้แก่ เนยแข็ง เป็นต้น

1. ไมซีเลีย เป็นลักษณะคล้ายๆ เส้นไหม ขึ้นปกคลุมอยู่บนอาหาร อาจเป็นหย่อมๆ หรือแผ่เป็นวงกว้างก็ได้

2. สปอร์ เป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรามีลักษณะเป็นเม็ดกลมเล็กๆ ซึ่งเม็ดดังกล่าวมีลักษณะเบาสามารถจะปลิวไปในอากาศได้ ดังนั้นสปอร์ของเชื้อราจึงมีอยู่ทุกหนทุกแห่ง

เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่มีความชื้นต่ำ ซึ่งปริมาณความชื้นดังกล่าว พวกแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีความเป็นกรด

ขนมปังมีลักษณะที่เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่อใดก็ตามที่ขนมปังสัมผัสกับบรรยากาศ และถ้าหากความชื้นในบรรยากาศมีสูง เชื้อราก็จะเจริญเติบโตเร็วยิ่งขึ้น แต่ถ้าหากความชื้นในบรรยากาศต่ำ เชื้อราก็ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่สปอร์อาจเกาะอยู่บนผิวก้อนขนมปัง ดังนั้นขนมปังที่เก็บรักษาในสภาพที่แห้งและสะอาดก็สามารถป้องกันการเสื่อมเสียเนื่องจากเชื้อราได้

บางท่านอาจสงสัยว่าภายในแป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการทำขนมปังมีสปอร์ของเชื้อราอยู่เป็นจำนวนมาก อาจจะเป็นตัวการทำให้ขนมปังเกิดการเน่าเสียได้ สาเหตุจากวัตถุดิบที่จะทำขนมปังเกิดการเน่าเสียมีน้อยมาก เนื่องจากวัตถุดิบดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน นอกจากนั้นในขั้นตอนสุดท้ายยังต้องผ่านเตาอบที่มีอุณหภูมิสูง ไม่มีเชื้อราใดๆ สามารถทนทานได้ และเชื้อราได้ตายหมดแล้ว ดังนั้นปัญหาต่างๆ ที่ต้องคำนึงถึงคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สถานที่เก็บรักษาขนมปัง
2. เครื่องหั่นขนมปัง
3. เครื่องหีบห่อและวัสดุสำหรับหีบห่อขนมปัง

สถานที่เก็บรักษาขนมปัง

สถานที่เก็บรักษาขนมปังควรจะสะอาดมีการระบายอากาศได้ดี และถ้าห้องที่เก็บขนมปังมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิบรรยากาศด้วยยิ่งดีมากขึ้น ข้อสำคัญอากาศที่ระบายถ่ายเทนั้นควรปราศจากฝุ่นผงและอื่นๆ

เครื่องหั่นขนมปัง

ใบมีดของเครื่องหั่นขนมปังควรทำความสะอาดบ่อยๆ โดยใช้แอลกอฮอล์เช็ดให้สะอาด เพราะว่าโอกาศที่สปอร์ของเชื้อราหรืออาจจะมีสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียติดอยู่กับใบมีด จะทำให้เนื้อภายในขนมปังเน่าเสียได้

วัสดุหีบห่อ

วัสดุหีบห่อโดยทั่วไปควรจะเป็นกระดาษไขหรือพลาสติกชนิดใสห่อหุ้มขนมปัง เมื่อขนมปังหีบเรียบร้อยแล้ว ภายในห่อนั้นโดยทั่วๆ ไปจะมีความชื้นอยู่สูง ดังนั้นถ้าหากมีสปอร์ของเชื้อราหรือแบคทีเรียปะปนอนยู่ก็จะทำให้ขนมปังเน่าเสียเร็วขึ้น

วิธีการป้องกันการเน่าเสียเนื่องจากเชื้อราที่ทำกันทั่วๆ ไปก็คือ การระมัดระวังเกี่ยวกับสุขลักษณะของโรงงาน ความสะอาด และสภาพที่เก็บควรจะมีอุณหภูมิต่ำ และที่สำคัญคือ การทำให้ก้อนขนมปังเย็นลงก่อนอย่างรวดเร็วภายหลังที่ขนมปังออกจากเตาอบ

นอกจากวิธีการป้องกันดังกล่าวอาจใช้สารเคมีบางอย่างก็ได้ โดยใช้ในปริมาณที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และสารเคมีดังกล่าวลงไปนั้นไม่ได้เป็นตัวทำละลายหรือฆ่าเชื้อราเพียงแต่เป็นตัวชะลอการเน่าเสียของขนมปังได้ประมาณ 2-3 วัน

สารเคมีดังกล่าวจะให้ได้ผลดี ถ้าหากโดที่ผสมแล้วมีความเป็นกรด ความเป็นกรดของโดสามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการเพิ่มเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ลงไปประมาณ 30 วัน เกลือดังกล่าวมีประโยชน์ 2 ประการคือ

1. เป็นอาหารของเชื้อ (ยีสต์)ให้เจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น
2. เพิ่มความเป็นกรดในโด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่นิยมใช้กันและเป็นที่ยอมรับกันคือ

ชนิดของสารเคมี	ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้ใช้
1. กรดโปรปีออเนบต	300 กรัม/100 กิโลกรัม
2. แคลเซียมโปรปีออเนต	377กรัม/100 กิโลกรัม
3. โซเดียมโปรปีออเนต	399กรัม/100 กิโลกรัม

สารเคมีดังกล่าวอาจใช้น้อยกว่าปริมาณดังกล่าวก็ได้ เช่น แคลเซียมโปรปีออเนตใช้กันเพียง 200 กรัม ต่อแป้ง 100กิโลกรัม เท่านั้น เนื่องจากสารเคมีดังกล่าว ถ้าใช้มากเกินไปจะทำให้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ดังนั้นถ้าหากมีการใช้สารเคมีดังกล่าว ควรเพิ่มปริมาณของเชื้อยีสต์อีกประมาณ 1% สีของเชื้อราที่ขึ้นบนขนมปังมีหลายสี เช่น สีน้ำตาล แดง ส้ม เหลือง เขียว น้ำเงิน ชมพู ขาว และสีดำเป็นต้น

2.3.2 การเสื่อมเสียเกิดจากแบคทีเรีย

การเน่าเสียของขนมปังซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่พบทั่วๆไปเรียกว่า โรบ (Rope) การเน่าเสียนี้จะเห็นได้ชัดคือ ภายในเนื้อของขนมปังจะมีลักษณะเหนียว และสีจะเปลี่ยนไปจากเดิม นอกจากนั้นกลิ่นยังมีลักษณะคล้ายกับสับปะรดเน่า

การเน่าเสียดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากขนมปังมีเชื้อแบคทีเรียปะปนอยู่ และสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทนทานต่อความร้อนภายในเตาอบได้ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียจะเจริญเติบโตภายในขนมปังและจะทำลายพวกสารโปรตีนและสตาร์ชภายในขนมปัง ทำให้เนื้อของขนมปังเปลี่ยนสีและมีกลิ่นเน่า ระยะเวลาหลังจากขนมปังออกจากเตาอบจนเกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประมาณ 12-36 ชั่วโมง ทั้งนี้ย่อมขึ้นอยู่กับปริมาณของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนอยู่

