การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

โดย

นายปัญจ์ยศ มงคลชาติ

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

โดย
นายปัญจ์ยศ มงคลชาติ

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

THE REDUCTION OF MICROBIAL CONTAMINATION IN THE SEASONING SAUCE INDUSTRY

By

Panyot Mongkolchat

An Independent Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Food Technology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2011

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้การค้นคว้าอิสระ เรื่อง “การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส” เสนอโดย นายปัญจ์ยศ มงคลชาติ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

…….....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจีรจำเนียร

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ แก้วมณีชัย)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจีรจำเนียร)

...../...../.....

52403304 : สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
คำสำคัญ : การลดการปนเปื้อน/ ซอสปรุงรส/ สารฆ่าเชื้อ/ โซเดียมไฮโปคลอไรต์
ปัญจ์ยศ มงคลชาติ : การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส. อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ : ผศ.ดร.อรุณศรี ลีจีรจำเนียร. 86 หน้า.

สปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *Rhizomucor miehei* สามารถสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส จากการศึกษาเบื้องต้นพบจุลินทรีย์เหล่านี้ปนเปื้อนเกือบทุกขั้นตอนการผลิตซอสปรุงรส และพบจุลินทรีย์ เหล่านี้ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ คัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ และประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกไปใช้ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส จากการศึกษาสาเหตุและแหล่งที่มาของการปนเปื้อน พบว่าภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบเป็นแหล่งที่มาสำคัญของการปนเปื้อน ซึ่งมีสาเหตุจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักไม่เหมาะสมเพียงพอ ในการศึกษาคัดเลือกสารฆ่าเชื้อ โดยเปรียบเทียบการใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว ได้แก่ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อแบบผสม คือ สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ และสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า ได้แก่ กรดผสมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ อัตราส่วน 1:1 และออกโซเนีย ตามลำดับ ทั้งหมดเตรียมที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที จากการทดลองพบว่ากรดอะซิติกผสมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้น 3-7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 10 นาที สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด เมื่อพิจารณาโอกาสและความรุนแรงของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ จึงประยุกต์ใช้กรดอะซิติกผสมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้น 3-7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 20 นาที เป็นสารฆ่าเชื้อ พบว่าสามารถกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบได้ ทำการทวนสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโดยเก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบจากถังพักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่ผ่านการคัดเลือก ที่ระยะเวลาทวนสอบ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน จากการทดลองไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำซอสปรุงรสดิบที่ระยะเวลาการทวนสอบ 0-45 วัน

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554
ลายมือชื่อนักศึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าอิสระ .....

52403304 : MAJOR : FOOD TECHNOLOGY
KEYWORD : REDUCTION OF CONTAMINATION/ SEASONING SAUCE/ DISINFECTANT/ SODIUM HYPOCHLORITE
PANYOT MONGKOLCHAT: THE REDUCTION OF MICROBIAL CONTAMINATION IN THE SEASONING SAUCE INDUSTRY. INDEPENDENT STUDY ADVISOR : ASST.PROF. ARUNSRI LEEJEERAJUMNEAN, Ph.D.

Spore of *Bacillus* sp., white mold and gray mold were capable of biofilms formation and caused serious problems in seasoning sauce industry. They were found in almost every step in the production process, including the finished product. The objective of this study was to reduce the contamination of these microbials in seasoning industry. So this work focused on finding resource of the contaminations, including their genotypes and using disinfectants to kill them in the industry. It was found that the contaminated storage tank was the resource of the contaminations. *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. and *Rhizomucor miehei* were identified as genotype of the contaminations. The used of disinfectants to kill them, prepared as spore suspension. Individual disinfectants; acetic acid, citric acid, lactic acid, hydrochloric acid, sodium hypochlorite compared with mixed disinfectant; acid mixed with sodium hypochlorite in ratio of 1:1 and oxonia, commercial mixed disinfectant. Most of all prepared at 100,150 and 200 ppm each of which the initial pH was controlled at 3, 4, 5, 6, 7 and contacting time was 5 and 10 min, respectively. The results showed that using only acid or sodium hypochlorite could not eliminate the contaminated spores. On the other hand, using mixed of acetic acid+NaOCl (1:1) or lactic acid+NaOCl (1:1) at the concentration of 150 ppm, contacting time 10 min exhibited synergistic effect and could completely kill most of the contamination spores. However, considerating the cost, acetic acid was more economical. Therefore, acetic acid+NaOCl (1:1) was recommended for controlling the contamination in seasoning sauce industry. In addition, acetic acid+NaOCl (1:1) at the concentration of 200 ppm, initial pH was controlled at 3-7 and contacting time was 20 min was used to kill the contaminated tanks in seasoning industry. Seasoning sauce samples were taken to analyze the microbial contamination during 0-60 days. The result found that there was no contamination in seasoning sauce from 0-45 days.

Department of Food Technology, Graduate School, Silpakorn University, Academic Year2011
Student's signature .....
Independent Study Advisor’s signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ผู้สนับสนุนทุนสกว. อุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (สกว.) ประจำปี 2552

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อรุณศรี ลีจีรจำเนียร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนกระทั่งการค้นคว้าอิสระนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประสงค์ ศิริวงศ์วิไลชาติ ที่กรุณาตรวจแก้ไขบทคัดย่อภาษาอังกฤษ และให้คำแนะนำในการค้นคว้าอิสระนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เอกพันธ์ แก้วมณีชัย และ ผศ.ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ ที่ให้คำแนะนำในการปรับแก้การค้นคว้าอิสระนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความรู้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำงานได้

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณเบญจวรรณ แจ่มใส และคุณวิภาดา ช่วยด้วง ที่ให้ความช่วยเหลือในการคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการค้นคว้าอิสระนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

สมมติฐานของการศึกษา 2

ขอบเขตการศึกษา 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

อันตรายด้านความปลอดภัยในอาหาร 4

รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ 4

ไบโอฟิล์ม 4

สปอร์ 5

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอาหาร 6

Bacillus sp. 6

Staphylococcus sp. 7

Aspergillus sp. 7

Mucor sp. 7

Chrysosporium sp. 7

ซอสปรุงรส 7

กระบวนการผลิตซอสปรุงรส 7

ส่วนประกอบในซอสปรุงรส 8

ซอสปรุงรสกับอันตรายด้านความปลอดภัยอาหาร 8

สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร 9

บทที่ หน้า

สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร 9
สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรด 9
กรดผสมกับสารลดแรงตึงผิว 10
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 10
โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ 12
ชนิดของกรด 12
ค่าพีเอชของอาหาร 14
จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น 16
ประวัติของจุลินทรีย์ 16
ส่วนประกอบในอาหาร 16
ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 17
ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ 17
ปริมาณสารอินทรีย์ 17
3 วิธีดำเนินงานวิจัย 18
วัตถุดิบ 18
สารเคมี 18
สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว 18
สารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า 18
สารเคมีอื่น ๆ 18
อุปกรณ์และเครื่องมือ 18
วิธีการทดลอง 19
ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์
ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส 19
การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์
ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด 21
การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก
ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส 23
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 23

บทที่ หน้า
4 ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง 24
ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มา
ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส 24
การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์
ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด 36
การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก
ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส 47
5 สรุปผลการทดลอง 52
รายการอ้างอิง 53
ภาคผนวก 55
ภาคผนวก ก มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซอสปรุงรส 56
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์อันตรายและจุดควบคุมวิกฤต 70
ภาคผนวก ค ผลการทดลอง 76
ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมตัวอย่าง 82
ประวัติผู้วิจัย 86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะของกรดอ่อนที่ใช้ในการถนอมอาหารการ	14
2	จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำซอสปรุงรส ที่เก็บตัวอย่างจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต	29
3	จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในอากาศในบริเวณต่าง ๆ ภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ	30
4	จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพัก น้ำซอสปรุงรสดิบก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก	33
5	ค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของน้ำซอสปรุงรสดิบ จากด้านบนและด้านล่างของที่เก็บในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ถังพักน้ำต้น และถังพักน้ำวน	35
6	จำนวนสปอร์ *Bacillus* sp. หลังจากฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที	37
7	จำนวนจุลินทรีย์ในถังพักที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อ แบบผสมที่คัดเลือก	50
8	จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก และ ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ที่เวลาการทวนสอบ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน	51
9	การวิเคราะห์ความเสี่ยงจากโอกาสและความรุนแรงของ จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ตรวจพบ	75
10	สปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วย สารฆ่าเชื้อแบบผสม	78
11	สปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ที่เหลือรอดจากการ ฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม	79
12	สปอร์ของ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อ ด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม	80

ตารางที่ หน้า

13 สปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีแอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 81

14 สปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีแอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 81

15 วิธีการเตรียมสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การปนเปื้อนไบโอฟิล์มภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ	1
2	วงจรการเกิดไบโอฟิล์ม	5
3	การใช้กรดแก่ในการควบคุมจุลินทรีย์	12
4	การใช้กรดอ่อนในการควบคุมจุลินทรีย์	13
5	การทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากการแตกตัวของกรด และค่าพีเอชของกรด	15
6	ตำแหน่งที่วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ	20
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเส้นใยสีขาว *Chrysosporium* sp.	24
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเส้นใยสีเทา *R. miehei*	25
9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.	26
10	แผนภูมิกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส	28
11	วิธีการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบตามวิธีการของโรงงาน	32
12	ไบโอฟิล์มที่เหลืออยู่ภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้านบน และการเน้นย้ำล้างทำความสะอาดภายในถังพักด้านบน	34
13	จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม	39
14	จำนวนสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก	41
15	จำนวนสปอร์ของ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก	43
16	จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7	45
17	จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วย กรดแลคติก+NaOCl (1:1) ที่ค่าค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7	46

ภาพที่ หน้า

18 ระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่ออกแบบเพื่อการประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในโรงงานที่ประสบปัญหาการปนเปื้อน 48

19 ระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่สร้างจากที่ออกแบบ และการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก 49

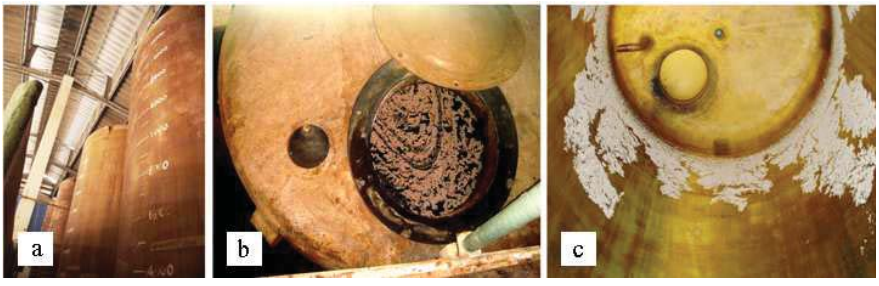
20 จำนวนสปอร์ *Bacillus* sp. หลังจากฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที 77

21 จำนวนจุลินทรีย์น้ำซอสปรุงรสดิบ ที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก และถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม 81

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บริษัท กิจไพศาลอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด เป็นสถานประกอบการผลิตซอสปรุงรสที่ประสบปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะในขั้นตอนการพักน้ำซอสปรุงรสดิบในถังพัก จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าจุลินทรีย์ปนเปื้อนมีลักษณะเป็นฟิล์มหนาสีขาว ปกคลุมผิวหน้าของน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก (ภาพที่ 1) และในการศึกษาเบื้องต้นเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่คัดแยกจากซอสปรุงรสดิบที่เก็บไว้ในถังพักนานกว่า 3 เดือน พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เชื้อราเส้นใยสร้างสปอร์สีขาว และเชื้อราเส้นใยสร้างสปอร์สีเทาเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่เป็นสาเหตุของการปนเปื้อน เพราะ *Bacillus* sp. สามารถสร้างไบโอฟิล์ม สปอร์ สารพิษที่ทนต่อความร้อนและทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์เหล่านี้ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย ความสำคัญของการพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ ส่งผลกระทบต่อความมั่นใจของผู้บริโภคในกระบวนการผลิต และความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของการปนเปื้อนจุลินทรีย์เหล่านี้ และคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดได้ ตลอดจนนำสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมซอสปรุงรสที่ประสบปัญหา



ภาพที่ 1 การปนเปื้อนไบโอฟิล์มภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ
เมื่อไบโอฟิล์มที่ปนเปื้อนใน (a) ถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (b) ไบโอฟิล์มมีลักษณะเป็นฟิล์มหนาสีขาวปกคลุมผิวหน้าน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก (c) เมื่อสิ้นสุดการผลิตประจำปีสังเกตเห็นไบโอฟิล์มยึดเกาะภายในถังพักชัดเจน

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส
2. คัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด
3. ประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

สมมติฐานของการศึกษา

1. ชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสัมพันธ์กับสาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน
2. ชนิดของสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อ และระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งหมดได้
3. สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่สะสมในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบได้

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

ครอบคลุมถึงการจำแนกชนิด สายพันธุ์ และจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำซอส-ปรุงรสดิบ ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรส รวมทั้งการจำแนกชนิด สายพันธุ์ และจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ และตัวอย่างจุลินทรีย์ในบรรยากาศภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ทั้งนี้เพื่อระบุสาเหตุแหล่งที่มาของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของโรงงานผลิตซอสปรุงรส

2. การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด

ครอบคลุมถึงการคัดเลือก ชนิดของสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ ค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อ รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์สำคัญที่เป็นสาเหตุของการปนเปื้อน ดังนี้

2.1 ชนิดของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

แบ่งเป็นสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ และสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า

สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว ได้แก่ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮโปคลอไรต์

สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ กรดผสมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ อัตราส่วน 1:1 และสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า คือ ออกโซเนีย

2.2 ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม

2.3 ค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อ 3, 4, 5, 6 และ 7

2.4 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

3. การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

ครอบคลุมถึงการนำสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกไปใช้ฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่โรงงานผลิตซอสปรุงรส เปรียบเทียบกับการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเหลว ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ตรวจวัดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อโดยการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ ทวนสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบจากถังพักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับน้ำซอสปรุงรสดิบจากถังพักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ที่ระยะเวลาการทวนสอบ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อันตรายด้านความปลอดภัยในอาหาร

อันตรายด้านความปลอดภัยในอาหาร ปัจจุบันพิจารณาถึงการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหารมากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พัฒนารูปแบบการเจริญเป็นไบโอฟิล์ม (biofilms) เช่น สปอร์ของ *Bacillus* sp. สามารถเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ ซึ่งทนต่อความร้อน และสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร วิธีการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอจึงไม่สามารถกำจัดไบโอฟิล์มในกระบวนการผลิตได้ และทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคกลับมาปนเปื้อนในกระบวนการผลิตและปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ได้ ส่งผลกระทบต่อความมั่นใจในมาตรฐานของกระบวนการผลิต คุณภาพของผลิตภัณฑ์ และความปลอดภัยของผู้บริโภค (Elhariry, 2008 และ Hornstra และคณะ, 2007)

รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ

1. ไบโอฟิล์ม

ไบโอฟิล์ม เป็นการเจริญรูปแบบหนึ่งของจุลินทรีย์ ซึ่งต่างจากการเจริญของจุลินทรีย์ปกติ (vegetative cells) เพราะไบโอฟิล์มใช้เวลาในการเจริญไม่นาน และสามารถสร้างชั้นฟิล์มโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide) เหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นมายึดเกาะบนพื้นผิวภาชนะสัมผัสอาหารที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งมีไบโอฟิล์มเจริญอยู่ได้ (Chmielewski และ Frank, 2003)

1.1 วงจรการเกิดไบโอฟิล์ม

วงจรการเกิดไบโอฟิล์ม แบ่งเป็น 5 ระยะ ดังนี้

ระยะเริ่มต้นยึดเกาะพื้นผิววัสดุ เป็นช่วงระยะเวลาที่ จุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อบนพื้นผิว ปนเปื้อนอยู่ในสารฆ่าเชื้อตกค้างบนพื้นผิวภาชนะ และเริ่มต้นยึดเกาะบนพื้นผิวได้อีก

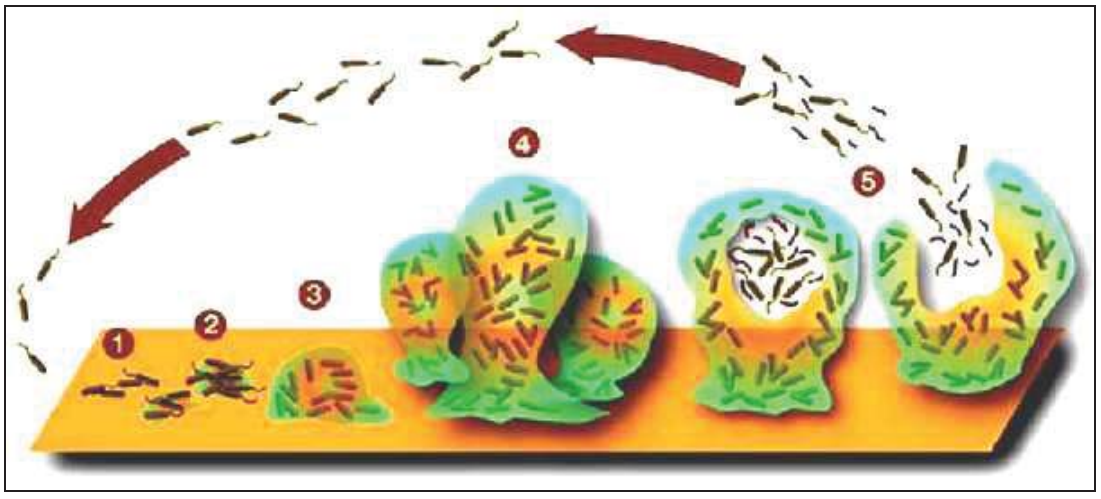
ระยะยึดเกาะแน่น ถ้าไม่สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดและตกค้างบนพื้นผิวได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นยึดเกาะพื้นผิววัสดุ จุลินทรีย์จะเจริญเพิ่มจำนวนและยึดเกาะบนพื้นผิววัสดุแน่นโดยใช้พิลไล (pili) และแฟลกเจลลา (flagella) รวมทั้งจุลินทรีย์มีความเป็นไฮโดรโฟบิก

(hydrophobic) และพื้นผิววัสดุที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะมีความเป็นไฮโดรโฟบิกเช่นกัน จึงดึงดูดให้จุลินทรีย์มายึดเกาะบนพื้นผิววัสดุแน่น

ระยะเพิ่มจำนวน (1) เป็นระยะที่โคโลนีของจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างมาก และเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นมายึดเกาะบนพื้นผิววัสดุ เกิดโครงสร้างชั้นฟิล์มห่อหุ้มกลุ่มโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหลายนั้นเข้าไว้ด้วยกัน

ระยะเพิ่มจำนวน (2) เมื่อเกิดเป็นโครงสร้างของไบโอฟิล์มแล้ว ไบโอฟิลม์จะเจริญหนาขึ้นตามจำนวนจุลินทรีย์ที่มาเกาะทับซ้อนกัน เพิ่มจำนวนเป็นชั้น ๆ ทำให้ขนาดและรูปร่างของไบโอฟิล์มเปลี่ยนไป

ระยะแพร่กระจาย เป็นระยะสุดท้ายของรูปแบบการเจริญเป็นไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมจะปล่อยจุลินทรีย์จากไบโอฟิล์มไปเกาะบนพื้นผิววัสดุอื่น สร้างโคโลนีและเริ่มวงจรการเกิดไบโอฟิล์มใหม่ ในระยะนี้ไบโอฟิล์มจะสังเคราะห์เอนไซม์ดิสเพอร์ซิน บี (dispersin B) และเอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease) เพื่อย่อยผนังชั้นนอกสุดของไบโอฟิล์มให้จุลินทรีย์ภายในแพร่กระจายไปกับสารฆ่าเชื้อหรือสารละลายต่าง ๆ ที่สัมผัสพื้นผิว (Xinming และ Xinna, 2009) วงจรการเกิดไบโอฟิล์มแบ่งเป็น 5 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วงจรการเกิดไบโอฟิล์ม

ที่มา : http://prometheus.mse.uluc.edu/glossary/biofilms/ สืบค้นเมื่อ 25 พฤศจิกายน 2553

2. สปอร์

สปอร์เป็นโครงสร้างที่พบในแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราบางชนิดเท่านั้น โครงสร้างของสปอร์มีผนังหลายชั้นที่สลับซับซ้อน จึงทำให้สปอร์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

เช่น ทนความร้อน และทนต่อสารเคมีได้มากกว่าจุลินทรีย์ปกติ การสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียจะสร้างสปอร์ 1 สปอร์ เพื่อรักษาเผ่าพันธุ์ แต่ยีสต์และเชื้อราจะสร้างสปอร์มากกว่า 1 สปอร์ เพื่อการขยายเผ่าพันธุ์ สปอร์เหล่านี้เมื่อปนเปื้อนในแหล่งอาหารที่สภาพแวดล้อมเหมาะสม จะงอกสปอร์เจริญเป็นจุลินทรีย์ปกติและแพร่พันธุ์ต่อไป สปอร์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบเหมือนกับแบคทีเรียปกติ แต่จะมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) สูงกว่าจุลินทรีย์ปกติของแบคทีเรีย 2-10 เท่า และยังมีกรดไดพิโคไลนิก (dipicolinic acid) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย (บุษกร, 2552) จุลินทรีย์สร้างสปอร์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สปอร์ของ *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอาหาร

1. *Bacillus* sp.

เป็นแบคทีเรียก่อโรคมีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ทนความร้อน เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ แต่ไม่มีอากาศก็สามารถเจริญได้ (facultative anaerobe) ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ดี คือ 30-37 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ คือ 8-55 องศาเซลเซียส ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity หรือ a_w) ที่เหมาะสม คือ 0.912-0.950 บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษเอนเทอร์โรทอกซิน (enterotoxin) ที่ทำให้อาเจียน เป็นสารพิษที่ทนความร้อนสูงถึง 126 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. ทนต่อค่าพีเอชในช่วงกว้าง 2-11 บางสายพันธุ์สร้างสารพิษชนิดที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วง (สุมณฑา, 2545)

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม พบได้ทั่วไป ในธรรมชาติสามารถพบ *B. cereus* ในดิน น้ำ และธัญพืช อันตรายจาก *B. cereus* เกิดเมื่อได้รับเชื้อเข้าไปในปริมาณมากจึงจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสอาจพบ *B. cereus* ที่ทำให้เกิดโรคท้องเดินได้ Elhariry (2008) รายงานว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีความเป็นไฮโดรโฟบิก และพื้นผิววัสดุสัมผัสอาหาร เช่น เหล็กไร้สนิม ยาง แก้ว และพลาสติก ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะมีความเป็นไฮโดรโฟบิกเช่นกัน จึงทำให้สปอร์ของ *B. cereus* สามารถยึดเกาะบนพื้นผิววัสดุสัมผัสอาหารได้ง่าย ไบโอฟิล์มที่มีสปอร์ของ *B. cereus* ในระยะแพร่กระจายจะปล่อยสปอร์ออกมาอย่างต่อเนื่อง ถ้าสปอร์ที่ปล่อยออกมาตกค้างอยู่บนพื้นผิววัสดุและเจริญเป็นไบโอฟิล์ม ทั้งสปอร์และไบโอฟิล์มที่เจริญขึ้นใหม่นี้จะทนต่อการออกซิไดซ์ของสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น Xinming และ Xinna (2009) พบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ และในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภทพบการปนเปื้อนไบโอฟิล์ม เช่น พบไบโอฟิล์มของ *B. cereus* และไบโอฟิล์มของ *Staphylococcus aureus* ในโรงงานผลิตนม

2. *Staphylococcus* sp.

