



รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับ
ห้องปฏิบัติการสู่กระบวนการผลิตนำร่องขนาดเล็ก

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Scaling up process of ready to use plara
starter from lab scale to trial model small-scale manufacture

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และคณะ
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15 ธันวาคม 2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับ
ห้องปฏิบัติการสู่กระบวนการผลิตนำร่องขนาดเล็ก

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Scaling up process of ready to use plara starter from
lab scale to trial model small-scale manufacture

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| 1. นางชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. นางเพ็ญพิมล จาตุรนต์รศมี | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. นายศานต์ เศรษฐชัยมงคล | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 4. นางสาววีรณัฐ หวันเสนา | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 5. นางสาวกมลวรรณ อ่อนรู้ที่ | คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

ชุดโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม” ปีงบประมาณ 2562

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย วช. - สกสว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าจากระดับห้องปฏิบัติการสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบขนาดเล็ก (ไม่เกิน 100 กิโลกรัม pilot scale) เพื่อสร้างกระบวนการผลิตระดับนำร่องสำหรับถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการที่ต้องการผลิตกล้าเชื้อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ งานวิจัยประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่ (1) การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบขนาดเล็ก (2) การจัดทำสถานที่ผลิตในระดับโรงงานต้นแบบที่เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร สำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ และ (3) การวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าที่ได้จากกล้าเชื้อดังกล่าว เพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้

สรุปผลการวิจัย

1. การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบขนาดเล็ก ครอบคลุม การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ น้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต การประเมินวิธีการเตรียมและกระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตระดับโรงงาน วิธีและสภาวะการขยายลำดับเชื้อระดับโรงงานขนาดเล็ก รวมถึงการผสม การทำแห้งการบรรจุ และการประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ ผลการวิจัยพบว่า

- วิธีการเตรียมน้ำสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเตรียมกล้าเชื้อในระดับโรงงานต้นแบบสามารถทำได้ 3 ตามทางเลือก คือ (i) การใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องผลิตโอโซน 500 mg/hr เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนใช้งาน (ii) น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน (สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์) ที่ระดับความเข้มข้น 2 ppm และทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง หรือให้มีคลอรีนเหลือไม่เกิน 0.1 ppm ก่อนใช้งาน (iii) น้ำดื่มบรรจุขวด เช่น น้ำดื่มตราสิงห์ น้ำดื่มตราเนสท์เล่ เปียวไลฟ์
- อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีการสัมผัสกับวัสดุที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อ จะต้องผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้น (moist heat) ด้วยความดันไอน้ำโดยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ และอบให้แห้งก่อนใช้งาน หรือการใช้รังสียูวีในช่วง UV-C ให้แสงความยาวช่วงคลื่น 254 nm โดยโรงงานต้นแบบได้ติดตั้งหลอดยูวี ให้มีความเข้มแสง 40 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ พื้นที่ผลิตเปิดครั้งละ 6 หลอด รวมเป็นกำลังไฟฟ้าทั้งหมด 216 วัตต์ หน่วยผลิตมีพื้นที่ทั้งหมด 48.75 ตารางเมตร คิดเป็น 4.43 วัตต์ ต่อ 1 ตาราง เมตร ใช้เวลา 20 นาที
- วัสดุอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดพื้นที่ผลิตต้นแบบสามารถใช้ถุงพลาสติกชนิด HDPE (TPC = non detected of spore) เป็นภาชนะชั้นที่ 1 ในการบรรจุกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 ลิตร ในระบบ static เพิ่มเวลาจากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจาก 48 เป็น 96 ชั่วโมง จึงจะได้จำนวนประชากรจุลินทรีย์สำหรับใช้เตรียมกล้าเชื้อแห้งเท่ากัน ถุงพลาสติกที่สัมผัสกับเชื้อจะถูกนำไปฆ่าเชื้อก่อนทิ้ง ส่วนอุปกรณ์อื่นๆจะไม่มีการสัมผัสกับเชื้อ แต่สามารถทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนแห้งโดยการใช้ alcohol flaming
- การประเมินสุขลักษณะการอบแห้งกล้าเชื้อ ในการอบแห้งใช้ถุงผ้าที่สามารถอบฆ่าเชื้อได้ สำหรับใช้ในการบรรจุราผสมเชื้อเพื่อป้องกันการกระจายของเชื้อ และถาดรองเชื้อมีการฆ่าเชื้อโดย alcohol flaming และ

ลมร้อนที่ปล่อยออกจากปลายตู้อบแห้ง มีการติดตั้ง HEPA filter และ ทำลายเชื้อปนเปื้อนตู้อบเชื้อโดยใช้ formaldehyde fuming พบว่ากระบวนการดังกล่าว กล้าเชื้อที่ผลิตได้มีอัตราการรอดชีวิต (100%) สูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการ (80%) เนื่องจากถุงผ้าที่ใช้ช่วยปกป้องเซลล์ในระหว่างการอบแห้งได้ส่วนหนึ่ง

- จัดทำแผนการผลิตประจำวัน ประกอบด้วย การเพาะเลี้ยงต้นเชื้อในอาหารสูตร A ในห้องปฏิบัติการ และเพาะเลี้ยงเพื่อขยายขนาดในอาหารสูตร B และ/หรือสูตร C และผสมกล้าเชื้อกับรำปลอดเชื้อก่อนการอบแห้ง โครงการวิจัยได้ทดลองผลิตตามแผนการผลิตในพื้นที่ผลิตกล้าเชื้อต้นแบบอย่างน้อย 3 ครั้ง พบว่ากล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องวัตถุเจือปนอาหารของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกล้าเชื้อที่ได้มีอายุการเก็บไม่ต่ำกว่า 6 เดือน
- ทดสอบคุณภาพและข้อคิดเห็นของผู้ประกอบการผลิตปลาร้า โดยนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้ในกระบวนการหมักปลาร้าจริงของโรงงาน จำนวน 5 ราย พบว่าการใช้กล้าเชื้อสามารถลดเวลาการหมักปลาร้าลงถึง 60-80% ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจมากและมีความสนใจที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเชิงพาณิชย์
- เมื่อแนะนำกล้าเชื้อปลาร้าให้กับผู้ผลิตปลาร้าทั่วไปให้รู้จักวิธีการใช้พบว่า ผู้เข้าร่วมโครงการร้อยละ 100 มีความสนใจในการนำหัวเชื้อไปใช้ในการผลิตปลาร้า และสนใจซื้อหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตปลาร้า โดยเฉลี่ยผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็นว่าหากต้องเพิ่มต้นทุนการผลิตเพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการซื้อหัวเชื้อสามารถยอมรับได้ที่ราคา 2 - 5 บาท ต่อกิโลกรัม ดังนั้นหากทำการผลิตกล้าเชื้อเพื่อจำหน่ายสำหรับการหมักปลาร้า 100 กิโลกรัม ราคาหัวเชื้อโดยประมาณ คือ 200 - 500 บาท ต่อซอง 10 กรัม

2. การจัดทำสถานที่ผลิตในระดับโรงงานต้นแบบที่เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร สำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้และการยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิต

การออกแบบโครงสร้างและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการผลิตและขยายกล้าเชื้อบริสุทธิ์ให้มีความปลอดภัยและเป็นไปตามกฎหมายได้ออกแบบให้สอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครองและการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561 สถานที่ผลิตต้นแบบ ประกอบด้วย ห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ และ ส่วนการขยายและผลิตกล้าเชื้อรำแห้งพร้อมใช้ โดยหน่วยผลิตต้นแบบกล้า เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการ แปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน จัดให้อยู่ในบริเวณชั้น 1 และ 2 ของอาคารโรงงานต้นแบบของ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร ถ.แก่งคอย – บ้านนา ต.ห้วยแห้ง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี โดยเส้นทางการผลิตจะเริ่มจากการเพาะเลี้ยงต้นเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารสูตร A ใน ห้องปฏิบัติการบนชั้น 2 ก่อนจะถูกนำไปขยายต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B และ/หรือสูตร C ซึ่งทำการผลิตในส่วนหน่วยการผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน ที่ตั้งอยู่ บนชั้น 1 ของตัวอาคารเดิม โครงการวิจัยได้ทดลองผลิตตามแผนการผลิตในพื้นที่ผลิตกล้าเชื้อต้น แบบอย่างน้อย 3 ครั้ง พบว่ากล้าเชื้อที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องวัตถุเจือปนอาหารของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกล้าเชื้อมีอายุการเก็บไม่ต่ำกว่า 6 เดือน โครงการได้เริ่มดำเนินการยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิต ณ สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสระบุรี เมื่อวันที่ 13 พฤศจิกายน 2562

และยื่นเอกสารฉบับแก้ไขให้สมบูรณ์ครบทั้งหมด เมื่อวันที่ 6 ธันวาคม 2562 และสถานะของการขออนุญาตสถานที่ผลิตอยู่ในขั้นตอนการรอประเมิน

3. การวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าที่ได้จากกล้าเชื้อเพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้าจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กล้าเชื้อออโตโคโนส ซึ่งพัฒนามาจากจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้ปลาร้าเพื่อเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักเพื่อให้สร้างกลิ่นรสที่เป็นอัตลักษณ์ ประกอบด้วย *Bacillus* UD6-2, *Bacillus* NC58-2, *Bacillus* SN78-1 และ *Virgibacillus* FF-2 และกล้าเชื้อเร่งสี *Salinicoccus* UD82-1 โดยวิเคราะห์ความปลอดภัยของจุลินทรีย์ทุกชนิด ตามรายการเอกสารที่ใช้ประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร อ้างอิงจากข้อมูลของกลุ่มกำหนดมาตรฐานสำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โครงการได้ประสานงานไปยังสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข เพื่อยื่นชุดเอกสาร เมื่อวันที่ 13 มีนาคม 2562 และทางสำนักอาหารได้ให้แนวทางปฏิบัติ โดยจัดให้กล้าเชื้อปลาร้าอยู่ในกลุ่มวัตถุเจือปนอาหาร ผลจากการทดสอบความปลอดภัยทุกรายการพบว่าจุลินทรีย์ทุกชนิดมีความปลอดภัย อย่างไรก็ตามโครงการได้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับจีโนมสมบูรณ์ (Whole genome sequencing analysis) ในการประเมินความปลอดภัยเพิ่มเติมเพื่อใช้ประกอบการทดสอบ แบบ in-vitro พบว่า *Bacillus* NC58-2 มี ยีนต้านสารปฏิชีวนะในจีโนมทางโครงการจึงไม่นำจุลินทรีย์ดังกล่าวในการประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อปลาร้า และสถานะของการขออนุญาตผลิตผลิตภัณฑ์อยู่ในขั้นตอนการส่งเอกสารให้ผู้ประเมินเพื่อพิจารณา และเตรียมนัดประชุมผู้ประเมินเพื่อสรุปผลต่อไป

ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

1. กระบวนการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ระดับการผลิตขนาดเล็กและการควบคุมคุณภาพ จำนวน 1 กระบวนการ
2. สถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ ปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็ก 1 แห่ง เอกสารประกอบการ ยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิตและขั้นตอนการยื่นขอ
3. ชุดข้อมูลความปลอดภัยของเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชุดข้อมูล สำหรับประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อปลาร้า และขั้นตอนการยื่นขอ
4. ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อต้นแบบ 3 ชนิด พร้อมข้อมูลคุณภาพ
5. ผู้ประกอบการนำกระบวนการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้เป็นต้นแบบในการผลิต 5 ราย และผู้ผลิตปลาร้าทั่วไป จำนวน 29 ราย ข้อมูลความพึงพอใจความสนใจในการใช้กล้าเชื้อปลาร้า และความเป็นไปได้ในการกำหนดราคากล้าเชื้อที่ผู้ประกอบการยอมรับ

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าจากระดับห้องปฏิบัติการสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบขนาดเล็ก (ไม่เกิน 100 กิโลกรัม; pilot scale) เพื่อสร้างกระบวนการผลิตและสถานที่ผลิตระดับนำร่องสำหรับถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการที่ต้องการผลิตกล้าเชื้อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ผู้วิจัยพบว่าสามารถใช้น้ำที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยก๊าซโอโซน สารละลายไฮโปคลอไรต์ หรือการใช้น้ำดื่มบรรจุขวดทางการค้าเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับโรงงานต้นแบบได้ไม่ต่างจากน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่บรรจุในถุงพลาสติกชนิด HDPE เพื่อขยายปริมาณการผลิตได้ ในการอบแห้งสามารถใช้ถุงผ้าปลอดเชื้อ บรรจุราปลอดเชื้อที่ผสมกล้าเชื้อวางบนถาดรองเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อเบื้องต้นด้วย alcohol flaming และลมร้อนที่ปล่อยออกจากปลายตู้อบแห้งที่มีการติดตั้ง HEPA filter เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยพบว่ากระบวนการดังกล่าวสามารถผลิตกล้าเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตสูง 100% แผนการผลิตประจำวันในโรงงานต้นแบบประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารสูตร A ในห้องปฏิบัติการ และเพิ่มจำนวนในอาหารสูตร B และ/หรือสูตร C หลังจากนั้นผสมกล้าเชื้อบริสุทธิ์กับราปลอดเชื้อก่อนการอบแห้งตามสูตรที่ต้องการและบรรจุในถุงพลาสติกปิดซิปปิดให้ได้ปริมาตร 90% แล้วบรรจุในถุงอูเลียมเนียมพอยด์อีกชั้นก่อนการปิดผนึกแบบสุญญากาศเป็นขั้นตอนสุดท้าย เมื่อทดลองผลิตกล้าเชื้อในโรงงานต้นแบบตามแผนการผลิตพบว่ากล้าเชื้อที่ผลิตทุกรุ่นมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดเรื่องวัตถุดิบอาหารของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และมีอายุการเก็บได้ไม่ต่ำกว่า 6 เดือน เมื่อนำกล้าเชื้อไปทดสอบกับผู้ประกอบการในการหมักปลาร้าขนาด 100 กิโลกรัม พบว่าการเติมกล้าเชื้อสามารถลดระยะเวลาในกระบวนการหมักปลาร้าได้ถึง 60-80% ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจและสนใจที่จะใช้กล้าเชื้อในการผลิตปลาร้าเชิงพาณิชย์ โดยต้นทุนที่ยอมรับได้คือ 200-500 บาท สำหรับกล้าเชื้อ 10 กรัม เอกสารข้อมูลสถานที่ผลิตต้นแบบและแผนการผลิตตามข้อกำหนดของกระทรวงสาธารณสุขได้ผ่านการแก้ไขตามข้อเสนอแนะ และได้แนบยื่นเพื่อขออนุญาตสถานที่ผลิตและรอการเข้าตรวจประเมินพื้นที่จากสำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสระบุรี โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อที่ผ่านการวิเคราะห์ความปลอดภัยตามข้อกำหนดของสำนักงานอาหาร กระทรวงสาธารณสุขประกอบด้วยข้อมูลลำดับจีโนมสมบูรณ์ ที่อยู่ในชุดเอกสารประกอบการยื่นขออนุญาตผลิตภัณฑ์ ได้แก่ *Bacillus* UD6-2, *Bacillus* SN78-1, *Virgibacillus* FF-2 และ *Salinicoccus* UD82-1 และอยู่ในขั้นตอนการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ

Abstract

This research was aimed to investigate the scaling up process for production of plara starter from lab-scale to pilot-scale manufacture (not over 100 kilograms) for further commercial manufacturing. Results demonstrated that water treated by ozone gas, hypochlorite solution, and commercially available bottled water could be used for microbial starter cultivation with the same quality as autoclaved water. The cultivation could be successfully scaled up in a HDPE bag and then mixed with sterile rice bran. The rice bran inoculum was aseptically packed in a sterile thin cloth bag and placed on a pre-alcohol flamed metal tray. The tray was dried in a drying cabinet with HEPA filter on the outlet air duct to prevent bacterial spread and contamination. Through this optimized scaling up process, dried starter culture with 100% survival could be produced. The routine production plan designed included (i) cultivation of each purified bacterial strain in medium A in the laboratory, (ii) scaling up in medium B or further in C (depending on starter consortium) in the production plant, (iii) mixing all cultures from B or C with sterile rice bran prior to (iv) drying and then (v) packing in a primary packaging, zip log plastic bag with 90% zipping and placing in aluminum foil pouch with vacuum seal as a secondary packaging. The quality of all test run of dried starters from the pilot scale production met the food additive regulation of Thai FDA and had shelf life at least for 6 months. When the starters produced were tested in 100 kilogram real manufacturing batch of 5 Plara factories, the starter could reduce fermentation time up to 60-80% relative to conventional production. All manufacturers were satisfied with the starter performance and interested to use in their future commercial productions. The manufacturers expected to buy starter with estimated prices around 200-500 Baht/10g pack. All documents of pilot plant and process were prepared following the comments and guideline of Thai FDA and have been submitted to Saraburi provincial public health office. Bacteria for Plara starter production with in-vitro and in-vivo safety evaluation results along with whole genome sequencing analysis results including *Bacillus* UD6-2, *Bacillus* SN78-1, *Virgibacillus* FF-2 and *Salinicoccus* UD82-1 have been submitted to the Thai FDA, Department of public health Bangkok in category of food additive.