แบคทีเรียดังกล่าว ส่วนใหญ่จะอยู่ในดิน และในบรรยากาศ ดังนั้นสาเหตุของการเน่าเสียดังกล่าวจะเกิดกับวัตถุดิบที่ไม่สะอาด

ลักษณะทางกายภาพ (Physical characteristics) ที่แสดงให้ทราบว่า ขนมปังนั้นเกิดการเน่าเสีย มีลักษณะดังนี้

1. มีกลิ่นและรสผิดปกติคล้ายๆกับสับปะรดที่สุกเกินไป
2. เนื้อภายในขนมปังจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ หรือสีดำ
3. เนื้อภายในขนมปังจะมีลักษณะเหนียว
4. สีของเปลือกนอกของขนมปังจะมีสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันเป็นที่น่ายินดีว่า ลักษณะการเน่าเสียดังกล่าวไม่ค่อยพบ แต่ถ้าหากเกิดขึ้น สามารถจะป้องกันได้ดังนี้

1. เพิ่มความเป็นกรดในโด โดยทั่วๆไปใช้สารละลายของกรดน้ำส้ม ซึ่งมีความเข้มข้น 12.5 % (ใช้ 1 กิโลกรัม ต่อแป้ง 100 กิโลกรัม) หรืออาจจะใช้โซเดียมไดแอซิเทตประมาณ 110 กรัม ต่อแป้ง 100 กิโลกรัมก็ได้

2. ในขณะผสมแป้งกับส่วนประกอบอื่นๆ ให้ลดปริมาณน้ำลงเล็กน้อย เพื่อให้โดลักษณะแข็งขึ้น

3. ลดปริมาณน้ำตาลที่ใช้ลงเล็กน้อย

4. ใช้โดที่หมักแล้วผสมลงไปเล็กน้อยเพื่อเพิ่มความเป็นกรดในโดที่ผสมใหม่ๆ

5. ลดอุณหภูมิในเตาอบลงเล็กน้อยและใช้เวลาในการอบให้นานขึ้นอีกเล็กน้อย

6. ขนมปังหลังจากออกจากเตาอบ ควรทำให้เย็นลงให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ ก่อนที่จะทำการบรรจุหีบห่อ

นอกจากนั้นก็ควรระมัดระวังรักษาความสะอาดของเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ตลอดจนคนงาน และทำความสะอาดพื้นโรงงานอยู่เสมอ การทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆและพื้นโรงงาน ทำได้โดยใช้สารละลายเจือจางของน้ำส้ม

<u>การแห้งของขนมปัง</u> (จิตธนา และอรอนงค์, 2539)

ขนมปังจะมีคุณภาพดีที่สุดหลังจากที่นำออกจากเตาอบประมาณ 2-3 ชั่วโมง ซึ่งมีลักษณะสดและนิ่ม แต่เป็นไปไม่ได้ที่ทุกคนจะหาซื้อขนมปังใหม่ๆได้ นอกจากผู้ที่อยู่ใกล้กับร้านหรือโรงงานทำขนมปังเท่านั้น ดังนั้นผู้บริโภคขนมปังส่วนใหญ่จะต้องซื้อขนมปังที่มีอายุมากกว่า 1 วัน เมื่อเป็นเช่นนี้ ผู้ประกอบกิจการในด้านนี้จะต้องคำนึงถึงคุณภาพของขนมปังเมื่อถึงมือผู้บริโภค

ขนมปังทุกชนิดจะมีลักษณะแห้ง หรืออาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์ปะปน ทำให้ขนมปังเกิดการเน่าเสียได้ เป็นความจริงที่ว่าขนมปังจะเกิดการแห้งอย่างรวดเร็ว และไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เหตุผลนี้เองทำให้ผู้ประกอบการในด้านนี้จะต้องคำนึงถึงเป็นหลัก การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการยืดอายุการเก็บของขนมปังได้ทำกันมานานแล้ว แต่ก็ยังเก็บได้ไม่นานพอ เช่น การใช้วัสดุห่อ หรือ การใส่สารเคมีบางอย่างลงในขนมปัง แต่ก็มีอายุการเก็บได้เพียง 3-4 วันเท่านั้น ด้วยเหตุผลอันนี้เอง ร้านหรือโรงงานทำขนมปังส่วนใหญ่จึงผลิตขนมปังตั้งแต่เช้าตรู่เพื่อขายให้หมดภายใน 1 วัน หรือในวันรุ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณของขนมปังที่เหลือเนื่องจากแห้งและผู้บริโภคไม่ต้องการ ต้องส่งคืนร้าน มีประมาณ 3% และอีกหลายเปอร์เซนต์ทีเดียวที่ผู้บริโภคซื้อไปแล้วไม่ได้รับประทานเนื่องจากขนมปังแห้ง ต้องโยนทิ้งหรือให้สัตว์เลี้ยงกิน

อย่างไรก็ตาม ขนมปังที่ส่งคืนไปนี้ทำให้ผู้ประกอบการจะต้องคิดหรือคำนึงเป็นอย่างมาก เนื่องจากเหตุผลทางเศรษฐกิจ เพราะถ้าหากมีการส่งคืนขนมปังมากอาจจะทำให้ดำเนินกิจการต่อไปไม่ได้ เนื่องจากขาดทุน ดังนั้นการป้องกันการเสียหายเนื่องจากขนมปังเกิดการแห้งนี้จะต้องทำอย่างระมัดระวัง

วิธีการทดสอบว่าขนมปังแห้งหรือไม่นั้นทำได้ง่าย โดยการหั่นขนมปังออก แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดเบาๆ ถ้าหากขนมปังเกิดการนิ่มแสดงว่า ขนมปังไม่แห้ง และถ้าหากกดลงไปได้เล็กน้อยแสดงว่าขนมปังแห้ง ส่วนการใช้เครื่องมือต่างๆทดสอบการแห้งของขนมปังนั้น ไม่ค่อยได้ใช้กัน แต่การค้นคว้าทดลองเกี่ยวกับการป้องกันการแห้งนั้น ยังได้ทำกันอย่างไม่หยุดยั้ง สำหรับสาเหตุที่ทำให้ขนมปังแห้งนั้น มีอยู่ 2 ประการ คือ

1. การสูญเสียความชื้นภายในก้อนขนมปัง
2. การแห้งเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมีภายในก้อนขนมปัง

