



รายงานวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้จากกุ้ง
ที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก

EFFECTIVENESS OF CLEANING FOR SHRIMP ALLERGEN REMAINING
ONTO A PLASTIC SURFACE

คณะผู้วิจัย

ดร. นฤมล จอมมาก

รศ. ดร. ปัทมา ระตะนະอาพร

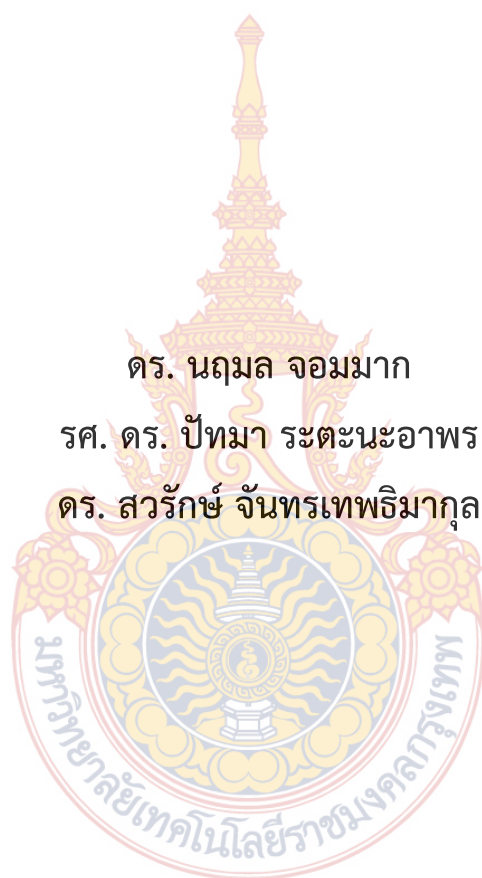
ดร. สวรรักษ์ จันทรเทพธิมากุล

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณเงินรายได้ ปี พ.ศ. 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

การศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้จากกุ้ง
ที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก



ดร. นฤมล จอมมาก

รศ. ดร. ปัทมา ระตะนະอาพร

ดร. สวรรักษ์ จันทรเทพธิมากุล

โครงการวิจัยทุนสนับสนุนงานวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

งบประมาณเงินรายได้ ปี พ.ศ. 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

ชื่องานวิจัย	การศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก	
โดย	นางสาวนฤมล	จอมมาก
	นางปีพมา	ระตะนะอาพร
	นางสาวสวรักษ์	จันทร์เทพธิมากุล
ปีงบประมาณ	2565	

บทคัดย่อ

การล้างเป็นวิธีการหนึ่งของการทำความสะอาดเพื่อลดการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งผู้ผลิตจำเป็นต้องหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนข้ามไปยังผลิตภัณฑ์อื่น โดยทั่วไปการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์แปรรูปอาหารมักดำเนินการควบคู่หรือตามด้วยกระบวนการฆ่าเชื้อ งานวิจัยจึงนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ได้จำลองการปนเปื้อนด้วยเนื้อกุ้งขาว ผลการวิเคราะห์ตรวจพบการตกค้างของโทรโปไมโอซิน (TM) ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักและยังคิดเป็นสัดส่วนที่พบมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นในกุ้งขาว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อนำพื้นผิวสัมผัสไปทดสอบการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีปริมาณคลอรีน ความเร็วในการปั่นล้าง และระยะเวลาในการล้างแตกต่างกัน ณ อุณหภูมิห้อง (แปรรูปปริมาณคลอรีน เท่ากับ 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วในการปั่นล้าง เท่ากับ 100 และ 200 รอบ/นาที และระยะเวลาล้าง เท่ากับ 1 และ 5 นาที) พบว่า การล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคลอรีน 10 มิลลิกรัม/ลิตร ปั่นล้างด้วยความเร็ว 100 หรือ 200 รอบ/นาที มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของโปรตีนโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกน้อยกว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคลอรีน 50 มิลลิกรัม/ลิตร แม้ว่าจะมีการเพิ่มระยะเวลาล้างจาก 1 เป็น 5 นาที ($p < 0.05$) ผลการศึกษาความเข้มข้นของแถบโปรตีนโทรโปไมโอซิน สารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่น และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในกุ้งขาว ได้แก่ ไมโอซินเฮฟวีเชน (MHC) และแอคติน (AC) ยังแสดงให้เห็นแนวโน้มของแถบโปรตีนจางลงซึ่งเป็นผลจากปริมาณคลอรีนในสารทำความสะอาด จากการศึกษาพบว่าการล้างทำความสะอาดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นคลอรีน 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วรอบในการปั่นล้าง 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เป็นสภาวะการล้างที่ทำให้มีปริมาณโทรโปไมโอซินตกค้างน้อยที่สุดเท่ากับ 9.52 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนจากกุ้งที่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้มีปริมาณอ้างอิงอยู่ที่ 10 มิลลิกรัม นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการล้างทำความสะอาดด้วยสภาวะที่คัดเลือกดังกล่าวเมื่อทิ้งระยะเวลาสัมผัสหลังการปนเปื้อนเป็น

เวลา 0 30 และ 120 นาที จึงนำไปล้างหรือล้างร่วมกับการลวกน้ำร้อน ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารก่อภูมิแพ้หลักและโปรตีนทั้งหมดจากกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกทั้งก่อนล้าง หลังล้างด้วยสารทำความสะอาด และหลังล้างด้วยสารทำความสะอาดร่วมกับการลวกน้ำร้อน พบว่า กระบวนการล้างทำความสะอาดมีส่วนช่วยในการลดปริมาณโทรโปไมโอซิน อย่างไรก็ตามหากทิ้งระยะเวลาหลังการปนเปื้อนไว้เป็นเวลานานหรือมีการใช้น้ำร้อนร่วมกับการล้างทำความสะอาด อาจทำให้โทรโปไมโอซินเกาะติดบนพื้นผิวแผ่นพลาสติกได้มากยิ่งขึ้นในปริมาณเท่าตัว เมื่อเทียบกับการล้างทำความสะอาดในทันทีหลังจากการปนเปื้อน ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: กุ้งขาว สารก่อภูมิแพ้ พื้นผิวพลาสติก การล้างทำความสะอาด



Research Title Effectiveness of Cleaning for Shrimp Allergen Remaining onto a Plastic Surface

Author Miss Naruemon Jommark
Mrs Pattama Ratana-arporn
Miss Savarak Chantaratheptimakul

Year 2022

Abstract

Washing is a cleaning method to reduce allergen contamination manufacturers need to find a suitable method to prevent cross-contamination of products across to another. Generally, the cleaning of food processing equipment is usually carried out in collaboration with or followed by sanitization. This research aimed to study the washing plastic surfaces contaminated with white shrimp meat. The result revealed tropomyosin (TM) residue as the major allergen, which was also one of the most proportions in white shrimp, with a molecular weight of approximately 37 kilodalton. Contacted surfaces were tested for washing with chlorinated sodium hypochlorite solution by varying chlorine concentrations, stirring speed, and washing time at room temperature (chlorine concentrations were 10 and 50 milligrams/liter, speeds were 100 and 200 round/minute, and washing times were 1 and 5 minutes). The result was found that applying the sodium hypochlorite solution with a chlorine concentration of 10 milligrams/liter at a stirring speed of 100 or 200 round/minute was less effective in reducing residual tropomyosin contaminated on plastic surfaces than using 50 milligrams/liter of the chlorinated solution, although the washing time was increased from 1 to 5 minutes ($p < 0.05$). For the result in band intensity of TM and other allergens, it found the main constituent proteins in white shrimp meat were myosin heavy chain (MHC) and actin (Ac), which also showed a trend to fade as a result of increasing chlorine concentration. From this study, washing with sodium hypochlorite solution at a chlorine concentration of 50 milligrams/liter by stirring speed of 200 round/minutes for 5 minutes was the optimum washing condition. It could reduce the amount of tropomyosin contaminated

on plastic surfaces and reached to $9.52 \pm 0.07 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ ($p < 0.05$). This corresponds to the amount of shrimp protein that causes allergies with a reference amount of 10 milligrams. Moreover, cleaning efficiency was studied by the selected optimal condition using different periods after contamination for 0 30 and 120 min, then washed and combined by sanitizing with hot water. In the quantitative assays of major allergens and total protein from shrimp adhering to plastic surfaces before and after the cleaning procedures (before washing, after washing and cleaner, and after washing in combination with hot water), it was found that both washing procedures contributed to the reduction of tropomyosin residues on the plastic sheet. However, in the case of leaving for an extended period, the tropomyosin would adhere more to the plastic surface. This resulted in difficulty in cleaning, subsequently, efficiency was reduced as a higher amount of tropomyosin on the surface after washing compared to washing immediately after the contamination ($p < 0.05$).

Keywords: white shrimp, allergen, plastic surface, cleaning



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก” สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณอุดหนุนงานวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2565 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ซึ่งผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการความปลอดภัยของอาหาร และสาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ รวมถึงภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ดำเนินการได้และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อนึ่งคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่ได้ศึกษาและผู้ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งหากโครงการงานเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 แผนการดำเนินงาน	3
1.4 ขอบเขต	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 กุ้งขาวแวนนาไม	5
2.2 การแพ้อาหาร	9
2.3 วัสดุอุปกรณ์ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร	13
2.4 การทำความสะอาดและการประเมินประสิทธิภาพการทำความสะอาดอุปกรณ์ ในอุตสาหกรรมอาหาร	15
2.5 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์หาสารก่อภูมิแพ้	25
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน	29
3.1 วัสดุดิบ	29
3.2 สารเคมีและชุดทดสอบ	29
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	30
3.4 วิธีการดำเนินงาน	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	38
4.1 ผลการศึกษารูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อ กุ้งและที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการศึกษาภาวะในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสาร ก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว	40
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวก ด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่ เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก	44
บทที่ 5 บทสรุป	50
5.1 สรุปผล	50
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก	59
ภาคผนวก ข	62
ภาคผนวก ค	67
ภาคผนวก ง	71
ภาคผนวก จ	73



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย	3
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งขาว	7
2.2 คุณลักษณะของสิ่งสกปรก	18
4.1 ปริมาณคลอรีนทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารทำความสะอาดที่เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นทางการค้า (4-6%)	40
4.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาด	42
4.3 ปริมาณโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาด	43
4.4 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดและโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด	45
4.5 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากกุ้งขาวที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาดและหลังการล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	46
4.6 ปริมาณโทรโปไมโอซินจากกุ้งขาวที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังผ่านการล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	48
ตารางผนวก	หน้า
จ1 ข้อมูลผลวิเคราะห์ความเข้ม (Intensity) ของแถบโปรตีน และร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด	74
จ2 ข้อมูลร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	74
จ3 ข้อมูลร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กุ้งขาว	7
3.1 แผ่นพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง สีขาว เกรดอาหาร	31
3.2 การจำลองการปนเปื้อนของเนื้อกุ้งขาวลงบนพื้นผิวพลาสติก	33
3.3 การล้างพื้นผิวพลาสติกด้วยวิธีการปั่นล้าง	34
3.4 ขั้นตอนการทดสอบสภาวะในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติก	35
3.5 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาดและการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	37
4.1 รูปแบบของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อกุ้งขาวและปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกที่มีการจำลองการปนเปื้อน	39
4.2 รูปแบบของโปรตีนที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังผ่านการล้างทำความสะอาด	41
4.3 แถบของโปรตีนจากเนื้อกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาดโดยมีระยะเวลาสัมผัสหลังปนเปื้อนเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที	45
4.4 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	47
4.5 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิว พลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน	49
ภาพผนวก	หน้า
ก1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	61
ข1 โปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net (บริษัท อาร์-ไบโอฟาร์ม, ประเทศเยอรมนี)	65
ข2 การคำนวณปริมาณโทรโปไมโอซินโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net	66
ค1 ชุดวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	70
ง1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนรวม (Total chlorine)	72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การแพ้อาหารเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบในด้านสุขภาพแบบไม่พึงประสงค์ องค์การอนามัยโลก (WHO) ยอมรับว่าการแพ้อาหารเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ (Kirsch et al., 2009) ประมาณ 10% ของประชากรทั่วโลกต้องทนทุกข์ทรมานจากการแพ้อาหาร (Leung et al., 2014) ซึ่งการแพ้อาหารเกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เฉพาะเจาะจงสามารถเกิดขึ้นซ้ำได้จากการสัมผัสกับอาหารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้สามารถส่งผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันของโปรตีนในอาหารที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันที่ไม่พึงประสงค์ทั้งแบบอิมมูโนโกลบูลินอี (IgE) และที่ไม่ใช่อิมมูโนโกลบูลินอีต่ออาหาร จากการรายงานพบว่าสัตว์มีเปลือก ถั่วเปลือกแข็ง นม ไข่ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และปลา มีสาเหตุมากกว่า 90% ของการแพ้อาหารทั้งหมด (Poms et al., 2004; Monaci & Visconti, 2009)

กุ้งเป็นสาเหตุหนึ่งของการแพ้อาหารที่พบบ่อยที่สุดในโลก (Ayuso et al., 2002) อาการทั่วไปของการแพ้กุ้ง ได้แก่ โรคผิวหนังภูมิแพ้ แอองจิโออีตีมา อาการทางเดินหายใจเฉียบพลัน และแม้กระทั่งภาวะช็อก ดังนั้นการรับประทานกุ้งโดยไม่ได้ตั้งใจอาจทำให้เกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงในผู้บริโภคที่มีความอ่อนไหวได้ สารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในกุ้งคือ ไทรโอโปไมโอซินซึ่งคิดเป็น 80% ของปฏิกิริยาแพ้กุ้ง (Daul et al., 1994) สารก่อภูมิแพ้เป็นโปรตีนของกล้ามเนื้อที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33–39 กิโลดาลตัน และมีส่วนควบคุมการหดตัวของกล้ามเนื้อโครงร่าง เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีความเสถียรทางความร้อน จึงไม่สามารถย่อยสลายได้ง่ายในระหว่างกระบวนการผลิตก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพที่สำคัญต่อผู้บริโภค (Abdul et al., 2010; Wu et al., 2012; Zeng et al., 2019) กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีการบังคับใช้ข้อกำหนดการติดฉลากสารก่อภูมิแพ้ในอาหาร โดยขอให้อุตสาหกรรมธุรกิจอาหารติดฉลากบรรจุภัณฑ์อาหารที่มีเนื้อกุ้ง นอกจากนี้สายการผลิตที่ใช้ร่วมกันระหว่างอาหารแปรรูปกุ้งและผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ นับว่าเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการปนเปื้อนข้าม นำไปสู่อันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคที่สำคัญ ในปัจจุบันการทดสอบอิมมูโนดูดซับที่เชื่อมโยงกับเอนไซม์ (ELISA) เป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการตรวจหาสารก่อภูมิแพ้ในอาหาร วิธีการวิเคราะห์เหล่านี้สามารถตรวจหาปริมาณไทรโอโปไมโอซินในอาหารที่มีขีดจำกัดได้ตั้งแต่ 0.45 ถึง 6.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Zeng et al., 2019)

กระบวนการล้างทำความสะอาดในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้สารทำความสะอาดในการล้างทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ภายในอุตสาหกรรม สารประกอบคลอรีนเป็นสารทำความสะอาดกลุ่มหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการทำความสะอาด ชนิดของสารประกอบคลอรีนที่สำคัญและมีการ

ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทำมาสะอาดและมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้ได้ทั้งกับการผลิตอาหาร เครื่องมือเครื่องใช้ หรือแม้แต่เยื่อหรือผิวหนังต่างๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย การใช้สารทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมักจะทำร่วมกับการฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมีหรือใช้วิธีการทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อนหรือการลวก เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อทำลายหรือลดจำนวนจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งจะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สูญเสียสภาพหรือจับตัวกันเป็นก้อน โดยการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อต้องพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้น ระยะเวลาในการสัมผัส (Contact time) ความสะอาด ค่าความเป็นกรดต่าง ความกระด้างของน้ำ และการสร้างฟิล์มชีวภาพบนพื้นผิว (Biofilms) (Vishweshwar & Krishnaiah, 2005)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกน้ำร้อนต่อสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกจากการตรวจสอบโปรตีนที่ตกค้างบนพื้นผิวโดยวิธีลาวรี (Lowry assay) เทคนิคอีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) และเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel-electrophoresis) โดยมีปัจจัยในการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของสารทำความสะอาด (โซเดียมไฮโปคลอไรท์) ความเร็วรอบในการปั่นล้าง และระยะเวลาในการล้างทำความสะอาด

1.2 วัตถุประสงค์

- 2.1.1 เพื่อศึกษารูปแบบโปรตีนจากกุ้งขาวที่ปนเปื้อนและตกค้างบนพื้นผิวพลาสติก
- 2.1.2 เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณสารก่อภูมิแพ้หลักจากเนื้อกุ้งขาวที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติก
- 2.1.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดและสารก่อภูมิแพ้หลักจากเนื้อกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก

1.3 แผนการดำเนินงาน

ตารางที่ 1.1 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย

กิจกรรม	ระยะเวลา (ตุลาคม 2564 – มีนาคม 2566)											
	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
	64	64	64	65	65	65	65	65	65	65	65	65
1. หาข้อมูล และจัดเตรียมวัตถุดิบ อุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการวิจัย												
2. จำลองการปนเปื้อน ศึกษารูปแบบโปรตีน ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และปริมาณสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติก												
3. ศึกษาประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก												
4. ศึกษาประสิทธิภาพการเกาะติดของโปรตีนโทรโปไมโอซินและโปรตีนทั้งหมดบนพื้นผิวสัมผัสอาหารและรูปแบบของโปรตีนก่อภูมิแพ้จากเนื้อกุ้งขาวที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติก												
5. วิเคราะห์ผล สรุป จัดทำและส่งรายงานเล่มสมบูรณ์												

1.4 ขอบเขต

1.4.1 การจำลองการปนเปื้อนของกึ่งลงบนพื้นผิวพลาสติก

1.4.2 รูปแบบและปริมาณโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลชนิดพอลิอะคริลาไมด์ที่มีเอสดีเอส

1.4.3 สภาพการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งที่มีการแปรระดับความเข้มข้นของสารทำความสะอาด 2 ระดับ (10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร) ความเร็วรอบในการปั่นล้าง 2 ระดับ (100 และ 200 รอบ/นาที) และระยะเวลาในการปั่นล้าง 2 ระดับ (1 และ 5 นาที)

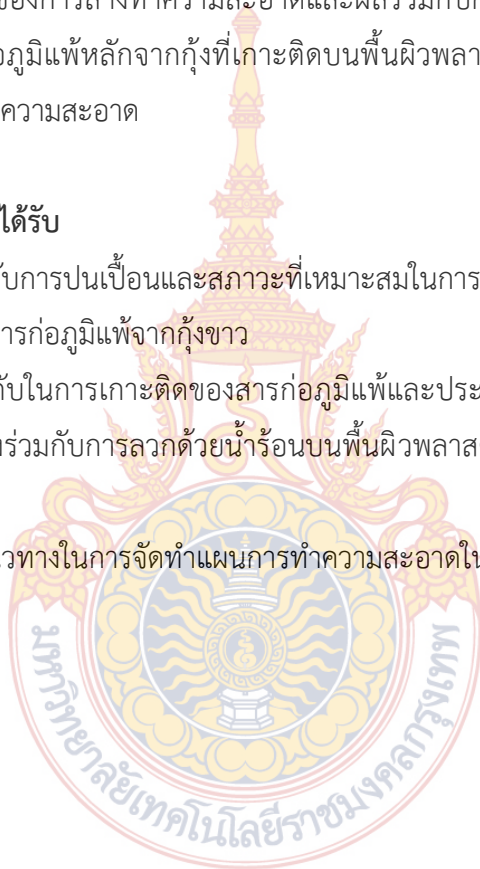
1.4.4 ประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที ก่อน กระบวนการทำความสะอาด

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบถึงระดับการปนเปื้อนและสถานะที่เหมาะสมในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่มีการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว

1.5.2 ได้ทราบถึงระดับในการเกาะติดของสารก่อภูมิแพ้และประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลของการล้างร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนบนพื้นผิวพลาสติกที่มีการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว

1.5.3 นำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดทำแผนการทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กุ้งขาวแวนนาไม

2.1.1 ความสำคัญของกุ้งขาว

กุ้งขาวหรือกุ้งขาวแปซิฟิกหรือกุ้งขาวแวนนาไม (White shrimp, Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*) ที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณเขตชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกของประเทศเม็กซิโก ตอนกลางและตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา กุ้งขาวเป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิการากัว เอกวาดอร์ ปานามา โคลัมเบีย และเปรู โดยมีเอกวาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตกุ้งขาวที่ใหญ่ที่สุด เหตุผลสำคัญที่ทำให้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งทะเลที่เจริญเติบโตเร็วในสภาพของการเพาะเลี้ยง สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี ในช่วงปี ค.ศ. 1995 กุ้งขาวได้ถูกนำเข้ามาเพาะเลี้ยงในเอเชียครั้งแรกในประเทศจีน เพื่อเป็นการหาพันธุ์กุ้งทะเลที่ทนทานต่อโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus) ทดแทนกุ้งกุลาดำ และเป็นการชดเชยผลผลิตกุ้งเพาะเลี้ยงในประเทศแถบละตินอเมริกา จนปัจจุบันให้มีการนำกุ้งขาวเข้ามาเพาะเลี้ยงมากขึ้นในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียใต้ ทำให้กุ้งขาวได้กลายเป็นสัตว์น้ำที่กำลังมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของหลายๆ ประเทศในเขตเอเชีย (McVey, 1993) เนื่องจากกุ้งขาวเป็นสายพันธุ์ที่มีจำนวนมากที่สุดในโลกและนิยมเพาะเลี้ยงมากที่สุด จึงเป็นสินค้าประมงที่สำคัญของไทย (Nirmal *et al.*, 2020) นับได้ว่ากุ้งขาวเป็นกุ้งสายพันธุ์หนึ่งที่มีความนิยมในการบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศทั้งนี้เนื่องจากมีเนื้อแน่น รสชาติหวานใกล้เคียงกับกุ้งแช่บ๊วย และเป็นกุ้งที่มีความทนทาน แข็งแรงเจริญเติบโตเร็วและให้ผลผลิตดี (ธวัชชัย, 2551)

2.1.2 สถานการณ์การค้าของกุ้งขาว

กุ้งขาวแวนนาไมมีความสำคัญในระบบเศรษฐกิจไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีปริมาณการส่งออกสูงและในปี พ.ศ. 2563 ผลผลิตกุ้งทะเล (กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งกุลาดำ) มีปริมาณรวม 288,765.35 ตัน โดยเป็นผลผลิตกุ้งขาวแวนนาไม 245,644.08 ตัน (95.48%) และกุ้งกุลาดำ 11,618.49 ตัน (4.52%) ของปริมาณกุ้งที่ส่งออกทั้งหมด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปีก่อน ผลผลิตกุ้งทะเลลดลง 6.25% โดยการผลิตกุ้งขาวแวนนาไมลดลงเพียง 5.74% ในขณะที่กุ้งกุลาดำลดลง 15.85%

ในส่วนของการนำเข้ากุ้งขาวแวนนาไม ในปี พ.ศ. 2563 ไทยมีการนำเข้ากุ้งทะเล (ไม่รวมกุ้งก้ามกราม และล็อบสเตอร์) ปริมาณ 25,061.24 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,125.91 ล้านบาท ปริมาณ

และมูลค่าการนำเข้าลดลง 10.79% และ 17.55% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปีก่อน หากพิจารณาจากมูลค่าการนำเข้า พบว่า นำเข้าจากอาร์เจนตินามากที่สุด (43.22%) เอกวาดอร์ (8.79%) เมียนมาร์ (5.74%) แคนาดา (4.85%) ปากีสถาน (4.719) และประเทศอื่นๆ (32.69%) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการนำเข้ากุ้งน้ำเย็น กุ้งขาว กุ้งกุลาดำ และกุ้งอื่นๆ แช่เย็นแช่แข็งเพื่อนำมาแปรรูปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเพื่อการส่งออกต่อไป