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

สารบัญ

บทที่	หัวข้อ	หน้า
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	11
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	13
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ	13
	1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัย	14
	1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	16
	1.7 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
	1.8 แผนงานโครงการ	26
บทที่ 2	ผลการวิจัย	
	2.1 การศึกษาขยายขนาดผลึกกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก	28
	2.2 จัดทำสถานที่ผลิตทดลองต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามเกณฑ์หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร	33
	2.3 ศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ เพื่อประกอบการพิจารณาในการขออนุญาตผลิตตามข้อกำหนดของ อย.	48
ภาคผนวก		
ภาคผนวก 1	รายชื่อรายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา ๑๘ แห่งพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561	58
ภาคผนวก 2	มาตรฐานน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 284) พ.ศ. 2547	185
ภาคผนวก 3	ประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ ปี พ.ศ. 2553	188
ภาคผนวก 4	Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets, 2nd Edition, U.S. Department of Health and Human Services	192
ภาคผนวก 5	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครองและการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๖๒	254
ภาคผนวก 6	ป้ายสัญลักษณ์ “อันตรายทางชีวภาพ”	265
ภาคผนวก 7	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และเงื่อนไขว่าด้วยการขนและการกำจัดมูลฝอยติดเชื้อในท้องที่เทศบาลตำบลและองค์การบริหารส่วนตำบล พ.ศ. 2558	276
ภาคผนวก 8	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๔๒) พ.ศ. ๒๕๕๕ เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหารแปรรูปที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่าย	299

บทที่	หัวข้อ	หน้า
ภาคผนวก 9	ฉบับที่ 193 พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษา อาหาร	315
ภาคผนวก 10	บัญชีรายเดือนการผลิต ครอบครอง และการขายเชื้อโรคและพิษจากสัตว์	323
ภาคผนวก 11	ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การประเมินความปลอดภัยของเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิต เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๖๑	327
ภาคผนวก 12	ผลการติดตามอายุการเก็บกล้าเชื้อปลาร้า	331
ภาคผนวก 13	ผลการทดลองการใช้กล้าเชื้อต้นแบบที่ผลิตจากโรงงานหมักปลาร้าที่โรงงานต้นแบบแปรรูป อาหาร	334
ภาคผนวก 14	สรุปผลความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้สำหรับการหมักปลาร้า	348
ภาคผนวก 15	แผนภาพแสดงกระบวนการเก็บรักษาและการนำกล้าเชื้อออกมาใช้งาน	352
ภาคผนวก 16	ผลการทดสอบคุณภาพการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อและความเป็นพิษ	354
ภาคผนวก 17	การทดสอบสมบัติด้านความปลอดภัยของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์เทคนิค gene deletion	367
ภาคผนวก 18	ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม เรื่องปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพในการขยายต้นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์	371
ภาคผนวก 19	ต้นทุนในการผลิตกล้าเชื้อ	372

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

กระบวนการผลิตปลาร้าโดยทั่วไปต้องใช้ระยะเวลาในการหมักยาวนาน โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้เกิดการพัฒนาคูณลักษณะเฉพาะตัวด้านกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของปลาร้าซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น ปัจจุบันการผลิตปลาร้าได้ขยายตัวจากการผลิตระดับครัวเรือนไปสู่การผลิตเชิงการค้าที่มีอัตราการผลิตสูงถึงปีละ 40,000 ตันต่อปี รวมมูลค่าสูงกว่า 1,000 ล้านบาท มีการจำหน่ายภายในประเทศและส่งออก เมื่อตลาดปลาร้าขยายขนาดขึ้น การพัฒนาระดับประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทีมวิจัยซึ่งมี รศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา เป็นหัวหน้าโครงการ ได้ดำเนินโครงการวิจัยเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตปลาร้าดังกล่าว ภายใต้โครงการวิจัย “การพัฒนาระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์” โดยได้รับทุนจากทุนชุดโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม” ปีงบประมาณ 2559 สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยการพัฒนาระบวนการผลิตปลาร้าพร้อมใช้ สำหรับเติมลงในกระบวนการหมักปลาร้าโดยตรง ทำให้ได้กรรมวิธีการผลิตที่ลดเวลาในการหมักปลาร้าจากเดิมใช้เวลานาน 6 เดือน ถึง 2 ปี เหลือเพียง 3 เดือน เป็นผลให้ลดต้นทุนในการผลิต แต่ยังคงไว้ซึ่งคุณภาพและอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสดั้งเดิม และเพื่อควบคุมคุณภาพของการใช้เทคโนโลยีการผลิตปลาร้าพร้อมใช้และเพื่อปกป้องสิทธิให้กับผู้รับถ่ายทอดเทคโนโลยีจึงได้จัดสิทธิบัตรกระบวนการผลิตปลาร้าพร้อมใช้สองฉบับ คือ

- สิทธิบัตรฉบับที่ 1 ปลาร้าพร้อมใช้สำหรับเร่งการหมักปลาร้าและกรรมวิธีการผลิต เลขที่คำขอ 1701005446
- สิทธิบัตรฉบับที่ 2 กรรมวิธีการผลิตปลาร้าโดยการเร่งกระบวนการหมักด้วยกล้ำเชื้อ เลขที่คำขอ 1701005445

กล้ำเชื้อปลาร้าและเทคโนโลยีการผลิตดังกล่าวได้รับความสนใจจากทั้งผู้ประกอบการปลาร้าและธุรกิจที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากมองเห็นโอกาสการขยายขนาดการผลิตและพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ทั้งเพื่อการส่งออกและการผลิตภายในประเทศที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับ โดยพบว่าหลังเสร็จสิ้นโครงการวิจัย ได้มีหน่วยงานต่างๆ ให้ความสนใจและเผยแพร่ผลงานวิจัยไปยังสื่อต่างๆ ส่งผลให้คณะผู้วิจัยได้รับการติดต่อเพื่อขอใช้ประโยชน์จากงานวิจัย ซึ่งเป็นออกเป็น 2 ประเด็น คือ

1. ผู้ประกอบการผลิตปลาร้าต้องการนำกล้ำเชื้อปลาร้าไปใช้ในกระบวนการผลิต แต่ไม่ต้องการผลิตกล้ำเชื้อเอง
2. ผู้ประกอบการรายใหม่ต้องการรับถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกล้ำเชื้อ เพื่อสร้างธุรกิจผลิตและจำหน่ายกล้ำเชื้อปลาร้าให้กับผู้ประกอบการโรงงานปลาร้า

ดังนั้นเพื่อให้การผลิตกล้าเชื้อสามารถผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไปได้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับการผลิตทดลองขนาดเล็ก (ไม่เกิน 100 กิโลกรัม pilot scale) เพื่อสร้างกระบวนการผลิตต้นแบบสำหรับถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการที่ต้องการดำเนินการธุรกิจการผลิตกล้าเชื้อเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไป

อย่างไรก็ตามกล้าเชื้อปลาร้าที่ได้นั้น ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 พ.ศ. 2561 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5) (ประกาศ ฯ ดังกล่าวมีผลบังคับใช้ ตั้งแต่วันที่ 26 กรกฎาคม พ.ศ. 2561) ในขณะที่ปลาร้าที่ผลิตได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ เนื่องจากการเป็นการผลิตด้วยกระบวนการใหม่หรือเทคโนโลยีใหม่จึงอาจเข้าข่ายอาหารใหม่ (Novel Foods) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 376) พ.ศ. 2559 ดังนั้นในการผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ จะต้องเข้าสู่กระบวนการที่มีขั้นตอนประกอบด้วย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกล้าเชื้อและกล้าเชื้อต้องผ่านการประเมินความปลอดภัย เพื่อใช้ประกอบการยื่นขอพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
2. การขออนุญาตผลิตกล้าเชื้อ ในการผลิตกล้าเชื้อเป็นกระบวนการทางเทคโนโลยีทางชีวภาพซึ่งเป็นกระบวนการผลิตรูปแบบจำเพาะและไม่มีผู้ผลิตในเชิงพาณิชย์มากนักในประเทศ จึงยังไม่มีแนวทางปฏิบัติที่เป็นข้อกำหนดที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามโรงงานผลิตจะต้องได้รับการรับรองหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร หรือ GMP ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 193) พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร เป็นอย่างน้อย โดยอาจมีข้อกำหนดเพิ่มเติมตามความเหมาะสม
3. ผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตจากการใช้กล้าเชื้อ อาจถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กระบวนการผลิตหรือเทคโนโลยีใหม่ จึงเข้าข่ายการเป็นอาหารใหม่ ซึ่งต้องผ่านการประเมินความปลอดภัย เพื่อใช้ประกอบการยื่นผลการประเมินความปลอดภัยการเป็นอาหารใหม่ เพื่อพิจารณาอนุญาต

ด้วยขั้นตอนที่ซับซ้อนดังกล่าว ทำให้เป็นข้อจำกัดที่ทำให้ผู้ประกอบการที่ต้องการรับถ่ายทอดเทคโนโลยีดำเนินการโดยลำพังได้ยาก ดังนั้นนอกเหนือจากการศึกษาการขยายขนาดการผลิตซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้แล้ว เพื่อให้การผลิตกล้าเชื้อเชิงพาณิชย์สามารถดำเนินการต่อไปได้โดยสมบูรณ์ จำเป็นต้องศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อเพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร รวมถึงการออกแบบและดำเนินการของโรงงานต้นแบบเพื่อขออนุญาตผลิต สำหรับใช้เป็นข้อมูลและต้นแบบกระบวนการผลิตขนาดเล็กสำหรับถ่ายทอดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดนาร่องไม่เกิน 100 กิโลกรัม

1.2.2 เพื่อจัดทำสถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดนาร่อง (pilot scale) ที่เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พร้อมข้อมูลเอกสารเพื่อเตรียมยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิต ต่อสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสระบุรี

1.2.3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ รวบรวมข้อมูลเพื่อเตรียมยื่นขอพิจารณาอนุญาตเป็นวัตถุเจือปนอาหาร ต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก การดำเนินการวิจัยครอบคลุมเรื่อง การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ น้ำ ที่ใช้ในกระบวนการผลิต การประเมินวิธีการเตรียม และกระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตระดับโรงงาน วิธีและสภาวะการขยายลำดับเชื้อระดับโรงงานขนาดเล็ก รวมถึงการผสม การทำแห้งและการบรรจุ

1.3.2 เพื่อจัดทำสถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร ครอบคลุมการจัดหาเครื่องมือ เครื่องจักรและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต การออกแบบพื้นที่การผลิตและแผนผังการผลิต และการจัดทำขั้นตอนและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการขออนุญาตผลิต เพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตกล้าเชื้อ

1.3.3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อเพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาต ประกอบด้วย การรวบรวมเอกสารข้อมูลด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อทุกชนิด จัดทำกระบวนการผลิตกล้าเชื้อแต่ละขั้นตอน เพื่อประเมินความปลอดภัย ประกอบด้วย การประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง รวบรวมผลการประเมินทุกรายการและจัดระบบเอกสารเพื่อเตรียมใช้ประกอบการพิจารณาขออนุญาต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ

1.4.1 กระบวนการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ระดับการผลิตขนาดเล็ก ที่เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

1.4.2 ผลิตภัณท์กล้าเชื้อต้นแบบเพื่อทดลองใช้เชิงพาณิชย์

1.4.3 ข้อมูลความปลอดภัย ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงและความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อเพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาต

1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัย

ปัจจุบันการผลิตปลาร้าได้ขยายตัวจากการผลิตระดับครัวเรือนไปสู่การผลิตเชิงการค้าที่มีอัตราการผลิตสูงถึงปีละ 40,000 ตันต่อปี รวมมูลค่าสูงกว่า 1,000 ล้านบาท ทั้งเพื่อจำหน่ายภายในประเทศและเพื่อการส่งออก ทั้งนี้เมื่อตลาดปลาร้าขยายขนาดขึ้นกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิมอาจไม่สอดคล้องกับความต้องการที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และหากไม่มีมาตรฐานการผลิตที่ดีพอหรือไม่ปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพอาจทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ให้สม่ำเสมอได้ อาจส่งผลทางลบต่อภาพลักษณ์สินค้า แหล่งท่องเที่ยว และความยั่งยืนของวิสาหกิจในพื้นที่ รวมถึงคุณภาพชีวิตของประชากรในพื้นที่บริโภคปลาร้าในชีวิตประจำวัน ข้อมูลจากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าในยุคที่ตลาดปลาร้ากำลังขยายตัวนี้ ปัญหาหลักที่จำเป็นต้องเร่งแก้ไข แบ่งออกเป็น 2 ประเด็นหลัก ได้แก่

1. ความล่าช้าในการผลิตและเงินทุนจม ทั้งนี้เนื่องจากอัตราเร็วในการผลิตปลาร้าจะแตกต่างจากกระบวนการผลิตอาหารประเภทอื่นๆ เนื่องจากปลาร้าที่มีคุณภาพดีจำเป็นต้องหมักโดยปล่อยให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบการหมักค่อยๆ พัฒนากลิ่นรสและเนื้อสัมผัสเป็นเวลานาน ซึ่งบางพื้นที่ต้องใช้เวลานานกว่า 1 ปีจึงจะได้ปลาร้าที่มีคุณภาพตามต้องการได้ ทำให้ผู้ประกอบการมีข้อจำกัดในเรื่องการขยายกำลังการผลิตเนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของการหมุนเวียนพื้นที่ในการจัดวางถังหมัก รวมถึงเงินทุนจมอยู่กับการรอเวลาการหมักปลาร้า ซึ่งส่งผลให้โอกาสที่ผู้ประกอบการระดับจากวิสาหกิจรายย่อยสู่การเป็นผู้ผลิตขนาดใหญ่ขึ้นเป็นไปได้ยาก รวมถึงอาจส่งผลให้ละทิ้งอาชีพเข้าสู่ตลาดแรงงานอื่นๆ

2. ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากปลาร้าเป็นการหมักโปรตีนด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ จึงมีโอกาสดังจุลินทรีย์จะย่อยกรดอะมิโนบางชนิดให้เป็นสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งนอกจากจะไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้ว ในอนาคตอันใกล้การพบสารก่อภูมิแพ้จะถูกใช้เป็นข้อกำหนดหนึ่งในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ยังรายงานว่าการเจริญของ *Clostridium botulinum* ซึ่งสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายเฉียบพลันในระบบการหมักปลาที่มีเกลือ รวมถึงเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงต่อจุลินทรีย์ทนเกลือที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* หากสุกลักษณะการผลิตไม่ดีพอ ซึ่งหากไม่เร่งแก้ปัญหาดังกล่าวหรือไม่มีมาตรการป้องกัน ผู้ประกอบการอาจประสบปัญหาเรื่องการขออนุญาตผลิตและจำหน่ายภายใต้ข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา รวมถึงข้อกำหนดคุณภาพในการเป็นสินค้าส่งออก เนื่องจากไม่สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะในเรื่องความปลอดภัยให้สม่ำเสมอได้

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเร่งแก้ปัญหาดังกล่าว โดยแนวทางที่น่าจะช่วยแก้ปัญหาได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือการพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าให้สามารถเร่งอัตราการหมักได้เร็วขึ้นโดยที่ปลาร้ายังคงคุณภาพหรืออัตลักษณ์เดิม โดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากระบบการหมักปลาร้าที่เกี่ยวข้องกับการหมักและสร้างกลิ่นรสที่เป็นอัตลักษณ์ของปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่ ซึ่งกระบวนการผลิตในรูปแบบที่พัฒนาขึ้นนี้นอกจากช่วยเร่งอัตราการหมักแล้วยังช่วยลดความเสี่ยงจากอันตรายที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ ดังนั้นในปี 2559 ทีมวิจัยซึ่งมี รศ.ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา เป็นหัวหน้าโครงการได้ดำเนินโครงการวิจัยเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตปลาร้าดังกล่าว โดยการพัฒนาหัวเชื้อปลาร้าร่า ผลจากงานวิจัยสามารถนำเสนอกรรมวิธีการผลิตที่ลดเวลาในการหมักปลาร้าจากเดิมใช้เวลานาน 6 เดือน ถึง 2 ปี เหลือเพียง 3 เดือน เป็นผลให้ลดต้นทุนในการผลิต แต่ยังคงไว้ซึ่งคุณภาพและอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสดั้งเดิม ผลผลิตจากงานวิจัยที่ได้ทั้งหมดประกอบด้วย (1) องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์ของการหมักปลาร้าและกลไกการแสดงออกของสารพันธุกรรมในระหว่างกระบวนการหมัก รวมทั้งชนิดและปริมาณของสารระเหยที่ให้กลิ่นรสและสารที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สัมพันธ์กับอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสจากกระบวนการผลิตในเขตพื้นที่เฉพาะ (2) หัวเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ 3 ชนิดที่จำเพาะตามรูปแบบการผลิตสำหรับหมักปลาร้าในแต่ละพื้นที่ และเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อดังกล่าว (3) คู่มือมาตรฐานการผลิตและอัตลักษณ์ปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่พัฒนาขึ้นสำหรับผู้ประกอบการในพื้นที่การผลิต 3 พื้นที่ในภาคอีสาน (4) ผลิตภัณฑ์ใหม่ 2 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากปลาร้าที่หมักด้วยหัวเชื้อสำหรับเป็นทางเลือกให้กับผู้ประกอบการ (5) Research commercialization plan และ (6) สิทธิบัตร 2 เรื่อง

หัวเชื้อปลาร้าและเทคโนโลยีการผลิตดังกล่าวได้รับความสนใจจากทั้งผู้ประกอบการปลาร้าและธุรกิจที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากมองเห็นโอกาสการขยายขนาดการผลิตและพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าให้เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ทั้งเพื่อการส่งออกและการผลิตภายในประเทศที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับ โดยพบว่าหลังเสร็จสิ้นโครงการวิจัย ได้มีหน่วยงานต่างๆ ให้ความสนใจและเผยแพร่ผลงานวิจัยไปยังสื่อต่างๆ ส่งผลให้คณะผู้วิจัยได้รับการติดต่อเพื่อขอใช้ประโยชน์จากงานวิจัยจำนวนมากหลายราย

ดังนั้นเพื่อให้การผลิตหัวเชื้อสามารถผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไปได้ ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาการขยายขนาดการผลิตหัวเชื้อจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับการผลิตขนาดเล็ก (ไม่เกิน 100 กิโลกรัม) เพื่อสร้างกระบวนการผลิตต้นแบบสำหรับถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการที่ต้องการดำเนินการธุรกิจการผลิตหัวเชื้อเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไป

อย่างไรก็ตามหัวเชื้อปลาร้าที่ได้นั้น ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข จัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) วัตถุเจือปนอาหาร อ้างอิงตามข้อ 4(3) ของประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ในขณะที่ปลาร้าที่ผลิตได้จากการหมักด้วยหัวเชื้อ เนื่องจากการผลิตด้วยกระบวนการใหม่หรือเทคโนโลยีใหม่จึงเข้าข่ายอาหารใหม่ (Novel Foods) ตามประกาศกระทรวง