<u>การสูญเสียความชื้น</u>

สารทุกชนิดเมื่อวางอยู่ในบรรยากาศจะเกิดการสูญเสียความชื้นหรือได้รับความชื้นในบรรยากาศจนกระทั่งถึงจุดสมดุล ซึ่งเราเรียกว่า ความชื้นสมดุล และที่จุดนี้เองปริมาณความชื้นทั้งหมดของสารนี้ซึ่งระเหยออกไปสู่บรรยากาศจะเท่ากับปริมาณน้ำในบรรยากาศกลั่นตัวลงบนสารนั้น สารบางอย่างก็สามารถดูดซึมน้ำในบรรยากาศได้มาก สารบางอย่างดูดซึมได้น้อย อย่างไรก็ตามสิ่งสำคัญที่มีอิทธิพลต่อสารนั้นๆก็คือ ปริมาณความชื้นในบรรยากาศ ซึ่งเรารู้จักกันทั่วไปว่าความชื้นสัมพัทธ์

โดยทั่วๆไปแล้วขนมปังที่อยู่ในสภาพดีนั้นจะมีความชื้นอย่างต่ำ 30% แต่ขนมปังที่ออกจากโรงงานจะมีความชื้นประมาณ 40-45% ขนมปังสามารถจะดูดซึมน้ำในบรรยากาศได้ ถ้าหากบรรยากาศมีความชื้นสัมพัทธ์เกิน 70% และขนมปังจะสูญเสียความชื้นไป ถ้าหากในบรรยากาศมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 70%

ดังนั้น ขนมปังมีโอกาสที่จะสูญเสียความชื้นไปมาก ผิดกับคุ้กกี้ หรือบิสกิต ซึ่งมีความชื้นประมาณ 2-3 % ซึ่งมีโอกาสจะดูดความชื้นในบรรยากาศได้มาก ขนมปังที่มีความชื้นสูงในตอนแรกโดยเฉพาะในเนื้อขนมปังนั้น สามารถจะเก็บได้หลายวัน แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าความชื้นในก้อนขนมปังนั้นสูง เพราะถ้าหากเป็นเช่นนี้แล้วจะเกิดการเน่าเสียได้เร็วขึ้นโดยเฉพาะเกิดจากเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การป้องกันหรือการยืดอายุของการแห้งนั้นมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1) ควรใส่น้ำให้มากที่สุดในขณะทำการผสมแป้ง และควรใช้แป้งชนิดโปรตีนสูง ทั้งนี้เพื่อให้การดูดซับน้ำดำเนินไปด้วยดี แต่การใส่น้ำจะต้องระวังไม่ควรจะให้มากเกินไปเพราะจะทำให้โดเหนียว แต่ถ้าหากโดเหนียวก็สามารแก้ไขได้เช่น

ก. ใช้ลมเป่าที่โดในขั้นการม้วนโดเพื่อให้ผิวนอกของโดแห้งเล็กน้อย

ข. ใช้สารเคมีบางอย่าง เช่น ฟลูออน โดยใส่สารนี้ลงบนลูกกลิ้ง ซึ่งรีดโดให้เป็นแผ่นบางๆ

การเพิ่มน้ำนับเป็นสิ่งจำเป็นดังกล่าว โดยเฉพาะการผสมโดยใช้เครื่องผสม ซึ่งการผสมเป็นไปอย่างทั่วถึง ทำให้คุณภาพของโดดีขึ้น

2) ระยะเวลาในการอบควรจะสั้น ทั้งนี้เพื่อให้แป้งภายในก้อนขนมปังเกิดการสุกและทำให้ได้ผิวของขนมปังบางๆ พยายามรักษาความชื้นภายในเตาอบให้สูงเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นภายในขนมปัง โดยปกติแล้วเวลาที่ใช้ในการอบขนมปังจะใช้เวลาประมาณ 24 นาที

3) การทำให้ขนมปังเย็นอย่างถูกต้อง เราทราบแล้วว่าขนมปังซึ่งออกจากเตาอบใหม่ๆ นั้นร้อน เมื่อกระทบกับอากาศที่เย็นกว่า ไอน้ำในขนมปังจะระเหยออกสู่บรรยากาศ การสูญเสียความชื้นจะมากหรือน้อยนั้นย่อมขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศในขณะนั้น ถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงการสูญเสียความชื้นก็น้อย แต่ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำการสูญเสียก็มาก ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยควรจะมีห้องพิเศษสำหรับทำให้ขนมปังเย็น โดยการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในห้องนั้นให้ดี ควรจะให้อากาศภายในห้องนั้นมีการหมุนเวียนอยู่เสมอ ปกติแล้วห้องที่ทำให้ขนมปังเย็นจะมีอุณหภูมิประมาณ 70 °ฟ และมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80%

<u>การแห้งเนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมี</u>

การแห้งของขนมปังซึ่งเกิดขึ้นโดยทางเคมีนั้น ในปัจจุบันก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก แต่เชื่อกันว่าการแห้งของขนมปังเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายในขนมปังอย่างช้าๆ โดยเฉพาะส่วนประกอบของแป้ง เราทราบแล้วว่าในขณะทำการอบ แป้งทั้งหมดจะเกิดการเจลาติไนซ์ คือ เป็นเจลและคุณสมบัติของเจลจะไม่เปลี่ยนแปลง ถ้าหากเก็บรักษาขนมปังที่อุณหภูมิสูงกว่า 131 °ฟ(55 °ซ) แต่ถ้าหากเก็บขนมปังต่ำกว่าอุณหภูมิดังกล่าว เจลจะเปลี่ยนคุณสมบัติเป็นแข็งขึ้น เมื่อเจลแข็งขึ้นจะขับน้ำออกจากเจล กระบวนการนี้จะเปลี่ยนไปรวดเร็วขึ้นถ้าหากอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิดังกล่าวมากๆ นอกเสียจากว่าหลังจากขนมปังออกจากเตาอบแล้ว นำไปทำให้เย็นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิต่ำกว่า 23 °ฟ (เท่ากับ-5 °ซ) การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีน้อยมากแม้ว่าจะนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 55 °ซ อีกครั้งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) ขนมปังควรจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ สูงกว่า 55 °ซ ซึ่งในทางปฏิบัติแล้วไม่เหมาะสมกับเศรษฐกิจเพราะรายจ่ายจะสูงขึ้น โดยทั่วไปแล้วขนมปังจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 °ฟ (27-32 °ซ) อีกประการหนึ่งการเก็บที่อุณหภูมิสูงๆนั้นหลีกเลี่ยงเกี่ยวกับปรากฏการณ์ที่เราเรียกว่า เกิดเหงื่อไม่ได้ ถ้าหากว่าเหตุการณ์เกิดขึ้นดังนี้แล้ว จะอันตรายยิ่งกว่าความแห้งเนื่องจากเกิดการเน่าเสียจากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อรา

2) การแช่เยือกแข็ง การป้องกันเกี่ยวกับความแห้งโดยวิธีนี้นับว่าประสบผลสำเร็จ แต่ในทางปฏิบัติโดยทั่วไปแล้ว ไม่ทำกัน เนื่องจากไม่คุ้มกับเศรษฐกิจ