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม บางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์คะทะเลส พบตามร่างกายมนุษย์และสัตว์ที่มีแผล ฝี หนอง ทำให้เกิดการอักเสบ *Staphylococcus* sp. สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์คะทะเลสสามารถสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

3. *Aspergillus* sp.

เชื้อราเจริญโดยสร้างกลุ่มเส้นใย (mycelium) บนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมที่เจริญ สร้างคอนิเดีย (conidia) ต่อกันเป็นลูกโซ่ โครงสร้างมีลักษณะคล้ายถุงซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแอสโคสปอร์ (ascospores) เชื้อรา *Aspergillus* sp. ในอาหารมีสีเขียวจนถึงสีดำ บางสายพันธุ์เจริญในพืชน้ำมัน เช่น ถั่วลิสง *A. flavus* และ *A. parasiticus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน และบางสายพันธุ์สร้างสารพิษโอคราทอกซิน เอ และสเตอริกมาโตซีสตินได้

4. *Mucor* sp.

เชื้อราเจริญโดยสร้างกลุ่มเส้นใยไม่มีผนังกั้น ใช้สร้างก้านชู (sporangiophores) ซึ่งเป็นที่เกิดของ columella และเกิดอับสปอร์ (sporangium) ที่ส่วนปลายก้านชู และมีสปอร์เกิดภายในอัปสปอร์ *Mucor* sp. ไม่สร้างไรซอยด์ (rhizoids) หรือสโตลอน (stolons) เชื้อรานี้เจริญปนมากับอาหาร โคโลนีมีลักษณะเป็นปุยฝ้าย เมื่อเจริญเต็มที่มีลักษณะเป็นคราบสีขาวเป็นปื้น *Mucor* sp. บางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *M. miehei* ซึ่งเป็นราที่พบได้ในอาหารหมักต่าง ๆ (บุษกร, 2552)

5. *Chrysosporium* sp.

เชื้อรา *Chrysosporium* sp. มี 34 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่พบมาก คือ *C. pannicola*, *C. keratinophilum*, *C. tropicum*, *C. merdarium*, *C. inops*, *C. queenslandicum* และ *C. zonatum* จำแนกสายพันธุ์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะของโคโลนี สถานที่พบ และขนาดคอนิเดีย *Chrysosporium* sp. มีเส้นใยไฮฟี (hyphae) และ conidiogenous cells ที่มีลักษณะใสคล้ายแก้ว บริเวณปลายของไฮฟีมีสปอร์แบบ chlamydospores ลักษณะค่อนข้างกลม *Chrysosporium* sp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเจริญเต็มที่ใน 5-6 วัน (Gun และคณะ, 2003)

ซอสปรุงรส

ซอสปรุงรส คือ ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใช้ปรุงรสอาหาร ได้จากการย่อยสลายโปรตีนพืชด้วยกรดหรือเอ็นไซม์ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2549)

1. กระบวนการผลิตซอสปรุงรส

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซอสปรุงรส ได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานสกัด

น้ำมันพืช กระบวนการผลิตซอสปรุงรสได้จากปฏิกิริยาเคมีโดยการใช้กรดย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลือง เมื่อการย่อยสมบูรณ์ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะได้เกลือเกิดขึ้น จากการทำให้เป็นกลาง จึงต้องผ่านการกรองเพื่อเอาส่วนที่ไม่ละลายออก นำไปปรุงแต่งกลิ่นด้วยสารแต่งกลิ่น หรือนำไปหมักอีกระยะหนึ่งเพื่อให้เกิดกลิ่นหอมในช่วงนี้ จากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรส์ได้เป็นซอสปรุงรส

2. ส่วนประกอบในซอสปรุงรส

ซอสปรุงรสมีส่วนประกอบสำคัญ คือ กากถั่วเหลือง น้ำตาล เกลือ และวัตถุเจือปนอาหาร รายละเอียดดังนี้

1) กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งกรดอะมิโน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิด สี กลิ่น และรสของผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว เนื่องจากกระบวนการผลิตซอสปรุงรสหากมีไขมันปนอยู่มากจะทำให้มีกลิ่นเหม็นของไขมันที่ถูกย่อย นอกจากใช้โปรตีนจากกากถั่วเหลืองอาจผสมโปรตีนจากแหล่งอื่นได้ เช่น ถั่วลิสง หรือข้าวโพดได้

2) น้ำตาล ซอสปรุงรสส่วนใหญ่เติมน้ำตาลปริมาณประมาณร้อยละ 1.2 -10.0 การเติมน้ำตาลมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยเพิ่มรสชาติ และช่วยปรับสีของผลิตภัณฑ์

3) เกลือ โดยทั่วไปซอสปรุงรสมีปริมาณเกลือร้อยละ 18.0 -21.0

4) วัตถุปรุงแต่งรสอาหาร อาจเติมไดโซเดียมอิโนซิเนต (disodium- 5′-inosinate) และไดโซเดียมกัวนิเลต (disodium-5′-guanylate) หรือเรียกว่า ไอพลัสจี (I plus G) ช่วยปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์

3. ซอสปรุงรสกับอันตรายด้านความปลอดภัยอาหาร

อันตรายด้านความปลอดภัยอาหาร แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ อันตรายทางกายภาพ อันตรายทางเคมี และอันตรายทางชีวภาพ (สุวิมล, 2546)

1) อันตรายทางกายภาพ หมายถึง สิ่งแปลกปลอมที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น เศษแก้ว และเศษพลาสติกแข็ง เป็นต้น

2) อันตรายทางเคมี หมายถึง สารเคมีที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยทั้งแบบเฉียบพลันและแบบสะสมในระยะยาว คือ สารเอ็มซีพีดี (3-MCPD) เป็นสารก่อมะเร็งที่เกิดจากกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสที่ใช้วิธีการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองด้วยกรดเกลือความเข้มข้นสูง ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (acid hydrolysis) และในขณะเดียวกันนี้ เกิดปฏิกิริยาคลอริเนชัน (chlorination) ของไขมัน สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2549) กำหนดให้น้ำซอสปรุงรส 1 กิโลกรัม พบสารเอ็มซีพีดีได้ไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

3) อันตรายทางชีวภาพ หมายถึง อันตรายจากสิ่งมีชีวิตก่อโรค ได้แก่ จุลินทรีย์ ไวรัส และพาราไซต์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2549) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสต้องไม่พบสารพิษจากจุลินทรีย์ หรือสารพิษอื่นในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ต้องไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรค ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรส 0.1 กรัม ต้องไม่พบ *Clostridium perfringens* ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรส 0.01 กรัม ต้องไม่พบ *B. cereus* ยีสต์และเชื้อรา ต้องไม่เกิน 10 โคโลนี และในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรส 1.0 กรัม พบ Coliform ได้ ไม่เกิน 3 โคโลนี

สารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

การฆ่าเชื้อ (sanitization) หมายถึง การลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารด้วยวิธีทางเคมี หรือกายภาพให้จุลินทรีย์อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่มีผลกระทบต่อคุณลักษณะของอาหาร

คุณสมบัติของสารฆ่าเชื้อที่ดี คือ สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราได้รวดเร็ว มีความคงตัวต่อสภาพแวดล้อม เช่น ในสารทำความสะอาด สารอินทรีย์ น้ำกระด้าง และสบู่ที่ตกค้างบนพื้นผิว เป็นต้น สารฆ่าเชื้อที่ดีควรละลายน้ำได้หมด ล้างออกได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ไม่เป็นพิษ มีกลิ่นที่ยอมรับได้ ที่ความเข้มข้นสูงมีความคงตัวสูง ง่ายต่อการใช้งานและการตรวจสอบ ราคาไม่แพง และไม่เสื่อมคุณภาพเมื่อเก็บไว้นาน (สุมณฑา, 2545)

1. สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรด (acidic sanitizer)

สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรด ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดเพอร์ออกซีอะซิติก กรดแลคติก กรดโพพิโอนิก และกรดฟอร์มิก ซึ่งมีความปลอดภัยในการใช้งาน นิยมใช้ร่วมกับการล้าง การฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดทำหน้าที่ป้องกันการเกิดตะกรันจากสารฆ่าเชื้อที่เป็นด่าง สามารถใช้ได้กับพื้นผิวสแตนเลสเพราะไม่กัดกร่อนพื้นผิวและไม่ทำให้เกิดรอย สารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรดสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ที่ระยะเวลาการฆ่าเชื้อเพียงพอ กรดที่แตกตัวภายนอกเซลล์จุลินทรีย์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกที่ผนังเซลล์จุลินทรีย์กับประจุลบของกรด ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย นอกจากนี้กรดที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์และแตกตัว ทำให้สภาวะภายในเซลล์จุลินทรีย์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ระบบการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลาย ปริมาณกรดที่ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค (สุมณฑา, 2545)

สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychotropic bacteria) ยีสต์ และไวรัส แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการทำลายแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ที่ค่าพีเอชน้อยกว่า 3 ทำลายจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

2. กรดผสมกับสารลดแรงตึงผิว (acid-anionic sanitizer)

สารฆ่าเชื้อแบบผสมระหว่างกรดอ่อนกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) สามารถทำลายได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียและไวรัสได้ สารฆ่าเชื้อแบบผสมนี้มีความคงตัวดี ใช้งานได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้าง ที่ค่าพีเอช 2.0-3.5 ความกระด้างของน้ำไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อแบบผสมนี้ ข้อจำกัดของสารฆ่าเชื้อแบบผสมระหว่างกรดอ่อนกับสารลดแรงตึงผิว คือ มีฤทธิ์กัดกร่อนโลหะที่ไม่มีสารเคลือบ ทำให้เกิดฟองมากภายในระบบท่อแบบปิด นิยมใช้ในโรงงานผลิตนมเนื่องจากกรดสามารถชะตะกรันที่ติดอยู่ตามพื้นผิวภาชนะได้ ฆ่าเชื้อได้รวดเร็วและหลายชนิดโดยการออกซิไดซ์ผนังเซลล์แบคทีเรีย มีฤทธิ์กัดกร่อนพื้นผิวน้อยกว่าคลอรีนและไอโอดีน จึงไม่ทำให้เกิดเป็นรูพรุนที่พื้นผิววัสดุ มีประสิทธิภาพในการทำลายยีสต์และเชื้อรา เช่น *Saccharomyces* sp. และ *Mucor* sp. นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ปัจจุบันนิยมใช้เพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารที่ความเข้มข้น 125-250 พีพีเอ็ม (Marriott, 2006) ราคาแพงกว่าไฮโปคลอไรต์ แต่ถูกกว่าควอตซ์ และไอโอโดฟอร์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิวกับประจุบวกของแบคทีเรีย ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุทำให้สารฆ่าเชื้อผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลายระบบภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ ปัจจุบันนิยมใช้กรดเพอร์ออกซีอะซิติกเป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสมระหว่างกรดอ่อนกับสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ

3. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3-6 มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเกิดไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์ สามารถใช้ได้กับพื้นผิวทุกชนิด เช่น พื้น ผนัง ท่อระบายน้ำ สายพาน ตะแกรงโลหะ และถุงมือ

4. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite)

โซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสารประกอบคลอรีนที่นิยมใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำปฏิกิริยากับน้ำเกิดกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) และคลอรีนออกไซด์ (OCl^-) สมการที่ 1 และ 2

ไฮโดรไรเซชัน : $$NaOCl + H_2O \rightarrow HOCl + Na^+ + OH^- \quad (1)$$

ไอออนไนเซชัน : $$HOCl \leftrightarrow H^+ + OCl^- \quad (2)$$

จากสมการที่ 1 และ 2 การแตกตัวของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ คลอรีนออกไซด์

ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลฟิดริว (sulfydryl groups) เอนไซม์บนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโพรโตพลาสซึม เนื่องจากคลอรีนมีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง ทำลายเซลลูลาโปรตีน โดยเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) แบบผันกลับไม่ได้ แต่ต้องมั่นใจว่ามีคลอรีนอิสระเพียงพอที่จะแข่งขันกับสารอินทรีย์ที่ถูกชะและปนอยู่ในสารฆ่าเชื้อ และยังเพียงพอในการทำลายแบคทีเรียบนพื้นผิว (Andrea และคณะ, 2004) กรดไฮโปคลอรัสเป็นสารประกอบคลอรีนที่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อสูงสุดที่ค่าพีเอช 6.5-7.0 สูงกว่าคลอรีนออกไซด์ 40-80 เท่า เนื่องจากที่ค่าพีเอชต่ำ ๆ คลอรีนจะกัดกร่อนโลหะได้ ระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทุก ๆ 10 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น 2 เท่า (Marriott, 2006)

กลไกการทำลายสปอร์จุลินทรีย์ของคลอรีน คือ กระตุ้นการงอกของสปอร์ และทำลายสปอร์ที่งอก ทำลายกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นไนไทร์ต และอัลดีไฮด์ ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีคาร์บอกซิเดชัน (oxidative decarboxylation) และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorelation) โดยคลอรีนทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิก พิวรีน และพิริมิดีน ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมไม่สมดุล ทำลายเอ็นไซม์สำคัญภายในเซลล์ ทำให้สูญเสีย DNA-transforming ขัดขวางการหายใจของเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของสารเข้าสู่เซลล์เปลี่ยนแปลง เกิดการรั่วของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ทำให้มีการผลิตอนุพันธ์ N-คลอรีน ที่เป็นสารพิษจากไซโตซีน (cytosine) บนสายดีเอ็นเอ และตกตะกอนโปรตีนภายในเซลล์ ขัดขวางการคืนตัวของเอนไซม์ภายในเซลล์ และทำปฏิกิริยากับด่างที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (บุษกร, 2552 และ Marriott, 2006)

ข้อดีของสารประกอบคลอรีน คือ ฆ่าจุลินทรีย์ได้รวดเร็ว ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเพียงพอ ราคาถูกที่สุดสามารถใช้งานได้ทั้งในสภาวะที่เป็นสารละลายและในสภาวะที่เป็นของแข็ง ความกระด้างของตัวทำละลายไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของคลอรีน การใช้คลอรีนฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 พีพีเอ็ม ไม่จำเป็นต้องล้างออก

ข้อด้อยของสารประกอบคลอรีน คือ เมื่อใช้ปริมาณมากสามารถทำให้ยางเกิดการอ่อนตัวและละลายคาร์บอนออกมา ไม่คงตัวและสลายตัวเมื่อสัมผัสแสงหรือได้รับความร้อน ที่อุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือเมื่อมีสารอินทรีย์ เช่น คราบโปรตีน หรือเซลล์จุลทรีย์ที่ตายแล้วตกค้างอยู่ในสารฆ่าเชื้อ มีฤทธิ์รุนแรงในการกัดกร่อนสแตนเลส และโลหะอื่น ๆ ถ้าจำเป็นต้องใช้คลอรีนฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่เป็นโลหะควรจำกัดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ เพื่อป้องกันการกัดกร่อน ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจะลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น การใช้คลอรีนเหลวที่ค่าพีเอชต่ำ ๆ สามารถเกิดแก๊สคลอรีนที่มีความเป็นพิษ และมีฤทธิ์กัดกร่อนพื้นผิว (Marriott, 2006)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ

1. ชนิดของกรด

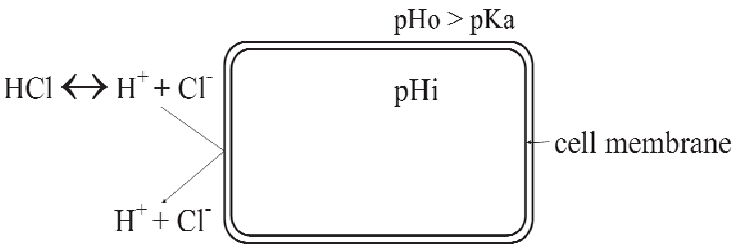
เมื่อกรดละลายน้ำจะแตกตัวจนกระทั่งอยู่ในสภาวะสมดุล ดังสมการที่ 3 และ 4

$$HA + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + A^- \quad (3)$$

$$HA + H_2O \leftrightarrow H^+ + A^- \quad (4)$$

กรดในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated form) เป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมจุลินทรีย์สูงกว่ากรดในรูปที่แตกตัว (dissociated form) โดยเฉพาะกับเชื้อราและยีสต์ที่ทนต่อค่าพีเอชต่ำ ๆ ได้ (ศุภชัย, 2549)

กรดแก่ การใช้กรดแก่ซึ่งมีค่าพีเคเอ (pKa) ต่ำ จะแตกตัวเกือบทั้งหมดในอาหาร ซึ่งมีค่าพีเอชสูงกว่าค่าพีเคเอของกรดแก่ กรดในรูปที่แตกตัวจะมีประจุ และไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในไซโตพลาสซึมได้ นอกจากนี้ในไซโตพลาสซึมของจุลินทรีย์ยังมีระบบบัฟเฟอร์รองรับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงยังคงรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ให้สูงกว่าค่าพีเอชของอาหาร หรือค่าพีเอชภายนอกเซลล์ได้ (ภาพที่ 3)

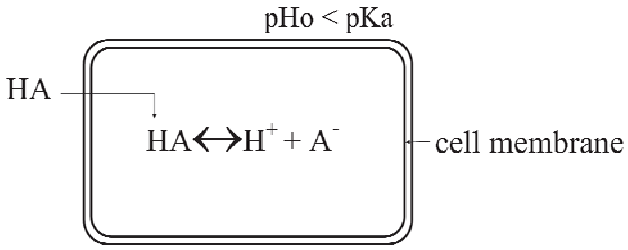


ภาพที่ 3 การใช้กรดแก่ในการควบคุมจุลินทรีย์

ที่มา : ศุภชัย (2549)

กรดอ่อน มีค่าพีเคเอสูงกว่ากรดแก่ กรดอ่อนที่ละลายได้ในไขมัน (lipophilic acid) จะสามารถละลายน้ำได้น้อยและแตกตัวได้น้อยมากที่ค่าพีเอชของอาหาร หรือ ค่าพีเอชภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ (pHo) ต่ำว่าค่าพีเคเอของกรดอ่อน กรดอ่อนจะไม่แตกตัวและไม่มีประจุ จึงสามารถผ่านเข้าออกเซลล์จุลินทรีย์ดีกว่ากรดที่แตกตัว เมื่อกรดที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีระดับพีเอชภายในเซลล์ (pHi) ที่สูงกว่าพีเอชภายนอกเซลล์ทำให้กรดอ่อน

แตกตัว มีผลให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง เมื่อกรดอ่อนที่ไม่แตกตัวสะสมในไซโตพลาสซึมมากขึ้น ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง เพื่อรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบกรดจะขับกรดอ่อน เช่น กรดแลคติก ออกจากเซลล์ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัว ส่วนกรดที่แตกตัวโปรตอนภายในเซลล์จะเป็นตัวจับและขับออกสู่ภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ (proton symport) ทั้งนี้จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้พลังงาน ซึ่งอาจได้จากการขับไฮโดรเจนไอออนออกจากเซลล์ผ่าน membrane-bound H^+ATPase เป็นการกำจัดไฮโดรเจนไอออนร่วมกับการสร้างพลังงาน เพื่อใช้ในการกำจัดกรดออกจากเซลล์ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงขาดแคลนพลังงานที่ต้องใช้ในการเจริญ การใช้กรดเป็นสารฆ่าเชื้อจึงสามารถควบคุมจุลินทรีย์ได้ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การใช้กรดอ่อนในการควบคุมจุลินทรีย์
ที่มา : ศุภชัย (2549)

กรดอ่อนที่ใช้ในการถนอมอาหาร

กรดอะซิติก เป็นกรดที่ละลายน้ำได้ ใช้ในการถนอมอาหารเนื่องจากมีราคาถูกหาง่าย และมีความเป็นพิษต่ำ กรดอะซิติกจัดเป็นสาร (Generally Recognized As Safe หรือ GRAS) ที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัย จึงใช้ใส่ในอาหารเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิต (GMP) เป็นสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเมื่อมีค่าพีเอชต่ำกว่าหรือที่ค่าพีเอช 4.5 กรดอะซิติกมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำลาย Coliform และ *Salmonella* sp. ได้ โดยมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อราจะน้อยกว่ายีสต์ แม้ว่ากรดอะซิติกจะมีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ได้ แต่อาหารบางประเภทไม่นิยมใช้กรดอะซิติกในการถนอมอาหาร เนื่องจากมีกลิ่นฉุนรุนแรงและมีฤทธิ์กัดกร่อนทำให้รูปสัมผัสและสีของอาหารซีดลงได้ กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่เติมลงในน้ำลวกไก่จะช่วยลดค่า D-value ในการฆ่าเชื้อ *Salmonella* sp. ได้ กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.3 จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสร้างสารพิษได้

กรดซิตริก หรือ กรดมะนาว พบในผลไม้ตระกูลส้ม ละลายน้ำได้ กรดซิตริกมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้น้อยกว่ากรดชนิดอื่น กรดซิตริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 สามารถฆ่าเชื้อ *Salmonella* sp. ในเนื้อไก่และเนื้อปลาได้

กรดแลคติก ที่พบในธรรมชาติพบว่าเป็นองค์ประกอบในอาหารบางชนิดนิยมใช้กรดแลคติกในการล้างตับสัตว์หรือใช้ฉีดพ่นบนซากสัตว์ เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ให้น้อยลง กรดแลคติกในสภาวะที่ไม่แตกตัวจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกได้ (บุษกร, 2552) คุณลักษณะของกรดอ่อนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการถนอมอาหาร และความสามารถในการแตกตัวเนื่องจากค่าพีเคเอของกรดและค่าพีเอชของอาหารดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของกรดอ่อนที่ใช้ในการถนอมอาหาร