การส่งออกกุ้งทะเล (ไม่รวมกุ้งก้ามกรามและlobster) จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2563 มีปริมาณการส่งออก 149,490.99 ตัน คิดเป็นมูลค่า 44,465.55 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าลดลง 15.29% และ 14.03% เมื่อเทียบกับปีก่อน ตามลำดับ หากพิจารณาจากสัดส่วนมูลค่าการส่งออกพบว่า ตลาดส่งออกหลักของไทย คือ สหรัฐอเมริกา 39.40% ญี่ปุ่น 24.60% จีน 13.55% เกาหลีใต้ 4,9796 และประเทศอื่นๆ 22.48% เมื่อพิจารณาถึงการส่งออกกุ้งขาวแวนนาไม ปี 2563 มีปริมาณการส่งออก 114,398.93 ตัน และมูลค่า 34,096.17 ล้านบาท หรือคิดเป็น 76.53% และ 76.68% ของปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลทั้งหมด และเมื่อเทียบกับปีก่อนการส่งออกมีปริมาณและมูลค่าลดลง 15.09% และ 14.37% ตามลำดับ หากพิจารณาจากสัดส่วนมูลค่าการส่งออก พบว่า ตลาดหลัก คือ สหรัฐอเมริกา 35.41% ญี่ปุ่น 22.25% จีน 13.549 เกาหลีใต้ 5.42% และประเทศอื่นๆ 23.38% (จิตรลดา และพัชรินทร์, 2563)

2.1.3 อนุกรมวิธานของกุ้งขาวแวนนาไม

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวหรือเรียกอีกชื่อว่ากุ้งขาวแวนนาไมตามการจำแนกของ Perez-Farfante and Kensley (1997) มีดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Litopenaeus vannamei*

ชื่อสามัญ : White shrimp

ไฟลัม : Arthropoda

คลาส : Crustacea

คลาสย่อย : Malacostraca

อันดับ : Decapoda

อันดับย่อย : Natantia

วงศ์ : Penaeidae

สกุล : *Litopenaeus*

สปีชีส์ : *Vannamei*

2.1.4 ลักษณะเฉพาะของกุ้งขาว

กุ้งขาว มีลักษณะลำตัวมีสีขาวใส 8 ปล้อง ส่วนหัว 1 ปล้อง เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง หนวดแดง 2 เส้นยาว ตาสีแดงเข้ม หนวดอกใหญ่มีการเคลื่อนไหวเร็ว ขาสีขาวโดดเด่น แพนหางมี 4 ใบ

และ 1 กรีทาง หางสีแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายหางจะมีสีแดงเข้ม ส่วนของกรีมี่ลักษณะเป็นแนวตรงปลายงุ้มลงเล็กน้อย กรีอยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัว สันกรีสอง ปลายกรีแคบ เมื่อโตขึ้นพนักกรีด้านบนจะมี 8 พนัก และด้านล่าง 2 พนัก ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก ลักษณะที่สังเกตเห็นเด่นชัดที่สุดของกุ้งสายพันธุ์นี้คือ ลำไส้เนื่องจากความใสของลำตัว ตัวเมีย (น้ำหนักประมาณ 120 กรัม) มีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ (น้ำหนักประมาณ 60 ถึง 80 กรัม) (ชะลอและพรเลิศ, 2547) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กุ้งขาว

2.1.5 องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งขาว

องค์ประกอบที่สำคัญของกุ้งหรือสัตว์น้ำทั่วไปนั้นประกอบด้วย น้ำ โปรตีน และไขมันซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะมีประมาณ 98% ของน้ำหนักเนื้อทั้งหมด (ตารางที่ 2.1) องค์ประกอบเหล่านี้มีผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ สมบัติเชิงหน้าที่ คุณภาพด้านประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาสำหรับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่มีปริมาณเล็กน้อย แต่มีความสำคัญต่อกลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการของกุ้ง ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของกุ้งเปลี่ยนแปลงตามชนิด ระยะการเจริญเติบโต และสภาวะทางโภชนาการของสัตว์น้ำ (สุทธวัฒน์, 2548; Sikorski *et al.* 2020)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งขาว

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (% โดยน้ำหนักเปียก)
ความชื้น	77.21
เถ้า	1.47
โปรตีน	18.80
ไขมัน	1.30

ที่มา: Sriket *et al.* (2007)

2.1.6 ชนิดของโปรตีนก่อภูมิแพ้ในกุ้งขาวแวนนาไม

1) โทรโปไมโอซิน (Tropomyosin; TM) เป็นโปรตีนจากกล้ามเนื้อ ถือว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ของกุ้งที่สำคัญ สามารถทนความร้อนได้ และยังถูกเรียกว่า Pen a 1 ในกุ้งสีน้ำตาล (Reese *et al.*, 1999) Pen i 1 ในกุ้งอินเดีย Pen m 1 ในกุ้งกุลาดำ Lit v 1 ในกุ้งขาวแวนนาไม (Gamez *et al.*, 2011) และ Cra c 1 ในกุ้งทะเลเหนือ (Woo and Bahna, 2011) เริ่มพบในสัตว์จำพวกสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็งในปี ค.ศ. 1981 โดย Hoffman *et al.* (1981) และ Shanti *et al.* (1993) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง 86% ในลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนจากกล้ามเนื้อ โทรโปไมโอซินเป็นกลุ่มโปรตีนที่หลากหลายซึ่งมีไอโซฟอร์มต่างกัน พบได้ทั้งในเซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์กล้ามเนื้อทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง (Miyazaki *et al.*, 1992) การศึกษาเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้แสดงให้เห็นว่าโทรโปไมโอซินเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่ทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มหลักในหมู่สัตว์น้ำเปลือกแข็งและมอลลัสคัส (Leung *et al.*, 1996) จากการศึกษาโดย Motoyama *et al.* (2007) รายงานว่าโทรโปไมโอซินสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ fast, slow-twitch และ slow-tonic ขึ้นอยู่กับเส้นใยกล้ามเนื้อของสิ่งมีชีวิต ในกุ้งส่วนใหญ่เรียกว่า fast type น้ำหนักโมเลกุลของโทรโปไมโอซินอยู่ระหว่าง 34 กิโลดาลตัน ถึง 39 กิโลดาลตัน นับว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็งเกือบทั้งหมด (Zailatul *et al.*, 2012; Margaret *et al.*, 2015)

2) อาร์จินีนไคเนส (Arginine kinase; AK) จัดเป็นเอนไซม์ชนิด monomeric phosphagen ATP phosphotransferase ซึ่งมักพบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและเป็นกุญแจสำคัญในการเผาผลาญพลังงาน (Yao *et al.*, 2005) อาร์จินีนไคเนสที่ได้จากกุ้งคาดว่าจะมีบทบาทในการเป็นสารก่อภูมิแพ้ของสัตว์จำพวกสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง มีปฏิกิริยาข้ามและมีการตอบสนองต่อภาวะภูมิคุ้มกันรวดเร็ว (Yu *et al.*, 2003) อาร์จินีนไคเนสมีอยู่มากในกล้ามเนื้อกุ้งขาวแวนนาไมและคาดว่าจะเป็สารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในลำดับรองลงมา Garcia-Orozco *et al.* (2007) รายงานว่า อาร์จินีนไคเนสจากกุ้งขาวแวนนาไมเรียกว่า Lit v 2 และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 40 กิโลดาลตัน

3) ไมโอซินไลต์เชน (Myosin light chain; MLC) Ayuso *et al.* (2008) รายงานว่า ไมโอซินไลต์เชนจากกุ้งขาวแวนนาไมที่เรียกว่า Lit v 3 ได้รับการยอมรับว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้ในกุ้งชนิดใหม่เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญแต่จะมีผู้ป่วยเพียงบางรายเท่านั้นที่มีความไวต่ออาการแพ้ ไมโอซินไลต์เชนมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 20 กิโลดาลตัน ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ที่เกิดกับแอนติบอดีชนิดอี (IgE) ของผู้ป่วยโดยเฉพาะ ซึ่งจะพบในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่ โดยเด็กบางคนมีอาการหอบหืดเมื่อสัมผัสกับกุ้งต้ม สารก่อภูมิแพ้ชนิดนี้อาจส่งผลต่อทางเดินหายใจในผู้ป่วย

4) ซาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน (Sarcoplasmic calcium-binding protein; SCP) โปรตีนซาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีนในพลาสมากล้ามเนื้อได้มาจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นที่รู้จักกันในชื่อ Lit v 4 เป็นสารก่อภูมิแพ้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 22 กิโลดาลตัน (Ayuso *et al.*,

2009) คณะผู้วิจัยยังเปิดเผยว่าการแพ้ต่อโปรตีนซาร์โคพลาสไมคแคลเซียมบดโปรตีนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาข้ามระหว่างสัตว์จำพวกสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็งเท่านั้น

2.2 การแพ้อาหาร

2.2.1 สารก่อภูมิแพ้ในอาหาร

สารก่อภูมิแพ้ เป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มักเป็นสารอาหารประเภทโปรตีนที่ทนต่อความร้อน ทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหาร เช่น การย่อยกรดในกระเพาะอาหาร และเอนไซม์ในลำไส้เล็ก สาเหตุสำคัญเกิดจากการสร้างภูมิคุ้มกัน (Antibody) เมื่อมีโปรตีนเข้าไปในร่างกาย อาหารที่เป็นแหล่งของสารก่อภูมิแพ้นั้น มักจะเป็นโปรตีนที่พบตามธรรมชาติที่มีอยู่ในอาหาร ทั้งที่มาจากพืชและสัตว์โดยเฉพาะสัตว์น้ำจำพวกกุ้ง หอย ปู และปลา ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการแพ้ อาหารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้นั้นมีมากกว่า 160 ชนิด พบว่า 90% ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้จะมีอาการแพ้อาหารและผลิตภัณฑ์ดัดแปรที่มาจากอาหารหลัก 8 ชนิด ต่อไปนี้ คือ นมวัว ไข่ ปลา สัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลังที่มีเปลือก (กุ้ง หอย ปู) ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วเปลือกแข็ง และข้าวสาลี โดยปกติแล้วอาหารเหล่านี้จะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปของวัตถุดิบหรือส่วนผสมในอาหาร (Ingredients) จากผลการสำรวจพบว่าในกลุ่มผู้ผลิตมีการใช้วัตถุดิบอาหารที่เป็นแหล่งของสารก่อภูมิแพ้ ได้แก่ นม 8% ถั่วเหลือง 84% ข้าวสาลี 78% ไข่ 72% และถั่วลิสง 55% จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อว่าอาหารหลายชนิดที่จำหน่ายในท้องตลาดมีสารก่อภูมิแพ้อยู่ทั้งโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจจากการปนเปื้อนข้ามในสายการผลิต การขาดข้อมูลของแหล่งที่มาอย่างครบถ้วนและถูกต้องของส่วนผสมอาหาร (Ingredient) ที่ได้รับจากผู้จัดส่งสินค้า (Supplier) ซึ่งในอาหารแต่ละชนิดนั้น อาจประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลายชนิด แต่ชนิดของอาหารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับพื้นที่และรูปแบบการบริโภคอาหารของประชากรในพื้นที่นั้น ๆ เช่น ภูมิแพ้ปลาจะพบมากในเขตสแกนดิเนเวีย ภูมิแพ้ข้าวพบในเขตเอเชีย หรือภูมิแพ้ถั่วลิสงพบมากในประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (วิภา, 2554)

กุ้งเป็นสัตว์น้ำจำพวกมีเปลือก (Shellfish) ที่ได้รับความนิยมนำมาปรุงอาหารอย่างมากทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศแถบเอเชียรวมถึงประเทศไทย อย่างไรก็ตามกุ้งสามารถเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแพ้อาหารได้ในผู้ที่มีการแพ้กุ้งมักจะมีอาการแพ้ต่อสัตว์จำพวกสัตว์น้ำมีเปลือกชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย เนื่องจากโครงสร้างทางชีววิทยาของโปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ของกลุ่มสัตว์น้ำมีเปลือก (Shellfish) มีความคล้ายคลึงกัน ในปัจจุบันมีการระบุชนิดและคุณสมบัติของสารก่อภูมิแพ้ (Allergen) ที่พบใน Shellfish จำนวนมากกว่า 30 ชนิด ซึ่งโทรโปไมโอซิน (Tropomyosin หรือ TM) ถือว่าเป็นสารก่อภูมิแพ้หลัก (Major allergen) ที่พบมากกว่า 60% ของผู้ป่วยที่มีอาการแพ้

Shellfish และเป็นสาเหตุของอาการแพ้รุนแรง โทโรโปโมโอซินเป็นโปรตีนส่วนกล้ามเนื้อ ในกุ้งขาวพบ Lit v 1 และในกุ้งกุลาดำพบ Pen m 1 เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักที่มีความทนทานต่อความร้อนสูง การปรุงอาหารด้วยความร้อนจึงไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีน ผู้ที่แพ้โทโรโปโมโอซินจึงสามารถเกิดอาการได้จากการรับประทานกุ้งดิบ กุ้งสุกกึ่งดิบ และสุก รong ลงมาเป็นโปรตีน อาร์จินีนไคเนส (Arginine kinase หรือ AK) ที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้แต่ไม่ทนทานต่อความร้อน ดังนั้นผู้ที่แพ้ต่อโปรตีนชนิดนี้อาจเกิดอาการจากการรับประทานกุ้งดิบและกุ้งสุกกึ่งดิบ (ประภาศรี และสิระ, 2562)

2.2.2 ภาวะการแพ้อาหาร

การแพ้อาหารเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้เข้าไป อาการของการแพ้อาหารแสดงออกได้หลายรูปแบบ เช่น เกิดอาการตามผิวหนัง ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ ระบบหัวใจ หลอดเลือด ระบบประสาท หรือหากมีอาการแพ้อย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิต ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันและโปรตีนมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันในการทำให้เกิดการแพ้อาหารในผู้ป่วยโรคที่เป็นโรคภูมิแพ้อาหาร สารที่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้มีชื่อเรียกทั่วไปว่า สารก่อภูมิแพ้ (Allergen) ภาวะภูมิแพ้อาหาร (Food allergy) เป็นปฏิกิริยาตอบสนอง (Immune response) ของร่างกายแบบไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้ โดยปฏิกิริยาที่ตอบสนองมีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ปฏิกิริยาตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉียบพลัน (IgE-mediated reaction) ปฏิกิริยาตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉียบพลัน (Non-IgE mediated reaction) และมีอาการเรื้อรัง (Cell-mediated reaction) หรือ แบบผสม (Mixed) แม้กระทั่ง โรคเซลิแอค หรือ โรคที่ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อกลูเตน (Celiac disease) ก็จัดเป็นปฏิกิริยาตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ Non-IgE mediated disorders และสาเหตุในการเกิดอาการแพ้อาจมีปัจจัยอื่นร่วม เช่น พันธุกรรม อายุ คุณลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนที่สัมผัส ลักษณะ และปริมาณการสัมผัส การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดจากกระบวนการแปรรูป เป็นต้น ส่วนคำว่าภาวะผลข้างเคียงจากอาหาร (Food Intolerance) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่ไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (Non-immune response) ยกตัวอย่างเช่น Lactose intolerance เมื่อผู้ป่วยรับประทานนมวัวแล้วไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ทำให้มีอาการปวดท้องและท้องเสียตามมา ปฏิกิริยาดังกล่าวไม่ใช่ภาวะแพ้อาหาร (Food allergy) แต่เป็นเพียงภาวะผลข้างเคียงจากอาหาร (Food intolerance) เท่านั้น (วิภา, 2559)

สาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยโรคเกิดภาวะภูมิแพ้มาจากอาหารทะเลโดยเฉพาะสัตว์น้ำมีเปลือก (Crustacean) โดยกุ้งจัดว่าเป็นอาหารที่คนทั่วโลกให้ความนิยมในการนำไปปรุงเป็นอาหาร จึงทำให้อัตราการบริโภคกุ้งทั้งในและต่างประเทศเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดการแพ้ในอาหารทะเลในผู้ใหญ่และเด็กของประเทศไทยเท่ากับ 65% และ 66% ของผู้ป่วยที่มีการแพ้

ข้อมูลการแพ้อาหารทะเลได้มีการรายงานอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยข้อมูลเกี่ยวกับสารก่อภูมิแพ้ในอาหารทะเลส่วนใหญ่นั้นจะเป็นสัตว์จำพวกปลาและตระกูลสัตว์น้ำมีเปลือก (อหิ, 2550; Leung *et al.*, 1996) ได้แก่ กุ้ง กุ้งมังกร ปู และเครย์ฟิช (crayfish) สารก่อภูมิแพ้ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสัตว์น้ำมีเปลือกนี้ได้รับการตรวจสอบพบว่าเป็นโปรตีนโทรโปไมโอซิน (Tropomyosin; TM) ซึ่งพบได้จากโปรตีนไมโอไฟบริลในกล้ามเนื้อของกุ้งแทบทุกสายพันธุ์ โทรโปไมโอซินที่พบมีประมาณ 5% ของโปรตีนไมโอไฟบริล โดยน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดนี้อยู่ระหว่าง 34-38 กิโลดาลตัน (Nagpal *et al.*, 1989; Shanti *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 1994; Foegeding *et al.*, 1995) คุณสมบัติที่ก่อให้เกิดการแพ้ในโปรตีนชนิดต่างๆ เรียกว่า การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา (Immunoassay) โดยการใช้แอนติบอดีที่มีผลต่อสารก่อภูมิแพ้นั้น แต่ความสามารถในการก่อให้เกิดภูมิแพ้ของโปรตีนต่างๆ ที่มีการจับกับแอนติบอดีต้องขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของโปรตีนชนิดนั้นๆ หากมีการทำให้โปรตีนมีการเสียสภาพไป อาทิเช่น การผ่านกระบวนการทางอาหาร อาจทำให้ความสามารถการก่อภูมิแพ้เปลี่ยนแปลงไป เป็นต้น (Besler, 2001)

1) เกิดแบบเฉียบพลัน (Immediate reaction) เป็นอาการแพ้ที่เกิดจาก Hypersensitivity type 1 หรือ IgE mediated allergic reaction อาการมักเกิดหลังสัมผัสหรือรับประทานภายในเวลาไม่กี่นาที หรือไม่เกิน 2 ชั่วโมง

2) เกิดแบบไม่เฉียบพลัน (Non-immediate reaction) จะเกิดอาการหลังสัมผัสหรือรับประทานภายในเวลาหลายชั่วโมงหรือเป็นวัน อาการที่พบได้บ่อย คือ อาการระบบผิวหนัง เช่น ผื่น ผื่นผิวหนัง อักเสบ เป็นต้น หรือ อาการระบบทางเดินอาหาร เช่น ถ่ายเป็นมูกเลือด ถ่ายเหลวเรื้อรัง เป็นต้น บางรายมีอาการรุนแรงอาจมีน้ำหนักตัวน้อย มีภาวะซีด หรือมีภาวะขาดสารอาหารร่วมด้วย

ภาวะแพ้อาหารจัดเป็นปัญหาด้านสุขภาพและอาจรุนแรงถึงแก่การเสียชีวิตได้ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษา การหลีกเลี่ยงอาหารที่แพ้เป็นวิธีเดียวที่มีประสิทธิภาพ ผู้ผลิตอาหารใช้การแสดงฉลากสารก่อภูมิแพ้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารก่อภูมิแพ้ตามกฎหมายบังคับเพื่อให้สามารถแสดงสารก่อภูมิแพ้ได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม รวมทั้งการดำเนินการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องจักรในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อกำจัดสารก่อภูมิแพ้และป้องกันการปนเปื้อนข้ามไปยังอาหารของผู้บริโภค ดังกล่าว (วิภา, 2559; วิศณี, 2562)

2.2.3 การปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้ในอุตสาหกรรมอาหาร

สารก่อภูมิแพ้ปริมาณเล็กน้อยสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้แบบไม่พึงประสงค์ในผู้ที่มีความไวต่อการแพ้นั้น การทำความสะอาดจึงมีความสำคัญที่ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนข้าม โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างการปรับเปลี่ยนสูตรการผลิต จากที่มีสารก่อภูมิแพ้เป็นไม่มีสารก่อภูมิแพ้ เมื่อต้องการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้ที่ไม่พึงประสงค์สิ่งที่จะต้องพิจารณาในกระบวนการทำความสะอาด สารก่อภูมิแพ้อาหาร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสถานะของสารก่อภูมิแพ้ด้วย เช่น ใช้ Compress air ในการทำความสะอาดฝุ่นผงเพื่อลดการฟุ้งกระจายของสารก่อภูมิแพ้ ในการทำความสะอาดควรมีติดตามว่ามีการทำความสะอาดโดยการตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของสารก่อภูมิแพ้โดยใช้วิธีทดสอบที่จำเพาะกับสารก่อภูมิแพ้นั้นมีความไวเพียงพอสอดคล้องกับระดับที่เป็นขีดจำกัดของสารก่อภูมิแพ้ ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการล้างทำความสะอาดนั้นทำได้จริงเนื่องจากสารก่อภูมิแพ้อาหารเป็นโปรตีนไม่ใช่เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการทำความสะอาดด้านสุขาภิบาลไม่สามารถกำจัดความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากสารก่อภูมิแพ้ได้แม้ว่าปราศจากแบคทีเรียแล้วแต่โปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ยังสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ในผู้ที่ไวโดยทั่วไปวิธีการทำความสะอาดแบบเปียกเป็นวิธีที่นิยมที่สามารถกำจัดสารก่อภูมิแพ้ที่ติดยึดได้ดี (วิภา, 2559)

มีรายงานว่าผู้ที่เป็นภูมิแพ้อาหารยังมีการบริโภคอาหารที่ตนเองแพ้ทั้งที่ควรหลีกเลี่ยง สาเหตุหลักเกิดจากอาหารเหล่านั้นมีการปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้โดยไม่ตั้งใจซึ่งแหล่งที่มาของ Hidden allergen ที่ปนเปื้อนลงในผลิตภัณฑ์อาหารเกิดจาก (Besler *et al.*, 2002)

1) การปนเปื้อนข้าม (Cross-contact) ส่วนใหญ่เกิดจากการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ร่วมกันในการจัดเตรียมและหรือผลิตอาหารที่มีและไม่มีส่วนผสมของสารก่อภูมิแพ้ เช่น อุปกรณ์ตัก ตวง มีด เครื่องบด เครื่องผสม เครื่องชั่ง ตะแกรง สายพานลำเลียง เป็นต้น

2) การปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากการผลิตครั้งก่อน (Carry over) และการทำงานซ้ำที่มีการจัดการไม่เหมาะสมโดยเฉพาะอาหารที่มีส่วนผสมของสารก่อภูมิแพ้

3) การปรับเปลี่ยนสูตรของผลิตภัณฑ์อาหาร (Changes of the formulation) แต่ไม่มีการจัดการที่เหมาะสม ทั้งนี้รวมถึงการใช้ฉลากที่ไม่สอดคล้องกับผลิตภัณฑ์

4) การแสดงฉลากผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีรายละเอียดส่วนผสมที่ไม่สมบูรณ์ หรือไม่ถูกต้อง (Incomplete or incorrect lists of ingredients)

5) การใช้วัตถุดิบชนิดใหม่ที่ไม่ทราบส่วนผสมซึ่งวัตถุดิบนั้นอาจมีการปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้ (Unknown ingredients)

6) การแปลความหมายผิดจากชื่อที่ใช้หรือระบุไว้บนฉลาก (Misinterpretation) บางครั้งการใช้ชื่อส่วนผสมอาหารที่ไม่สื่อถึงแหล่งที่มา โดยเฉพาะส่วนผสมที่ได้จากการดัดแปรหรืออนุพันธ์ของสารที่ได้จากแหล่งอาหารที่เป็นสารก่อภูมิแพ้

7) การยกเว้นรายการส่วนผสมที่ไม่จำเป็นต้องแสดงบนฉลาก (Exemptions of labeling) ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดว่าด้วยการแสดงฉลาก เช่น ส่วนผสมที่มีองค์ประกอบน้อยกว่า 25% ของอาหารไม่จำเป็นต้องแสดงบนฉลาก

ผู้ผลิตอาหารส่วนใหญ่ได้ตระหนักถึงปัญหาการแพ้อาหารของผู้บริโภค จึงมีการจัดทำมาตรการป้องกันโดยการแสดงสารก่อภูมิแพ้บนฉลากสินค้า (Surojanametakul *et al.*, 2012) แต่สาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบปัญหาการปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้ อาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนข้ามในกระบวนการผลิตจากการใช้อุปกรณ์เครื่องจักรร่วมกัน และการทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องจักรที่ไม่มีประสิทธิภาพทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามของสารก่อภูมิแพ้ไปยังผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งวิธีการทำความสะอาดเครื่องจักรสามารถทำได้ด้วยการล้างน้ำ และการใช้สารทำความสะอาดพื้นที่หลังใช้งาน แล้วทำการทวนสอบ (Validation) เพื่อพิสูจน์ยืนยันว่าสารก่อภูมิแพ้นั้นได้ถูกกำจัดออกไปหรือมีปริมาณลดลงจนอยู่ในระดับที่สามารถยอมรับได้ (วิศณ และคณะ, 2562)