3) หมักแป้ง หรือผสมโดให้ถูกต้อง ในการทำขนมปังไม่ว่าจะทำโดยวิธีใดก็แล้วแต่ ถ้าหากหมักมากหรือน้อยเกินไปแล้ว โอกาสที่จะเกิดความแห้งก็มีมากขึ้น

4) โดยการใช้สารเคมีบางอย่างเพื่อชะลอการแห้งที่จะเกิดขึ้นกับขนมปัง โดยใช้ จี.เอ็ม. เอส (กลีเซอรีลโมโนสเทียเรต) หรือ สเทียรีลทาเทรต ประมาณ 100 กรัม ต่อแป้ง 100 กิโลกรัม

2.4 จุลินทรีย์ที่สำคัญในขนมปัง

2.4.1 *Bacillus cereus* (พวงพร, 2525)

เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก เซลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.2 μm. และมีความกว้าง 3.0-5.0 μm. เป็นพวกแอโรบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-49 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.9-9.3 *Bacillus cereus* สามารถใช้ กลูโคส ฟรุคโตส และทรีฮาโลสในการเจริญเติบโต แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโตส และน้ำตาลแอลกอฮอล์บางชนิด บางสายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำตาลซูโครส ซาลิซิน มอลโตส แมนโนส กลีเซอรอล เอ็ม-อิโนซิทอล และแลคโทส สปอร์ของ *Bacillus cereus* มีค่า $D_{100°ซ}$ เท่ากับ 2.7-3.1 นาที ในนมพร่องมันเนย และเท่ากับ 8 นาทีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) *B. cereus* สร้างสารพิษที่ชื่อว่า "Exotoxin" ซึ่งมีลักษณะดังตารางที่ 2 จากการสำรวจอาหารและส่วนประกอบของอาหารหลายชนิดพบว่ามี *Bacillus cereus* ค่อนข้างสูง

ผู้บริโภคจะเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษก็ต่อเมื่อบริโภคเอาเซลแบคทีเรียเข้าไปเป็นจำนวนมาก คือประมาณ 10^7 เซลต่อกรัมสำหรับผู้ใหญ่ และในเด็กต้องบริโภคเข้าไปประมาณ 10^5 เซลต่อกรัม กลไกในการทำให้เกิดโรคเข้าใจว่าเกี่ยวข้องกับการแตกของเซลในลำไส้ และปล่อยสารพิษออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาการของโรค ตั้งแต่บริโภคไปจนเริ่มมีอาการใช้เวลาประมาณ 8-16 ชั่วโมง อาการมักไม่รุนแรง ได้แก่ ท้องเสีย ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มักจะหายเองโดยไม่ต้องรักษา และมีจำนวนมากที่ตรวจไม่พบเชื้อหรือไม่มีรายงาน

แหล่งที่พบเชื้อชนิดนี้ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นธัญพืช เช่น พืชตระกูลถั่ว ข้าว เป็นต้น และยังสามารถตรวจพบได้ในอาหารประเภทเนื้อและนม

ตารางที่ 1 Physiological Properties of *Bacillus cereus*

Property	Test parameters	Values report
Spore		
Heat resistance	$D_{95°C}$ (aqu./ PB suspn.)[a]	1.2-36.2 min[b]
	$D_{100°C}$ (aqu./PB suspn.)	1.2-8.0 min
	$D_{100°C}$ (skimmed milk)	2.7-3.1 min
	$D_{121°C}$ (vegetable oils)	17.5-30.0 min
	z-value (aqu./PB suspn.)	6.1-9.2°C
Germination temperatures	Range (laboratory media)[c]	-1-59°C
	(cooked rice)	5-50°C
Vegetative cell growth		
pH	Lower limits	4.35-4.9
	Upper limits	9.30
a_w	Minimum range	0.912-0.950
Temperature	Minimum range	5-15°C
	Maximum range	35-50°C
	Optimum range	28-35°C
Generation time	Range (laboratory media,35°C incubation)	18-27 min
	(boiled rice, 30°C incubation)	26-57 min

[a]aqu./Pb suspn. , spores in either squeous or phosphate buffer (pH 7.0) suspension.

[b]Atypical Values of 256.7 and 5122.3 min have been reported (25).

[c]Values apply to "initial-stage" germination.

ที่มา : Doyle (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 Principal Exotoxins of *Bacillus cereus*

Exotoxin (synonyms)	Properties
Diarrheal enterotoxin (Diarrheagenic factor, LRIL fluid accumulation factor, intestinonecrotic toxin, vascular permeability factor, dermonecrotic toxin, mouse lethal factor #1)	Thermolabile antigenic protein. MW ca. 38,000-46,000; pI 5.1-5.6. "Multicomponent" or subunit structure. Inactivated by proteolytic enzymes. Necrotic, lethal. Pathogenic role in foodborne illness and extraintestinal infection.
Emetic toxin/factor Vomiting toxin/factor	Highly stable. Probably a peptide. MW < 10,000. Not formed above 40°C. Resistant to proteolytic enzymes. Thermostable at 126°C for 90 min. Sporulation associated?
Primary hemolysin (Cereolysin, hemolysin I, mouse lethal factor #2)	Thermolabile antigenic protein. MW ca. 49,000-59,000; pI 6.3-6.7. Thioactivated cytolysin. Neutralized by cholesterol and antistreptolysin O. Necrotic, lethal. Pathogenic role in extraintestinal infection.
Secondary hemolysin (Hemolysin II)	Thermolabile antigenic protein. MW ca. 29,000-34,000; pI 4.9-5.3. Protease susceptible. In vitro activity unaffected by thiols. Cholesterol and antistreptolysin O. In vivo toxicity not yet established.
Phospholipase-C (Lecitinase, egg yolk turbidity factor)	Relatively stable enzyme complex : (a) phosphatidylcholine hydrolase : MW 23,000, pI ca. 6.5-8.5. (b) phosphatidylinositol hydrolase : MW 29,000, pI 5.4 (phosphatasemia factor). (c) Sphingomyelinase : Mw 24,000, pI 5.6. Hemolytic.
Exoenterotoxin described by Ezepchunk and Fluer	Thermolabile antigenic protein. MW 57,000. Inactivated by 60°C for 20 min. Lethal to rodents. I.V. administration to cats induces emesis. Possibly related to diarrheal enterotoxin.
Toxin isolate by Ezepchuk et al.	Protein. MW 100,000. Activity unaffected by trypsin. Lethal. I.V. administration to cats induces fever. LRIL fluid accumulation negative. VPR test positive. Relationship to exoenterotoxin not known.