กรดอ่อน	พีเคเอ (pKa)	ร้อยละของกรดที่ไม่แตกตัวที่ค่าพีเอชต่าง ๆ				
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
กรดอะซิติก	4.75	98.5	84.5	34.9	5.1	0.5
กรดซิตริก	3.1	53	18.9	0.4	0.01	< 0.01
กรดแลคติก	3.1	86.6	39.2	6.1	0.6	0.1

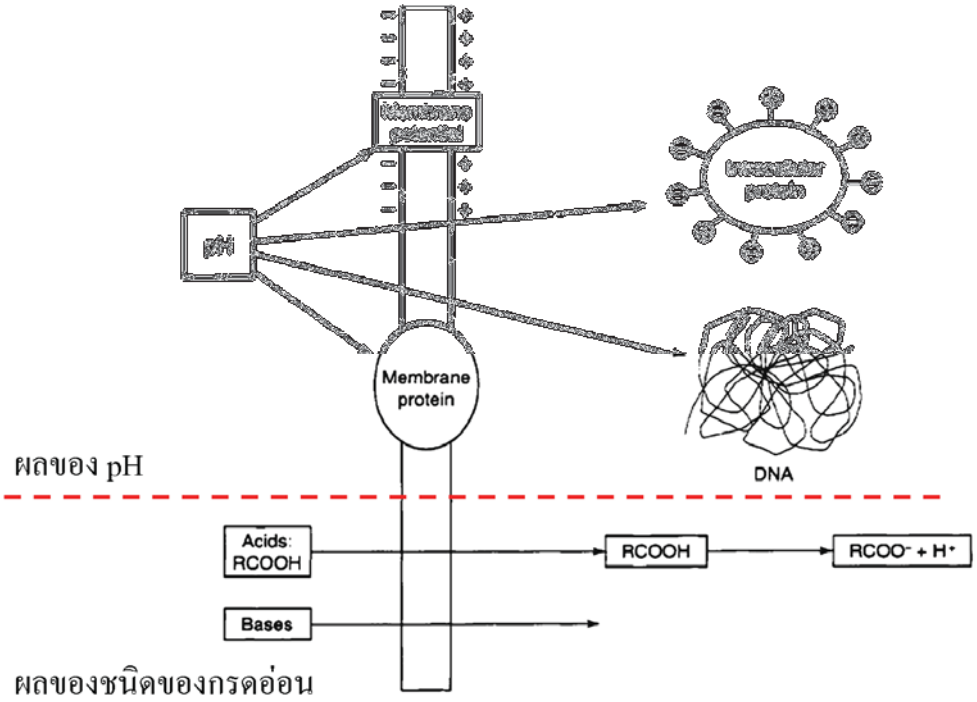
ที่มา : ศุภชัย (2549)

2. ค่าพีเอชของอาหาร

อาหารบางชนิดจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับค่าพีเอชได้มากกว่าอาหารชนิดอื่น เพราะมีคุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ ทำให้ระดับพีเอชของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงน้อยถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช โปรตีนทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ดี ทำให้การเปลี่ยนแปลงพีเอชเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยแม้ว่าในอาหารจะมีค่าพีเอชลดลง ดังนั้นการมีโปรตีนตกค้างในระบบทำให้ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดลดลงได้

ค่าพีเอชที่จุลินทรีย์เจริญได้ดี จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชประมาณ 7 (6.6-7.5) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าพีเอชของอาหาร และเจริญได้บ้างที่พีเอชต่ำกว่า 4 แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ ต่างจากเชื้อราและยีสต์ จุลินทรีย์ชนิดต่างกันจะทนต่อค่าพีเอชได้ในช่วงกว้างไม่เท่ากันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรด ดังนั้นอาหารแต่ละชนิดจึงมีความเสี่ยงที่จะพบจุลินทรีย์ได้มากกว่าหนึ่งชนิด จุลินทรีย์สามารถรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์

ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม เรียกว่า สมดุลพีเอช (pH homeostasis) ในสภาวะที่พีเอชภายนอกเซลล์ต่ำกว่าหรือสูงกว่าพีเอชที่เหมาะสม การตอบสนองของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของพีเอชภายในเซลล์จุลินทรีย์ที่ลดลง เรียกว่า acid tolerance response หรือ ATR โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถทนต่อกรดได้ คือ ระยะเฉียบพลัน (acute phase) และระยะต่อเชื่อม (transitional phase) ในระยะเฉียบพลันระบบการควบคุมค่าพีเอชของจุลินทรีย์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้เนื่องจากกรดในระดับที่ไม่มากนัก ดังนั้นการใช้สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดในระดับที่ทำให้จุลินทรีย์ตอบสนองต่อค่าพีเอชแบบระยะเฉียบพลันจึงไม่เพียงพอที่จะทำลายแบคทีเรียทนกรดได้ ในระยะต่อเชื่อม จุลินทรีย์มีการตอบสนองต่อกรดโดยการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นในการรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่ เรียกว่า acid-shock proteins หรือ ASP จุลินทรีย์ที่ไม่ได้ผ่านระยะเฉียบพลันส่วนใหญ่จะไม่สามารถทนกรดที่ค่าพีเอชภายนอกเซลล์เท่ากับ 3 ได้ การตอบสนองของจุลินทรีย์ต่อกรดนอกจากการสังเคราะห์โปรตีนแล้ว ยังมีการเปลี่ยนไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นไขมันชนิดอิ่มตัวมากขึ้น ทำให้ *E. coli* และ *Clostridium* sp. มีความสามารถทนต่อกรดได้เพิ่มขึ้น (Doores, 2005) ทั้งนี้กลไกการทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากการแตกตัวของกรด และค่าพีเอชของกรดที่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากการแตกตัวของกรดและค่าพีเอชของกรด

ที่มา : Doores (2005)

Marriott (2006) พบว่าการใช้กรดอ่อนในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ดีกว่าการใช้กรดแก่ โดยกรดอ่อนชนิดที่ไม่แตกตัวในไขมันและไม่มีประจุจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ได้อิสระ เพราะเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์มีไขมันเป็นส่วนประกอบ สารฆ่าเชื้อที่มีประจุจึงไม่สามารถผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ได้ และพบว่าการฆ่าเชื้อภายในระบบแบบปิด (cleaning-in-place หรือ CIP) โดยการฉีดพ่นคลอรีนเหลว หรือการใช้คลอรีนโฟมจะมีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อลดลงเมื่อมีคราบโปรตีนตกค้างบนพื้นผิว หรือเมื่อมีสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก ดังนั้นก่อนการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อ ควรล้างทำความสะอาดและกำจัดคราบสารอินทรีย์ตกค้างก่อน

3. จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมากมีโอกาสได้รับผลกระทบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมากกว่าจุลินทรีย์เริ่มต้นจำนวนน้อย แต่การที่จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมากกลับมีโอกาสที่จะมีจุลินทรีย์ 1 เซลล์ เหลือรอดจากการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชนั้นมีมากกว่าการที่มีจุลินทรีย์เริ่มต้นน้อย จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อ

4. ประวัติของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการทนกรดของจุลินทรีย์ต้องรายงานสภาวะที่ใช้ในการศึกษา ระยะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในศึกษา ชนิดและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเชื้อ เพราะจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่มีประวัติที่มาต่างกันจะทนต่อการฆ่าเชื้อได้ไม่เท่ากัน

5. ส่วนประกอบในอาหาร

สารอาหารจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้แบคทีเรียจะเจริญได้ดีเมื่อได้รับสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งจะแตกต่างกันไป อาหารที่มีสารอาหารครบถ้วน เช่น น้ำนม จึงเป็นแหล่งสารอาหารที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากมายหลายชนิด

เกลือ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ การเติมเกลือในอาหารเพียงเล็กน้อยอาจมีผลต่อจุลินทรีย์ให้สามารถทนความร้อนเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ โดยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 4.0 จุลินทรีย์จะทนความร้อนได้เพิ่มขึ้น และโซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-3.0 สปอร์ของแบคทีเรียทนร้อนจะทนความร้อนได้เพิ่มขึ้นอีก แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 8.0 จุลินทรีย์จะทนต่อความร้อนได้ลดลง Elhariry (2008) รายงานผลของโซเดียมคลอไรด์และผลของอุณหภูมิต่อการเกิดไบโอฟิล์มของ *B. cereus* บนผิวพลาสติกโพลีสไตรีนว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทำให้เกิดสภาวะไฮเปอร์โทนิคเช่นเดียวกับการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส ทำให้เซลล์ *B. cereus* เหี่ยวหรือแตกออกได้ นอกจากนี้โซเดียมไอออน (Na^+) มีต่อสมดุลเกลือแร่ภายในไบโอฟิล์มของ

B. cereus บนผิวโพลีสไตรีนมากกว่าและรุนแรงกว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส โซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เกิดสมดุลโซเดียมไอออน และคลอรีนไอออนระหว่างภายในเซลล์ *B. cereus* กับภายนอกเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 2.5 จะเกิดแรงดันออสโมติก ดึงน้ำปริมาณมากเข้าสู่เซลล์ *B. cereus* ทำให้เซลล์เต่งและแตกออก ทำให้ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของ *B. cereus* บนผิวโพลีสไตรีนลดลง

6. ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ

อัตราการตายของจุลินทรีย์เนื่องจากสารฆ่าเชื้อ มีอัตราการลดลงแบบลอการิทึม โดยร้อยละ 90.0 ของจุลินทรีย์จะถูกทำลายใน 1 หน่วยเวลา และอีกร้อยละ 90.0 ของจุลินทรีย์ที่เหลือรอดนั้นจะถูกทำลายใน 1 หน่วยเวลาต่อมา จะเหลือจุลินทรีย์เพียงร้อยละ 10.0 ของจุลินทรีย์เริ่มต้น จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้ไม่เท่ากัน ขึ้นกับอายุของจุลินทรีย์ ความสามารถในการสร้างสปอร์ของจุลินทรีย์ และปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ ซึ่งมีผลกระทบต่อการพิจารณาระยะเวลาที่เพียงพอในการทำลายจุลินทรีย์แต่ละชนิด

7. ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ

การเพิ่มความเข้นข้นของสารฆ่าเชื้อเป็นการเพิ่มอัตราการทำลายจุลินทรีย์

8. ปริมาณสารอินทรีย์

สิ่งสกปรกที่เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถตกค้างอยู่บนพื้นผิววัสดุสัมผัสอาหารต่าง ๆ ได้ ถ้าการล้างทำความสะอาดไม่ดีพอ มีผลทำให้ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อบางชนิดลดลง เช่น คราบโปรตีนที่ตกค้างเนื่องจากการล้างทำความสะอาดไม่เหมาะสมจะทำปฏิกิริยากับคลอรีน ทำให้ ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงได้ทั้งนี้สารอินทรีย์ชนิดต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของคลอรีนไม่เท่ากัน โปรตีนจะลดประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของคลอรีนมากกว่าสตาร์ชและคาร์โบไฮเดรต

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

ตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบ ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรส ตัวอย่างจุลินทรีย์ในอากาศและตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวจาก บริษัท กิจไพศาลอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด

สารเคมี

1. สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว

1) กรดอะซิติก ร้อยละ 99.7 บริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
2) กรดแลคติก ร้อยละ 88.0 บริษัท Carlo Erba, ฝรั่งเศส
3) กรดซิตริก มวลโมเลกุล 192.13 กรัม บริษัท Carlo Erba, ฝรั่งเศส
4) กรดไฮโดรคลอริก ร้อยละ 37.0 บริษัท Merck, เยอรมัน
5) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ร้อยละ 10.0 บริษัท Ecolab, ไทย

2. สารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า ออกโซเนีย บริษัท Ecolab, ไทย

ประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 25.0 กรดอะซิติก ร้อยละ 8.0 และกรดเปอร์อะซิติก ร้อยละ 5.20

3. สารเคมีอื่น ๆ

1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, เยอรมัน
2) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
3) อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PCA (plate count agar) บริษัท Merck, เยอรมัน
4) อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA (potato dextrose agar) บริษัท Merck, เยอรมัน
5) สีย้อมแกรม

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อง Olympus รุ่น CH-BI45-2, ญี่ปุ่น
   พร้อมสไลด์และกระจกปิดสไลด์
2) เครื่องแก้ว ยี่ห้อ Schott Dulan

3) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius Basic รุ่น BA 210 S, เยอรมัน
4) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius Basic รุ่น BA 2100 S, เยอรมัน
5) เครื่องนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ (colony counter)
ยี่ห้อ Stuart Scientific, อังกฤษ
6) เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 16
7) เครื่อผสมแบบวอร์เท็ก ยี่ห้อ Vortex-genie รุ่น G560E, สหรัฐอเมริกา
8) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น PB-11, เยอรมัน
9) เครื่องตีผสม (stomacher) ยี่ห้อ Seward รุ่น BA 7021, อังกฤษ
10) นาฬิกาจับเวลา ยี่ห้อ Casio, ไทย
11) ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert, สหรัฐอเมริกา
12) ตู้เย็น ยี่ห้อ Whirlpool, Hitachi และ Haier, ไทย
13) เตาไมโครเวฟ ยี่ห้อ LG รุ่น MS2127CW, ไทย
14) ตะเกียงแอลกอฮอล์
15) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ บริษัท Tomy Seiko รุ่น SS-325, ญี่ปุ่น
16) ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Pipetman ® Nero พร้อมไมโครปิเปตทิป
17) อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB22, สหรัฐอเมริกา
18) อุปกรณ์ถ่ายเชื้อ ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) และเข็มเขี่ยเชื้อ (straight needle)
19) ฮีมาไซโตมิเตอร์ พร้อมกระจกปิดสไลด์

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส

1) ศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน

1.1) การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา จำแนกโดยการคัดแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และส่งตัวอย่างเชื้อราบริสุทธิ์ให้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จำแนกชนิดและสายพันธุ์

1.2) การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. จำแนกโดยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีด้วย API CH และ API CHB Medium, bio Mérieux, ฝรั่งเศส

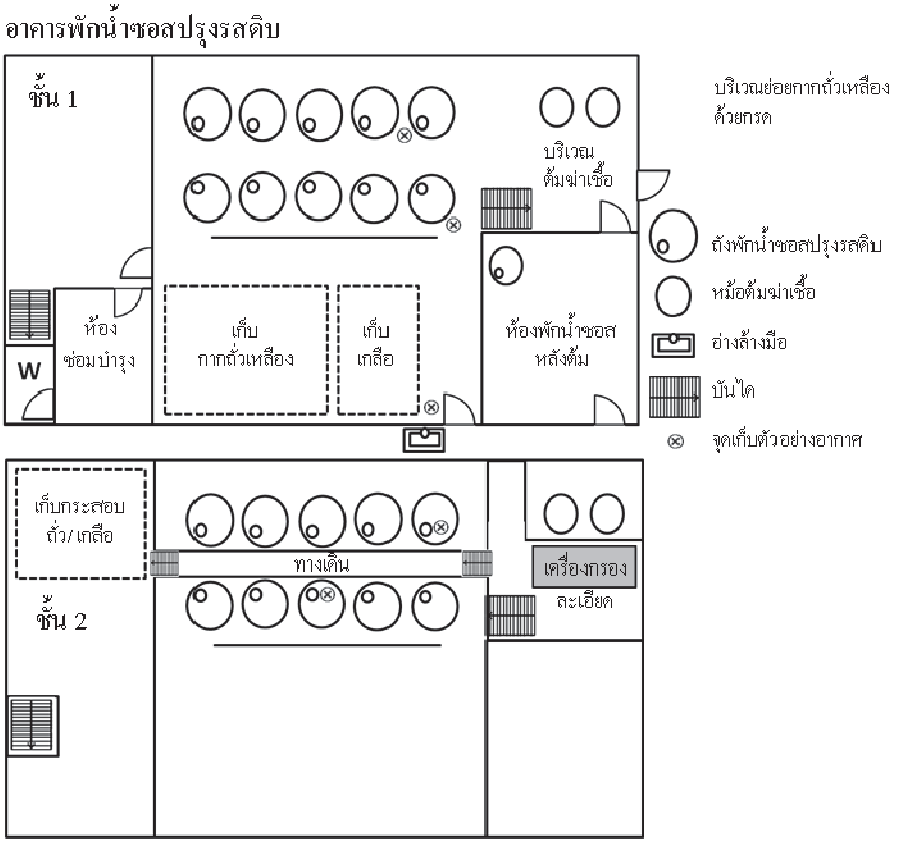
2) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

2.1) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำซอสปรุงรส

เก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต ได้แก่ น้ำซอสปรุงรสดิบจากขั้นตอนการพักรอเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ครั้งที่ 2 และน้ำซอสปรุงรสดิบจากขั้นตอนการเก็บถังพัก รวมทั้งผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสจากขั้นตอนการเก็บในคลังสินค้า โดยเก็บตัวอย่าง ๆ ละ 45 มิลลิลิตร นำไปตีผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีผสม เจือจางแบบลำดับส่วนถึง 10^{-4} เท่า pour plate บนจานอาหาร PCA เพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ pour plate บนจานอาหาร PDA เพื่อนับจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด จานอาหาร PCA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จานอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนี บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ

2.2) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ

เก็บตัวอย่างอากาศตามวิธีการของ ISO 18593 (2004) ตำแหน่งที่วางจานอาหาร PCA ภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (⊗) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ตำแหน่งที่วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ

ในการทดลองได้เปรียบเทียบจำนวน และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศ โดยวางจานอาหาร PCA ไว้ภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณด้านหน้าอาคาร 1 ใบ บริเวณเหนือถังพัก และบริเวณหน้าถังพักบริเวณละ 2 ใบ ทั้งนี้จานอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละใบถูกนำไปวางที่บริเวณต่าง ๆ แบบสุ่ม เปิดฝาจานอาหารทิ้งไว้ 15 นาที ปิดฝา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ บันทึกผลการทดลอง

2.3) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิว

เก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวตามวิธีการของ ISO 18593 (2004) โดยใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปลอดเชื้อ ถูบนพื้นผิวพื้นที่ 2.0 x 2.0 เซนติเมตร ภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ถังละ 5 จุด ใส่สำลีพันปลายไม้ลงในหลอดฝาเกลียวปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องผสมแบบวอร์เท็กให้จุลินทรีย์หลุดออกจากสำลี เจือจางแบบลำดับส่วนถึง 10^{-4} เท่า pour plate บนจานอาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญ

2.4) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์จากค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก

เก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบจากถังพักจำนวน 4 ถัง ๆ ละ 2 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากด้านบนและด้านล่างของถัง ตรวจวัดค่าพีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

2.5) การวิเคราะห์สาเหตุแหล่งที่มาของการปนเปื้อน

วิเคราะห์สาเหตุแหล่งที่มาของการปนเปื้อน โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมด ตามวิธีการของ ไพโรจน์ (2545) ร่วมกับการวิเคราะห์สาเหตุแหล่งที่มาของอันตรายตามหลักการจัดทำระบบ HACCP เรื่อง การวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมตามวิธีการของ สุวิมล (2546)

2. การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด

1) การเตรียมสปอร์ในสารแขวนลอย (spore suspension)

การเตรียมสปอร์ในสารแขวนลอยทำตามวิธีการของ Kim และคณะ (2008) โดยถ่ายเชื้อ *Bacillus* sp. บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เติม $MnSO_4 H_2O$ เพื่อเร่งการสร้างสปอร์ ส่วนเชื้อราถ่ายเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม $MnSO_4 H_2O$ นำสปอร์ของ *Bacillus* sp. ในสารแขวนลอยไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สปอร์ของเชื้อราบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จุลินทรีย์ที่เจริญต้องเป็นเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์มากกว่าร้อยละ 99.0 ปิเปตน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6.0 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดและถ่ายเชื้อที่ขูดได้รวมกันในขวดอาหารฝาเกลียว นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ล้างซ้ำ 2 ซ้ำ ปรับปริมาตรให้ได้จำนวนสปอร์ในสารแขวนลอย 6.0 log (cfu/ml) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส

2) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อ

2.1) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว

คัดเลือกจากการใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวทดสอบการทำลายสปอร์ในสารแขวนลอย เปรียบเทียบการใช้สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดไฮโดรคลอริก กับสารฆ่าเชื้อที่เป็นด่าง โซเดียมไฮโปคลอไรต์ สารฆ่าเชื้อทั้งหมดเตรียมที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดปรับค่าพีเอชเริ่มต้น ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5-6 ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที คัดเลือกชนิดของ สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว และความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ได้ผลดีที่สุดในการทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมด

2.2) การคัดเลือกใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสม

คัดเลือกจากการใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ กรดผสมกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ อัตราส่วน 1:1 (v/v) ได้แก่ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) กรดแลคติก+NaOCl (1:1) กรดซิตริก+NaOCl (1:1) และกรดไฮโดรคลอริก+NaOCl (1:1) และสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า ได้แก่ ออกโซเนีย ทั้งหมดเตรียมที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ปรับค่าพีเอชเริ่มต้น ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5-6 ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที คัดเลือกชนิดของสารฆ่าเชื้อแบบผสม และความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่ได้ผลดีที่สุดในการทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมด เปรียบเทียบกับผลการใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว

2.3) การคัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

การคัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อ ทำโดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อ ชนิดและความเข้มข้นที่คัดเลือก ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที เลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดได้

3. การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

พิจารณาระดับความรุนแรงของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่แตกต่างจากสภาวะทดสอบ ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานผลิตซอสปรุงรสที่ประสบปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์

1) การออกแบบระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ

ออกแบบระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ เพื่อลดข้อจำกัดเนื่องจากขนาดของถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบมีขนาดใหญ่ และวิธีการฆ่าเชื้อภายในถังพักของโรงงานที่ให้พนักงานเข้าไปทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายในถังพักเป็นหลัก ที่ทำให้การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อทำได้ยากและทำได้ไม่ทั่วถึง และนำระบบการฆ่าเชื้อที่ออกแบบไปประยุกต์ใช้ในการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

2) การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

เปรียบเทียบประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกกับสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม โดยวิธีการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักตามวิธีการของ ISO 18593 (2004) ก่อนและหลังการใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ 2 จำนวนถัง เปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสอีก 2 ถัง

3) การทวนสอบประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

ทวนสอบโดยเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพักที่ฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม เก็บตัวอย่างน้ำซอสในถังพัก และนับจำนวนจุลินทรีย์ตามวิธีการของ ไพโรจน์ (2545) เริ่มการทวนสอบเมื่อเริ่มรอบการผลิตและบรรจุน้ำซอส-ปรุงรสดิบในถังพัก ระยะเวลาการทวนสอบที่ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรมสถิติ SAS system version 9.0

บทที่ 4

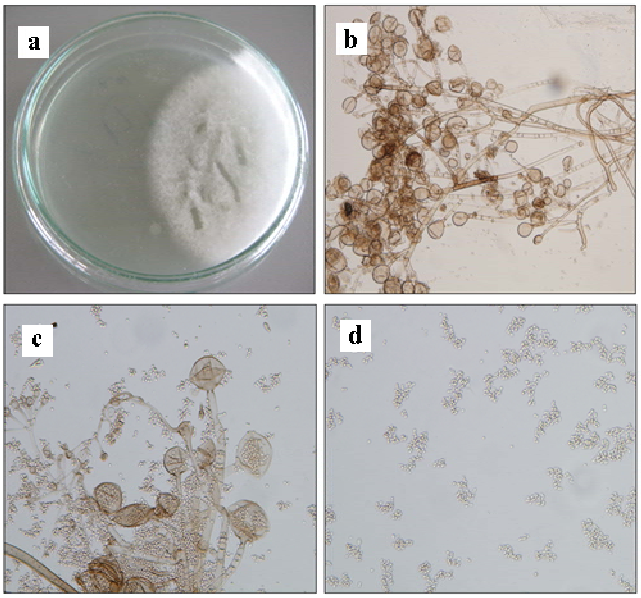
ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

1. ศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส

1) ศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

1.1) การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราเส้นใยสีขาว

จากการคัดแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราเส้นใยสีขาว และส่งตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราที่คัดแยกได้นี้ให้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา (ภาพที่ 7)



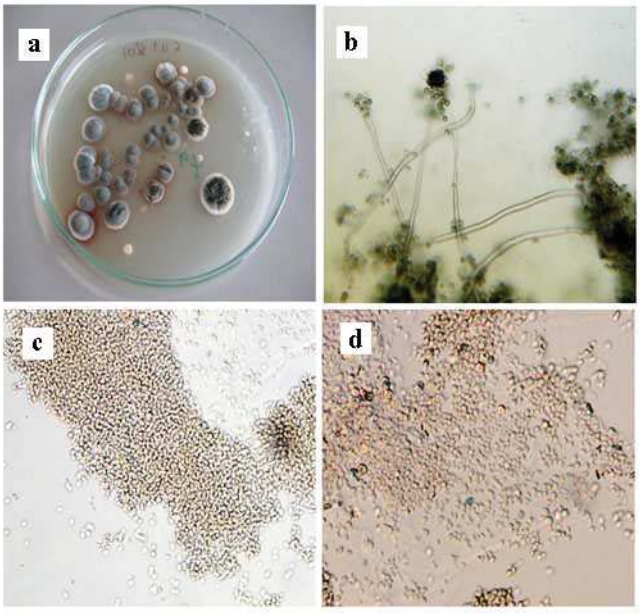
ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเส้นใยสีขาว *Chrysosporium* sp.