2.3 วัสดุอุปกรณ์ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร

ในกระบวนการแปรรูปอาหารพื้นผิวสัมผัสเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาแม้ว่าจะมีอุปกรณ์หลายประเภทที่ทำจากวัสดุที่มีลักษณะการใช้งานแตกต่างกันออกไป แต่คุณลักษณะที่จำเป็นจะต้องมีเหมือนกันคือต้องสามารถทำความสะอาดได้ง่าย (Holah, 2014)

Lewan and Partington (2014) รายงานว่าเครื่องมือส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมอาหารมักทำมาจากวัสดุที่เป็นเหล็กปลอดสนิม หรือ สแตนเลสสตีล (Stainless steel) นอกจากนี้พลาสติก (Plastic) ก็เป็นวัสดุอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็นพื้นผิวสัมผัสอาหารเนื่องจากจะช่วยป้องกันความเสียหายของเครื่องมือจากการสัมผัสกันระหว่างโลหะกับโลหะ เนื่องจากพลาสติกมีความยืดหยุ่นและทนต่อการกัดกร่อน ประเภทของพลาสติกต้องผ่านการอนุญาตก่อนที่จะใช้เป็นวัสดุสำหรับสัมผัสอาหารเพราะพลาสติกบางชนิดมีจุลินทรีย์สามารถดูดซับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์และกระจายสู่อาหารได้ พลาสติกที่ทำความสะอาดง่ายและมีรูปแบบการใช้งานที่ถูกต้องเหมาะสม ได้แก่ พอลิโพรพิลีน (PP) พอลิไวนิลคลอไรด์ (PVC) อะซีตัลโคพอลิเมอร์ พอลิคาร์บอเนต และพอลิเอทิลีน (PE) ความหนาแน่นสูง ซึ่งสิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาว่าพลาสติกอาจเกิดการเสื่อมสภาพจากสภาพทางเคมีบางอย่างได้หรือไม่ อีกหนึ่งวัสดุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารคือยางสัมผัสอาหาร เนื่องจากมีความยืดหยุ่น โดยทั่วไปจะใช้สำหรับทำปะเก็น ฝาปิด และท่อ ที่มีการสัมผัสกับอาหาร

โรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะมีการใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทำจากพลาสติกค่อนข้างหลากหลาย แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1.1) โพลีเอทิลีน (Polyethylene; PE) เป็นพลาสติกที่อากาศผ่านเข้าออกได้แต่ไอน้ำซึมผ่านได้เล็กน้อย มีลักษณะขุ่น ทนความร้อนได้พอควร เป็นพลาสติกที่นำมาใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรมใช้ในการทำท่อน้ำ ถัง ถู ขวด และแท่นรองรับสินค้า เป็นต้น

1.3) ไนลอน (Nylon) เป็นพลาสติกที่มีความเหนียวมาก คงทนต่อการเพิ่มอุณหภูมิ ใช้ในการทำแผ่นแลมินเนตสำหรับทำถุงพลาสติกบรรจุอาหารแบบสุญญากาศ

1.5) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride; PVC) เป็นพลาสติกที่ไอน้ำและอากาศซึมผ่านได้พอควร ป้องกันไขมันได้ดี มีลักษณะใส ใช้ในการทำแผ่นพลาสติกห่อเนยแข็ง แผ่นแลมินेट ชั้นในของถุงพลาสติก ขวดบรรจุน้ำมันหรือไขมันปรุงอาหาร และขวดบรรจุเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ เบียร์ เป็นต้น

2) เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Thermosetting plastic) เป็นพลาสติกที่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและทนปฏิกิริยาเคมีได้ดี เกิดคราบและรอยเปื้อนได้ยาก คงรูปหลังผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะแข็งมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัวหรือเปลี่ยนรูปร่าง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงจะแตกและไหม้เป็นถ่านสีดำ พลาสติกประเภทนี้โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำมาหลอมเหลวได้อีกโดยการใช้ความร้อน หากแต่จะสลายตัวทันทีที่อุณหภูมิสูงถึงระดับ การทำพลาสติกชนิดนี้ให้เป็นรูปลักษณะต่าง ๆ ต้องใช้แรงอัดและความร้อนสูง ตัวอย่าง เช่น เมลามีนฟอर्मัลดีไฮด์ (Melamine formaldehyde) ทนต่อปฏิกิริยาเคมีได้ดี ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ถึง 140 องศาเซลเซียส เกิดคราบและรอยเปื้อนยาก ใช้ในการทำภาชนะบรรจุอาหารหลายชนิดนิยมใช้กันมาก มีทั้งที่เป็นสีเรียบและลวดลายสวยงาม ข้อเสียคือ น้ำส้มสายชูจะซึมเข้าเนื้อพลาสติกได้ง่ายทำให้เกิดรอยต่างได้แต่ไม่มีพิษภัยเนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับพลาสติก

ภาชนะที่ใช้ล้างกึ่งอาจจะเป็นพลาสติกหรือโลหะสแตนเลสเพื่อสะดวกในการล้าง ซึ่งหากใช้ภาชนะที่ขอบเหลี่ยมอาจทำให้เกิดการตกค้างและสะสมจากโปรตีนได้ และการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมมีสายการผลิตที่หลากหลายอาจจะเสี่ยงไม่พ้นต่อการปนเปื้อนของโปรตีนที่สะสมเข้าไปยังผลิตภัณฑ์อื่นๆ อาจทำให้เกิดปัญหาร้ายแรงในผลิตภัณฑ์นั้นๆได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์หลายอย่างอาจมีการใช้สายการผลิตเดียวกัน นั้นจะเป็นใจความสำคัญที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนความและมีการสะสมของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ได้ (Faisal *et al.*, 2019) และนอกจากในสายผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมแล้วยังมีเกี่ยวกับเรื่องการใช้บรรจุภัณฑ์หรืออุปกรณ์ต่างๆ ภายในโรงงาน เช่น อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต เช่น สายพาน ถังล้าง ถาดสำหรับใส่วัตถุดิบ หรือไปจนถึงอุปกรณ์ในการแปรรูป ซึ่งวัสดุที่ใช้จะมีทั้งสแตนเลสและพลาสติกที่มีความหนาแน่นสูงที่ใส่เป็นอุปกรณ์จำพวกตะแกรงหรือกระบะสำหรับอาหารที่ผลิต ในส่วนของพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (HDPE) เป็นเนื้อพลาสติกที่มีความทึบแสง ไม่อ่องไวต่อสารเคมี มีความเหนียว ยืดหยุ่น มีความต้านทานแรงต่างๆ ได้ดี ทนทานต่อการแตกหรือแม้กระทั่งทนต่อการหักงอได้ดี ด้วยคุณสมบัติที่มีความหนาแน่นสูงอีกทั้งยังสามารถทนในช่วงอุณหภูมิที่กว้างได้ คือ ทนได้แม้กระทั่งอุณหภูมิติดลบจนถึงอุณหภูมิมากกว่า 100 องศาเซลเซียส และจากคุณสมบัตินี้จึงเป็นที่นิยมนำมาทำเป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร พิล์มยืด พิล์มหัดและใช้งานที่เกี่ยวข้องกับอาหารอยู่เสมอ เพราะมีความยืดหยุ่นที่ดีและเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำความเหนียวจะสูง จึงสามารถลดความเสียหายหรือรื้อขาดได้ (Garcia *et al.*, 2021)

2.4 การทำความสะอาดและการประเมินประสิทธิภาพการทำความสะอาดอุปกรณ์ในอุตสาหกรรมอาหาร

การล้างทำความสะอาดควรมีการพิจารณาถึงปัจจัยต่าง ๆ ด้วย เช่น ประเภทของสิ่งสกปรก สารชะล้างหรือสารทำความสะอาด สารฆ่าเชื้อ อุปกรณ์ล้างทำความสะอาด วิธีการล้างทำความสะอาด การตรวจสอบประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาด เนื่องจากมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของการล้างและทำความสะอาดภายหลังกระบวนการผลิตอาหารทุกครั้ง ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนจากอันตรายในอาหารและช่วยรักษาอุปกรณ์ให้ใช้ได้เป็นเวลานาน (ศรัญญา, 2560)

2.4.1 วัตถุประสงค์ของการทำความสะอาดอุปกรณ์

Bylund (1995) กล่าวถึงวัตถุประสงค์ของการทำความสะอาดไว้ดังนี้

- 1) เพื่อทำความสะอาดทางกายภาพ หมายถึง การกำจัดสิ่งสกปรกที่มองเห็นได้บนพื้นผิว
- 2) เพื่อทำความสะอาดทางเคมี หมายถึง การกำจัดสิ่งสกปรกทั้งที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแต่สามารถสัมผัสได้จากกลิ่นรส
- 3) เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการใช้สารฆ่าเชื้อ
- 4) เพื่อฆ่าเชื้อในระดับสเตรอไรส์

การทำความสะอาดเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอุปกรณ์ไม่จำเป็นต้องผ่านการทำความสะอาดทางกายภาพและเคมีก่อน แต่อย่างไรก็ตามการทำความสะอาดเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นประจำทุกวันจะทำให้สะดวกขึ้นหากมีการทำความสะอาดทางกายภาพก่อน

2.4.2 กระบวนการทำความสะอาดอุปกรณ์

สุริย์ (2539) กล่าวว่า การทำความสะอาดอุปกรณ์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารจะต้องประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1) การเก็บกวาดผลิตภัณฑ์ที่ตกค้าง

ก่อนที่จะทำความสะอาดอุปกรณ์ควรเก็บกวาดนำผลิตภัณฑ์ที่ตกค้างอยู่ออกให้หมด เพื่อช่วยลดการสูญเสียของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ตกค้างยังคงมีคุณภาพใช้ได้และเพื่อให้สามารถทำความสะอาดได้ง่ายขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการที่มีผลิตภัณฑ์ตกค้างจำนวนมากถูกชะล้างลงไปในท่อระบายน้ำจะเป็นการเพิ่มภาระทำให้การกำจัดน้ำเสียยุ่งยากขึ้นซึ่งจะทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายโดยไม่จำเป็นฉะนั้นก่อนที่จะล้างอุปกรณ์ควรใช้เวลาเพียงพอที่ผลิตภัณฑ์จะออกมาจากเครื่องได้หมด ถ้ามีผลิตภัณฑ์ติดอยู่จะต้องแกะออกก่อนล้าง

2) การชะด้วยน้ำ

ทันทีที่อุปกรณ์ได้สิ้นสุดการทำงานจะต้องชะด้วยน้ำก่อนเสมอ มิฉะนั้นอาหารที่ตกค้างอยู่จะแห้งและติดแน่นบนอุปกรณ์ทำให้ล้างได้ยากขึ้น การชะด้วยน้ำก่อนการล้างนี้สามารถกำจัดสิ่งที่เหลือได้ซึ่งตกค้างอยู่ได้ถึง 90%

3) การใช้สารทำความสะอาด

การทำความสะอาดอุปกรณ์อย่างมีประสิทธิภาพจะเกิดได้ต่อเมื่อเลือกใช้สารทำความสะอาดที่เหมาะสม ซึ่งชนิดของสารทำความสะอาดที่เลือกใช้นั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความมากน้อยของสิ่งสกปรก ชนิดของสิ่งสกปรก วิธีการทำความสะอาด (การใช้แรงงานคนหรือใช้เครื่องช่วยล้าง) ชนิดของอุปกรณ์และชนิดของวัสดุที่ใช้ทำอุปกรณ์นั้น

4) การล้างด้วยน้ำสะอาด

หลังจากทำความสะอาดด้วยสารทำความสะอาดแล้วจะต้องล้างด้วยน้ำสะอาดที่เป็นน้ำอ่อน โดยล้างเป็นระยะเวลาานพอที่จะไม่ให้มีสิ่งตกค้างที่อาจปนเปื้อนลงในอาหารได้

5) การตรวจผลของการทำความสะอาด

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่จำเป็นต้องกระทำเพื่อให้มั่นใจว่าอุปกรณ์ที่ผ่านการทำความสะอาดนั้นมีความสะอาดอย่างสมบูรณ์จริง ๆ โดยไม่มีสิ่งสกปรกตกค้างอยู่ อย่างไรก็ตามอุปกรณ์ที่ผ่านการทำความสะอาดตั้งแต่ขั้นต้นอาจมีจุลินทรีย์เหลืออยู่บ้าง ดังนั้นควรทำลายจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ให้หมดโดยการสเตอริไลซ์ในลำดับถัดไป

6) การฆ่าเชื้อพื้นผิวของอุปกรณ์หรือเครื่องมือ

การฆ่าเชื้อพื้นผิวของอุปกรณ์หรือเครื่องมือ สามารถทำได้โดยผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ หรือน้ำร้อนหรือด้วยสารเคมี

7) การทำให้ผิวของอุปกรณ์แห้ง

วัตถุประสงค์ที่ต้องทำให้ผิวของอุปกรณ์แห้งเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่อาจเหลืออยู่หรือเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอากาศหากอุปกรณ์ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำหรือน้ำร้อนอาจไม่ต้องทำขั้นตอนนี้ เนื่องจากผิวของอุปกรณ์จะแห้งอย่างรวดเร็วหลังการฆ่าเชื้อ แต่ถ้าอุปกรณ์ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีก็จำเป็นต้องทำให้ผิวของอุปกรณ์แห้งหลังการฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้นได้

2.4.3 ปัจจัยที่ควรพิจารณาในการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ในโรงงานอาหาร

การล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ รวมทั้งอาคารและสถานที่ผลิตอาหารควรพิจารณาถึงเรื่องต่อไปนี้

2.4.3.1 ประเภทของสิ่งสกปรก

สิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่บนผิวเครื่องจักรและอุปกรณ์ต่าง ๆ มีหลายประเภท ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและกระบวนการผลิตอาหารนั้น ๆ สิ่งสกปรกอาจอยู่ในรูปของอนุภาคแห้ง ติดที่ผิวหรือสุกแห้งติดที่ผิวหรือมันเป็นเมือกหรืออนุภาคเปียกติดพื้นผิว การปล่อยให้สิ่งสกปรกติดอยู่บนพื้นผิวนาน ๆ มีผลต่อความยากง่ายในการทำทำความสะอาดด้วย เช่น สิ่งสกปรกที่เป็นส่วนของไขมัน สัตว์ต้องใช้สารละลายทำความสะอาดที่มีความร้อน 70 องศาเซลเซียส ปกติอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ล้างทั่วๆ ไปประมาณ 43-54 องศาเซลเซียส ถ้าใช้ความร้อนตั้งแต่ 82 องศาเซลเซียส ขึ้นไป ผู้ปฏิบัติงานต้องมีเครื่องป้องกันความร้อนสิ่งสกปรกเหล่านี้เป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและราได้ดี คุณลักษณะของสิ่งสกปรกและความยากในการกำจัดสิ่งสกปรกประเภทต่างๆ รวมทั้งความยากในการทำทำความสะอาดเมื่อสิ่งสกปรกเปลี่ยนแปลงลักษณะสรุปดังในตารางที่ 2.2 (สุวิมล, 2544; สุวิมล, 2545)

การจำแนกสิ่งสกปรกสามารถแบ่งได้ตามวิธีการขจัด (ศิวาพร, 2542) แสดงดังตารางที่ 2.2 ดังนี้

1) สิ่งสกปรกที่ละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายที่ไม่มีน้ำยาที่ใช้ทำความสะอาด (cleaner) หรือสารทำความสะอาดอยู่ สิ่งสกปรกในกลุ่มนี้รวมถึงเกลืออนินทรีย์ชนิดต่างๆ น้ำตาล แป้งและเกลือแร่ สิ่งสกปรกเหล่านี้ไม่ค่อยมีปัญหาเพราะขจัดออกได้ง่ายด้วยการล้างทำความสะอาด

2) สิ่งสกปรกที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่ใช้ทำความสะอาด

2.1) สิ่งสกปรกที่ละลายได้ในกรด สามารถละลายได้ในสารละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 7 ได้แก่ สนิมเหล็ก ออกไซด์ของโลหะต่าง ๆ ซิงค์คาร์บอเนต (zinc carbonate) แคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) แคลเซียมและแมกนีเซียมคาร์บอเนต (calcium and

magnesium oxalate) น้ำหิน (water stone) นมหิน (milk stone) เกิดการตกตะกอนด้วยความร้อนจับอยู่ที่พื้นผิวของภาชนะบรรจุหรืออุปกรณ์ที่เป็นโลหะ

2.2) สิ่งสกปรกที่ละลายได้ในต่าง สามารถละลายได้ในสารละลายต่างที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 7 กรดไขมัน เลือด โปรตีนและสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่จับติดอยู่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างในภาวะที่เป็นด่างไขมันทำปฏิกิริยากับด่างเกิดเป็นสบู่ ซึ่งช่วยทำให้สิ่งสกปรกที่เหลือมีการละลายและกระจายตัวดีขึ้น

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของสิ่งสกปรก

สิ่งสกปรก	การละลาย	ความยากง่ายในการกำจัด	การเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกความร้อน
น้ำตาล	- ละลายในน้ำ	- ง่าย	- ทำให้มีลักษณะเหนียว (caramelization) ยึดเกาะติดภาชนะทำให้ขจัดได้ยาก
ไขมัน	- ละลายในต่าง - ไม่ละลายในน้ำ	- ยาก	- เกิดเป็นพอลิเมอร์ ทำความสะอาดได้ยาก
โปรตีน	- ละลายในต่างและสารละลายที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย - ไม่ละลายในน้ำ	- ยากมาก	- เกิดการสูญเสียลักษณะตามธรรมชาติ (denaturation) ทำให้ขจัดออกได้ยากมาก
เกลือแร่	- ละลายในน้ำได้ในระดับที่ต่าง ๆ กันขึ้นกับชนิดของเกลือแร่ซึ่งส่วนใหญ่ละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด	- ขจัดออกได้ง่ายไปจนถึงยาก	- เมื่อถูกความร้อนแล้วทำความสะอาดได้ง่าย เว้นแต่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นทำให้ขจัดออกได้ยาก

ที่มา: สุวิมล (2544; 2545)

3) สิ่งสกปรกที่ไม่ละลายในสารละลายที่ใช้ในการทำทำความสะอาด สามารถจัดจำแนกได้ตามชนิดของสารที่ใช้ทำความสะอาด เช่น น้ำตาลโดยปกติละลายในน้ำถ้าหากการทำทำความสะอาดใช้น้ำสิ่งสกปรกที่เป็นน้ำตาลนี้จัดอยู่ในประเภทสิ่งสกปรกที่ละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายที่ไม่มีน้ำยาที่ใช้ทำความสะอาดหรือสารทำความสะอาดอยู่ แต่ถ้าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการทำทำความสะอาดสิ่งสกปรกที่เป็นน้ำตาลจัดอยู่ในประเภทสิ่งสกปรกที่สามารถละลายได้ในสารละลายที่ใช้ทำความสะอาด

2.4.3.2 สารทำความสะอาด (Cleaning agents หรือ Detergents)

เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติที่จะละลายและขจัดสิ่งสกปรกที่เกาะติดภาชนะออกไปโดยไม่ทำลายผิวของภาชนะแต่ไม่จำเป็นต้องช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาด้วย (ศิวาพร, 2542)

1) คุณสมบัติของสารทำความสะอาด อาทิเช่น

- 1.1) ช่วยทำให้น้ำเปียกผิววัตถุได้ดี
- 1.2) ล้างออกได้ง่าย
- 1.3) ไม่กัดกร่อนโลหะ
- 1.4) คงตัวในระหว่างเก็บ
- 1.5) ง่ายต่อการดองวัด
- 1.6) ละลายไขมันและน้ำมันได้ดี รวดเร็ว และสมบูรณ์
- 1.7) ปราศจากสารเป็นพิษ
- 1.8) ละลายเกลือแร่ที่เกาะติดภาชนะออกได้
- 1.9) ไม่เป็นก้อนแข็งและไม่เป็นฝุ่น
- 1.10) ทำให้สิ่งสกปรกที่ไม่ละลายจับกลุ่มและตกตะกอน

เมื่อเติมสารชะล้างหรือสารทำความสะอาดเข้าไปช่วยในการทำทำความสะอาด โดยออกฤทธิ์ 4 อย่าง คือ (1) สารทำให้พื้นผิวเปียก (Wetting agent) (2) สารทำให้เกิดการละลาย (Solubilize) (3) สารทำให้เกิดอิมัลชัน (Emulsion) ช่วยลดแรงตึงผิวของสิ่งสกปรก ทำให้เกิดสบู่อิมัลชัน สกปรกกระจายตัว ช่วยทำให้ไขมันละลายได้ดียิ่งขึ้น และ (4) สารทำให้กระจายตัว (Dispersants) ทำให้สารตกค้างละลายหรือหลุดออกมา

สารทำความสะอาดนี้ไม่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติทำลายจุลินทรีย์แต่โดยทั่วไป สารชะล้างมักมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อด้วยซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

2) ชนิดของสารทำความสะอาดที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.1) ต่างประเภทอินทรีย์ (Inorganic alkalines) ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมออร์โทซิลิเกต โซเดียมเซสควิซิลิเกต ไตรโซเดียมฟอสเฟต

2.2) กรดประเภทอนินทรีย์ (Inorganic acids) ได้แก่ กรดไนตริก กรดฟอสฟอริก กรดซัลฟามิก

2.3) สารลดแรงตึงผิวและสบู่ (Surfactants หรือ Surface active agents and soap) ได้แก่ โซเดียมอัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต โซเดียมลอริลซัลเฟต โนนิลฟีนอลอีทอกซิเลต โด-เตซิลไดอะมินโนเอทิลไกลซีน

2.4) Sequestering agents หรือ Sequestrants หรือ Chelating agents ได้แก่ โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต โซเดียมเตตระฟอสเฟต โซเดียมเฮกซะ-เมตาฟอสเฟต เตตระโพแทสเซียมไพโรฟอสเฟต

2.4.3.3 สารฆ่าเชื้อ (Disinfectant)

เป็นสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อเป็นอีกวิธีที่ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยโรงงานควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับแต่ละส่วนงานเนื่องจากสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไป (ศิวาพร, 2542)

1) คุณสมบัติของสารฆ่าเชื้อ

1.1) ทำลายจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วทั้งแบคทีเรียและสปอร์ของเชื้อรา ถ้าทำลายสปอร์ของแบคทีเรียได้ยิ่งดี

1.2) มีความคงตัวได้ดีแม้มีสารประกอบอินทรีย์หรือเกลือแคลเซียมซัลเฟตหรือเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตอยู่

1.3) ไม่เป็นพิษและไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองของผิวหนังและตา

1.4) ไม่ทำให้เกิดการกัดกร่อนของพื้นผิวและอุปกรณ์

1.5) ไม่เสื่อมคุณภาพแม้เก็บไว้ได้นาน

1.6) ละลายน้ำได้ดีและล้างออกได้ง่าย

1.7) ไม่ทำให้เกิดกลิ่น รสและสีที่ไม่ดีขึ้นในอาหาร

1.8) ราคาถูก

2) ชนิดของสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.1) สารประกอบที่ให้คลอรีน (Chlorine-releasing compound) ได้แก่ ไฮโปคลอไรท์ คลอรามิน คลอรีเนต ไทโรโซเดียมฟอสเฟต แก๊สคลอรีน

สารไฮโปคลอไรท์เป็นเกลือของกรดไฮโปคลอรัส เมื่ออยู่ในสารละลายเกลือจะแตกตัวให้อนุมูลไฮโปคลอไรท์ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้ดีสำหรับ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) ประกอบด้วยคลอรีน 10-15% มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7-8 จึงจะมีประสิทธิภาพดี ถ้าใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ต่ำกว่านี้จะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นแต่สารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 7 จะมีฤทธิ์กัดกร่อนพื้นผิวโลหะทุกชนิด