ที่มา : Doyle (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 *Staphylococcus aureus* (ลัดดาวัลย์, 2536)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมมักเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น การเจริญในอาหารแข็งมักมีสีเหลืองทอง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.0 μm. *S. aureus* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เจริญได้ดีที่ 7.0-7.5 และเจริญได้ที่ช่วงค่าพีเอช 4.5-9.3 *S. aureus* ที่ผลิตสารพิษมักเป็นพวกที่สังเคราะห์เอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ได้ ซึ่งสารพิษนั้นเรียกว่า enterotoxigenic และจัดเป็นพวกฟาคัลเททีฟในอาหารที่มีกลูโคส แต่จะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะไร้ออกซิเจน สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือถึง 10 % *S. aureus* สามารถผลิตสารพิษได้ถึง 6 ชนิดด้วยกัน ซึ่งแยกโดยวิธีทางซีโรโลยี ได้แก่ A, B, C, D, และE (แม้ว่าเชื้อที่ให้สารพิษ C_1 และ C_2 จะแตกต่างกัน แต่ทางซีโรโลยีแล้วจะคล้ายกันจึงรวมกันเป็น C) แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร จุลินทรีย์ชนิดนี้จะสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ พีเอช และ a_w ที่กว้าง ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญและสร้างสารพิษจะอยู่ระหว่าง 4-46 องศาเซลเซียส

S. aureus พบได้ตามร่างกายคน โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นแผล เป็นหนอง ตามเยื่อบุช่องจมูก เส้นผม ผิวหนัง *S. aureus* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคได้จะมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค สร้างรงควัตถุสีเหลืออ่อน และมีคุณสมบัติเป็น coagulase-positive การเรียงตัวเป็นแบบไม่แน่นอน สามารถทำให้เกิดโรคได้หลายอย่าง เช่น การติดเชื้อที่เกิดจากแผลไฟไหม้ เป็นสาเหตุของการเกิดสิว โรค osteomyeletis และ artritis เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากสารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้ที่ติดอยู่ตามหนองฝี ของผู้ประกอบอาหาร เมื่อแบคทีเรียแปดเปื้อนลงไปในอาหารจะสามารถเจริญเติบโต และสร้างสารพิษที่เรียกว่า "enterotoxin" ซึ่งเป็นสารพิษที่ทนความร้อนสูง แม้จะต้มนานถึง 30 นาที สารพิษก็ไม่สลาย

อาการเป็นพิษจากเชื้อ *S. aureus* จะเกิดค่อนข้างเร็ว คือ เกิดขึ้นตั้งแต่ 2-6 ชั่วโมงหลังจากบริโภค แต่อาการไม่รุนแรงมาก ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดิน อาการนี้จะหายไปเองภายหลังถ่ายเอาอาหารที่มีเชื้อนี้ออกไปหมดแล้ว ในกรณีที่เกิดกับเด็กอาการเป็นพิษอาจรุนแรงมาก และอาจถึงตายได้ถ้าช่วยไม่ทัน

คนไข้ที่เป็นโรคอาหารเป็นพิษ การปฏิบัติรักษาไม่ควรให้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากตามธรรมชาติแล้ว เชื้อ *S. aureus* อาจถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ โดยจุลินทรีย์ที่เป็น normal flora ในทางเดินอาหารอยู่แล้ว ถ้าใช้ยาปฏิชีวนะจะไปทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เหล่านี้และทำให้ร่างกายเสียสมดุลย์ไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิวพร ศิวเวช. 2529. จุลินทรีย์ทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะจุลชีววิทยาการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 331 น.

ลักษณะของสารพิษ (ศิวพร, 2529)

enterotoxin ของเชื้อ *S. aureus* นั้นเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 26,000-30,000 ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดียวจับกันเป็นห่วงเรียกว่า cystine loop ด้วยแรงยึดไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโน เนื่องจากชนิดของกรดอะมิโนในห่วงนี้ของ enterotoxin แต่ละชนิดเหมือนกัน จึงเข้าใจว่าส่วนนี้น่าจะเป็นส่วนที่มีพิษของโมเลกุล enterotoxin ชนิด A และ D ทำให้เกิดโรคมากที่สุด การผลิตสารพิษจะเกิดตามหลังการเจริญของเชื้อไม่นานนัก ดังนั้นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษก็จะเป็นสภาพที่ดีที่สุดในการเจริญ การผลิตสารพิษจะทำได้ดีที่อุณหภูมิ 15.6-46.1 องศาเซลเซียส แต่ที่ดีที่สุดอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุและชนิดของอาหาร ซึ่งใช้เวลาเพียง 4-6 ชั่วโมงเท่านั้น และจะลดลงตามอุณหภูมิที่ลดลงหรือเพิ่มขึ้น enterotoxin นี้มักจะมีการสร้างขึ้นหลังจากจุลินทรีย์ชนิดนี้อยู่ประมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัมอาหาร และสามารถทนร้อนได้ดี โดยทั่วไปความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ (72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที) หรือ Ultra High Temperature (143.3 องศาเซลเซียส นาน 9 วินาที) ไม่สามารถทำลาย enterotoxin ชนิด B ทนความร้อนมากที่สุด ฉะนั้นอาหารที่มีสารพิษนี้อยู่ ถึงแม้จะทำลาย *S. aureus* หมดแล้ว ก็ยังพบว่าทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ ถ้าหากบริโภคอาหารนั้นเข้าไป

การเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ในห้องปฏิบัติการจึงนิยมเติมเกลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเติมเกลือลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 7.5 % และใส่น้ำตาลแมนนิทอลลงไปด้วย เนื่องจาก *S. aureus* สามารถสร้างเอนไซม์เลคซิติเนส (lecithinase) ที่สามารถย่อยไข่แดงได้ ดังนั้นจึงนิยมเติมไข่แดงลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เพื่อความสะดวกในการแยกเชื้อนี้ เช่น Baird-Parker, Egg yolk agar และ Mannitol salt egg yolk agar เป็นต้น

ตารางที่ 3 Properties of the Enterotoxins

Molecular weight :	26,000-29,000 daltons
Isoelectric points :	7.0-8.6
Absorbance :	Peak at 277 nm
Enzyme resistance :	Trypsin and pepsin
Monkey emetic dose Intragastric : Intravenous :	 5-20 μg/animal 0.02-0.5 μg/kg

ที่มา : Doyle (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องผสมแป้ง Kitchen Aid DIV. HOBAST
2. เตาอบ บริษัทกล้วยน้ำไทยเตาอบ
3. เครื่องชั่งน้ำหนัก
4. เครื่องปั่น (Blender)
5. พิมพ์สำหรับขนมปัง
6. แผ่นโลหะสำหรับตัดแบ่งก้อนโด
7. จานเพาะเชื้อ (plate)
8. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
9. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
10. ตู้ปลอดเชื้อ (larminar flow)
11. autoclave
12. ปิเปตขนาด 1.0 มิลลิลิตร. , 5.0 มิลลิลิตร. และ 10.0 มิลลิลิตร.
13. กระบอกปิเปต
14. กระบอกตวง (cylinder)
15. หลอดทดลองขนาดกลาง
16. บีกเกอร์
17. ขวดดูแรม (durham) ขนาด 250 มิลลิลิตร
18. ฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
19. เครื่องตีบดอาหาร (stomacher)
20. แท่งแก้วงอรูปตัว L
21. ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99560