เมื่อ (a) โคโลนีของเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวฟู (b) conidiogenous cells และไฮฟาของเชื้อราเส้นใยสีขาว (c) สปอร์แบบ chlamydospores และ (d) อัปสปอร์ของเชื้อราเส้นใยสีขาว

จากภาพที่ 7 เป็นภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า สังเกตเห็นไฮฟีและ conidiogenous cells ของเชื้อราเส้นใยสีขาว มีลักษณะใสคล้ายแก้วและที่ปลายไฮฟีมีสปอร์แบบ chlamydospores ลักษณะค่อนข้างกลม ซึ่งเหมือนกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Chrysosporium* sp. ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อราสีขาวที่ปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส คือ *Chrysosporium* sp.

1.2) การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราเส้นใยสีเทา

จากการคัดแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราเส้นใยสีเทา และส่งตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราที่คัดแยกได้นี้ให้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา พบว่าโคโลนีของเชื้อรามีลักษณะเป็นสีเทา ขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า สังเกตพบราก ที่ฐานรากมีก้านชูสปอร์เป็นกิ่งก้านแผ่ออกทางด้านข้าง บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีอับสปอร์รูปร่างคล้ายร่ม ใสไม่มีสี ตามก้าน columella มีปล้องทรงกลม spores globose และ subglobose ใสคล้ายแก้วและมีผิวเรียบ (ภาพที่ 8)



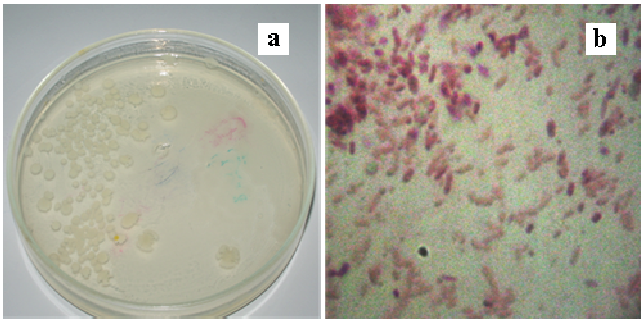
ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเส้นใยสีเทา *R. miehei*

เมื่อ (a) โคโลนีของเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นใยสีเทา (b) ราก และก้านชูสปอร์เป็นกิ่งก้านแผ่ออกทางด้านข้าง ปลายก้านชูสปอร์มีอับสปอร์ (c) และ (d) อับสปอร์ใสคล้ายแก้วและมีผิวเรียบ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

จากภาพที่ 8 พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเส้นใยสีเทาเหมือนกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. miehei* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อราสีเทาที่ปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส คือ *R. miehei*

1.3) การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของ *Bacillus* sp.

คัดแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เจริญบน PCA โคโลนีมีสีขาวครีม ขนาดประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก และมีเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 9) จำแนกสายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. โดยทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีด้วย API CH และ API CHB Medium bioMérieux, ฝรั่งเศส



ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

เมื่อ (a) โคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus* sp. (b) เซลล์ *Bacillus* sp. ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า รูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก

จากการศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน สามารถอภิปรายผลการทดลองได้ว่า *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* เป็นจุลินทรีย์สำคัญที่อาจเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส เพราะสปอร์ของ *Bacillus* sp. สามารถเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้ ไบโอฟิล์มและสปอร์ที่เกิดขึ้นใหม่จะทนต่อการออกซิไดซ์ด้วยสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้น (Elhariry, 2008) การฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบของโรงงานที่ใช้คลอรีนเหลวเป็นสารฆ่าเชื้อจึงไม่เพียงพอที่จะกำจัดอันตรายจากการปนเปื้อนสปอร์และไบโอฟิล์มของ *Bacillus* sp. และเป็นสาเหตุของปัญหาการปนเปื้อนภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ส่วนเชื้อรา *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายแบบเฉียบพลัน

หรืออันตรายถึงแก่ชีวิต (Gun และคณะ 2003) แต่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2549) ได้กำหนดให้พบยีสต์และเชื้อราในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสได้ไม่เกิน 10 โคโลนี (ภาคผนวก ก) จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานสารฆ่าเชื้อของจุลินทรีย์การพบจุลินทรีย์เริ่มต้นมาก โอกาสที่จุลินทรีย์นั้นจะเหลือรอดจากการฆ่าเชื้อ และปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยิ่งมากขึ้นด้วย (สุมณฑา, 2545) ดังนั้นการพบเชื้อรา *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* จำนวนมากในรูปของไบโอฟิล์มปนเปื้อนในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ จึงมีโอกาสพบเชื้อรานี้จะปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสได้ และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เพราะ *Chrysosporium* sp. ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และโรคผิวหนังอักเสบ (Gan และคณะ 2003) และ *R. miehei* สร้างเอนไซม์ไลเปสได้ (บุษกร, 2552) สามารถย่อยไขมันได้กรดไขมัน ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้เกิดกลิ่นหืนในระหว่างการเก็บในถังพักได้

2) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ปนเปื้อน

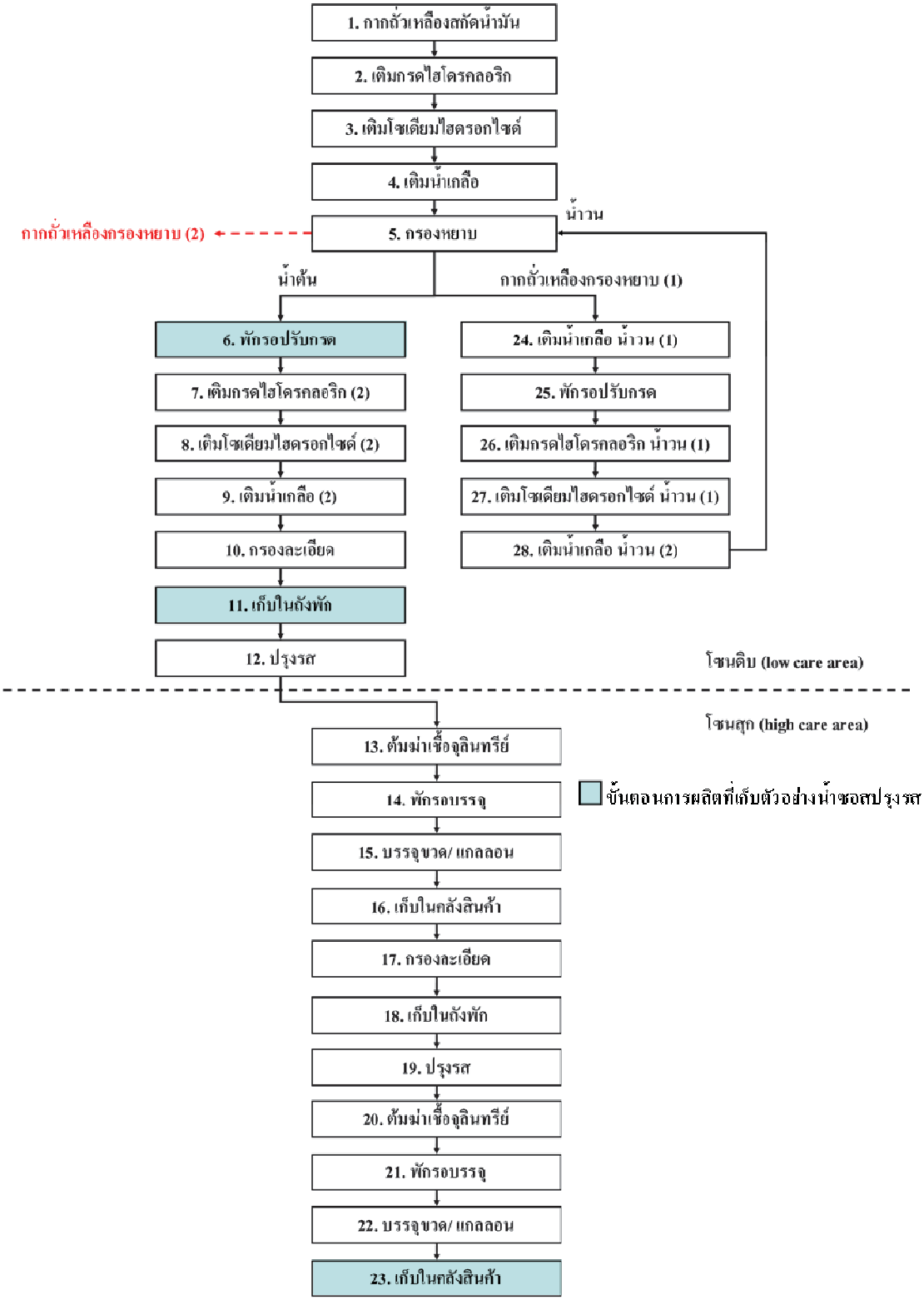
2.1) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ในน้ำซอสปรุงรส

จากการเก็บตัวอย่างซอสปรุงรสดิบก่อนขั้นตอนการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์น้ำซอสปรุงรสดิบจากขั้นตอนการเก็บในถังพัก และผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสจากขั้นตอนการเก็บในคลังสินค้า ร่วมกับการสอบถามข้อมูลจากโรงงานผลิตซอสปรุงรส พบว่าน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพักมี 2 ชนิด ได้แก่ น้ำซอสปรุงรสดิบน้ำต้น และน้ำซอสปรุงรสดิบน้ำวน (ภาพที่ 10)

น้ำต้น คือ น้ำซอสปรุงรสดิบที่ได้จากการย่อยโปรตีนกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมัน ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดสาร 3 เอ็มซีพีดี ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ กรองหยาบ น้ำซอสที่กรองได้จะถูกนำไปย่อยโปรตีนกากถั่วเหลือง ทำให้เป็นกลาง และปรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์อีกครั้ง กรองละเอียด น้ำซอสปรุงรสก่อนเก็บในถังพักน้ำต้นต้องมีค่าพีเอช 5.0-6.2 และมีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 23-26°บริกซ์ เก็บในถังพัก

น้ำวน คือ น้ำซอสปรุงรสดิบที่ได้จากการนำกากถั่วเหลือง จากการกรองหยาบน้ำต้นไปปรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ แล้วกลับไปย่อยโปรตีนกากถั่วเหลือง ทำให้เป็นกลาง ปรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์อีกครั้ง กรองละเอียด น้ำซอสปรุงรสก่อนเก็บในถังพักน้ำวนต้องต้องมีค่าพีเอช 5.0-6.2 และมีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 23-26°บริกซ์ ก่อนนำไปเก็บในถังพักน้ำต้น และน้ำวนที่เก็บในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบจึงมีความแตกต่างกัน คือ น้ำต้นมีโปรตีนมากกว่าและสีน้ำตาลคล้ำขุ่นกว่าน้ำวน

ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรส และขั้นตอนการผลิตน้ำซอสปรุงรส (ภาพที่ 10) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 10 แผนภูมิกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส

ที่มา : บริษัท กิจไพศาลอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด (2552)

ตารางที่ 2 จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในน้ำซอสปรุงรส ที่เก็บตัวอย่างจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต

น้ำซอสปรุงรส	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml)		Mean ± SD	จุลินทรีย์ที่ตรวจพบ
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2		
ถังพักรอปรับกรด	3.04	3.11	3.08 ± 0.05	- *Bacillus* sp.* - *Staphylococcus* sp.*
ถังพักน้ำต้น ถังที่ (1)	2.30	2.00	2.15 ± 0.21	- *Bacillus* sp.*
ถังพักน้ำต้น ถังที่ (2)	2.30	2.00	2.15 ± 0.21	- *Staphylococcus* sp.*
ถังพักน้ำวน ถังที่ (1)	2.58	1.00	1.79 ± 1.12	- *Chrysosporium* sp.
ถังพักน้ำวน ถังที่ (2)	2.40	1.95	2.18 ± 0.31	- *R. miehei*
คลังสินค้า (1)	3.14	1.30	2.22 ± 1.30	- *Bacillus* sp.*
คลังสินค้า (2)	3.06	2.52	2.79 ± 0.38	- *Staphylococcus* sp. - *Chrysosporium* sp. - *R. miehei* - *Aspergillus* sp.

หมายเหตุ : * คือ จุลินทรีย์ชนิดที่พบมาก

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมซอสปรุงรสมีหลายชนิด เพราะนอกจาก *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* แล้ว ยังพบ *Aspergillus* sp. และ *Staphylococcus* sp. ด้วย ทั้งนี้สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2549) กำหนดให้ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรส 0.01 กรัม ต้องไม่พบ *B. cereus* และเชื้อราต้องไม่เกิน 10 โคโลนี (ภาคผนวก ก) ดังนั้นการพบ *Bacillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสจึงยังมีจุลินทรีย์สำคัญ เพราะมีโอกาสเสี่ยงที่ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามมาตรฐานกำหนด และมีความเสี่ยงต่อความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภค

เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบที่พบว่า ขั้นตอนการพักรอปรับกรดมีจำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ย 3.08±0.05 log (cfu/ml) เมื่อผ่านการย่อยโปรตีนกากถั่วเหลืองด้วยกรดและทำให้เป็นกลางด้วยด่างแล้วนำไปเก็บในถังพัก พบว่าน้ำซอสปรุงรสในถังพักมีจำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยลดลงเหลือประมาณ 2.18±0.31 log (cfu/ml) สามารถอภิปรายผลการทดลองได้ว่า

ถึงแม้ขั้นตอนการเติมกรดไฮโดรคลอริก และขั้นตอนการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไม่ได้ออกแบบมาเพื่อการลดและกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน แต่ขั้นตอนดังกล่าวสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนก่อนการเก็บน้ำซอสปรุงรสดิบในถังพักได้ และเมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เก็บในคลังสินค้า เปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก พบว่าจุลินทรีย์มีจำนวนใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แสดงว่าการฆ่าเชื้อในน้ำซอสปรุงรสด้วยความร้อนโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่ในถังพักมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่มาก จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นก่อนการต้มฆ่าเชื้อจึงมาก โอกาสที่จุลินทรีย์จะเหลือรอดจากการฆ่าเชื้อจึงมากด้วย (บุษกร, 2552) ดังนั้นในน้ำซอสปรุงรสดิบที่มีสปอร์และไบโอฟิล์มของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* จึงไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยการต้มได้ จึงพบ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ในผลิตภัณฑ์ที่เก็บในคลังสินค้า จำนวนใกล้เคียงกับที่พบในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพักได้

2.2) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ในอากาศ

การทดลองเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในอากาศ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในอากาศในบริเวณต่าง ๆ ภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ

ตัวอย่างอากาศ	จำนวนจุลินทรีย์ log cfu/ plate		Mean $\pm$ SD	จุลินทรีย์ที่ตรวจพบ
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2		
หน้าอาคาร	2.40	-	2.30	- *Bacillus* sp.* - *Staphylococcus* sp.*
หน้าถังพัก	3.47	3.41	3.44 $\pm$ 0.04	- *Bacillus* sp.* - *Staphylococcus* sp.*
เหนือถังพัก	4.10	4.08	4.09 $\pm$ 0.01	- *Bacillus* sp.* - *Staphylococcus* sp.* - *Chrysosporium* sp. - *Aspergilluss* sp.

หมายเหตุ : * คือ จุลินทรีย์ชนิดที่พบมาก

จากตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนอยู่ในอากาศภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ พบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในอากาศมากที่สุด คือ *Bacillus* sp. และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในอากาศแต่ละบริเวณ พบว่าบริเวณที่มีจุลินทรีย์ในอากาศมากที่สุด คือ บริเวณเหนือถังพัก รองลงมาคือบริเวณหน้าถังพัก และบริเวณด้านหน้าอาคาร ตามลำดับ และมีเฉพาะอากาศในบริเวณเหนือถังพักที่พบ *Chrysosporium* sp. และไม่พบแสดงว่า *R. miehei* ในอากาศภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ แสดงว่าการปนเปื้อนของ *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ในถังพักไม่ได้มีสาเหตุมาจากอากาศภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบปนเปื้อนข้ามเข้าไปในถังพัก *S. aureus* พบในอากาศภายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ได้ในทุกขั้นตอนการผลิต (Salustiano, 2003) และพบ *Chrysosporium* sp. ในอากาศเหนือถังพักอาจมีสาเหตุมาจากสปอร์ของเชื้อราถูกปล่อยออกมาจากไบโอฟิล์มของเชื้อราที่ปกคลุมผิวหน้าของน้ำซอสปรุงรสดิบในถังพัก (Xinming และ Xinna, 2009) หรืออาจมีสาเหตุจากพนักงานในโรงงานเพราะ *Chrysosporium* sp. พบได้ตามผิวหนัง และเส้นผมของคนและสัตว์ (Gan และคณะ 2003)

2.3) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์บนพื้นผิว

จากเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อตามวิธีการของโรงงาน และการสอบถามข้อมูลจากผู้ประกอบการ สามารถอธิบายได้ว่าวิธีการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบตามวิธีการของโรงงาน แบ่งเป็น 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ฆ่าเชื้อภายในถังพักหลังสิ้นสุดการผลิตประจำปี และครั้งที่ 2 ฆ่าเชื้อภายในถังพักซ้ำอีกครั้งก่อนเริ่มการผลิตใหม่ โดยมีวิธีการดังนี้

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 : ฆ่าเชื้อภายในถังพักหลังสิ้นสุดการผลิต

พนักงานฉีดพ่นน้ำประปาล้างคราบน้ำซอสปรุงรสดิบที่ตกค้างอยู่ภายในถังพัก แล้วใช้แปรงด้ามยาวขัดทำความสะอาด เทสารทำความสะอาดภายในถังพักโดยรอบแล้วขัดทำความสะอาดซ้ำ แล้วจึงฉีดน้ำไล่สารทำความสะอาดและคราบน้ำซอสออก จากนั้นจึงเตรียมสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม โดยใช้คลอรีนเหลวผสมกับน้ำประปา อัตราส่วนที่โรงงานกำหนด แล้วให้พนักงานตักสารฆ่าเชื้อราดภายในถังพักโดยรอบ ปล่อยพักไว้เป็นเวลาประมาณ 2 เดือน

การฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 : ฆ่าเชื้อภายในถังพักซ้ำก่อนเริ่มการผลิตใหม่

2-3 วัน ก่อนเริ่มการผลิตประจำปีถัดไป พนักงานจะล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายในถังพัก (ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1) อีกครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 11

ภาพที่ 11 วิธีการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบตามวิธีการของโรงงาน

จากการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก (ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1) และพักทิ้งไว้นานกว่า 2 เดือน พบว่า *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* เป็นจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำตามวิธีการของโรงงาน

ก่อนการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก (ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1) หลังสิ้นสุดการผลิต

จากการทดลองพบว่า ภายในถังพักด้านบนพบจุลินทรีย์เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อมากที่สุด คือ 0.91 ± 0.02 log cfu/cm^2 มากกว่าภายในถังพักด้านข้างและด้านล่างที่พบบนพื้นผิว 0.35 ± 0.03 log cfu/cm^2 และ 0.11 ± 0.05 log cfu/cm^2 ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะภายในถังพักด้านบนมีความโค้ง และเป็นบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จึงมีโอกาสพบจุลินทรีย์เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อได้มากกว่าบริเวณอื่น ๆ ภายในถังพัก ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก

ถังพักน้ำซอสปรุงรส	ตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ	จำนวนจุลินทรีย์ log cfu/cm^2		Mean ± SD	จุลินทรีย์ที่ตรวจพบ
		ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2		
ก่อนการฆ่าเชื้อซ้ำ	ด้านบน	0.92	0.90	0.91 ± 0.02	- *Bacillus* sp.*
	ด้านข้าง	0.33	0.37	0.35 ± 0.03	- *Staphylococcus* sp.*
	ด้านล่าง	0.15	0.08	0.11 ±0.05	- *Chrysosporium* sp.
					- *R. miehei*
หลังการฆ่าเชื้อซ้ำ	ด้านบน	0.08	0.12	0.10 ± 0.03	- *Bacillus* sp.*
	ด้านข้าง	0.30	0.30	0.30 ± 0.00	- *Staphylococcus* sp.*
	ด้านล่าง	0.21	0.33	0.27 ± 0.08	- *Chrysosporium* sp.
					- *R. miehei*