สาธารณสุข (ฉบับที่ 376) พ.ศ. 2559 ดังนั้นในการผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ จะต้องเข้าสู่กระบวนการการประเมินความเสี่ยงและการประเมินความปลอดภัยการเป็นอาหารใหม่ของเชื้อที่ใช้ผลิต กุล่าเชื้อ และปลาร้าที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยกุล่าเชื้อ ในขณะเดียวกันเนื่องจาก ในการผลิตกุล่าเชื้อเป็นกระบวนการทางเทคโนโลยีทางชีวภาพซึ่งเป็นกระบวนการผลิตรูปแบบจำเพาะและไม่มีผู้ผลิตในเชิงพาณิชย์มากนักในประเทศ จึงยังไม่มีแนวทางปฏิบัติที่เป็นข้อกำหนดที่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามโรงงานผลิตจะต้องได้รับการรับรองหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร หรือ GMP ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 193) พ.ศ. 2543 เป็นอย่างน้อย โดยอาจมีข้อกำหนดเพิ่มเติมตามความเหมาะสม จึงจำเป็นต้องมีการประเมินรูปแบบและองค์ประกอบของสถานที่ผลิตที่เป็นไปตาม GMP โดยการใช้สถานที่ผลิตต้นแบบขนาดเล็ก (pilot scale) เป็น model

นอกจากนี้การผลิตผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตจากการใช้กุล่าเชื้อ ถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้กระบวนการผลิตหรือเทคโนโลยีใหม่ จึงเข้าข่ายการเป็นอาหารใหม่ ซึ่งต้องผ่านการประเมินความปลอดภัย เพื่อใช้ประกอบการยื่นผลการประเมินความปลอดภัยการเป็นอาหารใหม่ เพื่อพิจารณาอนุญาต

ด้วยขั้นตอนที่ซับซ้อนดังกล่าว ทำให้เป็นข้อจำกัดที่ทำให้ผู้ประกอบการที่ต้องการรับถ่ายทอดเทคโนโลยีดำเนินการโดยลำพังได้ยาก ดังนั้นนอกเหนือจากการศึกษาการขยายขนาดการผลิตซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้แล้ว เพื่อให้การผลิตกุล่าเชื้อเชิงพาณิชย์สามารถดำเนินการต่อไปได้โดยสมบูรณ์ จำเป็นต้องศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกุล่าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกุล่าเชื้อเพื่อประกอบการขอพิจารณาอนุญาต รวมถึงการจัดทำสถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกุล่าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามเกณฑ์หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหารเพื่อการจัดทำขั้นตอนและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการขออนุญาตผลิต สำหรับใช้ประกอบการขอพิจารณาอนุญาตผลิตกุล่าเชื้อเพื่อใช้เป็นข้อมูลและต้นแบบกระบวนการผลิตขนาดเล็กสำหรับถ่ายทอดต่อไป ซึ่งจะเป็นการช่วยให้การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ผู้ประกอบการเพื่อการผลิตกุล่าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้เพื่อการจำหน่ายเชิงพาณิชย์เป็นไปได้โดยสมบูรณ์

1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการผลิตปลาร้าประกอบด้วยขั้นตอนการเลือกปลาวัตถุดิบที่มีขนาดใกล้เคียงกันในการ หมัก การทำความสะอาด และการเติมเกลือที่ต้องคำนวณปริมาณเกลือให้เหมาะสม และบรรจุใน ภาชนะปิด ปล่อยให้เกิดการหมักย่อยเนื้อปลาประมาณ 5 เดือน จนถึง 1 ปีส่วนมากปลาที่ใช้ทำเป็น ปลาน้ำจืดที่หาได้ในท้องถิ่น และเป็นปลาประเภทที่ไม่มีเกล็ด การผลิตปลาร้าจะแตกต่างกันในแต่ละ ท้องถิ่น ซึ่งอาจแบ่งตามกรรมวิธีการผลิต ได้ดังนี้

- ปลาร้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลาร้าที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสีน้ำตาลปนดำ นิยมเรียกกันว่าปลาร้าดำ ซึ่งเป็นการเรียกตามกรรมวิธีการผลิตที่มีการใส่รำข้าวระหว่างหมัก วัตถุดิบใน

การผลิตปลาร้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมใช้ปลาเบญจพรรณ คือ ปลา เล็กๆ หลายชนิดนำมาผสมคลุกเคล้ารวมกัน แหล่งผลิตปลาร้าที่มีชื่อเสียงในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ พบได้ในเขตพื้นที่จังหวัด กาฬสินธุ์ อุบลราชธานีขอนแก่น และ นครราชสีมา

- ปลาร้าในภาคกลาง ปลาร้าที่นิยมผลิตในภาคกลางนิยมเรียกกันว่าปลาร้าข้าวคั่ว ซึ่งมีสีเหลืองนวล ส่วนปลาที่ใช้ในการทำปลาร้านั้นจะมีการแบ่งตามชนิดปลา และเรียกปลาร้าที่ได้ตาม ชนิดของปลา เช่น ปลาร้าปลากะตักปลาร้าปลาช่อน ปลาร้าปลาตะเพียน เป็นต้น แหล่งผลิต ปลาร้าที่มีชื่อเสียงในภาคกลาง พบได้ในเขตพื้นที่จังหวัด อ่างทอง ชัยนาท นครสวรรค์ สุพรรณบุรีอยุธยา สิงห์บุรีและลพบุรี

ปริมาณการผลิตปลาร้าในแต่ละปีจะมีประมาณ 40,000 ตัน โดยโรงงานที่ผลิตปลาร้าแบ่ง ออกเป็น 2 ขนาด คือ โรงงานขนาดใหญ่กำลังการผลิตปีละ 500-1,000 ตัน ปัจจุบันมีประมาณ 10-15 แห่ง และโรงงานขนาดกลางและเล็ก กำลังการผลิตปีละ 100-500 ตัน ปัจจุบันมีประมาณ 100-200 แห่ง (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2004)

การหมักปลาร้าโดยทั่วไปนั้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 5-6 เดือน เพื่อให้เกิดการย่อยสลาย สารประกอบอินทรีย์ในเนื้อปลา โดยเอนไซม์จากปลาและจุลินทรีย์ทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะ เช่น การพัฒนากลิ่นรสและสีของเนื้อปลาร้า (นันทา, 2549) โดยขั้นตอนในกระบวนการหมักปลาร้านั้นจะ ทำโดยผสมปลากับเกลือที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 10 มีผลทำให้เกิดการย่อยของสารประกอบ อินทรีย์ต่างๆ เช่น โปรตีนไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเนื้อ ปลาและจุลินทรีย์ เป็นผลให้เกิดการพัฒนาเนื้อสัมผัส กลิ่นรสและรสชาติของปลาร้าที่มีลักษณะ เฉพาะตัว หากกระบวนการย่อยเนื้อปลาร้าเกิดได้ในระยะเวลาอันน้อยกว่า 5 เดือน ปลาร้าที่ผลิตได้อาจ ไม่มีกลิ่นรสปลาร้า มีรายงานเรื่องจุลินทรีย์ที่พบในปลาร้าที่ผลิตขายในท้องตลาดจาก Tanasupawat และคณะ (2000) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. acidopiscis* และ *Weissella thailandensis* ในขณะที่จากการศึกษาของ Juthong และคณะ (2000) จุลินทรีย์ทั่วไปที่พบในปลาร้าเกือบทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย ชอบเกลือ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Micrococcus* sp., *Pediococcus* sp., *P. halophilus* และ *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* โดยพบว่า *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* พบตั้งแต่เริ่มหมักจนกระทั่งถึง 3-5 เดือน และอาจแสดงบทบาทในเรื่องของการย่อยโปรตีน *P. halophilus* เป็นจุลินทรีย์หลักที่พบในปลาร้าหมักช่วง 3-5 เดือน *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยโปรตีนเป็นหลัก ส่วน *Pediococcus* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบปริมาณน้อยในระหว่างการหมักแต่น่าจะสัมพันธ์กับการสร้างสาร ให้กลิ่นรสหลักในปลาร้า จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีบทบาทหลักในการหมักปลาร้ามักจะเป็น แบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) เป็นจุลินทรีย์หลักที่สามารถเจริญและดำเนินกระบวนการหมักปลาร้า (Sánchez-Porro, 2003)

การเร่งอัตราการย่อยสลายเนื้อปลาเป็นกระบวนการที่ลดระยะเวลาหมักปลาร้าให้สั้นลง โดย การเร่งนั้นจะต้องทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยมีค่าใกล้เคียงกับปลาร้าที่หมักตามกรรมวิธีปกติซึ่งปลาร้าต้องประกอบด้วยโปรตีนละลายได้ (soluble protein) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมด (นันทา, 2549) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาร้า มีเพียงรายงานวิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาเพื่อการผลิตน้ำปลา วิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาที่ทำได้ง่ายและใช้ต้นทุนไม่สูงนัก เช่น การสับ หรือบดเพื่อลดขนาดของหัวปลา, การลดปริมาณเกลือเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและดำเนินกิจกรรมได้เร็วขึ้นและรวมถึงการเร่งการย่อยเอนไซม์ protease เพื่อย่อยสลายเนื้อปลาโดยตรง เป็นต้น การลด ขนาดของหัวปลาโดยการบด อาจเร่งการย่อยเนื้อปลาได้ในผลิตภัณฑ์ปลาร้าหมักนิยมบดขึ้นปลาจนมี ขนาด 3-4 มิลลิเมตร เนื่องจากการย่อยเนื้อปลาจะเกิดได้เร็วกว่าการใช้ปลาทั้งตัว (Tatterson and Windsor, 2010) แนวทางการการลดปริมาณเกลือเพื่อเร่งการย่อยเนื้อปลาได้รับความสนใจในการ นำไปใช้ปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำปลา เนื่องจากการผลิตน้ำปลาใช้เกลือปริมาณมากระหว่างการ หมักทำให้การทำงานของเอนไซม์ย่อยเนื้อปลา กลุ่ม protease ที่มาจากกล้ามเนื้อและทางเดินอาหาร ของปลา มีประสิทธิภาพลดลง เมื่อเอนไซม์ขาดประสิทธิภาพการย่อยสลายเนื้อปลาจึงเกิดได้ช้า ทำให้ระยะเวลาในการหมักปลาร้าจึงยาวนานถึง 12-18 เดือน ในการผลิตน้ำปลาการใช้เกลือปริมาณมากกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลา ทำให้การทำงานของเอนไซม์ protease มีประสิทธิภาพลดลง แต่การลดปริมาณเกลือให้ต่ำกว่าร้อยละ 5 เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจทำให้เนื้อปลาเน่าเสียจากแบคทีเรีย (Gildberg et al., 1984) การใช้เกลือปริมาณร้อยละ 10 สามารถหยุดการเน่าเสียของปลาได้อย่างสมบูรณ์ (Beddows and Ardesir , 1979) ในการเร่งการย่อยสลายโปรตีน ในเนื้อปลาโดยการเติม protease เพื่อเร่งการย่อยเนื้อปลาร้านั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจน การศึกษาแต่อย่างใด แต่มีรายงานว่าแหล่งของ protease ที่ใช้เร่งการย่อยปลา ควรมาจากพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น สับปะรดซึ่งมีเอนไซม์กลุ่ม protease คือ bromelain และมะละกอ มี protease คือ papain (Potter and Hotchkiss, 1998)

แนวทางที่น่าสนใจอีกแนวทางหนึ่งคือ การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการเร่งการหมักเนื้อปลา โดย คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติการหมักที่เหมาะสม เช่น ทนเกลือสูง สร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนได้มากและหรือสร้างสารให้กลิ่นรสของปลาร้าหมักได้ดีโดยเทคโนโลยีหัวเชื้อ (Starter culture technology) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งประเภทเครื่องดื่ม เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ผลิตภัณฑ์นมหมัก ตลอดจนอาหารกลุ่มธัญพืช และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ทั้งนี้เนื่องจากการหมักอาหารด้วยการเติมหัวเชื้อ ทำให้สามารถควบคุมกระบวนการหมัก และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้อย่างสม่ำเสมอ และสามารถพัฒนาต่อเนื่องในเรื่องของการหมักเพื่อเพิ่มคุณภาพด้าน กลิ่นรส โดยการใช้พัฒนาหัวเชื้อให้อยู่ในรูปแบบของ multi-starter เพื่อให้หัวเชื้อมีความหลากหลาย ของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่อย่างจำเพาะในกระบวนการหมักได้ (Fleet, 2003) ในส่วนของอาหารไทยที่มีการพัฒนาเรื่องการใช้เทคโนโลยีดังกล่าวคือ แหนมไบโอเทค โดยห้องปฏิบัติการ

เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเรื่องการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปลาร้าแต่อย่างใด

ในปี 2559 ชื่นจิต และคณะ ได้ดำเนินงานวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าสำหรับเร่งการหมักปลาร้าด้วยการใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์อโตโคเนสที่มีประสิทธิภาพ ให้สามารถช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการหมักได้ถึงร้อยละ 50 แต่ยังคงไว้ซึ่งคุณภาพและอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสดั้งเดิมมากที่สุด กิจกรรมทั้งหมดดำเนินการภายใต้เครือข่ายนักวิจัยจาก 4 สถาบัน ใน 6 เขตพื้นที่หลักในการผลิตปลาร้าของภาคอีสาน โดยแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนคือ (1) สืบหาข้อมูลและเก็บตัวอย่างปลาร้า (2) ศึกษาอัตลักษณ์ของปลาร้าและรูปแบบการหมักของจุลินทรีย์ (3) พัฒนากล้าเชื้อจำเพาะในรูปแบบพร้อมใช้ที่สามารถเติมลงในระบบการหมักได้โดยตรง (4) การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในการหมักปลาร้าและคุณภาพของปลาร้าที่ได้ ผู้วิจัยนำเสนอข้อมูลงานวิจัยดังนี้

การสำรวจข้อมูลการผลิตปลาร้า ดำเนินการภายใต้เครือข่ายนักวิจัยจาก 4 สถาบัน ใน 6 เขตพื้นที่ที่ผลิตปลาร้าในภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครพนม สกลนคร นครราชสีมา และชัยภูมิ สืบหาข้อมูลและเก็บตัวอย่างปลาร้าโดยนักวิจัยในพื้นที่ลงพื้นที่สำรวจผู้ผลิตเพื่อรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นและเลือกพื้นที่ผลิตและผู้ประกอบการเป้าหมายที่สามารถใช้เป็นตัวแทนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตที่ต้องการศึกษาได้ และในช่วงที่สองนักวิจัยจากส่วนกลางจะร่วมลงพื้นที่เพื่อสำรวจกระบวนการผลิต เก็บตัวอย่าง และสัมภาษณ์ผู้ประกอบการเพื่อเก็บข้อมูลเชิงลึก ผลการสำรวจพบว่าการผลิตปลาร้าในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกัน ใช้วัตถุดิบจากแหล่งเดียวกัน จะมีรูปแบบการผลิตที่เหมือนกัน และปลาร้าที่ได้จะมีอัตลักษณ์ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า การผลิตปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีคล้ายกับจังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนมคล้ายกับจังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครราชสีมาคล้ายกับจังหวัดชัยภูมิ กระบวนการผลิตที่พบแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง และการหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF)

ผลการสำรวจพบว่าการผลิตปลาร้าในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกัน ใช้วัตถุดิบจากแหล่งเดียวกัน จะมีรูปแบบการผลิตที่เหมือนกัน และปลาร้าที่ได้จะมีอัตลักษณ์ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า การผลิตปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีคล้ายกับจังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนมคล้ายกับจังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครราชสีมาคล้ายกับจังหวัดชัยภูมิ กระบวนการผลิตที่พบแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง และการหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF)

สมบัติที่สามารถใช้บ่งชี้อัตลักษณ์ของปลาร้า ได้แก่ สมบัติทางเคมีและกายภาพ และองค์ประกอบของสารระเหย ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับพื้นที่การผลิตและกระบวนการผลิต โดยพบว่าสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ของปลาร้า มีความแตกต่างอย่างชัดเจนที่สามารถบ่งชี้อัตลักษณ์ของปลาร้าได้ คือ ปริมาณเกลือ (ความเค็ม) และปริมาณราที่ใช้ (ไฟเบอร์) โดยพบว่า ปลาร้าหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป ที่พบในจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดหนองคาย จะมีเกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่ร้อยละ 25 หากเป็นปลาร้าตัวเนื้อปลาไม่มีสีแดงตัวปลาไม่ยุบ น้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากหมักนาน หากเป็นปลาร้ารวมน้ำปลาร้ามีสีเข้มและเนื้อปลายุบ ปลาร้าหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่พบโดยทั่วไปในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม จะมีเกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่มากกว่าร้อยละ 30 ปลาร้ารวมเนื้อปลาไม่มีสีแดงเนื้อปลายุบ น้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากการหมักเป็นเวลานาน และปลาร้าหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF) ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่พบโดยทั่วไปในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดชัยภูมิ จะมีเกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่ต่ำที่สุดคือร้อยละ 20 มีไฟเบอร์สูง ตัวปลาไม่มีสีแดงตัวปลาไม่ยุบ น้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากสีของรำข้าว

องค์ประกอบของสารระเหยที่บ่งชี้อัตลักษณ์ด้านกลิ่นของปลาร้าพบว่าปลาร้าที่มีคุณภาพดีทุกรูปแบบการผลิต คือ ปลาร้าที่มีกลิ่นหอมจากสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของกรด butanoic และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว เช่น ethylbutanoate และ 3-methylbutanoate โดยพบว่าสัดส่วนของสารระเหยที่พบในปลาร้าที่ผลิตจากแต่ละรูปแบบจะมีความแตกต่างกัน