คลอรีนเป็นสารเคมีฆ่าเชื้อที่มีการใช้อย่างกว้างขวางเป็นสารเคมีที่ใช้มากที่สุดและเก่าแก่ที่สุดในบรรดาสารเคมีฆ่าเชื้อ คลอรีนยังเป็นสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เติมลงในน้ำที่ใช้ล้างวัตถุดิบอาหาร ใช้เติมในน้ำที่ใช้หล่อเย็นอาหารกระป๋องที่ผ่านการฆ่า

เชื้อแล้ว ใช้สำหรับฆ่าเชื้อพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร ใช้ล้างวัตถุดิบ เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารบางชนิด เช่น เนื้อ สัตว์ปีก และปลา (Cords & Dychdala, 1993)

ในปัจจุบันการเติมคลอรีนเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการฆ่าเชื้อโรคของการปรับปรุง คุณภาพน้ำในระบบประปา เพื่อให้ น้ำปราศจากเชื้อโรค เนื่องจากคลอรีนมีราคาถูก หาได้ง่าย (Nicos & Scott, 2010) สารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีนที่นิยมใช้เป็นไฮโปคลอไรต์ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของคลอรีนที่อยู่ในสารกลุ่มออกซิไดซ์จะออกฤทธิ์ได้ดี เมื่อใช้งานที่อุณหภูมิต่ำและใช้ร่วมกับสารชะล้างเพื่อที่จะทำให้สามารถทำความสะอาดโปรตีนที่ตกค้างได้ ทั้งนี้คลอรีนเหลวและคลอรีนผง ควรเก็บไว้ในที่มืด แห้งและเย็น ไม่ควรให้ถูกแสง ควรเตรียมแล้วใช้ทันทีเพื่อป้องกันการสลายตัวของคลอรีน (Schmidt, 1997)

2.2) สารประกอบควอเทอนารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonia compound) หรือที่เรียกทั่วไปว่า ควอท (Quats หรือ QACs) ได้แก่ อะซีทิลไทรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์และลอริลไดเมทิลเบนซิลแอมโมเนียมคลอไรด์ เบนซิลโคเนียมคลอไรด์หรือเซฟิรานและเซทิลไพริเดียมคลอไรด์หรือเซฟาคอล

2.3) สารประกอบแอมโฟเทอริก (Amphoric compounds) ได้แก่ ออกซิโพรพิโอนิก อิมิดาโซล

2.4) สารประกอบประเภทกรด (Acid sanitizers) ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก กรดเปอร์อะซิติก

2.5) แอลกอฮอล์ (Alcohol) ได้แก่ ไอโซโพรพานอล เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์

2.4.3.4 อุปกรณ์ล้างทำความสะอาด

การเลือกใช้เครื่องมือในการทำทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารนั้น ต้องมีการเลือกให้เหมาะกับชนิดของงานนั้น (ทวีศักดิ์, 2545) ได้แก่

1) ไม้กวาดและแปรง (brooms and brushes)

ควรใช้ไม้กวาดและแปรงให้เหมาะกับชนิดของพื้นผิวอุปกรณ์และเครื่องมือล้าง ควรมีที่จับหรือด้ามยาวพอให้ทำความสะอาดได้สะดวกและสะอาดได้ทั่วถึง ควรมีทั้งชนิดด้ามสั้นและด้ามยาว ขนแปรงควรแข็งเท่าที่เป็นไปได้โดยไม่ทำอันตรายต่อผิวของอุปกรณ์และเครื่องมือ โดยทั่วไปขนแปรงที่ทำด้วยไนลอนหรือโพลีเอสเตอร์ (epoxy vinyl) เป็นแปรงที่เหมาะสมสำหรับงานล้างทั่ว ๆ ไปมากเพราะขนแปรงแข็งใช้ทนทานและไม่ซึมน้ำ ขนแปรงที่ทำด้วยลวดเหมาะใช้กับพื้นที่ที่เป็นสนิมหรือขัดสีออกหรือต้องการล้างเอาสิ่งสกปรกที่จับอยู่แน่นกับอุปกรณ์เครื่องมือแต่ไม่เหมาะกับงานล้างทั่ว ๆ ไปเพราะลวดอาจไปขีดข่วนผิวของอุปกรณ์เครื่องมือได้ การแปรงนอกจากใช้พนักงานแปรงแล้วยังมีแปรงมอเตอร์และอาจใช้เครื่องมือช่วย แคะ แชะหรือชูด ในกรณีที่มีสิ่งสกปรกจับติด

อุปกรณ์เครื่องมือแน่นอนอาจต้องมีเครื่องฉูพื้น เครื่องขัดพื้น เครื่องดูดฝุ่นช่วยเพื่อให้งานทำความสะอาด อุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้อาคารโรงงานที่มีความสะอาดอย่างถูกหลักสุขาภิบาลมากยิ่งขึ้น

2) เครื่องสูบน้ำความดันสูง (high-pressure water pumps)

เครื่องสูบน้ำความดันสูงมีทั้งชนิดเคลื่อนย้ายได้และติดตั้งอยู่กับที่ขึ้นกับปริมาณน้ำที่ใช้ในแต่ละโรงงาน สามารถฉีดน้ำที่มีแรงดันสูงถึง 41.5 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้เครื่องสูบน้ำอาจมีทั้งถังสารละลายผสมระหว่างสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อโรคอยู่ด้วยเครื่องสูบน้ำอำนวยความสะดวกควรมีที่ปิดเปิดแบบอัตโนมัติและมีท่อต่อกับหัวฉีดชนิดต่าง ๆ ได้เพื่อให้เหมาะกับบริเวณหรือจุดที่ต้องการล้าง เช่น หัวฉีดแบบพ่นเป็นฝอยหรือแผ่เป็นแผ่นสำหรับล้างผิวหน้าที่เรียบหรือเป็นแบบที่งอเพื่อไว้สำหรับล้างบริเวณรอบ ๆ หรือพื้นผิวด้านล่างของอุปกรณ์เครื่องมือ

3) เครื่องทำความสะอาดแรงดันต่ำอุณหภูมิสูง (low pressure high temperature units)

เครื่องทำความสะอาดที่อาศัยความร้อนของน้ำช่วยด้วยโรงงานสามารถฉีดน้ำที่มีแรงดันน้อยกว่า 35 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร นิยมใช้ทำความสะอาดพื้นผิวที่มีความสกปรกมาก เครื่องชนิดนี้ประกอบด้วยถังในสารทำความสะอาดซึ่งสามารถทำให้ร้อนด้วยไอน้ำมีสูบน้ำทำให้น้ำมีแรงดันมีท่อสามารถต่อกับหัวฉีดแบบต่าง ๆ เป็นเครื่องที่อาจติดตั้งอยู่กับที่หรืออาจเคลื่อนย้ายได้มักใช้ในงานล้างก่อนที่มีการล้างแรงดันสูงสามารถกำจัดคราบไขมัน น้ำมันหล่อลื่นต่าง ๆ ที่จับติดอุปกรณ์เครื่องมือและบริเวณอาคารโรงงาน

4) เครื่องทำความสะอาดแรงดันสูง

ประกอบด้วยเครื่องสูบน้ำที่ให้แรงดันสูงมีถึงบรรจจุสารประกอบที่ใช้ทำความสะอาดโรงงานสามารถฉีดน้ำที่มีแรงดันสูงถึง 20-28 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส ผสมสารทำความสะอาดกับน้ำในอัตราส่วนที่ได้กำหนดไว้แล้วโดยอัตโนมัติ เครื่องทำความสะอาดชนิดนี้นิยมใช้กันมากในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพราะใช้ง่ายและมีประสิทธิภาพสามารถขจัดสิ่งสกปรกที่ติดแน่นกับผิวอุปกรณ์เครื่องมือและทำความสะอาดในบริเวณหรือจุดที่ใช้มือเข้าไปขัดถูทำความสะอาดได้ยาก

2.4.3.5 วิธีการล้างทำความสะอาด

การล้างทำความสะอาดควรทำให้บ่อยครั้งที่สุดเท่าที่ทำได้หลังจากเสร็จสิ้นการผลิตในแต่ละครั้ง และทำความสะอาดเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ โต๊ะที่ใช้ในการผลิตและบริเวณผลิตทันที (ศิวาพร, 2542)

ในการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อมี 5 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำความสะอาด 3 ขั้นตอน และขั้นตอนการฆ่าเชื้อโรคอีก 2 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1) การกำจัดสิ่งสกปรกขนาดใหญ่ด้วยวิธีกล

- 2) การกำจัดสิ่งสกปรกที่เหลืออยู่ด้วยสารล้างทำความสะอาด
- 3) การล้างน้ำเพื่อล้างสารล้างทำความสะอาดและสิ่งสกปรกออก
- 4) การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ
- 5) การล้างสารฆ่าเชื้อออกจากพื้นผิวเครื่องจักรและอุปกรณ์

การล้างทำความสะอาดนั้นหลายวิธีขึ้นกับธรรมชาติของสิ่งสกปรก ซึ่งสามารถอธิบายวิธีการเหล่านั้นตามลำดับ ดังต่อไปนี้

1) การใช้พนักงานทำความสะอาด

พนักงานเป็นผู้ช่วยลงมือกวาด ล้าง เช็ดถู ขัดหรือชะล้างด้วยน้ำสะอาดมีอุปกรณ์ช่วยล้างโดยการถอดหรือเปิดเครื่องมือเครื่องใช้ในการแปรรูปอาหารจากนั้นทำความสะอาดด้วยน้ำและใช้น้ำร้อน ถ้ามีคราบน้ำมันหรือไขมันหรือสกปรกมากอาจใช้แปรงหรือเครื่องมืออื่น ๆ ช่วย เมื่อทำความสะอาดแล้วให้ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งเพื่อทำความสะอาดสารเคมีที่ติดค้างให้หมดไป ถ้าต้องการฆ่าเชื้อให้แช่อุปกรณ์ในน้ำยาฆ่าเชื้อความเข้มข้น 75-100 มิลลิกรัม/ลิตร ทิ้งไว้สักครู่แล้วล้างออก และเพื่อป้องกันการกัดกร่อนจากประจุไฟฟ้าไม่ควรแช่เครื่องมือที่เป็นโลหะต่างชนิดกันในสารละลายเดียวกัน ก่อนเริ่มทำการแปรรูปต่อไปในแต่ละครั้งอุปกรณ์และเครื่องมือเครื่องใช้ทุกชิ้นต้องสะอาดปราศจากสิ่งสกปรกหรือสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ (สุวิมล, 2544)

2) การใช้เครื่องทำความสะอาด

การออกแบบวิธีต่าง ๆ เพื่อให้เกิดความสะดวกขึ้นในการทำทำความสะอาด ดังต่อไปนี้ การล้างทำความสะอาดแบบระบบเปิด (Cleaning out of place, COP) เป็นการล้างด้วยเครื่องมือในอ่างสแตนเลสที่เปลี่ยนผ้าที่มีแปรงที่หมุนด้วยมอเตอร์เพื่อล้างทำความสะอาดทั้งภายในและภายนอกอุปกรณ์เครื่องมือได้พร้อมกัน ในขณะที่แปรงทำงานมอเตอร์สูบล้างทำความสะอาดมาที่แปรงเพื่อช่วยในการล้าง และเมื่อล้างเสร็จย้ายมาล้างในอ่างที่สองด้วยน้ำสะอาดแล้วทำให้แห้งตามสายพานเพื่อนำไปอบในตู้อบหรือไปตากบนราว และการล้างทำความสะอาดแบบระบบปิด (Cleaning in place, CIP) การล้างเครื่องมือโดยไม่ต้องถอดชิ้นส่วนต่าง ๆ หรือเป็นระบบปิด (closed system) ออกมาหรืออาจล้างเพียงส่วนหนึ่งส่วนใดของอุปกรณ์เครื่องมือก็ได้ หลักการในการทำทำความสะอาดด้วยวิธีการนี้ประกอบด้วยขั้นตอนการล้างสิ่งสกปรกด้วยน้ำร้อนหรือเย็น ใช้สารล้างทำความสะอาดช่วยล้างทำความสะอาดเพื่อขจัดสิ่งสกปรกที่เหลือจากครั้งแรกล้างด้วยน้ำอีกครั้งเพื่อชำระล้างสารล้างทำความสะอาดที่ใช้ในการทำทำความสะอาดใช้สารเคมีฆ่าเชื้อช่วยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนออกมา แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งเพื่อชำระสารเคมีทั้งหมดออก

2.4.4 การประเมินประสิทธิภาพการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้

เนื่องจากสารก่อภูมิแพ้ปริมาณเล็กน้อยสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้แบบไม่พึงประสงค์ในผู้ที่มีความไว ต่อการแพ้ ดังนั้นการล้างทำความสะอาดจึงมีความสำคัญที่ช่วยลดปัญหาการปนเปื้อน

ข้าม โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างการปรับเปลี่ยนสูตรการผลิตจากที่มีสารก่อภูมิแพ้เป็นไม่มีสารก่อภูมิแพ้ เอกสารที่แสดงขั้นตอนการทำความสะอาดมีความจำเป็นเมื่อต้องการหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้ที่ไม่พึงประสงค์ซึ่งต้องพิจารณาในกระบวนการทำความสะอาดสารก่อภูมิแพ้อาหาร ทั้งนี้ขึ้นกับสถานะของสารก่อภูมิแพ้ด้วย เช่น ใช้ลมเป่า (Compress air) ในการทำความสะอาดฝุ่นผงเพื่อลดการฟุ้งกระจายของสารก่อภูมิแพ้ ในการทำความสะอาดควรมีเอกสารติดตามว่ามีการทำความสะอาดและมีการพิสูจน์ยืนยัน (Validate) ขั้นตอนการทำความสะอาดโดยการตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของสารก่อภูมิแพ้โดยใช้วิธีทดสอบที่จำเพาะกับสารก่อภูมิแพ้นั้นมีความไวเพียงพอสอดคล้องกับระดับที่เป็นขีดจำกัดของสารก่อน ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการนั้นทำได้จริง เนื่องจากสารก่อภูมิแพ้อาหารเป็นโปรตีนไม่ใช่เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการทำความสะอาดด้านสุขาภิบาลไม่สามารถกำจัดความเสี่ยงที่เกิดขึ้นจากสารก่อภูมิแพ้ได้แม้ว่าปราศจากแบคทีเรียแล้วแต่โปรตีนที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ยังสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ในผู้ที่ไวต่ออาการ โดยทั่วไปวิธีการทำความสะอาดแบบเปียกเป็นวิธีที่นิยม สามารถกำจัดสารก่อภูมิแพ้ที่เกาะติดได้ดี การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำเร็จสามารถใช้ในการเสริมการพิสูจน์ยืนยัน (Validate) และทวนสอบ (Verification) วิธีการทำความสะอาด แต่การตรวจวิเคราะห์เฉพาะผลิตภัณฑ์สำเร็จอย่างเดียวนั้นไม่เพียงพอควรมีการตรวจ ติดตามในขั้นตอนที่มีความเสี่ยงด้วย (วิภา, 2559)

การทวนสอบ (Verification) เป็นกระบวนการประเมิน ตรวจสอบ และควบคุมโปรแกรมสารก่อภูมิแพ้จัดทำให้มีความถูกต้องตรงตามวัตถุประสงค์ รวมทั้งการตรวจติดตามว่าวิธีตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพสำหรับสารก่อภูมิแพ้เป้าหมายให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องสามารถใช้เพื่อพิสูจน์ว่าสารก่อภูมิแพ้นั้นถูกกำจัดออกไป หรือลดลงในระดับที่ยอมรับได้ โดยวิธีที่นิยมคือเทคนิคอีไลซ่า (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) ในกรณีที่มีการใช้สารก่อภูมิแพ้ผสม หลายชนิดในผลิตภัณฑ์ให้ใช้การตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ที่มีความเสี่ยงสูงสุด โดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นหรือความยากในการกำจัด การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำเร็จถ้าพบว่าผลการทดสอบมีสารก่อภูมิแพ้ปนเปื้อนต้องกักเก็บผลิตภัณฑ์นั้นไว้ตรวจสอบต่อไป ในการประเมินความสะอาดของอุปกรณ์ เครื่องมือ พื้นผิวที่ผลิต อาจทำโดยการดูด้วยสายตาและดูบันทึก การประเมินด้วยสายตาควรทำการประเมินเมื่อพื้นผิววัสดุแห้งเพราะขณะที่พื้นผิวของวัสดุนั้นเปียกจะทำให้สังเกตเห็นคราบได้ยาก การทำความสะอาดที่ดีต้องไม่มีคราบหลงเหลืออยู่ที่ผิวภาชนะ/เครื่องมือต่าง ๆ อาจใช้ร่วมกันในขั้นตอนการตรวจด้านสุขาภิบาลที่มักตรวจโดยวิธีสวอบ (Swab test) การวิเคราะห์โปรตีนจากพื้นผิวหรือการใช้ ATP (Adenosine triphosphate) swab เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเพื่อประเมินผลการทำความสะอาดอุปกรณ์ แต่จากการทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดไม่ได้เฉพาะเจาะจงสำหรับสารก่อภูมิแพ้และ ATP เป็นการตรวจการมีอยู่ของเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงไม่เป็นวิธีที่ยอมรับสำหรับการ Validate ในเรื่องการจัดสารก่อภูมิแพ้เป้าหมายเนื่องจากไม่สามารถให้ค่าเชิง

ปริมาณของสารก่อภูมิแพ้ที่มีอยู่ ดังนั้นถ้ามีการใช้ปริมาณโปรตีนหรือ ATP ในการประเมินกระบวนการทำความสะอาดควรจะทำการ Calibrate โดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่เฉพาะเจาะจงกับสารก่อภูมิแพ้เป้าหมายก่อนทำการทดสอบและลงบันทึกผลเปรียบเทียบกับกัน (วิภา, 2559)

2.5 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์หาสารก่อภูมิแพ้

สำหรับการตรวจหาโปรตีนที่เป็นสาเหตุของการก่อภูมิแพ้ จะต้องทำการสกัดโปรตีนออกจากเนื้อกึ่ง โดยนำไปปั่นสับละเอียดด้วยเครื่องปั่นจากนั้นนำตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการบดแล้วไปใส่ในสารละลาย Sample buffer reducing เพื่อสลายพันธะที่ไม่ต้องการออก (Lee *et al.*, 2018) ขณะที่การตรวจหาโปรตีนตกค้างบนพื้นผิวจากการปนเปื้อนข้ามของกึ่งบนวัสดุที่ใช้ในโรงงาน เช่น สแตนเลส พลาสติก ทำโดยการสวอปด้วยชุดทดสอบบนพื้นผิว โดยลากหัวสวอปแบบสลับไปมา เก็บพื้นที่ผิวให้ทั่วแล้วกดที่ด้ามจับให้ปลายก้านสวอปทะลุสัมผัสสารละลายเขย่าไปมาประมาณ 5 วินาที เก็บตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์หาขั้นตอนไป (Faisal *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นสาเหตุของการก่อภูมิแพ้สามารถทำได้หลายวิธี

2.5.1 วิธีเจลดดาห์ล (Kjeldahl method)

วิธีที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบันคือวิธีเจลดดาห์ล เป็นวิธีหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของโปรตีนโดยอาศัยหลักการที่ว่า โปรตีนมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำมาต้มกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) โดยมีคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($CuSO_4$) เป็นตัวเร่งและโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นตัวช่วยทำให้ความร้อนของสารละลายเพิ่มขึ้น ไนโตรเจนจะเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และเมื่อเติมสารละลายเบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) เกลือแอมโมเนียมจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เมื่อกลั่นออกมาได้ก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) นำไปเก็บในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในปริมาณที่มากเกินไป หลังจากนั้นก็จะหาปริมาณของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยไทเทรตกรดที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน มีเมทิลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

2.5.2 วิธีลาร์วี (Lowry method)

การวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีลาร์วี เป็นการพัฒนามาจากวิธีไบยูเรต (Biuret) ทำให้ได้ความไว (Sensitivity) มากขึ้น สามารถวัดได้ที่ระดับความเข้มข้น ของโปรตีนต่ำๆ ลงไปถึง 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีหลักการกว้าง ๆ คือ ปลายไนโตรเจนที่อยู่ทีพันธะเปปไทด์จะจับตัวกับไอออนของทองแดง (Cu^{2+}) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน วิธีนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สำหรับค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 10-10.5 สารที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้ เช่น อนุพันธ์ของกรดอะมิโนบางชนิด ยา

ไขมัน น้ำตาล เกลือ เป็นต้น วิธีนี้มีสารรบกวน (Interfering substances) หลายชนิด เช่น ไอออนของแอมโมเนีย สารพวกฟีนอลิก กลีเซอรอล น้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคสและซูโครส เป็นต้น ควรกำจัดหรือเจือจางก่อนทำการวิเคราะห์ (Lowry, 1951)

2.5.3 วิธีบ่งชี้ด้วยน้ำหนัโมเลกุล

วิธีการบ่งชี้ด้วยน้ำหนัโมเลกุลของโปรตีน สำหรับการใช่วิธีหาน้ำหนัโมเลกุลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนัโมเลกุลของโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) เป็นตัวเร่ง (Catalyst) และมี Ammonium persulfate เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยา (Initiator) โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างและประกอบด้วย Sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น Anionic detergent โดย SDS จะจับโพลีเพปไทด์ โดยมี Mercaptoethanol หรือ Dithiothreitol เป็น Reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide) โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดน้ำหนัโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล (โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก) โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของอะคริลามายด์ (Acrylamide) ความเข้มข้นของอะคริลามายด์เพิ่มขึ้นขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูล (Smith, 1984)

2.5.4 วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอีไลซ่า (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

วิธีการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA เป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจน (Antigen) และแอนติบอดี (Antibody) โดยหลักการของวิธี ELISA คือ การใช้แอนติเจน (Antigen) หรือ แอนติบอดี (Antibody) เคลือบติดพื้นผิว ELISA Plate โดยติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงบนแอนติเจนหรือแอนติบอดี จากนั้นเมื่อเติมสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยา (Substrate) ลงไปจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วเปลี่ยนสีเมื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นวัดผลของสีที่เกิดขึ้นโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader) สามารถตรวจสอบทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพของสารที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุทธิพันธ์, 2542) ซึ่งมีขั้นตอนง่ายๆ ดังนี้

1) ให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบอยู่บน solid phase เช่น บนผิวของภาชนะทดลอง ได้แก่ Microtiter plate เป็นต้น ซึ่งเป็นพลาสติกพวกพอลิเอทิลีน พอลิโพรไพลีน พอลิสไตรีน พอลิไวนิล ไนลอน เซลลูโลส พอลิอะคริลามายด์

2) เติมสิ่งที่ต้องการตรวจหา (Antigen หรือ Antibody) ลงไปทำปฏิกิริยา และล้าง ส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไป

3) เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Conjugate) ลงไป เมื่อเติม Substrate เอนไซม์ จะย่อย Substrate เปลี่ยนเป็นสีโดยความเข้มสีขึ้นกับปริมาณแอนติเจนและ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยา กัน (Lequin, 2005)

นอกจากนี้ในการพิสูจน์ว่าสารก่อภูมิแพ้ นั้นถูกกำจัดออกไปหรือลดลงในระดับที่ยอมรับได้ วิธีที่นิยมคือ ELISA รองลงมาคือเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) ในกรณีที่มีการใช้สารก่อภูมิแพ้ผสมหลายชนิดในผลิตภัณฑ์ให้ใช้การตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ที่มีความเสี่ยงสูงสุด โดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นหรือความยากในการกำจัด (วิภา, 2559)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเกาะติดของสารก่อภูมิแพ้บนพื้นผิวสัมผัส ในปัจจุบันการปนเปื้อนของสารก่อภูมิแพ้ไปยังผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เป็นปัญหาร้ายแรงในโรงงานอาหารอาหารที่ผลิตภัณฑ์หลายชนิดใช้อุปกรณ์หรือสายการผลิตเดียวกัน ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกาะติดของสารก่อภูมิแพ้บนพื้นผิวสัมผัสอาหารมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการตัดสินใจเลือกวิธีการทำความสะอาดที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ ตรี และคณะ (2561) ที่ได้ศึกษาผลของวิธีการล้างที่แตกต่างกันต่อจำนวน จุลินทรีย์บนพื้นผิวถังนมในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำนม โดยมี 4 วิธี ได้แก่

- 1) การล้างด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)
- 2) การล้างด้วยน้ำร้อน (75 องศาเซลเซียส)
- 3) การล้างด้วยน้ำอุณหภูมิห้องน้ำร้อน และ
- 4) การล้างด้วยสารทำความสะอาดทางการค้า