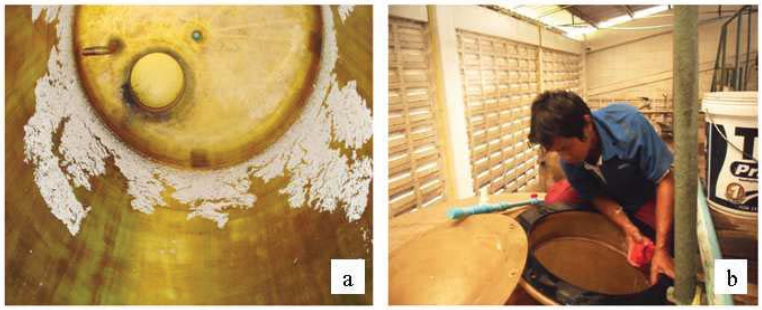
หมายเหตุ : * คือ จุลินทรีย์ชนิดที่พบมาก

จากตารางที่ 4 พบว่า *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* เป็นจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำตามวิธีการของโรงงาน

ก่อนการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก (ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1) หลังสิ้นสุดการผลิต จากการทดลองพบว่า ภายในถังพักด้านบนพบจุลินทรีย์เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อมากที่สุด คือ 0.91 ± 0.02 log cfu/cm^2 มากกว่าภายในถังพักด้านข้างและด้านล่างที่พบบนพื้นผิว 0.35 ± 0.03 log cfu/cm^2 และ 0.11 ± 0.05 log cfu/cm^2 ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะภายในถังพักด้านบนมีความโค้ง และเป็นบริเวณที่ทำความสะอาดได้ยาก จึงมีโอกาสพบจุลินทรีย์เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อได้มากกว่าบริเวณอื่น ๆ ภายในถังพัก นอกจากนี้คราบโปรตีนสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบคลอรีนทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อลดลง (Peng และคณะ, 2002 และ Marriott, 2006)

หลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก (ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1)

เมื่อทราบว่าภายในถังพักด้านบนเป็นบริเวณที่ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้ยาก ดังนั้นจึงเน้นให้พนักงานเน้นย้ำทำความสะอาดภายในถังพักด้านบนเพิ่มขึ้น ก่อนการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ไบโอฟิล์มที่เหลืออยู่ภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้านบน และการเน้นย้ำล้างทำความสะอาดภายในถังพักด้านบน

เมื่อ (a) ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวภายในถังพักด้านบน ที่ยังคงปนเปื้อนอยู่หลังสิ้นสุดการผลิต และ (b) พนักงานเน้นย้ำล้างทำความสะอาดภายในถังพักด้านบน ก่อนการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบตามวิธีการของโรงงาน

จากตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักด้านข้างและด้านล่าง ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 หลังสิ้นสุดการผลิตประจำปี พบว่าก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก ที่บริเวณด้านข้าง และด้านล่างมีจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวก่อนและหลังการฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพัก การฆ่าเชื้อซ้ำภายในถังพักด้วยคลอรีนเหลวตามวิธีการเดิมของโรงงานไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนภายในถังพักได้ แสดงว่า *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *R. miehei* และ *Chrysosporium* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อการออกซิไดซ์ด้วยคลอรีนเหลวที่โรงงานใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ นอกจากนี้วิธีการฆ่าเชื้อโดยการเทสารฆ่าเชื้อและราดลงบนผนังภายในถังพักโดยรอบมีผลทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้ออาจไม่นานเพียงพอที่จะสามารถทำลายจุลินทรีย์เหล่านี้ จึงมีโอกาสที่ไบโอฟิล์มปนเปื้อนภายในถังพักจะมีสาเหตุหลักมาจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักด้วยสารฆ่าเชื้อและวิธีการฆ่าเชื้อที่ไม่เหมาะสม

เนื่องจากเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิก เช่น *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์จะยึดเกาะบนผิวภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบได้ดี เพราะถังพักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะมีความเป็นไฮโดรโฟบิกเช่นกัน จึงเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์มายึดเกาะบนพื้นผิวภายในถังพัก และทนต่อสารฆ่าเชื้อได้เพิ่มขึ้นเมื่อเจริญเป็นไบโอฟิล์ม (Xinming และ Xinna, 2009)

ดังนั้นแนวทางการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่มีสาเหตุการปนเปื้อนมาจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ คือ กากคัดเลือกสารฆ่าเชื้อชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในการกำจัดจุลินทรีย์และสปอร์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในถังพักทั้งหมดได้ ออกแบบวิธีการและอุปกรณ์ฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบมากกว่าวิธีการฆ่าเชื้อเดิมของโรงงาน

2.4) ศึกษาสาเหตุแหล่งที่มาของจุลินทรีย์จากค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก

จากการทดลองพบว่าน้ำซอสปรุงรสดิบภายในถังพักเดียวกันมีค่าพีเอช และความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของน้ำซอสปรุงรสดิบจากด้านบนและด้านข่างของที่เก็บในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ ถังพักน้ำต้น และถังพักน้ำวน

ตัวอย่างน้ำซอส	ค่าพีเอช		ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (°บริกซ์)	
	ส่วนบน	ส่วนล่าง	ส่วนบน	ส่วนล่าง
น้ำต้น ถังที่ 1	5.28	5.50	28.0	27.8
น้ำต้น ถังที่ 2	5.18	5.02	28.0	28.0
น้ำวน ถังที่ 1	5.36	4.92	23.4	23.0
น้ำวน ถังที่ 2	6.93	4.71	24.0	23.8

เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในถังพักถังเดียวกัน ถังพักน้ำต้นถังเดียวกัน มีค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ถังพักน้ำวนถังเดียวกัน มีค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในถังพักชนิดเดียวกัน เปรียบเทียบน้ำต้นถังที่ 1 กับถัง 2 มีค่าพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) เปรียบเทียบน้ำวนถังที่ 1 กับถังที่ 2 พบว่ามีค่าพีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ระดับพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ภายในถังพักถังเดียวกันที่ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าระดับพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ไม่ใช่ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการปนเปื้อนไบโอฟิล์มบนผิวหน้าน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก

ดังนั้นจากการศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรสได้ว่า การปนเปื้อนไบโอฟิล์มภายในถังพักมีสาเหตุจาก *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ และจากผลการทดลองสามารถวิธีการวิเคราะห์ตามวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมได้ตามหลักการจัดทำเอกสาร HACCP (ภาคผนวก ข)

2. การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด

2.1 การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว

1) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp.

จากการทดสอบการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ด้วยสารเฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว ที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่ 5 นาที และ 10 นาที พบว่าการใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้

สามารถอภิปรายผลการทดลองได้ดังนี้

ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนมีค่าพีเอชเริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 6 ค่าพีเอชมากกว่าค่าพีเคเอ (pKa) ของกรดที่ใช้ในการทดลอง กรดไฮโดรคลอริก กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดอะซิติกจึงอยู่ในรูปที่แตกตัวเกือบทั้งหมด กรดที่อยู่ในรูปที่แตกตัวมาก จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อน้อย ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6 กรดไฮโดรคลอริก กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดอะซิติกจึงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อต่ำ และเนื่องจากจุลินทรีย์มีกลไกตอบสนองต่อความเป็นกรดภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น กรดที่แตกตัวจะไม่สามารถผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ ส่วนกรดที่ไม่แตกตัวที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์และแตกตัว ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์จุลินทรีย์ต่ำลง แต่กรดที่อยู่ในรูปแตกตัวอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์นี้จะถูกขับออกโดยโปรตอนภายในเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวจับกรดที่แตกตัวนี้ และขับออกสู่ภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ (ศุภชัย, 2549) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 และในภาคผนวก ค

ตารางที่ 6 จำนวนสปอร์ *Bacillus* sp. หลังจากฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว	ค่าพีเอชเริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
		5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	6.75	5.81 ± 0.15	5.73 ± 0.03	-	-
กรดอะซิติก	6.29	5.62 ± 0.15	5.59 ± 0.02	3.14	2.39
กรดซิตริก	6.77	5.74 ± 0.13	5.90 ± 0.07	1.17	-2.98
กรดแลคติก	6.07	5.58 ± 0.14	5.77 ± 0.12	3.91	-0.79
กรดไฮโดรคลอริก	6.26	5.49 ± 0.08	5.67 ± 0.12	5.43	1.08
โซเดียมไฮโปคลอไรต์	10.51	5.89 ± 0.01	5.68 ± 0.08	-1.48	0.87

จากตารางที่ 6 ถึงแม้ว่ากรดและโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ แต่การใช้กรด หรือโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่เป็นสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้ ทั้งนี้เพราะโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 10.51 จะแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัส และคลอรีนออกไซด์ได้น้อย จึงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อน้อย (Marriott, 2006) สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว กรดและโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จึงไม่สามารถสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้

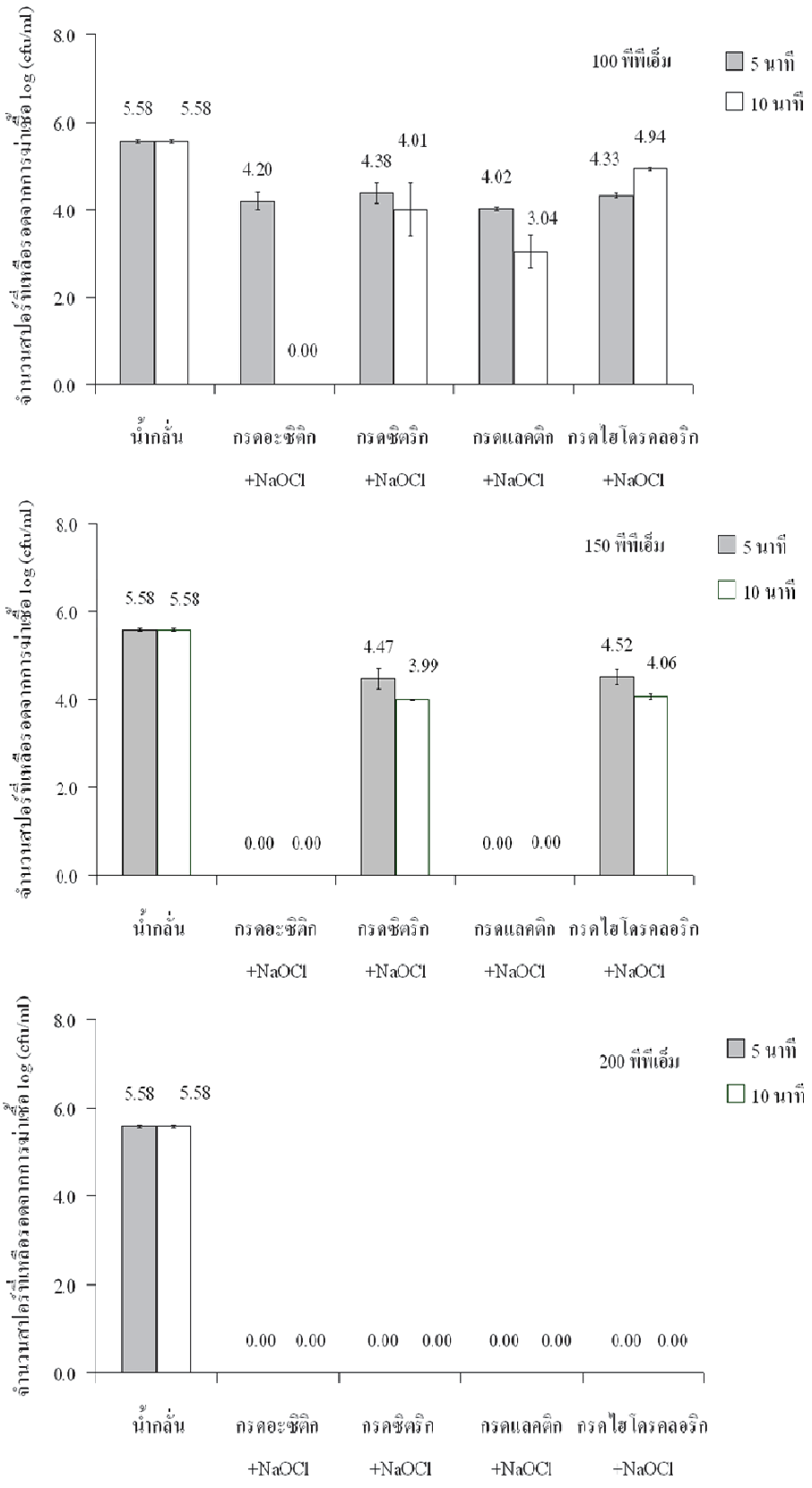
จากผลการทดสอบการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. การใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการทดสอบสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ระดับความเข้มข้นอื่น และไม่ได้ทดสอบสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวกับเชื้อรา *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* เพราะสปอร์ของแบคทีเรียทนต่อการฆ่าเชื้อได้มากกว่าสปอร์ของเชื้อรา ถ้าสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวจึงไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ได้

2.2 การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบผสม

1) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp.

จากการทดลอง พบว่าการใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการสามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้ ต่างจากการใช้สารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเท่ากัน คือ ค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6 และความแข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ทั้งนี้เพราะสารฆ่าเชื้อผสมที่เป็นกรดผสมกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะเสริมฤทธิ์ซึ่งกันในการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. (ภาพที่ 13) เนื่องจากการผสมกรดกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์มีผลทำให้ค่าพีเอชของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในสารฆ่าเชื้อแบบผสมลดลง ที่ค่าพีเอช 5-6 โซเดียม-ไฮโปคลอไรต์ จะแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัส และคลอรีนออกไซด์ได้เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจึงเพิ่มขึ้น โดยกรดไฮโปคลอรัส และคลอรีนออกไซด์จะกระตุ้นการงอกสปอร์และทำลาย *Bacillus* sp. ที่เกิดจากการงอกสปอร์ โดยทำลายกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน เปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นไนไทร์ตและอัลดีไฮด์ ทำให้โปรตีนภายในเซลล์ *Bacillus* sp. ตกตะกอนเอนไซม์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ *Bacillus* sp. เสียสภาพ (Marriott, 2006) และเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ *Bacillus* sp. เสียสภาพ กรดอ่อนและกรดแก่ทั้งที่แตกตัวและไม่แตกตัวจะสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ *Bacillus* sp. ได้ สารฆ่าเชื้อที่เป็นกรดจึงเสริมฤทธิ์โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (synergist effect) ในการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. เนื่องจากกรดที่ไม่แตกตัวและเข้าสู่ภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. และแตกตัวทำให้สมดุลค่าพีเอชภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. ลดลง กรดที่แตกตัวอยู่ภายนอกเซลล์ของ *Bacillus* sp. จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนภายในเซลล์แพร่ออกสู่ภายนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์เหี่ยวหรือแตกออก นอกจากนี้ค่าพีเอชภายในเซลล์ *Bacillus* sp. ยิ่งลดลง จะยิ่งทำให้โซเดียมไฮโปคลอไรต์แตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัส และคลอรีนออกไซด์เพิ่มขึ้น สารฆ่าเชื้อแบบผสมจึงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่าสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวในการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. (ศุภชัย, 2549)

จากผลการทดลองสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ คือ กรดผสมโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl)ได้แก่ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) กรดซิตริก+NaOCl (1:1) กรดแลคติก+NaOCl (1:1) และกรดไฮโดรคลอริก+NaOCl (1:1) ที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 6 ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที พบว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมชนิดที่มีประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. มากที่สุดสองอันดับแรก คือ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) เพราะสารฆ่าเชื้อแบบผสมทั้งสองชนิดนี้ สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมชนิดอื่น คือ ที่ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 13



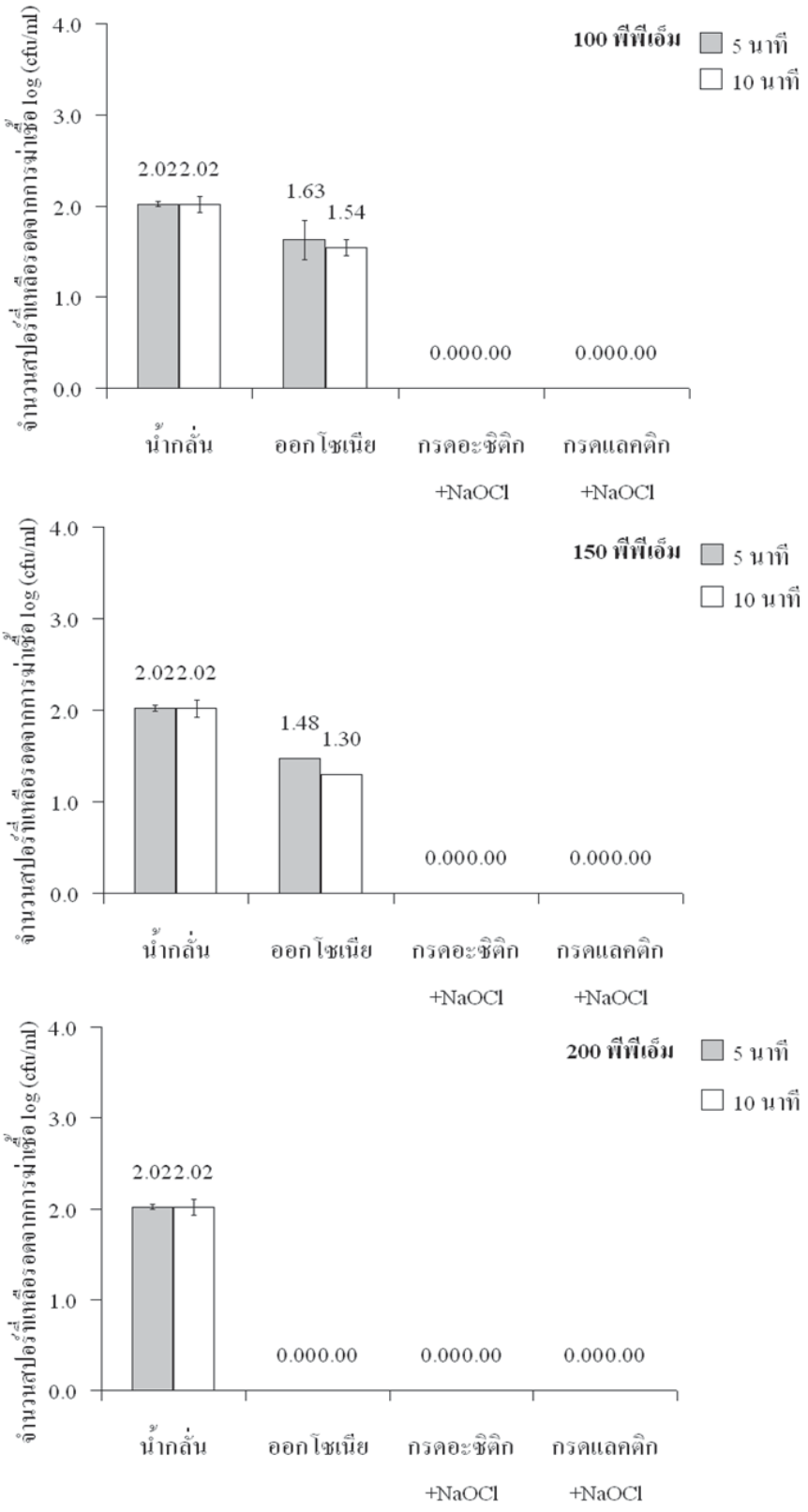
ภาพที่ 13 จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม

ดังนั้นในคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. ได้ จึงคัดเลือกกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) แลกรดแลคติก+NaOCl (1:1) เป็นสารฆ่าเชื้อที่จะนำไปใช้ทดสอบการทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei*

2) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่สามารถทำลายสปอร์ *Chrysosporium* sp.

จากการทดลองใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือกจากห้องปฏิบัติการ ได้แก่ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) เปรียบเทียบกับออกโซเนีย ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า พบว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมทั้งสามชนิดสามารถทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ได้ แต่สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีกว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า เพราะที่ความเข้มข้นเดียวกัน และระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อเท่ากัน คือ ที่ความเข้มข้นของ 100 และ 150 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที มีเพียงกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) เท่านั้นที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ได้ทั้งหมด ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบการทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp. คือ ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น หรือที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. จะเพิ่มขึ้นด้วย

เนื่องจากการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันของสารฆ่าเชื้อแบบผสมระหว่างสารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรดกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง ทำให้การทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. เกิดขึ้นทั้งจากภายในและภายนอกสปอร์ ประสิทธิภาพการทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ด้วยออกโซเนีย น้อยกว่ากรดอะซิติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ทั้งนี้อาจเพราะอัตราส่วนของส่วนผสม 1:1 ของกรดที่ผสมกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 10 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรต์แตกตัวเกิดกรดไฮโปคลอรัสซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูงและมีปริมาณมากเกินพอ ต่างจากออกโซเนียซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสมสำเร็จ ที่ประกอบด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอะซิติก และกรดเปอร์อะซิติกที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเนื่องจากผลของกรด และผลของแรงดึงดูดประจุที่เกิดจากการแตกตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้กรดแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลายระบบภายในเซลล์ *Chrysosporium* sp. ได้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อน้อยกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 14 และในภาคผนวก ค

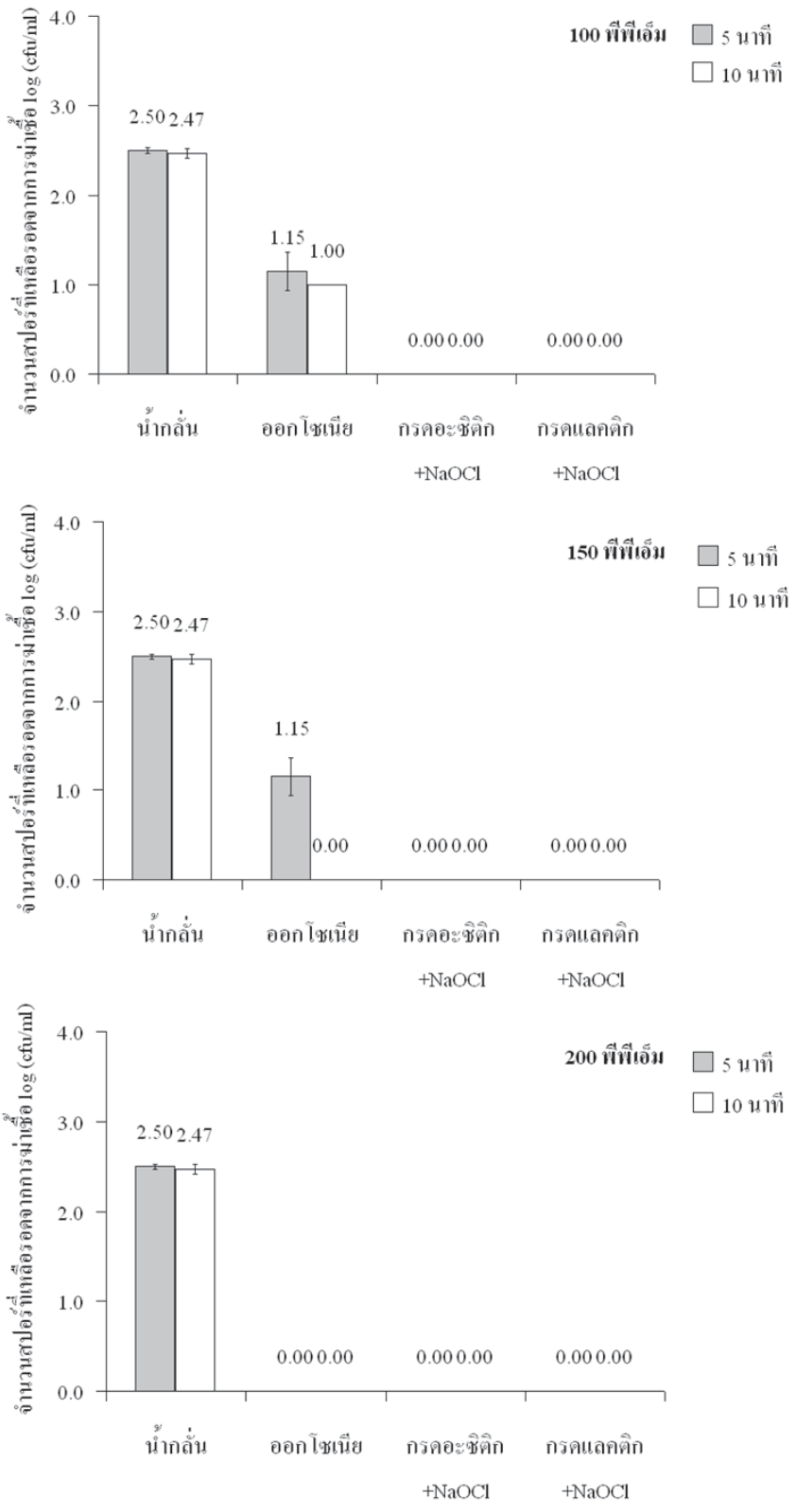


ภาพที่ 14 จำนวนสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก

3) การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่สามารถทำลายสปอร์ *R. miehei*

จากการทดลองใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือกจากห้องปฏิบัติการ ได้แก่ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) กรดแลคติก+NaOCl (1:1) และออกโซเนียในการทำลายสปอร์ของ *R. miehei* พบว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมทั้งสามชนิดสามารถทำลายสปอร์ของ *R. miehei* ได้ แต่สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่าสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้า ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบการทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Chrysosporium* sp. คือ ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์ของ *R. miehei* จะเพิ่มขึ้นด้วย การใช้สารประกอบคลอรีนความเข้มข้นต่ำ ๆ 1 พีพีเอ็ม ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นจึงจะสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Mucor piriformis* ได้ (Roberts, 1994)

ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 10 นาที การใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมในห้องปฏิบัติการแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัสที่มากเกินพอจึงมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อ แต่เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่ใช้ในการทดลอง ที่ความเข้มข้นเดียวกันการเตรียมออกโซเนียจะคิดความเข้มข้นโดยเทียบจากความเข้มข้นของกรดเพอร์อะซิติกเป็นหลัก ถ้าต้องการกรดเพอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม จะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 721.15 พีพีเอ็ม และ กรดอะซิติก 230.77 พีพีเอ็ม กลไกการทำลายจุลินทรีย์ด้วยออกโซเนียเกิดจากกรดเพอร์อะซิติกเป็นสำคัญ เนื่องจากกรดเพอร์อะซิติกสามารถออกซิไดซ์เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย ตลอดจนสปอร์ของยีสต์และเชื้อราได้ การออกซิไดซ์นี้ทำให้อิเล็คตรอนเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในสารฆ่าเชื้อแบบผสม ออกโซเนียนี้จะมีกรดเพอร์อะซิติกเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพราะกรดเพอร์อะซิติกเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดอะซิติกจะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (OMRI, 2000) แสดงให้เห็นว่า กรดเพอร์อะซิติกเป็นสารฆ่าเชื้อหลัก มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในออกโซเนียนั้นมีมากเกินพอ ทำให้สารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้านี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้ออยู่ ในการทดลองที่ความเข้มข้น 150 ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของออกโซเนียจึงเพิ่มขึ้น เพราะเมื่อเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น กรดอะซิติกในออกโซเนียยังคงทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็นกรดเพอร์อะซิติกอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีกรดเพอร์อะซิติกมากเกินพอที่จะทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 15 และในภาคผนวก ค



ภาพที่ 15 จำนวนสปอร์ของ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก

ผลของสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ และสารฆ่าเชื้อแบบผสมทางการค้าในการทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. และสปอร์ของ *R. miehei* จากการ ทดลอง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. และสปอร์ของ *R. miehei* คือ ชนิดของสารฆ่าเชื้อแบบผสม ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อแบบผสม และระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ โดยผลของแต่ละปัจจัยต่อการทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์สรุปได้ ดังนี้

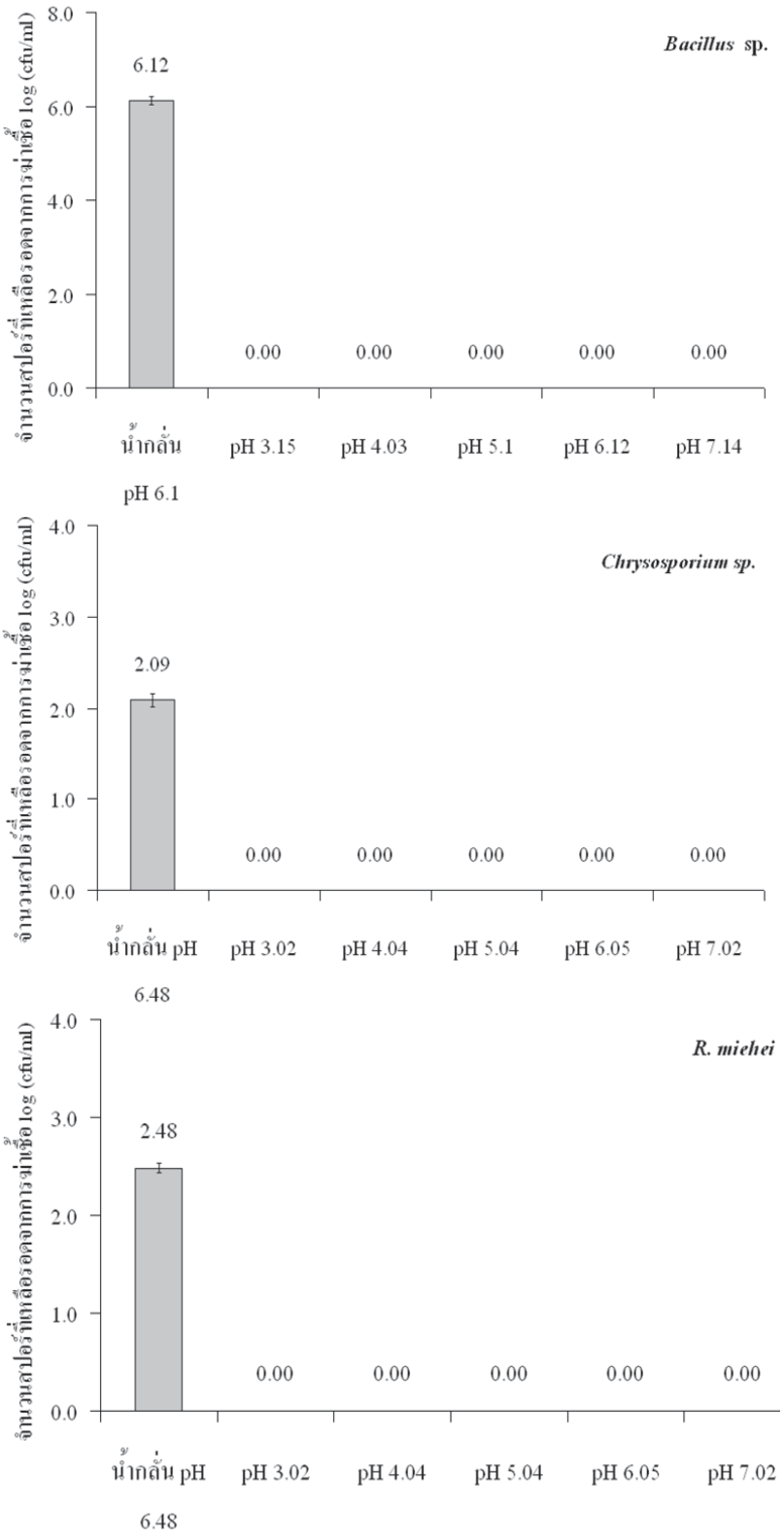
ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ คือ ที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้เพราะที่ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อแบบผสมมาก เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นมาก จะแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัสมากพอที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่กำหนด ดังนั้นในการทดลองนี้นอกจากแสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันในการฆ่าเชื้อระหว่างกรดกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์แล้ว ยังมีปัจจัยของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ และเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ต้องสัมพันธ์กันด้วย จึงจะทำให้การฆ่าเชื้อโดยใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมมีประสิทธิภาพสูงสุด

ผลของระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ คือ ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจาก 5 นาที เป็น 10 นาที การใช้ออกโซเนียความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม สามารถทำลายสปอร์ของ *Chrysosporium* sp. และสปอร์ของ *R. miehei* ได้เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Roberts (1994) ที่ทดลองใช้สารประกอบคลอรีนความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม พบว่าสามารถใช้กำจัดเชื้อราเส้นใย *Cryptosporiopsis perennans, Mucor piriformis*, *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* บนพื้นผิวภายในอาคารโรงคัดบรรจุผลไม้ได้ แต่ต้องเพิ่มระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ

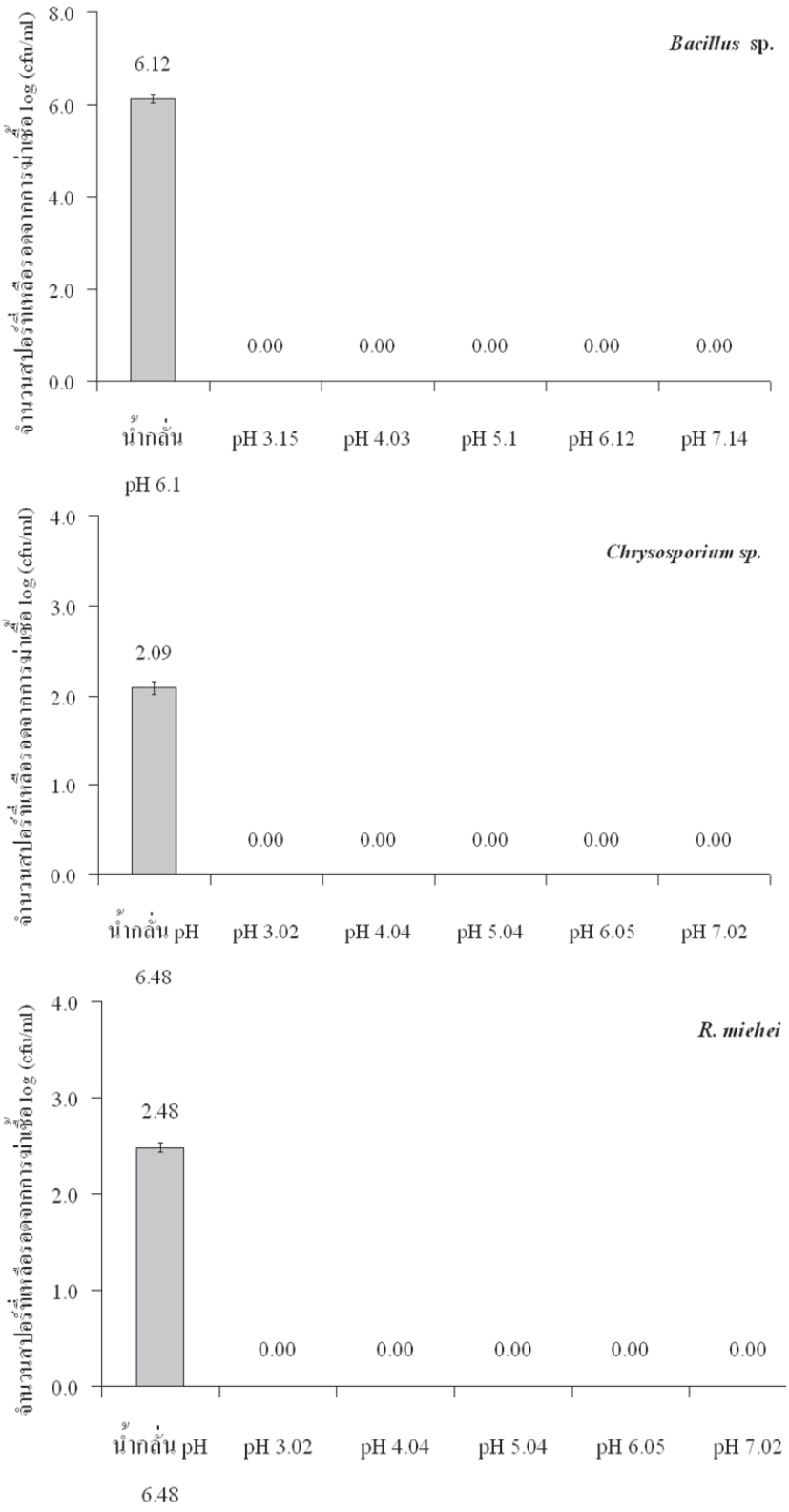
สรุปผลจากการคัดเลือกสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว และสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ทั้งหมดได้ พบว่ากรดอะซิติก+ NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ทั้งหมดได้ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 10 นาที ดังนั้นจึงคัดเลือกไปใช้ในการทดลอง การคัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อที่ดีที่สุด ที่สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ทั้งหมดได้

4) การคัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

เปรียบเทียบค่าพีเอชเริ่มต้นของกรดอะซิติก+ NaOCl (1:1) และกรดแลติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 16 และ17 และในภาคผนวก ค



ภาพที่ 16 จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7



<u>ภาพที่ 17</u> จำนวนสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7

จากภาพที่ 16 และ 17 พบว่าที่ทุกค่าพีเอชเริ่มต้นที่ทดสอบ การใช้กรดแลคติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 10 นาที สามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., C*hrysosporium* sp. และ *R. miehei* ได้

จากผลการทดลองสามารถอภิปรายได้ว่า การใช้สารฆ่าเชื้อแบบผสมระหว่างกรดผสมกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เกิดจากผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสำคัญ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่ำกว่า 7 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ได้กรดไฮโปคลอรัสมากเกินพอ ที่ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ10 นาที จึงสามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., C*hrysosporium* sp. และ *R. miehei* ได้ เพราะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นใกล้เคียง 7 ค่าพีเอชของสารฆ่าเชื้อมากกว่าค่าพีเคเอ (pKa) ของกรดอ่อน กรดอ่อนที่เป็นส่วนประกอบในสารฆ่าเชื้อแบบผสมจะแตกตัวเกือบทั้งหมด (ศุภชัย, 2549 และ Stratford, 1999) กรดอ่อนที่แตกตัวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อต่ำกว่ากรดอ่อนในรูปที่ไม่แตกตัว แต่ไฮโดรเจนไอออนที่ได้จากการแตกตัวของกรดอ่อนก็ช่วยลดค่าพีเอชของสารฆ่าเชื้อและส่งเสริมให้โซเดียม-ไฮโปคลอไรต์แตกตัวได้กรดไฮโปคลอรัสมากขึ้น ดังนั้นที่ค่าพีเอชเริ่มต้นใกล้เคียง 7 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อแบบผสมจึงเกิดจากผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสำคัญ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่ำกว่า 4 กรดอะซิติกและกรดแลคติกเกือบทั้งหมดจะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อ และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ค่าพีเอชประมาณ 4 จะแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัสมากที่สุด ดังนั้นที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่ำกว่า 4 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อแบบผสมจึงเกิดจากผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร่วมกับผลของกรดอ่อนที่ไม่แตกตัว

จากการศึกษาคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้ง 3 ชนิดได้ สามารถสรุปได้ว่าการใช้กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) และกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ที่ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง 3-7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 10 นาที เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้ง 3 ชนิด แต่เมื่อพิจารณารวมถึงค่าใช้จ่ายในการเตรียมสารฆ่าเชื้อ พบว่าการเตรียมสารฆ่าเชื้อแบบผสม กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการเตรียม กรดแลคติก+NaOCl (1:1) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือก กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 10 นาที เป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือกได้จากห้องปฏิบัติการ

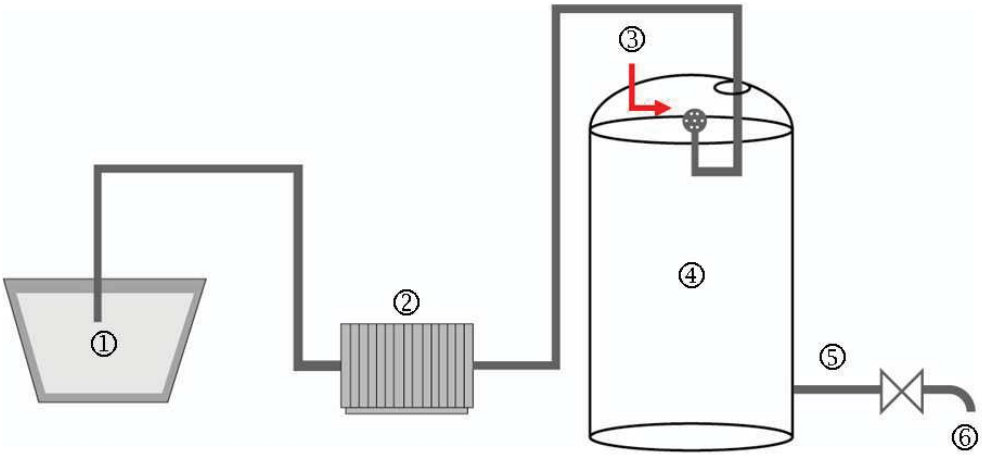
3. การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

เมื่อพิจารณาถึงสภาวะทดสอบในห้องปฏิบัติการ ที่มีการควบคุมจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ และสภาวะในการทดสอบสารฆ่าเชื้อ ซึ่งต่างจากสภาวะการ

ปนเปื้อนที่พบภายในถังพักน้ำที่ไม่มีการควบคุมจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ในถังพักมีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่ร่วมกัน ทั้งในรูปเซลล์ปกติ สปอร์ และไบโอฟิล์ม อีกทั้งขนาดของถังพักที่มีขนาดใหญ่ เป็นปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกลดลง ดังนั้นจึงประยุกต์ใช้กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 20 นาที เป็นสารฆ่าเชื้อที่นำไปประยุกต์ใช้ในโรงงาน โดยใช้กับระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่ออกแบบ และทวนสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก เพื่อให้มั่นใจว่าการใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในโรงงานผลิตซอสปรุงรสได้ตามวัตถุประสงค์

3.1 การออกแบบระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ

เพื่อลดข้อจำกัดของการฆ่าเชื้อด้วยพนักงาน และข้อจำกัดของบริเวณที่ฆ่าเชื้อได้ยาก ดังนั้นจึงออกแบบระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักให้กับโรงงานผลิตซอสปรุงรสใหม่ ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่ออกแบบเพื่อการประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในโรงงานที่ประสบปัญหาการปนเปื้อน

เมื่อ ① ถังผสมสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก ขนาดไม่น้อยกว่า 2 ตัน
② ปั๊มหอยโข่ง (ทนกรดและด่างกัดกร่อน)
③ ส่วนหัวฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อ หมุนได้ 180 องศา
④ ถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ
⑤ ท่อระบายน้ำทิ้ง
⑥ ปลายท่อระบายน้ำทิ้งอาจต่อกับถังเก็บสารฆ่าเชื้อใช้แล้ว

โดยระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่สร้างจากการออกแบบและขั้นตอนการฆ่าเชื้อภายในถังพักด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก ดังแสดงในภาพที่ 19

ภาพที่ 19 ระบบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบที่สร้างจากที่ออกแบบ และการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

เมื่อ (a-d) ส่วนประกอบของระบบฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ โดยขั้นตอนการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกทำได้โดย (e) การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้นผิวก่อนและหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก (f) แล้วล้างทำความสะอาดภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบซ้ำอีกครั้ง (g) เตรียมสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก (h-i) ติดตั้งระบบฆ่าเชื้อ และติดตั้งส่วนฉีดพ่นสารฆ่าเชื้อที่ด้านบนของถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (j) การฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบด้วยกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 20 นาที (k) ปล่อยสารฆ่าเชื้อที่ใช้แล้วออกจากถังพักทางด้านล่างของถัง และเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์บนพื้ผิวหลังการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

3.2 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

จากการประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก ฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบถังพักน้ำต้น 1 ถัง และถังพักน้ำวน 1 ถัง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 และในภาคผนวก ค

ตารางที่ 7 จำนวนจุลินทรีย์ในถังพักที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก

สารฆ่าเชื้อ	จุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพัก	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่ระยะเวลาการฆ่าเชื้อ		จำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวภายในถังพักที่ลดลง (%) ที่ระยะเวลาการฆ่าเชื้อ	
		0 นาที	20 นาที	0 นาที	20 นาที
กรดอะซิติก +	ด้านบน	2.96 ± 0.46	ไม่พบ	-	100
NaOCl (1:1)	ด้านข้าง	1.89 ± 0.83	ไม่พบ	-	100
(ถังพักน้ำต้น)	ด้านล่าง	2.39 ± 0.12	ไม่พบ	-	100
กรดอะซิติก +	ด้านบน	1.70 ± 0.16	ไม่พบ	-	100
NaOCl (1:1)	ด้านข้าง	1.39 ± 0.12	ไม่พบ	-	100
(ถังพักน้ำวน)	ด้านล่าง	2.24 ± 0.34	ไม่พบ	-	100

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 20 นาที สามารถกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบได้

3.3 การทวนสอบประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก

จากการทวนสอบการฆ่าเชื้อภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ โดยเก็บตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบที่ผลิตขึ้นใหม่และเก็บไว้ในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ที่เวลาการทวนสอบ 0, 15, 30, 45, และ 60 วัน

