

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำมันหอย

3.1.1 วัตถุดิบในการผลิตซอสหอยนางรม

1. น้ำปลา ตรา ใต้ต้น
2. เกลือ ตรา เกลือไทย
3. น้ำตาลแดง ตรา มิตรผล
4. ผงชูรส ตรา Red Leaf
5. โปแตสเซียมซอร์เบท
6. เบะแซ ตรา กระต่าย
7. น้ำตาลไหม้ ตรา BFI
8. น้ำตาลทรายขาว ตรา ผึ้ง
9. แป้งมันสำปะหลังคัดแปร ตรา Penford
10. I&G “Disodium 5'-inosinate 50%, Disodium Guanylate 50%” ตรา Miwon
11. สารแต่งกลิ่น Oyster flavour(concentration) ตรา Givaudan

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตซอสหอยนางรม

1. หม้อต้มซอสหอยนางรม
2. ไม้พาย
3. ตาชั่งชั่งสาร
4. ตะแกรง
5. ถังใส่ส่วนผสมที่ซั่งไว้แล้ว
6. ขวดแก้วสำหรับบรรจุ
7. กระบอกตวง
8. กรวยกรอก

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) temp 37 –45 °C (Memmert)
2. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์รุ่น Dragon 3002 (Mettler Toledo)
3. เครื่อง Laminar flow Type CLF 460 EC (Clean air Woerden)
4. หม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อ (Autoclave) SS-245 (Tomy)
5. เครื่องอบความร้อน (Hot air oven) (Memmert)
6. เครื่องอ่างน้ำ (Water bath) (Memmert)
7. จานเพาะเชื้อ sterile
8. ขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 มิลลิลิตร
9. หลอดทดลองขนาด 20x150 มิลลิลิตรสำหรับเจือจางปริมาณ 9 มิลลิลิตร
10. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
11. หลอดดักแก๊ส
12. Mixer

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- | | |
|--------------------------|-----------|
| 1. Peptone 0.1% | (Merck) |
| 2. Plate Count Agar | (Marck) |
| 3. Potato Dextrose Agar | (Merck) |
| 4. Potato Dextrose Broth | (Himedia) |
| 5. Tartaric acid | (Merck) |

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ศึกษาความเสี่ยงของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซอสหอยนางรม

3.2.1.1 ศึกษาคุณสมบัติของวัตถุดิบ

1) แป้งมันที่ใช้ในการผลิต

การเตรียมตัวอย่างแป้ง ส่งตรวจค่าทางจุลชีววิทยาตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยทำการบรรจุใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด น้ำหนักประมาณ 200 กรัม จำนวน 3 ถุง ส่งตรวจจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยรวม ยีสต์ และรา โคลิฟอร์ม *E. coli* *S. aureus* *B. cereus* *C. perfringens* *Salmonellae* โดยเกณฑ์มาตรฐานของจุลินทรีย์ที่ตรวจมีเกณฑ์ดังนี้

เกณฑ์และวิธีการที่ใช้ในการตรวจจุลินทรีย์แต่ละประเภทที่ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ใช้ในการวิเคราะห์

จำนวนจุลินทรีย์ (cfu / กรัม)	APHA. 2001. Compendium
จำนวนยีสต์และรา (cfu / กรัม)	BAM online. 2001
MPN Coliform bacteria	APHA. 2001. Compendium
เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ	
<i>S. aureus</i> (cfu / กรัม)	BAM online. 2001
<i>C. perfringens</i> (cfu / 0.01 กรัม)	BAM online. 2001
<i>Salmonella</i> (cfu / 25 กรัม)	ISO 6579-2002
<i>B. cereus</i> (cfu / กรัม)	BAM online. 2001

2) น้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต

การเตรียมตัวอย่างน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต เพื่อส่งตรวจทางฟิสิกส์ และทางเคมี ให้ทำการบรรจุน้ำในขวดพลาสติกใส ฝาเกลียวพลาสติก ขนาดบรรจุ 1.5 ลิตร จำนวน 4 ขวด ส่วนการตรวจทางจุลินทรีย์ให้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในขวดแก้วปราศจากเชื้อ บรรจุ 500 มิลลิลิตร จำนวน 1 ขวด

ในการตรวจคุณภาพน้ำทั้งทางฟิสิกส์ ทางเคมี และ ทางกายภาพ ทำการวิเคราะห์โดยส่งตัวอย่างตรวจที่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยเกณฑ์ที่ใช้สอดคล้องตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 โดยมีเกณฑ์การตรวจคุณภาพของน้ำมีรายละเอียดดังนี้

การตรวจทางด้านเคมี ทำการตรวจ

ทางฟิสิกส์

ค่าความเป็นกรด – ด่าง	APHA 2005(4500H-B)
-----------------------	--------------------