ผลการวิจัยพบว่าวิธีการล้างที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนพื้นผิวร้อยละ ของแบคทีเรียเหลือรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแนะนำวิธีการล้างด้วยสารทำความสะอาดทางการค้า ซึ่งมีอัตราการเหลือรอดต่ำสุด (72.78%)

Yael (2009) รายงานว่า การใช้ถั่ว นม และไข่ที่มีสารก่อภูมิแพ้วางลงบนสแตนเลสทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 15 นาที และนำมาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดสารก่อภูมิแพ้ในถั่ว นม และไข่ บนพื้นผิวที่ใส่และไม่ใช่เหล็กกล้าไร้สนิม โดยใช้สารชะล้างที่เป็นกรดสามารถลดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ใน ถั่วได้ 85.6% ในนม 91.3% และในไข่ 86.6% ในขณะที่อัลคาไลน์คลอรีนสามารถลดปริมาณสารก่อภูมิแพ้ในถั่วได้ถึง 99.3% ในนม 98.6% และในไข่ 100% การทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษา

ประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อต่อปริมาณสารก่อภูมิแพ้หลักและโปรตีนจากกุ้งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก

Zhang (2018) ศึกษาผลของการล้างทำความสะอาด เวลา และอุณหภูมิของน้ำต่อสารก่อภูมิแพ้ถั่วลิสงจากอุปกรณ์แปรรูปนม โดยจำลองการปนเปื้อนบนพื้นผิวสแตนเลสแล้วทำการล้างทำความสะอาดด้วยอัลตราโซน พบว่า สารก่อภูมิแพ้ของถั่วลิสงที่ตกค้างบนพื้นผิวสแตนเลสจาก 63-207 มิลลิกรัม/ลิตร เหลือเพียง 0.015-1.43 มิลลิกรัม/ลิตร ผลลัพธ์ชี้ให้เห็นว่า การล้างทำความสะอาดส่งผลให้สารก่อภูมิแพ้ลดลง

Watson *et al.* (2015) ศึกษาการจัดสรรสารก่อภูมิแพ้ถั่วลิสงออกจากพื้นผิวพลาสติก โดยการใช้เนยถั่ว 5 มิลลิลิตร ทาลงบนพื้นผิวพลาสติกลามิเนตขนาด 12×12 นิ้ว² เพื่อจำลองการปนเปื้อน และทำการใช้สารฟลิบิวทิลลาซัคซินในการทำความสะอาด พบว่า ในการจำลองการปนเปื้อนพบสารก่อภูมิแพ้ถั่วลิสงปริมาณ 1.2-19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 12×12 นิ้ว² หลังจากทำความสะอาดด้วยสารฟลิบิวทิลลาซัคซินแล้วไม่พบสารก่อภูมิแพ้ถั่วลิสงหลงเหลืออยู่บนพื้นผิวพลาสติกลามิเนต



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากห้างสรรพสินค้าแมคโคร สาขาสาทร จังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.1.2 แผ่นพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง (High-density polyethylene, HDPE) เกรดอาหาร สีขาว จากบริษัท เอส. พี.วี.ซี. อินเตอร์เนชั่นเนล จำกัด ประเทศไทย

3.2 สารเคมีและชุดทดสอบ

3.2.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Lowry

3.2.1.1 Bovine serum albumin ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.1.2 Copper (II) sulfate ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.1.3 Folin-Ciocalteu reagent ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.1.4 Potassium sodium tartrate ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.1.5 Sodium carbonate ยี่ห้อ Kemaus

3.2.1.6 Sodium hydroxide ยี่ห้อ Merck

3.2.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ สำหรับวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

3.2.2.1 40% Acrylamide / Bis-Acrylamide (37.5:1) ยี่ห้อ Bio-rad

3.2.2.2 Ammonium persulfate ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.2.3 Bromophenol blue เกรดรีเอเจนต์ ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.2.4 Boric acid ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.2.5 Coomassie brilliant blue ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.2.6 Ethylene diamine-N, N, N', N'-tetra acetic acid ยี่ห้อ Ajax

3.2.2.7 Glycerol ยี่ห้อ Fisher

3.2.2.8 Glycine ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.2.9 Hydrochloric acid ยี่ห้อ Loba

3.2.2.10 2-Mercaptoethanol ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.2.11 N, N, N', N'-tetramethylenediamine เกรดรีเอเจนต์ ยี่ห้อ Sigma-aldrich

3.2.2.12 Sodium dodecyl sulfate ยี่ห้อ Ajax-finechem

3.2.2.13 Sodium hydroxide ยี่ห้อ Merck

3.2.2.14 Standard unstained protein marker (10-250 กิโลดาลตัน), Bio-rad

3.2.2.15 Tris (hydroxymethyl) aminomethane ยี่ห้อ Vivantis

3.2.2.16 Urea ยี่ห้อ Ajax

3.2.3 สารเคมีและชุดทดสอบปริมาณคลอรีนอิสระด้วยวิธี Titration

3.3.4.1 Sodium hypochlorite เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Loba

3.3.4.2 ชุดน้ำยาทดสอบและเครื่องวัดปริมาณคลอรีนทั้งหมด ยี่ห้อ Hanna รุ่น HI771

ประเทศอิตาลี

3.2.4 ชุดทดสอบสารก่อภูมิแพ้ในกลุ่มครัสเตเชีย (RIDASCREEN®FAST Crustacean) บริษัทอาร์-ไบโอฟาร์ม (R-Biopharm), ประเทศเยอรมนี

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น KD-200 ยี่ห้อ Tanita ประเทศญี่ปุ่น

3.3.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) รุ่น PA214 ยี่ห้อ Ohaus ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.1.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบปรับปริมาตรได้ ชนิดช่องเดียว ขนาด 100 – 1,000 ไมโครลิตร และ ขนาด 10 - 100 ไมโครลิตร

3.3.1.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบปรับปริมาตรได้ ชนิดหลายช่อง ขนาด 100 – 300 ไมโครลิตร

3.3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) รุ่น Mikro 22R ยี่ห้อ Hettich ประเทศเยอรมนี

3.3.1.6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture) รุ่น ZX4 Advanced IR ยี่ห้อ VELP SCIENTIFICA ประเทศอิตาลี

3.3.1.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) รุ่น UV-1700 ยี่ห้อ SHIMADZU ประเทศญี่ปุ่น

3.3.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ST10 ยี่ห้อ Ohaus ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.1.9 เครื่องสับผสมอาหาร (Blender) รุ่น MCM3200W ยี่ห้อ Bosch ประเทศสาธารณรัฐสโลเวเนีย

3.3.1.10 เครื่องอ่านปฏิกิริยาอีไลซ่า (ELISA reader) ยี่ห้อ Stat Fax 4700 รุ่น CAAS

ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.1.11 เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) รุ่น T-25 ยี่ห้อ IKA ประเทศเยอรมนี

3.3.1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WDN30 ยี่ห้อ M-LAB ประเทศไทย

3.3.1.13 ชุดเครื่องมือแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Compact-PAGE apparatus)

บริษัท ไบโอ-ราด แลบบอราทอรีส์ จำกัด, รุ่น AE-6500, ประเทศญี่ปุ่น

3.3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

3.3.2.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ (Computer)

3.3.2.2 โปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net (R-Biopharm AG, ประเทศเยอรมนี)

สำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบปริมาณสารก่อภูมิแพ้

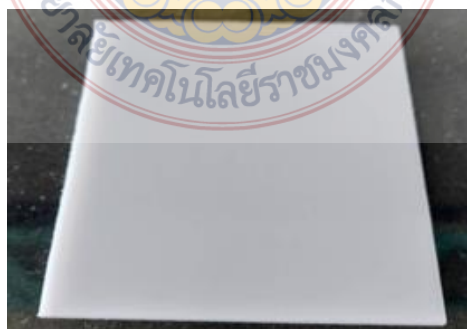
3.3.2.3 โปรแกรมสำเร็จรูป Image processing and analysis in java (Image J, ประเทศสหรัฐอเมริกา) สำหรับวิเคราะห์ความเข้ม (Intensity) ของแถบโปรตีน

3.3.2.4 โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical package for the social sciences (SPSS Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา) สำหรับวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมพื้นผิวพลาสติก

เตรียมแผ่นพลาสติกเกรดอาหารประเภทพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง (High-density polyethylene, HDPE) ความหนา 3 มิลลิเมตร ขนาดพื้นที่ 10x10 ตารางเซนติเมตร (ภาพที่ 3.1) นำมาทำความสะอาดพื้นผิวด้วยน้ำยาทำความสะอาดตามด้วยน้ำสะอาดและปล่อยให้แห้ง แล้วเช็ดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% โดยปริมาตร (v/v) ก่อนนำมาใช้



ภาพที่ 3.1 แผ่นพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง สีขาว เกรดอาหาร

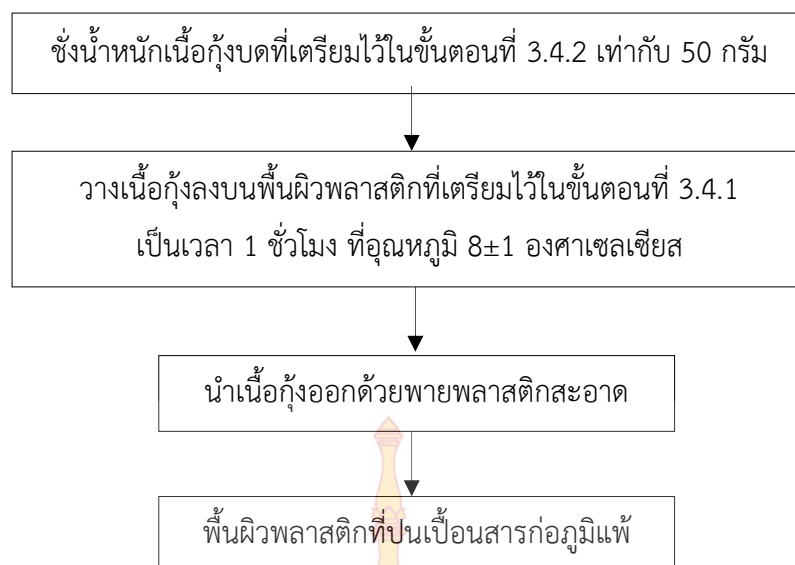
3.4.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้ง

เตรียมตัวอย่างเนื้อกุ้ง โดยนำกุ้งทั้งตัวมาล้างน้ำสะอาด แกะหัว ปอกเปลือก ดึงไส้ออก และล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำไปบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมอาหารเป็นเวลา 1 นาที

3.4.3 การศึกษารูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อกุ้งและที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อกุ้ง โดยชั่งน้ำหนักเนื้อกุ้งบดจากขั้นตอนที่ 3.4.2 เท่ากับ 1 กรัม ผสมกับสารละลาย Allergen extraction buffer ที่เจือจาง 10 เท่า และอุ่นแล้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากชุดทดสอบ Crustacean ELISA kit (RIDASCREEN®FAST Crustacean) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนความเร็วรอบ 4,850 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ภาคผนวก ข) และนำส่วนใสที่ได้ไปใช้สำหรับการตรวจสอบรูปแบบโปรตีน โดยผสมกับสารละลาย SDS-sample buffer อัตราส่วน 1:1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ตามวิธีดัดแปลงของ Laemmli (1970) โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนและทำการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-250 กิโลดาลตัน (kDa) ตามขั้นตอนใน ภาคผนวก ค

จากนั้นเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติก โดยวิธีการจำลองการปนเปื้อนของเนื้อกุ้งลงบนพื้นผิวพลาสติก โดยชั่งน้ำหนักเนื้อกุ้งจากขั้นตอนที่ 3.4.2 เท่ากับ 50 กรัม วางลงบนพื้นผิวพลาสติกที่มีขนาด 10x10 ตารางเซนติเมตร ซึ่งเตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.4.1 ใช้เวลาในการสัมผัสพื้นผิวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 8 ± 1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเนื้อกุ้งออกดังภาพที่ 3.2 เก็บตัวอย่างโปรตีนบนพื้นผิวโดยวิธีสวอป (ภาคผนวก ข) คือ 1) เก็บตัวอย่างบนพื้นผิวแห้ง โดยใช้ไม้สวอปจุ่มลงใน Allergen extraction buffer จากชุดทดสอบของ Crustacean ELISA kit ที่เจือจางแล้วก่อนเก็บตัวอย่าง (แต่กรณีที่เป็นพื้นผิวเปียกเนื่องจากการล้างสามารถใช้ไม้สวอปเก็บตัวอย่างได้ทันที) 2) ตัดก้านไม้สวอปใส่ลงในหลอดทดลอง 3) เติมน้ำ Diluted allergen extraction buffer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในขั้นตอนที่ 2) เขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixture) ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 4,850 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 100 ไมโครลิตร มาใช้วิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างเนื้อกุ้ง



ภาพที่ 3.2 การจำลองการปนเปื้อนของเนื้อกึ่งขาวลงบนพื้นผิวพลาสติก

3.4.4 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว

3.4.4.1 การเตรียมพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว

ทำการเตรียมพื้นผิวที่ปนเปื้อน โดยวิธีการจำลองการปนเปื้อนด้วยเนื้อกึ่งตามขั้นตอนในภาพที่ 3.2 เช่นเดียวกันกับการศึกษาในข้อที่ 3.4.3

3.4.4.2 การเตรียมสารทำความสะอาด

ทำการเจือจางสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (ทางการค้า) ที่มีความเข้มข้น 4,000-6,000 มิลลิกรัม/ลิตร (4-6%) ด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีปริมาณคลอรีนทั้งหมด (Total chlorine) 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งทำการตรวจสอบโดยใช้เครื่องวัดและน้ำยาทดสอบปริมาณคลอรีนทั้งหมด (ภาคผนวก ง) และตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายที่เตรียมได้เก็บสารละลายที่เตรียมไว้ในภาชนะพลาสติกปิดสนิทให้พ้นแสงและทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

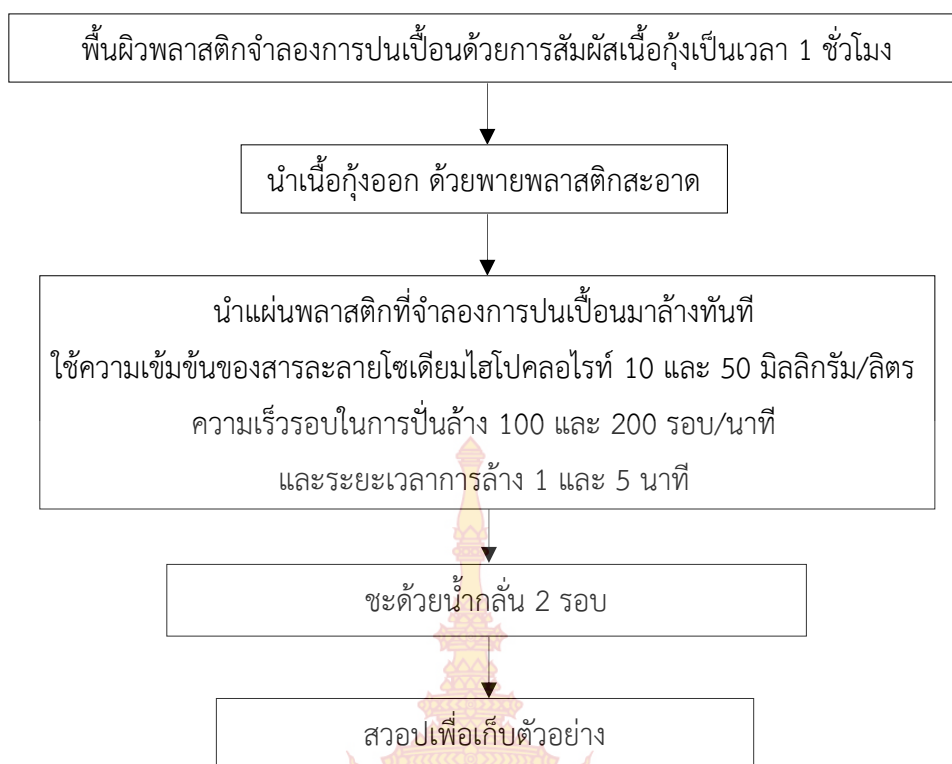
3.4.4.3 สถานะการล้างทำความสะอาด

ทำการล้างทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสที่ปนเปื้อนกุ้งขาว โดยนำแผ่นพลาสติกที่จำลองการปนเปื้อนในข้อ 3.4.4.1 นำมาทดสอบการล้างด้วยวิธีปั่นหรือกวนด้วยเครื่องกวนสารละลาย (Stirrer) ภายในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 3.3) โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วรอบในการปั่นล้าง 100 และ 200 รอบ/นาที และระยะเวลาการล้าง 1 และ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นพลาสติกไปชะล้าง (Rinse) ด้วย

น้ำกลั่น จำนวน 2 รอบ เพื่อชะล้างสารทำความสะอาด จากนั้นเก็บตัวอย่างโปรตีนที่ติดบนแผ่นพลาสติกทุกตัวอย่างทดสอบโดยการสวอป (ภาพที่ 3.4) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,850 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนใสมาใช้ในการตรวจสอบรูปแบบโปรตีน (ภาคผนวก ค) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างโดยวิธีลาวรี (Lowry) ตามขั้นตอนในภาคผนวก ก และปริมาณโทรโปไมโอซินโดยวิธีอีไลซา (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ตามขั้นตอนในภาคผนวก ข เพื่อที่จะคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการล้าง



ภาพที่ 3.3 การล้างพื้นผิวพลาสติกด้วยวิธีการปั่นล้าง



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการทดสอบสถานะในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติก

3.4.4.4 การตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

นำส่วนใสของโปรตีนที่ได้ในข้อ 3.4.4.3 มาผสมกับสารละลาย SDS-sample buffer อัตราส่วนปริมาตร 1:1 โดยปริมาตร (v/v) จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ไปตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ตามวิธีดัดแปลงของ Laemmli (1970) โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนและทำการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-250 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.4.3 (ภาคผนวก ค) ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

3.4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

นำส่วนใสของโปรตีนที่ได้ในข้อ 3.4.4.3 มาทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีลาวรี (Lowry *et al.*, 1951) โดยนำตัวอย่างปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 2 N NaOH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการไฮโดรไลซ์ตัวอย่าง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลายผสมที่เตรียมขึ้นใหม่ของ 2% Sodium carbonate : 1% Copper (II) sulfate : 2% Potassium sodium tartrate (100:1:1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม

สารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ภาคผนวก ก) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณโทรโปไมโอซิน

นำส่วนใสของโปรตีนที่ได้โดยวิธีการสวอปในข้อ 3.4.4.3 มาปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างละ 2 ซ้ำ มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโทรโปไมโอซินโดยวิธีอีไลซ่า (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ด้วยชุดทดสอบสารก่อภูมิแพ้ในกลุ่มครัสเตเชีย (RIDASCREEN®FAST Crustacean) ตามขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณโทรโปไมโอซินในภาคผนวก ข แล้วนำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร มาคำนวณปริมาณโทรโปไมโอซินด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net (บริษัท อาร์-ไบโอฟาร์ม, ประเทศเยอรมนี) ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

3.4.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโปรตีน

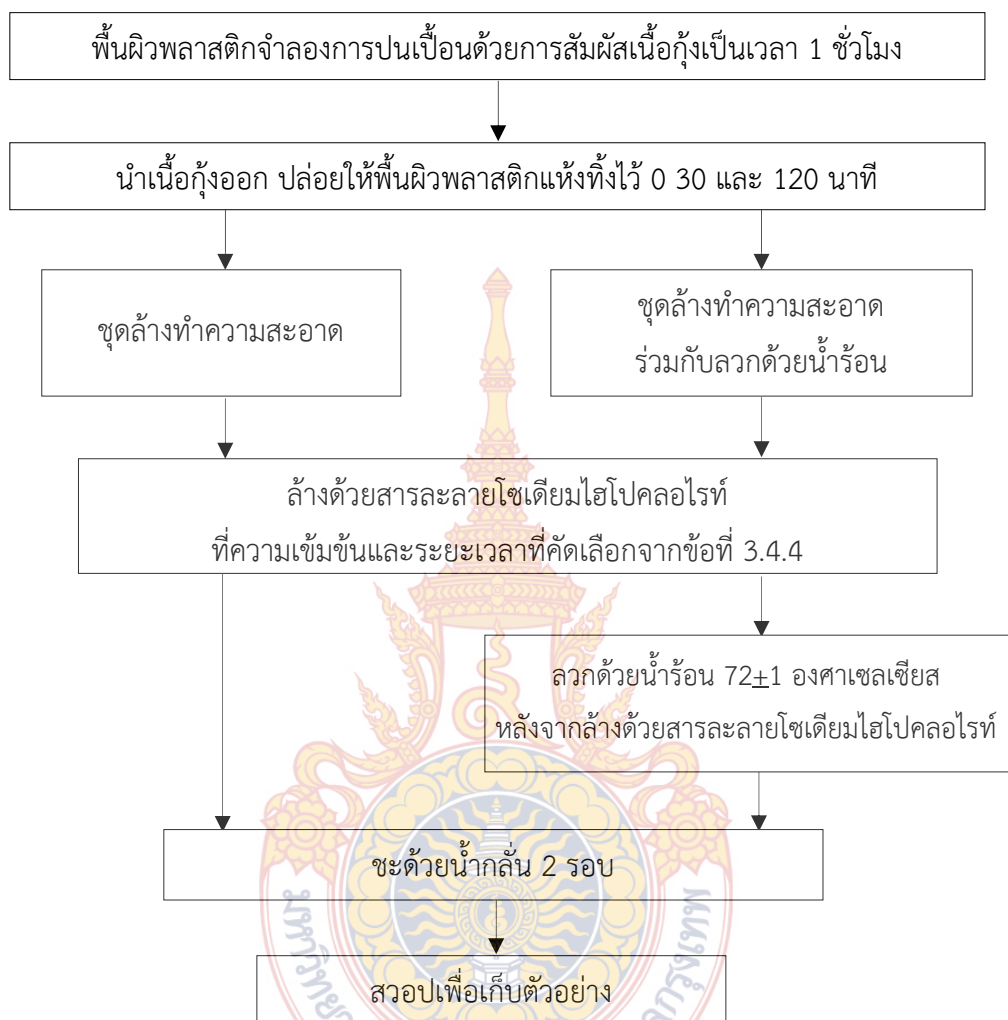
ประเมินผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและโทรโปไมโอซินโดยใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก

3.4.5.1 การเตรียมตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกและวิธีการล้างทำความสะอาดและการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

เตรียมพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อน โดยวิธีการจำลองการปนเปื้อนตามขั้นตอนในภาพที่ 3.2 โดยเตรียมการทดลองทั้งหมด 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดหลังล้างทำความสะอาด และชุดหลังล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน ในแต่ละชุดมีการจำลองการปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกด้วยการแปรระยะเวลาที่ปล่อยให้พื้นผิวสัมผัสแห้งก่อนนำไปล้างทำความสะอาดเป็น 3 ระดับ คือ 0 30 และ 120 นาที (โดยที่ 0 นาที หมายถึง การล้างพื้นผิวสัมผัสทันทีหลังจากได้รับการปนเปื้อน) จากนั้นนำตัวอย่างพื้นผิวสัมผัสชุดการทดลองแรก ไปทดสอบประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาด โดยใช้วิธีการล้างที่เหมาะสม (คัดเลือกจากการทดลองในข้อที่ 3.4.4) และอีกชุดการทดลองนำไปทดสอบประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน โดยการลวกพื้นผิวสัมผัสด้วยน้ำร้อน (72 ± 1 องศาเซลเซียส) รอแห้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างโปรตีนที่เกาะติดบนแผ่น

พลาสติกโดยการสวอป แล้วจึงแยกส่วนใสของโปรตีนนำไปตรวจสอบรูปแบบโปรตีน ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และปริมาณโพรโปไมโอซินบนพื้นผิวที่เกาะติดบนพื้นผิวสัมผัส ตามขั้นตอนในภาพที่ 3.5



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาดและการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

3.4.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณโปรตีน

ประเมินผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและโพรโปไมโอซินโดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Complete Randomize Design (Factorial in CRD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