งานวิจัยดังกล่าวยังได้รายงานถึงรูปแบบการหมักของจุลินทรีย์บ่งชี้ได้ว่า ในระบบการหมักปลาร้าทุกรูปแบบ กระบวนการหมักจะเริ่มต้นด้วยกระบวนการ auto-fermentation โดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันคือ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. โดยกิจกรรมของ *Halanaerobium* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดสารกลุ่มซัลไฟด์ทำให้ปลาร้ามีสีดำและกลิ่นฉุนของสารกลุ่มซัลไฟด์ พร้อมกับการแสดงกิจกรรมของ *Lentibacillus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เนื้อปลาร้าเริ่มมีสีแดง และหลังกระบวนการ auto-fermentation จุลินทรีย์อื่น ๆ จะสามารถเพิ่มจำนวน ได้แก่ *Bacillus* และ lactic acid bacteria ที่เป็นจุลินทรีย์เฉพาะถิ่น (แบคทีเรียออโตโคโนส) รวมถึงจุลินทรีย์ที่สร้างสารให้สีแดงซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะการหมักของแต่ละรูปแบบร่วมดำเนินการหมักซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นรสในปลาร้าให้มีความซับซ้อนและเป็นอัตลักษณ์มากยิ่งขึ้น ข้อมูลที่สังเคราะห์ได้จึงนำมาใช้เป็นแนวทางในการออกแบบกระบวนการหมักและพัฒนาการค้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับเร่งการหมักปลาร้า โดยได้พัฒนากล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ 3 ชนิด เพื่อใช้จำเพาะกับรูปแบบการผลิตปลาร้าทั้ง 3 รูปแบบดังกล่าว กล้าเชื้อที่ผลิตได้ เมื่อติดตามอายุการเก็บโดยประเมินแอคติวิตีของเชื้อ พบว่า สามารถเก็บได้มากกว่า 6 เดือน ทดสอบคุณสมบัติการหมักปลาร้าแบบเดิมกล้าเชื้อตามวิธีที่ผลิตของแต่ละพื้นที่พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อที่จำเพาะกับการหมัก 3 รูปแบบ พบว่าสามารถลดเวลาในการหมักปลาร้าทุกรูปแบบได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยปลาร้าที่ผลิตได้รับการยอมรับคุณภาพด้านประสาทสัมผัสไม่แตกต่างจากปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม

ด้วยปัจจุบันมีการนำวัตถุดิบที่เคยบริโภคเป็นอาหารมาใช้เป็นอาหารหรือเป็นส่วนประกอบของอาหารอื่น ทั้งมีการพัฒนากระบวนการผลิตอาหารโดยใช้เทคโนโลยีที่ไม่เคยใช้มาก่อน จึงมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๗๖) พ.ศ. ๒๕๕๙ เรื่อง อาหารใหม่ (Novel food) เพื่อใช้เป็นมาตรการการประเมินความปลอดภัยรองรับเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค โดยกำหนดให้อาหารใหม่ หรือส่วนประกอบของอาหารใหม่ หรือกรรมวิธีการผลิตใหม่ หรืออาหารที่ยังไม่ได้กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้ ประกอบการขออนุญาตผลิตภัณฑอาหารจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยอาหารหรือ ส่วนประกอบของอาหารที่ต้องขอประเมินความปลอดภัย คือ

1. อาหารหรือ ส่วนประกอบของอาหาร ที่ปรากฏหลักฐานทางวิชาการว่ามีประวัติการบริโภคเป็นอาหาร น้อยกว่า 15 ปี
2. อาหารหรือ ส่วนประกอบของอาหาร ที่ได้จากกระบวนการผลิตที่มีใช้กระบวนการผลิตโดยทั่วไปของอาหารนั้นๆ ที่ทำให้ส่วนประกอบ โครงสร้างของอาหาร รูปแบบของอาหารนั้นเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการ กระบวนการทางเคมีภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (metabolism) หรือ ระดับของสารที่ไม่พึงประสงค์
3. ผลิตภัณฑอาหารที่มีข้อ 1 และ 2 เป็นส่วนประกอบ

ทั้งนี้ ไม่รวมถึงวัตถุดิบอาหาร และอาหารที่ได้จากเทคนิคการตัดแปรพันธุกรรม

อาหารใหม่ เป็นอาหารที่ต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยก่อนและต้องส่งมอบฉลากให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาตรวจสอบก่อนนำไปใช้ การประเมินความปลอดภัยของอาหารใหม่ ต้องยื่นผลการประเมินความปลอดภัยจากหน่วยงานประเมินความปลอดภัยที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาให้การยอมรับและหลักฐานอื่น อาหารใหม่ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน และเงื่อนไขการใช้ตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเห็นชอบ ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าอาหารใหม่ เพื่อจำหน่ายต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ในการจัดทำสถานที่ผลิต เนื่องจากกระบวนการผลิตมีความเกี่ยวข้องกับการครอบครองและผลิตเชื้อโรค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง พ.ศ. 2561 และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ โดยที่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อไม่ถูกระบุในประกาศกระทรวงฯ เรื่องรายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 ดังนั้นการจัดเตรียมสถานที่จึงจะต้องครอบคลุมให้สามารถปฏิบัติงานได้ถึงเชื้อโรคความเสี่ยงระดับ 2 (ภาคผนวก 1)

1.7 วิธีการดำเนินการวิจัย

- 1.7.1 การศึกษาขยายขนาดผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก

1.7.1.1 ประเมินคุณภาพน้ำที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าสำหรับการผลิตในโรงงานต้นแบบ โดยการประเมินคุณภาพวัตถุดิบ น้ำ และวิธีการเตรียมที่เหมาะสมให้มีคุณภาพและต้นทุนที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการผลิตระดับโรงงานขนาดเล็ก

1.7.1.2 ประเมินรายละเอียดในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สภาพะการให้อากาศ และการกวน เพื่อเตรียมออกแบบถังหมักและสภาพะการเลี้ยงเชื้อระดับการผลิตขนาดเล็ก

1.7.1.3 จัดทำแผนการควบคุมคุณภาพและวิธีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบและน้ำ สำหรับใช้ประจำวัน และร่างแบบเครื่องมือเพื่อเตรียมใช้ประกอบการจัดหาอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับผลิตน้ำ และกล้าเชื้อปลาร้าระดับโรงงานขนาดเล็ก

1.7.2 จัดทำสถานที่ผลิตทดลองต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามเกณฑ์หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร

1.7.2.1 จัดเตรียมสถานที่ผลิตทดลองต้นแบบ

- จัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องใช้ ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาข้อ ที่ 1
- จัดเตรียมสถานที่ จัดวางอุปกรณ์เครื่องมือ วางแผนผังการผลิต
- วางแผนการผลิต แผนการควบคุมคุณภาพ
- จัดเตรียมเอกสารการขออนุญาตผลิต ประกอบการขอพิจารณาอนุญาต
- ทดลองผลิต ประเมินคุณภาพการผลิต และคุณภาพผลิตภัณฑ์

1.7.2.2 จัดทำข้อมูลกระบวนการผลิต เพื่อขอยื่นพิจารณาขออนุญาตการผลิตตามข้อกำหนด อย.

- จัดทำข้อมูลกระบวนการผลิตปลาร้าหมักด้วยกล้าเชื้อแต่ละขั้นตอนเพื่อใช้

ประกอบการยื่นขอประเมินความเสี่ยง

- ประเมินความปลอดภัย ทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ ความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของผลิตภัณฑ์ปลาร้า

1.7.2.3 ประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์

- ผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ 2 ชนิด ที่ผลิตจากสถานที่ผลิตต้นแบบ โดยทดลองผลิตโดยนำไปทดสอบหมักจริงในโรงงานของผู้ประกอบการจำนวน 5 ราย โดยหมักในโถงมังก์ขนาด 100 กิโลกรัม และประเมินประสิทธิภาพกล้าเชื้อโดยใช้แบบสอบถามให้ผู้ประกอบการเปรียบเทียบกับการผลิตแบบดั้งเดิม

1.7.3 ศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ เพื่อประกอบการพิจารณาในการขออนุญาตผลิตตามข้อกำหนดของ อย.

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้าจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กล้าเชื้อออโตโคเนส คือ พัฒนาจากจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักแต่ละรูปแบบเพื่อให้สร้างกลิ่นรสที่เป็น

อัตลักษณ์ และกล้าเชื้อเร่งสีโดยพัฒนาจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากปลาร้าจากแหล่งต่างๆ สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกที่ได้จากงานวิจัยปีที่ 1 ดังสรุปในตาราง

รูปแบบการผลิต	กล้าเชื้อออโตโคโนส* (autochthonous starter)	กล้าเชื้อเร่งกลิ่นและสี* Common starters
SSF แบบทั่วไป	<i>Bacillus</i> UD6-2	<i>Virgibacillus</i> FF-2 <i>Salinicoccus</i> UD82-1
SSF แบบเกลือสูง	<i>Bacillus</i> NC58-2	
SMF	<i>Bacillus</i> SN78-1	

*ปกปิดลิขสิทธิ์ เพื่อปกป้องข้อมูลในการยื่นขอสิทธิบัตร

โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ รุ่นที่ 1 ที่เก็บรักษาในรูปแบบของผงแห้งแบบพรีชดราย ใน ampule เก็บที่อุณหภูมิ -40°C กระตุ้นเชื้อโดยการเพาะเชื้อในอาหารอุดมและเก็บรักษาในกลีเซอรอลที่เติมบีทพลาสติกชนิดละอย่างน้อย 10 หลอด เพื่อควบคุมเป็นต้นเชื้อของจุลินทรีย์เพื่อใช้งานตลอดการวิจัย

1.7.3.1 ทดลองผลิตกล้าเชื้อจากกระบวนการผลิตระดับห้องปฏิบัติการที่ได้จากปี ที่ 1 ประเมินคุณภาพด้านสารแปลกปน ตามข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture) ได้แก่ โคลิฟอร์ม (Total coliforms) ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) เอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) สารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ซึ่งได้ส่งตัวอย่างทดสอบไปยังกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และประเมินอายุการเก็บของหัวเชื้อที่ได้้อย่างละเอียด โดยประเมินจนถึงสิ้นสุดเวลาของการวิจัย

1.7.3.2 ประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่พัฒนาใช้สำหรับผลิตกล้าเชื้อ ตามรายการเอกสารที่ใช้ประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร กำหนดโดย อย. อ้างอิงจากข้อมูลของกลุ่มกำหนดมาตรฐาน สำนักอาหาร ดังนี้

- การรวบรวมเอกสารข้อมูลด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์
- จัดทำกระบวนการผลิตกล้าเชื้อแต่ละขั้นตอนเพื่อใช้ประกอบการยื่นขอประเมิน

ความเสี่ยง ตามข้อกำหนดของ อย. ได้แก่

1. คุณลักษณะเฉพาะ คุณสมบัติ และแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์
2. กระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (starter culture)

2.1 สูตรส่วนประกอบต้นเชื้อบริสุทธิ์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

เลี้ยงเชื้อที่ใช้

2.2 กระบวนการผลิตต้นเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ (Flow chart) /อาหาร

2.3 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นเชื้อบริสุทธิ์ /อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

2.4 ระบุแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ (คัดแยกได้จาก) และหากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปรพันธุกรรม (GMO) จะต้องมีหลักฐานในเรื่องของการประเมินความปลอดภัย โดยจะต้องขอความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเป็นรายกรณีไป

3. กระบวนการในการผลิตอาหารที่จะนำต้นเชื้อบริสุทธิ์ไปใช้ และ flow chart

4. เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหาร

4.1 ประวัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร

4.2 การตรวจสอบการสร้าง cytotoxicity test (ไม่ได้ระบุวิธีการทดสอบ)

4.3 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

4.4 การทดสอบการสร้างสารประกอบเอมีน (biogenic amine)

4.5 การทดสอบระดับสายพันธุ์ (strain) เฉพาะเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มสแตปฟีโลค็อกคัส (Staphylococcus) เอ็นเทอโรค็อกคัส (Enterococcus) และบาซิลลัส (Bacillus) จะต้องไม่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ (absence of acquired antibiotic resistance genes)

4.6 ไม่มีกิจกรรมที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (absence of toxigenic activity) โดยการทดสอบความเป็นพิษด้วยเซลล์เยื่อบุ (cytotoxicity test using epithelial cell lines) อย่างน้อยควรมีการทดสอบด้วยเซลล์เยื่อบุ ดังนี้

(1) เซลล์เยื่อบุไต เช่น vero cell line หรือ BHK21 เป็นต้น และ

(2) เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร เช่น Caco 2 cell line, HT29 cell

line เป็นต้น

5. ข้อมูลด้านประสิทธิภาพและความจำเป็นทางเทคโนโลยีทางการผลิต

5.1 ข้อมูลประสิทธิภาพและความจำเป็นทางด้านเทคโนโลยีการผลิตในอาหารที่เสนอขอใช้

5.2 ข้อมูลกฎหมายหรือกฎระเบียบของประเทศที่มีระบบประเมินความปลอดภัยที่น่าเชื่อถือ

การวิเคราะห์ดำเนินภายใต้ข้อกำหนดของ อย. ทั้งในเรื่องของวิธีการวิเคราะห์และหน่วยงานที่รับบริการวิเคราะห์ต้องได้รับการรับรองโดย อย.

นำข้อมูลความปลอดภัยที่รวบรวมได้ มาจัดทำระบบเอกสารเพื่อจัดเตรียมใช้ประกอบการยื่นขอพิจารณาอนุญาตตามข้อกำหนดของกลุ่มกำหนดมาตรฐาน สำนักงานอาหาร อย.

ตารางที่ 1 กิจกรรมสถานที่ทำวิจัย/พื้นที่เก็บข้อมูล

วิธีการดำเนินการวิจัยและกิจกรรม*	สถานที่ทำวิจัย/พื้นที่เก็บข้อมูล
1. การศึกษาขยายขนาดผลตกกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก	1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ 2. ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร สระบุรี
2. จัดทำเตรียมสถานที่ผลิตทดลองต้นแบบสำหรับการผลตกกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามเกณฑ์หลักเกณฑ์และวิธีการ ที่อาหาร สระบุรี	1. ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร สระบุรี
3. ศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ เพื่อประกอบการพิจารณาในการขออนุญาตผลิต	1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ 2. ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร สระบุรี 3. หน่วยงานให้บริการทดสอบและประเมินความปลอดภัยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

1.8 แผนการโครงการ

กิจกรรม*	เดือนที่			
	1-3	4-6	7-9	10-12
1. การศึกษาขยายขนาดผลิตรถจักรยานไฟฟ้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก 1.1 ประเมินการจัดทำควบคุมคุณภาพ วัตถุดิบ น้ำ และวัสดุที่เกี่ยวข้องกับการผลิต 1.2 การประเมินวิธีการเตรียม และกระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตระดับโรงงานขนาดเล็ก (pilot scale) 1.3 ประเมินวิธีและสภาวะการขยายลำดับเชื้อระดับโรงงานขนาดเล็ก การผสม การทำแห้งและการบรรจุ	ผลสำเร็จ 100%  			
2. จัดเตรียมสถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตรถจักรยานไฟฟ้าพร้อมใช้ขนาดเล็ก 2.1 จัดหาเครื่องมือ เครื่องจักรและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต 2.2 ออกแบบพื้นที่การผลิตและแผนผังการผลิต 2.3 จัดทำขั้นตอนและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการขออนุญาตผลิตเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาขออนุญาต 2.4 ทดลองผลิตรถจักรยานไฟฟ้า และ ทดลองระบบควบคุมคุณภาพ และทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ 2.4 ทดลองผลิตรถจักรยานไฟฟ้าด้วยถั่วเหลือง		ผลสำเร็จ 100%  		
3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของถั่วเหลืองและผลผลิตถั่วเหลือง 3.1 รวบรวมเอกสารข้อมูลด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์ 3.2 จัดทำกระบวนการผลิตรถจักรยานไฟฟ้าแต่ละขั้นตอนเพื่อใช้ประกอบการยื่นขอประเมินความเสี่ยง 3.3 ประเมินความปลอดภัย ทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง 3.4 รวบรวมข้อมูลและจัดระบบเอกสารเพื่อเตรียมใช้ประกอบการพิจารณาขออนุญาต	ผลสำเร็จ 100%  			

 = แผน

 = ผล

บทที่ 2

ผลการวิจัย

2.1 การศึกษาขยายขนาดผลิตรถ้ำเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่การผลิตขนาดเล็ก

การขยายกำลังการผลิตถ้ำเชื้อจากขนาดการผลิตในห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับการผลิต semi-pilot scale ที่สามารถเพาะเลี้ยงถ้ำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ได้ถึง 100 ลิตร ก่อนที่จะประเมินการเตรียมก้อนรำแห้งพร้อมใช้สำหรับปลาร้าสูตรการหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป ที่ใช้ถ้ำเชื้อเร่งการหมัก UD6-2 ถ้ำเชื้อเร่งกลิ่น UD82-1 และถ้ำเชื้อเร่งสี FF-2 *Salinicoccus* sp. โดยขั้นตอนการผลิต ประกอบไปด้วยการขั้นตอนการเตรียมเซลล์จุลินทรีย์บริสุทธิ์และฝึกฝนให้เจริญในสภาวะที่มีเกลือสูง ก่อนที่จะนำสารละลายถ้ำเชื้อที่เลี้ยงได้ไปผลิตถ้ำเชื้อรำแห้งต่อไป

2.1.1 ประเมินคุณภาพน้ำที่ใช้ในการผลิตถ้ำเชื้อปลาร้าสำหรับการผลิตในโรงงานต้นแบบฯ

การประเมินคุณภาพน้ำ เป็นการประเมินเพื่อวางแผนการเตรียมน้ำปลอดเชื้อสำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อปริมาณมากในการผลิตระดับโรงงาน โดยใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อด้วยระบบ chlorination เปรียบเทียบกับระบบ ozonation เพื่อทดแทนการ sterilization เนื่องจากโรงปฏิบัติการต้นแบบอาหาร ได้มีการออกแบบอาคารรวมระบบสนับสนุน (บริเวณ K ของแปลนแผนผังอาคารโรงงานต้นแบบ ตามระบุไว้ในรูปที่ 3) โดยเครื่องผลิตน้ำโอโซนที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงถ้ำเชื้อสามารถผลิตก๊าซโอโซนเพื่อการฆ่าเชื้อได้ในปริมาณ 500 มิลลิกรัม/ชั่วโมง อยู่แล้ว และการใช้ระบบ chlorination ก็เพื่อเตรียมเป็นทางเลือกให้กับผู้ประกอบการในอนาคตที่ไม่มีระบบ ozonation ในโรงงาน จากการประเมินรูปแบบของการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำใช้ในกระบวนการผลิตถ้ำเชื้อ เริ่มต้นจากการประเมินการใช้เทคนิคทางกายภาพ คือก๊าซโอโซน และทางเคมี คือสารคลอรีน ในการบำบัดน้ำประปา ให้มีค่าทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 284) พ.ศ. 2547 (ภาคผนวก 2) โดยพบว่าทั้งเทคนิคการใช้ก๊าซโอโซน (ตารางที่ 2) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ตารางที่ 3) สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และสปอร์ที่ปนเปื้อนมาในน้ำประปาได้ อย่างไรก็ตาม การใช้คลอรีน มีข้อจำกัดเนื่องด้วยประกาศของกรมการอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ได้กำหนดว่า ปริมาณคลอรีนที่เหลือในน้ำดื่มและน้ำสำหรับใช้แสดงถึงความสะอาด ปลอดภัยจากเชื้อโรค ควรมีปริมาณคลอรีนที่เหลืออยู่ระหว่าง 0.2- 0.5 ppm (ภาคผนวก 3) ซึ่งจากการทดสอบการสลายตัวของโซเดียมไฮโปคลอไรต์เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตถ้ำเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ พบว่าจากโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นเริ่มต้น 2 ppm ใช้เวลานานถึง 5 ชั่วโมงในการสลายตัวและเหลือปริมาณคลอรีน 0.1 ppm ดังนั้นการใช้โอโซนโดยผ่านการก๊าซลงในถังน้ำ 5 ลิตร เป็นเวลา 60 นาที เพื่อฆ่าจุลินทรีย์ในน้ำในกระบวนการผลิต จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากประหยัดเวลาและเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิต ดังผลการทดสอบในตารางที่ 2 และ 3