ทางเคมี (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ปริมาณสารทั้งหมด	APHA 2005(2540 B)
ความกระด้างทั้งหมด	
โดยคำนวณเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต	APHA 2005(2340 C)
คลอไรด์ โดยคำนวณเป็นคลอรีน	APHA 2005(4110 B)
ไนเตรต โดยคำนวณเป็นไนโตรเจน	APHA 2005(4110 B)
ฟลูออไรด์ โดยคำนวณเป็นฟลูออรีน	APHA 2005(4110 B)
เหล็ก	APHA 2005(3111 B)
ตะกั่ว	APHA 2005(3111 B)

การตรวจทางจุลชีววิทยา

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด / มิลลิลิตร	APHA 2005(9215 A-B)
MPN Coliform bacteria / 100 มิลลิลิตร	APHA 2005(9221 A-C)
<i>E. coli</i> / 100 มิลลิลิตร	APHA 2005(9221E, 9225D)
<i>S. aureus</i> (cfu/100 มิลลิลิตร)	APHA 2005(9221B) และ AOAC 2000(987.09 F)
Salmonella (cfu/100 มิลลิลิตร)	ISO 6340 : 1995
<i>C. perfringens</i> (cfu/100 มิลลิลิตร)	APHA 2005 (9030 B.15) และ BAM online2001 (Chap.16)

3.2.2 ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยา เคมี และ กายภาพของผลิตภัณฑ์

1) นำซอสหอยนางรมที่ผลิตจากวัตถุดิบในล็อตเดียวกันไปทำการตรวจหาค่าทางจุลชีววิทยา เคมี และ กายภาพ โดย ซอสหอยนางรมถูกบรรจุในขวดแก้ว ปิดสนิทเรียบร้อย ขวดละ 600 กรัม ส่ง 6 ขวด ส่งทั้งหมด 3 ครั้ง ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการตรวจครั้งนี้เกณฑ์ที่ใช้ตรวจหาค่าทางจุลินทรีย์ ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 200 พ.ศ. 2543 เรื่อง ซอสในภาชนะบรรจุปิดสนิท

การตรวจทางจุลชีววิทยา

จำนวนจุลินทรีย์ / กรัม	APHA. 2001. Compendium
จำนวนยีสต์และรา / กรัม	BAM online. 2001
MPN Coliform bacteria	APHA. 2001. Compendium
MPN <i>E. coli</i>	APHA. 2001. Compendium
เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ	
<i>S. aureus</i> / กรัม	BAM online. 2001
<i>C. perfringens</i> / 0.01 กรัม	BAM online. 2001
Salmonella / 25 กรัม	ISO 6579-2002
<i>B. cereus</i> / กรัม	BAM online. 2001

ในการศึกษานี้ให้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการของ ภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบวิธีการ และ ตรวจติดตามในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมภายหลังการเปิด

3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในระหว่างการเคี้ยวชอยหอยนางรม

โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ดิจิตอลที่มีการสอบเทียบทำการใส่ลงในหมีดัมซอสโดยใส่หัววัด (probe) ในกึ่งกลางหมีด จะจับเวลาทุกๆ 20 นาที และอ่านอุณหภูมิในเวลานั้น มาทำการเขียนกราฟที่เกิดขึ้นว่า การดัมซอสหอยนางรมใช้ เวลา และ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต และ นำซอสที่ได้ไปทำการตรวจสอบเชื้อทาง จุลินทรีย์ตามวิธีการข้อ 3.2.2



รูปที่ 3.1 เทอร์โมมิเตอร์ดิจิตอลสำหรับวัดอุณหภูมิในการเคี้ยวชอยหอยนางรม



รูปที่ 3.2 ป้ายแสดงการสอบเทียบของอุปกรณ์ที่นำมาใช้

3.2.4 ศึกษาผลการเติมโปรตีนเคปแซลล์ที่มีผลต่อการเก็บผลิตภัณฑ์หลังเปิดใช้

การทดลองนี้จะทำการนำซอสหอยนางรมที่ผลิตได้ในข้อ 3.2.3 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ จุลินทรีย์ที่อาจมีการปนเปื้อน คือ จุลินทรีย์โดยรวม เชื้อยีสต์ และ เชื้อรา โดยตรวจภายในห้องปฏิบัติการทางจุลินทรีย์ ของภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยนำซอสหอยนางรมที่ไม่เติมและแบบที่เติมโปรตีนเคปแซลล์-เบท 0.08% มาหาเชื้อยีสต์ รา โดยตรวจเชื้อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อดูจำนวนเชื้อที่เกิด