ที่ระยะเวลาการทวนสอบ 45 วัน น้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกยังไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ใด ๆ ต่างจากน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิมที่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนตั้งแต่ที่ระยะเวลาการทวนสอบ 45 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 และในภาคผนวก ค

ตารางที่ 8 จำนวนจุลินทรีย์ที่พบในน้ำซอสปรุงรสดิบที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก และถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อซ้ำด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม ที่เวลาการทวนสอบ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน

วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ log (cfu/ml)			
	ฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก		ฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่โรงงานใช้อยู่เดิม	
	ถังพักน้ำต้น	ถังพักน้ำวน	ถังพักน้ำต้น	ถังพักน้ำวน
0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
15	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
45	ไม่พบ	ไม่พบ	2.39 ± 0.26	2.32 ± 0.87
60	2.39 ± 0.12	3.47 ± 0.21	3.10 ± 0.70	3.15 ± 0.21

จากการทดลองสามารถอภิปรายผลได้ว่า การฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกสามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนในถังพักทั้งหมดได้ ทั้งเซลล์จุลินทรีย์ปกติ สปอร์ และไบโอฟิล์มที่ยึดเกาะบนพื้นผิวภายในถังพัก ต่างจากการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเหลวที่โรงงานใช้อยู่เดิม บริเวณด้านบนของถังพักที่ฆ่าเชื้อได้ยากและฆ่าเชื้อด้วยวิธีการของโรงงานจึงอาจมีคราบโปรตีนกากถั่วเหลืองเหลืออยู่ เพราะประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของคลอรีนเหลวจะลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่มาก จุลินทรีย์เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อและเจริญเป็นไบโอฟิล์มได้อีก (Xinming และ Xinna, 2009) เนื่องจากไบโอฟิล์มมีระยะฟักตัวสั้นกว่าเซลล์จุลินทรีย์ปกติ ถังพักที่มีไบโอฟิล์มเหลือรอดจึงพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้เร็วกว่า ถังพักที่กำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดได้จะมีเพียงเซลล์ปกติของ *Bacillus* sp. ที่เหลือรอดจากการย่อยกากโปรตีนถั่วเหลืองด้วยกรดและทำให้เป็นกลางด้วยด่างเท่านั้นที่จะเจริญได้ และมีระยะเวลาในการฟักตัวนานกว่าไบโอฟิล์ม ดังนั้นน้ำซอส-ปรุงรสดิบ ที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกที่ระยะเวลาในการทวนสอบ 45 วัน จึงไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามการทวนสอบการทำความสะอาดภายในถังหมักขนาดใหญ่ ที่ได้ผลดีควรใช้วิธีการทวนสอบวิธีอื่นร่วมกับการตรวจจุลินทรีย์บนพื้นผิวด้วย (Salo และคณะ 2008) จากผลการทดลองประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส สรุปได้ว่าผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโรงงานผลิตซอสปรุงรสได้ โดยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือก คือ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้น 3-7 ที่ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 20 นาที สามารถรลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาชนิด สายพันธุ์ สาเหตุและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

จุลินทรีย์สำคัญที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตซอสปรุงรส คือ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp., และ *R. miehei* ทั้งนี้เพราะจำนวน *Bacillus* sp. และเชื้อราในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสต้องไม่เกินกว่าที่สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรมกำหนด การพบจุลินทรีย์ดังกล่าวปนเปื้อนอยู่มากในกระบวนการผลิตจึงมีความเสี่ยงสูงที่ผลิตภัณฑ์จะมีจุลินทรีย์ดังกล่าวมากกว่าที่กำหนด แหล่งที่มาของการปนเปื้อนที่สำคัญคือภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ เพราะน้ำซอส-ปรุงรสดิบ ต้องเก็บในถังพักนานถึง 2 เดือน จึงเอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จนมีจำนวนมากกว่าที่สามารถควบคุมได้ และเพราะการฆ่าเชื้อในถังพักอย่างทั่วถึงนั้นทำได้ยาก หากไม่หาวิธีการฆ่าเชื้อและสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดได้ ก็จะพบจุลินทรีย์กลับมาปนเปื้อนข้ามในผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสได้อีกในทุกรอบของการผลิต

5.2 การคัดเลือกสารฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ทั้งหมด

กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง 3-7 ระยะเวลาการฆ่าเชื้อ 10 นาที เป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสมคัดเลือก เพราะสามารถทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ทั้งหมดได้ ทั้งนี้เพราะสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวไม่สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์สำคัญได้ และการเตรียม กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) มีต้นทุนต่ำสุด และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการฆ่าเชื้อเนื่องจากโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และกรดอะซิติกนั้นเสริมฤทธิ์ซึ่งกันในการฆ่าเชื้อ

5.3 การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส

ผลจากการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการลดการกลับมาปนเปื้อนซ้ำในกระบวนการผลิตซอสปรุงรสได้ แต่ต้องพิจารณาถึงปัจจัยแวดล้อมเพิ่มเติมด้วยเพราะการปนเปื้อนภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบมีมากกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ จึงประยุกต์ใช้กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 3-7 ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 20 นาที เพราะสามารถทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดภายในถังพักได้ และที่ระยะเวลาทวนสอบ 45 วัน น้ำซอสปรุงรสที่เก็บในถังพัก ถังที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกยังคงไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน

รายการอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. 2543. ผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข 203; 1-3.

บริษัท กิจไพศาล อุตสาหกรรมอาหาร จำกัด. 2552. แผนภูมิกระบวนการผลิตซอสปรุงรส.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2552. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. หลักการวิเคราะห์จุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอาหาร. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุวิมล กีรติพิบูล. 2546. ระบบการจัดการและการควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2549. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซอสปรุงรส.

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ. 2549. ความปลอดภัยของอาหาร (Food safety) การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment) โรคอาหารเป็นพิษ ปัจจัยเสี่ยงในอาหาร. ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Andrea, L., Paul, S., Estelle, R., C., and Laila, A. 2004. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. Bioresource Technology. 94; 275-283.

Burlew, M., M., SAS® guide to report writing examples, Second edition. Cary, NC: SAS Institute Inc , NC, USA.

Chmielewski, R., A., N. and Frank, J., F., 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2; 22-32.

Doores, S., 2005. Organic acid. Antimicrobials in food. Third edition. Taylor & Francis Group, USA.

Elhariry, H., M., 2008. Biofilm formation by endosporeforming *Bacilli* on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry. 3(2); 69-78.

Gan, G., G., 2003. Non-sporulation *Chrysosporium*: an opportunistic fungal infection in a neutropenic patient. J Antibiotic. Apr. 56(4); 419-22.

Hornstra, L., M., de Leeuw, P., L., A, Moezelaar, R., Wolbert, E., J., de Vries, Y., P., de Vos, W., M., Abee, T., 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. International Journal of Food Microbiology. 116; 367-371.

ISO 18593, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. International Organization for Standardization.

Kim, H., Kang, Y., Beuchat, L., R., Ryu, J., H., 2008. Production and stability of chlorine dioxide in organic acid solutions as affected by pH, type of acid, and concentration of sodium chlorite, and its effectiveness in inactivating *Bacillus cereus* spores. Food Microbiology. 25; 964-969.

Marriott, N., G. and Gravani, R., B., 2006. Principles of food sanitation, fifth edition. Springer, New York.

OMRI, 2000. Peracetic acid processing. NOSB TAP Review. 1-7

Roberts, R., G. and Reymond, S., T., 1994. Chlorine dioxide for reduction of postharvest pathogen inoculum during handling of tree fruits. Applied and Environmental Microbiology. 60(8); 2864-2868.

Salustiano, V., C., Andrade, N., J., Soares, N., F., F., Lima, J., C., Bernardes, P., C., Luiz, L., M., P., and Fernandes, P., E., 2009. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. Food Control, 20 ; 439-442.

Salo, S., Friis, A., and Wirtanen, G., 2008. Cleaning validation of fermentation. Food and Bioproducts Processing, 86; 204-210.

Stratford M., 1999. Traditional preservatives-organic acids. Preservatives, UK.

Xianming, S. and Xinna, Z., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology. 1-7.

http://prometheus.mse.uluc.edu/glossary/biofilms/ สืบค้นเมื่อ 25 พฤศจิกายน 2553

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซอสปรุงรส

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก. 8–2549

น้ำซอสปรุงรส

SEASONING SAUCE

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 67.220.20

ISBN 974-1508-30-1

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
น้ำซอสปรุงรส

มอก. 8 – 2549

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 123 ตอนที่ 68ง
วันที่ 20 กรกฎาคม พุทธศักราช 2549

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 6
มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซอสปรุงรส

ประธานกรรมการ

นายประกาย บริบูรณ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรรมการ

นางศรีสุดา หร่มระฤก	กรมวิทยาศาสตร์บริการ
นางบังอร บุญชู	
นางลัดดา ฉันโชติกุล	กรมการค้าภายใน
นางสาววารุณี เสนสุภา	สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
รศ.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ	คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางอรวรรณ เคหสุขเจริญ	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเทคนิคกรุงเทพ
นายวิศิษฐ์ ลิ้มประนะ	สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย
นางสาวเทวี โพธิผละ	สภาสตรีแห่งชาติ ในพระบรมราชินูปถัมภ์
นางธิดา เล็กวิริยะกุล	บริษัท ง่วนเชียงอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด
นายวิชัย ทองธรรมชาติ	บริษัท จิ้วฮวด จำกัด
นายธนวัฒน์ วิญญรัตน์	บริษัท ไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)
นายเผด็จ วัชรโกมลพันธ์	ผู้ทรงคุณวุฒิ

กรรมการและเลขานุการ

นางเสาวลักษณ์ ทองสถิตย์	สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส ประกาศใช้ครั้งแรกเป็นมาตรฐานเลขที่ มอก.8-2513 ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 88 ตอนที่ 90 วันที่ 24 สิงหาคม พุทธศักราช 2514 และได้ยกเลิกมาตรฐานเดิมและกำหนดใหม่เป็นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส มาตรฐานเลขที่ มอก.8-2539 ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 113 ตอนที่ 67 ง วันที่ 20 สิงหาคม พุทธศักราช 2539 ต่อมาได้พิจารณา เห็นสมควรแก้ไขปรับปรุงใหม่เนื่องจากมี 3-เอ็มซีพีดี เกิดขึ้นในขบวนการย่อยสลายโปรตีนพืชในน้ำซอสปรุงรส จึงได้แก้ไขปรับปรุงโดยยกเลิกมาตรฐานเดิมและกำหนดมาตรฐานนี้ขึ้นใหม่

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้แก้ไขปรับปรุงโดยใช้ผลการศึกษาวิจัยร่วมกันของคณะกรรมการวิชาการคณะที่ 6 ผู้ทำ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

Official Methods of Analysis of the Association of Official and Analytical Chemists (AOAC), 17th Edition, 2000

มอก.34-2546 ข้อปฏิบัติแนะนำระหว่างประเทศ : หลักการทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหาร

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตามมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 3483 (พ.ศ. 2549)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

น้ำซอสปรุงรส

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส มาตรฐานเลขที่ มอก.8-2539

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศยกเลิกประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2163 (พ.ศ. 2539) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส ลงวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2539 และออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำซอสปรุงรส มาตรฐานเลขที่ มอก. 8-2549 ขึ้นใหม่ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ให้มีผลเมื่อพ้นกำหนด 90 วัน นับแต่วันที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 24 มีนาคม พ.ศ. 2549

สุริยะ จึงรุ่งเรืองกิจ

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
น้ำซอสปรุงรส

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมเฉพาะน้ำซอสปรุงรสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์โปรตีนพืช

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 น้ำซอสปรุงรส (seasoning sauce) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ใช้ปรุงรสอาหาร มีโปรตีนพืชที่ย่อยสลายด้วยกรดหรือเอ็นไซม์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ

2.2 สิ่งแปลกปลอม หมายถึง สิ่งอื่นใดที่ไม่ใช่วัตถุดิบที่ใช้เป็นส่วนประกอบของการผลิตน้ำซอสปรุงรส เช่น ขน ผม ชิ้นส่วนของแมลง

3. คุณลักษณะที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป

3.1.1 รส และกลิ่น

ต้องมีรสกลมกล่อม อร่อย และมีกลิ่นหอมดีตามลักษณะเฉพาะของน้ำซอสปรุงรส

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 9.1 คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะต้องไม่น้อยกว่า 4 คะแนน

3.1.2 สี

ต้องเป็นสีน้ำตาลไหม้

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

3.1.3 ความใส

ต้องใส หากมีตะกอนต้องไม่มากกว่า 0.03 โดยน้ำหนัก

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.2

3.2 สิ่งแปลกปลอม

ต้องปราศจากสิ่งแปลกปลอม

การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 9.3

3.3 คุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี

ให้เป็นไปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมี

(ข้อ 3.4)

ลำดับที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	วิธีทดสอบตาม
1	ความเป็นกรด–ด่าง (pH)	4.5 ถึง 6	ข้อ 9.4
2	โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	15	ข้อ 9.5
3	โปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	12	ข้อ 9.6
4	ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	60	ข้อ 9.7
5	3 เอ็มซีพีดี (3 monochloropropane – 1, 2 diol, 3 MCPD) มิลลิกรัมต่อน้ำซอสปรุงรส 1 กิโลกรัม ไม่เกิน	1	ข้อ 9.8

4. วัตถุเจือปนอาหาร

4.1 วัตถุกันเสีย

ห้ามใช้วัตถุกันเสีย

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 47.3.01 และข้อ 47.3.34

4.2 วัตถุให้ความหวาน

ให้ใช้น้ำตาลหรือวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาลตามมาตรฐานอาหารเอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ โคเด็กซ์ (Joint FAO/WHO, Codex) เรื่องวัตถุเจือปนอาหารและฉบับที่แก้ไขเพิ่มเติม

4.3 สี

ให้ใช้น้ำตาลเคี่ยวไหม้ในการแต่งสีเท่านั้น

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 46.1.01 และข้อ 46.1.02

5. สุขลักษณะ

5.1 สุขลักษณะ ให้เป็นไปตาม มอก.34

5.2 จุลินทรีย์ มีได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดต่อไปนี้

5.2.1 ราและยีสต์ ต้องไม่เกิน 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.1.03 E

5.2.2 โคลิฟอร์ม (Coliform) โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN) ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.2.02

5.2.3 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถึง 37 องศาเซลเซียส ต้องไม่เกิน 10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.2.01

5.2.4 *แบซิลลัส ซีเรียส (Bacillus cereus)* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม ISO 7932

5.2.5 *สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.01 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.5.02

6. การบรรจุ

6.1 ให้บรรจุน้ำซอสปรุงรสในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ปิดได้สนิท และไม่รั่วซึม

6.2 หากมิได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น ให้ปริมาตรสุทธิของน้ำซอสปรุงรสเป็น 100 มิลลิลิตร 200 มิลลิลิตร 600 มิลลิลิตร 700 มิลลิลิตร และต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

7. เครื่องหมายและฉลาก

7.1 ที่ภาชนะบรรจุน้ำซอสปรุงรสทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) คำว่า “น้ำซอสปรุงรส”

(2) ปริมาตรสุทธิ เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ มิลลิลิตร

(3) วัน เดือน ปีที่ทำ และ/หรือเดือน ปีที่ควรบริโภคก่อน

(4) ชนิดวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล (ถ้าใช้)

(5) ชื่อผู้ทำ หรือโรงงานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วยหรือในกรณีที่ใช้เฉพาะภาษาต่างประเทศเพื่อการส่งออก ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

8. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

8.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสินให้เป็นไปตามภาคผนวก ก.

9. การทดสอบ

9.1 รส และกลิ่น

9.1.1 คณะผู้ตรวจสอบ ต้องประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบน้ำซอสปรุงรสอย่างน้อย 5 คน โดยแต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระแล้วนำมาคิดเป็นคะแนนเฉลี่ยรวม

9.1.2 หลักเกณฑ์การให้คะแนนให้เป็นไปตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 หลักเกณฑ์การให้คะแนน

(ข้อ 9.1)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	ระดับการตัดสิน	คะแนน
รส	รสกลมกล่อมดีมากเป็นพิเศษระหว่างรสเค็มกับรสหวาน และอร่อยมากเป็นพิเศษตามลักษณะเฉพาะของน้ำซอสปรุงรส	6
	รสกลมกล่อมดีมากและอร่อยมาก	5
	รสกลมกล่อมดีและอร่อยดี	4
	ค่อนข้างเค็มหรือหวาน หรืออ่อนเค็มหรืออ่อนหวาน หรือมีรสเปรี้ยวเล็กน้อย	3
	เค็มจัด หรือหวานจัด หรือรสแปลกไปจากลักษณะเฉพาะของน้ำซอสปรุงรสเล็กน้อย	2
	รสผิดไปมากจากลักษณะเฉพาะของน้ำซอสปรุงรสโดยมีรสแปลกปลอม เช่น ขมขื่น ฝาด	1
กลิ่น	มีกลิ่นหอมดีมากเป็นพิเศษตามลักษณะเฉพาะของน้ำซอสปรุงรส	6
	มีกลิ่นหอมดีมาก	5
	มีกลิ่นหอมดี ไม่มีกลิ่นแปลกปลอมอื่นใด	4
	มีกลิ่นหอมเล็กน้อย แต่ไม่มีกลิ่นแปลกปลอมอื่นใด	3
	มีกลิ่นหอมเล็กน้อย แต่มีกลิ่นแปลกปลอม	2
	มีกลิ่นแปลกปลอมมาก เช่น กลิ่นสารเคมี กลิ่นเน่า กลิ่นเหม็นเปรี้ยว	1

9.2 ตะกอน

9.2.1 เครื่องมือ

9.2.1.1 กระดาษกรองวัตต์แมนเบอร์ 1 ขนาดพอดีที่จะใช้กับกรวยบุคเนอร์ (Buchner funnel) ทำให้เปียกด้วยน้ำกลั่น แล้วอบที่อุณหภูมิ (100 ± 5) องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่ง (m_1)

9.2.1.2 กรวยบุคเนอร์

9.2.1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง

9.2.1.4 ขวดแก้วสำหรับดูด (suction flask)

9.2.2 วิธีทดสอบ

ชั่งตัวอย่างซึ่งเขย่าเข้ากันดีแล้วประมาณ 100 กรัม ให้ทราบมวลที่แน่นอน (m_2) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร กรองตัวอย่างผ่านกรวยบุคเนอร์ซึ่งมีกระดาษกรองวางอยู่ ถ่ายตะกอนออกจากบีกเกอร์ให้หมด แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดคลอไรด์ นำกระดาษกรองที่มีตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ (100 ± 5) องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นำไปชั่ง (m_3) ในกรณีที่ต้องการกรองให้เร็วขึ้นอาจจะใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงช่วย

9.2.3 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณตะกอน ร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \times 100$$

m_3 คือ มวลกระดาษกรองที่อบแห้ง และมวลตัวอย่าง เป็นกรัม

m_1 คือ มวลกระดาษกรองที่อบแห้ง เป็นกรัม

m_2 คือ มวลตัวอย่าง เป็นกรัม

9.3 สิ่งแปลกปลอม

9.3.1 เครื่องมือ

ชามกระเบื้องเคลือบ

9.3.2 สารละลาย

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 + 3

9.3.3 วิธีทดสอบ

ชั่งตัวอย่างที่เข้ากันดีแล้วประมาณ 100 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร กรองตัวอย่างผ่านกรวยบุคเนอร์ซึ่งมีกระดาษกรองวางอยู่ ถ่ายตะกอนออกจากบีกเกอร์ให้หมด แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างออกมาไม่มีสี ล้างตะกอนต่อไปอีก 2 ถึง 3 ครั้ง ถ่ายตะกอนทั้งหมดลงในชามกระเบื้องเคลือบ แล้วตรวจพินิจ ถ้าตะกอนมีปริมาณมากให้ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1+3 ล้างตะกอนก่อน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ถึง 4 ครั้ง รินส่วนใสทิ้ง แล้วตรวจพินิจส่วนที่เหลือ

9.4 ความเป็นกรด–ด่าง

วัดด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง (pH meter)

9.5 โซเดียมคลอไรด์

9.5.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 20 กรัม ให้ทราบมวลที่แน่นอน (m) ใส่บีกเกอร์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

9.5.2 วิธีทดสอบ

ใช้สารละลายตัวอย่างในข้อ 9.5.1 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร และให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 35.1.18 และข้อ 35.1.19

9.6 โปรตีน

9.6.1 วิธีทดสอบ

ใช้สารละลายตัวอย่างในข้อ 9.5.1 จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร และให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 2.4.05

9.6.2 วิธีคำนวณ

ปริมาณโปรตีนจากสูตร

ปริมาณโปรตีน ร้อยละโดยน้ำหนัก = $N \times 6.4$

เมื่อ N คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เป็นกรัม

9.7 ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน

ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน คือ ผลต่างระหว่างฟอร์มาลดีไฮด์ไนโตรเจน (formaldehyde nitrogen) กับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน (ammoniacal nitrogen) คิดเป็นกรัมในน้ำซอสปรุงรส 100 กรัม

9.7.1 ฟอร์มาลดีไฮด์ไนโตรเจน

9.7.1.1 เครื่องมือ

เครื่องวัดความเป็นกรด–ด่าง

9.7.1.2 สารละลาย

(1) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

(2) สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 9 (โดยการปรับความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์)

9.7.1.3 วิธีทดสอบ

นำสารละลายตัวอย่างในข้อ 9.5.1 มา 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับค่าความเป็นกรด–ด่างให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 9

9.7.1.4 วิธีคำนวณ

คำนวณหาฟอร์มาลดีไฮด์ไนโตรเจน จากสูตร

$$\times = \frac{28.014\ V_1 c_1}{m}$$

เมื่อ $\times$ คือ ปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์ไนโตรเจน ในตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสเป็นกรัมต่อ 100 กรัม

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร

c_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

m คือ มวลตัวอย่าง เป็นกรัม

9.7.2 แอมโมเนียคัลไนโตรเจน

9.7.2.1 สารเคมีและสารละลาย

(1) แมกนีเซียมออกไซด์

(2) กรดบอริก ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก

(3) สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.05 โมลต่อลูกบาสก์เดซิเมตร

(4) เมทิลเรด–โบรโมครีซอลกรีนอินดิเคเตอร์

9.7.2.2 วิธีวิเคราะห์

ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 9.5.1 มา 50 ลูกบาศก์เซนติเมตรใส่ในขวดกลั่น เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัมและน้ำกลั่น 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วกลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในขวดแก้วที่มีกรดบอริก 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และเมทิลเรด–โบรโมครีซอลกรีนอินดิเคเตอร์ 6 ถึง 10 หยด จนกระทั่งปริมาตรของสารละลายในขวดกลั่นเหลือเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม ไทเทรตแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกจนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