ทั้งนี้ คุณภาพน้ำปลอดเชื้อที่ใช้เตรียมสำหรับอาหารสูตร B ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการประเมินและทดสอบแล้ว มี 3 วิธีทางเลือก ดังนี้

1. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องผลิตโอโซน 500 mg/hr เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนใช้งาน
2. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน (สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์) 2 ppm และทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง หรือให้มีคลอรีนเหลือไม่เกิน 0.1 ppm ก่อนใช้งาน
3. น้ำดื่มบรรจุขวด เช่น น้ำดื่มสิงห์ น้ำดื่มเนสท์เล่ เพียวไลฟ์ เป็นต้น

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อในน้ำด้วยก๊าซโอโซน

Treated time (hrs.)	Total viable count (CFU/g)		
	after treatment	after 24 hrs.	adding medium B for 24 hrs.
15	ND	30	$> 10^6$
30	ND	20	$> 10^6$
45	ND	ND	20
60	ND	ND	ND

ND = non detected;

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อในน้ำด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์

Treated time (hrs.)	Chlorine residue (ppm)	Total viable count (CFU/g)		
		after treatment	after 24 hrs.	adding medium B for 24 hrs.
0.5	2	ND	ND	ND
1.5	0.8	ND	ND	ND
3	0.4	ND	ND	ND
5	0.1	ND	ND	ND

ND = not detected

2.1.2 ประเมินรายละเอียดในการเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอุปกรณ์และเครื่องใช้ที่มีการสัมผัสกับวัสดุที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อ จะต้องผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนชื้น (moist heat) ด้วยความดันไอน้ำโดยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ และอบให้แห้งก่อนใช้งาน หรือการใช้รังสียูวีในช่วง UV-C ให้แสงความยาวช่วงคลื่น 254 nm ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และ vegetative cell ของเชื้อราได้ (http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_7_001c.asp?info_id=697) โดยทางผู้วิจัยมีแผนการติดตั้งหลอดยูวีในหน่วยการผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน ให้มีความเข้มแสง $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ประเทศอเมริกา (ภาคผนวก 4)

การประเมินรายละเอียดในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สภาพะการให้อากาศ และการกวน เพื่อเตรียมออกแบบถังหมักและสภาพะการเลี้ยงเชื้อระดับการผลิตขนาดเล็ก

- การประเมินวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

พบว่าสามารถใช้ถุงพลาสติกชนิด HDPE (TPC = non detected of spore) เป็นภาชนะขั้นที่ 1 ในการบรรจุสารละลายกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B ในระบบ static เพิ่มเวลาจากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจาก 48 เป็น 96 ชั่วโมง จึงจะได้จำนวนประชากรจุลินทรีย์สำหรับใช้เตรียมกล้าเชื้อแห้งเท่ากัน ดังแสดงในภาพด้านล่าง และถุงพลาสติกที่สัมผัสกับเชื้อจะถูกนำไปฆ่าเชื้อก่อนทิ้ง ส่วนอุปกรณ์อื่นๆจะไม่มีการสัมผัสกับเชื้อ แต่สามารถทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนแห้งโดยใช้ alcohol flaming



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและขยายกล้าเชื้อในอาหารสูตร B

- การประเมินสุขลักษณะการอบแห้งกล้าเชื้อ

ในการอบแห้ง ได้ออกแบบถุงผ้าที่สามารถอบฆ่าเชื้อได้ สำหรับใช้ในการบรรจุรำผสมเชื้อเพื่อป้องกันการกระจายเชื้อ และถาดรองเชื้อมีการฆ่าเชื้อโดย alcohol flaming และลมร้อนที่ปล่อยออกจากปลายตู้อบแห้ง ดังรูปด้านล่าง มีการติดตั้ง HAPPA filter และ decontamination ตู้อบเชื้อโดยใช้ formaldehyde fuming พบว่ากระบวนการดังกล่าว กล้าเชื้อที่ผลิตได้มีอัตราการรอด (100%) สูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการ (80%) ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความเสถียรของตู้อบแห้ง และถุงผ้าที่ใช้ช่วยปกป้องเซลล์ในระหว่างการอบแห้งได้ส่วนหนึ่ง



รูปที่ 2 ตู้อบแห้งกล้าเชื้อรำแห้ง

2.1.3 จัดทำแผนการควบคุมคุณภาพและวิธีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบและน้ำ

สำหรับใช้ประจำวัน และร่างแบบเครื่องมือเพื่อเตรียมใช้ประกอบการจัดหาอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับผลิตน้ำ และกล้าเชื้อปลาร้าระดับโรงงานขนาดเล็ก มีการจัดทำแผนผังการดำเนินงานสำหรับเป็น working chart ในหน่วยการผลิต ดังนี้

กระบวนการผลิตกล้าเชื้อแห้งพร้อมใช้

ต้นเชื้อ glycerol stock = : *Bacillus* 6-2 และ *Tetragenococcus* FF2

ดำเนินการในห้องปฏิบัติการ

1. เติมเชื้อ 1% จาก glycerol stock ลงในหลอดอาหารต้นเชื้อ* (NB+3%NaCl) โดยแยกหลอดแต่ละเชื้อ

เขย่า 100 rpm บ่ม 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปรับ OD ที่ 600 nm ด้วยอาหารต้นเชื้อให้ได้ค่า OD = 0.3-0.5 (blank=อาหารต้นเชื้อ)

2. นำเชื้อปริมาตร 1% ที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 1 เติมลงในอาหารสูตร A** โดยแยก flask แต่ละเชื้อ

เขย่า 100 rpm บ่ม 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปรับ OD ที่ 600 nm ด้วยอาหารสูตร A ให้ได้ค่า OD = 0.3-0.5 (blank=อาหารสูตร A)

ดำเนินการในพื้นที่ผลิต

3. นำเชื้อปริมาตร 1% ที่ปรับ OD ได้จากข้อ 2 เติมลงในอาหารสูตร B โดยแยกถังแต่ละเชื้อ

(น้ำในถังผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วจึงเติมอาหารสูตรB*** ตามตาราง)

เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ก่อนปรับ OD คนเชื้อในถังแบบ aseptic technique

ปรับ OD ที่ 600 nm ด้วยอาหารสูตร B ให้ได้ค่า OD = 0.3-0.5 (blank=อาหารสูตร B)

4. นำเชื้อที่ปรับ OD ได้จากข้อ 3 ผสมในถังเดียวกันภายใต้สภาวะป้องกันการปนเปื้อน

เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (อัตราส่วนตามตาราง) ลงในถังและผสมให้เข้ากัน

Aseptic technique

5. นำกล้าเชื้อที่ผสมได้บรรจุใส่ถุงผ้าขาวบางปลอดเชื้อเกลี่ยให้มีความหนาประมาณ 1 ซม. ถุงละประมาณ 1 กก.

นำเข้าตู้อบลมร้อน อบแห้งแบบ 2 ขั้นตอน ที่ 55 องศา 1.5 ชั่วโมง และ 50 องศา 18 ชั่วโมง

ทิ้งกล้าเชื้อให้เย็น (ในตู้อบลมร้อน)

บรรจุกล้าเชื้อในถุงซิปล็อคถุงละ 100g ปิดซิปล็อค 90%และบรรจุต่อในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์

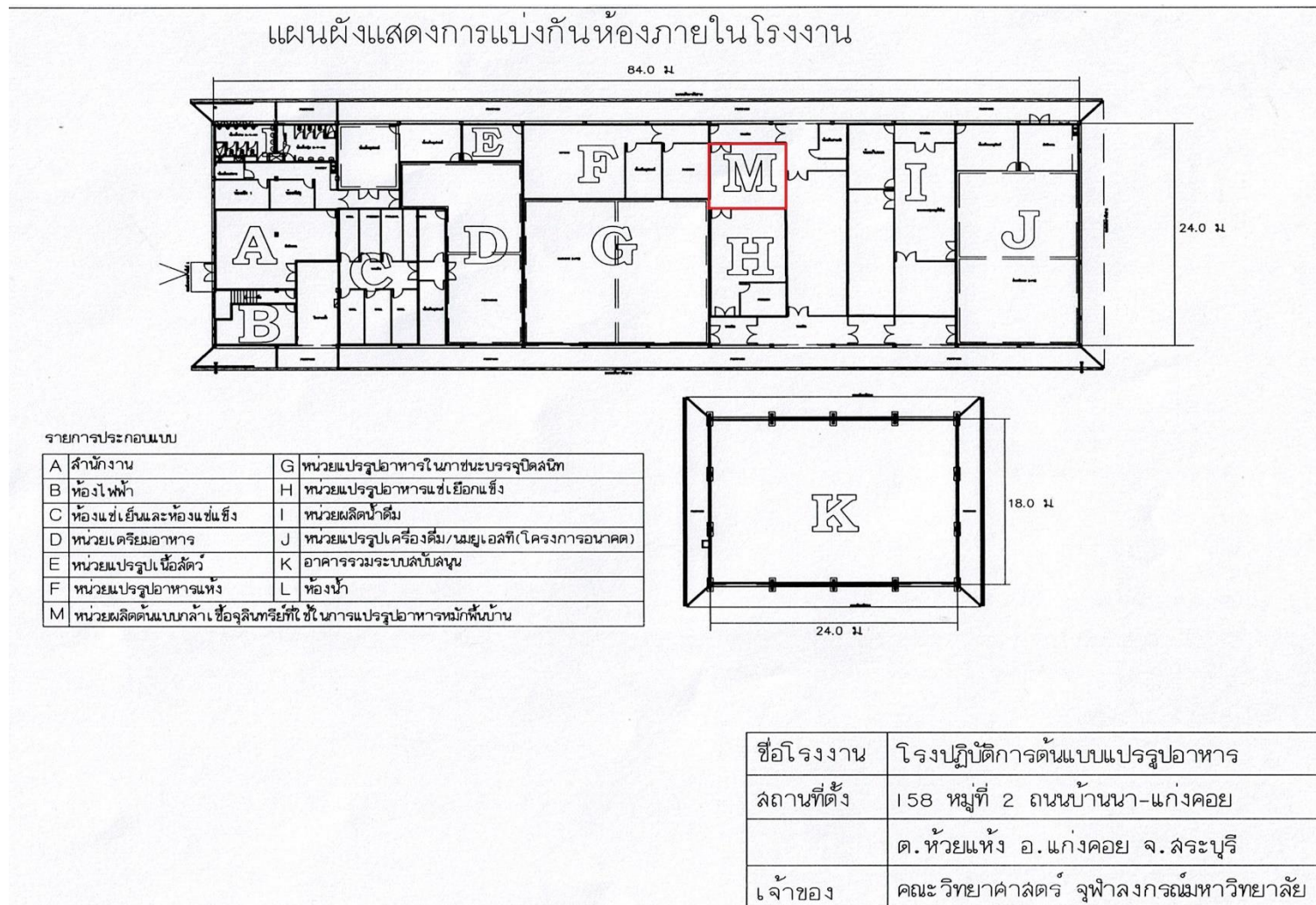
Aseptic technique

ปิดผนึกแบบสุญญากาศเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

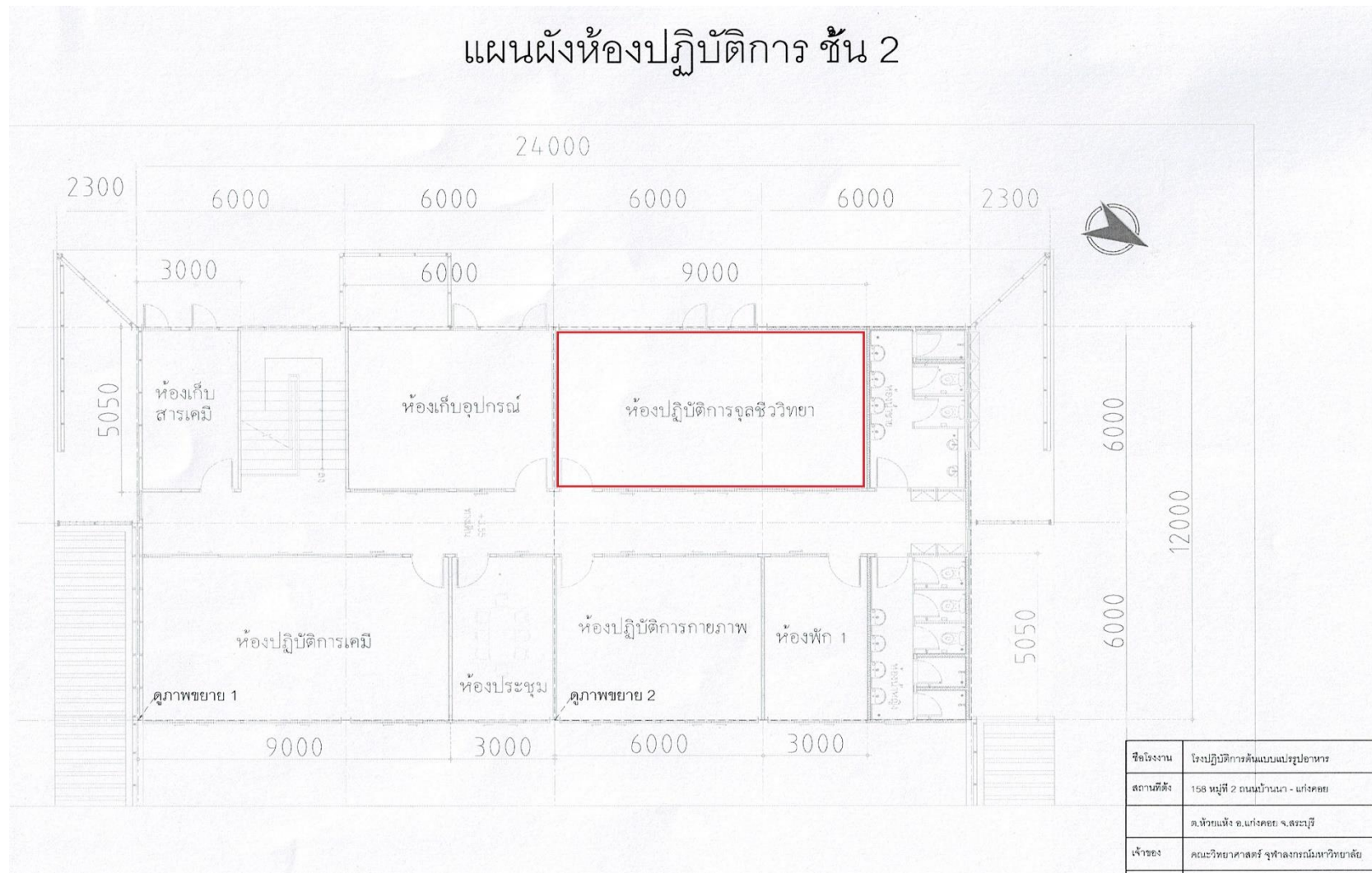
2.2 จัดทำสถานที่ผลิตทดลองต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็กที่เป็นไปตามเกณฑ์หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร

2.2.1 การออกแบบสถานที่ต้นแบบการผลิต

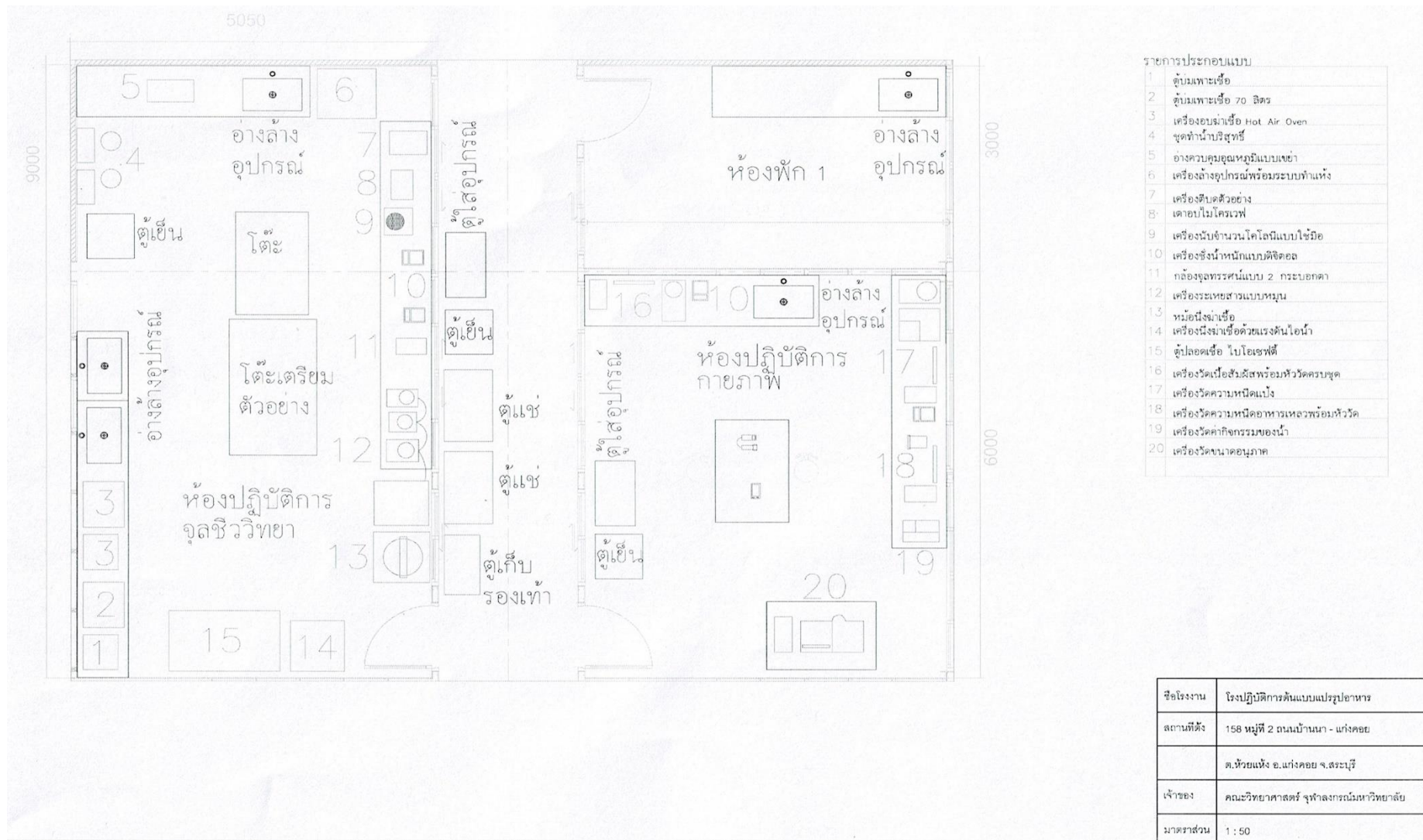
สำหรับการวางแผนห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตกล้าเชื้อร้าแห้งพร้อมใช้ ให้มีความเหมาะสมและถูกต้องตามหลักมาตรฐานห้องปฏิบัติการในระดับอุตสาหกรรมนั้น แสดงในรูปที่ 3 - 6 โดยห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการผลิตต้นเชื้อบริสุทธิ์ และส่วนการขยายและผลิตกล้าเชื้อร้าแห้งพร้อมใช้ จะอยู่ในอาคารโรงปฏิบัติการต้นแบบอาหาร ของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร ถนนแก่งคอย - บ้านนา ตำบลห้วยแห้ง อ.แก่งคอย จ.สระบุรี ที่มีแบบแปลนโครงสร้างโดยรวมดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4 สำหรับแปลนโครงสร้างของหน่วยผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน จัดให้อยู่ในบริเวณชั้น 1 และ 2 ของอาคารโรงงานต้นแบบ ดังแสดงในรูปที่ 5 (ห้องปฏิบัติการ) และรูปที่ 6 (โรงงานต้นแบบ) โดยเส้นทางการผลิตจะเริ่มจากการเพาะเลี้ยงต้นเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการบนชั้น 2 ก่อนจะถูกนำไปขยายต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A และ B ซึ่งทำการผลิตในส่วนหน่วยการผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน ที่ตั้งอยู่บนชั้น 1 ของตัวอาคารเดิม



รูปที่ 3 แพลนแผนผังส่วนผลิตต่างๆ ในอาคารโรงงานต้นแบบ

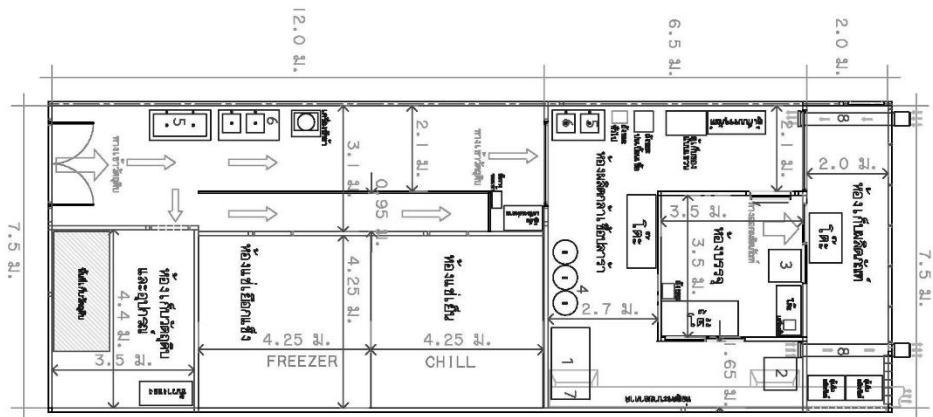


รูปที่ 4 แพลนแผนผังห้องปฏิบัติการต่างๆ ในอาคารโรงงานต้นแบบ ชั้นที่ 2



รูปที่ 5 แผนผังผังห้องปฏิบัติการการผลิตกล้าเชื้อราแห้งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้ในระดับอุตสาหกรรม

หน่วยผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน (M)



รายละเอียดประกอบแบบ

1	Hot Air Oven
2	Auto Clave
3	SEALER
4	ถังพักเชื้อ
5	อ่างล้างมือ
6	อ่างล้างอุปกรณ์
7	ชุดฟัดเจอร์อากาศ
8	ชุดฟัดเจอร์อากาศ
9	ชุดฟัดเจอร์อากาศ

ชื่อโรงงาน	โรงแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน
สถานที่ตั้ง	158 หมู่ที่ 2 ถนนบ้านนา-แก่งคอย
เจ้าของ	ด.ช. หนึ่ง อ. แก่งคอย จ. สระบุรี
เจ้าของ	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ขนาดจำนวน	1 : 100

รูปที่ 6 แผนผังหน่วยการผลิตต้นแบบกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารหมักพื้นบ้าน ที่ใช้ผลิตกล้าเชื้อราแห้งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้ในระดับอุตสาหกรรม และระบบหมุนเวียนอากาศ

การออกแบบโครงสร้างและการจัดวางอุปกรณ์ที่จำเป็นในการผลิตและขยายต้นเชื้อบริสุทธิ์ให้มีความปลอดภัยและเป็นไปตามกฎหมาย ได้ออกแบบให้สอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครองและการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561 (ภาคผนวก 5) กล่าวคือ สถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็ก ถือเป็นสถานปฏิบัติการ ที่เป็นพื้นที่ บริเวณ อาคาร ห้อง หรือสถานที่อื่นใดที่ใช้ดำเนินการเพื่อเพาะ ผสม ปูรง แปรสภาพ เพิ่มปริมาณ สังเคราะห์ แบ่งบรรจุ หรือรวมบรรจุเชื้อโรคหรือพิษจากสัตว์ และให้รวมถึงการมีไว้ในครอบครองที่เกี่ยวข้องด้วย โดยถือเป็นสถานปฏิบัติการระดับ 2 ได้แก่ สถานปฏิบัติการที่ใช้ดำเนินการกับเชื้อโรค กลุ่มที่ 1, เชื้อโรค กลุ่มที่ 2, พิษจากสัตว์กลุ่มที่ 1 สารชีวภาพที่เป็นอนุภาคโปรตีนก่อโรค และเชื้อโรคกลุ่มที่ 3 ที่สามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการระดับ 2 ตามที่กำหนดในประกาศที่ออกตามมาตรา 6 (1) เพื่อให้ครอบคลุมการปฏิบัติงานกับเชื้อโรคได้ถึง 3 กลุ่ม กล่าวคือ

1. เชื้อโรค กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เชื้อโรคที่ไม่มีความเสี่ยง หรือมีความเสี่ยงน้อยหรืออันตรายน้อยต่อบุคคลและชุมชน ได้แก่ เชื้อโรคที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์
2. เชื้อโรค กลุ่มที่ 2 เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงปานกลางหรืออันตรายปานกลางสำหรับบุคคล แต่มีความเสี่ยงน้อยสำหรับชุมชน เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ แต่ไม่เป็นอันตรายร้ายแรงต่อผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการ ชุมชน ปศุสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม โรคที่เกิดมีวิธีป้องกันและรักษาที่ได้ผลและมีความเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อที่จำกัด
3. เชื้อโรค กลุ่มที่ 3 เชื้อโรคที่มีความเสี่ยงสูงหรืออันตรายสูงต่อบุคคล บุคคล แต่มีความเสี่ยงน้อยสำหรับชุมชน เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ที่ปกติจะไม่แพร่จากคนและสัตว์ที่ติดเชื้อมายังคนและสัตว์อื่น โรคที่เกิดมีวิธีป้องกันและรักษาที่ได้ผล

ตามประกาศที่ออกตามมาตรา 6 (3) ของพรบ. ฉบับนี้ ดังนั้น โครงสร้างของหน่วยการผลิตต้นแบบ และห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ จึงมีลักษณะตามรูปที่ 3 และ 4 คือ

1. เป็นพื้นที่ปิดหรือห้องแยกเป็นสัดส่วน ซึ่งสามารถมองเห็นภายในห้องได้ และมีขนาดเพียงพอสำหรับการผลิตและครอบครองกล้าเชื้อ ผ่นัง พื้น และผ้าเปดานที่ถูกออกแบบและก่อสร้างโดยใช้วัสดุที่คงทนและทำความสะอาดได้ง่าย มีแสงสว่างในระดับที่เพียงพอต่อการปฏิบัติงาน
2. มีประตูที่สามารถล็อกได้ และปิดได้เอง
3. มีอุปกรณ์และเครื่องมือที่เพียงพอต่อปริมาณการผลิตกล้าเชื้อได้ถึง 100 กก. ต่อครั้งการผลิต รวมถึงตู้ชีวนิรภัย (biological safety cabinet) ที่มีชุดกรองอากาศประสิทธิภาพสูง (high efficiency particulate air (HEPA) filter) และระบบควบคุมการไหลเวียนอากาศทั้งภายในตู้ และอากาศที่ไหลออกต้องผ่านชุดกรองอากาศประสิทธิภาพสูง
4. มีอ่างล้างมือภายในบริเวณที่ปฏิบัติงาน

5. มีอ่างล้างทำความสะอาดอุปกรณ์หรือวัสดุที่ใช้งานแล้ว มีจุดรวบรวมและจัดเก็บมูลฝอย โดยแยกมูลฝอยติดเชื้อออกจากมูลฝอยประเภทอื่น ๆ โดยมีวิธีการทำลายมูลฝอยติดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรค

6. ติดตั้งเครื่องปรับอากาศโดยมีการหมุนเวียนอากาศและการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม มีการไหลเข้าของอากาศในทิศทางเดียว (directional airflow) และมีท่ออากาศออก (exhaust air duct) ภายนอกอาคาร มีแผ่นกรอง HEPA filter กรองอากาศก่อนเข้าและออกจากพื้นที่การผลิต ดังแสดงในภาพที่ 6 รายการประกอบแบบข้อที่ 8

7. การป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรค มีการใช้วัสดุป้องกัน เช่น ผ้าปิดปาก หมวกคลุมผม และผ้าคลุมรองเท้า แบบใช้ครั้งเดียว และการฆ่าเชื้อเสื้อผ้าของเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงาน

8. มีการควบคุมผู้มีสิทธิเข้าออก โดยการลงชื่อในเอกสารการเข้า-ออกของเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงาน

9. จัดทำป้ายสัญลักษณ์ “อันตรายทางชีวภาพ” ติดที่ประตู โดยมีรูปแบบดังแสดงในภาพผนวก 6

10. กรณีในอนาคตที่มีดำเนินการกับเชื้อโรคตามที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง รายการเชื้อโรคที่ประสงค์ควบคุมตามมาตรา 18 พ.ศ. 2561 (ภาคผนวก 1) อนุโลมให้ดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการระดับ 2 เสริมสมรรถนะ (Biosafety Level 2 enhanced: BSL-2 enhanced) ได้มีการจัดเตรียมโครงสร้างและแนวทางการปฏิบัติงาน คือ มีห้องสำหรับดำเนินการกับเชื้อโรคตั้งข้างต้นแยกเป็นสัดส่วนเฉพาะ และจัดหาอุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคล (ชุดปฏิบัติการ, ถุงมือ ถุงครอบเท้า และหน้ากาก) เพื่อสวมใส่อย่างมิดชิดและเหมาะสม

ด้านระบบความปลอดภัยและระบบคุณภาพในการดำเนินการปฏิบัติงานของหน่วยการผลิตต้นแบบ และห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ ได้จัดให้

1. มีการรักษาความปลอดภัย โดยชุดรักษาความปลอดภัยของศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร ซึ่งจะควบคุมการเข้าถึงโดยบุคคลอื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง

2. มีการใช้อุปกรณ์ปกป้องส่วนบุคคลที่เหมาะสมตามหลักวิชาการ ในขณะที่ปฏิบัติงาน กล่าวคือชุดปฏิบัติการ และถุงมือ ถุงครอบเท้า และหน้ากาก แบบใช้ครั้งเดียว

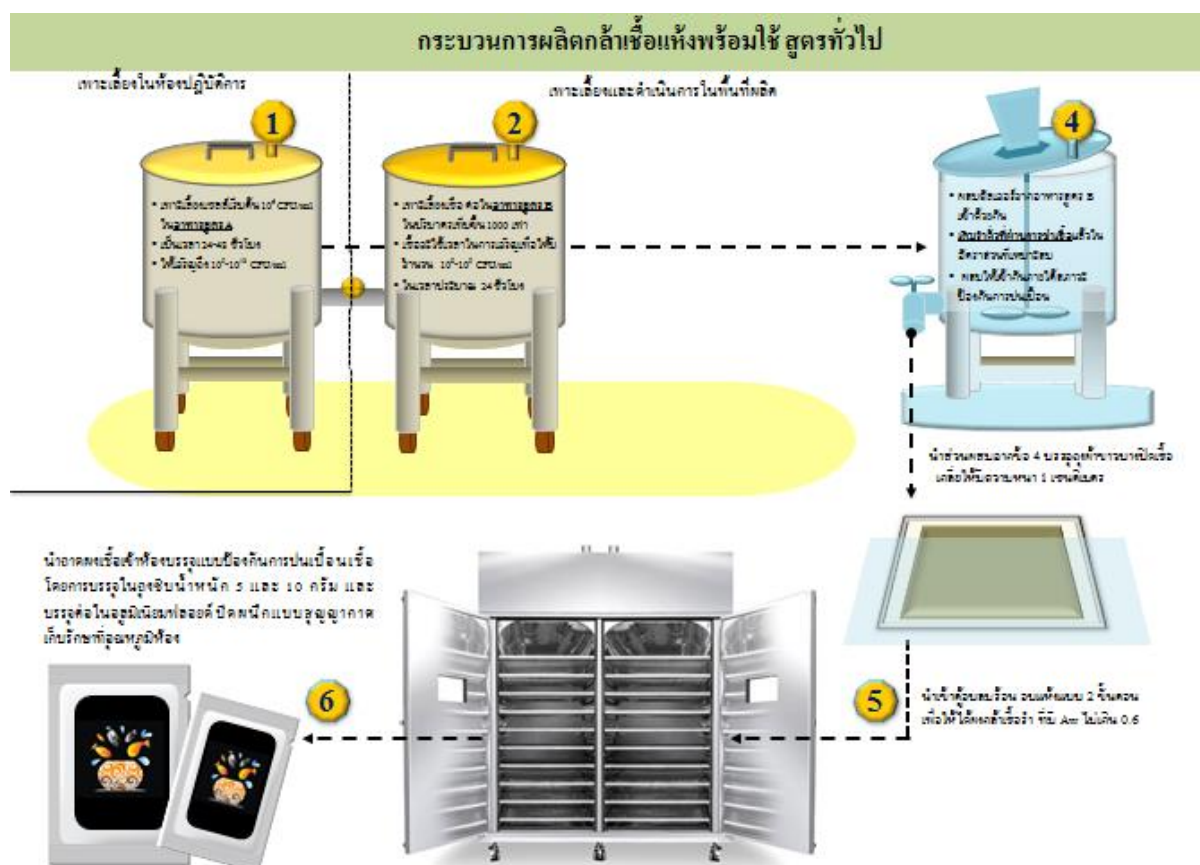
3. มีการรวบรวม จัดเก็บ เคลื่อนย้าย และทำลายมูลฝอยติดเชื้อที่เป็นไปตามกฎหมายว่าด้วยการสาธารณสุข อ้างอิงประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์และเงื่อนไขว่าด้วยการขนและการกำจัดมูลฝอยติดเชื้อในท้องที่เทศบาลตำบลและองค์การบริหารส่วนตำบล พ.ศ. 2558 (ภาคผนวก 7)

4. มีการทำความสะอาดวัสดุ อุปกรณ์ สิ่งปนเปื้อนเชื้อโรคหรือพิษจากสัตว์ที่เหมาะสมตามหลักวิชาการ โดยการใช้แอลกอฮอล์ฉีดพ่นพื้นผิว การใช้รังสียูวี การใช้ความร้อนทั้งแบบเปียกและแบบแห้ง