ตัวอย่างที่นำมาศึกษา คือ swab ในส่วนของคอขวด และเนื้อซอสหอยนางรมทำการตรวจทุกๆ 7 วัน ที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ทำ ทั้งหมด 3 ครั้ง

3.2.5 ศึกษาชนิดเชื้อราที่พบในซอสหอยนางรมสูตรไม่มีโปรตีนเติมซอร์เบท

โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราที่พบในซอสหอยนางรมที่ไม่มีโปรตีนเติมซอร์เบท ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDA) 5 มิลลิลิตร ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อแยกประเภทของเชื้อรา

3.2.6 ศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนเติมซอร์เบทที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราที่พบ

นำเชื้อราแต่ละประเภทที่ได้จากการศึกษา 3.2.5 มาทำการทดสอบกับ โปรตีนเติมซอร์เบท ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ ที่ 0.02%, 0.04%, 0.06% และ 0.08% ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทำ 3 ซ้ำ โดยนำเชื้อราที่เพาะไว้ในหลอดทดลอง นำมาปรับความเข้มข้น (dilution) และ หยดลงไปที่กึ่งกลางของ จานเพาะเชื้อที่ 10^6 cfu/g และตรวจติดตามผลการเจริญเติบโต หรือ การยับยั้งเชื้อราในแต่ละประเภทและในความเข้มข้นของโปรตีนเติมซอร์เบทที่แตกต่างกัน

3.2.7 ศึกษาผลของความร้อนกับความเข้มข้นของโปรตีนเติมซอร์เบทที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราที่พบ

นำเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.5 ที่เลี้ยงไว้ใน slant PDA 5 มิลลิลิตร มาผสมกับ 9 PDB มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นที่ระดับ 1:10 ทำการปรับความเข้มข้น ให้ได้ 10^4 และหยด 0.01 (จะเป็นปริมาณ 10^6) ลงใน PDA และ spread plate เพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้น ในขั้นตอนของการศึกษา ถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีความเข้มข้นของเชื้อรา ใน PDB ที่ 1:10 ลงในหลอด PDB อย่างเดียวและหลอด PDB ที่มีโปรตีนเติมซอร์เบท ในปริมาณ 0.01 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.02%, 0.04%, 0.06% และ 0.08% ตามลำดับ นำ ทั้ง 5 หลอดนี้ไปต้ม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อราที่ลดลงทุก 15 นาที ด้วยวิธีการ spread plate บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง นำปริมาณเชื้อที่เกิดขึ้นและนำมาวิเคราะห์ความเสี่ยงและหามาตรการควบคุมในช่วงที่การวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (HACCP Plan)

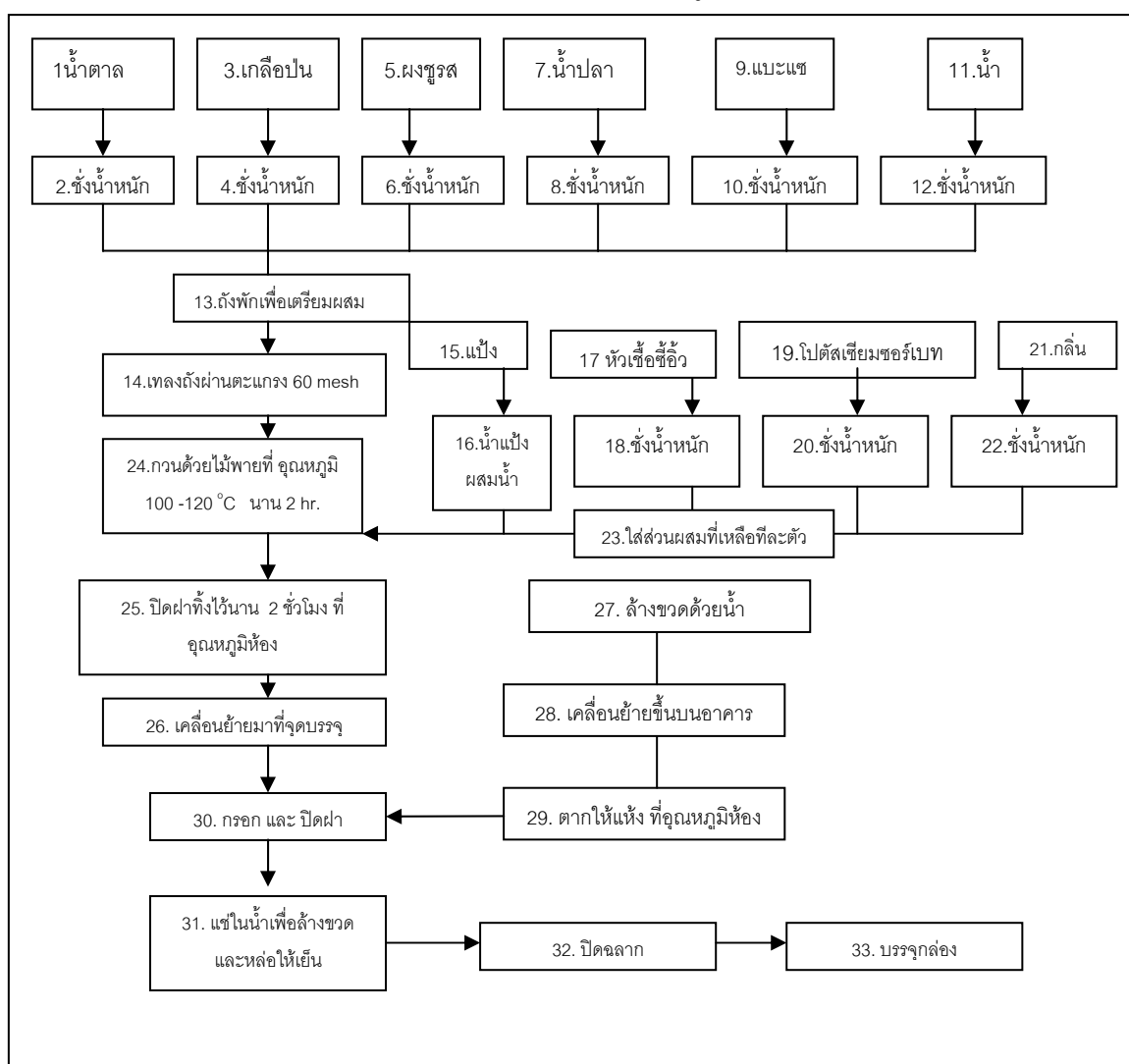
3.2.8 ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP ต่อซอสหอยนางรมในระดับโรงงานขนาดเล็ก