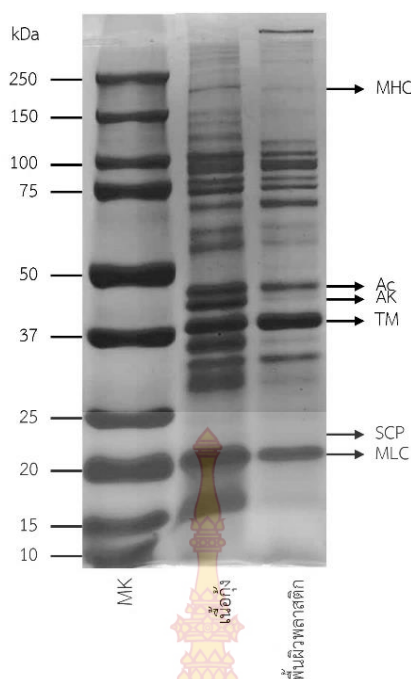
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษารูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อกุ้งและที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดตัวอย่างโปรตีนที่เป็นสารก่อภูมิแพ้หลักในเนื้อกุ้งสดแช่เย็นและบนพื้นผิวพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (High Density Poly Ethylene; HDPE) ที่มีการจำลองการปนเปื้อน ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อกุ้งและที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง โดยนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคโพลีอะคริลามิเด เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) ซึ่งผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่า ในเนื้อกุ้งมีองค์ประกอบของโปรตีนชนิดที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ ได้แก่ โทรโปไมโอซิน (TM) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน อาร์จินีน-ไคเนส (AK) มีน้ำหนักโมเลกุล 40 กิโลดาลตัน ซาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน (SCP) มีน้ำหนักโมเลกุล 22 กิโลดาลตัน และไมโอซินไลท์เซน (MLC) มีน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน

ส่วนองค์ประกอบของโปรตีนที่ตรวจพบบนพื้นผิวพลาสติกเมื่อมีการจำลองการปนเปื้อนแล้ว โดยปราศจากการล้างทำความสะอาดหลังปนเปื้อนยังคงพบแถบโปรตีนชนิดเดียวกันกับกรณีที่พบในเนื้อกุ้งสด อย่างไรก็ตามแถบของโปรตีนชนิดอื่น ๆ มีแนวโน้มว่าความเข้มของแถบโปรตีนจะลดลงเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างยกเว้นโทรโปไมโอซิน ซึ่งยังคงมีสัดส่วนที่มากบนพื้นผิวพลาสติกเมื่อจำลองการปนเปื้อน (ภาพที่ 4.1) แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเกาะติดบนพื้นผิวของโปรตีนโทรโปไมโอซิน



ภาพที่ 4.1 รูปแบบของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อไก่และบนพื้นผิวพลาสติกที่มีการจำลองการปนเปื้อน

หมายเหตุ: MK หมายถึง โปรตีนมาตรฐาน; MHC หมายถึง ไมโอซินเฮฟวีเชน; Ac หมายถึง แอกติน; AK หมายถึง อาร์จินีนไคเนส; TM หมายถึง โทรโปไมโอซิน; SCP หมายถึง ชาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน; MLC หมายถึง ไมโอซินไลต์เชน

จากรายงานของ Gámez *et al.* (2011) กล่าวว่า ในจำนวนผู้แพ้อาหารทั้งหมดมีผู้ป่วยจำนวน 60% ที่มีปฏิกิริยาแพ้ต่อโปรตีนชนิดนี้จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าโทรโปไมโอซินเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักของกุ้งขาว จากผลการศึกษาที่สอดคล้องกับ Akimoto *et al.* (2021) ที่รายงานว่า สารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในกุ้งที่เป็นสาเหตุของการแพ้กุ้งมี โทรโปไมโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 กิโลดาลตัน อาร์จินีนไคเนสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน ชาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20-22 กิโลดาลตัน และไมโอซินไลต์เชนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18-20 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนทั้งหมดในกุ้งรวมทั้งโทรโปไมโอซินสามารถดูดซับและยึดเกาะบนพื้นผิวสแตนเลสได้อย่างแน่นหนา ซึ่งแทบจะไม่ถูกกำจัดด้วยน้ำ (Gattens & Gilbert, 2006) จึงจำเป็นต้องทำความสะอาดเป็นพิเศษเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามของโทรโปไมโอซินไปยังอาหารอื่นๆ (Jeurnink & Brinkman, 1994; Nagata *et al.*, 1995; Sakiyama *et al.*, 1998)

4.2 ผลการศึกษาสถานะในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว

ในการศึกษาสถานะในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาว ผู้วิจัยได้นำแผ่นพลาสติกที่จำลองการปนเปื้อนด้วยเนื้อกุ้งขาวแล้วมาทำความสะอาดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารทำความสะอาดในการทดลองนี้ ซึ่งสารละลายดังกล่าวมีค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 11.94 และ 12.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) และในการล้างใช้วิธีการปั่นด้วยเครื่องกวนสารละลายที่มีความเร็ว 100 และ 200 รอบ/นาที ใช้เวลา 1 และ 5 นาที จากนั้นสวอปเพื่อเก็บตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ ผลการศึกษามีดังนี้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณคลอรีนทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารทำความสะอาดที่เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นทางการค้า (4-6%)

ระดับการเจือจาง (มิลลิกรัม/ลิตร)	ปริมาณคลอรีนทั้งหมด* (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง* (pH)
10	11±2.65	11.94±.05
50	50.67±1.53	12.06±.02

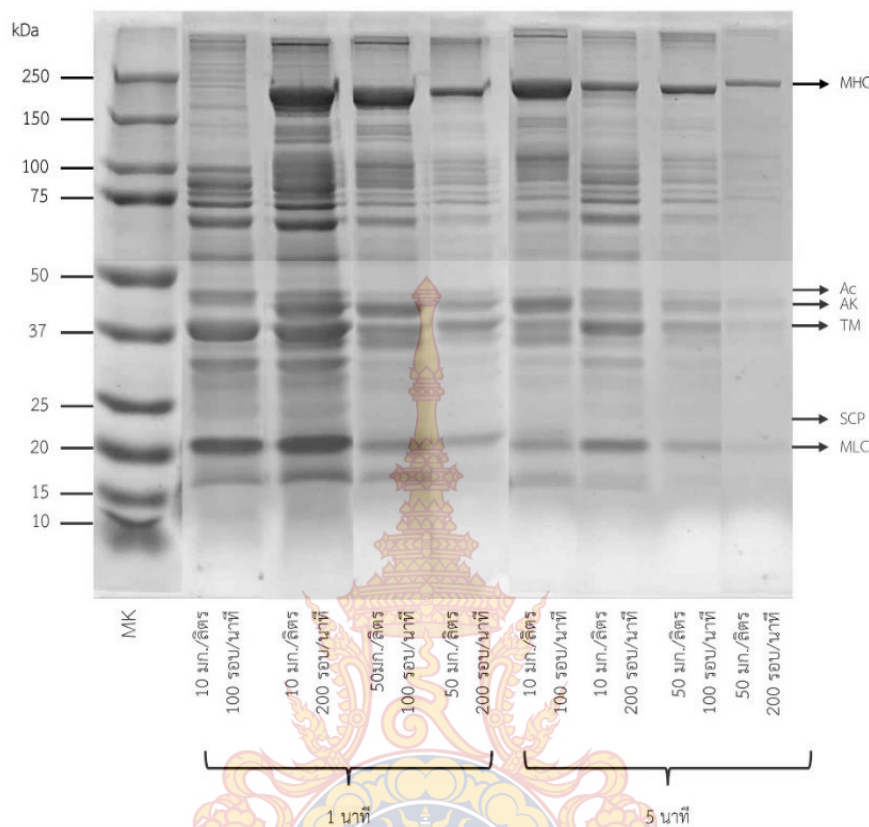
หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยเครื่องหมาย * ในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

4.2.1 ผลการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาด

จากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีน พบว่า แลบบิโปรตีนในแต่ละตัวอย่างทดลองมีแนวโน้มแตกต่างกันจากการใช้สภาวะการล้างดังที่กล่าวข้างต้น โดยขณะที่มีการใช้เวลาล้าง 1 นาที การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีผลช่วยในการล้างกำจัดโปรตีนโทรโปไมโอซิน ซึ่งแสดงได้จากความเข้มของแถบโปรตีนยังคงมีความเข้มใกล้เคียงกันเมื่อเพิ่มความเร็วขณะล้างจาก 100 เป็น 200 รอบ/นาที แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการล้างจาก 1 นาที เป็น 5 นาที พบว่า แลบบิโปรตีนชนิดโทรโปไมโอซินและโปรตีนชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไมโอซินเฮฟวีเชน (MHC) และแอคติน (Ac) และชนิดที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ชนิดอื่นด้วย ซึ่งเห็นได้จากแถบของโปรตีนจางลง ซึ่งตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่ล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ใช้เวลาล้าง 5 นาที แสดง

แนวโน้มว่าโปรตีนชนิดโทรโปไมโอซินนั้นได้ถูกกำจัดออกไปจากพื้นผิวพลาสติกและตกค้างอยู่ในปริมาณน้อยที่สุด ($p < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 รูปแบบของโปรตีนที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังผ่านการล้างทำความสะอาด

หมายเหตุ: MK หมายถึง โปรตีนมาตรฐาน; MHC หมายถึง ไมโอซินเฮฟวีเชน; Ac หมายถึง แอกติน; AK หมายถึง อาร์จินีนไคเนส; TM หมายถึง โทรโปไมโอซิน; SCP หมายถึง ชาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน; MLC หมายถึง ไมโอซินไลท์เชน

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่า ตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีปริมาณคลอรีนทั้งหมดเท่ากับ 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้ความเร็วรอบในการปั่นล้างเท่ากับ 100 และ 200 รอบ/นาที โดยมีระยะเวลาในการล้างเท่ากับ 5 นาที สามารถลดการปนเปื้อนของโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกได้มากกว่าการล้างทำความสะอาดด้วยวิธีการเดียวกันเมื่อใช้เวลาล้างเพียง 1 นาที ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาด

ตัวอย่างพื้นผิว พลาสติก ทรีทเมนต์ที่	สภาวะการล้างทำความสะอาด			ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร)
	ความเข้มข้นคลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	เวลา (นาที)	
1	10	100	1	382.92±149.08 ^a
2	10	200	1	152.64±56.24 ^c
3	50	100	1	350.69±73.37 ^{ab}
4	50	200	1	122.08±24.16 ^c
5	10	100	5	225.14±26.50 ^b
6	10	200	5	120.63±30.94 ^c
7	50	100	5	140.21±12.67 ^c
8	50	200	5	167.29±12.08 ^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่าง หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้การล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับปริมาณคลอรีน 50 มิลลิกรัม/ลิตร และการใช้ความเร็วในการปั่นล้าง 200 รอบ/นาที ยังแสดงแนวโน้มว่าช่วยลดการปนเปื้อนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากเนื้อกุ้งได้ เนื่องจากโซเดียมไฮโปคลอไรท์เมื่อละลายน้ำจะได้กรดไฮโปคลอรัสซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน ออกซิไดซ์หมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH group) ให้กลายเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (S-S bond) ทำให้โปรตีนถูกทำลายและตกตะกอน สารประกอบคลอรีนจึงสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อย่างรุนแรงจนสามารถออกซิไดซ์สายเพปไทด์ได้ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (นวลัย, 2564) สอดคล้องกับ Xiaomeng *et al.* (2015) ที่รายงานว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เท่ากับ 0 และ 1 มิลลิกรัม ปริมาณของเซลล์ที่แตกสลายเกือบจะเท่ากันโดยมีค่าต่ำกว่า 3% ซึ่งบ่งชี้ถึงผลกระทบเล็กน้อยของ NaOCl ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaOCl ให้สูงขึ้นเป็น 5 10 20 และ 50 มิลลิกรัม ทำให้ปริมาณเซลล์ที่แตกสลายเพิ่มขึ้นเป็น 26% 39% 91% และ 98% ตามลำดับ บ่งชี้ว่าความเข้มข้นของ NaOCl ที่สูงขึ้นทำให้ความเสียหายของเซลล์รุนแรงขึ้น

4.2.3 ผลวิเคราะห์ปริมาณโพรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโพรโปไมโอซินที่ตกค้างบนตัวอย่างพื้นผิวพลาสติก พบว่าตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่มีการล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความ-

เข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 10 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วรอบในการปั่นล้างเท่ากับ 100 และ 200 รอบ/นาที และระยะเวลาการล้างเท่ากับ 1 และ 5 นาที พบว่า ทุกตัวอย่างทดลองมีปริมาณโทรโปโมโอซินตกค้างแตกต่างกันทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยมีปริมาณตกค้างอยู่ในช่วง 9.52 ถึง 10.02 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโทรโปโมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาด

ตัวอย่างพื้นผิว พลาสติก ทรีทเมนต์ที่	สภาวะการล้างทำความสะอาด			ปริมาณโทรโปโมโอซิน (ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร)
	ความเข้มข้นคลอรีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	เวลา (นาที)	
1	10	100	1	9.91±0.00 ^b
2	10	200	1	9.90±0.06 ^c
3	50	100	1	9.80±0.11 ^d
4	50	200	1	9.78±0.00 ^f
5	10	100	5	9.79±0.10 ^e
6	10	200	5	10.02±0.04 ^a
7	50	100	5	9.77±0.01 ^g
8	50	200	5	9.52±0.07 ^h

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่าง หมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Steve *et al.* (2013) รายงานว่า ปริมาณโปรตีนชนิดสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งที่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ มีปริมาณอ้างอิงอยู่ที่ 10 มิลลิกรัม เทียบเท่ากับโปรตีนในกุ้ง 44 มิลลิกรัมที่สามารถทำให้เกิดอาการแพ้ได้ และต้องแสดงฉลากหากมีปริมาณสารก่อภูมิแพ้เกินกว่าปริมาณที่กำหนดไว้ คือ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของอาหาร (Akiyama & Adachi, 2021) ในขณะที่ตัวอย่างพื้นผิวที่มีการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีนเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ความเร็วรอบในการปั่น 200 รอบ/นาที และระยะเวลาการล้าง 5 นาที มีปริมาณโทรโปโมโอซินตกค้างน้อยที่สุดเท่ากับ 9.52±0.07 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า สภาวะการล้างดังกล่าวมีประสิทธิภาพมากที่สุดจากการทดลองและเป็นสภาวะที่ผู้วิจัยได้คัดเลือกไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

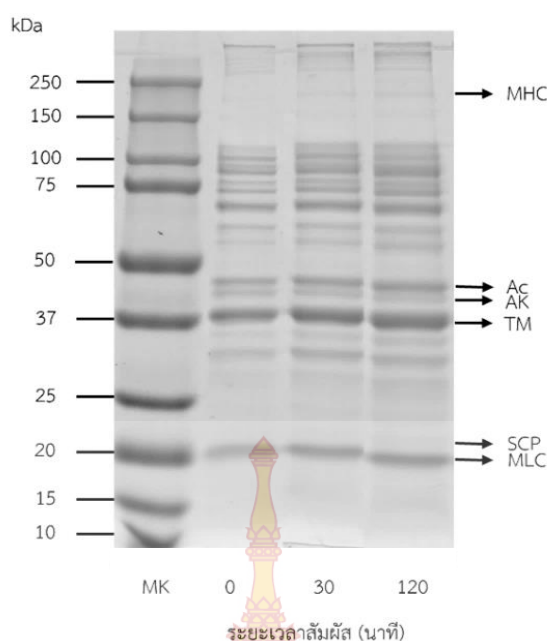
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก

ในการศึกษาประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดและผลร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อนต่อปริมาณโปรตีนและสารก่อภูมิแพ้หลักจากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติก ผู้วิจัยได้นำแผ่นพลาสติกที่จำลองการปนเปื้อนของกุ้งขาวแล้วมาปล่อยไว้ให้พื้นผิวแห้งเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำชุดหนึ่งไปผ่านการล้างเพียงอย่างเดียวและอีกชุดหนึ่งนำไปล้างร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน ซึ่งในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณโทรโปไมโอซินที่มีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวในระหว่างกระบวนการปนเปื้อนหรือก่อนล้างทำความสะอาด ภายหลังการล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการใช้ความร้อน โดยผลการวิเคราะห์มีดังนี้

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที ก่อนกระบวนการล้างทำความสะอาด

จากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนจากกุ้งขาวที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด พบว่า ตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่มีระยะเวลาสัมผัสหลังการปนเปื้อนเป็นเวลา 120 นาที แสดงแถบโปรตีนของโทรโปไมโอซิน อาร์จินีนไคเนส ซาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน และไมโอซินไลต์เซน ซึ่งมีแนวโน้มเข้มข้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเกาะติดของโปรตีนภายหลังจากการจำลองการปนเปื้อนจากระยะเวลา 0 เป็น 30 และ 120 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.3

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากวิธีลาวรี เมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาดมาคิดเป็นค่าร้อยละของปริมาณสัมพัทธ์ โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวที่ระดับของระยะเวลาสัมผัสเท่ากับ 0 นาที คิดเป็น 100% พบว่า ตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่มีระยะเวลาในการเกาะติดของโปรตีนนานขึ้นเป็น 30 และ 120 นาที ส่งผลให้ปริมาณการตกค้างของโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกเพิ่มขึ้นคิดเป็น 20.17% เมื่อใช้เวลานาน 30 นาที ($p>0.05$) และเพิ่มขึ้น 97.29% เมื่อใช้เวลานาน 120 นาที ($p<0.05$) ทั้งนี้เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบบนพื้นผิวที่มีระยะเวลาปนเปื้อน 0 นาที หรือทำการล้างทำความสะอาดทันทีหลังจากการปนเปื้อน (ตารางที่ 4.4) และจากผลการวิเคราะห์ความเข้ม (Intensity) ของแถบโปรตีนโทรโปไมโอซินที่ปรากฏบนแผ่นเจล (ภาพที่ 4.3) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Image J) ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางผนวก จ1 และเมื่อนำมาคิดเป็นค่าร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ในทำนองเดียวกันนั้น ยังพบว่าปริมาณโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นทิศทางเดียวกันกับโปรตีนทั้งหมด โดยเพิ่มขึ้น 16.19% และ 20.02% ตามลำดับ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างพื้นผิวที่มีระยะเวลาหลังการปนเปื้อนเป็นเวลา 0 นาที หรือก่อนที่จะนำไปทดสอบการล้าง (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 แถบของโปรตีนจากเนื้อกึ่งที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด โดยมีระยะเวลาสัมผัสหลังปนเปื้อนเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที

หมายเหตุ: MK หมายถึง โปรตีนมาตรฐาน; MHC หมายถึง ไมโอซินเฮฟวีเชน; Ac หมายถึง แอกติน; AK หมายถึง อาร์จินีนไคเนส; TM หมายถึง โทรโปไมโอซิน; SCP หมายถึง ซาร์โคพลาสมิกแคลเซียมบายดิงโปรตีน; MLC หมายถึง ไมโอซินไลต์เชน

ตารางที่ 4.4 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดและโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด

ระยะเวลาหลังการปนเปื้อน (นาที)	ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content)	
	โปรตีนทั้งหมด	โทรโปไมโอซิน
0	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
30	120.17±7.54 ^a	116.19±5.51 ^b
120	197.29±27.47 ^b	120.02±11.05 ^b

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (0 30 และ 120 นาที) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4.3.2 ผลวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาดและการล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

หลังจากการล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่มีระยะเวลาการเกาะติดของโปรตีน ภายหลังการปนเปื้อนเป็นเวลา 0 30 และ 120 นาที ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ ตกค้างอยู่บนพื้นผิวพลาสติกด้วยวิธีลารวี พบว่า ตัวอย่างพื้นผิวพลาสติกที่มีการปนเปื้อนทั้ง 3 ระดับ ภายหลังจากนำไปผ่านการล้างทำความสะอาด มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดตกค้างอยู่บนแผ่นพลาสติกไม่ แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) โดยพบในปริมาณ 86.07-182.29 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร นอกจากนี้พื้นผิวพลาสติกที่มีการล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกพื้นผิวด้วยน้ำร้อนยังมีผลทำให้ พื้นผิวพลาสติกที่มีการปนเปื้อนทั้ง 3 ระดับ มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดตกค้างอยู่บนพื้นผิวพลาสติกไม่ แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) ซึ่งเป็นทิศทางเดียวกันกับผลจากกระบวนการล้างทำความสะอาดเพียงอย่าง เดียว โดยปริมาณโปรตีนทั้งหมดอยู่ในช่วง 95.50-255.43 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผลของการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และผลรวมกับการ ลวกด้วยน้ำร้อนหลังการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่า ผลของ กระบวนการทั้งสองต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกดังกล่าวไม่มีความแตกต่าง กัน ($p \geq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากกุ้งขาวที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังการล้างทำความสะอาดและหลังการล้างทำความสะอาดรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

ระยะเวลา หลังการปนเปื้อน (นาที)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร)	
	หลังล้าง	หลังล้างรวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน
0 ^{ns}	86.07±12.02 ^a	95.50±19.29 ^a
30 ^{ns}	156.57±42.02 ^a	137.57±32.53 ^a
120 ^{ns}	182.29±37.98 ^a	255.43±53.74 ^a

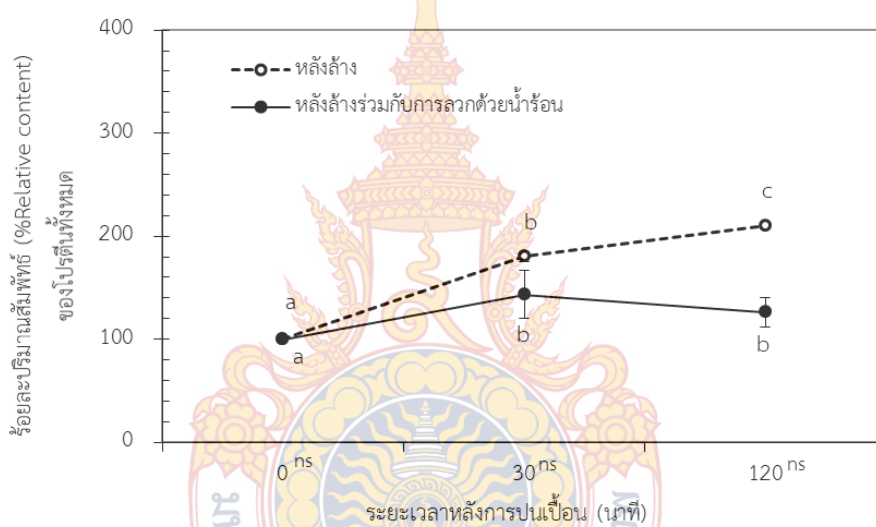
หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง (0 30 และ 120 นาที)

หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วย ^{ns} ในแนวนอน (หลังล้างทำความสะอาดและหลังล้างทำความสะอาด รวมกับการลวกด้วยน้ำร้อน) หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากวิธีลารวี (ตารางที่ 4.5) มาคิดเป็นค่า ร้อยละปริมาณสัมผัส โดยให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวที่ระดับของระยะเวลาสัมผัส เท่ากับ 0 นาที คิดเป็น 100% แสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่า การเพิ่มระดับของการเกาะติดของโปรตีน ด้วยการเพิ่มระยะเวลาหลังการปนเปื้อนจาก 0 เป็น 30 และ 120 นาที ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการ

ล้างทำความสะอาด โดยปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกมีเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 180.26% และ 210.76% ($p < 0.05$) ตามลำดับ (ตารางผนวก จ2) เมื่อเทียบกับตัวอย่างพื้นผิวที่ทำการล้างทันที (ระยะเวลาสัมผัส 0 นาที) เท่ากับ 100% ซึ่งผลของประสิทธิภาพในการทำความสะอาดดังกล่าวนี้ เป็นทำนองเดียวกันกับผลของการล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน ซึ่งทำให้ยังคงมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดตกค้างอยู่สูงสุดถึง 267.23% ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพื้นผิวหลังการปนเปื้อนเป็นเวลา 120 นาที กับตัวอย่างพื้นผิวที่ทำการล้างในทันที คิดเป็นเท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าระดับของการปนเปื้อนที่สูงมากมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการล้างพื้นผิวลดลงและเมื่อมีการใช้ความร้อนร่วมด้วยจะทำให้โปรตีนที่ตกค้างถูกกำจัดออกไปได้ยากจึงมีโอกาสดังกล่าวบนพื้นผิวมากขึ้น



ภาพที่ 4.4 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$)

: ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณโทรโปไมโอซินด้วยเทคนิคอีไลซา (ELISA) พบว่า ตัวอย่างพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนทั้ง 3 ระดับ เมื่อผ่านการล้างทำความสะอาดมีปริมาณโทรโปไมโอซินตกค้างอยู่บนแผ่นพลาสติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) โดยปริมาณที่ตกค้างอยู่ในระดับ 28.79-29.27 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร ในขณะที่การล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกในทันทีหลังจากการปนเปื้อนส่งผลให้กระบวนการลวกด้วยน้ำร้อนที่ดำเนินการหลังการล้างมี

ประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนโทรโปไมโอซินได้มากกว่าการปล่อยไว้ให้มีระยะเวลาสัมผัสหลังการปนเปื้อนนาน 30 และ 120 นาที ($p<0.05$) ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 โดยมีปริมาณโทรโปไมโอซินตกค้างอยู่บนพื้นผิวพลาสติกเท่ากับ 13.77 ± 0.87 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

และเมื่อนำผลมาคำนวณเป็นค่าร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) โดยให้ปริมาณโปรตีนโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวที่ระยะเวลาหลังการปนเปื้อนเท่ากับ 0 นาที คิดเป็น 100% พบว่า การเพิ่มระดับการปนเปื้อนโดยการเพิ่มระยะเวลาสัมผัสภายหลังการปนเปื้อนจาก 0 นาที เป็น 30 และ 120 นาที ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวที่ปนเปื้อนในทุกระดับ แต่จะมีผลทำให้ปริมาณโทรโปไมโอซินยังคงตกค้างบนพื้นผิวในปริมาณที่สูงเมื่อมีกระบวนการลวกด้วยน้ำร้อนร่วมกับการล้างทำความสะอาดพื้นผิว ซึ่งจากการทดลองพบว่ามีปริมาณโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกสูงขึ้นเป็นประมาณ 28.80-28.96 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร หรือคิดเป็นประมาณ 220% เมื่อเทียบกับปริมาณตกค้างบนพื้นผิวที่มีการล้างทำความสะอาดทันทีซึ่งมีโทรโปไมโอซินที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกเท่ากับ 13.77 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร โดยคิดเป็น 100% (ภาพที่ 4.5)

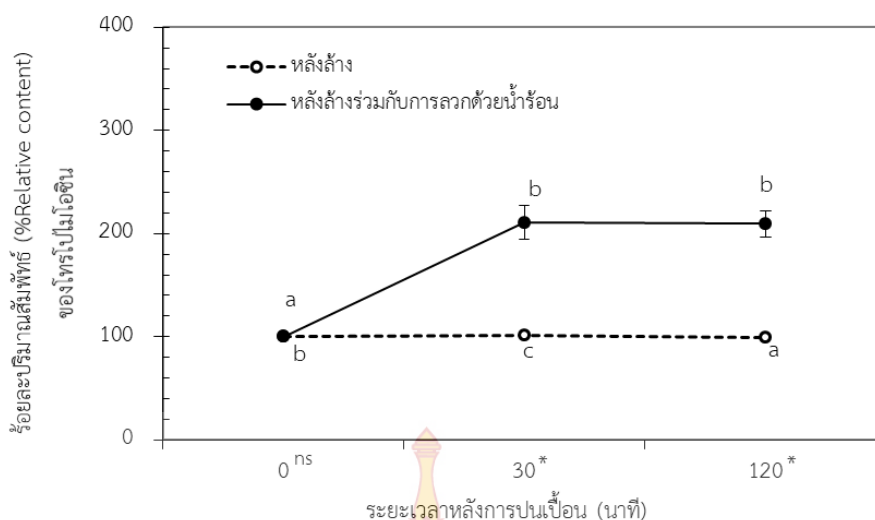
ตารางที่ 4.6 ปริมาณโทรโปไมโอซินจากกุ้งขาวที่ตกค้างบนพื้นผิวพลาสติกหลังผ่านการล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

ระยะเวลา หลังการปนเปื้อน (นาที)	ปริมาณโทรโปไมโอซิน (ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร)	
	หลังล้าง	หลังล้างร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน
0 ^{ns}	28.92 ± 0.14^a	13.77 ± 0.87^b
30 ^{ns}	29.26 ± 0.16^a	28.96 ± 0.49^a
120 ^{ns}	28.80 ± 0.18^a	28.78 ± 0.11^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน (0 30 และ 120 นาที)

หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วย ns ในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\geq0.05$)



ภาพที่ 4.5 ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=2)

: ค่าที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาของ Hoffman *et al.* (1981) ที่รายงานว่า โทรโปไมโอซินเป็นโปรตีนไมโอไฟบิลลาร์ ที่มีความคงความร้อนสูงทำหน้าที่เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญจากสัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง ความเสถียรของโทรโปไมโอซินยังได้รับการยืนยันโดย Liu *et al.* (2018) จากสารสกัดครัสเตเชียนที่ผ่านการต้ม นึ่ง และผ่านแรงดันสูง แสดงแถบโปรตีนหลักใกล้เคียง 38 กิโลดาลตัน และแถบรองใกล้เคียง 21 กิโลดาลตัน จากการศึกษาของ Jinlong *et al.* (2022) แสดงให้เห็นว่าโทรโปไมโอซิน (TM) จากกุ้งที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนนั้นมีศักยภาพในการทำให้เกิดอาการแพ้ที่สูงขึ้น ในทำนองเดียวกัน Liu *et al.* (2010) สังเกตว่ากิจกรรมการจับ IgE ของโทรโปไมโอซินจากกุ้งต้ม (*Litopenaeus vannamei*) นั้นแข็งแกร่งกว่าโทรโปไมโอซินจากกุ้งดิบ โทรโปไมโอซินที่ผ่านกระบวนการอาจมีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนระหว่างกระบวนการให้ความร้อน ซึ่งอาจทำให้สามารถเข้าถึงได้มากขึ้นที่พื้นผิวนำไปสู่การจับ IgE ที่เพิ่มขึ้นของโทรโปไมโอซิน (Lasekan & Nayak, 2016)

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุปผล

5.1.1 โทโรโปไมโอซินเป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่พบทั้งในเนื้อกุ้งขาวสดและบนพื้นผิวพลาสติกพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDPE) ที่มีการปนเปื้อนจากเนื้อกุ้งมีสัดส่วนปริมาณที่เป็นสาเหตุของการแพ้ที่พบสูงสุดเมื่อเทียบกับโปรตีนอื่นในกลุ่มสารก่อภูมิแพ้ โทโรโปไมโอซินจึงเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักในกุ้งขาว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37 กิโลดาลตัน

5.1.1 การล้างทำความสะอาดพื้นผิวพลาสติกที่ปนเปื้อนสารก่อภูมิแพ้จากกุ้งขาวในการศึกษานี้ คือ การล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีคลอรีนเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้ความเร็วรอบในการปั่นล้าง 200 รอบ/นาที เวลาในการล้างเท่ากับ 5 นาที จะทำให้มีปริมาณโทโรโปไมโอซินตกค้างน้อยที่สุดเท่ากับ 9.52 ± 0.07 ไมโครกรัมต่อพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร โดยที่ปริมาณโปรตีนจากกุ้งที่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ได้นั้นจะมีปริมาณอ้างอิงอยู่ที่ 10 มิลลิกรัม

5.1.3 ในส่วนของผลประสิทธิภาพในการล้างทำความสะอาดพื้นผิวที่ปนเปื้อนด้วยโทโรโปไมโอซินซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้หลักในกุ้งขาว โดยใช้สภาวะการล้างที่เหมาะสมในขณะที่ปล่อยให้พื้นผิวสัมผัสแห้งเป็นเวลา 30 และ 120 นาที หลังจากการปนเปื้อนส่งผลให้ประสิทธิภาพการล้างลดลงตามระยะเวลาหลังการปนเปื้อน แต่ในกระบวนการล้างทำความสะอาดที่รวมกับการลวกด้วยน้ำร้อนมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการล้างโปรตีนชนิดโทโรโปไมโอซินเพิ่มขึ้นเฉพาะกรณีที่ดำเนินการล้างในทันทีหลังการปนเปื้อน (0 นาที)

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 หากมีการศึกษาเพิ่มเติมผู้วิจัยควรทำการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณที่แน่นอนเท่ากันทุกตัวอย่างเพื่อลดค่าความคลาดเคลื่อนในการเตรียมตัวอย่างโดยการใช้สารละลายของโปรตีนในปริมาณที่เท่ากันทุกแผ่น

5.2.2 ผู้ที่สนใจสามารถนำวิธีการล้างทำความสะอาดที่ได้รับจากการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้กับกระบวนการฆ่าเชื้ออุปกรณ์และเครื่องมือได้

5.2.3 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาดโดยวิธีการอื่น ๆ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง

บรรณานุกรม

- จิตรลดา ศรีตระกูล และพัชรินทร์ ลังกาปอน. (2563). **สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ปี 2563**. กลุ่มเศรษฐกิจการประมง, กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง, กรมประมง. 14 หน้า.
- ชลอ ลีมสุวรรณ และพรเลิศ จันทรรักษ์กุล. (2547). **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. บริษัทเมจิคพับลิเคชั่นจำกัด, กรุงเทพฯ. 206 หน้า.
- ตรี วาทกิจ, ณรงค์ วงศ์เณร และ กฤติกา ชูณหวีจิตรา. (2561). **ผลของวิธีการล้างที่แตกต่างกันต่อจำนวนจุลินทรีย์บนพื้นผิวถังนมในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำนม**. คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม.
- ทวีศักดิ์ สีดลรัศมี. (2545). **การสุขาภิบาลในอุตสาหกรรมอาหาร ใน เอกสารชุดวิชาการถนอมและการแปรรูปอาหาร หน่วยที่ 8-15**. พิมพ์ครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, นนทบุรี.
- นวลใย ญารักษา, ชัดชัย แก้วตา, ศุภาวีร์ มากดี และ ชีระ สารพันธ์. (2564). **ประสิทธิภาพของน้ำอิลีโทรไลต์ชนิดกรดในการฆ่าเชื้อโรค**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- ประภาศรี กุลาเลิศ และ สิริระ นันทพิศาล. (2562). **การแพ้งุ้ง**. ภาควิชาภูมิมาตรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- วิภา สุโรจนะเมธากุล. (2554). **สารก่อภูมิแพ้อาหาร**. วารสารอาหาร ปีที่ 41 ฉบับที่ 3, หน้า 211-216.
- วิภา สุโรจนะเมธากุล. (2559). **การพัฒนาโปรแกรมการควบคุมสารก่อภูมิแพ้อาหาร**. วารสารอาหาร ปีที่ 46, ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม-กันยายน 2559), หน้า 21-28.
- วิศณี สุพรรณกลาง, อพัชชา จินดาประเสริฐ, วริฬสย อารีกุล, อติสร เสวตวิวัฒน์ และ ประภาพร ขอไพบูลย์. (2562). **ในการประชุมการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “วลัยลักษณ์วิจัย” ครั้งที่ 11, 27-28 มีนาคม 2562**, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, สงขลา.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. **เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ**. โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.
- ศรัญญา วอขวา. (2560). **เอกสารประกอบการสอน วิชาสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร**. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- ศิวาพร ศิวเวช. (2542). **การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 5. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- สุรีย์ นานาสมบัติ. (2539). **เทคโนโลยีของนมและผลิตภัณฑ์นม**. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

- สุวิมล กิริติพิบูลย์. (2544). **GMP ระบบการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย.**
สำนักพิมพ์ ส.ส.ท. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น. กรุงเทพมหานคร.
- สุวิมล กิริติพิบูลย์. (2545). **การควบคุมจุลินทรีย์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.** สำนักพิมพ์ ส.ส.ท.
สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยีไทย-ญี่ปุ่น. กรุงเทพมหานคร.
- อัจฉรา แสนคม, น้ำทิพย์ ชันตยาภรณ์ และ วราภา มหากาญจนกล. (มปป.) **การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อกลุ่มออกซิไดส์ซึ่งเพื่ลดจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.** สาขาอุตสาหกรรม
เกษตร. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. (หน้า 408-416).
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- Abdel Rahman, A. M., Kamath, S., Lopata, A. L., & Helleur, R. J. (2010). Analysis of the
allergenic proteins in black tiger prawn (*Penaeus monodon*) and
characterization of the major allergen tropomyosin using mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry 24(16), 2462–2470.
- Abdel Rahman, A. M., Lopata, A. L., Randell, E. W., & Helleur, R. J. (2010). Absolute
quantification method and validation of airborne snow crab allergen
tropomyosin using tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**
681(1–2), 49–55.
- Akimoto, S., Yokooji, T., Ogino, R. et al. (2021) Identification of allergens for food-
dependent exercise-induced anaphylaxis to shrimp. **Scientific reports** 11, 5400.
- Ayuso, R., Grishina, G., Bardina, L., Carrilo, T., Blanco, C., Ibanez, M.D., Sampson, H.A. &
Beyer, K. (2008). Myosin Light Chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. **The
Journal of Allergy and Clinical Immunology** 122, 795-802.
- Ayuso, R., Grishina, G., Ibanez, M.D., Blanco, C., Carrilo, T., Bencharitiwong, R., Sanchez,
S., Nowak-Wegrzyn, A. & Sampson, H.A. (2009). Sarcoplasmic calcium binding
protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. **The
Journal of Allergy and Clinical Immunology** 124, 114-120.
- Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., & Lehrer, S. B. (2002). Molecular basis
of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp,
house dust mite and cockroach tropomyosins. **International Archives of
Allergy and Immunology**, 129(1), 38–48.

- Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. Sweden: LP Gafiska AB. Cords, B. R. & G. R. Dychdala. 1993. Sanitizer : halogens, surface-active agents, and peroxides, pp. 469-537. In P. M. Davidson & A. L. Branen (eds.). Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, New York.
- Cords, B. R. & G. R. Dychdala. (1993). Sanitizer : halogens, surface-active agents, and peroxides, pp. 469-537. In P. M. Davidson & A. L. Branen (eds.). Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, New York.
- Daul, C. B., Slattery, M., Reese, G., & Lehrer, S. B. (1994). Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. **International Archives of Allergy and Immunology**, 105(1), 49–55.
- Gamez, C., Sanchez-Garci, S., Ibanez, M.D., Lopez, R., Aguado, E., Lopez, E., Sastre, B., Sastre, J. & Pozo, V.D. (2011). Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology** 66, 1375-1383.
- García-Orozco, K.D., Aispuro-Hernández, E., Yepiz Plascencia, G., Calderón-de-la Barca, A. & Sotelo-Mundo, R. (2007). Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **International Archives of Allergy and Immunology** 144, 23-28.
- Gattens, R. T. T., & Gilbert, J. L. (2006). Quantification of fibrinogen adsorption onto 316L stainless steel. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 81A(2), 465–473.
- Gibson D. M. (1995). Hygiene and Safety of Seafood. In Fish and Fisheries Products. **CAB International**, pp. 243-260.
- Hoffman, D., Day Jr, E. & Miller, J. (1981). The major heat stable allergen of shrimp. **Annals of Allergy** 47, 17-22.
- Holah, J.T. (2014). Cleaning and disinfection practices in food processing. In: Lelieveld, H.L.M, Holah, J., & Napper, D. Hygiene in Food Processing, 2nd ed. Woodhead publishing Limited, Cambridge, p. 259-304.
- Jeurnink, T. J. M., & Brinkman, D. W. (1994). The cleaning of heat exchangers and evaporators after processing milk or whey. **International Dairy Journal**, 4, 347–368.

- Jinlong Zhao, Yonghong Li, Lili Xu, Vaileth Timira, Ziye Zhang, Guanzhi Chen, Lijing Zhang, Hong Lin, Zhenxing Li. (2022). Improved protein extraction from thermally processed shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for reliable immunodetection via a synergistic effect of buffer additives. **College of Food Science and Engineering**, 154, 1-9.
- Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., & De Pauw, E. (2009). Quantitative methods for food allergens: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 395, 57–67.
- Kirwan M.J. & Strawbridge, J.W. (2003). Plastics in food packaging. In: **Giles, G.A. Food packaging technology**, pp. 174-240.
- Lasekan, A. O., & Nayak, B. (2016). Effects of buffer additives and thermal processing methods on the solubility of shrimp (*Penaeus monodon*) proteins and the immunoreactivity of its major allergen. **Food Chemistry**, 200, 146–153.
- Leung, N. Y., Wai, C. Y., Shu, S., Wang, J., Kenny, T. P., Chu, K. H., & Leung, P. S. (2014). Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: A comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 46, 180-197.
- Leung, P.S.C., Chow, W.K., Duffey, S., Kwan, H.S., Gershwin, M.E. & Chu, K.H. (1996). IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacean and mollusca: evidence from tropomyosin as the common allergen. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology** 98, 954-961.
- Lewan, M., & Partington, E. (2014). 5 - Food processing equipment construction materials. In: Lelieveld, HLM, Holah JT, and Napper D, Hygiene in Food Processing, 2nd ed. Woodhead Publishing, Cambridge. p. 142-154.
- Liu, G., Cheng, H., Nesbit, J. B., Su, W. J., Cao, M. J., & Maleki, S. J. (2010). Effects of boiling on the IgE-binding properties of tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Food Science**, 75(1), T1–T5.
- Liu, M., Liu, G. Y., Yang, Y., Mei, X. J., Yang, H., Li, Y., & Liu, G. M. (2018). Thermal processing influences the digestibility and immunoreactivity of muscle proteins of *Scylla paramamosain*. **LWT-Food Science and Technology**, 98, 559–567.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275.
- Margaret, P. M., Jinap, S., & Faizal, A. A. (2015). Allergens derived from shrimp. **International Food Research Journal**, 22(5), 1751-1754.
- Miyazaki, J.I., Makioka, T., Fujiwara, Y. & Hirabayashi, T. (1992). Tissue specificity of crustacean tropomyosin. **Journal of Experimental Zoology** 263, 235–244.
- Monaci, L., & Visconti, A. (2009). Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28, 581–591.
- Motoyama, K., Suma, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (2007). Molecular cloning of tropomyosin identified as allergens in six species of crustaceans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 55, 985- 991.
- Nagata, A., Sakiyama, T., Itoh, H., Toyomasu, T., Enomoto, E., Nagai, T., *et al.* (1995). Comparative study on caustic and enzymatic cleanings of stainless steel surface fouled with b-lactoglobulin. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 59(12), 2277–2281.
- Nicos, N., & Scott, S. (2010). Entrepreneurship and occupational choice: Genetic and environmental influences. **Journal of Economic Behavior & Organization** 76, 3–14.
- Ozawa, H., Yamamura, A., Kimijima, T. *et al.* (2020). Elimination of the major allergen tropomyosin from shrimp muscle by boiling treatment. **Fishery Sciences**, 86, 197–202.
- Pereira, C. I., M. T. BarretoCrespo & M. V. San Romao. (2001). Evidence for Proteolytic Activity and Biogenic Amines Production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. Journal Food Microbiol.* 68: 211-216.
- Perez Farfante, I. & Kenslep, B. (1997). Penaeid and Sergestoid Shrimp and Prewns of the World. Key and Diagnoses for the Families and General. *Memories du Museum Nation D’Histoire Naturelle*, Paris, France.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: A review. **Food Additives and Contaminants**, 21, 1–31.

- Reese, G., Jeoung, B., Daul, C. & Lehrer, S. (1997). Characterization of recombinant shrimp allergen pen a 1 (tropomyosin). **International Archives of Allergy and Immunology** 113, 240-242.
- Sakiyama, T., Toyomasu, T., Nagata, A., Imamura, K., Nakanishi, K., Takahashi, T., et al. (1998). Fouling and cleaning of stainless steel surface: Adsorption and desorption of bovine serum albumin and gelatin. **Journal of Chemical Engineering of Japan** 31(2), 208–213.
- Santos, M. H. S. (1996). Biogenic Amines: Their Importance in Foods. Int. **Journal Food Microbiol.** 29: 213-231.
- Schmidt, R.H. (1997). Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS.
- Shanti, K., Martin, B., Nagpal, S., Metcalfe, D. & Rao, P. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. **The Journal of Immunology** 150, 153-159.
- Sikorski, Z. E., Kołakowska, A., & Pan, B. S. (2020). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In *Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation* (pp. 29-54). CRC Press.
- Sriket, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kijroongrojana, K. (2007). Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. **Food chemistry**, 103(4), 1199-1207.
- Steve L. Taylor, Joseph L. Baumert, Astrid G. Kruizinga, Benjamin. Remington, Rene W.R. Crevel, Simon Brooke-Taylor, Katrina J. Allen. (2013). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. **The Allergen Bureau of Australia & New Zealand** 63, 9-17.
- Surojanametakul, V., Khaiprapai, P., Jithan, P., Varayanond, W., Shoji M., Ito, T., & Tamura, H. (2012). Investigation of undeclared food allergens in commercial Thai food products. **Food Control** 23, 1-6.
- Vishweshwar, N., & Krishnaiah, N. (2005). Quality control of milk and processing. India: Sindoor Graphics.