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ

1. Buffered peptone water
2. อาหารแข็งPCA
3. อาหารแข็ง Mannitol Egg-yolk Phenol Red Polymyxin Agar
4. อาหารเหลว Nitrate
5. อาหารแข็ง Nutrient
6. อาหาร Nutrient gelatin
7. อาหาร Voges Proskauer
8. สีย้อมแกรม (Gram stain reagents)
9. อาหารเหลว Tryticase soy
10. อาหารแข็ง Mannitol Salt Phenol red ผสมไข่แดง
11. อาหารเหลวBrain heart infusion
12. พลาสม่ากระต่าย (Rabbit plasma) สำหรับทำการทดสอบเอนไซม์ coagulase

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 <u>การเตรียมโด</u>

1. ชั่งน้ำหนักส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ (คิดเป็น %)

แป้งขนมปัง	100	%
น้ำ	59	%
ยีสต์ผง	1	%
เกลือ	1.75	%
น้ำตาล	5	%
นมผงปราศจากไขมัน	4	%
เนยขาว	5	%

1. ผสมส่วนผสมต่างๆ ด้วยเครื่องผสม โดยจะผสมส่วนที่เป็นผงให้เข้ากันก่อน แล้วค่อยๆ เติมน้ำลงไป นวดจนก้อนแป้งรวมตัวกันให้มีลักษณะเรียบเนียนแห้งไม่ติดกับข้างอ่างผสมและตะขอที่ใช้ผสม จะได้เป็นก้อนโด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การเตรียมเชื้อ *Bacillus cereus*

1. เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส
3. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยนำเชื้อจากข้อ 2.1 ประมาณ 1.0 ml. inoculate ใน peptone water 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางตามลำดับ (serial dilution) หลังจากนั้นนำมา spread plate ในอาหารแข็ง MYP ตรวจนับโดยให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7cfu/ml ซึ่งเมื่อนำมา inoculate ลงในแป้งโดจะได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^5 cfu/g

3.3.3 การเตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อ *Bacillus cereus* โดยให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml ซึ่งเมื่อนำมา inoculate ลงในแป้งโดจะได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^4 cfu/g

3.3.4 การถ่ายเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ลงโด

3.3.4.1 นำโดที่ได้จากข้อ 1 มาแบ่งเป็น 3 ส่วนดังนี้

- โดส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างควบคุม ไม่มีการ inoculate เชื้อจุลินทรีย์ใดๆลงแป้งโด
- โดส่วนที่ 2 นำมา inoculate ด้วยเชื้อ *B. cereus* โดยให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อในโดประมาณ 10^5 cfu/g แล้วแบ่งโดเป็น 3 ก้อน ก้อนละประมาณ 50 กรัม
- โดส่วนที่ 3 นำมา inoculate ด้วยเชื้อ *S. aureus* โดยให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อในโดประมาณ 10^4 cfu/g แล้วแบ่งโดเป็น 3 ก้อน ก้อนละประมาณ 50 กรัม

3.3.4.2 นำโดทั้ง 3 ส่วนมาหมักเป็นเวลา 2-2$^1/_2$ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.4.2 นำมาอบที่อุณหภูมิ 350 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 25-30 นาที

3.3.5 การศึกษาจำนวนเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ภายหลังการหมักโด (AOAC, 1995) และ (BAM, 1976)

นำตัวอย่างโดจากข้อ 3.3.4.2 มาทำการตรวจหาเชื้อดังนี้

3.3.5.1 การตรวจหาเชื้อ *B. cereus* โดยวิธี MPN ในอาหาร TSB แล้วนำมา streak บนอาหาร Mannitol Egg-yolk Phenol Red Polymyxin Agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะให้โคโลนีที่มีวงขาวขุ่นทึบรอบๆ โคโลนี นำมายืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมีด้วยวิธี

- การย้อมสีแกรม เชื้อ *B. cereus*

  ผลบวก : เชื้อ *B. cereus* มีลักษณะเป็นท่อน ติดสีม่วง

- การย่อยสลายเจลาติน ทดสอบโดยอาหาร nutrient gelatin

  ผลบวก : สามารถหลอมเหลวเจลาตินได้ภายใน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส

- การรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

ผลบวก : เกิดสีเหลืองส้ม

- การทดสอบ VP

ผลบวก : เกิดสีชมพูจนถึงสีแดงสด แต่เชื้อ *B. cereus* ให้การทดสอบ VP เป็นลบ

3.3.5.2 การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี MPN ที่ใช้ 3 ระดับความเจือจาง ความเจือจางละ 3 หลอด ลงในอาหาร TSB ที่มีเกลือ NaCl 10 % บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำมา streak บนอาหารเลียงเชื้อ MS-EY agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะให้โคโลนีสีเหลืองขุ่น รอบๆ โคโลนีจะทึบแสง นำมายืนยันผลโดยการทดสอบทางชีวเคมีด้วยวิธี

- coagulase test ทดสอบโดยอาหารเหลว BHI ใส่พลาสมากระต่าย

ผลบวก : เมื่อ coagulase test ให้ผล 3(+) หรือ 4(+)

3.3.6 <u>การศึกษาจำนวนเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่เหลือรอดภายหลังการอบ</u>

นำตัวอย่างขนมปังจากข้อ 3.3.4.3 มาทำการตรวจหาเชื้อ *B. cereus* ดังเช่นข้อ 3.3.5.1 และเชื้อ *S. aureus* ดังเช่นข้อ 3.3.5.2

3.3.7 <u>การวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Completely Random Design (CRD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาจำนวนเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากการ inoculate ภายหลังการหมักโด

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ในแป้งโดก่อนและภายหลังการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-2 ½ ชั่วโมง

ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนเชื้อ (MPN/g)		
	ตัวอย่างควบคุม(ไม่มีการผสมเชื้อ)	ก่อนการหมักโด	ภายหลังการหมักโด
B. cereus	< 3	10^5 cfu/g	$>1.1x10^3$
S. aureus	< 3	10^4 cfu/g	7.1x10

จากการ inoculate เชื้อ *B. cereus* ลงในแป้งโดโดยให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^5 cfu/g และเชื้อ *S. aureus* ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^4 cfu/g ภายหลังการหมักโดเป็นเวลา 2-2 ½ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 พบว่าจำนวนเชื้อ *B. cereus* ภายหลังการหมักโดมีค่า MPN > $1.1x10^3$ ในขณะเชื้อ *S. aureus* ภายหลังการหมักโดมีค่า MPN 7.1x10 แต่ในตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ได้มีการเติมเชื้อใดๆ ลงในแป้งพบว่า จำนวนเชื้อ *B. cereus* มีค่า MPN < 3 และ เชื้อ *S. aureus* มีค่า MPN < 3 เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

4.2 การศึกษาจำนวนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ที่เหลือรอดภายหลัง การอบ

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *S. aureus* ในขนมปังภายหลังการอบที่อุณหภูมิ 350 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 25-30 นาที