ศึกษาการผลิต ตั้งแต่วัตถุดิบจนกระทั่งผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

- 1) ทวนสอบแผนภูมิ ดังรูปที่ 3.1 และ นำไปทวนสอบกับปฏิบัติการจริง เพื่อยืนยันผลการทดลองว่าเป็นจริงตามที่ทำการทดสอบได้
- 2) วิเคราะห์อันตราย 3 ชนิด ตามเกณฑ์ของ codex โดยอันตรายทางกายภาพ โดยการศึกษาจากการตรวจสอบวัตถุดิบ และกระบวนการผลิตที่ใช่ว่ามีโอกาสเกิดอันตรายทางกายภาพในอาหารหรือไม่ อันตรายทางเคมี ทำการศึกษาการวิเคราะห์จากผู้ส่งสินค้า และ ประเมินความเสี่ยงที่มีโอกาสจะเกิด ส่วนอันตรายทางจุลินทรีย์ ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ
- 3) ศึกษามาตรการในระบบสัญลักษณ์ที่ดีในกระบวนการผลิตของโรงงาน

- 4) วิเคราะห์จุดวิกฤติ โดย วิธี decision tree และการประเมินความเสี่ยง
- 5) หาค่าควบคุมในแต่ละขั้นตอน
- 6) หาวิธีการตรวจติดตามในแต่ละขั้นตอน
- 7) หาวิธีการแก้ไขหากมีการเบี่ยงเบน
- 8) จัดทำแผนการทวนสอบ

ความน่าเชื่อถือของระบบ HACCP (Validation HACCP) ทำการประเมินระบุอันตรายหรือความเสี่ยงจากสิ่งปนเปื้อนที่จะเกิดขึ้นในกระบวนการผลิต ตามรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.3 แผนภูมิกระบวนการผลิตซอสหอยนางรม

3.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงชนิดของเชื้อที่มีผลต่อการเสื่อมเสียของซอสหอยนางรม ที่เดิมและไม่เดิม
โป้ดัสเซียมซอร์เบท
- 2) ทราบถึงอายุการเก็บซอสหอยนางรมที่ใส่และไม่ใส่โป้ดัสเซียมซอร์เบทที่ 0, 7, 14, 28 วัน
- 3) ทราบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บซอสหอยนางรมที่ใส่และไม่ใส่โป้ดัสเซียมซอร์เบท
- 4) ทราบถึงอันตรายทางชีวภาพ ทางเคมี และ ทางกายภาพ ของกระบวนการผลิตซอสหอย
นางรมและวิธีการควบคุมการเกิดอันตรายต่างๆ
- 5) ทราบถึงมาตรการการควบคุมที่จุดวิกฤติ
- 6) ได้แผนงานระบบ HACCP ดั้แบบสำหรับโรงงานผลิตซอสหอยนางรมของโรงงานระดับ
เล็ก