9.7.2.3 วิธีคำนวณ

คำนวณหาแอมโมเนียคัลไนโตรเจน จากสูตร

$$y = \frac{5.6028\ V_2 c_2}{m}$$

เมื่อ y คือ ปริมาณของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำซอสปรุงรส เป็นกรัมต่อ 100 กรัม

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไทเทรต เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร

c_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก เป็นโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

m คือ มวลของตัวอย่าง เป็นกรัม

9.8 เอ็มซีพีดี

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 48.1.06

ภาคผนวก ก.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 8.1)

ก.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง น้ำซอสปรุงรสที่ทำโดยกรรมวิธีเดียวกัน ขนาดบรรจุ ชื่อตราหรือเครื่องหมายการค้าเดียวกัน ที่ทำหรือส่งมอบหรือซื้อขายในระยะเวลาเดียวกัน

ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ก.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 2 นำไปตรวจสอบเครื่องหมายและฉลากก่อน แล้วจึงตรวจสอบการบรรจุ ลักษณะทั่วไป และสิ่งแปลกปลอม

ก.2.1.2 ตัวอย่างทุกหน่วยภาชนะบรรจุต้องเป็นไปตามข้อ 7. และจำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 3.1 ข้อ 3.2 และข้อ 6. ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ ก.1 จึงจะถือว่าน้ำซอสปรุงรสรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ ก.1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวน ที่ยอมรับ
ไม่เกิน 500	2	0
501 ถึง 3 200	8	1
3 201 ถึง 35 000	13	2
35 001 ถึง 150 000	32	5

ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี และวัตถุเจือปนอาหาร

ก.2.2.1 ให้ใช้ตัวอย่างที่เหลือจากข้อ ก.2.1 โดยชักตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุในปริมาณเท่า ๆ กัน ผสมกันให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 700 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ปิดได้สนิทและกันความชื้นได้

ในกรณีที่ตัวอย่างไม่พอ ให้ชักตัวอย่างเพิ่มจนได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 700 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ก.2.2.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.3 และข้อ 4. ทุกรายการ จึงจะถือว่าน้ำซอสปรุงรสรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบจุลินทรีย์

ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน 4 หน่วยภาชนะบรรจุ ทำเป็นตัวอย่างรวม

ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5.2 จึงจะถือว่าน้ำซอสปรุงรสรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างน้ำซอสปรุงรสต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 และข้อ ก.2.3.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าน้ำซอสปรุงรสรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์อันตราย ณ จุดควบคุมวิกฤต

การวิเคราะห์อันตราย ณ จุดควบคุมวิกฤตตามหลักการจัดทำระบบ HACCP เพื่อประเมินโอกาสและความรุนแรงของชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ ทำให้ทราบถึง ชนิด สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต้องเฝ้าระวัง และขั้นตอนการผลิตที่ต้องเฝ้าระวัง เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต

การประเมินโอกาสพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตซอสปรุงรส

1. ขั้นตอนการพักรอปรับกรด

จากภาพที่ 10 แผนภูมิกระบวนการผลิตซอสปรุงรส พบการปนเปื้อนของ *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* sp. ในขั้นตอนการพักรอปรับกรดซึ่งอาจมีสาเหตุที่มาของการปนเปื้อนได้จากหลายสาเหตุ

1.1 การปนเปื้อนของอันตรายทางชีวภาพ

1) การเหลือรอดของจุลินทรีย์นี้เนื่องจากการฆ่าเชื้อในถังพักรอปรับกรดไม่เหมาะสม
2) การเจริญของจุลินทรีย์นี้เนื่องจากการหน่วงเวลาการผลิตทำให้ต้องเก็บน้ำซอสปรุงรสดิบไว้พักรอปรับกรดเป็นเวลานานกว่าที่กำหนด
3) การปนเปื้อนของ *Bacillus* sp. เนื่องจากการย่อยโปรตีนกากถั่วเหลืองด้วยกรดไม่ได้ออกแบบมาเพื่อทำลายสปอร์ของ *Bacillus* sp.

นอกจากนี้ในขั้นตอนการย่อยโปรตีนกากถั่วเหลือง การทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียม - ไฮดรอกไซด์ และการพักรอปรับกรดอาจพบการปนเปื้อนของอันตรายทางเคมีด้วย

1.2 การปนเปื้อนของอันตรายทางเคมี

1) การเกิดสาร 3 เอ็มซีพีดี ในระหว่างการไฮโดรไรซ์ด้วยกรดที่อาจไม่สามารถกำจัดได้หมดในขั้นตอนการทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. ขั้นตอนการเก็บในถังพัก

พบการปนเปื้อนของ *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ซึ่งอาจมีสาเหตุที่มาของการปนเปื้อนจาก

2.1 การปนเปื้อนของอันตรายทางชีวภาพ

1) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอก เนื่องจากการปฏิบัติงานของพนักงานในการเก็บน้ำซซอสปรุงรสดิบในถังพักไม่เหมาะสม
2) การเหลือรอดของจุลินทรีย์ เนื่องจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักไม่เหมาะสม
3) จุลินทรีย์ที่เจริญเนื่องจากหน่วงเวลาการเก็บในถังพักนานกว่า 2 เดือน

2.2 การปนเปื้อนของอันตรายทางเคมี

1) สารฆ่าเชื้อตกค้างปนเปื้อนในถังพัก เนื่องจากการฆ่าเชื้อภายในถังพักไม่เป็นไปตามที่กำหนด

3. ขั้นตอนการเก็บในคลังสินค้า

การปนเปื้อนของ *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ซึ่งอาจมีสาเหตุที่มาของการปนเปื้อนได้จาก

3.1 การปนเปื้อนของอันตรายทางชีวภาพ

1) การเหลือรอดของจุลินทรีย์ เนื่องจากการต้มฆ่าเชื้อไม่เป็นไปตามที่กำหนด
2) การปนเปื้อนข้ามของจุลินทรีย์ เนื่องจากการควบคุมหลังขั้นตอนหลังการต้มฆ่าเชื้อไม่เหมาะสม

เนื่องจาก *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* สามารถสร้างสปอร์ทนต่อความร้อนที่ใช้ในการต้มฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตามวิธีการของโรงงาน และเมื่อวิเคราะห์จุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (CCP) พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีสาเหตุที่มาสำคัญจาก ขั้นตอนการผลิต 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเก็บในถังพัก (CCP 1) และขั้นตอนการต้มฆ่าเชื้อ (CCP 2)

และเนื่องจากขั้นตอนการเก็บในถังพัก เป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลานานที่สุดในกระบวนการผลิต เมื่อเทียบกับขั้นตอนอื่นในกระบวนการผลิตซอสปรุงรสมีโอกาสสูงที่ต้องเก็บน้ำซอสไว้ในถังพักนานเกินกว่า 2 เดือน จุลินทรีย์จึงมีโอกาสพัฒนาโครงสร้างเป็นไบโอฟิล์มได้ และเนื่องจากขั้นตอนการต้มฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่สามารถควบคุมอันตรายทางชีวภาพได้และไม่มีขั้นตอนถัดไปในกระบวนการผลิตซอสปรุงรส ที่สามารถลดและกำจัดจุลินทรีย์ได้อีก

เมื่อประเมินโอกาสที่น้ำซอสปรุงรสดิบจะปนเปื้อนเนื่องจากจุลินทรีย์ในอากาศนั้นจะเกิดขึ้นได้จาก 2 สาเหตุ คือในระหว่างการถ่ายน้ำซอสปรุงรสดิบเข้าเก็บในถังพัก และปล่อยถังพักที่ล้างฆ่าเชื้อทิ้งไว้นานกว่า 2 เดือน

การประเมินความรุนแรงของจุลินทรีย์ปนเปื้อน

การปนเปื้อนทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ สามารถแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงเมื่อเกิดการปนเปื้อน ได้แก่ กลุ่มที่มีความรุนแรงปานกลาง (M) ที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายแต่ไม่ถึงชีวิต เช่น อาเจียน ท้องเสีย หรืออาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Bacillus* sp., และกลุ่มที่มีความรุนแรงน้อย (L) ที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย ไม่เกิดอาการในทันที อาจสะสมในร่างกายทำให้เกิดโรคเรื้อรัง ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* เมื่อ

1. *Bacillus* sp.

เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ (จึงประเมินความรุนแรงเป็น M) และเป็นจุลินทรีย์ที่มีแหล่งที่มาได้ทั้งจาก วัตถุดิบ อากาศ พนักงาน และอุปกรณ์การผลิต ที่สำคัญคือเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรมควบคุมจำนวนที่พบได้ในผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรส (จึงประเมินโอกาสพบ *Bacillus* sp. เป็น H)

2. *Staphylococcus* sp.

เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ แต่สามารถควบคุมได้ด้วยการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ของ GMP เรื่อง สุขลักษณะส่วนบุคคล และ GMP เรื่อง การควบคุมกระบวนการผลิต (จึงประเมินความรุนแรงเป็น L) ซึ่งพบในได้ในหลายขั้นตอนการผลิต (จึงประเมินโอกาสพบ *Staphylococcus* sp. เป็น M)

3. *Aspergillus* sp.

เป็นจุลินทรีย์สร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ แต่สามารถควบคุมได้ด้วยการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ของ GMP เรื่อง การตรวจรับวัตถุดิบ และเรื่องการทำความสะอาดภายในอาคารพักน้ำซอสปรุงรสดิบ จึงประเมินเป็น (L)

4. *Chrysosporium* sp.

เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนัง (จึงประเมินความรุนแรงเป็น M) และเนื่องจากมีรูปแบบการเจริญเหมือนไบโอฟิล์มที่พบภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (จึงประเมินโอกาสพบการปนเปื้อนของ *Chrysosporium* sp. เป็น M)

5. *R. miehei*

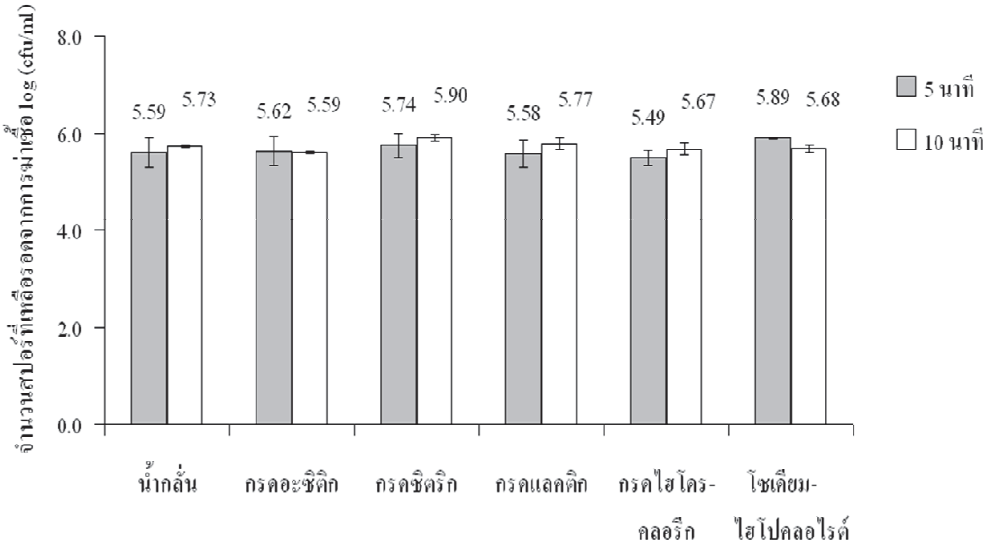
เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในวัวได้ (จึงประเมินความรุนแรงเป็น M) และเนื่องจากมีรูปแบบการเจริญเหมือนไบโอฟิล์มที่พบภายในถังพักน้ำซอสปรุงรสดิบ (จึงประเมินโอกาสพบการปนเปื้อนเป็น M) จากข้อมูลที่รวมรวมสามารถวิเคราะห์ความเสี่ยงได้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ความเสี่ยงจากโอกาสและความรุนแรงของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ตรวจพบ

จุลินทรีย์	โอกาส	ความรุนแรง	ความเสี่ยง
Bacillus sp.	H (High)	M (Moderate)	Ma (Major)
Chrysosporium sp.	M (Moderate)	L (Low)	Mi (Minor)
R. miehei	M (Moderate)	L (Low)	Mi (Minor)
Staphylococcus sp.	L (Low)	L (Moderate)	Mi (Minor)
Aspergillus sp.	L (Low)	L (Moderate)	Mi (Minor)

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง



ภาพที่ 20 จำนวนสปอร์ *Bacillus* sp. หลังจากฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

ตารางที่ 10 สปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม เมื่อสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่ใช้ทดลอง คือ กรด+NaOCl (1:1) ที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

สารฆ่าเชื้อแบบผสม อัตราส่วน (1:1)	ความเข้มข้น (พีพีเอ็ม)	พีเอช เริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
			5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	6.89	5.58 ± 0.03	5.58 ± 0.03	-	-
กรดอะซิติก+NaOCl		6.38	4.20 ± 0.14	ไม่พบ	24.73	100.00
กรดซิตริก+NaOCl		6.08	4.38 ± 0.24	4.01 ± 0.44	21.51	28.14
กรดแลคติก+NaOCl		6.18	4.02 ± 0.04	3.04± 0.27	27.96	45.52
กรดไฮโดรคลอริก+NaOCl		6.37	4.33 ± 0.05	4.94± 0.02	22.40	11.47
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	150	6.86	5.58 ± 0.03	5.58 ± 0.03	-	-
กรดอะซิติก+NaOCl		6.37	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดซิตริก+NaOCl		6.02	4.47 ± 0.24	3.99 ± 0.02	19.89	28.49
กรดแลคติก+NaOCl		6.27	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดไฮโดรคลอริก+NaOCl		6.25	4.52 ± 0.17	4.06± 0.06	19.00	27.24
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	200	6.75	5.58 ± 0.03	5.58 ± 0.03	-	-
กรดอะซิติก+NaOCl		5.90	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดซิตริก+NaOCl		6.84	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl		6.18	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดไฮโดรคลอริก+NaOCl		6.71	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00

ตารางที่ 11 สปอร์ของ *Chrysosporium* sp. ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม เมื่อสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่ใช้ทดลอง คือ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) กรดแลคติก+NaOCl (1:1) และออกโซเนีย ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

สารฆ่าเชื้อแบบผสม	ความเข้มข้น (พีพีเอ็ม)	ค่าพีเอชเริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
			5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	6.61	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.09	-	-
ออกโซเนีย (a)		6.00	1.63 ± 0.21	1.54 ± 0.09	19.45	23.66
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.01	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.06	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	150	6.61	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.09	-	-
ออกโซเนีย (b)		6.04	1.48 ± 0.00	1.30 ± 0.00	26.90	35.49
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	200	6.61	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.09	-	-
ออกโซเนีย (c)		6.01	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00

หมายเหตุ : คิดความเข้มข้นของออกโซเนีย โดยเทียบกับความเข้มข้นของกรดเพอร์อะซิติก

(a) ออกโซเนีย 100 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 100 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 480.77 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 153.85 พีพีเอ็ม

(b) ออกโซเนีย 150 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 150 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 721.15 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 230.77 พีพีเอ็ม

(c) ออกโซเนีย 200 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 200 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 961.54 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 307.69 พีพีเอ็ม

ตารางที่ 12 สปอร์ของ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อแบบผสม เมื่อสารฆ่าเชื้อแบบผสมที่ใช้ทดลอง คือ กรดอะซิติก+NaOCl (1:1) กรดแลคติก+NaOCl (1:1) และออกโซเนีย ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ 5 นาที และ 10 นาที

สารฆ่าเชื้อแบบผสม	ความเข้มข้น (พีพีเอ็ม)	ค่าพีเอชเริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
			5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	100	6.61	2.50 ± 0.03	2.47 ± 0.05	-	-
ออกโซเนีย (a)		6.00	1.15 ± 0.21	1.00 ± 0.00	53.94	59.49
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.01	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.06	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	150	6.61	2.50 ± 0.03	2.47 ± 0.05	-	-
ออกโซเนีย (b)		6.04	1.15 ± 0.21	ไม่พบ	53.94	100.00
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	200	6.61	2.50 ± 0.03	2.47 ± 0.05	-	-
ออกโซเนีย (c)		6.01	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดอะซิติก+NaOCl (1:1)		6.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl (1:1)		6.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00

หมายเหตุ : คิดความเข้มข้นของออกโซเนีย โดยเทียบกับความเข้มข้นของกรดเพอร์อะซิติก

(a) ออกโซเนีย 100 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 100 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 480.77 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 153.85 พีพีเอ็ม

(b) ออกโซเนีย 150 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 150 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 721.15 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 230.77 พีพีเอ็ม

(c) ออกโซเนีย 200 พีพีเอ็ม ประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 200 พีพีเอ็ม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 961.54 พีพีเอ็ม และกรดอะซิติก 307.69 พีพีเอ็ม

ตารางที่ 13 สปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดอะซิติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7

สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก อัตราส่วน (1:1)	ความเข้มข้น (พีพีเอ็ม)	ค่าพีเอชเริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
			5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	150	6.48	2.48 ± 0.05	-	-	-
กรดอะซิติก+NaOCl		3.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		4.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		5.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		6.05	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		7.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl	150	3.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		4.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		5.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		6.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		7.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00

ตารางที่ 14 สปอร์ของ *Bacillus* sp., *Chrysosporium* sp. และ *R. miehei* ที่เหลือรอดจากการฆ่าเชื้อด้วยกรดแลคติก+NaOCl (1:1) ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 3, 4, 5, 6 และ 7

สารฆ่าเชื้อแบบผสมที่คัดเลือก อัตราส่วน (1:1)	ความเข้มข้น (พีพีเอ็ม)	ค่าพีเอชเริ่มต้น	จำนวนจุลินทรีย์ log (cfu/ml) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ		จำนวนสปอร์ที่ลดลง (%) ที่เวลาในการฆ่าเชื้อ	
			5 นาที	10 นาที	5 นาที	10 นาที
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	150	6.48	2.09 ± 0.07	-	-	-
กรดอะซิติก+NaOCl		3.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		4.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		5.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		6.05	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		7.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
กรดแลคติก+NaOCl	150	3.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		4.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		5.04	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		6.03	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00
		7.02	ไม่พบ	ไม่พบ	100.00	100.00

ภาคผนวก ง
วิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยว

1. กรดอะซิติกความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

คือ ต้องการกรดอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากกรดอะซิติกเข้มข้น ความเข้มข้นร้อยละ 99.7

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดอะซิติก เท่ากับ ร้อยละ 99.7 (w/v)

C_2 คือ ความเข้มข้นที่ต้องการ เท่ากับ ร้อยละ 0.10 (w/v)

V_1 คือ ปริมาตรที่ต้องเตรียมจากกรดอะซิติก เท่ากับ ร้อยละ 99.7 (w/v)

V_2 คือ ปริมาตรที่สุทธิที่ต้องการ เท่ากับ 200 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$V_1 = (0.1 \times 200)/ 99.7$

$V_1 = 0.2006$ มิลลิลิตร

ดังนั้นต้องเตรียมจากกรดอะซิติก ร้อยละ 99.7 ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

2. การเตรียมกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม และ 200 พีพีเอ็ม

กรดอะซิติกความเข้มข้น 150 พีพีเอ็ม ต้องเตรียมจากกรดอะซิติก ร้อยละ 99.7 ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

กรดอะซิติกความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ต้องเตรียมจากกรดอะซิติก ร้อยละ 99.7 ปริมาตร 0.40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร การเตรียมสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 วิธีการเตรียมสารฆ่าเชื้อแบบเดี่ยวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสารฆ่าเชื้อ	% (w/v)	ความเข้มข้นที่ต้องการ (พีพีเอ็ม)	ปริมาตรที่ต้องการ (มิลลิลิตร)	คำนวณปริมาตรที่ต้องเตรียม (มิลลิลิตร)
กรดอะซิติก	99.7	100	200	0.20
		150	200	0.30
		200	200	0.40
กรดซิตริก		100	200	3.84 กรัม
n = 192.13 กรัม		150	200	5.76 กรัม
Density = 1.542 กรัม/ ลิตร		200	200	7.69 กรัม
กรดแลคติก	88.0	100	200	0.23
		150	200	0.34
		200	200	0.45
กรดไฮโดรคลอริก	37.0	100	200	0.54
		150	200	0.81
		200	200	1.08
โซเดียมไฮโปคลอไรต์	10.0	100	200	2.00
		150	200	3.00
		200	200	4.00
อ็อกโซเนีย	10.0	100	200	0.34
(คำนวณเทียบจาก		150	200	0.58
กรดเพอร์อะซิติก)		200	200	0.77

วิธีการเตรียมออกโซเนีย เป็นสารฆ่าเชื้อแบบผสม

ออกโซเนีย ประกอบด้วยกรดเพอร์อะซิติก : ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 5.20 : 25.0 : 8.0 % (w/v) แสดงว่าในสารละลายออกโซเนีย 100 มิลลิลิตร จะประกอบด้วย กรดเพอร์อะซิติก 5.20 กรัม

ถ้าต้องการออกโซเนีย

ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม (หรือ 0.10% ออกโซเนีย) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (คำนวณเทียบจากความเข้มข้นของกรดเพอร์อะซิติก ในออกโซเนีย)

ต้องการออกโซเนียความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม (หรือ 100 มิลลิกรัม/ลิตร)

คือ ออกโซเนียปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วยกรดเพอร์อะซิติก = 0.10 กรัม

ถ้าต้องการออกโซเนียปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต้องใช้กรดเพอร์อะซิติก $= \frac{0.10 \times 200}{1,000}$

$= 0.02$ กรัม

กรดเพอร์อะซิติก 5.20 กรัม ในออกโซเนีย = 100 มิลลิลิตร

ต้องการกรดเพอร์อะซิติก 0.02 กรัม เตรียมจากออกโซเนีย $= \frac{0.02 \times 100}{5.2}$

$= 0.34$ มิลลิลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายปัญจ์ยศ มงคลชาติ
ที่อยู่	123 ถนนประชานิยม ตำบลบ้านโป่ง อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี 70110
วัน/เดือน/ปี เกิด	9 มีนาคม พ.ศ. 2524

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาโรงเรียนสารสิทธิ์พิทยาลัย ตำบลบ้านโป่ง อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี
พ.ศ. 2545	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2552	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงานวิชาการ

มกราคม 2553	เสนอผลงานวิจัยภาคบรรยายเรื่อง “การลดการปนเปื้อนของ *Bacillus* sp. ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส”, ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
มิถุนายน 2554	เสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ เรื่อง “Reduction of *Bacillus* spore contaminated in soy sauce plant by weak acids and sodium hypochlorite”, 4th congress of European microbiologists, FEMS 2011, Geneva, Switzerland.