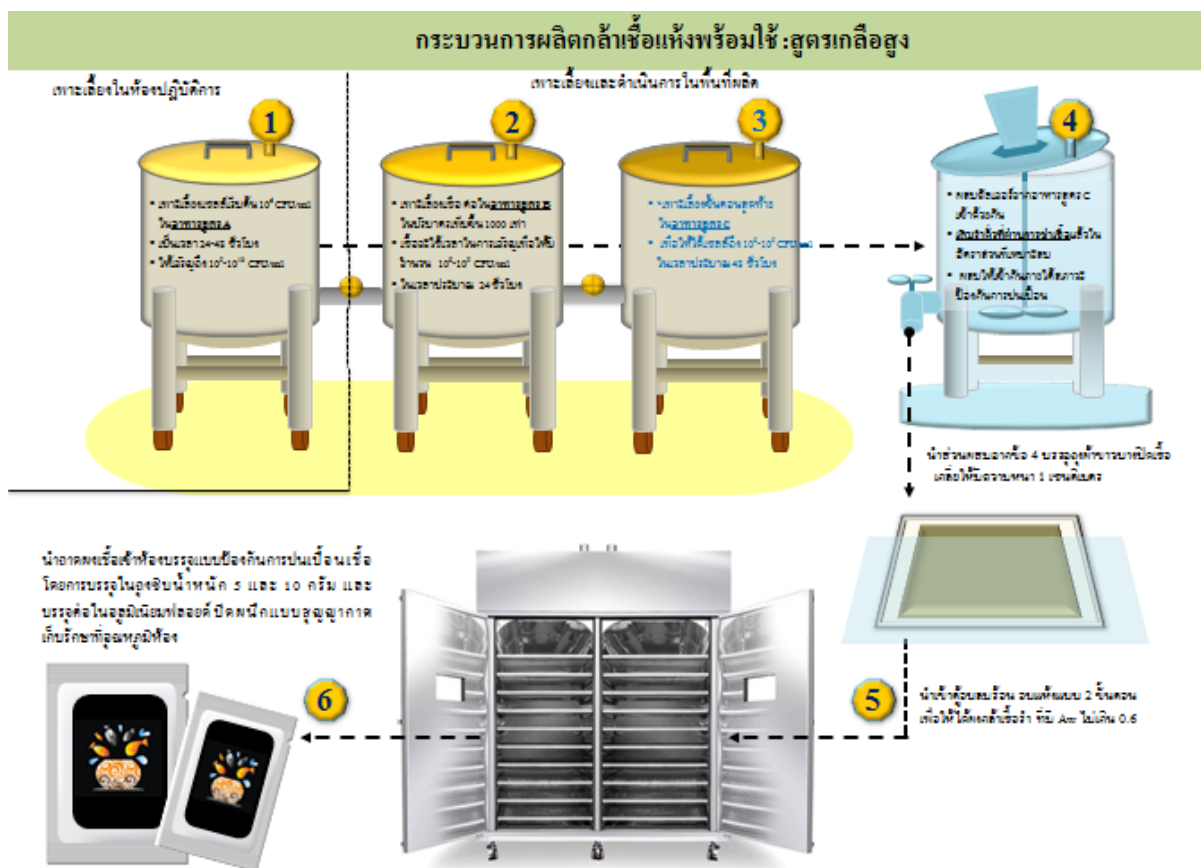
นอกจากนี้ การออกแบบอาคารผลิต ยังเป็นไปตามมาตรฐานการผลิตตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อ้างอิงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 193 พ.ศ. 2543 เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร (ภาคผนวก 9) อีกด้วย

2.2.2 จัดทำข้อมูลกระบวนการผลิต เพื่อขอยื่นพิจารณาขออนุญาตการผลิตตามข้อกำหนด อย. ดังแสดงในแผนภาพด้านล่าง

ผู้วิจัยในโครงการได้จัดทำชุดเอกสาร ขอยื่นพิจารณาขออนุญาตการผลิตตามข้อกำหนด อย. โดยขอผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ ชนิด (*Zygosaccharomyces rouxii*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์อ้างอิง เนื่องจาก อย. ประกาศให้ใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหาร คือ ใช้ในการผลิตชีวี่ โครงการได้เริ่มดำเนินการยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิต ณ สำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสระบุรี เมื่อวันที่ 13 พฤศจิกายน 2562 สถานะและขั้นตอนการยื่นแสดงในเอกสารแนบ 1 ชุดเอกสารประกอบการยื่นขอแสดงในวันนำเสนอปิดโครงการ



หมายเหตุ แยกเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแต่ละชนิดในแต่ละสูตรอาหารแล้วจึงผสมเข้าด้วยกันในถังที่ 4

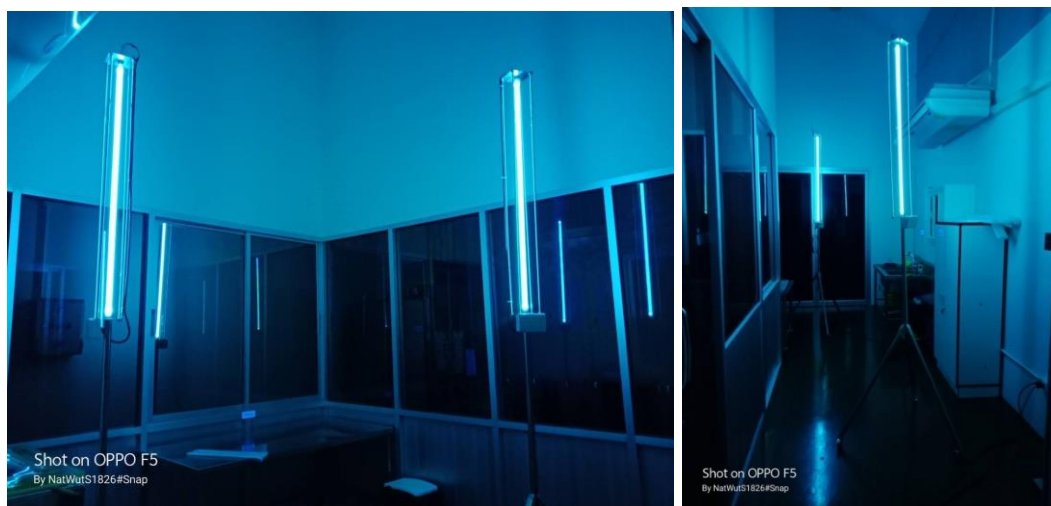


หมายเหตุ แยกเพาะเลี้ยงเชื้อเดี่ยวแต่ละชนิดในแต่ละสูตรอาหารแล้วจึงผสมเข้าด้วยกันในถังที่ 4

และได้จัดเตรียมสถานที่ผลิตที่พร้อมผลิตเสร็จสิ้นแล้ว ดังภาพ



รูปที่ 7 พื้นที่ผลิตกล้วยเชื่อม



รูปที่ 8 การติดตั้งระบบแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อบนพื้นผิวอุปกรณ์และอาหารในห้องผลิต

- พื้นที่ผลิตเปิดครั้งละ 6 หลอด รวมเป็นกำลังไฟฟ้าทั้งหมด 216 วัตต์ หน่วยผลิต มีพื้นที่ทั้งหมด 48.75 ตารางเมตร คิดเป็น 4.43 วัตต์ ต่อ 1 ตาราง เมตร ใช้เวลา 20 นาที
- พื้นที่เตรียมกล้าเชื้อก่อนบรรจุ 36.5 ตารางเมตร ใช้หลอดยูวี 4 หลอด x 36 วัตต์ = 144 วัตต์ คิดเป็น 3.94 วัตต์ ต่อ 1ตารางเมตร
- พื้นที่ห้องบรรจุ 12.25 ตารางเมตร ใช้หลอดยูวี 2 หลอด x36 วัตต์ =72 วัตต์ คิดเป็น 5.76 วัตต์/ต่อ 1ตาราง เมตร
(1กิโลวัต/ชม 1000 วัตต์ = 1 unit)



รูปที่ 9 ห้องปฏิบัติการ

2.2.2.1 การจัดการเอกสารระบบปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้นั้น จำเป็นต้องมีการจัดการเอกสารอย่างเป็นระบบ เพื่อประกันคุณภาพการปฏิบัติงานและความปลอดภัย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ลักษณะของสถานที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และการดำเนินการเกี่ยวกับเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๖๑ ซึ่งทางโรงงานต้นแบบ ได้มีการออกแบบบัญชีรายเดือนการผลิต ครอบครอง และการขายเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (ภาคผนวก 10) เพื่อบันทึกรายการและจำนวนเชื้อโรคหรือพิษจากสัตว์ที่ผลิตหรือมีไว้ในครอบครอง และมีการเตรียมพร้อมเพื่อจัดทำรายงานการประเมินความปลอดภัยของเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตเชื้อโรคหรือพิษจากสัตว์ ตามแบบฟอร์มแบบรายงานสำหรับการประเมินความปลอดภัยของเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตเชื้อโรคหรือพิษจากสัตว์ อ้างอิงประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การประเมินความปลอดภัยของเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2561 (ภาคผนวก 11)

2.2.3 ทดลองผลิต ประเมินคุณภาพการผลิต และคุณภาพผลิตภัณฑ์

ทดลองผลิตกล้าเชื้อที่สถานที่ผลิตต้นแบบ ทั้งสิ้น 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 จำนวน 1 สูตร ระดับการผลิต 25 กิโลกรัม ครั้งที่ 2 ระดับการผลิต 25 กิโลกรัม และ ครั้งที่ 3 ระดับการผลิต 50 กิโลกรัม ครั้งละจำนวน 2 สูตร ติดตามอายุการเก็บกล้าเชื้อพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในกล้าเชื้อทุกสูตรไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเวลา 24 สัปดาห์ และเมื่อนำกล้าเชื้อที่ผลิตไปทดลองหมักปลาร้า 10 กิโลกรัม โดยหมักปลาร้าแบบธรรมชาติ 1 เดือน แล้วเติมกล้าเชื้อ ติดตามผลการหมักและจำนวนจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ เทียบกับตัวอย่างปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ผลการทดลองแสดงในภาคผนวกที่ 12 และ 13 ผลการทดลองพบว่าจากการทดลองใช้กล้าเชื้อจากการผลิต 3 ครั้ง จำนวน 4 สูตร พบว่าเมื่อหมักด้วยกล้าเชื้อต่อไปเวลาหมักประมาณ 7 สัปดาห์ ปลาร้าที่ได้มีกลิ่นหอมยอมรับได้ เมื่อเทียบกับปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ จึงกล่าวได้ว่าการใช้กล้าเชื้อต้นแบบสามารถเร่งหมักปลาร้าให้ได้ผลิตปลาร้าใช้เวลาทั้งสิ้น 11 สัปดาห์ (2 เดือน 3 สัปดาห์)

โครงการวิจัยได้นำกล้าเชื้อต้นแบบจากการผลิตครั้งที่ 1 ที่ได้ (รูปที่ 10 และ 11) ไปทดสอบการหมักในกระบวนการผลิตจริงในโรงงานของผู้ประกอบการจำนวน 5 ราย โดยหมักปลาร้าในโอ่งมังกรขนาด 100 กิโลกรัมที่หมักแบบธรรมชาติมาแล้ว 1 เดือน แล้วจึงเติมกล้าเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 12-13 ประเมินผลการทดสอบโดยใช้แบบสอบถามให้ผู้ประกอบการเปรียบเทียบกับการผลิตแบบดั้งเดิม (โดยผู้ประกอบการที่เข้าร่วมการทดลองใช้ ได้ลงนามในเอกสารรักษาความลับเพื่อป้องกันการเปิดเผยข้อมูล ภาคผนวก 13) ดังรายชื่อต่อไปนี้

1. บริษัท เทพธิดาฟู้ด จังหวัดอุดรธานี
2. บริษัท native food จังหวัดสระบุรี
3. ผู้ประกอบการผลิตปลาร้า (นางชลนิกาล สุภาวรรณ) จังหวัดตราด

4. ผู้ประกอบการผลิตปลาร้า (นางกชกร นวลสุวรรณ) จังหวัดสระแก้ว

5. ผู้ประกอบการปลาร้า น.ส.วีรณัฐ คำแคล้ว จังหวัดสกลนคร

ผลการทดสอบ ข้อคิดเห็นและความพึงพอใจจากผู้ประกอบการ (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ 14 บริษัท native food ระบุว่า ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อ หมักเป็นเวลา 2.5 เดือน มีคุณภาพเทียบเท่ากับ ปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ อายุ 8 เดือน โดยมีการพัฒนากลิ่นที่ดีกว่าเดิม ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อมาก และสนใจนำไปใช้ในกระบวนการผลิตปลาร้าของโรงงาน และบริษัทเทพธิดาฟู้ด ระบุว่า ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อเป็นปลาร้าที่มีคุณภาพเทียบเท่าปลาร้าที่ทางบริษัทต้องการ เมื่อหมักเป็นเวลา 2 เดือน จากการหมักปกติ 6 เดือน ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อมาก และสนใจนำไปใช้ในกระบวนการผลิตปลาร้าของโรงงาน ภาพตัวอย่างการทดสอบกล้าเชื้อดังแสดงในรูปที่ 12 และ 13 ผู้ประกอบการปลาร้า นางกชกร นวลสุวรรณ จังหวัดสระแก้ว ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อ หมักเป็นเวลา 2 เดือน มีคุณภาพเทียบเท่ากับปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ อายุ 6 เดือน ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อมาก และสนใจนำไปใช้ในกระบวนการผลิตปลาร้าหากขยายโรงงาน ผู้ประกอบการปลาร้า น.ส.วีรณัฐ คำแคล้ว ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อ หมักเป็นเวลา 6 เดือน มีคุณภาพเทียบเท่ากับ ปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ อายุ 12 เดือน เนื่องจากเป็นปลาร้าที่ผลิตแบบเหลือสูง ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อมากและมีความสนใจที่จะใช้ในการผลิตปลาร้า บริษัทผู้ผลิตปลาร้า (นางชลนิภา สุกาวรรณ) จังหวัดตราด ผลของการใช้กล้าเชื้อปลาร้าไม่มีความชัดเจน เนื่องจากกระบวนการผลิตแตกต่างจากการผลิตปลาร้าทั่วไป กล่าวคือผู้ประกอบการจะนำปลาวัดฤดูดิบเติมลงในปลาร้าที่หมักและเติมเกลือใหม่ทุกครั้งที่ได้รับปลาวัดฤดูดิบเข้ามาในโรงงาน ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ต่อคณะผู้วิจัยในการที่จะใช้เป็นข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการใช้กล้าเชื้อปลาร้าในอนาคต



รูปที่ 10 บรรจุภัณฑ์ชั้นที่ 1 (A) และ 2 (B) ที่ใช้บรรจุกล้าเชื้อร้าแห้งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้

สำหรับเร่งการหมักปลาร้า สูตรหมักแบบทั่วไป



กล้าเชื้อปลาร้าชีวภาพ

ทดลองผลิตโดยศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรงงานต้นแบบแปรรูปอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

จัดทำภายใต้โครงการวิจัย
"การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าเพื่อใช้จากระบบปล่อยปุ๋ยชีวภาพในกระบวนการผลิตน้ำพริกขนาดเล็ก"

ใช้ในการทดสอบคุณภาพการหมักปลาร้าเข้มข้น -ห้ามจำหน่าย-

กล้าเชื้อปลาร้าชีวภาพ สูตรหมักแบบทั่วไป

สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเร่งกระบวนการหมักปลาร้าที่หมักแบบทั่วไป

1. นำปลามาตัดหัว ขอดเกล็ด ครีบก้น แล้วล้างน้ำให้สะอาด
2. คลุกเคล้ากับเกลือ
3. หมักทิ้งไว้ 0-5 วัน
4. เด็ดรำข้าว
5. หมักต่อประมาณ 1 - 2 เดือน โดยในระหว่างนี้จะมีน้ำล้น อาจเติมน้ำเกลือเพื่อป้องกันไม่ให้ปลาสัมผัสอากาศหากน้ำล้นออกมากเกินไป
6. เด็ดกล้าเชื้อ อัตราส่วน กล้าเชื้อ 100 กรัม เติมน้ำปลาร้า 100 กิโลกรัม
7. หมักไว้ในภาชนะบรรจุที่มีฝาปิดสนิทต่ออีกประมาณ 1 - 2 เดือน จะได้เป็นปลาร้าที่มีลักษณะตามที่ต้องการ

ใช้ในการทดสอบคุณภาพการหมักปลาร้าเข้มข้น "ห้ามจำหน่าย"

ข้อป่งใช้: เมื่อมีของเหลวใช้ทันที

น้ำหนักสุทธิ 100 กรัม

ผลิต

หมดอายุ

รูปที่ 11 ฉลากผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อราแห่งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้



รูปที่ 12 การทดสอบหมักปลาร้าเติมกล้าเชื้อราแห่งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้ บริษัท native food



รูปที่ 13 การทดสอบหมักปลาร้าเดิมกล้าเชื้อราแห้งเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้ บริษัท เทพธิดาฟู้ด

2.2.2.4 การประเมินความสนใจของผู้ผลิตปลาร้าทั่วไปกับเทคโนโลยีกล้าเชื้อปลาร้า

ผู้วิจัยในโครงการได้ร่วมกับนักวิจัยจากภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จัดโครงการ “การอบรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้หัวเชื้อหมักปลาร้าเพื่อย่นระยะเวลาในการหมัก” ณ จังหวัดสกลนคร โดยผู้เข้าอบรมคือผู้ประกอบการปลาร้าในเขตพื้นที่ภาคอีสาน จำนวน 29 คน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแนะนำให้ผู้ประกอบการรู้จักกล้าเชื้อ ประโยชน์ของกล้าเชื้อปลาร้า และวิธีการใช้ โดยใช้กล้าเชื้อต้นแบบที่ผลิตจากโรงงานต้นแบบของโครงการวิจัยเพื่อประกอบการสาธิต จากโครงการดังกล่าวได้ข้อสรุปดังต่อไปนี้

1. ความสนใจที่มีต่อกล้าเชื้อปลาร้า

ผู้เข้าอบรมจำนวน 29 คน พบว่า ร้อยละ 100 มีความสนใจในการนำหัวเชื้อไปใช้ในการผลิตปลาร้า และสนใจซื้อหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตปลาร้า เนื่องจาก

- สามารถย่นระยะเวลาในการหมัก และประหยัดเวลาในการผลิตได้
- สามารถผลิตปลาร้าได้ทันตามเวลาที่ลูกค้าต้องการ
- เป็นนวัตกรรมใหม่ที่ช่วยตอบสนองความต้องการของผู้ประกอบการ
- เป็นนวัตกรรมใหม่สามารถใช้เพื่อพัฒนาและต่อยอดอาชีพให้กับผู้ประกอบการ
- สามารถใช้ในการผลิตปลาร้าเพื่อพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับปลาร้าใหม่ๆได้

2. ราคาที่เหมาะสมสำหรับการจำหน่าย

เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดขนาดบรรจุที่แน่นอน จึงได้สอบถามเป็นต้นทุนต่อกิโลกรัมการผลิตโดยเฉลี่ยผู้เข้าอบรมแสดงความคิดเห็นว่าหากต้องเพิ่มต้นทุนการผลิตเพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการซื้อหัวเชื้อสามารถยอมรับได้ที่ราคา 2 - 5 บาท ต่อกิโลกรัม ดังนั้นหากทำการผลิตกล้าเชื้อเพื่อจำหน่ายสำหรับการหมักปลาร้า 100 กิโลกรัม ราคาหัวเชื้อจะอยู่ที่ 200 - 500 บาท ต่อซอง

3. ความพอใจต่อปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ

ผู้จัดอบรมได้เตรียมตัวอย่างปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อในเวลาประมาณ 7 สัปดาห์ จากการสอบถามเบื้องต้น ผู้ผลิตพอใจกับปลาร้าที่ได้ เนื่องจากมีกลิ่นความและกลิ่นเปรี้ยวลดลง



รูปที่ 14 ภาพการจัดโครงการ “การอบรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้หัวเชื้อหมักปลาร้าเพื่อย่นระยะเวลาในการหมัก” ณ จังหวัดสกลนคร

2.3 ศึกษาและวิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อและผลผลิตปลาร้าจากกล้าเชื้อ เพื่อประกอบการพิจารณาในการขออนุญาตผลิตตามข้อกำหนดของ อย.