- Watson, W.T., Woodrow, A. & Stadnyk, A.W. (2015). Removal of peanut allergen Ara h 1 from common hospital surfaces, toys and books using standard cleaning methods. **Allergy and Clinical Immunology** 11, 4.
- Woo, C.K. & Bahna, S.M. (2011). Not all shellfish “allergy” is allergy!. **Clinical Translational Allergy** 1: 1-7.
- Wu, T. C., Tsai, T. C., Huang, C. F., Chang, F. Y., Lin, C. C., Huang, I. F. & Tang, R. B. (2012). Prevalence of food allergy in taiwan: A questionnaire-based survey. **Internal Medicine Journal** 42(12), 1310–1315.
- Xiaomeng Han, Zhiwei Wang, Xueye Wang, Xiang Zheng, Jinxing Ma, Zhichao Wu. (2015). Microbial responses to membrane cleaning using sodium hypochlorite in membrane bioreactors: Cell integrity, key enzymes and intracellular reactive oxygen species. **Water research** 88, 293-300.
- Yao, C. L., Wua, C. G., Xiang, J. H. & Dong, B. (2005). Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology** 19, 317-329.
- Yeal (2009). Effect of cleaning protocols on the removal of milk, egg, and peanut allergens from abraded and unabraded stainless steel surface. Gainesville, Fla: University of Florida.
- Yu, C.J., Lin, Y.F., Chiang, B.L. & Chow, L.P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. **The Journal of Immunology** 170, 445-453.
- Zailatul, H.M.Y., Rosmilah, M., Noormalin, A., Faizal, B., Masita, A. & Shahnaz, M. (2012). Identification of the major allergen of (*Macrobrachium rosenbergii*) giant freshwater prawn. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 2, 50-54.
- Zeng, L., Song, S. S., Zheng, Q. K., Luo, P. J., Wu, X. L., & Kuang, H. (2019). Development of a sandwich ELISA and immunochromatographic strip for the detection of shrimp tropomyosin. **Food and Agricultural Immunology**, 30(1), 606–619.
- Zhang, J. (2018). Effect of rinsing-, washing-time and water temperature on removal of peanut allergen from dairy processing equipment. United Kingdom: University of Southampton.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry Method)



ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry Method)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 1.1 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง
- 1.2 ปีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 1.3 ปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน
- 1.5 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 สารละลายผสมที่เตรียมทันทีก่อนใช้เป็นสารละลายผสมของสาร A : B : C ในอัตราส่วน- 100 : 1 : 1 มิลลิลิตร โดยสารละลาย A คือ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2% (Na_2CO_3 , น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ละลายในน้ำกลั่น ส่วนสารละลาย B คือ สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 1% ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ละลายในน้ำกลั่น และสารละลาย C คือ สารละลายโซเดียมโพตัสเซียมเตตระโบรไมด์ความเข้มข้น 2% (Na_2CO_3 , น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ละลายในน้ำกลั่น

2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (2N NaOH)

2.3 สารละลายโฟลีน (Folin reagent) โดยใช้ความเข้มข้น 1N หรือเดิมใช้สารละลายโซเดียมทังสเตมและโซเดียมโมลิบเดตในกรดฟอสฟอริกและกรดไฮโดรคลอริกให้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2.4 สารละลายมาตรฐานเตรียมได้จากสารละลายมาตรฐานของโปรตีน เช่น bovine serum albumen เป็นต้น ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในน้ำกลั่น ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

3. วิธีการหาโปรตีนโดยใช้วิธีลาวรี (Lowry Method) ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

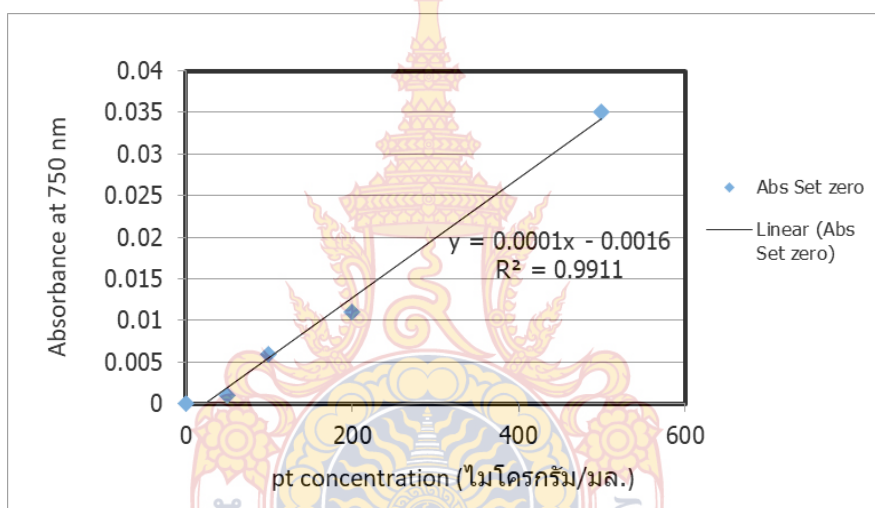
3.1 ตัวอย่างอาหารหรือสารละลายมาตรฐานปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2N ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการไฮโดรไลส์ตัวอย่าง

3.2 ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลายผสมที่เตรียมขึ้นมาใหม่ ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปลอ่ยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.3 เติมสารละลายโพลินปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องผสมแบบเวอร์เทกซ์และปลอ่ยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30-60 นาที (ไม่ควรเกินเวลาที่กำหนดไว้)

3.4 อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนน้อยกว่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 100-2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.5 วาดกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานและใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง



ภาพผนวก ก1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณโทรโปไมโอซินด้วยวิธีอีไลซา (ELISA)



ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณโทรโปไมโอซินด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA)

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 1.1 เครื่องอ่านไมโครเพลทสตริป
- 1.2 เครื่องผสมสารละลาย
- 1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน
- 1.4 เครื่องบดตัวอย่างหรือโฮมจีไนเซอร์
- 1.5 เครื่องชั่งตวงน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง
- 1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- 1.7 ปีเปตชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 1.8 ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิตร
- 1.9 หลอดทดลอง
- 1.10 นาฬิกาจับเวลา

2. ขั้นตอนการเตรียมสารและตัวอย่าง

2.1 การเตรียม Allergen Extraction Buffer (ใช้สำหรับสกัดตัวอย่าง)

สารละลายนี้มีความเข้มข้น 10 เท่า ก่อนใช้งานจะต้องละลายตะกอนโดยอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เมื่อนำมาใช้งาน เจือจาง 10 เท่า (สารละลาย 1 ส่วน : น้ำกลั่น 9 ส่วน เช่น ปีเปตสารละลาย Allergen Extraction Buffer 10 เท่า มา 100 มิลลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 900 มิลลิตร) แล้วนำไปอุ่นอีกครั้งใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารละลายที่เจือจางแล้วจะมีอายุการใช้งาน 12 สัปดาห์ โดยเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส สารละลายนี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

2.2 การเตรียม Washing buffer (ใช้สำหรับล้าง)

สารละลายนี้มีความเข้มข้น 10 เท่า ก่อนใช้งานจะต้องละลายตะกอนโดยอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เมื่อนำมาใช้งาน ทำให้เจือจาง 10 เท่า (นำสารละลาย 1 ส่วน + น้ำกลั่น 9 ส่วน เช่น ปีเปตสารละลาย Buffer 10 เท่า มา 100 มิลลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 900 มิลลิตร) สารละลายที่เจือจางแล้วมีอายุการใช้งาน 4 สัปดาห์ เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ในเนื้อกุ้ง

- 2.3.1 ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในหลอด Centrifuge
- 2.3.2 เติม Allergen Extraction Buffer ที่เจือจางซึ่งได้อุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C มาแล้ว 20 มิลลิลิตร ปิดฝาผสมตัวอย่างให้เข้ากัน
- 2.3.3 บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 10 นาที
- 2.3.4 นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 2.3.5 Centrifuge ที่ 2,500 g น้ำหนักที่เกิดจากแรงโน้มถ่วงของโลก ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที (แนะนำให้ Centrifuge ที่ 4 °C) และกรองด้วยกระดาษกรอง
- 2.3.6 ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดสอบอันใหม่
- 2.3.7 ปิเปตส่วนใสมา 100 ไมโครลิตร ลงหลุมสำหรับวิเคราะห์ ELISA
- 2.4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์บนพื้นผิว
 - 2.4.1 ตัดก้าน Cotton Swab ที่อยู่ในหลอดทดลองทิ้งหลังจากเก็บตัวอย่างมาแล้ว
 - 2.4.2 อุ่น Diluted Allergen Extraction Buffer 60 °C แล้วเติม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
 - 2.4.3 นำไป Vortex 30 วินาที หรือ เขย่า 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
 - 2.4.4 ใช้ 100 ไมโครลิตร ลงหลุมสำหรับวิเคราะห์ Elisa แล้วทำตามขั้นตอนวิเคราะห์ ELISA ต่อไป (factor swab สำหรับ Allergen Crustaceans เท่ากับหาร 20)

3. วิธีการทดสอบวิธี ELISA

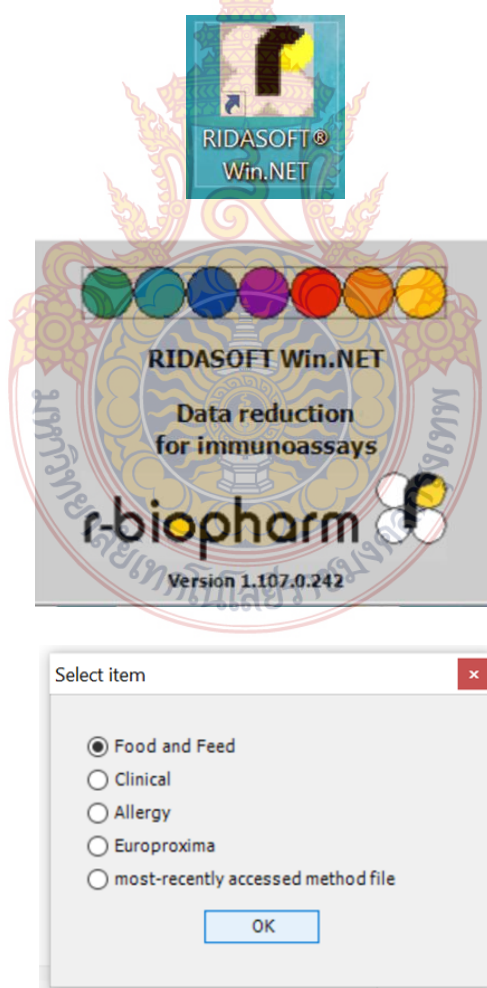
- 3.1 ก่อนใช้งานนำชุดทดสอบออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอุณหภูมิของชุดทดสอบเท่ากับอุณหภูมิห้อง (นำสารเคมีที่มากับชุดทดสอบวางไว้ด้านนอกกล่องประมาณ 20-30 นาที ก่อนทำการทดสอบ)
- 3.2 นำ microtiter well ใส่ใน microwell holder ตามจำนวนที่ต้องการใช้ทดสอบ ส่วน microtiter wells ที่ไม่ได้ใช้เก็บในถุง foil ที่มีสารดูดความชื้นและปิดช่องให้สนิทนำไปเก็บในตู้เย็น
- 3.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน microtiter wells ที่กำหนด (ควรทำ duplicate)
- 3.4 เคาะ plate เบา ๆ บ่มในที่มืดนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 3.5 เทน้ำออกเคาะบนกระดาษซับจนแน่ใจว่าไม่มีน้ำยาเหลืออยู่ในแต่ละหลุม ล้าง plate ด้วย diluted washing buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เคาะบนกระดาษซับไม่ให้มีหยดน้ำเกาะติดอยู่ในแต่ละหลุม
- 3.6 ปิเปต enzyme conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เคาะ plate เบา ๆ บ่มในที่มืดนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.7 เทน้ำออกเคาะบนกระดาดาชับจนแน่ใจว่าไม่มีน้ำยาเหลืออยู่ในแต่ละหลุมล่าง plate ด้วย diluted washing buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เคาะบนกระดาดาชับไม่ให้มีหยดน้ำเกาะติดอยู่ในแต่ละหลุม

3.8 เติม substrate/chromogen 100 ไมโครลิตร เคาะ plate เบา ๆ บ่มในที่มืดนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.9 ปิด Stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในตะหลุมเคาะ plate เบา ๆ

3.10 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (ควรอ่านค่าภายใน 10 นาที หลังการเติม Stop Solution) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณปริมาณโทรโปไมโอซินโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net (บริษัท อาร์-ไบโอฟาร์ม, ประเทศเยอรมนี) ดังภาพผนวก ค1 สำหรับวิเคราะห์ผลการทดสอบปริมาณโทรโปไมโอซิน ดังภาพผนวก ค2



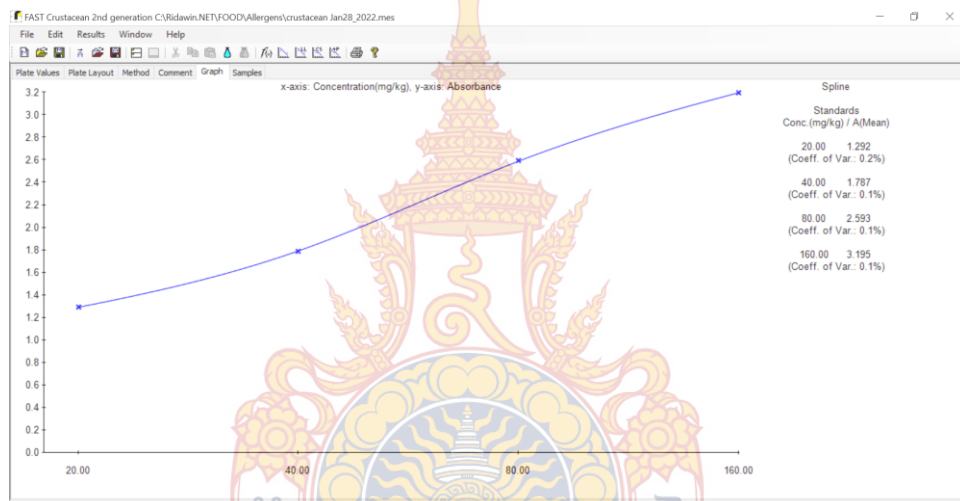
ภาพผนวก ข1 โปรแกรมสำเร็จรูป Radasoft Win.net (บริษัท อาร์-ไบโอฟาร์ม, ประเทศเยอรมนี)

FAST Crustacean 2nd generation C:\Ridawin.NET\FOOD\Allergens\crustacean Jan28_2022.mes

File Edit Results Window Help

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std5	P4	P8	BLK	BLK	BLK	BLK	Std1	BLK	BLK	BLK
B	Std1	Std5	P4	P8	BLK	BLK	BLK	BLK	Std2	BLK	BLK	BLK
C	Std2	P1	P5	P9	BLK	BLK	BLK	BLK	Std3	BLK	BLK	BLK
D	Std3	P1	P5	P9	BLK	BLK	BLK	BLK	Std4	BLK	BLK	BLK
E	Std3	P2	P6	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	Std5	BLK	BLK	BLK
F	Std3	P2	P6	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	P	BLK	BLK	BLK
G	Std4	P3	P7	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	Auto	BLK	BLK	BLK
H	Std4	P3	P7	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.518E	3.196E	0.767E	1.063E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.518E	3.193E	0.766E	1.062E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	1.293E	2.963E	0.701E	2.629E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	1.290E	2.962E	0.700E	2.628E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	1.788E	2.820E	0.739E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	1.788E	2.819E	0.738E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	2.594E	2.099E	1.474E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	2.594E	2.098E	1.473E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



FAST Crustacean 2nd generation C:\Ridawin.NET\FOOD\Allergens\crustacean Jan28_2022.mes

File Edit Results Window Help

Plate Values Plate Layout Method Comment Graph Samples

Ser. No.	Concentration mg/kg	Absorbance (Mean) (CV)	B/Bmax (%)
1	0.00	0.518E 0.4	16.2
2	20.00	1.292E 0.2	40.4
3	40.00	1.787E 0.1	55.9
4	80.00	2.593E 0.1	81.2
5	160.00	3.195E 0.1	100.0

Ser. No.	ID	Absorbance (Mean) (CV) (%)	Samples calculated mg/kg	*	=	mg/kg
1		2.963E 0.0 92.7	118.75	1.00		118.75
2		2.820E 0.0 88.3	100.86	1.00		100.86
3		2.099E 0.0 65.7	52.77	1.00		52.77
4		0.766E 0.1 24.0	4.91 **	1.00		4.91 *
5		0.700E 0.1 21.9	3.47 **	1.00		3.47 *
6		0.738E 0.1 23.1	4.29 **	1.00		4.29 *
7		1.474E 0.0 46.1	27.10	1.00		27.10
8		1.063E 0.1 33.3	12.65 **	1.00		12.65 *
9		2.629E 0.0 82.2	82.77	1.00		82.77

**The result is extrapolated. The concentration should be reported as < LOQ (limit of quantitation) or > Standard 5/6.
A polynomial function 2nd order was used to estimate concentrations of samples below the LOQ (Standard 2).
Cubic spline curve fitting was used for result calculation above the LOQ.

ภาพผนวก ข2 การคำนวณปริมาณโทรโปไมโอซินโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยโปรแกรม
สำร็จรูป Radasoft Win.net

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 เครื่องแยกโมเลกุลโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 1.2 ปีเปตชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 1.4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.5 ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.6 หลอดทดลอง
- 1.7 หลอดหยด
- 1.8 แผ่นกรองสาร
- 1.9 ขวดสำหรับเตรียมสารเคมี
- 1.10 กล่องพลาสติกสำหรับย้อมเจล

2. วิธีการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1 เตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคโพลีอะคริลไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชนิดมีเอสดีเอส (SDS-PAGE) โดยนำกระจกของชุดอุปกรณ์สำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสมาเช็ดทำความสะอาด สะอาดแผ่นกระจก (glass plates) ที่วาง (casting stand) และกรอบวาง (casting frames) ด้วย แอลกอฮอล์ 70% ให้สะอาดและแห้งก่อนทำการประกบแผ่นกระจก 2 แผ่น เข้าด้วยกันประกอบเข้ากับตัวยี่ดวงลงใน Casting Frame โดยวางแผ่นสั้น (Short Plate) ไว้ด้านหน้า Casting Frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว จากนั้นค่อย ๆ กดล็อก ด้วย Pressure Cams ด้วยความระมัดระวังเพราะกระจกอาจแตกจากการประกบไม่เข้ารูปควรเช็คการรั่วของแผ่นกระจก โดยใช้น้ำกลั่นทดสอบการรั่วของแผ่นกระจก

2.2 หลังจากนั้นเตรียมส่วน Separating gel ซึ่งประกอบด้วย distilled water, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 40% acrylamide-bis ก่อนเติม 10% ammonium persulfate (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และ TEMED เติม ammonium persulfate และ TEMED ผสมให้เข้ากันเบาๆ ดูดสารละลายใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกระวังอย่าให้มีฟองอากาศจนกระทั่งมีความสูงเท่ากับ ระยะที่ ทำเครื่องหมายไว้สำหรับส่วน separating gel ถ้า separating gel มีความสูงของ polyacrylamide gel เท่ากับระยะที่ทำเครื่องหมายไว้เติมน้ำกลั่น (distilled water) เบาๆ บน

ผิวหน้าเจลเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาที เทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าของเจลทิ้ง สังเกตที่ผิวหน้าเจลจะเรียบสม่ำเสมอ

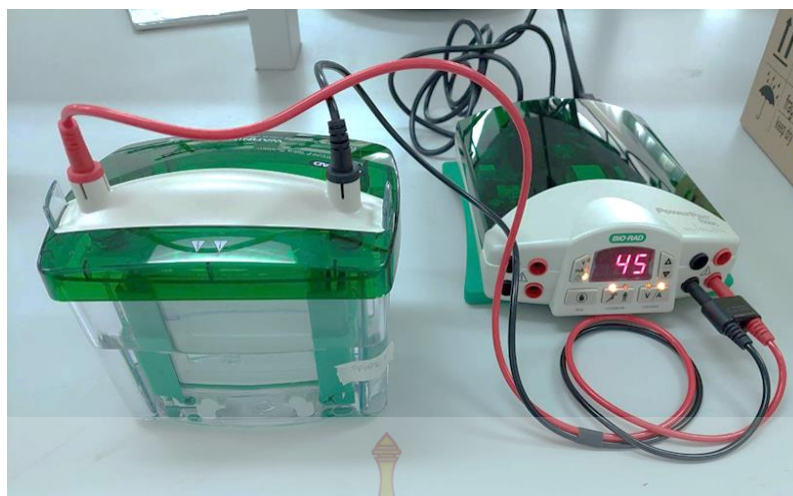
2.3 ดูดสารละลายเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ส่วน stacking gel ลงใน ปีกเกอร์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 40% acrylamide-bis ก่อนเติมสารละลาย 10% ammonium persulfate (ควรเตรียมใหม่เสมอ) และ TEMED หลังจากใส่ polyacrylamide gel ในส่วน stacking gel ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก จนกระทั่งท่วมฟันของ comb โดยวาง comb ให้ตรงอย่าให้มีฟองอากาศตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (polymerize) ประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึง comb ออกอย่างช้า ๆ

2.4 ล้างช่องใส่ตัวอย่างโปรตีนด้วยน้ำกลั่นหรือ running buffer สามารถวางแผ่นกระจกพักไว้ที่ stand ก่อนได้ในกรณีทำเจลหลายแผ่น

2.5 นำ Gel Cassette Assemblies ออกจาก Casting Stand แล้วนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly โดยหันด้าน Short Plate ของ Gel Cassette Sandwich เข้าด้านในตรงส่วนของ U-shaped Gaskets หลังจากนั้นนำ gel cassette sandwiches และ electrode assembly เลื่อนใส่ เข้าไปใน clamping frame กด electrode assembly ลงใน clamping frame พร้อมทั้งกดล็อก ด้วย cam levers เพื่อประกอบเป็นส่วน inner chamber นำส่วน Inner Chamber เข้าไปข้างใน ส่วน Mini Tank

2.6 เท running buffer ลงใน upper buffer chamber ประมาณ 125 มิลลิลิตร จนกระทั่งถึง ระดับกึ่งกลางแผ่นกระจกและเท running buffer ประมาณ 200 มิลลิลิตร ลงใน lower buffer chamber ของ Mini Tank ใส่ฟองอากาศออกให้หมดแล้วนำ Sample Loading Guide วางระหว่าง เจลทั้งสองในส่วนของ Electrode Assembly เพื่อรอการใส่สารละลายตัวอย่างต่อไป

2.7 ดูดสารละลายตัวอย่างประมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงใน sample well ที่มี running buffer ท่วมอยู่ (โปรตีนในสารละลายมีปริมาณเท่า ๆ กัน) หลังจากนั้นปิดฝา Lid บน Mini Tank ต่อ สายขั้วไฟฟ้าให้สีตรงส่วนของ Banana Plugs และ Jacks ให้ถูกต้องเปิดเครื่อง power supply กำหนดการทำ SDS-PAGE ที่ 150 โวลต์ 14 มิลลิแอมป์ ต่อ 2 เจล เวลา 25 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น 30 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วสังเกตสี tracking dye เริ่มเคลื่อนที่เป็นแถบสีน้ำเงินจากขั้วลบลงสู่ขั้วบวกสิ้นสุดการทำ electrophoresis เมื่อแถบของ tracking dye เคลื่อนที่ห่างจากปลายล่างของ gel ประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร (ภาพผนวก ก1)



ภาพผนวก ค1 ชุดวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.8 นำเจลออกจาก Gel Cassette Sandwich จากนั้นนำแผ่น gel ออกจากแผ่นกระจกโดยใช้ plastic gel releaser ช่วยในการแยกแผ่นกระจกสองแผ่นออกจากกัน ตัดส่วน stacking gel ที่นำไปนำส่วน separating gel ไปตรึง (fixing) และย้อมสีด้วยสีย้อม Bromophenol blue นาน 30 นาที

2.9 เขย่าแผ่นเจลในน้ำยา Destained buffer และล้างสีย้อมออกจากแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ จนกว่าจะปรากฏแถบโปรตีนโดยส่วนอื่น ๆ ของแผ่นเจลจะใส จากนั้นทำการแพ็คแผ่นเจลเพื่อนำไปศึกษา

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนทั้งหมดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนรวมในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 1.1 เครื่องวัดคลอรีน Hanna รุ่น HI771 (0 ถึง 500 ppm)
- 1.2 ปีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 1.3 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- 1.4 ปีเปตชนิดปรับปริมาตรได้ ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์คลอรีน

2.1 ทำการเจือจาง Sodium hypochlorite ความเข้มข้นทางการค้า (4-6%) ประมาณ 2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 998 มิลลิลิตร

2.2 นำสารละลายผสมของ Sodium hypochlorite ใส่ในคิวเวทพร้อมฝาปิดแล้วนำไปรีเซ็ตเครื่องวัดคลอรีน

2.3 แล้วนำ reagent A และ reagent B ใส่ในคิวเวทในข้อ 2.2 แล้วนำไปใส่เครื่องวัดคลอรีน และอ่านค่าปริมาณคลอรีนทั้งหมดจากเครื่อง



เตรียมสารละลายที่ต้องการวัดคลอรีน



นำสารละลายใส่คิวเวทแล้วนำไปรีเซ็ตเครื่องวัดคลอรีน



นำ reagent A และ reagent B ใส่ในคิวเวท
แล้วนำไปใส่เครื่องวัดคลอรีน และอ่านค่าปริมาณคลอรีน



ภาคผนวก ง1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณคลอรีนรวม (Total chlorine)

ภาคผนวก จ
ข้อมูลผลการวิเคราะห์



ตารางผนวก จ1 ข้อมูลผลวิเคราะห์ความเข้ม (Intensity) ของแถบโปรตีน และร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโทรโปไมโอซินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกก่อนล้างทำความสะอาด

ระยะเวลาหลัง การปนเปื้อน (นาทีก)	พื้นที่ (Area) ของแถบโปรตีน โทรโปไมโอซิน		ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ ของโทรโปไมโอซิน		ค่าเฉลี่ย
					ร้อยละปริมาณ
	เจด แผ่นที่ 1	เจด แผ่นที่ 2	เจด แผ่นที่ 1	เจด แผ่นที่ 2	สัมพัทธ์ของโทรโปไม โอซิน
0	7,985.45	8,829.10	100.00	100.00	100.00±.00 ^a
30	9,588.86	9,914.30	120.08	112.29	116.19±5.51 ^b
120	10,207.93	9,906.83	127.83	112.21	120.02±11.05 ^b

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (0 30 และ 120 นาทีก) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางผนวก จ2 ข้อมูลร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมดที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

ระยะเวลาหลังการปนเปื้อน (นาทีก)	ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโปรตีนทั้งหมด	
	หลังล้าง	
	หลังล้าง	หลังล้างร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน
0 ^{ns}	100.00±.00 ^a	100.00±.00 ^a
30 ^{ns}	180.26±23.65 ^b	143.54±5.06 ^b
120 ^{ns}	210.76±14.69 ^b	267.23±2.28 ^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (0 30 และ 120 นาทีก) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วย ns และ * ในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\geq 0.05$) และค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางผนวก จ3 ข้อมูลร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโพรโปโมโนอินที่เกาะติดบนพื้นผิวพลาสติกหลังล้างทำความสะอาดและล้างทำความสะอาดร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน

ระยะเวลาหลังการปนเปื้อน (นาทิจ)	ร้อยละปริมาณสัมพัทธ์ (%Relative content) ของโพรโปโมโนอิน	
	หลังล้าง	หลังล้างร่วมกับการลวกด้วยน้ำร้อน
0 ^{ns}	100.00±0.00 ^b	100.00±0.00 ^a
30 [*]	101.15±0.08 ^c	210.86±16.88 ^b
120 [*]	99.57±0.15 ^a	209.44±12.41 ^b

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (0 30 และ 120 นาทิจ) หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วย ns ในแนวนอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\geq 0.05$)