ชนิดจุลินทรีย์	จำนวนเชื้อ (MPN/g) ภายหลังการอบ	
	ตัวอย่างควบคุม	ตัวอย่างที่ inoculate เชื้อ
B. cereus	< 3	< 7.9
S. aureus	< 3	< 3

จากการตรวจหาเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ในขนมปังที่ inoculate เชื้อดังกล่าวลงในแป้งโดก่อนการหมักและหลังการอบที่อุณหภูมิ 350 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 25-30 นาที ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าจำนวนเชื้อ *B. cereus* ภายหลังการอบมีค่า MPN < 7.9 แต่เชื้อ *S. aureus* มีค่า MPN < 3 ส่วนตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อใดๆ ภายหลังการอบ เชื้อ *B. cereus* มีค่า MPN < 3 และเชื้อ *S. aureus* มีค่า MPN < 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อในขนมปังที่เป็นตัวอย่างควบคุมซึ่งผ่านกระบวนการผลิตโดยการหมักแป้งที่อุณหภูมิห้อง 2-2 ½ ชั่วโมง และผ่านการอบที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 25-30 นาที จากการตรวจเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในขนมปังดังกล่าว ภายหลังการหมักและการอบพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าMPN <3 ซึ่งแสดงว่าขนมปังโดยทั่วไปมักจะไม่พบเชื้อดังกล่าว แต่จากการศึกษาโดยการเติมเชื้อ *B. cereus* ในขั้นตอนการทำโด โดยใส่เชื้อในปริมาณ 10^5 cfu/g แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาจำนวนเชื้อที่เหลือรอดภายหลังการอบ ปรากฏว่า เชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดมีปริมาณลดลงคือมีค่า MPN < 7.9 ซึ่งจากเดิมปริมาณเชื้อ *B. cereus* ภายหลังการหมักโดมีค่า MPN > 1.1×10^3 แสดงว่าความร้อนที่ใช้ในการอบขนมปังสามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* จนไม่สามารถทำให้ผู้ที่บริโภคขนมปังเข้าไปเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษได้ เนื่องจากปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษนั้นต้องมีปริมาณเชื้อ > 10^6 cfu/g เพื่อที่จะสามารถสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดโรคดังกล่าว

จากการศึกษาเชื้อ *S. aureus* โดยการเติมลงในแป้งปริมาณ 10^4 cfu/g ในขั้นตอนการทำโด ซึ่งเมื่อผ่านการอบพบว่า เชื้อ *S. aureus* ที่เหลือรอดมีค่า MPN < 3 แสดงว่าความร้อนที่ใช้ในการอบขนมปังก็สามารถทำลาย เชื้อ *S. aureus* เช่นกัน แต่ก็ควรระวังเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* จากบุคลากรที่ทำการผลิต เพราะเชื้อชนิดนี้จะอยู่บริเวณผิวหนังซึ่งสามารถปนเปื้อนได้ในทุกขั้นตอน และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. aureus* ภายหลังการหมักโดปรากฏว่า เชื้อนี้มีค่า MPN < 7.1×10 ซึ่งมีจำนวนลดลงจากจำนวนเชื้อเริ่มต้น แสดงว่า เชื้อ *S. aureus* อาจจะถูกยับยั้งหรือถูกทำลายโดยสารที่เกิดจากปฏิกิริยาของการหมัก ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ หรืออาจเนื่องจากค่า pH ที่ลดลงในโด ซึ่งผลที่ได้ดังกล่าวทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยจากโรคอาหารเป็นพิษ โดยปกติแล้วเชื้อ *S. aureus* ที่ทำให้เกิดโรคชนิดนี้ต้องมีปริมาณ > 10^6 cfu/g

ดังนั้นจากการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ในขนมปัง จึงสรุปได้ว่า ความร้อนและระยะเวลาที่ใช้ในการอบขนมปังสามารถทำลายเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ และทำให้ขนมปังปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ นัยวิกุล. 2539. เบเกอรีเทคโนโลยีเบื้องต้น.คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 224 น.

พวงพร โชติกไกร. 2525. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 335น.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลชีววิทยาทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์การอาหารและชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี. 248 น.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหารขั้นสูง. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 46 น.

ศิวพร ศิวเวช. 2529. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่. 331 น.

Association of offical Analytical Chemist. 1995. Official methods of analysis. 17th. Association of Analytical Chemists. Washington, DC.

Bacteriological Analytical manual for Foods. 1976. 4th. Food and Drug Adiministration.USA.

Doyle, M.P. 1989. Foodborne Bacterial Phatogens. Marcel Dekker, INC. New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

วิธีการตรวจวิเคราะเชื้อ *Bacillus cereus* และเชื้อ *Staphylococcus aureus*

1. เชื้อ *B. cereus* (วราวุฒิ, 2539)

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร

นำขนมปัง 25 กรัม ใส่ถุงสำหรับใส่ในเครื่องบดอาหาร(stomacher) จากนั้นเติม PW 225 มล. ตีบดเป็นเวลา 20 นาที

1.2 เจือจาง

ก. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมจากข้อ 1.1 มา 1.0 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี PW 9.0 มล. ผสมให้เข้ากันอย่างดี

ข. ทำการเจือจางต่อไป โดยใช้ปิเปตเดิมดูดตัวอย่างจากหลอดที่เจือจางหลอดแรกใส่ลงในหลอดที่มี PW 9.0 มล. และผสมให้เข้ากันอย่างดี จากนั้นจึงทำการเจือจางต่อไปลงในหลอดที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ค. เขย่าแต่ละหลอดที่เจือจางอย่างระมัดระวัง

1.3 ขั้นตอน Pre-enrichment

ปิเปตสารละลาย(ข้อ 1.1 และ 1.2)ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth(TSB) โดยใส่ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มล.

1.4 ขั้นตอน Selective

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3 ปริมาตร 0.1 มล. มากระจาย (spread) บนอาหาร MYP หรือนำมา ลาก (streak) บนอาหาร MYP เช่นกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง : ผลบวก เมื่อรอบๆ โคโลนีของ *B. cereus* เกิดสีขาวขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 การยืนยันผล (Confirmation)

ก. นำโคโลนีที่มีวงขาวขุ่นทึบโดยรอบมาย้อมสีแกรม แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเชื้อ *B. cereus* มีลักษณะเป็นท่อน (rod) ติดสีม่วง (แกรมบวก) ขนาด 3.5×(1-1.2) ไมครอน และเซลมักจะต่อเป็นลูกโซ่

ข. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีดังกล่าวลงใน nutrient agar slant แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทดสอบ

- การหลอมละลายเจลาติน โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร nutrient gelatin แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนดูผลให้นำหลอดอาหารไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจดูว่าอาหารจะแข็งเป็นเจลหรือไม่

  ผลการทดลอง : ผลบวก อาหาร nutrient gelatin จะไม่แข็งตัวเป็นเจล แสดงว่าเชื้อ *B. cereus* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาตินได้

- หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหาร VP เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำสารละลายเชื้อในอาหาร VP ปริมาณ 0.2 มล. ใส่หลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลาย creatin 2 หยด สารละลาย ethanolic naphthol solution 3 หยด และสารละลาย KOH 2 หยด เขย่าให้เข้ากันอย่างดี อ่านผลภายใน 15 นาที

- ผลการทดลอง : ผลบวก เกิดสีชมพูจนถึงสีแดงสด

1.6 สรุปลักษณะของ *B. cereus*

จากวิธีการต่างๆ พอจะสรุปได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารจะเป็นเชื้อ *B. cereus* ถ้าผลทดสอบมีลักษณะดังนี้

- เชื้อติดสีแกรมบวก
- ให้โคโลนีที่มีวงขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร *Bacillus* ที่ผสมไข่แดง
- สามารถหลอมเหลวเจลาตินได้ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- รีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์
- ให้การทดสอบ VP เป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เชื้อ *S. aureus* (วราวุฒิ, 2539)

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำขนมปัง 25 กรัม ใส่ถุงสำหรับใส่ในเครื่องบดอาหาร(stomacher) จากนั้นเติม PW 225 มล. ตีบดเป็นเวลา 20 นาที

2.2 เจือจาง

ก. ปิเปตตัวอย่างอาหารที่เตรียมจากข้อ 2.1 มา 1.0 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี PW 9.0 มล. ผสมให้เข้ากันอย่างดี

ข. ทำการเจือจางต่อไป โดยใช้ปิเปตเดิมดูดตัวอย่างจากหลอดที่เจือจางหลอดแรกใส่ลงในหลอดที่มี PW 9.0 มล. และผสมให้เข้ากันอย่างดี จากนั้นจึงทำการเจือจางต่อไปลงในหลอดที่ 3

ค. เขย่าแต่ละหลอดที่เจือจางอย่างระมัดระวัง

2.3 ขั้นตอน Pre-enrichment

ปิเปตสารละลาย(ข้อ 2.1 และ 2.2)ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth(TSB) + 10% NaCl โดยใส่ความเจือจางละ 3 หลอด หลอดละ 1 มล. แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 ขั้นตอน Selective

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3 ปริมาตร 0.1 มล. มากระจาย (spread) บนอาหาร MS-EY agar หรือนำมา ลาก (streak) บนอาหาร MS-EY agar เช่นกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง : ผลบวก เมื่อโคโลนีของ *S. aureus* จะมีสีเหลืองขุ่น อาหารรอบๆ โคโลนีจะทึบแสง

2.5 ขั้นตอนยืนยัน (Confirmation)

ก. นำโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *S. aureus* จากข้อ 2.4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. นำเชื้อจากข้อ ก. 0.5 มล.เติม พลาสม่าของกระต่าย 0.5 มล. สังเกตุการแข็งตัว (clot) ของพลาสม่าที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการแข็งตัวของพลาสม่าภายหลัง 4-6 ชั่วโมง ถ้ามีการแข็งตัวของพลาสม่าเกิดขึ้น แสดงว่าเป็น *S. aureus*

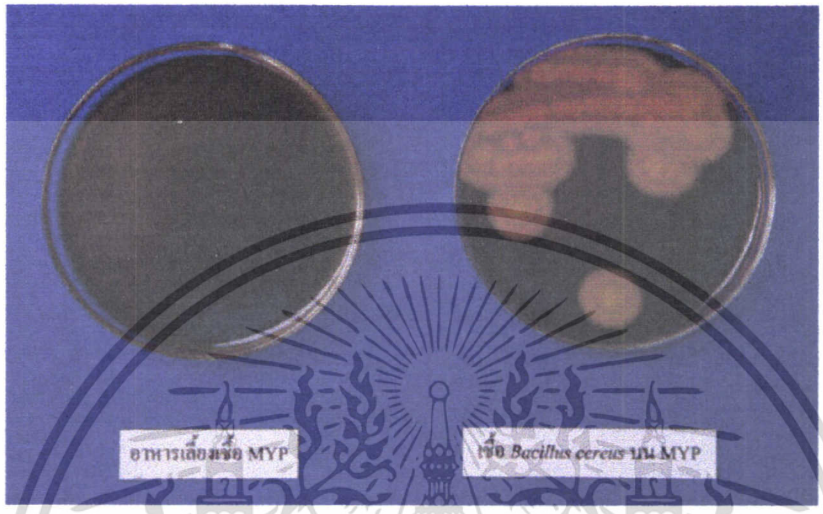
2.6 การเทียบผลโดยวิธี MPN

นำผลที่ได้จากข้อ 2.3 ที่ผ่านขั้นตอนการยืนยัน มาเปรียบเทียบกับตาราง MPN ของ *S. aureus* ตามภาคผนวก....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

รูปแสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus*



<u>รูปที่ 1</u> ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg-yolk Phenol Red Polymyxin Agar (MYP)

<u>รูปที่ 2</u> ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Solt Phenol-red Agar (MS-EY)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nitrate broth

Meat extrate	3.0	g.
Potassium nitrate	1.0	g.
Peptone	5.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ปรับ pH 7.0±0.1 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient agar

Beef extract	3.0	g.
agar	15.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient gelatin medium

Beef extract	3.0	g.
Sodium chloride	30.0	g.
Peptone	5.0	g.
Gelatin	10.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Voges-Proskauer (VP medium)

Peptone	7.0	g.
di-Potassium hydrogen phosphate	5.0	g.
Glucose	5.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ปรับ pH เท่ากับ 6.5±0.1 กรองแล้วจึงทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. 10% Sodium chloride Trypticase Soy Broth (TSB + 10% NaCl)

Pancreatic Digest of Casein	17.0	g.
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0	g.
Sodium chloride	100.0	g.
di-Basic Potassium Phosphate	2.5	g.
Glucose	2.5	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Mannitol Solt Phenol-red Agar (MS)

Peptone	10.0	g.
Meat extract	1.0	g.
Sodium chloride	75.0	g.
D(-) Mannitol	10.0	g.
Phenol red	0.025	g.
Agar	12.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. **Brain Heart Broth (BHI)**

Nutrient substrate (extracts of brain and heart and peptones)	27.5	g.
D(+) Glucose	2.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
di-Sodium hydrogen phosphate	2.5	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Egg yolk

แช่ไข่ไก่ทั้งฟองลงในแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตอกไข่เอาแต่ไข่แดง โดยวิธี aseptic ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

8. **Mannitol Egg-yolk Phenol Red Polymyxin Agar**

Peptone	10.0	g.
Meat extract	1.0	g.
D-Mannitol	10.0	g.
Sodium chloride	10.0	g.
Phenol red, 0.2 per cent solution	12.5	ml.
Agar	15.0	g.
Distilled water	887.5	ml.

ปรับ pH 7.1 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. **Buffered peptone water**

Peptone	10.0	g.
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	g.
Sodium chloride	5.9	g.
Disodium hydrogen phosphate	9.0	g.
Distilled water	1000.0	ml.

ปรับ pH 7.0 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้