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้าจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กล้าเชื้อออโตโคโนส ซึ่งพัฒนามาจากจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้จากระบบการหมักแต่ละรูปแบบเพื่อให้สร้างกลิ่นรสที่เป็นอัตลักษณ์ และกล้าเชื้อเร่งสีโดยพัฒนาจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากปลาร้าจากแหล่งต่างๆ สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกที่ได้จากงานวิจัยปีที่ 1 ดังสรุปในตารางด้านล่าง

รูปแบบการผลิต	กล้าเชื้อออโตโคโนส* (autochthonous starter)	กล้าเชื้อเร่งกลิ่นและสี* Common starters
SSF แบบทั่วไป	<i>Bacillus</i> UD6-2	<i>Virgibacillus</i> FF-2 <i>Salinicoccus</i> UD82-1
SSF แบบเกลือสูง	<i>Bacillus</i> NC58-2	
SMF	<i>Bacillus</i> SN78-1	

*ปกปิดสปีชีส์ เพื่อปกป้องข้อมูลในการยื่นขอสิทธิบัตร

โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ รุ่นที่ 1 ที่เก็บรักษาในรูปแบบของผงแห้งแบบพรีซดราย ใน ampule เก็บที่อุณหภูมิ -40 °C กระตุ้นเชื้อโดยการเพาะเชื้อในอาหารอุดมและเก็บรักษาในกลีเซอรอลที่เติมบีทพลาสติก

ชนิดละอย่างน้อย 10 หลอด เพื่อควบคุมเป็นต้นเชื้อของจุลินทรีย์เพื่อใช้งานตลอดการวิจัย แผนการเก็บรักษา ต้นเชื้อสำหรับการผลิตเป็นเวลา 20 ปี ดังแสดงในภาคผนวก 15

2.3.1 ประเมินคุณภาพของกล้าเชื้อจากกระบวนการผลิต

ใช้กล้าเชื้อฟรีซดรายที่ได้จากปี ที่ 1 มาผลิต เป็นกล้าเชื้อปลาร้า โดยทดลองผลิตที่โรงงานต้นแบบ ครั้งละ 25 กิโลกรัม ครั้งละ 1 สูตร จำนวน 3 ครั้ง ได้กล้าเชื้อสูตรที่ 1 สูตร 2 และ สูตร 3 และประเมิน คุณภาพด้านสารแปลกปน ตามข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture) ได้แก่ จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์และรา โคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ คลอสตริเดียม (*Clostridium* spp) ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) สแตปไฟโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) สารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ซึ่งได้ส่งตัวอย่าง ทดสอบไปยังกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลการทดสอบดังแสดงในภาคผนวก 16 ผลการทดลองพบว่า คุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture) ของกล้าเชื้อทั้ง 3 สูตรเป็นไปตามมาตรฐานทุกข้อที่กำหนด รวมถึงไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองที่ทดสอบ

2.3.2 ประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์ที่พัฒนาใช้สำหรับผลิตกล้าเชื้อ

ตามรายการเอกสารที่ใช้ประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร กำหนดโดย ออย. อ้างอิงจากข้อมูลของกลุ่มกำหนดมาตรฐาน สำนักงานอาหาร ที่โครงการได้ประสานงานไปยัง สำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยหัวหน้าโครงการ ได้แก่ รศ.ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และผู้ร่วมโครงการ นางเพ็ญพิมล จาตุรงค์ศรี ได้เดินทางไปยังสำนักงานอาหาร เมื่อวันที่ 13 มีนาคม 2562 และ ทางสำนักงานอาหารได้ให้แนวทางปฏิบัติ โดยจัดให้กล้าเชื้อปลาร้าอยู่ในกลุ่มวัตถุเจือปนอาหาร จึงได้ดำเนินการ ดังต่อไปนี้

- การรวบรวมเอกสารข้อมูลด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์
- จัดทำกระบวนการผลิตกล้าเชื้อแต่ละขั้นตอนเพื่อใช้ประกอบการยื่นขอประเมินความเสี่ยง

ตามข้อกำหนดของ ออย. ได้แก่

1. คุณลักษณะเฉพาะ คุณสมบัติ และแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ ผลการทดสอบแสดง ในเอกสารที่ใช้ยื่นการขออนุญาตใช้จุลินทรีย์ในอาหาร ตามข้อกำหนดของ ออย.

2. กระบวนการผลิตเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (starter culture)

2.1 สูตรส่วนประกอบต้นเชื้อบริสุทธิ์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

2.2 กระบวนการผลิตต้นเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ (Flow chart) /อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

2.3 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นเชื้อบริสุทธิ์ /อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

2.4 ระบุแหล่งที่มาของเชื้อจุลินทรีย์ และหากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปรพันธุกรรม (GMO) จะต้องมีหลักฐานในเรื่องของการประเมินความปลอดภัย โดยจะต้องขอความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเป็นรายกรณีไป

3. กระบวนการในการผลิตอาหารที่จะนำต้นเชื้อบริสุทธิ์ไปใช้ และ flow chart

4. เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหาร

4.1 ประวัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหาร

4.2 การตรวจสอบการสร้าง cytotoxicity test (ไม่ได้ระบุวิธีการทดสอบ)

4.3 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

4.4 การทดสอบการสร้างสารประกอบเอมีน (biogenic amine)

4.5 การทดสอบระดับสายพันธุ์ (strain) เฉพาะเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มสแตปิโลค็อกคัส (Staphylococcus) เอนเทอโรค็อกคัส (Enterococcus) และบาซิลลัส (Bacillus) ดังนี้

- ไม่มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ (absence of acquired antibiotic resistance genes)

4.6 ไม่มีกิจกรรมที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ (absence of toxigenic activity) โดยการทดสอบความเป็นพิษด้วยเซลล์เยื่อบุ (cytotoxicity test using epithelial cell lines) อย่างน้อยควรมีการทดสอบด้วยเซลล์เยื่อบุ ดังนี้

(1) เซลล์เยื่อบุไต เช่น vero cell line หรือ BHK21 เป็นต้น และ

(2) เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร เช่น Caco 2 cell line, HT29 cell line เป็นต้น

5. ข้อมูลด้านประสิทธิภาพและความจำเป็นทางเทคโนโลยีทางการผลิต

5.1 ข้อมูลประสิทธิภาพและความจำเป็นทางด้านเทคโนโลยีการผลิตในอาหารที่เสนอขอใช้

5.2 ข้อมูลกฎหมายหรือกฎระเบียบของประเทศที่มีระบบประเมินความปลอดภัยที่น่าเชื่อถือ

การวิเคราะห์ตามรายการทั้งหมด ได้ดำเนินการครบทุกรายการร้อยละ 100 และได้ดำเนินการยื่นขออนุญาตผลิตภัณฑ์ต่อสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เมื่อวันที่ 18 กรกฎาคม 2562 (ขั้นตอนการดำเนินการโดยสรุปและเอกสารประกอบการยื่นขออนุญาตดังแสดงในเอกสารแนบ 2 โดยเอกสารมีจำนวนหน้ามากกว่า 600 หน้า จึงขอแสดงเอกสารแนบ 2 ในวันนำเสนอปิดโครงการ) ผลการทดสอบทุกรายการดังแสดงในเอกสารประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหารซึ่งจะแสดงในวันที่รายงานปิดโครงการ ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยของโครงการได้เพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล โดยการจัดทำการวิเคราะห์ whole genome

sequencing analysis (WGS) เพื่อประเมินการมีอยู่ของ virulence genes ที่ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการก่อโรค และ การมียืนต้านสารปฏิชีวนะ ผลการทดสอบพบว่า จุลินทรีย์ 1 สายพันธุ์ คือ 58-1 ที่มียืนต้าน tetracyclin, macrolide และ aminoglycoside ดังแสดงในรูปด้านล่าง ทางโครงการจึงยกเลิกการขออนุญาตการใช้กล้า เชื้อนี้ จึงไม่ปรากฏในเอกสาร ส่วนจุลินทรีย์ที่เหลือทั้งหมด มีความปลอดภัยในทุกด้าน

Resistance gene	Hits
rifampicin	Not found
oxazolidinone	Not found
nitroimidazole	Not found
fosfomycin	Not found
macrolide	mph(K)
tetracycline	Tet(L) Tetracycline resistance
glycopeptide	Not found
phenicol	Not found
trimethoprim	Not found
quinolone	Not found
beta-lactam	Not found
colistin	Not found
fusidic acid	Not found
sulphonamide	Not found
aminoglycoside	aadK-Aminoglycoside resistance

ผลการทดสอบ WGS ของ *Bacillus* UD58-1 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม Resfinder

นอกจากนี้จากผลการทดสอบความสามารถในการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ UD6-2 และ SN78-1 พบวงใสล้อมรอบโคโลนีที่ตรงกับลักษณะของ beta hemolysis (รูปที่ 1) ซึ่งมีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงกิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดงบนจานเพาะเชื้อที่เกิดจากผลของสารที่เซลล์แบคทีเรียสร้างขึ้น ไม่ใช่เกิดจากความสามารถในการก่อโรคหรือเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (Boucabeille, Mengin-Lecreulx, Henckes, Simonet, & van Heijenoort, 1997; Huang et al., 2009) หรือ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสชนิด extracellular proteases (Seo et al., 2018) รวมถึงใช้ผลการตรวจสอบลำดับจีโนมสมบูรณ์ที่ได้ทำเพิ่มเติมอ้างอิง อย่างไรก็ตามเพื่อเตรียมข้อมูลสำหรับการยืนยันการอธิบายดังกล่าวในกรณีมีคำถามจากผู้ประเมินของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่า ความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน และ/หรือ extracellular proteases เป็นผลให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง แล้วปรากฏเป็น beta hemolysis หรือไม่ โดยการทำ single gene deletion กับยืนเป้าหมาย (target gene) ที่ควบคุมการสังเคราะห์ แบคเทอริโอซิน และ/หรือ extracellular proteases ก่อนที่จะนำ mutant ไปทำการทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดงต่อไป รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก 17

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ประเมินแนวทางการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตกล้าเชื้อในระดับโรงงานต้นแบบ โดยการประเมินปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพการผลิต ดังแสดงในภาคผนวก 18 เรื่อง ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพในการขยายต้นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

ทางผู้วิจัยได้คำนวณต้นทุนของกล้าเชื้อที่ผลิตในโรงงานต้นแบบ โคนเฉลี่ยราคาต่อซองอยู่ที่ 7.15 บาท ดังแสดงในภาคผนวกที่ 19

ตาราง ก สรุปความก้าวหน้าการขอประเมินเอกสารทางวิชาการเกี่ยวกับการยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิต ณ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสระบุรี

ลำดับที่	รายการ	วันที่นำส่ง	ช่องทางการนำส่ง
1	- ยื่นเอกสารรายละเอียดการผลิตกล้าเชื้อพร้อมผังรายละเอียดของทุกหน่วยของโรงงาน - ชำระค่าตรวจประเมินสถานที่ พร้อมทั้งยื่นแบบขอตรวจประเมินสถานที่ผลิตและเก็บอาหาร และแบบตรวจสอบคำขอและบันทึกข้อบกพร่องคำขอตรวจประเมินสถานที่ผลิตและเก็บอาหารที่ลงนามผู้ดำเนินการ	13 พ.ย. 2562	นำส่งกับทางเจ้าหน้าที่โดยตรง
2	- ยื่นรายละเอียดสูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงต้นเชื้อ ณ สาธารณสุข จังหวัดสระบุรี - สอบถามเรื่อง การพิจารณาการขอเพิ่มหน่วยผลิต	3 ธ.ค. 2562	นำส่งกับทางเจ้าหน้าที่โดยตรง
3	- สอบถามเรื่องการพิจารณาผังการเพิ่มหน่วยผลิต - นัดหมายทาง สสจ.เพื่อมารับฟังการอธิบายขั้นตอนการผลิต การควบคุมอากาศ และการจัดการภายในห้องผลิตกล้าเชื้อ ในวันที่ 3 มกราคม 2563	27 ธ.ค. 2562	-
4	- เข้าพบเจ้าหน้าที่ สาธารณสุข จังหวัดสระบุรี เภสัชกรชำนาญการ เรื่องการทำเส้นทางการเข้าออกของทุกหน่วยผลิต	3 ม.ค. 2563	เตรียมเอกสารตามข้อเสนอแนะเรียบร้อยแล้ว เตรียมยื่นเอกสารไปยัง สสจ อีกครั้ง
5	- ดำเนินการติดตั้งระบบระบายหมุนเวียนอากาศโดยการติดตั้ง HEPA filter ก่อนอากาศออกสู่ภายนอกอาคาร	23 ม.ค.-15 ก.พ. 63	-

ตาราง ข สรุปความก้าวหน้าการขอประเมินเอกสารทางวิชาการเกี่ยวกับการใช้วัตถุเจือปนอาหารที่ยังไม่มีการกำหนดเงื่อนไขการใช้ ต่อกลุ่มกำหนดมาตรฐาน สำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข (ลำดับคำขอ FOOD-3372-2526-7)

ลำดับที่	รายการ	วันที้นำส่ง	ช่องทางการนำส่ง
1	เอกสารประกอบการพิจารณาอนุญาตการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร	18 กรกฎาคม 2562	นำส่งกับทางเจ้าหน้าที่โดยตรง
2	ข้อชี้แจงเพิ่มเติม	15 สิงหาคม 2562	ทางอีเมลล์
3	เอกสารเพิ่มเติม รายงานการตรวจวิเคราะห์กล้าเชื้อปลาร้าทางด้านจุลินทรีย์ก่อโรค	26 กันยายน 2562	ทางอีเมลล์
4	เอกสารเพิ่มเติม รายงานการตรวจวิเคราะห์หาพิษเฉียบพลัน	11 พฤศจิกายน 2562	ทางอีเมลล์
5	ยื่นเอกสารรายละเอียดการผลิตกล้าเชื้อ พร้อมผังรายละเอียดของทุกหน่วยของโรงงาน และจ่ายค่าตรวจประเมินสถานที่ พร้อมทั้งยื่นแบบขอตรวจประเมินสถานที่ผลิตและเก็บอาหาร และแบบตรวจสอบคำขอและบันทึกข้อบกพร่องคำขอตรวจประเมินสถานที่ผลิตและเก็บอาหารที่ลงนามผู้ดำเนินการ	13 พฤศจิกายน 2562	นำส่งกับทางเจ้าหน้าที่โดยตรง

สัญญาเลขที่ RDG62T0114

การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากระดับห้องปฏิบัติการสู่กระบวนการผลิตนำร่องขนาดเล็ก
สรุป รายงานฉบับสมบูรณ์

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลผลิต (Output) ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ดำเนินการได้จริง

ผลผลิต (Output)		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่านระบุสาเหตุและ การแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	
1. กระบวนการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ระดับการผลิตขนาดเล็ก จำนวน 1 กระบวนการ	100%	-
2. ผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อต้นแบบ 3 ชนิด	100%	มีการเปลี่ยนแปลงสูตรการผลิตตามรายการที่ได้ออกแบบในหัวข้อ 2.1.3 จำนวนทั้งหมด 6 สูตร เพื่อให้สอดคล้องกับการยื่นขอ อนุญาต อย.
3. สถานที่ผลิตต้นแบบสำหรับการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ขนาดเล็ก 1 แห่ง	100%	เนื่องจากการจัดทำสถานที่แล้วเสร็จภายในช่วงเวลาการดำเนินการโครงการวิจัย จึงได้นำเอกสารที่เกี่ยวข้อง ยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิตต่อ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสระบุรี ลำดับการยื่นเอกสารดังแสดงในตาราง ก
4. ข้อมูลความปลอดภัย อย่างน้อย 5 ชุดข้อมูล	100%	เนื่องจากการวิเคราะห์ความปลอดภัยได้ดำเนินการแล้วเสร็จภายในช่วงเวลาการดำเนินการโครงการวิจัย จึงได้นำเอกสารที่เกี่ยวข้อง ยื่นขออนุญาตสถานที่ผลิตต่อสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสระบุรี ลำดับการยื่นเอกสารดังแสดงในตาราง ข
5. การใช้ประโยชน์จากงานวิจัยในระดับอุตสาหกรรม อย่างน้อย 1 อุตสาหกรรม	100%	-
6. ถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน อย่างน้อย 1 ราย	100%	มีผู้แสดงความสนใจรับถ่ายทอดเทคโนโลยีอย่างน้อย 1 รายคือ คือ บริษัท เดอะโฮม ฟู้ดจำกัด (เอกสารแนบ ในภาคผนวก 4.2)
7. ผู้ประกอบการนำกระบวนการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้เป็นต้นแบบในการผลิต อย่างน้อย 1 ราย	100%	-
8. ผู้ประกอบปลาร้านำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้ในการผลิตปลาร้า	100%	

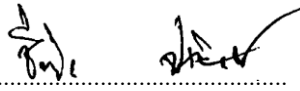
ลงนาม.....

(รศ.ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)

วันที่.....

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกสว.

ไม่มีข้อคิดเห็นเพิ่มเติม

ลงนาม.....

(รศ.ดร.ชินจิต ประกิจชัยวัฒนา)

วันที่.....

เอกสารอ้างอิง

- Beddows, C., Ardeshir, A. J. I. J. o. F. S., & Technology. (1979). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture I. The use of added enzymes. 14(6), 603-612.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1), 11-22. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Gildberg, A., Espejo-Hermes, J., Magno-Orejana, F. J. J. o. t. S. o. F., & Agriculture. (1984). Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. 35(12), 1363-1369.
- Sánchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., & Ventosa, A. J. J. o. a. m. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. 94(2), 295-300.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., Komagata, K. J. I. J. o. S., & Microbiology, E. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. 50(4), 1479-1485.
- นนทา เป็งเนตร . (2550). การพัฒนาน้ำปลาร้าปรุงรสบรรจุภาชนะปิดสนิท. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.